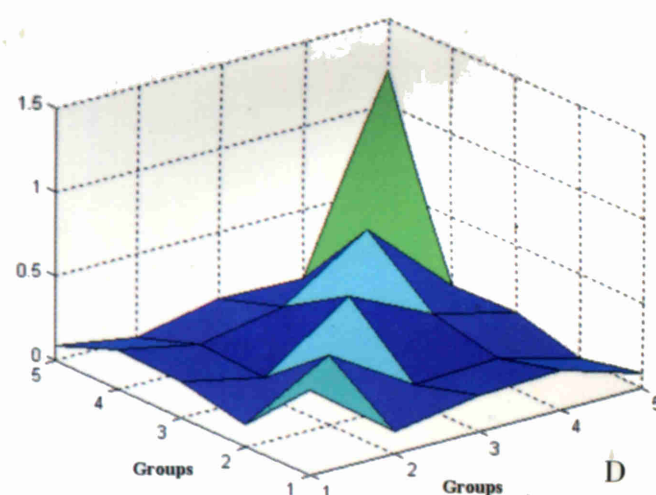
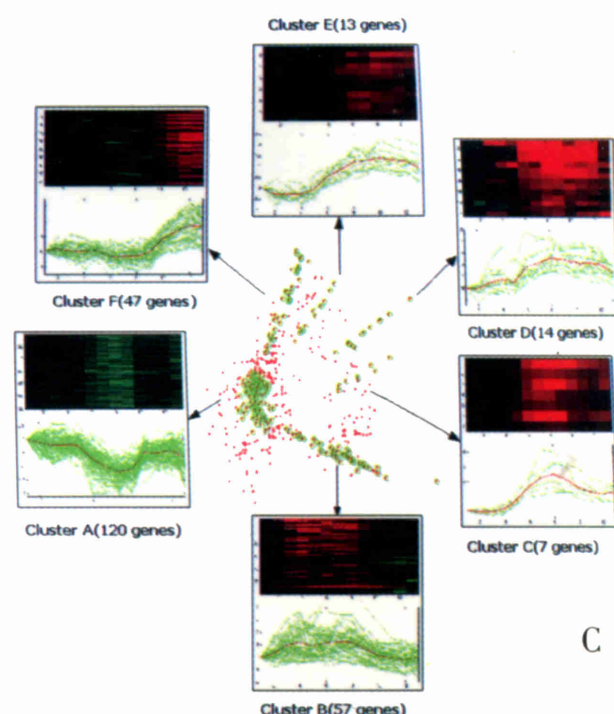
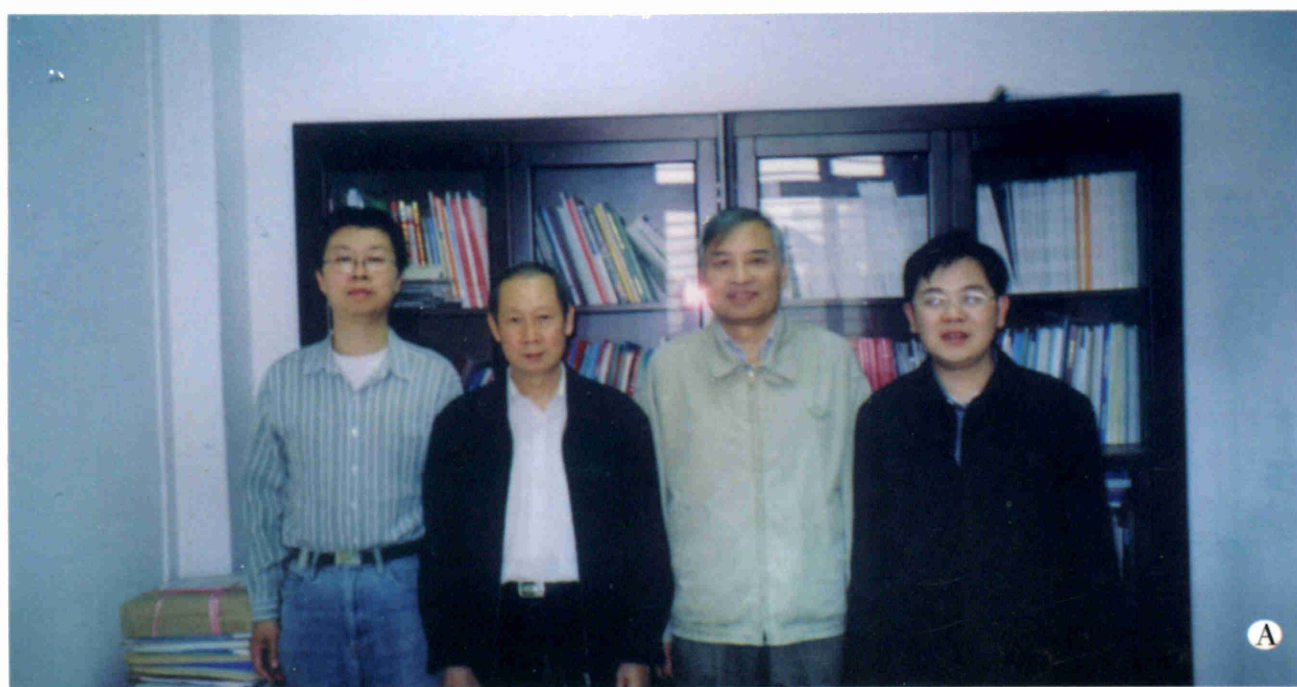


# 世界华人消化杂志®

**WORLD CHINESE  
JOURNAL OF DIGESTOLOGY**

**Shijie Huaren Xiaohua Zazhi**

2003 年 10 月 15 日 第 11 卷 第 10 期 (Volume 11 Number 10)



**10/2003**

ISSN 1009-3079



名誉总编辑  
潘伯荣  
总编辑  
马连生

World Journal of Gastroenterology® 被 SCI®-E, Research Alert®, Current Contents®/Clinical Medicine, Journal Citation Reports® Index Medicus, MEDLINE, Chemical Abstracts, EMBASE/Excerpta Medica 收录. 2002 年 JCR® 报告 WJG 影响因子 2.532. 世界华人消化杂志® 被 Chemical Abstracts, EMBASE/Excerpta Medica 收录. 2001 年中国科技期刊引证报告: 世界华人消化杂志® 影响因子 3.733, WJG 影响因子 2.920.



# 世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ●

2003 年 10 月 15 日 第 11 卷 第 10 期 (总第 114 期)

述 评	1465 复杂性疾病生物信息学研究的策略与方法 李梢, 张学工, 季梁, 李衍达
幽门螺杆菌	1470 幽门螺杆菌黏附素基因 babA <sub>2</sub> 的克隆、序列测定及其生物信息学分析 白杨, 黄文, 王继德, 张兆山, 周殿元, 张亚历 1475 幽门螺杆菌 HspA 与大肠杆菌 LTB 基因融合及表达 郭红, 邹全明, 赵晓晏, 吴超 1480 人幽门螺杆菌热休克蛋白 A 编码基因的克隆、表达及抗原性研究 姜政, 蒲丹, 黄爱龙, 陶小红, 王丕龙 1485 幽门螺杆菌对克拉霉素耐药的分子基础 郝庆, 李岩, 高红, 张显忠
基础研究	1488 氧化苦参碱对四氯化碳诱导的大鼠肝纤维化 I, III, IV 型胶原表达的影响 陆伦根, 曾民德, 茅益民, 李继强, 邱德凯, 杨文卓, 贾一韬, 曹爱平 1492 粉防己碱、大黄与潘生丁抗肝纤维化作用比较 王如涛, 陈颖伟, 卫新革, 徐芹芳, 李定国 1497 珍珠梅水提物对大鼠肝损伤的保护作用 张学武, 朴龙, 刘超, 孙权, 金海玲, 尹宗柱 1500 乙型肝炎病毒 S 基因系列单突变克隆人工构建 余祖江, 杨东亮, 张俊, 郝友华, 王宝菊, 郝连杰 1505 急性胰腺炎大鼠肝脏 NF- $\kappa$ B 对 ICAM-1 表达的调控及其意义 石力, 田伏洲, 黄大熔, 李旭, 赵碧, 顾大勇, 唐旭东, 王雨 1508 丁酸钠对结肠癌细胞株 HT-29 组织蛋白酶 D 表达水平的影响 李曦, 罗和生, 李凡 1511 国人青年结直肠癌解剖部位分布及临床病理特点 谢正勇, 卿三华 1515 慢性乙型肝炎病毒清除自杀基因平衡制约载体系统的构建 阙全程, 余祖江, 雷延昌, 杨东亮, 郝连杰 1520 人工构建含丙型肝炎病毒核糖体插入位点的双顺反子表达载体 阙全程, 余祖江, 雷延昌, 杨东亮, 郝连杰 1524 溃疡性结肠炎患者肠黏膜 Th1/Th2 类细胞因子 m-RNA 的表达 崔海宏, 陈村龙, 杨玉捷, 张祚建, 张耀东, 崔耀升
临床研究	1528 自膨胀金属支架治疗晚期食管癌吞咽困难 26 例 张朋彬, 赵晓晏, 李宜辉, 达四平 1531 胃癌组织 CD <sub>44</sub> v9 和 MMP-2 基因的表达 张翠萍, 田宇彬, 赵清喜, 武军, 梁永信 1535 奥沙利铂综合治疗胃癌的疗效及机制 林万隆, 李定国, 陈强, 陆汉民, 马小明, 孙培龙 1540 聚合酶链反应检测 SEN 病毒 D 型和 H 型方法的建立及初步应用 唐蔚, 彭晓谋, 张瑛, 王辉, 蒋晓玲, 周伯平 1544 肝病患者血清 IGF-I 和 IGF-II 的变化 邵静鸣, 俞丽芬, 张曙, 吴云林 1547 ERCP 对儿童胰腺炎的诊断与治疗价值 李兆申, 许国铭, 施新岗, 邹晓平, 金震东, 孙振兴 1550 急性胆源性胰腺炎内镜诊治疗效及安全性 王东, 李兆申, 张文俊, 潘雪, 孙振兴, 邹晓平 1554 胰腺癌组织 ChAT, GAD65 和 PKC 酶活性的表达 杨竹林, 王群伟, 邓星辉, 李代强, 吕芳, 李永国 1558 国人胆囊结石的形态结构特征 吴杰, 杨海珉, 李静仪, 宋一德, 刘刚 1563 结核性腹膜炎与恶性腹水端粒酶活性 赵金满, 李福才, 于继红, 崔巍, 傅宝玉, 沙文阁
科研方法	1566 山莨菪碱联用地塞米松治疗腹部外科疾病并发 MODS 临床研究的操作方案 岳茂兴
文献综述	1569 门脉高压性肠病 尹朝晖, 刘浔阳 1572 肝纤维化治疗研究进展 叶方鹏, 肖冰, 张万岱 1576 现代肝脏局部解剖在活体部分肝移植应用的研究进展 方驰华, 朱新勇 1581 生长抑素类似物治疗肝细胞肝癌的抗肿瘤作用及其机制 冒海蕾, 黄介飞 1588 胰头部解剖在扩大胰十二指肠切除术中的应用 方驰华, 马俊勋, 钟世镇 1593 p53 基因在肿瘤基因治疗中的研究进展 张艳, 何凤田 1597 血管抑素的研究进展 陈建发, 黄宗海 1601 TGF $\beta$ -Smad 信号转导通路与肝纤维化 吴晓玲, 曾维政, 王丕龙 1606 消化管发育中上皮细胞凋亡研究进展 李均, 汪维伟 1609 生物芯片技术及其在消化系统疾病研究中的应用 蒋业贵, 李兆申



文献综述	1614 Wilson病的诊断和治疗 林连捷, 郑长青 1618 E- 钙粘蛋白与食管癌侵袭转移的关系 吴静, 薛群基, 刘维民, 王爱勤, 寇伟 1621 胰腺癌的光动力学治疗 丁新民, 顾瑛, 刘凡光 1624 Ets 转录因子家族在发育和肿瘤发生中作用的研究进展 张健, 高福禄, 刘芝华 1628 核因子-κB 与细胞凋亡关系的研究进展 於亮亮, 于皆平, 罗和生, 于红刚
研究快报	1632 paxillin 在胃腺癌中的表达及临床意义 田素芳, 熊永炎, 余少平, 汪必成 1634 丹参对 TGF-β1 刺激的 NIH/3T3 细胞 <i>c-fos</i> mRNA 表达和 AP1 蛋白结合活性的影响 胡旭东, 王晓玲, 童普德, 吴小江, 刘平 1636 左旋精氨酸对大鼠肝脏缺血再灌注损伤的保护作用 郝悦, 周新民 1638 端粒酶在大肠癌细胞中的活性表达及临床意义 鲁明良, 林富林, 郑国宝, 姜朝晖 1640 多种因子在门脉高压大鼠结肠黏膜中的表达 尹朝晖, 刘浚阳, 黄飞舟, 黄穰浪, 任树平 1642 黄连素对 HT-29 人结肠癌细胞系 Ca <sup>2+</sup> 的抑制作用 台卫平, 罗和生 1645 DPC4 蛋白在不同病理分期的结肠肿瘤中的表达 唐朝晖, 邹声泉, 杨想平, 陈启奇 1646 Genistein 和 PD98059 对 aFGF 及 bFGF 诱导的 CCL229 细胞增生的抑制作用 尚海, 张颐, 单吉贤 1649 CO <sub>2</sub> 气腹对肠道菌群生物学特性影响的实验研究 周丁华, 卫冰, 李宁, 黎介寿 1652 CO <sub>2</sub> 气腹对大鼠胃肠肌电作用的实验研究 周丁华, 卫冰, 李宁, 黎介寿 1654 CO <sub>2</sub> 气腹对胃黏膜血管活性肠肽及 P 物质含量的影响 周丁华, 卫冰, 李宁, 黎介寿
临床经验	1656 腹腔严重感染致多器官功能障碍的临床救治新对策 岳茂兴 1657 解毒固本冲剂治疗腹腔感染合并全身炎性反应综合征的临床研究 姜玉峰, 岳茂兴 1659 TIPSS 和 EVS 治疗食管静脉曲张破裂出血的临床分析 诸葛宇征, 王英德, 刘丽娜, 宫爱霞, 赵钢
消 息	1504 中国科技期刊走向世界的步伐正在加快 1568 欢迎订阅 2004 年度世界华人消化杂志 1571 欢迎订阅 2004 年度 World Journal of Gastroenterology® 1580 世界华人消化杂志获得 2001 年度百种中国杰出学术期刊 1613 WJG 搭建我国消化学基础和临床研究惟一国际交流的平台 1655 世界胃肠病学杂志英文版获得 2003-2004 年国家自然科学基金重点学术期刊专项基金资助
封面故事	1553 清华大学生物信息学研究所、生物信息学教育部重点实验室

# 世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

吴阶平 题写封面刊名  
陈可冀 题写版权刊名  
(月刊)

创 刊 1993-01-15  
改 刊 1998-01-25  
出 版 2003-10-15  
原刊名 新消化病学杂志

总顾问 陈可冀  
黄象谦  
黄志强  
黎介寿  
刘耕陶  
裘法祖  
汤钊猷  
王宝恩  
危北海  
吴孟超  
吴咸中

社长总编辑 马连生  
中文编辑 潘伯荣  
王瑾晖  
英文编辑 朱丽虹  
排 版 李少华  
校 对 李天华

张金哲  
张学庸  
赵东海  
周殿元

编辑 世界华人消化杂志编辑委员会  
030001, 山西省太原市双塔西街 77 号  
E-mail: wcjd@wjgnet.com

出版 世界胃肠病学杂志社  
100023, 北京市 2345 信箱  
E-mail: wcjd @ wjgnet.com  
http://www.wjgnet.com  
电话: 010-85381892  
传真: 010-85381893

印刷 北京科信印刷厂

发行 国内: 北京报刊发行局  
国外: 中国国际图书贸易总公司  
(100044, 北京 399 信箱)

订购 全国各地邮电局

邮购 世界胃肠病学杂志社发行部  
(100023, 北京市 2345 信箱)  
电话: 010-85381892  
传真: 010-85381893  
2003 年版权归世界胃肠病学杂志社所有

## 本刊已被国内外检索系统收录

美国《化学文摘(CA)》  
荷兰《医学文摘库/医学文摘(EM)》  
俄罗斯《文摘杂志(P Ж)》  
中国科技论文统计与分析  
中国学术期刊文摘  
中国中医药信息服务网  
中国生物医学文献光盘数据库  
《中文科技资料目录(医药卫生)》  
中国生物医学期刊目次数据库  
中国医学文摘外科学分册(英文版)  
中国医学文摘内科学分册(英文版)

## 特别声明

本刊刊出的所有文章不代表世界胃肠病学杂志社和本刊编委会的观点, 除非特别声明. 本刊如有印装质量问题, 请向本刊编辑部调换.

ISSN 1009-3079	邮发代号	国外代号	国内定价	广告经营许可证
CN 14-1260/R	82-262	M 4481	每期 24.00 元 全年 288.00 元	1401004000050

www.wjgnet.com



# 复杂性疾病生物信息学研究的策略与方法

李 梢, 张学工, 季 梁, 李衍达

李梢, 张学工, 季梁, 李衍达, 清华大学生物信息学研究所、生物信息学教育部重点实验室 北京市 100084

李梢, 男, 1973-10-22 生, 安徽徽州人, 汉族. 1995 年北京中医药大学本科毕业, 2001 年北京中医药大学博士, 2001-2003 年清华大学生物信息学研究所博士后, 讲师. 主要从事自身免疫和炎症疾病、中医药生物信息学研究. 国家自然科学基金重点资助项目、青年基金项目, No.90209002, 30200365; 中国博士后科学基金资助项目, No. 2002-11

项目负责人: 李梢, 100084, 北京市海淀区清华园 1 号, 清华大学生物信息学研究所、生物信息学教育部重点实验室. shaoli@mail.tsinghua.edu.cn  
电话: 010-62794294

收稿日期: 2003-06-06 接受日期: 2003-07-24

## 摘要

本文简述近年来复杂性疾病生物信息学研究的策略与方法, 并介绍清华大学生物信息学教育部重点实验室的有关工作. 由于遗传、环境的相互作用及基因型-表型复杂的内部结构, 常用的家系研究、基于遗传图谱的连锁分析、基于物理图谱的定位克隆以及关联分析等单基因病策略与方法, 在复杂性疾病的分子机制研究上存在局限. 在后基因组时代, 生物信息学的发展, 为从分子水平和系统观念研究复杂性疾病, 以及研究模式从“序列→结构→功能”向“相互作用→网络→功能”的转变提供了契机. 从多因素分析、基因的相互作用着手研究复杂性疾病成为热点. 我们以信息、系统的观点, 从功能基因组系统学出发研究复杂性疾病的机制, 并在复杂性疾病的基因组合及相互作用信息提取、复杂性疾病基因转录水平和表达水平的芯片分析、多层次生物信息整合、分子调控网络建模、中医药生物信息学等方面进行了有益的尝试.

李梢, 张学工, 季梁, 李衍达. 复杂性疾病生物信息学研究的策略与方法. 世界华人消化杂志 2003;11(10):1465-1469

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1465.asp>

## 0 引言

随着人类基因组计划的发展, 目前生命科学进入了快速、准确、低耗分析遗传和表达的信息时代. 生物信息学(Bioinformatics)作为当今生命科学研究最重要的平台技术, 其目标是揭示基因组信息结构的复杂性及遗传语言的根本规律<sup>[1]</sup>, 并阐明人类约 10 万种蛋白质的结构、功能、相互作用以及与各种人类疾病之间的关系, 寻求各种治疗和预防措施. 自 1980 年代末期以来, 生物信息学相继推动了系统生物学(systems biology)<sup>[2]</sup>、功能基因组系统学<sup>[1, 3]</sup>等的兴起, 发展了从系统观、信息结构、“复杂性”研究健康与疾病的新方法, 并已深入到与人类疾病密切相关的基因组学、蛋白质组学、药物基因组学<sup>[4]</sup>等各个领域.

## 1 遗传-环境的相互作用及基因型-表型复杂的内部结构

疾病的发生与环境(环境有害因素)和遗传(遗传易感性)有关. 单基因病(monogenic disease)是疾病发病的遗传因素中以单基因缺陷占主导地位, 且在家系成员中疾病传递符合孟德尔规律者. 复杂性疾病(complex diseases)则是由多个基因及环境因素(包括致病微生物)相互作用所致, 且在家系中不符合孟德尔规律, 又称为多基因病(polygenic diseases), 多基因遗传病(polygenic inheritance diseases), 多因子病(multifactorial diseases). 如肿瘤、心血管病、代谢性疾病、神经-精神类疾病<sup>[5]</sup>、免疫性疾病<sup>[6]</sup>、帕金森氏症<sup>[7]</sup>、肠癌<sup>[8]</sup>等. 由于机体常见的疾病、健康状态是环境暴露、遗传易感性和年龄等因素复杂交互作用的结果, 基因-环境各种因素之间往往存在复杂的非线性关系, 因此导致研究上存在困难.

1.1 微效基因的困扰, 以及由此导致的预选基因难以选择 复杂性疾病的特点往往是由多个中效、微效基因共同决定疾病的复杂性状, 仅一个基因的改变对疾病的发生、发展, 以及对药物作用的影响不大, 其中某一或某些基因位点仅对应于该疾病的某个亚型、某个症状或体征<sup>[9]</sup>.

1.2 遗传与环境因素的交互作用分离 复杂性疾病的发病率, 即疾病外显性(penetrance)取决于后天环境因素影响的性质及程度. 目前按临床表现进行分类诊断的一个疾病, 实际上可能是由一组致病基因、或易感基因、或环境因素不同, 而表型相似的疾病组成, 如糖尿病. 群体中也存在具有遗传易感性但不发病或尚未发病的亚群. 缺乏对疾病形成过程中环境作用的有效控制途径, 必然导致研究对象的内部异质性, 从而影响疾病相关基因的研究. 随着多因素相关性疾病中遗传因素的作用以及遗传因素和环境因素互动认识的进一步深入, 将有可能改变现有的疾病分类方法.

1.3 疾病基因型与表型(gene-to-phenotype)存在复杂的关系, 以及丰富的内部结构<sup>[10]</sup> 疾病基因型与表型存在多因素致病、多基因调控、涉及多个层次、临床表型复杂等特征. 如类风湿性关节炎(RA)的病理、免疫学改变虽然相似, 但其临床表现、基因表达谱改变却呈现出多样性<sup>[11]</sup>. 同时, 复杂病的遗传易感性不一定是对疾病表型本身的直接影响, 而可仅是对疾病中间性状影响的间接后果. 可以认为, 现代医学与分子遗传学在疾病解释上存在可能的矛盾, 即对于复杂疾病而言, 分子遗传学的解释过于概括, 以致不适用于分为若干不同类别、乃至亚组的特定疾病.



## 2 几种利用遗传标记分析遗传病方法的局限

单基因遗传病由于因素单一, 基因型-表型关系清晰, 已经形成了较为成熟的患病家系研究、病例/对照分析法、患病同胞对法、传递不平衡测试法(transmission/disequilibrium test, TDT), 以及基于遗传图谱的连锁分析(linkage analysis)、基于群体病例-对照(case-control populations)的关联分析(association study)、基于物理图谱的定位克隆等策略与方法<sup>[12, 13]</sup>. 其中遗传家系的连锁分析包括参数方法和非参数方法. TDT法实质上是一种以家系为基础的病例/对照关联分析法. NCB1的OMIM数据库已经收集了众多单基因遗传病的致病基因.

定位克隆已被证实是克隆基因尤其是人类群体中遗传疾病相关基因的一种有效手段<sup>[14]</sup>. 复杂疾病的致病基因则很难用位置克隆法及致病基因定位、分离技术体系来确定<sup>[15]</sup>, 从可能的疾病易感位点到致病基因的跨越也充满困难. 相对于定位主效基因十分有效的连锁分析法来说, 关联分析法定位弱效基因的能力要强得多<sup>[16]</sup>. 关联分析法侧重于研究遗传标记与疾病的关联关系, 然而受到需首先大致确定致病基因位置的局限. Baier et al<sup>[17]</sup>曾试图利用位置克隆法定位II型糖尿病的易感基因. 运用关联分析表明, 一个位于内含子区域的多态位点UCSNP-43与疾病易感性密切相关, 这一位点位于CAPN10基因内. 对一段包含CAPN10基因的长为66 kb的区域进行测序发现了179个多态位点. 对其中的63个位点进行的病例/对照研究表明, 杂合体比纯合体更容易患病. 这意味着可能是CAPN10与其周围的某个遗传因素复杂的相互作用导致了糖尿病易感性的差异<sup>[18]</sup>. 即是环境与人类基因、基因产物相互作用的结果, 以致最终的致病因素仍难确证.

## 3 新的研究策略: 生物信息学和系统观

从“序列→结构→功能”的生物学观点是既往复杂性疾病机制研究的基础, 即认为基因组本身包含蛋白质结构的所有必需信息, 这一观点过于简单并有太多还原论色彩. 由于生理-化学原理和生物学机制都不可避免地要涉及分子相互作用和反应的时空依赖性, 当前从“相互作用→网络→功能”的模式出发, 在转录组和蛋白质组层次研究基因调控网络、蛋白质相互作用网络的丰富信息成为后基因组学、生物信息学的前沿和热点<sup>[19]</sup>. 同时, 功能基因组研究也开始朝复杂系统的方向发展<sup>[1]</sup>. 这为复杂性疾病在大量已有数据资料的分析处理基础上, 由局部朝向整体, 由孤立朝向系统提供了可能.

3.1 以系统的观点适于阐发复杂疾病中遗传与环境的复杂关系 生物是在遗传信息与外界信息作用下的一个复杂、有序的动态系统. 基因组的调控与信息系统的调控具有相似的规律<sup>[3]</sup>. 借鉴生命作为复杂系统的自组织现象, 以及基因的表达调控过程, 我们建立了基于基因表达调控的进化模型. 分析了其由简单结构向复杂结构进

化的趋势. 并发现高级复杂结构的出现是在一定的外界环境下, 生物种群内部出现的自组织过程<sup>[20, 21]</sup>.

3.2 以系统的观点适于阐发复杂疾病中基因功能的特点 计算与实验相结合的系统生物学方法有助于深入认识复杂的生物系统功能<sup>[22]</sup>. 而在系统水平上理解生物体, 需要侧重于细胞、机体的功能而不是孤立的局部特点<sup>[1]</sup>. 亦即研究各级产物的相互作用、整体形式比逐个研究基因产物将更为可取.

3.3 以系统的观点适于分析疾病基因型-表型之间的复杂关系 复杂疾病同一表型可能是由于同一代谢途径或信号传导途径上不同基因发生突变的结果, 在一个群体中孤立地研究某一个或几个热门基因将难以得出满意的结论<sup>[23]</sup>. 因此, 在复杂疾病基因组分析中应注重对基因功能以及相关生化通路的阐明. 目前基因组研究已重视对生命基本过程的分析, 以及对基因调控、信号传导等的研究, 如生化途径数据库KEGG的建立<sup>[24]</sup>等.

因此, 以系统观为特点的生物信息学研究策略与方法, 有望突破单基因病分析方法在复杂疾病研究中的局限. 并将在生物学和临床医学的诊断、治疗、药物开发等方面提供理论指导和分析, 具有广泛而关键的应用价值<sup>[25-27]</sup>.

## 4 复杂疾病的基因组合及相互作用信息提取

单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNPs)是疾病易感性、外显性、抵抗性以及药物反应性等生物学性状差别的重要遗传学基础. 很多疾病与基因突变或基因多态有关. 分析基因型数据, 特别是将SNPs数据与疾病和致病因素相关的计算方法是生物信息学研究的重点之一. 不同于传统的单基因研究方式, 目前对基因的相互作用、多个基因组合与疾病关系的研究日益受到关注.

在基因组层次上发展的多因子与表型关联算法, 可提供与表型相关的多个基因相互作用的信息. 复杂疾病的基因研究在设计上可表述为, 通过对病例和对照的实际样本(A, C, T, G)、一定数量SNPs的检测(可看作向量X), 从而寻找疾病有无或轻重的变量和向量X之间的关系. 现有的基于连锁分析、关联分析的研究多是针对X的单个分量展开, 忽略了各分量之间的关系. 提取有效基因组合的算法则是从各分量之间的关系入手, 研究多个可能致病因素的综合效果, 从而给疾病的预测、诊断以及个性化治疗提供依据. 我们应用小样本情况下的主效多因提取方法, 从基因的联合作用出发研究偏执型精神分裂症, 结果表明不同的SNPs组合可能反映出疾病的不同亚型<sup>[28]</sup>. 同时, 在致病因素与临床表型的系上, 通过对胃癌前病变与Helicobacter pylori关系的Cluster分析表明, 不同临床表现的组合对于Helicobacter pylori感染具有不同的诊断准确率<sup>[29]</sup>. 这为运用生物信息学对分子信息、病理及临床试验的资料进行整合, 通过一些重要的疾病致病因素, 从相互



关系阐释复杂疾病的病因及其诊断提供了初步的依据。

由于复杂疾病的机制涉及多个基因的累加作用, 以及某些环境因子的作用, 这些基因的SNPs及其特定组合可能是造成疾病易感性最重要的原因。最近Zhao et al<sup>[30]</sup>提出了病例-对照研究中分析SNPs单倍型与环境因素的方法, 并通过分析载脂蛋白CIII(6SNPs)与冠心病术后再狭窄, 发现2种单倍型可能降低术后再狭窄患病风险。随着SNPs的不断发现和人类第三代遗传标记图的绘制等进展, 与疾病相关的人类基因信息数据库、与基因组多态性和基因突变有关的数据库dbSNP<sup>[31]</sup>、HGBASE<sup>[32]</sup>等相继建立, 为从SNPs探讨复杂性疾病的机制探讨提供了可行性。因此, 对疾病相关调节通路的候选基因进行SNPs的关联研究, 可能是多基因疾病研究取得突破的希望所在。目前我们同时还提出了一种新的基于SNPs数据, 用于研究复杂疾病和对疾病进行亚型分类的方法, 这一研究方法可以在小样本条件下充分利用已有的信息资源, 计算复杂度降低<sup>[28]</sup>。

同时, 寻找与表型相关的有意义的多基因组合还需要加强以下方面的研究: (1)预选基因的采集需要集中于主要的代谢途径、调控通路, 从而避免由于样本分散导致的样本量相对减少; (2)实验设计中预选的疾病相关基因可能存在遗漏, 如果致病基因的作用具有累加性, 仍有可能准确地找到致病相关基因。候选基因组合中的最佳基因数目取决于样本数和基因缺失比率<sup>[28]</sup>。因此研究中预先指定基因组合中的基因数目并不合理, 特别是孤立地研究单个基因与复杂疾病的关系往往不是最优选择, 并经常会导致信息利用的不充分。 (3)试验中病例本身的缺失也是潜在的偏差来源。目前对于缺失数据(missing data)的分析有均值、协方差的ML模型<sup>[33]</sup>, 自回归模型<sup>[34]</sup>, EM算法<sup>[35]</sup>, 归因(imputation)等方法, 然而仍需要通过进一步的研究, 形成较一致的认识。

## 5 芯片生物信息分析与多层次信息融合

解析复杂疾病基因型-表型的关系, 需要综合多层次信息, 如人类全部基因在染色体上的位置、序列特征(包括SNPs)、表达规律和产物(RNA和蛋白质)等。基因芯片, 如生物芯片(biochip)、微阵列(Microarray)、DNA芯片(DNA chip), 以及蛋白芯片等高通量检测技术, 使得高密度的数以万计的探针分子以及对杂交信号进行的检测分析变得切实可行, 是高效地大规模获取相关生物信息的主要手段。基因表达谱、蛋白质谱等芯片数据的生物信息学分析, 成为在基因转录、表达水平研究临床疾病的分子机制、疾病诊断和药物筛选的重要领域。目前模式识别、人工智能、统计学中的多种方法, 如聚类分析<sup>[36]</sup>, 人工神经网络<sup>[37]</sup>, 隐马尔可夫模型<sup>[38]</sup>等, 已被用于在核酸和蛋白质两个层次上对基因表达谱, 即基因表达矩阵(行表示基因, 列表示实验样本)集合、分类及优化等信息的处理。并应用到肿瘤分型、肿瘤分类、基因功能研究、通路(pathway)分析、基

因调控网络构建、药物靶位识别等许多方面。对86例肺癌患者基因表达谱芯片的生物信息学分析发现数百个基因与癌细胞显著相关, 属于细胞分裂、蛋白降解、嘧啶与嘌呤代谢、氧化磷酸化等通路<sup>[39]</sup>, 从信号通路调节异常的分析中则可预测肿瘤表型<sup>[40]</sup>。在神经网络等传统方法得到很多应用的同时, 统计学习理论(statistical learning theory, SLT), 即专门用于研究小样本情况下机器学习规律的理论日益受到重视, 以支持向量机(SVM)<sup>[41]</sup>方法为代表的SLT方法将为芯片的生物信息学分析提供新的途径, 从而进一步推动人们在基因组水平上以系统的、全局的观念去研究疾病多层次的现象及其本质。

## 6 分子调控网络建模

基因的结构或种类决定物种, 基因的功能或表达则决定生命的健康、疾病等状态。基因调控网络、蛋白调控网络、代谢网络等分子调控网络的研究, 是理解基因组功能、进而理解复杂疾病本质正在发展的方向, 并将为复杂性疾病多基因之间的关系、基因型-表型各部分、各层次的相互作用、调控通路提供背景和依据<sup>[42]</sup>。其中在转录组层次上发展的基因调控网络建模方法可提供与表型相关基因调控网络的部分信息。在Promoter区的调控元件可提供基因之间相互作用的线索。随着基因组数据的指数式增长, 有关生理、病理数据库快速发展, 如基因表达有关的数据库<sup>[43]</sup>, 蛋白质序列数据库有PIR<sup>[44]</sup>, Swiss-Prot<sup>[45]</sup>; 蛋白质结构数据库有PDB<sup>[46]</sup>等, 以及选择性剪接数据库<sup>[47]</sup>等。数据的大量积累也使得从系统水平上研究分子调控网络成为可能。

对于基因调控、细胞信号传导过程等已具有大量的分子生物学实验研究, 急需对实验结果进行理论总结。基因、蛋白等调控网络的建模, 即综合生理病理相关的基因、SNPs、基因表达状况、蛋白质功能状态以及临床治疗等信息, 以系统方法将不同的测量数据、各种因素的辨识, 各个层次上的相互作用关系进行整合, 利用数学模型深入了解生物的结构和功能以及生理病理过程。目前分子调控网络目前大多为简单系统、局部网络的基础研究, 以及从大规模基因表达谱中发现和描述基因调控网络的研究。基因调控网络建模主要在于代谢网络<sup>[48]</sup>、信号通路网络<sup>[49]</sup>、生化网络<sup>[50]</sup>、运用数据挖掘方法构建人类基因表达网络<sup>[51]</sup>、运用多元回归分析构建DNA微阵列数据基础上构建基因调控网络<sup>[52]</sup>、神经网络<sup>[53]</sup>等。按控制论的基本原理, 我们曾归纳出基因调控过程中的7种典型控制环节, 基因调控和信号传导路径可以由这些控制环节组合而成, 控制论的研究有助于寻找其中的共同规律<sup>[54]</sup>。通过基因组、转录组等层次多种信息相互印证, 则有望扩充已知基因调控网络的方法。

随着系统建模各种手段的发展, 尤其是复杂系统仿真、建模等方法的建立, 表明目前已有能力与方法



将复杂的生物系统问题“降维”处理。依据一个复杂系统的输入(遗传物质的差异)和输出(基因表达谱、蛋白质谱)确定各种变量之间的因果关系,有望逐步建立与疾病密切相关的分子调控网络,从而最终解释复杂疾病的成因、治疗等各种理论问题。也将为降低复杂疾病有关信息分析的难度,减少实际观测样本量的限制提供依据。

## 7 中医药生物信息学

中医药学植根于临床实践,防治众多常见疾病具有较佳的疗效,是世界医学不可或缺的组成部分。然而长期以来研究策略与方法的局限,制约了中医药治疗规律和疗效机制的探讨。将侧重于宏观的中医药学及其诊疗特色、丰富资源与侧重于微观的生物信息学进行有机结合,开展“中医药生物信息学”(traditional chinese medicine bioinformatics, TCMB)有关理论与方法的研究,是我们提出的一个充满挑战和机遇的方向<sup>[55]</sup>。我们的研究表明,以生物信息学的有关理论与方法为桥梁,在中医学研究中发展相应的信息分析与整合手段,将有助于深入了解以整体观、辨证论治为核心的中医诊疗规律;一套行之有效的中医药生物信息分析方法,也将为在分子水平上发掘中医药的系统内涵,在系统层次上加深对于复杂性疾病的理解提供新的途径。

**7.1 中医证候生物信息分析** 由于中医学对人体体质因素、环境因素及疾病不同阶段证候演变的整体认识方法,使得在微观层面上研究中医学诊疗机制,必然需要大量的生物信息分析,特别是非线性规律的分析尤为突出。中医学对疾病的观察体现出机体与环境相交融的整体观念。对空间的“证”、时间的“候”进行证候学判断,从而指导方药的治疗则是中医临床的核心特点。我们运用控制论方法与中医理论相结合,已初步揭示在机体与环境、机体内多因素相互作用基础上的稳态机制和系统特性<sup>[56, 57]</sup>。通过“降维升阶”等处理,则有助于从复杂的四诊信息、理化信息以及多层次生物信息中,使主要证候因素得以辨识<sup>[58, 59]</sup>。目前国际上认为,揭示复杂疾病机制的新途径,在于了解亚细胞、细胞、组织、器官及系统结构中的蛋白质相互作用,以及认识基于相互作用的疾病不同状态<sup>[60]</sup>,而多学科的协作、有效的信息整合,其意义超过了单纯的基因研究<sup>[61]</sup>。我们开展的中医证候与复杂性疾病有关病理、生理多层次信息的综合研究<sup>[62]</sup>,也符合了这一发展趋势。

**7.2 中药药效系统学研究** 中药成分相对复杂,治疗疾病时往往通过不同环节发挥整体调节作用<sup>[59]</sup>。针对方剂、证候高维小样本数据,我们建立了统计模式识别分析的PARM算法。应用于评价中药不同配比的分析与优化、寒热方剂的作用、寒热证候的特征等,取得了较好效果。与统计学方法相比,该模型可合理利用启发式的直观信息,适合于药效的特征提取、系统评价,而不仅是给出差异性的比较结果。表明“中药药效系统学”

是符合中药作用特色的研究途径。

**7.3 中医药与复杂疾病研究的互补** 中医药在治疗上注重功能调节,可能是在调控疾病的相关(易感)基因的表达及表达产物上发挥重要作用,已发现中药可以影响一些细胞因子、组织损伤酶的比例<sup>[63]</sup>、动态变化等。中药的作用具有多因微效基础上的突现特点,在一定意义上符合多基因病的形成特征及治疗趋势。因此,充分发挥生物信息学计算、设计的作用,在计算与实验相结合的研究框架下,进行基于多层次生物信息分析的中药有效分子组合筛选,中药生物信息与化学信息相关性研究,以及中药基因组学等研究,对于复杂疾病的药物设计及防治具有较大价值;同时,以确有疗效、成分明确的中药为探针,可望开启复杂疾病机制研究中“以药测病”的思路,从新的角度扩充疾病相关的分子调控网络<sup>[62]</sup>,并促进生物信息、医学信息的融合。

总之,生物信息学掌握着基因组的真正用途,并将引起生物医学以及临床诊疗的革命性变化<sup>[64]</sup>。作为当今生命科学研究最重要的平台技术,生物信息学不仅能够分析复杂疾病多种生物分子数据,同时更适于综合多种生物分子及其相互作用的知识来了解生物系统的功能,由获取有关生物知识迈进到对生命基本规律的认识,并促进复杂性疾病的研究向功能、系统的方向发展。

## 8 参考文献

- 1 李衍达. 以信息系统的观点了解基因组. 电子学报 2001;29:1731-1734
- 2 Kitano H. Systems biology: a brief overview. *Science* 2002; 295:1662-1664
- 3 李衍达. 信息与生命. 化学通报 2001;10:601-607
- 4 Bayat A. Science, medicine, and the future: Bioinformatics. *BMJ* 2002;324:1018-1022
- 5 Bray NJ, Owen MJ. Searching for schizophrenia genes. *Trends Mol Med* 2001;7:169-174
- 6 Ulfgren AK, Grondal L, Lindblad S, Khademi M, Johnell O, Klareskog L, Andersson U. Interindividual and intra-articular variation of proinflammatory cytokines in patients with rheumatoid arthritis: potential implications for treatment. *Ann Rheum Dis* 2000;59:439-447
- 7 Warner TT, Schapira AH. Genetic and environmental factors in the cause of Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2003;53(Suppl 3):S16- S23
- 8 Augenlicht LH, Heerdt BG, Mariadason JM, Yang W, Wilson AJ, Fragale A, Velcich A. Environment-gene interactions in intestinal cancer. *Eur J Cancer Prev* 2002;11(Suppl 2):S12-S17
- 9 Felsenfeld S. Finding susceptibility genes for developmental disorders of speech: the long and winding road. *J Commun Disord* 2002;35:329-345
- 10 Lazzaroni LC, Karlovich CA. Genotype to phenotype: associations, errors and complexity. *Trends Genet* 2002;18: 283-284
- 11 Kamradt T, Mitchison NA. Tolerance and autoimmunity. *N Engl J Med* 2001;344:655-664
- 12 Sun FZ, Flanders WD, Yang QH, Zhao HY. Transmission/disequilibrium tests for quantitative traits. *Ann Hum Genet* 2000;64(Pt 6):555-565
- 13 Zhao H. Family-based association studies. *Stat Methods Med Res* 2000;9:563-587
- 14 Collins FS. Positional cloning: let's not call it reverse anymore. *Nat Genet* 1992;1:3-6



- 15 Patterson M. That damned elusive polygene. *Nat Rev Genet* 2000;1:86
- 16 Risch N, Merikangas K. The future of genetic studies of complex human diseases. *Science* 1996;273:1516-1517
- 17 Baier LJ, Permana PA, Yang X, Pratley RE, Hanson RL, Shen GQ, Mott D, Knowler WC, Cox NJ, Horikawa Y, Oda N, Bell GI, Bogardus C. A calpain-10 gene polymorphism is associated with reduced muscle mRNA levels and insulin resistance. *J Clin Invest* 2000;106:R69-R73
- 18 Horikawa Y, Oda N, Cox NJ, Li X, Orho-Melander M, Hara M, Hinokio Y, Lindner TH, Mashima H, Schwarz PE, del Bosque-Plata L, Horikawa Y, Oda Y, Yoshiuchi I, Colilla S, Polonsky KS, Wei S, Concannon P, Iwasaki N, Schulze J, Baier LJ, Bogardus C, Groop L, Boerwinkle E, Hanis CL, Bell GI. Genetic variation in the gene encoding calpain-10 is associated with type 2 diabetes mellitus. *Nat Genet* 2000;26:163-175
- 19 Kanehisa M 著. 孙之荣译. Post-genome Informatics. 第1版. 北京: 清华大学出版社、牛津大学出版社, 2002:114
- 20 周晴, 计宏凯, 李衍达. 基于基因表达调控的进化模型. 清华大学学报(自然科学版) 2002;42:135-139
- 21 卢欣, 孙之荣, 李衍达. 基因组复杂度进化的仿真研究. 生物物理学报 2001;17:318-328
- 22 Kitano H. Computational systems biology. *Nature* 2002;420:206-210
- 23 Emahazion T, Jobs M, Howell WM, Siegfried M, Wyoni PI, Prince JA, Brookes AJ. Identification of 167 polymorphisms in 88 genes from candidate neurodegeneration pathways. *Gene* 1999;238:315-324
- 24 Kanehisa M. The KEGG database. *Novartis Found Symp* 2002;247:91-101
- 25 Peltonen L, McKusick VA. Genomics and medicine. Dissecting human disease in the postgenomic era. *Science* 2001;291:1224-1229
- 26 Butler D. Genomics. Are you ready for the revolution? *Nature* 2001;409:758-760
- 27 Debouck C, Metcalf B. The impact of genomics on drug discovery. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2000;40:193-207
- 28 计宏凯, 季梁. 基于 SNPs 的复杂疾病基因分析和亚型分类. 第二届中国生物信息学大会论文集. 北京: 2002:6
- 29 Li S, Lu AP, Zhang L, Li YD. Anti-*Helicobacter pylori* immunoglobulin G (IgG) and IgA antibody responses and the value of clinical presentations in diagnosis of *H. pylori* infection in patients with precancerous lesions. *World J Gastroenterol* 2003;9:755-758
- 30 Zhao LP, Li SS, Khalid N. A method for the assessment of disease associations with single-nucleotide polymorphism haplotypes and environmental variables in case-control studies. *Am J Hum Genet* 2003;72:1231-1250
- 31 Smigielski EM, Sirotkin K, Ward M, Sherry ST. dbSNP: a database of single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Res* 2000;28:352-355
- 32 Brookes AJ, Lehtvaslaiho H, Siegfried M, Boehm JG, Yuan YP, Sarkar CM, Bork P, Ortigao F. HGBASE: a database of SNPs and other variations in and around human genes. *Nucleic Acids Res* 2000;28:356-360
- 33 Horton NJ, Laird NM. Maximum likelihood analysis of logistic regression models with incomplete covariate data and auxiliary information. *Biometrics* 2001;57:34-42
- 34 Albert PS, Follmann DA, Wang SA, Suh EB. A latent autoregressive model for longitudinal binary data subject to informative missingness. *Biometrics* 2002;58:631-642
- 35 Albert PS. A transitional model for longitudinal binary data subject to nonignorable missing data. *Biometrics* 2000;56:602-608
- 36 Lee JM, Sonnhammer EL. Genomic gene clustering analysis of pathways in eukaryotes. *Genome Res* 2003;13:875-882
- 37 O'Neill MC, Song L. Neural network analysis of lymphoma microarray data: prognosis and diagnosis near-perfect. *BMC Bioinformatics* 2003;4:13
- 38 Ji X, Li LJ, Sun Z. Mining gene expression data using a novel approach based on hidden Markov models. *FEBS Lett* 2003;542:125-131
- 39 Creighton C, Hanash S, Beer D. Gene expression patterns define pathways correlated with loss of differentiation in lung adenocarcinomas. *FEBS Lett* 2003;540:167-170
- 40 Graeber TG, Eisenberg D. Bioinformatic identification of potential autocrine signaling loops in cancers from gene expression profiles. *Nat Genet* 2001;29:295-300
- 41 张学工. 关于统计学习理论与支持向量机. 自动化学报 2000;26:32-43
- 42 Huang S. Rational drug discovery: what can we learn from regulatory networks? *Drug Discov Today* 2002;7(20 Suppl):S163-S169
- 43 Scherf U, Ross DT, Waltham M, Smith LH, Lee JK, Tanabe L, Kohn KW, Reinhold WC, Myers TG, Andrews DT, Scudiero DA, Eisen MB, Sausville EA, Pommier Y, Botstein D, Brown PO, Weinstein JN. A gene expression database for the molecular pharmacology of cancer. *Nat Genet* 2000;24:236-244
- 44 Barker WC, Garavelli JS, Huang H, McGarvey PB, Orcutt BC, Srinivasarao GY, Xiao C, Yeh LS, Ledley RS, Janda JF, Pfeiffer F, Mewes HW, Tsugita A, Wu C. The protein information resource (PIR). *Nucleic Acids Res* 2000;28:41-44
- 45 Boeckmann B, Bairoch A, Apweiler R, Blatter MC, Estreicher A, Gasteiger E, Martin MJ, Michoud K, O'Donovan C, Phan I, Pilbout S, Schneider M. The SWISS-PROT protein knowledgebase and its supplement TrEMBL in 2003. *Nucleic Acids Res* 2003;31:365-370
- 46 Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, Shindyalov IN, Bourne PE. The protein data bank. *Nucleic Acids Res* 2000;28:235-242
- 47 Ji H, Zhou Q, Wen F, Xia H, Lu X, Li Y. AsMamDB: an alternative splice database of mammals. *Nucleic Acids Res* 2001;29:260-263
- 48 Jeong H, Tombor B, Albert R, Oltvai ZN, Barabasi AL. The large-scale organization of metabolic networks. *Nature* 2000;406:651-655
- 49 Karp PD. Pathway databases: A case study in computational symbolic theories. *Science* 2001;293:2040-2044
- 50 Kitami T, Nadeau JH. Biochemical networking contributes more to genetic buffering in human and mouse metabolic pathways than does gene duplication. *Nat Genet* 2002;32:191-194
- 51 Jenssen TK, Laegreid A, Komorowski J, Hovig E. A literature network of human genes for high-throughput analysis of gene expression. *Nat Genet* 2001;28:21-29
- 52 Kato M, Tsunoda T, Takagi T. Inferring genetic networks from DNA microarray data by multiple regression analysis. *Genome Inform Ser Workshop Genome Inform* 2000;11:118-128
- 53 Pouget A, Latham P. Digitized neural networks: long-term stability from forgetful neurons. *Nat Neurosci* 2002;5:709-710
- 54 卢欣, 李衍达. 基因调控过程中的典型控制环节. 自动化学报 2000;26:638-645
- 55 Li S. Advances in TCM symptomatology of rheumatoid arthritis. *J Tradit Chin Med* 2002;22:137-142
- 56 庄永龙, 李梢, 李衍达. 基于控制论的中医学四时五脏系统稳态性能仿真. 系统仿真学报 2003;15:922-926
- 57 李梢, 王永炎, 季梁, 李衍达. 复杂系统意义下的中医药学及其案例研究. 系统仿真学报 2002;14:1429-1403
- 58 李梢. 从维度与阶度探讨中医证候的特征及标准化方法. 北京中医药大学学报 2003;26:1-4
- 59 Li S, Lu AP, Jia HW. Therapeutic actions of the Chinese herbal formulae with cold and heat properties and their effects on ultrastructures of synoviocytes in rats of the collagen-induced arthritis. *J Tradit Chin Med* 2002;22:290-296
- 60 Noble D. Modeling the heart-from genes to cells to the whole organ. *Science* 2002;295:1678-1682
- 61 Kiberstis P, Roberts L. It's not just the genes. *Science* 2002;296:685
- 62 李梢. 中医证候与分子网络调节机制的可能关联. 中国科学技术协会首届学术年会报告. 周光召. 面向21世纪的科技进展与社会经济发展, 第1版. 北京: 中国科学技术出版社, 1999:442
- 63 Li S, Lu AP, Wang YY, Li YD. Suppressive effects of a Chinese herbal medicine Qing-Luo-Yin extract on the angiogenesis of collagen induced arthritis in rats. *Am J Chin Med* 2003;31:861-866
- 64 Kim JH. Bioinformatics and genomic medicine. *Genet Med* 2002;4(6 Suppl):62S-65S

# 幽门螺杆菌黏附素基因 babA<sub>2</sub> 的克隆、序列测定及其生物信息学分析

白 杨, 黄 文, 王继德, 张兆山, 周殿元, 张亚历

白杨, 黄文, 王继德, 周殿元, 张亚历, 中国人民解放军第一军医大学南方医院全军消化病研究所 广东省广州市 510515  
张兆山, 军事医学科学院生物工程研究所 北京市 100071  
白杨, 男, 1973 年生, 山西省太原人, 汉族, 2002 年毕业于第一军医大学, 医学博士, 主治医师, 讲师. 主要从事消化系统疾病的研究.  
“863”计划专题, No. 102-07-03-06  
国家自然科学基金, No. 30170890, 30270078  
军队“十五”医药卫生科研课题, No.OIMA-132  
项目负责人: 张亚历, 100071, 广东省广州市广州大道北路 1838 号, 中国人民解放军第一军医大学南方医院全军消化病研究所. zhangyl@fimmu.edu.cn  
电话: 020-61641531  
收稿日期: 2002-10-29 接受日期: 2002-11-25

## Cloning, sequencing and bioinformatics analysis of adhesin gene babA<sub>2</sub> of *Helicobacter pylori*

Yang Bai, Wen Huang, Ji-De Wang, Zhao-Shan Zhang, Dian-Yuan Zhou, Ya-Li Zhang

Yang Bai, Wen Huang, Ji-De Wang, Dian-Yuan Zhou, Ya-Li Zhang, PLA Institute for Digestive Disease, The First Military Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China  
Zhao-Shan Zhang, Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China  
Supported by grants from State 863 High Technology R&D Project of China (102-07-03-06), the National Natural Science Foundation of China (30270078, 30270078) and the Public Health and Medical Research Project of the Chinese PLA of 10<sup>th</sup> Five-Year Plan.  
Correspondence to: Dr Ya-Li Zhang, PLA Institute for Digestive Disease, the First Military Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China. zhangyl@fimmu.edu.cn  
Received: 2002-10-29 Accepted: 2002-11-25

## Abstract

**AIM:** To obtain DNA of human *Helicobacter pylori* (Hp) adhesin gene babA<sub>2</sub> and the amplified fragment was inserted into plasmid pET-22b (+) for nucleotide sequencing analysis and to carry out bioinformatics analysis.

**METHODS:** The babA<sub>2</sub> DNA was amplified by PCR and inserted into the plasmid pET-22b (+) and sequenced. The biological property was analysed by the software ANTHEPROT V4.3c.

**RESULTS:** DNA sequencing analysis showed that the sequence of babA<sub>2</sub> DNA was the same as that published by GenBank. ANTHEPROT V4.3c software predicted its relative molecular mass(M<sub>r</sub>) was 78 kD and it possessed good antigenicity and hydrophobicity.

**CONCLUSION:** A confirmed babA<sub>2</sub> gene has been obtained and bioinformatics analysis showed that it had good immunogenicity. Our study lays a good foundation for recombination, expression and relevant research on adhesin

gene babA<sub>2</sub> of *Helicobacter pylori*.

Bai Y, Huang W, Wang JD, Zhang ZS, Zhou DY, Zhang YL. Cloning, sequencing and bioinformatics analysis of adhesin gene babA<sub>2</sub> of *Helicobacter pylori*. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003;11(10):1470-1474

## 摘要

**目的:** 获取幽门螺杆菌黏附素基因 babA<sub>2</sub>, 并将他克隆到质粒 pET-22b(+) 中进行核苷酸序列分析, 并对其进行生物信息学分析, 为研究 Hp 黏附素的分子机制和免疫原性提供基础.

**方法:** 利用 PCR 技术扩增 babA<sub>2</sub>, 并将其定向插入 pET-22b(+) 载体, 通过 DNA 序列分析仪进行核苷酸分析, 生物信息学软件对其进行生物学特性分析.

**结果:** DNA 序列分析表明, 所克隆的 babA<sub>2</sub> 基因序列与 GenBank 公布的一致. ANTHEPROT V4.3c 软件预测其蛋白质分子量约为 78 KD, 并显示出了良好的抗原性和疏水性.

**结论:** 本研究获得了序列正确的 babA<sub>2</sub> 基因, 生物信息学分析表明其具有优良的免疫原性, 为其重组表达及其相关研究奠定了良好的基础.

白杨, 黄文, 王继德, 张兆山, 周殿元, 张亚历. 幽门螺杆菌黏附素基因 babA<sub>2</sub> 的克隆、序列测定及其生物信息学分析. 世界华人消化杂志 2003;11(10):1470-1474

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1470.asp>

## 0 引言

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)感染是慢性胃炎和消化性溃疡的主要病因<sup>[1-6]</sup>, 与胃腺癌、胃黏膜相关性淋巴瘤组织恶性淋巴瘤的发生亦密切相关<sup>[7-20]</sup>. 此外, 血清流行病学研究表明 Hp 感染与循环、呼吸、胃十二指肠外消化系统以及自身免疫疾病的发生也有关<sup>[21-24]</sup>. 随着 Hp 病因地位的上升, 对其致病机制的研究日趋深入, Hp 的致病机制包括诸多环节, 但尤以其黏附机制最为关键, 因为 Hp 必须首先定植于人胃黏膜才能进一步发挥其致病作用, 而黏附又是 Hp 定植在胃黏膜表面的前提. 文献报道的 Hp 黏附素较多, 但已经证实的有四种, 即 LewisB 血型抗原(Leb)结合黏附素(BabA)、AlpA、AlpB 和 HopZ<sup>[25]</sup>. 其中 BabA 是迄今为止惟一明确受体的 Hp 黏附素, 研究表明 babA 基因存在两个等位基因: babA<sub>1</sub> 和 babA<sub>2</sub>, 其中 babA<sub>1</sub> 缺乏 10-bp 的重复序列, 其蛋白不具有与 Le<sup>b</sup> 结



合的功能<sup>[26]</sup>. 目前国内尚未见有关 babA<sub>2</sub> 的研究报道, 我们运用 PCR 技术克隆人幽门螺杆菌 babA<sub>2</sub> 基因, 并构建载体对其进行序列及生物信息学分析, 为进一步表达 babA<sub>2</sub> 基因, 研究其黏附作用、免疫原性等打下了基础.

## 1 材料和方法

1.1 材料 菌株 BL21(DE3) 及质粒 pET-22b(+) 由军事医学科学院生物工程研究所提供. 幽门螺杆菌 SS1 为本所保存. 限制性内切酶 Not I、Nco I 及 T4 DNA 连接酶、Vent DNA 聚合酶购自 New England Biolabs 公司, Taq DNA 聚合酶、DNA 分子量标准  $\lambda$  DNA/EcoR I + Hind III 购自华美生物工程公司, 琼脂糖、dNTPs、DNA 快速纯化试剂盒购自 Promega 公司, 测序质粒纯化试剂盒购自 Qiagen 公司, 其他试剂为国产分析纯.

### 1.2 方法

1.2.1 Hp 染色体 DNA 的提取 固体培养基上刮取生长良好的 Hp 菌落, 按基因组 DNA 小量制备法制备<sup>[27]</sup>.

1.2.2 质粒的提取及纯化 质粒的快速抽提及大量制备均采用碱变性法<sup>[27]</sup>.

1.2.3 目的基因的 PCR 扩增 根据文献<sup>[26]</sup>设计引物, 在其 5' 端加上合适的限制性酶切位点, 由军事医学科学院生物工程所张京生合成. 序列如下: babA<sub>2</sub>1:5' -TG GCC ATG GAT AAA AAA CAC ATC CTT TCA-3', babA<sub>2</sub>2:5' -AG TGC GGC CGC ATA AGC GAA CAC ATA G-3'. 热启动法进行 PCR, 95 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 90 s, 35 个循环后再延伸 10 min. 0.8 % 琼脂糖凝胶电泳观察扩增结果.

1.2.4 DNA 片段的酶切、连接、转化和阳性克隆的鉴定<sup>[27]</sup> 质粒和目的基因 DNA 经 Not I 和 Nco I 双酶切, 玻璃奶回收酶切片段, T4 连接酶作用下 16 °C 连接 12 h, 转化宿主菌 BL21(DE3), 双酶切鉴定筛选出阳性克隆.

1.2.5 序列测定及分析 碱裂解法大量抽提经双酶切鉴定的重组克隆质粒, 用自动测序仪进行序列分析.

1.2.6 生物信息学分析 ANTHEPROT V4.3c 软件分析其生物学特性.

## 2 结果

2.1 babA<sub>2</sub> 基因的扩增 PCR 结果电泳分析发现在 2 200 bp 左右有一条带, 大小与预计相符.

2.2 重组质粒的构建及酶切鉴定 重组质粒的构建如图 1, 将 PCR 产物经 Not I 和 Nco I 双酶切后, 定向插入经同样双酶切的 pET-22b(+) 载体中, 获得重组质粒命名为 pET-22b(+)/BabA<sub>2</sub>. 经 Not I 和 Nco I 双酶切后的重组质粒电泳, 结果与预计相符.

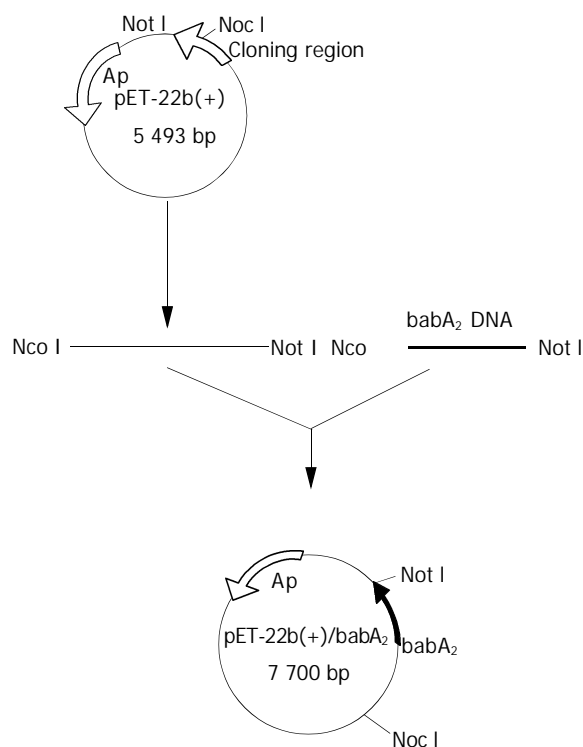


图 1 重组质粒 pET-22b(+)/BabA<sub>2</sub> 的构建示意图.

2.3 babA<sub>2</sub> 基因片段的序列分析 直接以重组质粒 pET-22b(+)/BabA 为模板进行测序, 得到了克隆片段的 DNA 序列, 与 Ilver et al<sup>[26]</sup>报道的一致. babA<sub>2</sub> 基因编码区的核苷酸序列和氨基酸序列见图 2.

```

atg  aaa  aaa  cac  atc  ctt  tca  tta  act  tta  ggc  tcg  ctt  tta  gtt  tcc  act  ttg  agc  gct
M   K   K   H   I   L   S   L   T   L   G   S   L   L   V   S   T   L   S   A
gaa  gac  gac  ggc  ttt  tac  aca  agc  gta  ggc  tat  caa  atc  ggt  gaa  gcc  gct  caa  atg  gta
E   D   D   G   F   Y   T   S   V   G   Y   Q   I   G   E   A   A   Q   M   V
aca  aac  acc  aaa  ggc  atc  caa  gat  ctt  tca  gac  aac  tat  gaa  aac  ttg  agc  aaa  ctt  ttg
T   N   T   K   G   I   Q   D   L   S   D   N   Y   E   N   L   S   K   L   L
acc  cga  tac  agc  acc  cta  aac  acc  ctt  atc  aaa  ttg  tcc  gct  gat  ccg  agc  gcg  att  aac
T   R   Y   S   T   L   N   T   L   I   K   L   S   A   D   P   S   A   I   N
gcg  gca  cgt  gaa  aat  ctg  ggc  gcg  agc  gcg  aag  aac  ttg  atc  ggc  gat  acc  aaa  aat  tcc
A   A   R   E   N   L   G   A   S   A   K   N   L   I   G   D   T   K   N   S
ccc  gcc  tat  caa  gcc  gtg  ctt  ttg  gcg  atc  aat  gcg  gcg  gta  ggg  ttt  tgg  aat  gtc  tta
P   A   Y   Q   A   V   L   L   A   I   N   A   A   V   G   F   W   N   V   L
ggc  tat  gct  acg  caa  tgc  ggg  ggt  aac  gct  aat  ggt  caa  gaa  agc  acc  tct  tca  acc  acc
G   Y   A   T   Q   C   G   G   N   A   N   G   Q   E   S   T   S   S   T   T

```

```

atc ttc aac aac gag cca ggg tat cga tcc act tcc atc act tgc agt ttg aac agg tat
I F N N E P G Y R S T S I T C S L N R Y
aag cct gga tac tac ggc cct atg agc att gaa aat ttc aaa aag ctt aac gaa gcc tat
K P G Y Y G P M S I E N F K K L N E A Y
caa atc ctc caa acg gct tta aat aaa ggc tta ccc gcg ctc aaa gaa aac aac gga acg
Q I L Q T A L N K G L P A L K E N N G T
gtc agt gta acc tac acc tac aca tgc tca ggg gaa ggg aat gat aac tgc tcg aaa aaa
V S V T Y T Y T C S G E G N D N C S K K
gcc aca ggt gta agt gac caa aat ggc gga acc aaa act aaa acc caa acc ata gac ggc
A T G V S D Q N G G T K T K T Q T I D G
aaa acc gta acc acc acc agc atc agt tca aaa gtc gtt gat agt cag gca aaa ggt aat aca
K T V T T T I S S K V V D S Q A K G N T
aca agg gtg tcc tac acc gaa atc atc aac aaa tta gac ggt gtg cct gat agc gct caa
T R V S Y T E I T N K L D G V P D S A Q
gcg ctc ttg gcg caa gcg agc acg ctc atc aac acc atc aac acg gca tgc ccg tat ttt
A L L A Q A S T L I N T I N T A C P Y F
agt gta act aat aaa agt ggt ggt cca cag atg gaa ccg act aga ggg aag ttg tgc ggt
S V T N K S G G P Q M E P T R G K L C G
ttt aca gaa gaa atc agc gcg atc caa aag atg atc aca gac gcg caa gag ctg gtc aat
F T E E I S A I Q K M I T D A Q E L V N
caa acg agc gtc att aac gag cat gaa caa tca acc ccg gta ggc ggt aat aat ggc aag
Q T S V I N E H E Q S T P V G G N N G K
cct ttc aac cct ttc acg gac gca agc ttc gct caa ggc atg ctc gct aac gct agt gcg
P F N P F T D A S F A Q G M L A N A S A
caa gcc aaa atg ctc aat cta gcc cat caa gtg ggg caa acc att aac cct gac aat ctt
Q A K M L N L A H Q V G Q T I N P D N L
acc ggg act ttt aaa aat ttt gtt aca ggc ttt tta gcc aca tgc aac aac aaa tca aca
T G T F K N F V T G F L A T C N N K S T
gct ggc act agt ggc aca caa ggt tca cct cct ggc aca gta acc act caa act ttc gct
A G T S G T Q G S P P G T V T T Q T F A
tcc ggt tgc gcc tat gtg gag caa acc ata acg aat cta aac aac agc atc gct cat ttt
S G C A Y V E Q T I T N L N S I A H F
ggc act caa gag cag cag ata cag caa gct gaa aac atc gct gac act cta gtg aat ttc
G T Q E Q Q I Q Q A E N I A D T L V N F
aaa tct aga tac agc gaa tta ggg aat act tat aac agc atc act act gcg ctc tcc aaa
K S R Y S E L G N T Y N S I T T A L S K
gtc cct aac gcg caa agc ttg caa aac gtg gtg gga aaa aag aat aac ccc tat agc ccg
V P N A Q S L Q N V V G K K N N P Y S P
caa ggc ata gaa acc aat tac tac ttg aat caa aac tct tac aac caa atc caa acc atc
Q G I E T N Y Y L N Q N S Y N Q I Q T I
aac caa gaa tta ggg cgt aac ccc ttt agg aaa gtg ggc atc gtc agt tct caa acc aac
N Q E L G R N P F R K V G I V S S Q T N
aat ggt gcc atg aat ggg atc ggt atc cag gtg ggc tac aag caa ttc ttt ggg caa aaa
N G A M N G I G I Q V G Y K Q F F G Q K
agg aaa tgg ggt gca aga tac tac ggc ttt ttt gat tac aac cat gcg ttc att aaa tcc
R K W G A R Y Y G F F D Y N H A F I K S
agc ttc ttc aac tcg gct tct gac gtg tgg act tat ggt ttt gga gcg gac gct ctt tat
S F F N S A S D V W T Y G F G A D A L Y
aac ttc atc aac gat aaa gcc acc aat ttc tta ggc aaa aac aac aag ctt tct gtg ggg
N F I N D K A T N F L G K N N K L S V G
ctt ttt ggc ggg att gcg tta gcg ggc act tca tgg ctt aat tct gaa tac gtg aat tta
L F G G I A L A G T S W L N S E Y V N L
gcc acc atg aat aac gtc tat aac gct aaa atg aac gtg gcg aac ttc caa ttc tta ttc
A T M N N V Y N A K M N V A N F Q F L F
aac atg gga gtg agg atg aat tta gcc aga tcc aag aaa aaa ggc agc gat cat gcg gct
N M G V R M N L A R S K K G S D H A A
cag cat ggc att gag tta ggg ctt aaa atc ccc acc att aac acg aac tac tat tcc ttt
Q H G I E L G L K I P T I N T N Y Y S F
atg ggg gct gaa ctc aaa tac cgc agg ctc tat agc gtg tat ttg aac tat gtg ttc gct
M G A E L K Y R R L Y S V Y L N Y V F A
tat taa
Y

```

图2 Hp 粘附素 BabA<sub>2</sub> 的核苷酸序列及其推导出的氨基酸序列.



2.4 生物信息学分析结果 ANTHEPROT V4.3c 软件预测其蛋白质分子量约为 78 kD, Parker 法和 Welling 法分析均显示出了良好的抗原性(图 3, 4).

### 3 讨论

早在 1996 年, Wadstr et al<sup>[28]</sup>推测处在休眠或生长缓慢状态的 Hp 能够与胃黏膜表面和上皮细胞的 Lewis 血型

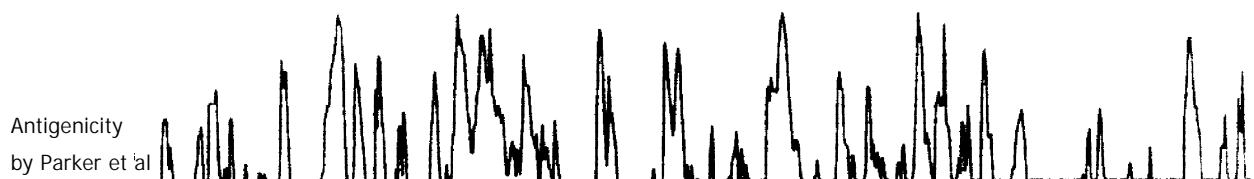


图3 BabA 抗原性的 Parker 法分析.



图4 BabA 抗原性的 Welling 法分析.

抗原相互作用以促进其定植. 之后, Ilver et al<sup>[26]</sup>研究了 Lewis 血型抗原中 Le<sup>b</sup> 调节 Hp 黏附的作用. 研究显示, 含 Le<sup>b</sup> 的可溶性糖蛋白或抗 Le<sup>b</sup> 的抗体能抑制 Hp 黏附于胃上皮细胞. 他们进一步采用再标记技术发现并纯化了能与胃黏膜表面 Le<sup>b</sup> 特异结合的黏附素 - BabA, M<sub>r</sub> 78 kD, 免疫电镜显示其位于细菌表面. I 型和 II 型 Hp 菌株结合 Le<sup>b</sup> 的研究显示 CagA 致病岛的存在与 BabA 黏附有关. 亲和实验研究表明 Le<sup>b</sup> 与 BabA 的亲和系数约为  $1 \times 10^{10} \text{M}^{-1}$ , 即每个细菌结合 Le<sup>b</sup> 的分子数约为 500. 另外, 他们检测了 95 株临床分离的 Hp 结合于 <sup>125</sup>I 标记的血型抗原的能力, 发现 90 % 的 Hp 呈现血型抗原结合能力, 其中 66 % 能与 Le<sup>b</sup> 结合. 近来, Bosch et al<sup>[29]</sup>调查了应激状态下唾液中硫酸化 Lewis (S-Le) 水平与 Hp 黏附的关系. 结果显示, 随着应激状态下唾液中 S-Le 浓度、分泌量及 S-Le/ 总蛋白比率增加, 唾液介导的 Hp 黏附也增加. 这一结果表明 BabA 及其受体在 Hp 致病机制、特别是在宿主应激状态下 Hp 致病机制中起重要作用.

由于 CagA 致病岛的存在与 BabA 黏附有关且只有 babA<sub>2</sub> 可以表达 BabA<sup>[30-37]</sup>, 因此本研究选用了黏附性强并含有 CagA 致病岛的 Hpss1 染色体 DNA 为模板, 成功得到了 babA<sub>2</sub> 的基因. 为便于下一步的表达和纯化工作又将其装入了带有组氨酸尾巴的融合表达载体, 酶切鉴定和测序结果显示获得了特异的 Hp 的 babA<sub>2</sub> 基因, 生物信息学分析预测其蛋白质 M<sub>r</sub> 78 kD, 并显示出了良好的抗原性, 为重组表达 BabA、研究其黏附功能和免疫保护作用奠定了重要的实验基础.

### 4 参考文献

- 1 张玲霞, 张沥, 刘永国, 张宁霞, 阎小君, 韩锋产, 侯瑜. 幽门螺杆菌细胞毒素相关蛋白 A 与胃十二指肠溃疡关系的病例对照研究. 世界华人消化杂志 2000;8:733-736

- 2 刘海峰, 刘为纹, 房殿春, 高晋华, 王振华. 幽门螺杆菌诱导胃黏膜上皮细胞凋亡和增生与 p53 基因表达. 世界华人消化杂志 2001;9:1265-1268
- 3 王承党, 黄海辉, 陈玉丽. 幽门螺杆菌感染对消化性溃疡患者胃 G, D 细胞的影响. 世界华人消化杂志 2000;8:847-850
- 4 Hobbles M, Tovey FI. *Helicobacter pylori*: the primary cause of duodenal lceration or a secondary infection? *World J Gastroenterol* 2001;7:149-151
- 5 彭仲生, 梁湛聪, 刘慕嫦, 欧阳能太. 幽门螺杆菌相关胃溃疡的细胞增生与凋亡研究. 世界华人消化杂志 1999;7:218-219
- 6 Vandenplas Y. *Helicobacter pylori* infection. *World J Gastroenterol* 2000;6:20-31
- 7 郭长青, 王玉萍, 刘国永, 马社旺, 丁贯一, 李继昌. 胃黏膜癌变过程中幽门螺杆菌感染与 P53、c-erbB-2 基因表达的研究. 世界华人消化杂志 1999;7:313-315
- 8 刘海峰, 刘为纹, 房殿春, 王国安, 滕小春. 根除幽门螺杆菌对胃癌前病变组织中 bax 蛋白表达的影响. 世界华人消化杂志 2003;11:22-24
- 9 刘海峰, 刘为纹, 房殿春, 王国安, 滕小春. 幽门螺杆菌感染与胃癌前病变演化的关系 2002;10:912-915
- 10 顾金柱, 侯天文, 王晓熙. 幽门螺杆菌致胃黏膜癌前期病变的横断研究. 世界华人消化杂志 2001;9:111
- 11 王东旭, 房殿春, 李为, 杜群先, 刘为纹. 胃幽门螺杆菌感染与抑癌基因失活的关系. 世界华人消化杂志 2001;9:984-987
- 12 陈世耀, 王吉耀, 纪元, 张希德, 朱晴文. 幽门螺杆菌与蛋白激酶 C 在胃癌及癌前病变基因突变中的作用. 世界华人消化杂志 2001;9:302-307
- 13 王普选, 张晓茹, 尹艳芬, 万东君. 中国西部少数民族幽门螺杆菌感染与胃癌发病的流行病学关系. 世界华人消化杂志 2000;8:1444
- 14 何兴祥, 王家马, 吴捷莉, 袁顺玉, 艾莉. 胃黏膜癌变过程中幽门螺杆菌感染与端粒酶活性的表达. 世界华人消化杂志 2000;8:505-508
- 15 全俊, 范学工. 幽门螺杆菌感染与胃癌发生的实验研究进展. 世界华人消化杂志 1999;7:1068-1069
- 16 华杰松. 幽门螺杆菌: 细胞增生和细胞凋亡在胃癌发生中的作用. 世界华人消化杂志 1999;9:647-648
- 17 胡品津. 幽门螺杆菌与胃癌: 研究面临的挑战. 世界华人消化杂志 1999;7:1-2
- 18 Gao HJ, Yu LZ, Bai JF, Peng YS, Sun G, Zhao HL, Miu K, Lü XZ, Zhang XY, Zhao ZQ. Multiple genetic alterations and behavior of cellular biology in gastric cancer and other gastric mucosal lesions: *H pylori* infection, histological types and staging. *World J Gastroenterol* 2000;6:848-854
- 19 庄小强, 林三仁. 幽门螺杆菌与胃癌的研究进展. 世界华人消化杂志 2000;8:206-207
- 20 姚永莉, 张万岱. 幽门螺杆菌与胃癌的关系. 世界华人消化杂志 2001;9:1045-1049

- 21 Bulajic M, Stimec B, Milicevic M, Loehr M, Mueller P, Boricic I, Kovacevic N, Bulajic M. Modalities of testing *Helicobacter pylori* in patients with nonmalignant bile duct diseases. *World J Gastroenterol* 2002;8:301-304
- 22 彭小宁, 范学工, 黄燕, 王志明, 陈永平. 螺杆菌感染与肝癌关系的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:902-906
- 23 姜政, 黄爱龙, 陶小红, 王丕龙. 幽门螺杆菌感染与胃肠外疾病关系的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:706-709
- 24 李侠, 王洪, 郝良纯, 江逊, 张燕, 徐华, 尹燕兰, 刘杰. 儿童厌食伴消瘦与幽门螺杆菌感染的相关性. 世界华人消化杂志 2000;8:255
- 25 Peck B, Ortkamp M, Diehl KD. Conservation, localization and expression of HopZ, a protein involved in adhesion of *Helicobacter pylori*. *Nucleic Acids Res* 1999;16:3325-3333
- 26 Ilver D, Arnqvist A, Ogren J. *Helicobacter pylori* adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. *Science* 1998;281:373-377
- 27 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989:35-490
- 28 Wadstr T, Hirno S, Bor T. Biochemical aspects of *Helicobacter pylori* colonization of the human gastric mucosa. *Aliment Pharmacol Ther* 1996;10(Suppl 1):17-27
- 29 Bosch JA, de Geus EJ, Ligtenberg TJ. Salivary MUC5B-mediated adherence (ex vivo) of *Helicobacter pylori* during acute stress. *Psychosom Med* 2000;62:40-49
- 30 姚永莉, 张万岱. 幽门螺杆菌致病因子研究进展. 世界华人消化杂志 2002;10:455-458
- 31 Yamaoka Y, Soucek J, Odenbreit S, Haas R, Arnqvist A, Boren T, Kodama T, Osato MS, Gutierrez O, Kim JG, Graham DY. Discrimination between cases of duodenal ulcer and gastritis on the basis of putative virulence factors of *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol* 2002; 6:2244-2246
- 32 Rad R, Gerhard M, Lang R, Schoniger M, Rosch T, Schepp W, Becker I, Wagner H, Prinz C. The *Helicobacter pylori* blood group antigen-binding adhesin facilitates bacterial colonization and augments a nonspecific immune response. *J Immunol* 2002;168:3033-3041
- 33 李娟君, 阎小君, 刘智广, 苏成芝. 幽门螺杆菌细胞毒素相关抗原A的表达纯化及其临床研究. 世界华人消化杂志 2002;10:271-274
- 34 Mizushima T, Sugiyama T, Komatsu Y, Ishizuka J, Kato M, Asaka M. Clinical relevance of the babA2 genotype of *Helicobacter pylori* in Japanese clinical isolates. *J Clin Microbiol* 2001;39:2463-2465
- 35 Prinz C, Schoniger M, Rad R, Becker I, Keiditsch E, Wagenpfeil S, Classen M, Rosch T, Schepp W, Gerhard M. Key importance of the *Helicobacter pylori* adherence factor blood group antigen binding adhesin during chronic gastric inflammation. *Cancer Res* 2001;61:1903-1909
- 36 Gerhard M, Lehn N, Neumayer N, Boren T, Rad R, Schepp W, Miehke S, Classen M, Prinz C. Clinical relevance of the *Helicobacter pylori* gene for blood-group antigen-binding adhesin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:12778-12783
- 37 江红, 阎小君, 苏成芝, 韩锋产, 冯永强, 侯瑜. 幽门螺杆菌 vac-A 基因毒性相关片段的克隆及序列分析. 世界华人消化杂志 2000; 8:728-733



# 幽门螺杆菌 HspA 与大肠杆菌 LTb 基因融合及表达

郭 红, 邹全明, 赵晓晏, 吴 超

郭红, 赵晓晏, 中国人民解放军第三军医大学附属新桥医院消化内科  
重庆市 400037  
邹全明, 吴超, 中国人民解放军第三军医大学检验系临床微生物教研室  
重庆市 400037  
郭红, 女, 1971-11-22 生, 湖南省湘潭市人, 汉族. 1995 年重庆医科大学临  
床医学本科毕业, 学士, 2001 年第三军医大学消化内科专业硕士毕业, 主治  
医师, 讲师, 目前主要从事幽门螺杆菌研究.  
国家“九五”重点科技攻关课题, No.96-901-01-54  
全军“九五”医药卫生科研基金资助项目  
项目负责人: 邹全明, 400038, 重庆市, 中国人民解放军第三军医大学检验  
系临床微生物教研室. zouquanming@mail.tmmu.com.cn  
电话: 023-68752316 传真: 023-68755604  
收稿日期: 2002-11-29 接受日期: 2003-06-10

## Construction and expression of the fusion gene of *H pylori* HspA subunit and *E.coli* heat-labile enterotoxin B subunit

Hong Guo, Quan-Ming Zou, Xiao-Yan Zhao, Chao Wu

Hong Guo, Xiao-Yan Zhao, Department of Gastroenterology, Xinqiao  
Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China  
Quan-Ming Zou, Chao Wu, Department of Clinical Microbiology, Third  
Military Medical University, Chongqing 400037, China  
Supported by the State Key Science and Technology Brainstorm Project  
of 9<sup>th</sup> Five-year Plan, No. 96-901-01-54  
Correspondence to: Quan-Ming Zou, Department of Clinical Microbiology,  
Third Military Medical University, Chongqing 400037, China. zouquan  
ming@mail.tmmu.com.cn  
Received: 2003-05-18 Accepted: 2003-06-06

## Abstract

AIM: To construct and express the fusion gene of *H pylori* heat shock protein A subunit (HspA) and *E.coli* heat-labile enterotoxin B subunit (LTb), and analyse the biologic and immunologic characteristics of the fusion protein.

METHODS: HspA gene was amplified from *H pylori* chromosome by PCR. The gene was cloned into plasmid pPLtB and the fusion gene of *H pylori* urease B subunit (HspA) and *E.coli* heat-labile enterotoxin B subunit (LTb) was constructed, and then LTb-HspA recombinant protein was expressed in *E.coli* JM109.

RESULTS: LtB-HspA fusion gene was found to be 684 base pairs and encode the recombinant fusion protein, which was composed of 228 amino acid residues. SDS-PAGE and Western blotting analysis showed that the recombinant fusion protein had a molecular weight of 25kD and a positive reaction with the serum from *H pylori*-infected patients. ELISA analysis showed that LTb protein existed in the fusion protein. At the same time, fusion protein kept the character of binding with LTb receptor-ganglioside GM<sub>1</sub>.

CONCLUSION: LTb-HspA recombinant protein may be used

for research of genetically engineered *H pylori* vaccine.

Guo H, Zou QM, Zhao XY, Wu C. Construction and expression of the fusion gene of *H pylori* HspA subunit and *E.coli* heat-labile enterotoxin B subunit. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003;11(10):1475-1479

## 摘要

目的: 构建和表达人幽门螺杆菌(*H pylori*)热休克蛋白 A 亚单位(HspA)与 *E. coli* 不耐热肠毒素 B 亚单位(LTb)的重组融合蛋白, 并对其基本的生物学及免疫学特性进行研究.

方法: 采用 PCR 技术从人 *H pylori* 染色体 DNA 中扩增出 354 bp 的 HspA 基因, 并克隆至 pPLtB 载体中与 LtB 基因融合, 形成含有 LtB - HspA 融合基因的原核表达载体 pPLH, 并在工程菌 *E.coli* JM109 中诱导表达.

结果: 经序列分析, LtB - HspA 融合基因由 684 个碱基组成, 为编码 228 个氨基酸残基的多肽. SDS-PAGE 和 Western blotting 检测发现, 融合蛋白的  $M_r$   $25 \times 10^3$ , 并与 *H pylori* 感染的阳性血清发生抗原抗体反应, ELISA 检测显示融合蛋白中存在 LTb 组分, 并保持与 LT 受体 - 神经节苷脂 GM<sub>1</sub> 结合的活性.

结论: LTb - HspA 融合蛋白有可能用于 *H pylori* 基因工程疫苗的研究.

郭红, 邹全明, 赵晓晏, 吴超. 幽门螺杆菌 HspA 与大肠杆菌 LTb 基因融合及表达. 世界华人消化杂志 2003;11(10):1475-1479

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1475.asp>

## 0 引言

幽门螺杆菌(*H.pylori*)与 B 型胃炎, 消化性溃疡, 胃黏膜相关淋巴组织 (MALT)淋巴瘤以及胃癌发生密切相关, WHO 已将其列为一类致癌物质<sup>[1-37]</sup>. *H pylori* 的致病性包括他的动力、黏附力、尿素酶、磷脂酶 A、热休克蛋白 (Hsp)和毒素, 毒素包括空泡细胞毒素(vacuolating cytotoxin A, VacA)和细胞毒素相关 A 蛋白(cytotoxin associated gene A protein, CagA)<sup>[38-48]</sup>. *H pylori* 的尿素酶 B 亚单位(UreB)、热休克蛋白 A 亚单位(HspA)和 VacA 均是有效的抗原成分, 作为疫苗免疫动物均已取得良好的免疫预防和治疗效果. 大肠杆菌不耐热肠毒素(LT)与 *H pylori* 的保护性抗原共同口服免疫后可起到预防和治疗 *H pylori* 感染的作用, 其中 B 亚单位以其无毒性和较好佐剂活性已得到高度重视<sup>[49-58]</sup>. 我们采用 PCR 技术克隆 *H pylori* HspA 并与 LtB 基因融合, 进行表达, 为研究其产物的免疫

学功能及LTB的分子内佐剂活性奠定了基础。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 质粒pFs2.2由F.schodel博士惠赠;原核表达载体PinPoint™Xa-III购自Promega公司;E.coli DH5α及E.coli JM109由本室保存,H pylori标准菌株NCTC11637购自中国预防科学研究所;各种工具酶购自宝灵曼公司;兔抗LT多抗血清购自上海市卫生防疫站,兔抗H pylori多抗血清本室制备;羊抗兔HRP酶标二抗,核酸相对分子质量标准、蛋白相对分子质量标准、IPTG购自华美公司;HRP标记的羊抗兔IgG抗体购自博士德公司;LT, GM<sub>1</sub>购自Sigma公司。根据Genebank公布的hLT基因序列,设计了两条引物分别为:上游引物5' ATCTG CAGGGAGTTACTCACATGGCTCCCCAGTCTATTAC 3',下游引物5' CGCGGATCCATCCTGAGGGTAGTTTT' 3。上游引物位于LTB DNA序列ATG下游64 bp位置,下游引物位于LTB 3'端终止子前面部分序列,同时引入Pst I和Bam HI酶切位点,并在LTB最后一氨基酸(Asn)残基密码子AAC与Bam HI酶切位点之间设计增加了编码YPQD的12个核苷酸。以含有ltB基因的质粒pFs2.2为模板进行PCR扩增。根据GenBank公布的H pylori HspA序列及实验目的设计扩增引物,分别在上游引物和下游引物5'端加入Bam HI和EcoR V酶切位点,由于靠近hspA基因终止密码子TAA处存在大量不利于引物设计的连续相同的碱基,故将下游引物设计到与终止密码子TAA后约130\*bp处的碱基相匹配。采用Net Primer引物分析软件评价设计引物,由上海生工公司合成,PAGE方式纯化。上游引物:5'-GTC GAT CCA AGT TTC AAC CAT TAG G-3'下游引物:5'-GCG ATA TCA CAG CGT CAT GGA GTT-3'。

**1.2 方法** LtB基因和H pylori HspA基因的PCR扩增:分别以含有ltBDNA的质粒pFs2.2和Hp NCTC1 1637基因组DNA为模板,按常规PCR条件进行扩增。反应条件:94℃预变性5 min,加入Taq DNA聚合酶,然后按如下参数循环:94℃,1 min,55℃,1 min,72℃,1 min,最后一个循环结束后72℃反应5 min。反应完毕后取产物3 μl,在10 g/L<sup>-1</sup>琼脂糖凝胶中进行电泳分析。融合基因表达载体的构建及DNA序列分析:LTB PCR产物经Pst I+Bam HI双酶切并纯化后与同样Pst I+Bam HI双酶切的PinPoint™Xa-III载体相连接,构建LTB融合表达质粒pPLtB,外源基因可通过pPLtB上多克隆位点插入,与ltB基因构成融合基因。质粒pPLtB和HspA PCR产物均用Bam HI和EcoR V酶切,用上海生工公司Silver Beads胶回收kits纯化回收DNA片段,将pPLtB/BamHI+EcoR V和PCR产物/BamHI+EcoR V在14-16℃连接16 h。连接产物转化E.coli DH5a,经氨苄青霉素抗性,质粒少量抽提电泳筛选,酶切鉴定,得到阳性重组子,命名为pPLH。用全自动测序仪进行序列分析。将重组表达质粒pPLH转化至E.coli JM109中,经IPTG诱

导后重组融合蛋白表达,SDS-PAGE电泳分析。重组融合蛋白的免疫学鉴定:Western-blotting检测按《精编分子生物学实验指南 ISBN 7-03-006408-9/Q.768》进行。所用一抗为兔抗H pylori抗血清(1:2 000倍稀释),二抗为辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG(1:3 000倍稀释),邻苯二胺显色。ELISA检测用重组菌诱导表达超声破碎物包被酶标板,10 g/L<sup>-1</sup>牛血清白蛋白封闭各孔,先后加入兔抗LT多抗(1:1 000)和HRP标记的羊抗兔IgG抗血清(1:10 000),邻苯二胺显色。重组融合蛋白的GM<sub>1</sub>-ELISA检测,按文献进行。

## 2 结果

采用PCR技术分别从质粒pFs2.2和H pylori基因组中扩增出ltB基因和HspA基因,大小与预计大小相符(图1)。

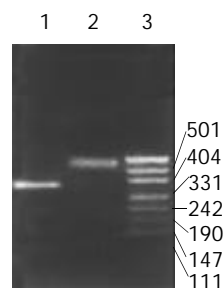


图1 琼脂糖凝胶电泳分析PCR产物。1 ltB PCR product; 2 hspA PCR product; 3 PCR marker。

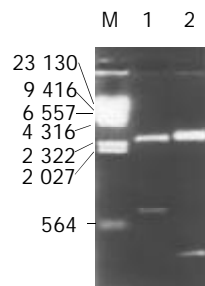


图2 重组质粒pPLH的双酶切鉴定图谱。Marker; 1. Positive recombinant plasmid pPLH PstI+EcoRV; 2. Positive recombinant plasmid pPLH PstI+BamHI。

**2.1 融合基因的构建与鉴定** LtB PCR产物经PstI+BamHI双酶切并纯化后与同样PstI+BamHI双酶切的PinPoint™Xa-III载体相连接,构建LTB融合表达质粒pPLtB。经Amp抗性筛选,碱裂解少量抽提和PstI+BamHI酶切鉴定,出现330 bp DNA片段的为阳性重组子(图2)。再通过多克隆位点中BamHI和EcoRV切点将HspA PCR产物定向克隆于pPLtB载体并与ltB基因形成ltB-HspA融合基因,得到重组质粒pPLH(图3),PstI+EcoRV酶切鉴定,出现约800 bp DNA片段的为阳性重组子(图2)。将克隆载体pPLH进行双向序列分析(图4),与GenBank中公布的相应基因序列相比较,结果表明融合基因中ltB基因序列的同源性为99.1% (327/330),推定氨基酸同源性为



99.1 %, 而 HspA 基因序列同源性为 96.3 % (341/354), 氨基酸同源性为 98.3 % (2/118). 整个融合基因仅有 2.33 % 的碱基差异和 1.3 % 的氨基酸不同.

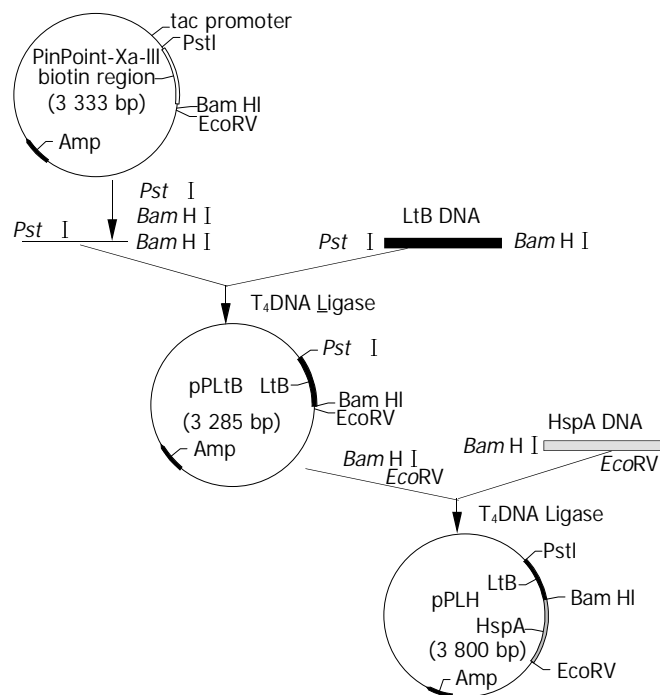


图3 重组质粒 pPLH 的构建示意图.

gct ccc cag tct att aca gaa cta tgt tcg gaa tat cgc aac aca caa ata tat acg ata  
A P Q S I T E L C S E Y R N T Q I Y T I  
aat gac aag ata cta tca tat aca gaa tcg atg gca ggc aaa aga gaa atg gtt atc att  
N D K I L S Y T E S M A G K R E M V I I  
aca ttt aag agc ggc gca aca ttt cag gtc gaa gtc ccg ggc agt caa cat ata gac tcc  
T F K S G A T F Q V E V P G S Q H I D S  
caa aaa aaa gcc att gaa agg atg aag gac aca tta aga atc aca tat ctg acc gag acc  
Q K K A I E R M K D T L R I T Y L T E T  
aaa att gat aaa tta tgt gta tgg aat aat aaa acc ccc aat tca att gcg gca atc agt  
K I D K L C V W N N K T P N S I A A I S  
atg gaa aac tac cct cag gat gga tcc aag ttt caa cca tta gga gaa agg gtc tta gta  
M E N Y P Q D G S K F Q P L G E R V L V  
gaa aga ctt gaa gaa gag aac aaa acc agt tca ggc att atc atc cct gat aac gct aaa  
E R L E E E N K T S S G I I I P D N A K  
gaa aag cct ttg atg ggc gta gtc aaa gcg gtt agc cat aaa atc agt gag ggt tgc aaa  
E K P L M G V V K A V S H K I S E G C K  
tgc gct aaa gaa ggc gat gtg atc gct ttt ggc aaa tat aaa ggt gca gaa atc gtt tta  
C A K E G D V I A F G K Y K G A E I V L  
gat ggc acc gaa tac atg gtg cta gaa cta gaa gac att ctg ggc att gtg ggt tca ggc  
D G T E Y M V L E L E D I L G I V G S G  
tct tgt tgt cat aca ggt aat cat gat cat aag cat gct aaa gag cat gaa gct tgc tgt  
S C C H T G N H D H D H A K E H E A C C  
cat gat cac aaa aaa cac taa  
H D H K K H \*

图4 LtB - HspA 融合基因的核苷酸序列及推定的氨基酸序列.

2.2 LtB - HspA 融合基因的表达 重组质粒 pPLH 在 E.coli JM109 中诱导表达后进行 SDS-PAGE 电泳, 可见新的蛋白条带出现, 与推定的融合蛋白  $M_r$  25 000 基本相符 (图 5). 重组 LTB - HspA 融合蛋白经 Western blotting 检测显示, 重组表达质粒在未经 IPTG 诱导和诱导后均在  $M_r$  25 000 处出现单一的阳性反应条带, 而其他对照均无阳性反应条带 (图 6). 证明融合蛋白中含有 HspA 组分. ELISA 检测显示融合蛋白包被孔呈明显的棕黄色, 而其他对照孔呈无色或淡黄色, 说明 LTB - HspA 融合蛋白中存在 LTB 组分. GM<sub>1</sub>-ELISA 检测结果显示, 融合蛋白组呈现阳性, 而其他组为阴性, 证明该蛋白保留与神经节苷脂 GM<sub>1</sub> 受体相结合的活性.

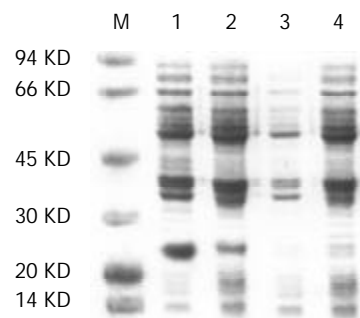


图5 重组质粒 pPLH 表达产物 SDS-PAGE 分析. M: Molecular weight marker; 1: E.coli JM109/pPLH after induction with IPTG; 2: E.coli JM109/pPLH before induction; 3: E.coli JM109/PinPoint™Xa-III after induction with IPTG; 4: E.coli JM109/PinPoint™Xa-III before induction.

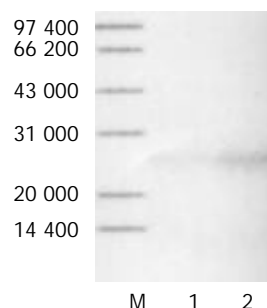


图6 重组 LTB - HspA 融合蛋白的免疫印迹分析. M: marker; 1:诱导前重组菌; 2:诱导 5 h 后重组菌.

### 3 讨论

幽门螺杆菌的热休克蛋白(Hsp)由于其特殊的结构和结合镍离子的特性, 已被认为是激发机体产生预防 H pylori 感染的最有效的抗原成分之一<sup>[59]</sup>, 可以作为基因工程疫苗的候选分子. 我们克隆出 H pylori 354 bp HspA 基因并与大肠杆菌 LtB 基因进行融合, 得到 LtB - HspA 融合基因. 经序列分析, 该融合基因由 684 个碱基组成, 包括 LtB 基因和 HspA 基因的序列, 其 LtB 基因序列与文献报道的序列相比较, 有 0.90 % (3/330) 的编码碱基发生变异, 但其推定的氨基酸序列完全相同, 同源性高达 99.1 %; 而 HspA 基因序列与 GenBank 公布的序列相比, 有 3.67 % (13/354) 的编码碱基发生变异, 其氨基酸序列中仅有 2 个氨基酸不同, 分别为 Val-51 变为 Ala-51 和 Val-73 变为

Thr-73, 同源性高达 98.3 %。整个融合基因约有 2.33 % (16/684) 的碱基差异和 1.3 % (3/228) 的氨基酸序列不同, 同源性极高, 为该融合基因的准确表达奠定了基础, 并且两个结构基因间仅存在 18 个非编码的碱基, 可以推测其编码的氨基酸将不会影响整个融合蛋白的免疫原性。为了使所构建的 Ltb-HspA 融合基因以天然蛋白形式表达, 特意将该融合蛋白表达载体中编码担体蛋白(tag)的一段 DNA 序列切去, 构建得到重组表达质粒 pPLH, 在工程菌 E.coli JM109 中经 IPTG 诱导表达后, 可见  $M_r$  25 000 的蛋白条带出现。Western blotting 检测目的条带处出现阳性反应, ELISA 试验呈现阳性。表明所表达蛋白为 LTB-HspA 融合蛋白, 且具有免疫反应性。大肠杆菌的不耐热肠毒素为一种外毒素物质, 可引起人和猪等家畜的严重腹泻, 其主要的毒性部位为 A 亚单位, 可通过 B 亚单位与肠黏膜上皮细胞膜上的神经节苷脂  $GM_1$  受体相结合进而发挥肠毒素活性。我们根据 LTB 可与神经节苷脂  $GM_1$  特异结合的特点, 建立  $GM_1$ -ELISA 方法, 检测证明了 LTB-HspA 融合蛋白中 LTB 的存在且具有与神经节苷脂  $GM_1$  进行特异性结合的生物学活性。同时以融合蛋白作为抗原包被酶标板后, 与 H pylori 感染患者的阳性血清发生抗原-抗体反应, 表明该融合蛋白保持了 HspA 原有的免疫反应性, 据此可将其用于 H pylori 感染患者的血清学检测与诊断。

大肠杆菌不耐热肠毒素(LT)除了具有毒素活性外, 更重要的是他还具有黏膜免疫原性和黏膜免疫佐剂性<sup>[60, 61]</sup>。LTB 亚单位既缺乏 LT 全毒素分子的毒性, 又保留了黏膜免疫佐剂的作用, 他与多种非相关的蛋白或非蛋白抗原经不同途径免疫均能明显增强机体的黏膜免疫反应, 故研究者们选用他作为口服疫苗的黏膜免疫佐剂。Weltzin 将重组 LTB 作为佐剂与尿素酶共同免疫小鼠, 发现可产生特异性的血清抗尿素酶 IgG1 和 IgG2a 以及唾液中的抗尿素酶 IgA, 以及对 H pylori 的保护性免疫<sup>[11]</sup>。大量实验研究证明, UreA, HspA 加 LT 通过黏膜途径免疫可获得有效的免疫保护性。将 LTB 与 HspA 构建成融合蛋白形式表达, 为进一步研究 LTB 的分子内佐剂性和整个蛋白的免疫原性奠定了基础。

#### 4 参考文献

- 1 卢世云, 施作霖, 潘秀珍, 彭孝伟. 幽门螺杆菌感染与胃黏膜上皮细胞增生和凋亡. 世界华人消化杂志 1999;7:975-977
- 2 卢世云, 潘秀珍, 彭孝伟, 施作霖. 幽门螺杆菌感染对胃病细胞动力学的研究. 世界华人消化杂志 1999;7:760-762
- 3 梁后杰, 高晋华, 刘为纹, 房殿春, 门荣甫. 幽门螺杆菌培养滤液长期作用下大鼠胃黏膜组织学的变化. 世界华人消化杂志 1999;7:861-863
- 4 胡品津. 幽门螺杆菌与胃癌: 研究面临的挑战. 世界华人消化杂志 1999;7:1-2
- 5 黄品川, 陈彩凤, 程荣墀, 叶蕤, 卢惟纯. 消化性溃疡及胃癌患者血清 CagA VacA 抗体研究. 世界华人消化杂志 1999;7:917-918
- 6 华杰松. 幽门螺杆菌: 细胞增生和细胞凋亡在胃癌发生中的作用. 世界华人消化杂志 1999;7:647-648
- 7 司君利, 刘吉勇, 元玉琴. 幽门螺杆菌感染与胃黏膜端粒酶活性关系的研究. 世界华人消化杂志 1999;7:429-430
- 8 Go MF. Review article: natural history and epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther* 2002;16

- (Suppl 1): 3-15
- 9 高华, 袁媛, 吴烨秋, 王兰, 董明, 张忠. 根除 Hp 对增生细胞核抗原 P53 蛋白表达的影响. 世界华人消化杂志 1999;7:995-996
- 10 全俊, 范学工. 幽门螺杆菌感染与胃癌发生的实验研究进展. 世界华人消化杂志 1999;7:1068-1069
- 11 庄则豪, 陈玉丽, 王承党, 陈奕贵. 胃黏膜组织幽门螺杆菌感染与 TGF- $\beta$ 1 表达的关系. 世界华人消化杂志 1999;7:1090-1091
- 12 高利利, 梁浩, 纪小龙. 幽门螺杆菌相关性胃 MALT 淋巴瘤的发病机制及治疗. 世界华人消化杂志 1999;7:789-790
- 13 夏华向, 张贵水. 细胞凋亡与增生在幽门螺杆菌感染致胃癌中的重要作用. 世界华人消化杂志 1999;7:740-742
- 14 聂昭华, 祝扬, 张敏, 赵源, 耿玉兰, 曹颖, 陈秀珍. Hp(+)DU 患者外周血 T 淋巴细胞亚群与胃黏膜组织急性炎症的关系. 世界华人消化杂志 2000;8:590-592
- 15 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. 世界华人消化杂志 2000;8:219-220
- 16 何兴祥, 王家马, 吴捷莉, 袁顺玉, 艾莉. 胃黏膜癌变过程中幽门螺杆菌感染与端粒酶活性的表达. 世界华人消化杂志 2000;8:505-508
- 17 汪荣泉, 房殿春, 刘为纹, 罗云辉. 幽门螺杆菌感染胃癌和癌旁组织中 MRC1 和 MUC6 基因表达的关系. 世界华人消化杂志 2000;8:584-585
- 18 庄小强, 林三仁. 幽门螺杆菌与胃癌的研究进展. 世界华人消化杂志 2000;8:206-207
- 19 庄小强, 林三仁. 胃癌及癌前病变中幽门螺杆菌分布的感染研究. 世界华人消化杂志 2000;8:710-711
- 20 姚金锋, 姚希贤. 慢性萎缩性胃炎与幽门螺杆菌感染的关系. 世界华人消化杂志 2000;8:1042-1045
- 21 王承党, 黄海辉, 陈玉丽. 幽门螺杆菌感染对消化性溃疡患者胃 G, D 细胞的影响. 世界华人消化杂志 2000;8:847-850
- 22 刘海峰, 刘为纹, 房殿春, 杨仕明, 赵丽. 幽门螺杆菌诱导胃黏膜上皮细胞凋亡与 Bax 蛋白的表达. 世界华人消化杂志 2000;8:860-862
- 23 黄梅芳, 朱尤庆, 张春香, 刘珊, 黄星, 邓长生. Hp 感染对胃黏膜增生, DNA 含量及癌基因表达的影响. 世界华人消化杂志 2000;8:1057-1059
- 24 Sokucu S, Suoglu OD, Turkkan E, Elkabes B, Ozden T, Saner G. *Helicobacter pylori* infection in Turkish children with gastrointestinal symptoms and evaluation of serology. *Turk J Pediatr* 2002;44:102-108
- 25 聂昭华, 祝扬, 张敏, 陈秀珍. Hp(+)DU 胃黏膜组织中的 T 淋巴细胞亚群. 世界华人消化杂志 2000;8:1303-1305
- 26 张万岱, 徐智民. 幽门螺杆菌研究现状及共识. 世界华人消化杂志 2000;8:1084-1088
- 27 顾金柱, 侯天文, 王晓熙. 幽门螺杆菌致胃黏膜癌前期病变的横断研究. 世界华人消化杂志 2001;9:111
- 28 陆和平, 郑银宝. 肠化生, 胃癌组织中幽门螺杆菌感染与 ras 基因表达. 世界华人消化杂志 2001;9:218-219
- 29 吕其军, 吴玉娥, 李玉生, 李淑霞. 十二指肠球部幽门螺杆菌定植与细胞增生及溃疡形成的关系. 世界华人消化杂志 2001;9:472-473
- 30 钟慧闽, 宋健, 姚萍, 尹成才. 幽门螺杆菌阳性胃癌 P53 和 Fas 的表达意义. 世界华人消化杂志 2001;9:456-457
- 31 张焜和, 王崇文. 幽门螺杆菌相关性胃炎的胃肠动力改变. 世界华人消化杂志 2001;9:422-426
- 32 陈世耀, 王吉耀, 纪元, 张希德, 朱畴文. 幽门螺杆菌与蛋白激酶 C 在胃癌及癌前病变基因突变中的作用. 世界华人消化杂志 2001;9:302-307
- 33 宋春芳, 袁媛. 细胞凋亡与胃癌及幽门螺杆菌相关胃疾病. 世界华人消化杂志 2002;10:427-429
- 34 王东旭, 房殿春, 李为, 杜群先, 刘为纹. 胃幽门螺杆菌感染与抑癌基因失活的关系. 世界华人消化杂志 2001;9:984-987
- 35 顾掌生, 吴巍. 幽门螺杆菌在胃外疾病中作用. 世界华人消化杂志 2002;10:459-464
- 36 林敏娟, 阳惠湘. 幽门螺杆菌感染患者白介素 -8 及白介素 - $\beta$  的变化. 世界华人消化杂志 2002;10:478-480
- 37 孙善明, 李国庆, 丰义宽, 张玉英, 田强, 刘丽娜. Hp+ 胃炎黏膜 iNOS, NO 的表达及意义. 世界华人消化杂志 2001;9:1459-1461
- 38 韩锋产, 阎小君, 侯瑜, 肖乐义, 郭晏海, 苏成芝. 胶体金免疫层析法检测抗幽门螺杆菌细胞毒素相关蛋白 A 抗体. 世界华人消化杂志

- 志 1999;7:743-745
- 39 张玲霞, 张沥, 张宁霞, 刘永国, 阎小君, 韩锋产, 侯瑜. 西安市儿童 CagA 阳性幽门螺杆菌感染血清流行病学调查. 世界华人消化杂志 1999;7:702-703
- 40 潘秀珍, 陈明红. 幽门螺杆菌的毒力研究与分型. 世界华人消化杂志 2000;8:551-553
- 41 郭浩岩, 张建中. 幽门螺杆菌黏附素研究进展. 世界华人消化杂志 2000;8:690-692
- 42 张玲霞, 张沥, 刘永国, 张宁霞, 阎小君, 韩锋产, 侯瑜. 幽门螺杆菌细胞毒素相关蛋白 A 与胃十二指肠溃疡关系的病例对照研究. 世界华人消化杂志 2000;8:733-736
- 43 江红, 阎小君, 苏成芝, 韩锋产, 冯永强, 侯瑜. 幽门螺杆菌 vacA 基因毒性相关片段的克隆及序列分析. 世界华人消化杂志 2000;8:728-732
- 44 胡维杰, 李宁生, 王淑丽, 刘炯, 屠振兴, 许国铭. 中国人感染幽门螺杆菌中检出 cag I 的结构差异. 世界华人消化杂志 2001;9:405-409
- 45 Gotteland M, Corvalan A, Sarmiento F, Chavez E, Backouse C, Palma M, Kakarieka E, Vial MT, Figueroa G. Gastric permeability is not increased in children colonized by CagA-positive strains of *Helicobacter pylori*. *Dig Liver Dis* 2001;33:750-754
- 46 尹焱, 张建中, 孙兆军. 幽门螺杆菌 HSPB 基因的克隆与序列分析. 世界华人消化杂志 2001;9:348-350
- 47 姚永莉, 张万岱. 幽门螺杆菌致病因子研究进展. 世界华人消化杂志 2002;10:455-458
- 48 李炯君, 阎小君, 刘智广, 苏成芝. 幽门螺杆菌细胞毒素相关抗原 A 的表达纯化及其临床研究. 世界华人消化杂志 2002;10:271-274
- 49 吴超, 邹全明, 郭红, 张卫军, 袁小澎, 毛旭虎. 幽门螺杆菌 UreB 与大肠杆菌 LTB 基因融合及表达的研究. 中华微生物学和免疫学杂志 2002;22:175-179
- 50 郭学青, 邹全明. 霍乱毒素及大肠杆菌不耐热肠毒素生物学特性的研究. 世界华人消化杂志 2000;8:325-326
- 51 毛旭虎, 邹全明, 许霖水. 大肠杆菌不耐热肠毒素的分子生物学特性. 国外医学·临床生物化学与检验学分册 2000;21:228-229
- 52 王缚鲲, 于长青, 邹全明. 聚合物微粒包裹幽门螺杆菌疫苗的研究. 世界华人消化杂志 2000;8:452-453
- 53 吴超, 邹全明. 幽门螺杆菌黏膜疫苗的研究进展. 世界华人消化杂志 2000;8:203-205
- 54 Dundon WG, Nishioka H, Polenghi A, Papinutto E, Zanotti G, Montemurro P, Del GG, Rappuoli R, Montecucco C. The neutrophil-activating protein of *Helicobacter pylori*. *Int J Med Microbiol* 2002;291:545-550
- 55 Londono-Arcila P, Freeman D, Kleanthous H, O' Dowd AM, Lewis S, Turner AK, Rees EL, Tibbitts TJ, Greenwood J, Monath TP, Darsley MJ. Attenuated salmonella enterica serovar Typhi expressing urease effectively immunizes mice against *Helicobacter pylori* challenge as part of a heterologous mucosal priming parenteral boosting vaccination regimen. *Infect Immun* 2002;70:5096-5106
- 56 Raghavan S, Svennerholm AM, Holmgren J. Effects of oral vaccination and immunomodulation by cholera toxin on experimental *Helicobacter pylori* infection, reinfection, and gastritis. *Infect Immun* 2002;70:4621-4627
- 57 Keller WC, Michetti P. Vaccination against *Helicobacter pylori*—an old companion of man. *Expert Opin Biol Ther* 2001;1:795-802
- 58 Nilsson CL. Bacterial proteomics and vaccine development. *Am J Pharmacogenomics* 2002;2:59-65
- 59 Figura N, Piomboni P, Ponzetto A, Gambera L, Lenzi C, Vaira D, Peris C, Lotano MR, Gennari L, Bianciardi L, Renieri T, Valensin PE, Capitani S, Moretti E, Colapinto R, Baccetti B, Gennari C. *Helicobacter pylori* infection and infertility. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002;14:663-669
- 60 De Haan L, Verweij WR, Feil IK, Holtrop M, Hol WG, Agsteribbe E, Wilschut J. Role of GM1 binding in the mucosal immunogenicity and adjuvant activity of the *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin and its B subunit. *Immunology* 1998;94:424-430
- 61 Weltzin R, Guy B, Thomas WD Jr, Giannasca PJ, Monath TP. Parenteral adjuvant activities of *Escherichia coli* heat-labile toxin and its B subunit for immunization of mice against gastric *Helicobacter pylori* infection. *Infect Immun* 2000;68: 2775-2782



# 人幽门螺杆菌热休克蛋白 A 编码基因的克隆、表达及抗原性研究

姜 政, 蒲 丹, 黄爱龙, 陶小红, 王丕龙

姜政, 蒲丹, 陶小红, 王丕龙, 重庆医科大学第一附属医院消化科  
重庆市 400016  
黄爱龙, 重庆医科大学肝炎研究所 重庆市 400010  
姜政, 男, 1965-06-06, 四川武胜人, 汉族, 1989年重庆医科大学本科毕业, 1994年重庆医科大学硕士研究生毕业, 现攻读2000级博士研究生, 副教授, 主要从事胃肠疾病的研究。  
项目负责人: 姜政, 400016, 重庆市渝中区医学院路1号, 重庆医科大学第一附属医院消化科。 Jianggooddoctor@mailchina.com  
电话: 023-68891218  
收稿日期: 2002-11-29 接受日期: 2002-12-27

## Cloning, expression and antigenic analysis of heat shock protein A gene of human *Helicobacter pylori*

Zheng Jiang, Dan Pu, Ai-Long Huang, Xiao-Hong Tao, Pi-Long Wang

Zheng Jiang, Dan Pu, Xiao-Hong Tao, Pi-Long Wang, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China  
Ai-Long Huang, Institute of Viral Hepatitis, Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China  
Correspondence to: Dr. Zheng Jiang, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China. jianggooddoctor@mailchina.com  
Received: 2002-11-29 Accepted: 2002-12-27

## Abstract

**AIM:** To construct a recombinant vector containing gene encoding heat shock protein A with a  $M_r$  of 13 000 from human *Helicobacter pylori* (*H pylori*) and express it in *E. coli* BL21, and to explore the antigenicity.

**METHODS:** The target gene was amplified from *H pylori* chromosome by PCR, and then inserted into the prokaryotic expression vector pET32a (+) digested by restrictive endonuclease enzymes of *kpn* I, *Bam*H I simultaneously. The recombinant vector was transformed and expressed in *E. coli* BL21. The antigenicity of recombinant fusion protein was analysed by Western blot.

**RESULTS:** Enzyme digestion and sequencing analysis showed that the target gene has been inserted into the recombinant vector, but as compared with the gene reported by GenBank, 1.6 % of gene mutation and 1.6 % of amino acid residues change in *H pylori* occurred, respectively. SDS-PAGE analysis showed that the recombinant vector could be expressed in *E. coli* BL21, the relative molecular mass ( $M_r$ ) of expressed product was  $33 \times 10^3$ , while  $M_r$  of protein expressed by pET32a (+) was about  $20 \times 10^3$ , and soluble fusion expression product accounted for 18.96 % of total bacterial protein. After purification with  $Ni^{2+}$ -NTA agarose resin, the purity of recombinant fusion protein was about

95 %. Western blot result showed that recombinant fusion protein could be recognized by anti-*H pylori* positive serum, suggesting that the protein had good antigenicity.

**CONCLUSION:** The gene encoding *H pylori* heat shock protein A has been cloned and expressed successfully. The results lay the foundation for development of *H pylori* protein vaccine and a quick diagnostic kit for detection of *H pylori* infection.

Jiang Z, Pu D, Huang AL, Tao XH, Wang PL. Cloning, expression and antigenic analysis of heat shock protein A gene of human *Helicobacter pylori*. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003;11(10):1480-1484

## 摘要

**目的:** 构建含人幽门螺杆菌(*H pylori*)热休克蛋白A编码基因的重组载体、进行核苷酸序列分析,并在*E. coli* BL21中表达,研究其抗原性,为疫苗的开发奠定基础。

**方法:** 利用分子克隆技术从*H pylori* DNA染色体中,扩增热休克蛋白A编码基因片段;将目的基因与载体pET32a(+)同时经*kpn* I、*Bam*H I双酶切、纯化、连接后,转化含有目的基因的重组载体;以含目的基因片段的重组载体转化大肠杆菌BL21(DE30)并表达;表达产物经纯化后,用Western blot法检测其抗原性。

**结果:** 经酶切、测序分析表明,插入的基因片段为*H pylori*热休克蛋白A编码基因,与GenBank报道的相比较,有1.6 %的碱基(bp)发生变异,1.6 %的氨基酸残基改变。经SDS-PAGE分析发现,融合基因表达的蛋白 $M_r$ 为 $33 \times 10^3$ ,其中pET32a(+)表达的蛋白 $M_r$ 约为 $20 \times 10^3$ ,可溶性表达产物占全菌总蛋白的18.96 %。重组蛋白经 $Ni^{2+}$ -NTA琼脂糖树脂纯化后,其纯度达95 %以上。用Western blot方法检测显示,该重组蛋白可被*H pylori*阳性患者的血清所识别,具有良好的抗原性。

**结论:** 成功地克隆并表达了*H pylori*热休克蛋白A基因,为*H pylori*蛋白质疫苗的研制和快速诊断试剂盒的研究奠定了良好的基础。

姜政, 蒲丹, 黄爱龙, 陶小红, 王丕龙. 人幽门螺杆菌热休克蛋白A编码基因的克隆、表达及抗原性研究. 世界华人消化杂志 2003;11(10):1480-1484  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1480.asp>

## 0 引言

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H pylori*)是人类最常见

的致病菌, 我国普通人群的感染率为 50-80 %, 仍以每年 1-2 % 的速度增加<sup>[1]</sup>, 每年新增感染人数近千万. *H pylori* 感染不但与消化性溃疡、MALT 淋巴瘤、胃癌的发生有密切关系<sup>[2-7]</sup>, 而且与肠道外疾病的发生也有显著的作用<sup>[8-15]</sup>, 故已被世界卫生组织国际癌症研究机构列入第一类致癌原<sup>[16]</sup>. 根除 *H pylori* 的感染目前采取的方式很多: 比如药物的二联、三联以及四联疗法, 虽然可以达到治疗消化道疾病的目的, 同时也不同程度的根除 *H pylori* 的感染, 但近年来, 由于广泛的、大剂量的抗生素应用, 导致了 *H pylori* 耐药菌株的产生; 同时出现了一些药物副作用; 而且患者耐受性、依从性以及承受力都受到了挑战. 鉴于此, 欲求降低 *H pylori* 感染率及其相应疾病的发生率, 不少研究工作者正致力于开发研究新的 *H pylori* 治疗以及预防方案: *H pylori* 疫苗的开发. 疫苗的研制已成为全球研究的热点, 美国已将其列为 21 世纪疫苗优先发展的 II 类项目, 有人预测在 2010 年, *H pylori* 疫苗将有选择地应用于人群的预防和临床治疗. 新近研究表明: *H pylori* 的尿素酶、热休克蛋白 A(HspA)、中性粒细胞激活蛋白、黏附素、空泡细胞毒素、细胞毒素相关 A 蛋白以及 Mr 为 18 000、26 000 OMP 均是有效的抗原成分<sup>[17-34]</sup>. 而 HspA 为所有的 *H pylori* 共同的抗原成分, 用作疫苗抗原可使 70-80 % 试验小鼠获得保护, 由于 *H pylori* 属微需氧菌, 培养条件高, 难以获得大量天然的 HspA, 因此, 我们采用基因克隆技术, 将 HspA 编码基因, 经 PCR 扩增后, 构建重组载体, 在 *E. coli* 中进行表达, 为 *H pylori* 疫苗的研制及快速诊断试剂盒的制备奠定基础.

## 1 材料和方法

1.1 材料 *H pylori* 由本校微生物学教研室提供; Top10、BL21(DE3)菌株和 pET32a(+)载体, 为本校病毒性肝炎研究所保存; T<sub>4</sub> DNA 连接酶和限制性内切酶(kpnI 和 BamH I)购自 Promega 公司; Taq DNA 聚合酶为 Takara 产品; dNTP 为上海生工生物工程公司产品; IPTG 为 sigma 公司产品; PE-2400 型 PCR 为美国 PE 公司产品. 参考文献[33]提取 *H pylori* 基因组 DNA, 取 *H pylori* 培养物 1.5 mL, 以 12 000 r/min 离心 2 min; 取沉淀, 加入 TE 缓冲液 567  $\mu$ L 混悬, 再加入 100 g/L SDS 30  $\mu$ L 和 20 g/L 蛋白酶 K 3  $\mu$ L, 于 37  $^{\circ}$ C 温育 1h; 而后依次加入 5 mol/L NaCl 100  $\mu$ L 和 100 g/L SDS 80  $\mu$ L, 于 65  $^{\circ}$ C 温育 10 min. 用酚及酚/氯仿各抽提 3 次, 收集上清液转入 EP 管中, 加入 0.6 倍于上清液的异丙醇, 并以 12 000 r/min 离心 15 s. 取沉淀, 加入 700 mL/L 乙醇 1 mL 洗涤, 再以 12 000 r/min 离心 5 min, 弃掉上清, 将沉淀溶于 100  $\mu$ L TE 中, 于 -20  $^{\circ}$ C 保存备用.

1.2 方法 热休克蛋白 A(HspA)编码基因的扩增, 根据 GenBank, 经微机分析设计扩增 HspA 编码基因的引物 P1 和 p2, P1 的序列为 5' -CCGGTACC-ATGAAGTTTCAACCATTAGG-3'; P2 为 5' -CCGGATCC-GTGT

TTTTGTGATCATGAC-3'. P1 引物中引入 kpnI 酶切位点, P2 引物中引入 BamH I 酶切位点. 在 50  $\mu$ L 反应体系中, 分别加入 dNTP 1  $\mu$ L, DNA(作为模板) 2  $\mu$ L 及浓度各为 18  $\mu$ mol/L 的 P1 和 P2 引物各 1  $\mu$ L, 以及 Taq DNA 聚合酶 1  $\mu$ L, 按照以下条件进行 PCR 扩增, 即 94  $^{\circ}$ C 变性 7 min, 然后 94  $^{\circ}$ C 变性 1 min, 52  $^{\circ}$ C 退火 50 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 50 s, 最后 1 个循环结束后再 72  $^{\circ}$ C 延伸 7 min, 共 35 个循环. 所获 PCR 产物进行 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 同时进行 10 g/L 琼脂糖凝胶回收. 将纯化的 PCR 产物和载体 pET32a(+), 分别以 kpnI 和 BamH I 双酶切, 并用 PCR 纯化试剂盒进行纯化; 将酶切纯化的目的基因和 pET32a(+)按 4:1 (摩尔数)比例, 并在 4  $^{\circ}$ C 条件下连接过夜; 同时根据文献[33]制备 Top10 感受态菌: 取 Top10 菌的过夜培养物 50  $\mu$ L, 加于 LB 培养液 2 mL 中, 以 300 r/min 摇荡 3 h, 然后在室温下以 10 000 r/min 离心 2 min. 弃上清, 加入 100 mmol/L CaCl<sub>2</sub> 150  $\mu$ L 混悬, 置 0  $^{\circ}$ C 冰水浴中 2 h, 而后加入连接产物 10  $\mu$ L 混悬, 依次于 0  $^{\circ}$ C 冰水浴中 30 min、42  $^{\circ}$ C 水浴中 2 min 及冰水浴中 2 min; 加入 1 mL LB 培养液, 于 37  $^{\circ}$ C 孵育 30 min; 取 200  $\mu$ L 培养物, 涂于 LB+ 氨苄青霉素 100 mg/L 平皿, 于 37  $^{\circ}$ C 过夜. 于次日挑选单个菌落, 接种于 2 mL LB+ 氨苄青霉素 100 mg/L 培养液中, 于 37  $^{\circ}$ C 以 250 r/min 培养 12 h. 重组载体的提取, 按照上海生物工程公司出版的 DNA 抽提纯化操作手册进行, 同时进行酶切鉴定和基因测序分析.

1.2.1 重组载体 pET32a(+)/HspA 在 *E. coli* 中的表达 以酶切鉴定的重组载体转化 *E. coli* BL21, 随后挑选含重组载体的单个菌落接种于盛有 LB 培养基的试管(含氨苄青霉素 100 mg/L)中. 于 37  $^{\circ}$ C 培养至 A<sub>600</sub>=0.4-0.6 时, 加入终浓度为 1.0 mmol/L 的 IPTG, 诱导表达 4 h, 以 10 000 r/min 离心 2 min. 收集菌体, 加入等体积蛋白上样缓冲液, 煮沸 5 min, 进行 150 g/L SDS-PAGE, 筛选高表达的含重组质粒的单个菌落, 以获得大量的重组蛋白.

1.2.2 表达产物的纯化及活性检测 由于融合蛋白的 C 端融合了 6 个组氨酸, 故表达产物采用 Ni<sup>2+</sup>-NTA 琼脂糖树脂进行纯化. 将 500 mL LB 培养基制备的细菌, 混悬于超声破碎液(50 mmol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 和 300 mmol/L NaCl, pH 7.0)10 mL 中, 在 35 %  $\times$  600 v 的低温条件下, 超声破碎 40 min, 以 4  $^{\circ}$ C 10 000 r/min 离心 15 min, 取上清液过 Ni<sup>2+</sup>-NTA 琼脂糖树脂柱, 先以洗涤液(50 mmol/L 磷酸盐缓冲液、300 mmol/L NaCl 及 20 mmol/L 咪唑, pH 7.8)10 mL 洗涤 2 次, 然后以洗脱液(50 mmol/L 磷酸盐缓冲液、300 mmol/L NaCl, 250 mmol/L 咪唑, pH 7.8)10 mL 洗脱, 并分 3 段收集. 分别取 3 段收集液各 10  $\mu$ L, 以等量 2  $\times$  蛋白上样缓冲液混匀后, 煮沸 5 min, 进行 150 g/L SDS-PAGE. 采集 *H pylori* 阳性患者的血清作为一抗, 辣根过氧化物酶标记的羊抗人血清(IgG)为二抗, 以 western blot 方法, 检测目的蛋白的生物学活性.

## 2 结果

**2.1 热休克蛋白 A(HspA)编码基因的扩增** 以 *H. pylori* 基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增. 所获 PCR 产物进行 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳分析(图 1). 结果表明, PCR 扩增产物位于 250-500 bp 之间. 序列分析证实, PCR 扩增产物, 即为所需要的目的基因片段, 其大小约为 357 bp.

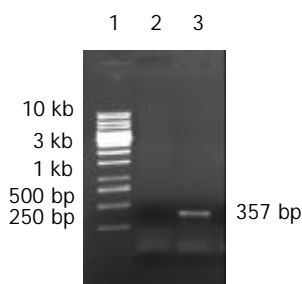


图1 HspA 编码基因 PCR 产物的 1 % 琼脂糖凝胶电泳分析. 1: DNA Marker; 2: Negative control; 3: PCR products of HspA gene.

**2.2 重组载体的酶切鉴定** 分别以重组载体和含重组载体的 Top10 菌为模板, 按照上述 PCR 扩增条件进行 PCR 扩增, 反应体系 25  $\mu$  L, 共 35 个循环. 所获 PCR 产物进行 10g/L 琼脂糖凝胶电泳, 结果显示: 以重组载体和含重组载体的 Top10 菌为模板, 均能扩增出 1 条约

为 357 bp 的带(图 2), 与实验设计相一致. 说明重组载体构建成功.

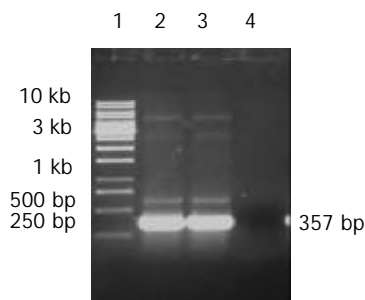


图2 重组载体的 PCR 鉴定. 1: DNA marker; 2: PCR product with the template of pET32a(+)/HspA; 3: PCR product with the template of Top10/pET32a(+)/HspA; 4: Negative control.

**2.3 HspA 基因片段的序列分析** 将重组载体以 T7 为引物进行序列分析(上海基康生物有限公司), 并采用电脑 DNA 分析辅助软件, 对所测定的 DNA 序列进行同源性分析. 结果发现, 插入的基因片段为 HspA 基因的片段, 其中有 6 个 bp 发生变异, 另有 2 处编码的氨基酸残基发生变化, 一处由 G  $\rightarrow$  D, 一处由 A  $\rightarrow$  S, 但 HspA 的特性无明显改变, 其同源性高达 98 %. 关于克隆的编码 HspA 基因及表达的目的蛋白的序列见其后.

```

357a 1          ATGAAGTTTCAACCATTAGGAGAAAGGGTCTTAGTAGA 38
cx 477 ATGGACAGCCCAGATCTGGGTACCATGAAGTTTCAACCATTAGGAGAAAGGGTCTTAGTAGA 544

357a 39 AAGACTTGAAGAAGAGAAACAAAACCAGTTCAGGCATCATCATCCCTGATAACGCTAAAGAAAAGCCTT 106
cx 545 AAGACTTGAAGAAGAGAAACAAAACCAGTTCAGGCATCATCATCCCTGATAACGCTAAAGAAAAGCCTT 612

357a 107 TAATGGGCGTAGTCAAAGCGGTTAGCCATAAAATCAGTGAGGGTTGCAAATGCGTTAAAGAAGGCGAT 174
cx 613 TAATGGGCGTAGTCAAAGCGGTTAGCCATAAAATCAGTGAGGGTTGCAAATGCGTTAAAGAAGGCGAT 680

357a 175 GTGATCGCTTTTGGCAAATACAAAGGCGCAGAAATCGTTTTAGATGGCGTTGAATACATGGTGCTAGA 242
cx 681 GTGATCGCTTTTGGCAAATACAAAGGCGCAGAAATCGTTTTAGATGGCGTTGAATACATGGTGCTAGA 748

357a 243 ACTAGAAGACATTCTAGGTATTGTGGGCTCAGGCTCTTGCTGTCATACAGGTAATCATGATCATAAAC 310
cx 749 ACTAGAAGACATTCTAGGTATTGTGGGCTCAGGCTCTTGCTGTCATACAGATAGTCATGACCATAAAC 816

357a 311 ATGCTAAAGAGCATGAAGCTTGCTGTCATGATCACAAAAAACACTAA 357
cx 817 ATGCTAAAGAGCATGAATCTTGCTGTCATGATCACAAAAAACACGGATCCTCGAGCTCCGTCGA 884
  
```

357 a 为 GenBank 中 HspA 的序列, CX 为本实验所得序列, 划线部分为酶切位点.

**2.4 重组载体在 E.coli 中的表达** 从重组载体 pET32a(+)/HspA 转化的 E.coli BL21 中, 筛选高效表达菌株. 将含有重组载体的单个菌落置于 LB 培养液(含氨苄青霉素 100 mg/L)中, 于 37  $^{\circ}$ C 培养至  $A_{600}=0.4-0.6$  时, 加入终浓度为 1.0 mmol/L 的 IPTG 诱导表达 4 h, 以 10 000 r/min, 离心 5 min. 收集菌体, 进行 150 g/L SDS-PAGE. 结果发现, 经 IPTG 诱导后, 可高效表达 Mr 为 33 000 的融合蛋白(图3). 通过 Imagemaster totallab v1.11 软件进行凝胶自动扫描分析, 融合蛋白的表达量约占菌体总蛋

白的 18.96 %. 将 500 mL LB(含氨苄青霉素 100 mg/L)培养基制备的菌体, 溶于超声波缓冲液中, 破碎细菌、离心以及  $Ni^{+}$ -NTA 琼脂糖树脂柱纯化, 通过 SDS-PAGE 以及 Imagemaster totallab v1.11 软件进行凝胶自动扫描分析, 获得纯度达 95 % 以上的终产物.

**2.5 用 western blot 方法检测 HspA 表达产物的抗原性** 将诱导培养的 BL21/pET32a(+), BL21/pET32a(+)/HspA 细菌各取 1 mL, 离心, 在沉淀中加入蛋白上样缓冲液, 煮沸 5 min, 进行 150 g/L SDS-PAGE 电泳, 而



后在以电压 14 V, 4 °C 的条件下, 进行电转 8-12 h, 再将 PVDF 膜进行封闭、洗涤, 加入 *H pylori* 阳性患者的血清作为一抗, 同时以 HRP 标记的羊抗人 IgG 作为二抗(1:1 000)进行 western blot 检测. 结果显示, 在 BL21/pET32a(+)/HspA 的泳道上相应于其表达产物相对分子质量的地方出现了棕色的条带, 而 BL21/pET32a(+) 的泳道上未出现任何条带(图 4).

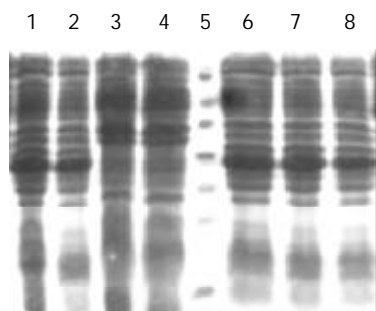


图 3 重组载体在 BL21 中表达的全菌蛋白的 150g/L SDS-PAGE 分析. 1, 2, 6-8: Expression of recombinant vector in BL21 after induction of 4h with IPTG; 3: Bacterial protein expressed in BL21 after induction of 4 h with IPTG; 4: Expression of pET32a(+) in BL21; 5: Standard protein marker(Mr 14.2; 20.1; 24; 29; 36; 45; 66X10<sup>3</sup>).



图 4 用 western blot 方法检测表达产物的抗原性. 1. BL21/pET32a(+); 2. BL21/pET32a(+)/HspA.

### 3 讨论

热休克蛋白, 其广泛存在于人、动物、微生物和植物细胞内, 主要在细胞内发挥功能, 占细胞内总蛋白的 5%, 属高度保守的应激蛋白质<sup>[35-38]</sup>. 而 *H pylori* 合成的热休克蛋白 - 热休克蛋白家族 HspA、B、Hsp60、Hsp70 等, 在细菌的致病机制中起着重要的角色, 同时能显著增强 *H pylori* 尿素酶的活性. 编码热休克蛋白 A、B 的 DNA 疫苗, 分别接种 C57BL 小鼠: 接种 pcDNA3.1-HspA 小鼠产生了 IgG2a, 而接种 pcDNA3.1-HspB 则产生 IgG1/IgG2a, 他们都显著地减少 *H pylori* 在胃内的定植, 同时减轻因 *H pylori* 存在的炎症反应. 因而, 作者认为, 以热休克蛋白为基础的(核酸 DNA, 或蛋白质)疫苗不失为一种有效的 *H pylori* 疫苗.

鉴于此, 我们将 *H pylori* HspA 编码基因进行了克隆、构建了重组载体并进行了表达. 克隆 HspA 编码基因有 1.6% (6/357) 的碱基发生变异, 约 1.6% (2/119) 的氨基酸残基发生改变, 据文献<sup>[33]</sup>报道, 可能的原因有: (1)所采用的 *H pylori* 菌种不同; (2)*H pylori* 具有转化能力, 能够通过已死亡的 *H pylori* DNA 转化而致基因组发生重排导致基因变异. (3)由 *H pylori* 菌株间的变异引起. 不同的患者感染的 *H pylori* 具有其特殊的限制性片段长

度多态性(RFLP)谱型, 尤其是不同地区差别更加明显, 通常有好几个片段的差异, 但其高度的同源性又决定了不同菌株间编码蛋白的主要抗原决定簇的一致性, 从而保证了重组载体的表达. (4)PCR 扩增所致的错配现象. 由于 *H pylori* HspA 编码基因编码 119 个氨基酸残基, 其多肽 *M<sub>r</sub>* 约 13 000 道尔顿, 分子量较小, 故我们采用原核表达载体 pET32a(+), 其主要特点是, 除能够编码 6 个组氨酸残基外, 还带有大肠杆菌 TrxA 基因. TrxA 基因可编码 109 个氨基酸的硫氧还蛋白, 外源基因经多克隆位点插入后, 可与 TrxA 一起融合表达. 融合表达不仅提高了表达产物的稳定性, 而且由于相对分子质量增大, 用 SDS-PAGE 更容易分析鉴定. 此外, 外源蛋白与硫氧还蛋白之间具有肠激酶和凝血酶的识别位点, 从而也方便了外源蛋白与硫氧还蛋白的分离. 本研究中, 我们获得了高产量的融合蛋白产物, 由于载体 pET32a(+)表达的 6 个组氨酸残基可与 Ni<sup>2+</sup>-NTA 琼脂糖树脂中的 Ni<sup>2+</sup> 结合, 从而可对表达产物进行纯化. 我们通过 Western blotting 检测了融合蛋白表达产物的抗原性, 在 BL21/pET32a(+)/HspA 的泳道上相应于其表达产物相对分子质量的地方出现了棕色的条带, 而 BL21/pET32a(+) 的泳道上未出现任何条带, 实验结果表明, 融合表达的蛋白具有良好的抗原性, 能够被 *H pylori* 阳性患者的血清所识别. 为以后制备安全、高效的疫苗, 以及制备 ELISA 快速诊断试剂盒奠定了基础.

除了构建和表达 *H pylori* HspA 编码基因外, 我们还致力于寻找活的载体. 因为抗原的呈递系统影响免疫反应的质和量. 黏膜免疫具有以下优点: (1)能够刺激局部免疫和体液免疫; (2)简单、经济, 适合群体免疫; (3)具有广泛的场所, 但到目前为止, 还未找到适合人类的副作用小的活载体; 而通过皮下免疫除了具有上述优点外, 还具有: (1)一次性接种, 终身带菌; (2)本身就是一种免疫佐剂, 可增强机体免疫功能; (3)如果细菌在体内过度表达, 可通过体外简单的方法加以解决, 这类载体以卡介苗为代表. 以 BCG(*mycobacterium bovis bacillus calmette-guerin*)牛型结核分枝杆菌的减毒菌株作为载体, 则具有无比的优越性. BCG 以往主要用于预防结核菌的感染, 由于是活载体及其独特的安全性和免疫佐剂作用而受到科学家们的关注, 现已经研究表明, 重组的 BCG(rBCG)表达的 IL-12、IFN- $\gamma$ 、GM-CSF、HCG- $\beta$  能被机体识别, 具有生物活性, 可广泛用于医疗卫生事业. 关于抗爱滋病、百白破、寄生虫疫苗正在研究之中, 我们正在构建以 BCG 为载体的重组能同时表达 *H pylori* HspA 与 *M<sub>r</sub>* 18 000 OMP 疫苗, 我们相信, 不久的将来, *H pylori* 疫苗一定将广泛应用于临床, 彻底根除与 *H pylori* 相关的一切疾病.

### 4 参考文献

- Morgner A, Miehlke S, Fischbach W, Schmitt W, Muller-Hermelink H, Greiner A, Thiede C, Schetelig J, Neubauer A, Stolte M, Ehninger G, Bayerdorffer E. Complete remission of

- primary high-grade B-cell gastric lymphoma after cure of *Helicobacter pylori* infection. *J Clin Oncol* 2001;19:2041-2048
- 2 Nakamura S, Matsumoto T, Suekane H, Takeshita M, Hizawa K, Kawasaki M, Yao T, Tsuneyoshi M, Iida M, Fujishima M. Predictive value of endoscopic ultrasonography for regression of gastric low grade and high grade MALT lymphomas after eradication of *Helicobacter pylori*. *Gut* 2001;48:454-460
- 3 Hiyama T, Haruma K, Kitadai Y, Masuda H, Miyamoto M, Ito M, Kamada T, Tanaka S, Uemura N, Yoshihara M, Sumii K, Shimamoto F, Chayama K. Clinicopathological features of gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma: a comparison with diffuse large B-cell lymphoma without a mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma component. *J Gastroenterol Hepatol* 2001;16:734-739
- 4 Uemura N, Okamoto S, Yamamoto S, Matsumura N, Yamaguchi S, Yamakido M, Taniyama K, Sasaki N, Schlemper RJ. *Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer. *N Engl J Med* 2001;345:784-789
- 5 Kate V, Ananthakrishnan N, Badrinath S. Effect of *Helicobacter pylori* eradication on the ulcer recurrence rate after simple closure of perforated duodenal ulcer: retrospective and prospective randomized controlled studies. *Br J Surg* 2001;88:1054-1058
- 6 Xue FB, Xu YY, Wan Y, Pan BR, Ren J, Fan DM. Association of *H pylori* infection with gastric carcinoma: a Meta analysis. *World J Gastroenterol* 2001;7:801-804
- 7 Xia HX, Fan XG, Talley NJ. Clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* and its clinical relevance. *World J Gastroenterol* 1999;5:263-266
- 8 Tsai CJ, Huang TY. Relation of *Helicobacter pylori* infection and angiographically demonstrated coronary artery disease. *Dig Dis Sci* 2000;45:1227-1232
- 9 Gocyk W, Niklinski T, Olechnowicz H, Duda A, Bielanski W, Konturek PC, Konturek SJ. *Helicobacter pylori*, gastrin and cyclooxygenase-2 in lung cancer. *Med Sci Monit* 2000;6:1085-1092
- 10 Tsang KW, Lam WK, Kwok E, Chan KN, Hu WH, Ooi GC, Zheng L, Wong BC, Lam SK. *Helicobacter pylori* and upper gastrointestinal symptoms in bronchiectasis. *Eur Respir J* 1999;14:1345-1350
- 11 Caselli M, Zaffoni E, Ruina M, Sartori S, Trevisani L, Ciaccia A, Alvisi V, Fabbri L, Papi A. *Helicobacter pylori* and chronic bronchitis. *Scand J Gastroenterol* 1999;34:828-830
- 12 Dauden E, Jimenez Alonso I, Garcia-Diez A. *Helicobacter pylori* and idiopathic chronic urticaria. *Int J Dermatol* 2000;39:446-452
- 13 Ojetti V, Armuzzi A, De-Luca A, Nucera E, Franceschi F, Candelli M, Zannoni GF, Danese S, Di-Caro S, Vastola M, Schiavino D, Gasbarrini G, Patriarca G, Pola P, Gasbarrini A. *Helicobacter pylori* infection affects eosinophilic cationic protein in the gastric juice of patients with idiopathic chronic urticaria. *Int Arch Allergy Immunol* 2001;125:66-72
- 14 Vainio E, Huovinen S, Liutu M, Uksila J, Leino R. Peptic ulcer and *Helicobacter pylori* in patients with lichen planus. *Acta Derm Venereol* 2000;80:427-429
- 15 Szlachet A, Sliowski Z, Karczewska E, Bielanski W, Pytko-Polonczyk J, Konturek SJ. *Helicobacter pylori* and its eradication in rosacea. *J Physiol Pharmacol* 1999;50:777-786
- 16 Delchier JC, Lamarque D, Levy M, Tkoub EM, Copie-Bergman C, Deforges L, Chaumette MT, Haïoun C. *Helicobacter pylori* and gastric lymphoma: high seroprevalence of CagA in diffuselarge B-cell lymphoma but not in low-grade lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type. *Am J Gastroenterol* 2001;96:2324-2328
- 17 Ghiara P, Rossi M, Marchetti M, Di Tommaso A, Vindigni C, Ciampolini F, Covacci A, Telford JL, De Magistris MT, Pizza M, Rappuoli R, Del Giudice G. Therapeutic intragastric vaccination against *Helicobacter pylori* in mice eradicates an otherwise chronic infection and confers protection against reinfection. *Infect Immune* 1997;65:4996-5002
- 18 Goto T, Nishizono A, Fujioka T, Ikewaki J, Mifune K, Nasu M. Local secretory immunoglobulin A and postimmunization gastritis correlate with protection against *Helicobacter pylori* infection after oral vaccination of mice. *Infect Immune* 1999;67:2531-2539
- 19 Michetti P, Kreiss C, Kotloff K, Porta N, Blanco J, Bachmann D, Herranz M, Saldinger PF, Cortes-Theulaz I, Losonsky G, Nichols R, Simon J, Stolte M, Ackerman S, Monath TP, Blum AL. Oral immunization with Urease and *Escherichia coli* Heat-labile enterotoxin is safe and immunogenic in *Helicobacter pylori*-infected adults. *Gastroenterology* 1999;116:804-812
- 20 Li MF, Ling Z, Ma AY, Zhao JH, Sun JX, Yu SZ, Wu XP. Cloning, expression and immunogenicity of *Hp* UreB gene. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:596-600
- 21 Lee CK, Soike K, Hill J, Georgakopoulos K, Tibbitts T, Ingrassia J, Gray H, Boden J, Kleanthous H, Giannasca P, Ermak T, Weltzin R, Blanchard J, Monath TP. Immunization with recombinant *Helicobacter pylori* urease decreases colonization levels following experimental infection of rhesus monkeys. *Vaccine* 1999;17:1493-1505
- 22 Solnick JV, Canfield DR, Hansen LM, Torabian SZ. Immunization with recombinant *Helicobacter pylori* urease in specific-pathogen-free rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Infect Immune* 2000;68:2560-2565
- 23 Satin B, Del Giudice G, Della Bianca V, Dusi S, Laudanna C, Tonello F, Kelleher D, Rappuoli R, Montecucco C, Rossi F. The neutrophil-activating protein (HP-NAP) of *Helicobacter pylori* is a protective antigen and a major virulence factor. *J Exp Med* 2000;191:1467-1476
- 24 Todoroki I, Joh T, Watanabe K, Miyashita M, Seno K, Nomura T, Ohara H, Yokoyama Y, Tochikubo K, Itoh M. Suppressive effects of DNA vaccines encoding heat shock protein on *Helicobacter pylori*-induced gastritis in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;277:159-163
- 25 Myers GA, Ermak TH, Georgakopoulos K, Tibbitts T, Ingrassia J, Gray H, Kleanthous H, Lee CK, Monath TP. Oral immunization with recombinant *Helicobacter pylori* urease confers long-lasting immunity against *Helicobacter felis* infection. *Vaccine* 1999;17:1394-1403
- 26 Kim BO, Shin SS, Yoo YH, Pyo S. Peroral immunization with *Helicobacter pylori* adhesin protein genetically linked to cholera toxin A2B subunits. *Clin Sci (Lond)* 2001;100:291-298
- 27 Kotloff KL, Szein MB, Wasserman SS, Losonsky GA, DiLorenzo SC, Walker RI. Safety and immunogenicity of oral inactivated whole-cell *Helicobacter pylori* vaccine with adjuvant among volunteers with or without subclinical infection. *Infect Immune* 2001;69:3581-3590
- 28 Ikewaki J, Nishizono A, Goto T, Fujioka T, Mifune K. Therapeutic oral vaccination induces mucosal immune response sufficient to eliminate long-term *Helicobacter pylori* infection. *Microbiol Immunol* 2000;44:29-39
- 29 Koesling J, Lucas B, Develiglou L, Aebischer T, Meyer TF. Vaccination of mice with live recombinant *Salmonella typhimurium* aroA against *H pylori*: parameters associated with prophylactic and therapeutic vaccine efficacy. *Vaccine* 2001;20:413-420
- 30 Bumann D, Metzger WG, Mansouri E, Palme O, Wendland M, Hurwitz R, Haas G, Aebischer T, von Specht BU, Meyer TF. Safety and immunogenicity of live recombinant *Salmonella enterica* serovar Typhi Ty21a expressing urease A and B from *Helicobacter pylori* in human volunteers. *Vaccine* 2001;20:845-852
- 31 Liao W, Chen M, Zhu S. Construction of attenuated *Salmonella typhimurium* vaccine strain expressing *Helicobacter pylori* catalase and observation on its protective immunity. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2001;81:613-616
- 32 Lee MH, Roussel Y, Wilks M, Tabaqchali S. Expression of *Helicobacter pylori* urease subunit B gene in *Lactococcus lactis* MG1363 and its use as a vaccine delivery system against *H pylori* infection in mice. *Vaccine* 2001;19:3927-3935
- 33 Jiang Z, Tao XH, Huang AL, Wang PL. A study of recombinant protective *H pylori* antigens. *World J Gastroenterol* 2002;8:308-311
- 34 Keenan J, Oliaro J, Domigan N. Immune response to an 18-kilodalton outer membrane antigen identifies Lipoprotein 20 as a *Helicobacter pylori* vaccine candidate. *Infect Immune* 2000;68:3337-3343
- 35 Ning XX, Wu KC, Shi YQ, Wang X, Zhao YQ, Fan DM. Construction and expression of gastric cancer MG7 mimic epitopic fused to heat shock protein 70. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:892-896
- 36 Jiang YG, Wang YM, Li QF. Expression and significance of HLA-DR antigen and heat shock protein 70 in chronic hepatitis B. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:907-910
- 37 Chen ZF, Deng CS, Xia B, Zhu YQ, Zeng J, Gong LL. Expression of heat shock protein60, CD44 splice variant V6 in human gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:988-991
- 38 Wu SL, Pan CE, Yang W, Niu XJ, Geng ZM. Expression of Hsp70 and MHC-1 antigen in hepatocellular carcinoma and its significance. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:291-294

# 幽门螺杆菌对克拉霉素耐药的分子基础

郝庆, 李岩, 高红, 张显忠

郝庆, 李岩, 中国医科大学附属二院消化科 辽宁省沈阳市 110004  
高红, 中国医科大学附属二院卫生部先天畸形重点实验室  
辽宁省沈阳市 110004  
张显忠, 沈阳市红十字会医院消化科 辽宁省沈阳市 110013  
郝庆, 女, 1969-11-20 生, 辽宁省沈阳市人, 汉族. 1993 年中国医科大学本科毕业, 1998 年中国医科大学硕士毕业, 2002 年博士毕业, 讲师, 主要从事中药与胃肠动力及幽门螺杆菌耐药机制方面的研究.  
项目负责人: 郝庆, 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科. haoqing007@sohu.com  
电话: 024-83956416  
收稿日期: 2002-11-06 接受日期: 2002-11-18

## Molecular mechanism of the resistance of *Helicobacter pylori* to clarithromycin

Qing Hao, Yan Li, Hong Gao, Xian-Zhong Zhang

Qing Hao, Yan Li, Department of Gastroenterology of the 2<sup>nd</sup> Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China  
Hong Gao, Key Laboratory for Congenital Malformation of the Ministry of Health, China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China  
Xian-Zhong Zhang, Department of Gastroenterology, the Red Cross Hospital of Shenyang, Shenyang 110013, Liaoning Province, China  
Correspondence to: Dr. Qing Hao, Gastroenterology Department of the 2<sup>nd</sup> Affiliated Hospital of China Medical University, 36 Sanhao Jie, Heping District, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. haoqing007@sohu.com  
Received: 2002-11-06 Accepted: 2002-11-18

## Abstract

AIM: To investigate the resistance mechanism of *Hp* to clarithromycin.

METHODS: With E-test method, we examined the minimal inhibitory concentration (MIC) to clarithromycin of 35 *Hp* clinical isolates. Resistance strains were defined when MIC  $\geq$  8 mg/L. Extract the DNA from the bacteria with the phenol-chloroform extraction method. Then amplify the fragments from 2 047 to 2 347 of 23 S rRNA gene. Gene sequence of the PCR products was analyzed to observe the mutation in the resistant *Hp* strains.

RESULTS: Compared with susceptible strains, No13 strain contained one point mutation (T2289C), No17 had two point mutations (G2224A, T2289C) and No22 strain had 3 point mutations (G2224A, C2245T, T2289C). The MICs of the 3 resistant *Hp* isolates were as follows: No13 of 8.0 mg/L, No17 of 64 mg/L, No22 of >256 mg/L. With increase of the resistance of *Hp* strains, the number of point mutations increased.

CONCLUSION: The point-mutations at 23 S rRNA gene responsible for *Hp* resistance to clarithromycin have not been reported in literature either at home or abroad, demonstrating that different mechanism of *Hp* resistance to

clarithromycin exists in different regions.

Hao Q, Li Y, Gao H, Zhang XZ. Molecular mechanism of the resistance of *Helicobacter pylori* to clarithromycin. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(10):1485-1487

## 摘要

目的: 探讨幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)对克拉霉素耐药的分子基础.

方法: 采用 E-test 方法对 35 例 Hp 的临床分离株进行克拉霉素的 MIC (minimal inhibitory concentration) 检测, 大于或等于 8 mg/L 为耐药株. 按酚-氯仿方法提取 Hp 的 DNA, PCR 方法扩增 23S rRNA 基因中 2 047-2 347 之间的片段, 对 PCR 产物进行序列分析, 观察耐药株的基因突变情况.

结果: 与敏感菌(No33)序列比较, No13 存在 1 个突变位点, 即 2 289 位点 T 变成了 C (T2289C), No17 存在 2 个突变位点, 即 G2224A、T2289C, No22 存在 3 个突变位点, 即 G2224A、C2245T 及 T2289C. 三株耐药 Hp 菌株的 MIC 值分别是: No13 为 8.0 mg/L, No17 为 64 mg/L, No22 为大于 256 mg/L. 随着耐药性的提高(表现在 MIC 值的升高), 高耐药性菌株的突变位点多于低耐药性菌株的突变位点.

结论: 与耐药有关的 3 个突变位点, G2224A、C2245T 及 T2289C, 国内外未见报道, 反映了 Hp 耐药的地区差异.

郝庆, 李岩, 高红, 张显忠. 幽门螺杆菌对克拉霉素耐药的分子基础. 世界华人消化杂志 2003;11(10):1485-1487

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1485.asp>

## 0 引言

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)是许多消化系统疾病包括胃癌的主要致病因子<sup>[1-10]</sup>, 抗 Hp 的治疗也成为消化性溃疡治疗学方面的一个重要突破. 由于 Hp 主要定植在胃黏膜层下胃小凹表面, 根除治疗相对困难, 克拉霉素被认为是杀 Hp 效果最好的抗生素<sup>[11]</sup>. Hp 耐药是治疗失败的主要原因<sup>[12-14]</sup>, 国外报道克拉霉素耐药是由于 Hp 的 23S rRNA 基因中 2 143, 2 144 位点上 A 到 G 的突变引起<sup>[15-18]</sup>, 而国内关于该方面的报道极少<sup>[19, 20]</sup>. 我们在前述实验基础上<sup>[21]</sup>, 利用 E-test 方法筛选出克拉霉素耐药 Hp 菌株, 探讨了其耐药的分子基础如下:

## 1 材料和方法

1.1 材料 Hp 菌株来源: 利用 E-test 方法对 35 例 Hp 的



临床分离株进行克拉霉素的 MIC (minimal inhibitory concentration) 值测定, 大于或等于 8 mg/L 为耐药株, 共 3 株, No13 (MIC 为 8 mg/L)、No17 (MIC 为 64 mg/L) 及 No22 (MIC 为大于或等于 256 mg/L), 1 例敏感株, No33 (MIC 为 0.125 mg/L); 引物(23S rRNA 基因 2 047-2 347 之间, 由上海生工生物工程技术服务有限公司); dNTP, 100 bp DNA Ladder Marker (宝生物工程大连有限公司); PCR 扩增仪(biometra, germany); 测序仪器为 ABI PRISM 377-96; 测序试剂为 BigDye terminator v2.0

1.2 方法 按酚-氯仿方法提取 Hp DNA. PCR 扩增上游引物: 5' -CTGCATGAATGGCGTAACGAG-3' (2 047-2 067); 下游引物: 5' -GAGCGACCGCCCCAGTCAAAC-3' (2 347-2 327); PCR 循环体系共 20  $\mu$ L, 其中包括: dd H<sub>2</sub>O 13.3  $\mu$ L; 10xPCR buffer 2.5  $\mu$ L; dNTPs (2.5 mmol/L) 2.0  $\mu$ L; Taq 酶 (5 KU/L) 0.2  $\mu$ L; 引物(1 : 5x) 1.5  $\mu$ L; DNA sample 0.5  $\mu$ L; 循环条件: 94.0  $^{\circ}$ C 4 min, 94.0  $^{\circ}$ C 40 s, 61.5  $^{\circ}$ C 1 min, 72.0  $^{\circ}$ C 1 mins, 72.0  $^{\circ}$ C 7 min, 共 32 个循环; 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 观察 PCR 产物纯度; 观察扩增产物电泳图, 确定反应体系中 PCR 产物单一而含量高时, 按上述条件扩增 50  $\mu$ L PCR 产物, 由上海生工生物技术有限公司, 进行 PCR 产物序列测定。

## 2 结果

PCR 产物为 301 bp 的 DNA 片段, 反应体系中只含有单一的目的片段, 无污染, 无杂带(图1). No33 为克拉霉素敏感 Hp 菌株, No.13, 17, 22 均为克拉霉素耐药 Hp 菌株. 从测序图谱中可以发现: 与敏感菌(No.33)序列比较, No.13 共测出 279 个碱基, 其中存在 1 个突变位点, 即 2 289 位点 T 变成了 C(T2289C), No.17 共测出 278 个碱基, 其中存在 2 个突变位点, 即 G2224A, T2289C, No.22 共测出 278 个碱基, 其中存在 3 个突变位点, 即 G2224A, C2245T 及 T2289C. 三株耐药 Hp 菌株的 MIC 值分别是: No.13 为 8.0 mg/L, No.17 为 64 mg/L, No.22 为大于 256 mg/L. 随着耐药性的提高(表现在 MIC 值的升高), 我们发现高耐药性菌株的突变位点多于低耐药性菌株的突变位点(图 2).

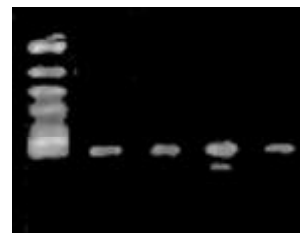


图1 301 bp PCR 产物的电泳。

## 3 讨论

Hp 对克拉霉素耐药的现象不断出现, 从而导致了三联根治方案的失败. 根据大肠杆菌对克拉霉素的耐药机制, Stone et al<sup>[15]</sup>首先发现并报告了 Hp 对克拉霉素耐药的分子基础是 23S rRNA 基因中 2 143, 2 144 位点上 A 到 G 的突变, 在随后的研究<sup>[22-25]</sup>中也发现了其他位点上的一些突变导致耐药, 比如: A2142C, A2143C, A2143T, A2115G, G2141A. Hp 的遗传学特征存在明显的地域差别<sup>[26, 27]</sup>, Hp 耐药株的遗传学特征也存在着明显的地域差别<sup>[28]</sup>. 关于中国人感染的克拉霉素耐药 Hp 菌株的分子基础, 研究报道的极少, 史彤 et al<sup>[19]</sup>曾利用 PCR-RFLP 方法分析了上海地区克拉霉素耐药 Hp 菌株的遗传特征, 该研究只是根据 23S rRNA 基因中 2 143, 2 144 位点上 A 到 G 突变后, 可以产生新的酶切位点, 而推断耐药株可能存在该位点的突变, 而未进行直接的目的基因的序列分析, 故也不能发现除上述 2 个位点之外的突变, 因而该研究具有一定的局限性. 我们通过 E-test 方法筛选出 3 株不同程度的 Hp 耐药株, 其 MIC 值分别为: No.13 8 mg/L, No.17 64 mg/L, No.22 >256 mg/L, 和 1 例敏感株, No.33, 其 MIC 值为 0.125 mg/L. 我们发现, 与敏感株相比, 3 株耐药株均存在点突变, 且不同耐药程度的 Hp 菌株, 突变位点的数目也不相同, 低度耐药的 13 号 Hp 菌株只存在 T2289C 的突变, 中度耐药的 17 号 Hp 菌株存在 2 处突变, 即 G2224A 和 T2289C, 而高度耐药的 22 号 Hp 菌株发生了 3 处突变: 即 G2224A, C2245T 和 T2289C, 随耐药性的增加, 突变的位点数目也增加. 由上述结果还可以看出, 耐药突变局限于 2 219-2 289 之间, 共 70 个碱基对之中, 其中 T2289C 的突

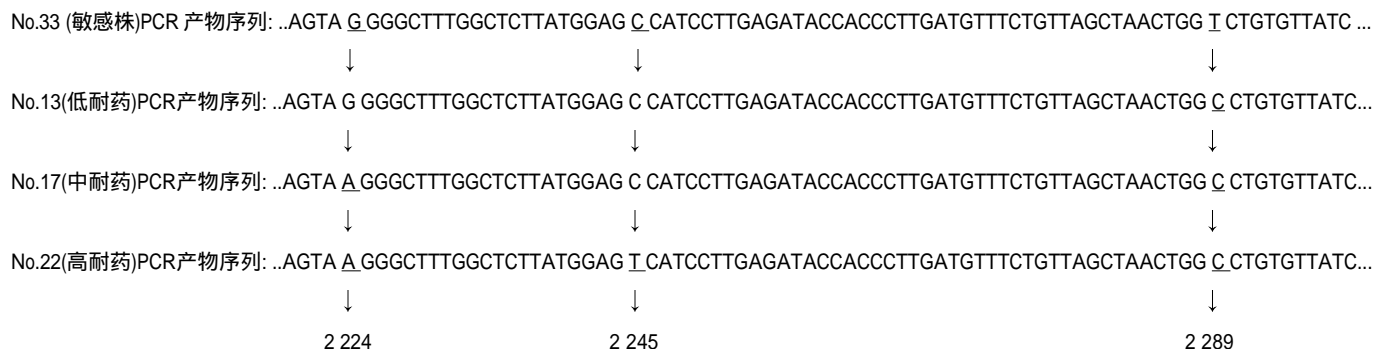


图2 克拉霉素耐药 Hp 菌株 23S rRNA 基因突变情况。

变存在于3例Hp耐药株中,而C2245T只存在于高耐药的No.22号Hp菌株中,G2224A存在于中、高度耐药株中.这个现象在国内外的研究中均未见报道,而国外常报道的A2143G和A2144G的突变也未能在本研究中出现,这一点也证实了Hp耐药机制的地域差异.国内关于这方面的研究还需进一步深入进行,以期建立中国人感染的克拉霉素耐药Hp菌株的遗传学资料.

克拉霉素杀菌机制<sup>[29]</sup>在于,它可以与23S rRNA肽链转移酶结合,从而抑制菌体蛋白质的合成,起到杀菌作用,当该基因发生突变时,其编码的氨基酸发生改变,肽链转移酶环状结构的局部发生破坏,克拉霉素与核糖体的结合即减弱,失去了作用位点,不能发挥抗菌作用,临床上即出现了克拉霉素耐药现象.自然界中,生物的遗传物质存在着自然突变率,但是非常低,大约在 $10^{-6}$ - $10^{-8}$ ,Hp耐药突变的产生目前倾向于认为是抗生素选择性压力的结果<sup>[30]</sup>,即由于克拉霉素的大量广泛应用,杀死了敏感菌,而留下了自然突变产生的耐药株进一步繁殖,形成主要致病菌,但大环内酯类药物能否诱发这种耐药突变,目前还未见有关报道.

#### 4 参考文献

- Vandenplas Y. *Helicobacter pylori* infection. *World J Gastroenterol* 2000;6:20-31
- Xia HX, Fan XG, Talley NJ. Clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* and its clinical relevance. *World J Gastroenterol* 1999;5:263-266
- Peng ZS, Liang ZC, Liu MC, Ou-Yang NT. Studies on gastric epithelial cell proliferation and apoptosis in Hp associated gastric ulcer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:218-219
- Xiao SD, Liu WZ. Current status in treatment of Hp infection. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:3-4
- Meyer JM, Silliman NP, Dixon CA, Siepmann M, Sugg JE, Hopkins RJ. *Helicobacter pylori* and early duodenal ulcer status post-treatment: a review. *Helicobacter* 2001;6:84-92
- Casella G, Buda CA, Maisano R, Schiavo M, Perego D, Baldini V. Complete regression of primary gastric MALT-lymphoma after double eradication *Helicobacter pylori* therapy: role and importance of endoscopic ultrasonography. *Anticancer Res* 2001;21:1499-1502
- Suganuma M, Kurusu M, Okabe S, Sueoka N, Yoshida M, Wakatsuki Y, Fujiki H. *Helicobacter pylori* membrane protein 1: a new carcinogenic factor of *Helicobacter pylori*. *Cancer Res* 2001;61:6356-6359
- Sheng T, Zhang JZ. Current status in study of Hp ureB. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:881-884
- Zhang ZW, Farthing MJ. Molecular mechanisms of *H pylori* associated gastric carcinogenesis. *World J Gastroenterol* 1999;5:369-374
- Zhuang XQ, Lin SR. Progress in research on the relationship between Hp and stomach cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:206-207
- Matsuoka M, Yoshida Y, Hayakawa K, Fukuchi S, Sugano K. Simultaneous colonisation of *Helicobacter pylori* with and without mutations in the 23S rRNA gene in patients with no history of clarithromycin exposure. *Gut* 1999;45:503-507
- Realdi G, Dore MP, Piana A, Atzei A, Carta M, Cugia L, Manca A, Are BM, Massarelli G, Mura I, Maida A, Graham DY. Pretreatment antibiotic resistance in *Helicobacter pylori* infection: results of three randomized controlled studies. *Helicobacter* 1999;4:106-112
- Pilotto A, Leandro G, Franceschi M, Rassi M, Bozzole L, Furlan F, Di Mario F, Valerio G. The effect of antibiotic resistance on the outcome of three 1-week triple therapies against *Helicobacter pylori*. *Aliment Pharmacol Ther* 1999;13:667-673
- Megraud F. Antibiotic resistance in *Helicobacter pylori* infection. *Br Med Bull* 1998;54:207-216
- Stone GG, Shortridge D, Flamm RK, Versalovic J, Beyer J, Idler K, Zulawinski L, Tanaka SK. Identification of a 23s rRNA gene mutation in clarithromycin-resistance *Helicobacter pylori*. *Helicobacter pylori* 1996;1:227-228
- Versalovic J, Shortridge D, Kibler K, Griffy MV, Beyer J, Flamm RK, Tanaka SK, Graham DY, Go MF. Mutations in 23s rRNA are associated with clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40:477-480
- Stone GG, Shortridge D, Versalovic J, Beyer J, Flamm RK, Graham DY, Ghoneim AT, Tanaka SK. A PCR-oligonucleotide ligation assay to determine the prevalence of 23s rRNA gene mutations in clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:712-714
- Szcebara F, Dhaenens L, Vincent P, Husson MO. Evaluation of rapid molecular methods for detection of clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1997;16:162-164
- 史彤, 刘文忠, 萧树东, 徐蔚文. 幽门螺杆菌对克拉霉素耐药的分子机制. *中华消化杂志* 2001;21:25-27
- Zheng X, Hu F, Wang W. The prevalence and mechanism of *Helicobacter pylori* resistance to clarithromycin in Beijing. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2001;81:1413-1415
- 郝庆, 李岩, 张智杰, 刘勇, 王晓. 沈阳地区幽门螺杆菌耐药情况的研究. *世界华人消化杂志* 2002;10:480-481
- Van Doorn LJ, Debets-Ossenkopp YJ, Marais A, Sanna R, Megraud F, Kusters JG, Quint WG. Rapid detection, by PCR and reverse hybridization, of mutations in the *Helicobacter pylori* 23S rRNA gene, associated with macrolide resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:1779-1782
- Alarcon T, Domingo D, Prieto N, Lopez-Brea M. PCR using 3-mismatched primers to detect A2142C mutation in 23s rRNA conferring resistance to clarithromycin in *Helicobacter pylori* clinical isolates. *J Clin Microbiol* 2000;38:923-925
- Taylor DE. Pathophysiology of antibiotic resistance: clarithromycin. *Can J Gastroenterol* 2000;14:891-894
- Fontana C, Favaro M, Minelli S, Criscuolo AA, Pietroiusti A, Galante A, Fat C. New site of modification of 23S rRNA associated with clarithromycin resistance of *Helicobacter pylori* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:3765-3769
- Mukhopadhyay AK, Kersulyte D, Jeony JY, Datta S, Ito Y, Chowdhury A, Chowdhury S, Santra A, Bhattacharyya SK, Azuma T, Nair GB, Berg DE. Distinctiveness of genotypes of *Helicobacter pylori* in Calcutta, India. *J Bacteriol* 2000;82:3219-3227
- Yu FJ, Wu DC, Kuo CH, Lu CY, Su YC, Lin SR, Liu CS, Jan CM, Wang WM. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection by stool antigen test in southern Taiwan. *Kaohsiung J Med Sci* 2001;17:344-350
- Meyer JM, Silliman NP, Wang W, Siepmann NY, Sugg JE, Morris D, Zhang J, Bhattacharyya H, King EC, Hopkins RJ. Risk factors for *Helicobacter pylori* resistance in the United States: the surveillance of Hp antimicrobial resistance partnership (SHARP) study, 1993-1999. *Ann Intern Med* 2002;136:13-24
- Occhialini A, Urdaci M, Doucet-Populaire F, Bebear CM, Lamouliatte H, Megraud F. Macrolide resistance in *Helicobacter pylori*: rapid detection of point mutations and assays of macrolide binding to ribosomes. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:2724-2728
- Maeda S, Yoshida H. Mechanism of drug resistance in *Helicobacter pylori*. *Nippon Rinsho* 2001;59:367-373

# 氧化苦参碱对四氯化碳诱导的大鼠肝纤维化 I, III, IV 型胶原表达的影响

陆伦根, 曾民德, 茅益民, 李继强, 邱德凯, 杨文卓, 贾一韬, 曹爱平

陆伦根, 曾民德, 茅益民, 李继强, 邱德凯, 杨文卓, 贾一韬, 曹爱平, 上海第二医科大学附属仁济医院 上海市消化疾病研究所 上海市 200001  
陆伦根, 男, 1965-11-09, 江苏省扬州市人, 博士, 副教授, 副主任医师, 主要从事消化系统疾病尤其是肝脏疾病的基础和临床研究. 发表论文 50 篇, 主编专著 2 部, 参编专著近 20 篇, 获上海市和教育部科技成果奖 3 项.  
上海市医学发展基金重点研究项目, No.99ZDI001  
1999 年中华肝病学会中青年肝病科研基金.  
项目负责人: 陆伦根, 200001, 上海市, 上海第二医科大学附属仁济医院上海市消化疾病研究所. lulungen@online.sh.cn  
电话: 021-63364118 传真: 021-63364118  
收稿日期: 2003-03-08 接受日期: 2003-03-25

## Effect of oxymatrine on expressions of type I, III, IV collagen in CCl<sub>4</sub> induced liver fibrosis in rats

Lun-Gen Lu, Min-De Zeng, Yi-Min Mao, Ji-Qing Li, De-Kai Qiu, Wen-Zhuo Yang, Yi-Tao Jia, Ai-Ping Cao

Lun-Gen Lu, Min-De Zeng, Yi-Min Mao, Ji-Qing Li, De-Kai Qiu, Wen-Zhuo Yang, Yi-Tao Jia, Ai-Ping Cao, Shanghai Institute of Digestive Disease, Renji Hospital, Shanghai Second Medical University, Shanghai 200001, China.  
Supported by the key project of Shanghai Medical Development Foundation, No. 99ZDI001 and grants from 1999 Liver Diseases Research Fund for Young Scholars of Chinese Liver Diseases Association  
Correspondence to: Lun-Gen Lu, Shanghai Institute of Digestive Disease, Renji Hospital, Shanghai Second Medical University, Shanghai 200001, China. lulungen@online.sh.cn  
Received: 2003-03-08 Accepted: 2003-03-25

## Abstract

**AIM:** To study the effect of oral oxymatrine on expressions of type I, III, IV collagen in rat liver fibrosis induced by CCl<sub>4</sub>.

**METHODS:** 140 male Wistar rats were randomly divided into normal control group ( $n=20$ ), CCl<sub>4</sub> group ( $n=30$ ), and oxymatrine-treated group including low-dose subgroup ( $n=30$ ), median-dose subgroup ( $n=30$ ), and high-dose subgroup ( $n=30$ ). Low, median, and high-dose oxymatrine subgroups were given 30, 60 and 100 mg/kg oxymatrine by daily gastrogavage for 12 wk, respectively. Inflammation and fibrosis degree of liver tissues were examined by hematoxylin-eosin staining. Expressions of type I, III, IV collagen were detected by immunohistochemistry, and ultra-structural changes were observed by electron microscopy.

**RESULTS:** Liver histologic examination showed that the degree of liver inflammation and fibrosis were more serious in control group than in oxymatrine-treated groups. In control group, the amounts of collagen type I, III, IV deposits were observed, and type III and IV collagen deposits were the main constituents of hepatic sinusoid capillarization. But in oxymatrine-treated groups, type I, III, IV collagen deposits were less, hepatic sinusoid capillarization was

not obviously found. Electron microscopy showed that the degree of hepatocyte injury was more serious in control group than in oxymatrine-treated groups.

**CONCLUSION:** Oral oxymatrine might decrease expression of type I, III, IV collagen in rat liver fibrosis model induced by carbon tetrachloride, suggesting oral oxymatrine might have anti-fibrogenic effect.

Lu LG, Zeng MD, Mao YM, Li JQ, Qiu DK, Yang WZ, Jia YT, Cao AP. Effect of oxymatrine on expressions of type I, III, IV collagen in CCl<sub>4</sub> induced liver fibrosis in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(10):1488-1491

## 摘要

**目的:** 研究口服氧化苦参碱对 CCl<sub>4</sub> 诱导的大鼠肝纤维化组织 I, III, IV 型胶原表达的影响.

**方法:** ♂ Wistar 大鼠 140 只随机分为正常对照组( $n=20$ )、CCl<sub>4</sub> 模型组( $n=30$ )、氧化苦参碱预防低剂量组( $n=30$ )、中剂量组( $n=30$ )和高剂量组( $n=30$ ). 氧化苦参碱低、中、高剂量组大鼠氧化苦参碱的用量分别为 30, 60, 100 mg/kg, 每日灌胃 1 次, 共 12 wk. 肝组织学检查观察肝组织炎症和纤维化程度, 免疫组化观察肝组织中 I, III 和 IV 型胶原的表达, 电镜观察肝组织的超微结构变化.

**结果:** 组织学检查结果表明对照组肝脏炎症和纤维化程度明显高于氧化苦参碱预防组; 免疫组化检测表明预防对照组大鼠肝内有大量 I, III 和 IV 型胶原沉积, 其中 III 型和 IV 型胶原的沉积形成肝窦毛细血管瘤, 而氧化苦参碱预防组肝内胶原沉积较少, 无明显的肝窦毛细血管瘤形成; 电镜学检查证明氧化苦参碱预防组肝细胞损伤程度较对照组显著减轻.

**结论:** 口服氧化苦参碱可减少 CCl<sub>4</sub> 诱导的大鼠肝纤维化组织中胶原的表达, 对肝纤维化有预防作用.

陆伦根, 曾民德, 茅益民, 李继强, 邱德凯, 杨文卓, 贾一韬, 曹爱平. 氧化苦参碱对四氯化碳诱导的大鼠肝纤维化 I, III, IV 型胶原表达的影响. *世界华人消化杂志* 2003;11(10):1488-1491

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1488.asp>

## 0 引言

氧化苦参碱是从中药苦参和苦豆子中提取的一种生物碱, 近年来人们在研究中发现其有效成分氧化苦参碱具有保护肝细胞、抗乙型和丙型肝炎病毒和抗肝纤维化等作用<sup>[1-15]</sup>. 我们观察了氧化苦参碱对肝纤维化动物模



型肝组织中 I, III, IV 型胶原的表达变化, 为临床应用氧化苦参碱治疗肝纤维化提供实验依据。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 氧化苦参碱纯品由宁夏药物研究所提供, 批号: 971201。使用前用 0.01 mol/L PBS 配成为 100 g/L 的母液, 分装后 -70 °C 冰箱保存备用。多克隆兔抗大鼠 I、III 和 IV 型胶原抗体为 Sigma 公司产品。链霉菌抗生物素蛋白 - 过氧化酶免疫组化染色超敏试剂盒(UltraSensitive™ S-P Kit)购于福州迈新试剂公司。♂ Wistar 大鼠 140 只, 清洁级, 体质量 120-140 g, 购于中科院上海实验动物中心。动物自由进食与饮水, 在整个实验过程中房间定期消毒。

**1.2 方法** 将动物随机分为正常对照组 20 只, 不加处理, 自由进食与饮水; CCl<sub>4</sub> 模型组 30 只, CCl<sub>4</sub> 用花生油配成 400 ml/L, 初次剂量为 5 ml/kg, 以后为 2 ml/kg 皮下注射, 2 次 /wk, 共进行 12 wk。本组用于观察造模过程中, 肝组织纤维化进展情况。在 4, 6, 8, 12 wk 时, 分批处死, 每次随机 3 只, 观察肝组织学病理变化; 氧化苦参碱预防组 90 只, 低剂量组 30 只, 中剂量组 30 只, 高剂量组 30 只, 在注射 CCl<sub>4</sub> 的同时口服氧化苦参碱, 分别为 30, 60 和 100 mg/kg, 1 次 /d, 共进行 12 wk。灌胃给药容积为 10 ml/kg。动物处死后取右叶肝组织, 用 40 g/L 中性甲醛溶液固定, 经系列乙醇脱水、二甲苯透明后, 石蜡包埋。切成 5 μm 厚切片。HE 染色后, 光镜下观察肝纤维化程度。肝炎症活动度和纤维化程度按 1995 年全国诊断标准进行。免疫组织化学根据 S-P 免疫组化试剂盒说明进行。检测肝组织内 I, III 和 IV 型胶原表达。光镜下观察, 棕褐色为表达阳性。着色面积(1/3 为(+), 1/3 -2/3 为(++), 2/3 为(+++))。40 ml/L

戊二醛固定后的肝组织, 经锇酸后固定, 包埋后, 制成 70 nm 厚超薄切片, 铅铂双染色后, 透射电镜检查。

统计学处理 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示。统计分析采用 SAS 软件包进行, 组间比较采用方差分析, 计数资料采用  $\chi^2$  检验。

## 2 结果

氧化苦参碱预防各剂量组未见腹水发生, 死亡情况分别为: 低剂量组 1 只, 中剂量组 3 只, 高剂量组 2 只, 预防对照组 7 只。大鼠 CCl<sub>4</sub> 注射后短期出现兴奋症状, 表现为活动增加, 奔跑等, 而后为抑制症状, 表现为活动减少、团缩, 全身被毛稀疏无光泽。从症状程度来看, 预防组明显轻于对照组。预防对照组大鼠体质量获得较氧化苦参碱预防低、中和高剂量组显著降低( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。肝质量 / 体质量比值显著升高, 而氧化苦参碱预防组显著降低( $P < 0.01$ ), 并随氧化苦参碱剂量增大有降低趋势(表 1)。

**2.1 组织学检查** 氧化苦参碱预防组较对照组肝纤维化程度显著改善, 氧化苦参碱中、高剂量组肝纤维化程度轻于氧化苦参碱低剂量组。氧化苦参碱正常对照组肝脏无明显改变。氧化苦参碱预防组肝纤维化程度较对照组明显减轻( $P < 0.01$ ), 中和高剂量组略好于低剂量组( $P > 0.05$ )。

免疫组织化学检查氧化苦参碱对照组 I, III, IV 型胶原表达均显著增加, 明显高于氧化苦参碱预防各剂量组( $P < 0.01$ )(表 2)。预防对照组 I 型胶原主要分布在纤维隔, III 和 IV 型胶原在 Disse 间隙也非常明显, 形成肝窦基底膜, 显示典型的肝窦毛细血管瘤化。III 和 IV 型胶原在预防低剂量组大鼠肝窦内沉积较少, 未见典型的肝窦毛细血管瘤化形成。中、高剂量组 I、III 和 IV 型胶原沉积显著低于低剂量组(图 1, 2)。电镜下见氧化苦参

表 1 各组动物的一般情况

组分	n	体质量增加值(g)	肝质量 / 体质量	肝纤维化分期				
				S0	S1	S2	S3	S4
正常对照	20	230±15	0.033±0.001	20				
预防对照	23	78±26 <sup>b</sup>	0.048±0.002 <sup>a</sup>	0	0	2	7	14
预防低剂量	29	133±18 <sup>a</sup>	0.039±0.002 <sup>b</sup>	0	2	6	14	7
预防中剂量	27	156±27 <sup>b</sup>	0.038±0.002 <sup>b</sup>	0	4	10	9	4
预防高剂量	28	151±29 <sup>b</sup>	0.037±0.001 <sup>b</sup>	1	5	12	8	2

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$ , vs 预防组。

表 2. 氧化苦参碱对 I, III 和 IV 型胶原表达的影响

组分	n	I				II				III			
		-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++
对照组	23	0	2	5	16	0	0	5	18	0	1	6	16
低剂量	29	2	6	13	8	1	4	18	6	3	7	14	5
中剂量	27	1	8	14	4	3	10	11	3	3	8	11	5
高剂量	28	2	10	13	3	3	12	9	4	2	11	12	3

碱预防对照组肝细胞胞质疏松, 并有胶原纤维形成, 肝血窦纤维化及闭塞, 血窦壁下可见基底膜样物质, 而氧化苦参碱预防组病变程度较对照组显著减轻(图3, 4).

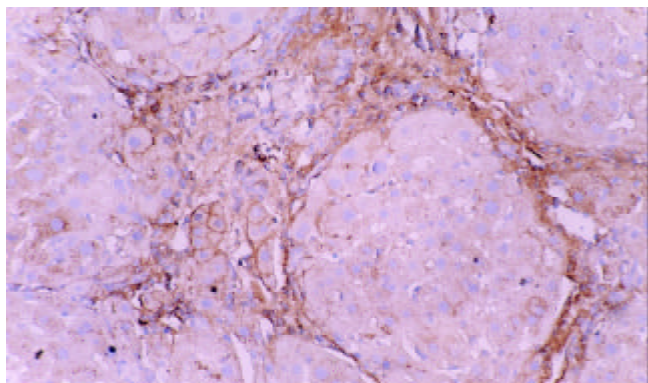


图1 对照组肝脏I型胶原免疫组化染色×200.

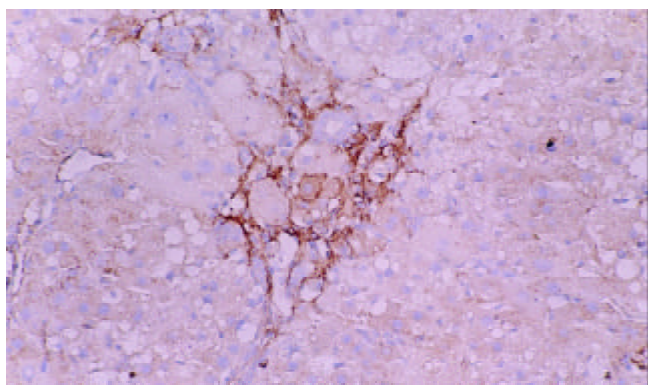


图2 氧化苦参碱中剂量组肝组织I型胶原免疫组化染色×200.



图3 对照组肝细胞胞质疏松, 并有胶原纤维形成 EM × 8 000.

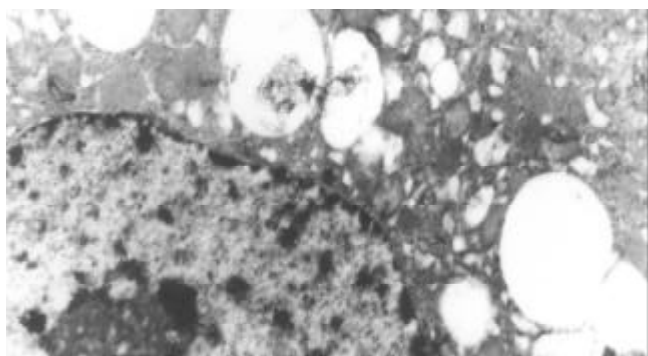


图4 氧化苦参碱中剂量组肝细胞胞质疏松, 无胶原纤维形成EM × 21 000.

### 3 讨论

苦参类生物碱有抗肝纤维化作用<sup>[1-5]</sup>, 在抗肝损伤方面具有良好的药理活性日益引起人们对苦参类生物碱的重视和兴趣. 肝纤维化是细胞外基质(extracellular matrix, ECM)在肝内大量沉积造成的, 它是各种慢性肝损伤向肝硬化发展的必经阶段, 一旦发生很难逆转, 现阶段对肝纤维化的防治尚缺乏有效措施, 如何寻找有效的抗肝纤维化药物已成为目前亟待解决的问题<sup>[16-21]</sup>. ECM的沉积增加及降解减少是肝纤维化形成的基础, 肝内ECM成分主要包括以下三类: 胶原、非胶原性糖蛋白及蛋白多糖, 而胶原是最主要的成分. 在肝脏内发现的胶原至少有近十种, 其中以I、III型为主, 约各占正常肝脏胶原的40%和50%. I型和III型胶原主要分布于肝包膜、汇管区、血管壁. 肝纤维化时, 胶原含量增加47倍, 早期以III型胶原为主, 晚期则以I型为主; IV型胶原为基底膜胶原, 过多沉积引起肝窦毛细血管化, 影响肝内外物质交换, 加重肝功能损害<sup>[22-25]</sup>. 本文组织学检查结果发现对照组肝脏炎症和纤维化程度明显高于氧化苦参碱预防组, 免疫组织化学检测显示预防对照组大鼠肝内有大量I、III和IV型胶原沉积, 其中III型和IV型胶原的沉积形成肝窦毛细血管化, 而氧化苦参碱预防组肝内胶原沉积较少, 无明显的肝窦毛细血管化形成; 此外, 电镜学检查显示氧化苦参碱预防组肝细胞损伤程度亦较对照组显著减轻. 这些结果说明口服氧化苦参碱可减少CCl<sub>4</sub>诱导的大鼠肝纤维化组织中胶原纤维的表达, 同时有保护肝细胞的作用, 对肝纤维化的发生有预防作用. 肝星状细胞是肝纤维化发生的主要效应细胞, 其激活和增生是肝纤维化发生的基础, 因此抑制肝星状细胞的活化和增生是治疗肝纤维化的方向<sup>[17, 18, 21, 26-32]</sup>. 我们既往的研究亦证明了氧化苦参碱可抑制肝星状细胞的增生及产生ECM的作用, 在临床上有研究报道氧化苦参碱可用于治疗慢性病毒性肝炎肝纤维化<sup>[1, 2]</sup>, 组织病理学也证明其有减轻肝纤维化的作用, 已应用于临床. 尽管目前有不少报道氧化苦参碱有抗肝纤维化作用, 但其确切机制尚待进一步研究.

### 4 参考文献

- 1 陆伦根, 曾民德, 茅益民, 李继强, 万谟彬, 李成忠, 陈成伟, 傅青春, 王吉耀, 余为民, 蔡雄, 叶军, 周霞秋, 王晖, 巫善明, 唐美芳, 朱金水, 陈维雄, 张惠泉. 氧化苦参碱胶囊治疗慢性乙型病毒性肝炎的随机、双盲、安慰剂对照多中心临床研究(I). 肝脏 2002; 7:218-221
- 2 茅益民, 曾民德, 陆伦根, 李继强, 万谟彬, 李成忠, 陈成伟, 傅青春, 王吉耀, 余为民, 蔡雄, 叶军, 周霞秋, 王晖, 巫善明, 唐美芳, 朱金水, 陈维雄, 张惠泉. 氧化苦参碱胶囊治疗慢性病毒性肝炎肝纤维化的随机、双盲、安慰剂对照的多中心临床研究(II). 肝脏 2002;7:222-225
- 3 杨文卓, 曾民德, 范竹萍, 茅益民, 宋育林, 贾一韬, 陆伦根, 陈成伟, 彭延申, 朱红音. 氧化苦参碱防治半乳糖胺诱导大鼠肝纤维化的实验研究. 中华肝脏病杂志 2002;10:193-196
- 4 陈紫喧, 李继强, 曾民德, 陆伦根, 邱德凯, 茅益民, 范竹萍, 华静. 氧化苦参碱抗丙型肝炎病毒的体外实验研究. 中华肝脏病杂志 2001;9(增刊):12-14
- 5 李继强, 陈紫喧, 曾民德, 陆伦根, 邱德凯, 茅益民, 范竹萍, 华静.

- 氧化苦参碱抗乙型肝炎病毒的体外实验研究. *中华消化杂志* 2001;21:550-552
- 6 Liu J, Manheimer E, Tsutani K, Gluud C. Medicinal herbs for hepatitis C virus infection: a Cochrane hepatobiliary systematic review of randomized trials. *Am J Gastroenterol* 2003;98:538-544
  - 7 Chen YX, Mao BY, Jiang JH. Relationship between serum load of HBV-DNA and therapeutic effect of oxymatrine in patients with chronic hepatitis B. *Zhongguo Zhongxiyi Jiehe Zazhi* 2002;22:335-336
  - 8 Wang ML, Zhou QL, Wang BX. Studies on metabolism of oxymatrine by human intestinal bacteria. *Zhongguo Zhongyao Zazhi* 2001;26:272-274
  - 9 Dong Y, Xi H, Yu Y, Wang Q, Jiang K, Li L. Effects of oxymatrine on the serum levels of T helper cell 1 and 2 cytokines and the expression of the S gene in hepatitis B virus S gene transgenic mice: a study on the anti-hepatitis B virus mechanism of oxymatrine. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17:1299-1306
  - 10 Yu YY, Wang QH, Zhu LM, Zhang QB, Xu DZ, Guo YB, Wang CQ, Guo SH, Zhou XQ, Zhang LX. A clinical research on oxymatrine for the treatment of chronic hepatitis B. *Zhonghua Ganzhangbing Zazhi* 2002;10:280-281
  - 11 Xiang X, Wang G, Cai X, Li Y. Effect of oxymatrine on murine fulminant hepatitis and hepatocyte apoptosis. *Chin Med J* 2002;115:593-596
  - 12 Chen XS, Wang GJ, Cai X, Yu HY, Hu YP. Inhibition of hepatitis B virus by oxymatrine in vivo. *World J Gastroenterol* 2001;7:49-52
  - 13 Wang BE. Treatment of chronic liver diseases with traditional Chinese medicine. *J Gastroenterol Hepatol* 2000;(15 Suppl):E67-70
  - 14 Li C, Luo J, Li L, Cheng M, Huang N, Liu J, Waalkes MP. The collagenolytic effects of the traditional Chinese medicine preparation, Han-Dan-Gan-Le, contribute to reversal of chemical-induced liver fibrosis in rats. *Life Sci* 2003;72:1563-1571
  - 15 Shi JJ, Miao F, Liu FL. Therapeutic effect of medicinal herbs and western drugs on hepatitis B virus. *World J Gastroenterol* 1998;4(Suppl 2):61-62
  - 16 Cheng ML, Wu YY, Huang KF, Luo TY, Ding YS, Lu YY, Liu RC, Wu J. Clinical study on the treatment of liver fibrosis due to hepatitis B by IFN $\alpha$ -1 and traditional medicine preparation. *World J Gastroenterol* 1999;5:267-269
  - 17 Lu LG, Zeng MD, Li JQ, Hua J, Fan JG, Fan ZP, Qiu DK. Study on the role of lipid in proliferation and activation of rat hepatic stellate cells. *World J Gastroenterol* 1998;4:497-499
  - 18 Lu LG, Zeng MD, Li JQ, Hua J, Fan JG, Fan ZP, Qiu DK. Study on the role of (II) free fatty acids in proliferation of rat hepatic stellate cells. *World J Gastroenterol* 1998;4:500-502
  - 19 姜慧卿, 张晓岚. 肝纤维化的发生机制. *世界华人消化杂志* 2000;8:687-689
  - 20 白文元, 姚希贤, 冯丽英. 肝纤维化的研究现状. *世界华人消化杂志* 2000;8:1267-1268
  - 21 Iredale JP. Hepatic stellate cell behavior during resolution of liver injury. *Semin Liver Dis* 2001;21:427-436
  - 22 Benyon RC, Arthur MJ. Extracellular matrix degradation and the role of hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis* 2001;21:373-384
  - 23 Kang HC, Nan JX, Park PH, Kim JY, Lee SH, Woo SW, Zhao YZ, Park EJ, Sohn DH. Curcumin inhibits collagen synthesis and hepatic stellate cell activation in-vivo and in-vitro. *J Pharm Pharmacol* 2002;54:119-126
  - 24 Gaca MD, Zhou X, Benyon RC. Regulation of hepatic stellate cell proliferation and collagen synthesis by proteinase-activated receptors. *J Hepatol* 2002;36:362-369
  - 25 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
  - 26 Gaca MD, Pickering JA, Arthur MJ, Benyon RC. Human and rat hepatic stellate cells produce stem cell factor: a possible mechanism for mast cell recruitment in liver fibrosis. *J Hepatol* 1999;30:850-858
  - 27 Williams EJ, Benyon RC, Trim N, Hadwin R, Grove BH, Arthur MJ, Unemori EN, Iredale JP. Relaxin inhibits effective collagen deposition by cultured hepatic stellate cells and decreases rat liver fibrosis in vivo. *Gut* 2001;49:577-583
  - 28 Shen H, Huang GJ, Gong YW. Effect of transforming growth factor beta and bone morphogenetic proteins on rat hepatic stellate cell proliferation and trans-differentiation. *World J Gastroenterol* 2003;9:784-787
  - 29 Bridle KR, Crawford DH, Ramm GA. Identification and characterization of the hepatic stellate cell transferrin receptor. *Am J Pathol* 2003;162:1661-1667
  - 30 Shen H, Zhang M, Minuk GY, Gong Y. Different effects of rat interferon alpha, beta and gamma on rat hepatic stellate cell proliferation and activation. *BMC Cell Biol* 2002;3:9
  - 31 Lang A, Schoonhoven R, Tuvia S, Brenner DA, Rippe RA. Nuclear factor kappaB in proliferation, activation, and apoptosis in rat hepatic stellate cells. *J Hepatol* 2000;33:49-58
  - 32 Washington K, Wright K, Shyr Y, Hunter EB, Olson S, Raiford DS. Hepatic stellate cell activation in nonalcoholic steatohepatitis and fatty liver. *Hum Pathol* 2000;31:822-828

# 粉防己碱、大黄与潘生丁抗肝纤维化作用比较

王如涛, 陈颖伟, 卫新革, 徐芹芳, 李定国

王如涛, 陈颖伟, 卫新革, 徐芹芳, 李定国, 上海第二医科大学附属新华医院消化内科 上海市 200092

王如涛, 男, 1949-11-07 生, 上海市人, 汉族, 1982年毕业于上海第二医科大学, 1982年至今在上海第二医科大学附属新华医院消化内科工作, 副主任医师, 长期从事肝纤维化的临床和基础研究。

项目负责人: 李定国, 200092, 上海市控江路 1665 号, 上海第二医科大学附属新华医院消化内科。dingguo\_li@hotmail.com

电话: 021-65790000-4036 传真: 021-55571294

收稿日期: 2002-08-17 接受日期: 2002-09-05

## Comparative study of anti-hepatofibrotic effect of tetrandrine, rhubarb and dipyrindamole

Ru-Tao Wang, Ying-Wei Chen, Xin-Ge Wei, Qin-Fang Xu, Ding-Guo Li

Ru-Tao Wang, Ying-Wei Chen, Xin-Ge Wei, Qin-Fang Xu, Ding-Guo Li, Department of Gastroenterology, Xinhua Hospital, Shanghai Second Medical University, Shanghai, 200092, China

Correspondence to: Dr. Ding-Guo Li, Department of Gastroenterology, Xinhua Hospital, Shanghai Second Medical University, Shanghai, 200092, China. dingguo\_li@hotmail.com

Received: 2002-08-17 Accepted: 2002-09-05

### Abstract

AIM: To study the antihepatofibrotic mechanism of tetrandrine, rhubarb and dipyrindamole.

METHODS: The experimental hepatic fibrosis was induced by subcutaneous injection of CCl<sub>4</sub>. The three drugs were administered to male Sprague-Dawley rats by intragastric infusion respectively. Liver function test was performed by enzyme kinetics and the extracellular matrix (ECM) contents were determined by radioimmunoassay. Pathological changes of liver tissues were detected by HE and VG staining, meanwhile, ultra micro-structure changes were observed by electron microscope in randomly selected samples.

RESULTS: All of the three drugs could improve the liver function in liver fibrosis, reduce the contents of ECM and the degree of liver fibrosis. There was no significant difference among the three drugs.

CONCLUSION: Tetrandrine, rhubarb and dipyrindamole could protect hepatocytes, inhibit the synthesis of ECM, and thereby could prevent the development of liver fibrosis and cirrhosis in the experimental animal models.

Wang RT, Chen YW, Wei XG, Xu QF, Li DG. Comparative study of anti-hepatofibrotic effect of tetrandrine, rhubarb and dipyrindamole. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003;11(10):1492-1496

### 摘要

目的: 观察并比较粉防己碱(tetrandrine, tet)、大黄与潘生

丁对实验性肝纤维化的影响, 探讨其可能的作用机制。

方法: 四氯化碳皮下注射法制备大鼠肝纤维化模型, 分别给予不同剂量的药物灌胃, 酶动力法测定肝功能指标, 放免法测定细胞外基质(extracellular matrix, ECM)水平, HE、VG 染色和电镜检测病理形态学改变。

结果: 三种药物可不同程度地改善肝纤维化时的肝功能状态, 降低ECM 含量, 降低肝纤维化程度, 以小剂量Tet、大剂量大黄和小剂量潘生丁效果最显著。药物间比较无显著差异。

结论: Tet、大黄和潘生丁均可保护肝细胞, 抑制ECM 合成, 具有防治实验性肝纤维化和肝硬化的作用。

王如涛, 陈颖伟, 卫新革, 徐芹芳, 李定国. 粉防己碱、大黄与潘生丁抗肝纤维化作用比较. 世界华人消化杂志 2003;11(10):1492-1496  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1492.asp>

### 0 引言

肝纤维化与肝硬化的治疗一直是医学界的难题。近年来, 我们曾就粉防己碱(tetrandrine, tet)对肝纤维化的防治作用进行了一系列的研究。研究表明: Tet 能保护肝细胞及各种细胞器, 降低血清透明质酸(hyaluronic acid, HA)、Ⅲ型前胶原(procollagen, PC Ⅲ)水平, 阻遏肝脏贮脂细胞的增生转化, 并能在转录水平上抑制胶原合成, 减少胶原沉积, 从而具有良好的抗肝纤维化作用<sup>[1]</sup>。然而, 大剂量的Tet 毒性较强, 且其中毒剂量与治疗剂量相当接近, 因而限制了Tet 在临床的推广应用。因此, 寻找更安全有效的抗肝纤维化药物是现今治疗肝纤维化的当务之急。文献报道, 大黄和潘生丁均能保护肝细胞, 并具有明显的抗脂质过氧化作用<sup>[2, 3]</sup>。本研究中, 我们分别观察和比较Tet、大黄与潘生丁对实验性肝纤维化的影响, 并探讨其可能的作用机制。

### 1 材料和方法

1.1 材料 动物: ♂ SD 大鼠, 体重 250 g 左右, 购自中国科学院上海实验动物中心。药物和试剂: Tet、潘生丁: 浙江金华第三制药厂产品; 生大黄粉: 上海童涵春堂国药号; 羟脯氨酸(hydroxyproline, HYP): 中国科学院上海生物化学研究所产品; HA、层粘连蛋白(laminin, LN)和PC Ⅲ放免测定试剂盒: 海军上海医学研究所产品。主要仪器: 自动生化分析仪: 日本岛津公司产品; MJ-182 型放射免疫计数器: 中国科学院上海原子核研究所四环



仪器厂产品; UV-Vis7530 型分光光度计: 上海分析仪器厂产品; 普通光学显微镜: 日本OLYMPUS公司产品; H-500 透射电镜: 日本 HITACHI 公司产品.

1.2 方法 实验分组及处理: 110 只 ♂ SD 大鼠, 随机分为 I 组: 正常对照组; II 组: 模型对照组; III 组: Tet 治疗组(大剂量组: 40 mg/kg; 中剂量组: 20 mg/kg; 小剂量组: 10 mg/kg); IV 组: 大黄治疗组(大剂量组: 1 000 mg/kg; 中剂量组: 500 mg/kg; 小剂量组: 250 mg/kg); V 组: 潘生丁治疗组(大剂量组: 12 mg/kg; 中剂量组: 6 mg/kg; 小剂量组: 3 mg/kg). 共 11 个实验组, 每组 10 只大鼠. 模型建立采用经 SD 大鼠的皮下注射 40% CCl<sub>4</sub>, 剂量为 0.3 ml/kg (首剂加倍), 3d/次, 共 15 次; 正常对照组则以同样方法注射等量的精制橄榄油. 造模结束后第 2 d 起, 给予模型治疗组不同剂量的 Tet、大黄或潘生丁混悬剂分别灌胃, 1 次/d, 共 42 次; 模型对照组则予以等量的 0.5% 羧甲基纤维素混悬剂按同样要求灌胃. 治疗结束后, 处死动物, 分别取血清和肝组织进行各项测定. 肝功能系列测定采用酶试剂法, 自动生化分析仪检测. 细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的检测: (1)肝组织 HYP 含量测定: 参照郑少雄法<sup>[4]</sup>; (2)血清 HA、LN 及 PCIII 含量测定: 采用放免法, 按 HA、LN 及 PCIII 放免分析测定试剂盒说明书操作. 病理形态学检测采用 HE 常规染色、VG 胶原染色, 并进行肝纤维化分级<sup>[5, 6]</sup>; 透射电镜下观察比较各组大鼠超

微结构变化.

统计学处理 计量资料采用方差分析; 计数资料采用 Ridit 检验.

## 2 结果

2.1 Tet、大黄与潘生丁对肝纤维化大鼠肝功能的影响与正常对照组相比, 模型对照组大鼠血清 ALT、AST 及 ALP 水平都明显升高( $P < 0.01$ ); 血清 ALB 及 TBIL 水平则无明显变化( $P > 0.05$ ). 三种药物各剂量治疗组的血清 ALT、ALP 水平均显著下降( $P < 0.01-0.05$ ); 大黄各剂量组间比较无统计学差异, Tet 和潘生丁则均以小剂量效果最优; 血清 AST 水平在 Tet 大、小剂量组及潘生丁各剂量组中亦明显降低. 三种药物比较, 血清 ALT 下降程度以小剂量 Tet 和小剂量潘生丁为优, 而血清 ALP 下降程度在三种药物九个剂量组均无统计学差异, 表 1-3.

2.2 Tet、大黄与潘生丁对肝纤维化大鼠 ECM 的影响与正常对照组相比, 肝纤维化模型组肝组织 HYP 含量及血清 HA、LN 及 PCIII 含量均显著升高( $P < 0.01$ ); Tet、大黄与潘生丁各剂量组能不同程度地降低这四种指标水平, 分别以 Tet 小剂量、大黄大剂量和潘生丁小剂量最为有效( $P < 0.05-0.01$ ). 此三者相比, HYP 下降以小剂量潘生丁最明显, 而对血清 HA、LN 及 PCIII 的影响则以小剂量 Tet 最有效, 表 4-9.

表 1 Tet 对肝纤维化大鼠肝功能的影响

	ALT( $\mu$ l)	AST( $\mu$ l)	AKP( $\mu$ l)	$\gamma$ -GT( $\mu$ l)	A1b(g/l)	TBIL( $\mu$ mmol/l)
正常对照组	59 $\pm$ 13	282 $\pm$ 47	165 $\pm$ 77	0.83 $\pm$ 0.7	40 $\pm$ 2.7	18.5 $\pm$ 12.0
模型对照组	148 $\pm$ 54 <sup>b</sup>	367 $\pm$ 43 <sup>b</sup>	480 $\pm$ 195 <sup>b</sup>	3.67 $\pm$ 2.7	46.7 $\pm$ 7.0	18.3 $\pm$ 4.6
模型治疗组						
大剂量	89 $\pm$ 9 <sup>d</sup>	287 $\pm$ 34 <sup>d</sup>	227 $\pm$ 70 <sup>d</sup>	6.0 $\pm$ 3.0	39.7 $\pm$ 4.1	16.8 $\pm$ 6.0
中剂量	79 $\pm$ 22 <sup>d</sup>	312 $\pm$ 72	170 $\pm$ 54 <sup>d</sup>	2.0 $\pm$ 2.3	41.5 $\pm$ 3.6	17.2 $\pm$ 5.8
小剂量	62 $\pm$ 16 <sup>d</sup>	306 $\pm$ 34 <sup>a</sup>	205 $\pm$ 45 <sup>d</sup>	1.5 $\pm$ 0.9	44.7 $\pm$ 5.3	10.3 $\pm$ 2.3

<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 正常对照组, <sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 模型对照组, <sup>d</sup> $P < 0.01$  vs 模型对照组.

表 2 大黄对肝纤维化大鼠肝功能的影响

	ALT( $\mu$ l)	AST( $\mu$ l)	AKP( $\mu$ l)	$\gamma$ -GT( $\mu$ l)	A1b(g/l)	TBIL( $\mu$ mmol/l)
正常对照组	59 $\pm$ 13	282 $\pm$ 47	165 $\pm$ 77	0.83 $\pm$ 0.7	46 $\pm$ 2.7	18.5 $\pm$ 12.0
模型对照组	148 $\pm$ 54 <sup>b</sup>	367 $\pm$ 43 <sup>b</sup>	480 $\pm$ 195 <sup>b</sup>	3.67 $\pm$ 2.7	46.7 $\pm$ 7.0	18.3 $\pm$ 4.6
模型治疗组						
大剂量	87 $\pm$ 11 <sup>d</sup>	382 $\pm$ 55	201 $\pm$ 36 <sup>d</sup>	2.0 $\pm$ 0.8	45.6 $\pm$ 6.5	18.1 $\pm$ 3.1
中剂量	92 $\pm$ 24 <sup>a</sup>	329 $\pm$ 80	193 $\pm$ 38 <sup>d</sup>	2.25 $\pm$ 0.5	40 $\pm$ 4.7	17.9 $\pm$ 4.2
小剂量	97 $\pm$ 20 <sup>a</sup>	398 $\pm$ 102	189 $\pm$ 41 <sup>a</sup>	2.78 $\pm$ 0.7	39.5 $\pm$ 3.5	17.7 $\pm$ 8.4

<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 正常对照组, <sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 模型对照组, <sup>d</sup> $P < 0.01$  vs 模型对照组.

表 3 潘生丁对肝纤维化大鼠肝功能的影响

	ALT( $\mu$ l)	AST( $\mu$ l)	AKP( $\mu$ l)	$\gamma$ -GT( $\mu$ l)	A1b(g/l)	TBIL( $\mu$ mmol/l)
正常对照组	59 $\pm$ 13	282 $\pm$ 47	165 $\pm$ 77	0.83 $\pm$ 0.7	40 $\pm$ 2.7	18.5 $\pm$ 12.0
模型对照组	148 $\pm$ 54 <sup>b</sup>	367 $\pm$ 43 <sup>b</sup>	480 $\pm$ 195 <sup>b</sup>	3.67 $\pm$ 2.7	46.7 $\pm$ 7.0	18.3 $\pm$ 4.6
模型治疗组						
大剂量	101 $\pm$ 36 <sup>d</sup>	304 $\pm$ 56 <sup>a</sup>	196 $\pm$ 41 <sup>d</sup>	6.0 $\pm$ 3.0	43.2 $\pm$ 1.8	11.8 $\pm$ 2.8
中剂量	74 $\pm$ 37 <sup>d</sup>	303 $\pm$ 61	170 $\pm$ 15 <sup>d</sup>	2.0 $\pm$ 2.3	45 $\pm$ 5.2	10.1 $\pm$ 2.1
小剂量	62 $\pm$ 19 <sup>d</sup>	308 $\pm$ 42 <sup>a</sup>	152 $\pm$ 21 <sup>d</sup>	1.5 $\pm$ 0.9	45.3 $\pm$ 5.7	12.6 $\pm$ 3.9

<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 正常对照组, <sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 模型对照组, <sup>d</sup> $P < 0.01$  vs 模型对照组.

表4 Tet对大鼠ECM的影响

	HYP( $\mu\text{g/g}$ )	PC III ( $\mu\text{g/l}$ )	HA( $\mu\text{g/l}$ )	LN( $\mu\text{g/l}$ )
正常对照组	709 $\pm$ 195	15 $\pm$ 3	36 $\pm$ 9	31 $\pm$ 11
模型对照组	1 765 $\pm$ 509 <sup>b</sup>	35 $\pm$ 8 <sup>b</sup>	119 $\pm$ 23 <sup>b</sup>	77 $\pm$ 17 <sup>b</sup>
模型治疗组				
大剂量	1 298 $\pm$ 234 <sup>a</sup>	33 $\pm$ 12	103 $\pm$ 19	48 $\pm$ 19 <sup>d</sup>
中剂量	1 062 $\pm$ 203 <sup>d</sup>	28 $\pm$ 8	43 $\pm$ 19 <sup>d</sup>	42 $\pm$ 16 <sup>d</sup>
小剂量	914 $\pm$ 169 <sup>d</sup>	20 $\pm$ 6 <sup>d</sup>	39 $\pm$ 18 <sup>d</sup>	44 $\pm$ 14 <sup>d</sup>

<sup>b</sup>P < 0.01 vs 正常对照组, <sup>a</sup>P < 0.05 vs 模型对照组, <sup>d</sup>P < 0.01 vs 模型对照组.

表5 大黄对大鼠ECM的影响

	HYP( $\mu\text{g/g}$ )	PC III ( $\mu\text{g/l}$ )	HA( $\mu\text{g/l}$ )	LN( $\mu\text{g/l}$ )
正常对照组	709 $\pm$ 195	15 $\pm$ 3	36 $\pm$ 9	31 $\pm$ 11
模型对照组	1 765 $\pm$ 509 <sup>b</sup>	35 $\pm$ 8 <sup>b</sup>	119 $\pm$ 23 <sup>b</sup>	77 $\pm$ 17 <sup>b</sup>
模型治疗组				
大剂量	966 $\pm$ 162 <sup>d</sup>	22 $\pm$ 6 <sup>d</sup>	72 $\pm$ 14 <sup>d</sup>	49 $\pm$ 14 <sup>d</sup>
中剂量	1 109 $\pm$ 195 <sup>d</sup>	28 $\pm$ 8	86 $\pm$ 16 <sup>d</sup>	61 $\pm$ 16 <sup>a</sup>
小剂量	1 297 $\pm$ 251 <sup>a</sup>	32 $\pm$ 7	105 $\pm$ 22	68 $\pm$ 16

<sup>b</sup>P < 0.01 vs 正常对照组, <sup>a</sup>P < 0.05 vs 模型对照组, <sup>d</sup>P < 0.01 vs 模型对照组.

表6 潘生丁对大鼠ECM的影响

	HYP( $\mu\text{g/g}$ )	PC III ( $\mu\text{g/l}$ )	HA( $\mu\text{g/l}$ )	LN( $\mu\text{g/l}$ )
正常对照组	709 $\pm$ 195	15 $\pm$ 3	36 $\pm$ 9	31 $\pm$ 11
模型对照组	1765 $\pm$ 509 <sup>b</sup>	35 $\pm$ 8 <sup>b</sup>	119 $\pm$ 23 <sup>b</sup>	77 $\pm$ 17 <sup>b</sup>
模型治疗组				
大剂量	1 067 $\pm$ 323 <sup>d</sup>	31 $\pm$ 8	81 $\pm$ 16 <sup>d</sup>	68 $\pm$ 11
中剂量	926 $\pm$ 120 <sup>d</sup>	27 $\pm$ 8 <sup>a</sup>	94 $\pm$ 21 <sup>d</sup>	65 $\pm$ 9
小剂量	882 $\pm$ 161 <sup>a</sup>	24 $\pm$ 9 <sup>d</sup>	98 $\pm$ 16 <sup>d</sup>	60 $\pm$ 11 <sup>a</sup>

<sup>b</sup>P < 0.01 vs 正常对照组, <sup>a</sup>P < 0.05 vs 模型对照组, <sup>d</sup>P < 0.01 vs 模型对照组.

表7 Tet对大鼠肝纤维化程度的影响

	<i>n</i>	0	I	II	III	IV	U值
正常对照组	10	10	0	0	0	0	-
模型对照组	10	0	1	1	3	5	-
模型治疗组							
大剂量	10	0	1	1	5	3	0.62
中剂量	10	0	4	3	1	2	1.70
小剂量	10	0	5	3	1	1	2.48 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>P < 0.05 vs 模型组.

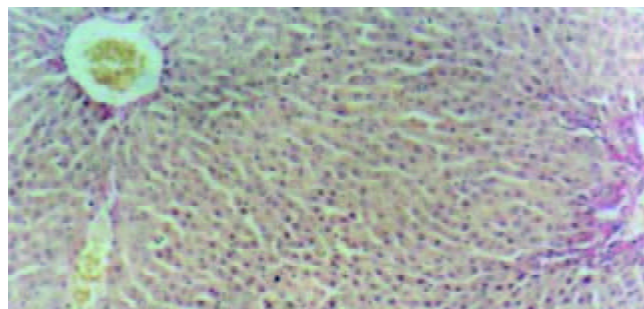
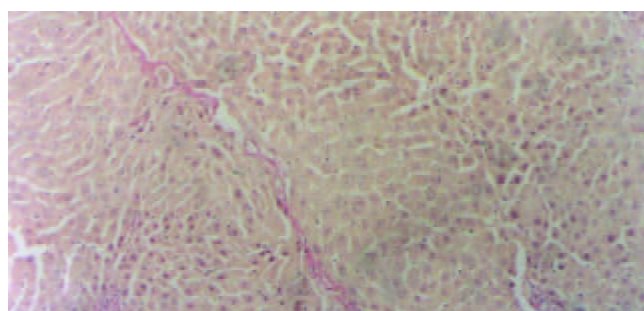
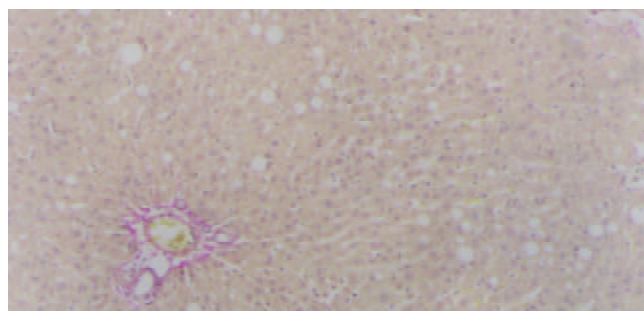
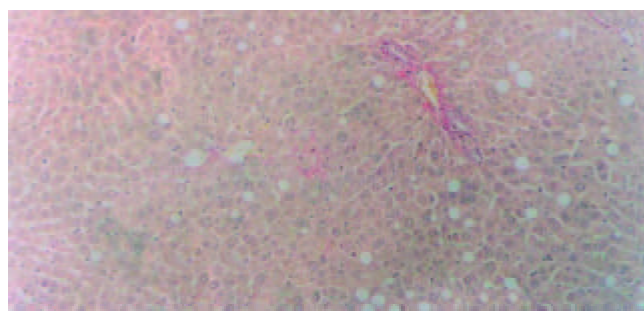
表8 大黄对大鼠肝纤维化程度的影响

	<i>n</i>	0	I	II	III	IV	U值
正常对照组	10	10	0	0	0	0	-
模型对照组	10	0	1	1	3	5	-
模型治疗组							
大剂量	10	0	5	2	2	1	2.32 <sup>a</sup>
中剂量	10	0	5	2	1	2	2.01 <sup>a</sup>
小剂量	10	0	2	2	3	3	1.01

<sup>a</sup>P < 0.05 vs 模型组.

表9 潘生丁对大鼠肝纤维化程度的影响

	<i>n</i>	0	I	II	III	IV	U值
正常对照组	10	10	0	0	0	0	-
模型对照组	10	0	1	1	3	5	-
模型治疗组							
大剂量	10	0	2	2	2	4	0.70
中剂量	10	0	4	2	2	2	1.78
小剂量	10	0	5	2	2	1	2.32 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>P < 0.05 vs 模型组.图1 正常对照组大鼠肝组织VG染色( $\times 100$ ).图2 模型对照组大鼠肝组织VG染色( $\times 100$ ).图3 小剂量潘生丁治疗组大鼠肝组织VG染色( $\times 100$ ).图4 小剂量Tel治疗组大鼠肝组织VG染色( $\times 100$ ).

2.3 Tet、大黄与潘生丁对肝纤维化大鼠病理形态学的影响。  
2.3.1 光镜观察(图 1-4) 肝组织切片 HE 常规染色和 VG 胶原染色显示, 肝纤维化模型对照组大鼠肝组织中可见肝细胞脂肪变性, 坏死, 炎细胞浸润; 汇管区内胶原纤维沉积, Henny's 管增生; 纤维结缔组织明显增生, 纤维间隔增粗, 并有典型假小叶形成。模型治疗组大鼠肝组织纤维结缔组织增生程度减轻, 纤维间隔变细, 假小叶形成不明显, 尤以小剂量 Tet、大、中剂量的大黄和小剂量潘生丁为明显, 与模型对照组比较有显著性差异( $P < 0.05$ )。

2.3.2 电镜观察(图 5-8) 正常对照组大鼠肝细胞间紧密相连, 细胞内各种细胞器分布规律, 结构典型。血窦排列整齐, Disse 腔内可见肝贮脂细胞, 胞质内有脂滴。模型对照组大鼠肝组织中则出现典型的肝细胞损伤结构, 相邻肝细胞间隙增宽, 肝细胞变性坏死, 核固缩, 胞质内出现大小不等、分布不规则的脂滴。线粒体增生、肿胀及肥大, 内质网扩张, 出现脂褐素体和髓鞘样结构; 此外, 肝组织中还存在轻重不等的纤维化病变。内质网明显扩张, 内质网池有絮状和丝状蛋白样结构, 内皮细胞窗孔明显减少, 内皮侧有基底膜形成, 形成“裙边”样切面。肝窦毛细血管化, Disse 腔内可见较多成纤维细胞(活化的肝贮脂细胞), 且周围有大量胶原纤维沉积。汇管区内可出现大量的胶原纤维。

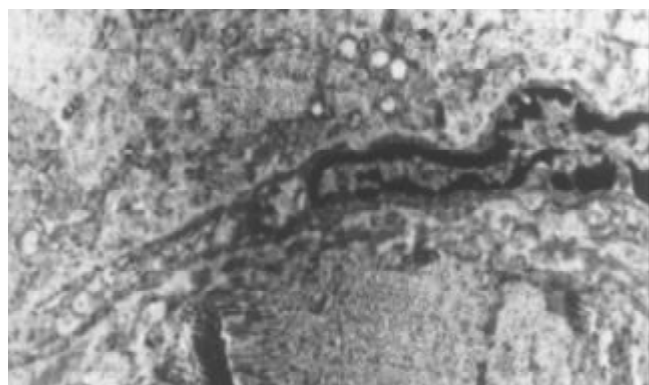


图5 模型对照组大鼠肝组织投射电镜( $\times 5\ 000$ )。

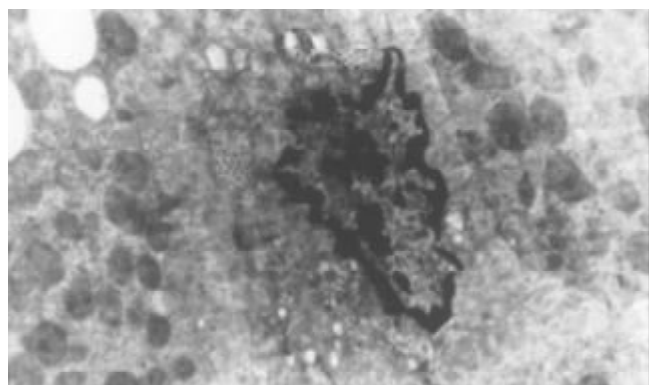


图6 大剂量大黄对照组大鼠肝组织投射电镜( $\times 5\ 000$ )。

Tet、大黄和潘生丁治疗组中, 肝细胞的损伤程度有不同程度的减轻, 肝细胞间隙较紧密, 胞质内脂肪小

滴减少, 细胞内结构趋向正常。肝纤维化病变不明显, 肝血窦和 Disse 腔内胶原纤维沉积及成纤维样细胞数量减少。

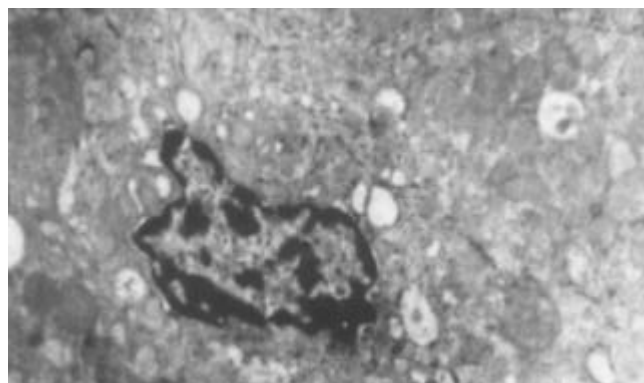


图7 小剂量 Tet 治疗组大鼠肝组织透射电镜( $\times 5\ 000$ )。

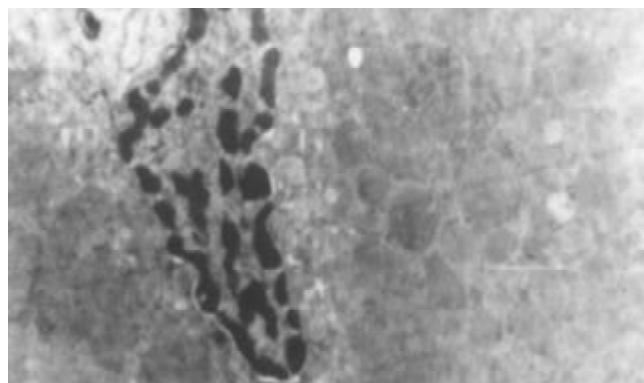


图8 小剂量潘生丁治疗组大鼠肝组织透射电镜( $\times 5\ 000$ )。

### 3 讨论

肝纤维化系多种慢性肝损伤的异常修复过程, 主要为细胞外胶原和其他基质成分的合成和降解失衡, 造成 ECM 在肝内过量生成和沉积。由于肝脏过度或异常的纤维结缔组织增生, 故使小叶结构发生紊乱, 肝内微循环障碍, 造成肝细胞功能进一步降低。因此, 抗肝纤维化的主要任务是减少慢性肝损伤过程中 ECM 在肝内的沉积量<sup>[7]</sup>。

ECM 包括胶原、非胶原性糖蛋白及蛋白多糖三种主要成分。HYP 是胶原蛋白的主要成分, 约占胶原氨基酸总量的 13 %。肝组织内 HYP 含量的测定是衡量肝脏胶原组织代谢和判定抗肝纤维化疗效的重要指标<sup>[8]</sup>。PC III 是 III 型胶原的前体, 其在血清中的水平可反映 III 型胶原的合成状态, 并与肝纤维化程度呈密切正相关<sup>[9]</sup>。HA 是 ECM 中重要的蛋白多糖, 主要由肝贮脂细胞合成, 在窦状隙内皮细胞内降解。血清 HA 水平与肝纤维化的病理改变之间存在着良好的一致性<sup>[10, 11]</sup>, 对反映肝纤维化程度和肝内皮细胞功能具有较高的敏感性和准确性<sup>[12]</sup>。LN 是 ECM 中的糖蛋白, 在肝纤维化时沉积于 Disse 腔, 参与肝窦毛细血管的形成<sup>[13]</sup>, 其血清含量变化在肝纤维化诊断和预后评估中均具有重要价值<sup>[14]</sup>。本实验中发现, 三种药物各剂量治疗组中不仅有各项肝功能指标的改善, 而且肝组织 HYP 含量和血清 HA、

LN及PCⅢ含量均有不同程度的降低,以小剂量Tet、大剂量大黄和小剂量潘生丁最为有效.结果提示,这三种药物能对抗CCl<sub>4</sub>所致的肝细胞损伤,减少肝纤维化时ECM的沉积,从而具有抗肝纤维化的作用.

本研究中HE常规染色显示,模型对照组大鼠肝组织中可见肝细胞脂肪变性坏死,炎细胞浸润,汇管区扩大,Henny's管增生;VG胶原染色则显示,汇管区内红色的胶原纤维明显增生,纤维间隔增粗,并有典型假小叶形成.模型治疗组大鼠肝组织纤维结缔组织增生程度减轻,纤维间隔变细,假小叶形成不明显,尤以小剂量Tet、大、中剂量大黄和小剂量潘生丁模型治疗组为明显,与模型对照组比较有显著性差异( $P < 0.05$ ),但这四者之间的变化则无统计学意义( $P > 0.05$ ).实验结果进一步证实了Tet、大黄和潘生丁的抗大鼠肝纤维化作用.

业已证实,肝脏贮脂细胞是肝脏发生纤维化的关键细胞.在正常状态下,其主要功能为储存和代谢维生素A,仅合成与分泌少量的ECM及有一定的产生胶原酶的能力.在肝损伤时,贮脂细胞大量增生并发生表型改变,转化为肌成纤维母细胞,产生除V型胶原以外几乎所有的ECM成分<sup>[15]</sup>.贮脂细胞的增生转化受多种因素调节,其中,血小板源生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)是最重要的细胞因子之一<sup>[16, 17]</sup>.体外研究发现, Tet能明显抑制肝贮脂细胞的增生与转化;阻断PDGF对肝贮脂细胞的激活作用;可呈浓度和时间依赖性地抑制成纤维细胞地生长和增生<sup>[18-21]</sup>.有文献报道,肝脏Kupper's细胞的活化可刺激肝贮脂细胞的增生和转化,而大黄可剂量依赖性地抑制肝脏Kupper's细胞的活化<sup>[22]</sup>;近年来国外研究认为,潘生丁在肝损伤时能抑制血小板的聚集,减少PDGF的释放,从而影响PDGF对贮脂细胞的激活.因此,我们推测,这三种药物抗肝纤维化作用可能与他们在不同环节抑制肝贮脂细胞增生转化有关.

本实验中,三种药物之间的疗效无显著差异.我们设想,药物的联合应用是否可以提高疗效?而联合应用时各种药物的剂量又该如何设定?这些问题均有待于进一步研究.

#### 4 参考文献

- 1 李定国, 陆汉明, 陈颖伟. 汉防己甲素抗肝纤维化研究进展. 世界华人消化杂志 1999;7:171-172
- 2 吴英良, 曹颖林, 时向群, 史逸达. 大黄对小鼠肝脏脂质过氧化的抑制作用. 中国中药杂志 1996;21:240-242
- 3 Perez-Alvarez V, Bobadilla-Lugo RA, Muriel P, Favari L, Villanueva-Lopez C. Effects of leukotriene synthesis inhibition on acute liver damage induced by carbon tetrachloride. *Pharmacology* 1993;47:330-336
- 4 郑少雄, 蔡文仪, 邱明才, 苏学良. 血尿羟脯氨酸测定的方法改进. 中华医学检验杂志 1983;6:133-136
- 5 Schvarcz R, Glaumann H, Weiland O. Survival and histological resolution of fibrosis in patients with autoimmune chronic active hepatitis. *J Hepatol* 1993;18:15-23
- 6 翟为溶, 王泰龄, 周晓军, 张泰和. 慢性肝炎的诊断、分级和分期. 中华消化杂志 1996;16:277-280
- 7 程明亮, 刘三都. 肝纤维化的基础研究及临床. 第1版. 北京:人民卫生出版社, 1996:1-10
- 8 车建途, 陆汉明, 李定国, 王秀玲, 陈强. 硝苯啶对大鼠肝纤维化肝透明质酸、羟脯氨酸及氨基葡萄糖苷酶的影响. 中国医学科学院学报 1994;16:35-38
- 9 叶红军. 血清Ⅲ型前胶原对肝纤维化的诊断价值. 临床肝胆病杂志 1993;9:90-92
- 10 张鲁榕, 孔宪涛, 张国治, 李石, 谢映华, 耿培兰, 许绍辉, 薛利华. 血清透明质酸在诊断肝纤维化中的价值. 中华消化杂志 1991;11:67-68
- 11 Nyberg A, Engstrom-Laurent A, Loof L. Serum hyaluronate in primary biliary cirrhosis-a biochemical marker for progressive liver damage. *Hepatology* 1988;8:142-146
- 12 Wu J, Danielsson A. Detection of hepatic fibrogenesis: a review of available techniques. *Scand J Gastroenterol* 1995;30:817-825
- 13 王杰军, 孔宪涛, 李石, 陈士葆. 血清层粘连蛋白检测在慢性肝病诊断中的价值. 中华消化杂志 1992;12:30-31
- 14 Schuppan D, Stölzel U, Oesterling C, Somasundaram R. Serum assays for liver fibrosis. *J Hepatol* 1995;22(2 Suppl):82-88
- 15 Ramadori G. The stellate cell (Ito-cell, fat-storing cell, lipocyte, perisinusoidal cell of the liver: new insights into pathophysiology of an intriguing cell. *Virchows Archiv B Cell Pathol* 1991;61:147-158
- 16 Peterson TC. Pentoxifylline prevents fibrosis in an animal model and inhibits platelet-derived growth factor driven proliferation of fibroblasts. *Hepatology* 1993;17:486-493
- 17 Marra F, Chouhury GG, Pinzani M, Abboud HE. Regulation of platelet-derived growth factor secretion and gene expression in human liver fat-storing cells. *Gastroenterology* 1994;107:1110-1117
- 18 刘玉兰, 李定国, 陆汉明, 徐芹芳. 四种钙拮抗剂对3T6成纤维细胞的调控. 北京医学 1996;18:26-29
- 19 刘学松, 李定国, 陆汉明, 徐芹芳. 汉防己甲素及维拉帕米对成纤维细胞生长增生的影响. 新消化病杂志 1997;5:82-83
- 20 刘玉兰, 李定国, 陆汉明. 汉防己甲素对RBL肝细胞及3T6成纤维细胞的影响. 中西医结合肝病杂志 1994;4:21-23
- 21 范列英, 孔宪涛, 高峰, 高春芳, 侯健. 汉防己甲素对成纤维细胞、人胎肝细胞DNA及胶原合成的影响. 临床肝胆病杂志 1995;11:25-26
- 22 许锋, 陆伯刚, 姚智, 鲁焕章, 吴咸中. 大黄、大黄素对内毒素刺激下大鼠肝巨噬细胞分泌细胞因子影响的动态观察. 中国实验临床免疫学杂志 1996;8:41-43



# 珍珠梅水提物对大鼠肝损伤的保护作用

张学武, 朴龙, 刘超, 孙权, 金海玲, 尹宗柱

张学武, 孙权, 金海玲, 尹宗柱, 延边大学医学院生物化学与分子生物学教研室 吉林省延吉市 133000  
朴龙, 延边大学医学院附属医院科教处 吉林省延吉市 133000  
刘超, 延边大学医学院附属医院神经内科 吉林省延吉市 133000  
张学武, 男, 1973-05-15年生, 汉族, 讲师, 医学硕士. 主要从事肝脏生物化学. 研究工作, 已发表论文10篇.  
项目负责人: 张学武, 133000, 吉林省延吉市局子街121号, 延边大学医学院生物化学与分子生物学教研室. zlz2913835@sina.com  
电话: 0433-2660588 传真: 0433-2659795  
收稿日期: 2003-03-29 接受日期: 2003-05-19

## Studies on liver-protection of *Sorbaria sorbifolia* aqueous extract

Xue-Wu Zhang, Long Piao, Chao Liu, Quan Sun, Hai-Ling Jin, Zong-Zhu Yin

Xue-Wu Zhang, Quan Sun, Hai-Ling Jin, Zong-Zhu Yin, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Yanbian University College of Medicine, Yanji 133000, Jilin Province, China  
Long Piao, Department of Science and Education, Affiliated Hospital, Yanbian University College of Medicine, Yanji 133000, Jilin Province, China  
Chao Liu, Department of Neurology, Affiliated Hospital, Yanbian University College of Medicine, Yanji 133000, Jilin Province, China  
Correspondence to: Xue-Wu Zhang, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Yanbian University College of Medicine. 121 Juzi Street, Yanji 133000, Jilin Province, China. zlz2913835@sina.com  
Received: 2003-03-29 Accepted: 2003-05-19

## Abstract

AIM: To study the liver-protection effects of *Sorbaria sorbifolia* aqueous extract.

METHODS: *Sorbaria sorbifolia* was perfused into stomach of the rats with liver injury induced by carbon tetrachloride and D-galactosamine. The activities of serum aspartate transaminase (AST), alanine transaminase (ALT), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-PX), and malondialdehyde (MDA) were investigated by using colorimetric method.

RESULTS: The aqueous extract of *Sorbaria sorbifolia* significantly reduced serum ALT and AST in acute liver-injury induced by carbon tetrachloride and D-galactosamine, the activities of SOD and GSH-PX were significantly higher in treated group than that in model group, and the MDA content in treated group was lower than that in model group.

CONCLUSION: The aqueous extract of *Sorbaria sorbifolia* has protecting effects for rats with acute hepatic injury induced by carbon tetrachloride and D-galactosamine.

Zhang XW, Piao L, Liu C, Sun Q, Jin HL, Yin ZZ. Studies on liver-protection of *Sorbaria sorbifolia* aqueous extract. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(10):1497-1499

## 摘要

目的: 研究珍珠梅水提物的保肝作用.

方法: 给动物灌胃给药, 用CCl<sub>4</sub>, D-半乳糖造大鼠急性肝损伤模型, 用比色分析法测定大鼠血清天冬氨酸转氨酶(aspartate transaminase, ALT)、丙氨酸转氨酶(alanine transaminase, AST)的活性; 测定大鼠血清超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)的活性及丙二醛(malondialdehyde, MDA)的含量.

结果: 珍珠梅水提物显著降低因CCl<sub>4</sub>, D-半乳糖所致急性肝损伤大鼠血清ALT, AST的升高; 对急性肝损伤大鼠血清SOD, GSH-PX的活性有明显的升高作用及降低MDA的含量.

结论: 珍珠梅水提物对CCl<sub>4</sub>, D-半乳糖所致大鼠急性肝损伤有保护作用.

张学武, 朴龙, 刘超, 孙权, 金海玲, 尹宗柱. 珍珠梅水提物对大鼠肝损伤的保护作用. 世界华人消化杂志 2003;11(10):1497-1499  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1497.asp>

## 0 引言

珍珠梅(*sorbaria sorbifolia*)属蔷薇科植物, 又称山高粱、八木条、珍珠杆, 广泛分布于云南、贵州、四川、湖北、甘肃、宁夏及东北, 有活血化瘀、消肿止痛, 治骨折、跌打损伤的作用, 我们曾研究珍珠梅乙酸乙酯提取物对CCl<sub>4</sub>所致大鼠急性肝损伤的保护作用<sup>[1]</sup>. 本次实验研究珍珠梅水提物的保肝作用.

## 1 材料和方法

1.1 材料 珍珠梅采集于吉林省延吉市市郊. 水提取物: 珍珠梅茎、叶、花, 加水煎煮三次, 做成水煎液, 浓缩成1 mL含有生药4 g. SOD, MDA, GSH-PX试剂盒购置南京建成生物工程研究所, 联苯双酯由浙江温岭制药厂生产, 批号: 980813, 其他试剂均为国产分析纯. Wistar大鼠, 雌雄各半, 质量为180-200 g, 由延边大学医学院动物科提供.

## 1.2 方法

1.2.1 CCl<sub>4</sub>致大鼠急性肝损伤 取Wistar大鼠50只, 随机分为正常组、模型组、大、小剂量给药组、阳性对照组5个组. 给药组按10 g/kg、5 g/kg剂量、阳性对照组按0.2 g/kg剂量灌胃联苯双酯, 正常组、模型组

以等体积生理盐水灌胃, 共5 d. 第4 d, 模型组、给药组和阳性对照组按5.0 mL/kg 剂量背部皮下注射CCl<sub>4</sub>, 正常组背部皮下注射等体积生理盐水. 皮下注射CCl<sub>4</sub> 24 h后, 摘眼球取血, 分离血清. 用全自动生化分析仪检测血清ALT, AST的活性, 用比色分析法检测血清SOD, GSH-Px的活性及MDA的含量.

1.2.2 D-半乳糖致大鼠急性肝损伤 取Wistar大鼠50只, 随机分为正常组、模型组、大、小剂量给药组、阳性对照组组5个组. 给药组按10 g/kg、5 g/kg 剂量, 阳性对照组按0.2 g/kg 联苯双酯灌胃, 正常组、模型组以等体积生理盐水灌胃, 共5 d. 第4 d, 模型组和给药组按0.5 g/kg 剂量腹腔注射D-半乳糖, 正常组腹腔注射等体积生理盐水. 腹腔注射24 h后, 摘眼球取血, 分离血清. 用全自动生化分析仪检测血清ALT、AST的活性, 用比色分析法检测血清SOD、GSH-Px的活性及MDA的含量.

统计学处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用SPSS-10.0统计软件进行方差分析.

## 2 结果

2.1 CCl<sub>4</sub>致急性肝损伤 珍珠梅水提取物明显降低CCl<sub>4</sub>所致急性肝损伤大鼠血清ALT, AST的升高, 同时升高SOD, GSH-Px的活力, 降低MDA的含量( $P < 0.01$ 或 $P < 0.05$ , 表1).

2.2 D-半乳糖致急性肝损伤 珍珠梅水提取物明显降低D-半乳糖所致急性肝损伤大鼠血清ALT、AST的升高, 同时升高SOD、GSH-Px的活力, 降低MDA的含量( $P < 0.01$ 或 $P < 0.05$ , 表2).

## 3 讨论

近年来研究表明, 肝损伤是多因素参与的复杂过程, 细胞质内ALT、AST渗入血液, 结果血清ALT、AST活性升高<sup>[2-13]</sup>. 自由基和脂质过氧化在肝损伤中起着十分重要的作用. D-半乳糖引起肝细胞内钙离子增多, 镁离子减少, 钙离子增多时抑制线粒体的呼吸功能, 激活磷脂酶, 分解膜磷脂, 破坏溶酶体膜, 使蛋白水解酶释放, 并使黄嘌呤脱氢酶转化为黄嘌呤氧化酶, 加速氧自由基的产生, 从而使损伤进一步加剧<sup>[14-16]</sup>. 自由基是人体正常生化过程的中间产物, 在机体正常及病理过程中都存在, 同时机体在进化过程中获得了清除氧自由基的一些酶, 如SOD, GSH-Px. 因此, 只有当自由基产生过多或者机体内的酶系统过少时才导致疾病. 氧自由基可促使不饱和脂肪自由基形成, 脂质自由基可引起细胞膜的流动性、通透性和完整性的破坏, 进而使其双层结构发生断裂, 引起膜镶嵌的一系列酶的排列紊乱, 功能丧失, 细胞的能量产生系统瘫痪. SOD、GSH-Px的变化可以间接地反应疾病情况下自由基的变化. SOD为高效的清道夫, 可抑制自由基启动的脂质过氧化, GSH-Px是重要的催化过氧化氢分解的酶, 他特异地催化还原性GSH对过氧化氢的还原反应, 从而起到保护细胞膜结构与功能的完整作用. MDA是脂质氧化的最终产物, 可严重破坏细胞膜的结构, 导致细胞肿胀、坏死, 其含量反映了组织过氧化的损伤程度<sup>[17-35]</sup>. 本实验中给药组SOD, GSH-Px较模型组显著升高, 而MDA含量显著降低, 这说明珍珠梅水提物的保肝机制与其对抗自由基脂质过氧化密切相关.

表1 珍珠梅水提取物对CCl<sub>4</sub>所致急性肝损伤大鼠血清ALT, AST, SOD, GSH-Px, MDA的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

分组	CCl <sub>4</sub> (mL/kg)	ALT (nkat/L)	AST(nkat/L)	SOD(nkat/L)	GSH-Px(nkat/L)	MDA(nmol/L)
正常组	0	1 396 ± 135 <sup>b</sup>	2 601 ± 752 <sup>b</sup>	666 ± 26 <sup>a</sup>	130 ± 35 <sup>a</sup>	1.3 ± 0.6 <sup>a</sup>
模型组	5.0	1 2608 ± 4 464	11 595 ± 4 336	307 ± 153	103 ± 15	2.7 ± 0.8
大剂量组	5.0	5 413 ± 2 097 <sup>a</sup>	4 160 ± 1 476 <sup>a</sup>	410 ± 50 <sup>a</sup>	142 ± 8 <sup>b</sup>	1.8 ± 0.7 <sup>a</sup>
小剂量组	5.0	5 850 ± 1 994 <sup>a</sup>	5 221 ± 1 665 <sup>a</sup>	525 ± 125 <sup>a</sup>	137 ± 20 <sup>b</sup>	1.3 ± 1.0 <sup>a</sup>
阳性对照组	5.0	2 279 ± 1 901 <sup>a</sup>	2 523 ± 950 <sup>a</sup>	591 ± 169 <sup>a</sup>	166 ± 26 <sup>b</sup>	1.5 ± 0.5 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs Compared with model group.

表2 珍珠梅水提取物对D-半乳糖所致急性肝损伤大鼠血清ALT, AST, SOD, GSH-Px, MDA的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

分组	CCl <sub>4</sub> (mL/kg)	ALT (nkat/L)	AST(nkat/L)	SOD(nkat/L)	GSH-Px(nkat/L)	MDA(nmol/L)
正常组	0	1 396 ± 135 <sup>a</sup>	2 601 ± 752 <sup>b</sup>	666 ± 26 <sup>a</sup>	130 ± 35 <sup>a</sup>	1.3 ± 0.6 <sup>a</sup>
模型组	0.5	10 881 ± 3 954	9 238 ± 3 572	367 ± 114	121 ± 9	3.0 ± 0.3
大剂量组	0.5	4 600 ± 1 894 <sup>a</sup>	4 160 ± 1 476 <sup>a</sup>	423 ± 26 <sup>a</sup>	151 ± 8 <sup>b</sup>	1.4 ± 0.9 <sup>a</sup>
小剂量组	0.5	4 168 ± 334 <sup>a</sup>	4 955 ± 1 416 <sup>a</sup>	475 ± 154 <sup>a</sup>	153 ± 20 <sup>a</sup>	1.2 ± 1.0 <sup>a</sup>
阳性对照组	0.5	2 279 ± 1 901 <sup>a</sup>	2 523 ± 950 <sup>a</sup>	591 ± 169 <sup>a</sup>	166 ± 26 <sup>b</sup>	1.5 ± 0.5 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs Compared with model group.

## 4 参考文献

- 1 金海玲, 张学武, 赵红, 柳明珠, 陈丽艳, 尹宗柱. 珍珠梅提取物对四氯化碳所致大鼠急性肝损伤的保护作用. *世界华人消化杂志* 2002;10:783-786
- 2 Wei HS, Li DG, Lu HM, Zhan YT, Wang ZR, Huang X, Zhang J, Cheng JL, Xu QF. Effects of AT 1 receptor antagonist, losartan, on rat hepatic fibrosis induced by CCl<sub>4</sub>. *World J Gastroenterol* 2000;6:540-545
- 3 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 CCl<sub>4</sub>. *World J Gastroenterol* 2000;6:824-828
- 4 田耕, 于皆平, 罗和生, 余保平, 李建英. 环氧合酶-2在急性肝损害中的作用机制. *世界华人消化杂志* 2002;10:24-27
- 5 Giffen PS, Pick CR, Price MA, Williams A, York MJ. Alpha-glutathione S-transferase in the assessment of hepatotoxicity-its diagnostic utility in comparison with other recognized markers in the Wistar Han rat. *Toxicol Pathol* 2002;30:365-372
- 6 Sotelo-Felix JJ, Martinez-Fong D, Muriel P, Santillan RL, Castillo D, Yahuaca P. Evaluation of the effectiveness of *Rosmarinus officinalis*(Lamiaceae) in the alleviation of carbon tetrachloride-induced acute hepatotoxicity. *J Ethnopharmacol* 2002;81:145-154
- 7 Hung DY, Chang P, Cheung K, McWhinnney B, Masci PP, Weiss M, Roberts MS. Cationic drug pharmacokinetics in diseased livers determined by fibrosis index, hepatic protein content, microsomal activity, and nature of drug. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;301:1079-1087
- 8 Stedman C. Herbal hepatotoxicity. *Semin Liver Dis* 2002;22:195-206
- 9 Nakade Y, Yoneda M, Nakamura K, Makino I, Terano A. Involvement of endogenous CRF in carbon tetrachloride-induced acute liver injury in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2002;282:R1782-1788
- 10 Shimizu H, Uetsuka K, Nakayama H, Doi K. Carbon tetrachloride-induced acute liver injury in Mini and Wistar rats. *Exp Toxicol Pathol* 2001;53:11-17
- 11 Bruckner JV, Ramanathan R, Lee KM, Muralidhara S. Mechanisms of circadian rhythmicity of carbon tetrachloride hepatotoxicity. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;300:273-281
- 12 Zhao Y, Liu L, Fu Z, Lu Y. Protective effect of Huyn decoction on acute hepatic injury induced by CCl<sub>4</sub> in mice. *Zhong Yao Cai* 2001;24:886-887
- 13 Campo GM, Squadrito F, Ceccarelli S, Calo M, Avenoso A, Campo S, Squadrito G, Altavilla D. Reduction of carbon tetrachloride-induced rat liver injury by IRF1042, a novel dual vitamin E-like antioxidant. *Free Radic* 2001;34:379-393
- 14 Lemire BD, Oyedotun KS. The *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial succinate:ubiquinone oxidoreductase. *Biochim Biophys Acta* 2002;1553:102-116
- 15 Ishihara A, Ohira Y, Tanaka M, Nishikawa W, Ishioka N, Higashibata A, Izumi R, Shimazu T, Ibata Y. Cell body size and succinate dehydrogenase activity of spinal motoneurons innervating the soleus muscle in mice, rats, and cats. *Neurochem Res* 2001;26:1301-1304
- 16 Wu Y, Liu C, Chen Q. Effect of acupuncture on enzymology of motor neuron of anterior horn of experimental spinal cord injury in rats. *Zhongguo Zhongxiyi Zazhi* 1999;19:740-742
- 17 Usta J, Kreydiyyeh S, Bajakian K, Nakkash-Chmais H. In vitro effect of eugenol and cinnamaldehyde on membrane potential and respiratory chain complexes in isolated rat liver mitochondria. *Food Chem Toxicol* 2002;40:935-940
- 18 Brusque AM, Borba R, Schuck PF, Dalcin KB, Ribeiro CA, Silva CG, Wannmacher CM, Dutra-Filho CS, Wyse AT, Briones P, Wajner M. Inhibition of the mitochondrial respiratory chain complex activities in rat cerebral cortex by methylmalonic acid. *Neurochem Int* 2002;40:593-601
- 19 李军, 孙梅, 韩梅. 宫内窒息鼠损伤肝 NO, SOD 和 NOS 的变化. *世界华人消化杂志* 2002;10:177-181
- 20 崔云华, 王小玲, 刘晴, 刘平. 丹参酸乙的抗氧化作用对大鼠肝星状细胞增生的影响. *世界华人消化杂志* 2002;10:317-319
- 21 赵佐庆, 朱文侠, 刘福兰, 张玲. 犬小肠缺血再灌注后氧自由基的改变意义. *世界华人消化杂志* 2001;9:921-924
- 22 陈文慧, 刘平, 徐光福, 陆雄, 熊卫国, 李风华, 刘成海. 脂质过氧化在二甲基亚硝胺大鼠肝纤维化形成过程中的作用. *世界华人消化杂志* 2001;9:645-648
- 23 杨俊涛, 王正国, 朱佩方. 谷氨酰胺对胃肠手术患者血浆还原型谷胱甘肽水平的影响. *世界华人消化杂志* 1999;7:867-868
- 24 刘成, 胡义扬, 王润平, 刘成海, 刘平. 丹酚酸 A 抗氧化鼠肝损伤的作用. *世界华人消化杂志* 1999;7:570-572
- 25 滕书玲, 武希润, 习玲. 一氧化氮和自由基对大鼠急性肝损伤的作用. *世界华人消化杂志* 1999;7:222-223
- 26 Zhou JF, Cai D, Zhu YG, Yang JL, Peng CH, Yu YH. A study on relationship of nitric oxide, oxidation, peroxidation, lipoperoxidation with chronic chole-cystitis. *World J Gastroenterol* 2000;6:501-507
- 27 Huang ZS, Wang ZW, Liu MP, Zhong SQ, Li QM, Rong XL. Protective effects of polydatin against CCl<sub>4</sub>-induced injury to primarily cultured rat hepatocytes. *World J Gastroenterol* 1999;5:41-44
- 28 Barilja G. Endogenous oxidative stress:relationship to aging, longevity and caloric restriction. *Ageing Res Rev* 2002;1:397-411
- 29 Iwamoto A, Egashira T, Takayama F, Yamanaka Y, Noguchi T. Change in free radical-related substances in plasma following ischemia-reperfusion in rat liver. *Pathophysiology* 2002;8:167-174
- 30 Lee S, Kim KS, Park Y, Shin KH, Kim BK. In vivo anti-oxidant activities of tectochrysin. *Arch Pharm Res* 2003;26:43-46
- 31 Zhang Z, Yu CX. Effect of melatonin on learning and memory impairment induced by aluminum chloride and its mechanism. *Yaoxue Xuebao* 2002;37:682-686
- 32 Kim KS, Lee S, Lee YS, Jung SH, Park Y, Shin KH, Kim BK. Anti-oxidant activities of the extracts from the herbs of *Artemisia apiacea*. *J Ethnopharmacol* 2003;85:69-72
- 33 Vaughan JE, Walsh SW. Oxidative stress reproduces placental abnormalities of preeclampsia. *Hypertens Pregnancy* 2002;21:205-223
- 34 Lu X, Wang R. Protective effect of magnesium on the damaged cultured endothelial cells induced by oxidized low density lipoprotein. *Weisheng Yanjiu* 2002;31:244-246
- 35 Yasar M, Yildiz S, Mas R, Dundar K, Yildirim A, Akay C, Kaymakcioglu N, Ozisik T, Sen D. The effect of hyperbaric oxygen treatment on oxidative stress in experimental acute necrotizing pancreatitis. *Physiol Res* 2003;52:111-116

# 乙型肝炎病毒S基因系列单突变克隆人工构建

余祖江, 杨东亮, 张俊, 郝友华, 王宝菊, 郝连杰

余祖江, 杨东亮, 张俊, 郝友华, 王宝菊, 郝连杰, 华中科技大学同济医学院同济医院临床免疫研究室 湖北省武汉市 430030  
余祖江, 男, 1970-06-03, 河南信阳人, 2001年博士毕业于华中科技大学, 从事病毒性肝炎慢性化分子机制研究。  
国家“十五”科技攻关项目, No.2001BA705B05  
国家重大基础研究项目, No.973-20014CB51008  
项目负责人: 杨东亮, 430030, 湖北省武汉市解放大道1095号, 华中科技大学同济医学院附属同济医院临床免疫研究室. dlyang@tjh.tjmu.edu.cn  
电话: 027-83662894  
收稿日期: 2003-03-07 接受日期: 2003-03-28

## Construction and analysis of HBV S gene clones with artificial mutation sites

Zu-Jiang Yu, Dong-Liang Yang, Jun Zhang, You-Hua Hao, Bao-Ju Wang, Lian-Jie Hao

Zu-Jiang Yu, Dong-Liang Yang, Jun Zhang, You-Hua Hao, Bao-Ju Wang, Lian-Jie Hao, Division of Clinic Immunology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong Science and Technology University, Wuhan 430030, Hubei Province, China  
Correspondence to: Zu-Jiang Yu, Division of Clinic Immunology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong Science and Technology University, Wuhan 430030, Hubei Province, China.  
Received: 2003-03-07 Accepted: 2003-03-28

## Abstract

AIM: To study the mutation in a determinant of HBV S gene, to explore how it influenced the biologic characteristics of S gene.

METHODS: Through site-mutation PCR, we constructed series variant clones (T126S, M133L, T144A) of HBV S gene 'a' determinant according to epidemiologic data.

RESULTS: After analysis of sequence and expression of cells, sequences of mutation clone were correct and the mutation of different positions in 'a' determinant could influence antigenicity of expressed HBsAg.

CONCLUSION: The successful construction and expression of variant clone provide the theoretical basis for developing new detection kit, HBV vaccine and HBIG.

Yu ZJ, Yang DL, Zhang J, Hao YH, Wang BJ, Hao LJ. Construction and analysis of HBV S gene clones with artificial mutation sites. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(10):1500-1504

## 摘要

目的: 研究乙型肝炎病毒(HBV)S基因高频突变位点(T126S, M133L, T144A)变异对HBV生物学活性的影响, 开发新的检测HBsAg试剂盒, 混合HBV多价疫苗及多效价的乙型肝炎免疫球蛋白(HBIG)。

方法: 利用人工定点突变技术, 基因重组, 建立系列HBV S基因'a'决定簇真核细胞表达的质粒。

结果: 测序和计算机软件分析, 克隆的质粒基因突变序列完全正确, 并且能在真核细胞中表达, 被HBsAg单克隆抗体识别。

结论: 所构建的乙型肝炎病毒S基因单突变克隆能够在真核细胞表达蛋白, 所表达的蛋白可以正确折叠, 维持天然二级构象, 具有良好的抗原性, 为开发新的检测试剂盒, HBV疫苗及高效价的乙型肝炎免疫球蛋白奠定物质基础。

余祖江, 杨东亮, 张俊, 郝友华, 王宝菊, 郝连杰. 乙型肝炎病毒S基因系列单突变克隆人工构建. *世界华人消化杂志* 2003;11(10):1500-1504  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1500.asp>

## 0 引言

我国是乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染的高流行区, 有报道全国血清学调查, HBsAg携带率达9.75%, 约1.2亿人, 慢性乙型肝炎患者约为3000万, 其中10-20%可以发展为肝硬化和肝癌。HBV在如此众多的人群中相互传播, 经受着巨大的宿主主动和被动免疫抵抗, 必须以变异等多种形式逃避宿主的免疫清除。由于病毒外膜蛋白在宿主保护性免疫起着重要作用, 因此外膜蛋白的变异是HBV变异最为常见的方式之一<sup>[1-6]</sup>。我们根据流行病学的调查结果<sup>[7-9]</sup>, 通过PCR定点突变技术(基因拼接重叠扩增PCR, gene SOEing PCR, gene splice of overlap extending PCR), 对患病人群中HBV S基因'a'决定簇高频突变频率位点进行人工定点突变, 得到真核细胞内表达克隆, 即T126S, M133L, T144A。最后采用真核细胞表达系统, 探讨HBV S基因'a'决定簇突变对其表达蛋白(HBsAg)的抗原性和免疫原性的影响。

## 1 材料和方法

1.1 材料 pcDNA3质粒购自Invitrogen公司, pCR3.1/SHBV质粒(含野生株HBVS基因). BHK-21(叙利亚仓鼠肾细胞)系本室保存. DNA/RNA定量分析仪, Pharmacia Biotech公司产; PTC-200PCR扩增仪, 美国MJ Research公司产; 凝胶成像分析系统, 美国UVP公司. Pfu聚合酶, EcoRI内切酶, SmaI内切酶, XhoI-I内切酶购自武汉中科建公司. 小牛碱性磷酸酶(CIAP), 123bp分子大小标准, 羊抗鼠免疫荧光抗体购自Gibco BRL公司. 凝胶回收试剂盒, 德国Qiagen公司. HBsAg鼠单克隆抗体由北京生物公司提供。



## 1.2 方法

**1.2.1 变异克隆的构建** PCR3.1/SHBV 和 pcDNA<sub>3</sub> 同时被 ECOR I 37 °C 酶切 5h(其中 pcDNA<sub>3</sub> 酶切后线装载体作以后连接用), 前者酶切后混合产物, CIAP 5' 去磷酸化, 与 pcDNA<sub>3</sub> EcoR I 酶切后线状载体连接. 提供下一步 Gene SOEing PCR 反应所需的模板. Gene SOEing PCR 引物(武汉金贝生物科技有限公司合成)HBV S 基因上, 下游引物 ZL、ZR 和 pcDNA<sub>3</sub> 载体对应引物 SP6R: ZL: (5' 位于 HBV 157, 5' - GCGCTGAACATGGAG AACATCAC-3', ZR: (5' 位于 HBV 860, 5' - CCA TCTTTTTGTTTTGTAAAGG-3'; 引物 SP6R, 位于 pcDNA<sub>3</sub> 载体上 SP6 启动子序列区: SP6R: 5' -AGCAT TTAAGTGACACTATAQAATAAG-3'. 定点突变 HBV S 基因 126, 133, 144 位的互补突变引物: 126 位突变互补引物 126L: 5' -CTGCATGACTAATGCTCAAGGAAC-3' (439-415), 126R: 5' -TTCTTGAGCACTAGTCATGCAG GTCC-3' (460-434); 133 位突变互补引物 133L: 5' -CCAGGAACCTCTCTGTATCCCTCC-3' (455-431), 133R: 5' -AGGGATACAGAGAGG TTCCTTGAGCA-3' (476-450); 144 位突变互补引物 144L: 5' -AACCTTCG GCCGAAA TTGC-3' (492-472), 144R: 5' -GTGCA ATTTCCGGCCGAAGGTTTG-3' (513-489). 按照 Horton et al (Gene, 1989;77: 61-68)方法进行, Pfu 酶保守扩增. 简单的说, 第 1 次 PCR: ZL 与 126R 扩增 126 位突变 S 基因的上半段; ZL 和 133R 扩增 133 位突变 S 基因的上半段; ZL 与 144R 扩增 144 位突变 S 基因的上半段(见图 1A). 126L 与 SP6R 扩增 126 位突变的 S 基因的下半段; 133L 与 SP6R 扩增 133 位突变的 S 基因的下半段; 144L 与 SP6R 扩增 144 位突变的 S 基因的下半段(见图 1B). 第 2 次 PCR 扩增利用引物 ZL 和 SP6R 进行(见图 1C). 最后提取 T126S, M133L, D144A 突变的 S 基因全长的 PCR 扩增产物(含有 pcDNA<sub>3</sub> 载体的多克隆酶切位点). XHOI 和 ECOR V 双向酶切 pcDNA<sub>3</sub>, 提纯. 同时用 XHOI

酶切 HBV S 基因定点突变产物, 提纯后与线状 pcDNA<sub>3</sub> 载体连接. 连接产物按常规方法进行转化感受态细胞后, 涂板, 37 °C 培养, 挑取单菌落, 常规培养转化后的菌株. 转化培养细菌 2 μl, ZL 和 ZL 为引物, 以 PCR3.1/SHBV 质粒作阳性对照, 进行鉴定和筛选. PCR 阳性克隆, 常规小提制备质粒, 分别 ECOR I 和 XHOI 双酶切鉴定. 小量提纯后质粒, 送大连宝生物工程公司, 采用双脱氧终止法进行全自动序列测定. 测序的结果利用计算机软件进行分析(见结果 2.2).

**1.2.2 变异克隆在真核细胞表达** 常规培养细胞, 转染前 1 d 将 BHK 细胞接种到 8 孔槽中, 加入含 10 % FCS 的 DMEM 培养基, 在 37 °C 和 5 % 的 CO<sub>2</sub> 中培养至细胞的融合率为 50-80 %. 用 QIAGEN 小量提取质粒试剂盒提取质粒 SHBV、T126S、M133L 和 D144A, 测定浓度后稀释到 1 g/L. 按 lipofectamine 试剂盒(boehringer mannheim biochemicals Co.USA)说明转染细胞, ELISA 检测细胞培养上清. PBS 洗涤细胞 2 次后用 4 °C 的甲醇和丙酮各半混合液低温固定 15 min, 间接免疫荧光检测. 固定后的细胞加鼠抗 HBsAg mAb(1:100 稀释), 37 °C 1 h 孵育. PBS 洗涤后加羊抗鼠 IgG-FITC (1:100 稀释, 含 1 g/L 的伊文氏蓝) 37 °C, 50 min. PBS 再洗涤后, 甘油封片后在荧光显微镜下观察照相.

## 2 结果

**2.1 S 基因上半段第 1 次 PCR 扩增产物结果电泳图(图 A); S 基因下半段产物第 1 次 PCR 扩增结果电泳图(图 B); 第 2 次 PCR 扩增的结果(图 C).**

**2.2 翻译蛋白质与 S 蛋白氨基酸序列同源性分析结果** Wshbvaa 代表野生株 HBsAg 的氨基酸序列, T126Saa, M133Laa 和 D144Aaa 分别代表 126, 133 和 144 位点突变后 HBsAg 的氨基酸序列. 黑体方框部分为 'a' 决定簇氨基酸序列一级结构和同源性序列比较结果如下.

	0	10	20	30	40	50	
	*	*	*	*	*	*	
Wshbvaa	MENITSGFLGPLLVLQAGFFLLTRILTI PQSLDSWWTSLNFLGGTTVCLGQNSQSPTSN						
T126Saa	.....						
M133Laa	.....						
D144Aaa	.....						
	60	70	80	90	100	110	
	*	*	*	*	*	*	
Wshbvaa	HSPTSCPPTCPGYRWMCLRRFIIFLFI LLCLIFLLVLLDYQGMLPVCPLIPGSSTTSTGP						
T126Saa	.....						
M133Laa	.....						
D144Aaa	.....						
	120	130	140	150	160	170	180
	*	*	*	*	*	*	*
Wshbvaa	CRTCMTTAQGTSMYPSCCCTKPSDGNCTCIPSSWAFGKFLWEWASARFSWLSLLVPFVQ						
T126Saa	.....S.....						
M133Laa	.....L.....						
D144Aaa	.....A.....						
Wshbvaa	WFVG						
T126Saa	.....G						
M133Laa	.....G						
D144Aaa	.....G						

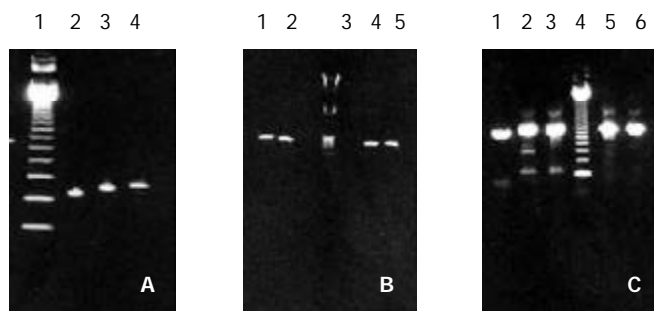


图1 SOEing PCR 扩增结果(图A, B, C). 图A: 泳道1为1 kb的Marker; 泳道2, 3, 4为126、133、144位S基因上半段序列第1次扩增产物, 分子量大小为378 bp、399 bp和432 bp. 图B: 泳道3为1 kb的Marker; 泳道1, 2, 4, 5分别为126、133和144, 144位S基因下半段序列第1次PCR扩增产物, 长度为380 bp、359 bp和326 bp(均含pcDNA<sub>3</sub>载体MCS位点及SP6启动子全长序列). 图C: 泳道4为123 bp的Marker; 泳道1为利用ZL, ZR扩增S基因的结果, 703 bp; 泳道2, 3, 5, 6 ZL和SP6R扩增相应模板的结果, 分别为126、133、144, 全长为758 bp(皆含有pcDNA<sub>3</sub>载体MCS位点及SP6启动子全长序列和相应的突变位点).

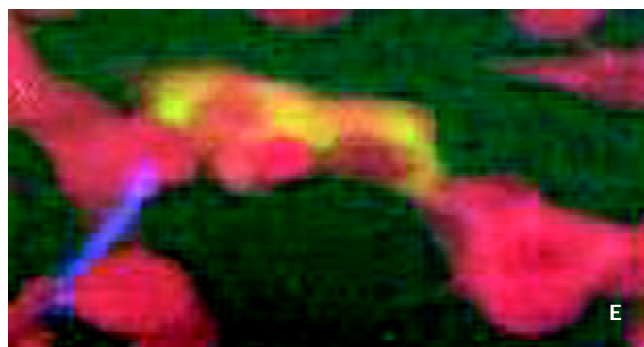


图2 系列突变克隆质粒转染后免疫荧光检测. A: Wild S; B: 阴性对照; C: T126S; D: M133L; E: 144A.

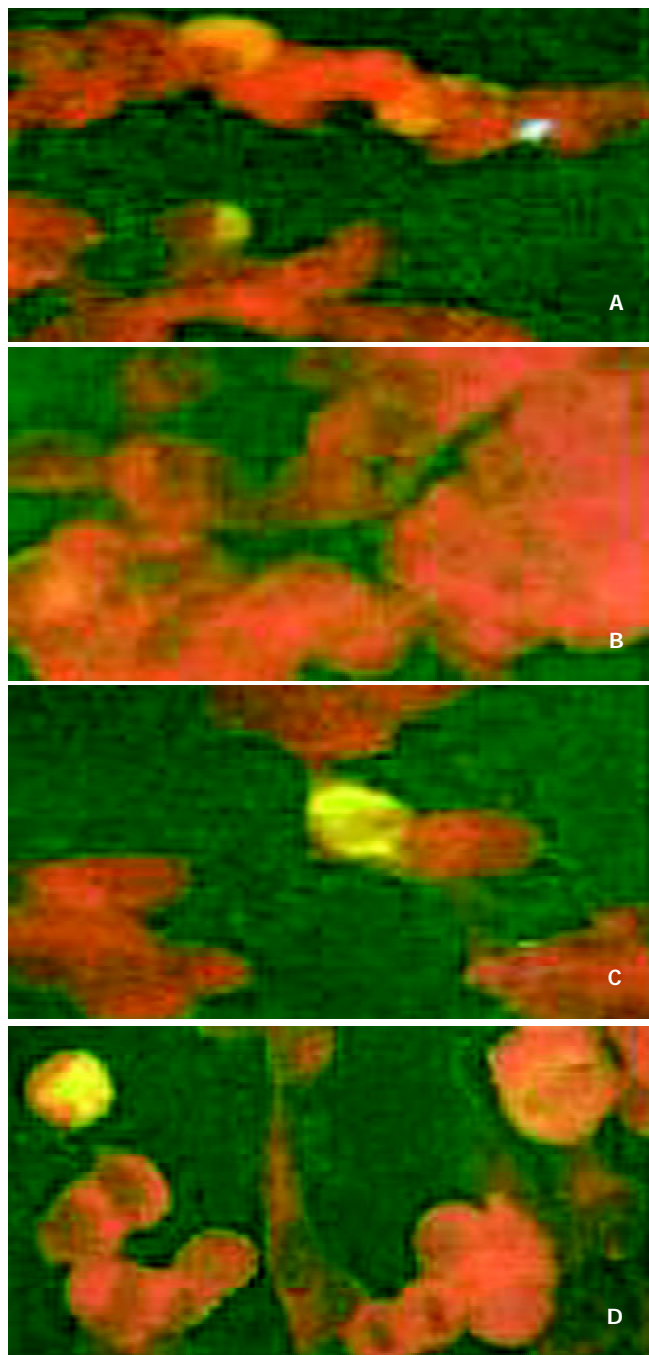
**2.3 BHK-21 细胞免疫荧光检测** 各突变质粒经脂质体包裹后, 转染BHK细胞3 d后, 收获细胞, HBsAg单克隆抗体免疫荧光检测各突变质粒表达产物, 细胞内或膜表面出现特异性荧光颗粒为阳性(荧光图片下标题表明相应的质粒转染细胞结果, Wild S表示未发生变异的S基因克隆, 空载体转染细胞的结果为阴性对照, 图2).

### 3 讨论

体外实验已经证实, S蛋白是形成HBV亚病毒颗粒的主要组成部分, 和其他蛋白一样由粗面内质网的膜结合核糖体合成的, 由226个氨基酸构成, N端信号I引导蛋白进行跨膜转运, 其下游的信号II在第80-90位氨基酸之间有一个疏水结构, 在信号II和S蛋白疏水性C末端形成一个环状结构, 其上携带主要的HBsAg抗原决定簇‘a’(Howard CR. J Viral Hepatology. 1995;2: 165-170). HBsAg‘a’决定簇是HBsAg诱导保护性抗体最主要的抗原决定簇, 其氨基酸表位上共有28个氨基酸, 含有构象依赖性B细胞表位和T<sub>H</sub>细胞表位, 他们与HBsAg抗原性及抗HBS的产生密切相关<sup>[7]</sup>. 通常基因组合的HBV疫苗包含S或者M蛋白, ‘a’决定簇的氨基酸任何变异, 在空间构象都会对疫苗产生的抗体有决定性影响<sup>[10-12]</sup>.

HBsAg是HBV感染的最重要标志, 一般认为抗-HBS出现表示宿主已将病毒清除并具备中和外来HBsAg的能力. 目前研究显示, HBsAg阴性或抗HBS阳性并不能排除HBV病毒血症. 提取这些病毒核酸, 序列分析的结果显示HBV S基因往往出现变异.

Carman et al最早发现在一意大利无症状携带者体内的G145R突变株可以稳定存在5 a. Ogata et al<sup>[13]</sup>从意大利患儿获得的G145R突变株血清感染黑猩猩, 证明该突变株可以在体内完整复制, 具有感染性和致病性. Coleman et al<sup>[14]</sup>对乙型肝炎病毒S基因‘a’决定簇在患者人群中高突变频率位点G145R, M133A突变质粒等分析表明, 不同的商业试剂盒对这些产生突变质粒所表达的HBsAg识别能力下降或根本不具备识别能力. 在被动免疫预防的儿童, 国内也发现了‘a’决定簇的变异: 在评估这些基因突变及其可能影响中发现, 逃避



被动免疫的儿童重新感染的HBV基因组中,有93.4%的样品的HBV基因组发生突变,其中对HBV S基因‘a’决定簇的点突变占30%以上,他们可以水平或垂直传播,并且不易被现有HBsAg检测试剂盒检测<sup>[15]</sup>.

在慢性感染患者人群中,S基因突变十分常见,突变位点多集中于‘a’决定簇第一个环上面.另外在乙型肝炎疫苗主动预防失败和高效价HBIG预防器官移植患者再感染HBV的人群中,‘a’决定簇也常常发生突变,但突变的位点多集中于a决定簇第2个环上面<sup>[16,17]</sup>.HBV‘a’决定簇的基因突变可以导致HBsAg明显抗原性和免疫原性变化,导致现有的试剂盒诊断的漏诊、误诊和疫苗预防和HBIG被动免疫的失败,因此早期检测和预防显得十分必要.解决上述问题关键在于对这些突变株所表达的蛋白在体内和体外的生物学活性进行细致的研究.

Coleman et al用HBsAg的单克隆抗体,可以检测标准试剂盒无法检测的‘a’决定簇129位氨基酸和145氨基酸突变<sup>[14,18]</sup>.Van Deursen et al<sup>[19]</sup>用PCR检测了HBsAg试剂盒检测阴性的慢性HBV感染者, Ma et al<sup>[20]</sup>用突变PCR检测了HBV基因组第551位核苷酸突变.闻玉梅 et al用单克隆抗体识别129位氨基酸突变,并构建了相应的突变基因克隆.他们在分析该克隆所表达的抗原的抗原性和免疫原性时发现:相应突变的HBsAg的抗原性和免疫原性发生了很大的变化<sup>[21]</sup>,后来他们又通过基因免疫的方式进一步阐述前述的结果<sup>[22]</sup>.为了在整体上分析突变位点对HBV生物活性的作用,最近Liu et al一次克隆了HBV全基因组,分析HBV基因突变与病毒免疫清除之间的关系,位点突变对HBV生物学特性的影响<sup>[23]</sup>.

在不同的患者人群中,HBV S基因‘a’决定簇上每一个氨基酸都可以发生点突变或和其他位点突变一起产生复合突变<sup>[24-26]</sup>,不同的位点突变对HBsAg的抗原性都会存在着或多或少的影响.因此对不同人群中高突变频率的位点研究显得更具有意义.

我们根据流行病学调查结果,以HBV S基因野生株为基础,利用Gene SOEing PCR技术,获得系列HBV S基因突变克隆.经过序列测定和氨基酸同源性分析表明:与野生株HBV S基因克隆相比,除目的位点突变外,除目的位点氨基酸突变外,其余位点氨基酸与野生株HBsAg的氨基酸同源性比较为100%(见结果2.2).以上结果表明我们对野生株S基因‘a’决定簇高突变频率位点实行了定点突变,获得了3株在不同患者人群中具有高突变频率的S基因‘a’决定簇突变克隆.

HBsAg体外表达具有其特殊性:由于HBsAg对大肠杆菌有一定的毒性,他不能完整的在原核细胞内表达,必须通过一定基因修饰才能在大肠杆菌中表达<sup>[27,28]</sup>,这势必会影响到HBsAg的抗原性和免疫原性的变化;另外基因工程乙型肝炎疫苗大多在酵母和昆虫等真核表达系统中生产,但在酵母等系统表达的HBsAg不能分

泌到细胞外,且表达水平也不高,因此也具有一定的局限性<sup>[29-31]</sup>.我们将HBV S基因不同位点突变的基因克隆入真核表达载体pcDNA3中,转染BHK中表达,转染细胞上清用ELISA检测,细胞用间接免疫荧光法进行检测.结果表明,HBV S基因系列突变(T126S, M133L, T144A)克隆能在真核细胞中表达,正确折叠,维持天然二级构象,能够被HBsAg单克隆抗体识别(见结果2.3),具有良好的抗原性.可以用作开发新型乙型肝炎混合多价疫苗,高效价HBIG及HBsAg检测试剂盒,同时也为分析不同位点突变的HBV S基因克隆在体内表达HBsAg生物学活性,特别对其抗原性和免疫原性的分析奠定基础.

#### 4 参考文献

- 1 Chen HB, Fang DX, Li FQ, Jing HY, Tan WG, Li SQ. A novel hepatitis B virus mutant with A-to-G at nt551 in the surface antigen gene. *World J Gastroenterol* 2003;9:304-308
- 2 Weinberger KM, Zoulek G, Bauer T, Bohm S, Jilg W. A novel deletion mutant of hepatitis B virus surface antigen. *J Med Virol* 1999;58:105-110
- 3 Rodriguez-Frias F, Buti M, Jardi R, Vargas V, Quer J, Cotrina M, Martell M, Esteban R, Guardia J. Genetic alterations in the S gene of hepatitis B virus in patients with acute hepatitis B, chronic hepatitis B and hepatitis B liver cirrhosis before and after liver transplantation. *Liver* 1999;19:177-182
- 4 Cabrerizo M, Bartolom inverted question mark J, Caramelo C, Barril G, Carreno V. Molecular analysis of hepatitis B virus DNA in serum and peripheral blood mononuclear cells from hepatitis B surface antigen-negative cases. *Hepatology* 2000; 32:116-23
- 5 Koyanagi T, Nakamura M, Sakai H, Sugimoto R, Enjoji M, Koto K, Iwamoto H, Kumazawa T, Mukaide M, Nawata H. Analysis of HBs antigen negative variant of hepatitis B virus: unique substitutions, Glu129 to Asp and Gly145 to Ala in the surface antigen gene. *Med Sci Monit* 2000;6:1165-1169
- 6 Lee KM, Kim YS, Ko YY, Yoo BM, Lee KJ, Kim JH, Hahm KB, Cho SW. Emergence of vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus with multiple surface gene mutations in a Korean child. *J Korean Med Sci* 2001;16:359-362
- 7 Karthigesu VD, Allison LM, Ferguson M, Howard CR. A hepatitis B virus variant found in the sera of immunised children induces a conformational change in the HBsAg “a” determinant. *J Med Virol* 1999;58:346-352
- 8 Theamboonlers A, Chongsrisawat V, Jantaradsamee P, Poovorawan Y. Variants within the “a” determinant of HBs gene in children and adolescents with and without hepatitis B vaccination as part of Thailand’s expanded program on immunization (EPI). *Tohoku J Exp Med* 2001;193:197-205
- 9 Wu L, Yuan ZH, Liu F, Waters JA, Wen YM. Comparing the immunogenicity of hepatitis B virus S gene variants by DNA immunization. *Viral Immunol* 2001;14:359-367
- 10 Karthigesu VD, Allison LM, Ferguson M, Howard CR. A hepatitis B virus variant found in the sera of immunised children induces a conformational change in the HBsAg “a” determinant. *J Med Virol* 1999;58:346-352
- 11 Preikschat P, Meisel H, Will H, Gunther S. Hepatitis B virus genomes from long-term immunosuppressed virus carriers are modified by specific mutations in several regions. *J Gen Virol* 1999;80(Pt 10):2685-2691
- 12 Shinji T, Koide N, Hanafusa T, Hada H, Oka T, Takayama N, Shiraha H, Nakamura M, Ujiike K, Yumoto Y, Tsuji T. Point mutations in the S and pre-S2 genes observed in two hepatitis B virus carriers positive for antibody to hepatitis B surface antigen. *Hepatogastroenterology* 1998;45:500-502
- 13 Ogata N, Zanetti AR, Yu M, Miller RH, Purcell RH. Infectivity

- and pathogenicity in chimpanzees of a surface gene mutant of hepatitis B virus that emerged in a vaccinated infant. *J Infect Dis* 1997;175:511-523
- 14 Coleman PF, Chen YC, Mushahwar IK. Immunoassay detection of hepatitis B virus surface antigen mutants. *J Med Virol* 1999;59:19-24
- 15 Zhu Q, Lu Q, Xiong S, Yu H, Duan S. Hepatitis B virus S gene mutants in infants infected despite immunoprophylaxis. *Chin Med J* 2001;114:352-354
- 16 Mesenas SJ, Chow WC, Zhao Y, Lim GK, Oon CJ, Ng HS. Wild-type and 'a' epitope variants in chronic hepatitis B virus carriers positive for hepatitis B surface antigen and antibody. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17:148-152
- 17 Schories M, Peters T, Rasenack J. Isolation, characterization and biological significance of hepatitis B virus mutants from serum of a patient with immunologically negative HBV infection. *J Hepatol* 2000;33:799-811
- 18 Yukimasa N, Ohkushi H, Fukasawa K, Fukuchi K, Takagi Y, Gomi K. Hepatitis B virus gene mutations in the sera of three patients with coexisting hepatitis B surface antigen and anti-surface antibody. *Rinsho Byori* 2000;48:184-188
- 19 Van Deursen FJ, Hino K, Wyatt D, Molyneaux P, Yates P, Wallace LA, Dow BC, Carman WF. Use of PCR in resolving diagnostic difficulties potentially caused by genetic variation of hepatitis B virus. *J Clin Pathol* 1998;51:149-153
- 20 Ma CL, Fang DX, Chen HB, Li FQ, Jin HY, Li SQ, Tan WG. A mutation specific polymerase chain reaction for detecting hepatitis B virus genome mutations at nt551. *World J Gastroenterol* 2003;9:509-512
- 21 Wu L, He JW, Yao X, Li HM, Wen YM. A novel hepatitis B virus variant S 129 (Gln-->Leu): lack of correlation between antigenicity and immunogenicity. *J Med Virol* 1999;59:424-430
- 22 Liu CJ, Chen PJ, Lai MY, Kao JH, Chang CF, Wu HL, Shau WY, Chen DS. A prospective study characterizing full-length hepatitis B virus genomes during acute exacerbation. *Gastroenterology* 2003;124:80-90
- 23 Bahn A, Gerner P, Martine U, Bortolotti F, Wirth S. Detection of different viral strains of hepatitis B virus in chronically infected children after seroconversion from HBsAg to anti-HBs indicating viral persistence. *J Hepatol* 1997;27:973-978
- 24 Hsu HY, Chang MH, Ni YH, Lin HH, Wang SM, Chen DS. Surface gene mutants of hepatitis B virus in infants who develop acute or chronic infections despite immunoprophylaxis. *Hepatology* 1997;26:786-791
- 25 Kalinina T, Riu A, Fischer L, Will H, Sterneck M. A dominant hepatitis B virus population defective in virus secretion because of several S-gene mutations from a patient with fulminant hepatitis. *Hepatology* 2001;34:385-394
- 26 Gu B, Ren H, Zhang D. Expression of recombinant inserting mutants of HBsAg in vitro and its antigenic analysis. *Zhonghua Yixue Zazhi* 1999;79:139-142
- 27 Lee YH, Tung YT, Lo SJ. Expression and secretion of hepatitis B viral surface antigen in E.coli. *Biochem Biophys Res Commun* 1986;135:1042-1049
- 28 Gu B, Ren H. Expression of HBsAg by using various eukaryotic expression vectors. *Zhonghua Ganzhangbing Zazhi* 1999;7:98-100
- 29 Kalinina T, Riu A, Fischer L, Will H, Sterneck M. A dominant hepatitis B virus population defective in virus secretion because of several S-gene mutations from a patient with fulminant hepatitis. *Hepatology* 2001;34:385-394
- 30 Qin S, Tang H, Zhao LS, He F, Lin Y, Liu L, He XM. Cloning of HBsAg-encoded genes in different vectors and their expression in eukaryotic cells. *World J Gastroenterol* 2003;9:1111-1113

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2002 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

## 中国科技期刊走向世界的步伐正在加快

截止到 2002-07, 中国被著名检索系统 SCI 收录的科技期刊数从 63 种增加到了 67 种. 从制作 SCI 的美国 ISI (美国科学情报所) 发布的 JCR (期刊引证报告) 上的数据看, 有指标数据的 59 种我国科技期刊中, 80 % 以上的期刊影响因子呈上升趋势; 约 90 % 的总被引频次都提高了.

在 2001 年的 JCR 中, 总被引频次超过 1000 次的中国科技期刊有 4 个, 他们是《高等学校化学学报》(中文版) (1959 次), 《科学通报》(1628 次), 《物理学报》(中文版) (1227 次), 《中国物理快报》(1215 次).

首次有两个中国科技期刊的影响因子超过 1, 他们是《细胞研究》(2.102) 和《世界胃肠病学杂志》(1.445), 这两种期刊均为中国英文版科技期刊.

从期刊影响因子在本学科的排位看, 进入 SCIE 的我国科技期刊, 有 8 个期刊排在本学科的中上水平, 他们是《力学学报》, 《高等学校化学学报》(中文版), 《中国物理》, 《中国物理快报》, 《科学通报》, 《中国科学 B》, 《中国科学 E》, 《中国有色金属学报》.

在本学科国际期刊中, 我国有 10 个期刊被引频次位于中上水平的. 他们是: 《科学通报》, 《高等学校化学学报》(中文版), 《中国科学 A》, 《物理学报》(中文版), 《中华医学杂志》, 《化学学报》(中文版), 《中国物理快报》, 《中国有色金属学报》(英文版), 《中国科学 B》, 《中国药理学报》.

在 SCI 网络版收录的中国科技期刊中, 有 25 个期刊是由中国科学出版社出版的, 其中在 JCR 中有指标的期刊有 18 个.

另外, 除 SCI 系统外, 中国科技期刊被其他几个重要国际检索系统收录的数量也呈上升趋势. 例如, 在反映工程技术论文的历史超百年的检索系统《EI》(工程索引) 中, 中国被收录的科技期刊从最少时的 40 种, 增加到了 2000 年的 104 种. 这也直接反映了我国科技期刊被国际认可的程度.

国家科技部中国科技信息研究所, 每年对我国科技期刊在国内的情况做出统计分析, 定期出版《中国科技期刊引证报告》. 以 2000 年数据看, 我国科技期刊的平均影响因子由上一年的 0.208 上升到 0.240, 其中影响因子超过 1 的有 20 个; 总被引频次的平均值达到了 192.2 次, 总被引频次超过 1000 次的期刊有 25 个, 其中《科学通报》的总被引频次达到了 2979 次.

目前, 我国科技期刊数量已达到 4600 余种, 已经形成了一定的规模, 而且门类相对齐全, 为我国基础研究的发展和科研成果转化为生产力做出了重要的贡献, 但我们承认中国的科技期刊发展水平与世界发达国家之间存在较大的差距. 随着中国加入 WTO, 对于中国的科技期刊, 既是机遇又是挑战. 我们相信, 通过我国学术界和编辑部门的共同努力, 一定会在不远的将来产生一批具有国际水准的科技期刊.

(2002-11-08)



# 急性胰腺炎大鼠肝脏NF- $\kappa$ B对ICAM-1表达的调控及其意义

石力, 田伏洲, 黄大熔, 李旭, 赵碧, 顾大勇, 唐旭东, 王雨

石力, 田伏洲, 黄大熔, 李旭, 顾大勇, 唐旭东, 王雨, 中国人民解放军成都军区总医院全军普外中心 四川省成都市 610083  
赵碧, 中国人民解放军成都军区总医院血液科 四川省成都市 610083  
石力, 男, 四川长寿县人, 1967-10-05 生, 汉族, 硕士, 主治医师, 主要从事胰腺疾病的研究。  
项目负责人: 田伏洲, 610083, 四川省成都市, 中国人民解放军成都军区总医院全军普外中心. lishi@mail.sc.cninfo.net  
收稿日期: 2002-06-27 接受日期: 2002-11-18

## Effect of hepatic NF- $\kappa$ B on ICAM-1 expression in rats with acute pancreatitis

Li Shi, Fu-Zhou Tian, Da-Rong Huang, Xu Li, Bi Zhao, Da-Yong Gu, Xu-Dong Tang, Yu Wang

Li Shi, Fu-Zhou Tian, Da-Rong Huang, Xu Li, Da-Yong Gu, Xu-Dong Tang, Yu Wang, Center of General Surgery, General Hospital of Chinese PLA Chengdu Command, Chengdu 610083, Sichuan Province, China  
Bi Zhao, Hematologic Department, General Hospital of Chinese PLA Chengdu Command, Chengdu 610083, Sichuan Province, China  
Correspondence to: Fu-Zhou Tian, Center of General Surgery, General Hospital of Chinese PLA Chengdu Command, Chengdu 610083, Sichuan Province, China. lishi@mail.sc.cninfo.net  
Received: 2002-06-27 Accepted: 2002-11-18

## Abstract

AIM: To study the effect of hepatic NF- $\kappa$ B on ICAM-1 expression in rats with acute pancreatitis.

METHODS: Seventy-two Wistar rats were randomly divided into three groups: acute pancreatitis group (AP), acute pancreatitis treated with pyrrolidine dithiocarbamate (PDTTC) group (APP) and sham operation group (SO). Hepatic NF- $\kappa$ B activities were determined with EMSA. The expression of hepatic ICAM-1 was detected with immunohistochemistry. Hepatic myeloperoxidase (MPO) and serum alanine aminotransferase (ALT) were measured.

RESULTS: Activities of NF- $\kappa$ B were significantly higher in AP and APP groups than that in SO group from 3 to 6 hours. The expressions of ICAM-1 were stronger in AP and APP groups than in SO group. The levels of hepatic MPO and serum ALT were also significantly higher in these two groups than in SO group. However, compared with AP group, the activities of NF- $\kappa$ B, the expression of ICAM-1 and the level of hepatic MPO and ALT significantly decreased in APP group.

CONCLUSION: Activation of hepatic NF- $\kappa$ B is involved in the liver injury by regulating ICAM-1 expression during pancreatitis.

Shi L, Tian FZ, Huang DR, Li X, Zhao B, Gu DY, Tang XD, Wang Y. Effect of hepatic NF- $\kappa$ B on ICAM-1 expression in rats with acute pancreatitis. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003;11(10):1505-1507

## 摘要

目的: 观察急性胰腺炎大鼠肝脏NF- $\kappa$ B对ICAM-1表达的调控及其在急性胰腺炎肝损伤中的作用。

方法: Wistar大鼠72只随机分为急性胰腺炎组(AP组)、急性胰腺炎PDTTC处理组(APP组)以及对照组(SO组)。分别在术后3 h、6 h、12 h及24 h检测肝组织NF- $\kappa$ B活性、ICAM-1表达, 肝组织髓过氧化物酶(MPO)活性以及血浆丙氨酸氨基转移酶(ALT)水平。

结果: AP及APP组NF- $\kappa$ B活性在术后3-6 h显著高于SO组; ICAM-1表达在术后3-24 h显著高于SO组; MPO及ALT在术后6-24 h也显著高于SO组。然而, 在运用了NF- $\kappa$ B抑制剂的APP组, NF- $\kappa$ B活性、ICAM-1表达、MPO以及血浆ALT均显著低于AP组。

结论: 急性胰腺炎发生时, 肝脏中活化的NF- $\kappa$ B促进了ICAM-1的表达, 并由此参与了肝损伤的发生。

石力, 田伏洲, 黄大熔, 李旭, 赵碧, 顾大勇, 唐旭东, 王雨. 急性胰腺炎大鼠肝脏NF- $\kappa$ B对ICAM-1表达的调控及其意义. 世界华人消化杂志 2003;11(10):1505-1507

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1505.asp>

## 0 引言

急性胰腺炎常伴有多脏器功能不全<sup>[1]</sup>, 而肝脏是最常受累的器官之一<sup>[2]</sup>。核因子 $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)是一类主要参与炎症分子表达调控的转录因子<sup>[3-5]</sup>, 同参与其他原因引起的组织损伤过程一样, 他参与了急性胰腺炎肝损伤的发生<sup>[7-10]</sup>。细胞间黏附分子-1(ICAM-1)主要介导多形核粒细胞(PMN)同血管内皮细胞之间的黏附, 他同样参与了不同原因引起的组织损伤过程<sup>[11, 12]</sup>。由于ICAM-1的启动子上存在着 $\kappa$ B结合位点<sup>[13]</sup>, 为了了解NF- $\kappa$ B参与急性胰腺炎肝损伤的机制, 我们观察了大鼠急性胰腺炎发生时, 肝脏NF- $\kappa$ B对ICAM-1表达的调节作用。

## 1 材料和方法

1.1 材料 Wistar大鼠72只, 雌雄不限, 体质量200-250 g, 随机分为3组: (1)急性胰腺炎组(AP组, 24只): 用3 g/L戊巴比妥钠ip麻醉(10 mL/kg), 上腹部正中切口入腹, 经十二指肠穿刺胆管成功后, 以无创血管夹阻断肝门部胆管, 向胰管内逆行注入50 g/L牛磺胆酸钠

(1 mL/kg), 注射完毕后松开血管夹, 关腹, 皮下注射生理盐水 2 mL, 以补充术中丢失水分; (2) 急性胰腺炎 PDTc 处理组 (APP 组, 24 只): 诱导胰腺炎前 1 h 经腹腔注入 NF- $\kappa$ B 抑制剂 PDTc (10 mg/kg); (3) 假手术组 (SO 组, 24 只): 操作方法同 1, 但不向胰管内注入牛磺胆酸钠. 各组分别在术后 3 h, 6 h, 12 h, 24 h 再次开腹, 经下腔静脉采血约 5 mL, 置于肝素钠抗凝瓶中, 离心 (2 000 r/min, 1 min), 取上清冻存; 并取大小约 0.5 cm<sup>3</sup> 肝中叶组织三块, 置于液氮中保存.

**1.2 方法** (1) 肝组织 NF- $\kappa$ B 活性 参照文献介绍的方法对肝组织进行核蛋白提取, 并用考马斯亮蓝测定蛋白浓度, 调蛋白浓度为 0.5  $\mu$ g/L 后置于 -70 $^{\circ}$ C 保存. 以  $\gamma$ -<sup>32</sup>P 在 T<sub>4</sub> 激酶的作用下标记 NF- $\kappa$ B 探针, 探针序列为 5'-AGTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3'. 将标记的探针同肝组织核蛋白进行结合后, 置于非变性聚丙烯酰胺凝胶中电泳并进行放射自显影, 用凝胶扫描分析仪对显影结果进行分析, 以积分辉度值表示 NF- $\kappa$ B 的活性变化. (2) 肝组织 ICAM-1 蛋白表达 以免疫组化 SP 法进行检测, 用 Tiger 电子计算机图像分析系统计算阳性细胞染色的积分光密度. (3) 肝组织髓过氧化物酶 (MPO) 参照文献介绍的方法进行检测. (4) 血浆丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 用自动生化分析仪 (Bckman CX7) 进行检测.

**统计学处理** 结果以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间行 t 检验,  $P < 0.05$  为差异有显著意义;  $P < 0.01$  为差异有极显著意义.

## 2 结果

**2.1 肝组织中 NF- $\kappa$ B 活性** 除 SO 组外, 其余二组在术后 3 h, 肝组织中 NF- $\kappa$ B 存在显著活化, 6 h 后活化程度下降, 但仍显著高于 SO 组 ( $P < 0.01$ ), 术后 12 h NF- $\kappa$ B 活化程度则明显下降, 同 SO 组相比无显著差异 ( $P > 0.05$ ), 至 24 h 活化消失. 其中 AP 组 NF- $\kappa$ B 活化程度在 3-6 h 均显著高于 APP 组 ( $P < 0.01$  表 1, 图 1).



SO 组 APP 组 AP 组

图 1 NF- $\kappa$ B 电泳结果 (3 h, 由左至右为 SO 组、APP 组、AP 组).

**2.2 肝组织 ICAM-1 蛋白表达** SO 组未检测到 ICAM-1 蛋白表达, 在术后 3-24 h, AP, APP 组均有 ICAM-1 蛋白表达, 术后 6 h 表达最强, 各时相点均显著高于 SO 组 ( $P < 0.01$ ). 阳性物质主要分布于肝窦内皮细胞及部分肝细胞膜. APP 表达强度明显低于 AP 组 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ , 表 1、图 2-4).

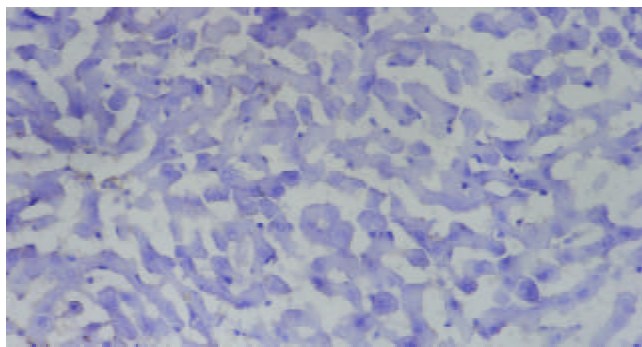


图 2 ICAM-1 阴性表达 (SO 组, 6 h).

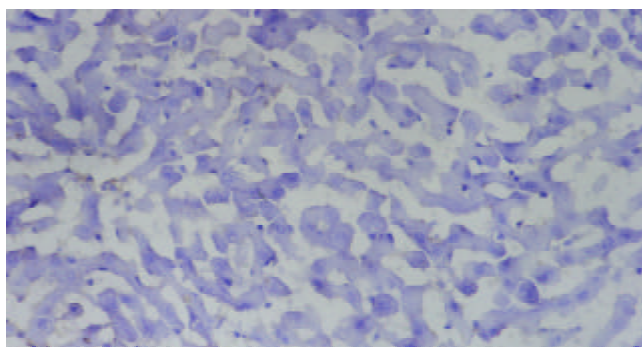


图 3 ICAM-1 弱阳性表达 (APP 组, 6 h).

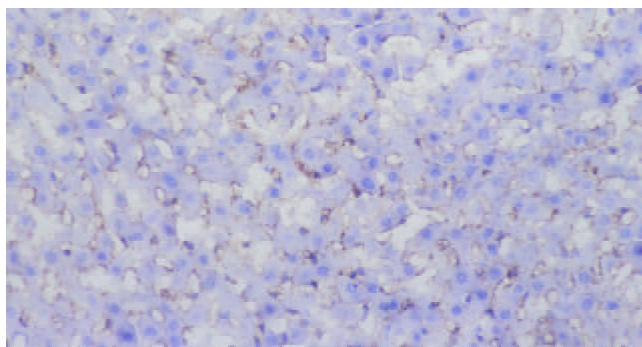


图 4 ICAM-1 强阳性表达 (AP 组, 6 h).

表 1 急性胰腺炎大鼠肝组织 NF- $\kappa$ B、ICAM-1、MPO 及血浆 ALT 测定结果 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 24$ )

项目	分组	T (术后)/h			
		3	6	12	24
NF- $\kappa$ B (吸光度)	AP	3.13 $\pm$ 0.57	1.92 $\pm$ 0.26	0.80 $\pm$ 0.12	0.68 $\pm$ 0.17
	APP	1.85 $\pm$ 0.38 <sup>b</sup>	1.36 $\pm$ 0.22 <sup>b</sup>	0.73 $\pm$ 0.11	0.71 $\pm$ 0.13
	SO	0.71 $\pm$ 0.10 <sup>d</sup>	0.67 $\pm$ 0.11 <sup>d</sup>	0.69 $\pm$ 0.11	0.69 $\pm$ 0.14
ICAM-1 (吸光度)	AP	7.20 $\pm$ 0.88	10.77 $\pm$ 1.66	6.20 $\pm$ 0.93	5.18 $\pm$ 0.92
	APP	4.85 $\pm$ 0.83 <sup>b</sup>	6.33 $\pm$ 0.85 <sup>b</sup>	4.23 $\pm$ 0.74 <sup>b</sup>	4.00 $\pm$ 0.75 <sup>a</sup>
	SO	1.88 $\pm$ 0.24 <sup>d</sup>	1.45 $\pm$ 0.36 <sup>d</sup>	1.57 $\pm$ 0.31 <sup>d</sup>	1.45 $\pm$ 0.33 <sup>d</sup>
MPO (kat/kg)	AP	2.13 $\pm$ 0.45	4.51 $\pm$ 0.78	6.45 $\pm$ 0.93	11.40 $\pm$ 1.62
	APP	2.06 $\pm$ 0.50	3.30 $\pm$ 0.70 <sup>a</sup>	4.95 $\pm$ 0.75 <sup>a</sup>	5.91 $\pm$ 1.30 <sup>b</sup>
	SO	1.71 $\pm$ 0.41	1.82 $\pm$ 0.38 <sup>d</sup>	1.76 $\pm$ 0.50 <sup>d</sup>	1.56 $\pm$ 0.37 <sup>d</sup>
ALT (kat/L)	AP	1.09 $\pm$ 0.19	1.56 $\pm$ 0.21	2.37 $\pm$ 0.36	3.47 $\pm$ 0.73
	APP	0.96 $\pm$ 0.14	1.17 $\pm$ 0.18 <sup>b</sup>	1.65 $\pm$ 0.21 <sup>b</sup>	2.13 $\pm$ 0.43 <sup>a</sup>
	SO	0.68 $\pm$ 0.09	0.72 $\pm$ 0.11 <sup>d</sup>	0.66 $\pm$ 0.09 <sup>d</sup>	0.78 $\pm$ 0.14 <sup>d</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$ , vs AP 组. <sup>d</sup> $P < 0.01$ , vs AP, APP 组.

2.3 肝组织 MPO 活性变化 同 SO 组相比, AP、APP 组 MPO 活性在术后 6 h 显著增加, 至 24 h 均呈持续性上升趋势( $P < 0.01$ ). 其中 APP 组 MPO 活性在 6-24 h 均显著低于 AP 组 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ , 表 1).

2.4 血浆 ALT SO 组 ALT 术后无明显变化. AP 及 APP 组 ALT 在术后 3-24 h 均呈持续性上升, 显著高于 SO 组 ( $P < 0.01$ ). 但 6 h 后 APP 组 ALT 明显低于 AP 组 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ , 表 1).

### 3 讨论

核因子 $\kappa$ B 是一类能与某些基因启动子及增强子区的 $\kappa$ B 序列结合的蛋白质, 他能启动或增强这些基因的转录<sup>[14-16]</sup>. 在静息的细胞中, NF- $\kappa$ B 以无活性的形式存在于细胞质之中, 当受到一定的刺激后, NF- $\kappa$ B 活化, 并发生核易位, 同靶基因启动子或增强子上的 $\kappa$ B 位点结合, 从而启动或增强这些基因的转录<sup>[17-20]</sup>, 进而参与组织的损伤过程<sup>[22-24]</sup>. 在急性胰腺炎肝损伤发生过程中, 肝脏 NF- $\kappa$ B 的活化同样起着重要的作用<sup>[10]</sup>.

由于在 ICAM-1 启动子上存在着 NF- $\kappa$ B 结合位点<sup>[13]</sup>. 为了进一步阐明 NF- $\kappa$ B 产生作用的机制, 我们观察了 NF- $\kappa$ B 对肝组织 ICAM-1 的表达的调控作用以及由此引起的组织损伤效应. ICAM-1 是细胞黏附分子免疫球蛋白超家族中的一员, 主要介导多形核粒细胞(PMN)与血管内皮细胞间的黏附, 在 PMN 向组织中聚集的过程中有着重要的作用, 而聚积于组织中的 PMN 则可导致细胞及组织的损伤. 髓过氧化物酶(MPO)存在于 PMN 的嗜天青颗粒之中, 每个 PMN 所含 MPO 的量是恒定的, 因此通过测定 MPO 就能够反映 PMN 的浸润程度. 结果表明, 同对照组相比, 诱导急性胰腺炎后 3-6 h, AP 及 APP 组 NF- $\kappa$ B 出现了显著活化, 活化程度在 3 h 较高. 与此同时, ICAM-1 蛋白表达在 3-24 h 也显著高于对照组, 其表达峰值出现在术后 6 h, 较 NF- $\kappa$ B 有所滞后. 肝组织 MPO 及血浆 ALT 也显著高于对照组. 然而, 同 AP 组相比, 在运用了 NF- $\kappa$ B 抑制剂 PDTC 的 APP 组, 随着 NF- $\kappa$ B 活化程度的显著下降, ICAM-1 蛋白表达、肝组织 MPO 以及血浆 ALT 在各时相点均有了显著下降. 这就说明在急性胰腺炎发生时, 肝脏 NF- $\kappa$ B 的活化促进了 ICAM-1 的表达, 并可由此导致 PMN 在肝组织中聚集, 从而引起肝损伤.

### 4 参考文献

- Jin SL, Zhang TJ, Wang RY, Liao WJ, Song XW, Zhou YQ. The diagnosis and treatment for the injury of heart, brain and lung in severe acute pancreatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:1221-1223
- Shen J, Xiao H, Wu ZP, Song YH, Liu M. The role of arachidonic acid metabolites in liver damage in acute experimental pancreatitis in rats. *Xin Xiaohuabingxue Zazhi* 1997;5:589-590
- Li YY, Gao ZF. Acute pancreatitis and NF- $\kappa$ B. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:420-421
- Suk K, Yeou Kim S, Kim H. Regulation of IL-18 production by IFN gamma and PGE2 in mouse microglial cells: involvement of NF- $\kappa$ B pathway in the regulatory processes. *Immunol Lett*

- 2001;77:79-85
- Izumi T, Saito Y, Kishimoto I, Harada M, Kuwahara K, Hamanaka I, Takahashi N, Kawakami R, Li Y, Takemura G, Fujiwara H, Garbers DL, Mochizuki S, Nakao K. Blockade of the natriuretic peptide receptor guanylyl cyclase-A inhibits NF- $\kappa$ B activation and alleviates myocardial ischemia/reperfusion injury. *J Clin Invest* 2001;108:203-213
- Chen X, Ji B, Han B, Ernst SA, Simeone D, Logsdon CD. NF- $\kappa$ B activation in pancreas induces pancreatic and systemic inflammatory response. *Gastroenterology* 2002;122:448-457
- Breuss JM, Cejna M, Bergmeister H, Kadl A, Baumgartl G, Steurer S, Xu Z, Koshelnick Y, Lipp J, De Martin R, Losert U, Lammer J, Binder BR. Activation of nuclear factor- $\kappa$ B significantly contributes to lumen loss in a rabbit iliac artery balloon angioplasty model. *Circulation* 2002;105:633-638
- Liu WB, Wang JY. NF- $\kappa$ B and the apoptosis of hepatic ito cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:1054-1055
- Xu MQ, Xue L, Gong JP. Significance of kupffer cell NF- $\kappa$ B activation during ischemia/reperfusion in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:1250-1253
- Shi L, Huang DR, Tian FZ, Wang Y, Ma JX, Li XJ, Yin ZL. Relationship between NF- $\kappa$ B activation and liver injury in rats with acute pancreatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:554-557
- Love S, Barber R. Expression of P-selectin and intercellular adhesion molecule-1 in human brain after focal infarction or cardiac arrest. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2001;27:465-473
- Lo HP, Ackland-Berglund CE, Pritchard KA Jr, Guice KS, Oldham KT. Attenuated expression of inducible nitric oxide synthase in lung microvascular endothelial cells is associated with an increase in ICAM-1 expression. *J Pediatr Surg* 2001;36:1136-1142
- Roebuck KA, Finnegan A. Regulation of intercellular adhesion molecule-1 (CD54) gene expression. *J Leukoc Biol* 1999;66:876-888
- Antonelli A, Bianchi M, Crinelli R, Gentilini L, Magnani M. Modulation of ICAM-1 expression in ECV304 cells by macrophage-released cytokines. *Blood Cells Mol Dis* 2001;27:978-991
- Ginis I, Jaiswal R, Klimanis D, Liu J, Greenspon J, Hallenbeck JM. TNF- $\alpha$ -induced tolerance to ischemic injury involves differential control of NF- $\kappa$ B transactivation: the role of NF- $\kappa$ B association with p300 adaptor. *J Cereb Blood Flow Metab* 2002;22:142-152
- Wright G, Singh IS, Hasday JD, Farrance IK, Hall G, Cross AS, Rogers TB. Endotoxin stress-response in cardiomyocytes: NF- $\kappa$ B activation and tumor necrosis factor- $\alpha$  expression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;282:H872-879
- Lakshminarayanan V, Lewallen M, Frangogiannis NG, Evans AJ, Wedin KE, Michael LH, Entman ML. Reactive oxygen intermediates induce monocyte chemotactic protein-1 in vascular endothelium after brief ischemia. *Am J Pathol* 2001;159:1301-1311
- Moine P, McIntyre R, Schwartz MD, Kaneko D, Shenkar R, Le Tulzo Y, Moore EE, Abraham E. NF- $\kappa$ B regulatory mechanisms in alveolar macrophages from patients with acute respiratory distress syndrome. *Shock* 2000;13:85-91
- Valen G, Yan ZQ, Hansson GK. Nuclear factor  $\kappa$ B and the heart. *J Am Coll Cardiol* 2001;38:307-314
- Omoya T, Shimizu I, Zhou Y, Okamura Y, Inoue H, Lu G, Itonaga M, Honda H, Nomura M, Ito S. Effects of idoxifene and estradiol on NF- $\kappa$ B activation in cultured rat hepatocytes undergoing oxidative stress. *Liver* 2001;21:183-191
- Altavilla D, Saitta A, Guarini S, Galeano M, Squadrito G, Cucinotta D, Santamaria LB, Mazzeo AT, Campo GM, Ferlito M, Minutoli L, Bazzani C, Bertolini A, Caputi AP, Squadrito F. Oxidative stress causes nuclear factor- $\kappa$ B activation in acute hypovolemic hemorrhagic shock. *Free Radic Biol Med* 2001;30:1055-1066
- Shames BD, Barton HH, Reznikov LL, Cairns CB, Banerjee A, Harken AH, Meng X. Ischemia alone is sufficient to induce TNF- $\alpha$  mRNA and peptide in the myocardium. *Shock* 2002;17:114-119
- Wang Z, Castresana MR, Detmer K, Newman WH. An IkappaB-alpha mutant inhibits cytokine gene expression and proliferation in human vascular smooth muscle cells. *J Surg Res* 2002;102:198-206
- Theuer J, Dechend R, Muller DN, Park JK, Fiebeler A, Barta P, Ganten D, Haller H, Dietz R, Luft FC. Angiotensin II induced inflammation in the kidney and in the heart of double transgenic rats. *BMC Cardiovasc Disord* 2002;2:3

# 丁酸钠对结肠癌细胞株 HT-29 组织蛋白酶 D 表达水平的影响

李 曦, 罗和生, 李 凡

李曦, 罗和生, 李凡, 武汉大学人民医院消化内科 湖北省武汉市 430060  
李曦, 男, 1977-12-21 生, 湖北省宜昌人, 武汉大学人民医院消化内科医学博士.  
项目负责人: 罗和生, 430060, 湖北省武汉市, 武汉大学人民医院消化内科.  
luotang@public.wh.hb.cn  
电话: 027-88041911-2243  
收稿日期: 2003-3-14 接受日期: 2003-03-25

## Effect of sodium butyrate on the expression of cathepsins D

Xi Li, He-Sheng Luo, Fan Li

Xi Li, He-Sheng Luo, Fan Li, Department of Gastroenterology, Renmin Hospital, Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei Province, China  
Correspondence to: He-Sheng Luo, Department of Gastroenterology, Renmin Hospital, Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei Province, China. luotang@public.wh.hb.cn  
Received: 2003-03-14 Accepted: 2003-03-25

### Abstract

AIM: To detect the effect of sodium butyrate on the expression of cathepsins D (Cath-D) in HT-29 colon carcinoma cell.

METHODS: MTT assay, light microscopy and immunocytochemistry were used to observe the growth, apoptosis and expression of Cath-D in HT-29 cell line after treated by sodium butyrate

RESULTS: Sodium butyrate inhibited the growth of HT-29 cell lines, induced apoptosis and increased the expression of Cath-D in HT-29 cell line.

CONCLUSION: Sodium butyrate can affect the expression of Cath-D and may play an important role in apoptosis of HT-29 cell line.

Li X, Luo HS, Li F. Effect of sodium butyrate on the expression of cathepsins D. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(10):1508-1510

### 摘要

目的: 观察丁酸钠对结肠癌细胞株 HT-29 的组织蛋白酶 D (Cath-D) 表达水平的影响。

方法: 运用细胞增生抑制实验 (MTT 法), 光镜观察, 免疫细胞化学技术观察丁酸钠对 HT-29 细胞株的生长, 凋亡和对 Cath-D 表达水平的影响。

结果: 丁酸钠能抑制 HT-29 细胞株增生, 诱导凋亡, 并促进 Cath-D 表达。

结论: 丁酸钠能够影响 Cath-D 的表达水平, 这暗示了 Cath-D 在丁酸钠诱导的凋亡中可能伴有重要角色。

李曦, 罗和生, 李凡. 丁酸钠对结肠癌细胞株 HT-29 组织蛋白酶 D 表达水平的影响. *世界华人消化杂志* 2003;11(10):1508-1510  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1508.asp>

### 0 引言

丁酸钠是由结肠共生细菌通过发酵肠道内食物纤维所产生的一种四碳短链脂肪酸, 他对体外培养细胞的基因表达调节, 细胞生长及蛋白质和酶的产生均有重要影响, 能够抑制多种肿瘤细胞的生长, 诱导细胞分化, 同时丁酸钠还能通过许多途径诱导肿瘤细胞发生凋亡<sup>[1-5]</sup>. 组织蛋白酶 D (Cath-D) 则是一种普遍存在的天冬氨酸蛋白质, 主要分布于溶酶体中, 有研究表明 Cath-D 可能参与肿瘤细胞的凋亡过程, 其在细胞质内的含量上升可能诱导细胞的凋亡. 他也可以促进某些肿瘤细胞如乳腺癌细胞的侵袭生长<sup>[6,7]</sup>. 结肠 HT-29 细胞保留了肠腺多能干细胞的特点, 能被诱导分化成杯状细胞样或肠吸收上皮样细胞, 是用于研究的一种重要的结肠癌细胞株. 我们运用 MTT 法, 光镜观察, 免疫细胞化学技术探讨丁酸钠对结肠癌细胞株 HT-29 抑制作用和对 Cath-D 表达水平影响。

### 1 材料和方法

1.1 材料 HT-29 细胞系来自湘雅医院肿瘤研究所, 丁酸钠, 四甲基偶氮唑盐 (MTT), 二甲基亚砜为 Sigma 产品, 小牛血清为国产三利公司产品, RPMI 1640 培养基为 Hyclone 公司产品, Cath-DmAb (1:50) 为 ADI 公司产品, SP 试剂盒为北京中山生物有限公司产品。

1.2 方法 HT-29 细胞株于含 100 ml/L 的小牛血清, 100 KU/L 青霉素, 100 mg/L 链霉素的 RPMI 1640 培养基中, 在 37 °C, 50 ml/L CO<sub>2</sub>, 饱和湿度条件下培养, 增生, 传代, 扩增以备. HT-29 细胞在丁酸钠处理后, 在倒置显微镜下观察细胞变化. 将对数生长期 HT-29 细胞配成 2.0 × 10<sup>7</sup>/L 的单细胞悬液, 接种于 96 孔培养板中, 每孔 200 μL, 于 37 °C, 50 ml/L CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养 48 h 后, 分别加入 1.0 mol/L, 3.0 mol/L, 5.0 mol/L 丁酸钠, 对照组为不含丁酸钠的培养液, 每种剂量的药物设 4 个复孔, 继续培养到 12 h, 24 h, 36 h, 48 h 时, 每组往一孔中加入 5 g/L MTT 20 μL, 孵育 4 h, 再加入



二甲基亚砜 100  $\mu$ L 微振荡, 使紫兰色沉淀完全溶解, 用酶标仪测 490 nm 处的吸光度. 细胞抑制率 =  $(1 - \text{试验孔 A} / \text{对照孔 A}) \times 100\%$ . 将 15×15 mm 盖玻片裁成 6×6 mm 大小放置于 24 孔培养板中, 将  $3.0 \times 10^5$  /L 单细胞悬液接种于 24 孔培养板中, 上述条件下培养 48 h, 待细胞长成单层后, 更换培养液, 分别加入不同浓度的丁酸钠, 使丁酸钠浓度为 1.0 mol/L, 3.0 mol/L, 5.0 mol/L. 对照组为不含丁酸钠的培养液, 每组设 4 个复孔, 继续培养到 24 h, 48 h, 72 h 时, 分别从各组中取出一块盖玻片, 固定后, 对细胞切片进行组织蛋白酶 D 免疫细胞化学染色, 染色结果用计算机图像分析系统处理, 自动记录吸光度值(A 值), 每张切片取 5 个视野, 取 A 均值.

统计学处理 采用 SPSS9.0 统计软件包进行分析. 计量资料用均数  $\pm$  标准差表示, 组间比较用方差分析.

## 2 结果

对照组细胞增生旺盛, 加入 1 mmol/L 丁酸钠作用 12 h, 24 h, 36 h, 48 h 后, 细胞生长抑制率由 7.4 % 上升至 51.9 %, 2 mmol/L 使 HT-29 细胞生长抑制率由 18.3 % 上升至 63.3 %, 5 mmol/L 丁酸钠则使细胞生长抑制率由

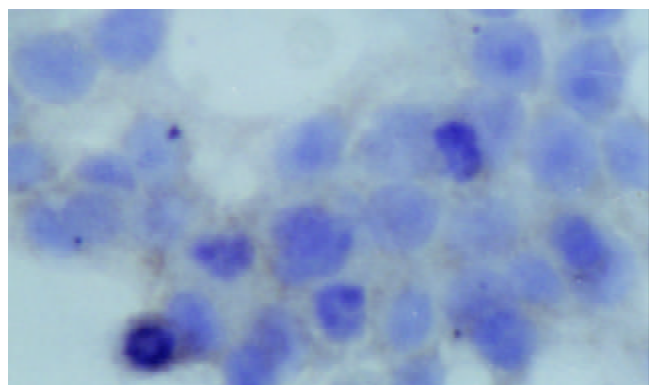


图 1 对照组 HT-29 细胞染色浅 免疫细胞化学染色  $\times 400$ .

## 3 讨论

丁酸钠是可抑制癌细胞株的生长, 促进癌细胞的分化、成熟. 通过多种途径诱导肿瘤细胞发生凋亡, 如通过 Fas,  $H_2O_2$  诱导凋亡<sup>[8-10]</sup>. Cath-D 在限制性蛋白水解中伴有最重要角色<sup>[11-13]</sup>. 剔除 Cath-D 基因的实验证明, Cath-D 又是小肠发育的关键酶. 乳腺癌中 Cath-D 表达上升, 并参与溶解基底膜, 细胞外基质及结缔组织, 促进肿瘤细胞侵袭<sup>[6, 7]</sup>. Cath-D 的表达水平是否与大肠癌 Dukes 分期有关存在争议, 而 Cath-D 在大肠癌细胞中的分布方式特点更能够反映出大肠肿瘤的潜在侵袭性<sup>[14, 15]</sup>. Cath-D 与肿瘤细胞凋亡的关系也十分密切, 可参与线粒体介导的凋亡. 本实验表明丁酸钠能够抑制结肠癌细胞株 HT-29 的生长和诱导细胞凋亡. 同时还能够促进 Cath-D 在 HT-29 细胞内的表达. 此结果与 Tan et al<sup>[16]</sup> 用 Western blot 分析测得丁酸钠作用 HT-29 细胞后 Cath-D

27.6 % 上升至 72.8 %, 表明丁酸钠对人结肠癌 HT-29 细胞生长抑制作用随浓度时间延长而增加, 呈时间、剂量依赖性. 低分化的人结肠癌 HT-29 细胞呈多边形, 部分细胞为圆形, 不规则, 丁酸钠处理的细胞 24 h 后, 凋亡细胞已明显增多, 每高倍视野下凋亡细胞为平均为 10.4 个, 对照组只有 2.0 个. 总之, 丁酸钠处理的细胞与未加干预相比, 可见漂浮凋亡细胞明显增多, 以及细胞固缩变小等凋亡变化. 免疫细胞化学染色表明丁酸钠可以促进组织蛋白酶 D 表达, 组织蛋白酶 D 在未分化的 HT-29 细胞株中染色较浅, 在经过丁酸钠干预后, Cath-D 在细胞内含量上升(图 1, 2), 但无明显时间剂量依赖(表 1).

表 1 丁酸钠对 HT-29 细胞 Cath-D 表达的影响(A)值

t/h 对照组	丁酸钠处理组(mmol/L)			
	1	2	5	
24	0.095 $\pm$ 0.007	0.127 $\pm$ 0.018 <sup>a</sup>	0.123 $\pm$ 0.009 <sup>a</sup>	0.145 $\pm$ 0.021 <sup>a</sup>
48	0.107 $\pm$ 0.013	0.148 $\pm$ 0.020 <sup>a</sup>	0.150 $\pm$ 0.018 <sup>a</sup>	0.188 $\pm$ 0.017 <sup>a</sup>
72	0.101 $\pm$ 0.011	0.158 $\pm$ 0.014 <sup>a</sup>	0.142 $\pm$ 0.011 <sup>a</sup>	0.153 $\pm$ 0.025 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>P < 0.05 vs 对照组.

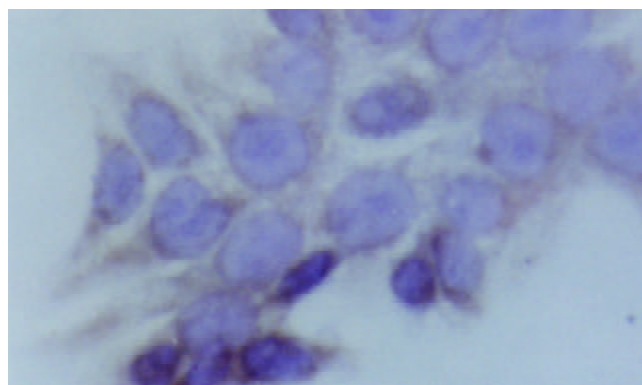


图 2 丁酸钠干预组 HT-29 细胞染色加深 免疫细胞化学染色  $\times 400$ .

的表达明显上升的结论相一致. 从细胞增生抑制实验结果可以看出, 丁酸钠明显抑制 HT-29 的生长, 且这种生长抑制作用随时间、浓度的增加而加强, 呈时间、剂量依赖性. 丁酸钠抑制肿瘤细胞生长的机制非常复杂, 至今仍不明确, 研究表明可能是丁酸钠通过组蛋白的超乙酰化激活一些转录因子, 并通过这些转录因子激活某些特定基因, 最终抑制细胞生长, 同时还有可能通过 DNA 甲基化, 组蛋白磷酸化等许多其他途径来发挥抑制作用<sup>[1, 17-22]</sup>.

我们还通过光镜观察和免疫细胞化学技术表明丁酸钠处理的细胞与对照相比凋亡细胞明显增多, 而且同时伴随着 Cath-D 的表达上升, 提示 Cath-D 的表达增高可能与凋亡有关. 丁酸钠促进细胞凋亡的机制研究有很多, 可通过多种途径发挥其诱导凋亡的作用, 如丁酸钠可能通过产生  $H_2O_2$  来诱导凋亡. Giardina et al<sup>[10]</sup> 发现丁

酸钠处理 HT-29 细胞后,  $H_2O_2$  在细胞内含量明显上升, 且这种上升是持续的, 超过 24 h. Roberg et al.<sup>[23]</sup> 的研究表明  $H_2O_2$  则可以诱导溶酶体失稳定, 从而促使 Cath-D 从溶酶体中释放到细胞质中. 而 Cath-D 与细胞凋亡密切相关, Cath-D 能够调节干扰素  $\gamma$  和肿瘤坏死因子介导的细胞程序性死亡, 如 PepstatinA (Cath-D 抑制剂), 可以抑制某些细胞株的细胞凋亡, 干扰肿瘤坏死因子  $\gamma$  诱导的程序性细胞死亡, Cath-D 在 P53 介导的凋亡中也伴有重要角色<sup>[24-26]</sup>. 此外, 一些诱导凋亡物质也可以通过 Cath-D 来诱导溶酶体介导的凋亡, 如 CD437,  $\alpha$ -TOS 等. 这些物质能促使 Cath-D 从溶酶体中释放到细胞质中, 这一事件伴随着细胞色素 C 的释放和线粒体膜的潜在性破坏, 最终引起凋亡<sup>[26, 27]</sup>. 通过以往研究和实验结果可以推测丁酸钠可能存在着一种诱导凋亡的新机制, 即丁酸钠通过  $H_2O_2$  诱导 Cath-D 表达上升和从溶酶体中释放到细胞质中来诱导凋亡.

#### 4 参考文献

- 1 Domon-Dell C, Wang Q, Kim S, Keding M, Evers BM, Freund JN. Stimulation of the intestinal Cdx2 homeobox gene by butyrate in colon cancer cells. *Gut* 2002;50:525-529
- 2 Santini V, Gozzini A, Scappini B, Grossi A, Rossi-Ferrini P. Searching for the magic bullet against cancer: the butyrate saga. *Leuk Lymphoma* 2001;42:275-289
- 3 Gaschott T, Werz O, Steinmeyer A, Steinhilber D, Stein J. Butyrate-induced differentiation of Caco-2 cells is mediated by vitamin D receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;288:690-696
- 4 Witt O, Schulze S, Kanbach K, Roth C, Pekrun A. Tumor cell differentiation by butyrate and environmental stress. *Cancer Lett* 2001;171:173-182
- 5 罗和生, 李瑾. 丁酸钠和阿司匹林对结肠癌细胞小肠三叶肽表达的影响. *世界华人消化杂志* 2002;10:465-467
- 6 Glondu M, Liaudet-Coopman E, Derocq D, Platet N, Rochefort H, Garcia M. Down-regulation of cathepsin-D expression by antisense gene transfer inhibits tumor growth and experimental lung metastasis of human breast cancer cells. *Oncogene* 2002;21:5127-5134
- 7 Heylen N, Vincent LM, Devos V, Dubois V, Remacle C, Trouet A. Fibroblasts capture cathepsin D secreted by breast cancer cells: possible role in the regulation of the invasive process. *Int J Oncol* 2002;20:761-767
- 8 Gaschott T, Maassen CU, Stein J. Tributyrin, a butyrate precursor, impairs growth and induces apoptosis and differentiation in pancreatic cancer cells. *Anticancer Res* 2001;21:2815-2819
- 9 Chopin V, Toillon RA, Jouy N, Le-Bourhis X. Sodium butyrate induces P53-independent, Fas-mediated apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells. *Br J Pharmacol* 2002;135:79-86
- 10 Giardina C, Inan MS. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs, short-chain fatty acids and reactive oxygen metabolism in human colorectal cancer cells. *Biochem Biophys Acta* 1998;1401:277-288
- 11 Berg T, Gjoen T, Bakke O. Physiological functions of endosomal proteolysis. *Biochem J* 1995;307:313-326
- 12 Berchem G, Glondu M, Gleizes M, Brouillet JP, Vignon F, Garcia M, Liaudet-Coopman E. Cathepsin-D affects multiple tumor progression steps in vivo: proliferation, angiogenesis and apoptosis. *Oncogene* 2002;21:5951-5955
- 13 Authier F, Metioui M, Fabrega S, Kouach M, Briand G. Endosomal proteolysis of internalized insulin at the C-terminal region of the B chain by cathepsin D. *J Bio Chem* 2002;277:9437-9446
- 14 Valentini AM, Pirrelli M, Armentano R, Caruso ML. The immunohistochemical expression of cathepsin D in colorectal cancer. *Anticancer Res* 1996;16:77-80
- 15 Arao J, Fukui H, Ono T, Ueda Y, Chiba T, Fujimori T. Immunohistochemical localization of cathepsin D in colorectal tumors. *Dis Colon Rectum* 2000;43:396-401
- 16 Tan S, Seow TK, Liang MY, Koh S, Lee PC, Chung MC, Hooi SC. Proteome analysis of butyrate-treated human colon cancer cells (HT-29). *Int J Cancer* 2002;98:523-531
- 17 Grunstein M. Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature* 1997;389:349-352
- 18 Della-Ragione F, Criniti V, Della-Pietra V, Borriello A, Oliva A, Indaco S, Yamamoto T, Zappia V. Genes modulated by histone acetylation as new effectors of butyrate activity. *FEBS Lett* 2001;499:199-204
- 19 Demary K, Wong L, Spanjaard RA. Effects of retinoic acid and sodium butyrate on gene expression, histone acetylation and inhibition of proliferation of melanoma cells. *Cancer Lett* 2001;163:103-107
- 20 Suenaga M, Soda H, Oka M, Yamaguchi A, Nakatomi K, Shiozawa K, Kawabata S, Kasai T, Yamada Y, Kamihira S, Tei C, Kohno S. Histone deacetylase inhibitors suppress telomerase reverse transcriptase mRNA expression in prostate cancer cells. *Int J Cancer* 2002;97:621-625
- 21 Tsubaki J, Hwa V, Twigg SM, Rosenfeld RG. Differential activation of the IGF binding protein-3 promoter by butyrate in prostate cancer cells. *Endocrinology* 2002;143:1778-1778
- 22 Sasahara Y, Mutoh M, Takahashi M, Fukuda K, Tanaka N, Sugimura T, Wakabayashi K. Suppression of promoter-dependent transcriptional activity of inducible nitric oxide synthase by sodium butyrate in colon cancer cells. *Cancer Lett* 2002;177:155-161
- 23 Roberg K, Johansson U, Ollinger K. Lysosomal release of cathepsin D precedes relocation of cytochrome C and loss of mitochondrial transmembrane potential during apoptosis induced by oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 1999;27:1228-1237
- 24 Isahara K, Ohsawa Y, Kanamori S, Shibata M, Waguri S, Sato N, Gotow T, Watanabe T, Momoi T, Urase K, Kominami E, Uchiyama Y. Regulation of a novel pathway for cell death by lysosomal aspartic and cysteine proteinases. *Neuroscience* 1999;91:233-249
- 25 Wu GS, Saftig P, Peters C, Ei-Deiry WS. Potential role for cathepsin D in p53-dependent tumor suppression and chemosensitivity. *Oncogene* 1998;16:2177-2183
- 26 Zang Y, Beard RL, Chandraratna RA, Kang JX. Evidence of a lysosomal pathway for apoptosis induced by the synthetic retinoid CD437 in human leukemia HL-60 cells. *Cell Death Differ* 2001;8:447-485
- 27 Neuzil J, Zhao M, Ostermann G, Sticha M, Gellert N, Weber C, Eaton JW, Brunk UT. Alpha-tocopheryl succinate, an agent with in vivo anti-tumor activity, induces apoptosis by causing lysosomal instability. *Biochem J* 2002;362:709-715

# 国人青年结直肠癌解剖部位分布及临床病理特点

谢正勇, 卿三华

谢正勇, 卿三华, 中国人民解放军第一军医大学附属南方医院普外科  
广东省广州市 510515  
谢正勇, 男, 1978-05 生, 汉族, 2001 年第一军医大学本科毕业, 2003 年第一军医大学硕士研究生毕业, 医师, 主要从事胃肠道肿瘤基础与临床研究。  
项目负责人: 卿三华, 510515, 广东省广州市, 中国人民解放军第一军医大学附属南方医院普外科. sanhuaq@yahoo.com  
电话: 020-61641888-87170 传真: 020-87280340  
收稿日期: 2003-05-14 接受日期: 2003-06-02

## Anatomic site distribution and clinic pathologic characteristics of colorectal cancer in young Chinese

Zheng-Yong Xie, San-Hua Qing

Zheng-Yong Xie, San-Hua Qing, Department of General Surgery, Nangfang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China  
Correspondence to: Dr. San-Hua Qing, Department of General Surgery, Nangfang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China. sanhuaq@yahoo.com  
Received: 2003-05-14 Accepted: 2003-06-02

### Abstract

AIM: To study the anatomic site distribution and pathologic characteristics of colorectal cancer (CRC) in young Chinese.

METHODS: A retrospective study was undertaken. Data were collected from 1 370 patients in Nan Fang Hospital from 1974 to 1999, including 309 patients younger than 40 years and 1 061 patients older than 40 years. The median age was 54 years. All patients with colorectal adenocarcinomas were diagnosed by histology and underwent surgery.

RESULTS: Overall, 22.3 % (309/1 370) of CRC patients were young people. The proportion of males in the young group was 57.0 % vs 58.3 % in the aged group ( $P > 0.05$ ,  $\chi^2 = 0.16$ ). 24.1 % of young group vs 25.1 % of aged group had lesions in the proximal colon and 72.4 % vs 71.2 % had cancers located in distal colorectum ( $P > 0.05$ ,  $\chi^2 = 0.42$ ). Adenocarcinoma was the most common histologic type in both groups. 71.5 % of young group vs 83.4 % of aged group was adenocarcinoma ( $P < 0.01$ ,  $\chi^2 = 18.09$ ), 17.4 % vs 12.0 % was mucinous adenocarcinoma ( $P < 0.05$ ,  $\chi^2 = 4.70$ ) and 5.5 % vs 1.1 % was signet-ring cell carcinoma ( $P < 0.01$ ,  $\chi^2 = 30.20$ ). 18.2 % of young group vs 24.9 % of aged group was early stage (Duke's stage A) and 81.9 % vs 75.1 % was advanced stage (Duke's stage B, C, D) ( $P < 0.05$ ,  $\chi^2 = 5.13$ ). 20.9 % of young group vs 11.1 % of aged group was poor differentiation ( $P < 0.01$ ,  $\chi^2 = 14.75$ ) and 59.5 % vs 34.3 % had lymphatic metastasis ( $P < 0.01$ ,  $\chi^2 = 53.25$ ).

CONCLUSION: CRC of young people has no significant difference from middle-aged and old people in either gender distribution or anatomic site distribution, but the former

has some clinical pathologic characteristics that are different from the latter. CRC in young people has relatively worse prognosis. The therapeutic effects depend on paying attention to these clinical pathologic characteristics and early diagnosis and early treatment.

Xie ZY, Qing SH. Anatomic site distribution and clinic pathologic characteristics of colorectal cancer in young Chinese. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003;11(10):1511-1514

### 摘要

目的: 探讨中国人青年结直肠癌解剖部位分布及临床病理特点。

方法: 回顾性分析 1974/1999 年第一军医大学附属南方医院连续收治的有完整记录的 CRC 患者 1 370 例, 其中小于或等于 40 岁 309 例, 40 岁以上 1 061 例。

结果: 全部病例的中位年龄为 54 岁。青年组 (小于或等于 40 岁) 309 例, 占 22.3 %。青年组与中老年相比: 男性所占比例分别为 57.0 %, 58.3 % ( $P > 0.05$ ,  $\chi^2 = 0.16$ ); 位于近端结肠者分别为 24.1 % 和 25.1 %, 位于远端结肠者分别为 72.4 % 和 71.2 % ( $P > 0.05$ ,  $\chi^2 = 0.42$ ); 腺癌皆占绝对优势, 分别为 71.5 % 和 83.4 % ( $P < 0.01$ ,  $\chi^2 = 18.09$ ), 黏液腺癌分别为 17.4 % 和 12.0 % ( $P < 0.05$ ,  $\chi^2 = 4.70$ ), 印戒细胞癌分别为 5.5 % 和 1.1 % ( $P < 0.01$ ,  $\chi^2 = 30.20$ ); Duke's A 期分别为 18.2 % 和 24.9 %, Duke's B 期及 B 期以上分别为 81.9 % 和 75.1 % ( $P < 0.05$ ,  $\chi^2 = 5.13$ ); 低分化所占比例分别为 20.9 % 和 11.1 % ( $P < 0.01$ ,  $\chi^2 = 14.75$ ); 有淋巴转移者分别为 59.5 % 和 34.3 % ( $P < 0.01$ ,  $\chi^2 = 53.25$ )。

结论: 青年 CRC 性别构成及解剖部位分布同中老年 CRC 相比无明显差异, 但具有明显不同的临床病理学特点, 预后不佳, 其治疗水平有赖于对这些特征的认识, 力争早期诊断及治疗。

谢正勇, 卿三华. 国人青年结直肠癌解剖部位分布及临床病理特点. 世界华人消化杂志 2003;11(10):1511-1514

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1511.asp>

### 0 引言

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)好发于中老年, 其发病率随年龄增加而增加<sup>[1]</sup>。青年 CRC 发病率较低, 与中老年 CRC 相比, 青年 CRC 在解剖部位分布、病理类型、病理分期、分化程度、淋巴结转移等方面具有不同特点, 预后不佳。国外对青年 CRC 患者这一特殊群体

研究较多,国内研究尤其是大样本研究较少.我们通过回顾性分析我院收治的青年CRC患者临床资料,并同国外类似研究比较,拟探讨中国人青年CRC特点,以利制定合理防治策略.

## 1 材料和方法

回顾性比较分析1974/1999年我院连续收治的有完整记录的CRC患者1370例,其中小于或等于40岁309例,大于40岁1061例.所有患者经组织学检查和手术证实.两组从性别、年龄构成、解剖部位分布、病理分期、分化程度、淋巴结转移等方面进行比较分析.近端结肠界定在回盲部、升结肠、结肠肝曲、横结肠、结肠脾曲;远端结直肠界定在降结肠、乙状结肠、直肠.直乙交界癌包括在直肠癌内,阑尾肿瘤及肛管肿瘤不包括在本研究内.肿瘤组织类型及分化程度按WHO标准,分期按Dukes分期.

统计学处理 采用SPSS10.0软件包进行.

## 2 结果

CRC患者1370例,年龄13-84(中位54)岁.青年组(小于或等于40岁)309例,占22.3%;1974/1984年为29.8%,1985/1989年为24.6%,1990/1994年为23.0%,1995/1999年为18.3%,随时间增加青年组占总体比例逐渐减少;中老年组(大于40岁)1061例,占77.8%.所有1370例中,男794例,占58.0%;青年组中,男176例,占57.0%;中老年组中,男618例,占58.3%.两组皆以男性占优势,但性别构成无统计学差异( $P>0.05$ ,  $\chi^2=0.16$ ).

2.1 解剖部位分布 两组在解剖部位分布上无统计学差异.远端结直肠尤其是直肠为两组最好发部位.青年组中,近端结肠癌69例,占24.1%,远端结直肠癌207例,占72.4%,其中乙状结肠癌及直肠癌194例,占65.7%;中老年组中,近端结肠癌253例,占25.1%,远端结直肠癌719例,占71.2%,其中乙状结肠癌及直肠癌701例,占69.4%.两组比较  $P>0.05$  ( $\chi^2=0.42$ ).

表1 青年和中老年CRC病理类型比较

分组	n	腺癌		黏液腺癌		印戒细胞癌		未分化癌		腺鳞癌		鳞癌		类癌	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
青年组	253	181	71.5 <sup>b</sup>	44	17.4 <sup>a</sup>	14	5.5 <sup>c</sup>	3	1.2	1	0.4	0	0.0	2	0.8
中老年组	906	756	83.4 <sup>b</sup>	109	12.0 <sup>a</sup>	10	1.1 <sup>c</sup>	5	0.6	6	0.7	6	0.7	11	1.2

病理类型不明数:青年组56例,中老年组155例; <sup>a</sup> $P<0.05$ ; <sup>b,c</sup> $P<0.01$ .

表2 青年和中老年CRC Duke's分期比较

分组	n	Duke's A期		Duke's B期		Duke's C期		Duke's D期	
		n	%	n	%	n	%	n	%
青年组	259	47	18.2 <sup>a</sup>	80	30.9	63	24.3	69	26.6
中老年组	887	221	24.9 <sup>a</sup>	299	33.7	168	18.9	199	22.4

分期不明数:青年组50例,中老年组174例; <sup>a</sup> $P<0.05$ .

2.2 病理类型和分化 两组病理类型构成明显不同.青年组及中老年组中,腺癌皆占绝对优势,分别为71.5%和83.4% ( $P<0.01$ ,  $\chi^2=18.09$ ).值得注意的是,黏液腺癌在青年组和中老年组中分别为44例和109例,各占17.4%、12.0%,两组比较有统计学差异( $P<0.05$ ,  $\chi^2=4.70$ );印戒细胞癌在青年组和中老年组中分别为14例和10例,各占5.5%和0.6%,两组比较有明显统计学差异( $P<0.01$ ,  $\chi^2=30.20$ ) (表1).青年组与中老年组相比,高分化所占比例分别为40.5%和43.3% ( $P>0.05$ ,  $\chi^2=0.59$ );中分化分别为38.6%和45.6% ( $P>0.05$ ,  $\chi^2=3.40$ );低分化分别为20.9%、11.1% ( $P<0.01$ ,  $\chi^2=14.75$ ).青年CRC呈现分化程度较低的特点.

2.3 病理分期和淋巴结转移 青年组中,早期(Duke's A期)占18.2%,进展期(Duke's B期及B期以上)占81.9%;中老年组中,早期(Duke's A期)占24.9%,进展期(Duke's B期及B期以上)占75.1%.两组比较,青年组中进展期所占比例明显高于中老年组( $P<0.05$ ,  $\chi^2=5.13$ ),统计学差异明显(表2).青年组中有淋巴结转移者所占比例超过半数,高达59.5%,明显高于中老年组的34.3% ( $P<0.01$ ,  $\chi^2=53.25$ ),统计学差异明显.青年CRC更易发生淋巴结转移.

## 3 讨论

青年CRC相对少见,尽管其在解剖部位分布、病理类型、病理分期、分化程度、淋巴结转移等方面的特点存在争议,多数作者认为其预后不佳.为便于比较,我们以国外文献常用的40岁为界,将青年组(小于或等于40岁)同中老年组(大于40岁)及国外文献比较,以探讨中国人青年结直肠癌特点.本组CRC诊断时的中位年龄为54岁,较美国人的70岁<sup>[2]</sup>明显年轻.青年CRC在全部病例中所占比例高达22.6%,而国外多数作者<sup>[2-4]</sup>报告不超过10%,提示国人CRC发病明显年轻化.在埃及,青年CRC占30%以上<sup>[5]</sup>,埃及CRC患者体内有机氯化物或其他杀虫剂水平较高提示工业污染可能与



该国 CRC 发病年轻化有关<sup>[6]</sup>. 而我们还不清楚中国 CRC 发病年轻化的真正原因. 青年组占总体比例随时间变化呈下降趋势, 可能与我国人口老龄化有关. 有癌前疾病(包括溃疡性结肠炎、克隆氏病等)或阳性家族史(包括家族性息肉病、遗传性非腺瘤性结直肠癌等)者在青年 CRC 患者中所占比例明显高于中老年 CRC 患者, 且认为癌前疾病、阳性家族史是 CRC 发病年轻化的原因之一<sup>[7-11]</sup>.

青年组及中老年组在性别分布上皆呈现男性优势, 但两组间并无统计学差异. 该结果与大部分资料<sup>[4, 12-14]</sup>一致, 也有人认为青年 CRC 发病并不存在性别差异<sup>[15]</sup>甚至以女性为优势<sup>[8]</sup>. CRC 在女性发病相对较低与雌激素的保护作用有关<sup>[16]</sup>. 肿瘤部位可影响 CRC 患者预后, 近端结肠癌患者预后较远端结直肠癌患者差, 其原因可能与由于诊断方法而导致的诊断延误或近端肿瘤本身的生物学特性有关<sup>[17, 18]</sup>. 同大多数作者<sup>[2, 4, 12-14]</sup>的研究结果一样, 我们发现在青年 CRC 患者中肿瘤绝大部分分布于远端结直肠尤其是直肠和乙状结肠, 且其解剖部位分布与中老年 CRC 患者相比并无明显差异, 而并不呈现部分作者报告的近端结肠分布趋势或远端结直肠分布趋势<sup>[7]</sup>. 尽管不少研究发现随着年龄的增加, CRC 的解剖部位分布呈现由远端结直肠向近端结肠转移的趋势<sup>[19, 20]</sup>, 甚至有人认为年龄每增加 1 岁, 肿瘤分布于近端的概率上升 2.2 %<sup>[21]</sup>, 但在本研究中未发现中老年 CRC 肿瘤部位分布的这种近端转移趋势.

腺癌是两组最常见的病理类型. 青年组中黏液腺癌及印戒细胞癌所占比例皆明显高于中老年组, 统计学差异显著, 这与多数研究结果一致<sup>[4, 7, 12-14, 22, 23]</sup>, 但 Paraf et al<sup>[8]</sup>的一项病例对照研究结果却认为两组在病理类型上并无明显差异. 尽管个别作者<sup>[22]</sup>认为黏液腺癌对 CRC 预后无明显影响, 多数人认为他具有易于局部固定、临床分期高、5 a 生存率低<sup>[24, 25]</sup>等不同于普通腺癌的特点. 印戒细胞癌则是恶性程度更高的一类特殊肿瘤, 其中位生存时间仅 9-16 mo, 5 a 生存率仅 10 % 左右<sup>[26]</sup>. 青年 CRC 患者中, 这两类高度恶性肿瘤所占比例高, 提示青年 CRC 预后不佳<sup>[8]</sup>.

青年 CRC 中, Duke's B 期及 B 期以上占 81.9 %、低分化癌占 20.9 %、有淋巴结转移者占 59.5 %, 较中老年组皆明显增高且有统计学意义. 此结果与大部分研究<sup>[27-33]</sup>结果一致, 但 Paraf et al<sup>[8]</sup>的病例对照研究结果及不少作者<sup>[7, 8, 10, 15]</sup>认为青年 CRC 与中老年 CRC 在上述各方面并无明显差异. 青年 CRC 患者中出现腹痛、大便习惯改变或便潜血试验阳性的比例较高, 但对青年人上述症状的警惕不够而致诊断延迟被认为是青年 CRC 诊断时病期较迟的重要原因之一<sup>[23, 32]</sup>. 肿瘤分期、分化程度是决定 CRC 预后最直接、最好的因素<sup>[34, 35]</sup>, 肿瘤分化程度越低、分期越高, 5 a 生存率越低、预后越差.

青年 CRC 患者的预后一直存在很大争议, 多数人

认为其预后较中老年患者差, 原因可能与诊断时病期较晚、黏液腺癌及印戒细胞癌等恶性程度高的病理类型所占比例高、肿瘤细胞分化程度低、近端结肠分布优势等有关<sup>[8, 22, 27, 29, 32]</sup>. 同中老年 CRC 相比, 青年 CRC 的性别构成及解剖部位分布无明显差异, 但黏液腺癌、印戒细胞癌、低分化癌所占比例更高, 临床病理分期更晚, 更易发生淋巴结转移, 高度提示其预后可能更差. 但因本研究缺乏较为详细的随访资料, 故未探讨预后. 重视青年人出现的腹痛、便血或大便习惯改变等早期症状, 有利作出结直肠癌的早期诊断. 对已经确诊的青年 CRC, 积极手术及有效的辅助治疗, 可改善预后.

#### 4 参考文献

- 1 Parkin DM. Global cancer statistics in the year 2000. *Lancet Oncol* 2001;2:533-543
- 2 Qing SH, Rao KY, Jiang HY, Wexner SD. Racial differences in the anatomical distribution of colorectal cancer: a study of differences between American and Chinese patients. *World J Gastroenterol* 2003;9:721-725
- 3 Wan J, Zhang ZQ, Zhu C, Wang MW, Zhao DH, Fu YH, Zhang JP, Wang YH, Wu BY. Colonoscopic screening and follow-up for colorectal cancer in the elderly. *World J Gastroenterol* 2002;8:267-269
- 4 Zhang YL, Zhang ZS, Wu BP, Zhou DY. Early diagnosis for colorectal cancer in China. *World J Gastroenterol* 2002;8:21-25
- 5 Abou-Zeid AA, Khafagy W, Marzouk DM, Alaa A, Mostafa I, Ela MA. Colorectal cancer in Egypt. *Dis Colon Rectum* 2002;45:1255-1260
- 6 Jaga K. Serum organochlorine pesticide levels in patients with colorectal cancer in Egypt. *Arch Environ Health* 1999;54:217-218
- 7 Mitry E, Benhamiche AM, Jouve JL, Clinard F, Finn-Faivre C, Faivre J. Colorectal adenocarcinoma in patients under 45 years of age: comparison with older patients in a well-defined French population. *Dis Colon Rectum* 2001;44:380-387
- 8 Paraf F, Jothy S. Colorectal cancer before the age of 40: a case-control study. *Dis Colon Rectum* 2000;43:1222-1226
- 9 Cai SJ, Xu Y, Cai GX, Lian P, Guan ZQ, Mo SJ, Sun MH, Cai Q, Shi DR. Clinical characteristics and diagnosis of patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2003;9:284-287
- 10 Turkiewicz D, Miller B, Schache D, Cohen J, Theile D. Young patients with colorectal cancer: how do they fare? *ANZ J Surg* 2001;71:707-710
- 11 Soetikno RM, Lin OS, Heidenreich PA, Young HS, Blackstone MO. Increased risk of colorectal neoplasia in patients with primary sclerosing cholangitis and ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gastrointest Endosc* 2002;56:48-54
- 12 Olofinlade O, Ao M. Colorectal cancer in young patients. *Dis Colon Rectum* 2001;44:1897
- 13 Keswani SG, Boyle MJ, Maxwell JP 4th, Mains L, Wilks SM, Hunt JP, O'Leary JP. Colorectal cancer in patients younger than 40 years of age. *Am Surg* 2002;68:871-876
- 14 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
- 15 Alici S, Aykan NF, Sakar B, Bulutlar G, Kaytan E, Topuz E. Colorectal cancer in young patients: characteristics and outcome. *Tohoku J Exp Med* 2003;199:85-93
- 16 Al-Azzawi F, Wahab M. Estrogen and colon cancer: current issues. *Climacteric* 2002;5:3-14
- 17 Cheng X, Chen VW, Steele B, Ruiz B, Fulton J, Liu L, Carozza SE, Greenlee R. Subsite-specific incidence rate and stage of

- disease in colorectal cancer by race, gender, and age group in the United States, 1992-1997. *Cancer* 2001;92:2547-2554
- 18 Marcella S, Miller JE. Racial differences in colorectal cancer mortality: the importance of stage and socioeconomic status. *J Clin Epidemiol* 2001;54:359-366
- 19 Okamoto M, Shiratori Y, Yamaji Y, Kato J, Ikenoue T, Togo G, Yoshida H, Kawabe T, Omata M. Relationship between age and site of colorectal cancer based on colonoscopy findings. *Gastrointest Endosc* 2002;55:548-551
- 20 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 distribution of colorectal cancer in Japan. *Dis Colon Rectum* 2002; 45:1249-1254
- 21 Gonzalez EC, Roetzheim RG, Ferrante JM, Campbell R. Predictors of proximal vs. distal colorectal cancers. *Dis Colon Rectum* 2001;44:251-258
- 22 Farrington SM, McKinley AJ, Carothers AD, Cunningham C, Bubbs VI, Sharp L, Wyllie AH, Dunlop MG. Evidence for an age-related influence of microsatellite instability on colorectal cancer survival. *Int J Cancer* 2002;98:844-850
- 23 Chen LK, Hwang SJ, Li AF, Lin JK, Wu TC. Colorectal cancer in patients 20 years old or less in Taiwan. *South Med J* 2001; 94:1202-1205
- 24 Nozoe T, Anai H, Nasu S, Sugimachi K. Clinicopathological characteristics of mucinous carcinoma of the colon and rectum. *J Surg Oncol* 2000;75:103-107
- 25 Consorti F, Lorenzotti A, Midiri G, Di Paola M. Prognostic significance of mucinous carcinoma of colon and rectum: a prospective case-control study. *J Surg Oncol* 2000;73:70-74
- 26 Ooi BS, Ho YH, Eu KW, Seow Choen F. Primary colorectal signet-ring cell carcinoma in Singapore. *ANZ J Surg* 2001;71: 703-706
- 27 Zheng CX, Zhan WH, Zhao JZ, Zheng D, Wang DP, He YL, Zheng ZQ. The prognostic value of preoperative serum levels of CEA, CA19-9 and CA72-4 in patients with colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2001;7:431-434
- 28 Yi J, Wang ZW, Cang H, Chen YY, Zhao R, Yu BM, Tang XM. p16 gene methylation in colorectal cancers associated with Duke's staging. *World J Gastroenterol* 2001;7:722-725
- 29 Ma QY, Williamson KE, Rowlands BJ. Variability of cell proliferation in the proximal and distal colon of normal rats and rats with dimethylhydrazine induced carcinogenesis. *World J Gastroenterol* 2002;8:847-852
- 30 Li XG, Song JD, Wang YQ. Differential expression of a novel colorectal cancer differentiation-related gene in colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2001;7:551-554
- 31 Luo MJ, Lai MD. Identification of differentially expressed genes in normal mucosa, adenoma and adenocarcinoma of colon by SSH. *World J Gastroenterol* 2001;7:726-731
- 32 Liang JT, Huang KC, Cheng AL, Jeng YM, Wu MS, Wang SM. Clinicopathological and molecular biological features of colorectal cancer in patients less than 40 years of age. *Br J Surg* 2003;90:205-214
- 33 Vastyam AM, Walker J, Pinter AB, Gerrard M, Kajtar P. Colorectal carcinoma in children and adolescents-a report of seven cases. *Eur J Pediatr Surg* 2001;11:338-341
- 34 Diculescu M, Iacob R, Iacob S, Croitoru A, Becheanu G, Popeneciu V. The importance of histopathological and clinical variables in predicting the evolution of colon cancer. *Rom J Gastroenterol* 2002;11:183-189
- 35 Purdie CA, Piris J. Histopathological grade, mucinous differentiation and DNA ploidy in relation to prognosis in colorectal carcinoma. *Histopathology* 2000;36:121-126

# 慢性乙型肝炎病毒清除自杀基因平衡制约载体系统的构建

阚全程, 余祖江, 雷延昌, 杨东亮, 郝连杰

阚全程, 雷延昌, 杨东亮, 郝连杰, 华中科技大学同济医学院附属同济医院临床免疫研究室 湖北省武汉市 430030  
余祖江, 郑州大学第一附属医院感染科 河南省郑州市 450052  
阚全程, 男, 1963-09-24 生, 河南信阳市人, 汉族, 1992 年河南医科大学(现郑州大学医学院)药理学硕士, 现为华中科技大学同济医学院分子免疫学博士生。  
国家“十五”科技攻关项目, No.2001BA705B05  
国家重大基础研究项目, No.973-20014CB51008  
项目负责人: 杨东亮, 430030, 湖北省武汉市解放大道 1095 号, 华中科技大学同济医学院附属同济医院临床免疫研究室。 dlyang@tjh.tjmu.edu.cn  
电话: 027-83662894  
收稿日期: 2003-08-08 接受日期: 2003-09-01

## Construction of the vector that harbors self-restricted system for hepatitis B virus clearance in gene therapy

Quan-Cheng Kan, Zu-Jiang Yu, Yan-Chang Lei, Dong-Liang Yang, Lian-Jie Hao

Quan-Cheng Kan, Yan-Chang Lei, Dong-Liang Yang, Lian-Jie Hao, Department of Clinical Immunology, Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China  
Zu-Jiang Yu, Department of Infectious Disease, the First Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China  
Correspondence to: Dong-Liang Yang, Department of Clinical Immunology, Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China. dlyang@tjh.tjmu.edu.cn  
Received: 2003-08-08 Accepted: 2003-09-01

## Abstract

**AIM:** To construct the vector that harbors self-restricted system for clearing hepatitis B virus, eliminating infected hepatic cells and inhibiting hepatitis B recurrence in gene therapy.

**METHODS:** After amplifying hepatitis C virus (HCV) internal ribosome entry sites (IRES) by reverse-transcription PCR (RT-PCR), the products were cloned into pcDNA3. A bicistronic vector was obtained. A part of sequence in HBV anti-surface gene and part of sequence in HCV core gene were cloned into the vector before IRES site in turn and thymidine kinase (TK) was also cloned into it following the IRES site. After determination by PCR and sequencing, we acquired the vector containing HBV anti-S, HCV-C gene, HCV IRES and thymidine kinase gene, which was named the vector pcDNA3-SCITK. The vectors were separately transfected into HepG2 cells and 2.2.15 cells and all the media contained ganciclovir.

**RESULTS:** The novel vector was transfected into 2.2.15 and hepG2 cells, the expressed protein could destroy the former, but had no effect on HepG2 cells if all the media contained ganciclovir. Apoptosis cells in the former accounted for 15 per cent of all cells by fluorescence (FACS) detection. There was obvious difference between the two types of cells (the later was only 6 per cent).

**CONCLUSION:** The function of genes that pcDNA3-SCITK

carried with self-restricted system could be ego-controlled, and it might be used as gene therapy vector for HBV clearance if taking HBV S gene as target gene and TK gene as objective gene.

Kan QC, Yu ZJ, Lei YC, Yang DL, Hao LJ. Construction of the vector that harbors self-restricted system for hepatitis B virus clearance in gene therapy. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(10):1515-1519

## 摘要

**目的:** 建立清除乙型肝炎病毒(HBV)自杀基因平衡制约载体系统, 靶向清除 HBV 感染的肝细胞, 抑制慢性乙型肝炎和肝硬化患者免疫再活动。

**方法:** 逆转录PCR(RT-PCR)扩增丙型肝炎病毒(HCV)基因组中核糖体插入位点(IRES), 以 pcDNA3 载体为基础, 构建双顺反子表达载体。同时在 IRES 位点的上游克隆 HBV 表面基因的部分反义序列和 HCV 全长核心基因, 在 IRES 位点下游克隆胸腺苷激酶基因, PCR、酶切和测序鉴定。构建的清除乙型肝炎病毒(HBV)自杀基因平衡制约载体系统分别转染培养基含有更昔洛韦的 HepG2 细胞和 2.2.15 细胞。

**结果:** 构建的清除乙型肝炎病毒(HBV)自杀基因平衡制约载体系统可以选择性促使 2.2.15 细胞凋亡(实验组细胞凋亡率为 15%, 而对照组仅为 6%); 抑制 2.2.15 细胞在培养基中分泌乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg), 统计学分析表明, HBsAg 在培养基中检测滴度, 在两组之间有显著性差异( $P < 0.05$ )。

**结论:** 构建以 HBV 表面基因为靶基因, 自杀基因为效应基因的自杀基因制约平衡系统, 可能为下一步慢性乙型肝炎的基因治疗提供理想的基因治疗载体。

阚全程, 余祖江, 雷延昌, 杨东亮, 郝连杰. 慢性乙型肝炎病毒清除自杀基因平衡制约载体系统的构建. *世界华人消化杂志* 2003;11(10):1515-1519  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1515.asp>

## 0 引言

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染是威胁人类健康的严峻问题, 全球大约有 5% 的人受到感染, 我国一般人群的 HBV 表面抗原携带率高达 10%<sup>[1-4]</sup>。其中 75-90% 原发性肝癌与此有关, 因此研究控制 HBV 感染的有效方法, 一直是 HBV 研究的难点和重点<sup>[5, 6]</sup>。当前人们主要根据上述慢性 HBV 感染 3 个自然过程及其相应的机体免疫应答特点<sup>[7-9]</sup>, 进行乙型肝炎病毒清除的治疗研究。迄今为止, 还没有一种有效的策略可以控

制和消除免疫清除后的逃逸病毒和耐受期高水平复制的HBV<sup>[10,11]</sup>. 采用现代基因治疗方法, 有可能对这两个时期的低病毒复制和高水平复制HBV-DNA的细胞进行靶向性基因治疗, 影响着慢性乙型肝炎预后. 我们根据HCV复制特殊性, 结合乙型肝炎免疫应答的基本特点, 利用真核细胞表达载体, 构建基因功能平衡制约系统, 有可能为上述困境提供一种新的治疗方法.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** pcDNA<sub>3</sub>, PCR产物提纯试剂盒, 德国QIAGEN; Expand PCR Kit, 美国Stratgene; Taq, Pfu酶, 加拿大Bio-Star; EcoR I, BamH I, Hind III, 洛阳华美生物工程公司. HBV pcDNA<sub>3</sub>-TK和pcDNA<sub>3</sub>-S基因质粒系本室保存. 引物合成由大连宝生物公司合成. HCV IRES L: 5' - GCGC GGATCCGGGCGA CACTCCACCATAG -3' (nt17-36, 划线为BamH-I切点), HCV IRES R: 5' - GCGAATTCGTTTTTCTTT GAGGTTTAGGATTC -3' (nt347-371, 划线为EcoR I切点), HBVL: 5' - GCGCGT GCAAGCTTAT AAAACGCCGCAGACACATC -3' (划线为Hind III切点), HBVR: 5' - ATTCGTGCTCATCAGGA TTCCT AGGACCCCTTC -3' (划线为HCV核心基因), HCVL: 5' - TAGGAATCCTGATGAGCACGAA TCCTAAACC TC-3' (划线为HBV部分反义序列), HCVR: 5' - GCG CGGATCCTTAAGCGGAAG CTGGG ATG -3' (划线为BamH I切点), TK R: 5' - ACTTCCGTGGCTTCTTGCT G-3' (nt150-nt170).

**1.2 方法** 载体构建策略, 如图1, HCV IRES位点和核心基因的获得. 临床上已被鉴定的1例国人慢性HCV感染患者的阳性血清50 μL, Trizol裂解(深圳晶美公司提供), 混匀后常规酚: 氯仿: 异戊醇抽提, 取上清2倍乙醇沉淀, 750 mL/L的乙醇洗涤, 沉淀烘干后加的DEPC水溶解20 μL, 获得HCV RNA. 取含有HCV RNA的溶液, 按照RT-PCR试剂盒(试剂提供为深圳晶美公司)要求, 分别加入随机引物, HCV IRES上下游引物, 含有逆转录酶的PCR扩增混合物. PCR仪为美国罗氏公司Real-time PCR仪. 反应程序为: 42 °C, 45 min; 94 °C, 5 min后进入主循环92 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s, 45个循环后收集PCR产物为目的HCV IRES目的基因产物. 同样的方法获得HCV核心基因. 分别提纯后备用. HBV部分S基因和胸腺苷激酶基因获得. 根据HBV S基因序列, 寻找合适的反义序列, 在HBV S基因反义序列5'端处有一200 nt左右序列, 之中不含有起始密码子ATG, 设计引物(见上述). 按下列程序: 主循环92 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s PCR扩增, 产物为反义HBV S基因目的序列; 小量提取TK质粒, EcoR I酶切获得TK基因. 分别提纯后备用. 反义HBV S和HCV核心基因连接: 按照Horton et al<sup>[12]</sup> (Gene 1989; 77: 61-68)方法进行SOEing PCR, 保守扩增. 在1.4.1.1中目的基因获得后, 反义HBV S和HCV核心

基因引物之间(HCV L和HBV R)存在互补序列(下划线所示): HCVL5'-TAGGAATCCTGATGAGCACGAATCCTAAACCTC-3'(斜体为HCV核心基因序列)3'-CCCCAGGATCCTTAGGACTACTCGTGCTTA-5': HBVR(斜体为反义HBV S基因部分). 所以, 将反义HBV S基因和HCV核心基因扩增产物按一定的比例混合后, 以HBV L和HCV R为引物进行第二次PCR扩增, 反应按下列程序进行: 主循环92 °C 30 s, 50 °C 45 s, 72 °C 60 s PCR扩增30个循环后, 72 °C再延伸10 min, 获得目的基因产物, 提纯后备用. 反义HBV S-HCV核心基因和HCV IRES位点三片段连接. BamH I分别常规酶切反义HBV S-HCV核心基因和HCV IRES位点, 分别提纯后按一定的比例混合, 常规T4连接酶连接, 连接产物常规酚: 氯仿: 异戊醇抽提后获得上清. 取上清, 以HBV L和HCV IRES R为引物, 进行PCR扩增, 反应按下列程序进行: 主循环92 °C 30 s, 53 °C 45 s, 72 °C 60 s PCR扩增30个循环后, 72 °C再延伸10 min, 获得目的基因产物, 提纯后备用. 反义HBV S-HCV核心基因-HCV IRES三片段克隆. Hind III和EcoR I双向酶切反义HBV S-HCV核心基因-HCV IRES序列和pcDNA<sub>3</sub>载体, 提纯, T4连接酶连接. 连接产物按常规方法进行转化感受态细胞后, 涂板, 37 °C培养, 挑取单菌落, 常规培养转化后的菌株, 以HBV L和HCV IRES R为引物进行PCR和Hind III和EcoR I双酶切鉴定, 获得的载体称为pcDNA3-SCI.

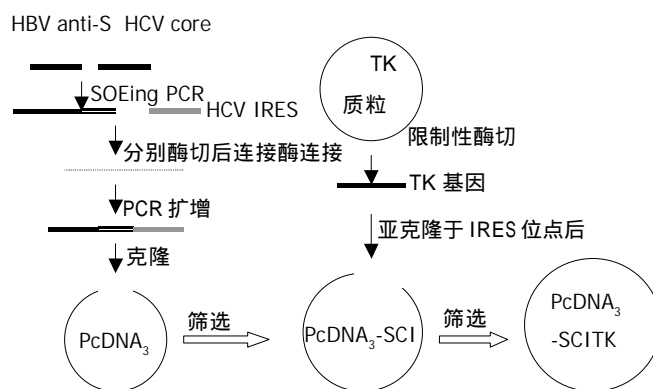


图1 自杀平衡载体构建策略图.

**1.2.1 胸腺苷激酶基因亚克隆** EcoR I分别酶切pcDNA3-SCI和前面所得的TK基因, 提纯后T4连接酶连接, 连接产物按常规方法进行转化感受态细胞后, 涂板, 37 °C培养, 挑取单菌落, 常规培养转化后的菌株, 以HBV L和TK R为引物进行PCR扩增, 有目的产物出现即为TK基因正向插入pcDNA3-SCI载体后的目的质粒, 即清除乙型肝炎病毒自杀基因平衡制约载体系统(pcDNA<sub>3</sub>-SCITK). 获得的质粒送大连宝生物公司测序鉴定.

**1.2.2 获得的载体细胞转染** 常规培养细胞, 转染前1 d将HepG2和2.2.15细胞接种到8孔槽中, 加入100 mL/L



胎牛血清( FCS)的 DMEM 培养基, 在 37 °C 和 50 mL/L 的 CO<sub>2</sub> 中培养至细胞的融合率为 50-80 %。用 QIAGENE 小量提取质粒(pcDNA3-SCI 和 pcDNA<sub>3</sub>-SCITK), 按 lipofectamine 试剂盒(boehringer mannheim biochemicals Co. USA)说明书要求, 转染 HepG2 和 2.2.15 细胞, 0, 3, 6 d 分别取细胞培养基上清, 6 d 后, 细胞常规碘化丙啶染色, 流式细胞仪检测。

## 2 结果

### 2.1 PCR 扩增和酶切鉴定结果 见图 2-4.

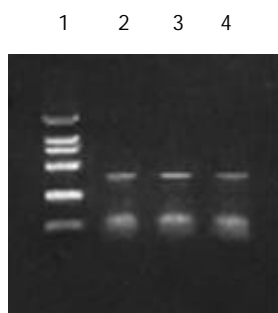


图2 HCV IRES PCR 扩增.

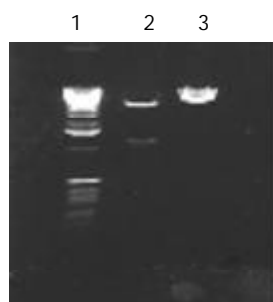


图3 SCI 平衡制约系统鉴定.

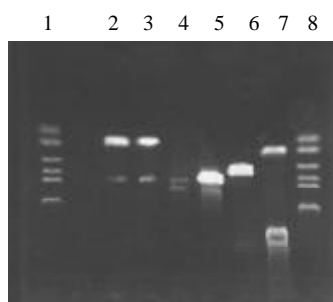


图4 SCITK 平衡制约系统克隆和鉴定过程.

图2为 HCV IRES RT-PCR 结果, 左侧为 2 kb Mark, 右侧为 PCR 产物, 大小 300 bp 左右; 图3为反义 HBV S-HCV 核心基因 -HCV IRES 克隆后, HinD III 和 EcoR I 双酶切鉴定结果, 左侧为 1 kb 的 Mark, 右侧为 2 泳道为双酶切结果, 前面为 1 kb 左右的 SCI 基因片段, 后面为线状 pcDNA<sub>3</sub> 载体, 3 泳道为 pcDNA3-SCI 载体; 图4为 SCITK 平衡制约系统克隆和鉴定过程, 1 和 8 泳道为 2 kb 的 Mark, 2, 3 泳道为 SCITK 载体系统经过 HBV L 和 TK R 为引物进行 PCR 扩增鉴定结果, 4 泳

道为反义 HBV S-HCV 核心基因和 HCV IRES 位点连接后 PCR 扩增后提纯的电泳结果, 5 泳道反义 HBV S 和 HCV 核心基因 SOEing PCR 连接的结果, 6 泳道为 HCV core RT-PCR 结果, 7 泳道为 HBV 部分 S 基因 PCR 结果. 2.2 质粒转染和检测 ELISA 分析 2.2.15 细胞培养上清, 表达的 HBsAg 检测结果呈波浪性. 对照组(pcDNA3-SCI) 1, 3, 6 d 的 A 值分别为 0.32±0.13, 0.61±0.23, 0.61±0.25, 而实验组(pcDNA3-SCITK)分别为 0.31±0.11, 0.51±0.22, 0.41±0.16. 在检测结果 6 d, 二者之间呈显著性差异 (P < 0.05).

2.3 细胞凋亡流式细胞仪检测和显微镜下观察 pcDNA3-SCITK 载体分别转染 2.2.15 细胞和 HepG2 细胞, 转染载体 6 d 后, 收集细胞, 进行流式细胞仪检测, 发现对照组凋亡率约为 6 %, 而实验组凋亡率约为 15 %, 显微镜下检测原有梭形形态已丢失, 细胞多皱缩呈圆形, 多向凋亡趋势发展, 图 5 和图 6.

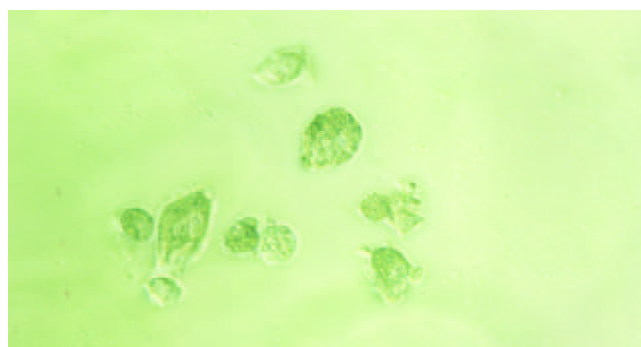


图5 2.2.15 细胞被转染后 6 d 细胞形态.

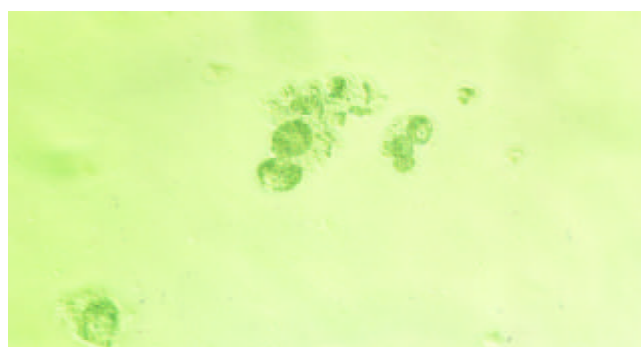


图6 2.2.15 细胞被转染后 6 d 细胞形态.

## 3 讨论

慢性乙型肝炎高水平的病毒复制、低水平的免疫应答和不完全免疫清除后逃逸的较少病毒复制是慢性乙型肝炎间断性发作的决定性因素. 目前常用的免疫调节剂如干扰素, IL-2 等治疗效果不尽人意. 以疗效较为肯定干扰素 - α 为例, 其对 e 抗原的阴转率不到 50 %, 对 HBsAg 的阴转率几无影响, 而且远期疗效尚差, 副作用大, 价格昂贵<sup>[13-15]</sup>. 另外抗病毒药物拉咪呋定, 虽然有较强抑制病毒复制作用, 但停药后, 病毒又重新复制而复发<sup>[16-18]</sup>. 现有的抗 HBV 药物都不能清除 HBV

cccDNA, 停药后可以再度复制, 难以达到使其表达 HBsAg 消失, 因此远期治疗效果有限. 迄今为止, 还没有一种有效的策略可以控制和消除这些免疫清除后的逃逸病毒和耐受期高水平复制的HBV. 随着分子生物学研究进展, 通过基因治疗的方法来治疗慢性乙型肝炎已经成为目前研究的热点. 基因治疗的关键在于载体选择, 必须具有靶向性, 目的基因可调控性及有效表达等<sup>[19, 20]</sup>. 因此对载体的合理修饰和改建是目前研究的热点和难点. 我们根据 HCV 复制特殊性, 蛋白质翻译的基本特点, 利用成熟的胸腺苷激酶基因(thymidine kinase, TK)为目的基因<sup>[21-25]</sup>, 构建基因功能平衡制约系统, 使目的基因的可调控性和靶向性融为一体, 有可能为目前慢性乙型肝炎的基因治疗提供一个有效的载体.

在慢性病毒性肝炎的病原中, 除 HBV 外, 丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)也是重要的病原之一. 研究表明 HCV 表达的核心蛋白可以与 HCV 的核糖体插入位点(IRES)相互结合, 下调 HCV 病毒蛋白表达, 自我调控 HCV 复制, 降低 HCV 水平, 导致 HCV 在血液中间断性出现, 逃避机体免疫监视, 造成患者体内持续病毒感染<sup>[26-29]</sup>. 另外研究表明, HCV 基因组上存在的 IRES 序列, 具有很强的翻译功能, 为双顺反子载体中效率较高的启动蛋白质翻译序列, 已经用于载体构建之中<sup>[30-33]</sup>.

我们根据上述 HCV 复制特点, 在真核细胞表达载体 pcDNA<sub>3</sub> 的 CMV 启动子下依次驱动部分 HBV S 反义基因、HCV 核心蛋白基因、HCV IRES 部分有效序列和 TK 基因, 即 HBV-anti S/HCV/core-IRES-TK 载体系统, 构成一个以 HBV 特有的 S 基因为靶向的基因功能相互平衡制约系统, 简称为 SCITK 系统, 当细胞内 HBV 病毒表达 HBsAg, 这时 S 基因的 mRNA 即与载体系统中的 S 基因反义序列转录 mRNA 的相结合, 也就在 HCV 核心蛋白基因起始密码子 AUG 前形成 mRNA 的二聚体, 抑制的 HCV 核心蛋白 mRNA 翻译, HCV 核心蛋白表达水平下降. HCV IRES 结合蛋白减少, IRES 启动下游基因 TK 表达相对增强, 受感染的肝细胞因表达 HBsAg 而自我同时表达 TK, 肝细胞局部存在相对高浓度的 TK, 而发挥 TK 溶解细胞效应, 细胞出现坏死和凋亡(图 7A). ii, 在正常细胞内, 没有 HBV S 基因存在时, 表达的 HCV 核心蛋白与 HCV IRES 结合, 抑制 IRES 对下游 TK 的启动表达, 从而对机体细胞无害. 如果感染细胞 HBV 清除后, SCITK 载体系统表达的 TK 逐渐降低和消失, 具有良好的调控性, 图 7B.

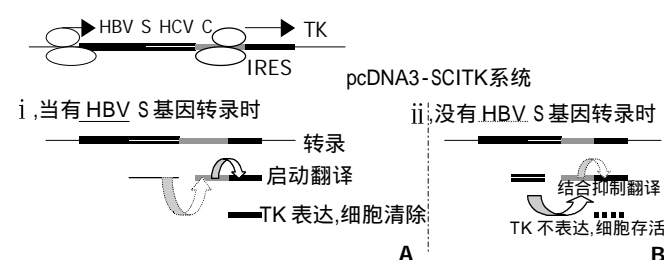


图7 pcDNA3-SCITK系统清除感染HBV细胞模式图.

为了验证上述理论, 我们构建了 pcDNA3-SCI 和 pcDNA3-SCITK 载体. PCR 和测序(图2-4)鉴定表明, 我们已经成功构建了一个以 HBV S 基因为靶向基因相互平衡制约系统. 将上述两种载体分别转染 2.2.15 在转染后的 0, 3, 6 d, 分别检测细胞培养基中 HBsAg 的表达量, 发现实验组中细胞分泌 HBsAg 呈波浪性, 而对照组细胞没有; 如果将 pcDNA3-SCITK 载体分别转染 2.2.15 细胞和 HepG2 细胞, 细胞凋亡明显增多, 细胞形态向凋亡方向发展(图5和图6). 该系统构建成功, 将为我们下一步的动物模型<sup>[34-36]</sup>研究奠定了坚实的基础.

#### 4 参考文献

- 1 Chu CM, Liaw YF. Natural history of chronic hepatitis B virus infection: an immunopathological study. *J Gastroenterol* 1997;13:218
- 2 Rabe C, Pilz T, Klostermann C, Berna M, Schild HH, Sauerbruch T, Caselmann WH. Clinical characteristics and outcome of a cohort of 101 patients with hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2001;7:208-215
- 3 Fang JN, Jin CJ, Cui LH, Quan ZY, Choi BY, Ki M, Park HB. A comparative study on serologic profiles of virus hepatitis B. *World J Gastroenterol* 2001;7:107-110
- 4 Roussos A, Goritsas C, Pappas T, Spanaki M, Papadaki P, Ferti A. Prevalence of hepatitis B and C markers among refugees in Athens. *World J Gastroenterol* 2003;9:993-995
- 5 Gao Y, Ma Y, Li M, Cheng T, Li SW, Zhang J, Xia NS. Oral immunization of animals with transgenic cherry tomato expressing HBsAg. *World J Gastroenterol* 2003;9:996-1002
- 6 Wu CH, Ou-Yang EC, Walton C, Promrat K, Forouhar F, Wu GY. Hepatitis B virus infection of transplanted human hepatocytes causes a biochemical and histological hepatitis in immunocompetent rats. *World J Gastroenterol* 2003;9:978-983
- 7 Fattovich G. Natural history and prognosis of hepatitis B. *Semin Liver Dis* 2003;23:47-58
- 8 Iino S. Natural history of hepatitis B and C virus infections. *Oncology* 2002;62:18-23
- 9 Lau GK, Lai CL, Wu PC. The natural history of chronic hepatitis B infection. *Hong Kong Med J* 1997;3:283-288
- 10 Liaw YF. Therapy of chronic hepatitis B: current challenges and opportunities. *J Viral Hepat* 2002;9:393-399
- 11 Chin R, Locarnini S. Treatment of chronic hepatitis B: current challenges and future directions. *Rev Med Virol* 2003;13:255-272
- 12 Horton RM, Hunt HD, Ho SN, Pullen JK, Pease LR. Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene* 1989;77:61-68
- 13 Manns MP. Current state of interferon therapy in the treatment of chronic hepatitis B. *Semin Liver Dis* 2002;22:7-13
- 14 Leung N. Treatment of chronic hepatitis B: case selection and duration of therapy. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17:409-414
- 15 Di Bisceglie AM. Long-term outcome of interferon- $\alpha$  therapy for chronic hepatitis B. *J Hepatol* 1995;22:s65-66
- 16 Sokal E. Lamivudine for the treatment of chronic hepatitis B. *Expert Opin Pharmacother* 2002;3:329-339
- 17 Schiff ER. Lamivudine for hepatitis B in clinical practice. *J Med Virol* 2000;61:386-391
- 18 Chayama K, Suzuki Y, Kobayashi M, Kobayashi M, Tsubota A, Hashimoto M, Miyano Y, Koike H, Kobayashi M, Koida I, Arase Y, Saitoh S, Murashima N, Ikeda K, Kumada H. Emergence and takeover of YMDD motif mutant hepatitis B virus during long-term lamivudine therapy and re-takeover by wild type after cessation of therapy. *Hepatology* 1998;27:1711-1716
- 19 Romano G, Pacilio C, Giordano A. Genetransfer Technology in therapy: current applications and future goals. *Stem Cell* 1999; 17:191-202

- 20 Ferry N, Heard JM. Liver-directed gene transfer vectors. *Hum Gene Ther* 1998;9:1795-1981
- 21 Dancer A, Julien S, Bouillot S, Pointu H, Vernet M, Huber P. Expression of thymidinekinase driven by an endothelial-specific promoter inhibits tumor growth of Lewis lung carcinoma cells in transgenic mice. *Gene Ther* 2003;10:1170-1178
- 22 Freund CT, Tong XW, Rowley D, Engehausen D, Frolov A, Kieback DG, Lerner SP. Combination of adenovirus-mediated thymidine kinase gene therapy with cytotoxic chemotherapy in bladder cancer in vitro. *Urol Oncol* 2003;21:197-205
- 23 Kwon GY, Jeong J, Woo JK, Choi HY, Lee MJ, Ko JK, Shim YH, Kim CW. Co-expression of bfl-1 enhances host response in the herpes simplex virus-thymidine kinase/ganciclovir gene therapy system. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;303:756-763
- 24 Litvinova E, Maury S, Boyer O, Bruel S, Benard L, Boissier G, Klatzmann D, Cohen JL. Graft-versus-leukemia effect after suicide-gene-mediated control of graft-versus-host disease. *Blood* 2002;100:2020-2025
- 25 Chen SH, Chen XHL, Wang YB, Kosai K, Finegold MJ, Rich SS, Woo SL. Combination gene therapy for liver metastasis of colon carcinoma. *Proc Natl Acad Sci* 1995;92:2577-2581
- 26 Yao ZQ, Ray S, Eisen-Vandervelde A, Waggoner S, Hahn YS. Hepatitis C virus: immunosuppression by complement regulatory pathway. *Viral Immunol* 2001;14:277-295
- 27 Shimoike T, Mimori S, Tani H, Matsuura Y, Miyamura T. Interaction of hepatitis c virus core protein with viral sense RNA and suppression of its translation. *J Virol* 1999;73:9718-9725
- 28 Zhang J, Yamada O, Yoshida H, Iwai T, Araki H. Autogenous translational inhibition of core protein: implication for switch from translation to RNA replication in hepatitis C virus. *Virology* 2002;293:141-150
- 29 Li D, Takyar ST, Lott WB, Gowans EJ. Amino acids 1-20 of the hepatitis C virus (HCV) core protein specifically inhibit HCV IRES-dependent translation in HepG2 cells, and inhibit both HCV IRES- and cap-dependent translation in HuH7 and CV-1 cells. *J Gen Virol* 2003;84(Pt 4):815-825
- 30 Urab M, Hasumi Y, Ogasawara Y, Matsushita T, Kamoshita N, Nomoto A, Colosi P, Kurtzman GJ, Tobita K, Ozawa K. A novel discistronic AAV vector using a short IRES segment derived from hepatitis c virus genome. *Gene* 1997;200:157-162
- 31 Kruger M, Begger C, Li QX, Welch PJ, Tritz R, Leavitt M, Barber JR, Wong-Staal F. Identification of eIF2Bgamma and eIF2gamma as cofactors of hepatitis C virus internal ribosome entry site-mediated translation using a functional genomics approach. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:8566-8571
- 32 Zhang H, Hanecak R, Brown-Driver V, Azad R, Conklin B, Fox MC, Anderson KP. Antisense oligonucleotide inhibition of hepatitis C virus (HCV) gene expression in livers of mice infected with an HCV-vaccinia virus recombinant. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:347-353
- 33 Liang XS, Lian JQ, Zhou YX, Nie QH, Hao CQ. A small yeast RNA inhibits HCV IRES mediated translation and inhibits replication of poliovirus in vivo. *World J Gastroenterol* 2003;9:1008-1013
- 34 Zoulim F, Berthillon P, Guerhier FL, Seignerres B, Germon S, Pichoud C, Cheng YC, Trepo C. Animal models for the study of HBV infection and the evaluation of new anti-HBV strategies. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17:460-463
- 35 Wang CY, Giambrone JJ, Smith BF. Detection of duck hepatitis B virus DNA on filter paper by PCR and SYBR green dye-based quantitative PCR. *J Clin Microbiol* 2002;40:2584-2590
- 36 Le Guerhier F, Pichoud C, Jamard C, Guerret S, Chevallier M, Peyrol S, Hantz O, King I, Trepo C, Cheng YC, Zoulim F. Antiviral activity of beta-L-2', 3'-dideoxy-2', 3'-dideoxy-5-fluorocytidine in woodchucks chronically infected with woodchuck hepatitis virus. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:1065-1077

# 人工构建含丙型肝炎病毒核糖体插入位点的双顺反子表达载体

阚全程, 余祖江, 雷延昌, 杨东亮, 郝连杰

阚全程, 雷延昌, 杨东亮, 郝连杰, 华中科技大学同济医学院附属同济医院临床免疫研究室 湖北省武汉市 430030  
余祖江, 郑州大学第一附属医院感染科 河南省郑州市 450052  
阚全程, 男, 1963-09-24, 河南信阳市人, 汉族, 1992年河南医科大学(现郑州大学医学院)药理学硕士, 现为华中科技大学同济医学院分子免疫学博士生。  
国家“十五”科技攻关项目, No.2001BA705B05  
国家重大基础研究项目, No.973-20014CB51008  
项目负责人: 杨东亮, 430030, 湖北省武汉市解放大道1095号, 华中科技大学同济医学院附属同济医院临床免疫研究室。 dlyang@tjh.tjmu.edu.cn  
电话: 027-83662894  
收稿日期: 2003-08-07 接受日期: 2003-09-01

## Artificially constructed bicistronic vector containing hepatitis C virus internal ribosome entry site

Quan-Cheng Kan, Zu-Jiang Yu, Yan-Chang Lei, Dong-Liang Yang, Lian-Jie Hao

Quan-Cheng Kan, Yan-Chang Lei, Dong-Liang Yang, Lian-Jie Hao, Department of Clinical Immunology, Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China  
Zu-Jiang Yu, Department of Infectious Disease, First Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China  
Correspondence to: Dong-Liang Yang, Department of Clinical Immunology, Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China. dlyang@tjh.tjmu.edu.cn  
Received: 2003-08-07 Accepted: 2003-09-01

## Abstract

**AIM:** To study the function of hepatitis C virus(HCV) internal ribosome entry site (IRES), and to construct bicistronic vector.

**METHODS:** After amplifying HCV IRES by reverse-transcription PCR (RT-PCR), the products were cloned into pcDNA3-S upstream hepatitis B virus (HBV) surface gene. HBV core gene was cloned following HCV IRES. After determination by PCR and sequencing, we acquired plasmids containing HBV S, C gene and HCV IRES, which were named as plasmids pcDNA3-SIC. PcDNA3-SIC were transfected into HepG2 cells and detected by immunofluorescence assay and Western blot.

**RESULTS:** HBV surface gene and core gene were both expressed in hepG2 cells, which were detected by immunofluorescence assay and confirmed by Western blot.

**CONCLUSION:** The 17 nt of 5' nontranslated RNA in HCV IRES had no effect on driving downstream gene expression itself and could be used in the bicistronic vector that drove two genes expression.

Kan QC, Yu ZJ, Lei YC, Yang DL, Hao LJ. Artificially constructed bicistronic vector containing hepatitis C virus internal ribosome entry site. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(10):1520-1523

## 摘要

**目的:** 研究丙型肝炎病毒核糖体插入位点启动翻译蛋白质功能, 构建双顺反子真核表达载体。

**方法:** 逆转录PCR(RT-PCR)扩增丙型肝炎基因组中核糖体插入位点序列(IRES), 定向克隆到pcDNA3-S质粒多克隆酶切位点中。在IRES下游克隆乙型肝炎病毒核心基因, 测序鉴定后获得的质粒经脂质体转染hepG2细胞, 间接免疫荧光染色和Western-blot检测。

**结果:** 在间接免疫荧光染色后, 荧光显微镜下可见乙型肝炎病毒S基因和核心基因表达。转染细胞破碎后免疫沉淀检测和图像分析表明, 两种基因有相似的表达量。

**结论:** 人为截断HCV 5' NTR区17个碱基, 并不影响IRES对下游基因蛋白质翻译, 为成功构建了含丙型肝炎病毒IRES的双顺反子表达载体打下基础。

阚全程, 余祖江, 雷延昌, 杨东亮, 郝连杰. 人工构建含丙型肝炎病毒核糖体插入位点的双顺反子表达载体. *世界华人消化杂志* 2003;11(10):1520-1523  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1520.asp>

## 0 引言

在引起慢性病毒性肝炎的病原中, 丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)是重要的病原之一<sup>[1-7]</sup>。丙型肝炎的慢性化机制虽然和乙型肝炎有许多相似之处, 如免疫耐受的形成, 细胞凋亡等<sup>[8-10]</sup>。但也有许多不同之处, 如HCV基因组具有高变性, 在血液中间断性出现等原因, 不易被免疫系统识别而造成患者慢性化<sup>[11-14]</sup>。最近有研究表明, HCV核心蛋白可以和其IRES位点相结合, 下调HCV抗原表达, 降低病毒复制, 有利于逃避宿主免疫系统的监视<sup>[15-17]</sup>。国内对于上一机制鲜有报道, 为了进一步阐述上述机制和研究HCV IRES位点功能, 我们构建了含HCV IRES的双顺反子载体。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** pcDNA<sub>3</sub>, 德国Qiagen公司; Expand PCR Kit, 美国Stratgene公司; Taq酶, 加拿大Bio-Star公司; EcoR I、BamH I, 洛阳华美生物工程公司。HBV pcDNA<sub>3</sub>-C和pcDNA<sub>3</sub>-S基因质粒系本室保存。引物序列: 以下引物均在大连宝生物公司合成 HCV IRES L: 5' - GCGCGG ATCCGG GCGACACTCCACCATAG -3'(nt17-36, 黑



体划线为 BamH-I 切点)HCV IRES R: 5' -GC GAATTC GTTTTCTTTGAGTTTAGGATTC -3' (nt347-371, 黑体划线为 EcoR I 切点).

1.2 方法 临床上已被鉴定的 1 例国人慢性 HCV 感染患者的阳性血清 50  $\mu$ L, 加 2 倍的裂解液 Trazol(深圳晶美公司提供), 加样枪混匀后, 常规酚: 氯仿: 异戊醇提取, 4  $^{\circ}$ C 离心 13 000 r/min, 14 min 后取上清, 加 2 倍乙醇沉淀, 在离心后加 750 mL/L 乙醇洗涤, 沉淀烘干后加 20  $\mu$ L 的 DEPC 水溶解后备用. 取含有 HCV RNA 的溶液, RT-PCR 一步法试剂盒由深圳晶美公司提供, 按照试剂盒要求, 依次加入随机引物, HCV IRES 上下游引物及含有逆转录酶的 PCR 扩增混合物. PCR 仪为美国罗氏公司 Real-time PCR 仪. 反应程序为: 42  $^{\circ}$ C, 45 min; 94  $^{\circ}$ C, 5 min 后进入主循环 92  $^{\circ}$ C 30 s, 55  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 30 s, 45 个循环后收集 PCR 产物. PCR 产物常规酚: 氯仿: 异戊醇提取后, 离心后上清直接 EcoR I 和 BamH I 双酶切, 酶切后电泳, QIAGEN(德国产)试剂盒回收 PCR 产物, 定向克隆入 pcDNA<sub>3</sub>-S 中, 所得的质粒为 pcDNA3-SI. PCR 和酶切鉴定后, 送入大连宝生物公司测序鉴定.

1.2.1 HBV (hepatitis B virus) 核心基因亚克隆 EcoR I 酶切含有 HBV 核心基因的质粒, 核心基因片段再回收. 小量提取 pcDNA<sub>3</sub>-SI 质粒后, EcoRI 酶切后与 HBV 核心基因连接, 连接后产物常规转化感受态细胞, 小量培养筛选的单菌落后提取质粒, 所得质粒称为 pcDNA<sub>3</sub>-SIC. 以 HCV IRES L 和 HCV 核心基因扩增下游引物(本室保存)作为所得质粒 PCR 方向鉴定引物, HBV 核心基因克隆鉴定方向后, 送大连宝生物公司测序.

1.2.2 pcDNA<sub>3</sub>-SIC 在真核细胞 HepG2 表达 常规培养细胞, 转染前 1 d 将 HepG2 细胞接种到 8 孔槽中, 加入 100 mL/L 胎牛血清(FCS)的 DMEM 培养基, 在 37  $^{\circ}$ C 和 50 mL/L 的 CO<sub>2</sub> 中培养至细胞的融合率为 50-80 %. II, 细胞转染 用 QIAGEN 小量提取质粒试剂盒提取 pcDNA<sub>3</sub>-SIC 质粒, 按 lipofectamine 试剂盒(boehringer mannheim biochemicals Co. USA)说明书要求, 转染 HepG2 细胞, PBS 洗涤细胞 2 次后用 4  $^{\circ}$ C 的 500 g/L 甲醇和丙酮混合液, 低温固定 15min, 间接免疫荧光检测.

1.2.3 免疫沉淀检测 超声波破碎转染细胞, 7 000 r/min, 离心 10 min, 取上清. 取等量上清分别加入单克隆 HBsAb 和 HBcAb, 37  $^{\circ}$ C 温浴 45 min 后, 加入 PEG6000, 终浓度为 25 g/L, 4  $^{\circ}$ C 过夜, 离心 10 000 r/min, 30 min, 收集沉淀, 30 g/L 的 PEG6000 洗涤 3 次, 3 mol/L KSCN 室温解离 3 h, 所得样品做 SDS-PAGE(分离胶为 120 g/L, 浓缩胶为 30 g/L, 稳流 25mA, 电泳 70min, 电泳仪为 Bio-Rad3000Xi 型), 凝胶用考马斯亮兰 R-250 染色.

## 2 结果

2.1 RT-PCR 在丙型肝炎患者血清中提取 RNA, 对 HCV IRES 片段进行 PCR 扩增, 扩增片段大小为 300 bp

左右, 图 1.

2.2 克隆目的基因鉴定 将外源性目的基因HBV S和core 基因依次克隆入 PCDNA3-SIC 中, PCR 扩增鉴定插入 PCDNA3-SIC 载体中片段大小, 分别约为 670 bp 和 550 bp, 图 2.

2.3 质粒转染鉴定 将测序和 PCR 鉴定完成后 pcDNA3-SIC 质粒, 在 HepG2 中转染, 间接免疫荧光染色和免疫沉淀鉴定, 图 3-5.

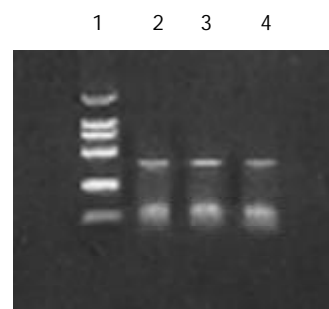


图1 血清中 HCV IRES RT-PCR.

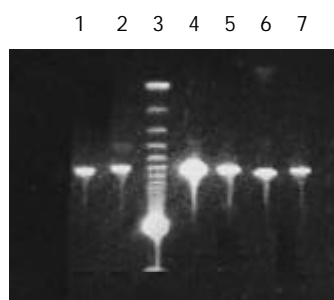


图2 克隆目的基因 PCR 鉴定.

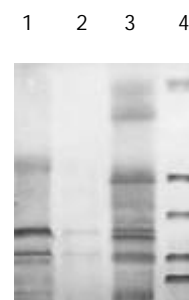


图3 质粒转染免疫沉淀鉴定.

图 1 为 HCV IRES 位点 RT-PCR 扩增的结果, 左侧 1 泳道为 2 kb 的 Mark, 右侧 2、3、4 泳道为 PCR 扩增结果, 分子大小为 335 bp. 图 2 为 PCDNA3-SIC 中 HBV S 和 core 基因扩增鉴定结果, 中间 3 泳道为 123 bp 的 Mark, 左侧第一泳道为 HBV core 基因 678 bp, 而第二泳道为 HBV S 基因 550 bp, 4、5 泳道为 S, 6、7 为 C; 图 3 为 pcDNA3-SIC 在 HepG2 中转染后, 免疫沉淀鉴定结果, 最右侧 4 泳道为中分子质量蛋白质 mark, 左侧第 1 泳道为 HBV S 基因表达后免疫沉淀的结果, 第 2 泳道为无关血清对照, 第 3 泳道为 HBV core 基因表达后免疫沉淀, 可见 HBV 核心蛋白表达, 为 2 000 左右.

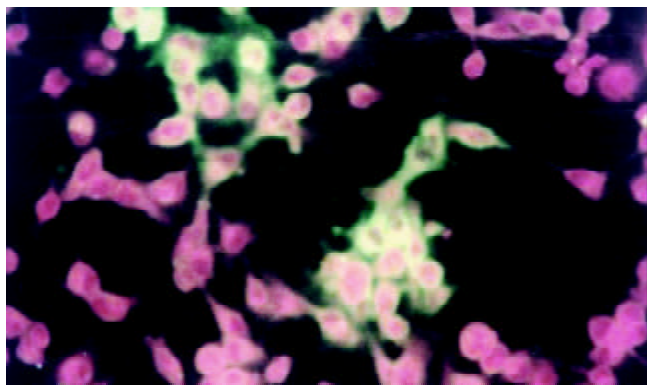


图4 单克隆 HBsAb 检测转染细胞图.

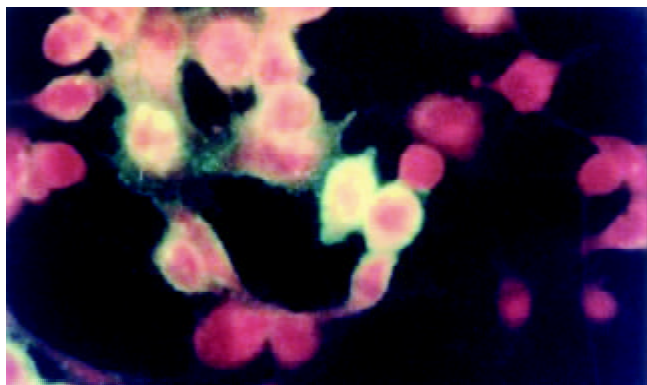


图5 被 HBcAb 结合后荧光检测图.

图4和图5分别为培养转染细胞被单克隆HBsAb和HBcAb结合后,间接免疫荧光显示(放大倍数:  $10 \times 20$ ).

### 3 讨论

最初描述核糖体插入位点(internal ribosome entry site, IRES)的启动帽非依赖性的翻译功能首先在细小病毒RNA的5'端非编码区<sup>[18]</sup>,随后在有多种病毒基因组中发现.评价这些IRES元件,特别是来源于脑心肌炎病毒(EMCV)的大约600 nt IRES序列,可以被用做表达多种蛋白质<sup>[19-21]</sup>.最近,HCV的基因组被证明也有一个IRES序列,大约为200 nt左右<sup>[22-26]</sup>.现研究表明在HCV基因组中的5'端存在一个非基因编码区(nontranslated RNA),即5' NTR区,长度大约300 bp,共有4个茎环,即I, II, III和IV.其中第2个茎环含有IIa和IIb等2个环状结构,第3个茎环含有5个环状结构,即IIIa, IIIb, IIIc, IIId和IIIE,翻译的起始位点可能位于IV环中的AUG,而这4个茎环空间结构的正确形成对下游基因蛋白质翻译有着重要影响(见左图)<sup>[27-32]</sup>. Rijnbrand et al<sup>[33]</sup>等研究HCV IRES功能区位于40 nt和370 nt之间,包括一部分HCV核心蛋白序列,即位于茎环II和III上,内含丰富的RNA假结,有利于核糖体进入结合.HCV IRES能够在绝大多数细胞系中可以启动下游基因表达,甚至包括那些非灵长类细胞,具有帽非依赖性的强大翻译功能<sup>[34]</sup>.也有研究表明,茎环中第4环能够和病毒的病毒产物相结合,对下游翻译

有负调节作用,有利于病毒的持续感染<sup>[35]</sup>.但多数学者认为5' NTR正确的空间构像对下游基因蛋白质的翻译有重要作用.

我们通过RT-PCR扩增HCV 5' NTR部分片段(图1),构建了pcDNA<sub>3</sub>-SIC载体,PCR鉴定(图2)和测序鉴定后,转染真核细胞.发现去断后的5' NTR区可完全启动下游蛋白质的表达(图4和图5),表达后的蛋白质经免疫沉淀后,SDS-PAGE发现,在HBcAb结合蛋白质质量远大于HBsAb结合蛋白质质量,IRES启动下游基因翻译不亚于CMV启动子的帽依赖结构对下游基因翻译(图3).表明人为去断HCV 5' NTR区20个碱基,破坏5' NTR区的第一茎环并不影响下游蛋白质表达.

在HCV基因组上的3'端同样也存在一个非编码区,即3' NTR,大约为40-60 nt.在HCV RNA结构稳定性方面有重要作用<sup>[36-38]</sup>.我们发现HCV 5' NTR区的第一个茎环在HCV蛋白质翻译并不起着重要作用,他是否起着3' NTR相似的稳定HCV RNA作用还不得而知,因此还有待于进一步研究.但本研究揭示了HCV IRES位点的对下游基因翻译功能,而且不受茎环I序列的限制,为下一步构建含HCV IRES的双顺反子载体奠定了基础.

### 4 参考文献

- 1 Chang KM. Immunopathogenesis of hepatitis C virus infection. *Clin Liver Dis* 2003;7:89-105
- 2 Chen YD, Liu MY, Yu WL, Li JQ, Dai Q, Zhou ZQ, Tisminetzky SG. Mix-infections with different genotypes of HCV and with HCV plus other hepatitis viruses in patients with hepatitis C in China. *World J Gastroenterol* 2003;9:984-992
- 3 Roussos A, Goritsas C, Pappas T, Spanaki M, Papadaki P, Ferti A. Prevalence of hepatitis B and C markers among refugees in Athens. *World J Gastroenterol* 2003;9:993-995
- 4 Jin J, Yang JY, Liu J, Kong YY, Wang Y, Li GD. DNA immunization with fusion genes encoding different regions of hepatitis C virus E2 fused to the gene for hepatitis B surface antigen elicits immune responses to both HCV and HBV. *World J Gastroenterol* 2002;8:505-510
- 5 Tang ZY. Hepatocellular carcinoma-cause, treatment and metastasis. *World J Gastroenterol* 2001;7:445-454
- 6 Rabe C, Pilz T, Klostermann C, Berna M, Schild HH, Sauerbruch T, Caselmann WH. Clinical characteristics and outcome of a cohort of 101 patients with hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2001;7:208-215
- 7 Assy N, Paizi M, Gaitini D, Baruch Y, Spira G. Clinical implication of VEGF serum levels in cirrhotic patients with or without portal hypertension. *World J Gastroenterol* 1999;5:296-300
- 8 Agrati C, Nisii C, Oliva A, D'Offizi G, Montesano C, Pucillo LP, Poccia F. Lymphocyte distribution and intrahepatic compartmentalization during HCV infection: a main role for MHC-unrestricted T cells. *Arch Immunol Ther Exp* 2002;50:307-316
- 9 Lin DB, Tsai TP, Chen WK. Seroprevalence of hepatitis C virus infection and its association with natural infection of hepatitis B virus among preschool children in Taiwan. *Eur J Epidemiol* 2003;18:245-249
- 10 Waris G. Regulatory mechanisms of viral hepatitis B and C. *J Biosci* 2003;28:311-321
- 11 Urbani S, Boni C, Missale G, Elia G, Cavallo C, Massari M, Raimondo G, Ferrari C. Virus-specific CD8+ lymphocytes share the same effector-memory phenotype but exhibit functional differences in acute hepatitis B and C. *J Virol* 2002;76:12423-12434
- 12 Freeman AJ, Law MG, Kaldor JM, Dore GJ. Predicting progression to cirrhosis in chronic hepatitis C virus infection. *J*

- Viral Hepat* 2003;10:285-293
- 13 Watanabe H, Saito T, Shinzawa H, Okumoto K, Hattori E, Adachi T, Takeda T, Sugahara K, Ito JI, Saito K, Togashi H, Suzuki R, Hayashi M, Miyamura T, Matsuura Y, Kawata S. Spontaneous elimination of serum hepatitis C virus (HCV) RNA in chronic HCV carriers: A population-based cohort study. *J Med Virol* 2003;71:56-61
- 14 Kato T, Miyamoto M, Furusaka A, Date T, Yasui K, Kato J, Matsushima S, Komatsu T, Wakita T. Processing of hepatitis C virus core protein is regulated by its C-terminal sequence. *J Med Virol* 2003;69:357-366
- 15 Shimoike T, Mimori S, Tani H, Matsuura Y, Miyamura T. Interaction of hepatitis C virus core protein with viral sense RNA and suppression of its translation. *J Virol* 1999;78:9718-9725
- 16 Zhang J, Yamada O, Yoshida H, Iwai T, Araki H. Autogenous translational inhibition of core protein: implication for switch from translation to RNA replication in hepatitis C virus. *Virology* 2002;293:841-150
- 17 Li D, Takyar ST, Lott WB, Gowans EJ. Amino acids 1-20 of the hepatitis C virus (HCV) core protein specifically inhibit HCV IRES-dependent translation in HepG2 cells, and inhibit both HCV IRES- and cap-dependent translation in HuH7 and CV-1 cells. *J Gen Virol* 2003;84(Pt 4):815-825
- 18 Pelletier J, Sonenberg N. Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature* 1988;334:320-325
- 19 Morgan RA, Couture L, Elroy-Stein O, Ragheb J, Moss B, Anderson WF. Retroviral vectors containing patent internal ribosome entry site: development of a polycistronic gene transfer system and applications to human gene therapy. *Nucl Acids Res* 1992; 20:1293-1299
- 20 Gurtu V, Yan G, Zhang G. IRES bicistronic expression vectors for efficient creation of stable mammalian cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;229:295-298
- 21 Pu H, Cashion LM, Kretschmer PJ, Liu Z. Rapid establishment of high-producing cell lines using dicistronic vectors with glutamine synthetase as the selection marker. *Mol Biotechnol* 1998;10:17-25
- 22 Reynolds JE, Kaminski A, Kettinen HJ, Grace K, Clarke BE, Carroll AR, Rowlands DJ, Jackson RJ. Unique features of internal ribosome entry site of hepatitis C virus RNA translation. *EMBO J* 1995;14:6010-6020
- 23 Lu HH, Wimmer E. Poliovirus chimera replicating under the translational control of genetic elements of hepatitis C virus reveal unusual properties of the internal ribosomal entry site of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci* 1996;93:1412-1417
- 24 Beales LP, Holzenburg A, Rowlands DJ. Viral internal ribosome entry site structures segregate into two distinct morphologies. *J Virol* 2003;77:6574-6579
- 25 Kim YK, Lee SH, Kim CS, Seol SK, Jang SK. Long-range RNA-RNA interaction between the 5' nontranslated region and the core-coding sequences of hepatitis C virus modulates the IRES-dependent translation. *RNA* 2003;9:599-606
- 26 Pudi R, Abhiman S, Srinivasan N, Das S. Hepatitis C virus internal ribosome entry site-mediated translation is stimulated by specific interaction of independent regions of human La autoantigen. *J Biol Chem* 2003;278:12231-12240
- 27 Friebe P, Lohmann V, Krieger N, Bartenschlager R. Sequences in the 5' nontranslated region of hepatitis C virus required for RNA replication. *J Virol* 2001;75:12047-12057
- 28 Branch AD. Hepatitis C virus RNA codes for proteins and replicates: does it also trigger the interferon response? *Semin Liver Dis* 2000;20:57-68
- 29 Hwang LH, Hsieh CL, Yen A, Chung YL, Chen DS. Involvement of the 5' proximal coding sequences of hepatitis C virus with internal initiation of viral translation. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;252:455-460
- 30 Frolov I, McBride MS, Rice CM. Cis-acting RNA elements required for replication of bovine viral diarrhea virus-hepatitis C virus 5' nontranslated region chimeras. *RNA* 1998; 4:1418-1435
- 31 Rijnbrand RC, Abbink TE, Haasnoot PC, Spaan WJ, Bredenbeek PJ. The influence of AUG codons in the hepatitis C virus 5' nontranslated region on translation and mapping of the translation initiation window. *Virology* 1996;226:47-56
- 32 Honda M, Rijnbrand R, Abell G, Kim D, Lemon SM. Natural variation in translational activities of the 5' nontranslated RNAs of hepatitis C virus genotypes 1a and 1b: evidence for a long-range RNA-RNA interaction outside of the ribosomal entry site. *J Virol* 1999;73:4941-4951
- 33 Rijnbrand R, van der Straaten T, van Rijn PA, Spaan WJ, Bredenbeek PJ. Internal entry of ribosomes is directed by 5' noncoding region of classical swine fever virus and is dependent on the presence of an RNA pseudoknot upstream of the initial codon. *J Virol* 1999;71:451-457
- 34 Borman AM, Le Mercier P, Girard M, Kean KM. Comparison of picornaviral IRES-driven internal initiation of translation in cultured cells of different origins. *Nucl Acids Res* 1997; 25:925-932
- 35 Ali N, Siddiqui A. The La antigen binds 5' noncoding region of the hepatitis C virus RNA in the context of the initiator AUG codon and stimulates internal ribosome entry site-mediated translation. *Proc Natl Acad Sci* 1997;94:2249-2254
- 36 Yi M, Lemon SM. Structure-function analysis of the 3' stem-loop of hepatitis C virus genomic RNA and its role in viral RNA replication. *RNA* 2003;9:331-345
- 37 Friebe P, Bartenschlager R. Genetic analysis of sequences in the 3' nontranslated region of hepatitis C virus that are important for RNA replication. *J Virol* 2002;76:5326-5338
- 38 Gontarek RR, Gutshall LL, Herold KM, Tsai J, Sathe GM, Mao J, Prescott C, Del Vecchio AM. hnRNP C and polypyrimidine tract-binding protein specifically interact with the pyrimidine-rich region within the 3' NTR of the HCV RNA genome. *Nucleic Acids Res* 1999;27:1457-1463

# 溃疡性结肠炎患者肠黏膜 Th1 / Th2 类细胞因子 m - RNA 的表达

崔海宏, 陈村龙, 杨玉捷, 张祚建, 张耀东, 崔耀升

崔海宏, 陈村龙, 杨玉捷, 中国人民解放军第一军医大学南方医院消化内科 广东省广州市 510515  
张祚建, 张耀东, 崔耀升, 空军济南医院消化内科 山东省济南市 250031  
崔海宏, 女, 1975-09-28 生, 山东济南人, 汉族. 1998 年山东医科大学毕业, 2000 年第一军医大学在读硕士研究生, 主要从事消化系统疾病的免疫研究. 广东省自然科学基金资助课题, No.010621  
项目负责人: 陈村龙, 510515, 广东省广州市, 中国人民解放军第一军医大学全军消化病研究所. cunlong@fimmu.edu.cn  
电话: 020-61641544 传真: 020-61641535  
收稿日期: 2002-12-23 接受日期: 2003-01-03

## Expression of Th1/Th2 cytokines in intestinal mucosa of ulcerative colitis

Hai-Hong Cui, Cun-Long Chen, Yu-Jie Yang, Zuo-Jian Zhang, Yao-Dong Zhang, Yao-Sheng Cui

Hai-Hong Cui, Cun-Long Chen, Yu-Jie Yang, Chinese PLA Institute for Digestive Diseases, Nanfang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 50515, Guangdong Province, China  
Zuo-Jian Zhang, Yao-Dong Zhang, Yao-Sheng Cui, Institute For Digestive Disease, Jinan Air Force Hospital, Jinan 250031, Shandong Province, China  
Supported by the Natural Science Foundation of Guangdong Province, No.010621.  
Correspondence to: Dr. Cun-Long Chen, Chinese PLA Institute For Digestive Diseases, Nanfang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 50515, Guangdong Province, China. cunlong@fimmu.edu.cn  
Received: 2003-03-06 Accepted: 2003-03-28

## Abstract

AIM: To investigate the effects of the expression of Th1/Th2 cytokines in intestinal mucosa with ulcerative colitis.

METHODS: Thirty patients (24 males, 6 females, age 18-79 years) with severe ulcerative colitis (UC) were examined by colonoscope, the diagnosis was confirmed by histological method. Bacterial infection was excluded through consecutive stool cultures twice. And ameba, schistosomiasis, gastroenterological cancer and endocrine diseases were also excluded. Ulcerative colitis was found in omni-colon ( $n=15$ ), sigmoid ( $n=9$ ), rectum ( $n=6$ ), respectively. Its clinical categories included relapse ( $n=20$ ), persistent ( $n=7$ ) and initial ( $n=3$ ). They were treated by Sulphasalazine (SASP) and glucocorticoid after histological diagnosis. Eight weeks later, they were re-examined by colonoscope. The expression of cytokines in the intestinal mucosa of UC patients were detected by a semi-quantitative assay, reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR) before and after treatment respectively.

RESULTS: Comparison with control groups, the expression of TNF- $\alpha$ , IL-2 was increased but IL-4 was decreased in the intestinal mucosa in acute stage. Sulphasalazine (SASP) and glucocorticoid inhibited inflammation by reducing the expression of TNF- $\alpha$  from  $1.22 \pm 0.02$  to  $0.78 \pm 0.08$  ( $P < 0.01$ )

and of IL-2 from  $0.82 \pm 0.06$  to  $0.47 \pm 0.04$  ( $P < 0.01$ ), and elevate the expression of IL-10 from  $0.68 \pm 0.03$  to  $0.91 \pm 0.02$  ( $P < 0.01$ ).

CONCLUSION: There is an imbalance of Th1 and Th2 phenotype cytokine in patients with ulcerative colitis.

Cui HH, Chen CL, Yang YJ, Zhang ZJ, Zhang YD, Cui YS. Expression of Th1/Th2 cytokines in intestinal mucosa of ulcerative colitis. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003;11(10):1524-1527

## 摘要

目的: 探讨溃疡性结肠炎肠黏膜内Th1型细胞分泌的细胞因子 TNF- $\alpha$ 、IL-2, Th2 型细胞分泌的细胞因子 IL-4、IL-10 的作用。

方法: 住院重症溃疡性结肠炎患者 30 例, 男 24 例, 女 6 例, 年龄 18-59(平均  $45 \pm 13$ ) 岁. 全部患者均经电子结肠镜检查及组织学检查确诊, 并连续粪培养 2 次排除细菌感染, 同时排除阿米巴肠病, 血吸虫病, 肠道肿瘤和内分泌疾病. 病变部位包括全结肠型 15 例, 乙状结肠 9 例, 直肠型 6 例; 临床类型包括复发型 20 例, 持续型 7 例和初发型 3 例. 急性期患者均服用强的松 30 mg, 柳氮磺胺吡啶 500 mg 2 次/d. 治疗 8 wk 后复查纤维结肠镜. 另选健康对照 20 名, 男 14 名, 女 6 名, 年龄 22-61 (平均  $43 \pm 12$ ) 岁, 排除胃肠道和内分泌疾病. 应用 RT-PCR 检测溃疡性结肠炎患者黏膜内细胞因子的表达。

结果: 溃疡性结肠炎患者急性期应用柳氮磺胺吡啶和糖皮质激素可降低 TNF- $\alpha$  (急性期  $1.22 \pm 0.02$ , 慢性期  $0.78 \pm 0.08$ ,  $P < 0.01$ )、IL-2 (急性期  $0.82 \pm 0.06$ , 慢性期  $0.47 \pm 0.04$ ,  $P < 0.01$ ) 的表达; 提高 IL-10 (急性期  $0.68 \pm 0.03$ , 慢性期  $0.91 \pm 0.02$ ,  $P < 0.01$ ) 的表达。

结论: 溃疡性结肠炎患者以分泌 Th1 细胞因子为主, 存在 Th1 和 Th2 细胞因子的平衡漂移. 提示他们在溃疡性结肠炎的发生发展中起了重要作用。

崔海宏, 陈村龙, 杨玉捷, 张祚建, 张耀东, 崔耀升. 溃疡性结肠炎患者肠黏膜 Th1/Th2 类细胞因子 m - RNA 的表达. 世界华人消化杂志 2003;11(10): 1524-1527

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1524.asp>

## 0 引言

溃疡性结肠炎(UC)的发病机制仍未明确. 目前认为与遗传

传因素、细菌的感染、机体免疫反应、环境因素及精神因素有关<sup>[1-6]</sup>, 其中肠道免疫系统调节异常可能在其发生发展中起重要作用. 研究表明在 UC 患者体内促炎症因子水平升高, 抑炎症细胞因子水平降低. 当前他的治疗仍以糖皮质激素类、柳氮磺胺类和免疫抑制剂等药物为主, 检测细胞因子表达的变化, 旨在从分子水平上探讨 UC 发病机制.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 重症急性期住院治疗 UC 患者 30 例, 均经纤维结肠镜和病理学检查确诊. 男 24 例, 女 6 例, 年龄 18-79 (45±13) 岁, 平均 45 岁, 15 例为全结肠型, 9 例为乙状结肠型, 6 例为直肠炎型. 诊断符合标准<sup>[7]</sup>, 根据病情分为急性期和缓解期, 急性期患者均服用强的松 30 mg, 柳氮磺胺吡啶 500 mg 2 次/d. 治疗 8 wk 后复查纤维结肠镜. 对照组为健康自愿者, 男 14 例, 女 6 例. 年龄 22-61 (平均 43±12) 岁. 每例患者各取 50 mg 活检组织, 并立即贮存在液氮中备用.

**1.2 方法** RT-PCR 半定量法检测 TNF- $\alpha$ 、IL-2、IL-4、IL-10 的表达. TNF- $\alpha$ 、IL-2、IL-4、IL-10 引物的设计参照文献<sup>[8]</sup>和 GeneBank 序列, 确定的序列交上海生工公司合成(表 1). 提取总 RNA 采用异硫氰酸胍二步法. RNA 沉淀溶 1 g/L DEPC 水中, 采用紫外分光光度计测 RNA 浓度. A260/A280 比值需在 1.8-2.0, 并稀释至 1 g/L. 在 20 mL 逆转录体系中加入模板 RNA 1  $\mu$ L, 总 RNA 达 0.1-1.0  $\mu$ g, Oligo (dT) 18 (0.2 g/L) 4  $\mu$ L, 用 DEPC 处理的双蒸水补足体积至 15.5  $\mu$ L. 于 70  $^{\circ}$ C 加热 5 min. 迅速置冰上, 短暂离心. 上述微量离心管内加入: 10 $\times$  反应缓冲液 2  $\mu$ L, 4 $\times$ d NTP mix (10 mmol/L each) 1  $\mu$ L, RNA 酶抑制剂(40 ku/L) 0.5  $\mu$ L, M-MuLV 逆转录酶(200 ku/L) 1  $\mu$ L, 38  $^{\circ}$ C 恒温 60 min, 进行逆转录反应. 70  $^{\circ}$ C 加热 10 min, 灭活逆转录酶活性. 取逆转录产物 10  $\mu$ L 作 PCR 扩增. PCR 参数为 94  $^{\circ}$ C 45 s, 56  $^{\circ}$ C 45 s, 72  $^{\circ}$ C 1 min, 30 循环, 最后 72  $^{\circ}$ C 延长 6 min, 指标均以 G3PDH 作内参照. PCR 产物 5  $\mu$ L 作 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色, 用图像分析仪进行分析.

表 1 各种引物序列及扩增片段长度和循环次数

引物	序列	扩增片段(bp)	循环次数
G3PDH	S ACCACAGTCCATGCCATCAC	452	29
	A TCCACCAACCTGTTGCTGTA		
TNF- $\alpha$	S ATGAGCACTGAAAGCATGATCCGG	695	30
	A GCAATGATCCCAAAGTAGACCTGCC		
IL-2	S CATTGCACTAAGTCTTGCACTTGTC	305	30
	A CGTTGATATTGCTGATTAAGTCCTG		
IL-4	S CGGCAACTTTGACCAACGACACAAGTGC	344	30
	A ACGTACTCTGGTTGGCTTCCTCAGGACAG		
IL-10	S AAGCTGAGAACCAAGACCCAGACATCAAGCG	328	30
	A AGCTATCCAGAGCCCGAGATCCGATTTTGG		

## 2 结果

UC 急性期 IL-2、TNF- $\alpha$  的(图 1-2)表达较正常对照组均显著增加, IL-4 图 3 表达减少. 经过柳氮磺胺吡啶和糖皮质激素治疗后, 二者的表达明显下降, 而 IL-10 显著增加图 4(表 2).

表 2 实验结果

IL level (%)	Normal	Active UC	Inactive UC
IL-2	0.22 $\pm$ 0.05	0.82 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	0.47 $\pm$ 0.04 <sup>bd</sup>
TNF- $\alpha$	0.42 $\pm$ 0.04	1.22 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.78 $\pm$ 0.08 <sup>bd</sup>
IL-4	1.04 $\pm$ 0.09	0.49 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.55 $\pm$ 0.06 <sup>d</sup>
IL-10	0.59 $\pm$ 0.06	0.68 $\pm$ 0.03	0.91 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>P < 0.01, <sup>b</sup>P < 0.01 vs 对照组 <sup>d</sup>P < 0.01 vs 缓解期.

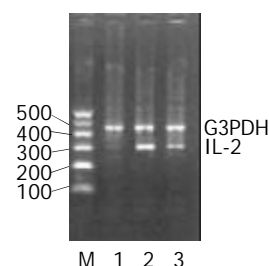


图 1 IL-10 的表达. 1: 正常; 2: 急性期; 3: 缓解期.

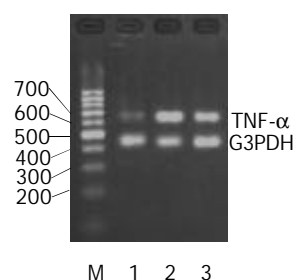


图 2 IL-2 的表达. 1: 正常; 2: 急性期; 3: 缓解期.

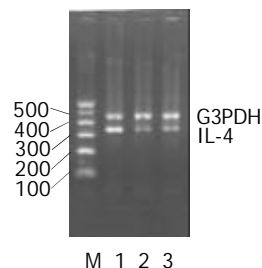


图 3 IL-4 的表达. 1: 正常; 2: 急性期; 3: 缓解期.

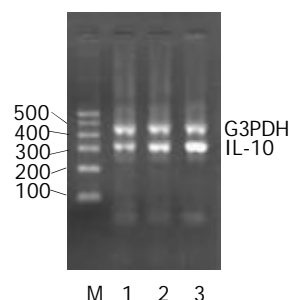


图 4 TNF- $\alpha$  的表达. 1: 正常; 2: 急性期; 3: 缓解期.



### 3 讨论

UC患者由肠道细菌等因素激活核因子<sup>[9, 10]</sup>, 可使肠道的黏膜细胞、固有层淋巴细胞和浸润的炎症细胞产生大量细胞因子, 直接或间接造成组织损害<sup>[11, 12]</sup>. 炎症发生时, 先激活的前炎症因子如: IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IFN- $\alpha$ 等. 越来越多的证据显示, UC的发生是由多因素共同作用的结果. 免疫因素是重要的因素之一. 细胞因子在调节肠道免疫中扮演重要角色<sup>[13-16]</sup>, 有诱导炎症(如: TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12等)和抗炎(如: IL-10, IL-4, IL-5等)作用. 对于UC患者Th1和Th2细胞因子的改变, 研究者们意见不一. Sawa et al<sup>[17]</sup>通过实时RT-PCR检测患者肠道中UC患者肠道各种细胞因子mRNA的扩增, 发现Th1和Th2细胞因子IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-5, IL-8, IL-10, IL-12p40, IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ 等mRNA表达都明显比正常对照组高, 这可能说明体液免疫和细胞免疫同时作用于UC的发病过程. Lakatos et al<sup>[18]</sup>认为UC患者体内以Th2细胞因子增多为主. Hata et al<sup>[19]</sup>用表达HLA-27的转基因大鼠在SP条件下模仿人的UC模型. 8 wk后用RT-PCR的方法检测细胞因子发现: Th1细胞因子IFN- $\gamma$ , IL-2等明显高于Th2细胞因子如IL-10, IL-4等. Sun et al<sup>[20]</sup>通过检测三硝基苯硫酸诱导的大鼠结肠炎中的细胞因子的变化发现Th1细胞分泌的细胞因子在炎症的发生发展中维持炎症细胞的浸润和活化、引起组织损伤. 这些细胞因子的表达有时间依赖性. TNF- $\alpha$ 是一种前炎症因子可诱导多种细胞产生炎症因子. 特别有炎症发生的初期, 参与UC炎症反应和免疫应答. IL-2是由IL-1激活T细胞, 促进IL-2受体的表达分泌的. IL-2可刺激T细胞和B细胞的增值, 引起体液免疫反应. IL-2还可帮助激活炎症部位的巨噬细胞的活化. 他们同属于Th1型细胞因子. Garrelds et al<sup>[23]</sup>用IL-2缺陷的小鼠制成UC模型发现, 24 wk后, IL-2缺陷的小鼠比没缺陷的小鼠的肠黏膜中IL-1 $\beta$ 明显增高可能是因为细胞毒性T细胞参与了UC的发生和发展过程. 然而IL-6和IL-10的浓度没有明显变化. 石蜡包埋的小鼠脾脏中, CD8<sup>+</sup>细胞明显下降. 我们的实验结果表明在炎症的急性期TNF- $\alpha$ , IL-2明显上升. 经柳氮磺胺吡啶和糖皮质激素治疗后, 有所下降, 可能是阻断了TNF- $\alpha$ , IL-2mRNA的表达<sup>[24-26]</sup>, 可做为疾病治疗的观测指标.

大量研究资料证实IL-4能抑制单核巨噬细胞分泌氧自由基的能力, 而且存在剂量效应关系. IL-4还能抑制前列腺素E2和IL-8的产生. 而且, IL-4能诱导IL-1 $\alpha$ 产生, 提高IL-1 $\alpha$ /IL-1 $\beta$ 的比例. 许多实验发现UC患者的IL-4分泌细胞数减少, IL-4mRNA表达及蛋白分泌明显减少<sup>[27-30]</sup>. 我们的实验结果显示, UC组IL-4水平显著低于正常对照组, 提示IL-4与UC的发病有关, 而且可作为监测疾病程度的一个指标. 此外经药物治疗后, 缓解组与未缓解组间IL-4水平无差别. IL-10在黏膜免疫中是一种重要的细胞因子调节剂. IL-10基因敲

除的大鼠易患结肠炎症. 早期用抗生素治疗可以缓解炎症的程度<sup>[31]</sup>. 本实验发现急性期炎症IL-10表达有所增加, 缓解期后IL-10仍持续增高. 可能是由于炎症刺激Th2型细胞分泌细胞因子引起增多. 现在人们开始尝试用IL-10来治疗UC来逆转肠道的症状<sup>[32, 33]</sup>, IL-10缺陷可能做为UC的发病机制之一引起严重的症状<sup>[34]</sup>.

目前, UC的发病机制尚未搞清, 他是由多因素导致的结果. 但免疫反应在UC的发生发展中起了重要作用. Th1和Th2型细胞因子存在分泌偏移. 研究这些细胞因子可了解他们在UC发病中的作用, 并可做为临床治疗的监测指标.

### 4 参考文献

- Scholmerich J. Inflammatory bowel disease. *Endoscopy* 2003; 35:164-170
- Seksik P, Rigottier-Gois L, Gramet G, Sutren M, Pochart P, Marteau P, Jian R, Dore J. Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon. *Gut* 2003;52:237-242
- Schwab M, Schaeffeler E, Marx C, Fromm MF, Kaskas B, Metzler J, Stange E, Herfarth H, Schoelmerich J, Gregor M, Walker S, Cascorbi I, Roots I, Brinkmann U, Zanger UM, Eichelbaum M. Association between the C3435T MDR1 gene polymorphism and susceptibility for ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2003; 124:26-33
- Su C, Lichtenstein GR. Recent developments in inflammatory bowel disease. *Med Clin North Am* 2002;86:1497-1523
- Williams JP, Meyers JA. Immune-mediated inflammatory disorders (I.M.I.D.s): the economic and clinical costs. *Am J Manag Care* 2002;8:S664-681
- Karban A, Eliakim R, Brant SR. Genetics of inflammatory bowel disease. *Isr Med Assoc J* 2002;4:798-802
- Jiang XL, Quan QZ, Wang ZK. Diagnosis, typing and effect criteria of ulcerative colitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000; 8:332-334
- Sun KH, Yu CL, Tang SJ, Sun GH. Monoclonal anti-double-stranded DNA autoantibody stimulates the expression and release of IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10 and TNF- $\alpha$  from normal human mononuclear cells involving in the lupus pathogenesis. *Immunology* 2000;99:352-360
- Kleessen B, Kroesen AJ, Buhr HJ, Blaut M. Mucosal and invading bacteria in patients with inflammatory bowel disease compared with controls. *Scand J Gastroenterol* 2002;37:1034-1041
- MacDonald TT, Pettersson S. Bacterial regulation of intestinal immune responses. *Inflamm Bowel Dis* 2000;6:116-122
- Stevceva L. Cytokines and their antagonists as therapeutic agents. *Curr Med Chem* 2002;9:2201-2207
- Ardizzone S, Porro GB. Inflammatory bowel disease: new insights into pathogenesis and treatment. *J Intern Med* 2002; 252:475-496
- Tsukada Y, Nakamura T, Iimura M, Iizuka BE, Hayashi N. Cytokine profile in colonic mucosa of ulcerative colitis correlates with disease activity and response to granulocytapheresis. *Am J Gastroenterol* 2002;97:2820-2828
- Rutgeerts P, Geboes K. Understanding inflammatory bowel disease-the clinician's perspective. *Eur J Surg Suppl* 2001;586:66-72
- Ikeda Y, Akbar SM, Matsui H, Onji M. Antigen-presenting dendritic cells in ulcerative colitis. *J Gastroenterol* 2002;37 (Suppl 14):53-55
- Bamias G, Marini M, Moskaluk CA, Odashima M, Ross WG, Rivera-Nieves J, Cominelli F. Down-regulation of intestinal lymphocyte activation and Th1 cytokine production by antibiotic therapy in a murine model of Crohn's disease. *J Immunol* 2002;169:5308-5314

- 17 Sawa Y, Oshitani N, Adachi K, Higuchi K, Matsumoto T, Arakawa T. Comprehensive analysis of intestinal cytokine messenger RNA profile by real-time quantitative polymerase chain reaction in patients with inflammatory bowel disease. *Int J Mol Med* 2003;11:175-179
- 18 Lakatos L. Immunology of inflammatory bowel diseases. *Acta Physiol Hung* 2000;87:355-372
- 19 Hata K, Andoh A, Sato H, Araki Y, Tanaka M, Tsujikawa T, Fujiyama Y, Bamba T. Sequential changes in luminal microflora and mucosal cytokine expression during developing of colitis in HLA-B27/beta2-microglobulin transgenic rats. *Scand J Gastroenterol* 2001;36:1185-1192
- 20 Sun FF, Lai PS, Yue G, Yin K, Nagele RG, Tong DM, Krzesicki RF, Chin JE, Wong PY. Pattern of cytokine and adhesion molecule mRNA in hapten-induced relapsing colon inflammation in the rat. *Inflammation* 2001;25:33-45
- 21 Sandborn WJ. Strategies for targeting tumour necrosis factor in IBD. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2003;17:105-117
- 22 Su C, Salzberg BA, Lewis JD, Deren JJ, Kornbluth A, Katzka DA, Stein RB, Adler DR, Lichtenstein GR. Efficacy of anti-tumor necrosis factor therapy in patients with ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 2002;97:2577-2584
- 23 Garrelds IM, Heiligers JP, Van Meeteren ME, Duncker DJ, Saxena PR, Meijssen MA, Zijlstra FJ. Interleukin-2-Deficient mice: effect on cytokines and inflammatory cells in chronic colonic disease. *Dig Dis Sci* 2002;47:503-510
- 24 Hasko G, Szabo C, Nemeth ZH, Deitch EA. Sulphasalazine inhibits macrophage activation: inhibitory effects on inducible nitric oxide synthase expression, interleukin-12 production and major histocompatibility complex II expression. *Immunology* 2001;103:473-478
- 25 Oshima T, Pavlick K, Grisham MB, Jordan P, Manas K, Joh T, Itoh M, Alexander JS. Glucocorticoids and IL-10, but not 6-MP, 5-ASA or sulfasalazine block endothelial expression of MADCAM-1: implications for inflammatory bowel disease therapy. *Aliment Pharmacol Ther* 2001;15:1211-1218
- 26 Vohra P. Inflammatory bowel disease. *Indian J Pediatr* 2000;67:747-756
- 27 Klein W, Tromm A, Griga T, Fricke H, Folwaczny C, Hocke M, Eitner K, Marx M, Duerig N, Epplen JT. Interleukin-4 and interleukin-4 receptor gene polymorphisms in inflammatory bowel diseases. *Genes Immun* 2001;2:287-289
- 28 Bisping G, Luger N, Lutke-Brintrup S, Pauels HG, Schurmann G, Domschke W, Kucharzik T. Patients with inflammatory bowel disease (IBD) reveal increased induction capacity of intracellular interferon-gamma (IFN-gamma) in peripheral CD8+ lymphocytes co-cultured with intestinal epithelial cells. *Clin Exp Immunol* 2001;123:15-22
- 29 Rogy MA, Beinhauer BG, Reinisch W, Huang L, Pokieser P. Transfer of interleukin-4 and interleukin-10 in patients with severe inflammatory bowel disease of the rectum. *Hum Gene Ther* 2000;11:1731-1741
- 30 Schmit A, Van Gossum A, Carol M, Houben JJ, Mascart F. Diversion of intestinal flow decreases the numbers of interleukin 4 secreting and interferon gamma secreting T lymphocytes in small bowel mucosa. *Gut* 2000;46:40-45
- 31 Madsen KL. Inflammatory bowel disease: lessons from the IL-10 gene-deficient mouse. *Clin Invest Med* 2001;24:250-257
- 32 Ishizuka K, Sugimura K, Homma T, Matsuzawa J, Mochizuki T, Kobayashi M, Suzuki K, Otsuka K, Tashiro K, Yamaguchi O, Asakura H. Influence of interleukin-10 on the interleukin-1 receptor antagonist/interleukin-1 beta ratio in the colonic mucosa of ulcerative colitis. *Digestion* 2001;63(Suppl 1):22-27
- 33 Bristol JJ, Farmer MA, Cong Y, Zheng XX, Strom TB, Elson CO, Sundberg JP, Leiter EH. Heritable susceptibility for colitis in mice induced by IL-10 deficiency. *Inflamm Bowel Dis* 2000;6:290-302
- 34 Kanauchi O, Mitsuyama K, Araki Y, Andoh A. Anti-TNF therapy for crohn's disease. *Curr Pharm Des* 2003;9:289-294

# 自膨胀金属支架治疗晚期食管癌吞咽困难26例

张朋彬, 赵晓晏, 李宜辉, 达四平

张朋彬, 赵晓晏, 李宜辉, 达四平, 中国人民解放军第三军医大学附属新桥医院消化内科 重庆市 400037  
张朋彬, 男, 1966-04-13 生, 河北省宁晋县人, 汉族, 医学博士, 主治医师, 讲师.  
项目负责人: 张朋彬, 400037, 重庆市, 中国人民解放军第三军医大学附属新桥医院消化内科.  
电话: 023-68755604  
收稿日期: 2002-10-08 接受日期: 2002-10-21

## Self-expandable metal stents for dysphagia in 26 patients with advanced esophageal cancer

Peng-Bin Zhang, Xiao-Yan Zhao, Yi-Hui Li, Si-Ping Da

Peng-Bin Zhang, Xiao-Yan Zhao, Yi-Hui Li, Si-Ping Da, Department of Gastroenterology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China  
Correspondence to: Peng-Bin Zhang, Department of Gastroenterology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China.  
Received: 2002-10-08 Accepted: 2002-10-21

## Abstract

**AIM:** To evaluate the therapeutic effect of self-expandable metal stents for dysphagia in 26 patients with advanced esophageal cancer.

**METHODS:** Twenty-six patients with inoperable esophageal cancer had dysphagia and were treated with self-expandable stents. After esophageal dilation, a covered self-expandable metal stent was inserted and released on the site of stenosis.

**RESULTS:** The stent was placed successfully in all of the 26 patients. Immediate relief of dysphagia was observed, the dysphagia score decreased from 3.08 to 1.38 ( $P < 0.01$ ). The main complications of this procedure were chest pain, gastroesophageal reflux and obstruction of the stent.

**CONCLUSION:** Self-expandable metal stent is a safe and effective method to palliate the dysphagia in inoperable esophageal cancer.

Zhang PB, Zhao XY, Li YH, Da SP. Self-expandable metal stents for dysphagia in 26 patients with advanced esophageal cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(10):1528-1530

## 摘要

**目的:** 回顾分析覆膜自膨胀金属支架(self-expandable metal stent, SEMS)对晚期食管癌吞咽困难患者的治疗效果及并发症的防治。

**方法:** 对26例晚期食管癌吞咽困难患者, 行食管狭窄扩张术后, 在内镜直视下置入覆膜SEMS, 观察其对吞咽困难的治疗效果及并发症的防治。

**结果:** 26例患者均顺利安放SEMS, 吞咽困难症状得到缓解, 吞咽困难计分由治疗前的3.08分下降至1.38分( $P < 0.01$ ), 主要并发症为胸痛、胃食管反流及SEMS阻塞。

**结论:** SEMS能明显改善晚期食管癌患者的吞咽困难, 提高生存质量, 延长生存时间。

张朋彬, 赵晓晏, 李宜辉, 达四平. 自膨胀金属支架治疗晚期食管癌吞咽困难26例. *世界华人消化杂志* 2003;11(10):1528-1530  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1528.asp>

## 0 引言

晚期食管癌患者由于失去了手术机会, 食管狭窄日益加重, 进食困难, 严重影响了患者的生活质量及生存时间. 我们通过给患者置入自膨胀金属支架(self-expandable metal stent, SEMS), 以改善患者的生存质量, 延长生存时间, 取得了较好的效果。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 晚期食管癌患者共26例, 男18例, 女8例, 年龄35-79(平均59.4)岁; 其中鳞癌18例, 腺癌8例. 食管上段狭窄2例, 中段15例, 下段7例, 中下段均累及者2例. 采用Vakil et al<sup>[1]</sup>计分方法对患者进行吞咽困难进行计分(0: 无吞咽困难; 1: 能进食固体食物, 但存在吞咽困难; 2: 能进食软食; 3: 能进食液体; 4: 不能进食), 其中4分4例, 3分20例, 2分2例, 平均计分3.08分. SEMS及支架置入器均为常州智力医疗器械公司产品, 其中SEMS为覆膜镍钛记忆合金支架, 规格18-20 mm × 60-140 mm (直径 × 长度); Savary-Gilliard扩张器及引导钢丝(Wilson-Cook Medical Inc, USA); Olympus GIFXQ-230及Fujinon EG-410HR电子胃镜。

**1.2 方法** 术前患者均应行食管吞钡(稀钡)或泛影葡胺检查并摄片, 了解食管癌狭窄的部位、程度及病变范围; 并常规胃镜检查活检以明确肿瘤诊断. 常规进行咽喉局部麻醉, 并给予安定针及654-2针各10 mg肌注. 胃镜检查至病变狭窄口, 直视下将引导导丝通过狭窄段至胃腔, 退出胃镜. 根据狭窄程度选择合适外径的扩张器, 然后渐增大扩张器至12 mm以上, 以利于胃镜进一步检查及确定病变范围. 重新胃镜检查明确病变上缘及下缘距门齿的距离, 判断病变的长度. 根据病变长度选择合适长度SEMS (病变长度+4 cm以上), 将SEMS装入置入器, 沿引导导丝将SEMS远端置于病变下缘以下2 cm处, 逐渐释放. 一般SEMS两端应超过

病变上下缘的2 cm. 若病变长度超出SEMS时, 可重叠置放两根支架. 复查胃镜, 观察支架位置及释放程度(图1-3). SEMS放置后, 即可进食流质饮食, 次日即可进食软食, 并逐渐过渡到正常食物. 对于较粗糙食物, 应完全嚼烂, 最好和水吞咽. 术后有6例患者接受了化疗, 另20例患者未再接受进一步化疗或放疗.

统计学处理 术前术后吞咽困难计分比较采用Wilcoxon检验.

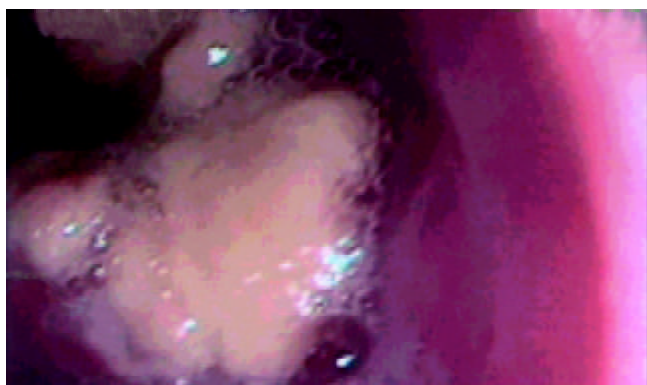


图1 食管中段癌并狭窄, 扩张前.

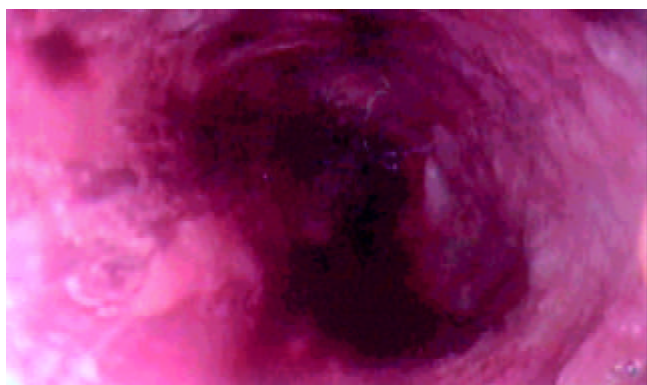


图2 食管中段癌并狭窄, 扩张后.

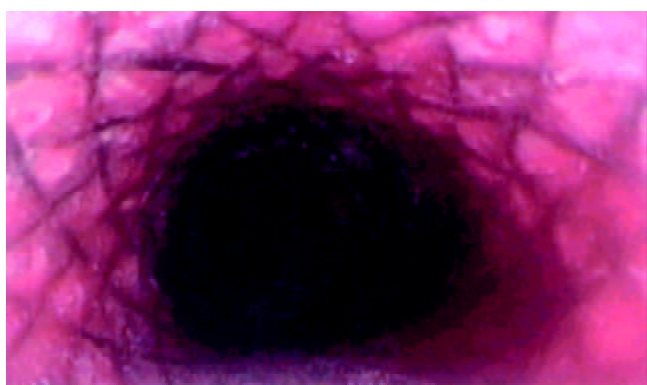


图3 自膨胀支架置入后.

## 2 结果

共置放SEMS 28根, 其中2例患者病变长度分别为12.5 cm和13 cm, 各置放2根SEMS (20 × 120 mm及20 × 60 mm). 所有患者均成功置放SEMS, 置放位置准确. 在置放SEMS后吞咽困难即得到缓解, 吞咽困难计分由治疗前

的3.08分降至治疗后的1.38分, 治疗效果明显( $P < 0.01$ ). 有19例在SEMS置放后均出现了不同程度的胸痛, 应用多瑞吉透皮剂后症状可缓解, 一般1 wk内症状基本消失. 共有11例患者出胃食管反流, 其中以病变位于下段者最多见(9例下段狭窄者中, 有8例发生反流; 15例中段狭窄中, 有3例发生反流; 2例上段未发生反流). 有7例次(其中1例患者出现2次)SEMS置放后出现阻塞, 均为食物所至, 内镜下治疗后得到畅通. 未发生SEMS移位及食管穿孔、出血等现象. 共随访19例(7例失访), 随访时间1-18 mo, 生存时间2-13.5 mo, 平均 $7.2 \pm 3.2$  mo. 死亡原因主要为肿瘤转移及全身衰竭.

## 3 讨论

SEMS与其他治疗晚期食管癌吞咽困难的姑息性方法相比, 具有安全, 简单, 经济的特点, 在临床得到广泛推广<sup>[2-12]</sup>.

SEMS多用不锈钢或镍钛合金制作, 有较强的柔韧性及较大的内径, 优于以前应用的塑料支架<sup>[13]</sup>. 植入SEMS时, 可在X线监视下和/或内镜直视下进行<sup>[14]</sup>. 内镜直视下安放SEMS效果与X线监视下相仿, 而且操作简便、省时<sup>[15, 16]</sup>. SEMS置入食管后, 依靠自身的张力, 其直径扩张至10-15 mm, 保证了患者食管的通畅, 使患者的正常饮食能够维持. 覆膜SEMS是在支架表面覆有聚亚氨脂(polyurethane), 后者能够有效地阻止肿瘤向腔内生长, 防止了再狭窄的产生<sup>[1, 17-20]</sup>.

安置SEMS后的主要并发症包括胸痛、胃食管反流、支架移位等<sup>[15, 16]</sup>. 胸痛几乎发生于任何患者, 可为新出现, 也可为原有症状的加重, 可能与SEMS对食管壁的扩张有关, 给预麻醉药品或加大麻醉品用量可得到缓解<sup>[21]</sup>. Christie et al<sup>[22]</sup>对100例SEMS置放者观察发现, 85%的患者置放后吞咽困难即刻得到缓解, 未发生与安放SEMS相关的死亡. 其主要并发症为食管气管瘘, 纵隔脓肿, SEMS移位. 其他观察与此相似<sup>[23]</sup>. 此外, 并发症还包括食管穿孔、出血、再狭窄、硬膜外脓肿、心室纤颤等<sup>[24-27]</sup>. 造成食管穿孔的原因可能与SEMS的压迫及病变食管的抵抗力下降有关<sup>[28, 29]</sup>. 安置SEMS前后进行的化疗、放疗也可诱发穿孔、出血、食管气管瘘<sup>[30, 31]</sup>. 我们在内镜直视下对晚期食管癌患者置放覆膜SEMS后, 患者吞咽困难均得到明显的缓解, 主要并发症为胸痛、胃食管反流, 及食物阻塞, 未发生食管气管瘘、出血等, 也未发生SEMS移位. SEMS置放前扩张食管狭窄很重要, 尽量扩至12 mm以上, 这样可使SEMS能够得到充分释放扩张. 本组观察中有12例明显的胃食管反流, 主要发生于在食管下段置放SEMS者, 可能与食管下段及贲门口部位的SEMS, 使贲门区不能正常闭合有关.

## 4 参考文献

- 1 Vakil N, Morris AI, Marcon N, Segalin A, Peracchia A, Bethge N, Zuccaro G, Bosco JJ, Jones WF. A prospective, randomized,

- controlled trial of covered expandable metal stents in the palliation of malignant esophageal obstruction at the gastroesophageal junction. *Am J Gastroenterol* 2001;96:1791-1796
- 2 Mason R. Palliation of oesophageal cancer. *Surg Oncol* 2001; 10:123-126
- 3 Kaneko K, Ito H, Konishi K, Kurahashi T, Katagiri A, Katayose K, Kitahara T, Ohtsu A, Mitamura K. Implantation of self-expanding metallic stent for patients with malignant stricture after failure of definitive chemoradiotherapy for T3 or T4 esophageal squamous cell carcinomas. *Hepatogastroenterology* 2002;49:699-705
- 4 Lee SH. The role of oesophageal stenting in the non-surgical management of oesophageal strictures. *Br J Radiol* 2001;74: 891-900
- 5 Cordero JA Jr, Moores DW. Self-expanding esophageal metallic stents in the treatment of esophageal obstruction. *Am Surg* 2000;66:956-958
- 6 Dallal HJ, Smith GD, Grieve DC, Ghosh S, Penman ID, Palmer KR. A randomized trial of thermal ablative therapy versus expandable metal stents in the palliative treatment of patients with esophageal carcinoma. *Gastrointest Endosc* 2001; 54:549-557
- 7 Acunas B, Poyanli A, Rozanes I. Intervention in gastrointestinal tract: the treatment of esophageal, gastroduodenal and colorectal obstructions with metallic stents. *Eur J Radiol* 2002; 42:240-248
- 8 陈维雄, 程英升, 杨仁杰, 李明华, 尚克中, 庄奇新, 陈尼维. 食管良性狭窄金属内支架介入治疗随访研究. 世界华人消化杂志 2002;10:333-336
- 9 郭毅, 彭少玲, 张健, 杨湘玲. 内镜介入下支架放置术 72 例. 世界华人消化杂志 2001;9:601-602
- 10 智发朝, 朱建新, 梁浓亮, 张兰军, 周丹, 潘德寿, 万田莫, 周殿元. 食管支架置入术治疗食管贲门癌性狭窄及瘘 63 例. 世界华人消化杂志 2000;8:947-948
- 11 刘变英, 栗彤, 李勇琴, 尹海萍, 梁翠珍, 刘胜武, 刘谦民. 带膜记忆合金支架治疗食管贲门良恶性狭窄 30 例. 世界华人消化杂志 1999;7:182-183
- 12 Weigel TL, Frumiento C, Gaumintz E. Endoluminal palliation for dysphagia secondary to esophageal carcinoma. *Surg Clin North Am* 2002;82:747-761
- 13 O'Donnell CA, Fullarton GM, Watt E, Lennon K, Murray GD, Moss JG. Randomized clinical trial comparing self-expanding metallic stents with plastic endoprostheses in the palliation of oesophageal cancer. *Br J Surg* 2002;89:985-992
- 14 Park HS, Do YS, Suh SW, Choo SW, Lim HK, Kim SH, Shim YM, Park KC, Choo IW. Upper gastrointestinal tract malignant obstruction: initial results of palliation with a flexible covered stent. *Radiology* 1999;210:865-870
- 15 Austin AS, Khan Z, Cole AT, Freeman JG. Placement of esophageal self-expanding metallic stents without fluoroscopy. *Gastrointest Endosc* 2001;54:357-359
- 16 White RE, Mungatana C, Topazian M. Esophageal stent placement without fluoroscopy. *Gastrointest Endosc* 2001;53:348-351
- 17 Vakil N, Morris AI, Marcon N, Segalin A, Peracchia A, Bethge N, Zuccaro G, Bosco JJ, Jones WF. A prospective, randomized, controlled trial of covered expandable metal stents in the palliation of malignant esophageal obstruction at the gastroesophageal junction. *Am J Gastroenterol* 2001;96:1791-1796
- 18 Siersema PD, Hop WC, van Blankenstein M, van Tilburg AJ, Bac DJ, Homs MY, Kuipers EJ. A comparison of 3 types of covered metal stents for the palliation of patients with dysphagia caused by esophagogastric carcinoma: a prospective, randomized study. *Gastrointest Endosc* 2001;54:145-153
- 19 Nomori H, Horio H, Imazu Y, Suemasu K. Double stenting for esophageal and tracheobronchial stenoses. *Ann Thorac Surg* 2000;70:1803-1807
- 20 Riccioni ME, Shah SK, Tringali A, Ciletti S, Mutignani M, Perri V, Zuccala G, Coppola R, Costamagna G. Endoscopic palliation of unresectable malignant oesophageal strictures with self-expanding metal stents: comparing Ultraflex and Esophacoil stents. *Dig Liver Dis* 2002;34:356-363
- 21 Golder M, Tekkis PP, Kennedy C, Lath S, Toye R, Steger AC. Chest pain following oesophageal stenting for malignant dysphagia. *Clin Radiol* 2001;56:202-205
- 22 Christie NA, Buenaventura PO, Fernando HC, Nguyen NT, Weigel TL, Ferson PF, Luketich JD. Results of expandable metal stents for malignant esophageal obstruction in 100 patients: short-term and long-term follow-up. *Ann Thorac Surg* 2001;71:1797-801
- 23 Bartelsman JF, Bruno MJ, Jensema AJ, Haringsma J, Reeders JW, Tytgat GN. Palliation of patients with esophagogastric neoplasms by insertion of a covered expandable modified Gianturco-Z endoprosthesis: experiences in 153 patients. *Gastrointest Endosc* 2000;51:134-138
- 24 Schowengerdt CG. Tracheoesophageal fistula caused by a self-expanding esophageal stent. *Ann Thorac Surg* 1999;67:830-831
- 25 Mayoral W, Fleischer D, Salcedo J, Roy P, Al-Kawas F, Benjamin S. Nonmalignant obstruction is a common problem with metal stents in the treatment of esophageal cancer. *Gastrointest Endosc* 2000;51:556-559
- 26 Boulis NM, Armstrong WS, Chandler WF, Orringer MB. Epidural abscess: a delayed complication of esophageal stenting for benign stricture. *Ann Thorac Surg* 1999;68:568-570
- 27 Khan HA, Ahmad I, Ahmed W. Ventricular fibrillation after insertion of a self-expanding metallic stent for malignant dysphagia. *Am J Gastroenterol* 2000;95:827
- 28 Maier A, Pinter H, Friehs GB, Renner H, Smolle-Juttner FM. Self-expandable coated stent after intraluminal treatment of esophageal cancer: a risky procedure? *Ann Thorac Surg* 1999; 67:781-784
- 29 Siersema PD, Hop WC, Dees J, Tilanus HW, van Blankenstein M. Coated self-expanding metal stents versus latex prostheses for esophagogastric cancer with special reference to prior radiation and chemotherapy: a controlled, prospective study. *Gastrointest Endosc* 1998;47:113-120
- 30 Nelson D, Borowsky S, Murdoch M. Risk of self-expanding metal stents in patients with prior radiation or chemotherapy. *Gastrointest Endosc* 1999;49:137-139
- 31 Christie NA, Buenaventura PO, Fernando HC, Nguyen NT, Weigel TL, Ferson PF, Luketich JD. Results of expandable metal stents for malignant esophageal obstruction in 100 patients: short-term and long-term follow-up. *Ann Thorac Surg* 2001;71:1797-801



# 胃癌组织 CD<sub>44</sub>v9 和 MMP-2 基因的表达

张翠萍, 田字彬, 赵清喜, 武 军, 梁永信

张翠萍, 田字彬, 赵清喜, 武军, 梁永信, 青岛大学医学院附属医院消化科 山东省青岛市 266003

张翠萍, 女, 1962-12-16 生, 山东省鄄城县人, 汉族, 1983 年青岛医学院本科毕业, 副主任医师, 硕士生导师, 主要从事消化系统疾病的临床研究. 曾获青岛市科技进步二等奖, 山东省卫生厅科技进步一、三等奖.

山东省自然科学基金资助项目, No.1999CA1CKB3

项目负责人: 张翠萍, 266003, 山东省青岛市江苏路 16 号, 青岛大学医学院附属医院消化科. tianzbsun@public.qd.sd.cn

电话: 0532-2911304

收稿日期: 2002-03-20 接受日期: 2002-08-29

## Relation between CD<sub>44</sub>v9, MMP-2 and tumor invasion and metastasis in gastric cancer

Cui-Ping Zhang, Zi-Bin Tian, Qing-Xi Zhao, Jun Wu, Yong-Xin Liang

Cui-Ping Zhang, Zi-Bin Tian, Qing-Xi Zhao, Jun Wu, Yong-Xin Liang, Department of Gastroenterology, The Affiliated Hospital of Qingdao University Medical College, Qingdao, 266003, Shandong Province, China Supported by the Natural Science Foundation of Shandong Province, No.1999CA1CKB3

Correspondence to: Dr. Cui-Ping Zhang, Department of Gastroenterology, The Affiliated Hospital of Qingdao University Medical College, Qingdao, 266003, Shandong Province, China. tianzbsun@public.qd.sd.cn

Received: 2002-03-20 Accepted: 2002-08-29

## Abstract

AIM: To study the expression of matrix metalloproteinase CD<sub>44</sub>v9, matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in gastric cancer and the corresponding adjacent normal tissues, to investigate the possible mechanism of tumor invasion and metastasis in gastric cancer.

METHODS: Tumor tissues and adjacent normal tissues in 40 cases of gastric cancer were detected by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) for the expression of CD<sub>44</sub>v9, MMP-2.

RESULTS: The expression of CD<sub>44</sub>v9, MMP-2 in tumor tissues were higher than that in adjacent normal tissues, respectively ( $\chi^2=12.929$ ,  $\chi^2=10.769$ ,  $P \leq 0.001$ ). The expression was related to tumor size, degree of differentiation, clinical staging. The expression of CD<sub>44</sub>v9, MMP-2 mRNA in 17 gastric cancers with lymph node metastasis were higher than that in gastric cancer without lymph node metastasis ( $P < 0.05$ ). The expression of CD<sub>44</sub>v9, MMP-2 correlated highly with gastric cancer ( $r = 0.6$ ,  $P < 0.001$ ).

CONCLUSION: CD<sub>44</sub>v9, MMP-2 were related to tumor invasion and metastasis in gastric cancer, and could be used as important indexes to predict invasion and metastasis of gastric cancer.

Zhang CP, Tian ZB, Zhao QX, Wu J, Liang YX. Relation between CD<sub>44</sub>v9, MMP-2 and tumor invasion and metastasis in gastric cancer. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003;11(10):1531-1534

## 摘要

目的: 研究 CD<sub>44</sub>v9 和 MMP-2 在胃癌和癌旁组织中的表达, 探讨胃癌侵袭与转移的可能机制.

方法: 采用 RT-PCR 方法分别检测 40 例胃癌及癌旁组织 CD<sub>44</sub>v9 及 MMP-2 的阳性表达情况.

结果: 40 例胃癌组织中 CD<sub>44</sub>v9 和 MMP-2 的阳性表达率分别为 75 % 和 82.5 %, 明显高于癌旁组织的 35 % 和 48.5 %, 二者比较差异均有显著性 ( $\chi^2=12.929$ ;  $\chi^2=10.769$ ,  $P \leq 0.001$ ). CD<sub>44</sub>v9 和 MMP-2 表达与肿瘤的大小、分化高低、浸润深度及临床分期有关, 合并有淋巴结转移的 17 例胃癌患者 CD<sub>44</sub>v9 和 MMP-2 表达率明显高于不伴有淋巴结转移的胃癌患者 ( $P < 0.05$ ), CD<sub>44</sub>v9 和 MMP-2 的表达与胃癌有相关性 ( $r = 0.6$ ,  $P < 0.001$ ).

结论: CD<sub>44</sub>v9 和 MMP-2 与胃癌侵袭和转移性有关, 可作为预测肿瘤转移潜能的指标.

张翠萍, 田字彬, 赵清喜, 武军, 梁永信. 胃癌组织 CD<sub>44</sub>v9 和 MMP-2 基因的表达. 世界华人消化杂志 2003;11(10):1531-1534

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1531.asp>

## 0 引言

消化道肿瘤侵袭和转移是肿瘤治疗失败的主要原因, 是多因素综合作用的结果. 已有研究资料表明细胞表面黏附分子 CD<sub>44</sub> 能降解细胞外基质蛋白的 IV 型胶原酶 (MMP) 可能在肿瘤的侵袭转移过程中起重要作用<sup>[1-9]</sup>. 但有关 CD<sub>44</sub>v9、MMP-2 联合检测在胃癌发生、转移和预后中的作用及二者相关性的未见报道. 我们采用 RT-PCR 方法观察 CD<sub>44</sub>v9 和 MMP-2 在胃癌组织和癌旁组织中的表达以及与各临床病理指标之间的关系, 以探讨其阳性表达与胃癌侵袭转移及预后的关系及二者表达的相关性.

## 1 材料和方法

1.1 材料 胃癌及癌旁组织标本 40 例均取自于本院 2000-06/2001-06 因胃癌行胃大部切除并经病理证实为胃癌的患者. 男 29 例, 女 11 例, 年龄 28-80 (平均  $59 \pm 13$ ) 岁. 胃窦 17 例, 胃体 11 例, 胃底及贲门 8 例, 残胃及幽门管各 2 例. 高分化 8 例, 中低分化 32 例. 临床早期 9 例, 中晚期 31 例. 有淋巴结转移 17 例, 无淋巴结转移 23 例, 4 例并远处广泛转移. 术中取无菌标本, 放入经消毒处理的小瓶内, -80 °C 储存备用. DEPC (焦

碳酸二乙酯) Sigma公司产品; 十二烷基磺酸钠(SDS) BIB 公司产品; TRIZOL 试剂 GIBCO 公司产品. 微量移液器 (法国 Gilson 公司产品); 高速低温台式离心机 3K30 型 (德国); DNA 扩增仪 480 型 (美国 PE 公司产品); 紫外分光光度计(日本岛津公司产品); Ultrascan XL 型激光密度扫描仪 (瑞典 LKB 公司).

1.2 方法 用 D-Hanks 液清洗组织标本, 然后用无菌眼科剪剪碎至直径约 1 mm 组织小块. 加胰蛋白酶和胶原酶消化. 将肿瘤组织和癌旁组织制成单细胞悬液, 用 Trizol 试剂进一步提取细胞总 RNA. 紫外分光光度计定量. CD<sub>44</sub>v9 和 MMP-2 的检测采用 RT-PCR 方法. 取细胞总 RNA 1 μg, 采用逆转录试剂盒要求的标准条件进行 RNA 逆转录反应, 所获 cDNA 用作 PCR 反应的模板. CD<sub>44</sub>v9 MMP-2 和内参照 β-actin 基因引物分别参照文献[10]设计, 引物序列如下: CD<sub>44</sub>v9 引物上游为: 5' - GCA GAG TAA TTC TCA GAG CTT CTC TAC AT-3', 下游为 5' - TTG ATG TCA GAG TAG AAG TTG TTG GAT GG-3', MMP-2 引物上游为: 5' - ACA AAG AGT GGC AGT GCA A-3', 下游为 5' - CAC GAG CAA AGG CAT CC-3', β-actin 引物上游为 5' - CTG TCT GGC GGC ACC ACC AT-3', 下游为 5' - GCA ACT AAG TCA TAG CCG C-3', 上述引物扩增片段长度分别为 302 bp, 365 bp, 476 bp 和 254 bp, 由上海生工技术服务有限公司合成. 对 PCR 反应条件进行优化确定最适浓度和其他各反应成分浓度, 全部实验按最佳优化条件进行, 在同一反应体系对 MMP-2 和 β-actin, CD<sub>44</sub>v9 和 β-actin 两对基因分别同时扩增, 扩增条件为 95 °C 变性 30 s, 57 °C 复性 30 s, 72 °C 延伸 1 min 共 33 个循环, 最后 72 °C 延伸 2 min. 取扩增产物 10 μL 于含 EB (0.5 mg/L) 的 20 g/L 的琼脂糖凝胶中电泳, 80 V, 1 h, 紫外透射仪下观察结果并照相. 在激光密度扫描仪上扫描底片, 若观察到特异性扩增条带者, 表明 CD<sub>44</sub>v9 或 MMP 基因阳性表达, 若无特异性扩增条带则视为无 CD<sub>44</sub>v9 或 MMP 基因表达.

统计学处理 采用 $\chi^2$ 及 Spearman 等级相关分析检验.

## 2 结果

2.1 胃癌组织 CD<sub>44</sub>v9, MMP-2 的阳性表达 40 例胃癌组织中 CD<sub>44</sub>v9 和 MMP-2 的阳性表达率分别为 82.5 %、75 %, 明显高于癌旁组织的 48.5 % 和 35 %, 二者比较差异均有显著性( $\chi^2=12.929$ ;  $\chi^2=10.769$ .  $P$  均  $\leq 0.001$ ). CD<sub>44</sub>v9 和 MMP-2 阳性表达率与肿瘤的大小、分化高低、临床分期、浸润深度(MMP-2 除外)及有无淋巴结转移有关, 合并有淋巴结转移的 17 例胃癌患者 CD<sub>44</sub>v9, MMP-2 表达率明显高于不伴有淋巴结转移的胃癌患者 ( $P < 0.05$ ). 在肿瘤较大、临床分期较晚、浸润较深、及伴有淋巴结转移者, MMP-2 及 CD<sub>44</sub>v9 阳性表达率明显高于肿瘤较小、临床分期较早、浸润较浅及无淋巴结转移者( $P < 0.05-0.01$ ), 表 1.

表 1 胃癌组织 CD<sub>44</sub>v9 和 MMP-2 与临床病理的关系

临床病理	<i>n</i>	CD <sub>44</sub> v9	MMP-2
肿瘤直径			
大于 5 cm	16	9	10
大于或等于 5 cm	24	21 <sup>a</sup>	23 <sup>b</sup>
分化程度			
高分化	8	3	4
中低分化	32	27 <sup>b</sup>	29 <sup>b</sup>
临床分期			
I、II	15	7	9
III、IV	25	23 <sup>b</sup>	24 <sup>b</sup>
浸润深度			
T <sub>1</sub> 、T <sub>2</sub>	21	13	15
T <sub>3</sub> 、T <sub>4</sub>	19	17 <sup>a</sup>	18
淋巴结转移			
有	17	16	17
无	23	14 <sup>a</sup>	16 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$ , vs 同一病理指标相同基因之间的比较.

2.2 CD<sub>44</sub>v9 与 MMP-2 表达的相关性 有 MMP-2 阳性表达的 33 例胃癌患者组织中 CD<sub>44</sub>v9 阳性表达者 29 例, 阴性表达者 4 例, 而在 MMP-2 阴性表达的 7 例胃癌患者组织中, CD<sub>44</sub>v9 阴性表达 6 例. 经 Spearman 等级相关分析检验, 胃癌中 MMP-2 与 CD<sub>44</sub>v9 表达呈正相关( $r=0.6$ ,  $P < 0.001$ ). 在比较胃癌淋巴结转移情况时发现在 MMP-2 和 CD<sub>44</sub>v9 均阳性表达的 29 例患者中术中发现淋巴结转移 15 例, 淋巴结转移率为 51.7 %; 而在 MMP-2 和 CD<sub>44</sub>v9 均阴性表达的 8 例患者中术中发现淋巴结转移 1 例, 淋巴结转移率为 12.5 %, 二者比较有显著性差异( $\chi^2=3.93$ ,  $P < 0.05$ ).

## 3 讨论

本研究表明 CD<sub>44</sub>v9 在胃癌组织中的阳性表达率显著高于其癌旁组织, 这与其他研究报道结果相一致<sup>[11-15]</sup>. 提示 CD<sub>44</sub>v9 可能与胃癌的发生发展、临床分期及转移有关, 伴有侵袭和转移的胃癌 CD<sub>44</sub>v9 的表达明显增高, 但与病理类型、肿瘤的大小及组织学类型无明显相关性. 变异型 CD<sub>44</sub> 作为一种透明质酸的受体, 分子的 NH<sub>2</sub> 末端功能区能连接细胞外间质及基底膜的透明质酸盐调节细胞的运动和形态, 同时“锚”定在宿主细胞外间质及基底膜上, CD<sub>44</sub> 阳性细胞更易与毛细血管后小静脉中的高柱状内皮细胞结合, 使肿瘤细胞更易进入淋巴系统和循环系统, 同时透明质酸降解产物还能启动血管的发生, 为侵袭转移奠定基础, 并且, CD<sub>44</sub>v9 具有介导淋巴细胞与血管内皮结合, 使淋巴细胞穿过血管壁返回淋巴组织的功能, 所以又称“归巢”受体, CD<sub>44</sub>v9 可使癌细胞获得转移能力, 通过与远隔血管和淋巴管内某些

配体结合, 使转移至那里的癌细胞更稳定的寄宿, 形成转移癌灶. 这些因素均能使 CD<sub>44</sub>v9 阳性肿瘤细胞获得更强的侵袭和转移能力.

大量研究显示基质金属蛋白酶尤其是 MMP-2 是细胞外基质成分分解代谢的关键酶, 能降解结缔组织分解细胞外基质(细胞间基质和基底膜)所有的大分子蛋白, 所以他们的活性与肿瘤的侵袭和转移有密切关系<sup>[16-25]</sup>. 我们采用先进的 RT-PCR 方法对胃癌及癌旁组织中 MMP-2 进行定性表达, 结果显示, 在胃癌组织中 MMP-2 的阳性表达率均较癌旁组织为高, 有癌旁组织表达的基本见于分化差且临床分期较高的胃癌病例. 分化好或早期胃癌, 癌组织及癌旁组织阳性表达者较少. 从而提示基质金属蛋白酶在胃癌的发生发展中可能起到某些重要的作用, 其活性的阳性检出率可作为胃癌的诊断指标之一. 癌旁组织虽较癌组织中表达率低, 但仍有一定的表达能力, 提示肿瘤细胞可以通过可溶递质或膜黏合分子与间质细胞进行信息交换, 协同产生和调节 MMP, 这在肿瘤细胞侵袭和转移机制中可能具有重大意义.

肿瘤组织中 MMP-2 或 CD<sub>44</sub>v9 与临床病理因素和预后的关系, 我们发现胃癌组织中 MMP-2 或 CD<sub>44</sub>v9 的表达与肿瘤的大小有关, 这可能是由于瘤体增大时, 瘤体的血供相对不足, 从而使与癌细胞侵袭相关的功能基因表达增加, 以便逃离血供不足的环境而向远处血供丰富的地方侵犯, 而 MMP-2 是重要的与侵袭相关的功能基因, 因此其表达随着胃癌瘤体的增大而增加<sup>[8]</sup>. 这点有助于胃癌的早期诊断及早期治疗. MMP-2 的过度表达与转移性肿瘤细胞的局部浸润和扩散之间具有很密切的关系<sup>[9]</sup>, 中晚期胃癌 MMP-2 的表达量明显高于早期胃癌, 有淋巴结转移和远处转移者明显高于非转移的胃癌患者, 提示 MMP 系列不仅在胃癌侵袭及转移过程中发挥重要的作用且与胃癌的预后密切相关. 单一 MMP-2 或 CD<sub>44</sub>v9 与原发肝癌、乳腺癌、结肠癌等<sup>[26-31]</sup>的侵袭和转移性的关系已有报道, 但有关 MMP-2 和 CD<sub>44</sub>v9 同时与胃癌侵袭和转移性的关系比较研究未见报道, 我们发现 MMP-2 表达与 CD<sub>44</sub>v9 表达呈正相关, 并且 MMP-2 和 CD<sub>44</sub>v9 均阳性表达的胃癌患者发生淋巴结转移的可能性大, 尤其当癌组织 MMP-2 表达高于癌旁组织时, 再加 CD<sub>44</sub>v9 表达明显升高, 提示肿瘤转移. 有人认为肿瘤细胞首先通过已存在的或新形成的结合位点与细胞外基质黏附、结合, 进而溶解细胞外基质, 最后经细胞外基质的缺损处向外侵袭和转移<sup>[32-35]</sup>.

总之, 到目前为止, 了解肿瘤有无侵袭和转移, 除了手术观察和有无淋巴结及远处转移外, 还没有其他更可靠的预后因子, 因此, 可将 MMP-2 和 CD<sub>44</sub>v9 作为胃癌侵袭转移性的标志物, 这将为研究使用肿瘤侵袭转移的抑制剂打下理论基础.

#### 4 参考文献

- 1 Wroblewski LE, Pritchard DM, Carter S, Varro A. Gastrin-stimulated gastric epithelial cell invasion: the role and mechanism of increased matrix metalloproteinase 9 expression. *Biochem J* 2002;365(Pt 3):873-879
- 2 Wang C, Tang C. Inhibition of human gastric cancer metastasis by ocreotide in vitro and in vivo. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2002;82:19-22
- 3 Kabashima A, Maehara Y, Koga T, Kakeji Y, Sugimachi K. The biologic features of intramucosal gastric carcinoma with lymph node metastasis. *Surgery* 2002;131(Suppl 1):S71-77
- 4 Matsuoka T, Yashiro M, Sawada T, Ishikawa T, Ohira M, Hirakawa K, Chung YS. Effect of a matrix metalloproteinase inhibitor on a lymph node metastatic model of gastric cancer cells passaged by orthotopic implantation. *J Exp Clin Cancer Res* 2001;20:213-218
- 5 Yonemura Y, Endo Y, Takino T, Sakamoto K, Bandou E, Kinoshita K, Fushida S, Miwa K, Sasaki T. Membrane-type 1 matrix metalloproteinase enhances lymph node metastasis of gastric cancer. *Clin Exp Metastasis* 2000;18:321-327
- 6 Kabashima A, Maehara Y, Kakeji Y, Baba H, Koga T, Sugimachi K. Clinicopathological features and overexpression of matrix metalloproteinases in intramucosal gastric carcinoma with lymph node metastasis. *Clin Cancer Res* 2000;6:3581-3584
- 7 Tahara E. Molecular aspects of invasion and metastasis of stomach cancer. *Verh Dtsch Ges Pathol* 2000;84:43-49
- 8 Yamamichi K, Uehara Y, Kitamura N, Nakane Y, Hioki K. Increased expression of CD44v6 mRNA significantly correlates with distant metastasis and poor prognosis in gastric cancer. *Int J Cancer* 1998;79:256-262
- 9 Xiao CZ, Dai YM, Yu HY, Wang JJ, Ni CR. Relationship between expression of CD44v6 and nm23-H1 and tumor invasion and metastasis in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 1998;4:412-414
- 10 Hofmann M, Rudy W, Zoller M. CD<sub>44</sub> splice variants confer metastatic behavior in rats: Homologous sequences are expressed in human tumor cell line. *Cancer Res* 1991;51:5292
- 11 Koyama S, Maruyama T, Adachi S. Expression of epidermal growth factor receptor and CD44 splicing variants sharing exons 6 and 9 on gastric and esophageal carcinomas: a two-color flow-cytometric analysis. *J Cancer Res Clin Oncol* 1999;125:47-54
- 12 Yasui W, Kudo Y, Naka K, Fujimoto J, Ue T, Yokozaki H, Tahara E. Expression of CD44 containing variant exon 9 (CD44v9) in gastric adenomas and adenocarcinomas: relation to the proliferation and progression. *Int J Oncol* 1998;12:1253-1258
- 13 Ue T, Yokozaki H, Kitadai Y, Yamamoto S, Yasui W, Ishikawa T, Tahara E. Co-expression of osteopontin and CD44v9 in gastric cancer. *Int J Cancer* 1998;79:127-132
- 14 Xin Y, Li XL, Wang YP, Zhang SM, Zheng HC, Wu DY, Zhang YC. Relationship between phenotypes of cell-function differentiation and pathobiological behavior of gastric carcinomas. *World J Gastroenterol* 2001;7:53-59
- 15 李泽民, 樊剑芳, 方建萍. CD44v6 基因变异体在胃癌中的表达及其临床意义. *世界华人消化杂志* 2000;8(特刊 8):21
- 16 Kazuki N, Teruhiko I, Yoshiya S. Front-cells-specific expression of membrane-type 1 matrix metalloproteinase and gelatinase A during migration of colon carcinoma cells induced by hepatocyte growth factor/scatter factor. *Cancer Res* 2000;60:3364-3369
- 17 Monig SP, Baldus SE, Hennecken JK, Spiecker DB, Grass G, Schneider PM, Thiele J, Dienes HP, Holscher AH. Expression of MMP-2 is associated with progression and lymph node metastasis of gastric carcinoma. *Histopathology* 2001;39:597-602
- 18 Feng G, Tan Y. Expression and significance of MMP(2) and type IV collagen in gastric cancer. *Zhonghua Waikao Zazhi* 2000;38:775-777

- 19 Kabashima A, Yao T, Sugimachi K, Tsuneyoshi M. Relationship between biologic behavior and phenotypic expression in intramucosal gastric carcinomas. *Hum Pathol* 2002;33:80-86
- 20 Mizutani K, Kofuji K, Shirouzu K. The significance of MMP-1 and MMP-2 in peritoneal disseminated metastasis of gastric cancer. *Surg Today* 2000;30:614-621
- 21 Matsuoka T, Yashiro M, Sawada T, Ishikawa T, Ohira M, Chang KH. Inhibition of invasion and lymph node metastasis of gastrointestinal cancer cells by R-94138, a matrix metalloproteinase inhibitor. *Anticancer Res* 2000;20:4331-4338
- 22 Chen PS, Zhai WR, Zhou XM, Zhang JS, Zhang YE, Ling YQ, Gu YH. Effects of hypoxia, hyperoxia on the regulation of expression and activity of matrix metalloproteinase-2 in hepatic stellate cells. *World J Gastroenterol* 2001;7:647-651
- 23 Sundblad A, Ricci L. MMP-2 expression (type IV collagenase) in gastric cancer. *Acta Gastroenterol Latinoam* 1998;28:287-290
- 24 蒋泽生, 方石岗, 高毅, 汪爽, 陈建锋. 二乙基亚硝胺诱发大鼠肝细胞癌发生过程中基质金属蛋白酶动态变化. *世界华人消化杂志* 2001;9:759-762
- 25 Kohaku K, Shujiro Y, Kiyotsugu Y, Konda Y, Nakajima M, Chiba T, Takahashi R. Activation of fibroblast-derived matrix metalloproteinase-2 by colon-cancer cells in non-contact co-cultures. *Int J Cancer* 2000;87:165-171
- 26 谢玉梅, 聂青和, 周永兴, 程勇前, 康文臻. 地高辛素标记探针原位杂交技术检测肝硬化组织中 TIMPs mRNA. *世界华人消化杂志* 2001;9:251-254
- 27 Guo WJ, Li J, Ling WL, Bai YR, Zhang WZ, Cheng YF, Gu WH, Zhuang JY. Influence of hepatic arterial blockage on blood perfusion and VEGF, MMP-1 expression of implanted liver cancer in rats. *World J Gastroenterol* 2002;8:476-479
- 28 Hou L, Li Y, Jia YH, Wang B, Xin Y, Ling MY, Lü S. Molecular mechanism about lymphogenous metastasis of hepatocarcinoma cells in mice. *World J Gastroenterol* 2001;7:532-536
- 29 Jiang YF, Yang ZH, Hu JQ. Recurrence or metastasis of HCC: predictors, early detection and experimental antiangiogenic therapy. *World J Gastroenterol* 2000;6:61-65
- 30 洪照友, 俞金龙, 张云生, 高毅. 基质金属蛋白酶-9, CD34 的表达与肝癌侵袭转移的关系. *世界华人消化杂志* 2001;9: 170-174
- 31 Yang CQ, Wang JY, Fang JT, Liu JJ, Guo JS. A comparison between intravenous and peritoneal route on liver targeted uptake and expression of plasmid delivered by Glyco-poly-L-lysine. *World J Gastroenterol* 2000;6:508-512
- 32 Qin LX, Tang ZY. The prognostic molecular markers in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2002;8:385-392
- 33 Zhang H, Morisaki T, Matsunaga H, Sato N, Uchiyama A, Hashizume K, Nagumo F, Tadano J, Katano M. Protein-bound polysaccharide PSK inhibits tumor invasiveness by down-regulation of TGF-beta1 and MMPs. *Clin Exp Metastasis* 2000;18:343-352
- 34 Spina D, Vindigni C, Presenti L, Schurfeld K, Stumpo M, Tosi P. Cell proliferation, cell death, E-cadherin, metalloproteinase expression and angiogenesis in gastric cancer precursors and early cancer of the intestinal type. *Int J Oncol* 2001;18:1251-1258
- 35 Lee JH, Koh JT, Shin BA, Ahn KY, Roh JH, Kim YJ, Kim KK. Comparative study of angiostatic and anti-invasive gene expressions as prognostic factors in gastric cancer. *Int J Oncol* 2001;18:355-361

# 奥沙利铂综合治疗胃癌的疗效及机制

林万隆, 李定国, 陈 强, 陆汉民, 马小明, 孙培龙

林万隆, 马小明, 孙培龙, 上海市闸北区北医院医学科 上海市 200435  
李定国, 陈强, 陆汉民, 上海第二医科大学附属新华医院消化科  
上海市 200092

林万隆, 男, 1974-01-29, 江苏省镇江市人, 在读博士, 研究方向消化道肿瘤的早期诊断及综合治疗, 发表论文4篇。

项目负责人: 林万隆, 200092, 上海市共和新路4500号, 上海市闸北区北医院医学科。linwanlong155@sohu.com

电话: 021-56995662

收稿日期: 2002-11-14 接受日期: 2002-12-07

## Clinical efficacy and mechanism of oxaliplatin in treating human gastric carcinoma

Wan-Long Lin, Ding-Guo Li, Qiang Chen, Han-Min Lu, Xiao-Ming Ma, Pei-Long Sun

Wan-Long Lin, Xiao-Ming Ma, Pei-Long Sun, Shibei Hospital, Shanghai 200435, China

Ding-Guo Li, Qiang Chen, Han-Min Lu, Xinhua Hospital, Shanghai Second Medical University, Shanghai 200092, China

Correspondence to: Wan-Long Lin, Digestive Department, Shibei Hospital, Shanghai 200435, China. linwanlong155@sohu.com

Received: 2002-11-14 Accepted: 2002-12-07

## Abstract

AIM: To evaluate the therapeutic effect of oxaliplatin on human gastric carcinoma and to explore the mechanisms.

METHODS: 22 cases of stage IV gastric carcinoma patients received 4-6 (mean 4.6) cycles of first line combined chemotherapy with oxaliplatin (oxaliplatin 85 mg/m<sup>2</sup>, ivgtt, 1 h, d 1; leukovorin 200 mg/m<sup>2</sup>, iv, gtt, 1 h, d 1-5; 5-FU 300 mg/m<sup>2</sup>, iv, d 1-2; 5-FU, continuously iv, gtt, 48 h; 1 cycle/2w). Response rate, progression-free survival (PFS), total survival time, toxic side effects were evaluated. The inhibitory effect of oxaliplatin on human gastric cell line SGC-7901 was calculated by MTT and IC<sub>50</sub> was measured. Flow cytometry and TUNEL were applied to evaluate the apoptosis of cell line induced by the drug. The expression of caspase-3 mRNA was detected by RT-PCR.

RESULTS: Total response (complete and partial) occurred in 9 (40.9 %) patients. Mean PFS was 4.2 months and mean total survival time was 7.2 months. Cumulative neurotoxicity (all grade I - II), vomiting and diarrhea, myelosuppression appeared in 93.5 %, 20 %, 32.9 % of the patients, respectively. Apoptosis index was elevated after incubating with 1 mmol/L oxaliplatin for 30 min, but without statistic significance ( $P > 0.05$ ), but was much higher both by flowcytometry and TUNEL with statistical significance ( $P < 0.05$ ) after incubating with 1 mmol/L oxaliplatin for 2 days. Caspase-3 mRNA expression was elevated in oxaliplatin treated cells and correlated with apoptosis induced by the drug.

CONCLUSION: Oxaliplatin is effective and well-tolerated on human advanced gastric carcinoma. Oxaliplatin could significantly inhibit the growth of human gastric cell line SGC-7901, inducing caspase-3 mRNA expression and cell apoptosis

Lin WL, Li DG, Chen Q, Lu HM, Ma XM, Sun PL. Clinical efficacy and mechanism of oxaliplatin in treating human gastric carcinoma. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003;11(10):1535-1539

## 摘要

目的: 评价奥沙利铂(Oxaliplatin, L-OHP)对人胃癌的疗效, 探讨其治疗胃癌的作用机制。

方法: IV期胃癌患者22例接受包含L-OHP的联合化疗方案(L-OHP 85 mg/m<sup>2</sup>, 静脉点滴, 1 h, 第1 d; 四氢叶酸钙 200 mg/m<sup>2</sup>, 静脉点滴, 1 h, 第1-5 d; 5-FU 300 mg/m<sup>2</sup>, 静脉注射, 第1-2 d, 5-FU, 持续静脉点滴, 48 h; 2 wk 1疗程)4-6(平均4.6)个疗程。观察有效率, 无进展生存时间(progression-free survival, PFS), 总体生存时间及毒副作用。体外培养人中分化胃癌细胞株SGC-7901, 应用MTT法检测L-OHP对细胞生长的抑制作用, 并计算50 %抑制浓度(IC<sub>50</sub>); 将不同浓度梯度的L-OHP与细胞株作用后, 应用流式细胞仪(ANEXIN-V标记)及TUNEL检测细胞凋亡情况。应用RT-PCR检测caspase-3m-RNA的表达。

结果: 有效(完全有效及部分有效)9例(40.9 %)。平均PFS 4.2 mo, 总体生存时间7.2 mo。蓄积性神经毒性(全部为I - II级), 呕吐及腹泻(1例III级腹泻), 骨髓抑制发生率分别为93.5 %, 20 %, 32.9 %。浓度为1 mmol/L的L-OHP与细胞株作用30 min, 流式细胞仪即可检测出细胞凋亡水平升高, 但无统计学差异( $P > 0.05$ ), 1 mmol/L作用2 d, 流式细胞仪及TUNEL均可检测到细胞凋亡水平显著性升高( $P < 0.05$ )。L-OHP作用后的细胞caspase-3 m-RNA表达升高, 并与药物诱导的凋亡相关。

结论: L-OHP治疗进展期胃癌安全有效。L-OHP在体外可明显抑制胃癌细胞株SGC-7901的生长, 诱导细胞caspase-3m-RNA表达及凋亡。

林万隆, 李定国, 陈强, 陆汉民, 马小明, 孙培龙. 奥沙利铂综合治疗胃癌的疗效及机制. 世界华人消化杂志 2003;11(10):1535-1539

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1535.asp>

## 0 引言

胃癌是危害人民健康的主要恶性肿瘤之一, 其发病原因尚未明了。近年来药物治疗作为胃癌综合治疗的重要



组成部分日益受到重视.在消化道恶性肿瘤中,胃癌属于对药物治疗较敏感的肿瘤,目前普遍认为药物治疗有可能减少复发,延长生存期.奥沙利铂(oxaliplatin, L-OHP)为第三代的铂类药物,抗癌活性强,与CDDP无交叉耐药,与5-Fu有协同作用,对多种肿瘤有效,毒副作用较低.目前用L-OHP治疗胃癌的临床及基础研究较少,我们总结包含L-OHP的联合化疗方案一线治疗IV期胃癌22例的疗效及毒副作用,并试图通过检测L-OHP诱导胃癌细胞株SGC-7901caspase-3 mRNA的表达及凋亡的作用,探讨其治疗胃癌的作用机制.

## 1 临床资料

1.1 对象 1999/2002年新华医院肿瘤中心住院IV期胃癌患者22例,男17例,女5例,年龄25-70(平均60.3)岁.均经术后病理或胃镜病理证实为低分化腺癌16例,印戒细胞癌6例.至少有一个可测量病灶直径大于或等于2 cm; WHO活动能力评分小于或等于2; 预计生存期大于或等于3 mo; 从未接受过化疗; 无外周神经疾病; 血液学,心脏,肝肾功能正常; 无其他抗肿瘤治疗.

1.2 方法 化疗方案: L-OHP 85 mg/m<sup>2</sup>, 静脉点滴, 1 h, 第1 d; 四氢叶酸钙 200 mg/m<sup>2</sup>, 静脉点滴, 1 h, 第1-5 d; 5-FU 300 mg/m<sup>2</sup>, 静脉注射, 第1-2 d, 5-FU, 持续静脉点滴, 48 h; 2 wk 1疗程. 4-6 (平均4.6)个疗程. 化疗前检查: 体质评分, 身体质量, 身高, 体表面积, 全身系统检查, 神经系统检查, 心电图, 血象, 血糖, 肝肾功能, 电解质, 血CEA; 化疗后每周复查一次各项生物学检查(同化疗前); 按NCI标准作前一疗程耐受性评价; 神经系统检查; 不良反应记录. 治疗前及4, 6周期后肿瘤病灶评价评定. 入组患者4个周期化疗后进行全面疗效评估, 1 mo后再次确认. 如果病情稳定或有效则继续用药至第6个周期.

按WHO和UICC标准分为完全有效(complete response, CR), 部分有效(partial response, PR), 稳定(stable disease, SD), 病情进展(progress disease, PD); 按NCI毒性评定标准评定毒性; 按神经毒副作用乐沙定专用分级法评定神经毒性.

1.3 结果 有效率40.9%. 无进展生存期(progression free survival, PFS)1-12(平均4.2 mo), 总体生存时间4-12(平均7.2 mo). 值得指出的是有1例PR和1例SD患者病情至今依然无进展, PFS分别达10 mo和12 mo. L-OHP主要不良反应是消化道反应, 骨髓抑制, 神经感觉障碍. 消化道反应表现为呕吐(20%)和腹泻(20%), 其中Ⅲ级腹泻1例. 骨髓抑制以轻中度贫血为特点, 发生率32.9%, 而对白细胞及血小板抑制较轻, 分别为22.9%和10%, 全部为Ⅰ-Ⅱ级. 神经感觉障碍是L-OHP最主要的不良反应, 发生率达93.5%, 以Ⅰ级为主, Ⅱ级3例, 化疗间歇期可完全缓解.

## 2 实验资料

2.1 材料 人中分化胃癌细胞株SGC-7901, 购自中国科学院上海细胞所, 用含100 ml/L小牛血清的RPMI 1640培养基, 在37℃, 50 ml/L CO<sub>2</sub>条件下培养, 生长至单层后, 以2.5 g/L的胰蛋白酶消化贴壁细胞, 调整细胞数至1×10<sup>5</sup>/L.

### 2.2 方法

2.2.1 MTT法及IC<sub>50</sub> 将收集的细胞接种于96孔培养板中, 5×10<sup>3</sup>/孔, 37℃, 50 ml/L CO<sub>2</sub>条件下培养24 h. 设置6组浓度梯度, 每组3个孔, 加入L-OHP, 使终浓度分别为10, 1, 0.5, 0.1, 0.05, 0.01 mmol/L, 对照组加入相同体积的培养液. 37℃, 50 ml/L CO<sub>2</sub>条件下培养48 h, 离心弃上清后, 每孔加入0.5 g/L的MTT 150 μL, 37℃, 50 ml/L CO<sub>2</sub>条件下避光孵育4 h; 离心弃上清后, 加入DMSO 150 μL/孔, 置水平摇床上15 min, 在525 nm波长下测A值, 细胞生长抑制率=(对照组的A值-实验组的A值)/对照组的A值×100%.

2.2.2 流式细胞仪 取对数生长期的细胞分为4组, 前3组加入L-OHP, 使终浓度分别为10, 1, 0.5 mmol/L, 第4组加入相同体积的培养液作为对照. 药物作用30 min后, 用2.5 g/L的胰蛋白酶消化, 离心后弃上清, 每组细胞数大于或等于1×10<sup>5</sup>/L, 参照ANEXIN-V (Roche)说明书操作, 于EPICS流式细胞仪(Beckman-Coulter)上进行分析.

2.2.3 TdT酶介导的dUTP缺口末端标记(TUNEL)应用 6孔板培养细胞, 取对数生长期的细胞, 细胞爬片. 试验组加入L-OHP, 对照组加入相同体积的培养液作为对照. 药物作用后, 弃上清后用培养液洗3次(图4), 所有标本均应用40 g/L多聚甲醛固定30 min, 用TdT酶将生物素标记的dUTP连接到DNA断裂的3' OH端, 加入ABC反应剂作用数分钟, 再加入DAB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>溶液显色, 苏木精复染, 中性树胶封固.

2.2.4 RT-PCR 取对数生长期的细胞分为2组, 每组3个样本, 1组加入L-OHP, 使终浓度分别为1 mmol/L, 第2组加入相同体积的培养液作为对照. 药物作用30 min后, 用2.5 g/L的胰蛋白酶消化, 离心后弃上清, 每样本细胞数大于或等于1×10<sup>5</sup>/L, PBS洗3次. 采用Trizol一步法提取RNA, 具体步骤见GibcoBrl公司的Protocol; RT步骤参见AMV reverse transcriptase Protocol; PCR步骤参见Taq DNA Polymerase Protocol; PCR产物经20 g/L琼脂糖电泳, 电泳图谱由VDS凝胶图像分析系统测定条带的积分吸光度(IOD). Caspase-3基因相对表达值=caspase-3 PCR产物条带IOD值/β-Actin PCR产物条带IOD值. 引物序列如下. β-actin forward 5'-TGG AGG GCG CGG ACT CGT CA-3'; β-actin reverse 5'-CTT CCT TCC TGG GCA TGG AG-3'; 扩增DNA片段: 315 bp, caspase-3; Sense 5'-ATGGAGAACAACACTGAAAACCTCA-3'; Antisense 5'-TTAGTGATAAAAATAGAGTTC-3'; 扩增DNA片段: 834 bp

统计学处理 采用t检验.

## 2.3 结果

**2.3.1 L-OHP 对胃癌细胞株 SGC-7901 的抑制作用** 根据 3 次 MTT 实验结果计算平均值, 由 Graphpaol Prism 软件绘制, 并求得  $IC_{50}$  值为 0.71 mmol/L. 由此可见, 曲线呈典型的倒 S 形, 较为平坦, 较好地反映了细胞生存率随药物浓度的变化情况(图 1), 说明 L-OHP 有效地抑制 SGC-7901 细胞株的生长.

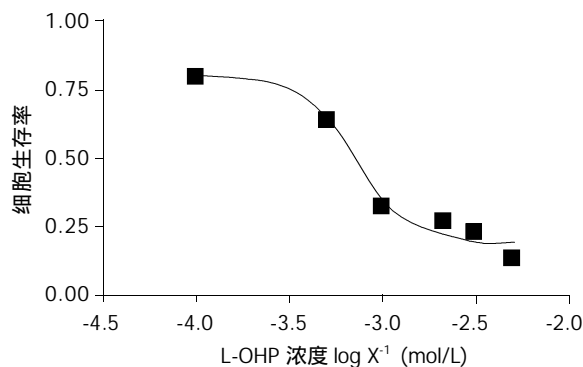


图 1 SGC-7901 细胞生存率与 L-OHP 浓度的相关性.

**2.3.2 L-OHP 诱导凋亡检测结果** 浓度为 1 mmol/L 的 L-OHP 与细胞株作用 30 min 后, 流式细胞仪即可检测出细胞凋亡水平升高, 但无统计学差异( $P > 0.05$ ). L-OHP (10 mmol/L, 30 min) 诱导胃癌细胞株 SGC-7901 凋亡为细胞凋亡明显增加(表 1, 图 2). TUNEL 实验空白对照组凋亡率为 0.38 %, 0.5 mmol/L 组为 4.63 %, 1.0 mmol/L 组为 7.35 %, 5.0 mmol/L 组为 14.35 %. 随药物浓度的增加, 细胞凋亡率显著上升( $P < 0.01$ )随时间变化, 对照组凋亡率无明显改变( $P > 0.05$ ); 加药组凋亡率随时间延长明显上升( $P < 0.01$ ), 第 4 d 达到峰值 7.93 % 和 10.15 %, 第 7 d 分别下降至 6.08 % 和 7.55 % (图 5). 图 2-4 为典型镜像.

表 1 L-OHP(10mmol/L, 30min)对 SGC-7901 细胞凋亡的影响

分组	R1	R2	R3	R4	AI
L-OHP 组	0.6	34.1	39.9	25.4	59.5
空白对照组	4.6	0.8	89.6	4.9	5.7

凋亡指数(apoptosis index, AI) =  $(R2+R4)/(R1+R2+R3+R4)$ .

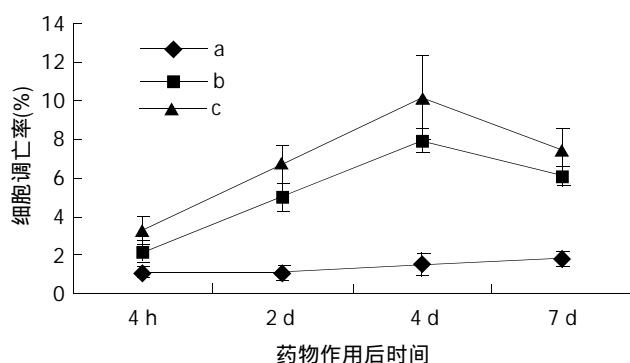


图 2 L-OHP 作用后时间对细胞凋亡率的影响.

**2.3.3 RT-PCR 实验结果** 图 5 为 L-OHP 诱导细胞表达 caspase-3 m-RNA 的琼脂糖电泳图谱, L-OHP 作用后的细胞 caspase-3 m-RNA 表达明显增强(图 5,  $0.48 \pm 0.47$  vs  $0.18 \pm 0.20$ ,  $P < 0.05$ ).

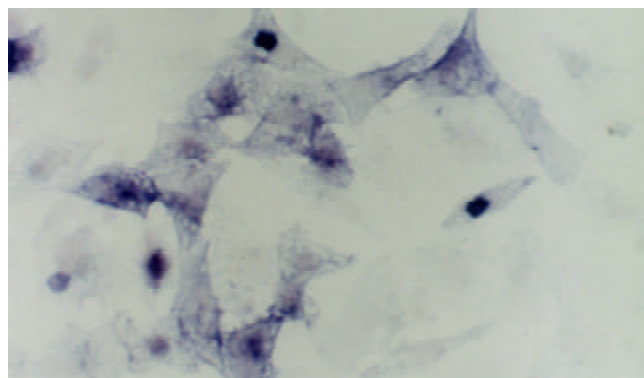


图 3 L-OHP 1 mmol/L 作用 30 min, TUNEL, 伊红复染  $\times 400$ .

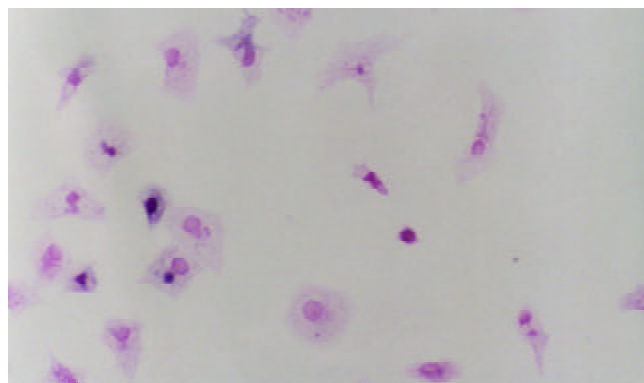


图 4 空白对照, TUNEL, 伊红复染  $\times 200$ .



图 5 L-OHP 诱导细胞表达 caspase-3 m-RNA 的琼脂糖电泳图谱.

## 3 讨论

胃癌是危害人民健康的主要恶性肿瘤之一, 他的转移及复发是导致治疗失败及死亡的主要原因. 目前在临床上对于已经有转移的患者主要应用以药物治疗为主的综合治疗, 虽然胃癌对药物治疗较为敏感, 但联合化疗方案疗效仅为 40 % 左右, 且药物副作用较大<sup>[1-8]</sup>, 化疗药物的毒性与疗效是一对矛盾. 临床常用方案中以 EAP 方案(表阿霉素, 鬼臼乙叉甙, 顺铂)疗效较高, 最高达 70 %, 完全有效率达 15 %, 但治疗相关死亡率亦高达 11 %, 从而限制了临床推广. 顺铂为胃癌化疗的常用药物之一, 对胃癌具有确切的疗效, 但其严重的

肾脏毒性亦限制了临床使用. 因此临床需要一种相对低毒高效药物的问世.

L-OHP 是第三代铂类化合物, 化学名为左旋反式二氨基环己烷草酸铂, L-OHP 的药理学特性与其他铂类药物相似, 均以 DNA 为靶点, L-OHP 易与 DNA 链上的 G 共价结合, 并可能形成链间交联, 从而阻断 DNA 的复制及转录. 目前已知肿瘤细胞通过错误配对修复(mismatch repair)功能移去有铂类结合 DNA 的复制产物, 而这一过程将诱发细胞凋亡. 我们总结 L-OHP 一线治疗 22 例 IV 期胃癌, 有效率 40.9%. 平均 PFS 4.2 mo, 总体生存时间 7.2 mo. 提示 L-OHP 对胃癌可能具有较高的抗瘤活性. 国外研究报道 L-OHP 毒性较小, 常规剂量下绝大多数患者均可耐受. 外周神经毒性是其剂量限制性毒性, 当累计剂量超过 600 mg/m<sup>2</sup> 时易出现感觉异常和肢端麻木, 常由寒冷触发, 但治疗期间注意保暖可以减轻症状, 且停药后可逐渐恢复. L-OHP 优于 CDDP 的特点之一为其无明显的肾脏毒性, 血液系统及消化系统毒性亦较轻. 目前普遍认为胃癌的发生及发展是一个多基因, 多步骤的长期过程. 细胞凋亡与肿瘤的发生, 发展, 治疗和预后均密切相关<sup>[9-28]</sup>. 1980 年发现 bcl-2 基因家族与细胞凋亡及肿瘤存在密切关系以来, 多数认为细胞凋亡在分子水平是受到诸因素调控的. 目前一组门冬氨酸特异性的胱氨酸蛋白酶-caspase 家族渐成为细胞凋亡及肿瘤研究的热点之一. 目前认为在细胞色素 C 和 dATP 存在的条件下, Apaf-1 与 caspase-9 通过他们与 CED-3 相似的氨基端相结合, 从而导致 caspase-9 的活化, 而活化的 caspase-9 又继而激活 caspase-3 从而导致的细胞内重要蛋白的溶解和细胞死亡, 因此 caspase-3 的激活可能是导致细胞凋亡最后的共同通路<sup>[29, 30]</sup>.

细胞凋亡检测方法多种多样, 如光镜、电镜下形态学观察; DNA 末端原位标记染色法(TUNEL); DNA 片断凝胶电泳以及碘化丙啶(PI)染色后流式细胞仪, 等. TUNEL 应用较广泛, 但是无法区分死亡细胞与凋亡细胞. 而 PI 染色后流式细胞仪仅能检出已死亡的细胞. 目前发现细胞凋亡早期仅存于胞膜内侧的磷脂酰丝氨酸会翻转到胞膜外侧, 而 Annexin V 能特异地与磷脂酰丝氨酸结合从而通过流式细胞仪检出凋亡早期的细胞. 故本文选用联合 TUNEL 法及 Annexin V 标记的流式细胞仪法检测细胞凋亡, 发现 L-OHP 在体外可以明显抑制胃癌细胞株 SGC-7901 的生长. 浓度为 1 mmol/L 的 L-OHP 与细胞株作用 30min, 流式细胞仪即可检测出细胞凋亡水平升高, 提示药物作用早期以细胞凋亡为主; 1 mmol/L 作用 2 d, 流式细胞仪及 TUNEL 均可检测到细胞凋亡水平显著性升高. 实验结果提示随药物浓度的增加及作用时间的延长, 细胞凋亡率及细胞死亡率均显著上升, 提示此时细胞凋亡与死亡并存. 因此, L-OHP 在体外对胃癌细胞株 SGC-7901 生长的抑制早期主要机制为诱导细胞凋亡, 随着作用时间的延长, 诱

导凋亡与细胞毒作用并存. RT-PCR 结果提示 L-OHP 作用后的细胞 caspase-3 mRNA 表达明显增强, 与 L-OHP 诱导凋亡作用相关, 提示药物诱导凋亡过程中有 caspase 家族的参与.

总之, L-OHP 对于进展期胃癌是一种相对低毒高效药物, 包含 L-OHP 的联合化疗方案临床疗效可与目前其他方案媲美, 但安全性明显提高. 诱导细胞 caspase-3 基因表达从而导致凋亡可能是其治疗胃癌的机制之一; 在细胞凋亡的早期检测中应用 ANEXIN-V 标记流式细胞仪检测的灵敏度较高. 然而 L-OHP 应用于临床时间不久, 对中外晚期胃癌的临床疗效及毒副作用还有待大样本的多中心随机双盲临床试验加以验证.

#### 4 参考文献

- 1 Wang X, Lan M, Shi YQ, Lu J, Zhong YX, Wu HP, Zai HH, Ding J, Wu KC, Pan BR, Jin JP, Fan DM. Differential display of vincristine-resistance-related genes in gastric cancer SGC7901 cell. *World J Gastroenterol* 2002;8:54-59
- 2 Cao WX, Ou JM, Fei XF, Zhu ZG, Yin HR, Yan M, Lin YZ. Methionine-dependence and combination chemotherapy on human gastric cancer cells in vitro. *World J Gastroenterol* 2002;8:230-232
- 3 Liu S, Wu Q, Ye XF, Cai JH, Huang ZW, Su WJ. Induction of apoptosis by TPA and VP-16 is through translocation of TR3. *World J Gastroenterol* 2002;8:446-450
- 4 Tao HQ, Zou SC. Effect of preoperative regional artery chemotherapy on proliferation and apoptosis of gastric carcinoma cells. *World J Gastroenterol* 2002;8:451-454
- 5 Shi XY, Zhao FZ, Dai X, Ma LS, Dong XY, Fang J. Effect of jianpiyiwei capsule on gastric precancerous lesions in rats. *World J Gastroenterol* 2002;8:608-612
- 6 Zhao AG, Zhao HL, Jin XJ, Yang JK, Tang LD. Effects of Chinese Jianpi herbs on cell apoptosis and related gene expression in human gastric cancer grafted onto nude mice. *World J Gastroenterol* 2002;8:792-796
- 7 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
- 8 Cao WX, Cheng QM, Fei XF, Li SF, Yin HR, Lin YZ. A study of preoperative methionine-depleting parenteral nutrition plus chemotherapy in gastric cancer patients. *World J Gastroenterol* 2000;6:255-258
- 9 Liu JR, Chen BQ, Yang YM, Wang XL, Xue YB, Zheng YM, Liu RH. Effect of apoptosis on gastric adenocarcinoma cell line SGC-7901 induced by cis-9, trans-11-conjugated linoleic acid. *World J Gastroenterol* 2002;8:999-1004
- 10 Liu DH, Zhang XY, Fan DM, Huang YX, Zhang JS, Huang WQ, Zhang YQ, Huang QS, Ma WY, Chai YB, Jin M. Expression of vascular endothelial growth factor and its role in oncogenesis of human gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2001;7:500-505
- 11 Cai L, Yu SZ, Zhang ZF. Glutathione S-transferases M1, T1 genotypes and the risk of gastric cancer: a case-control study. *World J Gastroenterol* 2001;7:506-509
- 12 He XS, Su Q, Chen ZC, He XT, Long ZF, Ling H, Zhang LR. Expression, deletion [was deletion] and mutation of p16 gene in human gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2001;7:515-521
- 13 Fang DC, Yang SM, Zhou XD, Wang DX, Luo YH. Telomere erosion is independent of microsatellite instability but related to loss of heterozygosity in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2001;7:522-526

- 14 Liu S, Wu Q, Chen ZM, Su WJ. The effect pathway of retinoic acid through regulation of retinoic acid receptor alpha in gastric cancer cells. *World J Gastroenterol* 2001;7:662-666
- 15 Xue FB, Xu YY, Wan Y, Pan BR, Ren J, Fan DM. Association of *H pylori* infection with gastric carcinoma: a Meta analysis. *World J Gastroenterol* 2001;7:801-804
- 16 Yao XX, Yin L, Sun ZC. The expression of hTERT mRNA and cellular immunity in gastric cancer and precancerosis. *World J Gastroenterol* 2002;8:586-590
- 17 Song ZJ, Gong P, Wu YE. Relationship between the expression of iNOS, VEGF, tumor angiogenesis and gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2002;8:591-595
- 18 Ren J, Dong L, Xu CB, Pan BR. The role of KDR in the interactions between human gastric carcinoma cell and vascular endothelial cell. *World J Gastroenterol* 2002;8:596-601
- 19 Ren J, Dong L, Xu CB, Pan BR. Expression of sphingosine kinase gene in the interactions between human gastric carcinoma cell and vascular endothelial cell. *World J Gastroenterol* 2002;8:602-607
- 20 Su JM, Gui L, Zhou YP, Zha XL. Expression of focal adhesion kinase and alpha5 and beta1 integrins in carcinomas and its clinical significance. *World J Gastroenterol* 2002;8:613-618
- 21 Nie YZ, He FT, Li ZK, Wu KC, Cao YX, Chen BJ, Fan DM. Identification of tumor associated single-chain Fv by panning and screening antibody phage library using tumor cells. *World J Gastroenterol* 2002;8:619-623
- 22 Zhao Y, Wu K, Xia W, Shan YJ, Wu LJ, Yu WP. The effects of vitamin E succinate on the expression of c-jun gene and protein in human gastric cancer SGC-7901 cells. *World J Gastroenterol* 2002;8:782-786
- 23 Fang DC, Luo YH, Yang SM, Li XA, Ling XL, Fang L. Mutation analysis of APC gene in gastric cancer with microsatellite instability. *World J Gastroenterol* 2002;8:787-791
- 24 Wu K, Li Y, Zhao Y, Shan YJ, Xia W, Yu WP, Zhao L. Roles of Fas signaling pathway in vitamin E succinate-induced apoptosis in human gastric cancer SGC-7901 cells. *World J Gastroenterol* 2002;8:982-986
- 25 Zhou YN, Xu CP, Han B, Li M, Qiao L, Fang DC, Yang JM. Expression of E-cadherin and beta-catenin in gastric carcinoma and its correlation with the clinicopathological features and patient survival. *World J Gastroenterol* 2002;8:987-993
- 26 Zhang H, Wu J, Meng L, Shou CC. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors KDR and Flt-1 in gastric cancer cells. *World J Gastroenterol* 2002;8:994-998
- 27 Jiang YA, Zhang YY, Luo HS, Xing SF. Mast cell density and the context of clinicopathological parameters and expression of p185, estrogen receptor, and proliferating cell nuclear antigen in gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2002;8:1005-1008
- 28 Guo DL, Dong M, Wang L, Sun LP, Yuan Y. Expression of gastric cancer-associated MG7 antigen in gastric cancer, precancerous lesions and *H pylori*-associated gastric diseases. *World J Gastroenterol* 2002;8:1009-1013
- 29 Li HL, Chen DD, Li XH, Zhang HW, Lu JH, Ren XD, Wang CC. JTE-522-induced apoptosis in human gastric adenocarcinoma [correction of adenocarinoma] cell line AGS cells by caspase activation accompanying cytochrome C release, membrane translocation of Bax and loss of mitochondrial membrane potential. *World J Gastroenterol* 2002;8:217-223
- 30 Li HL, Chen DD, Li XH, Zhang HW, Lu YQ, Ye CL, Ren XD. Changes of NF-kB, p53, Bcl-2 and caspase in apoptosis induced by JTE-522 in human gastric adenocarcinoma cell line AGS cells: role of reactive oxygen species. *World J Gastroenterol* 2002;8:431-435

# 聚合酶链反应检测 SEN 病毒 D 型和 H 型方法的建立及初步应用

唐蔚, 彭晓谋, 张瑛, 王辉, 蒋晓玲, 周伯平

唐蔚, 张瑛, 王辉, 蒋晓玲, 周伯平, 深圳市东湖医院深圳市肝病研究所 广东省深圳市 518020

彭晓谋, 中山大学附属第三医院传染病科 广东省广州市 510630

唐蔚, 女, 1970-01-25 生, 上海市人, 汉族. 1993 年复旦大学医学院(原上海医科大学)本科毕业, 2003-06 中山大学广州北校区硕士研究生毕业, 主治医师. 主要从事传染病的临床和科研工作. 发表论文 3 篇.

项目负责人: 唐蔚, 518020, 广东省深圳市布心路 2019 号, 深圳市东湖医院深圳市肝病研究所. viviantwei@hotmail.com

电话: 0755-25509800-3301 传真: 0755-25604034

收稿日期: 2003-03-07 接受日期: 2003-04-01

## Establishment and application of polymerase chain reaction for detecting D and H subtypes of SEN virus

Wei Tang, Xiao-Mou Peng, Ying Zhang, Hui Wang, Xiao-Ling Jiang, Bo-Ping Zhou

Wei Tang, Ying Zhang, Hui Wang, Xiao-Ling Jiang, Bo-Ping Zhou, Shenzhen Research Institute of Liver Disease, Shenzhen East Lake Hospital, Shenzhen 518020, Guangdong Province, China

Xiao-Mou Peng, Department of Infectious Disease, The Third Affiliated Hospital of Zhongshan University, Guangzhou 510630, Guangdong Province, China

Correspondence to: Dr. Wei Tang, Shenzhen Research Institute of Liver Disease, Shenzhen East Lake Hospital, 2019 Buxin Rd, Shenzhen 518020, Guangdong Province, China. viviantwei@hotmail.com

Received: 2003-03-07 Accepted: 2003-04-01

## Abstract

**AIM:** To establish a polymerase chain reaction (PCR) method to detect 2 SENV subtypes (SENV-D and SENV-H) in sera from patients with hepatitis and healthy adults.

**METHODS:** The outer primers were designed based on the data of SENV D and H subtypes from geneBank, while sequences of the inner pair of primers were obtained from newly published medical literature, both of which were used to establish a nested-PCR. SENV-D and H in sera from 192 healthy adults and 48 patients with acute hepatitis A, 176 with chronic hepatitis B, 98 with chronic hepatitis C, and 38 with non A-E hepatitis were detected by this method.

**RESULTS:** The specificity and sensitivity of the nested-PCR test were perfect. The prevalence of SENV-D and/or SENV-H (SENV-D/H) infections in healthy adults and patients with acute hepatitis A, chronic hepatitis B, chronic hepatitis C and non A-E hepatitis were 30.7 %, 37.5 %, 64.8 %, 57.1 % and 44.7 %, respectively. SENV D/H infection were more frequent in patients with chronic hepatitis B and chronic hepatitis C than in healthy adults ( $P < 0.001$ ), but showed no significant difference between patients with non A-E and healthy adults ( $P > 0.05$ ).

**CONCLUSION:** This nested PCR can be used to detect SEN virus. SENV infections do occur in Shenzhen. SENV may share similar modes of transmission to that of HBV and HCV, but whether it plays a causal role in non A-E hepatitis remains to be elucidated.

Tang W, Peng XM, Zhang Y, Wang H, Jiang XL, Zhou BP. Establishment and application of polymerase chain reaction for detecting D and H subtypes of SEN virus. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(10):1540-1543

## 摘要

**目的:** 建立检测 SEN 病毒(SENV)D 和 H 基因型的聚合酶链反应(PCR)方法, 并将其应用到流行调查.

**方法:** 从 GeneBank 下载 SENV 序列, 在 SENV 开放读码框 I 的高度保守序列内自行设计外引物, 参考文献报道合成 SENV D 型和 H 型的型特异性引物作为内引物, 建立检测 SENV D 型和 H 型的巢式 PCR 方法, 并对深圳地区 192 名健康体检人群、48 例急性甲肝患者、176 例慢性乙肝患者、98 例慢性丙肝患者和 38 例非甲 - 戊型肝炎患者的血清进行检测. 部分阳性 PCR 产物进行克隆和 DNA 序列分析.

**结果:** 巢式 PCR 方法的敏感性及特异性均好. SENV D 和 / 或 H 型在健康成人、急性甲肝、慢性乙肝、慢性丙肝和非甲 - 戊型肝炎患者中的总感染率分别为 30.7 %、37.5 %、64.8 %、57.1 % 和 44.7 %. SENV D 和 / 或 H 型在健康人群中的感染率低于慢性乙肝患者和慢性丙肝患者( $P < 0.001$ ). 非甲 - 戊型肝炎及急性甲肝患者中的感染率略高于健康人群, 但无显著性差异( $P > 0.05$ ).

**结论:** 巢式 PCR 方法可用于检测 SENV 感染. 深圳地区健康人群和急、慢性肝炎患者中存在 SENV 感染. SENV 可能与 HBV 和 HCV 有相似的传播途径, 其致病性有待进一步研究阐明.

唐蔚, 彭晓谋, 张瑛, 王辉, 蒋晓玲, 周伯平. 聚合酶链反应检测 SEN 病毒 D 型和 H 型方法的建立及初步应用. *世界华人消化杂志* 2003;11(10):1540-1543

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1540.asp>

## 0 引言

迄今仍有 10 % 的输血相关肝炎、20 % 的社区获得性肝炎和 30 % 的慢性肝病肝硬化没有明确的病因, 提示存在着不明致病病原<sup>[1-3]</sup>. HGV/GBV-C<sup>[4, 5]</sup>和 TTV<sup>[6]</sup>相继被用来解释非甲 - 戊型肝炎, 但是这一结论在后来的研究



中没有得到证实<sup>[7-9]</sup>. SEN 病毒(SEN virus, SENV)最早是由意大利学者 Primi et al<sup>[10]</sup>于 1999 年从 1 例有静脉药瘾的 HIV-1 型携带者的血清中发现的, 虽然与 TTV 结构相似, 但与 TTV 原型(TTV prototype)核苷酸同源性 55%, 而氨基酸同源性只有 37%<sup>[11]</sup>. SENV 属于 TTV 相关病毒超家族(super family of TTV-related viruses), 是一组无包膜的单链环状 DNA 病毒, 共分 8 个型别. 一般认为致病性较弱或无致病性<sup>[12,13]</sup>但不能排除部分基因型致病的可能性. 有研究显示 SENV D 型和 H 型与输血相关的非甲-戊型肝炎的联系最为密切<sup>[14]</sup>. 为此, 我们参照文献<sup>[10]</sup>报道的 SENV D 型和 H 型的型特异性引物序列, 建立了巢式 PCR 方法, 并对深圳地区的部分人群中 SENV 两亚型的感染状况进行了初步研究.

## 1 材料和方法

1.1 材料 健康成人 192 例的血清于 1999-08 某社区健康体检时收集, 急性甲肝 48 例、慢性乙型肝炎 176 例、慢性丙型肝炎 96 例及非甲-戊型肝炎 38 例为我院 2000-09/2001-12 住院及门诊病例, 诊断参照 2001 年《病毒性肝炎防治方案》<sup>[15]</sup>. 10 × Taq 酶聚合酶缓冲液、Taq DNA 聚合酶、pMD 18 T 载体、DL 2000 DNA Marker 购自 TaKaRa (大连)公司, dNTPs 和大肠杆菌 DH<sub>5</sub>α 为美国 Promega 公司产品. PCR 产物纯化试剂盒为 QiaGen 公司产品, 质粒抽提纯化试剂盒购自美国 Omega 公司, 测序试剂盒 BigDye Terminator Reaction Kit V 2.0 和 ABI Prism 3100 遗传分析仪均出自美国应用生物系统公司. ICycler DNA 扩增仪为 Bio-Rad 公司产品.

1.2 方法 从 GeneBank 下载 SENV 的基因序列, 采用 Primer Premier 5.0 软件辅助分析, 在开放读码框 I(ORF1)的高度保守序列内设计 SENV D 和 H 型的通用外引物 SENV1 和 SENV2, 其产物的理论大小为 588 bp. SENV1 (sense primer, 正义引物)序列: 5'-CCSAACTRTTTGAAGAC-3', SENV2 (antisense primer, 反义引物)序列: 5'-TRTTTGAGTACCAGCCT-3'; 以文献<sup>[10]</sup>公布的 SENV-D 型和 H 型的型特异性引物作为内引物. SENV-D 的正义引物(D10S)序列为: 5'-GTAACCTTTCGGTCAACTGCC-3'; SENV-H 的正义引物(C5S)序列为: 5'-GGTGCCCCTWGTAGTTGGCGGTT-3'; SENV-D 和 H 型的共用反义引物(L2AS)序列为: 5'-CCTCGGTTKSAAAGTYTGATAGT-3'. SENV-D 产物的理论大小为 224 bp. SENV-H 产物的理论大小为 230 bp. 引物由大连宝生物工程有限公司合成. 在血清 50 μL 中加入裂解液 120 μL, 混匀后 61.8 °C 水浴 30 min, 加入重蒸酚 150 μL 及仿醇 50 μL 混匀 10 000 r/min 离心 10 min, 吸上清 160 μL, 经醋酸钠乙醇溶液 250 μL -30 °C 冷冻沉淀 30 min 后, 以 15 000 r/min × 10 min 离心, 除上清, 700 mL/L 乙醇洗涤 1 次, 室温风干, 去离子水 5 μL 重悬浮, 作为 PCR 模板. 第 1 次 PCR 反应体系含 DNA 提取液 5 μL、dNTP 200 μmol/L, Taq DNA 聚合酶 2U、外引物各为

0.5 μmol/L 及 1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>. 扩增条件为 94 °C 3 min 预变性, 然后 94 °C 45 s 变性, 55 °C 30 s 退火, 72 °C 45 s 延伸, 共 35 个循环, 再 72 °C 延伸 7 min. 取扩增产物 2 μL 作为模板, 改换内引物, 同条件进行第 2 次 PCR. 取扩增产物 10 μL 进行琼脂糖凝胶电泳, 透射紫外灯下与 DNA Marker 比对, 观察结果. 取阳性第 2 次 PCR 片段切胶纯化, 分装 2 个 0.5 mL 离心管, 一管直接测序用, 另一管按 T 载体产品说明书操作进行连接反应, 反应液转化大肠杆菌 DH<sub>5</sub>α 感受态细胞. 经蓝白斑试验, 挑选白色菌落, 用 PCR 方法鉴定阳性克隆, 按试剂盒要求小剂量制备质粒 DNA 作为模板. 采用 M13 (-47) 通用引物, 按 PE 公司 BigDye Terminator Reaction Kit V2.0 测序试剂盒说明书, 在 ABI Prism 3100 Genetic Analyzer 上进行测序. 将阳性血清各 1 份逐级对倍稀释检验本方法的敏感性. 选择阳性及阴性标本各 15 份, 设立 3 个平行管进行 PCR 反应来评价其特异性和重复性. 采用优化后的巢式 PCR 方法分别对健康成人 192 例、急性甲肝患者 48 例、慢性乙肝患者 176 例、慢性丙肝患者 98 例和非甲-戊型肝炎患者 38 例的血清进行 SENV D 型和 H 型 DNA 的检测. 每批设空白对照 1 份、阳性对照(3 次 PCR 反应均为阳性的血清标本)1 份、阴性对照(3 次 PCR 反应均为阴性的血清标本)2 份. 随机选择 5 例 SENV D 型和 5 例 SENV H 型阳性 PCR 产物直接测序进行 DNA 序列分析.

统计学处理 组间数据比较用  $\chi^2$  检验.

## 2 结果

SENV D 和 H 型阳性产物分子大小与设计相符, SENV D 型约为 224 bp, SENV H 型约为 230 bp(图 1).

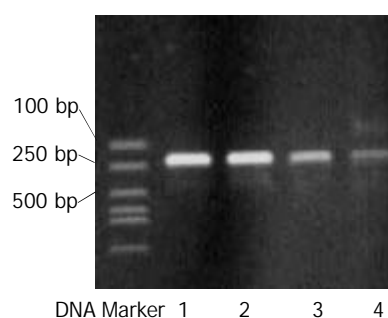


图 1 SENV DNA PCR 产物电泳图. 1: D 型阳性标本(224 bp); 2: H 型阳性标本(230 bp); 3: D 型标本稀释 2<sup>4</sup> 倍的阳性 PCR 产物; 4: H 型标本稀释 2<sup>5</sup> 倍的阳性 PCR 产物.

表 1 SENV D 型深圳株与 GeneBank 主要分离株的核苷酸同源性分析(%)

	SZ-6	AB059352	AX025730	AB075263	AY072045
AY072045	88.9	82.3	84.3	90.9	***
AB075263	88.4	82.8	85.4	***	
AX025730	82.8	98.0	***		
AB059352	80.3	***			
SZ-6	***				

	10										20										30										40											
SZ6	G	T	A	A	C	T	T	T	G	C	G	G	T	C	A	A	C	T	G	C	C	G	C	T	G	A	C	T	T	T	C	A	A	C	A	C	C	C	G	T		
ay(0245)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
ab(0236)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	M	.	.	.	.	T	.	.	.		
ax(0273)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	C	A	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	
ab(0982)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	C	C	A	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	
	50										60										70										80											
SZ6	T	C	T	G	C	T	C	A	C	C	A	C	A	A	A	A	C	G	A	A	C	A	A	C	C	C	T	T	G	C	A	C	C	A	C	C	T	T	C	C	A	
ay(0245)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
ab(0236)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
ax(0273)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
ab(0982)	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
	90										100										110										120											
SZ6	G	G	T	G	T	T	G	C	G	C	G	A	G	C	A	G	T	A	T	A	A	C	A	G	A	T	A	T	G	A	T	A	G	G	C	T	T	C	C	C	C	
ay(0245)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
ab(0236)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	A	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
ax(0273)	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	G	A	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T
ab(0982)	.	.	C	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	G	A	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T
	130										140										150										160											
SZ6	T	T	T	A	A	C	T	A	T	A	A	C	C	C	A	T	C	A	G	A	T	C	C	A	A	A	A	A	A	A	A	C	A	A	G	C	T	A	C	A	T	
ay(0245)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
ab(0236)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	C	A	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	A	A	.	A	C	.	.	.	
ax(0273)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	A	A	.	A	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	T	.	A	A	.	.	.	
ab(0982)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	A	A	.	A	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	G	T	.	A	A	.	A	.	
	170										180										190																					
SZ6	T	A	A	A	A	A	C	A	T	T	T	G	A	A	A	A	A	T	G	G	C	T	A	T	T	A	C	T	G	C	T	C	T	C	A	G	C	A	C	A		
ay(0245)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	
ab(0236)	.	.	G	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	A	.	.	.	C	.	.	.	.	.		
ax(0273)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		
ab(0982)	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	G	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.		

图2 SENV-D型深圳株DNA序列与GeneBank主要分离株DNA序列的排序比较。

	10										20										30										40											
SZ41	A	A	C	C	G	C	A	G	C	T	G	A	C	T	T	C	A	G	G	T	T	T	C	C	G	T	T	T	T	G	C	T	C	A	C	C	A	C	A	A		
ay15369	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		
ab0628	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		
ax0288	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		
ab09253	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		
	50										60										70										80											
SZ41	A	C	T	G	A	C	A	C	C	C	T	T	G	C	T	A	C	A	C	C	T	T	C	C	A	G	G	T	A	T	T	G	C	A	T	G	A	A	G			
ay15369	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		
ab0628	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		
ax0288	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		
ab09253	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		
	90										100										110										120											
SZ41	A	G	T	A	T	T	A	C	C	C	A	G	T	A	A	T	A	G	G	C	A	C	T	T	C	T	G	C	T	T	T	A	G	A	A	A	A	C	G	G		
ay15369	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		
ab0628	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		
ax0288	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	G	.		
ab09253	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	G	.	.		
	130										140										150																					
SZ41	A	A	C	A	A	C	T	A	T	A	A	T	T	C	T	A	T	-	C	A	G	G	C	A	C	A	T	C	A	C	T	A	C	A	T	T	A	G	A	A	A	C
ay15369	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
ab0628	.	.	G	T	.	.	T	.	.	C	.	.	.	.	T	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
ax0288	.	.	G	T	.	.	T	.	.	C	.	G	.	A	A	.	G	C	.	.	A	A	.	.	.	.	A	G	A	C	.	A	.	.	.	.	.	.	.	G	T	
ab09253	.	.	G	T	.	.	T	.	.	C	.	G	.	A	A	T	G	C	.	.	A	A	.	.	.	.	A	G	A	C	.	A	.	.	.	.	.	.	G	G		
	160										170										180																					
SZ41	T	T	T	T	T	A	T	A	T	A	A	C	A	A	A	T	G	T	A	C	T	C																				
ay15369	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.																				
ab0628	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.																				
ax0288	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.																				
ab09253	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.																				

图3 SENV-H型深圳株DNA序列与GeneBank主要分离株DNA序列的排序比较。

SENV D型和H型深圳株分别与GeneBank主要分离株DNA序列比较的排序图见图2, 3. 核苷酸序列同源性比较见表1, 2.

阳性血清 1 例经  $2^4$  倍稀释, 另 1 例经  $2^5$  倍稀释仍可见清晰的扩增条带(图 1)。30 份血清 3 个平行管重复实验的结果: SENV D 型及 H 型 DNA PCR 重复实验的符合率阳性标本均为 100 % (15/15), 阴性标本均为 93.3 % (14/15)。

健康人群和肝炎患者血清中SENV D型及H型检测结果见表3。SENV的总感染率为47.8%。D和H型的总检出率分别为39.3%和38.6%。混合感染约占总感染病例的62.9%。不同人群中均以混合感染为主,混合感染率为18.2-44.9%。各组之间D或H型单独感染、混合感染和D或H型总感染率均无统计学差异。

10 份 SENV D 型和 H 型 PCR 扩增产物的序列分析的结果与直接判断的结果符合率为 100 %.

表2 SENV H型深圳株与 GeneBank 主要分离株的核苷酸同源性分析(%)

	SZ-41	AB059353	AX025838	AB075283	AY153769
AY153769	95.0	80.7	84.0	93.9	***
AB075283	90.1	85.6	89.0	***	
AX025838	80.1	95.0	***		
AB059353	77.3	***			
SZ-41	***				

表3 健康人群及肝炎患者中 SENV - D 型及 H 型的流行情况

分组	n	SENV D		SENV H		SENV D & H		总感染率 (%)
		阳性	感染率	阳性	感染率	阳性	感染率	
		n	(%)	n	(%)	n	(%)	
健康成人	192	13	6.8	11	5.7	35	18.2	30.7
急性甲肝	48	4	8.3	4	8.3	10	20.8	37.5
慢性乙肝	176	19	10.8	16	9.1	79	44.9	64.8 <sup>b</sup>
慢性丙肝	98	9	9.2	12	12.2	35	35.7	57.1 <sup>b</sup>
非甲 - 非戊	38	6	15.8	4	10.5	7	18.4	44.7

<sup>b</sup>P < 0.01, vs 健康成人.

10 份 SENV D 型和 H 型 PCR 扩增产物的序列分析的结果与直接判断的结果符合率为 100 %.

### 3 讨论

自 SEN 病毒被发现以来, 各国学者<sup>[16-20]</sup>展开了有关其流行情况和致病性的研究. 国外的大部分研究是在 Primi 博士的领导下进行的, 由 Diasorin 公司申请了专利. 我们摘录了 SENV D 和 H 型特异性引物的序列, 并自行设计了巢式 PCR 方法, 以期获得与国际同行有可比性的资料. 经 DNA 序列分析, 等比稀释等证实建立的巢式 PCR 技术有极高的敏感性、特异性和重复性.

意大利和美国的志愿献血员中 SENV - D/H 的感染率为 2 %<sup>[10, 14]</sup>, 而日本同样的人群中为 10 %<sup>[16]</sup>. 台湾健康成人的感染率为 15 %<sup>[16]</sup>. 本研究显示, 健康成人的 SENV - D/H 的感染率为 30.7 %. 该结果似乎较其他学者报道的高, 可能与本研究使用了敏感的巢式 PCR 技术有关. 但 SENV 感染可能是全球性的, 其感染率也可能存在显著的地区差异. 慢性乙肝患者和慢性丙肝患者中 SENV D 和(或)H 的感染率分别为 64.8 % 和 57.1 %, 比健康人群中的 30.7 % 高(P < 0.001), 表明 SENV 可能与 HBV 和 HCV 有相似的传播途径<sup>[16]</sup>. 而在非甲非戊患者和急性甲肝患者中的感染率分别为 44.5 % 和 37.5 %, 与健康体检人群之间无显著性差异(P > 0.05), 进一步证实 SENV D 和 H 型虽然与非甲 - 戊型肝炎联系有一定关系, 但其意义有待进行进一步研究阐明.

本研究中 D 型与 H 型混合感染的比例较高, 与国外报道的结果有较大差异<sup>[16]</sup>, 其原因可能与该地区 SENV 感染率高, 合并感染和重叠感染机会较大有关. 也不排除是由于单链环型 DNA 病毒的聚合酶缺乏效对

功能而引起的准种现象. 如果是这样的话, SENV 的基因分型方法有待进一步改良.

### 4 参考文献

- Alter HJ, Bradley DW. Non-A, non-B hepatitis unrelated to the hepatitis C virus (non-ABC). *Semin Liver Dis* 1995;15:110-120
- Alter MJ, Margolis HS, Krawczynski K, Judson FN, Mares A, Alexander WJ, Hu PY, Miller JK, Gerber MA, Sampliner RE. The natural history of community-acquired hepatitis C in the United States. The sentinel counties chronic non-A, non-B hepatitis study team. *N Engl J Med* 1992;327:1899-1905
- Kodali VP, Gordon SC, Silverman AL, McCray DG. Cryptogenic liver disease in the United States: further evidence for non-A, non-B, and non-C hepatitis. *Am J Gastroenterol* 1994;89:1836-1839
- Linnen J, Wages J Jr, Zhang-Keck ZY, Fry KE, Krawczynski KZ, Alter H, Koonin E, Gallagher M, Alter M, Hadziyannis S, Karayiannis P, Fung K, Nakatsuji Y, Shih JW, Young L, Piatak M Jr, Hoover C, Fernandez J, Chen S, Zou JC, Morris T, Hyams KC, Ismay S, Lifson JD, Kim JP. Molecular cloning and disease association of hepatitis G virus: a transfusion-transmissible agent. *Science* 1996;271:505-508
- Simons JN, Leary TP, Dawson GJ, Pilot-Matias TJ, Muerhoff AS, Schlauder GG, Desai SM, Mushahwar IK. Isolation of novel virus-like sequences associated with human hepatitis. *Nat Med* 1995;1:564-569
- Nishizawa T, Okamoto H, Konishi K, Yoshizawa H, Miyakawa Y, Mayumi M. A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;241:92-97
- Alter HJ, Nakatsuji Y, Melpolder J, Wages J, Wesley R, Shih JW, Kim JP. The incidence of transfusion-associated hepatitis G virus infection and its relation to liver disease. *N Engl J Med* 1997;336:747-754
- Naoumov NV, Petrova EP, Thomas MG, Williams R. Presence of a newly described human DNA virus (TTV) in patients with liver disease. *Lancet* 1998;352:195-197
- Matsumoto A, Yeo AE, Shih JW, Tanaka E, Kiyosawa K, Alter HJ. Transfusion-associated TT virus infection and its relationship to liver disease. *Hepatology* 1999;30:283-288
- Primi D, Fiordalisi G. International patent number WO0028039 (<http://ep.espacenet.com/>)
- Tanaka Y, Primi D, Wang RY, Umemura T, Yeo AE, Mizokami M, Alter HJ, Shih JW. Genomic and molecular evolutionary analysis of a newly identified infectious agent (SEN virus) and its relationship to the TT virus family. *J Infect Dis* 2001;183:359-367
- Bowden S. New hepatitis viruses: contenders and pretenders. *J Gastroenterol Hepatol* 2001;16:124-131
- Umemura T, Tanaka Y, Kiyosawa K, Alter HJ, Shih JW. Observation of positive selection within hypervariable regions of a newly identified DNA virus (SEN virus)(I). *FEBS Lett* 2002;510:171-174
- Umemura T, Yeo AE, Sottini A, Moratto D, Tanaka Y, Wang RY, Shih JW, Donahue P, Primi D, Alter HJ. SEN virus infection and its relationship to transfusion-associated hepatitis. *Hepatology* 2001;33:1303-1311
- 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》. 中华传染病杂志 2001;19:56-64
- Kao JH, Chen W, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. Prevalence and implication of a newly identified infectious agent (SEN virus) in Taiwan. *J Infect Dis* 2002;185:389-392
- Shibata M, Wang RY, Yoshida M, Shih JW, Alter HJ, Mitamura K. The presence of a newly identified infectious agent (SEN virus) in patients with liver diseases and in blood donors in Japan. *J Infect Dis* 2001;184:400-404
- Schroter M, Laufs R, Zollner B, Knodler B, Schafer P, Sterneck M, Fischer L, Feucht HH. Prevalence of SENV-H viraemia among healthy subjects and individuals at risk for parenterally transmitted diseases in Germany. *J Viral Hepat* 2002;9:455-459
- Umemura T, Alter HJ, Tanaka E, Yeo AE, Shih JW, Orii K, Matsumoto A, Yoshizawa K, Kiyosawa K. Association between SEN virus infection and hepatitis C in Japan. *J Infect Dis* 2001;184:1246-1251
- Wilson LE, Umemura T, Astemborski J, Ray SC, Alter HJ, Strathdee SA, Vlahov D, Thomas DL. Dynamics of SEN virus infection among injection drug users. *Infect Dis* 2001;184:1315-1319

# 肝病患者血清 IGF-I 和 IGF-II 的变化

邵静鸣, 俞丽芬, 张曙, 吴云林

邵静鸣, 昆山市第二人民医院消化科 江苏省昆山市 215300  
俞丽芬, 张曙, 吴云林, 上海第二医科大学附属瑞金医院消化科  
上海市 200025  
邵静鸣, 男, 1963-06-30 生, 浙江省湖州, 汉族. 1983 年扬州医学院毕业,  
主治医师.  
日本 Asahi 医学发展项目基金资助  
项目负责人: 吴云林, 200025, 上海市瑞金二路 197 号, 上海市瑞金医院消  
化科. graceyu1028@sohu.com  
电话: 021-64370045-665260 传真: 021-64150773  
收稿日期: 2003-03-07 接受日期: 2003-04-03

## Serum levels of insulin-like growth factor (IGF)-I and II in patients with liver diseases

Jing-Ming Shao, Li-Fen Yu, Shu Zhang, Yun-Lin Wu

Jing-Ming Shao, Department of Gastroenterology, Kunshan Second  
Hospital, Kunshan 215300, Jiangsu Province, China  
Li-Fen Yu, Shu Zhang, Yun-Lin Wu, Department of Gastroenterology,  
Ruijin Hospital, Shanghai Second Medical University, Shanghai 200025, China  
Supported by the Asahi Medical Development Fund of Japan  
Correspondence to: Dr. Li-Fen Yu, Department of Gastroenterology,  
Ruijin Hospital, Shanghai Second Medical University, 200025, Shanghai,  
China. graceyu1028@sohu.com  
Received: 2003-03-07 Accepted: 2003-04-03

## Abstract

AIM: To investigate the serum levels and their clinical significance of insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF-II in patients of liver diseases.

METHODS: 89 patients with liver diseases were divided into three groups. hepatitis ( $n=10$ ), cirrhosis ( $n=66$ ) and liver cancer ( $n=13$ ) group. 38 healthy people were served as control group. The serum levels of IGF-I and IGF-II were measured by RIA.

RESULTS: The serum levels of IGF-I and IGF-II in cirrhotic group ( $65 \pm 14$  mg/L,  $328 \pm 86$  mg/L, respectively) and cancer group ( $49 \pm 14$  mg/L,  $194 \pm 61$  mg/L, respectively) were significantly lower than controls ( $261 \pm 75$  mg/L,  $1094 \pm 119$  mg/L, respectively). In cirrhotic patients, IGF-I and IGF-II were significantly higher in Child A than those in Child B/C ( $P < 0.05$ , respectively). The concentrations of IGF-I and IGF-II correlated significantly with different etiology of cirrhosis ( $P < 0.05$ , respectively).

CONCLUSION: The serum level of IGF-II, as well as that of IGF-I, was an important index to assess the liver function of patients with cirrhosis or liver cancer.

Shao JM, Yu LF, Zhang S, Wu YL. Serum levels of insulin-like growth factor (IGF)-I and II in patients with liver diseases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(10):1544-1546

## 摘要

目的: 为了研究肝病患者血清 IGF-I、IGF-II 水平的变化及其临床意义。

方法: 将 89 位肝病患者分成三组, 其中肝炎组 10 例, 肝硬化组 66 例, 肝癌组 13 例; 另设对照组 38 例. 应用放射免疫法测定患者血清 IGF-I、IGF-II 的含量。

结果: 肝硬化患者组血清 IGF-I、IGF-II 的测值分别为  $65 \pm 14$  mg/L,  $328 \pm 86$  mg/L; 肝癌组为  $49 \pm 14$  mg/L,  $194 \pm 61$  mg/L; 两组测值均显著低于对照组 ( $261 \pm 75$  mg/L,  $1094 \pm 119$  mg/L). 肝硬化 Child A 级患者的血清 IGF-I、IGF-II 水平较 Child B/C 级患者均明显增高 ( $P < 0.05$ ). 血清 IGF-I、IGF-II 值在不同病因的肝硬化患者之间亦存在显著差异 ( $P < 0.05$ ).

结论: 与 IGF-I 一样, 血清 IGF-II 水平的测定同样可作为评价肝硬化、肝癌患者肝功能状况的一项重要指标。

邵静鸣, 俞丽芬, 张曙, 吴云林. 肝病患者血清 IGF-I 和 IGF-II 的变化. 世界华人消化杂志 2003;11(10):1544-1546

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1544.asp>

## 0 引言

血清胰岛素样生长因子 (Insulin-like growth factor, IGF)-I 是由 70 个氨基酸组成的多肽, IGF-II 是由 67 个氨基酸组成的多肽, 在结构和功能与胰岛素相似, 可促进细胞的增生和生长, 在人体的分化和发育过程中起重要作用<sup>[1,2]</sup>. 肝病患者血清 IGF-I 和 IGF-II 的水平较正常人群低<sup>[3,4]</sup>, IGF-I 作为肝功能不良的早期标志物和 / 或判断肝硬化患者生存期的指标<sup>[5-7]</sup>, 结果显示血清 IGF-I 水平与肝患者的营养程度、内分泌等因素密切相关, 其正常值的范围较广, 在正常人群中的数值分布与年龄呈负相关; IGF-I 水平的高低与 Child-pugh 分级有显著的相关关系. 通过重组人生长激素 (rhGH) 刺激后的 IGF-I 测定, 能显著地提高对患者生存期预测的准确性<sup>[8-12]</sup>. 当研究的重点转移到肝硬化患者对特异性的 IGF 结合蛋白的效应时<sup>[13-18]</sup>, 仍然忽视了 IGF-II 的价值. 我们选择了病毒性肝炎、肝硬化和肝癌三种不同的肝病患者, 并以健康志愿者作为对照, 分别进行血清 IGF-I 和 IGF-II 水平的测定, 旨在探索 IGF-II 在不同类型的肝病患者血清中的浓度变化, 其与肝功能状态的相关程度及临床潜在价值。

## 1 材料和方法

1.1 材料 肝病患者 89 例, 其中慢性乙型肝炎患者 10 例(男 8 例, 女 2 例), 年龄 21-41(平均 26)岁; 肝硬化患者 66 例(男 47 例, 女 19 例), 年龄 38-83(平均 57)岁; 肝癌患者 13 例(均为男性), 年龄 46-61(平均 52)岁. 诊断符合 1995 年全国传染病与寄生虫病学术会议的诊断标准, 慢性乙型肝炎、肝硬化和肝癌的诊断均经肝组织活检、B 超和 CT 证实. 健康对照组 38 例从体检者中获得(排除肝脏疾患), 男女各 19 例, 年龄 36-60 (平均 48 岁). IGF-I 试剂盒, 法国 BECKMAN COULTER 公司产品; IGF-II 试剂盒, 美国 DSL 公司产品.

1.2 方法 所有患者均询问病史, 进行常规体检和相关实验室检查(包括肝、肾功能、凝血酶元时间、血氨、AFP)以及 B 超、CT 检查等. 清晨空腹采静脉血 3 ml, 常规离心分离血清, 置于 -40 °C 低温冰箱保存待测. 标本处理及测试步骤均严格参照试剂说明书, 运用放射免疫法测定血清中 IGF-I 和 IGF-II 的含量(mg/L), 其中 IGF-II 测值根据说明书要求取 log B/T 值.

统计学处理 用 SPSS 软件进行统计处理. 计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示; 各组均数间的差异比较用方差分析法检验; 血氨值与 IGF-I 和 IGF-II 之间的关系用相关分析法检验; 各组临床症状、体征与 IGF-I 和 IGF-II 值的关系用 t 检验.

## 2 结果

2.1 肝病患者血清 IGF-I 和 IGF-II 水平 肝硬化和肝癌组患者的 IGF-I、IGF-II 明显低于健康对照组( $P < 0.001$ ), 也明显低于慢性肝炎组( $P < 0.01$ , 表 1). 肝炎组与健康对照组相比, 其测值无显著差异( $P > 0.05$ ).

表 1 肝病患者血清 IGF-I 和 IGF-II 测值的比较( $\bar{x} \pm s$ , mg/L)

分组	<i>n</i>	IGF-I	IGF-II
肝炎	10	241 ± 61	985 ± 111
肝硬化	66	65 ± 14	328 ± 86
肝癌	13	49 ± 14	194 ± 61
对照	38	260 ± 75	1 094 ± 119

2.2 肝硬化肝功能分级与 IGF-I 和 IGF-II 水平的关系 Child A 级与 Child B/C 级患者的 IGF-I 和 IGF-II 水平均有显著性差异( $P < 0.01$ , 表 2). 而 Child B 级与 Child C

级间患者的 IGF-I 和 IGF-II 水平无明显差异( $P > 0.05$ ). IGF-I 和 IGF-II 在有黄疸/肝掌的患者中较低, 而没有黄疸/肝掌体征的患者却有较高水平的表达( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ , 表 3). 有蜘蛛痣的患者其 IGF-II 表达较少, 与无蜘蛛痣的患者间存在显著的差异( $P < 0.05$ ). 其他临床症状和体征的有无, 未见明显差异. 血氨大于 184 mmol/L 组的 IGF-I 为 54 ± 18 mg/L, IGF-II 为 293 ± 68 mg/L; 血氨 184 mmol/L 组的 IGF-I 为 74 ± 22 mg/L, IGF-II 为 338 ± 101 mg/L, 两组间无明显差异( $P > 0.05$ ). 血氨值与 IGF-I 的相关分析结果为  $r = -0.43$  ( $P < 0.05$ ), 与 IGF-II 的相关分析结果为  $r = -0.47$  ( $P < 0.05$ ).

表 2 肝硬化患者的 Child-pugh 分级及相应的 IGF-I、IGF-II 水平比较( $\bar{x} \pm s$ , mg/L)

肝硬化组	<i>n</i>	IGF-I	IGF-II
Child A 组	18	117 ± 31	497 ± 130
Child B 组	31	53 ± 18	340 ± 83
Child C 组	17	29 ± 8	206 ± 61

2.3 肝硬化病因与 IGF-I 和 IGF-II 水平的关系 病毒性肝炎后与血吸虫性、酒精性及其他 3 组比较, IGF-I 和 IGF-II 水平均显著降低( $P < 0.01$ ).

## 3 讨论

Okan et al<sup>[13]</sup>发现 IGF-I 和 IGF-Bp3 与肝脏炎症的严重程度、纤维化或转氨酶活性无相关. 慢性肝炎患者 IGF-I 和 IGF-Bp3 水平与肝硬化患者有一定的差异, 在慢性肝炎进展为肝硬化之前血清 IGF-I 有高水平表达. Hayakawa et al<sup>[19]</sup>发现血清 IGF-II 在慢性肝炎、肝硬化和原发性肝癌的表达均比正常组明显减少. 我们的实验结果显示肝炎组与健康对照组相比, IGF-I 和 IGF-II 水平无明显降低 ( $P > 0.05$ ); 而肝硬化组和肝癌组的 IGF-I 和 IGF-II 测值明显低于健康对照组( $P < 0.001$ ), 与慢性肝炎组也有显著差异( $P < 0.01$ ). IGF 家族包括 IGF-I、IGF-II、IGF-1R 和 IGF-BPs, 在肝癌的发生发展中起了重要的作用<sup>[20-23]</sup>. IGF-II 在肝癌中有较高的表达, 但是关于 IGF-II 的致癌机制, 目前仍不十分清楚, 比较一致的观点是肝癌细胞能分泌大量的 IGF-II, 直接作用于自身或邻近细胞的 IGF-II 受体, 产生胞质内短路循环, 加速或放大了细胞的 IGF-II 持续生长信号

表 3 肝硬化患者临床症状体征与 IGF-I 和 IGF-II 的关系 ( $\bar{x} \pm s$ , mg/L)

<i>n</i>	乏力		腹胀		巩膜黄染		蜘蛛痣		肝掌	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
	51	15	54	12	21	45	36	30	51	15
IGF-I	54 ± 18	68 ± 19	63 ± 18	72 ± 19	51 ± 16 <sup>a</sup>	71 ± 18	66 ± 17	64 ± 18	57 ± 16 <sup>b</sup>	91 ± 24
IGF-II	333 ± 80	311 ± 64	326 ± 85	365 ± 69	274 ± 60 <sup>a</sup>	354 ± 87	294 ± 72 <sup>a</sup>	370 ± 90	304 ± 72 <sup>a</sup>	410 ± 84

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$ , vs (-).



的传递. 我们测定的13例肝癌患者, 其IGF-II水平未见明显增高. Fan et al 认为IGF-II和IGF-II mRNA在慢性肝炎、肝硬化和肝癌中均有不同程度的表达, 阳性率依次为: 慢性肝炎(33.3%) < 肝癌(66.7%) < 肝硬化(72.0%), 但在肝细胞再生结节、肝细胞不典型增生及分化较差的肝癌细胞中IGF-II和IGF-II mRNA表达最为显著. 提示IGF-II和IGF-IIR在肝细胞癌变的早期阶段即有表达, IGF-II和IGF-IIR在肝细胞癌变演化过程中起重要作用.

Kratzsch et al 认为肝硬化患者血清中IGF-I ( $r = -0.64$ ,  $P < 0.001$ ) 或IGF-Bp3 ( $r = -0.67$ ,  $P < 0.001$ ) 水平与Child-Pugh分级密切相关, 肝硬化患者血清中IGF-I水平较正常人显著减少. 但Nikolic et al的试验显示血清IGF-I水平与肝硬化患者的Child-Pugh分级无明显相关, IGF-II与Child-Pugh分级有相关( $P = 0.007$ ), 血清IGF-II在Child A组的水平较Child B/C组明显增高. 从本研究结果可见Child B/C组患者的血清IGF-II水平较Child A组明显下降, 与Child A组的测值之间有显著性差异( $P < 0.01$ ). 而Child B组与Child C组间患者的IGF-I、IGF-II水平无明显差异( $P > 0.05$ ). 提示血清IGF-II水平也能判断肝病患者的肝功能状况. Nikolic et al 又将肝硬化的患者按发病原因分成酒精性( $n = 27$ )、病毒性( $n = 17$ )和其他( $n = 21$ )3组, 不同病因之间二者的测值无显著差异, 所以血清IGF-I、IGF-II水平与肝硬化病因之间无相关. 而本研究发现, 肝炎后肝硬化组的IGF-I和IGF-II水平均较其他病因导致的肝硬化明显降低, 有显著性差异( $P < 0.05$ ). 提示血清IGF-I和IGF-II水平在病毒性肝硬化患者中可能具有一定的特异性. 肝硬化的严重程度与其临床症状密切相关, 目前尚未见国内外有评价血清IGF-I、IGF-II水平与肝硬化患者相应临床症状、体征关系的类似报道. 我们发现, 一些特异性的肝硬化症状、体征, 如黄疸、蜘蛛痣和肝掌的有无与血清IGF-I、IGF-II水平相关( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ).

我们将肝病患者的血氨值与血清IGF-I和IGF-II水平进行比较发现, 血氨浓度大于正常值上限的组其IGF-I和IGF-II水平与血氨浓度正常组相比, 二者之间无明显差异( $P > 0.05$ ), 但血氨与血清IGF-I和IGF-II水平呈负相关.

#### 4 参考文献

- 1 Skrtic S, Wallenius K, Sjogren K, Isaksson OG, Ohlsson C, Jansson JO. Possible roles of insulin-like growth factor in regulation of physiological and pathophysiological liver growth. *Horm Res* 2001;55(Suppl 1):1-6
- 2 Thorgeirsson SS, Grisham JW. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Nat Genet* 2002;31:339-346
- 3 Donaghy AJ, Delhanty PJ, Ho KK, Williams R, Baxter RC. Regulation of the growth hormone receptor/binding protein, insulin-like growth factor ternary complex system in human cirrhosis. *J Hepatol* 2002;36:751-758
- 4 Lou M, Song N, Jin X, Luo SQ, Wang JJ. Detection of serum free insulin-like growth factor 1 in patients with chronic viral hepatitis. *Zhonghua Shiyan He Linchuang Bingduxue Zazhi* 2001;15:291-292
- 5 Mazziotti G, Sorvillo F, Morisco F, Carbone A, Rotondi M, Stornaiuolo G, Precone DF, Cioffi M, Gaeta GB, Caporaso N, Carella C. Serum insulin-like growth factor I evaluation as a useful tool for predicting the risk of developing hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C virus-related cirrhosis: a prospective study. *Cancer* 2002;95:2539-2545
- 6 Min J, Yu H, Yan H, He L, Liu H, Zhao C. The growth hormone and insulin-like growth factors axis in liver failure patients. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2001;9(Suppl):76-78
- 7 Stuver SO, Kuper H, Tzonou A, Lagiou P, Spanos E, Hsieh CC, Mantzoros C, Trichopoulos D. Insulin-like growth factor 1 in hepatocellular carcinoma and metastatic liver cancer in men. *Int J Cancer* 2000;87:118-121
- 8 Assy N, Hochberg Z, Enat R, Baruch Y. Prognostic value of generation of growth hormone-stimulated insulin-like growth factor-I (IGF-I) and its binding protein-3 in patients with compensated and decompensated liver cirrhosis. *Dig Dis Sci* 1998;43:1317-1321
- 9 Wallace JD, Abbott-Johnson WJ, Crawford DH, Barnard R, Potter JM, Cuneo RC. GH treatment in adults with chronic liver disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled, cross-over study. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:2751-2759
- 10 Castilla-Cortazar I, Aliaga-Montilla MA, Salvador J, Garcia M, Delgado G, Gonzalez-Baron S, Quiroga J, Prieto J. Insulin-like growth factor-I restores the reduced somatostatinergic tone controlling growth hormone secretion in cirrhotic rats. *Liver* 2001;21:405-409
- 11 Sevette A, Kee AJ, Carlsson AR, Baxter RC, Smith RC. Parenteral nutrition with lipid or glucose suppresses liver growth and response to GH in adolescent male rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001;281:E1063-1072
- 12 Bussieres L, Souberbielle JC, Pinto G, Adan L, Noel M, Brauner R. The use of insulin-like growth factor 1 reference values for the diagnosis of growth hormone deficiency in prepubertal children. *Clin Endocrinol* 2000;52:735-739
- 13 Okan A, Comlekci A, Akpinar H, Okan I, Yesil S, Tankurt E, Simsek I. Serum concentrations of insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor binding protein-3 in patients with chronic hepatitis. *Scand J Gastroenterol* 2000;35:1212-1215
- 14 Fernandez-Rodriguez CM, Prada I, Andrade A, Moreiras M, Guitian R, Aller R, Lledo JL, Cacho G, Quiroga J, Prieto J. Disturbed synthesis of insulinlike growth factor I and its binding proteins may influence renal function changes in liver cirrhosis. *Dig Dis Sci* 2001;46:1313-1320
- 15 Nedic O, Nikolic JA, Hajdukovic-Dragojlovic L, Todorovic V, Masnikosa R. Alterations of IGF-binding proteins in patients with alcoholic liver cirrhosis. *Alcohol* 2000;21:223-229
- 16 Gong Y, Cui L, Minuk GY. The expression of insulin-like growth factor binding proteins in human hepatocellular carcinoma. *Mol Cell Biochem* 2000;207:101-104
- 17 Jeschke MG, Herndon DN, Barrow RE. Insulin-like growth factor I in combination with insulin-like growth factor binding protein 3 affects the hepatic acute phase response and hepatic morphology in thermally injured rats. *Ann Surg* 2000;231:408-416
- 18 Weber MM, Auernhammer CJ, Lee PD, Engelhardt D, Zachoval R. Insulin-like growth factors and insulin-like growth factor binding proteins in adult patients with severe liver disease before and after orthotopic liver transplantation. *Horm Res* 2002;57:105-112
- 19 Hayakawa T, Kondo T, Shibata T, Kitagawa M, Ono H, Sakai Y, Kato K, Katada N, Sugimoto Y, Takeichi M. Serum insulin-like growth factor II in chronic liver disease. *Dig Dis Sci* 1989;34:338-342
- 20 Ng IO, Lee JM, Srivastava G, Ng M. Expression of insulin-like growth factor II mRNA in hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 1998;13:152-157
- 21 Le Roith D, Karas M, Yakar S, Qu BH, Wu Y, Blakesley VA. The role of the insulin-like growth factors in cancer. *Isr Med Assoc J* 1999;1:25-30
- 22 Scharf JG, Dombrowski F, Ramadori G. The IGF axis and hepatocarcinogenesis. *Mol Pathol* 2001;54:138-144
- 23 Scharf JG, Schmidt-Sandte W, Pahernik SA, Ramadori G, Bräulke T, Hartmann H. Characterization of the insulin-like growth factor axis in a human hepatoma cell line (PLC). *Carcinogenesis* 1998;19:2121-2128

# ERCP对儿童胰腺炎的诊断与治疗价值

李兆申, 许国铭, 施新岗, 邹晓平, 金震东, 孙振兴

李兆申, 许国铭, 施新岗, 邹晓平, 金震东, 孙振兴, 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  
李兆申, 男, 1956-10-13生, 河北省宁晋县人, 汉族. 硕士, 内科教研室主任, 消化内科主任, 主任医师, 教授, 博士生导师.  
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. zhsl@81890.net  
电话: 021-25072069  
收稿日期: 2002-12-23 接受日期: 2003-03-12

## Diagnostic and therapeutic value of ERCP in children with pancreatitis

Zhao-Shen Li, Guo-Ming Xu, Xin-Gang Shi, Xiao-Ping Zou, Zhen-Dong Jin, Zhen-Xing Sun

Zhao-Shen Li, Guo-Ming Xu, Xin-Gang Shi, Xiao-Ping Zou, Zhen-Dong Jin, Zhen-Xing Sun, Department of Gastroenterology of Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China  
Correspondence to: Zhao-Shen Li, Department of Gastroenterology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, 174 Changhai Lu, Shanghai 200433, China. zhsl@81890.net  
Received: 2002-12-23 Accepted: 2003-03-12

## Abstract

AIM: To explore the diagnostic and therapeutic value of endoscopic retrograde cholangiopancreatography (ERCP) in children with pancreatitis.

METHODS: 27 children with pancreatitis treated with ERCP from Feb 1997 to Feb 2002 were analyzed retrospectively. They included 9 boys and 18 girls ranging in age from 4 to 17 years ( $14.8 \pm 2.9$ ). Fourteen patients suffered from acute pancreatitis (AP) and thirteen from chronic pancreatitis (CP).

RESULTS: Diagnostic ERCP was done in 9 patients and therapeutic ERCP in 18. The ERCP findings were as follows: The morbidity of biliary tract disease was 7.7 % in CP group, while it was 95.7 % in AP group ( $P < 0.05$ ). 61.5 % of CP group had no definite etiology, higher than the 7.1 % in the AP group. ERCP showed that 76.9 % had pancreatic duct dilatation in CP group, much higher than the 14.2 % in AP group. The incidence of common bile duct stricture or/and dilatation, choledocholith were 49.7 %, 35.7 % respectively in AP group, while none in CP group. In the following 6 to 68 months after ERCP, 92.6 % had no recurrent pancreatitis or abdominal pain. After a second ERCP intervention in 2 patients with recurrent abdominal pain, none had abdominal pain any more. The overall ERCP related morbidity was 51.85 %, including hyperamylasemia in 6 cases (22.2 %), pancreatitis in 6 (22.2 %), and hemorrhage from papillosphincterotomy in 2 (7.4 %).

CONCLUSION: Diagnostic and therapeutic ERCP had significant clinical improvement in children with pancreatitis, but had a much higher complication rate in children than in adults, mostly associated with therapeutic procedures.

Therefore, more precautions should be given to pediatric patients in doing ERCP to decrease the adverse events.

Li ZS, Xu GM, Shi XG, Zou XP, Jin ZD, Sun ZX. Diagnostic and therapeutic value of ERCP in children with pancreatitis. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003;11(10):1547-1549

## 摘要

目的: 探讨儿童胰腺炎ERCP的影像学特点及其对儿童胰腺炎的诊断、治疗价值。

方法: 回顾分析 1997-02/2002-02 间于我科行 ERCP 的 27 例儿童胰腺炎患者临床资料。其中, 急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)14 例, 慢性胰腺炎(chronic pancreatitis, CP)13 例。

结果: 诊断性 ERCP 9 例, 治疗性 ERCP 18 例。CP 组胆道疾病发病率 7.7 %, 显著低于 AP 组 95.7 % ( $P < 0.05$ )。CP 组原因不明占 61.5 %, 显著高于 AP 组 7.1 % ( $P < 0.05$ )。ERCP 特点: AP 组胰管扩张发生率 14.2 %, 显著低于 CP 组 76.9 % ( $P < 0.01$ )。AP 组胆总管狭窄/扩张、胆总管结石发生率分别为 49.7 %、35.7 %, 显著高于 CP 组, CP 组未见胆总管狭窄/扩张及胆总管结石。ERCP 后高淀粉酶血症 6 例(22.2 %), 胰腺炎发作 6 例(22.2 %), 均为轻症胰腺炎, 乳头切开处出血、黑便发生率 7.4 % (2/27), 均发生于胆总管结石行十二指肠乳头括约肌切开(endoscopic sphincterotomy, EST)+ 取石术后。诊断性 ERCP 组并发症的发生率低于治疗性 ERCP 组, 但无统计学意义。经 6-68 mo 随访, 总体腹痛缓解率 25/27 (92.6 %), 2 例复发者经再次 ERCP 治疗后腹痛未再出现。

结论: 胆道疾病可能是儿童急性胰腺炎主要病因, 而慢性胰腺炎的病因不明。ERCP 能有效地消除 AP 病因, 缓解 CP 的腹痛症状。儿童患者 ERCP 后具有较高的并发症发生率, 内镜医师对此应高度重视。

李兆申, 许国铭, 施新岗, 邹晓平, 金震东, 孙振兴. ERCP 对儿童胰腺炎的诊断与治疗价值. 世界华人消化杂志 2003;11(10):1547-1549

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1547.asp>

## 0 引言

ERCP 是成人胰胆管疾病有效的诊断及治疗方法, 1970 年代末类似的诊疗方法已用于儿科胰胆管疾病患者。随着内镜医师操作技术的提高和内镜及其辅助设备的改进, 国内关于儿童胰胆疾病, 特别是胆道系统疾病的 ERCP 诊治

取得了较大的成果,但关于儿童胰腺炎的ERCP诊断及治疗经验仍很有限,目前报道极少.我院于1997-02/2002-02行ERCP诊治儿童胰腺炎患者27例,取得了满意的结果,现报告如下.

## 1 材料和方法

1.1 材料 回顾分析1997-02/2002-02我科诊断为胰腺炎并行ERCP诊治的27例儿童患者临床资料,男9例,女18例:年龄4-17岁(平均 $14.8 \pm 2.9$ 岁):AP14例,CP13例,CP组中既往有胰腺炎病史10例(76.9%):诊断性ERCP9例,治疗性ERCP18例.ERCP术前血清淀粉酶、白细胞计数、CA19-9均在正常范围内.所有患者均无饮酒史.AP诊断标准[中华外科杂志,1997;35:773]按照中华医学会外科学会胰腺外科组1996年关于AP的临床诊断和分级标准(第二次试行方案),CP诊断标准[Pancreas,1998;16:250]按照1995年日本胰腺疾病诊断标准.ERCP诊治内镜选用标准Olympus公司生产的纤维及电子十二指肠镜

1.2 方法 术前10-15 min静注地西洋、丁溴东莨菪碱或/和哌替啶:造影剂一般选用300 g/L泛影葡胺或低渗透压、非离子化造影剂:操作者均为相对固定、有一定经验的医生和护士:争取行胆管及胰管分别显影,胰管造影时控制造影次数、造影剂量及造影压力,减少胰腺腺泡显影:常规作X线摄片,ERCP影像由操作医师阅片及分析:ERCP术后常规禁食12-24 h,并予抗生素、减少胰液分泌及对症处理等.记录B超、ERCP等影像学特点及ERCP治疗方法,术后4 h、24 h检测血清淀粉酶及白细胞水平:记录恶心、呕吐、腹痛、腹部压痛等症状及体征以监测ERCP术后高淀粉酶血症、

胰腺炎、出血、穿孔等并发症的发生.仅有血清淀粉酶高于正常(大于300 U/L, Somogyi法)而无腹痛、恶心、呕吐及腹部压痛者诊断为高淀粉酶血症:高淀粉酶血症加上剧烈腹痛、恶心、呕吐、腹部压痛、白细胞增高等表现则诊断为AP.术后长期随访患者的一般情况、腹痛复发频率、程度及胰腺形态学改变等.

统计学处理 采用SPSS10.0软件实施统计,组间比较采用Fisher精确检验,  $P < 0.05$  表示差异有显著性.

## 2 结果

经ERCP、B超、CT、MRCP、内镜超声(EUS)及有关实验室等检查,病因为胆道疾病(胆囊炎、胆囊结石、胆总管结石、胆总管扩张/狭窄、胆总管囊肿等)者,CP组7.7%,显著低于AP组95.7% ( $P < 0.05$ ):原因不明者,CP组61.5%,明显高于AP组7.1% ( $P < 0.05$ ):其他如高脂血症(7.7% vs 0%)、胰腺外伤(0% vs 7.1%)、胰腺分裂(23.1% vs 0%)等两组间无显著性差异.CP组ERCP表现主要为胰管扩张/狭窄、胰管结石、胰腺假性囊肿、胰腺分裂(pancreatic divisum, PD)、胰管走行异常、胆总管狭窄、胆总管扩张、炎症、胰胆管汇流异常等.胰管扩张(14.2% vs 76.9%)、胆总管狭窄/扩张发病率(49.7% vs 0%)、胆总管结石(35.7% vs 0%)发病率,AP组与CP组有显著性差异( $P < 0.05$ ).

2.1 ERCP与B超检查 CP组胰管扩张/狭窄及胰管结石的检出率明显高于B超检查结果,有显著性差异( $P < 0.05$ ),并且ERCP检出PD 3例(表1).AP组B超、ERCP对于诊断胰管扩张、胆总管狭窄/扩张、胆总管结石、胆总管囊肿、胆囊结石无显著性差异,但B超胆囊炎症检出

表1 儿童胰腺炎CP ERCP与B超检查比较  $n(\%)$

分组	n	胰管				PD	胆总管狭窄/扩张	胆囊结石
		扩张/狭窄	结石	走行异常	假性囊肿			
ERCP	13	12 (92.3) <sup>a</sup>	7 (53.8) <sup>a</sup>	1 (7.7)	2 (15.4)	3 (23.1)	0	1 (7.7)
B超	13	6 (46.5)	0	0	2 (15.4)	0	1 (7.7)	1 (7.7)

ERCP <sup>a</sup> $P < 0.05$ , vs B超.

表2 儿童AP组ERCP与B超检查结果比较  $n(\%)$

分组	n	胰管扩张	胆总管				胆囊			胰胆管汇流异常
			狭窄	扩张	结石	囊肿	炎症	结石	炎症	
ERCP	14	2 (14.2)	1 (7.1)	7 (49.7)	5 (35.7)	4 (28.6)	1 (7.1)	3 (21.4)	0	2 (14.2)
B超	14	2 (14.2)	0	6 (42.6)	3 (21.3)	3 (21.3)	0	6 (42.7)	8 <sup>a</sup> (57.1)	0

ERCP <sup>a</sup> $P < 0.05$ , vs B超.

表3 儿童ERCP术后并发症发生率比较  $n(\%)$

分组	n	高淀粉酶血症	腹痛	恶心、呕吐	WBC ↑	胰腺炎	出血
CP	13	4 (30.8)	3 (23.1)	1 (7.7)	1 (7.7)	3 (23.1)	0
AP	14	2 (14.2)	5 (35.7)	1 (7.1)	1 (7.1)	3 (21.4)	2 (14.2)
诊断	9	1 (11.1)	1 (11.1)	0	0	1 (11.1)	0
治疗	18	5 (27.8)	7 (38.9)	2 (11.1)	2 (11.1)	5 (27.8)	2 (11.1)

率显著高于ERCP ( $P < 0.05$ ), ERCP 检出胰胆管汇流异常 2 例(表 2)。

2.2 ERCP治疗 ERCP插管成功率为100%。治疗性ERCP 主要包括EST 11例: 胰管结石网篮取出术6例: 胰管支架置入术5例: PD 分别行副乳头切开、背侧胰管狭窄探条或气囊扩张术3例、背侧胰管交通性假性囊肿行支架置入引流术1例: 十二指肠乳头括约肌气囊扩张成形术3例: 胆总管结石取石术4例: 胆总管支架置入1例。

2.3 ERCP术并发症和随访 ERCP术后总体并发症发生率为51.9% (14/27), 其中高淀粉酶血症22.2% (6/27), 一般于4-24 h内高于正常, 48-72 h后均恢复正常: 胰腺炎22.2% (6/27), 均为轻症胰腺炎, 按胰腺炎治疗后3-5 d恢复。诊断性ERCP组术后高淀粉酶血症、腹痛、恶心、呕吐、白细胞增高、AP 发生率低于治疗性ERCP术后: 乳头切开处出血、黑便7.4% (2/27), 均发生于胆总管结石行EST+取石术后, 经内镜下1:10 000 肾上腺素局部注射治疗治愈: 术后未发生重症胆道感染、穿孔、死亡等严重并发症(表3)。27例患者平均随访14.9 (3-61 mo), 3 mo 缓解率100%, 总体腹痛缓解率25/27 (92.6%)。术后腹痛、胰腺炎复发2例, 均为CP, 1例为CP, PD, 经副乳头切开后8 mo腹痛复发, 复查ERCP示胰头部胰管狭窄, 经探条扩张后腹痛消失: 另1例为胰管头部狭窄、体尾部扩张, 胰管支架置入术后25 mo腹痛复发, 复查ERCP示胰管堵塞、胰管呈全程扩张, 经更换胰管支架后腹痛消失。1例脂肪泻患者经ERCP治疗后脂肪泻消失。1例胰头部胰管狭窄超过1.5 cm, 支架置入术后随访38 mo无腹痛等不适主诉, 但于支架置入术后20 mo时行ERCP检查发现支架堵塞、体尾部胰管支架周围多枚结石, 予取石及更换支架治疗。1例胰管头部狭窄、胰尾部囊肿经胰管狭窄气囊扩张、胰尾支架置入术后随访32 mo无腹痛等不适主诉, 于术后17 mo时复查ERCP示囊肿消失, 但支架取出失败。

### 3 讨论

随着内镜及辅助设备的改进和内镜医师操作水平的提高, ERCP因其能清晰地显示胰胆管病理性改变而在儿童中开展日益增多, 如今儿童患者ERCP的适应证与成人相似, 主要为疑有胆、胰病变需要确诊及确诊为胆胰疾病需要内镜治疗者<sup>[1]</sup>。已有大量研究证明MRCP对原发或手术所致胰胆管解剖异常及胰胆管梗阻等疾病的诊断价值与ERCP相似<sup>[2-4]</sup>, Devereaux et al 认为, 尽管ERCP在诊断方面的作用正在减小, 但ERCP诊断及治疗范围却在不断扩大: Lankisch et al 认为CP的明确诊断需联合组织细胞学、胰腺功能及形态学等多种检查手段, 特别当需收集胰液及胰管细胞刷行分子生物学等检查时ERCP仍有不可替代的作用, 而且ERCP在胰胆管疾病治疗上的作用在某些情况下取代了外科手术治疗。

本研究显示儿童AP与胆道疾病关系密切, ERCP不但能明确AP病因, 如胆总管结石、胆总管囊肿、

胆总管狭窄/扩张、胰胆管汇流异常等, 而且能通过EST、十二指肠乳头括约肌气囊扩张成形、胆总管结石取石、胆总管支架置入等来解决AP发病的根本原因, 如胆总管结石、胆总管下端、壶腹部狭窄等。CP的病因未明, AP是否会转化为CP, 至今仍有争论, 本组CP中有10/13 (76.9%)曾发生过AP, 提示AP和CP似乎存在着一定的因果关系, 但这也有可能是错将CP的第一次急性发作诊断为AP, 而实际上在诊断AP时CP已存在。CP内镜治疗主要是扩张狭窄胰管、取出胰管结石, 通过使主胰管及PD背侧胰管的胰液引流通畅、降低胰管内压、增加胰腺血流灌注, 从而缓解疼痛、减缓胰腺功能的损害, 使胰腺炎发作的频率减少和严重程度减轻。

ERCP作为一种侵袭性检查手段, 存在相关的并发症, 如: 术后高淀粉酶血症、胰腺炎、胰胆管穿孔破裂、假性囊肿感染、胰胆管逆行感染、出血、支架移位等。Freeman et al 认为患者因素与操作一样是ERCP术后胰腺炎的高危因素, 而最主要相关性危险因子有: 女性、既往有ERCP后胰腺炎史、CP慢性腹痛、胆管细小(小于5 mm)、Oddi括约肌功能紊乱、胰胆管括约肌切开或气囊扩张、插管困难、反复注射造影剂、Oddi括约肌测压等。术中的机械性因素、化学性因素、胰胆管排泄力学改变、消化酶分泌异常、微生物感染、造影剂过敏、凝切时产生的热量刺激, 所有这些因素联合引起了ERCP术后高淀粉酶血症及胰腺炎。本组ERCP术后胰腺炎发生率22.2%, 与文献报道的28.5%相似, 但高于Freeman et al 报道的成人患者ERCP术后胰腺炎发生率。由于儿童ERCP术后具有较高的并发症, 因此内镜检查医师应对存在容易发生ERCP术后胰腺炎等并发症的相关危险因素应有正确的评估, 并采取合理的诊疗方法以尽量避免并发症的发生。

由于能较清楚地显示胰胆管和共同管, ERCP在国外已成为诊治CP及CP剖腹手术前第一线诊疗措施、在某些情况下已取代了外科手术治疗, 但在国内, ERCP的内镜诊疗仍只在少数大医院才能进行, 尚缺乏随机对照、双盲、大样本、多中心及具有长期疗效随访结果的研究。

### 4 参考文献

- 1 Guelrud M. Endoscopic retrograde cholangiopancreatography. *Gastrointest Endosc Clin N Am* 2001;11:585-601
- 2 Farrell RJ, Noonan N, Mahmud N, Morrin MM, Kelleher D, Keeling PW. Potential impact of magnetic resonance cholangiopancreatography on endoscopic retrograde cholangiopancreatography workload and complication rate in patients referred because of abdominal pain. *Endoscopy* 2001;33:668-675
- 3 Calvo MM, Bujanda L, Calderon A, Heras I, Cabriada JL, Bernal A, Orive V, Capelastegi A. Role of magnetic resonance cholangiopancreatography in patients with suspected choledocholithiasis. *Mayo Clin Proc* 2002;77:422-428
- 4 Adamek HE, Albert J, Breer H, Weitz M, Schilling D, Riemann JF. Pancreatic cancer detection with magnetic resonance cholangiopancreatography and endoscopic retrograde cholangiopancreatography: a prospective controlled study. *Lancet* 2000;356:190-193

# 急性胆源性胰腺炎内镜诊治疗效及安全性

王 东, 李兆申, 张文俊, 潘 雪, 孙振兴, 邹晓平

王东, 李兆申, 张文俊, 潘雪, 孙振兴, 邹晓平, 上海市第二军医大学附属长海医院消化内科 上海市 200433

王东, 男, 1972-09-01 生, 山东省泰安市人, 汉族, 1996 年青岛医学院本科毕业, 2001 年第二军医大学硕士研究生, 主治医师, 主要从事消化系统疾病临床及内镜介入治疗研究。

项目负责人: 王东, 200433, 上海市, 中国人民解放军第二军医大学附属长海医院消化内科。 wangdonglyz@hotmail.com

电话: 021-25070585

收稿日期: 2002-12-23 接受日期: 2003-01-08

## Value and safety of ERCP and endoscopic treatment for acute biliary pancreatitis

Dong Wang, Zhao-Shen Li, Wen-Jun Zhang, Xue Pan, Zhen-Xing Sun, Xiao-Ping Zou

Dong Wang, Zhao-Shen Li, Wen-Jun Zhang, Xue Pan, Zhen-Xing Sun, Xiao-Ping Zou, Department of Gastroenterology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, 200433, Shanghai, China

Correspondence to: Dr. Dong Wang, Department of Gastroenterology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, 200433, Shanghai, China. wangdonglyz@hotmail.com

Received: 2002-12-23 Accepted: 2003-01-08

## Abstract

**AIM:** To evaluate the value and safety of endoscopic retrograde cholangiopancreatography (ERCP) and endoscopic treatment in acute biliary pancreatitis.

**METHODS:** Ninety-one patients with acute biliary pancreatitis including 13 patients with severe acute biliary pancreatitis in the ERCP group underwent ERCP and endoscopic therapy. 15 patients with severe acute biliary pancreatitis were not treated by either surgery, endoscopy or early ERCP in the control group. Etiological factors, therapeutic effects and complications were observed in all the patients of the two groups.

**RESULTS:** In ERCP group, ERCP showed biliary tract disease in 56 cases, common bile duct stones in 26, cholecyst stone in 17, microcholelith in 4, cholangitis in 9, larger diverticula around the papilla in 3, papillitis in 5, pancreatic diverticulum in 2, and normal in 25. 46 cases of biliary tract disease were treated by endoscopy including papillosphincterotomy, endoscopic nasal biliary drainage and endoscopic dilatation of the accessory papilla. There were no significant differences in the recovery days of serum amylase back to normal between ERCP group ( $3.4 \pm 1.6$  d) and control group ( $4.5 \pm 2.8$  d), but the mean days of disappearance of abdominal pain ( $4.4 \pm 2.0$  d), fever ( $5.0 \pm 3.4$  d), abnormal white blood cell count ( $6.5 \pm 5.4$  d) and hospitalization ( $21.9 \pm 8.4$  d) were significantly shorter in the ERCP group than in the control group ( $8.4 \pm 6.1$  d,  $16.1 \pm 19.0$  d,  $19.1 \pm 19.3$  d,  $41.3 \pm 20.0$  d,  $P < 0.05$ ). Complication rate (53.9 %) and mortality rate (0 %) in ERCP group were lower than those of control group (80.0 %, 23.1 %  $P < 0.05$ ). 17 cases had early com-

plication (18.7 %) in ERCP group. Of them, biliary tract infection occurred in 2 cases (2.2 %), retroperitoneal pneumatosis in 1 case (1.1 %), bleeding of digestive tract in 1 case (1.1 %), deterioration of pancreatitis in 13 cases. 15 patients were cured by medication treatment. Operations were performed in one patient. One patient died.

**CONCLUSION:** ERCP and endoscopic therapy are safe and effective for patients with acute pancreatitis.

Wang D, Li ZS, Zhang WJ, Pan X, Sun ZX, Zou XP. Value and safety of ERCP and endoscopic treatment for acute biliary pancreatitis. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003;11(10):1550-1553

## 摘要

**目的:** 探讨急性胆源性胰腺炎患者内镜逆行胰胆管造影 (ERCP) 及内镜治疗的应用价值和安全性。

**方法:** 91 例次急性胆源性胰腺炎患者作 ERCP 及内镜治疗, 其中轻型胰腺炎 78 例, 重症胰腺炎 13 例。以同期保守治疗的重症胆源性胰腺炎 15 例作为实施 ERCP 的重症胰腺炎的对照组。观察患者胰腺炎的确切病因、治疗效果及并发症发生情况。

**结果:** 56 例为胆道疾患, 其中胆总管结石 26 例, 胆囊结石 17 例, 微胆石 4 例, 胆管炎 9 例。乳头旁巨大憩室 3 例, 乳头及胆总管下端炎症 5 例, 2 例次为胰管分裂, 25 例 ERCP 未见异常。46 例做了内镜下治疗, 其中内镜下十二指肠乳头括约肌切开术及取石术 21 例次, 2 例次作了副乳头切开及扩张术, 19 例次作了鼻胆管引流术。ERCP 组中重症胰腺炎的腹痛缓解天数 ( $4.4 \pm 2.0$  d), 体温正常时间 ( $5.0 \pm 3.4$  d), 白细胞正常时间 ( $6.5 \pm 5.4$  d) 及平均住院天数 ( $21.9 \pm 8.4$  d) 明显短于对照组 ( $8.4 \pm 6.1$  d,  $16.1 \pm 19.0$  d,  $19.1 \pm 19.3$  d,  $41.3 \pm 20.0$  d,  $P < 0.05$ )。淀粉酶正常时间 ( $3.4 \pm 1.6$  d) 与对照组 ( $4.5 \pm 2.8$  d) 比较无差异 ( $P > 0.05$ ), 并发症发生率 (53.9 %) 和死亡率 (0 %) 也低于对照组 (80.0 %, 23.1 %)。ERCP 后出现早期并发症 17 例 (18.7 %), 其中胆道感染 2 例 (2.2 %), 腹膜后积气 1 例 (1.1 %), 消化道大出血 1 例 (1.1 %), 胰腺炎加重 13 例。经内科保守治疗痊愈 15 例 (88.2 %), 外科手术治疗 1 例 (1.1 %), 死亡 1 例 (1.1 %)。

**结论:** 急性胆源性胰腺炎患者 ERCP 可发现确切病因, 内镜治疗是有效的, 安全的。

王东, 李兆申, 张文俊, 潘雪, 孙振兴, 邹晓平。急性胆源性胰腺炎内镜诊治疗效及安全性。世界华人消化杂志 2003;11(10):1550-1553

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1550.asp>



## 0 引言

急性胆源性胰腺炎(acute biliary pancreatitis, ABP)是消化系常见急症, 并发症(15-50 %)和死亡率(20-35 %)高, 早期诊断、采取适合的治疗措施非常重要<sup>[1, 2]</sup>. 近年来, 通过内镜逆行胆胰管造影(endoscopic retrograde cholangi-opancreatography ERCP)进行内镜下乳头括约肌切开(endoscopic sphincterotomy, EST)及内镜鼻胆管引流术(endoscopic nasobiliary drainage, ENBD), 已成为治疗的重要治疗手段<sup>[3]</sup>. ERCP 及 ENBD 可以明确 ABP 的病因, 指导采取合适的措施, 降低死亡率和并发症<sup>[4]</sup>. 我院自 2000-01/2002-01 对 91 例 ABP 患者作了 ERCP 及 ENBD, 其中的 13 例重症急性胆源性胰腺炎(severe acute biliary pancreatitis, SAP)与同期行保守治疗的 15 例 SAP 患者进行对照研究, 以探讨其应用价值及安全性如下.

## 1 材料和方法

1.1 材料 91 例 ABP 中男 49 例, 女 42 例, 年龄 18-75 (平均  $51 \pm 14$ ) 岁. 入院即刻行 CT 检查 48 例, Bakthazar A 级 15 例(31.3 %), B 级 18 例(37.5 %), C 级 8 例(16.7 %), D 级 4 例(8.3 %), E 级 3 例(6.3 %). A, B, C 级症状无好转者 72 h 内再次行 CT 检查 12 例, 其中 D、E 级 9 例, 结合 Ranson 及 APACHE II 评分, 确定 SAP 13 例, 轻型胰腺炎 78 例. 选取同期保守治疗的 15 例 SAP 为 ERCP 组中 SAP 的对照组. ERCP 组 SAP 的 Ranson 及 APACHE II 评分分别为  $3.2 \pm 0.9$  和  $9.8 \pm 2.8$ , 与对照组 SAP ( $2.8 \pm 0.9$ ,  $9.7 \pm 6.3$ ) 相比无明显差别( $P > 0.05$ ). Bakthazar CT 分级两组无差别( $P > 0.05$ ).

1.2 方法 ABP 常规给予禁食、胃肠减压、抑酶抑酸及预防感染治疗. 对伴随梗阻性黄疸、化脓性胆管炎、胆总管扩张的 SAP, 治疗 24 h 未好转, 24-72 h 内急诊 ERCP 及 ENBD. 轻型胰腺炎具有胆总管结石、胆总管扩张等 ERCP 指征者, 于症状消失、淀粉酶及白细胞正常后择期行 ERCP. ERCP 组患者术前 10-15 min 静注地西洋 5-10 mg、丁溴东莨菪碱 20 mg 和(或)哌替啶 25-50 mg. 内镜选用 Olympus JF-200、JF-230 及 JF-30 型十二指肠镜, 造影剂选用 30 g/L 泛影葡胺, 操作者均为相对固定、有一定经验的医生和护士, 争取行胆管及胰管分别显影, 胰管造影时控制造影次数(小于 3 次)、造影剂量及腺泡造影, 常规作 X 线摄片. ERCP 术后常规禁食 12-24 h, 并常规给予预防感染、补液治疗. 行 EPT 者静滴止血药. 胰管显影、术后 3 h 淀粉酶高于正常者加抑酶抑酸治疗. 观察 SAP 的腹痛缓解天数, 体温正常时间, 淀粉酶正常时间, 白细胞正常时间及平均住院天数. 详细记录 ERCP 组并发症情况及处理.

统计学处理 均数的统计采用两组完全随机化 t 检验. 率的显著性差异采用 Fisher 的精确检验.

## 2 结果

ERCP 91 例均成功. 胆总管结石 26 例, 微胆石 4 例, 单

纯胆囊结石 17 例, 胆管炎 9 例, 乳头旁巨大憩室 3 例, 胰腺分裂症 2 例, 乳头及胆总管下端炎症 5 例, 共 66 例明确了病因. 25 例 ERCP 未见异常. 对有内镜治疗指征者进行相应治疗: 有 21 例胆管结石, 1 例乳头狭窄及 3 例胆总管下端炎症患者在 ERCP 的同时施行内镜下十二指肠乳头括约肌切开术(EPT)及取石术, 19 例有胆管多发结石及碎石者作了鼻胆管引流术, 2 例次胰腺分裂症患者作了副乳头插管造影及扩张治疗. ERCP 组中 SAP 的腹痛缓解天数, 体温正常时间, 白细胞正常时间及平均住院天数明显短于对照组. 淀粉酶正常时间两组无明显差别(表 1). ERCP 组 SAP 的并发症发生率(80 % vs 54 %)和死亡率(23 % vs 0 %)明显低于对照组( $P < 0.05$ ).

表 1 两组重症胰腺炎指标比较( $d, \bar{x} \pm s$ )

ABP	腹痛缓解 <sup>a</sup>	体温正常	白细胞正常	住院	淀粉酶正常
ERCP 组	$4.4 \pm 2.0$	$5.0 \pm 3.4$	$6.5 \pm 5.4$	$21.9 \pm 8.4$	$3.4 \pm 2.8$
保守组	$8.4 \pm 6.1$	$16.1 \pm 19.0$	$19.1 \pm 19.3$	$41.3 \pm 20.0$	$4.5 \pm 2.8$

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , vs control group.

本组 ERCP 治疗后胆道感染 2 例, 腹膜后积气 1 例经内科治疗痊愈. EST 后大出血 1 例经内镜和内科保守治疗不佳, 转手术止血治愈. ABP 加重 13 例(14.3 %), 其中轻型 11 例, 重型 2 例. 1 例原为轻型胰腺炎, ERCP 术后转为重症胰腺炎后死亡. 其余均经保守治疗后痊愈.

## 3 讨论

在西方国家 BP 占胰腺炎年发病数的 34-54 %, 我国在 60 % 以上, 其次为酒精性及先天性(如胰腺分裂症)<sup>[5, 6]</sup>. ERCP 在明确病因方面有较大优势. B 超、CT 显示胆石的敏感性和特异性约为 50-70 %, 而 ERCP 诊断结石的敏感性可达 95-100 %. 本组 91 例 ERCP 检查 56 例为胆道疾患, 特别是胆道微结石可能占相当比例(文献报道 5-7 %), 常规影像学包括 ERCP 常不能确诊, 经内镜取胆汁镜检是确定诊断的惟一方法<sup>[7]</sup>. 本组微胆石 4 例, 占 6.1 %. 胰腺分裂、胰管结石及乳头旁巨大憩室亦占一定的比例, 为不可忽视的发病因素. 有胆管炎、黄疸、胆总管扩张的 BP, 或症状进行性加重, ERCP+EST 应尽早进行, 最为理想的是发病后 24 h 内施行<sup>[8, 9]</sup>. 轻症胆源性胰腺炎和临床症状好转者, 如有指征可待病情平稳后进行. 本组资料显示, 13 例 SAP 患者在发病后 4-72 h 进行 ERCP 及 EST, 可见突发释放出浓缩胆汁和脓液, 患者病情改善, 同时住院时间、并发症和死亡率显著低于常规治疗组<sup>[10, 11]</sup>. ERCP 及 EPT 具有创伤小, 操作相对较简单, 成功率高等优点<sup>[12]</sup>. 本资料表明早期 ERCP 后出现胆道感染 2 例(2.2 %), 经 ENBD 及内科保守治疗痊愈. ERCP 后胆管感染是常见的并发症, 通常是由于器械污染、向胆管内注入过量的造影剂、胆管

狭窄、胆管结石或碎石未彻底取干净引起胆汁引流不畅而致感染及败血症。本组病例提示,伴有胆管狭窄和实施碎石后的胆源性胰腺炎应特别重视,一方面尽量少注造影剂,另外要保证引流通畅。ERCP术后胆道感染病情凶险,要早期处理,最重要的是ENBD,尽快胆道减压,同时加强抗生素治疗。消化道大出血1例发生于伴有乳头旁巨大憩室、化脓性胆管炎的胰腺炎,行EST取石后出现大出血,内镜治疗及动脉插管栓塞治疗无效,转外科手术治疗痊愈。EST后出血量一般较少且为自限性,不必停止操作。大的出血多由于切割了十二指肠后动脉血管变异分支,也可能为患者伴有凝血机制障碍。此时可用乳头切开刀的凝固和混合电流予以烧灼止血,也可用内镜注射针向括约肌切开部位注射0.1 g/L肾上腺素,出血凶猛时可用金属夹止血,若仍无效应行动脉插管栓塞治疗或急诊外科手术治疗<sup>[13]</sup>。SAP多伴有梗阻性黄疸、胆道感染甚至败血症,出血危险性相对加大,应力求简单有效的操作,不可一味追求一次完全解决问题,盲目实施复杂操作。胰腺炎加重13例(14.3%),术后变为SAP死亡1例(1.1%)。该患者为轻型胆源性胰腺炎症状消失后行ERCP,距胰腺炎发病7 d,手术中乳头插管困难,反复插管多次才造影成功,未见胆总管结石,未行EPT。术后5 h出现剧烈腹痛、恶心呕吐、血淀粉酶和白细胞明显增高,并发多器官功能衰竭2 d后死亡。ERCP后胰腺炎的发生可能与插管困难,反复多次胰管显影,注入过量造影剂,对胰管开口造成机械性损伤等因素有关。多数患者仅有一过性血淀粉酶升高或伴有恶心、呕吐、腹痛及左上腹轻压痛等急性胰腺炎表现,多无腹膜炎,经3-5 d内科保守治疗可完全恢复。但有少数患者一般情况差,病情复杂,可发展成出血坏死型胰腺炎甚至死亡。应认识到急性胰腺炎是一严重的全身性疾病,要积极完善术前检查,严格选择适应证,除外ERCP检查及治疗的禁忌证。ERCP操作中,争取选择性插管,避免胰管显影。注射造影剂压力及速度均应严格控制,以显影能明确诊断即可,禁忌过量造影及腺泡显影。ERCP后,仍应进行全面的积极治疗,直至完全恢复为止。本组重症胰腺炎行ERCP及内镜治疗后未出现严重并发症,可能与严格选择适应证,尽早进行内镜干预,并由经验丰富的医师实施手术,术中尽量采取简单有效治疗措施有关<sup>[14]</sup>。

近年来,内镜介入治疗已成为急性胆源性胰腺炎的一个重要治疗手段,并取得了较为满意的效果<sup>[15-20]</sup>。2002年美国国立卫生院发布的急性胰腺炎诊疗规范和2002-03在泰国召开的亚太胃肠病学会议发布的急性胰腺炎诊治规范中均将内镜治疗列为水肿性和坏死性胆源性胰腺炎的早期治疗措施加以推荐<sup>[21]</sup>。

文献报道的ERCP术后并发症发生率差异较大,如急性胰腺炎的发生率为从0.74%到5.2%不等<sup>[22]</sup>。可能与评判标准、研究方法、患者组成、操作复杂程度及操作水平不同有关。目前认为的危险因素有插管困难、括

约肌预切开、初级ERCP医师、胰管显影剂胆管引流不畅等<sup>[23-27]</sup>。从本组情况来看,SAP患者行ERCP可发现确切病因,内镜治疗是有效的,安全的。为了减少ABP实施ERCP及内镜治疗的危险性,我们认为应注意以下方面:(1)治疗性ERCP必须由技术熟练的内镜医师操作,成功率应在90%以上;(2)ERCP时应尽量避免胰管显影;(3)在ERCP的同时进行EST,尽可能在首次内镜下完全清除胆总管内结石;(4)取石失败并估计自发排石困难者和ERCP或EST失败的患者都应立即进行手术治疗;(5)尽可能在24 h内行EST,超过72 h EST则并发症增加<sup>[32,33]</sup>。

#### 4 参考文献

- 1 Schietroma M, Carlei F, Lezoche E, Rossi M, Liakos CH, Mattucci S, Lygidakis NJ. Acute biliary pancreatitis: staging and management. *Hepatogastroenterology* 2001;48:988-993
- 2 Norton ID, Petersen BT. Interventional treatment of acute and chronic pancreatitis. Endoscopic procedures. *Surg Clin North Am* 1999;79:895-911
- 3 Shah RJ, Martin SP. Endoscopic retrograde cholangiopancreatography in the diagnosis and management of pancreatic diseases. *Curr Gastroenterol Rep* 2000;2:133-145
- 4 Ricci F, Castaldini G, de Manzoni G, Borzellino G, Rodella L, Kind R, Cordiano C. Treatment of gallstone pancreatitis: six-year experience in a single center. *World J Surg* 2002;26:85-90
- 5 Lankisch PG, Pflichthofer D, Lehnick D. Acute pancreatitis: which patient is most at risk? *Pancreas* 1999;19:321-324
- 6 Davenport M. Acute and chronic pancreatitis. *Indian J Pediatr* 2002;69:801-807
- 7 Coyle WJ, Pineau BC, Tarnasky PR, Knapple WL, Aabakken L, Hoffman BJ, Cunningham JT, Hawes RH, Cotton PB. Evaluation of unexplained acute and acute recurrent pancreatitis using endoscopic retrograde cholangiopancreatography, sphincter of Oddi manometry and endoscopic ultrasound. *Endoscopy* 2002;34:617-623
- 8 Mergener K, Baillie J. Endoscopic treatment for acute biliary pancreatitis. When and in whom? *Gastroenterol Clin North Am* 1999;28:601-613
- 9 Hagenmuller F, Keuchel M. Acute pancreatitis. Early elective endoscopic intervention. *Chirurg* 2000;71:265-268
- 10 Lightner AM, Kirkwood KS. Pathophysiology of gallstone pancreatitis. *Front Biosci* 2001;1:66-76
- 11 Scheurer U. Acute pancreatitis-ERCP/endoscopic papillotomy (EPT) yes or no? *Swiss Surg* 2000;6:246-248
- 12 Fiocca F, Santagati A, Ceci V, Donatelli G, Pasqualini MJ, Moretti MG, Speranza V, Di Giulio M, Minervini S, Sportelli G, Giri S. ERCP and acute pancreatitis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2002;6:13-17
- 13 Katsinelos P, Dimiropoulos S, Galanis I, Pilpilidis I, Amperiadis P, Katsiba D, Tsolkas P, Papaziogas B, Paroutoglou G, Papagiannis A, Vasiliadis I. Needle-knife sphincterotomy. *Surg Endosc* 2003;17:158
- 14 Enns R, Baillie J. Review article: the treatment of acute biliary pancreatitis. *Aliment Pharmacol Ther* 1999;13:1379-1389
- 15 Nitsche R, Folsch UR. Role of ERCP and endoscopic sphincterotomy in acute pancreatitis. *Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol* 1999;13:331-343
- 16 Bornman PC, Beckingham JJ, Krige JE. Gallstone pancreatitis-a critical review of current treatment strategies. *S Afr J Surg* 2000;38:97-99
- 17 Neuhaus H. Therapeutic pancreatic endoscopy. *Endoscopy* 2000;32:217-225
- 18 Aly EA, Milne R, Johnson CD. Non-compliance with national guidelines in the management of acute pancreatitis in the United Kingdom. *Dig Surg* 2002;19:192-198
- 19 Arguedas MR, Dupont AW, Wilcox CM. Where do ERCP, endoscopic ultrasound, magnetic resonance cholangiopancreatography,

- and intraoperative cholangiography fit in the management of acute biliary pancreatitis? A decision analysis model. *Am J Gastroenterol* 2001;96:2892-2899
- 20 Himel HS. Role of endoscopic retrograde cholangiopancreatography in early acute biliary pancreatitis. *Surg Endosc* 1999;13:541
- 21 Toouli J, Brooke SM, Bassi C. Guidelines for the management of acute pancreatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17(Suppl): s15-s39
- 22 Masci E, Toti G, Mariani A, Curioni S, Lomazzi A, Dinelli M, Minoli G, Crosta C, Comin U, Fertitta A, Prada A, Passoni GR, Testoni PA. Complications of diagnostic and therapeutic ERCP: a prospective multicenter study. *Am J Gastroenterol* 2001;96:417-423
- 23 Barthet M, Desjeux A, Gasmi M, Bellon P, Hoi MT, Salducci J, Grimaud JC. Early refeeding after endoscopic biliary or pancreatic sphincterotomy: a randomized prospective study. *Endoscopy* 2002;34:546-550
- 24 Hsu RK, Draganov P, Leung JW, Tarnasky PR, Yu AS, Hawes RH, Cunningham JT, Cotton PB. Therapeutic ERCP in the management of pancreatitis in children. *Gastrointest Endosc* 2000;51:396-400
- 25 Masci E, Toti G, Mariani A, Curioni S, Lomazzi A, Dinelli M, Minoli G, Crosta C, Comin U, Fertitta A, Prada A, Passoni GR, Testoni PA. Complications of diagnostic and therapeutic ERCP: a prospective multicenter study. *Am J Gastroenterol* 2001;96:417-423
- 26 Rabenstein T, Schneider HT, Bulling D, Nicklas M, Katalinic A, Hahn EG, Martus P, Ell C. Analysis of the risk factors associated with endoscopic sphincterotomy techniques: preliminary results of a prospective study, with emphasis on the reduced risk of acute pancreatitis with low-dose anticoagulation treatment. *Endoscopy* 2000;32:10-19
- 27 Nitsche R, Folsch UR. Role of ERCP and endoscopic sphincterotomy in acute pancreatitis. *Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol* 1999;13:331-343
- 28 Apel D, Riemann JF. Emergency endoscopy. *Can J Gastroenterol* 2000;14:199-203
- 29 Frakes JT. Biliary pancreatitis: a review. Emphasizing appropriate endoscopic intervention. *J Clin Gastroenterol* 1999;28: 97-109

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2003 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 封面故事 •

## 清华大学生物信息学研究所、生物信息学教育部重点实验室

1998 年清华大学信息科学技术学院和生物科学技术学院联合成立我国首家生物信息学研究所,李衍达院士为首任所长. 2002-01 在清华大学生物信息学研究所,及自动化系、生物系、计算机系、物理系等院系中进行生物信息学研究的实验室基础上,建立清华大学生物信息学教育部重点实验室.实验室第一任主任为郑纬民教授,副主任为张学工教授、刘湘军教授和孙之荣教授.

### 1 学术地位

为我国第一个生物信息学重点实验室,是清华大学 985 重点建设学科. 是首届(2001 年)、第 2 届(2002 年)中国生物信息学大会(包括“中医药现代化圆桌会议”)的承办单位. 2002 年面向全国 40 多个高等院校和科研单位组织承办了“龙星计划”系列课程“生物信息学”的课程讲学,为推动和促进我国生物信息学研究起了重要作用.

### 2 硬件条件

由生物信息学研究室、功能基因组学实验室、中医药信息学研究室(包括中医药生物信息学、中药化学信息学等)、网络实验室组成.在生物信息学、生命科学的基础研究、医学与药学应用基础研究等方面的研究设备精良;并建立集基因组学、生物信息学、功能基因组学和医药研究一体化的研究平台.实验室面积 2 000 m<sup>2</sup>;部分正在重点扩建.预计 2004 年对外开放.

### 3 技术力量

实验室目前有中科院院士 1 人,来自清华大学自动化系、生物系和计算机系的常任科学家 7 人.该室是博士、硕士学位授予点,设有博士后流动站.学术委员会由 15 名国内外著名专家组成,其中包括生物学、医学、生物化学、生物物理、信息学、计算机、数学等多个领域的专家,有中科院院士 9 名,还有美国哈佛大学、耶鲁大学和美国冷泉港实验室的生物信息学及分子生物学专家 3 名.吴旻院士、强伯勤院士分别任学术委员会名誉主任、主任;美国科学院院士、著名数学家林家翘(C.-C. Lin)教授任学术委员会顾问.

### 4 研究特色

实验室近期内主要在以下方向上开展一系列的研究工作:(1)复杂疾病及基因调控网络研究,包括基因型数据、表达谱数据和蛋白质谱数据的分析,疾病分类和致病基因发现等;(2)中医药生物信息学研究,包括证候的基因组学和信息学研究;中药方剂的信息学与化学信息学研究;针对特定疾病的中药药效客观鉴别体系与技术研究;中药生产自动化技术研究等;(3)基因组信息结构分析,包括基因选择性剪接的分析、基因及其调控因子的预测、基因注释、SNPs 及单倍型分析等;(4)蛋白质结构、功能和进化规律的研究;(5)用于生物信息学的高性能和网格计算技术研究.

### 5 科研方向

目前承担的课题有:863 课题“精神分裂症易感基因的研究”,“蛋白质结构和功能预测的新方法新算法研究”,“基因功能预测与药物靶标发现研究”;NSFC 重点项目“复杂系统意义下的生物信息学中若干问题研究”,“类风湿性关节炎寒热证候的基因组信息学研究”;NSFC 项目“基于神经内分泌免疫网络仿真的寒热证候整体规律研究”,“蛋白质超家族进化及其机理研究”,“基因芯片数据分析中的模式识别问题研究”,“生物序列分析的高效并行算法研究”,“面向研究目标的生物信息学数据平台与数据挖掘”;科技部前期研究项目“功能基因组系统学理论与技术方法前期研究”;973 项目“中国人口出生缺陷遗传与环境可控性研究”等.已在 NUCLEIC ACIDS RESEARCH, JOURNAL OF BIOMOLECULAR STRUCTURE & DYNAMICS, JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, FEBS LETTERS, WORLD JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY, COMPUTERS IN BIOLOGY AND MEDICINE 发表论文数十篇.

### 6 国际协作

与美国 Harvard 大学、Cold Spring Harbor 实验室、Boston 大学、The Catholic University of America、英国 University of Ulster 信息学院、丹麦技术大学(DTU)生物序列分析中心(CBS)、British University (Canada)等,在学术交流、项目合作、研究生培养等方面具有长期良好的合作关系.

### 7 封面图片

A 实验室部分成员张学工(左 1)、李衍达(左 2)、季梁(右 2)、李梢(右 1)合影;B 施蕴瑜院士(左 1)、强伯勤院士(左 2)、郝柏林院士(左 3)、李衍达院士(右 3)、洪德元院士(右 2)等及各界专家、领导在重点实验室成立大会上;C 应用 ISOMAP 分析基因芯片数据得到的六种典型基因表达模式;D 重复测量设计药理学资料的模式识别 PARM 算法.

### 8 通讯地址

100084,北京市清华园 1 号,清华大学生物信息学研究所,清华大学生物信息学教育部重点实验室. zhangxg@tsinghua.edu.cn

# 胰腺癌组织 ChAT, GAD65 和 PKC 酶活性的表达

杨竹林, 王群伟, 邓星辉, 李代强, 吕芳, 李永国

杨竹林, 王群伟, 邓星辉, 吕芳, 李永国, 中南大学湘雅二医院肝胆疾病研究室 湖南省长沙市 410011

李代强, 中南大学湘雅二医院病理科 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研究生毕业, 教授. 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: 2002-12-24 接受日期: 2003-01-14

## Enzymatic activities of ChAT, GAD65 and PKC in pancreatic carcinoma tissues

Zhu-Lin Yang, Qun-Wei Wang, Xing-Hui Deng, Dai-Qiang Li, Fang Lü, Yong-Guo Li

Zhu-Lin Yang, Qun-Wei Wang, Xing-Hui Deng, Dai-Qiang Li, Fang Lü, Yong-Guo Li, Research Laboratory of Hepatobiliary Diseases, Xiangya Second Hospital of Zhongnan University, Changsha 410011, Hunan Province, China

Correspondence to: Zhu-Lin Yang, Department of Pathology, Xiangya Second Hospital of Zhongnan University, Changsha 410011, Hunan Province, China.

Received: 2002-12-24 Accepted: 2003-01-14

## Abstract

**AIM:** To study on the expression characteristics of ChAT, GAD65 and PKC enzymatic activities and their clinicopathological significance in the tissues of chronic pancreatitis and pancreatic carcinoma.

**METHODS:** The enzymatic activities of ChAT, GAD65 and PKC were detected by immunohistochemical method of avidin-biotin complex on formalin-fixed and routine paraffin-embedded sections of specimens of chronic pancreatitis ( $n=10$ ) and pancreatic carcinoma ( $n=47$ ).

**RESULTS:** The positive rate and the score of ChAT, GAD65 and PKC were significantly lower in 10 cases of chronic pancreatitis than that of pancreatic carcinoma (ChAT, 0 % vs 48.9 % ,  $0.2 \pm 0.4$  vs  $2.2 \pm 1.4$ ; GAD65, 10.0 % vs 55.3 % ,  $0.6 \pm 0.9$  vs  $2.2 \pm 1.2$ ; PKC, 10.0 % vs 57.4 % ,  $0.6 \pm 0.9$  vs  $2.1 \pm 1.6$ ). The score of ChAT was significantly higher in well-differentiated adenocarcinoma than that of poorly-differentiated adenocarcinoma ( $P < 0.05$ ). The positive rate and the score of GAD65 or PKC were significantly lower (GAD65,  $P < 0.05$ ; PKC,  $P < 0.01$ ) in cases of well-differentiated adenocarcinoma than in cases of poorly-differentiated. No difference was found for the enzyme expressions and the clinicopathological characteristics among different sex, age, with or without metastasis of pancreatic carcinoma. A highly positive correlation was found between the scores of GAD65 and PKC in pancreatic carcinoma.

**CONCLUSION:** The expression of enzymatic activities of ChAT, GAD65 or PKC might be related to the carcinogenesis, progression and biological behaviors of pancreatic carcinoma. They might be important biological markers of

pancreatic carcinoma.

Yang ZL, Wang QW, Deng XH, Li DQ, Lü F, Li YG. Enzymatic activities of ChAT, GAD65 and PKC in pancreatic carcinoma tissues. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(10):1554-1557

## 摘要

**目的:** 研究 ChAT, GAD65 和 PKC 酶活性在慢性胰腺炎和胰腺癌组织中表达特征及其临床病理意义.

**方法:** 胰腺癌( $n=47$ )和慢性胰腺炎( $n=10$ )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, ChAT, GAD65 和 PKC 酶活性表达染色方法均为常规 ABC 免疫组化法.

**结果:** 胰腺癌 ChAT, GAD65 和 PKC 表达阳性率(48.9 %, 55.3 % 和 57.4 %)及其评分( $2.2 \pm 1.4$ ,  $2.2 \pm 1.2$  和  $2.1 \pm 1.6$ )明显高于慢性胰腺炎阳性率(0 %, 10.0 % 和 10.0 %)及其评分( $0.2 \pm 0.4$ ,  $0.6 \pm 0.9$  和  $0.6 \pm 0.9$ ), 均有显著或高度显著性差异( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ). 高分化腺癌 ChAT 评分值明显高于低分化腺癌( $P < 0.05$ ), 但阳性率之间无明显差异( $P > 0.05$ ); 高分化腺癌 GAD65, PKC 表达阳性率及其评分明显低于低分化腺癌, 均有显著或高度显著性差异( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ). 酶活性表达与胰腺癌患者性别、年龄、有无转移等临床特征均无明显关系. GAD65 评分与 PKC 评分存在高度密切关系( $r=0.50$ ,  $P < 0.01$ )

**结论:** ChAT, GAD65 和 PKC 酶活性表达特征可能与胰腺癌发生发展及生物学行为有密切关系, 均为胰腺癌重要生物学标志物.

杨竹林, 王群伟, 邓星辉, 李代强, 吕芳, 李永国. 胰腺癌组织 ChAT, GAD65 和 PKC 酶活性的表达. 世界华人消化杂志 2003;11(10):1554-1557

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1554.asp>

## 0 引言

胆碱乙酰转移酶(choline acetyltransferase, ChAT)在胆碱能神经元和神经纤维及细胞运动中起重要调节作用, 是胆碱能神经元特异性标志物<sup>[1-6]</sup>. 谷氨酸脱羧酶(glutamate decarboxylase, GAD)有两种异构体(即 GAD65 和 GAD67), 二者与  $\gamma$ -氨基丁酸(GABA)能系统的功能代谢存在密切关系, 是 GABA 合成的关键酶<sup>[7-9]</sup>. 蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 在信号转换、细胞分化和生长过程中起重要作用<sup>[10-13]</sup>. 新近发现 ChAT 表达活性与恶性肿瘤细胞发生及侵袭潜能有关<sup>[14-16]</sup>, GAD65 和 PKC 表达活性

与恶性肿瘤发生发展及生物学行为有较密切关系<sup>[17-30]</sup>. 国内外尚未见胰腺癌该方面研究的文献报道. 我们应用免疫组化方法研究胰腺癌和慢性胰腺炎组织中 ChAT, GAD65 和 PKC 酶活性表达及其生物学意义.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 收集湘雅医院和湘雅二医院1996-01/2001-12手术切除胰腺癌标本47例(术前均未进行化疗和放疗),男35例,女12例,年龄21-73(平均 $50 \pm 12$ )岁.均来源于胰腺导管上皮,包括高分化腺癌19例,中分化腺癌8例,低分化腺癌17例和黏液腺癌3例.临床和(或)病理证实发生胰腺外转移(区域淋巴结或胰腺外组织器官)36例(76.6%).另收集慢性胰腺炎手术切除标本10例,男6例,女4例,年龄35-65(平均 $42 \pm 7$ )岁.上述标本经40 g/L中性甲醛固定后,常规制作石蜡包埋连续切片,切片厚4  $\mu$ m.兔抗人ChAT, GAD65多克隆抗体,鼠抗人PKC单克隆抗体,生物素标记羊抗兔IgG,生物素标记羊抗鼠IgG,ABC试剂,以及DAB-HCL显色试剂盒均购自武汉博士德公司.

**1.2 方法** ChAT, GAD65和PKC表达染色方法均为常规ABC免疫组化法(具体染色步骤略),镜下观察5个高倍镜视野染色结果,细胞质内含棕黄色颗粒者为ChAT和GAD65阳性细胞,细胞膜含棕黄色颗粒者为PKC阳性细胞;根据免疫组化着色强度评分(0分,无;1分,弱;2分,中;3分,强)和阳性细胞率(0分,小于5%;1分,5-10%;2分,11-20%;3分,21-50%;

4分,大于50%)之和为该病例评分值,且将评分值0-2分定为阴性表达病例(-),大于2分定为阳性表达病例(+).以0.05 mol/L PBS液(PH7.4)代替一抗作为染色阴性对照或替代对照,以多次替代对照有效的乳腺癌切片作为染色阳性对照.

统计学处理 将所得数据输入SPSS10.0软件包进行 $\chi^2$ 检验, t检验及Fisher's精确概率法,检验水准 $\alpha = 0.05$ 和 $\alpha = 0.01$ .

## 2 结果

ChAT和GAD65免疫组化反应产物主要定位于细胞质,偶见细胞核着色(图1, 2). PKC免疫组化反应产物主要定位于细胞膜,部分病例定位于细胞膜和细胞质(图3).三者癌组织中分布呈较明显异质性,同一切片中癌组织内阳性细胞着色强度和阳性细胞率可有较明显不同.慢性胰腺炎导管上皮三者阳性率及其评分明显低于胰腺癌,均有显著或高度显著性差异( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ,表1).高分化腺癌ChAT表达阳性率及其评分明显高于中、低分化腺癌,与低分化腺癌相比其评分有显著性差异( $P < 0.05$ ).低分化腺癌GAD65、PKC表达阳性率及其评分明显高于中、高分化腺癌,与高分化腺癌比较均有显著或高度显著性差异( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ).三者表达阳性率与性别、年龄及有无转移均无明显关系( $P > 0.05$ ,表2).ChAT表达评分与GAD65、PKC表达评分无明显相关性( $P > 0.05$ ),但GAD65与PKC表达评分呈密切正相关( $r = 0.50$ ,  $P < 0.01$ ).

表1 胰腺癌组织 ChAT, GAD65 和 PKC 酶活性表达

分组	n	阳性率(%)			评分值( $\bar{x} \pm s$ )		
		ChAT	GAD65	PKC	ChAT	GAD65	PKC
胰腺炎	10	0.0	10.0	10.0	$0.2 \pm 0.4$	$0.6 \pm 0.9$	$0.6 \pm 0.9$
胰腺癌	47	48.9 <sup>b</sup>	55.3 <sup>a</sup>	57.4 <sup>a</sup>	$2.2 \pm 1.4^b$	$2.2 \pm 1.2^b$	$2.1 \pm 1.6^a$

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

表2 胰腺癌临床病理特征与 ChAT, GAD65 和 PKC 表达的关系

	n	阳性率(%)			评分值( $\bar{x} \pm s$ )		
		ChAT	GAD65	PKC	ChAT	GAD65	PKC
男	35	48.6	51.4	57.1	$2.3 \pm 1.5$	$2.1 \pm 1.3$	$2.1 \pm 1.5$
女	12	50.0	66.7	58.3	$2.0 \pm 1.1$	$2.6 \pm 0.9$	$2.1 \pm 1.7$
年龄小于45	15	40.0	60.0	66.7	$2.2 \pm 0.9$	$2.5 \pm 1.0$	$2.4 \pm 1.5$
大于或等于45	32	53.1	53.1	53.1	$2.2 \pm 1.6$	$2.1 \pm 1.3$	$2.0 \pm 1.6$
高分化腺癌	19	63.1	42.1	47.3	$2.7 \pm 1.4$	$1.8 \pm 1.4$	$2.0 \pm 1.5$
中分化腺癌	8	37.5	50.0	37.5	$1.9 \pm 1.5$	$2.2 \pm 0.9^b$	$1.2 \pm 1.5$
低分化腺癌	17	35.3	76.5 <sup>a</sup>	82.4 <sup>a</sup>	$1.8 \pm 1.2^a$	$2.8 \pm 0.9^b$	$2.8 \pm 1.5^c$
黏液腺癌	3	66.7	33.3	33.3	$2.0 \pm 1.7$	$1.3 \pm 1.5$	$1.3 \pm 1.5^d$
转移 无	11	45.5	54.5	63.6	$2.5 \pm 1.6$	$2.1 \pm 1.6$	$2.1 \pm 1.6$
有	36	50.0	55.6	55.6	$2.1 \pm 1.3$	$2.3 \pm 1.1$	$2.1 \pm 1.6$

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 高分化腺癌, <sup>c</sup> $P < 0.01$ , <sup>d</sup> $P < 0.01$  vs 低分化腺癌.



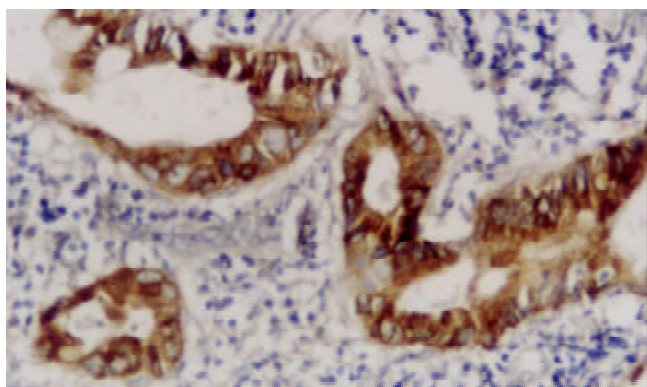


图1 胰腺高分化腺癌 ChAT 酶活性阳性表达 ABC 法  $\times 100$ .

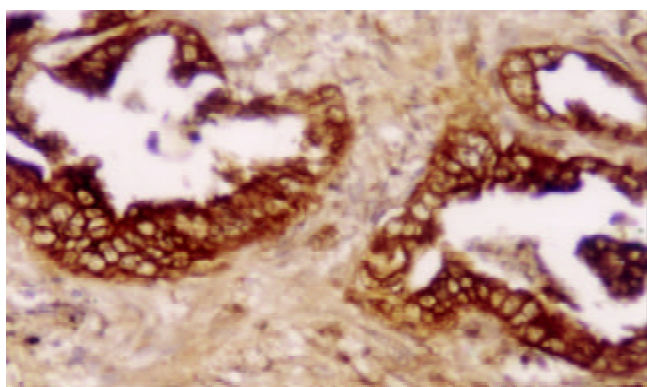


图2 胰腺中分化腺癌 GAD65 酶活性阳性表达 ABC 法  $\times 100$ .

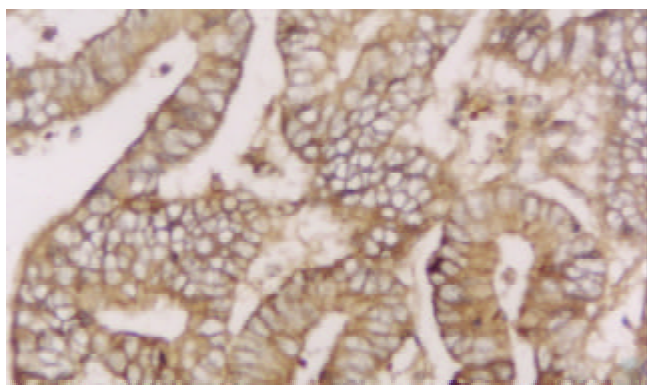


图3 胰腺高分化腺癌 PKC 酶活性阳性表达 ABC 法  $\times 100$ .

### 3 讨论

ChAT 可能与肿瘤发生发展及生物学行为有密切关系, 人类原发和转移性黑色素瘤存在 ChAT 和蝇蕈碱乙酰胆碱受体的表达, 而正常皮肤黑色素细胞则缺乏, 人类黑色素瘤细胞株(SK-mel28)中, ChAT 通过其受体调节瘤细胞收缩和运动, 认为与瘤细胞侵袭潜能有密切关系. 人类小细胞肺癌、畸胎瘤和神经母细胞瘤中 ChAT 能促进癌细胞生长和增强其侵袭和发生转移的能力<sup>[14-16]</sup>. ChAT 在其他恶性肿瘤中是否表达尚未文献报道. 我们发现慢性胰腺炎导管上皮均呈 ChAT 阴性表达, 胰腺癌阳性表达率 48.9%, 且高分化腺癌 ChAT 评分明显高于低分化腺癌, 但与胰腺癌是否转移无明显关系. 提示部分胰腺癌表达 ChAT, 说明部分上皮性恶性肿瘤象黑色

素瘤一样存在 ChAT, ChAT 可能通过其受体作用调节肿瘤细胞生长、分化、运动及其生物学行为, 其确切作用机制有待深入研究.

GAD65 为  $\gamma$ -氨基丁酸(GABA)合成的关键酶, 而 GABA 源性系统在调节细胞生长发育等方面起重要作用, 应用 GABA 受体拮抗剂处理后可抑制多种细胞的生长发育<sup>[7-9]</sup>. 近年研究发现恶性肿瘤(如结肠癌、乳腺癌、胃癌等) GAD65 表达水平明显高于其正常组织和良性病变, 认为 GAD65 表达与恶性肿瘤发生、生物学行为等有密切关系<sup>[17-20]</sup>. 我们发现慢性胰腺炎导管上皮 GAD65 表达阳性率及其评分明显低于胰腺癌, 高分化腺癌阳性率及其评分明显低于低分化腺癌, 但与是否转移无明显关系. 其结果与国外文献报道较一致, 说明 GAD65 表达特征与胰腺癌发生发展及生物学行为存在密切关系, 为胰腺癌重要生物学标志物之一.

PKC 是一大类结构功能不同的丝氨酸/苏氨酸激酶家族, 至少有 12 种同工酶亚型. PKC 广泛分布于哺乳动物组织细胞中, 具有多种生理功能, 是一系列细胞级联信号途径的关键环节<sup>[10-13]</sup>. 近年研究发现 PKC 表达在恶性肿瘤生物学行为及肿瘤细胞多药耐药性形成方面有重要作用, 恶性肿瘤 PKC 表达水平明显高于正常组织及其良性病变, 多药耐药胃癌细胞株 PKC 表达水平明显高于药物敏感细胞株<sup>[21-30]</sup>. 本结果显示慢性胰腺炎中导管上皮 PKC 表达阳性率及其评分明显低于低分化腺癌, 但与有无转移无明显关系. 说明 PKC 表达与胰腺癌发生及其恶性程度有密切关系, 检测 PKC 表达水平对指导临床胰腺癌化疗或放疗可能具有重要临床应用价值. 其机制可能与 PKC 本身生物学作用有关.

### 4 参考文献

- 1 Fujii T, Tajima S, Yamada S, Watanabe Y, Sato KZ, Matsui M, Misawa H, Kasahara T, Kawashima K. Constitutive expression of mRNA for the same choline acetyltransferase as that in the nervous system, an acetylcholine-synthesizing enzyme, in human leukemic T-cell lines. *Neurosci Lett* 1999;259:71-74
- 2 Sailer M, Oppitz M, Drews U. Induction of cellular contractions in the human melanoma cell line SK-mel 28 after muscarinic cholinergic stimulation. *Anat Embryol* 2000;201:27-37
- 3 Pahud G, Bontron S, Eder-Colli L. Modulation of choline acetyltransferase synthesis by okadaic acid, a phosphatase inhibitor, and KN-62, a CaM kinase inhibitor, in NS-20Y neuroblastoma. *Neurochem Int* 2001;38:75-82
- 4 Bugnard E, Sors P, Roulet E, Bloc A, Loctin F, Dunant Y. Morphological changes related to reconstituted acetylcholine release in a release-deficient cell line. *Neuroscience* 1999;94:329-338
- 5 Fujii T, Ushiyama N, Hosonuma K, Suenaga A, Kawashima K. Effects of human antithymocyte globulin on acetylcholine synthesis, its release and choline acetyltransferase transcription in a human leukemic T-cell line. *J Neuroimmunol* 2002;128:1-8
- 6 Miettinen RA, Kalesnykas G, Koivisto EH. Estimation of the total number of cholinergic neurons containing estrogen receptor-alpha in the rat basal forebrain. *J Histochem Cytochem* 2002;50:891-902
- 7 Matsuba T, Yano M, Abiru N, Takino H, Akazawa S, Nagataki S, Yasukawa K. Expression of recombinant human glutamic acid decarboxylase (GAD) in myeloma cells and enzyme-

- linked immunosorbent assay (ELISA) for autoantibodies to GAD. *J Biochem* 1997;121:20-24
- 8 Pinal CS, Cortessis V, Tobin AJ. Multiple elements regulate GAD65 transcription. *Dev Neurosci* 1997;19:465-475
- 9 Salazar P, del Carmen Sanchez-Soto M, Hiriart M, Tapia R. Biochemical characteristics of the gamma-aminobutyric acid system in the insulinoma cell lines HIT-T15, RIN-m5F, beta TC3, and comparison with rat brain. *Arch Med Res* 2001;32:419-428
- 10 Kohn EA, Yoo CJ, Eastman A. The protein kinase C inhibitor Go6976 is a potent inhibitor of DNA damage-induced S and G2 cell cycle checkpoints. *Cancer Res* 2003;63:31-35
- 11 Darley RL, Pearn L, Omidvar N, Sweeney M, Fisher J, Phillips S, Hoy T, Burnett AK. Protein kinase C mediates mutant N-Ras-induced developmental abnormalities in normal human erythroid cells. *Blood* 2002;100:4185-4192
- 12 Gopalakrishna R, Gundimeda U. Antioxidant regulation of protein kinase C in cancer prevention. *J Nutr* 2002;132:381S-382S
- 13 Wang SI, Mukhtar H. Gene expression profile in human prostate LNCaP cancer cells by (-) epigallocatechin-3-gallate. *Cancer Lett* 2002;182:43-51
- 14 Song P, Sekhon HS, Jia Y, Keller JA, Blusztajn JK, Mark GP, Spindel ER. Acetylcholine is synthesized by and acts as an autocrine growth factor for small cell lung carcinoma. *Cancer Res* 2003;63:214-221
- 15 Fisher HS, Berti I, Schatz DS, Humpel C, Saria A. Retinoic acid treatment enhances the acetylcholine contents in the human teratocarcinoma cell line NTera-2. *Regul Pept* 2000;96:59-63
- 16 Nagai A, Suzuki Y, Baek SY, Lee KS, Lee MC, McLarnon JG, Kim SU. Generation and characterization of human hybrid neurons produced between embryonic CNS neurons and neuroblastoma cells. *Neurobiol Dis* 2002;11:184-198
- 17 Matuszek M, Jesipowicz M, Kleinrok Z. GABA content and GAD activity in gastric cancer. *Med Sci Monit* 2001;7:377-381
- 18 Opolski A, Mazurkiewicz M, Wietrzyk J, Kleinrok Z, Radzikowski C. The role of GABA-ergic system in human mammary gland pathology and in growth of transplantable murine mammary cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 2000;19:383-390
- 19 Mazurkiewicz M, Opolski A, Wietrzyk J, Radzikowski C, Kleinrok Z. GABA level and GAD activity in human and mouse normal and neoplastic mammary gland. *J Exp Clin Cancer Res* 1999;18:247-253
- 20 Kleinrok Z, Matuszek M, Jesipowicz J, Matuszek B, Opolski A, Radzikowski C. GABA content and GAD activity in colon tumors taken from patients with colon cancer or from xenografted human colon cancer cells growing as s.c. tumors in athymic nu/nu mice. *J Physiol Pharmacol* 1998;49:303-310
- 21 Clark AS, West KA, Blumberg PM, Dennis PA. Altered protein kinase C (PKC) isoform in non-small cell lung cancer cells: PKC delta promotes cellular survival and chemotherapeutic resistance. *Cancer Res* 2003;63:780-786
- 22 Yoshikawa N, Nakamura K, Yamaguchi Y, Kagota S, Shinozuka K, Kunitomo M. Effect of PKC412, a selective inhibitor of protein kinase C, on lung metastasis in mice injected with B16 melanoma cells. *Life Sci* 2003;72:1377-1387
- 23 Orlandi L, Binda M, Folini M, Bearzatto A, Villa R, Daidone MG, Zaffaroni N. Ribozyme-mediated inhibition of PKC alpha sensitizes androgen-independent human prostate cancer cells to cisplatin-induced apoptosis. *Prostate* 2003;54:133-143
- 24 Biswas DK, Martin KJ, McAlister C, Cruz AP, Graner E, Dai SC, Pardee AB. Apoptosis caused by chemotherapeutic inhibition of nuclear factor-kappaB activation. *Cancer Res* 2003;63:290-295
- 25 Metzger E, Muller JM, Ferrari S, Buettner R, Schule R. A novel inducible transactivation domain in the androgen receptor: implications for PRK in prostate cancer. *EMBO J* 2003;22:270-280
- 26 Chen Y, Wu Q, Song SY, Su WJ. Activation of JNK by TPA promotes apoptosis via PKC pathway in gastric cancer cells. *World J Gastroenterol* 2002;8:1014-1018
- 27 Simard M, Zhang W, Hinton DR, Chen TC, Weiss MH, Su YZ, Gopalakrishna R, Law RE, Couldwell WT. Tamoxifen-induced growth arrest and apoptosis in pituitary tumor cells in vitro via a protein kinase C-independent pathway. *Cancer Lett* 2002;185:131-138
- 28 Volm M, Sauerbrey A, Zintl F, Koomagi R, Efferth T. Protein expression profile of newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia in children developing relapses. *Oncol Rep* 2002;9:965-969
- 29 Shimizu T, Taira N, Senou M, Takeda K. Involvement of diverse protein kinase C isoforms in the differentiation of ML-1 human myeloblastic leukemia cells induced by the vitamin D3 analogue KH1060 and the phorbol ester TPA. *Cancer Lett* 2002;186:67-74
- 30 韩英, 时永全, 李玲. 蛋白激酶 C 同工酶 PKC-A 及 PKC-BI 在胃癌及其耐药细胞中的表达和功能. *中华肿瘤杂志* 2001;23:103-106

# 国人胆囊结石的形态结构特征

吴杰, 杨海琨, 李静仪, 宋一德, 刘刚

吴杰, 杨海琨, 昆明医学院物理数学教研室 云南省昆明市 650031  
李静仪, 刘刚, 云南师范大学物理系 云南省昆明市 650092  
宋一德, 云南师范大学分析测试中心 云南省昆明市 650092  
吴杰, 男, 1964-09-17 生, 云南昆明人, 汉族. 1981 年云南大学物理系本科毕业, 副教授. 主要从事生物液晶研究.  
国家自然科学基金, No.39960024  
云南省自然科学基金, No.1999C0064M  
云南省教委科学研究基金, No.9912073  
项目负责人: 杨海琨, 650031, 云南省昆明市, 昆明医学院物理数学教研室.  
电话: 0871-5338812  
收稿日期: 2003-03-14 接受日期: 2003-03-29

## Structure pattern of gallbladder stone in Chinese

Jie Wu, Hai-Ming Yang, Jing-Yi Li, Yi-De Song, Gang Liu

Jie Wu, Hai-Ming Yang, Department of Physics and Mathematics, Kunming Medical College, Kunming 650031, Yunnan Province, China  
Jing-Yi Li, Gang Liu, Department of Physics, Yunnan Normal University, Kunming 650092, Yunnan Province, China  
Yi-De Song, The Center of Analysis and Determination, Yunnan Normal University, Kunming 650092, Yunnan Province, China  
Supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 39960024, and Applied Basic Research Fund of Yunnan Provincial Science and Technology Committee, No. 1999c 0064M and the Science Foundation of Yunnan Education Committee, No. 9912073  
Correspondence to: Hai-Ming Yang, Physics and Mathematics Department of Kunming Medical College, 191 West Renming Road, Kunming 650031, Yunnan Province, China.  
Received: 2003-03-14 Accepted: 2003-03-29

## Abstract

**AIM:** To investigate the compositions and structure of crystal materials in gallbladder stone and their roles in the formation and growth of gallbladder stone.

**METHODS:** The crystal structure, section ultramicroscopic structure and crystal compositions were observed with polarizing microscope, SEM and X-ray diffraction analysis respectively in single-blind trial.

**RESULTS:** Varied as it was in external and profile structures, all kinds of particulate bilestones were chiefly composed of crystalline cholesterol. The interference color order of these crystals was the second blue-green, the double refractive index  $\Delta n=0.022-0.025$ . These crystals in the bilestone took the form of many microcrystals or polymer-microcrystals, and the holes among microcrystals were filled with some noncrystalline substance. The major component of sandstone was bile pigment and bile pigment salt, mainly noncrystalline substance. Sandstone belonged to bile pigments stone.

**CONCLUSION:** Gallbladder stone is a special biological crystal, mainly composed of cholesterol. Although changeable crystallization environment in gallbladder does not favor the growth of cholesterol crystals, cholesterol crystals

form the basic structure of particulate gallbladder stone, deposition of noncrystalline substance facilitates further growth of bilestone.

Wu J, Yang HM, Li JY, Song YD, Liu G. Structure pattern of gallbladder stone in Chinese. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(10):1558-1562

## 摘要

**目的:** 探讨胆囊结石中晶体物质的组成、形态和结构及其在胆囊结石形成与生长过程中的作用.

**方法:** 在单盲的条件下, 分别用偏光显微镜、扫描电镜和 X 射线衍射仪对 35 例人体胆囊结石的晶体结构、剖面超微结构及晶体组成进行观察研究.

**结果:** 颗粒状胆囊结石尽管其外观和剖面的形态结构各不相同, 但都以结晶态物质为主, 其主要成分为胆固醇晶体. 晶体的干涉色级为二级蓝绿, 双折射率  $\Delta n=0.022-0.025$ . 胆石中的晶体以密集分布的微晶体和微晶体集合体的形式存在, 其间隙被非晶物质填充. 泥沙状结石以非晶态物质为主, 其主要成分是胆色素和胆色素盐, 属胆色素结石.

**结论:** 人体胆囊结石是一种特殊的生物晶体. 胆囊内多变的结晶环境并不支持胆固醇晶体的完整发育, 胆固醇晶体构成了颗粒状胆囊结石的基本架构, 非晶物质的沉积促使了结石的进一步生长.

吴杰, 杨海琨, 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(10):1558-1562

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1558.asp>

## 0 引言

胆囊结石是全球性常见病, 且发病率还在呈上升趋势<sup>[1-3]</sup>. 结石的形态结构与成因有着直接的联系. 为了探讨胆囊结石中晶体物质的组成、形态和结构及其在胆囊结石形成与生长过程中的作用, 进一步深入研究胆囊结石形成的机制, 为胆囊结石的治疗和预防提供一定的依据, 我们分别采用德国 Leitz 型高级偏光显微镜、国产 1000GKYKY 型扫描电子显微镜、国产 Y4Q 型 X 射线自动衍射仪, 在单盲的条件下对 35 例人体胆囊结石的形态结构特征进行全面的观察分析.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 胆囊结石取自昆明医学院第二附属医院肝胆外科手术摘除的胆囊结石共 35 例, 取出后用蒸馏水冲



洗干净, 自然风干备用. 对照样品胆固醇和胆红素, 均采用美国 Sigma 公司的标样, 其中胆固醇标样编号 C-8667 lot 54H8679,  $C_{27}H_{46}O$ , Cholesterol. 胆红素标样编号 B-4216 lot 36H1001,  $C_{33}H_{36}N_4O_6$ , Bilirubin.

1.2 方法 将胆囊结石从中剖开, 用放大镜观察胆结石的外观及剖面形态, 并按其剖面形态进行分类. 胆囊结石取纵剖面、经细白刚玉粉打磨平整后, 用加拿大树胶粘固在载玻片上, 固结后再用白刚玉粉、金刚沙手工打磨至 0.03 mm, 再加上盖玻片胶粘固定, 烘干后, 用德国 Leitz 高级偏光显微镜观察. 将不同类型的结石进行高真空喷金处理制样, 在国产 1000G KYKY 型扫描电子显微镜下进行观察, 对照样品也用相同的办法处理, 用同一扫描电镜在相同的条件下观察. 将干燥后的结石经玛瑙乳钵研磨成粉末状, 采用玻璃压片法制片, 用国产 Y4Q 型 X 射线自动衍射仪进行 X 射线衍射分析, Cu 靶, 石墨单色器, 40 kV, 30 mA, 扫描范围  $2^\circ - 52^\circ$ , 扫描速度  $0.02^\circ / s$ .

## 2 结果

根据常规的胆石剖面分类标准<sup>[4]</sup>, 35 例胆囊结石可分为 7 类, 放射状石 20 例, 放射年轮状石 5 例, 岩层状叠层石 1 例, 铸型无定型石 4 例, 沙层状叠层石 1 例, 泥沙状石 1 例, 混合性石 3 例.

2.1 胆囊结石的晶体结构 在正交偏光显微镜下, 可见各类颗粒状胆囊结石由许多密集分布的微晶体和微晶体的集合体组成, 这些微晶体和微晶体的集合体呈纤维状、粒状、松针状、放射状、柱状、板状等多种形态, 排列有序, 晶体间隙被非晶物质填充(图 1).

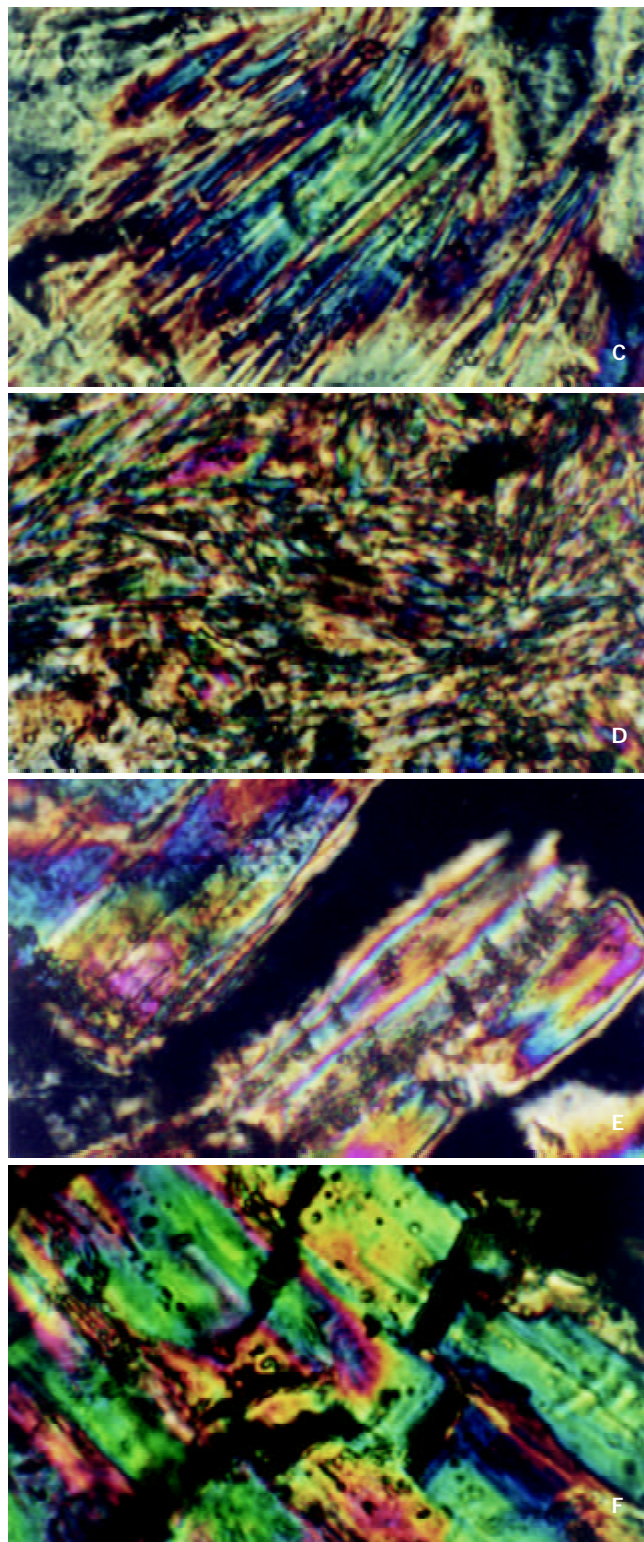
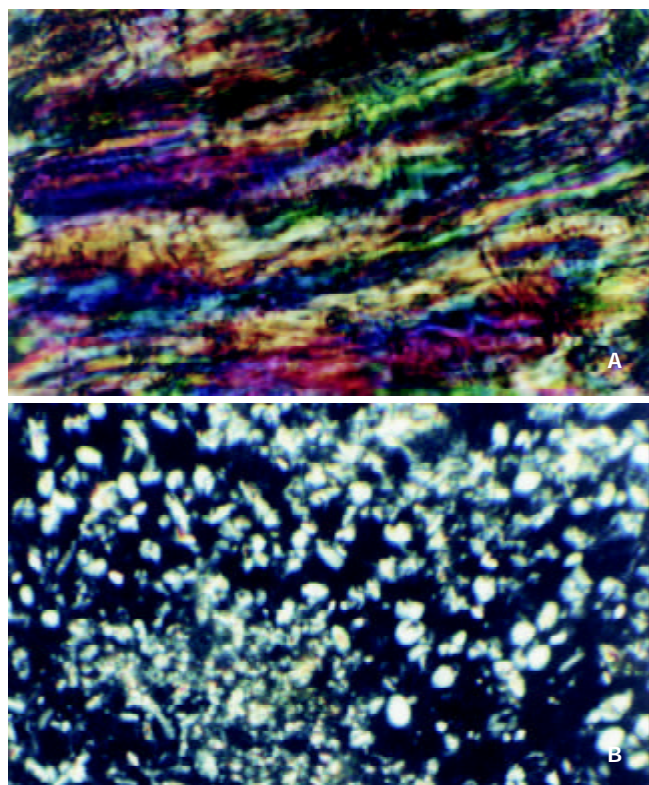


图 1 胆囊结石的晶体结构( $\times 252$ ). A: 纤维状; B: 粒状; C: 松针状; D: 放射状; E: 柱状; F: 板状.

2.2 胆囊结石的光学性质 在正交偏光显微镜下, 可看到胆囊结石中的晶体呈兰绿色, 晶体的边缘为一级灰白, 由边缘向中央干涉色逐渐升高, 构成不连续的干涉色细条带, 其中经过一条红带,(图 2A). 当在与上、下偏光镜振动方向呈  $45^\circ$  角的方向上, 插入光程差为 530 nm 的石膏试板时, 胆囊结石晶体的干涉色升高(图 2B); 插入光程差为 147 nm 的云母试板时, 胆囊结石晶体的干涉色降低(图 2C), 说明胆囊结石晶体的干涉色级为二



级兰绿<sup>[5]</sup>. 根据干涉色谱表<sup>[5]</sup>其光程差  $R$  应为 650-750 nm, 而胆囊结石样片磨片的厚度  $d=0.03$  mm, 由光程差公式  $R = d \cdot (N_e - N_o) = d \Delta n$ <sup>[5]</sup>可计算出胆囊结石中晶体的双折射率  $\Delta n = 0.022-0.025$ .

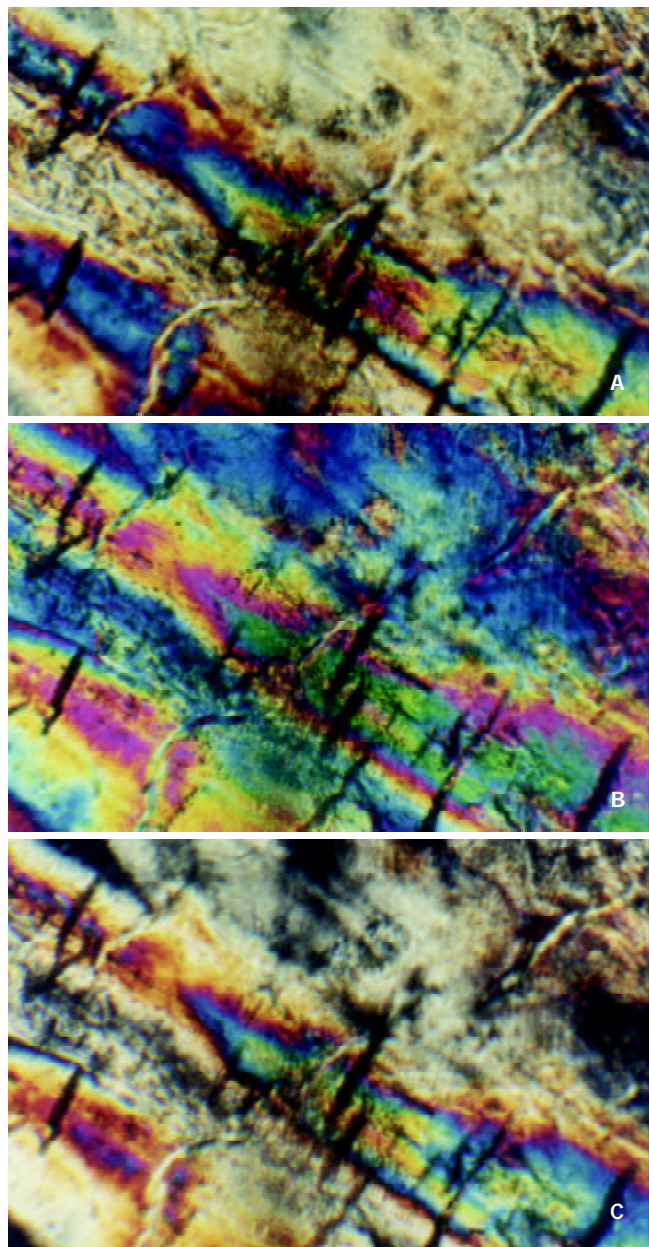
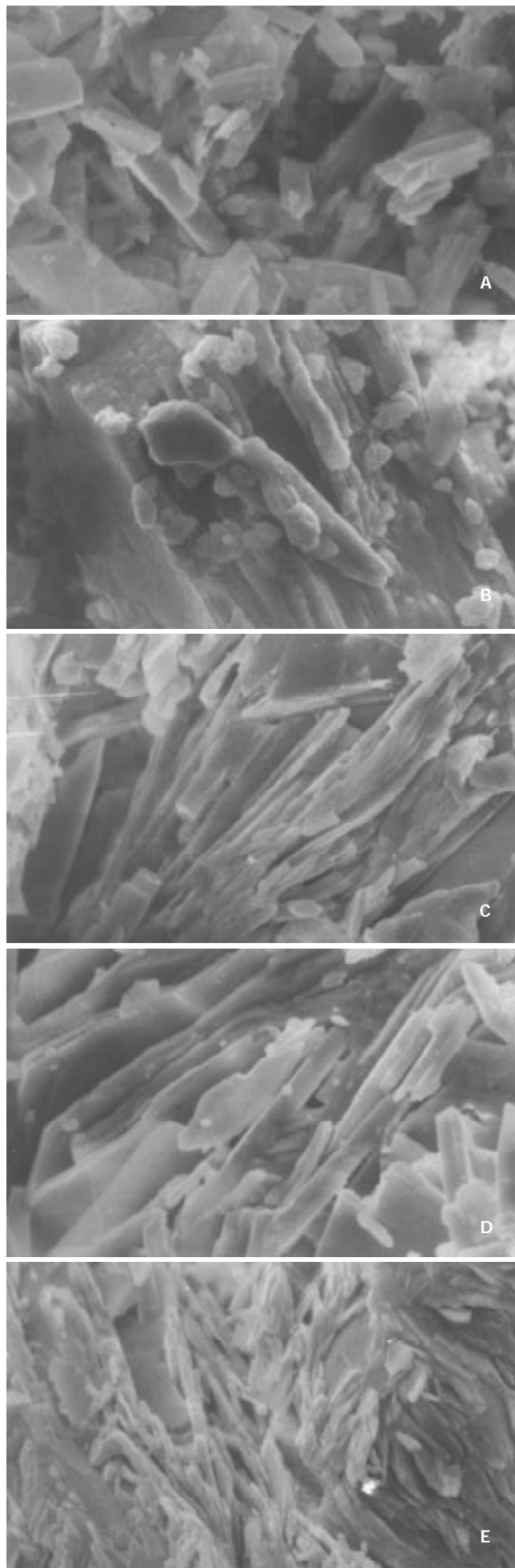


图2 胆囊结石晶体的干涉色. A: 胆囊结石晶体的干涉色 ( $\times 100$ ); B: 插入 530nm 的石膏试板后干涉色升高 ( $\times 100$ ); C: 插入 147nm 的云母试板后干涉色降低 ( $\times 100$ );

**2.3 胆囊结石的超微结构** 在扫描电子显微镜下观察, 各类颗粒状胆囊结石的超微结构均显示出多样性, 即使是在同一类结石的不同区域的超微结构都还有明显不同. 但是, 他们主要都是由条状或块状的胆固醇晶体组成, 这些胆固醇晶体有的排列成放射状, 有的排列成层状, 有的排列成条索状, 有的交错排列无一定的规律; 胆固醇晶体之间常见一些不规则的空隙; 在有的胆固醇晶体之间, 夹杂有少量的呈类球状颗粒组成的絮状团块的胆红素结晶(图 3).





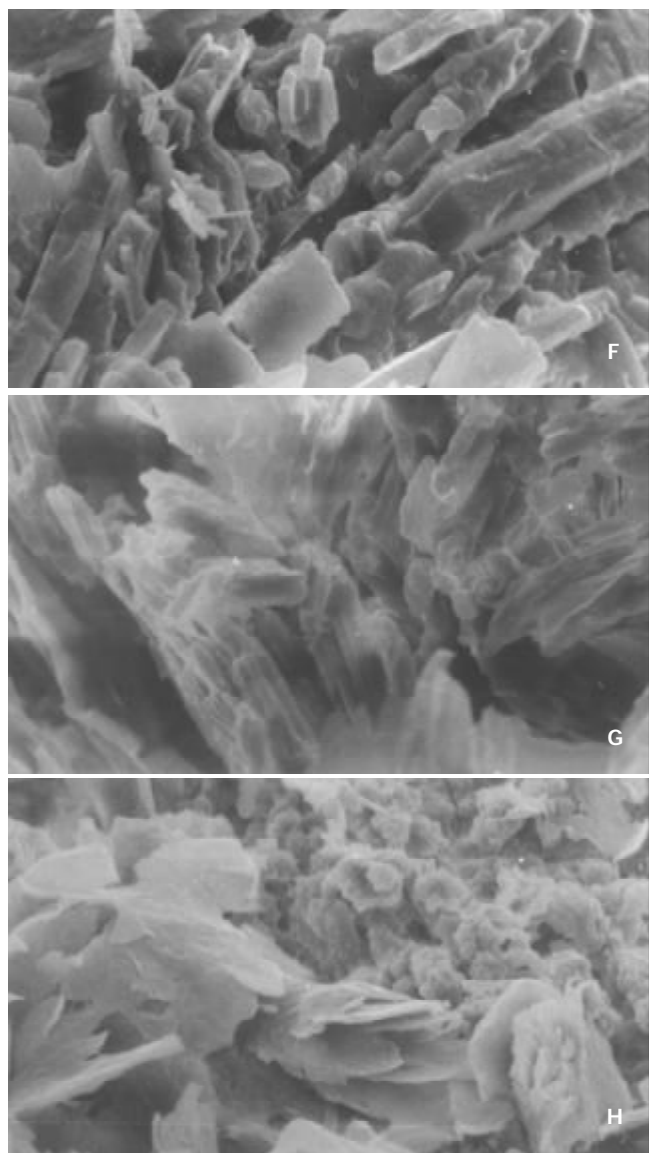


图3 胆囊结石的超微结构. A: 胆固醇标样( $\times 2\,000$ ); B: 胆色素标样( $\times 1\,500$ ); C: 胆固醇晶体排列成放射状( $\times 1\,500$ ); D: 胆固醇晶体排列成层状( $\times 1\,500$ ); E: 胆固醇晶体排列成条索状( $\times 1\,500$ ); F: 胆固醇晶体交错排列无一定的规律( $\times 1\,500$ ); G: 胆固醇晶体之间不规则的空隙( $\times 1\,500$ ); H: 成絮状团块的胆红素晶体( $\times 1\,000$ ).

2.4 胆囊结石的X射线衍射谱图 X射线衍射结果显示, 颗粒状结石尽管其外观和剖面的颜色形态各不相同, 但都以结晶态物质为主, 其衍射谱图与胆固醇标样的衍射谱图匹配良好, 属胆固醇结石, 其主要成分为胆固醇(图4A, C); 泥沙状结石以非晶态物质为主, 其主要成分是胆色素和胆色素盐, 属胆色素结石(图4B, D).

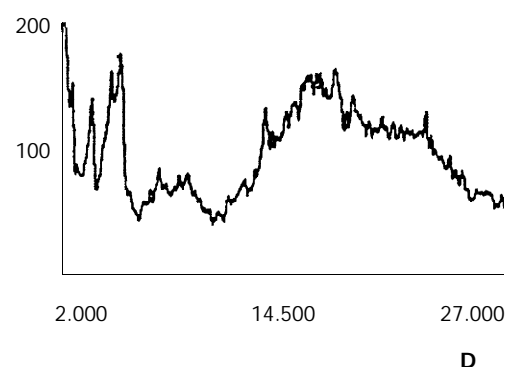
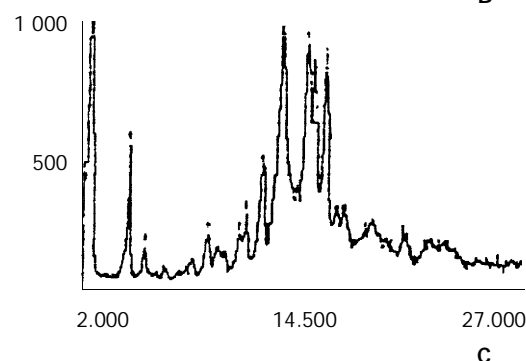
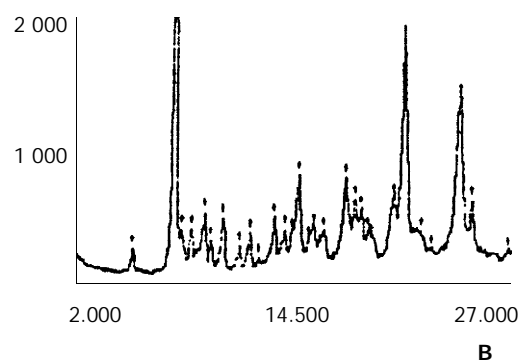
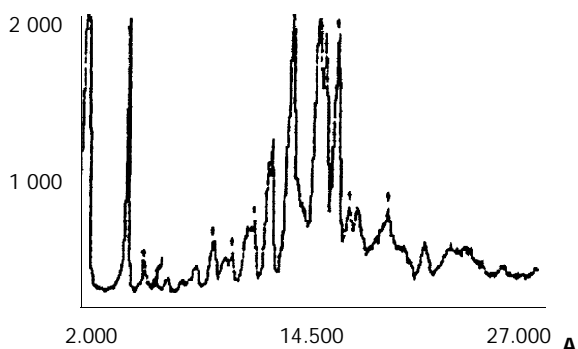


图4 胆囊结石的X射线衍射谱. A: 胆固醇标样; B: 胆色素标样; C: 颗粒状结石; D: 泥沙状结石.

### 3 讨论

在正交偏光显微镜下观察, 人体胆囊结石由许多密集分布的呈多种形态的微晶体和微晶体的集合体组成, 这些微晶体和微晶体的集合体呈多种形态, 排列有序, 晶体的间隙被非晶物质填充, 这些晶体的干涉色级为二级兰绿, 双折射率 $\Delta n=0.022-0.0025$ , 说明人体胆囊结石具有晶体的特征, 确实是一种晶体. 但是他们是一种特殊的生物晶体, 特殊在他是由很多密集分布的呈多种形态的微晶体和微晶体的集合体组成的晶体, 晶体的间隙由非晶物质填充, 与一般晶体相比, 胆囊结石这种生物晶体的结构较疏松、易破坏, 这就是在体外采用物理方法如体外震波碎石等<sup>[6, 7]</sup>粉碎胆囊结石的物理基础. 在扫描电镜下观察, 各类颗粒状胆囊结石尽管其外观、颜色及剖面结构各不相同, 但他们都是由排列成不同形式的胆固醇晶体组成, 只是在有的胆固醇晶体之间夹杂有少量的呈类球状颗粒组成的絮状团块的胆红素结晶, 说明这些胆囊结石的主要成分都是胆固醇, 此结论与用X射线衍射分析的结果和

薄层扫描测定的结果完全吻合,与有关文献报道的人体胆囊结石以胆固醇结石为主的结论也是完全一致的<sup>[1,8]</sup>。

在胆囊结石样片中我们看到,所有颗粒状胆囊结石均以胆固醇晶粒为结石主体。但不同样品,甚至同一样品不同区域晶粒的生长方式和发育程度都是各不相同的,都未能生成完整晶体。这反映出多变的胆囊环境对晶体发育的限制。同时我们也看到,在晶粒缝隙间非晶物质的沉积对有形结石的形成是十分重要的。胆汁中晶核出现后,晶粒会很快长出,但胆囊内多变复杂的结晶环境又不支持晶体的进一步生长。只有当晶粒间有其他物质沉积、填充,形成有形的微小结石后,才使得进一步的以此为基底的多核生长成为可能,并使结石进一步长大。由此看来,晶粒间填充物对结石生长至关重要。研究表明,蛋白质在结石形成过程中可能起重要的作用。其中,糖蛋白的作用也许更为重要<sup>[9,10]</sup>。在填充物中,难溶物主要由胆红素盐和蛋白质组成<sup>[11,12]</sup>。胆红素盐在微晶粒间填充并起促成核作用,而蛋白质则构成晶体间网架。

胆结石是胆汁中多种成分在多因素影响下相互作用的结果<sup>[13-17]</sup>,但胆汁胆固醇过饱和是胆固醇结石形成的重要条件<sup>[18-20]</sup>。有关研究指出,胆固醇在胆汁中是以微胶团和泡两种形式维持其溶解状态。微胶团是胆固醇-磷脂-胆盐的聚合体,而泡则为胆固醇-磷脂的复合体<sup>[21-29]</sup>。在胆汁中的促成核因子和抗成核因子的作用下,二者在胆汁中形成一个热力学平衡体系,互相联系、互相转换,对胆固醇的溶解和析出起着调节的作用。当胆汁中的促成核因子和抗成核因子平衡失调时,泡胆固醇就会凝集、融合,从单层小泡到大层小泡转而形成复层泡,析出胆固醇晶核基本单位,并进一步形成胆固醇单水结晶,产生胆固醇沉淀而形成胆固醇结石<sup>[30]</sup>。我们在扫描电镜下观察,人体胆囊结石主要由条状或块状的胆固醇晶体组成,这些胆固醇晶体有的排列成放射状,有的排列成层状,有的排列成条索状,有的交错排列无一定的规律。这些实验结果,从形态学的研究上支持了上述观点。

#### 4 参考文献

- 1 刘刚,吴杰,杨海珉.胆结石成石机制的研究进展.生物医学物理研究 2003;7:76-80
- 2 沈世鹏,萧蓉葆.胆石病.第1版.北京:人民卫生出版社,2000:1-2
- 3 于皆平,沈志祥,罗和生.实用消化病学.第1版.北京:科学出版社,1999:1228
- 4 张启宇.实用胆道病学.第1版.南京:江苏科学技术出版社,1997:160-161
- 5 李德惠.晶体光学.第2版.北京:地质出版社,2002:47-66
- 6 赵荣莱.胆石症的治疗.世界华人消化杂志 2001;9:1034-1036
- 7 冯若,王智彪.实用超声治疗学.第一版.北京:科学技术文献出版社,2002:151-162
- 8 吴在德.外科学.第五版.北京:人民卫生出版社,2000:617-618
- 9 秦永林,汤文浩.胆囊结石中糖蛋白的研究进展.国外医学外科

- 学分册 1999;26:344-346
- 10 刘刚,邢达,杨海珉,吴杰.胆结石中蛋白质的傅里叶变换红外光谱和表面增强拉曼光谱研究.光学学报 2002;22:441-446
- 11 刘刚,邢达,杨海珉,吴杰.人体胆结石难溶物的扫描电镜观察和红外光谱研究.光谱学与光谱分析 2002;22:591-595
- 12 Liu G, Xing D, Yang HM, Wu J. Vibrational spectroscopic study of human pigment gallstones and their insoluble materials. *J Molecular Structure* 2002;616: 187-191
- 13 韩天权,蒋兆彦,张圣道.胆结石成因研究进展.中国实用外科杂志 2001;21:123-125
- 14 张圣道,韩天权.胆结石研究的展望.外科理论与实践 1999;4: 5-6
- 15 Nishioka T, Tazuma S, Yamashita G, Kajiyama G. Partial replacement of bile salts causes marked changes of cholesterol crystallization in supersaturated model bile systems. *Biochem J* 1999;340(Pt 2):445-451
- 16 Wang DQ, Cohen DE, Lammert F, Carey MC. No pathophysiologic relationship of soluble biliary proteins to cholesterol crystallization in human bile. *J Lipid Res* 1999; 40:415-425
- 17 Rubin M, Pakula R, Konikoff FM. Microstructural analysis of bile: relevance to cholesterol gallstone pathogenesis. *Histol Histopathol* 2000;15:761-770
- 18 杨光华.病理学.第五版.北京:人民卫生出版社,2001:217-218
- 19 赵纪春,舒晔,程南生,肖路加,朱红.胆囊结石中胆固醇代谢变化的实验研究.中国普通外科杂志 2000;9:124-128
- 20 李秋荣,拱玉华,周建萍,郇青,庞保柱.高胆固醇饮食对胆结石形成的研究. *Chin J Clin Hepatol* 2002;18:320-321
- 21 Luk AS, Kaler EW, Lee SP. Structural mechanisms of bile salt-induced growth of small unilamellar cholesterol-lecithin vesicles. *Biochemistry* 1997;36:5633-5644
- 22 Prigun NP, Korolevich AN. Changes in human biliary vesicle sizes in pathological states. *Biofizika* 2002;47:1095-100
- 23 Portincasa P, Venneman NG, Moschetta A, van den Berg A, Palasciano G, vanBerge-Henegouwen GP, van Erpecum KJ. Quantitation of cholesterol crystallization from supersaturated model bile. *J Lipid Res* 2002;43:604-610
- 24 Venneman NG, Huisman SJ, Moschetta A, vanBerge-Henegouwen GP, van Erpecum KJ. Effects of hydrophobic and hydrophilic bile salt mixtures on cholesterol crystallization in model bile. *Biochim Biophys Acta* 2002;1583:221-228
- 25 Moschetta A, vanBerge-Henegouwen GP, Portincasa P, Palasciano G, van Erpecum KJ. Cholesterol crystallization in model bile: effects of bile salt and phospholipid species composition. *J Lipid Res* 2001;42:1273-1281
- 26 Moschetta A, Frederik PM, Portincasa P, vanBerge-Henegouwen GP, van Erpecum KJ. Incorporation of cholesterol in sphingomyelin-phosphatidylcholine vesicles has profound effects on detergent-induced phase transitions. *J Lipid Res* 2002;43:1046-1053
- 27 Moschetta A, vanBerge-Henegouwen GP, Portincasa P, Renooij WL, Groen AK, van Erpecum KJ. Hydrophilic bile salts enhance differential distribution of sphingomyelin and phosphatidylcholine between micellar and vesicular phases: potential implications for their effects in vivo. *J Hepatol* 2001;34:492-499
- 28 Eckhardt ER, Moschetta A, Renooij JW, Goerdal SS, van Berge-Henegouwen GP, van Erpecum KJ. Asymmetric distribution of phosphatidylcholine and sphingomyelin between micellar and vesicular phases. Potential implications for canalicular bile formation. *J Lipid Res* 1999;40:2022-2033
- 29 Sakamoto M, Tazuma S, Chayama K. Less hydrophobic phosphatidylcholine species simplify biliary vesicle morphology, but induce bile metastability with a broad spectrum of crystal forms. *Biochem J* 2002;362(Pt 1):105-112
- 30 Gantz DL, Wang DQ, Garey MC, Small DM. Cryoelectron microscopy of a nucleating model bile in vitreous ice: formation of primordial vesicles. *Biophys J* 1999;76:1436-1451

# 结核性腹膜炎与恶性腹水端粒酶活性

赵金满, 李福才, 于继红, 崔巍, 傅宝玉, 沙文阁

赵金满, 于继红, 崔巍, 傅宝玉, 沙文阁, 中国医科大学附属第一医院消化科 辽宁省沈阳市 110001  
李福才, 中国医科大学遗传学教研室 辽宁省沈阳市 110001  
赵金满, 男, 1955-10-09 生, 辽宁省沈阳市人, 教授, 主任医师, 主要从事肝炎-肝硬化-肝癌基础与临床研究及腹水诊断与治疗研究。  
辽宁省自然科学基金资助课题, No. 2001225002-2  
项目负责人: 赵金满, 110001, 辽宁省沈阳市南京北街 155 号, 中国医科大学附属第一医院消化科. jinmanzhao@hotmail.com  
电话 024-23256666-6199  
收稿日期: 2003-04-03 接受日期: 2003-05-17

## Telomerase activity in tuberculous peritonitis and malignant ascites

Jin-Man Zhao, Fu-Cai Li, Ji-Hong Yu, Wei Cui, Bao-Yu Fu, Wen-Ge Sa

Jin-Man Zhao, Ji-Hong Yu, Wei Cui, Bao-Yu Fu, Wen-Ge Sa, Department of Gastroenterology, First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China  
Fu-Cai Li, Department of Medical Genetics, China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China  
Supported by the Science Foundation of Liaoning Province, No. 2001225002-2  
Correspondence to: Jin-Man Zhao, Department of Gastroenterology, First Affiliated Hospital, China Medical University, 155 Nanjing North Street, Shenyang 110001, China. jinmanzhao@hotmail.com  
Received: 2003-04-17 Accepted: 2003-05-17

## Abstract

**AIM:** To determine telomerase activity of exfoliated cells in tuberculous peritonitis and malignant ascites, and study the diagnostic value of telomerase activity in differentiating tuberculous peritonitis from malignant ascites.

**METHODS:** TRAP-PCR-ELISA and TRAP-PCR-silver staining were employed to determine telomerase activity in 18 specimens of malignant ascites and 13 specimens of tuberculous peritonitis. Telomerase activities in tuberculous peritonitis and malignant ascites were analysed.

**RESULTS:** Telomerase activity in malignant ascites ( $0.387 \pm 0.023$ ) was significantly higher than that in tuberculous peritonitis ( $0.023 \pm 0.004$ ,  $P < 0.01$ ). The positive rate of telomerase activity in malignant ascites was significantly higher than that in tuberculous peritonitis, 88.9 % (16/18) vs 7.7 % (1/13),  $P < 0.01$ . The sensitivity, specificity and accuracy of determination of telomerase activity in diagnosis of malignant ascites were 88.9 %, 92.3 %, and 90.3 %, respectively.

**CONCLUSION:** Telomerase activity is positive in malignant ascites and may serve as a useful indicator for differentiating between tuberculous peritonitis and malignant ascites.

Zhao JM, Li FC, Yu JH, Cui W, Fu BY, Sa WG. Telomerase activity in tuberculous peritonitis and malignant ascites. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003;11(10):1563-1565

## 摘要

**目的:** 研究端粒酶在结核性腹膜炎腹水与恶性腹水的活性水平, 探讨腹水端粒酶检测鉴别结核性腹水与恶性腹水的诊断价值。

**方法:** 应用TRAP-PCR-ELISA方法和TRAP-PCR-银染法分别对13例结核性腹膜炎和18例恶性腹水标本(肝癌7例, 胃癌6例, 结肠癌2例, 胰腺癌1例, 卵巢癌2例)进行定性、定量端粒酶活性检测。对比腹水细胞学检查, 分析腹水端粒酶活性鉴别结核性腹膜炎与恶性腹水的诊断价值。

**结果:** 恶性腹水组端粒酶活性( $0.387 \pm 0.023$ )高于结核性腹膜炎腹水组( $0.023 \pm 0.004$ ), 统计差异显著( $P < 0.01$ ); 恶性腹水端粒酶阳性率88.9 % (16/18)明显高于结核性腹膜炎腹水组7.7 % (1/13),  $P < 0.01$ 。仅1例结核性腹膜炎腹水端粒酶阳性。

**结论:** 恶性腹水端粒酶阳性, 结核性腹水端粒酶阴性。腹水端粒酶活性检测可能是鉴别结核性与恶性腹水的重要依据。

赵金满, 李福才, 于继红, 崔巍, 傅宝玉, 沙文阁. 结核性腹膜炎与恶性腹水端粒酶活性. 世界华人消化杂志 2003;11(10):1563-1565  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1563.asp>

## 0 引言

良恶性腹水的鉴别诊断是临床常见的难题, 尤其棘手的是结核性腹膜炎与恶性腹水的鉴别诊断。为探索良恶性腹水的鉴别诊断, 近年有很多检测指标被尝试应用。如腹水AFP、CEA、铁蛋白、腺苷脱氨酶、LDH等, 但由于这些指标受器官组织特异性或良恶性腹水有重叠的限制, 而使其实际应用价值大打折扣。端粒酶的研究发现, 人类90 %的肿瘤组织存在异常端粒酶活性, 而正常组织细胞端粒酶活性低, 甚至无端粒酶活性。端粒酶是一个不受组织器官限制的肿瘤标志物, 故腹水端粒酶活性的研究受到国内外关注<sup>[1, 2]</sup>。我们探讨腹水端粒酶活性检测鉴别结核性腹膜炎与恶性腹水的价值。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 2001-05/2002-12腹水患者31例, 男15例, 女16例, 年龄22-67(平均48.6岁)。其中恶性腹水18例(肝癌7例, 胃癌6例, 结肠癌2例, 胰腺癌1例, 卵巢癌2例), 结核性腹膜炎腹水13例。所有病例均未经放疗或化疗。Telomerase PCR-ELISA试剂盒(boehringer manheim公司)。PCR扩增仪(PTC-100-60, MJ RESEARCH, 美

国), 酶标仪(Elx800, BIO-TEX, 美国), 低温离心机(RC-SC, DUPONT/SORVALL, 美国).

1.2 方法 常规腹腔穿刺抽腹水 10 mL, 3 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, PBS 洗 2 次. 加裂解液 200  $\mu$ L, 混匀, 冰浴 30 min; 4  $^{\circ}$ C 16 000 g 低温离心 20 min, 上清 -80  $^{\circ}$ C 保存待用. 取细胞抽提液 2  $\mu$ L 加 TRAP-PCR 扩增反应液, DEPC 水补足至 50  $\mu$ L, 按下列顺序在 PCR 仪上进行扩增反应: 25  $^{\circ}$ C 30 min, 95  $^{\circ}$ C 5 min 循环 1 周期; 继以 94  $^{\circ}$ C 30 s 变性、50  $^{\circ}$ C 30 s 退火、72  $^{\circ}$ C 90 s 延伸共循环 30 个周期; 最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min. 取 PCR 扩增产物 5  $\mu$ L, 加变性液 20  $\mu$ L, 室温 10 min, 加入杂交液后, 取出 100  $\mu$ L, 加入已包被的微孔板上, 37  $^{\circ}$ C 水浴 2 h, 洗板, 每孔加入酶标抗体 100  $\mu$ L, 室温 20 min, 洗板, 经 TMB 底物显色, 室温 20 min, 终止反应, 在酶标仪上测吸光度值(A 460 nm-A 690 nm). 取上述 PCR 扩增产物 25  $\mu$ L, 加入 125 g/L 非变性聚丙烯酰胺凝胶上进行垂直电泳, 电泳完成后, 取下凝胶进行银染. 显示端粒酶特异性 6- 碱基阶梯带为阳性. 阴性标本不出现 6-碱基阶梯带. 腹水细胞学检测为本院检验科常规检查.

统计学处理 均数比较显著性差异采用 t 检验, 率的比较采用  $\chi^2$  检验.

## 2 结果

在 18 例恶性腹水中端粒酶活性阳性检出率 88.9 % (16/18), 而在 13 例良性腹水中其阳性检出率仅 7.7 % (1/13), 两组间差异显著 ( $P < 0.01$ ). 恶性腹水组脱落细胞端粒酶活性吸光度值 ( $0.387 \pm 0.023$ ) 明显高于结核性腹膜炎组 ( $0.023 \pm 0.004$ ), 差异显著 ( $P < 0.01$ ). 腹水癌细胞阳性者, 端粒酶活性均阳性. 腹水端粒酶活性阴性者, 癌细胞均阴性. 细胞学诊断准确率 77.4 %, 端粒酶诊断准确率达 90.3 % (表 1).

表 1 端粒酶与细胞学诊断恶性腹水的敏感性及其特异性 (%)

	端粒酶	癌细胞
敏感性	88.9	61.1
特异性	92.3	100
阳性预测值	94.1	100
阴性预测值	85.7	65

## 3 讨论

目前良恶性腹水鉴别诊断问题, 尤其是结核性腹膜炎与恶性腹水的鉴别一直未能得到满意解决. 由于缺乏诊断结核性腹膜炎的敏感、特异性指标, 同时也缺乏诊断恶性腹水的广谱、特异性标志物, 所以给结核性腹膜炎与恶性腹水的鉴别诊断带来困难. 已有的腹水癌细胞检查, 虽有满意的特异性, 但其敏感性不足; 肿瘤标志物 AFP, CEA 明显受器官肿瘤来源限制; 铁蛋白、腺苷脱氨酶浓度在良恶性腹水之间存在一定重叠. 学者们一直在寻找一项特异性的广谱肿瘤标志物, 以供临

床需要, 用于良恶性腹水鉴别诊断, 但尚未取得突破性进展. 因此在临床实际工作中往往需要多项指标联合检测, 以提高诊断正确率.

端粒(telomere)是真核细胞染色体末端的一种特殊结构, 由串联排列的重复 DNA 序列和端粒结合蛋白构成, 是维持染色体完整性的保护结构. 人类端粒 DNA 序列一般 5-20 kb, 细胞分裂一次, 端粒丢失一段, 缩短到一定程度时, 出现细胞衰老或死亡. 端粒酶是一种能延长端粒末端的核酸蛋白酶, 由 RNA 和蛋白质组成, 能以其 RNA 为模板, 反转录合成端粒 DNA, 并加到染色体末端, 以补偿细胞分裂时端粒 DNA 的缩短, 维持端粒长度. 所以, 端粒酶的激活可导致异常分化的肿瘤细胞不断分裂增生. 近年来, 对各种恶性肿瘤端粒酶活性的研究日渐广泛、深入, 如胃癌<sup>[3-7]</sup>、肝癌<sup>[8-14]</sup>、结肠癌<sup>[15-19]</sup>、胰腺癌<sup>[20]</sup>、卵巢癌等<sup>[21, 22]</sup>. 端粒酶与肿瘤细胞永生关系的确立, 端粒酶被认为是目前已知最广谱的肿瘤特异性的肿瘤标志物之一<sup>[23]</sup>. 并且对判断抗肿瘤疗效、预后均有重要意义<sup>[24-28]</sup>. 国内外学者已将脱落细胞端粒酶活性检测用于恶性肿瘤的诊断研究, 如检测肠灌洗液端粒酶活性诊断结肠癌<sup>[29]</sup>、检测胰液端粒酶活性诊断胰腺癌<sup>[30-32]</sup>、检测腹水端粒酶活性诊断恶性腹水等<sup>[2, 33-35]</sup>. 但将端粒酶活性检测用于结核性腹膜炎与恶性腹水鉴别诊断的研究目前文献中尚少有报道.

我们对腹水标本 PCR 产物分别采用杂交 ELISA 和银染法检测了端粒酶活性, 检测结果一致, 定量法检测为阴性的标本定性法检测亦为阴性. 研究发现恶性腹水组中端粒酶活性为  $0.387 \pm 0.023$ , 阳性率 88.9 %, 与文献<sup>[1, 35]</sup>报道相近. 恶性腹水组端粒酶活性明显高于结核性腹膜炎腹水组 ( $0.023 \pm 0.004$ , 阳性率 7.7 %,  $P < 0.01$ ). 在恶性腹水中仅 2 例端粒酶阴性, 而结核性腹膜炎中仅 1 例端粒酶阳性. 另外, 本实验中发现 1 例结核性腹膜炎出现端粒酶活性增高, 这种假阳性结果曾有报道, 其原因能是由于腹水中大量淋巴细胞所致<sup>[36]</sup>. TRAP-ELISA 是一高度敏感性检测方法, 只要反应体系中有约 10 个端粒酶活性细胞存在, 即可检测出来. 与腹水癌细胞检查比较, 腹水癌细胞阳性者, 端粒酶活性均为阳性. 在 5 例腹水癌细胞阴性的恶性腹水中, 端粒酶活性也呈阳性. 端粒酶诊断的准确率 (90.3 %) 明显高于癌细胞检查的准确率 (77.4 %). 说明腹水端粒酶活性检测对结核性腹水与恶性腹水鉴别优于细胞学检查, 二者联合应用更有价值.

本研究结果表明, 腹水端粒酶活性检测鉴别结核性腹膜炎腹水与恶性腹水, 具有诊断特异性强, 准确率高. 我们认为腹水端粒酶活性检测是鉴别结核性腹膜炎腹水与恶性腹水一项新的重要指标, 腹水端粒酶活性阳性时是提示恶性腹水的有力证据. 如能进一步克服假阳性的影响, 并改进实验方法, 使其操作简单、方便、经济, 这一指标更具有临床实用价值.

## 4 参考文献

- 1 Mu XC, Brien TP, Ross JS, Lowry CV, McKenna BJ. Telomerase activity in benign and malignant cytologic fluids. *Cancer* 1999; 87:93-99
- 2 Mori N, Oka M, Hazama S, Iizuka N, Yamamoto K, Yoshino S, Tangoku A, Noma T, Hirose K. Detection of telomerase activity in peritoneal lavage fluid from patients with gastric cancer using immunomagnetic beads. *Br J Cancer* 2000;83: 1026-1032
- 3 Matsutani N, Yokozaki H, Tahara E, Tahara H, Kuniyasu H, Kitadai Y, Haruma K, Chayama K, Tahara E, Yasui W. Expression of MRE11 complex (MRE11, RAD50, NBS1) and hRap1 and its relation with telomere regulation, telomerase activity in human gastric carcinomas. *Pathobiology* 2001;69:219-224
- 4 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
- 5 Okusa Y, Ichikura T, Mochizuki H, Shinomiya N. Clinical significance of telomerase activity in biopsy specimens of gastric cancer. *J Clin Gastroenterol* 2000;30:61-63
- 6 Jong HS, Park YI, Kim S, Sohn JH, Kang SH, Song SH, Bang YI, Kim NK. Up-regulation of human telomerase catalytic subunit during gastric carcinogenesis. *Cancer* 1999;86:559-565
- 7 Yang SM, Fang DC, Yang JL, Luo YH, Lu R, Liu WW. Effect of antisense gene to human telomerase reverse transcriptase on telomerase activity and expression of apoptosis-associated gene. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:149-152
- 8 Hsieh HF, Harn HJ, Chiu SC, Liu YC, Lui WY, Ho LI. Telomerase activity correlates with cell cycle regulators in human hepatocellular carcinoma. *Liver* 2000;20:143-151
- 9 Takahashi S, Kitamoto M, Takaishi H, Aikata H, Kawakami Y, Nakanishi T, Shimamoto F, Tahara E, Tahara H, Ide T, Kajiyama G. Expression of telomerase component genes in hepatocellular carcinomas. *Eur J Cancer* 2000;36:496-502
- 10 Shimada M, Hasegawa H, Gion T, Utsunomiya T, Shirabe K, Takenaka K, Otsuka T, Maehara Y, Sugimachi K. The role of telomerase activity in hepatocellular carcinoma. *Am J Gastroenterol* 2000;95:748-752
- 11 Kojima H, Yokosuka O, Kato N, Shiina S, Imazeki F, Saisho H, Shiratori Y, Omata M. Quantitative evaluation of telomerase activity in small liver tumors: analysis of ultrasonography-guided liver biopsy specimens. *J Hepatol* 1999;31:514-520
- 12 Nagao K, Tomimatsu M, Endo H, Hisatomi H, Hikiji K. Telomerase reverse transcriptase mRNA expression and telomerase activity in hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol* 1999;34:83-87
- 13 Qu B, Li BJ, Lu ZW, Pan HL. Clinical significance of telomerase activity detected in fine-needle aspiration specimens to liver cancer diagnosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:538-541
- 14 范公忍, 汪毅, 邬光惠, 黄苏里. 端粒酶在原发性肝癌中的表达. *世界华人消化杂志* 2000;8:573
- 15 Kawanishi-Tabata R, Lopez F, Frattantonio S, Kim N, Goldblum J, Tubbs R, Elson P, Lavery I, Bukowski RM, Ganapathi R, Ganapathi MK. Telomerase activity in stage II colorectal carcinoma. *Cancer* 2002;95:1834-1839
- 16 Boldrini L, Faviana P, Gisfredi S, Zucconi Y, Di Quirico D, Donati V, Berti P, Spisni R, Galleri D, Materazzi G, Basolo F, Miccoli P, Pingitore R, Fontanini G. Evaluation of telomerase in the development and progression of colon cancer. *Int J Mol Med* 2002;10:589-592
- 17 Kamori M, Kanauchi H, Nakamura K, Kawahara M, Weber TK, Mafune K, Kaminishi M, Takubo K. Demonstration of human telomerase reverse transcriptase in human colorectal carcinomas by in situ hybridization. *Int J Oncol* 2002;20:15-21
- 18 Shoji Y, Yoshinaga K, Inoue A, Iwasaki A, Sugihara K. Quantification of telomerase activity in sporadic colorectal carcinoma: association with tumor growth and venous invasion. *Cancer* 2000;88:1304-1309
- 19 Fang XM, Yu JP, Luo HS. Relationship between hTERT and p16 gene expressions and telomerase activity in colorectal cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:12-14
- 20 Tang SJ, Dumot JA, Wang L, Memmesheimer C, Conwell DL, Zuccaro G, Goormastic M, Ormsby AH, Cowell J. Telomerase activity in pancreatic endocrine tumors. *Am J Gastroenterol* 2002;97:1022-1030
- 21 Wang SJ, Sakamoto T, Yasuda Si S, Fukasawa I, Ota Y, Hayashi M, Okura T, Zheng JH, Inaba N. The relationship between telomere length and telomerase activity in gynecologic cancers. *Gynecol Oncol* 2002;84:81-84
- 22 Datar RH, Naritoku WY, Li P, Tsao-Wei D, Groshen S, Taylor CR, Imam SA. Analysis of telomerase activity in ovarian Cystadenomas, low-malignant-potential tumors, and invasive carcinomas. *Gynecol Oncol* 1999;74:338-345
- 23 王伟, 刘俊平. 端粒酶与肿瘤. *世界华人消化杂志* 2002;10:683-688
- 24 Komine F, Shimojima M, Moriyama M, Amaki S, Uchida T, Arakawa Y. Telomerase activity of needle-biopsied liver samples: its usefulness for diagnosis and judgement of efficacy of treatment of small hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2000;32:235-241
- 25 Zhang RG, Guo LX, Wang XW, Xie H. Telomerase inhibition and telomere loss in BEL-7404 human hepatoma cells treated with doxorubicin. *World J Gastroenterol* 2002;8:827-831
- 26 Tatsumoto N, Hiyama E, Murakami Y, Imamura Y, Shay JW, Matsuura Y, Yokoyama T. High telomerase activity is an independent prognostic indicator of poor outcome in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2000;6:2696-2701
- 27 朱芮, 肖卫东, 熊永炎, 邹典定, 王莉, 陈新煜. 胃癌癌组织中端粒酶及 nm23 的表达与预后. *世界华人消化杂志* 2000;8:1305-1306
- 28 Jia L, Li YY. Telomerase activity of exfoliated cancer cells in colonic luminal washings. *Huaren Xiaohua Zazhi* 1998;6:955-957
- 29 Ishibashi K, Hirose K, Kato H, Ogawa K, Haga S. Determining the telomerase activity of exfoliated cells in intestinal lavage solution to detect colorectal carcinoma. *Anticancer Res* 1999; 19:2831-2836
- 30 Seki K, Suda T, Aoyagi Y, Sugawara S, Natsui M, Motoyama H, Shirai Y, Sekine T, Kawai H, Mita Y, Waguri N, Kuroiwa T, Igarashi M, Asakura H. Diagnosis of pancreatic adenocarcinoma by detection of human telomerase reverse transcriptase messenger RNA in pancreatic juice with sample qualification. *Clin Cancer Res* 2001;7:1976-1981
- 31 Myung SJ, Kim MH, Kim YS, Kim HJ, Park ET, Yoo KS, Lim BC, Wan Seo D, Lee SK, Min YI, Kim JY. Telomerase activity in pure pancreatic juice for the diagnosis of pancreatic cancer may be complementary to K-ras mutation. *Gastrointest Endosc* 2000;51:708-713
- 32 Uehara H, Nakaizumi A, Tatsuta M, Baba M, Takenaka A, Uedo N, Sakai N, Yano H, Iishi H, Ohigashi H, Ishikawa O, Okada S, KaKizoe T. Diagnosis of pancreatic cancer by detecting telomerase activity in pancreatic juice: comparison with K-ras mutations. *Am J Gastroenterol* 1999;94:2513-2518
- 33 Tseng CJ, Jain S, Hou HC, Liu WW, Pao CC, Lin CT, Horng SG, Soong YK, Hsueh S. Applications of the telomerase assay in peritoneal washing fluids. *Gynecol Oncol* 2001;81:420-423
- 34 Gauthier LR, Granotier C, Soria JC, Faivre S, Boige V, Raymond E, Boussin FD. Detection of circulating carcinoma cells by telomerase activity. *Br J Cancer* 2001;84:631-635
- 35 刘吉勇, 元玉琴. 端粒酶诊断癌性腹水的临床价值. *世界华人消化杂志* 1999;7:1008-1009
- 36 Tangkijvanich P, Tresukosol D, Sampatanukul P, Sakdikul S, Voravud N, Mahachai V, Mutirangura A. Telomerase assay for differentiating between malignancy-related and nonmalignant ascites. *Clin Cancer Res* 1999;5:2470-2475



# 山莨菪碱联用地塞米松治疗腹部外科疾病并发 MODS 临床研究的操作方案

岳茂兴

岳茂兴, 中国人民解放军第 306 医院腹部外科中心、特种医学中心  
北京市 100101

岳茂兴, 男, 1944-11-27 生, 江苏省武进人, 汉族, 教授、主任医师。对普通外科、ICU 急救外科及特种医学的紧急救治有专长。已发表论文 289 篇, 获全军科技成果奖二等奖 3 项, 三、四等奖 26 项, 编著《危重病急救与监测》等 6 部著作, 享受政府特殊津贴, 2000-12 被总装备部评为“优秀科技干部标兵”, 2003 年被总装备部评为“后勤科技先进个人”, 荣获“中国航天基金奖”, 现任中国科学院国防战略委员会特种伤病医学委员会主任委员, 中国救援协会理事, 中国中西医结合全国外科病急救学组组长, 总装备部腹部外科中心主任, 载人航天紧急救护专家组组长, 神州号宇宙飞船主着陆场区医疗救护队技术队长。目前担任中国工程院重大咨询项目立项研究课题、国家 921 工程航天员医疗救护重大课题、北京市科技计划重大项目、全军“十五”计划指令性科技重大项目等六项重大科研课题的研究工作。北京科技计划重大项目科研课题资金资助项目, No. 200202306  
项目负责人: 岳茂兴, 100101, 北京市, 中国人民解放军第 306 医院腹部外科中心、特种医学中心。yuemx@ns.cetin.net.cn  
电话: 010-66354546  
收稿日期: 2003-05-14 接受日期: 2003-06-02

## 摘要

目的: 本研究探索山莨菪碱联用地塞米松治疗腹部外科疾病并发 MODS 患者的效果。

方法: 通过多中心、前瞻性、随机对照临床研究。用法: 山莨菪碱: 每次 0.33 mg/kg, 3 次/d; 地塞米松: 每次 0.33 mg/kg, 3 次/d; 静脉滴注或静脉推注, 共 3 d。

结果: 联用山莨菪碱、地塞米松治疗需手术的 MODS 患者的治疗方案, 使 MODS 抢救成功率进一步提高, 死亡率降低。

结论: MODS 及 MOF 病因复杂, 治疗困难, 死亡率高, 山莨菪碱联用地塞米松能遏止住患者的危重状态, 为紧急手术和下一步的治疗赢得时间, 降低了死亡率。而对重要脏器无损伤作用。

岳茂兴. 山莨菪碱联用地塞米松治疗腹部外科疾病并发 MODS 临床研究的操作方案. 世界华人消化杂志 2003;11(10):1566-1568  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1566.asp>

## 0 引言

多器官功能障碍综合征(MODS)是严重感染、创伤、休克、大手术等原发病发生 24 h 后, 机体同时或序贯发生两个或两个以上器官或系统功能障碍的临床综合征。据美国危重病医学会报道, 美国每年约有 75 万例脓毒症患者, 其中 22.5 万例死于脓毒症相关的器官功能不全, 超过了急性心梗的死亡率, 被认为是良性疾病的第一死因。我国目前尚缺乏详细统计资料。若据此推测, 每年约有 300 万例患者发生脓毒症。MODS 病情凶险,

死亡率高<sup>[1]</sup>, 据国内外报道, 脓毒症及其相关器官功能不全的死亡率为 30-50 %, 而 MOF(多器官功能衰竭)患者死亡率高达 56-77.8 %。MODS 及 MOF 目前还没有好的治疗手段, 本研究探索降低患者死亡率的中西医结合治疗措施<sup>[2-4]</sup>。研究证实造成 MODS 患者死亡的 3 个主要原因: (1)微循环病变不能及时控制和纠正。因为微循环病变(血管渗出和微血管栓塞)是腹部外科 MOF 的重要发病基础, 当微循环障碍不能及时控制和纠正, 并出现临床称之为微循环衰竭时, 极易导致腹部外科 MODS 及 MOF 患者死亡。(2)严重感染不能控制。当严重感染不能控制, 常导致多种血管活性物质和炎症递质细胞因子等的增加以及内皮细胞损伤, 加剧了 MODS 及 MOF 的进程, 造成患者死亡。(3)高分解代谢始终得不到纠正。高动力型循环状态始终得不到纠正, 致使机体处于一种失控的代谢紊乱, 免疫功能异常状态, 常导致严重并发症的发生, 造成死亡。

遏止过度的炎症反应, 改善组织器官的微循环和代谢状况, 是 MODS 治疗的重要一环。山莨菪碱和地塞米松是临床常用药物。山莨菪碱是传统的 M 胆碱能受体阻滞剂, 其抗内毒素、抗休克、改善微循环、稳定生物膜等作用已普遍被人们接受。地塞米松也是常用的传统药物之一。它有拮抗机体的全身炎症反应、阻断中性粒细胞、激活巨噬细胞, 降低血小板活化因子(PAF)和氧自由基(OF<sub>R</sub>)的产生、抑制 PLA<sub>2</sub> 及花生四烯酸代谢产物的释放, 保护生物膜、拮抗内毒素等作用。将山莨菪碱和地塞米松短程联合应用, 其保护器官功能、阻断炎症反应、改善微循环、降温、抗休克及对抗内毒素的作用更强。对重要脏器无损伤作用。从我国的国情出发选用疗效确切、价格低廉, 并且适合于大范围抢救的药物山莨菪碱和地塞米松。并且无需特殊设备, 药品广泛, 对社会经济发展有显著意义。

提出并实验验证了山莨菪碱和地塞米松联用为特点的综合治疗方法<sup>[5-10]</sup>: (1)能显著改善心、肝、肺、肾功能, 降低死亡率, 减少药物副反应, 优于单独应用。(2)增加微循环灌注量和微循环内微粒移动的数量;(3)逆转胃黏膜内 pH 值下降, 改善组织氧供;(4)抑制血浆胃泌素、胃动素水平的升高;(5)降低血浆 TNF 和 LPO 的水平;(6)减轻组织细胞变性、坏死, 减少微血栓的形成;使肾脏内皮素 mRNA 表达水平明显降低等。临床救治中证实其具有方便、经济、可靠、疗效显著的特点, 能遏止

住患者的危重状态, 还为紧急手术和下一步的治疗赢得时间, 降低了死亡率. 而对重要脏器无损伤作用.

当前 MODS 的诊断、病情严重度评估尚无统一标准, 在治疗上国内外更无统一方案, 亦无确切降低死亡率的治疗方法, 或缺乏多中心大样本的临床验证. 因此, 探讨 MODS 诊断及更有效的治疗方法, 对提高抢救成功率具有重大意义. 本课题拟在既往工作的基础上, 通过多中心、大样本前瞻性研究, 以卫生经济学观点, 评价联用山莨菪碱和地塞米松治疗需手术 MODS 患者试验结果的科学性、准确性以及实际治疗效果, 以提高 MODS 的抢救成功率.

## 1 研究目的

(1)通过多中心、前瞻性、随机对照临床研究, 评价联用山莨菪碱和地塞米松治疗需手术 MODS 患者的效果; (2)探讨联用山莨菪碱和地塞米松治疗需手术 MODS 患者的治疗机制; (3)降低需手术的MODS患者的死亡率.

## 2 考核指标

(1)试验结果的科学性、准确性; (2)衰竭器官恢复的时间; (3) 28 d 死亡率; (4)统计源期刊文章等.

## 3 研究方案

本研究为前瞻性、多中心、随机对照临床研究

3.1 病例选择标准 具备发生MODS的病因并符合MODS的诊断标准, 同时必须要进行手术的患者. (1)需要手术处理的急性坏死性胰腺炎引起的 MODS; (2)需要外科处理的严重感染并发 MODS; (3)多发创伤后并发的 MODS 需要手术者; (4)急性肠梗阻、肠扭转、肠坏死并发 MODS 能手术解除病因者; (5)急性化脓性梗阻性胆管炎并发 MODS 需要手术解除病因者; (6)肝脓肿需要手术引流者. (7)需手术的 MODS 患者. (8)上述因素发生 24 h 后按 Marshall 标准(表 1)单一器官损伤积分=1 分为系统、器官功能障碍(MODS), 大于等于 3 分为系统、器官功能衰竭(MOF). (9)年龄 18-65 岁.

表 1 MODS 评分标准(Marshall 1995 年)

	0	1	2	3	4
呼吸系统(PaO <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub> )	> 300	226-300	151-225	76-150	≤ 75
肾(血清肌酐 μmol/L)	≤ 100	101-200	201-350	351-500	>500
肝(血胆红素 mg/L)	≤ 20	21-60	61-120	121-240	>240
心血管(PAR)	≤ 10.0	10.5-15.0	15.1-20.0	20.1-30.0	≥ 30.0
血液(血小板 × 10 <sup>9</sup> )	> 120	80-120	51-80	21-50	≤ 20
中枢神经系统	15	13-14	10-12	7-9	≤ 6
(Glasgow 评分)					

PAR(压力调整后心率)= 心率 × 右心房(中心静脉)压 / 平均血压.

3.2 排除标准 (1)有青光眼病史者; (2)凝血机制障碍患者;

(3)应激性溃疡及胃十二指肠溃疡病患者; (4)长期应用糖皮质激素患者; (5)肿瘤晚期及各种严重消耗性疾病患者; (6)年龄小于 18 岁或大于 65 岁; (7)有精神疾病病史者; (8)心率大于 140 次 / 分者.

3.3 剔除标准 (1)治疗未超过 24 h 死亡或出院者; (2)未能坚持系统治疗者.

3.4 治疗方案 (1)山莨菪碱: 每次 0.33 mg/kg, 3 次 /d. (2)地塞米松: 每次 0.33 mg/kg, 3 次 /d; 静脉滴注或静脉推注, 共 3 d.

3.5 防治可能发生的并发症 (1)为防治可能发生的并发症应同时应用甲氧米呱等药物静脉注入, 一般情况甲氧米呱 0.4g/ 次、2 次 /d, 以预防应激性溃疡的发生. (2)为防治使用激素可能发生的感染扩散, 应采用抗需氧菌和抗厌氧菌抗生素联合正确合理应用, 抗生素的应用应该能覆盖引起感染的所有致病菌, 采用对肝、肾功能影响极小的抗生素, 如抗厌氧菌的甲硝唑或替硝唑和抗需氧菌的第三代头孢菌素.

特别应该注意监测肠道菌群变化, 积极防治二重感染的发生, 同时要连续动态监测电解质的变化, 并及时给予纠正.

3.6 观察指标 (1)临床症状和体征. (2)患者 28 d 的死亡率、ICU 死亡率、医院死亡率、住 ICU 的时间、住院时间、各衰竭脏器恢复的时间. (3)实验室: (1)心血管: 动脉血压、心率、CK-MB、EKG. (2)肺: 呼吸频率、节律、PaO<sub>2</sub>、吸入氧浓度、肺 X 光片. (3)肾: Cr、BUN. 肝脏: ALT、AST、TBIL、DBIL、碱性磷酸酶. (4)胃肠: 血浆内毒素、肠鸣音、便潜血. (5)脑: 依据 Glasgow 评分所涉及的项目观察.

3.7 手术有关要求 手术人员应基本固定, 按操作常规进行, 以便尽量减少因手术熟练程度导致的误差. (1)手术记录及围手术期记录更要详尽、仔细. (2)手术中尽可能获取标本, 进行常规病理检查及进一步的细胞、分子生物学检查, 提取脓液、体液、引流液、血液等进行培养、生化检查及细菌学检测. (3)A, B, C 三组治疗上的差别仅仅在于 B 组应用山莨菪碱: 每次 0.33 mg/kg, 3 次 /d; 地塞米松: 每次 0.33 mg/kg, 3 次 /d; 静脉滴注或静脉推注, 共 3 d. C 组应用地塞米松每次 0.33 mg/kg, 3 次 /d; 静脉滴注或静脉推注, 共 3 d. A 组不用, 作对照. 在总的治疗上是一样的, 以便确定山莨菪碱和地塞米松联用及单用地塞米松在需手术的 MODS 患者中的效果. (4) A, B, C 三组应选择同病种、同病情随机对照.

3.8 需病例的数量 根据 WHO 推荐的 EPI6 软件计算, 总数为 300 例, 每组 100 例.

3.9 本项多中心临床试验指定用药 (1)山莨菪碱注射液(杭州民生药厂); (2)地塞米松注射液(天津金耀氨基酸有限公司)

3.10 质控措施 包括制定并严格落实诊断标准、人员培训计划、治疗观察表(包括变量清单, 病例报告表)、

计算机编码表、随机表,对入选病例逐例检查、评估、反馈,资料管理与统计(建立录入界面,双人录入,电子核对),中期评估与终期验收等.成立课题专家指导组,质量控制组,资料数据管理组等.

3.11 研究进度 (1)本课题实施年限为3(2002-11/2005-10); (2)确定各参研单位,通过计算机网络等手段,实行网上招聘及协会协作,组成多中心协作组,参加单位签定协作合同.并进行参加单位人员的培训与考核,启动课题; (3) 2002-12/2005-06 临床试验; (4)多中心、随机对照完成 300 例 MODS 患者; (5) 2005-07/2005-10 完成资料统计分析,撰写论文,验收及申报成果.

3.12 不良反应填表说明 (1)应激性溃疡的发生; (2)二重感染的发生; (3)出血严重程度判断:严重或危及生命的出血:指颅内出血;大量咯血(即1次咯血量>100 mL或24 h累积咯血量>400 mL).消化道大出血或腹膜后出血,引起低血压状态或休克或需输血者.轻度出血:指皮肤、黏膜、肉眼及显微镜下血尿、血痰,或小量咯血、呕血等(穿刺或注射部位少量瘀斑不计算在内).中度出血:介于轻度出血与严重出血之间; (4)其他不良反应:败血症;内毒素休克;溶血;低血容量性休克;治疗不充分;不良反应的出现时间;详细记录出现不良反应的年月日时.

#### 4 参考文献

- 1 王宝恩,张淑文,任爱民,张丽霞,王红,杨宇清,次秀丽,毕铭华,王彦,李昂,齐文杰.中西医结合救治感染性 MODS /MOF 225 例.世界华人消化杂志 1999;7:818-819
- 2 岳茂兴,李学彪,李成林,杨鹤鸣,李新元,赵尔增,李建忠,张诗琳.腹部外科疾病并发 MODS 的临床救治研究.中华急诊医学杂志 2001;10:17-20
- 3 岳茂兴.腹部外科疾病并发多器官功能障碍综合征代谢特点及分阶段营养支持治疗.中国危重病急救医学杂志 2003;15:29-31
- 4 岳茂兴.胃肠道功能障碍及衰竭的诊断和治疗.世界华人消化杂志 2002;6:3-6
- 5 岳茂兴,李成林,赵尔增,李新元,李学彪,冯凯,张诗琳,薛亮,张连春,罗放,王新明,张圭显.山莨菪碱及地塞米松对 MODS 时微循环及免疫病理学改变的实验研究.中华外科杂志 1997;35:392-396
- 6 岳茂兴,张圭显,李成林,李学彪,张连春,张诗琳,王新明,杨建武.短程大剂量山莨菪碱及地塞米松对多脏器功能失常综合征免微循环变化的影响.中国危重病急救医学 1997;9:718-720
- 7 李新元,郑燕华,岳茂兴,杨鹤鸣,李建中,张建忠.大剂量山莨菪碱、地塞米松对 MODS 大鼠肾脏.中国临床医学 1999;11:505-507
- 8 岳茂兴,李成林,张连春,李学彪,张圭显,张诗琳.短程大剂量山莨菪碱及地塞米松救治外科危重患者 186 例.解放军医学 1996;21:401-403
- 9 岳茂兴,李成林,杨鹤鸣,李建忠,李新元,赵尔增.山莨菪碱联用地塞米松治疗多器官功能障碍综合征机制的研究.中国危重病急救医学 2000;12:341-343
- 10 Yue MX. A new combined therapy to 15 patients with multiple organ failure in abdominal-surgery. China Natl J New Gastroenterol 1996;2:6-8

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2003 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消 息 •

## 欢迎订阅 2004 年度世界华人消化杂志®

本刊讯 世界华人消化杂志®被美国《化学文摘》(Chemical Abstracts,CA)、荷兰《医学文摘库/医学文摘(EMBASE/Excerpta Medica .EM)》和俄罗斯《文摘杂志》(Abstract Journal)收录.国内被以下检索系统收录,分别为中国科技论文统计与分析(科技部遴选为中国科技论文统计源期刊之一),中国学术期刊文摘,中国生物医学文献光盘数据库,中文科技资料目录医药卫生,解放军医学图书馆 CMCC 系统,中国医学文摘外科学分册(英文版),中国医学文摘内科学分册(英文版),国家级火炬计划项目中国学术期刊综合评价数据库来源期刊.世界华人消化杂志®(原刊名新消化病学杂志)1995 年度,1998 年度,1999 年度,2000 年度 2001 年度,分别被评为山西省一级期刊.中国科技信息研究所信息分析研究中心期刊检索报告:2001 年度世界华人消化杂志®总被引频次 6468,影响因子 3.733,即年指标 0.747,他引总引比 0.2,海外作者论文比 0.012,地区分布数 29,基金和资助论文比例 0.176,指标综合加权评分 76.96.世界华人消化杂志®大 16 开,200 页,月刊,定价 24.00 元/期,邮发代号 82-262. E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com

(世界胃肠病学杂志社 2002-11-08)

# 门脉高压性肠病

尹朝晖, 刘浚阳

尹朝晖, 刘浚阳, 中南大学湘雅三医院普外科 湖南省长沙市 410013  
项目负责人: 刘浚阳, 410013, 湖南省长沙市, 中南大学湘雅三医院普外科.  
yzh0451@yahoo.com.cn  
电话: 0731-8618451  
收稿日期: 2003-01-04 接受日期: 2003-03-29

## 摘要

门脉高压性肠病是一种由门静脉高压症而致的非炎症性的、独特的肠道黏膜病变, 包括门脉高压性小肠病变和门脉高压性结肠病变. 本文以门脉高压性结肠病变为主对其发病率、内镜下表现等多个方面作一综述.

尹朝晖, 刘浚阳. 门脉高压性肠病. 世界华人消化杂志 2003;11(10):1569-1571  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1569.asp>

## 0 引言

随着对肝硬化门静脉高压症胃黏膜病变认识的加深, 有学者渐认识到门静脉高压症肠黏膜病变的独特性, 并提出门脉高压性肠病的概念, 其主要包括门脉高压性小肠病变(portal hypertensive enteropathy, PHE)、门脉高压性结肠病变(portal hypertensive colopathy, PHC)<sup>[1, 2]</sup>; 由于小肠内镜检查的困难性, 故有关门脉高压性肠病的研究主要来自结肠病变, 本文对 PHC 作一综述.

## 1 发病率

有关肝硬化门脉高压结肠黏膜病变的发病率报道不一, 从 2.8-93 % 不等<sup>[2-15]</sup>. 相差较大的原因可能为: (1) 实验组患者选择标准不一: 如 Naveau et al<sup>[2]</sup> 选择 64 例酒精性肝硬化患者进行研究, 而 Bini et al<sup>[5]</sup> 的研究则包括多种病因的肝硬化患者; (2) PHC 判定标准不一; (3) 检查方法不同: 大多数学者应用结肠镜进行研究, 但 Zaman et al<sup>[6]</sup> 对 71 例等待行肝移植的肝硬化患者进行乙状结肠镜检查, 发现 PHC 为 2.8 % (2/71), 而同样行乙状结肠镜检查, Goenka et al<sup>[7]</sup> 报道 PHC 在门脉高压患者中发病率为 12 % (9/75).

综合多位学者的报道, PHC 在门脉高压患者中发病率大致为 40.6 % (668/1647), 若除外乙状结肠镜检查, PHC 发病率约为 43.8 % (657/1501), 皆高于对照组 4.5 % (15/334).

## 2 PHC 内镜表现

2.1 诊断标准 PHC 的内镜诊断标准尚未统一, 主要有下述争论焦点: (1) PHC 是否包括直肠壁静脉曲张(rectal varices, RV)<sup>[2, 5, 8, 12]</sup>; (2) PHC 是否包括黏膜肿胀<sup>[16]</sup>.

Naveau et al<sup>[2]</sup> 认为直肠壁静脉曲张和黏膜血管扩张(vascular ectasias, VE) 是 PHC 的惟一内镜表现. VE 诊断标准: 扁平或轻度突起的直径小于 10 mm 的红色病灶, 其周围为正常状态下的黏膜表现, 同时要排除操作时抽吸或损伤引起的假象. RV 诊断标准: 扩张的、突入管腔的、直径 3-6 mm 直肠黏膜下静脉, 其远端通向齿线; 同时注意与痔血管区别, 后者管径更粗且迂曲.

Bini et al<sup>[5]</sup> 将 PHC 定义为结肠炎样病变和/或血管病灶. 结肠炎样病变表现为结肠黏膜肿胀、红斑、颗粒样变、弥漫分布的暗红色改变、易脆性和/或自发性出血; 血管病灶表现为樱桃红点征、毛细血管扩张或血管发育异常改变. 血管发育异常改变指病变位于结肠黏膜, 直径约 10 mm, 并伴有一供血血管, 外观呈绒球状; 樱桃红点征是指散在的、清亮的红色斑点, 周围为完整黏膜<sup>[10]</sup>. Bini et al<sup>[5]</sup> 尚提出 PHC 的分级标准, 共分为三级: I 级: 结肠黏膜红斑; II 级: 结肠黏膜红斑并伴有黏膜马赛克样改变; III 级: 樱桃红点征、毛细血管扩张或血管发育异常改变.

2.2 发病部位 Bini et al<sup>[5]</sup> 研究发现在 167 例结肠镜检呈结肠炎样病变的肝硬化患者中, 病灶只位于脾曲远端者占 13.7 % (23/167), 脾曲近端者占 12.6 % (21/167), 整个结肠皆可见者 73.7 % (123/167); Tam et al<sup>[10]</sup> 的研究亦表明 PHC 病灶在结肠内的分布是多发的、均匀的. 但其他一些学者的研究认为左半结肠多见<sup>[3, 12-15]</sup>, 而 Kozarek et al<sup>[8]</sup> 却发现 PHC 病灶多涉及右半结肠. 对此难以用解剖学观点解释, 有学者认为可能因患者群体不同、入选条件不同、饮食习惯不同以及有些研究患者数目较少等原因所致<sup>[14, 17]</sup>.

## 3 PHC 组织学表现

Lamps et al<sup>[18]</sup> 应用 HE 和 CD34 染色的方法调查了 46 例门脉高压患者及 24 例对照组结肠黏膜的组织学情况, 与对照组相比, 有 73.9 % (34/46) 门脉高压患者的结肠黏膜血管扩张, 中间层血管迂曲明显、分枝增多; 但未见任何慢性结肠炎那样的黏膜弥漫性改变, 其他改变尚有黏膜轻度水肿、固有层黏膜灶性浸润、灶性黏膜结构紊乱以及腺上皮反应性改变等. 结肠镜下 PHC 病灶活检示, PHC 结肠黏膜组织学改变主要是黏膜毛细血管数目及直径增加, 基底层增厚, 且无明显炎细胞大量浸润<sup>[1, 2, 10, 11]</sup>.

#### 4 PHC 的临床表现

PHC 多是因下消化道出血行结肠镜检查发现, 而 PHC 所致出血较少见, 约占 4%<sup>[15,19]</sup>; 亦缺乏特异的临床表现.

#### 5 PHC 的病理生理

5.1 血流动力学 Yamakado et al<sup>[20]</sup>研究发现 HVPg 大于 12 mmHg 的肝硬化组较非门脉高压组 PHC 发病率高, 同时有 PHC 的肝硬化患者的 HVPg 较无 PHC 者高, 且较后者常伴食管静脉曲张和 PHG, 其认为门脉压力升高在 PHC 形成中起重要作用; 而且分流手术可使 PHC 好转的报道, 也提示门静脉压力与 PHC 间有一定相关关系<sup>[8,21,22]</sup>. 然而也有研究发现 PHC 与 HVPg 无明显相关<sup>[12]</sup>. 可能在 PHC 形成中门静脉压力升高并非惟一因素. Ohta et al<sup>[23]</sup>发现门脉高压大鼠结肠黏膜局部血流量明显升高.

5.2 血管活性物质 NO 是一种有效的血管扩张因子, 由 NOS 催化 L- 精氨酸产生. Ohta et al<sup>[23]</sup>发现门脉高压大鼠结肠黏膜中 iNOS mRNA 表达升高, 但 eNOS mRNA 表达无明显升高, 认为 NOS 对局部结肠黏膜微结构和异常血流改变起重要作用. Chen et al<sup>[12]</sup>检测到患者血浆中胰高血糖素升高, 但其水平与 PHC 有无相关性, 可能在 PHC 形成过程中不起重要作用.

#### 6 影响 PHC 的因素

Misra et al<sup>[3]</sup>发现 60 例门脉高压食管静脉曲张患者未治疗前 PHC 为 56.7% (34/60), EVL 治疗食管曲张静脉消失 4-6 wk 后复查结肠镜示 PHC 仍为 56.7% (34/60); Misra et al<sup>[15]</sup>尚发现 39 例食管静脉曲张患者 EST 前后 PHC 发病率为 60.5% (23/39) 和 66% (25/39), 无统计学差别; 作者认为 EVL 或 EST 后使黏膜下回流受阻, 由此形成的冲击对邻近的胃部影响较大, 而对距离较远的结肠无明显冲击. Ghoshal et al<sup>[13]</sup>亦认为食管曲张静脉的消失与 PHC 的进程无明显相关. 但有学者研究认为食管曲张静脉消失后 PHC 升高<sup>[9]</sup>. 对此矛盾的结果, 有学者质疑: PHC 是由于食管曲张静脉的消失直接引起, 或仅仅为 PH 病程进展的结果<sup>[24]</sup>? 此尚待大宗长期对比资料研究.

多项研究发现有肛直肠静脉曲张者 PHC 少见, 可能是存在的曲张静脉对结肠黏膜血流起减压作用<sup>[3,13-16]</sup>.

#### 7 PHC 的治疗

现阶段有关 PHC 的治疗多针对于其引起的出血, 预防性治疗尚无报道.

##### 7.1 PHC 的非手术治疗治疗

7.1.1 药物治疗 Yoshie et al<sup>[25]</sup>应用奥曲肽(Octreotide)成功治疗了一位因 PHC 出血的患者, 其认为奥曲肽可安全、有效地治疗 PHC 所致急性出血, 同时认为奥曲肽止血后尚需普萘洛尔(Propranolol)及其他药物治疗以降低门静脉压力, 防止复发出血. Nardone et al<sup>[26]</sup>也有应用奥曲肽成

功治疗结肠血管发育异常病灶的报道. Ghoshal et al<sup>[13]</sup>报道 1 例 PHC 便血患者应用普萘洛尔(120 mg/d)后, 其结肠处的樱桃红点征消退, 血便停止; Misra et al<sup>[3]</sup>亦报道应用普萘洛尔(40 mg, 2 次/d, 共 4 d)成功治疗 PHC 所致出血.

7.1.2 内镜治疗 Ohta et al<sup>[27]</sup>于结肠镜下应用热探头成功治疗了 1 例结肠黏膜血管发育异常病灶引起的急性出血, 术后随访 4 mo 无再发出血. Kozarek et al<sup>[8]</sup>也有类似报道. Santoro et al<sup>[28]</sup>尚有应用 NdYAG 激光、硬化、缝扎治疗结肠出血灶的报道.

7.1.3 TIPS Balzer et al<sup>[17]</sup>首次为 1 例 75 岁因 PHC 出血的患者行 TIPS 治疗, 术前示结肠内见多发的(50 个以上)、直径达 15 mm 的血管发育异常病灶, 术后 9 d 结肠镜示血管发育异常病灶的数目及大小均明显减少, 术后 4 mo 示结肠黏膜规则, 原病灶完全消失, 同时胃镜示原有的胃静脉曲张及 PHG 消失; 术后随访 18 mo 无消化道出血和脑病.

7.2 手术治疗 PHC 病变弥散, 即使切除局部出血病变的肠段, 但术后仍可再发其他肠段出血, 故局部切除仅用于暂时止血而无助于根治<sup>[22]</sup>. 门腔分流手术不仅可进行 PHC 急性止血, 也可使局部肠黏膜病灶缓解, 但远期临床疗效未见报道<sup>[8,21]</sup>.

上述所有治疗方法由于例数较少, 尚无法对其疗效做出确切评估. 对 PHC 治疗方法的选择可能如 PHG: 内镜治疗或药物治疗→TIPS→手术治疗.

#### 8 参考文献

- 1 Viggiano TR, Gostout CJ. Portal hypertensive intestinal vasculopathy: a review of the clinical, endoscopic, and histopathologic features. *Am J Gastroenterol* 1992;87:944-954
- 2 Naveau S, Bedossa P, Poynard T, Mory B, Chaput JC. Portal hypertensive colopathy. A new entity. *Dig Dis Sci* 1991;36:1774-1781
- 3 Misra SP, Misra V, Dwivedi M. Effect of esophageal variceal band ligation on hemorrhoids, anorectal varices, and portal hypertensive colopathy. *Endoscopy* 2002;34:195-198
- 4 Bernard AC, Hagihara PF, Burke VJ, Kugelmas M. Endoscopic localization and management of colonic bleeding in patients with portal hypertension. *Surg Laparosc Endosc Percutan Tech* 2001;11:195-198
- 5 Bini EJ, Lascarides CE, Micale PL, Weinshel EH. Mucosal abnormalities of the colon in patients with portal hypertension: an endoscopic study. *Gastrointest Endosc* 2000;52:511-516
- 6 Zaman A, Hapke R, Flora K, Rosen H, Benner K. Prevalence of upper and lower gastrointestinal tract findings in liver transplant candidates undergoing screening endoscopic evaluation. *Am J Gastroenterol* 1999;94:895-899
- 7 Goenka MK, Kochhar R, Nagi B, Mehta SK. Rectosigmoid varices and other mucosal changes in patients with portal hypertension. *Am J Gastroenterol* 1991;86:1185-1189
- 8 Kozarek RA, Botoman VA, Bredfeldt JE, Roach JM, Patterson DJ, Ball TJ. Portal colopathy: prospective study of colonoscopy in patients with portal hypertension. *Gastroenterology* 1991;101:1192-1197
- 9 Rabinovitz M, Schade RR, Dindzans VJ, Belle SH, Van Thiel DH, Gavalier JS. Colonic disease in cirrhosis. An endoscopic evaluation in 412 patients. *Gastroenterology* 1990;99:195-199



- 10 Tam TN, NG WW, Lee SD. Colonic mucosal changes in patients with liver cirrhosis. *Gastrointest Endosc* 1995;42:408-412
- 11 Dhiman RK, Saraswat VA, Choudhuri G, Sharma BC, Pandey R, Naik SR. Endosonographic, endoscopic, and histologic evaluation of alterations in the rectal venous system in patients with portal hypertension. *Gastrointest Endosc* 1999;49:218-227
- 12 Chen LS, Lin HC, Lee FY, Hou MC, Lee SD. Portal hypertensive colopathy in patients with cirrhosis. *Scand J Gastroenterol* 1996;31:490-494
- 13 Ghoshal UC, Biswas PK, Roy G, Pal BB, Dhar K, Banerjee PK. Colonic mucosal changes in portal hypertension. *Trop Gastroenterol* 2001;22:25-27
- 14 Misra SP, Dwivedi M, Misra V. Prevalence and factors influencing hemorrhoids, anorectal varices, and colopathy in patients with portal hypertension. *Endoscopy* 1996;28:340-345
- 15 Misra SP, Misra V, Dwivedi M. Effect of esophageal variceal sclerotherapy on hemorrhoids, anorectal varices and portal colopathy. *Endoscopy* 1999;31:741-744
- 16 Eleftheriadis E, Kotzampassi K. Portal hypertensive colopathy: a recently recognized entity. *Endoscopy* 1997;29:328-329
- 17 Balzer C, Lotterer E, Kleber G, Fleig WE. Transjugular intrahepatic portosystemic shunt for bleeding angiodysplasia-like lesions in portal-hypertensive colopathy. *Gastroenterology* 1998;115:167-172
- 18 Lamps LW, Hunt CM, Green A, Gray GF Jr, Washington K. Alterations in colonic mucosal vessels in patients with cirrhosis and noncirrhotic portal hypertension. *Hum Pathol* 1998;29:527-535
- 19 Ganguly S, Sarin SK, Bhatia V, Lahoti D. The prevalence and spectrum of colonic lesions in patients with cirrhotic and noncirrhotic portal hypertension. *Hepatology* 1995;21:1226-1231
- 20 Yamakado S, Kanazawa H, Kobayashi M. Portal hypertensive colopathy: endoscopic findings and the relation to portal pressure. *Intern Med* 1995;34:153-157
- 21 Ganger DR, Preston A, Sankary H. Colonic lesions in portal hypertension. *Gastrointest Endosc* 1993;39:212-213
- 22 Ponce Gonzalez JF, Dominguez Adame Lanuza E, Martin Zurita I, Morales Mendez S. Portal hypertensive colopathy: histologic appearance of the colonic mucosa. *Hepatogastroenterology* 1998;45:40-43
- 23 Ohta M, Kaviani A, Tarnawski AS, Itani R, Sugimachi K, Sarfeh II. Portal hypertension triggers local activation of inducible nitric oxide synthase gene in colonic mucosa. *J Gastrointest Surg* 1997;1:229-235
- 24 Kassem AM. The spectrum of portal hypertension in the gastrointestinal tract. *Endoscopy* 2002;34:223-225
- 25 Yoshie K, Fujita Y, Moriya A, Kawana I, Miyamoto K, Umemura S. Octreotide for severe acute bleeding from portal hypertensive colopathy: a case report. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001;13:1111-1113
- 26 Nardone G, Rocco A, Pollice S, Budillon G. Angiodysplasia as a possible cause of gastrointestinal bleeding in cirrhosis, and octreotide treatment. *J Hepatol* 1997;26(Suppl 1):1-4
- 27 Ohta M, Hashizume M, Kishihara F, Kawanaka H, Tanoue K, Sugimachi K. Recurrent rectal bleeding from portal hypertensive colopathy in a patient with hemorrhoids. *Am J Gastroenterol* 1995;90:1531-1533
- 28 Santoro GA, Aiello C, Galloro G, Savino N, Bucci L. Massive lower gastrointestinal hemorrhage in patients with portal hypertensive enteropathy: a report of two cases. *Hepatogastroenterology* 1997;44:1029-1032

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2003 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

## 欢迎订阅 2004 年度 World Journal of Gastroenterology®

本刊讯 美国科学情报研究所 (ISI), 2001 年《期刊引用报告》(Journal Citation Reports, JCR®) 报道我国科技期刊 59 种, 其中包括医学领域 3 种, 分别为 WJG® 影响因子 1.445, 中国药理学报英文版影响因子 0.631, 中华医学杂志英文版影响因子 0.108. Science Citation Index-Expanded (SCI-E®) 收录世界领先的胃肠病学和肝病学杂志 44 种, 其中包括 WJG®. Current Contents/Clinical Medicine® (即时目次 / 临床医学) 收录世界领先的 1130 种期刊和书所登载的文章, 社论, 会议摘要, 评论及其他重要信息的完整的书刊目次信息. 其中收录世界领先的胃肠病学和肝病学杂志 36 种, 其中包括 WJG®. Clinical Medicine Citation Index® 收录世界领先的胃肠病学和肝病学杂志 43 种, 其中包括 WJG®. WJG® 由 122 位胃肠病学者组成的编委会, 分布在 65 个国家和地区, 其中包括 53 个国家的胃肠病学会主席. 53 个国家和地区胃肠病学会为 WJG® 的合作伙伴. WJG® 被美国《医学索引》(Index Medicus / MEDLINE)、美国《化学文摘》(Chemical Abstracts, CA)、荷兰《医学文摘库 / 医学文摘》(EMBASE/Excerpta Medica, EM) 和俄罗斯《文摘杂志》(Abstract Journal, AJ) 收录. 国内被中国科学引文索引, 中国科技论文统计与分析, 世界消化网数据库, 国家级火炬计划项目中国学术期刊综合评价数据库来源期刊. WJG®, 1999 年度, 2000 年度, 2001 年度被评为山西省一级期刊. 中华人民共和国科学技术部, 国科发财字[2001]340 号文件 2001-09-10 关于公布科技期刊方阵名单的通知. 按照期刊方阵入选要求和比例, 经部门推荐、专家评审, 最终从推荐名单中选出科技期刊 716 种进入中国期刊方阵, 其中“双高”期刊 40 种, “双奖”期刊 58 种, “双百”期刊 122 种, “双效”期刊 496 种. WJG® 在众多消化类期刊中唯一进入双百期刊行列. 中国科技信息研究所信息分析研究中心期刊检索报告: 2001 年 WJG® 总被引频次 1844, 影响因子 2.92, 即年指标 0.694, 他引总引比 0.52, 地区分布数 20, 基金和资助论文比例 0.549, 海外作者论文数 0.353, 指标综合加权评分 57.268. WJG® 2004 年月刊, 大 16 开, 256 页 / 期, 定价 50.00 元 / 期, 邮发代号 82-261. E-mail: wjg@wjgnet.com <http://www.wjgnet.com>

(世界胃肠病学杂志社 2002-10-18)

# 肝纤维化治疗研究进展

叶方鹏, 肖冰, 张万岱

叶方鹏, 肖冰, 张万岱, 中国人民解放军第一军医大学南方医院全军消化研究所 广东省广州市 510515  
项目负责人: 肖冰, 510515, 广东省广州市, 中国人民解放军第一军医大学南方医院全军消化研究所. xiaobing@fimmu.com  
电话: 020-61641545 传真: 020-61641541  
收稿日期: 2002-12-28 接受日期: 2003-02-18

## 摘要

肝纤维化是近年学术界研究的热点,现一致认为肝纤维化是肝脏对不同的病因(如病毒、乙醇、寄生虫等)所致的慢性损害共有的应答反应,表现为肝脏细胞外基质各成分的过度沉积及分布异常,是纤维增生和纤维降解不平衡的结果.如纤维化进一步发展,则引起肝小叶改建,假小叶和结节形成,进入肝硬化阶段.近年来随着细胞生物学和生物化学的深入研究,对肝纤维化的发生机制有了更深的认识,并逐渐改变了传统肝纤维化不可逆转的观点,明确提出了肝纤维化完全有可能逆转的观点.因此阻断肝纤维化的形成和发展对于防治肝硬化具有重要意义.本文主要综述近年来抗肝纤维化在药物治疗、中药有效成分及基因治疗三个方面的研究进展.

叶方鹏, 肖冰, 张万岱. 肝纤维化治疗研究进展. 世界华人消化杂志 2003;11(10):1572-1575

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1572.asp>

## 0 引言

肝纤维化是各种病因所致的慢性肝病共同病理过程是向肝硬化发展的主要中心环节<sup>[1]</sup>.近年来随着细胞生物学,生物化学的深入研究,认为肝纤维化是慢性肝损伤过程中多种细胞密切联系,并通过多种细胞因子,细胞外基质蛋白等相互作用,相互影响组成的网络来调控.其中肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)的激活是核心事件<sup>[2,3]</sup>.并逐渐改变了传统肝纤维化不可逆转的观点,明确提出了肝纤维化完全有可能逆转的观点<sup>[4]</sup>.所以阻断肝纤维化的形成和发展对于防治肝硬化具有重要意义.本文主要综述近年来抗肝纤维化在药物治疗、中药有效成分及基因治疗三个方面的研究进展.

## 1 药物治疗

目前临床上用于治疗肝纤维化的药物主要有秋水仙碱<sup>[5]</sup>,糖皮质激素<sup>[6]</sup>等,虽然这些药物在一定程度上具有抗纤维化的作用,但由于其严重的不良反应及其作用机制的不清,因此在临床应用上受到限制.近年来,肝纤维化药物治疗取得了长足的进步,并且大多从分子机制得到了阐明.

1.1  $\gamma$ -干扰素(Interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ ) IFN- $\gamma$ 是一种免疫调节剂,主要用于自身免疫性疾病<sup>[7,8]</sup>,病毒性疾病<sup>[9,10]</sup>和肿瘤<sup>[11,12]</sup>的治疗. IFN- $\gamma$ 现被认为是一种很强的抗肝纤维化因子<sup>[13]</sup>.贺永文 et al<sup>[14]</sup>运用 IFN- $\gamma$ 治疗血吸虫病小鼠肝纤维化,发现 IFN- $\gamma$ 能够抗虫卵肉芽肿的炎症反应,减少 ECM 的分泌和沉积,从而抑制肝纤维化形成的作用.蔡卫民 et al<sup>[15]</sup>用 IFN- $\gamma$ 治疗 20 例慢性肝炎肝纤维化患者,与对照组相比, IFN- $\gamma$ 治疗组白蛋白升高,透明质酸(hyaluronic acid, HA), III 型前胶原(PC III), IV 型胶原(IV C), 层黏连蛋白(laminin, LN)等显著下降.现认为 IFN- $\gamma$ 抗纤维化的主要机制<sup>[16,17]</sup>为抑制 HSC 的激活,抗病毒及抗炎作用,抑制胶原基因 mRNA 表达,主要是 I、III 型胶原 mRNA 的表达,刺激其他细胞因子如前列腺素 E 释放,是一个较有前途的抗肝纤维化药物.

1.2 前列腺素 E1(prostaglandin E1, PGE1) 肝脏的枯否细胞、HSC、窦状内皮细胞等能产生 PGE1, PGE1 作为局部激素作用于肝细胞具有保护肝细胞,阻止肝细胞坏死,抑制肝纤维化,改善局部微循环,调节免疫病理反应等多种作用<sup>[18,19]</sup>.何文革 et al<sup>[20]</sup>将 100 例患者随机分为两组.结果治疗组血清 HA, IV C, LN 水平明显降低,且脾脏缩小,提示其具有一定抗纤维化作用.

1.3 己酮可可碱(Pentoxifylline) 己酮可可碱是甲基黄嘌呤可可碱的衍生物,在临床上已广泛用于治疗外周血管疾病<sup>[21]</sup>.最近,经动物实验和细胞培养研究发现他具有一定的抗纤维化作用,其机制<sup>[22,23]</sup>主要是抑制肝 HSC 的增生, $\alpha$ 平滑肌收缩蛋白( $\alpha$ -SMA)的表达减少,从而降低 ECM 成分.另外,他还可抑制血小板源性生长因子(PDGF)介导的肝 HSC 增生,并阻止大鼠肝 HSC 转化为激活状态<sup>[24,25]</sup>.Raetsch et al<sup>[26]</sup>采用胆管结扎制作肝纤维化大鼠模型,并用不同剂量的己酮可可碱灌胃治疗,结果发现,治疗组能够显著降低 I 型胶原 mRNA 的含量,并抑制致纤维化因子转化生长因子(TGF- $\beta$ 1)的分泌,下降约 60-70%,但发现组织基质金属蛋白酶抑制剂(TIMP-1)mRNA 上升了 2 倍,结果导致肝组织胶原合成及 III 型前胶原肽含量只是呈中等程度的降低,并指出如果能与 TIMP-1 抑制剂合用,能成为一个较有希望的抗肝纤维化药物.

1.4 安体舒通 安体舒通是醛固酮的拮抗剂,而醛固酮现被认为有致纤维化作用,而安体舒通有一定的抗纤维化作用<sup>[27,28]</sup>.Yang et al<sup>[29]</sup>发现,在 HSC 激活过程中,其醛固酮合成酶基因表达增强,醛固酮合成增加,运

用安体舒通治疗四氯化碳(carbon tetrachloride,  $\text{CCl}_4$ )所致的大鼠肝纤维化模型, 发现安体舒通治疗组早期肝纤维化分级, 胶原面积均低于模型组, 但后期作用不明显, 故认为安体舒通对早期肝纤维化有一定的治疗作用。

**1.5 匹格列酮(Pioglitazone)** 匹格列酮为一种过氧化物酶体增生物激活受体  $\gamma$  的配体, 用于糖尿病的治疗<sup>[30]</sup>. Kon et al<sup>[31]</sup>用匹格列酮预防 $\text{CCl}_4$ 所引起的大鼠肝损伤及纤维化(1 mg/kg, 2/wk), 发现能使 I 型胶原的 mRNA 下降约 2/3, 并且能够阻止  $\text{CCl}_4$  所诱导的肝细胞炎症和坏死. 并且在原代培养的 HSC 中, 匹格列酮能够抑制 HSC 的  $\alpha$ -平滑肌收缩蛋白( $\alpha$ -SMA)的表达和 I 型胶原的合成, 并呈剂量依赖关系. 提示匹格列酮有良好的抗纤维化作用<sup>[32]</sup>.

**1.6 卤夫酮(Halofuginone)** 卤夫酮是一个特异性的 I 型前胶原表达的抑制剂<sup>[33]</sup>, 对许多细胞如人成纤维细胞均可起作用, 在肝、肺、皮肤、子宫等实验性纤维化模型中均可抑制 I 型胶原的表达合成<sup>[34-36]</sup>. Bruck et al<sup>[37]</sup>用卤夫酮治疗硫代乙酰胺所致的大鼠肝纤维化模型, 结果胶原的含量、胶原 I 的基因表达、TIMP 的含量、 $\alpha$ -SMA 的表达均显著降低, 并且能抑制其他致纤维化的细胞的增生. 由于卤夫酮是特异性的在胶原(I 型)转录水平发挥作用, 因此是一个较有前景抗肝纤维药物<sup>[38]</sup>.

## 2 中药有效成分

近 10 a 来, 中医药抗肝纤维化治疗研究取得较大进展, 其中中药有效成分抗肝纤维化的研究取得了一些可喜的成绩, 甘草甜素、苦参碱等已试用于临床, 效果较为满意. 这些有效成分大多具有减少肝脏胶原沉积, 促进肝脏胶原降解, 减轻肝脏炎症及促进肝细胞再生等功能。

**2.1 甘草甜素** 甘草甜素是从中药甘草中提取的有效成分. 该药治疗慢性肝炎的机制<sup>[39, 40]</sup>在于能减少纤维化动物 I 型胶原含量、抑制培养细胞 I、III 型前胶原 mRNA 的表达. 他的另一个可能的作用机制在于可以诱导产生干扰素的免疫调节活性. 王吉耀 et al<sup>[41]</sup>应用甘草甜素治疗大鼠肝纤维化模型, 能使血清转氨酶下降, 肝脏脂肪变性和纤维化程度降低, 并抑制肝脏内核因子(NF- $\kappa$ B)活性.

**2.2 氧化苦参碱** 氧化苦参碱是从中药苦豆子或苦参根中提取的有效成分, 具有抗炎、免疫调节等作用. 氧化苦参碱目前已经广泛应用于临床慢性病毒性肝炎的治疗并且取得良好的疗效<sup>[42, 43]</sup>. 成扬 et al<sup>[44]</sup>用氧化苦参碱干预刀豆蛋白 A 致敏的肝纤维化小鼠模型, 可显著减轻小鼠肝脏组织内炎症活动度和抑制肝内胶原纤维组织增生, 而且呈现剂量依赖性. 认为其机制为抑制 HSC 的增生及 III 型胶原 mRNA 的表达, 阻断小鼠肝细胞凋亡, 抑制炎症细胞因子的分泌.

**2.3 汉防己甲素** 汉防己甲素是从防己科植物粉防己等根中提取的一种属异喹啉化合物的生物碱, 后被证明

为钙通道阻滞剂, 其作用于钙离子通道, 影响钙离子的跨膜转运以及在细胞内的分布利用. 现发现汉防己甲素有抗纤维化作用<sup>[45, 46]</sup>. 李定国 et al<sup>[47]</sup>报道汉防己甲素防治  $\text{CCl}_4$  引起的肝纤维化大鼠模型, 结果显示各期治疗组大鼠 HA 含量, 血清 AST 活性均低于对照组, 肝细胞变性、坏死及炎细胞浸润程度均低于对照组, 纤维组织增生减轻, 认为汉防己甲素能显著改善肝功能, 抑制 HSC 的增生转化, ECM 合成减少, 并认为其作用与阻断  $\text{Ca}^{2+}$  内流无关.

**2.4 大黄素** 大黄素属单萜核类 1, 8 二羟基萜衍生物, 是大黄、虎杖、何首乌等多种中药的有效成分之一. 具有抗病毒、抑菌、利尿等多种作用<sup>[48, 49]</sup>. 展玉涛 et al<sup>[50]</sup>等用不同剂量的大黄素干预  $\text{CCl}_4$  所致的大鼠肝纤维化模型, 结果大黄组肝功能明显改善, HA 及 LN 显著降低, 肝组织胶原蛋白含量明显减少,  $\alpha$ -SMA 表达减少, 并呈剂量依赖关系. 现认为大黄素抗肝纤维化的机制为保护肝细胞并抑制肝星状细胞的激活<sup>[51]</sup>.

**2.5 牛磺酸** 牛磺酸是从中药牛黄中提取的有效成分, 它具有维持细胞内外渗透压平衡、稳定细胞膜、调节细胞内钙稳态及抗脂质过氧化损伤等多种生物学效应<sup>[52, 53]</sup>. 陈岳祥 et al<sup>[54]</sup>用不同剂量的牛磺酸治疗  $\text{CCl}_4$  所引起的肝纤维化大鼠模型, 发现牛磺酸可显著减轻肝纤维化程度, 能明显降低肝羟脯氨酸和 I、III 型前胶原 mRNA 含量, 降低血清 HA 和 LN 水平, 改善肝功能, 提高细胞内 cAMP 含量, 组织学检查亦显示具有抗肝纤维化作用. 可望用于肝纤维化的防治.

**2.6 丹参单体 IH764-3 及丹酚酸 A** 二者均是丹参的有效成分. 陈岳祥 et al<sup>[55]</sup>研究发现丹参单体 IH764-3 可减轻大鼠  $\text{CCl}_4$  所致肝纤维化程度, 能降低肝 I、III 型前胶原 mRNA 含量, 具有抗肝纤维化作用. 丹酚酸 A 具有良好的抗氧化作用. 王晓玲 et al<sup>[56]</sup>观察了丹酚酸 A 对成纤维细胞增生及胶原合成的影响, 结果表明丹酚酸 A 能抑制细胞增生, 抑制细胞内胶原合成率, 但对细胞外胶原的分泌无明显影响.

## 3 基因治疗

随着对肝纤维化形成机制认识的深入及现代分子生物学技术的提高, 使基因治疗肝纤维化成为可能<sup>[57-60]</sup>, 并日益引起学者们的重视. 目前基因治疗主要集中于调控肝纤维化相关细胞因子的表达, 报告较多的有生长转化因子  $\beta$ (TGF- $\beta$ ), 肝细胞生长因子(HGF)及  $\gamma$ -干扰素(IFN- $\gamma$ )等.

**3.1 TGF- $\beta$**  TGF- $\beta$  被认为是肝纤维化过程中关键的因子<sup>[61-63]</sup>, 因此阻断 TGF- $\beta$  的信号通路成为肝纤维化治疗的理想选择. Qi et al<sup>[64]</sup>构建了表达 TGF- $\beta_2$  受体细胞外区域的复制缺陷型腺病毒载体, 通过门静脉注射实现其在肝脏的局部表达. 结果表明注射后大鼠肝脏 I 型胶原、FN、羟脯氨酸含量、 $\alpha$ -SMA、单核/巨噬细胞等与对照组相比均显著减少. HSC 及 枯否细胞的活

化被抑制,显示出良好的抑制肝纤维化进展的作用.而且能使血清 ALT、AST 水平显著下降. Ueno et al<sup>[65]</sup>构建表达人类 TGF- $\beta_2$  可溶性受体的腺病毒载体,并将其注入大鼠肌肉,可在血中测到 TGF- $\beta_2$  可溶性受体,并且显现出良好抗纤维化作用.因此以腺病毒为载体将阻断 TGF- $\beta$  表达的基因转导至体内是治疗肝纤维化非常有潜力的方法.

**3.2 HGF** HGF 是一种多功能细胞因子,能刺激多种类型细胞分化、增生、再生,对肝再生具有强大的促进作用<sup>[66,67]</sup>. Ueki et al<sup>[68]</sup>将人 HGF-cDNA 质粒包裹后反复注射至肝纤维化大鼠肌肉中,能在血液中测出高水平表达的人 HGF 及相应升高的内源性鼠 HGF. 注射组中,肝细胞表面的 HGF 特异性受体 c-met 蛋白表达量显著增加,免疫组化证实  $\alpha$ -SMA 于注射后明显减少,提示 HGF 在体内可抑制 HSC 活化,减少 I 型胶原、TGF- $\beta$  合成.

**3.3 IFN- $\gamma$**  IFN- $\gamma$  是一种较强的抗肝纤维化因子, Zhang et al<sup>[69]</sup>将重组 IFN- $\gamma$  腺病毒转染的肝细胞经脾移植给血吸虫感染 16 wk 的小鼠,结果发现 IFN- $\gamma$  基因治疗能显著降低 I、III 型胶原的合成与沉积,减轻肝纤维化程度. Song et al<sup>[70]</sup>把表达 IFN- $\gamma$  的腺病毒载体转染 CCl<sub>4</sub> 致模的大鼠肝细胞,能显著减少胶原的合成,降低血清羟脯氨酸和 III 型前胶原肽的水平.

总之,目前抗纤维化治疗有了长足的进步,但大多数尚处于动物实验阶段.药物尤其是中药将会是今后肝纤维化治疗的最主要措施.但这些中药含有抗纤维化作用的单体成分及其确切机制不是很清楚.提取这些中药的单体成分,从细胞、分子水平研究这些单体抗纤维化作用的确切机制,将是以后抗肝纤维化研究的主要方向.

#### 4 参考文献

- Lamireau T, Desmouliere A, Bioulac-Sage P, Rosenbaum J. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Arch Pediatr* 2002;9:392-405
- Mann DA, Smart DE. Transcriptional regulation of hepatic stellate cell activation. *Gut* 2002;50:891-896
- Lewindon PJ, Pereira TN, Hoskins C, Bridle KR, Williamson RM, Shepherd RW, Ramm GA. The role of hepatic stellate cells and transforming growth factor-beta(1) in cystic fibrosis liver disease. *Am J Pathol* 2002;160:1705-1715
- Okazaki I, Watanabe T, Hozawa S, Niioka M, Arai M, Maruyama K. Reversibility of hepatic fibrosis: from the first report of collagenase in the liver to the possibility of gene therapy for recovery. *Keio J Med* 2001;50:58-65
- Montasser MF, Younis TA, Fahmy IA, Sabry NM, el-Monayerhy MS, Rashad MS. Histopathological evidences for the antifibrogenic effect of colchicine in schistosomiasis mansoni in mice. *J Egypt Soc Parasitol* 1994;24:155-165
- Leuschner M, Maier KP, Schlichting J, Strahl S, Herrmann G, Dahm HH, Ackermann H, Happ J, Leuschner U. Oral budesonide and ursodeoxycholic acid for treatment of primary biliary cirrhosis: results of a prospective double-blind trial. *Gastroenterology* 1999;117:918-925
- Rosloniec EF, Latham K, Guedez YB. Paradoxical roles of IFN-gamma in models of Th1-mediated autoimmunity. *Arthritis Res* 2002;4:333-336
- Theofilopoulos AN, Koundouris S, Kono DH, Lawson BR. The role of IFN-gamma in systemic lupus erythematosus: a challenge to the Th1/Th2 paradigm in autoimmunity. *Arthritis Res* 2001;3:136-141
- Johnsen CK, Botner A, Kamstrup S, Lind P, Nielsen J. Cytokine mRNA profiles in bronchoalveolar cells of piglets experimentally infected in utero with porcine reproductive and respiratory syndrome virus: association of sustained expression of IFN-gamma and IL-10 after viral clearance. *Viral Immunol* 2002;15:549-556
- Boaz MJ, Waters A, Murad S, Easterbrook PJ, Vyakarnam A. Presence of HIV-1 Gag-specific IFN-gamma+IL-2+ and CD28+IL-2+CD4 T cell responses is associated with nonprogression in HIV-1 infection. *J Immunol* 2002;169:6376-6385
- Li G, Kawakami S, Kageyama Y, Yan C, Saito K, Kihara K. IFN gamma-induced up-regulation of PD-ECGF/TP enhances the cytotoxicity of 5-fluorouracil and 5'-deoxy-5-fluorouridine in bladder cancer cells. *Anticancer Res* 2002;22:2607-2612
- Gattacceca F, Pilatte Y, Billard C, Monnet I, Moritz S, Le Carrou J, Eloit M, Jaurand MC. Ad-IFN gamma induces antiproliferative and antitumoral responses in malignant mesothelioma. *Clin Cancer Res* 2002;8:3298-3304
- Weng HL, Cai WM, Liu RH. Animal experiment and clinical study of effect of gamma-interferon on hepatic fibrosis. *World J Gastroenterol* 2001;7:42-48
- 贺永文, 刘薇, 曾令兰, 罗端德.  $\gamma$  干扰素对血吸虫病小鼠肝纤维化的影响. *中华医学杂志* 1996;76:371-374
- 蔡卫民, 陈智, 陈峰, 翁红雷, 刘荣华.  $\gamma$ -干扰素抗肝纤维化临床疗效的初步观察. *临床肝胆病杂志* 1998;14:21-22
- Du X, Weng H, Cai W. Histological changes in 20 hepatic fibrosis patients with chronic hepatitis B after recombinant human interferon-gamma treatment. *Zhonghua Ganzhangbing Zazhi* 2001;9:273-275
- Henri S, Chevillard C, Mergani A, Paris P, Gaudart J, Camilla C, Dessein H, Montero F, Elwali NE, Saeed OK, Magzoub M, Dessein AJ. Cytokine regulation of periportal fibrosis in humans infected with *Schistosoma mansoni*: IFN-gamma is associated with protection against fibrosis and TNF-alpha with aggravation of disease. *J Immunol* 2002;169:929-936
- Akamatsu K, Yamasaki Y, Nishikawa M, Takakura Y, Hashida M. Synthesis and pharmacological activity of a novel water-soluble hepatocyte-specific polymeric prodrug of prostaglandin E(1) using lactosylated poly(L-glutamic hydrazide) as a carrier. *Biochem Pharmacol* 2001;62:1531-1536
- Akamatsu K, Yamasaki Y, Nishikawa M, Takakura Y, Hashida M. Development of a hepatocyte-specific prostaglandin E(1) polymeric prodrug and its potential for preventing carbon tetrachloride-induced fulminant hepatitis in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 1999;290:1242-1249
- 何文革, 刘泽富, 魏芳, 周永兴, 白雪帆. 前列腺素 E<sub>1</sub> 抗肝纤维化的临床疗效观察. *临床内科杂志* 2001;18:110-111
- Nikolovska S, Pavlova L, Petrova N, Gocev G, Ivanovski M. Pentoxifylline—efficient in the treatment of venous ulcers in the absence of compression? *Acta Dermatovenereol Croat* 2002;10:9-13
- Desmouliere A, Xu G, Costa AM, Yousef IM, Gabbiani G, Tuchweber B. Effect of pentoxifylline on early proliferation and phenotypic modulation of fibrogenic cells in two rat models of liver fibrosis and on cultured hepatic stellate cells. *J Hepatol* 1999;30:621-631
- 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
- Chen YM, Wu KD, Tsai TJ, Hsieh BS. Pentoxifylline inhibits PDGF-induced proliferation of and TGF-beta-stimulated collagen synthesis by vascular smooth muscle cells. *J Mol Cell Cardiol* 1999;31:773-783
- Isbrucker RA, Peterson TC. Platelet-derived growth factor and pentoxifylline modulation of collagen synthesis in myofibroblasts. *Toxicol Appl Pharmacol* 1998;149:120-126
- Raetsch C, Jia JD, Boigk G, Bauer M, Hahn EG, Riecken EO, Schuppan D. Pentoxifylline downregulates profibrogenic cytokines and procollagen I expression in rat secondary biliary fibrosis. *Gut* 2002;50:241-247

- 27 Silvestre JS, Heymes C, Oubenaissa A, Robert V, Aupetit-Faisant B, Carayon A, Swynghedauw B, Delcayre C. Activation of cardiac aldosterone production in rat myocardial infarction: effect of angiotensin II receptor blockade and role in cardiac fibrosis. *Circulation* 1999;99:2694-2701
- 28 Miric G, Dallemagne C, Endre Z, Margolin S, Taylor SM, Brown L. Reversal of cardiac and renal fibrosis by pirfenidone and spironolactone in streptozotocin-diabetic rats. *Br J Pharmacol* 2001;133:687-694
- 29 Yang X, Li X, Wu P, Meng Y, Li S, Lai W. CYP11B2 expression in rat liver and the effect of spironolactone on hepatic fibrogenesis. *Horm Res* 2000;53:288-293
- 30 Nakamura T, Ushiyama C, Osada S, Hara M, Shimada N, Koide H. Pioglitazone reduces urinary podocyte excretion in type 2 diabetes patients with microalbuminuria. *Metabolism* 2001;50:1193-1196
- 31 Kon K, Ikejima K, Hirose M, Yoshikawa M, Enomoto N, Kitamura T, Takei Y, Sato N. Pioglitazone prevents early-phase hepatic fibrogenesis caused by carbon tetrachloride. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;291:55-61
- 32 Galli A, Crabb DW, Ceni E, Salzano R, Mello T, Svegliati-Baroni G, Ridolfi F, Trozzi L, Surrenti C, Casini A. Antidiabetic thiazolidinediones inhibit collagen synthesis and hepatic stellate cell activation in vivo and in vitro. *Gastroenterology* 2002;122:1924-1940
- 33 Abramovitch R, Dafni H, Neeman M, Nagler A, Pines M. Inhibition of neovascularization and tumor growth, and facilitation of wound repair, by halofuginone, an inhibitor of collagen type I synthesis. *Neoplasia* 1999;1:321-329
- 34 Nagler A, Genina O, Lavelin I, Ohana M, Pines M. Halofuginone, an inhibitor of collagen type I synthesis, prevents postoperative adhesion formation in the rat uterine horn model. *Am J Obstet Gynecol* 1999;180:558-563
- 35 Elkin M, Ariel I, Miao HQ, Nagler A, Pines M, de Groot N, Hochberg A, Vlodavsky I. Inhibition of bladder carcinoma angiogenesis, stromal support, and tumor growth by halofuginone. *Cancer Res* 1999;59:4111-4118
- 36 Nagler A, Gofrit O, Ohana M, Pode D, Genina O, Pines M. The effect of halofuginone, an inhibitor of collagen type I synthesis, on urethral stricture formation: in vivo and in vitro study in a rat model. *J Urol* 2000;164:1776-1780
- 37 Bruck R, Genina O, Aeed H, Alexiev R, Nagler A, Avni Y, Pines M. Halofuginone to prevent and treat thioacetamide-induced liver fibrosis in rats. *Hepatology* 2001;33:379-386
- 38 McGaha TL, Phelps RG, Spiera H, Bona C. Halofuginone, an inhibitor of type-I collagen synthesis and skin sclerosis, blocks transforming-growth-factor-beta-mediated Smad3 activation in fibroblasts. *J Invest Dermatol* 2002;118:461-470
- 39 贾道全, 张正, 罗成福, 黄雨彬. 甘草甜素逆转肝纤维化及早期肝硬化的作用探讨. *中华消化杂志* 2001;21:754-756
- 40 宋方闻, 李学俊, 江元森. 复方甘草甜素(SNMC)对肝病病理改变观察. *中国现代医学杂志* 2001;11:24-25
- 41 王吉耀, 郭津生, 刘淑玲, Mark AZ. 甘草甜素对肝硬化动物模型肝脏内 NF- $\kappa$ B 结合活性的抑制作用. *中华肝脏病杂志* 1999;7:42-43
- 42 李继强, 陆伦根, 华静, 吴亚云, 曾民德. 氧化苦参碱对大鼠肝星状细胞增生的影响. *上海医学* 1999;22:598-599
- 43 甘乐文, 王国俊, 李玉莉. 氧化苦参碱对大鼠肝纤维化的影响. *第二军医大学学报* 1999;20:445-448
- 44 成扬, 张旻, 李华, 郭祥惠, 张清波. 氧化苦参碱对小鼠免疫性肝纤维化作用机制的研究. *现代实用医学* 2001;13:14-16
- 45 卫新革, 陈颖伟, 展玉涛, 沈礼勇, 李定国, 陆汉明. 大黄素、汉防己甲素对成纤维细胞增生的影响. *世界华人消化杂志* 2000;8:230-231
- 46 范列英, 孔宪涛, 高春芳. 汉防己甲素对大鼠肝细胞、贮脂细胞 DNA 及胶原合成的影响. *中华消化杂志* 1994;14:281-283
- 47 李定国, 陆汉明, 陈颖伟. 汉防己甲素抗肝纤维化研究进展. *世界华人消化杂志* 1999;7:71-72
- 48 展玉涛, 卫新革, 陈颖伟, 潘勤, 徐芹芳, 李定国. 大黄素对肝纤维化大鼠血清透明质酸的影响. *中西医结合肝病杂志* 1999;9:27
- 49 展玉涛, 魏红山, 王志荣, 黄新, 陈颖伟, 徐芹芳, 李定国. 大黄素对鼠肝纤维化肝功能、层粘连蛋白及透明质酸的影响. *中国中医药信息杂志* 2000;7:35
- 50 展玉涛, 魏红山, 王志荣, 黄新, 徐芹芳, 李定国, 陆汉明. 大黄素抗肝纤维化作用的实验研究. *中华肝脏病杂志* 2001;9:235-239
- 51 Zhan Y, Li D, Wei H. Effect of emodin on development of hepatic fibrosis in rats. *Zhongguo Zhongxiyi Jiehe Zazhi* 2000;20:276-278
- 52 Suzuki T, Suzuki T, Wada T, Saigo K, Watanabe K. Taurine as a constituent of mitochondrial tRNAs: new insights into the functions of taurine and human mitochondrial diseases. *EMBO J* 2002;21:6581-6589
- 53 汪朝晖, 张贤康, 缪明永, 王学敏. 牛磺酸对大鼠肝线粒体氧自由基损伤的保护作用. *安徽医科大学学报* 2000;35:111-113
- 54 陈岳祥, 李石, 张兴荣, 张忠夏, 孔宪涛. 牛磺酸对四氯化碳诱导大鼠肝纤维化的抑制作用. *中华消化杂志* 1999;19:185-187
- 55 陈岳祥, 李石, 张兴荣, 张忠兵, 谢谓芬. 丹参伍用牛磺酸对大鼠 CCl<sub>4</sub> 中毒性肝纤维化的防治作用. *中华肝脏病杂志* 2002;10:148-149
- 56 王晓玲, 刘平, 刘成海, 徐列明, 刘成, 胡义杨. 丹酚酸 A 对成纤维细胞活力、增生及胶原合成的影响. *中西医结合肝病杂志* 2000;10:24-25
- 57 Garcia-Banuelos J, Siller-Lopez F, Miranda A, Aguilar LK, Aguilar-Cordova E, Armendariz-Borunda J. Cirrhotic rat livers with extensive fibrosis can be safely transduced with clinical-grade adenoviral vectors. Evidence of cirrhosis reversion. *Gene Ther* 2002;9:127-134
- 58 Dai WJ, Jiang HC. Advances in gene therapy of liver cirrhosis: a review. *World J Gastroenterol* 2001;7:1-8
- 59 Gressner AM, Weiskirchen R, Breitkopf K, Dooley S. Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. *Front Biosci* 2002;1:793-807
- 60 Nie QH, Cheng YQ, Xie YM, Zhou YX, Cao YZ. Inhibiting effect of antisense oligonucleotides phosphorothioate on gene expression of TIMP-1 in rat liver fibrosis. *World J Gastroenterol* 2001;7:363-369
- 61 Okazaki I, Watanabe T, Hozawa S, Niioka M, Arai M, Maruyama K. Reversibility of hepatic fibrosis: from the first report of collagenase in the liver to the possibility of gene therapy for recovery. *Keio J Med* 2001;50:58-65
- 62 De Bleser PJ, Niki T, Rogiers V, Geerts A. Transforming growth factor-beta gene expression in normal and fibrotic rat liver. *J Hepatol* 1997;26:886-893
- 63 Knittel T, Mehde M, Kobold D, Saile B, Dinter C, Ramadori G. Expression patterns of matrix metalloproteinases and their inhibitors in parenchymal and non-parenchymal cells of rat liver: regulation by TNF-alpha and TGF-beta1. *J Hepatol* 1999;30:48-60
- 64 Qi Z, Atsuchi N, Ooshima A, Takeshita A, Ueno H. Blockade of type beta transforming growth factor signaling prevents liver fibrosis and dysfunction in the rat. *Proc Natl Acad Sci* 1999;96:2345-2349
- 65 Ueno H, Sakamoto T, Nakamura T, Qi Z, Atsuchi N, Takeshita A, Shimizu K, Ohashi H. A soluble transforming growth factor beta receptor expressed in muscle prevents liver fibrogenesis and dysfunction in rats. *Hum Gene Ther* 2000;11:33-42
- 66 Gohda E. Function and regulation of production of hepatocyte growth factor (HGF). *Nippon Yakurigaku Zasshi* 2002;119:287-294
- 67 Yu SL, Yang FH. Molecular biological progress of hepatocyte growth factor (HGF). *Shengwu Gongcheng Xuebao* 2002;18:1-4
- 68 Ueki T, Kaneda Y, Tsutsui H, Nakanishi K, Sawa Y, Morishita R, Matsumoto K, Nakamura T, Takahashi H, Okamoto E, Fujimoto J. Hepatocyte growth factor gene therapy of liver cirrhosis in rats. *Nat Med* 1999;5:226-230
- 69 Zhang L, Mi J, Yu Y, Yao H, Chen H, Li M, Cao X. IFN-gamma gene therapy by intrasplenic hepatocyte transplantation: a novel strategy for reversing hepatic fibrosis in Schistosoma japonicum-infected mice. *Parasite Immunol* 2001;23:11-17
- 70 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



# 现代肝脏局部解剖在活体部分肝移植应用的研究进展

方驰华, 朱新勇

方驰华, 朱新勇, 中国人民解放军第一军医大学珠江医院肝胆外科  
广东省广州市 510282  
项目负责人: 方驰华, 510282, 广东省广州市, 中国人民解放军第一军医大学珠江医院肝胆外科. fch58520@sina.com  
电话: 020-61642926  
收稿日期: 2003-03-14 接受日期: 2003-04-05

## 摘要

活体部分肝移植解决了供肝缺乏问题, 为肝移植患者带来了新的希望. 但其手术方法及涉及的解剖要领与肝移植有很大的不同. 活体部分肝移植手术既要保证供体的安全, 又要保证受体手术的安全. 既要熟悉供体肝脏的内部解剖, 又要考虑受体的腹腔解剖情况. 因此, 肝脏的局部解剖的研究对确保手术的成功和移植肝脏的成活极为重要. 目前, 肝脏局部解剖的研究又有了很大的发展, 如对供肝量的估计、移植肝重量与受体体重之比(G/W)以及肝脏各叶、段的管道走行及变异等. 为活体肝移植手术的发展提供了更多更可靠的基础研究. 本文就目前有关活体肝移植的解剖研究进展作一综述.

方驰华, 朱新勇. 现代肝脏局部解剖在活体部分肝移植应用的研究进展. 世界华人消化杂志 2003;11(10):1576-1580  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1576.asp>

## 0 引言

世界上首例活体肝移植由澳大利亚医生 Strong et al 于 1989 年成功实施, 之后全球已有 30 个国家进行了共 1 000 多例这种手术. 在我国, 活体部分肝移植起步较晚, 1997 年窦科峰 et al<sup>[1]</sup>开展首例近亲活体部分肝移植获得成功, 目前国内仅开展 29 例<sup>[2, 3]</sup>. 活体部分肝移植与原位肝移植的区别就在于其解剖基础主要立足于肝内, 手术既要保证供体的安全性, 又要涉及受体手术的成功两方面. 本文就现代肝脏局部解剖在活体部分肝移植中相关的问题及应用作一综述.

## 1 活体肝移植的类型

近年来, 活体部分肝移植发展较快, 以日本京都大学施行最多, 分 4 种类型即传统的左外叶(Ⅱ、Ⅲ段)、左全叶(Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ段), 带或不带肝中静脉的扩大左外叶(Ⅱ、Ⅲ加部分ⅠⅤ段), 右半肝(Ⅴ、Ⅵ、Ⅶ、Ⅷ段)但不带肝中静脉. 1999 年我国台湾陈肇隆和香港卢宠茂分别报告第 5 种活体肝移植的类型, 即含有肝中静脉的扩大右半肝(Ⅴ、Ⅵ、Ⅶ、Ⅷ段加含有部分Ⅳ段和肝中静脉), 取得优良疗效.

## 2 肝脏不同段供肝量的估计

日本信州大学的标准为供肝体积与受体正常标准肝体积之比大于 46 %<sup>[4]</sup>. 近几年的实践证明, 这一比值若能在 28-30 % 以上时, 肝移植术后受体就不会出现肝功能不全的表现. 移植肝一般能在术后短期内迅速再生, 术后 1 mo 再生后的移植肝体积与标准肝体积之比能达到 100 %. 成人间活体肝部分移植供肝量, 一般要求移植肝体积/受体肝标准体积(SLV)之比在 34-48 % 之间, 或移植肝重量与受体体重之比(G/W)大于 0.8 %<sup>[5, 6]</sup>. Tanaka 认为 G/W 等于 1 % 是安全的, 0.7 % 是安全线的最低值, G/W 比例大于 1 % 的受者 5 a 存活率达 85 %, 而 G/W 比小于 0.7 % 时, 则 5 a 存活率不到 50 %. Nishizaki et al<sup>[7]</sup>根据供肝量的体积把 33 例患者分成三组: 中度移植组、低度移植组、极低度移植组. 其结论是低于受体肝标准体积 30 % 的供肝亦可用于移植, 术中及术后须严格监护. Miyagawa et al<sup>[8]</sup>为一供肝左叶只占 SLV 29 % 的患者使用带有左侧尾状叶的左叶肝, 从而达到成人对成人供肝的 LRLT 标准. 其前提是供肝者有一个厚厚的尾叶, 术后证实供肝血流正常, 胆管通畅. 在成人-成人 LRLT 中, 选择包括尾叶在内的左半肝作为移植植物, 可能是克服供受体间体积差异的一种有效方法. Sakamoto et al<sup>[9]</sup>根据移植肝的大小以及与受体的比率分析扩大左肝移植和右叶肝移植的术后效果, 认为活体肝右叶移植是安全的, 但对余肝较小及年长者的供肝者术后要注意其并发症的发生<sup>[10, 11]</sup>.

## 3 肝脏的分段解剖基础

肝段以门静脉和肝静脉为基础, 门静脉分支分布于肝段内, 而肝静脉位于肝段间. 门静脉、肝动脉和肝管共同伴行于 Glisson 鞘内, 几乎有相同的分支走行. 门静脉管径最粗, 分支恒定, 变异少<sup>[12]</sup>, 因此以他为中心代表肝动脉和肝管作为肝脏分段的基础和标志. 肝静脉较门静脉变异多, 如: 以下腔静脉为基底, 右、中、左三个肝静脉形成的“W”型, 被认为是肝静脉的正常解剖, 约占 70 %; 有单一较大的肝右静脉者占 64-78 %, 双右肝静脉, 副右肝静脉, 包括下右肝静脉和短肝静脉及不发达右肝静脉等占其余的 22-36 %<sup>[13]</sup>. 而且几个肝段以同一肝静脉分界. 门静脉变异少, 不同的肝段有不同的门静脉分支分布. 尤为重要是在相邻肝段间, 肝静脉有大而多的吻合支, 而门静脉、肝静脉和肝管等则无功能上的吻合支. 故切断 Glisson 鞘内结构, 将不可避免地中断肝动脉、门静脉的血供和造成

胆汁淤积或胆漏, 门静脉解剖较肝静脉更为重要. 门静脉因进入每一肝段的中心被认为是肝脏分段的关键标志, 但有关肝铸型标本的解剖研究, 主要是以门静脉作为肝段的中心观察到肝段间的纵裂, 在肝静脉灌注的标本则不能观察到纵裂. 故肝静脉因位于这些段间的纵裂内而被作为肝段分界的指示标志.

#### 4 左外侧叶(Ⅱ、Ⅲ段), 左半肝(Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ段, 包括肝中静脉)的切取解剖要点

游离肝左叶, 在分离小网膜时注意寻找有无发自胃左动脉的变异的肝脏左动脉. 随后在肝门左侧解剖暴露肝左动脉至肝总动脉, 并解剖门静脉左干至与门静脉主干连接处. 注意识别及分离结扎肝尾状叶的分支, 以保证可游离出足够长度的门静脉左干. 游离出肝左静脉或肝左静脉和肝中静脉的共同干. 切取左外侧叶时, 肝脏横断线靠近镰状韧带的右侧或左肝静脉与内侧分支交界右侧几毫米处, 切取左半肝时的切面靠近肝中静脉的右侧, 从而获取Ⅱ段和Ⅲ段或左半肝. 在肝切除过程中, 供应Ⅱ段和Ⅲ段的动脉可以被持续保持. 术中不阻断肝门血流, 在贴近肝切面处分离左肝管, 注意保护其周围的 Glisson 鞘.

4.1 左外叶下段活体肝移植的应用解剖学基础 蒲森水 et al<sup>[14]</sup>对肝脏大体标本及铸型标本的观察, 分析左外叶下段活体肝移植直接切取移植时外部界线确定的解剖学基础, 如果供受体比重大于(10-12): 1 时, 左外叶下段活体肝移植可用于较小患儿(1-2 岁以下)<sup>[15, 16]</sup>, 临床上移植物的切取主要参照肝脏的表面结构确定界线, 根据解剖观测, 门管鞘系统和肝静脉系统分布形成的肝裂才是肝脏真正的分界标志. 左外叶下段以左叶间裂和左外叶段间裂为界, 分别与左内叶和左外叶上段相邻. 左叶间裂起点多位于腔静脉窝上口左外缘, 止于脐切迹. 与镰状韧带的走行并不完全一致. 左外叶下段活体取肝时确定左外叶裂膈面时应不超过镰状韧带右侧, 在其下部左侧 1 cm 范围内定位较安全, 而不至于损伤门静脉左支矢状部及囊部的分支. 左叶间裂脏面以肝圆韧带(窝)和静脉韧带(窝)为标志, 二者之间有肝桥连接左内叶下部, 门静脉左支囊部及肝圆韧带末端位于肝桥下. 脏面分离左外叶下段时靠肝圆韧带左侧 0.5-1.0 cm 范围内进行较为安全. (1)左叶间裂内部的处理: 左叶间裂上段内有肝左静脉主干通过, 下部有门静脉左支矢状部等及左叶间裂支经过<sup>[17]</sup>, 外叶活体取肝时, 肝左静脉在左叶间裂上部近第二肝门处定位、处理. 左外叶下段活体取肝时, 肝左静脉应在左外叶段间裂与左叶间裂交会处定位、处理. 从脏面游离门静脉左支至左外叶下段的分支, 如分支较多, 无法单独一一取时, 则不必一一游离各静脉支, 可将各分支连同门静脉左支矢状部或囊部部分血管壁一起取下, 形成一个较大的血管袖片, 将受体门静脉血管袖口修剪成较大的斜形以便吻合, 这样可以减少血管吻合口数量, 增加吻

合口管径, 减少吻合技术方面的并发症. 但这种处理方法对供体残肝的威胁较大, 需有良好的血管外科技术.

(2)左外叶段间裂的处理: 左外叶段间裂在膈面一般位于上 1/4-1/3 部, 右端起自左叶间裂上 1/4-1/2 段内, 其中 90% 起自上 1/4-2/5 段内. 两裂交界处有肝左静脉起始段及段间裂支通过, 应注意保护. 脏面右端起自肝桥下, 门静脉左支矢状部前 2/3 后 1/3 交界点左侧 0.5-1.0 cm 处. 在术中 B 超引导下确定一无较大门静脉支发出的区域为左外叶段间裂分离起点, 逐渐向左端延伸, 直至肝左下缘. 左外叶段间裂分离应注意以下几点: (1)此界面并非规则的平面, 一般自前上向后下倾斜, 形成一向左前下的面. 上下段界面内一般没有门静脉分支交叉通过, 胆管汇合一般在左支角部或横部之深面(背侧), 不在此界面内. (2)左外叶段间裂内有肝左静脉及其属支通过, 活体取肝时应注意保护这些重要的血管, 尤其是移植物的回流血管.

#### 4.2 左外叶活体肝移植的应用解剖学基础

4.2.1 肝左静脉的解剖 肝左外叶主要引流静脉是左外叶上段静脉支和左外叶下段静脉支, 分别引流左外叶上段和左外叶下段大部静脉血. 重要属支还有左后上缘静脉支和左叶间裂静脉支, 前者引流左外叶上段后上部分肝组织, 后者引流左内叶和左外叶下段相邻区域肝组织静脉血. 肝左静脉明显成干者占多数, 达 86.7%, 部分肝左静脉无明显的静脉干(13.3%). 肝左静脉与肝中静脉多数情况下也合并成干(68.3%), 共同注入下腔静脉, 此类肝左静脉“外科干”长  $1.4 \pm 1.2$  cm, 肝左静脉干单独注入下腔静脉者(18.3%), 干长  $2.6 \pm 1.7$  cm, 二者血管口径为  $1.2 \pm 0.8$  cm, 差别不大, 主要与引流范围有关. 肝左静脉解剖结构变异较多, 有 5 种情况: (1)肝左静脉无较大属支, 占 26.7%; (2)肝左静脉仅接收左后上缘静脉支汇入, 占 16.7%; (3)肝左静脉仅接收左叶间裂静脉支汇入, 占 23.3%; (4)肝左静脉同时接收左后上缘静脉支和左叶间裂静脉支汇入, 占 20.0%; (5)无明显肝左静脉干(2-3 支以上), 占 13.3%. 左外叶活体取肝时肝静脉的处理应考虑到上述情况, 选择合适的供体和肝静脉切取模式.

4.2.2 肝左静脉主要属支的处理 肝左静脉干接受属支有肝左后上缘静脉支及左叶间裂静脉支, “外科干”常有较大的变化, 但血管主干管径基本无明显差别. 如果肝左后上缘静脉支注入肝左静脉主干 1.0 cm 之内, 影响肝左静脉的切取, 直径小于 0.3 cm 者, 一般将其结扎, 术后注意观察被引流区域肝组织血液循环状况, 如术后早期无明显影响, 可随移植肝成活后建立侧支循环; 否则需行相应处理. 左叶间裂静脉注入肝左静脉近心端或肝中静脉及下腔静脉, 管径为 0.15-0.3 cm, 甚至更为细小者, 一般可采用处理左后上缘静脉支的原则. 但是左叶间裂静脉支引流的区域是肝移植物的创面, 如果该区域血流回流发生障碍, 其后果较左后上缘静脉支阻碍严重得多, 可导致该区域肝组织失活、出血、胆

漏, 增加感染的机会<sup>[18]</sup>. 如果左叶间裂静脉支汇入肝左静脉干较早, 对肝左静脉“外科干”长度影响不大, 有足够长度予以吻合, 处理则无困难. 如果左叶间裂静脉支汇入肝左静脉干部位较靠近心端, 肝左静脉“外科干”无足够的长度予以吻合, 可分别切取肝左静脉和左叶间裂静脉支, 如果距离较近、张力不大, 修整时可将两静脉口整形为一个袖口; 如果二者距离较远, 超过 1.0 cm. 且吻合口张力较大, 则受体需准备两个相应大小的吻合口进行吻合. 左外叶下段部分静脉血液回流入肝中静脉者的处理原则可参照以上处理原则.

4.2.3 肝左静脉解剖变异的处理 肝左外叶由2-3支静脉引流, 在距第二肝门不足1.0 cm范围内合并成干或无明显的共干, 一并注入下腔静脉, 或与肝中静脉合并共同注入下腔静脉. 建议在肝左外叶各静脉支汇合之前分别游离、处理各静脉支及近心端血管干. 肝中静脉的切取根据所取移植物的大小决定是否执行和切取部位, 左外叶活体肝脏移植如果供体足够大, 一般不包括肝中静脉. 如果静脉之间相邻距离不超过 1.0 cm, 游离静脉支使之在肝实质外有 0.5 cm 左右的长度, 将相邻静脉支修整缝合成一较大袖口<sup>[19]</sup>. 如果相邻肝静脉干相邻距离较远达 1.0 cm 以上, 或者稍少于 1.0 cm, 但二者基本平行, 无法合并成一个袖口, 那么受体必需准备两个相应大小的吻合口, 分别进行吻合. 肝左静脉这种解剖组成中可能有一些小的静脉支注入肝左静脉干或各段静脉的汇合部位, 直径小于 0.2-0.3 cm, 数目不超过 2 支可考虑结扎处理, 术后如出现明显淤血或可能坏死及由此引起其他并发症, 应立即切除部分边缘肝组织.

## 5 右半肝(V、VI、VII、VIII段加第IV段的部分, 包括肝中静脉)的切取解剖要点

解剖肝门, 游离门静脉右干至与门静脉主干连接处, 游离肝右动脉到胆总管的右侧, 仔细分离结扎右肝后同下腔静脉前面的许多小静脉, 游离出肝右静脉. 如果存在较大的肝右下静脉应予以保留. 切取右半肝的切面靠近肝中静脉的左侧. 术中不阻断肝门血流, 在贴近肝切面处分离右肝管, 注意保护其周围的Glisson鞘. (1)肝右叶移植的解剖学应用: 为了弥补左叶移植体体积的不足, 活体肝右叶移植也日益增多, 尤其是在成人与成人之间右叶的供体可以获得足够大体积的移植体, 同时供体的安全也显得尤为重要, Lee et al<sup>[20]</sup>利用核磁成像对 25 位供体检查, 其中 9 位因检查结果异常而不宜作为供体. 门静脉解剖变异有门脉左支发自右前支及门静脉三分支. 胆管变异有副左肝管引流至肝总管及右后肝管引流至左肝管. 肝动脉的变异包括双肝右动脉及副左肝动脉、肝总动脉起源于主动脉. 门脉和胆管的变异造成吻合口增多, 增加了术后的并发症的风险. 所以术前及术中对供体肝右叶的解剖及其变异的资料, 对术中出血和术后并发症的预防至关重要.

### 5.1 供体肝动脉解剖的评估 术前应用血管造影对精确

了解供体肝动脉的解剖很重要<sup>[21]</sup>. 汪闻夕 et al<sup>[22]</sup>认为肝动脉和肠系膜上动脉造影可以了解肝动脉和门静脉的解剖细节. 肝动脉的重要变异包括右肝动脉的分支越过 Cantlie's 线供应左叶肝脏(发生率是 15%)及右肝动脉副支从肝固有动脉发出进入第五和第六肝段(发生率5%)<sup>[23]</sup>. 伴随有主要动脉、静脉畸形的活体供肝成功肝切除已有报道<sup>[24-26]</sup>. 不同来源的副肝动脉或代替肝动脉在肝门处位置不同, 来自肠系膜上动脉的右副肝动脉从肝固有动脉的右侧入肝, 分布于右半肝. 来自胃左动脉的代替左干动脉从肝固有动脉的左侧入肝, 并分布于左半肝. 当以肝左叶作为LRLT移植时, 一个异常的肝动脉起自胃左动脉是其主要问题. 有这种变异的占整个肝移植供体的13%. 尽管这种异常的个体不应被作为活体肝移植的供体候选, 但应用这种供体的肝移植进行LRLT并无血管并发症发生. 这表明, 如果术前对供体肝动脉解剖结构进行正确评估, 那么异常肝左动脉的出现并不是禁忌, 而且可获得满意结果.

5.2 供体胆道解剖的评估 左肝管由左外叶和左内叶胆管汇合而成, 主要引流左半肝的胆汁(包括尾叶左半), 长度 1.5 cm. 肝右管由右前叶和右后叶胆管汇合而成, 长 1 cm. 术中胆道造影可以清楚显示胆道结构, 肝内胆管重要的变异包括引流第 6 和第 7 肝段的胆管, 从左肝管发出(发生率 30%)及右肝管副支从肝总管发出引流第 5 和第 6 肝段(发生率 5%)<sup>[27]</sup>. Gurkan et al<sup>[28]</sup>在为 2 例阿拉吉尔氏综合征的患者行肝移植时术中发现供体引流左叶的胆道直径小于 1 mm, 术后左肝外叶病理显示: 肝实质萎缩、胆管缺如、动脉发育不良、门脉增厚. 他们认为术前胆管造影应列为术前评估的常规<sup>[29, 30]</sup>.

5.3 供体肝静脉解剖的评估 CT 扫描及 MR 可以了解肝静脉的解剖细节及特定区域的结构, 借以选择手术方式. MR 静脉造影术能精确地反映肝静脉的复杂特点, 准确率 93%. 而超声的准确率仅有 73%<sup>[31]</sup>. MR 静脉造影术可以为肝脏的横断面提供准确定位, 从而减少术中失血及术后血管并发症的发生. Nghiem et al<sup>[32]</sup>使用双螺旋 CT 及三维 CTA 对患者术前检查肝动脉解剖、入肝血管直径、腹腔轴狭窄、门脉血栓, 55 例肝动脉解剖正常, 25 例不正常, 基于扫描发现外科医生采取不同的手术方法. 检查结果与外科手术方法的相关性分别达 91% (50/55)、92% (23/25), 所以 DHCT/3D-CTA 对拟行肝移植且有其他血管疾患的患者, 为外科医生术前的手术方式正确选择提供很大的帮助. Lee et al<sup>[33]</sup>采用不带肝中静脉的右肝移植时, 2 例患者出现严重的右中肝充血, 其中 1 例 20 d 后死于肝衰竭, 他们认为大于 5 mm 的肝中静脉的侧枝的保护和重建对预防肝充血极为重要. 肝静脉的直径小于 2 mm 无须保留, 大于 5 mm 必须重建. Inomata et al<sup>[34]</sup>采用不带肝中静脉的右肝叶移植, 供体术后总胆红素及天门氨酸转氨酶比左叶移植有短暂的升高, 死亡 2 例, 其中移植体有多个肝静脉开口, 多处肝静脉吻合导致流出道阻塞造成移植肝

功能衰竭. 他们认为活体肝右叶移植是安全的和有效的, 问题的关键是如何处理好右叶移植体可能发生的血管及胆管解剖变异, 以及供肝位置的如何放置才能避免肝静脉的阻塞, 保证肝静脉的通畅. 总之, 通过血管外科技术修整或整形管腔口径可以获得满意的吻合. 右叶的解剖变异可以很好的解决, 不会增加供体的并发症<sup>[35, 36]</sup>.

## 6 左内叶(第Ⅳ段)的处理

肝Ⅳ段的位置特殊, 从外表看属于右半肝, 但在解剖上与左半肝有着难以割裂的联系. 李启强 et al<sup>[37]</sup>认为供肝应分割成肝Ⅱ、Ⅲ段(左外叶)和肝Ⅴ、Ⅵ、Ⅶ、Ⅷ段(右半肝)两个移植物. 将肝Ⅳ段(左内叶)的肝组织清除, 保留其主要血管和肝管作为前者的蒂, 而下腔静脉、左、中肝静脉、门静脉右支(包括三支型的右前叶支)、右肝动脉、右肝管等作为后者的蒂. 理由如下: (1) 本组肝Ⅳ段的一部分静脉注入左肝静脉, 一部分注入中肝静脉, 肝Ⅳ段的门静脉来自左支囊部分出的左内叶支或其分支, 一部分来自右前叶支的分支. 肝Ⅳ段动脉分别来自左肝动脉和中肝动脉的分支. 肝Ⅳ段的肝管分别由左肝管和一部分右肝管引流. 他们认为: 将肝Ⅳ段保留给右半肝或将肝Ⅳ段与中肝静脉保留给左半肝者, 均可发生肝段坏死及肝Ⅴ、Ⅷ段边缘因静脉回流受阻而出现坏死<sup>[38]</sup>. Marcos et al<sup>[39]</sup>认为术中不要过多解剖管道的起源, 如果营养Ⅳ段的动脉来自右叶, 则尽可能的远离其Ⅳ段分支处解剖. 如果营养Ⅳ段的动脉来自左叶或来自左、右叶, 则可在分支处解剖. 以免供体的Ⅳ段术后坏死. 目前供肝的切取类型一般是左半肝或左外叶供肝用于受体为儿童, 而右半肝则多用于成人. 供肝量的多少对受、供体均极为重要. 所以肝Ⅳ段的保留或切除决定了供体和受体术后健康的恢复和生存质量. 由于肝移植术已成为治疗终末期肝病患者的惟一方法, 全球供体匮乏是困扰肝脏移植的主要问题之一, 而活体部分肝移植与常规肝移植相比, 供肝来自于亲属的部分肝脏而又不影响供体的健康, 在一定程度上拓宽了新的供肝途径, 但其前提是要确保供者的安全<sup>[40]</sup>. 术前供肝者的严格筛选, 术中的仔细操作, 丰富的肝叶切除经验及对肝脏熟悉的解剖知识是确保手术成功的条件.

## 7 参考文献

- 1 窦科峰, 管文贤, 李开宗, 高志清, 付由池, 张新海, 曹亿妹, 张英民, 王宇, 朱庆生, 周晓东, 丁振芳, 蒋永培, 孙秉中, 沈丽英, 李兰荪, 田俊士, 贺洪德, 赵青川, 史宪杰, 岳树强, 陶开山, 王德盛. 临床活体肝部分移植术 1 例报告. 解放军医学杂志 1997;22:252-254
- 2 夏穗生. 我国肝移植现状. 世界华人消化杂志 1999;7:645-646
- 3 向德栋, 王英杰, 王宇明. 人工肝生物反应器研究进展. 世界华人消化杂志 2003;11:598-600
- 4 Ito T, Kiuchi T, Yamamoto H, Oike F, Ogura Y, Fujimoto Y, Hirohashi K, Tanaka AK. Changes in portal venous pressure in the early phase after living donor liver transplantation: pathogenesis and clinical implications. *Transplantation* 2003;75:1313-1317

- 5 Byun JH, Kim TK, Lee SS, Lee JK, Ha HK, Kim AY, Kim PN, Lee MG, Lee SG. Evaluation of the hepatic artery in potential donors for living donor liver transplantation by computed tomography angiography using multidetector-row computed tomography: comparison of volume rendering and maximum intensity projection techniques. *J Comput Assist Tomogr* 2003;27:125-131
- 6 Lee SS, Kim TK, Byun JH, Ha HK, Kim PN, Kim AY, Lee SG, Lee MG. Hepatic arteries in potential donors for living related liver transplantation: evaluation with multi-detector row CT angiography. *Radiology* 2003;227:391-399
- 7 Nishizaki T, Ikegami T, Hiroshige S, Hashimoto K, Uchiyama H, Yoshizumi T, Kishikawa K, Shimada M, Sugimachi K. Small graft for living donor liver transplantation. *Ann Surg* 2001;233:575-580
- 8 Miyagawa S, Hashikura Y, Miwa S, Ikegami T, Urata K, Terada M, Kubota T, Nakata T, Kawasaki S. Concomitant caudate lobe resection as an option for donor hepatectomy in adult living related liver transplantation. *Transplantation* 1998;66:661-663
- 9 Sakamoto S, Uemoto S, Uryuhara K, Kim ID, Kiuchi T, Egawa H, Inomata Y, Tanaka K. Graft size assessment and analysis of donors for living donor liver transplantation using right lobe. *Transplantation* 2001;71:1407-1413
- 10 Schwartz M. Candidate selection criteria for living donor liver transplantation. *Mt Sinai J Med* 2003;70:171-173
- 11 Wiesner RH, Rakela J, Ishitani MB, Mulligan DC, Spivey JR, Steers JL, Krom RA. Recent advances in liver transplantation. *Mayo Clin Proc* 2003;78:197-210
- 12 Mitchell A, John PR, Mayer DA, Mirza DF, Buckels JA, De Ville De Goyet J. Improved technique of portal vein reconstruction in pediatric liver transplant recipients with portal vein hypoplasia. *Transplantation* 2002;73:1244-1247
- 13 Soyer P, Bluemke DA, Choti MA, Fishman EK. Variations in the intrahepatic portions of the hepatic and portal veins: findings on helical CT scans during arterial portography. *Am J Roentgenol* 1995;164:103-108
- 14 蒲森水, 钟世镇, 李忠华. 左外叶下段活体肝移植肝裂的应用解剖. 中国临床解剖学杂志 2000;18:146-148
- 15 Mentha G, Belli D, Berner M, Rouge JC, Bugmann P, Morel P, Le Coultre C. Monosegmental liver transplantation from an adult to an infant. *Transplantation* 1996;62:1176-1178
- 16 Strong R, Lynch S, Yamanaka J, Kawamoto S, Pillay P, Ong TH. Monosegmental liver transplantation. *Surgery* 1995;118:904-906
- 17 廖亚平. 肝脏解剖学. 第 1 版. 上海: 上海科技出版社, 1982:127-151
- 18 Boillot O, Voiglio E, Dawahra M, Benchetrit S, Porcheron J, Gille D. Surgical technique of left lateral hepatic lobectomy in a related living donor for pediatric transplantation. *Transplantation Proc* 1995;27:1708-1709
- 19 Egawa H, Inomata Y, Uemoto S, Asonuma K, Kiuchi T, Okajima H, Yamaka Y, Tanaka K. Hepatic vein reconstruction in 152 living-related donor liver transplantation patients. *Surgery* 1997;121:250-257
- 20 Lee VS, Morgan GR, Teperman LW, John D, Diflo T, Pandharipande PV, Berman PM, Lavelle MT, Krinsky GA, Rofsky NM, Schlossberg P, Weinreb JC. MR imaging as the sole preoperative imaging modality for right hepatectomy: a prospective study of living adult-adult liver donor candidates. *Am J Roentgenol* 2001;176:1475-1482
- 21 Takayama T, Makuuchi M, Kawarasaki H, Harihara Y, Kubota K, Hirata M, Inoue K, Sugawara Y, Ikegami T, Hashikura Y, Matsunami H, Kawasaki S. Hepatic transplantation using living donors with aberrant hepatic artery. *J Am Coll Surg* 1997;184:525-528
- 22 汪闻夕, 范上达. 活体肝移植的理论和实践. 中华肝胆外科杂志 2002;5:259-261
- 23 Voboyril R, Weberova J, Dvorak J. Anomalies in liver arterial

- blood supply and their importance for hepatic surgery. *Acta Medica (Hradec Kralove)* 2002;45:39-44
- 24 Lee SG, Hwang S, Kim KH, Ahn CS, Park KM, Lee YJ, Moon DB, Chu CW, Yang HS, Cho SH, Oh KB, Ha TY, Song KW, Yu YS, Min PC. Approach to anatomic variations of the graft portal vein in right lobe living-donor liver transplantation. *Transplantation* 2003;75(3 Suppl):S28-32
- 25 Sakamoto Y, Takayama T, Nakatsuka T, Asato H, Sugawara Y, Sano K, Imamura H, Kawarasaki H, Makuuchi M. Advantage in using living donors with aberrant hepatic artery for partial liver graft arterialization. *Transplantation* 2002;74:518-521
- 26 Nakamura T, Tanaka K, Kiuchi T, Kasahara M, Oike F, Ueda M, Kaihara S, Egawa H, Ozden I, Kobayashi N, Uemoto S. Anatomical variations and surgical strategies in right lobe living donor liver transplantation: lessons from 120 cases. *Transplantation* 2002;73:1896-903
- 27 Renz JF, Busuttil RW. Adult-to-adult living-donor liver transplantation: a critical analysis. *Semin Liver Dis* 2000;20:411-424
- 28 Gurkan A, Emre S, Fishbein TM, Brady L, Millis M, Birnbaum A, Kim-Schluger L, Sheiner PA. Unsuspected bile duct paucity in donors for living-related liver transplantation: two case reports. *Transplantation* 1999;67:416-418
- 29 Settmacher U, Steinmuller TH, Schmidt SC, Heise M, Pascher A, Theruvath T, Hintze R, Neuhaus P. Technique of bile duct reconstruction and management of biliary complications in right lobe living donor liver transplantation. *Clin Transplant* 2003;17:37-42
- 30 Suehiro T, Ninomiya M, Shiotani S, Hiroshige S, Harada N, Ryosuke M, Soejima Y, Shimada M, Sugimachi K. Hepatic artery reconstruction and biliary stricture formation after living donor adult liver transplantation using the left lobe. *Liver Transpl* 2002;8:495-499
- 31 Cheng YF, Chen CL, Huang TL, Chen TY, Lee TY, Chen YS, Wang CC, de Villa V, Goto S, Chiang YC, Eng HL, Jawan B, Cheung HK. Magnetic resonance of the hepatic veins with angular reconstruction: application in living-related liver transplantation. *Transplantation* 1999;68:267-271
- 32 Nghiem HV, Dimas CT, McVicar JP, Perkins JD, Luna JA, Winter TC 3rd, Harris A, Freeny PC. Impact of double helical CT and three-dimensional CT arteriography on surgical planning for hepatic transplantation. *Abdom Imaging* 1999;24:278-284
- 33 Lee S, Park K, Hwang S, Lee Y, Choi D, Kim K, Koh K, Han S, Choi K, Hwang K, Makuuchi M, Sugawara Y, Min P. Congestion of right liver graft in living donor liver transplantation. *Transplantation* 2001;71:812-814
- 34 Inomata Y, Uemoto S, Asonuma K, Egawa H. Right lobe graft in living donor liver transplantation. *Transplantation* 2000;69:258-264
- 35 Soejima Y, Harada N, Shimada M, Suehiro T, Minagawa R, Hiroshige S, Ninomiya M, Shiotani S, Nishizaki T. Perioperative management and complications in donors related to living-donor liver transplantation. *Surgery* 2002;131(1 Suppl):S195-199
- 36 Sugawara Y, Makuuchi M, Takayama T, Imamura H, Kaneko J. Right lateral sector graft in adult living-related liver transplantation. *Transplantation* 2002;73:111-114
- 37 李启强, 韦力, 彭民浩, 黄源. 部分肝移植术供肝分割的应用解剖探讨. *广西医科大学学报* 1997;14:56-60
- 38 邢雪, 夏穗生. 肝静脉在肝脏外科中的作用. *国外医学外科分册* 1993;20:72-74
- 39 Marcos A, Ham JM, Fisher RA, Olzinski AT, Posner MP. Surgical management of anatomical variations of the right lobe in living donor liver transplantation. *Annals Surgery* 2000;231:824-831
- 40 Sugawara Y, Makuuchi M, Takayama T, Imamura H, Kaneko J, Ohkubo T. Safe donor hepatectomy for living related liver transplantation. *Liver Transpl* 2002;8:58-62

## 世界华人消化杂志获得 2001 年度百种中国杰出学术期刊

本刊讯 期刊的学术质量是一个综合指标, 1999 年中国科技信息所研制了中国科技期刊综合指标评价体系, 该指标体系已应用于中国科协一年一度的期刊择优资助工作中. 综合指标评价体系是根据期刊的多项重要指标, 如被引总频次、影响因子、即年指标、基金论文比、他引总引比、扩散因子等对期刊分学科进行综合打分. 通过对中国科技论文与引文数据库收录的科技期刊进行综合评定, 今年中国科学技术信息研究所首次评出了中国百种杰出学术期刊. 世界华人消化杂志荣获 2001 年度百种中国杰出学术期刊称号.

(世界胃肠病学杂志 2002-12-18)



# 生长抑素类似物治疗肝细胞肝癌的抗肿瘤作用及其机制

冒海蕾, 黄介飞

冒海蕾, 黄介飞, 南通医学院附属医院消化内科 江苏省南通市 226001  
项目负责人: 冒海蕾, 226001, 江苏省南通市, 南通医学院附属医院消化内科. seqian@pub.nt.jsinfo.net  
电话: 0513-5052305  
收稿日期: 2003-04-03 接受日期: 2003-05-19

## 摘要

人工合成的生长抑素类似物血浆半衰期长, 作用更强大, 耐受性良好, 最新研究表明, 对多种实体肿瘤亦有抑制作用. 本文就生长抑素类似物对肝细胞肝癌的抗肿瘤作用及其机制方面的国内外研究进行综合阐述, 从其各种化学结构、作用受体亚型、以及肝脏肿瘤受体表达, 进而证实了生长抑素类似物对肝脏肿瘤的治疗作用, 具体包括原发性肝癌、转移性肝癌、原位种植瘤等. 同时研究表明生长抑素类似物抗肿瘤作用机制可能包括两大方面: 直接及间接作用, 前者通过特异性受体发挥作用; 后者通过抑制促肿瘤生长的激素及细胞因子的分泌, 或抑制肿瘤血管形成, 或调节机体免疫活性, 或诱导肿瘤细胞发生凋亡等间接阻止肿瘤生长. 进一步阐明其抗肿瘤机制将有可能在肝肿瘤治疗方面开辟出一条新的途径, 并产生广阔的临床应用前景.

冒海蕾, 黄介飞. 生长抑素类似物治疗肝细胞肝癌的抗肿瘤作用及其机制. 世界华人消化杂志 2003;11(10):1581-1587

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1581.asp>

## 0 引言

近 10 a 来, 人工合成的生长抑素类似物(somatostatin analogue, SSTA)如奥曲肽(Octreotide)比天然的生长抑素血浆半衰期长, 作用更强大; 并且其疗效确切, 耐受性良好, 因此被广泛应用于治疗门静脉高压、上消化道出血及胰腺炎等. 国内外最新研究表明, SSTA 不仅对绝大多数具有神经内分泌功能的肿瘤有肯定疗效<sup>[1]</sup>, 而且对多种实体肿瘤亦有抑制肿瘤细胞增生, 明显减缓肿瘤的生长速度, 诱导细胞凋亡等作用<sup>[2]</sup>, 目前已将其初步应用于肿瘤治疗领域. 肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)素有“癌中之王”之称. HCC 发病范围很广, 其中亚洲发病率最高<sup>[3]</sup>, 我国是 HCC 高发区, 年发病率是欧美的 10 倍以上. 我国肝癌死亡率在男性恶性肿瘤中居第 3 位, 女性恶性肿瘤中居第 4 位. 故研究 SSTA 在肝细胞癌中的抗肿瘤作用及其机制具有重要临床价值.

## 1 生长抑素及其类似物

生长抑素最初被发现是在 1968 年, Krulich et al<sup>[4]</sup>研究

大鼠下丘脑中生长激素释放因子分布状况时偶然得到了一种抑制生长激素释放的肽类物质. 5 a 后, Brazeau et al<sup>[5]</sup>证实他是由 14 个氨基酸组成的环状肽类化合物, 称之为生长激素释放抑制激素, 即生长抑素(somatostatin, SST). 随后的研究才知道 SST 是由神经内分泌细胞、炎性细胞、免疫细胞所产生, 针对离子、营养素、神经肽、神经递质、甲状腺和类固醇激素、生长因子、细胞因子起作用的调节多肽<sup>[6]</sup>, 其广泛分布于脑组织、胰腺、胃肠道, 少量分布在甲状腺、颌下腺、肾上腺、前列腺、胎盘、肾脏、肝脏、胆囊等组织中<sup>[7-9]</sup>, SST 分布的广泛性奠定了其广泛生物学活性的基础. 首先 SST 能够抑制多种激素的释放, 包括生长激素(GH)、促甲状腺素、胰岛素、胰高血糖素、胃泌素等; 还可以抑制许多激素和生长因子对靶细胞的作用; 由于 SST 能改变肝脏血流动力学状态, 加之其抑制胰腺外分泌和胃酸分泌的作用, 目前 SSTA 已广泛用于治疗门静脉高压、上消化道出血和胰腺炎等疾病; 近年来的研究又发现 SST 及其类似物具有广泛地抑制细胞增生的活性<sup>[10, 11]</sup>, 最先引起人们注意的是 SST 及其类似物对生长激素瘤、胰岛素瘤、胰高血糖素瘤等的抑制作用, 进一步研究发现: SST 及其类似物除了对绝大多数具有神经内分泌功能的肿瘤起到抑瘤作用外, 对普通的实体肿瘤同样有效, 如胃癌、结肠癌、肺癌、乳腺癌、前列腺癌、胰腺癌、肝癌、黑色素瘤等<sup>[12, 13]</sup>.

SST 属于种系发生上十分古老的多基因家族的多肽物质. 天然 SST 的两个重要的生物活性产物为 SST-14 和 SST-28, 他们均由一个 92 肽的生长抑素前体经蛋白水解而来, 实质上, SST-28 是 SST-14 在 N-末端延长而形成的, 因而二者生物学活性相似, 但具体作用强度和组织学特性仍有一定的差异: SST-14 对胰高血糖素和胃泌素的抑制作用强; 而 SST-28 侧重于抑制生长激素和胰岛素<sup>[7]</sup>.

由于 SST 能对多种组织器官的许多功能起强大的抑制作用, 因而人们尝试着应用他来治疗临床上这些器官的高功能疾病<sup>[14]</sup>. 但天然 SST 在血循环中的半衰期仅约 3 min, 加之停药后出现一些激素反跳高分泌现象, 如生长激素、胰岛素和胰高血糖素等<sup>[13]</sup>. 为此, 许多人工合成的 SSTA 应运而生, 他们的半衰期延长了, 并具有了作用的选择性. 通常采用在 SST 骨架中加入右型氨基酸以增强其抵抗降解酶的能力, 从而延长活性; 或者通过某些氨基酸的替换衍生出各种不同活性的类似物. 人工合成的 14 肽和 28 肽的类似物价格昂贵, 且其

体内作用并不增强,故限制了他的应用. Veber et al<sup>[15]</sup>最先开始合成新一代 SSTA,经构像分析,把 14 肽中 9 个氨基酸用一个脯氨酸残基代替,形成许多 6 肽类似物,其中一些合成物对生长激素、胰岛素和胰高血糖素的抑制作用明显增强. Bauer et al<sup>[16]</sup>将保留的 SST 序列中第 7-10 位的 4 个氨基酸与右型色氨酸残基一起嵌入胱氨酸桥中形成一系列 8 肽类似物,发现其中 SMS 201-995 (octreotide, sandostatin) 作用时间长,对生长激素的释放抑制作用比 SST 大 45-70 倍,已在临床实验中用于治疗内分泌肿瘤和胃肠、胰腺实体肿瘤. 基于抗肿瘤目的, Schally et al<sup>[2]</sup>设计了另外 3 个系列 8 肽类似物,其系列 2 中的 RC-160 (Vapreotide) 比 SST-14 对生长激素的抑制分泌作用强 135 倍,并且半衰期更长. 这些类似物的作用具有选择性,主要抑制生长激素释放,而对胰岛素及胰高血糖素抑制释放作用小;同时他们也能抑制胃酸分泌,抑制胃泌素及胆囊收缩素的释放和分泌. TT-232 是 Keri et al<sup>[12]</sup>设计的高选择性强烈抑制肿瘤增生的 7 肽类似物,无抑制生长激素作用,但在体内体外均能强烈抗肿瘤和诱导肿瘤细胞凋亡的作用,研究表明 TT-232 对 60 种人类肿瘤细胞系中的 58 种有强烈抑制增生的作用. 最近, Falb et al<sup>[17]</sup>又设计合成了一个新的双环类似物 PTR-3205,其药效基团与 Octreotide 相似,疏水区位置 1 和 8 上分别是一个内酰胺环和苯丙氨酸,这种结构决定了 PTR-3205 对 hSSTR2 的高选择性.

Octreotide 是第一个用于临床并且应用最广泛的 SSTA,他保留了天然 SST 的功能氨基酸序列,去除并修饰了其他不重要的氨基酸. 在猴体内研究表明:其抑制生长激素、胰高血糖素及胰岛素释放的作用分别是 SST-14 作用的 45 倍、11 倍及 1.3 倍<sup>[16]</sup>. 药代动力学显示:皮下注射 Octreotide 的生物利用度为 100%,用药后 30 min 血浆浓度达峰值;其半衰期显著延长,平均达 90 min,且无停药后反跳高分泌现象<sup>[1, 16]</sup>. 10 a 的临床应用已证明: Octreotide 在治疗上消化道出血、胰腺炎、肠痿、肢端肥大症等疾病中具有较好的疗效,且机体耐受性极好,无明显毒副作用. 新近合成的长效缓释制剂 -Octreotide LAR 是将 Octreotide 乙酸盐加在一种可被生物降解的聚合物微球中,一次肌注可长期控释,从而扩大了 Octreotide 的临床应用<sup>[18, 19]</sup>.

## 2 生长抑素受体

SST 及其类似物多种生物学活性的发挥是通过靶细胞膜上的特异性受体介导的,即生长抑素受体(somatostatin receptor, SSTR). Reubi et al<sup>[20, 21]</sup>证明 SSTR 存在于脑及软脑膜、前乳头体、内分泌及外分泌腺、胃肠黏膜及免疫细胞中. SSTR 属于 G 蛋白偶联受体家族(GPCR),由 7 个跨膜  $\alpha$ -螺旋结构、细胞外 N-末端和细胞内 C-末端的片段及连接这些结构的细胞内外环共同构成<sup>[7]</sup>.

SSTR 共有 5 个亚型,分别为 SSTR1-5,其中 SSTR2

又存在 SSTR2A 和 SSTR2B 两种变异体. 5 种 SSTR 的氨基酸序列均已知,相互间有 45-50% 的相似性,而 SSTR1 与 SSTR4 之间、SSTR2 与 SSTR5 之间的氨基酸序列有更多的相似性,故他们的配体结合特性亦更相似<sup>[22]</sup>. 根据他们对配体的亲和力不同, SSTR 分为两个亚族:一类为 SSTR1、4;另一类为 SSTR2、3、5. 其中后一类与人工合成的 SSTA 如 Octreotide、RC-160 (Vapreotide)、BIM2319 等的亲和力要比前一类强得多<sup>[23]</sup>.

不同配体与不同亚型受体的亲和力不同. 天然 SST-14 和 SST-28 与 5 种亚型受体均有较强的亲和力,但 SST-28 与 SSTR5 的亲和力强于 SST-14. 人工合成的 6 肽及 8 肽类似物如 Octreotide、RC-160 (Vapreotide)、BIM2319、MK678 等对 SSTR1 的亲和力弱,而与 SSTR2 的亲和力要比前者强得多,故 Octreotide、MK678 等是 SSTR2 的选择性受体激动剂<sup>[24, 25]</sup>. 具体地说, Octreotide 与 SSTR2、5 的亲和力高,与 SSTR3 有中等亲和力,但与 SSTR1、4 不结合<sup>[26, 27]</sup>.

各亚型受体在组织中的分布也有差异. SSTR1、2 的分布范围较广,脑组织、甲状腺、肾上腺、胃肠、肝脏、胰腺等处均有不同程度的表达; SSTR3、4、5 主要分布在脑组织中;另外 SSTR3 在胰腺、SSTR4 在肾上腺、SSTR5 在肺和胰腺也有分布<sup>[7, 8, 28-30]</sup>. SSTR 的表达不仅有组织器官特异性,而且还有种属特异性. 如正常人肝脏主要表达 SSTR2 亚型受体,而在大鼠肝脏组织中则主要为 SSTR3 基因的表达<sup>[31]</sup>.

不同亚型受体介导发挥不同的作用,不同受体介导的受体后作用亦不同. 如 SSTR2 介导抑制生长激素的释放, SSTR5 在抑制胰腺的 B 细胞分泌胰岛素方面起主要作用, SSTR3 与诱导细胞凋亡有关, SSTR1、2、4、5 则与抑制细胞生长有关. 环状的 SSTA 如 Octreotide 由于受体亲和力的差异,故其对生长激素释放的抑制作用强于对胰岛素的抑制<sup>[32-34]</sup>.

总之,由于 SSTR 与配体结合的选择性、组织器官分布的差异性以及各亚型受体介导作用的不同,决定了各种 SSTA 的生物学活性的差异.

随着分子生物学的发展,现已证实 SSTR 除了存在于许多正常人体组织器官中,多种肿瘤、肿瘤细胞系亦有 SSTR 的高密度表达. 多种神经内分泌肿瘤 SSTR 表达在 70% 以上,且分属不同亚型;而非神经内分泌肿瘤组织内 SSTR 表达相对较低,其中乳腺癌 SSTR 表达在 50% 以上,结直肠癌 40% 左右,其他乳腺癌、前列腺癌、淋巴瘤、甲状腺癌、胃癌、结肠癌、肾癌、卵巢癌、肝癌等肿瘤及其转移灶亦显示出 SSTR 表达<sup>[2, 18, 23, 35, 36]</sup>. 一般说来,绝大多数受 Octreotide 抑制的肿瘤细胞表面均存在一种或几种 SSTR,并且以 SSTR2 最常见<sup>[27, 37]</sup>. 如垂体肿瘤以 SSTR2、5 最高;乳腺癌、肺癌以 SSTR2 为主;前列腺癌以表达 SSTR1 为主;而正常前列腺组织主要表达 SSTR2<sup>[20, 38, 39]</sup>.

目前,有关 SSTR 在人类肝脏组织中表达的报道较

少. 一项关于大鼠肝脏组织中SSTR亚型的研究发现: 大鼠肝脏组织中仅含有 SSTR3, 而没有其他亚型的资料<sup>[31, 40]</sup>; 另一项应用单克隆抗体技术的研究证实: 大鼠肝脏组织中不含有 SSTR2<sup>[41]</sup>. 运用<sup>131</sup>In标记的奥曲肽(OctreoScan)的闪烁扫描技术进行有关SSTR的研究结果亦不相一致: 一篇文献报道大鼠肝脏组织对OctreoScan的摄取极少<sup>[42]</sup>; 相似的人体研究报道肝脏可以摄取, 但细节不明<sup>[43]</sup>, 或报道摄取极少<sup>[44]</sup>. 钟朝晖 et al<sup>[45]</sup>在研究大鼠肝硬变门脉高压症形成过程中肝脏组织 5 种 SSTR 亚型 mRNA 表达变化时发现: 大鼠肝脏组织中有 5 种 SSTR 亚型介导肝脏中 SST 的多种生物学作用, 其中 rSSTR5 在肝脏中的作用占主导地位. 希腊学者 Kououmalis et al<sup>[23]</sup>运用放射自显像技术对 23 例肝细针活检标本分析显示: 无论是原发性肝癌, 还是良性肝病如急慢性肝炎、肝硬化, 均有 SSTR 表达. 其中的 4 例肝癌标本未作亚型评估. 另外, 根据 SSTR 对 125I 标记的 SST 亲和力的高低, 可将 SSTR 分为两大类. 由于检测标本例数少, 不同组织及同种组织中 SSTR 含量变化大, 尚难以对受体含量与疾病的恶性程度进行相关性分析, 1999 年底, Reubi et al<sup>[46]</sup>用放免法检测 59 例 HCC 标本显示: SSTR 的表达为 41 %, 且同 Octreotide 有较高的亲和力. 2000 年底, 刘建生 et al<sup>[47]</sup>应用 RT-PCR 法检测了 30 对肝癌组织及癌旁组织中 SSTR2、5 的 mRNA 表达后发现: hSSTR2 亚型的 mRNA 在肝癌组织及癌旁组织中均有较高表达(53.33 %, 63.33 %); 而 hSSTR5 的表达极低, 这一发现为 SSTR2 的特异性高效配体应用与肝癌治疗提供了分子生物学依据. 随后颜登国 et al<sup>[48]</sup>亦采用 RT-PCR 法检测 27 例原发性肝癌标本中肝癌组织及癌旁组织 hSSTR2、3 的表达, 结果表明: hSSTR2 亚型 mRNA 在肝癌组织及癌旁组织中的表达阳性率分别为 81.5 % 和 96.3 %; hSSTR3 的表达阳性率分别为 66.7 % 和 51.9 %. 这些发现均说明大多数肝癌组织中有一种以上 SSTR 亚型存在, 同时也为 SSTA 用于肝癌治疗奠定了理论基础.

### 3 生长抑素类似物与肝癌的治疗

#### 3.1 原发性肝癌

3.1.1 体外试验 Ren et al<sup>[49]</sup>在研究体外培养的 HPG2 肝癌细胞时发现: Octreotide 可诱导 HPG2 肝癌细胞分泌胰岛素样生长因子结合蛋白-1 (IGFBP-1), 同对照组相比, 6 nmol/L 的 Octreotide 作用 12 h, IGFBP-1 含量增加 1.5 倍, 而 60 nmol/L 的 Octreotide 作用 24 h, IGFBP-1 由 0 h 的  $573 \pm 93$  ng/mg 增加至 24 h 的  $240 \pm 434$  ng/mg, 呈时间依赖性和浓度依赖性, 而且此作用不依赖于胰岛素及生长激素的刺激. IGFBP-1 可与胰岛素样生长因子(IGF-1)结合, 抑制后者对肝癌细胞的促生长作用. Chen et al<sup>[50]</sup>将人肝癌细胞株 BEL-7402 培养在不同浓度的 Octreotide 中, 观察其生长曲线、克隆形成率和凋亡率, 结果发现 Octreotide 对 BEL-7402 肝癌细胞株的群体增生和单个细胞增生均有抑制作用,

并呈明显的剂量效应关系, 同时观察到经 Octreotide 处理的肝癌细胞均存在凋亡, 且药物浓度与凋亡率呈正相关.

3.1.2 动物实验 Davies et al<sup>[10]</sup>在用 N-nitrosomorpholine (NNM)对  $\delta$  SD 大鼠进行诱癌试验的同时, 经皮下注射 Octreotide (200  $\mu$ g/kg), 隔日 1 次, 可明显抑制 NNM 对  $\delta$  SD 大鼠的诱癌作用, 16 wk 后, 同对照组相比, 处理组中肝癌结节数量、大小均明显减少, GGT 与 GST 阳性组织损害占整个组织的体积比亦明显降低, 组间有显著性差异.

3.1.3 临床试验 1998 年, 希腊学者 Kouroumalis et al<sup>[23]</sup>在一项为期 5 a 的临床随机对照研究里, 将 58 例无法手术的晚期肝癌患者分为两组: 治疗组 28 例, 对照组 30 例, 治疗组皮下注射 Octreotide 250  $\mu$ g, 2 次/d; 对照组无治疗. 结果显示 Octreotide 治疗后不仅能改变血液生化学指标, 使 AFP 降低, 白蛋白升高, 还能明显延长晚期肝癌患者的平均中位生存时间, 对照组 4 mo; 治疗组长达 13 mo, 患者的 6 mo、12 mo 的累积存活率亦显著提高: 治疗组比对照组分别为 75 % 比 37 %, 56 % 比 13 %. 这一点无疑对于进展期肝癌的治疗具有重要意义. 另外治疗组中有 5 例患者 6-13 mo 后经 B 超复查, 3 cm 以下的癌结节均消失, 对照组患者癌结节数目却明显增加. 试验还观察到 Octreotide 耐受性良好, 一过性腹泻是治疗开始时的惟一主要副作用, 同时患者的生活质量得到显著改善, 85.7 % 的患者食欲增强, 42.8 % 体重明显增加, 53.8 % 感到症状减轻. 1999 年底, Redaelli et al 报道了 21 例 HCC 患者, 10 例给予 Octreotide LAR, 11 例对照, 中位生存率分别为 11 mo 和 9 mo, Kaplan-Meier 曲线有明显不同, 但统计学上无意义. 通过检测 hSSTR 发现: 治疗 6 mo 内, hSSTR 阴性的 HCC 患者的肿瘤生长与 hSSTR 阳性而未予 Octreotide LAR 治疗的肿瘤生长类似. 到 12 mo 时, 治疗组中受体阳性与受体阴性相比肿瘤生长明显减慢, AFP 改变在第 1 mo 无明显改变, 第 6 mo 已明显下降, 患者生活质量也显著提高. 这些试验初步说明 Octreotide 对原发性肝癌有一定的抑制作用, 但由于研究病例数少, 未采用双盲法, 还有待进一步多中心、大规模的临床试验.

#### 3.2 转移性肝癌

3.2.1 胃肠胰神经内分泌肿瘤的肝转移 SSTA 在转移性肝癌中的研究较多, 其中又以胃肠胰神经内分泌肿瘤(如类癌、胃泌素瘤、胰岛素瘤、VIP 瘤等)肝转移多见. 1995 年, Diaco et al<sup>[51]</sup>对 10 例类癌肝转移患者在进行肝动脉栓塞化疗之前的 48 h, 给予皮下注射 Octreotide 100  $\mu$ g, 3 次/d, 发现 10 例患者的症状都得到很好的控制, 其中 6 例肝脏肿瘤缩小了 50 % 以上, 另外 3 例肝脏肿瘤大小保持稳定 6 mo 以上, 整组平均生存期达 58 mo (33-115 mo). Lokich et al<sup>[52]</sup>对 1 例已发生肝脏和腹腔淋巴结转移的结肠类癌患者皮下注

射 Octreotide 100  $\mu\text{g}$ , 2 次/d, 1 mo 后剂量增至 300  $\mu\text{g}$ , 3 次/d, 6 wk 后复查 CT 示肝脏肿瘤缩小达 50 % 以上, 腹腔淋巴结转为阴性. Di Bartolomeo et al<sup>[53]</sup>研究亦发现: Octreotide 对胃肠神经内分泌肿瘤的肝转移具有明显的抑制作用, 其中以类癌效果最为明显. Octreotide 不仅对肝转移瘤本身有抑制作用, 而且能明显控制肿瘤过度分泌激素引起的相关症状.

3.2.2 结直肠癌的肝转移 除了 SSTA 在神经内分泌肿瘤肝转移方面的研究外, 也有一些结直肠癌肝转移的研究. 刘瑞 et al<sup>[54]</sup>给 BALB/C 小鼠脾脏注射结肠癌细胞 (CT26), 然后治疗组每日皮下注射 Octreotide 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 对照组仅给予生理盐水, 以观察 Octreotide 对肝转移癌发生、发展的影响. 3 wk 后, 对照组肝转移 III 级以上者达 80 %, 而治疗组仅 30 %, 而且治疗组小鼠的生存期几乎延长了 1 倍, 体重亦明显增加. Davies et al<sup>[55]</sup>也发现 Octreotide 不仅能显著地抑制 2 种结直肠癌 (K12/Tr 和 WB2054m) 发生肝转移, 且对肝转移灶本身的生长亦明显抑制.

3.3 原位种植瘤 1997 年, Schindel et al<sup>[56]</sup>对部分性肝切除大鼠的肝内及皮下人工植入肝细胞瘤 (Mirris hepatoma 3924A), 结果显示, 同未行部分性肝切除的大鼠移植瘤相比, 肝切除的大鼠移植瘤平均体积增加了 6 倍, 重量增加了近 3 倍, 这说明部分性肝切除可促进残肝内肿瘤的生长; 对于移植瘤大鼠若在肝切除术后再给予 Octreotide (50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) 腹腔注射, 1 次/d, 15 d 后, 治疗组的肝细胞癌比对照组的体积明显减小 ( $312.4 \pm 117.8 \text{ mm}^3$  对  $6038.7 \pm 1748.2 \text{ mm}^3$ ), 重量显著减轻 ( $0.41 \pm 0.2 \text{ g}$  对  $5.0 \pm 0.63 \text{ g}$ ), 同时未给予 Octreotide 治疗的肝切除肝内移植瘤大鼠的脾脏及肺均发生转移, 而 Octreotide 治疗者未见到肝外转移灶, 这说明 Octreotide 还能预防肝癌根治术后残肝内肿瘤的复发与转移. Davies et al<sup>[55]</sup>的研究也得出类似结论, 并发现 Octreotide 能增强肝切除大鼠的网状内皮系统的功能, 提高大鼠的免疫力. Nott et al<sup>[57]</sup>在实验性种植性肝癌大鼠身上发现给予 SMS201-995 能提高门脉系统的血管阻力, 降低门脉血流量, 从而在减少肿瘤血供的同时, 降低肿瘤经门脉系统发生肝内外转移的可能性. 2001 年, Tang et al<sup>[58]</sup>利用培养的 SMMC-7721 肝癌细胞株建立裸鼠原位肝癌种植瘤模型, 实验组每日给予奥曲肽 (50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) 皮下注射, 共 8 wk. 结果显示奥曲肽治疗组裸鼠原位肝癌种植瘤重量明显低于生理盐水对照组, 可见奥曲肽能有效抑制肝癌生长, 其机制可能与抑制肝癌细胞 DNA 合成及诱导肝癌细胞凋亡有关.

#### 4 生长抑素类似物抗肿瘤的作用机制

目前, SSTA 抗肿瘤的作用机制尚未明了, 一般认为其主要作用途径包括两大方面: (1) 直接作用: 通过与特异性 SSTR 结合而直接发挥作用; (2) 间接作用: 通过抑制促肿瘤生长的激素及细胞因子的分泌, 或抑制肿瘤血管

形成, 或调节机体免疫活性, 或诱导肿瘤细胞发生凋亡等间接阻止肿瘤生长.

4.1 直接作用 在体外排除其他干扰因素的情况下, 多数在体内受 SSTA 抑制的肿瘤的体外细胞增生受到 SSTA 的抑制, 这提示: SSTA 可能通过直接抑制肿瘤细胞增生发挥作用. 这种作用与肿瘤细胞表面表达 SSTR 有关<sup>[59]</sup>. Schaer et al<sup>[37]</sup>还发现: 绝大多数可被 SSTA 抑制的肿瘤细胞表面存在一种或多种 SSTR, 并且以 SSTR2 最为常见. SST 及其类似物与 SSTR 结合后, 主要经三条重要的信息传导途径, 抑制 DNA 合成复制, 发挥抗肿瘤作用. (1) cAMP 途径: 激活的 SSTR 特异性偶联到  $G_{i1}$  蛋白, 与腺苷酸环化酶负性结合, 抑制其活性, 降低细胞内 cAMP 浓度, 抑制蛋白激酶活性, 阻止核内癌基因激活, 抑制肿瘤细胞的增生<sup>[60, 61]</sup>. (2) 磷酸蛋白磷酸酶途径: 正常蛋白酪氨酸磷酸酶 (PTP) 的激活, 使酪氨酸残基磷酸化, 通过多种蛋白激酶的级联放大激活有丝分裂原激活的蛋白激酶 (MAPK), 刺激细胞增生, 持续激活导致细胞转化. SSTR 与 SST 及 SSTA 结合后, 上调 PTP 的活性, 使酪氨酸激酶去磷酸化而失活, 并抑制 MAPK 等多种蛋白激酶, 从而抑制癌基因 c-fos、c-myc、c-jun 等的激活, 抑制 DNA 和蛋白质的合成, 干扰细胞周期, 发挥抗有丝分裂作用<sup>[61-64]</sup>. Sharma et al<sup>[64]</sup>对 CHO-K1 细胞的研究证明: 细胞增生抑制的信号是由 hSSTR1、2、4、5 传导的, 这些受体亚型传导的信号诱导 Rb 癌基因的失活及 G1 期的阻滞, 他们作用的相对活性依次为: hSSTR5 大于 hSSTR2 大于 hSSTR4=hSSTR1. (3)  $\text{Ca}^{2+}$  途径: SSTR2 和 SSTR5 可通过抑制细胞外  $\text{Ca}^{2+}$  内流, 降低胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度, 而对肿瘤细胞的增生发生抑制作用<sup>[59-61]</sup>.

Buscail et al<sup>[65]</sup>在对表达 hSSTR1 和 hSSTR2 的 COS-7 和 NIH3T3 细胞的研究中发现: RC-160 和 Octreotide 并不抑制腺苷酸环化酶活性, 而是通过激活酪氨酸磷酸酶途径抑制细胞增生. 而在表达 SSTR5 的 CHO 细胞中, RC-160 对其增生的抑制作用不受酪氨酸和丝/苏氨酸磷酸酶抑制剂的影响, 但 RC-160 可抑制胆囊收缩素 (CCK) 诱导的细胞内钙离子的运动, 表明 SSTR5 通过磷脂酶 C/三磷酸肌醇/ $\text{Ca}^{2+}$  途径介导细胞增生的抑制.

4.2 间接作用 具体地说, SST 及其类似物抗肿瘤的间接作用机制有以下几个方面: (1) 抑制 GH/IGF-1 轴. 现已发现, SST 及其类似物可以通过抑制生长激素 (GH)、胰岛素样生长因子-1 (IGF-1)、表皮生长因子 (EGF)、肿瘤自分泌生长因子等多种肿瘤生长刺激因子的基因表达及提高其与相应蛋白的结合率, 降低其在循环系统及肿瘤局部的浓度, 阻断他们的信号传递, 达到抑制肿瘤生长的目的. 其中 IGF-1 备受人们关注, 大量研究表明, GH/IGF-1 轴对许多肿瘤的生长具有重要作用. 垂体分泌的 GH 作用于肝脏, 刺激其合成与分泌 IGF-1, 因绝大多数肿瘤细胞表面存在 IGF-1 受体, 他们与 IGF-1 可结合, 引发细胞的增生活动. 一方面, Octreotide 可直

接抑制肝脏 IGF-1 基因的表达, 或抑制垂体分泌 GH, 使肝脏分泌的 IGF-1 减少, 血清 IGF-1 水平降低; 另一方面, Octreotide 可诱导 IGFBP-1 增加, 而 IGFBP-1 可与 IGF-1 结合抑制其活性, 从而抑制包括原发性肝癌在内的肿瘤细胞的增生<sup>[49, 66]</sup>. Reubi et al<sup>[67]</sup>对 Swarm 软骨肉瘤的研究已证明 SSTA 可抑制 SSTR 阴性肿瘤的增生, Swarm 软骨肉瘤是一种缺乏 SST 结合位点的实验性肿瘤, 其瘤细胞内有丰富的 IGF-1 受体, 其抑制作用是通过 SSTA 与垂体生长激素区的 SSTR 结合, 抑制 GH 分泌, 降低 IGF-1 表达而间接实现的. 多数肿瘤细胞具有 IGF-1 受体, 阻断性抗体与 IGF-1 受体结合后可降低肿瘤的增生. 将人类乳腺癌细胞接种于 IGF-1 缺乏的“lit/lit”裸鼠, 其生长明显低于接种于 IGF-1 充分的宿主<sup>[68]</sup>; 下丘脑切除可降低 IGF-1 反应性肉瘤的局部生长和转移行为, 而用 GH 可使之恢复, 提示阻断 GH/IGF-1 轴可降低某些肿瘤的侵袭行为. SSTA 是 GH/IGF-1 轴的有效抑制剂, O' Byrne et al<sup>[69]</sup>发现注射高剂量的 RC-160 可降低乳腺癌患者血清 IGF-1 水平 45 %.

(2) 抗肿瘤血管形成. 肿瘤周围血管有 SSTR 分布, 而且越靠近肿瘤的血管, SSTR 表达密度越高, 当 Octreotide 与 SSTR 特异性结合后, 可引起肿瘤周边血管强烈收缩, 并能抑制新生血管形成, 从而减少肿瘤血供, 导致肿瘤局部缺血坏死. 抗肿瘤血管形成是肿瘤治疗的重要方法, SSTA 可以通过抑制 IGF-1 而发挥抗肿瘤作用, 因 IGF-1 具有促进新生血管形成的作用<sup>[70]</sup>. 1999 年, Albini et al<sup>[71]</sup>研究 Kaposi's 肉瘤时观察到: SSTA 能直接作用于肿瘤组织微血管系统中的内皮细胞和单核细胞而发挥抗肿瘤血管形成的作用, 并且体外实验亦证明这两种细胞均表达 SSTR mRNAs. SSTA 能抑制肿瘤细胞因子刺激的内皮细胞的生长、浸润和突破基底膜, PTP 抑制剂钒酸盐可逆转该作用, 且 RT-PCR 分析发现内皮细胞只表达 SSTR3, 故认为 SSTA 是通过 SSTR3 介导而起到对内皮细胞的抑制作用<sup>[72]</sup>. 单核细胞可以表达 SSTA2、3、5, SSTA 能够直接与受体结合, 降低单核细胞对内皮细胞的趋化性, 抑制血管形成因子的产生, 是一种有效的血管形成抑制剂<sup>[71, 73]</sup>.

(3) 细胞内酸化与细胞凋亡. SST 及其类似物可以通过抑制细胞周期和 / 或诱导细胞凋亡<sup>[33, 74]</sup>. 肿瘤细胞可表达多种 SSTR 亚型, 研究证明选择性激活 hSSTR3 可诱导细胞凋亡, 而其他 hSSTR 亚型介导细胞抑制作用, 导致 G1 期抑制<sup>[74, 75]</sup>. Sharma et al<sup>[76]</sup>发现在表达各种 SSTR 亚型的人乳腺癌 MCF-7 细胞中, Octreotide 可选择性结合 SSTR3, 激活对  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  不敏感的核酸内切酶, 诱导 DNA 断裂, 激活 wtP53 和 Bax 基因, 从而促发细胞凋亡, 并认为其信号传递是通过细胞膜上非跨膜 PTP SHP-1 介导的, 其诱导细胞液的 SHP-1 移位到细胞膜, 以增加细胞膜上 SHP-1 的活性<sup>[74, 75]</sup>. 随后在 CHO-K1 细胞中的研究证明细胞增生抑制的信号是由 hSSTR1、2、4、5 传导的, 这些受体亚型传导的信号诱导 Rb 癌基因的失活及 G1 期的阻

滞, 作用的相对活性依次为: hSSTR5 大于 hSSTR2 大于 hSSTR4=hSSTR1<sup>[64]</sup>. 肿瘤细胞内的 pH(pHi) 一般要高于其细胞外环境. Thangaraju et al<sup>[75, 77]</sup>发现, 当细胞内 pHi 为 6.0-6.7 时, SSTA 诱导凋亡的发生, pHi 为 6.5 时最强; 而 pHi 大于 6.0 或 pHi 大于 6.7 时, 可进一步促进 SHP-1 的重新分布, 表明 SHP-1 和细胞内酸化相互依赖, 共同作用诱导细胞的凋亡.

对于肝转移瘤, SST 及其类似物的作用机制还包括: (1) 减少门脉系统的血流, 这样一方面可以减少肿瘤细胞从门静脉向肝脏转移的机会; 另一方面亦减少了肝转移瘤门静脉血供, 从而抑制转移生长. (2) 增强肝脏网状内皮系统的吞噬功能, 提高机体对肿瘤的免疫力<sup>[55]</sup>.

总之, SST 及其类似物可以通过直接与间接的机制发挥抗肝肿瘤的作用, 其抗肿瘤作用广泛, 毒副反应小, 血浆半衰期长, 使用方便. 进一步阐明其抗肿瘤机制将有可能在肝肿瘤治疗方面开辟出一条新的途径, 并产生广阔的临床应用前景.

## 5 参考文献

- Lamberts SW, van der Lely AJ, de Herder WW, Hofland LJ. Octreotide. *N Engl J Med* 1996;334:246-254
- Schally AV. Oncological applications of somatostatin analogues. *Cancer Res* 1988;48:6977-6985
- Scudamore CH, Ragaz J, Kluffinger AM, Owen DA. Hepatocellular carcinoma, a comparison of oriental and caucasian patients. *Am J Surg* 1988;155:659-662
- Krulich L, Dhariwal AP, McCann SM. Stimulatory and inhibitory effects of purified hypothalamic extracts on growth hormone release from rat pituitary in vitro. *Endocrinology* 1968;83:783-790
- Brazeau P, Vale W, Burgus R, Ling N, Butcher M, Rivier J, Guillemain R. Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science* 1973;179:77-79
- Patel YC. Somatostatin and its receptor family. *Front Neuroendocrinol* 1999;20:157-198
- Yamada Y, Post SR, Wang K, Tager HS, Bell GI, Seino S. Cloning and functional characterization of a family of human and mouse somatostatin receptors expressed in brain, gastrointestinal tract, and kidney. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:251-255
- Raynor K, O' Carroll AM, Kong H, Yasuda K, Mahan LC, Bell GI, Reisine T. Characterization of cloned somatostatin receptors SSTR4 and SSTR5. *Mol Pharmacol* 1993;44:385-392
- Florio T, Scorziello A, Fattore M, D' Alto V, Salzano S, Rossi G, Berlingieri MT, Fusco A, Schettini G. Somatostatin inhibits PC Cl3 thyroid cell proliferation through the modulation of phosphotyrosine activity. Impairment of the somatostatinergic effects by stable expression of E1A viral oncogene. *J Biol Chem* 1996;271:6129-6136
- Davies N, Yates J, Kynaston H, Taylor BA, Jenkins SA. Effects of octreotide on liver regeneration and tumour growth in the regenerating liver. *J Gastroenterol Hepatol* 1997;12:47-53
- Scherubl H, Bader M, Fett U, Hamm B, Schmidt-Gayk H, Koppenhagen K, Dop FJ, Riecken EO, Wiedenmann B. Somatostatin-receptor imaging of neuroendocrine gastroenteropancreatic tumors. *Gastroenterol* 1993;105:1705-1709
- Keri GY, Ercegyi J, Horvath A, Mezo I, Idei M, Vantus T, Balogh A, Vadasz Z, Bokonyi G, Seprodi J, Teplan I, Csuka O, Tejeda M, Gaal D, Szegedi Z, Szende B, Roze C, Kalthoff H, Ullrich A. A tumor-selective somatostatin analogue (TT-232) with strong in vitro and in vivo antitumor activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:12513-12518
- Robbins RJ. Somatostatin and cancer. *Metabolism* 1996;45:



- 98-100
- 14 Brazeau P, Gullemine R. Editorial: Somatostatin: newcomer from the hypothalamus. *N Engl J Med* 1974;290:963-964
  - 15 Veber DF, Holly FW, Nutt RF, Bergstrand SJ, Brady SF, Hirschmann R, Glitzer MS, Saperstein R. Highly active cyclic and bicyclic somatostatin analogues of reduced ring size. *Nature* 1979;280:512-514
  - 16 Bauer W, Briner U, Doepfner W, Haller R, Huguenin R, Marbach P, Petcher TJ, Pless. SMS 201-995: a very potent and selective octapeptide analogue of somatostatin with prolonged action. *Life Sci* 1982;31:1133-1140
  - 17 Falb E, Salitra Y, Yechezkel T, Bracha M, Litman P, Olender R, Rosenfeld R, Senderowitz H, Jiang S, Goodman M. A bicyclic and hss2 selective somatostatin analogue: design, synthesis, conformational analysis and binding. *Bioorg Med Chem* 2001; 9:3255-3264
  - 18 Steven WJ, Aart-Jan DL, Wouter WD. Drug therapy: Octreotide. *N Engl J Med* 1996;334:246-254
  - 19 Priou A, Levesque G, Simonetta C, Lancranjan I, Roger P, Jaquet P. Long acting sandostatine (sandostatine LAR) in the treatment of acromegaly. *Ann Endocrinol (Paris)* 1995;56:213-218
  - 20 Reubi JC, Kvols L, Krenning E, Lamberts SW. Distribution of somatostatin receptors in normal and tumor tissue. *Metabolism* 1990;39:78-81
  - 21 Reubi JC, Waser B, Horisberger U, Krenning E, Lamberts SW, Gebbers JO, Gersbach P, Laissue JA. In vitro autoradiographic and in vivo scintigraphic localization of somatostatin receptors in human lymphatic tissue. *Blood* 1993;82:2143-2151
  - 22 Liapakis G, Tallent M, Reisine T. Molecular and functional properties of somatostatin receptor subtypes. *Metabolism* 1996; 45:12-13
  - 23 Kouroumalis E, Skordilis P, Thermos K, Vasilaki A, Moschandre J, Manousos ON. Treatment of hepatocellular carcinoma with octreotide: a randomized controlled study. *Gut* 1998;42:442-447
  - 24 Reynisdottir I, Polyak K, Iavarone A, Massague J. Kip/Cip and Ink4 Cdk inhibitors cooperate to induce cell cycle arrest in response to TGF-beta. *Genes Dev* 1995;9:1831-1845
  - 25 Reynisdottir I, Massague J. The subcellular locations of p15 (Ink4b) and p27(Kip1) coordinate their inhibitory interactions with cdk4 and cdk2. *Genes Dev* 1997;11:492-503
  - 26 Patel YC, Srikant CB. Subtype selectivity of peptide analogues for all five cloned human somatostatin receptors (hsstr 1-5). *Endocrinology* 1994;135:2814-2817
  - 27 Hofland LJ, Lamberts SW. Somatostatin receptors and disease: role of receptor subtypes. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 1996; 10:163-176
  - 28 Bruno JF, Xu Y, Song J, Berelowitz M. Molecular cloning and functional expression of a brain-specific somatostatin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:11151-11155
  - 29 Buscail L, Delesque N, Esteve JP, Saint-Laurent N, Prats H, Clerc P, Robberecht P, Bell GI, Liebow C, Schally AV. Stimulation of tyrosine phosphatase and inhibition of cell proliferation by somatostatin analogues: mediation by human somatostatin receptor subtypes SSTR1 and SSTR2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:2315-2319
  - 30 Rohrer L, Raulf F, Bruns C, Buettner R, Hofstaedter F, Schule R. Cloning and characterization of a fourth human somatostatin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:4196-4200
  - 31 Patel YC, Greenwood MT, Panetta R, Demchysyn L, Niznik H, Srikant CB. The somatostatin receptor family. *Life Sci* 1995; 57:1249-1265
  - 32 Patel YC, Greenwood MT, Panetta R, Hukovic N, Grigorakis S, Robertson LA, Srikant CB. Molecular biology of somatostatin receptor subtypes. *Metabolism* 1996;45:31-38
  - 33 Sharma K, Patel YC, Srikant CB. Subtype-selective induction of wild-type p53 and apoptosis, but not cell cycle arrest, by human somatostatin receptor 3. *Mol Endocrinol* 1996;10:1688-1696
  - 34 Cordelier P, Esteve JP, Bousquet C, Delesque N, O'Carroll AM, Schally AV, Vaysse N, Susini C, Buscail L. Characterization of the antiproliferative signal mediated by the somatostatin receptor subtype sst5. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:9343-9348
  - 35 Krenning EP, Kooij PP, Pauwels S, Breeman WA, Postema PT, De Herder WW, Valkema R, Kwekkeboom DJ. Somatostatin receptor: scintigraphy and radionuclide therapy. *Digestion* 1996;57:57-61
  - 36 van Eijck CH, Krenning EP, Bootsma A, Oei HY, van Pel R, Lindemans J, Jeekel J, Reubi JC, Lamberts SW. Somatostatin-receptor scintigraphy in primary breast cancer. *Lancet* 1994; 343:640-643
  - 37 Schaer JC, Waser B, Mengod G, Reubi JC. Somatostatin receptor subtypes sst1, sst2, sst3 and sst5 expression in human pituitary, gastroentero-pancreatic and mammary tumors: comparison of mRNA analysis with receptor autoradiography. *Int J Cancer* 1997;70:530-537
  - 38 Greenman Y, Melmed S. Expression of three somatostatin receptor subtypes in pituitary adenomas: evidence for preferential SSTR5 expression in the mammosomatotroph lineage. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;79:724-729
  - 39 Reichlin S. Somatostatin. *N Engl J Med* 1983; 309: 1495-1501
  - 40 Bruno JF, Xu Y, Song J, Berelowitz M. Tissue distribution of somatostatin receptor subtype messenger ribonucleic acid in the rat. *Endocrinology* 1993;133:2561-2567
  - 41 Theveniau MA, Yasuda K, Bell GI, Reisine T. Immunological detection of isoforms of the somatostatin receptor subtype, SSTR2. *J Neurochem* 1994;63:447-455
  - 42 Bruns C, Stolz B, Albert R, Marbach P, Pless J. OctreoScan 111 for imaging of a somatostatin receptor-positive islet cell tumor in rat. *Horm Metab Res* 1993;27:5-11
  - 43 Krenning EP, Bakker WH, Kooij PP, Breeman WA, Oei HY, de Jong M, Reubi JC, Visser TJ, Bruns C, Kwekkeboom DJ. Somatostatin receptor scintigraphy with indium-111-DTPA-D-Phe-1-octreotide in man: metabolism, dosimetry and comparison with iodine-123-Tyr-3-octreotide. *J Nucl Med* 1992; 33:652-658
  - 44 Dorr U, Wurm K, Horing E, Guzman G, Rath U, Bihl H. Diagnostic reliability of somatostatin receptor scintigraphy during continuous treatment with different somatostatin analogs. *Horm Metab Res* 1993;27:36-43
  - 45 钟朝晖, 朱继业, 冷希圣, 杜如昱. 实验性肝硬化大鼠肝组织生长抑素受体亚型 mRNA 表达的研究. *中华实验外科杂志* 2000;17: 439-441
  - 46 Reubi JC, Zimmermann A, Jonas S, Waser B, Neuhaus P, Laderach U, Wiedenmann B. Regulatory peptide receptors in human hepatocellular carcinomas. *Gut* 1999;45:766-774
  - 47 刘建生, 彭淑牖, 吴育连. 原发性肝癌 hSSTR2,5 mRNA 的实验研究. *世界华人消化杂志* 2000;8:1308-1310
  - 48 颜登国, 区庆嘉. 生长抑素受体亚型 SSTR-2 和 SSTR-3 mRNA 在原发性肝癌中的表达. *癌症* 2001;20:152-155
  - 49 Ren SG, Ezzat S, Melmed S, Braunstein GD. Somatostatin analog induces insulin-like growth factor binding protein-1 (IGFBP) expression in human hepatoma cells. *Endocrinology* 1992;131:2479-2481
  - 50 Chen XJ, Liu ZS, Qian Q. Study of octreotide inhibit growth and induce apoptosis of human hepatocellular carcinoma cell. *Clin J Hepatobiliary Surg* 2000;6:146-147
  - 51 Diaco DS, Hajarizadeh H, Mueller CR, Fletcher WS, Pommier RF, Woltering EA. Treatment of metastatic carcinoid tumors using multimodality therapy of octreotide acetate, intra-arterial chemotherapy, and hepatic arterial chemoembolization. *Am J Surg* 1995;169:523-528
  - 52 Lokich J. Carcinoid tumor regression with high-dose octreotide acetate: a patient report. *Am J Clin Oncol* 1998;21:246-247
  - 53 Di Bartolomeo M, Bajetta E, Buzzoni R, Mariani L, Carnaghi C, Somma L, Zilembo N, di Leo A. Clinical efficacy of octreotide in the treatment of metastatic neuroendocrine tumors. A study

- by the italian trials in medical oncology group. *Cancer* 1996; 77:402-408
- 54 刘瑞, 唐岩, 王元和, 曹贵松, 王本茂. 生长抑素八肽对小鼠结肠癌肝转移瘤细胞动力学及血清 CEA 表达的影响. *中华实验外科杂志* 1997;14:130-131
  - 55 Davies N, Kynaston H, Yates J, Nott DM, Nash J, Taylor BA, Jenkins SA. Octreotide inhibits the growth and development of three types of experimental liver metastases. *Br J Surg* 1995; 82:840-843
  - 56 Schindel DT, Grosfeld JL. Hepatic resection enhances growth of residual intrahepatic and subcutaneous hepatoma, which is inhibited by octreotide. *J Pediatr Surg* 1997;32:995-997
  - 57 Nott DM, Baxter JY, Grime JS, Day DW, Cooke TG, Jenkins SA. Effects of a somatostatin analogue (SMS 201-995) on the growth and development of hepatic tumor derived by intraportal injection of Walker cells in the rat. *Br J Surg* 1989; 76:1149-1151
  - 58 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
  - 59 Pollak MN, Schally AV. Mechanisms of antineoplastic action of somatostatin analogs. *Proc Soc Exp Biol Med* 1998;217: 143-152
  - 60 Scherubl H, Hescheler J, Riecken EO. Molecular mechanisms of somatostatin's inhibition of hormone release: participation of voltage-gated calcium channels and G-proteins. *Horm Metab Res Suppl* 1993;27:1-4
  - 61 Bousquet C, Puente E, Buscail L, Vaysse N, Susini C. Antiproliferative effect of somatostatin and analogs. *Chemotherapy* 2001;47:30-39
  - 62 Delesque N, Buscail L, Esteve JP, Raully I, Zeggari M, Saint-Laurent N, Bell GI, Schally AV, Vaysse N, Susini C. A tyrosine phosphatase is associated with the somatostatin receptor. *Ciba Found Symp* 1995;190:187-196
  - 63 Srikant CB, Shen SH. Octapeptide somatostatin analog SMS 201-995 induces translocation of intracellular PTPIC to membranes in MCF-7 human breast adenocarcinoma cells. *Endocrinology* 1996; 137:3461-3468
  - 64 Sharma K, Patel YC, Srikant CB. C-terminal region of human somatostatin receptor 5 is required for induction of Rb and G1 cell cycle arrest. *Mol Endocrinol* 1999;13:82-90
  - 65 Buscail L, Esteve JP, Saint-Laurent N, Bertrand V, Reisine T, O' Carroll AM, Bell GI, Schally AV, Vaysse N, Susini C. Inhibition of cell proliferation by the somatostatin analogue RC-160 is mediated by somatostatin receptor subtypes SSTR2 and SSTR5 through different mechanisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:1580-1584
  - 66 Flyvbjerg A, Schuller AG, van Neck JW, Groffen C, Orskov H, Drop SL. Stimulation of hepatic insulin-like growth factor-binding protein-1 and -3 gene expression by octreotide in rats. *J Endocrinol* 1995;147:545-551
  - 67 Reubi JC. A somatostatin analogue inhibits chondrosarcoma and insulinoma tumour growth. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1985; 109:108-114
  - 68 Yang XF, Beamer WG, Huynh H, Pollak M. Reduced growth of human breast cancer xenografts in hosts homozygous for the lit mutation. *Cancer Res* 1996;56:1509-1511
  - 69 O' Byrne KJ, Dobbs N, Propper DJ, Braybrooke JP, Koukourakis MI, Mitchell K, Woodhull J, Talbot DC, Schally AV, Harris AL. Phase II study of RC-160 (vapeotide), an octapeptide analogue of somatostatin, in the treatment of metastatic breast cancer. *breast cancer. Br J Cancer* 1999;79:1413-1418
  - 70 Patel PC, Brarrie R, Hill N, Landeck S, Kurozawa D, Woltering EA. Postreceptor signal transduction mechanisms involved in octreotide-induced inhibition of angiogenesis. *Surgery* 1994; 116:1148-1152
  - 71 Albini A, Florio T, Giunciuglio D, Masiello L, Carlone S, Corsaro A, Thellung S, Cai T, Noonan DM, Schettini G. Somatostatin controls Kaposi's sarcoma tumor growth through inhibition of angiogenesis. *FASEB J* 1999;13:647-655
  - 72 Reardon DB, Dent P, Wood SL, Kong T, Sturgill TW. Activation in vitro of somatostatin receptor subtypes 2, 3, or 4 stimulates protein tyrosine phosphatase activity in membranes from transfected Ras-transformed NIH 3T3 cells: coexpression with catalytically inactive SHP-2 blocks responsiveness. *Mol Endocrinol* 1997;11:1062-1069
  - 73 O' Reilly MS, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS, Flynn E, Birkhead JR, Olsen BR, Folkman J. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 1997;88:277-285
  - 74 Imam H, Eriksson B, Lukinius A, Janson ET, Lindgren PG, Wilander E, Oberg K. Induction of apoptosis in neuroendocrine tumors of the digestive system during treatment with somatostatin analogs. *Acta Oncol* 1997;36:607-614
  - 75 Thangaraju M, Sharma K, Liu D, Shen SH, Srikant CB. Interdependent regulation of intracellular acidification and SHP-1 in apoptosis. *Cancer Res* 1999;59:1649-1654
  - 76 Sharma K, Srikant CB. Induction of wild-type p53, Bax, and acidic endonuclease during somatostatin-signaled apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells. *Int J Cancer* 1998;76: 259-266
  - 77 Zanke BW, Lee C, Arab S, Tannock IF. Death of tumor cells after intracellular acidification is dependent on stress-activated protein kinases (SAPK/JNK) pathway activation and cannot be inhibited by Bcl-2 expression or interleukin 1beta-converting enzyme inhibition. *Cancer Res* 1998;58:2801-2808

# 胰头部解剖在扩大胰十二指肠切除术中的应用

方驰华, 马俊勋, 钟世镇

方驰华, 马俊勋, 中国人民解放军第一军医大学珠江医院肝胆外科  
广东省广州市 510282  
钟世镇, 中国人民解放军第一军医大学临床解剖研究室 广东省广州市 510515  
项目负责人: 方驰华, 510282, 广东省广州市, 中国人民解放军第一军医大学  
珠江医院肝胆外科. fch58520@sina.com  
电话: 020-61642926  
收稿日期: 2003-03-14 接受日期: 2003-04-05

## 摘要

通过对文献的分析和研究, 我们论述了胰头部解剖在扩大胰十二指肠切除术中的应用, 包括目前的扩大胰十二指肠切除术的概念和胰头部解剖各部分的解剖关系. 其中详细介绍了胰头的周围关系, 胰头部钩突的解剖变异, 胰头部动脉及变异, 胰头部静脉在扩大胰十二指肠切除术血管重建的意义, 胰头部胰管走行及意义, 胰头部淋巴在扩大胰十二指肠切除术的临床意义, 胰头部神经的临床应用, 结合临床对胰头部各部解剖进行了探讨, 为指导临床提供了依据.

方驰华, 马俊勋, 钟世镇. 胰头部解剖在扩大胰十二指肠切除术中的应用. 世界华人消化杂志 2003;11(10):1588-1592  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1588.asp>

## 0 引言

据国外资料<sup>[1]</sup>, 胰腺癌的发病率近 30 a 来已增加 3-7 倍, 如美国的发病率达 10/10 万, 已超过胃癌的发病率, 其死亡率占恶性肿瘤的第 4 位, 其中手术切除率为 20%, 手术死亡率小于 5%, 5 a 生存率为 10% 左右. 国内统计, 胰腺癌发病率较低, 但近年来也呈上升趋势, 如 1963 年上海市区统计的发病率为 1.16/10 万, 1977 年增至 3.8/10 万, 1990 年上升至 5.1/10 万, 1974 年占恶性肿瘤的第 14 位, 至 1984 年跃居于第 5 位<sup>[2]</sup>. 胰腺癌好发于胰头部, 日本 15 a 间(1981-1995 年)登记 17 121 例胰腺癌中胰头癌占 57.5%, 手术切除率为 36%, 5 a 生存率为 18.2%<sup>[3]</sup>. 黎国屏 et al<sup>[4]</sup> 在 133 例胰腺癌回顾分析中发现胰头癌 116 例, 占 87.2%. 为了提高胰头癌患者的清除率和术后生存率. 而王成锋 et al<sup>[5]</sup> 回顾性分析 20 a 收治的 299 例进展期胰腺癌发现进展期无法行根治性切除的胰腺癌、姑息性切除是无益的. 同样郑树森 et al<sup>[6]</sup> 总结 216 例胰腺癌病例, 发现姑息性手术不能延长患者生命, 应该寻求一种更为有效的治疗模式. 有学者提出<sup>[7-13]</sup>

提出利用影像、分子生物学、生化等技术和手段, 早期发现并早期治疗是治疗胰腺癌的关键. 国内有学者认为胰腺癌应该进行系统的综合治疗, 提高生存率, 降低死亡率, 改善患者的生存质量<sup>[14-23]</sup>. 本文对扩大胰十

二指肠切除术中胰头部的局部应用解剖进行介绍.

## 1 扩大胰十二指肠切除术

目前胰腺癌切除术包括胰十二指肠切除术(Whipple 术); 扩大胰十二指肠切除术(extended pancreatoduodenectomy, EPD); 全胰切除术(total pancreatectomy, TP); 区域性胰腺切除术(regional pancreatectomy, RP); 保留幽门的胰十二指肠切除术(pylorus-preserving pancreatoduodenectomy, PPPD); 胰肠吻合与胰胃吻合术<sup>[24]</sup>. 所谓 EPD 是相对于经典的 Whipple 术而言, 在 Whipple 术的基础上进行广泛的淋巴结清扫和邻近的受侵袭血管联合切除<sup>[25]</sup>. 日本胰腺癌规约第 3 版(1986)称扩大手术为第 1 站及第 2 站以上淋巴结清扫或合并胰周围组织器官的胰腺切除术. 钟守先 et al<sup>[26]</sup> 认为 EPD 的适应证为肿瘤直径小于 5 cm; 无肝门、腹腔动脉干周围、肠系膜根部及远处淋巴结转移; 无肝动脉、肠系膜上动脉或下腔静脉的肿瘤浸润; 肿瘤未侵及或仅局部侵及门静脉, 而肠系膜上静脉的外科干可分离 2 cm 以上者. 切除的范围包括: (1)肝总管以下的胆道和胆囊及其周围的淋巴结; (2)切除远端 1/2 胃及 Treitz 韧带以下 10 cm 左右的空肠; (3)胰头颈及钩突部. 一般要求清扫 1、2 站淋巴结, 特别重视胰头前后、肠系膜上动脉周围、横结肠系膜根部、肝总动脉周围及腹腔动脉周围受累神经及淋巴的清除. 国内外学者认为如果肿瘤侵犯到肠系膜上静脉-门静脉(SMV-PV)则切除并重建<sup>[27-32]</sup>. 何三光 et al<sup>[33]</sup> 提出改良的 EPD, 即增加了: (1)肝十二指肠韧带区的软组织及淋巴结清除(肝十二指肠韧带的骨骼化); (2)腹腔动脉干周围的淋巴结清除; (3)第 16 组淋巴结的清除. Nakao et al<sup>[34]</sup> 切除门静脉 89 例, 发现 58.0% 的血管标本无侵犯, 仅仅粘连, 故认为应该切除门静脉. 郑英键 et al<sup>[35]</sup> 采取切除受侵犯血管的根治性胰十二指肠切除术治疗 26 例胰头癌, 结果发现平均生存期为 56 mo, 1、3、5 a 生存率分别为 96.1%、88.4%、57.5%. 曾天定 et al<sup>[36]</sup> 报道联合 SMV-PV 切除 17 例, 中位生存率位 17.7 mo, 4 例生存 5 a 以上, 对照组为 3.8 mo, 差异显著.

## 2 胰头部解剖在扩大胰十二指肠切除术中的应用

### 2.1 胰头的周围关系

胰头的上、下及右侧都与十二指肠紧密连接. 胰头与胰颈交界处的右前方有胃十二指肠动脉沟, 左后方有一较深的切迹, 内有肠系膜上静脉与脾静脉汇合而成的门静脉. 在胰颈的右下方, 胰头前面先与横结肠相邻, 他们之间有疏松结缔组织相隔. 下

腔静脉在胰头后面上行. 还有肾静脉和右膈脚. 在钩突前面, 有肠系膜上动、静脉通过. 钩突的背面接腹主动脉, 在胰头后面上外侧部的沟内, 有胆总管通过. 有时胆总管穿行于胰头实质内, 但少见. 在行胰十二指肠切除术时必须熟悉这些毗邻.

**2.2 胰头部钩突的解剖** 钩突是胰头后下部向左后下方呈钩状伸展到肠系膜上血管后方的部分. 国内报道98.3%的胰腺有钩突, 1.7%的人缺如, 3.3%的钩突大于胰头本身<sup>[37]</sup>. 其血液供应为胰背动脉右支的一个小分支, 其弯向下方供应部分胰头和钩突, 称为胰头钩突动脉. 胰头钩突部有1-2支钩突静脉小支在胰切迹附近注入肠系膜上静脉后壁或右后壁. 钩突伸于下腔静脉和腹主动脉前方, 肠系膜上动脉恰在钩突内向前下行, 右侧是肠系膜上静脉向上延续为门静脉, 下方是十二指肠水平部, 上方是左肾静脉经过. 钩突的大小, 形状和包绕肠系膜上血管的程度有个体差异, 因此临床在分离他们时难易程度不同. 胰头癌行胰十二指肠切除术时, 需将胰头钩突从肠系膜上动脉及静脉的后面和右侧剥离下来, 这是手术的难点之一. 为防止癌残留应该完全切除钩突部, 可以用剥离子轻轻剥离, 推开肠系膜上静脉右侧壁, 逐一结扎切断小静脉, 然后用血管拉钩或牵引带将门静脉及肠系膜上静脉向右拉, 同时把钩突部向左拉, 在搏动的肠系膜上动脉前方沿长轴切开血管前结缔组织, 沿血管右侧壁自上向下切除钩突. 彭淑牖 et al<sup>[38]</sup>使用PMOO进行解剖分离, 显露每一根小静脉, 在距离肠系膜或门静脉0.5 cm以外将其电凝一段后离断, 可以迅速的把肠系膜静脉从钩突部游离出来. 若胰头癌累及钩突, 可通过CT帮助判断肠系膜上静脉的后面和右侧是否已被肿瘤浸润<sup>[39-42]</sup>. 如果已被侵犯, 手术操作困难时, 则需行肠系膜上动静脉切除和重建. 裴永泉 et al<sup>[43]</sup>总结累及肠系膜上静脉的胰腺钩突部癌8例, 其中5例切除静脉干长度为20-42 cm, 直接对端吻合, 3例行受浸润血管侧壁切除修补术. 因此他认为胰腺钩突部癌的肠系膜上静脉浸润不是根治手术禁忌证, 联合门静脉、肠系膜上静脉切除可提高根治手术切除率.

### 2.3 胰头部血供

**2.3.1 胰头部动脉及变异** 胰头的血液供应主要来自胃十二指肠动脉和肠系膜上动脉分出的胰十二指肠上、下动脉构成的比较恒定的2个胰十二指肠动脉弓, 小部分与来自脾动脉的分支胰背动脉吻合. 胰头上部由胰十二指肠上前动脉和胰十二指肠上后动脉供应, 胰头下部由胰十二指肠下前动脉和胰十二指肠下后动脉供应<sup>[44]</sup>. 有时异常的肝总动脉或肝右动脉可自肠系膜上动脉发出, 出现机率10-15%, 行于胰头后方, EPD时易损伤而导致肝坏死. 有时异常高位起于肠系膜上动脉的中结肠动脉, 经过胰头后面或穿过胰头, 从胰头前面进入横结肠, 在EPD时也应该小心, 防止损伤出血或误扎. 胰十二指肠上前, 上后动脉分别起源的为73.4%, 共同起源的为26.7%, 而胰十二指肠下后, 下前分别起源的占

30.2%, 共同起源是69.9%. 此外64.3%的人沿胰头上缘尚有一条较细的动脉支, 他常起自胃十二指肠动脉, 向左行与胰背动脉处相连, 并且由他发出多数微细小支供应胰头上部, 称为胰头上缘支. 在切除胰头时应该小心处理, 以免出血不止, 影响手术<sup>[45]</sup>. 据国外资料表明<sup>[46]</sup>胰十二指肠上前动脉93-96.6%起源于胃十二指肠动脉, 还可以起源于肝总动脉3.6%, 胰十二指肠上动脉、胰横动脉、肠系膜上动脉发出的右肝动脉、腹腔干、脾动脉和肠系膜动脉的吻合支、肠系膜上动脉、肝动脉、脾动脉等. 缺如的胰十二指肠上动脉约1-2.5%、双支的约7.1-35%、甚至发现三支和四支. 我国的资料显示起于胃十二指肠动脉98%、肝总动脉1%、肠系膜上动脉和胰背动脉各0.5%. 胰十二指肠上后动脉来自胃十二指肠动脉58-96.9%、肝总动脉0.67-9.1%、肝固有动脉0-8%、胰十二指肠上动脉5.33-9.1%、肠系膜上动脉的异常肝动脉3%、肠系膜上动脉3-5%、脾动脉3.45-7.14%、右肝动脉2-4%、来自附属或变异的右肝动脉3-7%、罕见于胆囊动脉、胃网膜右动脉、腹腔干、脾动脉和附属肝动脉的吻合支等<sup>[47]</sup>. 胰十二指肠上后动脉双支10.7-20%, 三支5%, 甚至有四支. 国内研究发现胰十二指肠上后动脉起自胃十二指肠动脉90%、肝总动脉2%、肝固有及其左右支和胆囊动脉6%、肠系膜上动脉1.5%、胰背动脉0.5%. 胰十二指肠下动脉直接来自肠系膜上动脉变化较大4.6-100%、肠系膜上动脉的分支第一空肠动脉20-64.7%、肠系膜上动脉发出的附属右肝动脉、胰背动脉6-8%, 此外还有第二、三空肠动脉、胰横动脉等. 通常胰十二指肠下动脉并不发出分支, 但是当第一空肠动脉小于他时可以认为属于分支. 偶见发出十二指肠空肠动脉、胃网膜右动脉、一些吻合支(和脾动脉吻合2%, 和腹腔干吻合3%, 肠系膜上动脉吻合, 第一空肠动脉吻合)<sup>[48]</sup>. 胰十二指肠下动脉分为前后二支, 在胰头前后表面或浅穿胰实质向右上与胰十二指肠上前、上后动脉末梢吻合成动脉弓, 分支到胰头和十二指肠, 并常有一支分布于空肠近端. 胰十二指肠下前动脉来源于胰十二指肠下动脉60-70%、第一空肠动脉5.4-40%、胰十二指肠下后动脉和第一空肠动脉总干17.14-30.43%、肠系膜上动脉1.8-50%、起于肠系膜上动脉的肝动脉0.7-3.1%、第二空肠动脉2-6.65%、胰背动脉0.7-2.5%. 胰十二指肠下后动脉来源于胰十二指肠下动脉60-70%、胰十二指肠下后动脉和第一空肠动脉总干17.14-30.43%、第一空肠动脉3.6-30%、肠系膜上动脉8-25%、胰背动脉2.5-8.57%、起于肠系膜上动脉的肝动脉1.8-8.06%、胰横动脉共干1.42%<sup>[49]</sup>. 胰背动脉曾经有许多名称, 如胰最大动脉, 胰颈动脉, 胰岬部动脉等. 胰背动脉几乎100%出现在胰颈和胰头, 其在胰头或胰颈的背面分为左右2支, 多数可贯通全长, 右又分为2支. 左支沿胰下缘背面左行, 叫胰下动脉(即胰横动脉). 孟昭鲁 et al<sup>[50]</sup>尸解50例发现他是脾动脉的一条大的分支, 外径为1.4-3.3 mm,

平均为  $2.22 \pm 0.07$  mm, 起源于脾动脉为常见型, 约占 46%, 起源于脾动脉以外为变异型, 占 50%, 缺如的为 4%。国外资料表明胰背动脉来源变异很大, 脾动脉 22.22-80%、肝总动脉 12-24%、腹腔干 3-33.3%、肠系膜上动脉 1.8-25%、偶见于附属右肝动脉 0.6-7%、胰十二指肠下动脉共干 6-8%、胃十二指肠动脉<sup>[51]</sup>。胰背动脉具有很重要的临床价值: (1)因胰背动脉的管径与肠系膜上动脉或腹腔动脉狭窄有关, 其右支与胰十二指肠动脉形成胰前弓, 可成为脾动脉与肠系膜上动脉或腹腔动脉间的侧支循环通路; (2)如果胰背动脉起于肠系膜上动脉或起点异常的肝动脉, 则其行径恰好在手术切线上或与之交叉, 手术时需要引起重视; (3)胰背动脉是优势动脉, 供应胰颈, 胰体和尾, 有时可能是胰的单一动脉。因此在大的胰腺手术前, 均应作胰血管造影以了解其血供, 有无异常。在手术时应尽量找到胰背动脉及其左右分支, 行胰十二指肠切除术时只切断右支, 保留左支, 而在胰体尾切除时, 应保留右支, 切断左支。此外, 胰头还可以接受胃十二指肠动脉的 2 个小分支十二指肠上和十二指肠后动脉的血供。李家开 et al<sup>[52]</sup>回顾分析 1 000 例肝动脉 DSA 数字减影血管造影造影片。将发自肝固有动脉以远的各级肝动脉分支的供应胰腺的变异血管命名为肝胰动脉, 共发现 16 例存在肝胰动脉, 占 1.6%, 其中 1 例可见 2 支, 共显示 17 支肝胰动脉。其中起源于肝固有动脉 7 支, 占 41.2% (7/17); 起源于肝右动脉 6 支, 占 35.3% (6/17); 起源于肝左动脉 4 支, 占 23.5% (4/17)。以上的动脉变异在行 EPD 时应该值得引起高度重视, 他们关系到手术的成败及术后并发症的发生机率。

**2.3.2 胰头部静脉在 EPD 血管重建的意义** 主要是胰十二指肠上前、上后静脉和胰十二指肠下前、下后静脉。胰十二指肠上前、上后静脉相互吻合形成胰头前静脉弓, 胰十二指肠下前、下后静脉形成胰头后静脉弓<sup>[53]</sup>。宋彬 et al<sup>[54]</sup>随机选取 129 例连续性无中上腹区域恶性肿瘤及炎性病变的 CT 增强扫描病例, 观察胰头静脉弓各属支走行及 CT 表现并测定血管直径, 发现胰头静脉弓属支包括胰十二指肠上后及上前静脉、胃结肠干、结肠右上静脉和胃网膜右静脉等, CT 显示率分别为 63.7%、77.5%、69.8%、70.5% 和 34.9%, 血管直径均值分别为 2.28 mm、2.31 mm、4.85 mm、3.01 mm 和 3.88 mm。Crabo et al<sup>[55]</sup>发现 CT 中观察到胰十二指肠上前静脉 98%、胰十二指肠上后静脉 88%, 而胰十二指肠下静脉较小, 无法观察到。所以可以利用现代影像技术(超声检查、CT 扫描、磁共振扫描成像、数字减影血管造影、正电子发射断层扫描)和内镜诊断技术(EUS、腹腔镜、腹腔镜超声)来判断胰头癌的可切除性, 提高可切除率。此外常有数支来自胰头和钩突的小静脉汇入肠系膜上静脉右壁和后壁, 他们比较纤细, 无同名动脉伴行, 在胰十二指肠切除术时, 容易撕破, 造成难以控制的出血, 必须充分显露予以结扎和切断。在极少数的情况下,

可有来自胰头和胰颈的小静脉直接注入门静脉和肠系膜上静脉前壁, 这也是引起术中大出血的原因之一。

**2.4 胰头部胰管** 胰管位于胰实质内, 接近胰的后面, 从左到右横贯全长, 分为主胰管和副胰管。胰管白色, 长 15-25 cm, 最大管径 0.30-0.45 cm。主胰管具有重要的临床意义<sup>[56]</sup>。刘树伟 et al<sup>[57]</sup>利用 38 例成人腹部连续矢状断层标本和 6 例成人活体腹部磁共振矢状图像, 发现 36.84% 的主胰管位于胰头后上部, 34.21% 的居后下部, 内径  $1.98 \pm 0.55$  mm。副胰管的出现率为 31.58%, 大致行于胰头的中央部, 内径  $1.25 \pm 0.41$  mm。吴承堂 et al<sup>[58]</sup>研究发现 ♀ 杂种狗主胰管长度  $14.56 \pm 1.78$  mm, 直径  $2.23 \pm 0.16$  mm, ♂ 则分别为  $14.19 \pm 2.01$  mm,  $2.31 \pm 0.18$  mm。进一步证明了胰管的种属间有较大的差异。副胰管常起于胰头下部, 向上走于胰管前方, 开口于十二指肠小乳头, 与胰管有交通支(90%)。主胰管和副胰管的开口经常变化。徐恩多 et al<sup>[59]</sup>把胰管分为 IV 型。I 型为普通型, 主胰管开口十二指肠大乳头, 副胰管开口小乳头, 有细的副胰管和主胰管交通, 占 35.7%; II 型相反副胰管粗大, 开口十二指肠大乳头, 主胰管细小开口小乳头, 约 18.6%; III 型无副胰管, 但有许多细小胰管和主胰管交通, 占 27.1%。IV 型副胰管细, 在胰头上部与主胰管交通, 开口小乳头, 约 10%; V 型副胰管细小在胰头下部与主胰管交通, 开口小乳头, 占 5.7%; VI 型主胰管在胰头部有一圆形盘绕, 副胰管交通其上方, 约 2.9%。还有学者分为 7 或 8 型, 但基本类型一样。在行 EPD 手术时胰肠吻合口漏发生率在 2.5-13%, 可以造成 17% 的死亡率。何三光 et al<sup>[33]</sup>认为胰管扩张明显大于 4 mm 采用胰管外翻缝合后行黏膜套入式吻合; 胰管扩张仅 3-4 mm 时, 胰腺质地中等则做胰断端空肠吻合; 胰管无扩张, 胰腺质地正常, 采用胰管结扎后捆绑套入或吻合。彭淑牖 et al<sup>[60-67]</sup>设系统的研究了胰腺癌的手术方法及术后并发症诊疗和预防, 并且设计了捆绑式胰肠吻合术, 将空肠近端黏膜切除 3 cm 制成浆肌鞘, 胰残端与黏膜缘吻合后用浆肌鞘覆盖, 再用粗丝线捆绑, 使液体无法在两层面之间流动, 操作简单, 缝合容易, 彻底消除了胰漏, 已经施行 130 多例, 无 1 例发生胰肠吻合口漏, 值得推广。Sung et al<sup>[68]</sup>研究新鲜尸检发现胰断端的无数小动脉分支与小胰管为胰瘘的来源, 据此设计一种套入式吻合。先在胰残端上下缘深缝一针, 再沿残端一圈作褥式扣锁缝合, 然后将胰管口黏膜作 3、6、9、12 点 4 针贯穿胰腺的全层缝合使其保持开放最后与空肠端作两层套入式吻合。此后即再无胰瘘发生。

**2.5 胰头部淋巴在 EPD 的临床意义** 关于胰的淋巴流向, 1978 年 Cubilla 通过对胰腺癌手术标本的分析, 将胰周淋巴结分为 5 组: 胰头胰体上组; 胰头胰体下组; 胰十二指肠前、幽门、肠系膜; 胰十二指肠后、胆总管; 脾、脾门、胰尾。金昱 et al<sup>[69]</sup>在 36 具新鲜胎儿尸体上, 用  $300 \text{ g/L}^{-1}$  普鲁士蓝氯仿溶液器官内注射观察了胰的淋



巴流向, 发现胰周局部淋巴结有 12 群, 胰头淋巴主要汇入胰十二指肠前上淋巴结和肠系膜上淋巴结. Donatini et al<sup>[70]</sup>发现右侧腹腔, 肠系膜间淋巴结是胰头淋巴结引流的重要途径. 目前关于胰腺癌淋巴结转移规律、胰腺癌淋巴结清扫与预后的关系、胰腺癌的淋巴结清扫的方法及其并发症等都有了深刻的认识<sup>[71]</sup>. 淋巴转移是胰腺癌早期最主要的转移途径, 胰头癌的淋巴结转移率达 65-72%, 多发生在胰头后、胰头前、肠系膜上静脉旁、肝动脉旁、肝十二指肠韧带淋巴结. 日本全国统计发现胰头后淋巴结转移率为 30-40%, 胰头前淋巴结转移率为 20-25%, 肝总动脉干淋巴结、肠系膜上动脉根部淋巴结及腹主动脉周围淋巴结转移率为 10-20%. 淋巴结转移率与肿瘤大小及胰周浸润程度无直接的关系, 约 30% 的小胰腺癌已发生淋巴结转移, 少数可发生第 2 站淋巴结转移. Ishikawa et al<sup>[72]</sup>报告 81 例胰头癌, 其中淋巴结阳性第 13 组为 49%, 第 17 组为 37%, 第 16 组为 47%, 第 12 组为 15%. 张怡杰 et al<sup>[73]</sup>探讨胰头癌根治术加区域淋巴结廓清对提高手术根治效果和生存率的作用, 对 21 例胰头癌患者在 Whipple 基础上, 扩大手术切除的范围, 有针对性地进行区域淋巴结廓清, 有 11 例(52%)患者存在淋巴结转移, 淋巴结癌转移率以肠系膜根部(14 组)和胰头后(13 组)最高, 其次为胰头前(17 组)、肝动脉旁(8 组)和肝十二指肠韧带(12 组). 他们认为附加区域淋巴结廓清的胰头癌根治术风险并无明显增加, 但根治效果良好, 存活时间延长.

2.6 胰头部神经 胰腺是由内脏神经支配, 包括传出神经交感神经和副交感神经、传入神经感觉神经. 胰头和切迹的神经比胰尾丰富, 受右腹腔神经丛、右肝神经丛和右肠系膜神经丛的支配. 迷走神经纤维沿胰腺的上缘和下缘至胰腺, 伴随动脉走行, 在实质内节前纤维终止于胰腺小叶间隔中的小神经节, 然后再发出节后纤维, 沿血管走行, 最后分布到腺泡细胞和导管的平滑肌细胞<sup>[74]</sup>. 交感神经穿膈肌脚进入腹腔丛和腹腔神经节, 伴随脾动脉和胃十二指肠动脉等分支入胰腺, 分布于血管壁, 胰腺管, 腺泡细胞以及胰岛<sup>[75]</sup>. 感觉神经由伴随交感神经的来自第 5-10 胸脊神经后根神经节和伴随副交感神经的来自迷走神经下节的二部分组成. 林源问 et al<sup>[76]</sup>解剖 30 具尸体后发现交感和副交感神经在进入胰腺前先在胰头后方交织成“胰头丛”, 然后发出 2-10 支进入胰头后方. 胰头丛的出现率为 76.6%, 多数由右腹腔神经节和肝丛发支构成, 由丛发出的分支大多数进入胰头的右上、中、下、和中上区. 在切断胰头丛治疗胰头癌引起难忍的胰源性腹痛时, 可以考虑十二指肠胰头后入路. 临床病理研究发现胰头癌容易发生浸润神经, 进展期胰头癌浸润神经和转移率为 53.5-100%. 神经转移神经丛是胰腺癌的重要转移途径, 癌细胞可直接破坏神经束膜, 或经进入神经束膜的脉管周围侵入神经束膜间隙, 并沿此间隙扩散; 或再经束膜薄弱处侵至神经束膜外, 形成新的转移灶. 神经丛转移与胰后方

组织浸润及动脉浸润程度平行, 且与肿瘤大小密切相关. 胰头癌的神转移多发生于胰头前、后、腹腔干、肝总动脉、脾动脉及肠系膜上动脉周围, 构成了腹膜后浸润的主要方式, 亦成为腹膜后肿瘤组织残留的主要原因<sup>[77]</sup>. 行 EPD 时可以进行胰头神经丛、肠系膜上动脉周围及腹腔神经丛完全廓清术<sup>[78]</sup>. 现在提倡如果肠系膜上动脉神经丛无明显癌浸润, 只清除右半侧, 以避免引起难以控制的严重腹泻.

### 3 参考文献

- 1 Tsiotos GG, Farnell MB, Sarr MG. Are the results of pancreatic resection for pancreatic cancer improving? *World J Surg* 1999; 23:913-919
- 2 田雨霖. 胰腺癌的外科治疗. 中国普外基础与临床杂志 2000;7:386
- 3 Yamamoto M, Ohashi O, Saitoh Y. Japan pancreatic cancer registry: current status. *Pancreas* 1998;16:238-242
- 4 黎国屏, 李清怀, 王树峰, 黎珉. 133 例胰腺癌回顾分析. 河北医科大学学报 2002;23:32
- 5 王成锋, 赵平, 李文波, 宋德余. 进展期胰腺癌 299 例. 世界华人消化杂志 2003;11:679-680
- 6 郑树森, 李启勇, 黄东胜, 梁延波, 王伟林, 张珉, 沈岩, 吴健, 徐晓, 严盛, 俞军, 朱伟芳. 胰腺癌的外科治疗及随访研究(附 216 例报道). 中华肝胆外科杂志 2003;9:134
- 7 孙家邦. 早期胰头癌的诊断和治疗. 中国普外基础与临床杂志 2000;7:388
- 8 Zhao XY, Yu SY, Da SP, Bai L, Guo XZ, Dai XJ, Wang YM. A clinical evaluation of serological diagnosis for pancreatic cancer. *World J Gastroenterol* 1998;4:147-149
- 9 陈熹, 秦兆寅, 纪宗正, 黎一鸣. 血清 CA242 的测定在胰腺癌中的临床价值. 新消化病学杂志 1996;4:501-502
- 10 杨波, 张弘, 朱善德, 杜晓炬, 李顺明, 于众, 冯新莉, 蒲菲菲, 康健. 胰腺癌患者血清及组织中  $\beta$ -葡萄糖醛酸酶的活性. 世界华人消化杂志 1999;7:1067
- 11 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
- 12 沈洪薰, 江颖, 邵苏吉, 芮理, 郑震林, 朱远源, 王志伟, 陈玉泉, 王惠民. 胰头癌组织中 PGGT 基因研究. 世界华人消化杂志 1999; 7:712-713
- 13 Liu XL, Dai CC, Miao Y, Du JH, Zhang ZS, Chen SZ. Detection of k-ras gene point mutation in fine needle aspiration and pancreatic juice by sequence special primer method and its clinical significance. *World J Gastroenterol* 2000;6:917-919
- 14 倪泉兴, 张群华, 张延龄. 胰腺癌的综合治疗. 中华肝胆外科杂志 2003;9:129
- 15 曾勇, 王文涛, 严律南, 李波, 卢实春, 陈晓理, 文天夫, 林琦远, 姚辉华. 提高胰腺癌的治疗效果的探讨(附 5 a 经验总结). 中华肝胆外科杂志 2003;9:131
- 16 张圣道, 雷若庆. 胰头癌外科手术治疗效果的评价. 中华普通外科杂志 2003;18:5
- 17 张圣道, 王建承. 胰腺癌的诊治现状与展望. 中国普外基础与临床杂志 2000;7:349
- 18 徐选福, 王兴鹏. 胰腺癌诊断学新认识. 世界华人消化杂志 2000; 8:1034-1036
- 19 王兴鹏. 中国胰腺疾病研究的现状与展望. 世界华人消化杂志 2000;8:843-846
- 20 张世能, 袁世珍. 胰腺癌基因治疗研究进展. 世界华人消化杂志 1999;7:269-270
- 21 李波. 胰腺癌综合治疗现状. 中国普外基础与临床杂志 2000;7:390
- 22 傅德良. 胰腺癌的可切除性判断. 国外医学外科学分册 2002;29:155
- 23 石景森, 王作仁, 王林, 马庆久, 任斌, 汪涛, 李发智, 刘绍诰. 胰头十二指肠切除术早期并发症的防治经验. 新消化病学杂志 1996; 4:492-494
- 24 钟守先. 选择合理的胰头癌切除术式. 中国普通外科杂志 2002; 11:129
- 25 骆明德, 吴增斌. 胰腺癌外科治疗的变迁. 中国实用外杂志 2002; 22:263

- 26 钟守先, 赵平. 胰十二指肠切除术治疗胰头癌的若干问题. 普外基础与临床杂志 1997;4:221
- 27 彭俊平, 胡勇, 赵平, 刘爱详, 刘宝善. 胰头癌根治性切除的手术方法探讨. 中华普通外科杂志 2003;18:188
- 28 蒋劲松, 邹寿椿, 姜蔚, 赵大建. 联合血管切除和重建的 Fortner I 型和 II 型胰腺癌区域性切除术. 中华普通外科杂志 2003;18:7
- 29 Schafer M, Mullhaupt B, Clavien PA. Evidence-based pancreatic head resection for pancreatic cancer and chronic pancreatitis. *Ann Surg* 2002;236:137-148
- 30 Bachellier P, Nakano H, Oussoultzoglou PD, Weber JC, Boudjema K, Wolf PD, Jaeck D. Is pancreaticoduodenectomy with mesentericoportal venous resection safe and worthwhile? *Am J Surg* 2001;182:120-129
- 31 彭承宏, 刘颖斌, 吴育连, 方河清, 江献川, 陆才德, 史留斌, 李松岗, 唐喆, 彭淑牖. 胰十二指肠联合门静脉切除治疗胰头癌. 中华普通外科杂志 2002;11:190
- 32 向宏市. 胰腺癌并门静脉及肝转移的外科治疗. 世界华人消化杂志 1998;6(特刊 7):507-508
- 33 何三光, 张延龄, 严律南. 胰头癌根治性手术的适应证、术式选择及远期疗效. 中国实用外科杂志 2001;8:456
- 34 Nakao A, Harada A, Nonami T, Kaneko T, Inoue S, Takagi H. Clinical significance of portal invasion by pancreatic head carcinoma. *Surgery* 1995;117:50-55
- 35 郑英键, 邹鸿琪, 尹美蓉. 胰头癌侵犯胰后大血管的处理. 中国普通外科杂志 2002;11:149
- 36 曾天定, 郑樟栋, 陈凯, 许龙堂, 毛根军, 罗建生, 吴荣进. 整块切除含肠系膜上静脉-门静脉的胰十二指肠治疗 II-III 期胰头癌的探讨. 中华外科杂志 1997;35:144
- 37 韩方海, 陈易人. 胰腺钩突部的局部解剖和外科手术. 国外医学外科学分册 2000;27:78
- 38 彭淑牖, 刘颖斌. 胰十二指肠切除术后并发症的处理. 肝胆胰外科杂志 2001;13:57
- 39 梅志军, 刘瑞, 邵成伟, 唐岩. 胰腺钩突角在 CT 诊断胰头占位性病变中的意义. 中华普通外科杂志 2002;17:302
- 40 孙丛, 周存升. 螺旋 CT 在胰腺肿瘤诊断中的临床应用. 中华放射学杂志 2001;35:87
- 41 周诚, 韦嘉瑚, 施发表, 陈海云. 胰腺癌 CT 诊断难点的探讨. 中华放射学杂志 1993;27:846
- 42 周存升, 孙丛, 柳澄, 王涛, 王道萍. 螺旋 CT 二期扫描技术及其在胰腺癌诊断中的价值. 中华放射学杂志 2001;35:90
- 43 裴永泉, 李森, 王建立, 宋钦华. 联合肠系膜上静脉切除的胰十二指肠切除术治疗胰腺钩突部癌. 中国实用外科杂志 2001;21:610
- 44 徐恩多, 陈郡, 韩子玉, 孙琦运, 刘永锋, 马文锋, 高克明, 凌光烈, 佟守忠, 刘国忠, 李伟, 佟玉章. 胰腺及其周围有关动脉的临床解剖学研究. 中华外科杂志 1985;23:705
- 45 胡仁昭. 胰腺的外科解剖. 腹部外科 1988;1:126
- 46 裘法祖, 王健本, 张祐曾. 腹部外科临床解剖学. 第 1 版. 山东: 山东科学技术出版社, 2001:225
- 47 Bertelli E, Di Gregorio F, Bertelli L, Civali L, Mosca S. The arterial blood supply of the pancreas: a review. II. The posterior superior pancreaticoduodenal artery. An anatomical and radiological study. *Surg Radiol Anat* 1996;18:1-9
- 48 Bertelli E, Di Gregorio F, Bertelli L, Civali L, Mosca S. The arterial blood supply of the pancreas: a review. III. The inferior pancreaticoduodenal artery. An anatomical review and a radiological study. *Surg Radiol Anat* 1996;18:67-74
- 49 Bertelli E, Di Gregorio F, Bertelli L, Orazioli D, Bastianini A. The arterial blood supply of the pancreas: a review. IV. The anterior inferior and posterior pancreaticoduodenal aa., and minor sources of blood supply for the head of the pancreas. An anatomical review and radiologic study. *Surg Radiol Anat* 1997;19:203-212
- 50 孟昭鲁, 李富德, 刘翔林. 胰腺动脉的外科解剖. 临床应用解剖学杂志 1983;1:108
- 51 Bertelli E, Di Gregorio F, Mosca S, Bastianini A. The arterial blood supply of the pancreas: a review. V. The dorsal pancreatic artery. An anatomic review and a radiologic study. *Surg Radiol Anat* 1998;20:445-452
- 52 李家开, 张金山. 肝-胰动脉的 DSA 研究及其在肝癌经导管动脉内化疗栓塞术中的意义. 介入放射学杂志 2002;11:19
- 53 李森, 宋钦华, 林开祥, 裴永泉, 李春友, 庄冠一, 王建立. 肠系膜上静脉胰后干和门静脉干测量的临床意义. 世界华人消化杂志 1998;6(特刊 7):170-172
- 54 宋彬, 闵鹏秋, 周翔平, 杨恒选, 徐隽, 缪竞陶, 廖正银, 陈宪. 胰头静脉弓的 CT 研究 - 正常表现及临床意义. 中华放射学杂志 1997;31:603
- 55 Crabo LG, Conley DM, Graney DO, Freeny PC. Venous anatomy of the pancreatic head normal CT appearance in cadaves and patients. *Am J Roentgenol* 1993;160:1039-1045
- 56 陈坚, 李兆申. 胰管支架的临床应用. 世界华人消化杂志 1998;6:172-173
- 57 刘树伟, 王凡, 刘汉明, 于台飞, 王永贵, 赵斌, 王政. 胰头的矢状断层解剖 - 断层标本与磁共振图像对照研究. 解剖学报 1997;28:114
- 58 吴承堂, 黎沾良. 杂种狗主胰管的解剖学及胰腺炎模型制作. 世界华人消化杂志 1999;7:62-63
- 59 徐恩多, 舒强, 杨凌洪. 胰管的临床解剖学研究. 实用外科杂志 1991;11:480
- 60 彭淑牖, 吴育连, 彭承宏, 江献川, 牟一平, 王家骅, 蔡秀军, 李君达, 陆松春, 徐明坤. 捆绑式胰肠吻合术(附 28 例报告). 中华外科杂志 1997;35:158
- 61 刘颖斌, 彭淑牖. 捆绑式胰肠吻合术防止胰漏的机制. 世界华人消化杂志 2003;11:596-597
- 62 史留斌, 方河清, 刘颖斌, 李海军, 王建伟, 许斌. 彭氏 II 型捆绑式胰肠吻合术. 世界华人消化杂志 2003;11:595-596
- 63 白明东, 刘颖斌, 李海军, 彭淑牖. 胰肠吻合方法的演进. 世界华人消化杂志 2003;11:591-593
- 64 王建伟, 许斌, 蔡秀军, 李海军, 刘颖斌, 彭淑牖. 胰十二指肠切除术后胰漏的发生机制. 世界华人消化杂志 2003;11:589-590
- 65 邓贵龙, 李海军, 刘颖斌, 牟一平, 彭淑牖. 胰十二指肠切除术的主要并发症及诊断与治疗. 世界华人消化杂志 2003;11:587-588
- 66 许斌, 刘颖斌, 王建伟, 曹利平, 彭淑牖. 胰十二指肠切除术的适应证. 世界华人消化杂志 2003;11:584-587
- 67 彭淑牖, 刘颖斌. 吻合方法对防止胰肠吻合口漏的重要性. 世界华人消化杂志 2003;11:583-584
- 68 Sung JP, Stewart RD, O' Hara VS, Westphal KF, Wilkinson JE, Hill JA. A study of forty-nine consecutive Whipple resection for periampullary adenocarcinoma. *Am J Surg* 1997;174:6-10
- 69 金昱, 赵集中, 杨镇洙. 胰的淋巴流向. 延边大学医学学报 1998;21:125
- 70 Donatini B, Hidden G. Routes of lymphatic drainage from the pancreas: a suggested segmentation. *Surg Radiol Anat* 1992;14:35
- 71 詹文华. 胰腺癌的淋巴结清扫术. 中国实用外科杂志 2002;22:314
- 72 Ishikawa O, Ohigashi H, Sasaki Y, Kabuto T, Furukawa H, Nakamori S, Imaoka S, Iwanaga T, Kasugai T. Practical grouping of positive lymph nodes in pancreatic head cancer treated by an extended pancreatectomy. *Surgery* 1997;121:244-249
- 73 张怡杰, 胡志浩, 刘瑞, 唐岩. 区域淋巴结廓清在胰头癌根治术中的应用. 第二军医大学学报 1999;20:886
- 74 李劲孙, 陈道达. 胰腺外分泌的迷走神经调节. 国外医学外科学分册 1999;26:88
- 75 胡建昆, 周总光, 杨开清. 胰腺的应用解剖. 世界华人消化杂志 2001;9:826-829
- 76 林元问, 张郢华, 顾乃群, 陈维国. “胰头丛”的应用解剖学研究. 临床应用解剖学杂志 1985;3:140
- 77 郭克建. 胰头癌的生物特性及术式选择. 中国普外基础与临床杂志 2001;8:410
- 78 谭毓铨, 陈光. 胰头癌行扩大胰十二指肠切除术的现状与思考. 中国普外基础与临床杂志 2001;8:406

# p53 基因在肿瘤基因治疗中的研究进展

张 艳, 何凤田

张艳, 何凤田, 中国人民解放军第三军医大学基础部生化与分子生物学教研室 重庆市 400038  
项目负责人: 张艳, 400038, 重庆市, 中国人民解放军第三军医大学基础部生化与分子生物学教研室. zhangyan@mail.tmmu.com.cn  
电话: 023-65427852 传真: 023-68753462  
收稿日期: 2003-03-14 接受日期: 2003-03-26

## 摘要

p53 基因是一种重要的抑癌基因. 在人类 50 % 的肿瘤中都发现 p53 基因有缺失或突变, 可见其与肿瘤的关系十分密切. 因此, 利用 p53 基因治疗肿瘤已成为肿瘤继手术、放疗、化疗以及生物治疗后的又一种有希望的治疗方法. 本文就 p53 基因的结构、功能与肿瘤的关系以及在肿瘤基因治疗中的应用予以简要综述.

张艳, 何凤田. p53 基因在肿瘤基因治疗中的研究进展. 世界华人消化杂志 2003;11(10):1593-1596

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1593.asp>

## 0 引言

p53 基因是一种重要的抑癌基因. 他在细胞周期调控, 抑制细胞生长, 诱导肿瘤细胞凋亡等方面有重要的作用. 其与肿瘤的关系十分密切, 因为人类恶性肿瘤中至少有 50 % 发生了 p53 基因的变化, 因此, p53 成为近年来研究的热点. 以下就 p53 基因的结构、功能与以及在肿瘤基因治疗中的研究进展作简要综述.

## 1 p53 的结构和功能

人类 p53 基因位于 17 号染色体的短臂上(17 p 13.1), 全长 16-20 kb, 有 10 个内含子和 11 个外显子, 其中第 1 个外显子不编码, 其上游 4 00 bp 处有启动子 P1, 下游 1 kb 处有启动子 P2, 二者为转录起始点. 正常的 p53 基因又称野生型 p53 基因(wild type p53, wt-p53), 其编码的蛋白质是由 393 个氨基酸(aa)组成的与细胞分裂周期相关的核磷酸蛋白质,  $M_r$  53 000, 称为 p53 蛋白. p53 可以分为 5 个部分: N-末端的转录活化区(1-42 aa), 能与一系列的蛋白结构(如 MDM2、TBP、TAFs)结合, 而调节 p53 的转录功能<sup>[1]</sup>; 信号区(64-92 aa), 富含脯氨酸, 有 5 个脯-X-X-脯重复顺序. 此区不是转录活化所必须的, 但对诱导细胞凋亡是必需的<sup>[2]</sup>; DNA 结合区(102-292 aa), 识别顺序专一的 DNA 序列; 四聚体化区(324-355 aa), 此区能抑制癌细胞的生长; C-末端的非专一 DNA 结合区(370-393 aa), 能与非特异性的 DNA 序列结合.

p53 基因参与细胞周期调节, 调控细胞凋亡. DNA 损伤或缺氧后, p53 基因以序列专一的方式与 DNA 结合后, 起转录因子的作用, 活化 CDK 抑制剂 p21<sup>WAF1/CIP1</sup> 基因的转录, 其产物则可抑制 CDK 活性, 使 CDK 不能磷酸化 Rb, 从而使细胞生长停止在 G<sub>1</sub>/S 期<sup>[3]</sup>. p53 还可诱导 gadd45 基因表达, 其产物可与细胞周期相关蛋白 Cdc2、PCNA 相互作用, 使细胞生长停止在 G<sub>2</sub>/M 期, 有利于 DNA 的修复<sup>[4]</sup>.

wt-p53 的抗肿瘤作用主要是阻滞 G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub> 期, 使细胞不能进入 S 期, 从而抑制细胞的增生. p53 基因在 DNA 遭到破坏时, wt-p53 可与细胞核内特异的 DNA 部位结合, 通过氨基酸的酸性激活区激活邻近基因的启动子而促进基因的表达, 对抑制细胞增生的基因起到转录激活因子的作用, wt-p53 抑制肿瘤发生的另一途径是直接对某些基因的启动子起负调控作用, 受负调控的基因多数是一些与细胞增生有关的基因, 其机制可能是 wt-p53 通过与这些基因的 TATA 结合蛋白(TBP)结合后, 使 TBP 不能与启动子的 TATA 盒结合, 从而抑制转录的起始.

p53 能下调其下游的与凋亡相关的 bax、igf-bp3 基因, 上调 bcl-2 基因, 从而调控细胞凋亡. 目前已发现了一些受 p53 调控的与凋亡相关的基因如 killer/dr 5、fas/apo 1、nox a、ei24/pig8、puma 等<sup>[5-7]</sup>. 原癌基因 c-myc 的表达也受 p53 的抑制<sup>[8]</sup>, 因此当 p53 突变, c-myc 过度表达时易发生肿瘤.

## 2 p53 基因突变与肿瘤的相关性

p53 基因突变是许多肿瘤发生的重要原因之一. 基因突变主要包括点突变和等位基因的缺失. 据报道, 在大约 200 多种不同的肿瘤中, 有 50 % 的肿瘤带有 p53 基因突变. 已发现 p53 基因中有 4 个位于外显子 5-8 的突变热点, 虽然不同组织器官发生的肿瘤中, p53 基因突变谱显示有差异, 但约有 90 % 的突变是集中在这部分区域<sup>[9]</sup>. 他们分别编码 132-143、174-179、236-248 和 272-281 号氨基酸<sup>[10]</sup>.

在多种人类肿瘤中, 如食管癌、肺癌、胃癌、肝癌、结肠及直肠癌、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、甲状腺癌、骨肉瘤、横纹肌肉瘤、神经母细胞瘤中 p53 基因的突变率在 50 % 左右. 在黑色素瘤(原发)中 p53 基因突变率高达 97 %. 肺癌中各型肺癌均存在 p53 基因突变, 约 52 % 的非小细胞性肺癌, 90 % 的小细胞性肺癌存在 p53 基因突变. 还有部分白血病、脑肿瘤、多发性骨

髓瘤、星形细胞瘤也存在 p53 基因的改变. 研究发现, 难治的肿瘤 p53 基因突变率较高, 而相对容易治疗的肿瘤较少发生 p53 基因突变<sup>[11]</sup>. 而且 p53 基因的突变与病情的发展, 肿瘤的转移以及对放疗、化疗的敏感性和预后都密切关系.

### 3 p53 基因与肿瘤的基因治疗

近年来, 随着分子生物学的不断发展, 对于疾病的病因、发生、发展的研究已深入到分子水平. 因此, 基因治疗正逐渐从理论成为现实, 它具有选择性强, 副作用小, 对晚期肿瘤及转移灶仍有效等优点, 从而成为肿瘤继手术、放疗、化疗以及生物治疗后的又一种有希望的治疗方法. 由于 p53 基因在调节细胞周期和生长, 诱导细胞凋亡的过程中发挥着重要作用, 而且在人类恶性肿瘤中 p53 基因突变率如此之高, 因此, 利用 p53 基因治疗肿瘤已成为研究的热点. 目前研究最多的是以正常的野生型 p53 基因(wt-p53)替换肿瘤细胞中突变的 p53 基因, 称为野生型 p53 基因的替代疗法. 此方法主要是通过转基因技术将野生型 p53 基因整合到恶性肿瘤的基因组中去, 以替换肿瘤细胞中突变的 p53 基因. 大量的实验已证实, 野生型 p53 基因可以通过诱导肿瘤细胞凋亡而抑制肿瘤细胞的生长<sup>[12]</sup>, 从而使 p53 在肿瘤的基因治疗中具有良好的应用前景. 因此, 如何将目的基因导入机体细胞或肿瘤细胞, 并获得安全有效的表达是这一研究的重点. 目前, 向细胞内导入外源基因的方法大体可分非病毒法和病毒法 2 种. 重组病毒具有天然侵袭细胞和整合于宿主细胞的能力, 是具有潜力的 DNA 转导方法. 以病毒为载体转导 p53 基因的报道较多, 目前研究和应用最多的是腺病毒载体, 逆转录病毒载体, 还有以腺相关病毒、单纯疱疹病毒为载体的. 而非病毒载体以脂质体为主. 主要是阳离子脂质体的应用现在正日趋为人们所重视.

**3.1 腺病毒载体** 腺病毒载体是目前介导 p53 基因转移的常用载体. 腺病毒是一种 DNA 双链无包膜病毒, 基因组 DNA 约长 36 kb, 可编码 14 种蛋白. 腺病毒载体的主要优点有: (1) 性质稳定, 能高效表达, 对人类相对安全; (2) 感染的宿主细胞范围广, 可感染分裂期及静止期细胞; (3) 腺病毒感染细胞时无需整合到宿主细胞基因组中, 不存在激活致癌基因或插入突变等危险; (4) 操作简单, 重组病毒可通过静脉注射、喷雾、气管内滴注或制备成胶囊口服经肠道吸收等方法进入体内, 容易复制, 可获得高效价病毒载体. p53-rAd 中 p53 有时会发生自发性突变, 常发生在转录活化区和调控区, 而 DNA 结合区却几乎不发生, 而这一区却是发生肿瘤的主要突变位点<sup>[13]</sup>. 腺病毒介导的 p53 基因治疗肿瘤已广泛开展, 包括食管癌、肺癌、膀胱癌、乳腺癌、结直肠癌、卵巢癌、前列腺癌等. 大量的研究表明, 腺病毒介导的 p53 基因感染肿瘤细胞后, 能有效地控制肿瘤细胞生长或引起凋亡. 目前, 运用腺病毒介导的

p53 基因治疗食管癌、非小细胞肺癌、肝癌已进入 II 期临床试验<sup>[14-16]</sup>. 研究者还发现, 运用腺病毒载体协同转运 GM-CSF 和 p53 感染喉癌细胞, 较单独转运 p53 治疗肿瘤效果更好<sup>[17]</sup>. 虽然腺病毒载体具有良好的应用前景, 但其中也存在着一些问题, 如: 毒副作用, 有些腺病毒会引起急性感染, 宿主体内存在病毒基因会引起特异性免疫反应, 由于目前使用的腺病毒载体是复制缺陷型病毒, 不能在体内自主复制, 在治疗中需要连续重复给药, p53 基因进入周围肿瘤细胞的效率低也影响了 p53 基因作用于肿瘤细胞的效果. 因此, 人们正在寻找新的方法和载体, 使目的基因能够高效率、特异性地作用于肿瘤细胞, 并能够在肿瘤细胞中连续自我复制. 目前, 一种能够在体内复制的腺病毒载体 ATVs 得到应用, p53-ATV 中 p53 不会干扰 ATV 的复制, 甚至可增加 ATV 的溶胞作用, 是一个有效的基因治疗的载体系统<sup>[18]</sup>. Roy I et al<sup>[19, 20]</sup> 将 p53 融合 VP22 (一种重要的细胞间运输蛋白), 这样有效的提高了 p53 由腺病毒转移入肿瘤细胞内的效率. 还有人将腺病毒改造成选择性感染肿瘤细胞, 而不感染正常细胞, 有一种改良的腺病毒 ONYX-015 已运用于超过 300 例肿瘤患者, 取得了良好的效果<sup>[21]</sup>.

**3.2 逆转录病毒载体** 以逆转录病毒为基因转染载体的研究开展得最早. Roth et al<sup>[22]</sup> 采用逆转录病毒载体, 进行非小细胞肺癌的基因治疗, 发现可以抑制肿瘤生长. 它具有高效转移、基因能整合入靶细胞从而能实现长期稳定的表达等特点. 但逆转录病毒只能感染分裂复制的细胞, 因对高分化而不分裂的细胞就不能实施基因转移, 逆转录病毒相对于腺病毒而言滴度较低. 最令人担忧的是逆转录病毒载体在辅助细胞中有同源重组为野生型病毒的可能, 而引起恶性转化. 另外, 逆转录病毒介导的基因转移操作复杂, 技术要求. 因此, 其介导的基因治疗受到了一定的限制.

**3.3 脂质体包埋法** 近年来, 以脂质体包埋法进行基因治疗的研究越来越多. 因为该方法安全, 价格相对便宜, 操作非常简便, 可直接注入进行基因转移, 故成为一种极具希望的临床应用技术. 脂质体是一种人工合成的单层或多层磷脂双分子层组成的封闭环状囊状结构. 其主要功能成分是阳离子脂质, 可直接与 DNA 作用而将其包于中心水相空间形成复合物运载 DNA. 外层中性磷脂包于 DNA 脂质复合物外形成微团. 阳离子脂质的结构决定转染效率, 外层中性磷脂起辅助作用. 该 DNA 脂质复合物与组织培养细胞接触并融合时, 可以有效地发生 DNA 摄取和表达. 这类方法不同病毒载体可以获得高浓度的重组体, 转染效率也没有病毒载体高, 但他最突出的优点在于宿主不会出现外源性病毒基因所致的特异性免疫反应, 这在病毒载体是无法避免的. 当然, 不会出现特异性免疫反应, 并不是说不会发生毒副作用. 有人进行动物实验认为, 肿瘤局部注入一定剂量的 DNA 脂质复合物会出现局部的炎性反应, 静脉注射

DNA脂质复合物会出现肝功能的一过性改变. 类似的反应在其他载体进行治疗时也同样会出现. 但其仍在需较长期进行注射的多发或转移肿瘤灶治疗中显示了巨大优势. 脂质体包埋法的基因治疗的注入方式也是多样的, 经静脉注入、经导管或肿瘤局部注入均可. 有研究者对转移性乳腺癌动物模型以p53脂质复合物注入进行治疗, 发现肿瘤缩小、肿瘤转移受到限制, 目前的研究主要是怎样提高脂质体复合物进入肿瘤细胞的效率. 如吸入气雾剂治疗肺癌, 气雾剂中有聚乙烯亚胺(PEI)-p53, 一种新型的非病毒载体<sup>[23-25]</sup>. 另一种给合转铁蛋白(Tf)的阳离子脂质体能提高p53的转染效率<sup>[26]</sup>. 应用结合胆固醇的阳离子脂质转运p53治疗肺癌, 提高p53的转染效率, 明显抑制了肺癌细胞生长, 且毒性小. Xu et al<sup>[27]</sup>将anti-TfR scFv结合到脂质体的3'-半胱氨酸上, scFv-DNA-脂质体复合物用于治疗乳腺癌, scFv分子小, 能提高DNA-脂质体复合物进入肿瘤细胞的效率, 并有效表达. 虽然此方法仍处于初期阶段, 临床疗效的判定还有待于进一步的验证, 但目前的成果已令人满意. 研究者正在对这一方法的安全性、应用剂量、生物学效能进行更进一步的评价和探讨.

#### 4 p53 基因的应用前景

随着介入放射学向纵深发展, 经介入放射学方法进行基因治疗令人关注. 从介入放射学角度, 可以经皮穿刺直接将治疗基因注入瘤体, 也可经肿瘤供血动脉行导管引入, 还可同时进行肿瘤血管的栓塞或灌注化疗, 或制备带治疗基因的栓子, 以加强治疗效果. 经介入放射学方法进行基因治疗, 可清除手术后残留的恶性癌细胞, 防止复发<sup>[28]</sup>. 目前, 经动脉导管引入复制缺陷型腺病毒(rAd-p53, SCH58500)和选择复制型腺病毒(dl1520, aka Onyx-015; CG7870)治疗肿瘤已进入II期临床试验<sup>[29]</sup>. 利用Ad-p53(INGN 201)结合放疗治疗非小细胞肺癌已进入II期临床, 是一种安全有效的方法<sup>[30]</sup>. 经脑动脉注入Ad-p53, 能有效抑制脑肿瘤大小<sup>[31]</sup>. Asaumi et al<sup>[32]</sup>用热放疗结合p53基因的方法, 将p53基因转染人唾液腺癌细胞, 转染率达到62.3%, 提示这一方法能有效的治疗人唾液腺癌. 这些都肯定了介入技术在基因治疗中的应用前景, 为介入放射学的发展开辟了新领域.

总之, p53基因作为一个重要的肿瘤抑制基因, 在肿瘤细胞的发生、发展中都具有重要作用. 在其他疾病方面也有作用, 如研究者还发现, 运用腺病毒载体将p53转移至关节腔内, 能诱导滑膜液炎症细胞调亡, 从而治疗类风湿关节炎<sup>[33]</sup>. 因此, p53基因具有良好的应用前景, 但目前所进行的工作还处于探索阶段, 进一步研究应集中在以下几个方面: (1) 寻找更有效的载体, 提高转染效率, 降低其毒副作用; (2) 更深入地研究其作用机制; (3) 进一步了解其与多种肿瘤的相关性; (4) 研究其与化疗、放疗及免疫治疗的相互关系以及与其他基

因治疗的协同关系. 随着各种基因治疗工作的深入开展, p53基因治疗将会成为肿瘤治疗的又一种有希望的治疗方法.

#### 5 参考文献

- Chao C, Saito S, Anderson CW, Appella E, Xu Y. Phosphorylation of murine p53 at ser-18 regulates the p53 responses to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci* 2000;97:11936-11941
- Venot C, Maratrat M, Dureuil C, Conseiller E, Bracco L, Debussche L. The requirement for the p53 proline-rich functional domain for mediation of apoptosis is correlated with specific PIG3 gene transactivation and with transcriptional repression. *EMBO J* 1998;17:4668-4679
- Prives C, Hall PA. The p53 pathway. *J Pathol* 1999;187:111-126
- Zhan Q, Antinore MJ, Wang XW, Carrier F, Smith ML, Harris CC, Fornace AJ Jr. Association with Cdc2 and inhibition of Cdc2/Cyclin B1 kinase activity by the p53-regulated protein Gadd45. *Oncogene* 1999;18:2892-2900
- Oda E, Ohki R, Murasawa H, Nemoto J, Shibue T, Yamashita T, Tokino T, Taniguchi T, Tanaka N. Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* 2000;288:1053-1058
- Nakano K, Vousden KH. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Molecular Cell* 2001;7:683-694
- Gu Z, Flemington C, Chittenden T, Zambetti GP. ei24, a p53 response gene involved in growth suppression and apoptosis. *Molecular Cellular Biol* 2000;20:233-241
- Baudino TA, Cleveland JL. The Max network gone mad. *Molecular Cellular Biol* 2001;21:691-702
- Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 1997;88:323-331
- 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
- Nielsen LL, Maneval DC. p53 tumor suppressor gene therapy for cancer. *Cancer Gene Ther* 1998;5:52-63
- Zou Y, Zong G, Ling YH, Hao MM, Lozano G, Hong WK, Perez-Soler R. Effective treatment of early endobronchial cancer with regional administration of liposome-p53 complexes. *J Natl Cancer Inst* 1998;90:1130-1137
- Ugai H, Suzuki E, Inabe K, Murata T, Hamada H, Yokoyama KK. Spontaneous mutations in the human gene for p53 in recombinant adenovirus during multiple passages in human embryonic kidney 293 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;300:448-456
- Shimada H, Matsubara H, Ochiai T. p53 gene therapy for esophageal cancer. *J Gastroenterol* 2002;14:87-91
- Swisher SG, Roth JA. Clinical update of Ad-p53 gene therapy for lung cancer. *Surg Oncol Clin N Am* 2002;11:521-535
- Warren RS, Kirn DH. Liver-directed viral therapy for cancer p53-targeted adenoviruses and beyond. *Surg Oncol Clin N Am* 2002;11:571-588
- Qiu Z, Lao M, Wu C. Co-transfer of human wild-type p53 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor genes via recombinant adenovirus induces apoptosis and enhances immunogenicity in laryngeal cancer cells. *Cancer Letters* 2001;167:25-32
- Haviv YS, Takayama K, Glasgow JN, Blackwell JL, Wang M, Lei X, Curiel DT. A model system for the design of armed replicating adenoviruses using p53 as a candidate transgene. *Mol Cancer Ther* 2002;1:321-328
- Roy I, Holle L, Song W, Holle E, Wagner T, Yu X. Efficient translocation and apoptosis induction by adenovirus encoded VP22-p53 fusion protein in human tumor cells in vitro. *Anti-cancer Res* 2002;22:3185-3189



- 20 Zender L, Kuhnel F, Kock R, Manns M, Kubicka S. VP22-mediated intercellular transport of p53 in hepatoma cells in vitro and in vivo. *Cancer Gene Ther* 2002;9:489-496
- 21 Post LE. Selectively replicating adenoviruses for cancer therapy: an update on clinical development. *Curr Opin Investig Drugs* 2002;3:1768-1772
- 22 Roth JA, Nguyen D, Lawrence DD, Kemp BL, Carrasco CH, Ferson DZ, Hong WK, Komaki R, Lee JJ, Nesbitt JC, Pisters KM, Putnam JB, Schea R, Shin DM, Walsh GL, Dolormente MM, Han CI, Martin FD, Yen N, Xu K, Stephens LC, McDonnell TJ, Mukhopadhyay T, Cai D. Retrovirus-mediated wild-type p53 gene transfer to tumors of patients with lung cancer. *Nat Med* 1996;2:985-991
- 23 Gautam A, Waldrep JC, Kleinerman ES, Xu B, Fung YK, T' Ang A, Densmore CL. Aerosol gene therapy for metastatic lung cancer using PEI-p53 complexes. *Methods Mol Med* 2003;75:607-618
- 24 Dolivet G, Merlin JL, Barberi-Heyob M. In vivo growth inhibitory effect of iterative wild-type p53 gene transfer in human head and neck carcinoma xenografts using glucosylated polyethylenimine nonviral vector. *Cancer Gene Ther* 2002;9:708-714
- 25 Gautam A, Densmore CL, Melton S, Golunski E, Waldrep JC. Aerosol delivery of PEI-p53 complexes inhibits B16-F10 lung metastases through regulation of angiogenesis. *Cancer Gene Ther* 2002;9:28-36
- 26 Seki M, Iwakawa J, Cheng H, Cheng PW. p53 and PTEN/MMAC1/TEP1 gene therapy of human prostate PC-3 carcinoma xenograft, using transferrin-facilitated lipofection gene delivery strategy. *Hum Gene Ther* 2002;13:761-773
- 27 Xu L, Huang CC, Huang W, Tang WH, Rait A, Yin YZ, Cruz I, Xiang LM, Pirollo KF, Chang EH. Systemic tumor-targeted gene delivery by anti-transferrin receptor scFv-immunoliposomes. *Mol Cancer Ther* 2002;1:337-346
- 28 Oakley R, Phillips E, Hooper R, Wilson D, Partridge M. A preclinical model of minimal residual cancer in the muscle highlights challenges associated with adenovirus-mediated p53 gene transfer. *Clin Cancer Res* 2002;8:1984-1994
- 29 Reid T, Warren R, Kirn D. Intravascular adenoviral agents in cancer patients: Lessons from clinical trials. *Cancer Gene Ther* 2002;9:979-986
- 30 Swisher SG, Roth JA, Komaki R, Gu J, Lee JJ, Hicks M, Ro JY, Hong WK, Merritt JA, Ahrar K, Atkinson NE, Correa AM, Dolormente M, Dreiling L, El-Naggar AK, Fossella F, Francisco R, Glisson B, Grammer S, Herbst R, Huaranga A, Kemp B, Khuri FR, Kurie JM, Liao Z, McDonnell TJ, Morice R, Morrello F, Munden R, Papadimitrakopoulou V, Pisters KM, Putnam JB Jr, Sarabia AJ, Shelton T, Stevens C, Shin DM, Smythe WR, Vaporciyan AA, Walsh GL, Yin M. Induction of p53-regulated genes and tumor regression in lung cancer patients after intratumoral delivery of adenoviral p53(INGN 201) and radiation therapy. *Clin Cancer Res* 2003;9:93-101
- 31 Abe T, Wakimoto H, Bookstein R. Intra-arterial delivery of p53-containing adenoviral vector into experimental brain tumors. *Cancer Gene Ther* 2002;9:228-235
- 32 Asaumi J, Higuchi Y, Murakami J, Matsuzaki H, Wakasa T, Inoue T, Shigehara H, Konouchi H, Hisatomi M, Kawasaki S, Kuroda M, Hiraki Y, Kishi K. Thermoradiotherapy combined with p53 gene therapy of human salivary gland adenocarcinoma cell line. *Oncol Rep* 2003;10:71-74
- 33 Yao Q, Wang S, Glorioso JC, Evans CH, Robbins PD, Ghivizzani SC, Oligino TJ. Gene transfer of p53 to arthritic joints stimulates synovial apoptosis and inhibits inflammation. *Molecular Therapy* 2001;3:901-910

# 血管抑素的研究进展

陈建发, 黄宗海

陈建发, 黄宗海, 中国人民解放军第一军医大学附属珠江医院普外科  
广东省广州市 510282  
项目负责人: 陈建发, 510515, 广东省广州市白云区同和路. 中国人民解放军第一军医大学研究生队, 中国人民解放军第一军医大学附属珠江医院普外科. cjf.fimmu@eyou.com  
电话: 020-61364522 传真: 020-61643213  
收稿日期: 2002-10-07 接受日期: 2002-10-18

## 摘要

作为第一种被发现并纯化的肿瘤血管抑制剂, 血管抑素是目前抗肿瘤血管生成研究的热点之一. 血管抑素是血浆纤维蛋白溶解酶原和/或纤维蛋白溶解酶的降解产物, 具有抑制内皮细胞增生、促进内皮细胞凋亡、抑制内皮细胞定向迁移和抑制毛细血管芽生等抗肿瘤血管生长活性. 作用机制包括: (1)增强黏附激酶活性, 诱导内皮细胞凋亡; (2)拮抗碱性成纤维细胞生长因子和血管内皮细胞生长因子的作用; (3)诱导蛋白激酶ERK-1和ERK-2脱磷酸化, 降低两种酶活性; (4)和组织纤溶酶原激活物非竞争性结合, 抑制血管内皮细胞迁移和毛细血管芽生; (5)通过和内皮细胞表面ATP合成酶的 $\alpha/\beta$ 亚基结合, 使内皮细胞在缺氧环境中合成ATP的能力丧失, 抑制内皮细胞增生. 通过重组法、转基因法和体内降解法, 许多I期、II期临床试验证实血管抑素具有良好的抗肿瘤血管活性.

陈建发, 黄宗海. 血管抑素的研究进展. 世界华人消化杂志 2003;11(10): 1597-1600

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1597.asp>

## 0 引言

自从1971年Folkman et al<sup>[1]</sup>首次提出肿瘤的生长和转移具有血管依赖性以后, 肿瘤血管生长的调节机制和抗肿瘤血管生长在肿瘤治疗中的意义得到了广泛关注和深入研究. 由于难以获得纯化的血管抑制剂, 早期研究进展缓慢. 1994年O'Reilly et al<sup>[2]</sup>从接种Lewis肺癌细胞株的小鼠尿中发现并提纯的第1种肿瘤血管抑制剂-血管抑素(angiotatin), 使抗肿瘤血管生长的研究突飞猛进, 且有望成为第1种应用于临床的肿瘤血管抑制剂.

## 1 血管抑素的分子结构<sup>[3-8]</sup>

血管抑素是血浆纤维蛋白溶解酶原和/或纤维蛋白溶解酶的降解产物. 血浆纤溶酶原是一种由791个氨基酸和一些糖链组成的糖蛋白, 具有K1、K2、K3、K4和K5等5个环以及1个蛋白酶区. 每个环都是由80个左右的氨基酸组成、由3个二硫键维系的一种盘状双链结

构. 在纤溶酶原蛋白链的不同位置上有不同纤溶酶原激活物的作用位点, 因此不同纤溶酶原激活物作用于纤溶酶原或纤溶酶将会产生不同分子构成的血管抑素. 如在79-80、338-339、354-355及440-441位氨基酸处有弹性蛋白酶的作用位点, 分别位于K1前、K3与K4之间、K4与K5之间, 经弹性蛋白酶作用后便可产生K1-3、K4或K1-4 3种血管抑素. 而尿激酶或组织纤溶酶原激活物的作用位点则在561-562位氨基酸处(位于K5环内), 因此经他们作用后便产生K1-4.5血管抑素. 目前已发现的血管抑素有5种(根据所具有的环的种类命名), 即K1-3, K4, K1-4, K1-4.5和K5. O'Reilly首次提纯的血管抑素后来被证实为K1-4血管抑素, 是1种糖蛋白,  $M_r$  38 000. 至此已明确的是血管抑素并不是种蛋白质, 而是1类由血浆纤溶酶原或纤溶酶降解产生的、具有不同分子结构和不同强度抗血管活性的糖蛋白. 但此类物质发挥作用所必需的最基本活性结构尚有待于进一步确定.

在最近的一项研究中, 应用X线衍射分析法观察血管抑素K1-3的晶体结构, 发现其3个环共同形成一个腔隙样空间结构, 很可能就是该物质的活性中心<sup>[9, 10]</sup>.

## 2 血管抑素的抗肿瘤血管生长活性及其作用机制

2.1 肿瘤血管的生长过程和调控机制 肿瘤的生长可分为无血管期和血管期. 在无血管期, 肿瘤细胞主要依靠周围组织的弥散来获取氧和营养物质, 其生长受到明显限制, 肿瘤一般不超过1-2立方毫米. 只有到血管期, 肿瘤病灶内出现新生血管, 肿瘤细胞可经新生血管获得充足营养物质从而迅速生长并且获得进入血液循环引起转移的可能<sup>[11-13]</sup>. 肿瘤血管生长过程是一个复杂的、涉及到许多血管生长刺激信号接收和转导的生化反应过程. 这包括基底膜的溶解、内皮细胞的增生、内皮细胞的定向迁移、周围基质的浸润、毛细血管的芽生、新生毛细血管融合成较大血管、血管的修剪以及血管周围细胞的被覆等一系列过程. 阻断其中的任何一步都可能影响肿瘤血管生长, 从而阻断肿瘤细胞营养物质的获取<sup>[12-15]</sup>. 目前对肿瘤血管生长过程的具体分子生物学机制仍不清楚.

肿瘤血管生长的调控机制, 目前多数学者<sup>[11-28]</sup>接受Hanahan et al<sup>[29]</sup>提出的血管调控平衡学说(angiogenic switch). 认为肿瘤细胞、内皮细胞和巨噬细胞受缺氧、系统刺激、基底膜通道的信息传递等使局部微环境发生变化的因素作用后出现一系列基因表型变化, 打破

原先的促血管生长因子(血管内皮生长因子、碱性成纤维细胞生长因子和血小板源性内皮细胞生长因子等)和血管生长抑制因子(血管抑素、内皮稳定素和 $\beta$ 转化生长因子等)之间的平衡状态.当促血管生长因子的作用强于血管生长抑制因子时,便引起肿瘤血管生长.

**2.2 血管抑素的抗肿瘤血管生长活性及其作用机制** 血管抑素具有专一靶细胞,即血管内皮细胞.正常成人的血管内皮细胞(除了经期妇女子宫和创伤愈合)只有0.01%进行细胞分裂,而肿瘤病灶中进行细胞分裂的血管内皮细胞可达到正常的100-1 000倍<sup>[3, 11-13]</sup>.因此,血管抑素通过作用于肿瘤血管内皮细胞发挥其强大的抗肿瘤血管生长活性的同时对正常组织血管内皮细胞则损伤很小,是一种高效低毒肿瘤血管抑制剂.血管抑素对肿瘤血管内皮细胞具有以下4种作用<sup>[3, 30-38]</sup>: (1)抑制内皮细胞增生; (2)促进内皮细胞凋亡; (3)抑制内皮细胞定向迁移; (4)抑制毛细血管芽生.但其确切作用机制目前还不清楚.综合多项研究结果<sup>[39-46]</sup>,血管抑素抗肿瘤血管生长的作用机制可能与以下几个方面有关: (1)增强黏附激酶(focal adhesion kinase)的活性,诱导内皮细胞凋亡; (2)拮抗碱性成纤维细胞生长因子和血管内皮细胞生长因子的作用,抑制血管内皮细胞的迁移和毛细血管芽生; (3)诱导促进细胞有丝分裂的蛋白激酶ERK-1和ERK-2脱磷酸化,使两种酶的活性明显降低,从而抑制内皮细胞的增生; (4)机体内组织纤溶酶原激活物(tPA)通过与纤溶酶原、细胞外基质结合形成三联体以发挥其降解纤溶酶原的作用.血管抑素可以和tPA非竞争性结合,减少三联体生成,降低tPA的作用,减少纤溶酶生成,从而抑制血管内皮细胞的迁移和毛细血管芽生.此外,尚有人提出血管抑素是通过和内皮细胞表面的ATP合成酶的 $\alpha/\beta$ 亚基结合,使内皮细胞在缺氧环境中合成ATP的能力丧失,抑制内皮细胞的增生,从而发挥其抗肿瘤血管活性<sup>[47]</sup>.不同研究得出了许多不同结论,这可能说明血管抑素作用的多样性,也可能与不同研究者所应用的血管抑素的分子结构不同有关.应用重组技术, Cao et al<sup>[48]</sup>分别合成纤溶酶原的5个环(K1、K2、K3、K4和K5),并发现5个环的抗肿瘤血管活性有所不同. K1、K2、K3和K5具有抑制血管内皮细胞增生活性,而K4则没有这种活性,但K4可以抑制血管内皮细胞的定向迁移.在肿瘤患者体内,到底有几种血管抑素以及哪种血管抑素起主要作用尚有待进一步明确.根据目前的研究结果推测,肿瘤患者体内血管抑素的抗肿瘤血管活性并不是某种物质的单纯作用,而是多种纤溶酶原降解产物,即K1-3、K1-4、K1-4.5、K4和K5共同作用的结果.

### 3 临床试验及应用

近年来,已有许多种血管抑素制剂进入I期、II期临床试验,并取得了良好效果<sup>[11]</sup>.由于血管抑素合成方法不同,其产物的分子结构亦将随之有所改变.不同分子

结构的血管抑素的抗肿瘤血管活性有所不同,所以血管抑素的合成方法必将影响临床试验效果.

目前,临床试验中血管抑素的合成方法主要有3种:重组法、转基因法和体内降解法.

**3.1 重组法** 该方法是获得血管抑素最为直接的方法.目前各种血管抑素的分子结构已经比较清楚,将某种血管抑素的编码基因转入毕赤酵母菌属表达系统(pichia pastoris expression system)或哺乳类表达系统(mammalian expression system)进行表达提纯,便可获得该种血管抑素的纯化制剂<sup>[49-52]</sup>. Sim et al<sup>[50]</sup>最先开展这方面工作,他们将血管抑素K1-3编码基转入毕赤酵母菌属表达系统表达,获得了纯化的血管抑素K1-3制剂.给B16-BL6肺癌裸鼠模型注射该种血管抑素30 nmol/(kg/day),其抑瘤率可达80%.最近中科院上海生物所应用RT-PCR从人HepG2肝癌细胞株获得人血管抑素cDNA并将其转入pPIC9K,经毕赤酵母属表达系统表达提纯获得了高纯度的人血管抑素制剂.经体外实验发现该制剂可特异性抑制牛主动脉内皮细胞的增生反应<sup>[51]</sup>.在另一项研究中, Meneses et al<sup>[52]</sup>将上述编码基因转入哺乳类表达系统,将获得的血管抑素制剂应用于裸鼠颅内肿瘤模型,发现其抑瘤率达85%,肿瘤新生血管减少了32%.目前,正由费城的托马斯·杰斐逊大学牵头进行重组血管抑素K1-3的I期临床试验,主要评价不同剂量对肿瘤患者的毒性以及血管抑素K1-3和放疗联合应用的临床效果.该方法的缺点主要有: (1)肿瘤患者体内血管抑素的抗肿瘤血管活性并不是某种物质的单纯作用,而是多种纤溶酶原降解产物,即各种血管抑素共同作用的结果.而重组法主要是针对某种特定的血管抑素,因此其临床效果可能会有所降低; (2)血管抑素有一定的半衰期,需要重复给药,且用药时间长,这必将给临床用药带来许多不便.

**3.2 转基因法** 应用基因工程方法以脂质体、逆转录病毒和腺病毒等为载体构建带有血管抑素基因的重组体,经不同方法转染肿瘤细胞后使其在肿瘤患者体内表达产生血管抑素从而抑制肿瘤血管生成<sup>[53-63]</sup>. Griscelli et al<sup>[64]</sup>构建了带有血管抑素K1-3编码基因的腺病毒重组体,经体外实验发现该重组体转染后可选择性抑制内皮细胞增生,破坏G2/M转换,使细胞有丝分裂中止.体内实验发现该重组体转染后可明显抑制人乳腺癌裸鼠模型的肿瘤和肿瘤血管的生长.在此后的多项研究也报道了相似结果<sup>[65-70]</sup>,而且发现血管抑素重组体和其他肿瘤血管抑制剂(如内皮稳定素、血小板因子4等)重组体有协同效应<sup>[71, 72]</sup>.另外,尚可构建同时含有血管抑素基因和IL-12基因<sup>[73, 74]</sup>、T细胞共刺激因子B7.1基因<sup>[75]</sup>的重组体,其抗肿瘤效果明显增强.该方法的缺点有: (1)与重组法相同,转基因法也是针对某种特定的血管抑素; (2)重组体的转染率较低; (3)目的基因的表达水平不高; (4)费用较为昂贵.

**3.3 体内降解法** 肿瘤患者体内的纤维蛋白溶解酶原在

纤溶酶原激活物和自由巯基存在的情况下可转化为具有抗肿瘤血管活性的血管抑素. 给肿瘤患者注射纤溶酶原激活物(如尿激酶或组织纤溶酶原激活物 tPA)和自由巯基(如 N-乙酰胱氨酸), 使患者体内纤溶酶原转化为血管抑素达到抗肿瘤的目的. 这种方法与血管抑素生成的自然途径最为相似, 是一种值得探索的途径. Soff et al<sup>[3]</sup> 在美国癌症研究协会 2000 年年会上首先报道应用该方法治疗了 7 例晚期肿瘤患者, 他们在用药后的患者血液中检测到体内合成法诱生的血管抑素 K1-4.5.7 例患者中有 1 例肿瘤完全消失, 其他患者的肿瘤大小都有不同程度缩小. 目前美国西北大学医学院正在进行该方法的 I 期临床试验. 该方法的缺点有: (1)血管抑素水平难以控制; (2)长期效果不能保证; (3)仍需反复给药. 如果能结合转基因法和体内合成法, 将带有编码纤溶酶原激活物基因片段的重组体转染机体内某种分裂增生旺盛的细胞(如肿瘤细胞、肿瘤血管内皮细胞或造血细胞等)进行表达从而获得抗肿瘤效果, 或许能达到事半功倍的效果.

虽然还有许多问题, 如血管抑素的活性中心、抗血管活性的确切作用机制和信号传导途径、各种血管抑素是否有象凝血系统一样有共同的反应途径等仍有待于进一步明确, 但是血管抑素强大的抗肿瘤活性是不容置疑的. 相信作为第 1 个被发现的肿瘤血管抑制剂 - 血管抑素必为广大肿瘤患者带来福音.

#### 4 参考文献

- Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971;285:1182-1186
- O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Moses M, Lane WS, Cao Y, Sage EH, Folkman J. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell* 1994;79:315-328
- Soff GA. Angiostatin and angiostatin-related proteins. *Cancer Metastasis Rev* 2000;19:97-107
- Ramsden JD, Yarram S, Mathews E, Watkinson JC, Eggo MC. Thyroid follicular cells secrete plasminogen activators and can form angiostatin from plasminogen. *J Endocrinol* 2002;173:475-481
- Hatton MW, Southward SM, Ross BL, Legault K, Marien L, Korb D, Richardson M, Singh G, Clarke BJ, Blajchman MA. Angiostatin II is the predominant glycoform in pleural effusates of rabbit VX-2 lung tumors. *J Lab Clin Med* 2002;139:316-323
- Lay AJ, Jiang XM, Daly E, Sun L, Hogg PJ. Plasmin reduction by phosphoglycerate kinase is a thiol-independent process. *J Biol Chem* 2002;277:9062-9068
- Sim BK, MacDonald NJ, Gubish ER. Angiostatin and endostatin: endogenous inhibitors of tumor growth. *Cancer Metastasis Rev* 2000;19:181-190
- Mulligan-Kehoe MJ, Wagner R, Wieland C, Powell R. A truncated plasminogen activator inhibitor-1 protein induces and inhibits angiostatin (kringles 1-3), a plasminogen cleavage product. *J Biol Chem* 2001;276:8588-8596
- Abad MC, Binderup K, Rios-Steiner J, Arni RK, Preiss J, Geiger JH. The X-ray crystallographic structure of Escherichia coli branching enzyme. *J Biol Chem* 2002;277:42164-42170
- Abad MC, Geiger J. Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of human angiostatin. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2002;58:513-514
- 张国锋, 王元和, 王强. 消化道肿瘤的抗血管生成治疗. 世界华人消化杂志 2001;9:1180-1184
- 吴静, 樊代明. 肿瘤血管生成与肿瘤血管抑制治疗. 世界华人消化杂志 2001;9:316-321
- Keshet E, Ben-Sasson SA. Anticancer drug targets: approaching angiogenesis. *J Clin Invest* 1999;104:1497-1501
- Distler O, Neidhart M, Gay RE, Gay S. The molecular control of angiogenesis. *Int Rev Immunol* 2002;21:33-49
- Pozzi A, LeVine WF, Gardner HA. Low plasma levels of matrix metalloproteinase 9 permit increased tumor angiogenesis. *Oncogene* 2002;21:272-281
- Kunz M, Hartmann A. Angiogenesis-anti-angiogenesis. Significance for tumor growth and metastasis. *Hautarzt* 2002;53:373-384
- Kim ES, Herbst RS. Angiogenesis inhibitors in lung cancer. *Curr Oncol Rep* 2002;4:325-333
- Paley PJ. Angiogenesis in ovarian cancer: molecular pathology and therapeutic strategies. *Curr Oncol Rep* 2002;4:165-174
- Kim J, Hajjar KA. Annexin II: a plasminogen-plasminogen activator co-receptor. *Front Biosci* 2002;7:341-348
- Feraud O, Cao Y, Vittet D. Embryonic stem cell-derived embryoid bodies development in collagen gels recapitulates sprouting angiogenesis. *Lab Invest* 2001;81:1669-1681
- Wojtukiewicz MZ, Sierko E, Klement P, Rak J. The hemostatic system and angiogenesis in malignancy. *Neoplasia* 2001;3:371-384
- Pepper MS. Extracellular proteolysis and angiogenesis. *Thromb Haemost* 2001;86:346-355
- Yanagi K, Onda M, Uchida E. Effect of angiostatin on liver metastasis of pancreatic cancer in hamsters. *Jpn J Cancer Res* 2000;91:723-730
- Westphal JR, Van't Hullenaar R, Peek R, Willems RW, Crickard K, Crickard U, Askaa J, Clemmensen I, Ruiter DJ, De Waal RM. Angiogenic balance in human melanoma: expression of VEGF, bFGF, IL-8, PDGF and angiostatin in relation to vascular density of xenografts in vivo. *Int J Cancer* 2000;86:768-776
- Gasparini G. The rationale and future potential of angiogenesis inhibitors in neoplasia. *Drugs* 1999;58:17-38
- Fan YF, Huang ZH. Angiogenesis inhibitor TNP-470 suppresses growth of peritoneal disseminating foci of human colon cancer line Lovo. *World J Gastroenterol* 2002;8:853-856
- Tao HQ, Lin YZ, Wang RN. Significance of vascular endothelial growth factor messenger RNA expression in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 1998;4:10-13
- 谢传高, 王兴鹏. 血管生成与胰腺癌. 世界华人消化杂志 2001;9:338-341
- Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996;86:353-364
- Chavakis E, Dimmeler S. Regulation of endothelial cell survival and apoptosis during angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:887-893
- Bouma-ter Steege JC, Mayo KH, Griffioen AW. Angiostatic proteins and peptides. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2001;11:319-334
- Wahl ML, Grant DS. Effects of microenvironmental extracellular pH and extracellular matrix proteins on angiostatin's activity and on intracellular pH. *Gen Pharmacol* 2000;35:277-285
- Kirsch M, Santarius T, Black PM, Schackert G. Therapeutic anti-angiogenesis for malignant brain tumors. *Onkologie* 2001;24:423-430
- Kwon M, Yoon CS, Fitzpatrick S, Kassam G, Graham KS, Young MK, Waisman DM. p22 is a novel plasminogen fragment with antiangiogenic activity. *Biochemistry* 2001;40:13246-13253
- Tarui T, Miles LA, Takada Y. Specific interaction of angiostatin with integrin alpha(v)beta(3) in endothelial cells. *J Biol Chem* 2001;276:39562-39568
- Trojanovsky B, Levchenko T, Mansson G, Matvienko O, Holmgren L. Angiomotin: an angiostatin binding protein that regulates endothelial cell migration and tube formation. *Cell Biol* 2001;152:1247-1254
- Kirsch M, Schackert G, Black PM. Angiogenesis, metastasis, and endogenous inhibition. *J Neurooncol* 2000;50:173-180
- Ito H, Rovira II, Bloom ML, Takeda K, Ferrans VJ, Quyyumi AA, Finkel T. Endothelial progenitor cells as putative targets for angiostatin. *Cancer Res* 1999;59:5875-5877

- 39 Moser TL, Stack MS, Wahl ML, Pizzo SV. The mechanism of action of angiostatin: can you teach an old dog new tricks? *Thromb Haemost* 2002;87:394-401
- 40 Claesson-Welsh L, Welsh M, Ito N, Anand-Apte B, Soker S, Zetter B, O'Reilly M, Folkman J. Angiostatin induces endothelial cell apoptosis and activation of focal adhesion kinase independently of the integrin-binding motif RGD. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:5579-5583
- 41 Redlitz A, Daum G, Sage EH. Angiostatin diminishes activation of the mitogen-activated protein kinases ERK-1 and ERK-2 in human dermal microvascular endothelial cells. *J Vasc Res* 1999;36:28-34
- 42 Stack MS, Gately S, Bafetti LM, Enghild JJ, Soff GA. Angiostatin inhibits endothelial and melanoma cellular invasion by blocking matrix-enhanced plasminogen activation. *Biochem J* 1999;340:77-84
- 43 Moser TL, Stack MS, Asplin I, Enghild JJ, Hojrup P, Everitt L, Hubchak S, Schnaper HW, Pizzo SV. Angiostatin binds ATP synthase on the surface of human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:2811-2816
- 44 Farina AR, Tacconelli A, Cappabianca L, Gulino A, Mackay AR. Inhibition of human MDA-MB-231 breast cancer cell invasion by matrix metalloproteinase 3 involves degradation of plasminogen. *Eur J Biochem* 2002;269:4476-4483
- 45 Scapini P, Nesi L, Morini M, Tanghetti E, Belleri M, Noonan D, Presta M, Albini A, Cassatella MA. Generation of biologically active angiostatin kringle 1-3 by activated human neutrophils. *J Immunol* 2002;168:5798-5804
- 46 Hari D, Beckett MA, Sukhatme VP, Dhanabal M, Nodzenski E, Lu H, Mauceri HJ, Kufe DW, Weichselbaum RR. Angiostatin induces mitotic cell death of proliferating endothelial cells. *Mol Cell Biol Res Commun* 2000;3:277-282
- 47 Moser TL, Kenan DJ, Ashley TA, Roy JA, Goodman MD, Misra UK, Cheek DJ, Pizzo SV. Endothelial cell surface F1-F0 ATP synthase is active in ATP synthesis and is inhibited by angiostatin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:6656-6661
- 48 Cao Y, Ji RW, Davidson D, Schaller J, Marti D, Sohndel S, McCance SG, O'Reilly MS, Llinas M, Folkman J. Kringle domains of human angiostatin. Characterization of the anti-proliferative activity on endothelial cells. *J Biol Chem* 1996;271:29461-29467
- 49 王莹飞, 金勇丰, 张耀洲. 人血管抑素(k1-3)在家蚕细胞和幼虫中的表达及活性测定. *生物化学与生物物理学报* 2002;34:482-487
- 50 Sim BK, O'Reilly MS, Liang H, Fortier AH, He W, Madsen JW, Lapcevich R, Nacy CA. A recombinant human angiostatin protein inhibits experimental primary and metastatic cancer. *Cancer Res* 1997;57:1329-1334
- 51 辛利, 张励, 徐韧, 张倩, 叶勤, 李载平, 甘人宝. 人血管抑素在毕氏酵母中的表达及其活性测定. *生物化学与生物物理学报* 2001;33:291-295
- 52 Meneses PI, Abrey LE, Hajjar KA, Gultekin SH, Duvoisin RM, Berns KI, Rosenfeld MR. Simplified production of a recombinant human angiostatin derivative that suppresses intracerebral glial tumor growth. *Clin Cancer Res* 1999;5:3689-3694
- 53 Matsumoto G, Shindo J. Cancer therapy by gene therapy with angiostatin. *Drugs Today (Barc)* 2001;37:815-821
- 54 Matsumoto G, Sasaki K, Tsukinoki K, Ohmi Y, Lee U, Shindo J. Growth of human squamous cell carcinoma xenografts in mice is inhibited by local angiostatin gene therapy. *Oral Oncol* 2002;38:543-548
- 55 Shichinohe T, Bochner BH, Mizutani K, Nishida M, Hegerich-Gilliam S, Naldini L, Kasahara N. Development of lentiviral vectors for antiangiogenic gene delivery. *Cancer Gene Ther* 2001;8:879-889
- 56 Gyorffy S, Palmer K, Gaudie J. Adenoviral vector expressing murine angiostatin inhibits a model of breast cancer metastatic growth in the lungs of mice. *Am J Pathol* 2001;159:1137-1147
- 57 Rodolfo M, Cato EM, Soldati S, Ceruti R, Asioli M, Scanziani E, Vezzoni P, Parmiani G, Sacco MG. Growth of human melanoma xenografts is suppressed by systemic angiostatin gene therapy. *Cancer Gene Ther* 2001;8:491-496
- 58 Indraccolo S, Morini M, Gola E, Carrozzino F, Habeler W, Minghelli S, Santi L, Chieco-Bianchi L, Cao Y, Albini A, Noonan DM. Effects of angiostatin gene transfer on functional properties and in vivo growth of Kaposi's sarcoma cells. *Cancer Res* 2001;61:5441-5446
- 59 Andrawiss M, Maron A, Beltran W, Opolon P, Connault E, Griscelli F, Yeh P, Perricaudet M, Devauchelle P. Adenovirus-mediated gene transfer in canine eyes: a preclinical study for gene therapy of human uveal melanoma. *J Gene Med* 2001;3:228-239
- 60 Matsumoto G, Ohmi Y, Shindo J. Angiostatin gene therapy inhibits the growth of murine squamous cell carcinoma in vivo. *Oral Oncol* 2001;37:369-378
- 61 吴景文, 章翔, 高大宽, 荆俊杰, 屈延, 梁景文, 刘先珍, 王煌. 部分分泌的血管抑素 K(1-3)蛋白抑制人脑胶质瘤生长的实验研究. *中华医学杂志* 2000;80:861-864
- 62 Sacco MG, Caniatti M, Cato EM, Frattini A, Chiesa G, Ceruti R, Adorni F, Zecca L, Scanziani E, Vezzoni P. Liposome-delivered angiostatin strongly inhibits tumor growth and metastatization in a transgenic model of spontaneous breast cancer. *Cancer Res* 2000;60:2660-2665
- 63 Chen QR, Kumar D, Stass SA, Mixson AJ. Liposomes complexed to plasmids encoding angiostatin and endostatin inhibit breast cancer in nude mice. *Cancer Res* 1999;59:3308-3312
- 64 Griscelli F, Li H, Bennaceur-Griscelli A, Soria J, Opolon P, Soria C, Perricaudet M, Yeh P, Lu H. Angiostatin gene transfer: inhibition of tumor growth in vivo by blockage of endothelial cell proliferation associated with a mitosis arrest. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:6367-6372
- 65 Hampl M, Tanaka T, Albert PS, Lee J, Ferrari N, Fine HA. Therapeutic effects of viral vector-mediated antiangiogenic gene transfer in malignant ascites. *Hum Gene Ther* 2001;12:1713-1729
- 66 Ma HI, Lin SZ, Chiang YH, Li J, Chen SL, Tsao YP, Xiao X. Intratumoral gene therapy of malignant brain tumor in a rat model with angiostatin delivered by adeno-associated viral (AAV) vector. *Gene Ther* 2002;9:2-11
- 67 陶开山, 吴兴安, 龚科峰, 吕勇刚. 鼠源性血管抑素对裸鼠种植性肿瘤的抑制作用. *中华外科杂志* 2002;40:621-624
- 68 Fukumori T, Nishitani M, Naroda T, Onishi T, Oka N, Kanayama H, Kagawa S. Expression of angiostatin cDNA in a murine renal cell carcinoma suppresses tumor growth in vivo. *Urology* 2002;59:973-977
- 69 Ma HI, Guo P, Li J, Lin SZ, Chiang YH, Xiao X, Cheng SY. Suppression of intracranial human glioma growth after intramuscular administration of an adeno-associated viral vector expressing angiostatin. *Cancer Res* 2002;62:756-763
- 70 Zhang X, Wu J, Fei Z, Gao D, Li X, Liu X, Liang J, Wang X. Angiostatin K(1-3) gene for treatment of human gliomas: an experimental study. *Chin Med J (Engl)* 2000;113:996-1001
- 71 Scappaticci FA, Contreras A, Smith R, Bonhoure L, Lum B, Cao Y, Engleman EG, Nolan GP. Statin-AE: a novel angiostatin-endostatin fusion protein with enhanced antiangiogenic and antitumor activity. *Angiogenesis* 2001;4:263-268
- 72 Scappaticci FA, Smith R, Pathak A, Schloss D, Lum B, Cao Y, Johnson F, Engleman EG, Nolan GP. Combination angiostatin and endostatin gene transfer induces synergistic antiangiogenic activity in vitro and antitumor efficacy in leukemia and solid tumors in mice. *Mol Ther* 2001;3:186-196
- 73 Wilczynska U, Kucharska A, Szary J, Szala S. Combined delivery of an antiangiogenic protein (angiostatin) and an immunomodulatory gene (interleukin-12) in the treatment of murine cancer. *Acta Biochim Pol* 2001;48:1077-1084
- 74 Gyorffy S, Palmer K, Podor TJ, Hitt M, Gaudie J. Combined treatment of a murine breast cancer model with type 5 adenovirus vectors expressing murine angiostatin and IL-12: a role for combined anti-angiogenesis and immunotherapy. *J Immunol* 2001;166:6212-6217
- 75 Sun X, Kanwar JR, Leung E, Lehnert K, Wang D, Krissansen GW. Angiostatin enhances B7. 1-mediated cancer immunotherapy independently of effects on vascular endothelial growth factor expression. *Cancer Gene Ther* 2001;8:719-727



# TGF $\beta$ - Smad 信号转导通路与肝纤维化

吴晓玲, 曾维政, 王丕龙

吴晓玲, 王丕龙, 重庆医科大学附属第一医院消化内科 重庆市 400016  
曾维政, 中国人民解放军成都军区总医院消化内科 四川省成都市 610083  
项目负责人: 曾维政, 610083, 四川省成都市天回镇, 中国人民解放军成都军区总医院消化内科. wxllady@163.com  
电话: 028-83577558  
收稿日期: 2002-12-28 接受日期: 2003-01-16

## 摘要

转化生长因子 $\beta$ (transforming growth factor beta, TGF $\beta$ )是一类能够调节细胞生长和分化的多肽,具备多种生物作用,在肝纤维化发生、发展过程中具有活化肝星状细胞(hepatocellular stellate cell, HSC),促进胶原基因表达,促进细胞外基质合成与沉积等作用,是最重要的促肝纤维化细胞因子之一。大量研究证实,TGF $\beta$ -Smad信号转导通路是TGF $\beta$ 发挥生物学作用的主要通路,其分子组成与分子调节复杂,与其他信号通路存在广泛的交互影响,对不同的组织、细胞及肝纤维化的不同病程的作用均有明显的差异,对TGF $\beta$ -Smad信号转导通路的深入研究不仅使肝纤维化的发病机制得到进一步的阐明,也给肝纤维化的防治研究提供了新的有效途径,本文综述TGF $\beta$ -Smad信号转导通路的组成与调控,在肝纤维化发病与防治中的作用的研究进展。

吴晓玲, 曾维政, 王丕龙. TGF $\beta$ -Smad 信号转导通路与肝纤维化. 世界华人消化杂志 2003;11(10):1601-1605

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1601.asp>

## 0 引言

转化生长因子 $\beta$ 在肝纤维化发生、发展过程中具有活化肝星状细胞(hepatocellular stellate cell, HSC),促进胶原蛋白基因表达,促进细胞外基质(extracellular matrix, ECM)合成与沉积等作用,是肝纤维化最重要的始动因子之一<sup>[1-7]</sup>。近年对TGF $\beta$ -Smad信号转导通路的分子组成及其在肝纤维化病程中的作用机制进行了广泛的研究,使肝纤维化的发病机制得到进一步阐明,也为肝纤维化防治带来了新的希望,本文就这些研究进展作一综述。

## 1 TGF $\beta$ - Smad 信号转导通路的分子组成

TGF $\beta$ 家族: TGF $\beta$ 是一个庞大家族群<sup>[1]</sup>,脊椎动物TGF $\beta$ 超家族包括TGF $\beta$ 、活动素(activin)和骨成型蛋白(bone morphogenetic proteins, BMPs);哺乳动物TGF $\beta$ 共有三种: TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2和TGF $\beta$ 3,其中肝脏含量最高且具有生物活性的是TGF $\beta$ 1,由两条相同的含112个氨基酸的亚单位通过-S-S-键连接成二聚体多肽,Mr 25 000,他是细胞外Mr 75 000的TGF $\beta$ 隐型相关肽经

酶解修饰后的产物,还原剂可使二聚体分离,活性消失。正常成人肝脏肝窦内皮细胞、Kupffer细胞表达较高水平的TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2和TGF $\beta$ 3 mRNA则在相对较低但可以检出的水平;肝星状细胞正常状态下表达TGF $\beta$ 极少,肝损伤后三种TGF $\beta$ 表达均显著增加,是肝损伤时TGF $\beta$ 的主要来源<sup>[8,9]</sup>。

TGF $\beta$ 家族受体: TGF $\beta$ 超家族的受体有I、II型两种,均为受体丝氨酸/苏氨酸(Ser/Thr)激酶,二者形成异源二聚体<sup>[3]</sup>。II型受体(T $\beta$ R II)的胞外端首先与配体结合,其胞内段的丝氨酸/苏氨酸激酶被活化,进而使I型受体(T $\beta$ R I)的GS结构域磷酸化,GS域为高度保守的丝氨酸-甘氨酸(Ser-Gly-Ser-Gly-Ser-Gly)序列,是T $\beta$ R I活化的关键部位。T $\beta$ R I活化后成为丝氨酸/苏氨酸激酶,将生物信号向细胞内传导。 $\beta$ 聚糖(betaglycan)是附加受体,为细胞表面表达最丰富的TGF $\beta$ 结合蛋白,与TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2、TGF $\beta$ 3都有较高的亲和力,可易化T $\beta$ R I、T $\beta$ R II与配体的结合。Endoglin也是一种附加受体,与 $\beta$ 聚糖结构相似,易与TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 3结合而不与TGF $\beta$ 2结合。

Smads蛋白家族: TGF $\beta$ 信号通路的关键传导分子为胞质蛋白Smads。Smads为与线虫Sma和果蝇Mad蛋白同源的蛋白家族,他们可以将TGF $\beta$ 信号直接由细胞膜受体传导入细胞核内,是受体激酶介导的细胞内信号传导的新途径,为细胞信号跨膜后与核内基因转录之间开通了一条简便路径<sup>[10,11]</sup>。Smads分子中都有两个保守的Mad同源域,N端的MH1结构域可与DNA的CAGAC序列结合,C端的MH2结构域可与转录辅激活蛋白或辅阻遏物相互作用,是Smad的功能区;两个结构域之间的短连接区有多个磷酸化位点,可被ERK磷酸化而失活,是Smad的负调控区。Smads至少有8个成员,即Smad1-8,根据其功能不同分为三类:第一类是膜受体激活的Smad(R-Smads),包括Smad1、2、3、5、8,其C端功能域末端含有保守的磷酸化位点SSXS基序(motif),可与TGF $\beta$ 受体直接作用并被磷酸化,之后与Smad4结合为二聚体转位入核。R-Smads与信号通路的特异性有关: Smad2和Smad3介导TGF $\beta$ 和活性素的信号, Smads1、5、8则介导BMP的信号。第二类为通用Smad(co-Smad),目前只有Smad4,与其他Smads的同源性较低,C端功能域没有磷酸化位点,不与受体相互作用,但可与Smads家族其他成员相互作用形成稳定的异源多聚体,调节靶基因转录。第三类有Smad6、7,为TGF $\beta$ -Smad信号转导通路的抑制因

子, 可与 R-Smads 竞争性地结合受体, 阻止 R-Smads 的磷酸化, 从而阻断 TGF  $\beta$  的效应. TGF  $\beta$ -Smad 信号通路中各型 Smads 分子之间的作用精密协调, 共同完成生理及病理状态下 TGF  $\beta$  的生物学效应, 研究其生理状态下的平衡和病理状态下紊乱的确切分子基础对探索肝纤维发生机制及肝纤维化的有效预防均有重要现实意义.

## 2 TGF $\beta$ -Smad 信号转导通路的分子调节

TGF  $\beta$ -Smad 信号转导通路受多种因子的调节, R-Smad 与 Smad4 形成的寡聚体进入细胞后, 可直接与 DNA 结合调控基因表达, 但这种 DNA 结合活性很低, 更重要的是与胞核内的辅激活蛋白或辅阻遏物分子结合调节靶基因转录, 主要的辅激活蛋白有 CBP、p300、c-Jun、I $\kappa$ B、p53、pRB、p107、p130、p15、p16、p18、p19、p21、p27、p29、p35、p38、p42、p44、p46、p51、p54、p57、p60、p62、p65、p67、p69、p70、p72、p75、p77、p79、p80、p82、p84、p85、p87、p89、p90、p91、p93、p95、p97、p99、p100、p101、p103、p105、p107、p109、p110、p111、p113、p115、p117、p119、p120、p121、p123、p125、p127、p129、p130、p131、p133、p135、p137、p139、p140、p141、p143、p145、p147、p149、p150、p151、p153、p155、p157、p159、p160、p161、p163、p165、p167、p169、p170、p171、p173、p175、p177、p179、p180、p181、p183、p185、p187、p189、p190、p191、p193、p195、p197、p199、p200、p201、p203、p205、p207、p209、p210、p211、p213、p215、p217、p219、p220、p221、p223、p225、p227、p229、p230、p231、p233、p235、p237、p239、p240、p241、p243、p245、p247、p249、p250、p251、p253、p255、p257、p259、p260、p261、p263、p265、p267、p269、p270、p271、p273、p275、p277、p279、p280、p281、p283、p285、p287、p289、p290、p291、p293、p295、p297、p299、p300、p301、p303、p305、p307、p309、p310、p311、p313、p315、p317、p319、p320、p321、p323、p325、p327、p329、p330、p331、p333、p335、p337、p339、p340、p341、p343、p345、p347、p349、p350、p351、p353、p355、p357、p359、p360、p361、p363、p365、p367、p369、p370、p371、p373、p375、p377、p379、p380、p381、p383、p385、p387、p389、p390、p391、p393、p395、p397、p399、p400、p401、p403、p405、p407、p409、p410、p411、p413、p415、p417、p419、p420、p421、p423、p425、p427、p429、p430、p431、p433、p435、p437、p439、p440、p441、p443、p445、p447、p449、p450、p451、p453、p455、p457、p459、p460、p461、p463、p465、p467、p469、p470、p471、p473、p475、p477、p479、p480、p481、p483、p485、p487、p489、p490、p491、p493、p495、p497、p499、p500、p501、p503、p505、p507、p509、p510、p511、p513、p515、p517、p519、p520、p521、p523、p525、p527、p529、p530、p531、p533、p535、p537、p539、p540、p541、p543、p545、p547、p549、p550、p551、p553、p555、p557、p559、p560、p561、p563、p565、p567、p569、p570、p571、p573、p575、p577、p579、p580、p581、p583、p585、p587、p589、p590、p591、p593、p595、p597、p599、p600、p601、p603、p605、p607、p609、p610、p611、p613、p615、p617、p619、p620、p621、p623、p625、p627、p629、p630、p631、p633、p635、p637、p639、p640、p641、p643、p645、p647、p649、p650、p651、p653、p655、p657、p659、p660、p661、p663、p665、p667、p669、p670、p671、p673、p675、p677、p679、p680、p681、p683、p685、p687、p689、p690、p691、p693、p695、p697、p699、p700、p701、p703、p705、p707、p709、p710、p711、p713、p715、p717、p719、p720、p721、p723、p725、p727、p729、p730、p731、p733、p735、p737、p739、p740、p741、p743、p745、p747、p749、p750、p751、p753、p755、p757、p759、p760、p761、p763、p765、p767、p769、p770、p771、p773、p775、p777、p779、p780、p781、p783、p785、p787、p789、p790、p791、p793、p795、p797、p799、p800、p801、p803、p805、p807、p809、p810、p811、p813、p815、p817、p819、p820、p821、p823、p825、p827、p829、p830、p831、p833、p835、p837、p839、p840、p841、p843、p845、p847、p849、p850、p851、p853、p855、p857、p859、p860、p861、p863、p865、p867、p869、p870、p871、p873、p875、p877、p879、p880、p881、p883、p885、p887、p889、p890、p891、p893、p895、p897、p899、p900、p901、p903、p905、p907、p909、p910、p911、p913、p915、p917、p919、p920、p921、p923、p925、p927、p929、p930、p931、p933、p935、p937、p939、p940、p941、p943、p945、p947、p949、p950、p951、p953、p955、p957、p959、p960、p961、p963、p965、p967、p969、p970、p971、p973、p975、p977、p979、p980、p981、p983、p985、p987、p989、p990、p991、p993、p995、p997、p999、p1000、p1001、p1003、p1005、p1007、p1009、p1010、p1011、p1013、p1015、p1017、p1019、p1020、p1021、p1023、p1025、p1027、p1029、p1030、p1031、p1033、p1035、p1037、p1039、p1040、p1041、p1043、p1045、p1047、p1049、p1050、p1051、p1053、p1055、p1057、p1059、p1060、p1061、p1063、p1065、p1067、p1069、p1070、p1071、p1073、p1075、p1077、p1079、p1080、p1081、p1083、p1085、p1087、p1089、p1090、p1091、p1093、p1095、p1097、p1099、p1100、p1101、p1103、p1105、p1107、p1109、p1110、p1111、p1113、p1115、p1117、p1119、p1120、p1121、p1123、p1125、p1127、p1129、p1130、p1131、p1133、p1135、p1137、p1139、p1140、p1141、p1143、p1145、p1147、p1149、p1150、p1151、p1153、p1155、p1157、p1159、p1160、p1161、p1163、p1165、p1167、p1169、p1170、p1171、p1173、p1175、p1177、p1179、p1180、p1181、p1183、p1185、p1187、p1189、p1190、p1191、p1193、p1195、p1197、p1199、p1200、p1201、p1203、p1205、p1207、p1209、p1210、p1211、p1213、p1215、p1217、p1219、p1220、p1221、p1223、p1225、p1227、p1229、p1230、p1231、p1233、p1235、p1237、p1239、p1240、p1241、p1243、p1245、p1247、p1249、p1250、p1251、p1253、p1255、p1257、p1259、p1260、p1261、p1263、p1265、p1267、p1269、p1270、p1271、p1273、p1275、p1277、p1279、p1280、p1281、p1283、p1285、p1287、p1289、p1290、p1291、p1293、p1295、p1297、p1299、p1300、p1301、p1303、p1305、p1307、p1309、p1310、p1311、p1313、p1315、p1317、p1319、p1320、p1321、p1323、p1325、p1327、p1329、p1330、p1331、p1333、p1335、p1337、p1339、p1340、p1341、p1343、p1345、p1347、p1349、p1350、p1351、p1353、p1355、p1357、p1359、p1360、p1361、p1363、p1365、p1367、p1369、p1370、p1371、p1373、p1375、p1377、p1379、p1380、p1381、p1383、p1385、p1387、p1389、p1390、p1391、p1393、p1395、p1397、p1399、p1400、p1401、p1403、p1405、p1407、p1409、p1410、p1411、p1413、p1415、p1417、p1419、p1420、p1421、p1423、p1425、p1427、p1429、p1430、p1431、p1433、p1435、p1437、p1439、p1440、p1441、p1443、p1445、p1447、p1449、p1450、p1451、p1453、p1455、p1457、p1459、p1460、p1461、p1463、p1465、p1467、p1469、p1470、p1471、p1473、p1475、p1477、p1479、p1480、p1481、p1483、p1485、p1487、p1489、p1490、p1491、p1493、p1495、p1497、p1499、p1500、p1501、p1503、p1505、p1507、p1509、p1510、p1511、p1513、p1515、p1517、p1519、p1520、p1521、p1523、p1525、p1527、p1529、p1530、p1531、p1533、p1535、p1537、p1539、p1540、p1541、p1543、p1545、p1547、p1549、p1550、p1551、p1553、p1555、p1557、p1559、p1560、p1561、p1563、p1565、p1567、p1569、p1570、p1571、p1573、p1575、p1577、p1579、p1580、p1581、p1583、p1585、p1587、p1589、p1590、p1591、p1593、p1595、p1597、p1599、p1600、p1601、p1603、p1605、p1607、p1609、p1610、p1611、p1613、p1615、p1617、p1619、p1620、p1621、p1623、p1625、p1627、p1629、p1630、p1631、p1633、p1635、p1637、p1639、p1640、p1641、p1643、p1645、p1647、p1649、p1650、p1651、p1653、p1655、p1657、p1659、p1660、p1661、p1663、p1665、p1667、p1669、p1670、p1671、p1673、p1675、p1677、p1679、p1680、p1681、p1683、p1685、p1687、p1689、p1690、p1691、p1693、p1695、p1697、p1699、p1700、p1701、p1703、p1705、p1707、p1709、p1710、p1711、p1713、p1715、p1717、p1719、p1720、p1721、p1723、p1725、p1727、p1729、p1730、p1731、p1733、p1735、p1737、p1739、p1740、p1741、p1743、p1745、p1747、p1749、p1750、p1751、p1753、p1755、p1757、p1759、p1760、p1761、p1763、p1765、p1767、p1769、p1770、p1771、p1773、p1775、p1777、p1779、p1780、p1781、p1783、p1785、p1787、p1789、p1790、p1791、p1793、p1795、p1797、p1799、p1800、p1801、p1803、p1805、p1807、p1809、p1810、p1811、p1813、p1815、p1817、p1819、p1820、p1821、p1823、p1825、p1827、p1829、p1830、p1831、p1833、p1835、p1837、p1839、p1840、p1841、p1843、p1845、p1847、p1849、p1850、p1851、p1853、p1855、p1857、p1859、p1860、p1861、p1863、p1865、p1867、p1869、p1870、p1871、p1873、p1875、p1877、p1879、p1880、p1881、p1883、p1885、p1887、p1889、p1890、p1891、p1893、p1895、p1897、p1899、p1900、p1901、p1903、p1905、p1907、p1909、p1910、p1911、p1913、p1915、p1917、p1919、p1920、p1921、p1923、p1925、p1927、p1929、p1930、p1931、p1933、p1935、p1937、p1939、p1940、p1941、p1943、p1945、p1947、p1949、p1950、p1951、p1953、p1955、p1957、p1959、p1960、p1961、p1963、p1965、p1967、p1969、p1970、p1971、p1973、p1975、p1977、p1979、p1980、p1981、p1983、p1985、p1987、p1989、p1990、p1991、p1993、p1995、p1997、p1999、p2000、p2001、p2003、p2005、p2007、p2009、p2010、p2011、p2013、p2015、p2017、p2019、p2020、p2021、p2023、p2025、p2027、p2029、p2030、p2031、p2033、p2035、p2037、p2039、p2040、p2041、p2043、p2045、p2047、p2049、p2050、p2051、p2053、p2055、p2057、p2059、p2060、p2061、p2063、p2065、p2067、p2069、p2070、p2071、p2073、p2075、p2077、p2079、p2080、p2081、p2083、p2085、p2087、p2089、p2090、p2091、p2093、p2095、p2097、p2099、p2100、p2101、p2103、p2105、p2107、p2109、p2110、p2111、p2113、p2115、p2117、p2119、p2120、p2121、p2123、p2125、p2127、p2129、p2130、p2131、p2133、p2135、p2137、p2139、p2140、p2141、p2143、p2145、p2147、p2149、p2150、p2151、p2153、p2155、p2157、p2159、p2160、p2161、p2163、p2165、p2167、p2169、p2170、p2171、p2173、p2175、p2177、p2179、p2180、p2181、p2183、p2185、p2187、p2189、p2190、p2191、p2193、p2195、p2197、p2199、p2200、p2201、p2203、p2205、p2207、p2209、p2210、p2211、p2213、p2215、p2217、p2219、p2220、p2221、p2223、p2225、p2227、p2229、p2230、p2231、p2233、p2235、p2237、p2239、p2240、p2241、p2243、p2245、p2247、p2249、p2250、p2251、p2253、p2255、p2257、p2259、p2260、p2261、p2263、p2265、p2267、p2269、p2270、p2271、p2273、p2275、p2277、p2279、p2280、p2281、p2283、p2285、p2287、p2289、p2290、p2291、p2293、p2295、p2297、p2299、p2300、p2301、p2303、p2305、p2307、p2309、p2310、p2311、p2313、p2315、p2317、p2319、p2320、p2321、p2323、p2325、p2327、p2329、p2330、p2331、p2333、p2335、p2337、p2339、p2340、p2341、p2343、p2345、p2347、p2349、p2350、p2351、p2353、p2355、p2357、p2359、p2360、p2361、p2363、p2365、p2367、p2369、p2370、p2371、p2373、p2375、p2377、p2379、p2380、p2381、p2383、p2385、p2387、p2389、p2390、p2391、p2393、p2395、p2397、p2399、p2400、p2401、p2403、p2405、p2407、p2409、p2410、p2411、p2413、p2415、p2417、p2419、p2420、p2421、p2423、p2425、p2427、p2429、p2430、p2431、p2433、p2435、p2437、p2439、p2440、p2441、p2443、p2445、p2447、p2449、p2450、p2451、p2453、p2455、p2457、p2459、p2460、p2461、p2463、p2465、p2467、p2469、p2470、p2471、p2473、p2475、p2477、p2479、p2480、p2481、p2483、p2485、p2487、p2489、p2490、p2491、p2493、p2495、p2497、p2499、p2500、p2501、p2503、p2505、p2507、p2509、p2510、p2511、p2513、p2515、p2517、p2519、p2520、p2521、p2523、p2525、p2527、p2529、p2530、p2531、p2533、p2535、p2537、p2539、p2540、p2541、p2543、p2545、p2547、p2549、p2550、p2551、p2553、p2555、p2557、p2559、p2560、p2561、p2563、p2565、p2567、p2569、p2570、p2571、p2573、p2575、p2577、p2579、p2580、p2581、p2583、p2585、p2587、p2589、p2590、p2591、p2593、p2595、p2597、p2599、p2600、p2601、p2603、p2605、p2607、p2609、p2610、p2611、p2613、p2615、p2617、p2619、p2620、p2621、p2623、p2625、p2627、p2629、p2630、p2631、p2633、p2635、p2637、p2639、p2640、p2641、p2643、p2645、p2647、p2649、p2650、p2651、p2653、p2655、p2657、p2659、p2660、p2661、p2663、p2665、p2667、p2669、p2670、p2671、p2673、p2675、p2677、p2679、p2680、p2681、p2683、p2685、p2687、p2689、p2690、p2691、p2693、p2695、p2697、p2699、p2700、p2701、p2703、p2705、p2707、p2709、p2710、p2711、p2713、p2715、p2717、p2719、p2720、p2721、p2723、p2725、p2727、p2729、p2730、p2731、p2733、p2735、p2737、p2739、p2740、p2741、p2743、p2745、p2747、p2749、p2750、p2751、p2753、p2755、p2757、p2759、p2760、p2761、p2763、p2765、p2767、p2769、p2770、p2771、p2773、p2775、p2777、p2779、p2780、p2781、p2783、p2785、p2787、p2789、p2790、p2791、p2793、p2795、p2797、p2799、p2800、p2801、p2803、p2805、p2807、p2809、p2810、p2811、p2813、p2815、p2817、p2819、p2820、p2821、p2823、p2825、p2827、p2829、p2830、p2831、p2833、p2835、p2837、p2839、p2840、p2841、p2843、p2845、p2847、p2849、p2850、p2851、p2853、p2855、p2857、p2859、p2860、p2861、p2863、p2865、p2867、p2869、p2870、p2871、p2873、p2875、p2877、p2879、p2880、p2881、p2883、p2885、p2887、p2889、p2890、p2891、p2893、p2895、p2897、p2899、p2900、p2901、p2903、p2905、p2907、p2909、p2910、p2911、p2913、p2915、p2917、p2919、p2920、p2921、p2923、p2925、p2927、p2929、p2930、p2931、p2933、p2935、p2937、p2939、p2940、p2941、p2943、p2945、p2947、p2949、p2950、p2951、p2953、p2955、p2957、p2959、p2960、p2961、p2963、p2965、p2967、p2969、p2970、p2971、p2973、p2975、p2977、p2979、p2980、p2981、p2983、p2985、p2987、p2989、p2990、p2991、p2993、p2995、p2997、p2999、p3000、p3001、p3003、p3005、p3007、p3009、p3010、p3011、p3013、p3015、p3017、p3019、p3020、p3021、p3023、p3025、p3027、p3029、p3030、p3031、p3033、p3035、p3037、p3039、p3040、p3041、p3043、p3045、p3047、p3049、p3050、p3051、p3053、p3055、p3057、p3059、p3060、p3061、p3063、p3065、p3067、p3069、p3070、p3071、p3073、p3075、p3077、p3079、p3080、p3081、p3083、p3085、p3087、p3089、p3090、p3091、p3093、p3095、p3097、p3099、p3100、p3101、p3103、p3105、p3107、p3109、p3110、p3111、p3113、p3115、p3117、p3119、p3120、p3121、p3123、p3125、p3127、p3129、p3130、p3131、p3133、p3135、p3137、p3139、p3140、p3141、p3143、p3145、p3147、p3149、p3150、p3151、p3153、p3155、p3157、p3159、p3160、p3161、p3163、p3165、p3167、p3169、p3170、p3171、p3173、p3175、p3177、p3179、p3180、p3181、p3183、p3185、p3187、p3189、p3190、p3191、p3193、p3195、p3197、p3199、p3200、p3201、p3203、p3205、p3207、p3209、p3210、p3211、p3213、p3215、p3217、p3219、p3220、p3221、p3223、p3225、p3227、p3229、p3230、p3231、p3233、p3235、p3237、p3239、p3240、p3241、p3243、p3245、p3247、p3249、p3250、p3251、p3253、p3255、p3257、p3259、p3260、p3261、p3263、p3265、p3267、p3269、p3270、p3271、p3273、p3275、p3277、p3279、p3280、p3281、p3283、p3285、p3287、p3289、p3290、p3291、p3293、p3295、p3297、p3299、p3300、p3301、p3303、p3305、p3307、p3309、p3310、p3311、p3313、p3315、p3317、p3319、p3320、p3321、p3323、p3325、p3327、p3329、p3330、p3331、p3333、p3335、p3337、p3339、p3340、p3341、p3343、p3345、p3347、p3349、p3350、p3351、p3353、p3355、p3357、p3359、p3360、p3361、p3363、p3365、p3367、p3369、p3370、p3371、p3373、p3375、p3377、p3379、p3380、p3381、p3383、p3385、p3387、p3389、p3390、p3391、p3393、p3395、p3397、p3399、p3400、p3401、p3403、p3405、p3407、p3409、p3410、p3411、p3413、p3415、p3417、p3419、p3420、p3421、p3423、p3425、p3427、p3429、p3430、p3431、p3433、p3435、p3437、p3439、p3440、p3441、p3443、p3445、p3447、p3449、p3450、p3451、p3453、p3455、p3457、p3459、p3460、p3461、p3463、p3465、p3467、p3469、p3470、p3471、p3473、p3475、p3477、p3479、p3480、p3481、p3483、p3485、p3487、p3489、p3490、p3491、p3493、p3495、p3497、p3499、p3500、p3501、p3503、p3505、p3507、p3509、p3510、p35

内源性 TGF  $\beta$  诱导的 Smad2 持续活化及 Smad7 水平低下可能是肝纤维化进展的原因之一。

TGF  $\beta$  对 HSC 与分化成熟的 MFB 也表现出不同的转化增生效应, 研究证实, 培养液中加入 TGF  $\beta$ , 则 HSC 出现胶原合成增加, Smad7 基因表达增加, 而 MFB 则无此现象; 分子生物学方法显示 HSC 和 MFB 均出现 T  $\beta$  R I、T  $\beta$  R II 表达, 但 MFB 对两种 TGF  $\beta$  受体的亲和力明显下降, 且未发现 Smads 蛋白复合物向核内转移并与 DNA 结合的证据。

肝纤维化动物模型显示, 肝纤维化的进展往往伴随血清及组织中 TGF  $\beta$  增加, HSC 数量进行性增多, Smad3 mRNA 表达量显著高于正常肝脏。肝纤维化各个时期 Smad3 mRNA 表达方式无显著差别, 但抑制性 Smad7 呈现相反结果, 即肝纤维化初期升高, 中晚期进行性下降, 这也许是肝纤维化持续进展的又一分子生物学基础。

对 Smad3 基因敲除鼠的研究发现, 给予四氯化碳刺激后 72 h, HSC 中  $\alpha$  1 (I)、 $\alpha$  2 (I) mRNA 表达水平分别下降为野生型的 42 % 及 64 %, 而  $\alpha$  平滑肌动蛋白(smooth muscle alpha-actin,  $\alpha$ -SMA)表达水平略高于野生型 HSC。体外培养 Smad3 基因敲除鼠的 HSC 则  $\alpha$  1 (I) mRNA 表达水平下降为野生型的 73 %,  $\alpha$ -SMA 表达水平相同; 表明 HSC 合成最大量的 I 型胶原需要 Smad3 的作用, 其活化则可能通过不依赖 Smad3 的途径。另一项研究显示 MFB 内 Smad3 持续活化, 且不需配体的刺激即在胞核中持续存在, 即使 Smad7 过度表达亦不能影响  $\alpha$  2 (I) 与 PAI-1 基因的转录<sup>[15]</sup>。还有研究发现, MFB 表现出 T  $\beta$  R I 的持续活化, 导致 TGF  $\beta$  反应的启动子转录激活, 进而 ECM 合成增加, 产生 TGF  $\beta$  的促纤维化效应。这些研究表明, TGF  $\beta$  对实质细胞与间质细胞的效应不一致, 对急、慢性肝损伤时 HSC 的效应也因其活化状态不同而有显著差别, 因此, 病理性胶原转录增加与 TGF  $\beta$ -Smad 通路功能异常有关, 尽管其确切的分子机制不明, 但至少部分说明慢性肝损伤进展为肝纤维化及肝纤维化病程迁延不愈与 TGF  $\beta$  的促纤维化效应有关, 区别肝损伤的不同病程有助于选择合适的干预手段<sup>[19, 20]</sup>。

## 5 HBV 感染与 TGF $\beta$ -Smad 信号转导通路

HBV 感染是慢性肝炎、肝纤维化的主要病因之一, 其 X 基因编码产物 X 蛋白(protein X, pX)可刺激 HBV 增强子的转录, 并通过其独特的 DNA 顺式作用元件活化多种其他病毒及细胞基因启动子的转录, 已发现 pX 可结合 NF- $\kappa$ B、CREB/ATF、p53、AP1、AP2、Egr-1, 还可与多种前启动复合物(preinitiation complex, PIC)成分如 II 型 RNA 多聚酶、TATA 结合蛋白(TATA binding protein)、转录因子 II H(transcription factor II H, TF II H)、TF II B 等相互作用, pX 通过这些作用影响 HBV 的复制, 扰乱宿主细胞的生长控制和 DNA 修复功能, 成为一个引人注目的癌蛋白。近年研究发现, pX

在 HBV 慢性感染引起肝纤维化的过程中也发挥重要作用, 并与 TGF  $\beta$  信号通路密切相关<sup>[21]</sup>。

前已述及, CBP 和 p300 蛋白是 Smad 发挥作用最重要的转录辅激活蛋白。在 Smad4N 端 MH1 区含有结合 pX 的结构域, pX 可与 TF II B、Smad4 及 p300 蛋白形成稳定的复合物, 促进 Smad4 的核转位。对 NIH3T3 细胞的研究显示, 给予 TGF  $\beta$  刺激后, Smad4 的核转位增加, 而转导了 pX 基因的 NIH3T3 pX 细胞即使没有 TGF  $\beta$  刺激, 也出现 Smad4 的核转位, 加入 TGF  $\beta$  后 Smad4、Smad3 的核转位更显著多于 NIH3T3 细胞。这些研究表明, pX 作为 Smad 的转录辅激活蛋白增强 Smad 复合物的转录活性, 促进 TGF  $\beta$ -Smad 信号通路靶基因的转录, 特别是产生 ECM 的基因以及 TGF  $\beta$  基因的转录, 以自分泌、旁分泌方式活化被 HBV 感染的细胞, 增加 ECM 合成, 最终导致肝纤维化、肝硬化。近期报道活动素亦参与肝纤维化病程, 在肝纤维化、肝硬化大鼠其表达明显增加, 而 pX 不仅增强 TGF  $\beta$  的信号, 还可增强活动素和 BMP 的信号, 可能也参与了 HBV 致肝纤维化的漫长病程<sup>[21]</sup>。

## 6 TGF $\beta$ -Smad 信号转导通路与肝纤维化防治

正因为 TGF  $\beta$ -Smad 信号转导通路在肝纤维化发病中起着举足轻重的作用, 干预该信号通路就成为肝纤维化防治的理想选择<sup>[22-43]</sup>, 其中一些方法已经取得了满意的结果, 主要的有以下 2 类: 即 TGF  $\beta$ 1 受体水平和受体后信号转导分子水平的调控。

6.1 受体水平的调控 (1)可溶性 T  $\beta$  II R: 通过与细胞膜 T  $\beta$  II R 竞争性结合 TGF  $\beta$ , 抑制 TGF  $\beta$  信号的转导, 在肝纤维化动物模型中已取得初步疗效<sup>[44-46]</sup>。(2)转染截短的 T  $\beta$  II R 基因: 转染的 T  $\beta$  II R 缺少大部分胞内段, 因而失去酶活性, 不能活化 T  $\beta$  I R, 从而阻断 TGF  $\beta$  信号的转导。但使用腺病毒载体可诱导机体迅速产生中和性抗体而失效, 且存在剂量依赖的毒性, 限制了这一方法的研究<sup>[1]</sup>。(3)重组 T  $\beta$  II R: 将人 IgG 与 T  $\beta$  II R 胞外部分拼接, 形成的嵌合分子可阻止 TGF  $\beta$  的信号向胞内传导<sup>[47]</sup>。(4)TGF  $\beta$  中和抗体: 仅对动物实验性肾纤维化有效<sup>[1]</sup>。(5)重组 LAP: 能够阻止活性 TGF  $\beta$  过度表达引起的抗有丝分裂效应, 未观察抗纤维化疗效。(6)反义 TGF  $\beta$ : 利用逆转录病毒载体 PLATSN 将反义 TGF  $\beta$  基因导入 HSC 细胞株 LI90, 可见 LI90 自分泌 TGF  $\beta$  及产生 ECM 减少, 目前限于细胞实验<sup>[48]</sup>。(7)减少 TGF  $\beta$  的产生: 目前已报道许多西药<sup>[49-51]</sup>、中药制剂<sup>[52-65]</sup>能够降低肝脏 TGF  $\beta$  mRNA 水平, 减少 TGF  $\beta$  的产生, 是颇有希望的抗纤维化措施之一。

6.2 受体后信号转导分子水平的调控 如前所述 Smads 与 Smad7 表达失衡是肝纤维化发生的分子基础之一, 增加 Smad7 的表达或降低 R-Smads 的表达水平是理论上可行的基因治疗策略。将 tandem CAGACA 重复结构插入 CoLLA2 启动因子的 CAGA motif 区域后, 可显著降低

TGF  $\beta$ 1 诱导的转录反应; 应用 Smad2、3、4 的反义寡聚核苷酸或 cDNA 亦可有效阻断或抑制 TGF  $\beta$ 1 的生物学功能. 另有实验证实转染外源性 Smad7 的细胞失去了对 TGF  $\beta$ 1 的反应性效应; 将 Smad7 RNA 注射入非洲蟾蜍胚胎, 活动素与 TGF  $\beta$ 1 的效应被阻断; 以 RGD 三肽引物与 Smad7 基因合并构建重组质粒导入 HSC 中, HSC 中 RGD-Smad7 mRNA 表达明显增加, HSC 培养液中 III 型胶原水平明显降低.

尽管 TGF  $\beta$ -Smads 信号通路相关的基因治疗方法仍处于初始阶段, 其基础理论有待进一步研究, 基因干预方法有待进一步完善, 但已为肝纤维化防治提供了新的选择, 显示出其光明的前景和活跃的生命力. 作为最重要的促纤维化细胞因子之一, TGF  $\beta$  也具有细胞因子发挥作用的网络性、多效性特点, 单纯干预 TGF  $\beta$ -Smad 信号通路似乎不足以逆转肝纤维化病程, 并且干预 TGF  $\beta$  信号通路有可能导致细胞分化异常, 从而出现细胞生物学行为变化, 应给予足够重视.

总之, TGF  $\beta$ -Smads 信号转导通路与肝纤维化的发生、发展密切相关<sup>[66]</sup>, 虽然他在肝纤维化发生过程中的许多分子细节尚未阐明, 但众多的研究均已提示 TGF  $\beta$  为首要的促纤维化因子之一, 对 TGF  $\beta$ -Smad 信号转导通路的深入研究不仅有助于进一步阐明肝纤维化的发病机制, 也为肝纤维化的防治研究提供了重要的途径<sup>[67-77]</sup>.

## 7 参考文献

- Bissell DM, Roulot D, George J. Transforming growth factor  $\beta$  and the liver. *Hepatology* 2001;34:859-867
- 秦建平, 蒋明德. 肝星状细胞的表型及调控与肝纤维化. *世界华人消化杂志* 2001;9:801-804
- 刘芳, 刘金星. 转化生长因子  $\beta$ 1 在肝纤维化中的作用. *世界华人消化杂志* 2000;8:86-88
- Schuppan D, Porov Y. Hepatic fibrosis: From bench to bedside. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17(Suppl 3):S300-S305
- Lang A, Brenner DA. Gene regulation in hepatic stellate cell. *Ital J Gastroenterol Hepatol* 1999;31:173-179
- Gressner AM, Weiskirchen R, Breitkopf K, Dooley S. Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. *Front Biosci* 2002;7:793-807
- 姜慧卿, 张晓岚. 肝纤维化的发生机制. *世界华人消化杂志* 2000;8:687-689
- Kinnman N, Andersson U, Hultcrantz C. In situ expression of transforming growth factor-beta 1-3, latent transforming growth factor-beta binding protein and tumor necrosis factor-alpha in liver tissue from patients with chronic hepatitis C. *Scand J Gastroenterol* 2000;35:1294-1300
- Li D, Friedman SL. Liver fibrogenesis and the role of hepatic stellate cells: new insights and prospects for therapy. *J Gastroenterol Hepatol* 1999;14:618-633
- 史永军, 田宇彬, 赵清喜. Smads 蛋白家族的研究现状. *中华腹部疾病杂志* 2002;2:497-500
- 吴建新, 孟祥军, 陈源文, 李定国, 陆汉明. Smads 信息分子与肝星状细胞的活化. *胃肠病学和肝病学杂志* 2002;11:197-199
- Stopa M, Benes V, Ansorge W, Gressner AM, Dooley S. Genomic locus and promoter region of rat Smad7, an important antagonist of TGF beta signaling. *Mamm Genome* 2000;11:169-176
- 周馨, 李宣海, 李定国. 库普弗细胞与肝纤维化. *世界华人消化杂志* 2002;10:65-98
- 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
- Inagaki Y, Mamura M, Kanamaru Y, Greenwel P, Nemoto T, Takehara K, Ten Dijke P, Nakao A. Constitutive phosphorylation and nuclear localization of Smad3 are correlated with increased collagen gene transcription in activated hepatic stellate cells. *J Cell Physiol* 2001;187:117-123
- 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
- Dooley S, Delvoux B, Streckert M, Bonzel L, Stopa M, ten Dijke P, Gressner AM. Transforming growth factor beta signal transduction in hepatic stellate cells via Smad2/3 phosphorylation, a pathway that is abrogated during in vitro progression to myofibroblasts. TGF beta signal transduction during transdifferentiation of hepatic stellate cells. *FEBS Lett* 2001;502:4-10
- 许伟华, 吕晓霞, 朱菊人. 肝纤维化大鼠肝星状细胞凋亡的体内研究. *世界华人消化杂志* 2002;10:972-974
- 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
- Nakamura T, Sakata R, Ueno T, Sata M, Ueno H. Inhibition of transforming growth factor beta prevents progression of liver fibrosis and enhances hepatocyte regeneration in dimethylnitrosamine-treated rats. *Hepatology* 2000;32:247-255
- 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
- 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
- 蒋树林, 姚希贤, 孙玉凤. 肝纤维化的治疗. *世界华人消化杂志* 2000;8:684-686
- Kang KW, Choi SH, Ha JR, Kim CW, Kim SG. Inhibition of dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis by [5-(2-pyrazinyl)-4-methyl-1, 2-dithiol-3-thione] (oltipraz) in rats: suppression of transforming growth factor-beta1 and tumor necrosis factor-alpha expression. *Chem Biol Interact* 2002;139:61-77
- Sato M, Kakubari M, Kawamura M, Sugimoto J, Matsumoto K, Ishii T. The decrease in total collagen fibers in the liver by hepatocyte growth factor after formation of cirrhosis induced by thioacetamide. *Biochem Pharmacol* 2000;59:681-690
- Rivera CA, Bradford BU, Hunt KJ, Adachi Y, Schrum LW, Koop DR, Burchardt ER, Rippe RA, Thurman RG. Attenuation of CCl (4)-induced hepatic fibrosis by GdCl(3) treatment or dietary glycine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;281:200-207
- Garcia L, Hernandez I, Sandoval A, Salazar A, Garcia J, Vera J, Grijalva G, Muriel P, Margolin S, Armendariz-Borunda J. Pirfenidone effectively reverses experimental liver fibrosis. *J Hepatol* 2002;37:797-805
- Neuman MG, Benhamou JP, Bourliere M, Ibrahim A, Malkiewicz I, Asselah T, Martinot-Peignoux M, Shear NH, Katz GG, Akremi R, Benali S, Boyer N, Lecomte L, Le Breton V, Le Guludec G, Marcellin P. Serum tumour necrosis factor-alpha and transforming growth factor-beta levels in chronic hepatitis C patients are immunomodulated by therapy. *Cytokine* 2002;17:108-117
- Bissell DM. Chronic liver injury, TGF-beta, and cancer. *Exp Mol Med* 2001;33:179-190
- Kanzler S, Baumann M, Schirmacher P, Dries V, Bayer E, Gerken G, Dienes HP, Lohse AW. Prediction of progressive liver fibrosis in hepatitis C infection by serum and tissue levels of transforming growth factor-beta. *J Viral Hepat* 2001;8:430-437
- Jia JD, Bauer M, Cho JJ, Ruehl M, Milani S, Boigk G, Riecken EO, Schuppan D. Antifibrotic effect of silymarin in rat secondary biliary fibrosis is mediated by downregulation of procollagen alpha1(I) and TIMP-1. *J Hepatol* 2001;35:392-398
- Jonsson JR, Clouston AD, Ando Y, Kelemen LI, Horn MJ, Adamson MD, Purdie DM, Powell EE. Angiotensin-converting enzyme inhibition attenuates the progression of rat hepatic fibrosis. *Gastroenterology* 2001;121:148-155

- 33 Paizis G, Gilbert RE, Cooper ME, Murthi P, Schembri JM, Wu LL, Rumble JR, Kelly DJ, Tikellis C, Cox A, Smallwood RA, Angus PW. Effect of angiotensin II type 1 receptor blockade on experimental hepatic fibrogenesis. *J Hepatol* 2001;35:376-385
- 34 Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, Ikenaka Y, Noguchi R, Nakatani T, Tsujinoue H, Fukui H. Angiotensin-II type 1 receptor interaction is a major regulator for liver fibrosis development in rats. *Hepatology* 2001;34:745-750
- 35 Di Sario A, Bendia E, Svegliati Baroni G, Ridolfi F, Casini A, Ceni E, Saccomanno S, Marziani M, Trozzi L, Sterpetti P, Taffetani S, Benedetti A. Effect of pirfenidone on rat hepatic stellate cell proliferation and collagen production. *J Hepatol* 2002;37:584-591
- 36 Li CX, Li L, Lou J, Yang WX, Lei TW, Li YH, Liu J, Cheng ML, Huang LH. The protective effects of traditional Chinese medicine prescription, Han-Dan-Gan-Le, on CCl<sub>4</sub>-induced liver fibrosis in rats. *Am J Chin Med* 1998;26:325-332
- 37 Shimizu I. Sho-saiko-to: Japanese herbal medicine for protection against hepatic fibrosis and carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2000;15:D84-D90
- 38 Liu P, Hu YY, Liu C, Zhu DY, Xue HM, Xu ZQ, Xu LM, Liu CH, Gu HT, Zhang ZQ. Clinical observation of salvianolic acid B in treatment of liver fibrosis in chronic hepatitis B. *World J Gastroenterol* 2002;8:679-685
- 39 Xu JW, Gong J, Chang XM, Luo JY, Dong L, Hao ZM, Jia A, Xu GP. Estrogen reduces CCl<sub>4</sub>-induced liver fibrosis in rats. *World J Gastroenterol* 2002;8:883-887
- 40 Shimizu I. Antifibrogenic therapies in chronic HCV infection. *Curr Drug Targets Infect Disord* 2001;1:227-240
- 41 康文臻, 谢玉梅, 聂青和, 张岩, 郝春秋, 王久平, 陈伟红. 苦参素对实验性大鼠肝纤维化防治作用的研究. 世界华人消化杂志 2003;11:195-198
- 42 杨新波, 黄正明, 王建华. 肝纤维化的药物治疗. 世界华人消化杂志 2002;10:956-957
- 43 Zhong Z, Froh M, Wheeler MD, Smutney O, Lehmann TG, Thurman RG. Viral gene delivery of superoxide dismutase attenuates experimental cholestasis-induced liver fibrosis in the rat. *Gene Ther* 2002;9:183-191
- 44 George J, Roulot D, Koteliensky VE, Bissell DM. In vivo inhibition of rat stellate cell activation by soluble transforming growth factor  $\beta$  type II receptor: a potential new therapy for hepatic fibrosis. *Medical Sciences* 1999;96:12719-12724
- 45 Yata Y, Gotwals P, Koteliensky V, Rockey DC. Dose-dependent inhibition of hepatic fibrosis in mice by a TGF- $\beta$  soluble receptor: implications for antifibrotic therapy. *Hepatology* 2002;35:1022-1030
- 46 Ueno H, Sakamoto T, Nakamura T, Qi Z, Astuchi N, Takeshita A, Shimizu K, Ohashi H. A soluble transforming growth factor beta receptor expressed in muscle prevents liver fibrogenesis and dysfunction in rats. *Hum Gene Ther* 2000;11:33-42
- 47 Arias M, Lahme B, Van de Leur E, Gressner AM, Weiskirchen R. Adenoviral delivery of an antisense RNA complementary to the 3' coding sequence of transforming growth factor-beta1 inhibits fibrogenic activities of hepatic stellate cells. *Cell Growth Differ* 2002;13:265-273
- 48 Jiang W, Wang J, Yang C, Wang Y, Liu W, He B. Effects of antisense transforming growth factor beta receptor 1 expressing plasmid on pig serum-induced rat liver fibrosis. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2002;82:1160-1164
- 49 刘成海, 李风华, 顾宏图, 胡义扬, 刘平, 刘成.  $\gamma$  - 干扰素对大鼠二甲亚硝胺肝纤维化肝脏胶原代谢的作用. 世界华人消化杂志 2002;10:313-316
- 50 黄正明, 杨新波, 于仁变. 肝硬化的药物治疗. 世界华人消化杂志 2002;10:957-958
- 51 潘勤, 李定国, 汪余勤, 徐芳芹. 生长抑素对肝星状细胞的影响机制. 世界华人消化杂志 2002;10:1250-1252
- 52 胡怡秀, 刘秀英, 丘丰, 胡余明, 周月婵, 臧雪冰, 聂焱. 甘泰康对抗大鼠免疫性肝纤维化的实验研究. 世界华人消化杂志 2002;10:1460-1462
- 53 姚欣, 姚希贤, 修贺明, 高君萍, 张玉琢. 活血化淤中药益肝浓缩煎剂对大鼠肝纤维化的作用. 世界华人消化杂志 2002;10:544-548
- 54 郭传勇, 申振宇, 钟敏章, 钱珍华. 清肝饮对大鼠肝纤维化 N - 乙酰 -  $\beta$  - 氨基葡萄糖苷酶活性的影响. 世界华人消化杂志 2002;10:227-238
- 55 赵稳兴, 陈志明, 候辉, 梁崇礼, 庞荣清, 赵彬, 陈志龙. 木犀草素降低 CCl<sub>4</sub> 诱导的大鼠肝纤维化. 世界华人消化杂志 2002;10:779-782
- 56 贺德, 曾志良, 曹建华, 彭爱军, 向红霞. 阿魏酸钠抗大鼠肝纤维化. 世界华人消化杂志 2002;10:240-241
- 57 刘玉侃, 沈薇. 虫草菌丝对大鼠实验性肝纤维化肝细胞增生的影响. 世界华人消化杂志 2002;10:388-391
- 58 崔云华, 王晓玲, 刘晴, 刘平. 丹参酸乙的抗氧化作用对大鼠肝星状细胞增生的影响. 世界华人消化杂志 2002;10:317-319
- 59 孙玉凤, 姚希贤, 蒋树林. 肝纤维化的中医中药治疗. 世界华人消化杂志 2000;8:686-687
- 60 Liu CH, Hu YY, Wang XL, Liu P, Xu LM. Effects of salvianolic acid-A on NIH/3T3 fibroblast proliferation, collagen synthesis and gene expression. *World J Gastroenterol* 2000;6:361-364
- 61 Du WD, Zhang YE, Zhai WR, Zhou XM. Dynamic changes of type I, III and IV collagen synthesis and distribution of collagen-producing cells in carbon tetrachloride-induced rat liver fibrosis. *World J Gastroenterol* 1999;5:397-403
- 62 曾维政, 吴晓玲, 蒋明德, 陈晓斌, 徐辉, 王钊, 熊碧君. 复方红景天对大鼠肝组织转化生长因子  $\beta_1$  mRNA 表达的影响. 中国中西医结合消化杂志 2002;10:138-141
- 63 崔巍, 苏小林, 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
- 64 刘诗权, 于皆平, 罗和生, 冉宗学. 银杏叶萃取物对大鼠纤维化肝脏 NF -  $\kappa$ B 的影响. 世界华人消化杂志 2002;10:922-926
- 65 蒋树林, 姚希贤, 吕涛. 丹参抑制大鼠肝纤维化线粒体脂质过氧化. 世界华人消化杂志 2002;10:1253-1256
- 66 Kusunose M, Qiu B, Cui T, Hamada A, Yoshioka S, Ono M, Miyamura M, Kyotani S, Nishioka Y. Effect of Sho-saiko-to extract on hepatic inflammation and fibrosis in dimethylnitrosamine induced liver injury rats. *Biol Pharm Bull* 2002;25:1417-1421
- 67 Guo MZ, Li XS, Xu HR, Mei ZC, Shen W, Ye XF. Rhein inhibits liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in rats. *Acta Pharmacol Sin* 2002;23:739-744
- 68 Yuen MF, Norris S, Evans LW, Langley PG, Hughes RD. Transforming growth factor-beta 1, activin and follistatin in patients with hepatocellular carcinoma and patients with alcoholic cirrhosis. *Scand J Gastroenterol* 2002;37:233-238
- 69 Wei HS, Li DG, Lu HM, Zhan YT, Wang ZR, Huang X, Zhang J, Cheng JL, Xu QF. Effects of AT1 receptor antagonist, losartan, on rat hepatic fibrosis induced by CCl<sub>4</sub>(4). *World J Gastroenterol* 2000;6:540-545
- 70 Raetsch C, Jia JD, Boigk G, Bauer M, Hahn EG, Riecken EO, Schuppan D. Pentoxifylline downregulates profibrogenic cytokines and procollagen I expression in rat secondary biliary fibrosis. *Gut* 2002;50:241-247
- 71 Murata T, Arai S, Nakamura T, Mori A, Kaido T, Furuyama H, Furumoto K, Nakao T, Isobe N, Imamura M. Inhibitory effect of Y-27632, a ROCK inhibitor, on progression of rat liver fibrosis in association with inactivation of hepatic stellate cells. *J Hepatol* 2001;35:474-481
- 72 Williams EJ, Benyon RC, Trim N, Hadwin R, Grove BH, Arthur MJ, Unemori EN, Iredale JP. Relaxin inhibits effective collagen deposition by cultured hepatic stellate cells and decreases rat liver fibrosis in vivo. *Gut* 2001;49:577-583
- 73 Kang KW, Ha JR, Kim CW, Kim ND, Kim SG. 2-(Allylthio) pyrazine, a cancer chemopreventive agent, inhibits liver fibrosis induced by dimethylnitrosamine in rats: role of inhibition of transforming growth factor-beta1 expression. *Pharmacol Toxicol* 2001;89:23-29
- 74 Wells RG. Fibrogenesis. V. TGF- $\beta$  signaling pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000;279:G845-G850
- 75 Wu J, Zern MA. Hepatic stellate cells: a target for the treatment of liver fibrosis. *J Gastroenterol* 2000;35:665-672
- 76 Flisiak R, Pytel-Krolczuk B, Prokopowicz D. Circulating transforming growth factor beta(1) as an indicator of hepatic function impairment in liver cirrhosis. *Cytokine* 2000;12:677-681
- 77 Fujimoto J. Gene therapy for liver cirrhosis. *J Gastroenterol Hepatol* 2000;15:D33-36



# 消化管发育中上皮细胞凋亡研究进展

李 均, 汪维伟

李均, 汪维伟, 重庆医科大学组胚教研室 重庆市 400016  
项目负责人: 汪维伟, 400016, 重庆市, 重庆医科大学组胚教研室.  
www.wjgnet.com  
电话: 023-68485050  
收稿日期: 2002-05-22 接受日期: 2002-10-22

## 摘要

细胞凋亡是在某些生理或病理条件下, 细胞接受到某种信号的触发后主动参与并遵循一定程序的较慢的死亡过程. 消化管在发育过程中, 消化管上皮广泛存在着细胞凋亡现象. 胎鼠肠上皮中凋亡小体主要分布在近上皮的肠腔面, 但在食管中则广泛分布于上皮各层. 食管, 十二指肠和结肠上皮凋亡小体密度的峰值分别出现在胚胎 12 d、15 d、16 d, 食管上皮的凋亡小体密度峰值明显高于十二指肠和结肠. 细胞凋亡对消化管形态发生起着重要的作用, 是适应发育进程的需要, 在消化管发育过程中, 细胞自然凋亡规律一旦失常, 个体即不能正常发育或发生畸形. 消化管发育中上皮细胞凋亡受到多种因素的调控, 其中基因调控起着关键的作用. Bcl-2 家族、p53 和 c-myc 等多种基因以及细胞因子共同参与了其调控. 胚胎发育过程中发生的增生和凋亡, 并不是随机出现的, 而是发生在胚胎发育过程特定部位和特定时间, 并有着严格的时空程序.

李均, 汪维伟. 消化管发育中上皮细胞凋亡研究进展. 世界华人消化杂志 2003; 11(10):1606-1608  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1606.asp>

## 0 引言

细胞凋亡(apoptosis)首先是由英国病理学家 Kerr et al 在 1972 年提出的, 用以描述一种在形态学上有别于细胞坏死(necrosis)的细胞死亡过程. 细胞凋亡是在某些生理或病理条件下, 细胞接受到某种信号的触发后主动参与并遵循一定程序的较慢的死亡过程. 它是机体的一种基本生理机制, 贯穿于机体的整个生命活动过程<sup>[1, 2]</sup>. 关于胚胎消化管上皮发生的调控机制, 多认为与肠上皮细胞增生与凋亡, 肠壁平滑肌的限制作用, 间充质及某些活性物质的诱导作用等因素有关<sup>[3-6]</sup>. 细胞凋亡在消化管发育过程中具有重要的生物学意义. 消化管发育中上皮细胞凋亡受到多种因素的调控, 其中基因调控起着关键的作用. Bcl-2 家族、p53 和 c-myc 等多种基因以及细胞因子共同参与了其调控.

## 1 消化管发育中的细胞凋亡

### 1.1 早在十九纪末就有人报道胚胎发育过程中肠上皮细

胞中有颗粒状的包含物, 被称为胎粪小体(meconium corpuscle), 认为是肠上皮细胞吸收肠腔内物质形成的<sup>[7]</sup>. 1980 年代通过大鼠和人胚胎结肠发生的电镜观察, 揭示了胎粪小体实属肠上皮细胞凋亡崩解后所形成的有膜被的凋亡小体(apoptosis bodies), 可被邻近的上皮细胞吞噬或脱入肠腔内<sup>[8, 9]</sup>. 胚胎发育至一定阶段, 肠腔表面的上皮细胞核固缩浓染, 细胞退变脱落<sup>[10]</sup>. 凋亡细胞在电镜下有其形态特征, 早期细胞凋亡表现为核固缩并凝集成块; 晚期时核染色质固缩在核膜周边成半月状或环状, 内质网极度扩张, 线粒体改变不明显. 以后凋亡细胞形成多个有膜包裹的凋亡小体<sup>[11-14]</sup>. 用 TUNEL (In-situ dTdT-mediated dUTP nick end labeling) 法可原位标记凋亡细胞的核及含核碎片的凋亡小体. Hall et al<sup>[15]</sup> 还在光镜下计数小鼠 HE 染色切片中胃肠上皮的凋亡小体. 汪维伟 et al<sup>[16]</sup> 报道在胎鼠 HE 染色石蜡切片中见消化管上皮内凋亡小体直径在 1.20  $\mu$ m-6.25  $\mu$ m, 圆形, 内含 1 至多个深染核碎片和强嗜酸性胞质或仅含强嗜酸性胞质, 外有清楚晕环, 在未见淋巴细胞浸润的胚胎消化管上皮中较易识别, 其分布与 TUNEL 法原位标记的凋亡细胞在上皮中分布一致. 胎鼠肠上皮中凋亡小体主要分布在近上皮的肠腔面, 但在食管中则广泛分布于上皮各层. 食管, 十二指肠和结肠上皮凋亡小体密度的峰值分别出现在胚胎 12 d、15 d、16 d, 食管上皮的凋亡小体密度峰值明显高于十二指肠和结肠.

1.2 凋亡不是可有可无, 无规律的现象, 而是多细胞动物生命活动过程中不可缺少的部分<sup>[17]</sup>. 一方面是个体正常发育成熟过程所必需的, 另一方面也是动物维持个体正常细胞数量所必须的. 在消化管发育过程中的凋亡具有重要的生物学意义, 首先是适应发育进程的需要. 在胎鼠发育过程中肠上皮近游离面和食管上皮各层均有大量凋亡小体出现, 说明细胞凋亡在消化管上皮发生中起着重要作用. 在胚胎发育至人胚第 7-8 wk 以及鼠胚第 13-14 d 时, 肠上皮细胞大量分裂增生, 上皮变为复层, 肠腔变小或“闭塞”; 随后复层上皮内的细胞间出现次级腔, 并渐与原发腔相通连并融合, 肠腔扩大, 是肠绒毛形成的基础. 原发腔和次级腔的扩大, 肠绒毛的形成以及复层上皮向单层上皮的转变中均依赖于细胞凋亡. 消化管的发育是在消化管上皮细胞的增生与自然凋亡的动态平衡中进行的. 可以说, 没有凋亡就没有消化管的发育. 其次, 在消化管发育过程中, 细胞自然凋亡规律一旦失常, 个体即不能正常发育或发生畸形, 例如, 先天性肠狭窄或闭锁, 就是由于应

该凋亡的细胞没有凋亡而造成的; 而不应该凋亡的细胞出现凋亡则可造成如气管 - 食管瘘这样的畸形. 此外, 胚胎消化管发育过程中存在广泛的细胞迁移现象也可以通过凋亡清除异常迁移的细胞, 以保证胚胎的正常发育<sup>[18]</sup>. 但也有人认为细胞凋亡在结肠上皮的组织发生中意义不大<sup>[19]</sup>.

## 2 消化管发育中凋亡相关基因的表达和调节

2.1 由于分子生物学的飞速发展, 近年来有关消化管上皮发生中凋亡分子机制的研究取得了可喜的进展, 有关凋亡的新基因不断被发现. Bcl-2<sup>[20, 21]</sup> (B-cell lymphoma/leukemia-2) 基因是 1984 年 Tsujimoto et al 从滤泡性淋巴瘤中分离出来的一种癌基因. Bcl-2 蛋白是调节凋亡的关键元件, 他通过抑制半胱天冬蛋白酶 Caspase (又称为死亡蛋白酶) 激活所需的配体(adaptor)活性而使细胞生存, 所以 Bcl-2 又称生存蛋白. 基因 Bcl-2 及 Bcl-2 蛋白不影响细胞的增生率而是抑制或阻断多种因素引起的细胞凋亡. 随着研究的深入, Bcl-2 基因家族不断扩大, 他们有的对凋亡起抑制作用, 例如: Bcl-2、Bcl-xl、A1、Mcl-1、ced-9 等; 有的则为凋亡的促进者, 例如: Bcl-x、Bax、Bad、Mcl-1 等. 这些基因均与 Bcl-2 有较高同源性. Novack 和 Korsmeyer et al<sup>[22]</sup> 在 C3H 10T1/2-Cl8 小鼠中观察到: 在胚胎 14.5 d 时, 肠上皮细胞尚未分化, Bcl-2 在肠管上皮中所有的细胞均有高水平表达; 到胚胎 16.5 时, 肠管已有绒毛形成, 但所有肠管上皮细胞继续表达 Bcl-2, 其表达水平可能比 14.5 d 时有所下降; 到胚胎 18.5 d 时, 绒毛更明显, 细胞已经开始分化, Bcl-2 表达于是局限在绒毛基底部. Bcl-2 表达于全部未分化肠上皮细胞, 却在发育成熟的绒毛里局限表达于未分化祖细胞带. 研究表明 Bcl-2 在人胚胎组织中表达比在成年后更为广泛. 因此, 未成熟细胞表达 Bcl-2 是为了克服特殊时期的细胞凋亡. 尽管 Bcl-2 在正常胚胎中有广泛表达, 但在 Bcl-2 缺陷小鼠中除了肾脏以外的许多器官仍正常发育, 这可能是由于 Bcl-2 相关分子家族在胚胎发生过程中提供了过剩的死亡抑制<sup>[22]</sup>. Vachon 和 Cardin et al<sup>[23]</sup> 利用原位末端标记(in situ terminal uridine deoxynucleotidy1 nick-end labelling, ISEL)方法检测人胚胎 9-20 wk 空肠发育过程中肠细胞的凋亡. 在 9-17 wk 时肠细胞凋亡不明显. 但是, 从 18 wk 开始, ISEL 阳性细胞可在绒毛顶部上皮规则地检测到. 利用免疫荧光方法发现 Bcl-2 蛋白家族, 包括 Bcl-2、Bcl-X(L)、Mcl-1、Bax、Bak、Bad 六个同系物和一个非同系物分子 Bag-1 全部表达于 19-20 wk 肠上皮细胞. 而 Bcl-2 同系物在 18-20 wk 以前沿着肠腺 - 绒毛轴上皮中呈区域化的梯度表达. Western blot 分析表明在肠腺 - 绒毛轴形态发生过程中, Bcl-2 同系物表达的调节是与其区域化的上皮表达相平行的.

2.2 c-myc 是凋亡调节有关基因中的成员之一, 他有直接调节 Bcl-2 基因转录的作用, 在胃肠的胚胎发育

中, c-myc 和 Bcl-2 经常是联合表达. c-myc 在胎鼠结肠黏膜早期中有所表达, 在鼠和人的结肠上皮中表达一直持续到成年. Zorbas et al<sup>[24]</sup> 等用 c-myc 基因剔除小鼠观察到: 在结肠上皮腔面和腺体中的细胞凋亡都增加, 而 Bcl-2 表达显著减少. 因此认为 c-myc 是通过控制 Bcl-2 的转录而调节凋亡的. c-myc 在成年小鼠小肠上皮中的表达水平与结肠表达相似. 但是, 在发育过程中, c-myc 基因缺失小鼠在胚胎 14 d 时, 小肠 Bcl-2 的表达却不受影响. 因此, 虽然 Bcl-2 可能在结肠中部分被 c-myc 所调节, 但这种情况不出现在小肠中.

2.3 p53 是一种典型的抑癌基因, 对细胞生长起负调节作用(negative regulation), 促进细胞凋亡<sup>[25-27]</sup>. 大量文献表明 p53 基因虽可诱导细胞凋亡, 但并非所有细胞的凋亡过程均必须. 小鼠肺发育的任何阶段均未见 p53 的阳性表达, 对不同发育阶段的人胎肺组织的检测也出现同一结果<sup>[28]</sup>. p53 缺失小鼠肠腺中细胞凋亡水平保持正常<sup>[29]</sup>. 在小鼠胚胎 14.5 d 时, 所有复层肠上皮均表达 p53, 到胚胎 16.5 天时, 肠隐窝里的上皮细胞表达 p53 明显强于覆盖绒毛上的细胞; 形成黏膜下层的中胚层细胞仅表达低水平的 p53 mRNA. 在胎鼠肠腺/绒毛轴形成后, p53 的表达就局限于腺上皮<sup>[30]</sup>. 胚胎发育过程中, p53 高水平表达于未分化和增生细胞中. 因此 p53 可能与细胞分化过程调节及细胞成熟有关<sup>[31]</sup>. p53 基因家族, 包括 p63 和 p73, 他们具有相互重叠的功能又各有其不同的特点. 这些家族成员都具有相似的结构, 此结构在诱导发育凋亡中具有重要作用. 与正常小鼠相比, 在 p53 缺失小鼠的食管复层上皮有 p63 高表达, 因此 p63 表达可能与 p53 缺陷有关<sup>[32]</sup>.

2.4 抑制凋亡的基因 Survivin et al<sup>[33]</sup> 是 IAP 基因家族成员之一, 在胎鼠 11.5 d 胃肠管上皮中有表达. 同样, 在人胎胃和肠腺体底部表达水平很高, 而在绒毛上皮中没有表达. 由此可见, Survivin 基因在胃肠发育过程中具有重要作用. 此外, Merritti 的研究结果显示啮齿类动物胃肠道上皮细胞在转化的原癌基因 p53 的介导下, 细胞凋亡的数量增加. 将原癌基因 c-myc, c-Ha-ras 转染第 14 d 大鼠胚胎细胞后, 在放射诱导下, 转染 c-myc 或 c-Ha-ras 和 c-myc 的胚胎细胞凋亡数量增加, 而只转染 c-Ha-ras 的胚胎细胞有抗放射诱导细胞凋亡的作用.

3 消化管发育中与细胞凋亡相关的细胞因子的调节  
细胞因子与消化管发育中凋亡密切相关. 文献报道, 表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)和转化生长因子- $\alpha$  (transforming growth factor- $\alpha$ , TGF- $\alpha$ ) 在胚胎生长发育过程中, 通过与相应膜受体结合具有调控上皮细胞生长的作用. EGF 在肠上皮中有阻止 TGF- $\beta$  诱导的凋亡的作用. Iwanaga et al 对成年大鼠肠上皮细胞凋亡的研究, 见绒毛顶部的细胞发生凋亡, 可能与巨噬细胞分泌的肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 等细胞因子的

化学作用等因素有关。TGF- $\beta$ 是一种多功能多肽,调节肠上皮细胞增生、移行、分化及细胞外基质的形成。Barnard 报告了TGF- $\beta$ 可能在上皮细胞离开增生区时,阻止细胞增生并维持其最终的分化状态。TGF- $\beta$ 还对体外培养IEC-6肠上皮细胞增生有强烈的抑制作用。TGF- $\beta$ 可以诱导结肠上皮细胞凋亡,免疫组化研究表明,TGF- $\beta$ 1主要表达于小肠绒毛顶部,而在结肠组织中,则主要表达于结肠腺顶部不再分裂的细胞。在腺顶部的细胞中TGF- $\beta$ 的阳性表达和Bcl-2的阴性表达则表明这些细胞处于凋亡状态中。

#### 4 细胞增生与细胞凋亡

细胞分裂增生与细胞凋亡,从功能的角度来看是两个截然相反的生物学现象。然而近年来随着人们对这两个过程研究的深入,有越来越多的证据表明:这两个原来截然相反的过程,实际上有着非常密切的联系。Vachon et al<sup>[23]</sup>报道人胚胎肠细胞的凋亡与腺体-绒毛轴的细胞增生和分化有关。发育生物学认为,许多精细器官的胚胎发生,无一例外地包含着细胞凋亡的机制。而胚胎发育过程中发生的增生和凋亡,并不是随机出现的,而是发生在胚胎发育过程特定部位和特定时间,并有着严格的时空程序。关于二者的相互影响和联系,尚未见到系统的报道。

关于胚胎肠上皮凋亡的机制,Sbarbati et al 认为与表层上皮细胞血供不足有关;Knox et al 认为远离基底层的细胞可能因接受基膜的生存信息减弱而易发生凋亡<sup>[26]</sup>;Iwannaga et al 则报道成体大鼠小肠绒毛固有层的巨噬细胞能诱导上皮细胞凋亡。更多资料表明,凋亡在胚胎消化管发育过程中受多种基因和生长因子调节。随着分子生物学的迅速发展,已发现了许多与细胞凋亡有关的调控基因,初步说明细胞凋亡是受基因控制的,是主动连续的程序化反应。但是,凋亡的调控机制是个十分复杂的过程,许多新基因还有待发现,许多调节因素以及基因间的相互作用关系尚需研究。

#### 5 参考文献

- Correa P, Miller MJ. Carcinogenesis, apoptosis and cell proliferation. *Br Med Bull* 1998;54:151-162
- 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
- Kaestner KH, Silberg DG, Traber PG, Schutz G. The mesenchymal winged helix transcription factor Fkh6 is required for the control of gastrointestinal proliferation and differentiation. *Genes Dev* 1997;11:1583-1595
- Hocker M, Wiedenmann B. Molecular mechanisms of enteroendocrine differentiation. *Ann N Y Acad Sci* 1998;859:160-174
- Kedinger M, Duluc I, Fritsch C, Lorentz O, Plateroti M, Freund JN. Intestinal epithelial-mesenchymal cell interactions. *Ann N Y Acad Sci* 1998;859:1-17
- Aliaga JC, Deschenes C, Beaulieu JF, Calvo EL, Rivard N. Requirement of the MAP kinase cascade for cell cycle progression and differentiation of human intestinal cells. *Am J Physiol* 1999;277(3 Pt 1):G631-641
- Ruebner BH, Kanayama R, Bronson RT, Blumenthal S. Meconium corpuscles in intestinal epithelium of fetal and newborn primates. *Arch Pathol* 1974;98:396-399
- Harmon B, Bell L, Williams L. An ultrastructural study on the "meconium corpuscles" in rat foetal intestinal epithelium with particular reference to apoptosis. *Anat Embryol* 1984;170:119-124
- Williams L, Bell L. An ultrastructural study of meconium corpuscles in human foetal colon. *Anat Embryol* 1985;171:373-376
- Mathan M, Moxey PC, Trier JS. Morphogenesis of fetal rat duodenal villi. *Am J Anat* 1976;146:73-92
- 郭敏, 杜靖, 穆长征, 邵佑之. 小鼠肾脏发育中的细胞凋亡. *解剖学报* 2001;32:268-270
- Camp V, Martin P. The role of macrophages in clearing programmed cell death in the developing kidney. *Anat Embryol (Berl)* 1996;194:341-348
- Kim J, Lee GS, Tisher CC, Madsen KM. Role of apoptosis in development of the ascending thin limb of the loop of Henle in rat kidney. *Am J Physiol* 1996;271(4 Pt 2):F831-845
- Kim J, Cha JH, Tisher CC, Madsen KM. Role of apoptotic and nonapoptotic cell death in removal of intercalated cells from developing rat kidney. *Am J Physiol* 1996;270(4 Pt 2):F575-592
- Hall PA, Coates PJ, Ansari B, Hopwood D. Regulation of cell number in the mammalian gastrointestinal tract: the importance of apoptosis. *J Cell Sci* 1994;107(Pt 12):3569-3577
- 汪维伟, 曾小川. 小鼠胚胎食管和肠上皮的电镜学研究. *解剖学报* 2000;31:73-76
- Ramachandran A, Madesh M, Balasubramanian KA. Apoptosis in the intestinal epithelium: its relevance in normal and pathophysiological conditions. *J Gastroenterol Hepatol* 2000;15:109-120
- Potten CS. Epithelial cell growth and differentiation. II. Intestinal apoptosis. *Am J Physiol* 1997;273:G253-G257
- Colony PC, Conforti JC. Morphogenesis in the fetal rat proximal colon effects of cytochalasin D. *Anat Rec* 1993;235:241-252
- Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 1998;281:1322-1326
- Ichimiya M, Chang SH, Liu H, Berezsky IK, Trump BF, Amstad PA. Effect of Bcl-2 on oxidant-induced cell death and intracellular Ca<sup>2+</sup> mobilization. *Am J Physiol* 1998;275(3 Pt 1):C832-839
- Novack DV, Korsmeyer SJ. Bcl-2 protein expression during murine development. *Am J Pathol* 1994;145:61-73
- Vachon PH, Cardin E, Harnosis C, Reed JC, Vezina A. Early establishment of epithelial apoptosis in the developing human small intestine. *Int J Dev Biol* 2000;44:891-898
- Zorbas M, Sicurella C, Bertonecello I, Venter D, Ellis S, Mucenski ML, Ramsay RG. C-myb is critical for murine colon Development. *Oncogene* 1999;18:5821-5830
- Reiser M, Neumann I, Schmiegel W, Wu PC, Lau JY. Induction of cell proliferation arrest and apoptosis in hepatoma cells through adenoviral-mediated transfer of p53 gene. *J Hepatol* 2000;32:771-782
- Reed JC. Double identity for proteins of the Bcl-2 family. *Nature* 1997;387:773-776
- Vousden KH. p53: death star. *Cell* 2000;103:691-694
- 王樯, 黄中新, 夏潮涌. 小鼠肺发育中细胞增生与凋亡及相关调控基因的表达. *解剖学报* 2000;31:372-374
- Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, McArthur MJ, Montgomery CA Jr, Butel JS, Bradley A. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumors. *Nature* 1992;356:215-221
- Sattar A, Robson SC, Patel HR, Angus B, Campbell FC. Expression of growth regulatory genes in a SCID mouse-human model of intestinal epithelial regeneration. *J Pathol* 1999;187:229-236
- Schmid P, Lorenz A, Hameister H, Montenarh M. Expression of p53 during mouse embryogenesis. *Development* 1991;113:857-865
- Suliman Y, Opitz OG, Avadhani A, Burns TC, El-Deiry W, Wong DT, Rustgi AK. P63 expression is associated with p53 loss in oral-esophageal epithelia of p53-deficient mice. *Cancer Res* 2001;61:6467-6473
- Adida C, Crotty PL, McGrath J, Berrebi D, Diebold J, Altieri DC. Developmentally regulated expression of the novel cancer anti-apoptosis gene survivin in human and mouse differentiation. *Am J Pathol* 1998;152:43-49

# 生物芯片技术及其在消化系统疾病研究中的应用

蒋业贵, 李兆申

蒋业贵, 李兆申, 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: 蒋业贵, 200433, 上海市, 中国人民解放军第二军医大学长海  
医院消化内科. jiangyegui@yahoo.com.cn  
电话: 021-25070556  
收稿日期: 2003-01-04 接受日期: 2003-02-19

## 摘要

生物芯片技术因其可在一次反应中进行信息的平行分析, 而受到众多研究者的瞩目, 特别是在人类基因组计划研究工作中的应用, 不仅极大地促进了该项工作的进行, 也使芯片技术在短短的几年间得到了长足地发展, 并迅速在杂交测序以外的领域得到广泛的应用. 利用生物芯片的高通量特性, 系统地研究生物体系表达的蛋白质功能及其相互作用, 使蛋白质芯片在最近几年有了迅速的发展. 生物芯片技术不断应用于食管癌、肝癌、胰腺癌和结直肠癌等消化系统肿瘤以及幽门螺杆菌感染相关性疾病和病毒性肝炎等消化系统疾病的研究中, 对阐明其发病机制以及诊断和治疗起着巨大的推动作用.

蒋业贵, 李兆申. 生物芯片技术及其在消化系统疾病研究中的应用. 世界华人消化杂志 2003;11(10):1609-1613  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1609.asp>

## 0 引言

生物芯片由美国 Affymetrix 公司首先开发, 芯片技术进步迅速, 并呈现发展高峰, 其特点是高度平行性、多样性、微型化和自动化<sup>[1]</sup>. 按芯片上探针的不同, 生物芯片可分为基因芯片和蛋白质(肽)芯片. 如果芯片上固定的分子是寡核苷酸探针或靶 DNA, 则称为基因芯片<sup>[2-6]</sup>; 如果芯片上固定的是肽或蛋白质, 则称为蛋白质芯片或肽芯片<sup>[7-9]</sup>. 本文就基因芯片和蛋白质芯片技术在消化系统疾病研究中的应用作一综述.

## 1 生物芯片技术概述

1.1 生物芯片的种类 按基因芯片的用途分为表达芯片、基因组芯片和测序芯片; 按芯片上核苷酸的长度分为寡核苷酸芯片、cDNA 芯片和基因组芯片. 根据芯片上固定的蛋白质是否有活性, 蛋白质芯片可以分为两种形式: 无活性芯片和有活性芯片. 无活性芯片是将已经合成好的蛋白质点在芯片上, 有活性芯片则是在芯片上点上生物体(如细菌), 在芯片上原位表达蛋白质. 活性芯片可以提供模拟的机体内环境, 对于蛋白质功能分析更为有利<sup>[10, 11]</sup>. 根据反应类型, 蛋白质芯片可分为抗

原 - 抗体芯片、受体 - 配体芯片、酶 - 底物芯片等; 根据芯片的用途, 蛋白质芯片又可分为蛋白质组研究芯片、临床检测芯片、药物筛选芯片和代谢工程芯片等.

1.2 生物芯片的制备 基因芯片种类多, 制备方法也各不相同, 主要有两种基本方法<sup>[12, 13]</sup>: (1)原位合成: 主要有光引导聚合法和喷墨打印合成法(压电打印法)两种途径, 是目前制造高密度寡核苷酸芯片最为成功的方法, 适用于寡核苷酸; (2)合成点样法: 主要利用手工或自动点样装置将预先制备好的寡核苷酸或cDNA样本点在经特殊处理的玻璃片或其他材料上, 利用cDNA与载体之间共价交联或通过静电作用产生黏附, 适用于大片段DNA, 也适用于寡核苷酸和mRNA. 点样前需将递质表面包被氨基硅烷或多聚赖氨酸, 使之带上正电荷来黏附核酸分子. 除上述2种方法外, 还有用聚丙烯酰胺凝胶作为支持递质, 制成以凝胶块为阵点的芯片, 或者也可以通过导电的吡咯单体的聚合形成微阵列<sup>[14, 15]</sup>. 很多基因芯片的制备方法, 如光引导聚合法、合成点样等, 也可应用于蛋白质芯片的制备<sup>[16, 17]</sup>. 制备蛋白质芯片的主要困难之一是需要保持蛋白质的活性. 首先, 在荧光标记蛋白质的时候, 对反应体系中被检测的蛋白质需要进行适度的荧光标记. 如果每个蛋白质分子上标记的荧光分子过少, 则会影响到芯片检测蛋白质的灵敏度; 但如果每个蛋白质分子上标记的荧光分子过多, 则可能影响蛋白质的活性. 其次, 在固定化的过程中, 需要选择最佳的方案, 使蛋白质保持最好的结合能力. 影响因素包括耦联化学、缓冲液、制备蛋白质阵列和固定时所用的温度、湿度等. 最后, 在芯片表面抗原 - 抗体进行相互作用反应时所用的温度、湿度及探针蛋白质与靶蛋白质的浓度等也会影响其反应效率.

1.3 信号检测 最常用的荧光标记法使用激光共聚焦荧光扫描仪进行信号检测. 目前荧光检测主要有2种: 激光共聚焦荧光显微扫描和CCD荧光显微照相检测. 前者检测灵敏度、分辨率均较高, 但扫描时间长; 后者扫描时间短, 但灵敏度和分辨率不如前者. 目前的荧光检测系统还有待进一步完善与发展. 有研究者正试图绕过荧光标记, 建立新的检测系统, 以提高信号检测的灵敏度.

## 2 生物芯片在消化系统疾病研究中的应用

2.1 在消化系统肿瘤研究中的应用 Lu et al<sup>[18]</sup>应用cDNA芯片筛查了正常黏膜组织、轻度不典型增生、中度不典型增生、原位癌和鳞状细胞癌5个级别食管病变组织

细胞基因表达谱的改变,通过聚类分析发现了一批与食管癌发生、发展有关的基因。Kihara et al<sup>[19]</sup>应用基因表达谱芯片技术从20例应用同一化疗方案治疗的食管癌患者中发现大约有52个基因与术后生存率和化疗敏感性有关,并指出基因化疗敏感性积分与患者的预后具有显著相关性。陈少全 et al<sup>[20]</sup>利用cDNA芯片检测5例胃腺癌组织,发现上调基因11条,下调基因16条,下调的基因中有2条新基因。

李瑶 et al<sup>[21]</sup>从2例原发性肝细胞癌标本的4次重复实验筛选到1000条在肝细胞癌中差异表达的基因。Okabe et al<sup>[22]</sup>采用包含23040个基因的芯片分析了20例肝癌和癌旁组织基因表达的差异,发现促有丝分裂基因在大多数患者中的表达上调,HBV阳性肝癌中,表达水平改变的基因大多数编码代谢致癌物和抗癌药的酶类,与HCV阳性肝癌中基因表达的改变不同。

金钢 et al<sup>[23]</sup>用含4096个人cDNA基因的芯片对3例临床切除的胰腺癌和正常胰腺标本的基因表达谱进行分析,结果筛选出在3例胰腺癌和正常胰腺组织中均有差异表达的基因398条,其中新基因289条,旧基因109条。从旧基因中筛选出表达有显著差异的基因37条,其中在胰腺癌组织中上调基因20条,下调基因17条。在差异表达的基因中,有一些与肿瘤发生的发展有密切关系。张乐之 et al<sup>[24]</sup>用蛋白质芯片技术定量测定42名正常人、30例胰腺癌和16例胰腺炎患者血清12种肿瘤标志物的变化并对检测的效果进行评价。研究发现胰腺癌患者CA19-9、CA242和CA153明显升高,该蛋白质芯片测定的敏感性为70%,特异性为89.7%,阳性预测值为77.8%,阴性预测值为88.1%。虞先浚 et al<sup>[25]</sup>利用cDNA芯片分析胰腺癌相关基因表达谱,发现MBD1、EDG1等基因和过甲基化表达调控可能在胰腺癌发病机制中起关键作用。

Frantz et al<sup>[26]</sup>构建人结肠特异性cDNA芯片,筛选结肠癌、正常结肠黏膜和结肠转移灶的基因表达情况,发现与正常组织相比,其中59条是在癌组织中表达水平上调2倍和2倍以上的基因。Soeth et al<sup>[27]</sup>采用芯片检测CEA介导的结肠癌细胞基因表达谱的改变,通过273条基因的筛查,发现CEA改变不同癌相关基因组,特别是细胞周期和凋亡基因,CEA影响结肠癌细胞的凋亡,是结肠癌细胞的永生性因子。Alon et al<sup>[28]</sup>用代表6500个基因的寡核苷酸芯片研究结肠癌基因表达谱,并用表达谱数据对基因和组织进行聚类分析,广泛揭示了基因表达图谱的相关性。通过这种方法,可将基因分成功能群,用于疾病发生及临床诊断等方面的研究。有学者将结肠癌患者与非癌对照者的血清或排泄物样品通过蛋白质芯片进行了研究,分别用5种蛋白质芯片来分析,发现有一个13.8 kD的特殊相关蛋白,存在于结肠癌及其癌前病变患者的血清中,而在非癌或克隆病以及溃疡性结肠炎等良性肠病的患者中该蛋白缺如。因此通过检测血中是否有该蛋白存在可确定肠病

的良恶性并并对结肠癌做出早期筛查。邓安梅 et al<sup>[29]</sup>采用肿瘤诊断用蛋白质芯片对结直肠癌患者以及正常对照组、疾病对照组的血清进行检测分析,结果发现CEA、CA19-9、CA242联合检测结直肠癌患者血清阳性率可达83.3%。

2.2 在幽门螺杆菌(Hp)感染相关性研究中的应用 Hp感染的诊断至今仍然存在诸多问题,最根本的原因在于目前的方法不能同时兼备很高的灵敏性、特异性和易操作性。目前普遍采用电泳法,其结果有较大的误差,易造成污染和假阴性,且多为检测单一基因,效率低。基因芯片技术具有较高的灵敏性,用多种多点同步杂交法检测靶基因和自动化检测可确保检测的特异性和客观性。还可以对结果进行定量,对研究Hp与消化系统疾病的关系,指导Hp相关性疾病的治疗有重要价值。Hp与胃癌的发生有密切关系,Hp的长期感染可导致胃黏膜的恶变。胃癌的形成是在多种因素作用下,使胃黏膜逐步发展到癌前病变,再发展到胃癌的渐进过程。正常胃黏膜到癌前病变,以及癌前病变到胃癌的变化过程均存在特征性差异表达基因,应用基因芯片技术研究这些差异表达基因对于了解胃癌发生、发展和转归,指导临床治疗均具有重要意义。

Maeda et al<sup>[30]</sup>用cDNA芯片技术研究发现CagA阳性Hp上调胃癌细胞株2304条基因中的8条,其中6条基因经RT-PCR证实,等位基因cagE阴性突变不能上调这些基因。Israel et al<sup>[31]</sup>应用Hp全基因组芯片分析从不同临床相关疾病分离的Hp基因组差异,发现与致十二指肠溃疡菌株G1.11相比,B128菌株感染沙鼠后引起更严重的胃炎、溃疡和黏膜细胞增生凋亡紊乱。Salama et al<sup>[32]</sup>用Hp全基因组芯片检测不同菌株之间基因的改变,发现22%的基因对于1个或者多个菌株是非必需的,进而确定了Hp的1281条核心基因。阎小君 et al<sup>[33]</sup>制备Hp DNA芯片和Hp蛋白质芯片,以检测Hp及对Hp基因进行定性、定量及结构分析。同时通过mRNA差异显示技术从胃癌细胞株和正常胃黏膜细胞株中筛选出了154个差异表达基因,并对其中35个片段进行克隆和分析,已筛选出19个新序列。这些初步研究表明,基因芯片技术在基因分型、毒力相关基因以及对宿主基因表型的研究方面存在巨大的应用潜力和前景。

2.3 在病毒性肝炎研究中的应用 为了正确选择抗病毒治疗药物及评价其临床疗效,除了生化、免疫和病理指标外,还必须明确肝炎病毒的核酸结构和体液病毒核酸的含量。基因芯片技术能对所有肝炎病毒的分型、变异、突变和病毒核酸含量进行高通量、平行检测<sup>[34-37]</sup>。拉米夫定抗HBV治疗中常出现的YMDD变异,检测分析其耐药性,对于正确选择治疗病例,制订最佳治疗方案及提高临床疗效具有重要意义。基因芯片的高通量、平行检测技术针对引起YMDD变异的众多基因突变位点设计探针,根据杂交信号判定HBV的YMDD变异,得



出是否产生耐药性的结论<sup>[38, 39]</sup>. Livache et al<sup>[37]</sup>将HCV的5' UTR区及其型特异探针固定于硅芯片上, 与不同标本的、扩增标记的DNA样品杂交, 通过藻红蛋白-链亲和素耦联物与生物素结合, 在荧光显微镜下即可观察结果. 该芯片已成功区分血清标本中的1和2型HCV, 灵敏度很好, 且空间分辨率很高. Honda et al<sup>[40]</sup>用cDNA芯片技术发现HBV感染的肝细胞中, 炎症相关基因表达水平的下调改变较为突出, 而HCV感染的肝细胞中, 以抗炎基因表达上调为主, 提示两类病毒有不同的致病机制.

随着DNA结合蛋白研究的深入, 受组合化学、抗体库和随机噬菌体肽库技术的启发, 人们构建了随机核酸库并从中筛选出与靶蛋白特异结合的核酸配基, 此核酸配基的筛选过程称之为SELEX技术(systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX). 与蛋白类抗体相比, 核酸配基具有许多优越性: 作用的靶分子范围更广、配基与靶分子的结合能力与特异性更强、动力学参数可依体外诊断条件的要求而改变, 不受抗原毒性和免疫原性的限制, 特异性和亲和力不受组织或样本中非靶蛋白的干扰, 体外人工化学合成实现标准化生产, 在合成时可随意连接其他功能基团和分子等. 选择针对肝炎免疫应答过程中特异性标志物及相关反应蛋白筛选核酸配基, 人工合成后结合于固相载体制作基因芯片, 即可实现基因芯片技术的病毒性肝炎免疫标志物及免疫应答过程中的细胞因子、细胞周期、细胞凋亡等的免疫学检测, 同时应用荧光淬灭原理将核酸配基作为桥梁, 标记两种相互淬灭的荧光素, 建立新型的非核酸(如蛋白质)的定性和定量基因诊断方法. 这种方法可以解决一张芯片同时检测抗原抗体的技术难题, 弥补抗体在蛋白质芯片诊断领域中应用的不足<sup>[39]</sup>.

总之, 基因芯片技术因其可在一次反应中进行信息的平行分析, 而受到众多研究者的瞩目, 特别是在人类基因组计划研究工作中的应用<sup>[41-56]</sup>, 不仅极大地促进了该项工作的进行, 也使芯片技术在短短的几年间得到了长足地发展, 并迅速在杂交测序以外的领域得到广泛的应用<sup>[57-65]</sup>. 利用生物芯片的高通量特性, 系统地研究生物体系表达的蛋白质功能及其相互作用, 使蛋白质芯片在最近几年有了迅速的发展<sup>[66, 67]</sup>. 不断涌现的新技术可以加速蛋白质芯片的发展, 如将寡核苷酸阵列转化为多肽和蛋白质阵列的核糖体展示技术, RNA多肽融合技术, 寡核苷酸标签配体技术和大规模的利用基因替换与RNA抑制进行的基因敲除技术. 在检测技术方面, 荧光共振能量转换和原子力显微镜都可以用于蛋白质芯片研究. 蛋白质芯片之所以比DNA芯片发展慢, 主要还是因为蛋白质本身的变化太多, 如何保证检测结果的可重复性, 如何降低成本, 这些都需要科学界进一步加深对蛋白质结构和功能的理解, 需要其他辅助技术的成熟. 生物芯片作为一项极具应用前景和

开发价值的新兴技术, 他的产业化和规模化已是指日可待<sup>[68-70]</sup>. 生物芯片发展的最终目标是将样品制备、化学反应到检测的整个分析过程集成化以获得所谓的微型全分析系统(micro total analytical system)或称缩微芯片实验室(lab-on-a-chip). 而且, 也出现了将样品制备、化学反应和分析检测部分结合的芯片. 缩微芯片实验室取得的巨大成功, 使得生物芯片的研究更是如火如荼<sup>[71, 72]</sup>.

### 3 参考文献

- Graves DJ. Powerful tools for genetic analysis come of age. *Trends Biotechnol* 1999;17:127-134
- Steinrucke P, Aldinger U, Hill O, Hillisch A, Basch R, Diekmann S. Design of helical proteins for real-time endoprotease assays. *Anal Biochem* 2000;286:26-34
- Li B, Chang T, Larson A, Ding J. Identification of mRNAs expressed in tumor-infiltrating lymphocytes by a strategy for rapid and high throughput screening. *Gene* 2000;255:273-279
- Hernaiz M, Liu J, Rosenberg RD, Linhardt RJ. Enzymatic modification of heparan sulfate on a biochip promotes its interaction with antithrombin III. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;276:292-297
- Xiao Z, Jiang X, Beckett ML, Wright GL. Generation of a baculovirus recombinant prostate-specific membrane antigen and its use in the development of a novel protein biochip quantitative immunoassay. *Protein Expr Purif* 2000;19:12-21
- Check W. Upping the ante in biochip research. *CAP Today* 2000;14:50-54
- Weinberger SR, Morris TS, Pawlak M. Recent trends in protein biochip technology. *Pharmacogenomics* 2000;1:395-416
- Marshall A, Hodgson J. DNA chips: an array of possibilities. *Nat Biotechnol* 1998;16:27-31
- Boguski MS, McIntosh MW. Biomedical informatics for proteomics. *Nature* 2003;422:233-237
- Emili A, Cagney G. Large-scale functional analysis using peptide or protein arrays. *Nat Biotechnol* 2000;18:393-397
- Uetz P, Giot L, Cagney G, Mansfield TA, Judson RS, Knight JR, Lockshon D, Narayan V, Srinivasan M, Pochart P, Qureshi Emili A, Li Y, Godwin B, Conover D, Kalbfleish T, Vijayadamodar G, Yang M, Johnston M, Fields S, Rotherg JM. A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 2000;403:623-627
- Cheung VG, Morley M, Aguilar F, Massimi A, Kucherlapati R, Childs G. Making and reading microarrays. *Nat Genet* 1999;21(Suppl):15-19
- Hacia JG, Makalowski W, Edgemon K, Erdos MR, Robbins CM, Fodor SP, Brody LC, Collins FS. Evolutionary sequence comparisons using high-density oligonucleotide arrays. *Nat Genet* 1998;18:155-158
- Livache T, Bazin H, Mathis G. Conducting polymers on microelectronic devices as tools for biological analyses. *Clin Chim Acta* 1998;278:171-176
- Livache T, Fouque B, Roget A, Marchand J, Bidan G, Teoule R, Mathis G. Polypyrrole DNA chip on a silicon device: example of hepatitis C virus genotyping. *Anal Biochem* 1998;255:188-194
- Lueking A, Horn M, Eickhoff H, Bussow K, Lehrach H, Walter G. Protein microarrays for gene expression and antibody screening. *Anal Biochem* 1999;270:103-111
- MacBeath G, Schreiber SL. Printing proteins as microarrays for high throughput function determination. *Science* 2000;289:1760-1763
- Lu J, Liu Z, Xiong M, Wang Q, Wang X, Yang G, Zhao L, Qiu Z, Zhou C, Wu M. Gene expression profile changes in initiation and progression of squamous cell carcinoma of esophagus. *Int J Cancer* 2001;91:288-294

- 19 Kihara C, Tsunoda T, Tanaka T, Yamana H, Furukawa Y, Ono K, Kitahara O, Zembutsu H, Yanagawa R, Hirata K, Takagi T, Nakamura Y. Prediction of sensitivity of esophageal tumors to adjuvant chemotherapy by cDNA microarray analysis of gene-expression profiles. *Cancer Res* 2001;61:6474-6479
- 20 陈少全, 陈菊祥, 施靖华, 胡志前, 应康, 唐榕, 李瑶, 符薇, 谢毅, 毛裕民. 基因表达谱芯片在筛选胃癌相关基因中的应用. 第二军医大学学报 2001;22:523-526
- 21 李瑶, 袁敏燕, 吴超群, 曹跃琼, 唐榕, 陈沁, 石学银, 胡志前, 谢毅, 毛裕民. 用基因表达谱芯片研究人正常肝和肝细胞癌中差异表达的基因. 遗传学报 2000;27:1042-1048
- 22 Okabe H, Satoch S, Kato T, Kitahara O, Yanagawa R, Yamaoka Y, Tsunoda T, Furukawa Y, Nakamura Y. Genome-wide analysis of gene expression in human hepatocellular carcinomas using cDNA microarray: identification of genes involved in viral carcinogenesis and tumor progression. *Cancer Res* 2001; 61: 2129-2137
- 23 金钢, 胡先贵, 应康, 李瑶, 唐榕, 唐岩, 景在平, 谢毅, 毛裕民. 基因表达谱芯片在胰腺癌相关基因筛选中的应用研究. 第二军医大学学报 2000;21:819-823
- 24 张乐之, 龚燕芳, 沈茜, 徐忠玉, 万里军. 胰腺癌患者血清十二种肿瘤标志物的变化. 胰腺病学 2002;2:151-154
- 25 虞先浚, 龙江, 傅德良, 张群华, 倪泉兴. 利用 cDNA 微阵列技术分析胰腺癌相关基因表达谱. 中华实验外科杂志 2002;19:302-303
- 26 Frantz DJ, Hughes BG, Nelson DR, Murray BK, Christensen MJ. Cell cycle arrest and differential gene expression in HT-29 cells exposed to an aqueous garlic extract. *Nutr Cancer* 2000; 38:255-264
- 27 Soeth E, Wirth T, List HJ, Kumbhani S, Petersen A, Neumaier M, Czubyko F, Juhl H. Controlled ribozyme targeting demonstrates an antiapoptotic effect of carcinoembryonic antigen in HT29 colon cancer cells. *Clin Cancer Res* 2001;7:2022-2030
- 28 Alon U, Barkai N, Notterman DA, Gish K, Ybarra S, Mack D, Levine AJ. Broad patterns of gene expression revealed by clustering analysis of tumor and normal colon tissues probed by oligonucleotide arrays. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:6745-6750
- 29 邓安梅, 仲人前, 陈孙孝, 周晔, 孔宪涛. 用蛋白质芯片技术检测结直肠癌患者的肿瘤标志物. 中华消化杂志 2002;22:501-502
- 30 Maeda S, Otsuka M, Hirata Y, Mitsuno Y, Yoshida H, Shiratori Y, Masuho Y, Muramatsu M, Seki N, Omata M. cDNA microarray analysis of *Helicobacter pylori*-mediated alteration of gene expression in gastric cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;284:443-449
- 31 Israel DA, Salama N, Arnold CN, Moss SF, Ando T, Wirth HP, Tham KT, Camorlita M, Blaser MJ, Falkow S, Peck RM Jr. *Helicobacter pylori* strain-specific differences in genetic content, identified by microarray, influence host inflammatory responses. *J Clin Invest* 2001;107:611-620
- 32 Salama N, Guillemin K, McDaniel TK, Sherlock G, Tompkins L, Falkow S. A whole-genome microarray reveals genetic diversity among *Helicobacter pylori* strains. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:14668-14673
- 33 阎小君, 苏成芝. 生物芯片技术在 Hp 诊断和研究中的应用. 世界华人消化杂志 1999;7:737-739
- 34 Vo Dinh T, Alarie JP, Isola N, Landis D, Wintenberg AL, Ericson MN. DNA biochip using a phototransistor integrated circuit. *Anal Chem* 1999;71:358-363
- 35 Chambers J, Angulo A, Amaratunga D, Guo H, Jiang Y, Wan JS, Bittner A, Frueh K, Jackson MR, Peterson PA, Erlander MG, Ghazal P. DNA microarrays of the complex human cytomegalovirus genome: profiling kinetic class with drug sensitivity of viral gene expression. *J Viral* 1999;73:5757-5766
- 36 Ruano JM, Benoit VV, Aitchison JS, Cooper JM. Flame hydrolysis deposition of glass on silicon for the integration of optical and microfluidic devices. *Anal Chem* 2000;72:1093-1097
- 37 Livache T, Fouque B, Roget A, Marchand J, Bidan G, Teoule R, Mathis G. Polypyrrole DNA chip on a silicon device: example of hepatitis C virus genotyping. *Anal Biochem* 1998;255:188-194
- 38 Mendoza LG, McQuary P, Mongan A, Gangadharan R, Brignac S, Eggers M. High-throughput microarray-based enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Biotechniques* 1999; 27:778-780
- 39 Odde DJ, Renn MJ. Laser-guided direct writing for applications in biotechnology. *Trends Biotechnol* 1999;17:385-389
- 40 Honda M, Kaneko S, Kawai H, Shirota Y, Kobayashi K. Differential gene expression between chronic hepatitis B and C hepatic lesion. *Gastroenterology* 2001;120:955-966
- 41 Hacia JG, Fan JB, Ryder O, Jin L, Edgemon K, Ghandour G, Mayer RA, Sun B, Hsie L, Robbins CM, Brody LC, Wang D, Lander ES, Lipshutz R, Fodor SP, Collins FS. Determination of ancestral alleles for human single-nucleotide polymorphisms using high-density oligonucleotide arrays. *Nat Genet* 1999; 22:164-167
- 42 Khan J, Bittner ML, Chen Y, Meltzer PS, Trent JM. DNA microarray technology : the anticipated impact on the study of human disease. *Biochim Biophys Acta* 1999;1432:M17-M28
- 43 Lipshutz R, Fodor SP, Gingeras TR, Lockhart DJ. High density synthetic oligonucleotide arrays. *Nat Gene* 1999;21(1 Suppl):20-24
- 44 Hacia JG, Collins FS. Mutational analysis using oligonucleotide microarrays. *J Med Genet* 1999;36:730-736
- 45 Halushka MK, Fan JB, Bentley K, Hsie L, Shen N, Weder A, Cooper R, Lipshutz R, Chakravarti A. Patterns of single-nucleotide polymorphisms in candidate genes for blood-pressure homeo stasis. *Nat Genet* 1999;22:239-247
- 46 Duggan DJ, Bittner M, Chen Y, Meltzer P, Trent JM. Expression profiling using cDNA microarrays. *Nat Genet* 1999;21(1 Suppl):10-14
- 47 Brown PO, Botstein D. Exploring the new world of the genome with DNA micro arrays. *Nat Genet* 1999;21:33-37
- 48 Panda S, Sato TK, Hampton GM, Hogenesh JB. An array of insights: application of DNA chip technology in the study of cell biology. *Trends Cell Biol* 2003;13:151-156
- 49 Lehman TA, Haffty BG, Carbone CJ, Bishop LR, Gumbs AA, Krishnan S, Shields PG, Modali R, Turner BC. Elevated frequency and functional activity of a specific germ-line p53 intron mutation in familial breast cancer. *Cancer Res* 2000;60: 1062-1069
- 50 Bubendorf L, Kononen J, Koivisto P, Schraml P, Moch H, Gasser TC, Willi N, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP. Survey of gene amplifications during prostate cancer progression by high-throughout fluorescence in situ hybridization on tissue microarrays. *Cancer Res* 1999;59:803-806
- 51 Pollack JR, Perou CM, Alizadeh AA, Eisen MB, Pergamenschikov A, Williams CF, Jeffrey SS, Botstein D, Brown PO. Genome-wide analysis of DNA copy-number changes using cDNA microarrays. *Nat Genet* 1999;23:41-46
- 52 Wang K, Gan L, Jeffery E, Gayle M, Gown AM, Skelly M, Nelson PS, Ng WV, Schummer M, Hood L, Mulligan J. Monitoring gene expression profile changes in ovarian carcinomas using cDNA microarrays. *Gene* 1999;229:101-108
- 53 Wang HT, Kong JP, Ding F, Wang XQ, Wang MR, Liu LX, Wu M, Iiu ZH. Analysis of gene expression profile induced by EMP-1 in esophageal cancer cells using cDNA microarray. *World J Gastroenterol* 2003;9:392-398
- 54 Yang SH, Kim JS, Oh TJ, Kim MS, Lee SW, Woo SK, Cho HS, Choi YH, Kim YH, Rha SY, Chung HC, An SW. Genome-scale analysis of resveratrol-induced gene expression profile in human ovarian cancer cells using cDNA microarray. *Int J Oncol* 2003;22:741-750
- 55 Risinger JJ, Maxwell GL, Chandramouli GV, Jazaeri A, Aprelikova O, Patterson T, Berchuck A, Barrett JC. Microarray analysis reveals distinct gene expression profiles among different histologic types of endometrial cancer. *Cancer Res* 2003; 63:6-11
- 56 Xu SH, Qian LJ, Mou HZ, Zhu CH, Zhou XM, Liu XL, Chen Y,

- Bao WY. Difference of gene expression profiles between esophageal carcinoma and its pericancerous epithelium by gene chip. *World J Gastroenterol* 2003;9:417-422
- 57 Liu HC, He Z, Rosenwaks Z. Application of complementary DNA microarray (DNA chip) technology in the study of gene expression profiles during folliculogenesis. *Fertil Steril* 2001; 75:947-955
- 58 Mukaiyama T. Molechlar and cellular biological analysis on cancer cachexia syndrome. *Gan To Kagaku Ryoho* 2001;28:883-891
- 59 Mikhailovich V, Lapa S, Gryadunov D, Sobolev A, Strizhkov B, Chemyh N, Skotnikova O, Irtuganova O, Moroz A, Litvinov V, Vladimirkii M, Perelman M, Chernousova L, Erokhin V, Zasedatelev A, Mirzabekov A. Identification of rifampin-resistant Mycobacterium tuberculosis strains by hybridization, PCR, and ligase detection reaction on oligonucleotide microchips. *J Clin Microbiol* 2001;39:2531-2540
- 60 Kurian KM, Watson CJ, Wyllie AH. DNA chip technology. *J Pathol* 1999;187:267-271
- 61 Hacia JG. Resequencing and nutational analysis using oligonucleotide microarrays. *Nat Genet* 1999;21(1 Suppl 1):42-47
- 62 Chen YJ, Kodell R, Sistare F, Thompson KL, Morris S, Chen JJ. Normalization methods for analysis of microarray gene-expression data. *J Biopharm Stat* 2003;13:57-74
- 63 Bae DS, Hanneman WH, Yang RS, Campain JA. Characterization of gene expression changes associated with MNNG, arsenic, or metal mixture treatment in human keratinocytes: application of cDNA microarray technology. *Environ Health Perspect* 2002;6:931-941
- 64 Hoyt PR, Tack L, Jones BH, Van Dinther J, Staat S, Doktycz MJ. Automated high-throughput probe production for DNA microarray analysis. *Biotechniques* 2003;34:402-407
- 65 Presneau N, Mes Masson AM, Ge B, Provencher D, Hudson TJ, Tonin PN. Patterns of expression of chromosome 17 genes in primary cultures of normal ovarian surface epithelia and epithelial ovarian cancer cell lines. *Oncogene* 2003;22:1568-1579
- 66 Emili AQ, Cagney G. Large scale functional analysis using peptide or protein arrays. *Nat Biotechnol* 2000;18:393-397
- 67 de Wildt RM, Mundy CR, Gorick BD, Tomlinson IM. Antibody arrays for high-throughput screening of antibody antigen interactions. *Nat Biotechnol* 2000;18:989-994
- 68 Ozawa K. Perspectives on postgenome medicine: Hematological diseases. *Nippon Rinsho* 2001;59:59-64
- 69 Greenberg SA. DNA microarray gene expression analysis technology and its application to neurological disorders. *Neurology* 2001;57:755-761
- 70 Cuzin M. DNA chips: a new tool for genetic analysis and diagnostics. *Transfus Clin Biol* 2001;8:291-296
- 71 Cheng J, Sheldon EL, Wu L, Uribe A, Gerrue LO, Carrino J, Heller MJ, O'Connell JP. Preparation and hybridization analysis of DNA/RNA from E. coli on microfabricated bioelectronic chips. *Nature Biotech* 1998;16:541-546
- 72 Kricka LJ. Microchips, microarrays, biochips and nanochips: personal laboratories for the 21<sup>st</sup> century. *Clin Chim Acta* 2001; 307:219-223

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2003 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

## WJG 搭建我国消化化学基础和临床研究惟一国际交流的平台

World Journal of Gastroenterology® (ISSN 1007-9327 CN 14-1219/R) 2003 年由双月刊改为月刊, 加快刊出周期, 展示我国在国际上的食管癌、胃癌、肝癌、大肠癌、病毒性肝炎、Hp 等方面基础和临床研究的成果。

WJG 1998 年被美国科学引文索引(SCI-E)收录.SCI-E 收录文献的作者、题目、源期刊、摘要、关键词等以外, 还收录论文的参考文献, 从而把一篇论文和其他论文之间有意义的联系勾画出来, 也就是把发表论文的两位作者和两位作者群体之间的学术联系显示出来等特点. 作为一种比较客观和定量的评价方式之一, 已愈来愈受到科学界的重视. 当 WJG 出版 20 天后, 国际上的胃肠病学和肝病学专家即可在 ISI Web of SCIENCE(<http://www.isinet.com/isi/journals/index.html>)上看到论文的摘要、参考文献、被引用的次数、关键词、单位名称、通讯地址等信息。

WJG 1998 年被美国《医学索引》(*Index Medicus* / MEDLINE)收录. WJG 电子版摘要及全文在印刷版出版前 15 天, 国际上的胃肠病学和肝病学专家即可在 PubMed(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/jrbrowser.cgi>)上阅读到论文的摘要及全文, 包括彩色、黑白、线条图照片. 世界胃肠病学杂志社将 WJG 和世界华人消化杂志出版的过刊和现刊全部放在 [www.wjgnet.com](http://www.wjgnet.com) 上供国际和国内消化病学者免费使用. WJG 是惟一全面反映我国消化化学专家研究成果的平台之一, 让世界更多的学者在 PubMed 或 [www.wjgnet.com](http://www.wjgnet.com) 上免费看到来自我国胃肠病学和肝病学专家撰写的具有中国特色的创新原始论文。

总之, WJG 提供了一个与世界胃肠病学和肝病学专家进行有效的学术交流平台, 促进消化病学研究成果的快速发展。

(世界胃肠病学杂志社)

# Wilson 病的诊断和治疗

林连捷, 郑长青

林连捷, 郑长青, 中国医科大学附属第二医院消化内科 辽宁省沈阳市110004  
项目负责人: 郑长青, 110004, 辽宁省沈阳市三好街36号, 中国医科大学附属第二医院消化内科. Zhengchangqing88@163.com  
电话: 13940346589  
收稿日期: 2002-11-19 接受日期: 2002-11-28

## 摘要

Wilson病是一种以原发性铜代谢障碍为特征的常染色体隐性遗传病, 基因定位于13q14.3, 蛋白产物是一种铜转运P型ATP酶。已发现多种基因突变类型, 突变结果是铜转运障碍。患者胆道排铜障碍及铜蓝蛋白合成障碍, 导致过量的铜沉积在肝细胞、豆状核、角膜等全身各处, 临床表现为多种多样, 涉及消化、神经、眼睛、血液等多系统、多器官的损伤, 极易误诊。治疗主要是低铜饮食、减少铜的吸收、增加铜的排泄和肝移植。首选药物是D-青霉胺。本文结合个人临床经验, 系统阐述Wilson病的发病机制, 临床表现, 诊断和治疗情况, 以提高对本病的认识, 减少误诊。

林连捷, 郑长青. Wilson病的诊断和治疗. 世界华人消化杂志 2003;11(10): 1614-1617

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1614.asp>

## 0 引言

Wilson病(wilson's disease, WD)即肝豆状核变性(hepatolenticular degeneration), 是一种以原发性铜代谢障碍为特征的常染色体隐性遗传病, 该病好发于青少年, 病理生理学改变是胆道排铜障碍及铜蓝蛋白(ceruloplasmin, CP)合成障碍, 导致过量的铜沉积在肝细胞和其他部位。临床特点是与铜在肝、豆状核、角膜等处沉积相关的肝脏病变、神经精神障碍和Kayser-Fleischer (K-F)环等症状。各国报道的患病率从5/百万-50/百万不等。一般认为我国患病率比西方国家高。WD致残性及致死性均高, 但又是先天遗传病中为数不多的可治性疾病之一, 如早期诊断、治疗完全可以控制病情, 并基本恢复正常的生活和工作, 如不治疗则是致死性的, 因此国内外很重视对WD的临床分析和总结<sup>[1-31]</sup>。

## 1 分子生物学研究

自1912年Kinnear Wilson报道本病以来, 国内外对WD的研究相当广泛并且不断深入。1985年Frydman et al 将WD基因定位于13q14.3后, 国外对WD的研究全面进入分子生物学领域。1993年北欧的3个研究小组分别成功克隆了WD基因<sup>[32-34]</sup>。分析表明, 他编码的蛋白产物是一种铜转运P型ATP酶, 与以前克隆的Menkes病

基因(ATP7A)结构有高度同源性, 参与铜跨膜转运的代谢过程, 因此WD基因被命名为ATP7B基因。该基因大约7.5 kb, 编码1465个氨基酸, 编码区含有21个外显子。除了肝脏外, ATP7B蛋白广泛表达于肾、脑、眼、心、肺等多种器官。目前至少200种ATP7B基因突变被发现<sup>[35-43]</sup>。研究显示欧洲裔及地中海国家以14号外显子的His 1069 Gln 突变<sup>[38-41]</sup>和18号外显子的Gly1267Lys 突变<sup>[41]</sup>较为常见, 而中国大陆的患者主要是8号外显子的Arg778Leu 突变和12号外显子的Thr935Met突变<sup>[42, 43]</sup>。这种不同的突变热区可能是各地区患病率不同和临床表现差异的主要原因。推测是因为8号外显子位于ATP7B蛋白的跨膜功能区, 该位点发生突变引起蛋白的1级和2级结构发生改变, 导致铜的转运在细胞膜上停滞而发病。14号外显子处于ATP7B蛋白的磷酸化区和ATP结合区, 该位点突变导致转运铜过程中能量缺乏, 铜在细胞内停滞而发病。

## 2 病理生理

正常人饮食中微量的铜从胃肠道吸收入血, 先与白蛋白疏松结合, 经门脉系统进入肝脏后, 与 $\alpha$ -2球蛋白牢固结合成CP。循环中的铜90%结合于CP上, 约70%CP存在于血浆中。铜作为辅基参与多种生物酶的合成。多余的铜主要通过胆道由粪便排出, 尿液和汗液排铜量甚微。而WD患者中胆道排铜障碍及CP合成障碍, 导致过量的铜沉积在肝细胞, 可导致肝细胞坏死, 肝纤维化等改变。从坏死的肝细胞释放的大量铜可导致溶血, 并逐渐沉积在脑、肾、角膜、骨关节等部位, 引起神经系统、消化系统、血液系统、泌尿系统、骨骼、角膜等多系统、多器官受累。因此WD临床表现是多种多样的。目前, 有许多关于铜在WD中作用的研究<sup>[44-48]</sup>。

## 3 临床表现

WD多于青少年期起病, 少数可迟至成年期, 发病年龄4-50岁, 有的甚至可晚至60岁发病<sup>[1]</sup>。以肝脏症状起患者平均年龄11岁, 以神经症状起病者平均年龄19岁。少数以急性溶血性贫血、肾损伤、骨骼关节改变等为首发症状。据统计WD的临床表现主要有以下几方面: (1)肝脏症状: 多表现为非特异性慢性肝病, 如乏力、食欲不振、肝区疼痛、黄疸、腹水、肝脾大、食管静脉曲张破裂出血及肝昏迷。极少数患者以急性肝衰竭起病。也有无症状转氨酶升高者。(2)神经系统症状: 临床上突出表现是锥体外系病症, 表现为肢体舞蹈样及

手足徐动样动作、肌张力异常、肌强直、动作迟缓、构音障碍、吞咽困难、屈曲姿态、紧张步态等。还可有广泛的神经损害, 如进行性智力减退、思维迟钝、以及情感、行为、性格异常, 晚期可有器质性精神病, 少数有癫痫发作。症状常缓慢进展, 可有阶段性缓解或加重, 亦有进展迅速者, 特别是年轻患者。(3)眼部损害: K-F环是本病最重要的体征, 对早期诊断很重要<sup>[49]</sup>, 是由于铜沉积于角膜后弹力层所致, 多见于双眼, 个别见于单眼, 呈绿褐色或金褐色, 用裂隙灯检查可发现, 明显者肉眼可见。少数患者可出现白内障、晶体混浊等。(4)肾脏损害: 可出现蛋白尿、血尿、尿酸尿、肾结石、高尿钙、肾性糖尿等。(5)骨骼受累: 出现骨质疏松、骨关节炎、骨折、骨和软骨变性等。(6)其他表现: 溶血性贫血、皮肤色素沉着、胰腺炎等。

## 4 辅助检查

4.1 WD 的实验室检查包括与铜代谢有关的指标 (血清 CP、血清铜、24 h 尿铜排泄、肝铜含量等) 和肝、肾功能等常规检查。(1)血清 CP 正常值为 0.15-0.60 g/L, 多数 WD 患者 CP 显著降低。血清 CP 降低是诊断本病重要依据之一, 一般认为其值与病情、病程及驱铜治疗效果无关。有学者认为可检测 CP 用于人群普查<sup>[50]</sup>。注意血清 CP 降低还可见于肾病综合征、慢性活动性肝炎、原发性胆汁性肝硬化、某些吸收不良综合征等。另外, CP 是一种急性反应蛋白, 有 5 % 患者由于感染或炎症 CP 正常; 免疫学方法检测时, 前铜蓝蛋白与 CP 有交叉反应, 可使低值的结果升高为正常; WD 基因型多种多样, 表型不可避免也多种多样, 因此 CP 正常不能排除本病<sup>[51]</sup>。(2)血清铜正常值是 11-22  $\mu\text{mol/L}$ , 90 % WD 患者降低。同 CP 一样与病情、病程、疗效无关, 并有假阳性。(3)24 h 尿铜排泄正常人小于 50  $\mu\text{g}$ , WD 患者未治疗时常大于 100  $\mu\text{g}$ , 甚至增加数十倍, 服排铜药后进一步增高, 待体内蓄积的铜大量排出后, 尿铜又渐降低。对可疑患者, 如 D-青霉胺治疗前尿铜大于 100  $\mu\text{g}/24\text{h}$ , 治疗后升高至 1 000  $\mu\text{g}/24\text{h}$ , 除外其他原因所致肝细胞坏死的疾病, 可诊断本病。但是应注意尿铜假阳性: 收集尿液的容器可能被污染而影响其准确性; 在广泛肝细胞坏死的疾病中尿铜排泄均可增加; 24 h 尿量计数不准确。而无症状者尿铜可能正常。(4)肝铜含量是诊断 WD 的重要指标, 正常小于 50  $\mu\text{g/g}$  肝组织, 多数患者大于 250  $\mu\text{g/g}$  肝组织。但在国内患者难以接受肝穿, 故不是常规检查。如恰好取材为新生的肝硬化结节则可出现假阴性。(5)肝肾功能可无或有不同程度的损害, 表现为白蛋白降低、转氨酶升高、胆红素升高、尿素氮升高、肌酐升高、血尿、蛋白尿等。(6)其他改变, 如贫血、血三系减少、凝血时间延长等。

4.2 影像学检查无特异性诊断价值 腹部彩超、头 CT、MRI 可提示肝、脑损伤。我们总结 58 例 WD 患者的临床及影像特点<sup>[4]</sup>, 53 例患者行腹部彩超检查, 其中 44 例示弥漫性肝损伤(83 %)甚至肝硬化, 38 例示胆囊壁增

厚、水肿, 伴 / 不伴胆囊增大(72 %), 32 例示脾大(60 %), 21 例示腹水(40 %)。13 例行头 MRI 检查, 7 例示内囊、基底节区信号异常, T1WI 低信号, T2WI 高信号(54 %)。8 例行头 CT 检查, 6 例示内囊、基底节区低密度信号(75 %)。由此可见, 超声虽不能作为确诊依据, 但对肝损伤的提示, 不失为一种简便、有效方法; 头部 CT、MRI 的应用对提高诊断有帮助。另外, 骨关节 X 线检查可发现骨质疏松、骨关节炎、自发性骨折、骨软化和软骨变性等, 多出现在双腕关节以下。

4.3 基因诊断是目前的研究热点问题之一, 国内外学者致力于 WD 蛋白及基因的研究<sup>[52-56]</sup>。应用荧光 PCR, SSCP 等分子生物学技术<sup>[56-59]</sup>对本病进行基因检测。但由于上文提及至少 200 种 ATP7B 基因突变被发现, 这种多变性使基因诊断不能作为一种简单、有效的诊断方法, 特别对散发病例。但近几年来, 分子生物学技术对患病家族研究、症状前诊断和杂合子检出以及科学研究是很有价值的。

## 5 诊断

本病起病常为慢性隐匿经过, 当只有肝损伤或神经系统表现时, 常因对其认识不足而导致误诊、漏诊。临床诊断主要根据 4 条标准<sup>[60]</sup>: (1)肝病史或肝病征/锥体外系病征; (2)血清 CP 显著降低和/或肝铜增高; (3)角膜 K-F 环; (4)阳性家族史。符合上述 4 条中的 3 条可诊断, 符合 2 条则可能是 WD。

## 6 误诊情况

由于 WD 基因突变的多样性, 临床表现多种多样, 本病极易误诊。我们总结 58 例 WD 的误诊情况<sup>[4]</sup>, 发现初诊即确诊者仅 19 例 (33 %), 28 例曾被误诊(67 %)。误诊病种达 17 种, 涉及消化、神经、泌尿、血液、运动、结缔组织等多系统, 同一病例也可同时误诊为几种病。误诊病种依次为肝硬化 16 例, 肝炎 15 例, 肾炎、溶血性贫血各 6 例, 扭转性痉挛、锥体外系病变、溶血尿毒综合征各 2 例, 脑瘤、癫痫、病毒性脑炎、胆囊炎、结核性腹膜炎、类风湿、系统性红斑狼疮、重症肌无力、骨髓炎、微量元素缺乏各 1 例, 共计 59 例次。

## 7 治疗

WD 是先天遗传病中为数不多的可治性疾病之一, 早期诊断、早期治疗, 患者可以基本正常的生活。治疗原则是低铜饮食、减少铜的吸收、增加铜的排泄、对症治疗, 必要时进行肝移植。(1)铜螯合剂, 增加铜排泄 D-青霉胺是治疗 WD 的首选药物。他使血液和组织中的过量游离铜从尿液中排出, 而且能和铜在肝中形成无毒复合物而消除游离铜的毒性。能诱导肝细胞合成金属铜硫蛋白, 发挥去铜毒的作用。Durand et al<sup>[61]</sup>认为对有严重肝功不全的 WD 患者, 在脑病发生之前早期应用 D-青霉胺, 可快速改善症状, 避免急诊肝移植手术。



经6 mo-12 a的随访,患者不必进行肝移植.即使进行择期肝移植,手术风险也要小得多.D-青霉胺成人量1-1.5 g/d,儿童20 mg/(kg·d),分3次口服,需终生用药.三乙基四胺作用同D-青霉胺,副作用小,在国外较受推崇<sup>[62]</sup>,但价格昂贵.二巯基丁二酸钠能与血中游离铜、组织中以与酶系统结合的铜离子结合,形成硫醇化合物经尿排出.还有二巯丙磺酸、二巯基丙醇等.(2)减少铜的吸收 锌制剂是一种有效的治疗药物<sup>[62-64]</sup>,锌通过竞争机制抑制铜在肠道的吸收,使铜通过粪便排出,并且通过增加金属硫蛋白的合成而减少铜的毒性,甚至可以用于孕妇的治疗<sup>[64]</sup>.锌元素50-150 mg/d,分3-4次口服.硫化钾使铜在肠道形成不溶性的硫化铜排出体外.(3)肝移植<sup>[61,65]</sup>是上述治疗无效患者最后的希望,而对于以严重肝功不全起病的WD患者,若不进行肝移植或D-青霉胺治疗,很快进展为脑病而死亡<sup>[61]</sup>.(4)低铜饮食即避免食用含铜高的食物,如肝、贝壳类、蟹、虾、巧克力、蚕豆、豌豆、坚果等.(5)对症治疗.

总之,目前国际上对WD的基础研究主要集中于利用动物模型,研究WD基因编码蛋白在动物体内(主要是肝脏)的表达,探讨基因治疗的可能性<sup>[66,67]</sup>;利用细胞模型研究ATP7B蛋白的分子结构特点和生物学特性<sup>[68-71]</sup>.

虽然对WD分子生物学的研究使我们看到基因诊断在未来可能发挥重要作用,但目前WD仍然是一种不易诊断的疾病,诊断必须依赖临床和实验室检查的结合,而无单一的检查可以确诊或排除诊断.临床医生应重视以下几点<sup>[4]</sup>:(1)对不可解释的肝病,肝、脾大,特别是青少年的肝硬化;对不明原因的吐字不清,步态不稳,共济失调等,特别是头CT、MRI有基底节区改变;对血尿、蛋白尿,骨折、骨痛,贫血,出血点及淤斑等,特别是同时有肝损害者,均应警惕本病的可能性.(2)由于本病是常染色体隐性遗传病,故家族中有该病或不明原因的肝病、神经系统等病征,应注意本病的可能性.(3)对上述患者应进行眼裂隙灯检查K-F环,测血铜蓝蛋白,血铜,尿铜排泄等检查,可明确诊断.(4)条件不允许进行铜代谢检查时,可行头CT、MRI和腹部超声检查,虽不能作为确诊依据,但可提示脑、肝损伤.早期诊断、早期治疗可有效控制病情,恢复正常的生活和工作,甚至怀孕、生育<sup>[72]</sup>.

## 8 参考文献

- Gow PJ, Smallwood RA, Angus PW, Smith AL, Wall AJ, Sewell RB. Diagnosis of Wilson's disease: an experience over three decades. *Gut* 2000;46:415-419
- 姜海琼, 徐敏, 王兴鹏. 以肝硬化门脉高压为主要表现的Wilson's病例. *世界华人消化杂志* 2000;8:170
- 杨鸿禧, 汪佩文, 姜海琼, 吴建新. 不典型Wilson's病8例临床分析. *世界华人消化杂志* 2001;9:446
- 林连捷, 郑长青, 金玉, 胡刚正. Wilson病的诊断和误诊分析58例. *世界华人消化杂志* 2002;10:1096-1097
- Chroni E, Lekka NP, Tsibri E, Economou A, Paschalis C. Acute, progressive akinetic-rigid syndrome induced by neuroleptics in a case of Wilson's disease. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 2001;13:531-532

- Barthel H, Sorger D, Kuhn HJ, Wagner A, Kluge R, Hermann W. Differential alteration of the nigrostriatal dopaminergic system in Wilson's disease investigated with [123I]ss-CIT and high-resolution SPET. *Eur J Nucl Med* 2001;28:1656-1663
- Keller R, Torta R, Lagget M, Crasto S, Bergamasco B. Psychiatric symptoms as late onset of Wilson's disease: neuroradiological findings, clinical features and treatment. *Ital J Neurol Sci* 1999;20:49-54
- Patel AD, Bozdech M. Wilson disease. *Arch Ophthalmol* 2001;119:1556-1557
- Grudeva-Popova JG, Spasova MI, Chepileva KG, Zaprianov ZH. Acute hemolytic anemia as an initial clinical manifestation of Wilson's disease. *Folia Med (Plovdiv)* 2000;42:42-46
- Kuruvilla A, Joseph S. 'Face of the giant panda' sign in Wilson's disease: revisited. *Neurol India* 2000;48:395-396
- Hermann W, Tietze F, Villmann T, Grahmann F, Wagner A. Clinical and fine motor therapy assessment in Wilson disease. *Nervenarzt* 2000;71:970-974
- Macedo G, Maia JC, Gomes A, Amil J, Fernandes N, Carneiro F, Teixeira A, Ribeiro T. Wilson's disease: challenging diagnosis, management, and liver transplantation timing. *Transplant Proc* 2000;32:2668
- Gaffney D, Fell GS, O'Reilly DS. ACP Best Practice No 163. Wilson's disease: acute and presymptomatic laboratory diagnosis and monitoring. *J Clin Pathol* 2000;53:807-812
- Yuce A, Kocak N, Yetgin S, Ozen H, Gurakan F, Yenicesu I. Acute lymphoblastic leukemia in a child with Wilson disease. *Turk J Pediatr* 2000;42:256-257
- Gow PJ, Peacock SE, Chapman RW. Wilson's disease presenting with rapidly progressive visual loss: another neurologic manifestation of Wilson's disease? *J Gastroenterol Hepatol* 2001;16:699-701
- Yonetani L, Walshe JM. Surviving Wilson's disease. *Clin Med* 2001;1:72-74
- Sakai T, Shiraki K, Tada T, Fuke H, Tanabe M, Inoue H, Sugimoto K, Ohmori S, Takase K, Nakano T. Images in focus laparoscopic findings in Wilson's disease without cirrhosis. *Endoscopy* 2001;33:389
- Nicholl DJ, Ferenci P, Polli C, Burdon MB, Pall HS. Wilson's disease presenting in a family with an apparent dominant history of tremor. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2001;70:514-516
- Sternlieb I. Wilson's disease. *Clin Liver Dis* 2000;4:229-39
- Giagheddu M, Tamburini G, Piga M, Tacconi P, Giagheddu A, Serra A, Siotto P, Satta L, Demelia L, Marrosu F. Comparison of MRI, EEG, EPs and ECD-SPECT in Wilson's disease. *Acta Neurol Scand* 2001;103:71-81
- Loudianos G, Gitlin JD. Wilson's disease. *Semin Liver Dis* 2000;20:353-364
- Wilson DC, Phillips MJ, Cox DW, Roberts EA. Severe hepatic Wilson's disease in preschool-aged children. *J Pediatr* 2000;137:719-722
- Stuerenburg HJ, Eggers C. Early detection of non-compliance in Wilson's disease by consecutive copper determination in cerebrospinal fluid. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2000;69:701-702
- Pilloni L, Lecca S, Coni P, Demelia L, Pilleri G, Spiga E, Faa G, Ambu R. Wilson's disease with late onset. *Dig Liver Dis* 2000;32:180
- Shiono Y, Wakusawa S, Hayashi H, Takikawa T, Yano M, Okada T, Mabuchi H, Kono S, Miyajima H. Iron accumulation in the liver of male patients with Wilson's disease. *Am J Gastroenterol* 2001;96:3147-3151
- Barthel H, Sorger D, Kuhn HJ, Wagner A, Kluge R, Hermann W. Differential alteration of the nigrostriatal dopaminergic system in Wilson's disease investigated with [123I]ss-CIT and high-resolution SPET. *Eur J Nucl Med* 2001;28:1656-1663
- Perretti A, Pellicchia MT, Lanzillo B, Campanella G, Santoro L. Excitatory and inhibitory mechanisms in Wilson's disease: investigation with magnetic motor cortex stimulation. *J Neurol Sci* 2001;192:35-40
- Svetel M, Kozic D, Stefanova E, Semnic R, Dragasevic N, Kostic VS. Dystonia in Wilson's disease. *Mov Disord* 2001;16:719-723
- Shiono Y, Hayashi H, Wakusawa S, Yano M. Ultrastructural identification of iron and copper accumulation in the liver of a male patient with Wilson disease. *Med Electron Microsc* 2001;34:54-60

- 30 Tavill AS, Schilsky ML. Wilson's Disease. *Curr Treat Options Gastroenterol* 1999;2:68-71
- 31 Rodo M, Czonkowska A, Pulawska M, Swiderska M, Tarnacka B, Wehr H. The level of serum lipids, vitamin E and low density lipoprotein oxidation in Wilson's disease patients. *Eur J Neurol* 2000;7:491-494
- 32 Bull PC, Thomas GR, Rommens JM, Forbe JR, Cox DW. The Wilson disease gene is a putative copper transporting P-type ATPase similar to the Menkes gene. *Nat Genet* 1993;5:327-337
- 33 Petrukhin K, Fischer SG, Pirastu M, Tanzi RE, Chernov I, Devoto M, Brzustowicz LM, Cayanis E, Vitale E, Russo JJ. Mapping, cloning and genetic characterization of the region containing the Wilson disease gene. *Nat Genet* 1993;5:338-343
- 34 Tanzi RE, Petrukhin K, Chernov I, Pellequer JL, Wasco W, Ross DM, Parano E, Pavone L, Brzustowicz LM. The Wilson disease gene is a copper transporting ATPase with homology to the Menkes gene. *Nat Genet* 1993;5:344-350
- 35 Riordan SM, Williams R. The Wilson's disease gene and phenotypic diversity. *J Hepatol* 2001;34:165-171
- 36 Loudianos G, Lovicu M, Solinas P, Kanavakis E, Tzetzis M, Manolaki N, Panagiotakaki E, Karpathios T, Cao A. Delineation of the spectrum of Wilson disease mutations in the Greek population and the identification of six novel mutations. *Genet Test* 2000;4:399-402
- 37 Olsson C, Waldenstrom E, Westermarck K, Landegre U, Syvanen AC. Determination of the frequencies of ten allelic variants of the Wilson disease gene (ATP7B), in pooled DNA samples. *Eur J Hum Genet* 2000;8:933-938
- 38 Firneisz G, Lakatos PL, Szalay F, Polli C, Glant TT, Ferenci P. Common mutations of ATP7B in Wilson disease patients from Hungary. *Am J Med Genet* 2002;108:23-28
- 39 Cauza E, Ulrich-Pur H, Polli C, Gangl A, Ferenci P. Distribution of patients with Wilson disease carrying the H1069Q mutation in Austria. *Wien Klin Wochenschr* 2000;112:576-579
- 40 Witt H, Landt O. Rapid detection of the Wilson's disease H1069Q mutation by melting curve analysis with the LightCycler. *Clin Chem Lab Med* 2001;39:953-955
- 41 Tarnacka B, Gromadzka G, Rodo M, Mierzejewski P, Czlonkowska A. Frequency of His1069Gln and Gly1267Lys mutations in Polish Wilson's disease population. *Eur J Neurol* 2000;7:495-498
- 42 Wu ZY, Wang N, Murong S, Lin M. Identification and analysis of the mutations of the Wilson disease gene in Chinese Population. *Chin Med J* 2000;113:40-43
- 43 Wu ZY, Wang N, Lin MT, Fang L, Murong SX, Yu L. Mutation analysis and the correlation between genotype and phenotype of Arg778Leu mutation in chinese patients with Wilson disease. *Arc Neurol* 2001;58:971-976
- 44 Vanderwerf SM, Cooper MJ, Stetsenko IV, Lutsenko S. Copper specifically regulates intracellular phosphorylation of the Wilson's disease protein, a human copper-transporting ATPase. *J Biol Chem* 2001;276:36289-36294
- 45 Watt NT, Hooper NM. The response of neurones and glial cells to elevated copper. *Brain Res Bull* 2001;55:219-224
- 46 Strausak D, Mercer JF, Dieter HH, Stremmel W, Multhaup G. Copper in disorders with neurological symptoms: Alzheimer's, Menkes, and Wilson diseases. *Brain Res Bull* 2001;55:175-185
- 47 Jonas L, Fulda G, Salameh T, Schmidt W, Kroning G, Hopt UT, Nizze H. Electron microscopic detection of copper in the liver of two patients with morbus Wilson by EELS and EDX. *Ultrastruct Pathol* 2001;25:111-118
- 48 Narayanan VS, Fitch CA, Levenson CW. Tumor suppressor protein p53 mRNA and subcellular localization are altered by changes in cellular copper in human Hep G2 cells. *J Nutr* 2001;131:1427-1432
- 49 Liu M, Cohen EJ, Brewer GJ, Laibson PR. Kayser-Fleischer ring as the presenting sign of Wilson disease. *Am J Ophthalmol* 2002;133:832-834
- 50 Hahn SH, Lee SY, Jang YJ, Kim SN, Shin HC, Park SY, Han HS, Yu ES, Yoo HW, Lee LS, Chung CS, Lee SY, Lee DH. Pilot study of mass screening for Wilson's disease in Korea. *Mol Genet Metab* 2002;76:133-136
- 51 Forbes JR, Cox DW. Copper-dependent trafficking of Wilson disease mutant ATP7B proteins. *Hum Mol Genet* 2000;9:1927-1935
- 52 Hou GQ, Liang XL, Chen R, Tang LW, Wang Y, Xu PY, Zhang YR, Ou CH. Copper transportation of WD protein in hepatocytes from Wilson disease patients in vitro. *World J Gastroenterol* 2001;7:846-851
- 53 Ren MS, Hu WB, Zhang Z, Ju SW, Fan YX, Wang GQ, Yang RM. Copper-chelating therapeutic effect in Wilson disease with different clinical phenotypes and polymorphisms of ATP7B gene. *World J Gastroenterol* 1998;4:340-342
- 54 侯国庆, 梁秀龄, 黄帆, 陈嵘, 欧翠华, 杨春水, 王莹. 肝豆状核变性患者 Wilson 病蛋白及其基因的改变. *世界华人消化杂志* 2000;8:988-992
- 55 Lockhart PJ, Mercer JF. Functional analysis of the sheep Wilson disease protein (sATP7B) in CHO cells. *Eur J Cell Biol* 2001;80:349-357
- 56 Xu P, Liang X, Jankovic J, Le W. Identification of a high frequency of mutation at exon 8 of the ATP7B gene in a Chinese population with Wilson disease by fluorescent PCR. *Arch Neurol* 2001;58:1879-1882
- 57 黄帆, 梁秀龄, 徐评仪, 林平, 周向平, 王莹, 侯国庆, 程钢. 用荧光 PCR 对中国人肝豆状核变性进行早期诊断及携带者检测. *中华医学遗传学杂志* 2001;18:17-20
- 58 Butler P, McIntyre N, Mistry PK. Molecular diagnosis of Wilson disease. *Mol Genet Metab* 2001;72:223-230
- 59 Yuce A, Kocak N, Demirtas M, Ozen H, Gurakan F, Ozguc M. DNA haplotype analysis for the diagnosis of Wilson disease in siblings. *Acta Paediatr* 2000;89:1142-1144
- 60 王维治. *神经病学*. 第4版. 北京: 人民卫生出版社, 2001:215-218
- 61 Durand F, Bernuau J, Giostra E, Mentha G, Shouval D, Degott C, Benhamou JP, Valla D. Wilson's disease with severe hepatic insufficiency: beneficial effects of early administration of D-penicillamine. *Gut* 2001;48:849-852
- 62 Schilsky ML. Treatment of wilson's disease: what are the relative roles of penicillamine, trientine, and zinc supplementation? *Curr Gastroenterol Rep* 2001;3:54-59
- 63 Najda J, Stella-Holowiecka B, Machalski M. Low-dose zinc administration as an effective Wilson's disease treatment. *Biol Trace Elem Res* 2001;80:281-284
- 64 Brewer GJ, Johnson VD, Dick RD, Hedera P, Fink JK, Kluin KJ. Treatment of Wilson's disease with zinc. XVII: treatment during pregnancy. *Hepatology* 2000;31:364-370
- 65 Emre S, Atillasoy EO, Ozdemir S, Schilsky M, Rathna Varma CV, Thung SN, Sternlieb I, Guy SR, Sheiner PA, Schwartz ME, Miller CM. Orthotopic liver transplantation for Wilson's disease: a single-center experience. *Transplantation* 2001;72:1232-1236
- 66 Michalczyk AA, Rieger J, Allen KJ, Mercer JF, Ackland ML. Defective localization of the Wilson disease protein (ATP7B) in the mammary gland of the toxic milk mouse and the effects of copper supplementation. *Biochem J* 2000;352:565-571
- 67 Minami T, Kaneda S, Otsuka T, Jiao Z, Suzuki Y, Yamada T, Matsumoto K, Izumi K. Role of Atp7b gene in spontaneous and N-diethylnitrosamine-induced carcinogenesis in a new congenic strain, WKAH.C-Atp7b rats. *Jpn J Cancer Res* 2001;92:841-847
- 68 DiDonato M, Zhang J, Que L Jr, Sarkar B. Zinc binding to the NH2-terminal domain of the Wilson disease copper-transporting ATPase: implications for in vivo metal ion-mediated regulation of ATPase activity. *J Biol Chem* 2002;277:13409-13414
- 69 Hou ZJ, Narindrasorasak S, Bhushan B, Sarkar B, Mitra B. Functional analysis of chimeric proteins of the Wilson Cu(I)-ATPase (ATP7B) and ZntA, a Pb(II)/Zn(II)/Cd(II)-ATPase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 2001;276:40858-40863
- 70 Sarkar B. Copper transport and its defect in Wilson disease: characterization of the copper-binding domain of Wilson disease ATPase. *J Inorg Biochem* 2000;79:187-191
- 71 Roelofsen H, Wolters H, Van Luyn MJ, Miura N, Kuipers F, Vonk RJ. Copper-induced apical trafficking of ATP7B in polarized hepatoma cells provides a mechanism for biliary copper excretion. *Gastroenterology* 2000;119:782-793
- 72 Furman B, Bashiri A, Wiznitzer A, Erez O, Holcberg G, Mazor M. Wilson's disease in pregnancy: five successful consecutive pregnancies of the same woman. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2001;96:232-234

# E-钙粘蛋白与食管癌侵袭转移的关系

吴 静, 薛群基, 刘维民, 王爱勤, 寇 伟

吴静, 中国科学院兰州化学物理研究所固体润滑国家重点实验室; 兰州医学院第一附属医院消化科 甘肃省兰州市 730000  
薛群基, 刘维民, 王爱勤, 中国科学院兰州化学物理研究所固体润滑国家重点实验室 甘肃省兰州市 730000  
寇伟, 兰州医学院第一附属医院消化科 甘肃省兰州市 730000  
项目负责人: 吴静, 730000, 中国科学院兰州化学物理研究所固体润滑国家重点实验室; 兰州医学院第一附属医院消化科. wujing36@163.com  
电话: 0931-8619605  
收稿日期: 2002-11-06 接受日期: 2002-11-21

## 摘要

E-钙粘蛋白(E-Cadherin, E-Cad)是一类建立细胞间紧密连接, 维持细胞极性, 保持组织结构完整的钙依赖性跨膜糖蛋白. 众多研究表明, E-Cad与其相应配体的表达异常与肿瘤的发生、发展相关; E-钙粘蛋白的基因缺失、基因突变以及转录异常是E-钙粘蛋白表达异常的主要原因; E-钙粘蛋白的表达异常与肿瘤细胞的低分化、高侵袭性和转移性相关; E-钙粘蛋白功能失活还直接影响了患者的预后. 目前国外对 E-Cad 与食管癌侵袭转移关系的研究相当活跃, 本文就其研究进展作一综述.

吴静, 薛群基, 刘维民, 王爱勤, 寇伟. E-钙粘蛋白与食管癌侵袭转移的关系.  
世界华人消化杂志 2003;11(10):1618-1620  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1618.asp>

## 0 引言

细胞黏附分子是一类存在于细胞黏膜表面介导细胞与细胞, 细胞与基质之间相互黏附的糖蛋白. 依其结构的不同, 可分为选择素族、免疫球蛋白超家族、整合素族、CD44 分子和钙粘蛋白家族等类型. 上皮细胞钙粘蛋白(E-Cadherin, E-Cad)是属于钙粘蛋白家族典型的钙粘蛋白亚族中的一员, 该亚族还包括肝细胞钙粘蛋白、胎盘钙粘蛋白和神经细胞钙粘蛋白. E-Cad 在建立与维持细胞间紧密连接、保持上皮细胞极性中发挥重要作用<sup>[1-5]</sup>. 他的异常表达与肿瘤的发生、发展有密切的关系. 本文就E-Cad的生物学特征以及其与食管癌侵袭转移的关系作一综述.

## 1 E-Cad 的结构、生物学特性与功能调控

E-Cad 基因是位于 16 号染色体长臂 22.1 区带基因编码的一种跨膜糖蛋白. 含有 16 个外显因子及 15 个内含子<sup>[6]</sup>. E-Cad 在体内有二种形式, 一种为组织型(或称细胞型); 另一种是可溶型. 组织型 E-Cad  $M_r$  120 000, 其在特定条件下可经蛋白水解酶脱落成  $M_r$  80 000 的可溶性 E-Cad. 因此, E-Cad 又称细胞 CAM120/80<sup>[7]</sup>. 组织型 E-Cad 主要由细胞外区、跨膜区和细胞内区三部分组

成, 细胞外区包括 5 个重复同源结构域(ECAD1-ECAD5), 每个结构域内都有钙结合位点, 当这些位点与  $Ca^{2+}$  离子结合后细胞外的球形结构域变为棒形, 从而介导细胞间的黏附<sup>[8-11]</sup>. 因此 E-Cad 黏附功能的发挥依赖于  $Ca^{2+}$  的存在.  $Ca^{2+}$  的缺失可使 E-Cad 细胞外区出现构象的可逆性改变, 从而使其丧失黏附作用. 郑志红 et al<sup>[12]</sup>研究发现 E-Cad 基因突变位于细胞外 ECAD3 内, 其第 432 位密码子由天门冬酰胺→赖氨酸(AAC→AAG), 从而影响细胞外结构域的黏附功能.

E-Cad 黏附作用还受其配体 - 连环素(catenin, cat)的调节, E-Cad 需要与其配体 cat 结合成复合物才能起作用. cat 主要包括  $\alpha$ -、 $\beta$ - 和  $\gamma$ -cat<sup>[13]</sup>.  $\alpha$ -cat  $M_r$  102 000, 基因位于 5q21-22, 与黏连斑蛋白(vinculin)有同源性<sup>[14]</sup>.  $\beta$ -cat  $M_r$  95 000, 基因位于 3p21.3-22.  $\gamma$ -cat 又称斑珠蛋白(Plakoglobin), 与  $\beta$ -cat 同属一个基因家族, 二者有 60 % 以上的氨基酸序列相同, 但其作用尚不清楚. E-Cad 的胞质部分与细胞骨架相连, 由连环素将细胞内的信息传给 E-Cad 分子而至细胞外, 介导细胞外的黏附作用. 而这一过程影响着细胞的活动、迁移、浸润和转移. 有关 E-cadherin-catenin 复合体的功能及在肿瘤发生、发展等病理过程中所起的作用非常复杂, 特别是  $\beta$ -catenin 参与的信号转导途径的具体通路及信号转导相关蛋白的生物学效应等尚需深入研究.

## 2 E-Cad 在食管癌组织中的表达及其调节

许多研究发现<sup>[15-20]</sup>食管癌组织中E-cad下调或缺失与肿瘤的恶性生物学表型有很强的相关性; 与肿瘤细胞的分化程度密切相关. 分化良好、保留上皮形态的肿瘤细胞, E-cad表达正常或较高; 低分化或未分化的肿瘤细胞 E-cad 表达较低或不表达. 而且 E-cad 表达正常的患者, 预后优于 E-cad 表达异常者, 这些研究提示 E-cad 表达异常是细胞恶性转变的一个标志性特征.

大量相关研究<sup>[21-25]</sup>也发现具有侵袭性组织学特征的肿瘤细胞常有 E-cad 表达下调或缺失, 浸润性生长的肿瘤其 E-cad 表达异常的发生率显著高于膨胀性生长的肿瘤.

Krishnath et al<sup>[26]</sup>采用免疫组化方法, 对 65 例食管腺癌病理标本同时进行 E-cad,  $\alpha$ -cat,  $\beta$ -cat 检测, 结果发现, 食管癌普遍存在表达异常, 其异常表达率分别为 74 %、61 % 和 64 %. 而且 E-cad、 $\alpha$ -cat 异常表达与肿瘤的分期、分级密切相关;  $\beta$ -cat 异常表达与食管腺癌的分级存在相关性; 三者异常表达均与患者生

存期缩短有关. Nakanishi et al<sup>[27]</sup>对 96 例食管鳞癌的研究显示: E-cad,  $\alpha$ -cat,  $\beta$ -cat 异常表达率分别为 44 %, 72 % 和 74 %, 其表达下调与癌细胞的分化差呈正相关, 与患者的预后也有相关性. 这些研究表明 E-cad 和  $\alpha$ -cat,  $\beta$ -cat 复合体异常表达是食管癌发生、发展过程中的事件, 对食管癌的形成起重要作用; 同时认为 E-cad 和  $\alpha$ -cat,  $\beta$ -cat 复合体异常表达可作为预测食管癌预后的有价值的指标.

Washington et al<sup>[28]</sup>检测 54 例 Barrett's 食管和食管腺癌组织中 E-cad 表达, 结果显示, 随食管黏膜病理变化从轻度不典型增生到重度不典型增生, 再到黏膜内癌、腺癌, E-cad 表达逐渐减低. Matsumoto et al<sup>[29]</sup>对食管未分化鳞癌与分化鳞癌的比较研究中发现, 前者 E-cad 表达明显降低或缺失, 与后者比较有显著性差异, 认为与肿瘤具有高的恶性程度相一致; 而且平均生存期分别为  $35.5 \pm 28.9$  a 和  $6.5 \pm 6.2$  a, 显示与患者的预后有关. 日本学者<sup>[30]</sup>对 416 例食管鳞癌进行了回顾性研究, 发现不论是单因素分析, 还是多因素分析, 均显示 E-cad 表达正常者比异常表达者具有明显的生存优势, 也认为 E-cad 是预测食管癌预后的重要指标.

### 3 E-cad 与食管癌的侵袭、转移和预后

肿瘤的转移是一个复杂的过程, 包括: 黏附作用减弱、癌细胞侵入邻近组织、癌细胞进入血管和淋巴管<sup>[31]</sup>. E-cad 是关键的黏附分子, 其表达下调或功能障碍, 不仅参与了上皮细胞的早期恶性转变<sup>[32]</sup>, 而且与肿瘤的浸润和转移有关. E-cad 表达下调或缺失, 可导致同种细胞失去黏附, 使正常组织不能正常发育成形<sup>[33, 34]</sup>, 可使肿瘤细胞具备侵袭性生长的特点, 有利于癌细胞从原发灶脱落分离, 向局部淋巴结转移或侵入血管向远处转移<sup>[35, 36]</sup>.

Krishnath et al<sup>[26]</sup>对 65 例食管癌标本的研究发现, 在 E-cad 表达正常的 17 例标本中无淋巴结转移的 0 期、I 期、II a 期共占 88 %, 有局部和远处淋巴结转移的 II b 和 III 只占 12 %, 有明显的腺样结构、肿瘤中有良好的细胞间连接的高分化或中分化癌占 100 %. 而 E-cad 表达下调的 48 例中 0 期、I 期、II a 期占 37 %, II b 和 III 占 63 %; 高、中分化的占 33 %, 差分化和未分化的占 67 %. 说明 E-cad 表达下调与食管癌的分期、分级存在相关性. 同时研究还显示, E-cad 表达正常的患者 5 a 生存率为 74 %, 而表达下降者为 14 %, 二者比较有显著性差别  $P < 0.001$ , 提示 E-cad 表达正常者预后显著优于 E-cad 表达下调者.

体内外的多项研究表明<sup>[18-20, 27, 36]</sup>, E-cad 表达下调或缺失的肿瘤, 浸润和转移能力强于 E-cad 表达正常的肿瘤, 在肿瘤转移病灶中 E-cad 表达也低于正常. 认为其表达下调与癌细胞分化差呈正相关, 与患者的预后亦密切相关. 但有研究发现<sup>[26]</sup>, 在食管癌受累的 15 例淋巴结中有 14 例表达了 E-cad (占 93 %), E-cad 的表达

与淋巴结转移呈正相关, 推测<sup>[15, 38]</sup> E-cad 表达下调对癌细胞从原发灶脱落, 释放并侵入血管起着重要作用. 当癌细胞转移到相应部位, 又恢复了 E-cad 表达, 从而有利于癌细胞在转移灶的黏附、定植和生长.

总之, E-cad 在细胞间相互黏附过程中起着重要作用. 研究认为 E-cad 介导的细胞黏附功能下降可能与以下机制有关: (1) E-cad 表达下调和/或基因突变; (2) cat 异常表达或缺失, 包括  $\alpha$ -cat,  $\beta$ -cat 缺乏; (3) 分子异常生化修饰, 如  $\beta$ -cat 的磷酸化. 目前 E-cad 已成为公认的肿瘤浸润和转移抑制因子, 肿瘤细胞通过不同机制干扰 E-cad 黏附系统. E-cad 表达异常不但与肿瘤的发生发展相关, 而且还与肿瘤细胞的低分化、高侵袭性和转移性相关, 同时也直接影响着患者的预后. 因此, 检测 E-cad 在肿瘤组织中的表达有助于对肿瘤的生物表型和预后作出判断; 促使 E-cad 在癌细胞中的正常表达有望成为治疗癌症的新途径. 认为对 E-cad-cat 复合体的深入研究将有助于进一步探讨食管癌等恶性肿瘤的发生发展机制.

### 4 参考文献

- Friedlander DR, Mege RM, Cunningham BA, Edelman GM. Cell sorting-out is modulated by both the specificity and amount of different cell adhesion molecules (CAMs) expressed on cell surfaces. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:7043-7047
- Takeichi M. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science* 1991;251:1451-1455
- Becker KF, Kremmer E, Eulitz M, Becker I, Handschuh G, Schuhmacher C, Muller W, Gabbert HE, Ochiai A, Hirohashi S, Hofler H. Analysis of E-cadherin in diffuse-type gastric cancer using a mutation-specific monoclonal antibody. *Am J Pathol* 1999;155:1803-1809
- Cai J, Ikeguchi M, Tsujitani S, Maeta M, Liu J, Kaibara N. Significant correlation between micrometastasis in the lymph nodes and reduced expression of E-cadherin in early gastric cancer. *Gastric Cancer* 2001;4:66-74
- Berx G, Van Roy F. The E-cadherin/catenin complex: an important gatekeeper in breast cancer tumorigenesis and malignant progression. *Breast Cancer Res* 2001;3:289-293
- Berx G, Staes K, van Hengel J, Molemans F, Bussemakers MJ, van Bokhoven A, van Roy F. Cloning and characterization of the human invasion suppressor gene E-cadherin (CDH1). *Genomics* 1995;26:281-289
- Matsuyoshi N, Tanaka T, Toda K, Okamoto H, Furukawa F, Imamura S. Soluble E-cadherin: a novel cutaneous disease marker. *Br J Dermatol* 1995;132:745-749
- Takeichi M. The cadherin cell adhesion receptor family: roles in multicellular organization and neurogenesis. *Prog Clin Biol Res* 1994;390:445-453
- Overduin M, Harvey TS, Bagby S, Tong KI, Yau P, Takeichi M, Ikura M. Solution structure of the epithelial cadherin domain responsible for selective cell adhesion. *Science* 1995;267:386-389
- Nagar B, Overduin M, Ikura M, Rini JM. Structural basis of calcium-induced E-cadherin rigidification and dimerization. *Nature* 1996;380:360-364
- Fukudome Y, Yanagihara K, Takeichi M, Ito F, Shibamoto S. Characterization of a mutant E-cadherin protein encoded by a mutant gene frequently seen in diffuse-type human gastric carcinoma. *Int J Cancer* 2000;88:579-583
- 郑志红, 孙秀梅, 邱广蓉, 刘言厚, 王梅先, 孙开来. 胃癌癌前和发展阶段中 E-cadherin 基因的突变. *世界华人消化杂志* 2002;10:153-165

- 13 Ozawa M, Baribault H, Kemler R. The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecule uvomorulin associates with three independent proteins structurally related in different species. *EMBO J* 1989;8:1711-1717
- 14 Nagafuchi A, Takeichi M, Tsukita S. The 102 kd cadherin-associated protein: similarity to vinculin and posttranscriptional regulation of expression. *Cell* 1991;65:849-857
- 15 Shiozaki H, Oka H, Inoue M, Tamura S, Monden M. E-cadherin mediated adhesion system in cancer cells. *Cancer* 1996;77(8 Suppl):1605-1613
- 16 Syrigos KN, Krausz T, Waxman J, Pandha H, Rowlinson-Busza G. E-cadherin expression in bladder cancer using formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: correlation with histopathological grade, tumor stage and survival. *Int J Cancer* 1995;64:367-370
- 17 Takayama T, Shiozaki H, Shibamoto S, Oka H, Kimura Y, Tamura S.  $\beta$ -catenin expression in human cancers. *Am J Pathol* 1996;148:39-42
- 18 Siitonen SM, Kononen JT, Helin HJ, Rantala IS, Holli KA, Isola JJ. Reduced E-cadherin expression is associated with invasiveness and unfavorable prognosis in breast cancer. *Am J Clin Pathol* 1996;105:394-402
- 19 Matsuura K, Kawanishi J, Fujii S, Imamura M, Hirano S, Takeichi M, Niitsu Y. Altered expression of E-cadherin in gastric cancer tissues and carcinomatous fluid. *Br J Cancer* 1992;66:1122-1130
- 20 Dorudi S, Hanby AM, Poulsom R, Northover J, Hart IR. Level of expression of E-cadherin mRNA in colorectal cancer correlates with clinical outcome. *Br J Cancer* 1995;71:614-616
- 21 Oka H, Shiozaki H, Kobayashi K, Inoue M, Tahara H, Kobayashi T. Expression of E-cadherin cell adhesion molecules in human breast cancer tissues and its relationship to metastasis. *Cancer Res* 1993;53:1696-1701
- 22 Nagafuchi A, Shirayoshi Y, Okazaki Y, Yasuda K, Takeichi M. Transformation of cell adhesion properties by exogenously introduced E-cadherin cDNA. *Nature* 1987;329:341-343
- 23 McNeill H, Ozawa M, Kemler R, Nelson WJ. Novel function of the cell adhesion molecule uvomorulin as an inducer of cell surface polarity. *Cell* 1990;62:309-316
- 24 Takeichi M. Cadherins in cancer: implications for invasion and metastasis. *Curr Opin Cell Biol* 1993;5:806-811
- 25 Umbas R, Schalken JA, Aalders TW, Carter BS, Karthaus HF, Schaafsma HE, Debruyne FM, Isaacs WB. Expression of the cellular adhesion molecule E-cadherin is reduced or absent in high-grade prostate cancer. *Cancer Res* 1992;52:5104-5109
- 26 Krishnadath KK, Tilanus HW, van Blankenstein M, Hop WC, Kremers ED, Dinjens WN, Bosman FT. Reduced expression of the cadherin-Catenin complex in esophageal adenocarcinoma correlates with poor prognosis. *J Pathol* 1997;182:331-338
- 27 Nakanishi Y, Ochiai A, Akimoto S, Kato H, Watanabe H, Tachimori Y, Yamamoto S, Hirohashi S. Expression of E-cadherin, alpha-Catenin, beta-Catenin and plakoglobin in esophageal carcinomas and its prognostic significance: immunohistochemical analysis of 96 lesions. *Oncology* 1997;54:158-165
- 28 Washington K, Chiappori A, Hamilton K, Shyr Y, Blanke C, Johnson D, Sawyers J, Beauchamp D. Expression of beta-Catenin, alpha-Catenin, and E-cadherin in Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinomas. *Mod Pathol* 1998;1:805-813
- 29 Matsumoto M, Natsugoe S, Nakashima S, Shimada M, Nakano S, Kusano C, Baba M, Takao S, Matsushita Y, Aikou T. Biological evaluation of undifferentiated carcinoma of the esophagus. *Ann Surg Oncol* 2000;7:204-209
- 30 Prognostic significance of CylinD1 and E-Cadherin in patients with esophageal squamous cell carcinoma: multiinstitutional retrospective analysis. *J Am Coll Surg* 2001;192:708-718
- 31 Beavon IR. The E-cadherin-catenin and complex in tumour metastasis: structure, function and regulation. *Eur J Cancer* 2000;36:1607-1620
- 32 Sakaki T, Wato M, Tamura I, Nakajima M, Morita S, Kakudo K, Shirasu R, Tanaka A, Sakaki T. Correlation of E-cadherin and alpha-catenin expression with differentiation of oral squamous cell carcinoma. *J Osaka Dent Univ* 1999;33:75-81
- 33 Larue L, Ohsugi M, Hirchenhain J, Kemler R. E-cadherin null mutant embryos fail to form a trophectoderm epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:8263-8267
- 34 Riethmacher D, Brinkmann V, Birchmeier C. A targeted mutation in the mouse E-cadherin gene results in defective preimplantation development. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:855-859
- 35 Oka H, Shiozaki H, Kobayashi K, Inoue M, Tahara H, Kobayashi T, Takatsuka Y, Matsuyoshi N, Hirano S, Takeichi M. Expression of E-cadherin cell adhesion molecules in human breast cancer tissues and its relationship to metastasis. *Cancer Res* 1993;53:1696-1701
- 36 Pignatelli M, Ansari TW, Gunter P, Liu D, Hirano S, Takeichi M, Kloppel G, Icmoine NR. Loss of membranous E-cadherin expression in pancreatic cancer: correlation with lymph node metastasis, high grade, and advanced stage. *J Pathol* 1994;174:243-248
- 37 Hemiston ML, Gordon JI. In vivo analysis of cadherin function in the mouse intestinal epithelium: essential roles in adhesion, maintenance of differentiation, and regulation of programmed cell death. *J Cell Biol* 1995;129:489-506
- 38 Gagliardi G, Kandemir O, Liu D, Guida M, Benvestito S, Ruers TG, Benjamin IS, Northover JM, Stamp GW, Talbot IC. Changes in E-cadherin immunoreactivity in the adenoma-carcinoma sequence of the large bowel. *Virchows Arch* 1995;426:149-154



# 胰腺癌的光动力学治疗

丁新民, 顾 瑛, 刘凡光

丁新民, 顾瑛, 刘凡光, 中国人民解放军总医院激光科 北京市 100853  
项目负责人: 顾瑛, 100853, 北京市复兴路28号, 中国人民解放军总医院激光科.  
电话: 010-66939394  
收稿日期: 2002-11-06 接受日期: 2002-11-16

## 摘要

胰腺癌的发病率有逐年增高的趋势,但目前对胰腺癌的处理疗效欠理想.光动力学治疗(Photodynamic therapy, PDT)有望成为胰腺癌综合治疗中可选择的手段之一,研究发现光敏剂可在胰腺癌组织内有选择性滞留,PDT后可引起胰腺癌组织坏死,延长患者的生存期.PDT胰腺癌主要并发症为穿刺部位的疼痛、出血和术后胆道梗阻.

丁新民, 顾瑛, 刘凡光. 胰腺癌的光动力学治疗. 世界华人消化杂志 2003;11(10):1621-1623

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1621.asp>

## 0 引言

胰腺癌主要是指胰腺外分泌腺癌,约占各种肿瘤发病率的1-4%,消化道肿瘤的8-10%.全球胰腺癌的发病率有逐年增高的趋势,近20 a来我国胰腺癌的发病率已增加1-5倍.2000年的胰腺癌死亡率,在美国已位列因肿瘤死亡的第4位,我国为第5-7位.胰腺癌的首选方法为手术切除,但胰腺癌多不易早期发现,手术切除率较低,约5-20%,手术时已有40-50%以上为晚期和出现远处转移.胰腺癌的手术复杂,手术相关的死亡率约3-8%,术后并发症发生率达20%以上.且手术的效果也不甚理想,术后中位生存期为13-17 mo,5 a生存率仅5-15%.胰腺癌是放、化疗不敏感型肿瘤,化疗、放疗或二者联合,对患者的生存期延长并不明显.虽手术、放疗、化疗或综合治疗后,胰腺癌的预后仍较差,诊断后的1 a生存率约10%,中位生存期没有转移和有转移的分别为6-10 mo和3-6 mo<sup>[1-3]</sup>.可见,要提高胰腺癌患者的生存率,还有必要寻求新的治疗方法.最近的临床研究发现,光动力学治疗有望成为治疗胰腺癌的新手段<sup>[4]</sup>.

## 1 PDT 概述

PDT是1970年代初发展起来的一种治疗肿瘤的方法,是指光敏剂(Photosensitizer)进入人体后,可有选择性的聚集在肿瘤组织,被照射在肿瘤组织的合适波长光激发后,在肿瘤组织内发生一系列的光化学反应,产生一些中间活性物质,而发挥治疗肿瘤作用.目前普遍认为这些中间活性物质主要为活性氧物质(reactive oxygen

species, ROS). PDT治疗肿瘤主要通过三方面机制: (1)直接杀死肿瘤细胞; (2)破坏肿瘤组织内的血管,阻断肿瘤的血供; (3)免疫调节作用<sup>[5]</sup>.

光敏剂是指能吸收特定波长光的能量并传递给周围的分子,从而产生活性氧等毒性物质的一类化学物质.血卟啉衍生物(HPD)类是最常用的第一代光敏剂,目前已有加拿大、美国、俄罗斯、法国、荷兰和日本等多国政府批准应用于多种肿瘤的治疗,其中光敏素 II (Photofrin II, PII)是被最广泛应用的 HPD 类光敏剂之一<sup>[4]</sup>. HPD类光敏剂在临床上应用还存在一些缺陷:如他们多为混合物,储存的条件和时间不同,最终成分可不相同;他们的最长激发波长在630 nm,此波长穿透的组织深度有限(小于0.5 cm),限制了PDT在较大肿瘤上的应用;PII只有注射剂量的0.1-3%集聚在肿瘤组织,组织选择性差,而在皮肤内的滞留时间超过2 mo,需避光时间长<sup>[6]</sup>.因此在第一代光敏剂的基础上,相继开发了第二、三代光敏剂.第二代光敏剂有卟啉(Porphyrin)和卟啉相关化合物(Porphyrin related compounds),如苯并卟啉衍生物单酸(BPD-MA, Verteporfin)、酞菁类(Phthalocyanines)、四间-羟基苯基二氢卟吩(Temoporfin, m-THPC),德州卟啉(Texaphyrins)、N-天门冬酰基二氢卟吩e6 (N-aspartyl chlorin e6、NPe6), 金丝桃素(hypericin)等.第二代光敏剂在对组织的选择性、单线氧的产率和受激发的波长方面,较第一代光敏剂有所改善.目前他们多处在临床I-III期研究阶段,尚无批准正式临床应用<sup>[7]</sup>.第三代光敏剂是在第二代光敏剂的基础上交联上特殊的物质,更加提高了对肿瘤组织的选择性.交联上的物质简单的有多聚体(Polymers)和脂质体(Liposomes),复杂的有肿瘤组织表达的抗原或受体相应的抗体或配体等.目前第三代光敏剂多处在实验室研究阶段.光敏剂在能量的传递过程还可产生荧光,因此除治疗外尚可用于检测.

## 2 PDT 胰腺癌的实验研究

早在1987年就有PDT胰腺癌的实验研究报道<sup>[8]</sup>.细胞或动物实验发现,第一代光敏剂<sup>[9]</sup>和第二代光敏剂的酞菁(PC)<sup>[10]</sup>、脱镁叶绿素甲酯酸A (Pheophorbide A, PH-A)<sup>[11, 12]</sup>、m-THPC<sup>[13, 14]</sup>、5-氨基乙酰丙酸(5-ALA)<sup>[15]</sup>及金丝桃素<sup>[16]</sup>等,均是PDT胰腺癌有效的光敏剂.

Schroder et al 用<sup>125</sup>I 标记的二血卟啉醚(DHE),经血管注入叙利亚金鼠3 h后,胰腺癌区域的DHE浓度是非肿瘤区域的2.4倍. PDT后,胰腺的肿瘤区域发生广

泛的坏死,而正常区域无明显的变化,但高达57% (4/7)动物发生十二指肠和空肠穿孔而引起死亡<sup>[9]</sup>. Chatlani et al<sup>[10]</sup>应用化学提取和荧光显微镜检测发现,偶氮丝氨酸(azaserine)诱导的仓鼠胰腺癌组织内酞菁的浓度比正常胰腺组织高. PDT造成正常胰腺组织坏死的参数(光敏剂的给药浓度和光剂量)阈值是造成胰腺癌组织坏死的7倍,除与酞菁在肿瘤区域的浓度较高外,也可能与正常组织表达抗单线氧物质相关. Aprahamian et al<sup>[11]</sup>给Lewis小鼠静注3 mg/kg<sup>-1</sup> PH-A 24 h后,胰腺癌组织滞留的浓度是正常胰腺组织的6.7倍. 在小鼠体内PH-A主要被网状内皮系统吸收,皮肤的浓度很低,提示PH-A引起皮肤光敏反应应用较弱,比第一代光敏剂更适合于胰腺癌的治疗. 如PH-A剂量提高为9 mg/kg<sup>-1</sup>,静注24 h后偶氮丝氨酸诱导的胰腺癌组织内的PH-A的浓度是正常胰腺组织内的13.5倍. 治疗组的9只小鼠中有6只生存期超过120 d,而对照组的36只荷瘤小鼠均在35 d内死亡( $P < 0.01$ ). PDT后正常胰腺和肝门区未受明显损伤,但均发生不同程度的十二指肠损伤<sup>[12]</sup>. Milky et al研究发现, mTHPC在肿瘤组织中约4-5 d达到最高浓度,而在正常胰腺组织只需2-4 d. 可用mTHPC在不同组织达到最高浓度的时间差,来提高PDT时选择性. mTHPC-PDT后约3 d,肿瘤坏死区域的直径达到最大. 相同PDT参数下肿瘤坏死的直径与激光照射的方法有一定的关系,持续(continuous)照射坏死直径约8.7 mm,间隙性(fractionated)照射约可达12.4 mm. mTHPC-PDT后主要并发症为十二指肠穿孔,偶有可逆性的胆道梗阻<sup>[13,14]</sup>.

应用这些光敏剂进行PDT对靶组织有一定的选择性,这可能与光敏剂在靶组织内分布的特性及靶组织自身的特性相关. 动物实验也揭示,十二指肠穿孔是PDT后主要的并发症,此致命性的并发症在一定程度上阻碍了胰腺癌PDT进一步的临床研究.

### 3 PDT胰腺癌的临床研究

Bown et al 考虑到实验研究所用的动物多为啮齿类动物,人类的十二指肠壁要比啮齿类动物的厚,理论上人类胰腺癌PDT后发生十二指肠穿孔的机率会低一些. 因此他们从1996-11开展PDT胰腺癌的临床研究,最近报道了16例胰腺癌患者PDT的I期临床研究结果<sup>[4]</sup>. 这是目前首次也是惟一的一项PDT胰腺癌的临床研究报道,为PDT胰腺癌适应证的选择、具体操作及术后情况的了解提供了一定的帮助.

3.1 入选患者的情况(适应证) 纳入的病例均已不适宜手术治疗,但有远处转移或预期寿命小于3 mo的病例排除在外, PDT前患者Karnofsky状态评分超过60%,也未经任何治疗. 本组临床研究的病例均来自伦敦Middlesex医院胰腺胆道科,共有16例,年龄46-77岁(中位年龄66岁). 11例是胰头癌,3例为壶腹周围癌(其中2例已浸润到胰头),另外2例为原发部位不详的

胰头部位肿瘤,所有患者均经病理证实. 根据UICC的TNM分期, I期2例, II期8例, III期6例. 经ERCP和双时相对比增强螺旋CT检查及胰腺外科医生会诊,所有患者均不能手术,不能手术的原因,14例为肿瘤浸润大血管(肠系膜上静脉12例,肠系膜上动脉3例,门静脉6例,胃十二指肠动脉2例),2例无大血管浸润但一般情况差. 在PDT前已明确诊断的时间1-5 mo(平均2.5 mo),多是诊断后不能确定最佳治疗方案而延误了时间.

3.2 PDT的操作 此项研究所选用的光敏剂为mTHPC,理由是他们的动物实验发现mTHPC导致肿瘤坏死的直径最大,且所需的光功率也最小-即mTHP所需的照光时间最短. mTHPC经专用的溶剂溶解并用特定的滤器滤过后,以0.15 mg/kg<sup>-1</sup>剂量缓慢静脉注射. mTHPC注射3 d后,进行照光. 照光前给予镇静剂和镇痛剂,局麻后在B超和CT双重引导和定位下,经上腹部皮肤插入6枚以上19G穿刺针,各穿刺针均达肿瘤的最深处,针尖的间距约1.5 cm,穿刺针的数量由肿瘤大小和部位所决定. 激光通过光束分离器(beam splitter)耦合入四根0.4 mm的光纤中,光纤通过穿刺针导入,超出针头3 mm直接与肿瘤组织接触. 确定穿刺针和光纤位置无误,每根光纤给予功率100 mW(此功率光纤周围的血液凝固作用最弱,光纤能量可最大限度传送于组织),当能量达到预定目标后,CT引导下后退穿刺针和光纤1 cm,应用相同的功率和能量照光,保证照光范围基本覆盖整个肿瘤组织,每个点预定的照光能量约20-40 J(能量增加,肿瘤坏死的直径并不增加而并发症增多,因此有13例患者所用能量为20 J),每例患者总能量的范围40-480 J(中位能量240 J). 1例壶腹部癌患者,第一次经皮穿刺插入的光纤基本滑入癌旁的正常胰腺组织而未行PDT,之后在内镜引导下把弥漫性光纤插入远端的胆总管进行照射.

3.3 PDT后的情况 PDT后患者的生存期4-30 mo(中位9.5 mo),有1例随访31 mo仍存活. 诊断后的生存期6-34 mo(中位12.5 mo),1例已超过35 mo仍存活. 有3例患者PDT恢复后进行了化疗,他们的生存期分别为11 mo、12 mo和15 mo. 应用双时相对比增强螺旋CT监测PDT后反应,治疗区出现新的非增强区域(对1例患者的非增强区针吸活检提示为坏死的肿瘤,但活检引起患者的不适和少量出血,因此随后患者没有进行活检),10例患者在治疗区周围出现水肿. 多数的肿瘤坏死区恢复后,大小没有变化,有3例因坏死物吸收而皱缩.

PDT后所有患者均出现上腹痛,多需使用鸦片类镇痛剂才能缓解,腹痛多在48 h内缓解. 5例患者PDT后出现腹泻(其中3例PDT前就有间歇性腹泻),经胰腺功能替代治疗后治愈. PDT后有1例需胰岛素替代治疗,1例需口服降糖药治疗. PDT后住院时间方面,1例因消化道大出血而住院26 d,1例因持续性厌食需

胃造口喂养而住 30 d, 其他患者住院时间为 5-9 d (中位 7 d). PDT 前所有患者均有梗阻性黄疸, 经放胆道支架而缓解. PDT 后可使支架变形, 本组 6 例行预防性更换胆道支架, 3 例发生胆管炎 (其中 2 例胆管远端塑料支架受到狭窄的十二指肠明显挤压, 重置支架存在技术上的困难), 3 例进展为难治性梗阻性黄疸. 本组虽有十二指肠壁的坏死, 约 PDT 6 wk 后基本已愈合, 并未发生动物实验常见的十二指肠穿孔, 但有 2 例因坏死面积较大愈合后出现了十二指肠狭窄. 6 例患者在穿刺的部位出现了出血, 有 2 例需输血纠正. 胰腺炎不是常见的并发症, 本组 PDT 后均未发生. 有 1 例患者在穿刺部位出现肿瘤种植, 经局部切除和放疗治愈. 本组未发生 PDT 相关的死亡.

可见 PDT 可引起胰腺癌组织坏死, 延长患者的生存期. PDT 术后的并发症主要为疼痛、胆道梗阻和出血. PDT 后仍可联合化疗等.

总之, PDT 胰腺癌技术要求高, 且胰腺附近重要脏器和血管较多, 如操作不慎可带来严重的并发症, 因此 PDT 应用于胰腺癌的治疗, 尚需更多的临床研究来权衡其利弊. 但应用目前的手段 (手术、化疗和放疗) 综合治疗胰腺癌的疗效欠佳时, PDT 有望成为胰腺癌综合治疗中可选择的方法之一.

#### 4 参考文献

- Schafer M, Mullhaupt B, Clavien PA. Evidence-based pancreatic head resection for pancreatic cancer and chronic pancreatitis. *Ann Surg* 2002;236:137-148
- Heinemann V. Present and future treatment of pancreatic cancer. *Semin Oncol* 2002;29:23-31
- 刘民培, 马景云, 潘伯荣, 马连生. 中国胰腺癌的研究. *世界华人消化杂志* 2001;9:1103-1109
- Bown SG, Rogowska AZ, Whitelaw DE, Lees WR, Lovat LB, Ripley P, Jones L, Wyld P, Gillams A, Hatfield AW. Photodynamic therapy for cancer of the pancreas. *Gut* 2002;50:549-557
- Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW, Jori G, Kessel D, Korbek M, Moan J, Peng Q. Photodynamic therapy. *J Natl Cancer Inst* 1998;90:889-905
- Moore JV, West CM, Whitehurst C. The biology of photodynamic therapy. *Phys Med Biol* 1997;42:913-935
- Sharman WM, Allen CM, van LJE. Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications. *DDT* 1999;4:507-517
- Mang TS, Wieman TJ. Photodynamic therapy in the treatment of pancreatic carcinoma: dihematoporphyrin ether uptake and photobleaching kinetics. *Photochem Photobiol* 1987;46:853-858
- Schroder T, Chen IW, Sperling M, Bell RH Jr, Brackett K, Joffe SN. Hematoporphyrin derivative uptake and photodynamic therapy in pancreatic carcinoma. *J Surg Oncol* 1988;38:4-9
- Chatlani PT, Nuutinen PJ, Toda N, Barr H, MacRobert AJ, Bedwell J, Bown SG. Selective necrosis in hamster pancreatic tumours using photodynamic therapy with phthalocyanine photosensitization. *Br J Surg* 1992;79:786-790
- Whitaker CJ, Battah SH, Forsyth MJ, Edwards C, Boyle RW, Matthews EK. Distribution of pheophorbide A in normal tissues and in an experimental pancreatic cancer in rats. *Anticancer Drug Des* 1993;8:101-114
- Evrard S, Keller P, Hajri A, Balboni G, Mendoza-Burgos L, Damge C, Marescaux J, Aprahamian M. Experimental pancreatic cancer in the rat treated by photodynamic therapy. *Br J Surg* 1994;81:1185-1189
- Mikvy P, Messmann H, Pauer M, Stewart JC, Millson CE, MacRobert AJ, Bown SG. Distribution and photodynamic effects of meso-tetrahydroxyphenylchlorin (mTHPC) in the pancreas and adjacent tissues in the Syrian golden hamster. *Br J Cancer* 1996;73:1473-1479
- Mikvy P, Messman H, MacRobert AJ, Pauer M, Sams VR, Davies CL, Stewart JC, Bown SG. Photodynamic therapy of a transplanted pancreatic cancer model using meta-tetrahydroxyphenylchlorin (mTHPC). *Br J Cancer* 1997;76:713-718
- Regula J, Ravi B, Bedwell J, MacRobert AJ, Bown SG. Photodynamic therapy using 5-aminolaevulinic acid for experimental pancreatic cancer-prolonged animal survival. *Br J Cancer* 1994;70:248-254
- Liu CD, Kwan D, Saxton RE, McFadden DW. Hypericin and photodynamic therapy decreases human pancreatic cancer in vitro and in vivo. *J Surg Res* 2000;93:137-143

# Ets转录因子家族在发育和肿瘤发生中作用的研究进展

张 健, 高福禄, 刘芝华

张健, 河北师范大学生命科学院 河北省石家庄市 050016  
高福禄, 承德医学院组织学与胚胎学教研室 河北省承德市 067000  
刘芝华, 中国医学科学院肿瘤医院分子肿瘤学国家重点实验室  
北京市 100021  
项目负责人: 刘芝华, 100021, 北京市左安门外潘家园, 中国医学科学院肿瘤医院分子肿瘤学国家重点实验室. liuzh@pubem.cicams.ac.cn  
电话: 010-67723791 传真: 010-67723789  
收稿日期: 2003-01-10 接受日期: 2003-03-05

## 摘要

Ets转录因子家族包括30多个成员, 具有复杂的结构和功能, 通过调节细胞的增生、分化、凋亡及细胞与细胞间的相互作用, 在许多生理和病理过程中发挥重要的调控作用. Ets家族成员在发育过程中特异性时空表达与其对发育的调控作用密切相关, 他从细胞、组织、器官不同的水平调控发育过程, 特别是在血管发生和免疫系统的发生中发挥重要作用. 此外, Ets在肿瘤的侵袭、转移和血管生成过程中发挥重要作用, 主要与调节细胞外基质(ECM)酶的转录活性有关. Ets转录因子受多种信号通路的调控, MAP激酶(Erk, p38和JNK)、Ca<sup>2+</sup>依赖的信号通路以及TGF-β、JAK/STAT信号通路都可以调控转录因子Ets表达和功能.

张健, 高福禄, 刘芝华. Ets转录因子家族在发育和肿瘤发生中作用的研究进展. 世界华人消化杂志 2003;11(10):1624-1627

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1624.asp>

## 0 引言

Ets基因最早发现于美国Frederick的国家癌症研究所分子肿瘤学实验室.通过研究禽类逆转录病毒-E26<sup>[1]</sup>, 研究者发现了一系列拥有与E26高度保守的同源序列的基因, 根据E26(E-twenty six)的缩写而将该基因命名为Ets. 该基因的共同特点是含有高度保守的DNA结合域, 能够和特定序列结合调控靶基因的表达和功能.通过调节细胞的增生、分化、凋亡及上皮-间充质间的相互作用<sup>[2, 3]</sup>, Ets参与许多生理和病理过程. 大量研究发现, Ets在两栖类、鸟类及哺乳动物的发育和肿瘤的侵袭转移中发挥重要的调控作用.现就Ets转录因子家族在发育和肿瘤发生中的研究进展作一综述.

## 1 Ets转录因子家族组成

人类Ets家族基因在进化上高度保守, 其共同点是均含有一个大约85个氨基酸的DNA结合域, 也就是位于C-端的Ets区. 该区富含精氨酸和赖氨酸残基, 为螺旋-转角-螺旋基序, 可识别并结合富含嘌呤的DNA核心序列A/CGGAA/T, 这一序列存在于许多基因的

5'-侧翼调节区, 有反式活化功能.目前Ets转录因子家族包括30多个成员, 根据ETS结构域构象和位置不同, Ets家族分为多个亚家族.

亚族	组成
Ets	Ets1 Ets2
EGR	Erg2 Fli-1 Fev
ELG	GABP α
ETS4	TEL(ETV6)
PEA3	E1AF ERM ETV1 ERB1
TCFs	E1k-1 Sapla NET/ERP/Sap
Elf	Elf-1 NERF1b MEF
Spi	PU.1 Spi-B
ERF	ERF PE-1
ESX	ESX/ESE-1

## 2 Ets转录因子在胚胎不同阶段及生后的表达模式<sup>[2]</sup>

Ets转录因子在细胞、组织、器官等水平调控胚胎发生和生后发育过程. 近来, 人们对Ets转录因子在胚胎不同阶段及成年后的表达模式有了较为全面的了解. 研究发现Ets家族成员在胚胎发生早期的血细胞生成和血管发生及胚胎发育后期的组织发生中发挥重要的调控作用. 成年后Ets在许多组织, 如造血组织、血管、脑和中枢神经系统、乳腺、子宫内膜、卵巢、睾丸、肾和肺中均有表达. 由于Ets转录因子不同成员在胚胎发育过程中的特异性的表达与其功能关系密切, 现将Ets转录因子在胚胎不同阶段及成年后的时空表达模式总结如下表:

## 3 部分Ets转录因子家族成员在胚胎发育中的研究进展

3.1 Ets1在胚胎发生早期起重要的调节作用 原位杂交实验表明: Ets1在胚胎间充质细胞中表达, 提示Ets1在器官形成和组织重建的过程中, 对中胚层细胞有重要的调节作用. 此外, Ets1在增生旺盛的人胚胎血管内皮细胞和成年后血管中均有高水平的表达, 体外实验也发现了他能促进血管内皮细胞黏着和毛细血管样的结构的形成<sup>[4]</sup>, 说明Ets1在血管的发生和发育中起着重要的作用. 但是, 在Ets1基因敲除的小鼠胚胎中血管可以正常发育, 说明Ets1在胚胎血管发生过程中不是必需的<sup>[5]</sup>. 在免疫系统中, Ets1对T、B淋巴细胞系的生存及成熟必不可少, 缺少Ets1将导致T细胞凋亡.

3.2 Ets2在胚胎和新生期发育过程中高水平表达 是细

Ets 家族成员	最早出现的部位	妊娠中期的表达区	成年后的表达区
Ets1	卵黄囊的血岛	心脏, 背主动脉节间 动脉的血管网络	脾, 胸腺, 肺, 肠, 子宫内 膜, 卵巢, 神经系统的星形胶 质细胞
Ets2	滋养外胚层	肾, 肺, 肠及子宫的上皮层, 软骨和骨的原基, 淋巴组织 及胸腺的皮质区	淋巴组织及胸腺的皮质区, 脑的某些特定区域, 乳腺, 子宫壁, 卵巢及肺泡
Erg	卵黄囊的血岛, 中胚层及胚外 中胚层的组织, 胚胎的内皮组织	血管树, 前软骨形成区, 生殖 嵴、肾、泌尿小管的间充质	
Fli1	间充质细胞, 新形成的中胚层, 脉管系统, 迁移的神经嵴细胞 或其附近的区域	脉管系统, 肝中巨核细胞	脾巨核样细胞, 胸腺内皮质、 髓质样的结构, 血小板
TEL1	卵黄囊	肺, 肝, 胸腺, 造血细胞系	心脏, 脑, 脾, 肺, 肝, 骨 骼肌, 肾, 睾丸, 骨髓
PU1	发育中的血细胞如红细胞、单核 细胞系、粒细胞和 B- 淋巴细胞系	肝, 神经管周围组织以及环绕 脊索的间质细胞	脾, 胸腺, 骨髓, 巨噬细胞, 肥大细胞, 树突细胞, B 细胞
SpiB		脾的骨髓, 腋、肠系膜的淋巴结, 胸腺的髓质	腋、肠系膜的淋巴结, 脾的生发中心及脾细胞
Elf1	在早期胚胎发生的过程中以 低水平表达	在胸腺的皮质、髓质, 脾和上皮组织	造血组织, 胸腺, 脾, 骨髓, 肾, 膀胱, 睾丸, 肝, 小肠, 心脏, 肺, 卵巢, 输尿管, 子宫内层
PEA3 亚家族	开始于神经管的闭合	乳腺, 生肌细胞系, 生软骨 细胞系及中、外胚层的心, 肾, 肺等	以不同水平在感觉和运动神经 元、骨骼肌表达, 在脑中以 高水平表达.此外, 在结肠表达

胞增生相关的早期反应基因. Ets2 还与细胞分化相关, 如在 T 细胞激活的过程中, Ets2 在有活性的 T 细胞中表达, 而 Ets1 则表达于静止期的 T 细胞.此外, 在胚胎滋养层细胞的迁移、分化过程中, Ets2 也是一个重要的转录因子<sup>[6]</sup>.

3.3 Erg 在未成熟的 B 淋巴细胞和 T 淋巴细胞系中高表达 当这些细胞成熟以后, 其表达水平明显下降, Erg 低表达对 T 细胞成熟可能是必需的.与之近似的是在内皮发育成熟以后, 血管树中的 Erg 表达也降低了, 随后, Erg 的表达仅局限于形成中的毛细血管.上述事实说明 Erg 在血管发生中起重要的调节作用<sup>[7]</sup>.

3.4 Fli1 有助于造血细胞系的建立和维持 Fli1 基因敲除小鼠出现发育缺陷<sup>[8]</sup>. 在妊娠中期, Fli1 对参与血管发生的内皮细胞起重要的调节作用, 还可以调节脑脊膜血管丛内血管的稳定性, 在成年后血管内皮细胞中未检测到 Fli1 的表达<sup>[9, 10]</sup>.

3.5 胚胎血细胞的生成并不需要 FEL1 但在生后或成年的小鼠中, FEL1 不仅对造血干细胞和骨髓中多能祖细胞的归巢起作用<sup>[11]</sup>, 还可以维持造血组织形成卵黄囊血管的正常结构.FEL1 基因敲除小鼠骨髓不能重建造血功能, 胚胎会失去形成卵黄囊脉管的能力, 在胚胎发育的第 10.5 d, 不能保证更加复杂脉管网络的完整性, 以维持其胚胎发育, 这种缺陷引起卵黄囊血管生成的崩

解破坏, 导致胚胎在第 12.5 d 死亡.

3.6 在造血系统中 PU.1 对增生和分化的调节作用与其表达水平有关<sup>[12]</sup>. PU.1 在髓样细胞而不是在淋巴细胞中以较高水平表达, 在有粒白细胞、红细胞和巨核细胞的早期分化中起作用, 并且抑制成红血细胞分化为红细胞, PU.1 持续作用于成红血细胞导致其无限生长, 而后转化为红白血病状态. 近来 Dekoter et al<sup>[13]</sup>研究也表明: 在由 B 淋巴祖细胞转变为前 B 细胞的过程中需要低水平的 PU.1, 而高水平的 PU.1 导致巨噬细胞分化, 而不是促进其祖细胞的增生. 在胚胎发生过程中, PU.1 缺失会导致发育延缓和 T 细胞数目减少, 缺乏 PU.1 的 B 细胞则表现为 B 细胞介导的信号转导异常.

3.7 SpiB 的表达主要局限于淋巴细胞系 在淋巴细胞分化中起关键的调节作用. 在由淋巴祖细胞发育到成熟 T 细胞的过程中, SpiB 的表达降低, 在 B 细胞成熟过程中则明显升高. SpiB 基因敲除小鼠不仅导致了选择性的 T 细胞体液免疫反应的缺陷, 而且影响了 B 细胞介导的反应, B 细胞在这些动物中虽然可以发育成熟, 但没有功能.

#### 4 Ets 转录因子家族在肿瘤发生中的调节作用

Ets 基因在整个进化过程中是一个保守基因, 其正常功能发生改变时, 可导致分化和发育异常及肿瘤发生, 在某些类型的肿瘤中, 有许多与肿瘤相关的 Ets



突变发生, 一个易位染色体将 Ets 基因片段与一个不相关的基因融合, 导致了嵌合癌蛋白的表达, 该类蛋白分为两类, 第一类 Ets 蛋白可使他们的癌基因效应作为转录因子, 来下调 Ets 调控的基因, 这对细胞周期的调控十分重要. 第二类 Ets 嵌合肿瘤蛋白, 通过永久的激活某些信号转导途径或抑制一个关键转录因子的活性来促进癌基因<sup>[14]</sup>.

已有研究发现 Ets 家族的重要成员 Ets-1 的表达与胰腺癌、甲状腺癌、乳腺癌、胃癌、子宫内膜癌、口腔鳞癌、肝细胞性肝癌(HCC)的发生、转移显著相关. ELF3 能够调节鳞状上皮细胞分化相关基因的表达, 在肺癌、食管癌和宫颈上皮癌的发生中起重要作用. ELF4 可以抑制肿瘤中血管生成及 MMP-2、MMP-9 的表达水平<sup>[15]</sup>, ELF4 过表达的 A549 细胞系失去了对裸鼠的致瘤性. ELF5 在肿瘤中表现为等位基因的缺失或重排, 可能参与乳腺癌、肺癌、前列腺腺瘤的发生. TEL 基因在侵袭性乳腺癌组织中存在缺失, 在晚期卵巢癌中杂合性缺失, 这提示他与乳腺癌、卵巢癌的发生、发展有关. Erg 基因在髓细胞白血病、Ewing' 肉瘤、儿童长骨肿瘤中发生重排.

进一步研究已经发现癌基因 Ets 家族在肿瘤发生、发展中的作用, 特别是他作为转录因子在肿瘤转移和肿瘤血管生成中的作用, 主要与某些降解细胞外基质(ECM)酶的转录激活有关, 这些酶包括基质金属蛋白酶(MMP)、丝氨酸蛋白酶等<sup>[16]</sup>. 研究发现, 大多数诱导型 MMP<sub>s</sub> 启动子(除 MMP12 以外)都含有与 Ets 转录因子结合的 PEA3 组件, 所以 Ets 转录因子可以调控大部分 MMP<sub>s</sub> 的表达. 研究者用免疫组化和 mRNA 原位杂交等方法已就 Ets1 与 MMP 在肺癌、结肠直肠癌、皮肤血管肉瘤、肝细胞癌等多种肿瘤中的表达进行了研究, 发现在已发生浸润的肿瘤组织基质细胞中存在 Ets1 和 MMP-1、MMP-3、MMP-7 共表达, 并且随肿瘤的浸润转移, 这些基因表达明显上调, 而在良性和非浸润的肿瘤中, 就很少检测到 Ets1<sup>[17, 18]</sup>. 进一步研究证明: 在 MMP-1 基因启动子区 -1 607 bp 存在单核苷酸多态性, 插入的 G (extra guanine)构成 Ets1 结合位点并增强启动子活性<sup>[19]</sup>. 有研究发现用反义寡聚核苷酸抑制 Ets1, 可以阻断神经胶质瘤细胞的迁移和浸润. 用反义寡聚核苷酸抑制 E1AF 在口腔鳞状细胞癌细胞系中的表达, 能抑制由 HGF (hepatocyte growth factor)诱导的 MMP-9, MMP-1 表达和细胞的浸润潜能<sup>[20]</sup>. 丝氨酸蛋白酶也与肿瘤的侵袭和转移相关, Maspin 是丝氨酸蛋白酶的抑制剂, 在 Maspin 的启动子中有 Ets 和激素反应组件(HRE), Maspin 表达受 Ets 和 HRE 调节, 在肿瘤进展中 Ets 反式活化功能的失活以及负性 HRE 组件诱导的转录抑制导致 Maspin 表达丧失, 这与部分肿瘤的浸润、转移有关. 总之, Ets 在部分肿瘤基质细胞中的作用已经比较明确<sup>[21-24]</sup>, 其在肿瘤细胞中的调节作用还不清楚, 有待进一步研究.

## 5 与 Ets 转录因子家族有关的信号传导方式

Ets 转录因子对靶基因的调控作用由复杂的调控网络进行调节, 在信号传导通路中, Ets 家族中有两个重要的亚家族已被进行了深入研究, 一是 Ets, 包括 Ets1, Ets2 和 pointed (Pt2). 该组基因都包括 C 末端保守的 DNA 结合域和 N 末端的 pointed 域, 并且含有一个距 pointed 域比较近的 MAPK 磷酸化位点. 第二个是三重复合物因子(ternary complex factors, TCFs), 包括 Elk1, Sap1a, Sap1b, Fli1 和 Net, TCF 的反式激活域含有多个丝、苏氨酸残基的磷酸化位点, 磷酸化后可以增强其激活转录功能, 这一功能是通过与立即早期反应基因启动子上的 Ras 效应组件(ras-responsive element, RREs)和血清效应组件(serum response elements, SREs)结合来实现的.

MAPK 信号通路的 ERK1/2、p38 和 JNK 将外部刺激传到核内, 可以激活数种因子, 引起下游基因表达的时空变化, 这些信号转导通路的下游转录调节因子包括 Ets 家族, 如 MAPKs 使 Ets 因子的磷酸化就可以控制下游基因的功能, Ets 转录因子家族激活后对特定基因表达的调节是通过与其他种类的转录因子在 DNA 组件上形成某种特异的复合物实现的. 目前已发现有多种此类复合物, 例如: EBS 位点结合的“ETS-AP-1”复合物, SRE 位点结合的“SRF-TCF”复合物, 组织特异的 Ras 反应组件结合的“ETS-1-Pit-1”复合物等<sup>[25]</sup>.

Ca<sup>2+</sup> 依赖的信号通路和 MAPK 一样可以通过磷酸化控制 Ets1 活性. Ca<sup>2+</sup> 依赖性磷酸化的位点在 Ets1 的 DNA 结合域附近第 7 外显子编码区的 6 个丝氨酸残基上. 通过比较野生型和丝氨酸突变为丙氨酸的 Ets1 人们发现 Ca<sup>2+</sup> 特异性的磷酸化作用可以抑制 DNA 结合. 与此一致的研究表明: 缺少第 7 外显子的突变体, 不存在磷酸化位点, 其结合 DNA 能力比全长 Ets1 明显增加. 这种磷酸化抑制 Ets1 与 DNA 结合的机制在于: 磷酸化后可以增加 Ets1 折叠构象的稳定性, 从而阻断其与 DNA 结合<sup>[26]</sup>. 除了抑制 Ets1 和 DNA 结合, Ca<sup>2+</sup> 参与的信号通路可对 ELK1 活性进行负调节. ELK1 是 MAPK 级联反应的底物, MAPK 级联反应可以使 ELK1 磷酸化, 之后 ELK1 和 SRF 共同作用激活 c-fos 的启动子. Ca<sup>2+</sup>/CaM 激活的丝氨酸/苏氨酸磷酸酶(calcineurin)能够导致 ELK1 的脱磷酸化, 并抑制其在 c-fos 启动子上的作用, 通过复杂的调控网络调节 ELK1 的活性和功能<sup>[27]</sup>.

此外, Ets 家族成员通过作用于 TGF- $\beta$  受体在 TGF- $\beta$  信号转导通路中起重要作用<sup>[28]</sup>. JAK/STAT 信号通路也可以调控 Ets 的功能. STAT5 与 Ets1, Ets2 的相互作用可以调控 T 细胞中基因表达, 而 PU.1, Spi-B 能够与 STAT-1 $\alpha$  共同调控巨噬细胞 CD40 基因的表达<sup>[29, 30]</sup>.

总之, Ets 转录因子家族是进化过程中关键的调节子, 他在分子水平调控诸多器官如造血、免疫器官的发育、分化. 另外, Ets 基因的过表达与人类某些肿瘤发生、侵袭、转移直接相关. 胚胎发育是播洒生命之

火, 而肿瘤发生则是迈向死亡之门, 目前对于动物胚胎发育的分子调控已展开大量的工作, 国内外学者对胚胎发育调控的研究亦见成效. 采用实验胚胎学和分子生物学等技术方法探讨发育过程中肿瘤相关基因的时空表达, 必将有助于深刻揭示肿瘤发生、发展的分子机制.

## 6 参考文献

- Sementchenko VI, Watson DK. Ets target genes: past, present and future. *Oncogene* 2000;19:6533-6548
- Maroulakoi IG, Bowe DB. Expression and function of Ets transcription factors in mammalian development: a regulatory network. *Oncogene* 2000;19:6432-6442
- Trojanowska M. Ets factors and regulation of the extracellular matrix. *Oncogene* 2000;19:6464-6471
- Mattot V, Vercamer C, Soncin F, Calmels T, Huguet C, Fafeur V, Vandenbunder B. Constitutive expression of the DNA-binding domain of Ets1 increases endothelial cell adhesion and stimulates their organization into capillary-like structures. *Oncogene* 2000;19:762-772
- Lelievre E, Lionneton F, Soncin F, Vandenbunder B. The Ets family contains transcriptional activators and repressors involved in angiogenesis. *Int J Biochem Cell Biol* 2001;33:391-407
- Kawachi K, Masuyama N, Nishida E. Essential role of the transcription factor Ets-2 in *Xenopus* early development. *J Biol Chem* 2003;278:5473-5477
- Vlaeminck-Guillem V, Carrere S, Dewitte F, Stehelin D, Desl X, Duterque-Coquillaud M. The Ets family member Erg gene is expressed in mesodermal tissues and neural crests at fundamental steps during mouse embryogenesis. *Mech Dev* 2000;91:331-335
- Spyropoulos DD, Pharr PN, Lavenburg KR, Jackers P, Papas Ogawa M, Watson DK. Hemorrhage, impaired hematopoiesis, and lethality in mouse embryos carrying a targeted disruption of the Fli1 transcription factor. *Mol Cell Biol* 2000;20:5643-5652
- Truong AH, Ben-David Y. The role of Fli-1 in normal cell function and malignant transformation. *Oncogene* 2000;19:6482-6489
- Brown LA, Rodaway AR, Schilling TF, Jowett T, Ingham PW, Patient RK, Sharrocks AD. Insights into early vasculogenesis revealed by expression of the ETS-domain transcription factor Fli-1 in wild-type and mutant zebrafish embryos. *Mech Dev* 2000;90:237-252
- Potter MD, Buijs A, Kreider B, van Rompaey L, Grosveld GC. Identification and characterization of a new human ETS-family transcription factor, TEL2, that is expressed in hematopoietic tissues and can associate with TEL1/ETV6. *Blood* 2000;95:3341-3348
- Brass AL, Zhu AQ, Singh H. Assembly requirements of PU.1-Pip (IRF-4) activator complexes: inhibiting function in vivo using fused dimers. *EMBO J* 1999;18:977-991
- DeKoter RP, Singh H. Regulation of B lymphocyte and macrophage development by graded expression of PU. 1. *Science* 2000;288:1439-1441
- Lacronique V, Boureux A, Valle VD, Poirel H, Quang CT, Mauchauffe M, Berthou C, Lessard M, Berger R, Ghysdael J, Bernard OA. A TEL-JAK2 fusion protein with constitutive kinase activity in human leukemia. *Science* 1997;278:1309-1312
- Seki Y, Suico MA, Uto A, Hisatsune A, Shuto T, Isohama Y, Kai H. The ETS transcription factor MEF is a candidate tumor suppressor gene on the X chromosome. *Cancer Res* 2002;62:6579-6586
- Singh S, Barrett J, Sakata K, Tozer RG, Singh G. ETS proteins and MMPs: partners in invasion and metastasis. *Curr Drug Targets* 2002;3:359-367
- Naito S, Shimizu K, Nakashima M, Nakayama T, Ito T, Ito M, Yamashita S, Sekine I. Overexpression of Ets-1 transcription factor in angiosarcoma of the skin. *Pathol Res Pract* 2000;196:103-109
- Ozaki I, Mizuta T, Zhao G, Yotsumoto H, Hara T, Kajihara S, Hisatomi A, Sakai T, Yamamoto K. Involvement of the Ets-1 gene in overexpression of matrilysin in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2000;60:6519-6525
- Benbow U, Tower GB, Wyatt CA, Buttice G, Brinckerhoff CE. High levels of MMP-1 expression in the absence of the 2G single nucleotide polymorphism is mediated by p38 and ERK1/2 mitogen-activated protein kinases in VMM5 melanoma cells. *J Cell Biochem* 2002;86:307-319
- Hanzawa M, Shindoh M, Higashino F, Yasuda M, Inoue N, Hida K, Ono M, Kohgo T, Nakamura M, Notani K, Fukuda H, Totsuka Y, Yoshida K, Fujinaga K. Hepatocyte growth factor upregulates E1AF that induces oral squamous cell carcinoma cell invasion by activating matrix metalloproteinase genes. *Carcinogenesis* 2000;21:1079-1085
- Behrens P, Rothe M, Wellmann A, Krischler J, Wernert N. The Ets-1 transcription factor is up-regulated together with MMP 1 and MMP 9 in the stroma of pre-invasive breast cancer. *J Pathol* 2001;194:43-50
- Sato T, Miwa A. Ets-1 and integrin beta3 for lung metastasis from colorectal cancer. *APMIS* 2002;110:347-353
- Nakayama T, Ito M, Ohtsuru A, Naito S, Sekine I. Expression of the ets-1 proto-oncogene in human colorectal carcinoma. *Mod Pathol* 2001;14:415-422
- Kanda K, Nakayama T, Onizuka S, Tomioka T, Kanematsu T. Expression of the Ets-1 proto-oncogene is linked to cell differentiation of human hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology* 2002;49:747-751
- Yordy JS, Muise-Helmericks RC. Signal transduction and the Ets family of transcription factors. *Oncogene* 2000;19:6503-6513
- Cowley DO, Graves BJ. Phosphorylation represses Ets-1 DNA binding by reinforcing autoinhibition. *Genes Dev* 2000;14:366-376
- Tian J, Karin M. Stimulation of Elk1 transcriptional activity by mitogen-activated protein kinases is negatively regulated by protein phosphatase 2B (calcineurin). *J Biol Chem* 1999;274:15173-15180
- Chang J, Lee C, Hahm KB, Yi Y, Choi SG, Kim SJ. Overexpression of ERT(ESX/ESE-1/ELF3), an ets-related transcription factor, induces endogenous TGF-beta type II receptor expression and restores the TGF-beta signaling pathway in Hs578t human breast cancer cells. *Oncogene* 2000;19:151-154
- Rameil P, Lecine P, Ghysdael J, Gouilleux F, Kahn-Perles B, Imbert J. IL-2 and long-term T cell activation induce physical and functional interaction between STAT5 and ETS transcription factors in human T cells. *Oncogene* 2000;19:2086-2097
- Nguyen VT, Benveniste EN. Involvement of STAT-1 and ets family members in interferon-gamma induction of CD40 transcription in microglia/macrophages. *J Biol Chem* 2000;275:23674-23684

# 核因子 - $\kappa$ B 与细胞凋亡关系的研究进展

於亮亮, 于皆平, 罗和生, 于红刚

於亮亮, 于皆平, 罗和生, 于红刚, 武汉大学人民医院消化内科 湖北省武汉市 430060  
项目负责人: 於亮亮, 430060, 湖北武汉武昌解放路 238 号, 武汉大学人民医院消化内科. yuliangliang@sina.com  
电话: 027-88078054  
收稿日期: 2002-10-09 接受日期: 2002-11-13

## 摘要

核因子 -  $\kappa$ B 是一类具有多向转录调节作用的核蛋白因子, 存在于多种组织的多种细胞中, 具有广泛的生物学活性, 激活后参与许多基因的转录调控, 在感染、炎症反应、氧化应激、细胞增生、细胞凋亡等过程中发挥作用. 近年的研究表明 NF- $\kappa$ B 与细胞凋亡的关系密切, 其参与多种凋亡相关基因的转录调控, 在肿瘤的发生、发展过程中发挥重要作用. 许多高表达 NF- $\kappa$ B 的细胞表现出对放疗、化疗、细胞因子介导的凋亡的抵抗作用, 而现在又发现 NF- $\kappa$ B 具有促进细胞凋亡的作用. 因而 NF- $\kappa$ B 与细胞凋亡存在双向调节关系: 既可抑制细胞凋亡, 也可促进细胞凋亡. 是抑制凋亡, 还是促进凋亡依赖于细胞类型和刺激因素的不同, 但具体机制还不十分清楚. 本文对其与细胞凋亡关系的研究作一综述, 同时也为进一步改善肿瘤的有效治疗提供理论基础.

於亮亮, 于皆平, 罗和生, 于红刚. 核因子 -  $\kappa$ B 与细胞凋亡关系的研究进展.  
世界华人消化杂志 2003;11(10):1628-1631  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1628.asp>

## 0 引言

细胞核因子 -  $\kappa$ B (nuclear factor kappa B, NF- $\kappa$ B) 是一个多功能核转录因子, 最先发现在 B 淋巴细胞中, 其能与免疫球蛋白  $\kappa$  轻链基因增强子  $\kappa$ B 序列 (GGGACTTCC) 特异结合, 故称之为核因子 -  $\kappa$ B. NF- $\kappa$ B 具有广泛的生物学活性, 激活后参与许多基因的转录调控, 在感染、炎症反应、氧化应激、细胞增生、细胞凋亡等过程中发挥作用. 近年研究表明 NF- $\kappa$ B 与细胞凋亡的关系密切.

## 1 NF- $\kappa$ B/Rel 蛋白家族的特性

目前已证实, NF- $\kappa$ B 存在于多种组织的多种细胞中. 到目前为止, 在哺乳动物细胞中发现的 NF- $\kappa$ B/Rel 蛋白家族成员包括<sup>[1-8]</sup>: p52(亦称 p49)、p50、p65/RelA、c-Rel、Rel B; 在果蝇细胞中发现两个成员: Dorsal 和 Dif. 他们以不同的二聚体存在于几乎所有的细胞中. 这些蛋白都有一个大约由 300 个氨基酸组成的氨基末端, 称为 Rel 同源区 RHD (relhomology domain) 或 NRD (NF- $\kappa$ B/Rel/Dorsal),

其中包含二聚体化部位、DNA 结合部位及核定位序列 NLS (nuclear localization signal). 另外, 在 p65/Rel A、c-Rel、Rel B、Dorsal 和 Dif 的 c-末端含有一个或多个反式激活区, 而在 p49/p52 和 p50 亚单位中则不存在<sup>[1]</sup>. 因此, 只有 p52 或 p50 与 p65、c-Rel、Rel B、Dorsal 和 Dif 形成的异二聚体才具有转录活性, p52、p50 同源二聚体对转录起抑制作用<sup>[9, 10]</sup>. 通常所指的 NF- $\kappa$ B 是 p50/p65 异源二聚体, 结构型表达的 NF- $\kappa$ B 活性异源二聚体只存在于少数细胞中, 在大多数细胞中, NF- $\kappa$ B 二聚体与 I $\kappa$ B 单体耦联; 或 Rel 蛋白与 p52 未裂解前体 p100、p50 未裂前体 p105 结合成二聚体, 以无活性的形式存在于细胞质. 所有的 I $\kappa$ B 分子均含有 3-7 个锚蛋白 (Ank) 重复序列, 每个重复序列约 33 个氨基酸, 形成与 RHD 结合位点. 已克隆的 I $\kappa$ B 包括: p100、p105、I $\kappa$ B- $\alpha$ 、I $\kappa$ B- $\beta$ 、I $\kappa$ B- $\epsilon$ 、I $\kappa$ B- $\gamma$ 、I $\kappa$ BR 和 Bcl-3<sup>[11, 12]</sup>. 最重要的是 I $\kappa$ B- $\alpha$  和 I $\kappa$ B- $\beta$ , I $\kappa$ B- $\alpha$  基因的启动子中含有多个 NF- $\kappa$ B 结合序列, NF- $\kappa$ B 活化后可上调 I $\kappa$ B- $\alpha$  的基因表达, 而 I $\kappa$ B- $\beta$  则不受 NF- $\kappa$ B 的反馈调节, 其降解后导致 NF- $\kappa$ B 持续活化. NF- $\kappa$ B 是一类蛋白质, 具有和一些基因的启动子或增强子的特定核苷酸序列结合而启动靶基因转录的功能. 最常见的结合序列是 5'-GGGRNTY(C/Y)C-3', 其中 R=A 或 G, Y=C 或 T, N= 任何核苷酸<sup>[1]</sup>. 不同的 NF- $\kappa$ B/Rel 蛋白二聚体具有不同的结合序列, 且具有各自的特性. 不同的二聚体可识别细微不同的 DNA 靶目标, 从而使 NF- $\kappa$ B 得以调节不同的靶基因<sup>[13-20]</sup>.

## 2 NF- $\kappa$ B 的激活

多种细胞外刺激信号可激活 NF- $\kappa$ B, 如细胞因子 IL-1、TNF- $\alpha$  等、脂多糖、病毒、活性氧自由基、紫外线、双链 RNA 等<sup>[21-25]</sup>. 其激活机制是一个复杂的过程, 尚未完全阐明, 但至少需要两个步骤: (1) I $\kappa$ B 从 NF- $\kappa$ B 复合体上解离降解, 暴露 NF- $\kappa$ B 的核定位序列; (2) NF- $\kappa$ B 发生核易位并与特定的 DNA 序列结合, 其中蛋白磷酸化和蛋白水解是两个主要环节<sup>[26-29]</sup>. NF- $\kappa$ B 的激活途径可分为主要途径和次要途径<sup>[30]</sup>, 主要途径是在受外界刺激后早期即发挥作用, 次要途径是在受外界刺激后晚期才发挥作用<sup>[31]</sup>. 主要途径表现在细胞因子通过自分泌或旁分泌的方式作用于细胞膜并与相应受体相结合, 如 TNF 与其特异性跨膜受体 TNFR 结合后, 在胞质中形成肿瘤坏死因子受体相关死亡结构域 (TRADD)、受体作用蛋白 (RIP)、肿瘤坏死因子受体

相关因子(TrAF2)的复合物, 诱导 NIK 作用于 I $\kappa$ B 激酶 IKK, IKK 磷酸化 I $\kappa$ B 的两个特异的丝氨酸残基, 即 I $\kappa$ B- $\alpha$  的 Ser32、Ser36 或 I $\kappa$ B- $\beta$  的 Ser19、Ser23 或 I $\kappa$ B- $\epsilon$  的 Ser18、Ser22. 在蛋白酶的作用下磷酸化的 I $\kappa$ B 从 p50/p65 异源二聚体上降解进而 p50/p65 异源二聚体活化, 进入胞核中发挥转录活性. 次要途径表现在磷酸酶 C 作用后产生的甘油二酯通过 MAPK 或 JNK/p38 引起 p65 磷酸化和从前体蛋白 p105 形成 p50 而使 p50/p65 异源聚体活化且进入核中发挥转录活性. 值得注意的是: 不同的刺激信号对 NF- $\kappa$ B 激活和信号通路不同, 产生的效果也不同. TNF- $\alpha$  诱导 NF- $\kappa$ B 激活在几分钟内出现, 而化疗药物诱导的 NF- $\kappa$ B 激活在几小时后才出现<sup>[32, 33]</sup>. 原因可能与参与 I $\kappa$ B 降解的 I $\kappa$ B 激酶不同有关.

### 3 NF- $\kappa$ B 与细胞凋亡的关系

以往对 NF- $\kappa$ B 的研究局限于在炎症、应激、免疫方面的作用<sup>[34-44]</sup>, 近来很多研究证实 NF- $\kappa$ B 与细胞凋亡关系密切. 许多高表达 NF- $\kappa$ B 的细胞表现出对放疗、化疗、细胞因子介导的凋亡的抵抗作用<sup>[45-53]</sup>. 而现在又发现 NF- $\kappa$ B 具有促进细胞凋亡的作用<sup>[1, 54]</sup>.

3.1 NF- $\kappa$ B 抗凋亡的可能机制 NF- $\kappa$ B 的抗凋亡活性已从很多研究中得以证实<sup>[45-63]</sup>, 如: RelA 基因敲除鼠发生大量肝细胞凋亡而死亡<sup>[64]</sup>; 从 RelA(-/-)中提取出的细胞系或是高表达 I $\kappa$ B- $\alpha$  的细胞系都表现出 NF- $\kappa$ B 的低表达, 并且对 TNF- $\alpha$  诱导的细胞凋亡的敏感性明显增强, 而 RelA(+/-)细胞不受影响; 凋亡信号存在时, B 淋巴细胞的存活依赖于 NF- $\kappa$ B 的活化; NF- $\kappa$ B 活化能阻滞由电离辐射、TNF- $\alpha$  及柔红霉素诱导的细胞凋亡; 显性负性突变子 I $\kappa$ B- $\alpha\Delta$  抑制磷状细胞癌细胞存活. 但 NF- $\kappa$ B 抑制凋亡的机制尚未完全阐明, 可能存在以下两种途径的细胞凋亡<sup>[65]</sup>: (1)NF- $\kappa$ B 诱导抗凋亡因子. 到目前为止, 这些已证实的抗凋亡因子包括: Bcl-2 蛋白家族<sup>[66-68]</sup>、Hsp70、Hsp27、即早基因 IEX-1、存活基因<sup>[69]</sup>、凋亡抑制基因(TrAF1、TrAF2、C-IAP1、C-IAP2 和 XIAP)<sup>[33]</sup>他们的基因启动子或增强子上存在  $\kappa$ B 位点, 活化的 NF- $\kappa$ B 能诱导他们发挥抗凋亡效应. 如: 人 B 淋巴细胞分化过程中, NF- $\kappa$ B 激活通过 CD40 信号通路诱导 Bcl-XL mRNA 和 Bcl-XL 蛋白水平上调, 从而抵抗 Fas 介导的细胞凋亡<sup>[70, 71]</sup>. (2)通过蛋白间相互作用而干预凋亡信号通路<sup>[72]</sup>. Shinichi et al<sup>[65]</sup>应用 CHX (Cycloheximide, 环己酰亚胺)一种蛋白合成抑制剂作用于人胰腺癌细胞系, 发现 CHX 不能阻止 IL-1 $\beta$  (F- $\kappa$ B 的高效刺激因子)的抗凋亡效应, 而高表达 I $\kappa$ B- $\alpha$  人胰腺癌细胞系中 IL-1 $\beta$  的抗凋亡活性却被阻止. 提示 IL-1 $\beta$  的抗凋亡作用是由于 NF- $\kappa$ B 的激活, 并且 NF- $\kappa$ B 的抗凋亡作用可以不需重新蛋白合成亦或是抗凋亡因子蛋白的合成, 而是通过蛋白间相互作用来干预凋亡信号通路, 实现其抗凋亡活性. 如: 活化的 NF- $\kappa$ B 与凋亡蛋白 53BP2 相互作用而抑制凋亡<sup>[72, 73]</sup>. 但这两种途径都

不十分精确, 都不能单独解释 NF- $\kappa$ B 的抗凋亡机制<sup>[65]</sup>. 3.2 NF- $\kappa$ B 促凋亡的可能机制 在发现 NF- $\kappa$ B 抗凋亡活性并应用于肿瘤治疗不久, 人们又惊奇的发现: NF- $\kappa$ B 还具有促进凋亡的作用<sup>[1, 73-78]</sup>. Shou et al<sup>[74]</sup>观察到鼠脑局部缺血时, 海马中 NF- $\kappa$ B 激活能上调促凋亡基因 Bcl-Xs 蛋白表达. Tamatani et al<sup>[75]</sup>也证实: 在鼠海马中, NF- $\kappa$ B 激活能上调 Bcl-Xs 的表达, 且这些种作用能被 I $\kappa$ B- $\alpha$  抑制. Carsten et al<sup>[79]</sup>提出: NF- $\kappa$ B 在诱导细胞凋亡中的作用依赖于细胞的类型. 如: 在神经元细胞<sup>[80]</sup>、许旺氏细胞<sup>[81]</sup>、胚胎的肾细胞<sup>[82]</sup>中 NF- $\kappa$ B 促进细胞凋亡. 还有一些研究表明<sup>[77]</sup>: NF- $\kappa$ B 的激活是促进还是抑制凋亡依赖于刺激信号的差异和细胞类型. Clemens et al<sup>[76]</sup>在研究鼠脑局部缺血脑神经元凋亡与 NF- $\kappa$ B 关系时发现: 短时间的局部缺血刺激活化 NF- $\kappa$ B 可抑制神经元凋亡; 长时间的局部缺血刺激活化 NF- $\kappa$ B 则促进神经元凋亡. 已有研究证实: B 淋巴细胞的存活依赖于 NF- $\kappa$ B 的激活, 而 T 淋巴细胞的存活则不需 NF- $\kappa$ B 参与调节, 反而 NF- $\kappa$ B 活化能促进 T 淋巴细胞的凋亡<sup>[83]</sup>. 出现些两种对立的结果提示: NF- $\kappa$ B 的激活可能是一个处于细胞生存与细胞凋亡之间的调节点<sup>[54]</sup>. NF- $\kappa$ B 促进凋亡的机制可能为: 由于 NF- $\kappa$ B 的靶基因上存在众多功能性的 NF- $\kappa$ B 结合位点, 如 NF- $\kappa$ B 的靶基因 Bcl-2 基因家族包括抗凋亡基因 Bcl-2、Bcl-XL 和 Bcl-w; 促凋亡基因 Bax、Bcl-Xs 和 Bad. NF- $\kappa$ B 的激活可能诱导抗凋亡基因, 也可能诱导促凋亡基因, 至于诱导哪一类基因, 就依赖于刺激信号的差异和细胞类型<sup>[1]</sup>.

总之, 自 1986 年, Sen 和 Baltimore 首次从 B 淋巴细胞核抽提物中检测出 NF- $\kappa$ B 以来, 对其的研究一直是生命科学的热点. NF- $\kappa$ B 作为一种具有多向性转录调节作用的蛋白, 他的激活机制、在细胞凋亡中的作用仍不十分清楚, 特别是 NF- $\kappa$ B 促凋亡的作用机制及其在凋亡中正性或负性作用依赖于刺激信号的差异和细胞类型, 人们更是知之甚少. 深入研究 NF- $\kappa$ B 在细胞凋亡中的作用, 探讨其机制, 将会为临床治疗肿瘤开创一条全新的途径.

### 4 参考文献

- 1 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
- 2 Furia B, Deng L, Wu K, Baylor S, Kehn K, Li H, Donnelly R, Coleman T, Kashanchi F. Enhancement of nuclear factor-kappa B acetylation by coactivator p300 and HIV-1 Tat proteins. *J Biol Chem* 2002;277:4973-4980
- 3 Chen F, Bower J, Leonard SS, Ding M, Lu Y, Rojanasakul Y, Kung HF, Vallyathan V, Castranova V, Shi X. Protective roles of NF-kappa B for chromium(VI)-induced cytotoxicity is revealed by expression of Ikappa B kinase-beta mutant. *J Biol Chem* 2002;277:3342-3349
- 4 Papouli E, Defais M, Larminat F. Overexpression of metallothionein-II sensitizes rodent cells to apoptosis induced by DNA cross-linking agent through inhibition of NF-kappa B activation. *J Biol Chem* 2002;277:4764-4769
- 5 Thomas KW, Monick MM, Staber JM, Yarovsky T, Carter AB, Hunninghake GW. Respiratory syncytial virus inhibits

- apoptosis and induces NF-kappa B activity through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway. *J Biol Chem* 2002;277:492-501
- 6 Shumway SD, Berchtold CM, Gould MN, Miyamoto S. Evidence for unique calmodulin-dependent nuclear factor-kappaB regulation in WEHI-231 B cells. *Mol Pharmacol* 2002; 61:177-185
  - 7 Huang Y, Fan W. IkappaB kinase activation is involved in regulation of paclitaxel-induced apoptosis in human tumor cell lines. *Mol Pharmacol* 2002;61:105-113
  - 8 Bonvin C, Guillon A, van Bemmelen MX, Gerwins P, Johnson GL, Widmann C. Role of the amino-terminal domains of MEKs in the activation of NF kappa B and MAPK pathways and in the regulation of cell proliferation and apoptosis. *Cell Signal* 2002;14:123-131
  - 9 Roland MS, Guido A. NF-kB/Rel/IkB: Implications in gastrointestinal diseases. *Gastroenterology* 2000;118:1208-1228
  - 10 Lehming N, Thanos D, Brickman JM, Ma J, Maniatis T, Ptashne M. An HMG-like protein that can switch a transcriptional activator to a repressor. *Nature* 1994;371:175-179
  - 11 May MJ, Ghosh S. Rel/NF-kappa B and I kappa B proteins: an overview. *Semin Cancer Biol* 1997;8:63-73
  - 12 Jin R, De Smaele E, Zazzeroni F, Nguyen DU, Papa S, Jones J, Cox C, Gelinas C, Franzoso G. Regulation of the gadd45beta promoter by NF-kappaB. *DNA Cell Biol* 2002;21:491-503
  - 13 Blackwell TS, Christman JW. The role of nuclear factor-kappa B in cytokine gene regulation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997; 17:3-9
  - 14 Pentikainen V, Suomalainen L, Erkkila K, Martelin E, Parvinen M, Pentikainen MO, Dunkel L. Nuclear factor-kappa B activation in human testicular apoptosis. *Am J Pathol* 2002;160: 205-218
  - 15 Cahir-McFarland E, Kieff E. NF-kappaB inhibition in EBV-transformed lymphoblastoid cell lines. *Recent Results Cancer Res* 2002;159:44-48
  - 16 Satoh A, Shimosegawa T, Fujita M, Kimura K, Masamune A, Koizumi M, Toyota T. Inhibition of nuclear factor-kappaB activation improves the survival of rats with taurocholate pancreatitis. *Gut* 1999;44:253-258
  - 17 Mayo MW, Madrid LV, Westerheide SD, Jones DR, Yuan XJ, Baldwin AS Jr, Whang YE. PTEN blocks tumor necrosis factor-induced NF-kappa B-dependent transcription by inhibiting the transactivation potential of the p65 subunit. *J Biol Chem* 2002;277:11116-11125
  - 18 Spalding AC, Jotte RM, Scheinman RI, Geraci MW, Clarke P, Tyler KL, Johnson GL. TRAIL and inhibitors of apoptosis are opposing determinants for NF-kappaB-dependent, genotoxin-induced apoptosis of cancer cells. *Oncogene* 2002;21:260-271
  - 19 Han Y, Weinman S, Boldogh I. Tumor necrosis factor-alpha-inducible I kappa proteolysis mediated by cytosolic m-calpain. A mechanism parallel to the ubiquitin-proteasome pathway for nuclear factor-kappa B activation. *J Biol Chem* 1999;274: 787-794
  - 20 Murga C, Zohar M, Teramoto H, Gutkind JS. Rac1 and RhoG promote cell survival by the activation of PI3K and Akt, independently of their ability to stimulate JNK and NF-kappaB. *Oncogene* 2002;21:207-216
  - 21 Ng CS, Novick AC, Tannenbaum CS, Bukowski RM, Finke JH. Mechanisms of immune evasion by renal cell carcinoma: tumor-induced T-lymphocyte apoptosis and NF kappaB suppression. *Urology* 2002;59:9-14
  - 22 Wei XW, James LA, Douglas BE, Lillie L, Karen RC, Paul JC. The nuclear factor-kB relA transcription factor is constitutively activated in human pancreatic adenocarcinoma cells. *Clin Can Res* 1999;5:119-127
  - 23 Sunil KM, Valsala H, Bharat BA. Bcl-x1 suppresser TNF-mediated apoptosis and activation of nuclear factor-kB, activation protein-1, and c-Jun N-terminal kinase. *J Inter CK Res* 2000;20:725-735
  - 24 Guo SP, Wang WL, Zhai YQ, Zhao YL. Expression of nuclear factor-kB in hepatocellular carcinoma and its relation with the X protein of hepatitis B virus. *World J Gastroenterol* 2001;7: 340-344
  - 25 Neil RC, Neil DP. Inhibition of the RelA(p65) NF-kB subunit by egr-1. *J Biol Chem* 2000;275:4719-4725
  - 26 Didonato JA, Hayakawa M, Rothwarf DM. A cytokine-responsive I kappaB kinase that activates the transcription factor NF-kappaB. *Nature* 1997;388:548-554
  - 27 Zandi E, Rothwarf DM, Delhase M, Hayakawa M, Karin M. The IkappaB kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKK $\alpha$  and IKK $\beta$ , necessary for IkB phosphorylation and NF-kappaB activation. *Cell* 1997;91:243-252
  - 28 Nakano H, Shindo M, Sakon S, Nishinaka S, Mihara M, Yagita H, Okumura K. Differential regulation of IkappaB kinase alpha and beta by two upstream kinases, NF-kappaB-inducing kinase and mitogen-activated protein kinase/ERK kinase-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:3537-3542
  - 29 Chen F, Castranova V, Shi Xdemers LM. NF-kappaB activation is involved in regulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) by interleukin-1beta. *J Biol Chem* 2001;276:15441-15444
  - 30 Katsuyama K, Shichiri M, Marumo F, Hirata Y. Role of nuclear factor-kappaB activation in cytokine- and sphingomyelinase-stimulated inducible nitric oxide synthase gene expression in vascular smooth muscle cells. *Endocrinology* 1998;139:4506-4512
  - 31 Roberts JR, Rowe PA, Demaine AG. Activation of NF-kappaB and MAP kinase cascades by hypothermic stress in endothelial cells. *Cryobiology* 2002;44:161-169
  - 32 Yi H, Korey RJ, James SN, Weimin F. Nuclear factor-kB/IkB signaling pathway may contribute to the mediation of paclitaxel-induced apoptosis in solid tumor cells. *Cancer Res* 2000;60:4426-4432
  - 33 David RJR, Michael B, Lee VM, Albert SB, Marty WM. Inhibition of NF-kB sensitizes non-small cell lung cancer cells to chemotherapy-induced apoptosis. *Ann Thorac Surg* 2000;70: 930-937
  - 34 Gong JP, Liu CA, Wu CX, Li SW, Shi YJ, Li XH. Nuclear factor kB activity in patients with acute severe cholangitis. *World J Gastroenterol* 2002;8:346-349
  - 35 Arnalich F, Garcia-Palomero E, Lopez J, Jimenez M, Madero R, Renart J, Vazquez JJ, Montiel C. Predictive value of nuclear factor kB activity and plasma cytokine levels in patients with sepsis. *Infect Immun* 2000;68:1942-1945
  - 36 Pennington C, Dunn J, Li C, Ha T, Browder W. Nuclear factor kB activation in acute appendicitis: a molecular marker for extent of disease. *Am Surg* 2000; 66:914-919
  - 37 Matsukawa A, Hogaboam CM, Lukacs NW, Lincoln PM, Evanoff HL, Strieter RM, Kunkel S. Expression and contribution of endogenous IL-13 in an experimental model of sepsis. *J Immunol* 2000;164:2738-2744
  - 38 Jiang Q, Akashi S, Miyake K, Petty HR. Cutting Edge: lipopolysaccharide induces physical proximity between CD14 and Toll-like receptor 4 (TLR4) prior to nuclear translocation of NF-kB. *J Immunol* 2000;165: 3541-3544
  - 39 Adib-Conquy M, Adrie C, Moine P, Asehnoune K, Fitting C, Pinsky MR, Dhainaut JF, Cavaillon JM. NF-kB expression in mononuclear cells of patients with sepsis resembles that observed in lipopolysaccharide tolerance. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:1877-1883
  - 40 Gasparian AV, Yao YJ, Kowalczyk D, Lyakh LA, Karseladze A, Slaga TJ, Budunova IV. The role of IKK in constitutive activation of NF-kappaB transcription factor in prostate carcinoma cells. *J Cell Sci* 2002;115(Pt 1):141-151
  - 41 Yang CS, Maliakal P, Meng X. Inhibition of carcinogenesis by tea. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2002;42:25-54
  - 42 Grutkoski PS, Graeber CT, Ayala A, Simms HH. Paracrine suppression of apoptosis by cytokine-stimulated neutrophils involves divergent regulation of NF-kappaB, Bcl-X(L), and Bak. *Shock* 2002;17:47-54
  - 43 Force T, Haq S, Kilter H, Michael A. Apoptosis signal-regulating



- kinase/nuclear factor-kappaB: a novel signaling pathway regulates cardiomyocyte hypertrophy. *Circulation* 2002;105:402-404
- 44 Fujihara S, Ward C, Dransfield I, Hay RT, Uings IJ, Hayes B, Farrow SN, Haslett C, Rossi AG. Inhibition of nuclear factor-kappaB activation un-masks the ability of TNF-alpha to induce human eosinophil apoptosis. *Eur J Immunol* 2002;32:457-466
  - 45 Quaaaz F, Li M, Beg AA. A critical role for the RelA subunit of nuclear factor kappa B in regulation of multiple immune-response genes and in Fas-induced cell death. *J Exp Med* 1999;189:999-1004
  - 46 Kasibhatla S, Genestier L, Green DR. Regulation of fas-ligand expression during activation-induced cell death in T lymphocytes via nuclear factor kappaB. *J Biol Chem* 1999;274:987-992
  - 47 Hsu SC, Gavrilin MA, Lee HH, Wu CC, Han SH, Lai MZ. NF-kappaB-dependent Fas ligand expression. *Eur J Immunol* 1999;29:2948-2956
  - 48 Lang A, Schoonhoven R, Tuvia S, Brenner A, Rippe RA. Nuclear factor kappa B in proliferation, activation, and apoptosis in rat hepatic stellate cells. *J Hepatol* 2000;33:49-58
  - 49 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
  - 50 You H, Wang B. Effect of NF-kappa B Inhibition on TNF-alpha-induced apoptosis and downstream pathways in cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 2001;33:1223-1232
  - 51 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
  - 52 Kang KH, Lee KH, Kim MY, Choi KH. Ras regulation of NF-kappa B and apoptosis. *Methods Enzymol* 2001;333:73-87
  - 53 Marra F, Efsen E, Romanelli RG, Caligiuri A. Caspase-3-mediated cleavage of the NF-kappa B subunit p65 at the NH2 terminus potentiates naphthoquinone analog-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2001;276:24638-24644
  - 54 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
  - 55 Min LW, Oskar L, Kirsten D, Peter HK. T cell activation-induced and HIV tat-enhanced CD95(APO-1/Fas) ligand transcription involves NF-kB. *Eur J Immunol* 2000;30:661-670
  - 56 Cun YW, Denis CG, Marty WM, Albert SB. NF-kB induces expression of the Bcl-2 homologue A1/Bfl-1 to preferentially suppress chemotherapy-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 1999;19:5923-5929
  - 57 Dubravka D, Carolyn MM, David WS. Steroid- and retinoid-mediated growth arrest and apoptosis in WEHI-231 cells: role of NF-kB, c-myc and CKI p27kip1. *Eur J Immunol* 2000;30:1154-1161
  - 58 Jalen DC, Shenmin Y, David WG. Apoptosis induced by the nuclear death domain protein p84N5 is associated with caspase-6 and NF-kB activation. *J Biol Chem* 2000;275:25336-25341
  - 59 Eric GL, David LB, Sophia C, Shon LL, Marcia C, James PL, Averil M. Failure to regulate TNF-induced NF-kB and cell death responses in A20-deficient mice. *Science* 2000;289:2350-2354
  - 60 Philippe D, Sandra C, Fabienne H, Wanda D, Emanuella FB, Bernard T. Dominant negative MyD88 proteins inhibit interleukin-1 $\beta$ /interferon- $\gamma$ -mediated induction of nuclear factor (B-dependent) nitrite production and apoptosis in  $\beta$  cells. *J Biol Chem* 2000;275:37672-37678
  - 61 Isis RW, Mary EC, Gutian X, Shao-cong S. The NF-kB signaling pathway is not required for Fas ligand gene induction but mediates protection from activation-induced cell death. *J Biol Chem* 2000;275:25222-25230
  - 62 Wang CY, Cusack JC Jr, Liu R, Baldwin AS Jr. Control of inducible chemoresistance: enhanced anti-tumor therapy through increased apoptosis by inhibition of NF-kB. *Nature Med* 1999;5:412-417
  - 63 Cornelia SS, Rachel AF, Kaede H, Paul AK. NF-kB determines location and features of cell death in epidermis. *J Clin Invest* 2000;105:253-260
  - 64 Potoka DA, Upperman JS, Nadler EP, Wong CT, Zhou X, Zhang XR, Ford HR. NF-kappaB inhibition enhances peroxynitrite-induced enterocyte apoptosis. *J Surg Res* 2002;106:7-14
  - 65 Shinichi K, Masashi S, Futoshi T, Naoko T, Toshifumi T, Hirotaka O, Makoto I, Takashi O. Evidence that de novo protein synthesis is dispensable for anti-apoptotic effects of NF-kB. *Oncogene* 2000;19:2233-2239
  - 66 Zong WX, Edelstein LC, Chen C, Bash J, Gelinas C. The prosurvival Bcl-2 homolog Bfl-1/A1 is a direct transcriptional target of NF-kappa B that blocks TNF $\alpha$ -induced apoptosis. *Genes Dev* 1999;13:382-387
  - 67 Lee HH, Dadgostar H, Cheng Q, Shu J, Cheng G. NF-kappa B mediated up-regulation of Bcl-x and Bfl-1/A1 is required for CD40 survival signaling in B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:9136-9141
  - 68 Li HL, Chen DD, Li XH, Zhang HW, Lü YQ, Ye CL, Ren XD. Changes of NF-kB, p53, Bcl-2 and caspase in apoptosis induced by JTE-522 in human gastric adenocarcinoma cell line AGS cells: role of reactive oxygen species. *World J Gastroenterol* 2002;8:431-435
  - 69 Rudiger G, Alexandra G, Burkhard G, Youhai C. Rapid communication regulation of trail-induced apoptosis by transcription factors. *Cell Immunol* 2000;201:77-82
  - 70 Russell G, Michael P, Madeleine B, Vera SE, Wen-Chen Y, James RW, Pamela SO. Protein kinase B regulates T lymphocyte survival, nuclear factor  $\kappa$ B activation, and Bcl-XL levels in vivo. *J Exp Med* 2000;191:1721-1733
  - 71 Guo SP, Wang WL, Zhai YQ, Zhao YL. Expression of nuclear factor-kB in hepatocellular carcinoma and its relation with the X protein of hepatitis B virus. *World J Gastroenterol* 2001;7:340-344
  - 72 Cook JL, Walker TA, Worthen GS, Radke JR. Role of the E1A Rb-binding domain in repression of the NF-kappa B-dependent defense against tumor necrosis factor-alpha. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:9966-9971
  - 73 Yang JP, Hori M, Takahashi N, Kawabe T, Kato H, Okamoto T. NF-kappaB subunit p65 binds to 53BP2 and inhibits cell death induced by 53BP2. *Oncogene* 1999;18:5177-5186
  - 74 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
  - 75 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 NF-kappaB activation in primary hippocampal neurons. *J Biol Chem* 1999;274:8531-8538
  - 76 Clemens JA, Stephenson DT, Yin T, Smalstig EB, Panetta JA, Little SP. Drug-induced neuroprotection from global ischemia is associated with prevention of persistent but not transient activation of nuclear factor-kappaB in rats. *Stroke* 1998;29:677-682
  - 77 Lin YZ, Yao SY, Veatch RA, Torgerson TR, Hawiger J. Inhibition of nuclear translocation of transcription factor NF-kappaB by a synthetic peptide containing a cell membrane-permeable motif and nuclear localization sequence. *J Biol Chem* 1995;270:14255-14258
  - 78 Yu LL, Yu JP, Ran ZX, Yu HG. Relationship between nuclear factor-kappa B and apoptosis and proliferation in colorectal neoplasia. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:309-312
  - 79 Carsten G, Katja S, Andreas RG, Gunter E. Luteinizing hormone-releasing hormone induces nuclear factor  $\kappa$ B-activation and inhibits apoptosis in ovarian cancer cells. *JCE M* 2000;85:3815-3820
  - 80 Grilli M, Pizzi M, Memo M, Spano P. Neuroprotection by aspirin and sodium salicylate through blockade of NF-kappaB activation. *Science* 1996;274:1383-1385
  - 81 Carter BD, Kaltschmidt C, Kaltschmidt B, Offenhauser N, Bohm-Matthaei R, Baeuerle PA, Barde YA. Selective activation of NF-kappa B by nerve growth factor through the neurotrophin receptor p75. *Science* 1996;272:542-545
  - 82 Grimm S, Bauer MK, Baeuerle PA, Schulze-Osthoff K. Bcl-2 down-regulates the activity of transcription factor NF-kappaB induced upon apoptosis. *J Cell Biol* 1996;134:13-23
  - 83 Liam O, David CSH, Lorraine AO, Andreas S. Apoptosis and cell division. *Curr Opin Cell Biol* 2000;12:257-263

# paxillin在胃腺癌中的表达及临床意义

田素芳,熊永炎,余少平,汪必成

田素芳,熊永炎,余少平,汪必成,武汉大学中南医院病理科  
湖北省武汉市 430071  
项目负责人:熊永炎,430071,湖北省武汉市东湖路169号,武汉大学中南医院病理科.  
电话:027-67813159  
收稿日期:2002-11-12 接受日期:2002-11-29

## 摘要

目的:研究焦点黏附相关调节蛋白paxillin在胃癌组织中的表达及其与胃癌细胞分化、浸润及转移的关系.

方法:应用免疫组化SP法检测80例胃癌和40例淋巴结转移灶中paxillin的表达情况.

结果:paxillin在胃中、低分化腺癌组织中的表达显著高于高分化腺癌,进展期胃癌组织中显著高于早期胃癌,胃癌原发灶中显著高于淋巴结转移灶.

结论:paxillin可能在胃癌细胞的分化、浸润和转移中起着重要作用.

田素芳,熊永炎,余少平,汪必成. paxillin在胃腺癌中的表达及临床意义. 世界华人消化杂志 2003;11(10):1632-1634  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1632.asp>

## 0 引言

paxillin是一种焦点黏附相关蛋白,而焦点黏附物(也称为黏着斑)是细胞与细胞外基质的接触点,构成胞外基质(ECM)与细胞骨架联系纽带,也是信号转导的主要部位,促进信号从细胞外基质经整合素途径向细胞内传递<sup>[1]</sup>. 多项研究表明, paxillin定位于黏着斑,有参与动态调节焦点黏附、调节细胞的移动和播散等功能<sup>[2,3]</sup>,而肿瘤的浸润和转移与细胞的黏附力、移动力的改变直接相关,所以paxillin与肿瘤细胞的浸润和转移必定存在着一定联系. 本文采用免疫组化方法检测胃癌组织及淋巴结转移灶中paxillin的表达,旨在探讨paxillin与胃癌细胞分化、侵袭和转移的关系.

## 1 材料和方法

1.1 材料 收集我科1999年/2001年存档的手术切除的胃腺癌标本80例,有相应淋巴结转移灶者40例,所有病例均经病理确诊. 其中男63例,女17例,年龄27-80岁,中位年龄55.4岁. 标本均经100 ml/L中性甲醛液固定,石蜡包埋,连续切片4  $\mu$ m厚.

1.2 方法 HE染色用于肿瘤常规病理诊断(包括组织学分类、分级、浸润深度及转移状况). 免疫组化SP的操作步骤按试剂盒说明进行,所用抗paxillin抗体及SP

试剂盒、EDTA抗原修复液均购于福州迈新生物技术公司,抗体和试剂盒均为即用型. 使用已知阳性组织作为阳性对照,用PBS取代一抗作阴性对照. 免疫组化染色结果的评估标准: paxillin为胞质着棕黄色. 每例随机观察10个高倍( $\times 400$ )视野,计算阳性细胞百分率,阳性细胞数大于10%者定为阳性,小于或等于10%或缺乏者定为阴性.

统计学处理 SPSS10.0统计软件分析数据,采用 $\chi^2$ 检验.

## 2 结果

2.1 paxillin在胃腺癌组织中的表达 paxillin在胃癌组织中主要定位于肿瘤细胞胞质. 表1示paxillin在男女病例之间表达无差异. 在胃腺癌组织中随分化程度降低,其阳性表达率逐渐增高,中、低分化腺癌显著高于高分化腺癌,进展期(浸润至肌层、全层)胃癌组织中的表达显著高于早期胃癌(黏膜内癌或黏膜下癌) ( $P < 0.05$ ). 有淋巴结转移者表达较无淋巴结转移者高,但无统计学差异.

表1 paxillin在胃腺癌组织中的表达

临床病理参数	n	paxillin		阳性率(%)	P值
		-	+		
性别					
男	63	23	40	63.5	$P > 0.05$
女	17	5	12	70.6	
分化程度					
高分化	27	15	12	44.4	$P < 0.05$
中分化	23	7	16	69.6	
低分化	30	6	24	80.0	
浸润深度					
黏膜内癌或黏膜下癌	10	7	3	30.0	$P < 0.05$
肌层	15	4	11	73.3	
全层	55	17	38	69.1	
转移情况					
无淋巴结转移	40	16	24	60.0	$P > 0.05$
有淋巴结转移	40	12	28	70.0	

2.2 paxillin在胃腺癌原发灶与淋巴结转移灶中的表达 表2示paxillin在胃原发灶中的表达高于淋巴结转移灶,其差异具有统计学差异,在有淋巴结转移的原发灶中的表达显著高于与之配对的淋巴结转移灶( $P < 0.05$ ).

表2 paxillin在胃腺癌原发灶与淋巴结转移灶中的表达

病理学类型	n	paxillin		阳性率(%)	P 值
		-	+		
部位					
所有原发灶	80	28	52	65.0	
淋巴结转移灶	40	23	17	42.5	P <0.05
部位					
对应原发灶	40	12	28	70.0	
淋巴结转移灶	40	23	17	42.5	P <0.05

2.3 paxillin在淋巴结转移不同转移阶段的表达 根据Shigetomi关于淋巴结转移阶段的划分标准<sup>[4]</sup>,结合本实验,我们根据癌细胞所占的淋巴结最大横切面的面积百分率将淋巴结转移阶段简化为早期转移和晚期转移两级(以50%为分界点)。研究发现paxillin在淋巴结转移的不同阶段其表达也具有差异性,在转移的晚期阶段显著高于早期阶段(表3)。

表3 paxillin在早期淋巴结转移灶与晚期转移灶中的比较

病理学类型	n	paxillin		阳性率(%)	P 值
		-	+		
晚期转移灶(≥ 50%)	24	10	14	58.3	
早期转移灶(< 50%)	16	13	3	18.8	P <0.05

### 3 讨论

焦点黏附物的分子分为两组:结构蛋白和调节蛋白。前者含量丰富,包括张力蛋白、纽蛋白、 $\alpha$ -辅肌蛋白等;而调节蛋白则含量相对较少,包括黏着斑激酶(focal adhesion kinase, FAK)、paxillin、p130CAS<sup>[5]</sup>。

paxillin最早是在被src基因转染的细胞中发现的,是迄今为止所发现的惟一能与癌基因结合的含酪氨酸的焦点黏附调节蛋白,其分子量为68-70 kD。有研究表明其在胚胎的发育过程中发挥至关重要的作用,paxillin等位基因缺失的小鼠易发生胚胎期死亡,而该基因缺失的成纤维细胞表现为细胞迁移能力缺陷,从而表明paxillin具有控制细胞播撒和移动的能力<sup>[2]</sup>。进一步研究表明paxillin含有一些介导蛋白间相互作用的基序:包括LD(富含亮氨酸)重复序列、LIM区域(富含半胱氨酸、类似双锌指区域)及src同源区2(SH2)和src同源区3(SH3),这些基序能与整合素(如 $\beta$ 链和 $\alpha$ 4链)的胞质区、细胞骨架蛋白、酪氨酸激酶(如FAK)、丝氨酸/苏氨酸激酶、GTP酶激活蛋白及其他一些调节蛋白结合,形成特异的信号分子复合物,将信号向下游传递<sup>[2, 6, 7]</sup>。与之结合的细胞骨架蛋白都是参与胚胎发育、损伤修复、肿瘤转移相关的细胞迁移活动所必须的,如肌动蛋白、微管蛋白、纽蛋白、actopaxin等<sup>[8]</sup>。虽然paxillin本身不表现酶的活性,但因其含有一系列的结合部位,决定了paxillin可作为一种“码头”或“脚手架”、反应底物或是为信号反应提供场所来发挥作用。

细胞的迁移过程是其前端新的焦点黏附不断形成和以前黏附点随之消失的动态过程<sup>[9]</sup>。关于paxillin对细胞的迁移力、侵袭力等的调节方向存在不同的见解。如Vadlamudi et al<sup>[9]</sup>研究发现上调paxillin的表达能够使没有侵袭性的乳腺癌细胞系向有侵袭性的表型转化。而另有研究表明paxillin的表达缺失或低表达会使小细胞肺癌更具有侵袭性<sup>[10]</sup>。这可能与他们的实验设计、组织存在差异等有关。本研究显示paxillin在中、低分化胃腺癌组织中表达显著高于高分化腺癌,表明paxillin与胃腺癌的分化程度有关。而进展期胃癌中paxillin表达的阳性率显著高于早期胃腺癌,这表明paxillin与肿瘤的浸润也存在一定的联系,paxillin可能是具有促进肿瘤细胞移动的作用,但浸润肌层者paxillin表达较全层浸润者高,其确切机制尚待进一步研究。在整合素信号途径中位于paxillin上游、与paxillin直接作用的酪氨酸激酶FAK也是一种调节细胞黏附、迁移、凋亡和锚定不依赖性生长的关键蛋白,其在多种恶性肿瘤中过度表达,其过表达能促进paxillin的酪氨酸磷酸化<sup>[2, 11-13]</sup>。苏剑敏 et al<sup>[14]</sup>研究发现FAK在低分化及进展期胃癌中的表达较高、中分化及早期胃癌组织中高<sup>[14]</sup>,本研究检测paxillin在胃癌中的表达与他们检测的FAK的表达有相近的趋势,但我们研究的病例中有淋巴结转移者与无淋巴结转移者的paxillin表达阳性率无统计学差异,尽管前者较后者高。

目前国内外关于肿瘤原发灶及淋巴结转移的不同阶段的对照性研究较少见。Shigetomi于1992年将淋巴结转移阶段分为四级,0级为癌细胞局限在淋巴结周围的淋巴管内;1级为癌细胞仅见于边缘窦;2级为癌细胞侵犯淋巴结皮质但不超过50%;3级为癌细胞占据淋巴结的50%以上<sup>[4]</sup>。本实验中我们根据癌细胞所占的淋巴结最大横切面的面积百分率将淋巴结转移程度做了适当简化。本组胃癌原发灶中paxillin的表达较淋巴结转移灶中高,晚期淋巴结转移灶中paxillin的表达显著高于早期转移灶。我们推测这可能与癌细胞的黏附力下降、迁移力增加易于使其从原发灶脱离出来而进入血液循环,而进入转移灶后黏附力增加、迁移力下降便于其生存有关。进入转移灶后的癌细胞根据其侵袭和转移的需要,其迁移能力又随之增加。Cajot et al<sup>[15]</sup>研究发现从人类大肠腺癌中分离培养的肝转移癌细胞,其移动相关蛋白(MRP/CD9)在肝转移灶中的表达较原发灶中下降,原发灶的癌细胞的迁移潜能显著高于转移灶的癌细胞<sup>[15]</sup>。这一实验结果支持了我们的上述推测。

总之,paxillin作为一种调节焦点黏附蛋白,在胃癌的分化、浸润和转移中起着重要作用。

### 4 参考文献

- Clark EA, Brugge JS. Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science* 1995;268:233-239
- Schaller MD. Paxillin: a focal adhesion-associated adaptor protein. *Oncogene* 2001;20:6459-6472

- 3 Iwasaki T, Nakata A, Mukai M, Shinkai K, Yano H, Sabe H, Schaefer E, Tatsuta M, Tsujimura T, Terada N, Kakishita E, Akedo H. Involvement of phosphorylation of Tyr-31 and Tyr-118 of paxillin in MM1 cancer cell migration. *Int J Cancer* 2002;97:330-335
- 4 Shigetomi A, Kotoh T, Harada T, Morikawa S, Nakamura T. Development of an experimental model for spontaneous lymph node metastasis of human esophageal carcinoma in nude mice histopathological analysis. *Hum Cell* 1992;5:273-281
- 5 Jockusch BM, Bubeck P, Giehl K, Kroemker M, Moschner J, Rothkegel M, Rudiger M, Schluter K, Stanke G, Winkler J. The molecular architecture of focal adhesions. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1995;11:376-416
- 6 Tu LC, Chou CK, Chen HC, Yeh SF. Protein kinase C-mediated tyrosine phosphorylation of paxillin and focal adhesion kinase requires cytoskeletal integrity and is uncoupled to mitogen-activated protein kinase activation in human hepatoma cells. *J Biomed Sci* 2001;8:184-190
- 7 Haier J, Nicolson GL. Role of the cytoskeleton in adhesion stabilization of human colorectal carcinoma cells to extracellular matrix components under dynamic conditions of laminar flow. *Clin Exp Metastasis* 1999;17:713-721
- 8 Turner CE. Paxillin interactions. *J Cell Sci* 2000;113:4139-4140
- 9 Vadlamudi R, Adam L, Tseng B, Costa L, Kumar R. Transcriptional up-regulation of paxillin expression by heregulin in human breast cancer cells. *Cancer Res* 1999;59:2843-2846
- 10 Salgia R, Li JL, Ewaniuk DS, Wang YB, Sattler M, Chen WC, Richards W, Pisick E, Shapiro GI, Rollins BJ, Chen LB, Griffin JD, Sugarbaker DJ. Expression of the focal adhesion protein paxillin in lung cancer and its relation to cell motility. *Oncogene* 1999;18:67-77
- 11 刘红岩. 整合素激活FAK介导的信号传导途径研究进展. 国外医学免疫学分册 2000;23:1-5
- 12 Rodina A, Schramm K, Musatkina E, Kreuser ED, Tavitian A, Tatosyan A. Phosphorylation of p125FAK and paxillin focal adhesion proteins in src-transformed cells with different metastatic capacity. *FEBS Lett* 1999;455:145-148
- 13 Lu Z, Jiang G, Blume-Jensen P, Hunter T. Epidermal growth factor-induced tumor cell invasion and metastasis initiated by dephosphorylation and downregulation of focal adhesion kinase. *Mol Cell Biol* 2001;21:4016-4031
- 14 苏剑敏, 桂律, 周逸平, 查锡良. 粘着斑激酶在胃癌中的表达及其临床意义. 实用癌症杂志 2000;15:341-343
- 15 Cajot JF, Sordat I, Silvestre T, Sordat B. Differential display cloning identifies motility-related protein (MRP1/CD9) as highly expressed in primary compared to metastatic human colon carcinoma cells. *Cancer Res* 1997;57:2593-2597

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2003 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

## 丹参对 TGF- $\beta$ 1 刺激的 NIH/3T3 细胞 c-fos mRNA 表达和 AP1 蛋白结合活性的影响

胡旭东, 王晓玲, 童普德, 吴小江, 刘平

胡旭东, 王晓玲, 童普德, 吴小江, 上海中医药大学生物教研室 上海市 200032  
刘平, 上海中医药大学肝病研究所 上海市 200032  
上海市高等学校科学技术自然基金资助课题, No. 99C03  
项目负责人: 王晓玲, 200032, 上海市零陵路 530 号, 上海中医药大学生物教研室. wxlzzx@sohu.com  
电话: 021-54231704  
收稿日期: 2003-03-06 接受日期: 2003-04-03

### 摘要

目的: 研究丹参对 TGF $\beta$ 1 刺激的 NIH/3T3 成纤维细胞功能的影响。

方法: 将正常大鼠进行丹参灌胃, 分离含药血清, 温育 TGF $\beta$ 1 刺激的 NIH/3T3 成纤维细胞。RT-PCR 法检测 c-fos 基因表达, Gel mobility shift assay 法检测 AP1 蛋白的结合活性。

结果: 经 TGF $\beta$ 1 刺激后, 细胞 c-fos mRNA 表达及 AP1 蛋白结合活性明显增强, 丹参含药血清可分别抑制由 TGF $\beta$ 1 引起的细胞 c-fos mRNA 表达及 AP1 蛋白结合活性的增强。

结论: 丹参可以抑制 TGF $\beta$ 1 刺激的 NIH/3T3 成纤维细胞中的 c-fos 基因表达及 AP1 蛋白结合活性。

胡旭东, 王晓玲, 童普德, 吴小江, 刘平. 丹参对 TGF- $\beta$ 1 刺激的 NIH/3T3 细胞 c-fos mRNA 表达和 AP1 蛋白结合活性的影响. 世界华人消化杂志 2003; 11(10):1634-1636  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1634.asp>

### 0 引言

正常情况下, 成纤维细胞中胶原蛋白处于合成代谢和分解代谢的动态平衡中。在某些条件诱导下, 导致合成代谢大于分解代谢, 造成胶原蛋白(其中以 I 型胶原为主)过度增生沉积于细胞间质中而发生纤维化。这是心脏、肝脏、肾脏等各种脏器发生纤维化的细胞学基础。纤维化阶段是抑制和逆转疾病进一步发展的关键时期, 也是药物介入的最佳时期, 因此, 此阶段常作为治疗学上的研究对象和药物作用的关键环节。

在纤维化的起始阶段, 各种始动因素促使多种细胞因子的释放, 其中转化生长因子  $\beta$ 1 (transforming growth factor  $\beta$ 1, TGF $\beta$ 1)是目前所知最强大的促胶原生成因子, 在各种纤维化模型中, TGF $\beta$ 1 mRNA 主要定位在纤维化局部区域。TGF $\beta$ 1 对胶原基因表达的调节有一部分直接发生在转录水平上, TGF $\beta$ 1 可使 I 型胶原  $\alpha$ 1 和  $\alpha$ 2 链的转录速率分别增加 2-3 和 4 倍, 他通过诱导细胞核内立早基因(immediate early genes)内如 c-fos 与 c-jun 的表达增加转录调节因子(如 AP1、NF1 等), 并通过增强转录调节因子 AP1、NF1 等与响应顺式作用元件的结合活性, 使胶原基因的启动子活性增强而促进胶原的合成。在小鼠、大鼠及人胶原基因的启动子上均有 TGF $\beta$ 1 的作用位点<sup>[2, 11]</sup>; 其中 I 型胶原  $\alpha$ 2 链

(COL1A2)启动子中存在一个核转录因子AP1(c-fos和c-jun的产物)结合位点对TGF $\beta$ 1调节I型胶原的表达起着非常关键的作用。

丹参是活血化瘀药的代表之一,素有“丹参一味,功同四物”之称,广泛应用于心血管疾病中。近年来,临床<sup>[5]</sup>与动物实验<sup>[3, 6]</sup>均证实,丹参能有效改善肝脏炎症,减轻细胞外基质的增生与沉积,有较好的抗纤维化作用,也常常作为抗纤维化复方的君药。因此,在既往研究的基础上,探讨丹参影响TGF $\beta$ 1促I型胶原生成的机制及其抗纤维化的主要作用机制。

## 1 材料和方法

1.1 材料 药物:丹参为唇形科植物丹参*Salvia miltiorrhiza* Bge的干燥根及根茎,由上海中华制药厂协助制成流浸膏。主要试剂:重组人TGF $\beta$ 1, Calbiochem 公司产品;1640培养基及Moloney鼠白血病病毒逆转录酶, GIBCO 公司产品;PCR markers 及六聚体随机引物、gel mobility shift assay 试剂盒, Promega 产品; $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP (5 000 Ci/mmol) 北京福瑞生物工程公司;其余试剂为国产或进口分析纯。引物: GAPDH 引物(甘油醛-3-磷酸脱氢酶, 长度为299 bp)<sup>[8]</sup>、c-fos 引物(长度为432 bp)<sup>[9]</sup>。细胞:小鼠胚胎 NIH/3T3 成纤维细胞株, 购自中国科学院上海细胞研究所。

1.2 方法 (1)丹参含药血清制备方法:使用丹参流浸膏灌胃, 用量为体重65 kg成人的10倍, 对照组给予等量的生理盐水;大鼠2次/d灌胃2 d, 第3 d首次灌胃2 h后追加1次, 再1 h后自后腔静脉采血, 离心分离含药血清<sup>[1]</sup>。(2)细胞培养:以含100 mL/L小牛血清的1640培养液, 在50 mL/L CO<sub>2</sub>, 37 °C潮湿空气的培养箱中培养, 长至亚单层后, 更换为丹参含药血清及TGF $\beta$ 1(5 ng/mL)继续培养24 h, 收取细胞层标本。(3)RT-PCR 及其产物分析:异硫氰酸胍一步法提取细胞总RNA<sup>[10]</sup>, 取总RNA 1-2  $\mu$ g 经逆转录后, 进行PCR 30-35个循环扩增。产物经20 g/L琼脂糖凝胶电泳, 紫外透射反射仪观察及照相, 以GAPDH作为内参照, 调节各组总RNA用量。(4)gel mobility shift assay:参照文献方法提取细胞核蛋白<sup>[7, 13]</sup>, 考马斯亮蓝法定量蛋白。5'-末端标记寡核苷酸, 反应体系为:寡核苷酸(1.75 pmol/ $\mu$ L) 2  $\mu$ L、T4 激酶缓冲液 1  $\mu$ L、 $[\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP] 1  $\mu$ L、无核酸酶水 5  $\mu$ L、T4 激酶 1  $\mu$ L, 37 °C 10 min, 加入0.5 mol/L EDTA 1  $\mu$ L 终止反应, 再加入89  $\mu$ L TE 缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl, pH8.0, 1 mmol/L EDTA)。G-25柱分离除去未标记核苷酸。DNA结合反应体系为:无核酸酶水 5  $\mu$ L 5 $\times$ shift缓冲液 2  $\mu$ L、核提取物 10  $\mu$ g 蛋白, 室温 10 min, 加入1  $\mu$ L <sup>32</sup>P 标记寡核苷酸, 室温 20 min。反应结束后, 取10  $\mu$ L 样品经40 g/L凝胶, 0.5 $\times$ TBE 缓冲液 (TRIS 碱 5.39 g, 硼酸 2.75 g, EDTA-Na<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O 0.37 g)电泳, 固定、增感、水洗、干胶、放射自显影 10-72 h, 定影、显影。

## 2 结果

2.1 丹参对 c-fos mRNA 表达的影响 TGF $\beta$ 1 作用组较对照组 c-fos mRNA 表达显著增加, 丹参加 TGF $\beta$ 1 组较TGF $\beta$ 1单独作用组c-fos mRNA表达量显著减少(图1)。

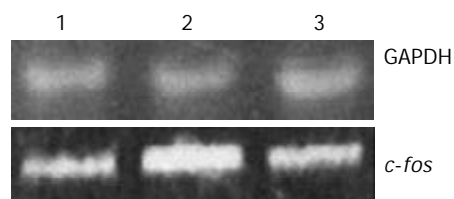


图1 c-fos RT-PCR 电泳图。1: 丹参+TGF $\beta$ 1 组; 2: TGF $\beta$ 1 组; 3: 对照组。

2.2 丹参对转录因子 AP1 对启动子结合活性的影响 TGF $\beta$ 1(5ng/mL)作用后, NIH/3T3 细胞 AP1 对启动子结合活性明显增加, 而 100 mL/L 丹参药物血清可拮抗 TGF $\beta$ 1 的作用, 使 AP1 对启动子结合活性下降(图2)。



图2 AP1 结合活性分析。1: 阳性对照组(Hela 细胞核提取物); 2: 正常对照; 3: TGF $\beta$ 1 组; 4: 丹参+TGF $\beta$ 1 组。

## 3 讨论

TGF $\beta$ 1 是目前所知的最强大的促胶原生成因子。在 小鼠、大鼠及人胶原 2 条多肽链基因的启动子上均有 TGF $\beta$ 1 的作用位点<sup>[2]</sup>, 因此, TGF $\beta$ 1 对胶原的调节至少有一部分直接发生在转录水平。TGF $\beta$ 1 的促胶原表达是通过转录调节因子的参与而进行的。目前已知, 由 c-fos 和 c-jun 基因产物组成的 AP1 蛋白及其家族参与了 TGF $\beta$ 1 对胶原启动子的作用<sup>[2, 12]</sup>。

本文的研究结果显示, 经 TGF $\beta$ 1 作用后, c-fos 的表达和 AP1 蛋白的结合活性明显增加, 提示 TGF $\beta$ 1 的促胶原生成作用有一部分是通过促进 c-fos 的转录增加和 AP1 蛋白的表达增加而实现的, 而丹参可降低 TGF $\beta$ 1 刺激的 c-fos 的转录增加及 AP1 蛋白的结合活性。结合以往的研究发现: 丹参对 TGF $\beta$ 1 所产生的明显促进 I 型胶原 $\alpha$ 2 链基因表达的作用也有部分抑制效果<sup>[1]</sup>。表明丹参通过拮抗 TGF $\beta$ 1 的作用来影响胶原蛋白的表达, 丹参对 TGF $\beta$ 1 刺激的 NIH/3T3 细胞 I 型胶原表达的抑制作用有一部分是其抑制 c-fos 基因表达和 AP1 蛋白结合活性的结果。国外已有文章报道, 胶原基因启动子竞争性结合物可以通过拮抗 TGF $\beta$  与启动子的结合从而抑制



由TGF $\beta$ 诱导的胶原细胞中胶原蛋白的生成<sup>[15]</sup>,丹参对胶原蛋白产生的抑制作用是否也与胶原基因启动子的竞争性结合有关,值得进一步研究。

最近的研究证明,丹参抗纤维化的有效成分之一的丹参酚酸B可通过干扰TGF $\beta$ 1在肝星状细胞胞质中的信号通路进而影响肝星状细胞的胶原生成<sup>[4,14]</sup>,和本研究中丹参影响成纤维细胞TGF $\beta$ 1的细胞核内信号转导的结果相结合,可看到丹参抗纤维化作用的一些作用位点和机制,为丹参的进一步临床应用和开发提供理论依据。

#### 4 参考文献

- 1 王晓玲,刘平,董普德,谭英姿,钱汝红,胡旭东,蒋文娟.丹参对转化生长因子 $\beta$ 1刺激的NIH/3T3细胞表达I型胶原和c-fos mRNA的影响.中西医结合肝病杂志 2001;11:19-20
- 2 王晓玲,刘平,刘成.转化生长因子 $\beta$ 1对I型胶原基因转录的调节.中西医结合肝病杂志 1998;8(增刊):196-199
- 3 胡义扬,刘平,刘成,顾宏图,徐列明,刘成海,季光.丹参提取物对CCl<sub>4</sub>和DMN诱导的大鼠肝纤维化的影响.上海中医药杂志 1999;10:7-10
- 4 刘成海,刘平,胡义扬,朱大元.丹酚酸B盐对转化生长因子- $\beta$ 1刺激肝星状细胞活化与胞内信号转导的作用.中华医学杂志 2002;82:1267-1272
- 5 余亚新,杨汉青,朱立专,曹莉,刘宗良,朱礼尧,张尔康,田永明,沈怀成,滕士超.大剂量丹参治疗肝纤维化的临床观察.上海中医药杂志 1994;2:8-10
- 6 张灵芝,赵元昌,韩德五,陈贤明,许瑞龄,尹镭,马学惠.丹参在抗

- 肝细胞坏死中的钙拮抗作用.中国病理生理杂志 1993;9:191-195
- 7 Dignam JD, Lebovitz RM, Roeder RG. Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Research* 1983;11:1475-1489
- 8 Nicoletti A, Heudes D, Hinglais N, Appay MD, Philippe M, Sassy-Prigent C, Bariety J, Michel JB. Left ventricular fibrosis in renovascular hypertensive rats. Effect of losartan and spironolactone. *Hypertension* 1995;26:101-111
- 9 Potter JJ, Rennie-Tankersley L, Anania FA, Mezey E. A transient increase in c-myc precedes the transdifferentiation of hepatic stellate cells to myofibroblast-like cells. *Liver* 1999;19:135-144
- 10 Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156-159
- 11 Carcamo J, Weis FM, Ventura F, Wieser R, Wrana JL, Attisano L, Massague J. Type I receptors specify growth-inhibitory and transcriptional responses to transforming growth factor beta and activin. *Mol Cell Biol* 1994;14:3810-3821
- 12 Jardine H, MacNee W, Donaldson K, Rahman I. Molecular mechanism of transforming growth factor (TGF)- $\beta$ 1-induced glutathione depletion in alveolar epithelial cells. Involvement of AP-1/ARE and Fra-1. *J Biol Chem* 2002;277:21158-21166
- 13 Smart DE, Vincent KJ, Arthur MJ, Eickelberg O, Castellazzi M, Mann J, Mann DA. JunD regulates transcription of the tissue inhibitor of metalloproteinases-1 and interleukin-6 genes in activated hepatic stellate cells. *J Biol Chem* 2001;276:24414-24421
- 14 王晓玲,刘平,谭英姿,董普德,蒋文娟.丹酚酸乙对转化生长因子 $\beta$ 1刺激的大鼠肝星状细胞的观察.中华肝病杂志 2001;6:96-97
- 15 Meisler NT, Chiu JF, Cutroneo KR. Promoter competitors as novel antifibrotics that inhibit transforming growth factor-beta induction of collagen and noncollagen protein synthesis in fibroblasts. *J Cell Biochem* 1999;75:196-205

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2003年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

## 左旋精氨酸对大鼠肝脏缺血再灌注损伤的保护作用

郝悦,周新民

郝悦,武警海南总队医院消化内科 海南省海口市 570203  
周新民,中国人民解放军第四军医大学西京医院消化内科 陕西省西安市 710033  
项目负责人:郝悦,570203,海南省海口市文明东路49,武警海南总队医院消化内科. haikouhaoyue@hotmail.com  
电话:0898-68284056 传真:0898-65343033  
收稿日期:2003-03-06 接受日期:2003-03-26

#### 摘要

目的:探讨左旋精氨酸(L-arg)对大鼠肝脏缺血再灌注(I/R)损伤的保护作用。

方法:将24只SD大鼠随机分为对照组(n=12)和灌喂精氨酸组(n=12)。制备大鼠肝I/R损伤模型,观察损伤后谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、乳酸脱氢酶(LDH)、一氧化氮(NO)和肝组织丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)含量变化及肝组织病理变化。

结果:L-arg组:ALT、AST、LDH明显下降t分别为3.66,

14.28, 6.22 (P<0.01)。MDA含量明显降低(t=3.21, P<0.01), SOD及NO活性明显升高(t=3.71, 8.93, P<0.01),组织的病理改变也轻于对照组。

结论:左旋精氨酸具有减轻肝I/R引起的肝功损害和脂质过氧化损害,其机制可能与血清NO含量增加有关。

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(10):1636-1638

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1636.asp>

#### 0 引言

肝I/R损伤是临床上广泛关注的问题,常见于许多临床病理过程和创伤外科疾病的肝脏手术过程,如失血性休克,肝切除和肝移植等。肝I/R时,肝脏组织细胞发生了一系列代谢、结构和功能的紊乱<sup>[1]</sup>。本实验探讨精氨酸对大鼠肝I/R损伤的作用及影响。

## 1 材料和方法

1.1 材料 ♂ SD 大鼠 24 只, 体重 200-250 g, 由第四军医大学实验动物中心提供. MDA、SOD、NO 试剂盒均购自南京建成生物工程研究所, L-arg 为 Alexis 产品.

1.2 方法 随机将大鼠分为 2 组, 每组 12 只. 普通喂养, 饲料为大鼠标准饲料, 自由进饮进食. 肝 I/R 模型制备前 1 wk 对照组用生理盐水灌喂 1 mL/次, 2 次/d; L-arg 组: 70 g/L 的 L-arg 溶液 1 mL/次, 2 次/d 经口灌喂. 实验用 SD 大鼠术前禁食 12 h, 经腹腔注射氯胺酮 100 mg/kg 麻醉后, 上腹正中切口进腹, 分离肝脏周围诸韧带, 解剖肝门, 用小号无损伤动脉夹阻断左、中叶肝蒂, 90 min 后开放, 恢复被阻断肝叶血供, 建立部分肝 I/R 模型<sup>[2, 3]</sup>. 血样检测: 两组大鼠于肝脏再灌注 2h 后经下腔脉留取 4-5 mL 血样, 离心(4 °C, 4 000 r/min, 10 min), 取部分上清液用日本柯达 250 型全自动生化分析仪测定 ALT、AST、LDH; 部分上清液置于 -70 °C 冰箱保存, 硝酸还原法测定 NO; 组织检测: 各组大鼠于肝脏再灌注 2 h 后取部分肝组织制成匀浆, 保存于液氮中用相应试剂盒测定抗氧化酶活力及脂质过氧化产物, 操作均按试剂盒说明进行. 部分肝组织保存于含 100 mL/L 甲醛的金属沉淀液中用于 HE 染色, 光镜检查.

统计学处理 全部数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 均数间的比较采用 t 检验, 采用 SPSS 软件, 以  $P < 0.05$  为差异有显著性意义.

## 2 结果

2.1 肝功能酶学的变化 肝缺血再灌注 120 min, L-arg 组血清 AST、ALT 及 LDH 明显低于对照组( $P < 0.01$ , 表 1), 提示 L-arg 组肝脏受到的损害较轻或功能恢复更快更好.

表 1 大鼠血清 ALT、AST、LDH 的变化( $n = 12$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	ALT(U/L)	AST (U/L)	LDH (U/L)
对照组	532.9 ± 194.7	1 602.2 ± 279.7	7 173.2 ± 817.3
L-arg 组	317.9 ± 58.5	385.9 ± 93.4	3 597.6 ± 1 812.5

$P < 0.01$  vs 对照组.

表 2 大鼠肝组织 MDA、SOD 及血清 NO 变化( $n = 12$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	MDA(μmol/g)	SOD(U/g)	NO(μmol/L)
对照组	18.54 ± 3.48	127.79 ± 19.09	13.90 ± 2.69
L-arg 组	11.14 ± 4.09	153.58 ± 14.70	29.66 ± 5.49

$P < 0.01$  vs 对照组.

2.2 抗氧化酶、脂质氧化产物及 NO 含量变化 肝缺血再灌注 120 min, L-arg 组肝组织的抗氧化酶活力较对照组明显升高( $P < 0.01$ ), 而相应的脂质过氧化产物明显减少( $P < 0.01$ ), 血清 NO 水平较对照组明显升高( $P < 0.01$ , 表 2).

2.3 病理组织学改变 光镜下结构: 对照组肝小叶结构紊乱, 肝血窦和中央静脉有程度不同的瘀血, 肝血窦变窄或消失, 内皮细胞及肝细胞普遍水肿变性, 大量的中性粒细胞附壁及小灶样坏死. L-arg 组肝小叶结构基本正常, 散在肝细胞肿胀变性, 少量粒细胞浸润.

## 3 讨论

近年研究表明, 肝微循环障碍是导致肝 I/R 损伤的病理基础<sup>[4]</sup>. 其机制是肝缺血时, 肝细胞 ATP 含量减少, 钙离子大量内流致肝细胞缺氧水肿, 肝细胞骨架结构受损, 肝血窦变窄<sup>[5]</sup>. 也有人认为氧自由基的大量释放是导致损伤后早期组织器官功能障碍的重要原因<sup>[6-9]</sup>. 本实验结果表明, 肝 I/R 损伤导致肝功能酶学发生变化, ALT、AST、LDH 明显升高, MDA 含量增高, 而 SOD 活力明显下降, 证明氧自由基的参与引发了肝组织的脂质过氧化损伤.

L-arg 作为 NO 合成的前体, 在一氧化氮合酶(NOS)的作用下生成 NO, 后者具有多种生物学功能, 扩张血管, 抑制血小板黏附<sup>[10-13]</sup>, 参与杀菌<sup>[14]</sup>等作用. 近年来认识到严重创伤及缺氧时导致肝细胞变性甚至坏死, 已证明 NO 是最主要的血管内皮舒张因子. 从理论上讲预先用 L-arg 补充 NO 生成的前体, 可使组织血管扩张<sup>[15, 16]</sup>, 损伤后缺氧状况可以改善. 本实验证明了这一点, L-arg 组 I/R 损伤后血清 NO 及肝组织 SOD 含量明显升高, MDA 含量减少, 说明经口喂 L-arg 可增加肝组织局部 NO 合成, 改善局部血流灌注. 因此口喂 L-arg 具有减轻肝 I/R 所引起的脂质过氧化损害和保护肝细胞的作用.

## 4 参考文献

- Colletti LM, Cortis A, Lukacs N, Kunkel SL, Green M, Strieter RM. Tumor necrosis factor up-regulates intercellular adhesion molecule 1, which is important in the neutrophil-dependent lung and liver injury associated with hepatic ischemia and reperfusion in the rat. *Shock* 1998;10:182-191
- Colletti LM, Remick DG, Burtch GD, Kunkel SL, Strieter RM, Campbell DA Jr. Role of tumor necrosis factor- $\alpha$  in the pathophysiologic alterations after hepatic ischemia/reperfusion injury in the rat. *J Clin Invest* 1990;85:1936-1943
- 董满库, 崔彦, 周立艳, 施清华, 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
- Kurokawa T, Takagi H. Mechanism and prevention of ischemia-reperfusion injury. *Transplant Proc* 1999;31:1775-1776
- Li XK, Matin AF, Suzuki H, Uno T, Yamaguchi T, Harada Y. Effect of protease inhibitor on ischemia/reperfusion injury of the rat liver. *Transplantation* 1993;56:1331-1336
- Yamaguchi Y, Matsumura F, Liang J, Okabe K, Ohshiro H, Ishihara K, Matusda T, Mori K, Ogawa M. Neutrophil elastase and oxygen radicals enhance monocyte chemoattractant protein-expression after ischemia/reperfusion in rat liver. *Transplantation* 1999;68:1459-1468
- Gasbrini A, pasini P, Nardo B, De Notariis S, Simoncini M, Cavallari A, Roda E, Bernardi M, Roda A. Chemiluminescent real time imaging of post-ischemic oxygen free radicals formation in livers isolated from young and old rats. *Free Radic Biol Med* 1998;24:211-216
- Vendemiale G, Grattagliano I, Altomare E. An update on the role of free radicals and antioxidant defense in human disease. *Int J Clin Lab Res* 1999;29:49-55

- 9 陈玺华, 鲍民生, 李正中. 大鼠肝缺血腺苷预处理的作用机制. 世界华人消化杂志 1999;7:298-299
- 10 Stoclet JC, Muller B, Andriantsitohaina R, Kleschyov A. Overproduction of nitric oxide in pathophysiology of blood vessels. *Biochemistry (Mosc)* 1998;63:826-832
- 11 Endlich K, Muller C, Barthelmebs M, Helwig JJ. Role of shear stress in nitric oxide-dependent modulation of renal angiotensin II vasoconstriction. *Br J Pharmacol* 1999;127:1929-1935
- 12 Olszanecki R, Chlopicki S. Endotoxaemia in rats: role of NO, PAF and TXA2 in pulmonary neutrophil sequestration and hyperlactataemia. *J Physiol Pharmacol* 1999;50:443-454
- 13 Eleftheriadis E, Kotzampassi K, Heliadis N, Herodotou A, Hatjopoulou E, Petridou E, Sarris K. The implication of nitric oxide in the process of bacterial translocation. *Int Surg* 2000;85:23-26
- 14 Fierro IM, Nascimento-DaSilva V, Arruda MA, Freitas MS, Plotkowski MC, Cunha FQ, Barja-Fidalgo C. Induction of NOS in rat blood PMN in vivo and in vitro: modulation by tyrosine kinase and involvement in bactericidal activity. *J Leukoc Biol* 1999;65:508-514
- 15 王万铁, 王卫, 徐正, 林丽娜, 李东. 肝缺血 - 再灌注损伤中脂质过氧化反应及左旋精氨酸的干预作用. 中国危重病急救医学 2003;15:91-93
- 16 朱永安, 张西洲, 哈振德, 张芳, 韩敏, 朱金山. 左旋精氨酸治疗高原肺水肿患者血流动力学观察. 中国急救医学 2002;22:217-218

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2003 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

## 端粒酶在大肠癌细胞中的活性表达及临床意义

鲁明良, 林富林, 郑国宝, 姜朝晖

鲁明良, 林富林, 姜朝晖, 中国人民解放军解放军第 117 中心医院肛肠科 浙江省杭州市 310013  
郑国宝, 浙江大学医学院肿瘤研究所 浙江省杭州市 310000  
项目负责人: 鲁明良, 310013, 浙江省杭州市灵隐路 14 号, 中国人民解放军解放军第 117 中心医院肛肠外科. lum1505@sohu.com  
电话: 0571-87348628  
收稿日期: 2003-01-15 接受日期: 2003-03-28

### 摘要

目的: 探讨端粒酶活性的改变在大肠癌发生发展过程中的作用以及端粒酶活性检测作为一种新的大肠癌临床诊断的生物学标志的可行性。

方法: 采用 TRAP(telomeric repeat amplification protocol)结合聚酰胺凝胶电泳银染法检测 46 例配对大肠癌及癌旁组织, 4 例大肠癌肝转移病灶组织内端粒酶的活性, 并用 Southern-blot-ECL (enhanced chemiluminescence)法对上述标本内端粒酶平均长度进行检测。

结果: 肿瘤组内端粒酶活性明显高于对应癌旁组织, 在肿瘤组织内, 端粒酶的活性表达升高与大肠癌的病理学分期呈显著相关性( $P < 0.01$ ,  $t = 8.3477$ ), 而与肿瘤的大小、部位, 肿瘤的恶性程度、分级、浸润深度、CEA 表达水平等无显著相关性, 与肿瘤组相比, 在肝转移病灶内, 端粒酶的活性表达无显著升高, 肿瘤组内的端粒酶平均长度明显大于对应的癌旁组织。端粒酶平均长度与大肠癌的病理学分期呈显著相关性。

结论: 端粒酶的活化及其长度的缩短可能成为早期检测大肠癌癌变的临床指标。

鲁明良, 林富林, 郑国宝, 姜朝晖. 端粒酶在大肠癌细胞中的活性表达及临床意义. 世界华人消化杂志 2003;11(10):1638-1640  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1638.asp>

### 0 引言

大肠癌是我国最常见的恶性肿瘤之一, 其发病率和死亡率均有上升趋势, 大肠癌的早期诊断尚缺乏有效的临床指标。近年来, 端粒酶在细胞衰老和癌变过程中的作用已受到人们的重视。研究者普遍认为, 端粒酶的激活是肿瘤形成过程中的关键步骤, 为了进一步明确端粒酶的激活与在大肠癌形成发展过程中的确切作用, 我们对 46 例配对大肠癌及癌旁组织, 4 例大肠癌肝转移病灶组织内端粒酶的活性及端粒酶平均长度进行了检测。

### 1 材料和方法

1.1 材料 46 例配对大肠癌及癌旁组织, 4 例大肠癌肝转移病灶组织均取自 2000-01/2000-12 我院住院手术的患者。其中, 癌旁组织均取自肿瘤切除标本的远癌断端, 所有标本均于手术切除术后 20 min 内取材, 并迅速置  $-180^{\circ}\text{C}$  液氮内冻存待用。

#### 1.2 方法

1.2.1 端粒酶活性检测 严格按端粒反复扩增法(telomeric amplification protocol)试剂盒说明书进行操作。(1)组织提取液的制备: 从液氮中取出冻存组织 500 mg, 剪碎, 清洗, 离心, 弃上清, 组织匀浆器将组织制成匀浆, 加组织裂解液, 离心, 上清经蛋白定量后液氮中保存待用。(2)合成 TS 和 CX 引物, (3)建立 TRAP 反应体系( $50\ \mu\text{L}$ ), 反应参数如下: 引物延伸  $25^{\circ}\text{C}$  30 min, 端粒酶灭活  $94^{\circ}\text{C}$  5 min. 扩增: 变性  $94^{\circ}\text{C}$  30 s, 退火  $50^{\circ}\text{C}$  30 s, 延伸  $72^{\circ}\text{C}$  90 s, 循环 30 次, 延伸  $72^{\circ}\text{C}$  10 s,  $4^{\circ}\text{C}$  抑制。

1.2.2 聚丙烯凝胶电泳, 增强化学发光法(ECL)显影 取  $25\ \mu\text{L}$  上述 PCR 产物, 于  $120\ \text{g/L}$  非变性聚丙烯凝胶电

泳, ECL 显影. 分子量标记物为 pBR322 DNA/HaeIII Markers.

1.2.3 端粒酶末端限制性片段长度测定 采用经典法提取组织 DNA, 根据 260 nm 处的吸收光值计算基因组 DNA 浓度, 取 2.5  $\mu\text{g}$  DNA 并建立限制性内切酶消化体系, HinfI/RsaI 联合酶切, 琼脂糖凝胶电泳, Southern blot 印迹转膜, 与生物素标记的端粒探针进行杂交, ECL 法显影. 胶片上杂交信号经光密度扫描仪(美国 Bromma 公司 LKB2400Gelescan XL)检测 2-23 kb 间吸收光度  $A$  值, 按公式计算出各样本 DNA 平均端粒长度.

统计学处理  $t$  检验.

## 2 结果

2.1 端粒酶在大肠癌、配对癌旁组织及大肠癌肝转移组织内的表达以 PCR 产物电泳后见到条带间相差 6 bp 的梯形条带为阳性(出现三条以上条带), 根据上述判断标准, 46 例大肠癌组织中, 41 例端粒酶表达阳性, 阳性率 89.13 %, 而配对的癌旁组织中, 端粒酶表达全部为阴性, 两组之间具有极显著性差异( $P < 0.05$ ), 在肿瘤组内, 17 例 Dukes A-B 期肿瘤组织中, 13 例端粒酶表达阳性, 阳性率为 76.47 %, 29 例 Dukes C-D 期肿瘤组织中, 28 例端粒酶表达阳性, 阳性率为 96.55 %, Dukes C-D 期的阳性率显著高于 Dukes A-B 期( $P < 0.001$ ), 4 例大肠癌肝转移病灶内端粒酶表达全部阳性. 因例数太少, 不宜与配对肿瘤组织进行显著性分析; 端粒酶阳性表达与肿瘤的大小、部位、性别、浸润深度、组织学类型及分化程度等病理学指标无显著相关性.

2.2 46 例大肠癌组织中不同位点端粒的平均长度 肿瘤组端粒的平均长度为  $4.4 \pm 1.1$  kb, 癌旁组的平均长度为  $9.6 \pm 1.5$  kb, 两组间具有显著差异( $P < 0.001$ ).

2.3 46 例大肠癌组织不同临床分期与端粒长度的关系 实验结果表明, 随着肿瘤分期的下降, 端粒的长度显著下降( $t = 8.3477$ ,  $P < 0.01$ , 表 1), 端粒的长度与其他临床病理学指标无明显相关性.

表 1 直肠癌癌的 Dukes 分期与端粒长度的关系( $\bar{x} \pm s$ , kb)

Dukes 分期	$n$	端粒长度
Dukes A-B	17	$6.6 \pm 1.2$
Dukes C-D	29	$3.7 \pm 1.1$

## 3 讨论

染色体端粒是位于染色体末端的一种特殊结构, 由串联的短片序列和蛋白组成, 在染色体的定位、复制及保护方面起重要作用<sup>[1]</sup>, 端粒序列的复制依赖于端粒酶的作用, 正常体细胞中通常无该酶的表达, 随着细胞有丝分裂次数的增加, 端粒片段的长度不断缩短, 细胞即进入程序化死亡, 端粒的长度被认为是细胞有丝分裂的时钟<sup>[2]</sup>. 自 1994 年以来, 国外研究表明, 85 % 以上的肿瘤细胞呈端粒酶表达阳性, 而正常组织中却检测

不到端粒酶的活性. 细胞提示这一分子事件与肿瘤细胞的恶性转化及肿瘤细胞的持续分裂增殖的相关性, 同时有力的提示端粒酶的活性可作为肿瘤检测的一个特异性指标.

我们的实验结果表明, 46 例大肠癌组织中, 41 例端粒酶表达阳性, 阳性率 89.13 %, 而配对的癌旁组织中, 端粒酶表达全部为阴性, 两组之间具有极显著性差异( $P < 0.05$ ), 与国外其他学者的研究结果接近<sup>[3-10]</sup>, 同时, 肿瘤组内端粒序列的长度显著低于配对的癌旁组, 说明端粒的缩短和端粒酶的激活间存在着某种平衡, 这种平衡的维持, 使肿瘤细胞获得无限增生的能力.

在肿瘤组内, 17 例 Dukes A-B 期肿瘤组织中, 13 例端粒酶表达阳性, 阳性率为 76.47 %, 29 例 Dukes C-D 期肿瘤组织中, 28 例端粒酶表达阳性, 阳性率为 96.55 %, Dukes C-D 期的阳性率显著高于 Dukes A-B 期( $P < 0.01$ ), 同时, Dukes C-D 期的端粒长度显著低于 Dukes A-B 期( $P < 0.05$ ), 这说明, 晚期肿瘤中, 由于细胞分裂次数的增加, 进入死亡临界点的细胞数增加, 端粒的长度越来越短, 端粒酶被激活的数量增加. 其他学者的实验结果表明<sup>[11]</sup>, 在早期神经母细胞瘤中, 端粒酶的表达较高, 而在晚期表达较低, 另外, 我们收集的 4 例大肠癌肝转移病灶内端粒酶表达全部阳性. 因例数太少, 不宜与配对肿瘤组织进行显著性分析, 尚不能说明端粒的表达与大肠癌肝转移之间的相关性, 但已有报道表明, 端粒酶的活性与肿瘤的转移特性有密切的关系<sup>[12]</sup>, 到目前为止, 这种现象的原因还不清楚, 需进一步扩大样本进行深入研究.

实验结果表明, 端粒酶的活性及端粒序列的长短与大肠癌患者的年龄、组织学类型、浸润深度等病理学指标无显著相关性, 这与其他学者的研究结果相似<sup>[13, 14]</sup>. 这说明, 端粒的缩短和端粒酶的激活只是肿瘤恶变的一个必要条件, 而肿瘤细胞的分裂速度、侵袭及转移特性可能与细胞内其他调节机制有关.

端粒酶作为肿瘤诊断的标记物的希望已展现出光辉的前景, 已有不少学者对大肠癌患者粪便中脱落细胞进行了端粒酶活性检测, 特异性达到 95.7 %, 阳性预测值达到 96.4 %, 充分说明了端粒酶作为大肠癌诊断标记物的有效性和潜在的应用价值<sup>[15]</sup>. 此外, 也有人提出研制端粒酶抑制剂用于治疗恶性肿瘤, 但是端粒酶在细胞永生代过程中发挥作用的机制仍有待进一步研究. 因此, 将端粒酶真正用于临床, 还需要做大量基础和临床研究工作.

## 4 参考文献

- 1 Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, Coviello GM, Wright WE, Weinrich SL, Shay JW. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 1994;266:2011-2015
- 2 Haber DA. Telomeres, cancer, and immortality. *New Engl J Med* 1995;332:955-956
- 3 Tahara H, Kuniyasu H, Yokozaki H, Yasui W, Shay JW, Ide T,

- Tahara E. Telomerase activity in preneoplastic and neoplastic gastric and colorectal lesions. *Clinical Cancer Res* 1995;1:1245-1251
- 4 Tatsumoto N, Hiyama E, Murakami Y, Imamura Y, Shay JW, Matsuura Y, Yokoyama T. High telomerase activity is an independent prognostic indicator of poor outcome in colorectal cancer. *Clinical Cancer Res* 2000;6:2696-2701
- 5 Chadeneau C, Hay K, Hirte HW, Gallinger S, Bacchetti S. Telomerase activity associated with acquisition of malignancy in human colorectal cancer. *Cancer Res* 1995;55:2533-2536
- 6 Hastie ND, Dempster M, Dunlop MG, Thompson AM, Green DK, Allshire RC. Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing. *Nature (Lond)* 1990;346:866-868
- 7 Hiyama E, Gollahan L, Kataoka T, Kuroi K, Yokoyama T, Gazdar AF, Hiyama K, Piatyszek MA, Shay JW. Telomerase activity in human breast tumors. *J Natl Cancer Inst* 1996;88:116-122
- 8 Hiyama K, Hirai Y, Kyoizumi S, Akiyama M, Hiyama E, Piatyszek MA, Shay JW, Ishioka S, Yamakido M. Activation of telomerase in human lymphocytes and hematopoietic progenitor cells. *J Immunol* 1995;155:3711-3715
- 9 Hiyama K, Hiyama E, Ishioka S, Yamakido M, Inai K, Gazdar AF, Piatyszek MA, Shay JW. Telomerase activity in small-cell and non-small-cell lung cancers. *J Natl Cancer Inst* 1995;87:895-902
- 10 Counter CM, Hirte HW, Bacchetti S, Harley CB. Telomerase activity in human ovarian carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:2900-2904
- 11 Hiyama E, Hiyama K, Yokoyama T, Matsuura Y, Piatyszek MA, Shay JW. Correlating telomerase activity levels with human neuroblastoma outcomes. *J Neture Med* 1995;1:249-255
- 12 Engelhardt M, Drullinsky P, Guillem J, Moore MA. Telomerase and telomere length in the development and progression of premalignant lesions to colorectal cancer. *J Clinical Cancer Res* 1997;3:1931-1941
- 13 Ohta K, Kanamaru T, Yamamoto M, Saitoh Y. Clinical significance of telomerase activity in hepatocellular carcinoma. *Kobe J Med Sci* 1996;42:207
- 14 Rogalla P, Rohen C, Bonk U, Bullerdiek J. Telomeric repeat fragment lengths are not correlated to histological grading in 85 breast cancers. *Cancer Lett* 1996;106:155-161
- 15 骆成玉, 李世拥, 李鸿义, 赵丹宁, 曲军, 祝学光. 大肠癌患者粪便标本的端粒酶活性研究. *中华外科杂志* 2001;39:580-582

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2003 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

## 多种因子在门脉高压大鼠结肠黏膜中的表达

尹朝晖, 刘浔阳, 黄飞舟, 黄穰浪, 任树平

尹朝晖, 刘浔阳, 黄飞舟, 黄穰浪, 任树平, 中南大学湘雅三医院普外科湖南省长沙市 410013  
项目负责人: 刘浔阳, 410013, 湖南省长沙市, 中南大学湘雅三医院普外科. yzh0451@yahoo.com.cn  
电话: 0731-8618451  
收稿日期: 2003-04-03 接受日期: 2003-05-19

### 摘要

目的: 探讨多种因子在门脉高压大鼠结肠黏膜中的表达及其意义.

方法: 实验组大鼠行门静脉两步结扎加左肾上腺静脉结扎; 应用免疫组化SP染色法检测iNOS、ecNOS、ET-1、及TNF- $\alpha$ 在大鼠结肠黏膜中的表达情况.

结果: 实验组 iNOS、ET-1、及 TNF- $\alpha$  表达较对照组增强( $2.97 \pm 0.51$  vs  $2.33 \pm 0.76$ ;  $2.01 \pm 0.32$  vs  $1.38 \pm 0.74$ ;  $2.57 \pm 0.64$  vs  $1.67 \pm 0.36$ ,  $P < 0.05$ ), ecNOS 无明显变化( $2.01 \pm 0.69$  vs  $1.87 \pm 0.56$ ,  $P > 0.05$ ).

结论: iNOS、ET-1、TNF- $\alpha$  参与门脉高压大鼠结肠黏膜局部病变.

尹朝晖, 刘浔阳, 黄飞舟, 黄穰浪, 任树平. 多种因子在门脉高压大鼠结肠黏膜中的表达. 世界华人消化杂志 2003;11(10):1640-1642

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1640.asp>

### 0 引言

随着门脉高压性结肠病变(portal hypertensive colopathy,

PHC)<sup>[1]</sup>概念的提出, 局部体液因子的改变在 PHC 病因学中的作用渐受关注, 但有关此方面的报道甚少<sup>[2]</sup>. 本文选取具有不同作用的一氧化氮合酶(NOS)、内皮素 1(ET-1)及肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ), 应用免疫组化技术检测他们在门脉高压大鼠结肠黏膜局部的表达情况, 以期探讨门脉高压大鼠结肠黏膜病变中体液因子的变化及意义.

### 1 材料和方法

1.1 材料 (1)动物与分组: 20 只  $\delta$  SD 大鼠 (225-275 g, 购自中南大学湘雅医学院实验动物中心) 随机分成两组, 实验组行门静脉两步法结扎加左肾上腺静脉结扎手术; 对照组为假手术组. (2)试剂: 兔抗大鼠 ecNOS 多克隆抗体、兔抗大鼠 iNOS 多克隆抗体、兔抗大鼠 ET-1 多克隆抗体、山羊抗大鼠 TNF- $\alpha$  多克隆抗体、通用型 S-P 染色试剂盒、生物素标记兔抗山羊 IgG 染色试剂盒及 DAB 购自北京中山生物技术有限公司.

1.2 方法 (1)动物模型制备: 对 Tanoue et al<sup>[3]</sup>方法加以改进, 应用门静脉两步法结扎加左肾上腺静脉结扎制备门脉高压大鼠模型. (2)门静脉完全结扎后 2 wk, 将两组大鼠麻醉后开腹, 找到肠系膜上静脉, 剪一小口, 将一根充满生理盐水的硬膜外导管置入静脉近端, 以鼠右心房水平为“0”点, 测定门静脉压力. 其后小心切除



小段乙状结肠, 常规固定、脱水、透明、石蜡包埋。(3)免疫组化SP染色法 抗原修复(NOS、ET-1应用EDTA煮沸20 min; TNF- $\alpha$ 应用柠檬酸缓冲液煮沸20 min), 余同说明; DAB显色; PBS代替一抗作阴性对照。(4)判断标准: 反应产物的染色强度以光密度值(optical density, OD值)表示。选取结肠不同部位(黏膜、黏膜下层、肌层), 每一部位随机选5处, 应用计算机辅助HPIAS-1000图像分析系统测定反应产物的A值(若无记为0), 每一标本取平均A值。

统计学处理 应用SPSS10.0 for window 统计软件分析, 检测数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 计量资料组间比较采用t检验,  $P < 0.05$ 为差异有显著性。

## 2 结果

2.1 一般情况及静脉压力 实验组大鼠腹壁血管、肠系膜血管扩张较对照组明显; 实验组大鼠有两只可见腹腔内有少量腹水生成, 余大鼠及对照组未见明显腹水生成; 实验组大鼠门静脉压力较对照组明显升高( $20.90 \pm 3.27$  cm H<sub>2</sub>O vs  $11.43 \pm 1.55$  cm H<sub>2</sub>O,  $P < 0.01$ )。

2.2 NOS表达情况 NOS表达阳性细胞为胞质内棕黄色颗粒, 可见于黏膜上皮、肠腺腔、黏膜下层血管内皮, 同时在黏膜表面及肌层也可见黄染产物。实验组中iNOS的表达强度明显高于对照组( $2.97 \pm 0.51$  vs  $2.33 \pm 0.76$ ,  $P < 0.05$ ), 但ecNOS的表达强度两组间无明显差异( $2.01 \pm 0.69$  vs  $1.87 \pm 0.56$ ,  $P > 0.05$ )。

2.3 ET-1表达情况 阳性表达为棕黄色颗粒, 主要见于黏膜下层、黏膜上皮, 黏膜表面及肌层亦可见少量黄染。实验组表达强度高于对照组( $2.01 \pm 0.32$  vs  $1.38 \pm 0.74$ ,  $P < 0.05$ )。

2.4 TNF- $\alpha$ 表达情况 阳性表达于黏膜层可见黄染产物, 阳性细胞为胞质内可见棕黄色颗粒; 实验组TNF- $\alpha$ 表达强度较对照组明显增高( $2.57 \pm 0.64$  vs  $1.67 \pm 0.36$ ,  $P < 0.01$ )。

## 3 讨论

门脉高压症肠黏膜病变发病机制至今尚不清楚。既然分流手术可使PHC好转, 提示门静脉压力与PHC间有一定相关关系<sup>[4-6]</sup>, 然而也有研究发现PHC与HVPG无明显相关<sup>[7]</sup>, 故在PHC形成中门静脉压力升高可能并非惟一因素。随着对门静脉高压症胃黏膜病变认识的加深, 血管活性因子等体液因子在PHC中的作用受到关注, 初步研究提示局部体液因子参与PHC的发展进程<sup>[2]</sup>。有学者研究认为门静脉结扎制作的大鼠门脉高压模型可用于PHC的研究<sup>[2]</sup>, 本研究中门静脉完全结扎后2 wk, 实验组大鼠门静脉压力较对照组明显升高, 认为门脉高压大鼠模型制作成功。

内源性NO是一种强烈的血管舒张因子, 也是新型的细胞内信使和神经递质, 在机体的病理生理过程中有重要作用<sup>[8]</sup>。由于NO稳定性差, 半衰期甚短, 直接

测定十分困难, 作为合成NO的惟一限速酶NOS成为研究NO的重要手段。本研究中, 实验组结肠中iNOS的表达强度明显高于对照组( $P < 0.05$ ), 但ecNOS在结肠中的表达强度两组间无明显差异( $P > 0.05$ )。其升高可能是由于升高的门脉压力使肠道回流受阻, 肠道淤血、水肿, 肠黏膜屏障受损, 毒素物质移位、入血, 同时由于回流受阻, 高毒素血液在肠局部较长时间的刺激血管内皮等, 使iNOS生成增加, 这必然使NO生成增加, 致血管扩张, 加重淤血。尚有学者认为NO使平滑肌舒张, 调节胃肠动力<sup>[9]</sup>, NO升高使结肠运动功能减弱, 延长了黏膜与损伤因素接触时间, 而加剧结肠黏膜损伤。本研究中结肠处ecNOS无明显变化, 可能在PHC不起重要作用。

ET-1可通过其受体起多效性的生物作用<sup>[10]</sup>, 对于门脉高压症肠道黏膜中ET-1表达情况尚未见报道。本研究中, ET-1在实验组表达强度高于对照组。一方面, 在通常情况下, 扩血管物质与缩血管物质的释放和激活处于一动态平衡, 以此提供一相对稳定的微环境, ET-1升高可保持局部微环境相对稳定; 另一方面, 由于ET-1尚可诱导黏膜损伤<sup>[11]</sup>, 过量表达的ET-1必使肠道黏膜进一步受损。

TNF- $\alpha$ 是一种细胞毒性蛋白, 研究表明TNF- $\alpha$ 不仅可激活NOS基因<sup>[12, 13]</sup>, 也可激活ET-1基因<sup>[14]</sup>。本研究中TNF- $\alpha$ 在实验组表达强度高于对照组, 升高可能为回流受阻, 水肿、淤血使肠黏膜屏障受损, 毒素物质移位, 诱使肠道黏膜局部TNF- $\alpha$ 生成增加。TNF- $\alpha$ 升高既可激活ET-1、NOS基因, 而参与门脉高压症结肠黏膜病变过程; 同时TNF- $\alpha$ 尚可增加血管通透性<sup>[15]</sup>, 其升高也加重肠壁水肿、损伤黏膜屏障而加重局部病变。

由此可见, 门脉高压结肠黏膜病变是多因素共同作用的结果, 其机制尚有待进一步阐明。

## 4 参考文献

- 1 Naveau S, Bedossa P, Poynard T, Mory B, Chaput JC. Portal hypertensive colopathy. A new entity. *Dig Dis Sci* 1991;36: 1774-1781
- 2 Ohta M, Kaviani A, Tarnawski AS, Itani R, Sugimachi K, Sarfeh IJ. Portal hypertension triggers local activation of inducible nitric oxide synthase gene in colonic mucosa. *J Gastrointest Surg* 1997;1:229-235
- 3 Tanoue K, Kitano S, Hashizume M, Wada H, Sugimachi K. A rat model of esophageal varices. *Hepatology* 1991;13:353-358
- 4 Kozarek RA, Botoman VA, Bredfeldt JE, Roach JM, Patterson DJ, Ball TJ. Portal colopathy: prospective study of colonoscopy in patients with portal hypertension. *Gastroenterology* 1991; 101:1192-1197
- 5 Ganger DR, Preston A, Sankary H. Colonic lesions in portal hypertension. *Gastrointest Endosc* 1993;39:212-213
- 6 Ponce Gonzalez JF, Dominguez Adame Lanuza E, Martin Zurita I, Morales Mendez S. Portal hypertensive colopathy: histologic appearance of the colonic mucosa. *Hepatogastroenterology* 1998; 45:40-43
- 7 Chen LS, Lin HC, Lee FY, Hou MC, Lee SD. Portal hypertensive colopathy in patients with cirrhosis. *Scand J Gastroenterol* 1996;31:490-494
- 8 Nathan C, Xie QW. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell* 1994;78:915-918

- 9 Sanders KM, Ward SM. Nitric oxide as a mediator of nonadrenergic noncholinergic neurotransmission. *Am J Physiol* 1992;262:G379-392
- 10 Levin ER. Endothelins. *N Engl J Med* 1995;333:356-363
- 11 Lazaratos S, Kashimura H, Nakahara A, Fukutomi H, Osuga T, Urushidani T, Miyauchi T, Goto K. Gastric ulcer induced by submucosal injection of ET-1: role of potent vasoconstriction and intraluminal acid. *Am J Physiol* 1993;265(3Pt 1):G491-G498
- 12 Lopez-Talavera JC, Cadelina G, Olchowski J, Merrill W, Groszmann RJ. Thalidomide inhibits tumor necrosis factor alpha, decreases nitric oxide synthesis, and ameliorates the hyperdynamic circulatory syndrome in portal-hypertensive

- rats. *Hepatology* 1996;23:1616-1621
- 13 Ohta M, Tarnawski AS, Itani R, Pai R, Tomikawa M, Sugimachi K, Sarfeh IJ. Tumor necrosis factor alpha regulates nitric oxide synthase expression in portal hypertensive gastric mucosa of rats. *Hepatology* 1998;27:906-913
- 14 Marsden PA, Brenner BM. Transcriptional regulation of the endothelin-1 gene by TNF-alpha. *Am J Physiol* 1992;262(4 Pt 1):C854-C861
- 15 Stephens KE, Ishizaka A, Larrick JW, Raffin TA. Tumor necrosis factor causes increased pulmonary permeability and edema. Comparison to septic acute lung injury. *Am Rev Respir Dis* 1988;137:1364-1370

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2003 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

## 黄连素对 HT-29 人结肠癌细胞系 $\text{Ca}^{2+}$ 的抑制作用

台卫平, 罗和生

台卫平, 罗和生, 武汉大学人民医院消化内科 湖北省武汉市 430060  
项目负责人: 罗和生, 430060, 湖北省武汉市武昌区解放路 238 号, 武汉大学人民医院消化内科. luotang@public.wh.hb.cn  
电话: 027-88041919-2134  
收稿日期: 2003-01-10 接受日期: 2003-02-19

### 摘要

目的: 探讨黄连素对人结肠癌细胞系 HT-29 的作用及与  $\text{Ca}^{2+}$  有关的机制, 为黄连素作为一种新的结肠癌化学治疗药物进行理论上的准备和提供相关实验结果。

方法: 0.1  $\mu\text{mol/L}$ , 0.3  $\mu\text{mol/L}$ , 3.0  $\mu\text{mol/L}$ , 30.0  $\mu\text{mol/L}$  的黄连素加入到 HT-29 结肠癌细胞系培养液中. 分别在第 1 d, 第 2 d, 第 3 d 测量各有关值. 以 bapta-AM (33  $\mu\text{mol/L}$ ) 为细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  螯合剂, verapamil (50 mmol/L) 为细胞膜  $\text{Ca}^{2+}$  通道拮抗剂, 分别抑制细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  和细胞膜  $\text{Ca}^{2+}$  通道, 对比观察黄连素对细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  的影响及结肠癌细胞在不同  $\text{Ca}^{2+}$  浓度条件下各有关值. 细胞计数检测细胞的生长和增生, 用免疫荧光分光光度法检测细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度。

结果: 黄连素在浓度大于 0.3  $\mu\text{mol/L}$  时则有明显的量效关系抑制结肠癌细胞的生长. 黄连素在浓度大于 0.3  $\mu\text{mol/L}$  时对细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  的释放有抑制作用。

结论: 黄连素能够抑制  $\text{Ca}^{2+}$  的释放可能为黄连素抑制 HT-29 细胞生长和增生的一个机制。

台卫平, 罗和生. 黄连素对 HT-29 人结肠癌细胞系  $\text{Ca}^{2+}$  的抑制作用. 世界华人消化杂志 2003;11(10):1642-1644

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1642.asp>

### 0 引言

结肠癌是常见的恶性肿瘤之一, 他严重地危害着人们的身体健康. 目前临床上结肠癌常用的化疗药物毒副作用

用大, 寻找新的化疗效果好、毒副作用小的药物, 可以提高结肠癌患者的治疗效果, 提高患者的生存期及生存质量. 已有研究证实黄连素(berberine, ber)对平滑肌细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  有作用<sup>[1]</sup>.  $\text{Ca}^{2+}$  作为第二信使可能以某种形式参与肿瘤生长和繁殖的调节<sup>[2]</sup>. 本题采用细胞培养的方法, 将黄连素加入到结肠癌细胞培养环境中, 观察培养上清中细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  的改变, 同时观察 ber 对结肠癌细胞生长、增生的影响, 为 ber 作为一种新的结肠癌化疗药物进行理论上的研究。

### 1 材料和方法

1.1 材料 细胞系: HT-29 细胞系购自中南大学湘雅医学院肿瘤研究所, 该细胞系由该所引自 ATCC. 主要试剂和仪器: berberine (Sigma), Fura-2/AM (Sigma), bapta-AM (Sigma), verapamil (Sigma), 日本产岛津 RF-5000 荧光分光光度计。

#### 1.2 方法

1.2.1 细胞培养 HT-29 以 RPMI-1640 为培养液, 加入 100 mL/L 热灭活的 FBS 及青霉素和链霉素, HT-29 细胞置于 37  $^{\circ}\text{C}$ , 50 mL/L  $\text{CO}_2$  培养箱中培养, 以  $1 \times 10^6/\text{mL}$  细胞接种 24 h 后, 分组加药: 终浓度为 0.1  $\mu\text{mol/L}$ , 0.3  $\mu\text{mol/L}$ , 3.0  $\mu\text{mol/L}$ , 30.0  $\mu\text{mol/L}$  的 ber 加入到 HT-29 结肠癌细胞系培养液中. 以 bapta-AM (33  $\mu\text{mol/L}$ ) 为细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  螯合剂, verapamil (30 mmol/L) 为细胞膜  $\text{Ca}^{2+}$  通道拮抗剂, 分别抑制胞内  $\text{Ca}^{2+}$  及胞膜钙通道, 对比观察黄连素对细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  的影响. 24 h 后测量钙离子浓度。

1.2.2 生长曲线的绘制 采用氮兰四唑盐实验(MTT)法, 取对数生长期的 HT-29 细胞按传代方式制成单细胞悬液, 以每孔  $4 \times 10^3$  个细胞接种于 96 孔培养板中, 培养 24 h 后, 弃去原细胞培养液, 实验组每孔加入 ber

母液,使其浓度为0.1  $\mu\text{mol/L}$ 、0.3  $\mu\text{mol/L}$ 、3.0  $\mu\text{mol/L}$ 、30.0  $\mu\text{mol/L}$ ,对照组不加药,换成与实验组相同体积的培养液.每组每个时间点设6个平行孔,继续培养箱内培养,培养6 d,每组各取6孔加入MTT溶液(5 mg/mL) 20  $\mu\text{L}$ ,37  $^{\circ}\text{C}$ 孵育4 h后弃去孔内培养液,每孔加入15  $\mu\text{L}$  DMSO 震荡10 min.以空白孔调零,在酶联免疫检测仪上测490 nm波长处的每孔吸光度值(aborbance, A值),求其平均值.

**1.2.3 免疫荧光分光光度法检测钙离子浓度** 经典的Fura-2/AM负载测钙<sup>[2]</sup>方法:用无血清的培养液洗涤细胞,将 $10^6$ 细胞悬浮于1 mL含2.5 mmol/L Fura-2/AM和2 g/L BSA的BSS液中,37  $^{\circ}\text{C}$ 温浴80 min,并不断振荡.用冷BSS洗涤细胞2次,去除胞外游离的Fura-2/AM.将细胞悬浮在冷BSS中.连续测定340 nm、380 nm波长激发光交替激发时,490 nm发射新的荧光强度F,同时记录荧光强度比值R( $R = F_{340}/F_{380}$ ).扫描结果由Super Ion Probe Software软件自动分析,依据公式 $[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d (R_{\text{min}} - R) / (R - R_{\text{max}}) \times (F_{f2}/F_{b2})$ ,其中 $K_d$ 为Fura-2/AM与钙离子结合反应的解离平衡常数. $F_{f2}/F_{b2}$ 分别为钙离子游离与饱和时380 nm的荧光强度.自发荧光以未负载Fura-2/AM的细胞同样方法测得,计算时减去.

统计学处理 采用统计软件SPSS10.0分析.根据资料性质,实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用t检验处理, $P < 0.05$ 为有统计学差异.

## 2 结果

**2.1 ber对HT-29细胞生长、增生的影响** 不同浓度的ber对HT-29细胞干预后的生长曲线如图1.细胞接种后,对照组细胞几乎呈线性生长,72 h后细胞数量大约增加8倍.ber干预后呈剂量依赖性抑制细胞增生,生长曲线向右移,3.0  $\mu\text{mol/L}$ 及30.0  $\mu\text{mol/L}$ 浓度抑制细胞增生较明显.

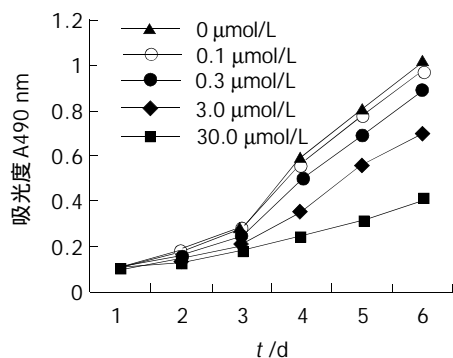


图1 不同浓度ber对HT-29细胞干预后的生长曲线.

**2.2 ber对HT-29 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的影响** 不同浓度的ber及verapamil、Bapta-AM对HT-29 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的影响见表1.结果显示当ber浓度在0.3–30  $\mu\text{mol/L}$ 之间时,对 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 有抑制作用,但作用强度比胞膜 $\text{Ca}^{2+}$ 拮抗剂verapamil弱,比胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 螯合剂Bapta-AM更弱.

表1 Ber和verapamil、Bapta-AM对HT-29 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的影响( $n = 6$ )

组别	浓度( $\mu\text{mol/L}$ )	$[\text{Ca}^{2+}]_i(\text{nmol/L})$
对照		$145.5 \pm 10.7$
Ber	0.1	$141.3 \pm 9.5$
	0.3	$123.7 \pm 7.5^a$
	3.0	$120.7 \pm 10.3^a$
	30.0	$118.8 \pm 8.5^a$
Verapamil	50	$110.3 \pm 8.7^a$
Bapta-AM	33	$20.1 \pm 5.4^b$

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

## 3 讨论

黄连素是从毛茛科黄连素(Coptis chinensis)根状茎中提取的一种季胺类化合物,属于异喹啉生物碱,主要用于肠道炎症伴发热,其毒副作用很小.近年来有研究证实ber对肿瘤细胞系也有作用<sup>[3]</sup>.关于ber对肿瘤细胞的作用机制,以前侧重于ber与细胞凋亡的关系<sup>[4]</sup>. $\text{Ca}^{2+}$ 作为一种第二信使,在细胞信号传导中起着重要作用<sup>[5]</sup>.

细胞钙以结合钙(如与带负电的脂质及蛋白质结合)和游离钙两种形式存在.在通常情况下,细胞外液约50–60%是结合钙,游离钙浓度约0.1–10 mmol/L,细胞内钙则99.9%以上为结合钙,主要分布于细胞核、线粒体、内质网/肌浆网和质膜,而胞内游离钙极少.细胞在非激活状态时,胞内游离钙浓度仅为0.1  $\mu\text{mol/L}$ 左右,但胞内游离钙浓度的改变却是细胞生理功能的关键环节.钙库如内质网、线粒体中的 $\text{Ca}^{2+}$ 缓冲能力很大,在调节细胞质内 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度中起着重要作用.当一种刺激使胞外即使少量的 $\text{Ca}^{2+}$ 进入胞内溶质或钙库释放稍有增加时,均可以导致胞质内 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度大幅度增加,继而引起一系列生理生化反应,而起到传递细胞外信号的作用<sup>[6]</sup>.由此可见,胞内游离钙浓度的变化是细胞生理功能的重要物质基础,胞内游离钙浓度的调节也就成为信息传递过程中的关键环节<sup>[7,8]</sup>.

细胞游离钙浓度的变化是 $\text{Ca}^{2+}$ 跨膜转运的结果.胞外 $\text{Ca}^{2+}$ 内流:钙在细胞内外的电化学梯度大于其他许多离子,细胞外 $\text{Ca}^{2+}$ 可通过被动扩散进入细胞内,但控制胞外 $\text{Ca}^{2+}$ 内流最主要的途径还是通过细胞膜上的钙通道.钙通道的种类很多,但对其确切的分子结构大多还不清楚,目前认为有五大钙通道:(1)电压操纵的钙通道(voltage-operated calcium channels, VOCs):常见于应激细胞,其活动受膜电压变化的影响,存在于心肌、骨骼肌、神经元及内分泌等不同细胞中<sup>[9]</sup>.(2)受体操纵的钙通道(receptor-operated calcium channels, RCCs):见于神经元与其靶细胞之间的突触传递<sup>[10]</sup>.(3)第二信使操纵的钙通道(second messenger operated calcium channels, SMOCs):受控于细胞的第二信使,其电导很小<sup>[11]</sup>.(4)机械操纵的钙通道(mechanically operated calcium channels, MOCs):内皮细胞上有牵张刺激的钙通道,这一通道也

存在于平滑肌与骨骼肌中<sup>[12]</sup>。(5)漏流钙通道(leak calcium channels, LCCs):也称为静息钙通道或背景钙通道,存在于平滑肌与心肌细胞膜中,在无电学或机械刺激时,参与静息钙电流,协助调节静息细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度<sup>[13]</sup>。

细胞内钙主要储存于内质网(endoplasmic reticulum, ER)/肌浆网(sarcoplasmic reticulum, SR)内。目前已知 ER/SR 有两类钙库,即 IP<sub>3</sub> 敏感(IP<sub>3</sub>-sensitive calcium pools, IsCaP)和 IP<sub>3</sub> 不敏感钙库(lisCaP),分别通过上面的 IP<sub>3</sub> 受体通道和 ryanodine 受体通道释放  $\text{Ca}^{2+}$ <sup>[14]</sup>。

本研究发现浓度大于 0.3  $\mu\text{mol/L}$  时黄连素可以降低胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度,结果如表所示。在正常培养环境中,胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度为  $145.5 \pm 10.7 \text{ nmol/L}$ , verapamil 50  $\mu\text{mol/L}$  可以使胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度降至  $110.3 \pm 8.7 \text{ nmol/L}$ 。而 verapamil 的作用位点为 VOCs,这说明在 HT-29 细胞膜上存在 VOCs,这一点与 Jamie et al<sup>[14]</sup>的研究结果相一致;由于 RCCs 仅见于神经元与其靶细胞之间的突触传递;SMOCs 由于受控于细胞的第二信使;MOCs 仅见于血管内皮细胞、平滑肌和骨骼肌;LCCs 仅存于心肌和平滑肌细胞膜,参与静息钙电流。故在 HT-29 细胞中黄连素降低  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  胞外钙离子内流环节可能涉及到的通道为 VOCs 和 SMOCs。而在细胞内钙离子动员方面, Bischof et al<sup>[15]</sup> 已经证实 HT-29 细胞胞内钙可以通过 ER/SR 钙库动员。故本实验推测黄连素降低细胞内钙离子浓度其机制可能是通过 VOCs 或 SMOCs 或抑制 ER、SR 胞内钙离子的释放进而降低胞内钙离子浓度;在观察的 0.1-10.0  $\mu\text{mol/L}$  浓度范围内,其抑制用的强度弱于 50  $\mu\text{mol/L}$  的细胞膜 L-通道拮抗剂 verapamil (30  $\mu\text{mol/L}$  黄连素组 vs 50  $\mu\text{mol/L}$  verapamil 组,  $P > 0.05$ , 无显著性差异),更不如 33  $\mu\text{mol/L}$  的胞内钙离子螯合剂 bapta-AM (30  $\mu\text{mol/L}$  黄连素组 vs 33  $\mu\text{mol/L}$  bapta-AM 组,  $P < 0.05$ , 差异有显著性)。

#### 4 参考文献

- 1 Cao JW, Luo HS, Yu BP, Huang XD, Sheng ZX, Yu JP. Effects of berberine on intracellular free calcium in smooth muscle cells of Guinea pig colon. *Digestion* 2001;64:179-183
- 2 Scott DA, de Souza W, Benchimol M, Zhong L, Lu HG, Moreno SN, Docampo R. Presence of a plant-like proton-pumping pyrophosphatase in acidocalcisomes of *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem* 1998;273:22151-22158
- 3 Li XK, Motwani M, Tong W, Bornmann W, Schwartz GK. Huanglian, A Chinese herbal extract inhibits cell growth by suppressing the expressing of cyclinB1 and inhibiting CDC2 kinase activity in human cancer cells. *Mol Pharmacol* 2000;58:1287-1293
- 4 Lin HL, Liu TY, Wu CW, Chi CW. Berberine modulates expression of mdr1 gene product and the responses of digestive track cancer cells to Paclitaxel. *Br J Cancer* 1999;81:416-422
- 5 Shen MR, Chou CY, Browning JA, Wilkins RJ, Ellory JC. Human cervical cancer cells use  $\text{Ca}^{2+}$  signalling, protein tyrosine phosphorylation and MAP kinase in regulatory volume decrease. *J Physiol* 2001;537(Pt 2):347-362
- 6 刘景生. 细胞信息与调控. 第1版. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1998:169-170
- 7 Gomez-Lagunas F, Melishchuk A, Armstrong CM. Block of Shaker potassium channels by external calcium ions. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:347-351
- 8 Kindzelskii AL, Petty HR. Intracellular calcium waves accompany neutrophil polarization, formylmethionylleucylphenylalanine stimulation, and phagocytosis: a high speed microscopy study. *J Immunol* 2003;170:64-72
- 9 Yoshida M, Ishikawa M, Izumi H, De Santis R, Morisawa M. Store-operated calcium channel regulates the chemotactic behavior of ascidian sperm. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:149-154
- 10 Mao L, Wang JQ. Group I metabotropic glutamate receptor-mediated calcium signalling and immediate early gene expression in cultured rat striatal neurons. *Eur J Neurosci* 2003;17:741-750
- 11 Mitra P, Slaughter MM. Calcium-induced transitions between the spontaneous miniature outward and the transient outward currents in retinal amacrine cells. *J Gen Physiol* 2002;119:373-388
- 12 Jorgensen NR, Teilmann SC, Henriksen Z, Civitelli R, Sorensen OH, Steinberg TH. Activation of L-type calcium channels is required for gap junction-mediated intercellular calcium signaling in osteoblastic cells. *J Biol Chem* 2003;278:4082-4086
- 13 Subramani S, Vijayanand C, Tharion E. Differential effects of organic calcium-channel blockers on diastolic SR calcium-handling in the frog heart. *Br J Pharmacol* 2002;137:756-760
- 14 Jamie H, Dyason K, Milne PJ, Grant G, Graz CJ. The influence of acetoacetate and butyrate on calcium influx and ATP concentrations in HT-29 cells. *Pharmazie* 2001;56:332-336
- 15 Bischof G, Brenman J, Bredt DS, Machen TE. Possible regulation of capacitative  $\text{Ca}^{2+}$  entry into colonic epithelial cells by NO and cGMP. *Cell Calcium* 1995;17:250-262

# DPC4 蛋白在不同病理分期的结肠肿瘤中的表达

唐朝晖, 邹声泉, 杨想平, 陈启奇

唐朝晖, 邹声泉, 华中科技大学同济医学院附属同济医院普外科  
湖北省武汉市 430030  
杨想平, Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule 生化系  
德国亚琛 D-52074  
陈启奇, 依阿华州立大学病理系 美国依阿华 IA 52242  
项目负责人: 唐朝晖, 430030, 湖北省武汉市解放大道 1195 号, 华中科技大学  
同济医学院附属同济医院普外科. tangzh45@21cn.com  
电话: 027-83663410  
收稿日期: 2002-01-24 接受日期: 2002-02-20

## 摘要

目的: 探讨DPC4基因的突变是否仅仅发生在结肠癌变过程的晚期.

方法: 我们通过免疫组织化学法检测了102例经石蜡包埋固定的结肠肿瘤标本, 所有标本被分为5期: I期(腺瘤, 36例); II期(黏膜下癌, 8例); III期(不伴淋巴结转移的浸润性癌, 11例); IV期(伴淋巴结转移的浸润性癌, 25例); V期(伴远处器官、组织转移的浸润性癌, 22例).

结果: DPC4蛋白缺失表达率在结肠腺瘤为5.5% (2/36), 在结肠癌中为27% (18/66), 其中在结肠癌II期中为12.5% (1/8); 在III期中为9% (1/11); 在IV期中为36% (9/25); 在V期中为32% (7/22). 结肠癌和结肠腺瘤的DPC4蛋白缺失表达率相比差异有极显著性( $P < 0.01$ ). II期和III期结肠癌的DPC4蛋白缺失率与IV期和V期相比差异有极显著性( $P < 0.01$ ).

结论: DPC4蛋白缺失表达率随着结肠癌的进展而增加, DPC4基因的突变发生在结肠组织癌变过程的晚期. 如果结肠组织标本中存在DPC4基因突变, 意味该组织可能已恶性变. 这将有助于增加对结肠癌的预见性.

唐朝晖, 邹声泉, 杨想平, 陈启奇. DPC4蛋白在不同病理分期的结肠肿瘤中的表达. 世界华人消化杂志 2003;11(10):1645-1646  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1645.asp>

## 0 引言

结肠癌的发生、发展经过了一个多步骤、多阶段的过程, 此过程主要与体内大量的癌基因激活和/或抑癌基因失活的积聚密切相关. 最近, 一种新的定位于18q21.1位置的抑癌基因DPC4/SMAD4被发现, 其在一种与结肠癌癌变过程密切相关的机制-TGF- $\beta$ 信号传导途径中居于中心地位<sup>[2]</sup>. 在本试验中我们通过免疫组化的方法观察了处于不同病理学分期的结肠肿瘤中DPC4蛋白的表达情况, 旨在探讨该基因的表达与结肠肿瘤生物学的关系及在结肠癌诊断中的意义.

## 1 材料和方法

1.1 材料 收集我院1999-05/2001-04 102例术后或结肠

镜检后经石蜡包埋用于常规病理学检查的结肠肿瘤标本, 分5期: I期(腺瘤, 36例); II期(黏膜下癌, 8例); III期(不伴淋巴结转移的浸润性癌, 11例); IV期(伴淋巴结转移的浸润性癌, 25例); V期(伴远处器官、组织转移的浸润性癌, 22例), 其中18例转移至肝脏, 3例转移至肺, 1例转移至骨. 所有病例术前均未行放、化疗.

1.2 方法 5  $\mu$ m 石蜡切片脱蜡至水; 微波处理, 加DPC4单抗(clone B8, Santa Cruz公司产品, 1:100稀释), 4  $^{\circ}$ C过夜; 生物素化羊抗小鼠IgG(1:200), 30 min; ABC试剂(1:100), 6 min. DAB显色, 苏木素复染, 脱水, 透明, 封片. PBS缓冲液作为阴性对照. 结果判断: 肿瘤组织中大多数细胞胞质中的强而均一的表达和胞核中灶状表达为阳性; 细胞胞质中的弱的表达和胞核中无表达为弱阳性; 细胞胞质中和胞核中均无表达为阴性; 在后续的分析中阳性和弱阳性加在一起作为阳性与阴性对比.

统计学处理 各期结肠肿瘤中DPC4蛋白表达的差异性经 $\chi^2$ 检验,  $P < 0.05$ 为差异有显著性,  $P < 0.01$ 为差异有极显著性.

## 2 结果

2.1 免疫组织化学染色 正常的结肠组织, 淋巴结, 基底纤维母细胞均有中到重度的DPC4蛋白表达. 结肠腺瘤和III期结肠癌显示中度的DPC4表达. 部分结肠癌细胞(V期)的胞质和胞核缺失DPC4蛋白的表达, 而其周边正常细胞则呈灶状的DPC4表达.

2.2 DPC4蛋白缺失表达率和肿瘤分期 结肠腺瘤中有2例(5.5%, 2/36), 而结肠癌中有18例标本(27%, 18/66) DPC4蛋白表达阴性. 二者的DPC4蛋白缺失表达率相比差异有极显著性( $P < 0.01$ ). DPC4蛋白缺失表达率随着结肠癌的进展而增加. 在结肠癌II期中DPC4蛋白缺失率为12.5% (1/8); 在III期中为9% (1/11); 在IV期中为36% (9/25); 在V期中为32% (7/22). II期和III期结肠癌的DPC4蛋白缺失率与IV期和V期相比差异有极显著性( $P < 0.01$ ).

## 3 讨论

结肠癌是一种基因疾病, 多种癌基因及抑癌基因与其肿瘤生物学过程有关. 包括: p53、DCC的失活; k-ras的突变; c-met、c-ErbB-2的扩增以及微卫星不稳定性等<sup>[3-9]</sup>. DPC4基因定位于染色体18q21.1, 最初是在胰腺癌中, 随后在结肠癌和胆管癌中相继发现其失活. DPC4基因编码的DPC4蛋白是转化生长因子 $\beta$  (TGF- $\beta$ )超家

族信号传导途径的成员,参与细胞内信号传导.且DPC4在TGF- $\beta$ 信号传导途径中居于中心地位<sup>[10-12]</sup>.

在本研究中,DPC4蛋白表达缺失率在I期中是5.5%(2/36),在II期中是12.5%(1/8),在III期中是9%(1/11),在IV期中是36%(9/25),在VI期中是32%(7/22),缺失率随着肿瘤的进展而增加.显然,DPC4基因的突变发生在结肠组织癌变过程的晚期.在胰腺癌中也观察到了这种相似的现象<sup>[13-15]</sup>.这种现象对肿瘤生物学的研究有着重要的意义,因为其再次证明生物学特性的重大改变总是和特定基因的改变强烈的联系在一起.

在基因水平检测DPC4的突变是比较困难的,因为需要将肿瘤组织显微切割后以获比较纯的肿瘤样本而后分析,故基因水平的检测费时、费力、过程复杂、费用较高.Wilentz et al<sup>[16,17]</sup>(2 000)的研究表明DPC4蛋白的免疫组化分析是一种检测DPC4基因改变的特异、敏感的方法.且与基因分析相比还具有以下优点:其允许将基因的改变和组织病理分类直接联系起来;其费用较为经济,操作简便,可检测大量标本;可检测石蜡包埋固定的已存档的病理标本.

#### 4 参考文献

- 1 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
- 2 Hahn SA, Schutte M, Hoque AT. DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1[J]. *Science* 1996;271:350-353
- 3 范应方,黄宗海.结直肠癌基因治疗研究进展.世界华人消化杂志 2001;9:427-430
- 4 邱健,姜馨,何文宪. CDK1 p27Kip1 及其在结(直)肠肿瘤中的研究.世界华人消化杂志 2001;9:209-211
- 5 李铭,王灏,郁宝铭,郑民华. p53 基因突变和肿瘤标志物对大肠癌患者预后的影响.世界华人消化杂志 1999;7:425-426
- 6 乔庆,吴金生,张静,马庆久,赖大年.凋亡相关基因 bcl-2, bax 在

- 7 人类大肠腺癌中的表达意义.世界华人消化杂志 1999;7:936-938
- 8 王青,吴金生,高德明,赖大年,马庆久. EGF 受体和转化生长因子  $\alpha$  mRNA 在人大肠癌组织的表达意义.世界华人消化杂志 1999;7:590-592
- 9 赖大年,解远峰,卞玲,要秀.结肠癌细胞株 p16 基因甲基化的研究.世界华人消化杂志 1999;7:676-678
- 10 陈健,顾红光,林武华,罗元辉.散发性结直肠癌 46 例微卫星不稳定性的研究.世界华人消化杂志 2000;8:350-352
- 11 Wang D, Kanuma T, Mizunuma H, Takama F, Ibuki Y, Wake N, Mogi A, Shitara Y, Takenoshita S. Analysis of specific gene mutations in the transforming growth factor-beta signal transduction pathway in human ovarian cancer. *Cancer Res* 2000;60:4507-4512
- 12 Venkatasubbarao K, Ahmed MM, Mohiuddin M, Swiderski C, Lee E, Gower WR Jr, Salhab KF, McGrath P, Strodel W, Freeman JW. Differential expression of transforming growth factor beta receptors in human pancreatic adenocarcinoma. *Anticancer Res* 2000;20:43-51
- 13 Calonge MJ, Massague J. Smad4/DPC4 silencing and hyperactive Ras jointly disrupt transforming growth factor-beta antiproliferative responses in colon cancer cells. *J Biol Chem* 1999;274:33637-33643
- 14 Peng B, Fleming JB, Breslin T, Grau AM, Fojioka S, Abbruzzese JL, Evans DB, Ayers D, Wathen K, Wu T, Robertson KD, Chiao PJ. Suppression of tumorigenesis and induction of p15 (ink4b) by Smad4/DPC4 in human pancreatic cancer cells. *Clin Cancer Res* 2002;8:3628-3638
- 15 Chen WB, Lenschow W, Tiede K, Fischer JW, Kalthoff H, Ungefroren H. Smad4/DPC4-dependent regulation of biglycan gene expression by transforming growth factor-beta in pancreatic tumor cells. *J Biol Chem* 2002;277:36118-36128
- 16 Cullingworth J, Hooper ML, Harrison DJ, Mason JO, Sirard C, Patek CE, Clarke AR. Carcinogen-induced pancreatic lesions in the mouse: effect of Smad4 and Apc genotypes. *Oncogene* 2002;21:4696-4701
- 17 Wilentz RE, Iacobuzio-Donahue CA, Argani P, McCarthy DM, Parsons JL, Yeo CJ, Kern SE, Hruban RH. Loss of expression of Dpc4 in pancreatic intraepithelial neoplasia: evidence that DPC4 inactivation occurs late in neoplastic progression. *Cancer Res* 2000;60:2002-2006
- 18 Wilentz RE, Su GH, Dai JL, Sparks AB, Argani P, Sohn TA, Yeo CJ, Kern SE, Hruban RH. Immunohistochemical labeling for dpc4 mirrors genetic status in pancreatic adenocarcinomas: a new marker of DPC4 inactivation. *Am J Pathol* 2000;156:37-43

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2003 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

## Genistein 和 PD98059 对 aFGF 及 bFGF 诱导的 CCL229 细胞增生的抑制作用

尚海,张颐,单吉贤

尚海,辽宁省肿瘤医院肝胆胰外科 辽宁省沈阳市 110042  
张颐,中国医科大学附属第一医院妇科 辽宁省沈阳市 110001  
单吉贤,中国医科大学附属第一医院肿瘤外科 辽宁省沈阳市 110001  
项目负责人:尚海,110042,辽宁省沈阳市大东区小河沿路 44 号,辽宁省肿瘤医院. syzi@163.com  
电话:024-22711682  
收稿日期:2003-01-18 接受日期:2003-03-25

#### 摘要

目的:探讨酪氨酸蛋白激酶(TPK)抑制剂Genistein和细胞外

信号调节激酶(ERK)激酶MEK抑制剂PD98059对酸性及碱性成纤维细胞生长因子(aFGF,bFGF)诱导的人大肠癌细胞株 CCL229 细胞增生的抑制作用.

方法:以不同浓度的aFGF或bFGF刺激CCL229细胞,再对由aFGF或bFGF引起增生的细胞施加不同浓度的Genistein或PD98059,通过MTT比色法,观察Genistein及PD98059对细胞增生的抑制作用.



结果: aFGF 和 bFGF 均可使该细胞株增生比明显增加, 而 Genistein 和 PD98059 均可使该细胞株增生比明显下降, 其程度均随浓度增高而增强, 且 Genistein 的抑制作用强于 PD98059.

结论: 该细胞株中 aFGF 及 bFGF 受体有 TPK 活性, Genistein 对 aFGF 及 bFGF 引起的细胞增生具有抑制作用, 且 aFGF 及 bFGF 可能通过激活 TPK 受体从而激活 Ras-Raf-ERK 信号传导途径来调控 CCL229 细胞增生, PD98059 可有效阻滞此传导途径.

尚海, 张颐, 单吉贤. Genistein 和 PD98059 对 aFGF 及 bFGF 诱导的 CCL229 细胞增生的抑制作用. 世界华人消化杂志 2003;11(10):1646-1649

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1646.asp>

## 0 引言

酪氨酸蛋白激酶(tyrosine protein kinase, TPK)是一种催化蛋白质分子中酪氨酸残基磷酸化的蛋白激酶. 当生长因子与其受体结合后即可诱导受体 TPK 活性的激活, 从而使底物蛋白磷酸化, 调节细胞的分裂、增生<sup>[1]</sup>, Ras-Raf-ERK 为其下游信号传导途径之一. 本文应用 TPK 的特异性抑制剂 Genistein 及 ERK 激酶 MEK 抑制剂 PD98059, 观察以上 2 种抑制剂对 aFGF 或 bFGF 诱导的细胞增生的抑制作用, 进一步认识肿瘤细胞内的信号传导机制, 并为通过阻断信号传导途径而抑制肿瘤细胞增生提供依据.

## 1 材料和方法

1.1 材料 人大肠癌细胞系 CCL229, 由中国医科大学细胞生物教研室提供. aFGF, bFGF 购自北京邦定科技有限公司; Genistein、DMEM 培养基、四甲基偶氮唑蓝(MTT)购自 Sigma 公司; PD98059 购自 Promega 公司; 二甲基亚砜(DMSO)为市售分析纯试剂. 酶联免疫检测仪为奥地利 TACAN 公司产品.

## 1.2 方法

1.2.1 细胞培养 CCL229 细胞在含 100 mL/L 小牛血清, 100 U/mL 青霉素, 100 μg/mL 链霉素的 DMEM 培养基中贴壁生长, 于 37 °C, 50 mL/L CO<sub>2</sub> 培养箱中传代培养.

1.2.2 实验分组 消化处于指数增生期的细胞, 以  $5 \times 10^3$  个细胞/孔接种于 96 孔板, 在 37 °C, 50 mL/L CO<sub>2</sub> 及饱和湿度的条件下恒温密闭培养. 随机分组为: (1)空白对照组; (2)aFGF 组, 观察 aFGF 对细胞的作用; (3)bFGF 组, 观察 bFGF 对细胞的作用; (4)gen 组, 观察 genistein 对细胞的作用; (5)PD 组, 观察 PD98059 对细胞的作用; (6)aFGF+ gen 组, 观察 aFGF 和 Genistein 同时施加对细胞的作用; (7)bFGF+ gen 组, 观察 bFGF 和 Genistein 同时施加对细胞的作用; (8)aFGF +PD 组, 观察 aFGF 和 PD98059 同时施加对细胞的作用; (9)bFGF+PD 组, 观察 bFGF 和 PD98059 同时施加对细胞的作用.

1.2.3 施加因素 当细胞达到亚融合状态时, 吸出旧培养液, 每孔加入 200 μL 无血清培养液, 12 h 后吸出旧培养液. 按分组要求加入肝素 8 μL (2 μg/μL), 不同量的 aFGF, bFGF, Genistein, PD98059 及培养液, 使各孔终体积均为 200 μL. aFGF+ gen 组, 细胞与 Genistein 温育 30 min 后加入 aFGF; bFGF+ gen 组, 细胞与 Genistein 温育 30 min 后加入 bFGF; aFGF +PD 组, 细胞与 PD98059 温育 1 h 加入 aFGF; bFGF +PD 组, 细胞与 PD98059 温育 1 h 加入 bFGF. 各组具体剂量见表 1.

1.2.4 MTT 比色 将 96 孔板放回孵箱, 2 d 后倾出培养液, 每孔加 MTT 溶液(5 mg/mL) 20 μL. 继续孵育 4 h, 每孔加入 150 μL DMSO, 振荡 10 min, 用酶联免疫检测仪读取每孔 A 值(测量波长 620 nm, 参考波长 490 nm). 绘制细胞生长曲线, 根据公式  $B/A \times 100\%$  计算细胞的增生、抑制率(A, B 分别为对照组和实验组的光密度值). 实验重复 3 次, 每浓度均设 3 孔.

统计学处理 采用 SPSS 软件进行数据统计处理,  $P < 0.05$  有统计学意义.

表 1 各组施加因素剂量

分组	aFGF(μg/mL)				bFGF(ng/mL)				gen(μg/mL)				PD(μmol/L)			
对照组	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
aFGF 组	0.15	0.3	0.6	1.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
bFGF 组	0	0	0	0	25	50	75	100	0	0	0	0	0	0	0	0
gen 组	0	0	0	0	0	0	0	0	6	12	24	48	0	0	0	0
PD 组	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	50	100	150	200
aFGF+ gen 组	0.6	0.6	0.6	0.6	0	0	0	0	6	12	24	48	0	0	0	0
bFGF+gen 组	0	0	0	0	50	50	50	50	6	12	24	48	0	0	0	0
aFGF +PD 组	0.6	0.6	0.6	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	50	100	150	200
bFGF +PD 组	0	0	0	0	50	50	50	50	0	0	0	0	50	100	150	200

## 2 结果

2.1 aFGF 和 bFGF 对 CCL229 细胞增生程度的影响 随 aFGF 及 bFGF 浓度升高, aFGF 组及 bFGF 组增生比明显增加, 二者相比, bFGF 组增生程度更明显(表 2).

表 2 aFGF 和 bFGF 对 CCL229 细胞增生的影响

aFGF 浓度( $\mu\text{g/mL}$ )	bFGF 浓度( $\text{ng/mL}$ )	细胞 A 值	增生比(%)
0	0	$0.802 \pm 0.004$	100
0.15	0	$0.855 \pm 0.017$	107
0.3	0	$1.017 \pm 0.031^a$	127
0.6	0	$1.093 \pm 0.009^a$	136
1.2	0	$1.211 \pm 0.025^a$	151
0	25	$1.055 \pm 0.032^a$	132
0	50	$1.318 \pm 0.041^a$	164
0	75	$1.412 \pm 0.027^a$	176
0	100	$1.486 \pm 0.021^a$	185

<sup>a</sup>P < 0.05 vs 对照组.

表 3 genistein 对 aFGF 或 bFGF 诱导的 CCL229 细胞增生的影响

genistein 浓度( $\mu\text{g/mL}$ )	gen 组		aFGF+gen 组		bFGF+gen 组	
	A 值	增生比 (%)	A 值	增生比 (%)	A 值	增生比 (%)
0	$0.802 \pm 0.004$	100	$1.093 \pm 0.009$	100	$1.318 \pm 0.041$	100
6	$0.747 \pm 0.014^a$	93	$0.907 \pm 0.008^a$	83	$0.910 \pm 0.022^a$	69
12	$0.690 \pm 0.009^a$	86	$0.872 \pm 0.036^a$	80	$0.723 \pm 0.019^a$	55
24	$0.385 \pm 0.027^a$	48	$0.487 \pm 0.015^a$	45	$0.578 \pm 0.008^a$	44
48	$0.164 \pm 0.033^a$	20	$0.213 \pm 0.040^a$	19	$0.189 \pm 0.029^a$	14

<sup>a</sup>P < 0.05 vs 对照组.

表 4 PD98059 对 aFGF 或 bFGF 诱导的 CCL229 细胞增生的影响

PD98059 浓度( $\text{mmol/L}$ )	PD 组		aFGF+PD 组		bFGF+PD 组	
	A 值	增生比 (%)	A 值	增生比 (%)	A 值	增生比 (%)
0	$0.802 \pm 0.004$	100	$1.093 \pm 0.009$	100	$1.318 \pm 0.041$	100
50	$0.770 \pm 0.048$	96	$1.021 \pm 0.012^a$	93	$1.186 \pm 0.022^a$	90
100	$0.722 \pm 0.040^a$	90	$0.907 \pm 0.025^a$	83	$1.068 \pm 0.036^a$	81
150	$0.674 \pm 0.017^a$	84	$0.853 \pm 0.019^a$	78	$0.949 \pm 0.027^a$	72
200	$0.569 \pm 0.006^a$	71	$0.678 \pm 0.008^a$	62	$0.778 \pm 0.011^a$	59

<sup>a</sup>P < 0.05 vs 对照组.

与异常的细胞间信息传递密切相关<sup>[2-4]</sup>. 酪氨酸蛋白激酶信号系统是一条重要的信号传导途径. 许多生长因子受体具有 TPK 活性, 该蛋白激酶能以受体本身为底物, 发生自身磷酸化, 进而引起多种蛋白质的磷酸化, 与细胞增生密切相关<sup>[5-9]</sup>. 而 Ras-Raf-ERK 为其下游信号传导途径之一<sup>[10-12]</sup>, 二者相辅相成, 相互作用, 共同完成细胞内信号传导过程.

本实验观察到 aFGF 和 bFGF 均可促进大肠癌细胞株 CCL229 的增生, 且随浓度升高, 作用加强. 加入

2.2 genistein 对 CCL229 细胞增生的抑制作用 随 genistein 浓度增加, gen 组、aFGF+gen 组及 bFGF+gen 组细胞增生比下降程度明显增加; genistein 对 bFGF 引起的细胞增生抑制作用最强(P < 0.05), 对 aFGF 引起的细胞增生抑制作用也强于 gen 组(表 3).

2.3 PD98059 对 CCL229 细胞增生的抑制作用 加入 PD98059 后, PD 组、aFGF+PD 组及 bFGF+PD 组细胞增生比明显下降, 其下降程度随 PD98059 浓度增加而增加. 三组比较, PD98059 对 bFGF 诱导的细胞增生抑制作用最强(P < 0.05), 其次为 aFGF+PD 组.

2.4 genistein 和 PD98059 对 CCL229 细胞抑制作用的比较 genistein 对 CCL229 细胞的抑制作用及对 aFGF 或 bFGF 诱导的 CCL229 细胞增生的抑制作用均强于 PD98059 (P < 0.05, 表 3、4).

## 3 讨论

肿瘤细胞的侵袭、转移是一个多步骤、多因素的过程, 随着对细胞内信号传导途径研究的深入, 发现癌变

TPK 抑制剂 genistein 或 ERK 激酶 MEK 抑制剂 PD98059 后, 细胞增生明显受抑制, 随浓度升高, 抑制增强, 且 genistein 的抑制作用强于 PD98059, 说明 CCL229 细胞的增生主要由 TPK 活化介导, Ras-Raf-ERK 为其下游信号传导途径. 并且, aFGF+gen 组及 bFGF+gen 组对细胞的抑制程度明显大于 gen 组, aFGF+PD 组及 bFGF+PD 组对细胞的抑制程度也明显大于 PD 组, 说明 genistein 及 PD98059 对 aFGF 和 bFGF 诱导的细胞增生具有更强的抑制作用.

研究已证实大肠癌中存在 FGF 及其受体的过度表达<sup>[13-18]</sup>。本实验将为以阻断信号传导途径为靶点治疗大肠癌提供实验依据。

#### 4 参考文献

- 1 孙黎光, 马际, 侯伟健, 邢伟. Genistein 对 aFGF 诱导的 AGZY-83A 细胞增生的抑制作用. 中国医科大学学报 2000;29:11-14
- 2 颜春洪, 韩锐. Genistein 抑制 HT1080 人纤维肉瘤细胞的体外侵袭作用. 中华肿瘤杂志 1999;21:171-174
- 3 Kue PF, Taub JS, Harrington LB, Polakiewicz RD, Ullrich A, Daaka Y. Lysophosphatidic acid-regulated mitogenic ERK signaling in androgen-insensitive prostate cancer PC-3 cells. *Int J Cancer* 2002;102:572-579
- 4 Carnesecchi S, Bradaia A, Fischer B, Coelho D, Scholler-Guinard M, Gosse F, Raul F. Perturbation by geraniol of cell membrane permeability and signal transduction pathways in human colon cancer cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;303:711-715
- 5 孙黎光, 邢伟, 刘素媛. aFGF 对人脐静脉内皮细胞 TPK, PKC 活性及  $Ca^{2+}$  浓度的影响. 中国生物化学与分子生物学报 2000;16:267-270
- 6 Shin EY, Ma EK, Kim CK, Kwak SJ, Kim EG. Src/ERK but not phospholipase D is involved in keratinocyte growth factor-stimulated secretion of matrix metalloprotease-9 and urokinase-type plasminogen activator in SNU-16 human stomach cancer cell. *J Cancer Res Clin Oncol* 2002;128:596-602
- 7 Rao CV, Simi B, Hirose Y, Upadhyaya P, El-Bayoumy K, Reddy BS. Mechanisms in the chemoprevention of colon cancer: modulation of protein kinase C, tyrosine protein kinase and diacylglycerol kinase activities by 1, 4-phenylenebis-(methylene)selenocyanate and impact of low-fat diet. *Int J Oncol* 2000;16:519-527
- 8 Portela P, Howell S, Moreno S, Rossi S. In vivo and in vitro phosphorylation of two isoforms of yeast pyruvate kinase by protein kinase A. *J Biol Chem* 2002;277:30477-30487
- 9 Almeida RA, Calvinho LF, Oliver SP. Influence of protein kinase inhibitors on Streptococcus uberis internalization into bovine mammary epithelial cells. *Microb Pathog* 2000;28:9-16
- 10 Woessmann W, Chen X, Borkhardt A. Ras-mediated activation of ERK by cisplatin induces cell death independently of p53 in osteosarcoma and neuroblastoma cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol* 2002;50:397-404
- 11 Johnson GL, Lapadat R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 2002;298:1911-1912
- 12 Swiatkowski S, Seifert HH, Steinhoff C, Prior A, Thievensen I, Schliess F, Schulz WA. Activities of MAP-kinase pathways in normal uroepithelial cells and urothelial carcinoma cell lines. *Exp Cell Res* 2003;282:48-57
- 13 Grotowski M, Piechota W. Receptors of selected cytokines and angiokine bFGF in patients with colorectal cancer (a preliminary study). *Pol Merkuriusz Lek* 2001;11:398-401
- 14 Tabara H, Kohno H, Dhar DK, Kotoh T, Yoshimura H, Masunaga R, Tachibana M, Kubota H, Nagasue N. Concurrent expression of angiogenic growth factors and neovascularization during tumorigenesis in colorectal carcinoma patients. *Acta Oncol* 2001;40:622-628
- 15 Iwasaki K, Yamamoto M, Minami S, Komuta K, Yamaguchi J, Furui J, Kanematsu T. Human colon cancer produces a factor which induces the proliferation of venous endothelial cells. *Oncol Rep* 2001;8:1057-1061
- 16 Jayson GC, Vives C, Paraskeva C, Schofield K, Coutts J, Fleetwood A, Gallagher JT. Coordinated modulation of the fibroblast growth factor dual receptor mechanism during transformation from human colon adenoma to carcinoma. *Int J Cancer* 1999;82:298-304
- 17 Junquera F, Saperas E, de Torres I, Vidal MT, Malagelada JR. Increased expression of angiogenic factors in human colonic angiodysplasia. *Am J Gastroenterol* 1999;94:1070-1076
- 18 Arai N, Mitomi H, Uesugi H, Aihara S, Ohtani Y, Okayasu I. An aggressive desmoid tumor in a patient with familial adenomatous polyposis: immunohistochemical findings. *Am J Gastroenterol* 1999;94:530-532

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2003 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

## CO<sub>2</sub> 气腹对肠道菌群生物学特性影响的实验研究

周丁华, 卫冰, 李 宁, 黎介寿

周丁华, 卫冰, 中国人民解放军解放军二炮总医院普外科 北京市 100088  
李宁, 黎介寿, 南京军区南京总医院全军普外研究所 江苏省南京市 210002  
国家自然科学基金资助项目, No.30270406  
中国博士后科学研究基金资助项目, No. 中博基 2001-14  
项目负责人: 周丁华, 100088, 北京市西城区新街口外大街 16 号, 中国人民解放军解放军二炮总医院普外科. zhouhdh@sina.com  
电话: 010-66343608 传真: 010-66343055  
收稿日期: 2003-03-07 接受日期: 2003-03-28

#### 摘要

目的: 探讨 CO<sub>2</sub> 气腹对肠道菌群生物学特性的影响。

方法: 采用细菌显微培养、通用引物 PCR 及细菌形态学检测技术对 CO<sub>2</sub> 气腹后大鼠肠道菌群进行细菌鉴定, 并观察其繁殖及群集性能。

结果: CO<sub>2</sub> 气腹后肠道细菌繁殖能力最强的仍是大肠杆菌、乳酸杆菌、双歧杆菌和肠球菌, 并无特异性菌株生长与繁殖。随着 CO<sub>2</sub> 气腹持续时间的延长及压力的增高, 肠道细菌群集率、细菌潜在体检出率逐渐增大。CO<sub>2</sub> 气腹持续 2 h 后, 肠道菌群潜在体大量生长, 并可稳定传代, 有明显的群集现象。

结论: CO<sub>2</sub> 气腹后肠道细菌繁殖能力及适应能力显著增强, 应充分估计其对抗生素的耐受特性。

周丁华, 卫冰, 李宁, 黎介寿. CO<sub>2</sub> 气腹对肠道菌群生物学特性影响的实验研究. 世界华人消化杂志 2003;11(10):1649-1651

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1649.asp>

## 0 引言

随着腹腔镜技术及其配套器械的不断完善,腹腔镜手术作为一种微创诊断和治疗手段,其应用范围不断扩大,手术时间也相应延长,CO<sub>2</sub>气腹对机体的影响也将更加显著<sup>[1-5]</sup>.CO<sub>2</sub>气腹对机体呼吸、循环系统影响的研究已有大量文献报道<sup>[6-9]</sup>.本文采用PCR检测及细菌显微培养技术,对CO<sub>2</sub>气腹后肠道菌群生物学特性进行了研究.现将结果报告如下:

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 健康 Wistar 大鼠 40 只,体质量 200-250 g,♀ 20 只,♂ 20 只.随机分为低压组(气腹压 1.33 kPa),中压组(气腹压 2.0 kPa),高压组(气腹压 2.67 kPa)以及对照组.所有 Wistar 大鼠无消化道症状,均未使用过抗生素及影响肠道菌群的药物.试剂:普通琼脂培养基;PCR试剂由上海生物技术服务公司提供;DNA提取试剂盒由中国人民解放军微生物监测中心提供;试验菌株如大肠杆菌、变形杆菌、金色葡萄球菌、肠球菌、乳酸杆菌、双歧杆菌、沙门菌、志贺菌、肠杆菌、军团杆菌及其他细菌等均购自中国药品生物制品研究所;标准菌液制备时将 100 μL 的蒸馏水加入 1.5 mL 离心管中,用接种环挑取一环菌落于蒸馏水中,震荡,混匀,备用;引物合成由塞百盛生物技术公司合成与纯化.

**1.2 方法** 乙醚麻醉后,平卧固定,腹部酒精消毒,闭合法建立 CO<sub>2</sub> 气腹,气腹压力设定为 1.33 kPa, 2.0 kPa, 2.67 kPa,持续时间分别定为 30 min, 1.0 h, 2.0 h, 4.0 h.结束时经气腹针排出气体.于气腹后次日取少许粪便标本制成混悬液,震荡均匀,涂片做革兰氏染色,在 Opton 相差显微镜下观察标本细菌群集情况.同时,将混悬液分为三份,一份分别稀释成 10<sup>3</sup>、10<sup>6</sup> 倍,在 37 °C 琼脂糖平板上培养 24 h 后,在 Opton 相差显微镜下观察菌群繁殖情况,一份采用 Shapiro 的方法<sup>[3]</sup>进行细菌显微培养,以显微摄像系统动态观察并记录菌群的繁殖、生长、运动的过程;另一份做 PCR 检测.行 PCR 检测时,20 μL 反应体系含引物 FU<sub>1</sub> 10 pmol, FU<sub>2</sub> 10 pmol,模板 DNA 2 μL, dNTP 各 200 μmol, Taq 酶 1.0 u. 94 °C 变性 30 s, 50 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 90 s, 共 35 个循环.

统计学处理 测定数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,所得数据进行方差分析及配对 t 检验.

## 2 结果

**2.1 肠道细菌 PCR 检测及鉴定** 选择多种试验菌株进行特异性检测,结果显示气腹后大鼠粪便中的大肠杆菌、乳酸杆菌、双歧杆菌、肠球菌出现阳性结果,未发现其他菌株特异性扩增产物.

**2.2 肠道细菌镜检及鉴定** 正常大鼠粪便中可见少量细菌的潜生体和繁殖体及短小杆菌,不能传代生长.气腹后大鼠粪便中可见大量细菌的潜生体和繁殖体,其子

代个体中仍有潜生体生长,并有群集现象.随着气腹持续时间的延长及气腹压力的增高,肠道细菌群集率、细菌潜生体检出率逐渐增大;气腹持续时间 2 h 后,气腹低压组、中压组、高压组细菌群集率、细菌潜生体检出率均显著大于对照组(表 1、2).

表 1 各组不同气腹持续时间的肠道细菌群集率变化( $\bar{x} \pm s$ , %)

组别	n	30 min	1.0 h	2.0 h	4.0 h
低压组	10	9.1 ± 3.4	9.4 ± 3.7	15.5 ± 4.8 <sup>a</sup>	26.7 ± 11.2 <sup>b</sup>
中压组	10	9.3 ± 2.9	9.7 ± 4.4	21.6 ± 11.8 <sup>b</sup>	35.5 ± 16.2 <sup>b</sup>
高压组	10	9.2 ± 3.6	9.8 ± 3.5	32.3 ± 14.2 <sup>b</sup>	47.6 ± 19.5 <sup>b</sup>
对照组	10	8.8 ± 3.2	9.2 ± 2.5	9.4 ± 2.6	9.3 ± 3.4

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

表 2 各组不同气腹持续时间的肠道细菌潜生体检出率变化( $\bar{x} \pm s$ , %)

组别	n	30 min	1.0 h	2.0 h	4.0 h
低压组	10	2.5 ± 0.4	2.7 ± 0.7	7.2 ± 0.8 <sup>a</sup>	11.3 ± 6.2 <sup>b</sup>
中压组	10	2.3 ± 0.5	2.6 ± 0.6	10.5 ± 5.7 <sup>b</sup>	18.5 ± 11.1 <sup>b</sup>
高压组	10	2.2 ± 0.6	2.8 ± 0.8	12.8 ± 9.2 <sup>b</sup>	27.5 ± 14.5 <sup>b</sup>
对照组	10	2.4 ± 0.4	2.5 ± 0.5	2.4 ± 0.6	2.5 ± 0.4

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

**2.3 肠道细菌显微培养** 气腹后大鼠粪便细菌培养出大肠杆菌、乳酸杆菌、双歧杆菌、肠球菌.细菌的运动有灵活运动和定向运动两种方式.气腹后大鼠粪便混悬液在 37 °C 细菌接种板上动态观察 8 h 后,出现细菌潜生体多部位断裂增生、多部位出芽增生,形成数个子代,最终发育成繁殖体.

## 3 讨论

随着腹腔镜技术的广泛应用,CO<sub>2</sub>气腹对机体所产生的各种病理生理学改变受到众多学者的重视<sup>[10-14]</sup>.本文应用 PCR 检测及细菌显微培养技术,研究了 CO<sub>2</sub>气腹后肠道菌群生物学特性.结果显示,大鼠气腹后肠道细菌繁殖能力最强的仍是大肠杆菌、乳酸杆菌、双歧杆菌和肠球菌,并无特异性菌株生长与繁殖.随着气腹持续时间的延长及气腹压力的增高,肠道细菌群集率、细菌潜生体检出率逐渐增大.气腹持续 2 h 后,肠道菌群潜生体大量生长,并可稳定传代,有明显的群集现象.气腹后肠道菌群的上述特征性变化,一方面可能是腹腔内压力增高导致内脏血管收缩,静脉回流减少,致使心脏的前负荷降低<sup>[15-17]</sup>.同时,由于腹内高压机械性压迫大鼠肠道毛细血管床,反射性引起血管血流阻力增高导致肠道黏膜血流灌注不足,进而引起肠黏膜淤血水肿、肠黏液 pH 值改变,有利于肠道细菌的繁殖与群集;另一方面可能是腹内高压导致机体全身或肠道局部免疫功能下降<sup>[18, 19]</sup>.加之肠道细菌有较强的传代繁殖能

力和特殊的运动方式,使得肠道菌群得以大量繁殖与生长.当肠道环境有利于细菌繁殖时,细菌潜在体迅速发育成多个繁殖体,当不利于细菌繁殖时,细菌繁殖体又迅速转变成成为潜在体.气腹后肠道细菌的上述生物学特征变化使得其对渗透压、湿度、酸碱性等不利环境有较强的耐受性.

CO<sub>2</sub> 气腹不仅促使肠道细菌大量繁殖与群集,而且还有利于肠道细菌移位和播散<sup>[20, 21]</sup>,且肠道细菌繁殖、群集、移位和播散与气腹压力及持续时间密切相关.因此,实施腹腔镜手术时,CO<sub>2</sub> 气腹压力应尽量控制在既能满足手术要求,又能对机体肠道菌群产生较小影响的水平.实施气腹时保持腹肌良好的松弛,有助于维持和降低腹腔内压.此外,根据患者与手术需要,采取术中间歇放气可缓解高腹内压对腹腔内血管的压迫,维持肠道黏膜内环境的相对稳定.腹腔镜手术后,要充分估计到气腹后肠道细菌对抗生素的耐受特性,使用兼顾细菌因素和宿主因素两方面的药物,以降低肠道细菌群集率,抑制其潜生体的形成,阻止肠道细菌移位和播散.

#### 4 参考文献

- 1 Himal HS. Minimally invasive (laparoscopic) surgery. *Surg Endosc* 2002;16:1647-1652
- 2 Scott-Conner CE. Laparoscopic gastrointestinal surgery. *Med Clin North Am* 2002;86:1401-1422
- 3 Weber JC, Navarra G, Habib NA, Bachellier P, Jaeck D. Laparoscopic radiofrequency-assisted liver resection. *Surg Endosc* 2003;17:834
- 4 Ponsky LE, Cherullo EE, Banks KL, Greenstein M, Streem SB, Klein EA, Zippe CD. Laparoscopic radical nephrectomy: incorporating advantages of hand assisted and standard laparoscopy. *J Urol* 2003;169:2053-2056
- 5 Kalil AN, Mastalir ET. Laparoscopic hepatectomy for benign liver tumors. *Hepatogastroenterology* 2002;49:803-805
- 6 Schulze S, Lyng KM, Bugge K, Perner A, Bendtsen A, Thorup J, Nielsen HJ, Rasmussen V, Rosenberg J. Cardiovascular and respiratory changes and convalescence in laparoscopic colonic surgery: comparison between carbon dioxide pneumoperitoneum and gasless laparoscopy. *Arch Surg* 1999;134:1112-1118
- 7 Latimer FG, Eades SC, Pettifer G, Tetens J, Hosgood G, Moore RM. Cardiopulmonary, blood and peritoneal fluid alterations associated with abdominal insufflation of carbon dioxide in standing horses. *Equine Vet J* 2003;35:283-290
- 8 Hawasli A, Oh H, Schervish E, Frontera R, Gonsheva I, Khoury H. The effect of pneumoperitoneum on kidney function in laparoscopic donor nephrectomy. *Am Surg* 2003;69:300-303
- 9 Rosin D, Rosenthal RJ. Adverse hemodynamic effects of intraabdominal pressure- is it all in the head? *Int J Surg Investig* 2001;2:335-345
- 10 Holthausen UH, Nagelschmidt M, Troidl H. CO<sub>2</sub> pneumoperitoneum: what we know and what we need to know. *World J Surg* 1999;23:794-800
- 11 Agostini A, Robin F, Jais JP, Aggerbeck M, Vilde F, Blanc B, Lecuru F. Impact of different gases and pneumoperitoneum pressures on tumor growth during laparoscopy in a rat model. *Surg Endosc* 2002;16:529-532
- 12 Hanly EJ, Mendoza-Sagaon M, Murata K, Hardacre JM, De Maio A, Talamini MA. CO<sub>2</sub> Pneumoperitoneum modifies the inflammatory response to sepsis. *Ann Surg* 2003;237:343-350
- 13 Tan M, Xu FF, Peng JS, Li DM, Chen LH, Lv BJ, Zhao ZX, Huang C, Zheng CX. Changes in the level of serum liver enzymes after laparoscopic surgery. *World J Gastroenterol* 2003;9:364-367
- 14 Wildbrett P, Oh A, Naundorf D, Volk T, Jacobi CA. Impact of laparoscopic gases on peritoneal microenvironment and essential parameters of cell function. *Surg Endosc* 2003;17:78-82
- 15 Yokoyama Y, Alterman DM, Sarmadi AH, Baveja R, Zhang JX, Huynh T, Clemens MG. Hepatic vascular response to elevated intraperitoneal pressure in the rat. *J Surg Res* 2002;105:86-94
- 16 Gutt CN, Schmandra TC. Portal venous flow during CO<sub>2</sub> pneumoperitoneum in the rat. *Surg Endosc* 1999;13:902-905
- 17 Schmandra TC, Kim ZG, Gutt CN. Effect of insufflation gas and intraabdominal pressure on portal venous flow during pneumoperitoneum in the rat. *Surg Endosc* 2001;15:405-408
- 18 Gupta A, Watson DI. Effect of laparoscopy on immune function. *Br J Surg* 2001;88:1296-1306
- 19 Chekan EG, Nataraj C, Clary EM, Hayward TZ, Brody FJ, Stamat JC, Fina MC, Eubanks WS, Westcott CJ. Intraperitoneal immunity and pneumoperitoneum. *Surg Endosc* 1999;13:1135-1138
- 20 Ozmen MM, Col C, Aksoy AM, Tekeli FA, Berberoglu M. Effect of CO<sub>2</sub> insufflation on bacteremia and bacterial translocation in an animal model of peritonitis. *Surg Endosc* 1999;13:801-803
- 21 Matsumoto T, Tsuboi S, Dolgor B, Bandoh T, Yoshida T, Kitano S. The effect of gases in the intraperitoneal space on cytokine response and bacterial translocation in a rat model. *Surg Endosc* 2001;15:80-84

# CO<sub>2</sub>气腹对大鼠胃肠机电作用的实验研究

周丁华, 卫冰, 李 宁, 黎介寿

周丁华, 卫冰, 中国人民解放军解放军二炮总医院普外科 北京市 100088  
李宁, 黎介寿, 南京军区南京总医院全军普外研究所 江苏省南京市 210002  
国家自然科学基金资助项目, No.30270406  
中国博士后科学研究基金资助项目, No. 中博基 2001-14  
项目负责人: 周丁华, 100088, 北京市西城区新街口外大街 16 号, 中国人民解放军解放军二炮总医院普外科. zhoudh@sina.com  
电话: 010-66343608 传真: 010-66343055  
收稿日期: 2003-03-07 接受日期: 2003-03-28

## 摘要

目的: 研究CO<sub>2</sub>气腹对胃肠机电活动的影响.

方法: 采用电生理方法, 观察 CO<sub>2</sub> 气腹不同压力、不同持续时间大鼠胃肠消化间期综合肌电(IMC)各时相变化规律, 统计单位时间内胃、十二指肠及回肠肌电快波数及气腹前后肌电快波数变化率.

结果: 正常大鼠胃肠消化间期常出现 IMC III 时相, 但缺乏 IMC IV 时相与 II 时相. CO<sub>2</sub> 气腹后大鼠胃肠 IMC III 时相极少出现. 随着气腹持续时间的延长及气腹压力的增高, 大鼠胃、十二指肠及回肠肌电单位时间内快波数逐渐减少. 气腹持续 1 h 后, 高压组(气腹压 2.67 kPa)的胃、十二指肠及回肠肌电快波数变化率显著大于对照组. 气腹持续 2 h 后, 低压组(气腹压 1.33 kPa)、中压组(气腹压 2.0 kPa)的胃、十二指肠及回肠肌电快波数变化率显著大于对照组.

结论: CO<sub>2</sub> 气腹可抑制胃肠机电活动, 并导致胃肠机电活动节律紊乱.

周丁华, 卫冰, 李宁, 黎介寿. CO<sub>2</sub> 气腹对大鼠胃肠机电作用的实验研究. 世界华人消化杂志 2003;11(10):1652-1653

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1652.asp>

## 0 引言

随着腹腔镜技术的广泛应用, CO<sub>2</sub> 气腹对机体所产生的各种病理生理学改变受到众多学者的重视<sup>[1-5]</sup>. 目前, CO<sub>2</sub> 气腹对机体呼吸、循环系统影响的研究已有大量文献报道<sup>[6-9]</sup>, 而有关对胃肠动力学影响的研究较少. 本文研究了 CO<sub>2</sub> 气腹对大鼠胃肠机电活动的作用. 现将结果报告如下:

## 1 材料和方法

1.1 材料 健康 Wistar 大鼠 40 只, 体质量 200-250 g, ♀ 20 只, ♂ 20 只. 随机分为低压组(气腹压 1.33 kPa), 中压组(气腹压 2.0 kPa), 高压组(气腹压 2.67 kPa)以及对照组. 引导电极的安置: 乙醚麻醉后, 按外科常规手术行上腹正中切口, 将三对自制颜色不同的小型

银-氯化银双电极分别埋置于胃窦(幽门下 5 mm)、十二指肠(幽门下 5 mm)和回肠(回盲部近端 20 mm)的浆膜面. 每对电极双极的间距为 4 mm, 电极由腹腔穿过腹膜和肌层, 在胸背部皮下潜行, 于两肩胛骨之间引出体外. 1.2 方法 术后 7-10 d, 待大鼠伤口、饮食恢复正常后开始进行实验. 实验前禁食 8-24 h, 乙醚麻醉后, 平卧固定, 腹部酒精消毒, 闭合法建立 CO<sub>2</sub> 气腹, 气腹压力设定为 1.33 kPa, 2.0 kPa, 2.67 kPa, 持续时间分别定为 0.5 h, 1.0 h, 2.0 h, 4.0 h. 结束时经气腹针排出气体. 对照组仅插入气腹针, 并不注入 CO<sub>2</sub> 气体. 引导电极导线接四道生理记录仪, 经放大的电信号由记录仪显示器显示. 观察 IMC 各时相变化, 胃肠肌电信号以 80 min 为 1 个记录单位, 统计各组胃肠肌电的快波总数, 计算气腹前后胃肠肌电快波数变化率. 胃肠肌电快波数变化率 = (气腹前快波总数 - 气腹后快波总数) / 气腹前快波总数 × 100 %

统计学处理 测定数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 所得数据进行方差分析及配对 t 检验.

## 2 结果

正常大鼠胃肠消化间期 IMC 常出现 III 时相, 但缺乏 IMC IV 时相与 II 时相. CO<sub>2</sub> 气腹后大鼠胃肠 IMC III 时相极少出现. 随着气腹持续时间的延长及气腹压力的增高, 大鼠胃、十二指肠及回肠肌电单位时间内快波数逐渐减少. 气腹持续时间 1 h 后, 高压组的胃、十二指肠及回肠肌电快波数变化率显著大于对照组. 气腹持续时间 2 h 后, 气腹低压组、中压组的胃、十二指肠及回肠肌电快波数变化率显著大于对照组(表 1-3).

表 1 各组不同气腹持续时间的胃肌电快波数变化率( $\bar{x} \pm s$ , %)

组别	n	30 min	1.0 h	2.0 h	4.0 h
低压组	10	9.1 ± 3.6	10.3 ± 3.8	17.6 ± 5.9 <sup>a</sup>	36.7 ± 11.9 <sup>b</sup>
中压组	10	9.3 ± 2.7	11.9 ± 4.2	28.8 ± 14.7 <sup>b</sup>	47.5 ± 18.3 <sup>b</sup>
高压组	10	10.2 ± 4.5	20.7 ± 3.5 <sup>a</sup>	36.6 ± 18.2 <sup>b</sup>	58.5 ± 21.6 <sup>b</sup>
对照组	10	8.7 ± 3.1	8.9 ± 2.2	8.7 ± 2.5	8.8 ± 3.3

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

表 2 各组不同气腹持续时间的十二指肠肌电快波变化率( $\bar{x} \pm s$ , %)

组别	n	30 min	1.0 h	2.0 h	4.0 h
低压组	10	7.5 ± 2.4	9.7 ± 2.7	17.6 ± 13.5 <sup>a</sup>	28.3 ± 6.2 <sup>b</sup>
中压组	10	8.3 ± 2.5	10.6 ± 3.3	21.9 ± 15.3 <sup>b</sup>	39.5 ± 21.5 <sup>b</sup>
高压组	10	9.2 ± 2.9	16.8 ± 3.4 <sup>a</sup>	28.8 ± 19.2 <sup>b</sup>	46.7 ± 24.5 <sup>b</sup>
对照组	10	6.5 ± 1.7	6.9 ± 2.0	6.6 ± 1.6	6.5 ± 1.4

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



表3 各组不同气腹持续时间的回肠肌电快波变化率( $\bar{x} \pm s, \%$ )

组别	n	30 min	1.0 h	2.0 h	4.0 h
低压组	10	3.5 ± 0.4	4.7 ± 0.7	8.9 ± 1.9 <sup>a</sup>	11.5 ± 8.8 <sup>b</sup>
中压组	10	4.3 ± 0.5	5.6 ± 0.8	11.6 ± 6.8 <sup>b</sup>	25.8 ± 15.6 <sup>b</sup>
高压组	10	5.2 ± 0.8	9.8 ± 1.0 <sup>a</sup>	19.2 ± 10.4 <sup>b</sup>	34.5 ± 19.5 <sup>b</sup>
对照组	10	3.5 ± 0.7	3.5 ± 0.8	3.4 ± 0.6	3.5 ± 0.7

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

### 3 讨论

随着腹腔镜及其配套器械的不断完善,腹腔镜手术作为一种微创诊断和治疗手段,其应用范围不断扩大<sup>[10-14]</sup>.胃肠肌电活动是研究胃肠运动形式及其规律的灵敏指标.消化间期移行性运动综合波(MMC)反映了胃肠道在消化间期运动的周期性变化,以电活动为指标研究胃肠运动时,这种周期性变化称为IMC. IMC通常被分为4个时相(I - IV).

本研究发现,正常大鼠胃肠消化间期IMC常出现Ⅲ时相,但缺乏IMCⅣ时相与Ⅱ时相.CO<sub>2</sub>气腹后大鼠胃肠IMCⅢ时相极少出现,且胃、十二指肠及回肠单位时间内快波数显著减少.说明CO<sub>2</sub>气腹可导致大鼠胃肠肌电活动节律紊乱,抑制胃肠道的蠕动功能.CO<sub>2</sub>气腹后胃肠道肌电上述特征性变化,一方面可能是腹腔内压力增高可导致内脏血管收缩,静脉回流减少,致使心脏的前负荷降低<sup>[15-17]</sup>.同时,腹内压力机械性压迫胃肠道毛细血管床,反射性引起血管血流阻力增高,导致胃肠道血流灌注不足,进而引起胃肠道淤血水肿,抑制了胃肠平滑肌肌电活动;另一方面可能是CO<sub>2</sub>高度的可溶性和腹腔、血液之间CO<sub>2</sub>的压力梯度导致CO<sub>2</sub>吸收迅速增加,引起全身或局部高碳酸血症和酸中毒,从而降低了胃肠平滑肌受体对外界刺激的敏感性.

本研究还表明,CO<sub>2</sub>气腹对胃、十二指肠一直到回肠(末端)的消化道肌电活动均有一定的抑制作用.随着气腹持续时间的延长及气腹压力的增高,CO<sub>2</sub>气腹对胃肠肌电活动的抑制作用显著增强.因此,实施腹腔镜手术时,CO<sub>2</sub>气腹压力应尽量控制在既能满足手术要求,又能对机体胃肠道肌电活动产生较小影响的低水平.实施CO<sub>2</sub>气腹时保持腹肌良好的松弛,有助于维持和降低腹腔内压.此外,根据患者与手术需要,采取术中间歇放气可缓解高腹内压对腹腔内血管的压迫,维持胃肠道内环境的相对稳定.腹腔镜手术后,要充分估计到

CO<sub>2</sub>气腹后胃肠肌电活动的影响,适量使用促胃肠动力的药物,有助于尽早恢复胃肠道的运动功能.

### 4 参考文献

- Holthausen UH, Nagelschmidt M, Troidl H. CO<sub>2</sub> pneumoperitoneum: what we know and what we need to know. *World J Surg* 1999; 23:794-800
- Agostini A, Robin F, Jais JP, Aggerbeck M, Vilde F, Blanc B, Lecuru F. Impact of different gases and pneumoperitoneum pressures on tumor growth during laparoscopy in a rat model. *Surg Endosc* 2002;16:529-532
- Hanly EJ, Mendoza-Sagaon M, Murata K, Hardacre JM, De Maio A, Talamini MA. CO<sub>2</sub> Pneumoperitoneum modifies the inflammatory response to sepsis. *Ann Surg* 2003;237:343-350
- Tan M, Xu FF, Peng JS, Li DM, Chen LH, Lv BJ, Zhao ZX, Huang C, Zheng CX. Changes in the level of serum liver enzymes after laparoscopic surgery. *World J Gastroenterol* 2003; 9:364-367
- Wildbrett P, Oh A, Naundorf D, Volk T, Jacobi CA. Impact of laparoscopic gases on peritoneal microenvironment and essential parameters of cell function. *Surg Endosc* 2003;17:78-82
- Schulze S, Lyng KM, Bugge K, Perner A, Bendtsen A, Thorup J, Nielsen HJ, Rasmussen V, Rosenberg J. Cardiovascular and respiratory changes and convalescence in laparoscopic colonic surgery: comparison between carbon dioxide pneumoperitoneum and gasless laparoscopy. *Arch Surg* 1999;134: 1112-1118
- Latimer FG, Eades SC, Pettifer G, Tetens J, Hosgood G, Moore RM. Cardiopulmonary, blood and peritoneal fluid alterations associated with abdominal insufflation of carbon dioxide in standing horses. *Equine Vet J* 2003;35:283-290
- Hawasli A, Oh H, Schervish E, Frontera R, Gonsherova I, Khoury H. The effect of pneumoperitoneum on kidney function in laparoscopic donor nephrectomy. *Am Surg* 2003;69: 300-303
- Rosin D, Rosenthal RJ. Adverse hemodynamic effects of intraabdominal pressure- is it all in the head? *Int J Surg Investig* 2001;2:335-345
- Himal HS. Minimally invasive (laparoscopic) surgery. *Surg Endosc* 2002;16:1647-1652
- Scott-Conner CE. Laparoscopic gastrointestinal surgery. *Med Clin North Am* 2002;86:1401-1422
- Weber JC, Navarra G, Habib NA, Bachellier P, Jaeck D. Laparoscopic radiofrequency-assisted liver resection. *Surg Endosc* 2003;17:834
- Ponsky LE, Cherullo EE, Banks KL, Greenstein M, Streem SB, Klein EA, Zippe CD. Laparoscopic radical nephrectomy: incorporating advantages of hand assisted and standard laparoscopy. *J Urol* 2003;169:2053-2056
- Kalil AN, Mastalir ET. Laparoscopic hepatectomy for benign liver tumors. *Hepatogastroenterology* 2002;49:803-805
- Yokoyama Y, Alterman DM, Sarmadi AH, Baveja R, Zhang JX, Huynh T, Clemens MG. Hepatic vascular response to elevated intraperitoneal pressure in the rat. *J Surg Res* 2002; 105:86-94
- Gutt CN, Schmandra TC. Portal venous flow during CO<sub>2</sub> pneumoperitoneum in the rat. *Surg Endosc* 1999;13:902-905
- Schmandra TC, Kim ZG, Gutt CN. Effect of insufflation gas and intraabdominal pressure on portal venous flow during pneumoperitoneum in the rat. *Surg Endosc* 2001;15:405-408

# CO<sub>2</sub> 气腹对胃黏膜血管活性肠肽及 P 物质含量的影响

周丁华, 卫 冰, 李 宁, 黎介寿

周丁华, 卫冰, 中国人民解放军解放军二炮总医院普外科 北京市 100088  
 李宁, 黎介寿, 南京军区南京总医院全军普外研究所 江苏省南京市 210002  
 国家自然科学基金资助项目, No.30270406  
 中国博士后科学研究基金资助项目, No. 中博基 2001-14  
 项目负责人: 周丁华, 100088, 北京市西城区新街口外大街 16 号, 中国人民解放军解放军二炮总医院普外科. zhoudh@sina.com  
 电话: 010-66343608 传真: 010-66343055  
 收稿日期: 2003-03-07 接受日期: 2003-03-28

## 摘要

目的: 研究CO<sub>2</sub>气腹对胃黏膜血管活性肠肽(VIP)及P物质(SP)含量的影响。

方法: 采用放射免疫分析方法, 对CO<sub>2</sub>气腹不同压力, 不同持续时间大鼠胃黏膜VIP及SP的含量进行测定。

结果: 大鼠CO<sub>2</sub>气腹后胃黏膜VIP及SP含量均发生变化。随着气腹持续时间的延长, 大鼠胃黏膜VIP含量逐渐减少, 而胃黏膜SP含量却逐渐增大。气腹时间持续1h后, 高压组胃黏膜VIP含量显著小于对照组, 而高压组胃黏膜SP含量显著大于对照组。气腹时间持续2h后, 气腹低压组, 中压组胃黏膜VIP含量均显著小于对照组, 而胃黏膜SP含量均显著大于对照组。

结论: CO<sub>2</sub>气腹可导致胃黏膜VIP及SP含量变化, 其影响程度取决于气腹压力大小和气腹持续时间长短。

周丁华, 卫冰, 李宁, 黎介寿. CO<sub>2</sub>气腹对胃黏膜血管活性肠肽及P物质含量的影响. 世界华人消化杂志 2003;11(10):1654-1655  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1654.asp>

## 0 引言

随着腹腔镜技术的广泛应用, CO<sub>2</sub>气腹对机体所产生的各种病理生理学改变受到众多学者的重视<sup>[1-5]</sup>。特别是CO<sub>2</sub>气腹对机体呼吸、循环系统影响的研究已有大量文献报道<sup>[6-9]</sup>, 本文采用放射免疫分析方法, 对CO<sub>2</sub>气腹后小鼠胃黏膜血管活性肠肽(vessel active peptide, VIP)及P物质(SP)的含量进行了研究。现将结果报告如下:

## 1 材料和方法

1.1 材料 健康Wistar大鼠40只, 体质量200-250g, ♀20只, ♂20只。随机分为低压组(气腹压1.33kPa), 中压组(气腹压2.0kPa), 高压组(气腹压2.67kPa)以及对照组。

1.2 方法 乙醚麻醉后, 平卧固定, 腹部酒精消毒, 闭合法建立CO<sub>2</sub>气腹, 气腹压力设定为1.33kPa, 2.0kPa, 2.67kPa, 持续时间分别定为30min, 1.0h, 2.0h, 4.0h。

结束时经气腹针排出气体。即刻将大鼠断颈处死, 取鼠胃在冷盐水中清洗, 取部分黏膜组织, 用滤纸吸干水分, 称质量, 每毫克(湿重)加入300μL冰醋酸, 煮沸5min, 在玻璃匀浆器中匀浆, 离心(3500r/min)20min, 取上清夜置-20℃冰箱保存, 1mo内测定。VIP及SP放射免疫药盒由晶美生物工程有限公司北京分公司提供, 具体测定方法按说明书进行, 2种激素同一批分别测定, 质量控制符合放射免疫测定要求。

统计学处理 测定数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 所得数据进行方差分析及配对t检验。

## 2 结果

大鼠CO<sub>2</sub>气腹后胃黏膜VIP及SP含量均发生变化。随着气腹持续时间的延长, 大鼠胃黏膜VIP含量逐渐减少, 而胃黏膜SP含量却逐渐增大。气腹时间持续1h后, 高压组胃黏膜VIP含量显著小于对照组, 而高压组胃黏膜SP含量显著大于对照组。气腹时间持续2h后, 气腹低压组, 中压组胃黏膜VIP含量均显著小于对照组, 而胃黏膜SP含量均显著大于对照组(表1、2)

表1 各组不同气腹持续时间的胃黏膜VIP含量变化( $\bar{x} \pm s$ , pg/mL)

组别	n	30 min	1.0 h	2.0 h	4.0 h
低压组	10	72.1 ± 28.6	70.3 ± 27.8	61.6 ± 25.6 <sup>a</sup>	56.7 ± 26.5 <sup>b</sup>
中压组	10	71.3 ± 22.8	68.9 ± 28.2	54.8 ± 24.7 <sup>b</sup>	45.5 ± 23.4 <sup>b</sup>
高压组	10	69.2 ± 24.5	61.4 ± 23.5 <sup>a</sup>	46.6 ± 28.2 <sup>b</sup>	38.5 ± 25.5 <sup>b</sup>
对照组	10	75.3 ± 28.5	74.2 ± 32.7	75.8 ± 29.5	72.9 ± 32.3

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

表2 各组不同气腹持续时间的胃黏膜SP含量变化( $\bar{x} \pm s$ , pg/mL)

组别	n	30 min	1.0 h	2.0 h	4.0 h
低压组	10	190.1 ± 38.3	210.3 ± 43.8	277.6 ± 55.9 <sup>a</sup>	336.7 ± 81.9 <sup>b</sup>
中压组	10	205.3 ± 48.6	211.9 ± 44.2	328.8 ± 64.7 <sup>b</sup>	444.5 ± 98.5 <sup>b</sup>
高压组	10	212.2 ± 54.5	270.6 ± 53.5 <sup>a</sup>	486.6 ± 88.2 <sup>b</sup>	558.5 ± 91.6 <sup>b</sup>
对照组	10	185.7 ± 37.0	186.9 ± 39.2	185.7 ± 38.5	185.8 ± 32.4

<sup>a</sup>P<0.05, <sup>b</sup>P<0.01, vs 对照组比较。

## 3 讨论

胃肠道黏膜是产生胃肠道调节肽(regulatory peptide)的主要场所, 其中SP是兴奋性运动神经元的主递质之一, VIP是抑制性运动神经元的主递质之一。他们与胃肠道的肠肌神经丛和黏膜下神经丛共同构成有别于交感神

经和副交感神经系的第三大自律神经-胃肠道神经系统。

我们以前的研究发现, CO<sub>2</sub> 气腹可导致胃肠肌电活动节律紊乱, 并抑制胃肠肌电活动<sup>[10]</sup>。本文采用放射免疫分析方法, 对 CO<sub>2</sub> 气腹不同压力, 不同作用时间大鼠胃黏膜 VIP 及 SP 的含量进行测定。结果表明, 大鼠 CO<sub>2</sub> 气腹后胃黏膜 VIP 及 SP 含量均发生变化, 且随气腹持续时间的延长及气腹压力的增大, 大鼠胃黏膜 VIP 含量逐渐减少, 而胃黏膜 SP 含量逐渐增大。由于胃黏膜 VIP 及 SP 作为胃肠道神经系统主递质, 与交感神经和副交感神经系统共同构筑起胃肠道运动调节体系, 故推测 CO<sub>2</sub> 气腹对胃黏膜 VIP 及 SP 含量的影响在抑制胃肠肌电活动, 降低胃肠蠕动及胃排空功能中起重要作用。目前, CO<sub>2</sub> 气腹后胃黏膜 VIP 含量下降和 SP 含量升高的机制仍不清楚, 可能是腹腔内压力增高导致内脏血管收缩, 静脉回流减少, 致使心脏的前负荷降低<sup>[11-14]</sup>。同时, CO<sub>2</sub> 气腹后的腹内高压, 机械性压迫胃肠道毛细血管床, 导致胃肠道血流灌注不足, 以及腹腔、血液之间 CO<sub>2</sub> 的压力梯度导致 CO<sub>2</sub> 吸收迅速增加, 引起全身或局部高碳酸血症和酸中毒<sup>[15]</sup>, 可能对此起重要作用。

#### 4 参考文献

- 1 Holthausen UH, Nagelschmidt M, Troidl H. CO<sub>2</sub> pneumoperitoneum: what we know and what we need to know. *World J Surg* 1999;23:794-800
- 2 Agostini A, Robin F, Jais JP, Aggerbeck M, Vilde F, Blanc B, Lecuru F. Impact of different gases and pneumoperitoneum pressures on tumor growth during laparoscopy in a rat model. *Surg Endosc* 2002;16:529-532
- 3 Hanly EJ, Mendoza-Sagaon M, Murata K, Hardacre JM, De Maio A, Talamini MA. CO<sub>2</sub> Pneumoperitoneum modifies the inflammatory response to sepsis. *Ann Surg* 2003;237:343-350
- 4 Tan M, Xu FF, Peng JS, Li DM, Chen LH, Lv BJ, Zhao ZX, Huang C, Zheng CX. Changes in the level of serum liver enzymes after laparoscopic surgery. *World J Gastroenterol* 2003; 9:364-367
- 5 Wildbrett P, Oh A, Naundorf D, Volk T, Jacobi CA. Impact of laparoscopic gases on peritoneal microenvironment and essential parameters of cell function. *Surg Endosc* 2003;17:78-82
- 6 Schulze S, Lyng KM, Bugge K, Perner A, Bendtsen A, Thorup J, Nielsen HJ, Rasmussen V, Rosenberg J. Cardiovascular and respiratory changes and convalescence in laparoscopic colonic surgery: comparison between carbon dioxide pneumoperitoneum and gasless laparoscopy. *Arch Surg* 1999;134: 1112-1118
- 7 Latimer FG, Eades SC, Pettifer G, Tetens J, Hosgood G, Moore RM. Cardiopulmonary, blood and peritoneal fluid alterations associated with abdominal insufflation of carbon dioxide in standing horses. *Equine Vet J* 2003;35:283-290
- 8 Hawasli A, Oh H, Schervish E, Frontera R, Gonsheva I, Khoury H. The effect of pneumoperitoneum on kidney function in laparoscopic donor nephrectomy. *Am Surg* 2003;69:300-303
- 9 Rosin D, Rosenthal RJ. Adverse hemodynamic effects of intraabdominal pressure- is it all in the head? *Int J Surg Investig* 2001;2:335-345
- 10 周丁华, 卫冰, 李宁, 黎介寿. CO<sub>2</sub> 气腹对大鼠胃肠肌电作用的实验研究. *世界华人消化杂志* 2003;11:1651-1652
- 11 Yokoyama Y, Alterman DM, Sarmadi AH, Baveja R, Zhang JX, Huynh T, Clemens MG. Hepatic vascular response to elevated intraperitoneal pressure in the rat. *J Surg Res* 2002; 105:86-94
- 12 Gutt CN, Schmandra TC. Portal venous flow during CO<sub>2</sub> pneumoperitoneum in the rat. *Surg Endosc* 1999;13:902-905
- 13 Schmandra TC, Kim ZG, Gutt CN. Effect of insufflation gas and intraabdominal pressure on portal venous flow during pneumoperitoneum in the rat. *Surg Endosc* 2001;15:405-408
- 14 Lindberg F, Bergqvist D, Bjorck M, Rasmussen I. Renal hemodynamics during carbon dioxide pneumoperitoneum: an experimental study in pigs. *Surg Endosc* 2003;17:480-484
- 15 Pavlidis T, Papaziogas B, Vretzakis G, Argiriadou H, Sfira E, Papaziogas T. Continuous monitoring of arterial blood gases and pH during laparoscopic cholecystectomy using a Paratrend sensor. *Minerva Chir* 2002;57:17-22

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2003 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

## 世界胃肠病学杂志英文版获得 2003 - 2004 年 国家自然科学基金重点学术期刊专项基金资助

本刊讯 世界胃肠病学杂志英文版(*World Journal of Gastroenterology*)申报的2002年度国家自然科学基金重点学术期刊专项基金项目, 经专家评审, 国家自然科学基金委员会务会议审定, 予以批准资助(项目批准号: 30224801)。资助期限2年, 2003 - 2004年, 资助强度每年8万元。

2002 年度重点学术期刊专项基金资助 30 本学术期刊, 分别为天体物理学报(英), 计算数学(英), 理论物理通讯(英) 中国物理快报(英), 力学学报(英), 分析化学, 高等学校化学学报, 化学学报, 化学通报, 中国化学工程学报(英), 世界胃肠病学杂志(英), 作物学报, 中国农业科学, 中国中西医结合杂志, 中国药理学报(英), 生物化学与生物物理学报, 细胞研究(英), 植物学报(英), 大气科学进展(英), 地球物理学报, 地质学报(英), 金属学报, 稀土学报(英), 材料科学技术(英), 稀有金属材料与工程, 电力系统自动化, 计算机科学技术学报(英), 管理科学学报, 中国科学(中、英), 科学通报(中、英)。

(世界胃肠病学杂志社 2002-10-18)

# 腹腔严重感染致多器官功能障碍的临床救治新对策

岳茂兴

岳茂兴, 中国人民解放军第306医院腹部外科中心 北京市 100101  
总装备部卫生局重点科研课题资金资助项目, No. 9521086  
项目负责人: 岳茂兴, 100101, 北京市朝阳区安翔北里9号, 中国人民解放军第306医院腹部外科中心. yuemx@ns.cetin.net.cn  
电话: 010-66354546  
收稿日期: 2003-03-14 接受日期: 2003-03-25

## 摘要

目的: 探索降低腹腔严重感染致多器官功能障碍(MODS)患者死亡率的治疗措施.

方法: (1)整体治疗 MODS 时, 在“炎性递质、细菌、内外毒素、微循环、免疫功能、营养代谢、基础疾病、脏器功能”等方面进行兼顾和并治; (2)采用短程大剂量山莨菪碱联用地塞米松为主的救治方案; (3)应用“分阶段代谢营养支持”治疗; (4)配合“解毒固本颗粒”治疗.

结果: 本组 53 例, 应用常规疗法 31 例患者, 22 例死亡, 死亡率 70.96 %. 采用综合救治新对策 22 例患者, 死亡 8 例, 死亡率 36.36 %. 经  $\chi^2$  检验, 两组死亡率具有显著的统计学差异( $\mu=2.469$ ,  $P<0.05$ ).

结论: 腹腔严重感染致 MODS 治疗困难, 死亡率高, 采用综合救治新对策能降低 MODS 的死亡率.

岳茂兴. 腹腔严重感染致多器官功能障碍的临床救治新对策. 世界华人消化杂志 2003;11(10):1656-1657  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1656.asp>

## 0 引言

尽管现代外科治疗手段日新月异, 腹腔严重感染致多器官功能障碍(MODS)仍有极高的发病率<sup>[1]</sup>, 近 20 a 其死亡率并未见明显降低<sup>[2]</sup>. 我院在近 12 a 间, 共收治明确诊断为腹腔严重感染导致 MODS 的患者 53 例, 应用常规疗法 31 例, 采用综合救治新策略 22 例, 现报告如下:

## 1 材料和方法

1.1 材料 53 例均为住院患者. 其中男 32 例, 女 21 例, 年龄 8-93 岁. 原发疾病: 急性化脓性胆管炎 20 例, 出血坏死性胰腺炎 1 例, 巨大肝脓肿 3 例, 腹腔内脓肿 11 例, 肠穿孔、弥漫性腹膜炎 7 例, 膈下巨大脓肿 1 例, 败血症 4 例, 复合伤合并感染 6 例. 感染灶检出细菌: 大肠杆菌、副大肠杆菌占 52.83 %; 肠球菌、金黄色葡萄球菌、链球菌占 33.96 %; 绿脓杆菌占 3.77 %; 克雷伯菌、脆弱拟杆菌占 9.43 %. 药敏结果大肠杆菌对 5 种抗生素严重耐药, 克雷伯菌、绿脓杆菌均对 7 种抗生素

严重耐药, 全部 G<sup>-</sup> 杆菌都对氨苄青霉素耐药, 但对第三代头孢菌素如头孢噻肟、头孢唑肟、头孢哌酮等较为敏感. 衰竭脏器情况: 2 个脏器障碍 15 例, 3 个脏器障碍 18 例, 4 个脏器障碍 19 例, 6 个脏器障碍 1 例. 1.2 方法 (1)传统常规疗法按常规进行; (2)采用新对策疗法; 从治疗的一开始就在“炎性递质、细菌、内外毒素、微循环障碍、免疫功能失调”等方面进行兼顾和并治: (1) 外科手术消除脓肿极为重要; (2)改善微循环, 防止微血栓<sup>[3]</sup>; (3)序贯性抗生素治疗; (4)代谢营养支持治疗<sup>[4]</sup>; (5)配合“解毒固本颗粒”治疗<sup>[5]</sup>; (6)大剂量应用腹腔灌洗液清洗腹腔; (9)选择性肠道去污染; (10)加强监护治疗; (11)防治可能发生的并发症等.

## 2 结果

本组共 53 例, 应用常规疗法 31 例患者, 22 例死亡, 死亡率 70.96 %. 采用综合救治新对策 22 例患者, 死亡 8 例, 死亡率 36.36 %. 经  $\chi^2$  检验, 两组死亡率具有显著的统计学差异( $\mu=2.469$ ,  $P<0.05$ ).

## 3 讨论

3.1 “抗生素、外科手术、营养代谢支持和加强监护治疗”是处理腹腔严重感染的四大支柱 (1)腹腔感染主要由大肠杆菌、肠球菌、克雷伯菌、肠杆菌、变形杆菌、类杆菌属、厌氧性球菌、梭状芽孢杆菌、梭形菌属引起. 革兰氏阴性需氧菌主要通过其内毒素发挥致病作用, 引起全身性脓毒反应和腹部局部反应. 而厌氧菌的主要毒性作用是其外毒素和荚膜多糖. 腹腔严重感染的抗生素应用必须及早进行, 合理地选用抗生素是必不可缺少的. (2)预防性治疗措施的关键是清除和控制引起败血症的炎症, 感染和脓肿. (3)腹腔严重感染患者常处于高分解代谢状态, 机体蛋白消耗大, 营养的消化吸收也存在一定的障碍, 因此完全的代谢营养支持非常必要<sup>[4]</sup>. (4)腹腔严重感染患者进行 ICU 加强监护治疗具有十分重要的意义, 他能及时估价病情, 迅速地评价治疗效果. 3.2 关键是要清除和控制引起败血症的炎症, 感染和脓肿 腹腔严重感染致 MODS 患者最关键是要清除和控制引起败血症的炎症, 感染和脓肿, 早期应用抗生素虽可防止脓肿的形成, 但一旦发现脓肿应立即切开引流或穿刺置管引流. 外科严重感染并发 MODS 并不是手术治疗的禁忌证, 相反在强有力的支持治疗下采取积极态度消除感染这一诱发因素, 反而有可能及时有效中断 MODS 及 MOF 的发展, 利于治疗的成功. 3.3 采用序贯性抗生素治疗的重要性 序贯性抗生素治

疗包括3个给药阶段: (1)在取得培养及药敏报告前, 应按照经验性抗生素方案给药, 抗生素的应用应该能覆盖引起感染的所有致病菌, 采用对肝、肾功能影响极小的抗生素, 如抗厌氧菌的甲硝唑或替硝唑和抗需氧菌的第三代头孢菌素, 对腹腔严重感染的致病菌特别有效。(2)经3-4 d取得药敏报告后, 应选用针对性更强的抗生素治疗以取得最佳的疗效, 并需预防二重感染的发生。(3)在抗生素治疗后7-9 d, 患者情况明显好转, 可开始考虑改换口服治疗, 以巩固疗效。

3.4 改善微循环, 防止微血栓形成 山莨菪碱: 0.66 mg/Kg / 次; 3/d. 地塞米松: 0.66 mg/kg / 次; 3/d. 静脉滴注或静脉推注, 共3 d. 他有扼止危重状态进展、促进症状缓解、改善微循环、防止微血栓及良好的降温、抗毒、抗炎、抗休克作用, 对重要脏器无损伤作用。

3.5 大剂量应用腹腔灌洗液清洗腹腔 在清除和控制引起败血症的炎症, 感染和脓肿手术时, 大剂量应用腹腔灌洗液清洗腹腔很重要。已有脓液溢出或外漏者, 应作全面的腹腔清洗, 以减少坏死组织、细菌总数和稀释毒素。

3.6 从阻断全身炎症反应来防治 MODS 国际上采用外源性物质以对抗过度生成的炎症递质等临床实验相继失败, 有的甚至显示有害作用<sup>[6]</sup>。而传统中医中药, 如通里攻下加清热解毒, 活血化瘀、通腑清肠之法, 方药采用大承气汤、大陷胸汤、桃红承气汤等加减临床验证有较好的疗效。我们采用研制的“解毒固本颗粒”, 由306医院制剂室制作提供<sup>[5]</sup>。成分及用量: 栀子15 g、黄芩15 g、柴胡15 g、生地15 g、甘草15 g、连翘15 g、玄参15 g、僵蚕15 g、防风15 g、大黄8 g

等, 取得满意的治疗效果。他具有多途径、多靶点、多环节发挥治疗作用的特点。

3.7 采用分阶段代谢营养支持及免疫营养支持治疗 腹腔严重感染患者常处于高分解代谢状态, 机体蛋白消耗大, 营养的消化吸收也存在一定的障碍, 因此完全的代谢营养支持非常必要: 代谢营养支持的方法可分肠外(TPN)和肠内(TEN)两大类。在救治中证实, 这是阻止病情进一步发展的关键性环节之一。这为腹腔严重感染患者最终获得治愈提供了一个极为有利的条件。

临床研究和动物实验证实, 本治疗措施兼顾了腹腔严重感染致MODS患者的“炎症递质、细菌、内外毒素、微循环障碍、免疫功能失调、营养代谢紊乱、基础疾病、脏器功能”八个主要方面, 有显著地改善微循环、抗细胞因子、抗氧自由基及促进损伤细胞逆转的作用。为临床综合治疗腹腔严重感染致MODS患者提供了一条途径。

#### 4 参考文献

- 1 张延龄. 外科严重感染的抗生素和新颖治疗剂. 国外医学外科学分册 1997;24:65-66
- 2 申耀宗. 腹腔严重感染的抗生素治疗. 腹部外科杂志 1996;9:3-5
- 3 岳茂兴. 胃肠道功能障碍及衰竭的诊断和治疗. 世界华人消化杂志 2002;10:3-6
- 4 岳茂兴. 腹部外科疾病并发MODS的代谢特点及分阶段营养支持治疗. 中国危重病急救医学杂志 2003;15:29-31
- 5 姜玉峰, 岳茂兴. 解毒固本汤对CLP大鼠TNF、IL-2及病理形态学的影响. 中国中西医结合学会急救医学杂志 2000;59:39-41
- 6 邱海波, 陈德昌. 严重感染的抗递质治疗及展望. 中国危重病急救医学 1996;8:756-758

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2003年版权归世界胃肠病学杂志社

• 临床经验 •

## 解毒固本冲剂治疗腹腔感染合并全身炎症反应综合征的临床研究

姜玉峰, 岳茂兴

姜玉峰, 岳茂兴, 中国人民解放军306医院普通外科 北京市 100101  
中国人民解放军306医院院级课题, No. 99006  
项目负责人: 姜玉峰, 100101, 北京德外安翔北里9号9720信箱, 中国人民解放军306医院普通外科. jyfeng@haoyisheng.com.cn  
电话: 010-66356729-2008  
收稿日期: 2002-11-11 接受日期: 2002-11-28

### 摘要

目的: 探讨解毒固本冲剂在腹腔感染合并全身炎症反应综合征中的治疗作用。

方法: 选取腹腔感染合并全身炎症反应综合征患者60例,

根据入院先后次序随机分为标准治疗组、中西医结合治疗组。原发病: 急性阑尾炎36例, 肠梗阻12例, 上消化道穿孔8例, 急性胰腺炎6例。标准治疗组入院后均根据病情分别采取手术、抗炎、补液、禁食水等综合治疗; 中西医结合治疗组在标准治疗基础上加用解毒固本冲剂24 g/200 mL口服, 禁食水患者不禁药, 10 mL/次, 间隔30 min, 分次饮入或从胃管内注入。分别于开始治疗后24 h、48 h、72 h观测体温、脉搏、白细胞总数及排气、排便时间。

结果: 解毒固本冲剂可以降低体温、脉搏、白细胞总数,

缩短排气排便时间。

结论: 中西医结合疗法较传统疗法有明显优势, 其中解毒固本冲剂通过多靶向、多部位、整体观、双向调节的特点发挥重要作用。

姜玉峰, 岳茂兴. 解毒固本冲剂治疗腹腔感染合并全身炎症反应综合征的临床研究. 世界华人消化杂志 2003;11(10):1657-1659

http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1657.asp

## 0 引言

腹腔严重感染情况下, 胃肠黏膜损伤导致白细胞系统持续激活, 应激状态下免疫稳态失衡时, 多种炎症递质失控性释放产生一系列瀑布样级联反应的综合过程中常出现全身炎症反应综合征(SIRS), 多脏器功能失常综合征(MODS)和多脏器功能衰竭(MOF)往往成为疾病的最后转归<sup>[1]</sup>. 我们已经通过实验研究证实解毒固本冲剂有通过调节炎症递质释放, 降低 SIRS 时肺、肝、肠等器官受到的损害, 保护重要脏器, 阻止了病程进一步向 MODS 发展的作用<sup>[2]</sup>. 用于腹腔感染合并全身炎症反应综合征患者, 可明显改善 SIRS 的诊断指标, 并可促进早期排气, 胃肠功能早期恢复. 现报告如下:

## 1 材料和方法

1.1 材料 60 例 SIRS 患者男 34 例, 女 26 例. 年龄 12-68 岁, 平均  $36.5 \pm 12$  岁, 均为收住院治疗患者. 所观察病例入选标准均符合 SIRS 诊断标准<sup>[3]</sup>. 根据入院先后次序随机分为标准治疗组、中西医结合治疗组. 原发病: 急性阑尾炎 36 例, 肠梗阻 12 例, 上消化道穿孔 8 例, 急性胰腺炎 6 例. 解毒固本冲剂以黄芩、柴胡、连翘、大黄等为主, 每袋含生药 12 g, 由本院制剂室制作提供.

1.2 方法 标准治疗组入院后均根据病情分别采取手术、抗炎、补液、禁食水等综合治疗; 中西医结合治疗组在标准治疗基础上加用解毒固本冲剂 24 g 口服, 禁食水患者不禁药, 解毒固本冲剂溶成 200 mL, 10 mL/次, 间隔 30 min, 分次饮入或从胃管内注入. 分别于开始治疗后 24 h、48 h、72 h 观测体温、脉搏、白细胞总数及排气、排便时间.

统计学处理 应用 SAS 统计分析应用软件包采用组间 t 检验.

## 2 结果

解毒固本冲剂可以降低体温、脉搏、白细胞总数, 缩短排气、排便时间(表 1).

## 3 讨论

腹腔严重感染后, 肠道黏膜屏障功能受到损害, 免疫系统消除功能也被阻断, 由此使肠道内菌群移位, 造成肠源性内毒素血症, 机体受到肠道细菌和内毒素刺激释放大量活性物质, 引起促炎和抗炎因素失衡, 随着病程的进一步发展, 会不可避免地出现全身炎症反应综合征(SIRS)过程, 进一步恶化则会演变为多脏器功能失常综合征(MODS)或多脏器功能衰竭(MOF). SIRS 主要的临床特征是持续高代谢、高动力循环状态和过度的炎症反应, 与感染的严重程度呈正相关, 临床典型表现为高热、脉速、呼吸快及白细胞增高. 由腹腔感染引发时则可能出现麻痹性肠梗阻. 在本研究中发现解毒固本冲剂可以降低体温、脉搏、白细胞总数, 缩短排气、排便时间.

1990 年代, 试图阻断 SIRS 瀑布反应各个环节的抗炎治疗成为研究热点, 但内毒素单抗、肿瘤坏死因子单抗等炎症递质拮抗剂等一系列尝试从实验室走向临床时接连失败<sup>[4]</sup>. 因此, 有必要通过其他方式进一步进行研究. 急腹症中医辨证以阳明证或少阳证者居多, 解毒固本冲剂以大柴胡汤化裁而成, 主治少阳、阳明合病, 诸药合用, 共奏外解少阳, 内泻热结之功. 本方剂重用大黄, 动物实验证实大黄具有拮抗炎性递质的作用<sup>[5]</sup>. 解毒固本冲剂可能通过以下机制取得治疗作用: (1)机械排出作用, 大黄主要致泻成分为结合型蒽甙, 部位在大肠<sup>[6]</sup>, 通过荡涤肠道, 使实邪积滞排出, 减少细菌、内毒素、代谢产物的蓄积及再吸收; (2)直接破坏内毒素结构; (3)改善肠管微循环, 增加血流量; (4)减少过量细胞因子的产生, 降低过度免疫反应; (5)抗菌消炎, 大黄、黄芩、柴胡等均有较强的抗菌作用, 减少细菌的增生, 使内毒素产生减少; (6)促进免疫, 现代药理研究证实柴胡多糖等成分对特异及非特异免疫均有促进作用<sup>[7]</sup>, 大黄的不同成分分别具有免疫抑制和免疫促进作用<sup>[8]</sup>; (7)解热、镇痛, 抑制胰酶作用<sup>[9]</sup>; (8)改善 SIRS 状态下异常代谢; (9)脏器保护作用, 大黄等中药能保护细胞间紧密连接, 维持细胞结构完整等. 在本研究中, 可以发现解毒固本冲剂对于应激状态下的 SIRS 有较好的治疗作用. 因其多靶向、多部位、整体观、双

表 1 病例观测结果

	体温(°C)			脉搏(次/min)			白细胞总数( $\times 10^9/L$ )			排气排便时间
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	
标准治疗组	$38.7 \pm 0.56$	$37.9 \pm 0.46$	$37.2 \pm 0.63$	$98.2 \pm 0.6$	$95.6 \pm 0.3$	$90.7 \pm 0.6$	$12.4 \pm 0.6$	$11.7 \pm 0.3$	$10.8 \pm 0.56$	$52.3 \pm 6.4$
中西医结合治疗组	$37.4 \pm 0.33^a$	$37.2 \pm 0.43^b$	$37.1 \pm 0.35$	$88.7 \pm 0.4^a$	$86.4 \pm 0.6^a$	$82.1 \pm 0.9^a$	$10.2 \pm 0.4^a$	$9.3 \pm 0.6^a$	$7.4 \pm 0.2^a$	$31.2 \pm 4.9^a$

<sup>a</sup>P < 0.01 vs 标准治疗组, <sup>b</sup>P < 0.05 vs 标准治疗组



向调节等的治疗特点,符合辨证论治的中医治疗法则,亦符合现代医学理论,避免了单克隆抗体等疗法的片面性,因此中西医结合治疗较单纯西医治疗具有较大的优势。

#### 4 参考文献

- 1 Border JR. Multiple systems organ failure. *Ann surg* 1992; 216:211
- 2 姜玉峰, 岳茂兴. 解毒固本冲剂对大鼠肿瘤坏死因子- $\alpha$ 和白介素-2及病理形态学改变的影响. *中国中西医结合急救杂志* 2000; 7:52-53
- 3 Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus

- WA, Schein RM, Sibbald WJ. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Chest* 1992;101:1644-1655
- 4 邱海波. 全身炎症反应综合征与多器官功能衰竭综合征. *中国实用外科杂志* 2000;20:713
  - 5 杨建东, 陈德昌, 景炳文, 杨兴易, 陈学云, 李红江. 大黄抗内毒素性休克大鼠炎症递质作用的实验研究. *中国危重病急救医学* 1998;10:470-473
  - 6 李仪奎, 姜名瑛. 中药药理学. 第1版. 北京: 中国中医药出版社, 1992:81
  - 7 李仪奎, 姜名瑛. 中药药理学. 第1版. 北京: 中国中医药出版社, 1992:44
  - 8 李仪奎, 姜名瑛. 中药药理学. 第1版. 北京: 中国中医药出版社, 1992:83
  - 9 李仪奎, 姜名瑛. 中药药理学. 第1版. 北京: 中国中医药出版社, 1992:8

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2003 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 临床经验 •

## TIPSS 和 EVS 治疗食管静脉曲张破裂出血的临床分析

诸葛宇征, 王英德, 刘丽娜, 宫爱霞, 赵 钢

诸葛宇征, 王英德, 刘丽娜, 宫爱霞, 赵钢, 大连医科大学附属第一医院消化科 辽宁省大连市 116011  
项目负责人: 诸葛宇征, 116011, 辽宁省大连市中山路 222 号, 大连医科大学附属第一医院消化科. yu8zheng@yahoo.com  
电话: 0411-3635963-2171 传真: 0411-2682686  
收稿日期: 2003-03-06 接受日期: 2003-03-29

### 摘要

目的: 比较 TIPSS 和 EVS 治疗食管静脉曲张破裂出血的疗效, 治疗前后两组患者肝功能的变化和术后患者的死亡原因。

方法: 回顾性分析两组各 18 例经 TIPSS 和 EVS 治疗的食管静脉曲张破裂出血患者在治疗后不同时间的死亡率, 再出血率及治疗前后血浆白蛋白和胆红素的变化。

结果: TIPSS 组在术后 30 d 的死亡率略低于硬化剂治疗组 (16.67% vs 22.22%), 术后 1 a, 两组的死亡率比较有显著差异 (22.22% vs 44.44%); 术后 2a, TIPSS 组仍略低于 EVS 组 (38.89% vs 50.00%), 但差异无显著性。在术后 2 a 的随访期内, EVS 组的再出血率高于 TIPSS 组。与 EVS 组比较, TIPSS 组患者术后肝功能的降低更明显。

结论: TIPSS 治疗的近期疗效优于 EVS 治疗, 中远期疗效的对比尚需进一步的观察。TIPSS 术后肝功能的衰竭是本组患者治疗后死亡的主要原因, 而 EVS 组患者的术后死亡与再出血密切相关。

诸葛宇征, 王英德, 刘丽娜, 宫爱霞, 赵钢. TIPSS 和 EVS 治疗食管静脉曲张破裂出血的临床分析. *世界华人消化杂志* 2003;11(10):1659-1660  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1659.asp>

### 0 引言

经颈静脉肝内门体静脉支架分流术(TIPSS)曾在食管静脉曲张破裂出血的治疗中引起人们的广泛关注<sup>[1-3]</sup>。但由于存在术后分流道狭窄或闭塞导致再出血和术后门体分流性肝性脑病的发生, 其治疗门脉高压征的地位仍存争议。食管静脉曲张硬化术(EVS), 因操作相对简单, 安全, 一次可处理多条曲张血管, 已成为治疗和预防食管静脉曲张破裂出血的常用方法之一。本文比较了 TIPSS 和 EVS 治疗难治性和反复发作性食管静脉曲张破裂出血的疗效。

### 1 材料和方法

1.1 材料 2000-04/2001-01 在我院住院行 TIPSS 和 EVS 治疗的患者各 18 例。所有上消化道出血的患者均行急诊或择期胃镜检查, 明确出血原因。内科治疗有效者采用择期 TIPSS 或 EVS 治疗; 无效者则采用急诊 TIPSS 或 EVS 治疗, 患者一般情况见表 1。

1.2 方法 TIPSS 技术参照 Richter et al 方法略加修改。EVS 采用 VE 电子胃镜, 首先明确患者食管静脉曲张情况和出血部位, 每条曲张静脉注射 1-2 mL 硬化剂, 每次处理 1-4 条静脉。硬化剂治疗后再出血者, 均行再次硬化剂治疗。随访: TIPSS 组的患者术后采用超声多普勒观察分流道是否通畅, 两组患者定期复查肝功能和血常规, 随访期限为 2 a。

统计学处理 所有结果以  $\bar{x} \pm s$  表示。两组间的差异采用 t 检验。死亡率和再出血率用四格表确切概率法计算。P < 0.05 为有显著性差异。

表1 TIPSS 组和 EVS 组患者一般情况

	TIPSS	EVS
<i>n</i>	18	18
男性	10	9
女性	8	9
年龄	58 (35-72 岁)	57 (37-68 岁)
Child-Pugh 分级		
A	3	4
B	8	7
C	7	7
食管静脉曲张		
III	8	9
IV	10	9
治疗时机		
急诊	11	10
择期	7	8

## 2 结果

TIPSS 治疗组患者, 分流道均能有效的建立, 达到控制出血和降低门静脉压力的效果. 门静脉压力从术前  $46.32 \pm 6.54$  cm H<sub>2</sub>O 降到术后  $21.43 \pm 4.40$  cm H<sub>2</sub>O ( $P < 0.001$ ); EVS 治疗组的患者, 在治疗当时出血都能得到有效的控制或明显减轻.

2.1 死亡率 治疗后 30 d 患者死亡率分别是: TIPSS 组 16.67 % (3/18); EVS 组 22.22 % (4/18). 术后 1 a, TIPSS 组为 22.22 % (4/18), EVS 组为 44.44 % (8/18), 两组差异有显著性( $P < 0.05$ ). 在 2 a 的随诊期内, TIPSS 组的累计死亡率为 38.89 % (7/18), EVS 组的累计死亡率为 50.00 % (9/18), 差异无显著性( $P > 0.05$ ).

表2 TIPSS 组术前, 术后血清白蛋白及总胆红素变化( $\bar{x} \pm s$ )

时间	<i>n</i>	白蛋白(g/dL)	总胆红素(mg/dL)
治疗前	18	$3.32 \pm 0.55$	$3.28 \pm 1.62$
治疗后 12 mo	12	$2.84 \pm 0.34$	$4.86 \pm 2.30$
治疗后 24 mo	9	$2.63 \pm 0.34^a$	$6.78 \pm 2.50^a$

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 治疗前.

表3 EVS 组术前, 术后血清白蛋白及总胆红素变化( $\bar{x} \pm s$ )

时间	<i>n</i>	白蛋白(g/dL)	总胆红素(mg/dL)
治疗前	18	$3.15 \pm 0.43$	$2.54 \pm 0.53$
治疗后 12 mo	11	$3.18 \pm 0.54$	$2.74 \pm 0.68$
治疗后 24 mo	8	$2.98 \pm 0.40$	$3.48 \pm 1.50$

表4 TIPSS 组与 EVS 组治疗前后外周血血小板计数( $\bar{x} \pm s$  万/mm<sup>3</sup>)

时间	TIPSS		EVS	
	<i>n</i>	血小板	<i>n</i>	血小板
治疗前	18	$6.60 \pm 4.30$	18	$7.89 \pm 4.12$
治疗后 12 mo	15	$7.43 \pm 3.32$	10	$8.02 \pm 3.98$
治疗后 24 mo	9	$7.23 \pm 4.02$	6	$7.96 \pm 4.15$

2.2 再出血率 TIPSS 组在手术后 30 d 无 1 例复发上消化道大出血. 随诊期内, TIPSS 组有 5 例发生上消化道出血, 占总数的 27.78 % (5/18), 4 例经内科药物治疗均可有效止血. EVS 治疗组在术后 30 d 内有 6 例复发出血, 占患者总数的 33.33 % (6/18). 随诊期内又有 6 例复发出血, 共计有 12 例复发出血, 占 EVS 治疗患者的 66.66 % (12/18). 两组比较差异有显著性( $P < 0.05$ ).

2.3 肝功能改变 我们采用血清白蛋白和总胆红素作为观察两组患者术后不同时间肝功能改变的指标(表2, 表3).

2.4 外周血小板计数 在术后不同时间, 两组患者外周血血小板计数无显著变化(表4).

## 3 讨论

本文总结的患者平均有 2-3 次上消化道大出血病史, 肝功能多属 Child-Pugh 分级的 B, C 级, 这类患者的病情多较危急, 死亡率一般较高. 本研究结果表明, 患者治疗后 30 d 内的死亡率, TIPSS 治疗组低于 EVS 治疗组, 随诊 1 a 后, 这种差别具有显著性, 提示 TIPSS 治疗的 1 a 疗效优于 EVS 治疗. 2 a 的观察表明 TIPSS 治疗的死亡率仍略低于 EVS 组, 但差异无显著性. 本组资料显示, 在术后随诊期内, EVS 治疗组都有较高的再出血率. 从患者的死亡原因分析, TIPSS 治疗组 7 例死亡患者中, 3 例是死于严重的肝功能衰竭合并的肝肾综合征, 3 例死于肝昏迷, 1 例死于反复发作的消化道出血. 这一结果与 TIPSS 术治疗后患者血清白蛋白降低和总胆红素升高均提示, TIPSS 治疗可导致肝功能的减退, 甚至肝功能衰竭. 这可能是 TIPSS 治疗后患者死亡的主要原因. EVS 治疗后的高再出血率提示再出血是 EVS 治疗组患者死亡的重要原因. 这一结果与有关的报道在一定程度上相一致.

外周血血小板计数是反映肝硬化患者脾功能亢进的一个较敏感的指标. 尽管在部分行 TIPSS 治疗患者中, 观察到术后脾脏有不同程度的缩小, 血小板计数也有上升, 但本研究显示, 治疗后 TIPSS 组和 EVS 组外周血血小板计数均无明显升高. 这一结果支持 TIPSS 治疗对改善脾功能亢进无明显作用的结论.

总之, 本研究的结果提示, 对于肝功能较差, 由于严重的门静脉高压出现反复发作的和药物治疗无效的食管胃底静脉曲张破裂出血的患者, 两种方法均能达到有效急诊止血目的. TIPSS 治疗的近期(1 a)疗效要优于 EVS 治疗, 长期疗效有待进一步的观察.

## 4 参考文献

- Rossle M, Siegerstetter V, Huber M. Treatment of portal hypertension by portosystemic shunts. *Ther Umsc* 1998;55:89-96
- Textor HJ, Brensing KA, Wilhelm K, Strunk H, Block W, Raab P, Hofer U, Muller-Miny H, Layer G, Schiedermeier P, Schuller H, Sauerbruch T, Schild HH. TIPSS: technical and clinical results after 4 years. *Rofo Fortschr Geb Rontgenstr Neuen Bildgeb Verfahr* 1998;168:361-368
- Knechtle SJ, Rikkers LF. Current management of esophageal variceal bleeding. *Adv Surg* 1999;33:439-458



Published by **Baishideng Publishing Group Inc**  
7901 Stoneridge Drive, Suite 501, Pleasanton,  
CA 94588, USA  
Fax: +1-925-223-8242  
Telephone: +1-925-223-8243  
E-mail: [bpgoffice@wjgnet.com](mailto:bpgoffice@wjgnet.com)  
<http://www.wjgnet.com>



ISSN 1009-3079

