

# 硫代乙酰胺致大鼠轻微型肝性脑病模型的建立

贾林, 张美华, 苏常青, 李泽

贾林, 张美华, 广州市第一人民医院消化内科 广东省广州市 510180  
苏常青, 李泽, 广州市第一人民医院神经内科 广东省广州市 510180  
项目负责人: 贾林, 510180, 广东省广州市, 广州市第一人民医院消化内科.  
电话: 020-81628877 传真: 020-81628809  
收稿日期: 2003-12-10 接受日期: 2004-02-01

## 摘要

目的: 建立硫代乙酰胺(TAA)致大鼠轻微型肝性脑病(MHE)的动物模型.

方法: 24只♂SD大鼠随机分为TAA组和正常对照组, 各12只. TAA组应用TAA(每日200 mg/kg)隔日腹腔内注射, 共2次, 1d后行脑干听觉诱发电位(BAEP)和门静脉内毒素检测.

结果: TAA组的I波潜伏期为 $1.52 \pm 0.07$  ms, 显著高于正常对照组的 $1.29 \pm 0.09$  ms ( $P < 0.05$ ); TAA组内毒素水平为 $0.36 \pm 0.04$  pg/mL, 显著高于正常对照组的 $0.07 \pm 0.02$  pg/mL ( $P < 0.001$ ); 若以1.45 ms (正常对照组I波潜伏期均值 $\pm 1.96$ 标准差)为正常值, MHE发生率为83.3%(10/12).

结论: TAA致大鼠MHE模型研制成功, 适用于MHE实验治疗研究.

贾林, 张美华, 苏常青, 李泽. 硫代乙酰胺致大鼠轻微型肝性脑病模型的建立. 世界华人消化杂志 2004;12(5):1207-1208  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1207.asp>

## 0 引言

轻微型肝性脑病(minimal hepatic encephalopathy, MHE)过去多称为亚临床型肝性脑病(SHE), 指某些肝病患者缺乏临床常规手段可检测的大脑功能失调, 但具有可计量的智力检测和脑诱发电位异常<sup>[1-2]</sup>, 迄今尚未见MHE动物模型的研究报道. 本文在预实验基础上, 采用小剂量硫代乙酰胺(TAA)腹腔内注射导致大鼠急性肝功能障碍, 以脑干听觉诱发电位(BAEP)为MHE诊断指标, 旨在首次建立大鼠的实验性MHE模型及其诊断标准, 为MHE实验治疗研究提供动物模型.

## 1 材料和方法

1.1 材料 清洁级SD♂大鼠24只, 质量220-250 g, 由中山大学实验动物中心提供. TAA(分析纯)和萤试剂盒分别购自上海化学试剂公司和上海伊华临床医药科技公司. 应用丹麦丹迪公司生产的Keypoint型脑诱发电位仪检测大鼠BAEP.

### 1.2 方法

1.2.1 模型制备 根据Albrecht et al<sup>[3]</sup>方法改良制备. 24只SD大鼠随机分为TAA组和正常对照组, 每组12只.

TAA组采用每日200 mg/kg剂量的TAA隔日行腹腔内注射(ip), 正常对照组则采用生理盐水ip, 共2次, 注射结束后1d分别行BAEP和内毒素定量检测, 必要时辅以50 g/L葡萄糖盐水溶液5 mL ip进行补液.

1.2.2 BAEP检测及MHE的诊断 大鼠注射TAA后, 如出现嗜睡、反应迟缓、自主性活动减少、共济失调、昏迷等症状之一, 可诊断肝性脑病(HE); 无症状大鼠则需行BAEP检测以排除MHE(采用Shapiro et al<sup>[4]</sup>方法). 用20 g/L戊巴比妥40 mg/kg ip进行麻醉, 将其置于GS型金属组装机屏蔽隔音室内, 由神经功能检查室医师操作. 指标包括大鼠BAEP I-IV的潜伏期及其峰间期, 每项指标重复操作2次以上, 待波形重复性好之后进行描记, 以确保实验数据的可靠性.

预实验发现BAEP I波潜伏期较II-IV波潜伏期对药物治疗更为敏感和稳定, 因此把正常对照组BAEP I波潜伏期均值 $\pm 0.96$ 标准差作为正常值, 超过此值即可诊断MHE.

1.2.3 门静脉内毒素定量测定 采用萤试验(偶氮显色法).

1.2.4 肝病理检查 取血后处死裸鼠, 留取鼠肝同一叶肝组织, 苏木素-伊红染色后光镜观察.

统计学处理 两组计量资料和率的比较分别采用t检验和 $\chi^2$ 检验.

## 2 结果

2.1 大鼠BAEP正常值及MHE发生率 正常组大鼠活动灵活, 反应敏捷. SD大鼠注射TAA后, 未见嗜睡、反应迟缓、共济失调、昏迷等HE症状, 也无大鼠死亡; TAA组的I波潜伏期为 $1.52 \pm 0.07$  ms, 显著高于正常对照组的 $1.29 \pm 0.09$  ms ( $P < 0.05$ ); 若以1.45 ms(正常对照组I波潜伏期均值 $\pm 1.96$ 标准差)为正常值, MHE发生率为83.3%(10/12).

2.2 血浆内毒素检测 TAA组的内毒素水平为 $0.36 \pm 0.04$  pg/mL, 显著高于正常对照组的 $0.07 \pm 0.02$  pg/mL ( $P < 0.001$ ), 提示TAA组存在显著的高内毒素血症.

2.3 肝病理检查 肉眼见TAA组鼠肝普遍肿大, 表面较粗糙, 呈暗红色; 正常组鼠肝则未见异常. 光镜下见正常组鼠肝组织肝小叶结构完整, 肝细胞无变性、坏死; TAA组大部分肝脏有大面积空泡变和炎性细胞浸润; 部分肝脏呈现以中央静脉为中心的肝小叶坏死(条块状坏死和桥接坏死), 个别呈弥漫性片状坏死.

## 3 讨论

HE最新共识认为HE范畴为一连续阶段, 包含从MHE

(0期)到肝昏迷(IV期)等不同程度类型, MHE为HE广义概念的一部分<sup>[1-2]</sup>. HE动物模型的制备方法很多, 适合不同研究目的. 文献报道TAA致鼠急性肝衰竭模型具有良好的重复性和可行性, 已成为目前国内外最成熟和最常用的HE模型, 其中以TAA隔日腹腔内重复注射(2-3次)为公认的制备常规, TAA总量波动于500-1 200 mg/kg, TAA剂量-症状关系也未达成共识<sup>[3]</sup>.

脑诱发电位(EP)和智力检测为MHE患者的主要诊断手段, 由于动物难行智力检测, 因此EP成为MHE动物模型的惟一识别手段. 鉴于近年动物EP检测技术的广泛应用<sup>[4-5]</sup>, 建立动物MHE模型及其诊断标准的时机已日渐成熟, 国内外少数学者进行了初步尝试. Albrecht和Hilgier et al学者<sup>[3, 6]</sup>提出了MHE模型制备方法, 认为采用TAA(250 mg/kg)隔日ip大鼠2次后停药, 第21 d后即可制成鼠MHE模型, 由于未行EP检测致使动物MHE诊断不明, 仍为MHE假想模型. 2000年, 国内李瑞军 et al<sup>[7]</sup>首次把EP检测应用于乳果糖对TAA致免HE/MHE的防治研究, 但较粗略和笼统, 未建立MHE模型和确立动物MHE的诊断标准等.

本文前期研究显示TAA剂量与HE发生率呈正相关, 250 mg组(250 mg/kg隔日ip 2次)的临床HE发生率接近100%, 明显高于200 mg组(200 mg/kg体重隔日ip 2次), 因此, 本文采用小剂量TAA制备鼠MHE模型.

研究显示小剂量TAA(200 mg/kg体重隔日ip 2次)既可显著延长鼠BAEP I波的潜伏期和产生高内毒素血症, 又无临床HE和鼠死亡发生; 若以正常对照组BAEP I波潜伏期均值 $\pm 1.96$ 标准差作为MHE诊断标准, 本组SD大鼠的MHE确切发生率为83.3%, 适用于MHE疗效学的定量研究.

#### 4 参考文献

- 1 贾林, 张美华. 肝性脑病的定义、命名、诊断和定量标准修订方案的新进展. 世界华人消化杂志 2003;11:2008-2010
- 2 贾林. 建议将亚临床型肝性脑病更名为轻微型肝性脑病. 世界华人消化杂志 2004;12:432-433
- 3 Albrecht J, Hilgier W, Zielinska M, Januszewski S, Hesselink M, Quack G. Extracellular concentrations of taurine, glutamate, and aspartate in the cerebral cortex of rats at the asymptomatic stage of thioacetamide-induced hepatic failure: modulation by ketamine anesthesia. *Neurochem Res* 2000;25: 1497-502
- 4 Shapiro SM. Somatosensory and brainstem auditory evoked potentials in the Gunn rat model of acute bilirubin neurotoxicity. *Pediatr Res* 2002;52:844-849
- 5 Morales-Martinez Jde J, Gonzalez-Pina R, Alfaro-Rodriguez A. Brainstem auditory response in the reserpinized rat. *Proc West Pharmacol Soc* 2002;45:68-70
- 6 Hilgier W, Zielinska M, Borkowska HD, Gadamski R, Walski M, Oja SS, Saransaari P, Albrecht J. Changes in the extracellular profiles of neuroactive amino acids in the rat striatum at the asymptomatic stage of hepatic failure. *J Neurosci Res* 1999; 56:76-84
- 7 李瑞军, 杨昭徐. 乳果糖对临床及亚临床肝性脑病预防作用的实验研究. 胃肠病学 2000;5:214-215

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

## NOD2基因3020insC移码突变与中国湖北汉族炎症性肠病的相关性

瞿 艳, 郭秋莎, 夏 冰

瞿艳, 郭秋莎, 夏冰, 武汉大学中南医院综合医疗科 湖北省武汉市 430071  
国家自然科学基金资助课题, No. 30370638  
项目负责人: 夏冰, 430071, 湖北省武汉市, 武汉大学中南医院综合医疗科.  
bingxia@public.wh.hb.cn  
电话: 027-67812885  
收稿日期: 2003-12-10 接受日期: 2004-02-01

### 摘要

目的: 研究我国湖北汉族人NOD2基因3020insC移码突变频率与炎症性肠病(IBD)的相关性.

方法: 采用特异性等位基因PCR方法对74例溃疡性结肠炎(UC)、15例克罗恩病(CD)患者以及172例正常对照者NOD2基因3020insC多态性进行检测.

结果: 正常对照者、UC以及CD患者NOD2基因3020等

位基因频率分别为0.29%、1.35%及3.33%, 均无显著性差异. 但CD对比健康对照组的 $P=11.828$ , 95% CI=0.7 205-194.17, 提示NOD2基因3020insC移码突变是CD的危险因素.

结论: NOD2基因3020insC移码突变与中国湖北汉族CD与UC患者无显著相关性.

瞿艳, 郭秋莎, 夏冰. NOD2基因3020insC移码突变与中国湖北汉族炎症性肠病的相关性. 世界华人消化杂志 2004;12(5):1208-1210

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1208.asp>

### 0 引言

炎症性肠病(IBD)包括溃疡性结肠炎(UC)和克罗恩病(CD)

两种临床类型,其免疫和遗传因素在发病机制中起重要作用.至今,NOD2基因是所发现的CD的第一个易感基因<sup>[1-2]</sup>.在大多数西方人群已被证实,然而,未被日本和香港人所证实<sup>[3-4]</sup>.NOD2是参与细胞凋亡调控的NOD1/APAF-1家族的成员,表达于外周血单核细胞和回肠黏膜,通过NF- $\kappa$ B信号转导通路激活一系列炎症细胞因子的转录与表达,在肠黏膜的炎症损伤中起重要作用<sup>[5]</sup>.目前,鲜见NOD2基因多态性在中国汉族人群中的分布及与IBD患者相关性的报道.本研究旨在探讨我国湖北汉族人中NOD2基因移码突变的频率及其与IBD的相关性.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 收集2001/2003在武汉大学中南医院以及武汉市其他大型综合医院就诊的湖北汉族无亲缘关系的IBD患者89例(74例UC,15例CD)以及健康对照者172例. UC及CD诊断标准参照中华医学会消化病学分会2001“对炎症性肠病诊断治疗规范的建议”<sup>[6]</sup>.健康对照者来自正常体检者.

**1.2 方法** 基因组DNA提取:采血5 mL,EDTA抗凝,常规蛋白酶K消化,苯酚-氯仿提取.提取的DNA溶解于TE液中,-25℃保存. NOD2基因3020insC移码突变检测:采用特异性等位基因PCR (allele specific PCR)方法,检测NOD2基因3020insC移码突变.在25  $\mu$ L的反应体系中加入特异性引物(表1),引物设计参照文献<sup>[2]</sup>. 94℃预变性5 min. 变性94℃,45 s;退火59℃,45 s;延伸72℃,45 s;共35次循环.最后彻底延伸于72℃,7 min. PCR产物于20 g/L琼脂糖电泳,溴乙锭染色,在紫外分析仪下分析鉴定. PCR产生533 bp的非特异性产物及319 bp片段(野生型)和/或214 bp片段(3020insC突变型). 3020insC突变型DNA参考标本由荷兰阿姆斯特丹自由大学惠赠.

表1 NOD2基因3020insC突变特异性等位基因PCR引物

引物	序列
顺式引物	5' -CTGAGCCTTTGTTGATGAGC-3'
反式引物	5' -TCTTCAACCACATCCCCATT-3'
野生型顺式引物	5' -CAGAAGCCCTCCTGCAGGCCCT-3'
3020insC反式引物	5' -CGCGTGTCAATTCCTTCATGGGGC-3'

统计学处理 通过SPSS 11.5软件包,采用 $\chi^2$ 检验, $P < 0.05$ 认为有统计学意义.

## 2 结果

对89例IBD患者(74例UC,15例CD)以及172例健康对照者的DNA样本进行检测,发现4例3020insC移码突变杂合子,其中正常对照者1例、UC 2例、CD 1例.正常对照者、UC以及CD患者NOD2基因3020等位基因频率分别为0.29%,1.35%及3.33%,均无显

著性差异(表2).但CD对比健康对照组的 $P = 11.828$ ,95% CI = 0.7 205-194.17,提示NOD2基因3020insC移码突变是CD的危险因素.

表2 健康对照者、UC和CD患者NOD2基因3020insC突变基因型和等位基因频率

基因型	健康对照者	UC	CD
<i>n</i>	172	74	15
野生型	171	72	14
3020insC突变杂合子	1	2	1
3020insC突变纯合子	0	0	0
3020insC等位基因频率	0.29	1.35	3.33

## 3 讨论

NOD2基因位于16q12,是近2 a发现的人类CD的第一个易感基因.1996年Hugot et al<sup>[7]</sup>通过对IBD患者家系的连锁分析,发现第16条染色体着丝点附近的CD易感位点,称位IBD1.2001年,Hugot et al<sup>[1]</sup>在IBD1区域,对含有D16S3136微卫星标记的细菌人造染色体克隆进行测序,发现在该序列上,R702W,G908R,1007fs单核苷酸多态性(分别以SNP8,12,13表示),与CD有显著相关性.在与人类白细胞cDNA库相比后,发现了人类的第一个CD易感基因NOD2,现命名为CARD15基因. NOD2蛋白质是调节细胞凋亡的超家族CED4/APAF1的成员,由1 013个氨基酸组成,包括两个N末端caspase补充区域(N-terminal caspase recruitment domains, CARD),一个核苷酸结合区域(a nucleotide-binding domain, NBD),一个由多个C末端富含亮氨酸的重复组成的区域(multiple C-terminal leucine rich repeats, LRR区域). NOD2在单核细胞表达,在细胞质中对来源于细菌的致病成分起作用. LRR区域具有结合细菌LPS的活性,激活NF- $\kappa$ B信号通道. NOD2基因LRR区域的3020insC移码突变,使NOD2蛋白LRR区域发生Leu1007Pro氨基酸互换,终止密码子提前,最后33个氨基酸丢失,导致NF- $\kappa$ B活性减弱.由于NOD2的缺失导致CD患者对细菌产物的先天性免疫反应减弱,从而过度激活特异性继发性免疫反应,导致CD发生<sup>[8]</sup>. CD患者小肠黏膜和潘氏细胞可检测到NOD2的表达,支持NOD2与CD相关的结论<sup>[9-10]</sup>. Ogura et al<sup>[2]</sup>同时发现这三个基因多态性与CD呈显著性相关,以3020insC移码突变与CD的相关性最为密切,而且在功能上证实是CD的易感基因.一些在英国和德国人等的研究<sup>[11]</sup>证实NOD2的3020insC移码突变与CD相关,但Yamazaki et al<sup>[3]</sup>以及Leong et al<sup>[4]</sup>对日本人和中国香港人CD患者、UC患者以及健康对照者的研究,未发现NOD2基因的突变. NOD2的3020insC移码突变在不同人群中频率不同,可能与种族差异有关.

本研究采用特异性等位基因PCR方法,检测中国湖北汉族74例UC、15例CD以及172例正常对照者

NOD2 基因的 3020insC 突变频率, 未发现正常对照组 3020insC 移码突变频率与 UC 及 CD 患者有显著性差异, 提示在中国湖北汉族人中 NOD2 基因 3020insC 移码突变与 UC 及 CD 无显著相关性, 不可能是 CD 的易感基因, 与日本人<sup>[3]</sup>及中国香港人<sup>[4]</sup>的结果一致. 但 CD 对比健康对照组的  $P=11.828$ ,  $95\% \text{ CI}=0.7 \text{ } 205-194.17$ , 提示 NOD2 基因 3020insC 移码突变是 CD 的危险因素. 由于本组 CD 患者病例较少, 有待进一步证实.

NOD2 作为所发现的人类第一个 CD 易感基因, 将 CD 的遗传易感性、机体的先天性免疫与细菌作用有机的联系起来, 在治疗 CD 的策略上重视细菌的作用. 目前, 尚未在亚洲人群中发现 NOD2 的基因突变与 CD 之间存在显著相关性的报道, 提示 IBD, 特别是 CD 涉及多基因的遗传模式, 在不同地区和人群具有明显的种族差异性.

#### 4 参考文献

- 1 Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cezard JP, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O' Morain CA, Gassull M, Binder V, Finkel Y, Cortot A, Modigliani R, Laurent-puig P, Gower-Rousseau C, Macry J, Colombel JF, Sahbatou M, Thomas G. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411:599-603
- 2 Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, Britton H, Moran T, Karaliuskas R, Duerr RH, Achkar JP, Brant SR, Bayless TM, Kirschner BS, Hanauer SB, Nunez G, Cho JH. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411:603-606
- 3 Yamazaki K, Takazoe M, Tanaka T, Kazumori T, Nakamura Y. Absence of mutation in the NOD2/CARD15 gene among 483 Japanese patients with Crohn's disease. *J Hum Genet* 2002;47:469-472
- 4 Leong RW, Armuzzi A, Ahmad T, Wong ML, Tse P, Jewell DP, Sung JJ. NOD2/CARD15 gene polymorphisms and Crohn's disease in the Chinese population. *Aliment Pharmacol Ther* 2003;17:1465-1470
- 5 Ogura Y, Inohara N, Benito A, Chen FF, Yamaoka S, Nunez G. Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF- $\kappa$ B. *J Biol Chem* 2001;276:4812-4818
- 6 中华医学会消化病学分会. 对炎症性肠病诊断治疗规范的建议. *中华消化杂志* 2001;21:236-239
- 7 Hugot JP, Laurent-puig P, Gower-Rousseau C, Olson JM, Lee JC, Beaugier L, Naom I, Dupas JL, Van Gossum A, Groupe d' Etude Therapeutique des Affections Inflammatoires Digestives, Orholm M, Bonaiti-pellie C, Weissenbach J, Mathew CG, Lennard-Jones JE, Cortot A, Colombel JF, Thomas G. Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16. *Nature* 1996;379:821-823
- 8 夏冰, 邓长生, Pena AS. 克罗恩病的第一个易感基因, NOD2 (CARD15). *中华消化杂志* 2002;22:307-308
- 9 Berrebi D, Maudinas R, Hugot JP, Chamaillard M, Chareyre F, De Lagausie P, Yang C, Desreumaux P, Giovannini M, Cezard JP, Zouali H, Emilie D, Peuchmaur M. Card15 gene overexpression in mononuclear and epithelial cells of the inflamed Crohn's disease colon. *Gut* 2003;52:840-846
- 10 Lala S, Ogura Y, Osborne C, Hor SY, Bromfield A, Davies S, Ogunbiyi O, Nunez G, Keshav S. Crohn's disease and the NOD2 gene: a role for paneth cells. *Gastroenterology* 2003;125:47-57
- 11 Hampe J, Cuthbert A, Croucher PJ, Mirza MM, Mascheretti S, Fisher S, Frenzel H, King K, Hasselmeier A, Macpherson AJ, Bridger S, Van Deventer S, Forbes A, Nikolaus S, Lennard-Jones JE, Foelsch UR, Krawczak M, Lewis C, Schreiber S, Mathew CG. Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations. *Lancet* 2001;357:1925-1928

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

## 高效液相色谱法测定人胃黏膜中 $\gamma$ - 氨基丁酸和谷氨酸含量

朱人敏, 秦苏堤, 何小平, 汪芳裕, 李 宁, 刘福坤

朱人敏, 秦苏堤, 何小平, 汪芳裕, 南京军区南京总医院消化内科 江苏省南京市 210002  
李宁, 刘福坤, 南京军区南京总医院普通外科 江苏省南京市 210002  
项目负责人: 朱人敏, 210002, 江苏省南京市中山东路 305 号, 南京军区南京总医院消化内科. wangf65@yahoo.com  
电话: 025-80861126  
收稿日期: 2003-11-13 接受日期: 2004-02-01

#### 摘要

目的: 建立一种可同时测定胃黏膜组织微量  $\gamma$ - 氨基丁酸 (GABA) 和谷氨酸 (Glu) 含量的高效液相色谱法.

方法: 用异硫氰酸苯酯 (PITC) 作衍生剂, 色谱柱为 Pico/Tag® 氨基酸专用柱, 梯度洗脱, 紫外检测波长 254 nm.

结果: GABA 在 0.125-6.25 nmol/mL 范围, Glu 在 0.025-

2.5  $\mu$ mol/mL 范围, 线性关系良好; GABA 和 Glu 加样回收率分别为 90.4-104%, 88.1-105.5%; 批内误差分别为 3.56%, 和 1.12%; 批间误差分别 7.47% 和 5.98%.

结论: 本法稳定、灵敏, 可用于胃黏膜组织 GABA 和 Glu 含量的检测.

朱人敏, 秦苏堤, 何小平, 汪芳裕, 李宁, 刘福坤. 高效液相色谱法测定人胃黏膜中  $\gamma$ - 氨基丁酸和谷氨酸含量. 世界华人消化杂志 2004;12(5):1210-1213  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1210.asp>

#### 0 引言

$\gamma$ - 氨基丁酸 ( $\gamma$ -aminobutyric acid, GABA) 主要来源于三羧酸循环中的谷氨酸 (Glu), 是一种重要的抑制性神经

递质,广泛存在于脊椎动物脑内,外周组织中含量很低<sup>[1-3]</sup>.近年来研究表明:GABA除了作为胃肠神经递质,还有可能作为一种胃肠激素<sup>[4]</sup>,协同Glu,参与胃肠黏膜细胞分裂、分化、成熟的调节<sup>[5]</sup>,抑制胃癌的发生<sup>[4]</sup>.随着GABA、Glu与胃癌关系研究的不断深入,要求建立一种快速、精确定量胃黏膜组织GABA、Glu含量的方法.

国外已有文献报道,应用荧光分光光度法测定人胃黏膜组织GABA含量,但灵敏度较低,干扰因素较多<sup>[5]</sup>.本文首次采用异硫氰酸苯酯(PITC)柱前衍生,高效液相色谱(HPLC)-紫外检测法测定胃黏膜组织GABA、Glu含量.国内外未见此类报道.该法的优点是PITC与氨基酸反应生成能在254 nm下检测的PITC-氨基酸<sup>[6-11]</sup>,分析速度快,灵敏度高,结果令人满意.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** Waters高效液相色谱仪系统(美国Waters公司),其中包括510泵两台,486紫外检测器,自动梯度控制器,控温仪及柱温箱;Pico/Tag<sup>TM</sup>工作台;7725 i进样阀(美国Rheodyne公司);色谱工作站(杭州英谱公司). $\gamma$ -氨基丁酸和谷氨酸:美国Sigma公司;衍生剂异硫氰酸苯酯(PITC):美国Pierce公司;乙腈、甲醇均为色谱纯;德国Merck公司;乙酸钠为分析纯;英国普尔BDH化学公司;其余试剂均为市售分析纯试剂,水为重蒸馏水.

**1.2 方法**

**1.2.1 色谱条件** 色谱柱:Pico/Tag<sup>®</sup>氨基酸专用柱,3.9 mm $\times$ 300 mm;流动相:流动相A为乙腈:70 mmol/L<sup>-1</sup>醋酸缓冲液(pH 6.5)=25:975,含0.25 mL/L<sup>-1</sup>的10 mmol/L<sup>-1</sup> EDTA;流动相B为乙腈:水:甲醇=450:400:150.梯度洗脱条件如表1.紫外检测波长254 nm;柱温45 $^{\circ}$ C;进样量20  $\mu$ L.

表1 梯度洗脱程序表

时间(min)	流动相(mL/min <sup>-1</sup> )	A%	B%	曲线
起始	1.00	100	0	-
13.50	1.00	97	3	11
20.00	1.00	96	4	8
20.50	1.00	20	80	5
22.50	1.00	0	100	6
23.00	1.00	100	0	6
30.00	1.00	100	0	6

**1.2.2 溶液配制** 样品稀释液:5  $\mu$ mol/L<sup>-1</sup>的Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>缓冲溶液,pH 7.4.样品干燥液:甲醇:1.0 mol/L<sup>-1</sup>醋酸钠:三乙胺=2/2/1(v/v/v).衍生化试剂:异硫氰酸苯酯(PITC):甲醇:乙醇:三乙胺:水=1/6/1/1/1 (v/v/v/v);需新鲜配制.

**1.2.3 标本收集及样品前处理** 于手术当天取胃癌组织标本(约100 mg),同时取距癌组织边缘5 cm以上的胃

黏膜组织作为对照,并经病理证实为癌组织和正常组织,迅速放入液氮中冷冻,再转移至-70 $^{\circ}$ C冰箱保存至测定.测定时,称取100 mg左右的胃黏膜组织置小研钵中,倒入液氮,待组织冷却坚硬后进行研磨,粉碎后再加入液氮研磨,如此反复3次,使组织完全粉碎.加入400  $\mu$ L的样品稀释液将粉碎的组织完全转移到离心管中,1 000 r/min,4 $^{\circ}$ C离心5 min,上清液转移到超滤管中,1 000 r/min,4 $^{\circ}$ C离心30 min.

**1.2.4 样品衍生化** 取超滤液20  $\mu$ L注入0.5 cm $\times$ 5 cm的玻璃试管中,冷冻干燥,然后加入干燥液10  $\mu$ L,再一次冻干,再加入20  $\mu$ L衍生化试剂,室温衍生20 min后经冻干置冰箱4 $^{\circ}$ C保存.50  $\mu$ L样品稀释液复溶,10  $\mu$ L或20  $\mu$ L进样.

## 2 结果

**2.1 色谱行为** 图1为Glu与GABA标准色谱图,各自的保留时间分别为Glu=3.98 min, GABA=16.7 min.图2为样品色谱图,从色谱图可知,该方法能很好的分离Glu与GABA.

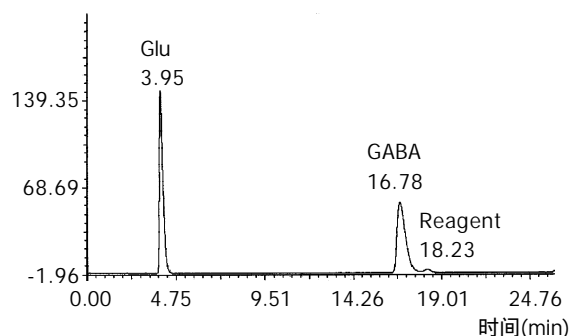


图1 标准品色谱图.

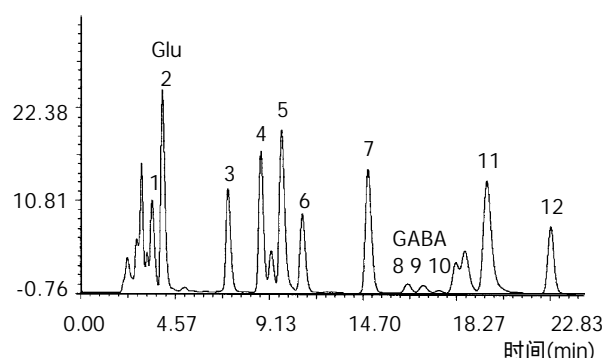


图2 样品色谱图.

**2.2 标准曲线** 分别精密配制Glu和GABA标准溶液,使其含量为Glu:0.025,0.05,0.1,0.25,0.5,1,2.5  $\mu$ mol/mL<sup>-1</sup>; GABA:0.125,0.25,0.625,1.25,2.5,6.25 nmol/mL<sup>-1</sup>.按照样品衍生步骤衍生并HPLC测定,以峰面积对质量浓度作线性回归,其线性方程为:Glu  $Y=1.58 \times 10^6 C + 18027$ ,相关系数0.9998;最小检测浓度2.5 nmol/mL<sup>-1</sup>. GABA  $Y=3\,723.3C - 547.8$ ,相关系数0.9988;最小检测浓度0.01 nmol/mL<sup>-1</sup>.

**2.3 回收率** 在混合样品超滤液中加入Glu和GABA标

准溶液,用加样回收方法考察方法的准确度.  $\gamma$ -氨基丁酸和谷氨酸加样回收率分别为 95.4%, 93.5%(表 2).

表 2 方法回收率(mean $\pm$ SD)

	样品测定值	加入量	测定值	回收率(%)
GABA (nmol/mL <sup>-1</sup> )	0.318 $\pm$ 0.013	0.5	0.852 $\pm$ 0.014	106.8 $\pm$ 3.0
		0.75	1.057 $\pm$ 0.082	95.3 $\pm$ 5.3
Glu ( $\mu$ mol/mL <sup>-1</sup> )	0.310 $\pm$ 0.005	0.5	0.837 $\pm$ 0.049	105.5 $\pm$ 13.1
		1	1.234 $\pm$ 0.036	92.5 $\pm$ 4.4
		5	4.825 $\pm$ 0.134	92.1 $\pm$ 1.4

2.4 精密度 同时取某一样品超滤液三份,按衍生化法处理测定, GABA和Glu的批内误差分别为3.56%, 1.12%. 不同日取样三次, 如上处理求得 GABA 和 Glu 的批间误差分别 7.47%, 5.98%.

2.5 临床应用 用该法测定了 30 例胃癌手术患者癌组织和正常组织的 GABA 和 Glu 含量, 胃癌组织 GABA 和 Glu 含量显著高于正常组织( $P < 0.05$ , 表 3). 这一现象值得引起临床重视, 可以为胃癌的临床诊断和治疗提供参考.

表 3 胃癌组织与正常胃黏膜组织 GABA 和 Glu 含量(mean $\pm$ SD,  $n = 30$ )

氨基酸	癌组织	正常组织	t	P
GABA(nmol/g <sup>-1</sup> )	0.832 $\pm$ 0.576	0.362 $\pm$ 0.417	3.29	<0.05
Glu ( $\mu$ mol/g <sup>-1</sup> )	1.324 $\pm$ 0.596	0.907 $\pm$ 0.342	2.90	<0.05

### 3 讨论

GABA、Glu 在胃黏膜组织含量极低, 不具有紫外吸收, 也不发射荧光, 因此需将他们转变为能被检测的高灵敏度衍生化产物<sup>[6-11]</sup>. 本文用 PITC 作衍生剂与胃黏膜组织中的氨基酸反应, 衍生物经 HPLC 分离后紫外检测, 建立了一种更简便、更灵敏的方法, 适于检测胃黏膜组织的微量 GABA、Glu.

本法的优点: (1)组织样品处理时, 采用液氮冷冻碾磨法碾碎胃黏膜组织, 该法比电动匀浆或超声匀浆法使组织粉碎更加完全, 而且简单易行; 易于推广. (2)组织衍生前, 采用超滤法去除蛋白, 不但去除完全, 回收率高, 样品也没有被稀释, 对于含量极低的氨基酸分析是一个非常有效的手段, 但美中不足的是成本较高, 需要超速冷冻离心机. (3)组织衍生时, 采用 PITC 作为氨基酸衍生剂, 具有稳定, 不会产生水解反应, 也不会形成多级衍生物的优点<sup>[6-11]</sup>, 但有时过量试剂会产生干扰. 本法除了采用在衍生化后真空干燥除去过量试剂外, 还通过调节流动相梯度, 使试剂峰与样品峰分离完全. (4)色谱分析时, 采用 Pico/Tag® 氨基酸专用柱, 他是 Waters 公司的专利产品, 可非常好的分离 PTC- 氨基酸, 可同时分析 18 种常用氨基酸, 但有报道柱寿命短, 最多能分析 150 个 PITC 样品. 在我们实际工作中采用前

处理干燥完全, 乙腈冲洗再生方法, 实际分析样品可达到约 500 个. (5)实际操作时, 采用 40.0  $\pm$  0.5  $^{\circ}$ C 柱温, 提高柱温能缩短保留时间, 降低柱压, 但过高的柱温会减少分离度, 使  $\gamma$ -氨基丁酸与在其后出现的瓜氨酸以及衍生剂峰重合, 因此使柱温保持在 40.0  $\pm$  0.5  $^{\circ}$ C 为最佳.

生物样品中微量氨基酸的测定在医学领域中占重要地位, 经典的氨基酸分离方法是离子交换色谱法, 此法需特殊装置, 且分析时间较长, 而荧光分光光度法和氨基酸自动分析仪检测, 灵敏度较低, 干扰因素较多. 测定 GABA 和 Glu 的高效液相色谱方法, 多为用邻苯二甲醛在催化剂作用下与氨基酸发生衍生化反应, 衍生物经 HPLC 分离, 电化学检测或荧光检测器检测, 并且分析对象为含量较高的脑组织和血清<sup>[12-15]</sup>. 本文采用 PITC 为柱前衍生剂, 配合紫外检测仪, 建立了一种高效、稳定、简便、快捷的 HPLC 梯度洗脱方法. 该法条件简便、灵敏度高, 分离周期短, 适于检测胃黏膜组织中微量的 GABA、Glu, 应用前景广泛.

### 4 参考文献

- Hinoi E, Takarada T, Ueshima T, Tsuchihashi Y, Yoneda Y. Glutamate signaling in peripheral tissues. *Eur J Biochem* 2004; 271:1-13
- Watanabe M, Maemura K, Kanbara K, Tamayama T, Hayasaki H. GABA and GABA receptors in the central nervous system and other organs. *Int Rev Cytol* 2002;213:1-47
- Kuroda E, Watanabe M, Tamayama T, Shimada M. Autoradiographic distribution of radioactivity from (14)C-GABA in the mouse. *Microsc Res Tech* 2000;48:116-126
- Tatsuta M, Iishi H, Baba M, Nakaizumi A, Ichii M, Taniguchi H. Inhibition by gamma-amino-n-butyric acid and baclofen of gastric carcinogenesis induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in Wistar rats. *Cancer Res* 1990;50:4931-4934
- Matuszek M, Jesipowicz M, Kleinrok Z. GABA content and GAD activity in gastric cancer. *Med Sci Monit* 2001;7:377-381
- Rubio LA. Determination of diaminopimelic acid in rat feces by high-performance liquid chromatography using the Pico Tag method. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2003;784:125-129
- Komarova NV, Kammentsev JS, Solomonova AP, Anufrieva RM. Determination of amino acids in fodders and raw materials using capillary zone electrophoresis. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2004;800:135-143
- Dale Y, Mackey V, Mushi R, Nyanda A, Maleque M, Ike J. Simultaneous measurement of phenylalanine and tyrosine in phenylketonuric plasma and dried blood by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2003;788:1-8
- Yang J, Sun LG, Bai XZ, Zhou HT. Simultaneous determination of 18 amino acids by reversed-phase high performance liquid chromatography with precolumn phenylisothiocyanate derivatization. *Se Pu* 2002;20:369-371
- Woo KL, Hwang QC, Kim HS. Determination of amino acids in the foods by reversed-phase high-performance liquid chromatography with a new precolumn derivative, butylthiocarbamyl amino acid, compared to the conventional phenylthiocarbamyl derivatives and ion-exchange chromatography. *J Chromatogr A* 1996;740:31-40
- Brennan JM, O' Dwyer PJ, Ozols RF, LaCreta FP. High-performance liquid chromatographic determination of the S- and R-diastereoisomers of L-buthionine (SR)-sulfoximine in human plasma and urine. *J Chromatogr* 1993;620:121-128

- 12 Rowley HL, Martin KF, Marsden CA. Determination of in vivo amino acid neurotransmitters by high-performance liquid chromatography with o-phthalaldehyde-sulphite derivatisation. *J Neurosci Methods* 1995;57:93-99
- 13 Smith S, Sharp T. Measurement of GABA in rat brain microdialysates using o-phthalaldehyde-sulphite derivatization and high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J Chromatogr* 1994;652:228-233
- 14 Naini AB, Vontzalidou E, Cote LJ. Isocratic HPLC assay with electrochemical detection of free gamma-aminobutyric acid in cerebrospinal fluid. *Clin Chem* 1993;39:247-250
- 15 Bourdelais A, Kalivas PW. High sensitivity HPLC assay for GABA in brain dialysis studies. *J Neurosci Methods* 1991;39:115-121

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

## 细胞凋亡蛋白在肝癌发生过程中的作用

白莉, 曹传平, 张映辉, 毛高平

白莉, 曹传平, 张映辉, 毛高平, 中国人民解放军空军总医院消化内科北京市 100036  
项目负责人: 白莉, 100036, 北京市海淀区阜成路 30 号, 中国人民解放军空军总医院. bai\_li@hotmail.com  
收稿日期: 2003-11-18 接受日期: 2004-02-01

### 摘要

目的: 进一步探讨促凋亡蛋白 Bid 在肝癌发生、发展过程中的作用。

方法: 应用基因毒性化学剂二乙基亚硝胺(diethylnitrosamine, DEN)制备肝癌动物模型, 通过阻断肝细胞凋亡信号传导途径, 观察肝癌发生过程中肝细胞的增生指数(BrdU LI)与凋亡比率(AI)及与肿瘤发生的关系。

结果: (1)在 DEN 用药后的第 3 d 和第 10 d, 野生型小鼠肝细胞 BrdU 标记指数和凋亡细胞百分比分别明显高于 Bid 缺陷小鼠( $P < 0.05$ )。 (2)在 DEN 用药后的第 4 mo, 野生型小鼠肝内损伤性结节的数量和表面积明显多于 Bid 缺陷小鼠, 二者间具有统计学意义( $P < 0.001$ )。

结论: Bid 缺陷小鼠对 DEN 诱导的肝癌具有明显的抵抗作用, 这一作用可能与早期肝细胞凋亡有关。

白莉, 曹传平, 张映辉, 毛高平. 细胞凋亡蛋白在肝癌发生过程中的作用. 世界华人消化杂志 2004;12(5):1213-1215

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1213.asp>

### 0 引言

细胞增生和凋亡之间的失平衡是肿瘤发生最根本的原因。细胞对任何包括化学、物理和生物的有害刺激的反应是通过自身修复、死亡、再增生等方式使机体恢复自身平衡, 细胞在损伤修复过程中的错误修复导致基因的突变使细胞获得了异常增生能力, 便发生了肿瘤。实际上, 肿瘤组织内细胞增生和凋亡比率均较正常状态的组织有明显增加, 而增生比率高于凋亡。Bid 是 Bcl-

2 家族成员中一个促凋亡蛋白, 通过死亡受体激活细胞凋亡, 尤其是肝细胞的凋亡过程。我们应用化学致癌模型和 Bid 缺陷小鼠研究细胞凋亡在肝癌发生的早期作用, 设想是早期凋亡刺激细胞增生, 发生基因变异的细胞较正常细胞具有明显的增生优势, 通过比较野生型和 Bid 缺陷鼠对 DEN 诱导致癌损伤的反应和观察细胞增生和凋亡的比率进一步探讨肝癌发生的机制。

### 1 材料和方法

1.1 材料 ♂ C57BL/6 小鼠, 野生型和 Bid 缺陷型各 14 只 (由美国匹斯堡大学病理系荫博士提供), 分别分为 DEN 组 and 对照组。DEN 组小鼠出生后第 14 d 腹腔内注射 DEN 15  $\mu\text{g/g}$ , 对照组注射同体积的生理盐水, 饲养 3、10 d 和 4 及 8 mo 分别杀鼠, 在杀鼠前 2 h 腹腔注射 30 mg/kg BrdU (Sigma, 美国), 收集肝组织标本分别放置液氮中或制备石蜡切片。

#### 1.2 方法

1.2.1 肝细胞凋亡和增生的检测 采用 TUNEL 试剂盒 (Roche, 美国) 检测肝细胞的凋亡, 操作按照说明。细胞增生的检测应用抗 BrdU 单克隆抗体 (Dako 公司, 美国) 进行免疫组化染色。

1.2.2 特殊酶学染色 葡萄糖-6-磷酸酶 (G-6-Pase) 染色: 冰冻肝组织切片戊二醛固定后用 2 g/L 硝酸银和 0.53 g/L G-6-Pase 共同孵育 45 min, 然后用 75 g/L 硫酸铵孵育 2 min, 水洗后用戊二醛和冰醋酸按一定比例混合固定, HE 染色封片。GST-pi 染色: 采用兔抗鼠 GST-pi 多克隆抗体 (StressGen, 美国) 进行免疫组化染色。

1.2.3 肝细胞损伤结节或肝肿瘤 HE 染色的肝组织切片在显微镜下观察和计数肝损伤或肝肿瘤结节的数量, 应用 SPOT 软件计量结节的面积, 求结节面积与全肝面积的比值。

统计学处理 细胞增生及凋亡指数和肝损伤结节的数量及平均面积采用 Student t 检验,  $P$  值小于 0.05 为



有显著差异。

## 2 结果

**2.1 肝损伤结节的形态学及酶学特点** 在DEN暴露第4 mo时显微镜下有4种不同改变: (1)嗜碱性结节, 细胞体积小于正常, 核大, 核/浆比率增加, 糖原减少, 核糖体丰富. (2)空泡细胞, 细胞肿胀, 空泡变性, 体积稍大, 有脂肪积累和糖原丢失. (3)嗜酸细胞, 细胞内富含糖原, 浆内大量的嗜伊红染色. (4)储脂细胞, 胞质内较多脂滴. 此外, 可在癌变前结节发现较多卵圆细胞. 除嗜伊红结节外, 绝大部分结节呈GST-pi染色阴性, 所有结节G-6-Pase染色呈阴性. 在DEN处理8 mo后, 大部分结节周边有明显边界, 结节明显增大, 形成腺瘤样结构, 部分结节内肝细胞核深染, 可见有丝分裂征象, 细胞排列为多层结构, 具备了肝癌的形态学特征. 在对照动物未发现肝损伤结节或肿瘤.

**2.2 肝损伤结节面积及数量的测定** 肝内结节的面积单位为 $\mu^2$ , 全肝面积单位为 $\text{mm}^2$ , 分别将结节的数量及所占全肝面积比率在相同处理时间不同基因表型间进行统计学比较(表1). 在DEN处理4 mo后, 肝内结节数量及面积在野生鼠明显多于Bid缺陷鼠( $P < 0.05$ ), 但8 mo后, 肝结节在基因表型间的差异消失.

表1 DEN体内诱导肝损伤结节的效果

基因表型	<i>n</i>	DEN 暴露时间	平均结节面积 / 全肝面积( $\mu^2/\text{mm}^2$ )	平均结节数
野生型	10	4 mo	572 570.4 $\pm$ 63 242.6 <sup>a</sup>	3.6 $\pm$ 2.065 <sup>b</sup>
Bid 缺陷型	12	4 mo	79 723.6 $\pm$ 10 771.1	1.0 $\pm$ 0.577
野生型	11	8 mo	6.29e+07 $\pm$ 1.33e+0	10.27 $\pm$ 7.52
Bid 缺陷型	13	8 mo	2.14e+07 $\pm$ 2.14e+07	9.02 $\pm$ 4.23

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs Bid 缺陷型动物.

**2.3 肝细胞增生及凋亡测定** DEN处理后第3、10 d和第4、8 mo, 肝组织标本分别进行BrdU和TUNEL染色, 显微镜下计数每1 000个细胞中的阳性细胞数, 得出细胞增生标记指数(BrdU LI)和凋亡比率(AI). 结果显示, DEN暴露后3 d, 野生鼠细胞凋亡数明显高于Bid基因缺陷鼠; 但BrdU标记指数在两组间无显著差异, 均接近于对照组; 10 d后细胞凋亡在野生鼠仍明显高于Bid基因缺陷鼠, 但与第3 d水平比较无明显改变, 而在Bid基因缺陷鼠则有显著下降, 接近对照组; 此时BrdU标记指数在野生鼠显著升高, 而Bid基因缺陷鼠仍接近对照组, 组间差异明显. 提示DEN暴露后, 肝脏对损伤的反应是发生细胞凋亡, 肝细胞数量的减少继发细胞大量增生. 在DEN处理后4和8 mo再次检测BrdU标记指数发现, 野生鼠肝结节外BrdU标记指数仍显著高于Bid缺陷型, 而在8 mo肝结节内比较, 两组则无明显差异(表2).

表2 DEN肝细胞增生及凋亡指数的测定(mean $\pm$ SD)

表型	<i>n</i>	DEN 暴露时间	AI	LI
Bid 缺陷型	3	3 d	11.04 $\pm$ 2.97	33.5 $\pm$ 8.89
野生型	3	3 d	19.83 $\pm$ 3.21 <sup>a</sup>	34 $\pm$ 6.66
Bid 缺陷型	3	10 d	7.71 $\pm$ 3.21	24.5 $\pm$ 5.47
野生型	3	10 d	16.21 $\pm$ 3.24 <sup>a</sup>	54.06 $\pm$ 11.99 <sup>a</sup>
Bid 缺陷型	11	4 mo	n.d.	1.42 $\pm$ 0.55
野生型	7	4 mo	n.d.	3.07 $\pm$ 1.77 <sup>a</sup>
Bid 缺陷型	8	8 mo	n.d.	1.05 $\pm$ 0.50(OF)
野生型	8	8 mo	n.d.	1.97 $\pm$ 0.47(OF) <sup>a</sup>
Bid 缺陷型	8	8 mo	n.d.	10.12 $\pm$ 5.60(IF)
野生型	8	8 mo	n.d.	11.61 $\pm$ 4.77(IF)

<sup>a</sup> $P < 0.01$  vs Bid 缺陷型动物; n.d., 未测定; OF, 肝外结节; IF, 肝内结节.

## 3 讨论

普遍认为: 肿瘤的发生是异常细胞失去了对凋亡信号的反应, 使这部分细胞获得不死性或生存期明显延长, 细胞增生比例大于细胞死亡, 二者之间失去平衡. Schult-Hermann et al 少数人<sup>[1-3]</sup>近年提出了一些不同的观点, 癌前病变的细胞对细胞凋亡信号刺激是有反应的, 细胞增生和凋亡相互间有联系, 二者在肝肿瘤发生过程中均有增高, 二者间的比率调节着细胞向恶性变发展. Grasl-Kraupp et al<sup>[3]</sup>报道肿瘤细胞较周围正常细胞的增生和凋亡率分别高出24倍和7.5倍, 在肿瘤发生过程中伴有选择性细胞增生和死亡. 本文结果显示, 在DEN暴露的较早期, 野生小鼠肝细胞凋亡指数和增生率均高出Bid缺陷小鼠2倍; 在DEN暴露后4 mo, 野生小鼠肝内癌前损伤结节的平均数量和面积也较Bid缺陷小鼠明显增多, 从DEN暴露后4和8 mo的标本中可以观察到癌前结节向癌变进展的质变过程. 对于DEN暴露8 mo后, 野生和Bid缺陷型小鼠在肝内癌前结节和肿瘤数量及面积之间差异不再有明显区别的解释, 目前尚无一个客观明确的认识. 根据肝细胞凋亡特点分析, 在DEN刺激下, 肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )受体首先被激活, 导致Caspase 8的活化, 后者水解Bid使之活化后诱导一系列参与凋亡的酶学反应, 最后发生肝细胞凋亡. 细胞的凋亡诱导了细胞增生, 而发生DNA损伤的肝细胞较正常肝细胞具有更大的增生潜力, 形成有遗传物质改变的、生长力旺盛的细胞克隆, 也就是癌前结节. 这一解释受到Knight et al<sup>[4]</sup>研究结果的支持, 他们发现在TNF受体1缺乏的鼠暴露于肝脏的致癌剂后, 肝脏卵圆细胞, 有人认为是具有增生潜力或癌变前的细胞受到损伤, 其致瘤性明显减弱. 因此他们认为TNF受体途径参与肝癌发生过程中癌前卵圆细胞的增生. TNF受体的作用是通过诱导凋亡还是其他机制有待于进一步证实. 然而, 在肝癌发生过程中由于细胞凋亡和增生均有增加, 因此他们之间的关系是十分复杂的, 在癌发生



的不同阶段他们之间的关系也可能会发生不同的改变. 我们的结果提示细胞凋亡对增生的刺激也许仅发生在肝癌发生的早期, 在肿瘤发展过程中其他因素参与, 或同一种蛋白还有其他功能, 如 Bid 是否还参与细胞周期的调节等, 有可能使其在肿瘤发生过程中的作用发生改变, 需进一步进行研究.

#### 4 参考文献

- 1 Grasl-Kraupp B, Ruttkay-Nedecky B, Mullaer L, Taper H, Huber W, Bursch W, Schult-Hermann R. Inherent increase of

- apoptosis in liver tumors: Implications for carcinogenesis and tumor regression. *Hepatology* 1997;25:906-912
- 2 Fausto N. Mouse Liver Tumorigenesis: Models, Mechanisms and relevance to human disease. *Seminars Liver Dis* 1999;19: 243-252
- 3 Grasl-Kraupp B, Rossmanith W, Ruttkay-Nedecky B, Mullaer L, Kammerer B, Bursch W, Schult-Hermann R. Levels of transforming growth factor beta and transforming growth factor beta receptors in rat liver during growth, regression by apoptosis and neoplasia. *Hepatology* 1998;28:717-726
- 4 Knight B, Yeoh GC, Husk KL, Ly T, Abraham LJ, Yu C, Rhim JA, Fausto N. Impaired preneoplastic changes and liver tumor formation in tumor necrosis factor receptor type 1 knock-out mice. *J Exp Med* 2000;192:1809-1818

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

## 硒蛋氨酸对食管癌细胞株增生的影响

陈滋华, 吴清明, 谢国建, 王晓虎, 于皆平

陈滋华, 吴清明, 谢国建, 王晓虎, 鄱阳医学院附属太和医院消化内科 湖北省十堰市 442000

于皆平, 武汉大学人民医院消化内科 湖北省武汉市 430000

项目负责人: 陈滋华, 442000, 湖北省十堰市, 鄱阳医学院附属太和医院消化内科. pollex001163@com

电话: 0719-8801431 传真: 0719-8883809

收稿日期: 2003-11-18 接受日期: 2004-01-08

### 摘要

目的: 探讨硒蛋氨酸对食管癌细胞系EC9706增生的影响.

方法: 通过MTT比色法、细胞生长曲线描绘研究硒蛋氨酸对食管癌细胞系EC9706增生的影响, 采用流式细胞仪观察硒蛋氨酸诱导EC9706细胞凋亡的作用及对细胞周期的影响.

结果: 硒蛋氨酸呈时间、剂量依赖性方式抑制EC9706细胞增生, 改变细胞周期分布, 增加G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期细胞比例, 诱导细胞凋亡.

结论: 硒蛋氨酸可能通过影响细胞周期分布和诱导细胞凋亡, 来抑制EC9706细胞增生. 硒蛋氨酸可能是预防和治疗食管癌的一种新方法.

陈滋华, 吴清明, 谢国建, 王晓虎, 于皆平. 硒蛋氨酸对食管癌细胞株增生的影响. 世界华人消化杂志 2004;12(5):1215-1217

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1215.asp>

### 0 引言

食管癌在我国是常见病, 严重威胁着人类的生命健康, 其发生、发展涉及多个基因及分子水平的变化, 目前无论是传统手术还是化疗及放疗都未能取得满意的疗

效<sup>[1-13]</sup>. 因此, 有必要寻找新的防治方法. 大量流行病学和临床研究发现, 微量元素硒与肿瘤的发生呈负相关性. 硒是人体所必需的微量元素, 在生命过程中发挥着重要作用, 本研究的目的在于观察硒蛋氨酸对体外培养食管癌细胞系EC9706生长的影响, 为探讨其对食管癌防治作用提供理论依据.

### 1 材料和方法

1.1 材料 主要试剂: RPMI-1640培养基, 小牛血清, 胰蛋白酶、蛋氨酸为Gibco公司产品; MTT、DMSO、硒蛋氨酸(selenomethionine)为sigma公司产品. 仪器设备: 恒温CO<sub>2</sub>培养箱(SanyD 日本), 倒置显微镜(Olympus IX-70)、酶联免疫检测仪( $\Sigma$  960 美国), 流式细胞仪(Epics XL, Beckman coulter 公司). 细胞系: 人食管癌细胞系EC9706由中国医学科学院王明荣教授惠赠.

### 1.2 方法

1.2.1 细胞培养 食管癌细胞EC9706常规培养于含10%小牛血清、100 U/mL青霉素及100 U/mL链霉素的RPMI-1640培养基中, 置于37℃ 5% CO<sub>2</sub>培养箱内培养.

1.2.2 硒蛋氨酸对食管癌细胞EC9706生长的影响 取对数生长期的食管癌细胞EC9706按每孔 $1 \times 10^4$ 个细胞/mL接种于96孔培养板中, 24 h后换液, 加入不同浓度硒蛋氨酸100、200、300、400、500  $\mu$ mol/mL设不接种细胞的空白对照组和只加入等体积溶剂DMSO的对照组. 每组浓度每个时间点设8个复孔, 继续培养, 于第24、48、72、96 h每孔加入MTT溶液(5 mg/mL)10  $\mu$ L, 37℃孵育4 h后弃去上清液, 每孔加入100  $\mu$ L DMSO, 轻轻振荡10 min, 使结晶物充分溶解, 在490 nm波

长酶联免疫检测仪上测定各孔光吸收值(A值), 求其平均值, 对照组细胞存活率记为100%, 实验组按下列公式计算细胞存活率: 细胞存活率 = 实验组A值 / 对照组A值 × 100%.

1.2.3 流式细胞仪检测细胞周期分布及凋亡情况 根据MTT法测出的最佳药物浓度处理食管癌细胞EC9706, 取96 h后实验组、空白对照组及阴性对照组细胞用PBS洗涤后, 加入700 mL/L冷乙醇固定, 离心后PI染液(PI 5 mg、Rnase 2 mg、TritmX-100 1.0%, 生理盐水65 mL, 枸橼酸钠0.1 g, 加蒸馏水至100 mL) 4℃染色30 min, 用流式细胞仪检测. 选用488 nm激发波长测定样品.

1.2.4 细胞生长曲线 把细胞按 $1 \times 10^4$ 个/孔分别接种在24孔培养板中, 待细胞分别长到40-50%融合时, 按一定的MOI感染食管癌细胞EC9706, 定期消化收集细胞, 每个时间点设3个平行组, 计数取平均值及标准差, 连续计数4 d, 对照组包括加蛋氨酸阴性对照组和不加药物空白对照组.

统计学处理 所有数值均以mean±SD表示, 采用SPSS10.0统计分析软件进行t检验.

## 2 结果

2.1 MTT测定结果 各组浓度硒蛋氨酸对食管癌细胞EC9706的增生有较强的抑制作用, 与空白对照组比较差异显著( $P < 0.01$ ), 且呈现一定的浓度、时间依赖性, 结果见(表1). 当硒蛋氨酸浓度为400  $\mu\text{mol/mL}$ 处理食管癌细胞96 h, 对癌细胞增生的抑制作用最明显, 所以以下实验均以此作用浓度进行.

2.2 流式细胞仪分析凋亡细胞的结果 食管癌细胞EC9706经400  $\mu\text{mol/mL}$ 硒蛋氨酸处理96 h后行流式细胞仪分析, 在 $G_1$ 期前出现一个二倍体峰,  $G_2/M$ 期细胞减少. 400  $\mu\text{mol/mL}$ 硒蛋氨酸致食管癌细胞凋亡百分率为52.3%, 与空白对照组及阴性对照组相比有非常显著差异( $P < 0.01$ ) (见图1).

2.3 细胞生长曲线 细胞生长曲线显示硒蛋氨酸组癌细胞计数随时间推移有明显降低趋势, 96 h癌细胞计数最少. 而空白对照组及阴性对照组癌细胞计数随时间推移有明显增多趋势(见图2).

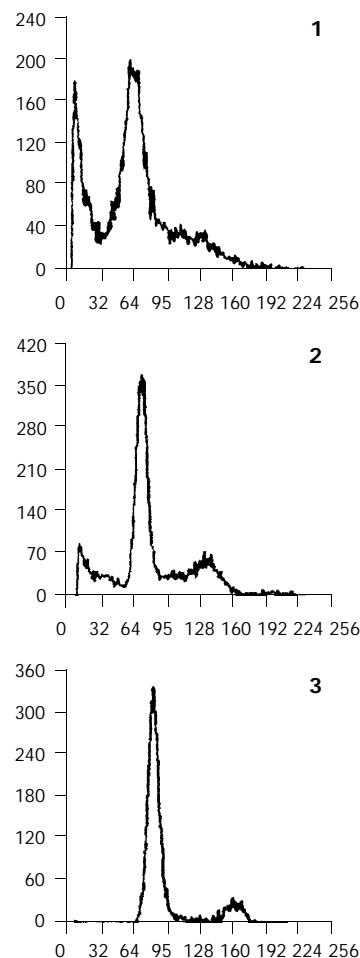


图1 流式细胞仪分析结果. 1: 硒蛋氨酸组; 2: 阴性对照组; 3: 空白对照组.

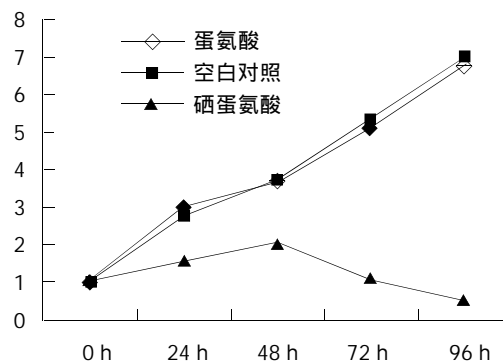


图2 细胞生长曲线.

## 3 讨论

硒是人体所必需的微量元素, 在生命活动过程中发挥

表1 硒蛋氨酸处理食管癌细胞EC9706后MTT法检测结果(mean±SD, n=8)

组项	剂量 ( $\mu\text{mol/mL}$ )	n	24 h	48 h	72 h	96 h
空白对照组		8	0.812±0.124	0.843±0.154	0.855±0.186	0.886±0.135
硒蛋氨酸组	100	8	0.725±0.173	0.662±0.165	0.605±0.132	0.585±0.118
	200	8	0.683±0.112	0.627±0.101	0.558±0.148	0.455±0.113
	300	8	0.598±0.179	0.503±0.128	0.406±0.134	0.351±0.116
	400	8	0.467±0.148	0.382±0.136	0.302±0.111	0.157±0.100
	500	8	0.465±0.114	0.390±0.132	0.314±0.125	0.160±0.118

着重要作用.大量流行病学和临床研究发现,微量元素硒与肿瘤的发生呈负相关.在中国河南林县,对大量食管鳞状细胞癌和胃贲门腺癌患者做微量元素硒测定,发现其血清硒水平明显低于正常人<sup>[14]</sup>.在美国,科学家在硒缺乏地区,补充硒化干酵母酶,经追踪观察,整个硒缺乏地区恶性肿瘤发生率明显减低.有实验研究证实硒蛋氨酸对前列腺癌、肺癌、肝癌、乳腺癌、结肠癌等癌细胞均有生长抑制作用<sup>[15-23]</sup>.

本实验研究证实,硒蛋氨酸对食管癌细胞系 EC9706 的生长有明显抑制作用,其有一定时间、浓度的依赖性,随浓度的增加、时间的延长,EC9706 的生长明显受到抑制.MTT法测定显示各组浓度硒蛋氨酸对食管癌细胞系 EC9706 增生均有较强的抑制作用,最大抑制率可达 82.3%,与空白对照组有显著性差异( $P < 0.01$ ),与细胞生长曲线基本一致.流式细胞仪检测发现,EC9706 细胞经硒蛋氨酸 400  $\mu\text{mol/mL}$  处理 96 h 后在  $G_1$  期前出现一个亚二倍体高峰,硒蛋氨酸可诱导 EC706 细胞发生凋亡,凋亡率为 52.3%,与对照组比有显著性差异.

总之,我们认为硒蛋氨酸对食管癌 EC9706 细胞增生的抑制作用可能机制之一在于改变细胞周期分布,增加  $G_0/G_1$  期细胞比例,诱发细胞凋亡.由于细胞凋亡是一个多阶段、多系统参与极其复杂的过程,本实验仅探讨了硒蛋氨酸对食管癌细胞系 EC9706 生长抑制及诱导凋亡的作用,其具体作用机制还有待进一步研究.本实验及国外大量研究证实硒蛋氨酸对恶性肿瘤的细胞生长有抑制作用;在硒缺乏地区补充硒可减少整个恶性肿瘤的发生.硒蛋氨酸作为硒的载体,在许多动植物体内存在,容易获取,与其他硒化物相比,毒性小,相对安全<sup>[24]</sup>.在硒缺乏地区补充硒预防肿瘤发生或把硒及其化合物用作治疗肿瘤的一种新手段,其前景非常广阔.

#### 4 参考文献

- Zhang LJ, Chen KN, Xu GW, Xiang HP, Shi XT. Con genital expression of mdr-1 gene in tissues of carcinoma and its relation with pathomorphology and prognosis. *World J Gastroenterol* 1999;5:53-56
- Wang LD, Zhou Q, Wei JP, Yang WC, Zhao X, Wang LX, Zou JX, Gao SS, Li YX, Yang C. Apoptosis and its relationship with cell proliferation, p53, Waf1p21, bcl-2 and c-myc in esophageal carcinogenesis studied with a high-risk population innorthern china. *World J Gastroenterol* 1998;4:287-293
- Lin J, Deng CS, Sun J, Zhou Y, Xiong P, Wang YP. Study on the genetic susceptibility of HLA-DQB1 alleles in esophageal cancer of Hubei Chinese Hans. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:965-968
- Liu J, Chen SL, Zhang W, Su Q. P21<sup>WAF1</sup> gene expression with p53 mutation in esophageal carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:1350-1353
- Gu HP, Shang PZ, Su H, Li ZG. Association of CD15 antigenexpression with cathepsin D in esophageal carcinoma tissues. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:259-261
- Qin HY, Shu Q, Wang D, Ma QF. Study on genetic polymorphisms of DCC gene VNTR in esophageal cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:782-785
- Wu QM, Li SB, Wang Q, Wang DH, Li XB, Liu CZ. The expression of COX-2 in esophageal carcinoma and its relation to clinicopathologic characteristics. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:11-14
- Tan LJ, Jiang W, Zhang N, Zhang XR, Qiu DH. Fas/FasL expression of esophageal squamous cell carcinoma, dysplasia tissues and normal mucosa. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:15-19
- Hao MW, Liang YR, Liu YF, Liu L, Wu MY, Yang HX. Transcription factor EGR-1 inhibits growth of hepatocellular carcinoma and esophageal carcinoma cells lines. *World J Gastroenterol* 2002;8:203-207
- Xu M, Jin YL, Fu J, Huang H, Chen SZ, Qu P, Tian HM, Liu ZY, Zhang W. The abnormal expression of retinoic acid receptor-beta, p53 and Ki67 protein in normal, premalignant and malignant esophageal tissues. *World J Gastroenterol* 2002;8:200-202
- Wang AH, Sun CS, Li LS, Hang JY, Chen QS. Relationship of tobacco smoking CYP1A1 GSTM1 gene polymorphism and esophageal cancer in xi' an. *World J Gastroenterol* 2002;8:49-53
- 张卫国, 吴清明, 董强, 于皆平. 腺病毒介导的 p27kip1 对食管癌裸鼠模型抑制的作用. *世界华人消化病杂志* 2003;11:512-516
- 李胜保, 吴清明, 王强, 王小虎, 谢国建. 腺病毒介导的 cox-2 反义 RNA 对食管癌细胞株 DNA 和蛋白质合成的影响. *世界华人消化病杂志* 2003;11:517-521
- Gerhard N. Nutrition selenium supplement: product types, quality, and safety. *J Am Coll Nutr* 2001;20:1-4
- Miki K, Xu MX, Gupta A, Ba Y, Tan YY, Al-Refaie W, Bouvet M, Makuuchi M, Moossa AR, Hoffman RM. Methioninase cancer gene therapy with selenomethionine as suicide Prodrug substrate. *Cancer Res* 2001;61:6805-6810
- Seo YR, Kelley MR, Smith ML. From the cover:Selenomethionine regulation of p53 by a ref1-dependent redox mechanism. *PNAS* 2002;99:14548-14553
- Menter DG, Selenium AL. Effects on prostate cell growth cancer epidemiol. *Biomarkers Prev* 2000;9:1171-1182
- Baines A, Taylor-Parker M, Goulet AC, Renaud C, Gerner EW, Nelson MA. Selenomethionine inhibits growth and suppresses cyclooxygenase-2(COX-2) protein expression in human colon cancer cell line. *Cancer Biol Ther* 2002;1:370-374
- Chigbrow M, Nelson M. Inhibition of mitotic cyclin B and cdc2 kinase activity by selenomethionine in synchronized coloncancer cells. *Anticancer Drugs* 2001;12:43-50
- Yamamoto N, Gupta A, Xu M, Miki K, Tsujimoto Y, Tsuchiya H, Tomita K, Moossa AR, Hoffman RM. Methioninase gene therapy with selenomethionine induces apoptosis in bcl-2-overproducing lung cancer cells. *Cancer Gene Ther* 2003;10:445-450
- Redman C, Scott JA, Baines AT. Inhibitory effect of selenomethionine on the growth of three selected human tumor cell lines. *Cancer Lett* 1998;125:103-110
- Redman C, Xu MJ, Peng YM, Scott JA, Payne C, Clark LC, Nelson MA. Involvement of polyamines in selenomethionine induced apoptosis and mitotic alterations in human tumor cells. *Carcinogenesis* 1997;18:1195-1202
- Duffield-Lillico AJ, Slate EH, Reid ME, Turnbull BW, Wilkins PA, Combs GF Jr, Park HK, Gross EG, Graham GF, Stratton MS, Marshall JR, Larry C. Clark for the nutritional prevention of cancer study group. Selenium supplementation and secondary prevention of nonmelanoma Skin cancer in a randomized. *Trial J Natl Cancer Inst* 2003;95:1477-1481
- Mark SD, Qiao YL, Dawsey SM, Wu YP, Katki H, Cunter EW, Fraumeni JF Jr, Blot WJ, Dong ZW, Taylor PR. Prospective study of serum selenium levels and incident esophageal and gastric cancers. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:1753-1763

# 大肠癌组织中 Survivin 和 Cox-2 表达的相关性

金玉, 林连捷, 郑长青

金玉, 林连捷, 郑长青, 中国医科大学附属第二医院消化科 辽宁省沈阳市 110004  
项目负责人: 金玉, 110004, 辽宁省沈阳市和平区三好街36号, 中国医科大学附属第二医院消化科. jinyu913@hotmail.com  
电话: 024-83956416  
收稿日期: 2003-12-23 接受日期: 2004-02-01

## 摘要

目的: 检测大肠癌组织Survivin和环氧化酶(Cox-2)的表达情况, 并探讨二者之间的相关性.

方法: 应用免疫组织化学(S-P)方法分别检测 Survivin 和 Cox-2在40例大肠癌及34例正常大肠黏膜中的表达情况.

结果: Survivin 的阳性表达定位于细胞质, 在大肠癌组织中其阳性率为 67.5%, 正常大肠黏膜组织中阳性率为 0, 二者差异十分显著( $P < 0.01$ ); Cox-2的阳性表达定位于细胞质, 在大肠癌组织中其阳性率为 90%, 正常大肠黏膜组织中阳性率为 11.8%, 二者差异十分显著( $P < 0.01$ ). Survivin 和 Cox-2 的表达具有一定的相关性( $r = 0.39$ ,  $P < 0.05$ ).

结论: 大肠癌组织中Survivin过表达可能是最终导致大肠癌发生的突破点, Survivin 和 Cox-2 的协同表达表明大肠癌中的抑制凋亡是通过多种通路实现的.

金玉, 林连捷, 郑长青. 大肠癌组织中 Survivin 和 Cox-2 表达的相关性. 世界华人消化杂志 2004;12(5):1218-1220

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1218.asp>

## 0 引言

凋亡的调节对人体组织保持内环境稳态及正常细胞形态至关重要, 这一过程受到干扰将使细胞的寿命无限延长或累积突变, 有利于肿瘤的发生. Survivin, 凋亡抑制蛋白家族(IAP)的新成员, 是一种最近才发现的抗凋亡基因, Survivin在胎盘和胚胎组织中高水平表达, 在正常组织中不表达, 已经证实 Survivin 在许多肿瘤中过表达<sup>[1-3]</sup>, 但 Survivin 在大肠癌中的作用所知甚少. 大肠癌发生、发展过程中环氧化酶(Cox)-2 表达增加<sup>[4-5]</sup>, 大量研究证实表达 Cox-2 的细胞株增加癌变潜能与抵抗凋亡有关, 但是关于 Cox-2 和 Survivin 的相关性还不清楚. 本实验通过检测 Survivin 在大肠癌中的表达说明 Survivin 在大肠癌发生、发展过程中的作用, 另外探讨大肠癌中 Survivin 和 Cox-2 表达的相关性.

## 1 材料和方法

1.1 材料 中国医科大学附属第二医院2002-06/2002-10手术切除和内窥镜活检后的大肠组织 74 例, 大肠癌组

织 40 例, 其中男 29 例, 女 11 例, 33-74 岁, 平均年龄  $61.4 \pm 10.7$  岁, 所有患者术前均未接受放疗和化疗. 选择 34 例正常大肠黏膜作为对照, 其中男 20 例, 女 14 例, 35-70 岁, 平均年龄  $60.5 \pm 19.4$  岁. Survivin 羊抗人多克隆抗体(sc-8806), Cox-2 单克隆抗体均为 Santa Cruz 公司产品, Survivin 一抗工作浓度 1:50, Cox-2 一抗工作浓度 1:75, SP 试剂盒为北京中山生物技术有限公司产品.

1.2 方法 采用链霉卵白素-生物素-辣根过氧化物酶复合法(S-P法)进行免疫组化染色. 在400倍放大的显微镜下计数至少 5 个随机视野, 取平均值, 阳性细胞数小于 10% 计为阴性, 余下为阳性, 采用盲法计数.

统计学处理 采用  $\chi^2$  检验,  $P < 0.05$  有统计学意义. Survivin 和 Cox-2 的相关性分析采用 Spearman 检验,  $P < 0.05$  有统计学意义.

## 2 结果

2.1 Survivin 和 Cox-2 在大肠癌中的表达 Survivin 阳性染色主要在大肠癌细胞的细胞质中(图 1), 大肠癌中其阳性率为 67.5%, 而正常大肠黏膜中未见到阳性表达(图 2), 二者差异十分显著( $P < 0.01$ )(表 1).

表 1 Survivin 在大肠癌组织及正常大肠黏膜中的表达

研究对象	n	Survivin	
		阳性	阴性
大肠癌组织	40	27	13
正常大肠黏膜	34	0	34

$P < 0.01$  vs 大肠癌组织.

Cox-2 的阳性表达定位于细胞质中, 大肠癌及正常大肠黏膜中均可见阳性表达, 阳性率分别为 90%(图 3)和 11.8%(图 4), 二者差异十分显著( $P < 0.01$ )(表 2).

表 2 Cox-2 在大肠癌组织及正常大肠黏膜中的表达

研究对象	n	Cox-2	
		阳性	阴性
大肠癌组织	40	36	4
正常大肠黏膜	34	4	30

$P < 0.01$  vs 大肠癌组织.

2.2 Survivin 和 Cox-2 表达的相关性 采用 Spearman 检验结果表明存在正相关( $r = 0.39$ ,  $P < 0.05$ ).

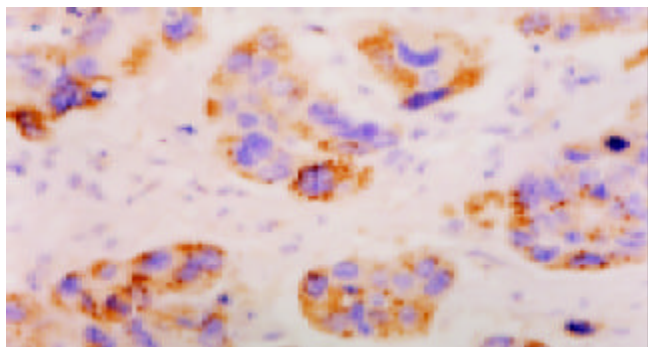


图1 大肠癌组织中Survivin的表达. 棕色染色的细胞为阳性细胞( $\times 400$ ).

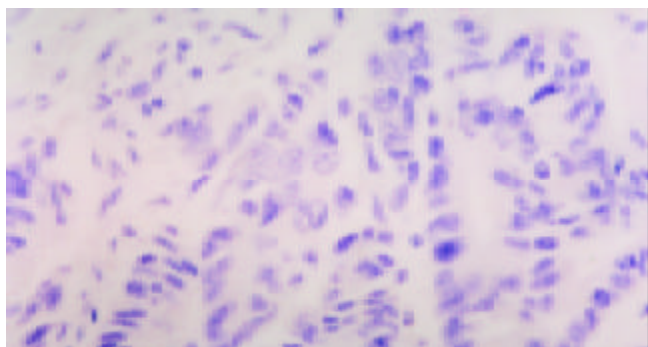


图2 正常大肠黏膜中无Survivin表达( $\times 400$ ).

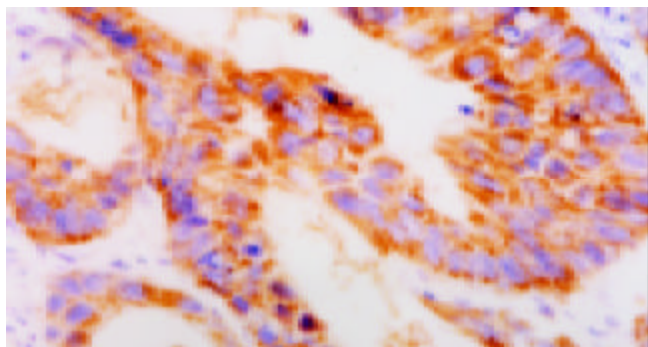


图3 大肠癌组织中Cox-2的表达. 棕色染色的细胞为阳性细胞( $\times 400$ ).

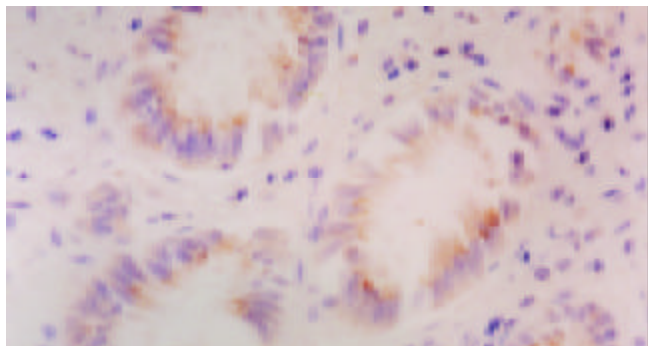


图4 正常大肠黏膜中Cox-2的表达. 棕色染色的细胞为阳性细胞( $\times 400$ ).

### 3 讨论

大肠癌的发展分多个阶段, 受多基因调控, 包括累积突变和细胞周期调节失衡, 在大肠癌的早期阶段检测出这些改变可以解释大肠癌的发展过程. IAP 家族是一种广泛表达的抑制凋亡的基因家族, Survivin 是人们

最近发现的凋亡抑制蛋白家族的新成员<sup>[6]</sup>, Survivin 基因定位于 17q25, 分子量 16.5 kD, Survivin 有保护细胞、维持微管结构完整性的作用, 他的表达特点是在胎盘和胚胎组织中强烈表达, 在终末分化良好的正常组织中不表达, 在许多恶性肿瘤组织胞质中重新出现高水平表达, 这样可以使肿瘤细胞免于凋亡, 促进有丝分裂的畸变, 加速多倍体的形成. 外界某些凋亡刺激因子激活 caspase<sup>[7-8]</sup>, 通过线粒体释放细胞色素 c 激活胞质内的 caspase 级联反应, 形成了由 procaspase-9, Apaf-1, 细胞色素 c 和 dATP 组成的凋亡小体, 最终激活 caspase-3 和 caspase-9 而导致凋亡, Survivin 调节线粒体内膜通过电压依赖的离子通道释放细胞色素 c, 比其他凋亡抑制基因如 bcl-2 的作用更强, 他可以直接与 caspase-3 和 caspase-7 结合, 使 caspase 的活性降低而抑制凋亡, 或者与 caspase 的启动子和效应子相互作用, 防止 caspase 蛋白水解酶活性成熟, 抑制细胞色素 c 的释放而保持线粒体的完整性; Survivin 还可以调节 G<sub>2</sub>/M 细胞周期<sup>[9, 25]</sup>. 本组实验得出这样的结果: Survivin 阳性染色主要位于细胞质, 大肠癌中其阳性率为 67.5%, 而正常大肠黏膜中未见到阳性表达, 二者差异十分显著 ( $P < 0.01$ ), Lin et al<sup>[28]</sup> 曾用免疫组化的方法检测 Survivin 蛋白在正常大肠黏膜、腺瘤及大肠癌中的表达情况时发现从正常大肠黏膜到腺瘤以及最终癌变的发展过程中 Survivin 表达逐渐增加<sup>[10]</sup>, 而且 Survivin 表达强度与大肠癌分化程度无关, 由此证明 Survivin 重新表达的时机为肿瘤发生的早期.

有研究表明大肠癌中 Survivin 的表达阳性率较高, 且与肿瘤的分化程度及淋巴结转移无关<sup>[11]</sup>, 在大肠癌的发生、发展过程中起重要作用, 这使得 Survivin 成为肿瘤特异性诊断指标, 并为大肠癌的治疗提供新的靶点. 实验<sup>[12]</sup>表明用磷酸化缺陷的 Survivin Thr34  $\rightarrow$  Ala 突变体防止 Survivin 蛋白第 34 位苏氨酸(Thr34)磷酸化, Thr34 磷酸化丢失导致 Survivin-caspase-9 复合体从有丝分裂结构中分离开, Survivin 的表达下降, Survivin 这种抗凋亡功能丢失使得依赖 caspase-9 的各种肿瘤细胞凋亡<sup>[25]</sup>. T34A 的抗癌特性最近在严重联合免疫缺陷鼠黑色素瘤异体移植动物模型中得到证实, Survivin T34A 的表达抑制肿瘤生长达 60-70%. Yamamoto et al<sup>[13]</sup> 将 EPR-1 导入结肠癌细胞株, 使 Survivin 表达下降, 降低细胞增生, 促进凋亡, 增加对抗癌药的敏感性.

研究表明 Survivin 干扰 caspase-9 的激活或直接与 caspase-3 和 caspase-7 结合而使凋亡的级联终止<sup>[25]</sup>, 而生物体内的凋亡是多步骤过程, 是多种因子相互作用的级联反应. Cox-2 是催化花生四烯酸转化为前列腺素的限速酶, 其过度表达与大肠癌的发生、发展密切相关, 大量研究已经证实在大肠癌的发生过程中 Cox-2 的表达增加<sup>[14]</sup>, 本研究结果表明大肠癌中 Cox-2 的阳性率为 90%, 而正常大肠黏膜中其阳性率为 11.8%, 二者差异十分显著 ( $\chi^2 = 45.29$ ,  $P < 0.01$ ). 以往的研究发现肠



上皮细胞内 Cox-2 过表达增加 IAP 水平, 而且前列腺素 E2, Cox-2 主要代谢产物, 可以增加人结肠癌细胞中另一种凋亡抑制蛋白 Bcl-2 的表达<sup>[15-17]</sup>; 另外, Cox-2 抑制剂 NSAIDs<sup>[18-20]</sup> 阻断 Cox-2 通路, 使 Bcl-2 表达下调, 肿瘤变小, 癌前和癌性病变细胞数减少<sup>[15, 21-22]</sup>, 使癌细胞对放疗化疗更敏感<sup>[23-24]</sup>; NSAIDs 也可以通过诱导线粒体释放细胞色素 c、激活 caspase-3 和 caspase-9 而促进肿瘤细胞的凋亡<sup>[26-27]</sup>. Survivin 和 Cox-2 在大肠癌中均呈高水平表达, 二者之间是否存在某种联系? 目前关于 Survivin 和 Cox-2 的相互作用所知甚少, Yu et al<sup>[29]</sup> 研究 Survivin 在胃癌及其一级亲属中的表达时已证实 Survivin 和 Cox-2 有明显的相关性, Cox-2 过表达的细胞株可以减少细胞色素 c 的释放, 并抑制 caspase 的活性<sup>[26]</sup>, Cox-2 表达的细胞株中内皮细胞生长因子受体(EGFR)呈高水平表达, Cox-2 通过 EGFR 调节结肠癌细胞株的增生, 而 Survivin 也可以抑制 caspase 的活性, 调节血管内皮细胞的表达<sup>[30]</sup>, 实验经统计学分析大肠癌中 Survivin 和 Cox-2 的表达具有正相关性( $r=0.39$ ,  $P<0.05$ ), 说明 Survivin 和 Cox-2 协同表达通过多种方式抑制凋亡.

Survivin 作为凋亡抑制蛋白家族的新成员, 他的生物学特性及与多种生物因子的相互作用已得到共识, Survivin 在大肠癌组织中表达, 而在正常大肠黏膜中不表达, Survivin 和 Cox-2 的表达具有一定的正相关性, 这说明大肠癌中凋亡的抑制作用是通过多种通路实现的, 因此, 深入研究 Survivin 将对大肠癌的治疗、化疗药物的研制奠定理论基础.

#### 4 参考文献

- Kania J, Konturek SJ, Marlicz K, Hahn EG, Konturek PC. Expression of survivin and caspase-3 in gastric cancer. *Dig Dis Sci* 2003;48:266-271
- Grabowski P, Kuhnel T, Muhr-Wilkenshoff F, Heine B, Stein H, Hopfner M, Germer CT, Scherubl H. Prognostic value of nuclear survivin expression in oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 2003;88:115-119
- Ikeguchi M, Hirooka Y, Kaibara N. Quantitative analysis of apoptosis-related gene expression in hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2002;95:1938-1945
- Zhang H, Sun XF. Overexpression of cyclooxygenase-2 correlates with advanced stages of colorectal cancer. *Am J Gastroenterol* 2002;97:1037-1041
- Wu AW, Gu J, Ji JF, Li ZF, Xu GW. Role of COX-2 in carcinogenesis of colorectal cancer and its relationship with tumor biological characteristics and patients' prognosis. *World J Gastroenterol* 2003;9:1990-1994
- Altieri DC. Survivin and apoptosis control. *Adv Cancer Res* 2003;88:31-52
- McKay TR, Bell S, Tenev T, Stoll V, Lopes R, Lemoine NR, McNeish IA. Procaspase 3 expression in ovarian carcinoma cells increases survivin transcription which can be countered with a dominant-negative mutant, survivin T34A; a combination gene therapy strategy. *Oncogene* 2003;22:3539-3547
- Chiou SK, Jones MK, Tarnawski AS. Survivin-an anti-apoptosis protein: its biological roles and implications for cancer and beyond. *Med Sci Monit* 2003;9:PI25-P129
- Altieri DC. Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer. *Oncogene* 2003;22:8581-8589
- Gianani R, Jarboe E, Orlicky D, Frost M, Bobak J, Lehner R, Shroyer KR. Expression of survivin in normal, hyperplastic, and neoplastic colonic mucosa. *Hum Pathol* 2001;32:119-125
- Kawasaki H, Toyoda M, Shinohara H, Okuda J, Watanabe I, Yamamoto T, Tanaka K, Tenjo T, Tanigawa N. Expression of Survivin correlates with apoptosis, proliferation, and angiogenesis during human colorectal tumorigenesis. *Cancer* 2001;91:2026-2032
- Wall NR, O'Connor DS, Plescia J, Pommier Y, Altieri DC. Suppression of survivin phosphorylation on Thr34 by flavopiridol enhances tumor cell apoptosis. *Cancer Res* 2003;63:230-235
- Yamamoto T, Tanigawa N. The role of survivin as a new target of diagnosis and treatment in human cancer. *Med Electron Microsc* 2001;34:207-212
- Einspahr JG, Krouse RS, Yochim JM, Danenberg PV, Danenberg KD, Bhattacharyya AK, Martinez ME, Alberts DS. Association between Cyclooxygenase expression and colorectal adenoma characteristics. *Cancer Res* 2003;63:3891-3893
- Tang X, Sun YJ, Half E, Kuo MT, Sinicrope F. Cyclooxygenase-2 overexpression inhibits death receptor 5 expression and confers resistance to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in human colon cancer cells. *Cancer Res* 2002;62:4903-4908
- Moran EM. Epidemiological and clinical aspects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and cancer risks. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 2002;21:193-201
- Cianchi F, Cortesini C, Bechi P, Fantappie O, Messerini L, Vannacci A, Sardi I, Baroni G, Boddi V, Mazzanti R, Masini E. Up-regulation of cyclooxygenase-2 gene expression correlates with tumor angiogenesis in human colorectal cancer. *Gastroenterology* 2001;121:1339-1347
- Stoecklacher J, Lenz HJ. Cyclooxygenase-2 inhibitors in colorectal cancer. *Semin Oncol* 2003;30(3 Suppl 6):S10-S16
- Howe LR, Dannenberg AJ. A role for cyclooxygenase-2 inhibitors in the prevention and treatment of cancer. *Semin Oncol* 2002;29(3 Suppl 11):S111-S119
- Reddy BS, Rao CV. Novel approaches for colon cancer prevention by cyclooxygenase-2 inhibitors. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 2002;21:155-164
- Saha D, Roman C, Beauchamp RD. New strategies for colorectal cancer prevention and treatment. *World J Surg* 2002;26:762-766
- Patrignani P. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs COX-2 and colorectal cancer. *Toxicol Lett* 2000;112:493-498
- Crane CH, Janjan NA, Mason K, Milas L. Preoperative chemoradiation for locally advanced rectal cancer: emerging treatment strategies. *Oncology (Huntingt)* 2002;16(5 Suppl 5):S39-S44
- Wall NR, O'Connor DS, Plescia J, Pommier Y, Altieri DC. Suppression of survivin phosphorylation on Thr34 by flavopiridol enhances tumor cell apoptosis. *Cancer Res* 2003;63:230-235
- Tamm I, Wang Y, Sausville E, Scudiero DA, Vigna N, Oltsersdorf T, Reed JC. IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. *Cancer Res* 1998;58:5315-5320
- Sun Y, Tang XM, Half E, Kuo MT, Sinicrope FA. Cyclooxygenase-2 overexpression reduces apoptotic susceptibility by inhibiting the cytochrome c-dependent apoptotic pathway in human colon cancer cells. *Cancer Res* 2002;62:6323-6328
- Li M, Wu X, Xu XC. Induction of apoptosis in colon cancer cells by cyclooxygenase-2 inhibitor NS398 through a cytochrome c-dependent pathway. *Clin Cancer Res* 2001;7:1010-1016
- Lin LJ, Zheng CQ, Jin Y, Ma Y, Jiang WG, Ma T. Expression of survivin protein in human colorectal carcinogenesis. *World J Gastroenterol* 2003;9:974-977
- Yu J, Leung WK, Ebert MP, Ng EK, Go MY, Wang HB, Chung SC, Malfertheiner P, Sung JJ. Increased expression of Survivin in gastric cancer patients and in first degree relatives. *Br J Cancer* 2002;87:91-97
- Yoshimoto T, Takahashi Y, Kinoshita T, Sakashita T, Inoue H, Tanabe T. Growth stimulation and epidermal growth factor receptor induction in cyclooxygenase-overexpressing human colon carcinoma cells. *Adv Exp Med Biol* 2002;507:403-407

• 临床经验 •

# 老年消化道多原发癌患者的辅助化疗及转归

蔡昌豪, 吴本俨, 吴道宏, 邵勇, 王孟薇

蔡昌豪, 吴本俨, 吴道宏, 邵勇, 王孟薇, 中国人民解放军总医院老年消化科 北京市 100853

项目负责人: 蔡昌豪, 100853, 北京市复兴路28号, 中国人民解放军总医院老年消化科. chchai@sina.com

电话: 010-66937502 传真: 010-66939413

收稿日期: 2003-08-23 接受日期: 2003-12-29

## 摘要

目的: 探讨多原发消化道肿瘤辅助化疗对预后的影响及与第三原发癌发生的关系。

方法: 回顾分析老年消化道双原发癌术后辅助化疗与非化疗患者生存时间及5 a生存率。

结果: 26例消化道双原发癌共52个病灶, 早期诊断73% (35/52), 次癌5 a生存率61%。接受辅助化疗共12例16例次, 非化疗患者14例。全组共12例发生第三癌, 化疗组6例, 非化疗组6例。化疗组与非化疗组首癌、次癌生存时间无显著差异, 化疗组第三癌中位生存时间33 mo, 非化疗组患者生存时间14 mo ( $P > 0.05$ )。

结论: 化疗对首癌、次癌生存时间无影响, 但延长发生第三癌的间隔时间, 对第三癌生存时间有延长作用。

蔡昌豪, 吴本俨, 吴道宏, 邵勇, 王孟薇. 老年消化道多原发癌患者的辅助化疗及转归. 世界华人消化杂志 2004;12(5):1221-1222

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1221.asp>

## 0 引言

消化道单发进展期癌术后辅助化疗已被广泛应用, 即便是黏膜癌也有转移<sup>[1-2]</sup>, 亦主张辅助化疗<sup>[3]</sup>。辅助化疗能延长患者的生存时间, 同时引起的后续肿瘤的危险性也随之增加已有共识<sup>[4-5]</sup>, 然而对消化道多原发癌(multiple primary carcinomas, MPC)的辅助化疗及发生后续癌却知之甚少。现将26例发生在老年人消化道的多原发癌报告如下, 其中16例接受辅助化疗, 并对辅助化疗后患者的生存时间、5 a生存率及后续肿瘤的发生进行探讨。

## 1 材料和方法

1.1 材料 消化道多原发癌患者26例, 均为男性住院病例, 60-89岁。其中第一原发癌(首癌)发病中位年龄71岁, 第二原发癌(次癌)发病中位年龄73.5岁。20例异时癌, 6例同时癌。间隔时间: 首癌与次癌中位间隔时间45 mo, 平均67 mo。肿瘤分布: 双原发大肠癌11例, 双原发胃癌7例, 双原发食管癌1例, 大肠癌-胃癌4例, 食管癌-胃癌1例, 大肠癌-食管癌2例。第三癌: 结直肠癌4例, 胃癌3例, 胆管癌2例, 肺

癌2例, 小肠癌1例。

1.2 方法 根据手术后是否进行化疗分成辅助化疗组、非化疗组, 计算每一种癌各自的生存时间、诊断满5 a以上的按其生存时间计算5 a生存率、第三肿瘤发生率。化疗患者其肿瘤均已侵及黏膜下层或肌层, 伴静脉癌栓、局部淋巴结转移。诊断: 26例消化道双原发癌, 共计52个病灶, 经病理组织学诊断。双发癌符合Warren<sup>[6]</sup>提出的多原发癌诊断标准。治疗: 26例双原发癌共52个病灶, 手术39例次, 内镜黏膜切除(EMR)治疗9例次, 共切除48个病灶。术后辅助化疗12人16例次, 其中大肠癌9例次, 胃癌7例次; 化疗组早期癌7例次, 进展期癌9例次。化疗方案: 5-氟尿嘧啶0.5 g 静脉点滴, 1-5 d/wk, 丝裂霉素6-8 mg 静脉点滴, 1次/wk, 21 d为1个周期, 平均化疗4个周期(2-6周期)。2例因肝功能损伤, 仅化疗2个周期。1例早期胃癌口服优福定, 0.648 g, 3次/d, 连服6 wk为1个周期, 化疗1个周期。

统计学处理 计数以中位数法计算, 生存时间以t检验法计算。

## 2 结果

2.1 化疗后状况 首癌状况: 首癌22例手术, 术后辅助化疗10例, 中位生存时间108 mo, 12例未进行化疗, 中位生存时间109.5 mo, 二者比较无差异。次癌状况: 次癌手术17例, 生存中位时间36 mo。其中接受辅助化疗患者6例, 另外1例患者EMR后辅助化疗, 共7例, 中位生存时间32 mo, 平均生存67 mo; 未接受辅助化疗11例, 中位生存时间36 mo, 平均生存66.8 mo。次癌5 a生存率61% (11/18), 10 a 35% (6/17)。

2.2 第三癌发生 26例消化道双原发癌, 随访中12例发生第三癌, 其中6例患者经辅助化疗, 其余6例未接受辅助化疗。中位年龄78.5岁。化疗组第三癌早期诊断50%(3/6), 胃癌2例, 肺癌1例; 未化疗组第三癌早期诊断50%(3/6), 直肠癌1例, 结肠癌1例, 原发性肝细胞癌1例。诊断次癌至第三癌之间隔时间, 化疗组中位间隔时间53.5 mo, 未做辅助化疗组中位间隔时间29 mo。12例三原发癌患者中位生存时间21.5 mo, 经化疗组患者中位生存期33 mo; 未化疗组中位生存时间14 mo, 无显著差异( $P > 0.05$ )。

## 3 讨论

3.1 辅助化疗的意义 辅助化疗是否延长患者的生存时间, 提高5 a生存率过去一直有争论, 但近几年文献[4, 5, 7-9]报告辅助化疗能延长生存时间、提高5 a



生存率<sup>[10-11]</sup>. 辅助化疗提高生存时间 9%, 提高 5 a 无病生存时间 17%<sup>[9]</sup>. 早期胃癌有下述情况可给辅助化疗<sup>[3]</sup>:

(1) 病理类型高度恶性; (2) 有脉管癌栓或淋巴结转移; (3) 多发病灶; (4) 面积大于 5 cm<sup>2</sup>. 本组结果显示, 化疗对自身肿瘤的生存时间无影响, 但是对后续肿瘤有影响, 化疗组比未化疗组生存时间长.

3.2 对当事肿瘤的作用 本组首癌 22 例手术后辅助化疗者与未进行化疗者中位生存时间无差异, 与文献<sup>[12]</sup>报告相符; 次癌手术 17 例, 接受辅助化疗者与未接受辅助化疗者中位生存时间无差异, 可见双癌术后辅助化疗对生存时间无影响. 文献<sup>[13]</sup>报道多原发癌早期诊断 41%, 5 a 生存率 43%, 本组次癌早期诊断 73%, 5 a 生存率 61%, 早期治疗及时, 可使次癌患者生存时间长(中位生存时间 33 mo, 平均生存时间 59.65 mo, 超过 63 mo 者 8 例, 占 44%(8/18)), 为第三癌发生提供了足够的生长时间<sup>[14-15]</sup>.

3.3 对后续肿瘤的作用 本组 12 例发生第三癌, 中位生存时间 21.5 mo, 从前一肿瘤是否接受辅助化疗看, 两组生存时间相差较大. 6 例经辅助化疗的患者, 中位生存期 33 mo; 而 6 例未化疗的患者, 中位生存时间仅 14 mo. 从现象上看, 前肿瘤辅助化疗对后续肿瘤的生存时间即延长期生存时间有影响. 原因: (1) 化疗后体内免疫功能增强, 口服中药扶正治疗; (2) 应用免疫增强剂. 另外, 辅助化疗组发生第三癌的间隔时间长于未化疗组, 化疗组第三癌来得晚, 67%(4/6) 发生在 3 a 以后, 未化疗组第三癌 67%(4/6) 在 3 a 以内, 提示辅助化疗延缓第三癌的发生时间, 同时提示对接受辅助化疗的患者要长期随访<sup>[16]</sup>, 以便发现早期癌.

#### 4 参考文献

- 1 Kobayashi M, Araki K, Matsuura K, Kawai S, Moriki T. Early gastric cancer giving rise to bone and brain metastases—a review of the Japanese literature. *Hepatogastroenterology* 2002; 49:1751-1754
- 2 Shimada S, Yagi Y, Honmyo U, Shiomori YN, Yoshida N, Ogawa M. Involvement of three or more lymph nodes predicts poor prognosis in submucosal gastric carcinoma. *Gastric Cancer* 2001; 4:54-59
- 3 孙燕. 内科肿瘤学. 第 1 版. 北京: 人民卫生出版社, 2001:554-568
- 4 Bajetta E, Buzzoni R, Mariani L, Beretta E, Bozzetti F, Bordogna G, Aitini E, Fava S, Schieppati G, Pinotti G, Visini M, Ianniello G, Di BM. Adjuvant chemotherapy in gastric cancer: 5-year results of a randomised study by the Italian Trials in Medical Oncology (ITMO) Group. *Ann Oncol* 2002; 13:299-307
- 5 Kim R, Yamaguchi Y, Toge T. Adjuvant therapy for colorectal carcinoma. *Anticancer Res* 2002;22:2413-2418
- 6 Warren S, Gates O. Multiple primary malignant tumors: a survey of the literature and a statistical study. *Ann J Cancer* 1932;16:1358-1414
- 7 Neri B, Cini G, Andreoli F, Boffi B, Francesconi D, Mazzanti R, Medi F, Mercatelli A, Romano S, Siliani L, Tarquini R, Moretti R. Randomized trial of adjuvant chemotherapy versus control after curative resection for gastric cancer: 5-year follow-up. *Br J Cancer* 2001;84:878-880
- 8 Yao JC, Ajani JA. Adjuvant and preoperative chemotherapy for gastric cancer. *Curr Oncol Rep* 2002;4:222-228
- 9 Sakamoto J, Teramukai S, Nakazato H, Sato Y, Uchino J, Taguchi T, Ryoma Y, Ohashi Y. Efficacy of adjuvant immunotherapy with OK-432 for patients with curatively resected gastric cancer: a meta-analysis of centrally randomized controlled clinical trials. *J Immunother* 2002;25: 405-412
- 10 Baeza MR, Giannini TO, Rivera SR, Gonzalez P, Gonzalez J, Vergara E, del Castillo C, Madrid J, Vines E. Adjuvant radiochemotherapy in the treatment of completely resected, locally advanced gastric cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001;50:645-650
- 11 Kim JP, Yu HJ, Lee JH. Results of immunochemo-surgery for gastric carcinoma. *Hepatogastroenterology* 2001;48:1227-1230
- 12 蔡昌豪, 王孟薇, 吴道宏, 邵勇, 吴本俨. 老年多原发癌早期诊断与治疗. 军医进修学院学报 2003;24:112-114
- 13 Kagei K, Hosokawa M, Shirato H, Kusumi T, Shimizu Y, Watanabe A, Ueda M. Efficacy of intense screening and treatment for synchronous second primary cancers in patients with esophageal cancer. *Jpn J Clin Oncol* 2002;32:120-127
- 14 蔡昌豪, 吴本俨, 吴道宏, 王孟薇. 18 例老年三原发癌临床分析. 中华老年多器官疾病杂志 2003;2:127-129
- 15 Hiyama T, Hanai A, Fujimoto I. Second primary cancer after diagnosis of stomach cancer in Osaka, Japan. *Jpn J Cancer Res* 1991;82:762-770
- 16 Knast W, Strutynska KM, Rabczynski J. Surgical treatment of patients with multiple carcinomas. *Med Sci Monit* 2001;7: 1256-1262

# 腹腔镜胆总管切开术后胆道引流

魏琪, 蔡小燕, 李立波, 王观宇, 虞洪

魏琪, 蔡小燕, 李立波, 王观宇, 虞洪, 浙江大学医学院附属邵逸夫医院普外科 浙江省杭州市 310016  
项目负责人: 魏琪, 310016, 浙江省杭州市, 浙江大学医学院附属邵逸夫医院普外科. weiqi@hz.cnc.com  
电话: 571-86437761  
收稿日期: 2003-09-09 接受日期: 2004-01-08

## 摘要

目的: 腹腔镜胆总管切开(LCD)术后采用经胆囊管胆道减压(TCBD)替代放置T管引流, 可以保证胆总管切开术后一期缝合的安全和消除T管相关并发症. TCBD管采用Roeder结或者贯穿缝扎固定, 但是术后仍需留置3 wk. 我们介绍一种改进的TCBD(mTCBD)方法, 使用输尿管导管和Lapro-Clip固定, 并将其与T管引流作一比较.

方法: 2002-10/2003-06回顾性研究比较LCD应用mTCBD(mTCBD组,  $n=30$ )和T管引流(T管引流组,  $n=52$ )治疗胆总管结石的临床结果.

结果: 两组患者手术时间和残留结石无显著差异. mTCBD组平均胆汁引流量明显少于T管引流组( $306 \pm 141$  mL/24 h vs  $409 \pm 243$  mL/24 h,  $P < 0.01$ ); 引流管的拔除也显著早于T管引流组(median, 5 d vs 29 d,  $P < 0.01$ ). mTCBD组无与引流管有关的并发症, 而T管引流组的并发症发生率为11.5%, 其中拔管后胆漏5.8%.

结论: 我们的初步经验表明LCD术后应用mTCBD是安全、有效、简便、易行的. mTCBD可以减少术后并发症, 尤其是胆漏. 患者术后1 wk内出院, 无任何引流管. 我们推荐胆总管结石的患者选择应用mTCBD.

魏琪, 蔡小燕, 李立波, 王观宇, 虞洪. 腹腔镜胆总管切开术后胆道引流. 世界华人消化杂志 2004;12(5):1223-1225

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1223.asp>

## 0 引言

腹腔镜胆总管切开术(Laparoscopic choledochotomy, LCD)一期治疗胆总管结石已被认为是安全、有效、性价比高的术式<sup>[1-3]</sup>. 然而, 其并发症相对较高, 主要与T管留置有关<sup>[4]</sup>. 为了消除T管相关并发症, 某些作者建议LCD术后应用经胆囊管胆道减压引流(transcystic biliary decompression, TCBD), 但TCBD术后仍需留置3 wk<sup>[5-6]</sup>, 腹腔镜治疗胆总管结石的价值受到了影响. 我们介绍一种改进的TCBD(modified TCBD, mTCBD)方法, 使用输尿管导管和Lapro-Clip固定, 并将其与T管引流作一比较.

## 1 材料和方法

1.1 材料 2002-10/2003-06行LCD治疗胆总管结石的患者82例, 其中应用mTCBD30例(mTCBD组), T管引流52例(T管引流组). 术前临床情况见表1, 两组无显著性差异.

1.2 方法 Trocar置入位置同腹腔镜胆囊切除术, 另在左上腹置一10 mm Trocar. 术中常规胆道造影, 胆总管纵向切开, 采用挤压、冲洗和胆道镜网篮等方法取石. mTCBD: 胆总管取净结石后, 3-0 Vicryl连续缝合胆总管. 5Fr输尿管导管置入胆总管2-4 cm, 如位置合适用12 mm Lapro-Clip固定(图1). 应用Lapro-Clip时, 经输尿管导管持续推注生理盐水, 以防止上夹过紧. 再次胆道造影确认导管位置合适、胆管无渗漏. 术后3-7 d胆道造影, 透视下拔除输尿管导管. T管引流: 采用12-16 Fr乳胶T管置入胆总管, 位置合适后用3-0 Vicryl间断缝合胆总管. 术后7-10 d开始夹闭T管, 3-4 wk行胆道造影. 如造影结果正常, 拔除T管; 如发现残余结石, 则T管继续留置3-4 wk. 肝下间隙均放置Jackson-Pratt引流管, 多数术后第3 d拔除. 仅记录住院期间的胆汁引流量. “引流管并发症”指直接与引流管留置或拔除有关的并发症, 并且需要处理, 导致住院时间延长或再次住院.

统计学处理 使用SPSS统计软件包. 计量资料均数t检验, 率比较采用 $\chi^2$ 检验, 非参数数据比较采用Mann-Whitney检验, 显著性标准 $P < 0.05$ .

## 2 结果

2.1 mTCBD组的结果 平均手术时间 $178 \pm 34$  min(表2). 2例患者转开腹手术(6.5%), 其中1例为结石嵌顿, 1例为多发结石; 均应用mTCBD. 经输尿管导管的平均胆汁引流量 $306 \pm 141$  mL/24 h. 中位引流管拔除时间5(4-5 d). X线透视下输尿管导管拔除, 无胆漏或者Lapro-Clip的滑脱(图2), 也无输尿管导管阻塞. 中位术后住院时间5(4-6 d). 1例患者残余结石(3.3%), 行内镜括约肌切开取石(endoscopic sphincterotomy, ES). 2例患者输尿管导管移位, 术后胆道造影未显示胆道, 但无胆漏发生.

2.2 T管组的结果 平均手术时间 $173 \pm 45$  min(表2). 2例患者转开腹手术(6.5%), 均为较大结石嵌顿. 平均T管引流量 $409 \pm 243$  mL/24 h, 中位引流管拔出时间为29(22-32 d). 中位术后住院时间4(4-6 d). T管组7例患者(13.5%)残余结石(表3). 5例患者(9.6%)为已知残余结石, 2例肝内胆管结石, 1例多发性胆总管结石, 均为腹腔镜术中取石困难病例; 另2例为胆道镜器械故障. 未预

知的残余结石2例(3.8%).术后所有患者均取净残余结石,5例经T管窦道胆道镜网篮取石,2例计划取石前T管脱出,ES取净结石.术后并发症6例(11.5%)(表4).拔除T管后胆漏3例(5.8%),其中2例腹部剧痛、大汗、心动过速,为腹腔局限性胆汁积液.经T管窦道再次置入引流管等治疗,患者症状缓解.第3例患者出现胆汁性腹膜炎需要再次开腹引流.1例T管放置部位胆管狭窄,需要T管继续支撑3 mo.另1例术后第2 d T管被拔出,肝下引流管引流胆汁持续2 wk. T管相关并发症还包括1例管周胆汁渗漏.此外,1例患者T管移位,并经胆道造影证实,但无胆漏症状.

2.3 两组临床结果比较 mTCBD组和T管引流组手术时间和残余结石无显著性差异. mTCBD组平均胆汁引流量明显少于T管引流组( $P < 0.01$ );引流管的拔除也显著早于T管引流组( $P < 0.01$ ).与引流管有关的并发症 mTCBD组为零,而T管引流组的并发症为11.5%( $P < 0.05$ ),其中拔管后胆漏5.8%.而mTCBD组术后住院时间长于T管引流组( $P < 0.05$ )(表2).无术后患者死亡和胆总管结石复发.术后随访4-30 wk.

表1 患者术前临床情况

	mTCBD	T管引流
<i>n</i>	30	52
年龄(岁)	28-77	26-82
男/女	12/18	17/35
黄疸	12	16
急性胆囊炎	9	13
急性胰腺炎	3	5
确诊CBD结石	16	37
可疑CBD结石	11	13
CBD直径( $\geq 9$ mm)	18	35
胆道手术	2	3

表2 两组间临床结果比较

	mTCBD	T管引流	<i>t</i> or $\chi^2$ ( <i>z</i> )	<i>P</i>
手术时间(min)	178	173	-0.469	0.640
胆汁引流(mL/24 h)	306	409	2.118	0.037
术后住院(d)	5 (4-6)	4 (4-6)	(-2.060)	0.039
引流管拔除(d)	5 (4-5)	29 (22-32)	(-7.560)	0.000
并发症(%)	0	11.5	5.736	0.017
残留结石(%)	3.3	13.5	2.574	0.109
转开腹(%)	6.5	3.8	0.315	0.575

表3 T管组残余结石

	<i>n</i>
已知残余结石	5 (9.6%)
器械问题	2
肝内胆管结石	2
多发性结石	1
残余结石	2 (3.8%)
<i>n</i>	7 (13.5%)

表4 胆道引流的并发症和潜在问题

	T管引流	mTCBD
并发症		
<i>n</i>	6 (11.5%)	0
引流管原位		
管周胆汁渗漏	1	0
胆管狭窄	1	0
引流管拔出	1	0
引流管拔除	3 (5.8%)	
胆汁性积液	2	0
胆汁性腹膜炎	1	0
潜在问题		
<i>n</i>	3 (5.8%)	2 (6.7%)
引流管脱出	2	0
引流管移位	1	2



图1 5Fr输尿管导管插入胆道减压 12 mm Lapro-Clip 夹固定.

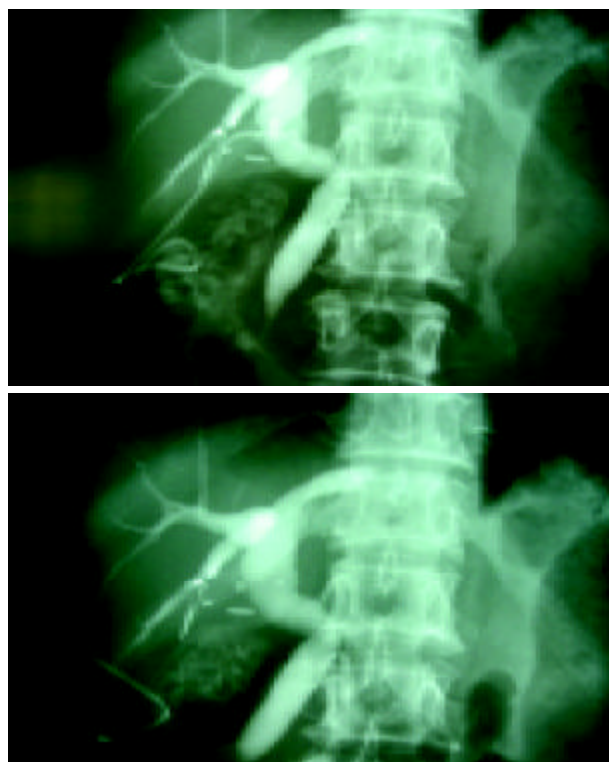


图2 拔除输尿管导管无胆漏 Lapro-Clip 夹闭胆囊管.

### 3 讨论

已有研究表明术后数天胆管内胆泥、纤维素的阻塞;取石操作引起的胆总管下端水肿以及胆管残留结石,均可导致胆总管下端暂时性梗阻,而临时性胆道减压引流有利于防止术后胆漏发生<sup>[5, 7-9]</sup>. TCBD 与 T 管引流一样,起胆道减压作用,并可以消除 T 管相关并发症.

2002-10 起我们应用 mTCBD 一期缝合胆管. Lapro-Clip 具有双层加压闭合机制,利用其弹性内轨环绕胆囊管及输尿管导管,而硬质外轨包绕内轨加压<sup>[10]</sup>. 输尿管导管容易拔除,无胆漏发生;一旦拔除输尿管导管,即可自动闭合胆囊管,即使输尿管导管移位也可避免胆漏的发生.

mTCBD 组引流管拔除后胆漏为零. 中位引流管拔除时间 5 (4-5 d). 2 例输尿管导管移位也无胆漏发生. 报道的 T 管相关并发症为 5-15.3%<sup>[4, 11-12]</sup>, 严重并发症为拔管后胆漏,发生率为 4.12-6.9%<sup>[12-13]</sup>. 而腹腔镜和开腹手术并发症(13.8% vs 15.5%)或者拔管后胆漏(6.9% vs 6.9%)<sup>[12]</sup>没有差异. 本研究 T 管组术后并发症 6 例(11.5%) (表 4), 3 例(5.8%)为拔管后胆漏, 3 例患者 T 管留置均为术后 3 wk. 由于腹腔镜手术创伤小,可能 T 管窦道的形成时间较长<sup>[14-15]</sup>. 中位 T 管拔除时间为 29(22-32 d),即使排除残余结石患者中位引流管拔除时间为 29(21-32 d). 我们的经验提示 T 管可能需要留置 4 wk 以上.

TCBD 管胆道引流和胆管一期缝合主要适用于术时取净结石的患者,腹腔镜术中常规胆道造影和胆道镜的应用,使胆管残余结石率已下降到可接受的程度. 术后 ES 是这些胆管残余结石的补救措施. 本研究 mTCBD 组中 1 例(3.3%)残余结石,术后 ES 取净结石.

如术中有胆管残余结石的可能,则需要放置 T 管以便术后行胆道镜取石. T 管引流组 5 例患者为已知残余结石(表 3). T 管需要再留置 3-4 wk,以利形成成熟的窦道. 术后胆道镜取石的优点是能够避免 Oddi 括约肌损伤,并且多能取净结石.

尽管 mTCBD 组患者的胆汁引流量显著低于 T 管引流组( $306 \pm 141$  mL/24 h vs  $409 \pm 243$  mL/24 h,  $P < 0.01$ ),但是其足够的胆汁引流量表明起到了降低胆道压力的作用. 因此,这一结果提示经 mTCBD 的胆汁引流和 T 管引流一样足以降低胆道压力. 然而, mTCBD 组中位术后住院时间长于 T 管引流组(5 d vs 4 d,  $P < 0.05$ ),可能与我们初步应用 mTCBD 主张住院期间拔除引流管有关.

mTCBD 不宜应用于胆囊管异常、肝内胆管结石、十二指肠乳头狭窄的患者.

需要关注的是 Lapro-Clip 过紧夹闭输尿管导管,经输尿管导管持续推注生理盐水,可防止上夹过紧. 我们

还认为防止输尿管导管的阻塞或者滑脱移位其管径是一个重要因素, 5Fr 输尿管导管管径最合适.

我们的初步经验表明 LCD 术后, mTCBD 的应用减少了术后并发症,尤其是胆漏的发生,而且操作简便易行,患者术后 1 wk 内出院没有任何引流管. 如果慎重选择应用胆道引流,患者术后即能获得较好的生活质量. 我们推荐胆总管结石的患者选择应用 mTCBD.

### 4 参考文献

- 1 Cuschieri A, Lezoche E, Morino M, Croce E, Lacy A, Tooouli J, Faggioni A, Ribeiro VM, Jakimowicz J, Visa J, Hanna GB. E.A. E.S. multicenter prospective randomized trial comparing two-stage vs single-stage management of patients with gallstone disease and ductal calculi. *Surg Endosc* 1999;13:952-957
- 2 Heili MJ, Wintz NK, Fowler DL. Choledocholithiasis: endoscopic versus laparoscopic management. *Am Surg* 1999;65:135-138
- 3 Wei Q, Wang JG, Li LB, Li JD. Management of choledocholithiasis: comparison between laparoscopic common bile duct exploration and intraoperative endoscopic sphincterotomy. *World J Gastroenterol* 2003;9:2856-2858
- 4 Martin IJ, Bailey IS, Rhodes M, Orourke N, Nathanson L, Fielding G. Towards T-tube free laparoscopic bile duct exploration: A methodologic evaluation during 300 consecutive procedures. *Ann Surg* 1998;228:29-34
- 5 Hensman C, Crosthwaite G, Cuschieri A. Transcystic biliary decompression after direct laparoscopic exploration of the common bile duct. *Surg Endosc* 1997;11:1106-1110
- 6 Paganini AM, Feliciotti F, Guerrieri M, Tamburini A, De Sanctis A, Campagnacci R, Lezoche E. Laparoscopic common bile duct exploration. *J Laparoendosc Adv Surg Tech A* 2001;11:391-400
- 7 Holdsworth RJ, Sadek SA, Ambikae S, Cuschieri A. Dynamics of bile flow through the choledochal sphincter following exploration of the common bile duct. *World J Surg* 1989;13:300-304
- 8 Tokumura H, Umezawa A, Cao H, Sakamoto N, Imaoka Y, Ouchi A, Yamamoto K. Laparoscopic management of common bile duct stones: transcystic approach and choledochotomy. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2002;9:206-212
- 9 Chen XP, Peng SY, Peng CH, Liu YB, Shi LB, Jiang XC, Shen HW, XuYL, Fang SB, Rui J, Xia XH, Zhao GH. A ten-year study on non-surgical treatment of postoperative bile Leakage. *World J Gastroenterol* 2002;8:937-942
- 10 Darzi A, Sooin B, Coleman J, Lirici NM, Angelini L. Initial experience with an absorbable laparoscopic ligation clip. *Brit J Surg* 1997;84:974-976
- 11 Moreaux J. Traditional surgical management of common bile duct stones: a prospective study during a 20-year experience. *Am J Surg* 1995;169:220-226
- 12 Wills VL, Gibson K, Karihaloo C, Jorgensen JO. Complications of biliary T-tube after choledochotomy. *ANZ J Surg* 2002;72:177-180
- 13 Gharabeh KI, Heiss HA. Biliary leakage following T-tube removal. *Int Surg* 2000;85:57-63
- 14 Tittel A, Treutner KH, Titkova S, Ottinger A, Schumpelick V. Comparison of adhesion reformation after laparoscopic and conventional adhesiolysis in an animal model. *Langenbecks Arch Surg* 2001;386:141-145
- 15 Polymeneas G, Theodosopoulos T, Stamatiadis A, Kourias E. A comparative study of postoperative adhesion formation after laparoscopic vs open cholecystectomy. *Surg Endosc* 2001;15:41-43

# 肝炎病毒感染的大肠癌患者较少发生肝转移

王凤山, 李桂臣, 梁 健, 孙宏治, 刘永锋, 何三光

王凤山, 李桂臣, 梁健, 孙宏治, 刘永锋, 何三光, 中国医科大学附属第一医院普外一科 辽宁省沈阳市 110001  
项目负责人: 王凤山, 110001, 辽宁省沈阳市和平区南京北街 155 号, 中国医科大学附属第一医院普外一科, wangfs@hotmail.com  
电话: 024-23256666-6235 传真: 024-25638965  
收稿日期: 2003-01-02 接受日期: 2004-02-01

## 摘要

目的: 探讨肝炎病毒感染与大肠癌肝转移的关系。

方法: 我院 1994-01/1995-12 住院进展期大肠癌患者, 共 177 例。将病例分为肝炎病毒感染组及非肝炎病毒感染组, 比较两组大肠癌肝转移的发生率。大肠癌肝转移的判定依据术中探查结果及肝脏 CT 检查。

结果: 肝炎病毒感染组 35 例, 合并肝转移 1 例, 肝转移发生率为 2.86%。非肝炎病毒感染组 142 例, 合并肝转移 24 例, 肝转移发生率为 16.9%。两组肝转移发生率差异性显著 ( $P < 0.05$ )。肝炎病毒感染组与非肝炎病毒感染组分层比较结果如下: 年龄:  $52.9 \pm 14.4$  vs  $56.2 \pm 12.5$ ,  $P > 0.05$ ; 癌肿最大径超过 10 cm 者: 14.3% vs 19.0%,  $P > 0.05$ ; 癌肿浸透浆膜者: 45.7% vs 64.1%,  $P = 0.05$ ; 腹腔淋巴结转移者: 25.7% vs 30.0%,  $P > 0.05$ 。

结论: 肝炎病毒感染的大肠癌患者较少发生大肠癌肝转移。

王凤山, 李桂臣, 梁健, 孙宏治, 刘永锋, 何三光. 肝炎病毒感染的大肠癌患者较少发生肝转移. 世界华人消化杂志 2004;12(5):1226-1227

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1226.asp>

## 0 引言

大肠癌肝转移临床比较常见, 在确诊大肠癌时已有 20-40% 的患者发生肝转移, 原发灶切除后, 异时性肝转移发生率仍高达 50%<sup>[1]</sup>。大肠癌合并肝转移病例预后较差, 如能寻找到大肠癌肝转移的规律, 预防大肠癌的肝转移, 则可明显延长大肠癌患者的生存时间。有报告肝硬化很少发生肝转移癌, 肝硬化时肝纤维化及微血管的变形不利于转移癌细胞的游走和增生<sup>[2]</sup>。也有报告肝硬化较少发生大肠癌肝转移, 但仍然常发生胆道系统癌肝转移<sup>[3]</sup>。研究表明, 肝炎病毒感染的肝脏处于高免疫反应状态。为探讨肝炎病毒感染与大肠癌合并肝转移的关系, 本研究对我院 177 例住院大肠癌患者进行了相关统计分析。

## 1 材料和方法

1.1 材料 我院 1994-01/1995-12 住院进展期大肠癌患者, 共 177 例, 其中男 98 例, 女 79 例, 年龄 16-

81 岁, 平均年龄 55.5 岁。按大肠癌部位分类, 盲升结肠癌 63 例, 横结肠癌 7 例, 降结肠癌 9 例, 乙状结肠癌 36 例, 直肠癌 64 例。按大肠癌病理分类, 腺癌 128 例, 黏液腺癌 17 例, 黏液癌 5 例, 其他 27 例。手术治疗 158 例, 未手术 19 例。

1.2 方法 (1) 将大肠癌病例分为 2 组, 即肝炎病毒感染组和非肝炎病毒感染组。肝炎病毒化验为肝炎八项, 包括: 抗甲型肝炎 IgM 抗体(HAV-IgM)、乙肝表面抗原(HBsAg)、乙肝表面抗体(HBsAb)、乙肝 e 抗原(HBeAg)、乙肝 e 抗体(HBeAb)、乙肝核心抗体-IgM(HBcAb-IgM)、抗丙型肝炎 IgG 抗体(HCV)、抗戊型肝炎 IgG 抗体(HEV)。肝炎病毒化验有一项及一项以上阳性者, 列为肝炎病毒感染组, 肝炎病毒化验全部阴性者列为非肝炎病毒感染组。凡未作肝炎化验的大肠癌病例不在统计之内。(2) 对肝炎病毒感染组和非肝炎病毒感染组的大肠癌肝转移发生率进行比较, 大肠癌是否合并肝转移依据术中探查结果以及肝脏 CT 判定。(3) 对肝炎病毒感染组与非肝炎病毒感染组病例的年龄构成、癌肿浸透浆膜者所占比例、腹腔淋巴结转移者所占比例以及癌肿最大径超过 10 cm 者所占比例进行分层分析。

统计学处理 使用 SPSS 统计软件对数据进行统计分析, 计量资料比较用非配对 t 检验, 计数资料比较采用  $\chi^2$  检验,  $P < 0.05$  认为组间差异显著。

## 2 结果

2.1 大肠癌合并肝转移情况 177 例大肠癌中合并肝转移 25 例, 肝转移总发生率为 14.1%。肝炎病毒感染组 35 例, 合并肝转移 1 例, 肝转移发生率为 2.86%; 非肝炎病毒感染组 142 例, 合并肝转移 24 例, 肝转移发生率为 16.9%。肝炎病毒感染组与非肝炎病毒感染组的肝转移发生率差异显著 ( $P < 0.05$ )。

2.2 肝炎病毒感染组与非肝炎病毒感染组分层分析结果 两组病例的年龄构成、癌肿浸透浆膜者所占比例、腹腔淋巴结转移者所占比例以及癌肿最大径超过 10 cm 者所占比例均无显著差异 ( $P \geq 0.05$ , 表 1)。

表 1 肝炎病毒感染组与非肝炎病毒感染组分层比较

	肝炎病毒感染组	非肝炎病毒感染组	P 值
年龄(岁, mean $\pm$ SD)	52.9 $\pm$ 14.4	56.2 $\pm$ 12.5	0.18
癌肿浸透浆膜	45.7%	64.1%	0.05
腹腔淋巴结转移	25.7%	30.0%	0.60
癌肿最大径超过 10 cm	14.3%	19.0%	0.52

2.3 不同部位大肠癌肝转移发生率 盲升结肠癌 15.9%, 横结肠癌 14.3%, 降结肠癌 22.2%, 乙状结肠癌 8.33%, 直肠癌 14.1%. 不同部位大肠癌肝转移发生率无显著差异( $P > 0.05$ ).

2.4 大肠癌进展程度与肝转移发生率 癌肿最大径超过 10 cm 者 32 例, 合并肝转移 4 例, 肝转移发生率为 12.5%; 癌肿最大径未超过 10 cm 者 145 例, 合并肝转移 21 例, 肝转移发生率为 14.5%. 癌肿侵透浆膜者 107 例, 合并肝转移 17 例, 肝转移发生率为 15.9%; 癌肿未侵透浆膜者 70 例, 合并肝转移 8 例, 肝转移发生率为 11.4%. 已有腹腔淋巴结转移者 52 例, 合并肝转移 8 例, 肝转移发生率为 15.4%; 没有腹腔淋巴结转移的 125 例, 合并肝转移 17 例, 肝转移发生率为 13.6%. 肿瘤的大小、癌肿是否侵透浆膜以及是否有腹腔淋巴结转移, 大肠癌肝转移发生率均无显著差异( $P > 0.05$ ).

### 3 讨论

细胞生物学研究证明, 癌转移到其他部位需经过如下过程: 首先, 癌细胞需从原发灶游离、浸润到间质, 进入脉管. 然后, 癌细胞在脉管内移动并到达转移器官, 癌细胞与转移器官的脉管内皮细胞或基底膜黏附. 最后, 癌细胞向转移器官脉管外游走并增生, 形成转移灶<sup>[4]</sup>.

大肠癌在我国较为常见, 大肠癌患者发生肝转移后, 其中 70% 因肝转移而死亡<sup>[5]</sup>. 各种肝炎也是我国常见多发病, 感染肝炎病毒的大肠癌患者在临床上也不少见. Utsunomiya et al<sup>[6]</sup>报告感染乙型或丙型肝炎病毒的肝脏很少发生大肠癌转移, 还有报道大肠癌转移至感染乙型肝炎病毒肝脏的概率很小<sup>[7-10]</sup>, 向仲素 et al<sup>[11]</sup>报告乙型肝炎表面抗原阳性胃癌患者较少发生肝转移. 因为各种肝炎病毒感染均可导致肝脏病理改变, 所以我们对所有肝炎病毒感染与大肠癌肝转移的关系进行了临床病例分析, 结果表明, 肝炎病毒感染者(包括肝炎病毒相关抗体阳性者)的大肠癌肝转移发生率明显低于非肝炎病毒感染的大肠癌患者. 产生这种现象的原因尚不清楚, 有待于进一步研究. 可能由于肝炎病毒感染, 增强了肝脏免疫调节作用, 抑制了癌细胞在肝脏向脉管外游走及增生, 从而抑制了癌细胞向肝脏的转移. 有报道肝炎病毒感染时, 免疫应答主要是由细胞毒性淋巴细胞(CD8+)介导的<sup>[12]</sup>, 细胞毒性淋巴细胞(CD8+)可以杀灭无抗原性异样细胞, 如漂浮在肝窦内的大肠癌细

胞<sup>[13]</sup>. 肝炎病毒感染引起的干扰素  $\gamma$  增加, 导致肝脏枯否氏细胞活性增强, 可以增加其对转移癌细胞的杀灭, 从而减少了大肠癌肝转移的发生<sup>[14]</sup>.

另外, 本研究表明, 不同部位大肠癌肝转移发生率无显著差异; 肿瘤的大小、癌肿是否侵透浆膜以及是否有腹腔淋巴结转移, 大肠癌肝转移发生率均无显著差异. 这与周正 et al<sup>[15]</sup>的报告不尽相同.

对肝炎病毒感染的大肠癌患者较少发生肝转移现象的进一步研究, 可能为寻找预防大肠癌肝转移策略提供帮助.

### 4 参考文献

- 1 夏振龙. 大肠癌肝转移的发生率及临床特点. 中国实用外科杂志 1999;19:579
- 2 Utsunomiya T, Matsumata T. Metastatic carcinoma in the cirrhotic liver. *Am J Surg* 1993;166:776
- 3 雷正明, 官德容, 张陪明, 何友钊, 刘宁, 李秋. 肝转移癌 186 例诊治分析. 中国实用外科杂志 1995;15:281-282
- 4 高桥俊雄. 癌转移の機序とその対策. 日外会誌 1995;8:539-546
- 5 郑英键. 结直肠癌肝转移诊治的有关问题. 腹部外科 2000;13:265-266
- 6 Utsunomiya T, Saitsu H, Saku M, Yoshida K, Matsumata T, Shimada M, Sugimachi K. Rare occurrence of colorectal cancer metastasis in livers infected with hepatitis B or C virus. *Am J Surg* 1999;177:279-281
- 7 Song E, Chen J, Ou Q, Su F. Rare occurrence of metastatic colorectal cancers in livers with replicative hepatitis B infection. *Am J Surg* 2001;181:529-533
- 8 薛福龙, 刘建伟, 黄时杰, 李梅, 高洁贤. 乙肝病毒感染与结直肠癌肝转移. 中华胃肠外科杂志 2001;4:55
- 9 刘金林, 肖谷欣, 何韵彬. 乙型肝炎表面抗原、癌胚抗原与结直肠癌肝转移和预后的关系. 实用癌症杂志 2001;16:501-503
- 10 刘金林, 肖谷欣, 何韵彬. HbsAg 与结、直肠癌肝转移的关系. 肝胆胰外科杂志 2001;13:10-11
- 11 向仲素. 乙型肝炎表面抗原与胃癌患者肝转移关系的初步探讨. 中国血流变学杂志 2002;12:321
- 12 Liaw YF, Lee CS, Tsai SL, Liaw BW, Chen TC, Sheen IS, Chu CM. T-cell-mediated autologous hepatocytotoxicity in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 1995;22:1368-1373
- 13 Ando K, Hiroishi K, Kaneko T, Moriyama T, Muto Y, Kayagaki N, Yagita H, Okumura K, Imawari M. Perforin, Fas/Fas ligand, and TNF- $\alpha$  pathways as specific and bystander killing mechanisms of hepatitis C virus-specific human CTL. *J Immunol* 1997;158:5283-5291
- 14 Schuurman B, Heuff G, Beelen RHJ, Meyer S. Enhanced human Kupffer cell-mediated cytotoxicity after activation of the effector cells and modulation of the target cells by interferon- $\gamma$ : a mechanistic study at the cellular level. *Cell Immunol* 1995;165:141-147
- 15 周正, 赵恭华, 王岩, 刘霞, 王文跃, 潘瑞芹. 大肠癌肝转移的临床病理学特点及临床意义. 中华外科杂志 1995;33:454-457