细胞表面表达 Toll 样受体-4、Toll 样受体-5、Toll 样受体-7、Toll 样受体-8[8]，提示我们在分娩发动时 TLR 可能通过促炎因子（如 IL-6）改变调节性 T 细胞介导的母胎免疫耐受状态[9]，唤醒母体对同种异体胎儿的排斥，进一步导致分娩发动。

参考文献：

[1] Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3 [J]. Science, 2003, 299 (5609): 1057 - 1061.

[2] 吴奎，毕玉田，王耀丽，等. Foxp3 基因转染对人 $CD4^+$ $CD25^-$ T 细胞表型和功能的影响[J]. 第三军医大学学报，2008，30(3)：186 - 188.

[3] 乐杰. 妇产科学 [M]. 第 7 版. 北京：人民卫生出版社，2008：67 - 68，87.

[4] Wilczynski J R, Radwan M, Kalinka J. The characterization and role of regulatory T cells in immune reactions[J]. Front Biosci, 2008, 13: 2266 - 2274.

[5] Wilczynski J R, Kalinka J, Radwan M. The role of the T-regulatory cells in pregnancy and cancer [J]. Front Biosci, 2008, 13: 2275 - 2289.

[6] Tilburgs T, Roelen D L, van-der-Mast B J, *et al*. Evidence for a selective migration of fetus-specific $CD4^+$ $CD25^{bright}$ regulatory T cells from the peripheral blood to the decidua in human pregnancy[J]. J Immunol, 2008, 180(8): 5737 - 5745.

[7] Keelan J A, Blumenstein M, Helliwell R J, *et al*. Cytokines, prostaglandins and parturition—a review[J]. Placenta, 2003, 24 (Suppl A): S33 - S46.

[8] Caramalho I, Lopes-Carvalho T, Ostler D, *et al*. Regulatory T cells selectively express toll-like receptors and are activated by lipopolysaccharide [J]. J Exp Med, 2003, 197(4): 403 - 411.

[9] Pasare C, Medzhitov R. Toll pathway-dependent blockade of $CD4^+$ $CD25^+$ T cell-mediated suppression by dendritic cells [J]. Science, 2003, 299(5609): 1033 - 1036.

（收稿：2010-06-18 修回：2010-08-29）

（编辑 张 维）

短篇论著

文章编号：1000-5404(2010)22-2440-04

非酒精性脂肪性肝病兔脂肪肝程度与肝组织硫化氢浓度的关系

谭华炳[1]，朱德文[2]，谢杏榕[1]，李 芳[1]，胡 波[1]，李金科[1]（442000 湖北 十堰，湖北医药学院：附属人民医院感染性疾病科[1]，临床医学系[2]）

【摘要】 目的 研究非酒精性脂肪性肝病（nonalcoholic fatty liver disease，NAFLD）兔脂肪肝程度与肝组织硫化氢（H_2S）浓度的相关性。**方法** 40 只日本大耳白兔按随机数字法分为重度 NAFLD 组（重度组）、轻度 NAFLD 组（轻度组）、对照组。重度组给予高脂饲料 160 g/d，轻度组给予高脂饲料 80 g/d + 普通饲料 80 g/d，对照组给予普通饲料 160 g/d。饲养至 10 周开始，重度组每周行肝脏 CT 检测了解 NAFLD 程度，至 13 周重度组达到重度 NAFLD，终止实验。饲养前耳中动脉采血 5 ml 于肝素管中，离心后保存于 -20 ℃的冰柜中待检。实验结束腹主动脉抽血 5 ml 于肝素管中，离心后保存于 -20 ℃的冰箱中待检。全部血浆按照设备、试剂操作常规检测实验前后甘油三酯（triglyceride，TG）、胆固醇（totol cholesteral，TC）。肝组织匀浆检测肝组织 H_2S 浓度。胱硫醚-γ-裂解酶（cystathionine-γ-lyase，CSE）免疫组织化学染色、HE 染色，光镜下观察肝脏组织形态学改变。**结果** ①TC、TG：饲养前重度组、轻度组、对照组 TC、TG 比较无统计学差异（$P > 0.05$）。饲养后重度组 TC、TG 分别为（32.12 ± 1.25）、（6.02 ± 2.12）mmol/L，轻度组 TC、TG 分别为（18.34 ± 2.10）、（4.39 ± 1.93）mmol/L，与饲养前比较有统计学差异（$P < 0.01$）。饲养后重度组 TG、TC 高于轻度组（$P < 0.01$）。②肝组织 H_2S 浓度：重度组、轻度组肝组织 H_2S 明显下降，重度组、轻度组与对照组比较均有统计学差异（$P < 0.01$）；重度组与轻度组比较也有统计学差异（$P < 0.05$）。③肝脏病理学：重度组重度 NAFLD，轻度组轻 ~ 中度 NAFLD，对照组正常肝脏。轻度组 CSE 免疫组织化学染色 CSE 阳性细胞强于正常组，重度组强于轻度组。**结论** NAFLD 兔脂肪肝程度与肝组织 H_2S 浓度负相关，可以通过脂肪肝程度负向推测肝组织 H_2S 浓度。肝组织存在 CSE 表达代偿性增强。

【关键词】 脂肪肝，非酒精性；程度；硫化氢，肝组织；关系

【中图法分类号】 Q593.1；R362；R575.5 **【文献标志码】** A

非酒精性脂肪性肝病（nonalcoholic fatty liver disease，NAFLD）是指以肝实质细胞脂肪变性为病理特征，无过量饮酒史，又除外其他肝病的临床综合征，其病理类型包括单纯性脂肪肝、脂肪性肝炎（nonalcohdicsteatohepatitis，NASH）及 NASH 相关肝硬化，后者可发展为肝癌[1-3]。NAFLD 已成为发达国家和地区的第一大肝病，在我国亦可能成为慢性肝病的首要病因[4]，NAFLD 在我国已成为日益严重的社会问题。已有研究证明内源性硫化氢（H_2S）参与肝硬化的发病过

【基金项目】 湖北省教育厅科技项目（D20102104）；湖北医药学院 2010 年学生科研项目

【通信作者】 李金科，电话：（0719）8637659，E-mail：renmthb@163.com

程[5,6]。内源性 H_2S 在 NAFLD 发病中的作用，特别是肝组织 H_2S 与 NAFLD 的关系，国内外少见报道。本课题组通过高脂饲料饲养建立不同程度 NAFLD 动物模型，观察不同程度 NAFLD 动物模型肝组织内 H_2S 浓度变化，并探讨其机制。

1　材料与方法

1.1　一般材料

40 只日本大耳白兔（雌雄各半，月龄相似），体质量（2.2 ± 0.2）kg，湖北医药学院实验动物中心提供（批号：00006546）。实验地点：湖北医药学院临床医学研究所，湖北省十堰市实验动物中心（实验设施使用证明号：00008391）。普通饲料由湖北医药学院实验动物中心提供。高脂饲料由湖北医药学院实验动物中心按实验配方配制成成品使用（配方：86% 普通饲料 +2% 胆固醇 +6% 蛋黄 +6% 猪油）。实验用胆固醇购自北京双旋生物培养基制品厂（批号：2009.07.15）。猪油由市售板油自行炼制而成。蛋黄粉由市售鸡蛋自行制作。TG、TC 检测试剂为瑞士 Roche/Hitache 公司原装进口试剂。

1.2　实验设备

Olympus DP-70 显微摄影系统（日本奥林巴斯公司）。全自动生化检测仪（瑞士，Roche/Hitache7600）。肝组织 H_2S 检测应用北京大学生理学系相关设备及试剂进行检测。

1.3　实验模型的建立

1.3.1　动物分组与饲养　　兔购入普通饲料饲养观察 1 周，无不良反应后，将 40 只兔随机数字法分为 3 组。重度 NAFLD 模型组（重度组 14 只）：每兔每天高脂饲料 160 g。轻度 NAFLD 模型组（轻度组 13 只）：每兔每天高脂饲料 80 g + 普通饲料 80 g。空白对照组（对照组 13 只）：每兔每天普通饲料 160 g。上午 9 时、下午 5 时各组分别投入一半饲料。全部动物单笼、单兔喂养，自由饮水。建立高脂血症致重度 NAFLD 动物模型、轻度 NAFLD 动物模型、空白对照动物模型。

1.3.2　NAFLD 程度的观测与饲养周期　　通过肝脏 CT 了解 FLD 的程度，最终确定实验周期为 13 周（CT 可以对 NAFLD 量化观测[7]。实验中，重度组饲养至 9 周时死亡 1 只，病理检查发现肝脏为重度 NAFLD。饲养至 10 周左右重度组兔出现精神萎靡。为观察 NAFLD 程度，10 周开始每周对重度组兔肝脏进行 CT 检测，13 周肝脏 CT 值为 30 Hu 以下，肝脏 CT 值低于脾脏 CT 值，提示重度 NAFLD 模型造模成功，终止实验）。

1.4　标本采集与检测

1.4.1　血液的采集与检测　　实验前耳中动脉采集血液标本 5 ml 于肝素管，离心取上清液，保存于 -20 ℃ 的冰柜中待检。13 周末，10% 的水合氯醛耳缘静脉麻醉，暴露腹主动脉，腹主动脉采集血液 5 ml 于肝素管，离心取上清液，上清液保存于 -20 ℃ 的冰柜中待检。同步按仪器和试剂说明书检测饲养前后血浆 TG、TC。

1.4.2　肝组织 H_2S 检测　　将肝组织匀浆加入预先配制好的反应体系中（反应体系由 100 mmol/L pH 7.4 磷酸钾缓冲液、10 mmol/L 的 L-半胱氨酸、2 mmol/L 的 5′磷酸吡哆醛组成），使组织匀浆占反应系的 10%。吸取 1% 醋酸锌 0.5 ml 吸收液加入中央室，另剪裁 2 cm × 2.5 cm 的滤纸置入中央室，以增加空气/液体接触面积。将内盛反应体系及中央室 25 ml 锥形瓶用氮气充盈后，以石蜡膜双层封口。转移锥形瓶至 37 ℃ 水浴摇床中摇荡反应 90 min 后，在反应体系中加入 0.5 ml 的 50% 三氯醋酸中止反应。再次石蜡膜封闭锥形瓶，继续 37 ℃ 水浴反应 60 min，使反应体系中释放出的 H_2S 被完全吸收。将中央室的内容物转移到预先加 3.5 ml 水的试管中，立即加入 0.5 ml 的 7.2 mol/L 含盐酸对苯二胺的盐酸溶液，再加入 0.4 ml 的 1.2 mol/L 含三氯化铁的盐酸溶液，20 min 后测 665 nm 波长处的光密度值[D(665)]。通过标准曲线计算 H_2S 的转化率，结果以 nmol/(min · g) 组织表示。

1.4.3　肝脏病理学　　同一部位取 1.5 cm × 1.5 cm × 1.5 cm 肝组织 1 块，10% 甲醛固定 48 h，脱水石蜡包埋，切片，HE 染色，观察肝脏组织形态学改变。

1.4.4　观察 CSE 阳性细胞　　S-P 法免疫组织化学染色，观察 CSE 阳性细胞。

1.5　统计学处理

所有数据采用 SPSS 9.0 统计软件处理，数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，治疗前后组内及组间比较行 t 检验。

2　结果

2.1　TG、TC 的变化

对照组饲养前后 TG、TC 比较无统计学差异（$P > 0.05$）；轻度组饲养后 TG、TC 与饲养前比较有统计学差异（$P < 0.01$）；重度组饲养后 TG、TC 升高，与饲养前比较有统计学差异（$P < 0.01$）；饲养后重度组 TG、TC 高于轻度组（$P < 0.01$）。见表 1。

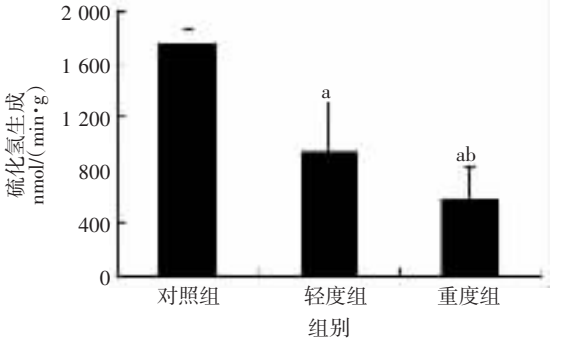
表 1　3 组饲养前后血脂指标变化（mmol/L，$\bar{x} \pm s$）

血脂指标	重度组（n = 14）		轻度组（n = 13）		对照组（n = 13）	
	饲养前	饲养后	饲养前	饲养后	饲养前	饲养后
TG	0.83 ± 0.29	6.02 ± 2.12^{ab}	0.82 ± 0.31	4.39 ± 1.93^{a}	0.83 ± 0.30	0.84 ± 0.26
TC	1.11 ± 0.21	32.12 ± 1.25^{ab}	1.10 ± 0.20	18.34 ± 2.10^{a}	1.12 ± 0.21	1.13 ± 0.20

a：$P < 0.01$，与饲养前比较；b：$P < 0.01$，与轻度组比较

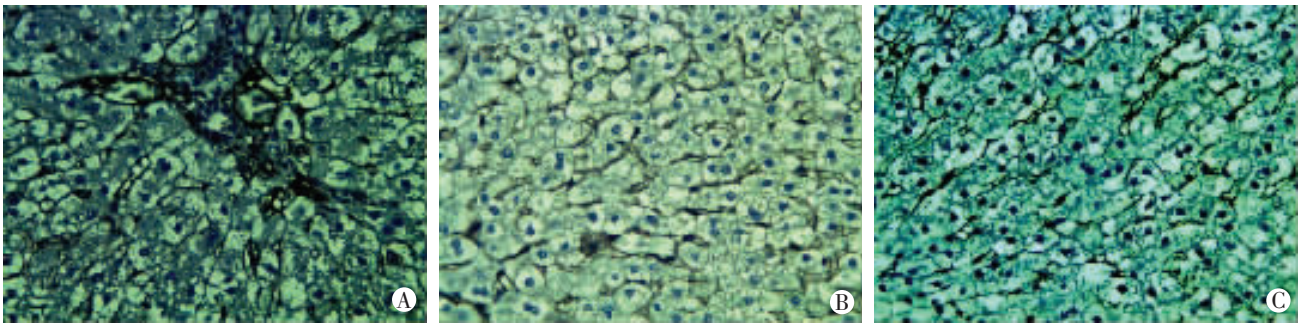
2.2　肝组织 H_2S 变化

重度组、轻度组肝组织 H_2S 明显下降，重度组、轻度组与对照组比较均有统计学差异（$P < 0.01$）；重度组与轻度组比较也有统计学差异（$P < 0.05$）。见图 1。



a：$P < 0.01$，与对照组比较；b：$P < 0.05$，与轻度组比较

图 1　不同程度脂肪肝肝组织 H_2S 浓度变化



A:重度组;B:轻度组;C:对照组

图2 胱硫醚-γ-裂解酶在不同程度非酒精性脂肪性肝病兔肝组织的表达(S-P ×400)

2.3 肝脏病理学观察

重度组达到重度NAFLD程度,轻度组NAFLD轻~中度,对照组为正常肝脏。

2.4 CSE免疫组织化学染色检测结果

轻度组CSE阳性细胞数多于正常组,重度组CSE阳性细胞数多于轻度组。见图2。

3 讨论

H_2S与一氧化氮(NO)和一氧化碳(CO)相似,是机体心血管功能调节的新型气体信号分子[8]。肝脏是人体生成H_2S的主要场所。本研究探讨了NAFLD脂肪肝程度与肝组织H_2S含量之间的关系,为进一步明确H_2S在NAFLD发病中的作用提供理论依据。

肝脏病理学显示重度组为重度NAFLD,轻度组为轻~中度NAFLD,对照组正常,说明不同程度NAFLD造模成功。本实验结果显示重度NAFLD组、轻度NAFLD组肝组织H_2S与对照组比较有明显下降($P<0.01$),重度组与轻度组比较,有统计学差异($P<0.05$)。当机体患有高脂血症时,血纤溶系统、血液动力学改变,血小板功能异常,红细胞变形能力减弱,微循环发生功能障碍[9];血流变异常可以影响肝脏微循环灌注,从而影响其代谢功能,导致出现高脂血症[10]。

H_2S是可以导致血管舒张的气体信号分子,可以自由通过细胞膜,不依赖于相应的质膜受体,可在CBS、CSE催化下内源性产生,H_2S对CBS和CSE的活性具有负反馈调节作用。肝脏是体内H_2S生成的主要部位,对维持循环血液中H_2S的浓度起到重要作用,而H_2S在调节正常及肝硬化的微循环中的作用也已被证实[11]。研究表明,在不需第二信息分子参与的条件下,H_2S很可能是通过开放的K_{ATP}通道而发挥作用[12]。在血管平滑肌细胞中,H_2S兴奋K_{ATP}通道,增加K_{ATP}通道的电流,使细胞膜出现超极化并使电压门控式L-型钙离子通道失活,进而减少胞内游离钙离子的浓度,从而导致血管和平滑肌的松弛和扩张。我们推测,高脂血症导致肝脏血液循环障碍,脂肪性肝病肝血管重构使肝组织缺血缺氧,内源性H_2S作为气体信号分子首先被消耗,从而导致脂肪性肝病程度与肝组织H_2S水平下降,且与脂肪肝程度成反比。为改善高脂血症导致肝脏微循环障碍,减轻脂肪肝血管重构导致的肝组织缺血缺氧,肝组织需要产生更多的内源性H_2S,需要CSE mRNA的持续高表达在翻译水平促进CSE蛋白的合成,进而补充机体对于H_2S的需要,是不同程度NAFLD兔肝组织CSE免疫组化染色不同的原因。与文献[5]报道相似。

本研究提示NAFLD兔脂肪肝程度与肝组织H_2S浓度负相关,可以通过脂肪肝程度负向推测肝组织H_2S浓度。改善H_2S代谢,提高肝组织H_2S浓度也许是未来NAFLD的治疗方向,我们正在进行深入的临床和实验研究。

参考文献:

[1] 中华医学会肝病学分会脂肪肝和酒精性肝病学组. 非酒精性脂肪性肝病诊疗指南[J]. 中华肝脏病杂志, 2006, 14(3):161-163.

[2] Farrell G C, Chitturi S, Lau G K, *et al*. Guidelines for the assessment and management of nonalcoholic fatty liver disease in the Asia-Pacific region:executive summary[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2007, 22(6):775-777.

[3] American Gastroenterological Association. American Gastroenterological Association medical position statement:nonalcoholic fatty liver disease[J]. Gastroenterology, 2002, 123(5):1702-1704.

[4] 周婷婷, 秦波, 郑天鹏, 等. 非酒精性脂肪肝患者血浆FGF21水平及与肥胖、胰岛素抵抗关系研究[J]. 第三军医大学学报, 2010 32(3):265-268.

[5] 张宁, 郑勇, 王于理, 等. 内源性硫化氢在不同时期大鼠肝硬化中的作用[J]. 世界华人消化杂志, 2009, 17(3):307-311.

[6] 张艳, 张伟. 气体信号分子硫化氢在肝硬化患者中的表达和意义[J]. 河北医学, 2009, 15(6):649-651.

[7] 谭华炳, 贺琴. 肝脏CT值与动脉粥样硬化关系[J]. 中国比较医学杂志, 2008, 18(3):19-22.

[8] 耿彬, 闫辉, 钟光珍, 等. 硫化氢——心血管功能调节的新型气体

信号分子[J]. 北京大学学报:医学版, 2004, 36(1):106.
[9] 马平勃, 朱全红, 黄中伟. 绞股蓝泡服对实验性高脂血症及血液流变学的影响[J]. 中国现代应用药学杂志, 2005, 22(6):454-455.
[10] 席连英, 谭华炳, 李儒贵, 等. 脂肪肝的成因与血流变的关系探讨[J]. 中国微循环, 2004, 8(4):251-252.
[11] Fiorucci S, Antonelli E, Mencarelli A, *et al*. The third gas: H_2S regulates perfusion pressure in both the isolated and perfused normal rat liver and in cirrhosis[J]. Hepatology, 2005, 42(3):539-548.
[12] Dawe G S, Han S P, Bian J S, *et al*. Hydrogen sulphide in the hypothalamus causes an ATP-sensitive K^+ channel-dependent decrease in blood pressure in freely moving rats[J]. Neuroscience, 2008, 152(1):169-177.

(收稿:2010-07-08;修回:2010-08-20)
(编辑 王 红)

文章编号:1000-5404(2010)22-2443-03

短篇论著

胃癌组织EGFR、HER-2与TopoⅡα的表达及临床意义

梁秀菊[1],高 明[1],周 云[2] (450052 郑州,郑州大学第一附属医院肿瘤科[1];450003 郑州,河南省人民医院肿瘤科[2])

[摘要] **目的** 研究EGFR、HER-2、TopoⅡα在胃癌组织中的表达与临床病理特征之间的关系。**方法** 应用免疫组化方法检测108例胃癌及22例正常胃组织中EGFR、HER-2、TopoⅡα的表达情况,分析三者的表达与临床病理特征之间的关系,并对其相关性进行分析。**结果** 108例胃癌组织中EGFR、HER-2、TopoⅡα阳性表达率分别为41.7%、31.5%、53.7%,22例正常胃组织阳性表达率分别为和0%、0%、4.5%。EGFR、HER-2、TopoⅡα蛋白的高表达与胃癌的部位、细胞分化程度、浸润深度、淋巴结转移及TNM分期有关($P<0.05$,$P<0.01$);而与患者的性别、年龄及肿瘤直径无明显关系($P>0.05$)。EGFR与HER-2之间($r=0.317$,$P=0.001$),EGFR与TopoⅡα之间($r=0.257$,$P=0.007$),HER-2与TopoⅡα之间($r=0.270$,$P=0.005$)的表达均呈正相关。**结论** EGFR、HER-2、TopoⅡα在胃癌组织表达增高与胃癌的发生、发展密切相关。

[关键词] 胃癌;EGFR;HER-2;TopoⅡα;靶向治疗
[中图法分类号] R735.2;R730.23;R730.43 **[文献标志码]** A

胃癌是消化系统最常见的恶性肿瘤,发病率居恶性肿瘤的第4位[1]。手术治疗仍然是根治胃癌的最有效方法,然而仅有30%~40%的胃癌患者可通过单纯的手术治疗而获得治愈,大部分患者死于肿瘤的再发或远处转移。内科治疗仍是胃癌主要的治疗方法,近年来,胃癌的分子靶向治疗研究取得实质性的进展,靶向治疗制剂的高效低毒特性越来越引起临床医师的重视,目前这种治疗策略主要包括表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)靶向治疗、血管内皮生长因子(VEGF)通道的靶向治疗、细胞周期抑制剂及多靶点治疗等。本研究应用免疫组化法检测并分析EGFR、原癌基因人类表皮生长因子受体2(human epidermal growth factor receptor-2, HER-2)、拓扑异构酶(TopoⅡα)在胃腺癌组织和正常胃黏膜组织中的表达情况,探讨其作为分子靶点指导胃癌分子靶向治疗的临床意义。

[通信作者] 周 云,E-mail:zhouyun1336@hotmail.com

1 资料与方法

1.1 标本

108例胃腺癌组织(包括乳头状腺癌、管状腺癌、黏液腺癌)和22例正常胃组织均来自河南省人民医院2008年11月至2009年12月间手术切除的新鲜标本,胃癌组织标本均经甲醛固定、石蜡包埋,并经HE染色组织学确诊。其中男性70例,女性38例,年龄30~79岁,全部患者术前未行放化疗。根据2003年国际抗癌联盟(UICC)和美国肿瘤联合会(AJCC)联合制定的TNM分期标准进行临床分期。另取正常胃黏膜组织22例作对照,其中男性12例,女性10例,年龄44~77岁。

1.2 试剂与仪器

一抗分别为EGFR(MAB-0196)、HER-2(MAB-0198)、TopoⅡα(MAB-0588),即用型MaxVision检测试剂盒,对二甲氨基偶氮苯(DAB)显色剂,均购自福州迈新生物技术开发公司。仪器包括:石蜡切片机、显微镜、电热恒温干燥箱,镜下图像以Olympus Dp70图像采集分析仪进行采集、分析。

1.3 方法

新鲜胃癌组织标本常规用10%中性甲醛固定,石蜡包埋,制成3~5 μm切片;切片65 ℃电热恒温干燥箱过夜,脱蜡至水;EGFR经胃酶进行酶消化抗原修复,37 ℃水浴箱内孵育