

[2] 张唯哲,徐之杰,赵育莹,等.脑囊虫病患者外周血单个核细胞体外诱导 IL-2、FN γ 及 TNF- α 活性的研究[J]. 寄生虫与医学昆虫学报, 1997, 4(4): 207-210

[3] 徐宏秀,刘玉冰,孙广平,等.脑囊虫病患者化疗前后血清中五种细胞因子变化的观察[J]. 地方病通报, 2001 16(2): 14-16

[4] Cortes J, Molinari JL, Solano S et al. Taenia solium metacestode antigens which are protective for pigs induce Th1/Th2 mix response in mice[J]. Parasitol Res 2003 90(4): 273-279

[5] 李莹,赵旭东,苏天运,等.猪囊尾蚴抗原诱导肿瘤坏死因子(TNF)和一氧化氮(NO)的观察[J]. 实用寄生虫病杂志, 1995 3(3): 122-124

[6] Wang Y, Zhang WZ, Li GQ et al. Detections of adhesion molecule and cytokines in neurocysticercosis patients[J]. Acta Parasitol Med Entomol Sin 2002, 9(4): 204-209

[7] 魏泉德,朱家勇.囊虫病免疫防卫能力与细胞因子水平的研究[J]. 临床检验杂志, 2000 18(2): 92-93

[8] 刘瑞春,宋秀娟,张祥建,等.脑囊虫病急性期脑脊液中 NQ TNF- α 水平的研究[J]. 脑与神经疾病杂志, 2004 12(1): 72

[9] 王明慧,李世恒,乔忠祥.脑囊虫病患儿血清 TNF- α 检测的临床意义[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2001, 19(2): 124

[10] 王峰,杨宵鹏,丁一,等.脑囊虫病患儿脑脊液中 NQ IL-1 β 和 TNF- α 的研究[J]. 河南实用神经疾病杂志, 2003, 6(4): 24, 50

[11] 周芬,子建文,刘文彬.脑囊尾蚴病患儿细胞免疫功能观察[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2002 20(1): 61

[12] 张唯哲,徐之杰,赵育莹,等.囊虫病患者 IL-2及 sIL-2R测定[J]. 中国寄生虫病防治杂志, 1997 10(2): 97-99

[13] 李淑红,陈丽,易世红.囊虫病患者免疫功能变化的研究[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1998 16(4): 310-311

[14] 黄静,吴文辉,冯冰,等.囊虫病患者血清 sIL-2R、TNF- α 、IL-6和 IL-8治疗前后的变化[J]. 中华传染病杂志, 2001 19(5): 316-317

[15] Restrepo BJ, Laguna P, Sandoval MA et al. Analysis of immune lesions in neurocysticercosis patients: Central nervous system response to helminth appears Th1-like instead of Th2[J]. J Neuroimmunol 1998, 89(1-2): 64-72

[16] Restrepo BJ, Alvarez JJ, Castano JA et al. Brain granulomas in neurocysticercosis patients are associated with a Th1 and Th2 profile[J]. Infect Immun 2001, 69(7): 4554-4560

[17] 徐宏秀,李文,时茂茂,等. RT-PCR检测脑囊虫病患者 FN- γ 和 IL-10的研究[J]. 中国寄生虫病防治杂志, 2002 15(6): 365-366

[18] 徐宏秀,贾凤菊,刘玉冰,等.脑囊尾蚴患者 Th2型细胞因子的研究[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2002 20(6): 348-350

[19] Grewal JS, Kaur S, Bhatti G et al. Cellular immune responses in human neurocysticercosis[J]. Parasitol Res 2000 86(6): 500-503

[20] 郭瀛军,吴丹,孙树汉.猪囊尾蚴抗原 C1与 γ 干扰素融合蛋白在大肠杆菌中的表达[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1999 17(4): 215-217

[21] 吴丹,郭瀛军,孙树汉.猪囊尾蚴抗原与猪白细胞介素-4基因融合 DNA疫苗载体的构建[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1999 17(3): 172-174

[文章编号] 1000-2200(2007)02-0244-03

·综述·

组织芯片技术及其在肝癌研究中的应用

傅军 综述,高涌 审校

[关键词] 肝肿瘤;组织芯片;综述

[中国图书资料分类法分类号] R 735.7 [文献标识码] A

肝癌是世界上最常见的恶性肿瘤之一,且肝癌的预后很差。肝癌发生的分子机制仍有待进一步研究。20世纪90年代末出现的组织芯片技术为医学分子生物学提供了一种高通量、大样本及快速的分子水平的分析工具。本文就组织芯片技术及其在肝癌中的应用作一简要综述。

1 组织芯片的概念及发展

组织芯片(tissue chip)又称组织微阵列(tissue microarray, TMA),它是将数十至上千个不同个体的微小组织按预先设计或研究需要整齐地排放在一个石蜡模块而形成组织微阵列生物芯片,简称组织芯片。它克服了传统病理学方法和DNA芯片技术中存在的某些缺陷,使人类第一次有可能利用成百上千份自然或处于疾病状态的组织标本,同时研究某一个特定基因和基因所表达的产物。这对人类后基因组学的深入研究与发展,特别是对研究特定基因及其所表达的蛋白质与疾病之间的相互关系、疾病的分子诊断、预后

指标的确定、治疗靶点的定位、治疗效果的预测、抗体和药物的筛选以及基因治疗的研发等方面均有着十分重大的实用价值。1998年Kononen等^[1]首先提出组织芯片概念,他们制作了乳腺癌的组织芯片,研究发现石蜡包埋标本和新鲜标本的结果无显著差别,试验数据与传统病理切片相应研究结果完全一致。随后,组织芯片得到了越来越多的应用。

2 组织芯片的分类

根据需要可以制作各种不同组织的组织芯片,但目前用于科研的组织芯片多数是肿瘤组织芯片,从功能上它们可分为^[2,3]:(1)多肿瘤组织芯片(multi tumor TMA);(2)肿瘤进展组织芯片(tumor progression TMA);(3)肿瘤预后组织芯片(patient outcome TMA)。

3 组织芯片的制作及注意事项

3.1 组织芯片的基本制作过程^[1] (1)首先收集待研究的石蜡标本,经复核诊断后,确定具有代表性的合适区域并进行适当标记。(2)制作受体蜡块,通过组织芯片制作机细针打孔的方法(也有手工制作)在受体蜡块上打孔。(3)在供体蜡块上取数十至上千个圆柱形小组织(一般直径在0.6~

[收稿日期] 2006-02-10

[作者单位] 蚌埠医学院附属医院 普外科,安徽 蚌埠 233004

[作者简介] 傅军(1972-),男,主治医师。

2.0 mm), 再将它放在已制备好的受体石蜡块的小孔内。(4)对组织芯片蜡块进行切片: 其切片方式可与普通石蜡切片方法一样, 但用一套切片辅助系统(包括胶膜、光胶玻片、紫外线灯等)效果会更好。

3.2 组织芯片制作过程中应注意 (1)受体石蜡模块的质量^[4]: 受体石蜡模块要求在柔韧性和硬度之间要达到一个平衡。另外, 制作受体蜡块时要避免气泡出现。(2)宜选择较厚的存档组织蜡块, 定位要准确。(3)钻头打孔时要深浅适当、一致, 孔距要适宜, 打孔和推样不宜过猛。

4 组织芯片的特点

4.1 组织芯片的优点 (1)高通量 (high-throughput): 一次检测可获取大量的生物学信息。(2)大样本: 一次实验可分析成百上千种同一或不同疾病的组织标本。(3)省时快速, 简便经济: 几周之内可完成数千个组织标本的一个或数个基因表达或蛋白分子的定位、定量、定性分析。而所需费用仅为传统病理学方法的 1/10~1/100^[5]。(4)用途广泛: 可应用免疫组化 (HC)、荧光原位杂交 (FISH)、mRNA原位杂交、TUNEL、原位 PCR (5)结果可靠: 一次实验即可完成数千个组织标本的分析, 同时进行, 条件一致, 故无批内和批间误差。(6)对原始组织蜡块损坏小: 由于制作组织芯片钻取的组织很小 (直径 0.6~2.0 mm), 对原组织蜡块损坏不大, 原始组织块可反复使用。(7)利于大样本回顾性研究。

4.2 组织芯片的局限性 (1)构成组织芯片的小组织能否代表原来的组织: Moch^[2]和 Richter^[6]等强调, 组织芯片是对肿瘤群体的研究, 而不是对个体的研究。同时他们对组织异源性的影响进行了组织芯片与普通切片对比性研究, 研究结果显示差异并不影响到相关参数的确定。(2)无效组织: 要对供体石蜡标本进行准确的定位, 且组织样本的取材不宜过浅, 一般主张为 3 mm。(3)要避免组织片的移位或脱落: 组织芯片模块中组织标本表面必须平滑水平, 制成后应放置在 37℃的培养箱内 10~15 min。使用石蜡切片辅助带移系统进行干裱片及紫外线烤片有助于避免制片过程中组织片的移位或脱落。

5 组织芯片在肝癌中的应用

Fan等^[7]将肝细胞肝癌 (HCC)标本制成组织芯片, 用免疫组织化学技术检测 Hep Par1 的表达, 结果显示 Hep Par1 是肝细胞肝癌分化的敏感标志物。傅军等^[8]利用组织芯片技术, 检测焦点黏附激酶 (FAK)在 HCC中的表达, 结果表明 FAK在 HCC组织中表达明显增高。刘凯等^[9]建立了 HCC的组织芯片, 应用免疫组织化学技术检测 P21 和 Rb蛋白的表达情况。结果表明 P21 和 Rb蛋白表达缺失可能与 HCC 的发生发展有密切联系, 两者可能通过负反馈机制相互调节。何煦等^[10]应用组织芯片技术以免疫组织化学方法检测 HCC中 HBsAg 和 HBeAg 表达情况。结论提示: 随着 HCC 的发展, HBV (HBsAg 和 HBeAg) 抗原的表达降低。他们^[11]还研究 HCC 中库普弗细胞的分布情况, 结果表明在同一患者的肝组织标本中, HCC 组织中的库普弗细胞数少于癌旁及远癌正常组织, 随着肿瘤体积的增大和组织分化程度的降低, 库普弗细胞数减少。Wang等^[12]利用组织芯片技术研究 HCC 中 HBsAg 表达情况。结合 RT-PCR 和 Southern blot 方法, 认为 HBV DNA 整合 HCC 细胞中是 HBV 感染诱发肝癌

的分子机制。张卫国等^[13]应用组织芯片技术及免疫组织化学方法检测 HCC 中 KA1/CD82 蛋白的表达。认为 KA1/CD82 蛋白表达失可能与肝细胞癌恶性进展及转移能力增强有关。陆建平^[14]应用组织芯片技术研究分析肝脏良恶性病变中增殖细胞核抗原 (PCNA)、Ki-67 和微血管密度 (MVD) 的表达差异及其相互关系, 结果显示, PCNA 及 Ki-67 的高表达与肿瘤细胞的活跃增殖关系密切, 癌旁肝硬化组织也显示一定的增殖活性, 似乎预示有恶变可能。朱明华等^[15]应用组织芯片技术及免疫组织化学方法检测了 HCC 中 P16^{INK4a}、P21^{WAF1}、P33^{ING1b}、P53、P57^{KIP2}、P73、mdm2、ATM 的表达。研究表明癌组织中 8 种基因的阳性率均高于癌旁组织, 8 种基因在不同分化程度的 HCC 组织间表达没有统计学意义差异。另外, 他们^[16]还运用组织芯片技术对 HCC 中 5 种细胞周期蛋白 (cyclin A、cyclin B、cyclin D1、cyclin D3 及 cyclin E) 在癌组织、癌旁组织及正常肝组织中的表达情况进行研究。结果 5 种细胞周期蛋白均显示不同程度的过表达。同时表明在 HCC 中 G₁ 期的细胞周期蛋白处于高表达状态, 并与肿瘤侵袭有关。Wang等^[17]运用组织芯片技术对 HCC 中 HBx、p65、p38 和 ubiquitin (泛素) 进行研究。结果显示 HBx 激活 NF-κB 不是通过其反式激活能力。Hu等^[18]利用组织芯片技术研究发现 vimentin (波形蛋白) 的过表达与 HCC 的转移密切相关, 表明 vimentin 过表达在肝细胞肝癌转移中起着重要的作用。

6 总结与展望

组织芯片技术作为一种新的技术, 具有高通量、高效率、经济方便、准确及对原始石蜡块损伤小的特点, 基于组织和细胞水平的高通量技术, 能原位、定量、平行应用在 DNA、RNA 和蛋白水平的研究, 它必将广泛应用于基础及临床研究, 特别是在肿瘤方面的研究。

[参 考 文 献]

- [1] Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *J. Natl Med* 1998, 4(7): 844-847.
- [2] Moch H, Kononen J, Kallioniemi OP, et al. Tissue microarray. *J. Adv Anat Pathol* 2001, 8(1): 14-20.
- [3] Nocito A, Kononen J, Kallioniemi OP, et al. Tissue microarrays (TMA) for high-throughput molecular pathology research. *J. Int J Cancer* 2001, 94(1): 1-5.
- [4] 孙保存, 张诗武, 赵秀兰, 等. 组织芯片制备过程中的体会与注意事项. *J. 临床与实验病理学杂志*, 2002, 18(6): 658-659.
- [5] 季加孚. 生物芯片技术在肿瘤基础和临床研究中的应用. *J. 医学研究通讯*, 2003, 32(4): 44-47.
- [6] Richter J, Wagner U, Kononen J, et al. High-throughput tissue microarray analysis of cyclin E gene amplification and overexpression in urinary bladder cancer. *J. Am J Pathol* 2000, 157(3): 787-794.
- [7] Fan Z, van der Rijm M, Montgomery K, et al. Hep Par1 antibody stain for the differential diagnosis of hepatocellular carcinoma. *J. Mod Pathol* 2003, 16(2): 137-144.
- [8] 傅军, 高涌. 应用组织芯片研究焦点黏附激酶在肝细胞肝癌中的表达. *J. 蚌埠医学院学报*, 2006, 31(4): 339-340.
- [9] 刘凯, 何煦, 赵连三, 等. 利用组织芯片研究 P21^{WAF1}/CIP1 和 Rb 基因在肝细胞肝癌中的表达. *J. 癌症*, 2001, 20(10): 1015-1018.

- [10] 何 煦,刘 凯,赵连三,等.应用组织芯片技术研究肝癌与乙型肝炎感染的关系[J].华西医科大学学报,2002,33(3):329-331.
- [11] 何 煦,刘 凯,赵连三,等.肝细胞性肝癌中库普弗细胞的分佈及意义[J].中华肝脏病杂志,2002,10(3):177-184.
- [12] Wang Y, Wu MC, Sham JS, et al. Different expression of hepatitis B surface antigen between hepatocellular carcinoma and its surrounding liver tissue studied using a tissue microarray[J]. J Pathol, 2002, 197(5): 610-616.
- [13] 张卫国,王 一,吴伟清,等. KA 1/CD82蛋白表达与肝细胞癌侵袭转移[J].中华普通外科杂志,2002,17(9):539-541.
- [14] 陆建平,王 涛,王 一,等.组织芯片技术研究肝良性病变细胞增殖活性和微血管密度的差异[J].第二军医大学学报,2003,24(1):70-72.
- [15] 朱明华,倪灿荣,祝山峙,等.应用组织芯片检测肝细胞癌组织中 8种 P53相关基因的表达[J].癌症,2003,22(7):680-685.
- [16] 朱明华,倪灿荣,祝山峙,等.原发性肝细胞癌中 5种细胞周期蛋白的表达及其临床意义[J].中华病理学杂志,2003,32(5):440-443.
- [17] Wang T, Wang Y, Wu MC, et al. Activating mechanism of transcription factor NF- κ B regulated by hepatitis B virus X protein in hepatocellular carcinoma[J]. World J Gastroenterol, 2004, 10(3):356-360.
- [18] Hu L, Lau SH, Tzang CH, et al. Association of vimentin overexpression and hepatocellular carcinoma metastasis[J]. Oncogene, 2004, 23(1):298-302.

[文章编号] 1000-2200(2007)02-0246-02

· 综 述 ·

体外循环对肺脏的损伤及肺保护的研究进展

武开宏 综述,刘学刚 审校

[关键词] 体外循环;肺损伤;肺保护;综述

[中国图书资料分类法分类号] R 654.1 [文献标识码] A

随着体外循环(CPB)技术和外科技术的提高,心内直视手术的安全性大大提高。CPB对肺脏的损伤,从难以察觉的亚临床损伤到成人呼吸窘迫综合征(ARDS)(发生率约2%)^[1],仍然是临床常见的并发症,现就其损伤机制及防治方法的研究进展作一综述。

1 CPB对肺脏的损伤机制

1.1 系统性炎症反应(SIRS) (1)白细胞与血管内皮细胞黏附并在肺内聚集是引起损伤的前提条件,CPB开始后血液与体外管道接触,通过补体途径使CD11b/CD18迅速在白细胞表面表达并与血管内皮细胞表面的细胞间黏附分子-1(ICAM-1)结合,介导白细胞与内皮细胞的黏附,另外P选择素在介导中性粒细胞与内皮细胞在后微静脉上的黏附发挥重要的作用^[2]。(2)CPB时血液与体外管道及氧合器的接触及机械性剪切力使多形核白细胞激活并进一步释放血小板活化因子、肿瘤坏死因子、蛋白酶类如基质金属蛋白酶、弹性蛋白酶等。它们可使肺泡内皮的通透性增加,使肺的超微结构发生改变,从而引起肺的损伤^[3]。(3)花生四烯酸代谢产物如前列腺素、前列腺素E₂具有扩张肺血管的作用,而白三烯B₄和血栓素B₂使肺血管收缩,这些代谢产物在肺损伤中的具体作用相互机制还没完全阐明。Friedman等^[4]研究认为,CPB时花生四烯酸代谢产物相互之间机制的破坏是导致术后肺损伤的原因。(4)CPB期间肠黏膜缺血和再灌注损伤导致血管壁和内脏黏膜屏障损伤,通透性增加,大量内毒素得以进入体循环。内毒素可刺激多形核白细胞激活并释放大量炎性介质而引起肺脏的损伤。

1.2 肺脏的缺血一再灌注损伤 (1)CPB开始后,特别当腔

静脉完全阻断后,肺动脉的血供基本停止,此时支气管动脉和侧支循环是肺脏供血唯一途径。Schlensak等^[5]研究发现,CPB结束时支气管动脉的血流量降低为基础值的13%,60min后才恢复到基础值的水平,同时,支气管动脉和侧支循环的分布是不均匀的,肺脏相对其他器官处于高温状态,耗氧量大,容易发生缺血缺氧性损害。CPB时肺脏的缺血缺氧使II型上皮细胞合成表面活性物质减少,易发生肺不张。(2)肺血管内皮细胞缺血缺氧后亦可发生线粒体肿胀和细胞水肿,开放循环恢复血流后,大量氧合血液进入肺脏,内皮细胞产生大量的细胞毒性酶如髓过氧化物酶,导致缺血一再灌注损伤。此处由于肺组织缺氧,导致呼吸链中氧化酶受抑制,产生大量超氧阴离子等氧自由基加重肺损害。

2 肺保护的研究进展

2.1 药物干预 通过围手术期给药达到预防和治疗目的,针对炎症反应的不同层次、不同阶段,吸入外源性一氧化氮可降低肺血管阻力,改善肺的顺应性;利用可溶性补体受体-1(SCR-1)抑制补体的激活和释放^[6];白细胞黏附抑制剂NPC15669可减少CD11b/CD18D表达,从而减轻白细胞在肺内的聚集滞留^[7];抑肽酶能限制肿瘤坏死因子、弹性蛋白酶的释放和补体的激活,但Engberger等^[8]则认为小剂量抑肽酶不能抑制由CPB引起的炎症反应,但能改善术后出血;甲泼尼龙能有效阻止各种炎性介质的释放,从而减轻了CPB对肺脏的损伤^[9];乌司他丁能抑制溶酶体酶的释放,并能抑制氧自由基的产生及黏附分子的表达,所以对CPB术后的肺脏可以起到很好的保护作用^[10]。

2.2 外循环装置和技术的改进 膜式氧合器已广泛应用于临床,主要特点是血液和气体不直接接触,红细胞损伤、血浆蛋白变性以及气栓、血栓的发生率都比鼓泡式氧合器低,更加符合人体的生理状态。搏动性CPB对肺内白细胞聚集及氧自由基产生和脂质过氧化都有明显抑制作用。肝素化管

[收稿日期] 2006-02-13

[作者单位] 蚌埠医学院附属 胸心外科,安徽 蚌埠 233004

[作者简介] 武开宏(1978-),男,博士研究生,住院医师。