

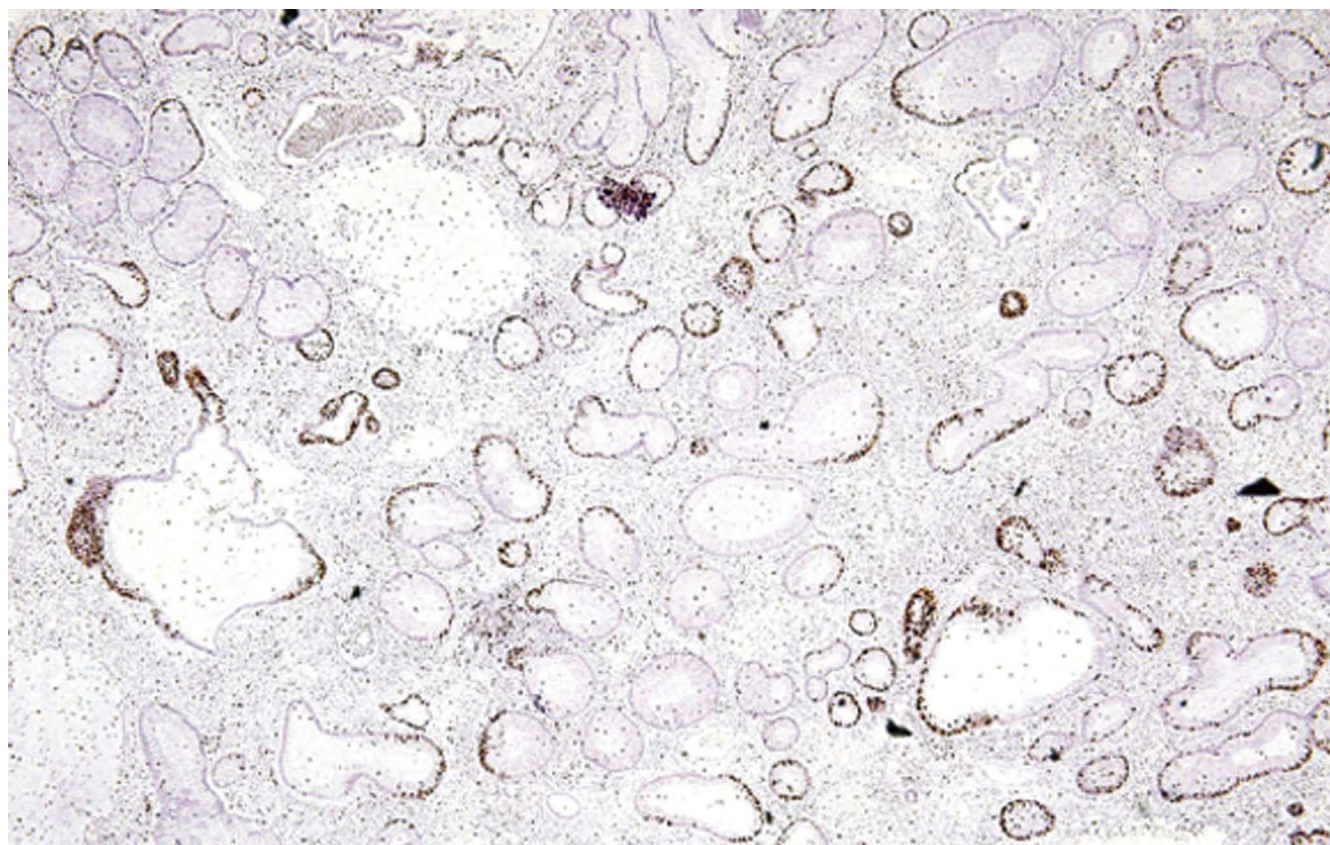
ISSN 1009-3079 (print)
ISSN 2219-2859 (online)

世界华人消化杂志®

**WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY**

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2014 年 3 月 28 日 第 22 卷 第 9 期 (Volume 22 Number 9)



9/2014

ISSN 1009-3079



《世界华人消化杂志》是一份同行评议性的旬刊，是一份被《中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊。《世界华人消化杂志》的英文摘要被《Chemical Abstracts》，《EMBASE/Excerpta Medica》，《Abstracts Journals》和《Digital Object Identifier》收录。

世界华人消化杂志®

编辑委员会

2012-01-01/2014-12-31

wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

《世界华人消化杂志》编辑委员会成员,由485位专家组成,分布在30个省市,自治区,特别行政区。其中,上海市81位、北京市71位、广东省40位、江苏省39位、辽宁省24位、陕西省22位、黑龙江省20位、湖北省18位、天津市16位、吉林省15位、湖南省14位、福建省13位、山东省13位、广西壮族自治区11位、河北省10位、四川省10位、浙江省10位、重庆市9位、安徽省8位、江西省8位、贵州省7位、新疆维吾尔自治区6位、云南省6位、海南省2位、河南省3位、甘肃省2位、宁夏回族自治区2位、山西省2位、内蒙古自治区1位和香港特别行政区1位。

总顾问

陈可冀教授
黄志强教授
纪小龙教授
王宝恩教授
王苑本教授
杨春波教授
杨思风教授
姚希贤教授
张万岱教授
周学文教授

名誉主编

潘伯荣教授

主编

程英升教授
党双锁教授
江学良教授
刘连新教授
刘占举教授
吕宾教授
马大烈教授
王俊平教授
王小众教授
姚登福教授
张宗明教授

编委

消化内科学

白爱平副教授
白岚教授
卜平教授
陈国忠主任医师
陈洪刚教授
陈其奎教授
陈卫昌教授
陈贻胜教授
程斌教授
迟宝荣教授
崔立红教授
邓鑫教授
丁士刚教授
董蕾教授
杜雅菊主任医师
杜奕奇副教授
樊冬梅副主任医师
樊晓明教授

房静远教授
冯志杰主任医师
傅春彬主任医师
甘华田教授
高凌副教授
戈之铮教授
关玉盘教授
关晓辉主任医师
郭晓钟教授
郝建宇教授
郝丽萍副教授
何继满教授
何松教授

洪天配教授
黄培林教授
黄晓东主任医师
黄颖秋教授
黄缘教授
季国忠教授
江米足教授
姜春萌教授
姜慧卿教授
姜相君主任医师
金瑞教授
蓝宇教授
李淑德教授
李瑜元教授
李玉民教授
廖家智副主任医师

林志辉教授
刘冰熔教授
刘凤斌教授
刘改芳主任医师
刘海峰主任医师
刘海林主任医师
刘亮明副教授
陆伦根教授
马红主任医师
马欣主任医师
毛恩强教授
毛高平教授
孟庆华教授
缪应雷主任医师
倪润洲教授
欧希龙副教授
潘秀珍教授
潘阳林副教授
朴云峰教授

秦成勇教授
任粉玉教授
任建林教授
邵先玉教授
沈琳主任医师
沈薇教授
施瑞华教授
宋军副教授
唐世刚教授
田宇彬教授
度必光教授
宛新建副教授
王邦茂教授
王炳元教授
王承党教授
王江滨教授
王蔚虹教授
王晓艳副教授
夏冰教授
夏时海副教授
徐灿霞教授
徐可树教授
杨建民教授
张国主任医师
姚树坤教授
张国梁主任医师
张军教授
张庆瑜教授
张小晋主任医师
张筱茵副教授
张志坚教授
郑培永教授
郑鹏远教授
郑素军副主任医师
郑勇教授
周国雄主任医师
周宇教授
邹晓平主任医师
诸琦教授
于珮主任医师

消化外科学

白雪副主任医师
白雪巍副主任医师
白玉作教授
蔡开琳副教授
蔡三军主任医师
曹杰主任医师

陈炳官教授
陈光教授
陈海龙教授
陈积圣教授
陈进宏副主任医师
陈凜教授
陈汝福教授
陈亚军主任医师
陈钟教授
程爱国教授
程树群副教授
崔云甫教授
戴朝六教授
戴冬秋教授
丁义涛教授
杜顺达副教授
房林教授
傅红副教授
傅华群教授
傅思源副教授
傅晓辉副教授
傅志仁主任医师
高毅主任医师
葛海燕教授
巩鹏副教授
谷俊朝主任医师
顾国利副主任医师
顾岩教授
韩天权教授
郝纯毅主任医师
郝立强副教授
何超教授
何向辉教授
何晓顺教授
何裕隆教授
胡安斌副教授
黄志勇教授
季加孚教授
姜卫东教授
姜波健教授
金山主任医师
康春博副主任医师
孔静副教授
黎乐群教授
李革副教授
李国威教授
李华副教授
李华山主任医师

李升平教授
李胜研究员
李涛副主任医师
李文岗教授
李小荣教授
李旭副教授
李永翔教授
李正荣副教授
李志霞教授
李宗芳教授
梁力建教授
刘宝林教授
刘超教授
刘宏鸣副教授
刘建教授
刘亮副主任医师
刘颖斌主任医师
卢军华教授
陆云飞教授
禄韶英副教授
吕凌副教授
吕云福教授
麻勇研究员
齐清会教授
秦春宏副主任医师
秦华东教授
秦环龙教授
秦建民主任医师
邱伟华主任医师
仇毓东教授
崔清波副教授
单云峰副主任医师
沈柏用副教授
施宝民教授
施诚仁教授
施晓雷副主任医师
石毓君研究员
宋新明教授
宋振顺教授
孙诚谊教授
孙文兵教授
孙星副教授
孙学英教授
邵升副教授
谭晓冬教授
汤朝晖副主任医师
汤绍涛教授
唐南洪教授

田晓峰教授
汪波主任医师
汪根树副教授
王道荣主任医师
王德盛副主任医师
王凤山教授
王刚副研究员
王健生教授
王蒙副教授
王石林主任医师
王文跃主任医师
王悦华副主任医师
王振宁教授
王铮副研究员
王正康教授
王志刚副主任医师
王忠裕教授
吴泰璜教授
伍晓汀教授
谢敏主任医师
徐迅迪教授
徐泱副主任医师
许戈良教授
许剑民教授
薛东波教授
杨柏霖副主任医师
杨桦教授
杨家和主任医师
杨银学教授
殷正丰教授
于聪慧教授
俞继卫副主任医师
于则利教授
禹正杨副教授
喻春钊教授
张必翔主任医师
张宏伟教授
张佳林教授
张进祥副教授
张俊副研究员
张力为副教授
张伟辉主任医师
赵刚副教授
赵青川主任医师
智绪亭教授
周伟平教授
周翔宇副主任医师
邹小明教授

消化感染病学

白浪副教授
陈国凤主任医师
陈红松研究员
陈建杰教授
陈志辉副主任医师

丁惠国教授
范建高教授
范小玲主任医师
范学工教授
方今女教授
高润平教授
高泽立副教授
龚国忠教授
管世鹤副教授
郭永红副主任医师
胡国信主任医师
靳雪源主任医师
林潮双副教授
刘正稳教授
彭亮副主任医师
钱林学主任医师
孙殿兴主任医师
谭德明教授
汤华研究员
王建明副教授
王凯教授
王怡主任医师
吴君主任医师
宣世英教授
杨江华副教授
姚鹏副教授
张明辉副主任医师
张占卿主任医师
赵桂鸣主任医师
赵秀英副教授
周陶友副教授
周霞秋教授
朱传武教授
庄林主任医师

消化中医药学

陈治水主任医师
杜群副研究员
扈晓宇主任医师
黄恒青主任医师
李军祥教授
李康副教授
李晓波教授
李勇副教授
李振华教授
刘成海研究员
刘绍能主任医师
鲁玉辉副教授
南极星教授
牛英才研究员
谭周进教授
王富春教授
王来友副教授
王笑民主任医师

邢建峰副教授
徐列明教授
许玲教授
徐庆教授
袁红霞研究员
张声生教授

消化肿瘤学

曹秀峰教授
曹志成院士
代智副研究员
侯风刚副教授
江建新副主任医师
蒋敬庭教授
李苏宜教授
李瑗教授
刘宝瑞教授
刘炳亚研究员
刘平教授
刘云鹏教授
卢宁副主任医师
卢晓梅教授
朴龙镇副教授
沈克平主任医师
王阁教授
王锐副主任医师
吴建兵教授
向德兵副教授
肖文华主任医师
肖秀英副主任医师
谢丹教授
张凤春教授

消化影像学

白彬主任医师
官泳松教授
胡红杰主任医师
李健丁教授
龙学颖副主任医师
倪才方教授
魏经国教授
肖恩华教授
徐辉雄教授
严惟力副教授
杨薇副教授
赵卫主任医师

消化内镜及介入治疗学

郝俊鸣副主任医师
李家平教授
刘杰民副主任医师
茅爱武教授
孙明军教授
万军教授

吴沛宏教授
余日胜主任医师
袁友红副教授
张火俊副教授

消化中西医结合学

范恒教授
唐文富副教授
王学美研究员
魏睦新教授
杨钦河教授
袁建业副研究员
张春虎副教授
朱西杰教授

消化基础研究

曹洁副教授
曹鹏副研究员
陈敬贤教授
陈志龙教授
崔莲花副教授
段义农教授
樊红教授
高国全教授
高英堂研究员
管冬元副教授
郭长江研究员
郭俊明教授
何红伟副研究员
何敏教授
黄昆教授
黄文林教授
黄园教授
洪艳教授
李刚教授
李君文研究员
李孟森教授
李文贵副教授
李焱副研究员
李增山副教授
刘长征副教授
刘克辛教授
刘森副教授
宁钧宇副研究员
彭宗根副研究员
任超世研究员
任浩副教授
任晓峰副教授
邵华副主任药师
沈东炎副教授
沈涛副教授
斯坎德尔·白克力教授
台桂香教授
谭学瑞教授

汤静主管药师
滕旭副教授
田文静副教授
汪思应教授
王钦红教授
王书奎教授
魏继福研究员
文彬研究员
吴道澄教授
吴江锋副教授
吴军研究员
吴俊华副教授
吴志强副教授
夏敏教授
徐健副主任医师
徐宁志研究员
许文燮教授
杨晓明教授
阴赓宏研究员
郁卫东副研究员
喻荣彬教授
曾柱教授
张红教授
张淑坤副研究员
赵平教授
赵铁建教授
周南进研究员
周素芳教授
周晓武副主任医师
朱益民教授
竺亚斌研究员

消化病理学

陈云昭副教授
邓昊副教授
杜祥教授
樊祥山副主任医师
郭炜教授
季菊玲副教授
李淳副教授
李晟磊副主任医师
刘丽江教授
刘勇钢副主任医师
门秀丽教授
莫发荣副教授
潘兴华副主任医师
王鲁平主任医师
王娅兰教授
颜宏利副教授
于颖彦教授
余宏宇教授
张锦生教授
赵春玲副教授
朱亮副教授

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ● 2014 年 3 月 28 日 第 22 卷 第 9 期 (总第449期)

基础研究	1193 不同肠内营养制剂对小鼠肝切除术后肝再生及其结构功能的影响 段飞, 陈靓, 訾雪剑, 伏旭, 姚辉, 伏晓, 仇毓东
临床研究	1201 丙泊酚联合咪达唑仑及利多卡因在老年胃镜检查中麻醉效果的比较 卢海龙, 应佩华, 李伟杰 1207 乙型肝炎病毒相关肝癌组织及外周血膜联蛋白A2异常表达的临床意义 陈雯, 张海健, 顾星, 时运, 钱琦, 姚登福, 陆少林
文献综述	1214 维生素D在肝病中作用的研究进展 赵景, 郑素军 1219 肿瘤微环境在肝细胞癌中的作用 李晓鹏, 崔东来 1226 CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ Treg细胞与肝移植免疫耐受的关系 廖晖, 杨定华 1235 uPA/uPAR系统在肿瘤中作用的研究进展 尚润泽, 戴斌, 王德盛 1241 抵抗素与胰岛素抵抗及肥胖关系的研究进展 陈信, 张琼方, 何颂华, 张意, 周时高
研究快报	1247 解毒化瘀健脾方对胃黏膜异型增生模型大鼠p16、PTEN基因的去甲基化和蛋白诱导表达 李志钢, 张伟, 邱作成, 夏宽宏, 纪勇, 李玲, 连军, 安娟 1256 双氢青蒿素联合吉西他滨治疗胰腺癌及其机制 吴伟林, 郑继行, 陈玲玲, 蔡振寨, 薛战雄 1262 大黄酸与A2建立大鼠“泻剂结肠”模型的比较 刘兴, 王文革, 次苗苗 1266 HIPK2调控COX-2及β-catenin表达对人结直肠癌细胞VEGF表达的影响 胡强, 周利红, 刘宣, 隋华, 付晓伶, 颜琳琳, 任建琳, 李琦
临床经验	1275 胃泌素与骨桥蛋白在胃癌及癌前病变组织中表达的相关性 苏薇, 吴会超, 杨莹莹, 穆媛媛 1280 肝肠钙黏蛋白在新疆哈萨克族、汉族胃腺癌中的表达及意义 谷翠华, 尚国臣, 李睿, 田书信, 陈卫刚, 郑勇 1285 肝包虫内囊摘除术后胆漏再手术治疗9例 陈长义, 陈耀堂, 李慧明, 田希兰, 张志红, 时煜山 1289 肝病者肝病严重程度与心功能的相关性 朱飞飞, 何庆荣, 李兆一, 党立群, 夏庆 1294 非酒精性脂肪性肝病合并自身免疫异常132例 吴凤娟, 徐芸, 保洁, 刘象 1300 广西地区丙型肝炎病毒的基因型分布与流行病学特征 唐维, 苏明华, 江建宁, 刘志红, 韦智, 晏双龙, 覃锦耀, 滕春玲 1307 脂肪肝患者肝脏剪切波速度与实验室指标的关系 王宇, 李广霞, 李素梅, 邹松平, 靳元 1312 胆肠吻合术后早期进食与传统进食的临床疗效对比 彭沙沙, 段健, 黄汉飞, 林杰, 徐王刚, 黄智, 苏子庭, 曾仲 1317 监护室新生儿长期胃肠外营养致胆汁淤积症的表现及预后 赵军育, 吴立江, 刘晓莉 1322 定量检测溃疡性结肠炎患者血清色氨酸的临床意义 苏丽, 李楠, 吴凯, 王欣, 张萌 1328 CacyBP/SIP在不同大肠组织中的表达及临床意义 翟惠虹, 冯珊珊, 仇长青, 武婧, 王安萍 1334 Survivin基因启动子区多态性与结肠癌易感性及临床意义的相关性 朱正明, 欧阳喜, 罗洪亮, 黄俊, 朱培谦

病例报告	1341 原发性肝脏平滑肌肉瘤1例 刘春华, 李庆彦, 管珊, 王思奎
附录	I-V 《世界华人消化杂志》投稿须知 I 2014年国内国际会议预告
志 谢	I 志谢世界华人消化杂志编委
消 息	1200 中国科技信息研究所发布《世界胃肠病学杂志(英文版)》影响因子0.873 1206 《世界华人消化杂志》再次入选《中文核心期刊要目总览》(2011年版) 1255 《世界华人消化杂志》于2012-12-26获得RCCSE中国权威学术期刊(A+)称号 1288 《世界华人消化杂志》参考文献要求 1340 《世界华人消化杂志》被评为中国精品科技期刊
封面故事	翟惠虹, 冯珊珊, 仇长青, 武婧, 王安萍. CacyBP/SIP在不同大肠组织中的表达及临床意义. 世界华人消化杂志 2014; 22(9): 1328-1333 http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/1328.asp http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i9.1328
本期责任人	编务 车新鑫; 送审编辑 鲁亚静, 郭鹏; 组版编辑 鲁亚静; 英文编辑 王天奇; 责任编辑 郭鹏; 形式规范审核编辑部主任 田滢; 最终清样审核总编 马连生

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
(旬刊)

创 刊 1993-01-15

改 刊 1998-01-25

出 版 2014-03-28

原刊名 新消化病学杂志

期刊名称

世界华人消化杂志

国际标准连续出版物号

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

主编

程英升, 教授, 200233, 上海市, 上海交通大学附属第六人民医院放射科

党双锁, 教授, 710004, 陕西省西安市, 西安交通大学医学院第二附属医院感染科

江学良, 教授, 250031, 山东省济南市, 中国人民解放军济南军区总医院消化科

刘连新, 教授, 150001, 黑龙江省哈尔滨市, 哈尔滨医科大学第一临床医学院普外科

刘占举, 教授, 200072, 上海市, 同济大学附属第十人民医院消化内科

吕宾, 教授, 310006, 浙江省杭州市, 浙江中医药大学附属医院(浙江省中医院)消化科

马大烈, 教授, 200433, 上海市, 中国人民解放军第二军医大学附属长海医院病理科
王俊平, 教授, 030001, 山西省太原市, 山西省人民医院消化科

王小众, 教授, 350001, 福建省福州市, 福建医科大学附属协和医院消化内科

姚登福, 教授, 226001, 江苏省南通市, 南通大学附属医院临床医学研究中心

张宗明, 教授, 100016, 北京市, 清华大学第一附属医院消化医学中心

编辑部

田滢, 主任

《世界华人消化杂志》编辑部

100025, 北京市朝阳区东四环中路62号,

远洋国际中心D座903室

电话: 010-59080035 手机: 13901166126

传真: 010-85381893

E-mail: wcjd@wjgnet.com

<http://www.wjgnet.com>

出版

百世登出版集团有限公司

Baishideng Publishing Group Co., Limited

Flat C, 23/F., Lucky Plaza, 315-321 Lockhart

Road, Wan Chai, Hong Kong, China

Fax: +852-3177-9906

Telephone: +852-6555-7188

E-mail: bpgoffice@wjgnet.com

<http://www.wjgnet.com>

制作

北京百世登生物医学科技有限公司

100025, 北京市朝阳区东四环中路62号,

远洋国际中心D座903室

电话: 010-85381892

传真: 010-85381893

《世界华人消化杂志》被《中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)》,《中文核心期刊要目总览(2011年版)》,《Chemical Abstracts》,《EMBASE/Excerpta Medica》,《Abstracts Journals》和《Digital Object Identifier》收录。

《世界华人消化杂志》在中国科学技术信息研究所, 2012-12-07发布的2011年度《中国科技期刊引证报告(核心版)》统计显示, 总被引频次3871次(他引率0.82), 影响因子0.775, 综合评价总分65.5分, 分别位居内科学领域类52种期刊第5位、第7位和第5位, 并荣获2011年度中国精品科技期刊。

《世界华人消化杂志》正式开通了在线办公系统(<http://www.baishideng.com/wcjd/ch/index.aspx>), 所有办公流程一律可以在线进行, 包括投稿、审稿、编辑、审读, 以及作者、读者、编者之间的信息反馈交流。

特别声明

本刊刊出的所有文章不代表本刊编辑部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。

定价

每期90.67元 全年36期3264.00元

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有

World Chinese Journal of Digestology

March 2014 Contents in Brief Volume 22 Number 9

BASIC RESEARCH	1193 Effects of two kinds of enteral nutrition preparations on liver regeneration and function in mice after partial hepatectomy <i>Duan F, Chen L, Zi XJ, Fu X, Yao H, Fu X, Qiu YD</i>
CLINICAL RESEARCH	1201 Effects of propofol with midazolam versus lidocaine during gastroscopy in elderly patients <i>Lu HL, Ying PH, Li WJ</i> 1207 Overexpression of annexin A2 in hepatic tissue and serum of patients with HBV-associated hepatocellular carcinoma <i>Chen W, Zhang HJ, Gu X, Shi Y, Qian Q, Yao DF, Lu SL</i>
REVIEW	1214 Role of vitamin D in liver diseases <i>Zhao J, Zheng SJ</i> 1219 Role of tumor microenvironment in hepatocellular carcinoma <i>Li XP, Cui DL</i> 1226 CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ Treg cells and liver transplant tolerance <i>Liao H, Yang DH</i> 1235 Role of uPA/uPAR system in tumors <i>Shang RZ, Dai B, Wang DS</i> 1241 Role of resistin in insulin resistance and obesity <i>Chen X, Zhang QF, He SH, Zhang Y, Zhou SG</i>
RAPID COMMUNICATION	1247 Jiedu Huayu Jianpi Fang induces demethylation and increased expression of <i>p16</i> and <i>PTEN</i> genes in gastric dysplasia in rats <i>Li ZG, Zhang W, Qiu ZC, Xia KH, Ji Y, Li L, Lian J, An J</i> 1256 Effect of dihydroartemisinin combined with gemcitabine for treatment of pancreatic cancer in mice <i>Wu WL, Zheng JX, Chen LL, Cai ZZ, Xue ZX</i> 1262 Comparison of rat models of cathartic colon established with rhein and rhubarb <i>Liu X, Wang WG, Ci MM</i> 1266 HIPK2 reduces VEGF expression by regulating expression of COX-2 and β -catenin in human colorectal cancer cells <i>Hu Q, Zhou LH, Liu X, Sui H, Fu XL, Yan LL, Ren JL, Li Q</i>
CLINICAL PRACTICE	1275 Correlation between expression of gastrin and osteopontin in gastric carcinoma <i>Su W, Wu HC, Yang YY, Mu YY</i> 1280 Significance of expression of Li-cadherin in gastric adenocarcinoma in Xinjiang Kazakh and Han patients <i>Gu CH, Shang GC, Li R, Tian SX, Chen WG, Zheng Y</i> 1285 Reoperation for biliary leakage after hepatic hydatid cyst removal <i>Chen CY, Chen YT, Li HM, Tian XL, Zhang ZH, Shi YS</i> 1289 Correlation between severity of liver diseases and left ventricular function in patients with liver diseases <i>Zhu FF, He QR, Li ZY, Dang LQ, Xia Q</i> 1294 Non-alcoholic fatty liver disease complicated with autoimmune problems: Analysis of 132 cases <i>Wu FJ, Xu Y, Bao J, Liu X</i> 1300 Epidemiological characteristics and genotype distribution of hepatitis C virus in Guangxi <i>Tang W, Su MH, Jiang JN, Liu ZH, Wei Z, Yan SL, Qin JY, Teng CL</i> 1307 Virtual touch tissue quantification and biochemical indicators for quantitative diagnosis of fatty liver <i>Wang Y, Li GX, Li SM, Zou SP, Jin Y</i> 1312 Clinical effects of early postoperative oral feeding versus traditional oral feeding after bilioenteric anastomosis <i>Peng SS, Duan J, Huang HF, Lin J, Xu WG, Huang Z, Su ZT, Zeng Z</i> 1317 Clinical manifestations and prognosis of long-term parenteral nutrition induced cholestasis in neonates <i>Zhao JY, Wu LJ, Liu XL</i> 1322 Clinical significance of quantitative detection of serum tryptophan in patients with ulcerative colitis <i>Su L, Li N, Wu K, Wang X, Zhang M</i> 1328 Clinical significance of expression of CacyBP/SIP in colorectal tissues <i>Zhai HH, Feng SS, Qiu CQ, Wu J, Wang AP</i> 1334 <i>Survivin</i> gene promoter polymorphisms: Clinical significance and association with susceptibility to colon cancer <i>Zhu ZM, Ouyang X, Luo HL, Huang J, Zhu PQ</i>

CASE REPORT	1341 A case of primary leiomyosarcoma of the liver <i>Liu CH, Li QY, Guang S, Wang SK</i>
APPENDIX	I – V Instructions to authors of <i>World Chinese Journal of Digestology</i> I Meeting events calendar in 2014
ACKNOWLEDGMENT	I Acknowledgments to reviewers of <i>World Chinese Journal of Digestology</i>
COVER	<i>Zhai HH, Feng SS, Qiu CQ, Wu J, Wang AP.</i> Clinical significance of expression of CacyBP/SIP in colorectal tissues. <i>Shijie Huaren Xiaohua Zazhi</i> 2014; 22(9): 1328-1333 http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/1328.asp http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i9.1328
RESPONSIBLE EDITORS FOR THIS ISSUE	Assistant Editor: <i>Xin-Xin Che</i> Review Editor: <i>Ya-Jing Lu, Peng Guo</i> Electronic Page Editor: <i>Ya-Jing Lu</i> English Language Editor: <i>Tian-Qi Wang</i> Editor-in-Charge: <i>Peng Guo</i> Proof Editor: <i>Ying Tian</i> Layout Editor: <i>Lian-Sheng Ma</i>

Indexed/Abstracted by Chemical Abstracts, EMBASE/ Excerpta Medica, Abstract Journals and Digital Object Identifier

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

Founded on January 15, 1993

Renamed on January 25, 1998

Publication date March 28, 2014

NAME OF JOURNAL

World Chinese Journal of Digestology

ISSN

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

EDITOR-IN-CHIEF

Ying-Sheng Cheng, Professor, Department of Radiology, Sixth People's Hospital of Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200233, China

Shuang-Suo Dang, Professor, Department of Infectious Diseases, the Second Affiliated Hospital of Medical School of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, Shaanxi Province, China

Xue-Liang Jiang, Professor, Department of Gastroenterology, General Hospital of Jinan Military Command of Chinese PLA, Jinan 250031, Shandong Province, China

Lian-Xin Liu, Professor, Department of General Surgery, the First Clinical Medical College of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China

Zhan-Ju Liu, Professor, Department of Gastroenterology, Shanghai Tenth People's Hospital, Tongji University, Shanghai 200072, China

Bin Lv, Professor, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hang-zhou 310006, Zhejiang Province, China

Da-Lie Ma, Professor, Department of Pathology,

Changhai Hospital, the Second Military Medical University of Chinese PLA, Shanghai 200433, China

Jun-Ping Wang, Professor, Department of Gastroenterology, People's Hospital of Shanxi, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China

Xiao-Zhong Wang, Professor, Department of Gastroenterology, Union Hospital, Fujian Medical University, Fuzhou 350001, Fujian Province, China

Deng-Fu Yao, Professor, Clinical Research Center, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China

Zong-Ming Zhang, Professor, Department of General Surgery, Digestive Medical Center, the First Affiliated Hospital, School of Medicine, Tsinghua University, Beijing 100016, China

EDITORIAL OFFICE

Ying Tian, Director

World Chinese Journal of Digestology

Room 903, Building D, Ocean International Center, No. 62 Dongsihuan Zhonglu, Chaoyang District, Beijing 100025, China
Telephone: +86-10-59080035 13901166126
Fax: +86-10-85381893

E-mail: wcjd@wjgnet.com
<http://www.wjgnet.com>

PUBLISHER

Baishideng Publishing Group Co., Limited
Flat C, 23/F., Lucky Plaza,
315-321 Lockhart Road, Wan Chai,
Hong Kong, China
Fax: +852-3177-9906
Telephone: +852-6555-7188

E-mail: bpg@baishideng.com

<http://www.wjgnet.com>

PRODUCTION CENTER

Beijing Baishideng BioMed Scientific Co., Limited
Room 903, Building D, Ocean International Center, No. 62 Dongsihuan Zhonglu, Chaoyang District, Beijing 100025, China
Telephone: +86-10-85381892
Fax: +86-10-85381893

PRINT SUBSCRIPTION

RMB 90.67 Yuan for each issue
RMB 3264 Yuan for one year

COPYRIGHT

© 2014 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved. Articles published by this Open Access journal are distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-commercial License, which permits use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non commercial and is otherwise in compliance with the license.

SPECIAL STATEMENT

All articles published in this journal represent the viewpoints of the authors except where indicated otherwise.

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

Full instructions are available online at www.wjgnet.com/1009-3079/tgxz.asp. If you do not have web access please contact the editorial office.

不同肠内营养制剂对小鼠肝切除术后肝再生及其结构功能的影响

段飞, 陈靛, 瞿雪剑, 伏旭, 姚辉, 伏晓, 仇毓东

段飞, 陈靛, 瞿雪剑, 伏旭, 姚辉, 伏晓, 仇毓东, 南京大学医学院附属鼓楼医院肝胆胰外科 江苏省南京市 210008
段飞, 2011级南京大学硕士, 主要从事肝再生与营养支持的研究。
作者贡献分布: 此课题由仇毓东与段飞设计; 研究过程由段飞、陈靛、瞿雪剑及伏旭操作完成; 研究所用新试剂与分析工具由仇毓东提供; 数据分析由段飞、姚辉及伏晓完成; 本论文写作由段飞完成。

通讯作者: 仇毓东, 教授, 主任医师, 210008, 江苏省南京市中山路321号, 南京大学医学院附属鼓楼医院肝胆胰外科。

yudongqiu510@163.com

收稿日期: 2013-12-17 修回日期: 2014-01-22

接受日期: 2014-02-03 在线出版日期: 2014-03-28

Effects of two kinds of enteral nutrition preparations on liver regeneration and function in mice after partial hepatectomy

Fei Duan, Liang Chen, Xue-Jian Zi, Xu Fu, Hui Yao, Xiao Fu, Yu-Dong Qiu

Fei Duan, Liang Chen, Xue-Jian Zi, Xu Fu, Hui Yao, Xiao Fu, Yu-Dong Qiu, Department of Hepatopancreatobiliary Surgery, the Affiliated Drum Tower Hospital of Nanjing University Medical School, Nanjing 210008, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Yu-Dong Qiu, Professor, Chief Physician, Department of Hepatopancreatobiliary Surgery, the Affiliated Drum Tower Hospital of Nanjing University Medical School, 321 Zhongshan Road, Nanjing 210008, Jiangsu Province, China. yudongqiu510@163.com

Received: 2013-12-17 Revised: 2014-01-22

Accepted: 2014-02-03 Published online: 2014-03-28

Abstract

AIM: To investigate the effects of two kinds of enteral nutrition preparations on liver regeneration and function in mice after partial hepatectomy (PH).

METHODS: A mouse model of oral enteral nutrition (EN) after 70%PH was used in this study. Seventy-two male ICR mice were randomly divided into a PH control group (routine diet after PH), a TP-MCT group (EN with TP-MCT after PH) and a SP group (EN with Peptisorb after PH). Serum samples and liver tissue specimens were collected 1, 3 and 7 d after PH. Serum samples were used to measure the levels of alanine

aminotransferase (ALT), aspartate transaminase (AST), albumin, interleukin-6 (IL-6) and IL-10. The liver tissue specimens were used to measure the proliferation of hepatocytes and the morphology of liver tissue by immunohistostaining and HE staining.

RESULTS: In comparison with the PH control group, serum levels of ALT and AST on days 1, 3 and 7 decreased significantly in the TP-MCT group and SP group ($P < 0.05$ for all). Compared with the PH control group, the level of IL-6 on day 1 decreased significantly in the TP-MCT group and SP group, but the level of IL-10 increased significantly in the TP-MCT group and SP group ($P < 0.05$ for all). Liver regeneration was enhanced significantly on days 1, 3 and 7 in the TP-MCT group and SP group, especially in the SP group.

CONCLUSION: Enteral nutrition can well protect mouse liver function and promote liver regeneration after PH, with SP (Peptisorb) having a better effect.

© 2014 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

Key Words: Hepatectomy; Enteral nutrition; Peptisorb; TP-MCT

Duan F, Chen L, Zi XJ, Fu X, Yao H, Fu X, Qiu YD. Effects of two kinds of enteral nutrition preparations on liver regeneration and function in mice after partial hepatectomy. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(9): 1193-1200 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/1193.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22i9.1193>

摘要

目的: 探讨两种不同肠内营养(enteral nutrition, EN)制剂对小鼠肝切除术后肝脏再生及其结构功能的影响。

方法: 建立小鼠70%肝切除术后口服EN模型, ♂ ICR小鼠72只随机均分为70%肝切除对照组

■背景资料

肠内营养(enteral nutrition, EN)在围手术期中营养支持治疗中的作用越来越受到重视。EN不仅能提供能量支持, 控制术后过度炎症反应, 更有利于肝脏的结构和功能的维护。目前临床上常用的EN制剂分为整蛋白型(EN混悬液TP-MCT, 商品名康全甘)和短肽游离氨基酸混合型(EN混悬液SP, 商品名百普力), 而对于肝切除围手术期EN的制剂的选择目前并无相关文献报道。

■同行评议者

潘兴华, 副主任医师, 中国人民解放军成都军区昆明总医院干细胞与组织器官工程研究中心

■研究前沿

本研究采用小鼠70%肝切除模型,通过围手术期喂养上述两种不同类型的营养制剂,旨在探讨不同EN制剂对肝切除术后肝脏结构功能恢复和肝再生的影响,为EN在肝脏外科的应用提供有价值的实验依据。

(术后常规饮食)、EN混悬液TP-MCT组(70%肝切除后选用TP-MCT喂养)、EN混悬液SP组(70%肝切除后选用SP喂养)。检测术后1、3、7 d肝功能指标,肝再生情况和残肝组织病理学改变及相关炎症因子的情况。

结果:与对照组相比,SP组及TP-MCT组术后1、3、7 d外周血中谷丙转氨酶、谷草转氨酶有所降低,差异有统计学意义($P<0.05$);与对照组相比,SP组及TP-MCT组术后第1天血清抗炎因子白介素-10(interleukin-10, IL-10)水平有所上升,血清促炎因子IL-6水平有所降低($P<0.05$);与对照组相比,HE染色及PCNA显示SP组和TP-MCT组术后肝再生明显,肝脏结构得到恢复,特别是SP组于术后1、3、7 d呈现显著性肝脏再生。

结论:小鼠肝切除后予以EN,可以保护术后肝脏结构功能,促进肝再生,应用EN混悬液SP优于TP-MCT。

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词:肝切除;肠内营养;肠内营养混悬液SP;肠内营养混悬液TP-MCT

核心提示:该论文重点探讨了肠内营养混悬液TP-MCT和SP对70%肝组织切除小鼠的肝再生及炎症反应水平的影响,结果从不同营养制剂辅助或支持肝再生的角度提示临床医师重视肝组织切除手术后营养支持治疗的重要性,结果证实营养支持治疗对肝再生有支持作用,最大的亮点是对临床治疗有较大的参考价值。

段飞, 陈靓, 訾雪剑, 伏旭, 姚辉, 伏晓, 仇毓东. 不同肠内营养制剂对小鼠肝切除术后肝再生及其结构功能的影响. 世界华人消化杂志 2014; 22(9): 1193-1200 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/1193.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i9.1193>

0 引言

在当今外科学领域,学者们正积极致力于运用精准肝脏外科的理念和技术来保护肝切除术后肝功能,减少术后并发症^[1,2]。近年来,在手术技术与理念飞速发展的同时,肠内营养(enteral nutrition, EN)在围手术期中营养支持治疗中的作用越来越受到重视^[3,4]。相关基础研究表明,EN不仅能提供能量支持,控制术后过度炎症反应,更有利于肝脏的结构和功能的维护^[5,6]。目前临床上常用的EN制剂分为整蛋白型(EN混悬液TP-

MCT, 商品名康全甘)和短肽游离氨基酸混合型(EN混悬液SP, 商品名百普力),而对于肝切除围手术期EN制剂的选择目前并无相关文献报道。本研究采用小鼠70%肝切除模型,通过围手术期喂养上述两种不同类型的营养制剂,旨在探讨不同EN制剂对肝切除术后肝脏结构功能恢复和肝再生的影响,为EN在肝脏外科的应用提供有价值的实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料 实验采用♂ICR小鼠72只,8-15周龄,体质量25-30 g(购自南京大学附属鼓楼医院动物实验中心)。饲养室温度为18℃-22℃,湿度为60%,每天光照12 h(6:00-18:00)。动物被随机分为3组(每组24只):70%肝切除对照组(术后常规饮食)、TP-MCT组(70%肝切除术后行TP-MCT口服EN支持)、SP组(70%肝切除术后行SP口服EN支持)。EN混悬液TP-MCT(TP-MCT, 商品名“康全甘”,1 kal/mL,批号: H20093283),EN混悬液SP(peptisorb, 商品名“百普力”,1 kal/mL,批号: H20010285),小鼠抗PCNA购自Invitrogen公司。

1.2 方法

1.2.1 模型建立:肝切除对照组术前禁食12 h,不禁水,行70%肝切除后行常规饮食。其他EN两组术前2 d起分别给予各自对应的EN液进行喂养,增加小鼠胃肠道适应,至术前12 h停止,术前不禁水,完成70%肝切除后,开始建立肝切除术后口服EN模型,即同组每2只小鼠置于1笼,每笼配备2个标有刻度的喂养瓶,分别灌装饮水和对应EN液,供小鼠随意饮用,此外不再供给小鼠其他任何营养能量来源。喂养瓶每日消毒换新并灌注新鲜营养液,同时计算并记录每笼每日营养液消耗量^[7]。所有小鼠均采用乙醚吸入麻醉,上述70%肝切除术即经典的Higgins-Anderson 70%肝切除术,依次切除小鼠左叶及中叶后关腹^[8]。

1.2.2 标本处理:各组分别于肝切除术后1、3、7 d处死小鼠,小鼠处死前称其体质量,处死后取出残肝,生理盐水漂洗后称质量,残肝组织保存方法:(1)部分组织固定在40 g/L甲醛保存;(2)部分组织放置液氮和-80℃冰箱中保存。

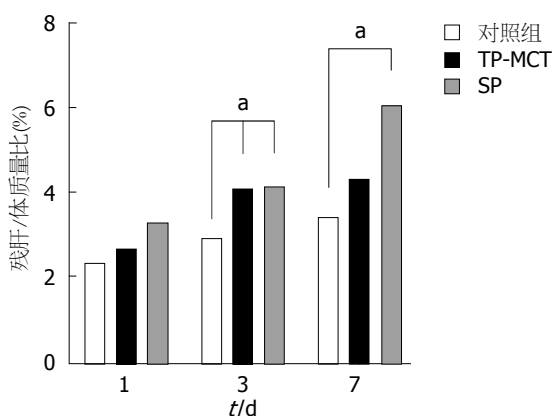
1.2.3 术后血清学指标检测:各组小鼠分别于肝切除术后1、3、7 d处死前取血,用生化分析仪检测血清中谷丙转氨酶(alanine aminotransferase,

表 1 小鼠肝切除后肠内营养液消耗量(mean \pm SD, $n = 8$, mL)

分组	术后时间(d)		
	1	2-3	4-7
TP-MCT组	14.8 \pm 2.6	21.4 \pm 3.2	21.2 \pm 2.8
SP组	13.6 \pm 3.5	19.3 \pm 3.2	19.6 \pm 1.7

表 2 小鼠肝切除后血清谷丙转氨酶的变化(mean \pm SD, $n = 8$, U/L)

分组	术后时间(d)		
	1	3	7
对照组	1478.9 \pm 80.0	339.6 \pm 30.2	132.5 \pm 27.2
TP-MCT组	975.5 \pm 26.4 ^a	167.8 \pm 50.6 ^a	37.3 \pm 15.2 ^a
SP组	786.7 \pm 78.5 ^b	55.3 \pm 17.2 ^b	30.8 \pm 14.8 ^a

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 对照组.图 1 小鼠肝切除术后残肝/体质量比. ^a $P < 0.05$ vs 相同时间对照组.

ALT)、谷草转氨酶(aspartate transaminase, AST)及白蛋白的水平.

1.2.4 组织病理学检测: 各组分别于肝切除术后1、3、7 d取0.5 cm \times 0.5 cm \times 0.5 cm左右小鼠肝组织在40 g/L甲醛中固定后, 包埋切片行HE染色, 并进行厚度为5 μ m的连续切片, HE染色观察肝脏病理结构的改变; PCNA免疫组织化学染色按试剂盒说明书进行, 免疫组织化学阳性结果判定标准: 以细胞核呈界限清楚的棕黄色-黄色反应为阳性. 每张切片随机选择相邻5个高倍视野, 每个视野计数100个肝细胞, 然后计算其平均阳性率.

1.2.5 血清白介素-6(interleukin-6, IL-6)、IL-10检测: 取各组小鼠1、3、7 d冻存血清, 使用炎症因子检测试剂盒(BD公司)检测血清IL-6、IL-10水平.

统计学处理 采用SPSS16.0统计软件分析,

■ 相关报道

EN作为外科营养支持的首选途径目前已经得到业界的广泛认同, EN较之肠外营养, 可以维持肠壁完整, 抑制肠源性感染, 增加门静脉血流, 促进胃肠激素释放, 刺激肝再生, 更加符合生理等诸多优点.

实验数据以mean \pm SD表示, 两组间均数差异采用独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 差异具有统计学意义.

2 结果

2.1 基本情况 所有各组小鼠试验过程中处死前均未出现死亡. TP-MCT组与SP组间术后日均EN液消耗量差异无统计学意义($P > 0.05$)(表1).

2.2 肝再生情况 与对照组比较, 肝切除术后3 d EN两组小鼠残肝/体质量比有所增高, 差异具有统计学意义($P < 0.05$); 与对照组相比, 术后7 d SP组残肝/体质量比有所增高, 差异具有统计学意义($P < 0.05$); SP与TP-MCT组间差异无统计学意义($P > 0.05$)(图1).

2.3 血清酶学指标变化 与对照组比较, 肝切除术后1、3、7 d两组EN组血清ALT、AST水平有所降低, 差异具有统计学意义($P < 0.05$); 与TP-MCT组比较, SP组血清ALT、AST水平的差异无统计学意义($P > 0.05$)(表2, 3); 与对照组比较, 术后1、3、7 d两组EN组血清白蛋白水平的差异无统计学意义($P > 0.05$)(表4).

2.4 组织病理学检测 HE染色切片显示: 对照组肝切除术后1、3 d肝细胞呈现明显肿胀和气球样变改变, 汇管区炎症细胞浸润明显, 肝细胞排列混乱, 肝小叶结构不清; TP-MCT组肝切除术后3、7 d肝细胞肿胀和气球样变有所改善, 但肝细胞排列、肝小叶结构改善不明显, 可见少量分裂相伴核增大; SP组1、3、7 d肝细胞均无明显肿胀及气球样变, 汇管区仅少量炎症细胞浸润, 肝小叶结构清晰, 肝细胞排列整齐, 肝索、肝窦清楚, 可见较多分裂相伴核增大(图2).

■创新盘点

目前已有大量文章已经证实肝脏外科中营养支持的必要性,且临床类型文章居多,从基础层面探讨营养支持对于肝脏再生及结构功能恢复机制类型的文章较少.

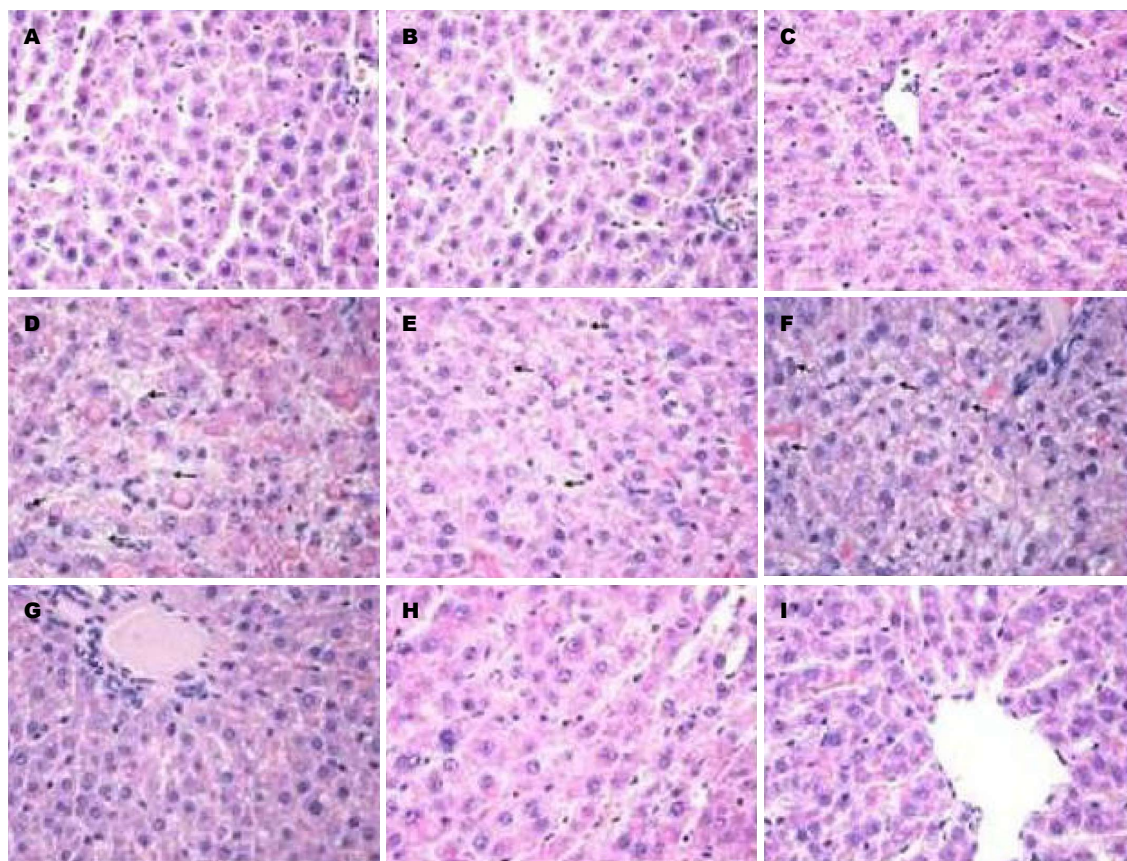


图2 小鼠肝切除术后肝脏HE染色($\times 400$). A: 对照组肝切除术后1 d; B: 对照组肝切除术后3 d; C: 对照组肝切除术后7 d; D: TP-MCT组肝切除术后1 d; E: TP-MCT组肝切除术后3 d; F: TP-MCT组肝切除术后7 d; G: SP组肝切除术后1 d; H: SP组肝切除术后3 d; I: SP组肝切除术后7 d.

表3 小鼠肝切除后血清谷草转氨酶的变化(mean \pm SD, $n = 8$, U/L)

分组	术后时间(d)		
	1	3	7
对照组	2290.1 \pm 98.2	679.3 \pm 78.3	247.3 \pm 36.4
TP-MCT组	1548.3 \pm 87.6 ^a	358.5 \pm 48.2 ^a	137.3 \pm 25.2 ^a
SP组	1254.7 \pm 108.5 ^a	223.3 \pm 37.2 ^a	90.8 \pm 14.8 ^b

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 对照组.

表4 小鼠肝切除后血清白蛋白的变化(mean \pm SD, $n = 8$, g/L)

分组	术后时间(d)		
	1	3	7
对照组	25.2 \pm 1.5	27.3 \pm 1.2	30.7 \pm 1.2
TP-MCT组	26.7 \pm 0.8	29.8 \pm 0.9	33.6 \pm 1.5
SP组	28.7 \pm 1.1	31.3 \pm 0.8	36.8 \pm 1.3

2.5 PCNA免疫组织化学检测 与对照组相比, TP-MCT组肝切除术后第3天、第7天PCNA染色细胞明显增加, 差异具有统计学意义($P < 0.05$); 而SP组1、3、7 d PCNA染色细胞均显著增加, 差

异具有统计学意义($P < 0.05$); SP与TP-MCT组间差异无统计学意义($P > 0.05$)(图3, 4).

2.6 血清IL-6、IL-10检测 (1)与对照组比较, 两组EN组肝切除术后第1天血清IL-6水平降低, 差异

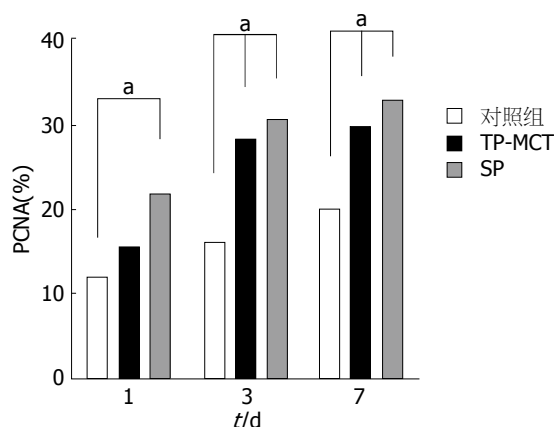


图3 小鼠肝切除术后PCNA表达。^a $P < 0.05$ vs 相同时间对照组。

具有统计学意义($P < 0.05$); 与TP-MCT组比较, SP组肝切除术后1、3、7 d血清IL-6水平的差异无统计学意义($P > 0.05$); (2)与对照组相比, 两组EN组肝切除术后第1天血清IL-10水平上升, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 与对照组相比, SP组术后第3天血清IL-10水平升高, 差异有统计学意义($P < 0.05$)(图5, 6)。

3 讨论

肝切除术作为肝脏外科最主要的治疗手段面临着重大变革, 以精确的术前评估、精细的手术操作和精良的术后处理为核心的肝脏精准外科日益受到关注^[1,9,10]。长期的临床实践证明, 对于肝脏肿瘤采取肝切除术有望提高患者的无瘤生存率, 但是病灶切除后的残余肝脏能否维持功能、顺利修复再生将直接影响患者的生存, 而围手术期采用有针对性的营养支持治疗可明显减轻患者肝功能损害, 显著降低并发症, 对肝再生有促进作用^[11-13]。我们的前期研究证实: 大鼠肝切除围手术期静脉应用 ω -3不饱和脂肪酸(ω -3PUFA)可抑制血清中炎症因子的释放, 控制门静脉系统的内毒素血症, 有效保护肝功能和肝脏紧密连接, 促进肝再生^[14,15]。但较之肠外营养, 目前EN作为目前外科临床营养支持的首选途径已经达成共识并已广泛引用于临床, EN具有促进肠蠕动功能的恢复, 保护肠道黏膜, 防止肠道细菌移位, 改善肠肝循环, 加速门静脉系统的血液循环, 促进胃肠道激素的分泌等作用, 使整个过程更加符合生理, 同时各种营养物质和营养因子直接进入肝脏, 为创伤后的肝脏提供良好的营养环境, 促进肝脏蛋白质的合成^[16,17]。目前已有大量临床研究表明围手术期早期采用EN支持治疗和特异性营养成分可以促进患者胃肠功能

恢复, 减轻肝功能损害并降低肠外营养相关并发症如胆汁淤积、导管感染等的发生率^[18-20]。但是, 肝脏切除围手术期应用何种EN制剂更有利于患者的恢复成了目前临床上迫切要了解的问题, 同时EN制剂对于术后肝再生和肝脏结构功能恢复的影响作用目前还不清楚^[21-23]。因此, 我们选择TC-MCT、SP两种目前临床上常用的EN制剂作对照, 初步探讨了不同EN制剂对小鼠部分肝切除术后肝脏再生和结构功能的影响。

本实验重点观察了在口服EN条件下两种EN制剂对小鼠70%肝切除术后对肝再生及肝脏结构功能恢复有无促进作用。研究结果显示, 通过血清学指标检测发现, 与肝切除对照组相比, EN两组术后1、3 d血清ALT、AST均明显降低, 而SP效果更为显著, 说明EN对肝切除术后早期有很强的肝功能保护作用, 使肝损害得以很大的缓解, 使创伤后的肝脏提前进入恢复阶段。与对照组相比, 术后血清白蛋白水平EN两组无明显变化, 说明两种EN制剂对肝脏白蛋白合成功能影响不大, 这可能与白蛋白的半衰期时间较长有关, 后续研究可以检测血清前白蛋白, 其半衰期仅有2 d, 能更好地反映术后急性期肝脏合成代谢的变化^[24]。HE染色及PCNA染色显示与对照组相比, EN两组术后肝脏结构的得到了更好的恢复且肝再生明显, 而SP效果更具优势, PCNA结果显示特别是在早期即肝切除术后1 d, 与对照组相比, 肝脏再生即出现显著性差异, 这与残肝/体质量比这一大体宏观结果当中SP晚期即术后7 d的优势得以体现不谋而合。这可能由于肝切除术后肠屏障受到应激性损伤导致营养吸收不良所致, 而SP作为短肽混合游离氨基酸型EN制剂, 较之整蛋白型EN制剂TC-MCT, 创伤应激条件下更易于被机体吸收利用, 减轻胃肠道负担, 从而能更好地恢复肝切除术后肠屏障, 促进营养物质的代谢吸收, 为肝脏再生及其结构功能的恢复良好的物质基础; 而肠屏障和肝脏结构及肝脏紧密连接等密切相关, 所以, 术后早期恢复肠屏障功能还有利于促进肝再生及肝脏小叶结构的修复^[25-27]。同时围手术期营养EN能够很好地抑制全身炎症因子及促进抗炎因子的释放, 从而减少机体的应激性创伤, 本研究中, 术后应用EN于肝切除术后早期能很好地促进抗炎因子IL-10及抑制炎症因子IL-6的释放, 而SP对于其效果更为明显, 这也与其他同类研究结果相类似^[28-30]。所

应用要点
运用转化医学的方法, 通过基础实验探究机制, 取得结果, 指导临床肝脏外科围手术期EN制剂的选择。

■同行评价

本文具有一定科学性和应用价值。

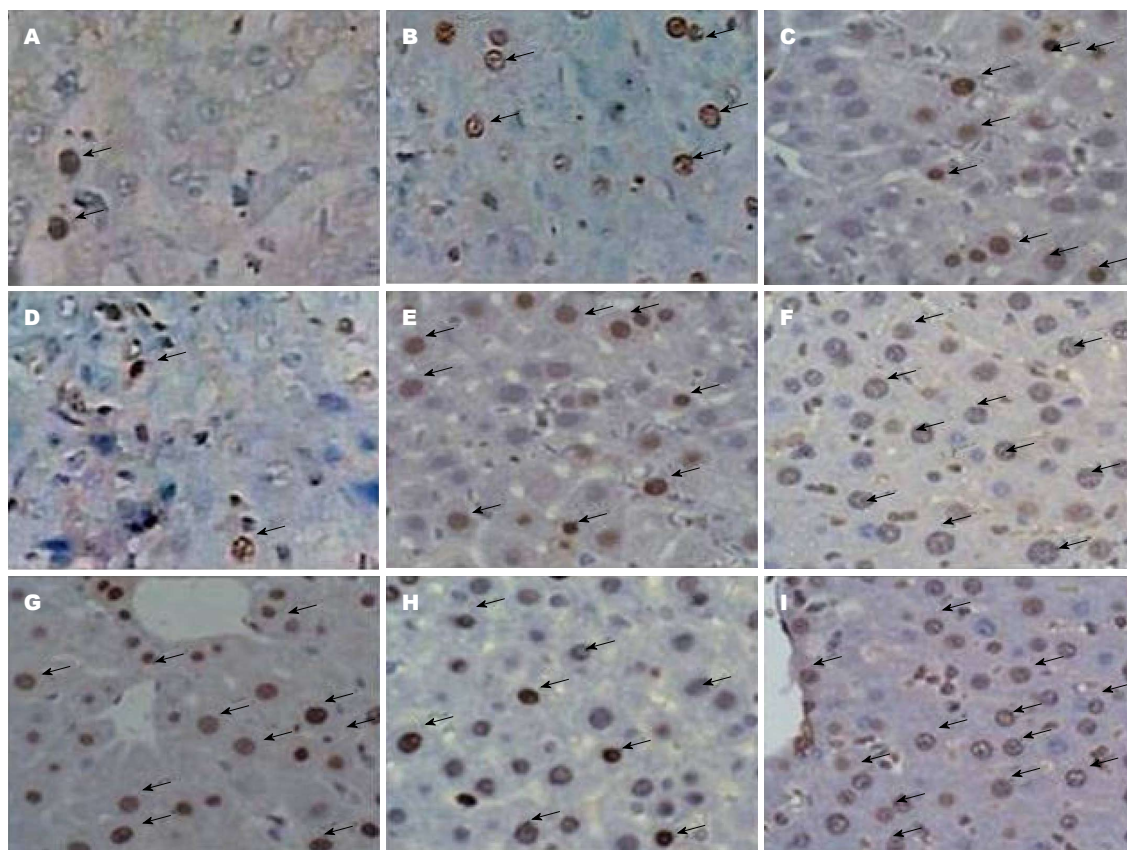


图4 小鼠肝切除术后肝脏PCNA染色($\times 400$)。A: 对照组肝切除术后1 d; B: 对照组肝切除术后3 d; C: 对照组肝切除术后7 d; D: TP-MCT组肝切除术后1 d; E: TP-MCT组肝切除术后3 d; F: TP-MCT组肝切除术后7 d; G: SP组肝切除术后1 d; H: SP组肝切除术后3 d; I: SP组肝切除术后7 d。箭头所指为阳性细胞核。

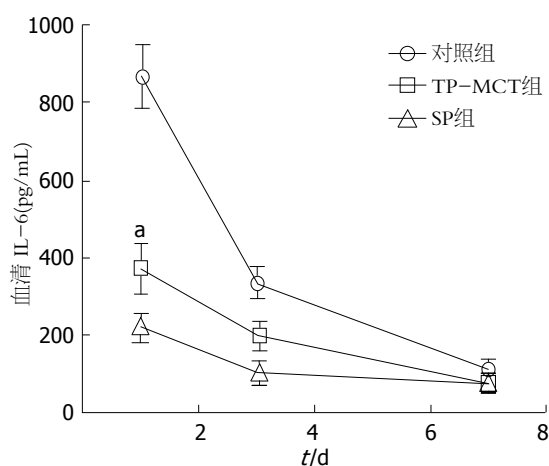


图5 小鼠肝切除术后IL-6水平比较。* $P < 0.05$ vs 相同时间对照组。IL-6: 白介素6。

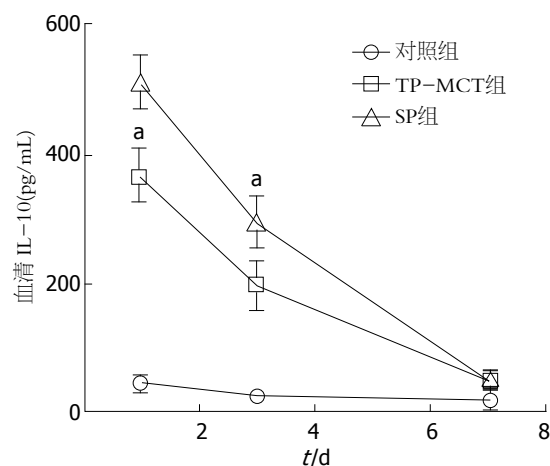


图6 小鼠肝切除术后IL-10水平比较。* $P < 0.05$ vs 相同时间对照组。IL-6: 白介素6。

以我们认为术后应用EN制剂,尤其是短肽游离氨基酸混合型制剂可以在一定程度上减轻肝内实质组织和非实质组织的损伤,更有效的促进肝切除术后肝再生和肝脏结构恢复。

总之,本研究在小鼠70%肝切除后口服EN模型的基础上,采用围手术期应用两种目前临床

常用EN制剂的方法,通过肝脏血清学指标,组织病理学检测和相关炎症因子的比较,对比了不同EN制剂对于肝切除术后影响。本研究结果显示肝切除术后早期应用EN特别是短肽游离氨基酸混合型EN制剂可以保护术后肝脏结构及加速肝功能的恢复,并有效的促进肝再生,为临床上

肝切除术后EN制剂的选择以及进一步研究EN支持在肝切除中的应用提供了一定的借鉴意义。

4 参考文献

- Fan ST. Precise hepatectomy guided by the middle hepatic vein. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2007; 6: 430-434 [PMID: 17690044]
- 仇毓东, 朱新华, 徐庆祥, 吴亚夫, 周建新, 丁义涛. 精准肝切除治疗原发性肝癌的疗效评价. *中华消化外科杂志* 2010; 9: 21-23
- Fan ST, Lo CM, Lai EC, Chu KM, Liu CL, Wong J. Perioperative nutritional support in patients undergoing hepatectomy for hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 1994; 331: 1547-1552 [PMID: 7969324]
- 黎介寿. 围手术营养支持的需要性. *肠外与肠内营养* 2006; 13: 129-131
- Qiu Y, Wang M, Tan T, Yuan X, Ding Y. Effects of n-3 polyunsaturated fatty acids on hepatic tight junction after partial hepatectomy in rats. *Transplant Proc* 2011; 43: 1480-1483 [PMID: 21693221 DOI: 10.1016/j.transproceed.2011.02.060]
- 陈政, 仇毓东, 周建新, 张维, 周铁, 冯伟. 精准肝切除围手术期病人肠内营养治疗的临床研究. *肠外与肠内营养* 2011; 18: 266-268, 271
- Javid PJ, Greene AK, Garza J, Gura K, Alwayn IP, Voss S, Nose V, Satchi-Fainaro R, Zausche B, Mulkern RV, Jaksic T, Bistrian B, Folkman J, Puder M. The route of lipid administration affects parenteral nutrition-induced hepatic steatosis in a mouse model. *J Pediatr Surg* 2005; 40: 1446-1453 [PMID: 16150347]
- Mezera V, Kučera O, Moravcová A, Peterová E, Cervinková Z. Epigallocatechin Gallate Does Not Accelerate the Early Phase of Liver Regeneration After Partial Hepatectomy in Rats. *Dig Dis Sci* 2013 Dec 8. [Epub ahead of print] [PMID: 24318805]
- 董家鸿, 黄志强. 精准肝切除-21世纪肝脏外科新理念. *中华外科杂志* 2009; 47: 1601-1605
- 董家鸿, 杨世忠, 段伟东, 纪文斌, 蔡守旺, 王敬, 史宪杰, 姜凯, 夏红天, 何蕾, 张文智, 黄晓强, 黄志强. 精准肝脏外科技术在复杂肝脏占位性病变切除中的应用. *中华外科杂志* 2009; 21: 1610-1615
- Omata J, Fukatsu K, Maeshima Y, Moriya T, Murakoshi S, Noguchi M, Okamoto K, Fukazawa S, Saitoh D, Mochizuki H, Yamamoto J, Hase K. Enteral nutrition rapidly reverses total parenteral nutrition-induced impairment of hepatic immunity in a murine model. *Clin Nutr* 2009; 28: 668-673 [PMID: 19541395 DOI: 10.1016/j.clnu.2009.05.015]
- 范上达, 邱宗祥, 潘冬平. 肝癌的综合治疗. *中华消化外科杂志* 2011; 10: 241-246
- Okabayashi T, Nishimori I, Sugimoto T, Maeda H, Dabanaka K, Onishi S, Kobayashi M, Hanazaki K. Effects of branched-chain amino acids-enriched nutrient support for patients undergoing liver resection for hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2008; 23: 1869-1873 [PMID: 18717761 DOI: 10.1111/j.1440-1746.2008.05504.x]
- Yan XP, Wang S, Yang Y, Qiu YD. Effects of n-3 polyunsaturated fatty acids on rat livers after partial hepatectomy via LKB1-AMPK signaling pathway. *Transplant Proc* 2011; 43: 3604-3612 [PMID: 22172813 DOI: 10.1016/j.transproceed.2011.10.045]
- 杨跃, 段飞, 蔡浩, 陈靓, 林建宇, 仇毓东. ω-3多不饱和脂肪酸对肝硬化大鼠肝切除术后肝细胞再生及肝纤维化程度的影响. *肠外与肠内营养* 2013; 20: 103-106
- Black D, Lyman S, Heider TR, Behrns KE. Molecular and cellular features of hepatic regeneration. *J Surg Res* 2004; 117: 306-315 [PMID: 15047136]
- 黎介寿. 肠内营养-外科临床营养支持的首选途径. *肠外与肠内营养* 2003; 10: 129-130
- Richter B, Schmandra TC, Golling M, Bechstein WO. Nutritional support after open liver resection: a systematic review. *Dig Surg* 2006; 23: 139-145 [PMID: 16809912 DOI: 10.1159/000094345]
- Kaido T, Mori A, Ogura Y, Hata K, Yoshizawa A, Iida T, Yagi S, Uemoto S. Impact of enteral nutrition using a new immuno-modulating diet after liver transplantation. *Hepatogastroenterology* 2010; 57: 1522-1525 [PMID: 21443114]
- Weimann A, Braga M, Harsanyi L, Laviano A, Ljungqvist O, Soeters P, Jauch KW, Kemen M, Hiesmayr JM, Horbach T, Kuse ER, Vestweber KH. ESPEN Guidelines on Enteral Nutrition: Surgery including organ transplantation. *Clin Nutr* 2006; 25: 224-244 [PMID: 16698152 DOI: 10.1016/j.clnu.2006.01.015]
- Javid PJ, Collier S, Richardson D, Iglesias J, Gura K, Lo C, Kim HB, Duggan CP, Jaksic T. The role of enteral nutrition in the reversal of parenteral nutrition-associated liver dysfunction in infants. *J Pediatr Surg* 2005; 40: 1015-1018 [PMID: 15991188 DOI: 10.1016/j.jpedsurg.2005.03.019]
- Kaufman SS. Prevention of parenteral nutrition-associated liver disease in children. *Pediatr Transplant* 2002; 6: 37-42 [PMID: 11906641 DOI: 10.1034/j.1399-3046.2002.10061.x]
- Rayes N, Seehofer D, Theruvath T, Schiller RA, Langrehr JM, Jonas S, Bengmark S, Neuhaus P. Supply of pre- and probiotics reduces bacterial infection rates after liver transplantation--a randomized, double-blind trial. *Am J Transplant* 2005; 5: 125-130 [PMID: 15636620 DOI: 10.1111/j.1600-6143.2004.00649.x]
- Robinson MK, Trujillo EB, Mogensen KM, Rounds J, McManus K, Jacobs DO. Improving nutritional screening of hospitalized patients: the role of prealbumin. *J Parenter Enteral Nutr* 2003; 27: 389-395; quiz 439 [PMID: 14621119 DOI: 10.1177/0148607103027006389]
- Miele L, Valenza V, La Torre G, Montalto M, Cammarota G, Ricci R, Mascianà R, Forgione A, Gabrieli ML, Perotti G, Vecchio FM, Rapaccini G, Gasbarrini G, Day CP, Grieco A. Increased intestinal permeability and tight junction alterations in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2009; 49: 1877-1887 [PMID: 19291785 DOI: 10.1002/hep.22848]
- Kakazu E, Kanno N, Ueno Y, Shimosegawa T. Extracellular branched-chain amino acids, especially valine, regulate maturation and function of monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* 2007; 179: 7137-7146 [PMID: 17982106]
- Fouts DE, Torralba M, Nelson KE, Brenner DA, Schnabl B. Bacterial translocation and changes in the intestinal microbiome in mouse models of liver disease. *J Hepatol* 2012; 56: 1283-1292 [PMID: 22326468 DOI: 10.1016/j.jhep.2012.01.019]
- Bourdi M, Eiras DP, Holt MP, Webster MR, Reilly TP, Welch KD, Pohl LR. Role of IL-6 in an IL-10 and IL-4 double knockout mouse model uniquely susceptible to acetaminophen-induced liver injury. *Chem Res Toxicol* 2007; 20: 208-216 [PMID: 17305405]

- 29 Shibata M, Hirota M, Nozawa F, Okabe A, Kurimoto M, Ogawa M. Increased concentrations of plasma IL-18 in patients with hepatic dysfunction after hepatectomy. *Cytokine* 2000; 12: 1526-1530 [PMID: 11023668]
- 30 Tsiaousi ET, Hatzitolios AI, Trygonis SK, Savopoulos CG. Malnutrition in end stage liver disease: recommendations and nutritional support. *J Gastroenterol Hepatol* 2008; 23: 527-533 [PMID: 18397483 DOI: 10.1111/j.1440-1746.2008.05369.x]

编辑 田滢 电编 鲁亚静



ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) DOI: 10.11569 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有

• 消息 •

中国科技信息研究所发布《世界胃肠病学杂志(英文版)》 影响因子 0.873

本刊讯 一年一度的中国科技论文统计结果2012-12-07由中国科技信息研究所(简称中信所)在北京发布。《中国科技期刊引证报告(核心版)》统计显示, 2011年《世界胃肠病学杂志(英文版)》总被引频次6 979次, 影响因子0.873, 综合评价总分88.5分, 分别位居内科学类52种期刊的第1位、第3位、第1位, 分别位居1998种中国科技核心期刊(中国科技论文统计源期刊)的第11位、第156位、第18位; 其他指标: 即年指标0.219, 他引率0.89, 引用刊数619种, 扩散因子8.84, 权威因子2 144.57, 被引半衰期4.7, 来源文献量758, 文献选出率0.94, 地区分布数26, 机构分布数1, 基金论文比0.45, 海外论文比0.71。

经过多项学术指标综合评定及同行专家评议推荐,《世界胃肠病学杂志(英文版)》再度被收录为“中国科技核心期刊”(中国科技论文统计源期刊)。根据2011年度中国科技论文与引文数据库(CSTPCD 2011)统计结果,《世界胃肠病学杂志(英文版)》荣获2011年“百种中国杰出学术期刊”称号。

丙泊酚联合咪达唑仑及利多卡因在老年胃镜检查中麻醉效果的比较

卢海龙, 应佩华, 李伟杰

卢海龙, 应佩华, 李伟杰, 浙江省丽水市缙云县第二人民医院麻醉科 浙江省丽水市 321404

卢海龙, 麻醉医师, 主要从事临床麻醉的研究。

作者贡献分布: 课题设计与论文写作由卢海龙完成; 研究过程由应佩华完成; 数据分析由李伟杰完成。

通讯作者: 卢海龙, 麻醉医师, 321404, 浙江省丽水市缙云县壶镇溪东南路46号, 浙江省丽水市缙云县第二人民医院麻醉科。

10361238@qq.com

电话: 0578-3163459

收稿日期: 2014-02-08 修回日期: 2014-03-06

接受日期: 2014-03-13 在线出版日期: 2014-03-28

Effects of propofol with midazolam versus lidocaine during gastroscopy in elderly patients

Hai-Long Lu, Pei-Hua Ying, Wei-Jie Li

Hai-Long Lu, Pei-Hua Ying, Wei-Jie Li, Department of Anesthesiology, the Second People's Hospital of Jinyun County, Lishui 321404, Zhejiang Province, China

Correspondence to: Hai-Long Lu, Clinical Anesthetist, Department of Anesthesiology, the Second People's Hospital of Jinyun County, 46 Huzhen Xidong South Road, Lishui 321404, Zhejiang Province, China. 10361238@qq.com

Received: 2014-02-08 Revised: 2014-03-06

Accepted: 2014-03-13 Published online: 2014-03-28

Abstract

AIM: To compare the effects of propofol with midazolam versus lidocaine during endoscopy in elderly patients.

METHODS: Ninety-seven ASA-II class patients were used as an experimental group. They were treated with propofol with midazolam for painless gastroscopy between July 2008 and July 2013 at our hospital. Eighty-two ASA-II level patients who used traditional lidocaine gel pulp in painless gastroscopy were used as a control group. Age, weight, baseline blood pressure between two groups had no significant differences ($P > 0.05$ for all). Professional medical personnel recorded the changes in blood pressure, heart rate, oxygen saturation and adverse reactions in the examination process.

RESULTS: After the painless gastroscopy procedure, blood pressure and heart rate in the experimental group were significantly lower than those in the control group (blood pressure: $90.2 \text{ mmHg} \pm 2.5 \text{ mmHg}$ vs $131.2 \text{ mmHg} \pm 3.4 \text{ mmHg}$; heart rate: 70.2 ± 1.5 vs 85.0 ± 6.4 , $P < 0.05$). During the examination process, blood pressure and heart rate dropped initially and then rose to a stable level in the experimental group, while in the control group, blood pressure and heart rate initially increased and then decreased to a stable level. The differences were statistically significant ($P < 0.05$) within the two groups. Oxygen saturation between groups and within groups showed no significant differences ($P > 0.05$). Compared with the control group, adverse reactions in the experimental group were significantly reduced ($\chi^2 = 12.991, 142.482, 55.838, 179.000, P < 0.05$). Times to wake up from anesthesia and drug elimination were relatively short in the experimental group ($1.51 \text{ s} \pm 0.17 \text{ s}$, $8.21 \text{ s} \pm 2.32 \text{ s}$).

CONCLUSION: Propofol combined with midazolam in painless gastroscopy can effectively reduce the risk of cardiovascular diseases in patients and is associated with shorter times to wake up and drug elimination.

© 2014 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

Key Words: Propofol; Midazolam; Painless gastroscopy; Anesthesia

Lu HL, Ying PH, Li WJ. Effects of propofol with midazolam versus lidocaine during gastroscopy in elderly patients. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(9): 1201-1206 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/1201.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v22.i9.1201>

摘要

目的: 本文旨在探讨丙泊酚联合咪达唑仑及利多卡因胶浆两种麻醉方法在老年患者内镜检查中的效果。

■背景资料

无痛电子胃镜是指在检查前, 医生对患者使用麻醉手段减少检查时间及痛苦的方法, 因其无痛苦、创伤小、时间短和精确度高的优点, 已逐步代替普通胃镜。因此, 选择起效快、不良反应小、视野清晰的麻醉药对提高诊断效率具有重要作用。本研究通过对丙泊酚联合咪达唑仑静脉麻醉及传统利多卡因胶浆两种麻醉方法在胃镜检查中应用效果比较, 选择有效麻醉方式提高患者的舒适度并降低危险率。

■同行评议者
陈贻胜, 教授, 福建省立医院

■相关报道

老年患者大多呼吸功能较差,可联合使用阿托品,减少呼吸道分泌物,有利于维护呼吸通畅。

方法: 选择2008-07/2013-07于我院应用丙泊酚联合咪达唑仑麻醉方式行无痛胃镜检查的美国麻醉医师协会(American Society of Anesthesiology, ASA) II级患者97例作为实验组,应用传统利多卡因胶浆行无痛胃镜检查患者的ASA-II级患者82例作为对照组,两组患者在年龄、体质量、基础血压方面均无统计学差异($P>0.05$),具有可比性。分别由专业医护人员记录检查过程患者血压、心率、血氧饱和度及不良反应程度变化。

结果: 实验组检查中及检查后血压和心率均比对照组低(血压: $90.2 \text{ mmHg} \pm 2.5 \text{ mmHg}$ vs $131.2 \text{ mmHg} \pm 3.4 \text{ mmHg}$, 心率: $70.2 \text{ 次/min} \pm 1.5 \text{ 次/min}$ vs $85.0 \text{ 次/min} \pm 6.4 \text{ 次/min}$, $P<0.05$), 其差异具有统计学意义($P<0.05$); 实验组检查过程中血压及心率先下降,再上升至稳定水平,对照组先上升,再下降至稳定水平,两组组内差异均有统计学意义($P<0.05$)。血氧饱和度在组间和组内比较均无明显差异($P>0.05$)。实验组与对照组相比产生不良反应患者数明显减少($\chi^2 = 12.991, 142.482, 55.838, 179.000$, $P<0.05$)。麻醉苏醒时间与药物消除时间较短($1.51 \text{ s} \pm 0.17 \text{ s}, 8.21 \text{ s} \pm 2.32 \text{ s}$)。

结论: 在无痛胃镜技术中使用丙泊酚联合咪达唑仑方式可有效降低患者发生心血管疾病的危险率,并因苏醒迅速、药物消除作用快、舒适度高等优点可广泛应用于临床。

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词: 丙泊酚; 咪达唑仑; 无痛胃镜; 麻醉

核心提示: 实验组患者在实施麻醉后苏醒快、药物作用消除时间短,可在检查完成后立即离开,与传统局部麻醉方法无显著差异,而在患者检查后不良反应程度方面显出较大优势。实验组表现恶心呕吐、呛咳及躁动患者数明显少于对照组,且无主诉术后不良反应者,与对照组差异均有统计学意义($P<0.05$)。说明丙泊酚联合咪达唑仑方法对老年麻醉患者的不良反应较少,患者在麻醉苏醒后较少发生不良反应,主观感受舒适度较好。

卢海龙, 应佩华, 李伟杰. 丙泊酚联合咪达唑仑及利多卡因在老年胃镜检查中麻醉效果的比较. 世界华人消化杂志 2014; 22(9): 1201-1206 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/1201.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v22.i9.1201>

0 引言

纤维胃镜作为许多消化系统疾病诊断和治疗常见的方法,是一种侵入性的检测。由于其检查痛苦大、安全程度低,很容易使患者产生焦虑感及恐惧感,甚至导致检查中断,影响疾病及时诊断。除此之外,还可影响循环系统引发心脑血管意外^[1]。而无痛电子胃镜(painless gastroscopy)的出现,较为有效地避免了这些不良反应。无痛电子胃镜是指在检查前,医生对患者使用麻醉手段减少检查时间及痛苦的方法,因其无痛苦、创伤小、时间短和精确度高的优点,已逐步代替普通胃镜^[2]。因此,选择起效快、不良反应小、视野清晰的麻醉药对提高诊断效率具有重要作用^[3,4]。本研究通过对丙泊酚联合咪达唑仑静脉麻醉及传统利多卡因胶浆两种麻醉方法在胃镜检查中应用效果比较,选择有效麻醉方式提高患者的舒适度并降低危险率,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料 2011-07/2013-07于我院行无痛胃镜检查患者共960例,根据患者病情程度及耐受能力不同,分别使用丙泊酚联合咪达唑仑及利多卡因胶浆麻醉两种方式进行检查,选择其中应用丙泊酚联合咪达唑仑麻醉方式行无痛胃镜检查的老年患者,共530例,按美国麻醉师学会(American Society of Anesthesiology, ASA)麻醉风险分级标准^[5]选择ASA-II级患者97例作为实验组,其中男性45例,女性52例,年龄65-83岁,平均 $75.4 \text{ 岁} \pm 5.2 \text{ 岁}$,平均血压($135.0 \text{ mmHg} \pm 10.4 \text{ mmHg}$)/($82.0 \text{ mmHg} \pm 7.9 \text{ mmHg}$)。应用传统利多卡因胶浆行胃镜检查患者共430例,选择ASA-II级患者82例作为对照组,其中男性39例,女性43例,年龄55-85岁,平均 $77.4 \text{ 岁} \pm 6.1 \text{ 岁}$,平均血压($141.0 \text{ mmHg} \pm 11.3 \text{ mmHg}$)/($87.0 \text{ mmHg} \pm 9.2 \text{ mmHg}$)。排除心肺功能异常者后,两组患者在年龄、体质量、基础血压等一般资料方面均无统计学差异($P>0.05$),具有可比性。

1.2 方法

1.2.1 麻醉: 麻醉前所有患者和家属了解麻醉过程及手术方法,签署知情同意书。入室后对患者进行常规心电监护,观察患者检查前、检查中以及检查后收缩压、心率以及血气饱和度的变化。术后送入监护室复苏,由专业医护人员记录不良反应、主观感受和麻醉苏醒、药物消除时间。实验组:患者确认无麻醉禁忌症后禁食5 h,行完善术前准备,静脉注入咪达唑仑 0.2 mg/kg 后给予丙泊酚 1.5 mg/kg (20 mg/s)至起效,再以微量泵静脉滴注维持^[6]。检查中血氧饱和度低于90%时,可加面罩进行辅助呼吸,如术中血压低

表 1 两组患者基础状态差异比较 (mean ± SD)

分组	n	性别(n)		年龄(岁)	血压(mmHg)	
		男性	女性		舒张压	收缩压
实验组	97	45	52	75.4 ± 5.2	145.0 ± 10.4	112.3 ± 7.9
对照组	82	39	43	77.4 ± 6.1	151.0 ± 11.3	119.1 ± 9.2
χ^2/t	—	0.024		2.337	1.181	1.356
P值	—	0.876		0.051	0.433	0.152

■应用要点

在无痛胃镜技术中使用丙泊酚联合咪达唑仑方式可有效降低患者发生心血管疾病的危险率, 并因苏醒迅速、药物消除作用快、舒适度高优点可广泛应用于临床。

表 2 两组患者检查过程中收缩压差异比较 (mean ± SD, mmHg)

分组	n	检查前	检查中	检查后	F值	P值
实验组	97	112.6 ± 7.9	90.2 ± 2.5	109.5 ± 10.1	13.225	0.000
对照组	82	119.3 ± 9.2	131.2 ± 3.4	120.4 ± 2.9	10.457	0.000
t值	—	1.356	1.849	9.437	—	—
P值	—	0.152	0.004	0.000	—	—

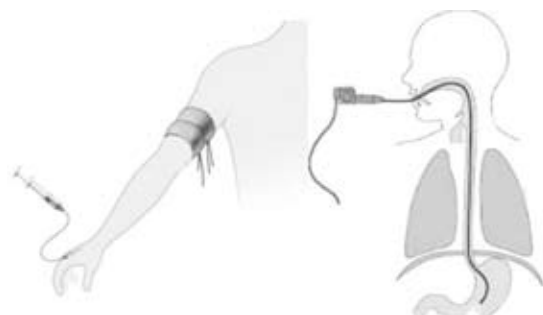


图 1 静脉麻醉及无痛电子胃镜示意图。

于90 mmHg/60 mmHg, 少量给予麻黄素静脉注射升压, 待患者生命体征稳定后再行检查。麻醉方式如图1。对照组: 患者禁食12 h, 禁饮6 h后, 在检查前给予5-10 min服用盐酸利多卡因胶浆10 mL(其中利多卡因成分150 mg), 在咽部含服1 min左右慢慢咽下, 待观察诱导起效后行无痛胃镜检查。

1.2.2 观察项目: 采用心电监护仪全程监测患者血压、心率和血氧饱和度值, 同时由专业医护人员观察患者不良反应、自主呼吸状态, 记录麻醉苏醒时间及药物消除时间^[7]。麻醉苏醒时间以患者思想清晰、可正确回答问题为标准, 药物消除时间以患者可自由走动为标准, 跟踪患者术中舒适度及满意度^[8]。

统计学处理 所有数据均采用SPSS20.0进行处理, 数据以mean ± SD表示, 计数资料利用四格表 χ^2 检验, 计量资料采用t检验, 不同时间点及组间分析使用统计学重复测量设计方差分析, 所有统计检验均为双侧概率检验, 检验标准为 $\alpha =$

0.05. $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 比较两组患者基础状态差异 实验组和对照组在性别、年龄以及基础血压和患病程度方面经t检验及 χ^2 检验比较分析均无统计学意义($P > 0.05$)(表1)。

2.2 比较两组检查过程中收缩压、心率及血氧饱和度的变化 经重复测量方差及t检验统计分析后可看出, 实验组检查中及检查后血压和心率均比对照组低, 其差异具有统计学意义($P < 0.05$); 实验组检查过程中血压及心率先下降, 再上升至稳定水平, 对照组先上升, 再下降至稳定水平, 两组组内差异均有统计学意义($P < 0.05$). 血氧饱和度在组间和组内比较均无明显差异($P > 0.05$)(表2-4)。

2.3 比较两组患者不良反应及主观感受、麻醉苏醒时间、药物消除时间变化 根据两组患者主诉不良反应及体征变化, 可发现实验组即采用丙泊酚合并咪达唑仑方法与利多卡因胶浆方法相比产生不良反应患者数明显减少($P < 0.05$). 麻醉苏醒时间与药物消除时间较短(表5)。

3 讨论

胃镜技术虽然已经非常成熟, 但是其在操作过程中对患者造成的不适感仍非常严重, 有时甚至引发心脑血管意外对生命安全造成极大威胁, 因此寻找一种安全、有效、迅速的麻醉方法对临床具有极具重要的意义^[9-11]。而近些年来, 无痛

■同行评价

本文选题实用, 方法科学, 结果可靠, 结论对临床有指导意义。

表 3 两组患者检查过程中心率差异比较 (mean \pm SD, 次/min)

分组	n	检查前	检查中	检查后	F值	P值
实验组	97	79.7 \pm 8.2	70.2 \pm 1.5	72.3 \pm 5.1	21.984	0.000
对照组	82	81.1 \pm 7.8	85.0 \pm 6.4	83.6 \pm 3.2	32.456	0.000
t值	—	1.163	22.080	17.376	—	—
P值	—	0.246	0.000	0.000	—	—

表 4 两组患者检查过程中血氧饱和度差异比较 (mean \pm SD, %)

分组	n	检查前	检查中	检查后	F值	P值
实验组	97	95.5 \pm 7.2	97.0 \pm 2.5	96.6 \pm 3.1	1.172	0.211
对照组	82	96.2 \pm 8.8	96.0 \pm 6.0	95.8 \pm 4.2	1.413	0.121
t值	—	0.585	1.495	1.4631	—	—
P值	—	0.560	0.136	0.145	—	—

表 5 两组患者不良反应及主观感受及麻醉苏醒时间和药物消除时间差异比较 (n, mean \pm SD)

分组	n	呛咳	恶心呕吐	躁动	术后舒适	苏醒时间(min)	消除时间(min)
实验组	97	9	0	9	97	1.51 \pm 0.17	8.21 \pm 2.32
对照组	82	25	72	51	0	—	—
χ^2 值	—	12.991	142.482	55.838	179.000	—	—
P值	—	0.000	0.000	0.000	0.000	—	—

麻醉胃镜的出现合理的解决了这一问题, 倍受各领域内镜专家的青睐. 但丙泊酚单用因需要较大剂量而使不良反应明显, 例如呼吸抑制引起血压下降等, 已被相关领域研究证实^[12,13]. 而咪达唑仑因具有较强镇痛作用, 对心血管影响小等优点, 广泛应用于心血管疾病患者的麻醉过程中. 两者联用, 可减少丙泊酚用量从而减小不良反应^[14]. 本文根据丙泊酚联用咪达唑仑与传统利多卡因胶浆在血压、心率、血氧饱和度以及不良反应变化方面的比较, 验证了此方法临床应用的价值.

从本项研究中可以看出, 实验组在实施麻醉后, 收缩压及心率均有一定程度的下降, 检查结束后在一定程度内上升并稳定. 这说明丙泊酚联合咪达唑仑方法进行麻醉的过程是相对安全的, 收缩压及心率的降低使患者血液在一定范围内保持稳定^[15], 降低了患者在此过程中发生心脑血管等循环系统疾病的危险度. 而传统利多卡因胶浆法在检查过程中收缩压和心率持续上升, 检查结束后有所下降但仍保持在较高水平. 这说明传统方法严重影响患者血流稳定, 引起血管收缩等不良反应, 使血压升高及心率加快,

极有可能诱发心率失常及心脏衰竭^[16,17]. 正常人可通过自身调节恢复正常, 而老年人代谢能力明显减弱, 危险程度大大提高^[18].

一般麻醉过程, 最危险的因素为血氧饱和度降低, 因麻醉造成的呼吸系统抑制使组织缺氧而使生命体征不稳定^[19]. 本研究中两种方法的血氧饱和度无明显差异. 这与本研究术前给予常规低流量吸氧有关, 体内氧气储备量增加, 在麻醉过程中自动释放缓解组织缺氧状态, 对患者血氧饱和度的稳定具有重要意义^[20]. 在此应注意, 部分肥胖及创伤患者使用静脉麻醉应注意气道易开放性^[21,22], 否则易引起气道功能障碍使窒息死亡.

实验组患者在实施麻醉后苏醒快、药物作用消除时间短, 可在检查完成后立即离开, 与传统局部麻醉方法无显著差异, 而在患者检查后不良反应程度方面显出较大优势. 实验组表现恶心呕吐、呛咳及躁动患者数明显少于对照组, 且无主诉术后不良反应者, 与对照组差异均有统计学意义 ($P < 0.05$). 说明丙泊酚联合咪达唑仑方法对老年麻醉患者的不良反应较少, 患者在麻醉苏醒后较少发生不良反应, 主观感受舒适

度较好。

虽然此方法不良反应少、苏醒时间及药物作用时间短且减少过程中心血管疾病的诱发因素, 但仍有很多问题需要注意^[14]。老年患者大多呼吸功能较差, 可联合使用阿托品^[23-25], 减少呼吸道分泌物, 有利于维护呼吸通畅^[26]。麻醉过程中要时刻做好生命体征检测^[27,28], 若出现心动过速或过缓、低血压等, 可及时对症处理, 对胃镜检查一般无影响^[29,30]。

总之, 丙泊酚联合咪达唑仑的麻醉方法在无痛苦胃镜技术中的应用是安全、无痛苦的, 本研究为胃镜检查开辟了更广阔的道路。

4 参考文献

- 李淑琴, 张利勇, 王保国. 丙泊酚诱导期不良反应的多中心、大样本调查. 临床麻醉学杂志 2006; 22: 738-739
- 徐贵森, 吴晓玲, 刘合年. 无痛内镜术在胃肠道疾病诊治中的应用. 世界华人消化杂志 2008; 16: 1890-1896
- Kim JH, Byun H, Kim JH. Abuse potential of propofol used for sedation in gastric endoscopy and its correlation with subject characteristics. *Korean J Anesthesiol* 2013; 65: 403-409 [PMID: 24363842 DOI: 10.4097/kjae.2013.65.5.403]
- Lee S. Guilty, or not guilty?: a short story of propofol abuse. *Korean J Anesthesiol* 2013; 65: 377-378 [PMID: 24363838 DOI: 10.4097/kjae.2013.65.5.377]
- Haynes SR, Lawler PG. An assessment of the consistency of ASA physical status classification allocation. *Anaesthesia* 1995; 50: 195-199 [PMID: 7717481 DOI: 10.1111/j.1365-2044.1995.tb04554.x]
- Gu JW, Yang T, Kuang YQ, Huang HD, Kong B, Shu HF, Yu SX, Zhang JH. Comparison of the safety and efficacy of propofol with midazolam for sedation of patients with severe traumatic brain injury: A meta-analysis. *J Crit Care* 2014; 29: 287-290 [PMID: 24360821 DOI: 10.1016/j.jcrc.2013.10.021]
- Mama KR, Gaynor JS, Harvey RC, Robertson SA, Koenig RL, Cozzi EM. Multicenter clinical evaluation of a multi-dose formulation of propofol in the dog. *BMC Vet Res* 2013; 9: 261 [PMID: 24359719 DOI: 10.1186/1746-6148-9-261]
- 徐安忆, 洪广亮, 赵光举, 吴斌, 邱俏檬, 卢中秋. 丙泊酚与咪达唑仑对急诊危重病机械通气患者镇静效果的比较研究. 中华危重病急救医学 2013; 25: 356-359
- Wang H, Yang C, Zhang B, Xia Y, Liu H, Liang H. Efficacy of target-controlled infusion of propofol and remifentanyl with high frequency jet ventilation in fibre-optic bronchoscopy. *Singapore Med J* 2013; 54: 689-694 [PMID: 24356755 DOI: 10.1112/j.jcrc.2013.54.012]
- Sethi S, Wadhwa V, Thaker A, Chuttani R, Pleskow DK, Barnett SR, Leffler DA, Berzin TM, Sethi N, Sawhney MS. Propofol versus traditional sedative agents for advanced endoscopic procedures: A meta-analysis. *Dig Endosc* 2013 Dec 19. [Epub ahead of print] [PMID: 24354404 DOI: 10.1111/den.12219]
- Aghadoost D, Fazel MR, Fakharian E. Comparing remifentanyl versus propofol effect on pain and hemodynamic change of patients undergoing phacoemulsification with topical anesthesia. *Iran Red Crescent Med J* 2013; 15: 424-427 [PMID: 24349732 DOI: 10.5812/ircmj.2316]
- Zhou R, Yang Z, Tang X, Tan Y, Wu X, Liu F. Propofol Protects Against Focal Cerebral Ischemia via Inhibition of Microglia-Mediated Proinflammatory Cytokines in a Rat Model of Experimental Stroke. *PLoS One* 2013; 8: e82729 [PMID: 24349350 DOI: 10.1371/journal.pone.0082729]
- Gruenbaum SE, Bilotta F. Propofol versus thiopental use in patients undergoing craniotomy. *Minerva Anesthesiol* 2013 Nov 28. [Epub ahead of print] [PMID: 24287672]
- Fu F, Chen X, Feng Y, Shen Y, Feng Z, Bein B. Propofol EC50 for inducing loss of consciousness is lower in the luteal phase of the menstrual cycle. *Br J Anaesth* 2014; 112: 506-513 [PMID: 24285693 DOI: 10.1093/bja/aet383]
- Yuce HH, Altay N, Karahan MA, Ocal F. Propofol and Additives in Studies Evaluating Inflammatory Responses. *J Pediatr Hematol Oncol* 2013 Oct 31. [Epub ahead of print] [PMID: 24276048 DOI: 10.1092/MPH.0000000000000059]
- Schroeter A, Schlegel F, Seuwen A, Grandjean J, Rudin M. Specificity of stimulus-evoked fMRI responses in the mouse: The influence of systemic physiological changes associated with innocuous stimulation under four different anesthetics. *Neuroimage* 2014 Feb 2. [Epub ahead of print] [PMID: 24495809 DOI: 10.1016/j.neuroimage.2014.01.046]
- Glover CD, Carling NP. Neuromonitoring for Scoliosis Surgery. *Anesthesiol Clin* 2014; 32: 101-114 [PMID: 24491652 DOI: 10.1016/j.andclin.2013.10.001]
- Mandel JE. Considerations for the use of short-acting opioids in general anesthesia. *J Clin Anesth* 2014; 26: S1-S7 [PMID: 24485553 DOI: 10.1016/j.jclinane.2013.11.003]
- Amiconi S, Hirl B. A combination of predispositions and exposures as responsible for acute eosinophilic pneumonia. *Multidiscip Respir Med* 2014; 9: 7 [PMID: 24475879 DOI: 10.1186/2049-6958-9-7]
- 李昊, 刘鹤冰. 咪达唑仑、丙泊酚联合用于瓣膜置换术后患者的效果观察. 哈尔滨医科大学学报 2012; 46: 516-517
- 韩清萍. 1例丙泊酚联合咪达唑仑维持镇静下急诊冠脉介入术的急救护理. 中华现代护理杂志 2013; 19: 3683-3684
- Korman LY, Haddad NG, Metz DC, Brandt LJ, Benjamin SB, Lazerow SK, Miller HL, Mete M, Patel M, Egorov V. Effect of propofol anesthesia on force application during colonoscopy. *Gastrointest Endosc* 2014 Jan 25. [Epub ahead of print] [PMID: 24472761 DOI: 10.1016/j.gie.2013.12.002]
- Nogueira FN, Mendonça T, Rocha P. Controlling the depth of anesthesia by a novel positive control strategy. *Comput Methods Programs Biomed* 2014 Jan 8. [Epub ahead of print] [PMID: 24468159 DOI: 10.1016/j.cmpb.2013.12.016]
- Ozgul U, Begec Z, Karahan K, Ali Erdogan M, Said Aydogan M, Colak C, Durmus M, Ozcan Ersoy M. Comparison of Propofol and Ketamine-Propofol Mixture (Ketofol) on Laryngeal Tube-Suction II Conditions and Hemodynamics: A Randomized, Prospective, Double-Blind Trial. *Curr Ther Res Clin Exp* 2013; 75: 39-43 [PMID: 24465041 DOI: 10.1016/j.curtheres.2013.06.003]
- 郑增旺, 王克杰. 咪达唑仑和丙泊酚用于全身麻醉效果的比较. 首都医科大学学报 2006; 27: 386-388

- 26 张耀中, 姚嵩梅, 赵国庆. 咪达唑仑和丙泊酚麻醉对胃癌手术患者围术期血浆细胞因子的影响. 吉林大学学报(医学版) 2006; 32: 501-503
- 27 Ching S, Brown EN. Modeling the dynamical effects of anesthesia on brain circuits. *Curr Opin Neurobiol* 2014; 25C: 116-122 [PMID: 24457211 DOI: 10.1016/j.conb.2013.12.011]
- 28 Chen KC, Cheng YJ, Hung MH, Tseng YD, Chen JS. Nonintubated thoracoscopic surgery using regional anesthesia and vagal block and targeted sedation. *J Thorac Dis* 2014; 6: 31-36 [PMID: 24455173 DOI: 10.3978/j.issn.2072-1439.2014.01.01]
- 29 唐敏, 符义刚, 李蕊, 李莉娥, 刘进, 李杰, 张文胜. Beagle犬单次静脉注射水溶性丙泊酚前药(HX0507)或与咪达唑仑、芬太尼联用时的麻醉效果. 四川大学学报(医学版) 2009; 40: 350-352
- 30 Anand VG. Evaluation of the new supraglottic airway S.A.L.T to aid blind orotracheal intubation: A pilot study. *Int J Crit Illn Inj Sci* 2013; 3: 241-245 [PMID: 24459620 DOI: 10.4103/2229-5151.124112]

编辑 郭鹏 电编 鲁亚静



ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) DOI: 10.11569 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有

• 消息 •

《世界华人消化杂志》再次入选《中文核心期刊要目总览》 (2011年版)

本刊讯 依据文献计量学的原理和方法, 经研究人员对相关文献的检索、计算和分析, 以及学科专家评审, 《世界华人消化杂志》再次入选《中文核心期刊要目总览》2011年版(即第六版)核心期刊。

对于核心期刊的评价仍采用定量评价和定性评审相结合的方法。定量评价指标体系采用了被引量、被引量、他引量、被摘率、影响因子、被国内外重要检索工具收录、基金论文比、Web下载量等9个评价指标, 选作评价指标统计源的数据库及文摘刊物达到60余种, 统计到的文献数量共计221177余万篇次, 涉及期刊14400余种。参加核心期刊评审的学科专家达8200多位。经过定量筛选和专家定性评审, 从我国正在出版的中文期刊中评选出1982种核心期刊。

《世界华人消化杂志》在编委、作者和读者的支持下, 期刊学术水平稳步提升, 编校质量稳定, 再次被北京大学图书馆《中文核心期刊要目总览》(2011年版)收录。在此, 向关心、支持《世界华人消化杂志》的编委、作者和读者, 表示衷心的感谢! (《世界华人消化杂志》编辑部)。

乙型肝炎病毒相关肝癌组织及外周血膜联蛋白A2异常表达的临床意义

陈雯, 张海健, 顾星, 时运, 钱琦, 姚登福, 陆少林

陈雯, 南通大学附属医院检验科 江苏省南通市 226001
张海健, 顾星, 时运, 钱琦, 姚登福, 陆少林, 南通大学附属医院
临床医学研究中心 江苏省南通市 226001
陈雯, 副主任医师, 主要从事临床诊断与肿瘤发病机制的研究。
国家自然科学基金国际合作专项基金资助项目, No. 2013DFA32150
南通市社会事业科技创新与示范基金资助项目, No. 2012034
作者贡献分布: 方法研究、数据整理及文章起草由陈雯与张海健完成; 临床资料与病例选择由顾星完成; 钱琦与时运参加完成部分研究; 统计分析由张海健完成; 设计、论文修改及审阅由姚登福与陆少林完成。
通讯作者: 姚登福, 教授, 226001, 江苏省南通市西寺路20号, 南通大学附属医院临床医学研究中心. yaodf@ahnmc.com
电话: 0513-85052413 传真: 0513-85052297
收稿日期: 2013-12-14 修回日期: 2014-02-10
接受日期: 2014-02-19 在线出版日期: 2014-03-28

Overexpression of annexin A2 in hepatic tissue and serum of patients with HBV-associated hepatocellular carcinoma

Wen Chen, Hai-Jian Zhang, Xing Gu, Yun Shi, Qi Qian, Deng-Fu Yao, Shao-Lin Lu

Wen Chen, Department of Clinical Laboratory, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China
Hai-Jian Zhang, Xing Gu, Yun Shi, Qi Qian, Deng-Fu Yao, Shao-Lin Lu, Research Center of Clinical Medicine, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China
Supported by: the International S&T Cooperation Program of China, No. 2013DFA32150; and the Innovation and Demonstration of Nantong Social Programs, No. 2012034
Correspondence to: Deng-Fu Yao, Professor, Research Center of Clinical Medicine, Affiliated Hospital of Nantong University, 20 Xisi Road, Nantong 226001, Jiangsu Province, China. yaodf@ahnmc.com
Received: 2013-12-14 Revised: 2014-02-10
Accepted: 2014-02-19 Published online: 2014-03-28

Abstract

AIM: To investigate the expression of annexin A2 (ANXA2) in hepatic tissue and serum of hepatitis B virus (HBV)-associated hepatocellular carcinoma (HCC).

METHODS: ANXA2 expression in HCC, tumor-adjacent precancerous and distal normal tissues was analyzed by real-time polymerase chain

reaction (PCR) and Western blot. The cellular localization of ANXA2 in these specimens was detected by immunohistochemistry, and hepatic HBV DNA was detected by in situ hybridization technique. Levels of serum ANXA2 in patients with HCC or benign liver diseases were quantitatively detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

RESULTS: Hepatic ANXA2 expression was localized in the cytoplasm and membrane of cells in cancerous tissues, and cytoplasm of cells in tumor adjacent cancerous tissues, but was undetectable in distal normal tissues ($F = 498.221$, $P < 0.001$). Overexpression of ANXA2 mRNA in cancerous tissues was significantly higher than that in tumor adjacent cancerous or distal normal tissues. ANXA expression was moderate to strong in cancerous tissues with HBV replication, but low in cancerous tissues without HBV replication ($Z = 4.933$, $P < 0.001$). Circulating ANXA2 levels in HCC patients were significantly higher than those in any group of other liver diseases ($P < 0.01$) except the metastatic liver cancer group. Serum levels of ANXA2 in patients with HCC were associated with HBV infection ($t = 6.820$, $P < 0.001$), extrahepatic metastasis ($t = 3.191$, $P = 0.002$), presence of portal vein thrombus ($t = 2.859$, $P = 0.005$), lower differentiation degree and TNM stage ($P < 0.01$), but not with patient sex, age, size or AFP level. Combined detection of serum ANXA2 and AFP substantially improved the diagnostic efficiency (96.5%).

CONCLUSION: Abnormal expression of ANXA2 in HBV-related HCC is useful for diagnosing HCC and understanding its pathogenesis.

© 2014 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

Key Words: Hepatocellular carcinoma; Annexin A2; Expression; Diagnosis; Hepatitis B virus infection

Chen W, Zhang HJ, Gu X, Shi Y, Qian Q, Yao DF, Lu SL. Overexpression of annexin A2 in hepatic tissue and serum of

■背景资料

乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 感染是肝癌发生的主要病原学因素。膜联蛋白亚组分 A2 (annexin A2, ANXA2) 在肝细胞生长、信号转导和诱发恶性转变中发挥重要作用, 但在 HBV 相关肝癌患者, HBV 感染与 ANXA2 表达的相互关系尚未见报道。研究 HBV 感染相关肝癌组织和患者外周血 ANXA2 表达水平, 有助于探讨其临床价值。

■同行评议者

卢宁, 副主任医师, 兰州军区乌鲁木齐总医院肿瘤科

■ 研究前沿

肝细胞癌防治是全球的医学难题,与HBV感染密切相关,早诊及有效治疗是提高患者生存率的有效措施。ANXA2在细胞生长、恶性转变过程中发挥重要作用。肝癌的手术切除仍是目前的主要手段,但并不适合多数已发生转移的患者,且术后患者生存率不理想,亟待发现其他新方法。

patients with HBV-associated hepatocellular carcinoma. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2014; 22(9): 1207-1213 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/1207.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v22.i9.1207>

摘要

目的: 探讨乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染对肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)组织及外周血中膜联蛋白A2(annexin A2, ANXA2)表达的影响。

方法: 以自身配对法收集30例术后肝癌组织、癌旁组织和远癌组织,以Western blot法和免疫组织化学法分析肝组织ANXA2表达与细胞中分布;并以生物素标记的HBV DNA探针检测肝组织中HBV DNA,以实时定量PCR技术分析肝组织ANXA2 mRNA转录与表达水平;以ELISA法定量肝病患者血ANXA2水平,分析其临床价值。

结果: 肝组织ANXA2表达定位于癌细胞的胞浆和胞膜,癌旁组织定位于胞浆;癌组织显著高于癌旁组织($F = 498.221, P < 0.001$),远癌组织则未见明显表达;癌灶组织中ANXA2基因呈过转录状态,显著高于癌旁与远癌组织;在HBV阳性肝癌组织中,ANXA呈中等至强阳性全数表达,在HBV阴性肝癌组织ANXA呈低阳性表达,组间差异显著($Z = 4.933, P < 0.001$)。血ANXA2水平,肝癌患者显著高于良性肝病各组($P < 0.01$),其表达与HBV感染($t = 6.820, P < 0.001$)、伴肝外转移($t = 3.191, P = 0.002$)、门静脉癌栓($t = 2.859, P = 0.005$)、中低程度分化和TNM分期期间显著相关($P < 0.01$),但与患者性别、年龄、肿瘤大小和甲胎蛋白(alpha-fetoprotein)水平间未见明显相关;血ANXA2与AFP联检,其诊断阳性率为96.5%。

结论: HBV相关肝癌ANXA2过表达,有助于HCC诊断和发病机制解析。

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词: 肝细胞癌; 膜联蛋白A2; 表达; 诊断; 乙型肝炎病毒感染

核心提示: 肝癌组织乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV) DNA阳性癌组织膜联蛋白亚组分(annexin, ANXA)表达显著高于阴性癌组织组;癌组织ANXA2 mRNA水平显著高于癌旁与远癌组织;肝癌患者血ANXA2表达与HBV感染、肝外转移、门静脉癌栓、中低程度分化和TNM分期期间显著相关;联检ANXA2与甲胎蛋白(alpha-

fetoprotein)诊断肝癌阳性率为96.5%。HBV相关肝癌中ANXA2异常表达,有助于肝癌(hepatocellular carcinoma)诊断和发病机制解析。

陈雯, 张海健, 顾星, 时运, 钱琦, 姚登福, 陆少林. 乙型肝炎病毒相关肝癌组织及外周血膜联蛋白A2异常表达的临床意义. 世界华人消化杂志 2014; 22(9): 1207-1213 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/1207.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v22.i9.1207>

0 引言

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)防治是全球的医学难题^[1],与乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)和丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)的感染密切相关^[2],肝癌早诊和早治是提高患者生存率的有效措施。手术切除仍是目前的主要手段^[3,4],但并不适合多数已发生转移的患者,且术后患者生存率不理想^[5]。膜联蛋白亚组分A2(annexin A2, ANXA2)是膜联蛋白家族成员之一,为钙离子依赖的磷脂酰结合蛋白,在细胞生长、信号转导调控、恶性转变和HCC发展过程中发挥重要作用^[6,7]。在我国肝癌患者中HBV感染者占80%以上,尚未见报道ANXA2在HBV相关HCC中的表达和诊断价值评估,本文通过定量分析了肝癌患者的癌组织中ANXA2表达,与HBV DNA复制关系及与胞内分布,定量分析了不同肝病患者外周血中ANXA2的表达,与HBV感染的关系及对HBV相关HCC诊断价值。

1 材料和方法

1.1 材料 (1)肝组织标本: 以自身配对法收集南通大学附属医院住院治疗HCC患者术后肝癌、癌旁(离癌灶>3 cm)和远癌组织(离癌灶>5 cm)各30份,于液氮中保存。从部分组织中制备总RNA,以分析癌组织不同部分中ANXA2 mRNA表达;再将部分组织匀浆后制备蛋白,以Western blot法分析ANXA2表达水平。HCC诊断依据全国肝癌研究协作组制定的标准核实^[8]。事先经患者知情同意,并经医院伦理委员会批准; (2)血清样本: 从住院治疗患者中收集肝癌115例(男88例,女27例),年龄范围在25-81岁,平均48.3岁;其他患者包括慢性肝炎35例、急性肝炎28例、肝硬化38例和转移性肝癌25例(肺癌、胃癌各6例;急性髓性白血病、乳腺癌各36例;结肠癌3例;宫颈癌和前列腺癌各2例);所有病例经生化检测、病毒性标志物和超声检查确诊,于清晨采集血液5 mL,分离血清后备用;以放射免疫法检测甲胎

蛋白(alpha-fetoprotein, AFP); 以30例献血员[肝炎病毒标志物阴性且谷氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)正常]血清标本作对照。

1.2 方法

1.2.1 总RNA提取和cDNA合成: 用TRIzol试剂(Invitrogen)分离50 mg肝组织总RNA, 琼脂糖凝胶电泳检测总RNA完整性, 核酸蛋白测定仪(Bio-RAD smartspec™ plus)检测其浓度和纯度。用cDNA合成试剂盒(Fermentas)以1 μg总RNA为模板同等条件下合成ANXA2和β-actin的cDNA。

1.2.2 实时定量PCR: 用stepone™实时定量PCR仪(Applied Biosystems), PCR反应。50 μL反应体系包含25 μL 2×SYBR Premix Ex Taq(TaKaRa, Japan), 2 μL引物混合物, 1 μL 50×ROX Reference Dye I, 4 μL cDNA, 和18 μL去离子水。ANXA2引物序列: 上游, 5'-TGAGCGGGATGCTTTGAAC-3', 下游5'-ATCCTGTCTCTGTGCAT TGCTG-3'; β-actin引物: 上游, 5'-ATTGCCGACAGGATGCAGA-3', 下游, 5'-GAGTACTTGCGCTCAGGAGGA-3'^[9], 优化PCR条件如下: 95 °C 2 min; 95 °C 10 s, 62 °C 1 min, 40个循环; 60 °C 15 s, 以2^{-ΔΔCt}值相对定量分析。

1.2.3 Western blot分析: 肝组织在预冷匀浆液匀浆(4 °C), 800 g离心10 min, 收集上清液, 以BCA法(碧云天生物技术有限公司)测定蛋白浓度。每个样品取20 mg蛋白上样到15%十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)上, 蛋白质然后转移到聚偏氟乙烯膜上, 用5%牛血清白蛋白tris缓冲液4 °C封闭过夜, 孵育在抗ANXA2和抗β-actin(Santa Cruz)一抗中4 h, 随后在连接有辣根过氧化物酶二抗中孵育1 h, 然后条带在化学发光系统(Millipore, USA)中可视化。用image J软件分析蛋白密度。用相对比值(RR)比较ANXA2表达, $RR = SI_{ANXA2}/SI_{\beta-actin}$, SI表示蛋白信号强度。

1.2.4 免疫组织化学染色: 采用Elivision一步法进行免疫组织化学。10%甲醛固定24 h、在梯增稀释的乙醇中脱水(5 min/次), 石蜡包埋, 制成厚度3 μm的组织切片。用二甲苯脱蜡两次(10 min/次), 在梯减稀释的乙醇中脱水(5 min/次)。脱蜡的切片用pH 7.4的PBS洗涤3次(5 min/次), 孵育在内源性过氧化物酶封闭液中, 0.01 mol/L pH 6.0的柠檬酸盐缓冲液处理10 min, 高压加热法修复抗原, 正常动物血清封闭非特异性结合, 滴加ANXA2抗体, 4 °C过夜, PBS缓冲液漂洗, 滴加二抗, 室温孵育10 min, PBS漂洗, 滴加链霉素抗

生物素蛋白-过氧化物酶, 室温孵育10 min, PBS冲洗, 滴加新鲜配制的DAB溶液, 室温显色。双蒸水洗涤, 苏木素复染, 无水乙醇脱水透明, 封片。Olympus BX50光学显微镜观察、摄像, 以0.01 mol/L PBS(pH 7.5)分别替代一抗、二抗作阴性对照。

1.2.5 酶联免疫吸附测定: 用人ANXA2 ELISA试剂盒(武汉优尔生科技股份有限公司)检测血清ANXA2表达水平, 100 μL血清样本或者标准品被分别添加到96孔板中, 接着添加100 μL检测试剂A并37 °C孵育1 h, 随后添加100 μL检测试剂B并37 °C孵育30 min, 然后添加90 μL底物溶液并37 °C孵育25 min, 最后每孔添加50 μL终止液并读取450 nm处的吸光度。

统计学处理 数据以mean±SD表示, 以t检验比较两样本均数; 以q检验作多样本均数的两两比较, 以受试者工作特征曲线(receiver operating characteristic curve, ROC)评估外周血ANXA2表达水平对肝癌诊断的灵敏性和特异性^[10,11], $P<0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 肝癌组织ANXA2表达与免疫组织化学分析 按自身配对法收集肝癌患者术后新鲜的30例肝癌的癌灶、癌旁和远癌组织, 以Western blot法, 相对定量分析肝组织ANXA2蛋白表达(图1A), 经组织ANXA2与β-actin相对定量显示: 癌灶组织ANXA2表达显著高于癌旁组织和远癌组织($F=498.221$, $P<0.001$, 图1B); 免疫组织化学分析的细胞定位, ANXA2在HCC癌灶组织中定位于胞浆和胞膜, 癌旁中定位于胞浆, 而远癌组织中未见明显表达(图1C)。

2.2 实时荧光定量癌组织ANXA2 mRNA转录状态 肝癌不同组织ANXA2 mRNA转录水平如表1。肝癌的癌灶组织中ANXA2 mRNA相对表达水平(2^{-ΔΔCt}值)明显高于自身配对的癌旁组织或远癌组织, 显示癌灶组织中ANXA2基因呈过转录状态。

2.3 癌组织ANXA表达与HBV复制关系 肝癌癌灶组织中ANXA全数表达(表2, 100%)。在HBV阳性肝癌组织中, ANXA呈中等至强阳性(++)-(+++表达, 而在HBV阴性肝癌组织ANXA呈低阳性(+)-(++)表达, 组间差异显著($Z=4.933$, $P<0.001$)。在23例HBV阳性肝癌组中ANXA的表达强度在(+++)以上为22例, 占95.7%; HBV阴

■ 相关报道

近期Dong和Zhang等报道了肝癌细胞中ANXA2高表达, 以小发夹型RNA特异性地抑制肝癌细胞株中ANXA2 mRNA转录, 可有效抑制肝癌细胞增殖与转移, 是一具有分子靶向作用的治疗方法, 值得深入研究, 具有应用前景与开发价值。

■ 创新盘点

正常肝或慢性肝炎肝组织罕见ANXA2表达。以自身对照方式分析肝癌、癌旁和远癌组织ANXA2转录和表达。癌组织ANXA2表达显著异常,定位于胞浆和胞膜。HBV相关肝癌组织ANXA呈全数阳性表达,呈中等至强阳性表达占95.7%,提示HBV复制与ANXA2表达明显相关。

表 1 肝组织ANXA2 mRNA相对定量(mean ± SD)分析 (n = 30)

分组	Ct _{ANXA2}	Ct _{β-actin}	ΔCt	2 ^{-ΔΔCt}
癌灶组	21.63 ± 0.09	21.19 ± 0.07	0.44 ± 0.06	1.00 ± 0.04
癌旁组	24.29 ± 0.09	22.60 ± 0.08	1.70 ± 0.12	0.43 ± 0.10 ^b
远癌组	24.71 ± 0.06	22.13 ± 0.06	2.57 ± 0.07	0.23 ± 0.07 ^b

^bP < 0.01 vs 癌灶组。ANXA2: 膜联蛋白亚组分A2。

表 2 肝癌组织HBV复制与ANXA2表达的关系 (n = 30)

HBV DNA	n	肝细胞中ANXA2表达状态				Z值	P值
		-	+	++	+++		
阳性	23	0	0	1	22	4.933	<0.001
阴性	7	0	1	6	0		

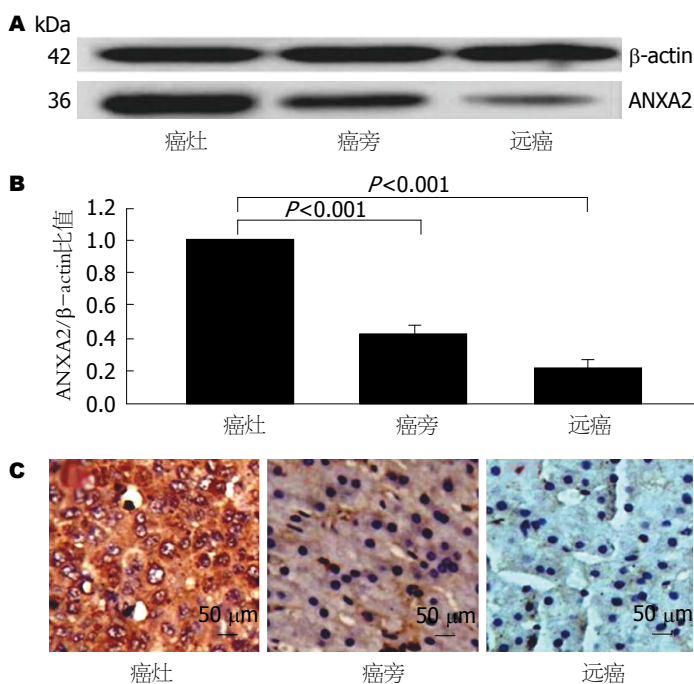


图 1 肝癌及癌旁组织中ANXA2表达水平的比较。A: Western blot; B: ANXA2/β-actin比率(n = 3, mean ± SD); C: 免疫组织化学。ANXA2: 膜联蛋白亚组分A2。

性肝癌组中ANXA的表达强度未见强阳性表达(+++), 以中等阳性表达(++)者为6例, 占85.7%。肝癌患者ANXA表达强度, 在HBV阳/阴性组间差异显著。

2.4 肝病患者血ANXA2表达与临床病理学特征
肝癌患者血ANXA2表达与HBV感染关系, 在HBsAg阳性组(27.38 ng/mL ± 5.67 ng/mL)高于阴性组(18.58 ng/mL ± 7.83 ng/mL), 差异显著($t = 6.820$, $P < 0.001$); 伴与不伴肝外转移组分别为26.03 ng/mL ± 5.99 ng/mL和22.79 ng/mL ± 5.64 ng/mL, 组间差异显著($t = 3.191$, $P = 0.002$); 伴/不伴有门静脉癌栓组分别为26.03 ng/mL ± 5.99

ng/mL和23.06 ng/mL ± 5.03 ng/mL, 差异显著($t = 2.859$, $P = 0.005$); 低分化组为27.05 ng/mL ± 5.13 ng/mL、中等分化组为26.19 ng/mL ± 5.34 ng/mL均显著高于高分化组20.43 ng/mL ± 4.97 ng/mL($P < 0.001$); TNM分期显示III-IV期为27.44 ng/mL ± 6.01 ng/mL显著高于I-II期21.16 ng/mL ± 5.97 ng/mL($t = 5.594$, $P < 0.001$); 但在年龄 ≥ 50岁和 < 50岁组、肿块 ≥ 5.0 cm与 < 5.0 cm组、AFP在 ≥ 400 ng/mL组和 < 400 ng/mL组间, 均未见明显差异。

2.5 血ANXA2过表达与AFP联合诊断肝癌 血ANXA2和AFP浓度对HCC诊断价值评估的ROC

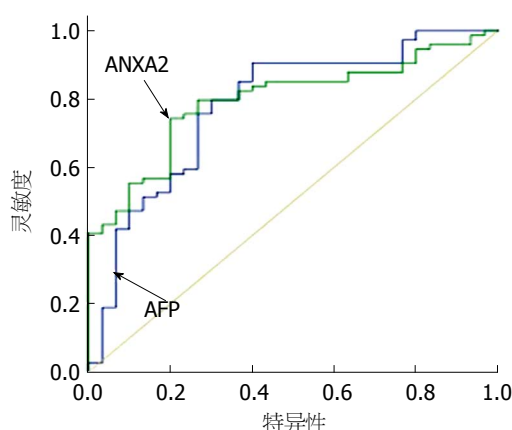


图2 血ANXA2和AFP诊断肝癌的ROC曲线. ANXA2: 膜联蛋白亚组分A2; AFP: 甲胎蛋白.

曲线如图2. 在该曲线下ANXA2的面积为0.903, AFP的面积为0.823. 血ANXA2敏感度是87.0%, 与AFP联合对HCC诊断的灵敏性96.5%, 阴性预测值提高到96.6%.

3 讨论

ANXA2是ANXA家族的重要成员, 其分子的核心岩藻糖基化水平随肿瘤转移潜能增加, 可激活并生成纤溶酶以降解环绕血管的细胞外基质(extracellular matrix, ECM)和基膜, 启动蛋白水解级联反应, 导致肿瘤细胞黏附、浸润和转移, 在肿瘤细胞转移和促血管形成中扮演重要角色^[12,13]. 长江口地区为肝癌高发地区, HBV感染是肝癌发生的主要病原学因素^[14,15]. ANXA2在肝细胞生长、信号转导和诱发恶性转变中发挥重要作用, 但在HBV相关肝癌患者, HBV感染与ANXA2表达的相互关系还尚未见报道^[16,17]. 本文分析了HBV感染相关的肝癌患者, 手术切除标本和患者外周血ANXA2表达水平及其临床价值.

肝组织ANXA2表达显示, 正常肝或慢性肝炎肝组织中, 很少见ANXA2表达. 本研究以自身对照方式分析了肝癌组织的癌灶组织、癌旁组织和远癌组织中ANXA2转录和表达水平^[6,10]. 以Western blot法相对定量分析癌灶、癌旁和远癌组织ANXA2表达(图1A)显示: 癌灶组织ANXA2表达显著高于癌旁组织和远癌组织(图1B); ANXA2在肝细胞定位, 免疫组织化学显示ANXA2定位于HCC癌组织的胞浆和胞膜, 癌旁组织胞浆, 远癌组织未见表达(图1C). ANXA2表达与肝细胞的程度分化呈负相关, 低分化肝癌组织中ANXA2表达越高, 高分化肝癌组织ANXA2表达越低. 从转录水平上分析不同肝组

织中ANXA2 mRNA表达(表1), 同样发现癌组织中ANXA2表达明显高于自身配对的癌旁或远癌组织. 癌组织中ANXA2过表达, 提示从ANXA2表达参与肝癌的进展过程^[6,18], 其水平异常是监测肝细胞恶性转化的有用标志物^[19,20].

HBV相关肝癌中ANXA2表达尚未见诸文献^[21,22]. 本文资料显示30例肝癌组织中ANXA呈全数阳性表达(表2), 但在HBV阳性肝癌组织中, ANXA2呈中等至强阳性表达占95.7%; 而HBV阴性肝癌组织中, ANXA2表达程度较低, 组间差异显著; 肝癌患者外周血中ANXA2浓度较于正常对照明显升高, 血ANXA2异常有助于肝癌诊断, 且与AFP可互补诊断HCC(图2); ANXA2表达的临床病理学特征显示: 肝癌患者血ANXA2表达与HCC侵袭和转移、HBV感染、分化程度和TNM分期有关, 其机制可能与血纤维蛋白溶酶原/血纤维蛋白溶酶^[23]、分子表面的酪氨酸23位磷酸化^[24]及核因子(nuclear factor κ B, NF- κ B)活化等相关^[25]. 但与肝癌的瘤体大小度间未见明显相关. 肝癌患者血ANXA2表达与HBV感染呈明显的正相关关系, 在乙肝表面抗原(hepatitis B virus surface antigen, HBsAg)阳性组血ANXA2水平明显高于HBsAg阴性组, 组间差异十分显著, 提示肝组织中HBV复制与ANXA2表达明显相关.

HCC是最常见的恶性肿瘤, 发病率居全球恶性肿瘤的第5位, 死亡率居第3位^[26,27]. HCC的发生发展由原癌基因激活和抑癌基因失活、信号传导通路异常、细胞周期调控因子突变、抗凋亡基因激活、血管形成及对放、化疗的耐药性等多种因素共同作用形成, 且发病率仍在持续增加, HCC预后极差, 早期特异诊断与有效治疗极为重要^[1,28,29]. 最近证实ANXA2在HCC的诊断中具有较高的灵敏性和特异性, 可作为早期诊断HCC的标志物^[10,30]. 对肝组织与外周血ANXA2研究, 显示在HBV感染相关的肝癌进展中, ANXA2过表达, 可为肝细胞恶性转化监测和肝癌的靶向治疗带来新契机, 对此深入研究将有助于揭示HCC发病机制或为HCC的治疗提供新靶点^[31,32].

4 参考文献

- 1 El-Serag HB. Hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2011; 365: 1118-1127 [PMID: 21992124 DOI: 10.1056/NEJMra1001683]
- 2 Shen YC, Hsu C, Cheng CC, Hu FC, Cheng AL. A critical evaluation of the preventive effect of

■应用要点

ANXA2在肝癌中异常表达和分子中Tyr23残基磷酸化上调. 定量夹心ELISA法检测肝癌患者血清ANXA2表达, 可能有助于肝癌早期诊断及肿瘤浸润和复发监测. 将血ANXA2检查添加到肝癌特异诊断标志物(GPC3、HS-GGT和HSP70)组合中, 可增加诊断的可靠性和客观性, 尤其是HBV相关肝癌诊断, 具有应用前景.

■同行评价

本文内容客观, 实验方法成熟, 观点新颖, 具有一定的科学意义。

- 3 DuBray BJ, Chapman WC, Anderson CD. Hepatocellular carcinoma: a review of the surgical approaches to management. *Mo Med* 2011; 108: 195-198 [PMID: 21736080]
- 4 Portolani N, Baiocchi GL, Coniglio A, Tiberio GA, Prestini K, Gheza F, Benetti A, Maria Giulini S. Limited liver resection: a good indication for the treatment of hepatocellular carcinoma in elderly patients. *Jpn J Clin Oncol* 2011; 41: 1358-1365 [PMID: 22039578 DOI: 10.1093/jjco/hyr154]
- 5 van Malenstein H, van Pelt J, Verslype C. Molecular classification of hepatocellular carcinoma anno 2011. *Eur J Cancer* 2011; 47: 1789-1797 [PMID: 21612914 DOI: 10.1016/j.ejca.2011.04.027]
- 6 Lokman NA, Ween MP, Oehler MK, Ricciardelli C. The role of annexin A2 in tumorigenesis and cancer progression. *Cancer Microenviron* 2011; 4: 199-208 [PMID: 21909879 DOI: 10.1007/s12307-011-0064-9]
- 7 Madureira PA, Surette AP, Phipps KD, Taboski MA, Miller VA, Waisman DM. The role of the annexin A2 heterotetramer in vascular fibrinolysis. *Blood* 2011; 118: 4789-4797 [PMID: 21908427]
- 8 Ministry of Health of the People's Republic of China. [Updated standards for the diagnosis and treatment of primary liver cancer]. *Zhonghua Gan-zangbing Zazhi* 2012; 20: 419-426 [PMID: 23230592]
- 9 Zhang HJ, Yao DF, Yao M, Huang H, Wang L, Yan MJ, Yan XD, Gu X, Wu W, Lu SL. Annexin A2 silencing inhibits invasion, migration, and tumorigenic potential of hepatoma cells. *World J Gastroenterol* 2013; 19: 3792-3801 [PMID: 23840117 DOI: 10.3748/wjg.v19.i24.3792]
- 10 Zhang HJ, Yao DF, Yao M, Huang H, Wu W, Yan MJ, Yan XD, Chen J. Expression characteristics and diagnostic value of annexin A2 in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2012; 18: 5897-5904 [PMID: 23139605 DOI: 10.3748/wjg.v18.i41.5897]
- 11 Qian J, Yao D, Dong Z, Wu W, Qiu L, Yao N, Li S, Bian Y, Wang Z, Shi G. Characteristics of hepatic igf-ii expression and monitored levels of circulating igf-ii mRNA in metastasis of hepatocellular carcinoma. *Am J Clin Pathol* 2010; 134: 799-806 [PMID: 20959664 DOI: 10.1309/AJCPTFDSE2V3LCZP]
- 12 Sharma MC, Sharma M. The role of annexin II in angiogenesis and tumor progression: a potential therapeutic target. *Curr Pharm Des* 2007; 13: 3568-3575 [PMID: 18220793 DOI: 10.2174/138161207782794167]
- 13 O'Connell PA, Surette AP, Liwski RS, Svenningsson P, Waisman DM. S100A10 regulates plasminogen-dependent macrophage invasion. *Blood* 2010; 116: 1136-1146 [PMID: 20424186 DOI: 10.1182/blood-2010-01-264754]
- 14 Pan N, Qiu J, Sun H, Miao F, Shi Q, Xu J, Jiang W, Jin H, Xie W, He Y, Zhang J. Combination of human leukocyte antigen and killer cell immunoglobulin-like receptor genetic background influences the onset age of hepatocellular carcinoma in male patients with hepatitis B virus infection. *Clin Dev Immunol* 2013; 2013: 874514 [PMID: 24312130]
- 15 Pan Y, Zhao L, Chen XM, Gu Y, Shen JG, Liu LM. The XRCC1 Arg399Gln genetic polymorphism contributes to hepatocellular carcinoma susceptibility: an updated meta-analysis. *Asian Pac J Cancer Prev* 2013; 14: 5761-5767 [PMID: 24289575]
- 16 Liu W, Cao Y, Wang T, Xiang G, Lu J, Zhang J, Hou P. The N-Glycosylation Modification of LHBs (Large Surface Proteins of HBV) Effects on Endoplasmic Reticulum Stress, Cell Proliferation and its Secretion. *Hepat Mon* 2013; 13: e12280 [PMID: 24282423 DOI: 10.5812/hepatmon.12280]
- 17 Li J, Shi W, Gao Y, Yang B, Jing X, Shan S, Wang Y, Du Z. Analysis of microRNA expression profiles in human hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *Clin Lab* 2013; 59: 1009-1015 [PMID: 24273923]
- 18 Mohammad HS, Kurokohchi K, Yoneyama H, Tokuda M, Morishita A, Jian G, Shi L, Murota M, Tani J, Kato K, Miyoshi H, Deguchi A, Himoto T, Usuki H, Wakabayashi H, Izuishi K, Suzuki Y, Iwama H, Deguchi K, Uchida N, Sabet EA, Arafa UA, Hassan AT, El-Sayed AA, Masaki T. Annexin A2 expression and phosphorylation are up-regulated in hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol* 2008; 33: 1157-1163 [PMID: 19020748]
- 19 Longerich T, Haller MT, Mogler C, Aulmann S, Lohmann V, Schirmacher P, Brand K. Annexin A2 as a differential diagnostic marker of hepatocellular tumors. *Pathol Res Pract* 2011; 207: 8-14 [PMID: 20971570 DOI: 10.1016/j.prp.2010.09.007]
- 20 Ji NY, Park MY, Kang YH, Lee CI, Kim DG, Yeom YI, Jang YJ, Myung PK, Kim JW, Lee HG, Kim JW, Lee K, Song EY. Evaluation of annexin II as a potential serum marker for hepatocellular carcinoma using a developed sandwich ELISA method. *Int J Mol Med* 2009; 24: 765-771 [PMID: 19885616]
- 21 Motavaf M, Safari S, Saffari Jourshari M, Alavian SM. Hepatitis B virus-induced hepatocellular carcinoma: the role of the virus x protein. *Acta Virol* 2013; 57: 389-396 [PMID: 24294951]
- 22 Fu Y, Wei X, Tang C, Li J, Liu R, Shen A, Wu Z. Circulating microRNA-101 as a potential biomarker for hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *Oncol Lett* 2013; 6: 1811-1815 [PMID: 24260081]
- 23 Kwaan HC, McMahon B. The role of plasminogen-plasmin system in cancer. *Cancer Treat Res* 2009; 148: 43-66 [PMID: 19377918 DOI: 10.1007/978-0-387-79962-9_4]
- 24 Zheng L, Foley K, Huang L, Leubner A, Mo G, Olino K, Edil BH, Mizuma M, Sharma R, Le DT, Anders RA, Illei PB, Van Eyk JE, Maitra A, Laheru D, Jaffee EM. Tyrosine 23 phosphorylation-dependent cell-surface localization of annexin A2 is required for invasion and metastases of pancreatic cancer. *PLoS One* 2011; 6: e19390 [PMID: 21572519 DOI: 10.1371/journal.pone.0019390]
- 25 Dong ZZ, Yao DF, Wu W, Yao M, Yu HB, Shen JJ, Qiu LW, Yao NH, Sai WL, Yang JL. Delayed hepatocarcinogenesis through antiangiogenic intervention in the nuclear factor-kappa B activation pathway in rats. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2010; 9: 169-174 [PMID: 20382589]
- 26 Chen K, Shi W, Xin Z, Wang H, Zhu X, Wu X, Li Z, Li H, Liu Y. Replication of genome wide association studies on hepatocellular carcinoma susceptibility loci in a Chinese population. *PLoS One* 2013; 8: e77315 [PMID: 24204805 DOI: 10.1371/journal.pone.0077315]
- 27 Zhang J, Lu C, He S, Wan C, Zhang Y, Cheng C.

- Decreased expression of Small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein (SGT) correlated with prognosis of Hepatocellular carcinoma. *Neoplasma* 2014; 61: 83-89 [PMID: 24195513 DOI: 10.4149/neo_2014_012]
- 28 Yao M, Wang L, Yan MJ, Gu X, Yan XD, Zhang HJ, Yao DF. Targeting Annexin A2 gene for suppressing invasion and tumor progression of liver cancer. *J Pure Appl Microbio* 2013; 7(Sp): 381-388
- 29 Thirion M, Ochiya T. Roles of microRNAs in the hepatitis B virus infection and related diseases. *Viruses* 2013; 5: 2690-2703 [PMID: 24212236 DOI: 10.3390/v5112690]
- 30 Hofmann A, Osman A, Leow CY, Driguez P, McManus DP, Jones MK. Parasite annexins--new molecules with potential for drug and vaccine development. *Bioessays* 2010; 32: 967-976 [PMID: 21105292 DOI: 10.1002/bies.200900195]
- 31 Dong ZZ, Yao M, Zhang HJ, Wang L, Huang H, Yan MJ, Yao DF. Inhibition of Annexin A2 gene transcription is a promising molecular-targeted for hepatoma cell proliferation and metastasis. *Oncology Letters* 2014; 7: 28-34
- 32 Jiang JH, Gao Q, Shen XZ, Yu Y, Gu FM, Yan J, Pan JF, Jin F, Fan J, Zhou J, Huang XW. An X-chromosomal association study identifies a susceptibility locus at Xq22.1 for hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2013; 37: 586-595 [PMID: 24209690 DOI: 10.1016/j.clinre.2013.09.002]

编辑 田滢 电编 鲁亚静



维生素D在肝病中作用的研究进展

赵景, 郑素军

■背景资料

目前对维生素D的研究越来越多, 许多过去未知的功能被一一开发, 而慢性肝病作为一个世界性的难题亟待解决, 两者之间的联系很可能为我们攻克这个难题带来一个新的视角。

赵景, 郑素军, 首都医科大学附属北京佑安医院人工肝中心北京市 100069

赵景, 主要从事肝病的基础与临床研究。

佑安肝病艾滋病基金资助项目, No. BJYAH-2011-045
北京市卫生系统高层次卫生技术人才培养基金资助项目, No. 2011-3-083

首都卫生发展科研专项基金资助项目, No. 2011-2018-04

作者贡献分布: 本文综述由赵景完成; 郑素军审校。

通讯作者: 郑素军, 主任医师, 100069, 北京市丰台区右安门外西头条8号, 首都医科大学附属北京佑安医院人工肝中心. zhengsujun003@126.com

收稿日期: 2013-12-30 修回日期: 2014-01-23

接受日期: 2014-02-03 在线出版日期: 2014-03-28

Role of vitamin D in liver diseases

Jing Zhao, Su-Jun Zheng

Jing Zhao, Su-Jun Zheng, Artificial Liver Center, Beijing YouAn Hospital, Capital Medical University, Beijing 100069, China

Supported by: Liver Disease and AIDS Foundation of YouAn Hospital, No. BJYAH-2011-045; Beijing Municipal Training Foundation for Highly-qualified and Technological Talents of Health System, No. 2011-3-083; and the Capital Special Health Research and Development Fund, No. 2011-2018-04

Correspondence to: Su-Jun Zheng, Chief Physician, Artificial Liver Center, Beijing Youan Hospital, Capital Medical University, 8 Youan Menwai Xitoutiao, Fengtai District, Beijing 100069, China. zhengsujun003@126.com

Received: 2013-12-30 Revised: 2014-01-23

Accepted: 2014-02-03 Published online: 2014-03-28

Abstract

Liver diseases, including hepatitis B, hepatitis C, fatty liver diseases, cirrhosis and liver cancer, seriously affect our lives, and patients with liver diseases often have different levels of vitamin D deficiency. The immune-regulatory, anti-infection and anticancer functions of vitamin D make it play a certain role in the occurrence and development of liver diseases. How to use vitamin D to delay the progression of liver diseases will be a valuable topic.

© 2014 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

Key Words: Vitamin D; Liver diseases

Zhao J, Zheng SJ. Role of vitamin D in liver diseases.

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2014; 22(9): 1214-1218 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/1214.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i9.1214>

摘要

近年研究显示, 乙型肝炎、丙型肝炎、脂肪肝、肝硬化、肝癌等各类肝病患者, 均普遍存在不同程度的维生素D缺乏, 维生素D在肝病的发生、发展中发挥了一定作用。如何利用维生素D来延缓肝病患者的病程, 将是一个很有价值的课题。

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词: 维生素D; 肝病

核心提示: 大量研究证实乙型肝炎、丙型肝炎、脂肪肝、肝硬化、肝癌患者体内存在维生素D不足, 维生素D缺乏影响肝病进展。

赵景, 郑素军. 维生素D在肝病中作用的研究进展. 世界华人消化杂志 2014; 22(9): 1214-1218 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/1214.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i9.1214>

0 引言

近年来, 各种关于维生素D(vitamin D, VD)的研究不断涌现, 大量资料均显示慢性肝病患者存在VD缺乏^[1-6]。VD与肝病之间究竟存在什么联系、其在肝病发生、发展中作用怎样? VD能否为肝病的治疗带来新的突破, 值得探讨。本文对VD就上述方面的一些研究进展综述如下。

1 VD的生理功能

传统认为VD主要对钙磷代谢起调节作用。近来研究发现远不止此^[7-10], VD受体(vitamin D receptor, VDR)几乎遍布所有细胞的细胞核, 包括心脏、肝脏、肾脏、骨骼、甲状腺、脑、泌尿生殖系统以及各种免疫细胞^[11]。一些VD新的生理作用如下。

1.1 VD的免疫调节作用 被激活的巨噬细胞会产生1,25-二羟维生素D₃[1,25-dihydroxyvitamin D₃,

■同行评议者

李勇, 副教授, 上海中医药大学附属市中医医院消化科

1,25-(OH)₂-D₃], 免疫细胞内表达有VDR、VD缺乏易患各种急慢性传染病, 这些都说明VD影响着免疫系统功能的发挥, 其作为一种新型的神经内分泌-免疫调节激素已被我们接受. 一方面, VD可以使正常外周血单核细胞向巨噬细胞转化, 加强巨噬细胞的吞噬作用^[12], 从而参与调解固有免疫; 另一方面, 特异性免疫中, 1,25-(OH)₂-D₃通过VDR作用于树突状细胞(dendritic cell, DC)抑制其成熟, 从而中止免疫反应^[13]. 此外, VD还是T细胞发挥免疫作用的调节剂, 通过抑制Th细胞增殖、分化、分泌肿瘤坏死因子-β(tumor necrosis factor-β, TNF-β)、白介素(interleukin-2, IL-2)、干扰素-γ, 使细胞因子表达从T1途径转变为T2途径, 从而使T细胞发挥抑制性免疫调节作用^[14]. VD也可增强免疫, 高水平的1,25-(OH)₂-D₃ VDR转录活性能促进CD4⁺ Th2细胞以及黏膜抗体对抗侵犯人体皮肤的抗原^[15], VD还可以作为疫苗的佐剂来增强机体体液免疫.

1.2 VD的抗传染病作用 VD可对抗多种传染病. 英国的研究人员称高剂量的VD治疗能加速肺结核的痊愈, 减少肺损伤, 低水平的VD会提高活动性肺结核的发生率^[16,17]. 这可能是因为VD会促使T细胞释放干扰素-γ的分子, 该分子会进而激活巨噬细胞进攻入侵的结核菌, 并释放一种抗菌肽, 来增强抗结核的能力^[18]. 另外, 补充VD可以延缓艾滋病的母婴传播, 降低艾滋病的病死率^[19].

1.3 VD的抗肿瘤作用 VD与癌症关系的研究炙手可热, 也充满了争议. 长期VD缺乏, 可能会引发一些恶性肿瘤, 如白血病、乳腺癌^[20-25]. 而补充VD可以减少一些肿瘤的发生, 例如补充VD可以使结肠直肠癌的发生率降低6%^[26]. 但有些研究表明, VD并非多多益善, 其与肿瘤呈U性曲线关系, 如乳腺癌、食管癌和胰腺癌, 推荐血清最佳浓度为40-80 nmol/L(16-32 ng/mL)^[27], 一项病例对照研究甚至指出高VD使得胰腺癌风险升高3倍^[28].

2 VD在肝病中作用

2.1 VD与乙型肝炎 慢性乙型病毒性肝炎是目前我国危害性最严重的一种传染病^[29,30]. 乙型肝炎患者普遍存在VD缺乏, 并与乙型肝炎病毒载量相关. 一组实验测量了203例慢乙型肝炎患者的25-羟基维生素D₃(25-OH-D₃)水平, 分别有69例(34%)有严重的VD缺乏(25-OH-D₃<10 ng/mL), 95例(47%)有VD不足(25-OH-D₃≥10并且

<20 ng/mL), 39例(19%)VD充足(25-OH-D₃≥20 ng/mL), 观察其与乙型肝炎病毒载量的关系, 发现在病毒<2000 IU/mL及≥2000 IU/mL患者中, 25-OH-D₃平均血清浓度分别为17、11 ng/mL. 单因素及多因素方差分析显示, 高乙型肝炎病毒载量预示着VD水平低下^[31]. 国内也有类似研究, 随机挑选慢乙型肝炎患者300例, 其中202例VD缺乏者为实验组, 98名正常者为对照组, 测得两组HBV DNA均值分别为6.03±2.30及4.31±2.48(log₁₀ copies/mL), 即实验组明显高于对照组^[32]; 另有研究显示, VD与乙型肝炎表面抗原的自发清除相关. Mahamid等^[33]在2007-2013年监测了53例发生乙型肝炎表面抗原自发清除的慢性乙型病毒性肝炎患者, 其中44例VD水平在正常范围, 9例VD水平低下, 说明了正常的VD水平有利于促进乙型肝炎表面抗原的自发清除. 最后, 有研究显示, 慢性肾病患者由于体内1,25-(OH)₂-D₃合成减少, 导致其接种乙型肝炎疫苗后无法得到有效的抗体滴度^[34].

2.2 VD与丙型肝炎 丙型肝炎病毒是引起肝硬化和肝癌的重要原因之一, 目前全球超过1.7亿例感染丙型肝炎病毒^[35]. 血清VD水平能否预测丙型肝炎抗病毒治疗的持续应答反应率(sustained virological response, SVR), 目前仍不明确^[36]. 有研究发现体内的25-OH-D₃水平可能会影响进行标准抗病毒治疗患者的炎症反应及纤维化的过程. 对197例基因1型(genotype 1, G1)慢性丙型肝炎(chronic hepatitis C, CHC)和49例健康受试者进行年龄和性别匹配连续评估, 其中167例患者接受了聚乙二醇干扰素联合利巴韦林抗病毒治疗, 结果显示CHC血清25-OH-D₃水平明显低于正常人(这可能是因为CHC患者减少CYP27A1的表达), 低VD水平导致严重纤维化以及低水平的持续病毒学应答率^[37,38]. Gal-Tanamy等^[39]的研究首次发现VD在体外病毒感染增殖系统中有直接抗病毒作用, 肝脏VD内分泌系统和丙型肝炎病毒之间存在相互影响, VD通过与干扰素发挥协同效应提高患者的抗病毒治疗效果. Kondo等^[40]则认为1-羟基维生素D₃(1-OH-D₃)可以通过抑制外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)及免疫血清球蛋白(immune serum globulin, ISG)释放趋化因子(interferon-inducible protein-10, IP-10)来增加聚乙二醇干扰素联合利巴韦林治疗的敏感性. 还有研究表明IL28B的基因多态性如rs12979860C/T能有效预测CHC的抗病毒治疗的应答, 而VD能增

■研究前沿

目前研究慢性肝病尤其是乙型肝炎、丙肝与维生素D之间关系的临床试验颇多, 但仍缺乏一些大样本、多中心的系统动态的研究, 包括为慢性肝病患者补充维生素D并进行随访, 观察其肝病的进程.

■创新盘点

本文从乙型肝炎、丙型肝炎、脂肪肝、肝硬化、肝癌这5个方面来阐述与维生素D之间的关系,较为系统、全面地阐述了维生素D在肝病中的作用。

加其对初治CHC患者预测的准确性。当血清VD浓度 $>20\text{ ng/mL}$ 时, G1等难治性基因型的患者也可达到85%的SVR^[41]。

2.3 VD与脂肪肝 研究表明, VD可以通过减少体质量及肝脏质量的增加、降低血清血脂浓度、减少肝脏脂肪生成相关基因的表达, 以及提高脂肪氧化相关基因的表达, 从而减弱高脂餐导致的大鼠肝脂肪变性, 对于高脂餐引起的大鼠肝脂肪变性, 有一定的预防作用^[42]。而VD缺乏时, 可以激活Toll样受体, 加重肥胖大鼠的非酒精性脂肪肝(nonalcoholic fatty liver, NAFLD)^[43]。同样, 在临床研究发现, 低VD水平增加非肥胖人群的NAFLD患病率^[44]。在韩国, 一个由1081例糖尿病或胰岛素抵抗患者组成的队列中发现, 低VD水平, 独立于内脏性肥胖, 是NAFLD的危险因素^[45]。与此同时, Targher等^[46]也在60例非酒精性脂肪肝以及60例健康人的对照研究中, 发现NAFLD患者的VD显著低于正常人。

2.4 VD与肝硬化 肝纤维化是细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的过量沉积, 是一种创伤修复反应。此修复过程涉及肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSCs)的TGF- β 1/SMAD活化, 使得ECM过量沉积并破坏肝功能。VD缺乏可能会加重肝纤维化。一项VD缺乏与HIV/HCV双重感染患者的肝病严重程度相关的研究中, 174例双重感染患者中, 伴有严重肝纤维化者维生素缺乏率更高, 达92.6%^[47]。VD水平亦与非酒精性脂肪肝引起肝纤维化的几率呈负相关^[48]。有学者认为VD-VDR轴通过SMAD路径诱导表观遗传学变异, 在抗肝纤维化中起重要作用^[49]。更有研究认为1,25-(OH) $_2$ -D $_3$ 新陈代谢的普遍变异可以适度增加肝脏弹性, 抑制肝纤维化的发生^[50]。这也提示VDR配体也许能作为抗肝纤维化的潜在治疗要去^[51]。但在评价VDR配体作用的临床试验开展之前, 更深层面的基础研究尚待完善, 特别是围绕着VDR配体对于肝星状细胞作用的研究。

2.5 VD与肝癌 肝癌的发生机制, 目前认为是肝炎病毒在肝细胞内和人体的染色体整合, 使肝细胞易于受到刺激而发生转化。另外一些原癌基因如*N-ras*基因被激活、抑癌基因如*p53*发生突变, 均可以启动癌变, 促进癌症的发生。VD为肝癌的治疗带了新的希望。肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)对于化、放疗皆不敏感, 在细胞培养和动物实验中, 1,25-(OH) $_2$ -D $_3$ 显示出了抗癌活性, 但不足之处是其会引起高钙血症, 而其类似物MART-10[一种VD的类似物,

即19-Nor-2 α -(3-hydroxypropyl)-1 α ,25-dihydroxyvitamin D $_3$]在体外抗增殖活性比1,25-(OH) $_2$ -D $_3$ 强100倍, 并且注入动物体内不会引起高钙血症, 其很可能成为治疗HCC的潜在药物^[52]。

3 结论

迄今为止, VD的在肝病中的作用还在不断更新。VD参与调控了免疫反应、病毒复制、肝纤维化发生、脂质代谢、肝癌发生等多个方面, 目前研究仍只是冰山一角。相信随着对VD研究的深入, 其可能会为我们治疗肝病、延缓其病情进展带来新思路、新视角。

4 参考文献

- 1 Arteh J, Narra S, Nair S. Prevalence of vitamin D deficiency in chronic liver disease. *Dig Dis Sci* 2010; 55: 2624-2628 [PMID: 19960254 DOI: 10.1007/s10620-009-1069-9]
- 2 吕呈, 张翀, 窦晓光. 慢性病毒性肝病患者维生素D水平的检测与分析. 第八届全国肝脏疾病临床学术大会暨第四届中国-印度尼西亚肝病峰会, 2012: 120-123
- 3 Villar LM, Del Campo JA, Ranchal I, Lampe E, Romero-Gomez M. Association between vitamin D and hepatitis C virus infection: a meta-analysis. *World J Gastroenterol* 2013; 19: 5917-5924 [PMID: 24124339 DOI: 10.3748/wjg.v19.i35.5917]
- 4 Avihingsanon A, Apornpong T, Ramautarsing RA, Ubolyam S, Tangkijvanich P, Ananworanich J, Lange JM, Matthews G, Lewin SR, Ruxrungtham K; HIV-NAT 105 study team. Decline in serum 25 hydroxyvitamin D levels in HIV-HBV-coinfected patients after long-term antiretroviral therapy. *Antivir Ther* 2013 Aug 23. [Epub ahead of print] [PMID: 23970149 DOI: 10.3851/IMP2673]
- 5 Efe C, Purnak T, Ozaslan E. Vitamin D levels in patients with chronic hepatitis B. *Hepatology* 2013 Dec 6. [Epub ahead of print] [PMID: 24310781 DOI: 10.1002/hep.26962.]
- 6 魏兆勇, 武凤云. 慢性肝病患者血清维生素D检测及其意义. *肝脏* 2012; (10): 753-754
- 7 Grant WB, Garland CF. The vitamin D revolution. *Mol Nutr Food Res* 2010; 54: 1053 [PMID: 20698010 DOI: 10.1002/mnfr.201090030]
- 8 Sigmundsdottir H. From the bench to the clinic: New aspects on immunoregulation by vitamin D analogs. *Dermatoendocrinol* 2011; 3: 187-192 [PMID: 22110778 DOI: 10.4161/derm.3.3.15115]
- 9 Di Rosa M, Malaguarnera M, Nicoletti F, Malaguarnera L. Vitamin D $_3$: a helpful immunomodulator. *Immunology* 2011; 134: 123-139 [PMID: 21896008 DOI: 10.1111/j.1365-2567.2011.03482.x]
- 10 Han YP, Kong M, Zheng S, Ren Y, Zhu L, Shi H, Duan Z. Vitamin D in liver diseases: from mechanisms to clinical trials. *J Gastroenterol Hepatol* 2013; 28 Suppl 1: 49-55 [PMID: 23855296 DOI: 10.1111/jgh.12016]
- 11 陈兆聪. 维生素D再认识. *医药导报* 2011; (5): 555-560
- 12 朱慧花, 赵琳. 维生素D与免疫功能的研究. *医学综述* 2013; (5): 820-822
- 13 辛星, 万献尧, 毕丽岩. 维生素D $_3$ 及其受体的临床意

- 义. 医学与哲学(临床决策论坛版) 2010; (4): 44-45
- 14 Ginde AA, Sutherland ER. Vitamin D in asthma: panacea or true promise? *J Allergy Clin Immunol* 2010; 126: 59-60 [PMID: 20620566 DOI: 10.1016/j.jaci.2010.05.030]
 - 15 Hayes CE, Nashold FE, Spach KM, Pedersen LB. The immunological functions of the vitamin D endocrine system. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2003; 49: 277-300 [PMID: 12887108]
 - 16 Linker-Israeli M, Elstner E, Klinenberg JR, Wallace DJ, Koeffler HP. Vitamin D(3) and its synthetic analogs inhibit the spontaneous in vitro immunoglobulin production by SLE-derived PBMC. *Clin Immunol* 2001; 99: 82-93 [PMID: 11286544]
 - 17 Mehta S, Mugusi FM, Bosch RJ, Aboud S, Urassa W, Villamor E, Fawzi WW. Vitamin D status and TB treatment outcomes in adult patients in Tanzania: a cohort study. *BMJ Open* 2013; 3: e003703 [PMID: 24247327 DOI: 10.1136/bmjopen-2013-003703]
 - 18 Gayoso CM, Mateos J, Méndez JA, Fernández-Puente P, Rumbo C, Tomás M, Martínez de Ilarduya O, Bou G. Molecular Mechanisms Involved in the Response to Desiccation Stress and Persistence in *Acinetobacter baumannii*. *J Proteome Res* 2014; 13: 460-476 [PMID: 24299215]
 - 19 Conesa-Botella A, Florence E, Lynen L, Colebunders R, Menten J, Moreno-Reyes R. Decrease of vitamin D concentration in patients with HIV infection on a non nucleoside reverse transcriptase inhibitor-containing regimen. *AIDS Res Ther* 2010; 7: 40 [PMID: 21092280 DOI: 10.1186/1742-6405-7-40]
 - 20 周建烈, 陈伟俊, 吴光驰. 维生素D补充的研究进展. *中华儿科杂志* 2009; 47: 714-715
 - 21 Stolzenberg-Solomon RZ, Hayes RB, Horst RL, Anderson KE, Hollis BW, Silverman DT. Serum vitamin D and risk of pancreatic cancer in the prostate, lung, colorectal, and ovarian screening trial. *Cancer Res* 2009; 69: 1439-1447 [PMID: 19208842 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-2694]
 - 22 Firmin N, Lamy PJ, Romieu G, Jacot W. Vitamin D and breast cancer: physiopathology, biological and clinical implications. *Bull Cancer* 2013 Oct 8. [Epub ahead of print] [PMID: 24103818]
 - 23 Der T, Bailey BA, Youssef D, Manning T, Grant WB, Peiris AN. Vitamin D and prostate cancer survival in veterans. *Mil Med* 2014; 179: 81-84 [PMID: 24402990 DOI: 10.7205/MILMED-D-12-00540]
 - 24 Redaniel MT, Gardner MP, Martin RM, Jeffreys M. The association of vitamin D supplementation with the risk of cancer in postmenopausal women. *Cancer Causes Control* 2014; 25: 267-271 [PMID: 24337883]
 - 25 Bernstein CN. Should Patients With Inflammatory Bowel Disease Take Vitamin D to Prevent Cancer? *Clin Gastroenterol Hepatol* 2013 Nov 12. [Epub ahead of print] [PMID: 24239859 DOI: 10.1016/j.cgh.2013.11.004]
 - 26 Lappe JM, Travers-Gustafson D, Davies KM, Recker RR, Heaney RP. Vitamin D and calcium supplementation reduces cancer risk: results of a randomized trial. *Am J Clin Nutr* 2007; 85: 1586-1591 [PMID: 17556697]
 - 27 Huncharek M, Muscat J, Kupelnick B. Colorectal cancer risk and dietary intake of calcium, vitamin D, and dairy products: a meta-analysis of 26,335 cases from 60 observational studies. *Nutr Cancer* 2009; 61: 47-69 [PMID: 19116875 DOI: 10.1080/01635580802395733]
 - 28 Chiang KC, Yeh CN, Chen MF, Chen TC. Hepatocellular carcinoma and vitamin D: a review. *J Gastroenterol Hepatol* 2011; 26: 1597-1603 [PMID: 21880026 DOI: 10.1111/j.1440-1746.2011.06892.x]
 - 29 林美芳, 何银珠. 乙肝的危害性、传播途径及相应的干预措施. *中国社区医师(医学专业)* 2010; 12: 57
 - 30 姜秀翠, 谢红. 关于乙型肝炎病毒的危害及其疫苗接种的几个问题的探讨. *中外健康文摘* 2012; 9: 101-102
 - 31 Farnik H, Bojunga J, Berger A, Allwinn R, Waidmann O, Kronenberger B, Keppler OT, Zeuzem S, Sarrazin C, Lange CM. Low vitamin D serum concentration is associated with high levels of hepatitis B virus replication in chronically infected patients. *Hepatology* 2013; 58: 1270-1276 [PMID: 23703797 DOI: 10.1002/hep.26488]
 - 32 陈肇杰, 詹杭锋, 洗汉福. 慢性乙肝青少年患者血清维生素D的相关性研究. *中国卫生产业* 2012; (36): 9-10
 - 33 Mahamid M, Nseir W, Abu Elhija O, Shteingart S, Mahamid A, Smamra M, Koslowsky B. Normal vitamin D levels are associated with spontaneous hepatitis B surface antigen seroclearance. *World J Hepatol* 2013; 5: 328-331 [PMID: 23805357 DOI: 10.4254/wjh.v5.i6.328]
 - 34 Zitt E, Sprenger-Mähr H, Knoll F, Neyer U, Lhotta K. Vitamin D deficiency is associated with poor response to active hepatitis B immunisation in patients with chronic kidney disease. *Vaccine* 2012; 30: 931-935 [PMID: 22142584 DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.11.086]
 - 35 Ren Y, Zheng SJ, Duan ZP. [The progress of hepatitis C chronic infection in the immune mechanism]. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2013; 21: 151-153 [PMID: 24000467 DOI: 10.3760/cma.j.issn.1007-3418.2013.02.020]
 - 36 Lapiński TW, Flisiak R. [Predictive factors of virological response in chronically HCV infected]. *Pol Merkur Lekarski* 2012; 33: 159-162 [PMID: 23157135]
 - 37 Petta S, Cammà C, Scazzone C, Tripodo C, Di Marco V, Bono A, Cabibi D, Licata G, Porcasi R, Marchesini G, Craxi A. Low vitamin D serum level is related to severe fibrosis and low responsiveness to interferon-based therapy in genotype 1 chronic hepatitis C. *Hepatology* 2010; 51: 1158-1167 [PMID: 20162613 DOI: 10.1002/hep.23489]
 - 38 Amanzada A, Goralczyk AD, Moriconi F, van Thiel DH, Ramadori G, Mihm S. Vitamin D status and serum ferritin concentration in chronic hepatitis C virus type 1 infection. *J Med Virol* 2013; 85: 1534-1541 [PMID: 23852677 DOI: 10.1002/jmv.23632]
 - 39 Gal-Tanamy M, Bachmetov L, Ravid A, Koren R, Erman A, Tur-Kaspa R, Zemel R. Vitamin D: an innate antiviral agent suppressing hepatitis C virus in human hepatocytes. *Hepatology* 2011; 54: 1570-1579 [PMID: 21793032 DOI: 10.1002/hep.24575]
 - 40 Kondo Y, Kato T, Kimura O, Iwata T, Ninomiya M, Kakazu E, Miura M, Akahane T, Miyazaki Y, Kobayashi T, Ishii M, Kisara N, Sasaki K, Nakayama H, Igarashi T, Obara N, Ueno Y, Morosawa T, Shimosegawa T. 1(OH) vitamin D3 supplementation improves the sensitivity of the immune-response during Peg-IFN/RBV therapy in chronic hepatitis C patients-case controlled trial. *PLoS One* 2013; 8: e63672 [PMID: 23717463 DOI: 10.1371/journal.pone.0063672.]
 - 41 Bitetto D, Fattovich G, Fabris C, Ceriani E, Falletti E, Fornasiere E, Pasino M, Ieluzzi D, Cussigh A,

同行评价

维生素D功能研究是目前研究的热点之一,已有临床报道证实慢性肝病患者体内普遍存在维生素D浓度异常.此文呼吁及引起临床医生对维生素D的重视,也具有一定的实际启发意义.

- Cmet S, Pirisi M, Toniutto P. Complementary role of vitamin D deficiency and the interleukin-28B rs12979860 C/T polymorphism in predicting antiviral response in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2011; 53: 1118-1126 [PMID: 21480318 DOI: 10.1002/hep.24201]
- 42 Yin Y, Yu Z, Xia M, Luo X, Lu X, Ling W. Vitamin D attenuates high fat diet-induced hepatic steatosis in rats by modulating lipid metabolism. *Eur J Clin Invest* 2012; 42: 1189-1196 [PMID: 22958216 DOI: 10.1111/j.1365-2362.2012.02706.x.]
- 43 Roth CL, Elfers CT, Figlewicz DP, Melhorn SJ, Morton GJ, Hoofnagle A, Yeh MM, Nelson JE, Kowdley KV. Vitamin D deficiency in obese rats exacerbates nonalcoholic fatty liver disease and increases hepatic resistin and Toll-like receptor activation. *Hepatology* 2012; 55: 1103-1111 [PMID: 21994008 DOI: 10.1002/hep.24737]
- 44 Kasapoglu B, Turkay C, Yalcin KS, Carlioglu A, Sozen M, Koktener A. Low vitamin D levels are associated with increased risk for fatty liver disease among non-obese adults. *Clin Med* 2013; 13: 576-579 [PMID: 24298105 DOI: 10.7861/clinmedicine.13-6-576]
- 45 Seo JA, Eun CR, Cho H, Lee SK, Yoo HJ, Kim SG, Choi KM, Baik SH, Choi DS, Yim HJ, Shin C, Kim NH. Low vitamin D status is associated with nonalcoholic Fatty liver disease independent of visceral obesity in Korean adults. *PLoS One* 2013; 8: e75197 [PMID: 24130687 DOI: 10.1371/journal.pone.0075197]
- 46 Targher G, Bertolini L, Scala L, Cigolini M, Zenari L, Falezza G, Arcaro G. Associations between serum 25-hydroxyvitamin D3 concentrations and liver histology in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2007; 17: 517-524 [PMID: 16928437]
- 47 Guzmán-Fulgencio M, García-Álvarez M, Berenguer J, Jiménez-Sousa MÁ, Cosín J, Pineda-Tenor D, Carrero A, Aldámiz T, Alvarez E, López JC, Resino S. Vitamin D deficiency is associated with severity of liver disease in HIV/HCV coinfecting patients. *J Infect* 2014; 68: 176-184 [PMID: 24184809 DOI: 10.1016/j.jinf.2013.10.011.]
- 48 Nobili V, Giorgio V, Liccardo D, Bedogni G, Morino G, Alisi A, Cianfarani S. Vitamin D levels and liver histological alterations in children with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Eur J Endocrinol* 2014 Jan 10. [Epub ahead of print] [PMID: 24412930]
- 49 Firrincieli D, Braescu T, Housset C, Chignard N. Illuminating liver fibrosis with vitamin D. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2014; 38: 5-8 [PMID: 24238723 DOI: 10.1016/j.clinre.2013.10.004]
- 50 Grünhage F, Hochrath K, Krawczyk M, Höblinger A, Obermayer-Pietsch B, Geisel J, Trauner M, Sauerbruch T, Lammert F. Common genetic variation in vitamin D metabolism is associated with liver stiffness. *Hepatology* 2012; 56: 1883-1891 [PMID: 22576297 DOI: 10.1002/hep.25830]
- 51 Ding N, Liddle C, Evans RM, Downes M. Hepatic actions of vitamin D receptor ligands: a sunshine option for chronic liver disease? *Expert Rev Clin Pharmacol* 2013; 6: 597-599 [PMID: 24164608 DOI: 10.1586/17512433.2013.841078]
- 52 Chiang KC, Yeh CN, Chen HY, Lee JM, Juang HH, Chen MF, Takano M, Kittaka A, Chen TC. 19-Nor-2 α -(3-hydroxypropyl)-1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 (MART-10) is a potent cell growth regulator with enhanced chemotherapeutic potency in liver cancer cells. *Steroids* 2011; 76: 1513-1519 [PMID: 21888924 DOI: 10.1016/j.steroids.2011.08.006]

编辑 田滢 电编 鲁亚静



肿瘤微环境在肝细胞癌中的作用

李晓鹏, 崔东来

李晓鹏, 崔东来, 河北医科大学第二医院消化内科 河北省石家庄市 050000

李晓鹏, 河北医科大学在读硕士, 主要从事消化系统肿瘤的基础与临床研究。

作者贡献分布: 本文综述由李晓鹏完成; 崔东来审校。

通讯作者: 崔东来, 教授, 主任医师, 050000, 河北省石家庄市和平西路215号, 河北医科大学第二医院消化内科。

liver369@126.com

电话: 0311-66002958

收稿日期: 2013-12-29 修回日期: 2014-01-22

接受日期: 2014-02-03 在线出版日期: 2014-03-28

Role of tumor microenvironment in hepatocellular carcinoma

Xiao-Peng Li, Dong-Lai Cui

Xiao-Peng Li, Dong-Lai Cui, Department of Gastroenterology, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China

Correspondence to: Dong-Lai Cui, Professor, Chief Physician, Department of Gastroenterology, the Second Hospital of Hebei Medical University, 215 Heping West Road, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China. liver369@126.com

Received: 2013-12-29 Revised: 2014-01-22

Accepted: 2014-02-03 Published online: 2014-03-28

Abstract

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the most common primary liver cancer and the third leading cause of cancer death worldwide, with an incidence increasing every year. HCC pathogenesis is very complex. Its occurrence, development and metastasis are closely related to multiple mutations, cell signaling pathways and abnormal angiogenesis. The main reason for the high mortality rate of liver cancer is the difficulties in early diagnosis, and most patients have had local or distant metastasis when diagnosed. Moreover, there is a lack of effective treatment, because the pathogenesis of HCC is not yet fully clear. In recent years, a large number of studies have found that stromal tumor microenvironment plays an important role in the occurrence, development and metastasis of HCC. Tumor microenvironment and tumor cells create a complex system with interacting signaling pathways. In this review, we will discuss the role of tumor microen-

vironment in HCC in terms of HCC stromal cell microenvironment, inflammatory microenvironment and angiogenesis microenvironment.

© 2014 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

Key Words: Hepatocellular carcinoma; Tumor microenvironment

Li XP, Cui DL. Role of tumor microenvironment in hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(9): 1219-1225 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/1219.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i9.1219>

摘要

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是最常见的原发性肝脏肿瘤, 并且是全世界癌症死亡的第3大原因, 其发病率还在逐年增加。肝癌的发病机制复杂, 其发生、发展和转移与多种基因突变、细胞信号传导通路和新生血管增生异常密切相关。其死亡率居高不下的主要原因是临床早期诊断困难, 确诊时大多数已达到局部晚期或发生远处转移, 且缺乏有效的治疗方法。近年来, 大量的研究发现基质肿瘤微环境在肝癌的发生、发展中发挥着重要作用, 其与肿瘤细胞共同创造了一个具有互相作用信号通路的复杂的系统。在这篇综述中, 从肿瘤微环境的概念、肝癌基质细胞微环境、炎症微环境、血管生成微环境等几个方面进行研究。

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词: 肝细胞癌; 微环境

核心提示: 肿瘤微环境(tumor microenvironment)包括基质细胞微环境、炎症微环境、血管生成微环境及细胞外基质等, 通过微环境中各种细胞、趋化因子、信号通路的作用在肝细胞癌(hepatocellular carcinoma)的增殖、侵袭和转移中起关键性作用。

李晓鹏, 崔东来. 肿瘤微环境在肝细胞癌中的作用. *世界华人消化杂志* 2014; 22(9): 1219-1225 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/1219.asp>

■背景资料

原发性肝癌是我国常见恶性肿瘤之一, 包括肝细胞癌和胆管细胞癌, 肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)(简称肝癌)在原发性肝癌中占90%以上, 我国为肝癌高发区, 大多数患者确诊时已为局部晚期或远处转移。肿瘤微环境在肝癌发生发展和转移过程中起着至关重要的作用。

■同行评议者

代智, 副研究员, 复旦大学附属中山医院肝癌研究所

■ 研发前沿

以往总是针对肿瘤细胞本身的特性进行研究,而忽略肿瘤微环境在肝细胞癌的发生发展和转移中发挥的重要作用,基质细胞微环境、炎症微环境、血管生成微环境等构成复杂的系统促进肿瘤增殖、侵袭和转移。

wjgnet.com/1009-3079/22/1219.asp DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v22.i9.1219>

0 引言

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是一种恶性程度极高的消化系统恶性肿瘤,是全世界癌症死亡的第3大原因^[1]。在全球范围内每年有超过750000例新发确诊病例,尽管近年来通过各种方法对肝癌尽早诊断和治疗,但由于他的高复发和转移率,使其仍然是一个极具杀伤力的疾病^[2]。肝癌是我国癌症中的第2号杀手,全球50%以上的肝癌发生在我国,并且发病率仍呈上升趋势。乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)、丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)感染、酒精和黄曲霉素均是导致HCC的危险因素,另外,对有慢性乙型肝炎和丙型肝炎病毒感染的患者,肝氧化应激可增加其发展为肝癌的风险^[3]。HCC有高致死率,特别是肝硬化基础上发展为肝癌的患者容易发生早期肝内外转移,预后较差。因此,对于肝癌的研究是一个重要课题。

长期以来的研究多注重肿瘤细胞本身的特征和作用机制,而忽略了肿瘤微环境的作用,肿瘤微环境是一个不断变化的概念,癌症的定义不仅只是由肿瘤细胞基因决定的,还决定于肿瘤细胞需要存活、生长、增殖和转移的周边环境^[4]。近年来,大量的注意力集中于对肿瘤微环境的研究,是为了更好的描述和预测癌症表型的特点^[5]。此外,了解肿瘤细胞不同成分与微环境之间的相互作用,可能有助于发现新的分子治疗靶点。

1 肿瘤微环境的概念

肿瘤微环境是肿瘤发生发展和转移过程中所处的内环境,他是由肿瘤细胞、间质细胞和细胞外基质(extracellular matrix, ECM)共同组成的一个复杂的混合体。微环境的基质细胞组成可以分为3个部分:血管生成细胞、免疫细胞和肿瘤相关的成纤维细胞。尤其是基质纤维母细胞,在微环境中的改变,可能会影响相邻上皮细胞肿瘤的发生和促进其进展^[6]。肿瘤微环境中的免疫细胞功能下调,促进了新生血管形成、肿瘤进展和转移。这些基质细胞和其周围由细胞外基质蛋白、生长因子、细胞趋化因子及一些基质降解酶类组成的肿瘤基质共同包绕着肿瘤,构成了肿瘤的整体^[7]。

2 肝癌基质细胞微环境

在肿瘤进展过程中,恶性肝细胞和活化的肝星状细胞,连同肿瘤相关成纤维细胞、肌成纤维细胞和免疫细胞一起通常称为肿瘤基质细胞。这种新的动态的环境通过肿瘤基质细胞分泌的可溶性介质进一步增强了肿瘤细胞的反应,进而直接影响了肝细胞的恶变^[8]。肝癌微环境中存在大量的基质细胞。目前,越来越多的证据证明基质细胞对肿瘤特征的重要作用,包括持续增殖信号、逃避生长抑制、抵抗细胞死亡、启动永久复制、引起血管生成、活化侵袭和转移、重编程能量代谢和逃避免疫破坏等^[9]。

2.1 肿瘤相关成纤维细胞 肿瘤相关成纤维细胞(cancer-associated fibroblasts, CAFs)是肿瘤微环境中的中心成分,他们是许多癌症中肿瘤间质内突出的细胞类型,并且在肿瘤间质互相作用中发挥关键的作用^[10]。CAF参与肝癌的生长和侵袭,因为他们能产生表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)、肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)、细胞因子、趋化因子和金属蛋白酶(metalloproteinase, MMP)(如MMP-3、MMP-9)^[11]。CAF还可以分泌白介素-8(interleukin-8, IL-8)、环氧化酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)和富含半胱氨酸的酸性蛋白,聚集和刺激巨噬细胞的产生,这些可以通过分泌肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)和血小板源性生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)来增加CAF的活性^[12]。癌细胞和CAF的入侵共培养实验显示,肿瘤进展中走在前面的细胞总是CAF,而癌细胞会在CAF之后移入ECM^[13]。因此,肝癌细胞的生长和转移扩散取决于CAF的存在和其与肝癌细胞互相作用^[14]。

2.2 肝星状细胞 肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSCs)是窦周细胞,这些细胞的激活在肝脏中是负责胶原蛋白合成的。对于肝脏反复损伤的反应是HSCs被激活,然后他们转分化为肌成纤维细胞样细胞,这种表型的转化被认为是肝纤维化发生的一个中心环节^[15]。在这一过程中活化的HSCs负责产生细胞因子、趋化因子、生长因子和广泛的ECM^[16]。收集于HSCs的条件培养基在培养中诱导肝癌细胞增殖和转移,而且通过核转录因子- κ B(nuclear factor kappa B, NF- κ B)的激活和细胞外调节激酶(extracellular

regulated kinase, ERK)途径, HSCs可促进肝癌生长和减少中心坏死的程度^[17]. Xia等^[18]阐明了在大鼠细胞培养中肝癌细胞是如何促进HSC活化的. 因此, HSCs和肝癌细胞共培养会刺激HSC的增殖、迁移和促血管生成基因的表达, 随后, I型、IV型胶原和层粘连蛋白沉积, 内皮细胞聚集, 新生血管形成和组织修复, HSC的激活和基底膜的聚集可能是细胞增殖和再生的一个重要步骤. 乙型肝炎病毒X蛋白、丙型肝炎病毒的非结构蛋白、MMP-9、PDGF、转化生长因子- β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)、JNK、胰岛素样生长因子结合蛋白5、组织蛋白B和D是HSCs活化、增殖的强诱导剂, 从而增强肝纤维化和癌变^[19].

另外, HSCs的免疫抑制特性也有助于肝癌的发生和发展. 具有免疫抑制活性的细胞如骨髓源抑制细胞(myeloid-derived suppressor cells, MDSCs)和调节性T细胞的大量积累是肿瘤免疫逃逸的关键机制. 活化的HSCs促进肝癌生长不仅是因为可以诱导肿瘤血管和淋巴管生成, 而且还可以显著增加对调节性T细胞和MDSCs这些免疫性细胞群在脾脏、骨髓和肿瘤组织中的抑制作用^[20].

3 肝癌炎症微环境

肝脏的慢性炎症状态, 肝炎病毒感染的持续状态和细胞因子及生长因子的产生, 导致一个复杂的微环境, 肝癌经常发生于肝脏有动态炎症反应的环境中, 这种环境易于肿瘤的发生. 炎症是肝脏损伤修复反应中必要的环节, 持续的慢性炎症产生一种不适当的修复反应, 刺激肝细胞死亡和再生, 这与异常结节和癌症的发生密切相关.

3.1 肿瘤相关巨噬细胞 在肝癌的免疫细胞中, 肿瘤相关巨噬细胞(tumor-associated macrophages, TAMs)在肿瘤细胞与间质细胞之间的相互作用中占主导地位, TAMs起源于循环的单核细胞, 通过肿瘤源性信号, 包括趋化因子配体2(chemokine ligand, CCL2)和巨噬细胞集落刺激因子(macrophage colony-stimulating factor, MCSF), 聚集到肿瘤微环境中, 并分化为成熟的巨噬细胞. 肿瘤相关巨噬细胞(tumor-associated macrophages, TAMs)是形成白细胞在肿瘤不同级别中浸润模型的基础, 他们存在于肿瘤基质中, 并能开始广泛的极化激活, TAMs表型的激活可以是经典激活形式即M1型, 也可以是选择性激活形

式即M2型. 肿瘤微环境中IL-4、IL-10、TGF- β 通过M2型巨噬细胞促进肿瘤相关巨噬细胞极化^[21]. M2型巨噬细胞支持组织的修复和重塑, 并可以通过产生血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)或EGF促进血管生成^[22]. 另外, 还发现枯否细胞是肝特异性的TAMs, 他可以通过与CD8⁺ T细胞的程序性死亡受体1(programmed death receptor, PDR-1)和枯否细胞-TAMs产生的程序性死亡配体1(programmed death ligand, PDL-1)相互作用, 引起CD8⁺ T细胞毒性功能下降, 减弱免疫依赖应答^[23], 此外, 阻断PDL-1和PDR-1之间的互相作用可以恢复CD8⁺ T细胞的功能. 另外, 枯否细胞以及星状细胞, 当被炎症性细胞因子刺激后会产生大量的骨桥蛋白, 这些骨桥蛋白在不同细胞信号转导途径中起着举足轻重的作用, 并促进了炎症反应及肿瘤的进展和转移^[24].

3.2 淋巴细胞 淋巴细胞可见于人类各种肿瘤中. 肝细胞癌中有丰富的免疫细胞, 肿瘤浸润性淋巴细胞在实体肿瘤和宿主抗肿瘤反应中都是主要的免疫成分^[25]. 在某些情况下, 这些浸润的淋巴细胞与良好的预后相关. 但是, 并非所有的T细胞都是抗肿瘤免疫效应细胞. CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺的T细胞亚群被称为Tregs细胞(调节性T细胞), 一种功能独特的T细胞, 可以有效地抑制抗肿瘤免疫应答^[26]. 他们通过抑制抗肿瘤免疫反应, 在促进肿瘤的生长和进展中起关键作用^[27]. 调节性T细胞在不同位置表现出不同的功能状态. 关于肝癌, 已经证实, 肝癌组织与邻近组织相比, Tregs细胞比CD8⁺ T细胞表达占主导地位, Tregs细胞还可以破坏CD8⁺ T细胞的增殖、活化和脱颗粒, 抑制颗粒酶和穿孔素的产生^[28]. 此外, 肿瘤内低CD8⁺ T细胞和高Tregs细胞与肝癌的不良预后相关. Lin等^[29]用流式细胞仪、定量PCR和趋化性试验分析了瘤内调节性T细胞的活性、功能和趋化性. 发现肿瘤内Foxp3⁺Tregs细胞所占比例与患者预后成负相关. Shen等^[30]最近的一项研究证明, 调节性T细胞的水平和功能与肝癌患者的TNM分级相关, SDF-1可能有趋化Tregs细胞到肿瘤部位的作用. Chen等^[31]通过动物实验证明, 应用次级淋巴组织趋化因子(Secondary lymphoid tissue chemokine, SLC)和抗CD25单克隆抗体瘤内联合用药是治疗肝癌的有效方法, 其机制是改变了肿瘤微环境, 使Tregs细胞、CD8⁺ T细胞和CD4⁺ T细胞在外周免疫器官得到了系统性优化的分配. 通过特定区

■ 相关报道

随着对肿瘤微环境的深入研究, 其中很多趋化因子/趋化因子受体的作用得到了证实, 并有研究证明一些可以调控这些因子的药物如索拉菲尼, 在晚期肝癌的治疗中起重要作用.

■创新盘点

本文主要介绍了肿瘤微环境的概念、肝癌基质细胞微环境、炎症微环境、血管生成微环境等几个方面,特别重点阐述了这些方面促进肝肿瘤细胞增殖、侵袭、转移的作用,为恶性肿瘤的治疗以及预后评估提供新的思路,对临床及实验工作都有一定的参考价值。

域Tregs的消除或抑制,可能会改善肝癌的免疫治疗效果^[32]。

3.3 Th17细胞 Th17细胞是产生IL-17的CD4⁺淋巴细胞,近来发现,他们在某些肿瘤中表达增高^[33]。但是, Th17细胞与肿瘤免疫病理学之间的关系还存在争议。在肝癌中,发现Th17细胞存在于大量肿瘤中,与低生存率和高术后复发率相关,这表明Th17细胞和IL-17在肝癌患者中可能会促进肿瘤进展^[34]。还有研究表明,肝内IL-17⁺ T细胞和Foxp3⁺的调节性T细胞可能联合作用,共同促进肝癌的进展^[35]。Th17细胞在肝细胞癌中是构成炎症/免疫性细胞的关键部分, IL-17和IL-17受体的高表达能很好地预测肝癌患者的不良预后。活化的肝星状细胞可诱导IL-17体外扩增,在肿瘤的进展过程中各种炎症/免疫细胞和细胞因子之间存在着复杂的内在联系^[36]。

4 细胞外基质的作用

细胞外基质对肝脏结构的支撑和对外环境的持续作用十分重要,能使信号转导和改变基因表达。在疾病中,细胞外基质重塑酶的活性失去控制,导致微环境纤维化,表现为硬度增加和大量的生长因子产生,从而促进肿瘤的生成^[37]。胶原交联的失控和细胞外基质硬化通过加强整合蛋白信号在癌症发病机制中扮演重要角色^[38],这种情况导致过量的I型纤维胶原、II型纤维胶原和纤连蛋白在肝脏中沉积。另外,通过整合素家族的调节,肿瘤细胞大量的生长和增殖。整合素 $\alpha 1\beta 1$ 和整合素 $\alpha 2\beta 1$ 也参与癌细胞的进展和侵袭^[39],因为通过一些生长因子诱导使他们受抑制后会减少肝癌细胞转移。

细胞外基质内环境的失调会直接影响上皮细胞,导致细胞转化和转移。肿瘤生长需要先前存在屏障的破裂和肝组织的重塑,这一过程主要受MMPs和基质金属蛋白酶组织抑制剂(tissue inhibitors of metalloproteinases, TIMPs)的调节, MMPs的过量表达能侵蚀基底膜屏障,促进癌细胞对组织的侵袭。肝癌与高蛋白酶水解活性和高MMP-2水平有关。另外, MMP2和TIMP2水平之间的失衡与肿瘤转移有关,造成不良的预后^[40]。有研究表明反式肝动脉化疗栓塞术后,较高的血清MMP-2水平和MMP-2/TIMP-2比值可以预测不良预后,这提示这些生物标志物在肝癌预后中的重要作用^[41]。并且,大量的临床和实验证据表明高浓度的MMP-9与肿瘤进展、转移和缩短病人生存时间关系密切^[42]。

细胞外基质在肿瘤血管生成中也有重要作用,要建立新的血管分支,基底膜必须被MMPs侵蚀掉,细胞外基质还参与血管内腔构造、血管生成和基底膜沉积物的形成。肿瘤新生血管比正常血管孔径多,渗透性大^[43],有利于免疫细胞浸润、转移和促进肿瘤进展。细胞外基质还可以通过损害T辅助细胞的正常成熟而影响免疫细胞和T细胞的活化,免疫细胞的分化^[44]。由于基质金属蛋白酶导致的细胞外基质降解与肿瘤细胞侵袭、转移关系密切,并且已经表明,通过合成的和天然的抑制剂抑制可能是肝癌治疗中非常重要的方法^[45]。

5 血管微环境

血管生成从肝癌发生的早期阶段即发挥重要的作用^[46],肝癌是一种高血供肿瘤,病态的血管生成是慢性肝病形成的重要贡献者之一,对于慢性肝损伤,肝脏的损伤修复反应会导致纤维化的发生,这一过程需要基质细胞分泌一些促血管生成因子,尤其是MMP、PDGF、TGF- $\alpha 1$ 、纤维母细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)和VEGF。此外,在纤维化发生的过程中,细胞外基质和组织结构的改变会增加血流阻力,从而减少氧气的交换代谢,造成低氧。

VEGF是非常重要的促血管生成因子,他的表达在退变结节中已经发生,并且在肝细胞癌的发展过程中逐渐增加。肿瘤一旦形成,癌细胞的存活就需要一种新的血管网的形成来为他提供营养和氧气。在肝癌中,血管生成过程是非常复杂的,并且被严密调控,使来自肿瘤和宿主细胞的多种血管生成因子和抗血管生成因子的达到平衡。肿瘤快速的生长会造成营养和氧气的缺乏,这种营养和氧气缺乏的环境会刺激内皮细胞(endothelial cells, ECs)的活化和增殖^[47],会在先前存在的血管基础上生成新的血管,内皮细胞的增殖和他所释放酶类会破坏基底膜,最后游走到最终的区域,在这里他们和细胞外基质一起形成一新的血管^[48]。

VEGF的表达与肝癌的侵袭有关,其发挥作用需要他的受体,也就是血管内皮生长因子受体1(vascular endothelial growth factor receptor 1, VEGFR1)和VEGFR2去激活一些内皮细胞中的增殖、转移和侵袭的信号通路^[49]。此外, VEGF还具有细胞因子样功能直接作用于肝星状细胞、Kupffer细胞和肝细胞^[50],进而调节血管基底膜和间隙基质的溶解。在晚期肝癌患者,

VEGF和血管生成素2的血浆浓度水平被认为是独立的预后标志物^[51]。血管生成素2在肝癌中表达上调,并在内皮细胞中增强VEGF的作用,内皮细胞和星状细胞都能表达Tie-2受体,此受体能够进一步协调肝癌中血管生成的调节^[52]。

纤维母细胞生长因子是肝素结合生长因子家族中的一员,他与VEGF协同作用诱导血管生成,而血小板源性生长因子参与细胞迁移和新生血管的成熟。癌细胞分泌血小板源性生长因子,这是一种旁分泌机制,还分泌一些如内皮细胞和纤维母细胞等其他,参与癌症进展。肿瘤血管生成中的一些其他重要的调节因子如整联蛋白和钙粘蛋白,他们分别调节细胞基质和细胞与细胞之间的连接,从而为新生血管的形成创造条件。

6 结论

随着研究的深入,肝癌肿瘤微环境在肝癌形成和演进中的重要作用已经逐步被人们所认识,微环境中各种基质、细胞、细胞因子和趋化因子等之间相互作用,形成一个复杂的网络系统,通过对此系统的研究,对肝癌的发生、发展、复发及转移过程有了更加全面的了解,为肝癌的进一步研究提供了新的思路。肝癌的很多治疗是以微环境中的某一环节作为靶点,对抗肿瘤的治疗开辟了新的道路,对于提高目前常用抗肿瘤的手段和最终控制肝癌具有十分重要的战略意义。

7 参考文献

- 1 Yang JD, Nakamura I, Roberts LR. The tumor microenvironment in hepatocellular carcinoma: current status and therapeutic targets. *Semin Cancer Biol* 2011; 21: 35-43 [PMID: 20946957 DOI: 10.1016/j.semcancer.2010.10.007]
- 2 Bruix J, Boix L, Sala M, Llovet JM. Focus on hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell* 2004; 5: 215-219 [PMID: 15050913]
- 3 Porta C, Riboldi E, Sica A. Mechanisms linking pathogens-associated inflammation and cancer. *Cancer Lett* 2011; 305: 250-262 [PMID: 21093147 DOI: 10.1016/j.canlet.2010.10.012]
- 4 Mbeunkui F, Johann DJ. Cancer and the tumor microenvironment: a review of an essential relationship. *Cancer Chemother Pharmacol* 2009; 63: 571-582 [PMID: 19083000 DOI: 10.1007/s00280-008-0881-9]
- 5 Mohla S, Witz IP. The 5th international conference on tumor microenvironment: progression, therapy and prevention versailles, france, october 20-24, 2009: conference summary. *Cancer Microenviron* 2010; 3: 1-5 [PMID: 21209771 DOI: 10.1007/s12307-010-0039-2]
- 6 Trimboli AJ, Cantemir-Stone CZ, Li F, Wallace JA, Merchant A, Creasap N, Thompson JC, Caserta E, Wang H, Chong JL, Naidu S, Wei G, Sharma SM, Stephens JA, Fernandez SA, Gurcan MN, Weinstein MB, Barsky SH, Yee L, Rosol TJ, Stromberg PC, Robinson ML, Pepin F, Hallett M, Park M, Ostrowski MC, Leone G. Pten in stromal fibroblasts suppresses mammary epithelial tumours. *Nature* 2009; 461: 1084-1091 [PMID: 19847259 DOI: 10.1038/nature08486]
- 7 Egeblad M, Nakasone ES, Werb Z. Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire organism. *Dev Cell* 2010; 18: 884-901 [PMID: 20627072 DOI: 10.1016/j.devcel.2010.05.012]
- 8 Carloni V, Luong TV, Rombouts K. Hepatic stellate cells and extracellular matrix in hepatocellular carcinoma: more complicated than ever. *Liver Int* 2014 Jan 8. [Epub ahead of print] [PMID: 24397349 DOI: 10.1111/liv.12465]
- 9 Hanahan D, Coussens LM. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell* 2012; 21: 309-322 [PMID: 22439926 DOI: 10.1016/j.ccr.2012.02.022]
- 10 Pietras K, Ostman A. Hallmarks of cancer: interactions with the tumor stroma. *Exp Cell Res* 2010; 316: 1324-1331 [PMID: 20211171 DOI: 10.1016/j.yexcr.2010.02.045]
- 11 Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC, Arenzana-Seisdedos F, Delaunay T, Naeem R, Carey VJ, Richardson AL, Weinberg RA. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell* 2005; 121: 335-348 [PMID: 15882617]
- 12 Mueller L, Goumas FA, Affeldt M, Sandtner S, Gehling UM, Brilloff S, Walter J, Karnatz N, Lamszus K, Rogiers X, Broering DC. Stromal fibroblasts in colorectal liver metastases originate from resident fibroblasts and generate an inflammatory microenvironment. *Am J Pathol* 2007; 171: 1608-1618 [PMID: 17916596]
- 13 Gaggioli C, Hooper S, Hidalgo-Carcedo C, Grosse R, Marshall JF, Harrington K, Sahai E. Fibroblast-led collective invasion of carcinoma cells with differing roles for RhoGTPases in leading and following cells. *Nat Cell Biol* 2007; 9: 1392-1400 [PMID: 18037882]
- 14 Fransvea E, Mazzocca A, Antonaci S, Giannelli G. Targeting transforming growth factor (TGF)-betaRI inhibits activation of beta1 integrin and blocks vascular invasion in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2009; 49: 839-850 [PMID: 19115199 DOI: 10.1002/hep.22731]
- 15 Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol* 2008; 214: 199-210 [PMID: 18161745]
- 16 Friedman SL. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol Rev* 2008; 88: 125-172 [PMID: 18195085 DOI: 10.1152/physrev.00013.2007]
- 17 Amann T, Bataille F, Spruss T, Mühlbauer M, Gäbele E, Schölmerich J, Kiefer P, Bosserhoff AK, Hellerbrand C. Activated hepatic stellate cells promote tumorigenicity of hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci* 2009; 100: 646-653 [PMID: 19175606 DOI: 10.1111/j.1349-7006.2009.01087.x]
- 18 Xia Y, Chen R, Song Z, Ye S, Sun R, Xue Q, Zhang Z. Gene expression profiles during activation of cultured rat hepatic stellate cells by tumoral hepatocytes and fetal bovine serum. *J Cancer Res Clin*

■应用要点

肿瘤微环境是近期消化系统肿瘤及其它恶性肿瘤研究的一个热点,明确肿瘤微环境在肝细胞癌中的作用及机制后,将为肝癌的治疗及进一步研究提供新的靶点。

■同行评价

本文选题很好, 有一定的新颖性, 有一定的参考价值.

- 19 Sokolović A, Sokolović M, Boers W, Elferink RP, Bosma PJ. Insulin-like growth factor binding protein 5 enhances survival of LX2 human hepatic stellate cells. *Fibrogenesis Tissue Repair* 2010; 3: 3 [PMID: 20163708 DOI: 10.1186/1755-1536-3-3]
- 20 Zhao W, Zhang L, Xu Y, Zhang Z, Ren G, Tang K, Kuang P, Zhao B, Yin Z, Wang X. Hepatic stellate cells promote tumor progression by enhancement of immunosuppressive cells in an orthotopic liver tumor mouse model. *Lab Invest* 2014; 94: 182-191 [PMID: 24296878 DOI: 10.1038/labinvest.2013.139]
- 21 Mantovani A, Sica A, Allavena P, Garlanda C, Locati M. Tumor-associated macrophages and the related myeloid-derived suppressor cells as a paradigm of the diversity of macrophage activation. *Hum Immunol* 2009; 70: 325-330 [PMID: 19236898 DOI: 10.1016/j.humimm.2009.02.008]
- 22 Biswas SK, Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat Immunol* 2010; 11: 889-896 [PMID: 20856220 DOI: 10.1038/ni.1937]
- 23 Barajas M, Mazzolini G, Genové G, Bilbao R, Narvaiza I, Schmitz V, Sangro B, Melero I, Qian C, Prieto J. Gene therapy of orthotopic hepatocellular carcinoma in rats using adenovirus coding for interleukin 12. *Hepatology* 2001; 33: 52-61 [PMID: 11124820]
- 24 Ramaiah SK, Rittling S. Pathophysiological role of osteopontin in hepatic inflammation, toxicity, and cancer. *Toxicol Sci* 2008; 103: 4-13 [PMID: 17890765]
- 25 Qin LX. Inflammatory immune responses in tumor microenvironment and metastasis of hepatocellular carcinoma. *Cancer Microenviron* 2012; 5: 203-209 [PMID: 22678823 DOI: 10.1007/s12307-012-0111-1]
- 26 Facciabene A, Motz GT, Coukos G. T-regulatory cells: key players in tumor immune escape and angiogenesis. *Cancer Res* 2012; 72: 2162-2171 [PMID: 22549946 DOI: 10.1158/0008-5472]
- 27 Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, McGrady G, Wahl SM. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* 2003; 198: 1875-1886 [PMID: 14676299]
- 28 Fu J, Xu D, Liu Z, Shi M, Zhao P, Fu B, Zhang Z, Yang H, Zhang H, Zhou C, Yao J, Jin L, Wang H, Yang Y, Fu YX, Wang FS. Increased regulatory T cells correlate with CD8 T-cell impairment and poor survival in hepatocellular carcinoma patients. *Gastroenterology* 2007; 132: 2328-2339 [PMID: 17570208]
- 29 Lin SZ, Chen KJ, Xu ZY, Chen H, Zhou L, Xie HY, Zheng SS. Prediction of recurrence and survival in hepatocellular carcinoma based on two Cox models mainly determined by FoxP3+ regulatory T cells. *Cancer Prev Res (Phila)* 2013; 6: 594-602 [PMID: 23599540 DOI: 10.1158/1940-6207]
- 30 Shen X, Li N, Li H, Zhang T, Wang F, Li Q. Increased prevalence of regulatory T cells in the tumor microenvironment and its correlation with TNM stage of hepatocellular carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2010; 136: 1745-1754 [PMID: 20221638 DOI: 10.1007/s00432-010-0833-8]
- 31 Chen L, Zhou S, Qin J, Hu H, Ma H, Liu B, Wang X, Ma J, Ye S, Zhong C, Zhou G, Liang C. Combination of SLC administration and Tregs depletion is an attractive strategy for targeting hepatocellular carcinoma. *Mol Cancer* 2013; 12: 153 [PMID: 24304581]
- 32 Wu H, Chen P, Liao R, Li YW, Yi Y, Wang JX, Cai XY, He HW, Jin JJ, Cheng YF, Fan J, Sun J, Qiu SJ. Intratumoral regulatory T cells with higher prevalence and more suppressive activity in hepatocellular carcinoma patients. *J Gastroenterol Hepatol* 2013; 28: 1555-1564 [PMID: 23517245 DOI: 10.1111/jgh.12202]
- 33 Kryczek I, Banerjee M, Cheng P, Vatan L, Szeliga W, Wei S, Huang E, Finlayson E, Simeone D, Welling TH, Chang A, Coukos G, Liu R, Zou W. Phenotype, distribution, generation, and functional and clinical relevance of Th17 cells in the human tumor environments. *Blood* 2009; 114: 1141-1149 [PMID: 19470694 DOI: 10.1182/blood-2009-03-208249]
- 34 Zhang JP, Yan J, Xu J, Pang XH, Chen MS, Li L, Wu C, Li SP, Zheng L. Increased intratumoral IL-17-producing cells correlate with poor survival in hepatocellular carcinoma patients. *J Hepatol* 2009; 50: 980-989 [PMID: 19329213 DOI: 10.1016/j.jhep.2008.12.033]
- 35 Huang Y, Wang F, Wang Y, Zhu Z, Gao Y, Ma Z, Xu R, Du Z. Intrahepatic IL-17(+) T cells and FoxP3(+) Tregs cooperate to promote development and affect the prognosis of hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2013 Oct 21. [Epub ahead of print] [PMID: 24303990 DOI: 10.1111/jgh.12418]
- 36 Liao R, Sun J, Wu H, Yi Y, Wang JX, He HW, Cai XY, Zhou J, Cheng YF, Fan J, Qiu SJ. High expression of IL-17 and IL-17RE associate with poor prognosis of hepatocellular carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res* 2013; 32: 3 [PMID: 23305119 DOI: 10.1186/1756-9966-32-3]
- 37 Lu P, Weaver VM, Werb Z. The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. *J Cell Biol* 2012; 196: 395-406 [PMID: 22351925 DOI: 10.1083/jcb.201102147]
- 38 Schrader J, Gordon-Walker TT, Aucott RL, van Deemter M, Quaas A, Walsh S, Benten D, Forbes SJ, Wells RG, Iredale JP. Matrix stiffness modulates proliferation, chemotherapeutic response, and dormancy in hepatocellular carcinoma cells. *Hepatology* 2011; 53: 1192-1205 [PMID: 21442631 DOI: 10.1002/hep.24108]
- 39 Yang C, Zeisberg M, Lively JC, Nyberg P, Afdhal N, Kalluri R. Integrin alpha1beta1 and alpha2beta1 are the key regulators of hepatocarcinoma cell invasion across the fibrotic matrix microenvironment. *Cancer Res* 2003; 63: 8312-8317 [PMID: 14678990]
- 40 Giannelli G, Bergamini C, Marinucci F, Fransvea E, Quaranta M, Lupo L, Schiraldi O, Antonaci S. Clinical role of MMP-2/TIMP-2 imbalance in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 2002; 97: 425-431 [PMID: 11802202]
- 41 Daniele A, Divella R, Quaranta M, Mattioli V, Casamassima P, Paradiso A, Garrisi VM, Gadaleta CD, Gadaleta-Caldarola G, Savino E, Maci R, Bellizzi A, Fazio V. Clinical and prognostic role of circulating MMP-2 and its inhibitor TIMP-2 in HCC patients prior to and after trans-hepatic arterial chemoembolization. *Clin Biochem* 2014; 47: 184-190 [PMID: 24355694 DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2013.11.022]
- 42 Roomi MW, Kalinovsky T, Rath M, Niedzwiecki A. Effect of a nutrient mixture on matrix metalloproteinase-9 dimers in various human cancer cell lines. *Int J Oncol* 2014; 44: 986-992 [PMID: 24378964 DOI: 10.3892/ijo.2013.2235]

- 43 Hashizume H, Baluk P, Morikawa S, McLean JW, Thurston G, Roberge S, Jain RK, McDonald DM. Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness. *Am J Pathol* 2000; 156: 1363-1380 [PMID: 10751361]
- 44 Bollyky PL, Wu RP, Falk BA, Lord JD, Long SA, Preisinger A, Teng B, Holt GE, Standifer NE, Braun KR, Xie CF, Samuels PL, Vernon RB, Gebe JA, Wight TN, Nepom GT. ECM components guide IL-10 producing regulatory T-cell (TR1) induction from effector memory T-cell precursors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108: 7938-7943 [PMID: 21518860 DOI: 10.1073/pnas.1017360108]
- 45 Ordoñez R, Carbajo-Pescador S, Prieto-Dominguez N, García-Palomo A, González-Gallego J, Mauriz JL. Inhibition of matrix metalloproteinase-9 and nuclear factor kappa B contribute to melatonin prevention of motility and invasiveness in HepG2 liver cancer cells. *J Pineal Res* 2014; 56: 20-30 [PMID: 24117795 DOI: 10.1111/jpi.12092]
- 46 Zhu AX, Duda DG, Sahani DV, Jain RK. HCC and angiogenesis: possible targets and future directions. *Nat Rev Clin Oncol* 2011; 8: 292-301 [PMID: 21386818 DOI: 10.1038/nrclinonc.2011.30]
- 47 North S, Moenner M, Bikfalvi A. Recent developments in the regulation of the angiogenic switch by cellular stress factors in tumors. *Cancer Lett* 2005; 218: 1-14 [PMID: 15639335]
- 48 Coulon S, Heindryckx F, Geerts A, Van Steenkiste C, Colle I, Van Vlierberghe H. Angiogenesis in chronic liver disease and its complications. *Liver Int* 2011; 31: 146-162 [PMID: 21073649 DOI: 10.1111/j.1478-3231.2010.02369]
- 49 Liu Y, Poon RT, Li Q, Kok TW, Lau C, Fan ST. Both antiangiogenesis- and angiogenesis-independent effects are responsible for hepatocellular carcinoma growth arrest by tyrosine kinase inhibitor PTK787/ZK222584. *Cancer Res* 2005; 65: 3691-3699 [PMID: 15867364]
- 50 Lichtenberger BM, Tan PK, Niederleithner H, Ferrara N, Petzelbauer P, Sibilio M. Autocrine VEGF signaling synergizes with EGFR in tumor cells to promote epithelial cancer development. *Cell* 2010; 140: 268-279 [PMID: 20141840 DOI: 10.1016/j.cell.2009.12.046]
- 51 Llovet JM, Peña CE, Lathia CD, Shan M, Meinhardt G, Bruix J. Plasma biomarkers as predictors of outcome in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2012; 18: 2290-2300 [PMID: 22374331 DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-11-2175]
- 52 Yoshiji H, Kuriyama S, Noguchi R, Yoshii J, Ikenaka Y, Yanase K, Namisaki T, Kitade M, Uemura M, Masaki T, Fukui H. Angiopoietin 2 displays a vascular endothelial growth factor dependent synergistic effect in hepatocellular carcinoma development in mice. *Gut* 2005; 54: 1768-1775 [PMID: 16033879]

编辑 田滢 电编 鲁亚静



CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg细胞与肝移植免疫耐受的关系

廖晖, 杨定华

■背景资料

肝移植(liver transplantation, LT)是目前治疗终末期肝病最有效的方法。但移植术后长期乃至终生应用免疫抑制剂, 不仅会加重患者的经济负担, 而且免疫抑制剂本身的不利反应也会严重地影响移植受者的生存质量。因此, 如何诱导LT受者产生免疫耐受一直以来都是LT研究领域的一大热点。

廖晖, 杨定华, 南方医科大学南方医院肝胆外科 广东省广州市 510515

廖晖, 博士, 主要从事肝癌、肝移植方面的研究。

作者贡献分布: 本文综述由廖晖完成; 杨定华审核。

通讯作者: 杨定华, 教授, 主任医师, 510515, 广东省广州市广州大道北1838号, 南方医科大学南方医院肝胆外科。

dhyang5810@yahoo.com

电话: 020-61641706

收稿日期: 2014-01-06 修回日期: 2014-01-20

接受日期: 2014-02-03 在线出版日期: 2014-03-28

CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg cells and liver transplant tolerance

Hui Liao, Ding-Hua Yang

Hui Liao, Ding-Hua Yang, Department of Hepatobiliary Surgery, Nanfang Hospital Affiliated to Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China
Correspondence to: Ding-Hua Yang, Professor, Chief Physician, Department of Hepatobiliary Surgery, Nanfang Hospital Affiliated to Southern Medical University, 1838 Guangzhou Avenue North, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China. dhyang5810@yahoo.com

Received: 2014-01-06 Revised: 2014-01-20

Accepted: 2014-02-03 Published online: 2014-03-28

Abstract

Several subgroups of regulatory T (Treg) cells play crucial roles in both induction and maintenance of immune tolerance to self-antigens and alloantigens. The most extensively and comprehensively studied regulatory T cell subgroup is CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg cells. Numerous studies indicate that insufficiency or dysfunction of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg cells is responsible for the development of many autoimmune diseases and rejections after organ transplantation. Therefore, harnessing CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg cells may provide a promising approach for inducing and maintaining liver transplant tolerance. In this review, we will focus on the history and classification of regulatory T cells, the mechanisms by which regulatory T cells induce transplant tolerance and their roles in liver transplant tolerance.

© 2014 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

Key Words: Regulatory T cells; Liver transplant; Immune tolerance

Liao H, Yang DH. CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg cells and liver transplant tolerance. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(9): 1226-1234 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/1226.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i9.1226>

摘要

调节性T(regulatory T, Treg)细胞包含有不同的亚群, 在诱导和维持机体对自身和同种异体抗原免疫耐受中具有重要的作用。CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg细胞是目前研究的最广泛和深入的调节性T细胞。大量研究显示, CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg细胞功能或数量的异常可引起多种自身免疫性疾病以及器官移植排斥反应。因此, CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg细胞在诱导和维持肝移植免疫耐受方面可能具有较好的应用前景。本文就调节性T细胞的历史、分类、诱导免疫耐受的机制以及与肝移植免疫耐受的关系作如下综述。

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词: 调节性T细胞; 肝移植; 免疫耐受

核心提示: 新型免疫抑制剂的应用极大地改善了肝移植术后的短期预后, 但远期疗效有限。诱导肝移植免疫耐受是解决这一问题最理想的方法。CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg细胞可以通过多种机制参与器官移植免疫耐受的形成, 在诱导和维持肝移植免疫耐受过程中起着重要作用, 可能具有较好的临床应用前景。

廖晖, 杨定华. CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg细胞与肝移植免疫耐受的关系. *世界华人消化杂志* 2014; 22(9): 1226-1234 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/1226.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i9.1226>

0 引言

对于终末期肝病来说, 肝移植(liver transplantation, LT)可能是唯一有效的方法。在手术技术日趋成熟之后, LT排斥反应已成为影响移植物长期存

■同行评议者

何晓顺, 教授, 中山大学附属第一医院

活的重要因素^[1]。LT术后, 需要长期乃至终生应用免疫抑制剂, 才能有效地控制排斥反应, 维持移植肝脏长期、有功能的存活。目前, 临床上常用的免疫抑制剂均具有多种不良反应, 如糖尿病、高血压、慢性肾功能损害以及对感染和肿瘤易感性增加等^[1]。因此, 诱导LT受者产生针对供者抗原特异性的免疫耐受, 才是彻底解决LT排斥反应最理想的措施。CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺调节性T(regulatory T, Treg)细胞约占外周血CD4⁺ T细胞的5%-10%, 是免疫系统中重要的调节细胞, 可以抑制自身反应性T细胞和同种反应性T细胞的功能, 他所介导的免疫调节反应是机体对自身和同种异体抗原产生免疫耐受的重要机制^[2,3]。近年来, 大量的研究发现, CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg细胞在诱导和维持LT免疫耐受中起着重要的作用。

1 Treg细胞的研究历史

早在20世纪70年代初, 科学家就发现T细胞除了具有促进免疫反应的功能外, 还有一部分T细胞具有抑制免疫反应的作用, 这部分T细胞被称为抑制性T细胞(suppressor T cells)^[4]。当时普遍认为, 抑制性T细胞通过主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)基因I-J亚区编码的抗原决定簇发挥免疫抑制作用, 但后来的研究未能在MHC基因中发现I-J亚区^[5,6]。同时, 由于未能确定该细胞亚群特异性的标志, 因此对于是否存在“抑制性T细胞”, 存在争议, 甚至有人在解释免疫抑制现象时, 故意回避使用“抑制性T细胞”一词^[7]。直到1995年, Sakaguchi等^[8]发现, 将CD4⁺CD25⁻ T细胞输入裸鼠体内, 可诱发多种自身免疫性疾病; 如果输入CD4⁺CD25⁺ T细胞后, 立即输入CD4⁺CD25⁻ T细胞, 可防止自身免疫性疾病的发生; 如果输入CD4⁺CD25⁻ T细胞后, 用抗原刺激裸鼠, 可引起异常强烈的免疫反应, 此时输入CD4⁺CD25⁺ T细胞, 可使免疫反应正常化。因此, Sakaguchi等^[8]认为CD4⁺CD25⁺ T细胞中包含有一群具有免疫抑制功能的T细胞亚群, 在维持机体自身免疫耐受中具有重要的作用, 后来这群细胞被称为Treg细胞。一年后, Asano等^[9]发现, 出生后第3天切除小鼠的胸腺, 会影响外周CD4⁺CD25⁺ T细胞的出现, 以及引起严重的自身免疫性疾病, 提示CD4⁺CD25⁺ T细胞来源于胸腺。2002年Zheng等^[10]报道, 人外周血中的初始T细胞(CD4⁺CD25⁻)在转化生长因子-β(transforming growth factor-β, TGF-β)的诱

导下, 可转化为具有免疫抑制功能的CD4⁺CD25⁺ T细胞。从而证明, Treg细胞还可来源于外周初始T细胞。2003年, 日本科学家^[11]和美国科学家^[12]几乎在同一时间发现转录因子Foxp3特异性表达于CD4⁺CD25⁺ T细胞, 将Foxp3基因导入CD4⁺CD25⁻ T细胞中, 可以使其获得Treg细胞表型, 在体内、体外均具有免疫抑制作用, 从而确立了Foxp3在调控Treg细胞分化发育和维持其免疫抑制功能中的重要地位^[13]。Foxp3是迄今为止, Treg细胞最具有特异性的标志物, 他的出现极大地推动了Treg细胞的研究进展。

2 抑制性T细胞和调节性T细胞

回顾Treg细胞的研究历史, 可以发现免疫学家在解释T细胞介导的免疫抑制现象时, 会把“抑制性T细胞”与“调节性T细胞”这两个词, 相互替换使用。起初“抑制性T细胞”的使用频率远远高于“调节性T细胞”, 但是在20世纪80年代末至90年代初期, 由于不少免疫学家对于是否存在抑制性T细胞持怀疑态度, 因此回避使用“抑制性T细胞”一词, 而倾向于使用“调节性T细胞”^[14]。故“调节性T细胞”一直沿用至今。

3 Treg细胞的来源及分类

Asano等^[9]发现正常小鼠出生后, 外周淋巴组织中无CD4⁺CD25⁺ T细胞, 3 d后, 外周淋巴组织才开始出现CD4⁺CD25⁺ T细胞, 2 wk内达到成年水平(约占CD4⁺ T细胞的5%-10%)。如果出生后第3天切除小鼠的胸腺, 外周淋巴组织出现CD4⁺CD25⁺ T细胞的时间, 将延迟至出生后的第10天, 成年后CD4⁺CD25⁺ T细胞明显低于正常小鼠^[9]。这说明小鼠出生后第3-10天, 外周淋巴组织中出现的CD4⁺CD25⁺ T细胞来自胸腺, 现在被称为天然调节性T细胞(natural Treg cells, nTreg)。出生后第3天切除胸腺的小鼠延迟出现的CD4⁺CD25⁺ T细胞来自何处呢? Asano等^[9]将Thy-1.1⁺ CD4⁺CD25⁻ T细胞注入出生后第3天切除胸腺的小鼠(Thy-1.1⁻), 一段时间后在外周淋巴组织中可检测到Thy-1.1⁺ CD4⁺CD25⁺ T细胞。说明CD4⁺CD25⁻ T细胞在外周淋巴组织中可以转化为CD4⁺CD25⁺ T细胞, 遗憾的是作者没有检测这群CD4⁺CD25⁺ T细胞是否具有免疫抑制功能, 因此并没有证明CD4⁺CD25⁻ T细胞可以转化为Treg细胞。因为有研究表明CD4⁺CD25⁻ T细胞活化后也可以上调CD25分子, 成为CD4⁺CD25⁺ 效应性T细胞, 但不具有免疫抑制功能^[2,15]。之后,

■**研发前沿**
CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺调节性T(regulatory T, Treg)细胞是外周免疫耐受机制的重要组成部分。他可以抑制自身反应性T淋巴细胞和同种反应性T淋巴细胞的功能, 是机体对自身和同种异体抗原产生免疫耐受的重要机制。目前, CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg细胞在诱导实体器官移植(如LT)免疫耐受方面的研究, 主要处于动物实验阶段。

■相关报道

CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺细胞在骨髓移植中的应用已进入了临床研究阶段,得出的结论是Treg细胞可以促进宿主免疫系统重建,降低移植抗宿主病的发生率和肿瘤的复发,是安全有效的。

有研究发现初始T细胞(CD4⁺CD25⁻)在TGF-β诱导下,可上调CD25分子,表达Foxp3,转化为具有免疫抑制功能的CD4⁺CD25⁺T细胞^[10,16]。现在,由初始T细胞转化而来的具有免疫抑制功能的T细胞被称为诱导性调节性T细胞(induced Treg cells, iTreg)。因此, Treg细胞除了来源于胸腺外,还可以来源于外周初始T细胞。

由此可见, Treg细胞不是均一的细胞群, 包含有不同的亚群(图1)。根据来源不同, Treg细胞可大致分为nTreg和iTreg细胞^[17]。nTreg细胞指来源于胸腺, 具有免疫抑制功能的T细胞。根据表面标志物的不同, nTreg细胞可进一步分为CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ nTreg细胞、CD8⁺ nTreg细胞、CD4⁺CD8⁻ nTreg细胞、γδ⁺ nTreg细胞和NKT细胞。一般情况下, nTreg细胞指胸腺来源的CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T细胞。iTreg细胞指初始T细胞在不同的细胞因子的作用下转化而来的具有免疫抑制功能的T细胞, 主要包括CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ iTreg细胞、Tr1细胞、Th3细胞、CD8⁺ iTreg细胞和CD4⁺CD8⁻ iTreg细胞。一般情况下iTreg细胞指前三者。在此特别说明, 以下所提及的“nTreg细胞”特指胸腺来源的CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg细胞, “iTreg细胞”特指由初始T细胞转化而来的CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg细胞。

4 同种异体抗原识别的机制

在器官移植术中, 由于供受体遗传背景不同, 受体的免疫系统可以识别移植植物中的抗原并产生免疫应答, 同时移植植物中残留的免疫细胞也可以识别受体组织中的抗原并产生免疫应答, 此为移植排斥反应。前者被称为宿主抗移植植物反应, 主要包括超急性排斥反应、急性排斥反应和慢性排斥反应; 后者被称为移植植物抗宿主反应。现已证明多种免疫细胞可参与排斥反应, 但是CD4⁺ T细胞和CD8⁺ T细胞是参与同种异体排斥反应的主要效应细胞^[18,19]。T细胞可以通过3种方式识别同种异体抗原, 分别为直接识别、间接识别和半直接识别, 如图2所示。直接识别是指移植植物中的抗原提呈细胞(antigen-presenting cells, APC)将其表面的MHC-抗原肽复合物直接递呈给受体的同种反应性T细胞; 间接识别是指供体抗原经过受体APC处理、加工后, 以受体MHC II类分子-供体抗原肽复合物的形式递呈给受体CD4⁺同种反应性T细胞; 半直接识别是指供体APC与受体APC进行细胞膜片段交换时, 有

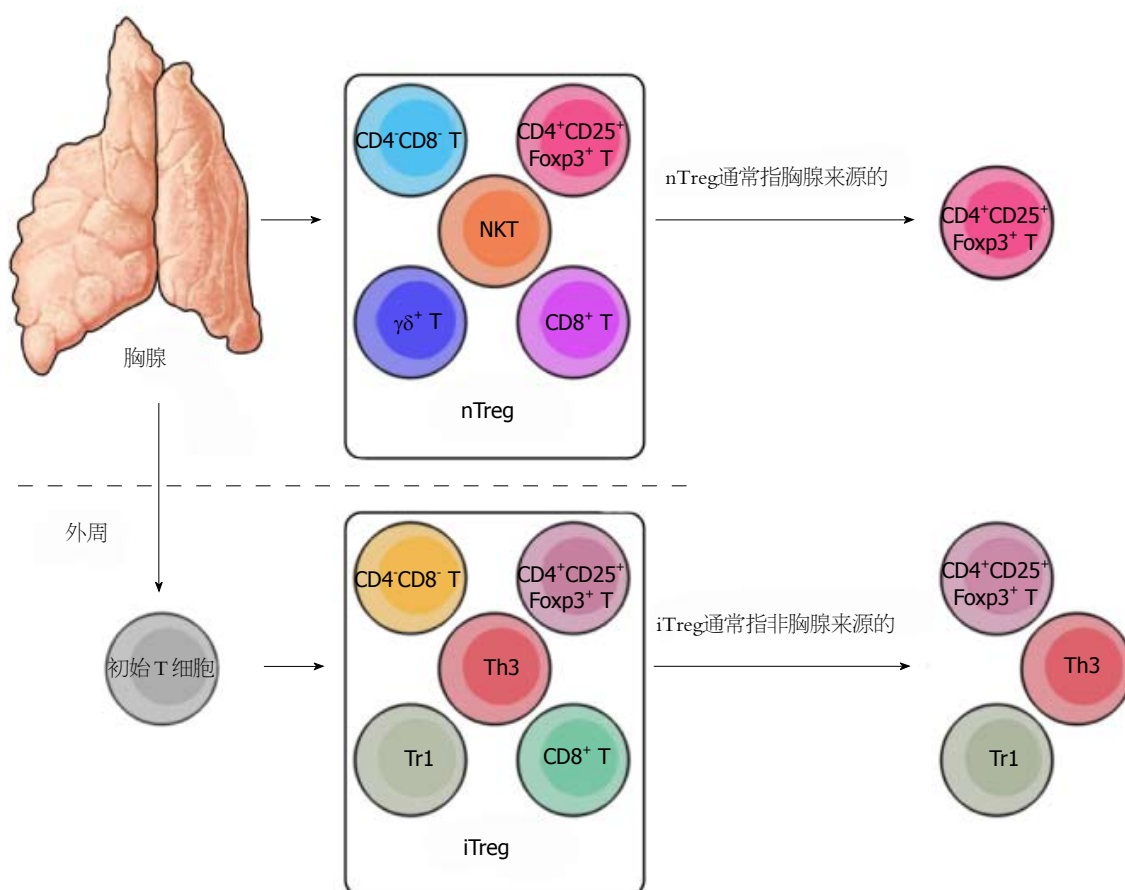
可能将MHC-抗原肽复合物交换至对方, 最后由受体APC将供体的MHC-抗原肽复合物递呈给受体同种反应性T细胞^[18,19]。同种反应性T细胞识别同种异体抗原后(第一信号)还需要CD28分子提供的第二信号才能被激活^[19]。第二信号可以降低同种反应性T细胞的活化阈值, 促进白介素-2(interleukin-2, IL-2)的分泌, 而IL-2(第三信号)又可以促进同种反应性T细胞活化、增殖和预防活化诱导的细胞凋亡^[19]。因此, 移植排斥反应从本质上来说是一种免疫反应。

5 Treg细胞诱导移植免疫耐受的机制

首先, Treg细胞可以通过APC抑制同种反应性T细胞的活化、增殖和功能。Treg细胞持续性高表达CTLA-4(CD152), CTLA-4与B7的亲合力是CD28分子的20倍, 可与初始T细胞表面的CD28分子竞争性地结合APC表面的B7分子, 从而减弱甚至阻断T细胞活化的信号^[20]。CTLA-4与B7分子结合后还可以诱导APC表达吡咯酮2,3双加氧酶(indoleamine 2,3-dioxygenase, IDO), 促进色氨酸的分解代谢, 从而抑制T细胞的增殖或诱导其凋亡^[21]。因此, CTLA-4在诱导移植免疫耐受中具有重要的作用^[22,23]。Treg细胞还表达淋巴细胞活化基因-3, 可与MHC II类分子以高亲和力结合, 向APC内传导抑制性信号, 抑制APC的成熟^[24,25]。Treg细胞的某些表面分子, 如淋巴细胞功能相关抗原和神经菌毛素(neuropilin-1)的表达水平也高于初始T细胞, 可促进Treg细胞与APC结合^[26,27]。

其次, Treg细胞可通过分泌TGF-β、IL-10和IL-35等细胞因子抑制排斥反应。虽然体外实验证明Treg是通过细胞间的接触而发挥免疫抑制作用, 不依赖细胞因子, 但体内实验却证实Treg细胞还可以通过分泌细胞因子, 发挥免疫抑制作用^[28]。Treg细胞分泌的TGF-β, 除了可以直接抑制效应性T细胞的增殖和功能外^[29,30], 还可以通过诱导APC表达IDO和Foxp3⁺ Treg细胞参与器官移植免疫耐受的形成^[31,32]。Treg细胞还可分泌IL-10, 阻断IL-10信号通路可以终止Treg细胞诱导的小鼠皮肤移植免疫耐受^[22]。供体来源的Treg细胞分泌的IL-10在控制骨髓移植后移植植物抗宿主病中具有重要作用^[33]。最近有研究发现, Treg细胞还可分泌IL-35, 并且在体外实验中证明IL-35是Treg细胞发挥非细胞接触性免疫抑制作用的重要因子^[22,34]。

还有, Treg细胞可以通过改变周围的微环



■创新盘点

本文重点阐述了 $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Treg细胞参与器官移植免疫耐受的机制及其对动物LT免疫排斥反应的影响。此外, 文章还深入浅出地阐述了Treg细胞的研究历史和分类。

图 1 Treg细胞的来源及分类. nTreg细胞: 天然调节性T细胞; iTreg细胞: 诱导性调节性T细胞.

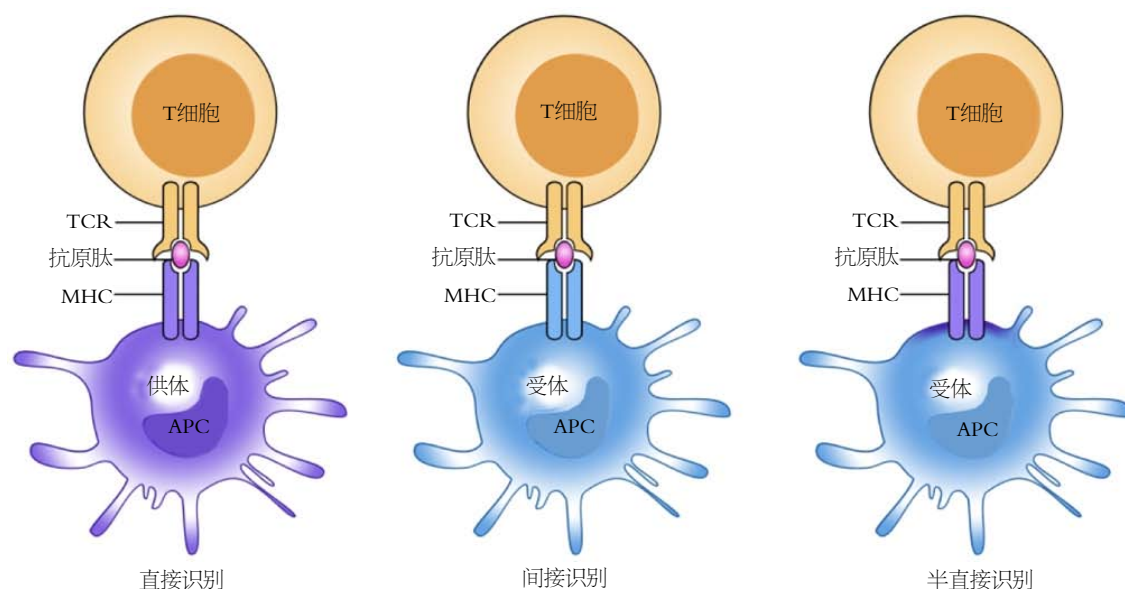


图 2 同种异体抗原识别的机制. TCR: T细胞抗原受体; MHC: 主要组织溶性复合体; APC: 抗原提呈细胞.

境抑制排斥反应. Treg细胞持续表达高亲和力的IL-2受体($CD25-CD122-CD132$ 三聚体), 可大量消耗周围环境中效应性T细胞赖以生存的IL-2, 从而诱导效应性T细胞发生凋亡^[35]. Treg细

胞还高表达胞外水解酶CD39和CD73, CD39可以将ATP水解成AMP, AMP又可以被CD73水解成腺苷^[36]. 一方面可消耗T细胞活化所需的能量(ATP)^[37]; 另一方面产生的腺苷还可激活效应性

■应用要点

成功地诱导和维持肝移植免疫耐受可以减轻患者的经济负担,降低甚至消除免疫抑制剂对移植受者生存质量的影响。目前,Treg细胞在骨髓移植研究中显现出了迷人的临床应用前景。如果能够通过Treg细胞成功地诱导并维持肝移植免疫耐受,可以带来巨大的经济和社会效益。

T细胞表面的腺苷受体2A,不仅可以抑制T细胞的增殖,还可以抑制IL-6的表达以及促进TGF- β 的分泌,有利于iTreg细胞的形成^[36,38,39]。CD39缺陷的Treg细胞诱导小鼠皮肤移植免疫耐受的能力明显低于正常Treg细胞^[36]。

再有,Treg细胞可以通过穿孔素(perforin)^[40]、颗粒酶(granzyme)^[41]、凋亡诱导配体受体DR5^[42]、半乳糖凝集素(galectin-1)^[43]和 γ 干扰素^[44]等直接杀伤效应性T细胞。此外,Treg细胞还可以通过传染性免疫耐受(infectious tolerance)诱导更多的初始T细胞转变为具有免疫抑制功能的T细胞^[45,46]。

6 Treg细胞与肝移植免疫耐受的关系

早在1975年,就有科学家提出抑制性T细胞(Treg细胞)可以诱导小鼠同种异体皮肤移植免疫耐受^[47]。现已证实,Treg细胞在诱导和维持同种异体器官移植免疫耐受中具有重要作用^[48]。有关Treg细胞与LT免疫耐受的文献最早见于1984年,Myburgh等^[49]利用全身淋巴照射(total lymphoid irradiation, TLI)的方法成功地诱导了狒狒同种异体LT免疫耐受,作者推测移植长期存活的原因可能是TLI可以促进受体抑制性T细胞增殖。这一推测之后被Fujiki等证实。Fujiki等^[50]发现,TLI可以显著延长大鼠同种异体LT(DA \rightarrow Lewis)受体的生存时间(>100 d),照射组移植肝(未被照射)内CD4⁺和CD8⁺ T细胞凋亡的数量以及Treg细胞的数量明显高于未照射组。提示TLI可以通过促进效应性T细胞凋亡和Treg细胞形成来诱导和维持LT免疫耐受。目前,诱导LT免疫耐受的方法有很多,研究表明这些方法或多或少都与Treg细胞有关。Sato等^[51]报道,反复、多次从门静脉输入供体来源的血液可明显减少活体LT术后急性排斥反应的发生率,并且可以迅速减少免疫抑制剂的用量,主要的机制包括促进Treg细胞的形成和诱导移植肝脏形成大嵌合体。Abe等^[52]在大鼠LT模型中也发现,供体特异性输血可以通过促进Treg细胞形成来诱导LT免疫耐受。近年来,雷帕鸣与其他诱导免疫耐受的方法(如未成熟树突状细胞)联合应用取得了较好的实验结果,已成为诱导移植免疫耐受领域的研究热点^[53,54]。其中非常重要的原因是,与其他免疫抑制剂(如糖皮质激素、他克莫司和环孢素A等)相比,雷帕鸣可以促进Treg细胞的形成,并且维持其功能稳定^[55]。肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSCs)^[56]、间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)^[57]以

及供体来源的凋亡淋巴细胞^[58],最近也被认为与LT免疫耐受有关,研究表明这些细胞诱导LT免疫耐受的机制也与其能够诱导Treg细胞形成有关。

Treg细胞在诱导和维持自发性免疫耐受中具有重要的作用。Li等^[59]发现,小鼠LT自发性免疫耐受组(C57BL/10 \rightarrow C3H/HeJ),移植肝和脾脏中Treg细胞的比例(CD4⁺CD25⁺ T/T)明显高于对照组,术前或术后用CD25抗体清除受体CD4⁺CD25⁺ T细胞,可引发急性排斥反应。还有研究报道,Th17/Treg细胞功能失调与LT免疫耐受和急性排斥反应有关。大鼠LT自发性免疫耐受组(BN \rightarrow Lewis)中Th17细胞相关的细胞因子(IL-17、IL-6和IL-23)和转录因子(ROR γ t)表达水平明显低于排斥组(Lewis \rightarrow BN),而Treg细胞相关的细胞因子(IL-10和TGF- β)和转录因子(Foxp3)则明显高于排斥组^[60];排斥反应组的情况正好相反,并且IL-17、IL-6、IL-23、ROR γ t的表达水平与排斥反应的严重程度呈正相关,而IL-10、TGF- β 和Foxp3的表达水平与排斥反应的严重程度呈负相关^[60]。最近,Zhang等^[61]在大鼠LT急性排斥反应模型中也发现,排斥反应与受体外周血中Treg细胞下降有关。

Pu等^[62]对nTreg细胞诱导大鼠LT(DA \rightarrow Lewis)免疫耐受的能力进行了直接地研究。作者分别于LT术后第1天和第7天从阴茎背静脉输入 1×10^6 nTreg细胞,发现未作任何治疗的大鼠平均生存时间为12 d;短期服用他克莫司[0.1 mg/(kg·d),术后1-7 d]的大鼠平均生存时间为28 d;输注新鲜nTreg细胞的大鼠平均生存时间为22 d;输注第三方(BN)抗原刺激过的nTreg细胞的大鼠平均生存时间为18 d;输注供体抗原刺激过的nTreg细胞的大鼠平均生存时间为28 d;而短期服用他克莫司+输注供体抗原刺激过的nTreg细胞的大鼠生存时间均超过60 d^[62]。上述结果充分说明Treg细胞确实可延长移植肝的存活时间,但效果并不优于短期小剂量应用他克莫司,似乎提示Treg细胞诱导LT免疫耐受的能力非常有限。但作者并不这样认为,因为有研究表明nTreg细胞在炎性环境中不稳定,容易丢失Foxp3,失去免疫抑制功能,甚至转化为炎性细胞^[63],而iTreg细胞在炎性环境中却表现的较稳定^[64]。最近,Feng等^[65]在小鼠缺血再灌注模型中也证实iTreg细胞比nTreg细胞更稳定。因此,利用iTreg细胞诱导LT免疫耐受可能会取得更好的

效果。另外, Pu等^[62]的研究发现短期服用他克莫司+输注Treg细胞可以显著延长移植肝的存活时间。但有研究表明, 他克莫司不利于Treg细胞的生长和发育^[66]。而在Pu等的研究中他克莫司+输注Treg细胞却取得了“1+1>2”的效果。可能的解释是, LT术后他克莫司可以抑制排斥反应, 减轻Treg细胞所处环境中的炎症程度, 更有利Treg细胞的存活和作用的发挥, 故而产生协同作用。与他克莫司相反, 目前大量的研究表明, 雷帕鸣不仅可以选择性地扩增nTreg细胞, 增强其免疫抑制功能和稳定其表型(即使在炎症环境中)^[63,67-69], 还可以促进iTreg细胞生成^[70,71]。据此, 我们推测联合应用雷帕鸣与输注iTreg细胞可能在诱导和维持LT免疫耐受方面具有更好的应用前景。

7 结论

Treg细胞可以通过多种机制抑制器官移植排斥反应, 在诱导和维持同种异体LT免疫耐受中具有重要的作用。目前需解决的问题有: (1)在排斥反应LT模型中进一步确定Treg细胞作用的大小, 直接比较nTreg与iTreg细胞的疗效以及明确Treg细胞疗法是否优于免疫抑制剂; (2)优化iTreg细胞的诱导方案或nTreg细胞的扩增方案, 以便获得功能强大、表型稳定的Treg细胞; (3)目前, LT术后彻底放弃使用免疫抑制剂是不切实际的想法, 较为可行的方案是短期或小剂量应用免疫抑制剂+Treg细胞疗法, 因此, 有必要明确各种免疫抑制剂对Treg细胞的影响。

8 参考文献

- 1 Lim KB, Schiano TD. Long-term outcome after liver transplantation. *Mt Sinai J Med* 2012; 79: 169-189 [PMID: 22499489 DOI: 10.1002/msj.21302]
- 2 Suri-Payer E, Amar AZ, Thornton AM, Shevach EM. CD4⁺CD25⁺ T cells inhibit both the induction and effector function of autoreactive T cells and represent a unique lineage of immunoregulatory cells. *J Immunol* 1998; 160: 1212-1218 [PMID: 9570536]
- 3 Issa F, Robb RJ, Wood KJ. The where and when of T cell regulation in transplantation. *Trends Immunol* 2013; 34: 107-113 [PMID: 23228885 DOI: 10.1016/j.it.2012.11.003]
- 4 Gershon RK, Cohen P, Hencin R, Liebhauer SA. Suppressor T cells. *J Immunol* 1972; 108: 586-590 [PMID: 4401006]
- 5 Kronenberg M, Steinmetz M, Kobori J, Kraig E, Kapp JA, Pierce CW, Sorensen CM, Suzuki G, Tada T, Hood L. RNA transcripts for I-J polypeptides are apparently not encoded between the I-A and I-E subregions of the murine major histocompatibility complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983; 80: 5704-5708 [PMID: 6193520 DOI: 10.1073/pnas.80.18.5704]
- 6 Volpé R. Suppressor T lymphocyte dysfunction is important in the pathogenesis of autoimmune thyroid disease: a perspective. *Thyroid* 1993; 3: 345-352 [PMID: 8118229 DOI: 10.1089/thy.1993.3.345]
- 7 Bloom BR, Salgame P, Diamond B. Revisiting and revising suppressor T cells. *Immunol Today* 1992; 13: 131-136 [PMID: 1533765 DOI: 10.1016/0167-5699(92)90110-s]
- 8 Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995; 155: 1151-1164 [PMID: 7636184]
- 9 Asano M, Toda M, Sakaguchi N, Sakaguchi S. Auto-immune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation. *J Exp Med* 1996; 184: 387-396 [PMID: 8760792 DOI: 10.1084/jem.184.2.387]
- 10 Zheng SG, Gray JD, Ohtsuka K, Yamagiwa S, Horwitz DA. Generation ex vivo of TGF-beta-producing regulatory T cells from CD4⁺CD25⁺ precursors. *J Immunol* 2002; 169: 4183-4189 [PMID: 12370347]
- 11 Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003; 299: 1057-1061 [PMID: 12522256 DOI: 10.1126/science.1079490]
- 12 Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003; 4: 330-336 [PMID: 12612578 DOI: 10.1038/ni904]
- 13 Gao Y, Lin F, Su J, Gao Z, Li Y, Yang J, Deng Z, Liu B, Tsun A, Li B. Molecular mechanisms underlying the regulation and functional plasticity of FOXP3(+) regulatory T cells. *Genes Immun* 2012; 13: 1-13 [PMID: 22048454 DOI: 10.1038/gene.2011.77]
- 14 Beissert S, Schwarz A, Schwarz T. Regulatory T cells. *J Invest Dermatol* 2006; 126: 15-24 [PMID: 16417213 DOI: 10.1038/sj.jid.5700004]
- 15 Itoh M, Takahashi T, Sakaguchi N, Kuniyasu Y, Shimizu J, Otsuka F, Sakaguchi S. Thymus and autoimmunity: production of CD25⁺CD4⁺ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *J Immunol* 1999; 162: 5317-5326 [PMID: 10228007]
- 16 Fu S, Zhang N, Yopp AC, Chen D, Mao M, Chen D, Zhang H, Ding Y, Bromberg JS. TGF-beta induces Foxp3⁺ T-regulatory cells from CD4⁺ CD25⁺ precursors. *Am J Transplant* 2004; 4: 1614-1627 [PMID: 15367216 DOI: 10.1111/j.1600-6143.2004.00566.x]
- 17 Shalev I, Schmelzle M, Robson SC, Levy G. Making sense of regulatory T cell suppressive function. *Semin Immunol* 2011; 23: 282-292 [PMID: 21592823 DOI: 10.1016/j.smim.2011.04.003]
- 18 Sagoo P, Lombardi G, Lechler RI. Relevance of regulatory T cell promotion of donor-specific tolerance in solid organ transplantation. *Front Immunol* 2012; 3: 184 [PMID: 22811678 DOI: 10.3389/fimmu.2012.00184]
- 19 Wood KJ, Goto R. Mechanisms of rejection: current perspectives. *Transplantation* 2012; 93: 1-10 [PMID: 22138818 DOI: 10.1097/TP.0b013e31823cab44]
- 20 Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T, Miyara M, Fehervari Z, Nomura T, Sakaguchi S. CTLA-4 control over Foxp3⁺ regulatory T cell function. *Science* 2008; 322: 271-275 [PMID: 18845758]

同行评价

本文综述了目前国内外Treg细胞在诱导和维持肝移植免疫耐受的研究进展, 对于Treg细胞疗法在肝移植领域的应用有一定的参考价值。

- DOI: 10.1126/science.1160062]
- 21 Wing K, Yamaguchi T, Sakaguchi S. Cell-autonomous and -non-autonomous roles of CTLA-4 in immune regulation. *Trends Immunol* 2011; 32: 428-433 [PMID: 21723783 DOI: 10.1016/j.it.2011.06.002]
 - 22 Kingsley CI, Karim M, Bushell AR, Wood KJ. CD25+CD4+ regulatory T cells prevent graft rejection: CTLA-4- and IL-10-dependent immunoregulation of alloresponses. *J Immunol* 2002; 168: 1080-1086 [PMID: 11801641]
 - 23 Zhang T, Fresnay S, Welty E, Sangrampurkar N, Rybak E, Zhou H, Cheng XF, Feng Q, Avon C, Laaris A, Whitters M, Nagelin AM, O'Hara RM, Azimzadeh AM. Selective CD28 blockade attenuates acute and chronic rejection of murine cardiac allografts in a CTLA-4-dependent manner. *Am J Transplant* 2011; 11: 1599-1609 [PMID: 21749640 DOI: 10.1111/j.1600-6143.2011.03624.x]
 - 24 Bayry J, Triebel F, Kaveri SV, Tough DF. Human dendritic cells acquire a semimature phenotype and lymph node homing potential through interaction with CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 2007; 178: 4184-4193 [PMID: 17371975]
 - 25 Liang B, Workman C, Lee J, Chew C, Dale BM, Colonna L, Flores M, Li N, Schweighoffer E, Greenberg S, Tybulewicz V, Vignali D, Clynes R. Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II. *J Immunol* 2008; 180: 5916-5926 [PMID: 18424711]
 - 26 Onishi Y, Fehervari Z, Yamaguchi T, Sakaguchi S. Foxp3+ natural regulatory T cells preferentially form aggregates on dendritic cells in vitro and actively inhibit their maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 10113-10118 [PMID: 18635688 DOI: 10.1073/pnas.0711106105]
 - 27 Sarris M, Andersen KG, Randow F, Mayr L, Betz AG. Neuropilin-1 expression on regulatory T cells enhances their interactions with dendritic cells during antigen recognition. *Immunity* 2008; 28: 402-413 [PMID: 18328743 DOI: 10.1016/j.immuni.2008.01.012]
 - 28 Sakaguchi S, Wing K, Yamaguchi T. Dynamics of peripheral tolerance and immune regulation mediated by Treg. *Eur J Immunol* 2009; 39: 2331-2336 [PMID: 19662638 DOI: 10.1002/eji.200939688]
 - 29 Green EA, Gorelik L, McGregor CM, Tran EH, Flavell RA. CD4+CD25+ T regulatory cells control anti-islet CD8+ T cells through TGF-beta-TGF-beta receptor interactions in type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 10878-10883 [PMID: 12949259 DOI: 10.1073/pnas.1834400100]
 - 30 Li MO, Wan YY, Sanjabi S, Robertson AK, Flavell RA. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol* 2006; 24: 99-146 [PMID: 16551245 DOI: 10.1146/annurev.immunol.24.021605.090737]
 - 31 Pallotta MT, Orabona C, Volpi C, Vacca C, Belladonna ML, Bianchi R, Servillo G, Brunacci C, Calvitti M, Biciato S, Mazza EM, Boon L, Grassi F, Fioretti MC, Fallarino F, Puccetti P, Grohmann U. Indoleamine 2,3-dioxygenase is a signaling protein in long-term tolerance by dendritic cells. *Nat Immunol* 2011; 12: 870-878 [PMID: 21804557 DOI: 10.1038/ni.2077]
 - 32 Regateiro FS, Howie D, Cobbold SP, Waldmann H. TGF-beta in transplantation tolerance. *Curr Opin Immunol* 2011; 23: 660-669 [PMID: 21839624 DOI: 10.1016/j.coi.2011.07.003]
 - 33 Tawara I, Sun Y, Liu C, Toubai T, Nieves E, Evers R, Alrubaie M, Mathewson N, Tamaki H, Reddy P. Donor- but not host-derived interleukin-10 contributes to the regulation of experimental graft-versus-host disease. *J Leukoc Biol* 2012; 91: 667-675 [PMID: 22262800 DOI: 10.1189/jlb.1011510]
 - 34 Chaturvedi V, Collison LW, Guy CS, Workman CJ, Vignali DA. Cutting edge: Human regulatory T cells require IL-35 to mediate suppression and infectious tolerance. *J Immunol* 2011; 186: 6661-6666 [PMID: 21576509 DOI: 10.4049/jimmunol.1100315]
 - 35 Pandiyan P, Zheng L, Ishihara S, Reed J, Lenardo MJ. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nat Immunol* 2007; 8: 1353-1362 [PMID: 17982458 DOI: 10.1038/ni1536]
 - 36 Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, Friedman D, Usheva A, Erat A, Chen JF, Enyoyi K, Linden J, Oukka M, Kuchroo VK, Strom TB, Robson SC. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med* 2007; 204: 1257-1265 [PMID: 17502665 DOI: 10.1084/jem.20062512]
 - 37 Yip L, Woehrle T, Corriden R, Hirsh M, Chen Y, Inoue Y, Ferrari V, Insel PA, Junger WG. Autocrine regulation of T-cell activation by ATP release and P2X7 receptors. *FASEB J* 2009; 23: 1685-1693 [PMID: 19211924 DOI: 10.1096/fj.08-126458]
 - 38 Zarek PE, Huang CT, Lutz ER, Kowalski J, Horton MR, Linden J, Drake CG, Powell JD. A2A receptor signaling promotes peripheral tolerance by inducing T-cell anergy and the generation of adaptive regulatory T cells. *Blood* 2008; 111: 251-259 [PMID: 17909080 DOI: 10.1182/blood-2007-03-081646]
 - 39 Han KL, Thomas SV, Koontz SM, Changpriroa CM, Ha SK, Malech HL, Kang EM. Adenosine A2A receptor agonist-mediated increase in donor-derived regulatory T cells suppresses development of graft-versus-host disease. *J Immunol* 2013; 190: 458-468 [PMID: 23225892 DOI: 10.4049/jimmunol.1201325]
 - 40 Czystowska M, Strauss L, Bergmann C, Szajnik M, Rabinowich H, Whiteside TL. Reciprocal granzyme/perforin-mediated death of human regulatory and responder T cells is regulated by interleukin-2 (IL-2). *J Mol Med (Berl)* 2010; 88: 577-588 [PMID: 20225066 DOI: 10.1007/s00109-010-0602-9]
 - 41 Kubach J, Lutter P, Bopp T, Stoll S, Becker C, Huter E, Richter C, Weingarten P, Warger T, Knop J, Müllner S, Wijdenes J, Schild H, Schmitt E, Jonuleit H. Human CD4+CD25+ regulatory T cells: proteome analysis identifies galectin-10 as a novel marker essential for their anergy and suppressive function. *Blood* 2007; 110: 1550-1558 [PMID: 17502455 DOI: 10.1182/blood-2007-01-069229]
 - 42 Ren X, Ye F, Jiang Z, Chu Y, Xiong S, Wang Y. Involvement of cellular death in TRAIL/DR5-dependent suppression induced by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *Cell Death Differ* 2007; 14: 2076-2084 [PMID: 17762882 DOI: 10.1038/sj.cdd.4402220]
 - 43 Garín MI, Chu CC, Golshayan D, Cernuda-Morollón E, Wait R, Lechler RI. Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4+CD25+ T cells. *Blood* 2007; 109: 2058-2065 [PMID: 17110462 DOI: 10.1182/blood-2006-04-016451]
 - 44 Koenecke C, Lee CW, Thamm K, Föhse L, Schaffer M, Mittrücker HW, Floess S, Huehn J, Ganser

- A, Förster R, Prinz I. IFN- γ production by allogeneic Foxp3⁺ regulatory T cells is essential for preventing experimental graft-versus-host disease. *J Immunol* 2012; 189: 2890-2896 [PMID: 22869903 DOI: 10.4049/jimmunol.1200413]
- 45 Zheng SG, Wang JH, Gray JD, Soucier H, Horwitz DA. Natural and induced CD4⁺CD25⁺ cells educate CD4⁺CD25⁻ cells to develop suppressive activity: the role of IL-2, TGF-beta, and IL-10. *J Immunol* 2004; 172: 5213-5221 [PMID: 15100259]
- 46 Gravano DM, Vignali DA. The battle against immunopathology: infectious tolerance mediated by regulatory T cells. *Cell Mol Life Sci* 2012; 69: 1997-2008 [PMID: 22205213 DOI: 10.1007/s00018-011-0907-z]
- 47 Kilshaw PJ, Brent L, Pinto M. Suppressor T cells in mice made unresponsive to skin allografts. *Nature* 1975; 255: 489-491 [PMID: 1094296]
- 48 Shalev I, Selzner N, Shyu W, Grant D, Levy G. Role of regulatory T cells in the promotion of transplant tolerance. *Liver Transpl* 2012; 18: 761-770 [PMID: 22523007 DOI: 10.1002/lt.23458]
- 49 Myburgh JA, Smit JA, Stark JH, Browde S. Total lymphoid irradiation in kidney and liver transplantation in the baboon: prolonged graft survival and alterations in T cell subsets with low cumulative dose regimens. *J Immunol* 1984; 132: 1019-1025 [PMID: 6228586]
- 50 Fujiki M, Esquivel CO, Martinez OM, Strober S, Uemoto S, Krams SM. Induced tolerance to rat liver allografts involves the apoptosis of intragraft T cells and the generation of CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T regulatory cells. *Liver Transpl* 2010; 16: 147-154 [PMID: 20104482 DOI: 10.1002/lt.21963]
- 51 Sato Y, Chikako T, Oya H, Yamamoto S, Kokai H, Miura K, Hatakeyama K. Regulatory T-cell activation among patients who displayed operational tolerance following intra-portal administration of donor-specific antigens in living donor liver transplantation. *Transplant Proc* 2012; 44: 560-564 [PMID: 22410069 DOI: 10.1016/j.transproceed.2012.01.045]
- 52 Abe Y, Urakami H, Ostanin D, Zibari G, Hayashida T, Kitagawa Y, Grisham MB. Induction of Foxp3-expressing regulatory T-cells by donor blood transfusion is required for tolerance to rat liver allografts. *PLoS One* 2009; 4: e7840 [PMID: 19956764 DOI: 10.1371/journal.pone.0007840]
- 53 Li X, Li JJ, Yang JY, Wang DS, Zhao W, Song WJ, Li WM, Wang JF, Han W, Zhang ZC, Yu Y, Cao DY, Dou KF. Tolerance induction by exosomes from immature dendritic cells and rapamycin in a mouse cardiac allograft model. *PLoS One* 2012; 7: e44045 [PMID: 22952868 DOI: 10.1371/journal.pone.0044045]
- 54 Wang GY, Yang Y, Li H, Zhang J, Li MR, Zhang Q, Chen GH. Rapamycin combined with donor immature dendritic cells promotes liver allograft survival in association with CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cell expansion. *Hepatol Res* 2012; 42: 192-202 [PMID: 22103959 DOI: 10.1111/j.1872-034X.2011.00909.x]
- 55 Lu L, Qian XF, Rao JH, Wang XH, Zheng SG, Zhang F. Rapamycin promotes the expansion of CD4⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells after liver transplantation. *Transplant Proc* 2010; 42: 1755-1757 [PMID: 20620516 DOI: 10.1016/j.transproceed.2009.10.008]
- 56 Jiang G, Yang HR, Wang L, Wildey GM, Fung J, Qian S, Lu L. Hepatic stellate cells preferentially expand allogeneic CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ regulatory T cells in an IL-2-dependent manner. *Transplantation* 2008; 86: 1492-1502 [PMID: 19077880 DOI: 10.1097/TP.0b013e318181bdf13]
- 57 Xia X, Chen W, Ma T, Xu G, Liu H, Liang C, Bai X, Zhang Y, He Y, Liang T. Mesenchymal stem cells administered after liver transplantation prevent acute graft-versus-host disease in rats. *Liver Transpl* 2012; 18: 696-706 [PMID: 22344929 DOI: 10.1002/lt.23414]
- 58 Cheng J, Zhou L, Qin YS, Wang Y, Xie HY, Feng XW, Zheng SS. Donor apoptotic lymphocyte transfusion-induced liver allograft tolerance by up-regulation of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in peripheral blood. *Transplant Proc* 2009; 41: 3893-3897 [PMID: 19917407 DOI: 10.1016/j.transproceed.2009.05.033]
- 59 Li W, Kuhr CS, Zheng XX, Carper K, Thomson AW, Reyes JD, Perkins JD. New insights into mechanisms of spontaneous liver transplant tolerance: the role of Foxp3-expressing CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells. *Am J Transplant* 2008; 8: 1639-1651 [PMID: 18557727 DOI: 10.1111/j.1600-6143.2008.02300.x]
- 60 Li J, Lai X, Liao W, He Y, Liu Y, Gong J. The dynamic changes of Th17/Treg cytokines in rat liver transplant rejection and tolerance. *Int Immunopharmacol* 2011; 11: 962-967 [PMID: 21376155 DOI: 10.1016/j.intimp.2011.02.010]
- 61 Zhang Y, Zhao H, Bo L, Yang Y, Lu X, Sun J, Wen J, He X, Yin G. Total body irradiation of donors can alter the course of tolerance and induce acute rejection in a spontaneous tolerance rat liver transplantation model. *Sci China Life Sci* 2012; 55: 774-781 [PMID: 23015125 DOI: 10.1007/s11427-012-4370-3]
- 62 Pu LY, Wang XH, Zhang F, Li XC, Yao AH, Yu Y, Lv L, Li GQ. Adoptive transfusion of ex vivo donor alloantigen-stimulated CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells ameliorates rejection of DA-to-Lewis rat liver transplantation. *Surgery* 2007; 142: 67-73 [PMID: 17630002 DOI: 10.1016/j.surg.2007.02.014]
- 63 Yurchenko E, Shio MT, Huang TC, Da Silva Martins M, Szyf M, Levings MK, Olivier M, Piccirillo CA. Inflammation-driven reprogramming of CD4⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells into pathogenic Th1/Th17 T effectors is abrogated by mTOR inhibition in vivo. *PLoS One* 2012; 7: e35572 [PMID: 22545118 DOI: 10.1371/journal.pone.0035572]
- 64 Lan Q, Fan H, Quesniaux V, Ryffel B, Liu Z, Zheng SG. Induced Foxp3⁺ regulatory T cells: a potential new weapon to treat autoimmune and inflammatory diseases? *J Mol Cell Biol* 2012; 4: 22-28 [PMID: 22107826 DOI: 10.1093/jmcb/mjr039]
- 65 Feng M, Wang Q, Zhang F, Lu L. Ex vivo induced regulatory T cells regulate inflammatory response of Kupffer cells by TGF-beta and attenuate liver ischemia reperfusion injury. *Int Immunopharmacol* 2012; 12: 189-196 [PMID: 22155100 DOI: 10.1016/j.intimp.2011.11.010]
- 66 Levitsky J, Mathew JM, Abecassis M, Tambur A, Leventhal J, Chandrasekaran D, Herrera N, Al-Saden P, Gallon L, Abdul-Nabi A, Yang GY, Kurian SM, Salomon DR, Miller J. Systemic immunoregulatory and proteogenomic effects of tacrolimus to sirolimus conversion in liver transplant recipients. *Hepatology* 2013; 57: 239-248 [PMID: 22234876 DOI: 10.1002/hep.25579]
- 67 Zeiser R, Leveson-Gower DB, Zambricki EA, Kamb-

- ham N, Beilhack A, Loh J, Hou JZ, Negrin RS. Differential impact of mammalian target of rapamycin inhibition on CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells compared with conventional CD4+ T cells. *Blood* 2008; 111: 453-462 [PMID: 17967941 DOI: 10.1182/blood-2007-06-094482]
- 68 Tresoldi E, Dell'Albani I, Stabilini A, Jofra T, Valle A, Gagliani N, Bondanza A, Roncarolo MG, Battaglia M. Stability of human rapamycin-expanded CD4+CD25+ T regulatory cells. *Haematologica* 2011; 96: 1357-1365 [PMID: 21565906 DOI: 10.3324/haematol.2011.041483]
- 69 Hester J, Schiopu A, Nadig SN, Wood KJ. Low-dose rapamycin treatment increases the ability of human regulatory T cells to inhibit transplant arteriosclerosis in vivo. *Am J Transplant* 2012; 12: 2008-2016 [PMID: 22500984 DOI: 10.1111/j.1600-6143.2012.04065.x]
- 70 Sauer S, Bruno L, Hertweck A, Finlay D, Leleu M, Spivakov M, Knight ZA, Cobb BS, Cantrell D, O'Connor E, Shokat KM, Fisher AG, Merken-schlager M. T cell receptor signaling controls Foxp3 expression via PI3K, Akt, and mTOR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 7797-7802 [PMID: 18509048 DOI: 10.1073/pnas.0800928105]
- 71 Shi LZ, Wang R, Huang G, Vogel P, Neale G, Green DR, Chi H. HIF1alpha-dependent glycolytic pathway orchestrates a metabolic checkpoint for the differentiation of TH17 and Treg cells. *J Exp Med* 2011; 208: 1367-1376 [PMID: 21708926 DOI: 10.1084/jem.20110278]

编辑 田滢 电编 鲁亚静



uPA/uPAR系统在肿瘤中作用的研究进展

尚润泽, 戴斌, 王德盛

尚润泽, 戴斌, 王德盛, 中国人民解放军第四军医大学西京医院肝胆外科 陕西省西安市 710032

尚润泽, 在读硕士, 主要从事肝癌侵袭与转移机制的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 81030010

陕西省科技研究发展计划基金资助项目 No. 2012FS2-09-1

作者贡献分布: 本文综述由尚润泽与戴斌共同完成; 由王德盛审校。

通讯作者: 王德盛, 教授, 710032, 陕西省西安市长乐西路15号, 中国人民解放军第四军医大学西京医院肝胆外科。

wangdesh@163.com

电话: 029-84775259

收稿日期: 2013-12-30 修回日期: 2014-01-29

接受日期: 2014-02-18 在线出版日期: 2014-03-28

Role of uPA/uPAR system in tumors

Run-Ze Shang, Bin Dai, De-Sheng Wang

Run-Ze Shang, Bin Dai, De-Sheng Wang, Department of Hepatobiliary Surgery, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 81030010; Shaanxi Provincial Science and Technology Research and Development Program Funded Projects, No. 2012FS2-09-1

Correspondence to: De-Sheng Wang, Professor, Department of Hepatobiliary Surgery, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University, 15 Changle West Road, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China. wangdesh@163.com

Received: 2013-12-30 Revised: 2014-01-29

Accepted: 2014-02-18 Published online: 2014-03-28

Abstract

Urokinase type plasminogen activator (uPA) is a major activator of plasminogen, and uPA receptor is the specific receptor of uPA. The uPA/uPAR system regulates plasminogen activity, which participates in degradation and remodeling of the extracellular matrix (ECM), and is involved in many pathophysiological processes. In neoplasms, the activation of plasminogen into plasmin caused by the uPA/uPAR system induces the degradation of components in the basement membrane as well as in the ECM, which provides a favorable microenvironment for tumor invasion and metastasis. In addition, the uPA/uPAR system regulates tumor proliferation and angiogenesis. In this review, we will discuss the role of the uPA/uPAR system in tumors and its potential clinical implications.

© 2014 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

Key Words: urokinase type plasminogen activator/urokinase type plasminogen activator receptor system; Tumors; Urokinase type plasminogen activator; Plasminogen

Shang RZ, Dai B, Wang DS. Role of uPA/uPAR system in tumors. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(9): 1235-1240
URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/1235.asp>
DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i9.1235>

摘要

尿激酶型纤溶酶原激活物(urokinase type plasminogen activator, uPA)是纤溶酶原的重要激活物之一, 其特异性受体为纤溶酶原激活物受体(urokinase type plasminogen activator receptor, uPAR)。大量研究表明, uPA/uPAR系统对纤溶酶原活性起调控作用, 参与多种与细胞外基质降解、重塑相关的病理生理过程。肿瘤组织中, 在uPA/uPAR系统的作用下将纤溶酶原激活为纤溶酶, 促进基底膜和细胞外基质内相关成分的降解, 为肿瘤的侵袭、转移提供有利微环境。此外, uPA/uPAR系统对于肿瘤的增殖及肿瘤血管形成也具有调控作用。本文就uPA/uPAR系统在肿瘤中的作用及其临床意义做一综述。

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词: 尿激酶型纤溶酶原激活物/纤溶酶原激活物受体系统; 肿瘤; 尿激酶型纤溶酶原激活物; 纤溶酶原

核心提示: 尿激酶型纤溶酶原激活物(urokinase type plasminogen activator)/纤溶酶原激活物受体(urokinase type plasminogen activator receptor)系统的表达受到多种细胞因子及促癌因子的调节, 与多条肿瘤相关信号通路之间密切作用, 其作用贯穿于肿瘤的增殖、侵袭转移及肿瘤血管生成的各个环节, 是研究肿瘤进展机制和肿瘤诊断及治疗的重要靶点。

尚润泽, 戴斌, 王德盛. uPA/uPAR系统在肿瘤中作用的研究进

■背景资料

尿激酶型纤溶酶原激活物(urokinase type plasminogen activator, uPA)是纤溶酶原的重要激活物之一, uPA/纤溶酶原激活物受体(urokinase type plasminogen activator receptor, uPAR)系统对纤溶酶原活性起调控作用, 参与多种与细胞外基质降解、重塑相关的病理生理过程。在肿瘤中, uPA/uPAR系统通过促进基底膜和细胞外基质内相关成分的降解, 为肿瘤的侵袭、转移提供有利微环境, 是肿瘤研究的热点。

■同行评议者

朴龙镇, 副教授, 延边大学附属医院肿瘤科

■ 研发前沿

uPA/uPAR系统的表达受到多种激素、细胞因子及促癌因子的调节,并与多条肿瘤相关信号通路之间密切作用,在肿瘤的增殖、侵袭转移及肿瘤血管生成等方面全面发挥作用,但其具体分子机制尚不明确。

展. 世界华人消化杂志 2014; 22(9): 1235-1240 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/1235.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i9.1235>

0 引言

自上世纪70年代第1次在肿瘤中提取出尿激酶型纤溶酶原激活物(urokinase type plasminogen activator, uPA)以来, uPA/纤溶酶原激活物受体(urokinase type plasminogen activator receptor, uPAR)系统在肿瘤中的作用越来越受到关注. uPA/uPAR系统由uPA、uPAR以及纤溶酶原激活物抑制物(plasminogen activator inhibitors, PAIs)共同组成. 回顾既往文献[1-4]发现, uPA/uPAR系统可通过降解细胞外基质和基底膜促进肿瘤细胞的侵袭与转移. 近年来研究发现, uPA/uPAR系统的表达受到多种激素、细胞因子及促癌因子的调节^[5,6], 并与多条肿瘤相关信号通路之间密切作用, 在肿瘤的增殖、侵袭转移及肿瘤血管生成等方面全面发挥作用. 同时uPA/uPAR系统用于肿瘤标志物及作为潜在治疗靶向的研究日益受到重视.

1 uPA/uPAR系统概述

1.1 uPA uPA是一种特异性较强的丝氨酸蛋白酶. 最初分泌的uPA, 其结构为单链的pro-uPA, 称为单链尿激酶纤溶酶原激活剂(scuPA)^[7], 该蛋白分子内包含3个结构域: 生长因子结构域、催化结构域和Kringle结构域^[8-10]. 在纤溶酶、组织蛋白酶等酶的作用下, pro-uPA在158Lys-159Ile位点处酶解, 酶解后的两条单链通过二硫键结合成为有活性的双链尿激酶^[11]. 在黏附细胞中, uPA几乎都分布于细胞与细胞间或细胞与细胞外基质间接接触的部位^[12]. 活性uPA可单独激活纤溶酶原或与uPAR相结合, 参与基底膜与细胞外基质降解, 在生理性细胞迁移和肿瘤细胞转移中发挥作用.

1.2 uPAR uPAR是一种单链膜糖蛋白受体, 他通过碳端的糖基磷脂酰肌醇锚定于细胞表面, 并在磷脂酰肌醇特异性的磷脂酶C作用下释放. 成熟uPAR含3个同源结构域: D1、D2、D3. 其中D1与抗原决定簇相关, D2、D3与定位于细胞膜有关, 最新报道显示D3结构域的uPAR/a5β1作用位点在新血管生成的过程中十分重要^[13]. uPAR与uPA特异性结合, 使纤溶酶原的激活增强, 加速细胞外基质降解, 便于细胞迁移. 报道^[14]显示, 在乳腺癌中uPA-uPAR复合物对于维持和放大纤溶酶活性是必要的. 此外, uPAR也可与被

PAI-1抑制的uPA结合, 共同组成uPAR-uPA-PAI复合物, 该复合物在体内被迅速内吞降解, 释放出的uPAR被循环利用, 出现在细胞表面的不同位点^[6,15], 这一过程在细胞迁移中起重要作用. 当uPAR从细胞表面脱落进入血液循环则成为可溶性uPAR(suPAR), suPAR的循环浓度在急性感染时显著增高^[16], 也有研究发现其血浆浓度变化可能与肿瘤相关^[17].

1.3 PAIs PAIs包括PAI-1、PAI-2. 目前认为, PAI-1与肿瘤的关系更为密切. PAI-1是52 kDa大小的糖蛋白, 属于丝氨酸蛋白酶抑制剂家族(serine protease inhibitor, serpin)成员之一. 他可由内皮细胞、肝细胞、血管平滑肌细胞及多种肿瘤细胞合成. 血浆中PAI-1水平具有昼夜节律, 清晨较高, 但其整体水平与机体纤维蛋白溶解活性相一致. 血浆PAI-1水平异常升高可见于代谢综合征、炎症状态及肿瘤^[18]. 肿瘤中PAI-1表现为双重作用, 首先PAI-1作为uPA的特异性抑制剂与玻连蛋白等多种细胞外基质蛋白关系密切, 调节细胞外基质的降解平衡, 具有抑制肿瘤侵袭作用; 另一方面PAI-1又可能通过抑制肿瘤细胞和血管平滑肌凋亡, 从而促进肿瘤生长和肿瘤血管形成^[19,20].

2 uPA/uPAR系统与肿瘤

2.1 uPA/uPAR系统与肿瘤增殖 uPA与uPAR在正常细胞和肿瘤细胞的增殖中都发挥作用. 研究显示, uPA可通过激活肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)促进肝细胞的增殖^[21], 此外uPA能够诱导一些增殖信号通路的级联反应, 如信号转导与转录激活因子3(signal transducer and activator of transcription, Stat3)通路、细胞外信号调节激酶1/2(extracellular signal-regulated kinase 1/2, ERK1/2)通路、磷脂酰肌醇3激酶/蛋白激酶B(phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B, PI3K/Akt)通路^[22-25]. 在肝癌HEp3肿瘤细胞系中抑制uPAR表达, 可破坏uPAR/integrin偶联, 抑制MAPK通路并迫使肿瘤细胞进入休眠状态、停留在细胞周期的G₀/G₁时相^[26]. 另外, Gogineni等^[25]发现, 体外shRNA转染抑制uPAR的表达可下调脑膜瘤细胞中TGF-β1信号诱导的肿瘤细胞增殖信号通路. 由此不难看出, uPA与uPAR对于肿瘤细胞增殖状态的维持发挥着重要作用. PAI-1在一些肿瘤中同时起促进增殖和抑制凋亡作用^[19,26], 但在不同肿瘤细胞系中的作用及机制并不确定. 一项关于结肠癌的研究发现,

间充质干细胞分泌的高浓度PAI-1可促进HT29肿瘤细胞系增殖, 但对于HCT-116肿瘤细胞系并无显著影响^[27]. Lara等^[28]对43例宫颈癌标本进行一系列研究提出, PAI-1过表达可能通过增加突变型P53和cyclin D1的表达从而抑制肿瘤细胞进入凋亡周期, 进而促进肿瘤生长. 可见, PAI-1在肿瘤增殖与凋亡中的确切作用和机制还需进一步深入研究.

2.2 uPA/uPAR系统与肿瘤侵袭转移 uPA/uPAR系统在肿瘤侵袭转移中的作用不仅限于对细胞外基质和基底膜的降解, 还涉及许多复杂的分子机制, 多条与肿瘤侵袭转移密切相关的信号通路牵涉其中. uPA能够直接催化纤溶酶原的激活, 后者进一步降解多种细胞外基质中的蛋白质, 例如纤连蛋白(fibronectin, FN)、玻连蛋白(vitronectin, VN)等, 同时也能催化激活多种基质金属蛋白酶的酶原, 进一步降解细胞外基质成分^[29,30], 上述步骤为肿瘤细胞向深部组织播散及侵入循环并最终形成远处转移提供了有利条件. 吴畅等^[31]研究发现, uPA在肝癌组织中的表达相较癌旁组织和正常肝组织显著增高, 且其高表达与肝门静脉处癌栓形成和肿瘤侵及肝被膜关系密切; 此外有研究显示uPA的表达与结肠癌侵袭、转移密切相关^[32]. 这些研究进一步印证了uPA在肿瘤侵袭转移中可能发挥重要作用. 近年研究^[33]发现uPA可作为独立配体直接激活Notch受体、调控Notch信号通路活性, 影响脑胶质瘤的侵袭性, 这一发现为理解uPA在调控肿瘤侵袭转移中的机制提供了新的思路. uPAR与uPA特异结合除了进一步激活细胞外基质降解相关进程外, 还可通过激活Src、Raf、FAK、ERK、MAPK等多种在肿瘤演进中起重要作用的信号通路, 实现对肿瘤细胞侵袭转移的调控^[34-36]. 研究表明, ERK信号通路是甲状腺乳头状瘤发生发展的中心信号通路, 而uPAR可通过激活ERK通路促进甲状腺癌的侵袭转移^[36]. 另有研究显示, uPA-uPAR复合物和ERK可通过中间信号通路相互激活并组成正反馈环路, 维持肿瘤细胞的高增殖性与侵袭性^[14]. 此外, 有报道显示uPA/uPAR系统与MAPK、核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)通路的相互作用促进结肠癌、乳腺癌、宫颈癌等多种肿瘤的侵袭转移^[30,37,38]. 在星形胶质瘤细胞中, 通过激活Ras/Raf/MEK信号可以增加uPA的表达, 促进肿瘤转移^[39]. 可见uPA/uPAR系统可能处于多条与肿瘤侵袭转移相关的信号分子或通路的交叉点, 这意味着uPA/uPAR系统可能会成

为一个重要的潜在治疗靶点.

2.3 uPA/uPAR系统与肿瘤血管生成 不论在生理或病理情况下, 新生血管形成的起始步骤都需要内皮细胞在局部降解基底膜, 为其迁移和侵袭开辟一条道路. 在这个过程中受uPA/uPAR系统调控的纤溶酶的活性起到重要作用. 首先, pro-uPA可在细胞表面uPAR的生长因子位点与uPAR受体结合, 促进pro-uPA激活为uPA, 后者激活纤溶酶原为活性纤溶酶, 进而激活基质金属蛋白酶参与基底膜降解, 上述步骤形成正反馈环路促进细胞表面基底膜与细胞外基质的降解, 而该环路的激活受到PAI-1的抑制调节^[13]. 此外, uPA-uPAR复合体水平上调可通过促进E-cadherin的降解增加血管通透性, 促进血管内皮细胞的游走迁移, 这对于血管出芽生长也是有利的^[40]. 众所周知, 血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是启动血管生成的中心调节因子, 大量研究^[13,41-43]显示, uPA/uPAR系统参与了VEGF对血管生成的调节. 因此, 目前对于uPA/uPAR系统在血管生成机制的研究多与VEGF相结合. Jiang等^[44]发现, 食管癌中uPA与VEGF的表达具有一致性, 特别是在高微血管密度(microvessel density, MVD)组中两者蛋白质的表达显著增高, 进一步分析发现VEGF与uPA在食道癌肿瘤血管形成中起协同作用并相互调节: 即高水平的uPA可能通过上调VEGF或直接激活VEGF诱导肿瘤血管生成, 而高水平的VEGF进一步通过上调uPA水平增加细胞外基质的降解. 可见, uPA与VEGF可能组成正反馈通路, 该通路的激活使细胞外基质和血管基底膜快速降解, 为内皮细胞的迁移和增殖及肿瘤血管生成提供了有利的微环境. 研究^[26]表明, 通过抑制PAI-1, 可以抑制移植瘤模型中膀胱癌细胞系和宫颈癌细胞系中的肿瘤血管形成, 这提示PAI-1在肿瘤血管形成中可能发挥促进作用. Fang等^[19]则认为PAI-1促进肿瘤血管形成的可能机制为其抑制了血管平滑肌的凋亡.

总之, uPA/uPAR系统在肿瘤的发展中发挥着全面的作用. 近年发现uPA可能处在与肿瘤发展密切相关的多个分子与通路的中心, 这确立了uPA在肿瘤演进机制研究中的关键地位, 同时也为将uPA/uPAR系统作为肿瘤治疗的中心靶点提供了依据.

3 uPA/uPAR系统在肿瘤中的临床意义

uPA/uPAR系统在肿瘤诊断、判断肿瘤预后等方面

■ 相关报道

近年研究发现uPA/uPAR系统的成分可以直接激活包括Notch信号通路在内的多条与肿瘤侵袭转移密切相关的信号调节通路, 为阐明该系统在肿瘤侵袭转移中的具体机制提供了新的研究思路.

■创新盘点

本文对近年来uPA/uPAR系统参与的与肿瘤增殖及侵袭转移相关的分子信号通路进行总结和简介,并对近期uPA/uPAR系统在临床应用探索工作做出归纳和展望。

有一定的意义,但该系统各成分在不同类型肿瘤中的表达意义存在差异^[45-49]。对7例胃癌腹膜转移患者的研究发现:7例CEA阳性的转移癌患者腹膜内转移灶中uPA、uPAR以及PAI-1的水平相较正常腹膜组显著增高,更重要的是,在CEA阴性的4例和CEA阳性的3例转移癌病灶外正常腹膜组织中,uPA、uPAR及PAI-1水平均高于正常,由此可见,相较于CEA,uPA/uPAR成分的测定在一些亚临床胃癌腹膜转移患者的诊断中可能具有更高的价值^[46]。另外,研究发现uPA和PAI-1在甲状腺癌组织中的浓度都显著高于正常甲状腺组织,而发生了甲状腺外侵袭、远处转移者uPA和PAI-1的浓度更高,进一步分析显示:uPA和PAI-1可作为甲状腺癌远处转移的独立预测因子^[47]。而Ren等^[48]对卵巢癌中的肝癌缺失基因1(deleted in liver cancer 1, DLC1)和PAI-1进行分析,发现PAI-1在卵巢癌组织中显著升高而DLC1显著下降,但DLC1水平与国际妇产科协会(Federation International Of Gynecology And Obstetrics, FIGO)肿瘤分级、腹水和淋巴结转移都密切相关,但PAI-1只与FIGO分级相关,在所有患者中DLC1低表达与PAI-1高表达同时存在者预后最差,因此认为PAI-1只有与DLC1结合才能对卵巢癌预后做出准确判断。Fidan等^[17]对胃癌患者和正常人血浆中suPAR进行对比分析发现,胃癌患者血浆suPAR水平显著高于正常人,且其水平越高肿瘤发生侵袭转移的可能性越大。一项关于非小细胞肺癌的研究^[49]也提示了suPAR高水平与不良预后间存在关联。可见血浆suPAR水平有可能作为肿瘤辅助诊断与判断预后的标志物,但仍需更大规模的研究以评判其临床应用的可行性。另一些研究则着眼于PAI-1的基因多态性分析在判断肿瘤预后中的意义。一项针对253例口腔癌患者PAI-1等位基因的研究发现,患者基因型为4G/5G或5G/5G者相较于4G/4G基因型者发展为临床III期或IV期肿瘤以及伴有淋巴结转移的风险低^[50]。而Lee等^[51]发现PAI-1启动子为4G/4G基因型的人群患乳腺癌的风险轻度增加,5G/5G基因型则与乳腺癌淋巴结转移相关,而4G/5G基因型在乳腺癌中的意义尚不明确。总之,尽管uPA/uPAR系统在不同肿瘤组织中的临床意义略有差别,还需要在更多肿瘤类型中进行深入研究加以明确,但不论在分子水平还是基因水平,uPA/uPAR系统在肿瘤诊断、判断肿瘤预后等方面都显示出了一定的潜力。

4 结论

uPA/uPAR系统在细胞外基质和基底膜降解中的调控作用与肿瘤侵袭转移密切相关,这是我们研究其在肿瘤中作用最初切入点。近年的研究发现,uPA/uPAR系统在肿瘤中的作用贯穿于肿瘤演进过程中的各个方面,并可能处于肿瘤相关的多种分子与信号通路的调节中心,这奠定了以该系统作为靶向治疗中心的基础。尽管目前对于uPA/uPAR系统在肿瘤中作用的研究取得了一些成就,但具体机制还需进一步明确和完善。此外,大多针对uPA/uPAR系统的研究结论都来源于体外实验和动物实验的结果,因此还需要进行更多关于该系统的深入研究。

5 参考文献

- 1 de Bock CE, Wang Y. Clinical significance of urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR) expression in cancer. *Med Res Rev* 2004; 24: 13-39 [PMID: 14595671 DOI: 10.1002/med.10054]
- 2 Liotta LA, Kohn EC. The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature* 2001; 411: 375-379 [PMID: 11357145 DOI: 10.1038/35077241]
- 3 Duffy MJ. The urokinase plasminogen activator system: role in malignancy. *Curr Pharm Des* 2004; 10: 39-49 [PMID: 14754404 DOI: 10.2174/1381612043453559]
- 4 Dutta S, Bandyopadhyay C, Bottero V, Veettil MV, Wilson L, Pins MR, Johnson KE, Warshall C, Chandran B. Angiogenin interacts with the plasminogen activation system at the cell surface of breast cancer cells to regulate plasmin formation and cell migration. *Mol Oncol* 2014 Jan 4. [Epub ahead of print] [PMID: 24457100 DOI: 10.1016/j.molonc.2013.12.017]
- 5 Montuori N, Cosimato V, Rinaldi L, Rea VE, Alfano D, Ragno P. uPAR regulates pericellular proteolysis through a mechanism involving integrins and fMLF-receptors. *Thromb Haemost* 2013; 109: 309-318 [PMID: 23238745 DOI: 10.1160/TH12-08-0546]
- 6 Poettler M, Unseld M, Mihaly-Bison J, Uhrin P, Koban F, Binder BR, Zielinski CC, Prager GW. The urokinase receptor (CD87) represents a central mediator of growth factor-induced endothelial cell migration. *Thromb Haemost* 2012; 108: 357-366 [PMID: 22782499 DOI: 10.1160/TH11-12-0868]
- 7 Järvinen HM, Laakkonen L, Haiko J, Johansson T, Juuti K, Suomalainen M, Buchrieser C, Kalkkinen N, Korhonen TK. Human single-chain urokinase is activated by the ompTins PgtE of *Salmonella enterica* and Pla of *Yersinia pestis* despite mutations of active site residues. *Mol Microbiol* 2013; 89: 507-517 [PMID: 23763588 DOI: 10.1111/mmi.12293]
- 8 Beloglazova IB, Beabealashvili RSh, Gursky YG, Bocharov EV, Mineev KS, Parfenova EV, Tkachuk VA. Structural investigations of recombinant urokinase growth factor-like domain. *Biochemistry (Mosc)* 2013; 78: 517-530 [PMID: 23848154 DOI: 10.1134/S0006297913050106]
- 9 Takada Y. Potential role of kringle-integrin interac-

- tion in plasmin and uPA actions (a hypothesis). *J Biomed Biotechnol* 2012; 2012: 136302 [PMID: 23125522 DOI: 10.1155/2012/136302]
- 10 Bager R, Kristensen TK, Jensen JK, Szczur A, Christensen A, Andersen LM, Johansen JS, Larsen N, Baatrup E, Huang M, Ploug M, Andreassen PA. Urokinase-type plasminogen activator-like proteases in teleosts lack genuine receptor-binding epidermal growth factor-like domains. *J Biol Chem* 2012; 287: 27526-27536 [PMID: 22733817 DOI: 10.1074/jbc.M112.369207]
- 11 Choong PF, Nadesapillai AP. Urokinase plasminogen activator system: a multifunctional role in tumor progression and metastasis. *Clin Orthop Relat Res* 2003; (415 Suppl): S46-S58 [PMID: 14600592 DOI: 10.1097/01.blo0000093845.72468.bd]
- 12 Sidenius N, Blasi F. The urokinase plasminogen activator system in cancer: recent advances and implication for prognosis and therapy. *Cancer Metastasis Rev* 2003; 22: 205-222 [PMID: 12784997 DOI: 10.1023/A:1023099415940]
- 13 Breuss JM, Uhrin P. VEGF-initiated angiogenesis and the uPA/uPAR system. *Cell Adh Migr* 2012; 6: 535-615 [PMID: 23076133 DOI: 10.4161/cam.22243]
- 14 Luo J, Sun X, Gao F, Zhao X, Zhong B, Wang H, Sun Z. Effects of ulinastatin and docetaxel on breast cancer invasion and expression of uPA, uPAR and ERK. *J Exp Clin Cancer Res* 2011; 30: 71 [PMID: 21798065 DOI: 10.1186/1756-9966-30-71]
- 15 McMahon B, Kwaan HC. The plasminogen activator system and cancer. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2008; 36: 184-194 [PMID: 19176991 DOI: 10.1159/000175156]
- 16 Mussap M, Noto A, Cibecchini F, Fanos V. The importance of biomarkers in neonatology. *Semin Fetal Neonatal Med* 2013; 18: 56-64 [PMID: 23164809 DOI: 10.1016/j.siny.2012.10.006]
- 17 Fidan E, Mentese A, Ozdemir F, Deger O, Kavgaci H, Caner Karahan S, Aydin F. Diagnostic and prognostic significance of CA IX and suPAR in gastric cancer. *Med Oncol* 2013; 30: 540 [PMID: 23512428 DOI: 10.1007/s12032-013-0540-9]
- 18 Vaughan DE, De Taeye BM, Eren M. PAI-1 antagonists: predictable indications and unconventional applications. *Curr Drug Targets* 2007; 8: 962-970 [PMID: 17896947 DOI: 10.2174/138945007781662364]
- 19 Fang H, Placencio VR, DeClerck YA. Protumorigenic activity of plasminogen activator inhibitor-1 through an antiapoptotic function. *J Natl Cancer Inst* 2012; 104: 1470-1484 [PMID: 22984202 DOI: 10.1093/jnci/djs377]
- 20 Rossignol P, Anglès-Cano E, Lijnen HR. Plasminogen activator inhibitor-1 impairs plasminogen activation-mediated vascular smooth muscle cell apoptosis. *Thromb Haemost* 2006; 96: 665-670 [PMID: 17080225 DOI: 10.1160/TH06-06-0321]
- 21 Park ES, Park YK, Shin CY, Park SH, Ahn SH, Kim DH, Lim KH, Kwon SY, Kim KP, Yang SI, Seong BL, Kim KH. Hepatitis B virus inhibits liver regeneration via epigenetic regulation of urokinase-type plasminogen activator. *Hepatology* 2013; 58: 762-776 [PMID: 23483589 DOI: 10.1002/hep.26379]
- 22 Shetty S, Rao GN, Cines DB, Bdeir K. Urokinase induces activation of STAT3 in lung epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006; 291: L772-L780 [PMID: 16751220 DOI: 10.1152/ajplung.00476.2005]
- 23 Stewart AG, Xia YC, Harris T, Royce S, Hamilton JA, Schuliga M. Plasminogen-stimulated airway smooth muscle cell proliferation is mediated by urokinase and annexin A2, involving plasmin-activated cell signalling. *Br J Pharmacol* 2013; 170: 1421-1435 [PMID: 24111848 DOI: 10.1111/bph.12422]
- 24 Ulisse S, Baldini E, Sorrenti S, D'Armiento M. The urokinase plasminogen activator system: a target for anti-cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets* 2009; 9: 32-71 [PMID: 19200050 DOI: 10.2174/156800909787314002]
- 25 Gogineni VR, Gupta R, Nalla AK, Velpula KK, Rao JS. uPAR and cathepsin B shRNA impedes TGF- β 1-driven proliferation and invasion of meningioma cells in a XIAP-dependent pathway. *Cell Death Dis* 2012; 3: e439 [PMID: 23222509 DOI: 10.1038/cd-dis.2012.170]
- 26 Gomes-Giacoa E, Miyake M, Goodison S, Rosser CJ. Targeting plasminogen activator inhibitor-1 inhibits angiogenesis and tumor growth in a human cancer xenograft model. *Mol Cancer Ther* 2013; 12: 2697-2708 [PMID: 24072883 DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-13-0500]
- 27 Hogan NM, Joyce MR, Murphy JM, Barry FP, O'Brien T, Kerin MJ, Dwyer RM. Impact of mesenchymal stem cell secreted PAI-1 on colon cancer cell migration and proliferation. *Biochem Biophys Res Commun* 2013; 435: 574-579 [PMID: 23685140 DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.05.013]
- 28 Lara PC, Lloret M, Valenciano A, Clavo B, Pinar B, Rey A, Henríquez-Hernández LA. Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) expression in relation to hypoxia and oncoproteins in clinical cervical tumors. *Strahlenther Onkol* 2012; 188: 1139-1145 [PMID: 23111469 DOI: 10.1007/s00066-012-0216-y]
- 29 Lijnen HR. Plasmin and matrix metalloproteinases in vascular remodeling. *Thromb Haemost* 2001; 86: 324-333 [PMID: 11487021]
- 30 Tang L, Han X. The urokinase plasminogen activator system in breast cancer invasion and metastasis. *Biomed Pharmacother* 2013; 67: 179-182 [PMID: 23201006 DOI: 10.1016/j.biopha.2012.10.003]
- 31 吴畅, 刘玉武, 何琼琼, 文继舫, 冯德云. 肝细胞肝癌中 uPA 及 vimentin 蛋白的表达及意义. *中国普通外科杂志* 2013; 22: 469-473
- 32 Sánchez-Tilló E, de Barrios O, Siles L, Amendola PG, Darling DS, Cuatrecasas M, Castells A, Postigo A. ZEB1 Promotes invasiveness of colorectal carcinoma cells through the opposing regulation of uPA and PAI-1. *Clin Cancer Res* 2013; 19: 1071-1082 [PMID: 23340304 DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-2675]
- 33 Raghu H, Gondi CS, Dinh DH, Gujrati M, Rao JS. Specific knockdown of uPA/uPAR attenuates invasion in glioblastoma cells and xenografts by inhibition of cleavage and trafficking of Notch-1 receptor. *Mol Cancer* 2011; 10: 130 [PMID: 22004682 DOI: 10.1186/1476-4598-10-130]
- 34 Blasi F, Sidenius N. The urokinase receptor: focused cell surface proteolysis, cell adhesion and signaling. *FEBS Lett* 2010; 584: 1923-1930 [PMID: 20036661 DOI: 10.1016/j.febslet.2009.12.039]
- 35 Eastman BM, Jo M, Webb DL, Takimoto S, Gonias SL. A transformation in the mechanism by which the urokinase receptor signals provides a selection advantage for estrogen receptor-expressing breast cancer cells in the absence of estrogen. *Cell Signal*

■应用要点

本文研究 uPA / uPAR 系统在肿瘤发生发展中的重要调控作用, 为更好地理解肿瘤进展的分子生物学机制提供了新的思路, 为肿瘤的诊断及治疗提供了新的策略。

■同行评价

本文通过阐述 uPA/uPAR 系统在肿瘤的增殖、肿瘤侵袭、转移及肿瘤血管生成等方面的重要作用,提示 uPA/uPAR 系统贯穿于肿瘤演进过程的各个方面,同时说明该系统与各种肿瘤相关分子与信号传导通路之间的关系。内容新颖、比较完整的阐述了近几年的研究成果,具有一定的科学意义。

- 2012; 24: 1847-1855 [PMID: 22617030 DOI: 10.1016/j.cellsig.2012.05.011]
- 36 Nowicki TS, Zhao H, Darzynkiewicz Z, Moscatello A, Shin E, Schantz S, Tiwari RK, Geliebter J. Down-regulation of uPAR inhibits migration, invasion, proliferation, FAK/PI3K/Akt signaling and induces senescence in papillary thyroid carcinoma cells. *Cell Cycle* 2011; 10: 100-107 [PMID: 21191179 DOI: 10.4161/cc.10.1.14362]
- 37 Liu SQ, Huang JA, Qin MB, Su YJ, Lai MY, Jiang HX, Tang GD. Sphingosine kinase 1 enhances colon cancer cell proliferation and invasion by up-regulating the production of MMP-2/9 and uPA via MAPK pathways. *Int J Colorectal Dis* 2012; 27: 1569-1578 [PMID: 22684547 DOI: 10.1007/s00384-012-1510-y]
- 38 Chou RH, Hsieh SC, Yu YL, Huang MH, Huang YC, Hsieh YH. Fisetin inhibits migration and invasion of human cervical cancer cells by down-regulating urokinase plasminogen activator expression through suppressing the p38 MAPK-dependent NF- κ B signaling pathway. *PLoS One* 2013; 8: e71983 [PMID: 23940799 DOI: 10.1371/journal.pone.0071983]
- 39 Zhao Y, Xiao A, Dipierro CG, Abdel-Fattah R, Amos S, Redpath GT, Carpenter JE, Pieper RO, Hussaini IM. H-Ras increases urokinase expression and cell invasion in genetically modified human astrocytes through Ras/Raf/MEK signaling pathway. *Glia* 2008; 56: 917-924 [PMID: 18383343 DOI: 10.1002/glia.20667]
- 40 Navaratna D, Menicucci G, Maestas J, Srinivasan R, McGuire P, Das A. A peptide inhibitor of the urokinase/urokinase receptor system inhibits alteration of the blood-retinal barrier in diabetes. *FASEB J* 2008; 22: 3310-3317 [PMID: 18559877 DOI: 10.1096/fj.08-110155]
- 41 Alexander RA, Prager GW, Mihaly-Bison J, Uhrin P, Sunzenauer S, Binder BR, Schütz GJ, Freissmuth M, Breuss JM. VEGF-induced endothelial cell migration requires urokinase receptor (uPAR)-dependent integrin redistribution. *Cardiovasc Res* 2012; 94: 125-135 [PMID: 22287577 DOI: 10.1093/cvr/cvs017]
- 42 Uhrin P, Breuss JM. uPAR: a modulator of VEGF-induced angiogenesis. *Cell Adh Migr* 2013; 7: 23-26 [PMID: 23076213 DOI: 10.4161/cam.22124]
- 43 Montuori N, Ragno P. Role of uPA/uPAR in the modulation of angiogenesis. *Chem Immunol Allergy* 2014; 99: 105-122 [PMID: 24217605 DOI: 10.1159/000353310]
- 44 Jiang JT, Zhang LF, Zhou B, Zhang SQ, Li SM, Zhang W, Zhang J, Qiao Z, Kong RR, Ma YF, Chen S. Relationships of uPA and VEGF expression in esophageal cancer and microvascular density with tumorous invasion and metastasis. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012; 13: 3379-3383 [PMID: 22994764 DOI: 10.7314/APJCP.2012.13.7.3379]
- 45 Yang L, Sajja HK, Cao Z, Qian W, Bender L, Marcus AL, Lipowska M, Wood WC, Wang YA. uPAR-targeted optical imaging contrasts as theranostic agents for tumor margin detection. *Theranostics* 2013; 4: 106-118 [PMID: 24396518 DOI: 10.7150/thno.7409]
- 46 Ding Y, Zhang H, Zhong M, Zhou Z, Zhuang Z, Yin H, Wang X, Zhu Z. Clinical significance of the uPA system in gastric cancer with peritoneal metastasis. *Eur J Med Res* 2013; 18: 28 [PMID: 23985164 DOI: 10.1186/2047-783X-18-28]
- 47 Horvatic Herceg G, Herceg D, Kralik M, Kulic A, Bence-Zigman Z, Tomic-Brzac H, Bracic I, Kusacic-Kuna S, Prgommet D. Urokinase plasminogen activator and its inhibitor type-1 as prognostic factors in differentiated thyroid carcinoma patients. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2013; 149: 533-540 [PMID: 23835563 DOI: 10.1177/0194599813496374]
- 48 Ren F, Shi H, Zhang G, Zhang R. Expression of deleted in liver cancer 1 and plasminogen activator inhibitor 1 protein in ovarian carcinoma and their clinical significance. *J Exp Clin Cancer Res* 2013; 32: 60 [PMID: 23988121 DOI: 10.1186/1756-9966-32-60]
- 49 Almasi CE, Høyer-Hansen G, Christensen IJ, Pappot H. Prognostic significance of urokinase plasminogen activator receptor and its cleaved forms in blood from patients with non-small cell lung cancer. *APMIS* 2009; 117: 755-761 [PMID: 19775344 DOI: 10.1111/j.1600-0463.2009.02533.x]
- 50 Weng CJ, Lin CW, Chung TT, Tsai CM, Chen MK, Yang SF. Impact of uPA system gene polymorphisms on the susceptibility of environmental factors to carcinogenesis and the development of clinicopathology of oral cancer. *Ann Surg Oncol* 2011; 18: 805-812 [PMID: 21125336 DOI: 10.1245/s10434-010-1432-2]
- 51 Lee JH, Kim Y, Choi JW, Kim YS. Clinicopathological significance of plasminogen activator inhibitor-1 promoter 4G/5G polymorphism in breast cancer: a meta-analysis. *Arch Med Res* 2013; 44: 39-45 [PMID: 23291383 DOI: 10.1016/j.arcmed.2012.12.002]

编辑 郭鹏 电编 鲁亚静



抵抗素与胰岛素抵抗及肥胖关系的研究进展

陈 信, 张琼方, 何颂华, 张 意, 周时高

陈信, 张琼方, 何颂华, 张意, 周时高, 上海中医药大学附属龙华医院示范科 上海市 200032

陈信, 在读硕士, 主要从事代谢综合征的基础与临床研究。

传统医学示范中心建设基金资助项目, No. ZYSN XD-YL-CTXK

作者贡献分布: 本文综述由陈信完成; 文献搜集由陈信、张琼方及张意完成; 何颂华与周时高审校。

通讯作者: 何颂华, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 200032, 上海市徐汇区宛平南路725号, 上海中医药大学附属龙华医院示范科. songhuahe3032@sina.com

收稿日期: 2013-12-26 修回日期: 2014-01-22

接受日期: 2014-02-03 在线出版日期: 2014-03-28

Role of resistin in insulin resistance and obesity

Xin Chen, Qiong-Fang Zhang, Song-Hua He, Yi Zhang, Shi-Gao Zhou

Xin Chen, Qiong-Fang Zhang, Song-Hua He, Yi Zhang, Shi-Gao Zhou, Department of Demonstration, Longhua Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China

Supported by: the Construction Project of Traditional Medicine Demonstration Center, No. ZYSN XD-YL-CTXK

Correspondence to: Song-Hua He, Professor, Chief Physician, Master Tutor, Department of Demonstration, Longhua Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, 725 Wanping South Road, Xuhui District, Shanghai 200032, China. songhuahe3032@sina.com

Received: 2013-12-26 Revised: 2014-01-22

Accepted: 2014-02-03 Published online: 2014-03-28

Abstract

Resistin is an adipose-derived hormone postulated to link adiposity to insulin resistance. Rodent animal experiments and *in vitro* experimental studies showed that resistin can induce insulin resistance, glucose and lipid metabolism disorders, and be closely related to metabolic syndrome. However, the specific mechanisms of action of resistin in humans are not clear. There is still controversy over the relationship between resistin and obesity. This review aims to elucidate the role of resistin in insulin resistance and discuss the relationship between resistin and obesity.

© 2014 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

Key Words: Resistin; Insulin resistance; Obesity

Chen X, Zhang QF, He SH, Zhang Y, Zhou SG. Role of resistin in insulin resistance and obesity. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(9): 1241-1246 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/1241.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i9.1241>

摘要

抵抗素是由脂肪组织特异表达分泌的细胞因子。在啮齿类动物实验和离体实验研究显示抵抗素可以诱导机体的胰岛素抵抗, 引起糖脂代谢紊乱, 和代谢综合征密切相关。但是抵抗素在人体的作用机制尚需更多的研究, 另外抵抗素和肥胖的关系也有争议, 故本文就抵抗素和胰岛素抵抗及肥胖之间的关系作一综述。

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词: 抵抗素; 胰岛素抵抗; 肥胖

核心提示: 对抵抗素的深入研究会为临床治疗以胰岛素抵抗为中心的代谢综合征提供新的思路和方法, 本文重点综述了抵抗素诱发胰岛素抵抗的机制以及抵抗素与肥胖的关系, 可供科研及临床参考。

陈信, 张琼方, 何颂华, 张意, 周时高. 抵抗素与胰岛素抵抗及肥胖关系的研究进展. *世界华人消化杂志* 2014; 22(9): 1241-1246 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/1241.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i9.1241>

0 引言

当今社会经济发展迅速, 随着人们生活质量的改善和方式的改变, 代谢综合征的发病率日益增高。目前认为胰岛素抵抗是代谢综合征一重要的发病基础, 而导致胰岛素抵抗的原因和具体机制尚不甚明确。近年来, 脂肪细胞的功能和胰岛素抵抗的关系备受重视。抵抗素作为一种脂肪分泌因子在肥胖和胰岛素抵抗的发病过程中发挥着重要的作用。

1 抵抗素概述

1.1 抵抗素的发现 2001年Steppan等^[1]在研究胰

■背景资料

我国代谢综合征的发病率逐年上升, 按WHO或NCEP-ATP III标准, MS患病率在西方普通人群为20%-30%, 我国为12.7%-14.2%。抵抗素在以胰岛素抵抗为中心的MS的发病过程中起着重要的作用。

■同行评议者

何继满, 教授, 南方医科大学南方医院消化研究所

■ 研发前沿

目前关于抵抗素的研究仍集中在啮齿类动物和离体实验上, 研究结论还不一致, 仍有一些问题未解决, 比如抵抗素作用受体及靶器官是什么? 在人体作用的研究以及临床研究中都存在不少争议, 尚需进一步探究。

胰岛素增敏剂噻唑烷二酮类(thiazolidinedione, TZDs)药物的机制时发现了一种由3T3-L1脂肪细胞特异分泌的富含半胱氨酸的蛋白质。由于该蛋白通过抑制胰岛素信号转导通路, 从而导致胰岛素抵抗, 故称之为抵抗素。

1.2 抵抗素的结构 2004年, Arnal等^[2]使用X-射线晶体学方法解析了抵抗素的多聚体结构特性, 发现抵抗素是一种多肽类激素。啮齿类的抵抗素基因位于第8号染色体, 由114个氨基酸残基组成, 共有591个碱基对, 相对分子质量为11 kDa^[3]; 人类的抵抗素基因位于第19号染色体, 由108个氨基酸残基组成, 共有476个碱基对, 相对分子质量为12.5 kDa^[4]。啮齿类和人类编码抵抗素的基因组片段, 在氨基酸水平, 两种蛋白有59%的同源性, 在mRNA水平有64.4%的一致性^[5]。抵抗素是以二硫键连接的同型二聚体, 其二聚作用由一单半胱氨酸残基完成, 其余的10个半胱氨酸残基可能参与分子内的二硫键连接, 形成高度保守的多肽结构^[6]。

1.3 抵抗素的分布 人抵抗素在脂肪组织^[1]、胎盘滋养层细胞^[7]、肝脏^[8]、胰岛细胞^[9]、骨骼肌细胞^[10]、外周血单核细胞和巨噬细胞、人急性白血病细胞、髓系细胞U937和HL60都有分布, 而以外周血单核细胞和巨噬细胞中的抵抗素表达比较丰富^[11]。鼠类的抵抗素分布和人类不同, 由于目前对抵抗素的研究还限于动物和离体实验, 所以关于人抵抗素对胰岛素抵抗及肥胖的作用机制尚有争议。

1.4 抵抗素的表达调控 抵抗素的表达受多种因素的调控。甲状腺激素^[12]、肾上腺素^[13]、异丙肾上腺素^[14]、瘦素、内皮素-1、禁食^[4]、维生素A^[15]等抑制抵抗素mRNA的表达, 而二甲双胍^[16]、生长激素^[17]、地塞米松^[13]、睾酮^[18]、脱氢异雄酮、神经肽Y^[19]、白介素-1(interleukin-1, IL-1)、IL-6、脂多糖^[20]、衰老等因素可以诱导其基因的表达。TZDs^[1,21,22]、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)^[13,14]和胰岛素^[21,23]对抵抗素表达是诱导还是抑制的报道都有, 尚待进一步研究。

2 抵抗素与胰岛素抵抗

2.1 抵抗素诱导的糖代谢异常与胰岛素抵抗

2.1.1 抵抗素诱导肝脏的胰岛素抵抗: 抵抗素通过拮抗空腹状态胰岛素抑制肝糖输出的作用, 导致肝脏胰岛素抵抗。Rajala等^[24]采用正葡钳技术, 给成年雄鼠颈动脉输注重组抵抗素, 结果可

以迅速诱导肝脏的胰岛素抵抗, 肝糖输出增加, 但不会引起外周组织的胰岛素抵抗。Muse等^[25]予小鼠3 wk高脂饮食使其产生胰岛素抵抗, 发现其肝糖产生(glucose production, GP)比正常组增高了2倍。用针对抵抗素mRNA的特异性反义寡核苷酸(antisense oligodeoxynucleotide, ASO)处理1 wk使抵抗素降至正常组水平后, GP也降至正常组水平。然后急性输注重组抵抗素蛋白, 则GP再次升高。认为抵抗素可以导致肝糖产生增多, 从而引起肝脏IR。Rangwala等^[26]在转基因小鼠的实验中也得出了类似的结论。

但其具体机制还不是特别清楚, 目前认为可能的机制如下: 抵抗素过表达抑制肝脏AMPK活性, 肝糖原输出增加, 从而导致胰岛素抵抗。Satoh等^[27]给雄鼠静脉注射腺病毒编码的大鼠抵抗素, 使其体内抵抗素过表达, 发现肝脏葡萄糖输出减少, 在肌肉和脂肪组织中胰岛素受体底物(insulin receptor substrate, IRS)-1、IRS-2的磷酸化和蛋白激酶B(protein kinase B, PKB/Akt)的活化受损。重要的是在肝脏、骨骼肌、脂肪组织中AMPK的激活明显减少。在Banerjee等^[28]的小鼠实验中, 通过5-氨基-4-咪唑甲酰胺核苷酸(5-amino-4-imidazole-carboxamide ribonucleotide, AICAR)激活AMPK和糖异生酶的减少而使肝糖生成减少, 从而降低血糖水平。另外, 由于磷酸烯醇丙酮酸羧激酶(phosphoenol-pyruvate carboxykinase, PEPCK)及葡萄糖-6-磷酸酶(G6Pase)可以抑制AMPK的激活, 所以Samuel等^[29]在小鼠研究中用Foxo1减少PEPCK及G6Pase的表达后, AMPK的生成增加, 糖异生受到抑制, 血糖降低, 胰岛素抵抗改善。同样, 后来Viana等^[30]在研究中用腺病毒介导的基因转移方法, 使显性负相(dominant negative, DN)小鼠和组成性激活突变基因(constitutively active, CA)小鼠AMPK α 1亚基和LacZ基因过表达, 结果DN小鼠比CA小鼠的肝脏AMPK活性高5倍, PEPCK的表达在DN小鼠和CA小鼠分别增加了131.54%和48.92%, 他们也同时研究了地塞米松处理的大鼠肝, 小鼠肝脏以及原代肝细胞, AMPK的表达也都增加了。Li等^[31]的研究中抵抗素过表达也可升高小鼠G6Pase、PEPCK的表达以及胰岛素水平, 抑制AMPK的活化、降低肝糖原水平、葡萄糖耐量和胰岛素敏感性。

抵抗素高表达损害肝细胞胰岛素的正常信号转导通路, 导致胰岛素抵抗。Zhou等^[32]研究抵抗素对人肝细胞影响的过程中, 从糖代谢的关

键基因和胰岛素信号通路分析表明, 抵抗素可以刺激G6Pase, 固醇调节元件结合蛋白1(sterol regulatory element-binding protein 1c, SREBP1c)和细胞因子信号转导抑制因子3(suppressor of cytokine signaling 3, SOCS-3)的表达, 抑制过氧化物酶体增殖蛋白激活性受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma, PPAR γ)以及IRS-2, 而没有影响葡萄糖激酶(glucokinase, GK)活性和葡萄糖转运蛋白(glucose transporter, GLUT)-2的表达. 抵抗素可以刺激SOCS-3的表达, 表明它损害糖耐量可能是通过阻断胰岛素信号转导通路而实现的. Luo等^[33]后来在人肝癌HepG2细胞的研究中也得出同样的结论, 并且发现抵抗素抑制胰岛素诱导的Akt磷酸化不依赖AMPK, 认为抵抗素诱导SOCS-3的表达和抑制Akt磷酸化而导致肝脏HepG2细胞的胰岛素抵抗的机制是非AMPK依赖性的.

2.1.2 抵抗素诱导脂肪组织的胰岛素抵抗: Stepan等^[34]利用重组抵抗素处理3T3-L1脂肪细胞, 可明显抑制胰岛素刺激下脂肪细胞的葡萄糖摄取能力. 改用从抵抗素抗血清中纯化得到的抵抗素抗体IgG处理3T3-L1脂肪细胞, 结果在抗体的作用下, 胰岛素刺激下的葡萄糖的摄取显著高于基础状态下的摄取量. 说明抵抗素可以诱导脂肪组织的IR. 机制可能是抵抗素诱导SOCS-3抑制胰岛素信号通路. SOCS-3可以抑制胰岛素的传导, 抵抗素可以刺激脂肪细胞增加SOCS-3表达, 促进SOCS-3与胰岛素受体竞争性结合. Stepan等^[35]后来的研究表明, 抵抗素对胰岛素的影响包括胰岛素受体及IRS-1的磷酸化水平降低, 磷脂酰肌醇-3-激酶(phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K)的激活减弱, 磷脂酰肌醇三磷酸的生产减少和Akt的激活减少等, 从而导致脂肪细胞的胰岛素抵抗. 而且SOCS-3诱导胰岛素抵抗是独立的. SOCS-3的诱导作用可能是脂肪细胞中抵抗素对胰岛素信号传导抑制的主要机制.

2.1.3 抵抗素诱导骨骼肌的胰岛素抵抗: Satoh等^[27]在其研究中发现: 在动物实验中, 抵抗素作用于骨骼肌细胞的胰岛素信号转导途径, 使AMPK激活减少、IRS-1和IRS-2磷酸化减少, Akt激活减少, 从而减少骨骼肌对葡萄糖的摄取. 在体外实验中, 抵抗素可使骨骼肌细胞葡萄糖摄取减少, 但是对其胰岛素信号转导及GLUT-4的膜转位没有影响. Fan等^[36]发现抵抗素可以抑制小鼠骨骼肌的胰岛素信号传导, 减少胰岛素刺激的2-脱

氧葡萄糖摄取和GLUT-4的转位. 突触相关蛋白23(synaptosomal-associated protein 23, SNAP23)含量降低, GLUT-4和GLUT-1蛋白含量均无影响. SNAP23表达的下降可能因为给予抵抗素后骨骼肌对葡萄糖摄取的减少, 所以有可能参与了抵抗素诱导骨骼肌胰岛素抵抗的过程. Jørgensen等^[37]用培养的小鼠趾长伸肌和比目鱼肌(extensor digitorum longus, EDL)研究低聚人抵抗素对胰岛素信号和骨骼肌葡萄糖代谢的影响, 结果表明抵抗素诱导的胰岛素刺激的葡萄糖摄取降低是不减少Akt激活和IRS-1的磷酸化或增加SOCS-3 mRNA的表达. 测量AS160/TBC1d4苏氨酸(642)在肌管磷酸化和GLUT-4易位, 抵抗素不损害TBC1d4磷酸化, 但没有减少胰岛素与AICAR刺激的GLUT-4膜易位. 结论认为抵抗素损害胰岛素刺激的葡萄糖摄取是通过降低血浆膜GLUT-4易位而不依赖AMPK和SOCS-3. 新的胰岛素信号研究表明^[38], 磷酸化的开始是通过胰岛素受体调节键GLUT-4转运蛋白实现的, 包括小GTP酶, 圈状复合物(tethering complexes)和囊泡融合组织(the vesicle fusion machinery). 这些蛋白质能通过胞内系统控制GLUT-4转运, 形成专门的GLUT-4囊泡和针对这些囊泡的胞吐作用.

2.2 抵抗素引起脂代谢异常与胰岛素抵抗 Sato等^[39]用表达抵抗素的腺病毒(admres)处理C57BL/6小鼠, admres处理的小鼠与对照组之间空腹血糖没有不同, 但admres处理小鼠的基础胰岛素浓度、总胆固醇、甘油三酯和低密度脂蛋白明显升高, 而高密度脂蛋白水平显著降低. 此外, 在体内的Triton WR-1339研究表明admres处理小鼠的极低密度脂蛋白产生增多. 低密度脂蛋白受体和载脂蛋白在肝脏的基因表达减少. 表明抵抗素表达诱导小鼠血脂异常, 而且在胰岛素抵抗状态下最常见. Liu等^[40]通过给小鼠肌注表达猪抵抗素基因的重组真核表达载体pcDNA3.1-retn发现: pcDNA3.1-retn处理组与对照组相比血清抵抗素水平、血清葡萄糖、总胆固醇显著增加; 游离脂肪酸、高密度脂蛋白、脂肪酶的活性明显降低, 而低密度脂蛋白和甘油三酯水平两组之间没有差异. 数据表明, 小鼠抵抗素的高表达和脂代谢异常有关.

脂代谢紊乱可以导致胰岛素抵抗. 游离脂肪酸的增高直接影响胰岛素的合成和分泌, 而且可以影响胰岛素的信号转导, 抑制胰岛素与受体的结合, 减少靶组织细胞的胰岛素受体数量

■ 相关报道

Liu等的研究提示: 抵抗素诱导大鼠肝细胞胰岛素抵抗的途径可能是通过抑制胰岛素信号传导的IRS磷酸化. Hegarty等研究表明抵抗素可抑制AMPK在肝脏和骨骼肌中的活性, 导致胰岛素抵抗. Yang等的研究发现抵抗素仅在蛋白质水平上影响糖代谢.

■创新盘点

目前对脂肪因子的研究比较多,而抵抗素是一种新发现的脂肪因子,和胰岛素抵抗密切相关。本文总结了近年来国内外对抵抗素的研究成果,并重点阐述了抵抗素诱导胰岛素抵抗的机制,具有有理论及实践意义。

从而抑制外周组织对葡萄糖的摄取和葡萄糖的有氧氧化,促进糖异生,引起胰岛素抵抗。高甘油三酯长期与葡萄糖竞争进入细胞内,阻碍葡萄糖的氧化和利用,并且可以产生过多的游离脂肪酸,干扰胰岛素在周围组织中与受体结合,使胰岛素生物效应降低从而导致胰岛素抵抗。

3 抵抗素与肥胖

最早在Steppan^[1]研究中就提示抵抗素可能介导饮食性肥胖相关的胰岛素抵抗。Milan等^[41]在研究中发现随着胖鼠体质量的减少,抵抗素的表达也明显降低,指出抵抗素和脂肪量密切相关。Asensio等^[42]的研究发现,在C57BL/6J野生型小鼠高脂饲料喂养,抵抗素表达增加,并且和肥胖ob/ob小鼠抵抗素基因表达之间呈显著正相关。同样,Rajala等^[43]的研究也发现,肥胖小鼠抵抗素mRNA表达受到抑制,循环抵抗素水平明显升高,并且和胰岛素、血糖、血脂呈正相关,在瘦素治疗抑制后抵抗素mRNA及蛋白表达水平、血糖、胰岛素并行减少。野生小鼠在禁食后抵抗素mRNA及蛋白表达水平、空腹血糖、胰岛素水平下降,在恢复喂食后这些指标又恢复到禁食前水平。这些说明抵抗素参与了肥胖的发病,抵抗素的变化受到营养的调节。后来Lee等^[44]在研究中发现,小鼠血清抵抗素水平与体质量相关,与血清胰岛素、血糖水平无关。抵抗素mRNA的表达水平与三者皆无关。

关于人的研究中,McTernan等^[45]证实在人类腹部皮下脂肪组织和大网膜脂肪有抵抗素mRNA表达,且远高于大腿部的脂肪组织,表明抵抗素的表达与中心性肥胖有关。在人群研究中,Norata等^[46]通过对1090例的研究发现血浆抵抗素水平与甘油三酯、腰围、腰臀比、收缩压、apoAI/apoB比值高度正相关,而与高密度脂蛋白、ApoAI水平呈负相关。尤其在女性更显著。在Malo等^[47]对1508例芬兰男性和年龄45-74岁女性的研究中发现,高抵抗素水平是代谢综合征的患病率的独立预测因子。抵抗素与腰围、体质量指数(body mass index, BMI)、总胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇,低密度脂蛋白胆固醇相关。Ortega等^[48]研究712例随机选择的12-16岁儿童,发现抵抗素水平与脂肪量呈显著正相关,而与BMI无关。Bai等^[49]研究发现单纯肥胖大学生血浆抵抗素和男学生BMI、腰臀围比(waist-to-hip ratio, WHR)相关,但和女性没有相关性。然而,Heilbronn等^[50]的小样本研究发现

血清抵抗素与BMI、脂肪百分比、脂肪细胞大小不相关。认为抵抗素不太可能是人类肥胖和胰岛素抵抗之间的主要环节。Krohn等^[51]研究认为抵抗素可能参与调节体质量,但在肥胖发病中抵抗素不参与诱导胰岛素抵抗。Reinehr等^[52]对肥胖儿童的研究发现:胖瘦儿童的抵抗素水平没有差异。1年内抵抗素水平的变化与SDS-BMI(standard deviation score-body mass index, SDS-BMI)、身体脂肪百分比、WHR、胰岛素抵抗指数的变化无关。16例减肥后儿童抵抗素水平也无显著变化。数据不支持抵抗素与儿童的体质量状况有关。抵抗素与中心型肥胖的关系目前尚无定论。

4 结论

抵抗素通过不同途径诱导糖脂代谢的异常,从而在胰岛素抵抗以及肥胖的发病过程中充当着重要的角色。然而,关于抵抗素的研究虽然在啮齿类动物和离体实验取得了一定进展,但在人体的作用机制尚需更多的研究。在临床上,抵抗素与肥胖的关系研究的不同结果也需要进一步探究。虽然如此,对抵抗素研究的深入,必将为治疗胰岛素抵抗为中心的代谢综合征提供新的方法。

5 参考文献

- 1 Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, Patel HR, Ahima RS, Lazar MA. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 2001; 409: 307-312 [PMID: 11201732 DOI: 10.1038/35053000]
- 2 Arnal JF, Dinh-Xuan AT, Pueyo M, Darblade B, Rami J. Endothelium-derived nitric oxide and vascular physiology and pathology. *Cell Mol Life Sci* 1999; 55: 1078-1087 [PMID: 10442089 DOI: 10.1126/science.1093466]
- 3 Juan CC, Kan LS, Huang CC, Chen SS, Ho LT, Au LC. Production and characterization of bioactive recombinant resistin from *Escherichia coli*. *J Biotechnol* 2003; 103: 113-117 [PMID: 12814870 DOI: 10.1016/S0168-1656(03)00099-3]
- 4 Kim KH, Lee K, Moon YS, Sul HS. A cysteine-rich adipose tissue-specific secretory factor inhibits adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 2001; 276: 11252-11256 [PMID: 11278254 DOI: 10.1074/jbc.C100028200]
- 5 Ghosh S, Singh AK, Aruna B, Mukhopadhyay S, Ehtesham NZ. The genomic organization of mouse resistin reveals major differences from the human resistin: functional implications. *Gene* 2003; 305: 27-34 [PMID: 12594039 DOI: 10.1016/S0378-1119(02)01213-1]
- 6 Banerjee RR, Lazar MA. Dimerization of resistin and resistin-like molecules is determined by a single cysteine. *J Biol Chem* 2001; 276: 25970-25973

- [PMID: 11358969 DOI: 10.1074/jbc.M103109200]
- 7 Yura S, Sagawa N, Itoh H, Kakui K, Nuamah MA, Korita D, Takemura M, Fujii S. Resistin is expressed in the human placenta. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 1394-1397 [PMID: 12629135 DOI: 10.1210/jc.2002-011926]
 - 8 Szalowska E, Elferink MG, Hoek A, Groothuis GM, Vonk RJ. Resistin is more abundant in liver than adipose tissue and is not up-regulated by lipopolysaccharide. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94: 3051-3057 [PMID: 19454585 DOI: 10.1210/jc.2008-2787]
 - 9 Minn AH, Patterson NB, Pack S, Hoffmann SC, Gavrilova O, Vinson C, Harlan DM, Shalev A. Resistin is expressed in pancreatic islets. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 310: 641-645 [PMID: 14521959]
 - 10 Dietze D, Koenen M, Röhrig K, Horikoshi H, Hauner H, Eckel J. Impairment of insulin signaling in human skeletal muscle cells by co-culture with human adipocytes. *Diabetes* 2002; 51: 2369-2376 [PMID: 12145147]
 - 11 Fain JN. Release of interleukins and other inflammatory cytokines by human adipose tissue is enhanced in obesity and primarily due to the nonfat cells. *Vitam Horm* 2006; 74: 443-477 [PMID: 17027526 DOI: 10.1016/S0083-6729(06)74018-3]
 - 12 Nogueiras R, Gualillo O, Caminos JE, Casanueva FF, Diéguez C. Regulation of resistin by gonadal, thyroid hormone, and nutritional status. *Obes Res* 2003; 11: 408-414 [PMID: 12634438 DOI: 10.1038/oby.2003.55]
 - 13 Shojima N, Sakoda H, Ogihara T, Fujishiro M, Katagiri H, Anai M, Onishi Y, Ono H, Inukai K, Abe M, Fukushima Y, Kikuchi M, Oka Y, Asano T. Humoral regulation of resistin expression in 3T3-L1 and mouse adipose cells. *Diabetes* 2002; 51: 1737-1744 [PMID: 12031960]
 - 14 Fasshauer M, Klein J, Neumann S, Eszlinger M, Paschke R. Isoproterenol inhibits resistin gene expression through a G(S)-protein-coupled pathway in 3T3-L1 adipocytes. *FEBS Lett* 2001; 500: 60-63 [PMID: 11434927]
 - 15 Felipe F, Bonet ML, Ribot J, Palou A. Modulation of resistin expression by retinoic acid and vitamin A status. *Diabetes* 2004; 53: 882-889 [PMID: 15047602]
 - 16 Fujita H, Fujishima H, Morii T, Koshimura J, Narita T, Kakei M, Ito S. Effect of metformin on adipose tissue resistin expression in db/db mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 298: 345-349 [PMID: 12413946]
 - 17 Delhanty PJ, Mesotten D, McDougall F, Baxter RC. Growth hormone rapidly induces resistin gene expression in white adipose tissue of spontaneous dwarf (SDR) rats. *Endocrinology* 2002; 143: 2445-2448 [PMID: 12021211 DOI: 10.1210/endo.143.6.8947]
 - 18 Ling C, Kindblom J, Wennbo H, Billig H. Increased resistin expression in the adipose tissue of male prolactin transgenic mice and in male mice with elevated androgen levels. *FEBS Lett* 2001; 507: 147-150 [PMID: 11684088]
 - 19 Yuzuriha H, Inui A, Goto K, Asakawa A, Fujimiya M, Kasuga M. Intracerebroventricular administration of NPY stimulates resistin gene expression in mice. *Int J Mol Med* 2003; 11: 675-676 [PMID: 12684710]
 - 20 Kaser S, Kaser A, Sandhofer A, Ebenbichler CF, Tilg H, Patsch JR. Resistin messenger-RNA expression is increased by proinflammatory cytokines in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 309: 286-290 [PMID: 12951047]
 - 21 Way JM, Görgün CZ, Tong Q, Uysal KT, Brown KK, Harrington WW, Oliver WR, Willson TM, Klierer SA, Hotamisligil GS. Adipose tissue resistin expression is severely suppressed in obesity and stimulated by peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *J Biol Chem* 2001; 276: 25651-25653 [PMID: 11373275 DOI: 10.1074/jbc.C100189200]
 - 22 Viengchareun S, Zennaro MC, Pascual-Le Tallec L, Lombes M. Brown adipocytes are novel sites of expression and regulation of adiponectin and resistin. *FEBS Lett* 2002; 532: 345-350 [PMID: 12482590]
 - 23 Kawashima J, Tsuruzoe K, Motoshima H, Shirakami A, Sakai K, Hirashima Y, Toyonaga T, Araki E. Insulin down-regulates resistin mRNA through the synthesis of protein(s) that could accelerate the degradation of resistin mRNA in 3T3-L1 adipocytes. *Diabetologia* 2003; 46: 231-240 [PMID: 12627322 DOI: 10.1007/s00125-002-1022-3]
 - 24 Rajala MW, Obici S, Scherer PE, Rossetti L. Adipose-derived resistin and gut-derived resistin-like molecule-beta selectively impair insulin action on glucose production. *J Clin Invest* 2003; 111: 225-230 [PMID: 12531878 DOI: 10.1172/JCI16521]
 - 25 Muse ED, Obici S, Bhanot S, Monia BP, McKay RA, Rajala MW, Scherer PE, Rossetti L. Role of resistin in diet-induced hepatic insulin resistance. *J Clin Invest* 2004; 114: 232-239 [PMID: 15254590 DOI: 10.1172/JCI21270]
 - 26 Rangwala SM, Rich AS, Rhoades B, Shapiro JS, Obici S, Rossetti L, Lazar MA. Abnormal glucose homeostasis due to chronic hyperresistinemia. *Diabetes* 2004; 53: 1937-1941 [PMID: 15189975 DOI: 10.2337.04.db04-0422]
 - 27 Satoh H, Nguyen MT, Miles PD, Imamura T, Usui I, Olefsky JM. Adenovirus-mediated chronic "hyperresistinemia" leads to in vivo insulin resistance in normal rats. *J Clin Invest* 2004; 114: 224-231 [PMID: 15254589 DOI: 10.1172/JCI20785]
 - 28 Banerjee RR, Rangwala SM, Shapiro JS, Rich AS, Rhoades B, Qi Y, Wang J, Rajala MW, Poci A, Scherer PE, Steppan CM, Ahima RS, Obici S, Rossetti L, Lazar MA. Regulation of fasted blood glucose by resistin. *Science* 2004; 303: 1195-1198 [PMID: 14976316 DOI: 10.1126/science.1092341]
 - 29 Samuel VT, Choi CS, Phillips TG, Romanelli AJ, Geisler JG, Bhanot S, McKay R, Monia B, Shutter JR, Lindberg RA, Shulman GI, Veniant MM. Targeting foxo1 in mice using antisense oligonucleotide improves hepatic and peripheral insulin action. *Diabetes* 2006; 55: 2042-2050 [PMID: 16804074 DOI: 10.2337/db05-0705]
 - 30 Viana AY, Sakoda H, Anai M, Fujishiro M, Ono H, Kushiya A, Fukushima Y, Sato Y, Oshida Y, Uchijima Y, Kurihara H, Asano T. Role of hepatic AMPK activation in glucose metabolism and dexamethasone-induced regulation of AMPK expression. *Diabetes Res Clin Pract* 2006; 73: 135-142 [PMID: 16503364 DOI: 10.1016/j.diabres.2005.12.011]
 - 31 Li FP, He J, Li ZZ, Luo ZF, Yan L, Li Y. Effects of resistin expression on glucose metabolism and hepatic insulin resistance. *Endocrine* 2009; 35: 243-251 [PMID: 19184634 DOI: 10.1007/s12020-009-9148-4]
 - 32 Zhou L, Li Y, Xia T, Feng S, Chen X, Yang Z. Resistin overexpression impaired glucose tolerance

应用要点

研究抵抗素对临床诊断及治疗胰岛素抵抗为中心的疾病有重要的意义。

■同行评价

本文从抵抗素的侧面综述了其与其胰岛素抵抗及肥胖的关系。立题重要, 理据合理, 有实际意义。

- in hepatocytes. *Eur Cytokine Netw* 2006; 17: 189-195 [PMID: 17194639]
- 33 Luo Z, Zhang Y, Li F, He J, Ding H, Yan L, Cheng H. Resistin induces insulin resistance by both AMPK-dependent and AMPK-independent mechanisms in HepG2 cells. *Endocrine* 2009; 36: 60-69 [PMID: 19440859 DOI: 10.1007/s12020-009-9198-7]
- 34 Steppan CM, Brown EJ, Wright CM, Bhat S, Banerjee RR, Dai CY, Enders GH, Silberg DG, Wen X, Wu GD, Lazar MA. A family of tissue-specific resistin-like molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 502-506 [PMID: 11209052 DOI: 10.1073/pnas.98.2.502]
- 35 Steppan CM, Wang J, Whiteman EL, Birnbaum MJ, Lazar MA. Activation of SOCS-3 by resistin. *Mol Cell Biol* 2005; 25: 1569-1575 [PMID: 15684405 DOI: 10.1128/MCB.25.4.1569-1575.2005]
- 36 Fan HQ, Gu N, Liu F, Fei L, Pan XQ, Guo M, Chen RH, Guo XR. Prolonged exposure to resistin inhibits glucose uptake in rat skeletal muscles. *Acta Pharmacol Sin* 2007; 28: 410-416 [PMID: 17303005 DOI: 10.1111/j.1745-7254.2007.00523.x]
- 37 Jørgensen SB, Honeyman J, Oakhill JS, Fazakerley D, Stöckli J, Kemp BE, Steinberg GR. Oligomeric resistin impairs insulin and AICAR-stimulated glucose uptake in mouse skeletal muscle by inhibiting GLUT4 translocation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009; 297: E57-E66 [PMID: 19435854 DOI: 10.1152/ajpendo.90744.2008]
- 38 Leto D, Saltiel AR. Regulation of glucose transport by insulin: traffic control of GLUT4. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012; 13: 383-396 [PMID: 22617471 DOI: 10.1038/nrm3351]
- 39 Sato N, Kobayashi K, Inoguchi T, Sonoda N, Imamura M, Sekiguchi N, Nakashima N, Nawata H. Adenovirus-mediated high expression of resistin causes dyslipidemia in mice. *Endocrinology* 2005; 146: 273-279 [PMID: 15471967 DOI: 10.1210/en.2004-0985]
- 40 Liu Y, Wang Q, Pan YB, Gao ZJ, Liu YF, Chen SH. Effects of over-expressing resistin on glucose and lipid metabolism in mice. *J Zhejiang Univ Sci B* 2008; 9: 44-50 [PMID: 18196612 DOI: 10.1631/jzus.B071479]
- 41 Milan G, Granzotto M, Scarda A, Calcagno A, Paganò C, Federspil G, Vettor R. Resistin and adiponectin expression in visceral fat of obese rats: effect of weight loss. *Obes Res* 2002; 10: 1095-1103 [PMID: 12429872 DOI: 10.1038/oby.2002.149]
- 42 Asensio C, Cettour-Rose P, Theander-Carrillo C, Rohner-Jeanrenaud F, Muzzin P. Changes in glycemia by leptin administration or high-fat feeding in rodent models of obesity/type 2 diabetes suggest a link between resistin expression and control of glucose homeostasis. *Endocrinology* 2004; 145: 2206-2213 [PMID: 14962997 DOI: 10.1210/en.2003-1679]
- 43 Rajala MW, Qi Y, Patel HR. Regulation of resistin expression and circulating levels in obesity, diabetes, and fasting. *Diabetes* 2004; 53: 1671-1679 [PMID: 15220189 DOI: 10.2337/diabetes.53.7.1671]
- 44 Lee JH, Bullen JW, Stoyneva VL, Mantzoros CS. Circulating resistin in lean, obese, and insulin-resistant mouse models: lack of association with insulinemia and glycemia. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005; 288: E625-E632 [PMID: 15522996 DOI: 10.1152/ajpendo.00184.2004]
- 45 McTernan CL, McTernan PG, Harte AL, Levick PL, Barnett AH, Kumar S. Resistin, central obesity, and type 2 diabetes. *Lancet* 2002; 359: 46-47 [PMID: 11809189 DOI: 10.1016/S0140-6736(02)07281-1]
- 46 Norata GD, Ongari M, Garlaschelli K, Raselli S, Grigore L, Catapano AL. Plasma resistin levels correlate with determinants of the metabolic syndrome. *Eur J Endocrinol* 2007; 156: 279-284 [PMID: 17287419 DOI: 10.1530/eje]
- 47 Malo E, Ukkola O, Jokela M, Moilanen L, Kähönen M, Nieminen MS, Salomaa V, Jula A, Kesäniemi YA. Resistin is an indicator of the metabolic syndrome according to five different definitions in the Finnish Health 2000 survey. *Metab Syndr Relat Disord* 2011; 9: 203-210 [PMID: 21332410 DOI: 10.1089/met.2010.0106]
- 48 Ortega L, Riestra P, Navarro P, Gavela-Pérez T, Soriano-Guillén L, Garcés C. Resistin levels are related to fat mass, but not to body mass index in children. *Peptides* 2013; 49: 49-52 [PMID: 24012666 DOI: 10.1016/j.peptides.2013.08.019]
- 49 Bai Y, Zhang J, Jiang S, Sun J, Zheng C, Wang K, Qian J, Nie L. [Effects of the body fat mass and blood sugar and plasma resistin to slim exercise prescription for overweight and obesity students]. *Weisheng Yanjiu* 2013; 42: 538-542, 549 [PMID: 24024360]
- 50 Heilbronn LK, Rood J, Janderoova L, Albu JB, Kelley DE, Ravussin E, Smith SR. Relationship between serum resistin concentrations and insulin resistance in nonobese, obese, and obese diabetic subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 1844-1848 [PMID: 15070954 DOI: 10.1210/jc.2003-031410]
- 51 Krohn K, Boczan C, Bauer CP. Resistin decreases after weight loss in obese children: PN1-08. *Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 2005; 40: 689 [DOI: 10.1097/00005176-200505000-00223]
- 52 Reinehr T, Roth CL, Menke T, Andler W. Resistin concentrations before and after weight loss in obese children. *Int J Obes (Lond)* 2006; 30: 297-301 [PMID: 16189500 DOI: 10.1038/sj.ijo.0803116]

编辑 田滢 电编 鲁亚静



解毒化痰健脾方对胃黏膜异型增生模型大鼠*p16*、*PTEN*基因的去甲基化和蛋白诱导表达

李志钢, 张伟, 邱作成, 夏宽宏, 纪勇, 李玲, 连军, 安娟

李志钢, 邱作成, 新疆维吾尔自治区中医医院专家门诊 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830000

张伟, 新疆维吾尔自治区中医医院耳鼻喉科 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830000

夏宽宏, 新疆维吾尔自治区中医医院病理科 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830000

纪勇, 李玲, 连军, 安娟, 新疆医科大学动物实验中心 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830000

李志钢, 博士后, 副主任医师, 硕士生导师, 主要从事消化病的基础与临床研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 81060288

作者贡献分布: 本课题由李志钢与张伟共同设计; 研究过程由李志钢、张伟、邱作成、连军及安娟共同完成; 病理分析由夏宽宏完成; 数据分析由纪勇与李玲共同完成; 写作由李志钢完成; 纪勇与李玲进行修改。

通讯作者: 张伟, 主管护理师, 830000, 乌鲁木齐市黄河路116号, 新疆维吾尔自治区中医医院耳鼻喉科。

doctorzhangwei@163.com

电话: 0991-5857265

收稿日期: 2013-12-13 修回日期: 2014-01-23

接受日期: 2014-01-24 在线出版日期: 2014-03-28

Jiedu Huayu Jianpi Fang induces demethylation and increased expression of *p16* and *PTEN* genes in gastric dysplasia in rats

Zhi-Gang Li, Wei Zhang, Zuo-Cheng Qiu, Kuan-Hong Xia, Yong Ji, Ling Li, Jun Lian, Juan An

Zhi-Gang Li, Zuo-Cheng Qiu, Department of Expert Outpatient Service, Xinjiang Uygur Autonomous Region Hospital of Traditional Chinese Medicine, Urumqi 830000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Wei Zhang, Department of ENT, Uygur Autonomous Region Hospital of Traditional Chinese Medicine, Urumqi 830000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Kuan-Hong Xia, Department of Pathology, Xinjiang Uygur Autonomous Region Hospital of Traditional Chinese Medicine, Urumqi 830000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Yong Ji, Ling Li, Jun Lian, Juan An, the Animal Experimental Center of Xinjiang Medical University, Xinjiang Urumqi 830000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 81060288

Correspondence to: Wei Zhang, Competent Care Division, Department of ENT, the Xinjiang Uygur Autonomous Region Hospital of Traditional Chinese Medicine, 116 Huanghe Road, Urumqi 830000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China. doctorzhangwei@163.com

Received: 2013-12-13 Revised: 2014-01-23

Accepted: 2014-01-24 Published online: 2014-03-28

Abstract

AIM: To observe the effect of Jiedu Huayu Jianpi Fang (JHJF) on the methylation status and expression of cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (*p16*) and phosphatase and tensin homolog (*PTEN*) in rats with gastric dysplasia (GD), and to explore the therapeutic effect of JHJF on GD.

METHODS: A low concentration of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG)-based modeling method was adopted to induce GMD, and model rats were randomly divided into a model control group, a retinoic acid treatment group, and a JHJF treatment group. Normal rats treated with JHJF were used as positive controls. Methylation specific PCR was used to detect the methylation status of *p16* and *PTEN* genes in gastric mucosal cells, and real-time PCR, Western blot and immunohistochemistry were used to detect the mRNA and protein expression of *p16* and *PTEN*.

RESULTS: The rates of *p16* and *PTEN* gene methylation in the model control group were both 33.33% (6/18), higher than those in the normal control group 20% (2/10), but the differences were not significant. In the JHJF treatment group, the rates of *p16* and *PTEN* gene methylation were both 0% (0/15), significantly lower than those in the model control group (33.33%, 6/18). The expression levels of *p16* and *PTEN* mRNAs ($P < 0.001$, $P < 0.05$) and proteins ($P < 0.01$ for both) were significantly higher in the JHJF treatment group than in the model control groups.

CONCLUSION: JHJF can induce demethylation and increase expression of the *p16* and *PTEN* genes in GD in rats. JHJF has a potential value for the treatment of GD.

© 2014 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

Key Words: Jiedu Huayu Jianpi; Gastric mucosal dysplasia; *p16*; *PTEN*; Methylation

■背景资料

肠化生与胃黏膜异型增生属胃癌前病变阶段, 如何有效阻断胃癌前病变向胃癌的转变成为目前防治胃癌的研究关键。

■同行评议者

唐世刚, 教授, 湖南省人民医院

■ 研发前沿

DNA甲基化与胃癌的发生发展密切相关。*p16*和*PTEN*是机体重要的抑癌基因。基因甲基化状态可因外界因素干预发生逆转,选择有效的药物干预,抑制抑癌基因的甲基化程度,对于抑制胃癌前病变向胃癌发展的进程具有重要意义。

Li ZG, Zhang W, Qiu ZC, Xia KH, Ji Y, Li L, Lian J, An J. Jiedu Huayu Jianpi Fang induces demethylation and increased expression of *P16* and *PTEN* genes in gastric dysplasia in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(9): 1247-1255 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/1247.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v22.i9.1247>

摘要

目的: 观察解毒化癥健脾方对胃黏膜异型增生模型大鼠细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂2A(cyclin-dependent kinase inhibitor 2A, *p16*)、磷酸酶张力蛋白同源蛋白(phosphatase and tensin homolog, *PTEN*)基因甲基化状态和蛋白表达的影响,并探讨解毒化癥健脾方对胃黏膜异型增生的治疗作用。

方法: 采用低浓度N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍(N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, MNNG)的综合造模方法,创建实验性大鼠胃黏膜异型增生病变模型;分模型对照组、西药维甲酸治疗组、解毒化癥健脾方治疗组,并选择正常大鼠作为阳性对照组进行干预;应用甲基化特异PCR技术检测大鼠胃黏膜*p16*、*PTEN*基因甲基化状态;Real-time PCR、Western blot、免疫组织化学技术检测*p16*、*PTEN*在mRNA和蛋白表达水平的变化。

结果: 模型组胃黏膜异型增生细胞*p16*、*PTEN*基因的甲基化阳性检出率均为33.33%(6/18),均高于正常对照组20%(2/10),但差异不显著;解毒化癥健脾方治疗组*p16*基因甲基化检出率均未0%(0/15),相比模型组20%(2/10)甲基化程度降低,但差异均无统计学意义;*p16*在mRNA($P<0.001$)和蛋白($P<0.01$)水平的表达相比模型组极显著升高;*PTEN*在mRNA($P<0.05$)和蛋白($P<0.01$)水平的表达相比模型组极显著升高。

结论: 解毒化癥健脾方对异型增生胃黏膜细胞*p16*、*PTEN*基因具有一定的去甲基化作用,并显著诱导二者的表达量增加。解毒化癥健脾方的对胃黏膜异型增生具有潜在的治疗作用。

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词 解毒化癥健脾; 胃黏膜异型增生; *p16*基因; *PTEN*基因; 甲基化

核心提示: 解毒化癥健脾中药可通过对抑癌基因*p16*、*PTEN*一定的去甲基化作用及诱导二者mRNA和蛋白水平表达量增加,实现对胃黏膜异型增生的治疗作用。

李志钢, 张伟, 邱作成, 夏宽宏, 纪勇, 李玲, 连军, 安娟. 解毒化癥健脾方对胃黏膜异型增生模型大鼠*p16*、*PTEN*基因的去甲基化和蛋白诱导表达. *世界华人消化杂志* 2014; 22(9): 1247-1255 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/1247.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v22.i9.1247>

0 引言

胃癌居全球癌症病死率第2位^[1],居我国恶性肿瘤死亡率首位^[2,3],严重威胁人类健康。一般认为胃癌的发生常在癌变之前经历多个步骤的演变。Correa等^[4]在1988年提出目前较为认可的胃癌进展模式:正常胃黏膜-慢性浅表性胃炎-慢性萎缩性胃炎-小肠型肠上皮化生-大肠型肠上皮化生-异型增生(中重度)-胃癌(肠型)。其中肠上皮化生和异型增生又称为胃癌前病变(precancerous lesions of gastric cancer, PLGC),其中重度异型增生的患者发展为胃癌的几率高达60%-80%^[5-7]。如何有效阻断异型增生向胃癌的转变成为目前防治胃癌的研究关键。而研究表明,胃癌的发生涉及遗传学与表观遗传学两大机制的共同作用,其中表观遗传学机制的DNA甲基化在胃癌发生进展中具有重要的作用^[8,9]。研究证实DNA甲基化是使抑癌基因失活的除基因突变和缺失之外的第3种机制^[10],*p16*和*PTEN*基因是机体重要的抑癌基因。*p16*可抑制周期蛋白依赖性激酶CDK4/6的活性使细胞周期停滞于G₁/S期,对细胞周期起负控的作用^[11];目前研究证实胃癌中*p16*基因启动子区甲基化可导致表达缺失,引起肿瘤的发生^[12,13]。*PTEN*基因DNA甲基化导致其基因失活与胃癌的关系,目前仍存在一定的争议。因此,本实验拟通过检测中药解毒化癥健脾方干预异型增生的胃黏膜细胞中*p16*、*PTEN*的甲基化状态,以及二者的蛋白表达变化,旨在探讨该中药方对于胃黏膜异型增生的治疗作用,为临床预防治疗胃癌前病变提供参考资料。

1 材料和方法

1.1 材料 SPF级健康♂SD大鼠[SCXK(新)2011-00-04]260只,体质量100 g±10 g(体质量<120 g),均购自新疆医科大学实验动物中心。DNeasy Blood and Tissue Kit(69581, Lot: 143374302)与EpiTect Fast Bisulfite Conversion Kits(59104, Lot: 142347785)均购自德国Qiagen公司;Robust HotStart DNA Polymerase购自美国KAPA Biosystems公司;96孔PCR板及封板膜(PCR-96M2-HS-C)购自美国AXYGEN公司;Rever-

tAid First Strand cDNA Synthesis Kit(K1622, Lot#E00143469)购自美国Thermo公司; SYBR Select Master Mix(4472919, Lot#1210006)购自美国ABI公司; 小鼠抗P16单克隆抗体(sc1661, Lot#B0612)购自美国Santa Cruz公司; 兔抗PTEN多克隆抗体(ab31392, Lot#GR51025-1)购自美国ABCAM公司; 兔抗小鼠HPR标记二抗(31431, Lot#90091028)购自美国Thermo scientific; 免疫组织化学染色试剂盒(KIT9902, Lot#1301319902), 浓缩型DAB试剂盒(DAB0031, Lot#1307290031)购自福州迈新生物公司; 抗体稀释液(ABD0030, Lot#13147A01)购自北京中杉金桥生物技术公司; 0.45 μ m PVDF膜(IPVH0010, Lot#K9NN010313)购自美国Millipore公司; BCA蛋白定量试剂盒(Sk3021, Lot#L1101), RIPA裂解液(PL006, Lot#20130626)购自上海生工公司。

解毒化痰健脾方全方制备药液3 mL/kg(含生药9 g/kg); 维甲酸(货号: 20090506 河北环海药业)使用当日碾成粉末状, 配制成10 mL/kg(4 mg/mL)悬浊液; N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍(N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, MNNG)(货号: M0527日本TCI东京化成工业)用去离子水配制成1 g/L的母液, 存放于4 $^{\circ}$ C冰箱备用, 使用当日用SPF级动物饮用水稀释成120 μ g/mL的溶液, 整个过程均需避光操作保存; 盐酸雷尼替丁胶囊(2011杭州赛诺菲安万特制药)制成0.04%雷尼替丁的颗粒状SPF级大鼠饲料。

1.2 方法

1.2.1 胃黏膜异型增生动物模型建立: 根据朱萱萱等^[14]采用低浓度MNNG的综合法综合造模方法, 创建实验性大鼠胃黏膜异型增生病变模型。具体方法如下: 动物分笼饲养, 每日自由饮用167 μ g/L MNNG溶液, 期间不再给予其他饮水; 同时下午灌胃0.017 mol/L浓度的MNNG溶液, 每只每天灌液1 mL; 给其食用含0.04%雷尼替丁的标准粉末状饲料, 同时每只大鼠每3天给予1 mL 40 mL/L乙醇灌胃1次, 造模期间每进食2 d, 再禁食1 d; 每24 h更换1次饮用水和饲料, 连续9 wk, 9 wk末时随机检杀造模大鼠8只, 通过光镜下观察确认造模成功, 大鼠胃黏膜萎缩, 异型增生。

1.2.2 分组及给药: 分组: SPF级♂SD大鼠260只, 随机选择10只作为正常对照组(control group CG), 其余大鼠全部进行9 wk造模。经造模后存活的SD大鼠131只, 造模死亡率为47.6%。8 wk末时随机检杀造模大鼠8只, 检测造模是否成功后。

将剩余的123只大鼠随机分为8组: 模型组(model group MG)18只、维甲酸治疗组(PCG)15只、中药解毒化痰健脾治疗组(A)15只、五组中药拆方治疗组各15只(结果本文中暂未作介绍), 进行药物干预治疗。给药: 正常对照组和模型对照组灌服生理盐水10 mL/kg, 1次/d; 维甲酸对照组灌服维甲酸悬浊液10 mL/kg(4 mg/mL), 1次/d; 解毒化痰健脾方组用制备药液灌胃, 1次/d, 每次灌液2 mL; 共治疗6 wk, 药物剂量的换算按照人和动物体表面积折算。所有大鼠于实验第15 wk末处死。

1.2.3 取材: 断颈法处死大鼠, 剪取完整的胃黏膜腺区, 随机分为两份: 一半新鲜胃组织样品置于40 g/L甲醛溶液中固定, 常温保存, 待后续免疫组织化学试验用; 剩余样品置于液氮中, 用于蛋白、DNA、RNA提取。

1.2.4 甲基化特异PCR法(methylation specific PCR, MSP)法检测胃黏膜细胞中*p16*、*PTEN*基因的甲基化状态: 将液氮中保存的组织样品, 参照天根公司动物组织基因组提取试剂盒说明书提取细胞DNA; Nanodrop 2000核酸定量仪检测DNA浓度和纯度, 琼脂糖凝胶电泳检测DNA完整性; 用EpiTect Fast Bisulfite Conversion Kits试剂盒对DNA进行亚硫酸盐修饰, 纯化。甲基化特异PCR反应体系50 μ L, 包括样品DNA 1 μ L, 10 \times PCR buffer 5 μ L, MgCl₂ 4 μ L, 引物各0.75 μ L, dNTP 1 μ L, Taq酶0.3 μ L, 双蒸水37.2 μ L。反应条件: 95 $^{\circ}$ C预变性3 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 51 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 40个循环; 72 $^{\circ}$ C延伸7 min。*p16*甲基化(M)引物: F: 5'-TGTTTGTTGAGGATAAGGATTATTC-3', R: 5'-AAAAAAAACACAAAAAAATCACGAC-3', 扩增产物147 bp; *p16*非甲基化(U)引物: F: 5'-GTTTGTTGAGGATAAGGATTATTTG-3', R: 5'-AAAAAAAACACAAAAAAATCACAAC-3', 扩增产物147 bp; *PTEN*甲基化(M)引物: F: 5'-TTTTTGAGTAGTTTTCGAAAGAGAC-3', R: 5'-CCAACCCTAACAATAATAACAAACG-3', 扩增产物167 bp; *PTEN*非甲基化(U)引物: F: 5'-TTTTTGAGTAGTTTTCGAAAGAGATG-3', R: 5'-AACCCTAACAATAATAACAAACAAC-3', 扩增产物126 bp; PCR产物经琼脂糖凝胶电泳, EB染色, 激光密度扫描仪(Pharmacia LKB Ultrascan)采集数据, 取同一基因的所有样本的平均值进行统计分析。

1.2.5 Real-time PCR法检测*p16*、*PTEN*基因mRNA

■ 相关报道

Shim等证实胃癌中*p16*基因启动子区异常甲基化是使其失活的主要机制; 范尧夫等研究认为*p16*蛋白异常表达对胃癌的发生发展、恶变程度密切相关。刘芬、kang等认为*PTEN*的甲基化与胃癌的发生及分化程度存在一定到各相关性, 但Sato的报道得出截然相反的结论。

■创新盘点

本研究采用MSP法检测解毒化癥健脾中药干预后抑癌基因*p16*和*PTEN*甲基化受抑制程度及二者的表达量变化,探索该中药治疗胃黏膜异型增生的可能机制。

表 1 造模对大鼠*p16*、*PTEN*甲基化程度的影响

基因	分组	甲基化		χ^2	<i>P</i> 值	OR	95%CI	
		M	U				Down	Up
<i>p16</i>	MG组	6	12	1.023	0.312	2.500	0.410	15.230
	CG组	2	10					
<i>PTEN</i>	MG组	6	18	0.321	0.571	1.667	0.282	9.856
	CG组	2	10					

M: 使用甲基化引物扩增; U: 使用非甲基化引物扩增; MG: 模型组; CG: 正常对照组. 差异显著性以 $P < 0.05$ 表示。

的表达: 将液氮中冻存的组织样品在液氮中研磨成粉末, TRIzol法总RNA; 核酸定量仪及琼脂糖凝胶电泳检测RNA浓度及完整性; 逆转录酶和Oligo(dT)15引物合成cDNA. *p16*引物: F: 5'-TCGTGCGGTATTTGCGGTAT-3', R: 5'-TAGTCTCGCGTTGCCAGAAG-3', 扩增产物184 bp; *PTEN*引物: F: 5'-TACCAGGACCAGAGGAAACCT-3', R: 5'-GGGTGAGCACAAGATACTCCT-3', 扩增产物120 bp; 以 β -actin为外参, 引物: F: 5'-GTGGGGCGCCCCAGGCACCA-3', R: 5'-CTCCTTAATGTCACGCACGATTTC-3', 扩增长度为198 bp. 荧光定量PCR反应体系20 μ L, 包含样品cDNA 1 μ L, 上下游引物各0.4 μ L, SYBR Select Master Mix(2 \times)10 μ L, RNase-free water 8.2 μ L. 在ABI 7500 fast荧光定量仪上设置以下反应条件: *p16* PCR反应条件为: 50 $^{\circ}$ C 2 min, 95 $^{\circ}$ C变性2 min, 95 $^{\circ}$ C 15 s, 72 $^{\circ}$ C, 共40个循环; *PTEN* PCR反应条件为: 50 $^{\circ}$ C 2 min, 95 $^{\circ}$ C变性2 min, 95 $^{\circ}$ C 15 s, 72 $^{\circ}$ C, 共40个循环。

1.2.6 免疫组织化学检测*p16*、*PTEN*蛋白的表达: 将制作好的石蜡切片60 $^{\circ}$ C烤片2 h使蜡熔化, 脱蜡2次, 经无水乙醇, 950、900、800、700 mL/L乙醇、蒸馏水完成水化; 抗原修复采用柠檬酸高温高压法; 加一抗前用H₂O₂处理切片以灭活内源性过氧化物酶, 并用山羊血清封闭; 滴加稀释后的一抗50 μ L, 37 $^{\circ}$ C孵育2 h; PBS漂洗3次, 滴加约50 μ L二抗, 37 $^{\circ}$ C孵育30 min; DAB显色, 苏木素复染; 经700、800、900、950 mL/L乙醇、无水乙醇脱水, 二甲苯透明2次, 中性树脂胶封片. 100倍光学显微镜下选择*p16*、*PTEN*阳性表达部位采集照片。

1.2.7 Western blot法检测*p16*、*PTEN*蛋白表达情况: 称取100 mg冷冻的胃黏膜组织样品, 按与细胞裂解液1:3的比例加入300 μ L RIPA裂解

液, 提取总蛋白, BCA法进行蛋白定量. 取100 μ L总蛋白沸水浴加热变性3 min后, 取20 μ L上样, SDS-PAGE凝胶(分离胶: 10%, 积层胶: 5%)电泳; 蛋白电泳分离后移至0.45 μ m孔径的PVDF膜; 5%脱脂奶粉室温封闭1 h; PVDF膜置于10 mL稀释的一抗稀释液中, 4 $^{\circ}$ C过夜; 洗涤3次, 再置于10 mL碱性磷酸酶标记的二抗稀释液中, 37 $^{\circ}$ C孵育2 h; 显色, 以 β -actin蛋白表达为参照, 用Chemiscope 3000成像, Image-proplus(Version 4.1)系统采集数据, 采用条带灰度密度值与相应的 β -actin灰度密度值的比值作为指标进行结果分析. 实验重复3次。

统计学处理 所有实验结果均采用SPSS19.0统计软件进行数据分析, GraphPad Prism 5.0软件作图. 计数资料的比较采用秩和检验; 计量资料组间比较采用*t*检验; 所有数据均以3次独立实验结果mean \pm SD表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠胃黏膜组织中*p16*、*PTEN*的甲基化情况 胃黏膜异型增生模型组大鼠与正常对照组*p16*基因甲基化阳性检出率分别为50%(6/12)与20%(2/10), 模型组*p16*甲基化程度高于正常组, 但差异不显著($\chi^2 = 1.023$, $P > 0.05$); *PTEN*基因甲基化阳性检出率分别为33.33%(6/18)与20%(2/10), 模型组*PTEN*甲基化程度高于正常组, 但差异无统计学意义($\chi^2 = 0.321$, $P > 0.05$)(表1). 图1分别为模型组*p16*与*PTEN*基因琼脂糖凝胶电泳检测结果. 维甲酸治疗组、中药治疗组均未检测到*p16*与*PTEN*基因甲基化(表2).

2.2 大鼠胃黏膜组织*p16*、*PTEN*基因mRNA的表达 胃黏膜异型增生模型组*p16*基因相比正常对照组呈现较低的表达; 西药维甲酸组该基因的

表 2 药物治疗对大鼠p16、PTEN去甲基化影响

基因	分组	甲基化		χ^2	P值	OR	95%CI
		U	M				
p16	MG组	12	6	6.111	0.013	0.4	/
	PCG组	15	0				
	A组	15	0	6.111	0.013	/	/
PTEN	MG组	12	6	4.432	0.035	0.6	/
	PCG组	15	0				
	A组	15	0	4.432	0.035	/	/

M: 使用甲基化引物扩增; U: 使用非甲基化引物扩增; MG: 模型组; CG: 正常对照组。以OR<1为疾病保护性因素, 差异显著性以 $P<0.05$ 表示。

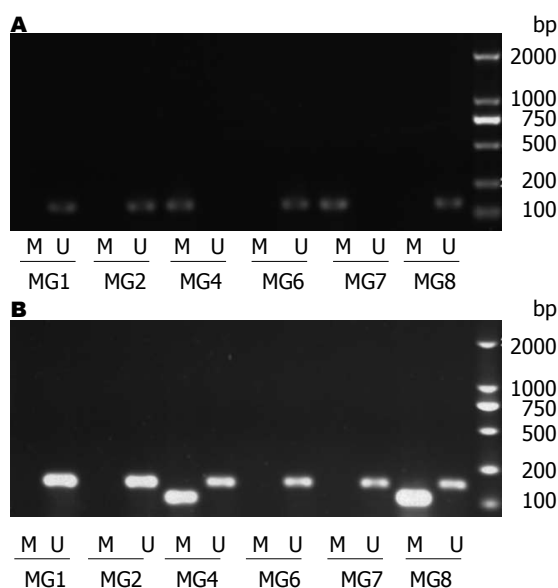


图 1 大鼠胃黏膜组织中p16、PTEN的甲基化检测。A: p16基因甲基化检测; B: PTEN基因甲基化检测。M: 使用甲基化引物扩增; U: 使用非甲基化引物扩增; MG: 模型组。

表达呈现增高趋势, 但无显著性差异; 中药治疗组该基因的表达量相比正常对照组和模型对照组均极显著被诱导增加($P<0.001$), 增加倍数约是对照组及模型组基因表达量的1700倍(图2)。

胃黏膜异型增生模型组PTEN基因相比正常对照组呈现较低的表达(图2), 中药治疗组和西药维甲酸治疗组治疗干预后该基因的表达呈现回升趋势, 与正常对照组的表达量基本相同, 即中西药治疗干预后, 该基因的表达显著高于模型对照组($P<0.05$)。

2.3 免疫组织化学及Western blot分析p16蛋白的表达 p16蛋白免疫组织化学结果为胞核、胞浆着色(图3A), 中西药药物处理组该蛋白表达阳性率均显著高于模型组; 胃黏膜异型增生模型

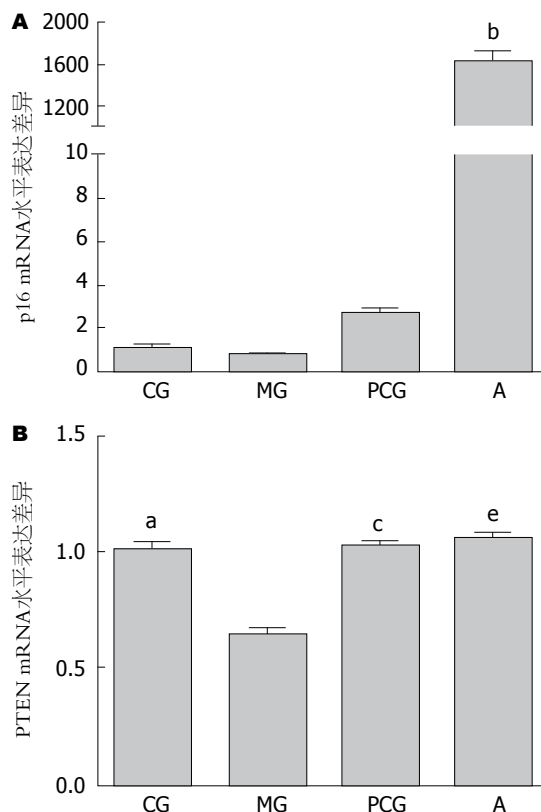


图 2 解毒化痰健脾方干预后大鼠胃黏膜组织中p16、PTEN mRNA水平表达差异。A: 各组p16基因表达差异。^b $P<0.01$ vs 模型MG组; B: 各组PTEN基因表达差异。^a $P<0.05$, ^c $P<0.05$, ^e $P<0.05$ vs 模型MG组。所有结果均以3次独立实验mean \pm SD表示。MG: 模型组; PCG: 维甲酸治疗组; A: 中药解毒化痰健脾治疗组; CG: 正常对照组。

组p16蛋白相比正常对照组均呈现微量表达, 差异极显著($P<0.01$); 且也极显著低于中药治疗组与西药维甲酸治疗组p16蛋白的表达量($P<0.01$); 其中西药维甲酸组p16蛋白的表达量约为模型组的3.74倍, 中药组p16蛋白的表达量约为模型组的5.28倍(图3B, C)。

2.4 免疫组织化学及Western blot分析PTEN蛋白的表达 PTEN蛋白免疫组织化学结果为胞浆着色(图4A), 与p16蛋白相同, 中西药药物处理组该蛋白表达阳性率均显著高于模型组($P<0.01$); 胃黏膜异型增生模型组PTEN蛋白相比正常对照组均呈现微量表达; 其中西药维甲酸组PTEN蛋白的表达量约为模型组的8.65倍, 中药组p16蛋白的表达量约为模型组的5.54倍。与p16蛋白不同的是中西药药物处理PTEN蛋白的表达量也显著地高于正常对照组; 但中药处理组该蛋白的表达量显著低于西药维甲酸治疗组(图4B, C)。

3 讨论

肿瘤的发生涉及遗传学与表观遗传学的共同

■应用要点
探讨中药解毒化痰健脾方对胃黏膜异型增生抑制基因的甲基化及蛋白表达异常的干预作用, 为中药靶基因治疗胃癌前病变提供依据, 且有助于降低胃癌的发生率。

同行评价

该课题设计比较合理,研究方法可靠,结论可信,推论合理.文章用较经典的方法建立胃黏膜异型增生大鼠模型,观察证实中药解毒化痰健脾方干预对胃黏膜 $p16$ 、 $PTEN$ 基因具有一定的去甲基化作用,并可诱导二者在mRNA和蛋白水平表达量增加.提示解毒化痰健脾组方对胃黏膜异型增生具有潜在的治疗作用.

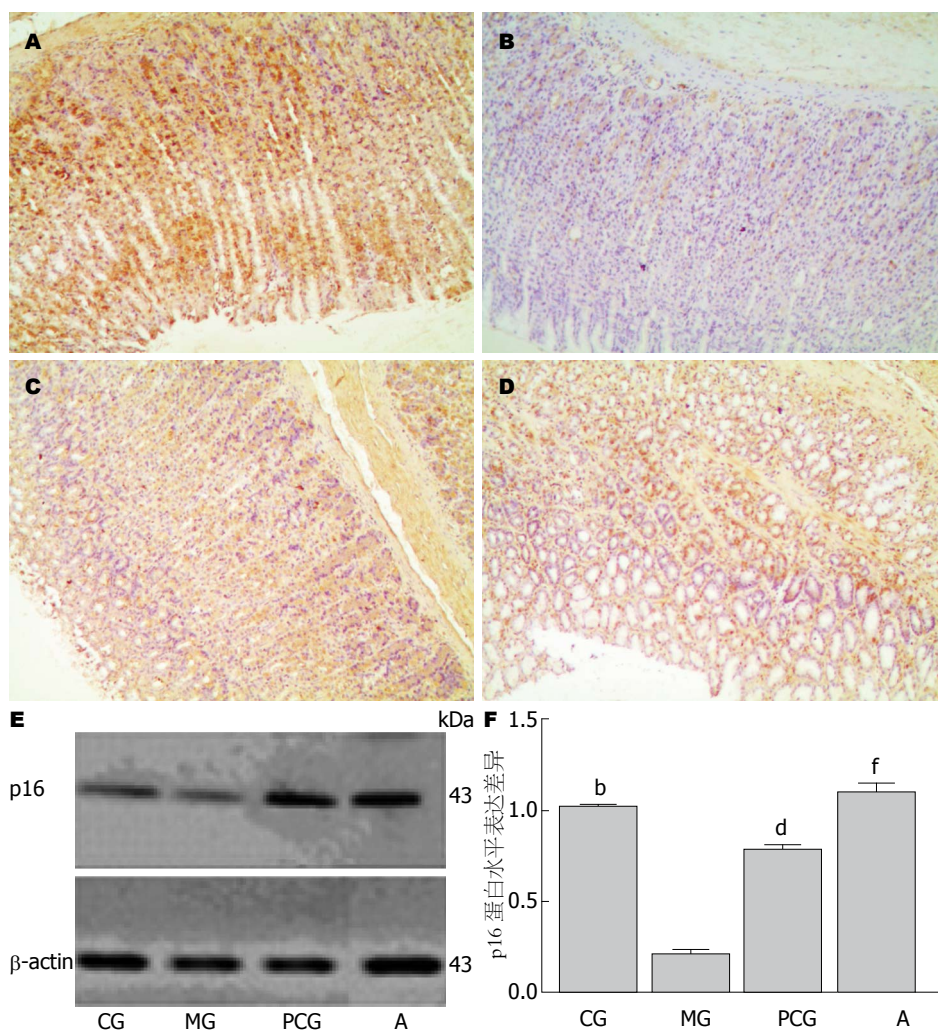


图3 免疫组织化学及Western blot检测解毒化痰健脾方干预对大鼠胃黏膜组织 $p16$ 蛋白的表达影响. A: 正常对照(CG组)(SP $\times 100$); B: 模型组(MG组)(SP $\times 100$); C: 维甲酸(PCG组)(SP $\times 100$); D: 中药解毒化痰健脾方(A组)(SP $\times 100$); E: Western blot结果; F: $p16$ 相对表达量分析图. $^bP < 0.01$, $^dP < 0.01$, $^fP < 0.01$ vs 模型MG组. MG: 模型组; PCG: 维甲酸治疗组; A: 中药解毒化痰健脾治疗组; CG: 正常对照组.

作用,其中DNA甲基化是表观遗传学的重要内容,是对DNA的一种化学修饰,在维持染色体结构、胚胎发育、细胞分化及肿瘤发生等方面发挥重要的作用^[15]. DNA高甲基化可能抑制基因的表达,相应的DNA低甲基化则可促进基因表达^[16]. 抑癌基因由于5'端启动子调控区CpG岛异常高甲基化而抑制mRNA转录作用^[17],从而使抑癌基因沉默或低表达,在某些情况下可能是抑癌基因失活的唯一机制^[10,18]. 胃癌的发展是一个多基因参与的多阶段过程,抑癌基因功能的缺失逐渐导致癌症的发生. 胃癌前病变是胃癌发生和发展过程中的一个重要阶段,该阶段的逆转消失是预防胃癌发生的有效措施^[19]. 由于甲基化调节基因的表达过程是可逆且受环境因素的影响,因此可以通过药物干预使抑癌基因去甲基化,诱导抑癌基因蛋白的表达,以此来改变胃

癌前病变的进程. 目前去甲基化的诱导多用去甲基化制剂,利用中药实现对抑癌基因的去甲基化国内外鲜有报道,而传统中药在治疗胃癌前病变及胃癌方面发挥重要的作用,因此,本研究选择解毒化痰健脾方干预胃黏膜异型增生大鼠,检测 $p16$ 和 $PTEN$ 基因的甲基化状态和表达变化,通过传统中药对抑癌基因的甲基化状态和蛋白表达的影响为临床采用中药治疗影响胃癌病程提供参考依据.

$p16$ 是一个重要的多肿瘤抑制基因,通过与CDK4/6结合抑制后者的作用,从而是RB蛋白低磷酸化,调控G₁/S期转变而抑制细胞增殖^[20],已证实胃癌中 $p16$ 基因启动子区异常甲基化是使其失活的主要机制^[21]. 近期的研究表明 $p16$ 基因蛋白异常表达对胃癌的发生发展、恶变程度、淋巴结转移预后有密切关系^[19]. $p16$ 基因的启动

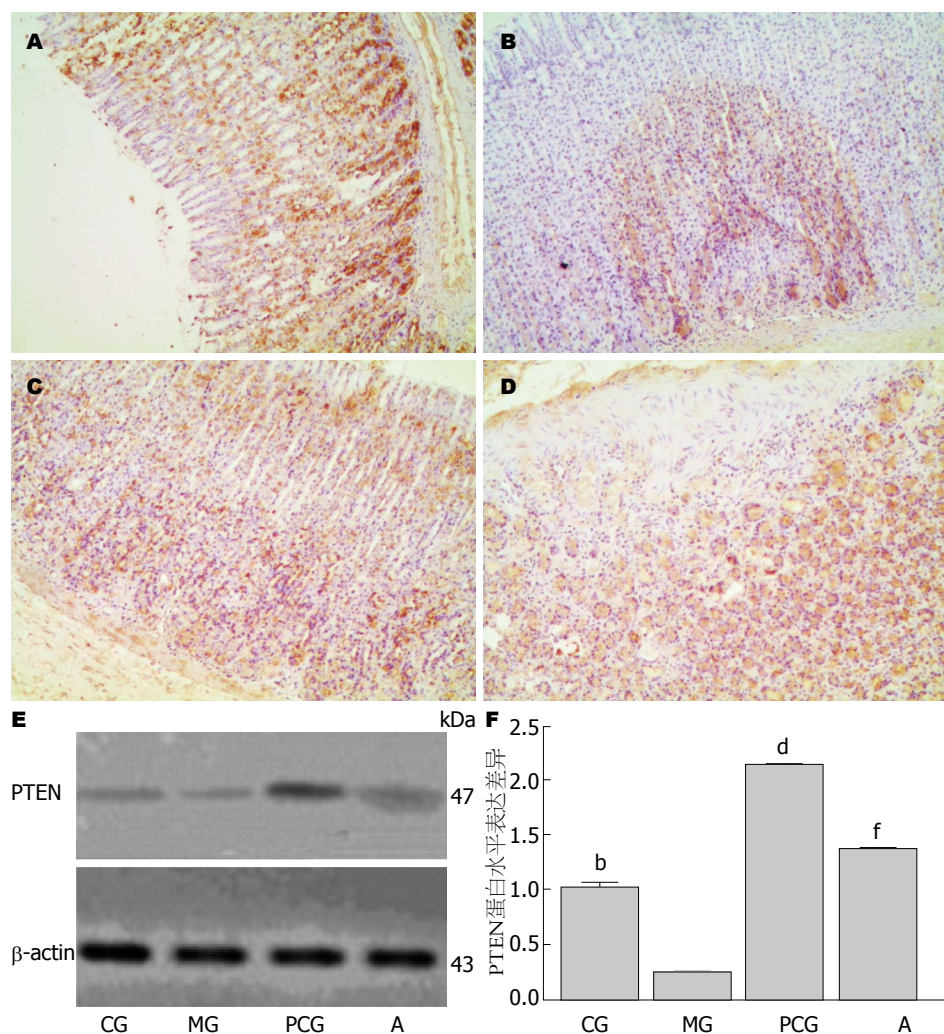


图 4 免疫组织化学及Western blot检测解毒化癥健脾方干预对大鼠胃黏膜组织PTEN蛋白的表达影响。A: 正常对照(CG组)(SP×100); B: 模型组(MG组)(SP×100); C: 维甲酸(PCG组)(SP×100); D: 中药解毒化癥健脾方(A组)(SP×100); E: Western blot结果; F: p16相对表达量分析图。^b $P<0.01$, ^d $P<0.01$, ^f $P<0.01$ vs 模型MG组。MG: 模型组; PCG: 维甲酸治疗组; A: 中药解毒化癥健脾治疗组; CG: 正常对照组。

子区域甲基化后, 其表达被抑制, 使得p16蛋白依赖的人转化生长因子 β 1生长抑制信号通路失去作用, 进而促进细胞分裂^[21]。本实验的研究结果表明, 解毒化癥健脾中药组方和西药维甲酸能一定程度实现大鼠异型增生胃黏膜细胞的p16基因的去甲基化; 此外, 该基因在mRNA表达水平和蛋白表达水平的变化结果均表明中药组方和西药维甲酸治疗组显著诱导了p16的表达量增加, 且中药组方治疗组p16 mRNA和蛋白表达水平(免疫组织化学与Western blot)显著高于西药维甲酸治疗组。这说明中药解毒化癥健脾组方能使得异型增生的胃黏膜细胞p16基因一定程度去甲基化, 同时诱导p16蛋白的高表达, 从而使胃癌前病变的逆转成为可能。

自1997年PTEN基因首次被发现以来, 在遗传学方面的突变和缺失在多种肿瘤中多有报道, 表

观遗传学方面由PTEN基因DNA甲基化导致基因失活相继在前列腺癌及其他肿瘤中得到报道^[23]。胃癌组织中PTEN甲基化检测的文献较少, 且结论存在争议, 部分报道认为PTEN的甲基化与胃癌的发生及分化程度存在一定到各相关性^[23-25], 但也有文献得出截然相反的结论^[26]。关于药物使PTEN去甲基化的文献鲜有报道。本实验采用MSP法检测解毒化癥健脾中药组方治疗对PTEN基因甲基化的影响发现, 中药组方和西药维甲酸治疗组亦一定程度促进了PTEN基因的去甲基化。PTEN的表达结果也表明, 解毒化癥健脾组方同西药维甲酸均可以诱导PTEN基因在mRNA水平和蛋白表达水平的显著增加。与对p16基因的影响不同, 中药治疗组的诱导作用在mRNA和蛋白表达水平均未显现出优于西药维甲酸治疗组组的趋势, 但是相比模型对照组, 解毒化癥健脾中

药的干预的确诱导了PTEN在mRNA水平和蛋白表达水平的极显著的增加. 因此, 我们认为中药解毒化痰健脾方对于异型增生的胃黏膜细胞PTEN基因具有一定的去甲基化和表达诱导作用. 因PTEN的甲基化与胃癌的相关性存在争议, 故本实验中药组方引起该基因的去甲基化是否对胃癌前病变的转归治疗具有参考价值, 仍需要进一步的实验探索得以确认. 但PTEN作为重要的抑癌基因, 本实验中药物诱导其蛋白表达量的增加仍提示我们解毒化痰健脾中药组方对异型增生的胃黏膜组织有一定的保护和治疗作用.

实验提示我们解毒化痰健脾中药可能通过影响p16、PTEN的甲基化状态和蛋白表达实现一定的胃黏膜异型增生治疗作用, 这为临床采用中药干预抑癌基因的甲基化状态和蛋白表达实现胃癌前病变的逆转, 防治胃癌的发生具有一定的参考价值.

此外, 模型组p16、PTEN的甲基化程度虽高于其他各组, 但无显著性差异; 以及正常对照组甲基化程度为20%, 高于两种中药治疗组(0%). 分析其原因, 可能是: 胃黏膜异型增生在胃内呈散发状态, 实验大鼠模型中检测取材针对整个胃窦部位的胃黏膜随机取样, 典型的异型增生的病变部位有遗漏检测或部分样品为非特征性明显的异型增生胃黏膜组织.

4 参考文献

- 胡品津, 刘新光. 消化内科学. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 34
- Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin* 2010; 60: 277-300 [PMID: 20610543 DOI: 10.3322/caac.20073]
- 李连弟, 张思维, 鲁凤珠, 牧人, 孙秀娣, 皇甫小梅, 孙杰, 周有尚, 夏毅, 戴旭东, 饶克勤, 陈育德, 孙爱明, 薛志福. 中国恶性肿瘤死亡谱及分类构成特征研究. *中华肿瘤杂志* 1997; 19: 323-328
- Correa P, Haenszel W, Cuello C, Tannenbaum S, Archer M. A model for gastric cancer epidemiology. *Lancet* 1975; 2: 58-60 [PMID: 49653 DOI: 10.1016/S0140-6736(75)90498-5]
- Lee JR, Chung WC, Kim JD, Lee KM, Paik CN, Jung SH, Jung JH, Lee YK, Han SW. Differential LINE-1 Hypomethylation of Gastric Low-Grade Dysplasia from High Grade Dysplasia and Intramucosal Cancer. *Gut Liver* 2011; 5: 149-153 [PMID: 21814593 DOI: 10.5009/gnl.2011.5.2.149]
- 蒋时红, 刘旺根, 张文娟, 刘燕. 中医治法对胃癌前病变大鼠胃黏膜细胞凋亡的影响. *世界华人消化杂志* 2010; 18: 3012-3015
- 游伟程. 胃癌早诊早治进展. *中国肿瘤* 2009; 18: 698
- 关志宇, 戴冬秋. DNA甲基化与胃肠道肿瘤. *国外医学肿瘤学分册* 2005; 32: 135-137
- 朱新江, 戴冬秋. 表遗传学与胃肠道肿瘤. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 3251-3256
- Lund AH, van Lohuizen M. Epigenetics and cancer. *Genes Dev* 2004; 18: 2315-2335 [PMID: 15466484 DOI: 10.1101/gad.1232504]
- 王燕, 周力, 陈晓琴, 张维, 王岚. 巢式MSP法检测胃癌患者血浆p16, MGMT基因甲基化. *世界华人消化杂志* 2010; 18: 384-387
- Honoki K, Tsujiuchi T, Mori T, Yoshitani K, Tsutsumi M, Takakura Y, Mii Y. Expression of the p16INK4a gene and methylation pattern of CpG sites in the promoter region in rat tumor cell lines. *Mol Carcinog* 2004; 39: 10-14 [PMID: 14694443 DOI: 10.1002/mc.10165]
- Kim H, Kim YH, Kim SE, Kim NG, Noh SH, Kim H. Concerted promoter hypermethylation of hMLH1, p16INK4A, and E-cadherin in gastric carcinomas with microsatellite instability. *J Pathol* 2003; 200: 23-31 [PMID: 12692837 DOI: 10.1002/path.1325]
- 朱萱萱, 王海丹, 周继发, 史淋峰. 仁术健胃颗粒对慢性萎缩性胃炎脾气虚证大鼠血清MTL、SS和GAS水平的实验研究. *中华中医药学刊* 2012; 30: 1459-1461
- Li Y, Tollefsbol TO. Impact on DNA methylation in cancer prevention and therapy by bioactive dietary components. *Curr Med Chem* 2010; 17: 2141-2151 [PMID: 20423306 DOI: 10.2174/092986710791299966]
- 沈文静, 戴冬秋, 滕玥, 刘洁. 5-Aza-CdR体外诱导胃癌细胞系p16基因去甲基化及表达增强. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 2082-2086
- Kaneda A, Kaminishi M, Yanagihara K, Sugimura T, Ushijima T. Identification of silencing of nine genes in human gastric cancers. *Cancer Res* 2002; 62: 6645-6650 [PMID: 12438262]
- Wajed SA, Laird PW, DeMeester TR. DNA methylation: an alternative pathway to cancer. *Ann Surg* 2001; 234: 10-20 [PMID: 11420478 DOI: 10.1097/0000658-200107000-00003]
- 范尧夫, 魏睦新. 胃癌癌前病变的研究进展及防治对策. *世界华人消化杂志* 2012; 20: 1807-1812
- Sherr CJ. Cancer cell cycles. *Science* 1996; 274: 1672-1677 [PMID: 8939849 DOI: 10.1126/science.274.5293.1672]
- Shim YH, Kang GH, Ro JY. Correlation of p16 hypermethylation with p16 protein loss in sporadic gastric carcinomas. *Lab Invest* 2000; 80: 689-695 [PMID: 10830779 DOI: 10.1038/labinvest.3780072]
- Attri J, Srinivasan R, Majumdar S, Radotra BD, Wig J. Alterations of tumor suppressor gene p16INK4a in pancreatic ductal carcinoma. *BMC Gastroenterol* 2005; 5: 22 [PMID: 15985168 DOI: 10.1186/1471-230X-5-22]
- 刘芬, 于皆平, 于红刚. 胃癌中抑癌基因PTEN甲基化状态的检测. *中华消化杂志* 2006; 28: 551-552
- Kang GH, Lee S, Kim WH, Lee HW, Kim JC, Rhyu MG, Ro JY. Epstein-barr virus-positive gastric carcinoma demonstrates frequent aberrant methylation of multiple genes and constitutes CpG island methylator phenotype-positive gastric carcinoma. *Am J Pathol* 2002; 160: 787-794 [PMID: 11891177 DOI: 10.1016/S0002-9440(10)64901-2]
- Kang YH, Lee HS, Kim WH. Promoter methylation and silencing of PTEN in gastric carcinoma. *Lab Invest* 2002; 82: 285-291 [PMID: 11896207 DOI: 10.1038/labinvest.3780422]
- Sato K, Tamura G, Tsuchiya T, Endoh Y, Sakata K, Motoyama T, Usuba O, Kimura W, Terashima M,

Nishizuka S, Zou T, Meltzer SJ. Analysis of genetic and epigenetic alterations of the PTEN gene in gas-

tric cancer. *Virchows Arch* 2002; 440: 160-165 [PMID: 11964046 DOI: 10.1007/s004280100499]

编辑 郭鹏 电编 鲁亚静



ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) DOI: 10.11569 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有

• 消息 •

《世界华人消化杂志》于 2012-12-26 获得 RCCSE 中国权威学术期刊 (A+) 称号

本刊讯 《世界华人消化杂志》在第三届中国学术期刊评价中被武汉大学中国科学评价研究中心(RCCSE)评为“RCCSE中国权威学术期刊(A+)”。本次共有6 448种中文学术期刊参与评价,计算出各刊的最终得分,并将期刊最终得分按照从高到低依次排列,按照期刊在学科领域中的得分划分到A+、A、A-、B+、B、C级6个排名等级范围。其中A+(权威期刊)取前5%; A(核心期刊)取前5%-20%; A-(扩展核心期刊)取前20%-30%; B+(准核心期刊)取前30%-50%; B(一般期刊)取前50%-80%; C(较差期刊)为80%-100%。

双氢青蒿素联合吉西他滨治疗胰腺癌及其机制

吴伟林, 郑继行, 陈玲玲, 蔡振寨, 薛战雄

■背景资料

胰腺癌预后差, 发现时大多属晚期, 化疗是目前改善胰腺癌预后的重要措施, 但由于肿瘤耐药, 目前胰腺癌的化疗效果仍不理想。青蒿素具有显著的抗肿瘤效应, 且具有逆转肿瘤耐药的作用。

吴伟林, 温岭市第一人民医院神经内科 浙江省温岭市 317500

郑继行, 蔡振寨, 薛战雄, 温州医科大学附属第二医院消化内科 浙江省温州市 325027

陈玲玲, 温岭市第一人民医院消化内科 浙江省温岭市 317500

吴伟林, 硕士, 住院医师, 主要从事中西医结合的基础与临床研究。浙江省自然科学基金资助项目, No. Y2100546

温州市科技局基金资助项目, No. Y20090086

作者贡献分布: 此课题由蔡振寨与陈玲玲设计, 薛战雄指导; 细胞培养与动物模型制作及治疗由吴伟林完成; Western blot部分由郑继行完成; 数据统计由陈玲玲完成; 本论文写作由吴伟林完成。

通讯作者: 蔡振寨, 副主任医师, 325027, 浙江省温州市学院西路109号, 温州医科大学附属第二医院消化内科。czz77@sina.com
电话: 0577-88002715

收稿日期: 2013-12-22 修回日期: 2014-01-13

接受日期: 2013-01-18 在线出版日期: 2014-03-28

Effect of dihydroartemisinin combined with gemcitabine for treatment of pancreatic cancer in mice

Wei-Lin Wu, Ji-Xing Zheng, Ling-Ling Chen, Zhen-Zhai Cai, Zhan-Xiong Xue

Wei-Lin Wu, Department of Neurology, Wenling City No. 1 People's Hospital, Wenling 317500, Zhejiang Province, China

Ji-Xing Zheng, Zhen-Zhai Cai, Zhan-Xiong Xue, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325000, Zhejiang Province, China

Ling-Ling Chen, Department of Gastroenterology, Wenling City No. 1 People's Hospital, Wenling 317500, Zhejiang Province, China

Supported by: the Zhejiang Provincial Natural Science Foundation of China, No. Y2100546; the Foundation of Wenzhou Municipal Sci-Tech Bureau, No. Y20090086

Correspondence to: Zhen-Zhai Cai, Associate Chief Physician, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, 109 Xueyuan West Road, Wenzhou 325027, Zhejiang Province, China. czz77@sina.com

Received: 2013-12-22 Revised: 2014-01-13

Accepted: 2014-01-18 Published online: 2014-03-28

Abstract

AIM: To investigate the anticancer effect of dihydroartemisinin combined with gemcitabine against pancreatic cancer in mice and the possible mechanisms involved.

METHODS: A xenograft model of SW1990

pancreatic cancer was developed in nude mice. Model mice were randomized into four groups according to the drug(s) injected: C (normal saline), D (dihydroartemisinin), G (gemcitabine), and D + G (dihydroartemisinin + gemcitabine). All groups underwent intraperitoneal injection of the corresponding drug(s) once every 4 days for a total of 5 times. Tumor volume was measured during the drug therapy. The mice were sacrificed 4 d after the last drug injection. TUNEL assay was used to detect the apoptosis of tumor cells. Western blot was used to detect the protein expression of Bcl-2 and C-myc.

RESULTS: The average tumor volume in group D + G was significantly decreased compared with the other groups. TUNEL assay showed that group D + G presented with apparently more apoptosis than the other groups. Western blot analysis showed the expression of Bcl-2 and C-myc in group D + G was significantly down-regulated compared with the other groups.

CONCLUSION: Dihydroartemisinin combined with gemcitabine can significantly decrease pancreatic cancer xenograft growth in nude mice possibly via mechanisms related to the down-regulation of Bcl-2 and C-myc expression.

© 2014 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

Key Words: Pancreatic cancer; Dihydroartemisinin; Gemcitabine; Apoptosis

Wu WL, Zheng JX, Chen LL, Cai ZZ, Xue ZX. Effect of dihydroartemisinin combined with gemcitabine for treatment of pancreatic cancer in mice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(9): 1256-1261 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/1256.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i9.1256>

摘要

目的: 研究双氢青蒿素联合吉西他滨抗胰腺癌作用及其机制。

方法: 构建裸鼠胰腺癌移植瘤模型, 按治疗用

■同行评议者

肖恩华, 教授, 中南大学湘雅二医院放射教研室

药随机分为对照组(C组)、双氢青蒿素组(D组)、吉西他滨组(G组)、联合用药组(D+G组). 各组均采取腹腔注射药物, 4 d 1次, 前后共5次. 观察各组用药过程中肿瘤体积的变化. 末次用药后4 d处死裸鼠取肿瘤组织. 采用Tunel法检测各组肿瘤组织凋亡情况. 采用Western blot法检测肿瘤组织凋亡相关蛋白Bcl-2和C-myc的表达变化.

结果: 联合用药组肿瘤体积明显小于其他各组($P<0.05$); Tunel法显示联合用药组肿瘤细胞凋亡比其余各组显著增多($P<0.05$); Western blot法显示联合用药组凋亡相关蛋白Bcl-2和C-myc的表达比其余各组明显降低($P<0.05$).

结论: 双氢青蒿素联合吉西他滨能明显抑制裸鼠SW1990细胞皮下移植瘤的生长, 其机制可能是抑制细胞中凋亡相关蛋白Bcl-2和C-myc的表达.

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有.

关键词: 胰腺癌; 双氢青蒿素; 吉西他滨; 凋亡

核心提示: 双氢青蒿素联合吉西他滨能显著抑制裸鼠胰腺癌移植瘤的生长并具有化疗增敏作用, 其机制可能是下调胰腺癌移植瘤组织中Bcl-2和C-myc蛋白的表达, 从而促进胰腺癌的凋亡有关.

吴伟林, 郑继行, 陈玲玲, 蔡振寨, 薛战雄. 双氢青蒿素联合吉西他滨治疗胰腺癌及其机制. 世界华人消化杂志 2014; 22(9): 1256-1261 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/1256.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v22.i9.1256>

0 引言

近年来, 胰腺癌发病率有上升趋势, 在西方国家中, 胰腺癌是恶性肿瘤的第4位死因, 由于早期诊断困难, 胰腺癌发现时大多已失去手术机会, 因此大多数胰腺癌患者需要选择包括化疗在内的辅助治疗^[1]. 美国国立综合癌症网络(National Comprehensive Cancer Network, NCCN)和欧洲肿瘤学协会临床指南均把吉西他滨作为胰腺癌的第一线化疗药物. 但在长期的临床应用中发现, 单用吉西他滨效果仍不理想, 总有效率 $<20\%$ ^[2], 原因主要在于胰腺癌细胞获得性或内在的耐药性. 寻求高效低毒的新型抗肿瘤药物或化疗增敏剂成了肿瘤研究亟待解决的问题.

青蒿素是我国传统的中草药, 他在抗疟方面的卓越成效, 挽救了数以亿万计的生命, 青蒿素在抗肿瘤方面的疗效也同样令人瞩目. 近年来

研究发现, 青蒿素具有显著的抗癌作用, 并且具有化疗增敏作用^[3-6]. 有报道双氢青蒿素在体外或者体内均能通过抑制细胞核因子(nuclear factor κ B, NF- κ B)信号通路促进吉西他滨对胰腺癌的化疗效果^[7], 但目前研究大多基于细胞株的体外研究, 青蒿素抗胰腺癌的体内研究较少.

本研究构建裸鼠胰腺癌移植瘤模型, 探讨双氢青蒿素联合吉西他滨治疗胰腺癌的效果并初步探讨两药协同作用的机制.

1 材料和方法

1.1 材料 人胰腺癌细胞株SW1990购自中国科学院细胞库(中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心). SW1990细胞培养于37 °C含5%CO₂、37 °C培养箱中, 使用含10%胎牛血清、100 U/mL青霉素和100 U/mL链霉素的DMEM细胞单层贴壁生长至70%-80%融合时胰蛋白酶消化传代. ♀4-6周龄健康Balb/c小鼠, 体重18-20 g购自中科院上海实验动物中心, 饲养于SPF环境中层流架内; 饲养和处理经温州医学院动物伦理委员会审批并通过. 双氢青蒿素购自中国药品生物制品检定所, 使用DMSO溶解, DMSO终浓度 $\leq 1\%$; 盐酸吉西他滨注射液(健择)购自法国Lilly公司, 使用生理盐水溶解. DMEM、胎牛血清、含0.25%EDTA的胰蛋白酶、不含0.25%EDTA的胰蛋白酶、青链霉素为Gibco公司产品; TRIzol试剂为美国Invitrogen公司产品; 原位细胞凋亡检测(Tunel检测)试剂盒为瑞士Roche公司产品; 兔抗人Bcl-2多克隆抗体、鼠抗人C-myc单克隆抗体、鼠抗人 β -actin单克隆抗体、羊抗兔二抗、羊抗鼠二抗为美国abcam公司. 3111型CO₂细胞培养箱(美国, ThermoForma公司); 细胞培养瓶(美国, Corning公司); 石蜡包埋机、病理切片机(Leika公司); 电子天平(瑞士, Mettler Toledo公司); CH20-BIM光学显微镜(日本, 奥林巴斯); 放射自显影暗盒(乐凯胶片集团有限公司); 超净工作台、电热恒温水浴箱、电烤箱、立式高压蒸汽灭菌器(上海医疗设备厂); 3K15型台式冷冻离心机(美国, Sigma公司); 微量移液器(德国, Eppendorf公司); 垂直蛋白电泳装置和垂直型蛋白电泳槽转膜装置(美国, Bio-Rad公司).

1.2 方法

1.2.1 人胰腺癌细胞株SW1990的培养: 人胰腺癌细胞SW1990细胞培养于37 °C含5%CO₂饱和湿度的培养箱中, 使用含10%胎牛血清、100 U/mL

■ 研究前沿

青蒿素抗肿瘤效应及其机制是目前中医药抗肿瘤研究的热点之一, 但青蒿素联合吉西他滨治疗胰腺癌的研究及其机制目前报道较少.

■相关报道

Wang等报道双氢青蒿素在体外或者体内研究中均能通过抑制核因子- κ B信号通路促进吉西他滨对胰腺癌的化疗效果。

青霉素和100 U/mL链霉素的DMEM, 细胞单层贴壁生长至70%-80%融合时胰蛋白酶消化传代。

1.2.2 胰腺癌裸鼠模型的建立: 胰蛋白酶消化对数生长期SW1990细胞, 用含10%胎牛血清的完全培养基终止消化, 离心后(1000 r/min, 5 min)将细胞用不含血清的DMEM培养基洗涤1次, 再次离心将细胞混匀于不含血清的DMEM培养基中。将SW1990细胞悬液注射于裸小鼠背部靠近后肢部位的皮下, 每只鼠约注射 4×10^6 个细胞。

1.2.3 实验分组及用药: 当裸鼠移植瘤长径4-6 mm时, 将裸鼠随机分成4组, 分别为对照组(C、生理盐水组)、双氢青蒿素组(D)、吉西他滨组(G)和联合组(D+G), 每组15只。对照组腹腔注射同量生理盐水, 双氢青蒿素组腹腔注射双氢青蒿素(40 mg/kg), 吉西他滨组腹腔注射吉西他滨(125 mg/kg), 联合组为腹腔注射双氢青蒿素(40 mg/kg)和吉西他滨(80 mg/kg)。分组当天即开始用药, 随后4 d 1次, 前后共5次, 末次用药4 d后处死裸鼠。并且从分组当天开始每4 d测一次裸鼠体重, 每次均在注射药物前测体重, 以此体重为标准进行用药, 并用游标卡尺测量1次皮下瘤的大小, 包括长径a(mm)和短径b(mm), 并计算皮下瘤的体积, 体积(V) = $\frac{4}{3} \times \pi \times r^3$, $r = (a+b)/4$ 。处死之前最后测一次瘤体体积和裸鼠体重, 前后共测量6次裸鼠体重和瘤体大小。末次用药4 d后用水合氯醛麻醉裸鼠, 取出瘤体组织称质量, 分取部分瘤体组织置于40 g/L甲醛固定液, 石蜡包埋, 行Tunel法检测, 并留取剩余部分新鲜肿瘤组织存于液氮中供Western blot法使用。

1.2.4 Tunel法检测肿瘤细胞凋亡: 取固定好的肿瘤组织, 经脱水、透明、浸蜡、4 μ m包埋切片、贴片、烘片。按Tunel试剂盒所示操作步骤进行操作, 最后加Tunel反应液37 $^{\circ}$ C孵育1 h后中性树胶封片, 用光学显微镜400倍下进行观察拍照; 取10个高倍视野, 数每个高倍视野下调亡细胞数, 再取平均值; 将对照组调亡细胞数调整为1, 计算双氢青蒿素组、吉西他滨组、双氢青蒿素+吉西他滨组相对调亡值。阳性对照样本处理: 样本经蛋白酶K处理、PBS浸洗后, 再加入100 μ L DNase I 反应液, 37 $^{\circ}$ C处理30 min, 其余步骤同待检样本。阴性对照样本处理: 在标记反应制备TdT酶反应液时, 不添加TdT酶, 其余步骤均相同。

1.2.5 Western blot法检测C-myc、Bcl-2蛋白表达: 用RIPA裂解液试剂盒说明书提取新鲜瘤体组织中的总蛋白, 按照BCA蛋白浓度测定试剂盒(碧

云天)测定总蛋白浓度。将定量后的蛋白质样品以每孔30 μ g点样于SDS-PAGE凝胶上样孔中, 200 V电泳至溴酚蓝迁移到距分离胶底部0.5 cm处, 300 mA转膜45 min, 将转好的硝酸纤维素膜至于5%的脱脂奶粉中, 室温振荡封闭2 h, 加入一抗, 4 $^{\circ}$ C孵育过夜, TBS缓冲液漂洗3次, 每次10 min, 再加入二抗, 37 $^{\circ}$ C于摇床孵育1 h, TBS缓冲液漂洗3次, 每次10 min, 化学发光显影, 胶片曝光, AlphaEaseFC扫描分析软件系统检测条带灰度值, 以目的蛋白与内参蛋白比值作为蛋白相对表达量。阴性对照组不加一抗, 其余步骤相同, 阳性对照为Miapaca-2胰腺癌细胞, 本研究组先前已经验证该细胞系表达C-myc、Bcl-2蛋白, 将 β -actin作为内参对照。

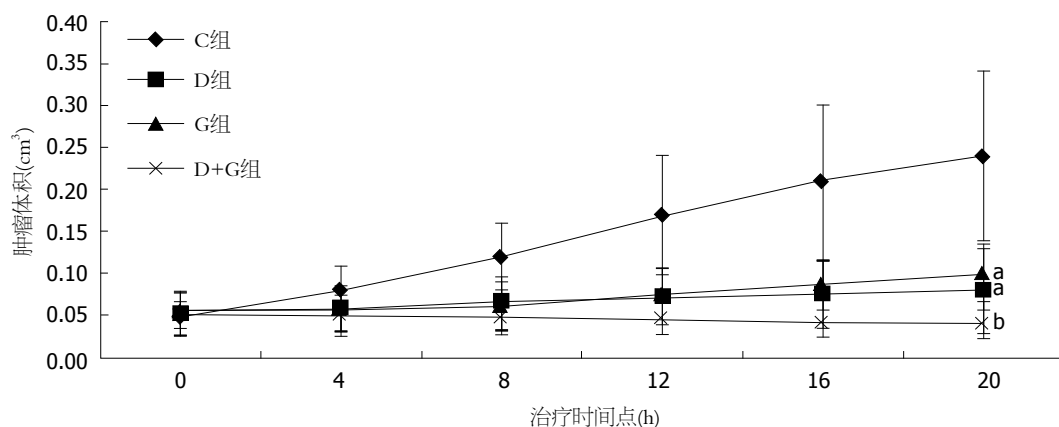
统计学处理 实验数据结果用mean \pm SD表示, 采用SPSS17.0软件ANOVA方差分析进行统计分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组瘤体体积的变化 随机分组当天C组、D组、G组及D+G组瘤体平均体积分别为 $0.048 \text{ cm}^3 \pm 0.018 \text{ cm}^3$ 、 $0.052 \text{ cm}^3 \pm 0.02 \text{ cm}^3$ 、 $0.056 \text{ cm}^3 \pm 0.026 \text{ cm}^3$ 及 $0.051 \text{ cm}^3 \pm 0.024 \text{ cm}^3$, 各组裸鼠移植瘤体积比较无显著差异($P > 0.05$)。用药20 d后处死裸鼠取肿瘤, C组、D组、G组及D+G组瘤体平均体积分别为 $0.24 \text{ cm}^3 \pm 0.01 \text{ cm}^3$ 、 $0.08 \text{ cm}^3 \pm 0.034 \text{ cm}^3$ 、 $0.1 \text{ cm}^3 \pm 0.05 \text{ cm}^3$ 及 $0.04 \text{ cm}^3 \pm 0.017 \text{ cm}^3$ 。与C组相比, D组与G组的瘤体平均体积明显减小($P < 0.05$), 但D+G组抑制肿瘤的作用更为明显($P < 0.01$)(图1)。

2.2 双氢青蒿素联合吉西他滨诱导胰腺癌细胞凋亡的作用 在光学显微镜下, Tunel染色法阳性对照组调亡细胞表现为棕黄色(或者棕褐色)为细胞核染色, 细胞核突出在细胞边缘; 对照组细胞不显色。C组调亡细胞稀少(图2A), D组、G组、D+G组(图2B)调亡细胞明显增加。随机选取10个高倍视野($\times 400$), 数每个高倍视野下调亡细胞数, 再取平均值; 将C组调亡细胞数调整为1, D组和G组相对调亡值分别为 3.7 ± 0.8 和 3.5 ± 0.7 , 均显著高于C组($P < 0.05$); D+G组相对调亡值为 7.0 ± 1.5 , 显著高于其他3组($P < 0.05$)(图3)。

2.3 Western blot法检测双氢青蒿素联合吉西他滨对裸鼠移植瘤SW1990细胞调亡相关蛋白C-myc和Bcl-2表达的影响 阴性对照组未表达目的蛋白, 阳性对照组表达目的蛋白。与对照组(C)相比较, 双氢青蒿素组(D)和吉西他滨组(G)均能抑制



■创新盘点

本文探讨双氢青蒿素联合吉西他滨治疗胰腺癌的移植瘤体内研究及其机制, 丰富和完善了青蒿素类中药抗肿瘤作用机制。

图 1 不同治疗组胰腺癌移植瘤体积变化曲线。* $P<0.05$, ^b $P<0.01$ vs 对照组。C组: 对照组; D组: 双氢青蒿素组; G组: 吉西他滨组; D+G组: 联合组。

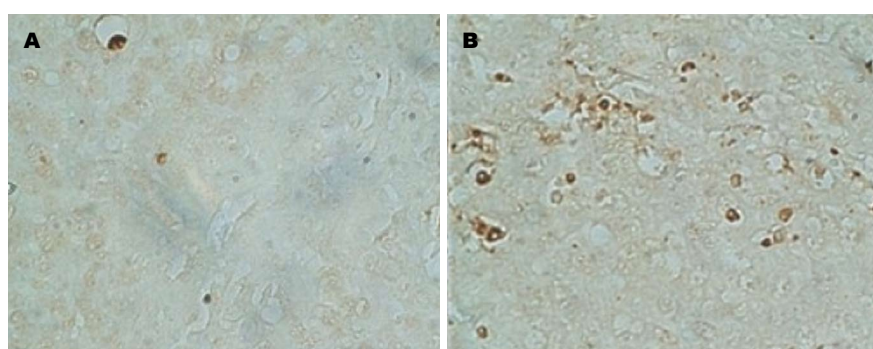


图 2 TUNEL法细胞凋亡图。A: 对照组凋亡细胞稀少; B: D+G组凋亡细胞明显增多。

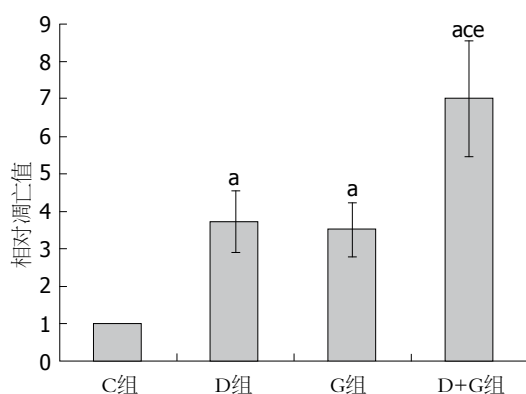


图 3 不同治疗组诱导胰腺癌细胞凋亡比较。* $P<0.05$ vs C组; ^c $P<0.05$ vs D组; ^e $P<0.05$ vs G组。C组: 对照组; D组: 双氢青蒿素组; G组: 吉西他滨组; D+G组: 联合组。

C-myc和Bcl-2的表达($P<0.05$), 与其他三组相比, 双氢青蒿素联合吉西他滨组(D+G)明显地下调C-myc和Bcl-2蛋白的表达($P<0.05$)(图4)。

3 讨论

手术治疗是胰腺癌治疗的首选方法, 但多数患者在确诊时已达局部晚期或有远处转移而失去手术机会。大多数胰腺癌主要治疗手段是化疗。吉西他滨是一种脱氧胞苷的水溶性类似物, 是

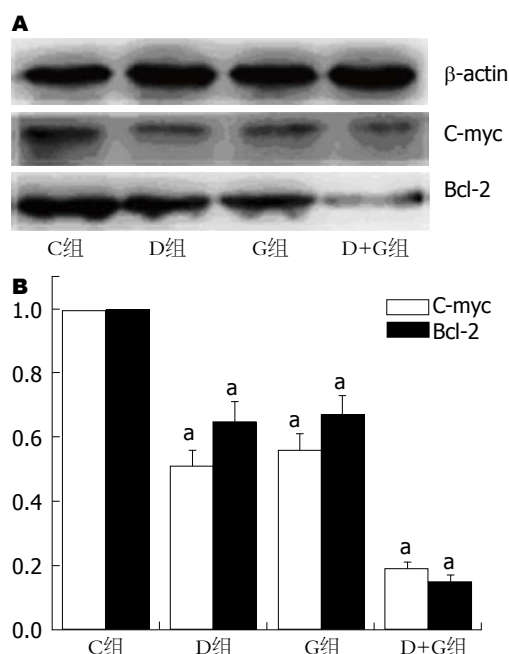


图 4 各组Bcl-2和C-myc蛋白表达水平。A: Bcl-2和C-myc蛋白Western blot表达图; B: Bcl-2和C-myc蛋白相对表达量。* $P<0.05$ vs 对照组。C组: 对照组; D组: 双氢青蒿素组; G组: 吉西他滨组; D+G组: 联合组。

细胞周期特异性的抗代谢类药物, 主要作用于DNA合成期的肿瘤细胞, 即S期细胞, 在一定条

■应用要点

本研究为青蒿素类中药用于胰腺癌的治疗提供实验基础,青蒿素逆转肿瘤耐药的机制需要进一步研究,将来青蒿素可能作为逆转肿瘤耐药的辅助用药进入临床使用。

件下,可阻止肿瘤细胞从G₁期向S期的进展。吉西他滨治疗胰腺癌患者在减轻疼痛和改善生活质量方面具有一定的作用,已被广泛接受作为晚期胰腺癌化疗的标准用药^[8],但吉西他滨在临床应用中也存在许多不足:(1)只能起到有限的姑息治疗作用,对胰腺癌的缓解率低,只有10%左右^[9,10],即便作为根治术后辅助化疗药,其中位生存时间也只有22.1 mo^[11];(2)多数胰腺癌会逐渐对吉西他滨产生耐药性;(3)作为一种化疗药物,存在一些较强的不良反应,长期用药对人体会造成一定的伤害;(4)价格昂贵,长期使用困难。由于上述原因,吉西他滨对胰腺癌化疗的临床应用受到了极大的限制。青蒿素是我国药学工作者于20世纪70年代初从植物黄花蒿中分离得到的有效抗疟疾药物,主要分布在植物的叶中。双氢青蒿素是青蒿素类药物在体内的主要活性代谢产物,也是青蒿素的一个重要衍生物。双氢青蒿素在抗肿瘤方面的作用逐渐成为研究的热点。先前研究表明双氢青蒿素能够明显抑制胰腺癌细胞的增殖^[12]。但青蒿素抗胰腺癌作用的体内研究较少。本研究在裸鼠移植瘤动物模型基础上发现双氢青蒿素和吉西他滨联合用药组的瘤体体积明显小于对照组及单用双氢青蒿素组和吉西他滨组,而且联合用药组吉西他滨使用剂量减少,表明双氢青蒿素联合吉西他滨具有显著抗胰腺癌作用,并且两者具有协同作用。

青蒿素的抗肿瘤作用主要包括促进肿瘤细胞凋亡、抑制肿瘤细胞增殖、抑制肿瘤血管形成及逆转肿瘤多药耐药等机制^[13]。诱导肿瘤细胞凋亡是青蒿素抗肿瘤效应的重要机制之一。我们采用Tunel方法检测双氢青蒿素和吉西他滨单用或联合使用对胰腺癌裸鼠移植瘤组织SW1990细胞凋亡的影响,结果显示,双氢青蒿素组、吉西他滨组与对照组相比,凋亡细胞明显增多,而双氢青蒿素联合吉西他滨组的凋亡细胞比其他三组均明显增多,提示双氢青蒿素和吉西他滨均可通过诱导肿瘤细胞凋亡抑制胰腺癌裸鼠移植瘤的生长,两者联合使用不仅效应增强,而且吉西他滨使用剂量明显减少,说明二氢青蒿素除了具有诱导肿瘤细胞凋亡作用,还具有吉西他滨化疗增敏作用。

细胞凋亡是一种多基因和细胞因子调控的过程,具有代表性的是*Bcl-2*基因家族和*c-myc*基因家族,已经证明原癌基因,如*Bcl-2*基因家族和*c-myc*基因家族等,均参与细胞凋亡的精确调控。现已发现,*Bcl-2*蛋白是典型的抑制细胞细胞凋

亡的蛋白,而且*Bcl-2*基因家族调节多种化疗药物的促凋亡作用,*Bcl-2*的过表达跟多种肿瘤对化疗药物的耐药性有关。高表达*Bcl-2*蛋白的患者预示着胰腺癌预后不良^[14]。*c-myc*基因是凋亡调控的重要基因,高表达*c-myc*基因的肿瘤细胞凋亡受阻^[15],在某些情况下如与致癌基因同时存在时*C-myc*则可协同*Bcl-2*导致肿瘤的发生。*NF-κB*信号通路活化后能使其下游基因*c-myc*、*cyclin D1*、*bcl-2*、*bcl-xL*表达增加,细胞凋亡受到抑制,从而产生耐药,二氢青蒿素能逆转吉西他滨诱导*NF-κB*信号通路的活化,从而改善吉西他滨化疗效应^[7]。本实验结果显示,双氢青蒿素和吉西他滨联合治疗可使胰腺癌移植瘤组织*Bcl-2*和*C-myc*蛋白表达明显下调,说明二氢青蒿素与吉西他滨具有协同治疗作用,与文献报道相符。

总之,双氢青蒿素联合吉西他滨能显著抑制裸鼠胰腺癌移植瘤的生长,其机制可能是下调胰腺癌移植瘤组织中*Bcl-2*和*C-myc*蛋白的表达,从而促进胰腺癌的凋亡有关。

4 参考文献

- 1 黄鹏,钟翔宇,徐艺,崔云甫.辅助治疗与新辅助治疗在胰腺癌治疗中的作用.世界华人消化杂志 2013; 21: 1292-1296
- 2 Tada M, Arizumi T, Nakai Y, Sasaki T, Kogure H, Togawa O, Matsubara S, Tsujino T, Hirano K, Sasahira N, Isayama H, Kawabe T, Omata M. Efficacy of gemcitabine for locally advanced pancreatic cancer: comparison with 5-fluorouracil-based chemoradiotherapy. *Chemotherapy* 2008; 54: 302-308 [PMID: 18689983 DOI: 10.1159/000151226]
- 3 Zhao C, Gao W, Chen T. Synergistic induction of apoptosis in A549 cells by dihydroartemisinin and gemcitabine. *Apoptosis* 2013 Dec 13. [Epub ahead of print] [PMID: 24337869]
- 4 Hu CJ, Zhou L, Cai Y. Dihydroartemisinin induces apoptosis of cervical cancer cells via upregulation of RKIP and downregulation of bcl-2. *Cancer Biol Ther* 2013 Dec 11. [Epub ahead of print] [PMID: 24335512]
- 5 Wang SJ, Sun B, Pan SH, Chen H, Kong R, Li J, Xue DB, Bai XW, Jiang HC. [Experimental study of the function and mechanism combining dihydroartemisinin and gemcitabine in treating pancreatic cancer]. *Zhonghua Waike Zazhi* 2010; 48: 530-534 [PMID: 20646665]
- 6 Kong R, Jia G, Cheng ZX, Wang YW, Mu M, Wang SJ, Pan SH, Gao Y, Jiang HC, Dong DL, Sun B. Dihydroartemisinin enhances Apo2L/TRAIL-mediated apoptosis in pancreatic cancer cells via ROS-mediated up-regulation of death receptor 5. *PLoS One* 2012; 7: e37222 [PMID: 22666346 DOI: 10.1371/journal.pone.0037222]
- 7 Wang SJ, Gao Y, Chen H, Kong R, Jiang HC, Pan SH, Xue DB, Bai XW, Sun B. Dihydroartemisinin inactivates NF-kappaB and potentiates the anti-tumor effect of gemcitabine on pancreatic cancer both

- in vitro and in vivo. *Cancer Lett* 2010; 293: 99-108 [PMID: 20137856 DOI: 10.1016/j.canlet.2010.01.001]
- 8 Tempero MA, Behrman S, Ben-Josef E, Benson AB, Cameron JL, Casper ES, Hoffman JP, Karl RC, Kim P, Koh WJ, Kuvshinov BW, Melvin WS, Muscarella P, Sasson AR, Shibata S, Shrieve DC, Talamonti MS, Tyler DS, Vickers SM, Warren RS, Willett C, Wolff RA. Pancreatic adenocarcinoma: Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw* 2005; 3: 598-626 [PMID: 16194453]
- 9 Burris HA, Moore MJ, Andersen J, Green MR, Rothenberg ML, Modiano MR, Cripps MC, Portenoy RK, Storniolo AM, Tarassoff P, Nelson R, Dorr FA, Stephens CD, Von Hoff DD. Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. *J Clin Oncol* 1997; 15: 2403-2413 [PMID: 9196156]
- 10 Burris H, Storniolo AM. Assessing clinical benefit in the treatment of pancreas cancer: gemcitabine compared to 5-fluorouracil. *Eur J Cancer* 1997; 33 Suppl 1: S18-S22 [PMID: 9166095]
- 11 Oettle H, Post S, Neuhaus P, Gellert K, Langrehr J, Ridwelski K, Schramm H, Fahlke J, Zuelke C, Burkart C, Gutberlet K, Kettner E, Schmalenberg H, Weigang-Koehler K, Bechstein WO, Niedergethmann M, Schmidt-Wolf I, Roll L, Doerken B, Riess H. Adjuvant chemotherapy with gemcitabine vs observation in patients undergoing curative-intent resection of pancreatic cancer: a randomized controlled trial. *JAMA* 2007; 297: 267-277 [PMID: 17227978]
- 12 吴伟林, 杜章, 鲍贤俊, 陈玲玲, 蔡振寨. 双氢青蒿素抑制人胰腺癌细胞SW-1990的实验研究. *中华中医药学刊* 2012; 30: 1595-1598, 1708
- 13 陆金健, 黄鸣清, 陈修平, 王一涛. 二氢青蒿素抗肿瘤作用及其机制研究进展. *中国药理学与毒理学杂志* 2012; 26: 397-401
- 14 Sinicrope FA, Evans DB, Leach SD, Cleary KR, Fenoglio CJ, Lee JJ, Abbruzzese JL. bcl-2 and p53 expression in resectable pancreatic adenocarcinomas: association with clinical outcome. *Clin Cancer Res* 1996; 2: 2015-2022 [PMID: 9816161]
- 15 Lu JJ, Meng LH, Shankavaram UT, Zhu CH, Tong LJ, Chen G, Lin LP, Weinstein JN, Ding J. Dihydroartemisinin accelerates c-MYC oncoprotein degradation and induces apoptosis in c-MYC-overexpressing tumor cells. *Biochem Pharmacol* 2010; 80: 22-30 [PMID: 20206143 DOI: 10.1016/j.bcp.2010.02.016]

同行评价

本文显示双氢青蒿素联合吉西他滨能明显抑制裸鼠胰腺癌移植瘤的生长, 有可能为临床治疗带来新的希望。

编辑 田滢 电编 鲁亚静



大黄酸与大黄建立大鼠“泻剂结肠”模型的比较

刘兴, 王文革, 次苗苗

■背景资料

应用刺激性泻剂所建立的“泻剂结肠”动物模型, 是目前研究慢传输便秘最常用的动物模型之一。大黄是目前最常用的造模药物, 但因其造模过程中存在诸多问题, 影响了所建模型的稳定性及可靠性, 因此寻找一种稳定、可控性好的药物是建立“泻剂结肠”动物模型的首要任务。

刘兴, 次苗苗, 河北北方学院 河北省张家口市 075000
王文革, 中国人民解放军空军总医院儿科 北京市 100142
刘兴, 在读硕士, 主要从事儿童消化系统疾病的研究。
北京市自然科学基金资助项目, No. 7122180
作者贡献分布: 此课题由王文革与刘兴设计; 研究过程由刘兴与次苗苗操作完成; 研究所用试剂由王文革提供; 数据收集与分析由刘兴与次苗苗完成; 本论文写作由刘兴与王文革共同完成。
通讯作者: 王文革, 副主任医师, 硕士研究生导师, 100142, 北京市海淀区阜成路30号, 中国人民解放军空军总医院儿科。
1264516006@qq.com
电话: 010-68410099
收稿日期: 2013-12-27 修回日期: 2014-01-20
接受日期: 2014-02-03 在线出版日期: 2014-03-28

Comparison of rat models of cathartic colon established with rhein and rhubarb

Xing Liu, Wen-Ge Wang, Miao-Miao Ci

Xing Liu, Miao-Miao Ci, Hebei North University, Zhangjiakou 075000, Hebei Province, China
Wen-Ge Wang, Department of Pediatrics, Air Force General Hospital of People's Liberation Army, Beijing 100142, China
Supported by: Beijing Natural Science Foundation, No. 7122180
Correspondence to: Wen-Ge Wang, Associate Chief Physician, Department of Pediatrics, Air Force General Hospital of People's Liberation Army, 30 Fucheng Road, Haidian District, Beijing 100142, China. 1264516006@qq.com
Received: 2013-12-27 Revised: 2014-01-20
Accepted: 2014-02-03 Published online: 2014-03-28

Abstract

AIM: To find a simple and stable drug for the induction of cathartic colon by comparing two rat models which were established with rhein and rhubarb, respectively.

METHODS: Thirty-three healthy 3-4-week-old Wistar rats were divided into three groups, namely, a control group, a rhubarb group and a rhein group. Normal saline was given by intragastric administration in the control group. Rhubarb suspension was given in the rhubarb group, and rhein suspension was given in the rhein group. The intestinal transit function was assessed using the activated carbon suspension transit method.

RESULTS: Modeling time was 136 and 114 days for the rhubarb group and rhein group, respectively. Activated carbon transit length in the rhubarb and rhein group was significantly shorter than that in the control group. The symptom of loose stools in the rhein group was stable in the modeling process, and the dose and modeling cycle were consistent with the reference literature.

CONCLUSION: A rat model of cathartic colon could be successfully established with both rhubarb and rhein. As a monomer, the efficacy of rhein is more stable than rhubarb. Concentration of rhein is easy to control and it is associated with a relatively short period of time in establishing the animal model. Rhein is better than rhubarb in establishing the rat model of cathartic colon.

© 2014 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

Key Words: Cathartic colon; Animal model; Rhubarb; Rhein; Monomer

Liu X, Wang WG, Ci MM. Comparison of rat models of cathartic colon established with rhein and rhubarb. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(9): 1262-1265 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/1262.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i9.1262>

摘要

目的: 应用大黄酸及大黄建立大鼠泻剂结肠模型, 二者进行比较, 寻找一种简单、稳定的建立泻剂结肠动物模型的药物。

方法: 健康3-4周龄Wistar大鼠33只, 均分为对照组、大黄组、大黄酸。对照组给予生理盐水灌胃; 大黄组给予大黄粉悬液灌胃; 大黄酸组给予大黄酸粉悬液灌胃。造模完成后采用活性炭悬液推进法测定大鼠肠道传输功能。

结果: 大黄组、大黄酸组造模时间分别为136 d和114 d; 大黄组及大黄酸组大鼠活性炭末推进长度及推进率较对照组明显缩短。大黄酸组

■同行评议者
甘华田, 教授, 四川大学华西医院老年消化内科

造模过程中大鼠稀便稳定,且给药剂量及造模周期同参考文献报道一致。

结论: 大黄及大黄酸均可成功建立大鼠泻剂结肠模型,但作为单体大黄酸药效更稳定,浓度易于控制,且造模时间相对较短,故作为造模药物,效果优于大黄。

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词: 泻剂结肠; 动物模型; 大黄; 大黄酸; 单体

核心提示: 本研究通过比较大黄酸及大黄建立的“泻剂结肠”模型的优劣,进一步证实了单体大黄酸药效更稳定,浓度易于控制,造模时间相对较短,作为造模药物效果优于大黄。为以后慢传输型便秘的研究提供了一种更稳定、可靠的动物模型。

刘兴, 王文革, 次苗苗. 大黄酸与 大黄建立大鼠“泻剂结肠”模型的比较. 世界华人消化杂志 2014; 22(9): 1262-1265 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/1262.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v22.i9.1262>

0 引言

慢传输型便秘(slow transit constipation, STC)是一种涉及全胃肠道动力紊乱,尤其是结肠传输减慢导致的便秘^[1]。目前国内外建立STC动物模型方法主要有泻剂结肠、复方苯乙哌啶法、吗啡法。泻剂结肠(cathartic colon)是指便秘患者长期应用刺激性泻剂使结肠神经系统紊乱和相应的功能失调,导致结肠动力障碍,对泻剂反应性下降,对泻剂产生依赖的一种状况^[2],是STC的一种重要临床类型。目前建立“泻剂结肠”动物模型的泻剂主要有大黄和酚酞,大黄因有价廉、来源广等优点成为最常用的建立该模型的药物。但因大黄建立“泻剂结肠”动物模型存在用药量、造模周期与以往研究^[3-5]报道出入较大等问题,在实验研究中模型的复制性较差,导致后续实验难以进行。因此寻找一种成分单一、药效稳定的造模药物对该模型的建立有重要意义。随着大黄提取工艺的改进,发现大黄的提取物大黄酸泻下作用明显,故近来有用大黄酸建立大鼠“泻剂结肠”模型的相关报道。本实验采用单体大黄酸建立大鼠“泻剂结肠”模型,并与大黄建立的该动物模型进行比较,从而找到一种稳定、可控性好的建立“泻剂结肠”动物模型的药物。

1 材料和方法

1.1 材料 健康♂ Wistar大鼠33只,清洁级,3-4周

龄,体质量50-80 g,由斯贝福(北京)实验动物科技有限公司提供[许可证号SCXK(京)2011-0004]。饲养条件:分笼饲养,实验室清洁安静,室温20℃-25℃,相对湿度50%-70%。大黄粉(北京同仁堂连锁药店有限责任公司,产地:甘肃);大黄酸粉(南京泽朗医药技术有限公司,批号ZL20130310A);活性炭粉末(分析纯)(国药集团化学试剂有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 模型制备:按照随机化分组原则,将实验大鼠均分为对照组、大黄组、大黄酸组,每组11只。3组大鼠在普通干饲料饲养的基础上,分别再给予生理盐水、大黄粉悬液、大黄酸粉悬液灌胃,给药量按照每只大鼠的体质量计算得出。整个实验过程分3个循环完成。对照组给予10 mL/(kg·d)生理盐水灌胃。大黄组参照张连阳等^[3]和童卫东等^[6]的方法给予大黄粉悬液灌胃,第1循环约50 d,起始剂量为300 mg/(kg·d),以后按300 mg/(kg·d)递增,增长至3300 mg/(kg·d)时,约半数大鼠出现稀便,维持此剂量灌胃,直至80%大鼠稀便消失后开始下一循环;第2循环约38 d,在3300 mg/(kg·d)的基础上再按300 mg/(kg·d)递增,增至4200 mg/(kg·d)时,半数大鼠出现稀便,维持此剂量直至80%大鼠稀便消失;第3循环约48 d,在4200 mg/(kg·d)的基础上增至5400 mg/(kg·d)时,半数大鼠出现稀便,维持此剂量直至80%大鼠稀便消失;3个循环结束共用136 d,整个过程结束1 wk后停止灌胃,普通干饲料饲养待处理。大黄酸组参照张波等^[7]的方法给予大黄酸粉悬液灌胃,第1循环约33 d,给药剂量为240 mg/(kg·d),灌2 d停1 d,直至半数大鼠出现稀便,维持此剂量至80%大鼠稀便消失后开始下一循环;第2循环约36 d,给药剂量同上,灌5 d停2 d,直至80%大鼠稀便消失;第3循环约45 d,给药剂量为320 mg/(kg·d),灌5 d停2 d,直至80%大鼠稀便消失;3个循环共约114 d,整个过程结束1 wk后停止灌胃,普通干饲料饲养待处理。

1.2.2 肠道传输功能测定:采用活性炭悬液推进法检测肠道传输功能。停药1 wk后的大鼠禁食,不禁水24 h,经口灌入100 g/L活性炭悬液2 mL,30 min后颈椎脱臼法处死,立即剖腹,取出幽门至直肠末段的全部肠管,在无张力的条件下测量肠道全长及活性炭悬液推进长度。炭末推进率(%)=(炭末前端与幽门的距离/肠道总长度)×100。

统计学处理 采用SPSS17.0软件包进行统计

■ 研发前沿

随着对大黄酸药理机制的深入研究,发现其泻下作用明显,故有学者尝试用大黄酸建立“泻剂结肠”动物模型,并取得了初步成功,但使用该药物所建立模型的稳定性、可靠性及引发便秘的机制需要进一步探讨。

■ 相关报道

国内已有报道长期大剂量使用大黄酸可致大鼠肠道传输功能减慢,推测大黄酸可损伤肠道神经系统引起,Cajal间质细胞改变,导致胃肠道动力障碍,最终形成“泻剂结肠”。

■创新盘点

本实验通过对大黄酸及大黄建立的“泻剂结肠”动物模型比较,以进一步证实大黄酸建立“泻剂结肠”动物模型的稳定性及可靠性。

表 1 3组大鼠造模前后体质量变化表(mean ± SD)

分组	造模前		造模后	
	n	体质量(g)	n	体质量(g)
对照组	11	117.73 ± 4.52	11	485.73 ± 11.96
大黄组	11	114.00 ± 4.79	10	384.27 ± 35.31 ^b
大黄酸组	11	117.00 ± 4.65	9	402.45 ± 10.73 ^b

^b $P < 0.01$ vs 对照组。

分析,计量资料均以mean ± SD表示,组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 造模过程中3组大鼠一般情况记录 大黄组造模时间为136 d,造模过程中死亡1只,死亡原因不明。大黄酸组造模时间为114 d,死亡2只,1只为误灌入气管致死,另1只死亡原因不明。两组大鼠均形体消瘦,体质量约平均下降20%,虽大黄组大鼠体质量下降更为明显,但两组大鼠体重变化比较无统计学差异($P = 0.067$)(表1)。两组大鼠饮水量较对照组明显增多,皮毛色泽发红,大部分大鼠在饲喂过程中出现血便,约50%大鼠出现血尿。4只大鼠在饲养过程中出现脱肛,其中大黄酸组3只,大黄组1只。

2.2 肠道传输功能测定 腹部正中剖开后可见大黄组及大黄酸组大鼠结肠较对照组粗大、迂曲,肠腔内可见大块粪便存留。3组大鼠肠道总长度无明显差异;大黄组和大黄酸组炭末推进长度分别为58.20 cm ± 6.66 cm、55.11 cm ± 6.78 cm,而对照组则为82.64 cm ± 7.33 cm;大黄组和大黄酸组炭末推进长度明显短于对照组,差异有统计学意义($P < 0.01$)。大黄酸组炭末推进长度略短于大黄组,但两组之间比较无统计学差异($P > 0.05$)(表2)。

3 讨论

STC是慢性便秘中的一种常见临床类型^[8],发病率呈逐年升高趋势。由于临床上难以对STC患者进行前瞻性研究,因此建立稳定、可靠的实验动物模型对慢传输型便秘的研究意义重大。近年来,国内外学者尝试着建立了多种STC的动物模型,经各种模型制作方法的比较,发现仅刺激性泻剂对肠神经系统损伤明显,并且经一系列研究发现“泻剂结肠”建立的模型与STC有相似的肠道病理生理改变^[9-11],是目前研究STC的常用模型。同时“泻剂结肠”大鼠模型复制了便秘患

者长期服用泻剂后由腹泻到加重便秘的疾病过程,最接近临床上STC患者的疾病形成过程,作为研究STC的动物模型具有代表性。目前常用于建立“泻剂结肠”动物模型的刺激性泻剂大黄造模时存在以下问题:(1)不同文献报道大黄导致腹泻时用药量差距较大,目前报道大鼠首次出现稀便时大黄用量从800-2700 mg/kg不等;(2)大鼠在饲喂大黄造模过程中可出现粥样便、泥状便、水样便等不同程度稀便,而目前对造模过程中大鼠稀便程度尚无统一判断标准;(3)大黄是一味成分复杂的中药,除对胃肠道有影响外,对全身如肾脏、肝脏等多个系统具有不同功效,长期大剂量应用后对其他系统的作用与“泻剂结肠”形成有无相互影响,需进一步研究;(4)有文献报道大黄使便秘大鼠肌间神经丛中的胆碱能神经分布趋于正常,这可能是调节结肠功能、治疗慢传输型便秘的机制之一^[12]。此结论与多数文献报道的大黄致使STC大鼠胆碱能神经减少的报道不一致,需进一步探讨大黄对肠道胆碱能神经的影响。虽然本实验用大黄粉最终成功复制了“泻剂结肠”大鼠模型,但在造模过程中也遇到了用药量同文献报道相差较大、稀便情况不稳定及造模周期与大多数报道不一致等问题,导致模型的可复制性较差。因此,近年来国内外学者尝试寻找更稳定的建立“泻剂结肠”的药物,有学者尝试用大黄的提取物大黄酸建立该模型,并取得初步成果。本实验旨在对大黄酸及大黄二者建立大鼠“泻剂结肠”模型优劣进行比较,寻找一种更稳定、可靠的造模药物。

大黄酸是大黄的提取物,为单体,化学名为1,8-二羟基蒽醌衍生物,在抗炎、抗菌、抗肿瘤、抗氧化、降糖调脂、保肝抗纤维化等多方面具有活性^[13]。大黄酸本身无泻下作用,但其结肠内菌转化产物大黄酸蒽醌具有泻下活性。泻剂结肠是全胃肠动力障碍性疾病,以肠道传输功能减慢为主要特点,故造模完成后采用活性炭悬液推进长度(肠管黑染长度)初步鉴定模型是否成功。3个循环结束后大黄酸组肠道传输功能较对照组明显减慢;与大黄组相比炭末推进长度略短,但二者之间无统计学差异。大黄酸组在给予大黄酸粉悬液灌胃第2 d开始,约80%大鼠出现水样便,易于观察,稀便稳定。给药量及造模周期与参考文献报道差异不大,说明大黄酸药效稳定,给药量容易掌握,用于建立“泻剂结肠”模型时重复性及可控性好。近期研究表明STC患者结肠黏膜水通道蛋白4(aquaporin,

■应用要点

大黄酸及大黄均可成功复制大鼠“泻剂结肠”模型,但作为单体,大黄酸药效更稳定,浓度易于控制,造模时间相对较短,稳定性及可控性优于大黄,为研究慢传输型便秘提供了一种简单模型。

表 2 3组大鼠肠道传输功能比较(mean ± SD)

分组	n	肠道总长度(cm)	炭末推进长度(cm)	百分比(%)
对照组	11	133.36 ± 8.02	82.64 ± 7.33	61.94 ± 3.86
大黄组	10	130.50 ± 5.54	58.20 ± 6.66 ^b	44.56 ± 4.32
大黄酸组	9	132.44 ± 3.91	55.11 ± 6.78 ^b	41.65 ± 4.04

^bP<0.01 vs 对照组.

AQP4)高表达^[14],而在大黄酸药理机制的研究中发现其能抑制LoVo细胞AQP4基因的转录与翻译^[15],推测大黄酸的长期大剂量服用使得这种抑制作用减弱,AQP4基因表达增高,导致肠道水分吸收增加,引起大便干燥,加重便秘.而目前关于STC大鼠近端结肠中水通道蛋白的研究却显示AQP3表达下调^[16],推测此改变对便秘的加重有一定的延缓作用.以上研究提示结肠黏膜中AQP4、AQP3的表达异常在“泻剂结肠”形成与发展中起重要作用.

本实验造模药物大黄酸及大黄均成功复制了“泻剂结肠”大鼠模型,但大黄酸为单体泻剂,药效稳定,避免了大黄成分复杂所致的用药剂量相差较大,排除了品种、产地、采收时间等因素对大黄泻下作用的影响;同时大黄酸粉悬液灌胃后稀便明确,大便性状容易判断,造模周期稳定,解决了大黄造模过程中用药剂量和造模周期与文献报道不一这两个主要问题.大黄酸质量稳定,浓度易于控制,给药方法简单,可重复及可控制性强,适用于慢传输型便秘动物模型的建立.

4 参考文献

- Bharucha AE, Phillips SF. Slow transit constipation. *Gastroenterol Clin North Am* 2001; 30: 77-95 [PMID: 11394038]
- 童卫东, 张胜本, 刘宝华, 张连阳, 黄显凯. 酚酞对大鼠结肠动力及肠神经系统的影响研究. *中华消化杂志* 2003; 23: 723-726
- 张连阳, 高峰, 童卫东, 张胜本, 黄显凯. 大鼠泻剂结肠模型的建立. *世界华人消化杂志* 1998; 6: 864-866
- 郑晨果, 金纯, 金定国. 大鼠泻剂结肠模型的再探讨. *浙江中西医结合杂志* 2006; 16: 687-688
- 张兴, 范一宏, 李延玲, 吕宾, 张璐. 外源性胶质细胞源性神经营养因子对慢传输型便秘大鼠肠道传输功能的影响. *胃肠病学* 2013; 18: 16-19
- 童卫东, 张胜本, 刘宝华, 张连阳, 黄显凯, 高峰. 大黄对大鼠结肠动力及肠神经系统的影响. *世界华人消化杂志* 2003; 11: 665-667
- 张波, 丁义江. 大黄酸建立“泻剂结肠”大鼠模型的研究. *时珍国医国药* 2012; 23: 1815-1816
- Shahid S, Ramzan Z, Maurer AH, Parkman HP, Fisher RS. Chronic idiopathic constipation: more than a simple colonic transit disorder. *J Clin Gastroenterol* 2012; 46: 150-154 [PMID: 22011587 DOI: 10.1097/MCG.0b013e318231fc64]
- He CL, Burgart L, Wang L, Pemberton J, Young-Fadok T, Szurszewski J, Farrugia G. Decreased interstitial cell of cajal volume in patients with slow-transit constipation. *Gastroenterology* 2000; 118: 14-21 [PMID: 10611149 DOI: 10.1016/S0016-5085(00)70409-4]
- Lee JI, Park H, Kamm MA, Talbot IC. Decreased density of interstitial cells of Cajal and neuronal cells in patients with slow-transit constipation and acquired megacolon. *J Gastroenterol Hepatol* 2005; 20: 1292-1298 [PMID: 16048580 DOI: 10.1111/j.1440-1746.2005.03809.x]
- Wedel T, Roblick UJ, Ott V, Eggers R, Schiedeck TH, Krammer HJ, Bruch HP. Oligoneuronal hypoganglionosis in patients with idiopathic slow-transit constipation. *Dis Colon Rectum* 2002; 45: 54-62 [PMID: 11786765 DOI: 10.1007/s10350-004-6114-3]
- 汪兴伟, 刘海峰, 徐梅, 王国安, 孙永刚, 房殿春. 大黄对慢传输型便秘大鼠结肠肌间神经丛胆碱能神经的影响. *重庆医学* 2008; 37: 1685-1689
- 冯素香, 谢新年, 李建生, 屈凌波, 梁生旺, 王淑美. 固相萃取-高效液相色谱法测定大黄酸血药浓度及在大鼠体内的药动学规律. *中国实验方剂学杂志* 2011; 17: 140-143
- 王笑军, 袁维棠, 宋军民, 张志永. 水通道蛋白4在慢传输型便秘患者结肠黏膜的表达和意义. *中华胃肠外科杂志* 2010; 13: 445-447
- 张文生, 李锋, 鲍军强, 王胜春, 尚刚伟, 李军昌, 王长海. 大黄酸对LoVo细胞水通道蛋白4表达的调节效应. *中药材* 2008; 31: 702-706
- 智会, 袁维棠. 水通道蛋白3、4、8在大鼠慢传输型便秘模型结肠黏膜中的表达. *中华胃肠外科* 2011; 14: 459-461

编辑 田滢 电编 鲁亚静



■同行评价

本文设计合理,有一定的实用价值,为研究便秘提供了一种简单模型.

HIPK2调控COX-2及 β -catenin表达对人结直肠癌细胞VEGF表达的影响

胡强, 周利红, 刘宣, 隋华, 付晓伶, 颜琳琳, 任建琳, 李琦

■背景资料

血管新生是结直肠癌发生的重要促进因素, 结直肠癌的生长、浸润、复发和转移均有赖于肿瘤血管的生成。 β -catenin信号途径在肿瘤的发生、发展中占据着重要的地位, 该通路的过度激活与多种人类肿瘤的发生有密切的联系, 尤其在结直肠癌的发生发展上, 约90%与该通路过度激活有关。

胡强, 上海市徐汇区大华医院普外科 上海市 200237
周利红, 刘宣, 隋华, 付晓伶, 颜琳琳, 李琦, 上海中医药大学附属曙光医院肿瘤科 上海市 201203
任建琳, 上海市中医医院肿瘤科 上海市 200071
胡强, 硕士, 副主任医师, 主要从事胃肠外科的临床与基础研究。
国家自然科学基金资助项目, Nos. 81303103, 81303106
上海市科委基金资助项目, Nos. 13140902500, 13ZR1462200
上海市教委创新基金资助项目, Nos. 12ZZ118, 12YZ058
上海市卫生局基金资助项目, Nos. 2010161, 2011ZJ030, 20124048
上海市徐汇区医学科研基金资助项目, No. SHXH201004
作者贡献分布: 本课题由李琦设计; 研究过程由胡强、周利红、刘宣、隋华、付晓伶及颜琳琳共同完成; 研究所用新试剂与分析工具由胡强与李琦提供; 数据分析由任建琳与周利红共同完成; 本论文写作由胡强与周利红完成。
通讯作者: 李琦, 主任医师, 博士生导师, 201203, 上海市张衡路528号, 上海中医药大学附属曙光医院肿瘤科。lzwf@hotmail.com
电话: 021-20256533
收稿日期: 2013-12-04 修回日期: 2014-01-13
接受日期: 2014-01-24 在线出版日期: 2014-03-28

HIPK2 reduces VEGF expression by regulating expression of COX-2 and β -catenin in human colorectal cancer cells

Qiang Hu, Li-Hong Zhou, Xuan Liu, Hua Sui, Xiao-Ling Fu, Lin-Lin Yan, Jian-Lin Ren, Qi Li

Qiang Hu, Dahua Hospital of Xuhui District, Shanghai 200237, China
Li-Hong Zhou, Xuan Liu, Hua Sui, Xiao-Ling Fu, Lin-Lin Yan, Qi Li, Shuguang Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China
Jian-Lin Ren, Shanghai Municipal Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200071, China
Supported by: National Natural Science Foundation of China, Nos. 81303103 and 81303106; Program of Science and Technology Commission of Shanghai China, Nos. 13140902500 and 13ZR1462200; the Foundation of Shanghai Municipal Education Commission, Nos. 12ZZ118 and 12YZ058; Program of Shanghai Municipal Health Bureau, Nos. 2010161, 2011ZJ030 and 20124048; Medical Research Program of Shanghai Xuhui District Health Bureau, No. SHXH201004
Correspondence to: Qi Li, Chief Physician, Department of Clinical Oncology, Shuguang Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, 528 Zhangheng Road, Shanghai 201203, China. lzwf@hotmail.com
Received: 2013-12-04 Revised: 2014-01-13
Accepted: 2014-01-24 Published online: 2014-03-28

■同行评议者

刘海峰, 主任医师, 北京市武警总医院消化科

Abstract

AIM: To study the effects of overexpression

of homeodomain-interacting protein kinase 2 (HIPK2) on the expression of cyclooxygenase 2 (COX-2) and β -catenin in HCT-116 cells, and to explore the regulatory effect of the HIPK2 gene on angiogenic factor expression in human colorectal cancer cells.

METHODS: The pEGFP-N3 vector or pEGFP-N3-HIPK2 plasmid was transfected into human colorectal cancer HCT-116 cells using Lipofectamine 2000, and untransfected cells were used as normal controls. The expression of VEGF (vascular endothelial growth factor) in cell culture medium was detected by ELISA assay, and the protein expression of β -catenin was tested by Western blot. The COX-2 promoter containing plasmid pGL3-basic-COX-2 was co-transfected with pRL-SV40 in the three groups above. COX-2 promoter activity was detected by dual luciferase activity assay, and COX-2 mRNA level was determined by real-time PCR.

RESULTS: The pEGFP-N3-HIPK2 group and pEGFP-N3 group had the same fluorescent level, and there was no statistically significant difference in HCT-116 cells. The VEGF expression was significantly inhibited ($857.54 \text{ pg/mL} \pm 65.04 \text{ pg/mL}$ vs $368.32 \text{ pg/mL} \pm 98.82 \text{ pg/mL}$, $P < 0.05$) after pEGFP-N3-HIPK2 plasmid transfection. COX-2 promoter activity and mRNA expression were significantly lower in the pEGFP-N3-HIPK2 group than in the pEGFP-N3 group ($75.467 \times 10^{-5} \pm 18.666 \times 10^{-5}$ vs $266.407 \times 10^{-5} \pm 40.902 \times 10^{-5}$, $1.07 \times 10^{-4} \pm 0.32 \times 10^{-4}$ vs $3.48 \times 10^{-4} \pm 0.64 \times 10^{-4}$, $P < 0.05$ for both). HIPK2 could inhibit the protein expression of β -catenin but up-regulate p- β -catenin expression.

CONCLUSION: pEGFP-N3-HIPK2 transfection significantly increased the expression of HIPK2, and reduced the transcription of the COX2 gene and VEGF level in human colorectal cancer HCT-116 cells. The mechanisms may be related to the inhibition of COX-2 and β -catenin expression in cells, and regulation of β -catenin-COX-2 signal transduction.

© 2014 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

Key Words: Homeodomain-interacting protein kinases 2; Vascular endothelial growth factor; Colorectal cancer; Angiogenesis; Cyclooxygenase-2

Hu Q, Zhou LH, Liu X, Sui H, Fu XL, Yan LL, Ren JL, Li Q. HIPK2 reduces VEGF expression by regulating expression of COX-2 and β -catenin in human colorectal cancer cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(9): 1266-1274 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/1266.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i9.1266>

摘要

目的: 研究同源结构域相互作用蛋白激酶2(homeodomain-interacting protein kinases 2, *HIPK2*)基因重组质粒对HCT-116细胞环氧合酶2(cyclooxygenase 2, COX-2)及 β -catenin表达的影响, 探讨*HIPK2*基因对人结直肠癌细胞血管新生因子表达的调节作用。

方法: 采用脂质体将pEGFP-N3和pEGFP-N3-*HIPK2*质粒转染人结直肠癌细胞, 分为正常组、载体质粒组和*HIPK2*质粒组, ELISA法检测细胞培养液中血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的表达, Western blot检测 β -catenin蛋白表达情况。在上述3组细胞中同时转染含*COX-2*基因启动子质粒pGL3-basic-COX-2后, 双荧光素酶活性检测*COX-2*启动子的表达, Real-time PCR检测COX-2 mRNA的表达水平。

结果: HCT-116细胞中pEGFP-N3-*HIPK2*质粒组的荧光表达量与载体质粒pEGFP-N3组的表达量基本一致, 两组相比无明显差异。转染pEGFP-N3-*HIPK2*质粒后, HCT-116细胞内VEGF的表达量由对照组的 $857.54 \text{ pg/mL} \pm 65.04 \text{ pg/mL}$ 降低至 $368.32 \text{ pg/mL} \pm 98.82 \text{ pg/mL}$, 两组相比具有统计学意义($P < 0.05$); *COX-2*启动子活性由空载体组的 $266.407 \times 10^{-5} \pm 40.902 \times 10^{-5}$ 下降至 $75.467 \times 10^{-5} \pm 18.666 \times 10^{-5}$, 两组相比具有统计学意义($P < 0.05$); COX-2 mRNA的相对表达量由空载体组的 $3.48 \times 10^{-4} \pm 0.64 \times 10^{-4}$ 下调至 $1.07 \times 10^{-4} \pm 0.32 \times 10^{-4}$, 两组相比具有统计学意义($P < 0.05$)。同时, Western blot结果显示, *HIPK2*可明显降低细胞 β -catenin的蛋白表达, 上调细胞内p- β -catenin蛋白的表达量。

结论: pEGFP-N3-*HIPK2*可明显上调HCT-116细胞*HIPK2*的表达, 显著下调人结直肠癌细胞COX-2的转录表达及VEGF的表达水平, 其作

用机制可能与其抑制细胞COX-2及 β -catenin表达, 调节 β -catenin-COX-2信号转导有关。

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词: 同源结构域相互作用蛋白激酶2; 血管内皮生长因子; 结直肠癌; 血管新生; 环氧合酶2

核心提示: 目前研究认为, 同源结构域相互作用的蛋白激酶2(homeodomain-interacting protein kinases 2)基因是一种在大肠癌细胞中低表达的抑癌基因, 我们研究发现其抑制结直肠癌细胞血管内皮生长因子表达可能与其下调细胞内环氧合酶2(cyclooxygenase 2)及 β -catenin表达有关, 其详细的作用机制尚有待于进一步的研究及探讨。

胡强, 周利红, 刘宣, 隋华, 付晓玲, 颜琳琳, 任建琳, 李琦. *HIPK2*调控COX-2及 β -catenin表达对人结直肠癌细胞VEGF表达的影响. *世界华人消化杂志* 2014; 22(9): 1266-1274 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/1266.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i9.1266>

0 引言

血管新生是结直肠癌发生的重要促进因素, 结直肠癌的生长、浸润、复发和转移均有赖于肿瘤血管的生成。 β -catenin信号途径在肿瘤的发生、发展中占据着重要的地位, 该通路的过度激活与多种人类肿瘤的发生有密切的联系, 尤其在结直肠癌的发生、发展上, 约90%与该通路过度激活有关。同源结构域相互作用的蛋白激酶2(homeodomain-interacting protein kinases 2, *HIPK2*)与肿瘤的发生发展关系密切, *HIPK2*能调节转录、凋亡、细胞生长和进展, 既作为转录共阻遏物又作为激酶, 而对一些功能蛋白产生影响。环氧合酶2(cyclooxygenase 2, COX-2)是花生四烯酶转化为前列腺素的限速酶, 是 β -catenin信号途径的下游靶基因, 在恶性肿瘤中特别是大肠癌细胞中过表达, 促进大肠癌的发生。肿瘤细胞中*HIPK2*过表达可能通过调节细胞内 β -catenin及COX-2的活性而下调血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的表达, 从而对结直肠癌血管新生产生抑制作用。本研究利用成功构建的人*HIPK2*基因重组质粒pEGFP-N3-*HIPK2*, 将重组质粒转染人结直肠癌HCT-116细胞, 观察*HIPK2*基因在HCT-116细胞中的表达情况及其对HCT-116细胞 β -catenin-COX-2信号通路的调控作用, 以期探讨*HIPK2*基因对人结直肠癌细胞血管新生因子表达的调节

■研究前沿

Wnt/ β -catenin信号通路是细胞内常见的信号通路, 在肿瘤的发生、发展中占据着重要的地位, 该通路的过度激活与多种人类肿瘤的发生有密切的联系, 尤其在大肠癌的发生、发展上, 约90%大肠癌发生与该通路过度激活有关。癌基因 β -catenin在细胞质的积累牵涉到多种人类肿瘤及其血管新生的进程, β -catenin可被多种生化机制调节, 但具体的机制尚不明确。

■ 相关报道

Kim研究小组最先发现与同源结构域转录因子相互作用的保守丝氨酸/苏氨酸激酶-同源结构域相互作用的蛋白激酶(homeodomain-interacting protein kinases, HIPKs)。目前已知该激酶有3个亚型,分别为HIPK1、HIPK2、HIPK3,其中HIPK2与肿瘤的发生发展关系密切, HIPK2既作为转录共阻遏物又作为激酶,能调节肿瘤细胞转录、凋亡、生长和进展。

作用,为临床上抗结直肠癌的作用靶点研究提供思路及途径。

1 材料和方法

1.1 材料 人结直肠癌HCT-116细胞(购自中国科学院上海细胞库),细胞培养于含10%胎牛血清的R/MINI 1640培养基,置于5%CO₂、37℃及饱和湿度的培养箱中培养。pGL3-Basic-COX-2重组质粒、pRL-SV40内参质粒、pEGFP-N3载体质粒及人HIPK2基因重组质粒pEGFP-N3-HIPK2均由上海中医药大学附属曙光医院肿瘤实验室提供。HilyMax转染脂质体(购自日本同仁化学研究所);人VEGF ELISA试剂盒(美国Bio Sources公司);Dual-Luciferase Assay System试剂盒(美国Promega公司);Rnaiso试剂、RNA的反转录试剂盒、Real-time PCR试剂盒(日本TaKaRa公司);BCA Protein Assay Kit(HyClone-Pierce,货号:23225);Prestained protein marker(中晶公司,货号:SM0441);ECL-PLUS/Kit(Amersham公司货号:RPN2132);医用X射线光片(Kodak公司);X线胶片显影粉(上海冠龙照相材料厂);X线胶片定影粉(上海冠龙照相材料厂)。双人垂直流超净工作台(新加坡ESCO公司, SVE-6A1),台式个人型高速离心机(德国Eppendorf公司, Minispan),台式高速冷冻离心机(德国Eppendorf公司, 5804R),银质梯度PCR仪(德国Eppendorf公司, Mastercycler Ep),荧光定量PCR仪(美国ABI公司, Prism® 7300型),生物分光光度计(德国Eppendorf公司, RS-232-C),高精度电子天平(德国Sartorius Stedim Biotech公司, CP225D),酶标仪(美国BioRad公司, 680),化学发光仪(美国Promega公司, GloMix 20/20),荧光倒置显微镜(日本OLYMPUS公司, CKX41/U-RFLT50), CO₂培养箱(英国RSBiotech公司, GALAXYS)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: 人结直肠癌HCT-116细胞,用含10%小牛血清的Mycoy's 5A培养基于置于体积分数5%CO₂、饱和湿度、37℃孵箱中常规培养,每1-2天传代一次。传代时,吸除瓶中培养液,加细胞消化液1 mL,消化贴壁细胞,吸取培养液轻轻吹打瓶壁,使其脱离瓶壁形成单个细胞悬液,取对数生长期的细胞用于实验。

1.2.2 pEGFP-N3-HIPK2质粒转染细胞: 将上述常规培养的人结直肠癌HCT-116细胞随机分为空白组、载体质粒组、重组质粒组,分别按如下剂量加入不同的质粒进行瞬时转染: (1)空白

组: 正常HCT-116细胞($n = 3$); (2)载体质粒组: pEGFP-N3($n = 3$); (3)重组质粒组: pEGFP-N3-HIPK2 ($n = 3$)。在1.5 mL的离心管中配制待转染质粒(1.0 μg/孔)、转染脂质体Hily-Max(4.5 μL/孔)复合物,将待转染质粒稀释至不含血清和抗菌素的Mycoy's 5A培养基中,混合均匀,然后将转染脂质体悬液,室温温育5 min。最后将两者混合在一起,充分混匀静置20 min,使质粒与脂质体充分结合。然后直接加入到细胞培养中,在37℃ 5%CO₂培养箱中培养24-72 h,荧光倒置显微镜下观察绿色荧光蛋白的表达情况。

1.2.3 pGL3-Basic-COX-2启动子质粒共转染HCT-116细胞: 将培养于含有10%新生牛血清、100 U/mL青霉素、100 μg/mL链霉素Mycoy's 5A完全培养基(37℃ 5%CO₂、饱和湿度)的人结直肠癌HCT-116细胞株,按 1×10^6 个细胞/孔的量在24孔板中接种指数生长期的细胞,在37℃ 5%CO₂培养箱中过夜培养,直到细胞密度达到60%-80%。将上述常规培养的人结直肠癌HCT-116细胞随机分为对照组、载体质粒处理组、重组质粒处理组,分别按如下剂量加入不同的质粒进行瞬时转染: (1)对照组: 转染pGL3-Basic-COX-2质粒和PRL-SV40内参质粒($n = 3$); (2)载体质粒处理组: 转染pGL3-Basic-COX-2质粒、PRL-SV40内参质粒和pEGFP-N3质粒($n = 3$); (3)重组质粒处理组: 转染pGL3-Basic-COX-2质粒、PRL-SV40内参质粒和pEGFP-N3-HIPK2重组质粒($n = 3$)。按上述分组将每一组细胞均转染含人COX-2基因启动子重组质粒和pRL-SV40内参质粒,不同处理组分别加转染pEGFP-N3载体质粒和pEGFP-N3-HIPK2重组质粒,转染48 h后使用化学发光法检测各组细胞的双荧光素酶活性。

1.2.4 化学发光法检测双荧光素酶活性: 将上述24孔板中转染pGL3-Basic-COX-2重组质粒和pRL-SV40内参质粒的HCT-116细胞于转染3-5 h后吸除质粒/脂质体/Mycoy's 5A复合物,以完全培养基为空白对照,分别在各组细胞中加入含TanIIA 4、8、12、16、20 μmol/L的Mycoy's 5A培养基,每组设4复孔,继续于5%CO₂、37℃的培养箱中培养24-48 h,一般于培养48 h后进行双荧光素酶活性。细胞内双荧光素酶活性检测采用美国Promega公司提供的Dual-Luciferase Assay System试剂盒检测,分别用萤火虫荧光素酶的值除以海肾荧光素酶的值,所得到的比值(RLU1/RLU2)即可反映COX-2基因启动子的转

录活性。

1.2.5 ELISA法检测细胞培养液中VEGF的表达:取常规培养对数生长期的人结直肠癌HCT-116细胞, 0.25%的胰蛋白酶将培养瓶中的细胞消化, 用含10%小牛血清的Mycoy's 5A培养液稀释细胞, 配制成单个细胞悬液, 充分混匀后调整细胞浓度至 $1 \times 10^5/\text{mL}$, 以每孔500 μL 的量接种于3个24孔细胞培养板中, 置于5% CO_2 、饱和湿度、37 $^\circ\text{C}$ 培养箱中培养。将24孔板中的人结直肠癌HCT-116细胞共分为3组, 每组4个复孔: (1)空白对照组: 加入空白培养液; (2)pEGFP-N3组: 转染pEGFP-N3质粒; (3)pEGFP-N3-HIPK2组: 转染pEGFP-N3-HIPK2质粒。按上述分组及要求对细胞进行pEGFP-N3、pEGFP-N3-HIPK2质粒转染处理24、48 h。作用不同时间点后, 将每孔中的细胞培养液分别收集到1.5 mL的离心管中, 5000 r/min离心5 min, 每孔各取100 μL 培养液上清, 按试剂盒提供的操作步骤进行ELISA法检测细胞培养液中VEGF的表达情况。

1.2.6 Western blot检测蛋白表达:细胞总蛋白抽提: 从培养箱中取出细胞, 弃去细胞培养液, PBS洗涤2次, 弃去PBS, 加入适量预冷的2 \times Lysis Buffer, 细胞刮刮下细胞, 将样品转移入Ep管中, 冰上裂解细胞10-15 min, 超声破碎仪破碎细胞(200 W共4次, 每次5 s, 间隔2 s), 4 $^\circ\text{C}$, 12000 g , 离心15 min, 取上清, 测蛋白浓度后, 每个样品蛋白终浓度均调整为2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, -80 $^\circ\text{C}$ 保存备用。上样样品准备: 每个样品取相同总蛋白量, 加入相同体积的2 \times loading buffer上样缓冲液, 混匀后, 沸水浴煮5-10 min, 4 $^\circ\text{C}$ 存放备用。SDS-PAGE: 制胶: 根据目的蛋白分子量大小配制不同浓度的胶; 上样: 等胶凝固好后, 拔去梳子, 电泳缓冲液清洗上样孔, 将准备好的样品上样; 电泳: 30 mA电泳2 h。免疫印迹(湿转): 电泳结束后, 使用转移电泳装置, 在4 $^\circ\text{C}$ 、400 mA恒流条件下电转120 min, 将蛋白转移到PVDF膜上。免疫显色: (1)封闭: 用封闭液(含5%脱脂牛奶的TBST溶液)室温封闭PVDF膜1 h或4 $^\circ\text{C}$ 过夜; (2)一抗孵育: 封闭液稀释抗体, 然后与封闭好的PVDF膜室温孵育2 h或4 $^\circ\text{C}$ 过夜; (3)洗膜: TBST洗膜3次, 每次10 min; (4)二抗孵育: 用封闭液稀释相应的二抗, 室温下孵育PVDF膜2 h; (5)洗膜: TBST洗膜3次, 每次10 min; (6)采用Amersham公司ECL+plusTM Western blotting system试剂盒进行显色; (7)X光显影: 在暗房中进行, 获得显示条带的胶片。

1.2.7 Real-time PCR检测mRNA表达:用RNAiso试剂提取细胞总RNA, 溶解于40-60 μL 的DEPC水中, 于55 $^\circ\text{C}$ -60 $^\circ\text{C}$ 放置10 min助溶; 紫外分光光度计测定 $A_{260/280}$ 值, 推算RNA纯度(1.8-2.0即可); 将各试剂按以下剂量加入到200 μL EP管中, 混合均匀: 5 \times PrimeScript Buffer 4 μL , PrimeScript RT Enzyme Mix I 1 μL , Oligo dT Primer (50 $\mu\text{mol/L}$) 1 μL , Random 6 mers (100 $\mu\text{mol/L}$) 1 μL , Total RNA 4 μL , Rnase free water up to 20 μL , 反应条件: 37 $^\circ\text{C}$ 15 min, 85 $^\circ\text{C}$ 5 s, 反应结束所得cDNA保存于-20 $^\circ\text{C}$ 。荧光定量PCR: 采用已合成的GAPDH和COX-2基因上下游引物和探针, 将上述cDNA分别按以下剂量加入到8联管中, 每个基因做12个复孔: Forward Primer 0.4 μL , Reverse Primer 0.4 μL , Probe 0.8 μL , cDNA 2 μL , Rox Reference Dye 0.4 μL , Premix EX Taq 10 μL , ddH₂O up to 20 μL , 反应条件: 预变性: 95 $^\circ\text{C}$, 10 s; 变性: 95 $^\circ\text{C}$, 5 s; 退火、延伸: 60 $^\circ\text{C}$, 31 s, 40个循环, 所得到的数据采用ABI 7300 SDS软件分析。相对mRNA表达水平的计算: 每个样本的相对mRNA表达, 能直接用样品各自的内源控制物GAPDH表达来标准化加入的初始RNA的量。即每个样品的靶基因的相对mRNA表达水平可以用以下公式计算: 相对mRNA表达 = $2^{-\Delta\text{Ct}}$, (ΔCt = 靶基因Ct值-GAPDH Ct值)。以GAPDH作为内参, 同时以正常HCT-116细胞作用为基准, 各组mRNA的表达量表示成正常HCT-116细胞的N倍($N = 2^{-\text{样品}\Delta\text{Ct}}/2^{-\text{基准}\Delta\text{Ct}}$)。

统计学处理 采用SPSS18.0专用统计软件包对数据进行统计分析, 所得到的数据以mean \pm SD表示, 多样本均数比较用单因素方差分析; 各组两两比较采用Student-Newman-Keuls检验, 组间比较用 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 重组质粒对人结直肠癌细胞HIPK2表达的影响 按照阳离子脂质体质粒转染技术, 将pEGFP-N3载体质粒与pEGFP-N3-HIPK2重组质粒转染人结直肠癌HCT-116细胞24 h后, 用荧光倒置显微镜观察细胞绿色荧光表达情况。结果显示如图1所示, HIPK2基因重组质粒转染细胞12 h就可以观察到细胞表达绿色荧光, 与转染pEGFP-N3载体质粒组相比, 其表达效果无明显统计学意义($P > 0.05$)。

2.2 HIPK2对人结直肠癌细胞VEGF表达的抑制作用 正常培养对数生长期的人结直肠癌

■创新盘点

本研究通过构建HIPK2基因CDS序列质粒转染人结直肠癌细胞, 发现HIPK2基因重组质粒能在人结直肠癌细胞中稳定表达, 可抑制HCT-116细胞VEGF的表达水平, 及环氧合酶2(cyclooxygenase 2, COX-2)启动子和mRNA的活性, 并下调细胞内 β -catenin的蛋白表达, 促进p- β -catenin蛋白的表达水平。

■应用要点

将利用人HIPK2基因重组质粒pEGFP-N3-HIPK2转染人结直肠癌细胞,观察其对肠癌细胞 β -catenin-COX-2信号通路的调控作用,探讨HIPK2基因对人结直肠癌细胞血管新生因子表达的调节作用,为临床上抗结直肠癌的作用靶点研究提供思路及途径。

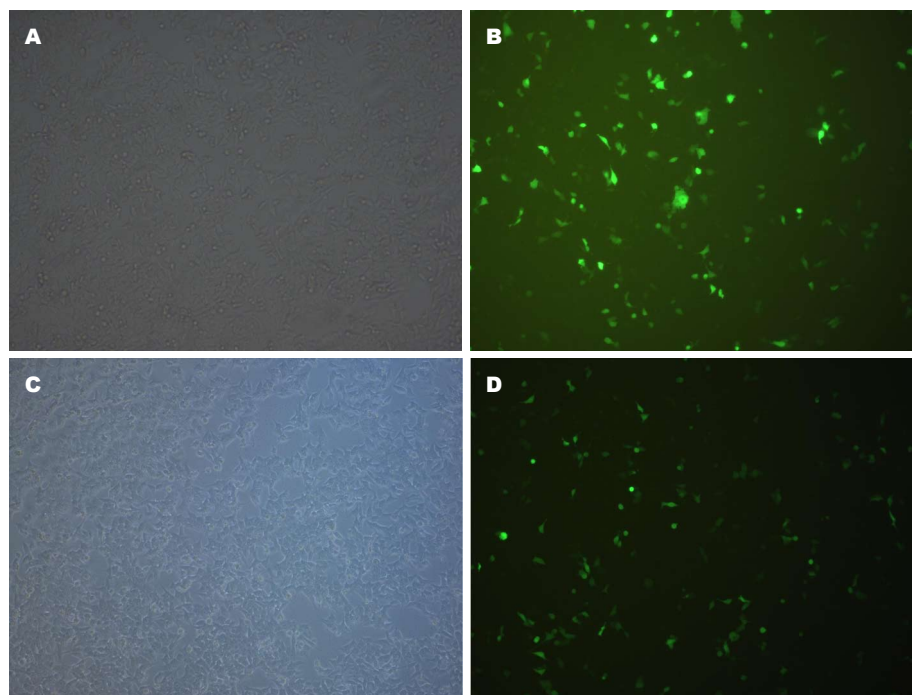


图1 pEGFP-N3-HIPK2重组质粒在人结直肠癌中的表达。A: pEGFP-N3正常光; B: pEGFP-N3荧光; C: pEGFP-N3-HIPK2正常光; D: pEGFP-N3-HIPK2荧光。

HCT-116细胞,分为正常组、pEGFP-N3载体质粒转染组、pEGFP-N3-HIPK2重组质粒转染组,采用阳离子脂质体法分别进行培养液处理、转染pEGFP-N3载体质粒和转染pEGFP-N3-HIPK2重组质粒。转染后正常培养24 h,收集细胞上清,采用ELISA试剂盒法检测细胞培养液中VEGF的浓度。结果如图2所示,空白培养液处理组和载体质粒处理组的细胞培养液中,VEGF的浓度较高,分别为 $886.63 \text{ pg/mL} \pm 34.86 \text{ pg/mL}$ 和 $857.54 \text{ pg/mL} \pm 24.04 \text{ pg/mL}$,而HIPK2重组质粒转染后,VEGF的浓度显著下调为 $368.32 \text{ pg/mL} \pm 27.82 \text{ pg/mL}$,具有统计学意义。

2.3 HIPK2对人结直肠癌细胞COX-2活性的影响 正常HCT-116细胞、转染pEGFP-N3载体质粒的HCT-116细胞和转染pEGFP-N3-HIPK2重组质粒的HCT-116细胞,分别共转染含COX-2启动子重组质粒的pGL3-Basic-COX-2启动子,转染48 h后使用化学发光法检测各组细胞的双荧光素酶活性、Real-time PCR法检测细胞内COX-2 mRNA的表达。结果如图3所示, HIPK2基因能明显抑制人结直肠癌细胞萤火虫荧光素酶活性,说明HIPK2基因抑制了细胞内COX-2启动子的转录活性,两者相比具有明显的统计学意义。同时, HIPK2基因对COX-2 mRNA和蛋白表达均具有抑制作用,结果如表1所示。

2.4 HIPK2基因对 β -catenin蛋白表达的影响 将指数生长期的HCT-116细胞接种于10 cm培养皿中,接种密度为60%-80%,接种6 h后,分别进行培养液处理、转染pEGFP-N3载体质粒和转染pEGFP-N3-HIPK2重组质粒,处理12、24、36 h后,分别提取细胞总蛋白,采用Western blot法检测细胞内 β -catenin蛋白的表达情况,结果如图4所示, HIPK2可以明显抑制 β -catenin蛋白的表达,上调细胞内磷酸化 β -catenin蛋白p- β -catenin的表达。

3 讨论

肿瘤血管新生(tumor angiogenesis)或血管生成(vascularization)是实体瘤生长非常关键的因素,恶性肿瘤的生长、浸润和转移有赖于肿瘤血管的生成。如果没有血管新生,原发瘤生长不会超过1-2 mm,其继续生长必须依赖新血管的形成,以提供足够的营养和氧,带走代谢产物^[1],同时,新生血管管壁不完整,呈高通透状态,有利于肿瘤细胞的转移。肿瘤血管生成受两者有机调控,一旦血管生成因子上调或血管生成抑制因子功能障碍,二者平衡被打破即发生肿瘤血管新生^[2,3]。肿瘤细胞分泌的血管生成因子能将增强新血管生成和增殖的特殊基因激活和蛋白表达的信号传递到正常组织周围,从而使血管内皮细胞加速分化,产生微血管包绕到肿瘤组织周围,从而促进肿瘤

表1 HIPK2对HCT-116细胞环氧合酶2基因mRNA表达的影响($n=3$, mean \pm SD)

分组	环氧合酶2 mRNA($\times 10^{-4}$)
空白组	3.72 \pm 0.46
pEGFP-N3组	3.48 \pm 0.64
pEGFP-N3-HIPK2组	1.07 \pm 0.32 ^a

^a $P<0.05$ vs pEGFP-N3组. HIPK2: 同源结构域相互作用蛋白激酶2.

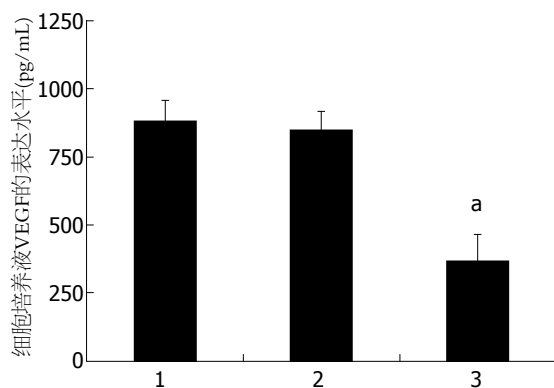


图2 HIPK2对人结直肠癌细胞VEGF表达的抑制作用. 1: 对照组; 2: pEGFP-N3组; 3: pEGFP-N3-HIPK2组. ^a $P<0.05$ vs pEGFP-N3组. VEGF: 血管内皮生长因子; HIPK2: 同源结构域相互作用蛋白激酶2.

侵袭和转移. 因此, 有效调控血管生成和抑制因子间的动态平衡, 是抗肿瘤血管生成的治疗关键和作用靶点^[4].

影响血管新生的因素较多, 机制极其复杂, 目前认为, 以VEGF家族和血管生成素(angio-genin, Ang)家族为代表的血管生成因子在肿瘤血管新生中扮演了重要的角色. VEGF是一种糖基化分泌性多肽因子, 分子量约4.3 kDa, 是作用最强的促血管生长因子, 能特异性刺激血管内皮细胞增殖与血管生成^[5]. 可直接作用于血管内皮细胞, 刺激其有丝分裂的发生, 从而促进新血管的生成, 也可通过增加血管通透性, 使包括许多基质形成重要因子的血浆蛋白外渗, 为血管内皮细胞的迁移及肿瘤细胞的转移提供基质^[6]. 已发现多种恶性肿瘤中VEGF表达增高, 并认为其与肿瘤的生长, 血管的新生有关^[7]. VEGF与大肠癌的发生、发展、浸润程度及淋巴结转移关系密切, 干预VEGF的生成及其产生的作用途径或破坏其受体可抑制大肠癌肿瘤血管生成, 从而抑制大肠癌的生长、转移, 为临床治疗本病提供了新思路. Ang是与血管新生密切相关的一类血管生长调节因子, Ang-2是该家族目前已发现

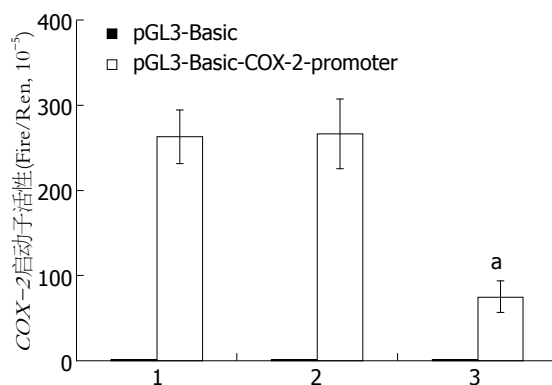


图3 HIPK2对人结直肠癌细胞COX-2启动子活性的影响. 1: 对照组; 2: pEGFP-N3组; 3: pEGFP-N3-HIPK2组. ^a $P<0.05$ vs pEGFP-N3组. COX-2: 环氧合酶2; HIPK2: 同源结构域相互作用蛋白激酶2.

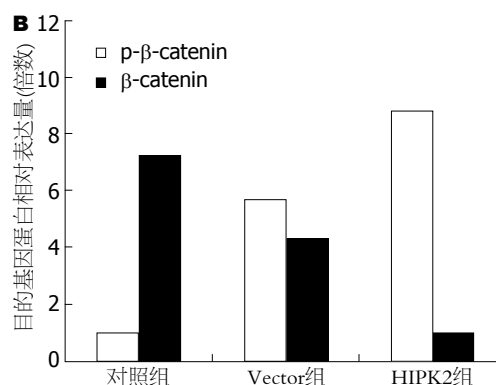
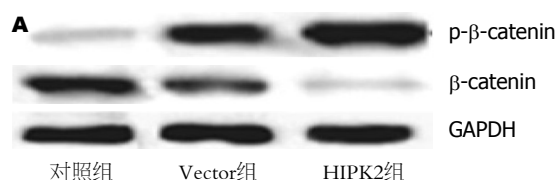


图4 HIPK2对人肠癌细胞 β -catenin蛋白表达的影响. A: Western blot结果; B: 目的蛋白相对表达量. HIPK2: 同源结构域相互作用蛋白激酶2.

的4个成员(Ang-1、2、3、4)之一. Ang-2是Ang家族成员参与血管形成的早期启动、激活阶段, 通过拮抗Ang-1离断内皮细胞与血管周细胞的作用, 在VEGF协同下促进血管出芽、生长, 与肿瘤血管生成密切相关^[8,9]. 临床病例分析表明, Ang-2在人大肠癌组织呈现过度表达, 与癌旁正常组织相比具有显著差异性($P<0.01$), 证实Ang-2可能在直肠癌的发生发展中起着重要作用^[10].

研究证实, VEGF和Ang-2的产生受到其上游诸多信号通路的调控和基因的介导, 特别是许多致癌基因蛋白的激活(如 β -catenin、COX-2、HIF-1 α 等), 促进了肿瘤形成过程中VEGF和Ang-2的过表达和释放. 我们前期研究发现, 作为多数肿瘤细胞中重要的肿瘤标志基

■名词解释

血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF), 是一种糖基化分泌性多肽因子, 分子量约4.3 kDa, 是作用最强的促血管生长因子, 能特异性刺激血管内皮细胞增殖与血管生成. 可直接作用于血管内皮细胞, 刺激其有丝分裂的发生, 从而促进新血管的生成, 也可通过增加血管通透性, 使包括许多基质形成重要因子的血浆蛋白外渗, 为血管内皮细胞的迁移及肿瘤细胞的转移提供基质.

■同行评价

作者研究了 *HIPK2* 基因对人结直肠癌细胞血管新生因子表达的调节作用, 发现 *HIPK2* 基因抑制结直肠癌细胞血管内皮生长因子表达可能与其下调细胞 *COX-2* 及 β -catenin 表达有关, 为临床上抗结直肠癌的作用靶点研究提供思路及途径。研究设计合理、科学性较强, 有一定的创新性, 文笔流畅, 可读性好, 是一篇不错的基础研究论文。

因, *COX-2* 的过度表达能明显上调人结直肠癌 HCT-116 细胞 VEGF 的表达水平, 在促进肿瘤血管新生和侵袭转移过程中发挥着重要的作用。Kawasaki 等^[11] 研究显示, 结直肠癌细胞中 *COX-2* 过表达与细胞质 β -catenin 蛋白的大量积累有关, β -catenin 对于稳定细胞内 *COX-2* mRNA 表达具有重要的作用, 并且 Wnt/ β -catenin 通路的激活伴随着 *COX-2* 表达的大量增加。结合本课题组的前期研究基础, 我们有理由推断 Wnt/ β -catenin-*COX-2* 通路的激活是结直肠癌血管新生的重要环节, 如何对其进行调控是防治结直肠癌血管新生新的治疗靶点。

大量研究显示, Wnt/ β -catenin 信号途径在肿瘤的发生、发展中占据着重要的地位^[12], 该通路的过度激活与多种人类肿瘤的发生有密切的联系, 尤其在大肠癌的发生、发展上, 约 90% 的大肠癌发生与该通路过度激活有关^[13,14]。Wnt/ β -catenin 信号通路主要由胞膜上的 Wnt 受体在外界信号的刺激下, 活化胞质内散乱蛋白 Dsh, Dsh 被磷酸化后抑制 β -catenin 降解复合体, 包括结直肠腺瘤性息肉肉基因 (adenomatous polyposis coli, APC)、Axin、糖原合成酶激酶 3 β (glycogen synthase kinase 3 β , GSK3 β) 和 CK1 α 。降解 β -catenin, β -catenin 降解复合体异常 (如 APC 或 axin 突变等) 和 β -catenin 基因本身突变均可致 β -catenin 降解障碍, 在胞质内积累继而进入细胞核, 激活转录因子 Tcf-4/LEF^[15], 启动靶基因 (如 *cyclinD1*、*TGF-1*、*MMP-7*、*VEGF*、*EGFR*^[16] 等) 的转录。

作为 Wnt/ β -catenin 信号通路一个最基本的组成部分, 癌基因 β -catenin 在细胞质的积累牵涉到多种人类肿瘤及其血管新生的进程。 β -catenin 可被多种生化机制调节, 但具体机制尚不明确。大多数研究认为, β -catenin 信号通路可被肿瘤抑制基因 APC 的突变所激活, 也有部分研究认为, β -catenin 本身在 GSK3 β 磷酸化位点的突变可导致 β -catenin 在细胞质内的积聚, 并作为转录激活因子诱导包含于细胞生长中一些靶基因的表达。作为 β -catenin 激活转录重要的靶基因, VEGF 对体内外肿瘤血管新生均能产生有效的诱导作用, 肿瘤发展通常由细胞 VEGF 表达上调后增加对周围微血管供应所控制, 而 VEGF 表达的抑制作用则可以减少裸鼠体内肿瘤体积和抑制肿瘤血管新生。因此, 探讨减少胞质 β -catenin 积累, 靶向调节 VEGF 的作用机制, 对于抑制结直肠癌血管新生具有重要意义。

1998 年, Kim 研究小组^[17] 发现了一种新

的核蛋白激酶家族, 是一个与同源结构域转录因子相互作用的保守丝氨酸/苏氨酸核激酶, 因能够增强同源蛋白转录活性, 故命名为 HIPKs。目前已知该激酶有 3 个亚型, 分别为 HIPK1、HIPK2、HIPK3, 其中 HIPK2 与肿瘤的发生发展关系密切, HIPK2 能调节转录、凋亡、细胞生长和进展, 既作为转录共阻遏物又作为激酶, 而对一些功能蛋白产生影响^[18]。D'Orazi 课题组经过近十年的研究发现, *HIPK2* 在细胞内作为一个肿瘤抑制基因, 通过多种方式影响肿瘤的生长, 如: 促进 p53 的凋亡功能、抑制 MDM2 或 CtBP 抗凋亡活性、抑制 HIF-1 α 的转录表达等^[19-21]。

大量研究证实^[22-24], β -catenin 信号转导通路中的 Axin 与 HIPK2、p53 形成一个三联复合物, 激活 p53 依赖的转录和凋亡。在 Wnt 信号通路中, Axin 和通路中的许多组份相互影响, 包括肿瘤抑制因子 APC、CKI α 、GSK3 β 和 β -catenin。因为 β -catenin 在 Ser-37、Ser-33 位点可被 GSK3 β 磷酸化, 所以该复合物通过多重、多层次的磷酸化事件 (如 β -Trcp 和靶向蛋白酶体降解等) 促进 β -catenin 的降解。HIPK2 能够下调 cPLA2 诱导的前列腺素 E2 产物, 而沉默 HIPK2 表达可以增加体内肿瘤生长和肿瘤血管生成。同时, 最新研究显示^[25-27], 肿瘤细胞中 HIPK2 过表达通过调控 β -catenin 的活性而调节 VEGF、EGFR、转化生长因子- β 等因子的活性, 影响肿瘤的进展。

本项目组前期对 β -catenin 蛋白调节 VEGF 对大肠癌血管新生及侵袭转移进行了大量的研究^[28-30], 发现其调节受到诸多因素的影响, 但是机制尚不清楚。研究通过前期构建的 pEGFP-N3-HIPK2 重组质粒转染人结直肠癌细胞, 上调 HCT-116 细胞内 *HIPK2* 基因的表达水平, 检测 HIPK2 对人结直肠癌细胞 β -catenin 及 *COX-2* 表达的调控作用。研究结果显示, *HIPK2* 基因重组质粒能在人结直肠癌细胞中稳定表达, 其表达效果与对照组相比无明显统计学意义。HIPK2 可明显抑制 HCT-116 细胞 VEGF 的表达水平, 及 *COX-2* 启动子和 mRNA 的活性, 并下调细胞内 β -catenin 的蛋白表达, 促进 p- β -catenin 蛋白的表达水平。根据结果, 我们可以推断, HIPK2 抑制结直肠癌细胞血管内皮生长因子表达可能与其下调细胞内 *COX-2* 及 β -catenin 表达有关, 其详细的作用机制尚有待于进一步的研究及探讨。

4 参考文献

- 1 Ferrara N. VEGF and the quest for tumour angio-

- genesis factors. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 795-803 [PMID: 12360282 DOI: 10.1038/nrc909]
- 2 Folkman J. Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Clinical applications of research on angiogenesis. *N Engl J Med* 1995; 333: 1757-1763 [PMID: 7491141 DOI: 10.1056/NEJM199512283332608]
 - 3 Thompson WD, Li WW, Maragoudakis M. The clinical manipulation of angiogenesis: pathology, side-effects, surprises, and opportunities with novel human therapies. *J Pathol* 2000; 190: 330-337 [PMID: 10685066]
 - 4 Cherrington JM, Strawn LM, Shawver LK. New paradigms for the treatment of cancer: the role of anti-angiogenesis agents. *Adv Cancer Res* 2000; 79: 1-38 [PMID: 10818676 DOI: 10.1016/S0065-230X(00)79001-4]
 - 5 Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 1983; 219: 983-985 [PMID: 6823562 DOI: 10.1126/science.6823562]
 - 6 Guo WJ, Li J, Chen Z, Zhuang JY, Gu WH, Zhang L, Pang J, Lu CH, Zhang WZ, Cheng YF. Transient increased expression of VEGF and MMP-1 in a rat liver tumor model after hepatic arterial occlusion. *Hepato-gastroenterology* 2004; 51: 381-386 [PMID: 15086165]
 - 7 Bates DO, Harper SJ. Regulation of vascular permeability by vascular endothelial growth factors. *Vascul Pharmacol* 2002; 39: 225-237 [PMID: 12747962 DOI: 10.1016/S1537-1891(03)00011-9]
 - 8 Holash J, Wiegand SJ, Yancopoulos GD. New model of tumor angiogenesis: dynamic balance between vessel regression and growth mediated by angiopoietins and VEGF. *Oncogene* 1999; 18: 5356-5362 [PMID: 10498889 DOI: 10.1038/sj.onc.1203035]
 - 9 Goede V, Schmidt T, Kimmina S, Kozian D, Augustin HG. Analysis of blood vessel maturation processes during cyclic ovarian angiogenesis. *Lab Invest* 1998; 78: 1385-1394 [PMID: 9840613]
 - 10 李霞, 朱尤庆, 罗峻, 陶文惠, 黄超, 张金梅. 血管生成素-2与基质金属蛋白酶-7在大肠癌中的表达及意义. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 434-437
 - 11 Kawasaki T, Nosho K, Ohnishi M, Suemoto Y, Kirkner GJ, Dehari R, Meyerhardt JA, Fuchs CS, Ogino S. Correlation of beta-catenin localization with cyclooxygenase-2 expression and CpG island methylator phenotype (CIMP) in colorectal cancer. *Neoplasia* 2007; 9: 569-577 [PMID: 17710160 DOI: 10.1593/neo.07334]
 - 12 Reya T, Clevers H. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* 2005; 434: 843-850 [PMID: 15829953 DOI: 10.1038/nature03319]
 - 13 Thorstensen L, Lind GE, Løvig T, Diep CB, Meling GL, Rognum TO, Lothe RA. Genetic and epigenetic changes of components affecting the WNT pathway in colorectal carcinomas stratified by microsatellite instability. *Neoplasia* 2005; 7: 99-108 [PMID: 15802015 DOI: 10.1593/neo.04448]
 - 14 Tetsu O, McCormick F. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 1999; 398: 422-426 [PMID: 10201372 DOI: 10.1038/nature18884]
 - 15 Shimokawa T, Furukawa Y, Sakai M, Li M, Miwa N, Lin YM, Nakamura Y. Involvement of the FGF18 gene in colorectal carcinogenesis, as a novel downstream target of the beta-catenin/T-cell factor complex. *Cancer Res* 2003; 63: 6116-6120 [PMID: 14559787]
 - 16 Tan X, Apte U, Micsenyi A, Kotsagrelis E, Luo JH, Ranganathan S, Monga DK, Bell A, Michalopoulos GK, Monga SP. Epidermal growth factor receptor: a novel target of the Wnt/beta-catenin pathway in liver. *Gastroenterology* 2005; 129: 285-302 [PMID: 16012954 DOI: 10.1053/j.gastro.2005.04.013]
 - 17 Kim YH, Choi CY, Lee SJ, Conti MA, Kim Y. Homeodomain-interacting protein kinases, a novel family of co-repressors for homeodomain transcription factors. *J Biol Chem* 1998; 273: 25875-25879 [PMID: 9748262 DOI: 10.1074/jbc.273.40.25875]
 - 18 Pierantoni GM, Bulfone A, Pentimalli F, Fedele M, Iuliano R, Santoro M, Chiariotti L, Ballabio A, Fusco A. The homeodomain-interacting protein kinase 2 gene is expressed late in embryogenesis and preferentially in retina, muscle, and neural tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 290: 942-947 [PMID: 11798164 DOI: 10.1006/bbrc.2001.6310]
 - 19 D'Orazi G, Cecchinelli B, Bruno T, Manni I, Higashimoto Y, Saito S, Gostissa M, Coen S, Marchetti A, Del Sal G, Piaggio G, Fanciulli M, Appella E, Soddu S. Homeodomain-interacting protein kinase-2 phosphorylates p53 at Ser 46 and mediates apoptosis. *Nat Cell Biol* 2002; 4: 11-19 [PMID: 11780126 DOI: 10.1038/ncb714]
 - 20 Di Stefano V, Blandino G, Sacchi A, Soddu S, D'Orazi G. HIPK2 neutralizes MDM2 inhibition rescuing p53 transcriptional activity and apoptotic function. *Oncogene* 2004; 23: 5185-5192 [PMID: 15122315 DOI: 10.1038/sj.onc.1207656]
 - 21 Nardinocchi L, Puca R, Guidolin D, Belloni AS, Bossi G, Michiels C, Sacchi A, Onisto M, D'Orazi G. Transcriptional regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha by HIPK2 suggests a novel mechanism to restrain tumor growth. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1793: 368-377 [PMID: 19046997 DOI: 10.1016/j.bbamcr.2008.10.013]
 - 22 Rubinfeld B, Albert I, Porfiri E, Fiol C, Munemitsu S, Polakis P. Binding of GSK3beta to the APC-beta-catenin complex and regulation of complex assembly. *Science* 1996; 272: 1023-1026 [PMID: 8638126 DOI: 10.1126/science.272.5264.1023]
 - 23 Ikeda S, Kishida S, Yamamoto H, Murai H, Koyama S, Kikuchi A. Axin, a negative regulator of the Wnt signaling pathway, forms a complex with GSK-3beta and beta-catenin and promotes GSK-3beta-dependent phosphorylation of beta-catenin. *EMBO J* 1998; 17: 1371-1384 [PMID: 9482734 DOI: 10.1093/emboj/17.5.1371]
 - 24 Liu C, Li Y, Semenov M, Han C, Baeg GH, Tan Y, Zhang Z, Lin X, He X. Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell* 2002; 108: 837-847 [PMID: 11955436 DOI: 10.1016/S0092-8674(02)00685-2]
 - 25 Puca R, Nardinocchi L, D'Orazi G. Regulation of vascular endothelial growth factor expression by homeodomain-interacting protein kinase-2. *J Exp Clin Cancer Res* 2008; 27: 22 [PMID: 18644116 DOI: 10.1186/1756-9966-27-22]
 - 26 Shang Y, Doan CN, Arnold TD, Lee S, Tang AA, Reichardt LF, Huang EJ. Transcriptional corepressors HIPK1 and HIPK2 control angiogenesis via TGF- β -TAK1-dependent mechanism. *PLoS Biol* 2013; 11: e1001527 [PMID: 23565059 DOI: 10.1371/journal.pbio.1001527]
 - 27 Hofmann TG, Stollberg N, Schmitz ML, Will H. HIPK2 regulates transforming growth factor-beta-induced c-Jun NH(2)-terminal kinase activation and apoptosis in human hepatoma cells. *Cancer Res*

- 2003; 63: 8271-8277 [PMID: 14678985]
- 28 刘宣, 王炎, 李丹光, 周利红, 殷佩浩, 隋华, 范忠泽, 李琦. 丹参酮IIA对COX-2激活Wnt β -catenin信号通路介导的人肠癌细胞VEGF表达的调控作用. 中华中医药杂志 2013; 28: 108-112
- 29 刘宣, 李丹光, 周利红, 王炎, 殷佩浩, 季青, 范忠泽, 李琦. COX-2/PGE2激活Wnt/ β -catenin信号通路调控人肠癌细胞VEGF表达. 第二军医大学学报 2012; 33: 1178-1181
- 30 刘宣, 王炎, 殷佩浩, 周利红, 范忠泽, 李琦. Wnt/ β -catenin信号通路对人肠癌细胞VEGF表达的调控作用. 中国癌症杂志 2012; 22: 567-571

编辑 郭鹏 电编 鲁亚静



胃泌素与骨桥蛋白在胃癌及癌前病变组织中表达的相关性

苏薇, 吴会超, 杨莹莹, 穆媛媛

苏薇, 吴会超, 杨莹莹, 穆媛媛, 贵州省遵义医学院附属医院
消化内科 贵州省遵义市 563003

苏薇, 住院医师, 主要从事消化系统肿瘤的研究。

贵州省科技厅基金资助项目, No. 黔科专合字[2010]3085

作者贡献分布: 苏薇与吴会超对此文所作贡献均等; 此课题由苏薇与吴会超设计; 研究过程由苏薇操作完成; 研究所用新试剂与分析工具由吴会超提供; 数据分析由苏薇完成; 本论文写作由苏薇完成, 由所有作者共同完成本文。

通讯作者: 吴会超, 主任医师, 563003, 贵州省遵义市大连路遵义医学院附属医院消化内科。 wuhuichao985@163.com

收稿日期: 2013-12-17 修回日期: 2014-01-20

接受日期: 2014-02-03 在线出版日期: 2014-03-28

Correlation between expression of gastrin and osteopontin in gastric carcinoma

Wei Su, Hui-Chao Wu, Ying-Ying Yang, Yuan-Yuan Mu

Wei Su, Hui-Chao Wu, Ying-Ying Yang, Yuan-Yuan Mu,
Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of
Zunyi Medical College, Zunyi 563003, Guizhou Province,
China

Supported by: the Foundation of Science and Technology
Department of Guizhou Province, No. [2010]3085

Correspondence to: Hui-Chao Wu, Chief Physician, De-
partment of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Zunyi
Medical College, Zunyi 563003, Guizhou Province,
China. wuhuichao985@163.com

Received: 2013-12-17 Revised: 2014-01-20

Accepted: 2014-02-03 Published online: 2014-03-28

Abstract

AIM: To explore the correlation between the expression of gastrin and osteopontin (OPN) in gastric cancer.

METHODS: The expression of gastrin and OPN was determined by immunohistochemistry in 60 gastric specimens including 20 cases of normal gastric mucosa, 20 cases of dysplasia and 20 cases of gastric carcinoma.

RESULTS: The expression levels of OPN and gastrin had an increasing tendency from normal gastric mucosa to precancerous lesions and gastric carcinoma ($P < 0.05$). Correlation analysis showed that there was a positive correlation between the expression of gastrin and OPN. The expression of OPN was significantly related to

tumor differentiation and stage ($P < 0.05$ for both), but not to age or sex.

CONCLUSION: OPN and gastrin expression is increased in gastric cancer. There was a positive relationship between the expression of gastrin and OPN. Up-regulated expression of OPN may be the reason why gastrin plays a key role in the development of gastric cancer.

© 2014 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

Key Words: Gastrin; Osteopontin; Gastric cancer

Su W, Wu HC, Yang YY, Mu YY. Correlation between expression of gastrin and osteopontin in gastric carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(9): 1275-1279 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/1275.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v22.i9.1275>

摘要

目的: 探讨胃泌素(gastrin, Gas)和骨桥蛋白(osteopontin, OPN)在胃癌组织中表达的相互关系。

方法: 取正常胃黏膜(normal gastric mucosa, NGM)、不典型增生(dimethyl sulfoxide, Dys)及胃癌组织(gastric cancer, GC)各20例, 采用SP免疫组织化学法检测各组织中Gas、OPN蛋白的表达变化。

结果: 免疫组织化学结果显示: Gas的表达在胃癌组和不典型增生组均高于正常组, 差异存在统计学意义($P < 0.05$), 胃癌组高于不典型增生组($P < 0.05$); OPN的表达在胃癌组和不典型增生组均高于正常组($P < 0.05$), 胃癌组高于不典型增生组($P < 0.05$)。经Spearman等级相关分析结果显示: 胃泌素与OPN表达呈正相关($r = 0.483, P < 0.05$)。OPN表达与胃癌分期、浸润深度及有无远处转移有关($P < 0.05$), 随胃癌的进展和浸润深度表达增多($P < 0.05$), 与分化程度、性别、年龄无关。

结论: OPN与Gas在胃癌组织中均表达增加, OPN表达与Gas表达呈正相关关系。胃泌素诱

■背景资料

胃癌是危害人类健康的主要恶性肿瘤之一, 胃癌的致死率位居所有肿瘤致死率的第2位。据流行病学资料显示, 大多数胃癌患者因治疗后复发和远处转移, 最终导致机体多器官功能衰竭而引发死亡。胃癌的发生、发展和转移是一个比较复杂的生物学过程, 常伴随着某些细胞因子及信号通路的改变, 近年来随着研究的不断深入, 对胃泌素(gastrin, Gas)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor)、基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases)及表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor)等细胞因子的研究逐渐成为探索胃癌转移机制的热点, 并且发现他们在胃癌转移过程中发挥着重要作用。与胃癌的发生、发展、浸润及转移密切相关。

■同行评议者

蒋敬庭, 教授, 常州市第一人民医院(苏州大学附属第三医院)肿瘤生物诊疗中心

■研究前沿

较多的研究发现Gas可以促进MMP的分泌,从而促进胃癌细胞的侵袭转移潜能。同样,OPN促进肿瘤细胞侵袭转移也与其促进MMP表达密切相关。迄今,调控Gas和OPN分泌的机制尚不完全清楚。Gas与OPN之间是否具有相关性,尚需进一步探索。随着研究的进一步深入, Gas与OPN有望成为肿瘤治疗中的新靶点。

导OPN表达增强,可能是胃泌素促进胃癌发生发展的机制之一。

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词: 胃泌素; 骨桥蛋白; 胃癌

核心提示: 胃泌素(gastrin)和骨桥蛋白(osteopontin, OPN)在肿瘤的发生、发展及转移中发挥着重要作用,由于其可以释放入患者的血液循环中,可作为一种无创性的肿瘤诊断及治疗标志应用于临床中,现已有很多研究发现多种肿瘤血浆胃泌素和OPN表达水平与肿瘤进展及预后相关。

苏薇, 吴会超, 杨莹莹, 穆媛媛. 胃泌素与骨桥蛋白在胃癌及癌前病变组织中表达的相关性. 世界华人消化杂志 2014; 22(9): 1275-1279 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/1275.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v22.i9.1275>

0 引言

胃癌是一种消化系统最常见的恶性肿瘤。研究发现胃泌素(gastrin, Gas)可通过多种途径促进胃癌的发生发展^[1],但其具体作用机制目前还不清楚,是否还有其他因子与其促癌作用有关尚待实验证明。近年来骨桥蛋白(osteopontin, OPN)与胃肠道肿瘤密切相关的报道日渐增多。研究显示OPN与各种癌症的致癌潜能相关,他能作用于肿瘤转移的多个环节,促进细胞黏附、浸润,促进血管生成和抑制凋亡^[2-5]。Junnila等^[4]研究发现,OPN在胃癌组织中过表达,提示OPN在胃癌的发生、发展中具有重要的作用。胃癌组织中OPN mRNA表达增高的患者的复发率明显高于低表达患者,提示OPN mRNA的表达与胃癌的预后具有密切的关系。较多的研究发现胃泌素可以促进基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)的分泌,从而促进胃癌细胞的侵袭转移潜能^[6,7]。同样,OPN促进肿瘤细胞侵袭转移也与其促进MMP表达密切相关^[8-10]。迄今,调控Gas和OPN分泌的机制尚不完全清楚。Gas与OPN之间是否具有相关性,尚需进一步探索。随着研究的进一步深入, Gas与OPN有望成为肿瘤治疗中的新靶点。本文采用免疫组织化学法测定胃癌及癌前病变组织中Gas和OPN表达的相关情况,据此探讨骨桥蛋白在胃癌变过程中的作用及分析Gas和骨桥蛋白两者之间表达的相互关系和生物学意义,深入了解胃癌发生的具体机制,并为以Gas受体拮抗剂及OPN为靶点防治胃癌开辟新的途径提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料 选取2011-01/2011-03我院内镜中心,内镜钳取及手术切除的正常胃黏膜、不典型增生及胃癌组织各20例,其中男32例,女28例,中位年龄56岁。胃癌组织中:早期胃癌6例,中晚期胃癌(进展期)14例;高分化胃癌(分化好)8例,中分化及低分化胃癌(分化较差及分化差)12例。入选标准:(1)有明确的病理资料,诊断清楚;(2)未接受过放、化疗等抗肿瘤治疗及非甾体抗炎药(nonsteroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs)、质子泵抑制剂(proton pump inhibitors, PPIs)、糖皮质激素治疗的患者。排除标准:入选标准外的均排除。兔抗人OPN单克隆抗体(即用型)购自Abcam公司,兔抗人Gas多克隆抗体(即用型)购自北京博奥森生物技术公司。

1.2 方法 采用SP免疫组织化学法测定不同胃黏膜组织中Gas和OPN蛋白的表达,应用IPP6.0(image proplus6.0)软件,对染色阳性区域的染色累积光密度(sum IA)及平均光密度(density mean)进行测定。固定采图的光源强度、曝光时间、增益、伽玛值及IPP选取阳性区域时的条件,且采图前均进行白平衡设定。累积光密度反映整张切片上阳性目标的总量,即目标抗原蛋白的总量,因累积光密度太大,以平均光密度(density mean)表示并进行统计分析。

统计学处理 采用SPSS17.0统计软件对数据进行分析。组间比较采用单因素方差分析,实验结果用mean±SD表示; Gas与OPN在胃癌病变过程中表达的相关性采用Spearman相关分析。检验水准 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 OPN在不同胃黏膜组织中的表达情况 OPN蛋白表达主要在细胞质,阳性颗粒呈棕黄色或棕褐色,OPN在正常胃黏膜鲜见表达;在胃癌组织中和不典型增生胃黏膜中均有表达,不典型增生胃黏膜中OPN多数为浅着色;在胃癌组织中OPN主要在胃癌细胞表达,颜色较深,呈弥漫分布(图1)。从正常胃黏膜组织→不典型增生组织→胃癌组织,OPN的表达强度呈逐渐递增趋势(表1),差异具有统计学意义($P < 0.05$),其中胃癌组的染色强度明显高于正常胃黏膜,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

在胃癌组织中,OPN表达无性别差异,无年龄差异(患者分为<60岁及>60岁两个年龄组);高分化组与低分化组中OPN表达无统计学差异。

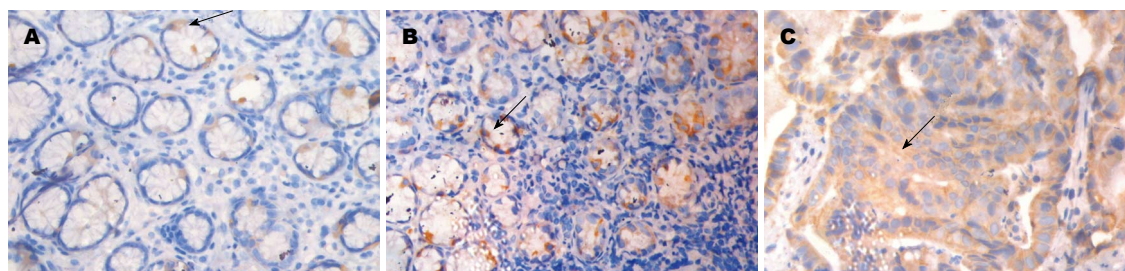


图 1 OPN的表达(SP × 100). A: 正常胃黏膜; B: 不典型增生中; C: 胃癌组织. OPN: 骨桥蛋白.

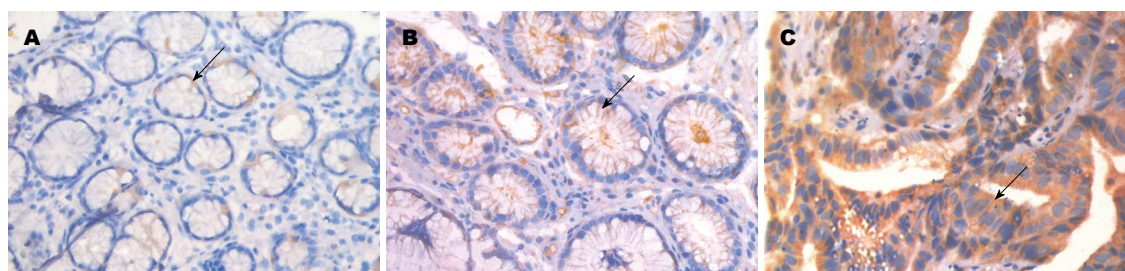


图 2 Gas的表达(SP × 100). A: 正常胃黏膜; B: 不典型增生中; C: 胃癌组织. Gas: 胃泌素.

■创新盘点
迄今, 调控Gas和OPN分泌的机制尚不完全清楚. Gas与OPN之间是否具有相关性, 尚需进一步探索. 随着研究的深入, Gas与OPN有望成为肿瘤治疗中的新靶点.

表 1 Gas、OPN在不同病变胃黏膜中表达的情况($n = 20$, mean \pm SD)

分组	Gas表达水平	OPN表达水平
NGM组	0.0784 \pm 0.0234	0.0543 \pm 0.0175
DYS组	0.1091 \pm 0.0286 ^a	0.0768 \pm 0.0254 ^a
GC组	0.1486 \pm 0.0314 ^{a,c}	0.1168 \pm 0.0334 ^{a,c}

^a $P < 0.05$ vs NGM组; ^c $P < 0.05$ vs DYS组. Gas: 胃泌素; OPN: 骨桥蛋白. NGM: 正常胃黏膜; DYS: 不典型增生; GC: 胃癌.

早期胃癌组与进展期胃癌组的OPN表达存在统计学差异($P < 0.05$)(表2).

2.2 Gas在不同胃黏膜组织中的表达情况 Gas蛋白主要表达于细胞质或细胞膜, 阳性颗粒呈棕黄色或棕褐色. 在正常胃黏膜组织中, Gas阳性细胞散在点状分布; 在不典型增生组织中可见Gas阳性细胞呈片状分布、着色较强; 在胃癌组织中Gas阳性细胞着色强、呈弥漫性分布(图2). 从正常胃黏膜组织→不典型增生组织→胃癌组织, Gas的表达强度呈逐渐递增趋势(表1). Gas表达在胃癌组和不典型增生组均高于正常组($P < 0.05$), 胃癌组高于不典型增生组($P < 0.05$).

2.3 胃黏膜组织中Gas表达与OPN表达的相关性 经Spearman等级相关分析结果显示: 从NGM→GC, 胃黏膜组织中Gas与OPN表达呈正相关($r = 0.483$, $P < 0.05$).

3 讨论

胃癌是危害人类健康的主要恶性肿瘤之一, 胃癌的致死率位居所有肿瘤致死率的第2位^[1]. 胃癌的发生、发展和转移是一个比较复杂的生物学过程, 常伴随着某些细胞因子及信号通路的改变, 近年来随着研究的不断深入, 对Gas、VEGF、MMPs及EGFR等细胞因子的研究逐渐成为探索胃癌转移机制的热点, 并且发现他们在胃癌转移过程中发挥着重要作用, 与胃癌的发生、发展、浸润及转移密切相关. 随着分子生物学技术的发展, 进一步研究肿瘤侵袭和转移的分子基础, 寻找与胃癌侵袭转移相关的分子生物学标志物, 对胃癌侵袭转移的预测、预后评估及合理的综合治疗等均有十分重要的意义.

3.1 Gas、OPN与胃癌的相关性 人们研究最早、最多的胃肠肽类激素就是Gas, 其促癌作用已得到充分肯定. 目前有大量研究证实Gas能够促进胃癌的发生发展, 但具体机制还不明确. Goetze等^[11]研究表明胃癌组织内可检出Gas表达, 阳性率为80%. Mishra等^[10,12]和Ito等^[13]研究表明Gas参与胃癌的生长及转移过程, 本实验结果显示: 在胃癌组织中存在Gas的高表达, 此结果与上述文献报道的一致.

OPN是一种分泌性非胶原型、富含唾液酸的磷酸化糖蛋白, 是SIBLING家族中的一员. Coppola等^[14]应用免疫组织化学方法对11例胃

■同行评价

本文有一定新颖性,具有一定指导意义。

表 2 胃癌组织中OPN的表达 (mean ± SD)

临床病理特征	OPN表达水平
性别	
男	0.0861 ± 0.0343
女	0.0897 ± 0.0365
年龄(岁)	
>60	0.1043 ± 0.0513
<60	0.0932 ± 0.0411
分化程度	
高分化	0.0663 ± 0.0427
低分化	0.0667 ± 0.0361
时期	
早期	0.0729 ± 0.0272
进展期	0.1428 ± 0.0314

OPN: 骨桥蛋白。

癌组织的OPN表达状况进行了检测, 结果发现, OPN蛋白的表达率为100%。Imano等^[15]研究结果提示: OPN在胃癌的侵袭和远处转移过程中可能起着重要的作用。本实验结果表明: 与正常胃黏膜相比较, 胃癌组织中存在OPN蛋白的过表达。另外, 我们研究还发现OPN在早期胃癌组与进展期组中表达存在差异性($P<0.05$), 随胃癌的进展OPN表达增多, OPN蛋白的过表达可能与胃癌的侵袭转移有密切关系; 该结果与以上文献报道结果一致。

3.2 Gas、OPN在不同胃组织中的差异表达 王丽等^[2]研究发现Gas在浅表性胃炎中表达很低, 在不典型增生及胃癌中表达增高, 且呈逐渐增高的趋势; 郝波等^[16]的研究中, 80.4%(37/46)的胃癌标本呈OPN阳性表达, 而12例正常胃黏膜组织均未见OPN阳性表达, 本实验结果表明: 在正常黏膜、不典型增生胃黏膜、胃癌3种病变组织中, OPN和Gas的阳性表达率随病变程度加重呈逐渐上升趋势, 差异具有统计学意义($P<0.05$), 该结果与文献报道一致。

3.3 Gas与OPN表达的相互关系 本实验结果表明人胃癌及癌前病变组织中均有Gas及OPN表达, 胃癌组织中存在OPN蛋白的过表达, OPN蛋白的过表达可能与胃癌的侵袭转移有密切关系, 且Gas与OPN的蛋白表达呈正相关; 由此推断: Gas可能通过诱导OPN表达的升高促进胃癌的发生发展。另外, 我们研究还发现OPN在早期胃癌组与进展期组中表达存在差异性($P<0.05$), 随胃癌的进展OPN表达增多, 提示OPN可能是胃癌预后不良的预测因子之一, 这可能与促进新生

血管形成, 从而促进肿瘤生长、转移有关。随着对Gas促癌作用机制的深入研究, 相信在不久的将来会出现愈来愈多的相关分子靶向药物, 从而为胃肠肿瘤的综合防治开辟新的途径。

4 参考文献

- Hotta K, Oyama T, Akamatsu T, Tomori A, Hasebe O, Nakamura N, Kojima E, Suga T, Miyabayashi H, Ohta H. A comparison of outcomes of endoscopic submucosal dissection (ESD) For early gastric neoplasms between high-volume and low-volume centers: multi-center retrospective questionnaire study conducted by the Nagano ESD Study Group. *Intern Med* 2010; 49: 253-259 [PMID: 20154428]
- 王丽, 周丽雅, 李渊, 金珠, 韩亚京. 胃泌素在胃炎与胃癌中表达的差异及意义. *中国微创外科杂志* 2011; 11: 435-438
- Higashiyama M, Ito T, Tanaka E, Shimada Y. Prognostic significance of osteopontin expression in human gastric carcinoma. *Ann Surg Oncol* 2007; 14: 3419-3427 [PMID: 17896150]
- Junnla S, Kokkola A, Mizuguchi T, Hirata K, Karjalainen-Lindsberg ML, Puolakkainen P, Monni O. Gene expression analysis identifies over-expression of CXCL1, SPARC, SPP1, and SULF1 in gastric cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 2010; 49: 28-39 [PMID: 19780053 DOI: 10.1002/gcc.20715]
- 商冠宁, 赵岩, 王玉名, 孙平. 骨桥蛋白与肿瘤侵袭转移关系的研究进展. *现代肿瘤医学* 2012; 20: 0419-0422
- 陈军, 陈发龙, 曾丽霞. 骨桥蛋白与MMP-9在胃癌中的表达及其临床意义. *现代肿瘤医学* 2008; 16: 0592-0594
- Weber GF. The metastasis gene osteopontin: a candidate target for cancer therapy. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1552: 61-85 [PMID: 11825687]
- Rittling SR, Chambers AF. Role of osteopontin in tumour progression. *Br J Cancer* 2004; 90: 1877-1881 [PMID: 15138464]
- Kermorgant S, Lehy T. Glycine-extended gastrin promotes the invasiveness of human colon cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 285: 136-141 [PMID: 11437383]
- Mishra P, Senthivayagam S, Rangasamy V, Sondarva G, Rana B. Mixed lineage kinase-3/JNK1 axis promotes migration of human gastric cancer cells following gastrin stimulation. *Mol Endocrinol* 2010; 24: 598-607 [PMID: 20150185]
- Goetze JP, Eiland S, Svendsen LB, Vainer B, Hannibal J, Rehfeld JF. Characterization of gastrins and their receptor in solid human gastric adenocarcinomas. *Scand J Gastroenterol* 2013; 48: 688-695 [PMID: 23544442 DOI: 10.3109/00365521.2013.783101]
- Mishra P, Senthivayagam S, Rana A, Rana B. Glycogen Synthase Kinase-3beta regulates Snail and beta-catenin during gastrin-induced migration of gastric cancer cells. *J Mol Signal* 2010; 5: 9 [PMID: 20637111 DOI: 10.1186/1750-2187-5-9]
- Ito M, Tanaka S, Maeda M, Takamura A, Tatsugami M, Wada Y, Matsumoto Y, Yoshihara M, Haruma K, Chayama K. Role of the gastrin-gastrin receptor system in the expansive growth of human gastric neoplasms. *Digestion* 2008; 78: 163-170 [PMID: 19065055 DOI: 10.1159/000181146]
- Coppola D, Szabo M, Boulware D, Muraca P, Alsarraj M, Chambers AF, Yeatman TJ. Correlation of

- osteopontin protein expression and pathological stage across a wide variety of tumor histologies. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 184-190 [PMID: 14734468]
- 15 Imano M, Satou T, Itoh T, Sakai K, Ishimaru E, Yasuda A, Peng YF, Shinkai M, Akai F, Yasuda T, Imamoto H, Okuno K, Ito H, Shiozaki H, Ohyanagi H. Immunohistochemical expression of osteopontin in gastric cancer. *J Gastrointest Surg* 2009; 13: 1577-1582 [PMID: 19582521 DOI: 10.1007/s11605-009-0955-y]
- 16 郝波, 张国新, 张伟明, 施瑞华, 王宏娣, 赵志泉. 骨桥蛋白在人胃癌中的表达及其临床意义. *中华消化内镜杂志* 2005; 22: 111-112

编辑 田滢 电编 鲁亚静



肝肠钙黏蛋白在新疆哈萨克族、汉族胃腺癌中的表达及意义

谷翠华, 尚国臣, 李睿, 田书信, 陈卫刚, 郑勇

■背景资料

研究报道, 在新疆, 胃癌的分布特征具有一定的民族差异, 其中哈萨克族胃癌的死亡率最高, 为41.3/10万, 高于同地区居住的汉族和维吾尔族人群, 而且发病率也较高, 因此寻找哈萨克族胃癌发生或高发的因子对哈萨克族胃癌的诊断和治疗具有重要意义。

谷翠华, 尚国臣, 李睿, 田书信, 陈卫刚, 郑勇, 石河子大学医学院第一附属医院消化内科 新疆维吾尔自治区石河子市832000

谷翠华, 主要从事消化系统肿瘤的研究。

作者贡献分布: 本文研究设计由郑勇、陈卫刚、李睿及尚国臣完成; 研究过程由谷翠华操作完成; 研究用部分标本由田书信与尚国臣提供; 数据分析由谷翠华完成; 本论文写作由谷翠华与郑勇完成。

通讯作者: 郑勇, 教授, 主任医师, 博士生导师, 国务院“政府特殊津贴”专家, 国家科技支撑计划项目首席科学家, 832002, 新疆维吾尔自治区石河子市北2路, 石河子大学医学院第一附属医院消化内科。zy2850@126.com

收稿日期: 2013-12-24 修回日期: 2014-01-20

接受日期: 2014-02-03 在线出版日期: 2014-03-28

Significance of expression of Li-cadherin in gastric adenocarcinoma in Xinjiang Kazakh and Han patients

Cui-Hua Gu, Guo-Chen Shang, Rui Li, Shu-Xin Tian, Wei-Gang Chen, Yong Zheng

Cui-Hua Gu, Guo-Chen Shang, Rui Li, Shu-Xin Tian, Wei-Gang Chen, Yong Zheng, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Shihezi University Medical School, Shihezi 832000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Correspondence to: Yong Zheng, Professor, Chief Physician, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Shihezi University Medical School, 32 Xiaoqu Beier Road, Shihezi 832000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China. zy2850@126.com

Received: 2013-12-24 Revised: 2014-01-20

Accepted: 2014-02-03 Published online: 2014-03-28

Abstract

AIM: To investigate the significance of expression of Li-cadherin in gastric adenocarcinoma in Xinjiang Kazakh and Han patients.

METHODS: The mRNA and protein expression of CDH17 was detected by RT-qPCR and immunohistochemistry in 30 gastric adenocarcinoma tissues and 20 normal gastric mucosal tissues from Kazakh patients, as well as 30 gastric adenocarcinoma tissues and 20 normal gastric mucosal tissues from Han patients.

RESULTS: The expression level of CDH17

mRNA was significantly higher in gastric adenocarcinoma than in normal gastric mucosal tissue in Kazakh patients (1.22 ± 0.22 vs 2.37 ± 0.30 , $P < 0.001$). In Kazakh patients, the positive expression rate of CDH17 protein was 70.0% in gastric adenocarcinoma, and 0 in the normal gastric mucosal tissue. No correlation was found between expression of CDH17 protein and sex, age, or tumor differentiation in gastric adenocarcinoma in Kazakh patients. There was no significant difference in the expression of CDH17 in tumor or normal tissues between Kazakh and Han patients.

CONCLUSION: The expression of CDH17 in gastric adenocarcinoma was significantly higher than that in normal gastric mucosal tissues in Kazakh patients, suggesting that CDH17 may play an important role in the occurrence and development of gastric adenocarcinoma in Xinjiang Kazakh patients. There was no significant difference in the expression of CDH17 between Kazakh and Han patients.

© 2014 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

Key Words: Gastric adenocarcinoma; CDH17; Kazakh; Han

Gu CH, Shang GC, Li R, Tian SX, Chen WG, Zheng Y. Significance of expression of Li-cadherin in gastric adenocarcinoma in Xinjiang Kazakh and Han patients. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(9): 1280-1284 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/1280.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i9.1280>

摘要

目的: 探讨肝肠钙黏蛋白(Li-cadherin, CDH17)在新疆哈萨克族、汉族胃腺癌中的表达及意义。

方法: 采用RT-qPCR和免疫组织化学的方法分别检测30例哈萨克族胃腺癌、20例哈萨克族正常胃黏膜组织, 以及相应的30例汉族胃

■同行评议者

刘颖斌, 主任医师, 上海交通大学医学院附属新华医院

腺癌、20例汉族正常胃黏膜组织中CDH17 mRNA和蛋白的表达情况。

结果: (1)RT-qPCR结果显示哈萨克族正常胃黏膜及哈萨克族胃腺癌组织中CDH17 mRNA的表达量分别为 1.22 ± 0.22 、 2.37 ± 0.30 , 后者较前者明显升高($P < 0.001$); (2)免疫组织化学结果显示CDH17蛋白在哈萨克族胃腺癌中的阳性表达率为70.0%, 而在哈萨克族正常胃黏膜组织中无表达。CDH17蛋白在哈萨克族胃腺癌中的表达与性别、年龄、肿瘤的分化程度无关; (3)CDH17(包括CDH17 mRNA及蛋白)在哈萨克族及汉族胃癌组织中的表达无差异, 在2个民族正常胃黏膜组织中亦如此。

结论: (1)CDH17在哈萨克族胃腺癌中的表达显著高于哈萨克族正常胃黏膜组织, 在哈萨克族胃腺癌的发生及发展中可能起重要作用; (2)CDH17在两个民族间的表达无差异。

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词: 胃腺癌; CDH17; 哈萨克族; 汉族

核心提示: 本研究应用实时荧光定量PCR和免疫组织化学的方法检测了肝肠钙黏蛋白(Li-cadherin, CDH17)在哈萨克族胃腺癌中的表达, 并设置了哈萨克族正常胃黏膜组织为对照, 结果CDH17在哈萨克族胃腺癌中的表达明显高于哈萨克族正常胃黏膜组织, 提示CDH17的高表达参与了哈萨克族胃腺癌的发生, 可作为诊断哈萨克族胃癌的分子标志物; CDH17在哈萨克族及汉族之间的表达无差异, 提示CDH17可能不是哈萨克族胃癌高发的相关因素。

谷翠华, 尚国臣, 李睿, 田书信, 陈卫刚, 郑勇. 肝肠钙黏蛋白在新疆哈萨克族、汉族胃腺癌中的表达及意义. 世界华人消化杂志 2014; 22(9): 1280-1284 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/1280.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v22.i9.1280>

0 引言

胃癌是世界范围内的第4大常见肿瘤, 其死亡率居癌症死亡率的第2位^[1]。据报道, 在新疆胃癌的分布特征具有一定的民族差异, 其中哈萨克族胃癌的死亡率为41.3/10万, 高于同地区的汉族和维吾尔族人群(18.5/10万, 14.2/10万), 而且发病率也较高^[2], 但是具体原因与机制尚不清楚, 因此探索哈萨克族胃癌发生及高发的因素成为本课题组研究的重点。肝肠钙黏蛋白(Li-cadherin, CDH17)属于黏附分子成员之一, 他依

赖 Ca^{2+} 具有介导细胞间黏附的功能^[3,4]。研究证实, CDH17的异常表达参与了多种肿瘤的发生发展, 如肝癌、结直肠癌、胆管癌、胰腺癌、胃癌等^[5-8]。目前CDH17与新疆哈萨克族胃癌的关系尚未见报道, 本实验采用RT-qPCR和免疫组织化学的方法检测了CDH17在哈萨克族胃癌中的表达, 探讨其在哈萨克族胃癌发生中的作用, 并与同地区汉族胃癌的表达情况进行了比较, 旨在为哈萨克族胃癌的诊断、治疗以及高发原因提供一定的理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料 收集石河子大学医学院第一附属医院2012-09/2013-08胃癌患者手术切除标本及胃镜活检癌组织标本共60例(其中哈萨克族及汉族胃癌各30例), (胃镜活检)正常胃黏膜组织标本40例(其中哈萨克族及汉族各20例)。所有的诊断经两名病理科医师确诊。胃癌为胃腺癌, 原发性。哈萨克族胃癌患者年龄30-70岁, 中位年龄60岁, 其中男性23例, 女性7例。汉族胃癌患者年龄34-81岁, 中位年龄58.5岁, 其中男性18例, 女性12例。所有病例均未行放疗及其他针对肿瘤的治疗。每个标本采集2份, 其中一份在采集后立即放入液氮冷冻, 再放入-80℃保存备用, 一份置于40 g/L甲醛溶液中以制作石蜡标本。兔抗人CDH17单克隆抗体购自Abcam公司; 二抗由石河子大学免疫组织化学实验室提供; 总RNA提取试剂TRIzol购自Invitrogen公司; 逆转录试剂盒购自Takara公司; SYBR Green 1荧光染料购自Roche(罗氏)公司。

1.2 方法

1.2.1 CDH17 mRNA的检测: 采用RT-qPCR法: 首先用TRIzol法提取新鲜组织总的RNA, 采用紫外分光光度法检测RNA浓度和纯度。之后立即按照反转录试剂盒说明书将RNA反转录为cDNA, 进行PCR扩增。引物序列利用Prime5软件设计并由北京华大基因科技公司合成。CDH17上游序列5'-TATCGGGTACAAGTACAAGTGGTG-3', 下游5'-GATGGCAGAAGAACAAGC-3'(139 bp)。内参为 β -actin, 上游5'-ACACTGTGCCCATCTACG-3', 下游5'-TGTCACGCACGATTTC-3'(149 bp)。PCR反应条件为: 95℃预变性30 s、95℃ 10 s、58℃ 30 s、72℃ 30 s共40个循环, 每个样本重复3次。

1.2.2 RT-qPCR结果判定: 以汉族正常胃黏膜组为对照组, 以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 表示CDH17 mRNA的相对表

■ 研发前沿

肝肠钙黏蛋白(Li-cadherin, CDH17)的异常表达参与了多种肿瘤的发生、发展, 如肝癌、胰腺癌、结直肠癌、胃癌等, CDH17在这些恶性肿瘤中具体的作用及机制已经成为目前的研究热点及重点。

■ 相关报道

研究显示, CDH17在胃癌中高表达, 参与了胃癌的发生, 并与胃癌的淋巴结转移和预后密切相关。有学者利用RNA干扰技术抑制CDH17在胃癌中的表达, 结果发现, 胃癌的增殖、黏附、转移能力均明显降低。推测CDH17在胃癌的发生、发展中起促癌因子的作用。但是其在胃癌中具体的作用机制还有待进一步研究。

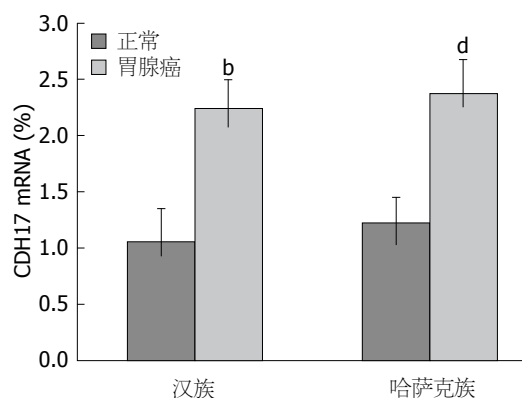


图1 CDH17 mRNA在4组组织中的表达。^a $P < 0.01$ vs 汉族正常胃黏膜组; ^b $P < 0.01$ vs 汉族胃腺癌组; ^c $P < 0.01$ vs 哈萨克族正常胃黏膜组; ^d $P < 0.01$ vs 哈萨克族胃腺癌组; CDH17 mRNA在两个民族的正常胃黏膜组织和胃癌组织之间均无统计学差异。CDH17: 肝肠钙黏蛋白。

定量。

1.2.3 CDH17蛋白的检测: 采用免疫组织化学的方法。将固定好的组织石蜡包埋, 后按4 μ m厚连续切片, 烤片, 切片脱蜡至水, 抗原修复(高压法), 3%的 H_2O_2 中阻断内源性过氧化物酶(PBS洗2次), 滴加一抗(1:100)4 $^{\circ}C$ 过夜(PBS洗2次), 滴加二抗(北京中杉)室温孵育(PBS洗2次), DAB显色, 水洗终止显色, 复染细胞核, 分化, 脱水透明, 封固(用PBS替代一抗作为空白对照, 人的正常结肠组织作为阳性对照)。

1.2.4 免疫组织化学结果判定: 细胞膜中出现棕黄色颗粒为阳性细胞。每张切片随机选取10个高倍视野(400倍), 按照显色强度及阳性细胞范围采用半定量积分法评分。评分标准如下: (1) 显色深浅: 深棕色为3分, 棕黄色为2分, 浅黄色为1分, 无着色为0分; (2) 阳性细胞百分率: 未见阳性细胞者计0分, <25%计1分, 25%-75%计2分, >75%计3分。以上2项计分相加为最终评定结果, 0分为阴性(-), 1-2分为弱阳性(+), 3-4分为阳性(++), 5-6分则为强阳性(+++)。

统计学处理 应用SPSS13.0统计软件进行统计学分析, 多个样本均数的比较采用方差分析; 率的比较采用 χ^2 检验和Fisher确切概率法($n < 40$)。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 RT-qPCR检测 CDH17 mRNA在汉族正常胃黏膜组织、汉族胃腺癌中的表达量分别为 1.05 ± 0.30 , 2.24 ± 0.25 , 两者比较差异具有统计学意义($P = 0.000$)。CDH17 mRNA在哈萨克族胃腺癌中的表达量显著高于哈萨克族正常胃黏膜组

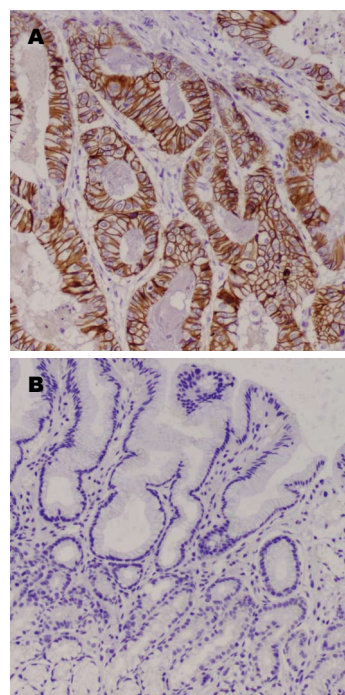


图2 CDH17蛋白的表达(SP $\times 200$)。A: 胃腺癌组织CDH17阳性表达; B: 正常胃黏膜组织CDH17阴性表达。

织(2.37 ± 0.30 vs 1.22 ± 0.22 , $P = 0.000$)。对两个民族的表达情况进行比较, 结果CDH17 mRNA在哈萨克族及汉族正常胃黏膜组织及胃癌组织中的表达均无差异($P = 0.091$, $P = 0.062$, 均 $P > 0.05$)(图1)。

2.2 免疫组织化学检测 CDH17蛋白表达于细胞膜(图2)。CDH17蛋白在哈萨克族及汉族胃腺癌组织中的阳性表达率分别为70.0%(21/30)和63.3%(19/30), 两者比较差异无统计学意义($P = 0.584 > 0.05$)(表1); 而CDH17蛋白在哈萨克族及汉族正常胃黏膜组织中均无表达。

2.3 CDH17蛋白的表达与临床病理特征的关系 CDH17蛋白在哈萨克族胃腺癌中的表达与患者的性别、年龄及肿瘤的分化程度无关(表2)。

3 讨论

CDH17是最近新发现的一种钙黏蛋白, 与以往发现的钙黏蛋白相比, 他最大的不同是其胞外域含有7个钙黏蛋白重复, 而非经典钙黏蛋白的5个, 而且他的胞质区较短少, 仅由约20个氨基酸组成。因此被认为是钙黏蛋白超家族中独特的成员。但是他仍然具有介导细胞间黏附的功能^[9], 对生理情况下胚胎发育的细胞识别、组织分化以及病理状况下肿瘤细胞的迁徙、转移等具有重要的作用。

表 1 肝肠钙黏蛋白在新疆哈萨克族、汉族胃癌中的表达 ($n = 30$)

分组	+	++	+++	阳性率(%)	χ^2 值	P 值
哈萨克族	6	10	5	70.0	0.300	0.584
汉族	10	7	2	63.3		

正常情况下, CDH17仅在人的肠道和胰腺导管上皮细胞表达, 而在正常的胃黏膜组织中表达静止或低表达^[10]。近年来的研究发现, CDH17在胃腺癌中表达上调, 并与胃腺癌的发展、转移密切相关^[11-15]。目前CDH17在胃癌的发生、发展过程中起促癌因子的作用已得到初步的证实, 其可能涉及的分子机制如下: (1) CDH17的上调表达可以激活Wnt信号转导通路, 使 β -catenin在胞质中累积, 并进入细胞核, 与转录因子Tcf形成复合物, 最终上调下游靶基因如*cyclin D1*、*c-myc*的表达, 从而促进细胞增殖, 抑制细胞凋亡^[16]; (2) CDH17的表达抑制*Rb*基因, 从而使细胞周期调节失控, 导致细胞无限增殖、肿瘤化^[17]; (3) CDH17的表达可以显著增强MMP-2和MMP-9的活性, 使基底膜和细胞外基质降解, 利于肿瘤细胞的浸润、转移^[16]。但是CDH17的结构复杂, 功能多样, 关于他在胃癌发生、进展中具体的作用及可能的机制还需要进一步的研究和证实。

目前国内关于CDH17与胃癌关系的研究主要集中在汉族人群, 而对CDH17与哈萨克族胃癌的关系知之甚少。本研究检测了CDH17在哈萨克族胃癌中的表达, 结果显示在mRNA和蛋白两个水平上, CDH17在哈萨克族胃腺癌组织中的表达均明显高于哈萨克族正常胃黏膜组织, 提示哈萨克族胃腺癌的发生与CDH17的过表达有关。免疫组织化学结果显示CDH17在哈萨克族胃腺癌中的表达与肿瘤的分化程度无关, 与王宾等^[18]和牛建华等^[19]的研究结果一致。而Park等^[20]的研究证实CDH17是高分化胃腺癌的标志物, CDH17在高分化胃腺癌中的表达明显高于低分化腺癌, 分析造成不同结论的原因可能与实验样本个体差异及数量有关。

作为新疆地区胃癌死亡率最高的民族, 哈萨克族胃癌的发病率也较高, 提示除环境、特殊的饮食因素(哈萨克族的饮食缺乏蔬菜和水果, 而具有民族特色的烤肉、奶渣等食物均为高盐食品)外, 哈萨克族与汉族之间可能存在遗传易感性的差异。本实验对CDH17在2个民族胃癌

表 2 哈萨克族胃癌中肝肠钙黏蛋白的表达与临床病理参数间的关系

临床病理特征	n	CDH17的表达		阳性率 (%)	P 值
		阳性	阴性		
性别					1.000
女	7	5	2	71.4	
男	23	16	7	69.6	
年龄(岁)					1.000
≤ 60	14	10	4	71.4	
> 60	16	11	5	68.8	
分化程度					1.000
高-中分化	8	6	2	75.0	
低分化	22	15	7	68.2	

中的表达进行了比较, 结果哈萨克族胃腺癌中CDH17 mRNA及蛋白的表达高于汉族胃癌人群, 但无统计学差异, 在正常胃黏膜组织中亦如此。因此我们推测CDH17可能不是哈萨克族胃癌高发的相关因素。

尽管如此, 值得肯定的是CDH17的高表达与哈萨克族胃腺癌的发生密切相关, 可作为哈萨克族胃癌诊断的一个分子标志物。而且目前针对CDH17靶向治疗胃癌的研究已取得了一定的效果, 因此对CDH17的深入研究将为哈萨克族胃癌的诊断和治疗提供新的方向和基础。

4 参考文献

- Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55: 74-108 [PMID: 15761078 DOI: 10.3322/canjclin.55.2.74]
- 刘玺, 陈卫刚, 李睿, 刘芳, 刘晓燕, 康雪, 马聪, 窦玉琴, 郑勇. 新疆哈萨克族胃癌中Smad4基因启动子的甲基化状态. *世界华人消化杂志* 2013; 21: 1907-1913
- Berndorff D, Gessner R, Kreft B, Schnoy N, Lajous-Petter AM, Loch N, Reutter W, Hortsch M, Tauber R. Liver-intestine cadherin: molecular cloning and characterization of a novel Ca(2+)-dependent cell adhesion molecule expressed in liver and intestine. *J Cell Biol* 1994; 125: 1353-1369 [PMID: 8207063 DOI: 10.1083/jcb.125.6.1353]
- Bartolmäs T, Hirschfeld-Ihlow C, Jonas S, Schaefer M, Geßner R. LI-cadherin cis-dimerizes in the plasma membrane Ca(2+) independently and forms highly dynamic trans-contacts. *Cell Mol Life Sci* 2012; 69: 3851-3862 [PMID: 22842778 DOI: 10.1007/s00018-012-1053-y]
- Liu LX, Lee NP, Chan VW, Xue W, Zender L, Zhang C, Mao M, Dai H, Wang XL, Xu MZ, Lee TK, Ng IO, Chen Y, Kung HF, Lowe SW, Poon RT, Wang JH, Luk JM. Targeting cadherin-17 inactivates Wnt signaling and inhibits tumor growth in liver carcinoma. *Hepatology* 2009; 50: 1453-1463 [PMID: 19676131 DOI: 10.1002/hep.23143]
- Lee HJ, Nam KT, Park HS, Kim MA, Lafleur BJ, Aburatani H, Yang HK, Kim WH, Goldenring

■创新盘点

哈萨克族是新疆长期居住的少数民族, 其在居住环境、饮食习惯、遗传学背景等方面与同地区的汉族人群尚存在差异。目前尚无CDH17与哈萨克族胃癌发生、发展关系的报道, CDH17在哈萨克族及汉族胃癌中的表达差异也未见报道。

■同行评议

本文设计合理, 逻辑清晰, 数据可信, 对我国少数民族的胃癌研究有一定指导意义.

- JR. Gene expression profiling of metaplastic lineages identifies CDH17 as a prognostic marker in early stage gastric cancer. *Gastroenterology* 2010; 139: 213-225.e3 [PMID: 20398667 DOI: 10.1053/j.gastro.2010.04.008]
- 7 Su MC, Yuan RH, Lin CY, Jeng YM. Cadherin-17 is a useful diagnostic marker for adenocarcinomas of the digestive system. *Mod Pathol* 2008; 21: 1379-1386 [PMID: 18552820 DOI: 10.1038/modpathol.2008.107]
- 8 Zhang J, Liu QS, Dong WG. Blockade of proliferation and migration of gastric cancer via targeting CDH17 with an artificial microRNA. *Med Oncol* 2011; 28: 494-501 [PMID: 20393816 DOI: 10.1007/s12032-010-9489-0]
- 9 Kreft B, Berndorff D, Böttinger A, Finnemann S, Wedlich D, Hortsch M, Tauber R, Gessner R. LI-cadherin-mediated cell-cell adhesion does not require cytoplasmic interactions. *J Cell Biol* 1997; 136: 1109-1121 [PMID: 9060475 DOI: 10.1083/jcb.136.5.1109]
- 10 Boo YJ, Park JM, Kim J, Chae YS, Min BW, Um JW, Moon HY. L1 expression as a marker for poor prognosis, tumor progression, and short survival in patients with colorectal cancer. *Ann Surg Oncol* 2007; 14: 1703-1711 [PMID: 17211730 DOI: 10.1245/s10434-006-9281-8]
- 11 李曼. 利用基因表达谱芯片筛选胃癌及转移相关差异表达基因的研究. 沈阳: 中国医科大学, 2007
- 12 Wang J, Yu JC, Kang WM, Wang WZ, Liu YQ, Gu P. The predictive effect of cadherin-17 on lymph node micrometastasis in pN0 gastric cancer. *Ann Surg Oncol* 2012; 19: 1529-1534 [PMID: 22009269 DOI: 10.1245/10434-011-2115-3]
- 13 Ito R, Oue N, Yoshida K, Kunimitsu K, Nakayama H, Nakachi K, Yasui W. Clinicopathological significant and prognostic influence of cadherin-17 expression in gastric cancer. *Virchows Arch* 2005; 447: 717-722 [PMID: 16044349 DOI: 10.1007/s00428-005-0015-2]
- 14 Xu Y, Zhang J, Liu QS, Dong WG. Knockdown of liver-intestine cadherin decreases BGC823 cell invasiveness and metastasis in vivo. *World J Gastroenterol* 2012; 18: 3129-3137 [PMID: 22791949]
- 15 Dong W, Yu Q, Xu Y. Altered expression of a Li-cadherin in gastric cancer and intestinal metaplasia. *Dig Dis Sci* 2007; 52: 536-542 [PMID: 17226075 DOI: 10.1007/s10620-006-9316-9]
- 16 Liu QS, Zhang J, Liu M, Dong WG. Lentiviral-mediated miRNA against liver-intestine cadherin suppresses tumor growth and invasiveness of human gastric cancer. *Cancer Sci* 2010; 101: 1807-1812 [PMID: 20500517 DOI: 10.1111/j.1349-7006.2010.01600.x]
- 17 Qiu HB, Zhang LY, Ren C, Zeng ZL, Wu WJ, Luo HY, Zhou ZW, Xu RH. Targeting CDH17 suppresses tumor progression in gastric cancer by down-regulating Wnt/ β -catenin signaling. *PLoS One* 2013; 8: e56959 [PMID: 23554857 DOI: 10.1371/journal.pone.0056959]
- 18 王宾, 周崇治, 唐华美, 王权, 温玉刚, 于振海. 肝肠钙粘蛋白在胃癌中的表达及其与患者预后的关系. *中华实验外科杂志* 2011; 28: 714-716
- 19 牛建华, 刘仕琪, 彭心宇, 木拉提, 秦江梅, 曹祝萍. 胃癌及癌前病变中肝肠钙粘蛋白的表达及其意义. *中华普通外科杂志* 2008; 23: 444-446
- 20 Park SS, Kang SH, Park JM, Kim JH, Oh SC, Lee JH, Chae YS, Kim SJ, Kim CS, Mok YJ. Expression of liver-intestine cadherin and its correlation with lymph node metastasis in gastric cancer: can it predict N stage preoperatively? *Ann Surg Oncol* 2007; 14: 94-99 [PMID: 17063305 DOI: 10.1245/s10434-006-9114-9]

编辑 田滢 电编 鲁亚静



肝包虫内囊摘除术后胆漏再手术治疗9例

陈长义, 陈耀堂, 李慧明, 田希兰, 张志红, 时煜山

陈长义, 陈耀堂, 李慧明, 田希兰, 张志红, 时煜山, 宁夏回族自治区固原市人民医院普外科 宁夏回族自治区固原市 756000

陈长义, 副主任医师, 主要从事普外科方面的临床工作与科研。

宁夏固原市科技发展计划基金资助项目, No. 2012-06

作者贡献分布: 本研究设计与写作由陈长义完成; 陈耀堂、李慧明、田希兰、张志红及时煜山参与临床诊治。

通讯作者: 陈长义, 副主任医师, 756000, 宁夏回族自治区固原市原州区文化街38号, 宁夏回族自治区固原市人民医院普外科。

ccyi19720501@163.com

收稿日期: 2014-01-06 修回日期: 2014-01-17

接受日期: 2014-01-24 在线出版日期: 2014-03-28

Reoperation for biliary leakage after hepatic hydatid cyst removal

Chang-Yi Chen, Yao-Tang Chen, Hui-Ming Li, Xi-Lan Tian, Zhi-Hong Zhang, Yu-Shan Shi

Chang-Yi Chen, Yao-Tang Chen, Hui-Ming Li, Xi-Lan Tian, Zhi-Hong Zhang, Yu-Shan Shi, Department of General Surgery, the People's Hospital of Guyuan, Guyuan 756000, Ningxia Hui Autonomous Region, China

Supported by: the Science and Technology Development Program of Guyuan City, No. 2012-06

Correspondence to: Chang-Yi Chen, Associate Chief Physician, Department of General Surgery, the People's Hospital of Guyuan, 38 Wenhua Street, Yuanzhou Region, Guyuan 756000, Ningxia Hui Autonomous Region, China. ccyi19720501@163.com

Received: 2014-01-06 Revised: 2014-01-17

Accepted: 2014-01-24 Published online: 2014-03-28

Abstract

AIM: To summarize the efficacy of reoperation for biliary leakage after hepatic hydatid cyst removal.

METHODS: A total of 9 patients with hepatic echinococcosis who underwent hepatic hydatid cyst removal, required long term tube drainage and had recurrent infections at Guyuan City People's Hospital from January 2011 to October 2013 were included in this study. These patients were in good general condition and had no serious heart or lung diseases. Nine patients underwent elective surgery, of whom three had evident residual cavity wall calcification in the right lobe and left lateral lobe and underwent total external cystectomy and hepatic drainage,

and the remaining 6 underwent suturing for bile leak, residual cavity omentum filling and common bile duct T tube drainage because of a potential risk of total external cystectomy due to the fact that the residual cyst cavity was too close to the first and second porta hepatis.

RESULTS: In 2 of the 9 patients who underwent reoperation, the daily volume of drainage was about 10-50 mL in the first 3 days after reoperation, and decreased to 5-10 mL on day 5, and the drainage tube was removed on day 7. In the remaining 7 cases, the daily volume of drainage was about 5-10 mL in the first 3 days and diminished gradually, and the drainage tube was removed on day 5. After discharge, all patients underwent follow-up ultrasound each month, and no abnormal changes in the surgical area or effusion were observed. During a telephone follow-up period of 6 mo to 3 years, 2 patients died of other diseases, and the remaining 7 cases recovered well.

CONCLUSION: Reoperation is effective in the management of biliary leakage after hepatic hydatid cyst removal.

© 2014 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

Key Words: Hepatic echinococcosis; Biliary leakage; Operation

Chen CY, Chen YT, Li HM, Tian XL, Zhang ZH, Shi YS. Reoperation for biliary leakage after hepatic hydatid cyst removal. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(9): 1285-1288 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/1285.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i9.1285>

摘要

目的: 总结肝包虫内囊摘除术后长期带管患者再行手术治疗的效果。

方法: 固原市人民医院2011-01/2013-10收治肝包虫内囊摘除术后长期带肝包残腔引流管且引流管口反复感染患者9例, 患者一般情况良

■背景资料

肝包虫病为牧区及西北偏远山区常见的人畜共患疾病, 手术是治疗肝包虫病的主要手段。传统的肝包虫内囊摘除术后, 如发现残腔有胆漏, 一般行残腔置管引流。但部分患者后残腔胆漏量大, 带管时间长, 给患者带来诸多不便, 且引流管容易逆行性感染, 严重影响生活质量。如何再治疗是外科医生面临的一个难题。

■同行评议者

于则利, 教授, 首都医科大学附属北京同仁医院外科

■ 研发前沿

宁夏南部山区因经济落后, 干旱少雨, 农村大多饮用窖水, 故肝包虫的发病率较高, 手术是治疗肝包虫主要手段。

好, 无严重心肺疾病者, 均可再次手术。9例患者均行择期手术, 其中3例残腔壁钙化明显, 位于肝右叶及左外叶, 行肝包残腔外囊完整剥除+肝下引流术。另外6例因囊肿残腔靠近第一、二肝门, 行残腔囊外完整剥除风险大, 采用直视下残腔内胆漏口缝闭+残腔大网膜填塞+残腔引流+胆总管T管引流术。

结果: 本组9例患者再手术后有2例前3 d每日残腔引流管引流量约10-50 mL, 到第5天降至每日5-10 mL, 至第7天无引流物拔除。其余7例术后1-3 d引流量每日约5-10 mL, 呈每日递减, 一般均在5 d内拔除。9例患者出院后月均行彩超复查, 肝包虫术后改变, 无积液。电话随访6 mo-3年, 除2例死于其他疾病外, 其余7例工作生活正常, 恢复良好。

结论: 肝包虫术后残腔胆漏长期带管患者, 再次手术解决胆漏并去除引流管效果较好。

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词: 肝包虫; 胆漏; 手术

核心提示: 本研究通过对肝包虫术后胆漏再手术治疗, 总结出以下几点经验: (1)肝包虫患者首次手术尽可能行根治性囊外切除术; (2)如肝包残腔靠近第一、二肝门, 行根治性囊外切除术困难者, 应仔细探查残腔寻找胆漏口, 尽可能缝闭胆漏口, 并用带蒂大网膜填塞残腔; (3)一旦术后残腔带管时间超过3 mo, 且胆漏量每日>100 mL, 应考虑再手术治疗。

陈长义, 陈耀堂, 李慧明, 田希兰, 张志红, 时煜山. 肝包虫内囊摘除术后胆漏再手术治疗9例. 世界华人消化杂志 2014; 22(9): 1285-1288 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/1285.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v22.i9.1285>

0 引言

肝包虫病为牧区及西北偏远山区常见的人畜共患疾病, 手术是治疗肝包虫病的主要手段^[1-4]。目前常用的手术方法有: (1)肝包内囊摘除, 残腔引流术; (2)根治性肝包虫囊外剥除术; (3)肝包内囊摘除、残腔大网膜填塞+残腔引流术。传统的肝包虫内囊摘除术后, 如发现残腔有胆漏, 一般行残腔置管引流。但部分患者后残腔胆漏量大, 带管时间长, 给患者带来诸多不便, 且引流管容易逆行性感染, 严重影响生活质量。如何再治疗是外科医生面临的一个难题^[5,6]。2011-01/2013-10

固原市人民医院收治肝包虫内囊摘除术后长期带肝包残腔引流管且引流管口反复感染患者9例, 为尽早拔除引流管患者进行住院手术治疗。本文总结肝包虫内囊摘除术后长期带管患者行再次手术治疗效果, 具体分析如下。

1 材料和方法

1.1 材料 本组肝包虫内囊摘除术后长期带管患者9例, 其中男性5例, 女性4例, 年龄18-72岁, 平均45岁。既往均行肝包内囊摘除+残腔引流术。残腔引流管带管时间最短6 mo, 最长38 mo, 平均22 mo。每日胆汁引流量60-300 mL, 平均180 mL。其中6例为县级医院手术, 2例为中心卫生院手术, 1例为本院手术。

1.2 方法 患者一般情况良好, 无严重心肺疾病者, 均可再次手术。本组9例患者均行择期手术, 其中3例残腔壁钙化明显, 位于肝右叶及左外叶, 行肝包残腔外囊完整剥除+肝下引流术。另外6例因囊肿残腔靠近第一、二肝门, 行残腔囊外完整剥除风险大, 采用直视下残腔内胆漏口缝闭+残腔大网膜填塞+残腔引流+胆总管T管引流术。

2 结果

2.1 术后带管时间 本组9例患者再手术后有2例前3 d每日残腔引流管引流量约10-50 mL, 到第5天降至每日5-10 mL, 至第7天无引流物拔除。其余7例术后1-3 d引流量每日约5-10 mL, 呈每日递减, 一般均在5 d内拔除。

2.2 随访 9例患者出院后每月均行彩色多普勒超声复查, 肝包虫术后改变, 无积液。电话随访6-36 mo, 除2例死于其他疾病外, 其余7例工作生活正常, 恢复良好。

3 讨论

宁夏南部山区因经济落后, 干旱少雨, 农村大多饮用窖水, 故肝包虫的发病率较高。手术是治疗肝包虫的主要手段。目前常用的手术方法有: (1)肝包内囊摘除, 残腔引流术。肝包虫内囊摘除术一直被公认为治疗肝包虫病的理想方案, 目前仍在临床广泛应用, 具有操作简单, 疗效可靠的优点。对内囊摘除术后残腔的处理应根据残腔大小、部位、外囊厚度、钙化程度、感染、渗液等区别处理。其原则是彻底清除残留内囊, 尽可能缩小残腔, 防止胆漏、渗血、渗液、感染的发生。但上述方法复发率高, 文献报道^[1]复发

率在4.5%-20.2%,加之伴有胆漏,必然导致残腔很高的并发症,发生率在10.8%-65.8%,极大地影响了手术疗效及术后生活质量;(2)根治性肝包虫囊外剥除术.彭心宇^[2]提出外膜下肝包虫切除术,实践工作中证明其手术操作较肝不规则切除术容易,出血少,尤其距肝门较远者手术更易操作,有条件的医院可以推广;(3)肝包虫内囊摘除、残腔大网膜填塞+残腔引流术.对不能完全切除的外囊残腔,大网膜填塞是防止术后并发症的较好方法.我们曾使用上述3种手术方法治疗肝包虫,并进行效果比较^[3],总结出直视下残腔内胆漏口缝闭+残腔大网膜填塞+残腔引流+胆总管T管引流术方法简单易行,比较适合基层医院实施.

肝包虫术后残腔胆漏量大,引流管长期不能拔除,就其原因有以下几点^[7-10]:(1)基层医院限于条件和技术,一般均行肝包虫内囊摘除+残腔引流术,很少行根治性肝包虫囊外剥除术.如术中发现肝包虫残腔有胆漏,很少仔细找寻胆漏口并缝扎.仅放置残腔引流管,导致大的胆漏口无法自闭,引流管放置时间长;(2)部分大的肝包虫内囊摘除前因残腔压力大于肝内胆管压力,故与肝包虫之间相通的毛细胆管处于闭锁状态.当内囊摘除,残腔压力消失,与肝内胆道相通的小毛细胆管大量开放,导致胆漏.这种患者术中残腔内可能未发现有明显胆漏,术后3-4 d开始残腔引流处出大量胆汁,但大多数残腔塌陷闭锁后胆漏逐渐减少直至消失,仅有部分患者残腔胆漏经久不愈长期带管;(3)术中处理肝包虫残腔简单,未用带蒂大网膜填塞残腔,加上残腔壁钙化不易塌陷闭锁,一旦有胆漏形成,很难自愈.对于肝包虫术后残腔胆漏长期带管患者,再次手术解决胆漏并去除引流管无疑是正确的选择.再手术方式有如下几种^[11-13]:(1)根治性肝包虫囊外手术:由于将外囊完整从肝组织剥除,从根本上杜绝了复发和胆漏原因,可达到消灭残腔,避免感染及胆漏并发症.本组3例行此手术效果良好;(2)残腔胆漏口缝闭+大网膜填塞+T管引流术.部分换患者再次术中发现,残腔较原来明显缩小,但未完全塌陷闭锁,并且靠近第一、二肝门,探查残腔能发现有明显的胆漏口与肝内胆管相通,但行残腔囊外剥除术困难的,可直视下缝闭胆漏口,将残腔两侧壁对拢缝合,尽量缩小残腔,并用带蒂大网膜填塞残腔,预防性于残腔

置引流管,关闭残腔.另外行T管引流,以降低胆道压力,促进胆漏口毛细胆管闭锁愈合.罗超英等^[4]对于包虫位于肝门部合并胆漏时,行胆总管内置“T”管引流,术中注水对明确的胆漏给予缝扎,明显缩短了术后胆漏带管时间,手术操作相对简单,风险小,疗效较好,术后残腔并发症少,便于肝包虫高发区的基层医院开展,对于肝包虫合并胆漏再手术治疗是一个有效的尝试.本组6例均以此方法处理,术后残腔引流管最长7 d拔出,效果良好.

本研究通过对肝包虫术后胆漏再手术治疗,总结出以下几点经验:(1)肝包虫患者首次手术尽可能行根治性囊外切除术.因为在外膜下包虫切除术中发现外囊均有多个管道相通,多为胆管系统,亦有滋养血管,外囊切除术解决了残腔原位复发及囊液外溢及种植原因,避免术后长期带引流管,应首选此术式;(2)如肝包虫靠近第一、二肝门,行根治性囊外切除术困难者,应仔细探查残腔寻找胆漏口,尽可能缝闭胆漏口,并用带蒂大网膜填塞残腔.因为大网膜具有强大的吸收修复及抗感染能力,填充残腔后可使残腔积液尽快消失,胆漏封闭、残腔缩小,明显减少带管时间;(3)一旦术后残腔带管时间超过3 mo,且胆漏量每日>100 mL,应考虑再手术治疗.

4 参考文献

- 1 张启瑜, 钱礼. 腹部外科学. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 552-553
- 2 彭心宇. 肝包虫病的外科治疗新观点. 中国实用外科杂志 2003; 23: 651-653
- 3 陈长义, 冶固卫. 肝包虫三种术式比较及临床应用评价. 中华普通外科杂志 2009; 24: 246-247
- 4 罗超英, 刁红亮, 乌尔班, 张德华, 夫尔多斯, 马尔丹, 陈萍. 不同方式治疗肝包虫合并胆瘘临床研究. 中华肝胆外科杂志 2010; 16: 148-149
- 5 彭心宇, 张示杰, 牛建华. 肝包虫外膜内完整摘除术30例报告. 中华普通外科杂志 2002; 17: 529-530
- 6 何登瀛, 张天龄, 李玉民, 王世栋. 肝包虫病的外科治疗. 中国普通外科杂志 2000; 9: 155-157
- 7 罗超英, 刁红亮, 马尔丹, 杜明红. 小儿肝包虫病110例特点及诊治分析. 新疆医科大学学报 2008; 31: 1303-1303
- 8 李新丰, 刘恒山, 依敏江. 肝塌陷术配合高渗盐水治疗小儿肝包虫病. 中华肝胆外科杂志 2004; 10: 199-200
- 9 阿力木江·托合提, 阿布都加帕, 阿布都外力. 肝包虫病的外科治疗讨论. 中外健康文摘 2012; 9: 170-171
- 10 夏亮, 彭心宇. 肝包虫病外科治疗的现状. 现代生物医学进展 2010; 10: 1994-1996
- 11 李晓东, 李波, 严律南, 文天夫. 肝包虫病的外科治疗和并发症的处理. 华西医学 2005; 20: 229-230

■同行评价

本研究选题实用, 总结具体, 讨论丰富, 对临床医师尤其是基层临床医师有参考价值.

- 12 何涛. 肝包虫病的并发症及外科治疗对策. 内蒙古医学杂志 2003; 35: 351-352
- 13 段振坤, 何凤国, 张兴武. 408例肝包虫病外科治疗的体会. 宁夏医学杂志 1999; 21: 355-356

编辑 田滢 电编 鲁亚静



ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) DOI: 10.11569 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有

• 消息 •

《世界华人消化杂志》参考文献要求

本刊讯 本刊采用“顺序编码制”的著录方法,即以文中出现顺序用阿拉伯数字编号排序.提倡对国内同行近年已发表的相关研究论文给予充分的反映,并在文内引用处右上角加方括号注明角码.文中如列作者姓名,则需在“Pang等”的右上角注角码号;若正文中仅引用某文献中的论述,则在该论述的句末右上角注码号.如马连生^[1]报告……,潘伯荣等^[2-5]认为……;PCR方法敏感性高^[6-7].文献序号作正文叙述时,用与正文同号的数字并排,如本实验方法见文献[8].所引参考文献必须以近2-3年SCIE, PubMed,《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊为准,通常应只引用与其观点或数据密切相关的国内外期刊中的最新文献,包括世界华人消化杂志(<http://www.wjgnet.com/1009-3079/index.jsp>)和*World Journal of Gastroenterology*(<http://www.wjgnet.com/1007-9327/index.jsp>).期刊:序号,作者(列出全体作者).文题,刊名,年,卷,起页-止页, PMID编号;书籍:序号,作者(列出全部),书名,卷次,版次,出版地,出版社,年,起页-止页.

肝病患者肝病严重程度与心功能的相关性

朱飞飞, 何庆荣, 李兆一, 党立群, 夏庆

朱飞飞, 何庆荣, 李兆一, 党立群, 齐齐哈尔医学院第五附属医院大庆龙南医院物理诊断科心电图室 黑龙江省大庆市 163453

夏庆, 齐齐哈尔医学院第五附属医院大庆龙南医院消化科 黑龙江省大庆市 163453

朱飞飞, 主治医师, 主要从事高血压性心脏病的研究

作者贡献分布: 课题设计, 论文写作由朱飞飞完成; 研究过程由何庆荣与夏庆完成; 数据分析由李兆一与党立群完成。

通讯作者: 朱飞飞, 主治医师, 163453, 黑龙江省大庆市爱国路35号, 齐齐哈尔医学院第五附属医院大庆龙南医院物理诊断科心电图室, 671491568@qq.com

电话: 0459-5910356

收稿日期: 2013-12-27 修回日期: 2014-01-20

接受日期: 2014-02-03 在线出版日期: 2014-03-28

Correlation between severity of liver diseases and left ventricular function in patients with liver diseases

Fei-Fei Zhu, Qing-Rong He, Zhao-Yi Li, Li-Qun Dang, Qing Xia

Fei-Fei Zhu, Qing-Rong He, Zhao-Yi Li, Li-Qun Dang, Department of Physical Diagnosis, Qiqihar Medical College Affiliated Fifth Hospital, Daqing Longnan Hospital, Daqing 163453, Heilongjiang Province, China

Qing Xia, Department of Gastroenterology, Qiqihar Medical College Affiliated Fifth Hospital, Daqing Longnan Hospital, Daqing 163453, Heilongjiang Province, China

Correspondence to: Fei-Fei Zhu, Attending Physician, Department of Physical Diagnosis, Qiqihar Medical College Affiliated Fifth Hospital, Daqing Longnan Hospital, 35 Aiguo Road, Daqing 163453, Heilongjiang Province, China. 671491568@qq.com

Received: 2013-12-27 Revised: 2014-01-20

Accepted: 2014-02-03 Published online: 2014-03-28

Abstract

AIM: To evaluate the correlation between the severity of liver diseases and left ventricular function in patients with liver diseases.

METHODS: Ninety-four patients who would undergo orthotopic liver transplantation were enrolled in this study. According to the MELD (model for end-stage liver disease) scoring system, these subjects were categorized into three groups by the severity of liver diseases: mild ($n = 34$, MELD score ≤ 9 points), moderate ($n = 44$, $10 \leq$ MELD score ≤ 19 points) and severe ($n = 16$, MELD score ≥ 20 points). The relationship

between the severity of liver disease and cardiac function was determined by analysis of variance and correlation analysis.

RESULTS: Serum creatinin, total bilirubin and international normalized ratio (INR) were significantly different among the three groups ($P < 0.05$), and the severity of liver disease was significantly correlated with serum creatinin, total bilirubin and INR ($r = 0.594, 0.763, 0.653$; $P = 0.000, 0.000, 0.000$, respectively). With the increase in the severity of liver diseases, left atrial diameter (LAD), interventricular septum thickness (IVST), left ventricular end-diastolic diameter (LVEDD), aortic valve flow (AF), corrected QT interval (QTc) and cardiac output (CO) were gradually increased, and the differences were statistically significant between groups.

CONCLUSION: The MELD scoring system can effectively reflect the severity of liver diseases, and with the progression of end-stage liver diseases, the structure, function and electrical activity of the heart gradually subside.

© 2014 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

Key Words: Liver cirrhosis; Left ventricular function; Evaluation study

Zhu FF, He QR, Li ZY, Dang LQ, Xia Q. Correlation between severity of liver diseases and left ventricular function in patients with liver diseases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(9): 1289-1293 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/1289.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i9.1289>

摘要

目的: 评价肝病患者肝病严重程度与左心功能的关系。

方法: 研究对象来自我院行原位肝移植的94例肝硬化患者。回顾性分析所有患者的生化指标、心脏超声、心电图和凝血指标等资料。根据终末期肝病模型(the model for end-stage liver disease, MELD)评分系统评价患

■背景资料

肝硬化早期尚不会出现心脏形态上改变,最近研究报道,肝硬化患者尸检发现心脏有明显的扩大,提示肝硬化的病情进展可能会引起心脏结构功能的改变,最终导致严重的心血管疾病。因而明确终末期肝病患者肝病严重程度与左心功能的关系对于预防患者发生心功能衰竭等心血管疾病有重要意义。而关于终末期肝病患者的心脏功能评估的研究仍比较缺乏。

■同行评议者

吴君, 主任医师, 贵阳医学院附属医院感染科

■ 研发前沿

目前关于终末期肝病患者的肝功能评估以及两者的相关性尚不确定,本研究旨在评价终末期肝病严重度与左心功能的关系。

者的肝病严重程度,将其分为3组:轻度组(34例, MELD评分 ≤ 9 分)、中度组(44例, 10分 \leq MELD评分 ≤ 19 分)、重度组(16例, MELD评分 ≥ 20 分)。采用单因素方差分析、相关性分析等评价肝病严重程度与心功能之间的关系。

结果:三组患者的肌酐、总胆红素以及国际标准化比值比较差异均有统计学意义($P < 0.05$),且肝病严重程度与肌酐、总胆红素以及国际标准化比值均呈正相关(分别为 $r = 0.594, P = 0.000; r = 0.763, P = 0.000; r = 0.653, P = 0.000$)。随着肝病严重程度的增加,左房内径(left atrial diameter, LAD)、室间隔厚度(interventricular septum thickness, IVST)、左室舒张末期内径(left ventricular end-diastolic diameter, LVEDD)、主动脉瓣流速(aortic valve flow, AF)、QT间期(corrected QT interval, QTc)和心输出量(cardiac output, CO)的均数都逐渐增加,并且组间差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

结论:MELD评分系统可以有效地反应肝病严重程度,且随着终末期肝病的进展,心脏的结构、功能及电生理活动逐渐减退。

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词:肝硬化;左心室功能;评价研究

核心提示:本研究结果显示,所有肝硬化的病因中,慢性乙型肝炎肝硬化比例最高(67/94),提示乙型肝炎仍是我国引起肝硬化最主要的原因,这与以往的研究报道相符。而国外的肝硬化主要为酒精性肝炎引起,这可能与国内外的医疗卫生水平相关,也与不同人群的饮食习惯有一定的关系。

朱飞飞, 何庆荣, 李兆一, 党立群, 夏庆. 肝病患者肝病严重程度与心功能的相关性. 世界华人消化杂志 2014; 22(9): 1289-1293
URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/1289.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v22.i9.1289>

0 引言

肝硬化是一种以肝功能损害及门脉高压症为主要临床表现的综合症^[1],其中门脉高压症主要特点是高动力循环,会引起心动过速、脉压下降等反应,同时又会增加心输出量,降低血管收缩反应,引起左心室收缩和舒张功能下降^[2]。肝硬化早期尚不会出现心脏形态上改变^[3,4],最近研究报道,肝硬化患者尸检发现心脏有明显的扩大^[5],提示肝硬化的病情进展可能会引起心脏结构功能的改变,最终导致严重的心血管疾病。因而明确终末期肝病患者肝病严重程度与左心功

能的关系对于预防患者发生心功能衰竭等心血管疾病有重要意义,而关于终末期肝病患者的肝功能评估的研究仍比较缺乏。本研究旨在评价终末期肝病患者肝病严重程度与左心功能的关系,为预防终末期肝病患者发生严重心血管并发症提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料 选取2012-06/2013-01于我院行原位肝移植患者。纳入标准:临床资料完整;无严重感染及外伤;无其他系统恶性肿瘤。最终纳入94例研究对象,其中男性73例,女性21例,平均年龄 48.6 ± 7.8 岁。其中,按病因分类,慢性乙型肝炎肝硬化患者共67例,慢性丙型肝炎肝硬化患者共10例,原发性肝癌患者共6例,酒精性肝硬化患者共5例,胆汁淤积性肝硬化患者共6例。

1.2 方法 所有研究对象于空腹8 h后抽血检测血液生化指标,包括肝肾功能及凝血功能等。主要分析并记录肌酐、总胆红素、国际标准化比值、谷丙转氨酶(alanine transaminase, ALT)和谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)等指标。使用公式计算终末期肝病模型(the model for end-stage liver disease, MELD)评分, MELD评分 = $3.8 \times \ln$ 胆红素(mg/dL) + $11.2 \times \ln$ (INR) + $9.6 \times \ln$ 肌酐(mg/dL) + $6.4 \times$ 病因(胆汁性或酒精性肝硬化为0分,其他为1分)。所有研究对象采用心脏二维超声测量心脏的结构和功能,包括左房内径(left atrium diameter, LAD)、室间隔厚度(interventricular septal thickness, IVST)、左室舒张末期内径(left ventricle end-diastolic diameter, LVEDD)、左室后壁厚度(left ventricular posterior wall thickness, LVPWT)、左室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF)、每搏量(stroke volume, SV)、二尖瓣流速E及A和主动脉瓣流速(AF)。计算二尖瓣流速E/A比值和心输出量(CO)。通过心电图分析心率(heart rate, HR)、QRS间期(QRS interval, QRSI)、校正的QT间期(QTc)和PR间期(PR interval, PRI)。

统计学处理 采用SPSS18.0软件进行统计学分析,计量资料使用 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示。采用单因素方差分析比较组间血液生化指标、左心结构功能和心脏电生理各指标的差异。采用Pearson相关分析观察肝病严重程度与血液生化指标、左心结构功能和心脏电生理各指标的相关性。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表 1 不同病种终末期肝病模型评分结果 (*n*)

病因	<i>n</i>	轻度(MELD评分≤9)	中度(10≤MELD评分≤19)	重度(MELD评分≥20)
慢性乙型肝炎肝硬化	67	20	35	12
慢性丙型肝炎肝硬化	10	3	4	3
酒精性肝硬化	5	5	0	0
胆汁淤积性肝硬化	6	3	2	1
原发性肝癌	6	3	3	0
总数	94	34	44	16

■相关报道

以往研究显示, 中晚期肝病患者心脏表现不明显, 可能是由于机体的自我调节功能使外周血管舒张从而降低了左心室后负荷。

表 2 终末期肝病模型评分与血液生化指标的关系 (mean ± SD)

MELD评分	肌酐(mg/dL)	总胆红素(mg/dL)	国际标准化比值	ALT(U/L)	AST(U/L)	AST/ALT
轻度组	0.67 ± 1.27	1.33 ± 2.47	1.22 ± 0.31	52.3 ± 2.1	60.2 ± 1.7	1.13 ± 1.68
轻度组	0.76 ± 1.31	3.72 ± 2.65	1.67 ± 0.42	64.2 ± 2.0	80.3 ± 1.6	1.26 ± 1.83
重度组	1.37 ± 1.82	9.27 ± 2.37	2.62 ± 0.78	57.8 ± 1.6	84.2 ± 2.0	1.44 ± 1.62
<i>F</i> 值	15.122	24.372	41.281	0.582	2.314	0.781
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.000	0.532	0.106	0.445
<i>r</i> 值	0.594	0.763	0.653	0.174	0.364	0.208
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.000	0.126	0.002	0.067

ALT: 丙氨酸转氨酶; AST: 谷草转氨酶。

表 3 各组的左心结构功能和心脏电生理各指标的比较

项目	轻度组	轻度组	重度组	<i>F</i> 值	<i>P</i> 值
左房内径(mm)	33.28 ± 3.56	36.92 ± 4.12	39.61 ± 4.22	8.660	0.000
室间隔厚度(mm)	8.09 ± 1.22	8.46 ± 1.03	9.48 ± 2.17	5.781	0.001
左室舒张末期内径(mm)	47.68 ± 3.27	50.22 ± 4.16	52.31 ± 4.81	5.689	0.004
左室后壁厚度(mm)	7.96 ± 1.12	8.03 ± 1.21	8.71 ± 0.59	2.768	0.087
左室射血分数(%)	62.91 ± 4.37	63.25 ± 6.15	61.39 ± 4.18	0.425	0.678
二尖瓣流速E/A	1.11 ± 0.42	1.17 ± 0.32	0.95 ± 0.23	2.234	0.153
主动脉瓣流速(m/s)	1.23 ± 0.17	1.35 ± 0.28	1.65 ± 0.37	9.402	0.000
PR间期(ms)	162.04 ± 23.80	156.78 ± 16.35	156.04 ± 18.36	0.825	0.443
QRS间期(ms)	86.92 ± 11.70	86.34 ± 12.63	94.36 ± 16.24	2.397	0.087
校正的QT间期(ms)	432.02 ± 28.01	439.26 ± 47.12	460.12 ± 35.26	4.651	0.010
左房内径(mm)	76.12 ± 13.05	78.23 ± 12.05	83.12 ± 18.14	0.892	0.512
室间隔厚度(mm)	4.36 ± 1.20	6.12 ± 2.38	6.65 ± 2.18	6.225	0.002

2 结果

2.1 不同病种终末期肝病模型评分 所有研究对象中, 轻度组有34例(36.2%), 中度组有44例(46.8%), 重度组有16例(17.0%)。病种包括慢性乙型肝炎肝硬化、慢性丙型肝炎肝硬化、酒精性肝硬化、胆汁淤积性肝硬化和原发性肝癌, 其中慢性乙型肝炎肝硬化仍然是肝移植的主要原因, 不同病种MELD评分结果如表1。

2.2 患者肝病严重程度与血液生化指标的关系 三组患者的肌酐、总胆红素以及国际标准化比

值比较差异均有统计学意义($P < 0.05$), 且肝病严重程度与肌酐、总胆红素以及国际标准化比值均呈正相关($P < 0.05$)。三组患者的ALT、AST以及AST/ALT比值比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。但AST与肝病严重程度具有正相关性($P < 0.05$)(表2)。

2.3 各组患者的左心结构功能和心脏电生理各指标的比较 随着肝病严重程度的增加, LAD、IVST、LVEDD、AF、QTc和CO的均数都逐渐增加, 并且组间差异具有统计学意义($P < 0.05$),

■同行评价

本文设计合理, 结果可靠, 具有一定的学术价值供理想细胞材料。

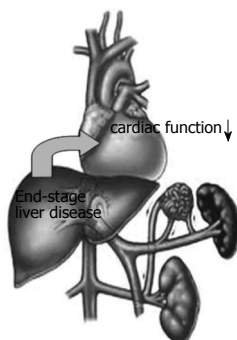


图1 终末期肝病对心功能的影响。

而LVPWT、LVEF、二尖瓣流速E/A、PRI、QRSI和HR差异无统计学意义($P>0.05$)(表3), 终末期肝病对心功能的影响的示意图如图1。

3 讨论

肝硬化患者由于肝脏结构和功能的改变^[6], 会引起全身各系统反应。其中, 肝硬化最容易影响门静脉回流^[7], 导致体循环淤血, 全身各系统缺血缺氧, 加之神经体液系统反射性调节反应^[8], 最终导致肝硬化的高动力循环状态, 心脏负担加重, 心率加快, 心肌代偿性肥厚, 收缩和舒张功能受限。随着肝硬化病程进展到终末期, 将会严重影响心脏结构和功能^[9]。目前关于终末期肝病患者的肝功能评估以及两者的相关性尚不确定, 本研究旨在评价终末期肝病患者肝病严重程度与左心功能的关系。

本研究结果显示, 所有肝硬化的病因中, 慢性乙型肝炎肝硬化比例最高(67/94), 提示乙型肝炎仍是我国引起肝硬化最主要的原因, 这与以往的研究报道相符^[10]。而国外的肝硬化主要为酒精性肝炎引起, 这可能与国内外的医疗卫生水平相关, 也与不同人群的饮食习惯有一定的关系^[11]。

本研究结果发现, 三组患者的肌酐、总胆红素以及国际标准化比值具有显著性差异, 且MELD评分与肌酐、总胆红素以及国际标准化比值均呈正相关, 提示MELD评分系统可以准确的反应终末期肝病的严重程度, 能够用于肝功能的分级评估, 也说明了本研究的终末期肝病患者具有较好的代表性。此外, 三组患者的ALT和AST均值水平均超过参考值上限, 而且AST与MELD评分呈正相关, 提示终末期肝病患者AST的升高可能不仅仅反应肝细胞受损, 也可能是心肌细胞受损的标志^[12]。因为心肌细胞损伤会明显降低心脏的收缩和舒张功能, 引起全身的代

谢紊乱, 肝肾功能失代偿, 电解质水平出现异常变化, 从而可能引起AST的异常合成与释放^[13]。

本研究还发现随着肝病严重程度的增加, LAD、IVST、LVEDD、AF和CO的均数都逐渐增加, 且各组存在显著性差异, 提示终末期肝病患者处于高动力循环状态, 表现出心输出量增加, 血流加快以及左心功能下降等代偿反。其中可能的主要原因是肝硬化会导致门静脉高压, 体循环充血, 回心血量不足, 从而引起代偿性的高动力循环状态以及心脏结构性的肥厚表现^[14]。而以往研究显示, 中晚期肝病患者心脏表现不明显, 可能是由于机体的自我调节功能使外周血管舒张从而降低了左心室后负荷^[15]。

总之, MELD评分系统可以有效地反应终末期肝病严重程度, 且随着终末期肝病的进展, 心脏的结构, 功能及电生理活动逐渐减退。虽然患者临床症状可能不明显, 但是具有发生心衰的风险。

4 参考文献

- 1 吴年贵, 吴心门. 肝硬化门脉高压综合征并结石性胆囊炎109例腹腔镜胆囊切除术. 临床误诊误治 2009; 22: 56-57
- 2 徐鑫, 黎春雷, 李红洲, 孙杰, 邓又斌. 超声二维斑点追踪成像技术评价肝硬化患者左心室局部纵向收缩功能. 中国医学影像技术 2010; 26: 288-290
- 3 毛华, 江登丰, 黄纯焄, 唐银丽, 宋卫生, 沈琼. 肝硬化患者心功能改变及其影响因素. 广东医学 2012; 33: 2149-2152
- 4 江登丰, 毛华, 黄纯焄, 陈春林. 肝硬化患者心功能改变及其与肝功能的关系. 肝脏 2011; 16: 439-441
- 5 吴志勇, 陈炜. 肝硬化门静脉高压症外科治疗程序. 中国实用外科杂志 2011; 31: 39-43
- 6 苑文雯, 郭桐生. cTnT, CK-MB, Mb检测对肝炎, 肝硬化患者心功能的诊断价值. 医学综述 2013; 19: 2835-2837
- 7 何炯红, 杨龙, 李子兵, 徐敏. 33例肝硬化患者肝功能与心功能改变临床观察. 贵州医药 2010; 34: 599-600
- 8 赵玥, 王润兰, 梅丽, 杨晓英. 心肌矢量应变和应变率成像技术对晚期肝硬化患者左心室局部收缩功能的评价. 吉林大学学报(医学版) 2011; 37: 150-153
- 9 焦荣红, 刘欣, 于明月, 黄冬霞. 超声心动图技术评价肝硬化患者左心功能的研究. 现代中西医结合杂志 2012; 21: 74-75
- 10 王洁, 顾鹏. 应变率成像对研究肝硬化患者右心室纵向功能的价值. 世界华人消化杂志 2013; 21: 1131-1135
- 11 卞继芳, 张蕾, 黄培红, 苏慧, 袁丁, 李典鸿, 梁宏宇. 卅味参附颗粒对急性心梗介入后BNP, CRP及心功能改善的疗效观察. 云南中医中药杂志 2013; 34: 24-25
- 12 张海霞, 卢实春. 肝硬化患者肝移植前后心电图改变的分析. 中华临床医师杂志(电子版) 2011; 5: 2228-2231
- 13 王丽萍, 张新力. 组织多普勒与脉冲多普勒Tei指数对肝硬化患者左心功能改变的对比研究. 临床超声医学杂志 2010; 12: 676-679
- 14 Matthews JC, Pagani FD, Haft JW, Koelling TM, Naftel DC, Aaronson KD. Model for end-stage liver

- disease score predicts left ventricular assist device operative transfusion requirements, morbidity, and mortality. *Circulation* 2010; 121: 214-220 [PMID: 20048215 DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA]
- 15 Wieselthaler GM, O Driscoll G, Jansz P, Khaghani A, Strueber M. Initial clinical experience with a novel left ventricular assist device with a magnetically levitated rotor in a multi-institutional trial. *J Heart Lung Transplant* 2010; 29: 1218-1225 [PMID: 20646936 DOI: 10.1016/j.healun]

编辑 田滢 电编 鲁亚静



非酒精性脂肪性肝病合并自身免疫异常132例

吴凤娟, 徐芸, 保洁, 刘象

■背景资料

非酒精性脂肪性肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)在欧美发达国家已成为慢性肝病的首要原因,在我国亦仅次于病毒性肝炎而居第2位;自身免疫性肝病(autoimmune liver diseases, AILD)是晚期慢性肝功能衰竭的主要原因之一,目前也是国内肝病领域研究的新热点。

吴凤娟, 徐芸, 保洁, 刘象, 郑州大学第一附属医院消化内科河南省高等学校临床医学重点学科开放实验室 河南省郑州市 450052

吴凤娟,在读硕士,主要从事消化系统疾病的研究。

作者贡献分布: 此课题由徐芸、保洁及吴凤娟设计;研究过程由吴凤娟与刘象操作完成;研究所用新试剂与分析工具由徐芸提供;数据分析由吴凤娟与保洁完成;本论文写作由吴凤娟完成;徐芸审核。

通讯作者: 徐芸,教授,主任医师,450052,河南省郑州市二七区建设东路1号,郑州大学第一附属医院消化内科。

xuyun@medmail.com.cn

电话: 0371-66862052

收稿日期: 2013-12-22 修回日期: 2014-01-20

接受日期: 2014-02-03 在线出版日期: 2014-03-28

Non-alcoholic fatty liver disease complicated with autoimmune problems: Analysis of 132 cases

Feng-Juan Wu, Yun Xu, Jie Bao, Xiang Liu

Feng-Juan Wu, Yun Xu, Jie Bao, Xiang Liu, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China

Correspondence to: Yun Xu, Professor, Chief Physician, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, 1 Jianshe East Road, Erqi District, Zhengzhou 450052, Henan Province, China. xuyun@medmail.com.cn

Received: 2013-12-22 Revised: 2014-01-20

Accepted: 2014-02-03 Published online: 2014-03-28

Abstract

AIM: To analyze the relationship between non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and autoimmune diseases.

METHODS: One hundred and thirty-two patients with biopsy-proven NAFLD were divided into four groups: 1 [patients with NAFLD and autoimmune liver disease (AILD)], 2 (patients with NAFLD and autoimmune disease except AILD), 3 (patients with NAFLD and autoimmune phenomena) and 4 (patients with NAFLD alone). All data on clinical and biochemistry indexes, autoantibodies, imaging findings and liver histology were analyzed.

RESULTS: The difference in AST was statisti-

cally significant between groups 1 and 4 ($P < 0.05$). There were significant differences in IgG in groups 1, 2 and 3 compared with group 4 ($P < 0.05$ for all). Liver stiffness, fibrosis stage and inflammation level were different significantly between group 1 and groups 2, 3 and 4 ($P < 0.05$ for all).

CONCLUSION: The levels of IgG, liver stiffness, liver fibrosis and hepatic inflammation were correlated with the severity of autoimmune problems. IgG and liver stiffness may act as long-term follow-up indicators.

© 2014 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

Key Words: Nonalcoholic fatty liver disease; Autoimmune liver disease; Liver biopsy

Wu FJ, Xu Y, Bao J, Liu X. Non-alcoholic fatty liver disease complicated with autoimmune problems: Analysis of 132 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(9): 1294-1299 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/1294.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i9.1294>

摘要

目的: 分析非酒精性脂肪性肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)与自身免疫异常的关系。

方法: 经肝活检确诊的NAFLD患者132例分为NAFLD合并自身免疫性肝病(autoimmune liver diseases, AILD)组、NAFLD合并其他自身免疫性疾病(除外AILD)组、NAFLD合并自身免疫现象组、NAFLD组。收集各组研究对象临床生化、自身抗体、影像学及肝组织学指标,应用SPSS17.0进行统计学分析。

结果: AST组1与组4之间比较差异有统计学意义($P < 0.05$),血清免疫球蛋白G(immunoglobulin G, IgG)组1、组2、组3分别与组4比较差异均有统计学意义($P < 0.05$),肝脏硬度值、肝纤维化、炎症程度组1分别与组2、组3、组4比较差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

■同行评议者

王怡,主任医师,天津市传染病医院,天津市肝病研究所

结论: IgG、肝脏硬度值、肝纤维化和炎症程度与自身免疫异常严重程度有关, IgG和肝脏硬度值可作为长期随访指标。

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有。

核心提示: 本研究对132例非酒精性脂肪性肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)患者进行自身抗体检测及肝脏组织活检, 结果发现IgG、肝脏硬度值、肝纤维化和炎症程度与自身免疫异常严重程度有关, 且IgG和肝脏硬度值可作为长期随访指标。目前, 对于NAFLD患者合并自身免疫性肝病(autoimmune liver diseases)的诊断, 仍需依赖肝组织病理学。

关键词: 非酒精性脂肪性肝病; 自身免疫性肝病; 肝活检

吴凤娟, 徐芸, 保洁, 刘象. 非酒精性脂肪性肝病合并自身免疫异常132例. 世界华人消化杂志 2014; 22(9): 1294-1299 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/1294.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i9.1294>

0 引言

非酒精性脂肪性肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)是以肝实质细胞脂肪变性为特征, 无过量饮酒史, 排除其他肝病的临床病理综合征, 是代谢综合征的重要组分^[1]。包括单纯性脂肪肝(nonalcoholic simple fatty liver, NAFL)、非酒精性脂肪性肝炎(nonalcoholic steatohepatitis, NASH)、肝硬化和隐源性肝硬化。近年来, 生活方式的改变使以NAFLD为基础的慢性肝病日益增多, NAFLD在欧美发达国家已成为慢性肝病的首要原因, 在我国亦仅次于病毒性肝炎而居第2位^[2,3]。其发病机制目前尚不明确, 肝活检仍为其诊断和分型的金标准。自身免疫(autoimmune)是机体免疫系统对自身组织细胞发生免疫应答的现象, 当免疫应答造成组织细胞病理损伤并出现临床症状者, 则表现为自身免疫性疾病^[4]。自身免疫性肝病(autoimmune liver diseases, AILD)是一组肝脏病理损害和肝功能异常为主要表现的自身免疫性疾病, 主要包括自身免疫性肝炎(autoimmune hepatitis, AIH)、原发性胆汁性肝硬化(primary biliary cirrhosis, PBC)、原发性硬化性胆管炎(primary sclerosing cholangitis, PSC)等^[5]。其表现主要根据不同程度的转氨酶升高、高丙种球蛋白血症、自身抗体的检出和特征性组织学改变。自身免疫现象(autoim-

mune phenomena)是指有至少一种自身抗体阳性, 但不能确诊为任何一种自身免疫性疾病的临床现象^[6,7]。

目前对无病毒感染、伴有肥胖、伴或不伴自身抗体阳性的慢性肝病的诊断日益备受临床关注, 对其发病机制及相关性的研究亦将成为热点课题。

1 材料和方法

1.1 材料 搜集2011-08/2013-10于郑州大学第一附属医院消化内科住院的NAFLD患者, 研究对象均选自经超声及肝活检诊断的NAFLD患者132例, 根据临床及病理学特征分为四组: NAFLD合并AILD组($n = 7$), 男2例, 女5例, 平均年龄56岁 ± 9 岁; NAFLD合并其他自身免疫性疾病(除AILD)组($n = 14$), 男5例, 女9例, 平均年龄44岁 ± 11 岁; NAFLD合并自身免疫现象组($n = 33$), 男13例, 女20例, 平均年龄47岁 ± 11 岁; NAFLD组($n = 78$), 男34例, 女44例, 平均年龄43岁 ± 13 岁。NAFLD诊断标准依据2012年美国非酒精性脂肪性肝病诊疗指南^[8], 病理学报告标准参照美国国立卫生研究院NASH临床研究网病理工作组指南^[9], AIH诊断参照2002年美国肝病学会(AASLD)制定的AIH诊疗指南^[10]。研究对象均为本地区长期居住人口, 收集其相关资料。

1.2 方法

1.2.1 ELISA法抗体检测及肝脏活检: 收集研究对象一般特征[年龄、体质量指数(body mass index, BMI)、腰臀比、血压]、临床生化指标[丙氨酸转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)、谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)、总胆固醇、甘油三酯、胰岛素抵抗指数等]、自身抗体(抗核抗体ANA、抗平滑肌抗体ASMA、抗线粒体抗体AMA、IgG等)及肝脏硬度值、肝组织学结果。其中BMI为晨起空腹测得数值得出; 生化指标由清晨空腹抽取正中静脉血2 mL测得; 自身抗体用ELISA法测出, 试剂盒由CUSABIO公司生产; 肝组织标本由16 G穿刺针在超声定位后穿刺获得, 40 g/L甲醛溶液固定, 镜下至少包括3个以上汇管区, 穿刺标本作连续切片, 进行HE、Masson、网状纤维染色, 试剂由中杉金桥公司生产。

1.2.2 肝活检病理学评估: 根据2001年《病毒性肝炎防治方案》^[11]慢性肝炎病理分级分期及美国国立卫生研究院NASH临床研究网病理工作

■ 研究前沿

对无病毒感染、伴有肥胖、伴或不伴自身抗体阳性的慢性肝病的诊断日益备受临床关注, 目前尚缺乏对其发病机制及相关性的进一步研究。

■ 相关报道

Yatsuji等研究发现高滴度抗核抗体合并NAFLD高危因素人群容易发生自身免疫性疾病,刘玉兰等发现慢性炎症反应是AILD和NAFLD的共同病变基础,但对NAFLD合并自身免疫异常的研究目前仍缺乏相关的临床数据。

表 1 4组一般特征及生化代谢指标比较

	组1	组2	组3	组4	F/χ^2	P值
<i>n</i>	7	14	33	78		
性别(男) <i>n</i> (%)	2(28.6)	5(35.7)	13(39.4)	34(43.6)	0.860	0.878
年龄(岁)	56±9	44±11	47±11	43±13	2.380	0.076
BMI(kg/m ²)	26.7±2.6	26.0±3.4	26.1±2.6	26.9±2.9	0.450	0.718
腰臀比	0.95±0.07	0.97±0.07	0.97±0.05	0.98±0.05	0.323	0.809
收缩压(mmHg)	130±16	129±13	121±11	124±14	1.208	0.314
舒张压(mmHg)	82±10	82±10	79±8	82±9	0.335	0.800
ALT(U/L)	133.0±180.6	86.8±40.6	93.6±44.4	87.4±59.3	1.385	0.709
AST(U/L)	101.9±143.7	61.2±19.2	75.2±30.8	55.7±32.6	8.752	0.033
ALP(U/L)	110.6±52.8	91.1±48.5	99.8±46.9	77.5±35.8	6.868	0.076
TG(mg/dL)	2.3±0.7	1.9±0.7	2.2±0.8	2.1±1.0	0.464	0.709
HOMA-R	3.1±1.0	3.5±2.1	2.5±0.8	2.7±1.1	3.871	0.276
IgG(g/L)	17.2±3.1	14.9±2.7	14.6±3.5	11.6±3.3	8.380	0.001
肝脏硬度值	17.0±7.7	10.3±2.9	11.0±2.8	8.8±2.8	10.3	0.001

BMI: 体质指数; TG: 甘油三酯; HOMA-R: 胰岛素抵抗指数; ALT: 丙氨酸转氨酶; AST: 谷草转氨酶; ALP: 碱性磷酸酶. 肝脏硬度值参考值<6.2 kpa.

表 2 4组肝组织病理纤维化、炎症活动及脂肪变程度比较 *n*(%)

	组1	组2	组3	组4	P值
<i>n</i>	7	14	33	78	
肝纤维化					0.001
S0	0(0)	3(21.4)	9(27.3)	28(35.9)	
S1	1(14.3)	7(50)	19(57.6)	36(46.1)	
S2	5(71.4)	3(21.4)	5(15.1)	13(16.7)	
S3	1(14.3)	1(7.2)	0(0)	1(1.3)	
S4	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	
炎症活动					0.033
G1	1(14.3)	8(57.1)	19(57.6)	50(64.1)	
G2	4(57.1)	4(28.6)	13(39.4)	26(33.3)	
G3	2(28.6)	2(14.3)	1(3.0)	2(2.6)	
G4	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	
脂肪变					0.794
轻度	3(42.9)	6(42.9)	11(33.4)	25(32.1)	
中度	3(42.9)	5(35.7)	14(42.4)	32(41.0)	
重度	1(14.2)	3(21.4)	8(24.2)	21(26.9)	

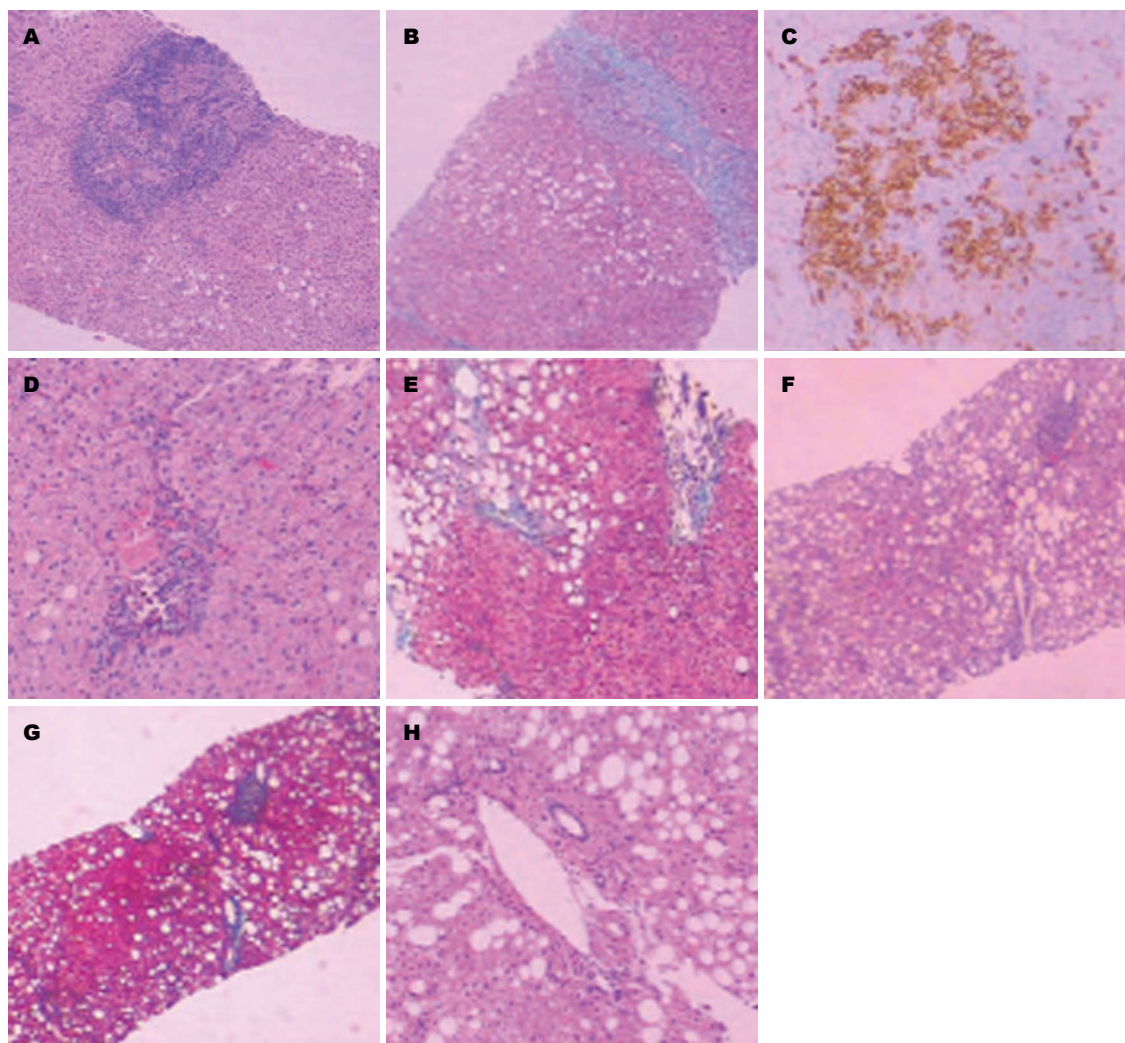
组指南,采用0-4级分法评估NAFLD纤维化程度(S)和炎症活动程度(G). AIH特征性表现包括:突出的界面炎,汇管区中重度淋巴细胞浆细胞浸润,明显的桥接坏死或融合严重的淋巴细胞炎症样变,以及肝细胞玫瑰花结的形成. 脂肪变程度根据肝活检标本脂肪样变所占比例分为轻、中、重度,轻度:肝细胞脂肪变占5%-33%;中度:肝细胞脂肪变占33%-66%;重度:肝细胞脂肪变占66%以上.

统计学处理 采用SPSS17.0统计学软件对数

据进行处理. 计量资料以mean±SD表示,采用单因素方差分析、K-W检验;计数资料以例数或百分率描述,采用 χ^2 检验、秩和检验;检验水准 $\alpha=0.05$. $P<0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 一般特征及生化 组1为NAFLD合并AILD组;组2为NAFLD合并其他自身免疫性疾病(除外AILD)组,其中NAFLD合并多发性肌炎4例、合并强直性脊柱炎2例、合并干燥综合征4例、合并类风湿性关节炎(RF)4例;组3为NAFLD合并自身免疫现象组;组4为NAFLD组. 四组患者一般特征、生化及代谢相关指标比较见表1,4组患者在性别、年龄、BMI、腰臀比、血压方面比较差异均无统计学意义($P>0.05$);ALT、ALP、HOMA-R、TG四组间比较差异均无统计学意义($P>0.05$);AST、IgG、肝脏硬度值在四组间比较差异有统计学意义($P<0.05$),AST组1与组4之间比较差异有统计学意义($P<0.05$),组1与组2、组3,组4与组2、组3,2与组3之间比较均无统计学意义;IgG组1、组2、组3分别与组4比较差异均有统计学意义($P<0.05$),组1、组2、组3之间比较差异无统计学意义;肝脏硬度值组1分别与组2、组3、组4比较差异均有统计学意义($P<0.05$),组2、组3、组4之间比较差异无统计学意义.



■创新盘点

本课题对132例NAFLD患者进行分组研究, 结果发现IgG、肝脏硬度值、肝纤维化和炎症程度与自身免疫异常严重程度有关, 且IgG和肝脏硬度值可作为长期随访指标。

图1 NAFLD合并自身免疫问题患者肝脏组织学表现. A: NAFLD合并PBC患者汇管区炎细胞浸润、PBC肉芽肿形成(HE × 40); B: NAFLD合并PBC患者纤维样变(Masson × 40); C: NAFLD合并PBC患者CD38细胞染色(× 100); D: NAFLD合并RF患者汇管区浆细胞浸润(HE × 100); E: NAFLD合并RF患者纤维样变(Masson × 40); F: NAFLD合并自身免疫现象患者HE染色(× 40); G: NAFLD合并自身免疫现象患者纤维样变(Masson × 40); H: 单纯NAFLD患者汇管区浆细胞浸润(HE × 100).

2.2 组织学表现 4组患者肝活检后纤维化分期、炎症程度分级及脂肪变程度比较如表2, 图1. 四组患者比较, 肝纤维化程度、炎症程度差异有统计学意义($P < 0.05$), 肝脂肪变程度比较差异无统计学意义($P > 0.05$). 肝纤维化程度、炎症程度组1分别与组2、组3、组4比较差异均有统计学意义($P < 0.05$), 组2、组3、组4之间比较差异无统计学意义。

2.3 7例NAFLD合并AILD患者主要指标 NAFLD合并AIH合并PBC3例, NAFLD合并AIH3例, NAFLD合并PBC1例, 7例患者IgG均升高, 3例NAFLD合并AIH患者抗体ANA均阳性(1:320), AIH评分>15分, 1例NAFLD合并PBC患者抗体AMA阳性(1:320), AIH评分小于10分, 3例NAFLD合并重叠综合征(AIH+PBC)患者抗体ANA、AMA均阳性, 并合并肝肾微粒体抗体

(liver-kidney microsomal antibody, LKM-1)等多种抗体阳性(表3).

3 讨论

近年来, 随着生活方式的改变, NAFLD已成为肝功能酶学异常和慢性肝病的最常见原因之一, 其发病可能与肝脏脂质代谢障碍、胰岛素抵抗、遗传、免疫等因素相关. NAFLD常有肝脏网状内皮系统功能障碍以及炎性细胞和促炎细胞因子浸润, 此观点已被动物实验证实^[12]; 肠道微生物菌群是调节异位脂肪沉积的关键, 有研究表明^[13]炎症因子导致的微生物菌丛失调可加剧肝脏脂肪变和NAFLD的治疗难度。

目前认为慢性炎症反应是AILD和NAFLD的共同病变基础. NAFLD患者肝脏大量脂肪因子的分泌使机体处于慢性炎症状态, 同时, 增加

■同行评价

本文选材好,思路清晰,分析透彻,通过临床研究所得出的结果为临床医生规范化诊疗、避免误诊及不必要的治疗提供了依据。

表 3 NAFLD合并AILD患者一般特征、生化及自身抗体

诊断	性别	BMI (kg/m ²)	ALT (U/L)	ALP (U/L)	TG (mg/dL)	HOM- A-R	IgG(g/L)	抗体	肝脏硬度值(kpa)	G	S	AIH评分
NAFLD 并重叠	女	32.4	22	96	1.69	3.8	21.4	ANA1:100 AMA1:320 LKM-1	15.2	2	2	14
	女	25.1	526	191	1.98	2.52	12.96	ANA1:100 SSA(+++) sp100(+)	12.8	2	2	13
	女	24.8	37	69	2.63	2.2	16.6	ANA1:320 AMA1:100 IgG4(+)	28.6	3	3-4	8
NAFLD 并AIH	女	26	63	178	3.31	2.46	21.3	ANA1:320 SMA(±) Anti- ASGPR(±)	16	1	2	18
	男	25.8	112	77	2.62	2.23	15.47	ANA1:320	6.5	2	1	15
	女	26.4	156	103	2.32	4.8	16.9	ANA1:320 SSA(+)	13.9	3	2	16
NAFLD 并PBC	男	26.7	15	60	1.24	3.5	15.8	AMA1:320	25.7	2	2	6

BMI: 体质指数; TG: 甘油三酯; HOMA-R: 胰岛素抵抗指数; ALT: 丙氨酸转氨酶; ALP: 碱性磷酸酶。

的游离脂肪酸使肝脏脂质过度沉积, 趋化大量巨噬细胞, 进而诱发自身免疫反应; 过多的脂质可使机体处于氧化应激状态, 产生的活性氧族通过与TNF- α 、FAS配体作用诱导肝细胞凋亡, 并可激活核转录因子, 调节炎症因子的表达, 引起肝组织纤维化。有文献报道脂肪因子瘦素可诱导Th1细胞启动自身免疫反应^[14]。对NASH和PBC小鼠模型的肝脏病理学研究也发现, NASH小鼠病理学上可出现界面炎、汇管区炎性细胞浸润以及小胆管损伤样改变, 并可检测出自身抗体, 如ANA, 但PBC小鼠病理学未发现NASH样改变。

本研究发现, NAFLD患者和NAFLD合并AILD、合并其他自身免疫性疾病(除AILD)、合并自身免疫现象患者一般特征并无显著差别, AST组1高于组2、组3、组4, 但只有组1与组4比较差异有统计学意义($P<0.05$); IgG在组1、组2、组3均升高, 组4正常, 组1、组2、组3分别与组4比较差异均有统计学意义($P<0.05$), 而组1、组2、组3之间差异无统计学意义, 此结果与国外研究结果相一致^[15]。IgG升高可怀疑NAFLD合并自身免疫异常, 但不能作为鉴别的依据。肝脏剪切波弹性成像(supersonic shear imaging, SSI)目前作为一种新技术被应用于此项研究中, 有文献报道^[16]SSI测得肝脏硬度值与肝纤维化程度正相关, 对于肝活检有风险者及病情长期随访有重大意义。本组研究中, 四组肝脏硬度值均升

高(参考值 <6.2 kpa), 组1升高显著, 组1分别与组2、组3、组4比较差异均有统计学意义($P<0.05$)。此外, 四组肝活检结果比较, 肝纤维化分级、炎症活动分期组1明显高于组2、组3、组4, 组1分别与另三组比较差异有统计学意义($P<0.05$), 此结果与SSI测得肝脏硬度值结果相一致。表明肝脏硬度值可作为除肝活检外病情长期随访的可靠指标。NAFLD合并其他自身免疫性疾病(除AILD)、合并自身免疫现象患者可表现为多种自身抗体阳性, 而肝组织学未发现AIH特征性改变, 表明NAFLD患者是否合并AILD确诊需依据肝组织学表现, 以避免临床误诊率和不必要的治疗。

AILD和NAFLD目前尚缺乏代表性血清标志物, ANA阳性高度怀疑AIH的可能, 但其诊断仍需要依据国际自身免疫性肝病组织报道的AIH评分系统^[17]。有西方国家研究表明, 20%-30%的NAFLD患者可合并有自身抗体阳性, 但是自身抗体阳性的NAFLD患者中只有10%够标准诊断NAFLD合并AIH, 尤其NASH所致肝硬化的女性患者可有很高的ANA或SMA滴度, 很难将其与抗体滴度低的AIH患者区分^[7]。目前对于NAFLD患者合并AILD的诊断, 仍需依赖肝组织病理学。研究中发现血清IgG、肝脏硬度值在四组之间比较中有统计学意义, 可作为长期随访指标。本研究针对中原地区NAFLD患者, 进一步深入研究仍需要纳入不同地区、大样本

量观察, 为NAFLD患者的长期随访及疾病早期预防提供指导意义。

4 参考文献

- 1 Krawczyk M, Bonfrate L, Portincasa P. Nonalcoholic fatty liver disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2010; 24: 695-708 [PMID: 20955971]
- 2 Farrell GC, Wong VW, Chitturi S. NAFLD in Asia-as common and important as in the West. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2013; 10: 307-318 [PMID: 23458891 DOI: 10.1038/nrgastro.2013.34]
- 3 Zhou YJ, Li YY, Nie YQ, Ma JX, Lu LG, Shi SL, Chen MH, Hu PJ. Prevalence of fatty liver disease and its risk factors in the population of South China. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 6419-6424 [PMID: 18081233 DOI: org/10.3748/wjg.13.6419]
- 4 卓玛, 李长山. 自身免疫和自身免疫性疾病的研究进展. *中国医药指南* 2012; 10: 92-94
- 5 贾继东. 自身免疫性肝病的基本概念和诊断思路. *中华肝脏病杂志* 2005; 13: 54
- 6 Barcellini W, Iurlo A, Radice T, Imperiali FG, Zaninoni A, Fattizzo B, Guidotti F, Bianchi P, Fermo E, Consonni D, Cortelezzi A. Increased prevalence of autoimmune phenomena in myelofibrosis: relationship with clinical and morphological characteristics, and with immunoregulatory cytokine patterns. *Leuk Res* 2013; 37: 1509-1515 [PMID: 24080022 DOI: 10.1016/j.leukres.2013.09.001]
- 7 Yatsuji S, Hashimoto E, Kaneda H, Tanai M, Tokushige K, Shiratori K. Diagnosing autoimmune hepatitis in nonalcoholic fatty liver disease: is the International Autoimmune Hepatitis Group scoring system useful? *J Gastroenterol* 2005; 40: 1130-1138 [PMID: 16378177 DOI: 10.1007/s00535-005-1711-z]
- 8 Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Diehl AM, Brunt EM, Cusi K, Charlton M, Sanyal AJ. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. *Hepatology* 2012; 55: 2005-2023 [PMID: 22488764 DOI: 10.1002/hep.25762]
- 9 Farrell GC, Chitturi S, Lau GK, Sollano JD. Guidelines for the assessment and management of non-alcoholic fatty liver disease in the Asia-Pacific region: executive summary. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22: 775-777 [PMID: 17565629 DOI: 10.1111/j.1440-1746.2007.05002.x]
- 10 Czaja AJ, Freese DK. Diagnosis and treatment of autoimmune hepatitis. *Hepatology* 2002; 36: 479-497 [PMID: 12143059 DOI: 10.1002/hep.23584]
- 11 中华医学会传染病与寄生虫病学分会肝病学会. 病毒性肝炎防治方案. *中华传染病杂志* 2001; 19: 56-62
- 12 Pesarín M, La Mura V, Gracia-Sancho J, García-Calderó H, Rodríguez-Vilarrupla A, García-Pagán JC, Bosch J, Abalde JG. Sinusoidal endothelial dysfunction precedes inflammation and fibrosis in a model of NAFLD. *PLoS One* 2012; 7: e32785 [PMID: 22509248 DOI: 10.1371/journal.pone.0032785]
- 13 Wood NJ. Microbiota: Dysbiosis driven by inflammation exacerbates hepatic steatosis and governs rate of NAFLD progression. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2012; 9: 123 [PMID: 22349167 DOI: 10.1038/nrgastro.2012.21]
- 14 Fernández-Riejos P, Najib S, Santos-Alvarez J, Martín-Romero C, Pérez-Pérez A, González-Yanes C, Sánchez-Margalet V. Role of leptin in the activation of immune cells. *Mediators Inflamm* 2010; 2010: 568343 [PMID: 20368778 DOI: 10.1155/2010/568343]
- 15 Cho DH, Choi MS, Kim DH, Kim DY, Shim SG, Lee JH, Koh KC, Paik SW, Yoo BC, Rhee JC. [A prospective study on the prevalence and clinical significance of autoantibodies in patients with suspected nonalcoholic fatty liver disease]. *Korean J Hepatol* 2005; 11: 261-267 [PMID: 16177552]
- 16 王利慧, 徐芸, 孙璐璐, 保洁. 实时剪切波弹性成像诊断自身免疫性肝病的肝纤维化程度. *中华内科杂志* 2013; 52: 601-603
- 17 Alvarez F, Berg PA, Bianchi FB, Bianchi L, Burroughs AK, Cancado EL, Chapman RW, Cooksley WG, Czaja AJ, Desmet VJ, Donaldson PT, Edleston AL, Fainboim L, Heathcote J, Homberg JC, Hoofnagle JH, Kakumu S, Krawitt EL, Mackay IR, MacSween RN, Maddrey WC, Manns MP, McFarlane IG, Meyer zum Büschenfelde KH, Zeniya M. International Autoimmune Hepatitis Group Report: review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 1999; 31: 929-938 [PMID: 10580593]

编辑 田滢 电编 鲁亚静



广西地区丙型肝炎病毒的基因型分布与流行病学特征

唐维, 苏明华, 江建宁, 刘志红, 韦智, 晏双龙, 覃锦耀, 滕春玲

■背景资料

丙型肝炎病毒 (hepatitis C virus, HCV) 是引起慢性病毒性肝炎及肝细胞肝癌的主要病原体之一, 全球每年约35万例死于与HCV感染相关的肝脏疾病, 他严重威胁着人类的健康。由于HCV基因型与肝炎严重程度及干扰素的应答关系密切, 因此HCV的基因分型对丙型肝炎的治疗及疗效预测有着重要意义。

唐维, 苏明华, 江建宁, 刘志红, 韦智, 晏双龙, 滕春玲, 广西医科大学第一附属医院感染性疾病科 广西壮族自治区南宁市 530021

覃锦耀, 广西医科大学第一附属医院检验科 广西壮族自治区南宁市 530021

唐维, 在读硕士, 主要从事与慢性丙型肝炎疾病进展相关因素的研究。

广西卫生厅基金资助项目, No. Z2011346

作者贡献分布: 此课题由唐维、苏明华及江建宁设计; 研究过程、资料查找及数据分析由唐维、刘志红、韦智及晏双龙共同完成; 实验样本由覃锦耀与滕春玲收集; 论文撰写由唐维完成; 苏明华审核。

通讯作者: 苏明华, 教授, 主任医师, 530021, 广西壮族自治区南宁市双拥路6号, 广西医科大学第一附属医院感染性疾病科。

smh9292@163.com

电话: 0771-5356531

收稿日期: 2013-12-27 修回日期: 2014-01-24

接受日期: 2014-02-03 在线出版日期: 2014-03-28

Epidemiological characteristics and genotype distribution of hepatitis C virus in Guangxi

Wei Tang, Ming-Hua Su, Jian-Ning Jiang, Zhi-Hong Liu, Zhi Wei, Shuang-Long Yan, Jin-Yao Qin, Chun-Ling Teng

Wei Tang, Ming-Hua Su, Jian-Ning Jiang, Zhi-Hong Liu, Zhi Wei, Shuang-Long Yan, Chun-Ling Teng, Department of Infectious Diseases, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Jin-Yao Qin, Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China
Supported by: the Foundation of Health Department of Guangxi, No. Z2011346

Correspondence to: Ming-Hua Su, Professor, Department of Infectious Diseases, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, 6 Shuangyong Road, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. smh9292@163.com

Received: 2013-12-27 Revised: 2014-01-24

Accepted: 2014-02-03 Published online: 2014-03-28

Abstract

AIM: To investigate the distribution characteristics of HCV genotypes in Guangxi, and to explore the correlations of ethnicity, gender, age, route of infection and HCN-RNA load with HCV genotypes.

METHODS: The NS5B region was amplified from

137 HCV-RNA positive serum samples and sequenced. The sequences obtained were compared with the sequences deposited in Genbank to construct a HCV NS5B phylogenetic tree.

RESULTS: The major genotype of HCV in Guangxi was 1b (58.4%), followed by 6a (12.4%), 3b (10.2%), 1a (7.3%), 2a (7.3%), and 3a (4.4%). There were no significant correlations between HCV genotype and ethnicity or gender ($P > 0.05$ for both). Significant correlations were found between HCV genotype and age, route of infection and HCV-RNA load ($P < 0.05$ for all).

CONCLUSION: Accurate HCV genotypes and subgenotypes can be obtained by establishing a phylogenetic tree of the HCV NS5B region. At least seven subgenotypes were detected in Guangxi and the main genotypes are 1b, 6a and 3b. Compared with previous reports, our results indicated that the prevalence of genotype 1b seems to decline, and the prevalence of 6a tends to increase gradually. Genotypes 3 and 6a were mainly found in young intravenous drug users. The distribution of HCV genotypes changes with the change in the route of infection.

© 2014 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

Key Words: Guangxi; Hepatitis C virus; Genotype; Phylogenetic tree; Correlative factor

Tang W, Su MH, Jiang JN, Liu ZH, Wei Z, Yan SL, Qin JY, Teng CL. Epidemiological characteristics and genotype distribution of hepatitis C virus in Guangxi. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(9): 1300-1306 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/1300.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i9.1300>

摘要

目的: 了解广西地区丙型肝炎病毒 (hepatitis C virus, HCV) 基因型的分布特征, 探讨HCV基因型与民族、性别、年龄、感染途径及HCV RNA载量的关系。

方法: 收集广西地区137例HCV RNA阳性患者

■同行评议者

阴赅宏, 研究员, 首都医科大学附属北京友谊医院感染与急救医学

的血清样本, 采用逆转录巢式PCR(RT nested-PCR)法扩增HCV NS5B区段, 对PCR终产物纯化测序后与Genbank中的标准株全基因序列比对, 共同构建HCV NS5B区段系统进化树。

结果: 广西地区HCV基因型主要为1b型(58.4%), 其次是6a型(12.4%), 3b型(10.2%), 1a型(7.3%), 2a型(7.3%), 3a型(4.4%)。分析表明, HCV基因型与民族、性别无明显相关性($P>0.05$), 而与年龄、感染途径及HCV-RNA载量有一定相关性($P<0.05$)。

结论: 构建HCV NS5B区段系统进化树能得到准确的HCV基因型和亚型; 广西地区至少存在7种HCV基因亚型, 以1b型为主, 6a型和3b型次之; 较国内早期的研究报道, 1b型的流行率似乎有下降趋势, 而6a型的流行率似乎逐步上升; 3型与6a型多见于有静脉药瘾史的年轻患者; 随着感染途径的变迁, HCV基因型的分布也将发生改变。

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词: 广西地区; 丙型肝炎病毒; 基因型; 系统进化树; 相关因素

核心提示: 广西地区目前至少存在7种丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)基因亚型(1a、1b、2a、3a、3b、6a、6d), 由于地处西南边境, 近年来吸毒人群不断增多, 静脉吸毒有可能成为广西地区新发HCV感染的主要传播途径, 且吸毒人群流动性大, 各地区的HCV基因型分布也将发生变化。

唐维, 苏明华, 江建宁, 刘志红, 韦智, 晏双龙, 覃锦耀, 滕春玲. 广西地区丙型肝炎病毒的基因型分布与流行病学特征. 世界华人消化杂志 2014; 22(9): 1300-1306 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/1300.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v22.i9.1300>

0 引言

丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)是引起慢性病毒性肝炎的主要病原体之一, 也是肝细胞肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)的重要病因之一。全球现约1.7亿人感染了HCV^[1], 平均流行率为3.0%, 每年新发感染300-400万例, 约35万例死于与HCV感染相关的肝脏疾病^[2], 可见HCV严重威胁着人类的健康。HCV属黄病毒科, 为单股正链的RNA病毒, 基因组全长约9.6 kb。HCV基因组具有高度异质性, 根据其核苷酸序列不同, 可将HCV分为不同的基因型和基因亚型。现国际上公认可分成6个基因型(1-6型)和至少83种亚型^[3]。目

前, HCV基因分型的方法有很多种, 而根据HCV NS5B区段的基因序列进行分型的方法被公认为HCV基因分型的“金标准”^[4]。由于HCV基因型与肝炎严重程度及干扰素的应答关系密切^[5], 因此HCV的基因分型对丙型肝炎的防治有着重要意义。广西是以壮族为主的少数民族自治区, 也是全国少数民族人口最多的省(区), 为了解该地区流行的HCV基因型的分布特点, 及探讨该地区丙型肝炎患者的民族、性别、年龄、感染途径及HCV RNA载量与HCV基因型有无关系, 我们做了以下研究。

1 材料和方法

1.1 材料 收集广西壮族自治区2011-02/2013-05在广西医科大学第一附属医院感染性疾病科门诊及住院部就诊的137例HCV-RNA阳性患者的血清, 并排除合并HAV、HBV、HDV、HEV感染者及酒精性肝炎、自身免疫性肝炎患者。其中, 男75例, 女62例, 平均年龄41.9岁±12.3岁(按首次确诊为慢性丙型肝炎的时间计算)。HCV-RNA载量 1.0×10^3 - 2.95×10^7 IU/mL(治疗前)。阴性对照组为健康体检者(抗HCV及HCV-RNA均阴性)的血清, 标本于-80℃保存。Trizol LS购自Invitrogen公司, 逆转录试剂盒、rTaq酶及DNA分子量标志品均购自Takara公司。引物按参考文献[6], 由上海英骏生物技术有限公司合成(表1)。

1.2 方法

1.2.1 提取RNA: 用传统TRIZOL法从200 μL血清中提取总RNA, 将其溶于10 μL焦碳酸二乙酯(diethylpyrocarbonate, DEPC)处理水中。

1.2.2 逆转录: 将上述提取的总RNA严格按照逆转录试剂盒PrimeScript RT Master Mix的说明书操作, 逆转录产物(cDNA)于-20℃保存备用。

1.2.3 PCR扩增: 应用巢式PCR扩增NS5B区, 按照Premix Taq Version 2.0说明书, 先取2 μL模板cDNA于25 μL体系中, 加引物ENO₂和ENO₄行第1轮PCR, 反应条件为94℃ 30 s, 59℃ 30 s, 72℃ 30 s, 30 cycles; 再取3 μL第1轮扩增产物于50 μL体系中, 加引物NS5S3和NS5A5行第2轮PCR, 反应条件同前; 最后取3 μL第2轮扩增终产物作2%琼脂糖凝胶电泳, 每次设立阴性对照、严格控制可能的污染, 确保实验的结果可靠。

1.2.4 核苷酸测序: 电泳结果可见阳性条带的PCR终产物送上海英骏生物技术有限公司测序, 测序引物用NS5S3。

■ 研究前沿

目前全国大部分地区已对HCV基因型的流行特征做了初步研究, 广西地区作为少数民族的自治区, 对此研究尚未深入探讨。本研究将可能与HCV基因型相关的因素(包括民族、性别、年龄、感染途径及HCV-RNA载量)纳入分析, 同时比较广西地区HCV基因型的流行模式与国内其他地区有无异同。

■ 相关报道

余晶等在广西地区小样本中未检出3a型,而聂红明等在广西地区检出罕见的6d型。云南地区以1b型和3b型多见,广东地区以1b型为主,6a型已成为第二常见的基因亚型。广西地区HCV基因型的流行模式与西南、华南地区更接近。

表 1 引物序列表

扩增区段	引物名	引物序列(5'→3')	位置(nt)	备注
NS5B区	ENO2	TGGGSTTYKCSATGAYACYCGMTGYTTTGA	8245-8275	外侧正向引物
	ENO4	ARTACCTRGTCATAGCCTCCGTGAA	8616-8640	外侧反向引物
	NS5S3	TATGATACCCGCTGCTTTGACTCCAC	8256-8281	内侧正向引物
	NS5A5	GTCATAGCCTCCGTGAAGGCTC	8611-8632	内侧反向引物

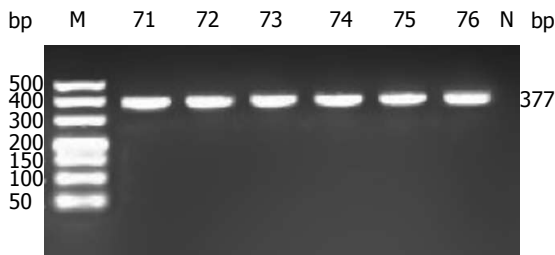


图 1 阳性扩增产物电泳图。M: MarkerDNA分子量标志品; 71-76: 不同HCV感染者的阳性扩增产物; N: 阴性对照。

1.2.5 构建进化树: 以GenBank中注册的HCV标准株全基因序列为参照, Genbank的登录号(Accession Number)1a型: AF009606、AF271632; 1b型: AB016785、AY460204、EU155217、AJ132996、AB049088; 2a型: AB047642、AF169004; 2b型: AF238486、AB030907; 3a型: D17763、AF046866; 3b型: D49374; 4a型: DQ418782、Y11604; 5a型: Y13184; 6a型: AY859526、DQ480515、EU246930、Y12083。采用软件MEGA5.0, 以ClustalW1.8进行序列比对, 邻接法(neighbor-joining)及P-distance模型构建系统进化树以确定基因型, 用Bootstrap法检验进化树的可靠性。

统计学处理 应用SPSS16.0, 将HCV基因型分别与民族、性别、年龄、感染途径及病毒载量进行统计分析, 计数资料采用卡方检验, 计量资料满足正态分布及方差齐性时采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 电泳 NS5B区PCR终产物全长377 bp, 电泳条带显示清晰, 无非特异性条带扩增(图1)。

2.2 基因型的检测 137例样本成功扩增并分型, 分型率达100%。结果显示, 1b型最多见, 占58.4%(80/137), 其次是6a型占12.4%(17/137), 3b型占10.2%(14/137), 1a与2a型各占7.3%(10/137)。此外, 还检出6例3a型(4.4%)。

2.3 相关因素中HCV基因型的分布 本研究137例

样本中共检出6种基因亚型, 由于受样本例数限制, 将1a型与1b型合并为1型, 3a型与3b型合并为3型; 5个可能与HCV基因型相关的因素(包括民族、性别、年龄、感染途径及HCV-RNA载量)被纳入分析; 其中民族分汉族与壮族; 年龄分为 <40 岁和 ≥ 40 岁2个组; 感染途径包括: 输血、静脉药瘾、不明原因及其他途径(如纹身、针灸、打耳洞、口腔治疗、性传播等)感染4类(表2)。

2.4 民族与HCV基因型的关系 137例患者中汉族占72.3%(99/137), 壮族为24.1%(33/137), 均以1b型为主基因型, 2a型最少, 另有5例分别为瑶族、苗族、侗族、水族、京族的患者均为1b型, 因例数少未纳入分析。分析表明, HCV基因型在汉族与壮族中的总体分布差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.5 性别与HCV基因型的关系 在75例男性和62例女性患者中, 均以1型居多, 分别为46例(61.3%), 44例(71.0%), 2a型、3型和6a型也占有一定比例。经统计分析, HCV基因型在男女两性别组中的分布无统计学差异($\chi^2 = 2.100, P > 0.05$)。

2.6 年龄与HCV基因型的关系 HCV基因型在 <40 岁和 ≥ 40 岁两个年龄组中的总体分布差异有统计学意义($\chi^2 = 13.683, P < 0.05$)。感染HCV1型的患者多见于 ≥ 40 岁年龄组中, 而3型、6a型主要见于 <40 岁的年轻患者。2a型在两个年龄组中的分布无明显差异。年龄(计量资料)满足正态分布及方差齐性, 采用单因素方差分析, 差异具有统计学意义($F = 4.127, P < 0.05$)。进一步两两比较, 1型患者的年龄大于3型和6a型($P < 0.05$); 而1型与2a型、2a型与3型、2a型与6a型、3型与6a型在两个年龄组中的分布均无统计学差异($P > 0.05$)。

2.7 感染途径与HCV基因型的关系 137例患者中40.1%有输血史, 9.5%有吸毒史, 19.7%来自其他感染途径如纹身、针灸、打耳洞、口腔治疗、性传播等, 另有30.7%为不明原因感染者。统计分析表明, HCV基因型在各类感染途径中的分布存在统计学差异($\chi^2 = 44.145, P < 0.05$)。1型主

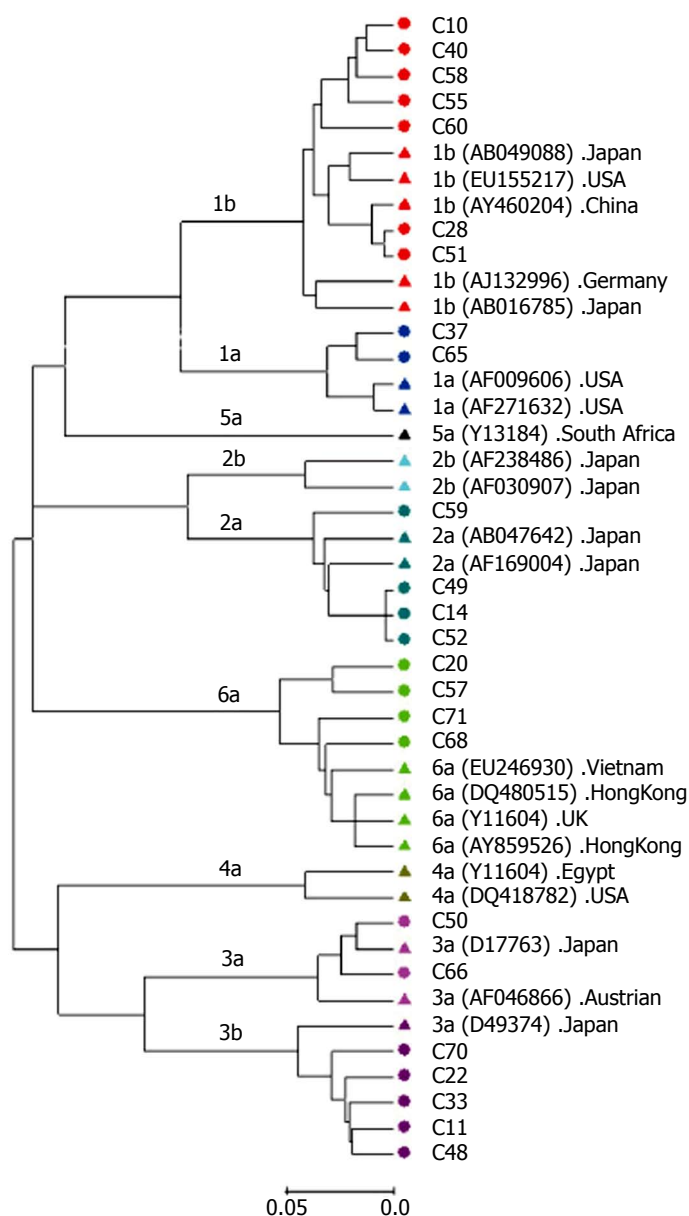


图 2 24例分离株与21例标准株共同构建的系统进化树. 圆: 成功测序的分离株; 三角: 在Genbank中注册的标准株.

■创新盘点

本研究通过构建系统进化树从而验证该基因分型的方法准确可靠. 分析HCV基因型与民族之间的关系时, 得出与国内早期研究不一致的结论. 民族(种族)对不同基因型HCV的易感性有无影响尚无报道, HCV基因型的遗传易感性值得深入研究.

要经输血感染, 3型和6a型因静脉药瘾感染占有很高比例; 其他感染途径则以1型和3型多见, 78.6%不明原因感染的为1型, 也见于2a型、3型及6a型.

2.8 HCV-RNA与HCV基因型的关系 本研究的HCV-RNA载量均为患者抗病毒治疗前的检测结果. 计量资料满足正态分布及方差齐性, 单因素方差分析表明, 不同HCV基因型患者中的HCV-RNA载量差异具有统计学意义($F = 4.408$, $P < 0.05$). 进一步分析, 3型与1型、6a型具有统计学差异($P < 0.05$), 1型和6a型患者的HCV-RNA载量要高于3型患者; 而2a型与1型、3型、6a型之间的差异无统计学意义($P > 0.05$).

2.9 进化树分析 进化树分析(phylogenetic analysis)也称种系发生史分析, 是指通过物种间遗传

编码的变异规律来推断或估计各物种间的进化关系. 如图2所示, 相同基因型的分离株与标准株分布在同一树枝上, 进一步说明该基因分型的方法准确可靠.

3 讨论

HCV基因组根据其核苷酸序列的差异程度, 可将HCV分为基因型(30%-35%), 基因亚型(20%-25%), 分离株(5%-9%)和准种(1%-5%)^[7]. 本研究通过对137例样本的HCV NS5B区段PCR终产物纯化测序, 并与Genbank中标准株的全基因核苷酸序列比对共同构建系统进化树, 得出不同的HCV基因型和亚型. 基因型为1b型的C28、C51与中国株(1b AY460204)分布在同一小树枝上, 表示进化距离很近, 而与美国株(1b

■应用要点

HCV基因型与肝炎严重程度及干扰素的应答关系密切, HCV的基因分型为丙型肝炎的治疗及疗效预测提供了理论依据. 因此抗病毒治疗前, 常规检测HCV基因型与HCV-RNA水平是很有必要的.

表 2 相关因素中HCV基因型的分布情况 $n(\%)$

相关因素	$n(\%)$	HCV基因型				χ^2/F	P 值
		1型(1a/1b)	2型(2a)	3型(3a/3b)	6型(6a)		
民族 ¹						²	0.127
汉族	99(72.3)	69(69.7)	7(7.1)	12(12.1)	11(11.1)		
壮族	33(24.1)	16(48.5)	3(9.1)	8(24.2)	6(18.2)		
性别						$\chi^2 = 2.100$	0.552
男	75(54.7)	46(61.3)	5(6.7)	13(17.3)	11(14.7)		
女	62(45.3)	44(71.0)	5(8.1)	7(11.3)	6(9.7)		
年龄(岁)						$\chi^2 = 13.683$	0.003
< 40	62(45.3)	31(50.0)	5(8.1)	14(22.6)	12(19.4)		
≥ 40	75(54.7)	59(78.7)	5(6.7)	6(8.0)	5(6.7)		
感染途径							0.000
输血	55(40.1)	45(81.8)	5(9.1)	1(1.8)	4(7.3)		
静脉药瘾	13(9.5)	2(15.4)	1(7.7)	6(46.2)	4(30.8)		²
其他 ³	27(19.7)	10(37.0)	1(3.7)	9(33.3)	7(25.9)		
不明原因	42(30.7)	33(78.6)	3(7.1)	4(9.5)	2(4.8)		
HCV-RNA载量							
对数值(mean \pm SD)	5.5 \pm 1.0	5.6 \pm 0.9	5.2 \pm 0.5	4.9 \pm 1.1	5.8 \pm 1.0	$F = 4.408$	0.005
年龄(mean \pm SD)	41.9 \pm 12.3	44.5 \pm 12.4	38.2 \pm 16.2	36.7 \pm 6.6	36.5 \pm 11.1	$F = 4.127$	0.008

¹其中5例1b型分别为瑶族、朝族、侗族、水族、京族, 因例数少未纳入分析; ²采用确切概率法, 无卡方值; ³包括纹身、针灸、打耳洞、口腔治疗、性传播等感染途径.

EU155217)、日本株(1b AB049088)进化距离较远; 日本株(2a AF169004和2a AB047642)分布在C49、C14、C52外侧; 6a型中的C68、C71紧挨着越南株(6a EU246930); C48、C11、C33、C22、C70依次分布在日本株(3b D49374)的内侧, 说明广西地区这些分离株与标准株有较高的同源性, 即有很近的亲缘关系, 有可能由同一祖先进化而来. 值得注意的是, 用PCR产物直接测序的局限性在于不能检出混合基因型, 只能得到优势株的序列. 但有学者认为, 如果在测序的序列图谱中某些位点出现兼并碱基, 也提示可能存在混合基因型的感染.

HCV基因型的分布存在明显的地域性差异, 其中1b型主要流行于日本、中国、南欧和东欧; 1a型多见于西欧和北美国家; 2a型主要分布于亚洲国家; 3型在印度半岛、东南亚和印度尼西亚较为突出^[8,9], 4型主要见于中东和北非^[10]; 5型主要见于南非^[11]; 6型主要分布在东南亚国家^[12,13]. 在中国大陆则以1b型为主, 2a型次之, 6型主要见于香港和澳门地区, 在南方边境省份也可见. 我们的研究显示, 广西地区以1b型(58.4%)居多, 其次是6a型(12.4%), 3b型(10.2%), 1a型(7.3%), 2a型(7.3%), 3a型(4.4%), 未发现4型、5型. 余晶等^[14]与我们的研究结果基本一致, 不同的是本研究

还检出6例3a型, 且6a型比例增多. 聂红明等^[15]对全国18个研究中心HCV基因型的分析表明, 广西、广州、深圳地区的基因型分布呈多样化, 其余地区均以1b型为主, 3b型和6a型主要分布在南方省份, 这与我们的研究结果也相吻合. 但他们在广西地区的样本中还检出1例罕见的6d亚型, 而本研究并未发现此基因型.

与国内绝大多数地区一样, 广西地区HCV基因型也以1b型为主, 但较国内以往报道(70%-80%), 1b型的流行率(58.4%)明显下降. 推测其原因可能是由于1b型与输血传播途径相关, 而中国自1993年开始对献血者进行严格筛查, 使得通过血液传播HCV的可能性大大减少. 国内外研究表明, 3型和6a型主要见于静脉药瘾者^[16], 尤其是3b型在静脉药瘾人群中的感染率高达40.3%. 李铮等^[17]报道云南地区以1b型和3b型多见; 广东地区则以1b型为主, 6a型已取代2a型成为第二常见的基因亚型^[6,18]. 在我国广西地处西南边境, 毗邻毒品主要产地“金三角”, 又与广东、云南、贵州等地区接壤, 吸毒贩毒现象比较突出, 显然静脉吸毒成了这些地区HCV的主要传播方式. 由此推测, 静脉吸毒有可能成为广西及周边地区新发HCV感染的主要传播途径.

广西是以汉族为主体, 壮族在少数民族中占

多数的自治区. 本研究中137例患者主要来自汉族(72.3%)和壮族(24.1%), 均以1b型多见, 其中有5例1b型患者分别来自瑶族、苗族、侗族、水族和京族. 研究显示, HCV基因型在汉族与壮族中的总体分布差异并无统计学意义($P>0.05$); 李钟燮等^[19]在分析延边地区朝鲜族与汉族HCV基因型特征时也得出上述结论, 我们的研究结果与国内外大多数报道是一致的. 然而早在1998年王云等^[20]研究表明在HCV感染中, 民族与民族之间基因型却存在差异. 这可能跟研究对象的地域性差异有关, 也有可能与不同民族的人通婚后, 其子女主要随其父亲同民族有关(以患者的身份证为参考). 研究证明, 不同种族的慢性丙型肝炎患者对干扰素抗病毒的疗效及预后存在差异. 但不同民族(种族)的人群对不同基因型HCV的易感性有无差别尚不明确. 目前有关HCV基因型遗传易感性方面的研究处于探讨阶段, 某些不一致的结论还有待深入研究和证实. 此外, HCV基因型在男女两组中的分布亦无统计学差异($P>0.05$), 男女患者都以1b型为主, 这与国内外大多数报道一致. 然而, HCV基因型在年龄、感染途径及HCV-RNA载量中的总体分布差异均具有统计学意义($P<0.05$). 1b型多见于 ≥ 40 岁年龄组中, 主要通过输血感染, 其HCV-RNA载量亦高于其他基因型, 显然这符合HCV基因型与慢性丙型肝炎临床表现之间的规律, 即HCV-RNA载量越高, 肝细胞损害越严重, 临床表现也越明显; 而3型及6a型主要见于 <40 岁的年轻患者, 且多数经吸毒(静脉药瘾)传播. 王佳佳等^[21]的研究也表明HCV基因型在不同感染途径中的分布存在差异, 且吸毒人群的HCV基因分型比较复杂, 可能与吸毒人员反复共用针头导致的混合感染有关.

由此可见, 广西地区HCV基因型的分布特征更接近于华南、西南地区, 其流行模式与广东、云南等周边地区相似. 广西地区HCV基因型呈多样化, 目前至少存在7种基因亚型(1a、1b、2a、3a、3b、6a、6d). 由于样本来源的地域性差异及检测方法的局限性, 尚不能排除广西地区还存在其他基因型及混合基因型感染的可能, 本研究还有待扩充样本后进一步完善和证实. 近年来, 尽管HCV筛查技术在不断提高, 经血液传播的可能性也在逐渐减少, 但静脉吸毒、高风险性行为的人群较以往明显增多, 且该类人群人员流动性较大, 这使得各地区HCV基因型的分布也将发生很大变化.

4 参考文献

- 1 Baldo V, Baldovin T, Trivello R, Floreani A. Epidemiology of HCV infection. *Curr Pharm Des* 2008; 14: 1646-1654 [PMID: 18673187 DOI: 10.2174/138161208784746770]
- 2 WHO第63届世界卫生大会. 病毒性肝炎: 秘书处的报告, 2010
- 3 Pawlotsky JM. Hepatitis C virus genetic variability: pathogenic and clinical implications. *Clin Liver Dis* 2003; 7: 45-66 [PMID: 12691458 DOI: 10.1016/S1089-3261(02)00065-X]
- 4 Pawlotsky JM. Molecular diagnosis of viral hepatitis. *Gastroenterology* 2002; 122: 1554-1568 [PMID: 12016423 DOI: 10.1053/gast.2002.33428]
- 5 Hézode C, Forestier N, Dusheiko G, Ferenci P, Pol S, Goeser T, Bronowicki JP, Bourlière M, Gharakhani S, Bengtsson L, McNair L, George S, Kieffer T, Kwong A, Kauffman RS, Alam J, Pawlotsky JM, Zeuzem S. Telaprevir and peginterferon with or without ribavirin for chronic HCV infection. *N Engl J Med* 2009; 360: 1839-1850 [PMID: 19403903 DOI: 10.1056/NEJMoa0807650]
- 6 Lu L, Nakano T, He Y, Fu Y, Hagedorn CH, Robertson BH. Hepatitis C virus genotype distribution in China: predominance of closely related subtype 1b isolates and existence of new genotype 6 variants. *J Med Virol* 2005; 75: 538-549 [PMID: 15714489 DOI: 10.1002/jmv.20307]
- 7 Simmonds P. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus--15 years on. *J Gen Virol* 2004; 85: 3173-3188 [PMID: 15483230 DOI: 10.1099/vir.0.80401-0]
- 8 Valliammai T, Thyagarajan SP, Zuckerman AJ, Harrison TJ. Diversity of genotypes of hepatitis C virus in southern India. *J Gen Virol* 1995; 76 (Pt 3): 711-716 [PMID: 7534816 DOI: 10.1099/0022-1317-76-3-711]
- 9 Narahari S, Juwle A, Basak S, Saranath D. Prevalence and geographic distribution of Hepatitis C Virus genotypes in Indian patient cohort. *Infect Genet Evol* 2009; 9: 643-645 [PMID: 19460332 DOI: 10.1016/j.meegid.2009.04.001]
- 10 Bahgat MM, Ibrahim AA, Abd-Elshafy DN, Mesalam AA, Gewaid HE, Ismaeil AA, El-Waseef AM, Maghraby AS, Barakat AB, El-Far MA, Ghanem Hel-D, Mohamed AM, Ali MA. Characterization of NS3 protease from an Egyptian HCV genotype 4a isolate. *Arch Virol* 2009; 154: 1649-1657 [PMID: 19763775 DOI: 10.1007/s00705-009-0500-z]
- 11 Smuts HE, Kannemeyer J. Genotyping of hepatitis C virus in South Africa. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 1679-1681 [PMID: 7650216]
- 12 Pham DA, Leuangwutiwong P, Jittmittraphap A, Luplertlop N, Bach HK, Akkarathamrongsin S, Theamboonlers A, Poovorawan Y. High prevalence of Hepatitis C virus genotype 6 in Vietnam. *Asian Pac J Allergy Immunol* 2009; 27: 153-160 [PMID: 19839502]
- 13 Lwin AA, Shinji T, Khin M, Win N, Obika M, Okada S, Koide N. Hepatitis C virus genotype distribution in Myanmar: Predominance of genotype 6 and existence of new genotype 6 subtype. *Hepatol Res* 2007; 37: 337-345 [PMID: 17441806 DOI: 10.1111/j.1872-034X.2007.00053.x]
- 14 余晶, 石清兰, 陈月桥, 曾芳, 杨爱水, 毛德文. 广西慢性丙型肝炎感染病毒基因型和治疗分析. *广东医学* 2012; 33: 1419-1421

■同行评价

本文选题较有价值, 研究方法科学, 数据真实可靠, 对了解广西地区HCV分布具有一定指导意义.

- 15 聂红明, 陈建杰, 汪蓉, 王成宝, 董慧琳, 陈逸云. 中国汉族人群慢性丙型肝炎病毒基因型分布规律研究. 中华流行病学杂志 2012; 33: 501-504
- 16 Su YY, Liu HX, Wang N. [Hepatitis C virus genotypes in China: a systematic review]. *Zhonghua Liuixingbingxue Zazhi* 2013; 34: 80-84 [PMID: 23648257]
- 17 李峥, 高玉红, 台虹, 毕胜, 杨曦, 张桂前. 云南省丙型肝炎病毒基因的分型. 中华传染病杂志 2007; 25: 246-247
- 18 Fu Y, Qin W, Cao H, Xu R, Tan Y, Lu T, Wang H, Tong W, Rong X, Li G, Yuan M, Li C, Abe K, Lu L, Chen G. HCV 6a prevalence in Guangdong province had the origin from Vietnam and recent dissemination to other regions of China: phylogeographic analyses. *PLoS One* 2012; 7: e28006 [PMID: 22253686 DOI: 10.1371/journal.pone.0028006]
- 19 李钟燮, 孟繁平, 申钢铁, 金丹, 冯相伟. 吉林省延边地区朝鲜族与汉族HCV基因型特征分析. 中华实验和临床病毒学杂志 2010; 2: 104-106
- 20 王云, 张希成, 谭欣成, 李小平, 刘志华, 王乐农. 新疆地区不同民族HCV基因酶切分型研究. 中华肝脏病杂志 1998; 6: 1-2
- 21 王佳佳, 唐筛娣, 丁伟良, 许可, 喻荣彬, 王洁, 张云. 不同感染途径丙型肝炎患者HCV基因分型. 中国公共卫生 2013; 29: 809-811

编辑 田滢 电编 鲁亚静



脂肪肝患者肝脏剪切波速度与实验室指标的关系

王宇, 李广霞, 李素梅, 邹松平, 靳元

王宇, 李广霞, 李素梅, 邹松平, 靳元, 大庆龙南医院齐齐哈尔医学院第五附属医院物理诊断科B超室 黑龙江省大庆市 163453

王宇, 主要从事腹部器官的超声诊断。

作者贡献分布: 课题设计与论文写作由王宇完成; 研究过程与病理采集由李广霞与李素梅完成; 数据分析由邹松平与靳元完成。

通讯作者: 王宇, 主治医师, 163453, 黑龙江省大庆市爱国路35号, 齐齐哈尔医学院第五附属医院大庆龙南医院物理诊断科B超室, 2458992624@qq.com

电话: 0459-5910872

收稿日期: 2014-01-15 修回日期: 2014-03-03

接受日期: 2014-03-12 在线出版日期: 2014-03-28

Virtual touch tissue quantification and biochemical indicators for quantitative diagnosis of fatty liver

Yu Wang, Guang-Xia Li, Su-Mei Li, Song-Ping Zou, Yuan Jin

Yu Wang, Guang-Xia Li, Su-Mei Li, Song-Ping Zou, Yuan Jin, Department of Physical Diagnosis Ultrasonography Room, Daqing Longnan Hospital, Qiqihar Medical College Affiliated Fifth Hospital, Daqing 163453, Heilongjiang Province, China

Correspondence to: Yu Wang, Attending Physician, Qiqihar Medical College Affiliated Fifth Hospital, Daqing Longnan Hospital, Physical Diagnosis Ultrasonography Room, 35 Patriotic Road, Daqing 163453, Heilongjiang Province, China. 2458992624@qq.com

Received: 2014-01-15 Revised: 2014-03-03

Accepted: 2014-03-12 Published online: 2014-03-28

Abstract

AIM: To explore the value of virtual touch tissue quantification (VTQ) measuring the liver shear wave speed and biochemical indicators in the quantitative diagnosis and classification of fatty liver.

METHODS: One hundred patients with fatty liver and 40 normal controls were included in the study. The shear wave speed of the liver was measured by VTQ, and alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), triglycerides (TG), high density lipoprotein (HDL-C) and low density lipoprotein (LDL-C) were measured. The relationship of these quantitative indexes with fatty liver was analyzed.

RESULTS: Among 100 patients with fatty liver, 46 had mild disease, 32 had moderate disease and 22 had severe disease. The values of shear wave speed, ALT, AST, TG, HDL-C and LDL-C were significantly different ($P < 0.05$ for all) between the control and fatty liver groups. The difference in the shear wave speed was not significant between the normal group and mild fatty liver group ($1.05 \text{ m/s} \pm 0.09 \text{ m/s}$ vs $1.09 \text{ m/s} \pm 0.12 \text{ m/s}$, $P > 0.05$). The shear wave speed was the highest in the moderate ($1.32 \text{ m/s} \pm 0.14 \text{ m/s}$) and the lowest ($0.85 \text{ m/s} \pm 0.07 \text{ m/s}$) in the severe fatty liver group. The shear wave speed in the mild-moderate fatty liver group was closely related with ALT, AST, HDL-C, LDL-C, TC and TG ($P < 0.05$ for all), of which HDL-C was negatively correlated with the shear wave speed while others were positively correlated with.

CONCLUSION: VTQ and biochemical indicators have appreciable value in quantitative diagnosis of fatty liver and provide a reliable and objective basis for clinical diagnosis and treatment of this disease.

© 2014 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

Key Words: Fatty liver; Virtual touch tissue quantification; Shear wave speed

Wang Y, Li GX, Li SM, Zou SP, Jin Y. Virtual touch tissue quantification and biochemical indicators for quantitative diagnosis of fatty liver. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(9): 1307-1311 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/1307.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i9.1307>

摘要

目的: 探讨脂肪肝患者肝脏剪切波速度与实验室指标的相关性, 为其研究提供可参考依据。

方法: 随机选择共纳入100例我院采用声触诊组织量化技术(virtual touch quantification, VTQ)行肝脏检查的脂肪肝患者及40例正常人群作为观察对象, 记录所有受试者肝脏剪切波速度, 且均空腹抽取静脉血检测实验室相关指标。

■背景资料

研究证实, 随着脂肪肝的进一步加重, 可出现肝纤维化甚至肝硬化的发生, 少部分患者可并发内分泌及心脑血管疾病。因此更好、更客观的进行脂肪肝的诊断尤为重要。临床上传统腹部彩色多普勒超声可以检测出脂肪含量大于30.0%的脂肪肝, 且对含量超过50.0%的脂肪肝诊断率超过90%。但仅仅定性诊断并不能更好的反应肝脏病变的严重程度, 因此通过声触诊组织量化技术(virtual touch quantification, VTQ)进行定量诊断并进行更为准确的分级得到广泛的关注。

■同行评议者

党双锁, 教授, 西安交通大学医学院第二附属医院感染科

■研究前沿

肝脏剪切波速度分析在分析肝纤维化方面已经得到了多方的认可, 但其在脂肪肝严重程度的评估方面的研究还鲜有报道, 而其与相关实验室生化指标的关系则更加缺乏相关研究.

结果: 100例诊断为脂肪肝患者中, 轻度脂肪肝46例, 中度脂肪肝32例, 重度脂肪肝22例. 4组受试者剪切波速度、谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT), 谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, AST), 高密度脂蛋白(high-density lipoprotein, HDL-C), 低密度脂蛋白(low-density lipoprotein, LDL-C), 总胆固醇(total cholesterol, TC), 甘油三酯(triglycerides, TG)比较均有差异($P<0.05$); 其中, 对照组与轻度脂肪肝组剪切波速度比较差异不明显($1.05\text{ m/s}\pm 0.09\text{ m/s}$ vs $1.09\text{ m/s}\pm 0.12\text{ m/s}$, $P>0.05$). 中度脂肪肝肝脏剪切波速度最高($1.32\text{ m/s}\pm 0.14\text{ m/s}$), 重度脂肪肝肝脏剪切波速度最低($0.85\text{ m/s}\pm 0.07\text{ m/s}$). 轻中度脂肪肝剪切波速度与ALT、AST、HDL-C、LDL-C、TC、TG均存在密切相关性(均 $P<0.05$), 其中HDL-C为负相关关系, 其余为正相关关系.

结论: 采用VTQ进行肝脏剪切波速度测定可以更为准确、客观的进行脂肪肝诊断与分度, 其操作简便、耗时短; 同时肝脏剪切波速度与肝功能及血脂等生化指标存在密切相关性, VTQ值得临床推广应用.

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有.

关键词: 脂肪肝; 声触诊组织量化技术; 剪切波速度

核心提示: 本研究随机选择共纳入100例我院采用声触诊组织量化技术(virtual touch quantification, VTQ)行肝脏检查的脂肪肝患者及40例正常人群作为观察对象, 记录所有受试者肝脏剪切波速度, 且均空腹抽取静脉血检测实验室相关指标. 得出采用VTQ进行肝脏剪切波速度测定可以更为准确、客观的进行脂肪肝诊断与分度, 其操作简便、耗时短; 同时肝脏剪切波速度与肝功能及血脂等生化指标存在密切相关性, VTQ值得临床推广应用.

王宇, 李广霞, 李素梅, 邹松平, 靳元. 脂肪肝患者肝脏剪切波速度与实验室指标的关系. 世界华人消化杂志 2014; 22(9): 1307-1311 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/1307.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i9.1307>

0 引言

临床上脂肪肝是肝细胞内脂肪量过多并超过一定程度的病变, 多种因素可引起脂肪肝的发生, 且脂肪肝被认为是隐蔽性肝硬化的常见原因, 是病毒性肝炎之后, 第2大危害健康的肝病^[1-3]. 一般而言轻度脂肪肝为脂肪量 $>5\%$, 中度脂肪肝为 $>10\%$, 重度脂肪肝为 $>25\%$ ^[4]. 目前脂肪肝的诊

断多采用B型超声, 但其主观性比较大, 易出现偏差. 声触诊组织量化技术(virtual touch quantification, VTQ)是目前较为先进的组织弹性评价技术, 其可以通过肝脏剪切波速度更准确地分析脂肪肝的严重程度^[5-9]. 我们已经知道, 脂肪肝患者的相关实验室生化指标会发生改变, 其已经成为评估脂肪肝严重程度的有效工具之一^[10]. 肝脏剪切波速度分析在分析肝纤维化方面已经得到了多方的认可, 但其在脂肪肝严重程度的评估方面的研究还鲜有报道, 而其与相关实验室生化指标的关系则更加缺乏相关研究. 在此背景下, 本研究探讨脂肪肝患者肝脏剪切波速度与实验室指标的相关性, 旨在为临床无创、简便地评估脂肪肝严重程度提供可参考的依据.

1 材料和方法

1.1 材料 随机选择2012-01/2013-10 100例采用VTQ行肝脏检查的脂肪肝患者, 男性58例, 女性42例, 年龄22-69岁, 平均年龄 $38.2\text{岁}\pm 5.2\text{岁}$. 同时选取40例正常人群作为对照组, 男性25例, 女性15例, 年龄23-69岁, 平均年龄 $38.3\text{岁}\pm 5.4\text{岁}$. 排除标准: 长期饮酒史、病毒性肝炎等肝脏疾病病史、恶性肿瘤、结缔组织病等. 所有受试者均签署知情同意书.

1.2 方法

1.2.1 超声检查: 所有受试者均行腹部彩色多普勒超声(PHILIPS IU22)检查, 脂肪肝诊断: 肝脏近场回声弥漫性增强或远场回声逐渐减弱; 肝脏结构显示不佳, 根据常规标准分为轻中重. 在上述检查基础上采用4C1凸阵探头(取频率2.5-7.5 MHz, 机械指数1.7)进行VTQ检查, 避开血管及胆管. 在感兴趣部位测量, 保持感兴趣区域(region of interest, ROI)上缘到肝包膜至少1 cm并固定, 嘱受试者屏住呼吸进行机械低频脉冲波激发, 产生肝脏剪切波速度, 同一位置重复5次取平均值.

1.2.2 观察指标: 所有受试者均抽取空腹肘正中静脉血2 mL, 3000 r/min离心5 min, 检测谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT), 谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, AST), 高密度脂蛋白(high-density lipoprotein, HDL-C), 低密度脂蛋白(low-density lipoprotein, LDL-C), 总胆固醇(total cholesterol, TC), 甘油三酯(triglycerides, TG)水平.

统计学处理 数据处理采用SPSS17.0软件包进行. 采用mean \pm SD表示正态分布且方差齐的计量资料, 行 t 检验; 采用百分数表示计数资料,

表 1 一般资料分析

分组	n	性别		年龄(岁)
		男	女	
轻度脂肪肝	46	25	21	38.3 ± 5.7
中度脂肪肝	32	20	12	38.5 ± 5.5
重度脂肪肝	22	13	9	38.1 ± 5.4
对照组	40	25	15	38.3 ± 5.4
$F(\chi^2)$ 值		1.023		0.787
P值		0.324		0.654

行 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般资料分析 100例诊断为脂肪肝患者中,轻度脂肪肝46例,男性25例,女性21例,年龄22-69岁,平均年龄38.2岁±5.2岁;中度脂肪肝32例,男性20例,女性12例,年龄22-69岁,平均年龄38.2岁±5.2岁;重度脂肪肝22例,男性13例,女性9例,年龄22-69岁,平均年龄38.2岁±5.2岁。4组受试者一般资料相比差异不明显($P > 0.05$)(表1)。

2.2 不同组受试者肝脏剪切波速度及相关生化指标分析 不同组受试者肝脏剪切波速度及相关生化指标分析结果显示,随着脂肪肝严重程度的逐渐严重,ALT、AST、LDL-C、TC、TG水平均显著升高,HDL-C水平显著降低,比较均有差异($P < 0.05$),而剪切波速度在轻、中度脂肪肝组中逐渐升高,在重度脂肪肝组中显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);两两比较发现,对照组与轻度脂肪肝组剪切波速度比较差异不明显($P > 0.05$),其余两两比较均有统计学意义($P < 0.05$),中度脂肪肝肝脏剪切波速度最高,重度脂肪肝肝脏剪切波速度最低(表2),中重度肝剪切波速度如图1。

2.3 肝脏剪切波速度与生化指标相关性分析 肝脏剪切波速度与生化指标相关性分析结果显示:剪切波速度由于呈现出“先升高后降低”的趋势与ALT、AST、HDL-C、LDL-C、TC、TG均不存在相关性($P > 0.05$),但如果只评估轻中度脂肪肝的剪切波速度发现,其与ALT、AST、LDL-C、TC、TG呈正相关,与HDL-C呈负相关关系($P < 0.05$)(表3),剪切波速度与ALT的散点图分析详如图2。

3 讨论

目前由于多种因素的影响,我国国民脂肪肝的发病率越来越高,严重危害其健康。关于脂肪肝



图 1 中重度肝剪切波速度图。A: 中度脂肪肝肝脏剪切波速度测量(1.31 m/s); B: 重度脂肪肝肝脏剪切波速度测量(0.72 m/s)。

发生率上升的原因认为主要有^[11-15]:(1)饮食结构的改变,营养过剩、高脂膳食及过量饮酒等是引起脂肪肝的根本原因;(2)生活水平的提高亦增强了人们的保健意识,当人们出现食后腹胀、右上腹痛感、疲乏感等不适时,能够及时进行诊断治疗;(3)医学技术的发展使脂肪肝的诊断手段更为先进,提高了脂肪肝的诊断率。研究证实,随着脂肪肝的进一步加重,可出现肝纤维化甚至肝硬化的发生,少部分患者可并发内分泌及心脑血管疾病^[16-19]。因此更好、更客观的进行脂肪肝的诊断尤为重要。临床上传统腹部彩色多普勒超声可以检测出脂肪含量大于30.0%的脂肪肝,且对含量超过50.0%的脂肪肝诊断率达超过90%。但仅仅定性诊断并不能更好的反应肝脏病变的严重程度,因此通过VTQ进行定量诊断并进行更为准确的分度得到广泛的关注^[20-23]。

本研究分析不同组受试者肝脏剪切波速度差异发现,对照组与轻度脂肪肝组剪切波速度比较差异不明显,但与中、重度比较有明显差异,中度脂肪肝肝脏剪切波速度最高,重度脂肪肝肝脏剪切波速度最低。这与Winaikosol等^[24]的研究发现近似,该研究中,正常组与脂肪肝组剪切波速度的差异具有统计学意义。其原因可能是由于VTQ检查肝脏剪切波速度是根据肝脏的

■ 相关报道

目前脂肪肝的诊断多采用B型超声,但其主观性比较大,易出现偏差。VTQ是目前较为先进的组织弹性评价技术,其可以通过肝脏剪切波速度更准确地分析脂肪肝的严重程度。

■应用要点

本研究显示,采用VTQ进行肝脏剪切波速度可以更为准确、客观的进行脂肪肝诊断与分度,其操作简便、耗时短;同时轻中度脂肪肝剪切波速度与肝功能及血脂等生化指标存在密切的相关性,值得临床推广应用。

表 1 不同组受试者肝脏剪切波速度及相关生化指标分析

分组	n	剪切波速度(m/s)	ALT (mmol/L)	AST(mmol/L)	HDL-C(mmol/L)	LDL-C(mmol/L)	TC(mmol/L)
对照组	40	1.05 ± 0.09	25.44 ± 22.23	20.33 ± 11.35	1.85 ± 0.65	3.06 ± 0.34	3.54 ± 0.44
轻度脂肪肝	46	1.09 ± 0.12	28.72 ± 9.34	23.54 ± 9.32	1.74 ± 0.32	3.32 ± 0.31	3.81 ± 0.53
中度脂肪肝	32	1.32 ± 0.14	36.83 ± 14.13	29.36 ± 10.44	1.67 ± 0.44	3.75 ± 0.53	4.06 ± 0.43
重度脂肪肝	22	0.85 ± 0.07	46.64 ± 20.44	35.44 ± 10.64	1.39 ± 0.23	4.15 ± 0.52	4.34 ± 0.74
F值		5.953	5.162	2.543	3.133	3.547	2.123
P值		0.011	0.026	0.041	0.039	0.036	0.043

ALT: 谷丙转氨酶; AST: 谷草转氨酶; HDL-C: 高密度脂蛋白; LDL-C: 低密度脂蛋白; TC: 总胆固醇; TG: 甘油三酯。

表 3 轻中度脂肪肝剪切波速度与生化指标相关性分析

剪切波速度	ALT	AST	HDL-C	LDL-C	TC	TG
r值	0.132	0.543	-0.433	0.547	0.423	0.464
P值	0.023	0.021	0.019	0.006	0.033	0.027

ALT: 谷丙转氨酶; AST: 谷草转氨酶; HDL-C: 高密度脂蛋白; LDL-C: 低密度脂蛋白; TC: 总胆固醇; TG: 甘油三酯。

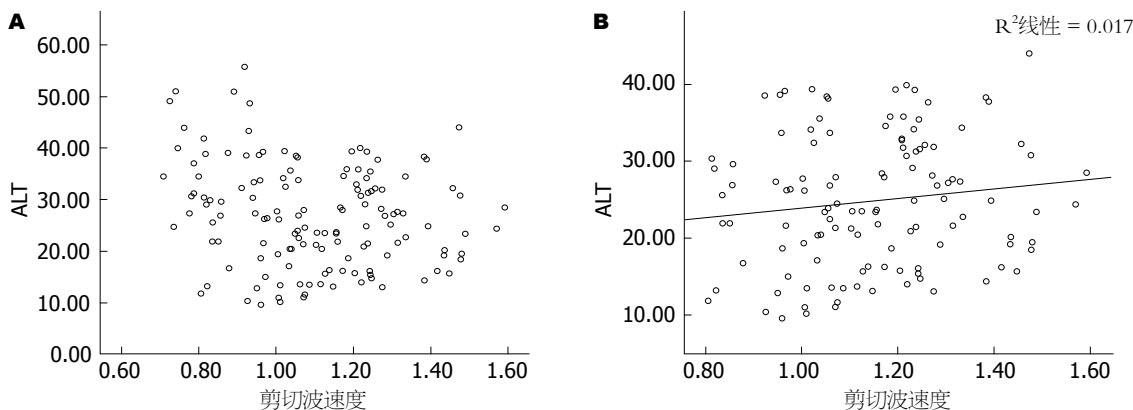


图 2 剪切波速度与ALT的散点图分析。A: 140例轻中度脂肪肝患者剪切波速度与ALT的相关性分析, 两者无相关性 ($P > 0.05$); B: 轻中度脂肪肝的剪切波速度与ALT的相关性分析, 两者呈正相关 ($P < 0.05$)。ALT: 谷丙转氨酶。

弹性或硬度进行评价, 而肝脏的弹性或硬度是基于肝组织分子结构的组织形式。轻度脂肪肝患者其肝组织细胞病理改变不明显, 因此肝脏的弹性或硬度变化不大。而重度脂肪肝患者的肝组织细胞病理改变比较大, 大量脂肪细胞占据肝细胞间隙, 使肝脏的密度下降, 组织变软, 最终使肝脏的弹性或硬度发生明显变化。

本研究进一步分析不同组受试者相关生化指标发现, 4组受试者ALT、AST、LDL-C、TC、TG随着脂肪肝严重程度的逐渐严重而均显著升高, HDL-C水平显著降低, 而剪切波速度由于呈现出“先升高后降低”的趋势与ALT、AST、HDL-C、LDL-C、TC、TG均不存在相关

性, 但如果只评估轻中度脂肪肝的剪切波速度, 其与ALT、AST、LDL-C、TC、TG呈正相关, 与HDL-C呈负相关关系。可见血脂等多种因素与轻中度脂肪肝患者肝脏剪切波速度存在密切的联系^[25,26]。但这与郝美娜等^[27]的研究存在不同, 其报道肝脏的剪切波速度与ALT、AST及血脂指标具有相关性 ($P < 0.05$), 而本研究只在轻中度脂肪肝的剪切波速度中发现了其余实验室生化指标的相关性。不过VTQ的应用重点就在轻中度脂肪肝的早期检测上, 因为重度脂肪肝可以通过B超检查、实验室指标等方式准确地评估。

总之, 本研究显示, 采用VTQ进行肝脏剪切波速度可以更为准确、客观的进行脂肪肝诊断

与分度, 其操作简便、耗时短; 同时轻中度脂肪肝剪切波速度与肝功能及血脂等生化指标存在密切的相关性, 值得临床推广应用。

4 参考文献

- 1 吴翠霞. 非酒精性脂肪肝相关危险因素的调查分析. 重庆医学 2011; 40: 364-365
- 2 林连捷, 曹男, 郑长青, 林艳, 王东旭, 金玉. 沈阳市成年居民脂肪肝的流行病学调查. 世界华人消化杂志 2013; 21: 1114-1119
- 3 李敏, 周健, 史丽萍, 张艾莉, 白智平, 刘元琳. 2006-2010年陕西省干部群体脂肪肝流行病学调查. 世界华人消化杂志 2012; 20: 1868-1872
- 4 中华医学会肝脏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. 胃肠病学 2010; 15: 676-680
- 5 金清, 赵明珠. 应用声辐射力脉冲成像技术评估非酒精性单纯性脂肪肝的初步经验. 中华医学超声杂志(电子版) 2010; 7: 1004-1008
- 6 裴书芳, 丛淑珍, 冯占武, 甘科红, 周立峰, 李康. 实时组织弹性成像诊断肝纤维化. 中国医学影像技术 2010; 26: 332-334
- 7 张新力, 李猛, 冯卉, 张大鹏, 苏颖, 周艳贤, 陈敏, 陈霞. 声触诊组织成像量化技术无创评价慢性肝病肝纤维化程度的初步临床研究. 中华超声影像学杂志 2010; 19: 12-15
- 8 沈文, 林森浩, 丁红, 毛丽娟, 王文平, 徐晨. 声触诊组织量化技术无创评价肝纤维化的临床研究. 中华临床医师杂志(电子版) 2012; 6: 593-596
- 9 沈文, 丁红, 王文平, 李丛, 李娜, 徐智章. 正常人肝脏声触诊组织量化值参考范围的建立. 中国医学影像技术 2010; 26: 690-692
- 10 周燕, 王绩凯, 黄凯, 李迎春. 脂肪肝患者肝功能与血脂水平关系. 中国公共卫生 2011; 27: 101-102
- 11 何本振, 夏国园, 江珍珍. 脂肪肝声像图分度与脂肪肝相关危险因素评估. 实用医学杂志 2012; 28: 269-271
- 12 陈越峰, 甘科红, 丛淑珍, 李妙珊, 李谊. 超声弹性成像组织弥散定量分析技术在脂肪肝分度中的应用. 中国医学影像技术 2011; 27: 1435-1438
- 13 张超, 万婕, 陈云超, 李开艳, 邓又斌, 张青萍. 超声检测脂肪肝患者胆囊床附近肝岛的发生率及临床意义. 放射学实践 2013; 28: 980-982
- 14 张大鹏, 张新力, 李志艳, 陈敏, 冯卉, 李猛, 董政, 赵媛媛. 声辐射力脉冲成像技术定量评价弥漫性脂肪肝的临床研究. 中国临床医学影像杂志 2010; 21: 744-746
- 15 苏善勇. 早期脂肪肝肝静脉多普勒频谱检测. 中国医药导刊 2013; (z1): 66-67
- 16 张炎晶, 刘利平, 鲁琴, 赵育芳, 郝艳红, 徐琨, 曹成. 超声造影评价兔脂肪肝及正常肝背景炎症假瘤血流灌注的研究. 中华超声影像学杂志 2013; 22: 525-529
- 17 陈越峰, 冯占武, 吴丽桑, 郭又涛, 许少兰. 组织弥散定量分析技术在脂肪肝分度中的价值评估. 中国临床医学影像杂志 2012; 23: 173-175
- 18 张羲娥, 黄子星, 袁放, 宋彬, 刘曦娇, 张威. 3.0T1H-MRS联合梯度回波化学位移技术定量分析评估脂肪肝治疗效果. 放射学实践 2012; 27: 641-644
- 19 石喻, 郭启勇, 夏菲, 张兰, 卞胜昕. 同反相位图像减影技术及T2校正1H-MRS定量分析非酒精性脂肪肝的临床研究. 中国临床医学影像杂志 2012; 23: 248-252
- 20 孟洁, 张凤娟, 周军华, 赵娜, 韩若凌. 声触诊组织量化技术对脂肪肝内低回声病变的定性诊断价值. 中国超声医学杂志 2012; 28: 1006-1008
- 21 吴燕, 庄磊, 柯红, 蒋银花, 周晓彦, 张民. 声脉冲辐射力成像定量技术对非酒精性脂肪肝的初步探讨. 医学影像学杂志 2011; 21: 1204-1206
- 22 王学梅, 桑亮. 脂肪肝的超声定量诊断研究. 中国医疗器械信息 2010; 16: 1-3
- 23 田跃军. 超声在脂肪肝诊断中的应用价值. 中国实用医药 2011; 7: 86-87
- 24 Winaikosol K, Phacherat K, Chotikawanich E. Laparoscopic simple nephrectomy: perioperative outcomes at Srinagarind Hospital. J Med Assoc Thai 2012; 95 Suppl 11: S18-S24 [PMID: 23961615]
- 25 张丽娟, 赵玉珍, 郭丹丹. 超声声强及生化指标在脂肪肝定量诊断中的应用. 中国医疗设备 2011; 26: 17-19, 16
- 26 王茜, 王兴田. 脂肪肝的超声定量诊断及与血糖血脂体质指数的相关性分析. 徐州医学院学报 2012; 32: 608-611
- 27 郝美娜, 赵玉珍, 舒瑞, 郭丹丹. 声触诊组织量化技术及生化指标在脂肪肝定量诊断中的应用. 中国超声医学杂志 2013; 29: 795-798

同行评价

本研究方法实用, 可操作性较强, 内容可引起超声医师重视, 值得报道。

编辑 郭鹏 电编 鲁亚静



胆肠吻合术后早期进食与传统进食的临床疗效对比

彭沙沙, 段键, 黄汉飞, 林杰, 徐王刚, 黄智, 苏子庭, 曾仲

■背景资料

胃肠道手术后早期进食作为快速康复外科的一项重要组成部分在欧美许多国家广泛应用于临床, 寻求术后合理的营养支持方式及时机, 对患者术后快速康复有着重要的意义。术后早期进食在胆肠吻合术患者中是否安全、有效值得进一步探讨。

彭沙沙, 段键, 黄汉飞, 林杰, 徐王刚, 黄智, 苏子庭, 曾仲, 昆明医科大学第一附属医院器官移植中心 云南省昆明市 650032

彭沙沙, 硕士研究生, 主要从事肝胆外科疾病的治疗与肝移植的研究。

云南省科技厅昆明医科大学应用基础研究联合专项基金资助项目, No. 2011FB176

云南省教育厅科学研究基金资助项目, No. 2013C245

云南省卫生科技计划基金资助项目, No. 2012ws0019

作者贡献分布: 彭沙沙与曾仲对此文做出主要贡献; 本课题由曾仲设计; 徐王刚、黄智及苏子庭收集并整理数据; 曾仲、段键、黄汉飞及彭沙沙统计分析数据; 本论文写作由曾仲与彭沙沙完成, 林杰参与研究。

通讯作者: 曾仲, 教授, 博士研究生导师, 650032, 云南省昆明市西昌路295号, 昆明医科大学第一附属医院器官移植中心。

zzong@medmail.com.cn

电话: 0871-65359202

收稿日期: 2013-12-04 修回日期: 2014-01-29

接受日期: 2014-02-18 在线出版日期: 2014-03-28

Clinical effects of early postoperative oral feeding versus traditional oral feeding after bilioenteric anastomosis

Sha-Sha Peng, Jian Duan, Han-Fei Huang, Jie Lin, Wang-Gang Xu, Zhi Huang, Zi-Ting Su, Zhong Zeng

Sha-Sha Peng, Jian Duan, Han-Fei Huang, Jie Lin, Wang-Gang Xu, Zhi Huang, Zi-Ting Su, Zhong Zeng, Organ Transplantation Center, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650032, Yunnan Province, China

Supported by: the Joint Special Fund of Practical and Basic Research of Kunming Medical University and Yunnan Provincial Science and Technology Department, No. 2011FB176; and the Scientific Research Foundation of Yunnan Provincial Education Department, No. 2013C245; and the Science and Technology Foundation of Yunnan Provincial Health Department, No. 2012ws0019

Correspondence to: Zhong Zeng, Professor, Organ Transplantation Center, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, 295 Xichang Road, Kunming 650032, Yunnan Province, China. zzong@medmail.com.cn

Received: 2013-12-04 Revised: 2014-01-29

Accepted: 2014-02-18 Published online: 2014-03-28

Abstract

AIM: To explore the security and feasibility of early postoperative oral feeding in patients after bilioenteric anastomosis.

METHODS: A randomized controlled trial was performed on 78 patients who underwent

bilioenteric anastomosis from January 2010 to December 2012 at the First Affiliated Hospital of Kunming Medical University. The patients were randomized into two groups: early oral feeding (EOF group, $n = 42$) and traditional oral feeding (TOF group, $n = 36$). The length of postoperative hospital stay, time to first flatus and defecation, nutritional status and postoperative complications were compared.

RESULTS: The EOF group was associated with significantly shorter post-operative hospital stay, time to first flatus and defecation compared with the TOF group ($P < 0.05$ for all). The levels of albumin, prealbumin and lymphocyte count were significantly higher in the EOF group than in the TOF group on postoperative days 3 and 7 ($P < 0.05$ for all). There were no significant differences in patient characteristics and other postoperative complications between the two groups ($P > 0.05$ for all).

CONCLUSION: Early oral feeding after bilioenteric anastomosis is safe and beneficial, and leads to faster recovery of bowel function and shorter postoperative hospital stay without increasing postoperative complications.

© 2014 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

Key Words: Bilioenteric anastomosis; Postoperative; Early oral feeding; Fast track surgery

Peng SS, Duan J, Huang HF, Lin J, Xu WG, Huang Z, Su ZT, Zeng Z. Clinical effects of early postoperative oral feeding versus traditional oral feeding after bilioenteric anastomosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(9): 1312-1316 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/1312.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i9.1312>

摘要

目的: 探讨胆肠吻合术后患者早期经口进食的安全性及有效性。

方法: 随机选取昆明医科大学第一附属医院我科2010-01/2012-12行胆肠吻合手术的78

■同行评议者

薛东波, 教授, 哈尔滨医科大学附属第一医院

例病例, 随机分为早期经口进食组(early oral feeding, EOF)42例和传统进食组(traditional oral feeding, TOF)36例, 比较两组术后住院时间、首次排气和排便时间、营养情况以及并发症的发生率。

结果: EOF组与TOF对照组比较, EOF组患者术后住院时间明显缩短、术后首次排气和排便时间均短于TOF组($P<0.05$)。在术后第3和第7天, EOF组患者白蛋白、前白蛋白、淋巴细胞计数均明显高于TOF组($P<0.05$), 两组术后并发症发生率的差异无统计学意义($P>0.05$)。

结论: 胆肠吻合术后EOF是安全可行的, 患者术后胃肠道功能恢复明显加快, 显著缩短了术后住院时间, 但并发症发生率无明显增加。

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词: 胆肠吻合术; 手术后期间; 早期经口进食; 快速康复外科

核心提示: 本文通过随机对照比较胆肠吻合术后早期经口进食(early oral feeding)与传统进食(traditional oral feeding)患者在临床指标、营养免疫情况以及并发症的发生率之间的差异, 结果显示术后早期进食是安全有效的, 在不增加并发症的情况下有助于肠道功能的恢复、提高机体营养状况及免疫功能, 同时有效避免了术后肝功能损害及胆汁淤积, 明显缩短术后住院时间及降低治疗费用。

彭沙沙, 段键, 黄汉飞, 林杰, 徐王刚, 黄智, 苏子庭, 曾仲. 胆肠吻合术后早期进食与传统进食的临床疗效对比. 世界华人消化杂志 2014; 22(9): 1312-1316 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/1312.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v22.i9.1312>

0 引言

对于肠道手术后进食时机的选择, 大多数外科医生依然遵循肠鸣音恢复和肛门排气后逐步进食的传统原则。但在术后到肛门排气期间禁食水会使术后患者肠内营养缺乏, 同时抑制唾液及消化腺的分泌, 延迟了消化系功能的恢复, 增加了潜在的致病菌感染、微生物移位等风险, 严重影响术后恢复和伤口愈合^[1]。营养状况是影响术后恢复的重要因素, 近年来国内外大量报道提出肠道手术后早期经口进食(early oral feeding, EOF)是可行的^[2-4]。我科2010-01/2012-12对实施胆肠吻合手术的患者进行随机分组对比分

析, 采取快速康复理念与方法, 术后早期经口进食效果明显。现报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料 选取昆明医科大学第一附属医院器官移植中心2010-01/2012-12行胆肠吻合术患者78例, 其中男性43例, 女性35例, 年龄9-68岁, 平均50.76岁±14.30岁。病因包括肝胆管结石、胆管结石伴胆管下段炎性狭窄、术后胆道狭窄、医源性胆管损伤、先天性胆管囊肿、肝门部胆管肿瘤、壶腹周围肿瘤等。本研究经医院伦理委员会同意, 所有患者均神志清楚, 并签署知情同意书。病例随机分为早期经口进食组(EOF组)和传统进食组(TOF组)。EOF组42例, 其中男20例, 女22例; TOF组36例, 其中男23例, 女13例。两组病例基本情况如表1。病例纳入标准: (1)患者自愿参与原则; (2)体质指数(body mass index, BMI)17.5-27.5 kg/m²; (3)既往无严重消化系疾病史; (4)术前检查未发现合并心、肝、脑肾等重要脏器的严重病变; (5)所有病例术前常规留置胃管、导尿、复方聚乙二醇电解质散口服清洁洗肠; (6)均行择期胆肠Roux-en-Y吻合术, 手术由同一手术组完成, 手术时间<4 h。

1.2 方法

1.2.1 围手术期处理: 患者术后均按照热量104.6 kJ(25 kcal)/(kg·d), 蛋白质1.2 g/(kg·d)总量供给。EOF组于术后5-6 h麻醉清醒后拔除胃管并开始饮水, 术后第1天进少量流质饮食如果汁、米汤、菜汤、面汤等, 并根据患者耐受情况逐渐过渡到半流质、普食。经口所进食物均由营养师监测其热量和蛋白质含量, 供给不足部分由静脉肠外营养提供(机体理论需要量-经口获得能量)。TOF组患者术后常规留置胃管、禁食水, 每天所需要热量和蛋白质量按照生理需要量均由静脉肠外营养提供, 待肛门排气后拔除胃管并进少量流质饮食, 并逐渐过渡到普通饮食, 供给不足部分仍由静脉肠外营养提供。患者出院标准: (1)患者完全恢复至普食, 不需静脉补液; (2)术前及术后不适症状消失, 无任何引流管及并发症; (3)可以自由活动, 有出院意愿。

1.2.2 术后观察指标: 记录患者术后首次排气和排便时间、术后住院时间, 分别检测术前、术后第3、7天患者白蛋白(albumin, ALB)、前白蛋白(prealbumin, PA)、淋巴细胞计数(lymphocyte, LY), 比较两组病例术后营养情况。比较术

■研究前沿

当前, 胃肠道手术后进食时机的选择是当前研究的一大热点。国内外越来越多的实验研究发现, 术后早期经口进食是可行的, 不会增加术后各种并发症的发生率。

■相关报道

Gianotti等研究发现胃肠道手术后早期经口进食可以促进胃肠功能恢复,增加内脏血流量,减少胆汁淤积,能减轻患者疲劳感,有利于患者术后恢复。

表 1 两组患者临床特征及术后观察指标比较 (mean ± SD)

分组	n	性别(M/F)	平均年龄(岁)	手术时间(min)	术中出血量(mL)	首次排气时间(h)	首次排便时间(h)	术后住院时间(d)
EOF组	42	20/22	51.1 ± 15.1	130.1 ± 9.1	66.2 ± 13.5	69.3 ± 9.0	76.4 ± 9.0	9.96 ± 1.37
TOF组	36	23/13	50.5 ± 13.6	127.8 ± 9.3	63.2 ± 15.0	75.7 ± 8.7	83.4 ± 8.8	11.01 ± 1.48
P值	—	0.150	0.862	0.286	0.361	0.002	0.001	0.001

EOF组: 早期经口进食组; TOF组: 传统进食组; M/F: 男性/女性。

表 2 两组患者术后营养学指标比较(mean ± SD)

分组	白蛋白(g/L)			前体白蛋白(mg/L)			淋巴细胞计数($\times 10^9/L$)		
	术前	术后3 d	术后7 d	术前	术后3 d	术后7 d	术前	术后3 d	术后7 d
EOF组	30.3 ± 6.9	33.5 ± 4.9	35.6 ± 6.7	310.3 ± 20.7	301.3 ± 19.4	308.7 ± 14.6	1.63 ± 0.57	1.18 ± 0.43	1.56 ± 0.53
TOF组	31.2 ± 6.3	29.8 ± 4.2	31.2 ± 6.9	316.4 ± 24.9	282.8 ± 18.9	290.8 ± 15.1	1.68 ± 0.62	1.03 ± 0.47	1.42 ± 0.46
P值	0.367	0.042	0.029	0.245	0.018	0.016	0.763	0.027	0.039

EOF组: 早期经口进食组; TOF组: 传统进食组。

表 3 两组患者术后并发症比较 (n)

分组	n	恶心呕吐	腹胀	胸腔积液	肺部感染肺不张	切口感染	吻合口瘘	腹腔脓肿
EOF组	42	4	2	2	4	2	0	0
TOF组	36	2	0	5	7	2	0	1
χ^2	—	0.430	1.759	1.977	1.575	0.025	—	1.182
P值	—	0.512	0.185	0.160	0.209	0.874	—	0.277

EOF组: 早期经口进食组; TOF组: 传统进食组。

后主要并发症包括: 恶心呕吐、腹胀、胸腔积液、肺部感染肺不张、切口感染、吻合口瘘、腹腔脓肿等。

统计学处理 采用SPSS17.0统计软件包进行统计学分析。正态计量资料用mean ± SD表示, 计量资料比较采用两独立样本t检验, 计数资料比较采用 χ^2 检验, 重复测量资料采用方差分析, 检验标准 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 术后观察指标 EOF组患者术后首次排气和排便时间明显短于TOF组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。EOF患者术后住院时程缩短, 与TOF组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)(表1)。

2.2 术后营养状况 EOF组患者术后第3天、第7天白蛋白和前体白蛋白均高于对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 两组患者术后淋巴细胞计数均降低, 术后第3天与术后第7天比较, EOF组淋巴细胞计数升高, 差异有统计学意义

($P < 0.05$)(表2)。

2.3 术后并发症 两组患者术后均康复出院, EOF组患者较TOF组并发症的发生率减少。但相比两组术后恶心呕吐、腹胀、胸腔积液、肺部感染肺不张、切口感染、吻合口瘘、腹腔脓肿等并发症差异均无统计学意义($P > 0.05$)(表3)。

3 讨论

胆肠吻合术自1888年Riedel首次施行以来, 常用于治疗先天性胆管囊肿、胆道良恶性梗阻、医源性胆管损伤等肝胆外科疾病, 也是包括肝移植、胰十二指肠切除术等手术后重建胆道的重要方法。大部分胆道疾病患者伴有营养障碍及电解质紊乱, 胆肠吻合手术创伤应激、术后机体高分解负氮平衡状态等容易导致患者免疫力下降及并发症发生率增高。因此, 胆肠吻合术后早期营养支持治疗十分重要, 对术后早期恢复具有决定性意义。随着现代临床外科的进步与发展, 术后EOF作为快速康复外科的一项重要措

施在欧美许多国家广泛应用于临床^[5,6]。

肠道是创伤应激的一个重要的器官, 手术、创伤、休克所引起肠道低灌注, 导致肠黏膜屏障功能损伤, 进而导致肠内正常菌群移位形成肠源性感染。肠道手术后恢复肛门排气后开始逐渐进食的传统方式一直沿用至今, 但围手术期传统进食方式缺乏循证依据, 目前国内学者一致认为只要胃肠道有功能就应该首选肠内营养支持^[7]。术后早期咀嚼动作和食物刺激能促进胃及小肠规律收缩、消化液分泌以及增加肠道血流灌注, 所以术后早期进食的重要性不仅仅在于提供肠内营养, 其更重要的意义在于降低肠道通透性保护肠道屏障结构、促进肠道功能的恢复、加速负氮平衡的恢复以及提高患者术后康复的信心。同时可以有效避免胆汁淤积引起的肝功能损伤。早期经口进食不仅适用于成人, 也适用于儿童, 这与Sholadoye等^[8]的研究一致。本研究结果显示85.71%(36/42)肠道术后患者能耐受早期进食, EOF组患者在手术后的第3天能耐受正常饮食, Han-Geurts等^[9,10]的研究也证实了这一点。EOF组患者术后首次排气排便时间以及住院时间均短与TOF组, 差异有统计学意义, 证实早期经口进食明显促进肠道功能恢复、缩短住院时间及降低治疗费用, 与Hosseini等^[11]的研究结果相似。

胆肠吻合术后早期经口进食能明显促进免疫蛋白动力学、改善营养状况及维护机体免疫功能。术后早期经口进食保障了肠道淋巴组织的能量供给, 维护了免疫细胞的结构和功能的稳定, 从而促进术后免疫功能的恢复^[7,12]。本研究结果显示, EOF组患者术后3和7 d ALB、PA、LY较TOF组升高明显($P<0.05$), 说明早期经口进食能明显改善患者术后的营养状况及提高免疫力。传统观念认为术后早期进食会导致腹胀、肠梗阻、吻合口瘘等并发症, 本研究EOF组术后并发症发生率低于TOF组, 两组患者术后发生恶心呕吐、腹胀、胸腔积液、肺部感染肺不张、切口感染、吻合口瘘等并发症的差异无统计学意义, 这与Osland等^[13]及邱强等^[14]的荟萃分析结果相同。EOF组中出现恶心呕吐、腹胀6例, 均给予胃动力药物及对症治疗后恢复。TOF组肺部并发症达12例, 考虑为术后长期留置胃管不利患者下床活动及咳嗽排痰引起, EOF组患者麻醉清醒后早期拔除胃管有利于下床活动促进肠蠕动, 减少术后肠粘连的形成, 同时也有效避免了肺部感染肺不张等并发症的发生。两组患者均未

发生吻合口瘘, 可能由于选取病例数较少原因, 吻合口瘘是否与早期进食有关, 还需要大量统计数据进一步论证。但是在动物实验证明早期进食可以促进吻合口的愈合^[15]。我们认为, 吻合口瘘的原因主要由吻合口缺血引起, 所以在精确熟练吻合技术的基础上, 早期进食能有效促进胃肠蠕动, 防止食物潴留, 避免吻合口产生纵向张力而引起缺血。同时早期进食增加了肠道血流灌注, 降低了吻合口缺血风险, 从而降低了吻合口瘘的发生率。

总之, 胆肠吻合术后患者大部分能耐受早期经口进食, 早期进食不但有助于肠道功能的恢复、提高机体营养状况及免疫功能, 而且避免了术后肝功能损害及胆汁淤积, 同时明显缩短术后住院时间及降低治疗费用。因此, 可以作为围手术期标准处理方式应用于临床。

4 参考文献

- 1 史振慧, 商晓燕, 付军. 术后早期进食对肛门排气的影响. 中华临床医药 2003; 4: 83
- 2 Gianotti L, Nespoli L, Torselli L, Panelli M, Nespoli A. Safety, feasibility, and tolerance of early oral feeding after colorectal resection outside an enhanced recovery after surgery (ERAS) program. *Int J Colorectal Dis* 2011; 26: 747-753 [PMID: 21286920 DOI: 10.1007/s00384-011-1138-3]
- 3 熊仁海, 莫伟明, 黄绪群, 徐祝英, 王兵, 阮勇. 胆道手术中不常规放置鼻胃管并早期进食的临床应用研究. 中华普通外科杂志 2012; 27: 1025-1027
- 4 Qiu Q, Cao JQ, Wang Q, Xin L, Huang J. [Safety and feasibility of early oral feeding after gastrectomy: a meta-analysis]. *Zhonghua Weichang Waike Zazhi* 2013; 16: 1045-1050 [PMID: 24277398]
- 5 Ansari D, Gianotti L, Schröder J, Andersson R. Fast-track surgery: procedure-specific aspects and future direction. *Langenbecks Arch Surg* 2013; 398: 29-37 [PMID: 23014834 DOI: 10.1007/s00423-012-1006-9]
- 6 Lassen K, Kjaeve J, Fetveit T, Tranø G, Sigurdsson HK, Horn A, Revhaug A. Allowing normal food at will after major upper gastrointestinal surgery does not increase morbidity: a randomized multicenter trial. *Ann Surg* 2008; 247: 721-729 [PMID: 18438106 DOI: 10.1097/SLA.0b013e31815cca68]
- 7 米磊, 仲蓓, 张佃良, 周岩冰, 王东升. 胃癌患者术后早期肠内营养对临床结局的影响. 中华胃肠外科杂志 2012; 15: 464-467
- 8 Sholadoye TT, Suleiman AF, Mshelbwala PM, Ameh EA. Early oral feeding following intestinal anastomoses in children is safe. *Afr J Paediatr Surg* 2012; 9: 113-116 [PMID: 22878758 DOI: 10.4103/0189-6725.99395]
- 9 Han-Geurts IJ, Hop WC, Kok NF, Lim A, Brouwer KJ, Jeekel J. Randomized clinical trial of the impact of early enteral feeding on postoperative ileus and recovery. *Br J Surg* 2007; 94: 555-561 [PMID: 17443854]
- 10 Han-Geurts IJ, Jeekel J, Tilanus HW, Brouwer KJ. Randomized clinical trial of patient-controlled versus fixed regimen feeding after elective abdomi-

■创新盘点

胃肠道手术后进食时机的选择一直是研究热点, 本文通过对比认为患者行胆肠吻合术后5-6 h麻醉清醒后经口进食是安全有效的, 有助于肠道功能的恢复、提高机体营养状况及免疫功能, 而且避免了术后肝功能损害及胆汁淤积, 同时明显缩短术后住院时间及降低治疗费用。

■同行评价

本文立意新意, 科学性较好, 研究严谨, 结果有一定的创新性, 对临床工作有实际的指导意义。

- 11 Hosseini SN, Mousavinasab SN, Rahmanpour H, Sotodeh S. Comparing early oral feeding with traditional oral feeding in upper gastrointestinal surgery. *Turk J Gastroenterol* 2010; 21: 119-124 [PMID: 20872323]
- 12 杨东杰, 何伟玲, 王亮, 徐建波, 彭建军, 吴晖, 宋武, 张常华, 何裕隆. 术后早期经口进食对结直肠癌术后体液免疫功能的影响. *中华胃肠外科杂志* 2013; 16: 1051-1054
- 13 Osland E, Yunus RM, Khan S, Memon MA. Early versus traditional postoperative feeding in patients undergoing resectional gastrointestinal surgery: a meta-analysis. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2011; 35: 473-487 [PMID: 21628607 DOI: 10.1177/0148607110385698]
- 14 邱强, 曹家庆, 王琦, 辛林, 黄俊. 胃癌患者术后早期经口进食的安全性与可行性Meta分析. *中华胃肠外科杂志* 2013; 16: 1045-1050
- 15 Tadano S, Terashima H, Fukuzawa J, Matsuo R, Ikeda O, Ohkohchi N. Early postoperative oral intake accelerates upper gastrointestinal anastomotic healing in the rat model. *J Surg Res* 2011; 169: 202-208 [PMID: 20421119 DOI: 10.1016/j.jss.2010.01.004]

编辑 郭鹏 电编 鲁亚静



监护室新生儿长期胃肠外营养致胆汁淤积症的表现及预后

赵军育, 吴立江, 刘晓莉

赵军育, 天津医科大学总医院儿科 天津市 300052
赵军育, 吴立江, 刘晓莉, 天津市滨海新区汉沽医院儿科 天津市 300480
赵军育, 主治医师, 主要从事新生儿疾病的研究.
作者贡献分布: 赵军育进行课题设计与论文写作; 吴立江参与研究过程; 刘晓莉进行数据分析.
通讯作者: 赵军育, 主治医师, 300480, 天津市滨海新区汉沽医院路28号, 天津市滨海新区汉沽医院儿科. tjhgzhaojunyu@163.com
电话: 022-67127136
收稿日期: 2014-02-10 修回日期: 2014-03-10
接受日期: 2014-03-18 在线出版日期: 2014-03-28

Clinical manifestations and prognosis of long-term parenteral nutrition induced cholestasis in neonates

Jun-Yu Zhao, Li-Jiang Wu, Xiao-Li Liu

Jun-Yu Zhao, Department of Pediatrics, Tianjin Medical University General Hospital, Tianjin 300052, China
Jun-Yu Zhao, Li-Jiang Wu, Xiao-Li Liu, Department of Pediatrics, Hangu Hospital of Binhai New Area, Tianjin 300480, China
Correspondence to: Jun-Yu Zhao, Attending Physician, Department of Pediatrics, Hangu Hospital of Binhai New Area, 28 Hangu Yiyuan Road, Binhai District, Tianjin 300480, China. tjhgzhaojunyu@163.com
Received: 2014-02-10 Revised: 2014-03-10
Accepted: 2014-03-18 Published online: 2014-03-28

Abstract

AIM: To explore the clinical manifestations and prognosis of parenteral nutrition induced cholestasis (PNIC).

METHODS: One hundred and two newborns receiving continuous parenteral nutrition (PN) ≥ 14 d from January 2010 to December 2013 were divided into either a PNIC group ($n = 42$) or a non-PNIC group ($n = 60$). PNAC onset time, duration and hepatic injury were compared between the two groups.

RESULTS: PNIC occurred $3.4 \text{ wk} \pm 1.5 \text{ wk}$ after PN administration, and its mean duration was $13.4 \text{ wk} \pm 5.2 \text{ wk}$. The maximum total bilirubin was $198.9 \mu\text{mol/L} \pm 95.8 \mu\text{mol/L}$, and the direct bilirubin was $137.1 \mu\text{mol/L} \pm 64.3 \mu\text{mol/L}$. In the PNIC group, 77.8% (28/36) suffered from

hepatic injury. Hepatic injury occurred $6.5 \text{ wk} \pm 2.9 \text{ wk}$ after PN administration, and lasted for $9.6 \text{ wk} \pm 5.2 \text{ wk}$. Multiple linear regression analysis showed that the severity of cholestasis was positively correlated with the duration of PN ($r = 0.287, P < 0.05$).

CONCLUSION: The prognosis of PNIC was favorable. To reduce the incidence of PNIC, long-term PN and infections should be avoided, enteral feeding should be started early and the PN formula should be improved.

© 2014 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

Key Words: Neonates; Parenteral nutrition; Cholestasis

Zhao JY, Wu LJ, Liu XL. Clinical manifestations and prognosis of long-term parenteral nutrition induced cholestasis in neonates. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(9): 1317-1321 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/1317.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i9.1317>

摘要

目的: 探讨监护室新生儿长期胃肠外营养相关性胆汁淤积症(parenteral nutrition associated cholestasis, PNAC)的表现及预后.

方法: 选择2010-01/2013-12在我院新生儿监护室接受持续胃肠外营养 ≥ 14 d的102例新生儿为研究对象, 其中42例发生了PNAC, 作为研究组(PNAC组), 未发生PNAC的60例患儿为对照组(非PNAC组). 观察PNAC患儿PNAC发生时间、持续时间、肝功能损害及预后等情况.

结果: PNAC组患儿发生PNAC的平均时间为开始接受胃肠外营养(parenteral nutrition, PN)后 $3.4 \text{ wk} \pm 1.5 \text{ wk}$, 平均持续时间为 $13.4 \text{ wk} \pm 5.2 \text{ wk}$, 平均总胆红素(total bilirubin, TB)峰值为 $198.9 \mu\text{mol/L} \pm 95.8 \mu\text{mol/L}$, 平均直接胆红素(direct bilirubin, DB)峰值为 $137.1 \mu\text{mol/L} \pm 64.3 \mu\text{mol/L}$; PNAC组患儿中有77.8%(28/36)伴有肝功能损害, 肝损一般发生于PN后6.5 wk

■背景资料

胃肠外营养(parenteral nutrition, PN)广泛应用于危重症新生儿, 尤其危重症早产儿及低出生体质量儿的救治中. 然而由于新生儿胃肠道及肝脏等重要脏器尚未完全发育成熟, PN在应用过程中出现诸多并发症, 其中胃肠外营养相关性胆汁淤积症(parenteral nutrition associated cholestasis, PNAC)是PN并发症中最为严重的一种, 部分患儿甚至可以发展为肝功能衰竭而死亡.

■同行评议者

崔清波, 副主任医师, 副教授, 哈尔滨医科大学附属第二医院儿外科

■研究前沿

PNAC的确切病因尚不明确,目前认为PNAC可能是脓毒血症、肝脏发育不成熟、肠内营养缺乏、肠外营养毒素等因素单独或相互作用导致的胆汁酸分泌受抑,致使胆管内胆汁流速及胆汁成份改变引起的一种综合征。其中有关胃肠外营养导致的PNAC越来越受重视。

±2.9 wk,持续9.6 wk±5.2 wk。多重线性回归分析显示,胆汁淤积程度与PN持续时间呈正相关($r = 0.287, P < 0.05$),与其他各项指标无线性关系。

结论: PNAC患儿总体预后良好,临床应用中应该避免长时间持续PN,同时防治感染、尽早开始肠内营养、改善PN配方等,可以有效减少PNAC发生。

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词: 新生儿; 胃肠外营养; 胆汁淤积

核心提示: 本研究中,42例胃肠外营养相关性胆汁淤积症(parenteral nutrition associated cholestasis, PNAC)患儿肝功能损害发生率为77.8%,一般发生于胃肠外营养(parenteral nutrition, PN)后6.5 wk±2.9 wk,较PNAC出现晚,肝损持续时间大约9.6 wk±5.2 wk。部分研究表明,停用PN后PNAC症状会好转缓解。本次入组的42例PNAC患儿在停用PN,并给予能量合剂、熊脱氧胆酸及护肝治疗后,40例患儿临床症状消失,随诊1-2 mo肝功能指标正常,2例患儿治疗2 wk临床症状无改善,自动出院。

赵军育, 吴立江, 刘晓莉. 监护室新生儿长期胃肠外营养致胆汁淤积症的表现及预后. 世界华人消化杂志 2014; 22(9): 1317-1321
URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/1317.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v22.i9.1317>

0 引言

胃肠外营养(parenteral nutrition, PN)广泛应用于危重症新生儿,尤其危重症早产儿及低出生体重儿的救治中。然而由于新生儿胃肠道及肝脏等重要脏器尚未完全发育成熟,PN在应用过程中出现诸多并发症,其中胃肠外营养相关性胆汁淤积症(parenteral nutrition associated cholestasis, PNAC)是PN并发症中最为严重的一种,部分患儿甚至可以发展为肝功能衰竭而死亡^[1,2]。PNAC的发病机制目前尚不完全清楚,了解新生儿PNAC的临床表现及预后,采取合理的干预措施对于新生儿PNAC的救治具有十分重要的意义。本研究对2010-01/2013-12我院新生儿监护室接受PN治疗的患者临床资料进行总结,分析PNAC的临床特征及预后。

1 材料和方法

1.1 材料 选择2010-01/2013-12在我院新生儿监

护室接受持续胃肠外营养≥14 d的102例新生儿为研究对象,其中42例发生了PNAC,作为研究组(PNAC组),剩余未发生PNAC的60例患儿作为对照组(非PNAC组)。

1.2 方法

1.2.1 PNAC诊断标准: 持续胃肠外营养≥14 d,临床表现有皮肤黄染和(或)大便颜色呈白陶土样,直接胆红素(direct bilirubin, DB)>34 μmol/L(2 mg/dL),排除病毒、细菌等感染,胆道畸形、外科手术及遗传代谢疾病等原因引起的胆汁淤积^[3]。肝功能损害标准: 谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)>50 U/L,谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)>50 U/L,排除标本溶血等因素者可诊断为肝功能损害。

1.2.2 肠外营养支持: PN液配方包括10%葡萄糖、6.74%小儿复方氨基酸、20%中长链脂肪乳、水溶性及脂溶性维生素、电解质、微量元素。氨基酸及脂肪乳均由1 g/(kg·d)开始,每天增加0.5 g/kg,最大增至2.5-3.5 g/(kg·d),葡萄糖用量开始用量为6-8 g/(kg·d),逐渐增至12-16 g/(kg·d)。PN液由周围或中心静脉微泵输入,输注过程注意避光处理。

1.2.3 观察项目: 包括各组患儿的性别、胎龄、出生体质量、禁食时间、PN时间、是否窒息、有无感染、颅内出血、机械通气、动脉导管开放等情况,所有患儿定期接受头颅B超,心脏彩超,腹部B超,甲状腺功能及其他常规检查。

1.2.4 PNAC患儿的治疗: DB>3 mg/dL时予以减少PN用量,DB>8 mg/dL时停用PN,并根据患儿胆汁淤积情况给予熊脱氧胆酸及护肝治疗,如果经上述治疗4 wk,患儿病情无好转甚至加重者,则转上级医院进一步治疗。

统计学处理 采用SPSS19.0统计软件进行统计分析。计量资料以mean±SD表示,两组之间比较采用 t 检验,计数资料比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患儿临床资料比较 PNAC组与非PNAC组患儿临床资料比较如表1。两组患儿在性别比例、合并感染及动脉导管开放方面差异无统计学意义($P > 0.05$)。PNAC组患儿的胎龄及出生体质量均小于非PNAC组,禁食时间、PN时间长于非PNAC组,同时PNAC组窒息、颅内出血的患儿明显多于非PNAC组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

表 1 PNAC组与非PNAC组患儿临床资料的比较

项目	PNAC组	非PNAC组	t 或 χ^2 值	P 值
n	42	60		
性别(男/女)	18/24	21/39	0.646	>0.05
胎龄(wk)	31.4 \pm 3.5	33.1 \pm 3.3	2.497	<0.05
出生体质量(g)	1351.6 \pm 321.5	1832.9 \pm 256.1	8.402	<0.05
禁食时间(d)	10.6 \pm 6.8	4.5 \pm 3.6	5.878	<0.05
PN时间(d)	39.5 \pm 19.2	24.6 \pm 9.3	5.209	<0.05
窒息 n (%)	15(35.7)	7(11.7)	8.446	<0.05
感染 n (%)	18(42.9)	17(28.3)	2.312	>0.05
颅内出血 n (%)	24(57.1)	21(35.0)	4.913	<0.05
机械通气 n (%)	26(61.9)	18(30.0)	10.253	<0.05
动脉导管开放 n (%)	13(31.0)	17(28.3)	0.816	>0.05

PNAC: 胃肠外营养相关性胆汁淤积症; PN: 胃肠外营养.

表 2 PNAC患儿的临床特征

项目	n	mean \pm SD	最小值	最大值
PNAC发生时间(wk)	42	3.4 \pm 1.5	1	7.5
PNAC持续时间(wk)	42	13.4 \pm 5.2	4	24
TB-max(μ mol/L)	36	198.9 \pm 95.8	58.5	486.3
DB-max(μ mol/L)	36	137.1 \pm 64.3	47.3	293.8
肝损发生时间(wk)	28	6.5 \pm 2.9	1	15
肝损持续时间(wk)	28	9.6 \pm 5.2	2	21
ALT-max(U/L)	28	120.9 \pm 47.3	50	248
AST-max(U/L)	28	239.6 \pm 121.8	81	642

PNAC发生时间: 开始胃肠外营养至发生PNAC的周数; 肝损发生时间: 开始胃肠外营养至发生肝损的周数; PNAC: 胃肠外营养相关性胆汁淤积症; DB: 直接胆红素; TB: 总胆红素; ALT: 谷丙转氨酶; AST: 谷草转氨酶.

2.2 PNAC患儿临床特征及预后 PNAC组患儿发生PNAC的平均时间为开始接受PN后3.4 wk \pm 1.5 wk, 其中5例发生在停用PN 1 wk, 1例发生在停用PN 2 wk, 停用PN后发生PNAC的患儿在排除其他原因引起后, 给予常规利胆护肝治疗等对症支持治疗后好转. PNAC平均持续时间为13.4 wk \pm 5.2 wk, 总胆红素(total bilirubin, TB)峰值为198.9 μ mol/L \pm 95.8 μ mol/L, DB峰值为137.1 μ mol/L \pm 64.3 μ mol/L; PNAC患儿中有77.8%(28/36)伴有肝功能损害, 肝损一般发生于PN后6.5 wk \pm 2.9 wk, 较PNAC发生晚, 持续9.6 wk \pm 5.2 wk, ALT峰值120.9 U/L \pm 47.3 U/L, AST峰值239.6 U/L \pm 121.8 U/L(表2). PNAC发生后, 逐渐停用PN, 并给予能量合剂、熊脱氧胆酸及护肝治疗, 40例患儿临床症状消失, 随诊1-2 mo

肝功能指标正常, 2例患儿治疗2 wk临床症状无改善, 自动出院.

2.3 胆汁淤积程度与PN持续时间的关系 通过对胆汁淤积程度即直接胆红素峰值与胎龄、出生体质量、禁食时间、PN持续时间进行多重线性回归分析, 结果显示, 胆汁淤积程度与PN持续时间呈正相关($r = 0.287, P < 0.05$), 其他各项指标无线性关系(图1).

3 讨论

PNAC的确切病因尚不明确, 目前^[4,5]认为PNAC可能是脓毒血症、肝脏发育不成熟、肠内营养缺乏、肠外营养毒素等因素单独或相互作用导致的胆汁酸分泌受抑, 致使胆管内胆汁流速及胆汁成份改变引起的一种综合征. 其中有关胃

■ 相关报道

Cober等曾报道, PN治疗小于2 wk的患儿没有或程度较轻的胆汁淤积, 而超过2 wk的患儿PNAC发生机率增高, PN持续超过6 wk者则会发生胆汁淤积及胆管增生.

■应用要点

PNAC的发病机制目前尚不完全清楚,了解新生儿PNAC的临床表现及预后,采取合理的干预措施对于新生儿PNAC的救治具有十分重要的意义。

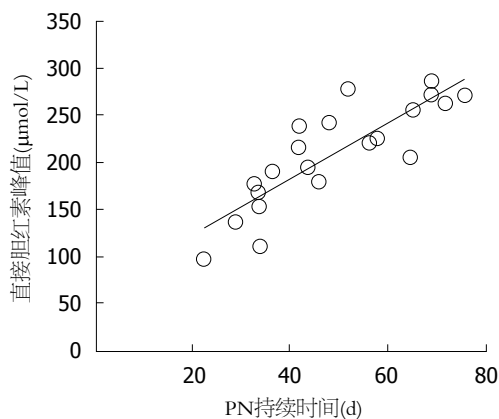


图1 PNAC患儿直接胆红素峰值与PN持续时间的散点图。
PNAC: 胃肠外营养相关性胆汁淤积症; PN: 胃肠外营养。

肠外营养导致的PNAC越来越受重视。

胃肠外营养是新生儿学中的一个重要发展,目前已成为新生儿监护室救治患儿的重要方法,但胃肠外营养液成分本身具有的毒性作用可以导致肝脏损害,出现PNAC。有报道,PN液中牛磺酸、谷氨酰胺缺乏或蛋氨酸过多等可引起PNAC^[6,7],另外热卡过高、水份及脂肪乳配伍不均等也可能是PNAC的重要因素^[8,9]。本次研究中我们通过对本院新生儿监护室接受持续PN治疗的患儿进行研究显示:PNAC患儿的胎龄及出生体质量普遍小于非PNAC患儿,平均禁食时间、PN时间均长于非PNAC患儿,同时PNAC组窒息、颅内出血的患儿明显多于非PNAC组。通过对上述因素进一步行多重线性回归分析显示,胆汁淤积程度与PN持续时间呈正相关其他各项指标无线性关系。说明PN持续时间是PNAC的重要危险因素,PN时间越长,PNAC发生的可能性越大,这与国内外报道结论一致^[10-13]。其原因可能与长时间的PN增加了PN液的累积毒性,同时由于过高的非蛋白热卡摄入,水份、糖原及脂肪乳等在肝脏的沉积致使肝细胞发生肿胀、变性,进而堵塞胆管引起胆汁淤积,从而对肝脏造成进一步的损害。

Cober等^[14]曾报道,PN治疗小于2 wk的患儿没有或程度较轻的胆汁淤积,而超过2 wk的患儿PNAC发生率增高,PN持续超过6 wk者则会发生胆汁淤积及胆管增生。本研究中,我们通过对PNAC组42例患儿的临床资料分析发现,PNAC的主要临床表现为黄疸、肝脾肿大、大便呈白陶土样外,PNAC平均时间为开始接受PN后3.4 wk \pm 1.5 wk,最早发生在开始PN后1 wk,最晚发生在开始PN后7.5 wk。其中5例发生在停用

PN 1 wk, 1例发生在停用PN 2 wk,停用PN后发生PNAC的患儿在排除其他原因引起后,给予常规利胆护肝治疗等对症支持治疗后好转,PNAC平均持续时间为13.4 wk \pm 5.2 wk。可见,临床上对于使用持续PN治疗的患儿应该定期监测肝功能,尤其对于持续使用2 wk以上的患儿,应密切观察患儿有无皮肤黄染,大便颜色变浅等情况,并结合相应肝功能检测结果,判断是否发生PNAC。另外,我们发现PNAC患儿的胆汁淤积程度并不一致,PNAC组患儿平均TB峰值为198.9 μ mol/L \pm 95.8 μ mol/L,平均DB峰值为137.1 μ mol/L \pm 64.3 μ mol/L;而最严重的患儿TB峰值可达486.3 μ mol/L, DB可达293.8 μ mol/L。这与国内学者报道的数据基本一致^[15,16]。线性回归分析结果也显示,胆汁淤积程度与PN持续时间呈正相关。这可能是由于新生儿机体降解机制尚不完善,肝脏、肾脏等重要脏器功能不全,长期PN致使患儿体内氨基酸不断积累,又缺乏相应的代谢,所以DB水平升高^[17]。

PNAC患儿常伴有肝功能的损害^[18,19]。本研究中,42例PNAC患儿肝功能损害发生率为77.8%,一般发生于PN后6.5 wk \pm 2.9 wk,较PNAC出现晚,肝损持续时间大约9.6 wk \pm 5.2 wk。部分研究表明^[20,21]停用PN后PNAC症状会好转缓解。本次入组的42例PNAC患儿在停用PN,并给予能量合剂、熊脱氧胆酸及护肝治疗后,40例患儿临床症状消失,随诊1-2 mo肝功能指标正常,2例患儿治疗2 wk临床症状无改善,自动出院。所以我们认为,PNAC患儿总体预后良好,当然这可能与本次研究中患儿接受PN治疗时间相对较短有关。

在PN治疗过程中,除了避免消除危险因素,如长时间持续PN外,防治感染、尽早开始肠内营养、改善PN配方等也是有效的预防手段^[21]。医务工作者应该密切观察患儿临床表现,及时调整PN用量并监测肝功能的变化。

4 参考文献

- 1 刘艳,黄志华,徐三清,黄永建,周华,董永绥,冯杰雄. 肝组织病理学检查在婴儿胆汁淤积症鉴别诊断中的价值. 世界华人消化杂志 2012; 20: 2200-2204
- 2 Willis TC, Carter BA, Rogers SP, Hawthorne KM, Hicks PD, Abrams SA. High rates of mortality and morbidity occur in infants with parenteral nutrition-associated cholestasis. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2010; 34: 32-37 [PMID: 19587385 DOI: 10.1177/0148607109332772]
- 3 Rangel SJ, Calkins CM, Cowles RA, Barnhart DC, Huang EY, Abdullah F, Arca MJ, Teitelbaum DH. Parenteral nutrition-associated cholestasis: an

- American Pediatric Surgical Association Outcomes and Clinical Trials Committee systematic review. *J Pediatr Surg* 2012; 47: 225-240 [PMID: 22244423 DOI: 10.1016/j.jpedsurg.2011.10.007]
- 4 Costa S, Maggio L, Sindico P, Cota F, De Carolis MP, Romagnoli C. Preterm small for gestational age infants are not at higher risk for parenteral nutrition-associated cholestasis. *J Pediatr* 2010; 156: 575-579 [PMID: 20036379 DOI: 10.1016/j.jpeds.2009.10.038]
- 5 Arsenault DA, Potemkin AK, Robinson EM, Fallon EM, Ozonoff A, de Meijer VE, Puder M. Surgical intervention in the setting of parenteral nutrition-associated cholestasis may exacerbate liver injury. *J Pediatr Surg* 2011; 46: 122-127 [PMID: 21238652 DOI: 10.1016/j.jpedsurg.2010.09.072]
- 6 蒋晓梅. 胃肠外营养中氨基酸摄入量与极低出生体重儿胃肠外营养相关性胆汁淤积的关系分析. *中国医药导报* 2011; 8: 38-40
- 7 邓亚楠, 王琳琳, 唐清, 陈秀奇, 陈萍, 单庆文, 连淑君, 云翔. 胆盐输出泵基因V444A与特发性婴儿肝炎肝内胆汁淤积的关系. *世界华人消化杂志* 2011; 19: 38-43.
- 8 许波, 王曼秋, 曹艳华. 早产儿早期微量喂养和胃肠外营养相关性胆汁淤积的关系探讨. *临床军医杂志* 2012; 40: 1477-1479
- 9 刘剑. 胃肠外营养对早产儿的作用研究. *吉林医学* 2013; 34: 429
- 10 杨慧, 王卫, 刘晓红. 早产儿胃肠外营养相关性胆汁淤积影响因素研究. *中国新生儿科杂志* 2013; 28: 32-35
- 11 许靖, 张小英, 李秋平, 王自珍, 周丽, 杨璐, 马兴娜, 封志纯. 超低出生体质量儿早期胃肠内微量喂养的临床研究. *实用儿科临床杂志* 2012; 27: 486-488, 518
- 12 Blackmer A B, Btaiche I F, Arnold M A, Teitelbaum D H. Parenteral Nutrition-Associated Liver Disease in Pediatric Patients: Strategies for Treatment and Prevention. *Diseases of the Liver in Children*. New York: Springer, 2014: 327-349 [DOI: 10.1007/978-1-4614-9005-017]
- 13 王艳. 新生儿胃肠外营养45例临床运用及分析. *中国当代医药* 2011; 18: 180-181
- 14 Cober MP, Teitelbaum DH. Prevention of parenteral nutrition-associated liver disease: lipid minimization. *Curr Opin Organ Transplant* 2010; 15: 330-333 [PMID: 20386446 DOI: 10.1097/MOT.0b013e328338c2da]
- 15 庞占凤, 郭静, 孙梅. 早产儿胃肠外营养相关性胆汁淤积的临床研究. *中华临床医师杂志(电子版)* 2011; 5: 4331-4335
- 16 黄瑞文, 周勇, 颜卫群, 肖艾青, 李军. 早产儿胃肠外营养总胆汁酸的变化. *医学临床研究* 2009; 26: 1318-1319
- 17 杨清波, 姚黎军, 于建渤. 极低出生体重儿胃肠外营养相关性胆汁淤积病因学研究及治疗进展. *内蒙古中医药* 2013; 32: 119
- 18 许红, 黄启凌. 熊去氧胆酸治疗早产儿胃肠外营养相关性胆汁淤积症. *实用药物与临床* 2012; 15: 820-821
- 19 王陈红, 施丽萍, 吴秀静, 陈正, 罗芳. 早产儿胃肠外营养相关性胆汁淤积症的临床特征. *中华儿科杂志* 2011; 49: 199-202
- 20 陈蓓, 苏萍, 韩进天, 王岩, 林广. 极早早产儿早期持续鼻饲输注喂养预防胃肠外营养相关性胆汁淤积. *广东医学* 2012; 33: 2298-2300
- 21 郭宏湘, 王怀立, 张茜, 徐千雅, 李燕. 熊脱氧胆酸治疗早产儿胃肠外营养相关性胆汁淤积症的疗效. *实用儿科临床杂志* 2012; 27: 138-140

■同行评价

本研究内容实用, 结果清晰, 对临床医师有一定的参考价值.

编辑 田滢 电编 鲁亚静



定量检测溃疡性结肠炎患者血清色氨酸的临床意义

苏丽, 李楠, 吴凯, 王欣, 张萌

■背景资料

溃疡性结肠炎是一种肠道慢性炎症性疾病, 近年来, 其在亚洲国家发病率呈上升趋势。目前病因尚不明确, 无有效评估疾病活动性方法, 临床诊断和治疗仍需进一步研究。对溃疡性结肠炎患者血清色氨酸水平定量检测, 了解溃疡性结肠炎发生、发展、诊断及治疗效果判断有一定的临床意义。

苏丽, 张萌, 河北北方学院 河北省张家口市 075000
李楠, 吴凯, 王欣, 中国人民解放军309医院消化科 北京市 100091

苏丽, 硕士, 主要从事炎症性肠病的临床与基础研究。

作者贡献分布: 主要实验、数据分析、文章起草由苏丽完成; 病例选择、临床资料整理由吴凯、王欣及张萌完成; 课题设计、文章修改和审阅由李楠完成。

通讯作者: 李楠, 主任医师, 100091, 北京市海淀区黑山扈路甲17号, 中国人民解放军309医院. xhk309@126.com

电话: 010-66775074

收稿日期: 2013-12-29 修回日期: 2014-01-25

接受日期: 2014-02-03 在线出版日期: 2014-03-28

Clinical significance of quantitative detection of serum tryptophan in patients with ulcerative colitis

Li Su, Nan Li, Kai Wu, Xin Wang, Meng Zhang

Li Su, Meng Zhang, Hebei North University, Zhangjiakou 075000, Hebei Province, China

Nan Li, Kai Wu, Xin Wang, Department of Gastroenterology, 309th Hospital of People's Liberation Army, China, Beijing 100091, China

Correspondence to: Nan Li, Chief Physician, Department of Gastroenterology, 309th Hospital of People's Liberation Army, China, 17 Heishanhu Road, Haidian District, Beijing 100091, China. xhk309@126.com

Received: 2013-12-29 Revised: 2014-01-25

Accepted: 2014-02-03 Published online: 2014-03-28

Abstract

AIM: To investigate the clinical significance of serum tryptophan in patients with ulcerative colitis (UC).

METHODS: Serum samples were obtained from 20 UC patients and 20 healthy volunteers. For each patient, serum samples were collected when the disease was active and inactive. The diagnosis for each patient was based on clinical symptoms, endoscopic, radiographic, and histological findings. The Montreal Classification was used for disease phenotyping. Disease activity was assessed by the modified Mayo score. Tryptophan in serum was measured by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Differences between different groups and the relationship between serum tryptophan and ESR/CRP in patients with active UC were analyzed.

■同行评议者

张庆瑜, 教授, 主任医师, 天津医科大学总医院科研处

RESULTS: Compared with patients with active UC, serum levels of tryptophan in patients with inactive UC and healthy volunteers were significantly lower ($P < 0.05$ for both), but there was no significant difference between patients with inactive UC and healthy volunteers. Serum tryptophan in active UC patients was inversely related to ESR ($r = -0.502$, $P = 0.024$) and CRP ($r = -0.530$, $P = 0.016$). After conventional treatment, the levels of serum tryptophan were significantly elevated ($P < 0.05$).

CONCLUSION: Tryptophan may play a key role in the occurrence and development of UC.

© 2014 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

Key Words: Ulcerative colitis; Tryptophan; Clinical significance

Su L, Li N, Wu K, Wang X, Zhang M. Clinical significance of quantitative detection of serum tryptophan in patients with ulcerative colitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(9): 1322-1327 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/1322.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i9.1322>

摘要

目的: 探讨溃疡性结肠炎血清色氨酸的临床意义。

方法: 从40例(20例溃疡性结肠炎患者和20例健康志愿者)收集血清样本。并分别收集同一名溃疡性结肠炎患者疾病活动期和缓解期血清。综合临床表现、内镜、影像及组织学检查对溃疡性结肠炎患者进行诊断。使用蒙特利尔分类对疾病分型, 使用梅奥评分评估疾病活动性。用液相色谱-质谱联用法定量检测色氨酸。对不同分组及色氨酸与血沉和C-反应蛋白的关系进行分析。

结果: (1)活动期溃疡性结肠炎患者血清色氨酸水平显著低于缓解期溃疡性结肠炎患者和健康志愿者($P < 0.05$)。缓解期溃疡性结肠炎患者组与健康志愿者无明显差异; (2)活动期溃疡性结肠炎血清色氨酸与血沉呈负相关($r =$

-0.502, $P = 0.024$); 活动期溃疡性结肠炎血清色氨酸与C-反应蛋白呈负相关($r = -0.530$, $P = 0.016$); (3) 活动期溃疡性结肠炎患者经规律治疗后, 血清色氨酸水平有所提高($P < 0.05$).

结论: 色氨酸在溃疡性结肠炎发生发展中起关键性作用.

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有.

关键词: 溃疡性结肠炎; 色氨酸; 临床意义

核心提示: 血清色氨酸水平在溃疡性结肠炎发生、发展以及治疗前后均发生显著变化, 说明色氨酸在溃疡性结肠炎发病过程中起重要作用, 对于人们更好的了解此疾病具有重要价值.

苏丽, 李楠, 吴凯, 王欣, 张萌. 定量检测溃疡性结肠炎患者血清色氨酸的临床意义. 世界华人消化杂志 2014; 22(9): 1322-1327
URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/1322.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i9.1322>

0 引言

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)与克罗恩病(Crohn's disease, CD)共同称为炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD), 其是一种与多因素有关, 但原因不明的疾病, 具有较高的表型变化^[1]. 目前许多文献显示UC与遗传、环境、微生物、免疫等多种因素相关. UC最常发生于青壮年期, 根据我国统计资料, 发病高峰年龄为20-49岁, 男女性别差异不大(男:女约为1.0-1.3:1)^[2,3]. 临床表现为持续或反复发作的腹泻、黏液脓血便伴腹痛、里急后重和不同程度的全身症状. 因其病因尚不明确, 所以目前缺乏诊断金标准. 主要结合临床表现、内镜和病理组织学检查进行综合分析, 在排除感染性和其他非感染性结肠炎的基础上作出诊断^[4]. 自身抗体核周抗中性白细胞胞质抗体(p-ANCA)可作为诊断标记物, 但是他的敏感性和特异性并不理想. 生物标志物通常用来监测疾病的活动性和对治疗的反应, 像红细胞沉降率(erythrocyte sedimentation rate, ESR)和C-反应蛋白(C-reactive protein, CRP), 他们并不总是和疾病活动性相关, 也不是UC特异性的标志物^[5]. 该疾病目前的治疗目标为诱导并维持临床缓解及黏膜愈合, 防治并发症, 改善患者生存质量^[6]. 主要为改善饮食及生活方式, 服用5-氨基水杨酸类药物、激素、免疫抑制剂、抗生素、微生态制剂、生物制剂、中药等, 以及外科手术治疗. 但目前尚无

令人满意的治疗方法. 所以, UC在发病机制、诊断和治疗方面成为研究热点. 最近有证据表明, 氨基酸在保持肠道健康中起着重要作用^[7]. 而色氨酸(tryptophan, Trp)又是一种与自身免疫相关的必需氨基酸, 其代谢途径与炎症性肠病的发病机制相关^[8]. 本实验中我们对20个UC患者(包括活动期和缓解期)与20个健康志愿者(HCs)血清Trp进行了定量分析, 探讨血清Trp水平在UC发生发展中可能的作用和临床意义.

1 材料和方法

1.1 材料 此项研究中的UC患者来自于2012-10/2013-05的中国人民解放军309医院消化科住院及门诊病人. HCs来自中国人民解放军309医院健康体检者. 均有完整的临床信息登记, 其中包括性别、年龄、种族、蒙特利尔分类、梅奥评分(Mayo score)、CRP、ESR、外科手术情况及用药史等. UC诊断严格按照2012年中国炎症性肠病诊断与治疗共识意见. UC疾病活动性的评估和分级来自于Mayo score. 排除标准: (1)合并糖尿病、痛风、骨质疏松症等代谢性疾病者; (2)合并严重心、肝、肾等重要脏器和血液、内分泌系统病变者; (3)有近期输血史及服用激素、免疫抑制剂药物的病例; (4)怀孕、哺乳或不能排除妊娠可能的女性. HCs为经体检不存在UC或者其他炎症性疾病的健康人群自愿参加. 人口统计信息与UC病例组相似. 本研究得到本医院伦理委员会批准后实施. (API)液相色谱-质谱联用仪(美国AB SCIEX公司), 配有Agilent 1200 SL自动进样器、Waters色谱柱柱(2.1 mm × 150 mm i.d., 3 μm). Analyst v.1.5.1 (应用的生物系统/MDS SCIEX)用于数据的获取和分析. 未标记的Trp, 2H5-Trp购自Sigma-Aldrich公司, 样品制备和LC-MS色谱纯的溶剂购自德国Fisher Scientific和Merck公司. 实验用水皆为Milli-Q水.

1.2 方法 采集符合纳入标准的UC患者及HCs基本信息, 并对其资料统计归纳整理. UC期患者统一经规律5-氨基水杨酸(美沙拉嗪)治疗后转为缓解期. 收集UC患者疾病活动期与缓解期不同时期的血清以及HCs晨起空腹静脉血, 血液标本被存取登记, 经离心处理获得血清, 将其保存在-80 °C的冰箱里. 血清样本于室温下解冻后, 将10 μL内标物加入50 μL血清中, 并用0.1%甲酸的水溶液(体积/体积)稀释至100 μL, 然后将400 μL的冷甲醇加入此混合溶液中涡旋, 于-20 °C下冷

■研究前沿
最近有证据表明, 氨基酸在保持肠道健康中起着重要作用, 因此对溃疡性结肠炎患者氨基酸代谢的研究已成为国内外热点课题.

■ 相关报道

Hisamatsu等研究发现, 溃疡性结肠炎患者血浆色氨酸水平显著低于健康志愿者。

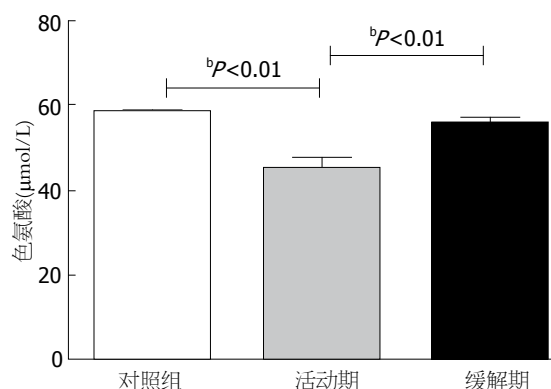


图1 对照组(HCs)、活动期UC组、缓解期UC组血清Trp水平差异分析. 活动期UC患者血清Trp水平显著低于活动期UC患者和HCs($P < 0.05$). 缓解期UC患者组与HCs无明显差异。

冻1 h, 以确保蛋白质完全沉淀. 然后离心(10000 r/min, 10 min)、氮气吹干, 将残余物再次溶解于100 μ L 0.1%甲酸的水溶液中, 再次离心(10000 r/min, 5 min), 取上清液进样检测。

统计学处理 根据LC-MS/MS色氨酸的峰面积与内标峰面积的比值, 由线性得到色氨酸的浓度值. 使用Graphpad Prism 5.0以及SPSS18.0软件进行数据的差异分析统计处理及绘图, 统计方法包括单因素方差分析(one-way analysis of variance)、配对的Student's *t*-test (paired Student's *t*-test)以及Spearman等级相关分析. 数据如无特殊说明, 均用mean \pm SD表示. $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 样本特征 本研究中疾病组与健康对照组人群特征如表1. 各个研究组中年龄、性别、饮食及生活方式没有显著差异. 活动期和缓解期血清样本均来自于同一个UC患者. 20例患者中均未接受过外科手术治疗, 疾病组用药情况包括: 5-氨基水杨酸(20例)、皮质类固醇(0例)、巯基嘌呤(0例)、抗代谢药物(0例)、抗肿瘤坏死因子(0例)。

2.2 各组间血清Trp差异性分析 UC患者处于疾病活动期的血清Trp水平(44.89 ± 12.11)与健康对照组的血清Trp水平(58.59 ± 5.986)相比明显下调, 与处于疾病缓解期患者的血清Trp水平($55.29 \mu\text{mol/L} \pm 9.497 \mu\text{mol/L}$)相比明显下调, 差异均有统计学意义($P < 0.05$), UC患者处于缓解期的血清Trp水平与健康对照组的血清Trp水平相比无明显变化(图1)。

2.3 UC组活动期患者血清Trp与炎症因子相关性

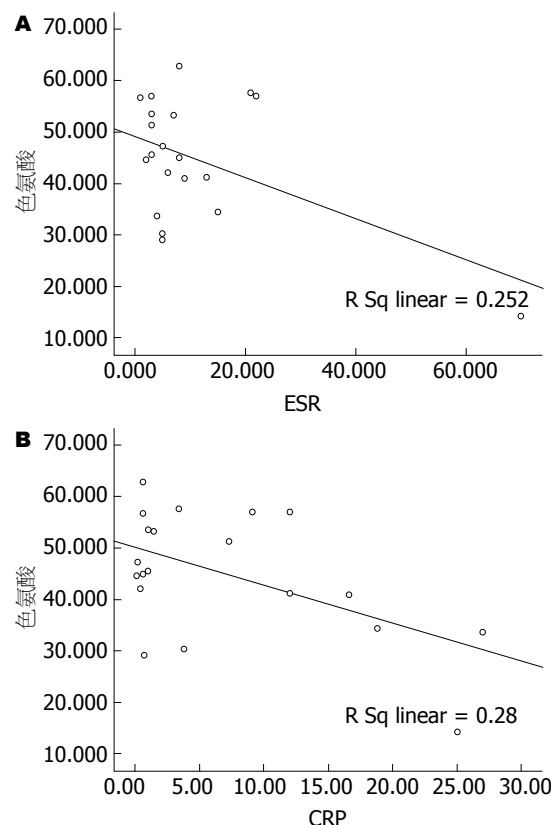


图2 活动期UC组血清Trp与炎症因子(ESR/CRP)相关性分析. A: UC组活动期患者血清Trp水平与血清ESR水平呈负相关($r = -0.502$, $P < 0.05$); B: UC组活动期患者血清Trp水平与血清CRP水平呈负相关($r = -0.502$, $P < 0.05$).

分析 UC组活动期患者血清Trp水平与血清ESR水平呈负相关($r = -0.502$, $P < 0.05$, 图2A); UC组活动期患者血清Trp水平与血清CRP($r = -0.502$, $P < 0.05$)(图2B)水平呈负相关。

2.4 UC活动期治疗后转为缓解期血清Trp水平变化 UC组活动期患者经治疗后转为缓解期, 其Trp的水平均有不同程度上调, 有统计学意义($P < 0.0001$)(图3)。

3 讨论

本实验中, 我们检测了20例UC患者活动期、缓解期血清和相应20例健康志愿者血清中Trp水平. 结果显示活动期患者血清Trp与UC缓解期患者及健康志愿者血清色氨酸之间差异均存在显著统计学意义($P < 0.05$), 而缓解期患者血清中Trp水平与健康志愿者之间无明显差异($P > 0.05$). Trp是人体八种必需氨基酸之一, 当人体摄入色氨酸后, 其将进入不同的代谢途径中, 包括: 蛋白质合成代谢以及Trp分解代谢. 其中Trp分解代谢途径包括: 五羟色胺途径(约占95%^[9]), 犬尿氨酸途径(约占1%-2%^[10]), 以及细菌分解途径. 这

表 1 本研究中溃疡性结肠炎组(活动期和缓解期)与健康对照组人群特征

	溃疡性结肠炎组		健康对照组
	活动期	缓解期	
数量(男/女)	20(13/7)	—	20(13/7)
平均年龄(范围)	38.8(23–59)	—	36.55(23–57)
疾病平均持续时间(年)	2.67	—	—
疾病持续中位时间(年)	2.115(0.1–10)	—	—
过去一年平均发病次数	1.15(0–2)	—	—
疾病发病部位(<i>n</i>)			
左半结肠	6	—	—
全结肠	2	—	—
直肠/乙状结肠	12	—	—
外科手术(男/女)	0	—	—
改良的Mayo Score			
平均值	9.1	1.05	—
中位值(范围)	10(6–12)	1(0–2)	—
主要用药(<i>n</i>)		—	—
氨基水杨酸类药物	20	20	—
皮质类固醇	0	—	—
巯基嘌呤	0	—	—
抗代谢药物	0	—	—
抗肿瘤坏死因子	0	—	—
血沉(ESR)	10.65(1–70)	4.90(1–13)	4.65(1–10)
C-反应蛋白(CRP)	7.08(0.1–25)	0.93(0.4–2.1)	0.81(0.1–1.6)

■创新盘点

本研究对溃疡性结肠炎患者(包括活动期和缓解期)与健康志愿者血清色氨酸进行了定量分析,探讨血清色氨酸水平在溃疡性结肠炎发生、发展中可能的作用和临床意义,为临床对该疾病的诊断、评估和治疗提供参考文献。

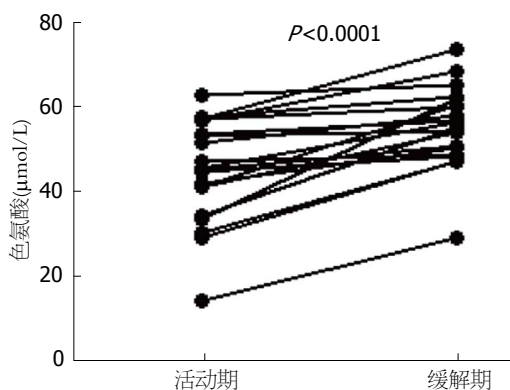


图 3 UC活动期患者经治疗后转为缓解期血清Trp水平变化. UC组活动期患者经治疗后转为缓解期,其Trp的水平均有不同程度上调($44.89 \mu\text{mol/L} \pm 12.11 \mu\text{mol/L}$ vs $55.29 \mu\text{mol/L} \pm 9.497 \mu\text{mol/L}$),有统计学意义($P<0.0001$).

些途径共同维持人体内环境平衡,使人体保持健康状态.同时,Trp也作为一种药物,被广泛应用于多种疾病的治疗中.例如:补充Trp可以降低妇女经前期综合征的情绪不稳、紧张易激惹症状^[11],改善睡眠障碍患者的睡眠质量^[12],治疗抑郁症^[13],以及可以作为吸烟者戒烟的辅助治疗手段^[14].最近研究证实,Trp的代谢途径能够调节胃肠道功能,而当Trp代谢情况发生改变时,将会导致胃肠道功能紊乱并致病,如炎症性肠病、肠

易激综合征、腹腔疾病和憩室炎^[8].已有研究中,UC患者Trp水平显著低于健康志愿者水平^[15,16].同样的结果也在UC动物模型中出现^[17,18].但研究者均未对疾病活动期与缓解期严格区分后研究.本实验通过比较Trp在UC患者不同时期(活动期、缓解期)及健康志愿者之间的差异,更进一步说明了Trp在UC发生、发展中起到关键性的作用.实验中,我们还发现处于活动期的UC患者血清Trp水平与炎症标志物ESR和CRP呈负相关($P<0.05$).基于UC活动期和缓解期血清Trp的变化,以及活动期Trp水平与炎症标志物的相关性结果,UC患者血清Trp水平可能对于监测UC的活动性具有重要意义.这也充分说明了Trp在UC研究中的价值.

另外,我们还对UC患者治疗前后血清Trp水平一一对应进行比较(治疗前即为活动期,治疗后即为缓解期).结果表明,UC患者治疗前后血清Trp水平均有不同程度的增加,说明疾病炎症缓解后,Trp水平相应提高,即Trp代谢过程在UC治疗过程中发生着相应的变化.那么UC活动期患者是否能够通过补充Trp,改变Trp的代谢过程来抑制疾病炎症,达到缓解炎症活动性的目的呢?2010年,Kim等^[19]用Trp灌胃大肠炎

■应用要点

本文证实血清色氨酸在溃疡性结肠炎患者(包括活动期和缓解期)与健康志愿者的水平差异、血清色氨酸与该疾病活动期炎症生物标志的相关性以及治疗前后血清色氨酸的变化情况。检测溃疡性结肠炎患者血清色氨酸水平对临床对该疾病的诊疗及评估具有重要的意义。

模型动物,使其肠道炎症程度减轻,康复时间缩短,减少炎症促炎因子肿瘤坏死因子- α 、白介素-6(interleukin-6, IL-6)、IFN- γ 、IL-12p40、IL-1 β 和IL-17以及IL-8和等的表达。从蛋白和基因表达水平上证明了Trp在UC发病机制中起到关键性作用,是治疗UC的有效免疫调节剂。2013年,Shizuma等^[20]也证实了给予UC模型鼠Trp治疗可以缓解UC模型鼠的炎症症状。Trp具有炎症调节作用,这可能与Trp家族的一些代谢产物是自由基清除剂有关^[21-23]。但目前为止,给予UC患者补充Trp是否能治疗UC患者尚无定论。我们希望本实验的结果同时也能为Trp治疗UC方面的研究提供相关依据。

总之,Trp在UC发生、发展中起到关键性的作用。通过对健康志愿者以及UC患者疾病不同时期Trp水平的比较,为更好的了解UC发病机制,疾病活动性检测以及疾病治疗提供了新的思路。未来,我们将还需要对UC患者Trp的代谢途径进行更进深入的研究,以期更加明确疾病的发病机制,更好的检测疾病的发展,从而发现UC更有效的治疗方法。

4 参考文献

- 1 Strober W, Fuss I, Mannon P. The fundamental basis of inflammatory bowel disease. *J Clin Invest* 2007; 117: 514-521 [PMID: 17332878 DOI: 10.1172/JCI30587]
- 2 Wang Y, Ouyang Q. Ulcerative colitis in China: retrospective analysis of 3100 hospitalized patients. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22: 1450-1455 [PMID: 17716349 DOI: 10.1111/j.1440-1746.2007.04873.x]
- 3 Chow DK, Leong RW, Tsoi KK, Ng SS, Leung WK, Wu JC, Wong VW, Chan FK, Sung JJ. Long-term follow-up of ulcerative colitis in the Chinese population. *Am J Gastroenterol* 2009; 104: 647-654 [PMID: 19262521 DOI: 10.1038/ajg.2008.74]
- 4 Ooi CJ, Fock KM, Makharia GK, Goh KL, Ling KL, Hilmi I, Lim WC, Kelvin T, Gibson PR, Gearry RB, Ouyang Q, Sollano J, Manatsathit S, Rerknimitr R, Wei SC, Leung WK, de Silva HJ, Leong RW. The Asia-Pacific consensus on ulcerative colitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2010; 25: 453-468 [PMID: 20370724 DOI: 10.1111/j.1440-1746.2010.06241.x]
- 5 Bossuyt X. Serologic markers in inflammatory bowel disease. *Clin Chem* 2006; 52: 171-181 [PMID: 16339302 DOI: 10.1373/clinchem.2005.058560]
- 6 胡品津, 钱家鸣, 吴开春, 冉志华, 炎症性肠病诊断与治疗的共识意见(2012年·广州). *中华内科杂志* 2012; 51: 818-831
- 7 Wang WW, Qiao SY, Li DF. Amino acids and gut function. *Amino Acids* 2009; 37: 105-110 [PMID: 18670730 DOI: 10.1007/s00726-008-0152-4]
- 8 Keszthelyi D, Troost FJ, Masclee AA. Understanding the role of tryptophan and serotonin metabolism in gastrointestinal function. *Neurogastroenterol Motil* 2009; 21: 1239-1249 [PMID: 19650771 DOI: 10.1111/j.1365-2982.2009.01370.x]
- 9 Peters JC. Tryptophan nutrition and metabolism: an overview. *Adv Exp Med Biol* 1991; 294: 345-358 [PMID: 1772073]
- 10 Bender DA. Biochemistry of tryptophan in health and disease. *Mol Aspects Med* 1983; 6: 101-197 [PMID: 6371429]
- 11 Steinberg S, Annable L, Young SN, Liyanage N. A placebo-controlled study of the effects of L-tryptophan in patients with premenstrual dysphoria. *Adv Exp Med Biol* 1999; 467: 85-88 [PMID: 10721042]
- 12 Schneider-Helmert D, Spinweber CL. Evaluation of L-tryptophan for treatment of insomnia: a review. *Psychopharmacology (Berl)* 1986; 89: 1-7 [PMID: 3090582]
- 13 Joyce PR, Porter RJ, Mulder RT, Luty SE, McKenzie JM, Miller AL, Kennedy MA. Reversed diurnal variation in depression: associations with a differential antidepressant response, tryptophan: large neutral amino acid ratio and serotonin transporter polymorphisms. *Psychol Med* 2005; 35: 511-517 [PMID: 15856721]
- 14 Bowen DJ, Spring B, Fox E. Tryptophan and high-carbohydrate diets as adjuncts to smoking cessation therapy. *J Behav Med* 1991; 14: 97-110 [PMID: 1880796]
- 15 Hisamatsu T, Okamoto S, Hashimoto M, Muramatsu T, Andou A, Uo M, Kitazume MT, Matsuoka K, Yajima T, Inoue N, Kanai T, Ogata H, Iwao Y, Yamakado M, Sakai R, Ono N, Ando T, Suzuki M, Hibi T. Novel, objective, multivariate biomarkers composed of plasma amino acid profiles for the diagnosis and assessment of inflammatory bowel disease. *PLoS One* 2012; 7: e31131 [PMID: 22303484 DOI: 10.1371/journal.pone.0031131]
- 16 Ooi M, Nishiumi S, Yoshie T, Shiomi Y, Kohashi M, Fukunaga K, Nakamura S, Matsumoto T, Hatano N, Shinohara M, Irino Y, Takenawa T, Azuma T, Yoshida M. GC/MS-based profiling of amino acids and TCA cycle-related molecules in ulcerative colitis. *Inflamm Res* 2011; 60: 831-840 [PMID: 21523508 DOI: 10.1007/s00011-011-0340-7]
- 17 Shiomi Y, Nishiumi S, Ooi M, Hatano N, Shinohara M, Yoshie T, Kondo Y, Furumatsu K, Shiomi H, Kutsumi H, Azuma T, Yoshida M. GCMS-based metabolomic study in mice with colitis induced by dextran sulfate sodium. *Inflamm Bowel Dis* 2011; 17: 2261-2274 [PMID: 21287666 DOI: 10.1002/ibd.21616]
- 18 Schicho R, Nazyrova A, Shaykhtudinov R, Duggan G, Vogel HJ, Storr M. Quantitative metabolomic profiling of serum and urine in DSS-induced ulcerative colitis of mice by (1)H NMR spectroscopy. *J Proteome Res* 2010; 9: 6265-6273 [PMID: 20886908 DOI: 10.1021/pr100547y]
- 19 Kim CJ, Kovacs-Nolan JA, Yang C, Archbold T, Fan MZ, Mine Y. L-Tryptophan exhibits therapeutic function in a porcine model of dextran sodium sulfate (DSS)-induced colitis. *J Nutr Biochem* 2010; 21: 468-475 [PMID: 19428234 DOI: 10.1016/j.jnutbio.2009.01.019]
- 20 Shizuma T, Mori H, Fukuyama N. Protective effect of tryptophan against dextran sulfate sodium-induced experimental colitis. *Turk J Gastroenterol* 2013; 24: 30-35 [PMID: 23794341 DOI: 10.4318/tjg.2013.0558]
- 21 Reiter RJ, Tan DX, Cabrera J, D'Arpa D. Melatonin and tryptophan derivatives as free radical scavengers.

- gers and antioxidants. *Adv Exp Med Biol* 1999; 467: 379-387 [PMID: 10721079]
- 22 Goda K, Hamane Y, Kishimoto R, Ogishi Y. Radical scavenging properties of tryptophan metabolites. Estimation of their radical reactivity. *Adv Exp Med Biol* 1999; 467: 397-402 [PMID: 10721081]
- 23 Kaszaki J, Palásthy Z, Erczes D, Rácz A, Torday C, Varga G, Vécsei L, Boros M. Kynurenic acid inhibits intestinal hypermotility and xanthine oxidase activity during experimental colon obstruction in dogs. *Neurogastroenterol Motil* 2008; 20: 53-62 [PMID: 17973632 DOI: 10.1111/j.1365-2982.2007.00989.x]

■同行评价
本文具有一定指导意义。

编辑 田滢 电编 鲁亚静



CacyBP/SIP在不同大肠组织中的表达及临床意义

翟惠虹, 冯珊珊, 仇长青, 武婧, 王安萍

■背景资料

钙周期素结合蛋白[calcyclin (S100A6)-binding-protein, CacyBP]首先发现是S100蛋白的靶蛋白, 随后在泛素化降解通路中发现其可以与Siah-1(Siah-1 interacting protein)相互作用, 因此命名为CacyBP/SIP。目前发现其与胃癌、肾癌、胰腺癌及乳腺癌相关。我们前期研究发现, 其在多种正常组织中低表达, 肿瘤组织中高表达。因此, 本研究拟进一步研究CacyBP/SIP在不同大肠组织中的表达, 探讨其在大肠癌发生发展中的作用。

翟惠虹, 仇长青, 武婧, 王安萍, 宁夏医科大学总医院消化内科宁夏回族自治区银川市750004
冯珊珊, 宁夏医科大学总医院外科学研究室宁夏回族自治区银川市750004
翟惠虹, 副教授, 主要从事大肠癌的临床与基础研究
国家自然科学基金资助项目, No. 81072040
作者贡献分布: 此课题设计、数据分析、制图由翟惠虹完成; 论文写作由翟惠虹与冯珊珊完成; 仇长青与武婧完成免疫组织化学检测; 王安萍完成Western blot检测。
通讯作者: 翟惠虹, 副教授, 750004, 宁夏回族自治区银川市兴庆区胜利街804号, 宁夏医科大学总医院消化内科。
zhaihuihong@263.net
电话: 0951-6744281 传真: 0951-6744200
收稿日期: 2013-11-09 修回日期: 2014-01-23
接受日期: 2014-01-24 在线出版日期: 2014-03-28

Clinical significance of expression of CacyBP/SIP in colorectal tissues

Hui-Hong Zhai, Shan-Shan Feng, Chang-Qing Qiu, Jing Wu, An-Ping Wang

Hui-Hong Zhai, Chang-Qing Qiu, Jing Wu, An-Ping Wang, Department of Gastroenterology, General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, Ningxia Hui Autonomous Region, China
Shan-Shan Feng, Surgery Laboratory, General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, Ningxia Hui Autonomous Region, China
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 81072040

Correspondence to: Hui-Hong Zhai, Associate Professor, Department of Gastroenterology, General Hospital of Ningxia Medical University, 804 Shengli Road, Xingqing District, Yinchuan 750004, Ningxia Hui Autonomous Region, China. zhaihuihong@263.net

Received: 2013-11-09 Revised: 2014-01-23
Accepted: 2014-01-24 Published online: 2014-03-28

Abstract

AIM: To detect the expression of CacyBP/SIP [Cyclin (S100A6)-binding protein/Siah-1 interacting protein] in normal colorectal tissue, colorectal hyperplastic polyps, colorectal adenoma and colorectal cancer.

METHODS: Immunohistochemistry was used to analyze the expression of CacyBP/SIP in 10 normal colorectal tissue samples, 17 samples of colorectal hyperplastic polyps, 26 samples of colorectal adenomas and 50 samples of colorectal cancer. Four frozen tissue samples of colorec-

tal cancer and adjacent noncancerous tissues were used in Western blot to detect CacyBP/SIP expression. Immunohistochemical results were compared against patient data and pathological analysis of tissue slices. Slices were assessed for associations with gender, age, degree of tumor differentiation and TNM stage.

RESULTS: CacyBP/SIP was detected in 0 (0/10) of normal tissue samples, 17.7% (7/26) of colorectal hyperplastic polyps, 26.9% (7/26) of colorectal adenomas, and 52% (26/50) of colorectal cancer tissues by immunohistochemistry. The expression of CacyBP/SIP in colorectal adenomas and colorectal cancer tissues was higher than that in the normal colon tissue and colorectal hyperplastic polyps (0 vs 26.9%, 0 vs 52%, 17.7% vs 26.9%, 17.7% vs 52%, $P < 0.05$ for all). The expression of CacyBP/SIP was also higher in cancerous tissue than in adjacent noncancerous colorectal tissue, as revealed by Western blot ($P < 0.05$). There was no association between CacyBP/SIP expression and patient age, gender, degree of tumor differentiation or TNM stage ($P > 0.05$ for all).

CONCLUSION: These results suggest that CacyBP/SIP may be involved in the progression of colorectal cancer.

© 2014 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

Key Words: CacyBP/SIP; Colorectal cancer; Immunohistochemistry; Western blot

Zhai HH, Feng SS, Qiu CQ, Wu J, Wang AP. Clinical significance of expression of CacyBP/SIP in colorectal tissues. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(9): 1328-1333 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/1328.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i9.1328>

摘要

目的: 检测钙周期素结合蛋白[calcyclin (S100A6)-binding-protein, CacyBP/Siah-1 interacting protein, SIP]在大肠各种组织中的表达, 探讨

■同行评议者

刘占举, 教授, 同济大学附属上海市第十人民医院

其在大肠癌发生发展中的作用。

方法: 采用免疫组织化学技术检测10例正常大肠组织、17例大肠增生性息肉、26例大肠腺瘤和50例大肠癌组织中CacyBP/SIP的表达。采用Western blot检测3例大肠癌及相应癌旁正常组织中CacyBP/SIP的表达。并分析CacyBP/SIP与大肠癌临床病理资料之间的关系。

结果: CacyBP/SIP在正常大肠、大肠增生性息肉、大肠腺瘤及大肠癌组织中的表达率分别为0(0/10)、17.7%(3/17)、26.9%(7/26)、52.0%(26/50), CacyBP/SIP在大肠增生性息肉中的表达与正常大肠组织中的表达比较无统计学差异($P>0.05$), 而在大肠腺瘤组织、大肠癌组织中的表达与正常大肠组织比较差异均有统计学意义($P<0.05$)。Western blot显示CacyBP/SIP在大肠癌组织中的表达明显高于其相应癌旁正常组织, 差异有统计学意义($P<0.05$)。CacyBP/SIP在大肠癌组织中的表达与大肠癌患者的性别、年龄、组织分化程度、TNM分期之间比较均无统计学差异($P>0.05$)。

结论: CacyBP/SIP在大肠腺瘤组织、大肠癌组织中高表达, 可能参与了大肠癌的发生发展。

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词: CacyBP/SIP; 大肠癌; 免疫组织化学; 蛋白质免疫印迹

核心提示: 钙周期素结合蛋白CacyBP/SIP[calcyclin(S100A6)-binding-protein, CacyBP, Siah-1 interacting protein, SIP]是泛素化降解通路中的一员, 在G₁/S期转换中具有重要作用。本文研究发现: 与正常大肠、大肠增生性息肉中的表达相比, CacyBP/SIP在大肠腺瘤、大肠癌中的表达明显升高, 提示其可能参与大肠癌的发生发展。

翟惠虹, 冯珊珊, 仇长青, 武婧, 王安萍. CacyBP/SIP在不同大肠组织中的表达及临床意义. 世界华人消化杂志 2014; 22(9): 1328-1333 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/1328.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v22.i9.1328>

0 引言

钙周期素结合蛋白CacyBP[calcyclin (S100A6)-binding-protein, CacyBP]是1998年在小鼠艾氏腹水瘤中发现的、以Ca²⁺浓度依赖的方式结合S100A6蛋白^[1]。2001年, 从人cDNA文库中钓到一个可以和人Siah-1相互作用的蛋白(Siah-1

interacting protein, SIP), 经序列比对发现, 人SIP和鼠CacyBP基因93%相同, 认为SIP即为CacyBP, 从此命名为CacyBP/SIP^[2]。

研究发现, CacyBP/SIP可以与S100蛋白家族结合, 如S100 A6蛋白^[3]; 可以与细胞骨架蛋白结合, 如tubulin、actin、tropomyosin(ERK1/2激酶)、ERK1/2^[4-6]。目前关于CacyBP/SIP的功能发现: CacyBP/SIP可以参与细胞的泛素化调控^[7]、神经细胞和心肌细胞的分化^[4,8]、调控凋亡^[9]等。另外还发现, CacyBP/SIP参与了胃癌^[10]、肾癌^[11]、胰腺癌^[12]、乳腺癌^[13-15]等肿瘤的发生发展。但是CacyBP/SIP在大肠癌中的病理作用仍不清楚。

本研究小组前期通过自制的CacyBP/SIP单克隆抗体(mAb)^[16]对其在正常组织及肿瘤组织中的表达进行了研究, 发现: CacyBP/SIP在正常大肠黏膜组织中不表达, 而在结肠癌中高表达^[17]。进一步的研究发现, CacyBP/SIP在结肠癌细胞中具有依赖Ca²⁺浓度的核转位现象^[18]。因此认为CacyBP/SIP可能参与了大肠癌的发生发展过程, 但需进一步验证。

为此, 本研究对CacyBP/SIP在大肠组织、大肠息肉、大肠腺瘤以及大肠癌中的表达进行检测, 并分析其表达与大肠癌临床病理资料之间的关系, 探讨其在大肠癌发生发展中的作用, 为大肠癌分子诊断和治疗提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料 收集2006-06/2008-02在宁夏医科大学总医院手术切除的50例大肠癌石蜡标本, 结肠镜及病理诊断的26例腺瘤组织、17例增生性息肉石蜡标本、10例大肠正常组织石蜡标本。大肠癌患者50例, 男29例, 女21例。用于Western blot检测的3例手术切除标本, 均经病理诊断为大肠癌。抗CacyBP/SIP单克隆抗体为实验室冻存^[13]; SP超敏免疫组织化学试剂盒、DAB显色试剂盒(北京中山公司); HRP及酶标二抗(DAKO公司)。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学染色: 取大肠癌组织、腺瘤组织、增生性息肉组织及正常组织石蜡标本, 连续3 μm切片, 采用免疫组织化学SP法检测CacyBP/SIP的表达情况, 具体操作参照SP试剂盒说明进行, PBS代替一抗作阴性对照, 以已知CacyBP/SIP阳性组织切片做阳性对照。

1.2.2 免疫组织化学结果判定: 由两位病理医师采用双盲法独立评估。随机于高倍镜下取10个

■ 研发前沿

CacyBP/SIP在正常大肠组织、大肠增生性息肉中低表达, 在大肠腺瘤及大肠癌中高表达, 表明其参与了大肠癌的发生过程, 可能是大肠癌早期发生的分子之一, 可以作为早期诊断早期治疗的靶标之一。

■ 相关报道

CacyBP/SIP在胃癌细胞、肾癌细胞中低表达, 增强其表达则抑制肾癌细胞生长; 在胰腺癌组织中高表达, 且与胰腺癌的肿瘤分期、转移呈正相关; 在乳腺癌的研究中目前结果不一, 有研究表明CacyBP/SIP在乳腺癌中的表达低于正常组织, 且与肿瘤的分化程度呈负相关; 但另有研究表明, CacyBP/SIP在乳腺癌组织中高表达, 且与预后呈正相关; 最新的研究表明: 在应用DMBA制备的乳腺癌鼠模型中发现, 随着乳腺癌的进展, CacyBP/SIP表达逐渐升高。

表 1 CacyBP/SIP在大肠不同组织中的表达

大肠不同组织	n	染色结果阳性数	阳性率(%)	P值
正常大肠黏膜	10	0	0	
增生性息肉	17	3	17.7	>0.05
大肠腺瘤	26	7	26.9	<0.05
大肠癌	50	26	52.0	<0.05

不同视野, 各计数100个细胞, 同时对染色强度及阳性细胞所占百分比进行评分。无色为0分, 淡黄色为1分, 棕黄色为2分, 棕褐色为3分; 小于总数的5%为0分, 5%-25%为1分, 26%-50%为2分, >50%为3分; 染色强度得分与阳性细胞数得分相乘, 0分为阴性(-), 1-3分为弱阳性(+), 4-5分为中度阳性(++), ≥6分为强阳性(+++). 胞浆、胞核染色均计为阳性细胞。

1.2.3 Western blot检测: 参照Santa Cruz公司提供的方法, 用RIPA组织裂解液裂解大肠癌及癌旁组织, 提取总蛋白, 按照蛋白定量试剂盒说明测定蛋白浓度, 取相同的蛋白上样量行SDS-PAGE, 电转移至NC膜, 封闭后, 加入一抗(抗hCacyBP/SIP单抗, 1:100)及用HRP标记的山羊抗小鼠IgG(1:2000), 按常规方法进行ECL底物化学发光, 曝光, 显影, 以 β -actin为内参。化学发光试剂检测蛋白条带, 测定各条带积分吸光度(A)值, 采用Image ProPlus图像分析系统对蛋白条带的相对深度进行分析。

统计学处理 采用SPSS18.0统计分析软件包进行统计分析, 采用 χ^2 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CacyBP/SIP在不同大肠组织中的表达 免疫组织化学结果: CacyBP/SIP在大肠癌组织、大肠腺瘤组织、大肠增生性息肉组织中的肠上皮细胞中均存在一定程度的表达, 在大肠正常组织中不表达, 主要分布于肠上皮细胞的细胞浆和细胞核, 呈棕黄色颗粒或线网状分布(图1)。CacyBP/SIP在大肠正常组织中无表达(0/10); 大肠增生性息肉组织中表达率为17.7%(3/17); 大肠腺瘤组织的表达率为26.9%(7/26); 在大肠癌组织中的表达最高为52.0%(26/50)。CacyBP/SIP在大肠增生性息肉中的表达与正常大肠组织相比, 差异无统计学意义($P>0.05$); 而CacyBP/SIP在大肠腺瘤组织、大肠癌组织中的表达率与正常大肠组织相比, 差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)(表

表 2 CacyBP/SIP表达与大肠癌临床病理参数的关系 n(%)

临床及病理学特征	n	阳性数	阳性率(%)	P值
性别				>0.05
男	29	17	58.6	
女	21	9	42.9	
年龄(岁)				>0.05
<50	18	11	61.1	
≥50	32	15	46.9	
分化程度				>0.05
高分化	19	11	57.9	
中分化	17	12	70.6	
低分化	14	9	64.3	
TNM分期				>0.05
I + II	23	15	65.2	
III + IV	27	11	40.7	

1). 与正常大肠组织、大肠增生性息肉及大肠腺瘤组织相比, CacyBP/SIP在大肠癌组织中的表达显著升高($P<0.05$)(表1, 图1), 且CacyBP/SIP在肠上皮细胞的细胞核中表达(图1P), 提示CacyBP/SIP参与了大肠从正常结肠黏膜-息肉-腺瘤-癌的发生发展过程。

2.2 CacyBP/SIP在大肠癌旁组织和大肠癌中的表达 3例大肠癌组织及相应癌旁组织中CacyBP/SIP的蛋白表达情况, 发现: CacyBP/SIP在大肠癌组织中均表达, 而在相应癌旁组织中均表达下调(图2A), 且差异均有统计学意义($P<0.05$)(图2B)。进一步从蛋白水平上提示CacyBP/SIP参与了大肠癌的发生。

2.3 CacyBP/SIP表达与大肠癌临床病理参数的关系 50例大肠癌的临床病理数据分析表明, CacyBP/SIP在大肠癌中的阳性表达与患者的性别、年龄、组织分化程度和TNM分期均无关, 差异均无统计学意义($P>0.05$), (表2)。

3 讨论

本研究小组前期发现: CacyBP/SIP在多种正常组织和肿瘤组织中表达^[17]。现有研究提示, CacyBP/SIP在胃癌细胞中低表达, 通过下调 β -catenin的表达来抑制胃癌细胞的增殖和侵袭^[10]; 在肾癌细胞中亦是低表达, 增强其表达则抑制肾癌细胞生长^[11]; 在胰腺癌组织中高表达, 且与胰腺癌的肿瘤分期、转移呈正相关^[12]; 在乳腺癌的研究中目前结果不一, 有研究表明CacyBP/SIP在乳腺癌中的表达低于癌组织, 且与肿瘤的分化程度呈负相关, 在乳腺癌细胞中降低其表达, 则可增强乳腺癌细胞的增殖及侵袭^[13]; 但另有研

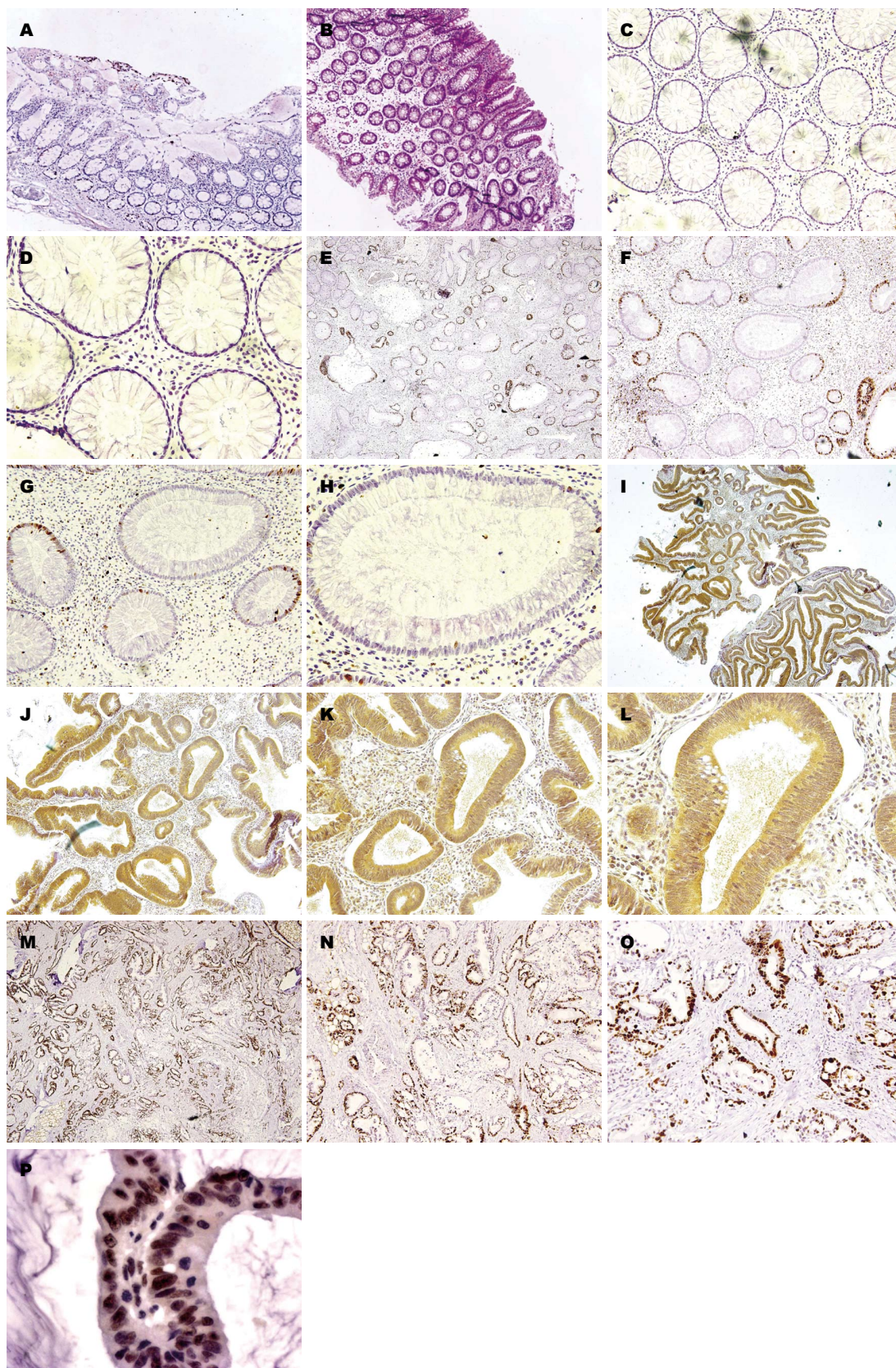


图 1 CacyBP/SIP 在不同大肠组织中的表达. A: 正常大肠黏膜CacyBP表达阴性(SP × 40); B: 正常大肠黏膜CacyBP表达阴性(HE染色); C: 正常大肠黏膜CacyBP表达阴性(SP × 100); D: 正常大肠黏膜CacyBP表达阴性(SP × 200); E: 大肠增生性息肉CacyBP表达阴性(SP × 40); F: 大肠增生性息肉CacyBP表达阴性(SP × 100); G: 大肠增生性息肉CacyBP表达阴性(SP × 200); H: 大肠增生性息肉CacyBP表达阴性(SP × 400); I: 大肠腺瘤CacyBP表达阳性(SP × 40); J: 大肠腺瘤CacyBP表达阳性(SP × 100); K: 大肠腺瘤CacyBP表达阳性(SP × 200); L: 大肠腺瘤CacyBP表达阳性(SP × 400); M: 大肠癌CacyBP表达阳性(SP × 40); N: 大肠癌CacyBP表达阳性(SP × 100); O: 大肠癌CacyBP表达阳性(SP × 200); P: 大肠癌CacyBP表达阳性(SP × 400).

■创新盘点

本文应用不同的大肠组织, 对CacyBP/SIP在正常大肠黏膜、增生性息肉、大肠腺瘤及大肠癌中的表达进行深入研究, 为明确CacyBP/SIP在大肠癌中的作用提供了依据。

■应用要点

本研究发现CacyBP/SIP在正常结肠黏膜-息肉-腺瘤-癌的演变过程中,表达逐渐升高,且发现其在大肠癌组织细胞核染色,表明其参与大肠癌的发生过程,且具有核转位现象,可以作为早期诊断的分子。

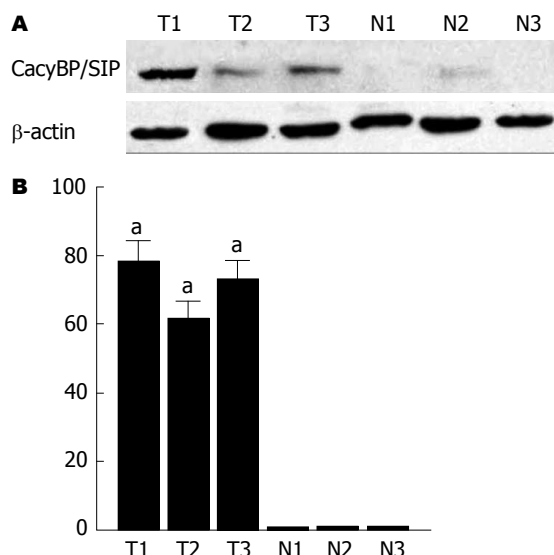


图2 CacyBP/SIP在大肠癌及相应癌旁组织中的蛋白表达。A: 免疫印迹检测大肠癌及相应癌旁组织CacyBP的蛋白表达。T: 大肠癌组织; N: 相应癌旁组织; CacyBP/SIP: 钙周期素结合蛋白/Siah结合蛋白; β -actin: 肌动蛋白 β ; B: 免疫印迹条带相对吸光度值的比较。* $P < 0.05$ vs 大肠癌癌旁组织组。

究表明, CacyBP/SIP在乳腺癌组织中高表达, 且与预后呈正相关^[14]; 最新的研究表明: 在应用二甲基苯并(α)蒽DMBA[dimethylbenz(α)anthracene]制备的乳腺癌鼠模型中发现, 随着乳腺癌的进展, CacyBP/SIP表达逐渐升高^[15]。本研究发现: CacyBP/SIP在正常大肠黏膜中不表达, 增生性息肉和腺瘤组织中表达逐渐增高, 大肠癌组织中的蛋白高表达, 在其相应的癌旁组织中不表达。结果提示, CacyBP/SIP参与了大肠癌的发生发展过程。CacyBP/SIP在不同的肿瘤中发挥的作用不同, 亦说明其作用的多样性。但是, 其在大肠癌组织的高表达, 为后续结肠癌细胞中的研究奠定了基础。

本研究结果亦发现: CacyBP/SIP在大肠癌组织中的高表达与肿瘤的分化程度、TNM分期无关。但CacyBP/SIP在胰腺癌组织中高表达, 且与肿瘤低分化, 高TNM分级有关^[14]。CacyBP/SIP在乳腺癌组织中低表达, 与肿瘤低分化、TNM分级增高, 淋巴转移及生存率降低有关^[13]。因此, CacyBP/SIP在不同肿瘤组织中所发挥的作用不同, 可能与其肿瘤类别有关; 在大肠癌中, CacyBP/SIP可能只是参与了大肠癌的发生发展, 并不是关键分子。

免疫组织化学结果提示, CacyBP/SIP在大肠癌组织的细胞核中表达。分析CacyBP/SIP的基因序列发现, CacyBP/SIP包含非经典的核定位

序列信号(nuclear localization signal, NLS, amino acids: 144-160)^[19,20]。本课题组前期研究证明CacyBP/SIP在结肠癌细胞中表达, 胃泌素可诱导CacyBP/SIP发生核转位, 具有依赖 Ca^{2+} 浓度的核转位现象^[18]。另外, 在胃癌^[12]和神经细胞瘤NB-2a细胞系^[20]中也发现CacyBP/SIP可根据不同的 Ca^{2+} 浓度出现由胞浆到胞核的转位现象。细胞核是细胞增殖、分化、代谢的调控中枢, 蛋白转位至细胞核且发生磷酸化对于传递细胞外信号, 调控下游基因表达具有重要意义。在大肠癌的组织学和细胞学水平均证实CacyBP/SIP主要存在于细胞浆, 某些时候可以转位至细胞核。由此提示, CacyBP/SIP可能作为信号分子, 可能通过入核来参与大肠癌的发生发展。

CacyBP/SIP广泛存在于哺乳动物的组织和细胞中, 他和S100A6蛋白结合。根据目前研究结果^[21]表明: CacyBP/SIP可以与S100A6及S100蛋白家族的其他成员, Siah-1、Skp 1、tubulin、actin、tropomyosin、ERK1/2结合。CacyBP/SIP与Siah-1、Skp 1结合在 β -catenin泛素化降解过程中发挥作用, 进而引起细胞增殖、肿瘤形成。CacyBP/SIP与tubulin、actin、tropomyosin、ERK1/2结合在细胞骨架重建、细胞分化、转录活性调控过程中发挥作用。因此, 从CacyBP/SIP的结构和功能上分析, CacyBP/SIP是通过结合不同的蛋白而在许多正常组织和病理组织中发挥不同的细胞学功能。那么, CacyBP/SIP引起大肠癌发生发展的机制为何, 他在信号通路中的作用如何, 这是我们下一步的研究方向。

4 参考文献

- Filipek A, Kuźnicki J. Molecular cloning and expression of a mouse brain cDNA encoding a novel protein target of calcyclin. *J Neurochem* 1998; 70: 1793-1798 [PMID: 9572262 DOI: 10.1046/j.1471-4159.1998.70051793.x]
- Matsuzawa SI, Reed JC. Siah-1, SIP, and Ebi collaborate in a novel pathway for beta-catenin degradation linked to p53 responses. *Mol Cell* 2001; 7: 915-926 [PMID: 11389839 DOI: 10.1016/S1097-2765(01)00242-8]
- Filipek A, Jastrzebska B, Nowotny M, Kuźnicki J. CacyBP/SIP, a calcyclin and Siah-1-interacting protein, binds EF-hand proteins of the S100 family. *J Biol Chem* 2002; 277: 28848-28852 [PMID: 12042313 DOI: 10.1074/jbc.M203602200]
- Schneider G, Nieznanski K, Kilanczyk E, Bieganski P, Kuźnicki J, Filipek A. CacyBP/SIP interacts with tubulin in neuroblastoma NB2a cells and induces formation of globular tubulin assemblies. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1773: 1628-1636 [PMID: 17916393 DOI: 10.1016/j.bbamer.2007.07.013]

- 5 Jurewicz E, Ostrowska Z, Jozwiak J, Redowicz MJ, Lesniak W, Moraczewska J, Filipek A. CacyBP/SIP as a novel modulator of the thin filament. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1833: 761-766 [PMID: 23266554 DOI: 10.1016/j.bbamcr.2012.12.010]
- 6 Kilanczyk E, Filipek S, Jastrzebska B, Filipek A. CacyBP/SIP binds ERK1/2 and affects transcriptional activity of Elk-1. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 380: 54-59 [PMID: 19166809 DOI: 10.1016/j.bbrc.2009.01.026]
- 7 Wasik U, Filipek A. The CacyBP/SIP protein is sumoylated in neuroblastoma NB2a cells. *Neurochem Res* 2013; 38: 2427-2432 [PMID: 24078263 DOI: 10.1007/s11064-013-1155-4]
- 8 Au KW, Kou CY, Woo AY, Chim SS, Fung KP, Cheng CH, Waye MM, Tsui SK. Calcyclin binding protein promotes DNA synthesis and differentiation in rat neonatal cardiomyocytes. *J Cell Biochem* 2006; 98: 555-566 [PMID: 16440310 DOI: 10.1002/jcb.20710]
- 9 Lou JR, Zhang XX, Zheng J, Ding WQ. Transient metals enhance cytotoxicity of curcumin: potential involvement of the NF-kappaB and mTOR signaling pathways. *Anticancer Res* 2010; 30: 3249-3255 [PMID: 20944094]
- 10 Ning X, Sun S, Hong L, Liang J, Liu L, Han S, Liu Z, Shi Y, Li Y, Gong W, Zhang S, Chen Y, Guo X, Cheng Y, Wu K, Fan D. Calcyclin-binding protein inhibits proliferation, tumorigenicity, and invasion of gastric cancer. *Mol Cancer Res* 2007; 5: 1254-1262 [PMID: 18171983 DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-06-0426]
- 11 Sun S, Ning X, Liu J, Liu L, Chen Y, Han S, Zhang Y, Liang J, Wu K, Fan D. Overexpressed CacyBP/SIP leads to the suppression of growth in renal cell carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 356: 864-871 [PMID: 17400182 DOI: 10.1016/j.bbrc.2007.03.080]
- 12 Chen X, Han G, Zhai H, Zhang F, Wang J, Li X, Huang S, Wang X, Fan D. Expression and clinical significance of CacyBP/SIP in pancreatic cancer. *Pancreatol* 2008; 8: 470-477 [PMID: 18765951 DOI: 10.1159/000151774]
- 13 Nie F, Yu XL, Wang XG, Tang YF, Wang LL, Ma L. Down-regulation of CacyBP is associated with poor prognosis and the effects on COX-2 expression in breast cancer. *Int J Oncol* 2010; 37: 1261-1269 [PMID: 20878073]
- 14 Wang N, Ma Q, Wang Y, Ma G, Zhai H. CacyBP/SIP expression is involved in the clinical progression of breast cancer. *World J Surg* 2010; 34: 2545-2552 [PMID: 20585948 DOI: 10.1007/s00268-010-0690-2]
- 15 Kilańczyk E, Gwoździński K, Wilczek E, Filipek A. Up-regulation of CacyBP/SIP during rat breast cancer development. *Breast Cancer* 2012 Aug 28. [Epub ahead of print] [PMID: 22926504]
- 16 Zhai H, Shi Y, Yu J, Hong L, Tang H, Wang J, Hu S, Bai F, Fan D. Establishment and characterization of calcyclin binding protein (CacyBP) monoclonal antibody. *Hybridoma (Larchmt)* 2006; 25: 91-94 [PMID: 16704310]
- 17 Zhai H, Shi Y, Jin H, Li Y, Lu Y, Chen X, Wang J, Ding L, Wang X, Fan D. Expression of calcyclin-binding protein/Siah-1 interacting protein in normal and malignant human tissues: an immunohistochemical survey. *J Histochem Cytochem* 2008; 56: 765-772 [PMID: 18443365 DOI: 10.1369/jhc.2008.950519]
- 18 翟惠虹, 陈雄, 卢媛媛, 王新, 樊代明. 结肠癌细胞中 CacyBP/SIP 的表达及核转位现象. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 3953-3957
- 19 Filipek A, Jastrzebska B, Nowotny M, Kwiatkowska K, Hetman M, Surmacz L, Wyroba E, Kuznicki J. Ca²⁺-dependent translocation of the calcyclin-binding protein in neurons and neuroblastoma NB-2a cells. *J Biol Chem* 2002; 277: 21103-21109 [PMID: 11927578 DOI: 10.1074/jbc.M111010200]
- 20 Wu J, Tan X, Peng X, Yuan J, Qiang B. Translocation and phosphorylation of calcyclin binding protein during retinoic acid-induced neuronal differentiation of neuroblastoma SH-SY5Y cells. *J Biochem Mol Biol* 2003; 36: 354-358 [PMID: 12895292]
- 21 Schneider G, Filipek A. S100A6 binding protein and Siah-1 interacting protein (CacyBP/SIP): spotlight on properties and cellular function. *Amino Acids* 2011; 41: 773-780 [PMID: 20182755 DOI: 10.1007/s00726-010-0498-2]

同行评价

CacyBP/SIP, 可以与 Siah-1, Skp 1 结合在 β -catenin 泛素化降解过程中发挥作用, 进而引起细胞增殖、肿瘤形成。与 tubulin、actin、tropomyosin、ERK 1/2 结合在细胞骨架重建、细胞分化、转录活性调控过程中发挥作用。发现 CacyBP/SIP 在细胞核染色, 提示其具有核转位现象, 同时在大肠腺瘤及大肠癌中高表达, 提示其参与了大肠癌的发生。

编辑 郭鹏 电编 鲁亚静



Survivin基因启动子区多态性与结肠癌易感性及临床意义的相关性

朱正明, 欧阳喜, 罗洪亮, 黄俊, 朱培谦

■背景资料

结肠癌是最常见的消化系恶性肿瘤之一。近年来, 随着食物结构和生活方式的改变, 我国的结肠癌发病率和死亡率呈逐年上升趋势。结肠癌的发生和发展已被证实是一个多步骤、多阶段及多基因改变参与的过程, 随着其发病机制研究的不断深入, 细胞增殖和凋亡的失衡在结直肠癌发生发展中的作用日益受到关注。

朱正明, 欧阳喜, 罗洪亮, 黄俊, 朱培谦, 南昌大学第二附属医院胃肠外科 江西省南昌市 330006

朱正明, 副教授, 主任医师, 主要从事消化系统肿瘤的诊疗、临床及基础研究。

江西省科技厅课题基金资助项目, No. 201013sb00202

作者贡献分布: 朱正明为课题负责人; 欧阳喜负责基础实验和论文的撰写; 罗洪亮、黄俊及朱培谦进行临床资料统计。

通讯作者: 朱正明, 副教授, 主任医师, 330006, 江西省南昌市民德路1号, 南昌大学第二附属医院胃肠外科。zzm8654@163.com

收稿日期: 2013-05-25 修回日期: 2013-12-28

接受日期: 2014-01-10 在线出版日期: 2014-03-28

Survivin gene promoter polymorphisms: Clinical significance and association with susceptibility to colon cancer

Zheng-Ming Zhu, Xi Ouyang, Hong-Liang Luo, Jun Huang, Pei-Qian Zhu

Zheng-Ming Zhu, Xi Ouyang, Hong-Liang Luo, Jun Huang, Pei-Qian Zhu, Department of Gastrointestinal Surgery, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China
Supported by: the Natural Science Foundation of Jiangxi, No. 201013sb00202

Correspondence to: Zheng-Ming Zhu, Associate Professor, Chief Physician, Department of Gastrointestinal Surgery, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, 1 Minde Road, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China. zzm8654@163.com

Received: 2013-05-25 Revised: 2013-12-28

Accepted: 2014-01-10 Published online: 2014-03-28

Abstract

AIM: To investigate the clinical significance of survivin gene promoter polymorphisms and their association with susceptibility to colon cancer.

METHODS: The -31G/C, -241T/C, -625G/C and -644T/C single nucleotide polymorphisms in the survivin gene promoter region were genotyped in 217 colon cancer specimens and 198 normal people specimens by PCR-RFLP.

RESULTS: The frequency of the -31G/C locus containing the G allele (CG + GG) in colon cancer patients (60.8%) was significantly lower

than that in the normal control group (60.8% vs 72.7%, $P = 0.010$, OR = 0.582, 95% CI: 0.385-0.882). The -31G/C site G variation was associated with tumor differentiation ($P = 0.019$), extent of tumor invasion ($P = 0.008$), and distant metastasis ($P = 0.0008$). Other three survivin polymorphisms had no significant differences between the colon cancer group and normal control group, and showed no significant correlation with tumor differentiation, tumor invasion, lymph node metastasis or tumor distant metastasis.

CONCLUSION: The -31G/C locus carrying the G allele significantly decreases susceptibility to colon cancer, and the G variant genotype is a protective factor against colon cancer.

© 2014 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

Key Words: Colon cancer; Polymorphism; Survivin; Gene

Zhu ZM, Ouyang X, Luo HL, Huang J, Zhu PQ. Survivin gene promoter polymorphisms: Clinical significance and association with susceptibility to colon cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(9): 1334-1340 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/1334.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i9.1334>

摘要

目的: 探讨生存素survivin基因启动子区单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)与结肠癌遗传易感性及临床意义的相关性。

方法: 采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态技术(PCR-RFLP)分别检测217例结肠癌患者与198例正常对照组的survivin基因启动子区-31G/C、-241T/C、-625G/C和-644T/C位点单核苷酸多态性。

结果: 发现-31G/C位点含G等位基因(CG+GG)的结肠癌组频率(60.8%)较正常对照组频率(72.7%)显著降低, 具有统计学意义($P = 0.010$,

■同行评议者

顾岩, 教授, 主任医师, 上海交通大学医学院附属上海第九人民医院普外科

OR = 0.582, 95%CI: 0.385-0.882); 同时, -31G/C位点G变异与肿瘤的分化程度($P = 0.019$)、肿瘤的浸润范围($P = 0.008$)及远处转移($P = 0.0008$)均相关。而*survivin*基因启动子区其他3个多态性位点各基因变异型在结肠癌组和正常对照组分布无明显差别, 在分化程度、肿瘤浸润范围、淋巴结转移、远处转移等因素上均无统计学差异。

结论: -31G/C位点携带G等位基因较不携带G等位基因患结肠癌的风险明显下降, 并且G变异基因型能显著降低结肠癌的恶性程度, 是结肠癌的保护因素。

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词: 结肠癌; 多态性; *Survivin*; 基因

核心提示: *Survivin*基因启动子区-31G/C位点携带G等位基因较不携带G等位基因患结肠癌的风险明显下降, 并且G变异基因型能显著降低结肠癌的恶性程度, 是结肠癌的保护因素。

朱正明, 欧阳喜, 罗洪亮, 黄俊, 朱培谦. *Survivin*基因启动子区多态性与结肠癌易感性及临床意义的相关性. 世界华人消化杂志 2014; 22(9): 1334-1340 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/1334.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v22.i9.1334>

0 引言

结肠癌是胃肠道中常见的恶性肿瘤, 以41-65岁发病率高, 现已成为恶性疾病的主要死因之一。在我国, 随着人口老龄化以及环境的恶化, 结肠癌发病率可能继续保持上升趋势, 严重影响着人们的身心健康。各地资料显示, 随着人民生活水平的提高, 饮食结构的改变, 结肠癌的发病率呈逐年上升趋势。国内外学者已经普遍认识到结肠癌的发生是一个多阶段发展的过程, 涉及多个癌基因的激活和抑癌基因的失活。个体遗传因素和环境的相互作用是结肠癌发生发展的主要原因^[1]。生存素(*survivin*)是凋亡抑制蛋白(*inhibition apoptosis protein*, IAP)家族的新成员, 也是这个家族中最小的成员, 由146个氨基酸组成^[2], 他广泛表达于人类的胚胎组织和恶性肿瘤组织中, 但是几乎不存在于正常的分化的细胞^[3]。*survivin*基因被公认为目前所发现的最强大的凋亡抑制基因^[4], 在抑制细胞凋亡、调节细胞周期、促进细胞增殖及细胞转化等方面均发挥着重要作用, 从而影响肿瘤的发生发展^[5-7]。单核苷酸多态性

(single nucleotide polymorphism, SNP)在基因组中具有高密度和遗传稳定性的特点, 是个体间遗传差异的主要来源, 也是肿瘤等多种基因疾病的发病基础。以SNP为研究目标将有助于揭示肿瘤的发病基础。我们从Genebank发现*survivin*基因有4个常见SNP位点: -31G/C、-241T/C、-625G/C和-644T/C, 我们推测这些位点的变异可能改变*survivin*基因的转录启动效率, 从而影响肿瘤的发生发展。本研究旨在探讨*survivin*基因启动子区SNP与结肠癌的发生发展的关系, 为结肠癌的早期诊断和个体化治疗提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料 收集2010-01/2011-10在南昌大学第二附属医院确诊为原发性结肠癌的患者外周静脉血标本217例以及正常对照组清晨外周静脉血标本198例, 各2 mL, EDTA-Na抗凝, -20 °C保存, 用于PCR检测。结肠癌组排除家族性腺瘤病和遗传性结肠癌, 正常对照组为来我院体检者, 均证实身体健康。所有结肠癌组和正常对照组均无血缘关系。收集并整理结肠癌组和正常对照组临床病理资料, 记录年龄、性别、吸烟、饮酒、家族史、肿瘤分化程度及TNM分期。结肠癌组病理分期按2003年UICC临床分期标准。本实验均得到所有对象知情同意签字, 并取得医院伦理委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 总DNA的提取: 用DNA提取试剂盒(北京全式金生物技术公司)提取每份抗凝外周血的总DNA, 操作均按说明书进行。采用紫外分光光度计(珠海黑马医学仪器有限公司)测定DNA纯度并进行定量, 波长设定为260和280 nm。

1.2.2 *survivin*基因启动子区SNP位点基因型检测: 引物设计及合成: 采用Oligo Primer 6.0软件设计, 由Invitrogen公司合成。引物序列如下: -31G/C位点: 上游引物: 5'-GACTACAACTCCCGGCACACCCCGC-3', 下游引物: 5'-CCCAGGAGGCCGGCAGTCTCACCC-3'片段长度297 bp; -241T/C: 上游引物: 5'-TGGCACCCTGTAAAGCTCTCCTG-3', 下游引物: 5'-GGGCAACGTCGGGGCAC-3', 片段长度619 bp; -644T/C: 上游引物5'-GCTGCACTCCATCCCTCCCCGGT-3', 下游引物: 5'-GGCAGAGGGTGCAGTGAGC-3', 片段长度: 185 bp; -625G/C: 上游引物5'-GTTCATTGTCTTCATGCGC-3', 下游引物5'-GGCAGAGGGTGCAGTGAGC-3', 片段长度

■ 研发前沿

*survivin*基因在肿瘤组织中被激活而参与肿瘤的发生发展并影响预后, 他的表达意味着疾病复发危险性较高和对放疗耐受。虽然目前对*survivin*的研究取得一定进展, 但仍有许多问题尚未阐明, 针对*survivin*的靶向治疗试验尚处于起步阶段。

■相关报道

多项研究表明-31G/C多态性与CDE/CHR抑制因子结合序列改变、启动子活动改变有关,是*survivin*启动子中的一个功能性SNP位点。此SNP位点的G等位基因能够形成一个CDE元件,因而影响*survivin*转录,而C等位基因不能形成此抑制元件,所以不同的等位基因型能对*survivin*表达造成不同的影响。

表 1 结肠癌流行病学相关因素频数表 $n(\%)$

变量	结肠癌组	正常对照组	P值
<i>n</i>	217	198	
性别			0.350
男	139(64.1)	118(59.6)	
女	78(35.9)	80(40.4)	
年龄(岁)			0.545
<50	33(15.2)	35(17.7)	
50-70	136(62.7)	127(64.1)	
>70	48(22.1)	36(18.2)	
吸烟史			0.006
是	131(60.4)	93(47.0)	
否	86(39.6)	105(53.0)	
饮酒史			0.018
是	77(35.5)	49(24.7)	
否	140(64.5)	149(75.3)	
肿瘤家族史			0.013
是	43(19.8)	22(11.1)	
否	174(80.2)	178(89.9)	

164 bp。在PCR反应管中依次加入ddH₂O 31.25 μL、10×PCR 缓冲液5 μL、25 mmol/L MgCl₂ 5 μL、10 mmol/L dNTPs 1 μL、上、下游引物各2.5 μL、5 U/μL Taq 酶0.25 μL、cDNA模板2.5 μL上下游引物各2.5 μL,充分混匀成50 μL PCR反应体系。94 °C变性5 min; (94 °C, 1 min; 58 °C-61 °C 30 s; 72 °C, 1 min)共35循环;最后72 °C 7 min延伸。

PCR扩增后所得产物经酶切反应后行琼脂糖凝胶电泳检测基因型。含-31G/C位点片段对应限制性内切酶为*EcoO109* I 限制性内切酶(New England Biolabs, USA),酶切反应结果判断标准为GG型: 163、134 bp, CC型: 297 bp, GC型: 163、134、297 bp; 含-241T/C位点片段对应限制性内切酶为*Hae* II 限制性内切酶(New England Biolabs, USA),酶切反应结果判断标准为CC型: 360、259 bp, TT型: 619 bp, TC型: 360、259、619 bp; 含-625G/C位点片段对应限制性内切酶为*BstU* I 限制性内切酶(New England Biolabs, USA),酶切反应结果判断标准为GG型: 145、19 bp, CC型: 164 bp, GC型: 145、19、164 bp; 含-644T/C位点片段对应限制性内切酶为*BstU* I 限制性内切酶(New England Biolabs, USA),酶切反应结果判断标准为CC型: 165、20 bp, TT型: 185 bp, TC型: 165、20、185 bp。

统计学处理 应用SPSS17.0软件进行统计分析,以优势比(odds ratio, OR)及其95%可信区间(confidence interval, CI)表示相对风险度。SNP

位点基因型进行哈迪-温伯格平衡(hardy-weinberg equilibrium, HWE)检验和连锁平衡分析。以 χ^2 检验比较结肠癌组和正常对照组之间各基因型分布的差异。采用 χ^2 检验和Fisher确切概率法统计分析各基因型与肿瘤分期、分化程度、淋巴结转移等临床病理因素的关系。所有的统计检验均为双侧概率检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 结肠癌流行病学相关因素的分析 本实验217例结肠癌组和198例正常对照组一般资料如表1。结肠癌组与正常对照组在年龄、性别因素上比较无统计学差异($P > 0.05$)。与正常对照组相比,结肠癌组在吸烟史、饮酒史、家族史及肿瘤家族史等暴露因素上有明显差异($P = 0.006$, $P = 0.018$, $P = 0.013$)。

2.2 *Survivin*基因启动子区SNP分型 所提取的各样品的DNA经紫外分光光度计检测, $A_{260/280}$ 为1.8-2.0,提示所提取DNA纯度较纯。含-31G/C位点扩增后片段为297 bp, G变异型能被*EcoO109*I 限制性内切酶酶切,故GG型产生两个片段(163、134 bp), CC型只产生一个片段(297 bp), GC型产生3个片段(163、134、297 bp)。与此类似,含-241T/C位点扩增后片段为619 bp, C变异型能被*Hae* II 限制性内切酶酶切,故CC型产生两个片段(360、259 bp), TT型只产生一个片段(619 bp), TC型产生3个片段(360、259、619 bp)。含-625G/C位点扩增后片段为164 bp, G变异型能被*BstU* I 限制性内切酶酶切,故GG型产生两个片段(145、19 bp), CC型只产生一个片段(164 bp), GC型产生3个片段(145、19、164 bp)。含-644T/C位点扩增后片段为185 bp, C变异型能被*Hae* II 限制性内切酶酶切,故CC型产生两个片段(165、20 bp), TT型只产生一个片段(185 bp), TC型产生3个片段(165、20、185 bp)。经2%琼脂糖凝胶电泳后, -31G/C、-241T/C、-625G/C和-644T/C 4个位点酶切结果与预期相符(图1)。

2.3 *Survivin*基因启动子区SNP与结肠癌易感性的相关性分析 *Survivin*基因启动子区-31G/C、-241T/C、-625G/C和-644T/C位点基因型在结肠癌组和正常对照组的分布频率如表2示。对比结肠癌组和正常对照组之间各基因型分布的差异,发现-31G/C位点含G等位基因(CG+GG)结肠癌组频率(60.8%)较正常对照组频率(72.7%)显著降低,具有统计学意义($P = 0.010$, OR = 0.582,

表 2 *survivin*基因启动子区SNP等位基因频数分布以及与结肠癌易感性分析 *n*(%)

基因型	结肠癌组	正常对照组	<i>P</i> 值	OR (95%CI)
<i>n</i>	217	120		
-31G/C				
CC	85(39.2)	54(27.3)	—	1.000(ref.)
CG	53(24.4)	56(28.3)	0.049	0.601(0.362–0.999)
GG	79(36.4)	88(44.4)	0.016	0.570(0.361–0.900)
CG+GG	132(60.8)	144(72.7)	0.010	0.582(0.385–0.882)
-241T/C				
TT	208(95.9)	194(98.0)	—	1.000(ref.)
TC	7(3.2)	4(2.0)	0.436	1.632(0.470–5.663)
CC	2(0.9)	0(0)	0.174	1.933(1.759–2.124)
TC+CC	9(4.1)	4(2.0)	0.214	2.099(0.636–6.925)
-625G/C				
CC	23(10.6)	16(8.1)	—	1.000(ref.)
CG	77(35.5)	70(35.3)	0.463	0.765(0.374–1.565)
GG	117(53.9)	112(56.6)	0.362	0.727(0.365–1.447)
CG+GG	194(89.4)	182(91.9)	0.380	0.742(0.380–1.448)
-644T/C				
TT	131(60.4)	129(65.2)	—	1.000(ref.)
TC	59(27.1)	49(24.7)	0.458	1.186(0.756–1.860)
CC	27(12.4)	20(10.1)	0.373	1.329(0.867–1.500)
TC+CC	86(39.6)	69(34.8)	0.314	1.227(0.823–1.830)

■创新盘点

本文检测了*survivin*基因启动子区4个常见SNP位点在结肠癌患者中的基因型分布情况及其与临床病理特征之间的关系,进而对*survivin*基因启动子区多态性与结肠癌易感性及临床意义的相关性进行分析。

95%CI: 0.385-0.882), 提示-31G/C位点携带G等位基因较不携带G等位基因患结肠癌的风险明显下降。而另外3个多态性位点各基因变异型之间在结肠癌组和正常对照组分布无明显差别。

2.4 *survivin*基因启动子区SNP等位基因与结肠癌肿瘤病理的相关性 由于-241T/C位点C变异型在结肠癌组和对照组样本分布均低于1%, 我们对于此位点不进行分析。其他3个位点SNP不同基因型与结肠癌病理分期的关系如表3。-31G/C位点G变异与肿瘤的分化程度($P = 0.019$)、肿瘤的浸润范围($P = 0.008$)、远处转移($P = 0.0008$)均相关, G变异基因型能显著降低结肠癌的恶性程度, G变异是结肠癌的保护因素。-625G/C与-644T/C位点不同基因型在肿瘤分化程度、肿瘤范围、淋巴结转移、远处转移等因素上均无统计学差异。

3 讨论

*survivin*基因被公认为目前所发现的最强大的凋亡抑制基因, 一方面通过与细胞周期调节因子CDK4结合, 使CDK2/cyclinE活化和Rb磷酸化, 促进细胞由G₁期进入S期, 促进细胞分化, 并且能躲避G₂/M期细胞凋亡监视, 抵抗自身介导

的细胞凋亡, 促进细胞的异常增殖^[8,9]; 另一方面*survivin*蛋白通过直接抑制细胞凋亡信号通路下游的终末效应因子Caspase3、Caspase7的活性以及干扰内源性凋亡信号通路上游Caspase9的活化来阻断各种刺激诱导的细胞凋亡过程, 从而实现其抗凋亡作用^[10]。*survivin*基因作为一种凋亡抑制基因, 已有研究证实他的表达产物能促进癌细胞的有丝分裂的进展和G₁/S期转换^[11], 从而在肿瘤的发生、发展中起重要作用。以往的研究证实*survivin*基因几乎与所有人类常见的恶性肿瘤, 如肺癌、肝癌、胰腺癌、前列腺癌和乳腺癌的发生发展有关, 并且*survivin*基因在这些癌组织内都是过度表达^[12]。

SNP是指在基因水平上由单个核苷酸的变异引起的DNA序列多样性。这种序列的多样性对于遗传表型起到了一定的累加作用^[13]。*survivin*基因启动子区有4个常见SNP位点-31G/C、-241T/C、-625G/C和-644T/C, 我们推测这些位点的变异可能改变*survivin*基因转录启动效率, 改变*survivin*蛋白表达情况从而影响肿瘤的发生发展。鉴于此, 本实验研究*survivin*基因启动子区4个SNP位点与结肠癌遗传易感性及临床意义的相关性。本研究结果显示, 发现-31G/C位

■应用要点

本文提示*survivin*基因启动子区-31G/C位点G变异通过降低*survivin*蛋白的表达来降低结肠癌的易感性,并抑制结肠癌,降低结肠癌的恶性程度。

表 3 *survivin*基因启动子区SNP与结肠癌肿瘤病理相关性分析

	-31G/C			-625G/C			-644T/C		
	CC	CG+GG	P值	CC	CG+GG	P值	TT	TC+CC	P值
分化程度			0.019			0.725			0.443
高分化	15	39		6	48		29	25	
中分化	29	53		7	75		53	29	
低分化	41	40		10	71		49	32	
肿瘤范围			0.008			0.062			0.314
T1	3	11		3	11		10	4	
T2	8	19		6	21		15	12	
T3	31	67		9	87		63	33	
T4	43	36		5	75		43	37	
淋巴结转移			0.890			0.962			0.078
N0	20	36		7	49		36	20	
N1	35	55		9	81		60	30	
N2	22	29		5	46		23	28	
N3	8	12		2	18		12	8	
远处转移			0.008			0.100			0.844
M0	77	101		16	162		108	70	
M1	8	31		7	32		23	16	

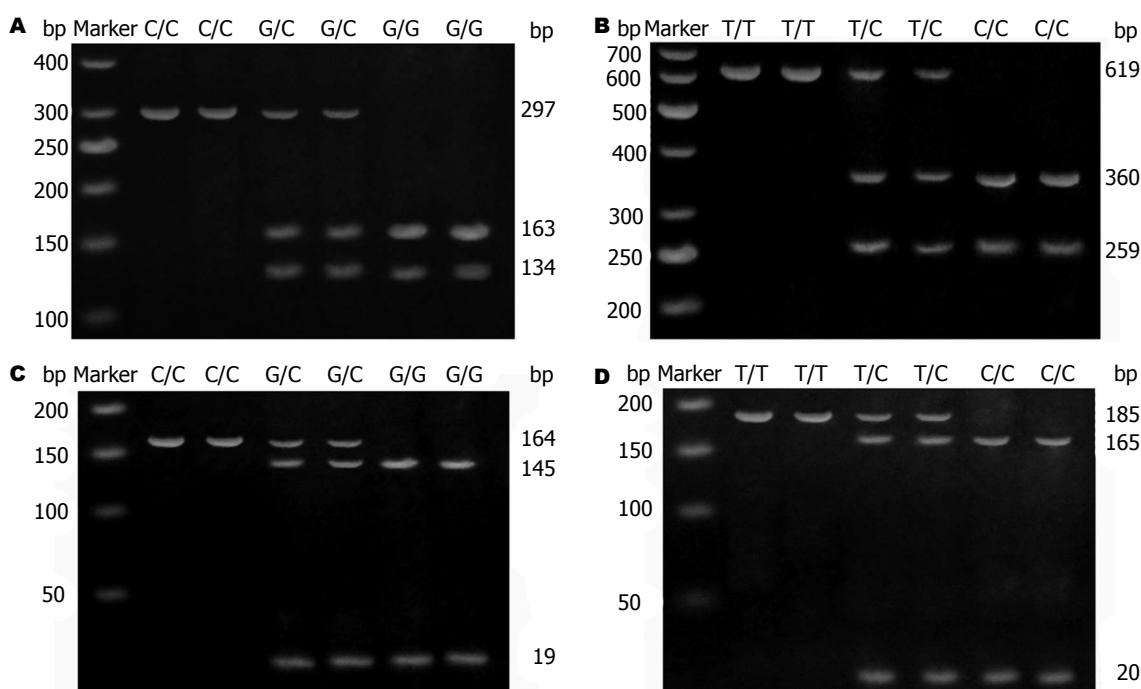


图 1 *survivin*基因启动子区4处SNP酶切分型结果. A: -31G/C位点GG型: 163、134 bp, CC型: 297 bp, GC型: 163、134、297 bp; B: -625G/C位点CC型: 360、259 bp, TT型: 619 bp, TC型: 360、259、619 bp; C: -644T/C位点GG型: 145、19 bp, CC型: 164 bp, GC型: 145 bp、19、164 bp; D: -241T/C位点CC型: 165、20 bp, TT型: 185 bp, TC型: 165、20、185 bp.

点G变异能明显降低结肠癌的患病风险, G变异是结肠癌发病的一个保护因素. 这与Qin等^[14]研究的*survivin*基因-31G>C多态性与患肿瘤的风险: 29项研究的荟萃分析的结果相符, 并且这一位点的多态性在其他相关恶性肿瘤中也有相

似的研究结果^[15,16]. 我们推测*survivin*基因启动子区-31G/C位点G变异, 降低*survivin*基因的转录活性使*survivin*蛋白表达量下降, 从而减少结肠癌的发生发展. *survivin*基因启动子区的细胞周期依赖性元件(cell cycle dependent element,

CDE)/细胞周期同源区(cell cycle homology region, CHR)激活后能启动G₂/M期的周期依赖的*survivin*基因高表达, -31G/C位点位于CDE/CHR区。C等位基因能与上游调控元件结合而启动*survivin*基因表达, -31G/C位点G变异等位基因通过改变CDE/CHR调控元件结合位点的特异序列阻遏上游调控元件与CDE/CHR元件的结合从而降低*survivin*基因的表达^[17]。这解释了本研究中正常对照组中G变异等位基因频率多于结肠癌组。这与黄俊等研究的*survivin*基因启动子区-31C/G单核苷酸多态性与中国华南地区散发性结直肠癌CRC遗传易感性报到的结果相符^[18]。此外, 本研究还发现-31G/C位点G变异与肿瘤的分化程度、肿瘤的浸润范围、远处转移均相关, 与C等位基因型相比, G变异基因型能显著降低结肠癌的恶性程度。G变异通过减少*survivin*的表达, 影响后者与DNA双链断裂修复蛋白的相互作用, 进而调整DNA-PKcs的活性, 诱导DNA损伤, 来调节肿瘤的分化和转移^[19]。

此外, 本研究结果显示*survivin*基因启动子区其他3个多态性位点基因变异与结肠癌的易感性无明显相关性。我们发现-241T/C、-625G/C和-644T/C 3个位点不位于非顺式作用元件或是转录因子结合位点, 故此三个多态性位点可能为无意义序列碱基, 因此可以解释这三个位点的基因变异与*survivin*基因表达无明显相关性。

总之, *survivin*基因启动子区-31G/C位点G变异通过降低*survivin*蛋白的表达来降低结肠癌的易感性, 并抑制结肠癌, 降低结肠癌的恶性程度。本课题的不足之处在于样本量偏少, 以及样本的局限性, 为此我们后续的研究将扩大样本量并建立适当的动物模型, 探索*survivin*基因激活后具体的信号传递分子机制, 为结肠癌的发生发展提供新的研究思路, 并为临床药物治疗提供重要依据。

4 参考文献

- 1 杨玲, 李连弟, 陈育德, Parkin DM. 中国2000年及2005年恶性肿瘤发病死亡的估计与预测. 中国卫生统计 2005; 22: 218-221
- 2 Jarrin M, Mansergh FC, Boulton ME, Gunhaga L, Wride MA. Survivin expression is associated with lens epithelial cell proliferation and fiber cell differentiation. *Mol Vis* 2012; 18: 2758-2769 [PMID: 23213276]
- 3 Kawata N, Tsuchiya N, Horikawa Y, Inoue T, Tsuruta H, Maita S, Satoh S, Mitobe Y, Narita S, Habuchi T. Two survivin polymorphisms are cooperatively associated with bladder cancer susceptibility. *Int J Cancer* 2011; 129: 1872-1880 [PMID: 21154810]

- DOI: 10.1002/ijc.25850]
- 4 Watson AJ. An overview of apoptosis and the prevention of colorectal cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 2006; 57: 107-121 [PMID: 16326109 DOI: 10.1016/j.critrevonc.2005.06.005]
- 5 Johnson ME, Howerth EW. Survivin: a bifunctional inhibitor of apoptosis protein. *Vet Pathol* 2004; 41: 599-607 [PMID: 15557069 DOI: 10.1354/vp.41-6-599]
- 6 Li F, Brattain MG. Role of the Survivin gene in pathophysiology. *Am J Pathol* 2006; 169: 1-11 [PMID: 16816356 DOI: 10.2353/ajpath.2006.060121]
- 7 Fukuda S, Pelus LM. Survivin, a cancer target with an emerging role in normal adult tissues. *Mol Cancer Ther* 2006; 5: 1087-1098 [PMID: 16731740 DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-05-0375]
- 8 Saleem M, Murtaza I, Witkowsky O, Kohl AM, Maddodi N. Lupeol triterpene, a novel diet-based microtubule targeting agent: disrupts survivin/cFLIP activation in prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 388: 576-582 [PMID: 19683515 DOI: 10.1016/j.bbrc.2009.08.060]
- 9 Dallaglio K, Palazzo E, Marconi A, Dumas M, Truzzi F, Lotti R, Bontè F, Pincelli C. Endogenous survivin modulates survival and proliferation in UVB-treated human keratinocytes. *Exp Dermatol* 2009; 18: 464-471 [PMID: 19320741 DOI: 10.1111/j.1600-0625.2008.00819.x]
- 10 Sah NK, Khan Z, Khan GJ, Bisen PS. Structural, functional and therapeutic biology of survivin. *Cancer Lett* 2006; 244: 164-171 [PMID: 16621243 DOI: 10.1016/j.canlet.2006.03.007]
- 11 Antonacopoulou AG, Floratou K, Bravou V, Kottorou A, Dimitrakopoulos FI, Marousi S, Stavropoulos M, Koutras AK, Scopa CD, Kalofonos HP. The survivin -31 snp in human colorectal cancer correlates with survivin splice variant expression and improved overall survival. *Cell Oncol (Dordr)* 2011; 34: 381-391 [PMID: 21538024 DOI: 10.1007/s13402-011-0038-4]
- 12 Hsieh YS, Tsai CM, Yeh CB, Yang SF, Hsieh YH, Weng CJ. Survivin T9809C, an SNP located in 3'-UTR, displays a correlation with the risk and clinicopathological development of hepatocellular carcinoma. *Ann Surg Oncol* 2012; 19 Suppl 3: S625-S633 [PMID: 22052111 DOI: 10.1245/s10434-011-2123-3]
- 13 夏荣耀, 张冉冉, 孙亚娇, 陈复辉. Survivin基因与肿瘤相关研究进展. 现代肿瘤医学 2013; 21: 0662-0665
- 14 Qin Q, Zhang C, Zhu H, Yang X, Xu L, Liu J, Lu J, Zhan L, Cheng H, Sun X. Association between survivin -31G& amp; gt; C polymorphism and cancer risk: meta-analysis of 29 studies. *J Cancer Res Clin Oncol* 2014; 140: 179-188 [PMID: 24077840 DOI: 10.1007/s00432-013-1524-z]
- 15 Upadhyay R, Khurana R, Kumar S, Ghoshal UC, Mittal B. Role of survivin gene promoter polymorphism (-31G& gt; C) in susceptibility and survival of esophageal cancer in northern India. *Ann Surg Oncol* 2011; 18: 880-887 [PMID: 20957442 DOI: 10.1245/s10434-010-1371-y]
- 16 Borges Bdo N, Burbano RR, Harada ML. Survivin -31C/G polymorphism and gastric cancer risk in a Brazilian population. *Clin Exp Med* 2011; 11: 189-193 [PMID: 21161671 DOI: 10.1007/s10238-010-0122-5]
- 17 Wagner M, Schmelz K, Dörken B, Tamm I. Epigenetic and genetic analysis of the survivin promoter in acute myeloid leukemia. *Leuk Res* 2008; 32: 1054-1060 [PMID: 18206228 DOI: 10.1016/

■同行评价

本文结合临床, 对于临床工作具有一定的意义。

- j.leukres.2007.11.013]
- 18 黄俊, 汪建平, 王磊, 刘焕亮, 魏宜胜, 黄美近, 傅新晖, 陈静, 陈典克. Survivin基因启动子区-31C/G多态性与散发性结直肠癌遗传易感性的关系. 中山大学学报 2010; 31: 59-63
- 19 Capalbo G, Dittmann K, Weiss C, Reichert S, Hausmann E, Rödel C, Rödel F. Radiation-induced survivin nuclear accumulation is linked to DNA damage repair. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2010; 77: 226-234 [PMID: 20394854 DOI: 10.1016/j.ijrobp.2009.12.001]

编辑 田滢 电编 鲁亚静



ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) DOI: 10.11569 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有

• 消息 •

《世界华人消化杂志》被评为中国精品科技期刊

本刊讯 2011-12-02, 中国科学技术信息研究所在北京发布2010年中国科技论文统计结果, 经过中国精品科技期刊遴选指标体系综合评价, 《世界华人消化杂志》被评为2011年度中国精品科技期刊. 中国精品科技期刊以其整体的高质量示范作用, 带动我国科技期刊学术水平的提高. 精品科技期刊的遴选周期为三年. (《世界华人消化杂志》编辑部)

原发性肝脏平滑肌肉瘤1例

刘春华, 李庆彦, 管珊, 王思奎

刘春华, 李庆彦, 管珊, 王思奎, 聊城市人民医院感染科 山东省聊城市 252000

刘春华, 主治医师, 主要从事病毒性肝炎与肝癌的研究.

作者贡献分布: 刘春华与李庆彦整理病例资料; 论文写作由刘春华完成; 由管珊与王思奎审校.

通讯作者: 王思奎, 教授, 主任医师, 252000, 山东省聊城市东昌西路67号, 聊城市人民医院感染科. wangsk1966@sina.com

电话: 0635-8272630

收稿日期: 2013-12-20 修回日期: 2014-01-18

接受日期: 2014-02-03 在线出版日期: 2014-03-28

A case of primary leiomyosarcoma of the liver

Chun-Hua Liu, Qing-Yan Li, Shan Guan, Si-Kui Wang

Chun-Hua Liu, Qing-Yan Li, Shan Guan, Si-Kui Wang, Department of Infectious Diseases, Liaocheng People's Hospital, Liaocheng 252000, Shandong Province, China

Correspondence to: Si-Kui Wang, Professor, Chief Physician, Department of Infectious Diseases, Liaocheng People's Hospital, 67 Dongchang West Road, Liaocheng 252000, Shandong Province, China. wangsk1966@sina.com

Received: 2013-12-20 Revised: 2014-01-18

Accepted: 2014-02-03 Published online: 2014-03-28

Abstract

A 22-year-old female patient was admitted with a hepatic space-occupying lesion found by CT examination. He had no history of liver disease. The alpha-fetoprotein (AFP) level was normal. The space-occupying lesion was further confirmed by computerized tomography and functional MRI scans. By histopathology and immunohistochemistry, a primary leiomyosarcoma of the liver was diagnosed.

© 2014 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

Key Words: Primary leiomyosarcoma; Liver

Liu CH, Li QY, Guang S, Wang SK. A case of primary leiomyosarcoma of the liver. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(9): 1341-1344 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/1341.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v22.i9.1341>

摘要

患者, 女, 22岁, 因发现肝占位性病变5 d入院,

既往无肝病史, AFP正常, CT增强及MRI提示肝内占位性病变, 恶性变可能性大, B超引导下行针吸细胞学检查, 病理确诊为肝脏平滑肌肉瘤, 此病罕见.

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有.

关键词: 平滑肌肉瘤; 肝脏

核心提示: 肝脏平滑肌肉瘤是一种罕见恶性肿瘤. 临床表现同原发性肝癌, 既往无肝病病史, 甲胎蛋白不高. 影像学显示呈巨块型、血供丰富、有囊性化倾向. 镜下可见梭形细胞, 细胞核极向不同, 排列杂乱, 免疫组织化学示特异标志物Vimentin及actin阳性.

刘春华, 李庆彦, 管珊, 王思奎. 原发性肝脏平滑肌肉瘤1例. *世界华人消化杂志* 2014; 22(9): 1341-1344 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/1341.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v22.i9.1341>

0 引言

原发性肝脏平滑肌肉瘤是一种比较罕见的恶性肿瘤, 多见于40岁, 男性, 常表现为巨大肿物, 血供丰富, 易误诊为原发性肝癌. 我院收治1例, 现将患者影像学表现、临床病理特点、免疫组织化学标记、诊断与治疗报道如下.

1 病例报告

患者, 女, 22岁, 因“乏力、腹胀、肝功异常10 d, 肝占位5 d”入院. 查体: 消瘦、贫血貌, 眼睑苍白, 上腹部膨隆, 肝肋下可触及, 约3 cm, 质硬, 移动性浊音阴性. 强化CT示肝右叶见截面12 cm × 10 cm肿块, 提示肝占位性病变(图1). 实验室检查: CA-199: 124.8 U/mL. 甲胎蛋白(alpha-fetoprotein, AFP)正常. 肝功示丙氨酸转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)202 IU/L, 谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)183 IU/L, 碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AKP)733 IU/L, γ-谷氨酰转肽酶(γ-glutamyl transpeptidase, GGT)345 IU/L, 排除甲型肝炎病毒(hapatitis A virus, HAV)、

■背景资料

肝脏平滑肌肉瘤在所有肝脏恶性肿瘤中极为罕见, 多认为起源于肝脏血管或胆管平滑肌. 临床诊断困难, 影像学检查无特异性, 确诊依赖免疫组织化学. 需要与原发肝癌、转移性肝癌、肝内瘤样癌等鉴别. 总结该病诊治过程, 减少误诊发生率.

■同行评议者

徐迅迪, 教授, 中南大学湘雅二医院肝胆胰外科

■ 研发前沿

目前病理学诊断研究相对较多. 该类患者一旦发现多为晚期, 亟待有一套诊疗方法, 以便能早期诊断, 早期手术切除. 因该病罕见, 病例稀少, 影像学及治疗方面的相关研究较少, 其早期诊断及治疗方面仍未有新进展.

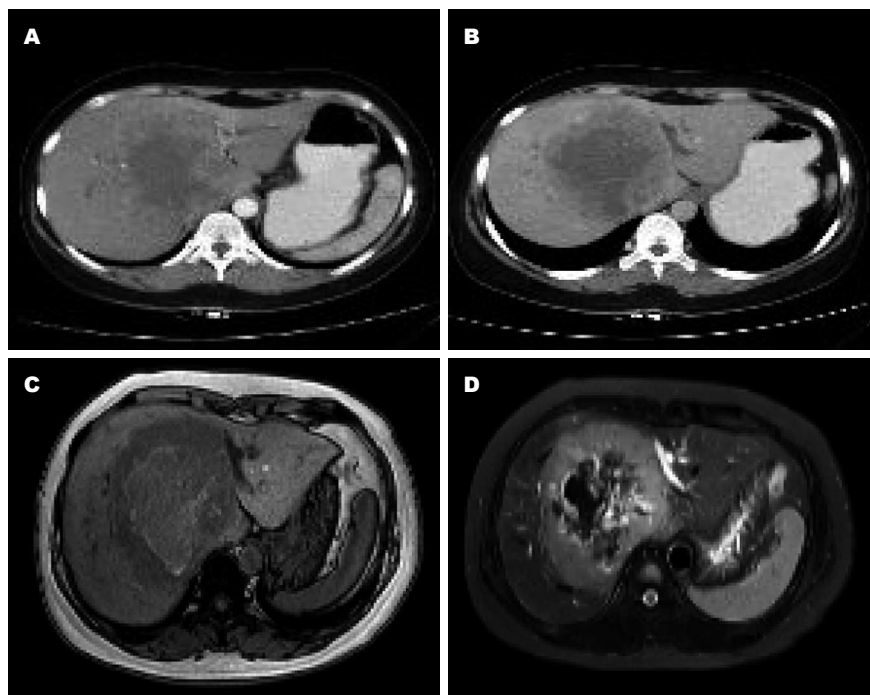


图 1 CT强化与MRI影像学表现. A:动脉期肿瘤周边血供丰富、强化明显、呈类分隔样改变, 可见供血动脉; 中央密度低呈不均匀强化, CT值34 Hu; B: 延迟期肿瘤病灶密度低于肝实质、中央低于周边; C: T1WI呈略长及短T1; D: T2WI长及短T2信号.

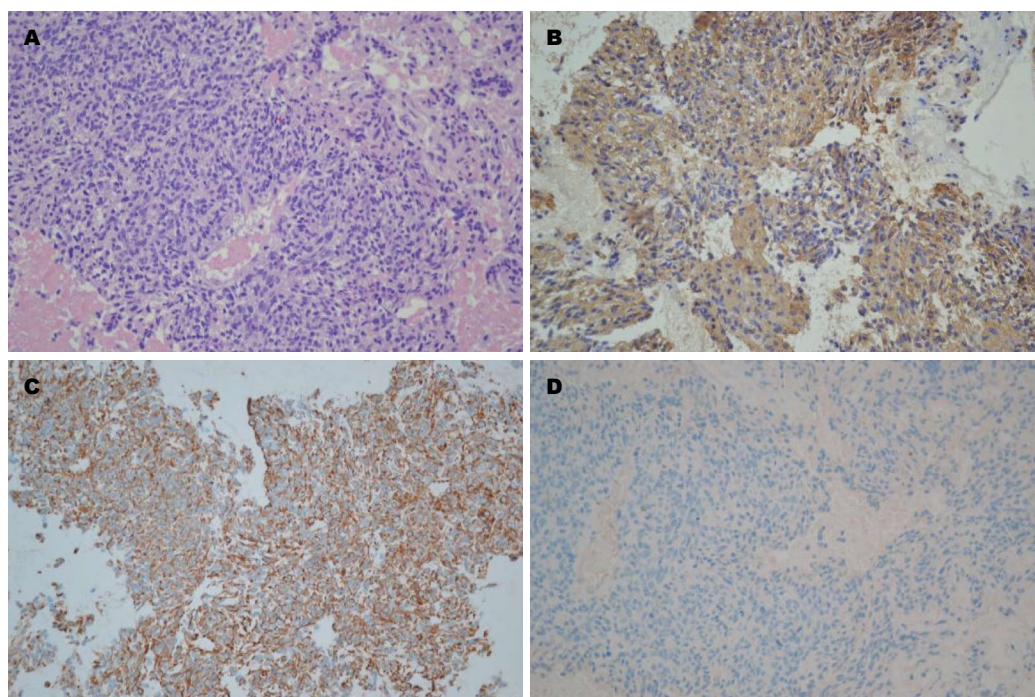


图 2 细针肝穿刺留取肝脏组织镜检及免疫组织化学($\times 400$). A: HE染色, 胞核呈梭形(极向不同, 排列杂乱呈网状), 红色区域为出血; 免疫组织化学(EliVision法); B: 标志物Actin(肌动蛋白)阳性; C: 标志物Vimentin(波形蛋白)阳性; D: 标志物CK(pan)阴性.

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)、丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)及戊型肝炎病毒(hepatitis E virus, HEV)感染. 以“肝占位性质待查”于2013-10-08收入我院. 入院后给予保肝、降酶治疗, 行肝脏MRI示肝右叶占位性病变, 性质待定, 恶性病变可能性大. 患者青年女性, 无饮酒及肝病病史、影像学显示肿瘤血供丰富,

AFP正常, 原发性肝癌不能解释, 为明确诊断, 行病理检查. 在B超引导下肝穿刺, 留取 $0.8\text{ cm} \times 0.6\text{ cm} \times 0.4\text{ cm}$ 暗红色血块样组织标本, 经 40 g/L 甲醛溶液固定, 常规石蜡包埋 $4\text{ }\mu\text{m}$ 厚切片, HE染色, 采用EliVisionTM法分别进行actin、Vimentin、CD34、CD117、S100、Desmin、DOG-1、CK等免疫组织化学染色. 光镜观察. 结果示镜

检见恶性瘤细胞, 考虑为梭形细胞性肉瘤, 免疫组织化学示actin(+)、Vimentin(+)、CD34(-)、CD117(-)、S100(-)、Desmin(-)、DOG-1(-)、CK(-)(图2)。病理诊断为平滑肌肉瘤。为明确病变原发部位, 行胸片、上消化道钡餐、肠镜及子宫B超等检查, 均未见异常, 排除肺、胃肠道及子宫原发性平滑肌瘤的可能, CK示阴性亦排除肝脏肉瘤样癌的可能, 确诊为肝脏原发性平滑肌瘤。入院后患者肝功能进行性恶化(出现阻塞性黄疸)、无手术治疗指征, 行经皮肝穿刺胆管引流术(percutaneous transhepatic biliary drainage, PTBD)症状改善后行TACE。出院1 mo, 随访患者一般情况尚可。

2 讨论

原发性肝脏平滑肌瘤在所有肝脏恶性肿瘤中极为罕见, 多认为起源于肝脏血管或胆管平滑肌, 易误诊为原发性肝癌。具体病因及发病机制尚不明确, 吕国庆等^[1]报道其与EB病毒感染有关。文献报道多发生于中老年人, 男性多见, 常见于右半肝, 单发, 质地硬易坏死、出血、囊性变^[2]。较小肿瘤临床上无任何症状, 中晚期症状及体征与原发肝癌类似, 腹胀、腹痛、发热、上腹部包块及黄疸。肝功能正常或异常, 甲胎蛋白不高, 肝炎病毒学指标阴性。

2.1 影像学及病理学特点 作为肝癌中一种罕见的特殊肿瘤, 除具有一般肝癌的特点又具有自身部分特征。体积大, 由于肿瘤生长迅速, 早期无临床症状, 发现时体积一般较大, 该病例直径约12 cm, 呈巨块性, 边界尚清。本例病灶CT表现较典型, 和徐爱民等^[3]报道的6例平滑肌瘤表现类似。平扫病灶密度不均匀, 内见不规则片状低密度区。增强扫描病灶周边强化明显, 可见条状及团块状肿瘤供血动脉, 呈类分隔状。中央低密度区呈不均匀强化、CT值34 Hu、未完全发生坏死液化, 病理已证实低密度区大部分为肿瘤实质, 存在散在陈旧性出血。三期扫描中, 实性部分强化明显, 病灶中心区域呈不均匀强化。MRI在T2WI呈长及短T2信号, 显示肿瘤组织的恶性特征, 与病理相符。

该病的病理学方面的研究报道相对较多, 尚未有统一的标准。分析文献总结其病理学特点^[4-7]: (1)镜下见梭形瘤细胞呈编织状排列, 胞核两端钝圆; (2)免疫组织化学染色VG呈黄色, Masson染色呈红色; (3)免疫组织化学标志物有Vimentin (波形蛋白)、Desmin(结蛋白)及平滑肌

肉瘤的特异性SM-action(平滑肌肌动蛋白)均阳性, 同时CK(-)排除上皮性成分。其中Desmin在良性肌源性肿瘤中强阳性表达, Vimentin在恶性肌源性肿瘤中强阳性表达, 二者呈反向关系。该病例诊断为平滑肌瘤依据: 镜下见到明确的恶性梭形细胞, 免疫组织化学Vimentin(+)、actin(+)、Desmin(-)、CK(-)。Vimentin(+)而Desmin(-)提示该病例恶性程度高。

2.2 诊断及治疗 原发性肝脏平滑肌瘤的诊断主要依靠临床、影像学 and 病理学, 确诊需要病理学和免疫组织化学。诊断该病亦应排除肝脏转移性平滑肌瘤及肝肉瘤样癌。本病例病理检查确诊平滑肌瘤, 已完善胸片、上消化道钡餐、肠镜、子宫B超等各项检查未见明显异常, 排除子宫、胃肠道、肺部原发的可能。免疫组织化学显示CK阴性排除肝内瘤样癌的可能。

手术切除可改善患者预后, 为目前首选治疗。李小刚等^[8,9]对56例手术病例进行综合分析, 平均存活率仅为3.5年。该病存活率低, 一方面与肿瘤的大小、分化程度有关; 另一方面与手术后并发症有关。该肿瘤发现时多中晚期, 瘤体大, 手术切除范围广, 存留肝实质细胞少, 术后门静脉血流量增加、压力升高, 过高的门静脉压力可导致剩余肝脏的再灌注损伤, 甚至发展至肝衰竭^[10]。平滑肌瘤对放化疗不敏感, 对不能耐受手术者, 可给予肝动脉化疗栓塞术结合中药抗癌治疗, 该治疗效果尚未有相关报道。该患者入院时肝功能异常, 肿瘤体积大, 短期内肝功能进行性恶化, 腹胀及乏力加重, 出现黄疸, 无手术治疗指征。行PTBD治疗症状改善后行TACE术。TACE术后出现发热、腹痛、恶心、呕吐, 10 d后症状缓解, 出院。现出院1 mo, 随访, 患者一般情况尚可。拟定下一步治疗方案, TACE联合肿瘤中心区放疗(陀螺刀), 缩小肿瘤体积以减轻其对胆管、血管的压迫, 缓解症状。

总之, 发现肝脏有血供丰富占位病变, AFP不高, 无肝炎病史及家族史, 影像学呈囊性化倾向, 应考虑到平滑肌瘤, 及时行病理检查以明确诊断及组织分化程度。如能早期发现可手术切除, 以延长患者存活时间。

3 参考文献

- 1 吕国庆. 肝平滑肌瘤一例. 中华肝胆外科. 2003; 6: 322
- 2 杨炼, 陈立波. 原发性肉瘤样癌肝细胞的临床与CT特征. 世界华人消化杂志. 2008; 16: 904 - 907
- 3 徐爱民, 程红岩, 贾雨辰, 吴孟超. 肝脏原发性平滑肌

■ 相关报道

徐爱民等总结了肝脏原发性平滑肌瘤的CT特点, 巨大占位, 血供丰富, 强化不均匀, 有囊性化倾向; 黄煥军等观察了6例原发性平滑肌瘤病例的病理及免疫组织化学特征, 指出平滑肌瘤确诊依赖免疫组织化学。李小刚对手术后患者进行随访, 发现手术后存活率低。

■同行评价

本文报道罕见病例肝脏平滑肌肉瘤, 临床资料详细, 结合国内外相关文献, 为该病诊断提供思路, 具有一定的临床参考价值。

- 肉瘤的CT表现(附6例病例分析). 中华肝胆外科杂志 2004; 3: 205-207
- 4 黄焕军, 刘瑶, 陈孝平, 林菊生. 原发性平滑肌肉瘤病理及免疫组织化学观察. 临床消化病杂志 2007; 2: 85-87
- 5 Kim DG, Park SY, Kim H, Chun YH, Moon WS, Park SH. A comprehensive karyotypic analysis on a newly established sarcomatoid hepatocellular carcinoma cell line SH-J1 by comparative genomic hybridization and chromosome painting. *Cancer Genet Cytogenet* 2002; 132: 120-124 [PMID: 11850072]
- 6 张哉根, 叶明福, 谢青, 王亚丽, 汤金梁. 肉瘤样癌的肉瘤的CT表现(附6例病例分析). 中华肝胆外科杂志 2004; 3: 205-207
- 7 马红钦, 姚若全. 肝肉瘤样癌1例并文献复习. 现代肿瘤医学 2012; 20: 765-767
- 8 李小刚, 刘青光, 姚英民. 原发性肝脏平滑肌肉瘤1例分析. 西安医科大学学报 2001; 22: 92
- 9 吴伯文, 吴孟超. 实用肝脏外科学. 北京: 人民军医出版社, 2009: 238-239
- 10 郑波, 杨训, 周晓辉, 张刚, 安宁, 邓晓军. 参附注射液在防治肝脏手术时缺血再灌注损伤的应用. 中国中医急症 2008; 17: 1234-1236

编辑 田滢 电编 鲁亚静



《世界华人消化杂志》投稿须知

1 投稿总则

1.1 性质 《世界华人消化杂志》(*World Chinese Journal of Digestology*, *WCJD*, ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online), DOI: 10.11569) 是一份同行评议和开放获取期刊(*Open Access Journal*, *OAJ*), 创始于1993-01-15, 旬刊, 每月8、18和28号出版。《世界华人消化杂志》编辑委员会成员, 由483位专家组成, 分布在30个省市、自治区和特别行政区。

《世界华人消化杂志》的首要任务是出版胃肠病学, 肝病, 消化系内镜学, 消化系外科学, 消化系肿瘤学, 消化系影像学, 消化系介入治疗, 消化系病理学, 消化系感染学, 消化系药理学, 消化系病理生理学, 消化系病理学, 消化系循证医学, 消化系管理学, 胰腺病学, 消化系检验医学, 消化系分子生物学, 消化系免疫学, 消化系微生物学, 消化系遗传学, 消化系转化医学, 消化系诊断学, 消化系治疗学和糖尿病等领域的原始创新性文章, 综述文章和评论性的文章。最终目的是出版高质量的文章, 提高期刊的学术质量, 使之成为指导本领域胃肠病学和肝病实践的重要学术性期刊, 提高消化系疾病的诊断和治疗水平。

《世界华人消化杂志》由百世登出版集团有限公司(*Baishideng Publishing Group*, *BPG*)主办和出版的一份印刷版, 电子版和网络版三种版本的学术类核心期刊, 由北京百世登生物医学科技有限公司生产制作, 所刊载的全部文章存储在《世界华人消化杂志》网站上。OAJ最大的优点是出版快捷, 一次性缴纳出版费, 不受版面和彩色图片限制, 作者文章在更大的空间内得到传播, 全球读者免费获取全文PDF版本, 网络版本和电子期刊。论文出版后, 作者可获得高质量PDF, 包括封面、编委会成员名单、目次、正文和封底, 作为稿酬, 样刊两本。BPG拥有专业的编辑团队, 涵盖科学编辑、语言编辑和电子编辑。目前编辑和出版42种临床医学OAJ期刊, 其中英文版41种, 具备国际一流的编辑与出版水平。

《世界华人消化杂志》被《中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)》, 《中文核心期刊要目总览(2011年版)》, 《Chemical Abstracts》, 《EMBASE/Excerpta Medica》, 《Abstracts

Journals》和《Digital Object Identifier》收录。《世界华人消化杂志》于2012-12-26获得RCCSE中国权威学术期刊(A+)称号。《世界华人消化杂志》在中国科学技术信息研究所, 2012-12-07发布的2011年度《中国科技期刊引证报告(核心版)》统计显示, 总被引频次3871次(他引率0.82), 影响因子0.775, 综合评价总分65.5分, 分别位居内科学领域类52种期刊第5位、第7位和第5位, 并荣获2011年度中国精品科技期刊。

1.2 栏目 述评, 基础研究, 临床研究, 焦点论坛, 文献综述, 研究快报, 临床经验, 循证医学, 病例报告, 会议纪要。文稿应具科学性、先进性、可读性及实用性, 重点突出, 文字简练, 数据可靠, 写作规范, 表达准确。

2 撰稿要求

2.1 总体标准 文稿撰写应遵照国家标准GB7713科学技术报告、学位论文和学术论文的编写格式, GB6447文摘编写规则, GB7714文后参考文献著录规则, GB/T 3179科学技术期刊编排格式等要求; 同时遵照国际医学期刊编辑委员会(*International Committee of Medical Journal Editors*)制定的《生物医学期刊投稿的统一要求(第5版)》(*Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals*)。见: *Ann Intern Med* 1997; 126: 36-47。

2.2 名词术语 应标准化, 前后统一, 如原词过长且多次出现者, 可于首次出现时写出全称加括号内注简称, 以后直接用简称。医学名词以全国自然科学名词审定委员会公布的《生理学名词》、《生物化学名词与生物物理学名词》、《化学名词》、《植物学名词》、《人体解剖学名词》、《细胞生物学名词》及《医学名词》系列为准, 药名以《中华人民共和国药典》和卫生部药典委员会编的《药名词汇》为准, 国家食品药品监督管理局批准的新药, 采用批准的药名; 创新性新药, 请参照我国药典委员会的“命名原则”, 新译名词应附外文。公认习用缩略语可直接应用(建议第一次也写出全称), 如ALT, AST, mAb, WBC, RBC, Hb, T, P, R, BP, PU, GU, DU, ACTH, DNA, LD50, HBsAg, HCV

《世界华人消化杂志》为保证期刊的学术质量, 对所有来稿均进行同行评议, 是一份被《中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)》, 《中文核心期刊要目总览(2011年版)》收录的学术期刊。

《世界华人消化杂志》英文摘要被《Chemical Abstracts》,《EMBASE/Excerpta Medica》,《Abstracts Journals》和《Digital Object Identifier》收录。

RNA, AFP, CEA, ECG, IgG, IgA, IgM, TCM, RIA, ELISA, PCR, CT, MRI等。为减少排印错误, 外文、阿拉伯数字、标点符号必须正确打印在A4纸上。中医药名词英译要遵循以下原则: (1)有对等词者, 直接采用原有英语词, 如中风stroke, 发热fever; (2)有对应词者应根据上下文合理选用原英语词, 如八法eight principal methods; (3)英语中没有对等词或相应词者, 宜用汉语拼音, 如阴yin, 阳yang, 阴阳学说yinyangology, 人中renzhong, 气功qigong; 汉语拼音要以词为单位分写, 如weixibao nizhuanwan(胃细胞逆转丸), guizhitang(桂枝汤)。通常应小写。

2.3 外文字符 注意大小写正斜体与上下角标。静脉注射iv, 肌肉注射im, 腹腔注射ip, 皮下注射sc, 脑室注射icv, 动脉注射ia, 口服po, 灌胃ig。s(秒)不能写成S, kg不能写成Kg, mL不能写成ML, lcpm(应写为1/min)÷E%(仪器效率)÷60 = Bq, pH不能写PH或P^H, *H. pylori*不能写成HP, $T_{1/2}$ 不能写成tl/2或T, V_{max} 不能Vmax, μ 不写为英文u。需排斜体的外文字, 用斜体表示。如生物学中拉丁学名的属名与种名, 包括亚属、亚种、变种。如幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*), *Ilex pubescens* Hook, et Arn. var. *glaber* Chang(命名者勿划横线); 常数*K*; 一些统计学符号(如样本数*n*, 均数mean, 标准差SD, *F*检验, *t*检验和概率*P*, 相关系数*r*); 化学名中标明取代位的元素、旋光性和构型符号(如*N*, *O*, *P*, *S*, *d*, *l*)如*n*-(normal, 正), *N*-(nitrogen, 氮), *o*-(ortho, 邻), *O*-(oxygen, 氧, 习惯不译), *d*-(dextro, 右旋), *p*-(para, 对), 例如*n*-butyl acetate(醋酸正丁酯), *N*-methylaniline(*N*-甲基乙酰胺), *o*-cresol(邻甲酚), 3-*O*-methyl-adrenaline(3-*O*-甲基肾上腺素), *d*-amphetamine(右旋苯丙胺), *l*-dopa(左旋多巴), *p*-aminosalicylic acid(对氨基水杨酸)。拉丁字及缩写*in vitro*, *in vivo*, *in situ*; *Ibid*, *et al*, *po*, *vs*; 用外文字母代表的物理量, 如*m*(质量), *V*(体积), *F*(力), *p*(压力), *W*(功), *v*(速度), *Q*(热量), *E*(电场强度), *S*(面积), *t*(时间), *z*(酶活性, kat), *t*(摄氏温度, °C), *D*(吸收剂量, Gy), *A*(放射性活度, Bq), ρ (密度, 体积质量, g/L), *c*(浓度, mol/L), ϕ (体积分数, mL/L), *w*(质量分数, mg/g), *b*(质量摩尔浓度, mol/g), *l*(长度), *b*(宽度), *h*(高度), *d*(厚度), *R*(半径), *D*(直径), T_{max} , C_{max} , V_d , $T_{1/2}$, *CI*等。基因符号通常用小写斜体, 如*ras*, *c-myc*; 基因产物用大写正体, 如P16蛋白。

2.4 计量单位 采用国际单位制并遵照有关国家标准, GB3100-3102-93量和单位。原来的“分子

量”应改为物质的相对分子质量。如30 kD改为*M_r* 30 000或30 kDa(*M*大写斜体, *r*小写正体, 下角标); “原子量”应改为相对原子质量, 即*A_r*(*A*大写斜体, *r*小写正体, 下角标); 也可采用原子质量, 其单位是u(小写正体)。计量单位在+、-及-后列出。在±前后均要列出, 如37.6 °C ± 1.2 °C, 45.6岁 ± 24岁, 56.4 d ± 0.5 d, 3.56 ± 0.27 pg/mL应改为3.56 ng/L ± 0.27 ng/L。BP用kPa(mmHg), RBC数用1 × 10¹²/L, WBC数用1 × 10⁹/L, WBC构成比用0.00表示, Hb用g/L。M_r明确的体内物质以nmol/L或mmol/L表示, 不明确者用g/L表示。1 M硫酸, 改为1 mol/L硫酸, 1 N硫酸, 改为0.5 mol/L硫酸。长10 cm, 宽6 cm, 高4 cm, 应写成10 cm × 6 cm × 4 cm。生化指标一律采用法定计量单位表示, 例如, 血液中的总蛋白、清蛋白、球蛋白、脂蛋白、血红蛋白、总脂用g/L, 免疫球蛋白用mg/L; 葡萄糖、钾、尿素、尿素氮、CO₂结合力、乳酸、磷酸、胆固醇、胆固醇酯、三酰甘油、钠、钙、镁、非蛋白氮、氯化物; 胆红素、蛋白结合碘、肌酸、肌酐、铁、铅、抗坏血酸、尿胆元、氨、维生素A、维生素E、维生素B1、维生素B2、维生素B6、尿酸; 氢化可的松(皮质醇)、肾上腺素、汞、孕酮、甲状腺素、睾酮、叶酸用nmol/L; 胰岛素、雌二醇、促肾上腺皮质激素、维生素B12用pmol/L。年龄的单位有日龄、周龄、月龄和岁。例如, 1秒, 1 s; 2分钟, 2 min; 3小时, 3 h; 4天, 4 d; 5周, 5 wk; 6月, 6 mo; 雌性♀, 雄性♂, 酶活性国际单位IU = 16.67 nkat, 对数log, 紫外uv, 百分比%, 升L, 尽量把1 × 10⁻³ g与5 × 10⁻⁷ g之类改成1 mg与0.5 mg, hr改成h, 重量γ改成mg, 长度m改成mm。国际代号不用于无数值的文句中, 例如每天不写每d, 但每天8 mg可写8 mg/d。在一个组合单位符号内不得有1条以上的斜线, 例如不能写成mg/kg/d, 而应写成mg/(kg·d), 且在整篇文章内应统一。单位符号没有单、复数的区分, 例如, 2 min不是2 mins, 3 h不是3 hs, 4 d不是4 ds, 8 mg不是8 mgs。半个月, 15 d; 15克, 15 g; 10%福尔马林, 40 g/L甲醛; 95%酒精, 950 mL/L乙醇; 5% CO₂, 50 mL/L CO₂; 1 : 1 000肾上腺素, 1 g/L肾上腺素; 胃黏膜含促胃液素36.8 pg/mg, 改为胃黏膜蛋白含促胃液素36.8 ng/g; 10%葡萄糖改为560 mmol/L或100 g/L葡萄糖; 45 ppm = 45 × 10⁻⁶; 离心的旋转频率(原称转速)用r/min, 超速者用g; 药物剂量若按体质量计算, 一律以“/kg”表示。

2.5 统计学符号 (1)*t*检验用小写*t*; (2)*F*检验用英文大写*F*; (3)卡方检验用希文小写χ²; (4)样本的

相关系数用英文小写 r ; (5)自由度用希文小写 ν ; (6)样本数用英文小写 n ; (7)概率用英文斜体大写 P . 在统计学处理中在文字叙述时平均数 \pm 标准差表示为 $\text{mean} \pm \text{SD}$, 平均数 \pm 标准误为 $\text{mean} \pm \text{SE}$. 统计学显著性用 $^aP < 0.05$, $^bP < 0.01$ ($P > 0.05$ 不注). 如同一表中另有一套 P 值, 则 $^cP < 0.05$, $^dP < 0.01$; 第三套为 $^eP < 0.05$, $^fP < 0.01$ 等.

2.6 数字用法 遵照国家标准GB/T 15835-1995出版物上数字用法的规定, 作为汉语词素者采用汉字数字, 如二氧化碳、十二指肠、三倍体、四联球菌、五四运动、星期六等. 统计学数字采用阿拉伯数字, 如1 000-1 500 kg, 3.5 mmol/L \pm 0.5 mmol/L等. 测量的数据不能超过其测量仪器的精密度, 例如6347意指6 000分之一的精密度. 任何一个数字, 只允许最后一位有误差, 前面的位数不应有误差. 在一组数字中的 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 应考虑到个体的变差, 一般以SD的1/3来定位数, 例如3 614.5 g \pm 420.8 g, SD的1/3达一百多g, 平均数波动在百位数, 故应写成3.6 kg \pm 0.4 kg, 过多的位数并无意义. 又如8.4 cm \pm 0.27 cm, 其SD/3 = 0.09 cm, 达小数点后第2位, 故平均数也应补到小数点后第2位. 有效位数以后的数字是无效的, 应该舍. 末尾数字, 小于5则舍, 大于5则进, 如恰等于5, 则前一位数逢奇则进, 逢偶(包括“0”)且5之后全为0则舍. 末尾时只可1次完成, 不得多次完成. 例如23.48, 若不要小数点, 则应成23, 而不应该23.48 \rightarrow 23.5 \rightarrow 24. 年月日采用全数字表达法, 请按国家标准GB/T 7408-94书写. 如1985年4月12日, 可写作1985-04-12; 1985年4月, 写作1985-04; 从1985年4月12日23时20分50秒起至1985年6月25日10时30分止, 写作1985-04-12 T23:20:50/1985-06-25 T10:30:00; 从1985年4月12日起至1985年6月15日止, 写作1985-04-12/06-16, 上午8时写作08:00, 下午4时半写作16:30. 百分数的有效位数根据分母来定: 分母 ≤ 100 , 百分数到个位; $101 \leq \text{分母} \leq 1\,000$, 百分数到小数点后1位; 余类推. 小数点前后的阿拉伯数字, 每3位间空1/4阿拉伯数字距离, 如1 486 800.475 65. 完整的阿拉伯数字不移行!

2.7 标点符号 遵照国家标准GB/T 15834-1995标点符号用法的要求, 本刊论文中的句号都采用黑圆点; 数字间的起止号采用“-”字线, 并列的汉语词间用顿号分开, 而并列的外文词、阿拉伯数字、外文缩略词及汉语拼音字母拼写词间改用逗号分开, 参考文献中作者间一律用逗号分开; 表示终了的标点符号, 如句号、逗号、顿号、分号、括号及书名号的后一半, 通常不用

于一行之首; 而表示开头的标点符号, 如括号及书名号的前一半, 不宜用于一行之末. 标点符号通常占一格, 如顿号、逗号、分号、句号等; 破折号应占两格; 英文连字符只占一个英文字符的宽度, 不宜过长, 如5-FU. 外文字符下划一横线表示用斜体, 两横线表示用小写, 三横线表示用大写, 波纹线表示用黑体.

3 稿件格式

3.1 题名 简明确切地反映论文的特定内容, 鲜明而有特色, 阿拉伯数字不宜开头, 不用副题名, 一般20个字. 避免用“的研究”或“的观察”等非特定词.

3.2 作者 论文作者的署名, 按照国际医学杂志编辑委员会(ICMJE, International Committee of Medical Journal Editors)作者资格标准执行. 作者标准为: (1)对研究的理念和设计、数据的获得、分析和解读做出重大贡献; (2)起草文章, 并对文章的重要的知识内容进行批评性修改; (3)接受对准备发表文章的最后一稿. 作者应符合条件1, 2, 3, 对研究工作有贡献的其他人可放入志谢中. 作者署名的次序按贡献大小排列, 多作者时姓名间用逗号, 如是单名, 则在姓与名之间空1格(正文和参考文献中不空格). 《世界华人消化杂志》要求所有署名人写清楚自己对文章的贡献. 世界华人消化杂志不设置共同第一作者和共同通信作者.

3.3 单位 作者后写单位的全称空1格后再写省市及邮政编码. 格式如: 张旭晨, 梅立新, 承德医学院病理教研室 河北省承德市 067000

3.4 第一作者简介 格式如: 张旭晨, 1994年北京中医药大学硕士, 讲师. 主要从事消化系统疾病的病理研究.

3.5 作者贡献分布 格式如: 陈湘川与庞丽娟对此文所作贡献两均等; 此课题由陈湘川、庞丽娟、陈玲、杨兰、张金芳、齐妍及李洪安设计; 研究过程由陈玲、杨兰、张金芳、蒋金芳、杨磊、李锋及曹秀峰操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由曹秀峰提供; 数据分析由陈湘川、杨兰及庞丽娟完成; 本论文写作由陈湘川、庞丽娟及李洪安完成.

3.6 同行评议者 为了确保刊出文章的质量, 本刊即将开始实行接受稿件的同行评议公开策略, 将同行评议者姓名, 职称, 机构的名称与文章一同在脚注出版. 格式如: 房静远, 教授, 上海交通大学医学院附属医院仁济医院, 上海市消化疾病研究所.

《世界华人消化杂志》编辑部, 100025, 北京市朝阳区, 东四环中路62号, 远洋国际中心D座903室, 电话: 010-8538-1892, 传真: 010-8538-1893, Email: wcjd@wjgnet.com; http://www.wjgnet.com

《世界华人消化杂志》自2006-01-01起改为旬刊发行, 每月8、18、28日出版。

3.7 基金资助项目 格式如: 国家自然科学基金资助项目, No. 30224801

3.8 通讯作者 格式如: 通讯作者: 黄缘, 教授, 330006, 江西省南昌市民德路1号, 南昌大学第二附属医院消化内科, 江西省分子医学重点实验室. huang9815@yahoo.com

电话: 0351-4078656 传真: 0351-4086337

收稿日期: 修回日期:

3.9 英文摘要

题名 文章的题名应言简意赅, 方便检索, 英文题名以不超过10个实词为宜, 应与中文题名一致。

作者 作者姓名汉语拼音拼写法规定为: 先名, 后姓; 首字母大写, 双名之间用半字线“-”分开, 多作者时姓名间加逗号。格式如: “潘伯荣”的汉语拼写法为“Bo-Rong Pan”。

单位 先写作者, 后写单位的全称及省市邮政编码。例如: Xu-Chen Zhang, Li-Xin Mei, Department of Pathology, Chengde Medical College, Chengde 067000, Hebei Province, China

基金资助项目 格式如: Supported by National Natural Science Foundation of China, No.30224801

通讯作者 格式如: Correspondence to: Dr. Lian-Sheng Ma, Taiyuan Research and Treatment Center for Digestive Diseases, 77 Shuangta Xijie, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China. wcjd@wjgnet.com

收稿及修回日期 格式如: Received: Revised:

摘要 包括目的、方法、结果、结论, 书写要求与中文摘要一致。

3.10 中文摘要 必须在300字左右, 内容应包括目的(应阐明研究的背景和设想、目的), 方法(必须包括材料或对象, 应描述课题的基本设计, 双盲、单盲还是开放性, 使用什么方法, 如何进行分组和对照, 数据的精确程度, 研究对象选择条件与标准是否遵循随机化、齐同化的原则, 对照组匹配的特征。如研究对象是患者, 应阐明其临床表现, 诊断标准, 如何筛选分组, 有多少例进行过随访, 有多少例因出现不良反应而中途停止研究), 结果(应列出主要结果, 包括主要数据, 有什么新发现, 说明其价值和局限, 叙述要真实、准确、具体, 所列数据经用何种统计学方法处理; 应给出结果的置信区间和统计学显著性检验的确切值; 概率写 P , 后应写出相应显著性检验值), 结论(全文总结, 准确无误的观点及价值)。

3.11 正文标题层次 0 引言; 1 材料和方法, 1.1 材料, 1.2 方法; 2 结果; 3 讨论; 4 参

考文献。序号一律左顶格写, 后空1格写标题; 2级标题后空1格接正文。正文内序号连排用(1), (2), (3)。以下逐条陈述。

0 引言 应包括该研究的目的和该研究与其他相关研究的关系。

1 材料和方法 应尽量简短, 但应让其他有经验的研究者能够重复该实验。对新的方法应该详细描述, 以前发表过的方法引用参考文献即可, 有关文献中或试剂手册中的方法的改进仅描述改进之处即可。

2 结果 实验结果应合理采用图表和文字表示, 在结果中应避免讨论。

3 讨论 要简明, 应集中对所得的结果做出解释而不是重复叙述, 也不应是大量文献的回顾。

图表的数量要精选。表应有表序和表题, 并有足够具有自明性的信息, 使读者不查阅正文即可理解该表的内容。表内每一栏均应有表头, 表内非公知通用缩写应在表注中说明, 表格一律使用三线表(不用竖线), 在正文中该出现的地方应注出。图应有图序、图题和图注, 以使其容易被读者理解, 所有的图应在正文中该出现的地方注出。同一个主题内容的彩色图、黑白图、线条图, 统一用一个注解分别叙述。如: 图1 萎缩性胃炎治疗前后病理变化。A: ...; B: ...; C: ...; D: ...; E: ...; F: ...; G: ...。曲线图可按●、○、■、□、▲、△顺序使用标准的符号。统计学显著性用: $^aP<0.05$, $^bP<0.01$ ($P>0.05$ 不注)。如同一表中另有一套 P 值, 则 $^cP<0.05$, $^dP<0.01$; 第3套为 $^eP<0.05$, $^fP<0.01$ 。 P 值后注明何种检验及其具体数字, 如 $P<0.01$, $t = 4.56$ vs 对照组等, 注在表的左下方。表内采用阿拉伯数字, 共同的计量单位符号应注在表的右上方, 表内个位数、小数点、±、-应上下对齐。“空白”表示无此项或未测, “-”代表阴性未发现, 不能用同左、同上等。表图勿与正文内容重复。表图的标目尽量用 t/min , $c/(\text{mol/L})$, p/kPa , V/mL , $t/^\circ\text{C}$ 表达。

志谢 后加冒号, 排在讨论后及参考文献前, 左齐。

4 参考文献 本刊采用“顺序编码制”的著录方法, 即以文中出现顺序用阿拉伯数字编号排序。提倡对国内同行近年已发表的相关研究论文给予充分的反映, 并在文内引用处右上角加方括号注明角码。文中如列作者姓名, 则需在“Pang等”的右上角注角码号; 若正文中仅引用某文献中的论述, 则在该论述的句末右上

角注码号。如马连生^[1]报告……, 潘伯荣等^[2-5]认为……; PCR方法敏感性高^[6-7]。文献序号作正文叙述时, 用与正文同号的数字并排, 如本实验方法见文献[8]。所引参考文献必须以近2-3年SCIE, PubMed, 《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊为准, 通常应只引用与其观点或数据密切相关的国内外期刊中的最新文献。期刊: 序号, 作者(列出全体作者)。文题, 刊名, 年, 卷, 起页-止页, PMID和DOI编号; 书籍: 序号, 作者(列出全部), 书名, 卷次, 版次, 出版地, 出版社, 年, 起页-止页。

5 网络版的发表前链接 本刊即将开始实行网络版的每篇文章上都有该文发表前纪录的链接, 包括首次提交的稿件, 同行评议人报告, 作者给审稿人回信和作者修回稿, 以PDF格式上传。读者可以针对论文、审稿意见和作者的修改情况发表意见, 指出问题与不足; 作者也可以随时修改完善自己发表的论文, 使文章的发表成为一个编者、同行评议者、读者、作者互动的动态过程。

4 写作格式实例

4.1 述评写作格式实例

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

4.2 研究原著写作格式实例

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

4.3 焦点论坛写作格式实例

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

4.4 文献综述写作格式实例

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

4.5 研究快报写作格式实例

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

4.6 临床经验写作格式实例

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

4.7 病例报告写作格式实例

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

5 投稿方式

接受在线投稿, 不接受其他方式的投稿, 如E-mail、打印稿。在线投稿网址: <http://www.baishideng.com/wcjd/ch/index.aspx>。无法在线提交的通过submission@wjgnet.com, 电话: 010-8538-1892, 传真: 010-8538-1893寻求帮助。投

稿须知下载网址<http://www.wjgnet.com/1009-3079/tgxz.pdf>。审稿过程平均时间需要14-28天。所有的来稿均经2-3位同行专家严格评审, 2位或以上通过为录用, 否则将退稿或修改后再审。

6 修回稿须知

6.1 修回稿信件 来稿包括所有作者签名的作者投稿函。内容包括: (1)保证无重复发表或一稿多投; (2)是否有经济利益或其他关系造成的利益冲突; (3)所有作者均审读过该文并同意发表, 所有作者均符合作者条件, 所有作者均同意该代表其真实研究成果, 保证文责自负; (4)列出通讯作者的姓名、职称、地址、电话、传真和电子邮件; 通讯作者应负责与其他作者联系, 修改并最终审核复核稿; (5)列出作者贡献分布; (6)来稿应附有作者工作单位的推荐信, 保证无泄密, 如果是几个单位合作的论文, 则需要提供所有参与单位的推荐信; (7)愿将印刷版和电子版出版权转让给本刊编辑部。

6.2 稿件修改 来稿经同行专家审查后, 认为内容需要修改、补充或删除时, 本刊编辑部将把退修稿连同审稿意见、编辑意见发给作者修改, 而作者必须于15天内将单位介绍信、作者符合要点承诺书、版权转让信等书面材料电子版发回编辑部, 同时将修改后的电子稿件上传至在线办公系统; 逾期寄回, 所造成的问题由作者承担责任。

6.3 版权 本论文发表后作者享有非专有权, 文责由作者自负。作者可在本单位或本人著作集中汇编出版以及用于宣讲和交流, 但应注明发表于《世界华人消化杂志》××年; 卷(期): 起止页码。如有国内外其他单位和个人复制、翻译出版等商业活动, 须征得《世界华人消化杂志》编辑部书面同意, 其编辑版权属本刊所有。

《世界华人消化杂志》编辑部

北京百世登生物医学科技有限公司

100025, 北京市朝阳区东四环中路62号

远洋国际中心D座903室

电话: 010-5908-0035

传真: 010-8538-1893

E-mail: wcjd@wjgnet.com

<http://www.wjgnet.com>

《世界华人消化杂志》坚持开放获取(open access, OA)的出版模式, 编辑出版高质量文章, 努力实现编委、作者和读者利益的最大化, 努力推进本学科的繁荣和发展, 向专业化、特色化和品牌化方向迈进。

2014年国内国际会议预告

2014-03-12/15

2014年亚太肝病研究协会肝病周(APASL)

会议地点: 澳大利亚

联系方式: <http://apasl2014.com/>

2014-04-05/09

2014年美国癌症研究协会大会(AACR)

会议地点: 美国

联系方式: <http://www.aacr.org/home/scientists/meetings--workshops/meetings--workshops-calendar.aspx>

2014-04-09/13

2014年第49届欧洲肝病研究协年会(EASL)

会议地点: 英国

联系方式: http://www.easl.eu/_the-international-liver-congress/general-information

2014-04-18/05-20

2014中国超声医学学术大会

会议地点: 北京市

联系方式: <http://www.cuda.org.cn/new/meeting>

2014-04-26/27

中华医学会临床药学会2014年全国学术会议

会议地点: 成都市

联系方式: <http://www.cncscp.org/>

2014-05-04/06

2014年美国消化疾病周(DDW)

会议地点: 美国

联系方式: <http://www.ddw.org/attendees/faqs>

2014-05-16/18

2014第七届世界癌症大会

会议地点: 南京市

联系方式: <http://www.bitlifesciences.com/cancer2014/cn/meeting.asp>

2014-05-23/24

第六届药源性疾病与安全用药中国论坛-消化系统与肝病药物专题研讨会

会议地点: 北京市

联系方式: adrhuiyi@126.com

2014-05-30/06-03

2014年美国临床肿瘤协会年会(ASCO)

会议地点: 美国

联系方式: <http://www.asco.org/meetings/calendar-events>

2014-06-04/07

2014年第20届国际肝移植协会年会(ILTS)

会议地点: 英国

联系方式: <http://www.ilts.org/meetings/>

2014-06-09/12

2014年第47届欧洲儿科胃肠病、肝病和营养学协会大会(ESPGHAN)

会议地点: 以色列

联系方式: <http://www.espghan2014.org/>

2014-06-18/21

2014年欧洲胃肠与腹部放射学协会肝部成像研讨会(ESGAR)

会议地点: 奥地利

联系方式: <http://www.esgar.org/files/File/ESGAR14>

2014-06-25/28

2014年世界胃肠癌大会(WGIC)

会议地点: 西班牙

联系方式: <http://worldgicancer.com/WCGI>

2014-06-25/28

2014年第14届欧洲内窥镜手术协会国际大会(EAES)

会议地点: 法国

联系方式: hdimcs@163.com

2014-06-27/28

2014中华医学会肝病与代谢学术研讨会

会议地点: 上海市

联系方式: lilyjia@163.com

2014-07-26/31

2014年世界移植大会

会议地点: 美国

联系方式: <http://www.wtc2014.org/>

2014-07-28/30

第3届国际肠胃病学与泌尿学大会

会议地点: 美国

联系方式: <http://www.omicsgroup.com/gastroenterology-urology-conference-2014/registration.php>

2014-09-05/07

2014年第8届国际肝癌协会大会(ILCA)

会议地点: 日本

联系方式: <http://www.ilca2014.org/>

2014-09-26/30

2014年欧洲临床肿瘤协会年会(ESMO)

会议地点: 西班牙

联系方式: <http://www.esmo.org/>

2014-10-18/22

2014年第22届欧洲联合胃肠病学周(UEG)

会议地点: 奥地利

联系方式: <http://www.ueg.eu/week/past-future/future-ueg-week/>

志谢世界华人消化杂志编委

本期文章审稿中(包括退稿), 我刊编委付出了宝贵的时间和大量的精力, 提高了《世界华人消化杂志》的学术质量, 在此表示衷心感谢!

白爱平 副教授
江西省南昌大学第一附属医院消化病研究所

蔡开琳 副教授
华中科技大学同济医学院附属协和医院普通外科

陈光 教授
吉林大学第一医院消化器官外科

陈其奎 教授
中山大学附属第二医院消化内科

陈卫昌 教授
苏州大学附属第一医院消化内科

崔莲花 副教授
青岛大学医学院公共卫生系

董蕾 教授
西安交通大学第二附属医院消化内科

傅红 副教授
上海复旦大学肿瘤医院肿瘤外科

傅晓辉 副教授
东方肝胆外科医院

甘华田 教授
四川大学华西医院老年消化内科

葛海燕 教授
同济大学附属第十人民医院普通外科

巩鹏 教授
大连医科大学附属第一医院普外二科

何松 教授
重庆医科大学附属第二医院消化内科

黄缘 教授
南昌大学第二附属医院消化内科, 江西省分子医学重点实验室

蒋敬庭 教授
常州市第一人民医院(苏州大学附属第三医院)肿瘤生物诊疗中心

康春博 副主任医师
北京大学航天临床医院普通外科

李苏宜 教授
东南大学附属中大医院肿瘤科

刘超 教授
中山大学孙逸仙纪念医院(附属第二医院)肝胆胰外科

刘亮 副主任医师
复旦大学胰腺癌研究所, 复旦大学附属肿瘤医院胰腺肝胆外科

刘正稳 教授
西安交通大学医学院第一附属医院

卢宁 副主任医师
中国人民解放军兰州军区乌鲁木齐总医院肿瘤科

茅爱武 教授
上海同仁医院介入中心

潘阳林 副主任医师
中国人民解放军第四军医大学西京医院消化病医院消化六科

唐文富 副教授
四川大学华西医院中西医结合科

万军 教授
中国人民解放军总医院南楼老年消化科

肖恩华 教授
中南大学湘雅二医院放射教研室

许玲 教授
上海中医药大学附属龙华医院肿瘤科

宣世英 教授
市立医院肝病内科

杨家和 教授
中国人民解放军第二军医大学附属东方肝胆外科医院综合治疗三科

杨薇 副教授
北京大学肿瘤医院超声科

赵春玲 副教授
潍坊医学院细胞生物学教研室

朱传武 主任医师
第五人民医院传染科

《中文核心期刊要目总览》收录证书

《中文核心期刊要目总览》入编通知

尊敬的主编先生/女士：

我们谨此郑重通知：依据文献计量学的原理和方法，经研究人员对相关文献的检索、统计和分析，以及学科专家评审，贵刊《世界华人消化杂志》入编《中文核心期刊要目总览》2011年版（即第六版）之临床医学/特种医学类的核心期刊。该书由北京大学出版社出版。书中按《中国图书馆分类法》的学科体系，列出了73个学科的核心期刊表，并逐一对核心期刊进行了著录。著录项目包括：题名、并列题名、主办单位、创刊时间、出版周期、学科分类号、ISSN号、CN号、邮发代号、编辑部地址、邮政编码、电话、网址、电子邮箱、内容简介等。

评选核心期刊的工作，是运用科学方法对各种刊物在一定时期内所刊载论文的学术水平和学术影响力进行综合评价的一种科研活动，研究工作量浩大。北京地区十几所高校图书馆、中国科学院国家科学图书馆、中国社会科学院文献信息中心、中国人民大学书报资料中心、中国学术期刊（光盘版）电子杂志社、中国科学技术信息研究所、北京万方数据股份有限公司、国家图书馆等相关单位的百余名专家和期刊工作者参加了研究。

课题组对核心期刊的评价理论、评价方法等问题进行了深入研究，进一步改进了核心期刊评价方法，使之更趋科学合理，力求使评价结果符合客观实际。对于核心期刊的评价仍采用定量评价和定性评审相结合的方法。定量评价指标体系采用了被引量、被摘量、被引量、他引量、被摘率、影响因子、被国内外重要检索工具收录、基金论文比、Web下载量等9个评价指标，选作评价指标统计源的数据库及文摘刊物达到60余种，统计到的文献数量共计221177余万篇次，涉及期刊14400余种。参加核心期刊评审的学科专家达8200多位。经过定量筛选和专家定性评审，从我国正在出版的中文期刊中评选出1982种核心期刊。

需要特别指出的是，该研究成果只是一种参考工具书，主要是为图书情报界、出版界等需要对期刊进行评价的用户提供参考，例如为各图书情报部门的中文期刊采购和读者导读服务提供参考帮助等，不应作为评价标准。谨此说明。

顺颂
撰安

《中文核心期刊要目总览》2011年版编委会
代章：_____





Published by **Baishideng Publishing Group Co., Limited**
Flat C, 23/F., Lucky Plaza,
315-321 Lockhart Road, Wan Chai, Hong Kong, China
Fax: +852-3177-9906
Telephone: +852-6555-7188
E-mail: bpgoffice@wjgnet.com
<http://www.wjgnet.com>



ISSN 1009-3079

