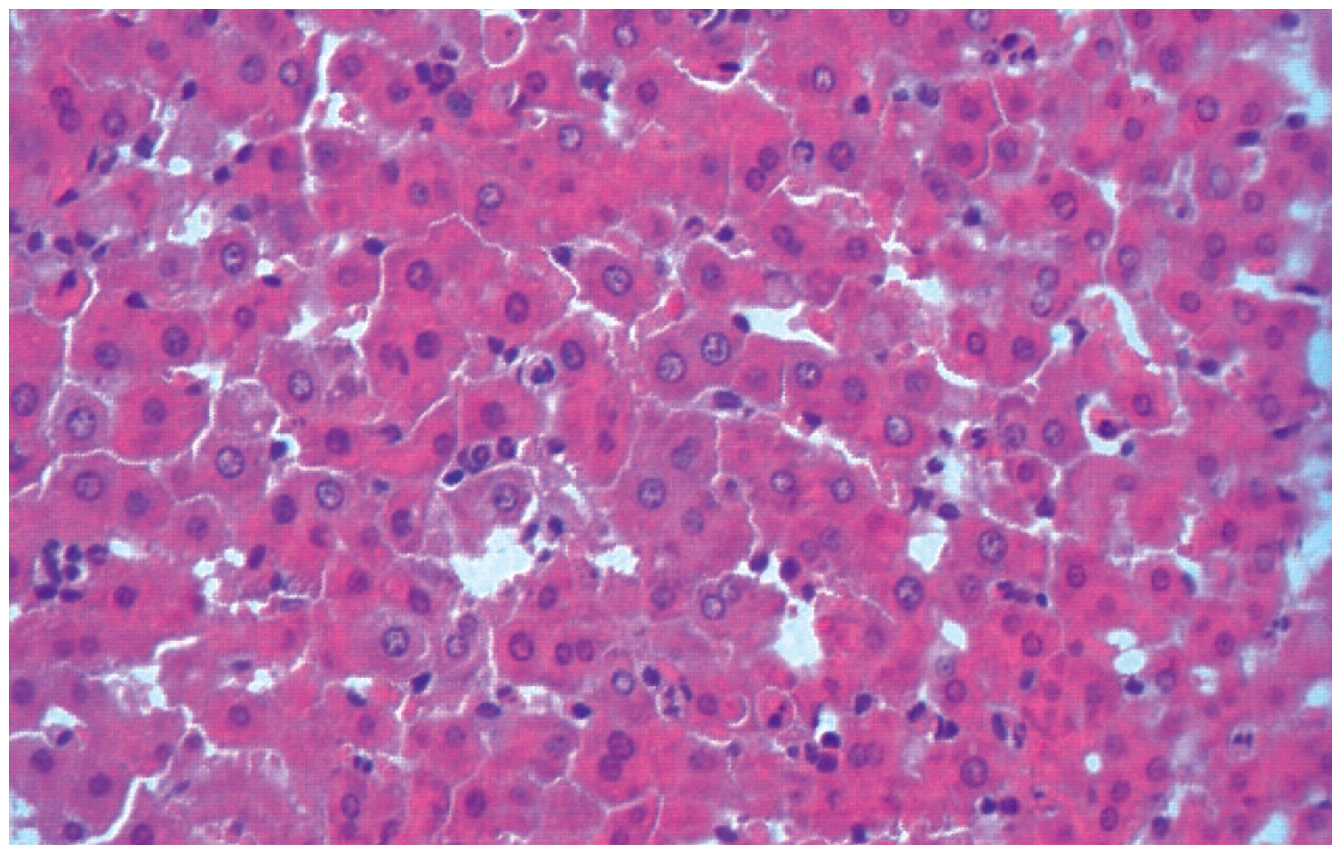


世界华人消化杂志®

**WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY**

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2014 年 8 月 28 日 第 22 卷 第 24 期 (Volume 22 Number 24)



24/2014

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
陈凇教授
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 8 月 28 日 第 22 卷 第 24 期 (总第464期)

基础 研究

- 3557 幽门螺杆菌脂多糖作用于胃癌细胞后刺猬蛋白信号通路中相关蛋白Ptch-1、Gli的表达及意义
周慧, 张军, 张国新, 邵婷, 周晓颖, 苏静
- 3565 *Crk*基因shRNA质粒的构建及其在肝纤维化中的作用
胡江峰, 陈超, 齐峰, 刘婷婷, 刘保海, 朱樑
- 3573 VEGFR-3 siRNA腺病毒载体对结肠癌细胞生长和运动能力的影响
苏芝兰, 高峰, 吕志诚, 张鑫

临 床 研 究

- 3580 白介素-10基因启动子多态性及其血浆水平与腹泻型肠易激综合征重叠功能性消化不良的关系
黄瑶, 赵梁, 张瑜, 周乐, 卜平

文 献 综 述

- 3587 MicroRNAs对HSC生物学功能的影响
毕艺鸣, 许嘉彬, 安海燕
- 3592 炎症性肠病的实验室检查及代谢组学的研究进展
李潘, 崔伯塔, 段义农, 张发明
- 3600 以胰腺为靶点治疗糖尿病的相关信号通路
林玉芳, 沈卫东

研 究 快 报

- 3608 HPV18 *E6*、*E7*基因-shRNA重组腺病毒表达载体的构建及鉴定
李钢, 冯彪, 邓彦超, 李德生, 居来提·艾尼瓦尔, 张力为
- 3613 雌激素对人胃癌细胞株PI9表达和细胞增殖的影响
陈海霞, 周业江, 王璐璐, 李华, 熊玉霞
- 3619 三七总皂甙对肝癌细胞株、甲胎蛋白异质体及高尔基体糖蛋白-73表达的影响
裴旭东, 翟玉峰, 张怀宏
- 3625 P38MAPK抑制剂对急性肝衰竭大鼠内质网应激反应性凋亡的作用
刘晓琨, 刘北彦, 孔俊英, 王凤平, 孙辉, 谢文媛, 王宏微, 沈滨, 杜雅菊
- 3632 双歧杆菌黏附素对大鼠肠缺血再灌注损伤后肠道菌群和细菌易位的影响
钟世顺, 李淑梅, 张振书
- 3639 结肠癌HCT116细胞在不同氧供状态下的氨基酸代谢变化
张小占, 戚文娟, 孔祥涛, 于庆功

- 3644 食管神经内分泌癌p53、nm23、Ki-67的表达及意义
郭庆喜, 蒲霞, 刘俊, 杨成万
- 3649 应用基因芯片筛选七氟醚和丙泊酚的诱导下胃黏膜表达差异基因
李月鹏, 高彩燕
- 3654 热灌注化疗对胃癌患者血管内皮生长因子受体及基质金属蛋白酶的影响
闫琳, 巴楠, 吴敏, 郑晓珂, 张剑, 邢鑫, 张自森
- 3660 胃癌组织中RNF180与RECK的表达水平与预后的关系
黄靓, 李国庆, 毛振江, 钟鹰
- 3665 普萘洛尔降门脉压对肝硬化失代偿期患者肠道屏障功能的影响
姜齐宏, 陈艳, 王爱祥, 骆中华
- 3670 甲胎蛋白、Dickkopf1糖蛋白和 α -L-岩藻糖苷酶在肝癌早期诊断中的应用
童华波, 庭永君, 段航, 罗利梅
- 3675 使用GEO数据集分析PFKFB3在肝细胞癌中的表达及临床意义
丁千山, 孙荣泽, 王笑臣, 沈世强
- 3681 海南地区胆结石患者感染菌群及术后护理效果的评价
王云, 叶兆莲, 林名花, 王媛媛
- 3685 轻型急性胰腺炎并急性肝损害的临床特点
王桃丹
- 3690 胰十二指肠切除术的开腹和微创手术方法疗效的比较
李瑞阳, 黄强, 林先盛, 刘臣海, 杨骥, 胡俊, 汪超
- 3699 二甲双胍联合米氮平治疗厌食症伴消化不良的临床疗效及对血清NE、5-HT和DA的影响
郑宗和, 杨淑青
- 3705 空肠弯曲菌的流行病学调查及其在夏季腹泻患者中的检出率
袁敏, 曾永鸿, 陈志国, 李晶, 赵欣
- 3710 CD4⁺CD29⁺ T细胞亚群与溃疡性结肠炎的相关性及黄芩苷的干预作用
于丰彦, 黄绍刚, 张海燕, 叶华, 迟宏罡, 邹颖, 吕汝西, 郑学宝
- 3718 氧化应激状态评价对消化系肿瘤诊断的临床指导意义
林明哲, 李欣
- 3722 肝源性糖尿病与2型糖尿病患者临床和预后情况的差异及相关护理
王少萍, 吴玉萍, 林小洁

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	3572 《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 3624 《世界华人消化杂志》出版流程 3638 《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) 3643 《世界华人消化杂志》性质、刊登内容及目标 3659 《世界华人消化杂志》被评为中国精品科技期刊 3664 百世登出版集团推出12种开放获取生物医学期刊全部被PubMed和PMC收录
封面故事	刘晓琨, 刘北彦, 孔俊英, 王凤平, 孙辉, 谢文媛, 王宏微, 沈滨, 杜雅菊. P38MAPK抑制剂对急性肝衰竭大鼠内质网应激反应性凋亡的作用. 世界华人消化杂志 2014; 22(24): 3625-3631 http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/3625.asp http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i24.3625
本期责任人	编务 李香; 送审编辑 闫晋利, 都珍珍; 组版编辑 闫晋利; 英文编辑 王天奇; 责任编辑 韦元涛; 形式规范 审核编辑部主任 郭鹏; 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 2014-08-28

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

郭鹏, 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: 18311378628

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 Inc
8226 Regency Drive, Pleasanton,
CA 94588, USA

Fax: +1-925-223-8242

Telephone: +1-925-223-8243

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 2012年版)》, 《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

August 2014 Contents in Brief Volume 22 Number 24

BASIC RESEARCH	<p>3557 Effect of <i>Helicobacter pylori</i> lipopolysaccharide on expression of Ptch-1 and Gli proteins in gastric cancer AGS cells <i>Zhou H, Zhang J, Zhang GX, Tai T, Zhou XY, Su J</i></p> <p>3565 Construction of an shRNA expression vector targeting the <i>Crk</i> gene: Potential role of Crk in liver fibrosis <i>Hu JF, Chen C, Qi F, Liu TT, Liu BH, Zhu L</i></p> <p>3573 SiRNA-mediated silencing of VEGFR-3 reduces proliferation, adhesion and migration of colorectal cancer cells <i>Su ZL, Gao F, Lv ZC, Zhang X</i></p>
CLINICAL RESEARCH	<p>3580 Relationship between <i>IL-10</i> promoter gene polymorphisms and plasma level and susceptibility to overlap syndrome of diarrhea irritable bowel syndrome and functional dyspepsia <i>Huang Y, Zhao L, Zhang Y, Zhou L, Bo P</i></p>
REVIEW	<p>3587 MicroRNAs and biological functions of hepatic stellate cells <i>Bi YM, Xu JB, An HY</i></p> <p>3592 Laboratory evaluation and metabolomics in inflammatory bowel disease <i>Li P, Cui BT, Duan YN, Zhang FM</i></p> <p>3600 Pancreatic signal pathways potentially used as targets for treatment of diabetes <i>Lin YF, Shen WD</i></p>
RAPID COMMUNICATION	<p>3608 Construction and identification of recombinant adenovirus expression vectors expressing short hairpin RNAs targeting HPV18 <i>E6</i> and <i>E7</i> <i>Li G, Feng B, Deng YC, Li DS, Julaiti•Ainiwaer, Zhang LW</i></p> <p>3613 Effect of estrogen on expression of PI9 and cell proliferation in human gastric cancer cell lines <i>Chen HX, Zhou YJ, Wang LL, Li H, Xiong YX</i></p> <p>3619 Influence of panax notoginsenosides on AFP-L3 and GP-73 expression in hepatoma cell lines <i>Pei XD, Zhai YF, Zhang HH</i></p> <p>3625 Effect of P38MAPK inhibitor on endoplasmic reticulum stress-induced hepatocyte apoptosis in rats with acute liver failure <i>Liu XJ, Liu BY, Kong JY, Wang FP, Sun H, Xie WY, Wang HW, Shen B, Du YJ</i></p> <p>3632 Effect of <i>bifidobacterial</i> adhesin on intestinal microflora and bacterial translocation induced by ischemia-reperfusion injury in rats <i>Zhong SS, Li SM, Zhang ZS</i></p> <p>3639 Changes of amino acid metabolism in colon cancer HCT116 cells under different oxygen supply conditions <i>Zhang XZ, Qi WJ, Kong XT, Yu QG</i></p>

- 3644 Significance of expression of p53, nm23 and Ki-67 in esophageal neuroendocrine carcinoma
Guo QX, Pu X, Liu J, Yang CW
- 3649 Identification of sevoflurane and propofol induced differentially expressed genes in gastric mucosa with DNA microarray
Li YP, Gao CY
- 3654 Effect of hyperthermic perfusion chemotherapy on vascular endothelial growth factor receptor 1 and matrix metalloproteinase-9 in patients with gastric cancer
Yan L, Ba N, Wu M, Zheng XK, Zhang J, Xing X, Zhang ZS
- 3660 Expression of RNF180 and RECK in gastric carcinoma
Huang L, Li GQ, Mao ZJ, Zhong Y
- 3665 Effect of reducing portal pressure on intestinal barrier function in patients with decompensated cirrhosis
Jiang QH, Chen Y, Wang AX, Luo ZH
- 3670 Value of alpha fetoprotein, Dickkopf1 glycoprotein and a-L-fucosidase in early diagnosis of liver cancer
Tong HB, Ting YJ, Duan K, Luo LM
- 3675 Analysis of clinical significance of expression of 6-phosphofructo-2-kinase in hepatocellular carcinoma utilizing GEO datasets
Ding QS, Sun RZ, Wang XC, Shen SQ
- 3681 Distribution characteristics of biliary bacteria and postoperative care in patients with cholelithiasis
Wang Y, Ye ZL, Lin MH, Wang YY
- 3685 Clinical characteristics of mild acute pancreatitis with acute liver injury
Wang TD
- 3690 Efficacy and safety of minimally invasive pancreaticoduodenectomy vs open pancreaticoduodenectomy: A systematic review and meta-analysis
Li RY, Huang Q, Lin XS, Liu CH, Yang J, Hu J, Wang C
- 3699 Metformin combined with mirtazapine for treatment of anorexia nervosa with dyspepsia: Clinical effect and impact on serum levels of norepinephrine, 5-hydroxy tryptamine and dopamine
Zheng ZH, Yang SQ
- 3705 Epidemiological investigation of *Campylobacter jejuni* and its detection in patients with summer diarrhea
Yuan M, Zeng YH, Chen ZG, Li J, Zhao X
- 3710 Baicalin modulates immuno-inflammatory response in patients with ulcerative colitis
Yu FY, Huang SG, Zhang HY, Ye H, Chi HG, Zou Y, Lv RX, Zheng XB
- 3718 Clinical significance of oxidative stress evaluation in gastrointestinal cancer diagnosis
Lin MZ, Li X
- 3722 Clinical characteristics, prognosis and nursing intervention in hepatogenic diabetes and type 2 diabetes mellitus
Wang SP, Wu YP, Lin XJ

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>Liu XJ, Liu BY, Kong JY, Wang FP, Sun H, Xie WY, Wang HW, Shen B, Du YJ. Effect of P38MAPK inhibitor on endoplasmic reticulum stress-induced hepatocyte apoptosis in rats with acute liver failure. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi</i> 2014; 22(24): 3625-3631 http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/3625.asp http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i24.3625
RESPONSIBLE EDITORS FOR THIS ISSUE	Assistant Editor: <i>Xiang Li</i> Review Editor: <i>Jin-Li Yan, Zhen-Zhen Du</i> Electronic Page Editor: <i>Jin-Li Yan</i> English Language Editor: <i>Tian-Qi Wang</i> Editor-in-Charge: <i>Yuan-Tao Wei</i> Proof Editor: <i>Peng Guo</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 August 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 Pathol

ogy, 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

Peng Guo, 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 18311378628

Fax: +86-10-85381893

E-mail: wcjd@wjgnet.com

<http://www.wjgnet.com>

PUBLISHER

Baishideng Publishing Group Inc

8226 Regency Drive, Pleasanton,

CA 94588, USA

Fax: +1-925-223-8242

Telephone: +1-925-223-8243

E-mail: bpgoffice@wjgnet.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 Inc. 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 journals owned by the Baishideng Publishing Group (BPG) represent the views and opinions of their authors, and not the views, opinions or policies of the BPG, except where otherwise explicitly indicated.

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.

幽门螺杆菌脂多糖作用于胃癌细胞后刺猬蛋白信号通路中相关蛋白Ptch-1、Gli的表达及意义

周慧, 张军, 张国新, 邵婷, 周晓颖, 苏静

周慧, 张军, 邵婷, 南京医科大学附属南京医院 南京市第一医院消化科 江苏省南京市 210006

张国新, 周晓颖, 苏静, 南京医科大学第一附属医院消化科 江苏省南京市 210029

作者贡献分布: 此课题由周慧、张军及张国新设计; 研究过程由周慧、张军、邵婷、周晓颖及苏静操作完成; 研究所用试剂与分析工具由张军与张国新提供; 数据分析由周慧与张军完成; 本文写作由周慧与张军完成。

通讯作者: 张军, 副教授, 210006, 南京市秦淮区长乐路68号, 南京市第一医院808区消化科. zhangjun711028@126.com

收稿日期: 2014-05-10 修回日期: 2014-06-19

接受日期: 2014-07-01 在线出版日期: 2014-08-28

Effect of *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide on expression of Ptch-1 and Gli proteins in gastric cancer AGS cells

Hui Zhou, Jun Zhang, Guo-Xin Zhang, Ting Tai, Xiao-Ying Zhou, Jing Su

Hui Zhou, Jun Zhang, Ting Tai, Department of Gastroenterology, the Affiliated Nanjing Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing First Hospital, Nanjing 210006, Jiangsu Province, China

Guo-Xin Zhang, Xiao-Ying Zhou, Jing Su, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China
Correspondence to: Jun Zhang, Associate Professor, Department of Gastroenterology, the Affiliated Nanjing Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing First Hospital, 68 Changle Road, Nanjing 210006, Jiangsu Province, China. zhangjun711028@126.com

Received: 2014-05-10 Revised: 2014-06-19

Accepted: 2014-07-01 Published online: 2014-08-28

Abstract

AIM: To explore the expression of Ptch-1 and Gli, two members in the sonic hedgehog (Shh) signaling pathway, in gastric cancer AGS cells after stimulation with *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) lipopolysaccharide (LPS) and cyclopamine.

METHODS: Different concentrations of *H. pylori* LPS were used to stimulate AGS cells for 24 h, and the expression of Ptch-1 and Gli was assayed by Western blot to find the optimal stimulation concentration. AGS cells were then

treated with *H. pylori* LPS at the optimal concentration for 24, 48 and 72 h, and the expression of Ptch-1 and Gli was detected by Western blot. MTT assay was applied to explore the effect of cyclopamine on AGS cell proliferation, and the half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) was calculated. AGS cells were then treated with cyclopamine at IC_{50} for 24, 48 and 72 h, and the expression of Ptch-1 and Gli was detected by Western blot. AGS cells were divided into three groups and stimulated with *H. pylori* LPS, cyclopamine and *H. pylori* LPS plus cyclopamine for 24 h, respectively, and the expression of Ptch-1 and Gli was then detected by Western blot.

RESULTS: After different concentrations of *H. pylori* LPS were used to stimulate AGS cells for 24 h, the expression of Ptch-1 and Gli was increased ($P < 0.05$) and eventually reached a plateau. After treatment of AGS cells with *H. pylori* LPS at the optimal concentration for 24, 48 and 72 h, the expression of Ptch-1 and Gli was increased in a time dependent manner ($P < 0.05$). After treatment of AGS cells with different concentrations of cyclopamine for 24 h, the proliferation of AGS cells was inhibited in a concentration dependent manner ($P < 0.05$). Treatment with cyclopamine at IC_{50} decreased the expression of Gli in a time dependent manner ($P < 0.05$), but showed no significant effect on expression of Ptch-1 ($P > 0.05$). The expression of Ptch-1 in the *H. pylori* LPS plus cyclopamine group was significantly higher than that in the control group and cyclopamine group ($P < 0.05$), but was not significantly different from that in the *H. pylori* LPS group ($P > 0.05$). The expression of Gli in the *H. pylori* LPS plus cyclopamine group was significantly lower than that in the control group and *H. pylori* LPS group ($P < 0.05$), but was not significantly different from that in the cyclopamine group ($P > 0.05$).

CONCLUSION: *H. pylori* may alter the expression of components of the Shh signaling pathway through its virulence factor LPS in AGS cells. Cyclopamine can inhibit the growth of

■背景资料

Shh在细胞的生长发育中起着重要作用, 已有研究证明, Shh信号通路在胃癌组织中高表达, 幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)感染能影响Shh信号通路的表达, 但其具体机制不明, 有研究发现在肺小血管上皮细胞中细菌脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)能影响Shh的表达, 因此我们设想*H. pylori* LPS也能影响Shh信号通路的表达变化。

■同行评议者

邹小明, 教授, 哈尔滨医科大学附属第二医院普外科二科; 郑鹏远, 教授, 主任医师, 郑州大学第二附属医院消化科

■ 研发前沿

Shh信号通路在胃癌发生发展中所起的作用及其机制, 环巴胺抑癌作用.

AGS cells by inhibition of the Shh signaling pathway. *H. pylori* LPS may play a role by influencing the upstream molecules of the Shh signaling pathway.

© 2014 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: *Helicobacter pylori*; Lipopolysaccharide; Gastric cancer; Sonic hedgehog; Cyclopamine

Zhou H, Zhang J, Zhang GX, Tai T, Zhou XY, Su J. Effect of *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide on expression of Ptch-1 and Gli proteins in gastric cancer AGS cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(24): 3557-3564 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/3557.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i24.3557>

摘要

目的: 通过用幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)、环巴胺(cyclopamine)分别或联合作用于胃癌细胞AGS后, 观察刺猬蛋白(sonic hedgehog, Shh)信号通路中相关蛋白Ptch-1、Gli的表达变化, 并探讨其意义.

方法: (1)不同浓度*H. pylori* LPS作用于AGS细胞24 h, Western blot检测Ptch-1、Gli的表达, 找到最佳刺激浓度. 以最佳刺激浓度分别作用于AGS细胞24、48、72 h, Western blot法检测Ptch-1、Gli的表达; (2)不同浓度环巴胺作用于AGS细胞24 h后, MTT法检测对AGS的抑制率, 求得半数抑制浓度(50% concentration of inhibition, IC₅₀). 以环巴胺IC₅₀作用AGS细胞24、48、72 h后, Western blot检测Ptch-1、Gli的表达; (3)AGS细胞培养后分3组, 分别用*H. pylori* LPS、环巴胺、*H. pylori* LPS+环巴胺作用AGS细胞24 h, 另设阴性对照组, 应用Western blot法对各组细胞中Shh信号通路相关蛋白Ptch-1、Gli的表达水平进行检测.

结果: 不同浓度*H. pylori* LPS作用于AGS细胞24 h后Ptch-1、Gli的表达升高, 且随着浓度增加, 表达逐渐增高($P<0.05$), 最终达到一个平台期, 以平台期浓度作为最佳刺激浓度, 分别刺激AGS细胞24、48、72 h, Western blot结果显示, Ptch-1、Gli的表达逐渐升高, 呈时间依赖性($P<0.05$); 不同浓度环巴胺作用于AGS细胞24 h后, MTT结果显示环巴胺对AGS的抑制作用呈浓度依赖性($P<0.05$); 以环巴胺IC₅₀作用AGS细胞24 h后, Western blot结果显示随着时间的延长, Gli的表达逐渐减低, 而Ptch-1的表达无显著性差异. *H. pylori* LPS、环巴胺、

H. pylori LPS+环巴胺组分别作用于AGS细胞24 h后, *H. pylori* LPS+环巴胺联合作用组的Ptch-1表达高于对照组及环巴胺组($P<0.05$), 而与*H. pylori* LPS组无统计学差异; *H. pylori* LPS+环巴胺联合作用组Gli的表达低于对照组和*H. pylori* LPS组($P<0.05$), 与环巴胺组无统计学差异.

结论: *H. pylori*通过其毒力因子LPS能够影响胃癌细胞AGS的Shh信号通路相关蛋白的表达. 环巴胺可通过抑制Shh信号通路抑制胃癌细胞AGS的生长. *H. pylori* LPS可能通过影响Shh信号通路的上游分子发挥作用.

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有.

关键词: 幽门螺杆菌; 脂多糖; 胃癌细胞; 刺猬蛋白; 环巴胺

核心提示: 通过用幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)、环巴胺分别或联合作用于胃癌细胞AGS后, 发现*H. pylori* LPS可能通过影响Shh信号通路的上游分子发挥作用, 环巴胺可抑制胃癌细胞生长.

周慧, 张军, 张国新, 邵婷, 周晓颖, 苏静. 幽门螺杆菌脂多糖作用于胃癌细胞后刺猬蛋白信号通路中相关蛋白Ptch-1、Gli的表达及意义. *世界华人消化杂志* 2014; 22(24): 3557-3564 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/3557.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i24.3557>

0 引言

脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)是幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)的毒力因子之一, 在*H. pylori*感染相关的疾病中起重要作用, 研究发现胃上皮细胞完整性的破坏大多数是通过*H. pylori*表面LPS减弱黏膜细胞和细胞外基质蛋白间的相互作用而发生的^[1]. 刺猬蛋白(hedgehog, *Hh*)基因于1980年首先由Nusslein-Volhard在果蝇胚胎中发现^[2]. 脊椎动物中存在3个同源基因, 即sonic hedgehog(*Shh*)、indian hedgehog(*Ihh*)和desert hedgehog(*Dhh*). *Shh*信号通路在胃肠道黏膜的发育以及维持黏膜的正常结构、形态、功能中发挥重要的作用^[3]. 研究表明, *Shh*的表达与多种消化道肿瘤相关. 环巴胺(cyclopamine)是*Shh*信号通路的拮抗剂, 可诱导多种肿瘤细胞凋亡, 而对正常体细胞的生长无影响^[4]. 研究发现, 环巴胺特异性结合中间信号分子Smo后, 通过阻断*Shh*信号通路, 能够抑制胃癌细胞的生长^[5]. *H.*

*pylori*和Shh均与胃癌的发生发展密切相关,大多数研究显示*H. pylori*感染对Shh信号通路的表达有影响作用,但具体机制尚未明确。LPS作为*H. pylori*的重要毒力因子之一,可能参与这一过程。本研究旨在通过体外实验,选择*H. pylori*的毒力因子之一LPS作为刺激因子,探讨*H. pylori* LPS对胃癌细胞Shh信号通路是否产生影响,以及环巴胺作用后对胃癌细胞Shh信号通路的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 胃癌细胞AGS、*H. pylori*菌株SS1由江苏省人民医院消化科馈赠;环巴胺购自美国Sigma公司;Ptc-1抗体购自美国cell signal公司;Gli抗体购自美国Santa Cruz公司;噻唑蓝(methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide, MTT)购自南京凯基生物科技发展有限公司。

1.2 方法

1.2.1 *H. pylori*的培养:微需氧环境中,37℃培养,厌氧孵箱内放置少量的水以保持湿度,气体交换使箱内气体O₂、CO₂、N₂的质量分数分别为5%、10%、85%。将菌种接种于哥伦比亚培养基(加入10%的脱纤维羊血)培养后在48-72 h,逐日观察结果,培养物经快速尿素酶试验判定阳性。

1.2.2 *H. pylori* LPS的制备:参考Luo等^[6]的热酚水法提取出*H. pylori* LPS,经动态比浊法证实为内毒素,并且测得其浓度为90.87 μg/mL。

1.2.3 胃癌细胞AGS的培养:常规复苏AGS细胞后,使用高糖DMEM培养基,于37℃,5%CO₂孵箱培养,约24 h换液1次,细胞生长至覆盖约70%-80%培养瓶底面时传代。

1.2.4 细胞增殖状态监测(MTT)法:将处于对数生长期的细胞,传代至96孔培养板中,每孔体积200 μL,培养12 h后,弃去原培养基,分别加入200 μL不同浓度环巴胺(5、10、15、20、25、30、35、40 μmol/L),同时设不加环巴胺的阴性对照组以及只加入培养基而无AGS细胞的调零孔,培养24 h后,加入50 μL 1×MTT,培养4 h,每孔加入150 μL二甲基亚砜,平板摇床振荡10 min,每组设8个复孔,重复3次,酶联免疫检测仪A_{490 nm}处测量各孔的吸光度(A)值,计算抑制率。抑制率=(阴性对照孔A值-加环巴胺孔A值)/(阴性对照孔A值)×100%。Probit回归分析计算得出环巴胺半数抑制浓度(50% concentration of inhibition, IC₅₀)。

1.2.5 Western blot法检测各组Ptc-1、Gli蛋白水平:分组:(1)将AGS细胞分为5组,分别加入5 mL不同浓度*H. pylori* LPS(1、5、10、20、40 μg/mL),

并设阴性对照组,干预24 h;用上述处理中所得的*H. pylori* LPS最佳刺激浓度分别作用AGS细胞24、48、72 h;环巴胺IC₅₀分别作用AGS细胞24、48、72 h;将AGS细胞分3组,培养至细胞覆盖约60%-70%培养瓶底时,分别加入*H. pylori* LPS(最佳刺激浓度)、环巴胺IC₅₀、*H. pylori* LPS(最佳刺激浓度)+环巴胺IC₅₀,并设阴性对照组,干预24 h;(2)Western blot法检测各组Ptc-1、Gli蛋白水平:上述各组细胞培养后,加入蛋白裂解液,得到全蛋白提取物,Bradford法进行蛋白浓度测定。配制10%的分离胶,5%浓缩胶,进行SDS-PAGE凝胶电泳、转膜,5%脱脂奶粉封闭液中封闭2 h后,加入稀释的一抗(4℃,过夜),TBST漂洗3次后加入二抗,室温下摇荡孵育2 h, TBST漂洗3次,然后使用ECL法显色,GIS凝胶图像分析系统照相并分析处理。

统计学处理 实验数据用mean±SD表示,多组间比较采用双变量相关分析,两组间两两比较用t检验分析,SPSS17.0软件进行数据处理及分析,*P*<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 *H. pylori* LPS浓度测定 用热酚水法提取出的*H. pylori* LPS水相,经动态比浊法证实为内毒素,浓度为90.87 μg/mL。

2.2 *H. pylori* LPS刺激胃癌细胞AGS24 h后Western blot结果 Western blot结果显示,*H. pylori* LPS 1、5、10、20、40 μg/mL分别作用胃癌细胞AGS 24 h后,Ptc-1、Gli的表达均较对照组升高(*P*<0.05)(表1),且随着浓度增加,Ptc-1、Gli的表达逐渐升高,最后出现平台期(图1)。

2.3 *H. pylori* LPS刺激胃癌细胞AGS 24、48、72 h后Western blot结果 不同浓度*H. pylori* LPS作用于AGS 24 h的Western blot显示随着浓度升高,Ptc-1、Gli的表达逐渐升高,平台期*H. pylori* LPS浓度为20 μg/mL,以此浓度作为最佳刺激浓度。

Western blot结果显示,*H. pylori* LPS 20 μg/mL作用于AGS 24、48、72 h后,Ptc-1、Gli的表达高于对照组(表2,图2),且随着作用时间的延长,Ptc-1、Gli的表达逐渐升高,呈时间依赖性(*P*<0.05)。

2.4 环巴胺作用胃癌细胞AGS 24 h MTT结果 MTT检测结果显示,5-40 μmol/L的环巴胺对胃癌细胞AGS均有抑制作用,且随着浓度的增加,抑制作用逐渐增强,呈浓度依赖性(*P*<0.05)(表3)。Probit回

■相关报道

Ma等通过RT-PCR、原位杂交及免疫组织化学法对56例胃切除标本进行Shh、Gli检测发现,Shh、Gli的表达较非癌组织明显升高,说明Shh信号通路在胃癌组织中被激活。

■同行评价

本文思路清晰, 逻辑合理, 结论中肯, 具有一定的理论指导意义。

表 1 不同浓度 *H. pylori* LPS 作用于 AGS 细胞 24 h Western blot 结果

<i>H. pylori</i> 脂多糖浓度 (μg/mL)	Ptch-1/β-actin	Gli/β-actin
0	0.139 ± 0.078	0.107 ± 0.065
1	0.304 ± 0.045 ^a	0.265 ± 0.070 ^a
5	0.432 ± 0.063 ^a	0.404 ± 0.054 ^a
10	0.575 ± 0.054 ^a	0.589 ± 0.067 ^a
20	0.705 ± 0.073 ^a	0.711 ± 0.071 ^a
40	0.718 ± 0.064 ^a	0.716 ± 0.078 ^a
<i>P</i> 值	$r = 0.833, P < 0.05$	$r = 0.824, P < 0.05$

^a $P < 0.05$ vs 对照组. *H. pylori*: 幽门螺杆菌; LPS: 脂多糖。

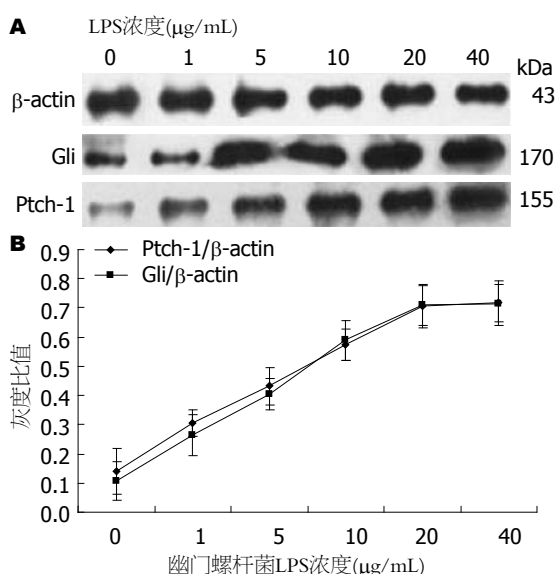


图 1 不同浓度脂多糖作用于 AGS 细胞 24 h 后 Western blot 结果. A: Western blot; B: 统计值. LPS: 脂多糖。

归分析计算得出环巴胺 IC_{50} 为 22.281 μmol/L。

2.5 环巴胺作用胃癌细胞 AGS 24、48、72 h 后 Western blot 结果 以环巴胺 IC_{50} 22.281 μmol/L 作用于胃癌细胞 AGS 24、48、72 h 后, Gli 的表达较对照组降低, 且随着时间延长, Gli 的表达的逐渐减低, 呈时间依赖性 ($P < 0.05$), 而环巴胺作用 24、48、72 h 后 Ptch-1 的表达与对照组没有统计学差异 (表 4, 图 3)。

2.6 *H. pylori* LPS 组、环巴胺组、*H. pylori* LPS+环巴胺组刺激胃癌细胞 AGS 24 h 后 Western blot 结果 *H. pylori* LPS 20 μg/mL、环巴胺 22.281 μmol/L、*H. pylori* LPS 20 μg/mL+环巴胺 22.281 μmol/L 分别作用于 AGS 24 h 后 Western blot 结果显示, *H. pylori* LPS 作用组 Ptch-1、Gli 的表达高于对照组 ($P < 0.05$); 环巴胺作用组的 Ptch-1 表达与对照组无统计学差异, 而 Gli 的

表 2 脂多糖 20 μg/mL 作用于 AGS 24、48、72 h 后 Western blot 结果

分组	Ptch-1/β-actin	Gli/β-actin
对照组	0.598 ± 0.025	0.503 ± 0.046
24 h	0.701 ± 0.043 ^a	0.709 ± 0.067 ^a
48 h	0.795 ± 0.066 ^a	0.867 ± 0.038 ^a
72 h	0.803 ± 0.028 ^a	0.906 ± 0.033 ^a
<i>P</i> 值	$r = 0.953, P < 0.05$	$r = 0.963, P < 0.05$

^a $P < 0.05$ vs 对照组。

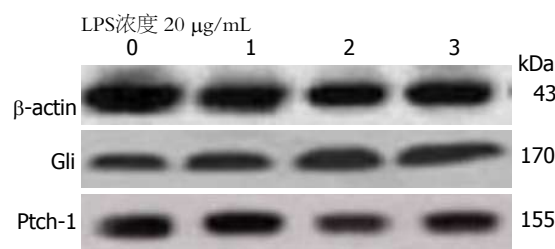


图 2 脂多糖 20 μg/mL 作用于 AGS 24、48、72 h 后 Western blot 结果. 0: 对照组; 1: 24 h; 2: 48 h; 3: 72 h. LPS: 脂多糖。

表达低于对照组 ($P < 0.05$); *H. pylori* LPS+环巴胺联合作用组的 Ptch-1 表达高于对照组及环巴胺组 ($P < 0.05$), 而与 LPS 组相比无统计学差异; *H. pylori* LPS+环巴胺联合作用组的 Gli 的表达低于对照组及 LPS 组 ($P < 0.05$), 而与环巴胺组没有统计学差异 (表 5, 图 4)。

3 讨论

H. pylori 是世界各地最常见的感染性病原之一, 他作为慢性胃炎、消化性溃疡、胃癌和胃黏膜相关性淋巴样组织淋巴瘤等上消化道疾病的重要发病因子, 已日益受到重视。据报道, 亚洲人群 *H. pylori* 感染率达 50%^[7]。1994 年世界卫生组织国际癌症研究机构 (International Agency for Research on Cancer, IARC) 将 *H. pylori* 列为人类胃癌第 I 类致癌原^[8]。LPS 是 *H. pylori* 的毒力因子之一, 具有内毒素的生物学活性, 在 *H. pylori* 感染及 *H. pylori* 相关疾病中起重要作用。有研究表明^[9] *H. pylori* LPS 能介导多种细胞因子和趋化因子的释放, 如白介素 1β (interleukin 1β, IL-1β)、IL-8 及肿瘤坏死因子 α 等, 从而介导免疫反应的发生。Innocenti 等^[10] 发现分别用 *H. pylori* 和 *H. pylori* LPS 刺激人外周血单核细胞后, 两者诱导产生的细胞表面趋化因子和 IL-8 的水平几乎一样高。提示 *H. pylori* LPS 可能是促使中性粒细

表 3 不同浓度环巴胺作用于AGS后的生长抑制率 ($n = 8$, mean \pm SD)

环巴胺浓度(μ mol/L)	生长抑制率(%)
5	5.263 \pm 0.307
10	12.133 \pm 1.203
15	27.195 \pm 0.616
20	40.988 \pm 0.921
25	50.785 \pm 1.355
30	67.548 \pm 0.470
35	81.955 \pm 0.624
40	86.960 \pm 1.938
<i>P</i> 值	$r = 0.996, P < 0.05$

表 4 环巴胺作用AGS 24、48、72 h后Western blot结果

分组	Ptc-1/ β -actin	Gli/ β -actin
对照组	0.523 \pm 0.054	0.604 \pm 0.012
24 h	0.450 \pm 0.020	0.398 \pm 0.048 ^a
48 h	0.468 \pm 0.036	0.207 \pm 0.039 ^a
72 h	0.457 \pm 0.078	0.079 \pm 0.022 ^a
<i>P</i> 值	$r = -0.701, P > 0.05$	$r = -0.995, P < 0.05$

^a $P < 0.05$ vs 对照组.

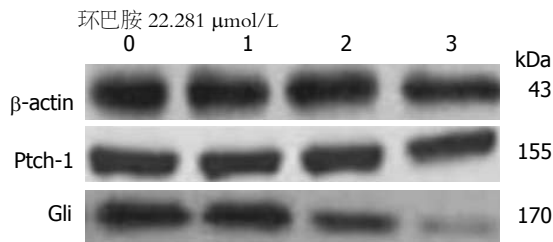
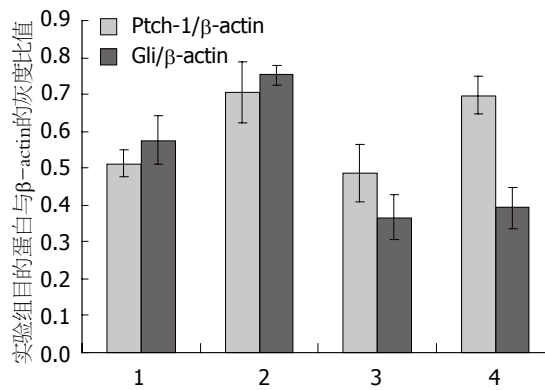
表 5 各组作用于AGS 24 h后Ptc-1、Gli蛋白的表达

分组	Ptc-1/ β -actin	Gli/ β -actin
对照组	0.513 \pm 0.035	0.576 \pm 0.065
<i>H. pylori</i> LPS 20 μ g/mL	0.705 \pm 0.082 ^a	0.752 \pm 0.028 ^a
环巴胺22.281 μ mol/L	0.488 \pm 0.077	0.367 \pm 0.059 ^a
<i>H. pylori</i> LPS 20 μ g/mL + 环巴胺22.281 μ mol/L	0.698 \pm 0.049 ^{ac}	0.393 \pm 0.057 ^{ab}

^a $P < 0.05$ vs 对照组; ^b $P < 0.05$ vs 环巴胺组; ^c $P < 0.05$ vs *H. pylori* LPS组. *H. pylori*: 幽门螺杆菌; LPS: 脂多糖.

胞在胃黏膜中持续聚集, 进而导致黏膜炎症的原因之一. 可见, LPS作为*H. pylori*的毒力因子, 在*H. pylori*相关性疾病的发生、发展中发挥重要作用.

刺猬蛋白(Hedgehog)信号通路在人类胚胎发育过程中起着调控细胞增殖分化, 胚胎发育成熟的作用. Hedgehog家族包含3个同源基因, 即: *Shh*、*Ihh*和*Dhh*, 其中*Shh*信号通路在神经、胃肠道等系统的发育中起着重要作用^[10-12]. *Shh*信号通路可简明表述为*Shh*-*Ptc*-*Smo*-*Gli*信号轴, 主要由分泌型信号蛋白*Shh*配体、跨膜蛋白受体*Ptc*和另一跨膜蛋白*Smo*以及下游转录因

图 3 环巴胺(22.281 μ mol/L)作用AGS 24、48、72 h后Western blot结果. 0: 对照组; 1: 24 h; 2: 48 h; 3: 72 h.图 4 Gli、Ptc-1蛋白与 β -actin灰度分析的比值(各组作用AGS 24 h). 1: 对照组; 2: *H. pylori* LPS 20 μ g/mL; 3: 环巴胺 22.281 μ mol/L; 4: *H. pylori* LPS 20 μ g/mL+环巴胺22.281 μ mol/L. *H. pylori*: 幽门螺杆菌; LPS: 脂多糖.

子*Gli*蛋白组成^[13]. 当*Shh*配体存在时, *Shh*配体与跨膜蛋白受体*Ptc*结合后, 解除了*Ptc*对*Smo*的抑制, *Smo*进入胞质中, 引发细胞内信号的下传, 激活转录因子*Gli*, *Gli*以全长的形式进入细胞核内, 启动靶基因的转录, 把细胞外的Hedgehog信号传递到细胞内, 从而调控细胞的生长发育^[14].

研究发现^[15-18], 在前列腺癌、胰腺癌、肺癌、乳腺癌等恶性肿瘤中陆续发现Hedgehog信号通路均有不同程度的异常活化, 提示Hedgehog信号通路参与了多种恶性肿瘤的发生与发展.

尽管早期诊断和治疗技术已较前有巨大进步, 胃癌仍是全世界癌症死亡的第二大病因^[19]. 胃癌的形成及发展是一个多阶段、多因素相互作用的结果. 最近研究发现Hedgehog信号通路的异常激活与胃癌的发生和发展有着非常密切的联系. Ohta等^[20]发现在胃癌标本中, 8/14存在*Shh*的高表达, 定量测定癌组织中*Shh*是癌旁组织的12.8倍, 并在培养的5种胃癌细胞株(AGS、MKN1、MKN7、MKN45、MKN74)中均发现*Shh*的异常表达, 且应用*Shh*抗体阻断Hedgehog信号通路, 能抑制5种细胞的生长. Ma等^[21]研究发现, *Shh*信号通路在胃癌组织中表达升高. Ber-

man等^[22]的一项体外培养实验显示, 6种人类胃癌细胞系中均可检测到Shh、Ptch及Gli的表达。Yoo等^[23]在离体胃癌细胞中发现Shh的表达与胃癌的分化程度呈负相关。有研究表明^[24]种植胃癌小鼠模型中, Shh表达组肺转移发生率高于Shh不表达组, 提示Shh可刺激胃癌转移, 以上研究提示Shh与胃癌的发生发展有密切关系。Lee等^[25]研究发现, 伴*H. pylori*感染的胃癌中, Shh表达明显上升, 其机制可能与抑制细胞凋亡有关。Schumacher等^[26]研究发现, *Shh*基因敲除的小鼠在感染*H. pylori* 6 mo后依然没有发展成胃炎, 而对照组感染*H. pylori* 6 mo后出现炎症反应, 提示*H. pylori*感染引起的Shh信号通路相关基因表达可能是胃炎发生的关键。由此可以推测, *H. pylori*感染后可能是通过引起Shh信号通路相关蛋白的表达而促进胃癌的发生发展, 但其通过何种毒力因子造成Shh信号通路中相关成员的表达发生变化仍然不确定。Yang等^[27]研究证实, 在肺小血管上皮细胞中细菌LPS能影响Shh的表达。由此, 我们推测, LPS作为*H. pylori*的一种重要毒力因子, 可能在这一过程中起着重要作用。

本研究用不同浓度的*H. pylori* LPS作用于胃癌细胞AGS 24 h, Western blot 结果提示*H. pylori* LPS作用后Ptch-1、Gli的表达增加($P<0.05$), 且随着浓度增高, Ptch-1、Gli的表达逐渐增高, 最后出现平台期, 取此平台期浓度为最佳刺激浓度; 以最佳刺激浓度的*H. pylori* LPS分别作用于AGS 24、48、72 h后, Ptch-1、Gli的表达较对照组增加, 且随着时间的延长, 表达逐渐升高($P<0.05$), 呈时间依赖性。本实验结果提示*H. pylori*可能通过LPS的作用而引起Shh通路相关蛋白的表达变化, 但其机制尚需进一步研究。研究显示^[28]*H. pylori* LPS能通过TLR2和TLR5激活细胞核因子 κ B(nuclear factor-kappa B, NF- κ B), 从而引起多种细胞因子的合成和释放。Nakashima等^[29]发现NF- κ B和*Shh*基因表达呈正相关, 激活NF- κ B后能够诱导Shh的过度表达, 导致Shh信号通路激活, 若此时阻断NF- κ B, Shh过度表达也会受到抑制。提示胃癌组织中Shh的高表达, 其机制可能是*H. pylori*感染导致假性幽门腺化生时, NF- κ B诱发Shh的再次活化^[30]。因此我们可以假设*H. pylori* LPS能通过NF- κ B引起Shh的高表达。

环巴胺能与Hedgehog信号通路中的关键分子Smo蛋白结合, 使其空间构象发生改变, 从而抑制该蛋白活性, 导致Shh信号通路的失活。本

实验MTT结果提示环巴胺对胃癌细胞AGS有抑制作用, 且随着浓度的增加, 抑制作用逐渐增强, 呈浓度依赖性($P<0.05$)。MTT证实环巴胺可以抑制胃癌细胞AGS增殖, 而环巴胺究竟是通过哪些途径对胃癌细胞增殖凋亡产生影响尚不明确, 为此, 我们进行了初步的探讨。

本研究中, Western blot结果显示, 经22.281 μ mol/L环巴胺作用胃癌细胞AGS后, Ptch-1的表达无明显变化, 而Gli的表达下降, 且随着作用时间的延长, 表达逐渐降低, 呈时间依赖性($P<0.05$)。证明环巴胺抑制胃癌细胞生长可能是通过Shh通路的抑制达成的。但环巴胺除了能阻断Hedgehog信号通路, 是否还有其他潜在的抗肿瘤机制及作用靶点, 仍需进一步的探讨。

本研究证明*H. pylori* LPS作用于AGS后, Ptch-1、Gli的表达增加, 而环巴胺作用后, Gli的表达下降, Ptch-1的表达无明显差异, 因此我们进一步探讨了两种干预条件同时作用于AGS时Ptch-1、Gli的变化。结果表明, *H. pylori* LPS+环巴胺联合作用组Ptch-1的表达高于对照组及环巴胺组($P<0.05$), 而与LPS组没有统计学差异; 联合作用组的Gli低于对照组及LPS组($P<0.05$), 而与环巴胺组没有统计学差异。结果提示*H. pylori* LPS的作用位点可能在Smo以上, 但仍需进一步探讨。

本研究证实, *H. pylori* LPS作用于AGS后可引起Shh通路中Ptch-1、Gli蛋白的高表达, 而Ptch-1、Gli的高表达可能与胃癌的预后有关, 积极探讨*H. pylori* LPS作用于该通路的机制对胃癌的防治研究有重要作用。环巴胺抑制肿瘤细胞的生长可能是通过抑制Shh通路完成的, 是一种潜在的抗肿瘤药物, 但环巴胺要广泛应用于临床还需要进行多方面的研究, 值得研究者们进一步探讨。

总之, 本研究提示, *H. pylori*通过其毒力因子LPS能够影响胃癌细胞AGS的Shh信号通路相关蛋白的表达。环巴胺可通过抑制Shh信号通路抑制胃癌细胞AGS的生长。*H. pylori* LPS可能通过影响Shh信号通路的上游分子发挥作用。

4 参考文献

- 1 Slomiany A, Piotrowski J, Slomiany BL. Sucralfate counteracts the inhibition of gastric mucosal mucin receptor by *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1995; 210: 77-81 [PMID: 8578214]
- 2 Nüsslein-Volhard C, Wieschaus E. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*.

- Nature* 1980; 287: 795-801 [PMID: 6776413]
- 3 Kim JH, Choi YJ, Lee SH, Shin HS, Lee IO, Kim YJ, Kim H, Yang WI, Kim H, Lee YC. Effect of *Helicobacter pylori* infection on the sonic hedgehog signaling pathway in gastric cancer cells. *Oncol Rep* 2010; 23: 1523-1528 [PMID: 20428805]
 - 4 McCarthy FR, Brown AJ. Autonomous Hedgehog signalling is undetectable in PC-3 prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 373: 109-112 [PMID: 18544338 DOI: 10.1016/j.bbrc.2008.05.169]
 - 5 Ma X, Chen K, Huang S, Zhang X, Adegboyega PA, Evers BM, Zhang H, Xie J. Frequent activation of the hedgehog pathway in advanced gastric adenocarcinomas. *Carcinogenesis* 2005; 26: 1698-1705 [PMID: 15905200]
 - 6 Luo YH, Yan J, Mao YF. *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide: biological activities in vitro and in vivo, pathological correlation to human chronic gastritis and peptic ulcer. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2055-2059 [PMID: 15237433]
 - 7 Fock KM, Ang TL. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer in Asia. *J Gastroenterol Hepatol* 2010; 25: 479-486 [PMID: 20370726 DOI: 10.1111/j.1440-1746.2009.06188.x]
 - 8 Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, 7-14 June 1994. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 1994; 61: 1-241 [PMID: 7715068]
 - 9 Bhattacharyya A, Pathak S, Datta S, Chattopadhyay S, Basu J, Kundu M. Mitogen-activated protein kinases and nuclear factor-kappaB regulate *Helicobacter pylori*-mediated interleukin-8 release from macrophages. *Biochem J* 2002; 368: 121-129 [PMID: 12150710]
 - 10 Innocenti M, Svennerholm AM, Quiding-Järbrink M. *Helicobacter pylori* lipopolysaccharides preferentially induce CXC chemokine production in human monocytes. *Infect Immun* 2001; 69: 3800-3808 [PMID: 11349045]
 - 11 Kim TH, Kim BM, Mao J, Rowan S, Shivdasani RA. Endodermal Hedgehog signals modulate Notch pathway activity in the developing digestive tract mesenchyme. *Development* 2011; 138: 3225-3233 [PMID: 21750033 DOI: 10.1242/dev.066233]
 - 12 Cayuso J, Ulloa F, Cox B, Briscoe J, Martí E. The Sonic hedgehog pathway independently controls the patterning, proliferation and survival of neuroepithelial cells by regulating Gli activity. *Development* 2006; 133: 517-528 [PMID: 16410413]
 - 13 Sherman AE, Zavros Y. Role of Sonic Hedgehog signaling during progression from inflammation to cancer in the stomach. *World J Gastrointest Pathophysiol* 2011; 2: 103-108 [PMID: 22180844 DOI: 10.4291/wjgp.v2.i6.103]
 - 14 Katoh Y, Katoh M. Hedgehog signaling pathway and gastric cancer. *Cancer Biol Ther* 2005; 4: 1050-1054 [PMID: 16258256]
 - 15 Zhang J, Lipinski RJ, Gipp JJ, Shaw AK, Bushman W. Hedgehog pathway responsiveness correlates with the presence of primary cilia on prostate stromal cells. *BMC Dev Biol* 2009; 9: 50 [PMID: 19811645 DOI: 10.1186/1471-213X-9-50]
 - 16 Olive KP, Jacobetz MA, Davidson CJ, Gopinathan A, McIntyre D, Honess D, Madhu B, Goldgraben MA, Caldwell ME, Allard D, Frese KK, Denicola G, Feig C, Combs C, Winter SP, Ireland-Zecchini H, Reichelt S, Howat WJ, Chang A, Dhara M, Wang L, Rückert F, Grützmann R, Pilarsky C, Izeradjene K, Hingorani SR, Huang P, Davies SE, Plunkett W, Egorin M, Hruban RH, Whitebread N, McGovern K, Adams J, Iacobuzio-Donahue C, Griffiths J, Tuveson DA. Inhibition of Hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer. *Science* 2009; 324: 1457-1461 [PMID: 19460966 DOI: 10.1126/science.1171362]
 - 17 Mizuarai S, Kawagishi A, Kotani H. Inhibition of p70S6K2 down-regulates Hedgehog/GLI pathway in non-small cell lung cancer cell lines. *Mol Cancer* 2009; 8: 44 [PMID: 19575820 DOI: 10.1186/1476-4598-8-44]
 - 18 ten Haaf A, Bektas N, von Serenyi S, Losen I, Arweiler EC, Hartmann A, Knüchel R, Dahl E. Expression of the glioma-associated oncogene homolog (GLI) 1 in human breast cancer is associated with unfavourable overall survival. *BMC Cancer* 2009; 9: 298 [PMID: 19706168 DOI: 10.1186/1471-2407-9-298]
 - 19 Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011; 61: 69-90 [PMID: 21296855 DOI: 10.3322/caac.20107]
 - 20 Ohta M, Tateishi K, Kanai F, Watabe H, Kondo S, Guleng B, Tanaka Y, Asaoka Y, Jazag A, Imamura J, Ijichi H, Ikenoue T, Sata M, Miyagishi M, Taira K, Tada M, Kawabe T, Omata M. p53-Independent negative regulation of p21/cyclin-dependent kinase-interacting protein 1 by the sonic hedgehog-glioma-associated oncogene 1 pathway in gastric carcinoma cells. *Cancer Res* 2005; 65: 10822-10829 [PMID: 16322228]
 - 21 Ma XL, Sun HJ, Wang YS, Huang SH, Xie JW, Zhang HW. Study of Sonic hedgehog signaling pathway related molecules in gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 3965-3969 [PMID: 16810741]
 - 22 Berman DM, Karhadkar SS, Maitra A, Montes De Oca R, Gerstenblith MR, Briggs K, Parker AR, Shimada Y, Eshleman JR, Watkins DN, Beachy PA. Widespread requirement for Hedgehog ligand stimulation in growth of digestive tract tumours. *Nature* 2003; 425: 846-851 [PMID: 14520411]
 - 23 Yoo YA, Kang MH, Kim JS, Oh SC. Sonic hedgehog signaling promotes motility and invasiveness of gastric cancer cells through TGF-beta-mediated activation of the ALK5-Smad 3 pathway. *Carcinogenesis* 2008; 29: 480-490 [PMID: 18174246 DOI: 10.1093/carcin/bgm281]
 - 24 Yoo YA, Kang MH, Lee HJ, Kim BH, Park JK, Kim HK, Kim JS, Oh SC. Sonic hedgehog pathway promotes metastasis and lymphangiogenesis via activation of Akt, EMT, and MMP-9 pathway in gastric cancer. *Cancer Res* 2011; 71: 7061-7070 [PMID: 21975935 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-11-1338]
 - 25 Lee KM, Lee JS, Jung HS, Park DK, Park HS, Hahm KB. Late reactivation of sonic hedgehog by *Helicobacter pylori* results in population of gastric epithelial cells that are resistant to apoptosis: implication for gastric carcinogenesis. *Cancer Lett* 2010; 287: 44-53 [PMID: 19540662 DOI: 10.1016/j.canlet.2009.05.032]
 - 26 Schumacher MA, Donnelly JM, Engevik AC, Xiao C, Yang L, Kenny S, Varro A, Hollande F, Samuelson LC, Zavros Y. Gastric Sonic Hedgehog acts as a macrophage chemoattractant during the immune

- response to *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 2012; 142: 1150-1159.e6 [PMID: 22285806 DOI: 10.1053/j.gastro.2012.01.029]
- 27 Yang Y, Li Q, Deng Z, Zhang Z, Xu J, Qian G, Wang G. Protection from lipopolysaccharide-induced pulmonary microvascular endothelial cell injury by activation of hedgehog signaling pathway. *Mol Biol Rep* 2011; 38: 3615-3622 [PMID: 21110116 DOI: 10.1007/s11033-010-0473-8]
- 28 Smith MF, Mitchell A, Li G, Ding S, Fitzmaurice AM, Ryan K, Crowe S, Goldberg JB. Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR5, but not TLR4, are required for *Helicobacter pylori*-induced NF-kappa B activation and chemokine expression by epithelial cells. *J Biol Chem* 2003; 278: 32552-32560 [PMID: 12807870]
- 29 Nakashima H, Nakamura M, Yamaguchi H, Yamanaoka N, Akiyoshi T, Koga K, Yamaguchi K, Tsuneyoshi M, Tanaka M, Katano M. Nuclear factor-kappaB contributes to hedgehog signaling pathway activation through sonic hedgehog induction in pancreatic cancer. *Cancer Res* 2006; 66: 7041-7049 [PMID: 16849549]
- 30 El-Zaatari M, Tobias A, Grabowska AM, Kumari R, Scotting PJ, Kaye P, Atherton J, Clarke PA, Powe DG, Watson SA. De-regulation of the sonic hedgehog pathway in the *InsGas* mouse model of gastric carcinogenesis. *Br J Cancer* 2007; 96: 1855-1861 [PMID: 17505514]

编辑 田滢 电编 闫晋利



Crk基因shRNA质粒的构建及其在肝纤维化中的作用

胡江峰, 陈超, 齐峰, 刘婷婷, 刘保海, 朱樑

胡江峰, 齐峰, 刘婷婷, 朱樑, 中国人民解放军第二军医大学
长征医院消化科 上海市 200003

陈超, 中国人民解放军总医院第一附属医院消化科 北京市
100037

刘保海, 中国人民解放军第二军医大学 上海市 200082

胡江峰, 在读硕士, 主要从事肝纤维化机制的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 11272342

作者贡献分布: 此课题由胡江峰、刘保海及朱樑设计; 质粒构建、RT-PCR和Western blot检测由胡江峰、刘婷婷及齐峰完成; 数据分析、论文写作由胡江峰与陈超完成。

通讯作者: 朱樑, 教授, 200003, 上海市黄浦区凤阳路415号, 中国人民解放军第二军医大学长征医院消化科。

zhuliangcz@126.com

电话: 021-81885261

收稿日期: 2014-06-11 修回日期: 2014-07-07

接受日期: 2014-07-28 在线出版日期: 2014-08-28

Construction of an shRNA expression vector targeting the *Crk* gene: Potential role of *Crk* in liver fibrosis

Jiang-Feng Hu, Chao Chen, Feng Qi, Ting-Ting Liu,
Bao-Hai Liu, Liang Zhu

Jiang-Feng Hu, Feng Qi, Ting-Ting Liu, Liang Zhu,
Department of Gastroenterology, Changzheng Hospital,
the Second Military Medical University, Shanghai 200003,
China

Chao Chen, Department of Gastroenterology, the First
Affiliated Hospital of General Hospital of PLA, Beijing
100037, China

Bao-Hai Liu, the Second Military Medical University,
Shanghai 200082, China

Supported by: National Natural Science Foundation of
China, No.11272342

Correspondence to: Liang Zhu, Professor, Department
of Gastroenterology, Changzheng Hospital, the Second
Military Medical University, 415 Fengyang Road, Huangpu
District, Shanghai 200003, China. zhuliangcz@126.com

Received: 2014-06-11 Revised: 2014-07-07

Accepted: 2014-07-28 Published online: 2014-08-28

Abstract

AIM: To construct a short-hairpin RNA (shRNA) eukaryotic expression vector targeting the v-*Crk* avian sarcoma virus CT10 oncogene homolog gene (*Crk*) and to study the potential role of *Crk* in liver fibrosis.

METHODS: The shRNA oligonucleotide fragments were designed and synthesized based

on the sequence of *Crk* mRNA. Double strands were then formed after annealing and inserted into the plko vector. Recombinant lentiviral vector was transfected into 293T cells to package lentivirus. LX-2 cells were then infected with the recombinant lentivirus and the function of *Crk* was studied after infection.

RESULTS: RT-PCR and Western blot analyses indicated that after successful infection, both mRNA and protein expression was dramatically down-regulated, compared with the control group. Knockdown of *Crk* decreased the expression of collagen type 1 (Col1), α -smooth muscle actin (α -SMA) and the capacity of cell migration, but had no effect on cell proliferation.

CONCLUSION: We have successfully constructed an shRNA eukaryotic expression vector targeting the *Crk* gene. Knockdown of *Crk* can inhibit liver fibrosis possibly by suppressing the activation and migration of LX-2 cells.

© 2014 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: *Crk*; Short hairpin RNA; Hepatic stellate cells; Liver fibrosis

Hu JF, Chen C, Qi F, Liu TT, Liu BH, Zhu L. Construction of an shRNA expression vector targeting the *Crk* gene: Potential role of *Crk* in liver fibrosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(24): 3565-3572 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/3565.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i24.3565>

摘要

目的: 构建靶向信号接头蛋白Crk的短发夹RNA(short hairpin RNA, shRNA)的真核表达载体质粒, 研究其对肝星状细胞株LX-2功能的影响。

方法: 根据*Crk* mRNA序列进行设计并合成shRNA寡核苷酸片段, 退火形成双链并连接入plko载体。包装*Crk*慢病毒, 感染人肝星状细胞株LX-2。研究其对LX-2细胞增殖、迁移和活

■背景资料

信号接头蛋白Crk被认为参与了细胞内受体整合蛋白和酪氨酸激酶等多种网络信号分子的信号转导过程。近几年, 越来越多的研究发现*Crk*在肿瘤疾病及炎症的进展中起到了重要的作用。

■同行评议者

赵铁建, 教授, 广西中医药大学基础医学院生理学教研室

■ 研发前沿

目前对肝纤维化的研究集中在肝星状细胞的表现遗传学上,例如非编码RNA对肝星状细胞的调控以及寻找非编码RNA相应的靶基因。但由于非编码RNA的靶基因并不局限于一个,因此寻找并验证对肝星状细胞调控的非编码RNA的靶基因是当前研究的一个难点。

化功能的影响。

结果: 定量PCR和Western blot检测结果提示成功构建了针对*Crk*特异性shRNA真核表达质粒, sh*Crk*组的*Crk*表达明显低于对照组。干扰*Crk*基因后, LX-2细胞的活化、迁移能力减弱;而细胞增殖没有受到影响。

结论: LX-2中成功构建*Crk*基因的shRNA真核表达载体;下调*Crk*基因后能够抑制LX-2细胞的活化和迁移。

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词: 信号接头蛋白; 短发夹RNA; 肝星状细胞; 肝纤维化

核心提示: 利用*Crk*的慢病毒载体感染肝星状细胞, 稳定持续的抑制*Crk*的表达。当*Crk*的表达被抑制后, 肝星状细胞的活化指标一型胶原和平滑肌肌动蛋白的表达减少, 肝星状细胞的迁移能力也出现了下降, 提示通过抑制*Crk*能够影响肝纤维化的进程。

胡江峰, 陈超, 齐峰, 刘婷婷, 刘保海, 朱樑. *Crk*基因shRNA质粒的构建及其在肝纤维化中的作用. 世界华人消化杂志 2014; 22(24): 3565-3572 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/3565.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i24.3565>

0 引言

信号接头蛋白Crk(v-Crk avian sarcoma virus CT10 oncogene homolog, Crk)被认为参与了细胞内受体整合蛋白和酪氨酸激酶等多种网络信号分子的信号转导过程^[1,2]。近几年,越来越多的研究发现*Crk*在肿瘤疾病及炎症的进展中起到了重要的作用^[3-8]。最近研究发现microRNA-126(miR-126)通过抑制肝星状细胞的功能从而抑制肝纤维化, 并发现了一个新的靶基因: *Crk*。众所周知, miRNA主要通过转录后水平抑制靶基因的表达行使其功能, 但一个miRNA常常有几个靶基因, 所以miR-126是否直接通过靶向抑制*Crk*对肝星状细胞的功能进行调控尚缺乏直接证据。因此, 通过构建靶向抑制*Crk*的shRNA真核表达质粒, 用以研究*Crk*对肝星状细胞的功能影响, 对于深入了解肝纤维化的分子调控机制有着重要意义。

RNA干扰(RNA interference, RNAi)是大部分生物体存在的一种普遍的细胞生物学现象, 在转录水平调控基因表达^[9-14]。近年来RNAi已经

发展成为一种新型的基因阻断技术, 广泛应用于特异抑制基因的表达及其功能研究。慢病毒载体可携带外源双链shRNA进入细胞, 整合到细胞的基因组中, 进而高效、稳定、特异地抑制目的基因表达。

肝星状细胞的活化被认为是肝纤维化进程中的关键环节。当肝脏受到各种病理因素的刺激后, 由静止状态开始逐渐活化, 伴随着增殖、迁移、活化能力的提升, 并分泌大量的胶原蛋白^[15-21]。本文通过构建*Crk*基因shRNA慢病毒表达载体并感染肝星状细胞系LX-2^[22], 形成*Crk*基因沉默细胞, 进一步研究了*Crk*在肝星状细胞中的作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料 实验大鼠购自中国人民解放军第二军医大学实验动物中心, SPF级♂SD大鼠, 体质量180-200 g, CCl₄、橄榄油(国产分析纯, 上海国药); 大肠杆菌DH5α自行制备; 真核表达载体pLKO.1购自Addgene; 限制性内切酶Age I、EcoR I及T4 DNA连接酶购自大连宝生生物; 小量质粒提取试剂盒购自捷瑞生物; Tublin抗体(巴傲德); I型胶原(collagen type I, Col1)抗体(Abcam); 平滑肌肌动蛋白(α-smooth muscle actin, α-SMA)抗体(Sigma); Crk抗体(Epitomics); Hoechst 33342(Sigma); CCK-8试剂盒(Dojindo); Transwell小室(Corning)。

1.2 方法

1.2.1 靶向*Crk*基因的shRNA序列的设计: 根据Genbank中*Crk*基因的mRNA序列(Genbank accession no. NM_001008365.1→NP_001008366.1), 采用Ambion公司的网上设计软件, 并参考shRNA的设计原则, 设计两段靶向*Crk* mRNA的shRNA序列, 并通过BLAST对所选择的靶序列进行同源分析, 排除shRNA非特异性抑制其他基因片段的可能, 最终确定shRNA序列。设计的具有发夹结构的靶向*Crk*基因的shRNA干扰片段序列及用于对照的序列片段如表1。以上DNA寡核苷酸单链均由上海捷瑞生物公司合成。将合成好的两条互补的单链稀释至100 pmol/L, 等量混合放置于95 °C水浴, 5 min关闭开关待自然冷却后即形成双链。各取5 μL过夜产物分别加入50 μL感受态细胞DH5α中混匀, 冰浴静置20 min, 42 °C水浴热激90 s, 迅速冰浴冷却5 min, 再向其中加入750 μL LB培养基, 37 °C摇床温育50 min, 使大肠杆菌复苏并表达质粒的

表 1 *Crk* shRNA序列及结构

sh <i>Crk</i>	序列及结构
sh <i>Crk</i> -1	5'-CCGGCGCCTCAGTATCGGCTCTGATCTCGAGATCAGAGCCGATACTGAGGCGTTTTT-3'
sh <i>Crk</i> -2	5'-CCGGGCTTTACTGGAATTCTACAACTCGAGTTTGTAGAATTCCAGTAAAGCTTTTT-3'
Control	5'-CCGGTGCTTCGACATTTAACCAATTTCAAGAGAATTGGTTA AATGTCGAAGCTTTTTT-3'

■ 相关报道

Crk 基因在多种肿瘤疾病与非肿瘤疾病中都扮演了重要的角色, 例如影响肿瘤细胞的侵袭和迁移能力, 但在肝纤维化中的作用尚不清楚。

表 2 合成的引物序列

名称	引物序列	大小(bp)
GAPDH	5'-GAAGGCTGGGGCTCATTTG-3'	258
Col1	5'-AGGGGCCATCCACAGTCTTCPF-3'	
	5'-GAGGGCCAAGACGAAGACATC-3'	
α -SMA	5'-CAGATC ACGTCATCGCACAAC-3'	140
	5'-AAAAGACAGCTACGTGGGTGA-3'	
Crk	5'-GCCATGTTCTATCGGGTACTTC-3'	76
	5'-CGCTCCGCCTGGTATATGG-3'	
	5'-GGACACCGACAGCACATAGTC-3'	129

Col1: I 型胶原; α -SMA: 平滑肌肌动蛋白。

氨苄抗性标记基因。将菌液均匀涂于含氨苄的LB平板上, 倒置放在37℃恒温箱培养过夜。第2天从LB平板上挑取3个单克隆菌落接种于5 mL含氨苄抗性的LB培养基中, 37℃恒温摇床250 r/min培养过夜。第2天取出按照质粒小量抽提说明书抽提质粒, 并测其浓度。

1.2.2 干扰效果的检测: 测序正确的PLKO.1/*Crk*-shRNA质粒, 与VSVG、PAX2按4:2:3的比例混合, 利用Lipofectamine 2000转染包装细胞(293T细胞)。48 h后收集病毒上清, 使用0.45 μ m滤器过滤, 短时间使用则置于4℃冰箱, 长时间保存至于-80℃冰箱。当细胞汇合度约30%时, 加入病毒感染LX-2细胞, 8 h换液, 72 h后收集细胞。RT-PCR法检测*Crk* mRNA表达水平。Western blot法检测蛋白表达水平。内参抗体Tublin(1:1500)、*Crk*(1:1500)。采用化学发光法进行显色反应。

1.2.3 细胞增殖检测: 将感染对照病毒的LX-2细胞和sh*Crk*的LX-2细胞按照3000/孔的密度接种于96孔板中, 选取24、48、72 h为3个观察时间点, 加入CKK-8试剂, 置于培养箱内孵育2 h, 取出放置于酶标仪下检测450 nm波长的吸光度(A)值。

1.2.4 细胞迁移检测: 将感染对照病毒的LX-2细胞和sh*Crk*的LX-2细胞按照4×10⁵/well的密度接种于Transwell小室, 上室加入100 μ L无血清培养

基, 下室加入600 μ L含有10%FBS的培养基。孵育16-20 h后取出, 去除原培养基, 加入PBS洗涤细胞2遍。加入4%PFA固定细胞5 min。避光加入Honchest33342进行染核。荧光显微镜下随机选取3个高倍镜视野, 计算3个视野的细胞平均数。

1.2.5 RT-PCR法检测Col1、 α -SMA、*Crk* mRNA水平: 使用TRIzolTM试剂盒(Takara)和RT-PCR试剂盒(Takara)。在6孔板中每个孔加入1 mL TRIzol试剂, 提取细胞总RNA。提取后使用分光光度计检测RNA质量和浓度。 $A_{260/280}$ 均在1.80以上。10 μ L体系中加入500 ng的RNA进行反转录。反转录的程序为: 37℃ 15 min, 85℃ 5 s, 随后置于冰上。定量PCR引物序列如表2。

1.2.6 Western blot检测相关蛋白: 1×SDS裂解蛋白, 每孔加样20 μ g。分别加入1:1500稀释的Tublin、Col1、 α -SMA和*Crk*抗体。1:3000稀释的兔二抗, 常规曝光、显色。

1.2.7 大鼠肝纤维化模型的建立及肝组织形态学观察: 采用CCl₄腹腔注射的方法复制肝纤维化大鼠模型。将大鼠分为两组: 肝纤维化组腹腔注射40%CCl₄的橄榄油溶液, 2 mL/kg, 首剂加倍, 2次/wk, 共8 wk。对照组注射橄榄油溶液, 剂量及注射时间、次数与肝纤维化造模组保持一致。造模结束后, 取大鼠肝左叶, 以4%PFA固定, 石蜡包埋组织制作切片, 行HE染色观察肝纤维化分期, 分期标准参照《病毒性肝炎防治

■创新盘点

与同类文章有所区别的是,本研究利用慢病毒感染肝星状细胞,可以使得目的基因在肝星状细胞中稳定持续的抑制,保证了实验结果的稳定性。此外,本研究还首次发现了*Crk*基因在肝星状细胞中的重要作用。

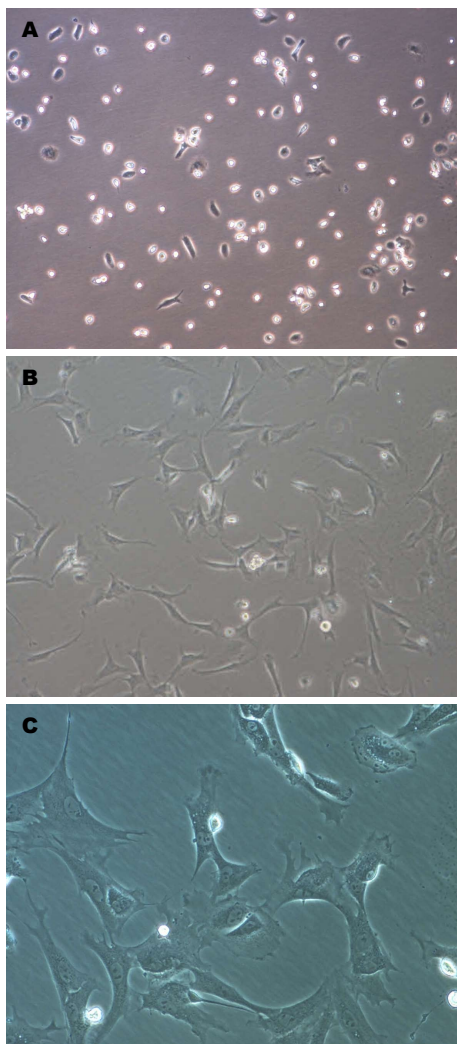


图1 静止、半活化和完全活化状态下的肝星状细胞形态($\times 40$)。A: 2 d静止状态的肝星状细胞; B: 7 d半活化状态的肝星状细胞; C: 14 d完全活化状态的肝星状细胞。

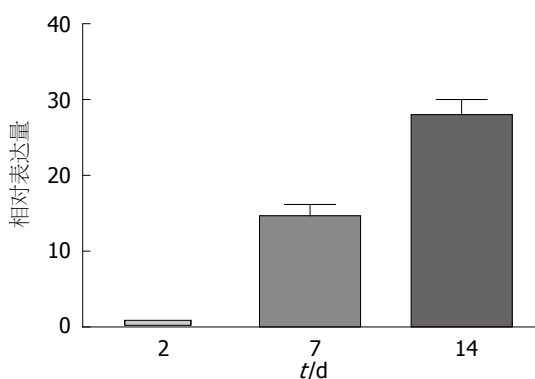


图2 细胞静止、半活化和完全活化状态下的*Crk* mRNA的表达。

方案》^[23]。

统计学处理 应用SPSS统计软件,实验数据以mean \pm SD表示,两两比较采用*t*检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

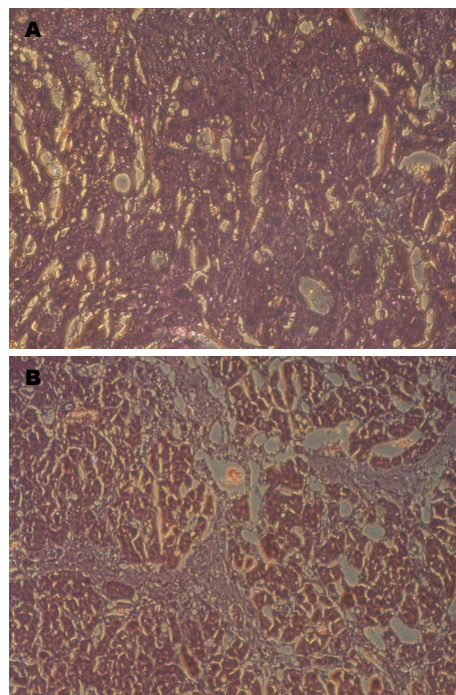


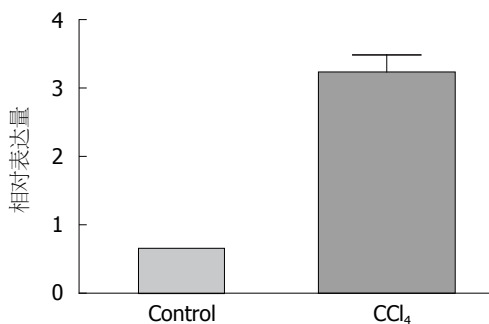
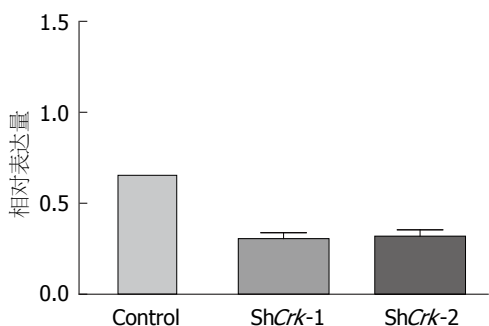
图3 正常肝组织和造模后肝纤维化组织HE染色结果($\times 40$)。A: 正常肝组织; B: 造模后肝纤维化组织。

2 结果

2.1 *Crk* 基因的表达随着肝星状细胞的活化明显升高 利用原位灌注胶原酶消化法分离大鼠的原代肝星状细胞^[24,25]。培养2 d的肝星状细胞保持静止状态,培养7 d的肝星状细胞为半活化状态,培养14 d的肝星状细胞为完全活化的状态。在肝星状细胞逐渐活化的过程中,肝星状细胞的形态由静止状态的圆球形逐渐向外伸出触角呈星形,细胞体积明显增大(图1)。分别收集大鼠和人的静止状态、半活化状态和完全活化状态的肝星状细胞,提取RNA检测*Crk*的表达水平,以2 d的*Crk*表达量为1,随着肝星状细胞逐渐活化,*Crk*的表达逐渐升高($P<0.01$),差异有统计学意义(图2)。

2.2 *Crk* 在肝纤维化组织中表达情况 大鼠CCl₄造模8 wk后,取部分肝组织,HE染色结果显示造模后的大鼠肝脏的纤维组织大量增生,并包绕增生的肝细胞团形成假小叶(图3)。提取肝组织的总RNA,检测*Crk*基因的表达。以对照组*Crk*表达量为1,CCl₄造模8 wk后,肝脏中*Crk*的表达量明显高于对照组($P<0.01$),差异有统计学意义(图4)。

2.3 *Crk* 干扰效果的检测 测序正确的质粒转染293T细胞进行慢病毒的包装,感染LX-2细胞72 h后,收集细胞,提取RNA和蛋白。荧光定量PCR结果显示,相比较于感染对照病毒组,感染了sh*Crk*慢病毒组中*Crk*基因的mRNA表达水平明

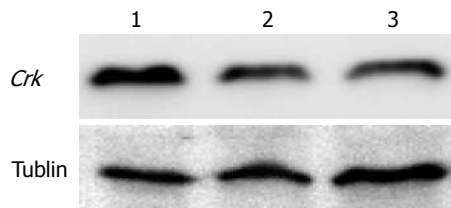
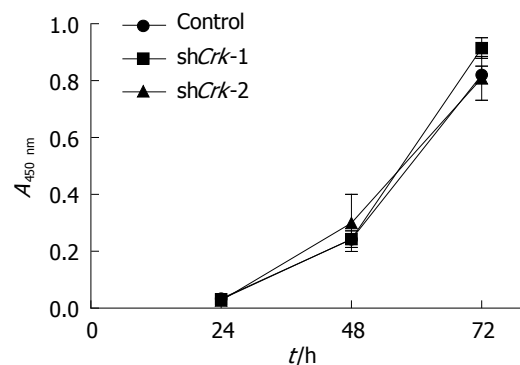
图4 正常组织和造模后肝纤维化肝组织中*Crk*的表达。图5 定量PCR检测*Crk*的干扰效果。

显下调。并且两条设计序列构建的质粒均有较好的干扰效果, 差异有统计学意义($P < 0.01$)(图5)。Western blot检测结果在蛋白表达水平上也提示在感染了sh*Crk*慢病毒组中, *Crk*基因的表达被明显抑制(图6)。

2.4 干扰*Crk*表达对肝星状细胞增殖检测 CCK-8法检测Control组、sh*Crk*-1组、sh*Crk*-2组的LX-2细胞增殖能力。LX-2细胞感染对照病毒和sh*Crk*慢病毒3 d后, 收集细胞, 重新接种于96孔板中。分别收集接种后24、48、72 h的细胞, 加入CCK-8试剂。结果显示, 当下调*Crk*的表达以后, LX-2细胞的增殖能力并未出现明显的变化, 提示*Crk*可能并不影响LX-2细胞的增殖(图7)。

2.5 肝星状细胞的迁移能力检测 利用Transwell小室检测LX-2细胞在抑制*Crk*基因后的细胞迁移能力。由于血清梯度的趋化作用, 细胞由上室穿到下室。当抑制*Crk*的表达后, LX-2细胞的迁移能力出现了明显的下调, sh*Crk*-1和sh*Crk*-2组的细胞迁移数量都明显少于对照组, 两两比较均有统计学意义(均 $P < 0.01$)(表3, 图8)。

2.6 干扰*Crk*后, 抑制Coll和 α -SMA的表达 LX-2细胞感染相应的慢病毒, 72 h后收集细胞, 检测*Coll*和 α -SMA的基因表达水平。结果显示, 当抑制了*Crk*后, *Coll*和 α -SMA的表达也受到了抑制($P < 0.01$)(图9), 差异有统计学意义。Western blot

图6 Western blot检测*Crk*的干扰效果。1: 感染对照病毒组; 2: 感染sh*Crk*-1病毒组; 3: 感染sh*Crk*-2病毒组。图7 对照组和*Crk*干预组的增殖曲线。表3 感染对照病毒和sh*Crk*慢病毒组的细胞迁移数 ($n = 3$, mean \pm SD)

分组	细胞迁移数
Control	86.67 \pm 2.906
sh <i>Crk</i> -1	34.33 \pm 1.764 ^a
sh <i>Crk</i> -2	32.00 \pm 2.082 ^b

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs Control组。

结果同样提示, 抑制*Crk*后, *Coll*和 α -SMA的蛋白水平也出现了明显的减少(图10)。结果提示抑制*Crk*可能会影响LX-2细胞的活化能力。

3 讨论

肝纤维化是多种病因引起的慢性肝脏损伤所导致的病理改变, 主要表现为细胞外间质成分过度沉积, 肝脏功能受损的状态, 是慢性肝病发展到肝硬化、肝癌的必经阶段。目前研究观点认为肝纤维化病变阶段能够逆转至正常, 而肝硬化则无法发生逆转。因此早期发现、早期治疗肝纤维化是目前临床和科研的重点。

肝星状细胞位于Disse间隙内, 紧临着肝细胞和肝窦内皮细胞。各种致纤维化因素均把肝星状细胞作为其作用的最终靶细胞。正常状态下该细胞处于静止状态, 当受到炎症或者机械等刺激时, 肝星状细胞开始被激活。主要表现为

■应用要点

利用慢病毒稳定持续的感染肝星状细胞, 干预*Crk*在肝星状细胞中的表达, 为后期注射到动物体内, 进行体内干预实验, 奠定了基础。

■名词解释

shRNA: short hairpin RNA的缩写, 翻译为: “短发夹RNA”, shRNA包括两个短反向的重复序列, 随后再连上5-6个T作为RNA聚合酶III的转录终止子。

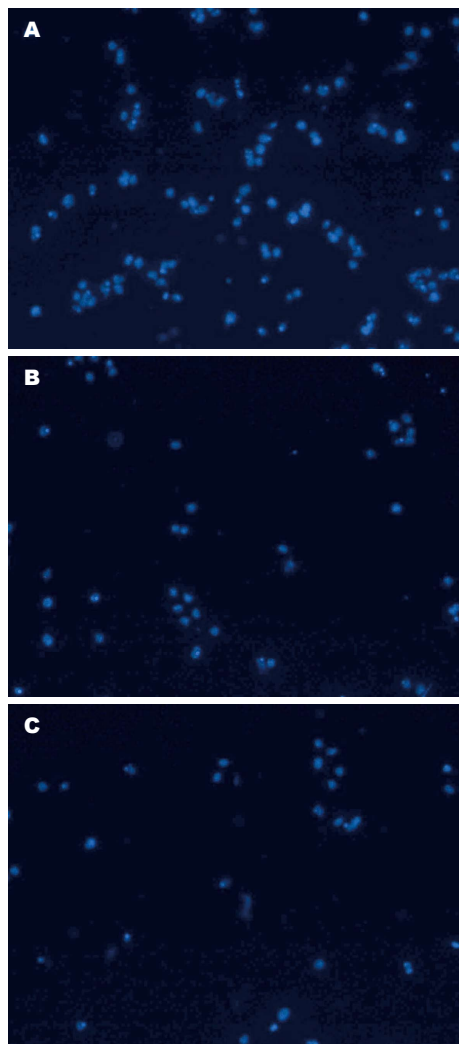


图8 对照组和Crk干预组的细胞迁移数目($\times 40$)。A: 感染对照病毒组的细胞迁移; B: 感染shCrk-1病毒组细胞迁移; C: 感染shCrk-2病毒组细胞迁移。

激活后的肝星状细胞增殖、活化、迁移能力的增强, 并且分泌大量细胞外基质, 参与肝内结构的重建。

肝纤维化的治疗策略中, 很重要的一条就是抑制肝星状细胞的活化。目前有报道的抗肝纤维化有效药物, 例如霉酚酸、转化生长因子- β (transforming growth factor beta, TGF- β)拮抗剂、5-羟色胺拮抗剂、维生素E、 α 干扰素和肝细胞生长因子等都是通过作用于肝星状细胞, 抑制其活化功能, 从而达到治疗肝纤维化的目的^[26-29]。

Crk是近年来发现的一种细胞内信号接头蛋白, 为原癌基因*c-Crk*的表达产物, 参与了细胞内受体整合蛋白和酪氨酸激酶等多种信号分子的信号转导过程。Crk在正常组织中表达较低, 但Crk在恶性肿瘤例如肺癌, 表达显著高于正常组

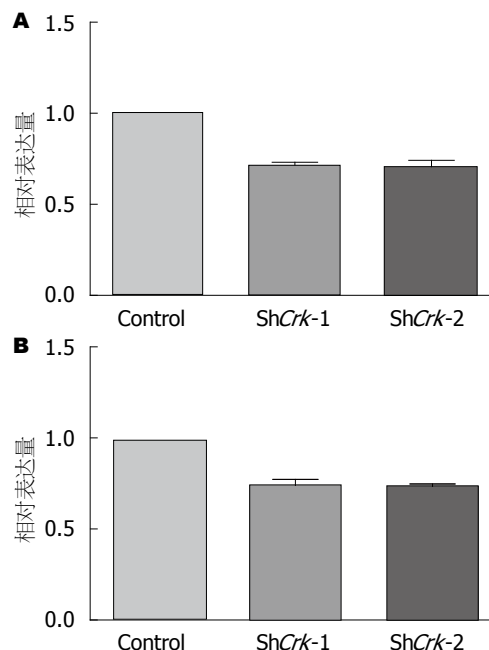


图9 定量水平检测干扰Crk后I型胶原和平滑肌肌动蛋白水平变化。A: Col1的表达情况; B: α -SMA的表达情况。Col1: I型胶原; α -SMA: 平滑肌肌动蛋白。

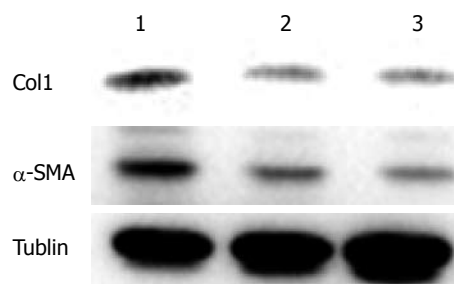


图10 蛋白水平检测干扰Crk后I型胶原和平滑肌肌动蛋白水平变化。1: 感染对照病毒组; 2: 感染shCrk-1病毒组; 3: 感染shCrk-2病毒组。Col1: I型胶原; α -SMA: 平滑肌肌动蛋白。

织。且研究发现其与肿瘤细胞的增殖、侵袭、凋亡等功能紧密相关。Crk作为一种接头蛋白, 通过与多种信号分子相联系, 广泛参与肿瘤细胞的增殖、迁移、凋亡的信号转导。

最近, 有研究者发现过表达miR-126能够明显抑制大鼠肝星状细胞的活化和迁移, 并发现了一个miR-126的新的靶基因: *Crk*^[30]。但Crk在肝纤维化中的作用尚不清楚。因此, 对Crk的功能进行研究显得尤为必要。我们利用RNA干扰技术, 设计并构建了两个靶向Crk基因的shRNA真核表达载体。利用包被的慢病毒感染LX-2细胞, 具备了高效性、稳定性、特异性等优势, 并且将目的基因整合到宿主细胞的染色体中, 在子代中稳定表达。通过RT-PCR和Western blot实

实验验证了干扰效果, 得到了两个较为有效的干扰质粒载体sh*Crk1*、sh*Crk2*。随后分别对细胞的增殖, 活化以及迁移的功能进行检测。我们发现, 干预了sh*Crk*后, LX-2细胞的增殖能力并未受到影响, 但其迁移能力明显被抑制, 细胞活化的相关指标Col1和 α -SMA也出现了明显的下调。这一结果提示*Crk*在调控LX-2细胞的功能起到了重要的作用, 抑制*Crk*能够阻减少肝星状细胞分泌合成细胞外基质, 抑制肝星状细胞向损伤部位迁移。提示*Crk*可能作为潜在的治疗肝纤维化的靶点。

总之, 本研究成功设计并构建了2条靶向*Crk*的shRNA质粒。在细胞水平上发现干扰*Crk*基因能够抑制肝星状细胞的活化和迁移。为后续进一步的体内外功能研究提供了理论基础。

4 参考文献

- Feller SM. Crk family adaptors-signalling complex formation and biological roles. *Oncogene* 2001; 20: 6348-6371 [PMID: 11607838 DOI: 10.1038/sj.onc.1204779]
- Nishihara H, Tanaka S, Tsuda M, Oikawa S, Maeda M, Shimizu M, Shinomiya H, Tanigami A, Sawa H, Nagashima K. Molecular and immunohistochemical analysis of signaling adaptor protein Crk in human cancers. *Cancer Lett* 2002; 180: 55-61 [PMID: 11911970 DOI: 10.1016/S0304-3835(01)00763-7]
- Mortazavi F, Dubinett S, Rettig M. c-Crk proto-oncogene contributes to transcriptional repression of p120-catenin in non-small cell lung cancer cells. *Clin Exp Metastasis* 2011; 28: 391-404 [PMID: 21336985 DOI: 10.1007/s10585-011-9378-8]
- Kumar S, Fajardo JE, Birge RB, Sriram G. Crk at the quarter century mark: perspectives in signaling and cancer. *J Cell Biochem* 2014; 115: 819-825 [PMID: 24356912 DOI: 10.1002/jcb.24749]
- Linghu H, Tsuda M, Makino Y, Sakai M, Watanabe T, Ichihara S, Sawa H, Nagashima K, Mochizuki N, Tanaka S. Involvement of adaptor protein Crk in malignant feature of human ovarian cancer cell line MCAS. *Oncogene* 2006; 25: 3547-3556 [PMID: 16491127]
- Fathers KE, Bell ES, Rajadurai CV, Cory S, Zhao H, Mourskaia A, Zuo D, Madore J, Monast A, Mes-Masson AM, Grosset AA, Gaboury L, Hallet M, Siegel P, Park M. Crk adaptor proteins act as key signaling integrators for breast tumorigenesis. *Breast Cancer Res* 2012; 14: R74 [PMID: 22569336]
- Tsuda M, Tanaka S. Roles for crk in cancer metastasis and invasion. *Genes Cancer* 2012; 3: 334-340 [PMID: 23226571 DOI: 10.1177/1947601912458687]
- Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 2005; 120: 15-20 [PMID: 15652477]
- Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 2001; 411: 494-498 [PMID: 11373684]
- Shen T, Liu K, Miao D, Cao R, Zhou B, Chen P. Lentivirus-mediated RNA interference against Japanese encephalitis virus infection in vitro and in vivo. *Antiviral Res* 2014; 108: 56-64 [PMID: 24942376 DOI: 10.1016/j.antiviral]
- Chen S, Feng J, Ma L, Liu Z, Yuan W. RNA interference technology for anti-VEGF treatment. *Expert Opin Drug Deliv* 2014 Jun 5. [Epub ahead of print] [PMID: 24898870]
- Shum D, Djballah H. Plasmid-Based shRNA Lentiviral Particle Production for RNAi Applications. *J Biomol Screen* 2014 Jun 17. [Epub ahead of print] [PMID: 24939963]
- van Cleef KW, van Mierlo JT, Miesen P, Overheul GJ, Fros JJ, Schuster S, Marklewitz M, Pijlman GP, Junglen S, van Rij RP. Mosquito and Drosophila entomobirnaviruses suppress dsRNA- and siRNA-induced RNAi. *Nucleic Acids Res* 2014; 42: 8732-8744 [PMID: 24939903]
- Beard PM, Griffiths SJ, Gonzalez O, Haga IR, Pechenick Jowers T, Reynolds DK, Wildenhain J, Tekotte H, Auer M, Tyers M, Ghazal P, Zimmer R, Haas J. A loss of function analysis of host factors influencing Vaccinia virus replication by RNA interference. *PLoS One* 2014; 9: e98431 [PMID: 24901222]
- Safadi R, Friedman SL. Hepatic fibrosis--role of hepatic stellate cell activation. *MedGenMed* 2002; 4: 27 [PMID: 12466770]
- Venugopal SK, Jiang J, Kim TH, Li Y, Wang SS, Torok NJ, Wu J, Zern MA. Liver fibrosis causes down-regulation of miRNA-150 and miRNA-194 in hepatic stellate cells, and their overexpression causes decreased stellate cell activation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2010; 298: G101-G106 [PMID: 19892940 DOI: 10.1152/ajpgi.00220.2009]
- Lo YT, Tsai YH, Wu SJ, Chen JR, Chao JC. Ginsenoside Rb1 inhibits cell activation and liver fibrosis in rat hepatic stellate cells. *J Med Food* 2011; 14: 1135-1143 [PMID: 21895415 DOI: 10.1089/jmf.2010.1485]
- Rosenberg P, Sjöström M, Söderberg C, Kinnman N, Stål P, Hultcrantz R. Attenuated liver fibrosis after bile duct ligation and defective hepatic stellate cell activation in neural cell adhesion molecule knockout mice. *Liver Int* 2011; 31: 630-641 [PMID: 21457436 DOI: 10.1111/j.1478-3231.2011.02486.x]
- Marcos LA, Terashima A, Yi P, Andrade R, Cubero FJ, Albanis E, Gotuzzo E, Espinoza JR, Friedman SL. Mechanisms of liver fibrosis associated with experimental Fasciola hepatica infection: roles of Fas2 proteinase and hepatic stellate cell activation. *J Parasitol* 2011; 97: 82-87 [PMID: 21348611 DOI: 10.1645/GE-2420.1]
- Ping J, Gao AM, Qin HQ, Wei XN, Bai J, Liu L, Li XH, Li RW, Ao Y, Wang H. Indole-3-carbinol enhances the resolution of rat liver fibrosis and stimulates hepatic stellate cell apoptosis by blocking the inhibitor of κ B kinase α /inhibitor of κ B- α /nuclear factor- κ B pathway. *J Pharmacol Exp Ther* 2011; 339: 694-703 [PMID: 21862660 DOI: 10.1124/jpet.111.179820]
- Ghatak S, Biswas A, Dhali GK, Chowdhury A, Boyer JL, Santra A. Oxidative stress and hepatic stellate cell activation are key events in arsenic induced liver fibrosis in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 2011; 251: 59-69 [PMID: 21134390 DOI: 10.1016/j.taap.2010.11.016]
- Xu L, Hui AY, Albanis E, Arthur MJ, O'Byrne SM, Blaner WS, Mukherjee P, Friedman SL, Eng FJ. Hu-

同行评价

本实验选题, 设计合理, 实验结果客观可信, 具有一定的应用价值。

- man hepatic stellate cell lines, LX-1 and LX-2: new tools for analysis of hepatic fibrosis. *Gut* 2005; 54: 142-151 [PMID: 15591520]
- 23 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. 中华肝脏病杂志 2000; 8: 324-329
- 24 Ramm GA. Isolation and culture of rat hepatic stellate cells. *J Gastroenterol Hepatol* 1998; 13: 846-851 [PMID: 9736182]
- 25 Chang W, Yang M, Song L, Shen K, Wang H, Gao X, Li M, Niu W, Qin X. Isolation and culture of hepatic stellate cells from mouse liver. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2014; 46: 291-298 [PMID: 24389643 DOI: 10.1093/abbs/gmt143]
- 26 Harrison SA, Torgerson S, Hayashi P, Ward J, Schenker S. Vitamin E and vitamin C treatment improves fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 2485-2490 [PMID: 14638353]
- 27 Li Q, Yan Z, Li F, Lu W, Wang J, Guo C. The improving effects on hepatic fibrosis of interferon- γ liposomes targeted to hepatic stellate cells. *Nano-technology* 2012; 23: 265101 [PMID: 22700686 DOI: 10.1088/0957]
- 28 Manzia TM, Angelico R, Toti L, Bellini MI, Sforza D, Palmieri G, Orlando G, Tariciotti L, Angelico M, Tisone G. Long-term, maintenance MMF monotherapy improves the fibrosis progression in liver transplant recipients with recurrent hepatitis C. *Transpl Int* 2011; 24: 461-468 [PMID: 21294787 DOI: 10.1111/j.1432-2277.2011.01228.x]
- 29 Germani G, Tsochatzis E, Burroughs AK. Does MMF really slow down fibrosis of HCV recurrence in liver transplant recipients? *Transpl Int* 2011; 24: e77-e78 [PMID: 21696454 DOI: 10.1111/j.1432-2277.2011.01288.x]
- 30 Gong XH, Chen C, Hou P, Zhu SC, Wu CQ, Song CL, Ni W, Hu JF, Yao DK, Kang JH, Zhu L. Overexpression of miR-126 Inhibits the Activation and Migration of HSCs through Targeting CRK. *Cell Physiol Biochem* 2014; 33: 97-106 [PMID: 24480980 DOI: 10.1159/000356653]

编辑 郭鹏 电编 闫晋利



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%。

VEGFR-3 siRNA腺病毒载体对结肠癌细胞生长和运动能力的影响

苏芝兰, 高峰, 吕志诚, 张鑫

苏芝兰, 甘肃武威市医院消化科 甘肃省武威市 733000
高峰, 吕志诚, 张鑫, 中国人民解放军兰州军区兰州总医院
肛肠外科 甘肃省兰州市 730050
甘肃省对外合作项目基金资助项目, No. 1104WCGA190
作者贡献分布: 苏芝兰与吕志诚对此文所作贡献均等; 此课题由
苏芝兰与吕志诚设计; 研究过程由吕志诚与张鑫操作完成; 研究
所用试剂及分析工具由高峰与张鑫提供; 数据分析由吕志诚完
成; 本论文写作由苏芝兰与吕志诚完成。
通讯作者: 吕志诚, 主治医师, 730050, 甘肃省兰州市七里河区
南滨河路333号, 中国人民解放军兰州军区兰州总医院肛肠外
科. lyuzc@sohu.com
收稿日期: 2014-04-08 修回日期: 2014-06-19
接受日期: 2014-07-01 在线出版日期: 2014-08-28

SiRNA-mediated silencing of VEGFR-3 reduces proliferation, adhesion and migration of colorectal cancer cells

Zhi-Lan Su, Feng Gao, Zhi-Cheng Lv, Xin Zhang

Zhi-Lan Su, Department of Gastroenterology, Wuwei City
Hospital, Wuwei 733000, Gansu Province, China
Feng Gao, Zhi-Cheng Lv, Xin Zhang, Department of Ano-
rectal Surgery, Lanzhou General Hospital of Lanzhou Military
Area, Lanzhou 730050, Gansu Province, China
Supported by: Foreign Cooperation Projects of Gansu
Province, No. 1104WCGA190
Correspondence to: Zhi-Cheng Lv, Attending Physician,
Department of Anorectal Surgery, Lanzhou General Hospital of
Lanzhou Military Area, 333 Nanbinghe Road, Qilihe District,
Lanzhou 730050, Gansu Province, China. lyuzc@sohu.com
Received: 2014-04-08 Revised: 2014-06-19
Accepted: 2014-07-01 Published online: 2014-08-28

Abstract

AIM: To investigate the effect of transfection with an adenovirus vector expressing short interfering RNA (siRNA) targeting vascular endothelial growth factor receptor-3 (VEGFR-3) on cell proliferation, adhesion and migration in colorectal cancer cell line LoVo.

METHODS: An adenovirus vector expressing siRNA targeting VEGFR-3 was constructed and transfected into LoVo cells. The expression of VEGFR-3 was detected by RT-PCR and Western blot. Cell proliferation and migration were detected by MTT assay and Transwell assay,

respectively.

RESULTS: The expression of VEGFR-3 mRNA and protein was significantly decreased after transfection with the recombinant adenovirus ($P < 0.05$), compared with the blank control group and negative control group. The proliferation, adhesion and migration of LoVo cells were significantly decreased after transfection with the recombinant adenovirus ($P < 0.05$).

CONCLUSION: SiRNA-mediated silencing of VEGFR-3 inhibits the proliferation, adhesion and migration of LoVo cells.

© 2014 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: Colorectal neoplasms; RNA interference; Vascular endothelial growth factor receptor-3; Adenovirus vector; Proliferation; Migration; Adhesion

Su ZL, Gao F, Lv ZC, Zhang X. SiRNA-mediated silencing of VEGFR-3 reduces proliferation, adhesion and migration of colorectal cancer cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(24): 3573-3579 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/3573.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v22.i24.3573>

摘要

目的: 探讨血管内皮生长因子受体3(vascular endothelial growth factor receptor-3, VEGFR-3)siRNA腺病毒载体对结肠癌细胞增殖、迁移、黏附和侵袭能力的影响。

方法: 将VEGFR-3 siRNA腺病毒转染结肠癌LoVo细胞, 以qRT-PCR和Western blot分别检测VEGFR-3 mRNA和蛋白的表达, 通过MTT比色法、划痕实验、Transwell实验、黏附实验检测LoVo细胞的增殖、迁移、侵袭和黏附能力。

结果: 与空白对照组和阴性对照组相比, 实验组VEGFR-3 mRNA和蛋白的表达水平明显降

■背景资料

结直肠癌是常见的恶性肿瘤之一, 近年来, 我国的结直肠癌发病率和死亡率呈上升趋势, 尤其结肠癌的发病率上升尤为显著。淋巴转移是结肠癌主要的转移途径, 血管内皮生长因子受体(vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR)家族成员及其受体是目前认为较为重要的调控肿瘤血管淋巴管生成的信号传导通路。

■同行评议者

郭俊明, 教授, 宁波大学医学院生物化学与分子生物学研究所; 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

VEGFR-3参与了肿瘤的发生、发展、侵袭和转移。针对此受体的研究在结肠癌靶向治疗方面具有重要意义。VEGFR-3的表达与结肠癌的生存时间相关,是一个独立的预后因素。期望为结肠癌的临床治疗开辟一条新的途径。

低($P<0.05$)。与空白对照组和阴性对照组相比,实验组细胞增殖明显抑制($P<0.05$),迁移能力减弱($P<0.05$),实验组的穿膜细胞数明显减少($P<0.05$),黏附能力减弱($P<0.001$)。

结论:腺病毒介导的VEGFR-3 siRNA可以通过下调结肠癌细胞VEGFR-3的表达从而抑制结肠癌细胞的增殖、黏附、侵袭和迁移能力。

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词: 结肠肿瘤; RNA干扰; 血管内皮生长因子受体3; 腺病毒; 增殖; 迁移; 黏附

核心提示: 本研究通过靶向血管内皮生长因子受体3(vascular endothelial growth factor receptor-3, VEGFR-3)小干扰RNA腺病毒转染结肠癌LoVo细胞,检测到VEGFR-3 mRNA和蛋白的表达受到抑制,细胞增殖减缓、迁移和侵袭能力明显减弱。说明VEGFR-3小干扰RNA腺病毒载体可以作为结肠癌靶向治疗的一种途径,为结肠癌靶向治疗提供新的理论依据和临床治疗手段。

苏芝兰, 高峰, 吕志诚, 张鑫. VEGFR-3 siRNA腺病毒载体对结肠癌细胞生长和运动能力的影响. 世界华人消化杂志 2014; 22(24): 3573-3579 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/3573.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i24.3573>

0 引言

血管内皮生长因子受体3(vascular endothelial growth factor receptor-3, VEGFR-3)是血管内皮细胞的酪氨酸受体之一,主要介导淋巴管的生成。在多种肿瘤的增殖和迁移中起着重要作用^[1,2]。结肠癌和其他恶性肿瘤一样,侵袭和转移是其主要特征^[3-5]。大多数结肠癌患者发现时已为晚期,已发生远处转移和局部周围器官的侵犯,给治疗带来一定难度,也是致死的主要原因之一^[6,7]。

本研究在原有研究的基础上,通过腺病毒介导的VEGFR-3小干扰RNA(small interfering, siRNA)感染结肠癌细胞,了解能否抑制结肠癌细胞的生长和运动能力,为结肠癌的靶向治疗提供新的依据。

1 材料和方法

1.1 材料 人结肠癌LoVo细胞系购自中科院上海生物研究所; 包含有靶向VEGFR-3的pGenesil-siRNA由晶赛公司合成; pAdTrack、pAdEasy-1质粒, DH5 α 、BJ5183菌种, HEK293细胞由中国人民解放军兰州军区兰州总医院实验室提供;

PCR试剂盒、T4 DNA连接酶及限制性内切酶 *Sal* I、*Hind* III、*Eco* R I 购自日本Takara公司; *Pac* I 购自美国NEB公司; 质粒小量抽提试剂盒与胶回收试剂盒购自Omega公司; 脂质体Lipofectamine™2000购自Invitrogen公司; Transwell小室(Millicore 8 μ m)购自Corning公司; Matrigel基质胶购自BD公司。

1.2 方法

1.2.1 VEGFR-3 siRNA腺病毒载体pAd-VEGFR-3-siRNA的构建及病毒感染: VEGFR3 siRNA腺病毒载体pAd-VEGFR-3-siRNA的构建见文献[8]。复苏后的结肠癌LoVo细胞在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂饱和湿度条件下、用含10%胎牛血清的1640培养液培养。在生长倍数期时,用胰酶消化,分为3组: 接种6孔板,未接种病毒的LoVo细胞为空白对照组; 接种空病毒载体pAd-siRNA为阴性对照组; 接种pAd-VEGFR-3-siRNA为实验组。按50 MOI的量接种病毒,培养箱中感染3 h; 然后弃尽培养上清,加入新鲜培养液继续培养24 h。荧光显微镜下观察感染效率,收集细胞。

1.2.2 实时荧光定量PCR(RT-PCR)法检测: 病毒转染48 h后,提取总RNA,采用Primer5.0引物设计软件设计引物,VEGFR-3特异性PCR上游引物: 5'-GACCAGACCATGCTTCAGTGAGA-3'; 下游引物: 5'-GTTGCATGGCTGTTTCACAGGA-3', 扩增产物为151 bp。内参 β -actin引物序列上游引物为: 5'-TCATGAAGTGTGACGTTGCATCCGT-3'; 下游引物为: 5'-CCTAGAAGCA-TTTGCGGTGCCGATG-3', 扩增产物片段长100 bp。荧光定量PCR的扩增条件: 95 $^{\circ}$ C变性3 min, 95 $^{\circ}$ C 30 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 扩增45个循环。每个样品设3个复孔。通过顺序检测系统观察各扩增曲线融解曲线,标准曲线的线性回归系数R值,统计软件自动进行各样本的mRNA拷贝数的计算。以VEGFR-3 mRNA与 β -actin mRNA拷贝数之比进行标准化。

1.2.3 Western blot: 提取细胞总蛋白,进行Western blot检测。将总蛋白变性后,进行SDS-PAGE凝胶电泳与转膜,VEGFR-3(1:500)、 β -actin抗体(1:1000)孵育,4 $^{\circ}$ C过夜,TBST洗2次 \times 10 min,分别加入碱性磷酸酶标记山羊抗兔IgG(1:2000)室温孵育2 h,超敏ECL化学发光、显影、定影。软件分析条带的吸光度(A)值,以VEGFR-3 A值与 β -actin A值之比进行半定量分析。实验重复3次。

1.2.4 MTT法检测: 上述3组细胞接种于96孔培养板中,以只加1640培养液为空白对照,每组设

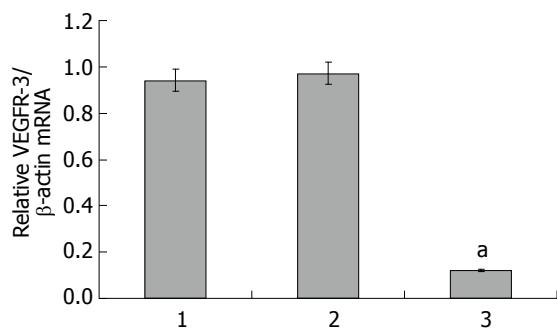


图 1 RT-PCR检测VEGFR-3 mRNA的表达. 1: LoVo细胞; 2: pAd-siRNA组; 3: pAd-VEGFR3-siRNA组. $^*P<0.05$ vs 对照组. VEGFR-3: 血管内皮生长因子受体3.

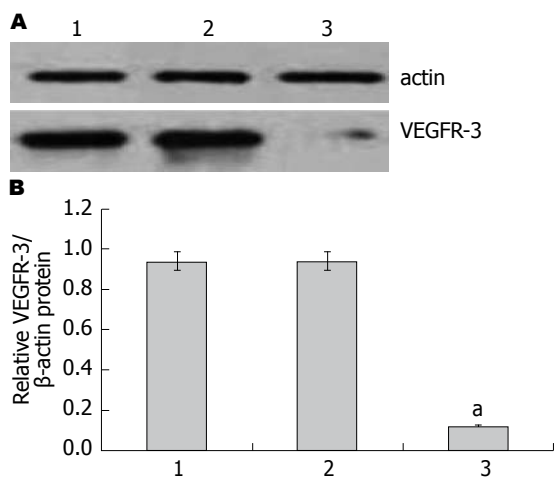


图 2 Western blot检测VEGFR-3蛋白的表达. A: Western blot; B: 统计图. 1: LoVo细胞; 2: pAd-siRNA组; 3: pAd-VEGFR3-siRNA组. $^*P<0.05$ vs 对照组. VEGFR-3: 血管内皮生长因子受体3.

3个重复孔, 分别于病毒感染前及感染后第2、4、6、8天, 加入MTT(5 mg/mL)溶液20 μ L/孔, 置于37 $^{\circ}$ C、饱和湿度CO₂培养箱中孵育4 h后; 吸弃上清液, 加入200 μ L/孔DMSO, 振荡10 min, 在酶联免疫检测仪上测定各孔在490 nm波长处的光密度A值, 计算各组平均值, 以培养时间为横坐标, A值为纵坐标, 绘制细胞生长曲线. 实验重复3次.

1.2.5 黏附实验: 将Matrigel胶与无血清培养基按1:1比例混匀后加入96孔板中, 每孔加Matrigel胶2 μ g, 置超净台中过夜风干. 收集对数生长期的实验组、阴性对照组和空白对照组细胞, 稀释后每孔加各稀释细胞数 2×10^5 个, 设3个复孔. 37 $^{\circ}$ C、5%的CO₂培养2 h, PBS洗去未经黏附的细胞, 每孔加入MTT(5 mg/mL)溶液20 μ L/孔, 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂培养箱中孵育4 h后吸弃MTT, 每孔加入200 μ L/孔DMSO, 振荡10 min, 用酶标仪测490波长A值. 实验重复3次. 细胞黏附抑制率

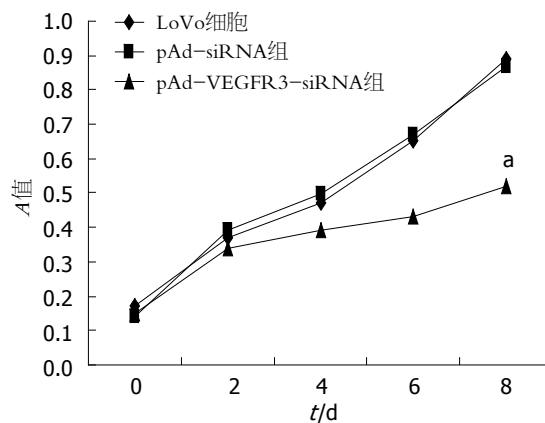


图 3 VEGFR-3 siRNA腺病毒对结肠癌LoVo细胞增殖的影响. $^*P<0.05$ vs 对照组. VEGFR-3: 血管内皮生长因子受体3.

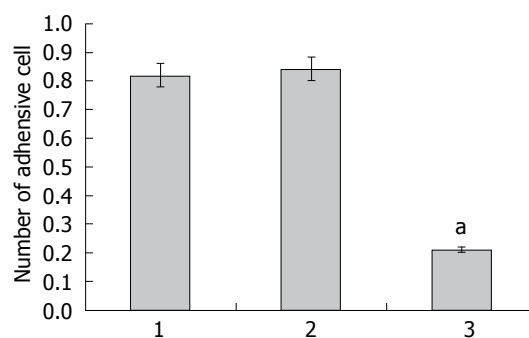


图 4 VEGFR-3 siRNA腺病毒对结肠癌LoVo细胞黏附能力的影响. 1: LoVo细胞; 2: pAd-siRNA组; 3: pAd-VEGFR3-siRNA组. $^*P<0.05$ vs 对照组. VEGFR-3: 血管内皮生长因子受体3.

= (未处理组平均A值-实验组平均A值)/未处理组平均A值 $\times 100\%$.

1.2.6 划痕实验: 将上述各组细胞以 4×10^4 /mL密度接种于6孔板, 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂培养24 h. 待细胞铺满板底, 在孔板中央用1000 μ L移液器枪头垂直划痕, PBS轻洗2次, 除去细胞碎片, 继续培养24 h, 在倒置显微镜下观察划痕处细胞的迁移情况. 每孔等距离取3个点作为测量点, 测量后取均数, 按下面公式计算细胞的相对迁移率: 计算划痕愈合程度 = (初始宽度-测量宽度)/初始宽度 $\times 100\%$.

1.2.7 细胞侵袭能力检测: 上述各组细胞在对数生长期时, 用0.25%胰蛋白酶消化, 收集细胞并稀释至 2×10^5 个/L. Transwell上室(Matrigel胶与无血清培养基按1:1比例混匀封闭, 聚碳酸酯膜孔径8 μ mol/L)中加入200 μ L的细胞悬液, 含30%胎牛血清的培养液500 μ L加入下室, 每组设3个复孔, 置37 $^{\circ}$ C恒温、5%CO₂培养箱中培养24 h后, 4%多聚甲醛固定15 min, HE染色. 高倍镜下计数膜背面的细胞数并进行分析.

■ 相关报道

Jayasinghe等认为VEGFR-3是淋巴管生成信号通路的主要诱导物, 通过组织淋巴管内皮细胞的凋亡和刺激淋巴管内皮细胞的迁移、增殖和细胞存活而起作用. Martins等通过研究结肠癌肿瘤切片和癌旁组织切片分析VEGFR-3的表达发现高表达的VEGFR-3有较差的预后和更短的生存期, VEGFR-3有表达的组织更容易发生肝转移.

■创新盘点

本研究通过靶向VEGFR-3小干扰RNA腺病毒抑制结肠癌LoVo细胞的增殖、迁移和侵袭能力,说明VEGFR-3小干扰RNA腺病毒载体可以作为结肠癌靶向治疗的一种途径,具有一定的创新性。

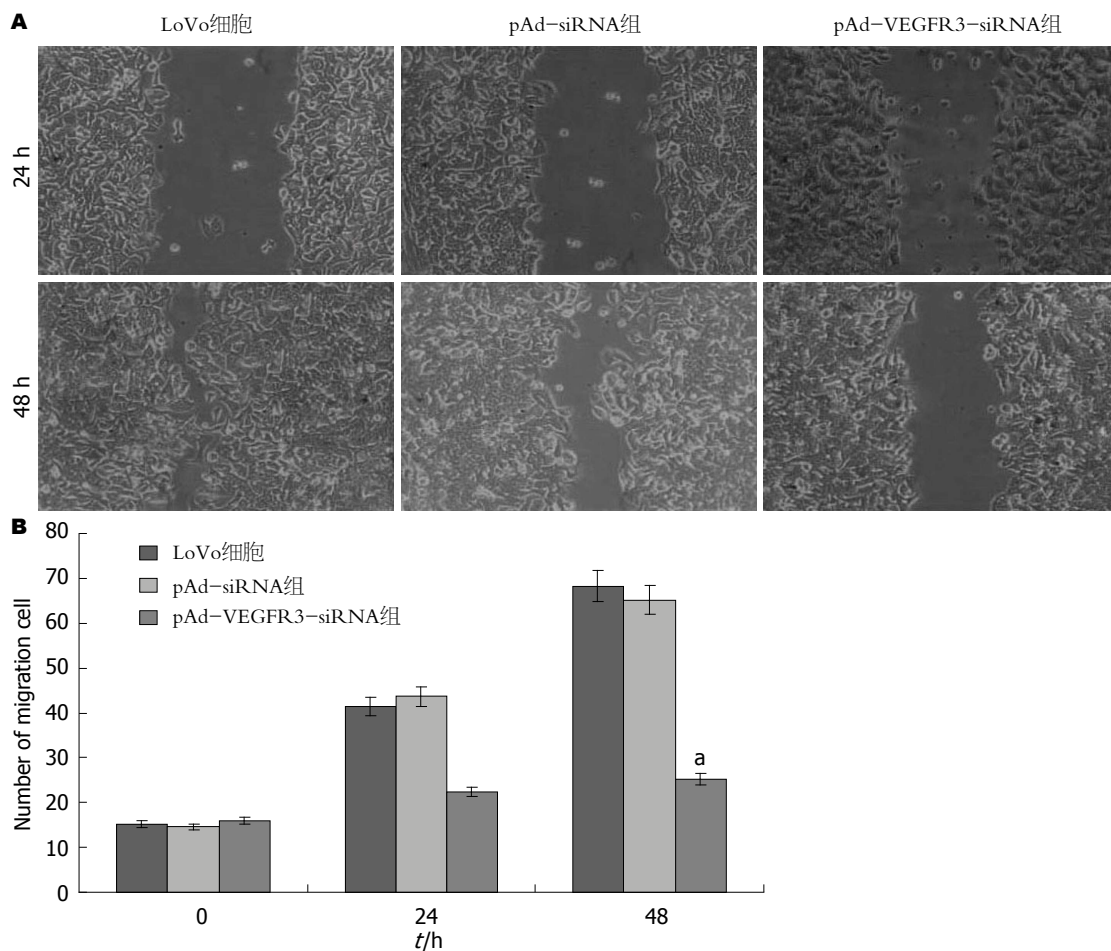


图5 VEGFR-3 siRNA腺病毒对结肠癌LoVo细胞迁移的影响。A: 各组细胞划痕实验; B: 统计值。* $P < 0.05$ vs 对照组。VEGFR-3: 血管内皮生长因子受体3。

统计学处理 所有数据均经SPSS13.0软件进行统计分析, 计量资料值以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示, 全部数据经方差齐性分析, 组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA), 组间的比较若方差齐用LSD- t 检验, 方差不齐时采用Dunnett法检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 VEGFR-3 siRNA腺病毒载体对结肠癌LoVo细胞中VEGFR-3 mRNA表达的影响 病毒转染48 h后, 提取总RNA, 经qRT-PCR显示, 与空白对照(0.94 ± 0.12)和阴性对照(0.97 ± 0.14)相比, 实验组(0.13 ± 0.19)VEGFR-3 mRNA表达水平均显著性降低($P < 0.001$)。和空白对照和阴性对照组相比VEGFR-3 mRNA表达抑制率分别达86.17%和86.46%, 而空白对照和阴性对照VEGFR-3 mRNA表达水平差异无统计学意义($P > 0.05$)(图1)。

2.2 VEGFR-3 siRNA腺病毒载体对结肠癌LoVo细胞中VEGFR-3蛋白表达的影响 蛋白印迹法检

测表明, 实验组(0.12 ± 0.14)与空白对照组(0.94 ± 0.15)和阴性对照组(0.97 ± 0.16)比较, 实验组的蛋白水平明显下降($P < 0.001$)。空白对照组和阴性对照组相比较蛋白水平无差异($P > 0.05$)(图2)。

2.3 VEGFR-3 siRNA腺病毒载体对结肠癌LoVo细胞增殖活性的影响 病毒感染前及感染后第2、4、6、8天进行细胞检测, 空白对照组和阴性对照组之间没有差异($P > 0.05$)。实验组细胞和对照组细胞比较增殖活力在4 d后开始降低, 出现明显差异($P < 0.05$)。第8天的抑制率达到41.6%(图3)。

2.4 VEGFR-3 siRNA腺病毒载体对结肠癌LoVo细胞黏附能力的变化 实验组LoVo细胞黏附能力(0.21 ± 0.08)较空白对照组(0.82 ± 0.07)和阴性对照组(0.84 ± 0.06)有明显降低($P < 0.001$)(图4)。

2.5 VEGFR-3 siRNA腺病毒载体对结肠癌LoVo细胞迁移的影响 应用单层细胞划痕实验分别观察转染24、48 h后结肠癌LoVo细胞的迁移情况。结果(图5)。可见, 24 h后, 与空白对照组和阴性对

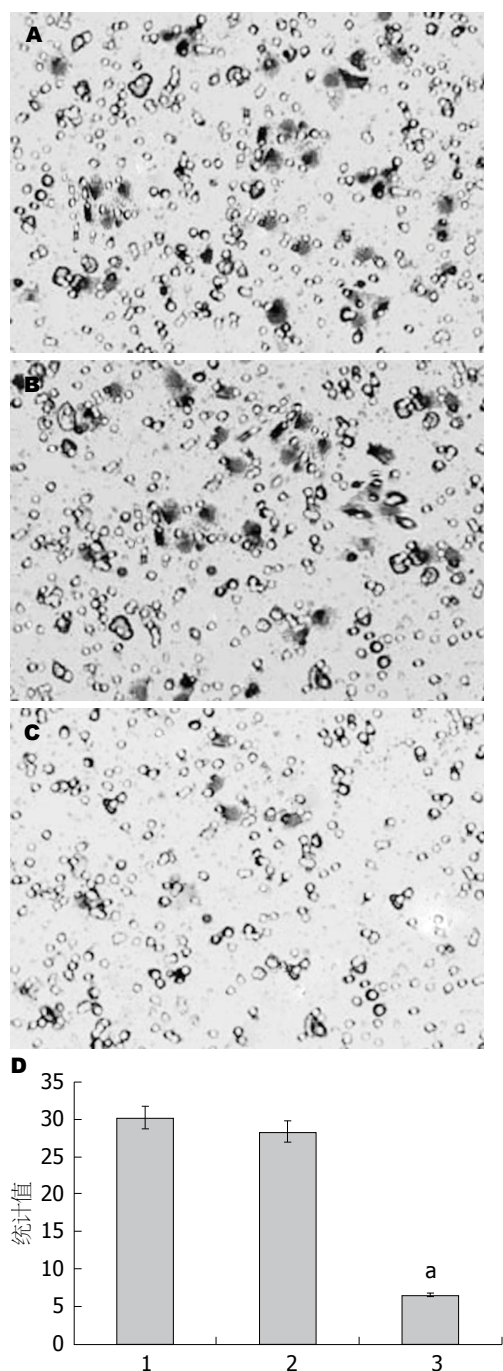


图6 Transwell小室法检测实验组pAd-VEGFR3-siRNA对结肠癌LoVo细胞侵袭能力。A: 空白对照组(LoVo细胞); B: 阴性对照组(pAd-siRNA); C: 实验组(pAd-VEGFR3-siRNA); D: 统计值。1: LoVo细胞; 2: pAd-siRNA组; 3: pAd-VEGFR3-siRNA组。^a $P<0.05$ vs 对照组。VEGFR-3: 血管内皮生长因子受体3。

照组相比, 实验组结肠癌LoVo细胞迁移能力明显减弱($P<0.05$), 而空白对照组和阴性对照组没有差异($P>0.05$)。

2.6 细胞侵袭能力 与空白对照组(30.21 ± 2.45)相比, 实验组细胞侵袭的个数为 7.33 ± 2.41 , 显著减少($P<0.05$), 阴性对照组细胞发生侵袭的个数

为 28.37 ± 2.39 , 无明显变化($P>0.05$)(图6)。

3 讨论

结直肠癌是最常见的恶性肿瘤之一, 全世界每年新发病例超过一百万, 其中1/3的患者因此而死亡。生活习惯严重影响该疾病的发生^[4,9]。随着我国经济发展和城市化进程的加快, 居民饮食结构和生活习惯的改变, 我国的结直肠癌发病和死亡率均呈上升趋势。其中, 结肠癌的发病率上升尤为显著, 大多数患者发现时已属于中晚期^[10,11]。侵袭和转移是恶性肿瘤与良性肿瘤区别的基本特征, 绝大多数恶性肿瘤最终会发生远处转移^[12,13]。转移是一个连续渐进的多因素、多步骤参与的动态过程。是肿瘤细胞和周围环境相互作用的结果, 有许多细胞因子和信号通路参与其中, 这些因子和信号通路相互作用、相互影响最终导致肿瘤的侵袭和转移^[14-16]。

淋巴转移是恶性肿瘤判断分期和预后的很重要因素, 为综合治疗决策提供重要依据^[17,18]。血管内皮生长因子家族成员及其受体是目前认为较为重要的调控肿瘤血管淋巴管生成的信号传导通路。VEGFR-3是一个高度糖基化的FMS样酪氨酸激酶, 是淋巴管特异性标志物, 在胚胎发育、伤口愈合以及肿瘤的发生、发展、侵袭及转移中起着非常重要的调控作用。在许多恶性肿瘤中均有表达, 参与诱导肿瘤淋巴管的生成, 促进肿瘤淋巴转移^[19,20]。

研究表明, VEGFR-3在非小细胞肺癌、大肠癌、子宫内膜癌、卵巢癌、乳腺癌、前列腺癌、胃癌中VEGFR-3表达与患者的生存时间有相关性, 且认为VEGFR-3的是一个独立的预后因素; VEGFR-3的高表达与淋巴管浸润、淋巴结转移及不良生存预后相关^[21-27]。Jayasinghe等^[28]认为VEGFR-3是淋巴管生成信号通路的主要诱导物, 通过组织淋巴管内皮细胞的凋亡和刺激淋巴管内皮细胞的迁移、增殖和细胞存活而起作用。VEGFR-3通过维持新生内皮细胞完整性和控制血管萌芽和血管网形成而达到血管生成的目的。同时在恶性肿瘤细胞以及淋巴结和远处转移病灶的肿瘤细胞中均检测到VEGFR-3的表达^[29]。Martins等^[23]通过研究结肠癌肿瘤切片和癌旁组织切片分析VEGFR-3的表达发现高表达的VEGFR-3有较差的预后和更短的生存期, VEGFR-3有表达的组织更容易发生肝转移。然而, 肿瘤细胞VEGFR-3/VEGF-C分泌系统在

■应用要点

本研究采用VEGFR-3小干扰RNA腺病毒可以抑制结肠癌增殖、迁移和侵袭, 具有一定的理论和临床应用价值。

同行评价

本文设计合理, 方法得当, 结论科学, 为肿瘤基因治疗体内研究提供了新的途径。

肿瘤细胞的增殖、生长、侵袭和转移的功能方面起着重要作用^[30,31]。

本研究通过腺病毒介导的VEGFR-3 siRNA抑制结肠癌细胞系中VEGFR-3 mRNA及蛋白的表达, 从而阻断VEGF-C/VEGFR-3信号通路, 用MTT法显示和对照组相比, 抑制VEGFR-3表达后结肠癌细胞生长减慢, 活性降低, 4 d后开始明显降低, 第8天的抑制率达到41.6%。通过划痕实验也证实了下调VEGFR-3的表达后可以显著抑制结肠癌细胞的迁移, 黏附实验和侵袭实验也表明抑制VEGFR-3的表达后, 结肠癌细胞的黏附和侵袭均受到明显影响。但这种抑制是否与肿瘤细胞的自分泌和其他分子机制有关, 还有待进一步研究。

本研究显示, 通过腺病毒介导的VEGFR-3 siRNA可以通过下调结肠癌细胞VEGFR-3的表达而抑制结肠癌细胞的增殖、迁移、黏附和侵袭, 可以为进一步靶向VEGFR-3基因治疗研究提供理论依据。

参考文献

- Alitalo A, Detmar M. Interaction of tumor cells and lymphatic vessels in cancer progression. *Oncogene* 2012; 31: 4499-4508 [PMID: 22179834 DOI: 10.1038/onc.2011.602]
- Swiderska M, Choromańska B, Dąbrowska E, Konarzewska-Duchnowska E, Choromańska K, Szczurko G, Myśliwiec P, Dadan J, Ladny JR, Zwiierz K. The diagnostics of colorectal cancer. *Contemp Oncol (Pozn)* 2014; 18: 1-6 [PMID: 24876814]
- Chan KM, Wu TH, Cheng CH, Lee WC, Chiang JM, Chen JS, Wang JY. Prognostic significance of the number of tumors and aggressive surgical approach in colorectal cancer hepatic metastasis. *World J Surg Oncol* 2014; 12: 155 [PMID: 24885967 DOI: 10.1186/1477-7819-12-155]
- Akgül Ö, Çetinkaya E, Ersöz Ş, Tez M. Role of surgery in colorectal cancer liver metastases. *World J Gastroenterol* 2014; 20: 6113-6122 [PMID: 24876733 DOI: 10.3748/wjg.v20.i20.6113]
- Lupinacci RM, Mello ES, Coelho FF, Kruger JA, Perini MV, Pinheiro RS, Fonseca GM, Ceconello I, Herman P. Prognostic implication of mucinous histology in resected colorectal cancer liver metastases. *Surgery* 2014; 155: 1062-1068 [PMID: 24856126 DOI: 10.1016/j.surg.2014.01.011]
- 何振华, 张森. 结直肠癌NCCN、NICE指南及中国卫生部诊疗规范的比较. *世界华人消化杂志* 2013; 21: 1297-1302
- Brenner H, Stock C, Hoffmeister M. Effect of screening sigmoidoscopy and screening colonoscopy on colorectal cancer incidence and mortality: systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials and observational studies. *BMJ* 2014; 348: g2467 [PMID: 24922745 DOI: 10.1136/bmj.g2467]
- 吕志诚, 苏芝兰, 杨文元, 张峰军. 靶向血管内皮细胞

因子受体3小干扰RNA腺病毒表达载体的构建. *大连医科大学学报* 2013; 35: 139-142

- Przybyla AG, Crockett JA, Rex JC, Culumovic PJ. Current screening guidelines overlook a significant number of patients treated for colorectal cancer. *Am Surg* 2014; 80: 539-543 [PMID: 24887789]
- Zhong X, Fang YJ, Pan ZZ, Lu MS, Zheng MC, Chen YM, Zhang CX. Dietary fiber and fiber fraction intakes and colorectal cancer risk in Chinese adults. *Nutr Cancer* 2014; 66: 351-361 [PMID: 24673635 DOI: 10.1080/01635581.2013.877496]
- Yusup A, Wang HJ, Rahmutula A, Sayim P, Zhao ZL, Zhang GQ. Clinical features and prognosis in colorectal cancer patients with different ethnicities in Northwest China. *World J Gastroenterol* 2013; 19: 7183-7188 [PMID: 24222964 DOI: 10.3748/wjg.v19.i41.7183]
- Landskron G, De la Fuente M, Thuwajit P, Thuwajit C, Hermoso MA. Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment. *J Immunol Res* 2014; 2014: 149185 [PMID: 24901008 DOI: 10.1155/2014/149185]
- Sehdev A, Catenacci DV. Gastroesophageal cancer: focus on epidemiology, classification, and staging. *Discov Med* 2013; 16: 103-111 [PMID: 23998446]
- Choudhari SK, Chaudhary M, Bagde S, Gadgil AR, Joshi V. Nitric oxide and cancer: a review. *World J Surg Oncol* 2013; 11: 118 [PMID: 23718886]
- Paschos KA, Majeed AW, Bird NC. Natural history of hepatic metastases from colorectal cancer--pathobiological pathways with clinical significance. *World J Gastroenterol* 2014; 20: 3719-3737 [PMID: 24744570 DOI: 10.3748/wjg.v20.i14.3719]
- Spolverato G, Ejaz A, Azad N, Pawlik TM. Surgery for colorectal liver metastases: The evolution of determining prognosis. *World J Gastrointest Oncol* 2013; 5: 207-221 [PMID: 24363829 DOI: 10.4251/wjgo.v5.i12.207]
- Aino H, Sumie S, Niizeki T, Kuromatsu R, Tajiri N, Nakano M, Satani M, Yamada S, Okamura S, Shimose S, Sumie H, Torimura T, Sata M. Clinical characteristics and prognostic factors for advanced hepatocellular carcinoma with extrahepatic metastasis. *Mol Clin Oncol* 2014; 2: 393-398 [PMID: 24772306 DOI: 10.3892/mco.2014.259]
- Paik KY, Lee IK, Lee YS, Sung NY, Kwon TS. Clinical implications of systemic inflammatory response markers as independent prognostic factors in colorectal cancer patients. *Cancer Res Treat* 2014; 46: 65-73 [PMID: 24520225 DOI: 10.4143/crt.2014.46.1.65]
- Woollard DJ, Opeskin K, Coso S, Wu D, Baldwin ME, Williams ED. Differential expression of VEGF ligands and receptors in prostate cancer. *Prostate* 2013; 73: 563-572 [PMID: 23038639 DOI: 10.1002/pros.22596]
- Godfraind C, Calicchio ML, Kozakewich H. Pyogenic granuloma, an impaired wound healing process, linked to vascular growth driven by FLT4 and the nitric oxide pathway. *Mod Pathol* 2013; 26: 247-255 [PMID: 22955520 DOI: 10.1038/mod-pathol.2012.148]
- Welti J, Loges S, Dimmeler S, Carmeliet P. Recent molecular discoveries in angiogenesis and antiangiogenic therapies in cancer. *J Clin Invest* 2013; 123: 3190-3200 [PMID: 23908119 DOI: 10.1172/JCI70212]
- Subramanian J, Morgensztern D, Govindan R. Vas-

- cular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small-cell lung cancer. *Clin Lung Cancer* 2010; 11: 311-319 [PMID: 20837456 DOI: 10.3816/CLC.2010.n.039]
- 23 Martins SF, Garcia EA, Luz MA, Pardal F, Rodrigues M, Filho AL. Clinicopathological correlation and prognostic significance of VEGF-A, VEGF-C, VEGFR-2 and VEGFR-3 expression in colorectal cancer. *Cancer Genomics Proteomics* 2013; 10: 55-67 [PMID: 23603341]
- 24 Takahashi K, Mizukami H, Saga Y, Takei Y, Urabe M, Kume A, Machida S, Fujiwara H, Suzuki M, Ozawa K. Suppression of lymph node and lung metastases of endometrial cancer by muscle-mediated expression of soluble vascular endothelial growth factor receptor-3. *Cancer Sci* 2013; 104: 1107-1111 [PMID: 23614535 DOI: 10.1111/cas.12184]
- 25 Tuppurainen L, Sallinen H, Kokki E, Koponen J, Anttila M, Pulkkinen K, Heikura T, Toivanen P, Hämäläinen K, Kosma VM, Heinonen S, Alitalo K, Ylä-Herttuala S. Preclinical safety, toxicology, and biodistribution study of adenoviral gene therapy with sVEGFR-2 and sVEGFR-3 combined with chemotherapy for ovarian cancer. *Hum Gene Ther Clin Dev* 2013; 24: 29-37 [PMID: 23692381 DOI: 10.1089/humc.2013.006]
- 26 Matsumoto M, Roufail S, Inder R, Caesar C, Karnezis T, Shayan R, Farnsworth RH, Sato T, Achen MG, Mann GB, Stacker SA. Signaling for lymphangiogenesis via VEGFR-3 is required for the early events of metastasis. *Clin Exp Metastasis* 2013; 30: 819-832 [PMID: 23591595 DOI: 10.1007/s10585-013-9581-x]
- 27 Kim JY, Jeon TJ, Bae BN, Kwon JE, Kim HJ, Park K, Shin E. The prognostic significance of growth factors and growth factor receptors in gastric adenocarcinoma. *APMIS* 2013; 121: 95-104 [PMID: 23030255 DOI: 10.1111/j.1600-0463]
- 28 Jayasinghe C, Simiantonaki N, Michel-Schmidt R, Kirkpatrick CJ. Endothelial VEGFR-3 expression in colorectal carcinomas is associated with haematogenous metastasis. *Oncol Rep* 2009; 22: 1093-1100 [PMID: 19787226 DOI: 10.3892/or.00000541]
- 29 Achen MG, Stacker SA. Vascular endothelial growth factor-D: signaling mechanisms, biology, and clinical relevance. *Growth Factors* 2012; 30: 283-296 [PMID: 22817635 DOI: 10.3109/08977194.2012.704917]
- 30 Klasa-Mazurkiewicz D, Jarząb M, Milczek T, Lipińska B, Emerich J. Clinical significance of VEGFR-2 and VEGFR-3 expression in ovarian cancer patients. *Pol J Pathol* 2011; 62: 31-40 [PMID: 21574104]
- 31 Matsuura M, Onimaru M, Yonemitsu Y, Suzuki H, Nakano T, Ishibashi H, Shirasuna K, Sueishi K. Autocrine loop between vascular endothelial growth factor (VEGF)-C and VEGF receptor-3 positively regulates tumor-associated lymphangiogenesis in oral squamoid cancer cells. *Am J Pathol* 2009; 175: 1709-1721 [PMID: 19779139 DOI: 10.2353/ajpath.2009.081139]

编辑 田滢 电编 闫晋利



白介素-10基因启动子多态性及其血浆水平与腹泻型肠易激综合征重叠功能性消化不良的关系

黄瑶, 赵梁, 张瑜, 周乐, 卜平

■背景资料

功能性消化不良 (functional dyspepsia, FD) 和肠易激综合征 (irritable bowel syndrome, IBS) 是一组由多因素引起的综合性异质性疾病, 其二者重叠发病率 >50%, 其病因和发病机制尚未明确, 无单一发病机制能解释所有的 FD 和 IBS 临床症状, 普遍认为和内脏高敏性、胃肠动力功能失调等相关, 近来随着对 FD 和 IBS 研究的深入, 了解其重叠的发病机制将会为 FD 和 IBS 的治疗提供新的途径。

黄瑶, 赵梁, 张瑜, 卜平, 扬州大学医学院消化病研究室 江苏省扬州市 225001

黄瑶, 周乐, 扬州市疾病预防控制中心检验科 江苏省扬州市 225001

黄瑶, 助理研究员, 主要从事病毒性疾病诊断及分子流行病学研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 81173392

作者贡献分布: 此课题由黄瑶、赵梁、张瑜及卜平设计; 研究过程由黄瑶、赵梁、张瑜及周乐操作完成; 实验试剂由周乐与卜平提供; 数据分析由黄瑶完成; 本论文写作由黄瑶与卜平完成。

通讯作者: 卜平, 教授, 主任医师, 225001, 江苏省扬州市淮海路 11 号, 扬州大学医学院消化病研究室: boping@yzu.edu.cn

电话: 0514-80828120

收稿日期: 2014-05-12 修回日期: 2014-06-18

接受日期: 2014-07-05 在线出版日期: 2014-08-28

Relationship between *IL-10* promoter gene polymorphisms and plasma level and susceptibility to overlap syndrome of diarrhea irritable bowel syndrome and functional dyspepsia

Yao Huang, Liang Zhao, Yu Zhang, Le Zhou, Ping Bo

Yao Huang, Liang Zhao, Yu Zhang, Ping Bo, Laboratory of Gastroenterology, Yangzhou University Medical Academy, Yangzhou 225001, Jiangsu Province, China

Yao Huang, Le Zhou, Clinical laboratory, Yangzhou Center for Disease Control and Prevention, Yangzhou 225001, Jiangsu Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 81173392

Correspondence to: Ping Bo, Professor, Chief Physician, Laboratory of Gastroenterology, Yangzhou University Medical Academy, 11 Huaihai Road, Yangzhou 225001, Jiangsu Province, China. boping@yzu.edu.cn

Received: 2014-05-12 Revised: 2014-06-18

Accepted: 2014-07-05 Published online: 2014-08-28

Abstract

AIM: To investigate the relationship between interleukin-10 (*IL-10*) promoter gene polymorphisms and plasma levels and susceptibility to overlap syndrome of diarrhea irritable bowel syndrome (D-IBS) and functional dyspepsia (FD).

METHODS: Blood samples were collected from

164 patients and 200 healthy controls and genomic DNA was extracted. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) was used to determine the genotypes in the -592A/C site, and amplification refractory mutation system polymerase chain reactions (ARMS-PCR) and DNA sequencing were performed to detect the polymorphism of the -1082G/A site. *IL-10* plasma levels were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

RESULTS: The -592A/C site in the *IL-10* gene showed no significant differences in genotypes or allele frequency between the D-IBS-FD overlap syndrome group and control group, but the frequency of -592 CC genotype was significantly decreased in the D-IBS-FD overlap syndrome group. Compared with the CC genotype, the AA genotype and the AA+AC genotypes increased the risk of D-IBS-FD overlap syndrome 1.989 and 1.808 times, respectively. There were no significant differences in the distribution or the allele frequency of -1082 genotypes, the genotypes of the combination of -592 and -1082, and the distribution of the genotypes of different *IL-10* levels between the D-IBS-FD overlap syndrome and healthy control groups. The average plasma *IL-10* levels were significantly lower in patients with D-IBS-FD overlap syndrome than in healthy controls ($14.60 \text{ pg/mL} \pm 7.14 \text{ pg/mL}$ vs $22.86 \text{ pg/mL} \pm 10.62 \text{ pg/mL}$, $P < 0.001$). Among patients with D-IBS-FD overlap syndrome, the average plasma *IL-10* levels in patients with -592 AA, -592 AC, -592 CC, and -592 AA+AC genotypes were $14.50 \text{ pg/mL} \pm 6.37 \text{ pg/mL}$, $14.85 \text{ pg/mL} \pm 7.75 \text{ pg/mL}$, $13.92 \text{ pg/mL} \pm 7.63 \text{ pg/mL}$, $14.68 \text{ pg/mL} \pm 7.10 \text{ pg/mL}$, respectively, which showed no significant differences. Plasma *IL-10* levels showed no significant difference between the carriers of A allele and non-carriers.

CONCLUSION: The -592A site in *IL-10* gene promoter and lower *IL-10* plasma level may be

■同行评议者

陈卫昌, 教授, 苏州大学附属第一医院消化内科

associated with susceptibility to overlap syndrome of D-IBS and FD, but there is no association between them.

© 2014 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: Overlap syndrome of diarrhea irritable bowel syndrome and functional dyspepsia; Interleukin-10; Gene polymorphism; Promoter

Huang Y, Zhao L, Zhang Y, Zhou L, Bo P. Relationship between *IL-10* promoter gene polymorphisms and plasma level and susceptibility to overlap syndrome of diarrhea irritable bowel syndrome and functional dyspepsia. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(24): 3580-3586 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/3580.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i24.3580>

摘要

目的: 探讨腹泻型肠易激综合征(diarrhea irritable bowel syndrome, D-IBS)重叠功能性消化不良(functional dyspepsia, FD)患者白介素-10(interleukin-10, *IL-10*)基因启动子区域多态性及其血浆水平与疾病易感性的关系。

方法: 对164例D-IBS重叠FD患者和200例健康对照者抽血提取其白细胞DNA, 应用聚合酶反应-限制性片段多态性(polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP)分析方法以及扩增受阻突变系统-聚合酶链反应(amplification refractory mutation system-polymerase chain reactions, ARMS-PCR)结合DNA测序法, 对*IL-10*基因启动子区-592与-1082位点进行多态性分析, 并使用酶联免疫吸附法测定血浆*IL-10*水平。

结果: D-IBS重叠FD病例组与正常对照组相比, *IL-10*启动子区域592位点基因型分布与等位基因频率无显著差异, 592CC基因频率显著下降, 基因型频率风险相关分析表示, AA基因型是CC基因型患病风险的1.989倍; A等位基因携带型(AA+AC基因型)为CC型纯合子的1.808倍; -1082位点基因型分布与等位基因频率均无显著差异; -592位点与-1082位点组合基因型分布与等位基因频率也无显著差异; 不同*IL-10*分泌水平基因型分布无显著差异。D-IBS重叠FD病例组血浆*IL-10*平均水平为14.60 pg/mL \pm 7.14 pg/mL, 对照组为22.86 pg/mL \pm 10.62 pg/mL, 两组比较, 病例组显著低于正常对照组($P<0.001$)。D-IBS重叠FD病例组592位点AA、AC、CC、AA+AC基因型血浆*IL-10*水平分别为14.50 pg/mL \pm 6.37 pg/mL、

14.85 pg/mL \pm 7.75 pg/mL、13.92 pg/mL \pm 7.63 pg/mL、14.68 pg/mL \pm 7.10 pg/mL, 病例组各基因型之间血浆*IL-10*水平无显著差异, 592位点AA+AC与CC基因型血浆*IL-10*水平也无显著差异。

结论: *IL-10*-592位点A和*IL-10*血浆水平降低可能与罹患D-IBS重叠FD的相关, 但这二者之间并无关联。

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词: 腹泻型肠易激综合征重叠功能性消化不良; 白介素-10; 基因多态性; 启动子区域

核心提示: 白介素-10(interleukin-10, *IL-10*)592位点A和*IL-10*血浆水平降低是罹患腹泻型肠易激综合征(diarrhea-irritable bowel syndrome, D-IBS)重叠功能性消化不良(functional dyspepsia, FD)的风险因素, 抑炎因子*IL-10*的失衡导致胃肠高敏感性及动力异常, 从而引起两病重叠发生。在D-IBS重叠FD的病理机制下, *IL-10*血浆水平显著降低与*IL-10*-592位点基因多态性无关联, 而可能是一种多因素的调控, 其调控的具体机制及-592A位点基因多态性是否存在其他作用机制影响D-IBS重叠FD, 有待于日后的进一步研究。

黄瑶, 赵梁, 张瑜, 周乐, 卜平. 白介素-10基因启动子多态性及其血浆水平与腹泻型肠易激综合征重叠功能性消化不良的关系. *世界华人消化杂志* 2014; 22(24): 3580-3586 URL www.wjgnet.com/1009-3079/22/3580.asp DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i24.3580>

0 引言

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)与功能性消化不良(functional dyspepsia, FD)属于功能性胃肠病(functional gastrointestinal disorders, FGIDs)中发病率较高的两种, 研究表明两病发生重叠的现象非常普遍^[1-6], 发生重叠的几率可高达50%^[1], 被认为有共同的生理病理基础, 与内脏感觉异常、胃肠动力异常、细菌过度生长、脑肠轴的异常、社会心理因素、遗传易感性等多种因素有关^[7-10], 因此有学者认为FD和IBS有时不能完全分开^[11]。目前研究表明^[12,13], 遗传因素可能使某些个体的白介素-10(interleukin-10, *IL-10*)水平降低, 造成体内抗炎因子失衡, 引起胃肠高敏感性及动力异常, 而易发生FGIDs。本研究旨在探讨*IL-10*启动子区域基因多态性及其血浆水平与腹泻型肠易激综合征(diarrhea irritable bowel syndrome, D-IBS)

■研究前沿

本研究发现白介素-10(interleukin-10, *IL-10*)-592位点A和*IL-10*血浆水平降低是罹患D-IBS重叠FD的风险因素, 其作用机制可能是抑炎因子*IL-10*的失衡导致胃肠高敏感性及动力异常而产生重叠症状。在D-IBS重叠FD的病理机制下, *IL-10*血浆水平显著降低与*IL-10*-592位点基因多态性无关联, 其调控的具体机制及-592A位点基因多态性是否存在其他作用机制影响D-IBS重叠FD, 有待于日后的进一步研究。

■相关报道

IL-10是一种人体内极为重要的免疫调节因子,与肠道炎症及免疫系统关系密切,IL-10敲除的大鼠可发生慢性结肠炎。IL-10的分泌水平与其启动子区域遗传多态性密切相关。功能性肠病的发生与遗传相关,众多研究表明IBS患者抑炎细胞因子生成减少的遗传素质在IBS发病机制中具有一定作用,但结果不完全一致,这可能与地域、人种、样本量的不同而有所区别。

和重叠FD之间的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 选择2011-03/2012-12在扬州大学附属医院消化科门诊就诊的D-IBS重叠FD患者164例作为研究对象,其中男75例,女89例,年龄25-74岁,平均年龄 49.15 ± 13.16 岁;正常对照组选择扬州市疾病预防控制中心体检健康人群共200例,其中男96例,女104例,年龄20-72岁,平均年龄 46.13 ± 12.15 岁,无IBS样症状及其他器质性疾病。两组间性别、年龄等比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。所有入组对象均通过扬州大学医学伦理委员会审查,并签署知情同意书。DNA提取试剂为天根公司的RelaxGene血液基因组DNA提取系统(DP-318),PCR引物由上海生工合成,限制性内切酶*Rsa* I 购自NEB,PCR Mix购自博尔迪公司,IL-10检测试剂盒购自北京达科维生物科技有限公司。酶标仪为瑞士泰肯公司SUNRISE型号,洗板机为瑞士泰肯公司hydroFlex型号。

1.2 方法

1.2.1 D-IBS重叠FD诊断标准及排除标准: 诊断标准: 诊断前症状出现 ≥ 6 mo,近3 mo每月至少有3 d出现反复发作的腹痛或不适(在临床试验中,筛选可评估的患者时,疼痛或不适出现的频率至少为2 d/wk),并且至少出现A类症状2项及B类症状1项,且没有可以解释上述症状的器质性疾病的证据。A类症状: (1)排便后症状缓解; (2)发作时伴有排便频率改变; (3)发作时伴有粪便性状(外观)改变。B类症状: (1)餐后饱胀不适; (2)早饱感; (3)上腹痛; (4)上腹烧灼感。排除标准: (1)妊娠期或哺乳期女性; (2)手术或其他应激情况下的患者; (3)合并严重肝、肾功能损害; (4)合并严重心脑血管疾病; (5)合并内分泌疾病; (6)合并各种急慢性感染性疾病。

1.2.2 血样处理: 采集受试者空腹静脉血5 mL于EDTA抗凝管中,3000 r/min离心15 min,取血浆分装于冻存于 -80°C 待测IL-10,剩余细胞部分取出150 μL 用于白细胞DNA提取,其余部分冻存于 -80°C 备用。提取DNA溶解分装于50 μL TE,置 -80°C 冰箱保存备用。DNA纯度及浓度用紫外分光光度法检测,计算 $A_{260/280}$ 的比值在1.75-1.85之间,DNA的纯度符合PCR扩增要求。

1.2.3 基因型检测: (1)聚合酶反应-限制性片段多态性(polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP)检测

*IL-10*启动子区域592位点: 根据Genbank已知序列使用DNASTar7.0及参考文献[14]设计引物,上游引物: 5'-GGTGAGCACTACCTGACTAGC-3'; 下游引物: 5'-CCTAGGTCACAGTGACGTGG-3',由上海生工合成。扩增体系为20 μL ,其中5 pmol上下游引物各1 μL ,模板2 μL , $2 \times \text{Taq plus PCR Mix}$ 10 μL 。反应条件为 94°C 5 min,然后 95°C 30 s, 57°C 40 s, 72°C 30 s,35个循环; 72°C 5 min, 4°C 保存。PCR产物经2%琼脂糖电泳检验。酶切反应体系20 μL ,其中PCR产物5 μL ,10 U *Rsa* I 0.4 μL , $10 \times \text{buffer}$ 2 μL ,ddH₂O 14.6 μL , 37°C 水浴酶切8 h,取15 μL 酶切产物3%琼脂糖凝胶电泳分离,判读基因型: CC: 412 bp, AC: 412、236、176 bp, AA: 236、176 bp; (2)扩增受阻突变系统-聚合酶链反应(amplification refractory mutation system -polymerase chain reactions, ARMS-PCR)检测*IL-10*启动子区域1082位点: 根据Genbank已知序列使用DNASTar7.0及参考文献[15]设计引物,上游引物G: 5'-CTACTA-AGGCTTCTTTGGGAG-3',上游引物A: 5'-AC-TACTAAGGCTTCTTTGGGA-3'; 下游引物: 5'-CAGTGCCAACTGAGAATTTGG-3'。扩增体系为20 μL ,其中5 pmol上下游引物各1 μL ,模板2 μL , $2 \times \text{Taq plus PCR Mix}$ 10 μL 。反应条件为 95°C 1 min,然后 95°C 1 min, 65°C 50 s, 72°C 50 s,10个循环; 95°C 1 min, 59°C 50 s, 72°C 50 s,20个循环; 72°C 5 min, 4°C 保存。PCR产物经2%琼脂糖电泳分离,判读基因型: 仅与-1082位点上游引物G及下游引物扩增后在258 bp处出现电泳条带为基因型GG; 仅与-1082位点上游引物A及下游引物扩增后在258 bp处出现电泳条带为基因型AA; 而与两对引物扩增后均在258 bp处出现电泳条带的为基因型GA。

1.2.4 血浆IL-10检测: 检测严格按照ELISA试剂盒说明书操作,测定血浆IL-10浓度,用标准品制作标准曲线。每组标准品及样品重复2次,取均值,IL-10浓度以pg/mL表示。

统计学处理 应用IBS SPSS Statistics21.0对数据进行统计分析,计量资料用 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示,组间比较采用两样本的*t*检验;等位基因及基因型频率采用直接计算法,两样本率比较、研究对象与基因遗传平衡规律(Hardy-Weinberg平衡)符合程度均采用 χ^2 检验,并以比值比(odds ratio, OR)及其95%可信区间(confidence interval, CI)表示相对风险度。 $P < 0.05$ 为

表 1 *IL-10*启动子区域592位点H-W平衡吻合度检验

分组	基因型						χ^2 值	P值
	AA		AC		CC			
	观察值	期望值	观察值	期望值	观察值	期望值		
D-IBS重叠FD组	77	76.49	70	71.02	17	16.49	0.03	0.86
正常对照组	82	75.65	82	94.71	36	29.65	3.60	0.06

IL-10: 白介素-10; D-IBS: 腹泻型肠易激综合征; FD: 功能性消化不良.

表 2 *IL-10*启动子区域1082位点H-W平衡吻合度检验

分组	基因型						χ^2 值	P值
	AA		GA		GG			
	观察值	期望值	观察值	期望值	观察值	期望值		
D-IBS重叠FD组	146	146.49	18	17.01	0	0.49	0.55	0.46
正常对照组	172	172.98	28	26.04	0	0.98	1.13	0.29

IL-10: 白介素-10; D-IBS: 腹泻型肠易激综合征; FD: 功能性消化不良.

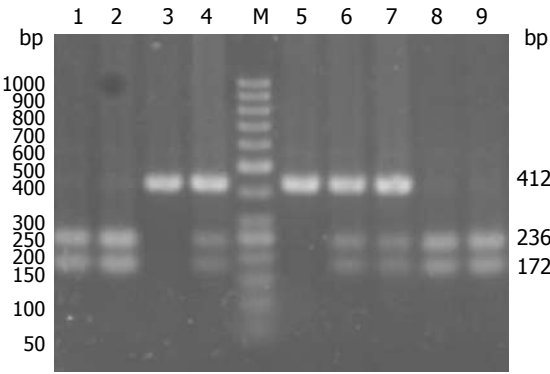


图 1 *IL-10*-592位点基因片段*Rsa*I 酶切后显示基因型. 1, 2, 8, 9: AA; 3, 5: CC; 4, 6, 7: AC; M: 50 bp Marker.

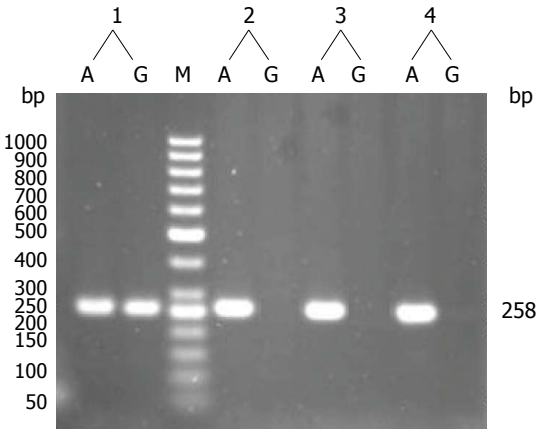


图 2 *IL-10*-1082位点经ARMS-PCR扩增显示基因型. 1: GA; 2-4: AA; M: 50 bp Marker.

差异有统计学意义.

■创新盘点
本文没有针对单一的D-IBS或FD进行研究,而是着重于高发的二者重叠症状,将研究对象进一步细化,从重叠症状产生的可能机制入手,将*IL-10*启动子区域基因多态性及*IL-10*血浆水平结合起来进行了进一步研究分析.

2 结果

2.1 Hardy-Weinberg遗传平衡吻合度检验 应用拟合优度 χ^2 检验对病例组和正常对照组进行Hardy-Weinberg遗传平衡定律检验, 病例组和健康对照组*IL-10*启动子区域592A/C, 1082G/A的实际基因分布与Hardy-Weinberg平衡状态下的理论分布差异无统计学意义($P>0.05$), 表明均符合该平衡法则, 具有群体代表性(表1, 2).

2.2 *IL-10*启动子多态位点分布及与D-IBS重叠FD风险性关系 *IL-10*启动子区域592位点检测到的基因型有AA、AC和CC(图1); 1082位点检测到的基因型有AA和AG, 未检测到GG(图2), 基因型与等位基因分布结果如表3. D-IBS重叠FD与正常对照组相比, *IL-10* 592位点、1082位点基因型分布与等位基因频率差异均无统计学意义($P>0.05$), 但592CC基因频率显著下降($\chi^2 = 4.221, P = 0.04$). 基因型频率风险相关分析表示, *IL-10*启动子区域592位点AA基因型和AC基因型分别是CC基因型患病风险的1.989倍(OR = 1.989, 95%CI: 1.033-3.829)与1.808倍(OR = 1.808, 95%CI: 0.935-3.494); AC基因型是CC基因型患病A等位基因携带者(AA+AC基因型)为CC型纯合子的1.808倍(OR = 1.808, 95%CI: 1.023-3.522).

2.3 *IL-10*启动子区域-592、-1082位点组合分布 病例组和正常对照组均存在5种组合, GC/AA、GC/AC、AC/AC、AA/AA及AA/AC, 均以AC/

■应用要点

D-IBS重叠FD的产生与抑炎因子IL-10水平的下降相关,这表明在重叠症的临床治疗上着重抗炎的治疗可能会产生较为显著的效果,也为D-IBS重叠FD作用机制的研究提供一个较为明确的方向。

表 3 *IL-10*启动子区域592、1082位点基因型与等位基因分布 $n(\%)$

分组	<i>n</i>	592A/C					1082A/G				
		CC	AC	AA	C	A	AA	GA	GG	A	G
D-IBS重叠FD组	164	17 (10.37) ^a	70 (42.68)	77 (46.95)	104 (31.71)	224 (68.29)	146 (89.02)	18 (10.98)	0	310 (94.51)	18 (5.49)
正常对照组	200	36 (18.00)	82 (41.00)	82 (41.00)	154 (38.50)	246 (61.50)	172 (86.00)	0 (14.00)	0	372 (93.00)	28 (7.00)
χ^2 值			4.40			3.63		0.75		0.70	
<i>P</i> 值			0.111			0.057		0.387		0.403	

^a $P < 0.05$ vs 正常对照组相同基因型. IL-10: 白介素-10; D-IBS: 腹泻型肠易激综合征; FD: 功能性消化不良。

表 4 D-IBS重叠FD病例组*IL-10*-592位点各基因型血浆IL-10水平 (mean \pm SD, pg/mL)

D-IBS重叠FD组IL-10 592位点	<i>n</i>	血浆IL-10水平
AA	77	14.50 \pm 6.37
AC	70	14.85 \pm 7.75
CC	17	14.85 \pm 7.75
AC+AC	147	14.68 \pm 7.10

IL-10: 白介素-10; D-IBS: 腹泻型肠易激综合征; FD: 功能性消化不良。

AC、AA/AC、AA/AA居多,其次为GC/AC和GC/AA(表5)。两组比较,基因型分布、等位基因频率差异无统计学意义($P > 0.05$),*IL-10*中分泌型GC/AA+GC/AA与低分泌性AC/AC+AA/AA+AA/AC分布也差异无统计学意义($\chi^2 = 2.45$, $P = 0.118$)。

2.4 血浆IL-10水平比较 D-IBS重叠FD病例组血浆IL-10平均水平为14.60 pg/mL \pm 7.14 pg/mL,对照组为22.86 pg/mL \pm 10.62 pg/mL,两组比较,病例组显著低于正常对照组($P < 0.001$)(表4)。D-IBS重叠FD病例组592位点AA、AC、CC、AA+AC基因型血浆IL-10水平差异无统计学意义($P = 0.885 > 0.05$),592位点AA+AC与CC基因型血浆IL-10水平差异也无统计学意义($P = 0.683 > 0.05$)。

3 讨论

IL-10是体内最为重要的抑炎因子,他的水平高低可以影响肠道黏膜的神经敏感性,因而被认为可能与FGIDs的发病相关。研究发现^[16,17]生理状态下IL-10的水平是与其启动子区域的1082、819、592位点的基因多态性密切相关的,因而针对FGIDs与*IL-10*启动子区域基因多态性研究众多,但尚无定论^[18-22]。本研究针对FGIDs中常见高发的D-IBS重叠FD这一病症研究IL-10血浆水平及其启动子区域多态性与疾病相关性研

究目前尚未见有报道。由于众多研究结果已经证实*IL-10*启动子区域819位点与592位点紧密连锁^[16,17,23-26],即-592C与-819C连锁存在,-592A与-819T连锁存在,可根据-592位点基因型得出-819位点基因型,所以本研究选取了1082位点和592位点进行多态性分析,结果显示,592位点基因多态性与D-IBS重叠FD患病相关,AA基因型是CC基因型患病风险的1.989倍,A等位基因携带者(AA+AC基因型)为CC型纯合子的1.808倍,提示IL-10-592位点C突变为A增加患D-IBS重叠FD的风险。*IL-10* 1082G/A位点基因型本研究中显示与D-IBS重叠FD无关联,上述结果与部分国内外关于D-IBS与*IL-10*基因多态性的研究结果基本一致^[21-23,27,28]。

592位点与1082位组合分布在对照组与病例组中无显著差异,在研究中我们也发现-1082A与-592A连锁,因此本研究共发现了5种基因型组合,GC/AA、GC/AC、AC/AC、AA/AA AA/AC,和国内外报道相比^[16,17,29,30]缺少GC/GC型,这可能与地域、环境及选择样本的差异有关。各基因型具体分布和国内报道^[16,17,30]也大致一致,以AA/AA、AA/AC居多,AC/AC、GC/AA、GC/AC较少。*IL-10*启动子区域的不同的基因型组合是分别对应不同的*IL-10*分泌水平^[17], -1082位点和-592位点的基因型为GC/GC为高分泌

表 5 IL-10启动子区域592位点与1082位点组合分布 $n(\%)$

分组	n	基因型					等位基因频率		
		GC/AA	GC/AC	AC/AC	AA/AA	AA/AC	GC	AC	AA
D-IBS重叠FD组	164	13(7.93)	5(3.04)	12(7.32)	77(46.95)	57(34.76)	18(5.49)	86(26.22)	224(68.29)
正常对照组	200	13(6.50)	15(7.50)	21(10.50)	82(41.00)	69(34.50)	28(7.0)	126(31.50)	246(61.5)
χ^2 值				5.25				3.67	
P 值				0.263				0.160	

IL-10: 白介素-10; D-IBS: 腹泻型肠易激综合征; FD: 功能性消化不良。

型; GC/AC和GC/AA为中分泌型; AC/AC、AC/AA、AA/AA为低分泌型。由于未检测到高分泌GC/GC型, 将基因组合分为中分泌型和低分泌型两类进行比较, 病例组和对照组也未出现明显差异, 可见IL-10不同分泌水平基因型分布与D-IBS重叠FD无关。

D-IBS重叠FD病例组血浆IL-10平均水平显著低于正常对照组($P<0.01$), 可见IL-10水平与D-IBS重叠FD相关, 但将病例组592位点AA、AC、CC、AA+AC基因型IL-10血浆水平进行比较, 无显著差异($P>0.05$), 由此推断病例组IL-10血浆水平的降低与病例组592位点基因多态性无关。研究也证实, IL-10分泌水平主要是受-1082位点多态性影响, 592和819位点只是协助作用^[17,31]。

本研究初步显示: IL-10-592位点A和IL-10血浆水平降低可能与罹患D-IBS重叠FD有关, 但二者之间并无关联。这和国内外一些针对IBS的研究结果部分一致, 但他们认为IL-10-592 A影响IL-10水平降低导致疾病发生的机制在本研究中未得到证实^[18,21,28]。我们认为, 在正常生理机制下, IL-10水平表达主要是通过-1082、-819、-592位点的共同作用, 但病理机制下, IL-10水平的调控可能是一种多因素的调控。D-IBS重叠FD的疾病发生本身就受多种因素影响, D-IBS重叠FD的患者比单一D-IBS或FD的人群受到环境与压力的影响更大, 胃肠道症状更为严重。是否由于外在环境等因素导致IL-10启动子区域出现异常甲基化而导致IL-10血浆水平下降, 亦或由于D-IBS重叠FD人群饮食失调影响IL-10血浆水平, 592A位点基因多态性是否存在其他作用机制影响D-IBS重叠FD, 这些均有待于日后的进一步研究。

4 参考文献

1 Corsetti M, Caenepeel P, Fischler B, Janssens J, Tack

- J. Impact of coexisting irritable bowel syndrome on symptoms and pathophysiological mechanisms in functional dyspepsia. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 1152-1159 [PMID: 15180740 DOI: 10.1111/j.1572-0241.2004.30040.x]
- Kaji M, Fujiwara Y, Shiba M, Kohata Y, Yamagami H, Tanigawa T, Watanabe K, Watanabe T, Tominaga K, Arakawa T. Prevalence of overlaps between GERD, FD and IBS and impact on health-related quality of life. *J Gastroenterol Hepatol* 2010; 25: 1151-1156 [PMID: 20594232 DOI: 10.1111/j.1440-1746.2010.06249.x]
- Wang A, Liao X, Xiong L, Peng S, Xiao Y, Liu S, Hu P, Chen M. The clinical overlap between functional dyspepsia and irritable bowel syndrome based on Rome III criteria. *BMC Gastroenterol* 2008; 8: 43 [PMID: 18808723 DOI: 10.1186/1471-230X-8-43]
- Park H. Functional gastrointestinal disorders and overlap syndrome in Korea. *J Gastroenterol Hepatol* 2011; 26 Suppl 3: 12-14 [PMID: 21443700 DOI: 10.1111/j.1440-1746.2011.06644.x]
- Zhao Y, Zou D, Wang R, Ma X, Yan X, Man X, Gao L, Fang J, Yan H, Kang X, Yin P, Hao Y, Li Q, Dent J, Sung J, Halling K, Wernersson B, Johansson S, He J. Dyspepsia and irritable bowel syndrome in China: a population-based endoscopy study of prevalence and impact. *Aliment Pharmacol Ther* 2010; 32: 562-572 [PMID: 20497141 DOI: 10.1111/j.1365-2036.2010.04376.x]
- Matsuzaki J, Suzuki H, Fukushima Y, Hirata K, Fukuhara S, Okada S, Hibi T. High frequency of overlap between functional dyspepsia and overactive bladder. *Neurogastroenterol Motil* 2012; 24: 821-827 [PMID: 22616664 DOI: 10.1111/j.1365-2982.2012.01939.x]
- Suzuki H, Hibi T. Overlap syndrome of functional dyspepsia and irritable bowel syndrome - are both diseases mutually exclusive? *J Neurogastroenterol Motil* 2011; 17: 360-365 [PMID: 22148104 DOI: 10.5056/jnm.2011.17.4.360]
- Gwee KA, Chua AS. Functional dyspepsia and irritable bowel syndrome, are they different entities and does it matter? *World J Gastroenterol* 2006; 12: 2708-2712 [PMID: 16718757]
- Outlaw WM, Koch KL. Dyspepsia and its overlap with irritable bowel syndrome. *Curr Gastroenterol Rep* 2006; 8: 266-272 [PMID: 16888867 DOI: 10.1007/s11894-006-0046-0]
- Park CS, Uhm JH. Polymorphisms of the Serotonin Transporter Gene and G-Protein $\beta 3$ Subunit Gene in Korean Children with Irritable Bowel Syndrome and Functional Dyspepsia. *Gut Liver* 2012; 6: 223-228

■名词解释

IBS: 肠道动力学与内脏感觉异常的胃肠功能性疾病, 是指一组包括有排便习惯改变(腹泻/便秘)、粪便性状异常(稀便、黏液便或硬结便)、腹痛及腹胀等临床表现的症候群, 症状持续存在或间歇发作。根据排便情况, 肠易激综合征可分为腹泻型、便秘型及腹泻便秘交替型3种类型, 其中腹泻型最为常见。

■同行评价

本文具有一定的科学性与研究价值。

- 11 Frissora CL, Koch KL. Symptom overlap and comorbidity of irritable bowel syndrome with other conditions. *Curr Gastroenterol Rep* 2005; 7: 264-271 [PMID: 16042909 DOI: 10.1007/s11894-005-0018-9]
- 12 Camilleri M. Genetics and irritable bowel syndrome: from genomics to intermediate phenotype and pharmacogenetics. *Dig Dis Sci* 2009; 54: 2318-2324 [PMID: 19655247 DOI: 10.1007/s10620-009-0903-4]
- 13 Hotoleanu C, Popp R, Trifa AP, Nedelcu L, Dumitrascu DL. Genetic determination of irritable bowel syndrome. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 6636-6640 [PMID: 19034965 DOI: 10.3748/wjg.14.6636]
- 14 Xie J, Wang S, He B, Pan Y, Li Y, Zeng Q, Jiang H, Chen J. Association of estrogen receptor alpha and interleukin-10 gene polymorphisms with endometriosis in a Chinese population. *Fertil Steril* 2009; 92: 54-60 [PMID: 18687423 DOI: 10.1016/j.fertnstert.2008.04.069]
- 15 Perrey C, Turner SJ, Pravica V, Howell WM, Hutchinson IV. ARMS-PCR methodologies to determine IL-10, TNF-alpha, TNF-beta and TGF-beta 1 gene polymorphisms. *Transpl Immunol* 1999; 7: 127-128 [PMID: 10544444 DOI: 10.1016/S0966-3274(99)80030-6]
- 16 廖宝平, 孙筱放, 潘倩莹, 周华, 吴学诗, 陈欣洁. 广东汉族人群细胞因子基因多态性研究. *中国优生与遗传杂志* 2003; 10: 13-15
- 17 吕铁明, 谭建明, 欧良明, 王庆华, 曾章新. 细胞因子基因多态性与细胞因子水平关系的研究. *中华器官移植杂志* 2002; 23: 266-268
- 18 Gonsalkorale WM, Perrey C, Pravica V, Whorwell PJ, Hutchinson IV. Interleukin 10 genotypes in irritable bowel syndrome: evidence for an inflammatory component? *Gut* 2003; 52: 91-93 [PMID: 12477767 DOI: 10.1136/gut.52.1.91]
- 19 van der Veek PP, van den Berg M, de Kroon YE, Verspaget HW, Masclee AA. Role of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 gene polymorphisms in irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 2510-2516 [PMID: 16279907 DOI: 10.1111/j.1572-0241.2005.00257.x]
- 20 Barkhordari E, Rezaei N, Mahmoudi M, Larki P, Ahmadi-Ashtiani HR, Ansari-pour B, Alighardashi M, Bashashati M, Amirzargar AA, Ebrahimi-Daryani N. T-helper 1, T-helper 2, and T-regulatory cytokines gene polymorphisms in irritable bowel syndrome. *Inflammation* 2010; 33: 281-286 [PMID: 20177758 DOI: 10.1007/s10753-010-9183-6]
- 21 王邦茂, 蒋晓忠, 杨玉龙, 刘文天, 曹晓沧, 赵晓志. 腹泻型肠易激综合征患者中IL-10基因多态性的研究. *中华内科杂志* 2006; 45: 289-292
- 22 纪昌林, 聂玉强, 姜英杰. 白细胞介素-10启动子-1082和-819位点基因多态性与肠易激综合征的关系. *中华消化杂志* 2011; 31: 669-672
- 23 Ma SL, Tang NL, Lam LC, Chiu HF. The association between promoter polymorphism of the interleukin-10 gene and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2005; 26: 1005-1010 [PMID: 15748779 DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2004.08.010]
- 24 Kusumoto K, Uto H, Hayashi K, Takahama Y, Nakao H, Suruki R, Stuver SO, Ido A, Tsubouchi H. Interleukin-10 or tumor necrosis factor-alpha polymorphisms and the natural course of hepatitis C virus infection in a hyperendemic area of Japan. *Cytokine* 2006; 34: 24-31 [PMID: 16698276 DOI: 10.1016/j.cyto.2006.03.011]
- 25 Scarpelli D, Cardellini M, Andreozzi F, Laratta E, Hribal ML, Marini MA, Tassi V, Lauro R, Perticone F, Sesti G. Variants of the interleukin-10 promoter gene are associated with obesity and insulin resistance but not type 2 diabetes in caucasian italian subjects. *Diabetes* 2006; 55: 1529-1533 [PMID: 16644716 DOI: 10.2337/db06-0047]
- 26 Okayama N, Hamanaka Y, Suehiro Y, Hasui Y, Nakamura J, Hinoda Y. Association of interleukin-10 promoter single nucleotide polymorphisms -819 T/C and -592 A/C with aging. *J Gerontol A Biol Med Sci* 2005; 60: 1525-1529 [PMID: 16424284 DOI: 10.1093/gerona/60.12.1525]
- 27 Lee HJ, Lee SY, Choi JE, Kim JH, Sung IK, Park HS, Jin CJ. G protein beta3 subunit, interleukin-10, and tumor necrosis factor-alpha gene polymorphisms in Koreans with irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol Motil* 2010; 22: 758-763 [PMID: 20337945 DOI: 10.1111/j.1365-2982.2010.01496.x]
- 28 姜英杰, 聂玉强, 赖晓波. IL-10启动子-592基因多态性与肠易激综合征的关系. *现代医院* 2010; 10: 8-10
- 29 Tabibzadeh S, Becker JL, Parsons AK. Endometriosis is associated with alterations in the relative abundance of proteins and IL-10 in the peritoneal fluid. *Front Biosci* 2003; 8: a70-a78 [PMID: 12700072 DOI: 10.2741/1045]
- 30 何佩, 林俊, 张信美, 邓琳, 马俊彦. 白细胞介素-10基因启动子多态性与子宫内膜异位症遗传易感性的相关性. *遗传* 2009; 31: 479-484
- 31 何佩, 林俊, 张信美, 邓琳. 子宫内膜异位症患者IL-10基因多态性与血清、腹腔液蛋白水平的相关性研究. *浙江预防医学* 2010; 21: 6-11

编辑 郭鹏 电编 闫晋利



MicroRNAs对HSC生物学功能的影响

毕艺鸣, 许嘉彬, 安海燕

毕艺鸣, 许嘉彬, 安海燕, 南方医科大学中医药学院 广东省广州市 510515

毕艺鸣, 主要从事中西医结合的临床研究.

国家级大学生创新创业训练计划基金资助项目, No. 201212121053

高等学校博士学科点专项科研基金资助项目, No. 20134433120009

作者贡献分布: 本文综述由毕艺鸣与许嘉彬完成; 安海燕审校.

通讯作者: 安海燕, 讲师, 主治医师, 510515, 广东省广州市白云区白云大道北1838号, 南方医科大学中医药学院.

anhaiya@fimmu.com

收稿日期: 2014-05-15 修回日期: 2014-06-10

接受日期: 2014-06-19 在线出版日期: 2014-08-28

MicroRNAs and biological functions of hepatic stellate cells

Yi-Ming Bi, Jia-Bin Xu, Hai-Yan An

Yi-Ming Bi, Jia-Bin Xu, Hai-Yan An, School of Traditional Chinese Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China

Supported by: the National Training Programs of Innovation and Entrepreneurship for College Students of China, No. 201212121053; Specialized Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education, No. 20134433120009

Correspondence to: Hai-Yan An, Lecturer, Attending Physician, School of Traditional Chinese Medicine, Southern Medical University, 1838 Baiyun Avenue North, Baiyun District, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China. anhaiya@fimmu.com

Received: 2014-05-15 Revised: 2014-06-10

Accepted: 2014-06-19 Published online: 2014-08-28

Abstract

MicroRNAs (miRNAs) are single-stranded, 18-24 nucleotide long, non-coding RNA molecules which are involved in virtually every cellular process including proliferation, differentiation and apoptosis by specifically interacting with the mRNA and regulating the expression of genes. Recently it has been found that miRNAs cooperate with transforming growth factor (TGF- β), nuclear factor kappa B (NF- κ B), tumor necrosis factor α (TNF- α) and other cytokines, and form complex "network" signaling pathways to influence the activation, proliferation, migration and apoptosis of hepatic stellate cells (HSCs), suggesting that miRNAs may regulate biological behaviors of HSCs via various signal transduction pathways,

and have a great influence on the development of hepatic fibrosis. This article will review the impact of miRNAs on the biological functions of HSCs via different signal transduction pathways.

© 2014 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: MicroRNAs; Hepatic fibrosis; Signal transduction

Bi YM, Xu JB, An HY. MicroRNAs and biological functions of hepatic stellate cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(24): 3587-3591 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/3587.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i24.3587>

摘要

MicroRNAs(miRNAs)是人体内长约18-24个核苷酸序列的非编码小RNA, 通过与mRNA特异性相互作用, 调节基因表达, 从而调控细胞增殖、分化和凋亡等过程. 近年来研究发现, miRNAs可协同转化生长因子(transforming growth factor- β)、核因子 κ B(nuclear factor-kappa B)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α)等细胞因子形成复杂的“网络”信号途径, 从而促进肝星形细胞(hepatic stellate cells, HSCs)活化、增殖、迁移和凋亡, 提示miRNAs通过各种不同信号转导通路参与调控HSC生物学行为进而影响肝纤维化的发生发展. 本文就miRNAs在不同转导通路上对HSC生物学功能的影响作一综述.

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有.

关键词: MicroRNAs; 肝纤维化; 信号转导

核心提示: MicroRNAs(miRNAs)通过靶向调控肝星形细胞(hepatic stellate cells)活化、增殖、迁移以及凋亡过程中相关细胞因子或蛋白, 从而影响肝纤维化的发生和发展.

毕艺鸣, 许嘉彬, 安海燕. MicroRNAs对HSC生物学功能的影响. *世界华人消化杂志* 2014; 22(24): 3587-3591 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/3587.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i24.3587>

■背景资料

MicroRNAs(miRNAs)是人体内一类非编码基因, 可通过与靶基因的作用调节蛋白质的翻译. 近年来, 随着对肝纤维化机制的深入研究, 表观遗传学水平的调控作用得到广泛关注, miRNAs对肝纤维化的作用及其作用机制的研究逐渐成为了焦点.

■同行评议者

袁红霞, 研究员, 天津中医药大学

■研发前沿

目前我们已经了解到miRNAs对肝星形细胞的生物学行为中的作用,但miRNAs的调控机制尚待进一步深入研究,尤其是关于miRNAs调控肝星形细胞迁移和凋亡的机制仍未清楚。

0 引言

肝纤维化是多种慢性肝病向肝硬化进展的共同环节。许多研究表明,肝纤维化的形成主要与肝星形细胞(hepatic stellate cells, HSCs)激活、增殖、凋亡等多种生物学行为有关,这些复杂的生物学行为涉及多条信号传导通路以及一系列的细胞信息分子^[1]。近年来,随着对肝纤维化机制的深入研究,表观遗传学水平的调控作用得到广泛关注,学者逐渐发现microRNAs(miRNAs)这一非编码RNA可调控转化生长因子(transforming growth factor- β , TGF- β)/Smad、Ras/ERK、Rho/ROCK、核因子 κ B(nuclear factor-kappa B, NF- κ B)等通路中的相关信息分子的合成,促进或阻断信号通路的级联反应,从而在许多肝脏疾病的发生发展过程中发挥重要的生物学作用^[2,3]。基于miRNAs对肝病的影响,研究miRNAs及其相关信号通路对肝纤维化的影响显得尤为重要。本文通过研究miRNAs对HSC生物学行为的影响,更深入地阐明miRNAs与肝纤维化的关系,为肝纤维化的治疗提供新方向。

1 miRNAs对肝细胞损伤和再生相关通路的影响

肝细胞是一种具有再生能力的终末分化细胞,能在各种刺激因素诱导下增殖分化以补偿肝体积和恢复肝功能,此为肝再生(liver regeneration, LR)^[4]。正常情况下, HSC可以分泌肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF), HGF可作用于肝细胞表面受体c-met,从而参与LR^[5]。但由于各种有害因素刺激, HSC活化并发生表型转换从而减少肝细胞再生,降低肝脏自我保护功能,这一作用最终导致细胞外大量胶原沉积^[6]。LR可分为启动、增生和终止阶段,涉及多条信号转导途径以及一系列转导蛋白^[7]。随着学者对LR过程的深入认识,逐渐发现miRNAs在LR刺激性反应中发挥着重要作用^[8]。

白介素-6(interleukin-6, IL-6)/STAT3通路是启动LR最重要的通道之一,磷酸化的STAT蛋白形成多聚复合体并穿过核膜诱导DNA转录^[9]。miR203作用于肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α),使TNF- α 诱导细胞合成TNF- α 诱导蛋白3(TNFAIP3/A20),激活IL-6/STAT3信号转导通路;同时TNFAIP3还可以抑制细胞因子信号抑制物3(suppressor of cytokine signaling-3, SOCS-3)的信号传递^[10]。这两种作用都可以促进LR。

NF- κ B的激活也是LR阶段最早出现的细胞信号转导事件之一^[11], TNF- α 与受体TNFR1结合,后者可磷酸化核因子抑制蛋白(inhibitor of NF- κ B, I κ B),从而激活NF- κ B。NF- κ B活性的增强可促进Jun、Myc等蛋白质的表达,启动DNA的合成,促进LR^[12]。在此过程中, miR21的表达上调,并靶向作用于衔接蛋白Pellion从而抑制NF- κ B激活,形成负反馈调节反应^[13]。miR21还可通过靶向作用于细胞周期抑制因子Btg2,抑制插头蛋白(Fox M1)的激活,使蛋白质的合成增加,为DNA合成作物质准备^[14]。有研究表明,当特异性抑制肝实质细胞miRNAs的合成,然后行肝部分切除术(2/3),残余肝细胞合成miRNAs能力降低,而G₁期向S期转变过程延迟;但直接行肝部分切除术时(2/3),通过观察发现残余肝细胞合成miR21明显增多^[15],提示miR21在肝再生过程中发挥重要作用。同时,有研究表明miR21可激活PI3K/Akt信号转导通路,促进肝细胞增殖^[16]。

在LR终止阶段,过度表达的miR34a通过降低抑制素 β B(INH β B)和Met的表达水平,阻止肝细胞的过度增殖^[17]; miR150可影响HGF的表达,从而减少肝细胞增殖^[18];此外,通过下调miR23b、miR193b影响Smad3蛋白的翻译,使细胞分裂停滞在G₁期,这表明TGF- β 是LR终止阶段表达的重要因子之一^[19,20]。

2 miRNAs对HSC活化增殖相关通路的影响

HSC的活化是肝纤维化的始动环节,此过程受到多种信号通路的调控。已有大量研究表明miRNAs在HSCs激活、增生过程中发挥重要作用,特异性阻断或促进miRNAs表达可逆转此过程^[21,22]。

2.1 miRNAs对TGF- β /Smad通路的影响

TGF- β 是肝纤维化最关键的细胞因子,对肝纤维化的发生发展具有重要的作用。在肝纤维化过程中, TGF- β 主要通过Smads等蛋白分子,使信号在胞内逐级传递直至转位到胞核内,调控DNA的表达,发挥活化HSC、促进HSC合成ECM、促进HSC分泌金属蛋白酶组织抑制物等作用^[23]。

miRNAs主要通过作用于信号转导分子Smads和下游效应蛋白酶,进而影响肝纤维化的进程。miR29及其家族成员作为TGF- β 和NF- κ B信号转导途径的一部分,是miRNAs中研究最为清楚的一类抗纤维化因子^[24-26]。其作用机制主要为:(1)协同miR26a和miR214,阻断胶原蛋白基因的转录过程,减少I型和IV型胶原蛋白的合成^[21,27];(2)下调DNA甲基转移酶3b(DNMT3b)的

■相关报道

Finch等揭示了miRNAs在肝脏的发育、再生以及多种肝脏疾病中发挥着重要的作用,尤其与慢性酒精性肝病、病毒性肝炎和原发性肝癌的发生和发展相关。

表达,使10号染色体上的磷酸酶基因甲基化水平降低,启动合成磷酸酶的过程,使TGF- β 下游信号转导分子去磷酸化,导致级联反应终止,从而在根本上阻断肝纤维化的发生^[28]。

除miR29外,多种miRNAs可通过作用于该通路上的各个靶点阻止肝纤维化。miR150可直接与转录因子Sp1和编码IV型胶原 α 4链的Col4A4基因结合,使平滑肌肌动蛋白和IV型胶原蛋白的合成减少^[29];miR133a可作用于Col1A1基因的3'-非翻译区(3'-UTR),阻止I型胶原蛋白合成^[30],同时可阻止ERK1/2和Smad2的磷酸化作用,终止级联反应^[31];miR19与相关基因相互作用,降低TGF- β II受体(TGF- β R II)和Smad3的表达水平^[32];miR200a通过抑制mRNA的翻译或者直接作用于TGF- β 2蛋白,抑制HSC的增殖以及平滑肌肌动蛋白的生成^[33];miR146a则直接作用于Smad4蛋白,阻止肝纤维化的发生^[34]。

另一方面,部分miRNAs在肝纤维化过程中表达增加,表明他们对肝纤维化起着促进作用^[35]。miR21表达水平随肝纤维化程度增加而提高,并靶向作用于TGF- β 信号转导通路中负性调控因子SMAD7,促进肝纤维化^[36]。并且,最近有研究表明,肝纤维化的不可逆转与miR21/PDCD4/AP-1反馈回路密切相关^[37]。

2.2 miRNAs对Ras/ERK通路的影响 丝裂原激活蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)属于Ser/Thr蛋白激酶家族,主要成员有3个:ERK、JNK和P38,该信号通路的激活有促肝纤维化作用。许蜜蝶^[38]通过研究肝纤维化过程中miRNA表达谱发现,miRNA34家族与肝纤维化进程密切相关,miRNA34a/c使MAP2K1表达上调,而MAP2K1可以作为MAPK的上游激活效应器,激活Ras/ERK通路,促进肝纤维化的发生。此外,PDGF是该通路的另一个活化信号分子,miRNA29除通过调控TGF β 发挥抗纤维化作用外,还可通过抑制PDGF-C的表达阻止HSC活化^[39,40]。

3 miRNAs对HSC迁移相关通路的影响

Rho/ROCK信号通路对HSC的影响是近年来研究肝纤维化的热点,该通路涉及肝纤维化的多个过程,其中对HSC迁移的调控越来越受到学者的重视。而许多研究表明,HSC的迁移与细胞骨架的重建有很大关系^[41]。TGF β 、PDGF-BB均激活Rho/ROCK信号通路,并通过促进活化的HSC表达细胞骨架的重要组成成分 α -平滑肌肌动蛋白

(α -smooth muscle actin, α -SMA)诱导细胞的移行^[42]。另外, Kim等^[43]发现IKK γ 通过鸟嘌呤交换因子(guanine nucleotide exchange factor, GEF)激活RhoA,而活化的RhoA又可以激活ROCK并磷酸化IKK β ,从而激活NF- κ B信号转导通路和诱导细胞迁移,这一结果提示miRNAs参与NF- κ B介导的HSC迁移的调节。

目前,miRNAs调控HSC迁移的作用机制仍不清楚,但已有少量研究发现miR1894-5p、miR1952、miR149、miR877和miR3102可作用于ROCK通路调节血管的收缩和舒张,此过程涉及血管内皮细胞骨架的重建^[44]。此外,miRNA21、miRNA221/222以及miRNA143/145等也参与了血管平滑肌可塑性的调节^[45];而通过研究神经元轴突的生长和延长发现miR124能特异性抑制靶基因ROCK1的表达,促进神经元轴突的延长,此过程同样涉及细胞骨架系统,由此推测miRNAs介导HSC迁移可能与细胞骨架的重建有关^[46]。

4 miRNAs对HSC凋亡相关通路的影响

肝纤维化的发生发展除与HSC活化、增殖、迁移相关外,还与HSC的凋亡有关。目前,对HSC凋亡通路的研究主要有:Bcl-2家族、NF- κ B等。HSC本身具有抗凋亡刺激的能力,其作用机制可能是静止的HSC转化为MFLC过程中抗凋亡途径的活化,尤其是与Bcl-2蛋白合成增加,而Bax蛋白则减少有关^[47]。miRNAs可以通过调控这些蛋白的表达诱导HSC凋亡。实验表明miR15b和miR16通过抑制Bcl-2蛋白的表达上调Caspase3、8、9,促进HSC的凋亡^[48]。

虽然目前相关研究报道十分缺乏,但在其他细胞凋亡过程中可发现某些miRNAs表达的改变。例如,脱甲基后的miR93和miR193a可作用于NF- κ B信号转导分子促进肺癌细胞凋亡^[49];在心肌细胞氧化应激过程中,miR21高表达,介导心肌细胞程序性死亡^[50];另外,NF- κ B通过调控miRNA30bB的表达,影响下游蛋白Bcl-2的信号传递,促进心肌细胞凋亡^[51]。

5 结论

miRNAs作为一类细胞内分子,在信号转导过程中发挥着巨大的作用。近年来,对HSC生物学功能的研究深入到分子生物学水平,并且发现在肝纤维化过程中多种miRNAs的表达具有差异性。不同miRNAs通过靶向调控HSC活化、增

■创新盘点

文章从分子机制水平总结了miRNAs主要通过影响肝星形细胞的信号转导通路中某些蛋白的合成调控其生物学行为,揭示了其对肝纤维化的进程的作用及其作用机制。

■应用要点

随着对miRNAs调节机制的深入研究,某些miRNAs有望成为预测早期肝纤维化的生物标识以及作为肝纤维化的治疗靶点。

殖、迁移以及凋亡过程中相关细胞因子或蛋白,激活相关信号传导通路,促进或抑制肝纤维化的发生。随着对miRNAs调节机制的深入研究,miRNAs极有可能成为新型肝纤维化分子调控靶点,进而为预防和控制肝纤维化提供依据。

6 参考文献

- 汪美凤, 平键, 成扬. 肝星状细胞主要信号转导通路与肝纤维化的关系. 实用肝脏病杂志 2010; 13: 466-469
- 许蜜蝶, 李维卿, 余宏宇. MicroRNAs与慢性肝病病变相关性的研究进展. 第二军医大学学报 2010; 31: 896-899
- 周雄根, 舒建昌. 微小RNA与肝纤维化关系的研究进展. 广东医学 2011; 24: 3280-3283
- 武晓勇, 黄博, 武晓勇. 肝再生的分子机制研究进展. 中国医药科学 2012; 2: 64-66
- 鲁艳平. HGF、ERK/MAPK、ESM和CNTF信号通路在大鼠肝再生中对肝细胞分化的调节作用研究. 新乡: 河南师范大学, 2013
- 宋明. 肝再生增强因子对大鼠肝纤维化的治疗作用及机制研究. 沈阳: 沈阳药科大学, 2012
- Riehle KJ, Dan YY, Campbell JS, Fausto N. New concepts in liver regeneration. *J Gastroenterol Hepatol* 2011; 26 Suppl 1: 203-212 [PMID: 21199532 DOI: 10.1111/j.1440-1746.2010.06539.x]
- 韦君, 樊晓明. microRNAs在肝脏中的作用. 世界华人消化杂志 2012; 20: 1-8
- 刘现忠, 李相成, 仲跻巍. 肝脏再生信号机制研究进展. 中华肝脏病杂志 2007; 15: 158-160
- da Silva CG, Studer P, Skroch M, Mahiou J, Minussi DC, Peterson CR, Wilson SW, Patel VI, Ma A, Csizmadia E, Ferran C. A20 promotes liver regeneration by decreasing SOCS3 expression to enhance IL-6/STAT3 proliferative signals. *Hepatology* 2013; 57: 2014-2025 [PMID: 23238769 DOI: 10.1002/hep.26197]
- 杜赵康. Bax、Bcl-2、NF-κB在肝再生早期中的表达. 大理: 大理学院, 2012
- 段丽娟. NF-κB信号通路对大鼠再生肝的肝细胞增殖的促进作用研究. 新乡: 河南师范大学, 2012
- Marquez RT, Wendlandt E, Galle CS, Keck K, McCaffrey AP. MicroRNA-21 is upregulated during the proliferative phase of liver regeneration, targets Pellino-1, and inhibits NF-kappaB signaling. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2010; 298: G535-G541 [PMID: 20167875 DOI: 10.1152/ajpgi.00338.2009]
- Song G, Sharma AD, Roll GR, Ng R, Lee AY, Bleiloch RH, Frandsen NM, Willenbring H. MicroRNAs control hepatocyte proliferation during liver regeneration. *Hepatology* 2010; 51: 1735-1743 [PMID: 20432256 DOI: 10.1002/hep.23547]
- Chen Y, Verfaillie CM. MicroRNAs: the fine modulators of liver development and function. *Liver Int* 2014; 34: 976-990 [PMID: 24517588 DOI: 10.1111/liv.12496]
- Yan-nan B, Zhao-yan Y, Li-xi L, Jiang Y, Qing-jie X, Yong Z. MicroRNA-21 accelerates hepatocyte proliferation in vitro via PI3K/Akt signaling by targeting PTEN. *Biochem Biophys Res Commun* 2014; 443: 802-807 [PMID: 24342610 DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.12.047]
- Chen H, Sun Y, Dong R, Yang S, Pan C, Xiang D, Miao M, Jiao B. Mir-34a is upregulated during liver regeneration in rats and is associated with the suppression of hepatocyte proliferation. *PLoS One* 2011; 6: e20238 [PMID: 21655280 DOI: 10.1371/journal.pone.0020238]
- Finch ML, Marquardt JU, Yeoh GC, Callus BA. Regulation of microRNAs and their role in liver development, regeneration and disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2014 Apr 13. [Epub ahead of print] [PMID: 24731940 DOI: 10.1016/j.biocel.2014.04.002]
- Yuan B, Dong R, Shi D, Zhou Y, Zhao Y, Miao M, Jiao B. Down-regulation of miR-23b may contribute to activation of the TGF-β1/Smad3 signalling pathway during the termination stage of liver regeneration. *FEBS Lett* 2011; 585: 927-934 [PMID: 21354414 DOI: 10.1016/j.febslet.2011.02.031]
- Zhong Q, Wang T, Lu P, Zhang R, Zou J, Yuan S. miR-193b promotes cell proliferation by targeting Smad3 in human glioma. *J Neurosci Res* 2014; 92: 619-626 [PMID: 24496888 DOI: 10.1002/jnr.23339]
- Maubach G, Lim MC, Chen J, Yang H, Zhuo L. miRNA studies in vitro and in vivo activated hepatic stellate cells. *World J Gastroenterol* 2011; 17: 2748-2773 [PMID: 21734783 DOI: 10.3748/wjg.v17.i22]
- 陈超. 肝纤维化相关microRNA的筛选及其功能研究. 上海: 第二军医大学, 2012
- 黄越龙, 周春光, 陈燕, 张谊, 张启瑜. TGF/Smad信号通路与肝纤维化的研究进展. 实用医学杂志 2011; 27: 1883-1884
- Roderburg C, Urban GW, Bettermann K, Vucur M, Zimmermann H, Schmidt S, Janssen J, Koppe C, Knolle P, Castoldi M, Tacke F, Trautwein C, Luedde T. Micro-RNA profiling reveals a role for miR-29 in human and murine liver fibrosis. *Hepatology* 2011; 53: 209-218 [PMID: 20890893 DOI: 10.1002/hep.23922]
- Zhang Y, Wu L, Wang Y, Zhang M, Li L, Zhu D, Li X, Gu H, Zhang CY, Zen K. Protective role of estrogen-induced miRNA-29 expression in carbon tetrachloride-induced mouse liver injury. *J Biol Chem* 2012; 287: 14851-14862 [PMID: 22393047 DOI: 10.1074/jbc.M111.314922]
- Hyun J, Choi SS, Diehl AM, Jung Y. Potential role of Hedgehog signaling and microRNA-29 in liver fibrosis of IKKβ-deficient mouse. *J Mol Histol* 2014; 45: 103-112 [PMID: 23949847 DOI: 10.1007/s10735-013-9532-5]
- Kwiecinski M, Noetel A, Elfimova N, Trebicka J, Schievenbusch S, Strack I, Molnar L, von Brandenstein M, Töx U, Nischt R, Coutelle O, Dienes HP, Odenthal M. Hepatocyte growth factor (HGF) inhibits collagen I and IV synthesis in hepatic stellate cells by miRNA-29 induction. *PLoS One* 2011; 6: e24568 [PMID: 21931759 DOI: 10.1371/journal.pone.0024568]
- Zheng J, Wu C, Lin Z, Guo Y, Shi L, Dong P, Lu Z, Gao S, Liao Y, Chen B, Yu F. Curcumin up-regulates phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 through microRNA-mediated control of DNA methylation--a novel mechanism suppressing liver fibrosis. *FEBS J* 2014; 281: 88-103 [PMID: 24138392 DOI: 10.1111/febs.12574]
- Zheng J, Lin Z, Dong P, Lu Z, Gao S, Chen X, Wu C, Yu F. Activation of hepatic stellate cells is suppressed by microRNA-150. *Int J Mol Med* 2013; 32: 17-24 [PMID: 23604143 DOI: 10.3892/ijmm.2013.1356]

- 30 Castoldi G, Di Gioia CR, Bombardi C, Catalucci D, Corradi B, Gualazzi MG, Leopizzi M, Mancini M, Zerbini G, Condorelli G, Stella A. MiR-133a regulates collagen 1A1: potential role of miR-133a in myocardial fibrosis in angiotensin II-dependent hypertension. *J Cell Physiol* 2012; 227: 850-856 [PMID: 21769867 DOI: 10.1002/jcp.22939]
- 31 Roderburg C, Luedde M, Vargas Cardenas D, Vucur M, Mollnow T, Zimmermann HW, Koch A, Hellerbrand C, Weiskirchen R, Frey N, Tacke F, Trautwein C, Luedde T. miR-133a mediates TGF- β -dependent derepression of collagen synthesis in hepatic stellate cells during liver fibrosis. *J Hepatol* 2013; 58: 736-742 [PMID: 23183523 DOI: 10.1016/j.jhep.2012.11.022]
- 32 Lakner AM, Steuerwald NM, Walling TL, Ghosh S, Li T, McKillop IH, Russo MW, Bonkovsky HL, Schrum LW. Inhibitory effects of microRNA 19b in hepatic stellate cell-mediated fibrogenesis. *Hepatology* 2012; 56: 300-310 [PMID: 22278637 DOI: 10.1002/hep.25613]
- 33 Sun X, He Y, Ma TT, Huang C, Zhang L, Li J. Participation of miR-200a in TGF- β 1-mediated hepatic stellate cell activation. *Mol Cell Biochem* 2014; 388: 11-23 [PMID: 24242045 DOI: 10.1007/s11010-013-1895-0]
- 34 He Y, Huang C, Sun X, Long XR, Lv XW, Li J. MicroRNA-146a modulates TGF- β 1-induced hepatic stellate cell proliferation by targeting SMAD4. *Cell Signal* 2012; 24: 1923-1930 [PMID: 22735812 DOI: 10.1016/j.cellsig.2012.06.003]
- 35 Vettori S, Gay S, Distler O. Role of MicroRNAs in Fibrosis. *Open Rheumatol J* 2012; 6: 130-139 [PMID: 22802911 DOI: 10.2174/1874312901206010130]
- 36 Shrivastava S, Mukherjee A, Ray RB. Hepatitis C virus infection, microRNA and liver disease progression. *World J Hepatol* 2013; 5: 479-486 [PMID: 24073299 DOI: 10.4254/wjh.v5.i9.479]
- 37 Zhang Z, Zha Y, Hu W, Huang Z, Gao Z, Zang Y, Chen J, Dong L, Zhang J. The autoregulatory feedback loop of microRNA-21/programmed cell death protein 4/activation protein-1 (MiR-21/PDCD4/AP-1) as a driving force for hepatic fibrosis development. *J Biol Chem* 2013; 288: 37082-37093 [PMID: 24196965 DOI: 10.1074/jbc.M113.517953]
- 38 许蜜蝶. 肝纤维化进程相关microRNA表达谱的筛选. 上海: 第二军医大学, 2012
- 39 叶蕾, 陈芝芸, 严茂祥, 赵振中, 李剑霜. 肝纤维化大鼠肝组织MAPKs信号通路的活化及意义. *中华中医药学刊* 2013; 12: 2748-2750
- 40 Kwiecinski M, Elfimova N, Noetel A, Töx U, Steffen HM, Hacker U, Nischt R, Dienes HP, Odenthal M. Expression of platelet-derived growth factor-C and insulin-like growth factor I in hepatic stellate cells is inhibited by miR-29. *Lab Invest* 2012; 92: 978-987 [PMID: 22565577 DOI: 10.1038/labinvest.2012.70]
- 41 洪金妮, 王标辉, 安海燕. Rho/ROCK信号通路参与肝纤维化过程的研究. *中西医结合肝病杂志* 2013; 23: 123-125
- 42 洪金妮, 许嘉彬, 安海燕. 肝星状细胞的移行机制及药物干预研究. *中西医结合肝病杂志* 2013; 23: 373-375
- 43 Kim HJ, Kim JG, Moon MY, Park SH, Park JB. IKK kinase γ /nuclear factor- κ B-essential modulator (IKK γ /NEMO) facilitates RhoA GTPase activation, which, in turn, activates Rho-associated KINASE (ROCK) to phosphorylate IKK β in response to transforming growth factor (TGF)- β 1. *J Biol Chem* 2014; 289: 1429-1440 [PMID: 24240172 DOI: 10.1074/jbc.M113.520130]
- 44 Stiles JM, Kurisetty V, Mitchell DC, Bryan BA. Rho kinase proteins regulate global miRNA expression in endothelial cells. *Cancer Genomics Proteomics* 2013; 10: 251-263 [PMID: 24336634]
- 45 Albinsson S, Bhattacharya A, Hellstrand P. Stretch-dependent smooth muscle differentiation in the portal vein-role of actin polymerization, calcium signaling, and microRNAs. *Microcirculation* 2014; 21: 230-238 [PMID: 24238368 DOI: 10.1111/micc.12106]
- 46 Gu X, Meng S, Liu S, Jia C, Fang Y, Li S, Fu C, Song Q, Lin L, Wang X. miR-124 represses ROCK1 expression to promote neurite elongation through activation of the PI3K/Akt signal pathway. *J Mol Neurosci* 2014; 52: 156-165 [PMID: 24338057 DOI: 10.1007/s12031-013-0190-6]
- 47 靳雅玲, 欧士钰, 罗伟生. Bcl-2、Bax与肝纤维化关系的研究进展. *临床医学工程* 2013; 20: 124-126
- 48 Guo CJ, Pan Q, Cheng T, Jiang B, Chen GY, Li DG. Changes in microRNAs associated with hepatic stellate cell activation status identify signaling pathways. *FEBS J* 2009; 276: 5163-5176 [PMID: 19674103 DOI: 10.1111/j.1742-4658.2009.07213.x]
- 49 Wang J, Yang B, Han L, Li X, Tao H, Zhang S, Hu Y. Demethylation of miR-9-3 and miR-193a genes suppresses proliferation and promotes apoptosis in non-small cell lung cancer cell lines. *Cell Physiol Biochem* 2013; 32: 1707-1719 [PMID: 24356455 DOI: 10.1159/000356605]
- 50 Wei C, Li L, Kim IK, Sun P, Gupta S. NF- κ B mediated miR-21 regulation in cardiomyocytes apoptosis under oxidative stress. *Free Radic Res* 2014; 48: 282-291 [PMID: 24237305 DOI: 10.3109/10715762.2013.865839]
- 51 Wei C, Li L, Gupta S. NF- κ B-mediated miR-30b regulation in cardiomyocytes cell death by targeting Bcl-2. *Mol Cell Biochem* 2014; 387: 135-141 [PMID: 24178239 DOI: 10.1007/s11010-013-1878-1]

同行评价

本文以miRNAs通过调控细胞因子形成复杂的“网络”信号途径诱导HSC凋亡的角度,为临床及基础研究选择治疗肝纤维化的靶点提供了理论支撑,具有一定学术价值。

编辑 田滢 电编 闫晋利



炎症性肠病的实验室检查及代谢组学的研究进展

李 潘, 崔伯塔, 段义农, 张发明

■背景资料

目前, 炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)的诊断和预后评估存在一定挑战. 代谢组学作为一门系统研究机体代谢产物的变化规律, 揭示机体生命活动代谢本质的科学, 已广泛应用于IBD的临床研究.

李潘, 崔伯塔, 张发明, 南京医科大学第二附属医院肠病中心 江苏省南京市 210011

李潘, 段义农, 南通大学医学院病原生物学系 江苏省南通市 226001

李潘, 在读硕士, 主要从事炎症性肠病的研究.

作者贡献分布: 本文综述由李潘与崔伯塔完成; 段义农与张发明审校.

通讯作者: 张发明, 副教授, 副主任医师, 210011, 江苏省南京市姜家园121号, 南京医科大学第二附属医院肠病中心.

fzhang@njmu.edu.cn

电话: 025-58509883

收稿日期: 2014-06-09 修回日期: 2014-06-18

接受日期: 2014-07-05 在线出版日期: 2014-08-28

Laboratory evaluation and metabolomics in inflammatory bowel disease

Pan Li, Bo-Ta Cui, Yi-Nong Duan, Fa-Ming Zhang

Pan Li, Bo-Ta Cui, Fa-Ming Zhang, Medical Center for Intestinal Diseases, the Second Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210011, Jiangsu Province, China

Pan Li, Yi-Nong Duan, Department of Pathogen Biology, Medical College of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Fa-Ming Zhang, Associate Professor, Associate Chief Physician, Medical Center for Intestinal Diseases, the Second Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, 121 Jiangjiayuan Road, Nanjing 210011, Jiangsu Province, China. fzhang@njmu.edu.cn

Received: 2014-06-09 Revised: 2014-06-18

Accepted: 2014-07-05 Published online: 2014-08-28

Abstract

Diagnosis and prognosis of inflammatory bowel disease (IBD) remain a challenge for physicians, and they are often based on history, clinical symptoms and endoscopic, histological, radiological and laboratory findings. Studies have shown that metabolomics may have important value in the diagnosis and prognosis of IBD. This paper will review the latest progress in laboratory evaluation and metabolomics in IBD.

© 2014 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: Inflammatory bowel disease; Diagnosis; Prognosis; Metabolomics

Li P, Cui BT, Duan YN, Zhang FM. Laboratory evaluation and metabolomics in inflammatory bowel disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(24): 3592-3599 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/3592.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i24.3592>

摘要

目前, 炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)的诊断和预后主要基于病史、临床表现、内镜、组织学、影像学和实验室检查, 但是仍然面临较大的挑战. 已有研究表明, 将代谢组学应用于IBD的研究具有重要价值. 本文就IBD的实验室检查手段和代谢组学用于IBD的研究进展进行综述.

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有.

关键词: 炎症性肠病; 诊断; 预后; 代谢组学

核心提示: 本文对炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)的实验室检查现状和代谢组学研究进展进行了综述, 重点强调了代谢组学在IBD的诊断、预后评估和机制研究方面的可行性.

李潘, 崔伯塔, 段义农, 张发明. 炎症性肠病的实验室检查及代谢组学的研究进展. *世界华人消化杂志* 2014; 22(24): 3592-3599 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/3592.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i24.3592>

0 引言

炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)是一类反复发作的慢性胃肠道炎症性疾病, 包括溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)和克罗恩病(Crohn's disease, CD). IBD的发病机制不明确, 遗传、环境、免疫和肠道菌群失调都是其重要的致病因素. 目前, IBD的诊断主要基于病史、临床表现、内镜、组织学、影像学和实验室检查. 但是由于缺乏灵敏性和特异性高的诊断指标, 使得IBD的诊断、病程分期、疗效评价和预后评估仍然存在较大挑战. 自2007年Marchesi等^[1]首次尝试使用核磁共振氢谱(proton nuclear mag-

■同行评议者

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

netic resonance spectroscopy, $^1\text{H-NMR}$)技术研究IBD患者粪便标本中的小分子代谢产物以来, 代谢组学已广泛用于IBD的临床研究. 本文综述了目前IBD的实验室检查手段和代谢组学在IBD研究中的应用.

1 IBD的实验室检查

1.1 IBD实验室诊断现状 临床上IBD的诊断主要依靠病史、临床表现、内镜、组织学、影像学和实验室检查, 而这时疾病处于进展期, 疾病的诊断往往延迟^[2,3]. 尽管借助上述诊断方法能排除具有相似临床表现的IBD患者, 对UC和CD进行鉴别诊断, 但仍有5%-10%的结肠病变患者诊断不明确, 这类患者既有UC的某些临床特征, 又有CD的某些特征, 即结肠IBD类型待定(colonic IBD type unclassified, IBDU)^[2,4]. 内镜和组织活检是目前诊断IBD最常用的方法, 非侵袭性检查方法起着辅助诊断的作用. 但内镜诊断有很大成分的主观性, 且受限于临床医生的水平. 通过内镜行组织活检是一种侵袭性检查, 不同程度上给患者带来痛苦. 而IBD的实验室检查方法^[2,3,5](表1), 由于缺乏特异性的诊断指标, 也不能满足临床诊断的需要.

红细胞沉降率(erythrocyte sedimentation rate, ESR)、C反应蛋白(c-reactive protein, CRP)和粪钙卫蛋白(faecal calprotectin)可用于辅助临床诊断、判断疾病的活性和指导临床治疗, 3项指标升高提示疾病处于活性期或者复发, 患者肠道存在炎症, 但他们都不是炎症的特异性指标^[3,6-9]. IBD患者由于饮食营养成分摄入不足, 丢失过多和肠黏膜受损引起的吸收障碍, 部分IBD患者表现出体质量不足且存在缺铁性贫血、低蛋白血症和血小板增多等症^[2,3]. 在IBD的诊断中用得最多的血清学指标是抗中性粒细胞浆抗体(antineutrophil-cytoplasmic antibodies, ANCA)和抗酿酒酵母抗体(anti-Saccharomyces cerevisiae, ASCA). ANCA和ASCA的联合检测有助于对UC和CD鉴别诊断, Bossuyt等^[10]在研究中发现ANCA阳性、ASCA阴性在UC患者中特异性达到81%-98%; ANCA阴性、ASCA阳性在CD患者中特异性高达92%-97%. ANCA和ASCA的联合检测也有助于结肠IBD类型待定的诊断. 其他血清学指标也有助于UC和CD的鉴别诊断, 如UC患者血清中的抗小肠杯状细胞抗体(anti-goblet cell antibodies, GAB)^[12]和CD患者血清中的抗胰腺腺泡抗体(autoantibodies against exocrine

pancreas, PAB)及与异常免疫反应相关的PAB的自身抗原酶原颗粒膜糖蛋白2(zymogen granule membrane glycoprotein 2, GP2)、CUB带状疱疹透明区样域蛋白1(CUB and zona pellucida-like domains 1, CUZD1)^[3,11-13]. 尽管上述血清学指标联合运用对于IBD的鉴别诊断具有一定的价值^[10,14], 但是ANCA和ASCA等指标并不能准确反映肠道黏膜损害程度且灵敏性较差^[2,3,15,16]. 因此, 还需要进一步的研究来证实上述实验室指标在IBD诊断中的价值.

1.2 IBD预后评估 IBD的治疗目标是诱导和维持临床缓解期, 通过内镜、影像学和实验室检查进行疗效评价和预后评估是一种有效的方法, 但是也存在一定的挑战, 如表2^[6]. 通过内镜可以观察黏膜的愈合情况, 但是黏膜愈合程度与IBD预后的关系尚无确切定义. 内镜检查作为一种侵袭性的检查方法, 价格昂贵, 同时需要严格的肠道准备, 特别是在低龄患儿中难以实施, 从而限制了其使用. CRP、粪钙卫蛋白和ESR作为非特异性的炎症指标, 在IBD的灵敏性和特异性较低, 且需排除生物标本的检测和保存导致的结果变异. 影像学检查对于IBD的疗效评价和预后评估意义不大, 且价格也较高. 因此, 需要探索更加有效可行的检查方法来满足临床的需求.

2 代谢组学在IBD研究中的应用

2.1 代谢组学的研究方法与临床应用 代谢组学的概念最早来源于Devaux等^[17]上世纪70年代提出的代谢轮廓分析(metabolic profiling). Nicholson等^[18]和Fiehn^[19]后来分别提出了metabolomics和metabolomics的概念, 目前, 国内的代谢组学研究小组用metabolomics一词来表示代谢组学. 代谢组学具有高通量、高精确性、高灵敏性的优势, 能定性或定量检测机体在新陈代谢的动态进程中所产生的小分子代谢物的变化^[20,21]. 代谢组学的分析流程包括样品制备、数据采集和数据分析及解释3个部分^[22]. 代谢组学分析的样品主要为各类生物标本, 常用到尿液、血液、唾液、粪便提取物、局部病理组织如结肠组织等. 样品中的代谢产物常用 $^1\text{H-NMR}$ 、气相色谱-质谱联用技术(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)和液相色谱-质谱联用技术(liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS)等方法进行检测. 数据的分析和解释则需借助于生物信息学平台进行数据处理, 最常用的是主成分分析(principal component analysis, PCA)

■研究前沿

与基因和蛋白质相比, 小分子代谢物能够更准确的反映生物机体的状态. 代谢组学通过定量或定性的对参与疾病进程的小分子代谢产物进行动态检测, 对疾病的研究具有重要的价值.

■相关报道

IBD生物标本的代谢组学分析表明, IBD患者与健康人、IBD不同分期、溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)和克罗恩病(Crohn's disease, CD)之间小分子代谢物[如短链脂肪酸、马尿酸、柠檬酸、谷氨酰胺、丙氨酸、低密度脂蛋白(low-density lipoprotein, LDL)和极低密度脂蛋白(very-low-density lipoprotein, VLDL)等]存在差异。

表 1 IBD的实验室检查指标

检查指标	UC	CD	指标特点
ESR	升高	升高	非特异性炎症指标
CRP	升高	升高	
粪钙卫蛋白	升高	升高	
缺铁性贫血	是	是	提示营养不良
低白蛋白血症	是	是	
血小板增多	是	是	
ANCA阳性率(%) ^[2]	50-70	<10	免疫球蛋白(IgA或IgG), 联合应用有助于疾病诊断, 但灵敏性差
ASCA阳性率(%) ^[3]	15	45-60	
GAB阳性率(%) ^[5]	15.4-46.6	1.4-33	
PAB阳性率(%) ^[5]	0-22.7	26-39	自身免疫反应
异常免疫反应 ^[3]	-	GP2、CUZD1	

IBD: 炎症性肠病; UC: 溃疡性结肠炎; CD: 克罗恩病; ESR: 红细胞沉降率; CRP: C反应蛋白; ANCA: 抗中性粒细胞胞浆抗体; ASCA: 抗酿酒酵母抗体; GAB: 抗小肠杯状细胞抗体; PAB: 抗胰腺腺泡抗体; GP2: 酶原颗粒膜糖蛋白2; CUZD1: CUB带状疱疹透明区样域蛋白1。

表 2 IBD预后检查方法的比较

目标	内镜	实验室检查			影像学
		CRP	粪钙卫蛋白	ESR	
用于预后评估	是	是	是	是	是
用于药物、手术治疗疗效评价	是	是	是	是	是
用于长期随访调查	是	不清楚	不清楚	不清楚	不清楚
可负担检查方法	否	是	是	是	否
非侵袭性检查方法	否	是	是	是	是
检查方法结果稳定性	是	否	否	否	不清楚

IBD: 炎症性肠病; ESR: 红细胞沉降率; CRP: C反应蛋白。

和偏最小二乘判别分析法(partial least squares discriminant analysis, PLS-DA)^[23]。自上世纪90年代末出现以来, 代谢组学已广泛应用于药物毒性及机制研究^[24], 微生物及植物代谢组学研究^[25], 营养科学^[26]和疾病诊断^[27]等多个领域的研究。

目前, 代谢组学作为一种颇具前景的疾病诊断方法已广泛应用于肿瘤^[28-30]、糖尿病^[31]、心血管疾病^[32]、过敏性疾病^[33]、风湿性关节炎^[34]和多发性硬化症^[35]等疾病的研究。代谢组学研究表明, 参与疾病进程的小分子代谢物(如氨基酸及其衍生物、酮类、有机酸、脂肪酸、胺类、核苷和糖类等)不仅可作为疾病诊断的候选生物指标, 而且有助于疾病的判别分析。

2.2 代谢组学在IBD的临床研究进展 近几年代谢组学已广泛用于IBD的临床研究, 如表3。在IBD的疾病进程中发生变化的小分子代谢产物主要

是氨基酸及其衍生物、短链脂肪酸、马尿酸、脂类和糖类等, 而这些物质大部分都是肠道菌群参与代谢人体摄入的营养物质和异源性物质的代谢产物。通过粪便标本进行代谢组学分析是最常用的方式。Marchesi等^[1]于2007年首次尝试使用代谢组学来阐释肠道菌群与IBD发病机制之间的关系。Le Gall等^[36]研究发现UC患者肠道菌群的多样性与代谢产物的组成具有直接联系。IBD患者存在肠道营养吸收不良, 这与研究者发现粪便标本中氨基酸的含量升高相吻合^[1,37]。尿液的代谢组学分析也是研究者关注的对象, 马尿酸是其中最具代表性的物质。国外学者^[38-41]对IBD患者的尿液标本分析发现, 肠道菌群代谢产物马尿酸的含量低于健康人, 表明马尿酸有可能成为诊断IBD的生物指标。血清、血浆和结肠黏膜组织也能反映宿主的新陈代谢。

表 3 代谢组学在IBD临床研究中的运用

作者	标本	分析方法	标本来源	结果或意义
Marchesi等 ^[1] 2007	粪便	¹ H-NMR	CD(10)、UC(10)、Controls(13)	CD患者短链脂肪酸、甲胺、三甲胺含量降低; UC和CD患者氨基酸含量升高; 代谢组学第一次用于IBD临床标本研究, IBD与肠道菌群有关
Jansson等 ^[37] 2009	粪便	ICR-FT/MS	CD(10)、Controls(7)	CD患者黏膜损伤部位(回肠、结肠)不同, 其酪氨酸、苯丙氨酸新陈代谢及胆汁酸、脂肪酸生物合成路径存在明显差异
Le Gall等 ^[36] 2011	粪便	¹ H-NMR	UC(13)、IBS(10)、Controls(22)	UC患者牛磺酸和尸胺含量升高, DGGE发现UC患者肠道菌群多样性的变化; 代谢产物的成分与肠道菌群的组成具有相关性
Huda-Faujan等 ^[64] 2010	粪便	HPLC	CD(2)、UC(6)、Controls(50)	IBD患者乙酸、丙酸、丁酸含量低于对照组, 乳酸、丙酮酸含量高于对照组, 提示肠道菌群代谢产物短链脂肪酸与IBD的发病机制相关
Walton等 ^[65] 2013	粪便	GC-MS	UC(20)、CD(22)、IBS(26)、Controls(19)	CD患者挥发性有机代谢产物中脂类和短链脂肪酸衍生物及吲哚含量高于对照组, 治疗后, 挥发性的代谢物与对照组相似
Williams等 ^[38] 2009	尿液	¹ H-NMR	CD(86)、UC(60)、Controls(60)	CD患者马尿酸盐、对甲酚硫酸盐含量降低, 甲酸含量升高, 表明不同疾病肠道菌群特异性代谢产物存在差异
Stephens等 ^[40] 2013	尿液	¹ H-NMR	CD(20)、UC(20)、Controls(40)	IBD患者三羧酸循环中间代谢产物、氨基酸代谢产物、葫芦巴碱、肌酸、尿素和牛磺酸等代谢产物含量发生改变; CD和UC可以鉴别诊断, 手术治疗患者则无差别
Schicho等 ^[39] 2012	尿液、血清、血浆	¹ H-NMR	CD(20)、UC(20)、Controls(40)	血液中氨基酸、肌酸、肌酐、尿素循环代谢物、单糖、尿液中马尿酸等代谢产物含量发生改变
Dawiskiba等 ^[41] 2014	尿液、血清	¹ H-NMR	UC(24)、CD(19)、Controls(17)	活性期IBD与缓解期的区别: 血清中N-乙酰化合物、苯丙氨酸含量升高, LDL、VLDL含量降低; 尿液中甘氨酸含量升高, 乙酰乙酸含量降低. 与IBD相关性最高的代谢产物包括乙酰乙酸、马尿酸、牛磺酸、柠檬酸、琥珀酸、甘氨酸、丙氨酸、甲酸等
Hisamatsu等 ^[66] 2012	血浆	AA analyzer	CD(165)、UC(222)、Controls(210)	IBD患者血浆氨基酸含量变化可以诊断和监视IBD
Williams等 ^[62] 2012	血清	¹ H-NMR	CD(24)、UC(20)、Controls(23)	CD和UC患者间脂质、胆碱代谢具有明显差异, IBD患者的脂蛋白(尤其是HDL)、胆碱、氨基酸代谢不同于对照组
Zhang等 ^[67] 2013	血清	¹ H-NMR	活性期UC(20)、Controls(19)	活性期UC患者3-羟基丁酸酯、葡萄糖、苯丙氨酸含量升高, 脂质含量降低
Sharma等 ^[51] 2010	结肠组织	¹ H-NMR	UC(12)、CD(9)、Controls(25)	IBD患者氨基酸、膜复合物(胆碱、甘油磷酸胆碱、肌醇)、乳酸、甲酸含量低于对照组, 葡萄糖含量高于对照组; IBD患者内镜下正常与损伤黏膜组织代谢产物无差异
Ooi等 ^[49] 2011	结肠组织、血清	GC-MS	UC结肠组织(22)、UC血清(13)、CD(21)、Controls(17)	UC患者结肠组织氨基酸和三羧酸循环中间代谢物含量降低; UC患者血清中氨基酸和三羧酸循环中间代谢物与CD患者和对照组存在差异
Balasubramanian等 ^[50] 2009	结肠组织	¹ H-NMR	活性期UC(20)、缓解期UC(11)、活性期CD(20)、缓解期CD(6)、Controls(26)	活性期IBD患者α-葡萄糖含量升高, 氨基酸、膜复合物、乳酸、琥珀酸含量降低; 缓解期UC患者, 乳酸、甘油磷酸胆碱、肌醇含量降低; 缓解期CD患者乳酸降低; 活性期UC患者甲酸低于活性期CD患者

■创新盘点

本文系统回顾了IBD实验室检查现状和代谢组学在IBD的临床应用. 重点强调代谢组学在IBD的诊断、预后评估和机制研究方面的可行性和应用前景.

■应用要点

IBD生物标本的代谢组学分析可能发现对IBD的诊断、预后评估和机制研究具有重大价值的候选生物指标。

Bjerrum等 ^[68] 2009	结肠组织、 ¹ H-NMR 尿液	活性期UC(41)、 静止期UC(33)、 Controls(25)	活性期UC患者结肠组织观察到高浓度的抗氧化剂和氨基酸、脂质、甘油磷酸胆碱、肌醇、甜菜碱含量降低; 20%的静止期UC患者代谢轮廓和活性期UC患者相似
-------------------------------	--------------------------------	--	--

CD: 克罗恩病; UC: 溃疡性结肠炎; Controls: 健康人; IBD: 炎症性肠病; LDL: 低密度脂蛋白; VLDL: 极低密度脂蛋白; ¹H-NMR: 核磁共振氢谱; GC-MS: 气相色谱-质谱联用技术; ICR-FT/MS: 傅立叶变换离子回旋共振质谱; HPLC: 高效液相色谱。

谢,但是受肠道菌群代谢活性的影响较小^[27]。与尿液和粪便标本相比,血清和血浆代谢物谱受环境因素影响较小且个体差异不大^[42]。活性期IBD患者血清低密度脂蛋白(low-density lipoprotein, LDL)和极低密度脂蛋白(very-low-density lipoprotein, VLDL)含量低于缓解期^[41],该结果可能与炎症反应时磷脂酶A2的活性升高,加速LDL、VLDL水解有关^[43]。这与2013年我们报道的用粪菌移植^[44,45]挽救治疗严重CD的检查结果相似:粪菌移植治疗前,患者的LDL-c浓度为1.8 mmol/L,此时处于活动期,粪菌移植后3 mo, LDL-c上升到了2.5 mmol/L,其他检查结果显示患者此时处于临床缓解期^[46]。因此,LDL、VLDL有可能作为判断IBD治疗预后的生物指标。我们的研究同时发现活动期IBD患者血清甘油三酯含量(0.5 mmol/L)明显低于缓解期(2.4 mmol/L)^[46]。该结果可能与促炎症细胞因子,如肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)和白介素-1(interleukin-1, IL-1)等影响脂蛋白脂肪酶的表达,从而促进脂蛋白中甘油三酯的水解有关^[47,48]。

此外,Ooi等^[49]和Stephens等^[40]发现IBD患者对能量需求升高。与粪便标本观察到的结果不同,IBD患者结肠黏膜细胞中氨基酸的含量降低,特别是谷氨酰胺^[49-51],而谷氨酰胺是除丁酸外结肠细胞重要的能量来源,占到30%左右,这可能与机体修复受损的黏膜需要大量能量有关^[27]。而代谢组学用于UC和CD的鉴别诊断则存在一定的争议:Dawiskiba等^[41]和Schicho等^[39]研究发现,尽管UC和CD患者代谢物谱存在差异,但是不足以对两者进行鉴别诊断;相反,Williams等^[38,52]和Stephens等^[40]则认为代谢组学可用于UC和CD的鉴别诊断。

上述研究结果提示UC和CD之间及IBD的不同分期之间代谢物谱存在差异,有助于IBD的诊断和预后评估,UC和CD的鉴别诊断则值得商榷;生物标本中肠道菌群相关代谢产物的变化提示肠道菌群与IBD的发病机制密切相关。

2.3 代谢组学在IBD动物模型的研究进展

组学也用于IBD动物模型的研究,如IL-10敲除小鼠模型^[53-56]、用于模拟克罗恩病的TNF Δ ARE/WT模型^[57]和DSS诱导的溃疡性结肠炎模型^[58-60]。与人一样,通过¹H-NMR、GC-MS和LC-MS等技术对动物模型的血清、尿液、粪便提取物和肠组织进行代谢产物分析。在克罗恩病模型中,胆固醇、甘油三酯和磷脂的含量发生改变,表明炎性脂质介质作为潜在的IBD生物指标的重要性^[57]。IL-10敲除小鼠模型代谢组学研究表明,与能量相关的代谢产物如乳酸、丁酸、柠檬酸含量发生变化^[53,54]。在DSS诱导的溃疡性结肠炎模型中,急性期和缓解期的代谢产物存在差异,表明代谢组学可用于判断疾病的进展情况^[58]。Zhang等^[61]从溃疡性结肠炎模型大鼠尿液和血浆中检测出5种和7种与肠道屏障功能、微生物群内稳态、免疫调节和炎症反应相关的代谢产物。代谢组学也广泛用于IBD治疗药物的监测。通过NMR技术分析小鼠的尿液和粪便提取液,可用于监测抗生素的使用对小鼠生命活动的影响^[62]。Kim等^[63]使用洛哌丁胺诱导SD大鼠便秘模型,用代谢组学分析发现了10种与便秘相关的代谢产物,其中氨基酸4种:丙氨酸、谷氨酰胺、谷氨酰胺、甘氨酸,6种内源性代谢产物:乙酸、葡萄糖、甘油、乳酸、琥珀酸、牛磺酸,对于理解便秘的发病机制提供了帮助。

3 结论

现有实验室检查手段对于IBD的诊断和预后评估有价值,但是也存在不足之处。代谢组学因其取材方便和非侵袭性的特点而受到越来越多的关注,也因其高通量、高灵敏性和高精确性的优势使其近几年成为IBD研究的热点。但是,代谢组学对技术条件的要求高,一定程度上也限制了其临床运用,从标本中发现的候选诊断指标还需临床证实。重视IBD的代谢组学研究,对于疾病诊断、预后评估和机制研究具有重要意义。

4 参考文献

- 1 Marchesi JR, Holmes E, Khan F, Kochhar S, Scanlan P, Shanahan F, Wilson ID, Wang Y. Rapid and noninvasive metabonomic characterization of inflammatory bowel disease. *J Proteome Res* 2007; 6: 546-551 [PMID: 17269711 DOI: 10.1021/pr060470d]
- 2 Conrad K, Roggenbuck D, Laass MW. Diagnosis and classification of ulcerative colitis. *Autoimmun Rev* 2014; 13: 463-466 [PMID: 24424198 DOI: 10.1016/j.autrev.2014.01.028]
- 3 Laass MW, Roggenbuck D, Conrad K. Diagnosis and classification of Crohn's disease. *Autoimmun Rev* 2014; 13: 467-471 [PMID: 24424189 DOI: 10.1016/j.autrev.2014.01.029]
- 4 Maunoury V, Savoye G, Bourreille A, Bouhnik Y, Jarry M, Sacher-Huvelin S, Ben Soussan E, Le-rebours E, Galmiche JP, Colombel JF. Value of wireless capsule endoscopy in patients with indeterminate colitis (inflammatory bowel disease type unclassified). *Inflamm Bowel Dis* 2007; 13: 152-155 [PMID: 17206697]
- 5 Kuna AT. Serological markers of inflammatory bowel disease. *Biochem Med (Zagreb)* 2013; 23: 28-42 [PMID: 23457764]
- 6 Sandborn WJ, Hanauer S, Van Assche G, Panés J, Wilson S, Petersson J, Panaccione R. Treating beyond symptoms with a view to improving patient outcomes in inflammatory bowel diseases. *J Crohns Colitis* 2014 Apr 5. [Epub ahead of print] [PMID: 24713173 DOI: 10.1016/j.crohns.2014.02.021]
- 7 D'Haens G, Ferrante M, Vermeire S, Baert F, Noman M, Moortgat L, Geens P, Iwens D, Aerden I, Van Assche G, Van Olmen G, Rutgeerts P. Fecal calprotectin is a surrogate marker for endoscopic lesions in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2012; 18: 2218-2224 [PMID: 22344983 DOI: 10.1002/ibd.22917]
- 8 Jürgens M, Mahachie John JM, Cleynen I, Schnitzler F, Fidder H, van Moerkercke W, Ballet V, Noman M, Hoffman I, van Assche G, Rutgeerts PJ, van Steen K, Vermeire S. Levels of C-reactive protein are associated with response to infliximab therapy in patients with Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2011; 9: 421-427.e1 [PMID: 21334460 DOI: 10.1016/j.cgh.2011.02.008]
- 9 Chamouard P, Richert Z, Meyer N, Rahmi G, Baumann R. Diagnostic value of C-reactive protein for predicting activity level of Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006; 4: 882-887 [PMID: 16630759]
- 10 Bossuyt X. Serologic markers in inflammatory bowel disease. *Clin Chem* 2006; 52: 171-181 [PMID: 16339302]
- 11 Roggenbuck D, Hausdorf G, Martinez-Gamboa L, Reinhold D, Büttner T, Jungblut PR, Porstmann T, Laass MW, Henker J, Büning C, Feist E, Conrad K. Identification of GP2, the major zymogen granule membrane glycoprotein, as the autoantigen of pancreatic antibodies in Crohn's disease. *Gut* 2009; 58: 1620-1628 [PMID: 19549613 DOI: 10.1136/gut.2008.162495]
- 12 Komorowski L, Teegen B, Probst C, Aulinger-Stöcker K, Sina C, Fellermann K, Stöcker W. Autoantibodies against exocrine pancreas in Crohn's disease are directed against two antigens: the glycoproteins CUZD1 and GP2. *J Crohns Colitis* 2013; 7: 780-790 [PMID: 23140841 DOI: 10.1016/j.crohns.2012.10.011]
- 13 Liaskos C, Rigopoulou EI, Orfanidou T, Bogdanos DP, Papandreou CN. CUZD1 and anti-CUZD1 antibodies as markers of cancer and inflammatory bowel diseases. *Clin Dev Immunol* 2013; 2013: 968041 [PMID: 23710207 DOI: 10.1155/2013/968041]
- 14 van Schaik FD, Oldenburg B, Hart AR, Siersema PD, Lindgren S, Grip O, Teucher B, Kaaks R, Bergmann MM, Boeing H, Carbonnel F, Jantchou P, Boutron-Ruault MC, Tjønneland A, Olsen A, Crowe FL, Peeters PH, van Oijen MG, Bueno-de-Mesquita HB. Serological markers predict inflammatory bowel disease years before the diagnosis. *Gut* 2013; 62: 683-688 [PMID: 22842615 DOI: 10.1136/gutjnl-2012-302717]
- 15 Reese GE, Constantinides VA, Simillis C, Darzi AW, Orchard TR, Fazio VW, Tekkis PP. Diagnostic precision of anti-Saccharomyces cerevisiae antibodies and perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibodies in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 2410-2422 [PMID: 16952282]
- 16 Peeters M, Joossens S, Vermeire S, Vlietinck R, Bossuyt X, Rutgeerts P. Diagnostic value of anti-Saccharomyces cerevisiae and antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 730-734 [PMID: 11280542]
- 17 Devaux P, Horning M, Horning E. Benzylxime derivatives of steroids. A new metabolic profile procedure for human urinary steroids human urinary steroids. *Analytical Letters* 1971; 4: 151-160
- 18 Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E. 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica* 1999; 29: 1181-1189 [PMID: 10598751 DOI: 10.1080/004982599238047]
- 19 Fiehn O. Metabolomics--the link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol Biol* 2002; 48: 155-171 [PMID: 11860207]
- 20 Barton RH. A decade of advances in metabonomics. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2011; 7: 129-136 [PMID: 21219245 DOI: 10.1517/17425255.2011.547473]
- 21 Nicholson JK, Lindon JC. Systems biology: Metabonomics. *Nature* 2008; 455: 1054-1056 [PMID: 18948945 DOI: 10.1038/4551054a]
- 22 夏建飞, 梁琼麟, 胡坪, 王义明, 罗国安. 代谢组学研究策略与方法的新进展. *分析化学* 2009; 37: 136-143
- 23 Lindon JC, Holmes E, Nicholson JK. So what's the deal with metabonomics? *Anal Chem* 2003; 75: 384A-391A [PMID: 14632032]
- 24 Ebbels TM, Keun HC, Beckonert OP, Bollard ME, Lindon JC, Holmes E, Nicholson JK. Prediction and classification of drug toxicity using probabilistic modeling of temporal metabolic data: the consortium on metabonomic toxicology screening approach. *J Proteome Res* 2007; 6: 4407-4422 [PMID: 17915905 DOI: 10.1021/pr0703021]
- 25 Rochfort S. Metabolomics reviewed: a new "omics" platform technology for systems biology and implications for natural products research. *J Nat Prod* 2005; 68: 1813-1820 [PMID: 16378385 DOI: 10.1021/np050255w]
- 26 Swann JR, Claus SP. Nutrimetabonomics: nutritional applications of metabolic profiling. *Sci Prog* 2014; 97: 41-47 [PMID: 24800468]
- 27 De Preter V, Verbeke K. Metabolomics as a diag-

■同行评价

本文对IBD的实验室检查及代谢组学研究进展等进行了综述, 具有一定的新颖性。

- nostic tool in gastroenterology. *World J Gastrointest Pharmacol Ther* 2013; 4: 97-107 [PMID: 24199025 DOI: 10.4292/wjgpt.v4.i4.97]
- 28 Wang H, Tso VK, Slupsky CM, Fedorak RN. Metabolomics and detection of colorectal cancer in humans: a systematic review. *Future Oncol* 2010; 6: 1395-1406 [PMID: 20919825 DOI: 10.2217/fon.10.107]
 - 29 DeFeo EM, Wu CL, McDougal WS, Cheng LL. A decade in prostate cancer: from NMR to metabolomics. *Nat Rev Urol* 2011; 8: 301-311 [PMID: 21587223 DOI: 10.1038/nrurol.2011.53]
 - 30 Bu Q, Huang Y, Yan G, Cen X, Zhao YL. Metabolomics: a revolution for novel cancer marker identification. *Comb Chem High Throughput Screen* 2012; 15: 266-275 [PMID: 22221059]
 - 31 Lu J, Xie G, Jia W, Jia W. Metabolomics in human type 2 diabetes research. *Front Med* 2013; 7: 4-13 [PMID: 23377891 DOI: 10.1007/s11684-013-0248-4]
 - 32 Rasmiena AA, Ng TW, Meikle PJ. Metabolomics and ischaemic heart disease. *Clin Sci (Lond)* 2013; 124: 289-306 [PMID: 23157406 DOI: 10.1042/CS20120268]
 - 33 Scrivo R, Casadei L, Valerio M, Priori R, Valesini G, Manetti C. Metabolomics approach in allergic and rheumatic diseases. *Curr Allergy Asthma Rep* 2014; 14: 445 [PMID: 24744271 DOI: 10.1007/s11882-014-0445-5]
 - 34 Hügler T, Kovacs H, Heijnen IA, Daikeler T, Baisch U, Hicks JM, Valderrabano V. Synovial fluid metabolomics in different forms of arthritis assessed by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Clin Exp Rheumatol* 2012; 30: 240-245 [PMID: 22410098]
 - 35 Noga MJ, Dane A, Shi S, Attali A, van Aken H, Suidgeest E, Tuinstra T, Muilwijk B, Coulter L, Luider T, Reijmers TH, Vreeken RJ, Hankemeier T. Metabolomics of cerebrospinal fluid reveals changes in the central nervous system metabolism in a rat model of multiple sclerosis. *Metabolomics* 2012; 8: 253-263 [PMID: 22448154 DOI: 10.1007/s11306-011-0306-3]
 - 36 Le Gall G, Noor SO, Ridgway K, Scovell L, Jamieson C, Johnson IT, Colquhoun IJ, Kemsley EK, Narbad A. Metabolomics of fecal extracts detects altered metabolic activity of gut microbiota in ulcerative colitis and irritable bowel syndrome. *J Proteome Res* 2011; 10: 4208-4218 [PMID: 21761941 DOI: 10.1021/pr2003598]
 - 37 Jansson J, Willing B, Lucio M, Fekete A, Dicksved J, Halfvarson J, Tysk C, Schmitt-Kopplin P. Metabolomics reveals metabolic biomarkers of Crohn's disease. *PLoS One* 2009; 4: e6386 [PMID: 19636438 DOI: 10.1371/journal.pone.0006386]
 - 38 Williams HR, Cox IJ, Walker DG, North BV, Patel VM, Marshall SE, Jewell DP, Ghosh S, Thomas HJ, Teare JP, Jakobovits S, Zeki S, Welsh KI, Taylor-Robinson SD, Orchard TR. Characterization of inflammatory bowel disease with urinary metabolic profiling. *Am J Gastroenterol* 2009; 104: 1435-1444 [PMID: 19491857 DOI: 10.1038/ajg.2009.175]
 - 39 Schicho R, Shaykhtudinov R, Ngo J, Nazyrova A, Schneider C, Panaccione R, Kaplan GG, Vogel HJ, Storr M. Quantitative metabolomic profiling of serum, plasma, and urine by (1)H NMR spectroscopy discriminates between patients with inflammatory bowel disease and healthy individuals. *J Proteome Res* 2012; 11: 3344-3357 [PMID: 22574726 DOI: 10.1021/pr300139q]
 - 40 Stephens NS, Siffledeen J, Su X, Murdoch TB, Fedorak RN, Slupsky CM. Urinary NMR metabolomic profiles discriminate inflammatory bowel disease from healthy. *J Crohns Colitis* 2013; 7: e42-e48 [PMID: 22626506 DOI: 10.1016/j.crohns.2012.04.019]
 - 41 Dawiskiba T, Deja S, Mulak A, Ząbek A, Jawień E, Pawełka D, Banasik M, Mastalerz-Migas A, Balcerzak W, Kaliszewski K, Skóra J, Barć P, Korta K, Pormańczuk K, Szyber P, Litarski A, Młynarz P. Serum and urine metabolomic fingerprinting in diagnostics of inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol* 2014; 20: 163-174 [PMID: 24415869 DOI: 10.3748/wjg.v20.i1.163]
 - 42 Lenz EM, Bright J, Wilson ID, Morgan SR, Nash AF. A 1H NMR-based metabolomic study of urine and plasma samples obtained from healthy human subjects. *J Pharm Biomed Anal* 2003; 33: 1103-1115 [PMID: 14656601 DOI: S0731708503004102]
 - 43 Chalimoniuk M. [Secretory phospholipase A2 and its role in oxidative stress and inflammation]. *Postepy Biochem* 2012; 58: 204-208 [PMID: 23214144]
 - 44 张发明, 范志宁, 季国忠. 粪菌移植的概念, 历史, 现状和未来. *中国内镜杂志* 2012; 18: 930-934
 - 45 张发明. 将标准化粪菌移植推向主流. *中华消化内镜杂志* 2014; 31: 61-63
 - 46 Zhang FM, Wang HG, Wang M, Cui BT, Fan ZN, Ji GZ. Fecal microbiota transplantation for severe enterocolonic fistulizing Crohn's disease. *World J Gastroenterol* 2013; 19: 7213-7216 [PMID: 24222969 DOI: 10.3748/wjg.v19.i41.7213]
 - 47 Spoettl T, Hausmann M, Klebl F, Dirmeier A, Klump B, Hoffmann J, Herfarth H, Timmer A, Rogler G. Serum soluble TNF receptor I and II levels correlate with disease activity in IBD patients. *Inflamm Bowel Dis* 2007; 13: 727-732 [PMID: 17260368]
 - 48 Friedman G, Barak V, Chajek-Shaul T, Etienne J, Treves AJ, Stein O, Stein Y. Recombinant human interleukin-1 suppresses lipoprotein lipase activity, but not expression of lipoprotein lipase mRNA in mesenchymal rat heart cell cultures. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1089: 83-87 [PMID: 2025651]
 - 49 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]
 - 50 Balasubramanian K, Kumar S, Singh RR, Sharma U, Ahuja V, Makharia GK, Jagannathan NR. Metabolism of the colonic mucosa in patients with inflammatory bowel diseases: an in vitro proton magnetic resonance spectroscopy study. *Magn Reson Imaging* 2009; 27: 79-86 [PMID: 18599242 DOI: 10.1016/j.mri.2008.05.014]
 - 51 Sharma U, Singh RR, Ahuja V, Makharia GK, Jagannathan NR. Similarity in the metabolic profile in macroscopically involved and un-involved colonic mucosa in patients with inflammatory bowel disease: an in vitro proton ((1)H) MR spectroscopy study. *Magn Reson Imaging* 2010; 28: 1022-1029 [PMID: 20418044 DOI: 10.1016/j.mri.2010.03.039]
 - 52 Williams HR, Willmore JD, Cox IJ, Walker DG, Cobbold JF, Taylor-Robinson SD, Orchard TR. Serum metabolic profiling in inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 2012; 57: 2157-2165 [PMID: 22574726 DOI: 10.1021/pr300139q]

- 22488632 DOI: 10.1007/s10620-012-2127-2]
- 53 Murdoch TB, Fu H, MacFarlane S, Sydora BC, Fedorak RN, Slupsky CM. Urinary metabolic profiles of inflammatory bowel disease in interleukin-10 gene-deficient mice. *Anal Chem* 2008; 80: 5524-5531 [PMID: 18558774 DOI: 10.1021/ac8005236]
- 54 Martin FP, Rezzi S, Philippe D, Tornier L, Messlik A, Hölzlwimmer G, Baur P, Quintanilla-Fend L, Loh G, Blaut M, Blum S, Kochhar S, Haller D. Metabolic assessment of gradual development of moderate experimental colitis in IL-10 deficient mice. *J Proteome Res* 2009; 8: 2376-2387 [PMID: 19323467 DOI: 10.1021/pr801006e]
- 55 Lin HM, Edmunds SI, Helsby NA, Ferguson LR, Rowan DD. Nontargeted urinary metabolite profiling of a mouse model of Crohn's disease. *J Proteome Res* 2009; 8: 2045-2057 [PMID: 19275240 DOI: 10.1021/pr800999t]
- 56 Otter D, Cao M, Lin HM, Fraser K, Edmunds S, Lane G, Rowan D. Identification of urinary biomarkers of colon inflammation in IL10^{-/-} mice using Short-Column LCMS metabolomics. *J Biomed Biotechnol* 2011; 2011: 974701 [PMID: 21188174 DOI: 10.1155/2011/974701]
- 57 Baur P, Martin FP, Gruber L, Bosco N, Brahmabhatt V, Collino S, Guy P, Montoliu I, Rozman J, Klingenspor M, Tavazzi I, Thorimbert A, Rezzi S, Kochhar S, Benyacoub J, Kollias G, Haller D. Metabolic phenotyping of the Crohn's disease-like IBD etiology in the TNF(ΔARE/WT) mouse model. *J Proteome Res* 2011; 10: 5523-5535 [PMID: 22029571 DOI: 10.1021/pr2007973]
- 58 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]
- 59 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]
- 60 Hong YS, Ahn YT, Park JC, Lee JH, Lee H, Huh CS, Kim DH, Ryu do H, Hwang GS. 1H NMR-based metabolomic assessment of probiotic effects in a colitis mouse model. *Arch Pharm Res* 2010; 33: 1091-1101 [PMID: 20661720 DOI: 10.1007/s12272-010-0716-1]
- 61 Zhang X, Choi FF, Zhou Y, Leung FP, Tan S, Lin S, Xu H, Jia W, Sung JJ, Cai Z, Bian Z. Metabolite profiling of plasma and urine from rats with TNBS-induced acute colitis using UPLC-ESI-QTOF-MS-based metabolomics--a pilot study. *FEBS J* 2012; 279: 2322-2338 [PMID: 22520047 DOI: 10.1111/j.1742-4658.2012.08612.x]
- 62 Romick-Rosendale LE, Goodpaster AM, Hanwright PJ, Patel NB, Wheeler ET, Chona DL, Kennedy MA. NMR-based metabolomics analysis of mouse urine and fecal extracts following oral treatment with the broad-spectrum antibiotic enrofloxacin (Baytril). *Magn Reson Chem* 2009; 47 Suppl 1: S36-S46 [PMID: 19768747 DOI: 10.1002/mrc.2511]
- 63 Kim JE, Lee YJ, Kwak MH, Jun G, Koh EK, Song SH, Seong JE, Kim JW, Kim KB, Kim S, Hwang DY. Metabolomics approach to serum biomarker for loperamide-induced constipation in SD rats. *Lab Anim Res* 2014; 30: 35-43 [PMID: 24707303 DOI: 10.5625/lar.2014.30.1.35]
- 64 Huda-Faujan N, Abdulamir AS, Fatimah AB, Anas OM, Shuhaimi M, Yazid AM, Loong YY. The impact of the level of the intestinal short chain Fatty acids in inflammatory bowel disease patients versus healthy subjects. *Open Biochem J* 2010; 4: 53-58 [PMID: 20563285 DOI: 10.2174/1874091X01004010053]
- 65 Walton C, Fowler DP, Turner C, Jia W, Whitehead RN, Griffiths L, Dawson C, Waring RH, Ramsden DB, Cole JA, Cauchi M, Bessant C, Hunter JO. Analysis of volatile organic compounds of bacterial origin in chronic gastrointestinal diseases. *Inflamm Bowel Dis* 2013; 19: 2069-2078 [PMID: 23867873 DOI: 10.1097/MIB.0b013e31829a91f6]
- 66 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]
- 67 Zhang Y, Lin L, Xu Y, Lin Y, Jin Y, Zheng C. 1H NMR-based spectroscopy detects metabolic alterations in serum of patients with early-stage ulcerative colitis. *Biochem Biophys Res Commun* 2013; 433: 547-551 [PMID: 23510994 DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.03.012]
- 68 Bjerrum JT, Nielsen OH, Hao F, Tang H, Nicholson JK, Wang Y, Olsen J. Metabolomics in ulcerative colitis: diagnostics, biomarker identification, and insight into the pathophysiology. *J Proteome Res* 2010; 9: 954-962 [PMID: 19860486 DOI: 10.1021/pr9008223]

编辑 郭鹏 电编 闫晋利



以胰腺为靶点治疗糖尿病的相关信号通路

林玉芳, 沈卫东

■背景资料

目前针对胰岛治疗糖尿病的药物主要通过促进胰岛素分泌, 控制胰高血糖素释放来降低血糖, 而胰岛β细胞凋亡直接影响胰岛素的分泌量, 胰岛β细胞凋亡与众多信号通路相关, 通过分析论述以胰腺为靶点的与糖尿病相关的信号通路, 对基础研究、新药研发、临床治疗都有重要意义。

林玉芳, 沈卫东, 上海中医药大学附属曙光医院针灸科 上海市 201203

林玉芳, 在读博士, 主要从事针灸临床效应机制的研究。

上海市科学技术委员会科研计划基金资助项目, No. 12401903204

作者贡献分布: 本文综述由林玉芳完成; 沈卫东审核。

通讯作者: 沈卫东, 教授, 主任医师, 201203, 上海市浦东新区张江高科张衡路528号, 上海中医药大学附属曙光医院针灸科。shenweidong@outlook.com

电话: 021-20256337

收稿日期: 2014-02-24 修回日期: 2014-03-20

接受日期: 2014-04-04 在线出版日期: 2014-08-28

Pancreatic signal pathways potentially used as targets for treatment of diabetes

Yu-Fang Lin, Wei-Dong Shen

Yu-Fang Lin, Wei-Dong Shen, Department of Acupuncture and Moxibustion, Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of TCM, Shanghai 201203, China

Supported by: Research Plan Project of Science and Technology Commission of Shanghai Municipality, No. 12401903204

Correspondence to: Wei-Dong Shen, Professor, Chief Physician, Department of Acupuncture and Moxibustion, Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of TCM, 528 Zhangheng Road, Zhangjiang Hitech, Pudong New Area, Shanghai 201203, China. shenweidong@outlook.com

Received: 2014-02-24 Revised: 2014-03-20

Accepted: 2014-04-04 Published online: 2014-08-28

Abstract

The pancreas is the main place where pathological changes of diabetes occur, and inflammation and oxidative stress can interfere with various cell signaling pathways, causing pancreatic lesions and diabetes. Therefore, the pancreas is an important target for the treatment of diabetes. This paper will discuss pancreatic signaling pathways potentially used as targets for the treatment of diabetes in terms of promotion of insulin secretion, inhibition of glucagon secretion, and suppression of islet beta cell apoptosis. The research of these signaling pathways is important for elucidating the pathogenesis of diabetes and developing more safe and effective new drugs. ATP sensitive potassium channel and glucagon like peptide-1 (GLP-1) receptor signaling pathways are associated with insulin

secretion and have been widely used as therapeutic targets. The signaling pathway mediated by G protein coupled receptors is a hot spot of diabetes research in recent years, and other signaling pathways are being studied.

© 2014 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: Diabetes; Pancreas; Signaling pathways; Target

Lin YF, Shen WD. Pancreatic signal pathways potentially used as targets for treatment of diabetes. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2014; 22(24): 3600-3607 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/3600.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i24.3600>

摘要

胰腺是糖尿病主要的病变场所, 炎症、氧化应激等都会干扰各种细胞信号通路的传导, 引起胰腺组织病变而导致糖尿病, 胰腺是治疗糖尿病的重要靶点。本文从促进胰岛素分泌、抑制胰高血糖素分泌、抗胰岛β细胞凋亡3个方面着手, 阐述以胰腺为靶点治疗糖尿病的相关信号通路, 这些信号通路的研究对阐明糖尿病发病机制及研发更安全有效的新药具有重要意义。与胰岛素分泌有关的ATP敏感性钾通道和胰高血糖素样肽1(glucagon like peptide-1)受体信号通路作为治疗靶点已被广泛运用于临床, G蛋白偶联受体介导的信号通路是近年来研究的热点, 其他信号通路还在不断的研究中, 更多更好的临床药物是值得期待的。

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词: 糖尿病; 胰腺; 信号通路; 靶点

核心提示: 以胰腺为靶点治疗糖尿病的相关各信号通路主要分为促进胰岛素分泌、抗胰岛β细胞凋亡, 同时抑制胰高血糖素分泌3个方面, 且不同信号通路之间各有特点又存在很多相互关联。

林玉芳, 沈卫东. 以胰腺为靶点治疗糖尿病的相关信号通路. 世界华人消化杂志 2014; 22(24): 3600-3607 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/3600.asp>

■同行评议者

田宇彬, 教授, 青岛大学医学院附属医院; 夏时海, 副教授, 副主任医师, 行政主任, 武警后勤学院附属医院肝胆胰脾科(中心)

wjgnet.com/1009-3079/22/3600.asp DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i24.3600>

0 引言

糖尿病是一种内分泌性炎症性疾病, 目前对糖尿病的治疗也体现出一种多通路、多靶点的调控方式. 胰腺是糖尿病主要的病变场所, 也是治疗糖尿病的重要靶点, 针对胰腺组织治疗糖尿病主要体现在促进胰岛素分泌、抑制胰高血糖素分泌、抗胰岛β细胞凋亡几个方面, 以下就以胰腺组织作为靶点治疗糖尿病的相关信号通路进行综述.

1 促进胰岛素分泌

1.1 Ca^{2+} 通道和ATP敏感性钾通道 胰腺β细胞是一种电兴奋性内分泌细胞, 而β细胞分泌胰岛素是由胞内 Ca^{2+} 浓度升高直接触发的, Ca^{2+} 通道和ATP敏感性钾通道(ATP-sensitive potassium channel, KATP)活性的改变对胞内钙浓度及胰岛素的分泌都起到关键作用. 其中L型钙通道是葡萄糖诱导的胰岛素分泌的重要通道, 其变异性容易导致2型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)^[1]. 能量代谢状态则对KATP通道的电活动会产生影响. 在生理状态下, 当葡萄糖升高到一定浓度时, 葡萄糖进入β细胞内代谢产生能量, 生成的ATP会使细胞膜上的KATP通道关闭, 膜去极化, 从而诱发动作电位, Ca^{2+} 通道开放, 使胞外钙内流, 胞浆内的 Ca^{2+} 浓度升高, 促使胞内钙库释放钙, 胞浆中 Ca^{2+} 浓度急剧升高, 从而启动胰腺β细胞分泌胰岛素^[2]. 因此, Ca^{2+} 通道和KATP通道可以作为治疗T2DM的药物作用靶点. 磺酰脲类药物是通过关闭胰岛细胞的ATP敏感性钾通道而发挥降血糖作用的, 但容易导致低血糖和体质量增加^[3], 非磺酰脲类药物如米格列奈的半衰期较短, 主要针对餐后高血糖, 与磺酰脲类药物相比, 可以避免严重低血糖现象发生.

1.2 β细胞GLP-1受体信号通路 胰高血糖素样肽1(glucagon like peptide-1, GLP-1)是一种主要由远端回肠、直肠和结肠的L细胞分泌的葡萄糖浓度依赖的多肽激素, 他不仅能作用于胰岛β细胞刺激胰岛素的基因表达、蛋白质合成和分泌, 还可以作为一种生长因子促进胰岛素分泌细胞增殖, 抑制其凋亡.

GLP-1受体主要定位在胰腺组织中, 当GLP-1与其受体结合后, 可激活腺苷酸环化酶(adenylate cyclase, AC), 使胞内环腺苷酸(cyclic

adenosine monophosphate, cAMP)增加, cAMP再激活下游的蛋白激酶A(protein kinase A, PKA)和交换蛋白(exchange protein directly activated by cAMP, EPAC). β细胞中GLP-1就是经由PKA和EPAC途径激活 Ca^{2+} 信号通路和促进胰岛素释放的^[4,5]. 此外, GLP-1受体还可经由基质金属蛋白酶9或表皮生长因子β细胞素反式激活表皮生长因子受体(epithelial growth factor receptor, EGFR)^[6], EGFR再激活磷脂酰肌醇3激酶(phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K)及其下游的PKB/Akt和丝裂原活化蛋白激酶P38^[6,7], 以调节影响胰岛素分泌的一些重要基因的表达. GLP-1还可以通过上调抗凋亡蛋白板层素相关多肽2和Bcl-2, 激活核因子κB(nuclear factor-κB, NF-κB)启动子的活性等途径, 确保胰岛素分泌细胞的存活. 生理状况下, 体内分泌的GLP-1半衰期很短, 极易被二肽基肽酶IV(dipeptidyl peptidase IV, DPP-IV)降解, 不能被人体有效地利用. 但是, 人们研究出了长效GLP-1类似物、DPP-IV抑制剂, 如利拉鲁肽、西格列汀等, 这些药物治疗糖尿病也取得了非常好的疗效^[8]. 在一项为期2年的安全性分析中, T2DM老年患者服用西格列汀100 mg/d的剂量进行治疗具有良好的耐受性, 且无不良反应^[9]. 西格列汀通过增加血浆GLP-1水平和峰值应力, 还可促进心肌葡萄糖摄取, 增强射血分数、二尖瓣环收缩期速度, 和局部缺血性左心室功能, 改善心肌缺血耐受^[10].

1.3 经典Wnt信号通路 经典Wnt信号通路又称Wnt/β-catenin信号通路, β-catenin是这条信号通路的效应因子. Wnt信号可与细胞表面受体Frizzled和低密度脂蛋白受体相关蛋白5/6(low density lipoprotein receptor related protein 5/6, LRP5/6)结合, 激活胞内蓬乱蛋白(dishevelled, Dsh). 激活的Dsh促进胞质内糖原合成酶激酶3β(GSK3β)、结肠癌抑制因子(adenomatous polyposis coli, APC)及支架蛋白(axin)与β-catenin形成的降解复合体解体, 抑制β-catenin磷酸化, β-catenin从胞质转位至核内, 与T细胞因子(T cell factor, TCF)/淋巴增强因子(lymphoid enhancer factor, LEF)相结合, 形成转录复合体激活细胞周期蛋白D1(cyclinD1)、c-Myc等靶基因的表达^[11].

大量研究表明, 经典Wnt信号通路调控因子基因TCF7L2的多态性与T2DM风险具有相关性, TCF7L2编码经典Wnt信号通路下游的重要转录调控因子TCF4. 而胰高血糖素原基因是经典Wnt信号通路的一个靶基因, 经典Wnt信号通

■研究前沿

与胰岛素分泌有关的ATP敏感性钾通道和GLP-1受体信号通路作为治疗靶点已被广泛运用于临床, G蛋白偶联受体介导的信号通路是近年来研究的热点, Wnt信号通路、MAPK信号转导通路等与糖尿病的关系也有较多研究, 开发更好的临床药物是研究各种信号通路的目的所在.

■相关报道

McCormick等发现西格列汀可通过增加血浆GLP-1水平和峰值应力,促进心肌葡萄糖摄取,增强射血分数、二尖瓣环收缩期速度,和局部缺血性左心室功能,改善心肌缺血耐受,说明该药对糖尿病及冠心病都有很好的治疗作用。

路激活可促进胰高血糖素原基因表达 $GLP-1^{[12]}$ 。TCF7L2多态性可能通过调控GLP-1的表达来增加T2DM的风险。TCF7L2基因突变会促进TCF4表达,TCF4过度表达可抑制经典Wnt信号通路下游的转录活性^[13],在T2DM中还发现 β -catenin浓度的明显降低^[14],都会导致GLP-1诱导的胰岛素分泌减少,加速糖尿病发展。此外,Wnt通路对调节胰岛 β 细胞功能和质量起着举足轻重的作用^[15]。激活经典Wnt信号通路还可以促进胰腺 β 细胞的增殖。TCF7L2多态性可能还通过影响 β 细胞增殖和功能,进而影响胰岛素分泌来诱发T2DM。

1.4 G蛋白偶联受体介导的信号通路

G蛋白偶联受体(G protein-coupled receptors, GPCRs)是体内最大的膜受体超家族,主要通过G蛋白介导生物效应。其中与胰岛素分泌相关的GPCRs主要是GPR40、GPR119、GPR120,其中以GPR40研究最多。

GPR40主要在胰腺组织中高表达,是中长链脂肪酸的受体,其通过耦合G蛋白中的Gi/o家族开始启动信号传导,通过激活磷脂酶C(phospholipase C, PLC),把磷酸肌醇4, 5-磷酸(phosphatidylinositol-4, 5-bis-phosphate, PIP-2)分解,生成了1,4,5-三磷酸肌醇(inositol 1,4,5-triphosphate, IP3),刺激内质网钙离子释放。GPR40还可通过提高胞内cAMP浓度,延迟整流性K⁺通道失活,延长细胞去极化,使Ca²⁺进入细胞,胞内Ca²⁺浓度迅速增加,触发胰岛素颗粒释放^[16-20]。且近年来报道了数10种人工合成的GPR40激动剂,TAK-875和AMG-837是首批进入临床实验的GPR40激动剂。GPR40激动剂如TAK-875促胰岛素分泌具有葡萄糖依赖性,且不会引起低血糖反应^[21]。TAK-875降低空腹和餐后血糖及HbA1c疗效与格列美脲相当^[22]。

GPR119在胰腺组织及胃肠道中都有表达,可被溶血磷脂胆碱和油酰乙醇胺激活,其下游中有信号传递至GPCRs的q亚基,并使胞内cAMP水平升高而发挥相应作用^[23]。GPR119也可通过促进肠道GLP-1分泌,间接促进胰岛素分泌。GPR120在脂肪组织中高表达,GPR120的激活促进GLP-1分泌^[24],间接促进胰岛素分泌。

2 改善胰岛 α 细胞胰岛素信号通路减少胰高血糖素分泌

胰高血糖素是胰岛 α 细胞分泌的多肽类激素,胰高血糖素分泌亢进及功能紊乱在T2DM的病理机制中占有重要的作用^[25]。生理情况下, β

细胞分泌的胰岛素通过旁分泌作用抑制 α 细胞分泌胰高血糖素。研究发现, α 细胞上同样有胰岛素受体(insulin receptor, IR)、胰岛素受体底物-1/2(insulin receptor substrate-1/2, IRS-1/2)及PI3K的表达,胰岛素通过IRS-1-PI3K途径来抑制胰岛 α 细胞胰高血糖素的基因表达和释放^[26,27]。Tsuchiyama等^[28]研究指出:T2DM中高胰高血糖素分泌的机制主要是由于 α 细胞胰岛素抵抗,导致 α 细胞分泌亢进。而运用噻唑烷二酮类药物和GLP-1^[29]能改善胰岛素抵抗,抑制胰高血糖素分泌。此外,胰高血糖素原是胰高血糖素的前体物质,抑制胰高血糖素原向胰高血糖素表达,也可间接抑制胰高血糖素分泌。总之,通过改善胰岛 α 细胞胰岛素抵抗、减少胰高血糖素分泌有望成为治疗糖尿病的新靶点。

3 抗胰岛 β 细胞凋亡

3.1 MAPK信号转导通路

MAPK信号转导通路是哺乳动物细胞内介导细胞反应的重要信号系统,参与细胞增殖、生长、分化及凋亡等多种细胞行为的调控^[30]。已发现在真核细胞中存在4条MAPK信号转导通路,即ERK通路、JNK通路、P38通路和ERK5通路。不同的细胞外刺激可使用不同的MAPKs信号通路,通过其相互调控而介导不同的细胞反应。细胞应激及细胞炎症因子主要激活JNK、P38通路^[31-33]。研究表明,链霉菌素可通过减少丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)的磷酸化及其上游激酶活性来抑制炎症反应,达到对1型糖尿病的预防作用^[34]。

3.1.1 JNK通路: c-Jun氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)

是一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,也被称为应激活化蛋白激酶,是MAPK的家族成员之一,他共有3个JNK基因, $JNK1-3$ 。JNK通路的关键激酶包括MAPKK类的MEK4、MEK7和MAPKKK类的MEKK1/2/3/4。JNK信号通路的模式可大致总结为:应激、紫外线等→生发中心激酶(germinal center kinase, GCK)→MEKK→MEK4/7→JNK→细胞凋亡、增殖、分化等^[35]。在静止细胞中,JNK定位于细胞浆与细胞核。JNK能通过转录因子途径和线粒体途径介导多种胞外刺激如应激、Fas、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)等诱导的细胞凋亡。

当被刺激因素激活后,胞质中一部分活化的JNK能够直接磷酸化激活胞质中促凋亡蛋白

Bax^[36]、抑制Bcl-2等抗凋亡蛋白^[36,37]。活化的Bax再转位至线粒体外膜,使其通透性增加而释放促凋亡线粒体蛋白^[38],进而介导线粒体途径的细胞凋亡。胞质中另一部分活化的JNK就转位到细胞核中,使核内底物磷酸化,发挥生物学效应,如通过磷酸化而激活转录因子激活蛋白1(activator protein-1, AP-1)(如c-Jun、c-Fos等)、激活转录因子2(activating transcription factor-2, ATF-2)等,从而调节下游的凋亡相关靶基因的转录和凋亡蛋白的表达^[36, 39-41]。活化的JNK进入细胞核激活相应转录因子后还可诱导Bim、Bid等BH3-only蛋白表达,从而使Bax等促凋亡蛋白活化,活化的Bax再从胞质转入线粒体,破坏线粒体膜通透性,致细胞色素C等促凋亡物质的释放而介导线粒体途径的细胞凋亡^[42]。

1型糖尿病及T2DM后期主要的发病机制都涉及胰腺β细胞的凋亡,JNK信号通路在胰腺β细胞凋亡过程中发挥了重要作用^[43]。促炎性因子白介素-1β(interleukin-1β, IL-1β)、干扰素c(interferon-γ, IFN-γ)等是白细胞介导的β细胞损伤和凋亡的主要诱因,在动物实验中,当阻断JNK信号通路后能抑制IL-1β诱导的β细胞凋亡^[44]。Fukuda等^[45]则报道了剔除*JNK1*基因后可显著下调MLD-STZ诱导的高血糖症模型小鼠的血糖水平,提示JNK通路介导了MLD-STZ诱导胰腺β细胞凋亡进而导致高血糖症的产生。因此,JNK信号通路可以作为抗胰腺细胞凋亡治疗糖尿病的一个重要调节靶点。

3.1.2 P38通路: p38MAPK作为MAPK信号转导通路的成员之一,广泛参与细胞增殖、分化及凋亡等多种细胞功能的调控。p38MAPK的激酶级联为:促分裂原活化蛋白激酶的激酶(包括MEKK1/2、MLK2/3、DLK、ASK1、Tpl2和Tak1)-促分裂原活化蛋白激酶的激酶(MEK3/MEK6, 又称MKK3/MKK6)-p38^[46]。哺乳动物p38MAPK有4种亚型分别是p38A、p38B、p38C(ERK6, SAPK3)、p38D(SAPK4),其中p38D在胰岛β细胞中的表达水平较高。

糖尿病状态下的高糖-蛋白激酶C通路、氧化应激、糖基化终产物等都可激活MAPK家族,可使p38MAPK水平升高,导致胰岛β细胞功能紊乱和凋亡^[47]。胰岛素突变体蛋白2的表达也可激活ask1-p38通路,通过诱导内质网应激并引起小鼠胰腺β细胞死亡。删除ASK1则可减轻胰岛素突变体蛋白2引起的胰腺β细胞死亡并延迟小鼠糖尿病的发生。此外,p38抑制剂也能抑制胰

岛素突变体蛋白2诱导的胰腺β细胞系细胞死亡,提示ask1-p38通路的抑制可成为各种类型的糖尿病的一种有效治疗方法^[48]。Sumara等^[49]则采用缺乏p38D的小鼠模型和相应的野生型对照小鼠模型进行研究,发现p38D在胰腺器官的表达与血糖稳态相关。在禁食16 h后,二者的胰岛素的敏感性相同,但缺乏p38D的小鼠相对于野生型小鼠的血糖结果提示糖耐量明显改善,葡萄糖刺激缺乏p38D的小鼠后获得了较低的血糖水平和较高的血清胰岛素水平。进一步的研究中,Sumara等^[49]分离了二者的胰岛β细胞,并检测他们在体外分泌胰岛素的能力,发现二者胰高血糖素的释放程度相同,但缺乏p38D的小鼠胰岛相比野生型小鼠胰岛释放更多的胰岛素,提示p38D缺乏可以通过直接刺激β细胞来改善葡萄糖耐量,增加胰岛素分泌,且这种胰岛素分泌并不依赖ATP敏感性钠通道及钙通道的开放。p38D可降低蛋白激酶D1(protein kinase D1, PKD1)的活性,抑制PKD1指导进行胞吐的反式高尔基体网(trans-golgi network, TGN)的胰岛素囊泡的分裂,从而减低胰岛素的分泌,表明p38D-PKD1通路是调节胰腺β细胞胰岛素胞吐的关键调控因素,也是MAPK信号转导通路中调节胰岛素释放及胰腺β细胞凋亡^[50]的关键靶点之一。

3.2 NF-κB通路 NF-κB可促进DM的β细胞凋亡,引起胰岛素分泌减少,在糖尿病发生中亦有重要作用^[51]。他存在于所有哺乳动物的细胞中,通过与一系列基因的上游启动子或增强子内部的κB序列特异性结合而调节这些基因的表达^[52]。哺乳动物NF-κB家族共有5个成员,分别是NF-κB1、NF-κB2、p65(RelA)、RelB、C-Rel。IκB是NF-κB的抑制蛋白,在通常情况下,IκB与NF-κB结合,形成无活性的复合物,存在于胞浆中。细胞因子如TNF-α、IL-1β、干扰素γ(interferon-γ, IFN-γ)、一氧化氮(nitric oxide, NO)及活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)等外界因素可刺激细胞,细胞产生蛋白激酶使IKKβ磷酸化,IKK被激活而降解IκB,从而使NF-κB活化进入核内,调控炎症反应和免疫应答相关基因的表达^[53]。

NF-κB活化与β细胞凋亡密切相关。Heimberg等^[54]研究发现在离体条件下,NF-κB活化是β细胞凋亡的前兆。β细胞的凋亡部分是依赖NF-κB介导的通路活化引起的^[55]。NF-κB通过削弱β细胞功能及促进β细胞凋亡,减少血清胰岛素含量使血糖升高,导致糖尿病发生。而在鼠胰岛

■创新盘点

针对糖尿病的相关信号通路有较多报道,本文针对胰岛为靶点治疗糖尿病有关的各类信号通路做系统阐述,有助于读者系统的了解各信号通路的特点和异同及相互联系。

■应用要点

本文系统的阐述了以胰腺为靶点治疗糖尿病的的所有相关信号通路,对指导新药开发及临床各类药物的对比运用都有一定指导意义。目前针对很多信号通路的药物研究尚处于初级阶段,需要更多基础理论知识的指导。

中,用NF- κ B特异性寡脱氧核酸来阻断四氧嘧啶引发的NF- κ B活化,可以预防糖尿病发生^[56]。因此,通过阻断依赖NF- κ B的信号通路来对抗 β 细胞凋亡,可以成为防治DM的新靶点。但是,IL-1 β 等在介导NF- κ B活化促进 β 细胞凋亡时,也促进了锰超氧化物歧化酶(Mn-SOD)、热休克蛋白(Hsp)70、*Hsp27*等基因的表达,增强 β 细胞的修复功能,一定程度上对抗了 β 细胞凋亡^[53]。或许NF- κ B活化介导的促凋亡和抗凋亡之间的平衡才是保证 β 细胞功能正常的因素。

3.3 mTORC1-S6K1信号通路 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)是在哺乳动物中发现的一个高度保守的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,属于磷酸酰肌醇激酶相关激酶(phosphatidylinositol kinase-related kinase, PIKK)超家族成员,其作用与细胞调节,增生调控和癌细胞新陈代谢有关。在哺乳动物中,mTOR以两种复合物的形式存在,mTOR Complex1及mTOR Complex2。mTOR活性也受多种调节信号的影响,结节性硬化复合体1/2(tuberous sclerosis complex1/2, TSC1/TSC2)是mTOR最重要的上游信号分子,调控mTOR活性的主要上游信号通路包括PI3K-Akt-TSC1/2-mTOR信号通路和LKB1-AMPK-TSC1/2-mTOR信号通路^[57],他们都主要通过TSC发挥调控mTOR的作用。核糖体蛋白S6激酶1(ribosomal protein S6 kinase 1, S6K1)是mTOR信号通路下游的主要效应蛋白,是一个属于AGC激酶家族的Ser/Thr激酶。S6K1的活性主要取决于其残基的功能。

目前认为PI3K-Akt-TSC1/2-mTORC1-S6K1信号通路主要在胰岛素信号传导及胰岛素抵抗中发挥主要作用,但是也有研究表明其在介导胰腺 β 细胞凋亡中也发挥作用。胰岛素受体底物-1的丝氨酸磷酸化是引起胰岛素抵抗的主要机制^[58],而在促进 β 细胞凋亡中,该通路同样是通过mTOR-S6K1介导IRS-2 Ser/Thr磷酸化,进而促进IRS-2降解而导致的^[59]。mTOR特异性抑制剂雷帕霉素可通过抑制IRS-1/2丝氨酸残基磷酸化,从而改善胰岛素敏感性、抑制 β 细胞凋亡^[60-63]等。

此外,微小RNA-7/7a(microRNA-7/7a, miR-7/7a)也作为mTOR信号通路的组成部分,抑制miR-7a可激活mTOR信号从而促进成年小鼠原代胰岛 β 细胞的复制,这一效果可被mTOR抑制剂雷帕霉素逆转,说明miR-7可作为成人 β 细胞增殖的开关,并且miR-7-mTOR增殖轴保留在人体

最初的 β 细胞中,可成为糖尿病的治疗目标^[64]。

3.4 “HIF-1 α -Bcl-xL等分子-凋亡”通路 缺氧诱导因子-1 α (hypoxia-inducible factor 1-alpha, HIF-1 α)具有氧浓度敏感性,通过核定位序列导入细胞核,与HIF-1 β 二聚化,形成具有转录活性的异二聚体HIF-1,发挥转录因子作用^[65],参与低氧适应、血管生成、免疫应答、细胞凋亡等多种反应^[66]。

研究显示HIF-1 α 在糖尿病中表达下调,且功能异常。Bcl-2家族的Bcl-xL、MCL-1和IAP家族的Survivin等重要的抗凋亡成员,是HIF-1 α 下游重要的凋亡调控分子^[67]。糖尿病中HIF-1 α 蛋白水平下调和功能障碍直接导致上述抗凋亡分子表达降低,最终导致 β 细胞凋亡,是糖尿病发生与进展的重要环节。研究显示,糖尿病患者胰岛细胞 β 细胞中Bcl-xL表达明显降低,同时伴随 β 细胞凋亡^[68]。而活化Akt信号所致Bcl-xL高表达则抑制 β 细胞凋亡和糖尿病发生^[69]。由此可见,Bcl-xL是 β 细胞凋亡的关键分子。HIF-1 α 的异常导致糖尿病患者Bcl-xL表达水平下调,从而促进 β 细胞凋亡。“HIF-1 α -Bcl-xL等分子-凋亡”通路异常,在糖尿病的发生与进展过程中发挥重要作用,也可以作为治疗糖尿病的新靶点。

4 结论

胰岛 β 细胞的数量及其分泌胰岛素能力在糖尿病的发生和发展中具有重要意义,促进胰岛素分泌、抗胰岛 β 细胞凋亡,同时抑制胰高血糖素分泌是针对胰腺组织治疗糖尿病的主要思路。随着在分子、基因等水平对糖尿病病因、病理机制的不断认识,治疗糖尿病的通路和靶点也在不断的研究发掘,以上信号通路在诱发和治疗糖尿病的机制各有不同,都为糖尿病的治疗提供了不同的思路和方法。其中,与胰岛素分泌有关的ATP敏感性钾通道和GLP-1受体信号通路作为治疗靶点已被广泛运用于临床,G蛋白偶联受体介导的信号通路是近年来研究的热点,其他信号通路还在不断的研究中,更多更好的临床药物是值得期待的,临床上应该根据患者的具体症状进行个体化选择治疗。此外,很多信号通路之间都有交汇点,可以产生相互反应扩大和增强信号作用,同时在很多信号通路中,往往又会产生相反的两种调节作用,正反调节作用的平衡或许才是胰岛细胞功能正常的保证。对不同信号通路的认识都涉及到较深入的分子、基因水平,但是仍然有很多分子机制不明

确, 进一步的研究和阐明不同信号通路的机制及相互反应, 对研究和治疗糖尿病都会有很大的帮助。此外, 西药治疗糖尿病以单通路单靶点为主, 针对不同信号通路的异常, 中医中药及针灸的多靶点多通路调节作用显示出明显的优势, 而中药及针灸治疗糖尿病的效应机制有赖于通过上述各种信号通路进行阐明, 中医针灸的效应机制研究也将更多趋于分子、基因水平。

5 参考文献

- 1 Reinbothe TM, Alkayyali S, Ahlqvist E, Tuomi T, Isomaa B, Lyssenko V, Renström E. The human L-type calcium channel Cav1.3 regulates insulin release and polymorphisms in CACNA1D associate with type 2 diabetes. *Diabetologia* 2013; 56: 340-349 [PMID: 23229155 DOI: 10.1007/s00125-012-2758-z]
- 2 Rutter GA. Nutrient-secretion coupling in the pancreatic islet beta-cell: recent advances. *Mol Aspects Med* 2001; 22: 247-284 [PMID: 11890977]
- 3 Bolen S, Feldman L, Vassy J, Wilson L, Yeh HC, Marinopoulos S, Wiley C, Selvin E, Wilson R, Bass EB, Brancati FL. Systematic review: comparative effectiveness and safety of oral medications for type 2 diabetes mellitus. *Ann Intern Med* 2007; 147: 386-399 [PMID: 17638715]
- 4 Fridlyand LE, Harbeck MC, Roe MW, Philipson LH. Regulation of cAMP dynamics by Ca²⁺ and G protein-coupled receptors in the pancreatic beta-cell: a computational approach. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007; 293: C1924-C1933 [PMID: 17928534]
- 5 Kang G, Chepurny OG, Holz GG. cAMP-regulated guanine nucleotide exchange factor II (Epac2) mediates Ca²⁺-induced Ca²⁺ release in INS-1 pancreatic beta-cells. *J Physiol* 2001; 536: 375-385 [PMID: 11600673]
- 6 Doyle ME, Egan JM. Mechanisms of action of glucagon-like peptide 1 in the pancreas. *Pharmacol Ther* 2007; 113: 546-593 [PMID: 17306374 DOI: 10.1016/j.pharmthera.2006.11.007]
- 7 Miettinen P, Ormio P, Hakonen E, Banerjee M, Otonkoski T. EGF receptor in pancreatic beta-cell mass regulation. *Biochem Soc Trans* 2008; 36: 280-285 [PMID: 18481942 DOI: 10.1042/BST0360280]
- 8 Sanusi H. The role of incretin on diabetes mellitus. *Acta Med Indones* 2009; 41: 205-212 [PMID: 20737753]
- 9 Round EM, Engel SS, Golm GT, Davies MJ, Kaufman KD, Goldstein BJ. Safety of sitagliptin in elderly patients with type 2 diabetes: a pooled analysis of 25 clinical studies. *Drugs Aging* 2014; 31: 203-214 [PMID: 24510656 DOI: 10.1007/s40266-014-0155-7]
- 10 McCormick LM, Kydd AC, Read PA, Ring LS, Bond SJ, Hoole SP, Dutka DP. Chronic dipeptidyl peptidase-4 inhibition with sitagliptin is associated with sustained protection against ischemic left ventricular dysfunction in a pilot study of patients with type 2 diabetes mellitus and coronary artery disease. *Circ Cardiovasc Imaging* 2014; 7: 274-281 [PMID: 24503784]
- 11 Liu Z, Habener JF. Wnt signaling in pancreatic islets. *Adv Exp Med Biol* 2010; 654: 391-419 [PMID: 20217507 DOI: 10.1007/978-90-481-3271-3_17]
- 12 Yi F, Sun J, Lim GE, Fantus IG, Brubaker PL, Jin T. Cross talk between the insulin and Wnt signaling pathways: evidence from intestinal endocrine L cells. *Endocrinology* 2008; 149: 2341-2351 [PMID: 18258680 DOI: 10.1210/en.2007-1142]
- 13 Cauchi S, Froguel P. TCF7L2 genetic defect and type 2 diabetes. *Curr Diab Rep* 2008; 8: 149-155 [PMID: 18445358 DOI: 10.1007/s11892-008-0026-x]
- 14 Gaudio A, Privitera F, Battaglia K, Torrisi V, Sidoti MH, Pulvirenti I, Canzonieri E, Tringali G, Fiore CE. Sclerostin levels associated with inhibition of the Wnt/ β -catenin signaling and reduced bone turnover in type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 2012; 97: 3744-3750 [PMID: 22855334 DOI: 10.1210/jc.2012-1901]
- 15 Schinner S. Wnt-signalling and the metabolic syndrome. *Horm Metab Res* 2009; 41: 159-163 [PMID: 19214925 DOI: 10.1055/s-0028-1119408]
- 16 Le Poul E, Loison C, Struyf S, Springael JY, Lannoy V, Decobecq ME, Brezillon S, Dupriez V, Vassart G, Van Damme J, Parmentier M, Detheux M. Functional characterization of human receptors for short chain fatty acids and their role in polymorphonuclear cell activation. *J Biol Chem* 2003; 278: 25481-25489 [PMID: 12711604]
- 17 Stewart G, Hira T, Higgins A, Smith CP, McLaughlin JT. Mouse GPR40 heterologously expressed in *Xenopus* oocytes is activated by short-, medium-, and long-chain fatty acids. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006; 290: C785-C792 [PMID: 16267104 DOI: 10.1152/ajpcell.00462.2005]
- 18 Brown AJ, Jupe S, Briscoe CP. A family of fatty acid binding receptors. *DNA Cell Biol* 2005; 24: 54-61 [PMID: 15684720 DOI: 10.1089/dna.2005.24.54]
- 19 Feng DD, Luo Z, Roh SG, Hernandez M, Tawadros N, Keating DJ, Chen C. Reduction in voltage-gated K⁺ currents in primary cultured rat pancreatic beta-cells by linoleic acids. *Endocrinology* 2006; 147: 674-682 [PMID: 16254037 DOI: 10.1210/en.2005-0225]
- 20 Shapiro H, Shachar S, Sekler I, Hershfinkel M, Walker MD. Role of GPR40 in fatty acid action on the beta cell line INS-1E. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 335: 97-104 [PMID: 16081037 DOI: 10.1016/j.bbrc.2005.07.042]
- 21 Araki T, Hirayama M, Hiroi S, Kaku K. GPR40-induced insulin secretion by the novel agonist TAK-875: first clinical findings in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab* 2012; 14: 271-278 [PMID: 22051148 DOI: 10.1111/j.1463-1326.2011.01525.x]
- 22 Burant CF. Activation of GPR40 as a therapeutic target for the treatment of type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2013; 36 Suppl 2: S175-S179 [PMID: 23882043 DOI: 10.2337/dcS13-2037]
- 23 Soga T, Ohishi T, Matsui T, Saito T, Matsumoto M, Takasaki J, Matsumoto S, Kamohara M, Hiyama H, Yoshida S, Momose K, Ueda Y, Matsushime H, Kobori M, Furuichi K. Lysophosphatidylcholine enhances glucose-dependent insulin secretion via an orphan G-protein-coupled receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 326: 744-751 [PMID: 15607732]
- 24 Hirasawa A, Tsumaya K, Awaji T, Katsuma S, Adachi T, Yamada M, Sugimoto Y, Miyazaki S, Tsujimoto G. Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120. *Nat Med* 2005; 11: 90-94 [PMID: 15619630 DOI: 10.1038/nm1168]
- 25 Kozawa J, Okita K, Iwahashi H, Yamagata K, Imagawa A, Shimomura I. Early postprandial glucagon surge affects postprandial glucose levels in

■名词解释

哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR): 在哺乳动物中发现的一个高度保守的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 与细胞增殖调控和细胞新陈代谢有关; 缺氧诱导因子-1(HIF-1 α): 具有氧浓度敏感性, 通过核定位序列介导入细胞核, 参与 β 细胞凋亡。

同行评价

文章内容以科学性理论性知识为主, 添加一些近期的相关基础及临床研究报道, 方便读者对胰腺为靶点治疗糖尿病的相关信号通路的系统认识。

- obese and non-obese patients with type 2 diabetes. *Endocr J* 2013; 60: 813-818 [PMID: 23459463 DOI: 10.1507/endocrj.EJ13-0018]
- 26 Wu YH, Li XJ, Li HL, Wang Y, Zhang XE, Ke L, Zhang XX. [A study on the mechanism of islet cell insulin resistance in high-fat-diet obese rats]. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2005; 85: 1907-1910 [PMID: 16255986]
- 27 Araujo EP, Amaral ME, Souza CT, Bordin S, Ferreira F, Saad MJ, Boschero AC, Magalhães EC, Velloso LA. Blockade of IRS1 in isolated rat pancreatic islets improves glucose-induced insulin secretion. *FEBS Lett* 2002; 531: 437-442 [PMID: 12435589]
- 28 Tsuchiyama N, Takamura T, Ando H, Sakurai M, Shimizu A, Kato K, Kurita S, Kaneko S. Possible role of alpha-cell insulin resistance in exaggerated glucagon responses to arginine in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2007; 30: 2583-2587 [PMID: 17644622]
- 29 Christensen M, Bagger JL, Vilsbøll T, Knop FK. The alpha-cell as target for type 2 diabetes therapy. *Rev Diabet Stud* 2011; 8: 369-381 [PMID: 22262074 DOI: 10.1900/RDS.2011.8.369]
- 30 Ono K, Han J. The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cell Signal* 2000; 12: 1-13 [PMID: 10676842 DOI: 10.1016/S0898-6568(99)00071-6]
- 31 Li Y, Batra S, Sassano A, Majchrzak B, Levy DE, Gaestel M, Fish EN, Davis RJ, Platanias LC. Activation of mitogen-activated protein kinase kinase (MKK) 3 and MKK6 by type I interferons. *J Biol Chem* 2005; 280: 10001-10010 [PMID: 15644321 DOI: 10.1074/jbc.M410972200]
- 32 Abell AN, Granger DA, Johnson GL. MEKK4 stimulation of p38 and JNK activity is negatively regulated by GSK3beta. *J Biol Chem* 2007; 282: 30476-30484 [PMID: 17726008 DOI: 10.1074/jbc.M705783200]
- 33 Bastard JP, Maachi M, Lagathu C, Kim MJ, Caron M, Vidal H, Capeau J, Feve B. Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. *Eur Cytokine Netw* 2006; 17: 4-12 [PMID: 16613757]
- 34 Shen MY, Lin YP, Yang BC, Jang YS, Chiang CK, Mettling C, Chen ZW, Sheu JR, Chang CL, Lin YL, Yang WC. Catenarin Prevents Type 1 Diabetes in Nonobese Diabetic Mice via Inhibition of Leukocyte Migration Involving the MEK6/p38 and MEK7/JNK Pathways. *Evid Based Complement Alternat Med* 2012; 2012: 982396 [PMID: 22454693 DOI: 10.1155/2012/982396]
- 35 侯炳旭, 冯丽英. JNK信号通路介导的凋亡在疾病中的作用. *世界华人消化杂志* 2011; 19: 1819-1825
- 36 Bogoyevitch MA, Kobe B. Uses for JNK: the many and varied substrates of the c-Jun N-terminal kinases. *Microbiol Mol Biol Rev* 2006; 70: 1061-1095 [PMID: 17158707 DOI: 10.1128/MMBR.00025-06]
- 37 Tournier C, Hess P, Yang DD, Xu J, Turner TK, Nimnual A, Bar-Sagi D, Jones SN, Flavell RA, Davis RJ. Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway. *Science* 2000; 288: 870-874 [PMID: 10797012]
- 38 Perier C, Bové J, Wu DC, Dehay B, Choi DK, Jackson-Lewis V, Rathke-Hartlieb S, Bouillet P, Strasser A, Schulz JB, Przedborski S, Vila M. Two molecular pathways initiate mitochondria-dependent dopaminergic neurodegeneration in experimental Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 8161-8166 [PMID: 17483459]
- 39 Carboni S, Antonsson B, Gaillard P, Gotteland JP, Gillon JY, Vitte PA. Control of death receptor and mitochondrial-dependent apoptosis by c-Jun N-terminal kinase in hippocampal CA1 neurones following global transient ischaemia. *J Neurochem* 2005; 92: 1054-1060 [PMID: 15715656]
- 40 Pan J, Zhao YX, Wang ZQ, Jin L, Sun ZK, Chen SD. Expression of FasL and its interaction with Fas are mediated by c-Jun N-terminal kinase (JNK) pathway in 6-OHDA-induced rat model of Parkinson disease. *Neurosci Lett* 2007; 428: 82-87 [PMID: 17959308]
- 41 Eferl R, Wagner EF. AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 859-868 [PMID: 14668816 DOI: 10.1038/nrc1209]
- 42 Guan QH, Pei DS, Xu TL, Zhang GY. Brain ischemia/reperfusion-induced expression of DP5 and its interaction with Bcl-2, thus freeing Bax from Bcl-2/Bax dimmers are mediated by c-Jun N-terminal kinase (JNK) pathway. *Neurosci Lett* 2006; 393: 226-230 [PMID: 16243436]
- 43 Major CD, Wolf BA. Interleukin-1beta stimulation of c-Jun NH(2)-terminal kinase activity in insulin-secreting cells: evidence for cytoplasmic restriction. *Diabetes* 2001; 50: 2721-2728 [PMID: 11723054 DOI: 10.2337/diabetes.50.12.2721]
- 44 Størling J, Binzer J, Andersson AK, Züllig RA, Tonnesen M, Lehmann R, Spinas GA, Sandler S, Billestrup N, Mandrup-Poulsen T. Nitric oxide contributes to cytokine-induced apoptosis in pancreatic beta cells via potentiation of JNK activity and inhibition of Akt. *Diabetologia* 2005; 48: 2039-2050 [PMID: 16132952]
- 45 Fukuda K, Tesch GH, Nikolic-Paterson DJ. c-Jun amino terminal kinase 1 deficient mice are protected from streptozotocin-induced islet injury. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 366: 710-716 [PMID: 18082135]
- 46 Roux PP, Blenis J. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev* 2004; 68: 320-344 [PMID: 15187187]
- 47 Makeeva N, Myers JW, Welsh N. Role of MKK3 and p38 MAPK in cytokine-induced death of insulin-producing cells. *Biochem J* 2006; 393: 129-139 [PMID: 16097952]
- 48 Yamaguchi K, Takeda K, Kadowaki H, Ueda I, Namba Y, Ouchi Y, Nishitoh H, Ichijo H. Involvement of ASK1-p38 pathway in the pathogenesis of diabetes triggered by pancreatic β cell exhaustion. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1830: 3656-3663 [PMID: 23416061 DOI: 10.1016/j.bbagen.2013.01.029]
- 49 Sumara G, Formentini I, Collins S, Sumara I, Windak R, Bodenmiller B, Ramracheya R, Caille D, Jiang H, Platt KA, Meda P, Aebersold R, Rorsman P, Ricci R. Regulation of PKD by the MAPK p38delta in insulin secretion and glucose homeostasis. *Cell* 2009; 136: 235-248 [PMID: 19135240 DOI: 10.1016/j.cell.2008.11.018]
- 50 Cuenda A, Nebreda AR. p38delta and PKD1: kinase switches for insulin secretion. *Cell* 2009; 136: 209-210 [PMID: 19167323 DOI: 10.1016/j.cell.2009.01.005]
- 51 Pieper CM, Roza AM, Henderson JD, Zhu YR, Lai CS. Spatial distribution and temporal onset of NF-kB activation and inducible nitric oxide synthase within pancreatic islets in the pre-diabetic stage of genetic, diabetic-prone BB rats: attenuation by drug intervention decreases inflammatory cell

- infiltration and incidence of diabetes. *Inflamm Res* 2004; 53: 22-30 [PMID: 15021977 DOI: 10.1007/s00011-003-1223-3]
- 52 Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* 1998; 16: 225-260 [PMID: 9597130 DOI: 10.1146/annurev.immunol.16.1.225]
- 53 Cardozo AK, Heimberg H, Heremans Y, Leeman R, Kutlu B, Kruhøffer M, Ørntoft T, Eizirik DL. A comprehensive analysis of cytokine-induced and nuclear factor-kappa B-dependent genes in primary rat pancreatic beta-cells. *J Biol Chem* 2001; 276: 48879-48886 [PMID: 11687580 DOI: 10.1074/jbc.M108658200]
- 54 Heimberg H, Heremans Y, Jobin C, Leemans R, Cardozo AK, Darville M, Eizirik DL. Inhibition of cytokine-induced NF-kappaB activation by adenovirus-mediated expression of a NF-kappaB super-repressor prevents beta-cell apoptosis. *Diabetes* 2001; 50: 2219-2224 [PMID: 11574401 DOI: 10.2337/diabetes.50.10.2219]
- 55 Liu D, Cardozo AK, Darville MI, Eizirik DL. Double-stranded RNA cooperates with interferon-gamma and IL-1 beta to induce both chemokine expression and nuclear factor-kappa B-dependent apoptosis in pancreatic beta-cells: potential mechanisms for viral-induced insulinitis and beta-cell death in type 1 diabetes mellitus. *Endocrinology* 2002; 143: 1225-1234 [PMID: 11897677 DOI: 10.1210/en.143.4.1225]
- 56 Quan N, Ho E, La W, Tsai YH, Bray T. Administration of NF-kappaB decoy inhibits pancreatic activation of NF-kappaB and prevents diabetogenesis by alloxan in mice. *FASEB J* 2001; 15: 1616-1618 [PMID: 11427504 DOI: 10.1096/fj.00-0855fje]
- 57 Vignot S, Faivre S, Aguirre D, Raymond E. mTOR-targeted therapy of cancer with rapamycin derivatives. *Ann Oncol* 2005; 16: 525-537 [PMID: 15728109 DOI: 10.1093/annonc/mdi113]
- 58 Greene MW, Sakaue H, Wang L, Alessi DR, Roth RA. Modulation of insulin-stimulated degradation of human insulin receptor substrate-1 by Serine 312 phosphorylation. *J Biol Chem* 2003; 278: 8199-8211 [PMID: 12510059]
- 59 Briaud I, Dickson LM, Lingohr MK, McCuaig JF, Lawrence JC, Rhodes CJ. Insulin receptor substrate-2 proteasomal degradation mediated by a mammalian target of rapamycin (mTOR)-induced negative feedback down-regulates protein kinase B-mediated signaling pathway in beta-cells. *J Biol Chem* 2005; 280: 2282-2293 [PMID: 15537654]
- 60 Rachdi L, Balcazar N, Osorio-Duque F, Elghazi L, Weiss A, Gould A, Chang-Chen KJ, Gambello MJ, Bernal-Mizrachi E. Disruption of Tsc2 in pancreatic beta cells induces beta cell mass expansion and improved glucose tolerance in a TORC1-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 9250-9255 [PMID: 18587048 DOI: 10.1073/pnas.0803047105]
- 61 Fraenkel M, Ketzinil-Gilad M, Ariav Y, Pappo O, Karaca M, Castel J, Berthault MF, Magnan C, Cerasi E, Kaiser N, Leibowitz G. mTOR inhibition by rapamycin prevents beta-cell adaptation to hyperglycemia and exacerbates the metabolic state in type 2 diabetes. *Diabetes* 2008; 57: 945-957 [PMID: 18174523 DOI: 10.2337/db07-0922]
- 62 Zahr E, Molano RD, Pileggi A, Ichii H, San Jose S, Bocca N, An W, Gonzalez-Quintana J, Fraker C, Ricordi C, Inverardi L. Rapamycin impairs beta-cell proliferation in vivo. *Transplant Proc* 2008; 40: 436-437 [PMID: 18374093 DOI: 10.1016/j.transproceed.2008.02.011]
- 63 Leibowitz G, Cerasi E, Ketzinil-Gilad M. The role of mTOR in the adaptation and failure of beta-cells in type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab* 2008; 10 Suppl 4: 157-169 [PMID: 18834443 DOI: 10.1111/j.1463-1326.2008.00952.x]
- 64 Wang Y, Liu J, Liu C, Naji A, Stoffers DA. MicroRNA-7 regulates the mTOR pathway and proliferation in adult pancreatic β -cells. *Diabetes* 2013; 62: 887-895 [PMID: 23223022 DOI: 10.2337/db12-0451]
- 65 Mahon PC, Hirota K, Semenza GL. HIF-1: a novel protein that interacts with HIF-1alpha and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity. *Genes Dev* 2001; 15: 2675-2686 [PMID: 11641274 DOI: 10.1101/gad.924501]
- 66 Semenza GL. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell* 2012; 148: 399-408 [PMID: 22304911 DOI: 10.1016/j.cell.2012.01.021]
- 67 Chen N, Chen X, Huang R, Zeng H, Gong J, Meng W, Lu Y, Zhao F, Wang L, Zhou Q. BCL-xL is a target gene regulated by hypoxia-inducible factor-1[alpha]. *J Biol Chem* 2009; 284: 10004-10012 [PMID: 19211554 DOI: 10.1074/jbc.M805997200]
- 68 Federici M, Hribal M, Perego L, Ranalli M, Caradonna Z, Perego C, Usellini L, Nano R, Bonini P, Bertuzzi F, Marlier LN, Davalli AM, Carandente O, Pontiroli AE, Melino G, Marchetti P, Lauro R, Sesti G, Folli F. High glucose causes apoptosis in cultured human pancreatic islets of Langerhans: a potential role for regulation of specific Bcl family genes toward an apoptotic cell death program. *Diabetes* 2001; 50: 1290-1301 [PMID: 11375329 DOI: 10.2337/diabetes.50.6.1290]
- 69 Chen J, Hui ST, Couto FM, Mungrue IN, Davis DB, Attie AD, Lusis AJ, Davis RA, Shalev A. Thioredoxin-interacting protein deficiency induces Akt/Bcl-xL signaling and pancreatic beta-cell mass and protects against diabetes. *FASEB J* 2008; 22: 3581-3594 [PMID: 18552236 DOI: 10.1096/fj.08-111690]

编辑 郭鹏 电编 闫晋利



HPV18 *E6*、*E7*基因-shRNA重组腺病毒表达载体的构建及鉴定

李 钢, 冯 彪, 邓彦超, 李德生, 居来提·艾尼瓦尔, 张力为

■背景资料

有研究表明人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)18 *E6*、*E7*基因与食管癌发病密切相关, 20世纪90年代开始, RNAi已引起了人们广泛的关注的同时, RNA干扰技术同时亦广泛发展。

李钢, 邓彦超, 李德生, 居来提·艾尼瓦尔, 张力为, 新疆医科大学第一附属医院胸外科 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830054

冯彪, 泰安市中心医院胸外科 山东省泰安市 271000

李钢, 在读硕士, 主要从事食管癌的基础与临床研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30960383

作者贡献分布: 此课题的设计和论文写作由李钢与张力为完成; 研究过程由李钢与冯彪操作完成; 数据分析由李钢、冯彪、邓彦超、李德生、张力为及居来提·艾尼瓦尔完成。

通讯作者: 张力为, 教授, 主任医师, 830054, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市鲤鱼山南路137号, 新疆医科大学第一附属医院胸外科, zhangliwei@medmail.com.cn

电话: 0991-4361528

收稿日期: 2014-04-30 修回日期: 2014-06-09

接受日期: 2014-07-05 在线出版日期: 2014-08-28

Construction and identification of recombinant adenovirus expression vectors expressing short hairpin RNAs targeting HPV18 *E6* and *E7*

Gang Li, Biao Feng, Yan-Chao Deng, De-Sheng Li, Julaiti·Ainiwaer, Li-Wei Zhang

Gang Li, Yan-Chao Deng, De-Sheng Li, Julaiti·Ainiwaer, Li-Wei Zhang, Department of Thoracic Surgery, the First Affiliated Hospital, Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China
Biao Feng, Department of Thoracic Surgery, the Central Hospital of Taian, Taian 271000, Shandong Province, China
Supported by: the National Natural Science Foundation of China, No. 30960383

Correspondence to: Li-Wei Zhang, Professor, Chief Physician, Department of Thoracic Surgery, the First Affiliated Hospital, Xinjiang Medical University, 137 Liyushan South Road, Urumqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China. zhangliwei@medmail.com.cn

Received: 2014-04-30 Revised: 2014-06-09

Accepted: 2014-07-05 Published online: 2014-08-28

Abstract

AIM: To construct adenovirus expression vectors carrying short hairpin RNAs (shRNAs) targeting human papillomavirus (HPV) 18 *E6* and *E7* to provide an experimental basis for gene therapy of HPV-associated esophageal cancer.

METHODS: The sequences of HPV18 *E6* and *E7* genes were retrieved from GenBank, and shR-

NAs for HPV18 *E6* and *E7* genes were designed, synthesized and cloned into an adenovirus plasmid (shpAd/PL-Dest) to result in the *E6/E7*-shRNA expression vectors shpAd-*E6/E7*-eGFP. The recombinant expression vectors were identified by restriction enzyme digestion, PCR and sequence analysis. After verification, the two vectors were transfected into HEK293A cells to obtain HPV18 *E6* and *E7* adenoviral expression vectors.

RESULTS: Enzyme digestion analysis of shpAd-*E6*-eGFP and shpAd-*E7*-eGFP adenovirus vectors showed positive results. The two adenovirus vectors were transfected into HEK293A cells successfully.

CONCLUSION: The adenoviral expression vectors carrying shRNAs targeting HPV18 *E6* and *E7* have been constructed successfully.

© 2014 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: Esophageal carcinoma; RNA interference; Recombinant adenovirus vector; Human papillomavirus

Li G, Feng B, Deng YC, Li DS, Julaiti·Ainiwaer, Zhang LW. Construction and identification of recombinant adenovirus expression vectors expressing short hairpin RNAs targeting HPV18 *E6* and *E7*. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(24): 3608-3612 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/3608.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i24.3608>

摘要

目的: 构建人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)18型*E6*、*E7*基因的短发夹RNA(short hairpin ribonucleic acid, shRNA)重组腺病毒载体, 为探讨食管癌与其发病关系的研究提供实验基础。

方法: 设计并合成2条shRNA均克隆到PL-Dest腺病毒骨架载体(pAd/PL-Dest)之中, 分别组

■同行评议者

姜春萌, 教授, 主任, 大连医科大学附属第二医院消化科

成HPV18 E6、HPV18 E7基因重组腺病毒基因沉默子(shpAd-E6-eGFP、shpAd-E7-eGFP)。然后对重组腺病毒基因沉默子(shpAd-E6-eGFP、shpAd-E7-eGFP)采用酶切、DNA测序、PCR鉴定。将验证后的沉默子经酶切后转染至HEK293A细胞, 然后再行包装、扩增、纯化与病毒滴度测定。

结果: 酶切鉴定得到阳性shpAd-E6-eGFP、shpAd-E6-eGFP重组腺病毒质粒; 转染到HEK293A细胞包装成功。

结论: 成功构建了HPV18 E6、HPV18 E7基因的shRNA重组腺病毒载体, 为HPV相关食管癌的基因治疗研究提供实验基础。

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词: 食管癌; RNA干扰; 腺病毒; 人乳头瘤病毒

核心提示: 构建人乳头瘤病毒(human papillomavirus)18 E6、E7基因的短发夹RNA(short hairpin ribonucleic acid)重组腺病毒载体, 为探讨食管癌与其发病关系的研究及RNA干扰沉默食管癌细胞株中对人类白细胞抗原类分子的影响提供实验基础。

李钢, 冯彪, 邓彦超, 李德生, 居来提·艾尼瓦尔, 张力为. HPV18 E6、E7基因-shRNA重组腺病毒表达载体的构建及鉴定. 世界华人消化杂志 2014; 22(24): 3608-3612 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/3608.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v22.i24.3608>

0 引言

人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)属于乳多空病毒科, 是一类共价双链环状DNA病毒, 他常特异感染人的皮肤、黏膜的。按照与肿瘤发生的关系, 我们将HPV分高危型、中危型以及低危型。有研究表明HPV16、HPV18型与宫颈癌、食管癌的发病密切相关, 所以我们常常把HPV16、HPV18归为高危型HPV。近年来在食管癌的研究中, 高危型HPV作为生物性危险因素越来越受到研究者的重视。Jung等^[1]通过体外研究证实, 高危型HPV产生的E6、E7癌蛋白可以有效导致人体细胞发生癌变, 当其与细胞周期调控因子p53^[2]、pRB^[3,4]相互作用时, 直接干预细胞周期进程, 在HPV诱导肿瘤形成过程中发挥极其重要的作用。

短发夹RNA(short hairpin ribonucleic acid, shRNA)是一段具有紧密发卡环(tight hairpin

turn)的RNA序列, 常被用于RNA干扰沉默靶基因的表达。利用载体把shRNA导入细胞, 载体中的U6启动子确保shRNA总是表达; 这种装载了shRNA载体可被传递到子代细胞中去, 从而使基因的沉默可被遗传。在宫颈癌治疗中, 抑制HPV E6和E7的表达已经成为一种有效手段。RNA干扰技术能使HPV E6和E7癌基因沉默, 或者特异性的抑制HPV E6和E7癌基因的表达, 从而促使肿瘤细胞的凋亡和坏死, 对抑制肿瘤生长有着显著效果^[5]。RNA干扰技术的不足之处是转染效率低、安全性差、容量小和免疫原性强。新型重组腺病毒载体是基因治疗中最常用的病毒载体之一^[6], 其优点在于其介导的基因转移效率较高、感染细胞谱较广、病毒滴度较高, 而且浓缩和贮存方便。有研究表明, HPV18 E6和E7与食管癌发病关系之间的关系密切^[7,8]。查阅大量文献, 有关构建了HPV18 E6、E7基因的shRNA重组腺病毒载体的文献很少。本实验拟构建HPV18 E6和HPV18 E7基因的重组腺病毒载体(shpAd-E6-eGFP、shpAd-E7-eGFP), 开展并推广以腺病毒载体为基因转移工具的基因治疗, 为今后进行重组HPV E6和E7腺病毒对HPV相关肿瘤细胞凋亡作用的体内外实验研究打下基础。

1 材料和方法

1.1 材料 感受态大肠杆菌DH5 α 、HEK293A细胞、Gateway[®] LRClonase[®] II Plus Enzyme Mix、shpDown多克隆位点(multiple cloning site, MCS)-eGFP载体和腺病毒骨架载体pAd/PL-Dest购自Invitrogen公司; dNTP Mix、GeneRuler[™] 100 bp DNA Ladder、Taq DNA Polymerase购自Fermentas公司; Hpa I、Xho I等限制性内切酶、T4 DNA Ligase购自TAKARA公司; 总RNA提取试剂(TRIZOL Reagent)、Thermoscript[™] RT-PCR System、Lipofectamine 2000、超纯质粒提取试剂盒、质粒小提试剂盒、绿色荧光蛋白(eGFP)(增强型)购自Invitrogen公司; 高糖DMEM和胎牛血清购自GIBCO公司。

1.2 方法

1.2.1 目的基因的设计及合成: 在GenBank中检索到HPV18 E6 E7基因序列(基因编号NC_001357)。根据shRNA设计原则, 设计合成3对shRNA, 分别为E6、E7的特异性干扰序列以及阴性对照无关序列(表1), 使用美国国立生物技术信息中心(National Center of Biotechnology Information,

■研发前沿

HPV18 E6、E7基因-shRNA重组腺病毒表达载体的构建为高危型HPV18感染食管的进一步研究提供了一个重要的实验工具。RNAi技术在宫颈癌的基因治疗中的研究已进入临床阶段。在食管癌中的研究尚且不多。本研究将构造一个柄样状结构的siRNA, 即短发卡RNAs(shRNA), 能够从多种启动子进行表达。

■相关报道

目前有关HPV16 E6、E7基因-shRNA重组腺病毒表达载体的构建的文献报道相对较多, 同为食管癌、宫颈癌感染的高危型HPV16 E6、E7基因-shRNA重组腺病毒表达载体的构建很少。

■创新盘点

RNAi技术在宫颈癌的基因治疗中的研究已进入临床阶段。在食管癌中的研究尚且不多。

表 1 合成片段的基因序列

名称	序列
shRNA-E6-F'	5'-TCACTTCACTGCAAGACATACTCGAGTATGTCTTGCACTGAAGTGTTC-3'
shRNA-E6-R'	5'-TCGAGAAAAACACTTCACTGCAAGACATACTCGAGTATGTCTTGCACTGAAGTGA-3'
ShRNA-E7-F'	5'-TCCACCAACGTCACACAATGTCTCGAGACATTGTGTGACGTTGGTGGTTC-3'
shRNA-E7-R'	5'-TCGAGAAAAACCAACGTCACACAATGTCTCGAGACATTGTGTGACGTTGGTGGGA-3'
阴性对照-F'	5'-TGCGCGCTTTGTAGGATTCGCTCGAGCGAATCCTACAAAGCGCGCTTTTC-3'
阴性对照-R'	5'-TCGAGAAAAAGCGCGCTTTGTAGGATTCGCTCGAGCGAATCCTACAAAGCGC-3'

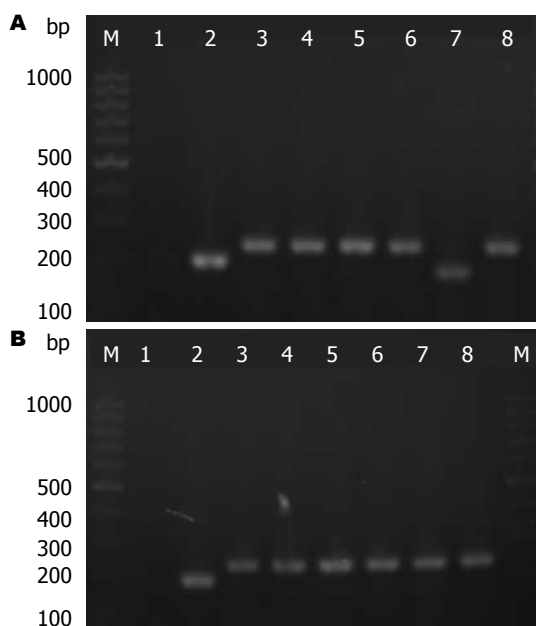


图 1 shpDown-U6-E6-eGFP、shpDown-U6-E7-eGFP 菌落PCR鉴定结果。A: shpDown-U6-E6-eGFP菌落PCR扩增。3-8: shpDown-U6-E6-eGFP克隆1-6, 其中3-7, 8多出阴性对照40 bp; B: shpDown-U6-E7-eGFP菌落PCR扩增。3-8: shpDown-U6-E7-eGFP克隆1-6, 其中3-8多出阴性对照40 bp; M: 100 bp DNA ladder; 1: ddH₂O; 2: 阴性对照 (shpDown-U6-MCS-eGFP)。

NCBI)的数据库对阴性对照无关序列进行了序列检索。

1.2.2 真核表达载体shpDown-U6-E6-eGFP和shpDown-U6-E7-eGFP的构建: 以HPV18 E6、E7基因为模板用酶切、PCR及DNA连接构建重组腺病毒基因沉默子。回收酶切载体shpDown-U6-MCS-eGFP, DNA琼脂糖凝胶电泳回收试剂盒。将上述合成的shRNA、T4 DNA ligase等加入在回收产物中, 16 °C连接过夜, 然后将连接产物转化DH5 α 感受态细菌, PCR扩增以后选取阳性克隆质粒进行测序鉴定。

1.2.3 重组腺病毒shpAd-E6-eGFP、shpAd-E7-eGFP质粒的构建及鉴定: 根据Gateway Technology说明书构建shpAd/PL-E6-eGFP, shpAd/

PL-E7-eGFP, 提取质粒shpDown-E6-eGFP、shpDown-E7-eGFP和shpAd/PL-Dest, 用Gateway[®] LRClonase[®] II Plus Enzyme Mix试剂盒连接shpDown-E6-eGFP与shpAd/PL-Dest。选阳性克隆质粒进行测序鉴定。

1.2.4 重组腺病毒shpAd-E6-eGFP、shpAd-E7-eGFP的包装及纯化: Pac I 酶切线性化腺病毒质粒, 按超纯质粒提取试剂盒说明书回收纯化, 接种HEK293A细胞到六孔板内(2×10^5 个/孔), 培养至80%-90%融合度, 参照lipofectamine 2000说明书介导质粒DNA转染, 二者比例为1 μ g : 3 μ L接种于六孔板内, 轻微摇晃, 37 °C、5%CO₂环境下培养过夜, 大部分细胞开始出现病变7 d之后。当细胞病变时, 开始收集细胞和上清液。进行反复冻融(37 °C/-80 °C)3次, 以裂解细胞、释放病毒。设定初次包装好的病毒代号为P0, 随后用P0转染HEK293A细胞, 大部分的细胞出现病变时, 收集细胞和培养上清200 g离心10 min, 弃上清, 无菌PBS将沉淀细胞重悬。反复冻融(37 °C/-80 °C)3次, 以裂解细胞、释放病毒, 惊醒腺病毒的扩增与浓缩, 通过TCID₅₀法测病毒滴度。

2 结果

2.1 真核表达载体shpDown-U6-E6-eGFP和shpDown-U6-E7-eGFP的鉴定 在1.5%的琼脂糖凝胶电泳中, PCR扩增片段中可以清楚地看出非阳性克隆条带比阳性克隆条带低, 与阴性对照(195 bp)相比, 阳性克隆的PCR产物片段(lane3-8)多出40 bp(图1)。成功的构建了shpDown-U6-E6-eGFP和shpDown-U6-E7-eGFP。

2.2 重组腺病毒shpAd-E6-eGFP、shpAd-E7-eGFP质粒的构建及鉴定 PCR扩增片段在1.5%的琼脂糖凝胶电泳中可以明显看出阳性克隆条带比非阳性条带高, 与阴性对照(195 bp)相比, 阳性克隆的PCR产物片段(lane3-8)多了40 bp(图2)。成功构建shpAd-E6-eGFP、shpAd-E7-eGFP。

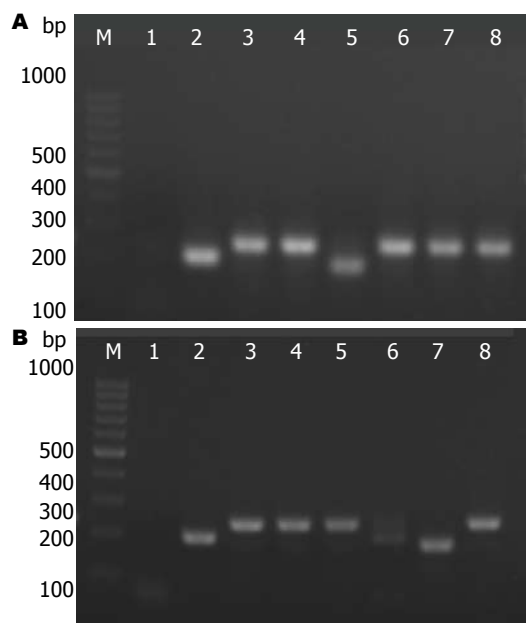


图 2 shpAd-E6-eGFP、shpAd-E7-eGFP菌落PCR鉴定结果. A: shpAd-E6-eGFP菌落PCR扩增. 3-8: shpAd-E6-eGFP克隆1-6, 其中3, 4, 6-8多出阴性对照40 bp. B: shpAd-E7-eGFP菌落PCR扩增. 3-8: shpAd-E7-eGFP克隆1-6, 其中3-5, 8多出阴性对照40 bp; M: 100 bp DNA ladder; 1: ddH₂O; 2: 阴性对照(shpAd-MCS-eGFP).

2.3 病毒包装后的结果 腺病毒质粒(shpAd-E6-eGFP、shpAd-E7-eGFP)转染HEK293A细胞后7 d产生明显病变, 病变细胞活力下降, 大多数细胞不能贴壁生长, 细胞内部出现空泡. 此结果表明了重组腺病毒包装成功. 在显微镜100×下观察病变细胞如图3. TCID₅₀法测病毒滴度为 1.26×10^{10} PFU/mL.

3 讨论

大量的研究表明, HPV与多种肿瘤发生关系密切. 在宫颈癌的研究中已得到突破性进展, 证实了HPV高度的致癌性. HPV是一种高度螺旋的环状双链DNA病毒, 含有7900 bp, 具备体积较小、结构高度螺旋的环状的特点. 通过病毒编码蛋白宿主细胞的调节蛋白与病毒的编码蛋白可形成复合物, 破坏细胞DNA修复以及有丝分裂. 高危型HPV(16、18型)E6、E7蛋白就是其可转化基因产物. 他们可干扰抑癌基因使其失去正常功能, 如p53、Rb. 有研究指出高危型HPV E6、E7是最有效的病毒癌蛋白, 与细胞的永生化和恶性转化相关, 可能是食管肿瘤发生的重要危险因素之一. PRb蛋白与HPV18型编码的E7原癌蛋白相结合, 致使PRb蛋白高度磷酸化, 基因转录同时也进入了S期. 研究表明, 宫颈癌细胞中E6/E7-shRNA已

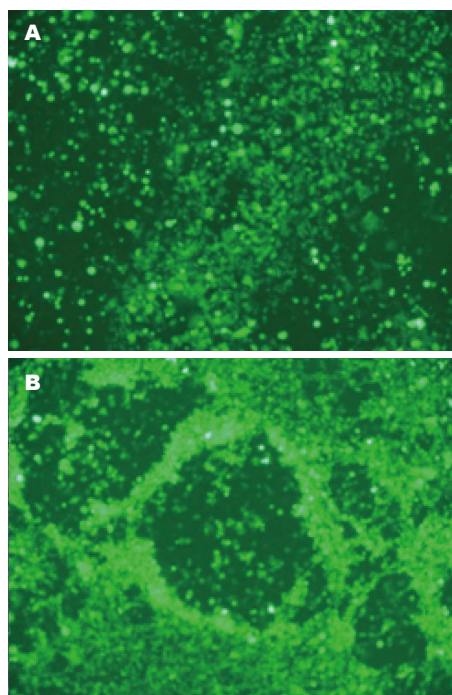


图 3 荧光电子显微镜下病毒转染7 d后产生的明显病变(×100). A: shpAd-E6-eGFP转染图; B: shpAd-E7-eGFP转染图.

经成功表达, 抑制作用表现突出. 郭建新等^[9]成功干扰了宫颈癌细胞中HPV16型E6基因的表达, 并抑制癌细胞生长的作用. 食管与宫颈有相类似的鳞状上皮, 都是HPV易侵袭组织结构. 本研究所构建的HPV18 E6、E7基因的shRNA重组腺病毒载体为下一步食管癌细胞中E6/E7-shRNA能抑制食管肿瘤的研究提供一个重要的工具.

自20世纪90年代开始, RNA干扰(RNA interference, RNAi)引起了人们广泛的关注, RNA干扰技术同时也得到广泛发展. RNAi的作用主要是在转录、转录后、翻译等多个不同的水平上实现的. 通过抑制靶mRNA的翻译, 阻止靶蛋白表达^[10]. 生物界广泛存在RNAi高效且特异的阻断基因表达方式. 有研究报道, 在多种疾病模型动物的治疗实验中, 用多种的载体将siRNA介导RNAi治疗中, 治疗效果特别明显. 灵长类动物抗病毒治疗中也显示出其可行性^[11]. 美国宾夕法尼亚大学于2011年利用基因疗法, 治疗晚期慢性淋巴细胞白血病进行治疗, 获得很好的治疗效果. 再次掀起了人们对基因治疗这一新的肿瘤治疗手段的极大热情^[12]. Davis等^[13]更是让研究人员鼓足了信心, 在治疗肿瘤的I期临床试验中, 他们开发的RNAi药物取得初步成功. 腺病毒基因组长约36 kb, 是一种无包膜的线性双链DNA病毒, 在自然界广泛分布, 有100多种血清型. 其两

应用要点

本研究将构造一个柄样状结构的siRNA, 即短发卡RNAs(shRNA), 能够从多种启动子进行表达.

同行评价

选题有意义, 实验设计合理, 采用方法适当, 成功建立并鉴定人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)18 E6、E7基因-shRNA腺病毒表达载体, 对HPV相关的食管癌病因及治疗研究具有一定意义。

端的反向末端重复区内侧是病毒包装信号。他不受靶细胞是否为分裂细胞限制, 而且转基因效率高, 易制成高滴度病毒载体, 瞬间表达及安全性高, 让其在进入细胞内不能整合到宿主细胞基因组。腺病毒载体越来越多的应用在基因治疗临床试验之中, 成为最具前景的病毒载体之一。

RNAi技术在宫颈癌的基因治疗中的研究已进入临床阶段。查阅国内外文献, 在食管癌中的研究尚且不多。本研究将构造一个柄袢状结构的siRNA, 即shRNA, 能够从多种启动子进行表达。比如RNAIII多聚酶启动子H1和U6, 在整合入shpAD-E6(E7)-eGFP后, 并跟腺病毒载体融合过程里, 产生出了稳定的转染细胞系。因此就有了能够长久抑制蛋白质表达的可能性^[14,15]。通过采用连接腺病毒载体骨架shpAd/PL-Dest与E6 E7-siRNA的DNA片段的方法, 成功构建腺病毒表达载体E6(E7)-shRNA, 且质粒shpAd-E6(E7)-eGFP中因含有GFP, 在转染、包装HEK293A后, 通过荧光显微镜能很方便的得到检测。本实验成功设计两条E6(E7)shRNA腺病毒表达载体, 但是有研究^[11]显示不同位点的RNAi作用效果存在着很大的差异, 导致差异的原因至今尚不明确, 与靶位点的依赖差异、病毒RNA序列以及二级结构等可能相关。因此, 为了确保RNAi的作用, 多数研究者建议每个基因至少选择3-4个靶位点, 这是本研究中的不足之处。本研究为进一步阐明HPV与食管癌的关系作出了一定的贡献, 并为以后HPV相关食管癌的基因治疗打下了基础。

参考文献

- Jung AC, Briolat J, Millon R, de Reyniès A, Rickman D, Thomas E, Abecassis J, Clavel C, Wasylyk B. Biological and clinical relevance of transcriptionally active human papillomavirus (HPV) infection in oropharynx squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 2010; 126: 1882-1894 [PMID: 19795456 DOI: 10.1002/ijc.24911]
- Sümbül AT, Akkız H, Bayram S, Bekar A, Akgöllü E, Sandıkçı M. p53 codon 72 polymorphism is associated with susceptibility to hepatocellular carcinoma in the Turkish population: a case-control study. *Mol Biol Rep* 2012; 39: 1639-1647 [PMID: 21607615 DOI: 10.1007/s11033-011-0903-2]
- Yu H, Huang YJ, Liu Z, Wang LE, Li G, Sturgis EM, Johnson DG, Wei Q. Effects of MDM2 promoter polymorphisms and p53 codon 72 polymorphism on risk and age at onset of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Mol Carcinog* 2011; 50: 697-706 [PMID: 21656578 DOI: 10.1002/mc.20806]
- Jiang M, Milner J. Selective silencing of viral gene E6 and E7 expression in HPV-positive human cervical carcinoma cells using small interfering RNAs. *Methods Mol Biol* 2005; 292: 401-420 [PMID: 15507723 DOI: 10.1385/1-59259-848-X: 401]
- Ahn KS, Sethi G, Aggarwal BB. Simvastatin potentiates TNF-alpha-induced apoptosis through the down-regulation of NF-kappaB-dependent antiapoptotic gene products: role of IkappaBalpha kinase and TGF-beta-activated kinase-1. *J Immunol* 2007; 178: 2507-2516 [PMID: 17277159 DOI: 10.4049/jimmunol.178.4.2507]
- 胡颖, 洪蝶, 谢幸, 叶枫. RNA干扰机制的分子生物学研究进展. *国际病毒学杂志* 2007; 6: 185-189
- 齐宗利, 霍霞, 张宝, 杨海伟, 邱波, 彭琳, 沈忠英, 徐锡金. 食管癌EC109细胞属人类乳头瘤病毒18型阳性细胞株. *汕头大学医学院学报* 2006; 19: 136-153
- 许丽艳, 沈忠英, 李恩民, 蔡唯佳, 沈健, 李淳, 洪超群, 陈炯玉, 曾毅. HPV E6 E7基因诱发的人胎儿食管上皮永生化和恶性转化细胞端粒长度和端粒酶活性. *癌变·畸变·突变* 2001; 13: 137-140
- 郭建新, 李力, 白焱等, 程小星, 邓少丽, 郑秀惠. 慢病毒携带shRNA对宫颈癌细胞中HPV16型E6表达的抑制作用. *第三军医大学学报* 2006; 28: 1218-1220
- Yokota T, Iijima S, Kubodera T, Ishii K, Katakai Y, Ageyama N, Chen Y, Lee YJ, Unno T, Nishina K, Iwasaki Y, Maki N, Mizusawa H, Akari H. Efficient regulation of viral replication by siRNA in a non-human primate surrogate model for hepatitis C. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 361: 294-300 [PMID: 17655825 DOI: 10.1016/j.bbrc.2007.06.182]
- Waterhouse PM, Wang MB, Lough T. Gene silencing as an adaptive defence against viruses. *Nature* 2001; 411: 834-842 [PMID: 11459066 DOI: 10.1038/35081168]
- Porter DL, Levine BL, Kalos M, Bagg A, June CH. Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *N Engl J Med* 2011; 365: 725-733 [PMID: 21830940 DOI: 10.1056/NEJMoa.1103849]
- Davis ME, Zuckerman JE, Choi CH, Seligson D, Tolcher A, Alabi CA, Yen Y, Heidel JD, Ribas A. Evidence of RNAi in humans from systemically administered siRNA via targeted nanoparticles. *Nature* 2010; 464: 1067-1070 [PMID: 20305636 DOI: 10.1038/nature08956]
- Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 2002; 296: 550-553 [PMID: 11910072 DOI: 10.1126/science.1068999]
- Yu JY, DeRuiter SL, Turner DL. RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 6047-6052 [PMID: 11972060 DOI: 10.1073/pnas.092143499]

编辑 郭鹏 电编 闫晋利



雌激素对人胃癌细胞株PI9表达和细胞增殖的影响

陈海霞, 周业江, 王璐璐, 李 华, 熊玉霞

陈海霞, 王璐璐, 李华, 熊玉霞, 泸州医学院药学院药理教研室 四川省泸州市 646000

周业江, 泸州医学院附属医院普外科 四川省泸州市 646000

陈海霞, 主要从事抗炎免疫和肿瘤药理学研究.

国家自然科学基金资助项目, No. 30672058

泸州医学院科研基金资助项目, No. 2009016

作者贡献分布: 此课题由熊玉霞与周业江设计; 研究过程与统计分析由陈海霞、王璐璐及李华完成; 论文写作由陈海霞与熊玉霞完成.

通讯作者: 熊玉霞, 副教授, 硕士生导师, 646000, 四川省泸州市江阳区忠山路三段319号, 泸州医学院药学院药理教研室.

xyx_cell@163.com

电话: 0830-3162291

收稿日期: 2014-06-07 修回日期: 2014-07-07

接受日期: 2014-07-24 在线出版日期: 2014-08-28

Effect of estrogen on expression of PI9 and cell proliferation in human gastric cancer cell lines

Hai-Xia Chen, Ye-Jiang Zhou, Lu-Lu Wang, Hua Li, Yu-Xia Xiong

Hai-Xia Chen, Lu-Lu Wang, Hua Li, Yu-Xia Xiong, Department of Pharmacology, School of Medicine, Luzhou Medical College, Luzhou 646000, Sichuan Province, China
Ye-Jiang Zhou, Department of General Surgery, Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000, Sichuan Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30672058; Scientific Research Foundation of Luzhou Medical College, No. 2009016

Correspondence to: Yu-Xia Xiong, Associate Professor, Department of Pharmacology, School of Medicine, Luzhou Medical College, 319 Zhongshan Road, Jiangyang District, Luzhou 646000, Sichuan Province, China. xyx_cell@163.com
Received: 2014-06-07 Revised: 2014-07-07

Accepted: 2014-07-24 Published online: 2014-08-28

Abstract

AIM: To detect the expression of estrogen receptors (ER alpha and ER beta) in four gastric cancer cell lines and evaluate the effect of estrogen on cell proliferation and expression of serine proteinase inhibitor 9 (PI9) in gastric cancer cells.

METHODS: Gastric cancer cell lines with PI9 positive expression (MNK45 and SGC7901) and those with negative expression (MNK28 and BGC823) were used. The expression of ER was detected by immunofluorescence. Cell proliferation

was tested by CCK8 assay, and expression of PI9 was detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR).

RESULTS: ER- α protein expression was noted in MNK45 and SGC7901 cells, ER- β expression was noted in BGC823 cells, and ER- α and ER- β were undetectable in MNK28 cells. Compared with the negative control group, estrogen could significantly promote the proliferation of MNK45 and SGC7901 cells at concentrations of 1-100 nmol/L, of BGC823 cells at concentrations of 10-100 nmol/L, and of MNK28 at a concentration of 10 nmol/L ($P < 0.05$). The expression of PI9 mRNA in SGC-7901 and MNK45 cells was enhanced after intervention with estrogen, and the relative grey value of PI9 mRNA in MNK45 cells (0.7158 ± 0.0734) increased significantly compared with the control group (0.5401 ± 0.0653 , $P = 0.014$).

CONCLUSION: Estrogen could significantly promote the proliferation of gastric cancer cells by binding to ER, possibly *via* inducing the expression of PI9.

© 2014 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: Gastric cancer cells; Estrogen; Estrogen receptor; Serine proteinase inhibitor 9

Chen HX, Zhou YJ, Wang LL, Li H, Xiong YX. Effect of estrogen on expression of PI9 and cell proliferation in human gastric cancer cell lines. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(24): 3613-3618 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/3613.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i24.3613>

摘要

目的: 观察四株胃癌细胞上雌激素受体(ER α 和ER β)的表达情况及雌激素对胃癌细胞株细胞增殖和丝氨酸蛋白酶抑制蛋白9(serine proteinase inhibitor 9, PI9)表达的影响.

方法: 对前期筛选出的PI9阳性表达胃癌细胞株(MNK45、SGC7901)和阴性表达胃癌细胞

■背景资料

雌激素能促进某些胃癌的发生发展,但其确切机制仍不清楚.某些胃癌组织中有ER表达,且ER阳性胃癌的恶性程度高、生物学行为不良.雌激素是诱导PI9表达的重要因素,雌激素促胃癌机制可能与其诱导胃癌细胞中内源性PI9的表达而导致了胃癌细胞的免疫耐受有关.

■同行评议者

欧希龙, 副教授, 东南大学中大医院消化科

■研究前沿

某些肿瘤细胞通过内源性表达PI9获得自身保护机制而具有逃避免疫清除的功能,肿瘤细胞的这种内源性免疫逃逸机制,可能与肿瘤的形成和发展中自身获得免疫耐受有关。因此,PI9极有可能是介导肿瘤免疫逃逸的重要机制和肿瘤免疫治疗的重要障碍。

株(MNK28、BGC823),采用免疫荧光化学法检测ER α 和ER β 的表达情况,CCK8法检测雌激素干预后胃癌细胞株的增殖情况,逆转录聚合酶链式反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)检测雌激素干预后PI9表达的变化。

结果: ER α 在MNK45和SGC7901的细胞核上均有表达,ER β 在BGC823的细胞核上呈弱阳性表达,MNK28上未见表达;雌激素在1-100 nmol/L时可明显促进MNK45、SGC7901的细胞增殖,与阴性对照组相比差异有统计学意义($P<0.05$),在10-100 nmol/L时亦促进BGC823的细胞增殖,与阴性对照组相比差异有统计学意义($P<0.05$),在10 nmol/L时促进MNK28的细胞增殖;雌激素干预后SGC-7901和MNK45的PI9 mRNA表达均增强,其中,MNK45的PI9 mRNA的相对灰度值(0.7158 ± 0.0734)较对照组(0.5401 ± 0.0653)明显升高,差异有统计学意义($P=0.014$)。

结论: 雌激素与胃癌细胞上雌激素受体结合后能明显促进胃癌细胞株的增殖活性,其促增殖作用与其诱导PI9的表达密切相关。

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词: 胃癌细胞; 雌激素; 雌激素受体; 丝氨酸蛋白酶抑制剂9

核心提示: 胃癌细胞能内源性表达PI9,进而通过PI9介导其免疫逃逸,雌激素是PI9表达的重要诱导剂,雌激素能促进某些胃癌的发生发展,其作用机制与诱导PI9表达有关吗? 本文将初步探讨雌激素与胃癌细胞PI9表达及细胞增殖的关系。

陈海霞, 周业江, 王璐璐, 李华, 熊玉霞. 雌激素对人胃癌细胞株PI9表达和细胞增殖的影响. 世界华人消化杂志 2014; 22(24): 3613-3618 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/3613.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v22.i24.3613>

0 引言

PI9^[1-3]是具有抑制颗粒酶B(granzyme B, GrB)功能作用的抑制蛋白,能阻断GrB所致的DNA降解,从而具有抑制GrB诱导的细胞凋亡作用。PI9表达于人体正常的细胞毒T淋巴细胞、成熟的树突状细胞、NK细胞及人体为数不多的具有免疫豁免的部位,如眼、睾丸和胎盘等组织,保护这些细胞不被GrB介导的细胞毒攻击而自相残杀。换言之,上述细胞可通过表达PI9抑制GrB介导的凋亡而获得自身保护,即内源性免疫逃逸

机制。我们的前期研究发现胃癌细胞能内源性表达PI9,进而通过PI9抑制PFP/GrB途径介导的细胞凋亡而获得自身保护,从而造成胃癌的免疫逃逸^[4,5]。PI9的表达受多种因素的调控,雌激素(estradiol, E2)是诱导PI9表达的一个重要因素^[6],雌激素能促进某些胃癌的发生发展,其作用机制与PI9有关吗? 本研究将首先观察PI9阳性和阴性胃癌细胞上雌激素受体的表达情况,接着观察雌激素干预后各细胞的增殖情况,并进一步观察雌激素对胃癌细胞PI9表达的影响,探讨雌激素与胃癌细胞PI9表达间的关系,雌激素是否具有诱导PI9表达进而促进胃癌细胞增殖的作用。

1 材料和方法

1.1 材料 人胃癌细胞株MNK45、SGC7901、MNK28和BGC823购自北京北纳创联生物技术研究院; DMEM培养基、胎牛血清购自HyClone公司; Cell Counting Kit-8购自碧云天生物技术研究所; Tamoxifen购自Adamas Reagent公司; BioBRK RT-PCR Kit、一抗ER β 兔抗人多克隆抗体和ER α 鼠抗人单抗购自美国Bioworld公司; 二抗罗丹明标记山羊抗兔IgG、FITC标记山羊抗小鼠IgG购自中杉金桥。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: MNK45、SGC7901、MNK28和BGC823人胃癌细胞株,于37℃、5%CO₂条件下,培养于含10%胎牛血清、1%双抗贮存液的DMEM培养基中,每2-3 d传代1次,取对数生长期细胞进行实验。

1.2.2 免疫荧光法检测细胞株ER α 和ER β 的表达: 取对数生长期细胞,0.25%胰蛋白酶消化,调整细胞悬液 1×10^5 /mL,接种到预先置有盖玻片的12孔板中,待细胞接近长成单层后用PBS洗涤,4%预冷的多聚甲醛室温下固定,预冷甲醇-20℃进行细胞通透,使用与二抗相同宿主10%胎牛血清封闭,分别加入浓度1:200鼠抗人ER α 和1:50兔抗人ER β 稀释液50 μ L,湿盒环境中4℃过夜,等量10%胎牛血清替代一抗作为阴性对照,加入浓度1:200 FITC标记羊抗小鼠IgG、1:50罗丹明标记山羊抗兔IgG稀释液50 μ L,37℃避光孵育30 min,封片并荧光显微镜下拍照观察。以激发波长为535-450 nm,观察四株细胞中ER α 、ER β 抗原表达的定位情况及荧光信号的强弱,FITC荧光标记显绿色,罗丹明荧光标记显红色,以明确的荧光为阳性,仅发浅荧光且与周围背

表 1 E2对人胃癌细胞株增殖活性的影响 (mean ± SD, n = 9)

分组	MNK45	SGC-7901	BGC-823	MNK28
阴性对照组	0.656 ± 0.023	0.633 ± 0.024	0.510 ± 0.034	0.614 ± 0.022
E2组(nmol/L)				
1000	0.623 ± 0.014 ^a	0.495 ± 0.034 ^a	0.407 ± 0.027 ^a	0.511 ± 0.017 ^a
100	0.901 ± 0.025 ^a	0.822 ± 0.026 ^a	0.574 ± 0.019 ^a	0.608 ± 0.013
10	0.840 ± 0.017 ^a	0.783 ± 0.013 ^a	0.617 ± 0.014 ^a	0.666 ± 0.019 ^a
1	0.733 ± 0.013 ^a	0.728 ± 0.015 ^a	0.530 ± 0.014	0.635 ± 0.013
0.1	0.672 ± 0.018	0.638 ± 0.021	0.521 ± 0.019	0.633 ± 0.014

^aP<0.05 vs 阴性对照组。

景区别不明显则判为阴性或弱阳性。

1.2.3 CCK-8法检测药物对肿瘤细胞增殖的影响: 取对数生长期的细胞, 0.25%胰蛋白酶消化, 活细胞计数>95%, 调整人胃癌细胞MNK45、SGC7901、MNK28和BGC823细胞悬液密度为 $2 \times 10^5/\text{mL}$, 接种于96孔培养板, 每孔90 μL , 置37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养, 24 h后分别加入终浓度为1000、100、10、1、0.1 nmol/L的苯甲酸雌二醇溶液各10 μL , 阴性对照组加DMEM 10 μL , 空白对照组加无血清DMEM 100 μL , 同时设溶媒对照组加1%甲醇10 μL , 设3个复孔。24 h后, 向每孔加入10 μL CCK溶液, 继续孵育4 h, 测定450 nm处的吸光度。细胞增殖能力大小以吸光度(A)值分析, 按公式计算细胞增殖率 = $(A_{\text{给药组}} - A_{\text{阴性对照组}}) / A_{\text{阴性对照组}} \times 100\%$, 实验重复3次。

1.2.4 半定量RT-PCR法检测PI9 mRNA表达: MN45、SGC-7901细胞经1 $\mu\text{mol/L}$ E2作用24 h后, 对照组设相同体积的1%甲醇, 按照RNA simple Total RNA Kit说明书操作提取总RNA, 紫外分光光度计测定RNA浓度和纯度后, 用ReverTra Ace逆转录酶合成cDNA, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。根据GenBank数据库设计引物: PI9 F: 5'-TTCATC-GGGCTTTCCAGT-3', R: 5'-TTTGAGACCCAG-GTGTTG-3', 引物大小217 bp; GAPDH F: 5'-AC-CACAGTCCATGCCATCAC-3', R: 5'-TCCAC-CACCCTGTTGCT GTA-3', 引物大小450 bp。PCR反应条件为94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 57 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 共35个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸5 min。2%琼脂糖凝胶电泳, Bio-Rad凝胶成像采集系统成像。

统计学处理 用SPSS13.0进行统计学分析, 计量资料采用mean ± SD表示, 组间比较采用单因素方差分析, 假定方差齐性采用LSD法检验, 未假定方差齐性采用Dunnett's T3法检验, $P < 0.05$

为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胃癌细胞株ER α 和ER β 的表达 ER α 和ER β 表达定位于细胞核, ER α 呈清晰的绿色颗粒, ER β 为红色颗粒。人胃癌细胞MNK45的ER α 呈强阳性表达, 而ER β 为阴性表达, SGC-7901细胞的ER α 呈弱阳性表达, ER β 为阴性表达, MNK28细胞ER α 和ER β 均未见表达, BGC-823的ER α 未见表达, 而ER β 表达则呈弱阳性(图1)。

2.2 E2对人胃癌细胞株增殖活性的影响 不同浓度的E2作用于MNK45、SGC-7901、MNK28及BGC-823胃癌细胞株24 h后, 采用CCK8法测定细胞增殖活性, 检测结果(表1)显示: 四株人胃癌细胞的生长均受到E2不同程度的影响, E2在0.1-100.0 nmol/L的浓度范围对四株胃癌细胞均具有促增殖活性, 而高浓度E2(1000 nmol/L)则对四株细胞均显示出抑制增殖的作用, 可能是由于雌激素浓度过高, 超出正常的生理浓度, 使渗透压和酸碱平衡紊乱, 其外环境不适合细胞的生长, 细胞动力学参数改变所致。MNK45和SGC-7901在E2 1-100 nmol/L范围内随药物浓度增高吸光度值逐渐增高, 与阴性对照组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$), 尤其在100 nmol/L浓度时促进增殖作用最明显, MNK45和SGC-7901的增殖率分别为 $37.34\% \pm 4.24\%$ 和 $23.70\% \pm 2.84\%$ 。BGC-823和MNK28的促增殖高峰浓度为10 nmol/L, 其增殖率分别为 $20.98\% \pm 3.12\%$ 和 $8.46\% \pm 0.94\%$, 而1 nmol/L E2的促增殖活性与阴性对照组比较差异无显著性($P = 0.214$, $P = 0.117$)。E2对PI9阳性表达细胞的促增殖活性强于PI9阴性表达细胞(图2)。

2.3 E2对PI9阳性胃癌细胞PI9 mRNA水平的影响 E2处理24 h后, RT-PCR产物电泳结果显

■ 相关报道

乳腺癌研究中已证实雌激素能促进PI9的表达, PI9能显著增加乳腺癌细胞对免疫细胞的耐受性, 阻止免疫细胞对乳腺癌细胞的杀伤作用。研究也发现雌激素拮抗剂他莫昔芬能抑制雌激素诱导的乳腺癌细胞中PI9的合成, 进而改善PI9介导的免疫耐受。

■ 创新盘点

本课题通过探讨雌激素及其受体与胃癌细胞PI9表达的关系,揭示雌激素促肿瘤作用的可能机制,即雌激素诱导胃癌细胞中内源性PI9的表达进而间接导致了胃癌细胞的免疫耐受。此外,研究成果对其他上皮肿瘤的研究也有一定的借鉴意义,对更深入认识上皮肿瘤的本质和特性开拓新的视野。

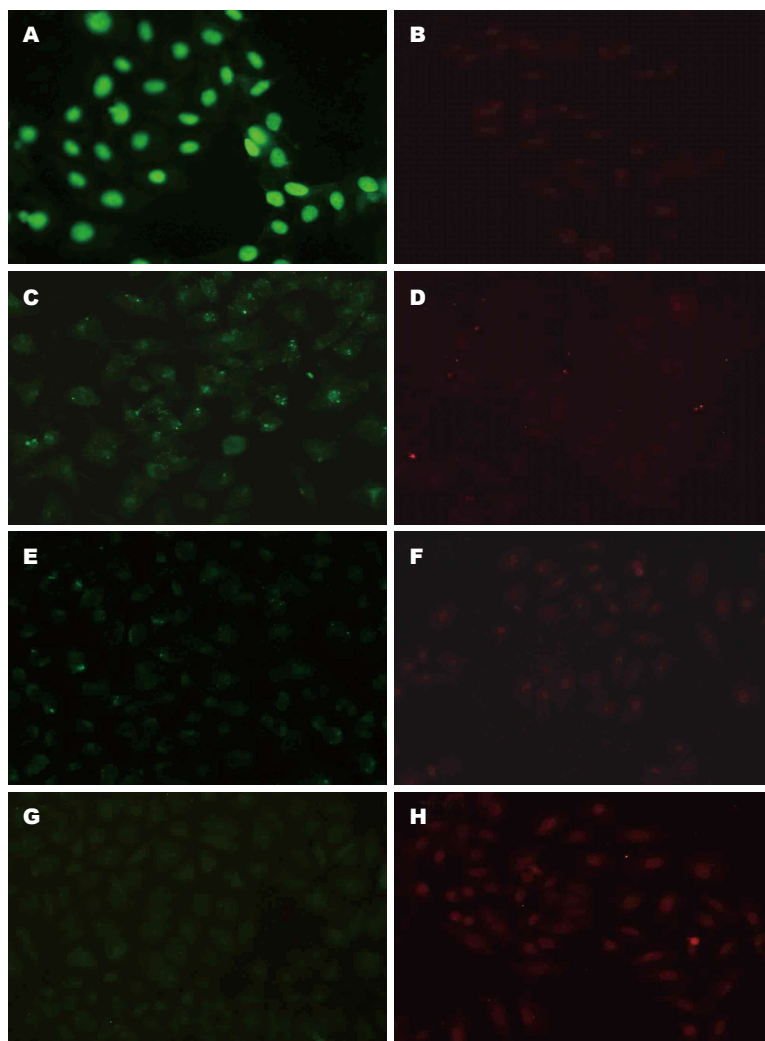


图1 免疫荧光检测MNK45、SGC-7901、MNK28及BGC-823细胞中ER α 、ER β 的表达(IF $\times 400$)。A: MNK45 ER α ; B: MNK45 ER β ; C: SGC-7901 ER α ; D: SGC-7901 ER β ; E: MNK28 ER α ; F: MNK28 ER β ; G: BGC-823 ER α ; H: BGC-823 ER β 。

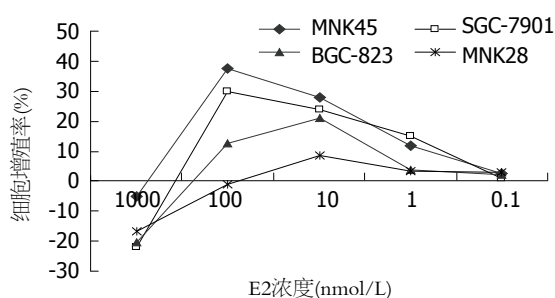


图2 E2对MNK45、SGC-7901、BGC-823和MNK28胃癌细胞的浓度增殖率曲线。

示: BGC-823和MNK28仍然未见PI9表达,而MNK45、SGC-7901细胞的PI9及GAPDH泳道中均出现阳性条带,PI9约在217 bp处产生阳性条带,GAPDH约在450 bp处出现阳性条带,均与预计扩增产物大小相一致。MNK45经E2作用后PI9 mRNA的相对灰度值(0.7158 ± 0.0734)较对照组(0.5401 ± 0.0653)明显升高($P = 0.014$),SGC-7901经E2作用后PI9 mRNA的相对灰度值(0.6216 ± 0.0465)较对照组(0.5445 ± 0.0387 , $P = 0.086$)升

高,但差异无统计学意义(图3)。

3 讨论

雌激素能促进某些胃癌的发生发展,但其确切机制仍不清楚。20世纪80年代,日本学者^[7]首先发现胃癌组织中有雌激素受体的表达,而正常胃癌粘膜中则未见表达,此后国内外学者^[8-10]应用不同的方法证实胃癌细胞ER表达的事实,作为非激素靶器官,ER阳性胃癌也被推测可能是雌激素依赖性肿瘤。目前多数研究^[11-13]提示ER阳性胃癌的恶性程度高,生物学行为不良,患者预后较差。本研究也发现在四株胃癌细胞株中,低分化胃癌细胞MNK45的ER α 呈强阳性表达,中分化胃癌细胞SGC-7901ER α 为弱阳性表达,另一株低分化胃癌细胞BGC-823的ER β 呈弱阳性表达,而高分化胃癌细胞MNK28的ER α 和ER β 均未见表达。雌激素能促进四株胃癌细胞的增殖活性,且对ER阳性的MNK45、SGC-7901和BGC-823胃癌细胞的促增殖活性强于ER阴性的

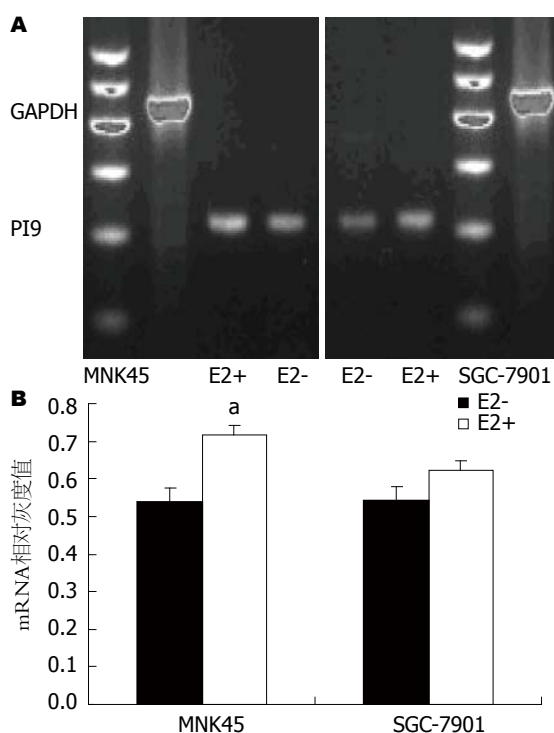


图3 E2对MNK45和SGC-7901人胃癌细胞株PI9 mRNA表达的影响。A: E2作用后PI9 mRNA电泳条带图; B: 柱状图, $P < 0.05$ vs 阴性对照组。

MNK28, 结果提示雌激素很可能通过与ER结合, 传递细胞生长的信号, 对胃癌的发生发展产生影响。

雌激素是诱导PI9表达的一个最重要因素。在雌激素 α 受体阳性的肝癌HepG2ER7细胞株发现雌激素能显著诱导PI9基因转录, 且雌激素的诱导作用不受其他激素调节因子的影响^[14]; Jiang等^[15,16]在乳腺癌研究中进一步证实雌激素能促进PI9的表达, 在一定浓度范围内随着雌激素浓度的增加PI9表达也增加。进一步研究发现^[2], PI9基因上独特的雌激素反应单元(estrogen response unit, ERU)是雌激素调控PI9表达的关键部位。美国伊利诺州大学的研究者^[6,17]首次发现雌激素诱导的PI9大量合成能显著增加乳腺癌细胞对免疫细胞的耐受性, 阻止免疫细胞对乳腺癌细胞的杀伤作用。研究也发现雌激素拮抗剂他莫昔芬(tamoxifen, TAM)^[16]能抑制雌激素诱导的乳腺癌细胞中PI9的合成, 进而改善PI9介导的免疫耐受。

雌激素能促进某些胃癌的发生发展, 雌激素及其受体的作用机制与PI9有关吗? 目前还未见相关报道。本研究发现前期筛选出的PI9阳性表达细胞(MNK45和SGC-7901)均为ER α 阳性表达细胞, 在E2作用后MNK45和SGC-7901的PI9表

达进一步增强, 且E2作用后MNK45和SGC-7901细胞增殖活性亦明显增强, 实验结果提示雌激素与胃癌细胞上ER结合后能明显促进胃癌细胞株的增殖活性, 其促增殖作用与其诱导PI9的表达密切相关。本课题通过探讨雌激素及其受体与胃癌细胞PI9表达的关系, 初步揭示了雌激素促肿瘤作用的可能机制, 雌激素可能通过与肿瘤细胞上ER结合后诱导PI9 mRNA的表达, 进而抑制PFP/GrB途径而介导免疫逃逸, 即雌激素间接导致了胃癌细胞的免疫耐受, 其作用及其机制还有待进一步的证实。

4 参考文献

- Bird CH, Sutton VR, Sun J, Hirst CE, Novak A, Kumar S, Trapani JA, Bird PI. Selective regulation of apoptosis: the cytotoxic lymphocyte serpin proteinase inhibitor 9 protects against granzyme B-mediated apoptosis without perturbing the Fas cell death pathway. *Mol Cell Biol* 1998; 18: 6387-6398 [PMID: 9774654]
- Krieg AJ, Krieg SA, Ahn BS, Shapiro DJ. Interplay between estrogen response element sequence and ligands controls in vivo binding of estrogen receptor to regulated genes. *J Biol Chem* 2004; 279: 5025-5034 [PMID: 14617632]
- Bots M, VAN Bostelen L, Rademaker MT, Offringa R, Medema JP. Serpins prevent granzyme-induced death in a species-specific manner. *Immunol Cell Biol* 2006; 84: 79-86 [PMID: 16405655]
- 熊玉霞, 周业江. PI9和GrB在胃癌细胞表达的生物学意义. 中国生理学会2011心血管生理学术会议论文集 2012
- 王俊伟, 周业江. PI9和GrB在肿瘤发生发展中作用的研究进展. 中国普通外科杂志 2011; 20: 88-91
- Jiang X, Ellison SJ, Alarid ET, Shapiro DJ. Interplay between the levels of estrogen and estrogen receptor controls the level of the granzyme inhibitor, proteinase inhibitor 9 and susceptibility to immune surveillance by natural killer cells. *Oncogene* 2007; 26: 4106-4114 [PMID: 17237823]
- Tokunaga A, Kojima N, Andoh T, Matsukura N, Yoshiyasu M, Tanaka N, Ohkawa K, Shirota A, Asano G, Hayashi K. Hormone receptors in gastric cancer. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1983; 19: 687-689 [PMID: 6683640]
- Ryu WS, Kim JH, Jang YJ, Park SS, Um JW, Park SH, Kim SJ, Mok YJ, Kim CS. Expression of estrogen receptors in gastric cancer and their clinical significance. *J Surg Oncol* 2012; 106: 456-461 [PMID: 22422271 DOI: 10.1002/jso.23097]
- Chandanos E, Rubio CA, Lindblad M, Jia C, Tsolakis AV, Warner M, Gustafsson JA, Lagergren J. Endogenous estrogen exposure in relation to distribution of histological type and estrogen receptors in gastric adenocarcinoma. *Gastric Cancer* 2008; 11: 168-174 [PMID: 18825311 DOI: 10.1007/s10120-008-0475-6]
- Motohashi M, Wakui S, Muto T, Suzuki Y, Shirai M, Takahashi H, Hano H. Cyclin D1/cdk4, estrogen receptors α and β , in N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced rat gastric carcinogenesis:

■应用要点

研究结果提示以雌激素为纽带将胃癌的内分泌机制和免疫耐受机制联系起来, 研究成果不仅为雌激素受体拮抗剂的临床应用提供有力的证据, 同时也为其他PI9抑制剂的开发提供参考。

■同行评价

本文内容新颖, 设计科学, 具有一定指导意义.

- immunohistochemical study. *J Toxicol Sci* 2011; 36: 373-378 [PMID: 21628965]
- 11 王绪明, 刘晶晶, 邓昊, 陈莹, 刘丽江. ER- α 36对胃癌SGC7901细胞在裸鼠体内生长的影响. *世界华人消化杂志* 2011; 19: 2919-2924
- 12 Kim MJ, Cho SI, Lee KO, Han HJ, Song TJ, Park SH. Effects of 17 β -estradiol and estrogen receptor antagonists on the proliferation of gastric cancer cell lines. *J Gastric Cancer* 2013; 13: 172-178 [PMID: 24156037 DOI: 10.5230/jgc.2013.13.3.172]
- 13 Kretzer NM, Cherian MT, Mao C, Aninye IO, Reynolds PD, Schiff R, Hergenrother PJ, Nordeen SK, Wilson EM, Shapiro DJ. A noncompetitive small molecule inhibitor of estrogen-regulated gene expression and breast cancer cell growth that enhances proteasome-dependent degradation of estrogen receptor α . *J Biol Chem* 2010; 285: 41863-41873 [PMID: 21041310 DOI: 10.1074/jbc.M110.183723]
- 14 Kannan-Thulasiraman P, Shapiro DJ. Modulators of inflammation use nuclear factor-kappa B and activator protein-1 sites to induce the caspase-1 and granzyme B inhibitor, proteinase inhibitor 9. *J Biol Chem* 2002; 277: 41230-41239 [PMID: 12177049]
- 15 Jiang X, Orr BA, Kranz DM, Shapiro DJ. Estrogen induction of the granzyme B inhibitor, proteinase inhibitor 9, protects cells against apoptosis mediated by cytotoxic T lymphocytes and natural killer cells. *Endocrinology* 2006; 147: 1419-1426 [PMID: 16306080]
- 16 Jiang X, Patterson NM, Ling Y, Xie J, Helferich WG, Shapiro DJ. Low concentrations of the soy phytoestrogen genistein induce proteinase inhibitor 9 and block killing of breast cancer cells by immune cells. *Endocrinology* 2008; 149: 5366-5373 [PMID: 18669594 DOI: 10.1210/en]
- 17 Cunningham TD, Jiang X, Shapiro DJ. Expression of high levels of human proteinase inhibitor 9 blocks both perforin/granzyme and Fas/Fas ligand-mediated cytotoxicity. *Cell Immunol* 2007; 245: 32-41 [PMID: 17490628]

编辑 田滢 电编 闫晋利



三七总皂甙对肝癌细胞株、甲胎蛋白异质体及高尔基体糖蛋白-73表达的影响

裴旭东, 翟玉峰, 张怀宏

裴旭东, 翟玉峰, 张怀宏, 南阳市中心医院感染肝病科 河南省南阳市 473009

裴旭东, 副主任医师, 主要从事感染性疾病和肝病的研究。

作者贡献分布: 裴旭东参与课题实施、数据分析、结果总结; 张怀宏参与课题具体实施; 翟玉峰为课题设计者。

通讯作者: 翟玉峰, 主任医师, 硕士生导师, 473009, 河南省南阳市工农路312号, 南阳市中心医院感染肝病科。

pxd_xiang@126.com

电话: 0377-61660521

收稿日期: 2014-05-31 修回日期: 2014-06-20

接受日期: 2014-07-05 在线出版日期: 2014-08-28

Influence of panax notoginsenosides on AFP-L3 and GP-73 expression in hepatoma cell lines

Xu-Dong Pei, Yu-Feng Zhai, Huai-Hong Zhang

Xu-Dong Pei, Yu-Feng Zhai, Huai-Hong Zhang, Department of Infectious Diseases, Nanyang Central Hospital, Nanyang 473009, Henan Province, China

Correspondence to: Yu-Feng Zhai, Chief Physician, Department of Infectious Diseases, Nanyang Central Hospital, 312 Gongnong Road, Nanyang 473009, Henan Province, China. pxd_xiang@126.com

Received: 2014-05-31 Revised: 2014-06-20

Accepted: 2014-07-05 Published online: 2014-08-28

Abstract

AIM: To study the effect of panax notoginsenosides (PNS) on the expression of alpha-fetoprotein-L3 (AFP-L3) and Golgi glucoprotein 73 (GP-73) in hepatoma cell lines.

METHODS: Hepatoma cell lines SMMC-7721 and Bel-7402 were used. The cells were divided into different groups and treated with 5-fluorouracil (5-Fu) or different concentrations of PNS (10-400 $\mu\text{g/mL}$) for 120 h. Untreated cells were used as controls. MTT assay was used to detect cell activity, and enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect AFP-L3 and GP-73 levels.

RESULTS: PNS at concentrations $> 200 \mu\text{g/mL}$ showed a significant inhibitory effect on hepatoma cell growth. PNS at a concentration of

400 $\mu\text{g/mL}$ had comparable inhibitory effect to 5-Fu at 40 $\mu\text{g/mL}$. PNS at concentrations of both 200 and 400 $\mu\text{g/mL}$ significantly inhibited GP-73 activity in hepatoma cells, and the inhibitory effect of PNS at 400 $\mu\text{g/mL}$ was significantly higher than that of 5-Fu at 40 $\mu\text{g/mL}$ ($P < 0.05$). PNS at 400 $\mu\text{g/mL}$ could significantly suppress AFP-L3 in hepatoma cells compared with controls ($P < 0.01$), and the effect was similar to that of 5-Fu.

CONCLUSION: PNS can inhibit hepatoma cell proliferation and suppress AFP-L3 and GP-73 activity.

© 2014 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: Hepatoma cell line; Alpha-fetoprotein-L3; Golgi glucoprotein 73; Panax notoginsenosides

Pei XD, Zhai YF, Zhang HH. Influence of panax notoginsenosides on AFP-L3 and GP-73 expression in hepatoma cell lines. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(24): 3619-3624 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/3619.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v22.i24.3619>

摘要

目的: 研究三七总皂甙(panax notoginsenosides, PNS)对不同肝癌细胞株、甲胎蛋白异质体(alpha-fetoprotein-L3, AFP-L3)分泌及高尔基体糖蛋白-73(Golgi glucoprotein 73, GP-73)的影响。

方法: 以肝癌细胞HepG2两种细胞株SMMC-7721和Bel-7402作为研究对象, 分为空白对照组、5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-Fu)组和不同浓度梯度(10-400 $\mu\text{g/mL}$)的PNS组, 共培养120 h, 利用MTT比色测定法检测细胞活性, ELISA及细胞分化法检测AFP-L3及GP-73活性。

结果: PNS在 $>200 \mu\text{g/mL}$ 时可表现出对两种肝

■背景资料

三七总皂甙(panax notoginsenosides, PNS)是从五加科人参属草本植物三七中提取的有效成分, 是多系统靶向药物, PNS不但具有良好的止血、活血化瘀双向药理作用, 还具有明显促进肝细胞增殖再生, 减轻肝细胞炎症, 抑制肝细胞纤维化。近年研究表明, PNS能够调控人体肝脏卵圆细胞代谢, 降低肝癌细胞活化基因的表达, 从而能够有效抑制肝癌细胞的生长。还有学者用小鼠移植性肿瘤模型对肝癌实体型HepG2进行了研究, 认为PNS对HepG2有良好的抗癌作用。

■同行评议者

何向辉, 教授, 天津医科大学总医院普通外科

■ 研发前沿

原发性肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)的早期诊断仍是目前肝癌诊治研究的热点之一。传统上甲胎蛋白异质体(alpha-fetoprotein-L3, AFP-L3)是诊断原发性肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)的主要方式之一,虽然在疾病的临床诊断中具有一定的应用价值,然而特异性和敏感性不强,可能出现的漏诊的现象。

癌细胞株增殖的抑制,高浓度PNS(400 $\mu\text{g/mL}$)对细胞活性影响较大,抑制率与5-Fu(40 $\mu\text{g/mL}$)的作用相似。PNS组200、400 $\mu\text{g/mL}$ 剂量均明显抑制肝癌两种细胞株GP-73活性,且剂量400 $\mu\text{g/mL}$ 的抑制作用与5-Fu组比较有显著差异($P<0.05$)。PNS组剂量达400 $\mu\text{g/mL}$ 时才能有效抑制肝癌两种细胞株AFP-L3活性,与对照组比较差异显著($P<0.01$);且400 $\mu\text{g/mL}$ 剂量的抑制作用与5-Fu组没有显著差异。

结论: PNS具有抑制肝癌细胞株的生长,降低AFP-L3与GP-73活性,肝癌细胞基因分化,诱导其在体外向正常肝细胞分化,且效果与剂量-时间呈正相关。

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词: 肝癌细胞株; 甲胎蛋白异质体; 高尔基体糖蛋白-73; 三七总皂甙

核心提示: 本研究发现,三七总皂甙(panax notoginsenosides, PNS)能够抑制人肝癌细胞SMMC-7721增殖、诱导细胞凋亡或坏死,并且随着药物浓度的增加而增强;同时抑制甲胎蛋白异质体(lectin-reactive alpha-fetoprotein)、高尔基体糖蛋白-73(Golgi protein-73)的分泌,通过作用于一系列的分子信号通路发挥抗肝癌细胞生长作用。但就PNS对肝癌细胞株抑制和一系列作用的机制尚未完全明确,需作进一步研究。

裴旭东, 翟玉峰, 张怀宏. 三七总皂甙对肝癌细胞株、甲胎蛋白异质体及高尔基体糖蛋白-73表达的影响. 世界华人消化杂志 2014; 22(24): 3619-3624 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/3619.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i24.3619>

0 引言

三七总皂甙(panax notoginsenosides, PNS)是从五加科人参属草本植物三七中提取的有效成分,是多系统靶向药物, PNS不但具有良好的止血、活血化瘀双向药理作用,还具有明显促进肝细胞增殖再生,减轻肝细胞炎症,抑制肝细胞纤维化。近年研究表明^[1] PNS能够调控人体肝脏卵圆细胞代谢,降低肝癌细胞活化基因的表达,从而能够有效抑制肝癌细胞的生长^[2]。还有学者用小鼠移植性肿瘤模型对肝癌实体型HepG2进行了研究,认为PNS对HepG2有良好的抗癌作用^[3]。本研究选择两种人肝癌细胞株(SMMC-7721, Bel-7402),观察PNS对体外培养肝癌细胞株生长、甲胎蛋白异质体(lectin-

reactive alpha-fetoprotein, AFP-L3)及高尔基体糖蛋白-73(Golgi protein 73, GP-73)分泌的影响。现报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料 人肝癌SMMC-7721细胞株和人肝癌Bel-7402细胞株细胞来源于新乡医学院免疫学教研室。三七总皂甙注射液(250 mg/支,昆明制药集团股份有限公司,纯度为95%)。5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-Fu)注射液(250 g/10 mL,上海旭东海普药业有限公司)。细胞培养基含10%FBS的DMEM培养基由Gibco公司提供。GP-73蛋白酶联免疫吸附检测试剂盒由北京热景生物技术有限公司提供。噻唑蓝(margaret blue, MTT Sigma公司)。AFP-L3检测Roche全自动化学发光定量分析,使用同型配套试剂; 96孔培养板(Corning公司); BH-2型酶标仪(美国Bio-rad公司)。免疫组织化学试剂主要包括: GP-73免疫组织化学染色法试剂盒(深圳联科公司); DAB显色剂(福州迈新生物技术开发有限公司); FACS Canto II型流式细胞仪(美国BD公司); 酶联免疫检测仪(型酶联免疫仪(美国Sigma公司); 751分光光度计(上海分析仪器厂)。

1.2 方法

1.2.1 细胞株培养: 肝癌细胞HepG2细胞的两种细胞株BEL-7402、SMMC-7721用含有10%胎牛血清的DMEM培养基,在37℃、5%CO₂浓度的孵箱中培养,不表达乙型肝炎表面抗原(hepatitis B surface antigen, HBsAg),观察并记录微孔板中细胞生长情况,并对细胞密度进行检测。按照1:2的比例更换培养液,提高细胞的存活率。取对数生长期的细胞,用胰酶消化洗脱,进行细胞计数。调整好细胞浓度后,均匀地接种于96孔培养板,每孔种植约10000个细胞,每孔培养基体积100 μL ,取空白孔不接种细胞为系统空白孔,置于37℃温度,浓度为5%的CO₂空气中保存24 h,使细胞展开贴壁。

1.2.2 细胞增殖抑制试验(MTT法): HepG2细胞分别接种于含10%胎牛血清的DMEM培养基和RPMI 1640培养基中,37℃、5%CO₂、饱和湿度的培养箱中培养,每3天换液传代1次。将HepG2细胞调整为 $1.0 \times 10^4/\text{mL}$ 接种到96孔细胞培养板中,每孔0.1 mL,4 h后加入PNS,终浓度分别为10、50、100、200、400 $\mu\text{g/mL}$,并设阳性对照药5-Fu(40 $\mu\text{g/mL}$)组和溶媒对照组,每个浓度均设6个复孔。分别培养24、48、

表 1 PNS体外对人肝癌HepG2 SMMC-7721和Bel-7402细胞生长的影响 ($n = 3$, mean \pm SD)

分组	药物剂量 ($\mu\text{g/mL}$)	SMMC-7721		Bel-7402		肝癌HepG2
		A_{570}	抑制率(%)	A_{570}	抑制率(%)	A_{570}
对照组	0	0.449 \pm 0.055	0	0.517 \pm 0.014	0	0.430 \pm 0.068
5-Fu	40	0.268 \pm 0.023	67.5	0.204 \pm 0.013	60.4	0.216 \pm 0.102
PNS	10	0.421 \pm 0.028 ^a	36.6	0.408 \pm 0.027 ^a	20.8	0.469 \pm 0.034
	50	0.409 \pm 0.011 ^b	38.8	0.353 \pm 0.028 ^b	31.5	0.475 \pm 0.048
	100	0.378 \pm 0.002 ^b	40.3	0.231 \pm 0.031 ^b	55.2	0.447 \pm 0.055
	200	0.289 \pm 0.016 ^b	47.4	0.221 \pm 0.032 ^b	57.1	0.452 \pm 0.218
	400	0.254 \pm 0.009	64.8	0.202 \pm 0.032	60.3	0.452 \pm 0.287

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 对照组. 5-Fu: 5-氟尿嘧啶; PNS: 三七总皂甙.

72、96、120 h后, 取出培养板, 每孔加入20 μL MTT(5 g/L)继续培养4 h, 经洗涤离心弃去上清, 并将其置入培养液中, 将血清与培养液搅拌均匀, 10 min后, 抽取上清液检测FP-L3和GP-73, 再利用MTT比色法^[4]测量 A_{570} 值, 根据相关计算公式计算肝癌细胞增殖的抑制率, 实验重复6次. HepG2细胞的生长抑制率: 抑制率(%) = $(1 - A_{\text{PNS组}} / A_{\text{5-Fu组}}) \times 100\%$.

1.2.3 AFP-L3和GP-73含量的测定: AFP-L3浓度测定采用ELISA双抗体夹心法, AFP-L3浓度结果以ng/mL表示, >35 ng/mL作为临界值. GP-73测定采用双抗体夹心法(ADL Biotech Dev Co, USA)测定GP-73含量: 取GP-73抗体置于微孔板中, 制成固相载体. 取血清标准置入微孔板中, 促使GP-73抗体与血清中的GP-73充分结合, 清洗微孔板, 取生物素化GP-73抗体置入微孔板中, 待其充分结合后, 再使用清水冲洗微孔板. 滴入HRP亲和素, 洗净微孔板后, 滴入TMB待其变成蓝色后, 滴入稀硫酸, 使其终止反应, 终止反应后的颜色为黄色. 记录TMB颜色的深浅, 并利用酶标仪570 nm处检测其 A 值, 浓度为6.25 $\mu\text{g/mL}$ 并依次在最终值上递增1倍, 最后递增值为200 $\mu\text{g/mL}$. 建立坐标轴, 其中吸光度为纵向坐标, S1-S6浓度为横向坐标, 制作log-log双对数曲线. 根据曲线表达方式确定计算标准, 根据样品中的GP-73浓度与 A 值成正比, 计算标本GP-73浓度($\mu\text{g/mL}$).

统计学处理 各组实验数据均重复3次以上. 计量资料用mean \pm SD表示, 各组间数据的比较, 多组间比较采用方差分析, 两样本均数的比较采用 t 检验, 数据统计采用SPSS17.0统计软件处理. $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 PNS和5-Fu对不同体外人肝癌细胞生长的影响 MTT实验显示, 不同浓度PNS和5-Fu均能明显抑制SMMC-7721细胞增殖, 具有浓度依赖性, 随着浓度增加对两种人肝癌SMMC-7721和Bel-7402细胞抑制率得到增强. 其中低浓度PNS(10、50 $\mu\text{g/mL}$)对SMMC-7721和Bel-7402细胞活性影响较小, 高浓度PNS(400 $\mu\text{g/mL}$)对细胞活性影响较大, 抑制率与5-Fu(40 $\mu\text{g/mL}$)的作用相似(分别为67.5%、64.8%和60.4%、60.3%), 与对照组比较差异有统计学意义. 其中PNS(400 $\mu\text{g/mL}$)对Bel-7402细胞株的抑制作用亦与5-Fu组的作用相似, 较SMMC-7721细胞株的抑制率较高, 但无统计学差异(表1). PNS组对正常小鼠肝细胞无明显的影响, 而5-Fu组则抑制正常小鼠肝细胞的增殖.

2.2 不同浓度PNS各时间段对不同体外人肝癌细胞生长的影响 从图1可以看出: 6个浓度组处理HepG2细胞24-120 h, 绘制生长曲线, 对人肝癌SMMC-7721细胞株和Bel-7402细胞株的抑制, 随浓度增加抑制率递增, 均在400 $\mu\text{g/mL}$ 时达到最大抑制率, 同时随着作用时间的增加而增强. 但对正常的细胞增殖和抑制均不明显, 在第120 h后SMMC-7721细胞株的抑制率和Bel-7402细胞株的抑制率与HepG2的比较均有显著差异(均 $P < 0.01$), 且对SMMC-7721细胞株的抑制率优于对Bel-7402细胞株的抑制率, 并随时间延长而增强.

2.3 PNS对人肝癌HepG2细胞AFP-L3和GP-73含量的影响 结果表明, PNS组对SMMC-7721细胞株和Bel-7402细胞株的抑制呈剂量依赖性, 200、400 $\mu\text{g/mL}$ 剂量均明显抑制肝癌两种细胞株GP-73活性, 且剂量400 $\mu\text{g/mL}$ 的抑制作

■相关报道

Ohashi等发现机体正常情况下, 高尔基体糖蛋白-73(Golgi glucoprotein 73, GP-73)是高尔基体顺面膜囊上的一种整合膜蛋白, 是一种与病毒性肝炎感染及肝细胞恶性转化密切相关的糖蛋白, 肝细胞癌变呈过表达状态, 在肝癌组织及外周血中明显增高, 其可以作为肝癌标志物, GP-73阳性细胞灶可以被认为是肝细胞癌前病变.

■同行评价

本研究选题科学, 结果可信, 结论客观, 具有一定的学术价值。

表 2 PNS 对人肝癌HepG2细胞GP-73含量和AFP-L3含量的影响 (mean \pm SD, $n = 2$, g/mL)

分组	药物剂量 (μ g/mL)	GP-73		AFP-L3	
		SMMC-7721	Bel-7402	SMMC-7721	Bel-7402
对照组	0	95.81 \pm 59.60	96.80 \pm 61.30	42.09 \pm 8.17	51.62 \pm 7.99
5-Fu	20	52.23 \pm 56.84	51.46 \pm 36.25	22.32 \pm 5.54	23.65 \pm 6.01
PNS	10	96.02 \pm 55.33	95.30 \pm 52.33	42.33 \pm 7.86	44.52 \pm 5.69
	50	90.54 \pm 49.32	92.37 \pm 48.68	40.52 \pm 8.02	40.36 \pm 6.53
	100	88.31 \pm 47.03	86.53 \pm 54.88	35.98 \pm 7.82	36.53 \pm 7.21
	200	60.03 \pm 39.88 ^a	64.28 \pm 38.53 ^a	30.53 \pm 6.59 ^a	31.55 \pm 6.24 ^a
	400	34.03 \pm 25.44 ^{bc}	40.55 \pm 24.62 ^{bc}	20.71 \pm 8.67 ^b	22.33 \pm 5.91 ^b

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 对照组; ^c $P < 0.05$ vs 5-Fu. 5-Fu: 5-氟尿嘧啶; PNS: 三七总皂甙; AFP-L3: 甲胎蛋白异质体; GP-73: 高尔基体糖蛋白-73.

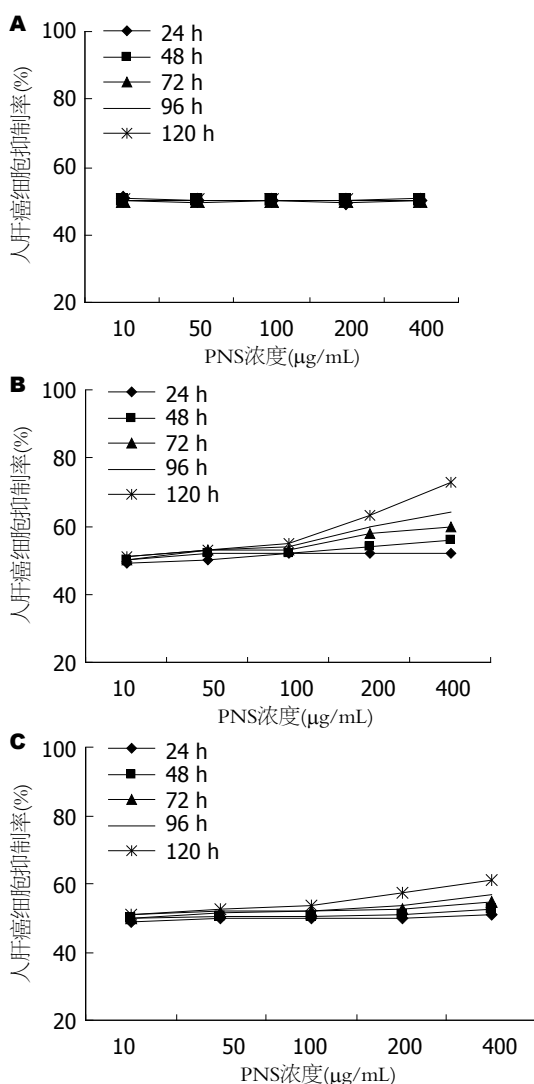


图 1 不同浓度PNS对人肝癌各细胞株的抑制率. A: 不同浓度PNS对人肝癌HepG2的抑制率; B: 不同浓度PNS对人肝癌SMMC-7721细胞株的抑制率; C: 不同浓度PNS对人肝癌Bel-7402细胞株的抑制率. PNS: 三七总皂甙.

用与5-Fu组比较差异有统计学意义($P < 0.05$); 同

时对SMMC-7721细胞株GP-73活性抑制率好于Bel-7402细胞株($P < 0.05$). PNS剂量400 μ g/mL时才能有效抑制肝癌两种细胞株AFP-L3活性; 且400 μ g/mL剂量的抑制作用与5-Fu组差异无统计学意义, 同时对SMMC-7721细胞株AFP-L3活性抑制率与Bel-7402细胞株相比较, 差异无统计学意义(表2).

3 讨论

原发性肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)的早期诊断仍是目前肝癌诊治研究的热点之一. 传统上AFP是诊断HCC的主要方式之一, 虽然在疾病的临床诊断中具有一定的应用价值, 然而特异性和敏感性不强, 可能出现的漏诊的现象. 对此, 临床开始探求更加有效的诊断方式. 随着学者对HCC的深入研究, 发现GP-73和AFP-L3是能够清楚反应患者血清值的变化情况^[5].

AFP-L3主要在肝癌细胞中的检出率相对较高, 他不仅会破坏肝细胞免疫功能结构, 还能增强肝癌细胞活性, 具有较高的敏感性, 能够应用于肝癌早期的诊断中^[6]. AFP-L3阳性的肝癌细胞分离速度相对较快, 会造成患者病情呈严重化发展. 此外, AFP-L3阳性还可能造成肝癌细胞转移, 累及其他肾脏组织. AFP-L3阳性与AFP无明显关系, 但是与肿瘤直径呈正相关. 对此, 有学者认为AFP可能与肝癌的发生发展存在直接关系^[7]. 有研究报道, PNS不仅能够降低肿瘤细胞活性, 其中人参皂苷Rb1也可达到抗肝癌的目的. Yamamoto等^[8]学者观察GP-1对小鼠肝癌的治疗效果, 利用GP-1灌胃给药治疗, 了解该药物对Heps的抑制作用, 研究结果显示, 对

Heps的抑制率可高达62%^[9]。本文结果表明, 不仅能够降低人肝癌细胞株的活性, 还能够减少SMMC-7721对细胞的分泌量, 能够有效控制疾病的发展。临床研究表明, 取浓度 $\geq 200 \mu\text{g/mL}$ 的PNS用于肝癌的治疗中时, 发现该药物能够有效HepG2、BEL-7402等增殖、转移等, 且持续取高浓度PNS治疗, 对肝癌细胞的抑制作用越强。

Ohashi等^[10]发现机体正常情况下, GP-73是高尔基体顺面膜囊上的一种整合膜蛋白, 是一种与病毒性肝炎感染及肝细胞恶性转化密切相关的糖蛋白, 肝细胞癌变呈过表达状态, 在肝癌组织及外周血中明显增高, 其可以作为肝癌标志物, GP-73阳性细胞灶可以被认为是肝细胞癌前病变^[11]。三七的主要活性成分是人参皂苷Rb1、Rg1、Rg3、Rh2以及三七皂苷R1等。毛一雷等^[12]也发现GP-73在肝癌患者中的水平最高, 肝癌患者中的敏感性达到76.9%, 特异性达到92.8%; 而AFP的敏感性仅为48.6%。人参皂苷Rb1具有抑制肿瘤增殖、增加化疗药物的敏感性、逆转肿瘤细胞耐药等作用。人参皂苷Rg1可通过调节癌基因和抑癌基因表达而抑制骨肉瘤细胞的增殖^[13], 本研究发现PNS可明显降低SMMC-7721细胞恶性程度指标AFP-L3浓度和GP-73活力, 且在一定范围内呈显著量效关系, 通过阻断癌细胞基因分化, 使基因表达的表型向正常方向逆。本实验还发现PNS组对SMMC-7721细胞株GP-73和AFP-L3活性抑制率要优于度Bel-7402细胞株的抑制, 对SMMC-7721细胞株GP-73活性抑制率优于5-Fu组。文玲玲等^[14]发现人参皂苷能够通过降低SMMC-7721细胞活性, 减少其对机体细胞结构的破坏, 还能够降低淋巴细胞、SMMC-7721等的黏附作用, 不仅能够提高手术治疗效果, 降低病情复发率, 还能够有效抑制肝癌细胞的转移, 避免累积其他肾脏组织等, 本实验研究结果与其相符。针对上述研究成果, 本文认为, 可加大对PNS的研发, 达到提高肝癌患者预后生存质量的目的。

目前, 尽管活血化瘀药被大量运用于肿瘤防治, 但该类药物的双向调节机制在临床上尚有争议的问题, 但本研究发现, PNS能够抑制人肝癌细胞SMMC-7721增殖、诱导细胞凋亡或坏死, 并且随着药物浓度的增加而增强; 同时抑制AFP-L3、GP-73的分泌^[15], 通过作用于一系列的

分子信号通路发挥抗肝癌细胞生长作用。但就PNS对肝癌细胞株抑制和一系列作用的机制尚未完全明确, 需作进一步研究。

4 参考文献

- 1 Shanbhogue AK, Karnad AB, Prasad SR. Tumor response evaluation in oncology: current update. *J Comput Assist Tomogr* 2010; 34: 479-484 [PMID: 20657213 DOI: 10.1097/RCT.0b013e3181db2670]
- 2 李元青, 马成杰, 陈信. 活性成分抗肿瘤作用及其免疫学机制初探. *北京中医药大学学报(中医临床版)* 2008; 15: 17-19
- 3 Stefaniuk P, Cianciara J, Wiercinska-Drapalo A. Present and future possibilities for early diagnosis of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 418-424 [PMID: 20101765]
- 4 方福德, 周吕, 丁廉. 现代医学实验技巧全书. 第4版. 北京: 北京医科大学, 中国协和医科大学联合出版社, 2012: 312-334
- 5 张丹, 李远, 徐泽强. 外周血肝癌标志物在肝癌诊断中的价值. *中华实用诊断与治疗杂志* 2011; 25: 742-744
- 6 徐万菊, 韩玉刚, 张芋甲. 胎蛋白异质体与高尔基体蛋白73在甲胎蛋白低浓度肝细胞癌诊断中的意义. *中华检验医学杂志* 2012; 35: 174-176
- 7 Leibowitz B, Yu J. Mitochondrial signaling in cell death via the Bcl-2 family. *Cancer Biol Ther* 2010; 9: 417-422 [PMID: 20190564]
- 8 Yamamoto K, Imamura H, Matsuyama Y, Kume Y, Ikeda H, Norman GL, Shums Z, Aoki T, Hasegawa K, Beck Y, Sugawara Y, Kokudo N. AFP, AFP-L3, DCP, and GP73 as markers for monitoring treatment response and recurrence and as surrogate markers of clinicopathological variables of HCC. *J Gastroenterol* 2010; 45: 1272-1282 [PMID: 20625772 DOI: 10.1007/s00535-010-0278-5]
- 9 Yamamoto K, Imamura H, Matsuyama Y, Hasegawa K, Beck Y, Sugawara Y, Makuuchi M, Kokudo N. Significance of alpha-fetoprotein and des-gamma-carboxy prothrombin in patients with hepatocellular carcinoma undergoing hepatectomy. *Ann Surg Oncol* 2009; 16: 2795-2804 [PMID: 19669841 DOI: 10.1245/s10434-009-0618-y]
- 10 Ohashi Y, Iijima H, Yamaotsu N, Yamazaki K, Sato S, Okamura M, Sugimoto K, Dan S, Hirano S, Yamori T. AMF-26, a novel inhibitor of the Golgi system, targeting ADP-ribosylation factor 1 (Arf1) with potential for cancer therapy. *J Biol Chem* 2012; 287: 3885-3897 [PMID: 22158626 DOI: 10.1074/jbc.M111.316125]
- 11 王寿明, 高蕾, 于乐成. 甲胎蛋白异质体对肝癌诊断及疗效评估价值研究进展. *实用肝脏病杂志* 2011; 14: 479-481
- 12 毛一雷, 杨华瑜, 徐海峰. 新的肝癌血清标记物GP73在肝癌诊断中的初步研究. *中华医学杂志* 2008; 88: 948-951
- 13 Amabeoku GJ, Bamuamba K. Evaluation of the effects of *Olea europaea* L. subsp. *africana* (Mill.) P.S. Green (Oleaceae) leaf methanol extract against castor oil-induced diarrhoea in mice. *J Pharm Pharmacol* 2010; 62: 368-373 [PMID: 20487221 DOI: 10.1211/jpp.62.03.0012]
- 14 文玲玲, 肖斌, 周辉. 三七总皂苷对三种不同人肝癌细胞株增殖的影响. *肿瘤药学* 2013; 2: 100-125
- 15 dos Santos DA, de C Braga PA, da Silva MF, Fer-

nandes JB, Vieira PC, Magalhães AF, Magalhães EG, Marsaioli AJ, de S Moraes VR, Rattray L, Croft SL. Anti-African trypanocidal and antimalarial activity

of natural flavonoids, dibenzoylmethanes and synthetic analogues. *J Pharm Pharmacol* 2009; 61: 257-266 [PMID: 19178775 DOI: 10.1211/jpp/61.02.0017]

编辑 郭鹏 电编 闫晋利



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》出版流程

本刊讯 《世界华人消化杂志》[ISSN 1009-3079 (print), ISSN 2219-2859 (online), DOI: 10.11569]是一份同行评议性和开放获取(open access, OA)的旬刊, 每月8、18、28号按时出版. 具体出版流程介绍如下:

第一步 作者提交稿件: 作者在线提交稿件(<http://www.baishideng.com/wcjd/ch/index.aspx>), 提交稿件中出现问题可以发送E-mail至submission@wjgnet.com咨询, 编务将在1个工作日内回复.

第二步 审稿: 送审编辑对所有来稿进行课题查新, 并进行学术不端检测, 对不能通过预审的稿件直接退稿, 通过预审的稿件送交同行评议专家进行评议. 编辑部主任每周组织定稿会, 评估审稿人意见, 对评审意见较高, 文章达到本刊发表要求的稿件送交总编辑签发拟接受, 对不能达到本刊发表要求的稿件退稿.

第三步 编辑、修改稿件: 科学编辑严格根据编辑规范要求编辑文章, 包括全文格式、题目、摘要、图表科学性和参考文献; 同时给出退修意见送作者修改. 作者修改稿件中遇到问题可以发送E-mail至责任科学编辑, 责任科学编辑在1个工作日内回复. 为保证文章审稿意见公平公正, 本刊对每一篇文章均增加该篇文章的同行评议者和同行评论, 同时配有背景资料、研发前沿、相关报道、创新盘点、应用要点和名词解释, 供非专业人士阅读了解该领域的最新科研成果.

第四步 录用稿件: 作者将稿件修回后, 编辑部主任组织第2次定稿会, 评估作者修回稿件质量. 对修改不合格的稿件通知作者重修或退稿, 对修改合格的稿件送总编辑终审, 合格后发正式录用通知. 稿件正式录用后, 编务通知作者缴纳出版费, 出版费缴纳后编辑部安排生产, 并挂号将缴费发票寄出.

第五步 排版制作: 电子编辑对稿件基本情况进行审核, 核对无误后, 进行稿件排版及校对、图片制作及参考文献核对. 彩色图片保证放大400%依然清晰; 中文参考文献查找全文, 核对作者、题目、期刊名、卷期及页码, 英文参考文献根据本杂志社自主研发的“参考文献检测系统”进行检测, 确保作者、题目、期刊名、卷期及页码准确无误. 排版完成后, 电子编辑进行黑马校对, 消灭错别字及语句错误.

第六步 组版: 本期责任电子编辑负责组版, 对每篇稿件图片校对及进行质量控制, 校对封面、目次、正文页码和书眉, 修改作者的意见, 电子编辑进行三校. 责任科学编辑制作整期中英文摘要, 并将英文摘要送交英文编辑进一步润色. 责任电子编辑再将整期进行二次黑马校对. 责任科学编辑审读本期的内容包括封面、目次、正文、表格和图片, 并负责核对作者、语言编辑和语言审校编辑的清样, 负责本期科学新闻稿的编辑.

第七步 印刷、发行: 编辑部主任和主编审核清样, 责任电子编辑通知胶片厂制作胶片, 责任科学编辑、电子编辑核对胶片无误送交印刷厂进行印刷. 责任电子编辑制作ASP、PDF、XML等文件. 编务配合档案管理员邮寄杂志.

第八步 入库: 责任电子编辑入库, 责任科学编辑审核, 包括原始文章、原始清样、制作文件等.

《世界华人消化杂志》从收稿到发行每一步都经过严格审查, 保证每篇文章高质量出版, 是消化病学专业人士发表学术论文首选的学术期刊之一. 为保证作者研究成果及时公布, 《世界华人消化杂志》保证每篇文章四月内完成. (《世界华人消化杂志》编辑部)

P38MAPK抑制剂对急性肝衰竭大鼠内质网应激反应性凋亡的作用

刘晓璐, 刘北彦, 孔俊英, 王凤平, 孙辉, 谢文媛, 王宏微, 沈滨, 杜雅菊

刘晓璐, 刘北彦, 孔俊英, 王凤平, 孙辉, 哈尔滨医科大学附属第二医院急诊医学科 黑龙江省哈尔滨市 150081
谢文媛, 哈尔滨市红十字中心医院综合内科 黑龙江省哈尔滨市 150076
王宏微, 哈尔滨市红十字中心医院急诊科 黑龙江省哈尔滨市 150076
沈滨, 哈尔滨医科大学附属第二医院普外科 黑龙江省哈尔滨市 150081
杜雅菊, 哈尔滨医科大学附属第二医院消化科 黑龙江省哈尔滨市 150081
刘晓璐, 副主任医师, 主要从事急诊急救医学的研究。
黑龙江省教育厅科技研究基金资助项目, No. 11541211
作者贡献分布: 此课题主要贡献者为刘晓璐; 实验由刘晓璐与刘北彦设计; 孔俊英与王凤平完成制模及取材过程; 沈滨与孙辉完成HE及Caspase12蛋白的免疫组织化学检测部分; 实验评估、数据分析由谢文媛与王宏微完成; 本论文写作由刘晓璐完成; 杜雅菊审校。
通讯作者: 杜雅菊, 教授, 硕士生导师, 150081, 黑龙江省哈尔滨市南岗区学府路246号, 哈尔滨医科大学附属第二医院消化科。 yajud001@163.com
收稿日期: 2014-06-05 修回日期: 2014-06-17
接受日期: 2014-07-01 在线出版日期: 2014-08-28

Effect of P38MAPK inhibitor on endoplasmic reticulum stress-induced hepatocyte apoptosis in rats with acute liver failure

Xiao-Jun Liu, Bei-Yan Liu, Jun-Ying Kong, Feng-Ping Wang, Hui Sun, Wen-Yuan Xie, Hong-Wei Wang, Bin Shen, Ya-Ju Du

Xiao-Jun Liu, Bei-Yan Liu, Jun-Ying Kong, Feng-Ping Wang, Hui Sun, Department of Emergency Medicine, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150081, Heilongjiang Province, China
Wen-Yuan Xie, Department of Integrated Medicine, Harbin Red Cross Central Hospital, Harbin 150076, Heilongjiang Province, China
Hong-Wei Wang, Department of Emergency Medicine, Harbin Red Cross Central Hospital, Harbin 150076, Heilongjiang Province, China
Bin Shen, Department of General Surgery, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150081, Heilongjiang Province, China
Ya-Ju Du, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150081, Heilongjiang Province, China
Supported by: Science and Technology Research Project of the Department of Education, Heilongjiang Province, No. 11541211
Correspondence to: Ya-Ju Du, Professor, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, 246 Xuefu Road, Nangang District, Harbin 150081, Heilongjiang Province,

China. yajud001@163.com
Received: 2014-06-05 Revised: 2014-06-17
Accepted: 2014-07-01 Published online: 2014-08-28

Abstract

AIM: To observe the effect of P38MAPK inhibitor SB203580 on Caspase12 protein expression and apoptosis of hepatocytes in rats with acute hepatic failure, and to explore the mechanism underlying its protective effect on acute hepatic failure.

METHODS: Seventy-two healthy Wistar rats were randomly divided into three groups: a control group (injected with normal saline), a model group (injected with D-galactosamine/lipopolysaccharide, D-Gal/LPS), and an inhibitor group (injected with D-Gal/LPS + SB203580). Each group was further divided into three subgroups for testing at different time points, with 8 rats in each subgroup. Blood samples were collected for the determination of alanine aminotransferase (ALT) and total bilirubin (TBIL). HE staining was performed to observe the liver pathological changes. Immunohistochemical assay was performed to detect the expression of Caspase12 protein. The diphenylamine method was used to detect the apoptosis rate.

RESULTS: The liver function, Caspase12 protein expression and apoptosis rate in the inhibitor group at 12 h were lower than those in the model group. Caspase12 protein expression at 18 h in the inhibitor group had no significant difference with that in the model group, while the apoptosis rate was significantly higher in the inhibitor group than in the model group. Necrosis occurred in the model group at 12 h, and in the inhibitor group at 18 h.

CONCLUSION: P38MAPK inhibitor SB203580 can reduce the expression of Caspase12 protein, inhibit the endoplasmic reticulum stress-mediated hepatocyte apoptosis, reduce the necrosis of liver cells and play a protective effect against acute hepatic failure.

■背景资料

急性肝衰竭具有起病急、进展快、病情复杂、病死率高等特点,以大量细胞死亡为主要表现,细胞凋亡在这一过程中有重要作用。国内外许多研究证实了内质网应激相关性的肝细胞凋亡参与了急性肝衰竭的发生发展过程。

■同行评议者

范学工, 教授, 中南大学湘雅医院感染病科

■ 研发前沿

ERS既是细胞抵抗应激的重要机制,也是应激损伤细胞的重要机制,被认为发生在各种损伤的早期阶段,因此,对内质网应激反应的干预有可能成为防治急性肝衰竭的有效手段。本实验的目的是应用P38MAPK抑制剂(SB203580)对急性肝衰竭大鼠模型进行干预,探讨P38MAPK抑制剂对Caspase12介导的内质网应激相关性肝细胞凋亡的影响,为急性肝衰竭的发病机制及其治疗寻求新的靶点。

© 2014 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: Acute hepatic failure; Endoplasmic reticulum stress; Apoptosis; Caspase12; P38MAPK; SB203580

Liu XJ, Liu BY, Kong JY, Wang FP, Sun H, Xie WY, Wang HW, Shen B, Du YJ. Effect of P38MAPK inhibitor on endoplasmic reticulum stress-induced hepatocyte apoptosis in rats with acute liver failure. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(24): 3625-3631 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/3625.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i24.3625>

摘要

目的: 观察P38MAPK抑制剂SB203580对急性肝衰竭大鼠肝组织Caspase12蛋白表达及肝细胞凋亡的影响,探讨其对急性肝衰竭大鼠肝脏保护作用的机制。

方法: 72只健康Wistar大鼠随机分3组: 对照组(注射生理盐水)、模型组(注射D-Gal/LPS)、抑制剂组(D-Gal/LPS+SB203580)。按时间点分为3个亚组,每亚组8只。取血检测丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、总胆红素(total bilirubin, TBIL); HE染色观察肝组织病理学变化; 免疫组织化学法检测Caspase12蛋白; 二苯胺法检测细胞凋亡率。SPSS18.0统计分析。

结果: 抑制组12 h肝功、Caspase12蛋白表达和细胞凋亡率均低于模型组; 18 h Caspase12蛋白表达与模型组差异无统计学意义,细胞凋亡率高于模型组; 模型组12 h出现坏死,抑制组18 h出现坏死。

结论: P38MAPK抑制剂SB203580能减少肝衰竭大鼠Caspase12蛋白表达和肝细胞凋亡率,减轻肝细胞坏死,对急性肝衰竭大鼠的肝脏具有保护作用。

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词: 急性肝衰竭; 内质网应激; 凋亡; Caspase12; P38MAPK; SB203580

核心提示: 急性肝衰竭起病急、进展快、病情复杂、病死率高。我们研究发现P38MAPK抑制剂SB203580能减少肝衰竭大鼠Caspase12蛋白表达和肝细胞凋亡率,减轻肝细胞坏死,对急性肝衰竭大鼠的肝脏具有保护作用,可以成为治疗急性肝衰竭的一个新靶点。

刘晓琨, 刘北彦, 孔俊英, 王凤平, 孙辉, 谢文媛, 王宏微, 沈滨, 杜雅菊. P38MAPK抑制剂对急性肝衰竭大鼠内质网应激反应性凋亡的作用. *世界华人消化杂志* 2014; 22(24): 3625-3631 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/3625.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i24.3625>

0 引言

急性肝衰竭(acute hepatic failure, AHF)具有起病急、进展快、病情复杂、病死率高等特点,虽有包括药物、人工肝支持系统及肝移植、细胞移植等多种治疗措施,死亡率仍然非常高^[1-3]。AHF以大量细胞死亡为主要表现,细胞凋亡在这一过程中有重要作用^[4-6]。国内外许多研究证实了内质网应激相关性的肝细胞凋亡参与了急性肝衰竭的发生、发展过程^[7]。其中Caspase12是内质网应激性细胞凋亡途径的特异性标志物,既往研究显示D-Gal/LPS诱导小鼠急性肝衰竭早期Caspase12 mRNA表达水平逐渐升高,后期降低,与肝细胞凋亡发生的时相性呈显著正相关^[8]。丝裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinase, MAPK)级联是细胞内重要的信号传导系统之一,其将细胞外刺激信号传递到细胞核引起一系列细胞生物学反应^[9],而P38MAPK作为MAPK家族的重要信号通路,在细胞炎症、增殖、应激、凋亡、细胞周期和生长等多种生理和病理过程中起着重要作用^[10]。本实验目的是应用P38MAPK抑制剂(SB203580)对急性肝衰竭大鼠模型进行干预,观察Caspase12蛋白的表达及肝细胞凋亡情况,探讨P38MAPK抑制剂对Caspase12介导的内质网应激相关性肝细胞凋亡的影响,为急性肝衰竭的发病机制及其治疗寻求新的靶点。

1 材料和方法

1.1 材料 ♂ Wistar大鼠72只,体质量180-200 g,购自哈尔滨医科大学附属第二医院动物实验中心。氨基半乳糖D-Gal(购自DAKO公司); 内毒素/脂多糖LPS(购自美国Sigma公司); SB203580(购自Calbiochem公司); Caspase12(购自英国Abcam公司); 二抗(购自武汉博士德公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物模型的建立: 72只大鼠随机分成3组,每组24只。即正常对照组: 腹腔注射生理盐水2 mL; 模型组: 腹腔联合注射400 mg/kg D-Gal及100 μg/kg LPS共2 mL; SB203580组: 于造模完成后给予1 mg/(kg·d)SB203580腹腔注射。每组

随机分为6、12、18 h 3个亚组, 每亚组8只. 实验前禁食水12 h, 以1%戊巴比妥钠(40 mg/kg)腹腔注射麻醉, 取胸腹正中切口, 充分暴露心脏和肝脏. 心脏采血2 mL, 全自动生化分析仪检测丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、总胆红素(total bilirubin, TBIL). 取肝组织, 以40 g/L甲醛固定, 用于HE染色和免疫组织化学; 另一块用PBS液清洗, 以二苯胺法测细胞凋亡率.

1.2.2 病理学检查: 取新鲜肝脏组织用10%甲醛固定, 常规石蜡包埋, 切片HE染色, 光学显微镜观察肝组织损伤情况.

1.2.3 二苯胺法定量测定肝细胞凋亡率: 取新鲜肝组织, Hank's液冲洗2-3次, 眼科剪剪组织块约2-3 mm, 加入30倍体积的胰蛋白酶消化液, 37 °C水浴箱消化1 h, 过滤留取细胞液, 按照二苯胺法定量测定肝细胞凋亡率^[11,12]进行细胞凋亡的DNA片段化百分率分析.

1.2.4 免疫组织化学法检测Caspase12蛋白表达: 取甲醛固定的肝组织, 依次进行包埋、切片、脱蜡和水化、抗原修复(热修复)、一抗孵育、二抗孵育、DAB显色、复染、蓝化、脱水、封片等程序, 烘干后进行镜下观察. 结果判定: 根据染色面积来界定蛋白的表达, 同等倍数下的肝小叶图片按照9×9等分, 然后查表格中阳性表达的表格数, 计算出阳性表达百分比.

统计学处理 各组数据连续型变量服从正态分布, 采用mean±SD; 3组之间的比较采用方差分析, 任意两组间的比较采用LSD检验. 所有数据采用SPSS18.0统计软件处理, $P<0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 一般情况 正常对照组大鼠活动及反应灵活; 模型组大鼠6 h开始出现活动减少, 12 h出现明显反应迟钝, 毛发干枯发黄, 眼神失去光亮, 18 h亚组于15 h死亡1例; 2例出现呼吸急促; 1例出现周身不自主颤抖; SB203580组于18 h出现懒动, 毛发干枯发黄, 眼神失去光亮等表现; 正常对照组和SB203580组无死亡病例.

2.2 肝脏组织形态学变化

2.2.1 肝脏大体变化: 正常对照组肝脏红润、表面光滑、边缘整齐. 模型组: 6 h部分大鼠肝脏略饱满; 12 h肝脏肿胀, 表面见散在出血点或瘀斑; 18 h肝脏高度充血水肿, 表面瘀血呈片状,

部分肝脏缩小, 呈暗红色, 肝包膜紧张无光泽. SB203580组大鼠肝脏在12 h出现充血水肿; 18 h肝脏明显肿胀, 表面可见散在出血点或瘀斑.

2.2.2 病理学变化: HE染色, 正常对照组肝小叶结构完整, 无炎细胞浸润, 无肝细胞变性坏死现象. 模型组6 h显示肝细胞肿胀, 中性粒细胞细胞浸润, 出现散在的肝细胞凋亡, 核固缩, 染色质浓聚, 胞核呈棕褐色; 12 h弥漫性肝细胞凋亡, 出现点片状出血及坏死现象; 18 h肝小叶结构破坏, 肝细胞大片变性坏死和出血. SB203580组相比模型组6 h无明显差别, 12 h凋亡现象明显少于模型组; 18 h发生片状坏死, 程度均较模型组轻(图1).

2.3 ALT与TBIL 模型组ALT与TBIL的值与正常对照组相比从6 h开始升高, 12和18 h显著升高($P<0.05$); SB203580组ALT与TBIL的值从12 h开始高于正常组相对应时间点的值($P<0.05$), 但低于模型组($P<0.05$)(表1).

2.4 Caspase12蛋白的表达情况 Caspase12蛋白表达于肝细胞胞质内. 模型组Caspase12蛋白在3个时间点均高于对照组($P<0.05$); 12、18 h阳性表达高于6 h($P<0.05$), 而18和12 h两组间差异无统计学意义($P>0.05$). SB203580组Caspase12蛋白表达量12 h表达高于6 h组($P<0.05$), 18与12 h组无统计学差异($P>0.05$); 与模型组相比, 6 h亚组Caspase12蛋白表达量无明显统计学差异($P>0.05$); 12和18 h阳性表达量低于模型组($P<0.05$)(表2, 图2).

2.5 细胞凋亡率 模型组6、12 h肝细胞凋亡率明显高于正常对照组($P<0.05$), 18 h组与正常对照组无差异($P>0.05$); 12 h高于6 h($P<0.05$); 而18 h的细胞凋亡率低于12 h组($P<0.05$). SB203580组与模型组比较, 6、12 h的细胞凋亡率明显低于模型组($P<0.05$), 而18 h肝细胞凋亡率高于模型组(表3).

3 讨论

急性肝衰竭可在多种疾病的过程中发生^[13], 其进展迅速, 病情复杂, 死亡率极高, 治疗困难^[14,15]. 因此, 如何保护肝脏功能, 减轻肝脏病变程度, 有效控制或延缓疾病的进展成为研究的难点. 内质网是细胞内功能十分活跃和重要的细胞器, 与蛋白质的合成、储存、加工修饰、折叠、组装和运输密切相关, 同时对钙离子的储存也起到重要作用. 内质网这些极其重要的功能紊乱

■ 相关报道

Luo等报道p38 MAPK在ERS中诱导GRP78等上调. GRP78为内质网应激反应的元件.

■创新盘点

急性肝衰竭是临床上常见的急危重症之一,如何保护肝脏功能,减轻肝脏病变程度,有效控制或延缓疾病的进展成为研究的难点。我们研究发现P38MAPK抑制剂SB203580能减少肝衰竭大鼠Caspase12蛋白表达和肝细胞凋亡率,减轻肝细胞坏死,对急性肝衰竭大鼠的肝脏具有保护作用。

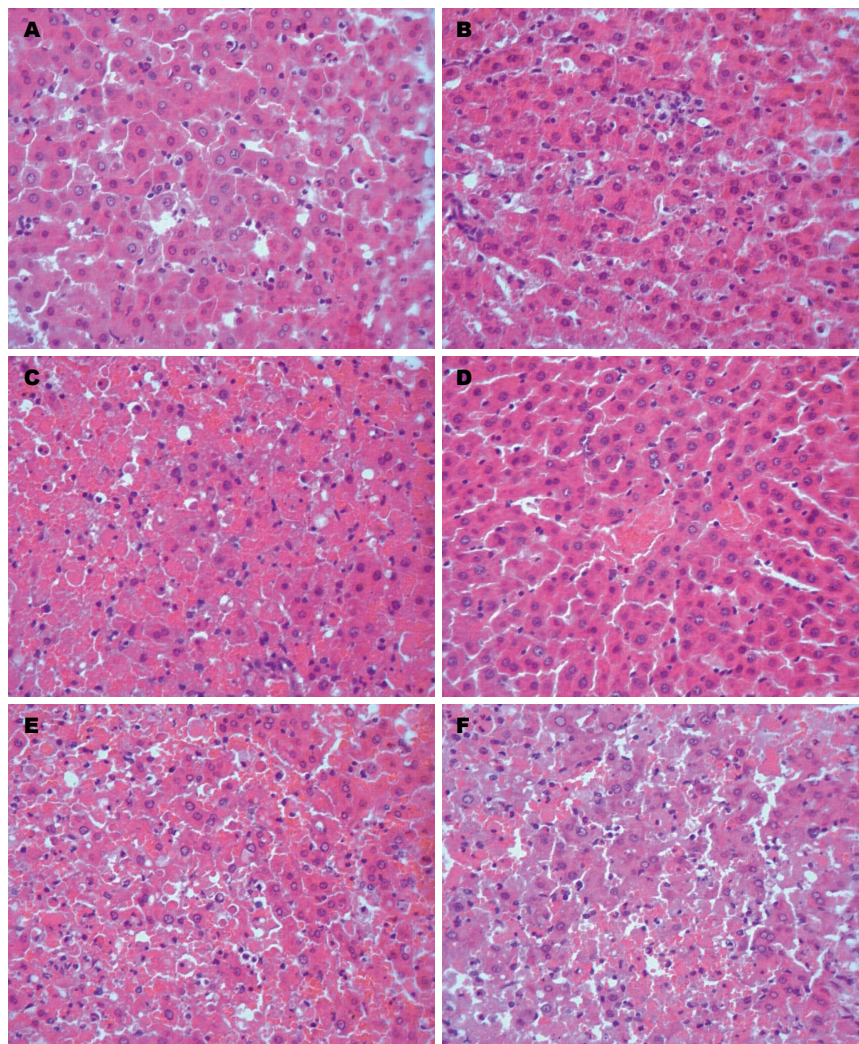


图1 肝脏组织病理学变化(HE × 200)。A: 模型组6 h; B: 模型组12 h; C: 模型组18 h; D: SB203580组6 h; E: SB203580组12 h; F: SB203580组18 h。

表1 TBIL、ALT值 (mean ± SD)

分组	对照组	模型组	SB203580组
TBIL(mg/dL)			
6 h	1.4 ± 0.1	2.1 ± 0.4	1.6 ± 0.1
12 h	1.1 ± 0.1	12.4 ± 2.3 ^a	7.4 ± 2.1 ^{ac}
18 h	1.9 ± 0.3	25.1 ± 4.4 ^a	10.3 ± 3.9 ^{ac}
ALT(U/L)			
6 h	29.3 ± 5.7	290.9 ± 54.6 ^a	174.1 ± 29.5 ^a
12 h	31.5 ± 4.8	3984.6 ± 983.5 ^a	1472.1 ± 205.9 ^{ac}
18 h	35.6 ± 6.1	7692.7 ± 1244.8 ^a	4067.8 ± 936.4 ^{ac}

^a*P* < 0.05 vs 对照组; ^c*P* < 0.05 vs 模型组。TBIL: 总胆红素; ALT: 丙氨酸氨基转移酶。

将导致未折叠或者错误折叠的蛋白质在内质网中的堆积,从而引发内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)^[16]。研究显示,ERS及其介导的细胞凋亡途径与许多肝脏疾病的发生发展都有密切的关系^[17-19]。ERS既是细胞抵抗应激的重要机制,也是应激损伤细胞的重要机制,被认为发生在各种损伤的早期阶段。因此,对内质网应

激反应的干预有可能成为防治急性肝衰竭的有效手段。

Caspase12是内质网应激介导的细胞凋亡特异性的标志物^[20,21]。研究显示,D-Gal/LPS诱导小鼠急性肝功能衰竭早期Caspase12 mRNA表达水平逐渐升高,Caspase12蛋白因内质网应激而被大量活化,后期降低,与肝细胞凋亡的发生

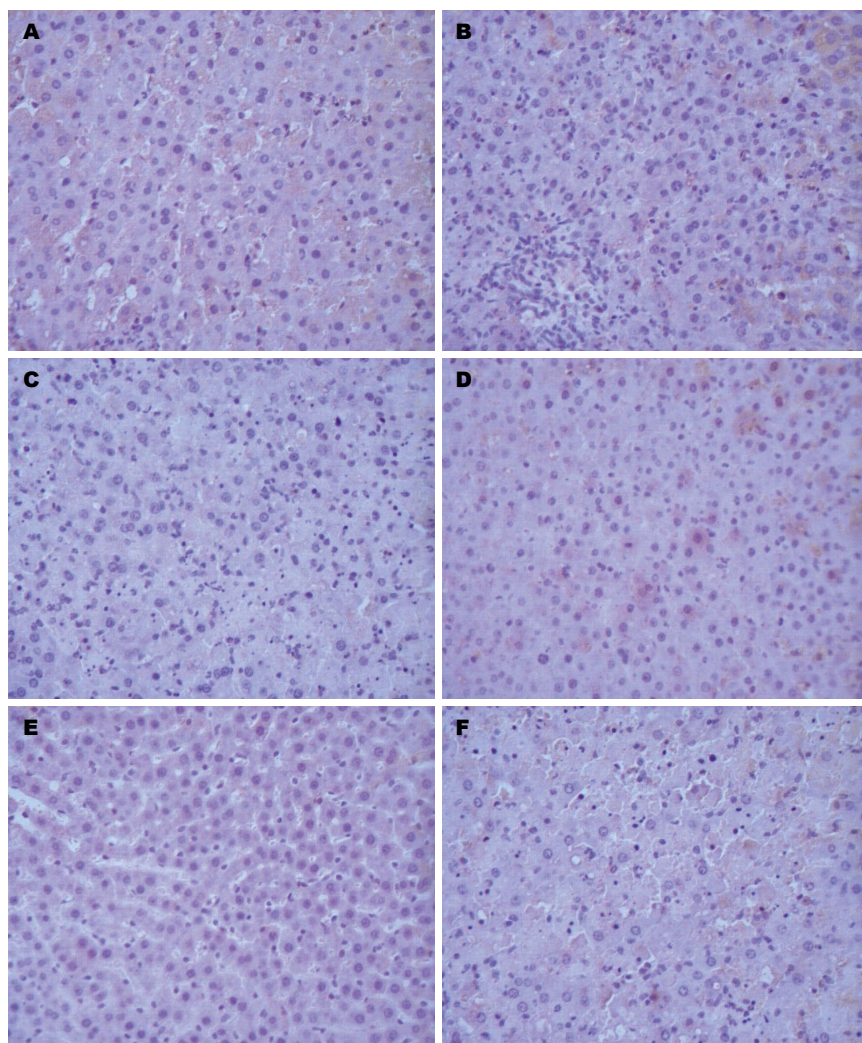


图 2 Caspase12表达 ($\times 200$). A: 模型组6 h; B: 模型组12 h; C: 模型组18 h; D: SB203580组6 h; E: 模型组12 h; F: SB203580组18 h.

■应用要点
应用SB203580抑制后可以有效地减少内质网应激介导的细胞凋亡, 改善肝功能, 推迟肝坏死的时间, 可以成为治疗急性肝衰竭的一个新靶点, 并为肝移植争取时间.

表 2 Caspase12蛋白表达百分比 (mean \pm SD, %)

分组	对照组	模型组	SB203580组
6 h	2.4 \pm 0.1	8.4 \pm 1.9 ^a	5.3 \pm 1.0
12 h	3.1 \pm 0.3	17.4 \pm 2.1 ^a	10.6 \pm 2.7 ^{a,c}
18 h	3.6 \pm 0.3	15.1 \pm 2.7 ^a	8.5 \pm 2.3 ^{a,c}

^a $P < 0.05$ vs 对照组; ^c $P < 0.05$ vs 模型组.

在时相保持一致, 提示Caspase12介导的内质网应激相关性肝细胞凋亡参与急性肝功能衰竭的发生发展, 是急性肝功能衰竭中肝细胞损伤的重要机制之一. 本实验应用D-Gal/LPS制造肝衰竭模型^[22], HE染色显示6 h肝细胞出现散在的肝细胞凋亡, 12 h肝细胞凋亡明显, 并出现点片状出血及坏死现象, 18 h肝小叶结构破坏, 肝细胞大片变性坏死和出血. 二苯胺法定量测定的肝细胞凋亡率也显示12 h组凋亡率最高, 为31.7%, 而18 h反而呈降低趋势, 肝细胞凋亡率低于12 h组($P < 0.05$). 实验表明大鼠急性肝衰竭模型成

功, 随着时间的延长肝损伤的程度加重, 早期以肝细胞凋亡为著, 18 h主要表现为坏死. 模型组Caspase12蛋白表达在3个时间点均高于对照组($P < 0.05$), 12、18 h阳性表达高于6 h($P < 0.05$), 而18和12 h两组间差异无统计学意义($P > 0.05$). 由此可见Caspase12凋亡通路参与了大鼠肝衰竭的发病过程, 但是Caspase12蛋白表达并没有随着肝衰竭程度加重呈现出持续升高, 18 h亚组Caspase12蛋白表达与肝细胞凋亡率显示出的一致性, 我们分析可能的原因是: (1)18 h组坏死明显, Caspase12蛋白的结构可能被破坏, 影响检测结果; (2)在肝衰竭的病理变化过程中其他因素作用于Caspase12蛋白, 并抑制其合成表达; (3)内质网应激相关的凋亡通路可能是肝衰竭早期病理变化的原因.

p38MAPK是细胞应激反应的重要信号分子, 其动态平衡对维持细胞功能状态稳定具有重要意义^[23], 并且在细胞炎症反应、细胞凋亡和免疫调节等过程中起重要作用^[24]. 文献报道,

■同行评价

本文对从内质网的角度理解肝衰竭的机制有一定科学意义。

表 3 肝细胞凋亡率 (mean ± SD, %)

分组	对照组	模型组	SB203580组
6 h	9.6 ± 1.3	16.3 ± 2.1 ^a	10.1 ± 2.4 ^c
12 h	9.2 ± 1.3	31.7 ± 2.8 ^a	22.5 ± 3.9 ^{ac}
18 h	10.5 ± 1.6	12.3 ± 0.8	18.4 ± 1.6 ^{ac}

^a*P* < 0.05 vs 对照组; ^c*P* < 0.05 vs 模型组。

p38MAPK在ERS中诱导GRP78等上调^[25,26]。抑制p38MAPK活性可阻断ERS特异性刺激诱导的CRT表达上调^[27]。因此,我们应用p38MAPK抑制剂SB203580进行干预,观察抑制p38MAPK活性是否可以影响急性肝衰竭大鼠肝细胞Caspase12蛋白的表达及肝细胞凋亡,从而延缓肝衰竭的发生。

我们于造模完成后给予SB203580腹腔注射,大鼠肝脏的大体标本,病理组织学及TBIL、ALT值均显示肝脏损伤程度较模型组减轻,抑制p38MAPK活性可以保护急性肝衰竭大鼠肝脏组织。SB203580组6、12 h的肝细胞凋亡率分别为10.7%和22.5%,低于模型组(*P* < 0.05),而18 h肝细胞凋亡率高于模型组;组内12、18 h亚组的凋亡率高于6 h,但12 h和18 h之间差异无统计学意义(*P* > 0.05)。Caspase12蛋白表达量12 h表达高于6 h组(*P* < 0.05),18与12 h组差异无统计学意义(*P* > 0.05);与模型组相比,6 h亚组Caspase12蛋白表达量无明显差异(*P* > 0.05);12和18 h阳性表达量低于模型组(*P* < 0.05)。在SB203580组Caspase12蛋白表达与肝细胞凋亡呈相似的变化,与模型组比较细胞凋亡减少、肝功能和组织学表现改善,其可能机制为SB203580抑制p38MAPK活性,抑制Caspase12蛋白表达及活化,减轻内质网应激相关性凋亡。另外,本实验发现模型组肝细胞坏死出现时间在12 h,而抑制剂组18 h才出现明显的肝细胞坏死,且坏死程度较模型组轻,提示p38MAPK抑制剂在抑制细胞凋亡的同时也通过某种机制推迟了肝细胞坏死的时间。机制可能为模型组细胞凋亡未受局限,持续的、广泛的、弥漫性的细胞凋亡后续引发大量炎症因子释放,促进肝细胞坏死^[28],而p38MAPK抑制剂抑制凋亡引起的后续炎症级联放大反应,从而推迟了坏死的时间和程度。可见,SB203580除了可减少急性肝衰竭发病中内质网应激介导的细胞凋亡,也可以推迟急性肝衰竭肝细胞发生坏死的时间。

总之,应用SB203580抑制后可以有效地减少内质网应激介导的细胞凋亡,改善肝功能,并通过某种机制推迟肝坏死的时间,因此他对急性肝衰竭具有保护性的作用,可以成为治疗急性肝衰竭的一个新靶点,并为肝移植争取时间。但是SB203580的作用时间、半衰期以及体内的代谢过程还有待进一步的研究。此外,在急性肝衰竭细胞凋亡中SB203580是直接抑制Caspase12表达及活化,从而减轻内质网应激相关性肝细胞凋亡,还是先作用于其他配件,如GRP78等再引起Caspase12的变化,都需要进一步实验证实。

4 参考文献

- Lee WM, Stravitz RT, Larson AM. Introduction to the revised American Association for the Study of Liver Diseases Position Paper on acute liver failure 2011. *Hepatology* 2012; 55: 965-967 [PMID: 22213561]
- Fábrega E, Míases MÁ, Terán A, Moraleja I, Casafont F, Crespo J, Pons-Romero F. Etiologies and outcomes of acute liver failure in a spanish community. *Int J Hepatol* 2013; 2013: 928960 [PMID: 24024035]
- 高加林, 施晓雷. 急性肝衰竭肝移植围手术期治疗的研究进展. *世界华人消化杂志* 2013; 21: 4104-4109
- Malhi H, Gores GJ, Lemasters JJ. Apoptosis and necrosis in the liver: a tale of two deaths? *Hepatology* 2006; 43: S31-S44 [PMID: 16447272]
- Wang YM, Feng GH, Dou XG, et al. Morphology and regulatory mechanism of hepatocyte apoptosis in experimental fulminant hepatic failure. *World Chin J Digestol* 2005; 13: 2658-2662 [DOI: 1009-3079/13/2658.asp]
- Ramachandran A, McGill MR, Xie Y, Ni HM, Ding WX, Jaeschke H. Receptor interacting protein kinase 3 is a critical early mediator of acetaminophen-induced hepatocyte necrosis in mice. *Hepatology* 2013; 58: 2099-2108 [PMID: 23744808]
- Chen L, Ren F, Zhang H, Wen T, Piao Z, Zhou L, Zheng S, Zhang J, Chen Y, Han Y, Duan Z, Ma Y. Inhibition of glycogen synthase kinase 3β ameliorates D-GalN/LPS-induced liver injury by reducing endoplasmic reticulum stress-triggered apoptosis. *PLoS One* 2012; 7: e45202 [PMID: 23028846]
- Zhou HJ, Xie Q, Jiang S, Li GM, Zhou XQ, Liu HF, Yu H, Guo Q. [Caspase-12 expression and activation in the pathogenesis of acute hepatic failure induced by lipopolysaccharide and D-galactosamine]. *Zhonghua Ganzhangbing Zazhi* 2005; 13: 685-688 [PMID: 16174460]
- Wen J, Watanabe K, Ma M, Yamaguchi K, Tachikawa H, Kodama M, Aizawa Y. Edaravone inhibits JNK-c-Jun pathway and restores anti-oxidative defense after ischemia-reperfusion injury in aged rats. *Biol Pharm Bull* 2006; 29: 713-718 [PMID: 16595905]
- Sosa MS. [Long-term results of intermittent massive therapy (protocol HIM-T.M.I.) in children with acute lymphoblastic leukemia]. *Bol Med Hosp Infant Mex* 1976; 33: 1151-1163 [PMID: 1067842]
- 刘艳红, 刘先洲, 邓兆群, 王焰山, 汤纪路, 白瑞珍. 二苯胺法定量检测细胞凋亡. *武汉大学学报(医学版)*

- 2002; 23: 63-65
- 12 Gercel-Taylor C. Diphenylamine assay of DNA fragmentation for chemosensitivity testing. *Methods Mol Med* 2005; 111: 79-82 [PMID: 15911973]
- 13 White H. Neurologic manifestations of acute and chronic liver disease. *Continuum* (Minneapolis) 2014; 20: 670-680 [PMID: 24893241]
- 14 Wesson RN, Cameron AM. Stem cells in acute liver failure. *Adv Surg* 2011; 45: 117-130 [PMID: 21954682]
- 15 Stravitz RT. Critical management decisions in patients with acute liver failure. *Chest* 2008; 134: 1092-1102 [PMID: 18988787]
- 16 Schröder M, Kaufman RJ. ER stress and the unfolded protein response. *Mutat Res* 2005; 569: 29-63 [PMID: 15603751]
- 17 Asselah T, Bièche I, Mansouri A, Laurendeau I, Cazals-Hatem D, Feldmann G, Bedossa P, Paradis V, Martinot-Peignoux M, Lebre C, Guichard C, Ogier-Denis E, Vidaud M, Tellier Z, Soumelis V, Marcellin P, Moreau R. In vivo hepatic endoplasmic reticulum stress in patients with chronic hepatitis C. *J Pathol* 2010; 221: 264-274 [PMID: 20527020]
- 18 钟卫卫, 林世德. 内质网应激与肝损伤研究进展. *世界华人消化杂志* 2010; 18: 1021-1025
- 19 Wei Y, Wang D, Topczewski F, Pagliassotti MJ. Saturated fatty acids induce endoplasmic reticulum stress and apoptosis independently of ceramide in liver cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006; 291: E275-E281 [PMID: 16492686]
- 20 Malhi H, Kaufman RJ. Endoplasmic reticulum stress in liver disease. *J Hepatol* 2011; 54: 795-809 [PMID: 21145844]
- 21 Curry SE. Clinician-educators in academic medical centers. *N Engl J Med* 2000; 342: 139 [PMID: 10636761]
- 22 Eipel C, Kidess E, Abshagen K, Leminh K, Menger MD, Burkhardt H, Vollmar B. Antileukoprotease protects against hepatic inflammation, but not apoptosis in the response of D-galactosamine-sensitized mice to lipopolysaccharide. *Br J Pharmacol* 2007; 151: 406-413 [PMID: 17420780]
- 23 Wada T, Penninger JM. Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation. *Oncogene* 2004; 23: 2838-2849 [PMID: 15077147]
- 24 Jameel NM, Thirunavukkarasu C, Wu T, Watkins SC, Friedman SL, Gandhi CR. p38-MAPK- and caspase-3-mediated superoxide-induced apoptosis of rat hepatic stellate cells: reversal by retinoic acid. *J Cell Physiol* 2009; 218: 157-166 [PMID: 18792915]
- 25 Luo S, Lee AS. Requirement of the p38 mitogen-activated protein kinase signalling pathway for the induction of the 78 kDa glucose-regulated protein/immunoglobulin heavy-chain binding protein by azetidine stress: activating transcription factor 6 as a target for stress-induced phosphorylation. *Biochem J* 2002; 366: 787-795 [PMID: 12076252]
- 26 Feaver RE, Hastings NE, Pryor A, Blackman BR. GRP78 upregulation by atheroprone shear stress via p38-, alpha2beta1-dependent mechanism in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28: 1534-1541 [PMID: 18556570]
- 27 Yamazaki T, Muramoto M, Nishimura S, Kita Y. Suppressive effects of FR167653, an inhibitor of p38 mitogen-activated kinase, on calreticulin mRNA expression induced by endoplasmic reticulum stresses. *Eur J Pharmacol* 2004; 484: 147-156 [PMID: 14744598]
- 28 Tabas I, Ron D. Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nat Cell Biol* 2011; 13: 184-190 [PMID: 21364565]

编辑 田滢 电编 闫晋利



双歧杆菌黏附素对大鼠肠缺血再灌注损伤后肠道菌群和细菌易位的影响

钟世顺, 李淑梅, 张振书

■背景资料

肠道缺血再灌注损伤(intestine ischemia/reperfusion injury, I/R)后造成肠黏膜屏障破坏、微生态失调及宿主免疫防御系统损伤, 导致肠道细菌易位、内毒素血症, 继而发生内源性感染及多器官损伤。

钟世顺, 福建医科大学省立临床医学院 福建省立医院消化内镜中心 福建省福州市 350001

李淑梅, 中国人民解放军南京军区福州总医院476临床部 福建省福州市 350002

张振书, 南方医科大学附属南方医院消化内科 广东省广州市 510515

钟世顺, 副主任医师, 主要从事消化内镜和肠道微生态的研究。

福建省青年人才资助项目, No. 2006F3107

作者贡献分布: 此课题由钟世顺设计; 研究过程由钟世顺与张振书共同完成; 本论文写作由钟世顺与李淑梅完成。

通讯作者: 钟世顺, 副主任医师, 350001, 福建省福州市东街134号, 福建医科大学省立临床医学院, 福建省立医院消化内镜中心。zdoctor@sohu.com
电话: 0591-87557768

收稿日期: 2014-05-28 修回日期: 2014-06-23

接受日期: 2014-07-15 在线出版日期: 2014-08-28

Effect of *bifidobacterial* adhesin on intestinal microflora and bacterial translocation induced by ischemia-reperfusion injury in rats

Shi-Shun Zhong, Shu-Mei Li, Zhen-Shu Zhang

Shi-Shun Zhong, Provincial Clinical Medical College, Fujian Medical University; Department of Digestive Endoscopy, Fujian Provincial Hospital, Fuzhou 350001, Fujian Province, China

Shu-Mei Li, 476th Clinical Department, Fuzhou General Hospital, Fuzhou 350002, Fujian Province, China

Zhen-Shu Zhang, Department of Gastroenterology, the Affiliated Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China

Supported by: Youth Talent Foundation of Fujian Province, No. 2006F3107

Correspondence to: Shi-Shun Zhong, Associate Chief Physician, Provincial Clinical Medical College, Fujian Medical University; Department of Digestive Endoscopy, Fujian Provincial Hospital, 134 East Avenue, Fuzhou 350001, Fujian Province, China. zdoctor@sohu.com

Received: 2014-05-28 Revised: 2014-06-23

Accepted: 2014-07-15 Published online: 2014-08-28

Abstract

AIM: To observe the effect of *bifidobacterial* adhesin on intestinal microflora and bacterial translocation induced by ischemia-reperfusion (I/R) injury in rats.

METHODS: Seventy-two SD rats were randomly divided into a sham operation group ($n = 24$), an I/R model group ($n = 24$) and an experiment group ($n = 24$; treated with *bifidobacterial* adhesin). The rats were sacrificed 6 h, 1, 4 and 7 d after inducing I/R. The changes of intestinal microflora and bacterial translocation were observed, and the blood level of endotoxin was measured.

RESULTS: In the I/R model group, the numbers of *Enterococci* ($6.63 \lg N/g \pm 1.06 \lg N/g$ vs $5.26 \lg N/g \pm 1.08 \lg N/g$, $9.44 \lg N/g \pm 1.37 \lg N/g$ vs $5.30 \lg N/g \pm 1.12 \lg N/g$, $8.56 \lg N/g \pm 1.35 \lg N/g$ vs $4.99 \lg N/g \pm 0.96 \lg N/g$, $8.23 \lg N/g \pm 1.01 \lg N/g$ vs $5.18 \lg N/g \pm 1.03 \lg N/g$, $P < 0.05$) and *Enterobacilli* ($7.86 \lg N/g \pm 1.17 \lg N/g$ vs $6.39 \lg N/g \pm 0.85 \lg N/g$, $9.49 \lg N/g \pm 1.23 \lg N/g$ vs $6.64 \lg N/g \pm 1.44 \lg N/g$, $8.76 \lg N/g \pm 0.86 \lg N/g$ vs $6.52 \lg N/g \pm 1.13 \lg N/g$, $8.89 \lg N/g \pm 1.09 \lg N/g$ vs $6.71 \lg N/g \pm 0.98 \lg N/g$, $P < 0.05$) in the feces of rats increased significantly at all time points, the numbers of *Clostridium perfringens* increased significantly on days 1 ($6.47 \lg N/g \pm 1.43 \lg N/g$ vs $4.51 \lg N/g \pm 1.22 \lg N/g$, $P < 0.05$), 4 ($6.70 \lg N/g \pm 1.16 \lg N/g$ vs $4.71 \lg N/g \pm 0.89 \lg N/g$, $P < 0.05$) and 7 ($6.55 \lg N/g \pm 1.29 \lg N/g$ vs $4.46 \lg N/g \pm 0.79 \lg N/g$, $P < 0.05$), while the numbers of *Bifidobacterium* ($6.13 \lg N/g \pm 1.28 \lg N/g$ vs $9.02 \lg N/g \pm 1.10 \lg N/g$, $5.59 \lg N/g \pm 1.22 \lg N/g$ vs $8.66 \lg N/g \pm 0.99 \lg N/g$, $P < 0.05$) and *Lactobacillus* ($6.07 \lg N/g \pm 1.09 \lg N/g$ vs $9.08 \lg N/g \pm 1.04 \lg N/g$, $5.35 \lg N/g \pm 1.26 \lg N/g$ vs $8.89 \lg N/g \pm 0.97 \lg N/g$, $P < 0.05$) decreased significantly on days 4 and 7 compared with those in the control subjects. The numbers of *Enterococci* ($6.37 \lg N/g \pm 1.04 \lg N/g$ vs $8.56 \lg N/g \pm 1.35 \lg N/g$, $5.42 \lg N/g \pm 0.92 \lg N/g$ vs $8.23 \lg N/g \pm 1.01 \lg N/g$, $P < 0.05$) and *Enterobaci* ($7.55 \lg N/g \pm 1.03 \lg N/g$ vs $8.76 \lg N/g \pm 0.86 \lg N/g$, $7.16 \lg N/g \pm 0.86 \lg N/g$ vs $8.89 \lg N/g \pm 1.09 \lg N/g$, $P < 0.05$) in the experiment group were significantly lower than those in the I/R model group on days 4 and 7. The numbers of *Clostridium perfringens* on days 1, 4 and 7 ($5.95 \lg N/g \pm 1.24 \lg N/g$ vs $4.51 \lg N/g \pm$

■同行评议者

门秀丽, 教授, 河北联合大学(原华北煤炭医学院)病理生理学教研室

1.22 lgN/g, 6.08 lgN/g \pm 1.07 lgN/g vs 4.71 lgN/g \pm 0.89 lgN/g, 5.87 lgN/g \pm 0.82 lgN/g vs 4.46 lgN/g \pm 0.79 lgN/g, $P < 0.05$) were significantly higher in the experiment group than in the control group, but had declined compared to those in the I/R group. The numbers of *Bifidobacterium* (8.56 lgN/g \pm 0.85 lgN/g vs 8.45 lgN/g \pm 0.86 lgN/g, 7.89 lgN/g \pm 1.47 lgN/g vs 8.78 lgN/g \pm 1.06 lgN/g, 8.67 lgN/g \pm 1.13 lgN/g vs 9.02 lgN/g \pm 1.10 lgN/g, 8.75 lgN/g \pm 0.96 lgN/g vs 8.66 lgN/g \pm 0.99 lgN/g, $P > 0.05$) and *Lactobacillus* (9.16 lgN/g \pm 0.94 lgN/g vs 8.91 lgN/g \pm 1.06 lgN/g, 8.56 lgN/g \pm 1.21 lgN/g vs 9.11 lgN/g \pm 1.13 lgN/g, 9.16 lgN/g \pm 1.08 lgN/g vs 9.08 lgN/g \pm 1.04 lgN/g, 9.01 lgN/g \pm 0.95 lgN/g vs 8.89 lgN/g \pm 0.97 lgN/g, $P > 0.05$) showed no significant changes at all time points in the experiment group. The values of endotoxin (1.43 EU/mL \pm 0.32 EU/mL vs 0.21 EU/mL \pm 0.18 EU/mL, 1.84 EU/mL \pm 0.24 EU/mL vs 0.30 EU/mL \pm 0.23 EU/mL, 1.69 EU/mL \pm 0.35 EU/mL vs 0.26 EU/mL \pm 0.21 EU/mL, 1.73 EU/mL \pm 0.31 EU/mL vs 0.28 EU/mL \pm 0.19 EU/mL, $P < 0.05$) and bacterial translocation rates in the liver (50% vs 0, 66.67% vs 16.67%, 83.33% vs 0, 83.33% vs 0, $P < 0.05$), spleen (33.33% vs 0, 50% vs 0, 66.67% vs 0, 66.67% vs 0, $P < 0.05$) and mesenteric lymph nodes (66.67% vs 0, 83.33% vs 0, 100% vs 16.67%, 100% vs 0, $P < 0.05$) in the I/R model group were significantly higher than those in the control group, while these parameters were significantly lower in the experiment group than in the I/R model group at all time points (endotoxin: 0.57 EU/mL \pm 0.23 EU/mL vs 1.43 EU/mL \pm 0.32 EU/mL, 0.71 EU/mL \pm 0.16 EU/mL vs 1.84 EU/mL \pm 0.24 EU/mL, 0.41 EU/mL \pm 0.22 EU/mL vs 1.69 EU/mL \pm 0.35 EU/mL, 0.35 EU/mL \pm 0.12 EU/mL vs 1.73 EU/mL \pm 0.31 EU/mL, $P < 0.05$; bacterial translocation in the liver: 16.67% vs 50%, 33.33% vs 66.67%, 50% vs 83.33%, 33.33% vs 83.33%, $P < 0.05$; spleen: 0 vs 33.33%, 16.67% vs 50%, 33.33% vs 66.67%, 33.33% vs 66.67%, $P < 0.05$; mesenteric lymph nodes: 50% vs 66.67%, 50% vs 83.33%, 50% vs 100%, 33.33% vs 100%, $P < 0.05$).

CONCLUSION: *Bifidobacterial* adhesin can improve the intestinal flora imbalance, reduce bacterial translocation and endotoxemia occurrence, and protect intestinal mucosal barrier function in rats after intestinal I/R injury.

© 2014 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: Adhesin; *Bifidobacterial*; Intestinal ischemia-reperfusion injury; Intestinal flora; Bacterial translocation; Endotoxemia

Zhong SS, Li SM, Zhang ZS. Effect of *bifidobacterial* adhesin on intestinal microflora and bacterial translocation induced by ischemia-reperfusion injury in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(24): 3632-3638 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/3632.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i24.3632>

摘要

目的: 观察双歧杆菌黏附素对大鼠肠缺血再灌注损伤(intestinal ischemia reperfusion injury, I/R)后肠道菌群和细菌易位的影响。

方法: SD大鼠72只随机分为假手术组(对照组, 24只)、I/R模型组(24只)和黏附素实验组(24只)。建模成功后6 h及1、4、7 d, 各组分别取6只大鼠剖杀, 观察肠道菌群和细菌易位的变化情况, 并检测各时间点血浆内毒素水平。

结果: I/R组各时点大鼠粪便中肠球菌(6.63 lgN/g \pm 1.06 lgN/g vs 5.26 lgN/g \pm 1.08 lgN/g, 9.44 lgN/g \pm 1.37 lgN/g vs 5.30 lgN/g \pm 1.12 lgN/g, 8.56 lgN/g \pm 1.35 lgN/g vs 4.99 lgN/g \pm 0.96 lgN/g, 8.23 lgN/g \pm 1.01 lgN/g vs 5.18 lgN/g \pm 1.03 lgN/g, $P < 0.05$)和肠杆菌(7.86 lgN/g \pm 1.17 lgN/g vs 6.39 lgN/g \pm 0.85 lgN/g, 9.49 lgN/g \pm 1.23 lgN/g vs 6.64 lgN/g \pm 1.44 lgN/g, 8.76 lgN/g \pm 0.86 lgN/g vs 6.52 lgN/g \pm 1.13 lgN/g, 8.89 lgN/g \pm 1.09 lgN/g vs 6.71 lgN/g \pm 0.98 lgN/g, $P < 0.05$)数量较对照组均明显升高, 产气荚膜梭菌数量在1 d(6.47 lgN/g \pm 1.43 lgN/g vs 4.51 lgN/g \pm 1.22 lgN/g, $P < 0.05$)、4 d(6.70 lgN/g \pm 1.16 lgN/g vs 4.71 lgN/g \pm 0.89 lgN/g, $P < 0.05$)、7 d(6.55 lgN/g \pm 1.29 lgN/g vs 4.46 lgN/g \pm 0.79 lgN/g, $P < 0.05$)时较对照组均明显升高, 双歧杆菌(6.13 lgN/g \pm 1.28 lgN/g vs 9.02 lgN/g \pm 1.10 lgN/g, 5.59 lgN/g \pm 1.22 lgN/g vs 8.66 lgN/g \pm 0.99 lgN/g, $P < 0.05$)、乳杆菌数量(6.07 lgN/g \pm 1.09 lgN/g vs 9.08 lgN/g \pm 1.04 lgN/g, 5.35 lgN/g \pm 1.26 lgN/g vs 8.89 lgN/g \pm 0.97 lgN/g, $P < 0.05$)在4、7 d时较对照组明显降低; 实验组粪便中肠球菌(6.37 lgN/g \pm 1.04 lgN/g vs 8.56 lgN/g \pm 1.35 lgN/g, 5.42 lgN/g \pm 0.92 lgN/g vs 8.23 lgN/g \pm 1.01 lgN/g, $P < 0.05$)和肠杆菌数量(7.55 lgN/g \pm 1.03 lgN/g vs 8.76 lgN/g \pm 0.86 lgN/g, 7.16 lgN/g \pm 0.86 lgN/g vs 8.89 lgN/g \pm 1.09 lgN/g, $P < 0.05$)在4、7 d时均明显低于I/R组, 在1、4、7 d时粪便中产气荚膜梭菌数量虽仍高于对照组(5.95 lgN/g \pm 1.24 lgN/g vs 4.51 lgN/g \pm 1.22 lgN/g, 6.08 lgN/g \pm 1.07 lgN/g vs 4.71 lgN/g \pm 0.89 lgN/g, 5.87 lgN/g \pm 0.82 lgN/g vs 4.46 lgN/g \pm 0.79 lgN/g, $P < 0.05$), 但较I/R组已有所下降, 各时点双歧杆菌(8.56 lgN/g \pm 0.85 lgN/g vs 8.45 lgN/g \pm 0.86

■ 研发前沿

应用益生菌制剂纠正肠道菌群紊乱, 保护肠道屏障功能, 减少细菌易位已有较多报道。但由于制造与保存活菌的难度较大及活菌在肠道黏附定植的数量较少。因此, 寻找、利用益生菌的菌体成分或代谢产物进行肠屏障功能的保护研究, 不失为一条新的临床思路, 具有重要临床应用价值。

■相关报道

Bruzzese等应用益生菌制剂纠正肠道菌群紊乱,保护肠道屏障功能,减少细菌易位,还有使用菌群均衡的大便回输到患者肠道内治愈艰难梭菌感染及成功应用于治疗炎症性肠病、肠易激综合征等肠道疾病的报道。我们前期的研究发现:双歧杆菌分泌型黏附素可以明显抑制多种炎性细胞因子的表达,对I/R后肠屏障功能障碍具有防护作用。

lgN/g, 7.89 lgN/g \pm 1.47 lgN/g vs 8.78 lgN/g \pm 1.06 lgN/g, 8.67 lgN/g \pm 1.13 lgN/g vs 9.02 lgN/g \pm 1.10 lgN/g, 8.75 lgN/g \pm 0.96 lgN/g vs 8.66 lgN/g \pm 0.99 lgN/g, $P>0.05$)和乳杆菌数量(9.16 lgN/g \pm 0.94 lgN/g vs 8.91 lgN/g \pm 1.06 lgN/g, 8.56 lgN/g \pm 1.21 lgN/g vs 9.11 lgN/g \pm 1.13 lgN/g, 9.16 lgN/g \pm 1.08 lgN/g vs 9.08 lgN/g \pm 1.04 lgN/g, 9.01 lgN/g \pm 0.95 lgN/g vs 8.89 lgN/g \pm 0.97 lgN/g, $P>0.05$)则较对照组均无显著变化; I/R组各时点血浆内毒素水平(1.43 EU/mL \pm 0.32 EU/mL vs 0.21 EU/mL \pm 0.18 EU/mL, 1.84 EU/mL \pm 0.24 EU/mL vs 0.30 EU/mL \pm 0.23 EU/mL, 1.69 EU/mL \pm 0.35 EU/mL vs 0.26 EU/mL \pm 0.21 EU/mL, 1.73 EU/mL \pm 0.31 EU/mL vs 0.28 EU/mL \pm 0.19 EU/mL, $P<0.05$)及肝(50% vs 0, 66.67% vs 16.67%, 83.33% vs 0, 83.33% vs 0, $P<0.05$)、脾(33.33% vs 0, 50% vs 0, 66.67% vs 0, 66.67% vs 0, $P<0.05$)和肠系膜淋巴结(66.67% vs 0, 83.33% vs 0, 100% vs 16.67%, 100% vs 0, $P<0.05$)细菌易位率均明显高于对照组, 实验组各时点血浆内毒素水平(0.57 EU/mL \pm 0.23 EU/mL vs 1.43 EU/mL \pm 0.32 EU/mL, 0.71 EU/mL \pm 0.16 EU/mL vs 1.84 EU/mL \pm 0.24 EU/mL, 0.41 EU/mL \pm 0.22 EU/mL vs 1.69 EU/mL \pm 0.35 EU/mL, 0.35 EU/mL \pm 0.12 EU/mL vs 1.73 EU/mL \pm 0.31 EU/mL, $P<0.05$)及肝(16.67% vs 50%, 33.33% vs 66.67%, 50% vs 83.33%, 33.33% vs 83.33%, $P<0.05$)、脾(0 vs 33.33%, 16.67% vs 50%, 33.33% vs 66.67%, 33.33% vs 66.67%, $P<0.05$)和肠系膜淋巴结(50% vs 66.67%, 50% vs 83.33%, 50% vs 100%, 33.33% vs 100%, $P<0.05$)细菌易位率均明显低于I/R组。

结论: 双歧杆菌分泌型黏附素可改善I/R后肠道菌群失衡,减少肠道细菌易位及内毒素血症的发生,保护肠黏膜屏障功能。

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词: 黏附素; 双歧杆菌; 肠缺血再灌注损伤; 肠道菌群; 细菌易位; 内毒素血症

核心提示: 本文观察了双歧杆菌黏附素对大鼠肠道缺血再灌注损伤(intestine ischemia/reperfusion injury, I/R)后肠道菌群和细菌易位的影响,发现双歧杆菌分泌型黏附素可改善I/R后肠道菌群失衡,减少肠道细菌易位及内毒素血症的发生。作为一种菌体成分,黏附素保存、运输方便,又避免了益生菌的其他一些不足之处,因此为肠屏障功能障碍的防护提供了一条崭新的临床思路。

钟世顺, 李淑梅, 张振书. 双歧杆菌黏附素对大鼠肠缺血再灌注损伤后肠道菌群和细菌易位的影响. 世界华人消化杂志 2014; 22(24): 3632-3638 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/3632.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i24.3632>

0 引言

肠道缺血再灌注损伤(intestine ischemia/reperfusion injury, I/R)后造成肠黏膜屏障破坏、微生态失调及宿主免疫防御系统损伤,导致肠道细菌易位、内毒素血症及肠源性炎症介质和细胞因子释放,继而发生内源性感染及多器官损伤。因此阻止缺血再灌注损伤时肠道细菌易位的发生对减少内源性感染及多器官损伤,保护肠黏膜屏障功能具有重要意义。本研究应用I/R大鼠模型及双歧杆菌黏附素,探讨新型无细胞生态制剂对实验性大鼠肠缺血再灌注损伤后肠道菌群和细菌易位的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 72只4-6周龄健康清洁级SD大鼠,体重220-300 g,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司[动物编号: SCXK(沪)2007-0005]。采用简单随机抽样法将实验动物分为3组,模型组(I/R组, $n = 24$)造模前后正常喂养加等量生理盐水灌胃;双歧杆菌黏附素预处理组(实验组, $n = 24$)建模前7 d开始给予正常喂养加黏附素5 mg/(kg \cdot d)灌胃,直至术后7 d剖杀完毕;假手术组(对照组, $n = 24$)造模前后始终给予正常喂养。3组均于建模后6 h、1、4和7 d各取材6只大鼠。

1.2 方法

1.2.1 双歧杆菌分泌型黏附素的提取及纯化: 按郑跃杰等^[1]报道的方法,将青春型双歧杆菌1027菌株(*Bifidobacterium adolescentis* 1027, *B. ado* 1027)接种于硫乙醇酸盐液体培养基,置厌氧培养箱37 $^{\circ}$ C培养48 h离心收集培养上清,经饱和硫酸铵沉淀,Superdex75柱凝胶过滤, Q-Sepharose FF离子交换层析后,收集第一峰,其分子量为16 kDa,冻干保存。

1.2.2 I/R动物模型: 每个时间点大鼠经氯胺酮0.2 mL/100 g腹腔注射麻醉后,仰卧固定于操作板,消毒后取腹正中切口长约3 cm进腹,用温盐水纱布将肠管推向左侧腹腔,暴露右肾内上方的肠系膜根部,找到肠系膜前动脉,以显微手术器械分离肠系膜前动脉,用无损伤动脉夹夹闭肠系膜上动脉起始部45 min造成肠缺血模型,然

表 1 各组大鼠肠道菌群的变化结果 ($n = 24$, mean \pm SD, lgN/g)

分组	时间			
	6 h	1 d	4 d	7 d
肠球菌				
对照组	5.26 \pm 1.08	5.30 \pm 1.12	4.99 \pm 0.96	5.18 \pm 1.03
I/R组	6.63 \pm 1.06 ^a	9.44 \pm 1.37 ^a	8.56 \pm 1.35 ^a	8.23 \pm 1.01 ^a
实验组	5.58 \pm 1.12	8.69 \pm 1.45 ^a	6.37 \pm 1.04 ^{ab}	5.42 \pm 0.92 ^b
肠杆菌				
对照组	6.39 \pm 0.85	6.64 \pm 1.44	6.52 \pm 1.13	6.71 \pm 0.98
I/R组	7.86 \pm 1.17 ^a	9.49 \pm 1.23 ^a	8.76 \pm 0.86 ^a	8.89 \pm 1.09 ^a
实验组	6.43 \pm 1.25	8.88 \pm 1.56 ^a	7.55 \pm 1.03 ^{ab}	7.16 \pm 0.86 ^b
产气荚膜梭菌				
对照组	4.53 \pm 0.78	4.51 \pm 1.22	4.71 \pm 0.89	4.46 \pm 0.79
I/R组	5.22 \pm 1.05	6.47 \pm 1.43 ^a	6.70 \pm 1.16 ^a	6.55 \pm 1.29 ^a
实验组	5.13 \pm 1.26	5.95 \pm 1.24 ^a	6.08 \pm 1.07 ^a	5.87 \pm 0.82 ^a
双歧杆菌				
对照组	8.45 \pm 0.86	8.78 \pm 1.06	9.02 \pm 1.10	8.66 \pm 0.99
I/R组	8.21 \pm 1.03	7.81 \pm 1.15	6.13 \pm 1.28 ^a	5.59 \pm 1.22 ^a
实验组	8.56 \pm 0.85	7.89 \pm 1.47	8.67 \pm 1.13	8.75 \pm 0.96
乳酸杆菌				
对照组	8.91 \pm 1.06	9.11 \pm 1.13	9.08 \pm 1.04	8.89 \pm 0.97
I/R组	8.33 \pm 1.10	8.24 \pm 1.18	6.07 \pm 1.09 ^a	5.35 \pm 1.26 ^a
实验组	9.16 \pm 0.94	8.56 \pm 1.21	9.16 \pm 1.08	9.01 \pm 0.95

^a $P < 0.05$ vs 对照组; ^b $P < 0.01$ vs I/R组. I/R: 肠道缺血再灌注损伤.

后松夹恢复肠系膜上动脉血流, 7.0号线双层缝合关闭腹腔. 假手术组只作剖腹, 血管游离, 不作血管夹闭, 45 min后同上方法关闭腹腔.

1.2.3 标本的采集和处理: 各组分别于再灌注后6h、1、4、7 d无菌收集实验大鼠粪便样品约0.1 g, 低温厌氧条件运送, 4 h内完成样品稀释处理, 分别倾注于各培养基中培养, 按照张秀荣^[2]方法经菌落特征、革兰氏染色、镜检等初步鉴定后计数, 计算出每克湿粪便中的双歧杆菌、乳杆菌、肠杆菌、肠球菌、产气荚膜梭菌的数量. 同时各组分别于上述各时间段麻醉下从腹腔静脉取血1 mL, 1000 r/min低温离心15 min, 分离血浆-80 °C中保存, 采用偶氮基质显色鲎试验定量法(试剂盒由厦门市鲎试剂实验厂有限公司提供)测定血浆内毒素. 测定血浆内毒素所用实验器材均经⁶⁰Co照射去热原. 处死动物后取肝、脾及肠系膜淋巴结, 匀浆后将组织匀浆液200 μ L涂于血琼脂平板和麦康凯平板进行细菌培养, 37 °C孵育24 h后计数菌落数, 评价细菌易位情况. 凡培养基中有细菌生长者即判为细菌易位阳性^[3].

统计学处理 应用SPSS13.0统计软件分析,

计量数据采用mean \pm SD表示, 多组间计量资料比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA), 组间有显著性差异时, 采用最小显著差法(LSD)进行两两比较. 检验水准 $\alpha = 0.05$. 细菌易位率采用精确 χ^2 检验. $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 各组大鼠肠道菌群的变化 I/R组各时点大鼠粪便中肠球菌和肠杆菌数量较对照组均明显升高($P < 0.05$); 实验组在1 d时肠球菌和肠杆菌数量也较对照组有明显升高($P < 0.05$), 在第4 d时虽也较对照组升高, 但已明显低于I/R组($P < 0.05$), 而在第7 d时实验组粪便中肠球菌和肠杆菌数量均已基本降至对照组水平. I/R组大鼠粪便中产气荚膜梭菌数量在1、4、7 d时较对照组均明显升高($P < 0.05$); 而实验组大鼠在1、4、7 d时粪便中产气荚膜梭菌数量虽仍高于对照组($P < 0.05$)但较I/R组已有所下降. I/R组大鼠粪便中双歧杆菌、乳杆菌数量在4、7 d时较对照组明显降低($P < 0.05$); 而实验组大鼠在各时点双歧杆菌和乳杆菌数量较对照组差异均无统计学意义($P > 0.05$)(表1).

■创新盘点

本文观察双歧杆菌黏附素对大鼠I/R后肠道菌群和细菌易位的影响, 发现双歧杆菌分泌型黏附素可改善I/R后肠道菌群失衡, 减少肠道细菌易位及内毒素血症的发生, 保护肠黏膜屏障功能.

■应用要点

本研究发现双歧杆菌分泌型黏附素可改善I/R后肠道菌群失衡,减少肠道细菌易位及内毒素血症的发生,提示寻找、利用益生菌的菌体成分或代谢产物进行肠屏障功能的防护不失为一条新的临床思路。

表 2 各组大鼠血浆内毒素测定结果的比较 ($n = 24$, mean \pm SD, EU/mL)

分组	时间			
	6 h	1 d	4 d	7 d
对照组	0.21 \pm 0.18	0.30 \pm 0.23	0.26 \pm 0.21	0.28 \pm 0.19
I/R组	1.43 \pm 0.32 ^a	1.84 \pm 0.24 ^a	1.69 \pm 0.35 ^a	1.73 \pm 0.31 ^a
实验组	0.57 \pm 0.23 ^{ad}	0.71 \pm 0.16 ^{ad}	0.41 \pm 0.22 ^d	0.35 \pm 0.12 ^d

^a $P < 0.05$ vs 对照组; ^d $P < 0.01$ vs I/R组. I/R: 肠道缺血再灌注损伤。

表 3 各组大鼠肝、脾及肠系膜淋巴结中细菌检测情况 $n(\%)$

分组	时间			
	6 h	1 d	4 d	7 d
肝				
对照组	0(0)	1(16.67)	0(0)	0(0)
I/R组	3(50) ^a	4(66.67) ^a	5(83.33) ^a	5(83.33) ^a
实验组	1(16.67) ^b	2(33.33) ^b	3(50) ^b	2(33.33) ^b
脾				
对照组	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
I/R组	2(33.33) ^a	3(50) ^a	4(66.67) ^a	4(66.67) ^a
实验组	0(0) ^b	1(16.67) ^b	2(33.33) ^b	2(33.33) ^b
肠系膜淋巴结				
对照组	0(0)	0(0)	1(16.67)	0(0)
I/R组	4(66.67) ^a	5(83.33) ^a	6(100) ^a	6(100) ^a
实验组	3(50) ^b	3(50) ^b	3(50) ^b	2(33.33) ^b

^a $P < 0.05$ vs 对照组; ^b $P < 0.01$ vs I/R组. I/R: 肠道缺血再灌注损伤。

2.2 各组大鼠血浆内毒素测定 结果显示, I/R组各时点血浆内毒素水平均明显高于对照组($P < 0.05$), 实验组各时点血浆内毒素水平均明显低于I/R组($P < 0.05$), 但在6 h和1 d时仍明显高于对照组($P < 0.05$)(表2)。

2.3 各组大鼠肝、脾及肠系膜淋巴结中细菌检测 对照组肝和肠系膜淋巴结各有1例细菌培养见细菌生长, 其余器官组织均无细菌生长。I/R组各时点肝、脾和肠系膜淋巴结细菌易位率均显著升高, 而实验组各时点肝、脾和肠系膜淋巴结细菌易位率均明显低于I/R组($P < 0.05$)(表3)。

3 讨论

肠道是对I/R最敏感的组织之一, 在严重感染、创伤、休克、多器官功能障碍等疾病的病理改变过程中起重要作用^[4,5]。肠I/R引起肠组织损伤, 黏膜屏障功能受损, 导致肠内细菌和内毒素易位到体循环, 引起网状内皮系统发生系列反应, 进而导致大量相关介质及细胞因子释放, 引起全身炎症反应综合征(systemic inflammatory

response syndrome, SIRS)、多器官功能障碍综合征(multiple organs dysfunction syndromes, MODS), 甚至死亡^[6]。

应用益生菌制剂纠正肠道菌群紊乱, 保护肠道屏障功能, 减少细菌易位已有较多报道^[7-10]。甚至有使用菌群均衡的大便回输到患者肠道内治愈艰难梭菌感染及成功应用于治疗炎症性肠病、肠易激综合征等肠道疾病的报道^[11,12]。但活菌制剂应用于肠屏障功能障碍可能存在几个问题: (1)制造与保存活菌的难度较大; (2)活菌在肠道黏附定植的数量较少; (3)活菌在肠屏障功能障碍患者肠道可能由于局部气体和生长底物的不足而难以足量繁殖, 且如果该菌穿过肠壁, 也可促进败血症的发生。因此, 寻找、利用益生菌的菌体成分或代谢产物进行肠屏障功能的保护研究, 不失为一条新的临床思路, 具有重要临床应用价值。黏附素是微生物的一类特殊物质, 与微生物的黏附密切相关, 可能是蛋白质、多肽、糖蛋白、糖脂、多糖或单糖, 对益生菌而言, 黏附素不但可以介导母菌对靶细胞

的黏着, 并激发细胞内信号传导途径; 而且可以通过竞争抑制等机制阻断某些有害菌对靶细胞的黏着^[13,14]. 我们既往的研究表明: 双歧杆菌分泌型黏附素可以明显抑制肠上皮细胞核转录因子 κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)的活化, 降低肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白介素 1β (interleukin- 1β , IL- 1β)和IL-8等炎症细胞因子mRNA的表达, 从而减轻肠上皮细胞的损伤, 可能对维持肠黏膜屏障的完整性具有一定保护作用^[15]. 体内试验也发现双歧杆菌黏附素可能通过抑制促炎细胞因子TNF- α 、IL-6以及降低肠黏膜通透性, 从而具有防护大鼠I/R后肠屏障功能障碍的作用^[16]. 但是, 双歧杆菌黏附素是否通过抑制肠内细菌和内毒素易位, 减少炎症相关介质及细胞因子的释放, 从而对I/R后肠屏障功能障碍产生防护作用, 尚不清楚. 本研究应用我们前期从青春型双歧杆菌培养上清液中提取的黏附素, 观察其对实验性大鼠I/R后肠道菌群和细菌易位的影响.

肠道屏障功能是指生理状态下肠道上皮可将肠腔内物质与机体内环境分隔开来, 防止各种致病菌的侵入, 并有效抑制内源性微生物及其毒素穿过肠黏膜进入其他组织器官和血液循环, 保持机体内环境相对稳定. 正常情况下, 肠道内乳酸杆菌、双歧杆菌等优势菌群通过营养、免疫调节等作用, 形成微生态平衡, 维持肠屏障功能的完整. 本实验结果显示肠I/R后大鼠粪便中肠球菌、肠杆菌和产气荚膜梭菌数量较对照组均明显升高, 而双歧杆菌、乳杆菌数量较对照组降低. 说明肠I/R后肠道菌群结构发生了很大变化, 呈现一种失衡状态. 其中肠球菌、肠杆菌和产气荚膜梭菌等条件致病菌数量显著增加, 而双歧杆菌、乳杆菌数量明显减少. 肠道内致病菌增多, 可通过分泌肠毒素、免疫抑制性蛋白以及直接侵袭、损伤和影响肠上皮细胞的能量代谢等作用^[17], 导致肠上皮细胞损伤, 肠上皮通透性增高, 最终导致细菌和内毒素易位, 肠屏障功能受损. 经双歧杆菌黏附素处理后, 大鼠粪便中肠球菌和肠杆菌数量逐渐下降, 第4天时已明显低于I/R组, 至第7天时肠球菌和肠杆菌数量均已基本降至对照组水平; 而各时点双歧杆菌和乳杆菌数量则较对照组均无显著变化; 产气荚膜梭菌数量虽仍高于对照组, 但较I/R组已有所下降, 说明双歧杆菌黏附素对恢复肠道微生态平衡具有一定作用, 双歧杆菌和乳杆菌是肠道生物屏障中最重要的两种益生菌^[18], 他

们与肠黏膜紧密黏附, 通过分泌细菌毒素、短链脂肪酸、抑菌肽、促进肠蠕动、调节肠道免疫、占据致病菌黏附位点以及争夺营养素等防止有害细菌的侵入, 形成肠道生物屏障, 参与维持肠屏障功能的完整.

本研究选取血浆内毒素和肝、脾、肠系膜淋巴结细菌易位率等指标来评价肠上皮屏障功能的完整性, 结果表明: 肠I/R后, 肠道上皮屏障受损, 肠通透性增加, 导致了内毒素血症和细菌易位的发生; 而经双歧杆菌黏附素处理后, 血浆内毒素水平及肝、脾和肠系膜淋巴结细菌易位率均明显低于I/R组. 说明双歧杆菌黏附素可通过改善肠道菌群, 增加肠道内益生菌数量, 从而改善肠屏障功能, 降低细菌易位率的发生, 抑制肠源性内毒素血症的发生, 增强肠道抗感染能力.

4 参考文献

- 1 郑跃杰, 潘令嘉, 王立生, 周殿元, 郭立安, 闫哲. 双歧杆菌黏附素的提纯及鉴定. 世界华人消化杂志 2002; 10: 1149-1151
- 2 张秀荣. 肠道菌群粪便涂片检查图谱. 北京: 人民军医出版社, 2000: 1-15
- 3 Kuru B, Dinc S, Altinok G, Aksoz T, Camlibel M, Gulcelik MA, Alagol H. Effect of different enteral nutrients on bacterial translocation in experimental obstructive jaundice. *Eur Surg Res* 2004; 36: 45-52 [PMID: 14730223]
- 4 Kuwabara Y, Kato T, Sato A, Fujii Y. Prolonged effect of leukocytosis on reperfusion injury of rat intestine: real-time ATP change studied using (31)P MRS. *J Surg Res* 2000; 89: 38-42 [PMID: 10720451]
- 5 屠伟峰, 肖光夏. “休克肠”与多脏器功能障碍. 中华麻醉学杂志 2002; 22: 125-128
- 6 Mura M, Andrade CF, Han B, Seth R, Zhang Y, Bai XH, Waddell TK, Hwang D, Keshavjee S, Liu M. Intestinal ischemia-reperfusion-induced acute lung injury and oncotic cell death in multiple organs. *Shock* 2007; 28: 227-238 [PMID: 17666944]
- 7 Liu C, Zhang ZY, Dong K, Guo XK. Adhesion and immunomodulatory effects of Bifidobacterium lactis HN019 on intestinal epithelial cells INT-407. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 2283-2290 [PMID: 20458767]
- 8 Bruzzese E, Callegari ML, Raia V, Viscovo S, Scotto R, Ferrari S, Morelli L, Buccigrossi V, Lo Vecchio A, Ruberto E, Guarino A. Disrupted intestinal microbiota and intestinal inflammation in children with cystic fibrosis and its restoration with Lactobacillus GG: a randomised clinical trial. *PLoS One* 2014; 9: e87796 [PMID: 24586292 DOI: 10.1371/journal.pone.0087796.eCollection2014]
- 9 Song J, Xiao K, Ke YL, Jiao LF, Hu CH, Diao QY, Shi B, Zou XT. Effect of a probiotic mixture on intestinal microflora, morphology, and barrier integrity of broilers subjected to heat stress. *Poult Sci* 2014; 93: 581-588 [PMID: 24604851 DOI: 10.3382/ps.2013-03455]
- 10 Sarowska J, Choroszy-Król I, Regulska-Ilow B, Frej-Mądrzak M, Jama-Kmiecik A. The therapeutic

■名词解释

黏附素: 微生物的一类特殊物质, 与微生物的黏附密切相关, 可能是蛋白质、多肽、糖蛋白、糖脂、多糖或单糖, 对益生菌而言, 黏附素不但可以介导母菌对靶细胞的黏着, 并激发细胞内信号传导途径; 而且可以通过竞争抑制等机制阻断某些有害菌对靶细胞的黏着.

■同行评价

本文观察了双歧杆菌黏附素对大鼠I/R后肠道菌群和细菌易位的影响,发现双歧杆菌分泌型黏附素可改善I/R后肠道菌群失衡,减少肠道细菌易位及内毒素血症的发生,对临床防治I/R有一定的应用价值。

- effect of probiotic bacteria on gastrointestinal diseases. *Adv Clin Exp Med* 2013; 22: 759-766 [PMID: 24285463]
- 11 Grehan MJ, Borody TJ, Leis SM, Campbell J, Mitchell H, Wettstein A. Durable alteration of the colonic microbiota by the administration of donor fecal flora. *J Clin Gastroenterol* 2010; 44: 551-561 [PMID: 20716985 DOI: 10.1097/MCG.0b0Be3181e5d06b]
- 12 Aroniadis OC, Brandt LJ. Fecal microbiota transplantation: past, present and future. *Curr Opin Gastroenterol* 2013; 29: 79-84 [PMID: 23041678 DOI: 10.1097/MOG.0b013e32835a4b3e]
- 13 Hoarau C, Martin L, Faugaret D, Baron C, Dauba A, Aubert-Jacquin C, Velge-Roussel F, Lebranchu Y. Supernatant from bifidobacterium differentially modulates transduction signaling pathways for biological functions of human dendritic cells. *PLoS One* 2008; 3: e2753 [PMID: 18648505 DOI: 10.1371/journal.pone.0002753]
- 14 Vaughan EE, Mollet B. Probiotics in the new millennium. *Nahrung* 1999; 43: 148-153 [PMID: 10399346]
- 15 钟世顺, 张振书, 李淑梅, 赖卓胜, 李东良. 双歧杆菌分泌型黏附素对肠上皮细胞应激反应的影响. *中华消化杂志* 2011; 31: 744-749
- 16 钟世顺, 宋京翔, 张振书, 李淑梅, 王烈. 双歧杆菌黏附素对大鼠肠缺血再灌注损伤的防护作用. *中华内科杂志* 2011; 50: 863-867
- 17 Shih DQ, Targan SR. Insights into IBD Pathogenesis. *Curr Gastroenterol Rep* 2009; 11: 473-480 [PMID: 19903423]
- 18 Turroni F, Marchesi JR, Foroni E, Gueimonde M, Shanahan F, Margolles A, van Sinderen D, Ventura M. Microbiomic analysis of the bifidobacterial population in the human distal gut. *ISME J* 2009; 3: 745-751 [PMID: 19295640 DOI: 10.1038/ismej.2009.19]

编辑 郭鹏 电编 闫晋利



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)

结肠癌HCT116细胞在不同氧供状态下的氨基酸代谢变化

张小占, 戚文娟, 孔祥涛, 于庆功

张小占, 孔祥涛, 于庆功, 大连大学附属中山医院消化内科
辽宁省大连市 116001

戚文娟, 大连大学附属新华医院消化内科 辽宁省大连市
116021

作者贡献分布: 此课题是由于庆功与张小占设计; 细胞培养是由
张小占、孔祥涛及戚文娟参与完成; 数据分析及论文写作是由
张小占完成。

通讯作者: 于庆功, 主任医师, 116001, 辽宁省大连市中山区解放
街6号, 大连大学附属中山医院消化内科. yuqing-669@sohu.com
电话: 0411-62893717

收稿日期: 2014-05-15 修回日期: 2014-06-26

接受日期: 2014-07-05 在线出版日期: 2014-08-28

Changes of amino acid metabolism in colon cancer HCT116 cells under different oxygen supply conditions

Xiao-Zhan Zhang, Wen-Juan Qi, Xiang-Tao Kong,
Qing-Gong Yu

Xiao-Zhan Zhang, Xiang-Tao Kong, Qing-Gong Yu,
Department of Gastroenterology, the Affiliated Zhongshan
Hospital of Dalian University, Dalian 116001, Liaoning
Province, China

Wen-Juan Qi, Department of Gastroenterology, the Affili-
ated Xinhua Hospital of Dalian University, Dalian 116021,
Liaoning Province, China

Correspondence to: Qing-Gong Yu, Chief Physician,
Department of Gastroenterology, the Affiliated Zhongshan
Hospital of Dalian University, 6 Jiefang Street, Zhongshan
District, Dalian 116001, Liaoning Province,
China. yuqing-669@sohu.com

Received: 2014-05-15 Revised: 2014-06-26

Accepted: 2014-07-05 Published online: 2014-08-28

Abstract

AIM: To identify metabolic changes of amino acids in HCT116 cells under low (5%) and normal oxygen (21%) supply conditions through metabonomic analysis, and to find new markers for early diagnosis and surgical and treatment effect monitoring, and new targets for colon cancer treatment.

METHODS: High performance liquid chromatography-mass spectrometry (UPLC-MS) was used to detect 40 kinds of amino acids in HCT116 cells under low (5%) and normal oxygen (21%) supply conditions. A total of 36 kinds of amino acids were detected.

RESULTS: Twenty different amino acids showed significant differences between HCT116 cells under low and normal oxygen supply conditions ($P < 0.05$), with isoleucine being the most significant.

CONCLUSION: Metabolic changes of amino acids occur in HCT116 cells under different oxygen supply conditions. The content of isoleucine in HCT116 cells is significantly higher under normal oxygen condition than under low oxygen condition.

© 2014 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: Metabonomics; Colon cancer; Amino acids; HCT116

Zhang XZ, Qi WJ, Kong XT, Yu QG. Changes of amino acid metabolism in colon cancer HCT116 cells under different oxygen supply conditions. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(24): 3639-3643 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/3639.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i24.3639>

摘要

目的: 找出HCT116在低氧(5%O₂)与常氧(21%O₂)的状态下代谢异常的氨基酸, 通过代谢组学分析, 找到新型标志物用于结肠癌的早期诊断、手术和治疗效果的监测, 寻找结肠癌治疗的新靶点。

方法: 应用高液相色谱-质谱(ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry, UPLC-MS)联用技术对于诊断明确的同一批细胞进行培养传代一系列的过程之后(低氧、常氧各12大瓶)查找40种氨基酸进行检测, 共计检测出36种氨基酸。

结果: 对检测所得数据进行两独立样本的 t 检验寻找差异氨基酸($P < 0.05$): 发现有20种差异氨基酸, 丝氨酸、甘氨酸、亮氨酸及异亮氨酸在常氧组较低氧组增高, 其他氨基酸降低, 其中异亮氨酸的差异性最为显著。

■背景资料

结肠癌是消化系统主要的恶性肿瘤之一, 在发达国家的发生率及死亡率颇高, 在我国也在日趋增加, 严重威胁人类的健康, 对于其发现及治疗无疑是内镜和手术、放化疗。代谢组学将高通量、高分辨率的分析技术与生物信息学相整合, 对生物代谢层面进行研究, 提供了了解生物体的独特视角, 本文就代谢组学研究结肠癌, 为其从分子角度的研究打下基础。

■同行评议者

于珮, 主任医师, 天津医科大学代谢病医院

■研究前沿

本文的研究热点在于普遍认为结肠癌只能通过临床才能发现与治疗,而本文从分子学角度去研究结肠癌。研究重点:本文从代谢组学方面研究结肠癌细胞中氨基酸的代谢变化,发现中间的异常变化的氨基酸,为结肠癌的诊治提供新思路。亟待解决的问题:代谢组学研究结肠癌的发现对于临床的应用的实践性。

■相关报道

代谢组学在临床研究的相关报道较为少见,属于一种新型研究范畴,如吴卉写过一篇代谢组学在结直肠癌的应用进展的综述及汪雪梅写过代谢组学在肿瘤个体化治疗的研究进展等等,他们都提到代谢组学对于结肠癌的诊治有一定的帮助性。

结论: HCT116在不同培养状态下代谢变化中确实存在差异的氨基酸,尤其以异亮氨酸差异性最大,在常氧HCT116中的含量明显高于低氧HCT116,从而能够通过分子学角度对结肠癌的早期诊断及治疗方面带来新突破。

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词: 代谢组学; 结肠癌; 氨基酸; HCT116

核心提示: 本文通过寻找HCT116在低氧(5%O₂)与常氧(21%O₂)的状态下代谢异常的氨基酸,通过代谢组学分析,找到新型标志物用于结肠癌的早期诊断、手术和治疗效果的监测,寻找结肠癌治疗的新靶点。

张小占, 戚文娟, 孔祥涛, 于庆功. 结肠癌HCT116细胞在不同氧供状态下的氨基酸代谢变化. 世界华人消化杂志 2014; 22(24): 3639-3643 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/3639>. asp DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v22.i24.3639>

0 引言

结肠癌是消化系主要的恶性肿瘤之一,在发达国家高居癌症发病率的第1位、死亡率第2位^[1,2],嘉善县是我国大肠癌的高发地区,对其地区的发病分析,结肠癌的发病率呈逐年的上升趋势^[3],严重威胁人类的健康。为了提高结肠癌患者的生存率,临床医生以粪便隐血试验(fecal occult blood test, FOBT)作为主要检查手段,实验证明,FOBT尽管减少了结肠癌的死亡率,但也缺乏一些敏感性、特异性^[4]。代谢组学将高通量、高分辨率的分析技术与生物信息学相整合,对生物代谢层面进行研究,提供了了解生物体的独特视角^[5]。代谢组学(metabolomics)处于基因组和蛋白质组的下游,是基因组和蛋白质组的补充,能够更为灵敏地鉴定出基因改变、疾病和环境因素作用所产生的特定代谢型(metabotype)^[6-8]。正常组织细胞内属于常氧状态,而肿瘤组织由于生长迅速,肿瘤细胞凋亡的速度明显低于其所对应的正常组织,故导致他对氧需求增加,使其处于乏氧状态,本实验所采用的两种不同氧供下的HCT116细胞(贴壁生长,呈上皮细胞样或多角,产生CEA、角蛋白,在无胸腺的裸鼠有致癌性,形成上皮样的肿瘤),就相当于我们将其放在不同的内环境下生长,我们通过对病理诊断明确的HCT116细胞在不同氧供下进行40种氨基酸的代谢组学检测(共检测出36种氨基酸),从中寻找差异性氨基酸,为下一步从分子学角度研

究结肠癌打下基础。

1 材料和方法

1.1 材料 细胞样本均来自大连大学附属中山医院,为本医院购买的HCT116细胞,细胞采集后放入-198℃的液氮保存。超净台,细胞培养箱,超高液相色谱质谱联用仪(UPLC-MS)(Waters, 美国);冷冻离心机(Biofuge startos)(Thermo, 德国);冻干机(Labconco, 美国);水浴锅(北京市广明医疗器械公司, 中国);超纯水系统(Milli-Q)(Millipore, 美国);氯仿、甲醇水(Burdick&Jackson, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 样品制备: 细胞复苏: (1)细胞室、细胞无菌操作台,紫外灯照射30 min。从液氮罐中取出本实验室冻存的人结肠癌细胞HCT116细胞,迅速放入39℃水浴锅中,轻轻摇晃,直至细胞冻存液完全变为液体; (2)将冻存管放入离心机中,4℃10000 r/min,离心3 min; (3)在超净台中,倒掉冻存管中的上清,加入1 mL培养基[含10%的含10%的胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)],吹打混匀后,吸入预先加好细胞培养基的培养瓶中,轻轻晃匀,将培养瓶盖稍旋开,放在CO₂培养箱(5%, 37℃)中培养。细胞传代: (1)取出细胞培养瓶,将瓶盖旋紧,在倒置显微镜下观察,待细胞生长状态较好且达到80%-90%汇合度时,可进行细胞传代,可按1:2或1:3的比例传代; (2)将培养瓶放在超净台中,点燃酒精灯,用无菌1×PBS洗3遍,加1 mL胰酶充分消化,加6 mL培养基终止消化,吹打混匀后吸出加入15 mL离心管中,4℃10000 r/min,离心3 min,弃上清,加入2 mL细胞培养基,吹打混匀后,吸入2个预先加好细胞培养基的培养瓶中,轻轻晃匀,将培养瓶盖稍旋开,放在CO₂培养箱中培养。

1.2.2 氨基酸检测: 从培养箱中取出细胞进行处理后到超声机上细胞超声,取上清,蛋白留置称干重。真空冷冻干燥机内冻干上清,封口膜封好,-80℃保存。冻干样品按1:1.5的比例加入甲醇水(甲醇:水=21:79)。取70 μL衍生缓冲液与10 μL样品复溶液于衍生进样瓶中,涡旋均匀。加入20 μL衍生试剂,涡旋数秒,于55℃水域中衍生10 min,上液相分析仪进样分析。

统计学处理 由超高液相色谱-质谱联用仪(ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry, UPLC-MS)获得的数据应用Waters公司的Masslynx V4.1软件进行分析,可获得24例细胞样本的36种氨基酸的峰面积的原始数据,

表 1 常氧HCT116组与低氧HCT116组的氨基酸峰值 (峰面积/净重 × 复溶体积 ± 5%误差值)的比较

氨基酸	常氧组	低氧组	P值	↑ ¹ 或↓ ²
3MH	627 ± 30	1259 ± 60	0.016	↓
Tau	374197 ± 15000	682897 ± 30000	0.027	↓
His	43708 ± 2000	84747 ± 4000	0.021	↓
Ser	407022 ± 20000	198006 ± 10000	0.018	↑
GIU	71537 ± 3500	97574 ± 4500	0.016	↓
Gly	985016 ± 45000	724144 ± 35000	0.039	↑
EA	918689 ± 45000	920823 ± 45000	0.014	↓
Met-SU	1515 ± 75	3208 ± 150	0.042	↓
Citrulline	4849 ± 250	9589 ± 500	0.049	↓
Thr	153750 ± 7500	294092 ± 15000	0.029	↓
Pro	542269 ± 25000	850600 ± 40000	0.014	↓
AABA	878 ± 40	1870 ± 100	0.015	↓
Tyr	183366 ± 10000	360608 ± 20000	0.029	↓
Met	25431 ± 750	31505 ± 1500	0.033	↓
Nval	75265 ± 3500	94874 ± 4500	0.019	↓
Leu	715221 ± 35000	576290 ± 30000	0.026	↑
Phe	335133 ± 15000	635982 ± 30000	0.028	↓
Trp	56576 ± 2500	80790 ± 4000	0.015	↓
Asn	76849 ± 3500	94905 ± 4500	0.033	↓
Ile	747787 ± 35000	397505 ± 20000	0.0001	↑

■创新盘点
本文从代谢组学方面研究结肠癌, 与其他文章不同的是, 本文采用分子细胞学研究, 应用色谱-质谱分析, 分析氨基酸的代谢变化, 从而进一步的研究结肠癌。

¹上升; ²下降.

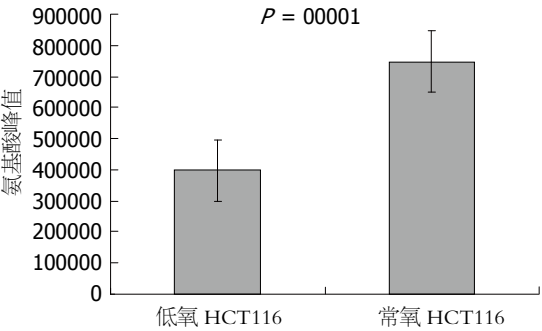


图 1 异亮氨酸在不同氧供下的变化.

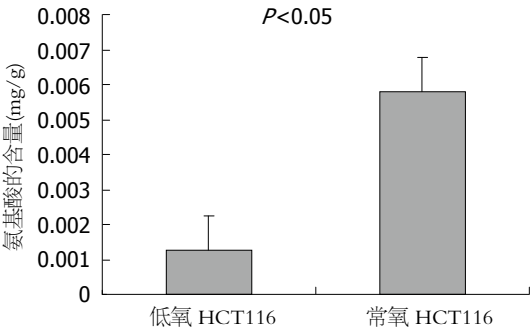


图 2 异亮氨酸在不同氧供下的绝对定量.

将峰面积除以浓缩倍数在除以净重进行标准化. 应用统计软件SPSS19.0对得到的数据进行分析, 对样品进行独立样本的t检验, 检验水准 α 取0.05. $P<0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

本实验对于24瓶HCT116在不同氧气供应下的40种氨基酸所检测出来的36种进行独立样本t检验: 发现有20种差异氨基酸, 其结果表现如表1, 其中以异亮氨酸差异性最大, 现将异亮氨酸的变化绘制如图1. 对发现的异亮氨酸的差异性, 为验证结果的正确性, 利用UPLC-MS对细胞内氨基酸的含量进行绝对定量分析, 得到结果

绘制如图2.

3 讨论

蛋白质是重要的营养成分, 是人类赖以生存的重要来源^[9], 有文献报道, 谷氨酰胺是肿瘤细胞的主要呼吸燃料和重要的氮源, 肿瘤细胞的生长依赖于谷氨酰胺及其中间代谢产物(谷氨酸、乳酸、脯氨酸、氨等)肿瘤细胞的生长速度与细胞内的谷氨酰胺浓度密切相关^[10]. 氨基酸是生物功能大分子蛋白质的基本组成单位, 对整个生命科学有着重要的意义^[11,12], 有研究表明^[13], 小肠吸收的食物氨基酸并不能全部进入门脉循环供肠外组织利用, 在机体首过代谢中, 他们会不

■应用要点
内镜是发现结肠癌的首选检查, 而此操作在操作过程中患者较为痛苦, 有些甚至不愿做, 从而不利于结肠癌的早期发现及预防恶化, 更不利普查, 代谢组学的发现能解决这些不必要的麻烦, 更利于结肠癌的早期的诊治. 在未来的前景, 代谢组学会慢慢为大家所熟悉接受.

■名词解释

代谢组学: 处于基因组和蛋白质组的下游, 是基因组和蛋白质组的补充, 能够更为灵敏地鉴定出基因改变、疾病和环境因素作用所产生的特定代谢型。

同程度地被门静脉排流组织(胃、小肠、结肠、胰和脾等实体组织集合的总称)截留, 而截留的大部分必需氨基酸被肠道组织吸收利用^[14]。食物中的必需氨基酸不仅是肠黏膜的能量物质, 而且还是肠道组织结合蛋白质、氨基酸、谷胱甘肽和多胺等含氮物质的底物, 在维持肠道健康方面发挥着重要作用^[15]。

本实验不选取肿瘤组织而是HCT116结肠癌细胞的原因: 一方面, 肿瘤组织是异质性的, 包括许多不同的细胞亚群, 这些亚群细胞在细胞表型、功能和基因表达等方面存在差异。另外, Ito等^[16]认为肿瘤干细胞是肿瘤组织中极小的一部分细胞群体, 但这一极小的群体往往能维持整个肿瘤的全部特性; 另一方面, HCT116细胞有着其自己的优点特性: 有实验研究^[17]发现HCT116细胞在无血清培养基中形成典型的“神经球”样结构, 展示了良好的体外自我更新能力以及很强的致瘤性, 其在数十年中依然具有很稳定的致瘤能力, 因此我们选HCT116细胞作为本实验的样本细胞进行研究。同样, 我们选取了两种不同状态(常氧21%O₂和低氧5%O₂), 这是由于21%O₂与外界空气类似, 普遍选来作为常氧状态, 而在5%O₂范围的细胞产生的二氧化碳最少, 这样的选取更为稳定准确的检测氨基酸的代谢变化。

通过相关文献我们不难发现, 肿瘤组织与正常组织之间确实存在氨基酸的差异变化, 而本实验通过对36种氨基酸做了独立样本的*t*检验, 发现低氧组与常氧组有20种差异氨基酸, 尤其是以异亮氨酸的差异最为显著。有文献报道^[18], 异亮氨酸对于人类来讲是安全保护的, 因为他不影响细胞的生长^[19], 而且Fehlbaum等^[20]报道到异亮氨酸及其类似物对于我们来讲具有高度的防御作用。我们都知道^[21-23], 血管生成是肿瘤生长的关键过程, 而且已有文献报道^[24,25], 亮氨酸具有促进生成的作用, 对于异亮氨酸来讲, 亦是如此, 且有实验证实^[19], 经过异亮氨酸治疗的小鼠没有患有癌症。

总之, 通过文献的发现也证实了本实验的结果, 即在正常氧气供应下的HCT116细胞相比于低氧状态下, 异亮氨酸的含量要高, 更能进一步说明我们可以通过分子学角度来研究结肠癌, 也为结肠癌的治疗提供了更多的帮助。

4 参考文献

- 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]

- 吴雨岗, 柯宋兵, 汪良, 李德春. CD40L刺激的DC疫苗抗结肠癌作用的体外研究. *现代免疫学* 2011; 31: 223-227
- 姚开颜, 马万里, 马新源. 1987-2011年嘉善县大肠癌发病分析. *中国肿瘤* 2014; 23: 87-91
- Towler BP, Irwig L, Glasziou P, Weller D, Kewenter J. Screening for colorectal cancer using the faecal occult blood test, hemoccult. *Cochrane Database Syst Rev* 2000; (2): CD001216 [PMID: 10796760]
- 王晶, 汤柳英, 杨杏芬, 高燕红, 许瑛华. 代谢组学技术及其研究进展. *中国卫生检验杂志* 2013; 4: 2821-2823
- Sachse D, Bærug A, Sletner L, Birkeland KI, Nakstad B, Jenum AK, Berg JP. Urine NMR metabolomics analysis of breastfeeding biomarkers during and after pregnancy in a large prospective cohort study. *Scand J Clin Lab Invest* 2014; 74: 264-272 [PMID: 24621206 DOI: 10.3109/00365513.2014.884240]
- Raamsdonk LM, Teusink B, Broadhurst D, Zhang N, Hayes A, Walsh MC, Berden JA, Brindle KM, Kell DB, Rowland JJ, Westerhoff HV, van Dam K, Oliver SG. A functional genomics strategy that uses metabolome data to reveal the phenotype of silent mutations. *Nat Biotechnol* 2001; 19: 45-50 [PMID: 11135551 DOI: 10.1038/83496]
- 马延磊, 刘伟杰, 彭佳远, 张鹏, 陈红旗, 秦环龙. 基于气相色谱-质谱联用的结直肠癌代谢组模式特征性研究. *中国胃肠外科杂志* 2009; 12: 386-390
- 董玉英, 洪雪花, 荣国琼. 食品中蛋白质含量的测定方法的探讨. *中国保健营养* 2012; 22: 647-648
- 毕胜, 刘宏鸣. 谷氨酰胺在肿瘤细胞的代谢及意义. *海南医学院学报* 2009; 15: 1340-1342
- 车兰兰, 李卫华, 林勤保. 氨基酸分析检测方法的研究进展. *氨基酸和生物资源* 2011; 33: 39-42
- 繆明永. 氨基酸代谢与临床. *中华普外科学文献* 2008; 2: 58-61
- 张京, 戴兆来, 朱伟云. 肠道必需氨基酸代谢及其功能的研究进展. *肠内与肠外营养* 2010; 17: 55-59
- Paoli PP, Wakeling LA, Wright GA, Ford D. The dietary proportion of essential amino acids and Sir2 influence lifespan in the honeybee. *Age (Dordr)* 2014; 36: 9649 [PMID: 24715247]
- 陆伟, 杨晶, 金玉坤, 张旭, 刘颖, 钱绍诚. 荷肝癌小鼠血浆与肿瘤组织支链氨基酸代谢变化. *天津医药* 2010; 38: 412-414
- Ito T, Zimdahl B, Reya T. aSIRTING control over cancer stem cells. *Cancer Cell* 2012; 21: 140-142 [PMID: 22340585 DOI: 10.1016/j.ccr.2012.01.014]
- 陈克力, 江恒, 陈建芳, 裴莉, 梁后杰. 人结肠癌HCT116细胞系肿瘤干细胞特性研究. *解放军医学杂志* 2009; 34: 1292-1296
- Berntsen KR, Vriend G. Anomalies in the refinement of isoleucine. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2014; 70: 1037-1049 [PMID: 24699648 DOI: 10.1107/S139900471400087X]
- Murata K, Moriyama M. Isoleucine, an essential amino acid, prevents liver metastases of colon cancer by antiangiogenesis. *Cancer Res* 2007; 67: 3263-3268 [PMID: 17409434 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-3739]
- Fehlbaum P, Rao M, Zasloff M, Anderson GM. An essential amino acid induces epithelial beta -defensin expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 12723-12728 [PMID: 11058160 DOI: 10.1073/pnas.220424597]
- Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971; 285: 1182-1186 [PMID:

- 4938153 DOI: 10.1056/NEJM197111182852108]
- 22 Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst* 1990; 82: 4-6 [PMID: 1688381 DOI: 10.1093/jnci/82.1.4]
- 23 Holmgren L, O'Reilly MS, Folkman J. Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nat Med* 1995; 1: 149-153 [PMID: 7585012 DOI: 10.1038/nm0295-149]
- 24 Anthony JC, Yoshizawa F, Anthony TG, Vary TC, Jefferson LS, Kimball SR. Leucine stimulates translation initiation in skeletal muscle of postabsorptive rats via a rapamycin-sensitive pathway. *J Nutr* 2000; 130: 2413-2419 [PMID: 11015466]
- 25 Ijichi C, Matsumura T, Tsuji T, Eto Y. Branched-chain amino acids promote albumin synthesis in rat primary hepatocytes through the mTOR signal transduction system. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 303: 59-64 [PMID: 12646166 DOI: 10.1016/S0006-291X(03)00295-X]

■同行评价

本研究有一定的创新性, 实验设计基本合理, 有一定的学术价值。

编辑 郭鹏 电编 闫晋利



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》性质、刊登内容及目标

本刊讯 《世界华人消化杂志》[国际标准刊号ISSN 1009-3079 (print), ISSN 2219-2859 (online), DOI: 10.11569, Shijie Huaren Xiaohua Zazhi/World Chinese Journal of Digestology], 是一本由来自国内30个省、市、自治区、特别行政区的483位胃肠病学和肝病专家支持的开放存取的同行评议的旬刊杂志, 旨在推广国内各地的胃肠病学和肝病领域临床实践和基础研究相结合的最具有临床意义的原创性及各类评论性的文章, 使其成为一种公众资源, 同时科学家、医生、患者和学生可以通过这样一个不受限制的平台来免费获取全文, 了解其领域的所有的关键的进展, 更重要的是这些进展会为本领域的医务工作者和研究者服务, 为他们的患者及基础研究提供进一步的帮助。

除了公开存取之外, 《世界华人消化杂志》的另一大特色是对普通读者的充分照顾, 即每篇论文都会附带有一组供非专业人士阅读的通俗易懂的介绍大纲, 包括背景资料、研发前沿、相关报道、创新盘点、应用要点、名词解释、同行评价。

《世界华人消化杂志》报道的内容包括食管、胃、肠、肝、胰肿瘤, 食管疾病、胃肠及十二指肠疾病、肝胆疾病、肝脏疾病、胰腺疾病、感染、内镜检查法、流行病学、遗传学、免疫学、微生物学, 以及胃肠道运动对神经的影响、传送、生长因素和受体、营养肥胖、成像及高科技技术。

《世界华人消化杂志》的目标是出版高质量的胃肠病学和肝病领域的专家评论及临床实践和基础研究相结合具有实践意义的文章, 为内科学、外科学、感染病学、中医学、肿瘤学、中西医结合学、影像学、内镜学、介入治疗学、病理学、基础研究等医生和研究人员提供转换平台, 更新知识, 为患者康复服务。

食管神经内分泌癌p53、nm23、Ki-67的表达及意义

郭庆喜, 蒲霞, 刘俊, 杨成万

■背景资料

食管癌是我国常见的消化系恶性肿瘤之一, 其中最常见病理学类型是鳞状细胞癌, 而神经内分泌癌少见, 国内外关于食管神经内分泌癌的病例报道都很少, 缺乏大宗病例总结分析。收集食管神经内分泌癌的临床和病理资料, 分析其临床病理特点及p53、nm23、Ki-67的表达情况, 有利于发现食管神经内分泌癌不同于鳞状细胞癌的生物行为学和免疫表型。

郭庆喜, 蒲霞, 刘俊, 杨成万, 泸州医学院病理教研室 四川省泸州市 646000

郭庆喜, 讲师, 主要从事病理学的研究。

作者贡献分布: 此课题由郭庆喜、蒲霞及杨成万设计; 研究过程由郭庆喜、蒲霞、刘俊及杨成万操作完成; 研究所用试剂及分析工具由刘俊提供; 数据分析由郭庆喜、蒲霞及杨成万完成; 本论文写作由郭庆喜与蒲霞完成。

通讯作者: 杨成万, 副教授, 646000, 四川省泸州市江阳区忠山路3段319号, 泸州医学院病理教研室: gqx_77@163.com
电话: 0830-3161808

收稿日期: 2014-05-08 修回日期: 2014-06-06

接受日期: 2014-07-05 在线出版日期: 2014-08-28

Significance of expression of p53, nm23 and Ki-67 in esophageal neuroendocrine carcinoma

Qing-Xi Guo, Xia Pu, Jun Liu, Cheng-Wan Yang

Qing-Xi Guo, Xia Pu, Jun Liu, Cheng-Wan Yang, Department of Pathology, Luzhou Medical College, Luzhou 646000, Sichuan Province, China

Correspondence to: Cheng-Wan Yang, Associate Professor, Department of Pathology, Luzhou Medical College, 3-319 Zhongshan Road, Jiangyang District, Luzhou 646000, Sichuan Province, China. gqx_77@163.com

Received: 2014-05-08 Revised: 2014-06-06

Accepted: 2014-07-05 Published online: 2014-08-28

Abstract

AIM: To investigate the significance of expression of p53, nm23 and Ki-67 in esophageal neuroendocrine carcinoma.

METHODS: The expression of p53, nm23 and Ki-67 in 42 esophageal neuroendocrine carcinoma specimens was assessed by immunohistochemistry.

RESULTS: The positive expression rate of p53 in esophageal neuroendocrine carcinoma was 97.62%, and the high expression rate was 90.48%; the positive expression rate of nm23 was 57.14%, and the high expression rate was 33.33%; the positive expression rate of Ki-67 was 97.62%, and the high expression rate was 61.90%. p53 and Ki-67 were highly expressed in esophageal neuroendocrine carcinoma. The expression of p53 and Ki-67 in esophageal neuroendocrine carcinoma had no significant association with age, sex, tumor site, pathological classification, depth of invasion or lymphatic metastasis ($P > 0.05$). The expression of nm23 had no significant association with age, sex, tumor site, or pathological classification ($P > 0.05$), but was significantly associated with depth of invasion and lymphatic metastasis ($P < 0.05$).

cinoma had no significant association with age, sex, tumor site, pathological classification, depth of invasion or lymphatic metastasis ($P > 0.05$). The expression of nm23 had no significant association with age, sex, tumor site, or pathological classification ($P > 0.05$), but was significantly associated with depth of invasion and lymphatic metastasis ($P < 0.05$).

CONCLUSION: The biological behavior and immunophenotype of esophageal neuroendocrine carcinoma are different from those of other malignant tumors. High expression of p53 and Ki-67 has a close relationship with poor prognosis. The examination of p53, Ki-67 and nm23 expression may be helpful to judge prognosis of esophageal neuroendocrine carcinoma.

© 2014 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: Esophageal neuroendocrine carcinoma; p53; nm23; Ki-67

Guo QX, Pu X, Liu J, Yang CW. Significance of expression of p53, nm23 and Ki-67 in esophageal neuroendocrine carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(24): 3644-3648 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/3644.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i24.3644>

摘要

目的: 探讨p53、nm23和Ki-67在食管神经内分泌癌(neuroendocrine carcinoma, NEC)中的表达及其临床意义。

方法: 对42例NEC中p53、nm23及Ki-67的表达进行免疫组织化学检测。

结果: NEC组织中p53的阳性表达率为97.62%, 高表达为90.48%; nm23的阳性表达率为57.14%, 高表达为33.33%; Ki-67阳性表达率为97.62%, 高表达为61.90%。p53和Ki-67在NEC中高表达, 与患者年龄、性别、部位、病理分类、浸润深度及淋巴结转移无关($P > 0.05$), nm23表达与患者年龄、性别、部位、病理分类无关($P > 0.05$), 与浸润深度及淋巴结转移有

■同行评议者

王鲁平, 主任医师, 中国人民解放军北京军区总医院病理科

关($P<0.05$).

结论: NEC具有不同于其他恶性肿瘤的生物学行为和免疫表型, 患者预后差可能与p53和Ki-67的高表达有关, 联合nm23检测, 可为判断预后提供重要的依据.

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有.

关键词: 食管神经内分泌癌; p53; nm23; Ki-67

核心提示: 食管神经内分泌癌(neuroendocrine carcinoma, NEC)是一种少见但是具有高度侵袭性的恶性肿瘤. 由于发病率低, 缺少大宗病例报道, 对其临床病理特点尚不完全清楚. nm23基因参与肿瘤细胞转移的调节, 具有抑制肿瘤淋巴转移的作用, 实验证实其在NEC中低表达, 联合p53和Ki-67表达的检测可为评估NEC预后提供参考.

郭庆喜, 蒲霞, 刘俊, 杨成万. 食管神经内分泌癌p53、nm23、Ki-67的表达及意义. 世界华人消化杂志 2014; 22(24): 3644-3648 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/3644.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v22.i24.3644>

0 引言

食管癌是我国常见的消化系恶性肿瘤之一, 其中常见的病理学类型有鳞状细胞癌、腺癌、腺鳞癌、神经内分泌肿瘤(neuroendocrine tumors, NETs)、间叶源性的肿瘤等. 鳞状细胞癌在我国食管癌患者中约占90%, 是最常见的病理学类型. 在李伟等^[1]对胃肠胰神经内分泌肿瘤进行临床病理特点研究时发现, 常见的发病部位依次为胃、胰腺、直肠、食道、壶腹部、结肠、回盲部. 原发于食管的神经内分泌肿瘤非常少见. 根据2010年世界卫生组织(World Health Organization, WHO)《消化系统肿瘤分类》^[2], 消化系统神经内分泌肿瘤根据核分裂和Ki-67指数分为3级(G1、G2、G3). 在对773例巴西患者消化系神经内分泌肿瘤进行临床病理分析时显示, 在食管中92.1%的神经内分泌肿瘤都是G3级, 即神经内分泌癌(neuroendocrine carcinoma, NEC)^[3]. 国内外关于NEC的病例报道都很少, 其发生率占食管癌的0.05%-7.60%^[2,4], 大多外观呈息肉样, 并表现为吞咽困难和黑便^[5]. NEC的生物学行为、免疫表型、治疗方式、预后均不同于鳞状细胞癌, 且缺乏大宗病例总结分析. 本文收集了泸州医学院42例NEC的临床和病理资料, 分析其临床病理特点及p53、nm23、Ki-67的表达情况.

1 材料和方法

1.1 材料 收集泸州医学院附属医院2002-01/2012-12 NEC标本42例, 术前均未接受放疗、化疗、激素等治疗, 且所有患者具有完整临床病历资料. 其中男37例, 女5例, 男女比: 7.4 : 1; 年龄40-76岁, 平均年龄62.25岁. 主要症状有进行性吞咽困难(38/42)、胸痛(7/42)、体质量下降(3/42)、黑便(1/42)等. 术后经两位有经验病理医师双盲阅片, 按2010年消化系统肿瘤WHO分类标准诊断^[2]. 其中大细胞NEC 6例, 小细胞NEC 28例, 混合性腺神经内分泌癌(mixed adenoneuroendocrine carcinomas, MANEC)8例; 未侵及肌层4例, 侵及肌层26例, 侵及外膜12例; 有淋巴结转移18例. 标本均经4%中性甲醛固定, 常规脱水石蜡包埋. 获得随访的31例中, 术后1、2、3、5年生存率分别为51.61%、19.35%、9.68%、3.23%, 术后中位生存期为13 mo. 一抗为鼠抗人p53单克隆抗体; 鼠抗人nm23单克隆抗体; 鼠抗人Ki-67单克隆抗体; S-P试剂盒等(上述试剂均购自美国Bioworld Technology公司).

1.2 方法 将石蜡包埋的组织切成厚约4 μm 的薄片, 脱蜡水化, 修复抗原. 采用免疫组织化学S-P法对42例NEC组织染色, 严格按试剂盒说明书操作. 以已知阳性组织作阳性对照, 以磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)代替一抗做阴性对照. 阳性结果为在相应部位出现棕黄色颗粒, Ki-67和p53均定位于细胞核, nm23定位于细胞浆. 随机选取50个高倍镜视野计算阳性细胞率. Ki-67阳性细胞数 $<10\%$ 为(-), 阳性细胞数 $10\%-50\%$ 为(+), 阳性细胞率 $>50\%$ 为(++); 增殖指数低于50%视为低表达, 高于50%视为高表达; p53和nm23未见阳性表达或阳性细胞数, $<5\%$ 为阴性(-), $5\%-25\%$ 为(+); $26\%-75\%$ 为(++); $>75\%$ 为(+++), (++)视为高表达. 所有数据均由两位有经验的病理医师盲法观察切片获得.

统计学处理 所有数据均经过SPSS17.0软件进行统计分析. 计数资料用阳性率表示, 阳性率之间的比较采用 χ^2 检验, 以 $\alpha = 0.05$ 作为检验水准, $P<0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 p53、nm23和Ki-67在NEC中的表达 p53蛋白在NEC中阳性表达(++++)率为97.62%, 高表达(++-++)率为90.48%; nm23蛋白在NEC中阳性表达(++++)率为57.14%, 高表达(++-++)率

■研究前沿

目前常采用p53、nm23、Ki-67联合检测用以判断食管鳞状细胞癌的预后. 以上检测指标在食管神经内分泌癌组织中的表达情况尚无可靠的数据支持, 其判断食管神经内分泌癌预后的价值也有待于进一步证实.

■相关报道

在6例食管小细胞神经内分泌癌的研究中显示, 患者的中位生存期为13 mo. p53、KIT和血小板生长因子(platelet-derived growth factor receptor- α , PDGFR α)阳性表达率为100%, Ki-67阳性表达率从56%至100%不等, 平均为79%. 基因分析也未发现KIT和PDGFR α 存在基因突变.

■创新盘点

食管神经内分泌癌作为一种少见的肿瘤类型,其临床病理特点尚未明确。2010年的世界卫生组织(WHO)《消化系统肿瘤分类》第4版,重新规范了消化系的神经内分泌肿瘤的分级分类原则,为进一步研究食管神经内分泌癌提供了契机。本实验发现食管神经内分泌癌患者中位生存期短, p53和Ki-67高表达,而nm23则明显低表达,可能与患者较差的预后相关。

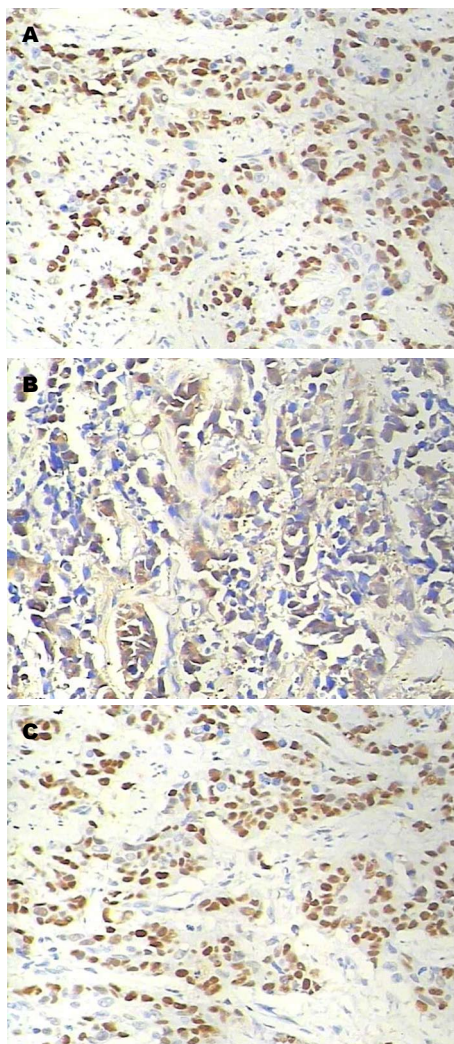


图1 p53、nm23和Ki-67蛋白在食管神经内分泌癌中的表达(SP × 200)。A: p53; B: nm23; C: Ki-67。

为33.33%; Ki-67在NEC中阳性表达(+~++)率为97.62%,高表达(++)率为61.90%。光镜下p53蛋白和Ki-67阳性表达表现为癌细胞的细胞核内出现棕黄色颗粒或团块; nm23蛋白阳性表达表现为癌细胞的细胞浆内出现浅棕色至深棕色颗粒(图1)。

2.2 p53、nm23和Ki-67的表达与NEC临床病理因素的关系 p53和Ki-67在NEC中高表达,与患者年龄、性别、部位、病理分类、浸润深度及淋巴结转移无关。nm23的表达与患者年龄、性别、部位、病理类型无关,与浸润深度及淋巴结转移有关(表1)。

3 讨论

食管癌是我国最常见的消化系恶性肿瘤之一,全国每年有近20万例死于食管癌,在张永贞等^[6]的研究中显示食管癌术后患者1、3、5年生存率分别为: 78.4%、56.9%、27.0%,中位生存期

为900 d。在本组资料中NEC患者5年生存率仅为3.23%,中位生存期为393 d,比发生于食管的其他恶性肿瘤预后更差。

p53和Ki-67在NEC中高表达,可能与患者的预后有关。p53是最重要的抑癌基因之一,位于17号染色体短臂上,野生型p53基因能够在细胞增殖周期中维持细胞周期正常运转、调节细胞周期进程和诱导细胞凋亡的发生。若p53基因发生突变,则诱导细胞凋亡的功能被抑制,细胞增殖失控,结果可能导致恶性肿瘤的发生。由于野生型p53蛋白半衰期短,不易被检测到,故通常情况下所测得的p53蛋白都为突变型。目前已经在多种人类肿瘤中检测出不同程度的p53基因突变,并观察到大多数恶性肿瘤中存在变异型p53基因过度聚集的现象^[7,8]。在刘泓基等^[9]对食管鳞状细胞癌的相关研究中显示p53阳性表达率为64.58%,与大多数关于食管鳞状细胞癌的实验结果接近。对5例胃神经内分泌癌患者进行临床病理分析, p53阳性表达率达到了100%,且Ki-67均为高表达状态(60%-90%)^[10]。由于NEC本身比较少见,因此关于p53与患者相应的临床病理参数之间的关系尚无统一论。而在本实验中, p53阳性表达率达到了97.62%,且高表达(++~+++)率为90.48%,明显高于在食管鳞状细胞癌中的表达,并与患者年龄、性别、部位、病理分类、浸润深度及淋巴结转移均无关。

Ki-67是细胞增殖核抗原,能较好的反映细胞的增殖状态,在正常组织中几乎不表达,或极低表达,而在恶性肿瘤中常呈高表达。其标记指数与肿瘤的恶性程度、复发转移及预后相关。对175例食管鳞状细胞癌的研究发现, Ki-67阳性表达率为56.0%^[11],但目前关于Ki-67与NEC患者相应的临床病理参数之间的关系也尚无统一论。本实验中, Ki-67阳性表达(++~+++)率为97.62%,高表达(++)率为61.90%,并与患者年龄、性别、部位、病理分类、浸润深度及淋巴结转移均无关。在对127例胃肠胰神经内分泌肿瘤的临床病理分析中发现, Ki-67的过度表达与肿瘤分级有关,在G3中Ki-67表达均值约为22.00%,在G1中Ki-67表达均值约为2.50%^[12]。在6例食管小细胞神经内分泌癌的研究中显示, Ki-67标记从56%-100%不等,平均为79%^[13],与本组研究结果相近。

nm23基因于1988年被首次发现,因其在低转移细胞株中高表达的特点而被认为是转移

■应用要点

通过对食管神经内分泌癌患者p53、nm23和Ki-67表达的检测和综合分析可能为临床判断肿瘤的预后提供依据。

表 1 p53、nm23和Ki-67的表达与食管神经内分泌癌临床病理因素的关系

病理学资料	n	p53		nm23		Ki-67	
		阳性率(%)	P值	阳性率(%)	P值	阳性率(%)	P值
性别			0.710		0.943		0.710
男	37	96.30		56.76		96.30	
女	5	100.00		60.00		100.00	
年龄(岁)			0.335		0.372		0.288
≤60	20	100.00		50.00		95.00	
>60	22	95.45		63.64		100.00	
部位			0.795		0.618		0.153
上段食管	4	100.00		50.00		100.00	
中段食管	9	100.00		44.44		88.89	
下段食管	29	96.55		62.07		100.00	
病理分类			0.113		0.896		0.774
大细胞NEC	6	100.00		50.00		100.00	
小细胞NEC	28	100.00		57.14		96.43	
MANEC	8	87.50		62.50		100.00	
浸润深度			0.730		0.028		0.730
未侵及肌层	4	100.00		75.00		100.00	
侵及肌层	26	96.15		69.23		96.15	
侵及外膜	12	100.00		25.00		100.00	
淋巴结转移			0.381		0.038		0.381
无	24	95.83		70.83		95.83	
有	18	100.00		38.89		100.00	

NEC: 神经内分泌癌; MANEC: 混合性腺神经内分泌癌。

抑制基因。nm23已被证实与食管癌淋巴结转移有关, 在一组食管鳞状细胞癌病例中, nm23阳性率为78.3%, 淋巴结转移者nm23明显低表达(42.9%), 无淋巴结转移者nm23明显高表达(83.6%)^[11]。在侯建章等^[14]对nm23基因在食管癌预后监测的研究中也发现检测nm23基因的变化, 可预测食管癌患者的预后。nm23在NEC中的表达目前还缺乏相关报道, 从本实验结果看来, nm23在NEC中的表达较鳞状细胞癌低, 本组数据中nm23阳性率为57.14%。nm23表达还与肿瘤浸润深度和淋巴结转移有关, 淋巴结转移者表达较低(38.89%), 无淋巴结转移者表达较高(70.83%), 与nm23在食管鳞状细胞癌中的表达情况基本一致^[15]。

上述研究结果提示, NEC与食管鳞状细胞癌相比, 患者预后差, 术后生存期短, 可能与NEC中p53和Ki-67更高表达, nm23更低表达有关。通过对p53、nm23和Ki-67表达的检测和综合分析可能为临床判断肿瘤的预后提供依据。同时由于NEC本身少见, 同类研究缺乏, 因此本研究可能还存在样本量较小, 抽样误差较大等缺陷, 有

待进一步的数据收集和实验完善。

4 参考文献

- 1 李伟, 隋红, 周建华. 胃肠胰神经内分泌肿瘤的临床病理特点及其与预后的关系. 世界华人消化杂志 2014; 22: 846-852
- 2 Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND. World Health Organization classification of tumours of the digestive system. Lyon: IARC Press, 2010: 1-155
- 3 Estrozi B, Bacchi CE. Neuroendocrine tumors involving the gastroenteropancreatic tract: a clinicopathological evaluation of 773 cases. Clinics (Sao Paulo) 2011; 66: 1671-1675 [PMID: 22012036]
- 4 Huang Q, Wu H, Nie L, Shi J, Lebenthal A, Chen J, Sun Q, Yang J, Huang L, Ye Q. Primary high-grade neuroendocrine carcinoma of the esophagus: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 42 resection cases. Am J Surg Pathol 2013; 37: 467-483 [PMID: 23426118 DOI: 10.1097/PAS.0b013e]
- 5 Schuerle T, Aoun E, Farah K. Small cell carcinoma of the oesophagus: a rare cause of dysphagia. BMJ Case Rep 2013 Sep 3. pii: bcr2013200468 [PMID: 24001733 DOI: 10.1136/bcr-2013-200468]
- 6 张永贞, 王国平, 许翊, 马朝辉, 王媛, 曹凌, 王昕琛. 食管癌患者术后预后影响因素分析. 现代预防医学 2011; 38: 1720-1723
- 7 Wang ZB, Peng XZ, Chen SS, Ning FL, Du CJ, Wang K, Ma W, Cheng YF. High p53 and MAP1 light chain 3A co-expression predicts poor prognosis in

■名词解释

食管混合性腺神经内分泌癌(mixed adenoneuroendocrine carcinomas, MANEC): 非常少见, 常常是NEC成分与胃肠型腺癌混合而成, 很少与鳞状细胞癌混合。有报道称其与Barrett食管和腺癌有关。

■同行评价

本研究所选病例资料可贵,设计合理,科学性较强,层次清楚,有一定可读性。

- patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Mol Med Rep* 2013; 8: 41-46 [PMID: 23632916 DOI: 10.3892/mmr.2013.1451]
- 8 江亚南, 范宗民, 王苒, 侯巧燕, 陆竞艳. 河南贛门癌高发区贛门癌组织浸润淋巴细胞CD4、CD8、 $\gamma\delta$ T和肿瘤细胞P53的表达及意义. *实用医学杂志* 2012; 28: 2193-2195
- 9 刘泓基, 臧真真, 侯冰宗, 侯巧燕, 陆竞艳. 食管鳞癌组织中脾酪氨酸激酶及p53基因的表达及临床病理意义. *西安交通大学学报(医学版)* 2011; 32: 107-110, 127
- 10 Namikawa T, Oki T, Kitagawa H, Okabayashi T, Kobayashi M, Hanazaki K. Neuroendocrine carcinoma of the stomach: clinicopathological and immunohistochemical evaluation. *Med Mol Morphol* 2013; 46: 34-40 [PMID: 23306663 DOI: 10.1007/s00795-012-0006-8]
- 11 刘华, 朱亚宁, 陈小飞. 食管鳞癌组织中Ki-67和nm23的表达及其临床意义. *现代医学* 2012; 3: 286-290
- 12 Alvarado-Cabrero I, de Anda-González J, Hernández-Hernández B, Mantilla-Morales A, Valencia-Cedillo R, Medrano-Guzmán R. [Clinicopathologic characteristics of 127 cases of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors (GEP-NETs) studied in an oncology hospital]. *Rev Gastroenterol Mex* 2012; 77: 174-180 [PMID: 23142406 DOI: 10.1016/j.rgm.2012.08.003]
- 13 Terada T. Small cell neuroendocrine carcinoma of the esophagus: report of 6 cases with immunohistochemical and molecular genetic analysis of KIT and PDGFRA. *Int J Clin Exp Pathol* 2013; 6: 485-491 [PMID: 23411580]
- 14 侯建章, 冯婧, 侯振江. nm23基因及其在食管癌预后监测中的研究进展. *世界华人消化杂志* 2013; 21: 3356-3362
- 15 郭海珍. nm23-H1蛋白在食管癌组织中的表达及意义. *海南医学院学报* 2014; 20: 321-323

编辑 郭鹏 电编 都珍珍



应用基因芯片筛选七氟醚和丙泊酚的诱导下胃黏膜表达差异基因

李月鹏, 高彩燕

李月鹏, 中国石油天然气集团公司中心医院麻醉科 河北省廊坊市 065000

高彩燕, 哈尔滨医科大学附属第一医院麻醉科 黑龙江省哈尔滨市 150001

李月鹏, 主治医师, 主要从事临床麻醉的研究.

作者贡献分布: 李月鹏负责论文研究的设计、资料收集与撰写; 高彩燕负责资料收集.

通讯作者: 李月鹏, 主治医师, 065000, 河北省廊坊市新开路51号, 中国石油天然气集团公司中心医院麻醉科.

bingqiang193@126.com

电话: 0316-2075450

收稿日期: 2014-06-01 修回日期: 2014-06-19

接受日期: 2014-07-15 在线出版日期: 2014-08-28

Identification of sevoflurane and propofol induced differentially expressed genes in gastric mucosa with DNA microarray

Yue-Peng Li, Cai-Yan Gao

Yue-Peng Li, Department of Anesthesiology, Central Hospital of China National Petroleum Corporation, Langfang 065000, Hebei Province, China

Cai-Yan Gao, Department of Anesthesiology, the First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China

Correspondence to: Yue-Peng Li, Attending Physician, Department of Anesthesiology, Central Hospital of China National Petroleum Corporation, 51 Xinkai Road, Langfang 065000, Hebei Province, China. bingqiang193@126.com

Received: 2014-06-01 Revised: 2014-06-19

Accepted: 2014-07-15 Published online: 2014-08-28

Abstract

AIM: To identify differentially expressed genes (DEGs) induced by sevoflurane and propofol with DNA microarray.

METHODS: The expression data of GSE4386 which contained atrial samples collected from patients receiving anesthetic gas sevoflurane or intravenous anesthetic propofol in gastrointestinal endoscopy were downloaded from Gene Expression Omnibus (GEO). The DEGs in the sevoflurane group and propofol group were identified and compared. Then, the functions significantly related to the DEGs were enriched.

The interactive functional modules for common, sevoflurane specific and propofol specific DEGs were constructed to perform analysis of biological processes.

RESULTS: The percentages of DEGs were 31.3% (275/879) and 94.8% (275/290) in the sevoflurane group and propofol group, respectively. Functional categories for the common, sevoflurane specific and propofol specific DEGs were very similar. Function modules, such as regulation of transcription and regulation of cellular process, for the common, propofol specific and sevoflurane specific DEGs were identified.

CONCLUSION: Sevoflurane and propofol may synergistically reduce gastric mucosal tissue injury in patients undergoing gastrointestinal endoscopy.

© 2014 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: Sevoflurane; Propofol; Gastrointestinal endoscopy; Functional categories; Function modules

Li YP, Gao CY. Identification of sevoflurane and propofol induced differentially expressed genes in gastric mucosa with DNA microarray. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(24): 3649-3653 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/3649.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i24.3649>

摘要

目的: 本文对行无痛胃镜检查的患者胃黏膜组织芯片表达谱进行分析, 分别利用吸入性麻醉剂七氟醚和静脉麻醉剂丙泊酚麻醉, 比较分析两种不同种类的麻醉剂诱导下表达发生显著改变的基因, 从功能方向筛选麻醉剂保护胃黏膜细胞的分子靶标以及保护机制.

方法: 从基因表达数据库(Gene Expression Omnibus, GEO)数据库中下载编号为GSE4386的基因芯片, 数据为无痛胃镜检查的患者胃黏膜组织芯片表达谱数据, 共40个样本, 平均分

■背景资料

胃镜检查是诊断上消化道疾病的重要手段, 但是有许多患者会有恐惧感, 而拒绝胃镜检查导致耽误病情, 还有许多患者在胃镜检查过程中感到各种不适、呛咳等而诱发高血压、心率加快, 严重者甚至会出现心律失常等. 而无痛胃镜则明显减少了胃镜检查的不良反应, 能够消除患者的紧张情绪, 让受检者在无痛苦、舒适状态中完成检查.

■同行评议者

莫发荣, 副教授, 广西医科大学组织学与胚胎学教研室

■研发前沿

基因芯片技术在筛选麻醉剂保护胃黏膜细胞的分子靶标以及保护机制方面具有明显的优势。

成了两个组:吸入性七氟醚麻醉和静脉麻醉剂丙泊酚,每组20个样本,分别为手术麻醉剂处理之前和经过麻醉剂手术后的胃黏膜组织表达谱。采用R软件包对表达谱做数据预处理和差异表达基因的筛选。筛选到的差异基因将进一步生物信息分析。首先比较两个组中筛选得到的麻醉剂处理前后的差异表达基因,得到两种麻醉剂刺激下诱导表达变化的基因,并做各组间的表达值比较;然后通过BLASTX对差异表达基因产物蛋白进行比对后进行COG功能分类注释;再用WebGestalt寻找差异表达基因所在的相互作用功能模块;最后利用DAVID搜索模块中差异基因参与的生物学过程。

结果:共同表达的差异基因在七氟醚组和异丙酚组中分别占差异基因数目的百分比为31.3%(275/879)和94.8%(275/290)。且从功能注释分类及同在一个模块中差异基因的功能结果,两种麻醉剂诱导影响的表达变异基因倾向于一致。共同表达差异基因,异丙酚诱导的差异基因和七氟醚诱导的差异基因主要参与的细胞转录和分化的过程。

结论:吸入性麻醉剂七氟醚和静脉麻醉剂丙泊酚在保护胃黏膜作用中具有协同的作用,因此,我们推测,吸入性麻醉剂七氟醚和静脉麻醉剂丙泊酚两种方式的静吸复合麻醉方式,在无痛胃镜检查术中可能会具有更好保护胃黏膜细胞作用。

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词:七氟醚; 丙泊酚; 无痛胃镜检查术; 功能注释; 功能模块

核心提示:吸入性麻醉剂七氟醚和静脉麻醉剂丙泊酚两种方式的静吸复合麻醉方式,在无痛胃镜检查术中可能会具有更好保护胃黏膜细胞作用。

李月鹏, 高彩燕. 应用基因芯片筛选七氟醚和丙泊酚的诱导下胃黏膜表达差异基因. 世界华人消化杂志 2014; 22(24): 3649-3653 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/3649>. asp DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i24.3649>

■相关报道

七氟醚是一种新型的吸入麻醉药,广泛应用于临床。大量的离体和在体动物实验都证实其对胃黏膜具保护作用。丙泊酚是一种常用全身麻醉药,对多种器官组织具有保护作用。

0 引言

胃镜检查是诊断上消化道疾病的重要手段,但是有许多患者会有恐惧感,而拒绝胃镜检查导致耽误病情,还有许多患者在胃镜检查过程中感到各种不适、呛咳等而诱发高血压、心率加快,严重者甚至会出现心律失常等^[1]。而无痛胃镜则明显减少了胃镜检查的不良反应,能够消

除患者的紧张情绪,让受检者在无痛苦、舒适状态中完成检查^[2]。本研究利用吸入性麻醉剂七氟醚和静脉麻醉剂丙泊酚处理后的行无痛胃镜检查的患者胃黏膜组织芯片表达谱,比较分析两种不同种类的麻醉剂诱导下表达发生显著改变的基因,从功能方向筛选麻醉剂保护胃黏膜细胞的分子靶标以及保护机制。

1 材料和方法

1.1 材料 Affymetrix芯片数据:从基因表达数据库基因表达数据库(Gene Expression Omnibus, GEO)数据库中下载编号为GSE4386的基因芯片^[3],数据为无痛胃镜检查的患者胃黏膜组织芯片表达谱数据,共160个样本,随机分成了两个组:吸入性七氟醚麻醉(sevoflurane)和静脉麻醉剂丙泊酚(propofol),每组80个样本,分别为手术麻醉剂处理之前和经过麻醉剂手术后的胃黏膜组织表达谱各40个。

1.2 方法

1.2.1 数据预处理及差异基因分析:下载该芯片表达谱数据的注释平台,GPL570[HG-U133_Plus_2] Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array,对下载得到的txt格式的表达式数据进行基因名称的对应。并采用R语言中的Affy包中的中值法对数据进行标准化^[4],再用mult-test^[5]包对吸入性七氟醚麻醉和静脉麻醉剂丙泊酚组分别进行统计检验分析,然后用BH方法进行多重检验校正^[6]。选取FDR值<0.05及|logFC|>1作为显著性阈值。

1.2.2 每组中差异表达基因的比较:我们对从吸入性七氟醚麻醉和静脉麻醉剂丙泊酚组中筛选得到的差异表达基因进行比较,得到吸入性七氟醚麻醉和静脉麻醉剂丙泊酚刺激下特异性影响的基因以及两种麻醉剂共同诱导的差异表达基因,并用韦恩图表示^[7]。

1.2.3 组间差异表达基因的比较:根据基因表达在不同状态的同种生物中表达的特异性,相同的组织在不同疾病状态下,基因的表达是有显著的差别的。对于每个组中找到的差异表达基因,我们用组间t检验^[8]对每组对应的差异表达基因值进行比较,研究每一组的差异表达基因在三种不同处理下的样本中的表达情况。我们以t检验得到的 $P = 0.05$ 为阈值,检验差异表达基因在不同组间是否同样是差异有统计学意义。

1.2.4 差异表达基因功能分类:用BLASTX^[9]将所得的两个组中所得差异基因的序列与集群中

的同源蛋白组(clusters of orthologous groups of proteins, COG)^[10]直系同源簇数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG>)进行比对分析(比对相似阈值: $E\text{-value} < 1e-05$), 从cellular_component、molecular_function、biological_process三个方面获得差异表达基因的功能注释及其COG功能分类. 通过COG分类可以对不同集合中特异表达的基因所属的功能有直观和感性的认识. 差异表达基因互作功能模块搜索: 模块划分是人们理解复杂系统的一个重要的研究方法. 对于生物系统, 人们普遍认为各种实现相同功能的基因或蛋白质倾向于形成模块^[11-13], 对功能模块的分析可以让人们进一步理解各种生物过程、了解生物的构成与组织方式. 因此, 我们利用软件WebGestalt^[14,15]搜索差异表达基因所在的互作功能模块, 以FDR值0.05作为阈值.

1.2.5 模块中差异基因的功能分析: 同在一个模块中的基因通常除了结构上联系紧密, 而且在功能上也具有很强的关联性. 因此, 我们利用软件表达分析系统开发(Expression Analysis Systematic Explorer, EASE)^[16]对模块中的差异表达基因所参与的生物学过程进行分析, 选取 $P > 0.05$ 作为阈值.

统计学处理 用R统计软件包对实验数据进行统计学处理, 两样本均数之间的差异显著性用独立样本均值比较的 t 检验, 应用方差分析对变量之间的相互关系进行检验. $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 差异基因的筛选 数据预处理后, 对标准化后的表达谱数据做差异比较分析, 我们从吸入性七氟醚麻醉和静脉麻醉剂丙泊酚组分别筛选得到了879个和290个满足差异阈值($FDR < 0.05$ 和 $|\log FC| > 1$)的差异表达基因.

2.2 差异表达基因的结果分析 我们对从吸入性七氟醚麻醉和静脉麻醉剂丙泊酚组中筛选得到的差异表达基因进行比较, 得到吸入性七氟醚麻醉和静脉麻醉剂丙泊酚刺激下特异性影响的基因以及两种麻醉剂共同诱导的差异表达基因. 分析结果显示, 吸入性七氟醚麻醉组中的差异表达基因数量明显多于丙泊酚麻醉剂组的, 两种麻醉剂刺激共同影响的基因共275个, 分别占两组中的31.3%(275/879)和94.8%(275/290).

2.3 各组差异表达基因的组间比较 对于吸入性七氟醚麻醉(604个)和静脉麻醉剂丙泊酚刺激下

(15个)特异性影响的基因以及两种麻醉剂共同诱导的差异表达基因(275), 我们进行了组间的比较, 结果显示的差异结果与筛选得到的差异表达基因结果一致, 如七氟醚组中独有的差异表达基因仅在七氟醚组中显示出显著性差异, 同时在丙泊酚组中情况亦如此, 唯有两组中共有的差异表达基因在两组中均为显著性差异.

2.4 差异表达基因功能分类 利用BLASTX将三个集合中的差异表达基因的分别与COG直系同源簇数据库进行比对分析(比对相似阈值: $E\text{-value} < 1e-05$). 根据序列与Gene Ontology中记载的每个GO节点上的基因序列相似程度, 对差异表达的基因所在的GO功能节点分类, 我们可以看到, 每个基因集合中的差异表达基因在cellular_component、molecular_function、biological_process三个方面的分布是很相似的.

2.5 差异表达基因互作功能模块搜索 我们利用软件WebGestalt搜索差异表达基因所在的互作功能模块, 以FDR值0.05作为阈值. 我们分别筛选到两种麻醉剂共同诱导的、静脉麻醉剂丙泊酚刺激下特异性影响的和吸入性七氟醚麻醉组的差异表达基因的2个、1个、1个显著所在的功能模块.

2.6 模块中差异基因的功能分析 我们利用EASE软件得到了之前所得到的模块中包含的差异表达基因所参与的生物学过程, 如表1-3所示. 从表1-3我们能够看出, 与之前基因注释分类类似, 模块中的差异表达基因均与细胞过程, 如转录调控、大分子活动等等.

3 讨论

七氟醚是一种新型的吸入麻醉药, 与传统的吸入麻醉药相比它具有诱导迅速、刺激性小、苏醒快的优点, 并且无明显不良反应, 广泛应用于临床. 大量的离体和在体动物实验都证实其对胃黏膜具保护作用^[17,18]. 丙泊酚是一种常用全身麻醉药, 对多种器官组织具有保护作用. 研究发现, 丙泊酚能抑制胃黏膜细胞凋亡, 防止胃黏膜缺血与损伤^[19].

为了研究这两种麻醉剂刺激下胃黏膜组织基因表达特征以及保护胃黏膜细胞的机制, 本文利用吸入性麻醉剂七氟醚和静脉麻醉剂丙泊酚处理后的行无痛胃镜检查的患者胃黏膜组织芯片表达谱, 比较分析两种不同种类的麻醉剂诱导下表达发生显著改变的基因, 研究胃黏膜组织转录表达特征与麻醉剂诱导的关联性, 并

■创新盘点

本文比较分析两种不同种类的麻醉剂诱导下表达发生显著改变的基因, 研究胃黏膜组织转录表达特征与麻醉剂诱导的关联性, 并从功能方向筛选麻醉剂保护胃黏膜细胞的分子靶标以及保护机制.

■应用要点

研究胃黏膜组织转录表达特征与麻醉剂诱导的关联性, 并从功能方向筛选麻醉剂保护胃黏膜细胞的分子靶标以及保护机制. 为临床应用提供理论基础.

■名词解释

基因表达谱(gene expression profile): 指通过构建处于某一特定状态下的细胞或组织的非偏性cDNA文库,大规模cDNA测序,收集cDNA序列片段、定性、定量分析其mRNA群体组成,从而描绘该特定细胞或组织在特定状态下的基因表达种类和丰度信息,这样编制成的数据表就称为基因表达谱。

表 1 七氟醚和丙泊酚诱导下的共同表达差异基因参与的生物学过程

生物学功能名称	校正P值	基因数目	生物学功能描述
6355	<0.05	10	Regulation of transcription, DNA-dependent
51252	<0.05	10	Regulation of RNA metabolic process
45449	<0.05	10	Regulation of transcription
10556	<0.05	10	Regulation of macromolecule biosynthetic process
10468	<0.05	10	Regulation of gene expression
19219	<0.05	10	Regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process
31326	<0.05	10	Regulation of cellular biosynthetic process
51171	<0.05	10	Regulation of nitrogen compound metabolic process
50794	<0.05	12	Regulation of cellular process
50789	<0.05	12	Regulation of biological process
65007	<0.05	12	Biological regulation
48518	<0.05	9	Positive regulation of biological process

表 2 丙泊酚诱导下的差异表达基因参与的生物学过程

生物学功能名称	校正P值	基因数目	生物学功能描述
42116	<0.05	1	Macrophage activation
2274	<0.05	1	Myeloid leukocyte activation
6909	<0.05	1	Phagocytosis

表 3 七氟醚诱导下的差异表达基因参与的生物学过程

生物学功能名称	校正P值	基因数目	生物学功能描述
23052	<0.05	12	Signaling
50794	<0.05	12	Regulation of cellular process
50789	<0.05	12	Regulation of biological process
65007	<0.05	12	Biological regulation
7165	<0.05	9	Signal transduction
23033	<0.05	9	Signaling pathway
23060	<0.05	9	Signal transmission
23046	<0.05	9	Signaling process

从功能方向筛选麻醉剂保护胃黏膜细胞的分子靶标以及保护机制。

从我们的分析结果来看,丙泊酚麻醉剂刺激下,94.8%(275/290)的诱导表达变异基因包括在七氟醚诱导变化基因中,且从功能注释分类及同在一个模块中差异极影的功能结果,两种麻醉剂诱导影响的表达变异基因倾向于一致。我们的结果说明,吸入性麻醉剂七氟醚和静脉麻醉剂丙泊酚在保护胃黏膜作用中具有协同的作用,因此,我们推测,吸入性麻醉剂七氟醚和静脉麻醉剂丙泊酚两种方式的静吸复合麻醉方式,在行无痛胃镜检查术中可能会具有更好保护胃

黏膜细胞作用。两种麻醉剂刺激诱导下表达发生显著改变的基因均为麻醉剂靶标基因,尤其是同在一个功能模块中共同产生作用的差异表达基因,如MAFF、FOSL2、ATF3等基因。

4 参考文献

- Ellett ML. A literature review of the safety and efficacy of using propofol for sedation in endoscopy. *Gastroenterol Nurs* 2010; 33: 111-117 [PMID: 20389224 DOI: 10.1097/SGA.0b013e3181d601fb]
- 陈立. 无痛内镜与普通胃镜检查的比较. *中国内镜杂志* 2012; 18: 220-222
- Lucchinetti E, Hofer C, Bestmann L, Hersberger M, Feng J, Zhu M, Furrer L, Schaub MC, Tavakoli R, Genoni M, Zollinger A, Zaugg M. Gene regulatory

- control of myocardial energy metabolism predicts postoperative cardiac function in patients undergoing off-pump coronary artery bypass graft surgery: inhalational versus intravenous anesthetics. *Anesthesiology* 2007; 106: 444-457 [PMID: 17325502]
- 4 Zhao Y, Wang E, Liu H, Rotunno M, Koshiol J, Marincola FM, Landi MT, McShane LM. Evaluation of normalization methods for two-channel microRNA microarrays. *J Transl Med* 2010; 8: 69 [PMID: 20663154 DOI: 10.1186/1479-5876-8-69]
- 5 Wettenhall JM, Smyth GK. limmaGUI: a graphical user interface for linear modeling of microarray data. *Bioinformatics* 2004; 20: 3705-3706 [PMID: 15297296 DOI: 10.1093/bioinformatics/bth449]
- 6 Fernando RL, Nettleton D, Southey BR, Dekkers JC, Rothschild MF, Solter M. Controlling the proportion of false positives in multiple dependent tests. *Genetics* 2004; 166: 611-619 [PMID: 15020448 DOI: 10.1534/genetics.166.1.611]
- 7 Soriano JB, Davis KJ, Coleman B, Visick G, Mannino D, Pride NB. The proportional Venn diagram of obstructive lung disease: two approximations from the United States and the United Kingdom. *Chest* 2003; 124: 474-481 [PMID: 12907531]
- 8 Shuster JJ. Student t-tests for potentially abnormal data. *Stat Med* 2009; 28: 2170-2184 [PMID: 19326398 DOI: 10.1002/sim.3581]
- 9 Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 1990; 215: 403-410 [PMID: 2231712 DOI: 10.1006/jmbi.1990.9999]
- 10 Tatusov RL, Natale DA, Garkavtsev IV, Tatusova TA, Shankavaram UT, Rao BS, Kiryutin B, Galperin MY, Fedorova ND, Koonin EV. The COG database: new developments in phylogenetic classification of proteins from complete genomes. *Nucleic Acids Res* 2001; 29: 22-28 [PMID: 11125040 DOI: 10.1093/nar/29.1.22]
- 11 Ihmels J, Friedlander G, Bergmann S, Sarig O, Ziv Y, Barkai N. Revealing modular organization in the yeast transcriptional network. *Nat Genet* 2002; 31: 370-377 [PMID: 12134151]
- 12 Hwang W, Cho YR, Zhang A, Ramanathan M. A novel functional module detection algorithm for protein-protein interaction networks. *Algorithms Mol Biol* 2006; 1: 24 [PMID: 17147822 DOI: 10.1186/1748-7188-1-24]
- 13 Tanay A, Sharan R, Kupiec M, Shamir R. Revealing modularity and organization in the yeast molecular network by integrated analysis of highly heterogeneous genomewide data. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 2981-2986 [PMID: 14973197]
- 14 Zhang B, Kirov S, Snoddy J. WebGestalt: an integrated system for exploring gene sets in various biological contexts. *Nucleic Acids Res* 2005; 33: W741-W748 [PMID: 15980575 DOI: 10.1093/nar/gki475]
- 15 Qiao Y, Badduke C, Mercier E, Lewis SM, Pavlidis P, Rajcan-Separovic E. miRNA and miRNA target genes in copy number variations occurring in individuals with intellectual disability. *BMC Genomics* 2013; 14: 544 [PMID: 23937676]
- 16 Hosack DA, Dennis G, Sherman BT, Lane HC, Lempicki RA. Identifying biological themes within lists of genes with EASE. *Genome Biol* 2003; 4: R70 [PMID: 14519205 DOI: 10.1186/gb-2003-4-10-r70]
- 17 Bernard JM, Wouters PF, Doursout MF, Florence B, Chelly JE, Merin RG. Effects of sevoflurane and isoflurane on cardiac and coronary dynamics in chronically instrumented dogs. *Anesthesiology* 1990; 72: 659-662 [PMID: 2321783]
- 18 Harkin CP, Pagel PS, Kersten JR, Hettrick DA, Warltier DC. Direct negative inotropic and lusitropic effects of sevoflurane. *Anesthesiology* 1994; 81: 156-167 [PMID: 8042785]
- 19 van den Berg AA, Chitty DA, Jones RD, Sohel MS, Shahen A. Intravenous or inhaled induction of anesthesia in adults? An audit of preoperative patient preferences. *Anesth Analg* 2005; 100: 1422-1424, table of contents [PMID: 15845699 DOI: 10.1213/01.ANE.0000150609.82532.C5]

■同行评价

本文有一定的创新性和实验意义。学术价值尚可。对后续临床的治疗提供参考意见。

编辑 郭鹏 电编 闫晋利



热灌注化疗对胃癌患者血管内皮生长因子受体及基质金属蛋白酶的影响

闫琳, 巴楠, 吴敏, 郑晓珂, 张剑, 邢鑫, 张自森

■背景资料

胃癌是临床最为常见的恶性肿瘤之一, 其发病率已跃居肿瘤发病第2位。近年来, 腹腔热灌注化疗在预防和治疗胃癌腹膜转移和复发中取得了一定的成效, 并被广泛应用于临床。血管内皮生长因子受体1与肿瘤组织的血管生成有关, 其高水平表达可能与肿瘤组织血供增加及瘤体增大有关。基质金属蛋白酶可分解细胞外基质, 降低细胞间的黏滞性使得肿瘤细胞更易向远处转移。通过检测这两个指标, 可有效把握肿瘤的治疗效果并推测预后。

■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

闫琳, 巴楠, 吴敏, 郑晓珂, 张剑, 邢鑫, 张自森, 郑州大学第五附属医院肿瘤内科 河南省郑州市 475000

闫琳, 主治医师, 主要从事肿瘤化疗、生物治疗和综合治疗的研究。

郑州市2010年度科研发展规划基金资助项目, No.

2010SFXM345

作者贡献分布: 本研究由闫琳设计; 巴楠、吴敏、郑晓珂、张剑、邢鑫及张自森参与研究过程; 文章由闫琳撰写。

通讯作者: 闫琳, 主治医师, 475000, 河南省郑州市康复前街3号, 郑州大学第五附属医院肿瘤内科. 328821265@qq.com

收稿日期: 2014-06-08 修回日期: 2014-06-25

接受日期: 2014-07-01 在线出版日期: 2014-08-28

Effect of hyperthermic perfusion chemotherapy on vascular endothelial growth factor receptor 1 and matrix metalloproteinase-9 in patients with gastric cancer

Lin Yan, Nan Ba, Min Wu, Xiao-Ke Zheng, Jian Zhang, Xin Xing, Zi-Sen Zhang

Lin Yan, Nan Ba, Min Wu, Xiao-Ke Zheng, Jian Zhang, Xin Xing, Zi-Sen Zhang, Department of Oncology, the Fifth Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 475000, Henan Province, China

Supported by: 2010 Zhengzhou Annual Research and Development Program, No. 2010SFXM345

Correspondence to: Lin Yan, Attending Physician, Department of Oncology, the Fifth Affiliated Hospital of Zhengzhou University, 3 Kangfuqian Street, Zhengzhou 475000, Henan Province, China. 328821265@qq.com

Received: 2014-06-08 Revised: 2014-06-25

Accepted: 2014-07-01 Published online: 2014-08-28

Abstract

AIM: To explore the effect of hyperthermic perfusion chemotherapy on vascular endothelial growth factor receptor 1 (VEGFR-1) and matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) in patients with gastric cancer.

METHODS: Eighty-six gastric cancer patients treated at our hospital from March 2010 to April 2013 were randomly divided into either a treatment group or a control group, with 43 cases in each group. The control group was given

conventional chemotherapy, and the treatment group was given hyperthermic perfusion chemotherapy. Carbohydrate antigen 72-4 (CA72-4), VEGFR-1 and MMP-9, changes in clinical symptoms and adverse reactions were compared between before and after treatment.

RESULTS: There were no significant differences in CA72-4 value, the percentages of VEGFR-1 or MMP-9 positive cases, or the number of cases with ascites between the two groups before treatment ($P > 0.05$). CA72-4 value, the percentages of VEGFR-1 and MMP-9 positive cases, and the number of cases with ascites were significantly lower in the treatment group than in the control group ($5.43 \text{ kU/L} \pm 2.07 \text{ kU/L}$ vs $7.08 \text{ kU/L} \pm 3.19 \text{ kU/L}$, 18.60% vs 41.86% , 23.26% vs 41.86% , 7 vs 15 , $P < 0.05$). The recurrence rates at 6 mo and 1 yr were significantly lower in the treatment group than in the control group (2.33% vs 18.6% , 13.95% vs 32.56% , $P < 0.05$), while the survival rates at 6 mo and 1 yr were significantly higher in the treatment group (88.37% vs 69.77% , 44.19% vs 67.44% , $P < 0.05$). The numbers of cases with gastrointestinal bleeding, abdominal pain, leukopenia and diarrhea were significantly less in the treatment group than in the control group (2 vs 9 , 5 vs 13 , 1 vs 9 , 2 vs 9 , $P < 0.05$).

CONCLUSION: Hyperthermic perfusion chemotherapy can achieve better effects than conventional chemotherapy in patients with gastric cancer, and it can reduce the levels of VEGFR-1 and MMP-9, relieve clinical symptoms and decrease the relapse rate.

© 2014 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: Perfusion chemotherapy; Gastric cancer; Vascular endothelial growth factor receptor; Relapse

Yan L, Ba N, Wu M, Zheng XK, Zhang J, Xing X, Zhang ZS. Effect of hyperthermic perfusion chemotherapy on

vascular endothelial growth factor receptor 1 and matrix metalloproteinase-9 in patients with gastric cancer. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2014; 22(24): 3654-3659 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/3654.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i24.3654>

摘要

目的: 探究热灌注化疗对胃癌患者血管内皮生长因子受体1(vascular endothelial growth factor receptor 1, VEGFR-1)及基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases 9, MMP-9)等的影响。

方法: 选取2010-03/2013-04于郑州大学第五附属医院就诊的胃癌患者86例, 依据分层随机分组法将患者分为治疗组及对照组, 每组43例。给予对照组常规化疗方案进行治疗; 给予治疗组热灌注化疗方案进行治疗。观察比较两组患者治疗前后的糖链抗原72-4(CA72-4)值、VEGFR-1及MMP-9阳性例数变化以及患者临床症状及不良反应情况。

结果: 治疗前两组患者的CA72-4值、VEGFR-1及MMP-9阳性例数以及腹水例数比较差异无统计学意义($P>0.05$); 治疗后治疗组患者的CA72-4值、VEGFR-1及MMP-9阳性例数、腹水例数分别是 $5.43 \text{ kU/L} \pm 2.07 \text{ kU/L}$ 、18.60%、23.26%、7例, 对照组依次是 $7.08 \text{ kU/L} \pm 3.19 \text{ kU/L}$ 、41.86%、44.19%、15例, 治疗组均低于对照组($P<0.05$); 治疗后治疗组6 mo复发率及1年复发率为2.33%、13.95%, 对照组分别是18.6%、32.56%, 治疗组低于对照组; 治疗组患者6 mo生存率及1年生存率分别是88.37%、67.44%, 对照组分别是69.77%、44.19%, 治疗组均高于对照组($P<0.05$); 治疗组治疗过程中出现消化道出血2例及腹痛例数5例均小于对照组9例、13例, 差异有统计学意义($P<0.05$); 治疗组出现白细胞减少1例及腹泻2例, 不良反应例数均低于对照组9例、9例, 差异有统计学意义($P<0.05$)。

结论: 应用热灌注化疗法相对于常规化疗法可达到更好的治疗效果, 降低患者VEGFR-1及MMP-9水平, 明显减轻患者临床症状, 降低复发率。

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词: 热灌注化疗; 胃癌; 血管内皮生长因子受体; 复发

核心提示: 本次研究表明, 应用热灌注化疗可明显提高患者生活治疗, 延长患者生存期($P<0.05$)。

热灌注疗法可通过提高病灶区域温度, 利用肿瘤组织与正常机体组织对温度的耐受不同而达到增强化疗药物对肿瘤细胞的杀伤作用。

闫琳, 巴楠, 吴敏, 郑晓珂, 张剑, 邢鑫, 张自森. 热灌注化疗对胃癌患者血管内皮生长因子受体及基质金属蛋白酶的影响. 世界华人消化杂志 2014; 22(24): 3654-3659 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/3654.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i24.3654>

0 引言

胃癌是临床最为常见的恶性肿瘤之一, 其发病率已跃居肿瘤发病率第2位^[1]。胃癌早期一般无任何不适症状及体征而被人们所忽略, 严重危害人们的身体健康。临床发现的胃癌患者往往处于晚期而丧失手术机会, 此时患者不得不面对不良反应严重的化疗方案进行治疗。但消化系统腺癌腹膜转移率高, 近年来, 腹腔热灌注化疗在预防和治疗胃癌腹膜转移和复发中取得了一定的成效, 并被广泛应用于临床。血管内皮生长因子受体1(vascular endothelial growth factor receptor 1, VEGFR-1)与肿瘤组织的血管生成有关, 其高水平表达可能与肿瘤组织血供增加及瘤体增大有关^[2]。基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase 9, MMP-9)可分解细胞外基质, 降低细胞间的黏滞性使得肿瘤细胞更易向远处转移^[3]。通过检测这两个指标, 可有效把握肿瘤的治疗效果并推测预后。为了探究更好的提高化疗治疗效果, 降低化疗不良反应的方法, 郑州大学第五附属医院在不耽误患者病情并且患者知情同意的前提下进行了探究热灌注化疗对胃癌患者VEGFR-1及MMP-9等影响的研究, 现将成果报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料 对来郑州大学第五附属医院治疗的86例晚期胃癌患者进行前瞻性研究。纳入标准: 患者均符合中晚期胃癌诊断标准及鲍曼(Borrmann)分型^[4]。I: 息肉样; II: 溃疡样; III: 溃疡浸润型; IV: 浸润型。患者预期寿命4 mo以上; 患者年龄20-60岁; 患者一般情况较好, 无其他威胁生命的疾病; 患者主要器官如心、肺、脑、肾及肝等功能良好, 无功能不良; 患者未合并高血压或糖尿病等慢性疾病; 患者无肝硬化及其他影响凝血功能的疾病; 患者及其家属对本次研究知情并自愿参与。排除标准: 患者合并乙型肝炎、结核或艾滋等传染性疾病; 患者处于妊娠

■ 研发前沿

由于胃癌的发病隐匿前期无明显症状或症状轻微与胃炎相似而不被人们重视, 等病情加重时往往已经失去了早期切除的机会。而常规化疗治疗方案存在全身不良反应明显, 药物杀伤作用无侧重点, 在杀灭肿瘤细胞的同时也使机体受到严重损伤而影响患者的生活质量。部分患者还因为不良反应的过于严重无法坚持治疗甚至危及生命。

■相关报道

有研究表明,幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)感染也与胃癌的发病有关,*H. pylori*对胃黏膜的反复破坏及胃内胃酸及食物等刺激造成出现不典型增生。据报道,抽烟也有一定的导致胃癌发病的可能。鉴于胃癌发病病因多种多样,很难做好一级预防,因此应当做好其早发现及早治疗。

或哺乳期;患者出现脑转移或有脑转移征象^[5];患者有胃溃疡、消化道出血或胃穿孔等胃肠道疾病史;患者合并精神疾病或有精神疾病史;患者对自身病情难以接受或不配合治疗;患者对本次治疗用药存在过敏反应。该方案经院里伦理委员会审核批准,所有受试者均为自愿签署知情同意书者。

奥沙利铂(50 mg, 江苏奥赛康药业股份有限公司, 批号: D1310012, 国药准字H20064296); 亚叶酸钙注射液(5 mL: 50 mg, 上海恒瑞医药有限公司, 批号: 13052721, 批准文号H32022391); 5-氟尿嘧啶(10 mL: 0.25 g, 上海旭东海普药业有限公司, 批号: FA130504, 国药准字H31020593); 顺铂注射液(20 mL: 20 mg, 齐鲁制药有限公司, 批号: 312039CF, 国药准字H37021358); 盐酸利多卡因注射液(5 mL: 0.1 g, 上海朝晖制药有限公司, 批号: 1403T02, 国药准字H31021072); 地塞米松注射液(1 mL: 5 mg, 国药集团容生制药有限公司, 批号: 1401408021, 国药准字H41020036); 卡培他滨(0.5 g, 上海罗氏制药有限公司, 批号: SH1118, 国药准字H20073024)。

1.2 方法

1.2.1 治疗: 在充分水化并利尿的前提下, 给予两组患者化疗方案进行治疗。对照组: 治疗第1天给予患者注射用90 mg/m², 静脉注射; 治疗第1-5天给予患者200 mg/m², 静脉注射; 治疗第1-5天给予患者500 mg/m², 静脉续滴进行治疗, 3 wk为一子疗程, 共进行3个子疗程治疗; 经B超定位后腹腔置管, 放空腹腔积液后将顺铂注射液30 mg/m², 盐酸利多卡因注射液2 mL, 地塞米松注射液5 mg及生理盐水2000 mL灌注患者腹腔, 并封管, 共进行60 min的治疗, 1次/wk, 连续2 wk治疗后停止1 wk; 口服卡培他滨1500 mg/(m² · d), 分两次口服, 连用14 d后停用7 d, 共进行为期9 wk的治疗。治疗组: 在对照组治疗方案的基础上, 对腹腔灌注液采用体腔热灌注治疗系统保持温度43 ℃保持循环注入腹腔, 每15 min变换体位; 共进行60 min的治疗, 1次/wk, 连续2 wk治疗后停止1 wk, 共进行为期9 wk的治疗。

1.2.2 检测项目: 指标: 分别于治疗前后检测患者的VEGFR-1阳性例数: 胃镜下采集患者胃癌组织, 经石蜡包埋HE染色、抗体处理及免疫组织化学染色等处理, 多处高倍镜下(×400)平均半数以上细胞为无色或淡黄色者为阴性, 半数以上细胞黄色或棕褐色为阳性。MMP-9阳性例数: 胃镜下采集患者胃癌组织, 采用免疫组织化学技术SP

表 1 两组患者一般资料对比 ($n = 43$)

分组	男(n)	女(n)	年龄(岁)	体质量(kg)
治疗组	28	15	47.63 ± 9.15	64.29 ± 11.05
对照组	26	27	49.81 ± 8.42	66.57 ± 8.24
统计值	0.199		-1.150	-1.085
P 值	0.655		0.254	0.281

法进行检测, 多处高倍镜下(×400)平均1/4以上细胞出现棕黄色颗粒则为阳性, 否则为阴性。糖链抗原72-4(carbohydrate antigen 72-4, CA72-4)值: 抽取患者静脉血液3 mL, 检测患者CA72-4值。统计患者治疗前后腹水例数、6 mo复发率、6 mo生存率、1年复发率及1年生存率。不良事件: 统计治疗过程中两组患者出现消化道出血、吞咽困难及腹痛等不良事件的例数。药物不良反应: 记录两组患者治疗过程中出现白细胞减少、脱发、肝功能异常及腹泻等不良反应例数。

统计学处理 将患者的研究数据录入到SPSS12.0统计学软件中进行分析, 组间计量资料的比较采用 t 检验, 计数资料构成比的比较采用 χ^2 检验或Fisher精确概率法检验; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患者治疗前后一般资料比较 参与本次研究的86例患者中, 失访率为0。其中符合标准的86例患者根据分层随机分组法随机分为两组, 比较两组患者的一般资料如性别、年龄及体质量无统计学差异($P > 0.05$)(表1)。

2.2 比较两组患者治疗前后胃癌相关指标情况 治疗前两组患者的CA72-4值、VEGFR-1及MMP-9阳性例数比较差异无统计学意义($P > 0.05$), 治疗后治疗组患者CA72-4值、VEGFR-1及MMP-9阳性例数均低于对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)(表2)。

2.3 比较两组患者治疗过程中不良事件发生情况 治疗过程中治疗组出现消化道出血及腹痛例数均小于对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)(表3)。

2.4 比较两组患者治疗效果及复发情况 治疗前两组患者腹水例数比较差异无统计学意义($P > 0.05$), 治疗后治疗组患者腹水例数、6 mo复发率及1年复发率均低于对照组, 治疗组患者6 mo生存率及1年生存率均高于对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)(表4)。

2.5 比较两组患者治疗过程中不良反应情况 治

■同行评价

本文设计合理, 方法科学, 结论可靠, 有一定的临床指导意义。

表 2 两组患者治疗前后胃癌相关指标情况比较 ($n = 43$)

分组	VEGFR-1阳性 $n(\%)$		MMP-9阳性 $n(\%)$		CA72-4(kU/L)	
	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
治疗组	34(79.07)	8(18.60)	29(67.44)	10(23.26)	9.15 ± 3.76	5.43 ± 2.07
对照组	31(72.09)	18(41.86)	28(65.12)	19(44.19)	9.37 ± 4.08	7.08 ± 3.19
统计值	0.567	5.513	0.052	4.214	-0.260	-2.845
P值	0.451	0.019	0.820	0.040	0.795	0.006

表 3 两组患者治疗过程中不良事件发生情况比较 ($n = 43, n(\%)$)

分组	消化道出血	吞咽困难	腹痛
治疗组	2(4.65)	0(0.00)	5(11.63)
对照组	9(20.93)	1(2.33)	13(30.23)
统计值	0.184	1.012	4.497
P值	0.049	0.314	0.034

表 4 两组患者治疗效果及复发情况比较 ($n = 43, n(\%)$)

分组	腹水例数		6 mo复发率	6 mo生存率	1年复发率	1年生存率
	治疗前	治疗后				
治疗组	37(86.05)	7(16.28)	1(2.33)	38(88.37)	6(13.95)	29(67.44)
对照组	35(81.40)	15(34.88)	8(18.6)	30(69.77)	14(32.56)	19(44.19)
统计值	0.341	3.909	0.104	4.497	4.170	4.715
P值	0.559	0.048	0.30	0.034	0.041	0.030

表 5 两组患者治疗过程中不良反应情况比较 ($n = 43, n(\%)$)

分组	白细胞减少	脱发	肝功能异常	腹泻
治疗组	1(2.33)	3(6.96)	2(4.65)	2(4.65)
对照组	9(20.93)	1(2.33)	4(9.30)	9(20.93)
统计值	0.090	3.150	0.476	0.184
P值	0.015	0.076	0.636	0.666

疗过程中治疗组出现白细胞减少及腹泻等不良反应例数均低于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)(表5)。

3 讨论

胃癌是一种起源于胃黏膜上皮细胞癌变的恶性肿瘤, 死亡率达25/10万以上, 且起病隐匿, 早期发现困难, 严重威胁人们的身体健康^[6]。胃癌的致病因素与多种因素有关^[7-9]: 胃癌发病与环境有一定相关性, 我国青海等西北地区的发病率明显高于其他地区, 可能与人们生活环境中及饮食中微量元素构成比例不同有关。长期食用腌制、烧烤、煎炸及烫食也可对胃癌的发病具

有一定的促进作用。慢性胃炎患者也可在病情进展未行有效控制的情况下出现萎缩性胃炎, 胃黏膜肠上皮化生并可能出现癌变。有研究表明^[10], 幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)感染也与胃癌的发病有关, *H. pylori*对胃黏膜的反复破坏及胃内胃酸及食物等刺激造成出现不典型增生。据报道^[11], 抽烟也有一定的导致胃癌发病的可能。鉴于胃癌发病病因多种多样, 很难做好一级预防, 因此应当做好其早发现及早治疗。

由于胃癌的发病隐匿前期无明显症状或症状轻微与胃炎相似而不被人们重视, 等病情加重时往往已经失去了早期切除的机会^[12,13]。而常

规化疗治疗方案存在全身不良反应明显, 药物杀伤作用无侧重点, 在杀灭肿瘤细胞的同时也使机体受到严重损伤而影响患者的生活质量^[14]. 部分患者还因为不良反应的过于严重无法坚持治疗甚至危及生命^[15]. 腹腔灌注化疗是具有高选择性区域化疗, 改作用特点让腹腔微小病灶暴露与高浓度的抗癌药物下, 可增加作用效果, 对容易腹腔内转移及复发的肿瘤具有一定的针对性. 腹腔热灌注化疗原自腹腔内灌注化疗, 他是根据肿瘤组织的耐热性低于正常机体组织这一原理, 将热效应好的化疗药采用物理能量加热的方式灌注到肿瘤所在部位, 因此腹腔热灌注化疗这种治疗方案对肿瘤细胞起到直接的细胞不良反应, 对正常组织又不损伤, 还可以增强化疗、放疗的疗效, 提高机体的免疫力, 最终实现抑制肿瘤转移的效果. 在一项进展期胃癌术后腹腔热灌注化疗有效性和安全性的系统评价报告中, 腹腔热灌注化疗大大提高了患者远期生存率, 降低术后复发率和远处转移率, 且不会增加不良反应的发生^[16]. 由此可见腹腔热灌注化疗的应用在一定程度上给晚期胃癌患者的治疗带来福音. 为何肿瘤组织对热灌注化疗敏感目前尚无定论, 我们针对这个问题展开了研究, 通过热灌注化疗对胃癌患者血管内皮生长因子受体及基质金属蛋白酶影响探讨其作用机制.

本次研究表明, 应用热灌注化疗可明显提高患者生活治疗, 延长患者生存期($P<0.05$). 热灌注疗法可通过提高病灶区域温度, 利用肿瘤组织与正常机体组织对温度的耐受不同而达到增强化疗药物对肿瘤细胞的杀伤作用. 有研究表明^[17], 通过热灌注治疗, 可提高病灶区域温度, 扩张血管, 使更多的化疗药物与病灶接触, 达到更好的治疗效果. 热灌注疗法可提高病灶部位血供及化疗药物浓度, 从而降低机体其他部位的化疗药物浓度, 减轻对正常组织的不良作用. 据报道^[18], 化疗药物在热灌注条件下通过对肿瘤组织VEGFR-1合成环节的抑制达到降低肿瘤组织新生血管形成及瘤体复发成长的可能. 利用肿瘤组织与正常组织对温度耐受不同而增强杀伤力同样可以促进对MMP-9生成的抑制作用, 抑制肿瘤细胞的转移, 对局限肿瘤细胞并重点治疗意义重大. 从分子层面破坏肿瘤细胞复发、生长及转移所需条件, 促进患者的康复. 本次研究结果与国内外相关研究一致^[8,19]. 鉴于本次研究样本量有限, 研究过程也可能存在诸多不足之处, 结果尚需进一步研究论证.

总之, 应用热灌注化疗法对胃癌患者进行治疗可明显降低化疗药物对患者正常组织细胞的损伤, 提高治疗效果, 延长患者的生存期.

4 参考文献

- 1 徐桂芳, 周志华, 吴寒, 徐新运, 汪灏, 管文贤, 邹晓平. 缺氧诱导因子-1 α 在胃癌组织中的表达与胃癌术后复发的关系. 中华消化杂志 2013; 33: 456-459
- 2 Zangarini M, Ceriani L, Bello E, Damia G, Cereda R, Camboni MG, Zucchetti M. HPLC-MS/MS method for quantitative determination of the novel dual inhibitor of FGF and VEGF receptors E-3810 in tumor tissues from xenograft mice and human biopsies. *J Mass Spectrom* 2014; 49: 19-26 [PMID: 24446259 DOI: 10.1002/jms.3305]
- 3 Mei XT, Xu DH, Xu SK, Zheng YP, Xu SB. Zinc(II)-curcumin accelerates the healing of acetic acid-induced chronic gastric ulcers in rats by decreasing oxidative stress and downregulation of matrix metalloproteinase-9. *Food Chem Toxicol* 2013; 60: 448-454 [PMID: 23933360 DOI: 10.1016/j.fct.2013.07.075]
- 4 Li A, Gao P, Wang Z, Song Y, Xu Y, Miao Y, Zhu J, Xu H. Positive association of the vascular endothelial growth factor-A +405 GG genotype and poor survival in stage I-II gastric cancer in the Northern Chinese population. *Mol Biol Rep* 2013; 40: 2741-2748 [PMID: 23264084 DOI: 10.1007/s11033-012-2365-6]
- 5 刘少平, 胡亚华, 方春华, 余立群, 张险峰, 董卫国. 胃癌及术后随访患者血清血管生成素-2含量的临床意义. 中华消化杂志 2011; 31: 513-516
- 6 Zhang C, Gao GR, Lv CG, Zhang BL, Zhang ZL, Zhang XF. Protease-activated receptor-2 induces expression of vascular endothelial growth factor and cyclooxygenase-2 via the mitogen-activated protein kinase pathway in gastric cancer cells. *Oncol Rep* 2012; 28: 1917-1923 [PMID: 22941376 DOI: 10.3892/or.2012.1998]
- 7 覃振赫. 弥漫型胃癌术后腹腔热灌注联合替吉奥辅助化疗的疗效观察. 广西医学 2013; 35: 810-811, 813
- 8 Osinsky S, Bubnovskaya L, Ganusevich I, Kovelskaya A, Gumenyuk L, Olijnichenko G, Merentsev S. Hypoxia, tumour-associated macrophages, microvessel density, VEGF and matrix metalloproteinases in human gastric cancer: interaction and impact on survival. *Clin Transl Oncol* 2011; 13: 133-138 [PMID: 21324802 DOI: 10.1007/s12094-011-0630-0]
- 9 廖国清, 曲怡梅, 王红梅, 刘鹏辉, 李亮亮. 循环热灌注化疗治疗晚期胃癌合并腹腔积液的临床研究. 中国肿瘤临床 2012; 39: 452-454
- 10 林朗, 郑元回, 林克荣. 胃癌组织中Survivin、CerbB-2和P53的表达及其临床意义. 中华消化杂志 2011; 31: 562-564
- 11 武帅, 房静远. 锌指蛋白在胃癌中的作用. 中华消化杂志 2013; 33: 139-141
- 12 Peng L, Zhan P, Zhou Y, Fang W, Zhao P, Zheng Y, Xu N. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor immunohistochemical expression in gastric cancer: a meta-analysis. *Mol Biol Rep* 2012; 39: 9473-9484 [PMID: 22729879 DOI: 10.1007/s11033-012-1812-8]
- 13 Chu D, Zhang Z, Li Y, Zheng J, Dong G, Wang W, Ji G. Matrix metalloproteinase-9 is associated with disease-free survival and overall survival in

- patients with gastric cancer. *Int J Cancer* 2011; 129: 887-895 [PMID: 20957628 DOI: 10.1002/ijc.25734]
- 14 贺德志, 李建生, 彭俏. 胰岛素样生长因子结合蛋白7在胃癌中的表达及其临床意义. *中华消化杂志* 2012; 32: 559-560
- 15 Lukaszewicz-Zajac M, Mroczko B, Szmitkowski M. Gastric cancer - The role of matrix metalloproteinases in tumor progression. *Clin Chim Acta* 2011; 412: 1725-1730 [PMID: 21693112 DOI: 10.1016/j.cca.2011.06.003]
- 16 李征, 杨克虎, 米登海, 天金徽, 刘晓光. 进展期胃癌术后腹腔热灌注化疗有效性和安全性的系统评价. *中国循证医学杂志* 2011; 11: 1402-1408
- 17 张自森, 薛长年, 张剑, 张红巧, 巴楠, 夏兴洲, 吴敏, 樊青霞. 腹腔热灌注顺铂联合卡培他滨治疗晚期胃癌腹腔积液. *实用医学杂志* 2012; 28: 3447-3449
- 18 Zhu P, Zhang J, Chen Q, Wang J, Wang Y. Expression of vascular endothelial growth factor-C in gastric carcinoma and the effect of its antisense gene transfection on the proliferation of human gastric cancer cell line SGC-7901. *Am J Surg* 2012; 204: 78-83 [PMID: 22227171 DOI: 10.1016/j.amjsurg.2011.06.056]
- 19 龙辉, 吴清明, 李欢. VEGF的表达及其微血管密度在胃癌组织中的意义. *世界华人消化杂志* 2010; 18: 557-562

编辑 田滢 电编 闫晋利



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)

胃癌组织中RNF180与RECK的表达水平与预后的关系

黄 靓, 李国庆, 毛振江, 钟 鹰

■背景资料

胃癌是最常见的消化系统恶性肿瘤之一, 目前对于晚期胃癌仍缺乏较为有效的治疗方法, 癌转移是晚期胃癌预后差死亡率高的主要原因。因此寻找早期诊断的靶点, 对提高胃癌早期诊断及预后具有重要的意义。

黄靓, 李国庆, 毛振江, 南华大学附属第二医院消化内科 湖南省衡阳市 421001

钟鹰, 南华大学附属湘潭医院消化内科 湖南省湘潭市 411100

黄靓, 主要从事消化系统疾病的研究。

作者贡献分布: 黄靓与李国庆对此文所作贡献均等; 此课题由黄靓设计, 李国庆教授指导; 研究过程由黄靓与毛振江操作完成; 研究所用新试剂与分析工具由李国庆提供; 数据分析由黄靓与钟鹰完成; 本论文写作由黄靓与李国庆完成。

通讯作者: 李国庆, 教授, 主任医师, 421001, 湖南省衡阳市解放大道35号, 南华大学附属第二医院消化内科。

ligq1970@yahoo.com.cn

电话: 0734-8899977

收稿日期: 2014-05-26 修回日期: 2014-06-27

接受日期: 2014-07-15 在线出版日期: 2014-08-28

Expression of RNF180 and RECK in gastric carcinoma

Liang Huang, Guo-Qing Li, Zhen-Jiang Mao, Ying Zhong

Liang Huang, Guo-Qing Li, Zhen-Jiang Mao, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Nanhua University, Hengyang 421001, Hunan Province, China

Ying Zhong, Department of Gastroenterology, the Affiliated Xiangtan Hospital of Nanhua University, Xiangtan 411100, Hunan Province, China

Correspondence to: Guo-Qing Li, Professor, Chief Physician, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Nanhua University, 35 Jiefang Avenue, Hengyang 421001, Hunan Province, China. ligq1970@yahoo.com.cn

Received: 2014-05-26 Revised: 2014-06-27

Accepted: 2014-07-15 Published online: 2014-08-28

Abstract

AIM: To detect the expression of ring finger protein 180 (RNF180) and reversion-inducing-cysteine-rich protein with Kazal motifs (RECK) in gastric carcinoma.

METHODS: Western blot and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) were used to detect the expression of RECK and RNF180 in gastric cancer, pericarcinomatous tissue and normal gastric mucosal tissue.

RESULTS: The positive rates of RNF180 expression in gastric cancer and pericarcinomatous tissue were significantly lower than that in normal gastric mucosal tissue (68.7%, 28.4% vs 6.1%, $P < 0.05$). RECK expression was significantly lower

in gastric carcinoma and pericarcinomatous tissue than in normal gastric mucosal tissue (71.4%, 31.6% vs 5.3%, $P < 0.05$).

CONCLUSION: RNF180 and RECK expression in gastric cancer is significantly reduced, suggesting that they may play an important role in the development of gastric cancer.

© 2014 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: Gastric carcinoma; Pericarcinomatous tissue; RNF180; RECK

Huang L, Li GQ, Mao ZJ, Zhong Y. Expression of RNF180 and RECK in gastric carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(24): 3660-3664 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/3660.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i24.3660>

摘要

目的: 分析胃癌组织中环指蛋白180(the ring finger protein, RNF180)与伴有Kazal域的富含半胱氨酸的逆转诱导蛋白(reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motif, RECK)基因的表达水平及与预后的关系。

方法: 应用Western blot及逆转录PCR(reverse transcription-PCR, RT-PCR)方法检测胃癌、癌旁组织及其正常胃黏膜中RNF180及RECK的表达水平, 分析其表达水平变化与胃癌发生发展的关系。

结果: RNF180在胃癌组织及癌旁组织中的表达水平较正常胃黏膜中显著下调(68.7% vs 6.1%, 28.4% vs 6.1%, $P < 0.05$); RECK在胃癌组织及癌旁组织中的表达显著低于正常胃黏膜(71.4% vs 5.3%, 31.6% vs 5.3%, $P < 0.05$)。

结论: RNF180及RECK在胃癌组织中表达水平显著降低, 提示其可能在胃癌的发生发展过程中有重要作用。

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有。

■同行评议者

黄颖秋, 教授, 本溪钢铁(集团)总医院消化内科

关键词: 胃癌; 癌旁组织; 环指蛋白180; 伴有Kazal域的富含半胱氨酸的逆转诱导蛋白

核心提示: 胃癌的发生、发展、侵袭及转移是一个多因素、多分子调节过程, 本研究采用Western blot与RT-PCR检测了胃癌组织、癌旁组织及正常胃黏膜中环指蛋白180(ring finger protein, RNF180)及伴有Kazal域的富含半胱氨酸的逆转诱导蛋白(reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motif, RECK)的表达水平, 从转录水平及翻译水平研究其表达变化, 提示RNF180与RECK的表达失调可能在胃癌的发生发展过程中扮演重要角色。

黄靓, 李国庆, 毛振江, 钟鹰. 胃癌组织中RNF180与RECK的表达水平与预后的关系. 世界华人消化杂志 2014; 22(24): 3660-3664 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/3660.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v22.i24.3660>

0 引言

胃癌是最常见的消化系恶性肿瘤之一, 是三大最易导致患者死亡的肿瘤之一。胃癌的发生与地理环境、饮食习惯、遗传因素及幽门螺旋杆菌感染等密切相关^[1]。随着医疗诊疗技术的快速发展, 对早中期胃癌主要采取手术为主的综合治疗, 但对于晚期胃癌仍缺乏较为有效的治疗方法, 预后差死亡率高。癌转移是晚期胃癌的一个显著特征, 包括淋巴结转移、远处脏器转移等^[2]。因此寻找早期诊断的靶点, 对提高胃癌早期诊断及预后有重要的意义。环指蛋白180(ring finger protein 180, RNF180)是一种膜结合的E3泛素连接酶, 是蛋白质降解过程必须的环节, 调节多种细胞过程。研究证实RNF180基因的DNA甲基化与胃癌的发生相关^[3]。伴有Kazal域的富含半胱氨酸的逆转诱导蛋白(reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motif, RECK)基因是一种肿瘤抑制基因, 具有抑制基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMP)表达与激活的功能, 研究显示RECK基因的表达能够抑制肿瘤的浸润转移与血管生成^[4]。本研究通过分析RNF180与RECK在不同胃癌组织中的表达, 为胃癌的早期诊断提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料 收集南华大学附属第二医院普外科2011-04/2013-07经胃癌手术切除的胃癌组织、

对应的癌旁组织及正常的胃黏膜59例, 其中男35例, 女24例; 年龄31-62岁, 平均47.3岁; 局部淋巴结转移患者36例, 未发现转移患者23例; 高分化腺癌患者7例, 中分化腺癌患者14例, 低分化腺癌患者38例; TNM分期: I-II期患者28例, III-IV期患者31例, 所有患者及家属均签署知情同意书。将标本收集后迅速放入液氮, 转移至-80℃保存备用。RNF-180一抗、RECK一抗购自美国CST公司; 兔抗人二抗购自Jackson公司; 超敏化学发光显色试剂盒、Bradford蛋白测定试剂盒购自碧云天公司; UVP凝胶成像系统购自Upland公司; ABI prism 7500荧光定量PCR购自Applied Biosystems公司; 核酸分析仪购自Beckman公司; 逆转录试剂盒购自Promega公司。

1.2 方法

1.2.1 蛋白样品制备: 从-80℃冰箱取出收集胃癌组织及对应的癌旁组织和正常胃黏膜组织, 称取0.2 g组织加200 μL组织裂解液(50 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 150 mmol/L PMSF, 0.1%NP-40, 蛋白酶抑制剂)冰浴匀浆。将匀浆液4℃ 12000 r/min离心15 min, 取上清, 采用Bradford法检测蛋白浓度。

1.2.2 Western blot检测RNF180与RECK蛋白表达水平: 取上述制备的蛋白样品50 μg上样到15%SDS-PAGE凝胶, 电泳完毕后将蛋白电转至NC膜, 用5%脱脂奶粉封闭, 分别加一抗(兔抗人RNF180单克隆抗体1:250, 兔抗人RECK单克隆抗体1:100), 37℃孵育2 h, 经0.1%TBST漂洗后加二抗(1:2000)室温孵育2 h, TBST洗膜后加ECL, X光胶片定影, 扫描后用IPP6.0进行图像分析。

1.2.3 组织总RNA提取: 称取100 mg组织样本, 参照试剂盒说明书提取组织总RNA, 加入1 mL TRIzol后冰浴匀浆, 加200 μL氯仿混匀, 静置10 min后13000 r/min离心10 min, 取上清, 加无水乙醇洗涤后, 再加10-50 μL DEPC水溶解, 核酸纯度分析仪分析总RNA纯度, $A_{260/280}$ 在1.8-2.0之间, 计算RNA浓度, 分装保存于-80℃备用。

1.2.4 逆转录PCR(reverse transcription-PCR, RT-PCR)检测RNF180与RECK基因表达水平: 引物: RNF180上游引物: 5'-CCTCAGAC-CAGGAAGAGCAC-3', 下游引物: 5'-ATGATC-CAGCAATCCCACTC-3'; RECK上游引物:

■研究前沿

研究证实环指蛋白180(ring finger protein 180, RNF180)基因的DNA甲基化与胃癌的发生相关。伴有Kazal域的富含半胱氨酸的逆转诱导蛋白(reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motif, RECK)基因具有抑制MMP表达与激活及抑制肿瘤的浸润转移与血管生成的功能。本研究通过分析RNF180与RECK在不同胃癌组织中的表达, 为胃癌的早期诊断提供实验依据。

■相关报道

Cheung等在胃癌中的研究表明RNF180基因表达下调或缺失是胃癌预后的危险因素相符。目前关于RNF180参与肿瘤过程的生物学机制并不清楚, 仅显示其是胃癌一个潜在的肿瘤抑制基因。Song等的研究发现RECK在胃癌中的表达同临床分期及淋巴结转移呈现明显负相关。

■创新盘点

本研究中Western blot分析胃癌组织、癌旁组织及正常胃黏膜中RECK的蛋白表达水平,结果显示在胃癌组织中的表达显著降低,RT-PCR结果与Western blot结果一致,提示RECK作为抑癌基因,其表达上调可以抑制肿瘤的发生、浸润与转移。

5'-CCTGCATTGCTCGCTGTGTG-3',下游引物: 5'-CCTGTGGTTTGGGTATGCACCTT-3'。逆转录: 将5 μ L RNA, 6 μ L DECP水, 1 μ L oligo(dT)18 primer混匀,离心后65 $^{\circ}$ C放置5 min,冷冻速离后加入1 μ L RNase inhibitor、4 μ L 5%RT-buffer、1 μ L RTase、2 μ L 10 mmol/L NTP Mix混匀,离心后放入逆转录仪进行逆转录,42 $^{\circ}$ C 1 h; 70 $^{\circ}$ C 5 s; 4 $^{\circ}$ C 1 h。完成后将样本-80 $^{\circ}$ C保存备用。扩增: 10 μ L Master Mix, 6.4 μ L ddH₂O, 10 μ mol/L PCR引物F, 10 μ mol/L PCR引物R, 1 μ L cDNA,共20 μ L。PCR反应条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 min; 59 $^{\circ}$ C 30 s; 30个循环,最后72 $^{\circ}$ C 8 min。经1.0%琼脂糖凝胶电泳后,灰度扫描,分析结果。

统计学处理 采用SPSS19.0进行统计学分析,所有数据以mean \pm SD表示,率的比较采用 χ^2 检验,均数比较采用t检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Western blot检测RNF180与RECK蛋白表达水平 通过对胃癌组织、癌旁组织及正常胃黏膜组织中的RNF180及RECK蛋白的Western blot检测结果进行分析,结果显示,RNF180在胃癌组织及癌旁组织中的表达水平较正常胃黏膜中显著下调(68.7% vs 6.1%, 28.4% vs 6.1%, $P<0.05$); RECK在胃癌组织及癌旁组织中的表达显著低于正常胃黏膜(71.4% vs 5.3%, 31.6% vs 5.3%, $P<0.05$)(图1)。

2.2 RT-PCR检测RNF180与RECK基因表达水平 通过对胃癌组织、癌旁组织及正常胃黏膜组织中的RNF180及RECK基因的RT-PCR检测结果进行分析,结果显示,在胃癌组织中RNF180及RECK的表达量均较癌旁组织和正常黏膜组织中降低($P<0.05$)(图2)。

3 讨论

胃癌是最常见的恶性肿瘤之一,严重影响着人们的生命健康,调查显示全球每年有100万新发胃癌患者,仅次于肺癌、乳腺癌及大肠癌^[5]。且70%的胃癌患者出现在发展中国家,而我国就占到41%^[6]。胃癌的发生一个多基因、多因素共同调节的复杂过程,原癌基因的激活、抑癌基因的失活、突变及凋亡基因的失调均可能导致细胞恶性增殖导致恶化、转移^[7-9]。越来越多的研究发现了相关的肿瘤标志物^[10-13],

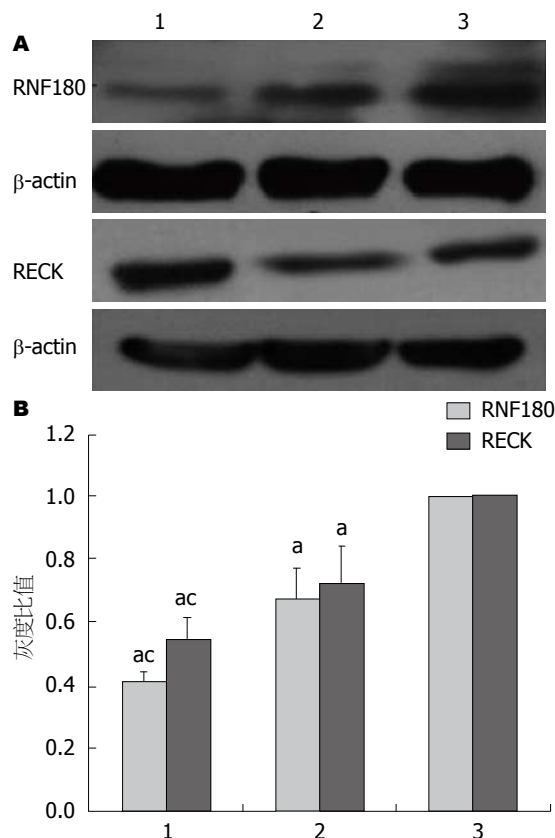


图1 Western blot检测RNF180与RECK蛋白的表达。A: Western blot结果; B: 蛋白的相对表达量。* $P<0.05$ vs 正常黏膜; * $P<0.05$ vs 癌旁组织。1: 胃癌组织; 2: 癌旁组织; 3: 正常胃黏膜。RNF180: 环指蛋白180; RECK: 伴有Kazal域的富含半胱氨酸的逆转诱导蛋白。

对胃癌的发生机制有了更深入的了解,为胃癌的诊断、治疗及预后提供了更多新的方法和途径。

RNF180是膜结合的E3泛素蛋白连接酶,参与调控包括细胞发育、增殖、周期调控及凋亡等生物学过程,已有研究显示RNF180作为新的抑癌基因参与到肿瘤的侵袭和转移等生物学过程。RNF180的甲基化可作为胃癌早期诊断及预防的分子标志物^[3]。在本研究中通过Western blot分析胃癌组织、癌旁组织及正常胃黏膜中RNF180的蛋白表达水平,结果显示在胃癌组织中的表达显著降低,RT-PCR结果与Western blot结果一致。与Cheung等^[14]在胃癌中的研究表明RNF180基因表达下调或缺失是胃癌预后的危险因素相符。目前关于RNF180参与肿瘤过程的生物学机制并不清楚,仅显示其是胃癌一个潜在的肿瘤抑制基因。但环指蛋白家族部分成员参与细胞生长及肿瘤形成,有研究显示RNF43可以作为肝癌治疗的新靶点^[15]。肿瘤的侵袭及远处转移是一个复杂调控过程,涉及肿瘤细胞

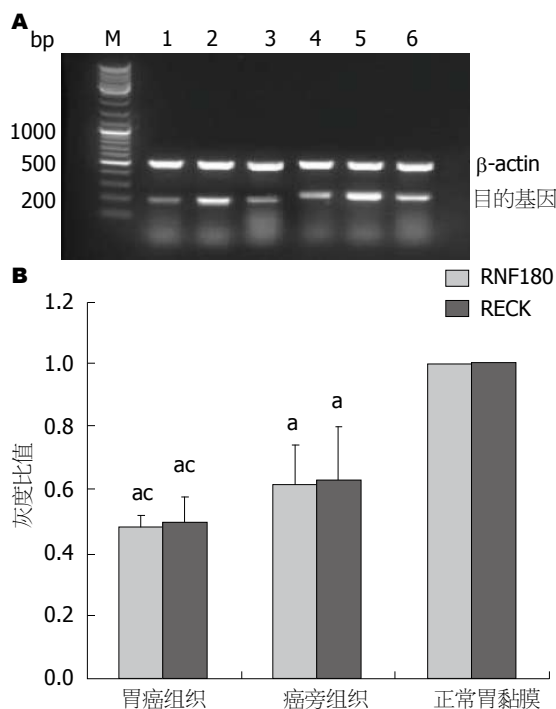


图2 RT-PCR检测RNF180与RECK基因表达。A: 琼脂糖凝胶电泳结果。1: 胃癌组织中的RNF180基因; 2: 正常胃黏膜中的RNF180基因; 3: 癌旁组织中的RNF180基因; 4: 胃癌组织中的RECK基因; 5: 正常胃黏膜中的RECK基因; 6: 癌旁组织中的RECK基因; B: 基因的相对表达量。* $P < 0.05$ vs 正常胃黏膜; $P < 0.05$ vs 癌旁组织。RNF180: 环指蛋白180; RECK: 伴有Kazal域的富含半胱氨酸的逆转诱导蛋白。

突破细胞外基质屏障, 血管壁基底膜进入宿主微环境。大量研究表明基质金属蛋白酶MMP在其中扮演重要的角色, 而RECK作为新发现的MMP抑制蛋白, 能够在转录后水平抑制多种MMP的表达从而抑制肿瘤的侵袭与转移。Song等^[16]的研究发现RECK在胃癌中的表达同临床分期及淋巴结转移呈现出明显负相关, 本研究中Western blot分析胃癌组织、癌旁组织及正常胃黏膜中RECK的蛋白表达水平, 结果显示在胃癌组织中的表达显著降低, RT-PCR结果与Western blot结果一致, 提示RECK作为抑癌基因, 其表达上调可以抑制肿瘤的发生、浸润与转移。

总之, 胃癌的发生、发展、侵袭及转移是一个多因素、多分子调节过程, 本研究采用Western blot与RT-PCR检测了胃癌组织、癌旁组织及正常胃黏膜中RNF180及RECK的表达水平, 从转录水平及翻译水平研究其表达变化, 提示RNF180与RECK的表达失调可能在胃癌的发生发展过程中扮演重要角色, 相关分子机制还有待进一步深入研究。

4 参考文献

- 1 季加孚. 我国胃癌防治研究三十年回顾. 中国肿瘤临床 2013; 40: 1345-1351
- 2 张征, 毛伯能, 钱佳. 胃癌组织血管内皮生长因子家族与胃癌转移的关系. 中华消化杂志 2012; 32: 866-867
- 3 杨光润. RNF180基因DNA启动子区域甲基化检测对肝细胞癌发病风险预测及预后的判断价值. 石家庄: 河北医科大学, 2012
- 4 李晟磊, 赵秋民, 刘宗文, 赵志华, 高冬玲, 郑湘予, 陈奎生, 张云汉. 食管鳞癌中RECK和MMP-9蛋白表达的相关性及临床病理意义. 世界华人消化杂志 2007; 15: 1082-1086
- 5 季加孚, 李鑫. 胃癌治疗的新进展. 循证医学 2011; 11: 82-86
- 6 侯丽, 董青, 张雅月, 田劭丹, 姜利霞, 王珍珍, 杨亨, 郭晓青. 中药抗胃癌新生血管生成的研究现状与评价. 世界中西医结合杂志 2013; 8: 750-753
- 7 Li Z, Miao Z, Jin G, Li X, Li H, Lv Z, Xu HM. β ig-h3 supports gastric cancer cell adhesion, migration and proliferation in peritoneal carcinomatosis. *Mol Med Rep* 2012; 6: 558-564 [PMID: 22710407 DOI: 10.3892/mmr.2012.951]
- 8 Mita K, Ito H, Fukumoto M, Murabayashi R, Koizumi K, Hayashi T. An adequate perioperative management and strategy for gastric cancer after coronary artery bypass using the right gastroepiploic artery. *Surg Today* 2013; 43: 284-288 [PMID: 22706786 DOI: 10.1007/s00595-012-0224-7]
- 9 Du Y, Liu Z, Gu L, Zhou J, Zhu BD, Ji J, Deng D. Characterization of human gastric carcinoma-related methylation of 9 miR CpG islands and repression of their expressions in vitro and in vivo. *BMC Cancer* 2012; 12: 249 [PMID: 22703336 DOI: 10.1186/1471-2407-12-249]
- 10 Keck JW, Miernyk KM, Bulkow LR, Kelly JJ, McMahon BJ, Sacco F, Hennessy TW, Bruce MG. Helicobacter pylori infection and markers of gastric cancer risk in Alaska Native persons: a retrospective case-control study. *Can J Gastroenterol Hepatol* 2014; 28: 305-310 [PMID: 24945184]
- 11 Huang ZB, Zhou X, Xu J, Du YP, Zhu W, Wang J, Shu YQ, Liu P. Prognostic value of preoperative serum tumor markers in gastric cancer. *World J Clin Oncol* 2014; 5: 170-176 [PMID: 24829865 DOI: 10.5306/wjco.v5.i2.170]
- 12 Ananiev J, Gulubova M, Manolova I, Tchernev G. Prognostic significance of HER2/neu expression in gastric cancer. *Wien Klin Wochenschr* 2011; 123: 450-454 [PMID: 21739203 DOI: 10.1007/s00508-011-0025-9]
- 13 Soon MS, Hsu LS, Chen CJ, Chu PY, Liou JH, Lin SH, Hsu JD, Yeh KT. Expression of Krüppel-like factor 5 in gastric cancer and its clinical correlation in Taiwan. *Virchows Arch* 2011; 459: 161-166 [PMID: 21732124 DOI: 10.1007/s00428-011-1111-0]
- 14 Cheung KF, Lam CN, Wu K, Ng EK, Chong WW, Cheng AS, To KF, Fan D, Sung JJ, Yu J. Characterization of the gene structure, functional significance, and clinical application of RNF180, a novel gene in gastric cancer. *Cancer* 2012; 118: 947-959 [PMID: 21717426 DOI: 10.1002/cncr.26189]
- 15 Koo BK, Spit M, Jordens I, Low TY, Stange DE, van de Wetering M, van Es JH, Mohammed S, Heck AJ, Maurice MM, Clevers H. Tumour suppressor RNF43 is a stem-cell E3 ligase that induces endocytosis of Wnt receptors. *Nature* 2012; 488: 665-669

■应用要点

本文对胃癌的发生机制有了更深入的了解, 为胃癌的诊断、治疗及预后提供了更多新的方法和途径。相关分子机制还有待进一步深入研究。

■同行评价

本文初步研究了RNF180与RECK在胃癌组织中的表达情况,对探讨胃癌的发病机制有一定参考价值.

- [PMID: 22895187 DOI: 10.1038/nature11308]
16 Song SY, Son HJ, Nam E, Rhee JC, Park C. Expression of reversion-inducing-cysteine-rich protein

with Kazal motifs (RECK) as a prognostic indicator in gastric cancer. *Eur J Cancer* 2006; 42: 101-108 [PMID: 16324834 DOI: 10.1016/j.ejca.2005.09.016]

编辑 郭鹏 电编 闫晋利



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 •

百世登出版集团推出 12 种开放获取生物医学期刊全部被 PubMed 和 PMC 收录

本刊讯 由美国国立医学图书馆(U.S. National Library of Medicine, 简称NLM), 美国国立生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, 简称NCBI)和美国国立卫生研究院(National Institutes of Health, 简称NIH), 共同于2010-2011年, 收录了百世登出版集团有限公司(Baishideng Publishing Group Co., Limited, 简称BPG)出版的12种开放获取生物医学期刊. 12种期刊被NLM, NCBI和NIH共同主办的PubMed Central和PubMed平台, 公开面向全球发布, 读者免费阅读和下载全文. 12种期刊被收录的名称及网址如下:

- 1 World Journal of Biological Chemistry (世界生物化学杂志)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/1495/>
- 2 World Journal of Cardiology (世界心脏病学杂志)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/1320/>
- 3 World Journal of Clinical Oncology (世界临床肿瘤学杂志)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/1494/>
- 4 World Journal of Diabetes (世界糖尿病杂志)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/1498/>
- 5 World Journal of Gastrointestinal Endoscopy (世界胃肠内镜杂志)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/1323/>
- 6 World Journal of Gastrointestinal Oncology (世界胃肠肿瘤学杂志)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/1324/>
- 7 World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology (世界胃肠病理生理学杂志)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/1496/>
- 8 World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics (世界胃肠药理学与治疗杂志)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/1497/>
- 9 World Journal of Gastrointestinal Surgery (世界胃肠外科杂志)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/1325/>
- 10 World Journal of Hepatology (世界肝病杂志)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/1321/>
- 11 World Journal of Radiology (世界放射学杂志)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/1322/>
- 12 World Journal of Stem Cells (世界干细胞杂志)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/1470/>

(总编辑: 马连生2011-05-30)

普萘洛尔降门脉压对肝硬化失代偿期患者肠道屏障功能的影响

姜齐宏, 陈艳, 王爱祥, 骆中华

姜齐宏, 陈艳, 王爱祥, 骆中华, 华中科技大学同济医学院附属普爱医院消化内科 湖北省武汉市 430034

姜齐宏, 副主任医师, 主要从事消化内科及内镜的相关研究。

作者贡献分布: 此课题由姜齐宏设计; 研究过程由姜齐宏与陈艳实施完成; 数据分析由陈艳、王爱祥及骆中华完成; 本论文写作由姜齐宏、陈艳、王爱祥及骆中华共同完成。

通讯作者: 陈艳, 主治医师, 430034, 湖北省武汉市硚口区古田三路50号, 华中科技大学同济医学院附属普爱医院消化内科。

cy0226@163.com

电话: 027-68831686

收稿日期: 2014-05-31 修回日期: 2014-07-05

接受日期: 2014-07-15 在线出版日期: 2014-08-28

Effect of reducing portal pressure on intestinal barrier function in patients with decompensated cirrhosis

Qi-Hong Jiang, Yan Chen, Ai-Xiang Wang, Zhong-Hua Luo

Qi-Hong Jiang, Yan Chen, Ai-Xiang Wang, Zhong-Hua Luo, Department of Gastroenterology, Puai Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430034, Hubei Province, China

Correspondence to: Yan Chen, Attending Physician, Department of Gastroenterology, Puai Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, 50 Gutiansan Road, Qiaokou Area, Wuhan 430034, Hubei Province, China. cy0226@163.com

Received: 2014-05-31 Revised: 2014-07-05

Accepted: 2014-07-15 Published online: 2014-08-28

Abstract

AIM: To explore the effect of reducing portal pressure on intestinal barrier function in patients with decompensated cirrhosis.

METHODS: Eighty-six patients with decompensated viral liver cirrhosis or alcoholic cirrhosis were randomly divided into either an experiment group or a control group. The control group received conventional symptomatic and supportive treatment, and the experiment group was additionally given propranolol hydrochloride tablets. The width of the portal vein, alanine aminotransferase (ALT), aspartic transaminase (AST), total bilirubin (TBIL), serum albumin (ALB), plasma endotoxin level, D-lactic acid con-

tent and plasma diamine oxidase (DAO) were compared between the two groups.

RESULTS: The width of the portal vein in the experiment group posttreatment was significantly lower than that before treatment ($1.37 \text{ cm} \pm 0.09 \text{ cm}$ vs $1.41 \text{ cm} \pm 0.11 \text{ cm}$, $P < 0.05$) and that in the control group ($1.37 \text{ cm} \pm 0.09 \text{ cm}$ vs $1.39 \text{ cm} \pm 0.10 \text{ cm}$, $P < 0.05$). The levels of ALT, AST and TBIL in both groups posttreatment were significantly lower and the levels of ALB were significantly higher than those before treatment ($35.15 \text{ U/L} \pm 11.92 \text{ U/L}$ vs $42.76 \text{ U/L} \pm 18.06 \text{ U/L}$, $29.03 \text{ U/L} \pm 13.88 \text{ U/L}$ vs $35.04 \text{ U/L} \pm 19.84 \text{ U/L}$, $19.57 \text{ } \mu\text{mol/L} \pm 10.59 \text{ } \mu\text{mol/L}$ vs $25.65 \text{ } \mu\text{mol/L} \pm 15.09 \text{ } \mu\text{mol/L}$, $32.69 \text{ g/L} \pm 3.96 \text{ g/L}$ vs $30.16 \text{ g/L} \pm 5.63 \text{ g/L}$, $34.03 \text{ U/L} \pm 11.46 \text{ U/L}$ vs $42.91 \text{ U/L} \pm 17.67 \text{ U/L}$, $28.36 \text{ U/L} \pm 14.37 \text{ U/L}$ vs $36.62 \text{ U/L} \pm 20.54 \text{ U/L}$, $18.94 \text{ } \mu\text{mol/L} \pm 9.56 \text{ } \mu\text{mol/L}$ vs $24.92 \text{ } \mu\text{mol/L} \pm 16.60 \text{ } \mu\text{mol/L}$, $32.28 \text{ g/L} \pm 6.13 \text{ g/L}$ vs $29.94 \text{ g/L} \pm 5.06 \text{ g/L}$, $P < 0.05$), although there were no significant differences in the levels of ALT, AST, TBIL and ALB between the two groups posttreatment ($35.15 \text{ U/L} \pm 11.92 \text{ U/L}$ vs $34.03 \text{ U/L} \pm 11.46 \text{ U/L}$, $29.03 \text{ U/L} \pm 13.88 \text{ U/L}$ vs $28.36 \pm 14.37 \text{ U/L}$, $19.57 \text{ } \mu\text{mol/L} \pm 10.59 \text{ } \mu\text{mol/L}$ vs $18.94 \text{ } \mu\text{mol/L} \pm 9.56 \text{ } \mu\text{mol/L}$, $32.69 \text{ g/L} \pm 3.96 \text{ g/L}$ vs $32.28 \text{ g/L} \pm 6.13 \text{ g/L}$, $P > 0.05$). Plasma endotoxin level, D-lactic acid content and DAO in the two groups posttreatment were significantly lower than those before treatment ($0.53 \text{ EU/mL} \pm 0.12 \text{ EU/mL}$ vs $0.72 \text{ EU/mL} \pm 0.11 \text{ EU/mL}$, $2.71 \text{ Ku/L} \pm 0.84 \text{ Ku/L}$ vs $5.19 \text{ Ku/L} \pm 2.12 \text{ Ku/L}$, $7.85 \text{ mg/L} \pm 0.62 \text{ mg/L}$ vs $12.95 \text{ mg/L} \pm 4.27 \text{ mg/L}$, $0.62 \text{ EU/mL} \pm 0.11 \text{ EU/mL}$ vs $0.75 \text{ EU/mL} \pm 0.14 \text{ EU/mL}$, $3.83 \text{ Ku/L} \pm 1.70 \text{ Ku/L}$ vs $5.34 \text{ Ku/L} \pm 2.08 \text{ Ku/L}$, $9.90 \text{ mg/L} \pm 6.70 \text{ mg/L}$ vs $13.24 \text{ mg/L} \pm 4.42 \text{ mg/L}$, $P < 0.05$). Plasma endotoxin level, D-lactic acid content and DAO in the experiment group were significantly lower than those in the control group ($0.53 \text{ EU/mL} \pm 0.12 \text{ EU/mL}$ vs $0.62 \text{ EU/mL} \pm 0.11 \text{ EU/mL}$, $2.71 \text{ Ku/L} \pm 0.84 \text{ Ku/L}$ vs $3.83 \text{ Ku/L} \pm 1.70 \text{ Ku/L}$, $7.85 \text{ mg/L} \pm 0.62 \text{ mg/L}$ vs $9.90 \text{ mg/L} \pm 6.70 \text{ mg/L}$, $P < 0.05$).

■背景资料

肝硬化是各种慢性肝病发展的晚期阶段, 以肝脏组织弥漫性纤维化、假小叶和形成再生结节为主要病理特征。肝硬化常引起门静脉高压症, 对肠黏膜微循环造成破坏而造成肠黏膜屏障损伤。临床研究表明, 盐酸普萘洛尔属于非选择性 β 受体阻滞剂, 能够通过减慢心率降低心排血量, 促进血管收缩等作用降低门静脉压力。

■同行评议者

金瑞, 教授, 主任医师, 北京佑安医院

■研究前沿

目前对于普萘洛尔降低肝硬化失代偿期门静脉高压后对肠屏障功能的影响并无深入研究。

CONCLUSION: Propranolol can not only improve liver function, reduce the width of the portal vein, decrease the levels of plasma endotoxin, *D*-lactic acid content and DAO, reduce portal hypertension, but also improve intestinal mucosal repair, reduce intestinal permeability, and improve intestinal barrier function.

© 2014 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: Propranolol; Portal hypertension; Cirrhosis of liver; Intestinal barrier

Jiang QH, Chen Y, Wang AX, Luo ZH. Effect of reducing portal pressure on intestinal barrier function in patients with decompensated cirrhosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(24): 3665-3669 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/3665.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i24.3665>

摘要

目的: 探讨普萘洛尔降门脉压对肝硬化失代偿期患者肠道屏障功能的影响。

方法: 按照随机数字表法将华中科技大学同济医学院附属普爱医院收治的86例病毒性或酒精性肝硬化失代偿期(门静脉高压)患者均分为实验组和对照组, 对照组患者给予常规护肝和对症支持治疗, 实验组患者在此基础上加用盐酸普萘洛尔片治疗, 比较两组患者治疗前后门静脉宽度、丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(aspartic transaminase, AST)、总胆红素(total bilirubin, TBIL)、血清白蛋白(serum albumin, ALB)水平、血浆内毒素水平、*D*-乳酸含量及血浆二胺氧化酶(plasma diamine oxidase, DAO)活性变化情况。

结果: 实验组患者治疗后门静脉宽度显著下降, 与治疗前比较($1.37\text{ cm} \pm 0.09\text{ cm}$ vs $1.41\text{ cm} \pm 0.11\text{ cm}$), 差异具有统计学意义($P < 0.05$); 实验组患者治疗后门静脉宽度显著低于对照组($1.37\text{ cm} \pm 0.09\text{ cm}$ vs $1.39\text{ cm} \pm 0.10\text{ cm}$), 差异具有统计学意义($P < 0.05$); 两组患者治疗后ALT、AST和TBIL水平均显著下降, ALB水平均显著升高, 与治疗前比较($35.15\text{ U/L} \pm 11.92\text{ U/L}$ vs $42.76\text{ U/L} \pm 18.06\text{ U/L}$, $29.03\text{ U/L} \pm 13.88\text{ U/L}$ vs $35.04\text{ U/L} \pm 19.84\text{ U/L}$, $19.57\text{ }\mu\text{mol/L} \pm 10.59\text{ }\mu\text{mol/L}$ vs $25.65\text{ }\mu\text{mol/L} \pm 15.09\text{ }\mu\text{mol/L}$, $32.69\text{ g/L} \pm 3.96\text{ g/L}$ vs $30.16\text{ g/L} \pm 5.63\text{ g/L}$, $34.03\text{ U/L} \pm 11.46\text{ U/L}$ vs $42.91\text{ U/L} \pm 17.67\text{ U/L}$, $28.36\text{ U/L} \pm 14.37\text{ U/L}$ vs $36.62\text{ U/L} \pm 20.54\text{ U/L}$, $18.94\text{ }\mu\text{mol/L} \pm 9.56\text{ }\mu\text{mol/L}$ vs

$24.92\text{ }\mu\text{mol/L} \pm 16.60\text{ }\mu\text{mol/L}$, $32.28\text{ g/L} \pm 6.13\text{ g/L}$ vs $29.94\text{ g/L} \pm 5.06\text{ g/L}$), 差异具有统计学意义($P < 0.05$); 两组患者治疗后ALT、AST、TBIL和ALB水平比较($35.15\text{ U/L} \pm 11.92\text{ U/L}$ vs $34.03\text{ U/L} \pm 11.46\text{ U/L}$, $29.03\text{ U/L} \pm 13.88\text{ U/L}$ vs $28.36\text{ U/L} \pm 14.37\text{ U/L}$, $19.57\text{ }\mu\text{mol/L} \pm 10.59\text{ }\mu\text{mol/L}$ vs $18.94\text{ }\mu\text{mol/L} \pm 9.56\text{ }\mu\text{mol/L}$, $32.69\text{ g/L} \pm 3.96\text{ g/L}$ vs $32.28\text{ g/L} \pm 6.13\text{ g/L}$), 差异无统计学意义($P > 0.05$); 两组患者治疗后血浆内毒素水平、DAO活性、*D*-乳酸水平均显著下降, 与治疗前比较($0.53\text{ EU/mL} \pm 0.12\text{ EU/mL}$ vs $0.72\text{ EU/mL} \pm 0.11\text{ EU/mL}$, $2.71\text{ Ku/L} \pm 0.84\text{ Ku/L}$ vs $5.19\text{ Ku/L} \pm 2.12\text{ Ku/L}$, $7.85\text{ mg/L} \pm 0.62\text{ mg/L}$ vs $12.95\text{ mg/L} \pm 4.27\text{ mg/L}$, $0.62\text{ EU/mL} \pm 0.11\text{ EU/mL}$ vs $0.75\text{ EU/mL} \pm 0.14\text{ EU/mL}$, $3.83\text{ Ku/L} \pm 1.70\text{ Ku/L}$ vs $5.34\text{ Ku/L} \pm 2.08\text{ Ku/L}$, $9.90\text{ mg/L} \pm 6.70\text{ mg/L}$ vs $13.24\text{ mg/L} \pm 4.42\text{ mg/L}$), 差异具有统计学意义($P < 0.05$); 实验组患者治疗后血浆内毒素水平、DAO活性、*D*-乳酸水平均显著低于对照组($0.53\text{ EU/mL} \pm 0.12\text{ EU/mL}$ vs $0.62\text{ EU/mL} \pm 0.11\text{ EU/mL}$, $2.71\text{ Ku/L} \pm 0.84\text{ Ku/L}$ vs $3.83\text{ Ku/L} \pm 1.70\text{ Ku/L}$, $7.85\text{ mg/L} \pm 0.62\text{ mg/L}$ vs $9.90\text{ mg/L} \pm 6.70\text{ mg/L}$), 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

结论: 普萘洛尔能够有效改善患者肝功能、减小门静脉宽度、降低血浆内毒素、DAO和*D*-乳酸水平, 表明普萘洛尔在降低门静脉高压的同时也促进了肠黏膜修复, 降低了肠道通透性, 改善了患者肠屏障功能, 疗效显著。

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词: 普萘洛尔; 门静脉高压; 肝硬化; 肠道屏障

核心提示: 本研究在常规护肝和对症支持治疗的基础上加用盐酸普萘洛尔片治疗, 首日10 mg, 逐日加10 mg, 至静息心率降至基础心率75%左右或心率不低于50次/min, 此时视患者达到有效降低门静脉压力的治疗标准(降低肝静脉压力梯度至 $<12\text{ mmHg}$ 或较基线水平下降 $>20\%$)。

姜齐宏, 陈艳, 王爱祥, 骆中华. 普萘洛尔降门脉压对肝硬化失代偿期患者肠道屏障功能的影响. *世界华人消化杂志* 2014; 22(24): 3665-3669 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/3665.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i24.3665>

0 引言

肝硬化是各种慢性肝病发展的晚期阶段, 以肝脏组织弥漫性纤维化、假小叶和形成再生结节

为主要病理特征^[1]。肝硬化常引起门静脉高压症,对肠黏膜微循环造成破坏而造成肠黏膜屏障损伤。临床研究表明,盐酸普萘洛尔属于非选择性 β 受体阻滞剂,能够通过减慢心率降低心排血量,促进血管收缩等作用降低门静脉压力^[2]。现回顾性分析华中科技大学同济医学院附属普爱医院应用普萘洛尔降门脉压对肝硬化失代偿期患者肠道屏障功能影响效果,报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料 选取2013-03/2014-03华中科技大学同济医学院附属普爱医院收治的86例病毒性和酒精性肝硬化失代偿期(门静脉高压)患者作为研究对象。所有患者均符合《病毒性肝炎防治方案》^[3]和《酒精性肝病诊疗指南》^[4]中肝硬化相关诊断标准,且经常规影像学及内镜检查证实。排除合并原发性肝癌或继发严重感染者;有消化系急慢性炎症、溃疡、活动性出血等对肠道屏障功能产生影响者;肝功能为Child-Pugh C级或肝功能衰竭者;合并全身其他系统严重疾病者;入选前2 wk内使用抗生素或肠道微生态制剂治疗者;对本研究所用药物过敏者。按照随机数字表法将86例患者均分为实验组和对照组,所有患者均签署知情同意书。盐酸普萘洛尔片(天津力生制药股份有限公司,国药准字H12020151,10 mg/片);飞利浦IU-22彩色多普勒超声诊断仪(荷兰);贝克曼库尔特AU5800全自动生化仪(美国);所有试剂盒均购自上海杰美基因医药科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 治疗: 对照组患者给予常规护肝和对症支持治疗,连续治疗2 wk;实验组患者在此基础上加用盐酸普萘洛尔片治疗,首日10 mg,逐日加10 mg,至静息心率降至基础心率75%左右或心率不低于50次/min(降低肝静脉压力梯度至<12 mmHg或较基线水平下降>20%)^[5],连续治疗2 wk。

1.2.2 实验室检测: 两组患者均于治疗前及疗程结束后测量门静脉宽度并抽血检测肝功能、血浆内毒素水平、D-乳酸含量及血浆二胺氧化酶(plasma diamine oxidase, DAO)活性。门静脉宽度测量采用彩色多普勒超声诊断仪,测量时指导患者屏气,超声束与患者血管长轴角度<60度^[6];肝功能采用全自动生化仪对丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(aspartic transaminase, AST)、总胆红素

(total bilirubin, TBIL)和血清白蛋白(serum albumin, ALB)水平进行测定;血浆内毒素水平采用改良偶氮基质显色法测定;D-乳酸水平采用改良酶学分光光度法检测;DAO活性采用邻联茴香胺试剂法测定,所有操作均按照试剂盒说明书进行。

1.2.3 观察指标: 比较两组患者治疗前后门静脉宽度、肝功能各项指标、血浆内毒素水平、D-乳酸含量及DAO活性变化情况。

统计学处理 使用SPSS17.0统计分析,用 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示计量资料,采用 t 检验,用百分比表示计数资料,采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患者临床资料比较 两组患者在性别、年龄、Child-Pugh分级及肝硬化类型等上差异无统计学意义($P > 0.05$)(表1),具有可比性。

2.2 两组患者治疗前后门静脉宽度变化情况比较 实验组患者治疗后门静脉宽度为 $1.41 \text{ cm} \pm 0.11 \text{ cm}$,与治疗前 $1.37 \text{ cm} \pm 0.09 \text{ cm}$ 比较显著下降,差异具有统计学意义($P < 0.05$);对照组患者治疗后门静脉宽度为 $1.39 \text{ cm} \pm 0.10 \text{ cm}$,与治疗前 $1.40 \text{ cm} \pm 0.12 \text{ cm}$ 比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);实验组患者治疗后门静脉宽度显著低于对照组,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

2.3 两组患者治疗前后肝功能各项指标水平变化情况比较 两组患者治疗后ALT、AST和TBIL水平均显著下降,ALB水平均显著升高,与治疗前比较,差异具有统计学意义($P < 0.05$);两组患者治疗后ALT、AST、TBIL和ALB水平比较差异无统计学意义($P > 0.05$)(表2)。

2.4 两组患者治疗前后血浆内毒素水平、DAO活性、D-乳酸水平变化情况比较 两组患者治疗后血浆内毒素水平、DAO活性、D-乳酸水平均显著下降,与治疗前比较,差异具有统计学意义($P < 0.05$);实验组患者治疗后血浆内毒素水平、DAO活性、D-乳酸水平均显著低于对照组,差异具有统计学意义($P < 0.05$)(表3)。

3 讨论

肝硬化属于常见慢性肝病,临床发病率较高。临床研究表明,肝硬化失代偿期因集体出现一系列病理生理改变,可对肠道屏障功能产生较大损害^[7]。其中肝硬化引起的门静脉高压是造成的肠道微循环改变从而对肠黏膜屏障产生损伤是

■ 相关报道

临床研究表明,肝硬化失代偿期因集体出现一系列病理生理改变,可对肠道屏障功能产生较大损害。

■应用要点

针对门静脉高压在肠屏障功能损害中的重要影响,有效降低门静脉压力对打破上述恶性循环、缓解肠道淤血等微循环障碍、促进肠黏膜修复、恢复胃肠蠕动功能、降低肠道通透性均有积极意义,能够帮助患者肠黏膜屏障功能恢复。

表 1 两组患者临床资料比较 [$n = 43, n(\%)$]

分组	性别		平均年龄(岁)	Child-Pugh分级		肝硬化类型	
	男	女		A级	B级	酒精性肝硬化	乙型肝炎后肝硬化
实验组	33(76.74)	10(23.26)	47.82 ± 10.13	8(18.60)	35(81.40)	12(27.91)	31(72.09)
对照组	31(72.09)	12(27.91)	47.57 ± 10.76	10(23.26)	33(76.74)	11(25.58)	32(74.42)

表 2 两组患者治疗前后肝功能各项指标水平变化情况比较 (mean ± SD)

分组	时间	ALT(U/L)	AST(U/L)	TBIL(μ mol/L)	ALB(g/L)
实验组	治疗前	42.76 ± 18.06	35.04 ± 19.84	25.65 ± 15.09	30.16 ± 5.63
	治疗后	35.15 ± 11.92 ^a	29.03 ± 13.88 ^a	19.57 ± 10.59 ^a	32.69 ± 3.96 ^a
对照组	治疗前	42.91 ± 17.67	36.62 ± 20.54	24.92 ± 16.60	29.94 ± 5.06
	治疗后	34.03 ± 11.46 ^a	28.36 ± 14.37 ^a	18.94 ± 9.56 ^a	32.28 ± 6.13 ^a

^a $P < 0.05$ vs 同组治疗前。ALT: 丙氨酸氨基转移酶; AST: 天冬氨酸氨基转移酶; TBIL: 总胆红素; ALB: 血清白蛋白。

表 3 两组患者治疗前后血浆内毒素水平、DAO活性、D-乳酸水平变化情况比较 (mean ± SD)

分组	时间	血浆内毒素(EU/mL)	DAO(Ku/L)	D-乳酸(mg/L)
实验组	治疗前	0.72 ± 0.11	5.19 ± 2.12	12.95 ± 4.27
	治疗后	0.53 ± 0.12 ^{ac}	2.71 ± 0.84 ^{ac}	7.85 ± 0.62 ^{ac}
对照组	治疗前	0.75 ± 0.14	5.34 ± 2.08	13.24 ± 4.42
	治疗后	0.62 ± 0.11 ^a	3.83 ± 1.70 ^a	9.90 ± 6.70 ^a

^a $P < 0.05$ vs 同组治疗前; ^c $P < 0.05$ vs 对照组。DAO: 二胺氧化酶。

最主要因素^[8]。其主要机制为肝硬化失代偿期出现的门静脉高压、肝功能障碍、内毒素和神经体液紊乱等共同对肠道屏障功能产生影响,进而导致细菌、内毒素移位,引发细菌感染和内毒素血症,进一步加重门静脉高压和肝功能障碍,形成恶性循环,促进肝硬化患者病情进展,也增加了患者各种严重并发症的发生风险,死亡率大增^[9]。因此,针对门静脉高压在肠屏障功能损害中的重要影响,有效降低门静脉压力对打破上述恶性循环、缓解肠道淤血等微循环障碍、促进肠黏膜修复、恢复胃肠蠕动功能、降低肠道通透性均有积极意义,能够帮助患者肠黏膜屏障功能恢复^[10]。

普萘洛尔在临床上主要应用于预防和降低肝硬化门静脉高压,临床效果确切^[11]。大量动物实验也证实普萘洛尔在预防肝硬化门静脉高压、降低门静脉压力、降低大鼠远期死亡率上具有显著效果^[12]。但目前对于普萘洛尔降低肝硬化失代偿期门静脉高压后对肠屏障功能的影响并无深入研究。本研究中在常规护肝和对症支

持治疗的基础上加用盐酸普萘洛尔片治疗,首日10 mg,逐日加10 mg,至静息心率降至基础心率75%左右或心率不低于50次/min,此时视患者达到有效降低门静脉压力的治疗标准(降低肝静脉压力梯度至<12 mmHg或较基线水平下降>20%)。门静脉宽度超声测量也是评估门静脉压力下降的有效指标,能够与心率共同对普萘洛尔的降压效果进行准确评估^[13]。本研究结果显示,实验组患者治疗后门静脉宽度显著下降,提示普萘洛尔在降低门静脉血压上疗效确切。另外,本研究中患者经普萘洛尔治疗后肝功能各项指标均显著改善,提示普萘洛尔对缓解肝硬化病情进展具有显著效果。内毒素水平、DAO活性、D-乳酸含量均为评价肠屏障功能的间接监测指标,其中内毒素水平,可反映肠道黏膜通透性改变^[14]; DAO活性可反映肠道黏膜损伤及修复情况; D-乳酸可反映肠黏膜损伤程度及肠通透性改变^[15]。本研究中患者治疗前内毒素水平、DAO活性、D-乳酸含量均高于正常水平,提示肝硬化门静脉高压患者普遍存在肠道黏膜

通透性增加、内毒素血症以及肠屏障受损, 与相关文献报道相符^[16]。本研究中实验组患者治疗后血浆内毒素水平、DAO活性、乳酸水平均显著下降, 提示普萘洛尔可促使肠黏膜组织修复、肠黏膜通透性下降和减少肠黏膜细胞损伤和坏死, 对改善患者肠屏障功能有显著临床效果。

总之, 普萘洛尔能够有效改善患者肝功能、减小门静脉宽度、降低血浆内毒素、DAO和D-乳酸水平, 表明普萘洛尔在降低门静脉高压的同时也促进了肠黏膜修复, 降低了肠道通透性, 改善了患者肠屏障功能, 疗效显著。

4 参考文献

- 熊智强, 刘丽. 肝硬化对肠道屏障功能损害的研究. 现代生物医学进展 2013; 13: 2979-2982
- 马骁, 刘冰熔. 门静脉高压药物治疗的新进展. 世界华人消化杂志 2008; 16: 3775-3781
- 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. 中华肝脏病杂志 2000; 8: 324-329
- 厉有名, 范建高, 王炳元, 陆伦根, 施军平, 牛俊奇, 沈薇, 徐有青. 酒精性肝病诊疗指南(2010年1月修订). 现代医药卫生 2011; 27: 801-804
- Qi X, Yang M, Fan D, Han G. Transjugular intrahepatic portosystemic shunt in the treatment of Budd-Chiari syndrome: a critical review of literatures. *Scand J Gastroenterol* 2013; 48: 771-784 [PMID: 23506234 DOI: 10.3109/00365521.2013.777775]
- 章杰, 张丽旻. 门静脉宽度测量评价普萘洛尔对门脉高压疗效的价值. 中国当代医药 2012; 19: 27-28
- Lebrec D, Bosch J, Jalan R, Dudley FJ, Jessic R, Moreau R, Garcia-Pagan JC, Mookerjee RP, Chiossi E, Van Giersbergen PL, Kusic-Pajic A, Dingemanse J. Hemodynamics and pharmacokinetics of tezosentan, a dual endothelin receptor antagonist, in patients with cirrhosis. *Eur J Clin Pharmacol* 2012; 68: 533-541 [PMID: 22101624 DOI: 10.1007/s00228-011-1157-6.]
- 戴鑫, 吕宗舜. 肠道屏障功能在非酒精性脂肪性肝病发病机制中的作用. 世界华人消化杂志 2012; 20: 656-661
- 张晓慧. 肝硬化失代偿期患者肠道微生态状况分析及护理. 齐鲁护理杂志 2011; 17: 88-89
- Ding SH, Liu J, Wang JP. Efficacy of beta-adrenergic blocker plus 5-isosorbide mononitrate and endoscopic band ligation for prophylaxis of esophageal variceal rebleeding: a meta-analysis. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 2151-2155 [PMID: 19418589]
- 张玲燕, 邵建国. 肝硬化门脉高压药物治疗的研究进展. 南通大学学报(医学版) 2012; 32: 292-295
- 杨保元, 霍丽娟, 林艾花, 黄会芳, 张清, 吴晓宁. 缬沙坦、普萘洛尔对大鼠门静脉高压性胃病胃窦黏膜下微循环及其超微结构的影响. 山西医科大学学报 2011; 42: 957-961
- Romeo J, Nova E, Wärnberg J, Gómez-Martínez S, Díaz Ligia LE, Marcos A. Immunomodulatory effect of fibres, probiotics and synbiotics in different life-stages. *Nutr Hosp* 2010; 25: 341-349 [PMID: 20593114]
- 黄普. 醋酸奥曲肽联合盐酸普萘洛尔治疗肝硬化门静脉高压致上消化道出血临床观察. 中华实用诊断与治疗杂志 2013; 27: 387-388
- Lee KC, Yang YY, Wang YW, Lee FY, Loong CC, Hou MC, Lin HC, Lee SD. Increased plasma malondialdehyde in patients with viral cirrhosis and its relationships to plasma nitric oxide, endotoxin, and portal pressure. *Dig Dis Sci* 2010; 55: 2077-2085 [PMID: 19826951 DOI: 10.1007/s10620-009-0990-2]
- Santora R, Kozar RA. Molecular mechanisms of pharmaconutrients. *J Surg Res* 2010; 161: 288-294 [PMID: 20080249 DOI: 10.1016/j.jss.2009.06.024]

■同行评价

本研究选题尚可, 内容有一定的实用性。

编辑 郭鹏 电编 闫晋利



甲胎蛋白、Dickkopf1糖蛋白和 α -L-岩藻糖苷酶在肝癌早期诊断中的应用

童华波, 庭永君, 段 航, 罗利梅

■背景资料

原发性肝癌在老年男性中高发, 其致病因素较为复杂, 病毒性肝炎、黄曲霉素等化学致癌物质均与原发性肝癌的发病相关, 在临床原发性肝癌以进展快、侵袭性强、恶性程度高而著称, 因临床诊疗技术的局限性, 患者一经诊断多处于中晚期, 预后极差, 即使获得根治性切除, 5年内的复发率仍高达60%-70%, 早期诊断于肝癌治疗疗效提高及患者生存时间的延长意义均有重要的临床意义, 肿瘤标志物在临床广泛应用也让肝癌早期诊断成为可能。

■同行评议者

宣世英, 教授, 青岛市市立医院肝病内科

童华波, 庭永君, 罗利梅, 遵义市第一人民医院检验科 贵州省遵义市 563002

段航, 遵义医学院附属医院检验科 贵州省遵义市 563003

童华波, 副主任技师, 主要从事血液病实验诊断的研究。

作者贡献分布: 本研究设计由童华波完成; 庭永君、段航及罗利梅共同参与; 论文撰写由童华波完成。

通讯作者: 童华波, 副主任技师, 563002, 贵州省遵义市汇川区凤凰路98号, 遵义市第一人民医院检验科. thbo650205@126.com

收稿日期: 2014-06-02 修回日期: 2014-07-10

接受日期: 2014-07-24 在线出版日期: 2014-08-28

Value of alpha fetoprotein, Dickkopf1 glycoprotein and α -L-fucosidase in early diagnosis of liver cancer

Hua-Bo Tong, Yong-Jun Ting, Keng Duan, Li-Mei Luo

Hua-Bo Tong, Yong-Jun Ting, Li-Mei Luo, Department of Clinical Laboratory, the First People's Hospital of Zunyi, Zunyi 563002, Guizhou Province, China

Keng Duan, Department of Clinical Laboratory, the Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi 563003, Guizhou Province, China

Correspondence to: Hua-Bo Tong, Associate Chief Physician, Department of Clinical Laboratory, the First People's Hospital of Zunyi, 98 Fenghuang Road, Huichuan District, Zunyi 563002, Guizhou Province, China. thbo650205@126.com

Received: 2014-06-02 Revised: 2014-07-10

Accepted: 2014-07-24 Published online: 2014-08-28

Abstract

AIM: To investigate the value of alpha fetoprotein (AFP), Dickkopf1 (DKK1) glycoprotein and α -L-fucosidase (AFU) in the early diagnosis of hepatocellular carcinoma (HCC).

METHODS: One hundred and three patients with primary HCC, 60 patients with liver cirrhosis, 127 patients with chronic hepatitis B, and 236 healthy people were included in the study. AFP, DKK1 and AFU were detected and compared among the four groups. The value of these markers in the diagnosis of primary HCC was evaluated.

RESULTS: Serum levels and abnormal rates of AFP, DKK1 and AFU were significantly higher

in the HCC group than in the other groups ($P < 0.05$), and in the liver cirrhosis group than in the chronic hepatitis B group and control group ($P < 0.05$). Combined detection of AFP, DKK1 and AFU in the diagnosis of HCC had a sensitivity of 89.3%, a Youden index of 0.789, and a negative predictive value of 97.2%. The diagnostic accuracy of combined detection was significantly improved compared to the detection of any single index.

CONCLUSION: Combined detection of AFP, AFU and DKK1 has a high sensitivity in the diagnosis of primary HCC and can reduce the rate of missed diagnosis.

© 2014 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: Primary liver cancer; Alpha fetoprotein; Dickkopf1 glycoprotein; α -L-fucosidase

Tong HB, Ting YJ, Duan K, Luo LM. Value of alpha fetoprotein, Dickkopf1 glycoprotein and α -L-fucosidase in early diagnosis of liver cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(24): 3670-3674 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/3670.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i24.3670>

摘要

目的: 探讨甲胎蛋白(alpha fetoprotein, AFP)、DKK1(Dickkopf1)糖蛋白及 α -L-岩藻糖苷酶(α -L-fucosidase, AFU)在肝癌早期诊断的临床应用价值。

方法: 103例原发性肝癌(primary carcinoma of the liver, PCL)设为肝癌组, 60例肝硬化设为肝硬化组, 127例慢性乙型肝炎设为肝炎组, 236例健康体检人员设为对照组。比较4组研究对象AFP、DKK1及AFU检测情况, 并对3种标志物在PCL早期诊断的临床应用价值进行方法学评价。

结果: 肝癌组患者血清AFP、DKK1、AFU

水平及异常率均高于其他各组, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 肝硬化组患者血清AFP、DKK1及AFU水平及异常率均高于肝炎组及对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$), AFP、DKK1及AFU 3种肿瘤标志物联合检测其方法学评价灵敏度为89.3%, Youden指数为0.789, 阴性预测值为97.2%, 相对于单独检测均有大幅提高。

结论: AFP、AFU及DKK1 3种肿瘤标志物联合检测方法学灵敏度有较大的提升, 减少了漏诊率, 在PCL的防治有较高的临床应用价值, 值得推广应用。

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词: 原发性肝癌; 甲胎蛋白; Dickkopf1糖蛋白; α -L-岩藻糖苷酶

核心提示: 甲胎蛋白(alpha fetoprotein, AFP)、DKK1(Dickkopf1)糖蛋白及 α -L-岩藻糖苷酶(α -L-fucosidase, AFU)血清水平及异常率在肝癌组均出现大幅升高, 与其他各组比较差异均有统计学意义, 数据说明: 3种肿瘤标志物对原发性肝癌具有提示作用。

童华波, 庭永君, 段航, 罗利梅. 甲胎蛋白、Dickkopf1糖蛋白和 α -L-岩藻糖苷酶在肝癌早期诊断中的应用. 世界华人消化杂志 2014; 22(24): 3670-3674 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/3670.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v22.i24.3670>

0 引言

原发性肝癌(primary carcinoma of the liver, PCL)为临床常见恶性肿瘤. 世界卫生组织(World Health Organization, WHO)资料显示^[1]: 肝癌在世界范围内每年的新发病例将近75万例, 死亡人数约为70万例. 其中, 在我国肝癌每年新发病例及死亡病例均占全世界的半数以上. 肝癌在消化系恶性肿瘤中的死亡率居第3位, 仅次于胃癌及食道癌. 多数肝癌病例诊断时均处于中晚期而贻误治疗时机, 预后极差. 肿瘤标志物于20世纪90年代应用于临床, 甲胎蛋白(alpha fetoprotein, AFP)为PCL早期诊断较为经典的肿瘤标志物, 但临床报道仍有将近30%肝癌漏诊^[2]. 本研究着重于多项肿瘤标志物: AFP、DKK1(Dickkopf1)糖蛋白及 α -L-岩藻糖苷酶(α -L-fucosidase, AFU)对PCL的变化情况, 旨在探讨3种肿瘤标志物联合检测相对PCL早期诊断的临床应用价值。

1 材料和方法

1.1 材料 选择2012-04/2014-01于遵义市第一人民医院和遵义医学院附属医院住院的患者, 其中103例临床确诊的PCL患者设为肝癌组, 男72例, 女31例, 年龄62-79岁, 平均年龄68.4岁 \pm 4.2岁, I期34例、II期49例、III期20例. 60例确诊肝硬化患者设为肝硬化组, 男41例, 女19例, 年龄61-77岁, 平均年龄66.9岁 \pm 4.7岁. 127例慢性乙型肝炎设为肝炎组, 男86例, 女41例, 年龄62-79岁, 平均年龄68.0岁 \pm 4.7岁. 236例健康体检人员设为对照组, 年龄60-75岁, 平均年龄68.2岁 \pm 4.2岁. 所有研究对象均遵循自愿原则, 签署知情同意书. 4组研究对象年龄、性别构成无统计学差异($P > 0.05$), 具有可比性. 诊断及纳入标准: PCL、肝硬化均有CT、MR影像学及病理学诊断支持, 慢性乙型肝炎均有实验室检查支持, 所有研究对象均排除继发性肝癌及其他系统肿瘤患者, 对照组要求无严重内科疾患, 肝、肾、心功能正常, 排除各型肝炎病毒感染患者。

1.2 方法

1.2.1 实验设计: 比较4组研究对象AFP、AFU及DKK1血清水平及异常率, 运用方法学评价3种肿瘤标志物单独及联合对PCL的灵敏度、特异度、Youden指数、诊断符合率、阴(阳)性预测值。

1.2.2 实验室操作: 所有受试者空腹12 h以上取血5 mL送检, 3000 r/min离心10 min分离血清, AFP检测采用化学发光法, 仪器为Beckman Coulter公司DXI800 Access免疫分析系统, 使用厂家配套试剂; AFU采用连续监测法, 仪器为Beckman Coulter公司DXC800临床化学系统, 试剂采用浙江伊利康生物技术有限公司生产产品; DKK1采用酶联免疫吸附法(ELISA)检测, 试剂采用美国R&D公司生产产品, 均严格按试剂说明书进行操作及设置, 正常范围: AFP 0-20 μ g/mL; AFU 0-30 U/L; DKK1 0-2.2 ng/mL。

统计学处理 使用统计学软件SPSS19.0进行数据分析, 阳性率、构成比比较采用 χ^2 检验分析比较, 多组间均值比较采用方差分析, 组间两两比较采用SNK法, 对AFP、AFU及DKK1单独及联合对PCL的早期诊断进行方法学评价, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 4组研究对象AFP、AFU及DKK1血清水平比较 4组研究对象AFP、AFU及DKK1经方差

■ 研发前沿

肿瘤标志物于20世纪90年代应用于临床, 甲胎蛋白(alpha fetoprotein, AFP)为原发性肝癌早期诊断较为经典的肿瘤标志物, 但临床报道仍有将近30%肝癌漏诊。

■相关报道

Tung等认为, DKK1升高程度与肿瘤血管浸润及肿瘤恶性程度相关, 高水平DKK1肿瘤患者预后较差。

表 1 4组AFP、AFU及DKK1血清水平比较 (mean ± SD)

分组	n	AFP(μg/mL)	AFU(U/L)	DDK1(ng/mL)
对照组	236	4.8 ± 2.6	13.6 ± 5.2	0.9 ± 0.2
肝炎组	127	5.2 ± 2.5	14.9 ± 6.4	1.0 ± 0.3
肝硬化组	60	14.2 ± 6.3 ^{ac}	21.8 ± 6.2 ^{ac}	1.5 ± 0.6 ^{ac}
肝癌组	103	159.4 ± 45.3 ^{ace}	113.7 ± 38.7 ^{ace}	5.3 ± 1.7 ^{ace}
F值		1582.95	843.77	794.69
P值		0.000	0.000	0.000

^aP<0.05 vs 对照组; ^cP<0.05 vs 肝炎组; ^eP<0.05 vs 肝硬化组. AFP: 甲胎蛋白; DKK1: Dickkopf1糖蛋白; AFU: α-L-岩藻糖苷酶。

表 2 4组AFP、AFU及DKK1异常率比较 n(%)

分组	n	AFP	AFU	DDK1
对照组	236	12(5.1)	8(3.4)	10(4.2)
肝炎组	127	8(6.3)	6(4.7)	6(4.7)
肝硬化组	60	10(16.6) ^{ac}	9(15.0) ^{ac}	11(18.3) ^{ac}
肝癌组	103	78(75.7) ^{ace}	68(66.0) ^{ace}	74(71.8) ^{ace}
χ ² 值		243.15	217.1	235.2
P值		0.000	0.000	0.000

^aP<0.05 vs 对照组; ^cP<0.05 vs 肝炎组; ^eP<0.05 vs 肝硬化组. AFP: 甲胎蛋白; DKK1: Dickkopf1糖蛋白; AFU: α-L-岩藻糖苷酶。

分析均有统计学意义(P<0.05), SNK法两两比较, AFP、AFU及DKK1对照组、肝炎组均无统计学差异(P>0.05), 肝硬化组、肝癌组血清水平依次升高与其他各组比较差异均有统计学意义(P<0.05)(表1)。

2.2 4组研究对象AFP、AFU及DKK1异常率比较 4组研究对象AFP、AFU及DKK1经卡方检验分析均有统计学意义(P<0.05), 两两比较, AFP、AFU及DKK1对照组、肝炎组均无统计学差异(P>0.05), 肝硬化组、肝癌组异常率依次升高与其他各组比较差异均有统计学意义(P<0.05)(表2)。

2.3 3种肿瘤标志物对PCL诊断方法学评估 3种肿瘤标志物单独检测方法学评价结果如表3, 联合检测以各种肿瘤标志物任意阳性为联合检测阳性, 全阴性为联合检测阴性, 肝癌组103例, 研究对象3种肿瘤标志物阳性例数为92例(真阳性), 阴性11例(假阴性), 对照组、肝炎组及肝硬化组阳性例数为44例(假阳性), 阴性379例(真阴性), 3种肿瘤标志物联合检测其方法学评价灵敏度为89.3%, Youden指数为0.789, 阴性预测值为97.2%, 相对于单独检测均有大幅提高, 相对任

意2种肿瘤标志物联合检测也均有提高。

3 讨论

PCL在中老年男性中高发, 其致病因素较为复杂, 病毒性肝炎、黄曲霉素等化学致癌物质均与PCL的发病相关^[3,4]。临床PCL以进展快、侵袭性强、恶性程度高而著称, 因临床诊疗技术的局限性, 患者一经诊断多处于中晚期, 预后极差, 即使获得根治性切除, 5年内的复发率仍高达60%-70%^[5]。早期诊断于肝癌治疗疗效提高及患者生存时间的延长意义均有重要的临床意义。肿瘤标志物在临床广泛应用也让肝癌早期诊断成为可能。

肿瘤标志物为一类其存在及量变可提示肿瘤的发生及性质的物质, 对肿瘤的诊断、分类、治疗及预后评估均有重要的临床价值^[6]。本组研究资料显示: AFP、AFU及DKK1血清水平及异常率在肝癌组均出现大幅升高, 与其他各组比较差异均有统计学意义, 数据说明: 3种肿瘤标志物对PCL具有提示作用。AFP属于α球蛋白, 产生于胎儿肝脏及卵黄囊, 电泳处于白蛋白及球蛋白之间, 正常成人含量甚微, 在PCL中未

表 3 3种肿瘤标志物对原发性肝癌诊断方法学评估

项目	灵敏度(%)	特异度(%)	Youden指数	符合率(%)	阴性预测值(%)	阳性预测值(%)
AFP	75.7	92.9	0.686	89.5	94.0	72.2
AFU	66.0	94.6	0.606	89.0	91.9	74.7
DKK1	71.8	93.6	0.654	89.4	93.2	73.2
AFP+AFU	81.5	89.8	0.711	88.2	95.2	66.1
AFP+DKK1	84.5	90.5	0.750	89.4	95.3	68.5
AFU+DKK1	82.5	90.1	0.726	88.6	93.5	66.9
三项联检	89.3	89.6	0.789	89.5	97.2	67.6

AFP: 甲胎蛋白; DKK1: Dickkopf1糖蛋白; AFU: α -L-岩藻糖苷酶。

分化的癌细胞可分泌大量AFP, 血清浓度可成万倍上升, AFP为PCL的首选肿瘤标志物^[7]。也有研究资料报道, 在小肝癌(单个<2 cm)中AFP的阳性率较低, 仅为35.7%^[8], 漏诊现象较为常见。AFU为溶酶体酸性水解酶, 在细胞新陈代谢过程中参与岩藻糖基中糖蛋白等物质的分解, 可被正常肝组织星形细胞清除^[9]。肝组织癌变时, AFU分泌增多, 清除受阻, 造成血清水平升高。DKK1为分泌型蛋白在Wnt信号通路(介导细胞增殖、分化、凋亡等)起重要作用^[10,11]。本研究发现在PCL中DKK1呈现过度表达。Tung等^[12]认为, DKK1升高程度与肿瘤血管浸润及肿瘤恶性程度相关。高水平DKK1肿瘤患者预后较差, 3种肿瘤标志物在肝硬化组的血清水平及异常率也高于肝炎组及对照组, 值得引起临床的重视。肝硬化易进展为肝癌, 部分肝硬化患者肿瘤标志物也出现较大幅度的升高, 肿瘤标志物升高的肝硬化患者是否更容易进展为肝癌仍需进一步研究。

肿瘤标志物的组织特异性也高于其器官特异性^[13]。不同性质肿瘤, 肿瘤标志物具有不同的表现^[14]。在PCL 3种肿瘤标志物具有不同的灵敏度及特异度。本组资料显示, AFP灵敏度(75.7%)最高, 特异度以AFU(94.6%)较好, 3种肿瘤标志物均存在不同程度的漏诊现象, 联合检测能较好的减少漏诊。有研究报道: DKK1在AFP阴性肝癌的阳性率为70.4%, 在早期肝癌及小肝癌有较好的灵敏度, 与AFP有良好的互补性^[15]。本研究数据支持上述观点, 在AFP及DKK1两项肿瘤标志物联合检测, 灵敏度为84.5%, 高于其他肿瘤标志物的组合形式。本研究中3例小肝癌AFP均为阴性, DKK1则为阳性, DKK1较好的弥补AFP对小肝癌的漏诊现象。3种肿瘤标志物联检灵敏度(89.3%)则有较大幅度的提升, Youden指数综合考虑诊断

方法的灵敏度、特异度为评价诊断方法优劣性的良好指标, 3种肿瘤标志物Youden指数为0.789, 均高于3种肿瘤标志物单独检测值。

总之, PCL的早期诊断与肝癌治疗方案选择、临床预后评估均有重要的临床意义。AFP、AFU及DKK1 3种肿瘤标志物联检对方法学灵敏度有较大的提升, 减少了漏诊率, 在PCL的防治有较高的临床应用价值, 值得推广应用。

4 参考文献

- 1 骆敏, 谢裕安. 肝癌早期诊断研究新进展. 内科 2012; 7: 299-300
- 2 宋捷. 肝癌相关肿瘤标志物研究新进展. 国际病理科学与临床杂志 2011; 31: 54-58
- 3 艾祖然木·苏皮, 古丽斯坦·艾买提, 玉素甫. AFU与AFP联合检测在肝脏疾病中的应用价值. 吉林医学 2014; 35: 1430-1431
- 4 汪文, 黄卫. 肝癌表观遗传学研究的进展. 国际消化病杂志 2013; 33: 75-77
- 5 陈建军, 陈建国, 高晓阳, 吴白平. 应用ROC曲线评价AFP、AFU、5'-NT在原发性肝癌诊断中的意义. 实用预防医学 2012; 19: 1402-1404
- 6 宁珠, 殷芳, 刘海, 尤丽英, 杨晋辉, 郑盛. 血清AFP、CEA、AFU、GGT-II联合检测诊断原发性肝癌的临床价值. 中国医药导报 2013; 10: 73-75
- 7 董飞波, 高国生, 徐晓珍, 祝成亮, 颜卫华. 血清GP73和AFP等十项肿瘤标志物联合诊断HBsAg阳性肝癌的研究. 浙江医学 2014; 36: 166-169
- 8 Gomceli I, Bostanci EB, Ozer I, Kemik AS, Turhan N, Tez M, Kilic S, Demiriz B, Akoglu M. A novel screening biomarker in gastric cancer: serum Dickkopf-1. *Hepatogastroenterology* 2012; 59: 1661-1664 [PMID: 22155860]
- 9 沈秋瑾, 覃文新. DKK1可作为肝癌早查早诊的血清蛋白标志物. 药品评价 2012; 9: 4-5
- 10 余艳军, 万晓帆, 于彬, 游海燕, 舒惠群, 姚根富, 覃文新. Dickkopf(DKK1)在肝癌组织及多种人肿瘤细胞系中的表达分析. 肿瘤 2006; 26: 1109-1111
- 11 庞一琳, 张斌, 陈虎. 间充质干细胞与肿瘤细胞相互作用: 促进还是抑制. 中华细胞与干细胞杂志 2013; 3: 31-34
- 12 Tung EK, Mak CK, Fatima S, Lo RC, Zhao H, Zhang C, Dai H, Poon RT, Yuen MF, Lai CL, Li JJ, Luk JM, Ng IO. Clinicopathological and prognostic significance of serum and tissue Dickkopf-1 levels

■应用要点

肿瘤标志物为一类其存在及量变可提示肿瘤的发生及性质的物质, 对肿瘤的诊断、分类、治疗及预后评估均有重要的临床价值。

■同行评价

本研究设计实用,
结果有一定的参
考价值.

- 13 in human hepatocellular carcinoma. *Liver Int* 2011; 31: 1494-1504 [PMID: 21955977 DOI: 10.1111/j.1478-3231.2011.02597.x]
- 14 黄炎, 于彬, 覃文新. Dickkopf1在肝癌组织中的表达. *药品评价* 2009; 35: 541-543
- 15 柳家荣. Dickkopf-1基因与肿瘤. *国际肿瘤学杂志* 2010; 37: 86-89
- 13 梁卫明, 陈义雄, 戴维, 蔡良真. 肝癌患者手术前后、介入治疗前后血清糖蛋白Dickkopf-1水平的变化. *中*

编辑 田滢 电编 都珍珍



使用GEO数据集分析PFKFB3在肝细胞癌中的表达及临床意义

丁千山, 孙荣泽, 王笑臣, 沈世强

丁千山, 孙荣泽, 王笑臣, 沈世强, 武汉大学人民医院肝胆腔镜外科 湖北省武汉市 430066

丁千山, 在读博士, 主要从事消化系统肿瘤的研究.

作者贡献分布: 此课题由丁千山设计; 数据分析与文章书写由丁千山、孙荣泽及王笑臣共同完成; 文章指导与审阅由沈世强完成.

通讯作者: 沈世强, 教授, 主任医师, 430066, 湖北省武汉市武昌区张之洞路95号, 武汉大学人民医院肝胆腔镜外科.

swsw2218@hotmail.com

收稿日期: 2014-05-14 修回日期: 2014-07-11

接受日期: 2014-07-28 在线出版日期: 2014-08-28

Analysis of clinical significance of expression of 6-phosphofructo-2-kinase in hepatocellular carcinoma utilizing GEO datasets

Qian-Shan Ding, Rong-Ze Sun, Xiao-Chen Wang, Shi-Qiang Shen

Qian-Shan Ding, Rong-Ze Sun, Xiao-Chen Wang, Shi-Qiang Shen, Department of Endoscopic Surgery, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430066, Hubei Province, China

Correspondence to: Shi-Qiang Shen, Professor, Chief Physician, Department of Endoscopic Surgery, Renmin Hospital of Wuhan University, 95 Zhangzhidong Road, Wuchang District, Wuhan 430066, Hubei Province, China. swsw2218@hotmail.com

Received: 2014-05-14 Revised: 2014-07-11

Accepted: 2014-07-28 Published online: 2014-08-28

Abstract

AIM: To investigate the expression of 6-phosphofructo-2-kinase (PFKFB3) in multiple tumors, to clarify the relationship between PFKFB3 expression and clinicopathological characteristics of hepatocellular carcinoma, and to evaluate the possibility of using PFKFB3 as a prognosis marker in hepatocellular carcinoma.

METHODS: GEO datasets were collected and expression profile and clinical information were analyzed. Gene set enrichment analysis (GSEA) was conducted to explore the gene sets enriched in samples with high PFKFB3 expression.

RESULTS: The expression of PFKFB3 was

up-regulated in high grade tumors ($P < 0.05$). PFKFB3 expression was significantly associated with age, alanine transaminase (ALT), tumor volume, the number of nodules, T stage, Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC) stage and Cancer Liver Italian Program (CLIP) stage. Higher expression of PFKFB3 indicated poor prognosis in hepatocellular carcinoma. GSEA indicated that PFKFB3 regulates gene sets associated with anti-apoptosis, negative regulation of programmed cell death, and positive regulation of cell proliferation and cellular metabolic process.

CONCLUSION: PFKFB3 is highly expressed in multiple tumors and functions as a potential marker and target for diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma.

© 2014 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: Hepatocellular carcinoma; 6-phosphofructo-2-kinase; Pathology; Prognosis

Ding QS, Sun RZ, Wang XC, Shen SQ. Analysis of clinical significance of expression of 6-phosphofructo-2-kinase in hepatocellular carcinoma utilizing GEO datasets. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(24): 3675-3680 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/3675.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i24.3675>

摘要

目的: 通过基因表达汇编(Gene Expression Omnibus, GEO)公共数据库, 探讨6-磷酸果糖激酶2(6-phosphofructo-2-kinase, PFKFB3)在肝细胞癌中的表达情况, 并进一步探索其与肝细胞癌临床病理特征的关系, 评价PFKFB3对肝细胞癌术后患者预后评价的意义, 预测PFKFB3推动肝细胞癌发展的机制.

方法: 检索、下载美国国立生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)的肿瘤公共数据集, 对表达谱资料及临床信息进行分析; 利用基因集富

■背景资料

肿瘤的特征性的代谢变化一直是肿瘤学研究的热点. 肿瘤细胞的瓦博格效应(Warburg effect)的意义和机制直到今天也未完全阐明. 6-磷酸果糖激酶2(6-phosphofructo-2-kinase, PFKFB3)的表达促进葡萄糖的摄入和酵解. 所以PFKFB3的异常表达被认为是导致肿瘤细胞瓦博格效应的重要原因.

■同行评议者

程树群, 副教授, 中国人民解放军第二军医大学东方肝胆外科医院综合治疗三科

■研究前沿

虽然有研究证实 PFKFB3 在多种肿瘤中都是起促进癌症发生和进展的作用, 并且其特异性的抑制剂可以抑制肿瘤的恶化。但是大多数实验都是基于细胞水平或者动物模型。

集分析(gene set enrichment analysis, GSEA)方法, 分析受PFKFB3调控的相关基因。

结果: PFKFB3 在高T分期肿瘤中高表达 ($P<0.05$); 在不同年龄、谷丙转氨酶(alanine transaminase, ALT)、肿瘤大小、肿瘤结节数目、T分期、肝细胞癌巴塞罗那分期(Barcelona Clinic Liver Cancer stage, BCLC stage)、意大利肝细胞癌项目分期(Cancer Liver Italian Program stage, CLIP stage)的肝细胞癌患者中, PFKFB3 的表达均有显著性差异 ($P<0.05$); PFKFB3 的表达状态与肝细胞癌患者术后的总体生存和复发相关 ($P<0.05$); PFKFB3 高表达样本富集了与细胞增殖、抗凋亡、代谢相关的基因集。

结论: PFKFB3 与肝细胞癌多个病理指标相关, 且可以做为潜在的判断肝细胞癌患者预后的标志物和治疗肿瘤的靶标。

© 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; 6-磷酸果糖激酶2; 病理; 预后

核心提示: 目前研究6-磷酸果糖激酶2(6-phosphofructo-2-kinase, PFKFB3)表达与肿瘤患者预后关系的文章非常少, 本文首次利用了生物信息学手段证实PFKFB3与肝细胞癌患者术后预后的关系并初步分析了其可能机制。不仅对于理解瓦博格效应的意义和机制有一定意义, 还进一步为PFKFB3抑制剂的研发和临床应用提供了依据和参考。

丁千山, 孙荣泽, 王笑臣, 沈世强. 使用GEO数据集分析 PFKFB3 在肝细胞癌中的表达及临床意义. 世界华人消化杂志 2014; 22(24): 3675-3680 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/3675.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v22.i24.3675>

0 引言

肿瘤细胞的能量代谢不同于正常细胞: 正常情况下, 细胞使用葡萄糖在线粒体内进行氧化磷酸化, 而肿瘤细胞能量代谢的特点是活跃地摄取葡萄糖, 主要通过有氧糖酵解为细胞的生命活动功能, 也就是瓦博格效应(Warburg effect)。低氧是肿瘤微环境的显著特征之一。低氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1, HIF-1 α)信号通路在上调有氧糖酵解以适应低氧环境起了重要作用, 其重要途径之一就是通过在转录水平上调6-磷酸果糖激酶2(6-phosphofructo-2-

kinase, PFKFB3)的表达促进葡萄糖的摄入和酵解。所以PFKFB3的异常表达被认为是导致肿瘤细胞瓦博格效应的重要原因^[1]。虽然有不少研究证实, PFKFB3可以调控肿瘤细胞的增殖和凋亡, 但是其表达水平与肿瘤患者预后的研究还很少。美国国立生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)的基因表达汇编(Gene Expression Omnibus, GEO)计划致力于建立一个基因表达数据仓库和在线资源, 支持公共使用和散布基因表达数据, 用于从任何物种的来源检索基因表达数据, 是生物信息学依赖的重要资源。本研究通过对GEO公共数据集GSE14520分析, 探索PFKFB3在肝细胞癌预后中的评价作用, 并依靠基因集富集分析(gene sets enrichment analysis, GSEA), 预测在肝细胞癌细胞中可能受PFKFB3调控的基因集, 为进一步研究其在肿瘤发生发展中的作用机制提供线索和思路。

1 材料和方法

1.1 材料 我们从NCBI的GEO数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>)中下载基因表达谱肝细胞癌样本数据集GSE14520^[2]。上述所有数据集的数据导入dChip软件还原原始芯片扫描图像, 以总荧光强度为中位数的芯片N2为基准进行标准化后, 方进行后续计算和进一步的分析。

1.2 方法

1.2.1 数据集筛选和临床相关性研究样本数据分组: GSE14520基因样本量大且附带临床信息。其中临床资料缺失的样本被排除。根据表达谱数据, 对样本的PFKFB3的表达进行由高到低排序后, 高于信号log2平均值的样本作为高表达组, 低于信号log2平均值的样本作为低表达组。

1.2.2 GSEA挖掘样本富集基因: 采用GSEA 2.0.14版本进行分析。GSE14520被纳入GSEA。肿瘤组织样本根据PFKFB3的表达水平被分为高低表达两组, 之后通过GSEA分析PFKFB3的表达水平对各种生物通路基因集的影响。我们从GSEA网站MsigDB数据库中获得的基因集作为参照基因集, 按default weighted enrichment statistic的方法, 每次分析重复1000次。

1.2.3 作图: 作图软件使用GraphPad Prism 6。

统计学处理 统计学处理软件使用GraphPad Prism 6。不同T分期中表达量的组件比较采用ANOVA检验; 回顾性研究中, 组间比较采

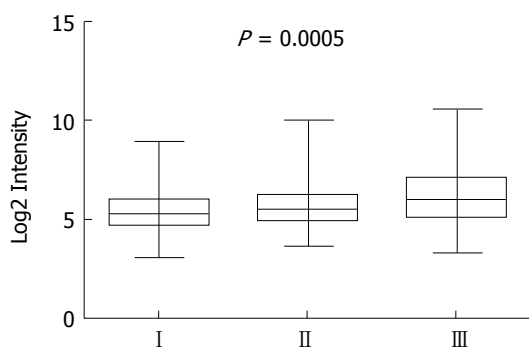


图1 PFKFB3在不同T分期肿瘤样本中的表达水平。从GSE14520获得PFKFB3的表达谱信息表明PFKFB3与肝细胞癌患者AJCC T分期显著相关。组间差异的显著性以一维方差分析完成($P = 0.0005$)

用联列表法, 采用 χ^2 检验; 生存期研究中, Log-rank(Mantel-Cox)法用于生存分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义; 在GSEA中, $P < 0.05$ 及错误发现率(false discovery rates, FDR) < 0.25 的基因集作为显著富集基因集。

2 结果

2.1 不同T分期肝细胞癌样本中PFKFB3的表达 我们首先比较了不同美国肿瘤研究联合委员会(American Joint Committee on Cancer, AJCC) T分期中, PFKFB3的表达差异。在肝细胞癌样本数据集GSE14520中, T分期为I、II、III的肿瘤样本的PFKFB3的表达逐次升高, 且组间有统计学差异($P = 0.0005$), 提示PFKFB3的表达与肝细胞癌的进展有关(图1)。

2.2 PFKFB3与肝细胞癌的临床病理相关性 我们接下来研究了PFKFB3的表达与肿瘤临床病理资料的相关性, 我们利用GSE14520中的临床资料进行了回顾性分析。在肝细胞癌样本数据集GSE14520中, 在不同年龄($P = 0.0263$)、ALT($P = 0.0092$)、肿瘤大小($P = 0.0453$)、肿瘤结节数目($P = 0.0150$)、T分期($P = 0.0018$)、BCLC分期($P = 0.0433$)、CLIP分期($P = 0.0009$)中, PFKFB3的表达均有显著性差异(表1)。

2.3 PFKFB3与肝细胞癌患者的预后相关性 接下来我们又进行了生存期分析以判断PFKFB3是否能作为肿瘤预后的评价分子。在肝细胞癌样本数据集GSE14520中, PFKFB3高表达组患者和低表达组患者的5年生存率分别为43.659%和64.523%, Log-rank = 9.652, $P = 0.002$ (图2A)。5年无病生存率分别为30.715%和44.083%, Log-rank = 4.897, $P = 0.027$ (图2B)。以上结果说明PFKFB3的高表达与肝细胞癌患者术后早期死亡和早期

表1 PFKFB3表达水平和肝细胞癌的临床病理特征的相关性

病理指标	n	PFKFB3表达		χ^2 值	P值
		高	低		
年龄(岁)				4.94	0.0263
≤55	166	73	93		
>55	76	22	54		
性别				1.24	0.2649
男	211	80	131		
女	31	15	16		
AFP(ng/mL)				2.18	0.1396
≤200	128	45	83		
>200	110	49	61		
ALT(U/L)				6.79	0.0092
≤50	142	46	96		
>50	100	49	51		
肝硬化				0.51	0.4753
是	223	89	134		
否	19	6	13		
肿瘤大小(cm)				4.01	0.0453
<5	153	53	100		
≥5	88	42	46		
结节数目				5.91	0.0150
单结节	190	67	123		
多结节	52	28	24		
AJCC T分期				12.63	0.0018
T1	96	26	70		
T2	78	31	47		
T3	51	29	88		
BCLC分期				6.28	0.0433
0	20	7	13		
A	152	51	101		
B/C	53	28	25		
CLIP分期				14.09	0.0009
0	98	25	73		
1	79	34	45		
2-5	48	27	21		
PRMS分类				60.32	<0.0001
高	121	77	44		
低	121	18	103		

AFP: 甲胎蛋白; ALT: 谷丙转氨酶; AJCC T分期: 美国癌症联合委员会T分期; BCLC分期: 肝癌巴塞罗那分期; CLIP分期: 意大利肿瘤计划分期; PRMS: 转移风险表达谱预测特征。

复发有关。

2.4 PFKFB3高表达的基因集富集 明确PFKFB3与肝细胞癌的临床相关性之后, 我们继而对PFKFB3推动肿瘤发生的可能机制进行的初步探究。我们利用肝细胞癌样本数据集GSE14520, 使用GSEA方法, 分析PFKFB3的表达水平对各种生物通路基因集的影响。我们使用“curated

■ 相关报道

目前研究PFKFB3表达与肿瘤患者预后关系的文章非常少。之前有研究报道, 在高级别星形细胞瘤中, PFKFB3的表达水平更高。但是在其他肿瘤中, PFKFB3的表达与肿瘤病理指标、患者预后的研究尚未见报道。

■ 创新盘点

首次利用了生物信息学手段证实PFKFB3与肝细胞癌患者术后预后的关系并初步分析了其可能机制。

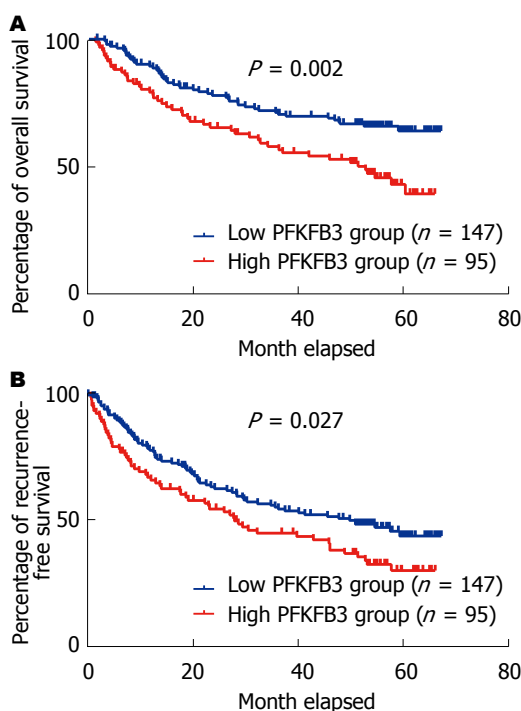


图2 PFKFB3表达水平与肝细胞癌患者预后的关系。A: 高表达PFKFB3的肝细胞癌患者术后死亡更快($P = 0.002$); B: 高表达PFKFB3的肝细胞癌患者术后复发更快($P = 0.027$)。

genes sets”作为参照基因集,可见PFKFB3高表达的肿瘤样本富集了与抗凋亡、促进细胞增殖、正向调节细胞代谢强度的基因(图3A),说明PFKFB3高表达肿瘤细胞对凋亡信号有更强的抵抗力,有更高的增殖潜力,代谢更加旺盛。说明PFKFB3可能通过调节肿瘤的增殖和耐药等方式,影响肿瘤的发生和发展。

3 讨论

PFKFB3是一种能够激活磷酸果糖激酶1(phosphofructo kinase-1)的酶,可以促进果糖形成果糖2,6-二磷酸的形成。由于磷酸果糖激酶1是糖酵解过程的限速酶,所以PFKFB3被认为对于调节细胞糖代谢具有重要意义。PFKFB3的启动子区域包含着低氧反应元件(hypoxia response element, HRE),可以与HIF-1 α 结合,在低氧条件下PFKFB3的表达因而得上调。由于PFKFB3在糖代谢中的重要作用,其由低氧导致的过表达被认为是肿瘤效应瓦博格效应的重要原因^[3,4]。

PFKFB3表达、活性异常导致的代谢异常,会造成肿瘤细胞的不同表型。如PFKFB3在关键氨基酸位置的甲基化,可以稳定PFKFB3的结构和功能,若甲基化降低,则会造成PFKFB3泛素化依赖途径的降解,进而导致肿瘤细胞的糖代谢由糖酵解转化为磷酸戊糖途径,伴随着肿瘤

细胞对氧化应激和抗肿瘤药物的敏感性增强^[5]。而肿瘤细胞在过度增殖过程中,常常产生过量的活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS),若过量ROS不能及时清除,将破坏肿瘤细胞的氧化还原稳态。有研究证实PFKFB3在维持这一稳态过程中扮演了重要角色:ROS可以通过对PFKFB3第206的半胱氨酸进行蛋白质谷胱甘肽化(S-glutathionylation),这种共价的、可逆的修饰,使得PFKFB3的催化活性显著下降,进而导致肿瘤细胞的糖代谢由糖酵解转化为磷酸戊糖途径,引起谷胱甘肽的水平增加,从而最终消耗掉ROS。这一负反馈机制确保了肿瘤细胞在旺盛的代谢下也能保持氧化还原稳态的稳定^[6]。

除了能影响肿瘤细胞的糖代谢,PFKFB3本身也是众多癌相关蛋白重要的上游或者下游分子:如细胞外信号调节激酶(extracellular signal regulated kinase, ERK)/核糖体S6激酶(ribosomal S6 kinase, RSK)的激活不仅会导致PFKFB3的转录活性增高,还会导致PFKFB6在461位丝氨酸的磷酸化,使得其活性增强^[7];肿瘤细胞在外界应激下,可以通过早期的PFKFB3基因转录增强,激活p38/MK2信号通路^[8];雌二醇可以促进雌激素受体阳性的肿瘤的发展,雌二醇可以促进雌激素受体,后者可以从转录水平上增强PFKFB3的表达,而PFKFB3表达的增加可以导致后续的葡萄糖摄入和糖酵解的增强,从而推动乳腺癌的发展^[9]。

也正因为上述原因,PFKFB3被认为是肿瘤治疗的潜在靶标。使用siRNA干扰PFKFB3的表达,伴随着糖酵解的下降,果糖2,6-二磷酸、乳酸、ATP的水平下降,肿瘤细胞的增殖减慢,细胞周期出现阻滞,凋亡细胞比例增加^[10]。有研究单位合成了PFKFB3的抑制性化合物N4A和YN1,这两种化合物可以抑制糖酵解过程,诱导肿瘤细胞凋亡^[11]。另一个研究单位合成的特异性抑制剂PFK15在细胞实验和动物实验中都表现出了良好的抗增殖特性,并且已经于2013年进入一期的临床试验^[12]。更有意义的是,抑制PFKFB3并不仅限于影响肿瘤细胞的增殖和凋亡:通过设计药物拮抗血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)从而抑制肿瘤血管形成是肿瘤治疗的新思路,但是这类药物的应用并不顺利。而有研究报道,小分子化合物3-(3-pyridinyl)-1-(4-pyridinyl)-2-propen-1-one (3PO)可以通过抑制PFKFB3,造成Notch信号通路的活性下降,使得内皮细胞的增殖和迁

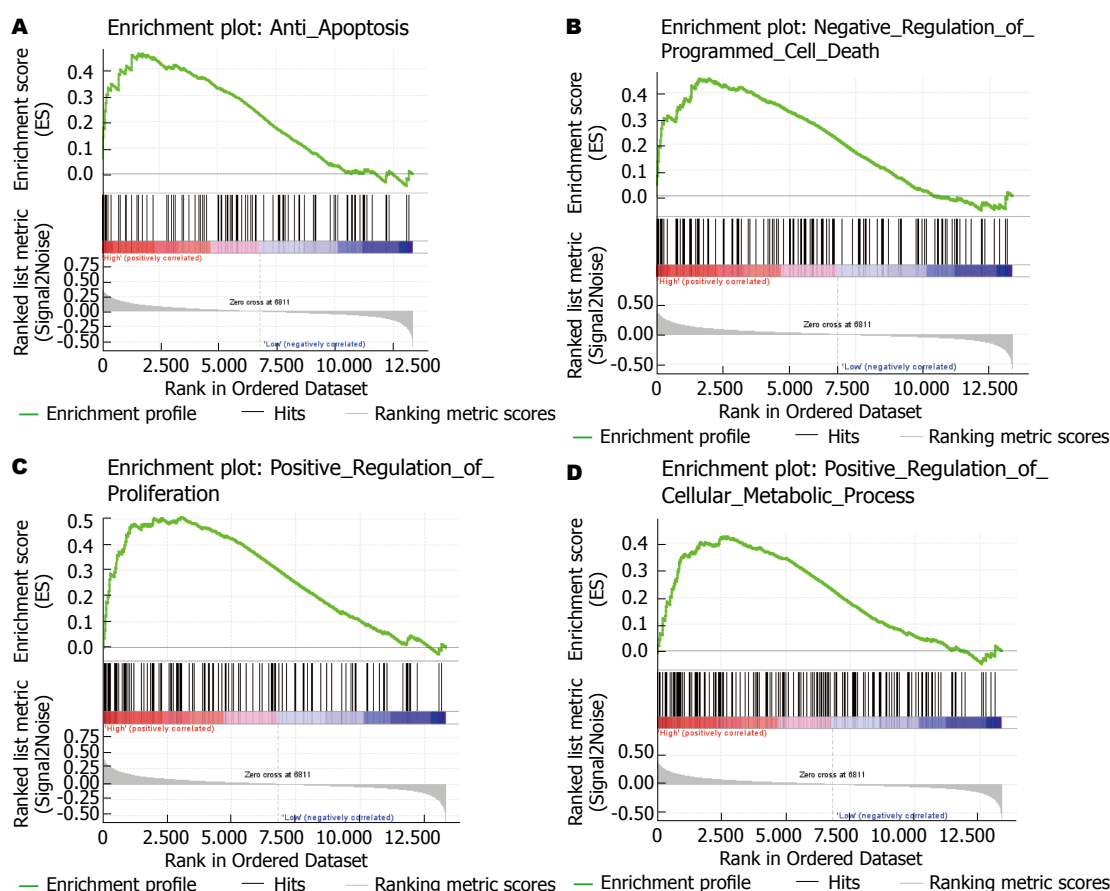


图3 GSEA分析PFKFB3高表达样本富集基因集。A: 抗凋亡相关基因集($P = 0.002$; FDR = 0.108; ES = 0.459); B: 细胞程序性死亡负调控基因集($P < 0.001$; FDR = 0.109; ES = 0.453); C: 促细胞增殖基因集($P < 0.001$; FDR = 0.108; ES = 0.509); D: 促细胞代谢基因集($P = 0.002$; FDR = 0.104; ES = 0.426)。富集基因集的显著性以 $P < 0.05$ 及FDR < 0.25判断。FDR: 错误发现率。ES: 富集分数; GSEA: 基因集富集分析; PFKFB3: 6-磷酸果糖激酶2。

移被抑制, 进而阻遏血管生成^[13,14]。

虽然PFKFB3在肿瘤治疗领域的研究已经开展已有多, 但是在肿瘤预后评价中的研究还十分少。之前有研究报道, 在高级别星形细胞瘤中, PFKFB3的表达水平更高, 剪接变体UBI2K4的表达水平下降^[15,16]。但是在其他肿瘤中, PFKFB3的表达与肿瘤病理指标、患者预后的研究尚未见报道。

本研究利用GEO数据集, 结合生物信息学, 证实PFKFB3在高T分期肿瘤样本中表达更高; 在不同年龄、ALT、肿瘤大小、肿瘤结节数目、T分期、BCLC分期、CLIP分期的肝细胞癌患者中, 其表达均有显著性差异; PFKFB3高表达的肝细胞癌患者术后复发更快、生存期更短。以上结果证实了PFKFB3在肝细胞癌中可以作为评价临床预后的指标。另外我们还证实, PFKFB3高表达的肿瘤样本富集了与细胞抗凋亡、细胞增殖和代谢相关的基因, 提示PFKFB3可能通过影响肝细胞癌细胞的耐药、增殖和代

谢组, 推动了肝细胞癌的发生发展。

4 参考文献

- 1 Yalcin A, Clem BF, Imbert-Fernandez Y, Ozcan SC, Peker S, O'Neal J, Klarer AC, Clem AL, Telang S, Chesney J. 6-Phosphofructo-2-kinase (PFKFB3) promotes cell cycle progression and suppresses apoptosis via Cdk1-mediated phosphorylation of p27. *Cell Death Dis* 2014; 5: e1337 [PMID: 25032860 DOI: 10.1038/cddis.2014.292]
- 2 Roessler S, Jia HL, Budhu A, Forgues M, Ye QH, Lee JS, Thorgeirsson SS, Sun Z, Tang ZY, Qin LX, Wang XW. A unique metastasis gene signature enables prediction of tumor relapse in early-stage hepatocellular carcinoma patients. *Cancer Res* 2010; 70: 10202-10212 [PMID: 21159642 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-2607]
- 3 Minchenko A, Leshchinsky I, Opentanova I, Sang N, Srinivas V, Armstead V, Caro J. Hypoxia-inducible factor-1-mediated expression of the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-3 (PFKFB3) gene. Its possible role in the Warburg effect. *J Biol Chem* 2002; 277: 6183-6187 [PMID: 11744734 DOI: 10.1074/jbc.M110978200]
- 4 Obach M, Navarro-Sabaté A, Caro J, Kong X, Duran J, Gómez M, Perales JC, Ventura F, Rosa JL, Bartrons R. 6-Phosphofructo-2-kinase (pfkfb3) gene

■应用要点

PFKFB3与肝细胞癌患者术后预后的显著相关性, 提示其可以作为协助临床医师判断肝细胞癌患者的肿瘤良恶性。并且为PFKFB3抑制剂的研发和进一步的临床实验, 提供了新的依据。

■名词解释

基因集富集分析: 一个利用全基因组表达谱数据的分析方法, 他根据已有的对基因的定位性质功能生物学意义, 首先确立了一系列分子标签数据库, 数据库包含了多个功能基因集, 通过分析一组处于两个生物学状态的基因表达谱杂交数据, 他们在特定的功能基因集中的表达状况, 以及这种表达状况是否存在某种统计学显著性。

同行评价

本研究通过生物信息学分析,探索PFKFB3在肝细胞癌预后中的评价作用. 论文有一定新意,方法正确,结论可靠.

- promoter contains hypoxia-inducible factor-1 binding sites necessary for transactivation in response to hypoxia. *J Biol Chem* 2004; 279: 53562-53570 [PMID: 15466858 DOI: 10.1074/jbc.M406096200]
- 5 Yamamoto T, Takano N, Ishiwata K, Ohmura M, Nagahata Y, Matsuura T, Kamata A, Sakamoto K, Nakanishi T, Kubo A, Hishiki T, Suematsu M. Reduced methylation of PFKFB3 in cancer cells shunts glucose towards the pentose phosphate pathway. *Nat Commun* 2014; 5: 3480 [PMID: 24633012 DOI: 10.1038/ncomms4480]
- 6 Seo M, Lee YH. PFKFB3 regulates oxidative stress homeostasis via its S-glutathionylation in cancer. *J Mol Biol* 2014; 426: 830-842 [PMID: 24295899 DOI: 10.1016/j.jmb.2013.11.021]
- 7 Novellademunt L, Obach M, Millán-Ariño L, Manzano A, Ventura F, Rosa JL, Jordan A, Navarro-Sabate A, Bartrons R. Progesterins activate 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 3 (PFKFB3) in breast cancer cells. *Biochem J* 2012; 442: 345-356 [PMID: 22115192 DOI: 10.1042/BJ20111418]
- 8 Novellademunt L, Bultot L, Manzano A, Ventura F, Rosa JL, Vertommen D, Rider MH, Navarro-Sabate A, Bartrons R. PFKFB3 activation in cancer cells by the p38/MK2 pathway in response to stress stimuli. *Biochem J* 2013; 452: 531-543 [PMID: 23548149 DOI: 10.1042/BJ20121886]
- 9 Imbert-Fernandez Y, Clem BF, O'Neal J, Kerr DA, Spaulding R, Lanceta L, Clem AL, Telang S, Chesney J. Estradiol stimulates glucose metabolism via 6-phosphofructo-2-kinase (PFKFB3). *J Biol Chem* 2014; 289: 9440-9448 [PMID: 24515104 DOI: 10.1074/jbc.M113.529990]
- 10 Calvo MN, Bartrons R, Castaño E, Perales JC, Navarro-Sabaté A, Manzano A. PFKFB3 gene silencing decreases glycolysis, induces cell-cycle delay and inhibits anchorage-independent growth in HeLa cells. *FEBS Lett* 2006; 580: 3308-3314 [PMID: 16698023 DOI: 10.1016/j.febslet.2006.04.093]
- 11 Seo M, Kim JD, Neau D, Sehgal I, Lee YH. Structure-based development of small molecule PFKFB3 inhibitors: a framework for potential cancer therapeutic agents targeting the Warburg effect. *PLoS One* 2011; 6: e24179 [PMID: 21957443 DOI: 10.1371/journal.pone.0024179]
- 12 Clem BF, O'Neal J, Tapolsky G, Clem AL, Imbert-Fernandez Y, Kerr DA, Klarer AC, Redman R, Miller DM, Trent JO, Telang S, Chesney J. Targeting 6-phosphofructo-2-kinase (PFKFB3) as a therapeutic strategy against cancer. *Mol Cancer Ther* 2013; 12: 1461-1470 [PMID: 23674815 DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-13-0097]
- 13 De Bock K, Georgiadou M, Schoors S, Kuchnio A, Wong BW, Cantelmo AR, Quaegebeur A, Ghesquière B, Cauwenberghs S, Eelen G, Phng LK, Betz I, Tembuysen B, Brepoels K, Welti J, Geudens I, Segura I, Cruys B, Bifari F, Decimo I, Blanco R, Wyns S, Vangindertael J, Rocha S, Collins RT, Munck S, Daelemans D, Imamura H, Devlieger R, Rider M, Van Veldhoven PP, Schuit F, Bartrons R, Hofkens J, Fraisl P, Telang S, Deberardinis RJ, Schoonjans L, Vinckier S, Chesney J, Gerhardt H, Dewerchin M, Carmeliet P. Role of PFKFB3-driven glycolysis in vessel sprouting. *Cell* 2013; 154: 651-663 [PMID: 23911327 DOI: 10.1016/j.cell.2013.06.037]
- 14 Schoors S, De Bock K, Cantelmo AR, Georgiadou M, Ghesquière B, Cauwenberghs S, Kuchnio A, Wong BW, Quaegebeur A, Goveia J, Bifari F, Wang X, Blanco R, Tembuysen B, Cornelissen I, Bouché A, Vinckier S, Diaz-Moralli S, Gerhardt H, Telang S, Cascante M, Chesney J, Dewerchin M, Carmeliet P. Partial and transient reduction of glycolysis by PFKFB3 blockade reduces pathological angiogenesis. *Cell Metab* 2014; 19: 37-48 [PMID: 24332967 DOI: 10.1016/j.cmet.2013.11.008]
- 15 Kessler R, Bleichert F, Warnke JP, Eschrich K. 6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase (PFKFB3) is up-regulated in high-grade astrocytomas. *J Neurooncol* 2008; 86: 257-264 [PMID: 17805487 DOI: 10.1007/s11060-007-9471-7]
- 16 Zscharnack K, Kessler R, Bleichert F, Warnke JP, Eschrich K. The PFKFB3 splice variant UBI2K4 is downregulated in high-grade astrocytomas and impedes the growth of U87 glioblastoma cells. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2009; 35: 566-578 [PMID: 19490427 DOI: 10.1111/j.1365-2990.2009.01027.x]

编辑 郭鹏 电编 闫晋利



海南地区胆结石患者感染菌群及术后护理效果的评价

王云, 叶兆莲, 林名花, 王媛媛

王云, 叶兆莲, 林名花, 王媛媛, 海南省人民医院胆胰关节外科 海南省海口市 570311

王云, 主管护师, 主要从事胆胰关节外科护理的研究。

作者贡献分布: 本研究设计由王云、叶兆莲、林名花及王媛媛共同完成; 文章撰写由王云完成。

通讯作者: 王云, 主管护师, 570311, 海南省海口市秀英区秀华路19号, 海南省人民医院胆胰关节外科。1225767443@qq.com
电话: 0898-66225933

收稿日期: 2014-06-03 修回日期: 2014-07-07

接受日期: 2014-07-15 在线出版日期: 2014-08-28

Distribution characteristics of biliary bacteria and postoperative care in patients with cholelithiasis

Yun Wang, Zhao-Lian Ye, Ming-Hua Lin, Yuan-Yuan Wang

Yun Wang, Zhao-Lian Ye, Ming-Hua Lin, Yuan-Yuan Wang, Department of Biliary-Pancreatic-Joint Surgery, the People's Hospital of Hainan, Haikou 570311, Hainan Province, China

Correspondence to: Yun Wang, Nurse-in-Charge, Department of Biliary-Pancreatic-Joint Surgery, the People's Hospital of Hainan, 19 Xiuhua Road, Xiuying District, Haikou 570311, Hainan Province, China. 1225767443@qq.com

Received: 2014-06-03 Revised: 2014-07-07

Accepted: 2014-07-15 Published online: 2014-08-28

Abstract

AIM: To analyze the distribution of biliary bacteria and postoperative care in patients with cholelithiasis and to explore the relationship between the Gram-positive (G^+) bacteria, Gram-negative (G^-) bacteria and postoperative care.

METHODS: Ninety-six patients with gallstones and infection were divided into either a G^+ group ($n = 16$) or a G^- group ($n = 80$) according to the results of bile culture. The culture results of pathogenic bacteria in bile samples were analyzed, and the epidemiological distribution, infection, incision healing, T tube removal time, number of sterile dressing changes, and suture removal time were compared between the two groups.

RESULTS: In 96 bile samples, 16 (16.67%) G^+ strains were isolated, including 15 *Enterococcus* strains and 1 *Staphylococcus* strain; 80 (83.33%)

G^- strains were isolated, including 51 *Escherichia coli* strains, 13 *Klebsiella pneumoniae* strains, 6 *Pseudomonas aeruginosa* strains, 4 *Enterobacter cloacae* strains, and 6 other strains. There were no significant differences in the rates of infection and incision healing (6.25% vs 20.00%, 93.75% vs 80.00%, 18.75% vs 11.25%, 62.50% vs 67.50%, 12.50% vs 1.25%, 0.00% vs 15.00%, 0.00% vs 3.75%, 6.25% vs 0.00%, 0.00% vs 1.25%, $P > 0.05$) between the two groups. The time to T tube removal, the number of sterile dressing changes, and the time to suture removal were significantly lower in the G^+ group than in the G^- group (16.81 d \pm 2.69 d vs 23.52 d \pm 10.01 d, 8.42 \pm 4.29 vs 14.71 \pm 11.70, 9.24 d \pm 1.48 d vs 13.54 d \pm 6.62 d, $P < 0.05$).

CONCLUSION: The main pathogens in patients with cholelithiasis and biliary tract infection are G^- bacteria, with *E. coli* being the most common. The postoperative care of T tube and operative incision should be enhanced in patients with G^- bacterial infection to promote wound healing and reduce the number of dressing changes and patient care costs.

© 2014 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: Gall Stones; Biliary tract infection; Biliary pathogenic bacteria; Nursing

Wang Y, Ye ZL, Lin MH, Wang YY. Distribution characteristics of biliary bacteria and postoperative care in patients with cholelithiasis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(24): 3681-3684 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/3681.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11559/wcjd.v22.i24.3681>

摘要

目的: 分析海南地区胆结石患者胆道感染的菌群分布特点, 探讨胆道感染革兰氏阳性菌(Gram-positive bacteria, G^+)和革兰氏阴性菌(Gram-negative bacteria, G^-)与术后护理的关系。

方法: 按照术中胆汁培养结果将海南省人民医院收治的96例胆结石并感染的患者分为 G^+

■背景资料

胆结石与胆道感染的发生有紧密联系, 多数胆结石患者含有胆道感染。手术时治疗胆结石的有效方式, 术中采取胆汁进行致病菌分离培养能够为控制胆道外科感染提供准确依据。健康人群胆道系统无细菌生长, 发生胆结石后肠道正常寄生菌逆行至胆道发生胆道感染, 因此, 胆道感染的病原菌与肠道寄生菌种类基本一致。

■同行评议者

谭周进, 教授, 湖南中医药大学

■研究前沿

大量研究报道指出,胆道感染致病菌以G⁻菌属为主,本研究中96例胆汁样本共培养G⁻菌80株(83.33%),其中大肠埃希菌最为常见,与上述文献报道结果相符。

组16例和G⁻组80例,观察胆汁样本致病菌分离培养结果,比较G⁺组与G⁻组患者流行病学分布、感染情况、手术切口愈合等级术后T型管拔除时间、更换无菌敷料次数及拆线时间。

结果: 96例胆汁样本共培养G⁺菌16株(16.67%),包括肠球菌15株、葡萄球菌1株, G⁻菌80株(83.33%),包括大肠埃希菌51株、肺炎克雷伯杆菌13株、铜绿假单胞菌6株、阴沟肠杆菌4株、其他6株;两组患者感染情况和手术切口愈合等级比较, (6.25% vs 20.00%)、(93.75% vs 80.00%)、(18.75% vs 11.25%)、(62.50% vs 67.50%)、(12.50% vs 1.25%)、(0.00% vs 15.00%)、(0.00% vs 3.75%)、(6.25% vs 0.00%)、(0.00% vs 1.25%),差异无统计学意义($P>0.05$); G⁺组患者术后T型管拔除时间、更换无菌敷料次数及拆线时间均少于G⁻组, (16.81 d \pm 2.69 d vs 23.52 d \pm 10.01 d)、(8.42次 \pm 4.29次 vs 14.71次 \pm 11.70次)、(9.24 d \pm 1.48 d vs 13.54 d \pm 6.62 d),差异具有统计学意义($P<0.05$)。

结论: 海南地区胆结石并胆道感染患者胆汁病原菌以G⁻菌为主,其中大肠埃希菌最为常见,术后应加强对G⁻菌感染组T型引流管和手术切口护理,防止引流管脱出、促进切口愈合、降低换药次数。

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词: 胆结石; 胆道感染; 胆汁病原菌; 护理

核心提示: 本研究中革兰氏阳性菌(Gram-positive bacteria, G⁺)组患者术后T型管拔除时间明显短于革兰氏阴性菌(Gram-negative bacteria, G⁻)组,主要是由于G⁻组患者有16例出现术后切口感染、4例发生胆漏,延迟了拔管时间,后经对症治疗均痊愈出院。提示需加强对G⁻组患者T型引流管护理,避免发生引流管脱出或感染。

王云, 叶兆莲, 林名花, 王媛媛. 海南地区胆结石患者感染菌群及术后护理效果的评价. 世界华人消化杂志 2014; 22(24): 3681-3684. URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/3681.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v22.i24.3681>

0 引言

胆结石症属于临床常见病和多发病,随着人们生活水平的提高和饮食习惯的改变,胆结石发病率呈现逐年升高的趋势^[1]。临床研究表明,多数胆结石患者存在胆道感染^[2]。现回顾性分析海南地区胆结石患者胆道感染的菌群分布特

表 1 胆汁致病菌培养结果

细菌种类	菌株数(<i>n</i>)	百分比(%)
G ⁺		
肠球菌	15	15.63
葡萄球菌	1	1.04
G ⁻		
大肠埃希菌	51	53.13
肺炎克雷伯杆菌	13	13.54
铜绿假单胞菌	6	6.25
阴沟肠杆菌	4	4.17
其他	6	6.25

G⁺: 革兰氏阳性菌; G⁻: 革兰氏阴性菌。

点,探讨胆道感染革兰氏阳性菌(Gram-positive bacteria, G⁺)和革兰氏阴性菌(Gram-negative bacteria, G⁻)与术后护理的关系,为预防和护理工作提供参考,报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料 选取2013-03/2014-03海南省人民医院收治的96例胆结石并感染的患者作为研究对象。所有患者均经B超证实为胆囊或肝内外胆管结石,实验室检查显示血常规白细胞计数及中性粒细胞比例升高,部分患者存在血清胆红素、转氨酶水平升高,胆汁培养均存在感染致病菌,临床主要表现为右上腹或剑突下阵发性疼痛,可伴有恶心、呕吐、发热等症状^[3]。排除入选前1 wk内使用抗生素或消炎利胆类中成药者,存在其他部位感染或合并恶性肿瘤、自身免疫性疾病者。按照术中胆汁培养结果,将96例患者分为G⁺组16例和G⁻组80例。所有患者均签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 胆汁采集: 手术或内镜逆行胰胆管造影经皮肝穿刺胆道引流术(percutaneous transhepatic cholangial drainage, PTCD)、经内镜逆行胰胆管造影(endoscopic retrograde cholangiopancreatography, ERCP)中使用一次性无菌注射器穿刺胆总管抽取2 mL胆汁样本,注入无菌试管中送检^[4]。

1.2.2 胆汁培养分离鉴定: 取胆汁样本接种于血平板,在37 °C恒温培养箱中常规培养48 h,观察结果,细菌分离培养按照《全国临床检验操作规程》^[5]进行。

1.2.3 观察指标: 观察胆汁样本致病菌分离培养

表 2 两组患者临床资料比较 $n(\%)$

分组	n	性别		职业			城乡		蛔虫史		鱼生史	
		男	女	农民	职员	退休	城	乡	有	无	有	无
G ⁺ 组	16	9 (56.25)	7 (43.75)	9 (56.25)	6 (37.50)	1 (6.25)	4 (25.00)	12 (75.00)	15 (93.75)	1 (6.25)	7 (43.75)	9 (56.25)
G ⁻ 组	80	35 (43.75)	45 (56.25)	38 (47.50)	35 (43.75)	7 (8.75)	21 (26.25)	59 (73.75)	63 (78.75)	17 (21.25)	27 (33.75)	53 (66.25)

G⁺: 革兰氏阳性菌; G⁻: 革兰氏阴性菌.表 3 两组患者感染情况和手术切口愈合等级比较 $n(\%)$

分组	感染情况		手术切口愈合等级							
	感染	无感染	I / 甲	II / 甲	III / 甲	II / 乙	III / 乙	II / 丙	III / 丙	
G ⁺ 组	1(6.25)	15(93.75)	3(18.75)	10(62.50)	2(12.50)	0(0.00)	0(0.00)	1(6.25)	0(0.00)	
G ⁻ 组	16(20.00)	64(80.00)	9(11.25)	54(67.50)	1(1.25)	12(15.00)	3(3.75)	0(0.00)	1(1.25)	

G⁺: 革兰氏阳性菌; G⁻: 革兰氏阴性菌.表 4 两组患者术后T型管拔除时间、更换无菌敷料次数及拆线时间比较 (mean \pm SD)

分组	T型管拔除时间(d)	更换无菌敷料次数(次)	拆线时间(d)
G ⁺ 组	16.81 \pm 2.69 ^a	8.42 \pm 4.29 ^a	9.24 \pm 1.48 ^a
G ⁻ 组	23.52 \pm 10.01	14.71 \pm 11.70	13.54 \pm 6.62

^a $P < 0.05$ vs G⁻组. G⁺: 革兰氏阳性菌; G⁻: 革兰氏阴性菌.

结果, 比较G⁺组与G⁻组患者流行病学分布、感染情况、手术切口愈合等级术后T型管拔除时间、更换无菌敷料次数及拆线时间.

统计学处理 使用SPSS17.0统计分析, 用mean \pm SD表示计量资料, 采用 t 检验, 用百分比表示计数资料, 采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 胆汁致病菌培养结果 96例胆汁样本共培养G⁺菌16株(16.67%), G⁻菌80株(83.33%)(表1).

2.2 两组患者流行病学分布比较 两组患者在性别、职业、城乡、蛔虫史、鱼生史等上差异无统计学意义($P > 0.05$)(表2), 具有可比性.

2.3 两组患者感染情况和手术切口愈合等级比较 两组患者感染情况和手术切口愈合等级比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$)(表3).

2.4 两组患者术后T型管拔除时间、更换无菌敷料次数及拆线时间比较 G⁺组患者术后T型管拔除时间、更换无菌敷料次数及拆线时间均少于

G⁻组, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)(表4).

3 讨论

胆结石与胆道感染的发生有紧密联系, 多数胆结石患者含有胆道感染. 手术时治疗胆结石的有效方式, 术中采取胆汁进行致病菌分离培养能够为控制胆道外科感染提供准确依据^[6]. 健康人群胆道系统无细菌生长, 发生胆结石后肠道正常寄生菌逆行至胆道发生胆道感染, 因此, 胆道感染的病原菌与肠道寄生菌种类基本一致^[7]. 大量研究报道指出, 胆道感染致病菌以G⁻菌属为主^[8], 本研究中96例胆汁样本共培养G⁻菌80株(83.33%), 其中大肠埃希菌最为常见, 与上述文献报道结果相符. 另外, 对G⁺组与G⁻组患者流行病学分布进行比较可见, 性别、职业、城乡、蛔虫史、鱼生史等均不为影响胆道感染病原菌种类的因素.

胆结石患者术后一般需留置T型管引流, 通过对引流胆汁的性状观察可明确是否发生胆道感染以及感染程度和细菌种类, 对拟定抗感染

■应用要点

胆结石患者术后一般需留置T型管引流, 通过对引流胆汁的性状观察可明确是否发生胆道感染以及感染程度和细菌种类, 对拟定抗感染方案具有指导意义.

■同行评价

本研究选题一般,但研究内容有一定的实用性。

方案具有指导意义^[9]。本研究中G⁺组患者术后T型管拔除时间明显短于G⁻组,主要是由于G⁻组患者有16例出现术后切口感染、4例发生胆漏,延迟了拔管时间,后经对症治疗均痊愈出院。提示需加强对G⁻组患者T型引流管护理,避免发生引流管脱出或感染。术后切口感染是外科术后常见感染形式,易造成切口愈合不良、愈合延迟,不仅影响了预后效果,也增加了患者的痛苦和治疗费用,严重者可危及生命安全^[10]。临床研究表明,致病菌是引起术后切口感染的主要原因,胆结石无菌切口感染的病原菌培养结果显示金黄色葡萄球菌占首位,其次为凝固酶阴性葡萄球菌、大肠埃希菌和脆弱类杆菌^[11]。本研究中G⁺组与G⁻组患者感染情况和手术切口愈合等级无统计学差异,提示护理过程中加强了无菌操作和切口裂开预防的管理工作,术后以胆汁病原菌培养结果和药敏试验结果为依据合理使用抗生素,因此控制了切口感染发生率,提高了患者切口甲级愈合率。另外,做好患者术后健康指导和饮食指导也是预防切口感染的重要举措。本研究中G⁺组患者更换无菌敷料次数明显少于G⁻组,分析原因为G⁻组致病菌脓液稀薄且带有甜腥味,而G⁺组致病菌脓液较局限,黏稠且不易扩散,因此更换敷料相对较少^[12]。提示护理人员需加强对G⁻组患者切口的清洁,及时更换无菌敷料,促进切口愈合。另外,机体愈合能力的强弱是缩短拆线时间的关键,G⁻菌可导致胃肠道黏膜功能和肝功能受损、蛋白质合成下降,免疫力降低^[13]。本研究中G⁺组患者术后拆线时间均少于G⁻组,与上述研究相符^[14]。提示护理人员需加强对G⁻组患者的术后饮食护理,遵医嘱适时应用少量白蛋白,促进患者切口尽早愈合^[15]。

总之,海南地区胆结石并胆道感染患者胆汁病原菌以G⁻菌为主,其中大肠埃希菌最为常见,术后应加强对G⁻菌感染组T型引流管和手术切口护理,防止引流管脱出、促进切口愈合、降低换药次数。

4 参考文献

- 1 邓仕华, 黄珂, 农建宏. 胆道感染现状及治疗研究进展. 齐齐哈尔医学院学报 2011; 32: 2310-2312
- 2 贾淑芹, 福泉, 金山. 肝内胆管结石合并胆道感染的细菌谱. 世界华人消化杂志 2012; 20: 3349-3353
- 3 Colton JB, Curran CC. Quality indicators, including complications, of ERCP in a community setting: a prospective study. *Gastrointest Endosc* 2009; 70: 457-467 [PMID: 19482278 DOI: 10.1016/j.gie.2008.11.022]
- 4 Negm AA, Schott A, Vonberg RP, Weismueller TJ, Schneider AS, Kubicka S, Strassburg CP, Manns MP, Suerbaum S, Wedemeyer J, Lankisch TO. Routine bile collection for microbiological analysis during cholangiography and its impact on the management of cholangitis. *Gastrointest Endosc* 2010; 72: 284-291 [PMID: 20541201 DOI: 10.1016/j.gie.2010.02.043]
- 5 中华人民共和国卫生部医政司. 全国临床检验操作规程. 第3版. 南京: 东南大学出版社, 2006: 331-335.
- 6 马辉, 杨连招, 莫新少, 阳诺. 胆石症合并胆道感染患者胆汁病原菌分布特征研究. 广西医学 2013; 35: 1145-1148
- 7 Sahu MK, Chacko A, Dutta AK, Prakash JA. Microbial profile and antibiotic sensitivity pattern in acute bacterial cholangitis. *Indian J Gastroenterol* 2011; 30: 204-208 [PMID: 22006165 DOI: 10.1007/s12664-011-0135-3]
- 8 杨其. 胆道感染患者胆汁细菌分布及药敏结果分析. 中华全科医学 2012; 10: 1142-1143
- 9 杨永, 杨连招, 莫新少, 陈似霞. 胆结石感染菌群与术后T型管护理的临床研究. 护士进修杂志 2012; 27: 297-298
- 10 陈晓敏, 吴惠文, 鲍惠莲. 经皮肝穿胆道引流术后并发胆道感染病人的护理. 全科护理 2014; 12: 32-33
- 11 Barber K, Madden S, Allen J, Collett D, Neuberger J, Gimson A. Elective liver transplant list mortality: development of a United Kingdom end-stage liver disease score. *Transplantation* 2011; 92: 469-476 [PMID: 21775931 DOI: 10.1097/TP.0b013e318225db4d]
- 12 李奉达, 邱法波, 刘宁. 胆石病患者胆汁细菌学检查分析. 世界华人消化杂志 2008; 16: 4004-4007
- 13 杨永, 杨连招, 莫新少, 陈似霞, 游雪梅. 胆结石并胆道感染不同菌群术后切口愈合情况的临床研究. 护理研究 2011; 25: 3337-3338
- 14 杨永, 杨连招, 莫新少. 胆石症并胆道感染患者常见菌群及其药敏分析、耐药情况. 西医科大学学报 2011; 28: 975-977
- 15 王金凤, 常璠. 某院普外科胆道细菌感染及耐药性分析. 国际检验医学杂志 2013; 34: 322-324
- 16 Leise MD, Kim WR, Kremers WK, Larson JJ, Benson JT, Therneau TM. A revised model for end-stage liver disease optimizes prediction of mortality among patients awaiting liver transplantation. *Gastroenterology* 2011; 140: 1952-1960 [PMID: 21334338 DOI: 10.1053/j.gastro.2011.02.017]

编辑 郭鹏 电编 闫晋利



轻型急性胰腺炎并急性肝损害的临床特点

王桃丹

王桃丹, 义乌市中心医院急诊科 浙江省义乌市 322000

王桃丹, 主要从事急诊科的相关工作。

作者贡献分布: 本文由王桃丹独立完成。

通讯作者: 王桃丹, 322000, 浙江省义乌市江东中路699号, 义乌市中心医院急诊科。wangyaodanyw@163.com

收稿日期: 2014-06-02 修回日期: 2014-06-25

接受日期: 2014-07-01 在线出版日期: 2014-08-28

Clinical characteristics of mild acute pancreatitis with acute liver injury

Tao-Dan Wang

Tao-Dan Wang, Department of Emergency Medicine, Center Hospital of Yiwu, Yiwu 322000, Zhejiang Province, China

Correspondence to: Tao-Dan Wang, Nurse, Department of Emergency Medicine, Center Hospital of Yiwu, 699 Ji-angdong Middle Road, Yiwu 322000, Zhejiang Province, China. wangyaodanyw@163.com

Received: 2014-06-02 Revised: 2014-06-25

Accepted: 2014-07-01 Published online: 2014-08-28

Abstract

AIM: To explore the clinical characteristics of mild acute pancreatitis (MAP) with acute liver injury.

METHODS: Ninety-three patients with MAP were divided into either an acute liver injury group ($n = 61$) or a non-acute liver injury group ($n = 32$). The clinical data, laboratory indexes, and MAP stage (abdominal pain relief time, serum amylase recovery time and hospital stay) were compared between the two groups. In addition, the 93 patients were divided into a biliary MAP group ($n = 52$) or a non-biliary MAP group ($n = 41$). The liver injury (alanine aminotransferase, aspartic transaminase, total bilirubin, DBIL) and MAP stage were compared between the two groups. The prognosis of the patients with acute liver injury was observed.

RESULTS: The percentages of patients between 45-59 years of age and those with hyperlipidemic pancreatitis were significantly lower in the acute liver injury group than in the non-acute liver injury group (24.59% vs 56.25%, 9.84% vs 28.13%,

$P < 0.05$). The percentages of patients aged > 60 years and those with biliary pancreatitis, blood glucose concentration > 6.1 mmol/L or peritoneal irritation sign were significantly higher in the acute liver injury group than in the non-acute liver injury group (52.46% vs 12.50%, 65.57% vs 37.50%, 63.93% vs 34.38%, 55.74% vs 31.25%, $P < 0.05$). The abdominal pain relief time, serum amylase recovery time and hospital stay were significantly shorter in the acute liver injury group than in the non-acute liver injury group (5.52 d \pm 2.21 d vs 4.10 d \pm 1.72 d, 6.11 d \pm 3.14 d vs 4.20 d \pm 2.16 d, 11.60 d \pm 5.26 d vs 8.52 d \pm 3.57 d, $P < 0.05$). The liver function indexes were significantly higher in the biliary MAP group than in the non-biliary MAP group (182.33 U/L \pm 157.06 U/L vs 48.82 U/L \pm 51.05 U/L, 185.22 U/L \pm 176.30 U/L vs 36.31 U/L \pm 22.24 U/L, 36.74 μ mol/L \pm 28.13 μ mol/L vs 25.92 μ mol/L \pm 9.60 μ mol/L, 16.61 μ mol/L \pm 17.51 μ mol/L vs 5.10 μ mol/L \pm 4.61 μ mol/L, $P < 0.05$). Serum amylase recovery time and hospital stay in the biliary MAP group were significantly longer than those in the non-biliary MAP group (6.83 d \pm 3.01 d vs 4.60 d \pm 2.91 d, 12.52 d \pm 5.40 d vs 9.38 d \pm 4.33 d, $P < 0.05$). Of 61 patients with acute liver injury, liver function indexes returned to normal in 39 (63.93%) cases 1-3 wk before discharge, and in 22 (36.07%) cases 1-2 wk after discharge.

CONCLUSION: Hepatic injury may occur in early MAP patients and lead to the prolongation of disease duration. Hepatic injury may recover with the cure of primary disease. Old age, biliary pancreatitis, hyperglycemia and peritoneal irritation sign are risk factors for hepatic injury in MAP patients.

© 2014 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: Mild acute pancreatitis; Acute liver injury; Liver function; Biliary pancreatitis

Wang TD. Clinical characteristics of mild acute pancreatitis with acute liver injury. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(24): 3685-3689 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/3685.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i24.3685>

■背景资料

急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)属于临床常见急腹症,起病急、病情进展迅速,若不能及时采取有效治疗措施可危及患者生命安全。AP可累及多个脏器,引起多种脏器功能障碍,其中肝损害最为常见。AP并急性肝损害不仅增加了病情严重程度,也给治疗增加了难度,未及时处理者可引发肝功能衰竭,严重影响预后效果。因此,掌握轻型急性胰腺炎(mild acute pancreatitis, MAP)并急性肝损害的临床特点对临床治疗有重要意义。

■同行评议者

夏时海,副教授,副主任医师,武警后勤学院附属医院肝胆胰脾科(中心)

■研究前沿

本研究结果还显示,伴有急性肝损害的患者入院时血糖异常发生率较高,这与肝功能受损后可导致糖代谢异常有关,但血糖异常与急性肝损害之间是否存在必然联系尚不能做结论。

摘要

目的:探讨轻型急性胰腺炎(mild acute pancreatitis, MAP)并急性肝损害的临床特点。

方法:按照患者是否伴急性肝损害将浙江省义乌市中心医院收治的93例MAP患者分为急性肝损害组61例和不伴急性肝损害组32例,比较两组患者的临床资料、入院时实验室指标以及MAP病程[腹痛缓解时间、血淀粉酶(serum amylase, AMY)复原时间和住院时间];按照患者是否为胆源性MAP将93例患者分为胆源性组52例和非胆源性组41例,比较两组患者肝损害程度[丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(aspartic transaminase, AST)、总胆红素(total bilirubin, TBIL)、血清直接胆红素(direct bilirubin, DBIL)]和MAP病程;同时记录61例MAP伴急性肝损害患者的转归情况。

结果:急性肝损害组患者年龄45-59岁和高脂血症所占比例显著低于不伴急性肝损害组(24.59% vs 56.25%, 9.84% vs 28.13%),年龄>60岁、胆源性、入院时血糖>6.1 mmol/L和腹膜刺激征所占比例均显著高于对照组(52.46% vs 12.50%, 65.57% vs 37.50%, 63.93% vs 34.38%, 55.74% vs 31.25%),差异具有统计学意义($P<0.05$);急性肝损害组患者腹痛缓解时间、AMY复原时间和住院时间均显著低于不伴急性肝损害组($5.52 \pm 2.21 \text{ d}$ vs $4.10 \pm 1.72 \text{ d}$, $6.11 \pm 3.14 \text{ d}$ vs $4.20 \pm 2.16 \text{ d}$, $11.60 \pm 5.26 \text{ d}$ vs $8.52 \pm 3.57 \text{ d}$),差异具有统计学意义($P<0.05$);胆源性组患者各项肝功能指标均显著高于非胆源性组($182.33 \text{ U/L} \pm 157.06 \text{ U/L}$ vs $48.82 \text{ U/L} \pm 51.05 \text{ U/L}$, $185.22 \text{ U/L} \pm 176.30 \text{ U/L}$, $36.31 \text{ U/L} \pm 22.24 \text{ U/L}$, $36.74 \mu\text{mol/L} \pm 28.13 \mu\text{mol/L}$ vs $25.92 \mu\text{mol/L} \pm 9.60 \mu\text{mol/L}$, $16.61 \mu\text{mol/L} \pm 17.51 \mu\text{mol/L}$ vs $5.10 \mu\text{mol/L} \pm 4.61 \mu\text{mol/L}$), AMY复原时间和住院时间均显著高于非胆源性组($6.83 \text{ d} \pm 3.01 \text{ d}$ vs $4.60 \text{ d} \pm 2.91 \text{ d}$, $12.52 \text{ d} \pm 5.40 \text{ d}$ vs $9.38 \text{ d} \pm 4.33 \text{ d}$),差异具有统计学意义($P<0.05$);61例MAP伴急性肝损害患者39例(63.93%)随原发病好转于出院前1-3 wk内肝功能各项指标恢复正常,其余22例(36.07%)经保肝、护肝治疗,出院后1-2 wk内肝功能各项指标恢复正常。

结论:MAP患者发病初期即可出现肝损害,可引起MAP患者病程延长,肝功能可随原发病好转逐渐恢复,高龄、胆源性、高血糖和腹膜刺激征等均为引发肝损害的危险因素,掌握

MAP并急性肝损害的临床特点对临床治疗具有重要意义。

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词:轻型急性胰腺炎;急性肝损害;肝功能;胆源性

核心提示:本研究中对不同病因导致的轻型急性胰腺炎(mild acute pancreatitis)进行分析,结果显示胆源性病因患者急性肝损害发生率显著高于其他病因,而胆源性组患者各项肝功能指标均显著高于非胆源性组,提示胆源性组肝损害严重程度更高,提示胆道疾病为诱发急性肝损害的重要危险因素。

王桃丹. 轻型急性胰腺炎并急性肝损害的临床特点. 世界华人消化杂志 2014; 22(24): 3685-3689 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/3685.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v22.i24.3685>

0 引言

急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)属于临床常见急腹症,起病急、病情进展迅速,若不能及时采取有效治疗措施可危及患者生命安全^[1]. AP可累及多个脏器,引起多种脏器功能障碍,其中肝损害最为常见^[2]. AP并急性肝损害不仅增加了病情严重程度,也给治疗增加了难度,如不及时处理可引发肝功能衰竭,严重影响预后效果^[3]. 因此,掌握轻型急性胰腺炎(mild acute pancreatitis, MAP)并急性肝损害的临床特点对临床治疗有重要意义. 现回顾性分析浙江省义乌市中心医院收治的MAP患者的临床资料,报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料 选取2013-03/2014-03浙江省义乌市中心医院收治的93例MAP患者作为研究对象. 所有患者均符合《中国急性胰腺炎诊治指南(2013, 上海)》^[4]中MAP相关诊断标准, Ranson评分<3分, APACHE II评分<8分, Balthazar CT积分在D级以下,实验室检查发现丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)>47 U/L和/或天冬氨酸氨基转移酶(aspartic transaminase, AST)>38 U/L或者总胆红素(total bilirubin, TBIL)>20.5 $\mu\text{mol/L}$ 和/或血清直接胆红素(direct bilirubin, DBIL)>6.84 $\mu\text{mol/L}$ ^[5]. 排除排除合并脏器衰竭和/或胰腺假性囊肿、坏死、脓肿等局部并发症者;患有各类型病毒性肝炎、肝硬化、

表 1 两组患者临床资料及入院时实验室检查指标比较 $n(\%)$

分组	性别		年龄(岁)			病因				入院时检查		
	男	女	<45	45-59	>60	胆源性	酒精性	高脂血性	其他	血糖>6.1 mmol/L	WBC> $10 \times 10^9/L$	腹膜刺激征
急性肝损害组 ($n = 61$)	3 (62.30)	2 (37.70)	1 (22.95)	1 (24.59) ^a	3 (52.46) ^a	4 (65.57) ^a	7 (11.48)	6 (9.84) ^a	8 (13.11)	39 (63.93) ^a	32 (52.46)	34 (55.74) ^a
不伴急性肝损害组 ($n = 32$)	1 (56.25)	1 (43.75)	1 (31.25)	1 (56.25)	4 (12.50)	1 (37.50)	4 (12.50)	9 (28.13)	7 (21.88)	11 (34.38)	1 (56.25)	10 (31.25)

^a $P < 0.05$ vs 不伴急性肝损害组. WBC: 血白细胞.

表 2 两组患者MAP病程比较 (mean \pm SD, d)

分组	腹痛缓解时间	AMY复原时间	住院时间
急性肝损害组	5.52 \pm 2.21 ^a	6.11 \pm 3.14 ^a	11.60 \pm 5.26 ^a
不伴急性肝损害组	4.10 \pm 1.72	4.20 \pm 2.16	8.52 \pm 3.57

^a $P < 0.05$ vs 不伴急性肝损害组. MAP: 轻型急性胰腺炎; AMY: 血淀粉酶.

血吸虫病、自身免疫性肝病、肝脏肿瘤或胆胰系统肿瘤者; 入选前应用对肝脏有不良反应的药物者. 按照患者是否伴急性肝损害将93例患者分为急性肝损害组61例和不伴急性肝损害组32例, 按照患者是否为胆源性MAP将93例患者分为胆源性组52例和非胆源性组41例. 所有患者均签署知情同意书, 病历资料完整.

1.2 方法

1.2.1 治疗: 所有患者入院时即进行腹部查体, 住院期间均进行血清肝功能指标(ALT、AST、TBIL、DBIL)、血淀粉酶(serum amylase, AMY)、血白细胞(white blood cell, WBC)及血糖监测, 重点为入院后24 h内上述指标监测.

1.2.2 观察指标: 比较急性肝损害组与不伴急性肝损害组患者的临床资料、入院时实验室指标以及MAP病程, 比较胆源性组与非胆源性组患者肝损害程度和MAP病程, 并记录61例MAP伴急性肝损害患者的转归情况.

统计学处理 使用SPSS17.0统计分析, 用mean \pm SD表示计量资料, 采用 t 检验, 用百分比表示计数资料, 采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义.

2 结果

2.1 急性肝损害组与不伴急性肝损害组患者相关因素比较 急性肝损害组患者年龄45-59岁和

高脂血性所占比例显著低于不伴急性肝损害组, 年龄>60岁、胆源性、入院时血糖>6.1 mmol/L和腹膜刺激征所占比例均显著高于对照组, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)(表1), 表明高龄、胆源性、高血糖和腹膜刺激征为引发MAP患者急性肝损害的主要危险因素.

2.2 急性肝损害组与不伴急性肝损害组患者病程比较 急性肝损害组患者腹痛缓解时间、AMY复原时间和住院时间均显著低于不伴急性肝损害组, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)(表2).

2.3 胆源性组与非胆源性组患者肝损害程度和MAP病程 胆源性组患者各项肝功能指标均显著高于非胆源性组, AMY复原时间和住院时间均显著高于非胆源性组, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)(表3).

2.4 急性肝损害转归情况 61例MAP伴急性肝损害患者39例(63.93%)随原发病好转于出院前1-3 wk内肝功能各项指标恢复正常, 其余22例(36.07%)经保肝、护肝治疗, 出院后1-2 wk内肝功能各项指标恢复正常.

3 讨论

AP是临床发生率较高、病情相对较重的急腹症, 发病原因复杂, 常见的发病原因为胆道疾病、高甘油三酯血症、酒精中毒等, 胰腺酶类被异常激活是主要发病机制^[6]. 临床研究表明,

■ 相关报道

临床研究表明, 诱发AP实验动物模型后组织病理观察发现, AP早期即可出现肝细胞不同程度病理改变.

■应用要点

MAP患者发病初期即可出现肝损害,可引起MAP患者病程延长,肝功能可随原发病好转逐渐恢复,高龄、胆源性、高脂血性、高血糖和腹膜刺激征等均为引发肝损害的危险因素,掌握MAP并急性肝损害的临床特点对临床治疗具有重要意义。

表 3 两组患者肝损害程度和MAP病程比较

分组	ALT(U/L)	AST(U/L)	TBIL(μ mol/L)	DBIL(μ mol/L)	腹痛缓解时间(d)	AMY复原时间(d)	住院时间(d)
胆源性组	182.33 \pm 157.06 ^a	185.22 \pm 176.30 ^a	36.74 \pm 28.13 ^a	16.61 \pm 17.51 ^a	5.71 \pm 2.19 ^a	6.83 \pm 3.01 ^a	12.52 \pm 5.40 ^a
非胆源性组	48.82 \pm 51.05	36.31 \pm 22.24	25.92 \pm 9.60	5.10 \pm 4.61	5.12 \pm 2.25	4.60 \pm 2.91	9.38 \pm 4.33

^a $P < 0.05$ vs 非胆源性组。MAP: 轻型急性胰腺炎; ALT: 丙氨酸氨基转移酶; AST: 天冬氨酸氨基转移酶; TBIL: 总胆红素; DBIL: 血清直接胆红素; AMY: 血淀粉酶。

胆道疾病为引发AP的主要原因^[7]。AP患者具有起病急、病情进展迅速、易引起多种脏器损伤、病死率高等特点,其中肝损害最为常见^[8]。AP患者胰酶被异常激活后与大量的炎性介质传递扩散至全身器官,进而引起全身炎症反应和多器官损害,其中肝脏为第一站^[9]。过量炎性递质刺激肝脏库肯伯格细胞和肝血窦内皮细胞,产生级联反应扩大,多种细胞因子及炎性介质参与肝脏实质性损伤和功能损害过程,肝功能受损后期屏障作用减弱导致炎症介质等损伤因子由体液循环进入全身其他组织和器官,产生多器官功能障碍^[10]。MAP伴急性肝损害在临床上较为常见,了解MAP伴急性肝损害的临床特点、与胰腺炎病因的相关性、肝损害主要发生因素以及转归情况对临床治疗有重要意义。

临床研究表明,诱发AP实验动物模型后组织病理观察发现,AP早期即可出现肝细胞不同程度病理改变^[11]。本研究中多数患者肝功能异常发生于MAP发病初期,即入院24 h内,与上述研究报道相符。本研究中93例患者中61例发生急性肝损伤,发生率为65.59%,与国外相关报道发生率基本一致^[12]。而在61例并发急性肝损伤的患者中胆源性病因占65.57%,这可能与胆源性胰腺炎发生率高有关。本研究中不同性别患者肝损害发生率无显著差异,但老年患者急性肝损害发生率显著高于中青年,分析原因主要为老年患者由于全身脏器功能衰退,且多伴有高血压、糖尿病等慢性疾病,抵抗应激能力差^[13]。因此,对于老年MAP患者要更注意进行肝功能监控,及时予以保肝治疗。本研究中对不同病因导致的MAP进行分析,结果显示胆源性病因患者急性肝损害发生率显著高于其他病因,而胆源性组患者各项肝功能指标均显著高于非胆源性组,提示胆源性组肝损害严重程度更高,提示胆道疾病为诱发急性肝损害的重要危险因素^[14]。本研究结果还显示,伴有急性肝损害的患者入

院时血糖异常发生率较高,这与肝功能受损后可导致糖代谢异常有关,但血糖异常与急性肝损害之间是否存在必然联系尚不能做结论^[15]。

从伴发急性肝损害患者的转归情况来看,多数患者随原发病好转于出院前1-3 wk内肝功能各项指标恢复正常,其余患者经保肝、护肝治疗,出院后1-2 wk内肝功能各项指标恢复正常。提示对MAP并急性肝损伤的临床治疗以治疗原发病为主,一般无需进行肝脏特殊治疗,对少数高龄患者或肝功能受损严重者可采取保肝、护肝治疗^[16]。

总之,MAP患者发病初期即可出现肝损害,可引起MAP患者病程延长,肝功能可随原发病好转逐渐恢复,高龄、胆源性、高脂血性、高血糖和腹膜刺激征等均为引发肝损害的危险因素,掌握MAP并急性肝损害的临床特点对临床治疗具有重要意义。

4 参考文献

- 1 卢世云, 潘秀珍. 重症急性胰腺炎发病机制研究现状. 世界华人消化杂志 2011; 19: 2421-2425
- 2 周琳, 欧阳资武, 付祖姣, 周江, 李敏, 李子博. 急性胰腺炎伴肝损伤的临床分析. 国际检验医学杂志 2013; 34: 412-414
- 3 朱应乾, 武建林, 刘宇飞. 急性胰腺炎合并肝损害114例临床分析. 海南医学 2011; 22: 70-71
- 4 王兴鹏, 李兆申, 袁耀宗, 杜奕奇, 曾悦. 中国急性胰腺炎诊治指南(2013,上海). 中国实用内科杂志 2013; 33: 530-535
- 5 Del Val Antónana A, Blé Caso M, Higón Ballester MD, Ortuño Cortés JA. Lacosamide-induced Acute Pancreatitis With Positive Rechallenge Test. *J Clin Gastroenterol* 2014; 48: 651 [PMID: 24859711]
- 6 朱桂丽, 王桂林, 邢建强. 急性胰腺炎并肝损害35例比较分析. 华西医学 2009; 24: 3182
- 7 Popa D. Treatment in severe acute pancreatitis--still a reason of debate. *J Med Life* 2013; 6: 486-490 [PMID: 24868268]
- 8 陈勇, 曾艳凌, 林志辉. 早期肝功能损害对急性胰腺炎病因判定的临床价值. 世界华人消化杂志 2012; 20: 3390-3393
- 9 Babu RY, Gupta R, Kang M, Bhasin DK, Rana SS, Singh R. Predictors of surgery in patients with severe acute pancreatitis managed by the step-

- up approach. *Ann Surg* 2013; 257: 737-750 [PMID: 22968079 DOI: 10.1097/SLA.0b013e318269d25d]
- 10 黄厚章, 马长青, 赵家林, 张建浦, 周晓祥, 张国秀. 急性胰腺炎合并急性肝损害128例分析. *现代生物医学进展* 2010; 10: 2530-2532
- 11 Zaheer A, Singh VK, Qureshi RO, Fishman EK. The revised Atlanta classification for acute pancreatitis: updates in imaging terminology and guidelines. *Abdom Imaging* 2013; 38: 125-136 [PMID: 22584543 DOI: 10.1007/s00261-012-9908-0]
- 12 曹炳清. 急性胰腺炎伴肝功能损害30例临床分析. *四川医学* 2009; 30: 1293-1294
- 13 Zhang J, Shahbaz M, Fang R, Liang B, Gao C, Gao H, Ijaz M, Peng C, Wang B, Niu Z, Niu J.. Comparison of the BISAP scores for predicting the severity of acute pancreatitis in Chinese patients according to the latest Atlanta classification. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 2014 May 22. [Epub ahead of print] [PMID: 24850587 DOI: 10.1002/jhbp.118]
- 14 朱月香, 李华, 朱月明, 崔书君, 张志林, 朱烨然, 王军. 急性胰腺炎所致肝脏损害的CT表现. *河北医药* 2010; 32: 2671-2673
- 15 Kawabe K, Ueno S. A case of acute pancreatitis associated with risperidone treatment. *Clin Psychopharmacol Neurosci* 2014; 12: 67-68 [PMID: 24851124 DOI: 10.9758/cpn.2014.12.1.67]
- 16 Jo IJ, Bae GS, Choi SB, Kim DG, Shin JY, Seo SH, Choi MO, Kim TH, Song HJ, Park SJ. Fisetin attenuates cerulein-induced acute pancreatitis through down regulation of JNK and NF- κ B signaling pathways. *Eur J Pharmacol* 2014; 737: 149-158 [PMID: 24861022 DOI: 10.1016/j.ejphar.2014.05.018]

■同行评价

本文结果实用, 结论明确, 有一定的参考价值.

编辑 田滢 电编 闫晋利



胰十二指肠切除术的开腹和微创手术方法疗效的比较

李瑞阳, 黄强, 林先盛, 刘臣海, 杨骥, 胡俊, 汪超

■背景资料

胰十二指肠切除术(pancreaticoduodenectomy, PD)作为腹部外科最大的手术,是壶腹部周围肿瘤和某些良性疾病的标准术式,目前的手术方式主要是开腹手术,随着科学技术的发展,腹腔镜和微创手术逐渐成为未来手术的发展方向,微创手术和开腹手术各有优缺点,存在争议,目前尚无相关系统评价对两种手术方式进行比较。

李瑞阳, 黄强, 林先盛, 刘臣海, 杨骥, 胡俊, 汪超, 安徽医科大学附属医院肝胆胰外科 安徽省重点实验室 安徽省合肥市 230001

李瑞阳,在读硕士,主要从事胆胰外科的研究。

作者贡献分布: 李瑞阳与杨骥负责文献检索、文献质量评价、提取资料及论文撰写; 刘臣海、林先盛、胡俊及汪超负责论文的数据分析及文献审核; 黄强教授负责论文的审阅及修改。

通讯作者: 黄强,教授, 230001, 安徽省合肥市庐江路17号, 安徽医科大学附属医院肝胆胰外科, 肝胆胰安徽省重点实验室。hq-sohu@sohu.com

电话: 0551-62281790

收稿日期: 2014-06-08 修回日期: 2014-06-25

接受日期: 2014-07-05 在线出版日期: 2014-08-28

Efficacy and safety of minimally invasive pancreaticoduodenectomy vs open pancreaticoduodenectomy: A systematic review and meta-analysis

Rui-Yang Li, Qiang Huang, Xian-Sheng Lin, Chen-Hai Liu, Ji Yang, Jun Hu, Chao Wang

Rui-Yang Li, Qiang Huang, Xian-Sheng Lin, Chen-Hai Liu, Ji Yang, Jun Hu, Chao Wang, Department of Bile Pancreatic Surgery, Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hepato-biliary and Pancreatic Laboratory of Anhui Province, Hefei 230001, Anhui Province, China

Correspondence to: Qiang Huang, Professor, Department of Bile Pancreatic Surgery, Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hepato-biliary and Pancreatic Laboratory of Anhui Province, 17 Lujiang Road, Hefei 230001, Anhui Province, China. hq-sohu@sohu.com

Received: 2014-06-08 Revised: 2014-06-25

Accepted: 2014-07-05 Published online: 2014-08-28

Abstract

AIM: To evaluate the safety and efficacy between minimally invasive pancreaticoduodenectomy and open pancreaticoduodenectomy.

METHODS: Medline, EMBASE, Science Direct and Springer link databases (till March 31, 2014) were searched by computer to collect the articles that compared the efficacy and safety of minimally invasive pancreaticoduodenectomy vs open pancreaticoduodenectomy. The trials were selected according to the inclusive and exclusive criteria, and the quality of the included trials was assessed. The data were extracted and ana-

lyzed using RevMan 5.2.7 software.

RESULTS: A total of 8 articles were included in the present meta-analysis. The meta-analysis showed that there were no significant differences in perioperative complications, mortality, pancreatic fistula, delayed gastric empty, postoperative hemorrhage, reoperation, mortality or R0 resection rate between the minimally invasive pancreaticoduodenectomy group and open pancreaticoduodenectomy group ($P > 0.05$). There were significant differences in operative time, estimated blood loss and length of hospital stays between the two groups ($P < 0.05$).

CONCLUSION: This meta-analysis indicates that minimally invasive pancreaticoduodenectomy is associated with shorter hospital stay and less estimated blood loss compared with open surgery, although there are no differences in preoperational complications or postoperative pathological diagnosis. Minimally invasive approach can be a reasonable alternative to laparotomy pancreaticoduodenectomy with potential advantages. Nevertheless, future large-volume, well-designed randomized control trials with extensive follow-up are awaited to confirm and update the findings of this analysis.

© 2014 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: Pancreaticoduodenectomy; Laparoscopic; Robotic; Minimally invasive; Meta-analysis

Li RY, Huang Q, Lin XS, Liu CH, Yang J, Hu J, Wang C. Efficacy and safety of minimally invasive pancreaticoduodenectomy vs open pancreaticoduodenectomy: A systematic review and meta-analysis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(24): 3690-3698 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/3690.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i24.3690>

摘要

目的: 探讨胰十二指肠切除术(pancreaticoduodenectomy, PD)的开腹行PD(open pancreaticoduodenectomy, OPD)和微创手术(minimally invasive pancreaticoduodenectomy,

■同行评议者

薛东波, 教授, 哈尔滨医科大学附属医院第一医院

MIPD)的疗效的对比。

方法: 计算机检索在2014-03-31前在Medline、EMBASE、Science Direct、Springer link公开发关于PD的开腹和微创手术方法的疗效的文献, 按纳入排除标准由2位研究者独立进行文献筛选、资料提取和方法学质量评价后, 采用RevMan5.2.7软件进行Meta分析。

结果: 共纳入8篇文献进行系统评价, 包含MIPD 204例, OPD 419例。Meta分析结果显示: MIPD和OPD在术后围手术期并发症发生率、胰瘘发生率、术后胃排空障碍、胆瘘、术后出血、再手术、病死率及R0切除方面的差异无统计学意义($P>0.05$); 在手术时间、术中出血量及术后住院时间的差异有统计学意义($P<0.05$)。

结论: MIPD能减少PD术后住院时间和术中出血量, 且围手术期并发症和术后病理诊断与传统的OPD基本无差异, 可以作为胰十二指肠切除术的常规术式, 值得临床的推广, 未来仍需要大样本、多中心、前瞻性随机对照的高质量临床研究来进一步验证。

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词: 胰十二指肠切除术; 腹腔镜; 机器人; 微创技术; 系统评价

核心提示: 本研究发现, 在围手术期并发症发生率、胰瘘发生率、术后胃排空障碍、胆瘘、术后出血、再手术以及病死率方面, 微创手术和传统开腹手术基本无差异。在术后病理诊断方面, 手术的R0切除率的差异也无统计学意义, 说明微创胰十二指肠切除术(pancreaticoduodenectomy, PD)的安全性和有效性和传统的开腹PD(open pancreaticoduodenectomy)差异不大。

李瑞阳, 黄强, 林先盛, 刘臣海, 杨骥, 胡俊, 汪超. 胰十二指肠切除术的开腹和微创手术方法疗效的比较. 世界华人消化杂志 2014; 22(24): 3690-3698 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/3690.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v22.i24.3690>

0 引言

自从1935年, Whipple等^[1]开展世界上第一例胰十二指肠切除术(pancreaticoduodenectomy, PD)后, PD即作为壶腹部周围肿瘤和某些良性疾病的标准术式, 现已经被各级医院广泛应用^[2-4]。目前最常见的术式是开腹行PD(open pancreatico-

duodenectomy, OPD), 但术后创伤较大, 且并发症较高^[3], 遂出现微创手术, 目前腔镜外科已经广泛地应用外科手术领域, 世界上第1例报道的腹腔镜胰十二指肠切除术(laparoscopic pancreaticoduodenectomy, LPD)在1994年^[5], 紧接着2003年出现了机器人胰腺切除术(robotic pancreatotomy)^[6]和机器人胰十二指肠切除术(robotic PD)^[7]。微创手术(minimally invasive pancreaticoduodenectomy, MIPD)现在已经成为目前的发展方向。与传统的开放性手术相比, 微创手术更能降低患者术后的疼痛、恢复更快等。目前对于传统开放手术和微创手术的选择, 存在着争议性, 并且已有相关病例对照研究比较MIPD和OPD的优缺点, 且病例数较少, 多为单中心研究, 为进一步明确两种手术的可行性和优缺点, 我们应用系统评价的方法评价两种手术的疗效和安全性的差异, 为临床提供循证医学证据。

1 材料和方法

1.1 材料 计算机检索在2014-03-31前在Medline、EMBASE、Science Direct、Springer link公开发关于胰十二指肠切除术的开腹和微创手术方法的疗效的英文临床对照文献。检索策略: 按照Cochrane协作网手册要求制定检索策略: 检索词为: “laparoscopic pancreaticoduodenectomy”、“duodenopancreatectomy”、“minimally invasive pancreaticoduodenectomy”、“robotic pancreaticoduodenectomy”, 并对以上检索词采用不同策略检索, 并追查已经纳入文献或者综述文献的参考文献以尽可能全面收集资料。

1.2 方法

1.2.1 文献纳入标准: (1)纳入研究应是2014-03-31前公开发表的英文文献; (2)文献中需要包含MIPD(本研究MIPD包括: 腹腔镜辅助胰十二指肠切除术、全腹腔镜下胰十二指肠切除术、机器人辅助胰十二指肠切除术、全机器人胰十二指肠切除术)和OPD组的基本情况和围手术期的相关指标的比较; (3)文献设计类型应是队列研究、病例对照研究或者随机对照研究; (4)前瞻性研究和回顾性研究予以纳入; (5)关于术后并发症的比较时需交代术后并发症的诊断标准。

1.2.2 文献排除标准: (1)无相关对比研究的研究; (2)方法学交代不健全的研究, 资料不全的研究, 重复发表或重复利用数据的研究取其中之一

■ 研发前沿

由于目前尚无文献系统性文献来评价微创小切口行胰十二指肠切除术和传统开腹胰十二指肠切除术的优缺点, 因此本文应用循证医学的方法来比较两种不同术式的差异性, 为临床选择提供证据。

■ 相关报道

目前认为,开腹胰十二指肠切除术安全性较高,但术后的创伤大、高并发症等特点使之成为腹部外科难度最大的手术之一,随着科学技术的发展,微创手术,如腹腔镜胰十二指肠切除术、机器人辅助胰十二指肠切除术等,其术后创伤较小,术后生存质量高等特点,这是目前外科手术的发展方向。

表 1 纳入文献的基本情况

纳入文献	国家	实验设计	纳入病例数(n)	
			微创组(LP/R)	开腹(OPD)
Cho等 ^[14] 2009	日本	前瞻性研究	LAPD: 15	OPD: 15
Buchs等 ^[15] 2011	美国	回顾性研究	RTPD: 44	OPD: 39
Zhou等 ^[16] 2011	中国	前瞻性研究	RTPD: 8	OPD: 8
Zureikat等 ^[17] 2011	美国	回顾性研究	LTPD: 14	OPD: 14
Kuroki等 ^[18] 2012	日本	回顾性研究	LAPD: 20	OPD: 31
Chalikonda等 ^[19] 2012	美国	前瞻性研究	RAPD: 30	OPD: 30
Lai等 ^[20] 2012	中国香港	前瞻性研究	RAPD: 20	OPD: 67
Asbun等 ^[21] 2012	美国	前瞻性研究	LTPD: 53	OPD: 215
合计			204	419

LAPD: 腹腔镜辅助胰十二指肠切除术; OPD: 开腹胰十二指肠切除术; RAPD: 机器人辅助胰十二指肠切除术; RTPD: 全机器人胰十二指肠切除术; LTPD: 全腹腔镜胰十二指肠切除术。

一,其他的不予纳入;(3)文献中未给出相关变量或指标说明或评价手术组和内镜组疗效的区别;(4)试验设计缺乏严格对照的文献、综述文献、个案报道等不予以纳入;(5)文献全文语言非英文书写的不予以纳入。

1.2.3 文献筛选及资料提取:严格按照Cochrane协作组的系统评价文献筛选规范^[8]和Meta分析报告规范PRISMA标准进行文献筛选^[9],由两位研究者独立阅读文献进行筛选,整个筛选过程采用盲法。先独立阅读所获文献的题目及摘要,剔除明显不符合纳入标准的文献,再对可能符合纳入标准的文献阅读全文,以确定该文献是否真正符合纳入标准。对筛选过程中有分歧而难以确定是否纳入的文献通过讨论或由第三个研究者决定其是否纳入。两位研究人员独立地对符合纳入标准的试验进行资料提取(第一作者、发表年限、人群构成、研究类型等),再填写资料提取表格,并交叉核对提取的资料,缺乏的资料通过临床试验的通讯作者联系予以补充。

1.2.4 文献质量评估:因该主题缺乏随机对照文献,均为病例对照研究和队列研究,故采用NOS量表(modified Newcastle-Ottawa scale)^[10-13],具体包含病例的选择、组间的可比性和术后并发症的评价。评分分为0-9分,其中≥6分视为高质量文献。

统计学处理 本文采用Cochrane协作网提供的RevMan5.2.7软件进行统计学分析。显著性水平设定为 $P = 0.05$,用 I^2 评估异质性大小, $I^2 < 25\%$ 提示有轻度异质性, I^2 在25%-75%之间提示中度异质性, $I^2 > 75\%$ 以上则提示明显异质性,若存在异质性则进行亚组分析或者敏感性分析。二项分

类资料计算相对危险度(relative risk, RR)为合并统计量,连续变量资料计算加权均数差(weighted mean difference, WMD)为合并统计量。统计结果用95%可信区间(confidence interval, CI)表示,以漏斗图(funnel plot model)判断发表偏倚。纳入研究进行异质性检验,异质性检验 $P > 0.05$ 时表示各研究间无明显异质性,此时合并分析采用固定效应模型,否则采用随机效应模型。

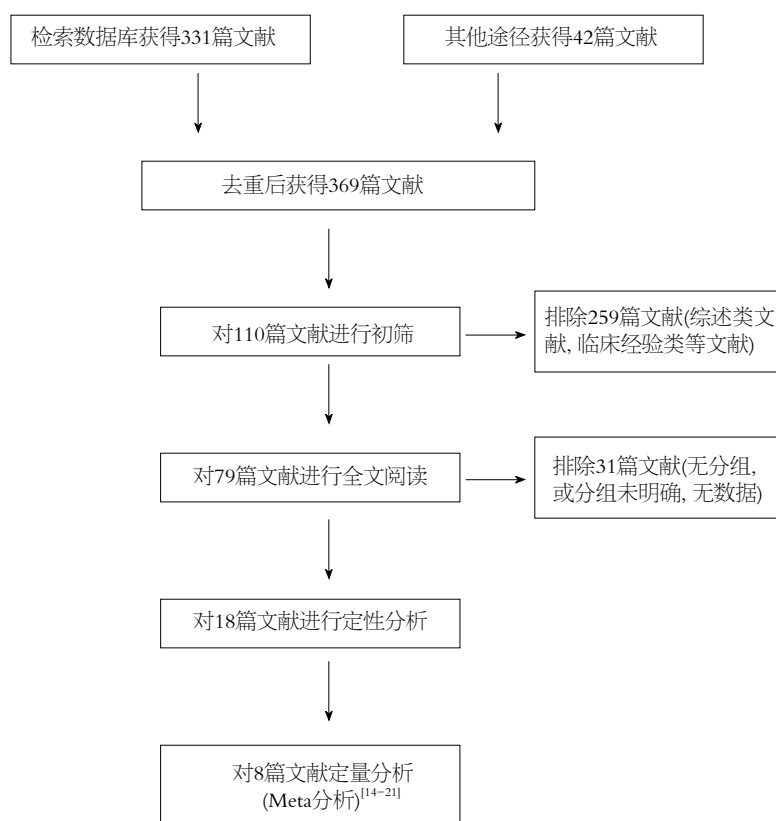
2 结果

2.1 文献筛选及纳入文献特点 经严格按照纳入排除标准筛选后,共纳入8篇研究^[14-21],纳入文献的基本情况详如表1。其中5篇文献为前瞻性临床对照研究^[14,16,19-21],3篇回顾性病例对照研究^[15,17,18],全组中共包含MIPD例数204例,OPD数419例。各研究中均交代两组之间的基本情况[年龄、性别、体质量指数(body mass index, BMI)指数:差异无统计学意义,具有可比性]和术后病理的具体情况。各研究组间一般因素的基本情况如表2。总文献筛选流程如图1。

2.2 纳入文献质量评价 严格按照NOS评分标准,按照标准中的病例的选择、组间的可比性分析和术后并发症的评价方面,对纳入文献进行综合评价,具体评分如表2,由表2可知,平均分数为5.75分,其中6分以上文献6篇,剩余2篇文献评分5分,主要是一般情况对比中未包含BMI以及ASA评分等。总体文献的质量较高。

2.3 胰十二指肠切除术微创术式和外科开腹术式的术后疗效的比较

2.3.1 MIPD和OPD围手术期相关并发症的比较:本组Meta分析中包含围手术期相关并发症(包括



■创新盘点

本文采用系统评价的方法将胰十二指肠切除术的两种手术方法做比较, 为临床的治疗方法的选择提供建议。

图 1 PRISMA文献筛选流程.

表 2 纳入研究的一般情况的比较

纳入文献	性别(男/女)		年龄(岁)		NOS评分
	微创组	开腹组	微创组	开腹组	
Cho等 ^[14] 2009	9/6	8/7	64.0 ± 10.0	68.0 ± 9.0	5
Buchs等 ^[15] 2011	22/22	14/25	63.0 ± 13.5	56.0 ± 15.8	5
Zhou等 ^[16] 2011	3/5	4/4	69.2 ± 15.1	68.0 ± 12.1	6
Zureikat等 ^[17] 2011	11/3	7/7	69.8 ± 10.2	67.4 ± 11.0	6
Kuroki等 ^[18] 2012	11/9	21/10	71.2 ± 8.8	73.5 ± 7.3	5
Chalikonda等 ^[19] 2012	16/14	16/14	62.6 ± 6.75	61.1 ± 7.75	6
Lai等 ^[20] 2012	12/8	29/38	66.4 ± 11.9	62.1 ± 12.1	6
Asbun等 ^[21] 2012	29/24	95/120	62.9 ± 14.14	67.3 ± 11.53	7

围手术期总并发症、术后胰瘘、术后胃排空障碍、术后出血发生率、术后胆瘘、再手术、病死率)的比较, MIPD和OPD术后相关并发症的比较的Meta分析如表3. 其中围手术期并发症发生率的森林图如图2, 术后胰瘘的发生率比较的森林图如图3. 由表3可知: MIPD与OPD比较, 围手术期并发症发生率、胰瘘发生率、术后胃排空障碍、胆瘘、术后出血、再手术以及病死率的差异无统计学意义($P>0.05$), 说明MIPD并不能减少围手术期相关并发症的发生率. 其中围手术期总并发症的比较的漏斗图如图4, 从图4可

以看出, 漏斗基本对称, 说明纳入文献的偏倚较少, 对结果影响较小.

2.3.2 微创手术和开放手术手术时间、术中出血量和术后住院时间的比较: MIPD和OPD手术在术中手术时间、术中出血和术后住院时间的比较的Meta分析如表4. 其中手术时间和术后住院时间的比较的森林图如图5, 6.

由表4可知: MIPD和OPD在术中出血, 手术时间以及术后住院时间的差异有统计学意义($P<0.05$). MIPD组在术中出血和术后住院时间较OPD时间短, 差异有统计学意义. 说明微创手

■应用要点

本研究提示,微创小切口胰十二指肠切除术能显著减少术后的住院时间和术中出血量,术后生存率较高,且其围手术期并发症和术后病理诊断与传统开腹手术差异不大,可以作为胰十二指肠切除术的常规手术方式,值得临床推广。

表 3 MIPD和OPD围手术期相关并发症的Meta分析

比较项目	纳入文献	MIPD	OPD	异质性检验		OR/WMD(95%CI)	
				I ² (%)	P值	95%CI	P值
围手术期并发症	14-21	204	419	45	0.08	0.73(0.51-1.06)	0.10
胰瘘	14-21	204	419	0	0.86	1.07(0.69-1.66)	0.77
胃排空障碍	14-21	204	419	0	0.90	0.90(0.49-1.68)	0.75
胆瘘	15-17, 20, 21	139	343	4	0.38	0.93(0.35-2.49)	0.89
出血	14-17, 20, 21	164	358	0	0.83	1.31(0.62-2.76)	0.45
再手术	15-17, 19-21	169	373	0	0.53	0.56(0.26-1.20)	0.14
病死率	15-17, 19-21	169	373	0	0.81	0.89(0.38-2.07)	0.78

OPD: 开腹胰十二指肠切除术; MIPD: 微创手术。

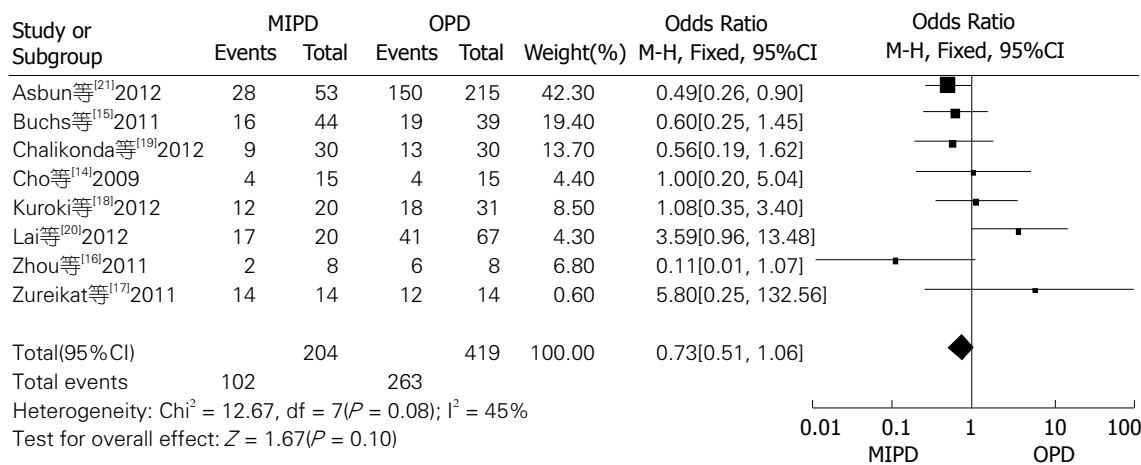


图 2 围手术期并发症的森林图。OPD: 开腹胰十二指肠切除术; MIPD: 微创手术。

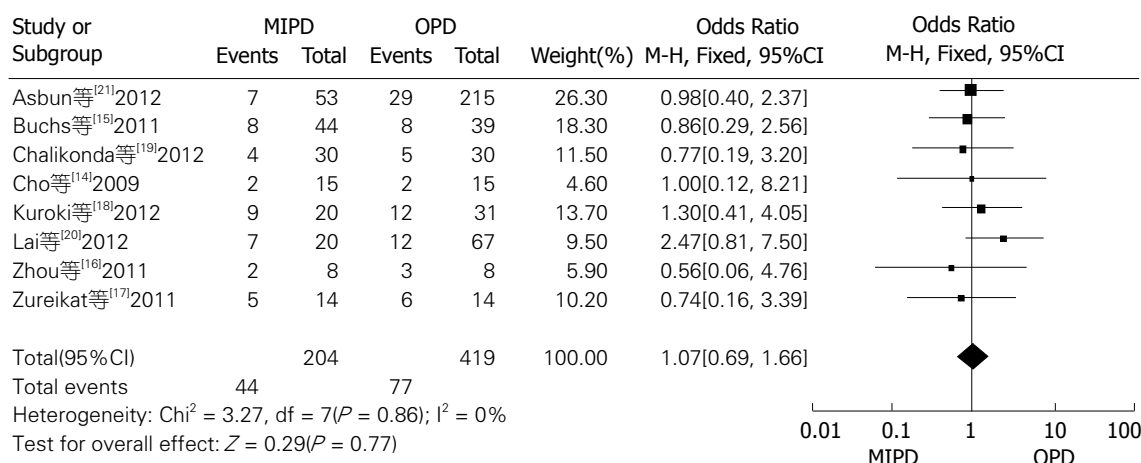


图 3 术后胰瘘比较的森林图。OPD: 开腹胰十二指肠切除术; MIPD: 微创手术。

术可以显著地缩短手术对于机体的打击和术中出血较少。而MIPD组手术时间较长($P > 0.05$)。

2.3.3 MIPD和OPD术后病理的比较: MIPD和OPD手术在术后标本病理的比较(包括手术的R0切除率和手术标本的淋巴结数目)分析如表5。

其中术后淋巴结数目的森林图如图7。由表5可知,术后病例的R0切除率和术后标本淋巴结数目的差异无统计学意义,即是术后标本切除对于病理学检查无统计学意义。手术方式对于术后诊断无明显差异。

表 4 MIPD和OPD术中出血、手术时间和术后住院时间比较的Meta分析

比较项目	纳入文献	MIPD	OPD	异质性检验		WMD	
				I ² (%)	P值	95%CI	P值
手术时间	14-21	204	419	94	<0.0001	99.72(20.72, 178.73)	0.01
术中出血	14-16, 18-21	190	405	94	<0.0001	-393.75(-714.84, -72.30)	0.02
术后住院时间	14-16, 20, 21	140	344	86	<0.0001	-4.26(-7.85, -0.68)	0.02

MIPD: 微创小切口胰十二指肠切除术; OPD: 开腹胰十二指肠切除术。

表 5 MIPD和OPD术后病理的比较

比较项目	纳入文献	MIPD	OPD	异质性检验		WMD	
				I ² (%)	P值	95%CI	P值
R0切除率	14, 16, 17, 19-21	153	297	0	0.51	2.29(-0.55, 5.13)	0.51
标本淋巴结数目	14-17, 19-21	168	312	62	0.01	1.92(-0.32, 4.17)	0.09

OPD: 开腹胰十二指肠切除术; MIPD: 微创手术。

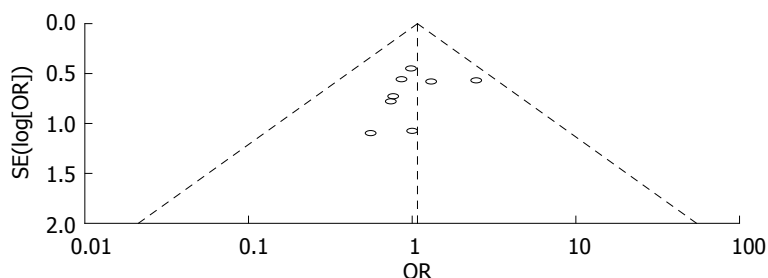


图 4 各纳入研究漏斗图. OR: 比值比。

3 讨论

随着近年来, 腹腔镜技术的进步, 目前微创外科已成为腹部外科的主要的发展方向, 尤其是在胰腺手术方面^[22], 目前胰十二指肠切除术是腹腔镜外科手术中难度最大的手术, 目前国内开展的较少, 且可行性和安全性受到争议^[23], 目前的微创PD包括: 腹腔镜(辅助)胰十二指肠切除术、机器人(辅助)胰十二指肠切除术。本文即使用系统评价的方法, 来进一步明确胰十二指肠切除术的微创和传统开腹手术的区别。系统评价结果显示: MIPD在围手术期并发症发生率、胰瘘发生率、术后胃排空障碍、胆瘘、术后出血、再手术以及病死率方面和OPD比较差异无统计学意义($P>0.05$), 且术后标本的病理诊断和R0切除率的差异无统计学意义($P>0.05$)。但是MIPD术中出血较传统的OPD少, 差异有统计学意义($P<0.05$), 术后住院时间也较传统的OPD手术短($P<0.05$)。OPD的手术时间较MIPD短($P<0.05$)。

通过本研究可知, 在围手术期并发症发生

率、胰瘘发生率、术后胃排空障碍、胆瘘、术后出血、再手术以及病死率方面, 微创手术和传统开腹手术基本无差异($P>0.05$)。在术后病理诊断方面, 手术的R0切除率的差异也无统计学意义, 这说明微创PD的安全性和有效性和传统的开腹PD差异不大。这也是微创PD得以普及的原因之一, 但是MIPD的主要缺点是手术时间较长($P<0.05$), 这主要是因为腹腔镜下操作的灵活性明显较开放手术下降, 镜头易被污染, 且一旦出血时止血困难, 腹腔镜下的缝合难度亦较大; 单个镜头视野涵盖结构少, 病灶难以辨别; 而且缺乏触觉, 无法提供更全面的探查信息等^[23-26]。这些缺点可能影响了MIPD的效率, 在使用相关器械时可能会减少手术中的困难(如出血等), 但是会增加手术的费用^[27-30]。本研究也显示: MIPD手术的术中出血量较少, 术后的住院时间显著减少, 患者的生活质量随之提高。术后住院时间较短、切口较小、手术出血较少、术后生活质量高等是微创胰十二指肠切除术的优点,

■名词解释

微创小切口胰十二指肠切除术(minimally Invasive pancreaticoduodenectomy, MIPD): 应用微创切口方式进行胰十二指肠切除术, 目前主要包含全腹腔镜下胰十二指肠切除术、腹腔镜辅助胰十二指肠切除术、全机器人胰十二指肠切除术、机器人辅助胰十二指肠切除术。

■同行评价

本文通过循证医学的方法来探讨胰十二指肠切除术的两种手术方式的比较, 理论依据及临床论证充足, 有统计价值, 有临床应用价值。

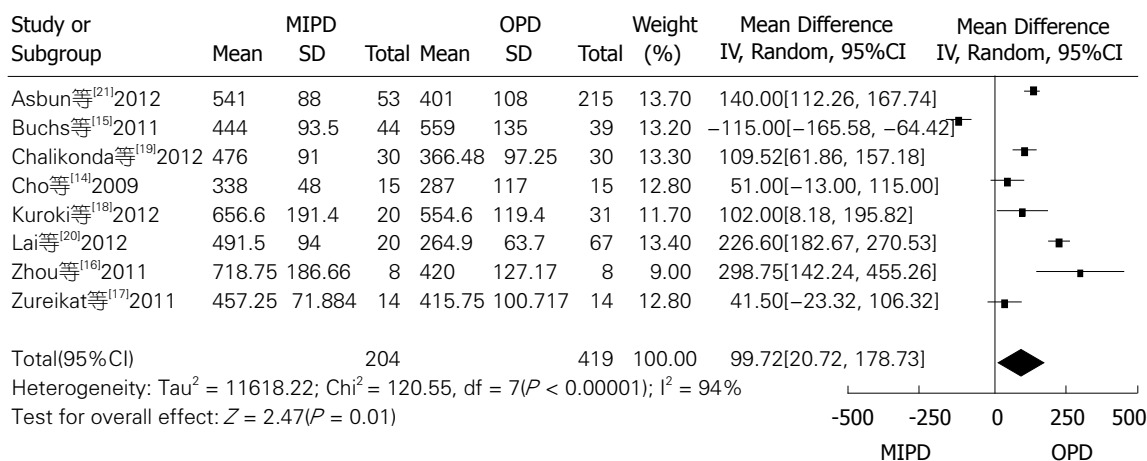


图 5 MIPD组和OPD组手术时间比较的森林图。OPD: 开腹胰十二指肠切除术; MIPD: 微创手术。

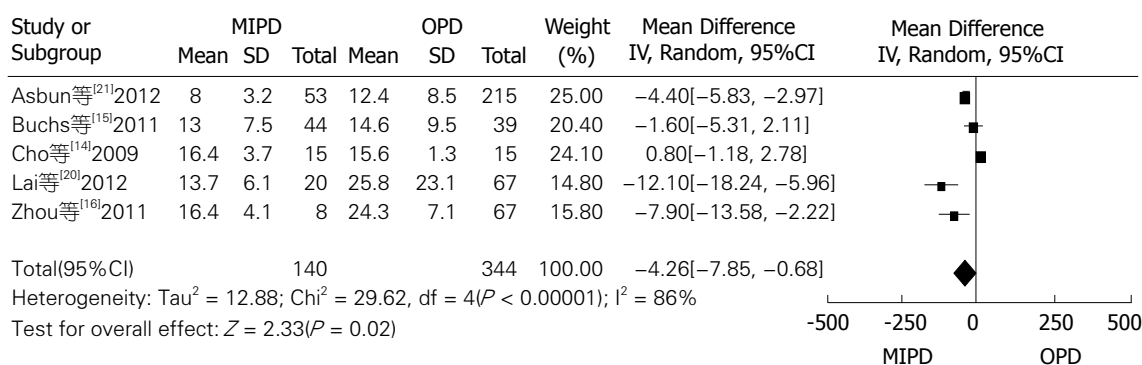


图 6 MIPD组和OPD组术后住院时间比较的森林图。OPD: 开腹胰十二指肠切除术; MIPD: 微创手术。

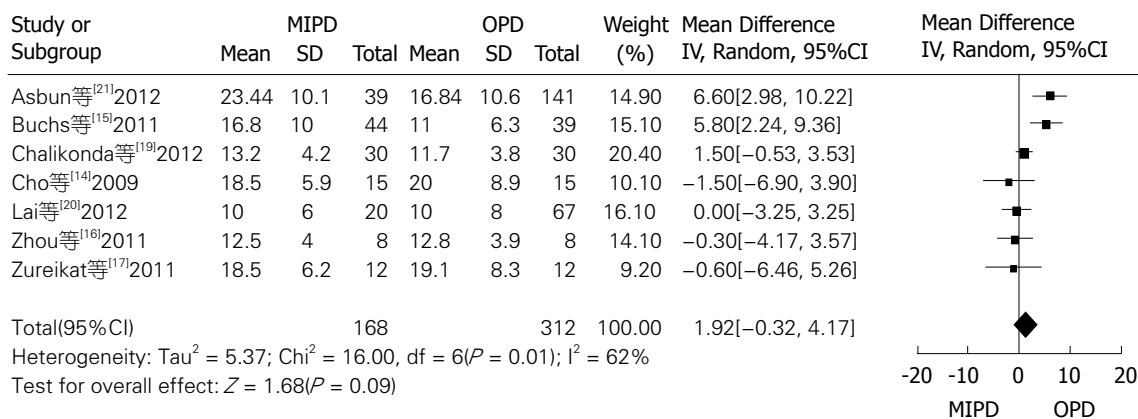


图 7 MIPD和OPD术后病理学标本的比较。OPD: 开腹胰十二指肠切除术; MIPD: 微创手术。

另外加上术后的并发症和病死率等方面与传统的开腹手术差异不大, 微创胰十二指肠切除术值得临床推广。

系统评价作为一种观察性研究^[31], 有一定的局限性: (1)对于本研究的主要的局限性是因为缺乏随机对照研究, 所有纳入的研究均为临床病例对照研究, 因此可能无法提供强有力的数据来说明相关结果; (2)另外本文的局限性有于

纳入不同国家地区的研究, 因此纳入研究的研究对象的差异不可避免, 存在选择偏倚, 参加对象的人群特征如发病率等不同, 和腹腔镜的技术和操作者的技术经验也不尽相同, 这可能影响了试验的结果; (3)纳入研究的病例数较少, 这也会影响数据的可靠性; (4)由于本文的纳入文献选择仅为英文文献, 可能存在文献选择的偏倚, 影响试验结果; (5)纳入文献未介绍了相关的

预后和随访, 这也可能影响 试验结果。

总之, 微创外科手术已经成为目前腹部外科的主要发展方向, 因此基于目前的研究结果, MIPD能减少PD术后住院时间和术中出血量, 且术后并发症和术后病理诊断与传统的OPD基本无差异, 可以作为胰十二指肠切除术的常规术式, 值得临床的推广。但是未来仍需要大样本、多中心、前瞻性随机对照试验、包含预后的高质量的关于PD的微创和开腹手术的研究。

4 参考文献

- Whipple AO, Parsons WB, Mullins CR. TREATMENT OF CARCINOMA OF THE AMPULLA OF VATER. *Ann Surg* 1935; 102: 763-779 [PMID: 17856666 DOI: 10.1097/00000658-193510000-00023]
- Cameron JL, Pitt HA, Yeo CJ, Lillemoe KD, Kaufman HS, Coleman J. One hundred and forty-five consecutive pancreaticoduodenectomies without mortality. *Ann Surg* 1993; 217: 430-435; discussion 435-438 [PMID: 8098202 DOI: 10.1097/00000658-199305010-00002]
- Winter JM, Cameron JL, Campbell KA, Arnold MA, Chang DC, Coleman J, Hodgin MB, Sauter PK, Hruban RH, Riall TS, Schulick RD, Choti MA, Lillemoe KD, Yeo CJ. 1423 pancreaticoduodenectomies for pancreatic cancer: A single-institution experience. *J Gastrointest Surg* 2006; 10: 1199-1210; discussion 1210-1211 [PMID: 17114007 DOI: 10.1016/j.gassur.2006.08.018]
- McPhee JT, Hill JS, Whalen GF, Zayaruzny M, Litwin DE, Sullivan ME, Anderson FA, Tseng JF. Perioperative mortality for pancreatotomy: a national perspective. *Ann Surg* 2007; 246: 246-253 [PMID: 17667503 DOI: 10.1097/01.sla.0000259993.17350.3a]
- Gagner M, Pomp A. Laparoscopic pylorus-preserving pancreatoduodenectomy. *Surg Endosc* 1994; 8: 408-410 [PMID: 7915434 DOI: 10.1007/BF00642443]
- Melvin WS, Needleman BJ, Krause KR, Ellison EC. Robotic resection of pancreatic neuroendocrine tumor. *J Laparoendosc Adv Surg Tech A* 2003; 13: 33-36 [PMID: 12676019 DOI: 10.1089/109264203321235449]
- Giulianotti PC, Coratti A, Angelini M, Sbrana F, Cecconi S, Balestracci T, Caravaglios G. Robotics in general surgery: personal experience in a large community hospital. *Arch Surg* 2003; 138: 777-784 [PMID: 12860761]
- Higgins JPT, Green S. *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions*. Version 5.1.0. Oxford. UK: The Cochrane Collaboration, 2011: 115-135
- Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *Int J Surg* 2010; 8: 336-341 [PMID: 20171303]
- 张燕舞, 蒋朱明, 王杨, 张珍, 胡铁军. 与转化医学有关的临床研究质量及研究报告质量的评价工具. *中华临床营养杂志* 2011; 19: 1-6
- Taggart DP, D'Amico R, Altman DG. Effect of arterial revascularisation on survival: a systematic review of studies comparing bilateral and single internal mammary arteries. *Lancet* 2001; 358: 870-875 [PMID: 11567701 DOI: 10.1016/S0140-6736(01)06069-X]
- 郭新峰, 温泽淮, 老膺荣, 赖世隆. 临床试验质量评价工具及其应用. *中国循证医学杂志* 2004; 4: 484-487
- Stang A. Critical evaluation of the Newcastle-Ottawa scale for the assessment of the quality of nonrandomized studies in meta-analyses. *Eur J Epidemiol* 2010; 25: 603-605 [PMID: 20652370 DOI: 10.1007/s10654-010-9491-z]
- Cho A, Yamamoto H, Nagata M, Takiguchi N, Shimada H, Kainuma O, Souda H, Gunji H, Miyazaki A, Ikeda A, Tohma T, Matsumoto I. Comparison of laparoscopy-assisted and open pylorus-preserving pancreaticoduodenectomy for periamпуляр disease. *Am J Surg* 2009; 198: 445-449 [PMID: 19342003 DOI: 10.1016/j.amjsurg.2008.12.025]
- Buchs NC, Addeo P, Bianco FM, Ayloo S, Benedetti E, Giulianotti PC. Robotic versus open pancreaticoduodenectomy: a comparative study at a single institution. *World J Surg* 2011; 35: 2739-2746 [PMID: 21947494 DOI: 10.1007/s00268-011-1276-3]
- Zhou NX, Chen JZ, Liu Q, Zhang X, Wang Z, Ren S, Chen XF. Outcomes of pancreatoduodenectomy with robotic surgery versus open surgery. *Int J Med Robot* 2011; 7: 131-137 [PMID: 21412963 DOI: 10.1002/rcs.380]
- Zureikat AH, Breaux JA, Steel JL, Hughes SJ. Can laparoscopic pancreaticoduodenectomy be safely implemented? *J Gastrointest Surg* 2011; 15: 1151-1157 [PMID: 21538192 DOI: 10.1007/s11605-011-1530-x]
- Kuroki T, Adachi T, Okamoto T, Kanematsu T. A non-randomized comparative study of laparoscopy-assisted pancreaticoduodenectomy and open pancreaticoduodenectomy. *Hepatogastroenterology* 2012; 59: 570-573 [PMID: 21940382]
- Chalikonda S, Aguilar-Saavedra JR, Walsh RM. Laparoscopic robotic-assisted pancreaticoduodenectomy: a case-matched comparison with open resection. *Surg Endosc* 2012; 26: 2397-2402 [PMID: 22437947 DOI: 10.1007/s00464-012-2207-6]
- Lai EC, Yang GP, Tang CN. Robot-assisted laparoscopic pancreaticoduodenectomy versus open pancreaticoduodenectomy--a comparative study. *Int J Surg* 2012; 10: 475-479 [PMID: 22732431 DOI: 10.1016/j.ijsu.2012.06.003]
- Asbun HJ, Stauffer JA. Laparoscopic vs open pancreaticoduodenectomy: overall outcomes and severity of complications using the Accordion Severity Grading System. *J Am Coll Surg* 2012; 215: 810-819 [PMID: 22999327 DOI: 10.1016/j.jamcollsurg.2012.08.006]
- Briggs CD, Mann CD, Irving GR, Neal CP, Peterson M, Cameron IC, Berry DP. Systematic review of minimally invasive pancreatic resection. *J Gastrointest Surg* 2009; 13: 1129-1137 [PMID: 19130151 DOI: 10.1007/s11605-008-0797-z]
- 卢榜裕, 李建军. 腹腔镜胰十二指肠切除术的难点与对策. *腹腔镜外科杂志* 2011; 16: 164-166
- Corcione F, Pirozzi F, Cuccurullo D, Piccolboni D, Caracino V, Galante F, Cusano D, Sciuto A. Laparoscopic pancreaticoduodenectomy: experience of 22 cases. *Surg Endosc* 2013; 27: 2131-2136 [PMID: 23355144 DOI: 10.1007/s00464-012-2728-z]
- Nguyen KT, Zureikat AH, Chalikonda S, Bartlett DL, Moser AJ, Zeh HJ. Technical aspects of robotic-assisted pancreaticoduodenectomy (RAPD). *J Gastrointest Surg* 2011; 15: 870-875 [PMID: 21512900 DOI: 10.1007/s11605-010-1362-0]

- 26 Mesleh MG, Stauffer JA, Bowers SP, Asbun HJ. Cost analysis of open and laparoscopic pancreaticoduodenectomy: a single institution comparison. *Surg Endosc* 2013; 27: 4518-4523 [PMID: 23943116 DOI: 10.1007/s00464-013-3101-6]
- 27 Winer J, Can MF, Bartlett DL, Zeh HJ, Zureikat AH. The current state of robotic-assisted pancreatic surgery. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2012; 9: 468-476 [PMID: 22733352 DOI: 10.1038/nrgastro.2012.120]
- 28 Kang CM, Choi SH, Hwang HK, Lee WJ, Chi HS. Minimally invasive (laparoscopic and robot-assisted) approach for solid pseudopapillary tumor of the distal pancreas: a single-center experience. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 2011; 18: 87-93 [PMID: 20676697 DOI: 10.1007/s00534-010-0316-y]
- 29 Schmidt CM, Turrini O, Parikh P, House MG, Zyromski NJ, Nakeeb A, Howard TJ, Pitt HA, Lillemoe KD. Effect of hospital volume, surgeon experience, and surgeon volume on patient outcomes after pancreaticoduodenectomy: a single-institution experience. *Arch Surg* 2010; 145: 634-640 [PMID: 20644125 DOI: 10.1001/archsurg.2010.118]
- 30 D'Annibale A, Orsini C, Morpurgo E, Sovernigo G. [Robotic surgery: considerations after 250 procedures]. *Chir Ital* 2006; 58: 5-14 [PMID: 16729603]
- 31 Longnecker MP. Re: "Point/counterpoint: meta-analysis of observational studies". *Am J Epidemiol* 1995; 142: 779-782 [PMID: 7572950]

编辑 郭鹏 电编 闫晋利



二甲双胍联合米氮平治疗厌食症伴消化不良的临床疗效及对血清NE、5-HT和DA的影响

郑宗和, 杨淑青

郑宗和, 邹平县精神卫生中心 山东省滨州市 256200
杨淑青, 邹平县中医院 山东省滨州市 256200
郑宗和, 副主任医师, 主要从事厌食症的研究。
作者贡献分布: 本研究设计与治疗由郑宗和完成; 杨淑青协助参与。
通讯作者: 郑宗和, 副主任医师, 256200, 山东省邹平县黛西西路16号, 邹平县精神卫生中心. zhengzongheej@163.com
电话: 0543-4351064
收稿日期: 2014-07-06 修回日期: 2014-07-16
接受日期: 2014-07-31 在线出版日期: 2014-08-28

Metformin combined with mirtazapine for treatment of anorexia nervosa with dyspepsia: Clinical effect and impact on serum levels of norepinephrine, 5-hydroxy tryptamine and dopamine

Zong-He Zheng, Shu-Qing Yang

Zong-He Zheng, Mental Health Center of Zouping County, Binzhou 256200, Shandong Province, China
Shu-Qing Yang, Traditional Chinese Medicine Hospital of Zouping County, Binzhou 256200, Shandong Province, China
Correspondence to: Zong-He Zheng, Associate Chief Physician, Mental Health Center of Zouping County, 16 Daixi West Road, Zouping County, Binzhou 256200, Shandong Province, China. zhengzongheej@163.com
Received: 2014-07-06 Revised: 2014-07-16
Accepted: 2014-07-31 Published online: 2014-08-28

Abstract

AIM: To explore the clinical effect of metformin combined with mirtazapine in the treatment of anorexia nervosa (AN) with dyspepsia.

METHODS: One hundred AN patients with dyspepsia treated at our hospital were randomly divided into either an observation group or a control group ($n = 50$ for each group). The control group was treated with mirtazapine tablets, and the observation group was additionally given oral metformin on the basis of mirtazapine tablets. Gastric juice pH was compared between before and after treatment and between the

two groups. After 2, 6, and 12 wk of treatment, body weight changes, Hamilton depression scale (HAMD) score, and Hamilton anxiety scale (HAMA) score were compared between the two groups. Serum norepinephrine (NE), 5-hydroxy tryptamine (5-HT), dopamine (DA) and blood glucose levels were also compared.

RESULTS: Gastric juice pH increased significantly after treatment in both groups, and the increase was more significant in the observation group ($t = 5.658, P < 0.05$). After 2, 6, and 12 wk of treatment, body weight significantly increased in both groups compared with before treatment. After 6 and 12 wk of treatment, body weight was significantly lower in the observation group than in the control group ($t = 4.805, 4.864, P < 0.05$). After treatment, HAMA and HAMD scores decreased significantly, serum NE, 5-HT and DA levels significantly increased in both groups compared with before treatment ($t = 3.784, 4.315, 4.783, P < 0.05$). After treatment, fasting plasma glucose (FPG), glycated haemoglobin (HbA1c), and 2-h plasma glucose (2 h PG) tended to decrease in the observation group compared with before treatment and the control group, but the differences were not statistically significant ($P > 0.05$). TESS score and the incidence of adverse reactions showed no significant differences between the two groups ($P > 0.05$).

CONCLUSION: Metformin combined with mirtazapine can improve depressive symptoms and appetite in the treatment of AN, without obvious weight gain or hypoglycemia symptoms.

© 2014 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: Metformin; Mirtazapine; Anorexia nervosa; Blood glucose

Zheng ZH, Yang SQ. Metformin combined with mirtazapine for treatment of anorexia nervosa with dyspepsia: Clinical effect and impact on serum levels of norepinephrine, 5-hydroxy tryptamine and dopamine.

■背景资料

神经性厌食症 (anorexia nervosa, AN) 是一种进食障碍类的精神疾病, 属于精神科领域中“与心理因素相关的生理障碍”一类。调查显示约5%-15%的患者最后死于心脏并发症、多器官功能衰竭、继发感染、自杀等。

■同行评议者

王蒙, 副教授, 中国人民解放军第二军医大学附属东方肝胆外科医院肝外综合治疗一科

■研究前沿

AN的发病机制目前尚不完全清楚,有研究称导致该病的主要因素有神经生化、心理因素、遗传因素以及社会文化因素等。

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2014; 22(24): 3699-3704
URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/3699.asp>
DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v22.i24.3699>

摘要

目的: 探讨二甲双胍联合米氮平治疗神经性厌食症伴消化不良患者的临床疗效。

方法: 将邹平县精神卫生中心就诊的100例厌食症(anorexia nervosa, AN)伴消化不良患者随机分为观察组和对照组各50例,对照组口服米氮平片,观察组在对照组基础上口服二甲双胍片;比较两组患者治疗前后空腹胃液pH变化水平,治疗后2、6、12 wk患者体质量变化、汉密尔顿抑郁量表(Hamilton depression scale, HAMD)、汉密尔顿焦虑量表(Hamilton anxiety scale, HAMA)积分,并对患者血清去甲肾上腺素(norepinephrine, NE)、5-羟色胺(5-hydroxy tryptamine, 5-HT)、多巴胺(dopamine, DA)和血糖水平进行检测。

结果: 治疗后两组胃液pH均明显升高,其中观察组pH升高水平显著高于对照组,两组间差异具有统计学意义($t = 5.658, P = 0.000$)。治疗2、6、12 wk后两组患者体质量均开始增加,与治疗前相比差异具有统计学意义;其中治疗6、12 wk观察组患者体质量显著低于对照组($t = 4.805, 4.864, P < 0.05$)。治疗后两组患者HAMD、HAMA评分显著降低,血清NE、5-HT、DA水平显著增加,与治疗前相比差异具有统计学意义($t = 3.784, 4.315, 4.783, P < 0.05$)。治疗后观察组FPG、HbA1c、2 h PG有降低趋势,但是与治疗前和对照组相比差异无统计学意义;两组治疗后TESS评分、各不良反应发生情况相比差异无统计学意义。

结论: 二甲双胍联合米氮平治疗AN能够改善患者抑郁症状和食欲,且患者增重不明显,并未出现低血糖等状况,值得临床推广。

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词: 二甲双胍; 米氮平; 神经性厌食症; 血糖

核心提示: 本研究中,治疗后两组胃液pH均明显升高,其中观察组平均pH值为 5.6 ± 0.5 ,更接近理想胃内pH值($pH > 5.4$)的标准,说明二甲双胍联合米氮平显著提高患者的食欲,对控制厌食症起到显著的效果。二甲双胍能够调节脂肪分布方式,降低局部脂肪堆积,是传统肥胖治疗药物。在本研究中对神经性厌食症(anorexia nervosa)患者采用二

甲双胍联合米氮平治疗,结果显示治疗后两组患者密尔顿抑郁量表(Hamilton depression scale)、汉密尔顿焦虑量表(Hamilton anxiety scale)评分均显著降低,说明两组患者治疗后精神状态得到显著改善;治疗后两组患者血清去甲肾上腺素(norepinephrine)、5-羟色胺(5-hydroxy tryptamine)水平显著增加,进一步证实了上述结论。

郑宗和, 杨淑青. 二甲双胍联合米氮平治疗厌食症伴消化不良的临床疗效及对血清NE、5-HT和DA的影响. 世界华人消化杂志 2014; 22(24): 3699-3704 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/3699.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v22.i24.3699>

0 引言

神经性厌食症(anorexia nervosa, AN)是一种进食障碍类的精神疾病^[1],属于精神科领域中“与心理因素相关的生理障碍”一类。AN好发于13-20岁之间的年轻女性^[2],其主要特征是以强烈害怕体质量增加和发胖为特点的对体质量和体型的极度关注,盲目追求苗条,体质量显著减轻,常有营养不良、代谢和内分泌紊乱;严重患者可因极度营养不良而出现恶病质状态、机体衰竭从而危及生命;调查显示约5%-15%的患者最后死于心脏并发症、多器官功能衰竭、继发感染、自杀等^[3]。研究^[4]显示,约80%AN患者常伴有消化不良,而继发性的消化不良又会加重厌食。目前研究^[5]证实该病发病与5-羟色胺(5-hydroxy tryptamine, 5-HT)、去甲肾上腺素(norepinephrine, NE)、多巴胺(dopamine, DA)能异常有关,目前常用的治疗药物主要以NE和5-HT再摄取抑制剂米氮平等,具有一定的疗效。近年来有研究发现^[6]虽然米氮平改善厌食食欲明显增加,但一部分人增重太明显,部分患者担心肥胖不愿继续服用,限制了其临床应用。二甲双胍能够降低患者血糖水平,降低糖利用率,有利于控制患者体质量。本文采用米氮平联合二甲双胍治疗AN,在改善患者食欲过程中患者增重不明显,且不出低血糖,提高了患者的治疗依从性;现将治疗经验总结如下。

1 材料和方法

1.1 材料 选择2008-08/2013-08在邹平县精神卫生中心消化内科就诊的AN伴消化不良患者100例作为研究对象,男11例,女89例;年龄15-29岁,平均 19.6 ± 7.3 岁;病程11-32 mo,平均 15.7 ± 4.1 mo。纳入标准: (1)符合中国精神障碍分

表 1 两组患者治疗前后空腹胃液pH变化对比 ($n = 50$, mean \pm SD)

分组	治疗前	治疗后
治疗组	1.5 \pm 0.7	4.4 \pm 0.8
对照组	1.6 \pm 0.4	5.6 \pm 0.5
t 值	0.548	5.658
P 值	0.293	0.000

表 2 两组患者治疗前后体质量变化比较 (kg, mean \pm SD)

分组	治疗前	治疗2 wk	治疗6 wk	治疗12 wk
观察组	33.7 \pm 5.7	35.2 \pm 3.9 ^a	36.4 \pm 3.6 ^{ac}	41.3 \pm 5.7 ^{ac}
对照组	34.1 \pm 6.1	34.5 \pm 4.8 ^a	40.3 \pm 5.3 ^a	46.8 \pm 7.2 ^a

^a $P < 0.05$ vs 治疗前; ^c $P < 0.05$ vs 对照组。

类与诊断标准第3版(CCMD-3)关于AN的诊断标准^[7]; (2)汉密尔顿抑郁量表(Hamilton depression scale, HAMD) < 30 分; (3)取得患者同意, 并签署知情同意书。排除标准: (1)重性精神障碍患者; (2)伴有严重心、肾、肝等重要器官病变者; (3)内分泌异常或全身性神经肌肉病患者; (4)近1 mo内服用过精神药物者; (5)对药物过敏或妊娠、哺乳期妇女。将符合标准的100例患者随机分为观察组和对照组各50例, 两组患者在性别构成、年龄、病程等一般资料差异无统计学意义($P > 0.05$), 具有可比性。米氮平片购自N.V. Organon公司, 30 mg/片; 二甲双胍片购自上海信谊药厂有限公司, 0.5 g/片。

1.2 方法

1.2.1 治疗: 对照组口服米氮平片, 每日1片, 晚间服用。观察组在对照组基础上口服二甲双胍片, 服用剂量根据血糖值随时调整, 第1周每日0.5 g, 若血糖增高则于第2周增加剂量至1.0 g, 于餐前服用。两组患者均完成12 wk的治疗疗程, 并于治疗后随访12 wk。

1.2.2 观察指标: (1)分别于治疗后2、6、12 wk对患者各随访1次, 记录患者体质量、HAMD、HAMA; 其中HAMD评价标准^[8,9]: ≤ 6 分正常; 7-17分伴有轻度抑郁; 18-24分代表中度抑郁; ≥ 25 分代表重度抑郁。HAMA ≥ 14 分代表患者伴有临床性焦虑; (2)患者空腹取静脉血3 mL, 高速离心分离血清后于-80 °C冰箱中保存待检; 采用高效液相-荧光检测分析法对患者血清NE、5-HT和DA水平进行检测; (3)血糖指标: 分别于治疗前后抽血监测患者空腹血糖(fasting plasma

glucose, FPG)、糖化血红蛋白(glycated haemoglobin, HbA1c)、餐后2 h血糖(2 h plasma glucose, 2 h PG); (4)记录患者治疗后不良反应发生情况, 并采用不良反应量表(treatment emergent symptom scale, TESS)对不良反应进行评价。

统计学处理 所有研究数据采用SPSS17.0统计学软件包进行统计分析, 计量资料以mean \pm SD表示, 组间资料相比采用 t 检验, 率的比较采用 χ^2 检验, 以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患者治疗前后空腹胃液pH变化水平 治疗后两组胃液pH均明显升高, 其中观察组pH升高水平显著高于对照组, 两组间差异具有统计学意义($P < 0.05$)(表1)。

2.2 两组患者治疗前后体质量变化比较 治疗2、6、12 wk后两组患者体质量均开始增加, 与治疗前相比差异具有统计学意义($P < 0.05$); 其中治疗6、12 wk观察组患者体质量显著低于对照组($P < 0.05$)(表2)。

2.3 治疗前后两组患者HAMD、HAMA评分比较 治疗后两组患者HAMD、HAMA评分均显著降低, 与治疗前相比差异具有统计学意义($P < 0.05$); 而治疗前后两组间HAMD、HAMA评分相比差异无统计学意义($P > 0.05$)(表3)。

2.4 两组患者治疗前后血清NE、5-HT和DA水平比较 治疗后两组患者血清NE、5-HT水平显著增加, 与治疗前相比差异具有统计学意义($P < 0.05$); 而治疗前后两组间DA水平相比差异无统计学意义($P > 0.05$)(表4)。

■ 相关报道

目前国内外研究发现, AN患者常伴有焦虑、抑郁等情绪障碍, 可能与机体的神经递质代谢异常有关。由于伴有厌食症的患者容易发生营养失衡、胃肠道激素水平变化、胃肠道菌群失调等, 进而继发导致患者消化系统功能障碍出现消化不良症状。

■同行评价

二甲双胍联合米氮平治疗AN能够改善患者抑郁症状和食欲,且患者增重不明显,有助于提高患者治疗依从性,值得临床推广。

表 3 治疗前后两组患者HAMD、HAMA评分比较 ($n = 50$, mean \pm SD, 分)

分组	时段	HAMA	HAMD
观察组	治疗前	15.3 \pm 4.3	19.1 \pm 5.6
	治疗后	5.7 \pm 1.9 ^a	6.7 \pm 1.5 ^a
对照组	治疗前	15.7 \pm 5.3	18.8 \pm 4.9
	治疗后	5.5 \pm 1.4 ^a	6.8 \pm 1.4 ^a

^a $P < 0.05$ vs 治疗前. HAMD: 汉密尔顿抑郁量表; HAMA: 汉密尔顿焦虑量表.

表 4 两组患者治疗前后血清NE、5-HT和DA水平比较 ($n = 50$, mean \pm SD, μ g/L)

分组	时段	NE	5-HT	DA
观察组	治疗前	35.78 \pm 10.18	253.93 \pm 107.49	241.74 \pm 48.46
	治疗后	108.41 \pm 57.54 ^a	335.73 \pm 132.97 ^a	229.43 \pm 53.19
对照组	治疗前	33.81 \pm 9.78	247.74 \pm 98.54	250.32 \pm 51.54
	治疗后	110.83 \pm 60.47 ^a	341.17 \pm 127.57 ^a	231.37 \pm 44.39

^a $P < 0.05$ vs 治疗前. NE: 去甲肾上腺素; 5-HT: 5-羟色胺; DA: 多巴胺.

表 5 治疗前后两组患者FPG、HbA1c及2 h PG变化比较 ($n = 50$, mean \pm SD)

分组	时段	FPG(mmol/L)	HbA1c(%)	2 h PG(mmol/L)
观察组	治疗前	5.76 \pm 0.31	4.76 \pm 0.37	5.54 \pm 0.38
	治疗后	5.13 \pm 0.17	4.37 \pm 0.29	5.27 \pm 0.24
对照组	治疗前	5.82 \pm 0.43	4.81 \pm 0.41	5.47 \pm 0.35
	治疗后	5.79 \pm 0.19	4.95 \pm 0.32	5.53 \pm 0.33

FPG: 空腹血糖; HbA1c: 糖化血红蛋白; 2 h PG: 餐后2 h血糖.

表 6 两组患者不良反应发生情况比较 ($n = 50$)

分组	TESS评分(分)	便秘(%)	震颤(%)	低血糖(%)	嗜睡(%)	其他(%)
观察组	6.2 \pm 3.1	7(14.0)	8(16.0)	1(2.0)	1(2.0)	7(14.0)
对照组	5.9 \pm 2.9	9(18.0)	6(12.0)	0	2(4.0)	5(10.0)
t/χ^2	0.499	0.595	0.665	2.020	0.687	0.758
P 值	0.309	0.440	0.415	0.155	0.407	0.384

2.5 治疗前后两组患者FPG、HbA1c、2 h PG变化比较 治疗后观察组FPG、HbA1c、2 h PG有降低趋势,但是与治疗前和对照组相比差异无统计学意义($P > 0.05$)(表5).

2.6 治疗后两组患者不良反应发生情况比较 两组治疗后TESS评分、各不良反应发生情况相比差异无统计学意义($P > 0.05$)(表6).

3 讨论

AN好发于年轻女性的一种疾病,该病首次于西

方国家发现,常见于现代化和城市化程度较高的国家.随着我们经济的不断发展,AN发病率呈上升趋势.由于AN患者长期厌食消瘦,会引起机体生长发育异常、内分泌紊乱、精神异常等疾病,甚至患者会有自杀倾向,对患者的身心健康造成了极大的影响. AN的发病机制目前尚不完全清楚,有研究^[10]称导致该病的主要因素有神经生化、心理因素、遗传因素以及社会文化因素等.目前国内外研究^[11]发现,AN患者常伴有焦虑、抑郁等情绪障碍,可能与机体的神经递质

代谢异常有关. 由于伴有厌食症的患者容易发生营养失衡、胃肠激素水平变化、胃肠道菌群失调等, 进而继发导致患者消化系统功能障碍出现消化不良症状. 而消化不良症状又会进一步加重厌食症病情, 给患者治疗带来极大挑战. 韩自力等^[12]在研究中证实, AN患者血清5-HT、NE量显著降低, 提示其发病与NE、5-HT水平有关. 目前对于AN的治疗临床上常5-HT再摄取抑制剂, 但是此类药物不良反应发生率较高, 如Avena等^[13]报道5-HT再摄取抑制剂与胃肠道损害发生密切相关, 限制了其临床应用.

米氮平是去甲肾上腺素能和5-HT抑制剂, 该药具有提高患者去甲肾上腺素和5-HT双重功能作用, 从而降低下丘脑-垂体肾上腺轴的活性. 由于米氮平对中枢 α_2 受体的作用强于外周, 且对5-HT I 型受体的亲和力较低, 因此其不良反应较少. 王二芳等^[14]采用米氮平治疗神经性厌食症患者, 结果显示治疗12 wk后米氮平组体质量显著高于对照组, 且患者HAMD、HAMA评分得到显著改善; 认为米氮平对神经性厌食症具有独特的疗效. 但是有部分患者在使用米氮平后食欲改善, 导致患者体质量过高; 另外还有部分患者特别是女性患者担心食欲增加后引起肥胖而不愿意继续服药. 董莹盈等^[15]报道称米氮平治疗抑郁患者的体质量增加与服药依从性呈负相关关系; Mannoury La Cour等^[16]也证实米氮平所导致肥胖与下丘脑神经递质、脂联素、瘦素的调节功能有关. 对于米氮平所致肥胖目前尚无有效预防手段; 宁鸿珍等^[17]在实验中发现茶多酚能够诱导米氮平所致肥胖大鼠体质量降低, 但是作用于人体的功效尚未见相关报道. 许玉芳等^[18]研究认为早期饮食与运动量化管理能够控制患者体质量, 预防肥胖发生. 但是由于神经性厌食症患者多伴有焦虑、抑郁症状, 患者对运动管理的依从性不高, 导致控制效果不甚理想.

本研究中, 治疗后两组胃液pH均明显升高, 其中观察组平均pH值为 5.6 ± 0.5 , 更接近理想胃内pH值(pH>5.4)的标准, 说明二甲双胍联合米氮平显著提高患者的食欲, 对控制厌食症起到显著的效果. 二甲双胍能够调节脂肪分布方式, 降低局部脂肪堆积, 是传统肥胖治疗药物. 在本研究中对AN患者采用二甲双胍联合米氮平治疗, 结果显示治疗后两组患者HAMD、HAMA评分均显著降低, 说明两组患者治疗后精神状态得到显著改善; 治疗后两组患者血清NE、5-HT、

水平显著增加, 进一步证实了上述结论. 治疗2、6、12 wk后两组患者体质量均开始增加, 与治疗前相比差异具有统计学意义; 说明两组患者治疗后食欲均得到显著改善, 有利于控制厌食症. 治疗6、12 wk观察组患者体质量显著低于对照组, 说明观察组患者体质量控制显著优于对照组, 这对于担心过于肥胖的患者有着独特优势, 能够有助于提高治疗依从性. Abbasi等^[19]在报道中认为米氮平不适宜用于贪食症或肥胖患者, 采用二甲双胍治疗能部分解决此类患者厌食症的问题. 有些研究者^[20]称二甲双胍治疗会导致低血糖, 但是在本研究中虽然观察组FPG、HbA1c、2 h PG有降低趋势, 但是与治疗前和对照组相比差异无统计学意义, 说明根据血糖值随时调整剂量能够避免低血糖的发生. 另外治疗后两组患者TESS评分、各不良反应发生情况相比差异无统计学意义, 说明二甲双胍联合米氮平治疗AN未增加不良反应, 使用较为安全.

总之, 二甲双胍联合米氮平治疗AN能够改善患者抑郁症状和食欲, 且患者增重不明显, 有助于提高患者治疗依从性, 值得临床推广.

4 参考文献

- 1 Bodell LP, Joiner TE, Keel PK. Comorbidity-independent risk for suicidality increases with bulimia nervosa but not with anorexia nervosa. *J Psychiatr Res* 2013; 47: 617-621 [PMID: 23384941 DOI: 10.1016/j.jpsychires.2013.01.005]
- 2 Goldschmidt AB, Peterson CB, Wonderlich SA, Crosby RD, Engel SG, Mitchell JE, Crow SJ, Cao L, Berg KC. Trait-level and momentary correlates of bulimia nervosa with a history of anorexia nervosa. *Int J Eat Disord* 2013; 46: 140-146 [PMID: 22987478 DOI: 10.1002/eat.22054]
- 3 李亚玲, 陈珏, 虞一萍, 王莲娥, 贾秀珍, 蒋文晖, 肖泽萍, 张明岛. 神经性厌食患者的人格特征及焦虑抑郁症状. *中国心理卫生杂志* 2012; 26: 590-594
- 4 Rodrigues Hulsmeyer A, Silva Marcon S, Getirana Santana R, Kállas D. [In anorexia nervosa and associated factors in female adolescents city in south of Brazil]. *Arch Latinoam Nutr* 2011; 61: 262-269 [PMID: 22696894]
- 5 王晨曦. 神经性厌食引起功能性下丘脑闭经的作用机制. *医学综述* 2013; 19: 2393-2395
- 6 陈玉龙, 王霞. 米氮平治疗神经性厌食症的疗效对照研究. *中国心理卫生杂志* 2005; 19: 640-642
- 7 中华医学会精神病学分会. 中国精神障碍分类与诊断标准第三版(精神障碍分类). *中华精神科杂志* 2001; 34: 184-188
- 8 李则攀, 彭代辉, 黄佳, 苑成梅, 王志阳, 栗幼嵩, 王勇, 陈俊, 洪武, 易正辉, 卢卫红, 胡莺燕, 吴志国, 曹岚方, 贻儒. 国产与进口文拉法辛对抑郁症患者汉密尔顿抑郁及焦虑量表因子影响的比较. *中国神经精神疾病杂志* 2012; 38: 760-763
- 9 Sung G, Kim BN, Lee EH, Yu BH, Hong KS, Kim

- JH. Underestimating the severity of bipolar depression: a comparison of the Hamilton Depression Rating Scale items. *J Affect Disord* 2012; 136: 425-429 [PMID: 22178241 DOI: 10.1016/j.jad.2011.11.007]
- 10 赵斌, 王世凤, 张琼, 席刚明. 神经性厌食症患者的防御机制及相关因素. *中国行为医学科学* 2007; 16: 214-216
- 11 Van den Eynde F, Guillaume S, Broadbent H, Campbell IC, Schmidt U. Repetitive transcranial magnetic stimulation in anorexia nervosa: a pilot study. *Eur Psychiatry* 2013; 28: 98-101 [PMID: 21880470 DOI: 10.1016/j.eurpsy.2011.06.002]
- 12 韩自力, 钟智勇, 陶炯, 王继辉, 王相兰, 胡三红. 女性神经性厌食症患者人格特征和心身状况的研究. *中华行为医学与脑科学杂志* 2009; 18: 885-887
- 13 Avena NM, Bocarsly ME. Dysregulation of brain reward systems in eating disorders: neurochemical information from animal models of binge eating, bulimia nervosa, and anorexia nervosa. *Neuropharmacology* 2012; 63: 87-96 [PMID: 22138162 DOI: 10.1016/j.neuropharm.2011.11.010]
- 14 王二芳, 李建明, 宋晓红, 张玉涛. 米氮平联合认知行为治疗神经性厌食症的疗效观察. *国际医药卫生导报* 2014; 20: 527-529
- 15 董莹盈, 甘建光, 曹世林, 詹建华, 吴桂红. 米氮平治疗抑郁症服药依从性与体质量相关性. *中国药师* 2010; 13: 548-549
- 16 Mannoury La Cour C, Chaput C, Touzard M, Millan MJ. An immunocapture/scintillation proximity analysis of G alpha q/11 activation by native serotonin (5-HT)_{2A} receptors in rat cortex: blockade by clozapine and mirtazapine. *Synapse* 2009; 63: 95-105 [PMID: 19016481 DOI: 10.1002/syn.20587]
- 17 宁鸿珍, 李清钊, 刘英莉, 唐咏梅, 刘辉, 陈彬, 张浩然. 茶多酚对肥胖大鼠体质量的影响及其与瘦素、血脂水平的关系. *食品科学* 2008; 29: 358-360
- 18 许玉芳, 裴建琴, 费静霞, 方春霞. 饮食与运动量化管理预防奥氮平所致肥胖研究. *护理学杂志* 2010; 25: 27-29
- 19 Abbasi SH, Behpournia H, Ghoreschi A, Salehi B, Raznahan M, Rezazadeh SA, Rezaei F, Akhondzadeh S. The effect of mirtazapine add on therapy to risperidone in the treatment of schizophrenia: a double-blind randomized placebo-controlled trial. *Schizophr Res* 2010; 116: 101-106 [PMID: 19959338 DOI: 10.1016/j.schres.2009.11.008]
- 20 Corbould A, Swinton F, Radford A, Campbell J, McBeath S, Dennis A. Fasting blood glucose predicts response to extended-release metformin in gestational diabetes mellitus. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 2013; 53: 125-129 [PMID: 23205962 DOI: 10.1111/ajo.12018]

编辑 郭鹏 电编 闫晋利



空肠弯曲菌的流行病学调查及其在夏季腹泻患者中的检出率

袁敏, 曾永鸿, 陈志国, 李晶, 赵欣

袁敏, 陈志国, 李晶, 南阳理工学院张仲景国医学院 河南省南阳市 473004

曾永鸿, 信阳职业技术学院医学院解剖教研室 河南省信阳市 464000

赵欣, 浙川县教体局 河南省浙川县 474450

作者贡献分布: 此课题由袁敏与曾永鸿设计; 资料搜集与整理由陈志国、李晶及赵欣完成; 数据分析和论文写作由袁敏与曾永鸿完成。

通讯作者: 袁敏, 讲师, 473004, 河南省南阳市长江路80号, 南阳理工学院张仲景国医学院. yimin37@163.com
电话: 0377-62071310

收稿日期: 2014-06-08 修回日期: 2014-06-25

接受日期: 2014-07-01 在线出版日期: 2014-08-28

Epidemiological investigation of *Campylobacter jejuni* and its detection in patients with summer diarrhea

Min Yuan, Yong-Hong Zeng, Zhi-Guo Chen, Jing Li, Xin Zhao

Min Yuan, Zhi-Guo Chen, Jing Li, Zhangzhongjing Traditional Chinese Medicine College, Nanyang Institute of Technology, Nanyang 473004, Henan Province, China
Yong-Hong Zeng, Xinyang Vocational and Technical College, Xinyang 464000, Henan Province, China
Xin Zhao, Education Bureau of Xichuan, Xichuan 474450, Henan Province, China

Correspondence to: Min Yuan, Lecturer, Zhangzhongjing Traditional Chinese Medicine College, Nanyang Institute of Technology, 80 Changjiang Road, Nanyang 473004, Henan Province, China. yimin37@163.com

Received: 2014-06-08 Revised: 2014-06-25

Accepted: 2014-07-01 Published online: 2014-08-28

Abstract

AIM: To analyze the detection of *Campylobacter jejuni* in patients with diarrhea.

METHODS: The detection of *Campylobacter jejuni* in patients with diarrhea was analyzed retrospectively. The clinical characteristics including patient sex, age, area for examination, and month distribution were analyzed.

RESULTS: The positive rate of *Campylobacter jejuni* was higher than that of *Campylobacter coli* in the years of 2012 and 2013 (6.14% vs 0.16%, 6.20% vs 0.14, $P < 0.05$). There was no significant difference

for the detection rate of *Campylobacter jejuni* between the years of 2012 and 2013 (6.14% vs 6.20%, $P > 0.05$). The positive rates of *Campylobacter jejuni* in males were higher than those in females in patients with summer diarrhea in the years of 2012 and 2013, but the differences were not significant (6.46% vs 5.60%, 6.52% vs 5.62%, $P > 0.05$). The detection of *Campylobacter jejuni* in patients with summer diarrhea in the years of 2012 and 2013 was mainly distributed in the age groups of < 1 and 16-45 years, although there were no significant differences in the positive rates between different age groups (9.33%, 3.31%, 6.25%, 6.60%, 2.44% vs 2.17%; 9.36%, 2.84%, 6.35%, 6.72%, 1.96% vs 0.00%, $P > 0.05$). The positive rates of *Campylobacter jejuni* in the years of 2012 and 2013 were significantly higher in out-patients than in inpatients (7.56% vs 2.37%, 7.82% vs 2.40%, $P < 0.05$). The positive rates of *Campylobacter jejuni* in the years of 2012 and 2013 showed no significant differences among different months (6.00%, 6.28% vs 6.14%; 6.09%, 6.33% vs 6.17%, $P > 0.05$). The positive rates of *Campylobacter jejuni* in summer in the years of 2012 and 2013 were significantly higher than those in the winter of 2012 (1.82%, 6.14% vs 1.82%, 6.20% vs 1.82%, $P < 0.05$).

CONCLUSION: *Campylobacter jejuni* was one of the major pathogens of summer diarrhea.

© 2014 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: *Campylobacter jejuni*; Summer diarrhea; Epidemiological

Yuan M, Zeng YH, Chen ZG, Li J, Zhao X. Epidemiological investigation of *Campylobacter jejuni* and its detection in patients with summer diarrhea. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(24): 3705-3709 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/3705.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i24.3705>

摘要

目的: 探讨空肠弯曲菌在夏季腹泻患者中的检出情况。

■背景资料

弯曲菌是常见细菌性肠道病原菌, 主要包括空肠弯曲菌和结肠弯曲菌, 可引起腹泻、急性肠炎以及格林巴利综合征等多种疾病。空肠弯曲菌引起的腹泻具有一定季节性, 多发于夏季。空肠弯曲菌是世界性导致腹泻发病的重要病原菌之一, 尤其对于发展中国家, 婴幼儿因感染空肠弯曲菌引发腹泻发生率较高。由于空肠弯曲菌病死率低、临床监测技术要求较高, 因此目前国内尚未形成有效的空肠弯曲菌监测系统, 对其流性传播缺乏有力控制手段。

■同行评议者

李君文, 研究员, 中国人民解放军军事医学科学院卫生学环境医学研究所

■ 研发前沿

由于病历资料限制,本研究并未对引发空肠弯曲菌感染的相关危险因素进行深入分析。但大量国内外相关报道指出食用未煮熟的鸡肉、饮用生牛奶或不洁的水以及携带猫、狗等宠物,尤其是有腹泻症状的宠物均为引发空肠弯曲菌感染的重要因素。

方法: 回顾性分析南阳理工学院附属医院2012与2013年收治的夏季腹泻患者空肠弯曲菌的检出情况,分析空肠弯曲菌阳性患者性别、年龄、诊区及月份分布特点。

结果: 2012与2013年空肠弯曲菌阳性率均显著高于结肠弯曲菌(6.14% vs 0.16%, 6.20% vs 0.14%), 差异具有统计学意义($P < 0.05$); 2012与2013年空肠弯曲菌阳性率比较(6.14% vs 6.20%), 差异无统计学意义($P > 0.05$); 2012与2013年夏季腹泻患者男性空肠弯曲菌阳性率均高于女性(6.46% vs 5.60%, 6.52% vs 5.62%), 但差异无统计学意义($P > 0.05$); 2012年与2013年夏季腹泻患者空肠弯曲菌阳性率年龄分布主要集中于<1岁和16-45岁, 但不同年龄段阳性率比较(9.33%, 3.31%, 6.25%, 6.60%, 2.44% vs 2.17%, 9.36%, 2.84%, 6.35%, 6.72%, 1.96% vs 0.00%), 差异无统计学意义($P > 0.05$); 2012与2013年夏季腹泻患者门诊部空肠弯曲菌阳性率均显著高于住院部(7.56% vs 2.37%, 7.82% vs 2.40%), 差异具有统计学意义($P < 0.05$); 2012、2013年夏季腹泻患者不同月份间空肠弯曲菌阳性率比较(6.00%, 6.28% vs 6.14%, 6.09%, 6.33% vs 6.17%), 差异无统计学意义($P > 0.05$); 2012与2013年夏季腹泻患者空肠弯曲菌阳性率均显著高于南阳理工学院张仲景国医学院2012年临床资料中冬季患者空肠弯曲菌阳性率(6.14% vs 1.82%, 6.20% vs 1.82%), 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

结论: 空肠弯曲菌为引起夏季腹泻的主要致病菌之一, 其流行病学分布具有多样性和复杂性。

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词: 空肠弯曲菌; 夏季腹泻; 流行病学

核心提示: 研究中共检测2626份粪便样本, 其中2012年夏季1238份, 2013年夏季1388份, 两年空肠弯曲菌阳性率分别为6.14%和6.20%, 表明空肠弯曲菌为引起腹泻的常见致病菌。通过对空肠弯曲菌阳性患者流行病学分布情况进行分析, 结果显示: 男性腹泻患者空肠弯曲菌阳性率普遍高于女性, 但二者并无统计学差异。

袁敏, 曾永鸿, 陈志国, 李晶, 赵欣. 空肠弯曲菌的流行病学调查及其在夏季腹泻患者中的检出率. 世界华人消化杂志 2014; 22(24): 3705-3709 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/3705.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i24.3705>

0 引言

弯曲菌是常见细菌性肠道病原菌, 主要包括空肠弯曲菌和结肠弯曲菌, 可引起腹泻、急性肠炎以及格林巴利综合征等多种疾病^[1]。空肠弯曲菌引起的腹泻具有一定季节性, 多发于夏季^[2]。现回顾性分析南阳理工学院张仲景国医学院2012-2013年收治的夏季腹泻患者空肠弯曲菌的检出情况, 探讨夏季腹泻患者空肠弯曲菌检测结果的性别、年龄等分布情况, 报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料 选取2012年夏季(6-8 mo)和2013年夏季南阳理工学院张仲景国医学院门诊部和住院部收治的急性腹泻患者作为研究对象。排除入选前已使用抗生素治疗的患者。其中2012年1238例, 男774例, 女464例, 年龄为6 mo-75岁, 平均年龄为20.66岁±12.33岁, 900例来自门诊部, 338例来自住院部; 2013年1388例, 男890例, 女498例, 年龄为6 mo-75岁, 平均年龄为21.57岁±13.21岁, 972例来自门诊部, 416例来自住院部。所有患者均采用灭菌棉拭采集粪便样品插入Carry-Blair运送培养基中24 h内送检^[3]。空肠弯曲菌标准菌株(ATCC33291)和结肠弯曲菌标准菌株(ATCC43478)均由中国疾病预防控制中心传染病预防控制所惠赠。

1.2 方法

1.2.1 空肠弯曲菌和结肠弯曲菌的分离培养: 使用灭菌棉拭将粪便样本涂于CCDA平板后使用接种环划线, 在恒温培养箱中分离培养48 h, 培养温度为42 °C, 观察可疑菌落^[4]。可疑菌落初步判断标准: 菌落形态为灰色、扁平、湿润、边缘完整、有金属光泽, 一般直径为1-2 mm^[5]。若未发现可疑菌落需继续培养5-6 d。挑取可疑菌落后使用接种环转划于哥伦比亚血平板上进行分纯^[6]。

1.2.2 空肠弯曲菌和结肠弯曲菌的PCR鉴定: 空肠弯曲菌引物序列: jun1: 5'-CATCTTCCTAGT-CAAGCCT-3', jun2: 5'-AAGATATGGCACTAG-CAAGAC-3'; 结肠弯曲菌引物序列: Col1: 5'-AGGCAAGGGAGCCTTTAATC-3', Col2: 5'-TATCCTATCTACAAATTCGC-3'^[7]。取灭菌超纯水制备200 μL菌悬液, 在100 °C干式恒温器上加热10 min, 使用12000 r/min离心机离心10 min, 取上清液分装于Eppendorf管中, 作为扩增反应的DNA粗制模板^[8]。反应总体积为25 μL, 体系中含dNTP mixtures各0.4 mmol/L, 10×Buffer

表 1 2012年与2013年夏季腹泻患者弯曲菌检测

弯曲菌	2012年			2013年		
	<i>n</i>	阳性	阳性率(%)	<i>n</i>	阳性	阳性率(%)
空肠弯曲菌	1238	76	6.14	1388	86	6.20
结肠弯曲菌	1238	2	0.16	1388	2	0.14
合计	2416	78	6.30	2776	88	6.34

表 2 2012年与2013年夏季腹泻患者不同性别空肠弯曲菌阳性率分布

性别	2012年			2013年		
	<i>n</i>	阳性	阳性率(%)	<i>n</i>	阳性	阳性率(%)
男性	774	50	6.46	890	58	6.52
女性	464	26	5.60	498	28	5.62
合计	1238	76	6.14	1388	86	6.20

表 3 2012年与2013年夏季腹泻患者不同年龄空肠弯曲菌阳性率分布

年龄 (岁)	2012年			2013年		
	<i>n</i>	阳性	阳性率(%)	<i>n</i>	阳性	阳性率(%)
<1	386	36	9.33	470	44	9.36
1-15	242	8	3.31	282	8	2.84
16-30	224	14	6.25	252	16	6.35
31-45	212	14	6.60	238	16	6.72
46-60	82	2	2.44	102	2	1.96
61-75	92	2	2.17	44	0	0.00
合计	1238	76	6.14	1388	86	6.20

■创新盘点

本研究采用国际标准检测方法, 通过PCR技术对南阳理工学院张仲景国医学院门诊和住院部收治的夏季腹泻患者进行了空肠弯曲菌检测, 为掌握空肠弯曲菌的流行病学特点提供了参考。

2.5 μL, TaKaRaTaq 1.25 U, 引物各10 μmol/L, 细菌DNA粗制模板1 μL^[9]. PCR循环参数为: 94 ℃ 预变性5 min, 94 ℃ 1 min、59 ℃ 1 min、72 ℃ 1 min, 循环35次, 72 ℃ 延伸5 min, 然后取扩增产物5 μL在1%琼脂糖凝胶上电泳, 使用Gel Doc XR凝胶成像系统照相^[10].

1.2.3 观察指标: 观察2012-2013年夏季腹泻患者弯曲菌检测结果, 分析空肠弯曲菌阳性患者性别、年龄、诊区及月份分布特点。

统计学处理 使用SPSS17.0统计分析, 用mean±SD表示计量资料, 采用 t 检验, 用百分比表示计数资料, 采用 χ^2 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 2012-2013年夏季腹泻患者弯曲菌检测 2012年夏季共检测1238份粪便样本, 弯曲菌阳性78份(6.30%), 其中空肠弯曲菌阳性76份, 占

97.44%; 2013年夏季共检测1388份粪便样本, 弯曲菌阳性88份(6.34%), 其中空肠弯曲菌阳性86份, 占97.73%, 两年空肠弯曲菌阳性率均显著高于结肠弯曲菌, 差异具有统计学意义($P<0.05$), 提示由弯曲菌引起的夏季腹泻病例中空肠弯曲菌为主要致病菌; 2012与2013年空肠弯曲菌阳性率比较, 差异无统计学意义($P>0.05$)(表1)。

2.2 2012与2013年夏季腹泻患者不同性别空肠弯曲菌阳性率分布 2012与2013年夏季腹泻患者男性空肠弯曲菌阳性率均高于女性, 但差异无统计学意义($P>0.05$)(表2)。

2.3 2012与2013年夏季腹泻患者不同年龄空肠弯曲菌阳性率分布 2012与2013年夏季腹泻患者空肠弯曲菌阳性率年龄分布主要集中于<1岁和16-45岁, 但不同年龄段阳性率比较, 差异无统计学意义($P>0.05$)(表3)。

2.4 2012与2013年夏季腹泻患者不同诊区空肠弯曲菌阳性率分布 2012与2013年夏季腹泻患者

■同行评价

本文通过培养和PCR技术验证了南阳理工学院张仲景国医医院收治的2012、2013夏季腹泻患者中空肠弯曲菌的检出率,结果一致,有一定的临床指导意义。

表 4 2012年与2013年夏季腹泻患者不同诊区空肠弯曲菌阳性率分布

诊区	2012年			2013年		
	<i>n</i>	阳性	阳性率(%)	<i>n</i>	阳性	阳性率(%)
门诊部	900	68	7.56 ^a	972	76	7.82 ^a
住院部	338	8	2.37	416	10	2.40
合计	1238	76	6.14	1388	86	6.20

^a $P<0.05$ vs 住院部。

表 5 2012年与2013年夏季腹泻患者不同月份空肠弯曲菌阳性率分布

月份	2012年			2013年		
	<i>n</i>	阳性	阳性率(%)	<i>n</i>	阳性	阳性率(%)
6月	400	24	6.00	460	28	6.09
7月	382	24	6.28	442	28	6.33
8月	456	28	6.14	486	30	6.17
合计	1238	76	6.14	1388	86	6.20

门诊部空肠弯曲菌阳性率均显著高于住院部,差异具有统计学意义($P<0.05$); 2013年不同诊区空肠弯曲菌阳性率较2012年均略有升高,但差异无统计学意义($P>0.05$)(表4)。

2.5 2012与2013年夏季腹泻患者不同月份空肠弯曲菌阳性率分布 2012与2013年夏季腹泻患者不同月份间空肠弯曲菌阳性率比较,差异无统计学意义($P>0.05$); 2013年不同月份空肠弯曲菌阳性率较2012年均略有升高,但差异无统计学意义($P>0.05$); 2012-2013年夏季腹泻患者空肠弯曲菌阳性率均显著高于南阳理工学院张仲景国医学院2012年临床资料中冬季患者空肠弯曲菌阳性率1.82%,差异具有统计学意义($P<0.05$)(表5)。

3 讨论

空肠弯曲菌是世界性导致腹泻发病的重要病原菌之一,尤其对于发展中国家,婴幼儿因感染空肠弯曲菌引发腹泻发生率较高^[11]。由于空肠弯曲菌病死率低、临床监测技术要求较高,因此目前国内尚未形成有效的空肠弯曲菌监测系统,对其流性传播缺乏有力控制手段^[12]。本研究采用国际标准检测方法,通过PCR技术对南阳理工学院张仲景国医学院门诊和住院部收治的夏季腹泻患者进行了空肠弯曲菌检测,为掌握空肠弯曲菌的流行病学特点提供了参考。

本研究中共检测2626份粪便样本,其中2012年夏季1238份,2013年夏季1388份,两年空肠弯曲菌阳性率分别为6.14%和6.20%,表明空肠弯

曲菌为引起腹泻的常见致病菌。通过对空肠弯曲菌阳性患者流行病学分布情况进行分析,结果显示:男性腹泻患者空肠弯曲菌阳性率普遍高于女性,但二者并无统计学差异,与Adzitey等^[13]的研究结果相似;夏季腹泻患者空肠弯曲菌阳性率年龄分布主要集中于<1岁和16-45岁两个年龄段,分析原因可能为<1岁婴幼儿免疫能力较差而16-45岁患者由于生活习惯不良或接触小动物及其他细菌感染途径机会较多^[14];门诊部空肠弯曲菌阳性率显著高于住院部,分析原因可能为门诊部患者尚未应用抗生素进行相关治疗,而住院部患者可能已经接受了抗生素经验性用药,起到了一定的临床效果;2012与2013年夏季腹泻患者空肠弯曲菌阳性率均显著高于南阳理工学院张仲景国医学院2012年临床资料中冬季患者空肠弯曲菌阳性率,与春季和秋季空肠弯曲菌阳性率比较也略有升高,表明夏季为空肠弯曲菌感染所致腹泻的多发季节,与相关文献报道结果相符^[15]。

另外,由于病历资料限制,本研究并未对引发空肠弯曲菌感染的相关风险因素进行深入分析。但大量国内外相关报道指出食用未煮熟的鸡肉、饮用生牛奶或不洁净的水以及携带猫、狗等宠物,尤其是有腹泻症状的宠物均为引发空肠弯曲菌感染的重要危险因素^[16]。控制空肠弯曲菌感染相关危险因素对人类健康具有积极意义。

总之,空肠弯曲菌为引起夏季腹泻的主要致

病菌之一, 其流行病学分布具有多样性和复杂性, 采取有效措施加强对食源性和宠物源性危险因素进行控制能够有效降低空肠弯曲菌感染引起的腹泻发生率, 对空肠弯曲菌感染的防控具有积极意义。

4 参考文献

- 1 谢永强, 周珍文, 魏艳, 邓秋连, 黄勇. 广州地区儿童空肠弯曲菌感染的病原学研究. 中国当代儿科杂志 2009; 11: 422-424
- 2 张昕, 高永军, 冯子健, 王子军, 冉陆. 2008年全国其他感染性腹泻报告病例信息分析. 世界华人消化杂志 2009; 17: 3370-3375
- 3 Chen X, Naren GW, Wu CM, Wang Y, Dai L, Xia LN, Luo PJ, Zhang Q, Shen JZ. Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* isolates in broilers from China. *Vet Microbiol* 2010; 144: 133-139 [PMID: 20116182 DOI: 10.1016/j.vetmic.2009.12.035]
- 4 徐义刚, 李丹丹, 田长永, 刘忠梅, 李苏龙, 张国财. 应用DNA环介导恒温扩增技术快速检测空肠弯曲菌. 中国农业科学 2012; 45: 2751-2757
- 5 Khan IU, Gannon V, Loughborough A, Jokinen C, Kent R, Koning W, Lapen DR, Medeiros D, Miller J, Neumann N, Phillips R, Robertson W, Schreier H, Topp E, van Bochove E, Edge TA. A methods comparison for the isolation and detection of thermophilic *Campylobacter* in agricultural watersheds. *J Microbiol Methods* 2009; 79: 307-313 [PMID: 19818368 DOI: 10.1016/j.mimet.2009.09.024]
- 6 Wieczorek K, Kania I, Osek J. Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* spp. isolated from poultry carcasses in Poland. *J Food Prot* 2013; 76: 1451-1455 [PMID: 23905805 DOI: 10.4315/0362-028X]
- 7 徐君怡, 曹际娟, 郑秋月, 裴铁君, 于珂. 多重PCR-变性高效液相色谱检测食品中空肠弯曲菌和结肠弯曲菌. 中国预防兽医学报 2009; 31: 207-212
- 8 孟凡亮, 张茂俊, 何利华, 张建中. 格林巴利综合征相关及单纯腹泻相关空肠弯曲菌细胞毒作用分析. 中国人兽共患病学报 2010; 26: 10-12
- 9 Sivadon-Tardy V, Orlikowski D, Porcher R, Ronco E, Caudie C, Roussi J, Fauchère JL, Mégraud F, Tabor H, Sharshar T, Annane D, Raphaël JC, Gaillard JL. Detection of *Campylobacter jejuni* by culture and real-time PCR in a French cohort of patients with Guillain-Barre syndrome. *J Clin Microbiol* 2010; 48: 2278-2281 [PMID: 20410350 DOI: 10.1128/JCM.00381-10]
- 10 李彩金, 谢永强, 周珍文, 邓秋连, 黄钰君, 何艳明. 2008-2011年广州地区腹泻儿童空肠弯曲菌感染情况及耐药性变迁. 热带医学杂志 2012; 12: 730-732
- 11 田辉. 肠道致病菌群体感应研究进展. 世界华人消化杂志 2007; 15: 879-884
- 12 廖和壮, 林玫, 周凌云, 梁大斌, 黄君. 广西南宁市腹泻人群空肠弯曲菌流行状况调查. 应用预防医学 2013; 19: 132-134
- 13 Adzitey F, Rusul G, Huda N, Cogan T, Corry J. Prevalence, antibiotic resistance and RAPD typing of *Campylobacter* species isolated from ducks, their rearing and processing environments in Penang, Malaysia. *Int J Food Microbiol* 2012; 154: 197-205 [PMID: 22285201 DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.01.006]
- 14 林玫, 周凌云, 王鸣柳, 廖和壮, 黄君, 农志新, 农良伟, 梁大斌, 权怡, 方锦嵩, 张茂俊. 广西空肠弯曲菌和结肠弯曲菌流行病学调查. 中国人兽共患病学报 2012; 28: 1143-1147
- 15 翟海华, 王娟, 王君伟, 盖文燕, 黄秀梅, 曲志娜. 空肠弯曲菌的致病性及致病机制研究进展. 动物医学进展 2013; 34: 164-169
- 16 Yamazaki W, Taguchi M, Kawai T, Kawatsu K, Sakata J, Inoue K, Misawa N. Comparison of loop-mediated isothermal amplification assay and conventional culture methods for detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in naturally contaminated chicken meat samples. *Appl Environ Microbiol* 2009; 75: 1597-1603 [PMID: 19139242 DOI: 10.1128/AEM.02004-08]

编辑 田滢 电编 闫晋利



CD4⁺CD29⁺ T细胞亚群与溃疡性结肠炎的相关性及黄芩苷的干预作用

于丰彦, 黄绍刚, 张海燕, 叶华, 迟宏罡, 邹颖, 吕汝西, 郑学宝

■背景资料

在与溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)发病密切相关的免疫因素中, T细胞起到了非常关键作用。CD29和CD4的共同表达可作为鉴别CD4⁺辅助性细胞亚群的标志, CD4⁺CD29⁺细胞主要辅助B细胞产生抗体和诱导CD8⁺细胞介导的淋巴细胞溶解作用, 其升高可造成B细胞高度活化而发生免疫异常, 作为UC的重要免疫学监测指标。黄芩苷(baicalin)是黄芩汤中黄芩的主要有效成分之一, 具有清热燥湿、泻火解毒功效。

于丰彦, 迟宏罡, 邹颖, 吕汝西, 郑学宝, 广东医学院中医研究室 广东省湛江市 524023

黄绍刚, 张海燕, 广东省中医院大学城分院 广东省广州市 510006

叶华, 广东医学院广东天然药物研究与开发重点实验室 广东省湛江市 524023

吕汝西, 南方医科大学中医药学院 广东省广州市 510515

于丰彦, 副主任医师, 主要从事中西医结合研究。

作者贡献分布: 本研究由于丰彦设计; 黄绍刚、张海燕、叶华、迟宏罡、邹颖、吕汝西及郑学宝共同参与完成; 论文写作由于于丰彦完成。

通讯作者: 于丰彦, 副主任医师, 524023, 广东省湛江市霞山文明东路2号, 广东医学院中医研究室, yujoyce022@163.com
电话: 0759-2388505

收稿日期: 2014-04-22 修回日期: 2014-06-25

接受日期: 2014-07-15 在线出版日期: 2014-08-28

Baicalin modulates immuno-inflammatory response in patients with ulcerative colitis

Feng-Yan Yu, Shao-Gang Huang, Hai-Yan Zhang, Hua Ye, Hong-Gang Chi, Ying Zou, Ru-Xi Lv, Xue-Bao Zheng

Feng-Yan Yu, Hong-Gang Chi, Ying Zou, Ru-Xi Lv, Xue-Bao Zheng, Traditional Chinese Medicine Institute, Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, Guangdong Province, China

Shao-Gang Huang, Hai-Yan Zhang, Guangdong Provincial Hospital of University City Branch, Guangzhou 510006, Guangdong Province, China

Hua Ye, Traditional Chinese Medicine Institute, Guangdong Medical College; Guangdong Key Laboratory of Natural Medicine Research and Development, Zhanjiang 524023, Guangdong Province, China

Ru-Xi Lv, School of Traditional Chinese Medicine of Southern Medical College, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China

Correspondence to: Feng-Yan Yu, Associate Chief Physician, Traditional Chinese Medicine Institute, Guangdong Medical College, 2 Xiashan Wenmingdong Road, Zhanjiang 524023, Guangdong Province, China. yujoyce022@163.com
Received: 2014-04-22 Revised: 2014-06-25
Accepted: 2014-07-15 Published online: 2014-08-28

Abstract

AIM: To evaluate the mechanisms underlying the therapeutic effect of baicalin on ulcerative colitis (UC) in terms of its effect on CD4⁺CD29⁺ T helper cells, surface markers and serum inflammatory cytokines.

METHODS: Flow cytometry was used to detect the percentage of CD4⁺CD29⁺ cells in patients with UC. Real-time polymerase chain reaction (PCR) was used to detect the expression of GATA-3, forkhead box P3 (FOXP3), T-box expressed in T cells (T-bet), and retinoic acid-related orphan nuclear hormone receptor C (RORC). Western blot was used to analyze the expression of nuclear factor-kappa B (NF-κB) p65, p-NF-κB p65, STAT4, p-STAT4, STAT6, and p-STAT6. The concentrations of interferon γ (IFN-γ), interleukin (IL)-4, IL-5, IL-6, IL-10, and tumor growth factor-β (TGF-β) in serum were determined by ELISA assay.

RESULTS: The percentages of CD4⁺CD29⁺ T cells were significantly lower in cells treated with 40 and 20 μmol/L baicalin than in untreated cells. Treatment with 40 or 20 μmol/L baicalin significantly upregulated the expression of IL-4, TGF-β1 and IL-10, increased the p-STAT6/STAT6 ratio, but downregulated the expression of IFN-γ, IL-5, IL-6, RORC, FOXP3, and T-bet, and decreased the ratios of T-bet/GATA-3, p-STAT4/STAT4, and p-NF-κB/NF-κB compared to those in untreated cells.

CONCLUSION: Baicalin regulates immune balance and relieves UC induced inflammation response possibly by promoting the proliferation of CD4⁺CD29⁺ cells and modulating immuno-suppressive pathways.

© 2014 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: Ulcerative colitis; Baicalin; CD4⁺CD29⁺; Cytokines; Nuclear factor-kappa B

Yu FY, Huang SG, Zhang HY, Ye H, Chi HG, Zou Y, Lv RX, Zheng XB. Baicalin modulates immuno-inflammatory response in patients with ulcerative colitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(24): 3710-3717 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/3710.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i24.3710>

■同行评议者

刘杰民, 副主任医师, 贵州省人民医院消化内科; 杜群, 副研究员, 广州中医药大学脾胃研究所药理学

摘要

目的: 探讨溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)患者CD4⁺CD29⁺辅助性T细胞及其表面标志和相关细胞因子的表达, 并进一步探讨体外黄芩苷干预的作用。

方法: 选取33例UC患者, 30例腹泻型肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS-D)组, 30例健康组, 应用流式细胞仪检测UC患者CD4⁺CD29⁺的表达, Q-PCR的检测其GATA-3、FOXP3、T-bet、RORC的表达, Western blot检测其核因子κB(nuclear factor-kappa B, NF-κB) p65和phospho-NF-κB p65、STAT4和phospho-STAT4、STAT6和phospho-STAT6的表达, 用ELISA法检测血清γ-干扰素(interferon γ, IFN-γ)、白介素(interleukin, IL)-4、IL-5、IL-6、IL-10、肿瘤生长因子β(tumor specific growth factor-β, TGF-β)的水平及体外黄芩苷干预的作用。

结果: UC患者外周血中CD4⁺CD29⁺ T细胞与健康对照组和IBS-D组相比, CD4⁺和CD4⁺CD29⁺明显增高, 差异有统计学意义($P<0.01$); IFN-γ、IL-4、IL-5、IL-10和TGF-β1与IBS-D组和健康对照组均有不同程度的升高, IL-6较IBS-D组和健康对照组稍降低; 外周血单个核细胞RORC和FOXP3 mRNA与健康对照组和IBS-D组相比, RORC和FOXP3 mRNA明显增高, 差异有统计学意义($P<0.05$); 外周血T细胞转录因子*T-bet*基因的表达水平明显高于健康对照组, *GATA-3*基因的表达低于健康对照组, T-bet/*GATA-3*的比值明显高于健康对照组($P<0.05$); 40 μmol/L和20 μmol/L浓度黄芩苷的干预下CD4⁺CD29⁺较未干预前明显增高, 明显降低IFN-γ、IL-5、IL-6, 而升高IL-4和IL-10; RORC和FOXP3均明显下降, 可明显降低T-bet, 可稍降低GATA3, 使T-bet/*GATA-3*的比值较干预前降低; p-STAT4/STAT4较未干预前明显下降, p-STAT6/STAT6明显增高, p-NF-κB/NF-κB明显下降。

结论: 黄芩苷可能通过促CD4⁺CD29⁺增殖作用及多方面的免疫抑制调节免疫平衡而缓解溃疡性结肠炎的炎症反应, 为深入研究UC的发病机制及新药开发提供理论基础。

© 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; 黄芩苷; CD4⁺CD29⁺; 细胞因子; 核因子κB

因子κB(nuclear factor-kappa B, NF-κB)及磷酸化NF-κB在溃疡性结肠炎(ulcerative colitis)中的表达, 发现与健康对照组和腹泻型肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS-D)组相比较, p-NF-κB明显增高, NF-κB明显下降, p-NF-κB/NF-κB明显增高, 差异有统计学意义($P<0.05$)。体外黄芩苷干预, 40 μmol/L浓度干预下p-NF-κB/NF-κB下降, 差异有统计学意义($P<0.05$)。从而说明黄芩苷可能抑制p-NF-κB/NF-κB, 调节免疫平衡而缓解溃疡性结肠炎的炎症反应。我们同时通过ELISA检测血清中细胞因子, 发现γ-干扰素(interferon γ)、白介素-4(interleukin, IL-4)、IL-5、IL-10和肿瘤生长因子β(tumor specific growth factor-β)与炎症性肠病(inflammatory bowled disease)组和健康对照组均有不同程度的升高, IL-6较IBS-D组和健康对照组稍降低。

于丰彦, 黄绍刚, 张海燕, 叶华, 迟宏罡, 邹颖, 吕汝西, 郑元宝. CD4⁺CD29⁺ T细胞亚群与溃疡性结肠炎的相关性及黄芩苷的干预作用. 世界华人消化杂志 2014; 22(24): 3710-3717 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/3710.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v22.i24.3710>

0 引言

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是一种原因不明的肠道慢性非特异炎症性疾病, 属炎症性肠病(inflammatory bowled disease, IBD)的一种。虽然其发病机制尚未完全明确, 但UC的发生与免疫、遗传、环境及感染因素有关已经得到认可^[1]。在与UC发病密切相关的免疫因素中, T细胞起到了非常关键作用^[2]。CD29和CD4的共同表达可作为鉴别CD4⁺辅助性细胞亚群的标志, CD4⁺CD29⁺细胞主要辅助B细胞产生抗体和诱导CD8⁺细胞介导的淋巴细胞溶解作用, 其升高可造成B细胞高度活化而发生免疫异常, 作为UC的重要免疫学监测指标。近年来的研究发现, Th17/Treg转化平衡是维持肠道免疫稳态的重要因素。维A酸相关核孤儿受体γt(retinoid acid related orphan receptor gamma t, RORγt)是Th17所特有的转录因子。Treg主要分泌白介素-4(interleukin, IL-4)、IL-10和肿瘤生长因子β(tumor specific growth factor-β, TGF-β)等细胞因子, 与多种免疫性疾病的发病机制密切相关, 叉头蛋白P3(forkhead box P3, FOXP3)是Treg细胞的特性核转录因子, 在调控其分化、发育和功能上起关键作用。黄芩苷(baicalin)是黄芩汤中黄芩的主要有效成分之一^[3], 具有清热燥湿、泻火解毒功效。本研究观察黄芩苷对UC患者CD4⁺CD29⁺

■研究前沿

UC是一种原因不明的反复发作的肠道慢性非特异炎症性疾病。已知机体免疫调节异常是导致免疫紊乱进而引发肠道炎症的重要原因。T细胞是一类重要的免疫活性细胞, 直接介导细胞免疫功能, 对机体免疫应答的调节起关键作用。

■相关报道

有文献报道,两种新的转录因子T-bet和GATA-3的平衡对调控Th1/Th2分化至关重要,T-bet与GATA-3均可形成自我激活的反馈调节环路,针对自身和其他亚群特异性转录因子,构成一个动态调节网络,T-bet自身可通过与GATA-3的直接结合来干扰GATA-3所介导的Th2反应。

表1 PCR引物

名称	序列
GATA3	F: 5'-AGTTGGCCTAAGGTGGTTG-3' R: 5'-CACGCTGGTAGCTCATACAC-3'
FOXP3	F: 5'-CAGGATCTGAGGTCCCAACA-3' R: 5'-TTTGGCAAGGCAGTGTGTGT-3'
T-bet	F: 5'-CTGCATATCGTTGAGGTGAA-3' R: 5'-GTAGGCAGTCACGGCAATGA-3'
RORC	F: 5'-CAAGACTCATCGCCAAAGCA-3' R: 5'-CAGTGCTGAAGAGCTCCTTG-3'
18S	F: 5'-CCTGGATACCGCAGCTAGGA-3' R: 5'-GCGGCGCAATACGAATGCCCC-3'

PCR: 聚合酶反应。

T细胞的增殖作用,为深入研究UC的发病机制及新药开发提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料 选取2010-06/2011-01南方医科大学南方医院及广东省中医院大学城分院就诊的UC患者和腹泻型肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS-D)患者。33例UC患者中,男18例,女15例;年龄22-56岁,平均年龄39岁±17岁。30例IBS患者中男16例,女14例;年龄18-60岁,平均年龄39岁±21岁;30例健康对照组,女15例,男15例;年龄23-62岁,平均年龄42.5岁±19.5岁。

1.2 方法

1.2.1 外周血单个核细胞的制备: 采用Ficoll密度梯度离心法提取受检者静脉血淋巴细胞,计数淋巴细胞,稀释细胞浓度至 $1 \times 10^6/\text{mL}$,取1 mL细胞悬液置于试管中,放入冰箱备用。

1.2.2 流式检测: 取上述细胞悬液,加入 $1 \times \text{PBS}$ 溶液2 mL离心,1500 r/min×10 min共洗涤2遍;弃上清,加入PBS溶液配成100 μL 细胞悬液;每管分别加入人或大鼠的CD4抗体、CD29抗体及其各自同型对照抗体(均约1.25 μg),避光,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育30 min。加PBS溶液2 mL离心;1500 r/min×10 min,共洗涤2次。加入流式细胞缓冲液后,检测CD4⁺及CD29⁺ T细胞的表达。

1.2.3 UC淋巴细胞接受药物处理: 采用台盼蓝拒染法检测细胞的存活率。UC实验分共分为6组,第1组为未干预组(cell);第2组为阴性对照组,即以添加DMSO;第3组为以5 $\mu\text{mol/L}$ 黄芩苷浓度干预;第4组为以10 $\mu\text{mol/L}$ 黄芩苷浓度干预;第5组为以20 $\mu\text{mol/L}$ 黄芩苷干预;第6组为以40 $\mu\text{mol/L}$ 黄芩苷干预。

1.2.4 MTS法检测细胞增殖: (1)取各组细胞进行下面实验; (2)消化细胞后吹打散细胞,计数,调整细胞浓度为 $1 \times 10^5/\text{mL}$,分到96孔板,每孔100 μL ,即每孔细胞为 1×10^4 个; (3)贴壁细胞需待细胞贴壁后,再收集各时间点细胞进行检测; (4)收集各个时间点的细胞(0, 24, 48, 72 h)加入MTS,比例为1:10。即100 μL 培养液加入10 μL 检测液; (5)在孵育4 h后,酶标仪读板,MTS检测读取 A_{490} 数据。

1.2.5 Q-PCR的检测: 取外周静脉血各1 mL,用人淋巴细胞分离液分离外周血单个核细胞。TRIzol一步法提取PBMC总mRNA,用琼脂糖凝胶电泳检测RNA完整性,紫外分光光度计测定RNA浓度和纯度。cDNA合成按照试剂盒说明书操作,相关引物如表1,反应条件: 50 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 32 s读板,40个循环;融解曲线分析: 温度60 $^{\circ}\text{C}$ -95 $^{\circ}\text{C}$ 。每个样重复3次。收集荧光信号,得到Ct值。循环结束应用系统软件绘制扩增曲线、融解曲线。由软件得出RQ值,即是所检测目的基因的相对表达量。

1.2.6 Western blot蛋白水平检测: 提取并检测培养细胞蛋白,采用裂解缓冲液经匀浆裂解提取蛋白。根据总蛋白测定试剂盒说明书测定样本中的总蛋白含量及电泳上样量。电泳、转膜、染色、去离子水震荡去除浮色,5%脱脂奶粉封闭,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,分别加入NF- κB p65和phospho-NF- κB p65, STAT4、phospho-STAT4和STAT6、phospho-STAT6单克隆抗体孵育,洗涤后加入二抗孵育,洗涤后加入底物孵育,取出NC膜并用蒸馏水漂洗后晾干,将胶片进行扫描或拍照,用凝胶图像处理系统分析目标带的分子量和净光密度值。

1.2.7 血清IFN- γ 、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、TGF- β 水平的检测: 应用ELISA法检测,按试剂盒说明书操作。使用酶标仪在450 nm处测定A值,转化为浓度。试剂盒购自深圳晶美生物工程有限公司。

统计学处理 统计学分析采用SPSS13.0统计分析软件,计量数据用mean±SD表示,采用方差分析后再进行 q 检验, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 黄芩苷的干预对CD4⁺CD29⁺细胞亚群的影响 与健康对照组和IBS-D组相比,UC组CD4⁺和CD4⁺CD29⁺细胞明显增高,差异有统计学意义。

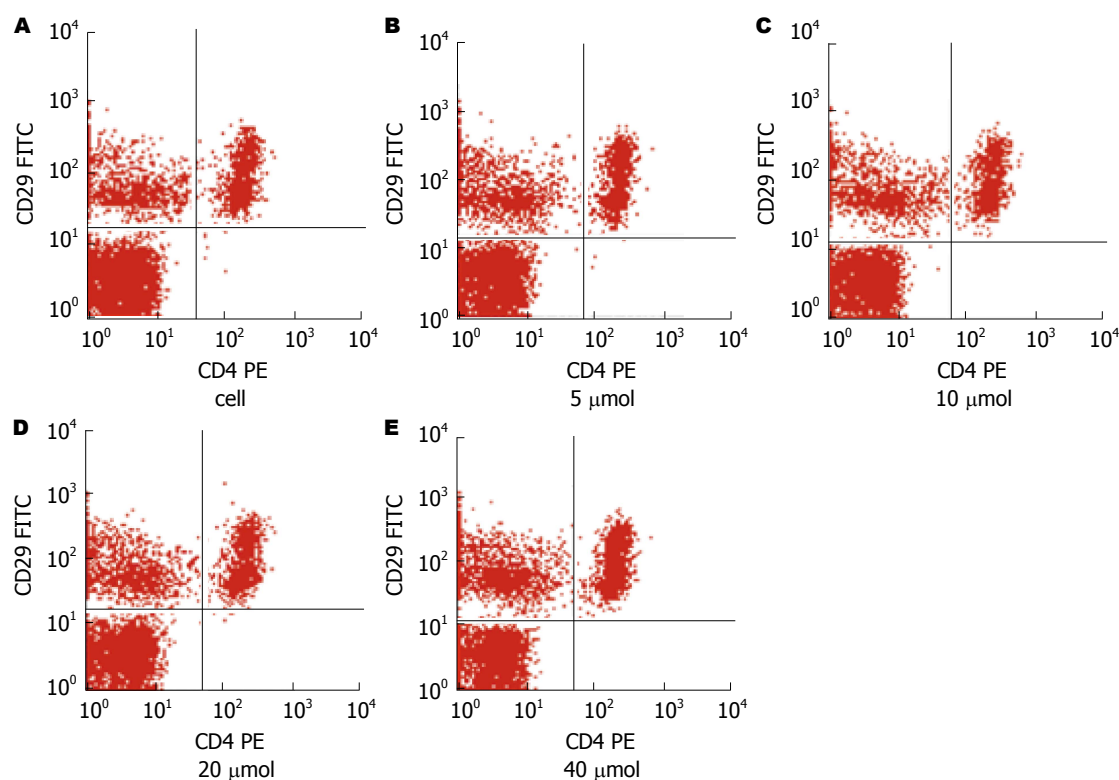


图1 黄芩苷处理72 h后流式细胞仪检测CD4⁺CD29⁺细胞含量. A: 健康对照组; B: 5 μmol/L干预组; C: 10 μmol/L干预组; D: 20 μmol/L干预组; E: 40 μmol/L干预组.

应用要点

黄芩苷可能是一种潜在的免疫抑制剂,可能通过多方面的免疫抑制调节免疫平衡而缓解溃疡性结肠的炎症反应,为深入研究UC的发病机制及新药开发提供理论基础,为包括UC在内其他Th细胞免疫紊乱的相关疾病提供新思路.

(41.56 ± 3.6 vs 19.37 ± 4.1, 20.12 ± 3.4; 8.33 ± 1.25 vs 1.91 ± 2.35, 2.42 ± 1.12, $P < 0.01$); IBS-D组与健康对照组相比较CD4⁺和CD4⁺CD29⁺细胞均增高,但差异无统计学意义($P > 0.05$)(图1).

2.2 Q-PCR检测情况 UC患者外周血T细胞转录因子*T-bet*和*GATA-3*基因的表达结果显示,UC患者外周血T细胞转录因子*T-bet*基因的表达水平明显高于健康对照组,*GATA-3*基因的表达低于健康对照组,*T-bet*/*GATA-3*的比值明显高于健康对照组($P < 0.05$).体外黄芩苷干预下,40 μmol/L浓度干预比干预前、DMSO干预、5 μmol/L干预、10 μmol/L干预和20 μmol/L的*GATA3*和*FOXP3*明显升高而*T-bet*、*RORC*明显下降,与未干预前、DMSO干预、5 μmol/L干预、10 μmol/L干预和20 μmol/L之间差异有统计学意义($P < 0.05$);未干预前、DMSO干预、5 μmol/L干预、10 μmol/L干预和20 μmol/L干预的*RORC*之间比较差异无统计学意义($P > 0.05$).

2.3 Western blot检测 与健康对照组和IBS-D组相比较,p-STAT6明显下降,STAT6较增高,p-STAT6/STAT6明显下降,差异有统计学意义($P < 0.05$);IBS-D组和健康对照组之间差异无统计学意义($P > 0.05$).体外黄芩苷干预下,在40

μmol/L和20 μmol/L浓度干预下p-STAT6/STAT6较未干预前、DMSO干预、5 μmol/L干预和10 μmol/L浓度干预明显增高,之间差异有统计学意义($P < 0.05$);与健康对照组和IBS-D组相比较,p-STAT4明显增高,STAT4也增高,p-STAT4/STAT4明显增高,差异有统计学意义($P < 0.05$);IBS-D组和健康对照组之间差异无统计学意义($P > 0.05$).体外黄芩苷干预下,在40 μmol/L和20 μmol/L浓度干预下p-STAT4/STAT4较未干预前、DMSO干预、5 μmol/L干预和10 μmol/L浓度干预之间比较明显下降,差异有统计学意义($P < 0.05$);40 μmol/L和20 μmol/L浓度干预下p-STAT4/STAT4相比较差异无统计学意义($P > 0.05$).干预前、DMSO干预、5 μmol/L干预、10 μmol/L和20 μmol/L浓度干预之间p-STAT4/STAT4差异无统计学意义($P > 0.05$).

与健康对照组和IBS-D组相比较,NF-κB磷酸化水平明显增高,NF-κB明显下降,差异有统计学意义($P < 0.05$);IBS-D组和健康对照组之间差异无统计学意义($P > 0.05$).

体外黄芩苷干预下,在40 μmol/L浓度干预下p-NF-κB/NF-κB较未干预前、DMSO干预、5 μmol/L干预、10 μmol/L和20 μmol/L浓度干预之

■同行评价

本文有很好的科学性, 设计合理, 方法可靠, 有较好的学术价值.

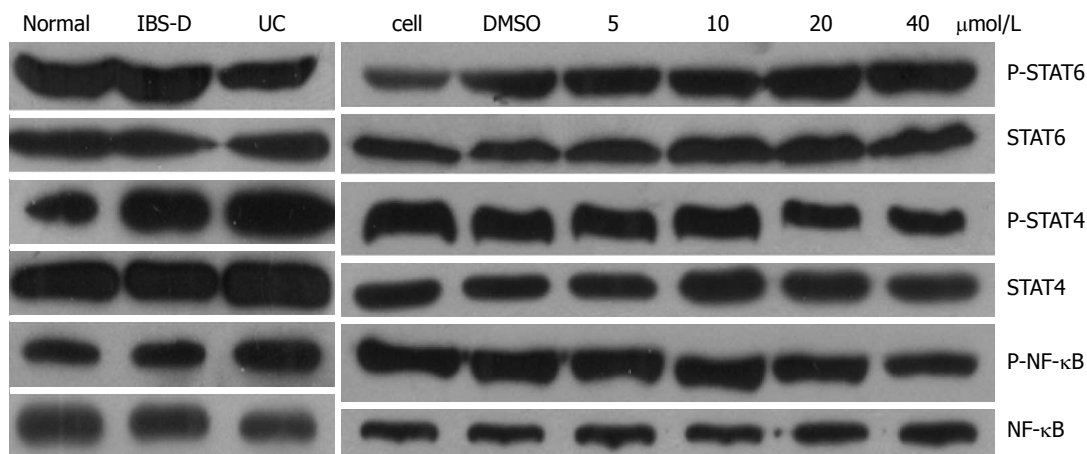


图2 体外黄芩苷干预下Western blot检测相关蛋白的表达变化. NF- κ B: 核因子 κ B. UC: 溃疡性结肠炎; IBS-D: 腹泻型肠易激综合征.

间差异有统计学意义($P<0.05$); 干预前、DMSO干预、5 μ mol/L干预、10 μ mol/L和20 μ mol/L浓度干预的p-NF- κ B/NF- κ B之间差异无统计学意义($P>0.05$)(图2).

2.4 ELISA检测情况 较健康对照组和IBS-D组, UC组IFN- γ 、IL-5浓度明显增高, 差异有统计学意义($P<0.01$); IBS-D组与健康对照组之间亦差异有统计学意义($P<0.05$).

体外黄芩苷干预下, 在40 μ mol/L和20 μ mol/L浓度干预下IFN- γ 、IL-5较未干预前明显下降, 与DMSO干预、5 μ mol/L干预和10 μ mol/L干预之间差异有统计学意义($P<0.05$); 40 μ mol/L和20 μ mol/L浓度干预下IFN- γ 、IL-5之间差异无统计学意义($P>0.05$), 未干预前、DMSO干预、5 μ mol/L干预和10 μ mol/L干预之间IFN- γ 、IL-5差异无统计学意义($P>0.05$).

健康对照组较IBS-D组和UC组IL-5浓度明显增高, 与健康对照组相比, 差异有统计学意义($P<0.01$); IBS-D组与健康对照组之间亦差异有统计学意义($P<0.05$).

体外黄芩苷干预下, 在40 μ mol/L、20 μ mol/L浓度干预下IL-6较未干预前、DMSO干预下的IL-6明显下降, 与未干预前、DMSO干预、5 μ mol/L干预和10 μ mol/L干预之间差异有统计学意义($P<0.05$); 40 μ mol/L和20 μ mol/L浓度干预下IL-5之间差异无统计学意义($P>0.05$), 未干预前、DMSO干预、5 μ mol/L干预和10 μ mol/L干预之间IL-5差异无统计学意义($P>0.05$).

健康对照组和IBS-D组IL-4、IL-10浓度均低于UC组, 差异有统计学意义($P<0.05$); 体外黄芩苷干预下, 在40 μ mol/L和20 μ mol/L浓度干预

下IL-4、IL-10较未干预前明显增高, 与DMSO干预、5 μ mol/L干预和10 μ mol/L干预之间差异有统计学意义($P<0.05$); 40 μ mol/L和20 μ mol/L浓度干预下IL-4、IL-10之间差异无统计学意义($P>0.05$), 未干预前、DMSO干预、5 μ mol/L干预和10 μ mol/L干预之间IL-4、IL-10差异无统计学意义($P>0.05$).

体外黄芩苷干预下, 在40 μ mol/L、20 μ mol/L浓度干预下TGF- β 1较未干预前、DMSO干预下的TGF- β 1差异无统计学意义($P>0.05$), 5 μ mol/L干预下TGF- β 1较未干预前、DMSO干预、10 μ mol/L干预、20 μ mol/L干预和40 μ mol/L干预的TGF- β 1明显下降, 差异有统计学意义($P<0.05$); 未干预前、DMSO干预、10 μ mol/L干预、20 μ mol/L干预和40 μ mol/L干预的TGF- β 1之间差异无统计学意义($P>0.05$).

3 讨论

UC是一种原因不明的反复发作的肠道慢性非特异炎症性疾病. 已知机体免疫调节异常是导致免疫紊乱进而引发肠道炎症的重要原因^[4-8]. T细胞是一类重要的免疫活性细胞, 直接介导细胞免疫功能, 对机体免疫应答的调节起关键作用. $CD4^+$ T细胞在控制T细胞对自身和外来抗原的免疫应答中扮演着重要的角色, 在溃疡性结肠炎的发展和持续中起重要作用^[9,10]. $CD4^+CD29^+$ T细胞属于辅助性T细胞, 参与自身免疫性疾病的发病已有报道, 并且发现 $CD4^+CD29^+$ T细胞能促进甲状腺功能亢进患者的B细胞生长因子增多^[11,12], 还发现妊娠糖尿病^[13]、过敏性鼻炎^[14]患者、急性丙型肝炎患

者的外周血CD29⁺ T细胞均高于对照组^[15]. 但有关黄芩汤从T细胞亚群的角度综合调控T细胞活性的机制研究未见报道. 我们前期的研究已经发现CD4⁺CD29⁺ T细胞在湿热型UC患者和大鼠中表达均显著升高, 可能参与了湿热型UC的发病. 我们在前期研究的基础上体外培养UC患者外周血中CD4⁺CD29⁺ T细胞发现与健康对照组和IBS-D组相比, CD4⁺和CD4⁺CD29⁺明显增高, 差异有统计学意义($P<0.01$); 体外黄芩苷干预下, CD4⁺和CD4⁺CD29⁺增殖明显. 说明了黄芩苷作为黄芩汤的重要组成成分之一, 可能通过促CD4⁺CD29⁺增殖作用而调节免疫功能而治疗溃疡性结肠炎.

近年来的研究发现, Th17与Treg在分化的过程中有着密切的联系, 二者存在相互转化的关系, 两者在机体免疫反应中起着独立统一的关系, 他们之间的平衡关系若被打破, 则可能成为多种疾病发生的关键因素. 研究发现, IL-23极受体IL-23R以及RORC在Th17的分化和维持中起到了关键的作用, 并与UC的发病密切相关^[16,17]. 另有文献报道, 两种新的转录因子T-bet和GATA-3的平衡对调控Th1/Th2分化至关重要, T-bet与GATA-3均可形成自我激活的反馈调节环路, 针对自身和其他亚群特异性转录因子, 构成一个动态调节网络^[18], T-bet自身可通过与GATA-3的直接结合来干扰GATA-3所介导的Th2反应^[19].

我们前期的实验证实, 通过调节转录因子FOXP3、ROR γ t以及细胞因子IL-17、IL-6、IL-10和TGF- β 1的表达, 黄芩汤能够调节Th17/Treg的平衡而缓解湿热型溃疡性结肠炎大鼠的炎症反应, 这也许是黄芩汤治疗湿热型溃疡性结肠炎的免疫调节机制之一. 在前期研究的基础上通过ELISA检测血清中细胞因子, 发现IFN- γ 、IL-4、IL-5、IL-10和TGF- β 1与IBS-D组和健康对照组均有不同程度的升高, IL-6较IBS-D组和健康对照组稍降低. 体外不同浓度的黄芩苷可引起IFN- γ 、IL-5、IL-6明显降低, IL-4和IL-10升高, 以20 μ mol/L和40 μ mol/L浓度更明显. 通过Q-PCR检测外周血单个核细胞RORC和FOXP3 mRNA, 与健康对照组和IBS-D组相比较, RORC和FOXP3 mRNA明显增高, 差异有统计学意义($P<0.05$). 较高浓度黄芩苷干预对FOXP3下降的作用更明显, 使ROR γ t/FOXP3比值降低, 间接调节了Th17/Treg分化的平衡. Q-PCR检测外周血T细胞转录因子T-bet的表达水平明显高

于健康对照组, *GATA-3*基因的表达低于健康对照组, T-bet/*GATA-3*的比值明显高于健康对照组($P<0.05$), T-bet水平升高, 可促使Th1细胞的分化和细胞因子的水平升高, 而*GATA-3*水平下降, 不能促进Th0细胞向Th2细胞分化, 而最后导致机体呈Th1优势表达, 与国外相关报道一致^[20]. 40 μ mol/L浓度黄芩苷干预可明显降低T-bet, 可稍降低*GATA3*, 使T-bet/*GATA-3*的比值较干预前降低. 从上述研究中我们发现, 较高浓度的黄芩苷均能够抑制T-bet、*GATA3*的表达及IFN- γ 、IL-4、IL-5、IL-10等细胞因子, 可以使IL-4、IL-10升高. 我们认为黄芩苷可能具有把Th0细胞向Th1/Th2细胞分化这个环节作为治疗UC的新靶点, 将Th1状态逆转为Th2状态. 同时说明了黄芩苷也可能通过调节T-bet与*GATA-3*表达, 可能纠正Th1/Th2细胞分化失衡.

STAT6和STAT4属于STAT家族, 他们分别参与调节Th细胞向Th1和Th2亚群的分化过程^[21]. STAT4被认为是调节Th1分化的转录因子, 因而STAT4的活化具有致炎作用. 有研究发现UC和CD患者以及作为对照组的肠易激综合征患者, 其结肠黏膜组织中磷酸化的STAT4的表达均增高, 但UC患者的STAT4升高得较显著^[21]. 有研究结果显示磷酸化的STAT4存在于UC组织中, 并明显高于对照组^[22]. 因为磷酸化的STAT4代表活化状态的STAT4, 说明STAT4在UC的发病中起作用, STAT4的表达增高可能导致了UC的炎症过程. STAT6是介导Th2的关键转录因子之一, 因而STAT6的活化有抗炎作用. 有研究显示溃疡性结肠炎结肠黏膜STAT6较健康对照组无明显变化, 但经复方中药干预下结肠黏膜的STAT6较治疗前明显下降, 通过抑制STAT6调节免疫而达到改善临床症状. 我们应用Western blot蛋白水平检测外周血单个核细胞STAT4和STAT6、磷酸化STAT4和STAT6及相关细胞因子在UC中的表达, 发现与健康对照组和IBS-D组相比较, p-STAT4/STAT4明显增高, p-STAT6/STAT6明显下降, 差异有统计学意义($P<0.05$). 体外黄芩苷干预下, 在40 μ mol/L和20 μ mol/L浓度干预下p-STAT4/STAT4较未干预前、DMSO干预、5 μ mol/L干预和10 μ mol/L浓度干预之间比较明显下降, p-STAT6/STAT6较未干预前、DMSO干预、5 μ mol/L干预和10 μ mol/L浓度干预明显增高, 差异有统计学意义($P<0.05$).

目前多数研究认为免疫功能紊乱在IBD发病中起关键作用^[23]. Neurath等^[22]第一次在TNBS

诱发的IBD动物模型中证实了炎性肠组织中存在NF- κ B的活化以来, Schreiber等^[23]的研究也证实NF- κ B在正常人肠上皮无活性, 而在UC和CD人肠上皮中高度活跃, 从而表明NF- κ B对UC的发生、发展起着重要作用. 有研究^[24]证实黄芩苷处理重症胰腺炎大鼠, 能减少血液中内毒素和TNF- α 的含量, 减轻肠黏膜损伤, 降低细胞因子NF- κ B的产生, 抑制炎症反应, 从而保护肠黏膜. 本研究通过检测外周血单个核细胞NF- κ B及磷酸化NF- κ B(p-NF- κ B)在UC中的表达, 发现与健康对照组和IBS-D组相比较, p-NF- κ B明显增高, NF- κ B明显下降, p-NF- κ B/NF- κ B明显增高, 差异有统计学意义($P < 0.05$). 体外黄芩苷干预, 40 $\mu\text{mol/L}$ 浓度干预下p-NF- κ B/NF- κ B下降, 差异有统计学意义($P < 0.05$). 从而说明黄芩苷可能抑制p-NF- κ B/NF- κ B, 调节免疫平衡而缓解溃疡性结肠的炎症反应. 我们同时通过ELISA检测血清中细胞因子, 发现IFN- γ 、IL-4、IL-5、IL-10和TGF- β 1与IBS-D组和健康对照组均有不同程度的升高, IL-6较IBS-D组和健康对照组稍降低. 体外不同溶度的黄芩苷可引起IFN- γ 、IL-5、IL-6明显降低, IL-4和IL-10升高, 以20 $\mu\text{mol/L}$ 和40 $\mu\text{mol/L}$ 浓度更明显. 从上述研究中我们发现黄芩苷作为黄芩汤的重要组成成分之一, 可能是一种潜在的免疫抑制, 可能抑制p-STAT4/STAT4, 调节p-STAT6/STAT6、p-NF- κ B/NF- κ B及相关细胞因子, 可能通过多方面的免疫抑制调节免疫平衡而缓解溃疡性结肠的炎症反应.

从上述研究中我们发现, 黄芩苷可能是一种潜在的免疫抑制剂, 可能通过多方面的免疫抑制调节免疫平衡而缓解溃疡性结肠的炎症反应, 为深入研究UC的发病机制及新药开发提供理论基础, 为包括UC在内其他Th细胞免疫紊乱的相关疾病提供新思路.

4 参考文献

- 1 Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology* 1998; 115: 182-205 [PMID: 9649475]
- 2 Yamaji O, Nagaishi T, Totsuka T, Onizawa M, Suzuki M, Tsuge N, Hasegawa A, Okamoto R, Tsuchiya K, Nakamura T, Arase H, Kanai T, Watanabe M. The development of colitogenic CD4(+) T cells is regulated by IL-7 in collaboration with NK cell function in a murine model of colitis. *J Immunol* 2012; 188: 2524-2536 [PMID: 22331065 DOI: 10.4049/jimmunol.1100371]
- 3 Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. 1986. *J Immunol* 2005; 175: 5-14 [PMID: 15972624]
- 4 Bai A, Lu N, Zeng H, Li Z, Zhou X, Chen J, Liu P, Peng Z, Guo Y. All-trans retinoic acid ameliorates trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis by shifting Th1 to Th2 profile. *J Interferon Cytokine Res* 2010; 30: 399-406 [PMID: 20187766 DOI: 10.1089/jir.2009.0028]
- 5 Xu J, Yang Y, Qiu G, Lal G, Yin N, Wu Z, Bromberg JS, Ding Y. Stat4 is critical for the balance between Th17 cells and regulatory T cells in colitis. *J Immunol* 2011; 186: 6597-6606 [PMID: 21525389 DOI: 10.4049/jimmunol.1004074]
- 6 Chen Z, Lin F, Gao Y, Li Z, Zhang J, Xing Y, Deng Z, Yao Z, Tsun A, Li B. FOXP3 and ROR γ t: transcriptional regulation of Treg and Th17. *Int Immunopharmacol* 2011; 11: 536-542 [PMID: 21081189 DOI: 10.1016/j.intimp.2010.11.008]
- 7 Mudter J, Weigmann B, Bartsch B, Kiesslich R, Strand D, Galle PR, Lehr HA, Schmidt J, Neurath MF. Activation pattern of signal transducers and activators of transcription (STAT) factors in inflammatory bowel diseases. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 64-72 [PMID: 15654782]
- 8 Lai MY, Hsiu SL, Tsai SY, Hou YC, Chao PD. Comparison of metabolic pharmacokinetics of baicalin and baicalein in rats. *J Pharm Pharmacol* 2003; 55: 205-209 [PMID: 12631413 DOI: 10.1111/j.1572-0241.2005.40615.x]
- 9 Shen YC, Chiou WF, Chou YC, Chen CF. Mechanisms in mediating the anti-inflammatory effects of baicalin and baicalein in human leukocytes. *Eur J Pharmacol* 2003; 465: 171-181 [PMID: 12650847 DOI: 10.1016/S0014-2999(03)01378-5]
- 10 Chao K, Zhong BH, Zhang SH, Gong XR, Yao JY, Chen MH. [Imbalance of CD4(+) T cell subgroups in ulcerative colitis]. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2011; 91: 1605-1608 [PMID: 21914392]
- 11 Grundmann O, Yoon SL. Irritable bowel syndrome: epidemiology, diagnosis and treatment: an update for health-care practitioners. *J Gastroenterol Hepatol* 2010; 25: 691-699 [PMID: 20074154 DOI: 10.1111/j.1440-1746.2009.06120.x]
- 12 Xu D, Liu H, Komai-Koma M, Campbell C, McSharry C, Alexander J, Liew FY. CD4+CD25+ regulatory T cells suppress differentiation and functions of Th1 and Th2 cells, Leishmania major infection, and colitis in mice. *J Immunol* 2003; 170: 394-399 [PMID: 12496424 DOI: 10.4049/jimmunol.170.1.394]
- 13 Kanai T, Nemoto Y, Kamada N, Totsuka T, Hisamatsu T, Watanabe M, Hibi T. Homeostatic (IL-7) and effector (IL-17) cytokines as distinct but complementary target for an optimal therapeutic strategy in inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2009; 25: 306-313 [PMID: 19448533 DOI: 10.1097/MOG.0b013e32832bc627]
- 14 Mahmoud F, Arifhodzic N, Haines D, Novotney L. Levocetirizine modulates lymphocyte activation in patients with allergic rhinitis. *J Pharmacol Sci* 2008; 108: 149-156 [PMID: 18946193 DOI: 10.1254/jphs.08037FP]
- 15 Boykinova OB, Stoilova YD, Tsvetkova TZ, Baltadjiev IG. Epidemiological, immunological and clinical characteristics of acute hepatitis C. *Folia Med (Plovdiv)* 2009; 51: 61-69 [PMID: 19437900]
- 16 Kitani A, Xu L. Regulatory T cells and the induction of IL-17. *Mucosal Immunol* 2008; 1 Suppl 1: S43-S46

- [PMID: 19079228 DOI: 10.1038/mi.2008.51]
- 17 Ogino H, Nakamura K, Ihara E, Akiho H, Takayanagi R. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells suppress Th17-responses in an experimental colitis model. *Dig Dis Sci* 2011; 56: 376-386 [PMID: 20521112 DOI: 10.1007/s10620-010-1286-2]
- 18 Rengarajan J, Szabo SJ, Glimcher LH. Transcriptional regulation of Th1/Th2 polarization. *Immunol Today* 2000; 21: 479-483 [PMID: 11071525]
- 19 Hwang ES, Szabo SJ, Schwartzberg PL, Glimcher LH. T helper cell fate specified by kinase-mediated interaction of T-bet with GATA-3. *Science* 2005; 307: 430-433 [PMID: 15662016]
- 20 Müller B, Gimsa U, Mitchison NA, Radbruch A, Sieper J, Yin Z. Modulating the Th1/Th2 balance in inflammatory arthritis. *Springer Semin Immunopathol* 1998; 20: 181-196 [PMID: 9836376]
- 21 Fan H, Zhao J, Shen L. Effect of compound Sophorae Flavescentis Jiechangrong capsule on expression of NF- κ B p65 and STAT6 in the intestinal mucosa of patients with ulcerative colitis. *Front Med China* 2009; 3: 480-484 [DOI: 10.1007/s11684-009-0083-9]
- 22 Neurath MF, Pettersson S. Predominant role of NF-kappa B p65 in the pathogenesis of chronic intestinal inflammation. *Immunobiology* 1997; 198: 91-98 [PMID: 9442381]
- 23 Schreiber S, Nikolaus S, Hampe J. Activation of nuclear factor kappa B inflammatory bowel disease. *Gut* 1998; 42: 477-484 [PMID: 9616307]
- 24 Zhang XP, Zhang L, He JX, Zhang RP, Cheng QH, Zhou YF, Lu B. Experimental study of therapeutic efficacy of Baicalin in rats with severe acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 717-724 [PMID: 17278194]

编辑 郭鹏 电编 闫晋利



氧化应激状态评价对消化系统肿瘤诊断的临床指导意义

林明哲, 李欣

■背景资料

胃肠道肿瘤患者常常伴有机体免疫功能不足, 术后疾病发展、肿瘤复发转移等收机体免疫功能重要影响。而氧化应激反应(oxidative stress, ROS)是化学性质活跃的含氧原子、原子团, 在其发病与诊断中具有重要的意义。

林明哲, 李欣, 青海大学附属医院肿瘤内科一病区 青海省西宁市 810001

林明哲, 副主任医师, 主要从事恶性肿瘤综合治疗的研究。

作者贡献分布: 此课题由林明哲设计, 李欣指导; 研究过程由林明哲与李欣操作完成; 数据分析由林明哲完成; 本论文写作由林明哲与李欣完成。

通讯作者: 林明哲, 副主任医师, 810001, 青海省西宁市城西区同仁路29号, 青海大学附属医院肿瘤内科一病区。

13997092227@163.com

电话: 0971-6162732

收稿日期: 2014-05-19 修回日期: 2014-06-23

接受日期: 2014-07-05 在线出版日期: 2014-08-28

Clinical significance of oxidative stress evaluation in gastrointestinal cancer diagnosis

Ming-Zhe Lin, Xin Li

Ming-Zhe Lin, Xin Li, Department of Internal Medicine, Qinghai University Affiliated Hospital, Xining 810001, Qinghai Province, China

Correspondence to: Ming-Zhe Lin, Associate Chief Physician, Department of Internal Medicine, Qinghai University Affiliated Hospital, 29 Tongren Road, Chengxi District, Xining 810001, Qinghai Province, China. 13997092227@163.com

Received: 2014-05-19 Revised: 2014-06-23

Accepted: 2014-07-05 Published online: 2014-08-28

Abstract

AIM: To analyze oxidative stress in patients with gastrointestinal tumors.

METHODS: Two hundred patients with gastrointestinal cancer treated from September 2011 to September 2013 at our hospital were randomly selected and divided into a gastric cancer group ($n = 100$) and a colorectal cancer group ($n = 100$). Fifty healthy volunteers receiving physical examination during the same period at our hospital were used as controls. All study subjects were subjected to measurement of serum oxidative damage products, antioxidants and antioxidant enzymes.

RESULTS: The concentrations of protein carbonyl (PC), advanced oxidation protein products (AOPP), malondialdehyde (MDA), and 8-hy-

droxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) in patients with gastric cancer and colorectal cancer were significantly different from those in healthy controls ($4.12 \text{ nmol/L} \pm 1.34 \text{ nmol/L}$, $4.24 \text{ nmol/L} \pm 1.29 \text{ nmol/L}$ vs $2.83 \text{ nmol/L} \pm 0.71 \text{ nmol/L}$; $31.93 \text{ } \mu\text{mol/L} \pm 12.34 \text{ } \mu\text{mol/L}$, $32.14 \text{ } \mu\text{mol/L} \pm 11.69 \text{ } \mu\text{mol/L}$ vs $25.91 \text{ } \mu\text{mol/L} \pm 9.10 \text{ } \mu\text{mol/L}$; $2.98 \text{ nmol/L} \pm 1.13 \text{ nmol/L}$, $3.02 \text{ nmol/L} \pm 1.24 \text{ nmol/L}$ vs $6.13 \text{ nmol/L} \pm 1.82 \text{ nmol/L}$; $125.91 \text{ mg/L} \pm 5.00 \text{ mg/L}$, $124.13 \text{ mg/L} \pm 5.00 \text{ mg/L}$ vs $96.16 \text{ mg/L} \pm 68.29 \text{ mg/L}$, $P < 0.05$), although there were no significant differences between the gastric cancer and colorectal cancer groups ($P > 0.05$). The concentrations of glutathione, glutathione (GSH), vitamin C and vitamin E in patients with gastric cancer and colorectal cancer were significantly different from those in healthy controls ($P < 0.05$), although there were no significant differences between the gastric cancer and colorectal cancer groups ($P > 0.05$). Superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) and catalase (CAT) activity in patients with gastric cancer and colorectal cancer were significantly different from those in healthy controls ($P < 0.05$), although there were no significant differences between the gastric cancer and colorectal cancer groups ($P > 0.05$).

CONCLUSION: Patients with gastrointestinal tumors undergo oxidative stress, and evaluation of oxidative stress in patients with gastrointestinal cancer has important clinical significance in determining the occurrence of gastrointestinal cancer.

© 2014 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: Gastrointestinal tumors; Oxidative stress; Reactive oxygen

Lin MZ, Li X. Clinical significance of oxidative stress evaluation in gastrointestinal cancer diagnosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(24): 3718-3721 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/3718.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i24.3718>

摘要

目的: 对胃肠道肿瘤患者机体氧化应激状态

■同行评议者

郭炜, 教授, 河北医科大学第四医院河北省肿瘤研究所病理研究室

展开分析研究。

方法: 随机选取2011-09/2013-09青海大学附属医院接收救治的200例胃肠道肿瘤患者, 分成胃癌组100例, 肠癌组100例, 并选取同期于青海大学附属医院进行健康体检正常人50例作为对照组, 所有研究对象均检测血清中氧化损伤产物、抗氧化剂及抗氧化酶类。

结果: 胃癌组和肠癌组蛋白羰基(protein carbonyl)、晚期氧化蛋白产物(advanced products)、丙二醛(malondialdehyde)以及8-羟基脱氧鸟苷(8-hydroxy-2'-deoxyguanosine)浓度与健康对照组相比, 差异具有统计学意义($4.12 \text{ nmol/L} \pm 1.34 \text{ nmol/L}$, $4.24 \text{ nmol/L} \pm 1.29 \text{ nmol/L}$ vs $2.83 \text{ nmol/L} \pm 0.71 \text{ nmol/L}$; $31.93 \text{ } \mu\text{mol/L} \pm 12.34 \text{ } \mu\text{mol/L}$, $32.14 \text{ } \mu\text{mol/L} \pm 11.69 \text{ } \mu\text{mol/L}$ vs $25.91 \text{ } \mu\text{mol/L} \pm 9.10 \text{ } \mu\text{mol/L}$; $2.98 \text{ nmol/L} \pm 1.13 \text{ nmol/L}$, $3.02 \text{ nmol/L} \pm 1.24 \text{ nmol/L}$ vs $6.13 \text{ nmol/L} \pm 1.82 \text{ nmol/L}$, $125.91 \text{ mg/L} \pm 5.00 \text{ mg/L}$, $124.13 \text{ mg/L} \pm 5.00 \text{ mg/L}$ vs $96.16 \text{ mg/L} \pm 68.29 \text{ mg/L}$, 均 $P < 0.05$); 胃癌组与肠癌组间氧化损伤产物浓度对比, 差异无统计学意义(均 $P > 0.05$); 胃癌组和肠癌组谷胱甘肽(glutathione, GSH)、维生素C以及维生素E浓度与健康对照组相比, 差异具有统计学意义(均 $P < 0.05$); 胃癌组与肠癌组间抗氧化剂浓度对比, 差异无统计学意义(均 $P > 0.05$); 胃癌组与肠癌组超氧化物歧化酶(orgotein superoxide dismutase)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase)以及过氧化氢酶(catalase)活性与健康对照组相比, 差异具有统计学意义(均 $P < 0.05$); 胃癌组、肠癌组间抗氧化酶类活性对比, 差异无统计学意义(均 $P > 0.05$)。

结论: 胃肠道肿瘤患者机体受氧化应激影响, 评价胃肠道肿瘤患者机体氧化应激状态对判定胃肠道肿瘤发生具有十分重要的临床指导意义。

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词: 胃肠道肿瘤; 机体氧化应激; 机体活性氧

核心提示: 胃肠道肿瘤患者机体经常受到氧化应激的影响, 临床中评价胃肠道肿瘤患者机体氧化应激状态对判定胃肠道肿瘤发生具有十分重要的临床指导意义。

林明哲, 李欣. 氧化应激状态评价对消化系统肿瘤诊断的临床指导意义. 世界华人消化杂志 2014; 22(24): 3718-3721 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/3718.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v22.i24.3718>

0 引言

氧化应激反应(oxidative stress, ROS)是化学性质活跃的含氧原子、原子团, 是外源性氧化剂、细胞内有氧代谢阶段形成的带有较高生物活性的含氧化合物的总称. ROS指机体受活性氧形成提升或者活性氧消除能力下降影响, 对活性氧形成、消除平衡造成破坏, 从而使多余的活性氧造成分子、细胞、机体出现损失情况^[1]. 胃肠道肿瘤患者机体免疫功能不足, 术后疾病发展、肿瘤复发转移等收机体免疫功能重要影响, 细胞免疫在机体免疫效应机制中发挥着重要功效. 本研究随机选取2011-09/2013-09青海大学附属医院接收救治的200例胃肠道肿瘤患者, 并选取100例同期于青海大学附属医院进行健康体检正常人, 通过对其临床资料进行综合分析, 初步了解胃肠道肿瘤患者机体氧化应激状态, 旨在提高对胃肠道肿瘤的诊断能力, 现报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料 本次研究对象为选取2011-09/2013-09青海大学附属医院接收救治的200例胃肠道肿瘤患者, 分成胃癌组100例, 肠癌组100例, 均符合世界卫生组织(World Health Organization, WHO)诊断标准^[2]. 胃癌组中, 男52例, 女48例; 年龄为49-77岁, 平均年龄 $58.5 \text{ 岁} \pm 6.6 \text{ 岁}$. 肿瘤TNM分期: I期20例, II期45例, III期20例, IV期15例. 分化程度: 高分化20例, 中分化50例, 低分化30例. 肠癌组中, 男58例, 女42例; 年龄为48-78岁, 平均年龄 $59.1 \text{ 岁} \pm 5.9 \text{ 岁}$. 肿瘤TNM分期: I期22例, II期45例, III期19例, IV期14例. 分化程度: 高分化18例, 中分化50例, 低分化32例. 并选取同期于青海大学附属医院进行健康体检正常人50例作为对照组, 男26例, 女24例; 年龄为50-79岁, 平均年龄 $59.2 \text{ 岁} \pm 6.0 \text{ 岁}$. 各组研究对象性别、年龄等资料对比差异无统计学意义($P > 0.05$), 具有可比性. 对所有研究对象进行静脉血采集, 经离心处理后保存于 $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 3 mo. 多功能荧光发光分析仪FLUOStar OPTIMA(德国BMGLABTECH实验仪器公司), 静脉血离心仪(上海安亭科学仪器厂). 试剂: 丙二醛(malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶(orgotein superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)、一氧化氮(nitrogen monoxide, NO)、过氧化氢酶(catalase, CAT)检测试剂盒均选自于南京建成生物工程研究所, 8-羟基脱氧鸟苷(8-hydroxy-2'-deoxyguano-

■研究前沿

临床中对于消化系统肿瘤的诊断研究也比较多, 常见的肿瘤标志物在诊断中具有一定的意义, 传统的诊断指标特异性与敏感度并不高. 而临床中也有资料显示, ROS在相关疾病中具有较好的应用, 对疾病的诊断与治疗具有一定的指导意义。

■相关报道

临床资料显示, 肿瘤发生、发展经常受到了ROS的重要影响, 一般在肺癌、结肠癌、肝癌、甲状腺癌等肿瘤中具有异常情况. 这些报道进一步说明, 肿瘤的发生与发展与ROS之间有着密切的联系。

■创新盘点

癌症的发生中, 抗氧化酶的作用机制尚未完全明确。而本次研究重点分析胃肠道肿瘤患者体内蛋白羰基(protein carbonyl, PC)、谷胱甘肽(glutathione, GSH)、晚期氧化蛋白产物(advanced products, AOPP)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)以及过氧化氢酶(catalase, CAT)以及8-羟基脱氧鸟苷(8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, 8-OHdG)等氧化应激指标, 全面的了解其在该病中的作用。

■应用要点

临床中PC、AOPP、MDA以及8-OHdG是有效的过氧化指标, 而氧化应激水平提升可能是引发胃肠道肿瘤的重要因素, 改善机体抗氧化系统的功能可能有利于胃肠道肿瘤预防、治疗与控制。

表 1 3组150例研究对象氧化损伤产物对比 ($n = 50$, mean \pm SD)

分组	PC(nmol/L)	AOPP(μ mol/L)	MDA(nmol/L)	8-OHdG(mg/L)
胃癌组	4.12 \pm 1.34 ^a	31.93 \pm 12.34 ^a	2.98 \pm 1.13 ^a	125.91 \pm 5.00
肠癌组	4.24 \pm 1.29 ^a	32.14 \pm 11.69 ^a	3.02 \pm 1.24 ^a	124.13 \pm 5.00
健康对照组	2.83 \pm 0.71	25.91 \pm 9.10	6.13 \pm 1.82	96.16 \pm 68.29

^a $P < 0.05$ vs 健康对照组。PC: 蛋白羰基; AOPP: 晚期氧化蛋白产物; MDA: 丙二醛; 8-OHdG: 8-羟基脱氧鸟苷。

表 2 3组150例研究对象抗氧化剂对比 ($n = 50$, mean \pm SD)

分组	GSH(μ mol/L)	维生素C(mg/L)	维生素E(mg/L)
胃癌组	168.74 \pm 71.56 ^a	15.84 \pm 4.31 ^a	10.31 \pm 6.35 ^a
肠癌组	171.10 \pm 68.23 ^a	16.53 \pm 5.02 ^a	11.13 \pm 5.33 ^a
健康对照组	216.81 \pm 72.76	87.59 \pm 15.42	19.12 \pm 6.42

^a $P < 0.05$ vs 健康对照组。GSH: 谷胱甘肽。

sine, 8-OHdG)检测试剂盒选自于Stressgen公司。

1.2 方法

1.2.1 氧化损伤产物检测: 氧化损伤产物分别包括蛋白羰基(protein carbonyl, PC)、晚期氧化蛋白产物(advanced products, AOPP)、MDA、8-OHdG等。采用2,4-二硝基苯肼比色法检测PC; 采用氯胺T比色法检测AOPP; 采用硫代巴比妥酸法检测MDA; 采用ELISA法检测8-OHdG。

1.2.2 抗氧化剂检测: 抗氧化剂检测内容包括谷胱甘肽(glutathione, GSH)、维生素C以及维生素E。采用紫外分光光度计检测GSH、维生素C以及维生素E。

1.2.3 抗氧化酶类检测: 抗氧化剂检测内容包括SOD、GSH-Px以及CAT。采用黄嘌呤氧化酶法检测SOD, 采用二硫代二硝基苯甲酸法检测GSH-Px, 采用钼酸铵比色法检测CAT。

1.2.4 观察指标: 对3组150例研究对象进行实验室指标检测后, 采用回顾性分析法, 根据医院氧化应激标志物相关规范准则设计调查表, 将各项观察指标详细记录于调查表中, 通过计算机进行统计学分析^[3]。

统计学处理 研究中所得到的相关数据采用SPSS12.0统计学数据处理软件进行处理分析, 连续性变量以mean \pm SD表示, 组间对比应用两独立样本计量资料采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 3组150例研究对象氧化损伤产物对比 胃癌

组和肠癌组PC、AOPP、MDA以及8-OHdG浓度与健康对照组相比, 差异具有统计学意义(均 $P < 0.05$); 胃癌组、肠癌组组间氧化损伤产物浓度对比, 差异无统计学意义(均 $P > 0.05$)(表1)。

2.2 3组150例研究对象抗氧化剂对比 胃癌组和肠癌组GSH、维生素C以及维生素E浓度与健康对照组相比, 差异具有统计学意义(均 $P < 0.05$); 胃癌组、肠癌组组间抗氧化剂浓度对比, 差异无统计学意义(均 $P > 0.05$)(表2)。

2.3 3组150例研究对象抗氧化酶类对比 胃癌组和肠癌组SOD、GSH-Px以及CAT活性与健康对照组相比, 差异具有统计学意义(均 $P < 0.05$); 胃癌组、肠癌组组间抗氧化酶类活性对比, 差异无统计学意义(均 $P > 0.05$)(表3)。

3 讨论

ROS是化学性质活跃的含氧原子、原子团, 是外源性氧化剂、细胞内有氧代谢阶段形成的带有较高生物活性的含氧化合物的总称。ROS分别有 H_2O_2 、HO \cdot 、 $O_2^{\cdot-}$ 、烷过氧化自由基、脂过氧化自由基等。大量医学研究支持, 肿瘤发生、发展受ROS重要影响, 包括肺癌、结肠癌、肝癌、甲状腺癌等^[4,5]。

本次研究结果显示, 胃癌组和肠癌组PC、AOPP、MDA以及8-OHdG浓度与健康对照组相比, 数据差异具有统计学意义(均 $P < 0.05$); 胃癌组和肠癌组GSH、维生素C以及维生素E浓度与健康对照组相比, 数据差异具有统计学意义(均 $P < 0.05$); 胃癌组和肠癌组SOD、GSH-Px以

表 3 3组150例研究对象抗氧化酶类对比 ($n = 50$, mean \pm SD)

分组	SOD(U/mL)	GSH-Px(μ mol/L)	CAT(U/mL)
胃癌组	78.74 \pm 31.26 ^a	89.81 \pm 26.82 ^a	20.31 \pm 6.97 ^a
肠癌组	76.10 \pm 28.29 ^a	93.13 \pm 25.43 ^a	21.13 \pm 7.13 ^a
健康对照组	110.32 \pm 28.73	153.52 \pm 47.49	29.13 \pm 10.13

^a $P < 0.05$ vs 健康对照组. SOD: 超氧化物歧化酶; GSH-Px: 谷胱甘肽过氧化物酶; CAT: 过氧化氢酶.

及CAT活性与健康对照组相比, 数据差异具有统计学意义(均 $P < 0.05$). 人类机体抗氧化防护系统中, SOD、GSH-Px以及CAT等是重要的抗氧化酶, 作用于协助消除体内自由基, 将已有的自由基转变成无毒分子, 从而降低、消除氧化对机体造成的损伤, 随着机体抗氧化酶活性降低, 可能对机体抗氧化系统造成不良影响, 诱发癌症^[6,7]. 针对抗氧化酶的研究机制尚不十分明确, 一些研究支持胃肠道肿瘤患者体内SOD、GSH-Px以及CAT降低, 与本次研究结果相符^[8,9]. 胃肠道肿瘤患者体内GSH、维生素C以及维生素E明显下降显示患者体内伴有氧化应激, 在不同氧化损伤产物中, 相关研究报道PC、AOPP、MDA以及8-OHdG是有效的过氧化指标, 氧化应激水平提升可能是引发胃肠道肿瘤的重要因素, 改善机体抗氧化系统的功能可能有利于胃肠道肿瘤预防、治疗与控制^[10-15].

总之, 胃肠道肿瘤患者机体受氧化应激影响, 评价胃肠道肿瘤患者机体氧化应激状态对判定胃肠道肿瘤发生具有十分重要的临床指导意义.

4 参考文献

- 1 丁艳芳. 输注脐血对恶性肿瘤患者外周血象及免疫功能的影响检测. 中国实用医药 2011; 6: 54-55
- 2 徐海帆, 谭风波. 围手术期肠内营养支持对胃肠道恶性肿瘤患者的疗效评估. 海南医学 2011; 22: 20-23
- 3 孙光, 彭勃, 徐超. 胃肠道肿瘤患者术后两种早期营养支持的对比研究. 中国普通外科杂志 2012; 21: 1119-1122
- 4 李根霞, 李巍巍. 多囊卵巢综合征患者胰岛素抵抗和氧化应激的关系. 郑州大学学报(医学版) 2011; 46: 759-762
- 5 付红兵, 王为民, 蔡清萍. 肿瘤标记物的联合检测在结肠癌中的应用. 中华临床医师杂志(电子版) 2012; 6: 5087-5090
- 6 江虹, 赵小虎, 王国良. 针刺足三里穴对机体免疫功能和脑功能变化影响的研究. 中华神经医学杂志 2010; 9: 697-701
- 7 陈志军. 食管及胃底贲门癌围手术期肠内营养支持88例临床分析. 肿瘤学杂志 2011; 17: 419-421
- 8 黎介寿. 临床营养支持的发展趋势. 肠外与肠内营养 2010; 17: 1-4
- 9 林桦, 李永辉. 食道癌术后早期应用肠内营养的临床观察. 中国临床营养杂志 2008; 10: 122-124
- 10 杨振淮, 李关宇. 胃肠道恶性肿瘤患者围手术期肠内营养支持的疗效分析. 实用全科医学 2008; 6: 483-484
- 11 Liu Q, Liu Z, Chen H, Ma L, Liu L, Zhang J, He Y, Chen J, Qian Q. Treatment with growth hormone, somatostatin, and insulin in combination with hypocaloric parenteral nutrition in gastrointestinal cancer patients after surgery. Nutrition 2011; 27: 633-640 [PMID: 20739147 DOI: 10.1016/j.nut.2010.06.008]
- 12 Voda SC. Same-day surgery nursing: it takes teamwork. Am J Nurs 2011; 111: 24-25 [PMID: 21191254 DOI: 10.1097/01.NAJ.0000392857.36942.fdf]
- 13 王焱冬, 德力, 陈珂, 陈峰, 张飞, 高小平. 趋化因子受体CXCR4在胃肠道肿瘤组织及细胞系中的异常表达. 医学综述 2011; 17: 3198-3200
- 14 龙辉, 吴清明, 李欢. VEGF的表达及其微血管密度在胃癌组织中的意义. 世界华人消化杂志 2010; 18: 557-562
- 15 魏志刚, 韩超, 李健. 胃肠道间质瘤的诊断治疗. 世界华人消化杂志 2010; 18: 65-69

■名词解释

氧化应激: 指体内氧化与抗氧化作用失衡, 倾向于氧化, 导致中性粒细胞炎症浸润, 蛋白酶分泌增加, 产生大量氧化中间产物.

■同行评价

本次研究主要分析ROS与胃肠道肿瘤之间的相关性, 评价胃肠道肿瘤患者机体氧化应激状态对判定胃肠道肿瘤发生具有重要意义. 整体性强、研究新颖, 统计学方法正确, 在临床中具有重要的应用价值.

编辑 郭鹏 电编 闫晋利



肝源性糖尿病与2型糖尿病患者临床和预后情况的差异及相关护理

王少萍, 吴玉萍, 林小洁

■背景资料

肝脏是调节体内糖代谢的重要器官, 是多种激素分解代谢的主要场所, 也是多种激素作用的主要靶位。肝硬化患者常并发糖代谢紊乱。这种继发于慢性肝实质损害的糖尿病统称为肝源性糖尿病。临床表现以高血糖, 葡萄糖耐量减低为特征。

王少萍, 吴玉萍, 林小洁, 海南省人民医院心血管内科 海南省海口市 570311

王少萍, 副主任护师, 主要从事内分泌科的临床护理、糖尿病教育及心血管临床的研究。

作者贡献分布: 王少萍负责实验设计、数据统计分析及文章撰写; 吴玉萍与林小洁负责研究过程与数据分析。

通讯作者: 王少萍, 副主任护师, 570311, 海南省海口市秀英区秀华路19号, 海南省人民医院心血管内科。

wangshaoping8363@163.com

电话: 0898-68622009

收稿日期: 2014-06-25 修回日期: 2014-07-10

接受日期: 2014-07-31 在线出版日期: 2014-08-28

Clinical characteristics, prognosis and nursing intervention in hepatogenic diabetes and type 2 diabetes mellitus

Shao-Ping Wang, Yu-Ping Wu, Xiao-Jie Lin

Shao-Ping Wang, Yu-Ping Wu, Xiao-Jie Lin, Department of Cardiology, Hainan Provincial People's Hospital, Haikou 570311, Hainan Province, China

Correspondence to: Shao-Ping Wang, Co-chief Superintendent Nurse, Department of Cardiology, Hainan Provincial People's Hospital, 19 Xiuhua Road, Xiuying District, Haikou 570311, Hainan Province, China. wangshaoping8363@163.com

Received: 2014-06-25 Revised: 2014-07-10

Accepted: 2014-07-31 Published online: 2014-08-28

Abstract

AIM: To compare the clinical characteristics, prognosis and nursing intervention between patients with hepatogenic diabetes (HD) and those with type 2 diabetes (T2DM).

METHODS: Sixty patients with hyperglycaemia were divided into two groups: an HD group ($n = 30$) and a T2DM group ($n = 30$). Oral glucose tolerance test (OGTT) and glucose-stimulated insulin release test were performed in all patients. The levels of fasting blood glucose (FBG) and glycosylated hemoglobin (HbA1c) were determined. All patients were given medical management, hypoglycemic therapy and comprehensive nursing intervention. BSL were compared

between before and after nursing intervention.

RESULTS: FBG and HbA1c in the HD group were significantly lower than those in the T2DM group ($7.8 \text{ mmol/L} \pm 2.4 \text{ mmol/L}$ vs $9.6 \text{ mmol/L} \pm 3.2 \text{ mmol/L}$, 0.065 ± 0.017 vs 0.083 ± 0.027 , $t = 1.017$, 0.976 ; $P = 0.002$, 0.004). BSL in the HD group at different time points (0, 30, 60, 120, 180 min) were all significantly lower than those in the T2DM group ($P < 0.05$). Insulin and peptide C levels in the HD group at different time points (0, 30, 60, 120, 180 min) were all significantly higher than those in the T2DM group ($P < 0.05$). All patients were given medical management, hypoglycemic therapy and comprehensive nursing intervention. BSL in both the HD group and T2DM group were significantly lower after intervention than before intervention ($t = 2.076$, 1.872 , 2.301 , 1.874 ; $P = 0.003$, 0.004 , 0.002 , 0.004).

CONCLUSION: Hyperinsulinemia is more obvious and BSL is controlled better in HD patients. Comprehensive nursing intervention is conducive to controlling BSL in both HD and T2DM patients.

© 2014 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: Hepatogenic diabetes; Type 2 diabetes mellitus; Oral glucose tolerance test; C-peptide; Insulin

Wang SP, Wu YP, Lin XJ. Clinical characteristics, prognosis and nursing intervention in hepatogenic diabetes and type 2 diabetes mellitus. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(24): 3722-3726 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/3722.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i24.3722>

摘要

目的: 了解肝源性糖尿病(hepatic diabetes, HD)与2型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)的临床特点, 探讨HD和T2DM患者临床和预后情况的差异, 及临床护理干预前后的血糖控制情况。

■同行评议者

徐健, 副主任医师, 深圳市慢性病防治中心

方法: HD患者30例和T2DM患者30例入组本研究. 分为HD组(30例)和糖尿病无肝硬化组(30例). 两组均进行糖耐量试验及胰岛素释放试验. 监测空腹血糖和糖化血红蛋白. 同时给予内科治疗、降糖治疗及内科护理干预, 比较临床护理干预前后的血糖控制情况.

结果: (1)HD组空腹血糖($7.8 \text{ mmol/L} \pm 2.4 \text{ mmol/L}$)和糖化血红蛋白水平(0.065 ± 0.017)显著低于T2DM组($9.6 \text{ mmol/L} \pm 3.2 \text{ mmol/L}$)和(0.083 ± 0.027), 差异均有统计学意义($t = 1.017$ 、 0.976 , $P = 0.002$ 、 0.004). HD组葡萄糖耐量试验各时间点(0、30、60、120、180 min)的血糖水平均显著低于T2DM组, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$); (2)胰岛素释放试验各时间点(0、30、60、120、180 min)的胰岛素水平及C肽水平均显著高于T2DM组, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$); (3)所有入组患者给予内科治疗、降糖治疗及内科护理干预后, HD组与T2DM组空腹血糖及糖化血红蛋白较前明显下降, 差异有统计学意义($t = 2.076$ 、 1.872 、 2.301 、 1.874 , $P = 0.003$ 、 0.004 、 0.002 、 0.004).

结论: HD患者存在高胰岛素血症, 血糖水平控制好于T2DM患者. 对于HD与T2DM患者, 除给予内科治疗外, 实施有效的综合护理干预, 能够改善血糖控制情况, 值得临床进一步推广使用.

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有.

关键词: 肝源性糖尿病; 2型糖尿病; 葡萄糖耐量试验; C肽; 胰岛素

核心提示: 本研究通过对比30例肝源性糖尿病(hepatic diabetes, HD)患者与30例2型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)患者的临床资料, 发现: 空腹血糖、糖化血红蛋白、糖耐量试验(oral glucose tolerance test)中血糖情况对比, HD组均低于T2DM患者组, 提示HD患者高血糖症状不典型, 易被慢性肝病所掩盖, 其原因可能是HD患者由于肝脏疾病原因, 掩盖高血糖症状, 同时HD患者在治疗过程中肝功能得到回复, 从而血糖也可得到控制.

王少萍, 吴玉萍, 林小洁. 肝源性糖尿病与2型糖尿病患者临床和预后情况的差异及相关护理. 世界华人消化杂志 2014; 22(24): 3722-3726 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/3722.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v22.i24.3722>

0 引言

肝源性糖尿病(hepatogenous diabetes, HD)是由

肝硬化继发的糖尿病, 因各种原因导致肝实质细胞损害时, 临床可表现为HD^[1]. HD以高血糖及葡萄糖耐量减低为特征, 其发生机制、临床表现及治疗均不同于原发性糖尿病, 目前为止其发病机制与内科治疗后血糖控制情况也不明确. 对于严重肝病导致的高血糖患者, 血糖水平与肝功能密切相关^[2], 因此此类患者良好的血糖控制显得尤为重要. 高血糖状态不利于患者肝脏疾病的治疗与恢复, 同时部分降糖药也通过肝脏代谢, 加重了已经本不堪重负的肝脏系统的负担. 2型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)占糖尿病总人群的95%以上, 早期症状不明显. 研究显示^[3-5], 代表 β 细胞功能的静脉葡萄糖耐量试验中 β 细胞第一时相胰岛素分泌受损和缺失是发病早期和晚期重要的生理变化. 因此, 充分了解HD患者的临床表现, 并明确HD患者与原发糖尿病患者的差别是十分必要的. 本研究分析30例HD与30例T2DM患者的临床资料, 了解HD和T2DM的临床特点, 分析HD和T2DM临床表现和预后的差异, 及加强临床护理对两者的血糖情况的影响.

1 材料和方法

1.1 材料 随机选取2013-05/2014-05在海南省人民医院住院治疗的HD、T2DM患者各30例, HD组入选标准: (1)有慢性肝病史, 肝病发生在糖尿病之前或同时发生; (2)无糖尿病史和家族史; (3)有肝病临床表现和生化学检查异常或影像学检查证据; (4)糖尿病的诊断符合1999年世界卫生组织(World Health Organization, WHO)及国际糖尿病联盟公布的标准; (5)排除垂体、肾上腺、甲状腺等疾病所引起的继发性糖尿病及原发性糖尿病. T2DM组入选标准: 均符合WHO发布的DM诊断标准.

1.2 方法

1.2.1 临床资料收集: 所有入选者均签署诊疗知情同意书. 记录患者人口学资料、基础疾病史、临床表现、辅助检查结果.

1.2.2 血糖、糖耐量试验(oral glucose tolerance test, OGTT)和胰岛素释放试验: 所有患者入院时均进行OGTT、胰岛素释放试验. 检测两组患者血糖、胰岛素和C肽.

1.2.3 临床护理干预: 患者住院期间给予: (1)心理干预: 给予患者健康宣教, 包括HD和T2DM的相关知识, 介绍如何预防出血、感染、低血糖等. 加强病友间经验交流, 使患者建立良好的心境,

■ 研究前沿

肝源性糖尿病(hepatic diabetes, HD)以高血糖及葡萄糖耐量减低为特征, 其发生机制、临床表现及治疗均不同于原发性糖尿病, 目前为止其发病机制与内科治疗后血糖控制情况也不明确.

■应用要点

HD是在肝病的基础上出现胰岛素抵抗及胰岛素代谢与分泌异常,同时检测胰岛素与C肽有助于临床诊断。对于HD及2型糖尿病患者,除给予内科治疗及降糖治疗,实施有效的综合护理干预,能够改善血糖控制情况,值得临床进一步推广使用。

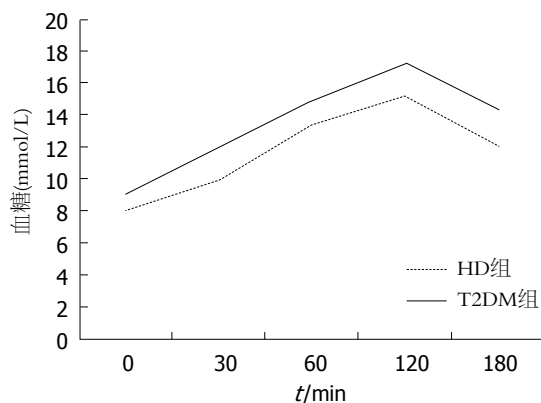


图1 HD组与T2DM组OGTT实验各时间点血糖水平比较。HD: 肝源性糖尿病; T2DM: 2型糖尿病; OGTT: 糖耐量试验。

积极配合治疗;(2)糖尿病饮食护理:指导糖尿病饮食要点,控制总热量,搭配合理,定时定量进餐,饮食与胰岛素的治疗相配合。随时监督患者饮食,纠正患者错误进食;(3)用药护理:护理人员监督患者按医生医嘱用药;若患者使用胰岛素降血糖,将患者血糖变化及时告知医生,调整胰岛素用量,避免发生低血糖反应;(4)运动指导:建议患者进行适量运动,运动以有氧运动为主,以提高患者的生活质量;(5)预防感染:给予患者修剪指甲,防止抓破皮肤,保持患者皮肤清洁干燥,经常更换体位,加强皮肤及足部护理,必要时使用气垫床减压防压疮;加强口腔护理;使用胰岛素治疗的患者,应定期更换注射部位,严格消毒。患者出院后延伸护理:出院后进行电话随访,第1-2月随访1次;第3个月以后每月随访1次。随访内容为患者饮食情况;是否规律及精确用药;是否进行运动;提醒患者每1周门诊随访空腹血糖。每2-3 mo随访糖化血红蛋白。

1.2.4 临床研究起点、终点:将入院时间作为起点,将死亡时间或2014-05-31作为临床研究终点。

统计学处理 应用SPSS16.0软件进行统计分析。计量资料以mean±SD表示。两组间均数的比较采用Student *t*检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HD与T2DM糖耐量情况 HD组空腹血糖($7.8 \text{ mmol/L} \pm 2.4 \text{ mmol/L}$)和糖化血红蛋白水平(0.065 ± 0.017)均显著低于T2DM组($9.6 \text{ mmol/L} \pm 3.2 \text{ mmol/L}$)和(0.083 ± 0.027),差异均有统计学意义($t = 1.017, 0.976, P = 0.002, 0.004$)。HD组OGTT各时间点(0、30、60、120、180 min)的血糖水平均显著低于T2DM组,差异均有统计学意义($t = 3.163, 2.224, 3.407, 3.112, 3.231$,

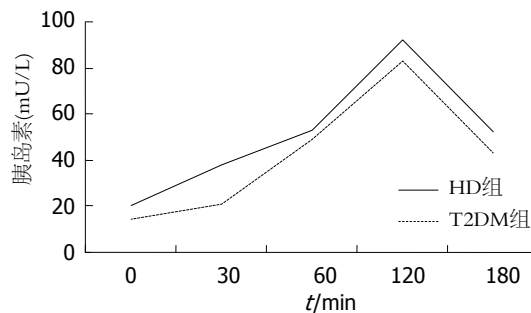


图2 HD组与T2DM组胰岛素释放试验实验各时间点胰岛素水平比较。HD: 肝源性糖尿病; T2DM: 2型糖尿病。

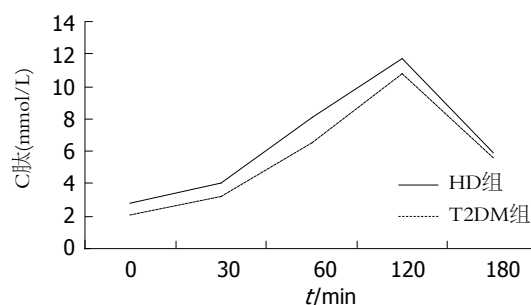


图3 HD组与T2DM组各时间点C肽水平比较。HD: 肝源性糖尿病; T2DM: 2型糖尿病。

$P = 0.004, 0.025, 0.002, 0.004, 0.001$)(图1)。

2.2 HD组与T2DM组胰岛素释放情况 HD组各时间点(0、30、60、120、180 min)的胰岛素水平均显著高于T2DM组,差异均有统计学意义($t = 2.581, 3.081, 2.776, 3.454, 2.760, P = 0.006, 0.002, 0.004, 0.001, 0.005$)(图2), HD组存在明显高胰岛素血症。HD组各时间点(0、30、60、120、180 min)的C肽水平均显著高于T2DM组,差异均有统计学意义($t = 3.543, 3.760, 3.580, 4.632, 4.643, P = 0.002, 0.002, 0.002, 0.001, 0.001$)(图3)。

2.3 HD组与T2DM组加强出院延伸护理后血糖控制情况 加强护理干预后,HD组和T2DM组空腹血糖和糖化血红蛋白水平较治疗前显著减低,差异均有统计学意义(表1)。

3 讨论

肝脏是调节体内糖代谢的重要器官^[2-7],是多种激素分解代谢的主要场所,也是多种激素作用的主要靶位^[8,9]。肝硬化患者常并发糖代谢紊乱^[10-14]。这种继发于慢性肝实质损害的糖尿病统称为HD。临床表现以高血糖,葡萄糖耐量减低为特征。

本研究通过对比30例HD患者与30例T2DM患者的临床资料,发现:(1)空腹血糖、糖化血

表 1 HD组与T2DM组加强临床护理后血糖及糖化血红蛋白情况 (mean ± SD)

分组		出院前	加强护理干预后	t值	P值
HD组	空腹血糖(mmol/L)	7.800 ± 2.400	5.000 ± 2.50	2.076	0.003
	糖化血红蛋白	0.065 ± 0.017	0.059 ± 0.012	1.872	0.004
T2DM组	空腹血糖(mmol/L)	9.600 ± 3.200	7.200 ± 3.11	2.301	0.002
	糖化血红蛋白	0.083 ± 0.027	0.071 ± 0.021	1.874	0.004

HD: 肝源性糖尿病; T2DM: 2型糖尿病。

红蛋白、OGTT实验中血糖情况对比, HD组均低于T2DM组, 提示HD患者高血糖症状不典型, 易被慢性肝病所掩盖, 其原因可能是HD患者由于肝脏疾病原因, 掩盖高血糖症状^[10], 同时HD患者在治疗过程中肝功能得到恢复, 从而血糖也可得到控制; (2)HD组的胰岛素及C肽水平平均高于T2DM组, 可能是胰岛素大多通过肝脏代谢, 慢性肝病患者因肝细胞数目减少、肝功能受损和肝脏失代偿时建立侧枝循环, 导致胰岛素的灭活和摄取减少, 使外周血胰岛素增高, 出现高胰岛素血症^[10]。胰岛素水平的增加可引起外周组织胰岛素受体数目的减少和与胰岛素的亲和力降低。肝脏摄取胰岛素异常者, 会出现高胰岛素血症^[12,15-17]。而血清中C肽和胰岛素水平常呈同步变化, 故同时检测胰岛素与C肽可能对HD的诊断具有一定的提示意义。胰岛素抵抗、胰岛素分泌与代谢异常是HD的主要原因; (3)加强临床护理干预后, HD组与T2DM组血糖均明显低于进行护理干预前, 提示坚持按照糖尿病饮食要求进食、进行相应的运动锻炼、坚持并准确使用口服降糖药物和/或胰岛素来进行降糖治疗, 及实施有效的出院指导以及出院后定期随访等综合护理措施^[18,19], 可以促进患者提高对疾病的认识度, 学会自我分析疾病、监测疾病, 做到自我管理, 在治疗过程中积极配合, 提高其依从性, 从而达到提高患者临床治疗效果的目的。

总之, HD是在肝病的基础上出现胰岛素抵抗及胰岛素代谢与分泌异常, 同时检测胰岛素与C肽有助于临床诊断。对于HD及T2DM患者, 除给予内科治疗及降糖治疗, 实施有效的综合护理干预, 能够改善血糖控制情况, 值得临床进一步推广使用。

4 参考文献

- Sibley SD, Palmer JP, Hirsch IB, Brunzell JD. Visceral obesity, hepatic lipase activity, and dyslip-

- idemia in type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 3379-3384 [PMID: 12843191 DOI: 10.1210/jc.2002-021693]
- da Rocha AF, Liboni TF, Kurauti MA, de Souza CO, Miksa DR, Moreira CC, Borba-Murad GR, Bazotte RB, de Souza HM. Tumor necrosis factor alpha abolished the suppressive effect of insulin on hepatic glucose production and glycogenolysis stimulated by cAMP. *Pharmacol Rep* 2014; 66: 380-385 [PMID: 24905512 DOI: 10.1016/j.pharep.2013.12.005]
- García-Compeán D, Jáquez-Quintana JO, González-González JA, Lavalle-González FJ, Villarreal-Pérez JZ, Maldonado-Garza HJ. [Diabetes in liver cirrhosis]. *Gastroenterol Hepatol* 2013; 36: 473-482 [PMID: 23628170 DOI: 10.1016/j.gastrohep.2013.01.012]
- Tu S, Shao A, Ye Z, Yao D. [Advances in understanding the pathogenesis of hepatogenic diabetes]. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2014; 22: 78-80 [PMID: 24754094]
- Picardi A, D'Avola D, Gentilucci UV, Galati G, Fiori E, Spataro S, Afeltra A. Diabetes in chronic liver disease: from old concepts to new evidence. *Diabetes Metab Res Rev* 2006; 22: 274-283 [PMID: 16506276 DOI: 10.1002/dmrr.636]
- Roden M, Bernroider E. Hepatic glucose metabolism in humans—its role in health and disease. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2003; 17: 365-383 [PMID: 12962691 DOI: 10.1016/S1521-690X(03)00031-9]
- Rui L. Energy metabolism in the liver. *Compr Physiol* 2014; 4: 177-197 [PMID: 24692138 DOI: 10.1002/cphy.c130024]
- Wang C, Dai J, Yang M, Deng G, Xu S, Jia Y, Boden G, Ma ZA, Yang G, Li L. Silencing of FGF-21 expression promotes hepatic gluconeogenesis and glycogenolysis by regulation of the STAT3-SOCS3 signal. *FEBS J* 2014; 281: 2136-2147 [PMID: 24593051 DOI: 10.1111/febs.12767]
- Mitchell J. Regulation of hepatic glucose production by Gq-coupled receptors: potential new targets for treatment of type 2 diabetes. *Endocrinology* 2013; 154: 3495-3497 [PMID: 24058155 DOI: 10.1210/en.2013-1713]
- García-Compeán D, Jáquez-Quintana JO, Maldonado-Garza H. Hepatogenous diabetes. Current views of an ancient problem. *Ann Hepatol* 2009; 8: 13-20 [PMID: 19221528]
- Jeon HK, Kim MY, Baik SK, Park HJ, Choi H, Park SY, Kim BR, Hong JH, Jo KW, Shin SY, Kim JM, Kim JW, Kim HS, Kwon SO, Kim YJ, Cha SH, Kim DJ, Suk KT, Cheon GJ, Kim YD, Choi DH, Lee SJ. Hepatogenous diabetes in cirrhosis is related to portal pressure and variceal hemorrhage. *Dig Dis Sci* 2013; 58: 3335-3341 [PMID: 23912248 DOI: 10.1007/s10620-013-2802-y]

■同行评价

本研究选题实用, 设计科学, 逻辑清晰, 具有很好的可读性。

- 12 Kim MG, Choi WC. [Differential diagnosis of diabetes mellitus caused by liver cirrhosis and other type 2 diabetes mellitus]. *Korean J Hepatol* 2006; 12: 524-529 [PMID: 17237630]
- 13 Gundling F, Seidl H, Löffler N, Strassen I, Schepp W. [Metabolic disturbances in liver cirrhosis (part 2), hepatogenous diabetes: diagnostic aspects and treatment]. *Dtsch Med Wochenschr* 2010; 135: 22-24 [PMID: 20024879 DOI: 10.1055/s-0029-1244811]
- 14 Gundling F, Schumm-Draeger PM, Schepp W. [Hepatogenous diabetes - diagnostics and treatment]. *Z Gastroenterol* 2009; 47: 436-445 [PMID: 19418413 DOI: 10.1055/s-0028-1109200]
- 15 Holstein A, Hinze S, Thiessen E, Plaschke A, Egberts EH. Clinical implications of hepatogenous diabetes in liver cirrhosis. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17: 677-681 [PMID: 12100613 DOI: 10.1046/j.1440-1746.2002.02755.x]
- 16 Garcia-Compean D, Jaquez-Quintana JO, Gonzalez-Gonzalez JA, Maldonado-Garza H. Liver cirrhosis and diabetes: risk factors, pathophysiology, clinical implications and management. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 280-288 [PMID: 19140227 DOI: 10.3748/wjg.15.280]
- 17 陈桂凤, 赖利春, 朱现丽. 初诊肝硬化患者负性情绪干预效果评价. *中华现代护理杂志* 2009; 15: 434-436
- 18 孙建慧. 肝硬化并发肝源性糖尿病患者的观察及护理. *中国实用护理杂志* 2012; 28: 35-36
- 19 郑颖俊, 邱梅, 贺劲松, 童光东, 高辉, 魏春山, 唐海鸿, 周大桥. 复肝降糖方对肝硬化伴肝源性2型糖尿病患者胰岛素抵抗及瘦素影响的临床研究. *光明中医* 2011; 26: 2472-2475

编辑 郭鹏 电编 闫晋利



《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学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 2012年版)》, 《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 2012年版)》, 《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-methylacetanilide(N-甲基乙酰苯胺), 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} , Vd, $T_{1/2}$ 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 $37.6\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1.2\text{ }^{\circ}\text{C}$, $45.6\text{岁} \pm 24\text{岁}$, $56.4\text{ d} \pm 0.5\text{ d}$, $3.56 \pm 0.27\text{ pg/ml}$ 应为 $3.56\text{ ng/L} \pm 0.27\text{ ng/L}$ 。BP用kPa(mmHg), RBC数用 $1 \times 10^{12}/\text{L}$, WBC数用 $1 \times 10^9/\text{L}$, 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 $1 \times 10^{-3}\text{ g}$ 与 $5 \times 10^{-7}\text{ g}$ 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 χ^2 ; (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6 347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; $101 \leq \text{分母} \leq 1000$, 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致谢中. 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, 所有作者均同意该文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、补充或删节时, 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!

崔莲花 副教授
青岛大学医学院公共卫生系

戴朝六 教授
中国医科大学第二临床学院(盛京医院)肝胆外科

杜奕奇 副教授
中国人民解放军第二军医大学长海医院

高英堂 研究员
天津市第三中心医院

高泽立 副教授
上海浦东新区周浦医院消化科, 上海交大医学院九院周浦分院

江建新 副主任医师
贵阳医学院附属医院肝胆胰脾外科

李正荣 副教授
南昌大学附属第一医院胃肠外科

李涛 副主任医师
北京大学人民医院肝胆外科

刘绍能 主任医师
中国中医科学院广安门医院

彭亮 副主任医师
中山大学附属第三医院感染科

倪润洲 教授
南通大学附属医院消化内科

任粉玉 教授
吉林省延边大学附属医院消化内科

汤华 研究员
重庆医科大学感染性疾病分子生物学教育部重点实验室

齐清会 教授
大连医科大学附属第一医院

邱伟华 主任医师
上海交通大学医学院附属瑞金医院普外科

王娅兰 教授
重庆医科大学基础医学院病理教研室

吴建兵 教授
南昌大学第二附属医院

吴军 研究员
中国人民解放军军事医学科学院生物工程研究所

吴泰璜 教授
山东省立医院肝胆外科

吴建兵 教授
南昌大学第二附属医院

肖恩华 教授
中南大学湘雅二医院

肖秀英 主治医师
上海交通大学医学院附属仁济医院肿瘤科

殷正丰 教授
中国人民解放军第二军医大学东方肝胆外科医院

袁红霞 研究员
天津中医药大学

袁建业 副研究员
上海中医药大学附属龙华医院/脾胃病研究所

张明辉 副主任医师
河北医科大学第一医院

张占卿 主任医师
上海市复旦大学公共卫生中心肝脏病学、传染病学

郑鹏远 教授
郑州大学第二附属医院消化科

张宗明 教授
清华大学第一附属医院

周晓武 副主任医师
中国人民解放军空军总医院普外科

《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 Inc**
8226 Regency Drive, Pleasanton,
CA 94588, USA
Fax: +1-925-223-8242
Telephone: +1-925-223-8243
E-mail: bpgoffice@wjgnet.com
<http://www.wjgnet.com>



ISSN 1009-3079

