

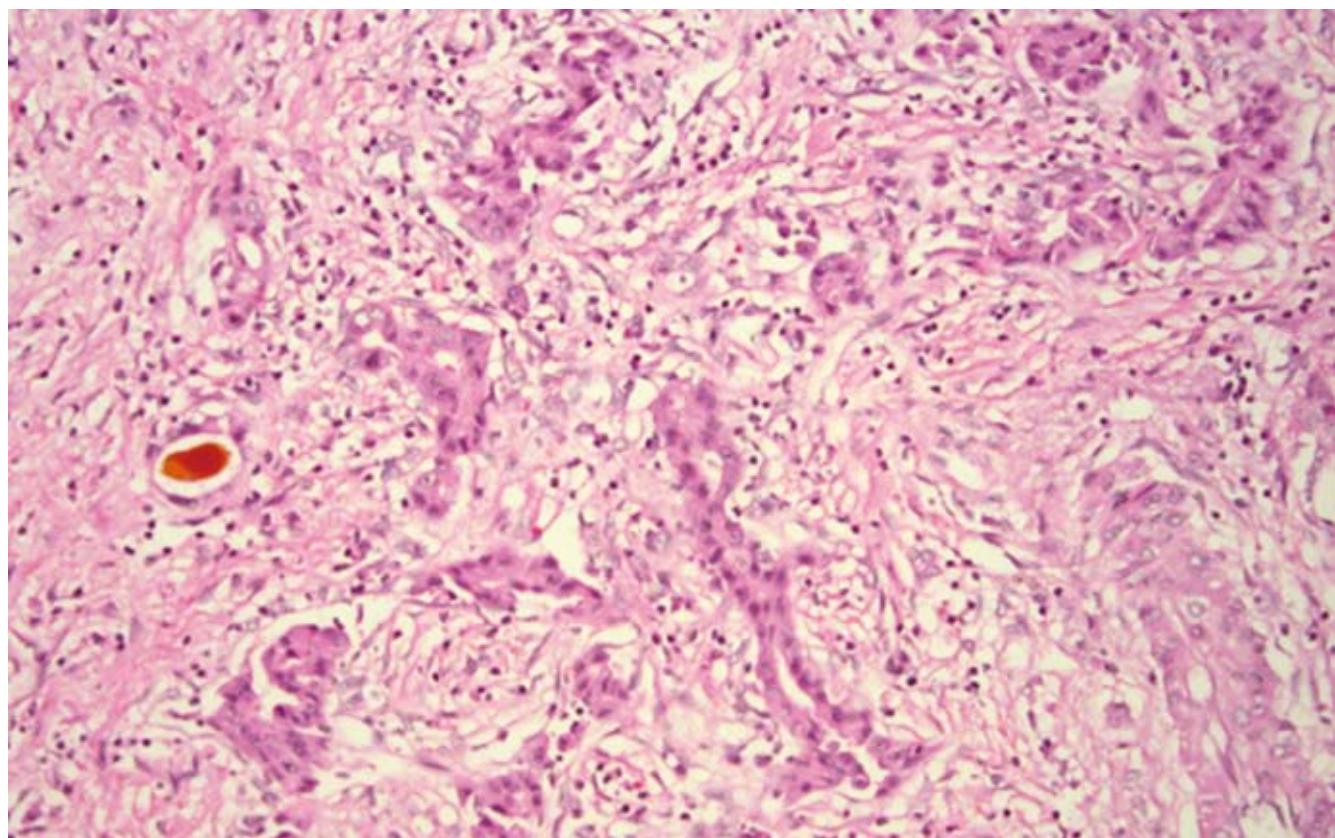
ISSN 1009-3079 (print)
ISSN 2219-2859 (online)
CN 14-1260/R

世界华人消化杂志[®]

WORLD CHINESE JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2012年7月8日 第20卷 第19期 (Volume 20 Number 19)



19/2012

ISSN 1009-3079



9 771009 307056

《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》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》的英文摘要被美国《化学文摘》，荷兰《医学文摘库/医学文摘》和俄罗斯《文摘杂志》收录。

世界华人消化杂志[®]

编辑委员会

2012-01/2014-12-31

wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

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
杨思凤教授
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
陈国忠主任医师
陈洪副教授
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
丁士刚教授
董蕾教授
杜雅菊主任医师
杜奕奇副教授
樊晓明教授
房静远教授
冯志杰主任医师
傅春彬主任医师
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
陆伦根教授
马红主任医师
马欣主任医师
毛高平教授
孟庆华教授
倪润洲教授
欧希龙副教授
潘秀珍教授
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
田字彬教授
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
王俊平教授
王蔚虹教授
王晓艳副教授
夏冰教授
夏时海副教授

徐可树教授
杨建民教授
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
郑培永副教授
郑鹏远教授
郑素军副主任医师
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

白雪巍副主任医师
蔡开琳副教授
蔡三军主任医师
曹杰主任医师
陈光教授
陈海龙教授
陈积圣教授
陈进宏副主任医师
陈凛教授
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

何晓顺教授
何裕隆教授
黄志勇教授
季加孚教授
莫卫东教授
姜波健教授
金山主任医师
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
李胜研究员
李涛副主任医师
李文岗教授
李旭副教授
李永翔教授
李志霞教授
李宗芳教授
梁力建教授
刘宝林教授
刘超教授
刘建教授
刘颖斌主任医师
陆云飞教授
禄韶英副教授
吕云福教授
麻勇副研究员
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
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
石毓君副研究员
宋振顺教授
孙诚信教授
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
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
赵刚副教授
智绪亭教授
周伟平教授
邹小明教授

消化感染病学

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

世界华人消化杂志[®]

编辑委员会

高润平教授
高泽立副教授
龚国忠教授
管世鹤副教授
胡国信主任医师
靳雪源主任医师
刘正稳教授
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
周霞秋教授
朱传武教授
庄林主任医师

消化中医学

陈治水主任医师
杜群副研究员
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
南极星教授
牛英才研究员
王富春教授
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
江建新副主任医师
李瑗教授
刘宝瑞教授
刘炳亚研究员
刘平教授
刘云鹏教授
卢晓梅教授
沈克平主任医师
王阁教授
向德兵副教授
肖文华主任医师

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
徐辉煌教授
严惟力副教授
赵卫主任医师

消化内镜及介入治疗学

郝俊鸣副主任医师
茅爱武教授
孙明军教授
万军教授
袁友红副教授

消化中西医结合学

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
樊红教授
高国全教授
高英堂研究员
管冬元副教授
何敏教授
黄昆教授
黄武林教授
黄园教授
洪艳教授
李刚教授
李君文研究员
李增山副教授
刘克辛教授
刘森副教授
任超世研究员
任浩副教授
任晚峰副教授
台桂香教授
谭学瑞教授
田文静副教授
汪思应教授
王钦红教授
魏继福研究员
吴道澄教授

吴军研究员
吴俊华副教授
徐宁志研究员
许文燮教授
阴赪宏研究员
郁卫东副研究员
喻荣彬教授
周南进研究员
周素芳教授
周晓武副主任医师
竺亚斌研究员

消化病理学

陈云昭副教授
杜祥教授
邓昊副教授
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
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 ● 2012 年 7 月 8 日 第 20 卷 第 19 期 (总第387期)

述 评	1701 克罗恩病的规范化药物治疗 刘占举
基础研究	1705 人突变型CDK4真核荧光表达质粒的构建及对人肝细胞SMMC-7702中POLD1基因表达的调控 李永继, 黄怡, 阮细玲, 廖柳凤, 吴琼, 黄文涛, 徐恒 1713 肿瘤坏死因子- α 刺激骨髓间充质干细胞后对肝星状细胞凋亡的促进作用 罗显克, 陆正峰, 姜海行, 覃山羽, 陈国忠 1720 慢病毒介导的重组人 α 1-抗胰蛋白酶在小鼠体内的表达 欧海龙, 雷霆雯, 李红梅, 王筑婷, 莫晓川
临床研究	1726 microRNA-433在胃癌组织中的表达下降及对胃癌细胞系生长的影响 李睿东, 韩高雄, 李伟, 陶凯雄 1732 HIF-1 α 、TXB2、6-Keto-PGF1 α 和HA联合检测在CHB肝脏微循环障碍中的诊断意义 范秀梅, 丁体龙, 代学枫, 于莉, 马勇 1737 miR-155在肝细胞癌中的表达及对肝癌细胞增殖的影响 胡蓉环, 蔡婧, 兰琼玉
文献综述	1742 难治性胃食管反流病诊断方法的研究进展 宋宏伟, 朱凌云 1747 肥大细胞在肠易激综合征发病机制中的研究进展 罗和生, 赵运志, 张法灿, 张国 1752 吻合器痔上黏膜环形切除术治疗内痔的研究进展 关维雨, 张德巍, 李春雨 1758 针刺对功能性便秘ENS-ICC调节机制的研究进展 任驰, 周思远, 卞建蛟, 李瑛
研究快报	1763 CRF通过CRF2受体介导肠上皮细胞中TLR4的表达 杨丽, 郑鹏远, 刘志强
临床经验	1768 PgP、TP、GST- π 、MRP在食管癌组织中的表达及与化疗的关系 李明, 张成辉, 张永喜 1773 磁控胶囊内镜胃部检查55例 杜凡, 曹辉琼, 杨铁一, 邓桂林 1778 SLP-2在胃癌中的表达及意义 张剑, 李建生, 吴敏, 赵晔 1782 胃大部切除术后3年胃癌患者生活质量的EORTC QLQ-C30与QLQ-STO22联合评价 周燕燕, 席淑华 1787 模拟肝段与超声图像的比较及其在教学中的应用 李银燕, 王学梅, 欧国成, 高宁宇 1791 胆管腺瘤临床病理特点 方三高, 马强, 林俐, 李艳青, 曾英, 肖华亮 1796 微生态制剂枯草杆菌、肠球菌二联活菌肠溶胶囊治疗溃疡性结肠炎58例 刘红, 姚萍

附录	1800 《世界华人消化杂志》投稿须知 1805 2012年国内国际会议预告
志谢	1806 志谢世界华人消化杂志编委
消息	1712 《世界华人消化杂志》外文字符标准 1725 WJG成功通过评审被PMC收录 1731 《世界华人消化杂志》2011年开始不再收取审稿费 1741 《世界华人消化杂志》被评为中国精品科技期刊 1757 《世界华人消化杂志》修回稿须知 1762 《世界华人消化杂志》出版流程 1767 《世界华人消化杂志》性质、刊登内容及目标 1772 《世界华人消化杂志》栏目设置 1777 《世界华人消化杂志》正文要求 1786 《世界华人消化杂志》参考文献要求 1790 《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) 1795 中国科技信息研究所发布《世界华人消化杂志》影响因子0.694 1799 WJG总被引频次排名位于第174名
封面故事	方三高, 马强, 林俐, 李艳青, 曾英, 肖华亮. 胆管腺瘤临床病理特点. 世界华人消化杂志 2011; 20(19): 1791-1795 http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1791.asp
本期责任人	编务 周媛; 送审编辑 李军亮, 张姗姗; 组版编辑 鲁亚静; 英文编辑 王天奇; 责任编辑 张姗姗; 形式规范审核编辑部主任 李军亮; 最终清样审核总编辑 马连生
<p>Shijie Huaren Xiaohua Zazhi</p> <p>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 2012-07-08 原刊名 新消化病学杂志</p> <p>期刊名称 世界华人消化杂志 主管单位 山西省科学技术厅 主办单位 太原消化病研治中心</p> <p>编辑 世界华人消化杂志编辑委员会 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com</p> <p>出版 世界华人消化杂志编辑部 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com</p>	<p>主编 程英升, 教授, 200072, 上海市, 同济大学附属第十人民医院影像临床医学中心 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 王小众, 教授, 350001, 福建省福州市, 福建医科大学附属协和医院消化内科 姚登福, 教授, 226001, 江苏省南通市, 南通大学附属医院临床医学研究中心 张宗明, 教授, 100016, 北京市, 清华大学第一附属医院消化医学中心</p> <p>编辑部主任 李军亮</p> <p>印刷 北京科信印刷厂 发行 国内: 北京报刊发行局 国外: 中国国际图书贸易总公司 (100044, 北京市399信箱) 订购 全国各地邮电局</p> <p>《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》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》的英文摘要被美国《化学文摘》, 荷兰《医学文摘库/医学文摘》和俄罗斯《文摘杂志》收录。</p> <p>《世界华人消化杂志》正式开通了在线办公系统(http://www.baishideng.com/wcjcd/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。</p> <p>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。</p> <p>2012年版权归世界华人消化杂志所有</p>

World Chinese Journal of Digestology

July 2012 Contents in Brief Volume 20 Number 19

EDITORIAL	1701 Standardized medical therapy for Crohn's disease <i>Liu ZJ</i>
BASIC RESEARCH	1705 Transfection of a eukaryotic vector expressing a mutant CDK4 up-regulates POLD1 expression in SMMC-7702 cells <i>Li YJ, Huang Y, Ruan XL, Liao LF, Wu Q, Huang WT, Xu H</i> 1713 Bone marrow mesenchymal stem cells stimulated by TNF- α enhance the apoptosis of hepatic stellate cells <i>Luo XK, Lu ZF, Jiang HX, Qin SY, Chen GZ</i> 1720 Lentivirus-mediated expression of human α 1-antitrypsin in mice <i>Ou HL, Lei TW, Li HM, Wang ZT, Mo XC</i>
CLINICAL RESEARCH	1726 Down-regulation of microRNA-433 expression in gastric cancer: Possible mechanisms involved <i>Li RD, Han GX, Li W, Tao KX</i> 1732 Significance of combined detection of HIF-1 α , TXB2, 6-keto-PGF1 α and HA in the diagnosis of hepatic microcirculatory disturbance in patients with chronic hepatitis B <i>Fan XM, Ding TL, Dai XF, Yu L, Ma Y</i> 1737 Expression of miR-155 in primary hepatocellular carcinoma and its effect on tumor cell proliferation <i>Hu RH, Cai J, Lan QY</i>
REVIEW	1742 Advances in diagnostic options for refractory gastroesophageal reflux disease <i>Song HW, Zhu LY</i> 1747 Progress in understanding the role of mast cells in the pathogenesis of irritable bowel syndrome <i>Luo HS, Zhao YZ, Zhang FC, Zhang G</i> 1752 Procedure for prolapse and hemorrhoids for grade III and IV internal hemorrhoids: A systematic review <i>Guan WY, Zhang DW, Li CY</i> 1758 Progress in understanding mechanisms underlying the regulatory effect of acupuncture on functional constipation <i>Ren C, Zhou SY, Mu JJ, Li Y</i>
RAPID COMMUNICATION	1763 Activation of TLR4 by CRF in human intestinal epithelial cells is mediated by the CRF2 receptor <i>Yang L, Zheng PY, Liu ZQ</i>
CLINICAL PRACTICE	1768 Correlation between PgP, TP, GST- π and MRP expression and response to chemotherapy in patients with esophageal cancer <i>Li M, Zhang CH, Zhang YX</i> 1773 Gastric examination with a magnetically guided capsule endoscope: An analysis of 55 volunteers <i>Du F, Cao HQ, Yang TY, Deng GL</i> 1778 Significance of SLP-2 expression in gastric adenocarcinoma <i>Zhang J, Li JS, Wu M, Zhao Y</i> 1782 Combined use of EORTC QLQ-C30 and QLQ-STO22 for assessment of quality of life in patients with gastric cancer after surgery for 3 years <i>Zhou YY, Xi SH</i> 1787 Application of simulated liver segments in medical teaching <i>Li YY, Wang XM, Ou GC, Gao NN</i> 1791 Analysis of clinicopathological features of bile duct adenoma of the liver <i>Fang SG, Ma Q, Lin L, Li YQ, Zeng Y, Xiao HL</i>

	1796 Treatment of ulcerative colitis with a microecological preparation comprising <i>Bacillus subtilis</i> and <i>Enterococcus</i> : An analysis of 58 cases <i>Liu H, Yao P</i>
APPENDIX	1800 Instructions to authors of <i>World Chinese Journal of Digestology</i> 1805 Meeting events calendar in 2012
ACKNOWLEDGMENT	1806 Acknowledgments to reviewers of <i>World Chinese Journal of Digestology</i>
COVER	<i>Fang SG, Ma Q, Lin L, Li YQ, Zeng Y, Xiao HL.</i> Analysis of clinicopathological features of bile duct adenoma of the liver. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(19): 1791-1795 http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1791.asp
RESPONSIBLE EDITORS FOR THIS ISSUE	Assistant Editor: <i>Yuan Zhou</i> Review Editor: <i>Jun-Liang Li, Shan-Shan Zhang</i> Electronic Page Editor: <i>Ya-Jing Lu</i> English Language Editor: <i>Tian-Qi Wang</i> Editor-in-Charge: <i>Shan-Shan Zhang</i> Proof Editor: <i>Jun-Liang Li</i> Layout Editor: <i>Lian-Sheng Ma</i>
Indexed/Abstracted by Chemical Abstracts, EMBASE/ Excerpta Medica and Abstract Journals	
Shijie Huaren Xiaohua Zazhi	<p>EDITOR-IN-CHIEF Ying-Sheng Cheng, Professor, Medical Imaging Center, Shanghai Tenth People's Hospital, Tongji University, Shanghai 200072, 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, Hangzhou 310006, Zhejiang Province, China Da-Lie Ma, Professor, Department of Pathology, Shanghai Hospital, the Second Military Medical University of Chinese PLA, Shanghai 200433, 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</p> <p>SCIENCE EDITORS Director: Jun-Liang Li</p> <p>SUBSCRIPTION RMB 68 Yuan for each issue RMB 2448 Yuan for one year</p> <p>CSSN ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R</p> <p>COPYRIGHT © 2012 Published by <i>World Chinese Journal of Digestology (WCJD)</i>. All rights reserved; no part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise without the prior permission of WCJD. Authors are required to grant WCJD an exclusive licence to publish.</p> <p>SPECIAL STATEMENT All articles published in this journal represent the viewpoints of the authors except where indicated otherwise.</p> <p>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.</p> <p>Copyright © 2012 by Editorial Department of <i>World Chinese Journal of Digestology</i></p>
PRINTING	Beijing Kexin Printing House
PUBLISHING	Editorial Department of <i>World Chinese Journal of Digestology</i> , 77 Shuangta Xijie, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China Telephone: +86-351-4078656 E-mail: wcd@wjgnet.com
OVERSEAS DISTRIBUTOR	Beijing Bureau for Distribution of Newspapers and Journals (Code No. 82-261) China International Book Trading Corporation PO Box 399, Beijing, China (Code No. M4481)

克罗恩病的规范化药物治疗

刘占举

刘占举，同济大学附属第十人民医院消化内科 上海市200072
刘占举，教授，主要从事炎症性肠病的免疫病理学和临床研究。
国家自然科学基金资助项目，No. 30971358, No. 81061120521
通讯作者：刘占举，教授，主任医师，200072，上海市延长中路301号，同济大学附属第十人民医院消化内科，zhanjuli@yahoo.com
收稿日期：2012-05-15 修回日期：2012-06-15
接受日期：2012-06-23 在线出版日期：2012-07-08

Standardized medical therapy for Crohn's disease

Zhan-Ju Liu

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

Correspondence to: Zhan-Ju Liu, Professor, Department of Gastroenterology, Shanghai Tenth People's Hospital, Tongji University, Shanghai 200072, China. zhanjuli@yahoo.com

Received: 2012-05-15 Revised: 2012-06-15

Accepted: 2012-06-23 Published online: 2012-07-08

Abstract

Crohn's disease (CD) is a chronic inflammatory disease of the digestive tract. Its etiology and pathogenesis are still elusive. Abnormal intestinal immune response, dysregulation of intestinal microflora, defects of intestinal mucosal barrier, and persistent intestinal infection may be involved in the pathogenesis of this disease. Therapeutic strategies should be typically based on disease severity, affected extent, complications, and postoperative status. The therapeutic purposes are to control the clinical symptoms, induce remission, enhance endoscopic mucosal healing, restore intestinal physiological function, postpone surgical intervention, and prevent postoperative recurrence and disability. This paper highlights current strategies and novel approaches for medical therapy in CD patients.

Key Words: Crohn's disease; Medical therapy; Standardization

Liu ZJ. Standardized medical therapy for Crohn's disease. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(19): 1701-1704

摘要

克罗恩病(Crohn's disease, CD)是发生在消化

系的原因不明的慢性复发性炎症疾病，其病因和发病机制可能与肠道异常免疫应答、肠道微生态调节异常、肠黏膜屏障缺损、持续肠道感染等有关。对CD的药物治疗决策原则上建立在疾病的进展程度、病变累及范围、合并症以及术后状态等，目的是控制临床症状，诱导缓解，促使内镜下黏膜愈合，恢复肠道生理功能，延缓手术治疗，预防复发和致残出现。本文重点阐述当前对CD患者的药物治疗方案以及新的治疗措施。

■背景资料

近年来国内克罗恩病(CD)患者逐年增多，但临幊上仍无标准化药物治疗方案。随着对CD发病机制的深入认识，规范化药物治疗具有重要意义。

关键词：克罗恩病；药物治疗；规范化

刘占举. 克罗恩病的规范化药物治疗. 世界华人消化杂志 2012; 20(19): 1701-1704

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1701.asp>

0 引言

近年来，来自欧美国家对克罗恩病(Crohn's disease, CD)临床荟萃分析和治疗指南不断涌现^[1-6]，不同程度地影响了国内临幊医生对CD的诊治。而国人CD患者发病率不高，来自多中心的大宗病例标准化治疗报道匮乏，大多是单一中心的少量病例报道，同时因临幊设计方案混乱，致使结论不一致，夹杂着经验主义，这对广大消化内、外科医生产生了很大的冲击，甚至茫然。本文在近年来欧美一些CD治疗荟萃分析和指南性建议的基础上，结合临幊治疗体会，阐述当前药物治疗CD的临床策略。

CD是发生在消化系的原因不明的慢性复发性炎症疾病，可发生于从口腔至肛门整个胃肠道黏膜，主要在回肠末端和升结肠部位为主，以肠壁穿透性炎症细胞浸润，裂隙样溃疡，伴有非干酪样肉芽肿成为病理学特征改变。其发病机制可能与肠腔内细菌抗原诱导肠道黏膜固有和获得性免疫系统应答异常有密切关系。肠黏膜组织内异常免疫应答主要特征是肠黏膜组织内有分泌大量分泌Th1型(如IFN-γ、TNF)和Th17型细胞因子(如IL-17A)的CD4⁺ T细胞，以及高水平IL-12和IL-23的巨噬细胞/树突状细胞浸润等。这些免疫细胞在炎症状态下还可表达高水平的细胞因子和趋化因子受体(如CCR5、CCR9)、整合素

■同行评议者
杜奕奇，副教授，中国人民解放军第二军医大学长海医院

■研发前沿

规范化药物治疗
CD是临床研究热点,根据CD患者的疾病临床分期,病变累及范围,并发症等选择药物治疗是重要的理论基础。

(如 $\alpha 4\beta 7$ integrin)、黏附分子和辅助信号分子等,进一步诱导血液循环中白细胞向肠黏膜组织内移动、归巢和聚集,促使局部炎症应答^[7,8]。另外,肠黏膜组织内固有性免疫应答调节功能异常或缺失在疾病发生过程中也起着重要作用。

随着对CD发病机制的深入研究,临床治疗方案也发生了新的转变,从传统的抗炎药物选择,逐步过渡到使用免疫抑制剂和生物制剂治疗。对CD的药物治疗决策原则上建立在疾病的进展程度(如活动期、缓解期;轻、中、重度),病变累及范围、并发症(如瘘管、脓肿、肠管狭窄、梗阻、穿孔),以及手术后药物预防复发等^[9,10]。目的主要是控制临床症状,诱导缓解,促使内镜下黏膜愈合,肠黏膜解剖组织学结构恢复和功能恢复,延缓手术治疗,避免肠道功能丧失、致残和失去工作能力的风险,长期坚持药物维持治疗,预防复发和致残出现。

1 活动期治疗

目前临幊上对活动期CD治疗有升台阶(step-up)和降台阶(step-down)方案,其目的是快速诱导临幊症状缓解。常规step-up治疗优点在于价格低廉,而缺点是疗效差、诱发感染、疾病进展高风险、不能避免手术干预、诱发淋巴瘤以及生物治疗(如抗TNF抗体, Infliximab, IFX)延迟等。然而,在疾病早期采用step-down治疗优点是高效、降低疾病相关并发症发生率、提高黏膜愈合率、降低手术干预风险或避免肠道致残风险、住院时间缩短,而缺点是可能诱发感染和费用高。临幊上,评估特定药物的疗效,一般指药物治疗2 wk以上,临幊症状完全消失, CDAI<150, 内镜下黏膜完全愈合,停药至少6 mo无症状复发。对于病情复发一般指临幊症状出现, CDAI>150, 内镜/影像学检查有肠黏膜炎症改变。

氨基水杨酸(5-ASA)/柳氮磺吡啶(SASP): 5-ASA治疗活动性CD的效果仍有争议,有报道4 g/d有降低活动性肠道炎症作用,但疗效仍不肯定。英国胃肠病学会建议其疗效是有限的,使用SASP(4-6 g/d)仅对轻度结肠病变的CD患者有一定效果,但欧洲克罗恩病和溃疡性结肠炎组织(ECCO)和美国胃肠病学院(ACG)已不推荐使用。笔者临床观察发现,5-ASA对部分活动性CD患者有效,仍需要随机对照试验(RCT)。

抗生素: 甲硝唑、环丙沙星或利福昔明对活动性CD病情缓解有效,尤其是CD继发有感染(如脓肿形成、瘘管内感染、贮袋炎)和肠内细

菌过度生长,并能促使肛周瘘管闭合。但因长期使用引起胃肠道不适和其他不良反应,许多患者不能长期坚持。抗痨治疗没有足够的证据,不提倡使用。

糖皮质激素: 可迅速控制活动性CD病情缓解,普通糖皮质激素(如氢化考的松、强的松、甲强龙)比布地奈德(Budesonide)更有效地诱导中、重度小肠型或结肠型CD症状缓解,但其相关不良反应多(如感染、血脂增高、向心性肥胖、骨质疏松),黏膜愈合率低,甚至引起死亡。强的松一般采用开始剂量为40 mg/d,连续2-3 wk,然后减量5 mg/wk,直至停用。若强的松无效或不应答,或治疗过程中复发(包括1年内超过2次需使用激素来控制症状复发,或强的松降至15 mg后复发,或停用6 wk后复发),考虑升级治疗(包括免疫抑制剂、IFX、外科手术)。

免疫抑制剂: 对于活动性CD患者,若出现糖皮质激素依赖或者无效,则考虑使用甲氨蝶呤(MTX, 15-25 mg/wk, im)可有效控制活动期CD患者病情,并能预防缓解期复发。应注意消化系(恶心、呕吐、腹泻、腹痛、消化不良、口角炎),骨髓抑制、肝功能损伤、头疼、骨骼疼痛和肺炎等不良反应,建议每4 wk复查血常规、肝功能。若出现WBC降低,立即补充叶酸(5 mg/wk)。MTX有致畸效应,怀孕期间忌用。硫唑嘌呤(AZA)和6-巯基鸟嘌呤(6-MP)因起效慢,不推荐单独用于活动性CD患者诱导病情缓解,但常与糖皮质激素联合用于提高疗效。另外,有报道使用他克莫司[Tacrolimus, 0.1-0.2 mg/(kg·d), po]对活动性CD有一定疗效,而环孢霉素(CsA)对活动性CD患者均无效,不建议使用。

生物制剂: 近年来临幊上使用IFX可有效治疗活动性CD,诱导病情缓解,促使瘘管愈合。对于瘘管合并有脓肿形成,一定要在彻底引流(经MRI检查确诊,并与肛肠外科医生密切合作)基础上,在有效抗生素使用下,可考虑使用IFX治疗。目前大多学者认为在肠道出现不可逆转破坏前尽早采取有效干预,一般2年病史内使用IFX治疗,收益最大,联合IFX+AZA比单用效果更好,但在使用过程中一定要检测抗IFX抗体,观察有无感染(如结核菌、李斯特菌、霉菌、病毒)、淋巴瘤、药物性狼疮,神经脱髓鞘疾病等不良反应出现^[11]。

总之,(1)对于早期活动性CD病变,若无肠损伤致残风险(<2年病史,无使用免疫抑制剂或IFX治疗,无肠管狭窄、瘘管、脓肿、穿孔等肠道严重破坏),可以使用糖皮质激素治疗,待症状缓解

■相关报道

近年来,欧美一些国家对CD临床治疗发表了相关的共识意见和指南,对中国医生有一定的参考价值。

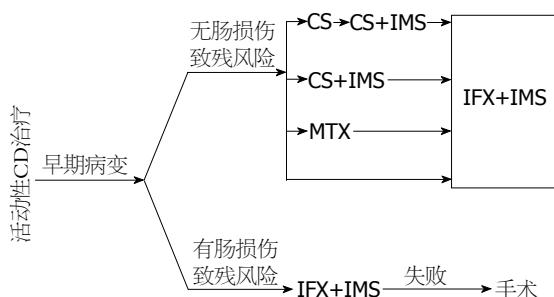


图 1 早期活动性CD病变临床治疗措施. CS: 糖皮质激素; IMS: 免疫抑制剂; MTX: 甲氨蝶呤; IFX: 英夫利昔单抗.

后使用免疫抑制剂维持治疗, 或使用肌注MTX治疗, 或者使用IFX或联合AZA治疗^[12], 见图1; (2)对于早期活动性病变合并有肠损伤致残风险可能(<40岁、病变累及小肠和结肠范围广, 肠周和/或直肠病变, 肠道深溃疡, 待手术切除, 狹窄和/或穿孔可能), 直接选择IFX联合AZA治疗, 若治疗失败则选择手术治疗, 见图1; (3)对于早期活动性病变, 合并有严重高风险致残病变, 如肠管狭窄、梗阻、穿孔、癌变、脓肿(大, 有明显感染征象)、内科药物无效、瘘管长期不愈合(药物无效)、严重影响生活质量(营养差、免疫抑制、免疫抑制剂严重不良反应), 建议手术治疗, 见图2; (4)近年来国外临床观察发现, 接受IFX治疗失败的部分CD患者可改用其他类型的抗TNF抗体(如Adalimumab)治疗, 使病情得到缓解.

2 缓解期治疗

为了预防缓解期病情复发, 生活上要戒烟, 同时避免过多肉类高脂肪食物, 提倡更多维生素和水果. 近年来大量临床荟萃分析显示5-ASA药物对缓解期维持疗效不肯定, 不主张推荐使用. 有报道一些抗生素(如甲硝唑)对缓解期患者病情有一定效果, 但因长期使用出现胃肠道等不良反应, 影响长期使用. 糖皮质激素(包括布地奈德)亦因诱发多种不良反应不推荐维持期治疗. 对于CD病情缓解后, 大多学者提倡使用足量AZA[2.0-2.5 mg/(kg·d)]或6-MP[1.0-1.5 mg/(kg·d)]进行维持期治疗, 注意定期检测骨髓造血功能、肝肾功能损伤, 诱发淋巴瘤、以及诱发感染等并发症, 一般可以持续3-5年. 对于AZA/6-MP不良反应检测, 一般推荐开始2 mo内每2-4 wk测定WBC水平, 然后4-8 wk测定一次WBC. AZA骨髓抑制与TPMT缺乏和硫鸟嘌呤核苷酸(thioguanine nucleotide)代谢物有关. 但TPMT基因在大多人群稳定, 不建议测定该酶活性和基因多态性. 另外, 对于不耐受AZA和6-MP

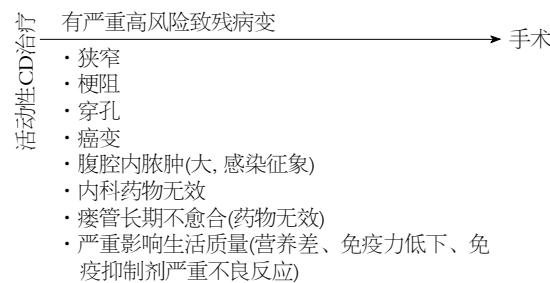


图 2 活动期CD临床治疗措施.

患者, 建议使用MTX(15 mg/wk, im), 对CD缓解后维持治疗也有良好疗效. IFX对维持治疗亦显示有良好疗效, 联合AZA或6-MP可提高临床疗效, 并能维持瘘管闭合状态, 预防瘘管复发. 另外, 营养支持和益生菌对维持期复发无效果.

3 术后复发的预防和治疗

CD术后复发是指手术切除病变肠管后, 肠黏膜炎症再次发生. 对于CD患者接受手术治疗后应采取预防复发和临床治疗两个部分, 前者是指对术后采取一系列生活调理和必要的药物干预来预防肠黏膜炎症出现, 目的是避免或延缓炎症复发; 后者是指术后临床症状或内镜下黏膜炎症复发采取必要的药物治疗^[10]. 目前仍无标准化术后预防和临床治疗方案, 生活上应立即戒烟. 对于首次手术治疗者, 若仅为肠管病变、无吸烟的低危患者, 术后无需任何治疗, 6-12 mo复查结肠镜, 若未发现炎症复发, 每年内镜检查随访, 不需治疗. 对于有吸烟史、合并肠穿孔、病变累及回肠和结肠、切除范围>10 cm的高危患者, 尽管5-ASA在循证医学上对预防复发的证据有争议, 仍推荐使用5-ASA(2 g/d)作预防性治疗, 6-12 mo后复查结肠镜, 若未见炎症复发, 每年内镜检查随访, 不需治疗; 若发现肠黏膜炎症复发, 则改为口服足量的AZA[2.0-2.5 mg/(kg·d)]或6-MP[1.0-1.5 mg/(kg·d)]长期维持治疗, 每年结肠镜随访. 对于再次手术治疗患者, 使用AZA或者6-MP治疗, 6-12 mo复发结肠镜检查, 若无复发, 继续维持治疗, 每年结肠镜随访; 若内镜下复发, 则采用类克治疗, 若仍无效则建议手术治疗. 临床研究发现激素、益生菌对术后复发的预防无效. 尽管报道术后连续使用抗生素, 如甲硝唑(20 mg/kg, 3 mo)或奥硝唑(1 g/d, 1年), 对预防术后复发有一定效果, 但长期使用出现严重胃肠道等不良反应, 长期使用受限.

■创新盘点

本文详细分析了当前对CD患者规范化药物治疗方案, 对CD临床治疗有重要的指导价值.

4 特殊情况下治疗

4.1 瘘管

临床观察发现IFX对瘘管的闭合有较好

■同行评价

文章思路明确、科学规范,具有重要的临床实用性
和应用价值。

的疗效,可以促使瘘管愈合,维持瘘管闭合状态,并能够预防瘘管复发。抗生素(如甲硝唑、环丙沙星)对改善瘘管引起的症状有帮助作用,尤其是肛周瘘管合并脓肿感染,但不能促使瘘管愈合。因长期使用抗生素会引起不良反应,致使不能久用。另外,嘌呤类药物对瘘管愈合有一定的促进作用。有报道使用他克莫司对肛周瘘管愈合有效,但仍需进一步RCT。若内科治疗效果无效,则需外科治疗。

4.2 肠外并发症 关节炎和骨结节痛可以使用对乙酰氨基酚、SASP、5-ASA、COX2抑制剂塞来昔布、糖皮质激素、MTX、NSAID、IFX治疗。若出现骨质疏松,可以使用钙剂、VitD和糖皮质激素治疗。皮肤病变(如结节性红斑、坏疽性脓皮病等)可以使用糖皮质激素、AZA或他克莫司治疗,若无效可改用IFX治疗。若出现巩膜炎、结膜炎、虹膜炎、或葡萄膜炎,建议使用糖皮质激素治疗(局部或静脉),可成功阻止失明和角膜穿孔,若无效改用IFX治疗。熊去氧胆酸对合并的原发性硬化性胆管炎、胆囊炎有一定效果,可以改善肝功能损伤,降低结肠癌发生。

4.3 孕妇 在活动期病变时,孕妇服用药物对胎儿的生长发育有明显影响,提倡在CD病情缓解后怀孕。一般地,5-ASA对怀孕期间和哺乳期胎儿的生长是安全的,而SASP可引起新生儿溶血,以及叶酸吸收障碍,应慎用。甲硝唑和环丙沙星对胎儿发育影响不大,但四环素和磺胺类药物应禁用。糖皮质激素类药物对孕妇一般是安全的,但有小部分可通过胎盘进入胎儿体内或进入乳汁内,可能会影响胎儿发育。免疫抑制剂(AZA、6-MP、CsA)可能会引起早产、先天性缺陷,应慎用。相反,MTX有致畸作用,应忌用。近期欧美临床观察发现怀孕期间使用IFX治疗一般是安全的,致畸、死胎和早产发生率没有明显变化。

5 结论

近年来,随着消化内镜、影像学、免疫病理学等技术在临幊上开展应用,对CD诊断有很大的帮助作用。对于CD临幊治疗,应根据患者的疾病分期、病变累及范围、有无合并症以及是否接受手术干预等来合理选择药物,控制临幊症状,诱导缓解,促使内镜下黏膜愈合,恢复肠道生理功能等。通过有效的药物维持治疗,预防疾病复发。

6 参考文献

1 Talley NJ, Abreu MT, Achkar JP, Bernstein CN,

Dubinsky MC, Hanauer SB, Kane SV, Sandborn WJ, Ullman TA, Moayyedi P; American College of Gastroenterology IBD Task Force. An evidence-based systematic review on medical therapies for inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2011; 106 (Suppl 1): S2-S25; quiz S26

- 2 Mowat C, Cole A, Windsor A, Ahmad T, Arnott I, Driscoll R, Mitton S, Orchard T, Rutter M, Younge L, Lees C, Ho GT, Satsangi J, Bloom S; IBD Section of the British Society of Gastroenterology. Guidelines for the management of inflammatory bowel disease in adults. *Gut* 2011; 60: 571-607
- 3 Cottone M, Renna S, Orlando A, Moccia F. Medical management of Crohn's disease. *Expert Opin Pharmacother* 2011; 12: 2505-2525
- 4 Dignass A, Van Assche G, Lindsay JO, Lémann M, Söderholm J, Colombel JF, Danese S, D'Hoore A, Gassull M, Gomollón F, Hommes DW, Michetti P, O'Morain C, Oresland T, Windsor A, Stange EF, Travis SP; European Crohn's and Colitis Organisation (ECCO). The second European evidence-based Consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: Current management. *J Crohns Colitis* 2010; 4: 28-62
- 5 Bernstein CN, Fried M, Krabshuis JH, Cohen H, Elia- kim R, Fedail S, Gearry R, Goh KL, Hamid S, Khan AG, LeMair AW, Malfertheiner, Ouyang Q, Rey JF, Sood A, Steinwurz F, Thomsen OO, Thomson A, Watermeyer G. World Gastroenterology Organization Practice Guidelines for the diagnosis and management of IBD in 2010. *Inflamm Bowel Dis* 2010; 16: 112-124
- 6 Van Assche G, Dignass A, Reinisch W, van der Woude CJ, Sturm A, De Vos M, Guslandi M, Oldenburg B, Dotan I, Marteau P, Ardizzone A, Baumgart DC, D'Haens G, Gionchetti P, Portela F, Vuclic B, Söderholm J, Escher J, Koletzko S, Kolho KL, Lukas M, Mottet C, Tilg H, Vermeire S, Carbonnel F, Cole A, Novacek G, Reinshagen M, Tsianos E, Herrlinger K, Oldenburg B, Bouchnik Y, Kiesslich R, Stange E, Travis S, Lindsay J; European Crohn's and Colitis Organisation (ECCO). The second European evidence-based Consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: Special situations. *J Crohns Colitis* 2010; 4: 63-101
- 7 刘占举. 炎症性肠病肠黏膜组织内T细胞分化异常和靶向治疗. 同济大学学报(医学版) 2010; 31: 3-6
- 8 Liu ZJ, Yadav PK, Su JL, Wang JS, Fei K. Potential role of Th17 cells in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 5784-5788
- 9 刘占举. 克罗恩病临床诊治策略. 中华消化杂志 2011; 31: 194-196
- 10 刘占举. 重视克罗恩病术后复发的预防和临床治疗. 中华消化杂志 2010; 30: 1-2
- 11 Van Assche G, Lewis JD, Lichtenstein GR, Loftus EV, Ouyang Q, Panes J, Siegel CA, Sandborn WJ, Travis SP, Colombel JF. The London position statement of the World Congress of Gastroenterology on Biological Therapy for IBD with the European Crohn's and Colitis Organisation: safety. *Am J Gastroenterol* 2011; 106: 1594-1602; quiz 1593, 1603
- 12 Ordás I, Feagan BG, Sandborn WJ. Early use of immunosuppressives or TNF antagonists for the treatment of Crohn's disease: time for a change. *Gut* 2011; 60: 1754-1763

人突变型CDK4真核荧光表达质粒的构建及对人肝细胞SMMC-7702中POLD1基因表达的调控

李永继, 黄怡, 阮细玲, 廖柳凤, 吴琼, 黄文涛, 徐恒

李永继, 阮细玲, 广西医科大学第一附属医院病理科 广西壮族自治区南宁市 530021

黄怡, 廖柳凤, 吴琼, 黄文涛, 广西医科大学第一附属医院药理学教研室 广西壮族自治区南宁市 530021

徐恒, 广西医学科学实验中心肿瘤实验室 广西壮族自治区南宁市 530021

李永继, 在读硕士, 主要从事肝癌、乳腺癌中POLD1/P125与细胞周期蛋白复合物调控通路及其致癌机制的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30672363

广西医科大学实验中心开放课题基金资助项目, No. 903011306

广西医科大学研究生创新课题基金资助项目, No. 2010105981001M227

作者贡献分布: 实验设计、质粒构建、细胞增殖检测、荧光定量PCR和Western blot等主要实验、数据分析和文章撰写由李永继完成; 部分细胞培养、质粒转染等由阮细玲、黄怡、廖柳凤、黄文涛及吴琼协助完成; 部分数据分析由黄怡完成; 课题指导、文章修改和审阅由徐恒完成。

通讯作者: 徐恒, 教授, 530021, 广西壮族自治区南宁市双拥路22号, 广西医科大学医学实验中心肿瘤实验室。

heng6888@yahoo.com

收稿日期: 2012-03-15 修回日期: 2012-05-03

接受日期: 2012-06-02 在线出版日期: 2012-07-08

Transfection of a eukaryotic vector expressing a mutant CDK4 up-regulates POLD1 expression in SMMC-7702 cells

Yong-Ji Li, Yi Huang, Xi-Ling Ruan, Liu-Feng Liao, Qiong Wu, Wen-Tao Huang, Heng Xu

Yong-Ji Li, Xi-Ling Ruan, Department of Pathology, Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Yi Huang, Liu-Feng Liao, Qiong Wu, Wen-Tao Huang, Department of Pharmacology, Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Heng Xu, Medical Experimental Research Center, Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30950028; the Natural Science Foundation of Guangxi Zhuang Autonomous Region, No. 2010jjC40020; the Foundation of the Medical Experimental Research Center of Guangxi Medical University, No. KFJJ2010-66; and the Postgraduate Innovation Foundation of Guangxi Medical University, No. 2010105981001M227

Correspondence to: Heng Xu, Professor, Medical Experimental Research Center, Guangxi Medical University, 22 Shuangyong Road, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. heng6888@yahoo.com

Received: 2012-03-15 Revised: 2012-05-03

Accepted: 2012-06-02 Published online: 2012-07-08

Abstract

AIM: To construct a eukaryotic expression vector encoding a mutant CDK4 protein and to investigate the effect of transfection of this vector on POLD1 expression in SMMC-7702 cells.

METHODS: The mutant CDK4 gene was amplified by RT-PCR from total RNA isolated from the human hepatocarcinoma cell line SMMC-7721, digested, and inserted into the eukaryotic expression vector pEGFP-C1. The resultant recombinant plasmid was confirmed by sequencing. After the recombinant plasmid was transfected into SMMC-7702 cells using Lipofectamine 2000, the expression of fusion protein was observed by fluorescence microscopy, and expression of CDK4 and POLD1 mRNAs was detected by real-time PCR.

■背景资料

POLD1基因编码的P125蛋白是细胞S期中负责DNA复制调控的关键蛋白,与其他细胞周期调控因子关系密切。

RESULTS: The eukaryotic expression plasmid GFP-CDK4 was successfully constructed. The mutant CDK4 gene contained 5 base mutation sites, 4 base insertions and 2 deletions, which caused 7 amino acids to change. Compared to non-transfected cells or cells transfected with the pEGFP-C1 vector, cell proliferation was significantly higher in cells transfected with the recombinant vector (0.826 ± 0.08 vs 0.596 ± 0.06 , 0.609 ± 0.10 , $F = 7.033$, $P < 0.05$). The expression levels of CDK4 and POLD1 genes in cells transfected with the recombinant vector was significantly higher than those in the two control groups (1.94 ± 0.11 vs 1.01 ± 0.00 , 1.05 ± 0.12 , $F = 54.046$, $P < 0.01$; 0.54 ± 0.04 vs 0.30 ± 0.07 , 0.25 ± 0.06 , $F = 11.788$, $P < 0.05$). Similar results were also obtained for the protein expression levels of CDK4 (0.65 ± 0.03 vs 0.41 ± 0.03 , 0.39 ± 0.05 , $F = 14.665$, $P < 0.05$) and P125 (0.54 ± 0.04 vs 0.30 ± 0.07 , 0.25 ± 0.06 , $F = 11.788$, $P < 0.05$).

CONCLUSION: Transfection of the eukaryotic expression plasmid GFP-CDK4 significantly increases the proliferation and invasion of SMMC-7702 cells possibly by up-regulating POLD1 expression.

Key Words: Hepatocellular carcinoma; Mutation; CDK4; POLD1

■同行评议者

王钦红, 副教授,
美国杜克大学医学院肿瘤生物系

■研发前沿

研究癌细胞和正常细胞中DNA与蛋白复合物，或蛋白与蛋白复合物空间结构和作用位点的改变能够解释细胞恶变的机制，从而为新的诊疗方法提供理论依据。

Li YJ, Huang Y, Ruan XL, Liao LF, Wu Q, Huang WT, Xu H. Transfection of a eukaryotic vector expressing a mutant CDK4 up-regulates POLD1 expression in SMMC-7702 cells. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(19): 1705-1712

摘要

目的：构建包含突变型CDK4基因的真核绿色荧光表达载体，作为POLD1基因依赖的细胞周期复制调控的模型，研究POLD1基因相关的癌性增殖的机制，为干预细胞恶性增殖提供新的思路。

方法：设计人突变型CDK4基因全长特异性引物进行PCR扩增人肝癌细胞系SMMC-7721总cDNA，以pEGFP-C1质粒为模板连接，得到重组质粒GFP-CDK4后进行测序和生物信息学比对分析；转染细胞分3组：实验组(转染突变型CDK4重组真核表达质粒GFP-CDK4)，阴性对照组(转染空载体pEGFP-C1组)和空白对照组(SMMC-7702)。通过MTT试验分析细胞增殖变化；实时荧光定量PCR技术检测CDK4、POLD1及细胞周期相关因子的表达量，Western blot检测蛋白表达的差异。

结果：成功构建了人突变型CDK4基因真核表达质粒GFP-CDK4，转染到肝细胞SMMC-7702后使细胞表达融合绿色荧光的CDK4蛋白；SMMC-7721细胞中突变型的CDK4存在5个碱基突变，4个碱基插入，2个碱基缺失，这使得5个氨基酸序列发生了改变；与空白对照组及阴性对照组相比，实验组细胞增殖明显升高(0.826 ± 0.08 vs 0.596 ± 0.06 , 0.609 ± 0.10 , $F = 7.033$, 均 $P < 0.05$)；实验组CDK4 mRNA表达水平差异明显(1.94 ± 0.11 vs 1.01 ± 0.00 , 1.05 ± 0.12 , $F = 54.046$, $P < 0.01$)，POLD1 mRNA相应地升高(2.47 ± 0.25 vs 1.16 ± 0.00 , 1.26 ± 0.23 , $F = 135.496$, $P < 0.01$)；稳定转染细胞的蛋白水平变化趋势与基因相同，其中实验组CDK4(0.65 ± 0.03 vs 0.41 ± 0.03 , 0.39 ± 0.05 , $F = 14.665$, 均 $P < 0.05$), P125(0.54 ± 0.04 vs 0.30 ± 0.07 , 0.25 ± 0.06 , $F = 11.788$, 均 $P < 0.05$)。

结论：人突变型CDK4基因的真核表达载体GFP-CDK4显著促进肝细胞的增殖能力，这与POLD1基因及P125蛋白的高表达相关。

关键词：肝细胞癌；突变；CDK4；POLD1

李永继, 黄怡, 阮细玲, 廖柳凤, 吴琼, 黄文涛, 徐恒. 人突变型CDK4真核荧光表达质粒的构建及对人肝细胞SMMC-7702中POLD1基因表达的调控. 世界华人消化杂志 2012; 20(19): 1705-1712

<http://www.wjnet.com/1009-3079/20/1705.asp>

0 引言

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是一种常见的恶性肿瘤，也是全球3大肿瘤死因之一，严重危害人类的健康。我国近20年来HCC发病率呈上升趋势，HCC患者每年死亡人数约为23万之多，占我国全部恶性肿瘤死亡率的18.8%，仅次于胃癌居第2位，在广西则居第1位^[1,2]。DNA聚合酶δ(DNA polymerase δ, Polδ)是真核生物DNA复制的主要复制酶，POLD1基因编码其活性催化亚基P125^[3,4]。细胞周期蛋白依赖性激酶4(cyclin dependent kinase 4, CDK4)是含丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶CDKs家族中的重要一员。他与细胞周期蛋白D(cyclinD)共同作用于细胞G₁期，成为关键调控蛋白复合物^[5]。目前已在多种肿瘤细胞系中检测到该区位的基因改变，包括表达丰度的改变、基因重排和点突变^[6-8]。研究表明CDK4参与了细胞恶变中细胞周期改变相关的过程^[9,10]，而这个过程最终调控POLD1基因编码P125进行DNA的复制。因此，我们推测CDK4参与了POLD1表达的调控，对细胞恶变具有关键作用的CDK4与POLD1调控模式的研究将有助于我们了解肝细胞癌的发病机制，从而为阻断肝细胞癌的发生和发展提供新的思路。

1 材料和方法

1.1 材料 肝癌细胞系SMMC-7721、正常肝细胞系SMMC-7702购自中国科学院上海细胞库；1640培养液购自Thermo scientific公司；胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料技术有限公司；大肠杆菌*E.coli*. DH5α、真核表达载体pEGFP-C1为本课题实验室保存；胰蛋白胨(Tryptone)及酵母提取液(Yeast Extract)购自OXOID公司；琼脂糖(Agarose)购自上海Yito公司；高保真酶(Prime STAR)、T4 DNA连接酶、pMD 18T载体、限制性内切酶(*Sal* I, *EcoR* I)为Takara公司产品；TRIzol试剂为Invitrogen公司产品；胶回收试剂盒、质粒小量抽提试剂盒、SYBRGreen荧光定量MIX试剂购自天根(北京)公司。PVDF膜购自美国Millipore公司；小鼠抗人CDK4抗体、山羊抗人DNA聚合酶δ(P125)抗体为Santa Cruz产品；免抗人GAPDH单克隆抗体购自南宁市蓝光生物技术有限公司；远红外荧光标记的免抗小鼠、山羊抗兔、免抗山羊二抗购自美国KPL公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养：肝癌细胞SMMC-7721和正常肝

表 1 PCR引物序列表

基因名称	引物序列(5' - 3')	产物长度(bp)
CDK4(全长)	上游 GGAATTCGAATGGCTACCTCTCGATATGA	977
	下游 ACGCGTCGACGCCCTCTCAGTGTCCAG	
CDK4(荧光定量)	上游 GTTCGTGAGGTGGCTTACTG	145
	下游 GTCCTTAGGTCTGGCTACATG	
POLD1(荧光定量)	上游 GCTCCGCTCCTACACGCTCAA	109
	下游 GGTCTGGTCGTTCCCATTCTGC	
β -actin(荧光定量)	上游 AACTCCATCATGAAGTGTGA	247
	下游 ACTCCTGTTGCTGATCCAC	

细胞SMMC-7702培养于含100 mL/L胎牛血清的1640培养基, 在37 °C、50 mL/L CO₂条件下培养.

1.2.2 质粒构建: 用TRIzol、氯仿法提取肝癌细胞SMMC-7721总RNA后逆转录为cDNA, 并以此为模板, 用CDK4特异性引物(表1)进行PCR得到包含CDK4编码区CDS的基因片段. 将质粒pEGFP-C1和PCR产物用限制性内切酶*Sa*I、*Eco*R I进行双酶切, 然后用T4连接酶链接, 转化到感受态细胞后筛选出重组质粒GFP-CDK4.

1.2.3 细胞转染: (1)瞬时转染: 转染前2 d将SMMC-7702细胞接种到6孔板, 转染前1 h用无血清1640培养基培养. 将转染试剂lipo2000与质粒以2.5 μL : 5 μg混合, 室温孵育, 15 min后均匀滴入培养板细胞, 6 h后换用完全培养基, 48 h收取细胞; (2)稳定转染: 将瞬时转染5 d后的6孔板细胞, 在每个孔加入终浓度为500 mg/L的G418进行筛选, 3 wk后得到稳定转染的细胞.

1.2.4 MTT分析: 将稳定转染GFP-CDK4后处于对数生长期的SMMC-7702细胞接种于96孔板作为实验组, 稳定转染PEGFP-C1的SMMC-7702作为对照组, 未经处理的SMMC-7702作为空白对照组. 平均每孔2×10³个细胞, 每组细胞均重复作3个孔. 于种板后的24、48、72、96 h分别加入20 μL MTT溶液, 4 h后小心吸出培养基及MTT, 每孔加150 μL DMSO, 混匀后用酶标仪检测490 nm处各孔的吸光度(A)值, 绘制生长曲线.

1.2.5 实时荧光定量PCR(qRT-PCR)检测: 通过primer premier 5.0软件设计特异性引物(表1); 将瞬时转染的细胞用TRIzol、氯仿法提取总RNA, 各取1 μg进行逆转录得到cDNA, 以此为模板在ABI7500实时荧光定量仪上进行荧光定量聚合酶链反应, 反应体系为: 9 μL PCR Mix、9 μL去离子水、1 μL引物、1 μL cDNA. PCR条件为: 95 °C预变性2 min; 95 °C变性20 s、60 °C退火30 s, 72 °C延伸30 s, 40个循环, 采用比较△△

Ct法, 设置 β -actin为内参, 结果用7500 Software v2.0.5分析数据.

1.2.6 蛋白质印迹(Western blot)分析: 将稳定转染后的细胞用RIPA裂解液裂解后提取细胞总蛋白, BCA法测定蛋白浓度后, 取70 μg总蛋白用梯度SDS-PAGE胶分离后转移到PVDF膜上. 杂交膜先用5%脱脂奶粉的PBST溶液封闭2 h后4 °C摇床孵育一抗(CDK4、P125—抗稀释度分别为1:5 000、1:3 000)过夜, PBST洗膜3次, 每次10 min, 室温下孵育二抗1 h(兔抗小鼠、兔抗山羊二抗稀释度为1:3 000), PBST洗膜3次, 每次10 min; 将漂洗过的PVDF膜用LI-COR Odyssey红外荧光扫描成像系统扫描, Odyssey V3.0软件分析图像及数据.

统计学处理 运用SPSS13.0统计软件进行ANOVA单因素方差分析, LSD法进行两两比较, 结果用mean±SD表示, 检验水准 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 有统计学意义.

2 结果

2.1 鉴定重组质粒GFP-CDK4 将PCR产物进行凝胶电泳在977 bp处有明亮特异条带, 与预期结果一致. 单酶切及双酶切鉴定结果行凝胶电泳, 在约5 700 bp处、4 700 bp处及1 000 bp处分别有明亮条带(图1), 表明CDK4基因已连接入pEGFP-C1载体. DNA测序结果与UCSC库中查找的CDK4序列与测序序列SEQ进行BLAST比对后得出, Expect = 0.0, Identities = 619/630(98%), Gaps = 5/630(1%), 5个碱基突变, 4个碱基插入, 2个碱基缺失(表2, 图2). 这导致突变型CDK4编码的蛋白CDK4对比野生型CDK4编码的CDK4蛋白有了5个氨基酸的改变.

2.2 MTT分析细胞的增殖差异 转染GFP-CDK4的实验组SMMC-7702细胞与转染PEGFP-C1对照组细胞SMMC-7702和空白对照组SMMC-7702

■创新点

CDK4是细胞G₁期关键调控蛋白, 但是CDK4与POLD1/P125的调控关系研究鲜有报道, 本文首先发现肝癌细胞系内CDK4为突变型, 转染到肝细胞系后能使其增殖能力显著增加, 这与CDK4参与调控POLD1/P125有关.

■应用要点

肝细胞癌中突变型CDK4对POLD1调控机制的研究将为阻断肝癌的发生和发展提供新的思路和理论依据。

表2 突变型CDK4碱基突变位点, 导致氨基酸的改变以及突变意义

突变位点	原碱基	突变后碱基	氨基酸变化
470	G_A	GGA	-
516	C_T	CCT	-
522	TCG	TGG	Ser→Try
524	GAA	GA_缺失	-
583	CCT	C_T缺失	-
605	GCT	GCA	Ala→Glu
606	_TT	CTT	-
610	TTT	TAT	Phe→Tyr
620	ATG	AAG	Met→Lys
622	_AT	GAT	-
633	AAC	AAT	Asp→Asp

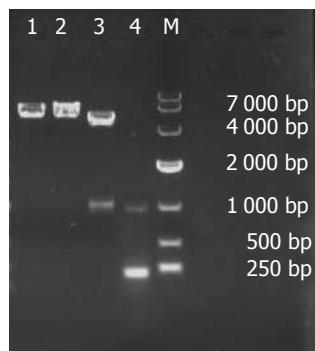


图1 重组质粒GFP-CDK4酶切和PCR产物电泳。1: GFP-CDK4质粒Sal I单酶切产物; 2: GFP-CDK4质粒EcoR I单酶切产物; 3: GFP-CDK4质粒Sal I /EcoR I双酶切产物; 4: CDK4和β-actin PCR产物。1, 2: 洋道显示GFP-CDK4质粒单酶切后的线性质粒位于4 000~7 000 bp之间, 符合预计长度5 708 bp; 3: 洋道显示双酶切产物为两根条带GFP(4 731 bp)和CDK4(977 bp); 4: 洋道同时显示CDK4和β-actin(247 bp)PCR扩增产物。

细胞相比, 吸光度值 A_{490} 在种板后的24、48、72 h差异无统计学意义分别是(0.279 ± 0.040 vs 0.283 ± 0.030 , 0.282 ± 0.030 , $F = 0.010$, 均 $P > 0.05$), (0.372 ± 0.030 vs 0.310 ± 0.040 , 0.325 ± 0.010 , $F = 3.145$, 均 $P > 0.05$)、(0.502 ± 0.110 vs 0.405 ± 0.030 , 0.410 ± 0.060 , $F = 1.603$, 均 $P > 0.05$), 但与96 h差异具有统计学意义(0.826 ± 0.080 vs 0.596 ± 0.060 , 0.609 ± 0.100 , $F = 7.033$, 均 $P < 0.05$), 实验组细胞增殖速度高于对照组和空白对照组(图3), 这与实验组细胞荧光出现的数量和强度趋势一致(图4)。

2.3 荧光定量PCR检测mRNA表达量 实验组细胞在转染后48 h检测CDK4基因和POLD1基因的相对表达量, 结果显示实验组细胞明显高于对照组, 阴性对照组和空白对照组(1.94 ± 0.11 vs 1.01 ± 0.00 , 1.05 ± 0.12 , $F = 54.046$, $P < 0.01$),

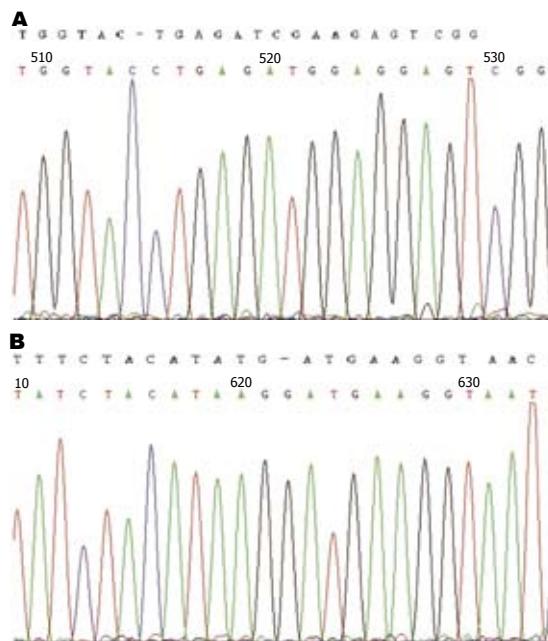


图2 GFP-CDK4序列碱基突变位点比对示意图。A: 突变密集区(516~524 bp); B: 突变密集区(605~633 bp)。

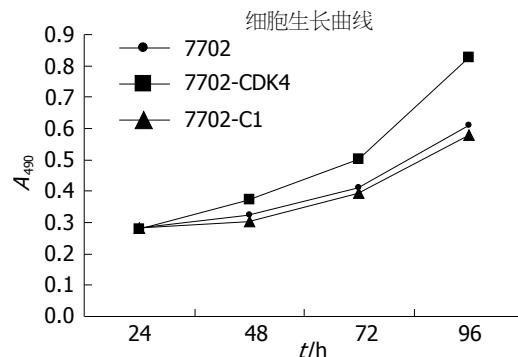


图3 SMMC-7702细胞生长曲线图。

(0.54 ± 0.04 vs 0.30 ± 0.07 , 0.25 ± 0.06 , $F = 11.788$, 均 $P < 0.05$, 图5)。说明重组质粒在正常肝细胞内高表达CDK4基因, 而且高表达的CDK4基因可以促进POLD1基因的高表达。

2.4 Western blot分析蛋白的表达量 实验组CDK4蛋白相对于对照组和空白对照组高表达(0.65 ± 0.03 vs 0.41 ± 0.03 , 0.39 ± 0.05 , $F = 14.665$, 均 $P < 0.05$), 对应的P125蛋白的表达增高, 与对照组和空白对照组差异明显(0.54 ± 0.04 vs 0.30 ± 0.07 , 0.25 ± 0.06 , $F = 11.788$, 均 $P < 0.05$), 对照组和空白对照组间则没有明显差异($P > 0.05$), 结果具有统计学意义。即CDK4蛋白高表达可以促进P125蛋白的高表达, 结论与mRNA水平趋势一致(图6)。

3 讨论

HCC以及其他恶性肿瘤的生长和转移都是以细胞恶性增殖为基础的^[11], 细胞的恶性增殖则必

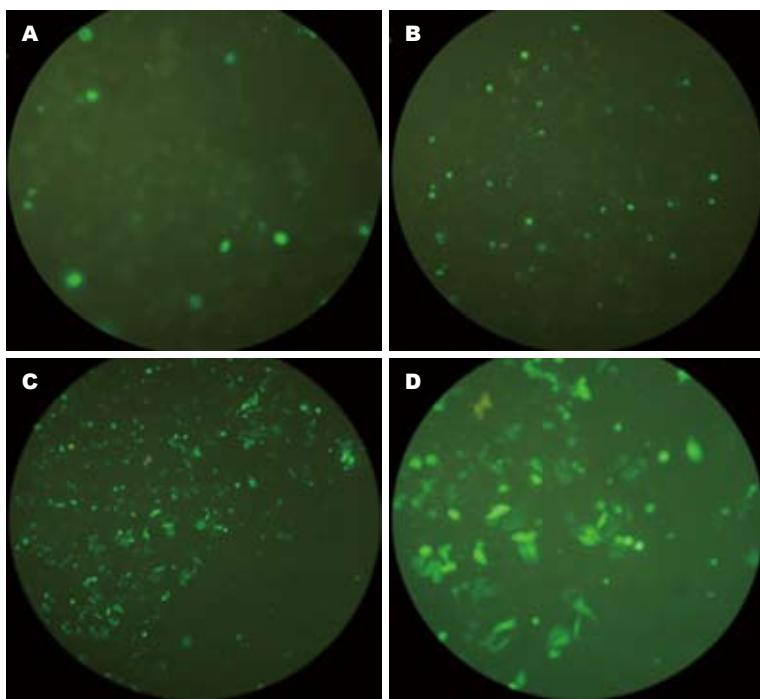


图 4 SMMC-7702瞬时转染GFP-CDK4后绿色荧光照片. A: 转染后24 h; B: 转染后48 h; C: 转染后72 h; D: 转染后96 h.

■同行评价

本研究在肝癌细胞中成功克隆了CDK4基因并对此基因的突变进行了分析,为进一步在肝癌中研究此基因提供了有力的工具.

须依赖POLD1编码的P125参与合成复制DNA,且这个过程与细胞周期调控密不可分. 调控细胞周期的核心因子是细胞周期蛋白依赖性激酶,他与不同的细胞周期蛋白形成多种复合物,作用于细胞周期的不同时相,决定着细胞周期的进程^[12]. 其中CDK4/cyclinD的复合物就是调控G₁/S期的关键蛋白复合物,他可以使Rb蛋白的丝氨酸或苏氨酸残基发生磷酸化^[13]. 在通常情况下Rb蛋白处于低磷酸化状态,并与转录因子E2F结合^[14]. 磷酸化后的Rb蛋白可导致E2F的释放,释放出的E2F可以诱导cyclinE的表达, cyclinE与CDK2蛋白形成复合物后又可以使Rb蛋白发生磷酸化,使E2F与cyclinE的活性在G₁/S期交界点处迅速增高,引起一系列与G₁/S期行进有关的靶分子的表达,促使细胞完成DNA复制^[15-17].

到目前为止,科学家们在多种癌细胞中检测到CDK4基因发生了突变, Pilotti等^[18]首先发现遗传性家族性黑色素瘤病人CDK4基因存在的较高突变率, Plan等^[19]在乳腺癌和胰腺癌中也发现了突变的CDK4. Miliani de Marval等^[20]在研究CDK4在肿瘤形成中的作用的发现,在CDK4缺失的小鼠体内,即使其他抑癌基因如P53或Ink4a/Arf失活的情况下,小鼠仍然不会形成肿瘤,这说明CDK4是肿瘤形成所不可缺少的基因. 我们的研究证实在肝细胞癌细胞系SMMC-7721中存在碱基缺失和突变,并推测出相应氨基酸的改变. 但是,研究人员一直未能证实CDK4的突变和恶性肿瘤之间的直接因果关系.

朱晓宇等的运用染色体免疫共沉淀(chromatin immunoprecipitation, ChIP)和荧光素酶报告基因实验证实了P53以及一些细胞周期调控因子可以在细胞内(*in vivo*)能与POLD1启动子结合并影响POLD1启动子活性^[21,22]. Greeve等^[23]的研究证实了MCF-7癌细胞增殖的阻断可能与CDK2和CDK4活性降低引起p21与CDK2和CDK4复合物结合的改变有关. 然而至今没有进一步的研究解释这些细胞周期因子是如何对癌细胞增殖阻断起作用,是否最终是通过抑制POLD1基因表达或P125活性达到的. 因此,研究关键的细胞周期调控因子对于POLD1基因和其编码蛋白P125表达影响就显得非常必要,特别是对存在着高突变率的恶性肿瘤中的CDK4对POLD1的调控通路和机制的研究,将有可能为阻止肿瘤发生提供新的思路.

本文探讨了肝癌细胞SMMC-7721中突变型CDK4对肝细胞SMMC-7702增殖和迁移能力的影响. 构建的突变型CDK4重组真核表达质粒GFP-CDK4经过DNA测序比对,发现SMMC-7721中突变型的CDK4存在有碱基突变和缺失,改变引起相应氨基酸序列的替换,证实了肝细胞癌SMMC-7721中的CDK4在结构功能发生了异常. 而氨基酸的替换引起的CDK4空间构象的改变,以及这些改变对细胞周期中细胞周期因子调控复合物结构和功能的机制尚不明确,需要进一步深入研究. 有意义的是,我们将GFP-CDK4转染到肝细胞SMMC-7702中, MTT

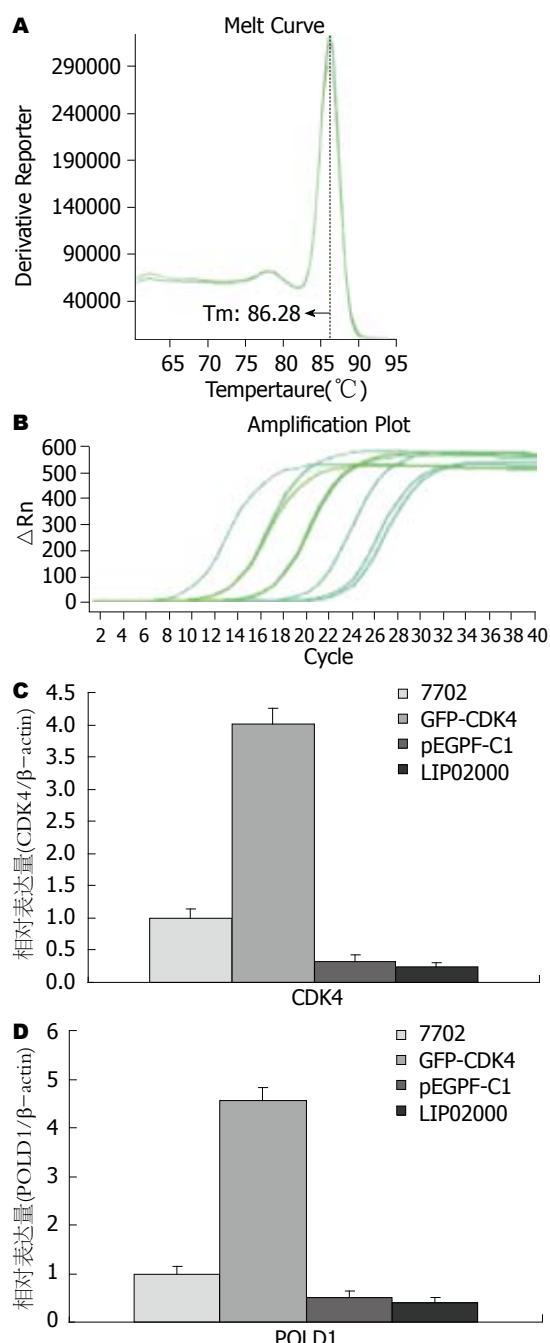


图5 荧光定量测定CDK4/POLD1 mRNA表达水平。以SMMC-7702细胞组为对照,转染后48 h检测实验组CDK4/POLD1明显高于阴性对照组pEGFP-C1和空白对照组lipo2000($P<0.01$)。

结果证实,突变型CDK4基因的高表达促进了正常肝细胞SMMC-7702的增殖。转染突变型CDK4后细胞生物学行为的改变与其他研究者对于CDK4基因促进细胞增殖和分裂的功能一致。

作为DNA复制中负主要责任的聚合酶,我们推断CDK4对细胞增殖和迁移的促进作用是通过调控POLD1基因和其编码的P125催化亚基实现的,这种调控方式可以是直接的也可以是间接的。实时荧光定量PCR的结果证实了这一

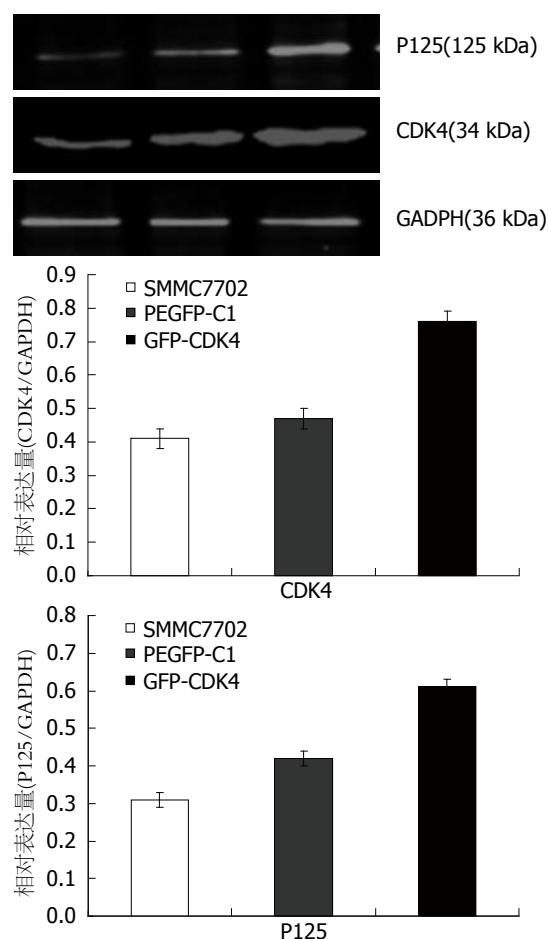


图6 Western blot检测CDK4/P125蛋白表达量, 稳转GFP-CDK4的SMMC-7702细胞CDK4/P125蛋白灰度值均高于对照组SMMC-7702和阴性对照组pEGFP-C1($P<0.05$)。

推论,CDK4促进了POLD1的表达,且POLD1的表达滞后于CDK4,这一方面说明POLD1作为CDK4的下游基因受到CDK4调控,另一方面也验证了CDK4和POLD1作用于不同细胞周期,共同承担细胞DNA复制的任务。Western blot的结果在蛋白质水平上也说明了CDK4对P125的存在正向调控作用。

现有研究^[24,25]证实cyclinD-CDK4复合物在细胞G₁期中期和晚期磷酸化RB蛋白释放E2f-Dp1, E2f靶基因的表达使细胞通过R点(restriction point)完成DNA复制的准备,进入下一细胞周期S期。这时,DNA聚合酶δ(DNA polymerase δ, polδ)的催化亚基P125在增殖细胞核抗(proliferation cell nuclear antigen, PCNA)和复制因子C(replication factor C, RFC)的参与下形成复合物定位于复制叉,以前导链和后续链为模板两种不同形式的DNA复制^[26],为细胞的增殖提供物质基础。但是,目前仍没有足够的证据证实CDK4蛋白是否直接参与了构成调控POLD1基因启动子的转录调控蛋白复合物,这种转录调

控复合物的空间结构与CDK4基因的突变是否有关系也没有实验验证。这些都需更加深入的研究。

另外, 作为细胞核蛋白复合物的CDK4/cyclinD本应在细胞核表达, 但在多种癌症的免疫病理的研究观察中发现, CDK4/cyclinD均可在胞浆中表达, 且表达强弱与癌恶程度有关^[27]。研究CDK4/cyclinD在不同细胞周期的定位对解释细胞周期依赖相关疾病的发生和发展有重要的意义。而在研究细胞蛋白定位方面, 荧光蛋白和依赖荧光蛋白的荧光共振能量转移(fluorescence resonance energy transfer, FRET)等新技术的使用将成为研究细胞周期蛋白的有力工具^[28-30]。

总之, 我们目前的实验结果证实了突变型CDK4促进了肝细胞SMMC-7702的增殖能力, 其机制是通过调控POLD1基因和P125蛋白的高表达实现的。进一步研究恶性肿瘤细胞中CDK4对POLD1调控通路和作用模式对从基因和蛋白水平上抑制肿瘤细胞增殖的提供新的思路, 对指导临上肿瘤的治疗有重要意义。

4 参考文献

- 1 娄国强, 加强HBV相关肝细胞肝癌的基础及临床研究. 中华实验和临床病毒学杂志 2011; 25: 321
- 2 Aladjem MI, Pasa S, Parodi S, Weinstein JN, Pommiere Y, Kohn KW. Molecular interaction maps--a diagrammatic graphical language for bioregulatory networks. *Sci STKE* 2004; 2004: pe8
- 3 Xu H, Zhang P, Liu L, Lee MY. A novel PCNA-binding motif identified by the panning of a random peptide display library. *Biochemistry* 2001; 40: 4512-4520
- 4 Burgers PM, Gerik KJ. Structure and processivity of two forms of *Saccharomyces cerevisiae* DNA polymerase delta. *J Biol Chem* 1998; 273: 19756-19762
- 5 Blain SW. Switching cyclin D-Cdk4 kinase activity on and off. *Cell Cycle* 2008; 7: 892-898
- 6 Altirriba J, García A, Sánchez B, Haba L, Altekkruse S, Stratmann T, Bombí JA, Mezquita C, Gomis R, Mora C. The sole presence of CDK4 is not a solid criterion for discriminating between tumor and healthy pancreatic tissues. *Int J Cancer* 2012; 130: 2743-2745
- 7 Molenaar JJ, Ebus ME, Koster J, van Sluis P, van Noesel CJ, Versteeg R, Caron HN. Cyclin D1 and CDK4 activity contribute to the undifferentiated phenotype in neuroblastoma. *Cancer Res* 2008; 68: 2599-2609
- 8 Chow YH, Zhu XD, Liu L, Schwartz BR, Huang XZ, Harlan JM, Schnapp LM. Role of Cdk4 in lymphocyte function and allergen response. *Cell Cycle* 2010; 9: 4922-4930
- 9 赵文翠, 刘国红, 徐金娥, 王春芹, 戴淑贞. P27、CDK4在子宫内膜癌中的表达. 现代妇产科进展 2004; 13: 41-44
- 10 Yu Q, Sicinska E, Geng Y, Ahnström M, Zagózdzon A, Kong Y, Gardner H, Kiyokawa H, Harris LN, Stål O, Sicinski P. Requirement for CDK4 kinase function in breast cancer. *Cancer Cell* 2006; 9: 23-32
- 11 欧贤红, 廖柳凤, 徐恒, 刘华刚. POLD1基因在原发性肝癌中的表达及其意义. 世界华人消化杂志 2011; 19: 151-155
- 12 石磊, 徐恒, 朱晓宇, 桑建利. p21对DNA聚合酶δ表达的抑制及其对MCF7细胞增殖和恶性表型的影响. 自然科学进展 2006; 16: 672-678
- 13 Schrage YM, Lam S, Jochemsen AG, Cleton-Jansen AM, Taminiau AH, Hogendoorn PC, Bovée JV. Central chondrosarcoma progression is associated with pRb pathway alterations: CDK4 down-regulation and p16 overexpression inhibit cell growth in vitro. *J Cell Mol Med* 2009; 13: 2843-2852
- 14 Lange C, Huttner WB, Calegari F. Cdk4/cyclinD1 overexpression in neural stem cells shortens G1, delays neurogenesis, and promotes the generation and expansion of basal progenitors. *Cell Stem Cell* 2009; 5: 320-331
- 15 Annicotte JS, Blanchet E, Chavey C, Iankova I, Costes S, Assou S, Teyssier J, Dalle S, Sardet C, Fajas L. The CDK4-pRB-E2F1 pathway controls insulin secretion. *Nat Cell Biol* 2009; 11: 1017-1023
- 16 Johnson SM, Torrice CD, Bell JF, Monahan KB, Jiang Q, Wang Y, Ramsey MR, Jin J, Wong KK, Su L, Zhou D, Sharpless NE. Mitigation of hematologic radiation toxicity in mice through pharmacological quiescence induced by CDK4/6 inhibition. *J Clin Invest* 2010; 120: 2528-2536
- 17 Li W, Kotoshiba S, Berthet C, Hilton MB, Kaldis P. Rb/Cdk2/Cdk4 triple mutant mice elicit an alternative mechanism for regulation of the G1/S transition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 486-491
- 18 Pilotti S, Della Torre G, Mezzelani A, Tamborini E, Azzarelli A, Sozzi G, Pierotti MA. The expression of MDM2/CDK4 gene product in the differential diagnosis of well differentiated liposarcoma and large deep-seated lipoma. *Br J Cancer* 2000; 82: 1271-1275
- 19 Plana K, Hemminki K. Re: High frequency of multiple melanomas and breast and pancreas carcinomas in CDKN2A mutation-positive melanoma families. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93: 323-325
- 20 Miliani de Marval PL, Macias E, Rounbehler R, Sicinski P, Kiyokawa H, Johnson DG, Conti CJ, Rodriguez-Puebla ML. Lack of cyclin-dependent kinase 4 inhibits c-myc tumorigenic activities in epithelial tissues. *Mol Cell Biol* 2004; 24: 7538-7547
- 21 徐恒, 朱晓宇, 张海江. G1期细胞周期相关蛋白对POLD1基因启动子活性的调控. 自然科学进展 2007; 17: 716-723
- 22 朱晓宇, 徐恒, 李莉. p53亚细胞定位变化对POLD1基因启动子活性的影响. 自然科学进展 2006; 16: 555-562
- 23 Greeve MA, Allan RK, Harvey JM, Bentel JM. Inhibition of MCF-7 breast cancer cell proliferation by 5alpha-dihydrotestosterone; a role for p21(Cip1/Waf1). *J Mol Endocrinol* 2004; 32: 793-810
- 24 阮细玲, 李永继, 廖柳凤, 黄文涛, 吴琼, 徐恒. P21对胃癌细胞MGC-803的增殖抑制及对POLD1基因表达的调控. 世界华人消化杂志 2011; 19: 1990-1995
- 25 Prall OW, Sarcevic B, Musgrove EA, Watts CK, Sutherland RL. Estrogen-induced activation of Cdk4 and Cdk2 during G1-S phase progression is accompanied by increased cyclin D1 expression and decreased cyclin-dependent kinase inhibitor association with cyclin E-Cdk2. *J Biol Chem* 1997; 272: 10882-10894
- 26 Hindges R, Hübscher U. DNA polymerase delta, an essential enzyme for DNA transactions. *Biol Chem*

- 1997; 378: 345-362
- 27 戴文斌, 任占平. 胃癌及癌前病变中p16、p21、CDK4、cyclinD1蛋白的表达及意义. 瘤症 2001; 20: 1074
- 28 Hu CD, Chinenov Y, Kerppola TK. Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Mol Cell* 2002; 9: 789-798
- 29 Zhang H, Rudkevich DM. A FRET approach to phosgene detection. *Chem Commun (Camb)* 2007; (12): 1238-1239
- 30 Silvius JR, Nabi IR. Fluorescence-quenching and resonance energy transfer studies of lipid micro-domains in model and biological membranes. *Mol Membr Biol* 2006; 23: 5-16

编辑 曹丽鸥 电编 闫晋利

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2012年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》外文字符标准

本刊讯 本刊论文出现的外文字符应注意大小写、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, T1/2不能写成t1/2或T_{1/2}, V_{max}不能V_{max}, 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.

肿瘤坏死因子- α 刺激骨髓间充质干细胞后对肝星状细胞凋亡的促进作用

罗显克, 陆正峰, 姜海行, 覃山羽, 陈国忠

罗显克, 广西壮族自治区民族医院消化内科 广西壮族自治区南宁市 530021

陆正峰, 陈国忠, 广西中医药大学第一附属医院消化内科 广西壮族自治区南宁市 530021

姜海行, 覃山羽, 广西医科大学第一附属医院消化内科 广西壮族自治区南宁市 530021

罗显克, 主治医师, 硕士, 留学德国, 从事消化专业10余年, 主要研究方向为干细胞移植治疗肝纤维化机制的研究; 此外对消化系各种疾病的诊治有较高的造诣, 尤其在重症肝炎及肝硬化的治疗有丰富的经验; 内镜方面擅长胃肠道出血以及肝胆管梗阻性黄疸的内镜介入性诊治。

广西自然科学基金资助项目, No. 0897008

作者贡献分布: 此课题由罗显克、陆正峰及姜海行设计; 研究过程和数据分析由罗显克、陆正峰、覃山羽及陈国忠操作完成; 本论文写作由罗显克完成。

通讯作者: 姜海行, 教授, 博士生导师, 530021, 广西壮族自治区南宁市双拥路6号, 广西医科大学第一附属医院消化内科。

jihaxi@263.net

电话: 0771-5356501 传真: 0771-5356725

收稿日期: 2012-05-30 修回日期: 2012-06-20

接受日期: 2012-06-27 在线出版日期: 2012-07-08

Bone marrow mesenchymal stem cells stimulated by TNF- α enhance the apoptosis of hepatic stellate cells

Xian-Ke Luo, Zheng-Feng Lu, Hai-Xing Jiang,
Shan-Yu Qin, Guo-Zhong Chen

Xian-Ke Luo, Department of Gastroenterology, Minzu Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Zheng-Feng Lu, Guo-Zhong Chen, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Traditional Chinese Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Hai-Xing Jiang, Shan-Yu Qin, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Supported by: the Natural Science Foundation of Guangxi, No. 0897008

Correspondence to: Hai-Xing Jiang, Professor, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. jihaxi@163.com

Received: 2012-05-30 Revised: 2012-06-20

Accepted: 2012-06-27 Published online: 2012-07-08

Abstract

AIM: To observe the effect of rat bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) stimulated by TNF- α on apoptosis of rat hepatic stellate cells

(HSCs) in a co-culture system and to explore the possible mechanisms involved.

METHODS: BMSCs from SD rats were isolated, cultured, and purified by the whole bone marrow adherence method. BMSCs at passages 3-4 were stimulated by TNF- α and then co-cultured with HSCs in a Transwell co-culture system. Cells were divided into HSCs blank group, BMSCs blank group, normal co-culture group, and TNF- α -stimulated co-culture group. Apoptosis of HSCs was detected by flow cytometry; expression of RhoA and HGF mRNAs and proteins was tested by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot, respectively; and concentration of hepatocyte growth factor (HGF) in cell supernatants was determined by ELISA.

RESULTS: Compared to the normal co-culture group and HSCs blank group, the expression of RhoA protein (24 h: 0.864 ± 0.006 , 48 h: 0.688 ± 0.013) and mRNA (24 h: 0.809 ± 0.004 , 48 h: 0.494 ± 0.010) in HSCs was significantly lower in the TNF- α -stimulated co-culture group (all $P < 0.01$). The expression of HGF protein (24 h: 1.032 ± 0.003 , 48 h: 1.060 ± 0.003) and mRNA (24 h: 0.857 ± 0.004 , 48 h: 1.195 ± 0.010) in BMSCs was significantly higher in the TNF- α -stimulated co-culture group than in the normal co-culture group (all $P < 0.05$). The apoptosis rate of HSCs was significantly increased in the TNF- α -stimulated co-culture group (24 h: $6.583\% \pm 0.091\%$; 48 h: $29.960\% \pm 0.223\%$) compared to the normal co-culture group (24 h: $4.700\% \pm 0.168\%$, 48 h: $23.140\% \pm 0.115\%$; both $P < 0.01$).

CONCLUSION: BMSCs stimulated by TNF- α enhance the apoptosis of HSCs possibly via paracrine production of HGF by BMSCs to down-regulate RhoA signaling in HSCs.

Key Words: Bone marrow mesenchymal stem cells; Hepatic stellate cells; Tumor necrosis factor- α ; Hepatocyte growth factor; RhoA

Luo XK, Lu ZF, Jiang HX, Qin SY, Chen GZ. Bone marrow

■背景资料

肝星状细胞(HSCs)的激活与增殖在肝纤维化发生过程中起关键的作用, 骨髓间充质干细胞(BMSCs)移植可改善甚至逆转肝纤维化。体外研究BMSCs与HSCs的作用机制具有重要意义。

■同行评议者

石毓君, 副研究员, 四川大学华西医院移植工程与移植免疫实验室; 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

■研发前沿

目前,国内外进行自体及异体BMSCs移植治疗肝病的研究越来越多,但采用肿瘤坏死因子- α (TNF- α)刺激BMSCs后与HSCs共培养的研究极少。

mesenchymal stem cells stimulated by TNF- α enhance the apoptosis of hepatic stellate cells. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(19): 1713-1719

摘要

目的: 观察肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)刺激大鼠骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)情况下,共培养体系中BMSCs对大鼠肝星状细胞/hepatocyte growth factor, HGF)的表达^[1], 研究显示, HGF转染MSCs明显抑制肝纤维化进程^[2], RhoA活化促进HSCs的重塑和迁移^[3]. 本实验在前期研究基础上,将TNF- α 刺激后的BMSCs与HSCs共培养情况下,观察BMSCs对HSCs凋亡的影响,探讨TNF- α 刺激的BMSCs诱导HSCs凋亡的机制,为临床治疗肝纤维化提供理论依据。

方法: 全骨髓贴壁法分离、纯化SD大鼠BMSCs,传至第3-4代使用。运用6孔Transwell板建立共培养体系,将TNF- α 刺激BMSCs后与HSCs共培养。实验分HSCs空白对照组、BMSCs空白对照组、正常共培养组、刺激共培养组;采用流式细胞术检测HSCs凋亡,RT-PCR、Western blot分别检测RhoA与HGF mRNA及蛋白表达,ELISA测定细胞培养上清液中HGF含量。

结果: 刺激共培养组24 h、48 h HSCs RhoA蛋白(24 h: 0.864±0.006, 48 h: 0.688±0.013)及mRNA(24 h: 0.809±0.004, 48 h: 0.494±0.010)表达进行性下降,与正常共培养组和HSCs空白对照组比较有显著性差异($P<0.01$), BMSCs HGF蛋白(24 h: 1.032±0.003, 48 h: 1.060±0.003)及mRNA(24 h: 0.857±0.004, 48 h: 1.195±0.010)表达呈时间依赖性递增,与正常共培养组比较差异有统计学意义($P<0.05$);刺激共培养组24 h、48 h HSCs凋亡率分别为6.583%±0.091%、29.960%±0.223%,与正常共培养组(24 h: 4.700%±0.168%, 48 h: 23.140%±0.115%)比较差异有统计学意义($P<0.01$)。

结论: TNF- α 刺激BMSCs后与HSCs共培养明显促进HSCs凋亡,其机制可能是BMSCs通过旁分泌HGF抑制HSCs RhoA表达实现的。

关键词: 骨髓间充质干细胞; 肝星状细胞; 肿瘤坏死因子- α ; 肝细胞生长因子; RhoA

罗显克, 陆正峰, 姜海行, 覃山羽, 陈国忠. 肿瘤坏死因子- α 刺激骨髓间充质干细胞后对肝星状细胞凋亡的促进作用. 世界华人消化杂志 2012; 20(19): 1713-1719

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1713.asp>

0 引言

肝星状细胞/hepatocyte growth factor, HGF)的表达^[1], 研究显示, HGF转染MSCs明显抑制肝纤维化进程^[2], RhoA活化促进HSCs的重塑和迁移^[3]. 本实验在前期研究基础上,将TNF- α 刺激后的BMSCs与HSCs共培养情况下,观察BMSCs对HSCs凋亡的影响,探讨TNF- α 刺激的BMSCs诱导HSCs凋亡的机制,为临床治疗肝纤维化提供理论依据。

stem cells, BMSCs)移植可改善甚至逆转肝纤维化。受损的肝组织可分泌肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)等炎症因子, TNF- α 刺激间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)后增加其向受损组织的迁移、定植能力, 促进肝细胞生长因子/hepatocyte growth factor, HGF)的表达^[1], 研究显示, HGF转染MSCs明显抑制肝纤维化进程^[2], RhoA活化促进HSCs的重塑和迁移^[3]. 本实验在前期研究基础上, 将TNF- α 刺激后的BMSCs与HSCs共培养情况下, 观察BMSCs对HSCs凋亡的影响, 探讨TNF- α 刺激的BMSCs诱导HSCs凋亡的机制, 为临床治疗肝纤维化提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料 肝星状细胞系(HSC-T6)购自中山大学附属肿瘤医院细胞库; DMEM购自美国Gibco公司; 特级胎牛血清购自美国Hyclone公司; 肿瘤坏死因子- α 购自美国Peprotech公司; 肝细胞生长因子ELISA试剂盒购自美国R&D system公司; 小鼠抗HGF单克隆抗体、小鼠抗RhoA单克隆抗体、HRP标记的山羊抗小鼠IgG购自美国Santa Cruz公司; TRIzol购自美国Invitrogen公司; 逆转录试剂盒购自美国MBI公司; Transwell insert半透膜购自美国Corning Costar公司; 100-120 g清洁级雄性SD大鼠购自广西医科大学实验动物中心。

1.2 方法

1.2.1 BMSCs的分离、培养与鉴定: 参考文献[4]在无菌条件下分离培养, 颈椎脱臼法处死SD大鼠, 无菌分离股骨, 剪断股骨干, 用5 mL注射器吸L-DMEM轻轻冲出骨髓至髓腔变白。1 000 r/min低速离心4 min收集细胞, 弃上清液, 用含100 mL/L胎牛血清的L-DMEM重悬细胞, 置于37 °C、饱和湿度、50 mL/L CO₂培养箱中培养, 24 h后全量换液, 以后每36-48 h全量换液一次, 待细胞长至80%-90%后, 用2.5 g/L胰酶消化, 按1:2传代, 首次传代时间需6-7 d。

1.2.2 HSC-T6的培养、传代: HSC-T6细胞于L-DMEM培养液(100 mL/L胎牛血清)、37 °C、50 mL/L CO₂培养箱中培养, 2 d后细胞铺满瓶底80%-90%即可传代。

1.2.3 细胞共培养: 参照文献[5-7]方法于6孔Transwell板下层接种BMSCs, 上层接种HSC-T6, 种板密度均为 1.5×10^5 cells/well, 常规培养48 h。实验分组: (1)HSCs空白对照组: 单纯HSCs培养; (2)BMSCs空白对照组: 单独BMSCs培养; (3)正

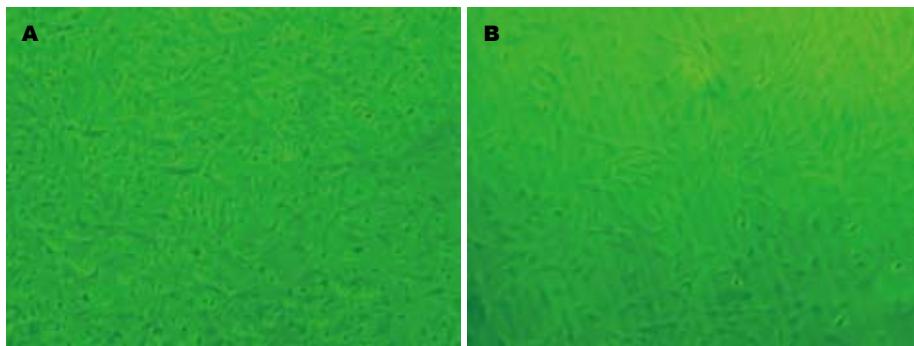


图 1 骨髓间充质干细胞形态($\times 50$)。
A: 原代培养5 d后;
B: 原代培养第3代.

■相关报道
研究显示, TNF- α 是受损的肝组织释放的重要炎症因子, 他不仅是骨髓基质细胞(MSCs)发挥免疫抑制功能的始动因子, 同时还增强MSCs向受损组织的迁移、定植和黏附能力.

常共培养组: BMSCs+HSCs共培养; (4)刺激共培养组: BMSCs+TNF- α +HSCs共培养(用0.1 $\mu\text{g}/\text{L}$ TNF- α 刺激BMSCs 5 h后弃去培养基, D-hanks液洗两遍, 换新鲜培养基后与HSCs共培养). 倒置相差显微镜下动态观察活体细胞形态学改变.

1.2.4 流式细胞仪检测细胞凋亡: 收集各组HSCs, 计数, 按照Annexin-V-FITC/P细胞凋亡试剂盒说明操作.

1.2.5 ELISA检测共培养上清液HGF浓度: 收集24、48 h时段BMSCs, 按说明书操作, 根据标准品A值绘制标准曲线, 计算每孔待测样本上清液中HGF质量浓度.

1.2.6 HSCs及BMSCs总RNA提取和RT-PCR: 收集24 h、48 h时段HSCs及BMSCs, 总RNA提取按TRIzol试剂盒说明进行操作. HSCs RhoA上游引物5'-TGGTGATGGAGCTTGTGGTAAG-3', 下游引物5'-AACATCAGTGTCTGGTAGGAG-3'; BMSCs HGF上游引物5'-AGAGGCGAGGAGAACGCAAAC-3', 下游引物5'-ATCCACGAC-CAGGAACAATGAC-3'; GAPDH上游引物5'-GCCAGTAGACTCCACGACAT-3', 下游引物5'-GCAAGTTCAACGGCACAG-3'. RhoA和GAPDH基因扩增条件: 95 °C预变性5 min, 95 °C变性45 s, 55 °C退火45 s, 72 °C 1 min, 35个循环后72 °C延伸5 min; HGF基因扩增条件: 95 °C预变性5 min, 95 °C变性45 s, 58 °C退火45 s, 72 °C 1 min, 35个循环后72 °C延伸5 min.

取6 μL PCR产物及6 μL DNA Marker进行1.7%琼脂糖凝胶电泳, 采用凝胶图像分析仪进行A值扫描, 以目的基因/GAPDH的灰度比值表示相对目的基因mRNA水平.

1.2.7 HSCs及BMSCs总蛋白提取和Western blot检测: 用细胞裂解液提取24 h、48 h细胞总蛋白, 考马斯亮蓝比色法测定蛋白含量, 上样量为15 μg , 蛋白进行15%SDS-PAGE凝胶电泳, PVDF转膜, 非特异性封闭, 按步骤分别加入RhoA、HGF一抗和二抗, 显影. 用Quality One分析软件对条

带进行积分吸光度比值测定.

统计学处理 数据资料以mean±SD表示, 组间比较采用t检验, 应用统计软件SPSS13.0进行分析, 以 $P<0.05$ 为有统计学差异, $P<0.01$ 为有显著性差异.

2 结果

2.1 骨髓间充质干细胞的分离、培养及形态学观察 全骨髓贴壁法培养的BMSCs活性良好, 原代培养第5天细胞数量明显增多, 呈短梭状或星状(图1A), 可见较多杂细胞, 6-7 d即可传代; 传代培养至第3代后细胞形态基本上趋于一致, 胞体大, 折光性好, 细胞呈长条梭状, 旋涡状生长(图1B).

2.2 骨髓间充质干细胞表面标志物的鉴定 流式细胞仪检测细胞表面标志物CD29 $^{+}$ 、CD34 $^{-}$ 、CD44 $^{+}$ 、CD45 $^{-}$ 的表达率分别为99.45%、97.91%、99.52%、98.42%. 贴壁法可以获得较高纯度的BMSCs(图2).

2.3 HSCs形态学观察 培养48 h后, HSCs空白对照组HSCs折光性强, 胞体光滑, 细胞活性良好, 正常共培养组HSCs出现明显细胞皱缩现象, 细胞表面粗糙、折光性差、胞体变小, 刺激共培养组细胞未铺满瓶底即出现细胞明显皱缩现象(图3).

2.4 HSCs活化的鉴定 免疫组织化学染色显示, 培养24 h HSCs的 α -SMA表达呈阳性, 并被特异抗体染成棕色细条索状. HSCs呈星形、胞体大、呈片状伸展、伪足很长. α -SMA阳性表达率95%以上(图4).

2.5 HSCs的凋亡率 刺激共培养组24 h、48 h HSCs的凋亡率分别为6.583%±0.091%, 29.960%±0.223%, 明显高于正常共培养组的4.700%±0.168%, 23.140%±0.115%($P<0.01$), 与HSCs空白对照组(1.347%±0.042%、2.933%±0.086%)比较差异有统计学意义($P<0.01$, 图5).

2.6 RhoA蛋白及mRNA的表达 刺激共培养组

■创新盘点

本文首次构建TN-F- α 刺激BMSCs后与HSCs共培养的方法,显示其机制可能是BMSCs通过旁分泌HGF抑制HSCs RhoA表达来实现的。

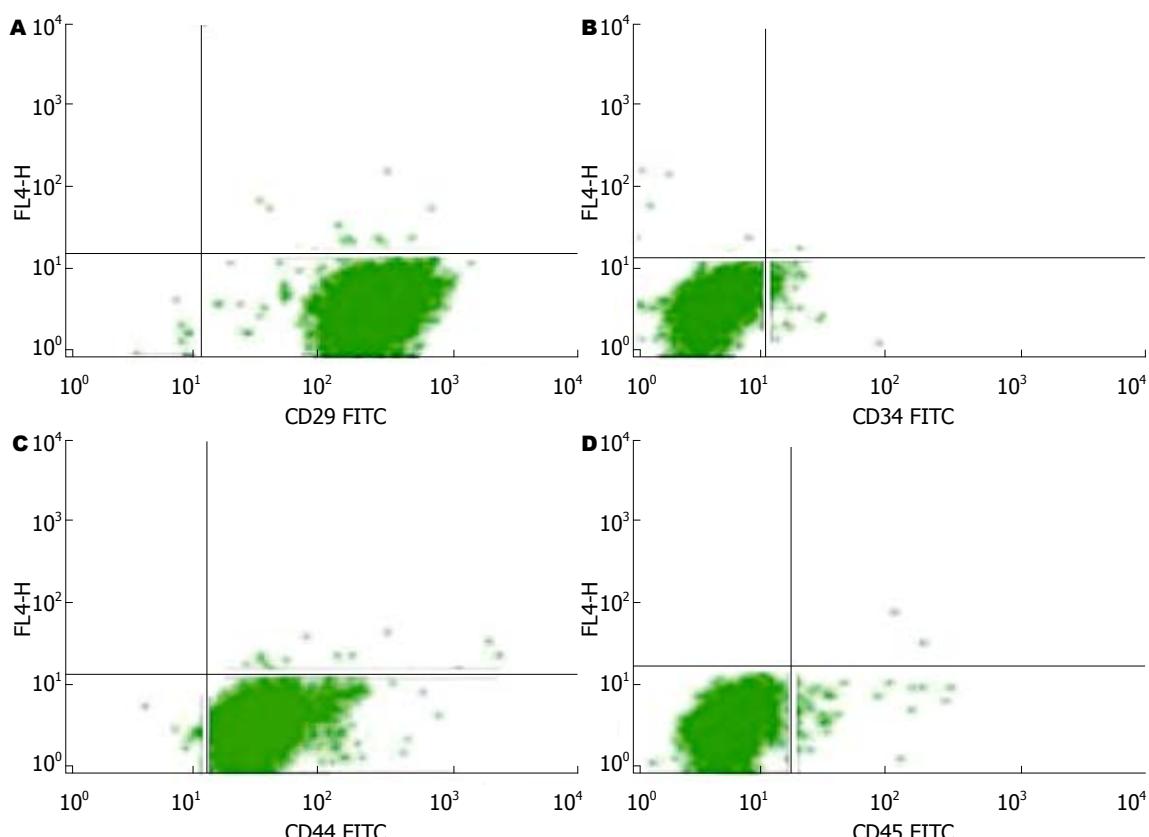


图 2 第3代骨髓间充质干细胞表面标记的流式结果. A: CD29⁺; B: CD34⁻; C: CD44⁺; D: CD45⁻.



图 3 各组培养48 h后HSCs形态观察($\times 50$). A: HSCs空白对照组; B: 正常共培养组; C: 刺激共培养组.

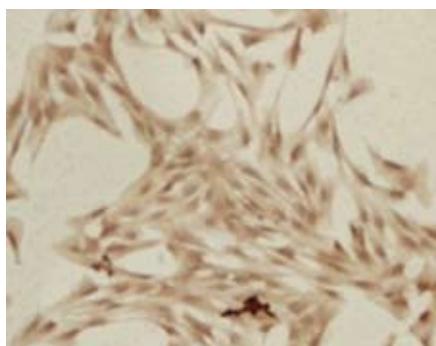


图 4 HSCs α -SMA免疫组织化学染色($\times 50$).

24 h、48 h HSCs RhoA蛋白及mRNA表达进行性下降,与正常共培养组和HSCs空白对照组比较有显著性差异($P<0.01$)(图6,表1)。

2.7 BMSCs HGF蛋白及mRNA的表达 刺激共培养组、正常共培养组24 h、48 h BMSCs HGF蛋白及mRNA表达呈时间依赖性递增,与BMSCs空白对照组比较有显著性差异($P<0.01$),24 h、48 h刺激共培养组与正常共培养组比较差异有统计学意义($P<0.05$)(图7,表2)。

2.8 上清液中HGF蛋白浓度的测定 刺激共培养组24 h、48 h HGF蛋白浓度显著高于相应时段正常共培养组($P<0.01$),BMSCs空白对照组24 h、48 h HGF蛋白浓度高于两个共培养组,且随时间延长分泌量增多(表3)。

3 讨论

HSCs是肝脏的一种非实质细胞,位于Disse间隙

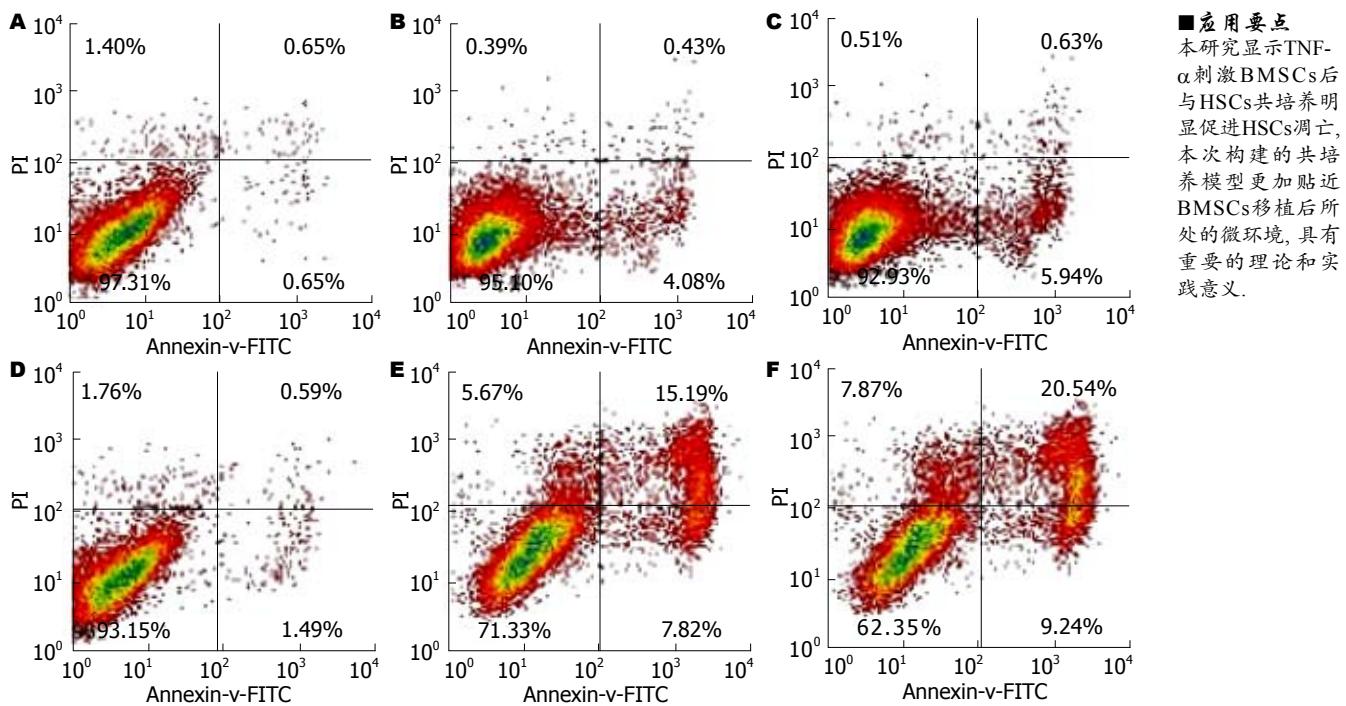


图 5 各培养组HSCs凋亡率。A: 24 h HSCs空白对照组; B: 24 h 正常共培养组; C: 24 h 刺激共培养组; D: 48 h HSCs空白对照组; E: 48 h 正常共培养组; F: 48 h 刺激共培养组。

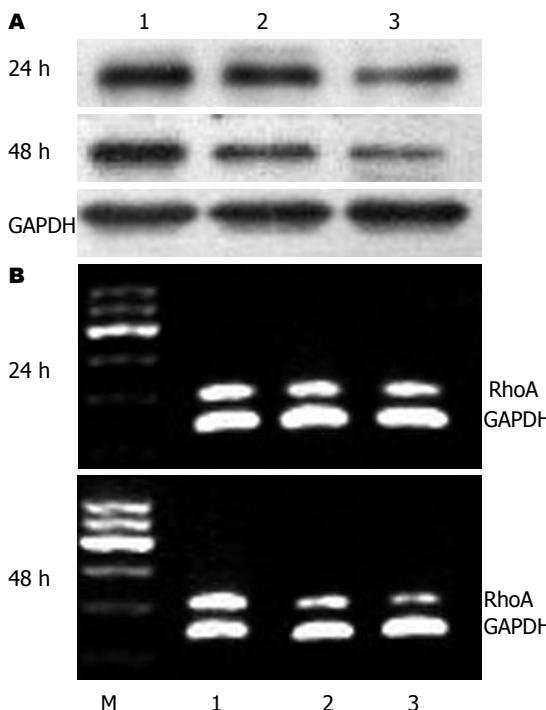


图 6 SCs RhoA蛋白及mRNA的表达。A: 蛋白; B: mRNA; M: Marker; 1: HSCs空白对照组; 2: 正常共培养组; 3: 刺激共培养组。

内,研究发现,HSCs是正常及纤维化肝脏中细胞外基质(extracellular matrix, ECM)及胶原(collagen)的主要合成细胞,它的激活与增殖在肝纤维化发生过程中起关键的作用^[5],因此找到促进HSCs凋亡,进而减少ECM分泌及胶原的合成,是防治肝纤维化的关键^[8,9]。众多研究表明,BM-

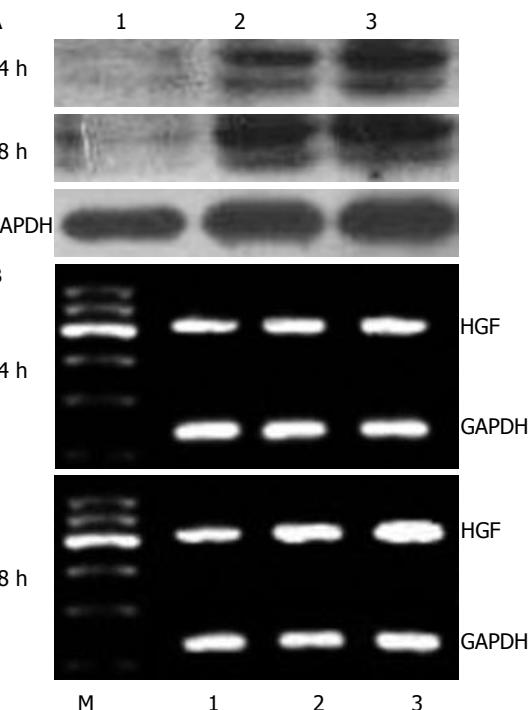


图 7 BMSCs HGF蛋白及mRNA的表达。A: 蛋白; B: mRNA; M: Marker; 1: BMSCs空白对照组; 2: 正常共培养组; 3: 刺激共培养组。

SCs能诱导HSCs凋亡^[10,11],对多种原因引起的肝损伤具有显著修复作用,可改善甚至逆转肝纤维化^[12-16],通过旁分泌细胞因子和生长因子途径可能是其作用机制之一^[17,18],但其具体机制目前尚不明确。

TNF- α 是受损的肝组织释放的重要炎症因

■同行评价

本文研究方法得当,具有一定的原
创性。

表 1 HSCs RhoA 蛋白及mRNA各时段灰度值和GAPDH比值结果 $n = 3$, mean \pm SD)

分组	时段(h)	Western blot	RT-PCR
HSCs空白对照组	24	0.933 \pm 0.006	0.894 \pm 0.005
	48	0.899 \pm 0.010	0.907 \pm 0.003
正常共培养组	24	0.915 \pm 0.002	0.811 \pm 0.004 ^b
	48	0.796 \pm 0.008 ^b	0.616 \pm 0.007 ^b
刺激共培养组	24	0.864 \pm 0.006 ^{bd}	0.809 \pm 0.004 ^b
	48	0.688 \pm 0.013 ^{bd}	0.494 \pm 0.010 ^{bd}

^b $P < 0.01$ vs HSCs空白对照组; ^d $P < 0.01$ vs 正常共培养组.

表 2 BMSCs HGF 蛋白及mRNA各时段灰度值和GAPDH比值结果 $n = 3$, mean \pm SD)

分组	时段(h)	Western blot	RT-PCR
BMSCs空白对照组	24	0.673 \pm 0.011	0.805 \pm 0.007
	48	0.726 \pm 0.009	0.866 \pm 0.007
正常共培养组	24	0.984 \pm 0.010 ^b	0.828 \pm 0.004
	48	1.042 \pm 0.003 ^b	1.103 \pm 0.005 ^b
刺激共培养组	24	1.032 \pm 0.003 ^{bd}	0.857 \pm 0.004 ^{bd}
	48	1.060 \pm 0.003 ^{bd}	1.195 \pm 0.010 ^{bd}

^b $P < 0.01$ vs BMSCs空白对照组; ^d $P < 0.05$ vs 正常共培养组.

子^[19],他不仅是MSCs发挥免疫抑制功能的始动因子^[20],同时还增强MSCs向受损组织的迁移、定植和黏附能力,同时明显增加各种生长因子的表达与分泌^[1,21-23],包括白介素-6(interleukin-6, IL-6)、HGF等。有研究发现TNF- α 刺激人BMSCs可通过p38 MAPK和PI3K通路促进HGF分泌,阻断BMSCs表面肿瘤坏死因子受体II(TNF receptor II, TNFR II)可抑制HGF分泌^[18]。课题组前期实验^[4]采用全骨髓贴壁法获得了较高纯度的大鼠BMSCs,并证实TNF- α 刺激大鼠BMSCs可以有效促进HGF的表达及分泌。在大鼠肝纤维化模型的研究表明^[10],BMSCs通过旁分泌HGF和TGF- β 上调HSCs p21和p27蛋白表达及下调cyclinD1蛋白表达,使细胞周期停滞于G₀/G₁期,从而抑制HSCs生长,同时通过降低ERK1/2的磷酸化抑制HSCs的活化,减少胶原I、III的表达,从而减少肝纤维化的发生。BMSCs能分泌多种细胞因子^[9,24],如神经细胞生长因子(nerve growth factor, NGF)、胰岛素样生长因子1(insulin-like growth factor, IGF-1)、HGF等,通过与肝细胞共培养发现,BMSCs表达肝细胞标志物CK-18、白蛋白、AFP等^[25,26],说明BMSCs具有分化成肝细胞的功能。Parekkadan等^[10]将人来源的BMSCs与HSCs共

表 3 各组上清液中HGF的质量浓度 $n = 6$, mean \pm SD, μ g/L)

分组	24 h	48 h
BMSCs空白对照组	14.193 \pm 0.060	18.267 \pm 0.035
正常共培养组	11.897 \pm 0.045	11.297 \pm 0.031
刺激共培养组	13.917 \pm 0.070 ^b	11.420 \pm 0.036 ^b

^b $P < 0.01$ vs 正常共培养组.

培养发现,BMSCs可以显著减少胶原的合成,抑制HSCs的增殖,促进其凋亡;抗体中和实验表明,BMSCs分泌的HGF在促进HSCs凋亡中起重要作用。Shi等^[27]提出BMSCs通过分泌NGF与HGF介导,诱导HSCs不可逆的细胞凋亡,阻断TGF- β 可以增加HSCs的凋亡。这是否提示在共培养体系中,增强BMSCs旁分泌能力可以抑制HSCs的活化,促进HSCs的凋亡?课题前期实验已经证实TNF- α 刺激大鼠BMSCs可以明显促进HGF的表达^[4],在此基础上,本次实验将TNF- α 刺激后的大鼠BMSCs与HSCs共培养,发现伴随BMSCs HGF表达及分泌的增加,HSCs RhoA蛋白及mRNA的表达进行性下降,HSCs凋亡率增加,与正常共培养组和HSCs空白对照组比较,刺激组的变化具有显著性差异,显然,TNF- α 对BMSCs的刺激增强了这些影响。其机制可能是TNF- α 刺激BMSCs促进HGF的表达和分泌来抑制HSCs RhoA蛋白及mRNA的表达,从而诱导HSCs凋亡,因为目前已知Rho/Rho Kinase(ROCK)信号通路在HSCs的活化中起突出作用,RhoA蛋白是该通路中介导细胞骨架形成的重要蛋白,RhoA蛋白的活化促进HSCs的重塑和迁移^[3],HGF作为RhoA的上游分子介导RhoA的活化^[28],运用Rho/Rho Kinase(ROCK)通路抑制剂Y-27632可以抑制肝纤维化的进程^[29,30]。在共培养体系中,随着时间的延长,HGF的质量浓度呈进行性减少,课题组认为这一现象的发生与其发挥生物学作用引起消耗有关。

但是,在体内试验中,TNF- α 刺激的BMSCs是否提高BMSCs向受损部位的“归巢率”,促进受损组织的修复?对TNF- α 与BMSCs之间相互作用的深入研究,无疑会在肝纤维化的干细胞移植治疗中产生积极作用。

4 参考文献

- Hemedaa H, Jakob M, Ludwig AK, Giebel B, Lang S, Brandau S. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha differentially affect cytokine expres-

- sion and migration properties of mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* 2010; 19: 693-706
- 2 Yu Y, Lu L, Qian X, Chen N, Yao A, Pu L, Zhang F, Li X, Kong L, Sun B, Wang X. Antifibrotic effect of hepatocyte growth factor-expressing mesenchymal stem cells in small-for-size liver transplant rats. *Stem Cells Dev* 2010; 19: 903-914
- 3 Li L, Li J, Wang JY, Yang CQ, Jia ML, Jiang W. Role of RhoA in platelet-derived growth factor-BB-induced migration of rat hepatic stellate cells. *Chin Med J (Engl)* 2010; 123: 2502-2509
- 4 陆正峰, 姜海行, 覃山羽, 肖健, 张君红, 孟云超. 肿瘤坏死因子 α 刺激骨髓间充质干细胞表达及分泌肝细胞生长因子. 中国组织工程研究与临床康复 2011; 15: 2540-2544
- 5 Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology* 2008; 134: 1655-1669
- 6 苏思标, 姜海行, 王东旭, 覃山羽, 梁梓宇. 骨髓间充质干细胞调控肝星状细胞RhoA、P27的表达. 世界华人消化杂志 2009; 17: 3283-3291
- 7 陈国忠, 姜海行, 陆正峰, 肖健, 梁梓宇, 覃山羽. 骨髓间充质干细胞共培养对肝星状细胞增殖、凋亡和RhoA表达的调控. 世界华人消化杂志 2010; 18: 1643-1649
- 8 Friedman SL. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol Rev* 2008; 88: 125-172
- 9 Gressner OA, Weiskirchen R, Gressner AM. Evolving concepts of liver fibrogenesis provide new diagnostic and therapeutic options. *Comp Hepatol* 2007; 6: 7
- 10 Parekkadan B, van Poll D, Megeed Z, Kobayashi N, Tilles AW, Berthiaume F, Yarmush ML. Immunomodulation of activated hepatic stellate cells by mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 363: 247-252
- 11 Lin N, Hu K, Chen S, Xie S, Tang Z, Lin J, Xu R. Nerve growth factor-mediated paracrine regulation of hepatic stellate cells by multipotent mesenchymal stromal cells. *Life Sci* 2009; 85: 291-295
- 12 Ramachandran P, Iredale JP. Reversibility of liver fibrosis. *Ann Hepatol* 2009; 8: 283-291
- 13 Gieling RG, Burt AD, Mann DA. Fibrosis and cirrhosis reversibility - molecular mechanisms. *Clin Liver Dis* 2008; 12: 915-937, xi
- 14 Sakaida I, Terai S, Yamamoto N, Aoyama K, Ishikawa T, Nishina H, Okita K. Transplantation of bone marrow cells reduces CCl₄-induced liver fibrosis in mice. *Hepatology* 2004; 40: 1304-1311
- 15 Baertschiger RM, Serre-Beinier V, Morel P, Bosco D, Peyrou M, Clément S, Sgroi A, Kaelin A, Buhler LH, Gonelle-Gispert C. Fibrogenic potential of human multipotent mesenchymal stromal cells in injured liver. *PLoS One* 2009; 4: e6657
- 16 Terai S, Ishikawa T, Omori K, Aoyama K, Marumoto Y, Urata Y, Yokoyama Y, Uchida K, Yamasaki T, Fujii Y, Okita K, Sakaida I. Improved liver function in patients with liver cirrhosis after autologous bone marrow cell infusion therapy. *Stem Cells* 2006; 24: 2292-2298
- 17 Wang J, Bian C, Liao L, Zhu Y, Li J, Zeng L, Zhao RC. Inhibition of hepatic stellate cells proliferation by mesenchymal stem cells and the possible mechanisms. *Hepatol Res* 2009; 39: 1219-1228
- 18 Zhang A, Wang Y, Ye Z, Xie H, Zhou L, Zheng S. Mechanism of TNF- α -induced migration and hepa-
- tocyte growth factor production in human mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem* 2010; 111: 469-475
- 19 Böcker W, Docheva D, Prall WC, Egea V, Papou E, Rossmann O, Popov C, Muttscher W, Ries C, Schieker M. IKK-2 is required for TNF-alpha-induced invasion and proliferation of human mesenchymal stem cells. *J Mol Med (Berl)* 2008; 86: 1183-1192
- 20 Ren G, Zhang L, Zhao X, Xu G, Zhang Y, Roberts AI, Zhao RC, Shi Y. Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell Stem Cell* 2008; 2: 141-150
- 21 Segers VF, Van Riet I, Andries LJ, Lemmens K, Demolder MJ, De Becker AJ, Kockx MM, De Keulenaer GW. Mesenchymal stem cell adhesion to cardiac microvascular endothelium: activators and mechanisms. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 290: H1370-H1377
- 22 Kim YS, Park HJ, Hong MH, Kang PM, Morgan JP, Jeong MH, Cho JG, Park JC, Ahn Y. TNF-alpha enhances engraftment of mesenchymal stem cells into infarcted myocardium. *Front Biosci* 2009; 14: 2845-2856
- 23 Ren G, Zhao X, Zhang L, Zhang J, L'Huillier A, Ling W, Roberts AI, Le AD, Shi S, Shao C, Shi Y. Inflammatory cytokine-induced intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in mesenchymal stem cells are critical for immunosuppression. *J Immunol* 2010; 184: 2321-2328
- 24 Crisostomo PR, Wang Y, Markel TA, Wang M, Lahm T, Meldrum DR. Human mesenchymal stem cells stimulated by TNF-alpha, LPS, or hypoxia produce growth factors by an NF kappa B- but not JNK-dependent mechanism. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008; 294: C675-C682
- 25 Lange C, Bassler P, Lioznov MV, Bruns H, Kluth D, Zander AR, Fiegel HC. Hepatocytic gene expression in cultured rat mesenchymal stem cells. *Transplant Proc* 2005; 37: 276-279
- 26 Lange C, Bassler P, Lioznov MV, Bruns H, Kluth D, Zander AR, Fiegel HC. Liver-specific gene expression in mesenchymal stem cells is induced by liver cells. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4497-4504
- 27 Shi L, Li G, Wang J, Sun B, Yang L, Wang G, Wang D, Mu L, Chen H, Jin L, Kostulas N, Li H. Bone marrow stromal cells control the growth of hepatic stellate cells in vitro. *Dig Dis Sci* 2008; 53: 2969-2974
- 28 Yanagisawa M, Huveldt D, Kreinest P, Lohse CM, Cheville JC, Parker AS, Copland JA, Anastasiadis PZ. A p120 catenin isoform switch affects Rho activity, induces tumor cell invasion, and predicts metastatic disease. *J Biol Chem* 2008; 283: 18344-18354
- 29 Fukushima M, Nakamura M, Kohjima M, Kotoh K, Enjoji M, Kobayashi N, Nawata H. Fasudil hydrochloride hydrate, a Rho-kinase (ROCK) inhibitor, suppresses collagen production and enhances collagenase activity in hepatic stellate cells. *Liver Int* 2005; 25: 829-838
- 30 Ikeda H, Nagashima K, Yanase M, Tomiya T, Arai M, Inoue Y, Tejima K, Nishikawa T, Omata M, Kimura S, Fujiwara K. Involvement of Rho/Rho kinase pathway in regulation of apoptosis in rat hepatic stellate cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003; 285: G880-G886

编辑 曹丽鸥 电编 鲁亚静

慢病毒介导的重组人α1-抗胰蛋白酶在小鼠体内的表达

欧海龙, 雷霆雯, 李红梅, 王筑婷, 莫晓川

■背景资料

α1-抗胰蛋白酶缺乏症是由于α1-抗胰蛋白酶(AAT)基因功能缺陷导致的一种单基因遗传病, 目前对AAT缺乏症的治疗, 除了注射外源的AAT外, 基因治疗是有望根治该病的有效方法。

欧海龙, 雷霆雯, 李红梅, 王筑婷, 莫晓川, 贵阳医学院生物化学与分子生物学教研室 贵州省贵阳市 550004
欧海龙, 博士, 主要从事分子遗传学方向的研究。

作者贡献分布: 此课题由欧海龙设计; 研究过程由欧海龙、雷霆雯、李红梅、王筑婷及莫晓川操作完成; 数据分析和论文写作由欧海龙完成。

通讯作者: 欧海龙, 副教授, 550004, 贵州省贵阳市北京路9号, 贵阳医学院生物化学与分子生物学教研室. ouhailong@hotmail.com 电话: 0851-6908068

收稿日期: 2012-03-13 修回日期: 2012-04-30

接受日期: 2012-06-01 在线出版日期: 2012-07-08

Lentivirus-mediated expression of human α1-antitrypsin in mice

Hai-Long Ou, Ting-Wen Lei, Hong-Mei Li,
Zhu-Ting Wang, Xiao-Chuan Mo

Hai-Long Ou, Ting-Wen Lei, Hong-Mei Li, Zhu-Ting Wang, Xiao-Chuan Mo, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Guiyang Medical University, Guiyang 550004, Guizhou Province, China

Correspondence to: Hai-Long Ou, Associate Professor, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Guiyang Medical University, 9 Beijing Road, Guiyang 550004, Guizhou Province, China. ouhailong@hotmail.com

Received: 2012-03-13 Revised: 2012-04-30

Accepted: 2012-06-01 Published online: 2012-07-08

Abstract

AIM: To construct a recombinant lentiviral vector carrying the human α1-antitrypsin (hAAT) gene, then express the hAAT in fibroblasts and mice.

METHODS: The coding sequence of the hAAT gene was amplified by RT-PCR and ligated into a lentiviral vector to construct a recombinant lentiviral vector (pLVX-ser). Lentiviral particles were packaged *in vitro* and used to infect fibroblasts and mice. GFP expression was detected by fluorescence microscopy. The supernatants of infected cells and liver samples from infected mice were used to detect the expression of hAAT by Western blot and ELISA.

RESULTS: The recombinant hAAT lentiviral vector pLVX-ser was successfully constructed. The titer of lentiviral particles reached 8×10^6 TU/mL after viral packaging. Fluorescence mi-

croscopic analysis showed that hAAT was successfully expressed in fibroblasts. Western blot analysis suggested that hAAT was expressed well in mice, and ELISA assay showed that the mean expression level amounted to 190 μg/L. The expression of hAAT in mice could even last for several months.

CONCLUSION: The recombinant lentiviral vector carrying the hAAT gene allows efficient and persistent expression of hAAT in mice, which paves the way to producing hAAT in industry and gene therapy for AATD disease.

Key Words: Alpha-1 antitrypsin; α1-AT deficiency; Lentiviral vector

Ou HL, Lei TW, Li HM, Wang ZT, Mo XC. Lentivirus-mediated expression of human α1-antitrypsin in mice. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(19): 1720-1725

摘要

目的: 构建重组人α1-抗胰蛋白酶(hAAT)因子的慢病毒表达载体, 并通过体外细胞水平和小鼠体内分析其表达情况。

方法: 通过RT-PCR的方法扩增出hAAT基因的编码序列, 并构建重组慢病毒质粒; 经体外包装后, 感染鼠成纤维细胞及注射小鼠。荧光显微镜下观察GFP的表达情况, 同时对收获的细胞及感染小鼠的肝脏或血浆进行Western blot、ELISA检测。

结果: 获得重组hAAT因子的慢病毒表达质粒pLVX-ser; 包装后得到 8×10^6 TU/mL滴度的慢病毒颗粒。通过荧光显微镜下观察, 显示重组hAAT因子在成纤维细胞中正常表达; 对小鼠尾静脉注射病毒之后, 进行hAAT因子检测, Western blot结果说明hAAT因子在小鼠体内成功表达; 通过ELISA检测发现hAAT在小鼠体内的表达平均达190 μg/L左右, 而且在慢病毒的介导下hAAT在小鼠中的表达可持续3 mo以上。

结论: 重组慢病毒载体可高效、持续表达hAAT因子, 为通过基因工程生产重组hAAT因

子以及为 α 1-AT缺乏症的基因治疗奠定基础。

关键词: α 1-抗胰蛋白酶; α 1-AT缺乏症; 慢病毒

欧海龙, 雷霆雯, 李红梅, 王筑婷, 莫晓川. 慢病毒介导的重组人 α 1-抗胰蛋白酶在小鼠体内的表达. 世界华人消化杂志 2012; 20(19): 1720-1725

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1720.asp>

0 引言

α 1-抗胰蛋白酶(α 1-antitrypsin, AAT)因子是体内一种重要的丝氨酸蛋白酶抑制剂, 主要由肝细胞合成并分泌到血液中, 同时巨噬细胞以及支气管上皮细胞中也合成少量的AAT. AAT可抑制多种蛋白酶活性包括弹性蛋白酶、胰蛋白酶、糜蛋白酶、纤维蛋白溶酶以及凝血酶等各种丝氨酸蛋白酶类, 维持组织、器官的正常功能。人AAT(hAAT)因子由*Serpina1*基因编码, 位于染色体的14q31-32.3位置上, 全长12.2 kb, 包含7个外显子和6个内含子。*Serpina1*基因具有极大的异质性, 根据等电聚焦电泳进行分型, 血浆中AAT水平由等位基因的不同类型决定, 其中PiMM占95%以上, 存在于正常人群中, AAT浓度大约为20-53 μ mol/L^[1]。 α 1-抗胰蛋白酶缺乏症(α 1-antitrypsin deficiency, AATD)是由于*Serpina1*基因的某些碱基突变导致 α 1-抗胰蛋白酶因子缺失或功能异常引起的一种遗传性疾病。PiSS(Glu264→Val264)、PiZZ(Glu342→Lys342)以及杂合型PiSZ等亚型均可致病。其中PiZZ最为常见, 占AATD病例的95%以上, 其血清中AAT含量是正常人的10%-15%^[2-4]。AATD的临床表现多样, 新生儿表现为胆汁淤积、肝脾肿大。青少年时最典型的临床表现为肺气肿, 这主要是由于AAT缺乏时, 体内蛋白酶与抗蛋白酶的平衡关系被打破, 中性粒细胞释放的弹力蛋白酶、组织蛋白酶不断累积并降解肺部组织的弹性蛋白, 损伤了肺泡结缔组织中的弹力纤维, 破坏肺泡间隔, 使气腔持续扩大, 从而导致肺气肿^[5]。另外由于合成的Z突变型AAT不能分泌到血浆, 聚集成多聚体, 累积在肝细胞内, 形成包涵体, 从而使某些AATD患者表现出不同程度的肝硬化^[6,7]。

目前对于AATD的治疗, 除了进行支持性疗法如对新生儿口服苯巴比妥、补充各种维生素以及远离烟尘空气, 避免肺部感染等外, 主要还是通过不断注射hAAT的方法, 维持体内蛋白酶与抗蛋白酶的平衡。另外, 对于特别是如AATD、地中海贫血以及家族性高胆固醇血症

表 1 引物序列

引物名称	序列 5'- 3'
ser1	ccg <u>GAATT</u> C ATG CCG TCT TCT GTC TCG TG
ser2	ccg <u>GAATT</u> C TTA TTT TTG GGT GGG ATT CA
F1	ATT GAC GTC AAT GGG TGG AG
GFP1	TGA CCT ACG GCG TGC AGT GCT T
GFP2	TCG TCC ATG CCG AGA GTG ATC C

下划线: *EcoR* I 识别位点。

等单基因遗传病, 基因治疗是有望根治这类疾病的有效方法。本文以慢病毒载体为工具, 通过构建重组hAAT因子表达载体, 分析其表达情况。该研究结果可为利用基因工程技术生产hAAT制剂提供新的思路, 同时为AATD基因治疗的研究提供可靠的实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料 大肠杆菌TPO10感受态细菌、293T细胞(本室保存); pLVX-AcGFP1-N1载体以及Lenti-X HTX Packaging Mix(Clontech)由本实验室保存; 聚凝胺(Polybrene, Sigma-Aldrich); 人 α 1抗胰蛋白酶酶联免疫分析试剂盒(上海希美生物公司); 琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒(北京天根生物公司); 各种限制性内切酶、T4连接酶、Taq酶(Takara公司); 胎牛血清、RPMI 1640培养基及DMEM培养基(Hyclone公司); TRIzol试剂(北京天根生物公司); 逆转录酶(Promega公司); DNA Marker(北京全式金生物公司); 其他各种试剂为国产分析纯; PCR引物由南京金斯瑞生物有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 *Serpina1*基因的扩增及慢病毒载体构建: 体外培养293T细胞, 当生长至对数末期后, 用0.25%胰酶消化并收获细胞。稍离心后用TRIzol消化、异丙醇沉淀的方法获得总RNA。并用紫外分光光度计测得吸光度(A)值。取1 μ g RNA作为模板依据相关说明进行第一链cDNA的合成。根据NCBI公布的数据(NM_000295)设计*Serpina1*基因编码序列的扩增引物, 上游引物ser1、下游引物ser2(表1), 引物5'分别连上限制性内切酶*EcoR* I 的识别序列。取1 μ L逆转录产物进行PCR反应, 扩增条件: 94 °C 5 min; 94 °C 45 s, 60 °C 45 s, 72 °C 45 s, 32 个循环; 72 °C 10 min。PCR产物进行凝胶回收纯化, 分别用*EcoR* I 酶对PCR回收片段和纯化好的慢病毒基因转移质粒pLVX-AcGFP1-N1过夜酶切, 经纯化回收后用

■研发前沿

在AAT缺乏症的基因治疗中, 外源*Serpina1*基因在宿主体内的表达水平高低以及能否持续性表达问题, 一直是受关注的热点, 也是研究重点之一。

■相关报道

最近, Mueller等通过miRNA手段抑制体内不正确折叠、功能异常的PiZ-AAT突变蛋白,以减少其在肝组织内的积累;同时转入具有正常功能的PiM-AAT亚型,提高体内AAT蛋白水平,实现对 α 1-抗胰蛋白酶缺乏症(AATD)的治疗。

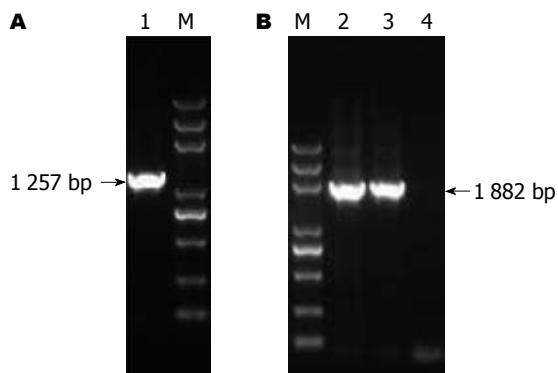


图1 PCR扩增. A: *Serpina1*基因cDNA; B: *Serpina1*基因cDNA片段的插入方向的鉴定. 1: 扩出*Serpina1*基因cDNA的阳性条带; 2, 3: 正确质粒; 4: 空白对照; M: Marker.

T4连接酶连接。将扩增片段连接进CMV启动子下游的EcoR I酶切位点,连接产物转化大肠杆菌,挑取单克隆。同时用pLVX-AcGFP1-N1载体上的EcoR I识别位点的上游设计引物F1与ser2引物进行菌落PCR对插入的方向性进行鉴定,可扩增出比1 257 bp稍大的1 882 bp片段为正确质粒,将初步鉴定为正确的克隆进行测序,将其命名为pLVX-ser。

1.2.2 慢病毒的制备: 取纯化好的pLVX-ser质粒15 μ g以及30 μ L Lenti-X HTX Packaging Mix,对培养至对数生长期的293T细胞采用磷酸钙沉淀的方法进行共转染,转染6 h后换成含100 mL/L FBS的DMEM完全培养液,并在37 °C、50 mL/L CO₂条件下继续培养,完成假病毒颗粒的包装。12、24 h后荧光显微镜下观察荧光表达情况,2-3 d后收集上清液,15 000 r/min超速离心0.5 h,弃上清,收集病毒,保存于-70 °C备用。

1.2.3 滴度测定及细胞感染: 转染前1 d,在6孔板中分别对每孔接种 2×10^5 的293T细胞,将所收集的病毒液按1、10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴及10⁻⁵比例进行梯度稀释,将0.5 mL稀释后的病毒液分别加入到相应的每个孔中,37 °C培养12 h后,更换含100 mL/L血清的DMEM。48-72 h后在荧光显微镜下观察各孔中GFP的表达,统计阳性细胞个数,将之乘以相应的稀释倍数再除于0.5 mL病毒原液即得到病毒滴度值(TU/mL)。根据所测得的病毒滴度,在小鼠成纤维细胞中加入含有5 μ L病毒液、8 mg/L聚凝胺的不含血清的培养液DMEM,2 h后换成完全培养液,于37 °C、50 mL/L CO₂条件下继续孵育、培养。当长至80%-90%汇合度时,进行传代、扩增培养,并通过荧光显微镜下观察hAAT的表达。

1.2.4 动物实验: C57BL/6J纯系小鼠在贵阳医

院实验动物中心饲养、繁殖,环境条件为室温20 °C-25 °C,相对湿度40%-70%。对8周龄左右、体质量为25-30 g的C57BL/6J纯系♂小鼠($n = 4$)用200 μ L含重组慢病毒的PBS瞬间经尾静脉注射,以空质粒pLVX-AcGFP1-N1为对照组。

1.2.5 RT-PCR: 对注射后5 d的小鼠断颈处死,获取肝组织,TRIzol裂解法抽提总RNA。经逆转录之后,分别用引物ser1、ser2和GFP1、GFP2(表1)对*Serpina1*和GFP基因的cDNA进行PCR扩增。

1.2.6 Western blot检测: 对注射后5 d的小鼠肝组织提取总蛋白,经浓缩后,用BCA法定量,取20 μ g进行SDS-PAGE电泳,转至硝酸纤维素(NC)膜,NC膜经漂洗、封闭后用生物素标记的羊抗 α -1抗胰蛋白酶抗体(一抗,1:1 000)以及辣根过氧化物酶标记抗羊IgG抗体(二抗,1:1 000)进行免疫检测,最后冲洗、显影。

1.2.7 ELISA分析: 分别对pLVX-AcGFP1-N1空质粒感染的对照组以及实验组,在注射后的5、10、20、30、50和100 d通过尾静脉采集血样,进行 α -1抗胰蛋白酶表达水平的检测,根据ELISA试剂盒说明书进行相关操作,最后用酶联仪在450 nm波长依序测量各孔的A值,每样品重复3次。

统计学处理 基因表达定量分析每组实验均重复3次,所有数据采用mean \pm SD表示,用SPSS10.0软件处理,两个样本均数间的比较采用t检验,以 $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果

2.1 重组人*Serpina1*基因慢病毒载体构建 从细胞中提取总RNA,对*Serpina1*基因进行扩增,获得1 257 bp的目的条带(图1A)。pLVX-AcGFP1-N1与扩增片段分别经EcoR I酶切后连接,获得重组人*Serpina1*基因菌落。接着用载体上的EcoR I识别位点上游设计的引物F1与ser2配对,对插入的方向性进行PCR鉴定,结果从菌落中扩增出比1 257 bp稍大的1 882 bp片段(图1B),说明在这些质粒中外源片段正确插入。对初步鉴定为正确的质粒进行测序,测序结果与NCBI上公布的一致。这样我们获得CMV启动子表达人 α 1-抗胰蛋白酶的慢病毒载体pLVX-ser。

2.2 慢病毒感染鼠成纤维细胞 收获包装后的病毒,根据293T细胞GFP的集落数,我们获得约8×10⁶ TU/mL病毒滴度值。感染小鼠成纤维细胞48 h后,荧光显微镜下观察慢病毒载体的GFP表达。结果显示大部分细胞已被感染,并成功表达外

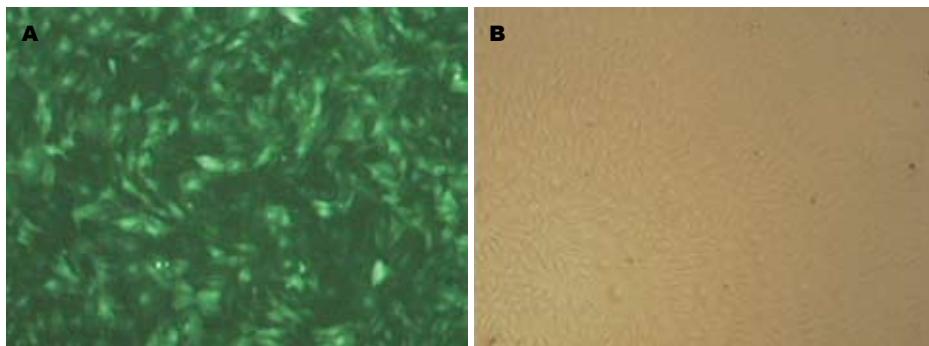


图 2 病毒感染后荧光显微镜下观察GFP基因在成纤维细胞中的表达($\times 400$)。A: 荧光; B: 白光。

■创新点
本研究以慢病毒为载体, 在其介导下, 外源*Serpina1*基因有效地与宿主染色体整合, 实现AAT因子的高效、持续表达。

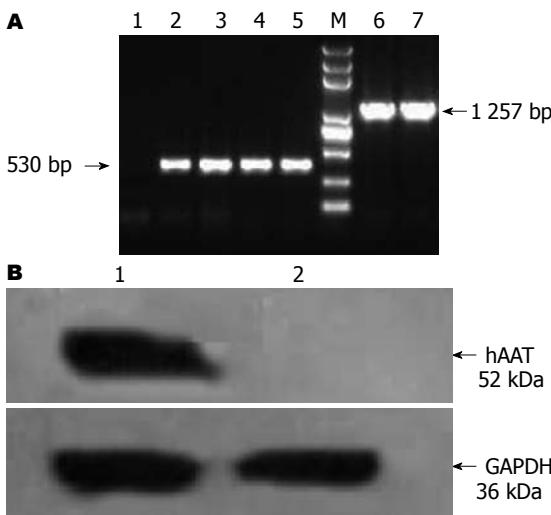


图 3 外源基因在小鼠体内的表达检测。A: RT-PCR, 1: 空白对照; 2-5: GFP; 6, 7: *Serpina1*. B: hAAT Western blot检测, 1: 在pLVX-ser病毒颗粒感染的细胞中检测出阳性的hAAT蛋白; 2: 以pLVX-AcGFP1-N1病毒颗粒感染的细胞作阴性对照, 以看家基因GAPDH为内对照。

源基因(图2)。

2.3 外源基因在小鼠体内的转录分析 对注射后5 d的小鼠进行解剖获取肝脏组织mRNA, 并进行RT-PCR分析, 结果我们分别从GFP、*Serpina1* mRNA中分别扩出相应的530 bp、1 257 bp的目的条带(图3A)。这说明在慢病毒的介导下外源基因在小鼠内成功转录。

2.4 *Serpina1*基因表达分析 首先, 对外源hAAT因子进行Western blot检测, 在pLVX-ser病毒颗粒注射的小鼠中得到大小相应的阳性条带, 而在对照的pLVX-AcGFP1-N1病毒颗粒感染的小鼠中检测不到(图3B)。说明, hAAT在小鼠体内正常表达。接着进一步利用ELISA定量分析*Serpina1*基因的表达水平, 并在含有pLVX-ser质粒的实验组中, 测得 $231 \mu\text{g/L} \pm 0.25 \mu\text{g/L}$ hAAT的表达量。另外, 对注射后10、20、30、50和100 d的小鼠分别采集血样, 分别检测hAAT的表达, 分析hAAT在小鼠体内的持续性表达能力。结果显示在注射后的第5-10天内, 表达量持续增高(图4), 到第10天时

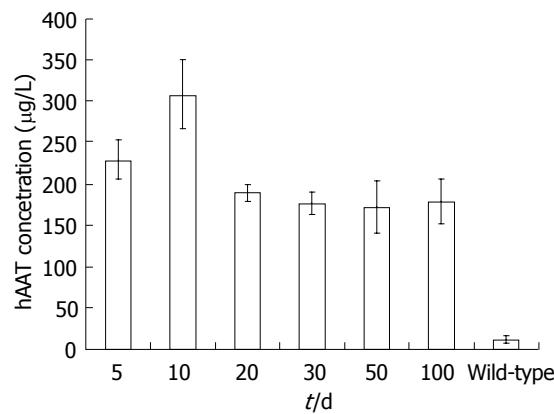


图 4 在注射后的第5、10、20、30、50以及100天小鼠体内hAAT的表达水平(mean \pm SD)。

hAAT表达水平达到最高($308 \mu\text{g/L}$)。而在10-100 d之间, hAAT在小鼠体内的表达水平波动不大, 维持在 $190 \mu\text{g/L}$ 左右。

3 讨论

对于AATD, 现在还没有特别有效的治疗途径时, 对患者输入外源的hAAT, 是最直接的方法, 可以短时间内提高血液中蛋白酶抑制剂水平, 恢复或在一定程度上缓解弹性蛋白酶对肺部组织的损伤, 这需要充实的hAAT储备。另外, hAAT是一种多功能蛋白, 除了与AATD有关外, hAAT还参与血液凝固过程^[8,9], 其与抗凝血酶联合使用, 可对弥漫性血管内凝血进行治疗^[10]。而且hAAT也在细菌、病毒感染的免疫调节过程中起作用^[11-15]。研究发现在外周血单个核细胞和滤泡树突状细胞中, hAAT可通过下调NF- κ B的活性, 抑制HIV病毒的复制^[16]。hAAT的广阔用途使只依靠从血液中分离纯化的途径, 无法满足现实需要, 并且代价昂贵, 还存在感染的风险。

随着生物工程技术的不断发展, 人们开始通过基因重组进行体外生产hAAT以节约血浆、降低成本。另外, 由于hAAT的编码序列不长, 又是一种分泌型蛋白, 使他在遗传操作上更加方便, 下游的蛋白纯化更加简单。Garver等^[17]首先获得

■应用要点

本研究通过慢病毒的介导,成功实现重组人AAT因子在小鼠体内高效、稳定地表达,为利用基因工程技术生产重组人AAT制剂提供新的思路,同时也为AATD基因治疗的研究积累可靠的实验证据。

了能稳定、持续表达hAAT的鼠成纤维细胞克隆。之后人们又分别在不同的细胞类型如CHO、COS-7、造血干细胞和单核吞噬细胞等^[18-20];不同的物种如真菌、绵羊、狗甚至烟草中进行表达hAAT的研究^[21-24]。但到目前为止还没有一个重组hAAT制剂上市,还需进一步深入的探索。

另外hAAT的半衰期很短,仅为4-6 d,这既给AATD患者的治疗带来麻烦,同时也是影响重组hAAT成功开发的一个重要原因。对于一些治疗性蛋白,经常通过进行转录后的相关修饰,从而改善该蛋白的某些属性或提高其治疗性能等^[25]。由于经聚乙二醇修饰的蛋白的溶解度和稳定性得到提高,并增强耐酶水解的能力。早期人们试图通过在hAAT的Cys232位置或者某些特定的糖基化位点进行聚乙二醇长链修饰,解决hAAT半衰期短的问题^[26-28]。最近,Lindhout等^[29]尝试利用一种可生物降解的,免疫原性更低的唾液酸,对hAAT的N聚糖进行修饰,以延长hAAT的半衰期。在今后的研究中,除了追求成功高效表达外,还希望能通过对hAAT的某些修饰进一步改善其相关的理化性质,实现更好的疗效。

最有希望根治AATD应当是基因治疗,通过原位纠正突变基因,恢复其功能或体内异位表达外源的hAAT,补充蛋白酶抑制剂的水平,保护组织结构的完整性。在基因治疗中病毒载体经常被作为输送外源基因的运载工具。从HIV-1病毒改造过来的慢病毒载体,与逆转录病毒载体、腺病毒载体等其他病毒类基因转移载体相比,慢病毒载体具有对分裂细胞和非分裂细胞均具有感染能力的优点,而且具有更广的宿主范围,可以有效感染神经元细胞、肝细胞、心肌细胞、肿瘤细胞、内皮细胞、干细胞等多种类型的细胞,引发机体免疫反应小等特点。另外,还可实现外源基因有效地在宿主染色体上整合,从而实现持久表达。特别是随着慢病毒载体技术的不断发展如通过多质粒的包装系统等,其安全性大大增加。所以慢病毒载体开发时间尽管不是很长,已成功地被运用于如β-地中海贫血、血友病等多种遗传病的基因治疗中^[30,31]。本研究通过构建重组hAAT慢病毒表达载体,研究其表达情况。结果显示慢病毒在293T细胞中成功包装;体内外的研究均显示hAAT在慢病毒载体的介导下持续、高效表达。这为我们利用基因工程生产hAAT因子以及下一步开展AATD的基因治疗工作奠定基础。

4 参考文献

1 Stoller JK, Aboussouan LS. Alpha1-antitrypsin defi-

- ciency. *Lancet* 2005; 365: 2225-2236
- 2 Knaupp AS, Bottomley SP. Serpin polymerization and its role in disease--the molecular basis of alpha1-antitrypsin deficiency. *JUBMB Life* 2009; 61: 1-5
- 3 Gooptu B, Ekeowa UI, Lomas DA. Mechanisms of emphysema in alpha1-antitrypsin deficiency: molecular and cellular insights. *Eur Respir J* 2009; 34: 475-488
- 4 Stoller JK, Aboussouan LS. A review of α1-antitrypsin deficiency. *Am J Respir Crit Care Med* 2012; 185: 246-259
- 5 Sun Z, Yang P. Role of imbalance between neutrophil elastase and alpha 1-antitrypsin in cancer development and progression. *Lancet Oncol* 2004; 5: 182-190
- 6 Ala A, Schilsky M. Genetic modifiers of liver injury in hereditary liver disease. *Semin Liver Dis* 2011; 31: 208-214
- 7 Tsutsui Y, Dela Cruz R, Wintrode PL. Folding mechanism of the metastable serpin α1-antitrypsin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109: 4467-4472
- 8 Hua B, Fan L, Liang Y, Zhao Y, Tuddenham EG. Alpha1-antitrypsin Pittsburgh in a family with bleeding tendency. *Haematologica* 2009; 94: 881-884
- 9 Emmerich J. Alpha1-antitrypsin and the maintenance of hemostatic balance. *Haematologica* 2009; 94: 762-763
- 10 Scully MF, Toh CH, Hoogendoorn H, Manuel RP, Nesheim ME, Solymoss S, Giles AR. Activation of protein C and its distribution between its inhibitors, protein C inhibitor, alpha 1-antitrypsin and alpha 2-macroglobulin, in patients with disseminated intravascular coagulation. *Thromb Haemost* 1993; 69: 448-453
- 11 Greene CM, McElvaney NG. Proteases and anti-proteases in chronic neutrophilic lung disease - relevance to drug discovery. *Br J Pharmacol* 2009; 158: 1048-1058
- 12 Meinert Niclasen L, Olsen JG, Dagil R, Qing Z, Sørensen OE, Kragelund BB. Streptococcal pyrogenic exotoxin B (SpeB) boosts the contact system via binding of α1-antitrypsin. *Biochem J* 2011; 434: 123-132
- 13 Burgener A, Rahman S, Ahmad R, Lajoie J, Ramdahin S, Mesa C, Brunet S, Wachihi C, Kimani J, Fowke K, Carr S, Plummer F, Ball TB. Comprehensive proteomic study identifies serpin and cystatin antiproteases as novel correlates of HIV-1 resistance in the cervicovaginal mucosa of female sex workers. *J Proteome Res* 2011; 10: 5139-5149
- 14 Whitney JB, Asmal M, Geiben-Lynn R. Serpin induced antiviral activity of prostaglandin synthetase-2 against HIV-1 replication. *PLoS One* 2011; 6: e18589
- 15 Bristow CL, Babayeva MA, LaBrunda M, Mullen MP, Winston R. α1Proteinase inhibitor regulates CD4+ lymphocyte levels and is rate limiting in HIV-1 disease. *PLoS One* 2012; 7: e31383
- 16 Zhou X, Shapiro L, Fellingham G, Willardson BM, Burton GF. HIV replication in CD4+ T lymphocytes in the presence and absence of follicular dendritic cells: inhibition of replication mediated by α1-antitrypsin through altered IκBα ubiquitination. *J Immunol* 2011; 186: 3148-3155
- 17 Garver RI, Chyttil A, Courtney M, Crystal RG. Clonal gene therapy: transplanted mouse fibroblast clones express human alpha 1-antitrypsin gene in vivo. *Science* 1987; 237: 762-764
- 18 Ghaedi M, Lotfi AS, Soleimani M, Shamsara M, Arjmand S, Adibi B. Expression of recombinant

- alpha-1 antitrypsin in CHO and COS-7 cell lines using lentiviral vector. *Iranian Journal of Biotechnology* 2009; 7: 148-156
- 19 Wilson AA, Kwok LW, Hovav AH, Ohle SJ, Little FF, Fine A, Kotton DN. Sustained expression of alpha1-antitrypsin after transplantation of manipulated hematopoietic stem cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2008; 39: 133-141
- 20 Wilson AA, Murphy GJ, Hamakawa H, Kwok LW, Srinivasan S, Hovav AH, Mulligan RC, Amar S, Suki B, Kotton DN. Amelioration of emphysema in mice through lentiviral transduction of long-lived pulmonary alveolar macrophages. *J Clin Invest* 2010; 120: 379-389
- 21 Karnaukhova E, Ophir Y, Trinh L, Dalal N, Punt PJ, Golding B, Shiloach J. Expression of human alpha1-proteinase inhibitor in *Aspergillus niger*. *Microb Cell Fact* 2007; 6: 34
- 22 Carver AS, Dalrymple MA, Wright G, Cottom DS, Reeves DB, Gibson YH, Keenan JL, Barras JD, Scott AR, Colman A. Transgenic livestock as bioreactors: stable expression of human alpha-1-antitrypsin by a flock of sheep. *Biotechnology(NY)* 1993; 11: 1263-1270
- 23 Halbert CL, Madtes DK, Vaughan AE, Wang Z, Storb R, Tapscott SJ, Miller AD. Expression of human alpha1-antitrypsin in mice and dogs following AAV6 vector-mediated gene transfer to the lungs. *Mol Ther* 2010; 18: 1165-1172
- 24 Nadai M, Bally J, Vitel M, Job C, Tissot G, Botterman J, Dubald M. High-level expression of active human alpha1-antitrypsin in transgenic tobacco
- 25 Walsh G, Jefferis R. Post-translational modifications in the context of therapeutic proteins. *Nat Biotechnol* 2006; 24: 1241-1252
- 26 Cantin AM, Woods DE, Cloutier D, Dufour EK, Leduc R. Polyethylene glycol conjugation at Cys232 prolongs the half-life of alpha1 proteinase inhibitor. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002; 27: 659-665
- 27 Veronese FM, Mero A. The impact of PEGylation on biological therapies. *BioDrugs* 2008; 22: 315-329
- 28 DeFrees S, Wang ZG, Xing R, Scott AE, Wang J, Zopf D, Gouty DL, Sjoberg ER, Panneerselvam K, Brinkman-Van der Linden EC, Bayer RJ, Tarp MA, Clausen H. GlycoPEGylation of recombinant therapeutic proteins produced in *Escherichia coli*. *Glycobiology* 2006; 16: 833-843
- 29 Lindhout T, Iqbal U, Willis LM, Reid AN, Li J, Liu X, Moreno M, Wakarchuk WW. Site-specific enzymatic polysialylation of therapeutic proteins using bacterial enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108: 7397-7402
- 30 Xie SY, Ren ZR, Zhang JZ, Guo XB, Wang QX, Wang S, Lin D, Gong XL, Li W, Huang SZ, Zeng F, Zeng YT. Restoration of the balanced alpha/beta-globin gene expression in beta654-thalassemia mice using combined RNAi and antisense RNA approach. *Hum Mol Genet* 2007; 16: 2616-2625
- 31 Tsui LV, Kelly M, Zayek N, Rojas V, Ho K, Ge Y, Moskalenko M, Mondesire J, Davis J, Roey MV, Dull T, McArthur JG. Production of human clotting Factor IX without toxicity in mice after vascular delivery of a lentiviral vector. *Nat Biotechnol* 2002; 20: 53-57

■同行评价

本文成功构建了 *SerpinA1* 基因的慢病毒表达载体，并通过感染小鼠证实其可在体内表达 AAT，为 AAT 缺乏症的基因治疗提供了实验室基础，因此本研究具有一定的临床价值。

编辑 张姗姗 电编 鲁亚静

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2012年版权归世界华人消化杂志

•消息•

WJG 成功通过评审被 PMC 收录

本刊讯 PubMed Central(PMC)是由美国国家医学图书馆(NLM)下属国家生物技术信息中心(NCBI)创立的开放存取(Open Access)的生物医学和生命科学全文数据库。此数据库只收录采取国际同行评审制度评议的期刊，并对收录期刊有较高的科学、编辑及数据文件质量要求。

截至目前，我国只有两本期刊被PMC收录。《浙江大学学报B》(英文版)(*Journal of Zhejiang University Science B*)是我国第一本通过PMC评审并于2006-03-15被收录的期刊。《世界胃肠病学杂志》(英文版)(*World Journal of Gastroenterology, WJG*)第二本通过PMC评审并于2009-03-26被收录，全文免费向公众开放，见：<http://www.pubmedcentral.nih.gov/tocrender.fcgi?journal=818&action=archive> (*WJG*编辑部主任：程剑侠 2009-03-26)

microRNA-433在胃癌组织中的表达下降及对胃癌细胞系生长的影响

李睿东, 韩高雄, 李伟, 陶凯雄

■背景资料

目前有相当多的研究发现, microRNAs在肿瘤的发生产生中有着重要的作用, microRNAs在细胞内表达异常可以引起多种肿瘤。

李睿东, 韩高雄, 李伟, 陶凯雄, 华中科技大学同济医学院附属协和医院 湖北省武汉市 430022

李睿东, 在读硕士, 主要从事胃肠道肿瘤分子生物学治疗的研究。国家自然科学基金资助项目, No. 81172294

作者贡献分布: 此课题由陶凯雄设计; 研究过程由李睿东与韩高雄完成, 数据分析由李睿东与李伟完成; 论文写作由李睿东与陶凯雄完成; 试剂由陶凯雄提供。

通讯作者: 陶凯雄, 教授, 主任医师, 博士研究生导师, 430022, 湖北省武汉市汉口解放大道1277号, 华中科技大学同济医学院附属协和医院普外科. tao_kaixiong@163.com

电话: 027-85351619

收稿日期: 2012-03-27 修回日期: 2012-05-07

接受日期: 2012-06-16 在线出版日期: 2012-07-08

transfected with a microRNA-433 mimic, and the proliferation and apoptosis of the transfected cells were examined by FCM.

RESULTS: The expression level of microRNA-433 was lower in gastric cancer than in normal gastric tissue ($P < 0.05$). MicroRNA-433 expression was associated with tumor stage ($P < 0.05$), but not with sex, age or tumor differentiation. The expression level of microRNA-433 in SGC-7901 cells was significantly lower than that in gastric mucosal cell line GES-1. Treatment of SGC-7901 cells with 5-Aza-CdR up-regulated microRNA-433 expression in a dose-dependent manner. Transfection of SGC-7901 cells with a microRNA-433 mimic up-regulated the expression of microRNA-433 and increased cell apoptosis.

CONCLUSION: The expression level of microRNA-433 is lower in gastric cancer than in normal gastric tissue. MicroRNA-433 expression correlates with tumor stage. Treatment of SGC-7901 cells with 5-Aza-CdR up-regulates microRNA-433 expression possibly by regulating promoter methylation. Transfection of SGC-7901 cells with a microRNA-433 mimic accelerates apoptosis of tumor cells, suggesting that microRNA-433 is a potent tumor suppressor.

Key Words: MicroRNA-433; Gastric cancer; Methylation; Apoptosis

Li RD, Han GX, Li W, Tao KX. Down-regulation of microRNA-433 expression in gastric cancer: Possible mechanisms involved. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(19): 1726-1731

Abstract

AIM: To investigate the expression of microRNA-433 in gastric cancer and to explore the possible mechanisms involved.

METHODS: The expression level of microRNA-433 in 43 cases of gastric cancer and matched adjacent normal tissue samples was examined by qRT-PCR. The relationship between microRNA-433 expression and clinical features of gastric cancer was analyzed. Human gastric cancer SGC-7901 cells were treated with 1, 5, or 10 μ mol/L of 5-Aza-CdR for five days, and the expression level of microRNA-433 in treated cells was determined. SGC-7901 cells were then

摘要

目的: 探讨胃癌组织中microRNA-433表达差异以及其可能下调的机制, 及在低表达microRNA-433胃癌细胞系中提升其表达的量对细胞生长的影响。

方法: 取胃癌组织及其正常癌旁组织43例, 实时定量检测两者表达差异, 并结合病例分

析。使用1、5、10 μmol/L 5-Aza-CdR干预胃癌SGC-7901细胞, 检测每组microRNA-433的表达变化。转染microRNA-433 mimics进入SGC-7901细胞, 用流式细胞术检测细胞增殖凋亡情况。

结果: 胃癌组织相对其正常癌旁组织, microRNA-433表达量明显减低, 差异有明显统计学意义($P<0.05$), microRNA-433表达与性别、分化、年龄无明显关系($P>0.05$), 同肿瘤分期有统计学意义($P<0.05$)。胃癌细胞系SGC-7901中microRNA-433的表达相对于正常胃黏膜上皮细胞GES-1明显减低。SGC-7901细胞通过甲基化酶抑制剂5-Aza-CdR以浓度1、5、10 μmol/L处理5 d之后, 分别检测microRNA-433的表达, 相对未处理组, 其表达均有上升并且呈现出剂量依赖性。将microRNA-433 mimics转染至SGC-7901中提高其表达, 通过流式细胞术检测发现, 相比未处理组, 提高表达后肿瘤细胞凋亡率上升, 具有统计学意义($P<0.05$)。

结论: microRNA-433在胃癌组织中表达减低, 并且同肿瘤分期有关。使用5-Aza-CdR作用SGC-7901肿瘤细胞系后, microRNA-433的表达明显上升。其表达下调的机制可能是由于前端启动子区域高甲基化造成, 转染提升肿瘤细胞中microRNA-433的表达, 可以促进肿瘤细胞的凋亡。microRNA-433具有潜在的抑癌作用。

关键词: microRNA-433; 胃癌; 甲基化; 凋亡

李睿东, 韩高雄, 李伟, 陶凯雄. microRNA-433在胃癌组织中的表达下降及对胃癌细胞系生长的影响. 世界华人消化杂志 2012; 20(19): 1726-1731

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1726.asp>

0 引言

在世界范围内, 胃癌(gastric cancer, GC)发病率居高不下, 在男性恶性肿瘤当中占第2位, 仅次于肺癌, 在女性恶性肿瘤中占据第4位。在我国, 目前胃癌在各种恶性肿瘤中已经占据首位。微小核糖核酸(microRNAs, miRNAs)是一种微小非编码RNAs, 在翻译水平通过与mRNA的3'UTR(untranslated region, UTR)完全或不完全结合加速mRNA的降解或者抑制mRNA的降解^[1]。目前有相当多的研究发现, microRNAs在肿瘤的发生发展中有着重要的作用, microRNAs在细胞内表达异常可以引起多种肿瘤^[2]。microRNAs的表达调控机制仍未完全阐明, 但许多研究成果

显示, 相当部分的microRNAs表达受到表观遗传学的调控, DNA甲基化修饰便是其中之一^[3-7]。表观遗传学在动物的生命过程中具有极其重要的作用, 与相当多疾病的产生和演变也有着密切的联系。在基因中, 有许多抑癌基因和癌基因, 前者启动子前端甲基化有可能导致肿瘤的发生和发展, 后者启动子前端去甲基化也可以导致肿瘤的发生或发展。许多实验也证明, 改变基因的甲基化状态, 往往可以改变或逆转肿瘤的发展。Luo等^[8]通过基因芯片筛查发现miRNA-433在胃癌细胞系和肿瘤组织中表达下降, 但是未对临床标本进行实时PCR检测进一步验证, 于是本实验首先检测临床标本中miRNA-433的表达差异, 然后在SGC-7901中转染miRNA-433的mimics对细胞的生长的影响, 探讨miRNA-433在胃癌发生发展中的作用及其潜在功能。5-氮杂-2'-脱氧胞苷(5-aza-2'-deoxycytidine, 5-Aza-CdR), 一种DNA甲基转移酶(DNA methyltransferase, DNMT)抑制剂, 通过抑制甲基化转移酶, 可使多种启动子区域高甲基化的抑癌基因重新表达或表达增高^[9,10]。鉴于miRNA-433前端启动子区域存在CpG岛, 其可能由于甲基化从而导致表达下降, 故而给予SGC-7901胃癌细胞系5-Aza-CdR处理, 观察miRNA-433表达变化, 探索miRNA-433在胃癌中表达下调的机制。

1 材料和方法

1.1 材料 收集华中科技大学同济医学院附属协和医院胃肠外科胃癌手术患者43例标本(2010-08/2011-09)作为研究对象, 其中男28例, 女15例, 年龄28-74岁, 平均年龄55.2岁。所有患者术前均未进行化学治疗, 标本适当处理后置于-80 °C冰箱, 留作日后使用; 细胞株SGC-7901, GES-1为华中科技大学同济医学院附属协和医院腹腔镜外科实验室冻存; 胎牛血清, 1640培养基均购自Hyclone公司; Opti-MEM培养基、lipofectamin™2000购自Invitrogen公司; 5-氮杂-2'-脱氧胞苷由sigma公司提供; TRIzol试剂, 逆转录、qRT-PCR试剂盒均由TAKARA提供; microRNA mimics和negative control购自广州锐博生物公司; microRNA引物及内参U6引物由南京金斯瑞公司合成。

1.2 方法

1.2.1 胃癌标本中实时定量PCR检测miRNA-433表达: (1)RNA提取。按TRIzol试剂说明书抽提标本中总RNA, DEPC水对RNA进行溶解, 用分光

■相关报道
Luo等提出并且证实miRNA-433可以结合与生长因子受体结合蛋白2, 抑制其翻译表达, 从而通过多条通路抑制细胞生长, 增殖, 分化。

■创新盘点

本文收集充足标本, 对miRNA-433的表达同临床病理进行了分析, 其次又验证了miRNA-433的潜在抑癌作用, 从表观遗传的角度阐述了miRNA-433表达可能导致肿瘤的发生。

光度计测量260 nm和280 nm下吸光度(*A*)值, 以确定和调整RNA的浓度和纯度; (2)miRNA-433在胃癌标本中的表达检测。本实验选择U6基因作为内部参照, 引物序列引自参考文献[3]。用提取的1 μg总RNA同miRNA-433 RT Primer 2 μL, U6 RT Primer 2 μL, 5×PrimerScript® Buffer 4 μL, PrimerScript® RT Enzyme Mix I 1 μL, 余下加入无RNA酶双蒸水补足至20 μL体系。设置反应条件为: 42 °C 60 min, 70 °C 10 min。反应结束后-80 °C保存。然后以20 μL体系进行实时定量PCR, 体系包括: SYBR® Primix Ex Tag™ II (2×)10 μL, microRNA-433 Forward Primer(10 μmol/L)1 μL, microRNA-433 Reverse Primer(10 μmol/L)1 μL, RT产物(cDNA)2 μL, 灭菌蒸馏水6 μL。反应条件设置为: 95 °C预变性: 30 s; 95 °C变性: 10 s, 60 °C退火: 20 s, 70 °C延伸: 10 s, 循环45次。实时定量PCR使用Applied Biosystems 7500设备, 每个样品设3个复孔。根据每孔荧光信号达到阈值时经历的循环数作为Ct值, 以U6为内参, 使用相对定量法, 用 $N = 2^{-\Delta Ct}$ 表示肿瘤中miRNA-433相对正常组织表达的倍数, 此时 $\Delta Ct = (Ct_{miRNA-433} - Ct_{U6})_{\text{肿瘤}} - (Ct_{miRNA-433} - Ct_{U6})_{\text{正常}}$ 。

1.2.2 细胞培养及去甲基化处理以及对miRNA-433表达的检测: (1)细胞培养。冻存的SGC-7901细胞株在37 °C水中快速复苏, 加入4 mL 1640培养基后快速1 000 r/min离心5 min, 弃上清, 用5 mL 1640培养基重悬, 移入培养瓶中, 置于37 °C、50 mL/L CO₂培养箱中。正常胃黏膜上皮细胞系GES-1采取同上相同的步骤培养; (2)检测胃癌正常黏膜细胞系GES-1同SGC-7901细胞miRNA-433的表达差异。取生长对数期细胞, 分别种于6孔培养板中, 每孔种植 5×10^5 个细胞, 24 h细胞贴壁生长后, PBS洗涤2遍, TRIzol法提取总DNA, 逆转录后进行实时定量PCR, 检测两者之间表达差异; (3)细胞培养干预及检测。6孔板中每孔种植 0.5×10^5 个细胞, 种植5组, 每组3个复孔, 放入37 °C温箱培养4 h后, 分别在每孔中加入0、1、5、10 μmol/L 5-Aza-CdR, 阴性对照组分别加入等量的DMSO, 每天更换培养基并按上述加药, 5 d后实时定量PCR检测microRNA-433的表达变化; (4)转染miRNA-433 mimics对SGC-7901细胞系生长的影响。转染前1 d, 细胞悬浮计数, 6孔板每孔种 4×10^5 个肿瘤细胞, 共设3孔, 设立对照、空白、转染组, 设3个复孔。用250 μL不含血清培养基Opti-MEM稀释mimics和阴性对照, 孵育5 min。然

表1 miRNA-433的表达同病例的关系

	<i>n</i>	miRNA-433表达量	<i>P</i> 值
性别			0.236
男	28	0.654 ± 0.219	
女	15	0.558 ± 0.138	
分化程度			0.842
高中分化	26	0.621 ± 0.160	
低分化	17	0.625 ± 0.249	
年龄			0.582
≤60	24	0.605 ± 0.156	
>60	19	0.645 ± 0.241	
TNM分期			0.024
I, II	29	0.701 ± 0.180	
III, IV	14	0.460 ± 0.115	

后用250 μL不含血清培养基Opti-MEM稀释5 μL lipofectamin™2000, 将两者混合室温孵育20 min, 混合液加入已经添加不含血清培养基Opti-MEM 1.5 mL 6孔板中, 6 h后更换普通培养基。转染后36 h, 将6孔板培养液吸出, PBS洗涤一次, 胰酶消化2 min, 将细胞从板中吹打下来, 收集进离心管中, 离心计数, 取 5×10^4 - 10×10^4 个细胞, 离心弃上清加入195 μL Annexin V-FITC结合液重悬, 再加入5 μL Annexin V-FITC, 轻轻混匀。室温孵育20 min, 离心弃上清, 加入Annexin V-FITC结合液190 μL, 加入10 μL碘化丙啶染色液, 冰浴放置, 流式检测。

统计学处理 SPSS19.0统计软件包处理数据, 实验数据以mean±SD表示, 采用Wilcoxon符号秩检验(配对正常组和肿瘤组), Mann-Whitney *U*检验(2组)和Kruskal-Wallis *H*检验(多组)进行统计学处理, *P*<0.05具有统计学意义, *P*<0.001具有显著统计学差异。

2 结果

2.1 miRNA-433在胃癌组织及其癌旁正常组织中的表达 在以U6为内参照的情况下, 同胃癌肿瘤周边正常组织比较, miRNA-433的表达量在胃癌中是相对下降的, 其表达量($N = 2^{-\Delta Ct}$)*N*值为 0.623 ± 0.197 , 可以见得, miRNA-433在肿瘤细胞上皮中的表达是明显低于其对应的正常组织胃黏膜(图1)。并且发现miRNA-433在TNM分期I、II相比III、IV期明显增高(表1), 具有统计学意义(*P*=0.035)。

2.2 正常胃黏膜细胞系GES-1同SGC-7901中miRNA-433表达差异 SGC-7901中的miRNA-433

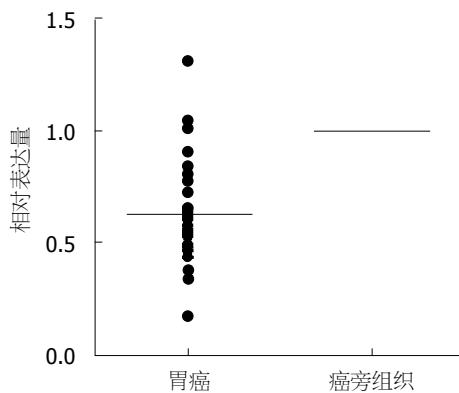


图 1 胃癌及其相对应癌旁组织黏膜中miRNA-433表达水平.

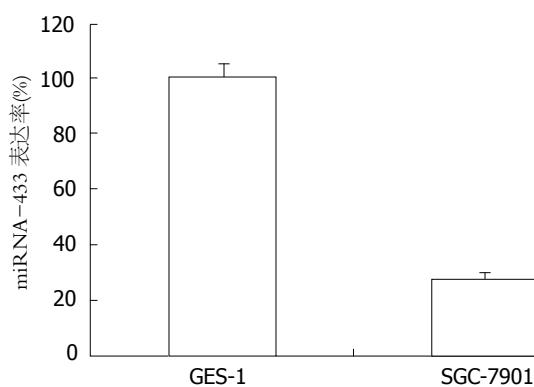


图 2 GES-1 细胞系同 SGC-7901 胃癌细胞系 miRNA-433 表达差异.

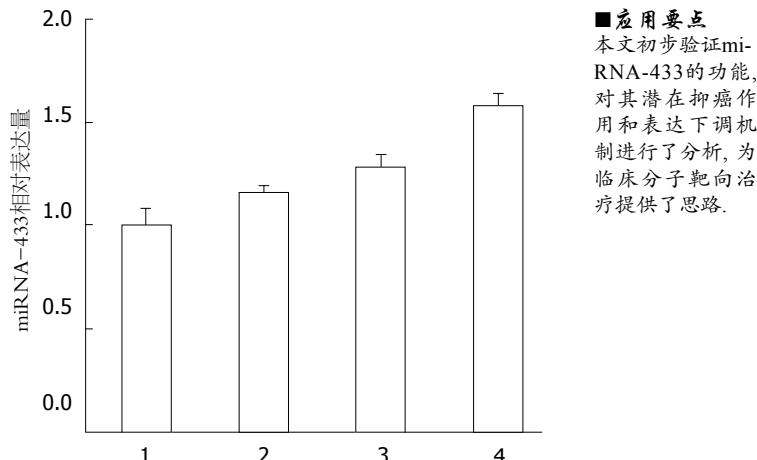
的表达量较低, 相对于正常胃黏膜细胞系GES-1下调了72.7%, 差异性明显($P<0.05$, 图2).

2.3 5-氮杂-2-脱氧胞苷后对miRNA-433在胃癌细胞系SGC-7901中表达的影响 同未进行处理的SGC-7901细胞相比, 其细胞表达miRNA-433的量随着5-Aza-CdR的量增加而增加, 0 $\mu\text{mol/L}$ 组为 1.00 ± 0.08 , 1 $\mu\text{mol/L}$ 组为 1.16 ± 0.03 , 5 $\mu\text{mol/L}$ 组为 1.28 ± 0.06 , 10 $\mu\text{mol/L}$ 组为 1.57 ± 0.06 , Kruskal-Wallis H检验差异有明显统计学意义($P=0.016$, 图3).

2.4 转染mimics进入SGC-7901后对细胞凋亡的影响 转染后导致肿瘤细胞凋亡增加. Mimics组凋亡明显, 达到 $24.4\% \pm 1.1\%$, 其阴性对照组为 $3.2\% \pm 1.0\%$, 正常对照组为 $2.5\% \pm 1.0\%$. 其中mimics同其余两组相比, 统计学差异明显($P<0.05$), 阴性对照同正常组无明显差别($P>0.05$, 图4).

3 讨论

已经有越来越多的研究表明, 一些microRNAs在人类的肿瘤性疾病中表达出现混乱^[11-16]. 具有抑癌作用的miRNAs, 其表达下调或缺失将导致其靶蛋白脱离控制, 表达上调, 促进肿瘤细

图 3 经5-Aza-CdR处理SGC-7901细胞后miRNA-433基因表达量的改变. 1: 0 $\mu\text{mol/L}$ 5-Aza-CdR; 2: 1 $\mu\text{mol/L}$ 5-Aza-CdR; 3: 5 $\mu\text{mol/L}$ 5-Aza-CdR; 4: 加入10 $\mu\text{mol/L}$ 5-Aza-CdR.

胞过度增殖, 生长加速, 凋亡缺失, 从而导致了肿瘤细胞的产生和肿瘤的发生和发展^[17-20]. 例如, 在慢性淋巴细胞白血病中发现miRNA-15和miRNA-16表达下调甚至缺失^[21]; 在胆管癌中, miRNA-513下调, 使得肿瘤细胞发生免疫逃避而发生肿瘤^[22]. 同时, miRNAs的表达出现异常, 也有近期研究发现, 在胃癌中有多个miRNA的表达发生下调, 其中有些是由于其启动子发生了高甲基化, 这些miRNA在正常表达的情况下被证实具有一定的抑癌功能^[23-28]. 例如, miRNA-34b、miRNA-34c在胃癌细胞中启动子CpG岛发生高甲基化从而导致其低表达, 而正常人黏膜中却没有甲基化这一现象^[29]. 从而提示, miRNAs启动子区域高甲基化也是胃癌的发生机制之一.

在本实验中, 首先通过对临床标本应用Real-time RT-PCR技术检测了43例标本中肿瘤和肿瘤旁正常组织miRNA-433的表达情况, 结果发现: 相比正常的胃黏膜组织, 肿瘤部分miRNA-433的表达明显降低, 差异有统计学意义($P<0.05$), 与Luo等^[8]的研究结果相一致. 并且通过临床病例分析, 发现microRNA-433在TNM分期3, 4期同1, 2期相比, 晚期肿瘤病例的表达相对早期病例较低, 具有统计学差异($P<0.05$). 与Ueda等^[30]的研究结果具有类似性. 至于在胃癌中miRNA-433下调的机制, 本文首次通过将甲基化抑制剂5-氮杂-2-脱氧胞苷加入到低表达miRNA-433的胃癌细胞系SGC-7901中作用一段时间后, 再去检测miRNA-433的表达是否有变化, 并且通过实时定量PCR的方法, 证实了在加入了5-氮杂-2-脱氧胞苷后, SGC-7901中的microRNA-433的表达提

■应用要点
本文初步验证miRNA-433的功能, 对其潜在抑癌作用和表达下调机制进行了分析, 为临床分子靶向治疗提供了思路.

■ 同行评价

本文立题新颖，研究思想明确，对从microRNA角度治疗胃癌等提供了较好的参考依据。

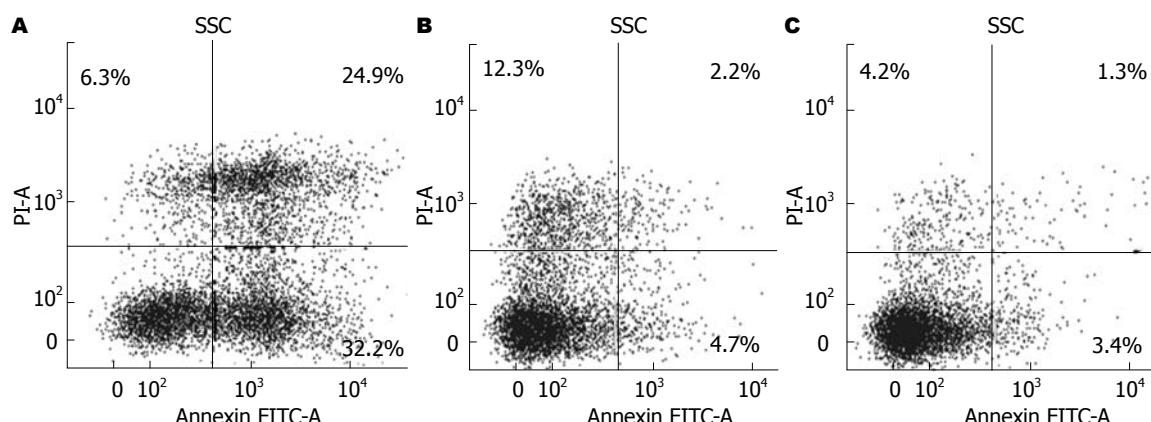


图 4 转染mimics后胃癌细胞发生凋亡. A: 转染mimics组; B: 阴性对照; C: 空白对照. 转染组凋亡比率相对空白和阴性对照明显上升.

升明显，同未加药组相比具有明显的统计学意义($P<0.05$)。由此间接证明了microRNA-433前端启动子CpG岛甲基化是导致了microRNA-433在胃癌中下调的可能机制之一。关于microRNA的作用机制，Luo等^[8]提出并且证实其可以结合与生长因子受体结合蛋白2(growth factor receptor-bound protein 2, GRB2)，抑制其翻译表达，从而通过多条通路抑制细胞生长、增殖、分化。叶韵斌等^[31]证实抑制GRB2的表达抑制乳癌细胞生长并诱导细胞凋亡。我们通过将miRNA-433的mimics转染到SGC-7901细胞系中，提高了miRNA-433在胃癌细胞系中表达之后，用流式细胞术检测其对细胞凋亡的影响，发现mimics组相比空白和阴性对照组，其细胞凋亡率上升，差异具有统计学意义($P<0.05$)。

总之，本次研究证明了microRNA-433相比正常癌旁组织，在胃癌组织中其表达是下调的，其表达同肿瘤分期相关。通过实时定量PCR间接证明了microRNA-433启动子甲基化在其下调机制中具有明显作用，最后通过转染mimics，流式细胞术检测细胞凋亡，证明了microRNA-433具有一定的抑癌基因作用。因此，通过药物改变miRNA-433启动子甲基化状态可能成为靶向治疗胃癌的靶点。

4 参考文献

- 1 Fassan M, Croce CM, Rugge M. miRNAs in precancerous lesions of the gastrointestinal tract. *World J Gastroenterol* 2011; 17: 5231-5239
- 2 Kasinski AL, Slack FJ. Epigenetics and genetics. MicroRNAs en route to the clinic: progress in validating and targeting microRNAs for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2011; 11: 849-864
- 3 王峰, 秦环龙. 大肠癌microRNA与DNA甲基化修饰相互调控的研究进展. 世界华人消化杂志 2010; 18: 808-814
- 4 Cheung HH, Davis AJ, Lee TL, Pang AL, Nagrani S, Rennert OM, Chan WY. Methylation of an intronic region regulates miR-199a in testicular tumor malignancy. *Oncogene* 2011; 30: 3404-3415
- 5 Tsai KW, Wu CW, Hu LY, Li SC, Liao YL, Lai CH, Kao HW, Fang WL, Huang KH, Chan WC, Lin WC. Epigenetic regulation of miR-34b and miR-129 expression in gastric cancer. *Int J Cancer* 2011; 129: 2600-2610
- 6 Shen R, Pan S, Qi S, Lin X, Cheng S. Epigenetic repression of microRNA-129-2 leads to overexpression of SOX4 in gastric cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 394: 1047-1052
- 7 Kim K, Lee HC, Park JL, Kim M, Kim SY, Noh SM, Song KS, Kim JC, Kim YS. Epigenetic regulation of microRNA-10b and targeting of oncogenic MAPRE1 in gastric cancer. *Epigenetics* 2011; 6: 740-751
- 8 Luo H, Zhang H, Zhang Z, Zhang X, Ning B, Guo J, Nie N, Liu B, Wu X. Down-regulated miR-9 and miR-433 in human gastric carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res* 2009; 28: 82
- 9 Yang AS, Doshi KD, Choi SW, Mason JB, Mannari RK, Gharybian V, Luna R, Rashid A, Shen L, Esteve MR, Kantarjian HM, Garcia-Manero G, Issa JP. DNA methylation changes after 5-aza-2'-deoxycytidine therapy in patients with leukemia. *Cancer Res* 2006; 66: 5495-5503
- 10 Mossman D, Kim KT, Scott RJ. Demethylation by 5-aza-2'-deoxycytidine in colorectal cancer cells targets genomic DNA whilst promoter CpG island methylation persists. *BMC Cancer* 2010; 10: 366
- 11 Weissmann-Brenner A, Kushnir M, Lithwick Yanai G, Aharonov R, Gibori H, Purim O, Kundel Y, Morgenstern S, Halperin M, Niv Y, Brenner B. Tumor microRNA-29a expression and the risk of recurrence in stage II colon cancer. *Int J Oncol* 2012; 40: 2097-2103
- 12 Li CL, Nie H, Wang M, Su LP, Li JF, Yu YY, Yan M, Qu QL, Zhu ZG, Liu BY. microRNA-155 is downregulated in gastric cancer cells and involved in cell metastasis. *Oncol Rep* 2012; 27: 1960-1966
- 13 Hassan O, Ahmad A, Sethi S, Sarkar FH. Recent updates on the role of microRNAs in prostate cancer. *J Hematol Oncol* 2012; 5: 9
- 14 Lopez-Camarillo C, Marchat LA, Arechaga-Ocampo E, Perez-Plasencia C, Del Moral-Hernandez O, Castaneda-Ortiz EJ, Rodriguez-Cuevas S. MetastamiRs: Non-Coding MicroRNAs Driving Cancer Invasion

- and Metastasis. *Int J Mol Sci* 2012; 13: 1347-1379
- 15 Mencia N, Selga E, Noé V, Ciudad CJ. Underexpression of miR-224 in methotrexate resistant human colon cancer cells. *Biochem Pharmacol* 2011; 82: 1572-1582
- 16 王冬冬, 赵文月, 宋孟铸, 由法平, 杨永飞, 陈立波, 杨炼, 江红. MicroRNA-377和组蛋白甲基转移酶SMYD3在肝细胞癌中的表达及两者的相关性. 世界华人消化杂志 2010; 18: 1902-1906
- 17 Wei H, Ke HL, Lin J, Shete S, Wood CG, Hildebrandt MA. MicroRNA target site polymorphisms in the VHL-HIF1 α pathway predict renal cell carcinoma risk. *Mol Carcinog* 2012; Apr 19. [Epub ahead of print]
- 18 Ansari D, Chen BC, Dong L, Zhou MT, Andersson R. Pancreatic cancer: translational research aspects and clinical implications. *World J Gastroenterol* 2012; 18: 1417-1424
- 19 Chen B, Zhang B, Luo H, Yuan J, Skogerbo G, Chen R. Distinct MicroRNA Subcellular Size and Expression Patterns in Human Cancer Cells. *Int J Cell Biol* 2012; 2012: 672462. Epub 2012 Feb 12
- 20 Sachdeva M, Liu Q, Cao J, Lu Z, Mo YY. Negative regulation of miR-145 by C/EBP- β through the Akt pathway in cancer cells. *Nucleic Acids Res* 2012; Apr 11. [Epub ahead of print]
- 21 Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K, Rassenti L, Kipps T, Negrini M, Bullrich F, Croce CM. Frequent deletions and down-regulation of microRNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 15524-15529
- 22 Gong AY, Zhou R, Hu G, Li X, Splinter PL, O'Hara SP, LaRusso NF, Soukup GA, Dong H, Chen XM. MicroRNA-513 regulates B7-H1 translation and is involved in IFN-gamma-induced B7-H1 expression in cholangiocytes. *J Immunol* 2009; 182: 1325-1333
- 23 Tsai KW, Wu CW, Hu LY, Li SC, Liao YL, Lai CH, Kao HW, Fang WL, Huang KH, Chan WC, Lin WC. Epigenetic regulation of miR-34b and miR-129 expression in gastric cancer. *Int J Cancer* 2011; 129: 2600-2610
- 24 Tsai KW, Hu LY, Wu CW, Li SC, Lai CH, Kao HW, Fang WL, Lin WC. Epigenetic regulation of miR-196b expression in gastric cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 2010; 49: 969-980
- 25 Hashimoto Y, Akiyama Y, Otsubo T, Shimada S, Yuasa Y. Involvement of epigenetically silenced microRNA-181c in gastric carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2010; 31: 777-784
- 26 Wada R, Akiyama Y, Hashimoto Y, Fukamachi H, Yuasa Y. miR-212 is downregulated and suppresses methyl-CpG-binding protein MeCP2 in human gastric cancer. *Int J Cancer* 2010; 127: 1106-1114
- 27 Ando T, Yoshida T, Enomoto S, Asada K, Tatematsu M, Ichinose M, Sugiyama T, Ushijima T. DNA methylation of microRNA genes in gastric mucosae of gastric cancer patients: its possible involvement in the formation of epigenetic field defect. *Int J Cancer* 2009; 124: 2367-2374
- 28 Tsai KW, Kao HW, Chen HC, Chen SJ, Lin WC. Epigenetic control of the expression of a primate-specific microRNA cluster in human cancer cells. *Epigenetics* 2009; 4: 587-592
- 29 Suzuki H, Yamamoto E, Nojima M, Kai M, Yamano HO, Yoshikawa K, Kimura T, Kudo T, Harada E, Sugai T, Takamaru H, Niinuma T, Maruyama R, Yamamoto H, Tokino T, Imai K, Toyota M, Shishimura Y. Methylation-associated silencing of microRNA-34b/c in gastric cancer and its involvement in an epigenetic field defect. *Carcinogenesis* 2010; 31: 2066-2073
- 30 Ueda T, Volinia S, Okumura H, Shimizu M, Taccioli C, Rossi S, Alder H, Liu CG, Oue N, Yasui W, Yoshida K, Sasaki H, Nomura S, Seto Y, Kaminishi M, Calin GA, Croce CM. Relation between microRNA expression and progression and prognosis of gastric cancer: a microRNA expression analysis. *Lancet Oncol* 2010; 11: 136-146
- 31 叶韵斌, 陈慧青, 刘杨, 李洁羽, 陈强. 抑制生长因子受体连接蛋白-2表达对乳癌细胞生长的影响. 中国药理学与毒理学杂志 2008; 22: 55-62

编辑 曹丽鸥 电编 鲁亚静

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2012年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》2011年开始不再收取审稿费

本刊讯 为了方便作者来稿, 保证稿件尽快公平、公正的处理, 《世界华人消化杂志》编辑部研究决定, 从2011年开始对所有来稿不再收取审稿费。审稿周期及发表周期不变。(编辑部主任: 李军亮 2011-01-01)

HIF-1 α 、TXB2、6-Keto-PGF1 α 和HA联合检测在CHB肝脏微循环障碍中的诊断意义

范秀梅, 丁体龙, 代学枫, 于莉, 马勇

■背景资料

慢性乙型肝炎(CHB)存在肝脏微循环障碍是药物治疗效果不佳的一个重要原因。因此,在CHB治疗过程中了解其肝脏微循环状况是十分必要的。肝脏微循环障碍的诊断与监测是一个难点,建立一种简单易行的判断肝脏微循环状况的方法是本课题研究的意义所在。

范秀梅, 蚌埠医学院临床诊断学教研室 安徽省蚌埠市 233000
丁体龙, 代学枫, 于莉, 马勇, 中国人民解放军第123医院南京军区肝病中心 安徽省蚌埠市 233015

范秀梅, 副教授, 主要从事肝病诊断学研究。

中国人民解放军南京军区医学科技创新基金资助项目, No. 10MA037

作者贡献分布: 范秀梅对此文作出主要贡献; 此课题由范秀梅设计; 研究过程由范秀梅、丁体龙、代学枫及于莉共同完成; 研究所用试剂和分析工具由马勇提供; 数据分析由范秀梅完成; 本文写作由范秀梅与丁体龙完成。

通讯作者: 马勇, 教授, 主任医师, 233015, 安徽省蚌埠市燕山路1052号, 中国人民解放军第123医院南京军区肝病中心。
my4973766@163.com

电话: 0552-4973666

收稿日期: 2012-03-29 修回日期: 2012-05-06

接受日期: 2012-06-01 在线出版日期: 2012-07-08

Significance of combined detection of HIF-1 α , TXB2, 6-keto-PGF1 α and HA in the diagnosis of hepatic microcirculatory disturbance in patients with chronic hepatitis B

Xiu-Mei Fan, Ti-Long Ding, Xue-Feng Dai, Li Yu, Yong Ma

Xiu-Mei Fan, Department of Clinical Diagnostics, Bengbu Medical College, Bengbu 233000, Anhui Province, China
Ti-Long Ding, Xue-Feng Dai, Li Yu, Yong Ma, Center for Liver Diseases, the 123rd Hospital, Nanjing Military Command of Chinese PLA, Bengbu 233015, Anhui Province, China

Supported by: the Medical Technology Innovation Fund of Nanjing Military Command of Chinese PLA, No. 10MA037
Correspondence to: Yong Ma, Professor, Center for Liver Diseases, the 123rd Hospital, Nanjing Military Command of Chinese PLA, 1052 Yanshan Road, Bengbu 233015, Anhui Province, China. my4973766@163.com

Received: 2012-03-29 Revised: 2012-05-06

Accepted: 2012-06-01 Published online: 2012-07-08

Abstract

AIM: To evaluate the significance of combined detection of HIF-1 α , TXB2, 6-keto-PGF1 α and HA in the diagnosis of hepatic microcirculatory disturbance in patients with chronic hepatitis B (CHB).

METHODS: In total, 275 patients with CHB and

15 normal volunteer were included. The ultrastructure of the liver was observed by transmission electron microscopy (TEM). HIF-1 α expression in liver biopsies was detected by immunohistochemistry. Plasma levels of TXB2 and 6-keto-PGF1 α were determined by chemiluminescence, and serum HA levels was measured by RIA.

RESULTS: As the pathological changes of the liver were aggravated, erythrocyte aggregation, stenosis and blockage of sinus hepaticas, collagen fiber deposition, and basal membrane formation became worsened, the strength and range of expression of HIF-1 α was enhanced, the levels of serum HA and plasma TXB2 were raised gradually, and plasma levels of 6-keto-PGF1 α slightly declined.

CONCLUSION: Combined detection of HIF-1 α , TXB2, 6-keto-PGF1 α and HA can help accurately diagnose hepatic microcirculatory disturbance in patients with CHB.

Key Words: Chronic hepatitis B; Hypoxia-inducible factor; Microcirculatory disturbance; Sinusoidal endothelial cells

Fan XM, Ding TL, Dai XF, Yu L, Ma Y. Significance of combined detection of HIF-1 α , TXB2, 6-keto-PGF1 α and HA in the diagnosis of hepatic microcirculatory disturbance in patients with chronic hepatitis B. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(19): 1732-1736

摘要

目的: 探讨慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)肝脏微循环障碍时, 联合检测低氧诱导因子(hypoxia-inducible factor, HIF)-1 α 、血栓烷素(thromboxan, TX)B2、6-酮-前列腺素F1 α (6-Keto-PGF1 α)及透明质酸(hyaluronic acid, HA)的临床意义。

方法: 275例CHB患者肝组织标本通过肝穿刺获得, 同时留取外周血待检。15例正常志愿者外周血来自健康体检者。用透射电镜观察肝细胞及肝窦的超微结构变化。用化学发光法检测血清HA, 放射免疫法检测血浆TXB2和

6-Keto-PGF1 α , 免疫组织化学法标记肝穿活检标本中的HIF-1 α .

结果: 随着CHB肝组织病变的加重, 电镜示肝窦腔内红细胞聚集, 肝窦阻塞和狭窄明显, 狄氏腔中胶原纤维沉积及基底膜形成率逐步增多。HIF-1 α 在肝组织中的表达强度和范围逐渐加大, HA、TXB2逐渐上升, 6-Keto-PGF1 α 轻度下降。

结论: HIF-1 α 、TXB2、6-Keto-PGF1 α 及HA联合检测能较好地反映肝脏微循环障碍状况。

关键词: 慢性乙型肝炎; 低氧诱导因子; 微循环障碍; 肝窦内皮细胞

范秀梅, 丁体龙, 代学枫, 于莉, 马勇. HIF-1 α 、TXB2、6-Keto-PGF1 α 和HA联合检测在CHB肝脏微循环障碍中的诊断意义. 世界华人消化杂志 2012; 20(19): 1732-1736

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1732.asp>

0 引言

慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)肝脏微循环障碍将进一步加重肝组织损伤, 已为越来越多的学者所认同, 但肝脏微循环障碍的监测却是难点。以往常用手指甲襞微循环检查法判断肝脏微循环障碍的程度, 但由于特异性差, 并不能准确反映肝脏微循环状况; 通过电镜进行组织学超微观察可反映组织和器官的微循环状况, 但由于价格昂贵限制了其广泛使用。肝窦是肝脏微循环的关键部位。因此, 本研究通过透射电镜观察肝细胞和肝窦的结构变化, 从超微结构上判断肝脏是否存在微循环障碍, 用组织病理学方法判断肝组织的病变程度, 同时观察低氧诱导因子(hypoxia-inducible factor, HIF)-1 α 在CHB肝组织中的表达及定位, 并检测患者血清透明质酸(hyaluronic acid, HA)、血浆血栓烷(thromboxan, TX)B2及6-酮-前列腺素F1 α (6-Keto-PGF1 α)与肝组织病变程度的关系, 探讨HIF-1 α 、HA、TXB2及6-Keto-PGF1 α 联合检测在CHB肝脏微循环障碍中的诊断意义。

1 材料和方法

1.1 材料 2008-07/2010-10我中心收治的CHB患者275例, 男192例, 女83例, 年龄18-62岁, 平均年龄34.8岁。病程1-20年, 平均11.4年。诊断符合2000年中华医学会传染病与寄生虫病学分会和肝病学分会联合修订的“病毒性肝炎防治方案”的标准^[1]。并排除外伤和其他组织及器官

的急慢性疾病。另取15例正常人静脉血作对照。HIF-1 α 鼠抗人单克隆抗体购自美国Santa cruce生物技术公司(货号: sc-13515); 即用型免疫组织化学EliVision™ plus试剂盒购自福州迈新生物技术公司(产品编号: KIT-9901/9902/9903)。透明质酸化学发光试剂购自郑州安图生物技术有限公司; TXB2及6-Keto-PGF1 α 放免试剂购自北京普尔伟业生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 CHB分组: 根据光镜观察结果, 按肝组织炎症、坏死和纤维化程度, 将275例CHB患者分为3组: CHB轻度81例, CHB中度96例, CHB重度98例。分组标准参照李玉林主编的第6版《病理学》中的标准^[2]。

1.2.2 标本采集及预处理: 肝组织活检标本采集, 用日本产16号肝活检针, B超引导下取出肝组织, 直径约2 mm, 长度≥1.5 cm, 肝组织标本分为2部分: 一部长度约1 mm, 用2.5%戊二醛固定, 1%四氧化锇固定, 0.1 mol/L磷酸缓冲液清洗, 梯度酒精脱水, Ep812树脂包埋, 超薄切片机切片, 醋酸铀、柠檬酸铅染色, 作透射电子显微镜观察, 剩余部分立即置于40 g/L甲醛固定(≥12 h), 石蜡包埋, 连续4 μm切片, 作HIF-1 α 免疫组织化学染色, 光镜观察。各组患者分别于肝穿当日清晨空腹采静脉血2 mL作HA检测, 另取静脉血3 mL(消炎痛EDTA-Na₂抗凝)作TXB2及6-Keto-PGF1 α 检测用。

1.2.3 免疫组织化学染色: 按试剂盒说明书操作, 慢性重度肝炎阴性对照以PBS代替一抗制备。结果判定方法: 黄色呈灶性分布为弱阳性(+), 深黄色呈片状分布为阳性(++)、深棕黄色呈弥漫性分布为强阳性(+++), 未着色为阴性(-)。

1.2.4 HA、TXB2、6-Keto-PGF1 α 检测: 由专人按仪器操作规程和试剂盒说明书操作。

统计学处理 SPSS11.5统计软件进行统计分析, 试验数据采用mean±SD表示, 两两比较采用t检验, 显著性水准为P<0.05。

2 结果

2.1 HIF-1 α 的表达特点 CHB轻度患者肝组织中HIF-1 α 呈灶性表达, 主要表达在肝细胞的胞浆部位, 多数呈弱阳性(+)表达(图1A); CHB中度患者肝组织中HIF-1 α 呈片状表达, 细胞核与细胞浆均有表达, 多数呈阳性(++)表达(图1B); CHB重度患者肝组织中HIF-1 α 呈弥漫性强阳性(+++)表达(图1C), 在肝窦毛细血管化部位表达更明

■研发前沿
低氧诱导因子(HIF)是在缺氧状态下发挥特异性活性的核转录因子, 与缺氧性疾病关系密切, 但在CHB肝组织中如何表达的报道鲜见。

■创新盘点

HIF-1 α 是反映组织缺氧的指标, TXB2和6-Keto-PGF1 α 是反映血液循环状态的指标, HA是反映SEC受损程度的指标, 四者联合检测可大大提高诊断肝脏微循环障碍的特异性和敏感度。

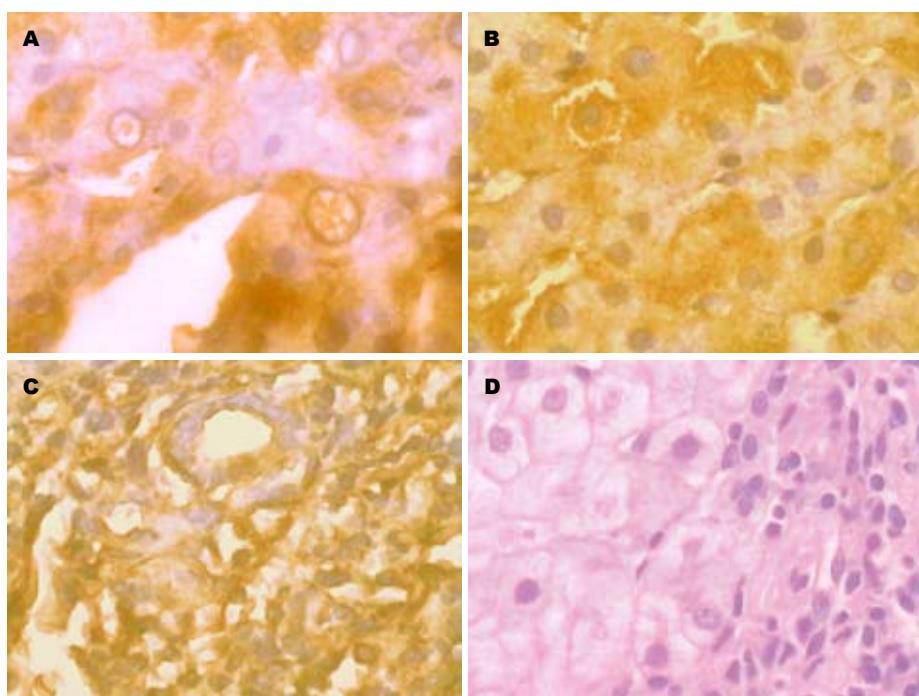


图 1 HIF-1 α 在慢性乙型肝炎肝组织中的表达($\times 400$).
A: 慢性乙型肝炎轻度; B: 慢性乙型肝炎中度; C: 慢性乙型肝炎重度; D: 阴性对照.

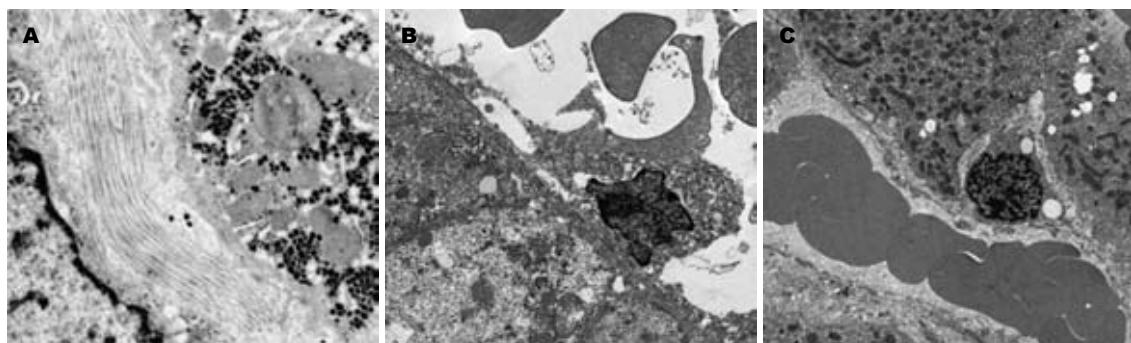


图 2 慢性乙型肝炎肝组织电镜观察. A: 肝窦腔中红细胞聚集($\times 4500$); B: 狄氏腔中大量胶原纤维沉积($\times 18000$); C: 肝窦内皮细胞表面形成基底膜($\times 7500$).

显。阴性对照片无表达(图1D).

2.2 慢性乙型肝炎肝组织病变电镜观察 CHB轻度主要表现为炎症性损伤, 肝细胞结构基本正常, 线粒体肿胀, 内质网扩张, 峰模糊缺失, 粗面内质网有脱颗粒现象, 部分内质网形成大泡样结构, 核膜孔逐渐消失, 核膜呈波纹状皱缩, 肝窦腔中红细胞聚集(图2A); CHB中度时, 肝细胞缺氧逐渐加重, 许多线粒体破坏, 峰消失, 外膜破裂, 线粒体基质外溢. 同时肝细胞体积变小, 肝细胞内空泡样结构常见, 部分肝细胞已崩解, 释出胞质成份, 并可见白细胞浸润, 此时可见大量凋亡细胞, 核固缩变小或异染色质聚集. 但细胞膜性结构完整, 没有溶酶体内容物释放, 随后细胞膜出现深的皱褶, 形成“凋亡小体”, 狄氏腔中有大量胶原纤维沉积(图2B); CHB重度时主要表现为微循环结构的改变, 肝窦内皮细胞窗孔减少减小, 甚至消失, 肝窦毛细血管化和基底

膜形成(图2C), 肝窦毛细血管化并在门静脉与门静脉、肝静脉与门静脉、肝静脉与肝静脉之间形成广泛的吻合支, 导致肝脏微循环紊乱.

2.3 慢性乙型肝炎患者血清HA、血浆TXB2及6-Keto-PGF1 α 的检测 随着CHB肝组织病变的加重, 血清HA、血浆TXB2水平显著升高, 不同组别之间差异有统计学意义($P<0.05$), 血浆6-Keto-PGF1 α 逐渐下降, 但邻组之间差异不显著($P>0.05$, 表1).

3 讨论

急性、亚急性重型肝炎较大血管阻塞诱发肝梗塞、肝组织大片、片状坏死, 导致患者肝功能快速衰竭而死亡, CHB较小血管和毛细血管病变从轻度肝炎至活动性肝硬化始终存在, 而且血管病变的程度与肝组织病变的程度一致^[3-10]. CHB肝窦病变已引起学者的关注^[11-17]. 但肝窦病

表 1 慢性乙型肝炎患者血清HA、血浆TXB2及6-Keto-PGF1 α 的检测

分组	<i>n</i>	HA($\mu\text{g/L}$)	TXB2(ng/L)	6-Keto-PGF1 α (ng/L)
正常组	15	105.25 \pm 18.62	75.61 \pm 10.25	92.43 \pm 19.44
CHB轻度	81	126.41 \pm 21.34	98.36 \pm 14.52	86.62 \pm 16.32
CHB中度	96	163.45 \pm 27.54	148.91 \pm 19.35	83.15 \pm 14.19
CHB重度	98	236.83 \pm 31.49	261.38 \pm 24.51	78.55 \pm 12.56 ^a

HA、TXB2相邻两组间比较, $P < 0.05$; ^a $P < 0.05$ vs 正常组.

变导致肝脏微循环障碍所诱发的肝细胞损伤、肝组织中HIF-1 α 表达及血液中HA、TXB2、6-Keto-PGF1 α 含量变化的探讨较少。我们通过透射电镜观察发现, CHB轻度主要表现为炎症性损伤, 肝细胞结构基本正常, 线粒体肿胀, 内质网扩张, 峴模糊缺失, 粗面内质网有脱颗粒现象, 部分内质网形成大泡样结构, 核膜孔逐渐消失, 核膜呈波纹状皱缩, 肝窦腔中红细胞聚集; CHB中度时, 肝细胞缺氧逐渐加重, 许多线粒体破坏, 峴消失, 外膜破裂, 线粒体基质外溢; 同时肝细胞体积变小, 肝细胞内空泡样结构常见, 部分肝细胞已崩解, 释出胞质成份, 并可见白细胞浸润, 此时可见大量凋亡细胞, 核固缩变小或异染色质聚集, 但细胞膜性结构完整, 没有溶酶体内容物释放, 随后细胞膜出现深的皱褶, 形成“凋亡小体”。狄氏腔中有大量胶原纤维沉积。CHB重度时主要表现为微循环结构的改变, 肝窦内皮细胞窗孔减少减小, 甚至消失, 肝窦毛细血管化和基底膜形成, 肝窦毛细血管化并在门静脉与门静脉、肝静脉与门静脉、肝静脉与肝静脉之间形成广泛的吻合支, 结果提示, 随着肝组织病变的加重, 肝细胞的损害及肝窦物质交换的障碍程度也随之加重。说明肝窦病变是引起肝脏微循环障碍的重要原因。与此同时, 肝组织中HIF-1 α 的表达, 随着肝窦病变的加重, 其阳性表达程度也随之增加; 血液中HA、TXB2含量随着肝窦病变的加重而升高, 6-Keto-PGF1 α 则轻度降低。提示肝组织中HIF-1 α 的表达、血液中HA、TXB2和6-Keto-PGF1 α 含量变化与肝脏微循环障碍的程度有关。

肝窦是血液与肝细胞物质交换的主要场所, 肝窦内皮细胞是血液与肝细胞之间进行物质交换的屏障, 其完整性又防止了血小板的黏附及凝血因子的激活, 从而维持肝窦血液循环和物质的顺畅。HA是一种氨基多糖, 由肝间质细胞合成。肝脏是HA的主要代谢器官, 在肝内标记的HA, 90%位于肝窦内皮细胞^[18]。SEC通过受体与

HA结合, 以液相胞饮的方式将HA摄入。摄入细胞的HA主要聚集于溶酶体中, 被其中的透明质酸酶分解代谢。慢性肝病时, SEC对HA的摄取和分解代谢功能受损, HA清除减少, 造成血清HA水平升高, 因此血清HA可准确地反映SEC的受损伤程度。血栓素TXA2主要是由血小板微粒体合成并释放的一种强烈促进血管收缩和活化血小板的生物活性物质。其生物半衰期约30 min, 而迅速代谢为无活性的TXB2。前列环素(PGI2)是由血管壁内皮细胞合成和释放的一种抗血小板聚集和舒张血管的生物活性物质, 其生物半衰期约3 s, 迅速代谢生成6-Keto-PGF1 α 。在生理状态下, 血浆或组织中TXA2和PGI2浓度比例处于相对平衡状态, 以保持机体内环境的稳定。许多病理因素如高血压性肾病、肺心病、前列腺增生及外伤均可导致TXA2和PGI2平衡失调而造成血小板聚集, 血管痉挛或血栓形成^[19-22]。本研究结果提示, 血液中TXA2的代谢产物TXB2含量升高、PGI2的代谢产物6-Keto-PGF1 α 含量降低, 说明肝组织内TXA2分泌增多和PGI2合成减少, 提示肝脏内TXA2和PGI2平衡失调。HIF-1是在缺氧状态下特异性发挥活性的核转录因子, 广泛存在于缺氧条件下的哺乳动物和人体内, 可以调控多种靶基因, 具有多种生物学效应, 在许多缺氧性疾病的病理过程中都发挥着重要作用^[23-30]。HIF-1有 α 、 β 两种亚基, HIF-1 β 亚基在细胞浆中稳定表达, 而HIF-1 α 亚基在翻译后即被泛素-蛋白酶水解复合体降解。因此, 在正常氧饱和度下的细胞中基本检测不到 α 亚基的表达。CHB肝组织由于微循环障碍, 导致肝组织无法从血液循环中得到足够的氧而出现缺氧状态, 此时, α 亚基的降解被抑制, 并可采用免疫组织化学的方法进行检测。

本研究表明, CHB肝窦病变包括肝窦内红细胞聚集、肝窦间隙胶原蛋白沉积、肝窦基底膜形成和肝窦内皮细胞窗孔减少或消失, 并与肝组织损伤的程度一致; 肝窦病变导致肝窦血

■应用要点
本文探讨了HIF-1 α 、TXB2、6-Keto-PGF1 α 及HA联合检测在CHB肝脏微循环障碍中的诊断意义, 该方法较手指甲襞微循环检查法特异性更高, 与电镜观察结果有很好的吻合度, 且实验条件要求不高, 成本较低, 适合大多中小型医院开展。

■ 同行评价

本文题目准确反映了研究工作的科学问题和特定内容, 简明而有特色, 结论明确, 试验证据充足。文章的科学性、创新性和可读性较强, 具有良好的临床实用价值。

液循环和物质交换障碍, 从而导致肝脏微循环。在排除外伤及其他器官和组织慢性疾病的CHB患者的血液中, HA、TXB₂含量升高、6-Keto-PGF1 α 含量降低, 肝组织中HIF-1 α 表达异常, 且HA、TXB₂含量升高、6-Keto-PGF1 α 含量降低, 肝组织中HIF-1 α 表达异常程度与肝窦病变的程度一致。说明联合检测血液中HA、TXB₂、6-Keto-PGF1 α 含量变化及肝组织中HIF-1 α 表达程度对诊断CHB肝脏微循环障碍的程度具有可靠的临床意义。本研究应用的检测方法特异性和灵敏度高, 与电镜观察的肝窦病变有很好的吻合度, 且实验条件要求不高, 成本较低, 大多数实验室均可开展, 值得临床进一步推广使用。

4 参考文献

- 1 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会. 病毒性肝炎防治方案. 中华肝脏病杂志 2000; 8: 324-329
- 2 李玉林. 病理学. 第6版. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 203
- 3 严家春, 马勇, 陈文笔, 刘健虎. 肝内血管病变与肝炎病变关系的研究. 世界华人消化杂志 1999; 7: 831-836
- 4 严家春, 陈文笔, 马勇, 田瑞霞, 丁体龙, 徐长江. 转化生长因子 β 1与乙型肝炎肝血管病变的关系. 世界华人消化杂志 2001; 9: 751-754
- 5 丁体龙, 叶根深, 李瑞麟, 马勇, 严家春, 张文学. 乙型肝炎肝组织血管病变对病程发展的影响. 实用医学杂志 2006; 22: 2495-2497
- 6 刘健虎, 严家春, 马勇. 慢性乙型肝炎肝组织内血管病变与肝组织病理学相关性研究. 东南国防医药 2003; 5: 7-9
- 7 张小丽, 徐钧. 肝硬化门静脉血管病变与Hsp_s的关系. 山西医科大学学报 2004; 35: 410-413
- 8 孙红霞, 杨凯. 乙型肝炎随访肝活检肝内血管病变动态变化观察. 淮海医药 2005; 23: 173-175
- 9 刘成海. 重视补虚化瘀中药对肝硬化肝脏微血管病变的影响. 中西医结合肝病杂志 2008; 18: 321-323
- 10 王莉, 李家斌, 马勇, 陆笼辉, 代雪枫, 丁体龙. 脂多糖在慢性乙型肝炎肝内血管病变中的作用. 实用肝脏病杂志 2012; 15: 14-17
- 11 陈文笔, 严家春, 马勇, 沈月萍. 乙型肝炎患者循环血中血管内皮生长因子的含量及其与肝组织肝窦病变的关系. 世界华人消化杂志 2000; 8: 1426-1427
- 12 Chevallier M, Guerret S, Chossegros P, Gerard F, Grimaud JA. A histological semiquantitative scoring system for evaluation of hepatic fibrosis in needle liver biopsy specimens: comparison with morphometric studies. *Hepatology* 1994; 20: 349-355
- 13 孙学刚, 符秀琼, 冯沃成, 黎春华, 吕志平. 论肝窦内皮窗孔异常是肝脾失调致动脉粥样硬化的微观病机. 山东中医药大学学报 2010; 34: 11-13
- 14 徐长江, 严家春, 马勇, 丁体龙, 袁苏娜. 肝窦及窦周隙病变在慢性乙型肝炎肝微循环障碍中担当关键角色. 临床与实验病理学杂志 2009; 25: 62-65
- 15 邵颖, 宋光平. 慢性肝炎肝窦毛细血管化的临床病理研究. 临床肝胆病杂志 2011; 27: 154-156
- 16 杨照新, 韩德五, 邢桦云, 刘慧荣, 燕子. 肝硬化时肝窦毛细血管化形成机制. 世界华人消化杂志 2009; 17: 3101-3108
- 17 宋光平. 肝组织HBsAg表达与肝窦毛细血管化的关系研究. 中国临床保健杂志 2008; 11: 518-519
- 18 汪明凤, 华肖杭. 透明质酸等血清学指标在慢性乙型肝炎患者诊断中的意义. 中华医院感染学杂志 2011; 21: 1816-1817
- 19 叶建明, 郁丽霞, 卢国元, 陈洪磊, 顾晓霞, 熊燕. 高血压性肾损害患者内皮功能及血小板活化指标的测定及其临床意义. 苏州大学学报(自然科学版) 2009; 29: 148-150
- 20 刘韵婵, 唐筑灵, 何燕. 慢性阻塞性肺疾病和肺心病患者血浆TXB₂、6-Keto-PGF1 α 的测定. 贵阳医学院学报 2002; 27: 314-315
- 21 段晓慧, 潘晓明, 易竟阳, 肖永新. 老年前列腺增生症患者血浆TXB₂和6-K-PGF1 α 变化的观察. 中国性科学 2009; 18: 24-25
- 22 李升旺, 麻晓林. 严重钝性肝损伤后血浆TNF α 、TXB₂及PGI α 变化的实验研究. 创伤外科杂志 2005; 7: 448-450
- 23 Shannon AM, Bouchier-Hayes DJ, Condron CM, Toomey D. Tumour hypoxia, chemotherapeutic resistance and hypoxia-related therapies. *Cancer Treat Rev* 2003; 29: 297-307
- 24 Blancher C, Harris AL. The molecular basis of the hypoxia response pathway: tumour hypoxia as a therapy target. *Cancer Metastasis Rev* 1998; 17: 187-194
- 25 Adams JM, Difazio LT, Rolandelli RH, Luján JJ, Haskó G, Csóka B, Selmeczi Z, Németh ZH. HIF-1: a key mediator in hypoxia. *Acta Physiol Hung* 2009; 96: 19-28
- 26 Lei L, Mason S, Liu D, Huang Y, Marks C, Hickey R, Jovin IS, Pypaert M, Johnson RS, Giordano FJ. Hypoxia-inducible factor-dependent degeneration, failure, and malignant transformation of the heart in the absence of the von Hippel-Lindau protein. *Mol Cell Biol* 2008; 28: 3790-3803
- 27 Weidemann A, Klanke B, Wagner M, Volk T, William C, Wiesener MS, Eckardt KU, Warnecke C. Hypoxia, via stabilization of the hypoxia-inducible factor HIF-1alpha, is a direct and sufficient stimulus for brain-type natriuretic peptide induction. *Biochem J* 2008; 409: 233-242
- 28 Zhao HX, Wang XL, Wang YH, Wu Y, Li XY, Lv XP, Zhao ZQ, Zhao RR, Liu HR. Attenuation of myocardial injury by postconditioning: role of hypoxia inducible factor-1alpha. *Basic Res Cardiol* 2010; 105: 109-118
- 29 Malhotra R, Tyson DW, Rosevear HM, Brosius FC. Hypoxia-inducible factor-1alpha is a critical mediator of hypoxia induced apoptosis in cardiac H9c2 and kidney epithelial HK-2 cells. *BMC Cardiovasc Disord* 2008; 8: 9
- 30 Chen SM, Li YG, Zhang HX, Zhang GH, Long JR, Tan CJ, Wang DM, Fang XY, Mai RQ. Hypoxia-inducible factor-1alpha induces the coronary collaterals for coronary artery disease. *Coron Artery Dis* 2008; 19: 173-179

编辑 张姗姗 电编 鲁亚静

miR-155在肝细胞癌中的表达及对肝癌细胞增殖的影响

胡蓉环, 蔡婧, 兰琼玉

胡蓉环, 蔡婧, 兰琼玉, 南昌大学第二附属医院肿瘤科 江西省南昌市 330006

胡蓉环, 副主任医师, 主要从事消化系统肿瘤临床和基础研究.

作者贡献分布: 此课题由胡蓉环设计; 研究过程由蔡婧操作完成; 数据分析由胡蓉环与兰琼玉完成; 本论文写作由胡蓉环与蔡婧完成.

通讯作者: 胡蓉环, 副主任医师, 330006, 江西省南昌市民德路1号, 南昌大学第二附属医院肿瘤科. hubingling18@163.com

电话: 0791-86292596

收稿日期: 2012-04-08 修回日期: 2012-05-12

接受日期: 2012-06-01 在线出版日期: 2012-07-08

Expression of miR-155 in primary hepatocellular carcinoma and its effect on tumor cell proliferation

Rong-Huan Hu, Jing Cai, Qiong-Yu Lan

Rong-Huan Hu, Jing Cai, Qiong-Yu Lan, Department of Oncology, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China

Correspondence to: Rong-Huan Hu, Associate Chief Physician, Department of Oncology, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, 1 Minde Road, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China. hubingling18@163.com

Received: 2012-04-08 Revised: 2012-05-12

Accepted: 2012-06-01 Published online: 2012-07-08

Abstract

AIM: To detect the expression of microRNA 155 (miR-155) in hepatocellular carcinoma and to analyze its influence on tumor cell proliferation and apoptosis.

METHODS: The expression of miR-155 in 42 cases of primary liver cancer and matched tumor-adjacent normal tissue was detected by quantitative PCR. The expression of miR-155 in hepatocellular carcinoma cell lines HepG2 and SMMC7721 was inhibited using a miR-155-specific antisense oligonucleotide (ASO-miR-155), and cell proliferation and early apoptosis were then determined by MTT assay and flow cytometry, respectively.

RESULTS: The positive rate of miR-155 expression was significantly higher in hepatocellular carcinoma (52%) than in tumor-adjacent tissue ($P < 0.05$). After ASO-miR-155 was transfected

into HepG2 and SMMC7721 cells using Lipofectamine, the expression of miR-155 was significantly reduced. MiR155 knockdown significantly inhibited growth and promoted early apoptosis of HepG2 and SMMC7721 cells.

CONCLUSION: MiR-155 is overexpressed in hepatocellular carcinoma. Inhibition of miR-155 expression could inhibit growth and induce early apoptosis of hepatocellular carcinoma cells. MiR-155 may become a new target for the treatment of liver cancer.

Key Words: Primary hepatocellular carcinoma; MiR-155; Proliferation; Apoptosis

Hu RH, Cai J, Lan QY. Expression of miR-155 in primary hepatocellular carcinoma and its effect on tumor cell proliferation. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(19): 1737-1741

摘要

目的: 检测微小RNA-155(miR-155)在肝癌组织中的表达并分析其对肝癌细胞增殖和细胞凋亡的影响.

方法: 采用TagMan MGB探针法荧光定量PCR分析42例原发性肝癌及对应的癌旁组织miR-155的表达; 利用miR-155反义寡核苷酸(ASO-miR-155)降低肝癌细胞HepG2和SMMC7721中miR-155的表达; 利用MTT比色法检测肝癌细胞增殖的变化, 并通过流式细胞技术检测肝癌细胞早期凋亡情况.

结果: 42例肝癌及癌旁组织标本中, miR-155在52%(22/42)肝癌组织中的表达明显高于癌旁组织($P < 0.05$); 利用脂质体将ASO-miR-155转染肝癌细胞HepG2和SMMC7721后, miR-155的表达明显降低, 肝癌细胞HepG2和SMMC7721生长受到明显抑制; 并且细胞的早期凋亡明显增加.

结论: miR-155在肝癌组织中过表达, 降低其表达能明显抑制肝癌细胞的生长并诱导细胞早期凋亡, miR-155有可能成为肝癌治疗的新靶点.

■背景资料

原发性肝癌恶性程度高, 治疗效果差, miRNAs在肝癌等恶性肿瘤发生发展过程中起了癌基因或抑癌基因的作用.

■同行评议者
王阁, 教授, 中国人民解放军第三军医大学第三附属医院

■研发前沿

近年研究发现miR-155在乳腺癌、直肠癌、胰腺癌、肺癌等恶性肿瘤中表达上调，并在其生物学行为方面起重要的调节作用，但在肝癌中表达的功能尚不清楚。

关键词: 原发性肝细胞癌; miR-155; 增殖; 凋亡

胡蓉环, 蔡婧, 兰琼玉. miR-155在肝细胞癌中的表达及对肝癌细胞增殖的影响. 世界华人消化杂志 2012; 20(19): 1737-1741
<http://www.wjnet.com/1009-3079/20/1737.asp>

0 引言

原发性肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是我国乃至世界上常见、且极具危害性的恶性肿瘤之一^[1-4]. 尽管近年来对其诊断、治疗技术不断进步，但肝癌的预后仍然较差，对肝癌的早期诊断及早期治疗具有特别重要意义。MicroRNAs(miRNAs)是近年来发现的一类长度约为22个核苷酸的单链非编码小分子RNA，通过与靶基因完全或不完全互补结合形式调控基因转录后的表达^[5-7]. 在恶性肿瘤发生发展过程中，miRNAs经常扮演着“癌基因”和/或“抑癌基因”的重要角色^[8-14]. 近年研究发现miR-155在乳腺癌、直肠癌、胰腺癌、肺癌等恶性肿瘤中表达上调，并在其生物学行为方面起重要的调节作用^[15-20]. 然而miR-155在肝癌中的表达及功能研究尚未见报道，本研究拟检测miR-155在肝癌组织中的表达情况，并通过反义寡核苷酸降低肝癌细胞miR-155的表达，观察miR-155对肝癌细胞增殖和凋亡的影响，以期为肝癌早期诊治提供新的理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料 收集2009-04/2011-04南昌大学第二附属医院肝胆外科手术切除的原发性肝癌组织标本42例，每例均有对应的癌旁组织。其中男25例，女17例，年龄35-72岁。所有标本均经病理学检查确诊，收集后立即放入液氮中保存。TaqMan miRNA分析试剂盒购自美国ABI公司；Annexin V-FITC凋亡检测试剂盒购自南京凯基公司；脂质体Lipofectamine™ 2000购自美国Invitrogen公司；全硫代修饰的ASO-miR-155购自Gene Pharma公司；人肝癌细胞株HepG2和SMMC7721由江西省分子医学重点实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 实时荧光定量PCR检测miR-155的表达：采用TRIzol试剂提取组织总RNA，紫外分光光度计测定浓度，-70℃保存备用，用miR-155检测试剂盒检测miR-155的表达。首先取2 μg总RNA作为模板与3 μL逆转录酶混合，在20 μL反应体系中，16℃ 30 min, 42℃ 30 min, 85℃ 5 min，进行

逆转录反应。收集cDNA，然后将cDNA 150倍稀释，取1 μL稀释的cDNA与2 μL TaqMan引物混合，20 μL反应体系：95℃ 10 min; 95℃ 15 s, 60℃ 60 s, 40个循环。相对miRNA表达水平用Ct值准确计算，U6 snRNA为内参。

1.2.2 细胞株的培养及转染：HepG2和SMMC7721细胞株接种于含100 mL/L胎牛血清的DMEM培养基，37℃、50 mL/L CO₂条件下培养。收集细胞，以1×10⁵个细胞/孔铺6孔板，细胞生长至90%融合率时严格按照脂质体Lipofectamine™ 2000转染试剂说明书进行转染。

1.2.3 ASO-miR-155转染后对miR-155表达的影响：转染ASO-miR-155肝癌细胞48 h后，抽提总RNA经纯度分析，逆转录为cDNA，测定cDNA浓度，同时设立空白对照组、随机对照组及转染PBS组，检测miR-155的表达。实验重复3次。

1.2.4 MTT检测各组细胞的增殖情况：转染ASO-miR-155后48 h收集细胞，在离心管内将各组细胞悬液充分打匀，按8×10³/孔接种于96孔培养板，每孔加液量200 μL，24 h后换液。实验分组同1.2.3，每组设6个复孔。继续将培养板移入培养箱中培养24、48、72 h后分别每孔加入5 g/L试剂MTT 20 μL，培养4 h后，吸去上清液，加入150 μL的DMSO液，振荡培养板10 min，用酶标仪检测波长为490 nm的吸光度(A)值。每组重复3次。按下列公式计算细胞生长抑制率(%)：

$$\text{细胞生长抑制率} = \frac{\text{试验组 } A_{490} - \text{对照组 } A_{490}}{\text{对照组平均 } A_{490}} \times 100\%$$

1.2.5 流式细胞术分析细胞早期凋亡：试验分组同1.2.3。细胞接种6孔板，转染ASO-miR-155后48 h收集细胞，250 μL结合缓冲液重悬细胞，取100 μL细胞悬液于5 mL流式管中，加入5 μL Annexin V/PI和10 mL 20 mg/L的碘化丙啶(PI终浓度1 mg/L)，室温避光孵育15 min，加入400 μL PBS，流式细胞仪检测，实验重复3次。

统计学处理 采用SPSS17.0统计软件，计量资料以mean±SD表示，两组比较采用独立样本t检验，多组间比较采用单因素方差分析，P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肝癌及癌旁组织中miR-155的表达 实时荧光定量PCR检测发现42对原发性肝癌及癌旁组织中，52%(22/42)的肝癌组织中miR-155的表达明显高于对应的癌旁组织，结果有统计学意义

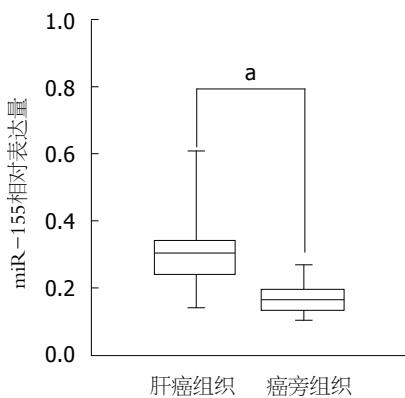


图1 荧光定量PCR检测miR-155在肝癌和癌旁组织中的表达。^a $P<0.05$.

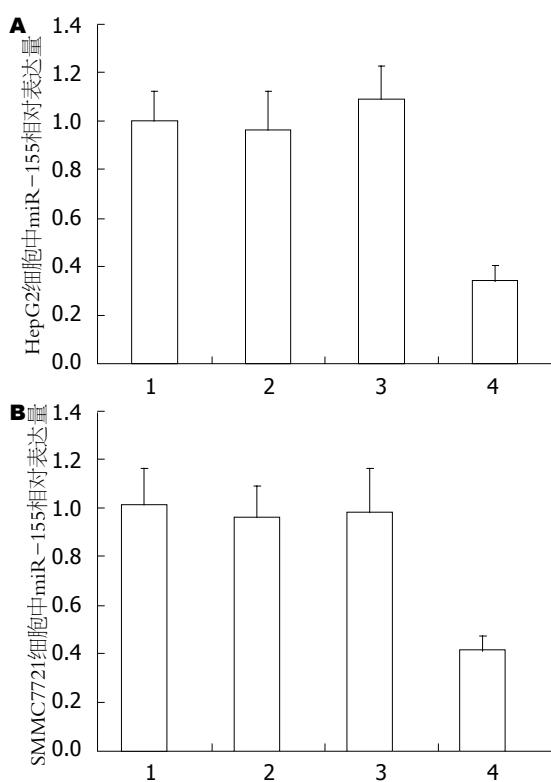


图2 实时荧光定量PCR检测HepG2和SMMC7721细胞中转染ASO-miR-155后miR-155的表达. A: HepG2细胞中miR-155相对表达量; B: SMMC7721细胞中miR-155相对表达量; 1: 空白对照组; 2: 随机对照组; 3: 转染PBS组; 4: ASO-miR-155组.

($P<0.05$, 图1).

2.2 ASO-miR-155对miR-155表达的变化 肝癌细胞HepG2和SMMC7721中转染ASO-miR-155后48 h, 实时荧光定量PCR检测发现, miR-155的表达较对照组降低($P<0.05$), 而空白对照组、随机对照组及PBS组间无明显差异($P>0.05$, 图2).

2.3 ASO-miR-155对肝癌细胞生长的抑制作用 转染ASO-miR-155后肝癌细胞生长明显慢于对照组($P<0.05$), 而空白对照组、随机对照组及转

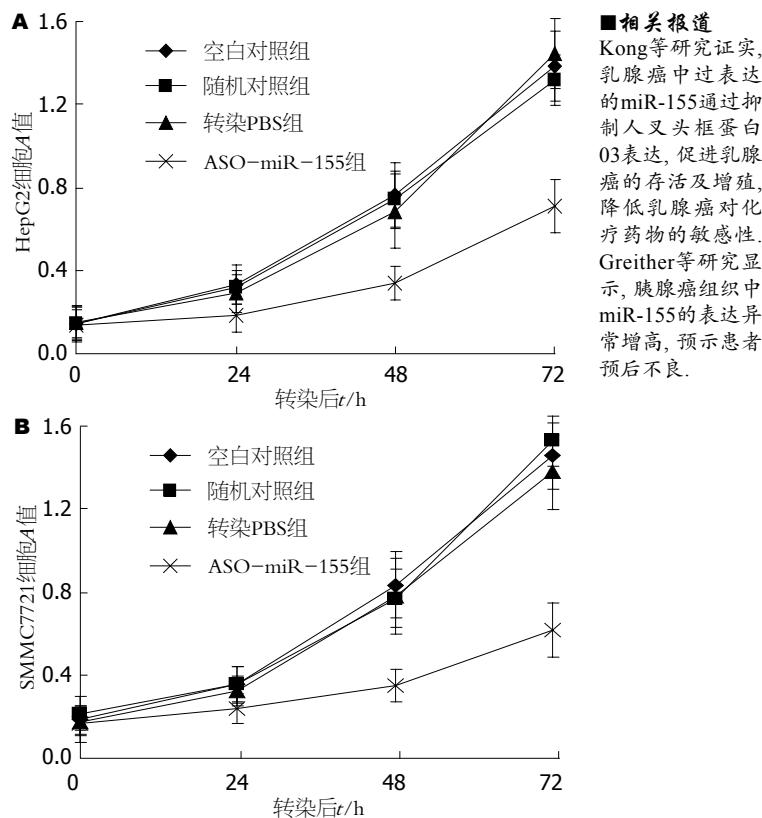


图3 转染ASO-miR-155的肝癌细胞HepG2和SMMC7721的增殖情况. A: HepG2细胞; B: SMMC7721细胞.

染PBS组间肝癌细胞的生长无明显差异($P>0.05$, 图3).

2.4 流式细胞术分析转染ASO-miR-155后肝癌细胞凋亡情况 肝癌细胞HepG2和SMMC7721转染ASO-miR-155后48 h, 结果发现转染ASO-miR-155组较空白对照组、随机对照组、转染PBS组早期凋亡明显增加($P<0.05$), 而晚期凋亡无明显改变; 空白对照组、随机对照组、转染PBS组之间各组细胞未见明显变化($P>0.05$, 表1, 2).

3 讨论

原发性肝癌的发生发展是癌基因激活和抑癌基因失活共同作用的结果, 其确切的发病机制尚未完全清楚。研究表明, 作为多步骤、多途径肿瘤发生的典型, 发现肝癌的早期诊断标记物和治疗靶点具有重要意义^[21,22]。近年发现, miRNAs与恶性肿瘤密切相关, 主要通过与目标mRNA分子的3'端非编码区域特异结合来抑制转录后的翻译。约52%调控miRNAs的编码基因位于肿瘤相关基因位点和染色体区域^[23,24]。因此miRNAs可能成为诊断肿瘤的新的分子标志和判断肿瘤治疗及预后的分子靶点^[25,26]。miR-155定位在人染色体21q21, 由B细胞整合簇(B-cell integration cluster,

■相关报道
Kong等研究证实, 乳腺癌中过表达的miR-155通过抑制人叉头框蛋白03表达, 促进乳腺癌的存活及增殖, 降低乳腺癌对化疗药物的敏感性。Greither等研究显示, 胰腺癌组织中miR-155的表达异常增高, 预示患者预后不良。

■创新盘点

本研究分析了miR-155在肝癌及癌旁组织中的表达，并探讨了降低miR-155表达后肝癌细胞的增殖及凋亡情况。

表1 HepG2细胞中不同组间细胞凋亡的变化 (mean ± SD, %)

分组	正常细胞	早期凋亡	晚期凋亡及坏死	损伤
空白对照组	88.20 ± 4.43	3.95 ± 0.46	5.95 ± 0.47	1.90 ± 0.31
阴性对照组	82.18 ± 6.25	4.82 ± 0.35	8.72 ± 0.62	4.28 ± 0.56
转染PBS组	77.23 ± 5.94	5.03 ± 0.68	11.59 ± 1.54	6.15 ± 0.94
ASO-miR-155组	67.69 ± 5.58	21.33 ± 1.57 ^a	7.63 ± 1.43	3.35 ± 0.55

^aP<0.05.

表2 SMMC7721细胞中不同组间细胞凋亡的变化 (mean ± SD, %)

分组	正常细胞	早期凋亡	晚期凋亡及坏死	损伤
空白对照组	86.64 ± 4.87	3.78 ± 0.65	7.25 ± 0.92	2.33 ± 0.32
阴性对照组	86.39 ± 5.29	4.25 ± 0.77	8.09 ± 1.34	1.27 ± 0.34
转染PBS组	83.28 ± 3.76	4.37 ± 0.52	9.27 ± 1.18	3.08 ± 0.39
ASO-miR-155组	71.02 ± 5.71	17.32 ± 2.17 ^a	8.37 ± 1.75	3.29 ± 0.56

^aP<0.05.

BIC)基因第3个外显子高度保守的区域编码^[27]。最近研究发现，miR-155在多种人体恶性肿瘤中异常表达，与肿瘤的发生、发展及预后密切相关，被认为是癌性微小RNA^[15]。另外，Kong等^[28]研究证实，乳腺癌中过表达的miR-155通过抑制人叉头框蛋白03(forkhead box protein 03, FOX03)表达，促进乳腺癌的存活及增殖，降低乳腺癌对化疗药物的敏感性。Greither等^[29]研究显示，胰腺癌组织中miR-155的表达异常增高，预示患者预后不良。Habbe等^[30]研究显示，当胰腺导管上皮发生上皮内瘤变时，其细胞及胰液内miR-155水平即有所增高，且在最容易癌变的肠型上皮内瘤变中miR-155升高最明显。提示miR-155可作为早期筛查胰腺癌的重要指标。但miR-155在肝癌中的表达及其作用目前还不清楚。

我们首先通过荧光定量PCR TagMan MGB探针法分析了42例肝癌患者手术标本癌组织及对应癌旁组织中miR-155的表达，发现52%(22/42)的肝癌患者癌组织中miR-155表达显著上调($P<0.05$)，表明miR-155很可能成为一个新的肝癌的癌前标记物。李海东等^[15]针对miR-122及miR-192的反义寡核苷酸能够明显抑制小鼠不同组织中对应miRNAs的表达，表明针对miRNAs的反义寡核苷酸可以有效抑制miRNAs的表达。随后本研究同样利用反义寡核苷酸技术成功降低肝癌细胞HepG2和SMMC7721中miR-155表达，发现其表达明显下降。同时我们通过MTT法检测发现HepG2和SMMC7721肝癌

细胞的生长受到抑制。最后我们应用流式细胞术对转染ASO-miR-155前后细胞凋亡情况进行分析，结果发现降低miR-155表达后，细胞的早期凋亡也明显增加。

总之，miR-155在肝细胞癌中过表达，参与促进肝癌细胞的增殖并抑制凋亡，miR-155很可能成为一个新的肝癌癌前标记物，为肝癌基因治疗提供新的靶点。但miR-155通过哪些靶基因促进肝癌细胞的增殖及具体调控机制仍有待进一步研究。

4 参考文献

- Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin* 2009; 59: 225-249
- Llovet JM, Bruix J. Novel advancements in the management of hepatocellular carcinoma in 2008. *J Hepatol* 2008; 48 Suppl 1: S20-S37
- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011; 61: 69-90
- 常宗宏, 汪泳, 吴汉平. 肝癌的综合治疗及肿瘤抗血管联合疗法. 世界华人消化杂志 2012; 20: 385-388
- Zeng Y. Principles of micro-RNA production and maturation. *Oncogene* 2006; 25: 6156-6162
- Kloosterman WP, Plasterk RH. The diverse functions of microRNAs in animal development and disease. *Dev Cell* 2006; 11: 441-450
- Sayed D, Abdellatif M. MicroRNAs in development and disease. *Physiol Rev* 2011; 91: 827-887
- Croce CM. Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nat Rev Genet* 2009; 10: 704-714
- Munker R, Calin GA. MicroRNA profiling in cancer. *Clin Sci (Lond)* 2011; 121: 141-158
- Szafranska AE, Davison TS, John J, Cannon T, Sipos

- B, Maghnouj A, Labourier E, Hahn SA. MicroRNA expression alterations are linked to tumorigenesis and non-neoplastic processes in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncogene* 2007; 26: 4442-4452
- 11 Yu DC, Li QG, Ding XW, Ding YT. Circulating MicroRNAs: Potential Biomarkers for Cancer. *Int J Mol Sci* 2011; 12: 2055-2063
- 12 Tricoli JV, Jacobson JW. MicroRNA: Potential for Cancer Detection, Diagnosis, and Prognosis. *Cancer Res* 2007; 67: 4553-4555
- 13 Zhang W, Dahlberg JE, Tam W. MicroRNAs in tumorigenesis: a primer. *Am J Pathol* 2007; 171: 728-738
- 14 Cho WC. OncomiRs: the discovery and progress of microRNAs in cancers. *Mol Cancer* 2007; 6: 60
- 15 李海东, 裴正军. 微小RNA miR-155在肿瘤中的研究. 国际肿瘤学杂志 2010; 37: 652-654
- 16 Jiang S, Zhang HW, Lu MH, He XH, Li Y, Gu H, Liu MF, Wang ED. MicroRNA-155 functions as an OncomiR in breast cancer by targeting the suppressor of cytokine signaling 1 gene. *Cancer Res* 2010; 70: 3119-3127
- 17 Nikiforova MN, Tseng GC, Steward D, Diorio D, Nikiforov YE. MicroRNA expression profiling of thyroid tumors: biological significance and diagnostic utility. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93: 1600-1608
- 18 Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, Seike M, Kumamoto K, Yi M, Stephens RM, Okamoto A, Yokota J, Tanaka T, Calin GA, Liu CG, Croce CM, Harris CC. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell* 2006; 9: 189-198
- 19 Wang X, Tang S, Le SY, Lu R, Rader JS, Meyers C, Zheng ZM. Aberrant expression of oncogenic and tumor-suppressive microRNAs in cervical cancer is required for cancer cell growth. *PLoS One* 2008; 3: e2557
- 20 Bloomston M, Frankel WL, Petrocca F, Volinia S, Alder H, Hagan JP, Liu CG, Bhatt D, Taccioli C, Croce CM. MicroRNA expression patterns to differentiate pancreatic adenocarcinoma from normal pancreas and chronic pancreatitis. *JAMA* 2007; 297: 1901-1908
- 21 黄涛, 秦建民. 免疫靶向纳米药物在肝癌治疗中的应用. 世界华人消化杂志 2011; 19: 3557-3561
- 22 周蓉蓉, 范学工. 危险信号分子与原发性肝癌的研究进展. 世界华人消化杂志 2011; 19: 1326-1330
- 23 Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006; 6: 259-269
- 24 Zhong X, Coukos G, Zhang L. miRNAs in human cancer. *Methods Mol Biol* 2012; 822: 295-306
- 25 Garzon R, Fabbri M, Cimmino A, Calin GA, Croce CM. MicroRNA expression and function in cancer. *Trends Mol Med* 2006; 12: 580-587
- 26 Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, Thun MJ. Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin* 2008; 58: 71-96
- 27 Xiang X, Zhuang X, Ju S, Zhang S, Jiang H, Mu J, Zhang L, Miller D, Grizzle W, Zhang HG. miR-155 promotes macroscopic tumor formation yet inhibits tumor dissemination from mammary fat pads to the lung by preventing EMT. *Oncogene* 2011; 30: 3440-3453
- 28 Kong W, He L, Coppola M, Guo J, Esposito NN, Coppola D, Cheng JQ. MicroRNA-155 regulates cell survival, growth, and chemosensitivity by targeting FOXO3a in breast cancer. *J Biol Chem* 2010; 285: 17869-17879
- 29 Greither T, Grochola LF, Udelnow A, Lautenschläger C, Würl P, Taubert H. Elevated expression of microRNAs 155, 203, 210 and 222 in pancreatic tumors is associated with poorer survival. *Int J Cancer* 2010; 126: 73-80
- 30 Habbe N, Koorstra JB, Mendell JT, Offerhaus GJ, Ryu JK, Feldmann G, Mullendore ME, Goggins MG, Hong SM, Maitra A. MicroRNA miR-155 is a biomarker of early pancreatic neoplasia. *Cancer Biol Ther* 2009; 8: 340-346

■同行评价

本文提示miR-155在肝细胞癌中过表达, 参与促进肝癌细胞的增殖并抑制凋亡。选题起点高, 技术方法先进, 结果可靠, 结论客观, 图表清晰。

编辑 张姗姗 电编 鲁亚静

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2012年版权归世界华人消化杂志

•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。(编辑部主任: 李军亮 2012-01-01)

难治性胃食管反流病诊断方法的研究进展

宋宏伟, 朱凌云

■背景资料

目前, 胃食管反流病(GERD)患者中, 有越来越多的患者在标准剂量质子泵抑制剂(PPIs)治疗下, 症状没有明显缓解, 生活质量难以得到保障。此类PPIs治疗后出现症状不回答的情况, 称之为难治性GERD。通过合理的诊疗方案, 明确病因及发病机制, 是进一步予以治疗的关键所在。

宋宏伟, 朱凌云, 上海中医药大学附属市中医医院 上海市 200071

宋宏伟, 硕士, 主要从事中医治疗脾胃病的研究工作。

上海市卫生局科研课题基金资助项目, No. 2010213

作者贡献分布: 本文综述由宋宏伟完成, 朱凌云校审。

通讯作者: 朱凌云, 主任医师, 200071, 上海市芷江中路274号, 上海中医药大学附属市中医医院. zhulingyun2211@yahoo.com.cn

收稿日期: 2012-05-16 修回日期: 2012-05-23

接受日期: 2012-06-02 在线出版日期: 2012-07-08

Advances in diagnostic options for refractory gastroesophageal reflux disease

Hong-Wei Song, Ling-Yun Zhu

Hong-Wei Song, Ling-Yun Zhu, Shanghai Municipal Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200071, China

Supported by: the Scientific Research Foundation of Shanghai Municipal Health Bureau, No.2010213

Correspondence to: Ling-Yun Zhu, Chief Physician, Shanghai Municipal Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, 274 Zhijiang Middle Road, Shanghai 200071, China. zhulingyun2211@yahoo.com.cn

Received: 2012-05-16 Revised: 2012-05-23

Accepted: 2012-06-02 Published online: 2012-07-08

Abstract

Gastroesophageal reflux disease (GERD) that does not respond to treatment with proton pump inhibitors (PPIs) is widely accepted as refractory GERD, and it is one of the most stubborn digestive system diseases. In recent years, great efforts have been made to develop various diagnostic options for refractory GERD and to explore its pathogenesis. This article will review recent advances in diagnostic options and pathogenesis of refractory GERD.

Key Words: Gastroesophageal reflux disease; Proton pump inhibitors; Diagnostics; Pathogenesis

Song HW, Zhu LY. Advances in diagnostic options for refractory gastroesophageal reflux disease. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(19): 1742-1746

摘要

众多学者把质子泵抑制剂(proton pump

inhibitors, PPIs)治疗不回答的胃食管反流病(gastroesophageal reflux disease, GERD)称为难治性胃食管反流病, 本病是当前消化系统疾病谱中最为顽固的治疗难题之一。近年来众多研究者运用多种诊疗手段来研究本病, 希望找到该病的发病机制。本文就最近国内外有关难治性GERD的诊断方案, 发病机制及相关研究成果等内容作一综述。

关键词: 难治性胃食管反流病; 质子泵抑制剂; 诊断; 发病机制

宋宏伟, 朱凌云. 难治性胃食管反流病诊断方法的研究进展. 世界华人消化杂志 2012; 20(19): 1742-1746

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1742.asp>

0 引言

胃食管反流病(gastroesophageal reflux disease, GERD)指的是由胃内容物反流而引起的不适症状或并发症^[1], 是常见的胃肠道疾病之一^[2]。质子泵抑制剂(proton pump inhibitors, PPIs)通过抑制胃酸成为治疗此病的有力应对措施。标准剂量的PPIs治疗可以使反流性食管炎的症状缓解率和治愈率达到85%^[3]。然而在部分经标准化PPIs治疗并持续4-8 wk的患者中, 反流症状依然持续出现, 则被认为是对PPIs治疗不回答^[4], 即难治性胃食管反流病。对这类患者, 医师希望进一步检查以明确病因, 制定正确有效的治疗方案。本文将对难治性GERD的诊断技术最新发展作一综述。

1 内镜

内镜可直接观察反流对食管黏膜造成的损伤, 是GERD重要的检测手段^[1]。最为常见的异常情况是反流性食管炎, 其特征表现为不同程度的食管黏膜破损。目前美国胃肠内窥镜检查学会已经提出指南, 认同PPIs治疗失败的GERD患者, 首先进行内镜检查是常规的临床诊断路径^[2]。而近期的一项研究^[3-6], 比较难治性GERD患者(PPIs治疗失败)和未接受抗反流治疗的胃灼热症状患者的内镜和病理表现, 结果显示未治疗组患者内镜下

■同行评议者

潘秀珍, 教授, 主任医师, 福建省立医院消化科; 魏睦新, 教授, 南京医科大学第一附属医院

食管炎改变显著高于难治性GERD组(55.2% vs 40.7%, $P<0.05$), 病理改变同样也是未治疗组显著高于难治性GERD组(30.8% vs 6.7%, $P<0.05$)。由此认为目前单纯通过内镜来诊断患者疾病性质以及程度是不够充分的。难治性GERD患者往往内镜检查的食管炎检出率比较低, 原因之一是其中大部分患者属于非糜烂性胃食管反流病(nonerosive reflux disease, NERD); 原因之二是接受过PPIs治疗后, 黏膜下损伤得到治愈。Poh等^[7]的研究还发现, 按照标准剂量服用PPIs之后, 内镜下腐蚀性食管炎治愈比率相当高(可以达到75%-95%), 而且内镜下的治愈往往都伴随着症状的改善, 而治疗效果不佳的则大多是C或D级的反流性食管炎(洛杉矶分级)^[5]。近年有学者应用食管内胶囊内镜对GERD患者进行观察, 并与普通内镜对比, 发现两者对GERD的诊断率相似^[6]。但胶囊内镜难以代替普通内镜的活检功能, 且缺乏与普通内镜大规模的临床比较, 其在临床的应用价值尚待评估。

2 食管组织学检查

寻找一种既有特异性又有敏感性的组织学变化来诊断GERD是目前学者关注的方法之一。实际上, 几乎所有GERD患者的食管黏膜都会出现细胞间隙扩大(dilated intercellular spaces, DIS), DIS的出现与电势差降低、上皮抵抗能力削弱、食管黏膜通透性增加等有关, 其形成往往是因为食管黏膜反复暴露在酸液及消化酶类物质下^[7]。在非糜烂性GERD患者中, 其细胞间隙的平均粒径是对照组患者的2倍^[8], 而且, DIS在GERD患者症状的产生中发挥着重要的作用, 其使反流的胃酸扩散至细胞间隙中, 随后激活黏膜内的化学敏感疼痛感受器, 食管本体疼痛感觉的信号通过脊髓后角传入大脑, 而产生不适感。Armstrong等^[9]发现, DIS在反流性食管炎中的出现率远远高于非糜烂性GERD。但是目前尚不能确定, DIS是否是食管炎的一个早期信号。

有3项食管组织学的微观研究将包括基底细胞增生、乳突状延伸和细胞间隙扩大3种细胞学改变作为GERD的特异性及敏感性的病理诊断标准^[9-11], 但是所有的这些病理改变在对照组中也有轻微的表现。其中2项研究结果发现没有任何一种病理变化的组合是GERD的特异性表现。Caviglia等^[11]设定了一个病理评分表, 以区分GERD患者和对照组患者, 其阳性预测值可以达到97%, 但其阴性预测值则为46%。

现阶段的假设集中在非糜烂性GERD症状的发生(如非心源性胸痛)是由于DIS而导致酸到达并激活食管上皮感觉神经中的化学敏感性疼痛感受器^[12]。这一假设目前还在研究当中, 以现有的研究资料还不足以完全解释DIS与非心源性胸痛必然联系, 因为DIS在无症状患者中也会达到30%的发现率, 也同样会在念珠菌感染性食管炎、食物过敏、嗜酸性食管炎^[13]及食管腺癌^[14,15]中出现。Ravelli等^[16]研究了服用奥美拉唑(40 mg/d)3 mo后DIS的可逆性, 92.1%的患者DIS消失, 症状消退($P<0.001$)。然而, 其他研究并未再现此研究经PPIs治疗后的可逆率。在Calabrese等^[17]的研究中, 患者接受埃索美拉唑或雷尼替丁各4 wk, 其中经过PPIs治疗后, 有25%-29%的患者细胞间隙恢复了正常。

对PPIs抵抗的难治性非糜烂性GERD患者会持续存在难以消除的DIS^[18], 其他反流成分可能是导致DIS和症状持续存在的原因。一项实验研究发现, 将实验动物食管黏膜暴露在含有胆酸的弱酸溶液中, 会刺激增加食管通透性并扩大细胞间隙^[19]。其他诸如胆酸、胰蛋白酶、脂肪酶之类的反流物质也可以导致DIS, 而且, 在实验条件下, 食管黏膜暴露在是否有胆酸的弱酸物质下, 都会导致DIS。这种方式的灌流不仅可以使近端暴露在反流物下的黏膜出现病理改变, 而且远端非暴露黏膜也会出现病变。然而, DIS的诱导作用可能与胃灼热的发生并不同时出现^[20]。

3 食管pH值监测

食管pH值监测的一个最常见用途就是评估已经过PPIs治疗的难治性GERD患者的病情, 检测正在发作的症状是否存在酸抑制未完成或其他与GERD不相关的病因。

在美国胃肠病学学院关于食管反流测试的医疗准则中^[21], 提出了3个关于在PPIs治疗期间的食管pH值监测的普遍观察结论: (1)正在接受PPIs(1次/d)治疗的患者经常在检查过程中发现不正常的食管酸暴露; (2)服用PPIs(2次/d)患者的食管炎程度越严重(甚至是巴雷特食管)pH值正常概率越低; (3)以反流症状为主的患者诊出率要高于以食管外症状为主的患者。

有两个现象出现在接受PPIs治疗的难治性反流性食管炎患者中。通过监测胃内pH值以及由普通生理等级的酸暴露而产生的症状可以判断胃质子泵的抑制不完全。而胃酸分泌抑制不完全则与药物抵抗和不恰当剂量或服用周期有

■研发前沿
国际上对于难治性GERD的研究者, 都致力于发现难治性反流性食管炎在食管组织活检中, 具有特异性以及敏感性的病理特征以及诊断标准, 而细胞间隙扩大与PPIs治疗效果的相关性正逐渐成为本病病理学基础的研究热点。

■ 相关报道

有研究发现，在2次/d服用PPIs的难治性GERD患者中，有75%的患者在24 h食管pH值监测过程中出现夜间酸突破(NAB)，说明NAB很可能与本病发病的一个重要原因。

关^[22]。后者(如并非在餐前30-60 min服用)往往会影响药代动力学和药效。生理水平的酸反流造成症状也会产生不适，这也是解释部分GERD患者对PPIs治疗不应答的一种可能性。当症状指标和症状出现概率说明了其与酸反流事件之间的关系时，上述这一现象就可以在进行食管pH值监测时被说明。而且，酸反流很可能在常规的pH值监测中未能被发现，因为导管在吃饭和活动中的相关限制会阻止酸反流在检查期间出现，从而给出一个错误的阴性结果^[23]。

阴性的食管pH值监测结果并不能完全排除服用PPIs患者的潜在酸反流的可能。最近一些有关无线食管pH值监测研究发现了每日的症状差异并为检测PPIs治疗与否的差异提供了可能性^[24]。但仍需要时间跨度更长的研究来证明4 d的食管pH值检测对诊断PPIs抵抗患者的酸反流情况的价值。

在常规的pH研究中，食管pH检测电极一般被放置在食管下端括约肌近端上5 cm的位置。而这一常规设置是为了防止电极在吞咽过程中不慎滑入胃中。然而，最近的一些研究^[25-27]发现，酸反流只在食管局部的一小段发作。在鳞状柱状上皮接合处以上的部分并未在常规pH监测研究中被发现。这一现象可能是由PPIs的治疗抵抗而产生的反流症状的一个重要原因。要正确评估PPIs标准剂量治疗下GERD症状的持续存在和食管下端短区域胃食管反流之间的联系以及其临床关联性，尚需要更加深层次的研究。

4 质子泵抑制剂试验

具有典型GERD症状的患者在对标准剂量PPIs和双倍剂量治疗无应答的情况下，需要进行诊断性治疗。很多GERD患者具有诸如非心源性胸痛或慢性咽炎之类的非典型性症状，PPIs的治疗更频繁的使用在这类患者的诊断试验^[28,29]。具有典型症状的患者需要持续治疗30 d，而非典型症状的患者需要一个周期更长的PPIs治疗试验。对治疗试验缺乏应答，可能和患者的依从性、治疗剂量、治疗周期和PPIs的种类有关。但即使是阴性结果也不能排除GERD的可能，患者很可能需要更加全面的检查。

5 食管阻抗-pH值监测

PPIs治疗下的持续的典型或非典型GERD症状很可能是由于少量的酸性或非酸性反流。在pH值监测的基础上，加入腔内阻抗技术，可以发现大多数的反流事件以及酸性、弱酸性弱碱性反

流之间的区别。

在服用PPIs患者的餐后阻抗-pH值研究中，可以发现酸反流显著减少，但同时会伴有持续的餐后弱酸性胃内容物反流。在酸抑制治疗期间，反胃也代替胸痛成为了最为主要的症状^[30]。有一些使用便携式24 h阻抗-pH值监测仪的研究发现难治性GERD患者，与酸反流有关的症状占7%-28%，与弱酸反流有关的症状占30%-40%，与反流无关的症状占30%-60%^[31-33]。

最近一项研究^[34]，针对39例难治性GERD患者分别在服用PPIs(2次/d)的情况下进行24 h食管内阻抗pH值监测(MII-pH)和不服用PPIs的情况下进行无线食管内pH值监测。在PPIs治疗下，所有患者的食管酸暴露情况均呈现正常状态，64%的患者其弱酸反流及碱性反流的阻抗参数正常。这一数据说明弱酸反流和碱性反流也是产生GERD症状的原因。在PPIs治疗下，MII-pH监测结果异常的患者中，有93%在未经治疗的情况下监测到异常的食管酸暴露。而且，相对于食管阻抗检查正常的患者，检查出有异常弱酸反流及碱性反流的患者更有可能产生更加严重的异常食管酸暴露。

不明原因的久咳往往有可能是由GERD病造成的。很多患者在呼吸科经过PPIs治疗后并未取得满意的效果。PPIs治疗下依然出现持续久咳的患者很可能是由于弱酸反流导致，这一现象只在阻抗-pH值监测中可能被发现^[35]。迄今为止的研究表明，24 h阻抗-pH值监测可以增加服用PPIs患者持续反胃及咳嗽的检测敏感度。而弱酸反流在难治性非心源性胸痛中所起到的作用目前尚未非常明确。

6 食管胆红素监测

食管胆汁监测仪可以检测反流的胆红素，而胆红素本身就是胆汁反流的替代标记。需要注意的是，非酸反流和胆汁反流是两个截然不同的概念。最近一项研究对20位难治性GERD患者的胆红素监测和食管pH阻抗监测结果进行了评估^[36]，其中有9例患者出现异常十二指肠胃食管反流，而这9例患者中6例非酸反流指标正常，这就说明，这两种反流之间没有必然的联系。

有证据可以证明，食管暴露在胆酸环境下可以导致胸痛。如，用非酸pH值的胆盐溶液灌注食管，可以刺激引起胸痛^[37]。而且，将兔食管黏膜暴露在含有胆酸的弱酸溶液下会导致黏膜通透性增加以及诱发DIS^[38]。

有一项研究^[39]说明了在常规pH值监测过程中增加胆红素监测的意义, 此研究对347例已经做过pH值监测的患者进行食管胆红素监测, 研究过程中患者在持续服用PPIs情况下(28%是减半剂量, 67%是标准剂量, 5%是双倍剂量)依然出现持续典型(53%)或非典型(75%)GERD症状。结果在单独监测pH值基础上增加了胆红素检测后, 出现异常结果的比例, 减半剂量患者从38%提升到了69%, 标准剂量患者从27%提升到了69%, 双倍剂量患者从0%提升到了38%。

大多数研究更多的关注于在难治性GERD患者进行PPIs治疗期间, 针对不同的反流模式进行比较。然而, 不管是酸性反流、非酸性反流亦或是胆汁反流, 是否是PPIs治疗失败的唯一原因, 是否是普遍存在于所有PPIs治疗下的患者中, 这些研究都无法完全给予解释。如果要回答这个问题, 则必须针对同等剂量服用PPIs的患者, 分别出现应答和不应答的情况, 比较这两种患者的反流模式。最近一项研究^[40]对24例治疗不应答以及23例治疗完全应答的患者(1次/d服用PPIs), 在其治疗期间都进行食管胆红素监测以及食管pH值监测, 结果在完全应答的患者中, 82%出现了异常的十二指肠胃食管反流, 而在不应答的患者中为67%, 两者差异无统计学意义。实际上, 2组患者所有的pH值监测和胆红素监测结果都比较相似。然而, 胃食管反流相关症状在未应答组中与酸反流有更加普遍的联系, 而并非是十二指肠胃食管反流。这一研究也首次说明了PPIs治疗应答与不应答的患者有着相似程度的胆汁暴露和酸暴露, 而且, 在PPIs(1次/d)治疗失败的患者中, 酸反流依然是症状发生的根源所在。

7 结论

在临床中, 患者出现PPIs治疗抵抗而导致反流症状不能消除是常见的现象, 其常规的诊断方法包括胃镜和PPIs治疗期间的便携式食管pH值监测。胃镜以及食管活检可以发现GERD组织学的改变并为症状的持续存在从组织改变上提供一定的依据, 在组织结构学上找到相关病因。食管pH值监测可以发现绝大多数的酸反流事件, 可以在反流症状和反流事件之间建立一定的相关性, 但依然无法完全分辞性反流和病理反流, 且对靠近贲门处的局部反流事件的监测存在盲区。诊断难治性GERD的新技术在近年来已经开始出现, 食管阻抗-pH值监测可以发现PPIs难以

应答的弱酸反流和弱碱反流, 对检测导致反胃和咳嗽的持续弱酸反流有着相当高的敏感度。食管胆红素监测可以发现持续增加的食管胆汁暴露。难治性GERD由于其症状的特殊性, 可能在诊断上与其他内科疾病存在着重叠的, 在应用PPIs治疗失败后, 需要通过进一步的诊察方法明确其诊断, 查找病因以鉴别诊断, 并对症治疗。

■应用要点

难治性GERD的诊断方法有很多种, 而且对于此方面的研究也在不断的深入, 对于不同的病情, 准确的判断应用何种方法来明确患者病因, 将为临床治疗打下基础。

8 参考文献

- Vakil N, van Zanten SV, Kahrilas P, Dent J, Jones R. The Montreal definition and classification of gastroesophageal reflux disease: a global evidence-based consensus. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 1900-1920; quiz 1943
- Dent J, El-Serag HB, Wallander MA, Johansson S. Epidemiology of gastro-oesophageal reflux disease: a systematic review. *Gut* 2005; 54: 710-717
- Fass R, Sifrim D. Management of heartburn not responding to proton pump inhibitors. *Gut* 2009; 58: 295-309
- 蓝宇, 张灵云. 胃食管反流病检测方法的进展. 世界华人消化杂志 2010; 18: 2071-2076
- Bautista JM, Wong WM, Pulliam G, Esquivel RF, Fass R. The value of ambulatory 24 hr esophageal pH monitoring in clinical practice in patients who were referred with persistent gastroesophageal reflux disease (GERD)-related symptoms while on standard dose anti-reflux medications. *Dig Dis Sci* 2005; 50: 1909-1915
- Lichtenstein DR, Cash BD, Davila R, Baron TH, Adler DG, Anderson MA, Dominitz JA, Gan SI, Harrison ME, Ikenberry SO, Qureshi WA, Rajan E, Shen B, Zuckerman MJ, Fanelli RD, VanGuilder T. Role of endoscopy in the management of GERD. *Gastrointest Endosc* 2007; 66: 219-224
- Poh CH, Gasiorowska A, Navarro-Rodriguez T, Willis MR, Hargadon D, Noelck N, Mohler J, Wendel CS, Fass R. Upper GI tract findings in patients with heartburn in whom proton pump inhibitor treatment failed versus those not receiving antireflux treatment. *Gastrointest Endosc* 2010; 71: 28-34
- Lacy BE, O'Shara T, Hynes M, Kelley ML, Weiss JE, Paquette L, Rothstein RI. Safety and tolerability of transoral Bravo capsule placement after transnasal manometry using a validated conversion factor. *Am J Gastroenterol* 2007; 102: 24-32
- Armstrong D, Bennett JR, Blum AL, Dent J, De Dombal FT, Galmiche JP, Lundell L, Margulies M, Richter JE, Spechler SJ, Tytgat GN, Wallin L. The endoscopic assessment of esophagitis: a progress report on observer agreement. *Gastroenterology* 1996; 111: 85-92
- van Malenstein H, Farré R, Sifrim D. Esophageal dilated intercellular spaces (DIS) and nonerosive reflux disease. *Am J Gastroenterol* 2008; 103: 1021-1028
- Caviglia R, Ribolsi M, Maggiano N, Gabbielli AM, Emerenziani S, Guarino MP, Carotti S, Habib FI, Rabitti C, Cicala M. Dilated intercellular spaces of esophageal epithelium in nonerosive reflux disease patients with physiological esophageal acid exposure. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 543-548
- Pandak WM, Arezo S, Everett S, Jesse R, DeCosta G, Crofts T, Gennings C, Siuta M, Zfass A. Short course of omeprazole: a better first diagnostic ap-

■同行评价

本文研究内容应用性较强，阐述清晰，结合临床，有一定的指导意义。

- proach to noncardiac chest pain than endoscopy, manometry, or 24-hour esophageal pH monitoring. *J Clin Gastroenterol* 2002; 35: 307-314
- 13 Takubo K, Honma N, Aryal G, Sawabe M, Arai T, Tanaka Y, Mafune K, Iwakiri K. Is there a set of histologic changes that are invariably reflux associated? *Arch Pathol Lab Med* 2005; 129: 159-163
- 14 Zentilin P, Savarino V, Mastracci L, Spaggiari P, Dulbecco P, Ceppa P, Savarino E, Parodi A, Mansi C, Fiocca R. Reassessment of the diagnostic value of histology in patients with GERD, using multiple biopsy sites and an appropriate control group. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 2299-2306
- 15 Barlow WJ, Orlando RC. The pathogenesis of heartburn in nonerosive reflux disease: a unifying hypothesis. *Gastroenterology* 2005; 128: 771-778
- 16 Ravelli AM, Villanacci V, Ruzzenenti N, Grigolato P, Tobanelli P, Klersy C, Rindi G. Dilated intercellular spaces: a major morphological feature of esophagitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2006; 42: 510-515
- 17 Calabrese C, Bortolotti M, Fabbri A, Areni A, Cenacchi G, Scialpi C, Miglioli M, Di Febo G. Reversibility of GERD ultrastructural alterations and relief of symptoms after omeprazole treatment. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 537-542
- 18 Johnsson F, Hatlebakk JG, Klintenberg AC, Román J. Symptom-relieving effect of esomeprazole 40 mg daily in patients with heartburn. *Scand J Gastroenterol* 2003; 38: 347-353
- 19 Kara MA, Peters FP, Ten Kate FJ, Van Deventer SJ, Fockens P, Bergman JJ. Endoscopic video autofluorescence imaging may improve the detection of early neoplasia in patients with Barrett's esophagus. *Gastrointest Endosc* 2005; 61: 679-685
- 20 Farré R, Fornari F, Blondeau K, Vieth M, De Vos R, Bisschops R, Mertens V, Pauwels A, Tack J, Sifrim D. Acid and weakly acidic solutions impair mucosal integrity of distal exposed and proximal non-exposed human oesophagus. *Gut* 2010; 59: 164-169
- 21 Hirano I, Richter JE. ACG practice guidelines: esophageal reflux testing. *Am J Gastroenterol* 2007; 102: 668-685
- 22 Fass R. Proton-pump inhibitor therapy in patients with gastro-oesophageal reflux disease: putative mechanisms of failure. *Drugs* 2007; 67: 1521-1530
- 23 Richter JE. The patient with refractory gastroesophageal reflux disease. *Dis Esophagus* 2006; 19: 443-447
- 24 Hirano I, Zhang Q, Pandolfino JE, Kahrilas PJ. Four-day Bravo pH capsule monitoring with and without proton pump inhibitor therapy. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2005; 3: 1083-1088
- 25 Dickman R, Bautista JM, Wong WM, Bhatt R, Beeler JN, Malagon I, Risner-Adler S, Lam KF, Fass R. Comparison of esophageal acid exposure distribution along the esophagus among the different gastroesophageal reflux disease (GERD) groups. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 2463-2469
- 26 Fletcher J, Wirz A, Henry E, McColl KE. Studies of acid exposure immediately above the gastro-oesophageal squamocolumnar junction: evidence of short segment reflux. *Gut* 2004; 53: 168-173
- 27 Pandolfino JE, Zhang Q, Ghosh SK, Post J, Kwiatek M, Kahrilas PJ. Acidity surrounding the squamo-columnar junction in GERD patients: "acid pocket" versus "acid film". *Am J Gastroenterol* 2007; 102: 2633-2641
- 28 DeVault K. A BALANCING VIEW: Empiric PPI therapy remains the champ, but not by a knock out! *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 10-11
- 29 Wang WH, Huang JQ, Zheng GF, Wong WM, Lam SK, Karlberg J, Xia HH, Fass R, Wong BC. Is proton pump inhibitor testing an effective approach to diagnose gastroesophageal reflux disease in patients with noncardiac chest pain?: a meta-analysis. *Arch Intern Med* 2005; 165: 1222-1228
- 30 Vela MF, Camacho-Lobato L, Srinivasan R, Tutuian R, Katz PO, Castell DO. Simultaneous intraesophageal impedance and pH measurement of acid and nonacid gastroesophageal reflux: effect of omeprazole. *Gastroenterology* 2001; 120: 1599-1606
- 31 Mainie I, Tutuian R, Shay S, Vela M, Zhang X, Sifrim D, Castell DO. Acid and non-acid reflux in patients with persistent symptoms despite acid suppressive therapy: a multicentre study using combined ambulatory impedance-pH monitoring. *Gut* 2006; 55: 1398-1402
- 32 Shay SS, Bomeli S, Richter J. Multichannel intraluminal impedance accurately detects fasting, recumbent reflux events and their clearing. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 283: G376-G383
- 33 Zerbib F, Roman S, Ropert A, des Varannes SB, Pouderoux P, Chaput U, Mion F, Vérin E, Galmiche JP, Sifrim D. Esophageal pH-impedance monitoring and symptom analysis in GERD: a study in patients off and on therapy. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 1956-1963
- 34 Pritchett JM, Aslam M, Slaughter JC, Ness RM, Garrett CG, Vaezi MF. Efficacy of esophageal impedance/pH monitoring in patients with refractory gastroesophageal reflux disease, on and off therapy. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2009; 7: 743-748
- 35 Blondeau K, Dupont LJ, Mertens V, Tack J, Sifrim D. Improved diagnosis of gastro-oesophageal reflux in patients with unexplained chronic cough. *Aliment Pharmacol Ther* 2007; 25: 723-732
- 36 Pace F, Sangaletti O, Pallotta S, Molteni P, Porro GB. Biliary reflux and non-acid reflux are two distinct phenomena: a comparison between 24-hour multi-channel intraesophageal impedance and bilirubin monitoring. *Scand J Gastroenterol* 2007; 42: 1031-1039
- 37 Siddiqui A, Rodriguez-Stanley S, Zubaidi S, Miner PB. Esophageal visceral sensitivity to bile salts in patients with functional heartburn and in healthy control subjects. *Dig Dis Sci* 2005; 50: 81-85
- 38 Thompson JK, Koehler RE, Richter JE. Detection of gastroesophageal reflux: value of barium studies compared with 24-hr pH monitoring. *AJR Am J Roentgenol* 1994; 162: 621-626
- 39 Karamanolis G, Vanuytsel T, Sifrim D, Bisschops R, Arts J, Caenepeel P, Dewulf D, Tack J. Yield of 24-hour esophageal pH and bilitec monitoring in patients with persisting symptoms on PPI therapy. *Dig Dis Sci* 2008; 53: 2387-2393
- 40 Gasiorowska A, Navarro-Rodriguez T, Wendel C, Krupinski E, Perry ZH, Koenig K, Moty B, Powers J, Fass R. Comparison of the degree of duodenogastroesophageal reflux and acid reflux between patients who failed to respond and those who were successfully treated with a proton pump inhibitor once daily. *Am J Gastroenterol* 2009; 104: 2005-2013

编辑 曹丽鸥 电编 闫晋利

肥大细胞在肠易激综合征发病机制中的研究进展

罗和生, 赵运志, 张法灿, 张国

罗和生, 赵运志, 武汉大学人民医院消化内科 湖北省武汉市 430060

赵运志, 张法灿, 张国, 广西壮族自治区人民医院消化内科 广西壮族自治区南宁市 530021

罗和生, 主任医师, 博士生导师, 教授, 主要从事消化内科方面的研究.

国家自然科学基金资助项目, No. 81160053

作者贡献分布: 本文综述由罗和生指导; 赵运志完成; 罗和生与张国修改; 张法灿审校.

通讯作者: 张法灿, 教授, 主任医师, 530021, 广西壮族自治区南宁市, 广西壮族自治区人民医院消化内科. zhangfacan@126.com 电话: 0771-2186184

收稿日期: 2012-03-29 修回日期: 2012-05-20

接受日期: 2012-06-16 在线出版日期: 2012-07-08

Progress in understanding the role of mast cells in the pathogenesis of irritable bowel syndrome

He-Sheng Luo, Yun-Zhi Zhao, Fa-Can Zhang,
Guo Zhang

He-Sheng Luo, Yun-Zhi Zhao, Department of Gastroenterology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei Province, China

Yun-Zhi Zhao, Fa-Can Zhang, Guo Zhang, Department of Gastroenterology, the People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 81160053

Correspondence to: Fa-Can Zhang, Professor, Department of Gastroenterology, the People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. zhangfacan@126.com

Received: 2012-03-29 Revised: 2012-05-20

Accepted: 2012-06-16 Published online: 2012-07-08

Abstract

Irritable bowel syndrome (IBS) is a common functional gastrointestinal disorder characterized by abdominal pain/discomfort and changes in bowel habit. The global prevalence of IBS is 2%-15%. The etiology and pathogenesis of IBS are still unclear. It is currently believed that a variety of factors, such as abnormal gastrointestinal motility, visceral hypersensitivity, infection and inflammation, neuro-endocrine maladjustment, mental or psychological causes, and food allergy, may contribute to the development of IBS. The "neuro-immuno-endocrine network" hypothesis has been proposed in recent years

to explain the pathogenesis of IBS. Mast cells in the digestive tract play an important role in the pathogenesis of IBS. In this article, we will review the recent advances in understanding the role of mast cells plays in the pathogenesis of IBS.

Key Words: Irritable bowel syndrome; Mast cells; Pathogenesis

Luo HS, Zhao YZ, Zhang FC, Zhang G. Progress in understanding the role of mast cells in the pathogenesis of irritable bowel syndrome. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(19): 1747-1751

摘要

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)是以腹痛、腹部不适伴排便习惯改变和/或大便性状异常为特征的常见功能性胃肠病. IBS全球患病率为2%-15%. 本病病因及发病机制尚不十分明确, 目前认为多与胃肠动力异常、内脏高敏、感染与炎症、神经-内分泌失调、精神心理、食物过敏等多种因素有关. 近年来提出的“神经-免疫-内分泌网络”理论在IBS发病机制中占有重要地位. 研究发现, 胃肠道的肥大细胞(mast cells, MCs)在IBS的发病中发挥着重要作用. 本文拟以MCs在IBS中的发病机制的最新研究进展作一综述.

关键词: 肠易激综合征; 肥大细胞; 发病机制

罗和生, 赵运志, 张法灿, 张国. 肥大细胞在肠易激综合征发病机制中的研究进展. 世界华人消化杂志 2012; 20(19): 1747-1751
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1747.asp>

0 引言

肥大细胞(mast cells, MCs)来源于骨髓造血干细胞, 主要分布于与外界相通的皮肤、气道和消化系^[1-5]. 在慢性、持续性炎症时, MCs的数量增加, 表型活化^[6]. MCs是消化系内重要的免疫活性细胞, 也是肠道主要的抗原感受器, 参与肠黏膜的免疫应答与调节. 其胞质中含有大量的内分泌颗粒, 对刺激应答时可以合成、释放颗粒内多种生物活性介质和因子, 如组胺、5-羟

■背景资料

近年来, 人们对肠易激综合征(IBS)的病因和发病机制进行了大量的研究, 发现肥大细胞(MCs)在其中扮演着极其重要的角色. 目前, MCs与肠易激综合征之间的密切分子机制仍不清楚、因果关系尚不明确.

■同行评议者
潘秀珍, 教授, 主任医师, 福建省立医院消化科

■相关报道

大量研究发现, IBS患者结肠MCs数目及活化水平显著升高, 且与相关症状严重程度呈正相关, 此外类胰蛋白酶在其中的作用也已被证实, 类胰蛋白酶抑制剂的研究显示出积极的意义.

色胺、类胰蛋白酶(tryptase)、前列腺素、白三烯、血小板活化因子和细胞因子等^[7], 通过这些活性介质的广泛作用, MCs在神经和免疫机制之间起到重要的沟通作用: 包括炎症和黏膜的免疫生理、产生大量多功能生物化学介质、与神经免疫的联系和脑-肠轴的关系、肠道高敏感性、胃肠动力紊乱等^[8]. 研究表明, IBS患者结肠MCs增多, 细胞脱颗粒明显增加, 并与IBS患者的腹痛、腹胀等症状相关^[9]. 因此, 对MCs在IBS中的深入了解显得尤为重要.

1 相应部位肥大细胞数量的增加与活化

MCs在胃肠道分布广泛, 而早在50年前, Spiller等^[10]在经外科手术获取的IBS患者结肠标本中检测到增多的肥大细胞. Weston等^[11]在1993年报道过IBS患者回肠末端黏膜固有层MCs数目增多, 使得人们开始意识到MCs的改变可能在IBS中起到重要作用. 2005年姜敏等^[12]在对IBS患者及正常组回盲部和直肠乙状结肠交界部MCs的分布特点和数量观察中发现, IBS组回盲部MCs计数明显增多, 其中以腹泻型IBS患者增加更加明显. 两处均可见明显MCs脱颗粒现象. Barbara等^[13,14]的两项研究均表明MCs在结肠的高浓度及活化程度与腹痛的严重程度有关, Piche等^[15]2008年对IBS患者、正常对照组和疲劳抑郁症患者的结肠活检显示IBS患者MCs数量的明显增加, 是盲肠低度炎症浸润的关键指征, 并且与焦虑抑郁程度显著相关. Wang等^[16]对IBS患者小肠MCs进行了相关探讨, 结果显示除末端回肠MCs明显增加外, 与正常组无明显差异, 而正是这种改变导致IBS相关症状. 以上研究我们可以发现MCs的异常表达在IBS进展上起着关键作用.

2 类胰蛋白酶

类胰蛋白酶贮存在MCs胞质的小颗粒内, 是MCs中重要的生物活性分子, 是其激活脱颗粒的特异性标志^[17]. 类胰蛋白酶通过刺激外周血T细胞、单核细胞和气道上皮细胞释放IL-6、TNF- α 、IL-1 β 、IL-8和GM-CSF等众多细胞因子, 直接或间接募集、激活嗜酸性粒细胞和中性粒细胞等炎症细胞, 增加血管通透性、诱导炎性细胞浸润、刺激上皮细胞增生^[18]; 其次类胰蛋白酶本身也具有激活MCs的作用^[19]. 在体内, 类胰蛋白酶激活蛋白酶活化受体-2(protease-activated receptor 2, PAR-2), 通过促细胞分裂活化蛋白激酶(MAPK)信号通路, 促进细胞异常增生及结构改变^[20,21]. 实验证实结肠内广泛存在

PAR-2阳性的神经元^[22], 在IBS类胰蛋白酶通过肠黏膜细胞表面PAR-2的活化, 可增加细胞通透性^[23]; PAR-2阳性的伤害感受神经元, 作为传入神经终止于脊髓背角, 在PAR-2激活后可释放传递伤害性信息神经递质P物质(substance P, SP)和降钙素基因相关肽(calcitonin gene related peptide, CGRP)^[24-26], 导致内脏高敏感性的发生. 此外, PAR-2的活化可导致结肠低度炎症迁延存在, 肠道黏膜渗透性的增加, 炎症细胞包括MCs的浸润, 反过来使类胰蛋白酶表达增加, 使伤害感受神经元持续兴奋, 导致IBS症状反复^[27,28]. Vivinus-Nébot等^[29]研究结果表明, IBS患者MCs的数量及胰蛋白酶的分泌明显增加, 并决定着患者病症的严重程度. MCs的活化及其脱颗粒、类胰蛋白酶的释放是引起IBS的重要原因.

3 肥大细胞在脑肠轴中的作用

近年来许多研究证明中枢神经系统在多个水平参与信号通路调节而影响胃肠运动, 参与IBS的发病过程^[30,31]. 有研究表明, IBS患者对外周刺激表现出中枢的高反应性, 同时对中枢的应激事件表现出内脏的高敏感性^[32]. Newson等^[33]、Stead等^[34]、Bauer等^[35]3项研究均发现MCs与胃肠黏膜的神经纤维联系紧密, 提示MCs在IBS的病理生理过程中可能发挥着重要的作用, 在肠道和神经系统之间可能是他们相互联系和相互影响的一种中间媒介. 杨云生等^[36]应用组织化学染色法检测了19名正常人及20例IBS患者回盲部MCs的计数, 同时应用免疫组织化学和电镜观察研究MCs与神经纤维的关系. 结果显示IBS患者回盲部MCs计数明显增多; 神经纤维与MCs密切毗邻, 相邻的神经纤维多是无髓神经纤维. 无髓神经纤维是内脏的传入纤维, 主要传导内脏的慢痛. Park等^[37]通过电镜对14名腹泻型IBS-D患者和14名正常人结肠与直肠活检标本MCs观察发现, 除了MCs数量明显增加外, 在肠神经附近活化MCs明显多于其他部位. 来自MCs的组胺、5-HT、血小板活化因子、前列腺素、细胞因子和白三烯等活性物质有激活内脏传入神经的潜能^[38], 可能通过作用于肠神经系统, 产生胃肠道不适症状和高敏感性^[39]. 有证据表明肠MCs同时受到中枢神经系统的支配^[40-42], 当一些精神心理因素如焦虑、抑郁等便会造成肠道动力及分泌异常、内脏高敏感性等外周情况. 脑干兴奋神经元通过释放促甲状腺激素释放激素(thyrotropin-releasing hormone, TRH)激发小鼠黏

■创新盘点

本文阐述了MCs在IBS发病中的作用, 将各方面理论观点联系起来, 更好的集中说明相关问题.

膜MCs脱颗粒进一步证明中枢系统与MCs之间的紧密联系^[43]。Levy等^[44]的实验也证实, 通过诱导MCs脱颗粒可直接作用于背侧角神经元, 造成疼痛及感觉高敏感。并且与神经节部位相一致, Barbara等^[13]也发现肠神经纤维毗邻部位的MCs数目与IBS患者腹痛频率和程度呈正相关, 认为MCs的浸润和介质释放与IBS患者腹痛感觉高敏有关。

4 肥大细胞与感染免疫

有研究表明, 在感染性胃肠炎患者中, 有相当一部分会发展为IBS^[45-47], 即感染后IBS(post-infective IBS, PI-IBS), 说明肠道感染在IBS的发病机理中起重要作用。1997年Neal等^[48]对544例急性胃肠炎患者进行随访发现, 在急性肠道感染6 mo后肠功能紊乱发生率是25%, 即使在清除病原体及肠黏膜炎症消退之后, 仍有患者存在IBS样症状。胃肠道黏膜是人体内接触外界抗原面积最大的屏障体系, 它和存在于肠道黏膜层及黏膜固有层的大量免疫细胞共同抵御微生物、大分子抗原物质及其他有害物质的入侵。而在肠道通透性改变和黏膜免疫上, MCs及其产物发挥了重要作用^[49]。一项对PI-IBS患者的研究发现^[50], 患者末端回肠和直肠乙状结肠MCs数目与正常组比较明显增多、活化, 5-HT阳性迷走神经纤维密度亦明显增加, 且与MCs联系紧密。MCs活化分数与IBS患者的症状指数呈正相关, 即MCs活化分数越高, 症状指数也越高。MCs可被细菌、寄生虫或食物抗原等诱导合成和释放具有生物活性的组胺、5-HT、胰蛋白酶、前列腺素、白三烯等介质, 这些物质大多具致痛作用, 可能与IBS患者对消化系痛觉的高敏感性有关^[14], 而组胺、5-HT分别作用于肠黏膜及肠平滑肌上的相应受体, 可影响到胃肠道的分泌和运动, 增加肠黏膜通透性和高敏感^[51-53]。近年来提出, 肠道感染后, 肠道黏膜炎症影响局部免疫-神经-内分泌网络, 并引起IBS症状, 但是具体机制仍不明确。针对MCs、5-HT、SP与CGRP等这些参与免疫-神经-内分泌网络机制的关键性因子, 研究他们之间的联系有着重大的意义。

5 相应干预方法的研究

近年来, 随着对MCs在IBS发病机制重要性的认识逐渐深入, 针对MCs干预方法的探讨研究也逐渐受到关注。早在1980年, Bolin等^[54]在其研究中发现与对照组相比, 40%的IBS患者在使用色甘酸钠后症状有明显改善。Lunardi等^[55]、Stefanini

等^[56]的研究也证实色甘酸钠可缓解IBS腹痛和腹部不适症状。但上述研究由于样本量较少, 试验设计不够严谨(如无对照组、未遵循盲法、治疗时间过短、缺乏后期随访)。Klooster等^[57]通过对60例IBS患者随机分组, 分别给予酮替芬和安慰剂治疗, 结果显示酮替芬可明显改善内脏敏感性IBS患者的IBS症状, 提高生活质量。在一项随机、双盲、安慰剂对照实验中, 与安慰剂相比, 美沙拉嗪能显著降低免疫细胞特别是抑制肥大细胞, 同时观察到患者整体状况的改善及腹痛的减轻, 尽管尚未达到统计学意义^[58]。而对肥大细胞分泌活性介质的拮抗剂(类胰蛋白酶抑制剂^[20]、抗组胺剂^[59]、抗白三烯药物^[60]、布地奈德等^[61])的研究也显示有着极大前景。在中药方面, 胡瑞等^[62]的研究表明与IBS-D型模型组大鼠相比, 模型组血清5-HT、NO水平下降, SP含量增加、MCs数目增多; 高、中剂量胃肠安丸可上调血清5-HT、NO水平; 下调SP表达、减少MCs数目。据此推测, 胃肠安丸止泻的机制可能与其调节5-HT、NO水平, 进而参与调整胃肠动力有关; 亦可能通过抑制SP表达、减少MCs数目, 从而降低内脏高敏感性。对中药在IBS的疗效进一步研究可能开辟新的治疗途径。

6 结论

IBS患者肠黏膜MCs的数目和脱颗粒功能的改变, 并由此影响局部肠黏膜类胰蛋白酶、5-HT浓度和其他可能与内脏感觉调控相关的介质水平, 并可能在PI-IBS内脏高敏感, 免疫应答的发生中发挥一定作用。对肠黏膜MCs及其分泌的活性介质功能的研究, 特别是其参与将有助于揭示IBS发病机制的核心环节, 并由此推动治疗IBS的相关药物的研究进展。而MCs与神经-免疫-内分泌系统间的联系将是以后研究的热点。

7 参考文献

- Barbara G, Cremon C, Carini G, Bellacosa L, Zecchi L, De Giorgio R, Corinaldesi R, Stanghellini V. The immune system in irritable bowel syndrome. *J Neuropathol Exp Neurol* 2011; 71: 349-359
- Choung RS, Locke GR. Epidemiology of IBS. *Gastroenterol Clin North Am* 2011; 40: 1-10
- Barbara G, De Giorgio R, Stanghellini V, Cremon C, Salvioli B, Corinaldesi R. New pathophysiological mechanisms in irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 20 Suppl 2: 1-9
- Galli SJ, Grimaldi M, Tsai M. Immunomodulatory mast cells: negative, as well as positive, regulators of immunity. *Nat Rev Immunol* 2008; 8: 478-486
- Metz M, Siebenhaar F, Maurer M. Mast cell functions in the innate skin immune system. *Immunobiol*

■应用要点
IBS发病机制尚不十分明确, 临床多采用对症治疗。随着人们对MCs在IBS发病中发挥作用更为深入的认识, 各种针对MCs作用新型药物的研制开发可能会给IBS患者带来福音。

■ 同行评价

本文立题有依据，内容集中，观点明确，阐明了MCs在IBS发病中的作用，对临床IBS发病机制的研究和临床治疗有一定参考意义。

- ology 2008; 213: 251-260
- 6 Taylor ML, Metcalfe DD. Mast cells in allergy and host defense. *Allergy Asthma Proc* 2001; 22: 115-119
 - 7 陈丽珠, 王承党. 肥大细胞相关介质在肠易激综合征发病机制中的作用. 国际消化病杂志 2010; 30: 325-328
 - 8 Gui XY. Mast cells: a possible link between psychological stress, enteric infection, food allergy and gut hypersensitivity in the irritable bowel syndrome. *J Gastroenterol Hepatol* 1998; 13: 980-989
 - 9 Park JH, Rhee PL, Kim HS, Lee JH, Kim YH, Kim JJ, Rhee JC. Mucosal mast cell counts correlate with visceral hypersensitivity in patients with diarrhea predominant irritable bowel syndrome. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21: 71-78
 - 10 Spiller R, Garsed K. Infection, inflammation, and the irritable bowel syndrome. *Dig Liver Dis* 2009; 41: 844-849
 - 11 Weston AP, Biddle WL, Bhatia PS, Miner PB. Terminal ileal mucosal mast cells in irritable bowel syndrome. *Dig Dis Sci* 1993; 38: 1590-1595
 - 12 姜敏, 李红菊, 汤浩, 张义侠, 傅宝玉. 肥大细胞在肠易激综合征患者结肠的分布特点及其作用. 中国医科大学学报 2005; 34: 335-336
 - 13 Barbara G, Stanghellini V, De Giorgio R, Cremon C, Cottrell GS, Santini D, Pasquinelli G, Morselli-Labate AM, Grady EF, Bunnett NW, Collins SM, Corinaldesi R. Activated mast cells in proximity to colonic nerves correlate with abdominal pain in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2004; 126: 693-702
 - 14 Barbara G, Wang B, Stanghellini V, de Giorgio R, Cremon C, Di Nardo G, Trevisani M, Campi B, Geppetti P, Tonini M, Bunnett NW, Grundy D, Corinaldesi R. Mast cell-dependent excitation of visceral-nociceptive sensory neurons in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2007; 132: 26-37
 - 15 Piche T, Saint-Paul MC, Dainese R, Marine-Barjoan E, Iannelli A, Montoya ML, Peyron JF, Czerucka D, Cherikh F, Filippi J, Tran A, Hébuterne X. Mast cells and cellularity of the colonic mucosa correlated with fatigue and depression in irritable bowel syndrome. *Gut* 2008; 57: 468-473
 - 16 Wang SH, Dong L, Luo JY, Gong J, Li L, Lu XL, Han SP. Decreased expression of serotonin in the jejunum and increased numbers of mast cells in the terminal ileum in patients with irritable bowel syndrome. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 6041-6047
 - 17 Abraham WM. Tryptase: potential role in airway inflammation and remodeling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002; 282: L193-L196
 - 18 Mullan CS, Riley M, Clarke D, Tatler A, Sutcliffe A, Knox AJ, Pang L. Beta-tryptase regulates IL-8 expression in airway smooth muscle cells by a PAR-2-independent mechanism. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2008; 38: 600-608
 - 19 He SH. Key role of mast cells and their major secretory products in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 309-318
 - 20 Cenac N, Andrews CN, Holzhausen M, Chapman K, Cottrell G, Andrade-Gordon P, Steinhoff M, Barbara G, Beck P, Bunnett NW, Sharkey KA, Ferraz JG, Shaffer E, Vergnolle N. Role for protease activity in visceral pain in irritable bowel syndrome. *J Clin Invest* 2007; 117: 636-647
 - 21 Yoshii M, Jikuhara A, Mori S, Iwagaki H, Takahashi HK, Nishibori M, Tanaka N. Mast cell tryptase stimulates DLD-1 carcinoma through prostaglandin- and MAP kinase-dependent manners. *J Pharmacol Sci* 2005; 98: 450-458
 - 22 Kayssi A, Amadesi S, Bautista F, Bunnett NW, Vanner S. Mechanisms of protease-activated receptor 2-evoked hyperexcitability of nociceptive neurons innervating the mouse colon. *J Physiol* 2007; 580: 977-991
 - 23 Jacob C, Yang PC, Darmoul D, Amadesi S, Saito T, Cottrell GS, Coelho AM, Singh P, Grady EF, Perdue M, Bunnett NW. Mast cell tryptase controls paracellular permeability of the intestine. Role of protease-activated receptor 2 and beta-arrestins. *J Biol Chem* 2005; 280: 31936-31948
 - 24 李兆申, 董文珠, 邹多武, 满晓华, 邹晓平, 尹宁, 朱爱勇. 肠易激综合征肠黏膜SP、VIP、CGRP变化的研究. 第二军医大学学报 2003; 24: 147-151
 - 25 La JH, Kim TW, Sung TS, Kim HJ, Kim JY, Yang IS. Role of mucosal mast cells in visceral hypersensitivity in a rat model of irritable bowel syndrome. *J Vet Sci* 2004; 5: 319-324
 - 26 Guilarte M, Santos J, de Torres I, Alonso C, Vicario M, Ramos L, Martínez C, Casellas F, Saperas E, Malagelada JR. Diarrhoea-predominant IBS patients show mast cell activation and hyperplasia in the jejunum. *Gut* 2007; 56: 203-209
 - 27 Cenac N, Garcia-Villar R, Ferrier L, Larauche M, Vergnolle N, Bunnett NW, Coelho AM, Fioramonti J, Bueno L. Proteinase-activated receptor-2-induced colonic inflammation in mice: possible involvement of afferent neurons, nitric oxide, and paracellular permeability. *J Immunol* 2003; 170: 4296-4300
 - 28 王承党, 郭朝书. 肥大细胞和类胰蛋白酶在腹泻型肠易激综合征升结肠黏膜中的表达及意义. 世界华人消化杂志 2010; 18: 1682-1686
 - 29 Vivinus-Nébot M, Dainese R, Anty R, Saint-Paul MC, Nano JL, Gonthier N, Marjoux S, Frin-Mathy G, Bernard G, Hébuterne X, Tran A, Theodorou V, Piche T. Combination of allergic factors can worsen diarrheic irritable bowel syndrome: role of barrier defects and mast cells. *Am J Gastroenterol* 2012; 107: 75-81
 - 30 Kraneveld AD, Rijnierse A, Nijkamp FP, Garssen J. Neuro-immune interactions in inflammatory bowel disease and irritable bowel syndrome: future therapeutic targets. *Eur J Pharmacol* 2008; 585: 361-374
 - 31 Ohman L, Simrén M. Pathogenesis of IBS: role of inflammation, immunity and neuroimmune interactions. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2010; 7: 163-173
 - 32 Fukudo S, Nomura T, Muranaka M, Taguchi F. Brain-gut response to stress and cholinergic stimulation in irritable bowel syndrome. A preliminary study. *J Clin Gastroenterol* 1993; 17: 133-141
 - 33 Newsom B, Dahlström A, Enerbäck L, Ahlman H. Suggestive evidence for a direct innervation of mucosal mast cells. *Neuroscience* 1983; 10: 565-570
 - 34 Stead RH, Dixon MF, Bramwell NH, Riddell RH, Bienenstock J. Mast cells are closely apposed to nerves in the human gastrointestinal mucosa. *Gastroenterology* 1989; 97: 575-585
 - 35 Bauer O, Razin E. Mast Cell-Nerve Interactions. *News Physiol Sci* 2000; 15: 213-218
 - 36 杨云生, 周殿元, 张万岱, 张振书, 宋于刚. 肠易激综合征回盲部肥大细胞的研究. 中华内科杂志 1997; 36: 231-233
 - 37 Park CH, Joo YE, Choi SK, Rew JS, Kim SJ, Lee MC. Activated mast cells infiltrate in close proximity to enteric nerves in diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *J Korean Med Sci* 2003; 18: 204-210
 - 38 Vergnolle N, Bunnett NW, Sharkey KA, Brussee

- V, Compton SJ, Grady EF, Cirino G, Gerard N, Basbaum AI, Andrade-Gordon P, Hollenberg MD, Wallace JL. Proteinase-activated receptor-2 and hyperalgesia: A novel pain pathway. *Nat Med* 2001; 7: 821-826
- 39 Grundy D, Al-Chaer ED, Aziz Q, Collins SM, Ke M, Taché Y, Wood JD. Fundamentals of neurogastroenterology: basic science. *Gastroenterology* 2006; 130: 1391-1411
- 40 Stead RH, Tomioka M, Quinonez G, Simon GT, Felten SY, Bienenstock J. Intestinal mucosal mast cells in normal and nematode-infected rat intestines are in intimate contact with peptidergic nerves. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84: 2975-2979
- 41 Williams RM, Berthoud HR, Stead RH. Vagal afferent nerve fibres contact mast cells in rat small intestinal mucosa. *Neuroimmunomodulation* 1997; 4: 266-270
- 42 Gottwald T, Lhoták S, Stead RH. Effect of truncal vagotomy and capsaicin on mast cells and IgA-positive plasma cells in rat jejunal mucosa. *Neurogastroenterol Motil* 1997; 9: 25-32
- 43 Santos J, Saperas E, Mourelle M, Antolín M, Malagelada JR. Regulation of intestinal mast cells and luminal protein release by cerebral thyrotropin-releasing hormone in rats. *Gastroenterology* 1996; 111: 1465-1473
- 44 Levy D, Kainz V, Burstein R, Strassman AM. Mast cell degranulation distinctly activates trigemino-cervical and lumbosacral pain pathways and elicits widespread tactile pain hypersensitivity. *Brain Behav Immun* 2012; 26: 311-317
- 45 Ji S, Park H, Lee D, Song YK, Choi JP, Lee SI. Post-infectious irritable bowel syndrome in patients with Shigella infection. *J Gastroenterol Hepatol* 2005; 20: 381-386
- 46 Spiller R, Garsed K. Postinfectious irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2009; 136: 1979-1988
- 47 Marshall JK, Thabane M, Garg AX, Clark WF, Moayyedi P, Collins SM. Eight year prognosis of postinfectious irritable bowel syndrome following waterborne bacterial dysentery. *Gut* 2010; 59: 605-611
- 48 Neal KR, Hebden J, Spiller R. Prevalence of gastrointestinal symptoms six months after bacterial gastroenteritis and risk factors for development of the irritable bowel syndrome: postal survey of patients. *BMJ* 1997; 314: 779-782
- 49 Ramsay DB, Stephen S, Borum M, Voltaggio L, Doman DB. Mast cells in gastrointestinal disease. *Gastroenterol Hepatol (N Y)* 2010; 6: 772-777
- 50 Wang LH, Fang XC, Pan GZ. Bacillary dysentery as a causative factor of irritable bowel syndrome and its pathogenesis. *Gut* 2004; 53: 1096-1101
- 51 Atkinson W, Lockhart S, Whorwell PJ, Keevil B, Houghton LA. Altered 5-hydroxytryptamine signaling in patients with constipation- and diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2006; 130: 34-43
- 52 Francis H, Glaser S, Demorrow S, Gaudio E, Ueno Y, Venter J, Dostal D, Onori P, Franchitto A, Marzoni M, Vaculin S, Vaculin B, Katki K, Stutes M, Savage J, Alpini G. Small mouse cholangiocytes proliferate in response to H1 histamine receptor stimulation by activation of the IP3/CaMK I/CREB pathway. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008; 295: C499-C513
- 53 Schneider E, Rolli-Derkinderen M, Arock M, Dy M. Trends in histamine research: new functions during immune responses and hematopoiesis. *Trends Immunol* 2002; 23: 255-263
- 54 Bolin TD. Use of oral sodium cromoglycate in persistent diarrhoea. *Gut* 1980; 21: 848-850
- 55 Lunardi C, Bambara LM, Biasi D, Cortina P, Peroli P, Nicolis F, Favari F, Pacor ML. Double-blind crossover trial of oral sodium cromoglycate in patients with irritable bowel syndrome due to food intolerance. *Clin Exp Allergy* 1991; 21: 569-572
- 56 Stefanini GF, Saggiaro A, Alvisi V, Angelini G, Capurso L, di Lorenzo G, Dobrilla G, Dodero M, Galimberti M, Gasbarrini G. Oral cromolyn sodium in comparison with elimination diet in the irritable bowel syndrome, diarrheic type. Multicenter study of 428 patients. *Scand J Gastroenterol* 1995; 30: 535-541
- 57 Klooster TK, Braak B, Koopman KE, Welting O, Wouters MM, van der Heide S, Schemann M, Bischoff SC, van den Wijngaard RM, Boeckxstaens GE. The mast cell stabiliser ketotifen decreases visceral hypersensitivity and improves intestinal symptoms in patients with irritable bowel syndrome. *Gut* 2010; 59: 1213-1221
- 58 Corinaldesi R, Stanghellini V, Cremon C, Gargano L, Cogliandro RF, De Giorgio R, Bartesaghi G, Canovi B, Barbara G. Effect of mesalazine on mucosal immune biomarkers in irritable bowel syndrome: a randomized controlled proof-of-concept study. *Aliment Pharmacol Ther* 2009; 30: 245-252
- 59 Jakate S, Demeo M, John R, Tobin M, Keshavarzian A. Mastocytic enterocolitis: increased mucosal mast cells in chronic intractable diarrhea. *Arch Pathol Lab Med* 2006; 130: 362-367
- 60 Fee WH. Irritable bowel syndrome helped by montelukast. *Chest* 2002; 122: 1497
- 61 Sokol H, Georghiou-Lavialle S, Grandpeix-Guyodo C, Canioni D, Barete S, Dubreuil P, Lortholary O, Beaugerie L, Hermine O. Gastrointestinal involvement and manifestations in systemic mastocytosis. *Inflamm Bowel Dis* 2010; 16: 1247-1253
- 62 胡瑞, 唐方. 胃肠安丸对IBS-D大鼠血清NO, 5-HT及结肠组织SP, MC的影响. 中国中药杂志 2009; 34: 3073-3077

编辑 曹丽鸥 电编 鲁亚静

吻合器痔上黏膜环形切除术治疗内痔的研究进展

关维雨, 张德巍, 李春雨

■背景资料

相比于传统的手术方法(外剥内扎术), 吻合器痔上黏膜环形切除(PPH)术具有术后疼痛轻, 住院时间短, 愈合快, 并发症少的优点, 但也存在一定的并发症和风险。因此正确的操作, 合理的应用该手术方法是十分必要的。

关维雨, 张德巍, 中国医科大学附属第四医院急诊外科 辽宁省沈阳市 110032

李春雨, 中国医科大学附属第四医院肛肠外科 辽宁省沈阳市 110032

关维雨, 主要从事普外急诊与创伤的研究。

作者贡献分布: 本文综述由关维雨完成; 张德巍与李春雨审校。

通讯作者: 张德巍, 副教授, 副主任医师, 110032, 辽宁省沈阳市皇姑区崇山东路4号, 中国医科大学附属第四医院急诊外科.
syzhangdewei@sohu.com

电话: 024-62041433

收稿日期: 2012-04-05 修回日期: 2012-05-22

接受日期: 2012-06-01 在线出版日期: 2012-07-08

Procedure for prolapse and hemorrhoids for grade III and IV internal hemorrhoids: A systematic review

Wei-Yu Guan, De-Wei Zhang, Chun-Yu Li

Wei-Yu Guan, De-Wei Zhang, Department of Emergency Surgery, the Fourth Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110032, Liaoning Province, China
Chun-Yu Li, Department of Anorectal Surgery, the Fourth Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110032, Liaoning Province, China

Correspondence to: De-Wei Zhang, Associate Professor, Department of Emergency Surgery, the Fourth Affiliated Hospital of China Medical University, 4 Chongshan East Road, Huanggu District, Shenyang 110032, Liaoning Province, China. syzhangdewei@sohu.com.

Received: 2012-04-05 Revised: 2012-05-22

Accepted: 2012-06-01 Published online: 2012-07-08

Abstract

Procedure for prolapse and hemorrhoids (PPH) is a new surgical technique that was developed based on the modern concept of internal hemorrhoids. It has gained wide acceptance as the treatment of choice for grade III and IV internal hemorrhoids, because of less postoperative pain and faster return to normal activities. Here we perform a systematic review on the recent advances in PPH for grade III and IV internal hemorrhoids.

Key Words: Procedure for prolapse and hemorrhoids; Internal hemorrhoids; Efficacy

■同行评议者
王正康, 教授, 中日友好医院普外科

Guan WY, Zhang DW, Li CY. Procedure for prolapse and hemorrhoids for grade III and IV internal hemorrhoids: A systematic review. Shijie Huaren Zazhi 2012; 20(19): 1752-1757

摘要

吻合器痔上黏膜环形切除术(procedure for prolapse and hemorrhoids, PPH)是根据肛垫下移学说发明。因该手术方法具有治疗效果显著, 住院时间短, 术后疼痛轻, 愈合快, 并发症少等优点, 已作为一项新的外科技术广泛应用于临床治疗III-IV度内痔。本文拟结合国内外吻合器痔上黏膜环形切除术的临床实践和对比研究, 对这一手术方法的现状及发展进行综合阐述。

关键词: 吻合器痔上黏膜环形切除术; 内痔; 疗效

关维雨, 张德巍, 李春雨. 吻合器痔上黏膜环形切除术治疗内痔的研究进展. 世界华人消化杂志 2012; 20(19): 1752-1757

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1752.asp>

0 引言

临幊上对于III-IV度内痔症状明显的患者, 通常需手术治疗^[1]。随着内痔的现代概念的提出推动了人们对内痔的重新认识, 而产生了一种新的手术方法: 吻合器痔上黏膜环形切除术(procedure for prolapse and hemorrhoids, PHH)^[2]。由于该方法保留了肛垫组织和肛门局部正常的生理结构, 治疗效果显著, 已成为临幊上治疗III-IV度内痔的常规手术方法之一^[3]。

1 病理学基础

1.1 内痔的病因 内痔的病因至今尚未彻底明确, 有关内痔的学说一直以来层出不穷^[4]。自20世纪70年代起, 通过对内痔的解剖学、组织学、生理学、病理生理学方面进行研究并取得突破性进展, 赋予了内痔新的概念。1975年Thomson^[5]首次提出内痔的现代概念, 认为内痔是直肠下端的唇状内赘或称肛垫, 并指出肛垫是肛管的正常解剖结构, 为齿状线上方宽约1.5-2.0 cm的环状组织, 位于右前、右后和左侧, 由扩张的窦状静脉、大量的Treitz肌纤维、胶原纤维和弹性结缔组织纤维组成; 并认为由于正常肛垫内的动、静脉吻合血管调节障碍和Treitz肌退行性变性, 而导致肛垫肥大后脱出, 即为内痔。这一观

点受到众多学者的支持, 也合理解释了先前的一些学说。肛垫下移学说初步阐明了内痔的本质是来源于肛垫, 受到人们的关注和支持, 成为目前最流行的学说。

1.2 内痔的发病机制 关于内痔的发病机制还存在许多争议, 目前认为内痔是肛垫的支持结构出现病理改变或异常移位, 导致出血、脱出等一系列临床症状的总称。依据肛垫的组成结构, 其发病机制主要有: (1)肛垫支持结构的退行性改变: Trietz肌是肛垫的重要组成和支持结构, 他是结缔组织和平滑肌纤维的网状复合体。正常肛垫组织中肌纤维排列连续、有序、层次清楚, 弹性纤维含量较高, 在内括约肌和黏膜间肌纤维之间呈紧张、网状交织分布。内痔组织中可见Trietz肌密度低, 排列疏松紊乱, 出现扭曲断裂, 弹性纤维少, 胶原纤维多, 部分肌纤维组织失活。1984年Haas等^[4]在肛垫学说的基础上, 详细观察了各年龄组的肛垫支持组织的变化。发现胎儿和新生儿痔区的弹性纤维较多, 且相互平行, 排列致密; 青年人痔区有同样发现, 但其纤维显得疏松; 30岁以后, 其结缔组织开始退化; 到老年时, 其弹力纤维较少而疏松, 且发生退变、断裂及扭曲等现象。由此说明内痔是肛垫支持组织断裂、退变致肛垫肥厚增大脱垂; (2)血流动力学改变: 正常情况下, 动静脉吻合通过调节吻合管的开合使肛垫供血量发生变化, 从而影响肛垫的体积大小^[6]。但是在某些因素刺激下, 如腹内压升高、直肠壶腹的机械性梗阻、妊娠或某些体液生化变化、饮酒或辛辣食物等, 均可能导致调控紊乱, 激发交感神经兴奋, 引起吻合管痉挛, 组织缺血缺氧, 继而肛垫组织因缺氧刺激, 释放组胺, 产生局部组胺效应, 毛细血管前括约肌痉挛, 动静脉吻合管突然开放, 导致痔静脉丛的血流量骤增, 扩张充血。由于此时毛细血管关闭, 动脉血经动静脉吻合管直接流入静脉, 使肛垫组织缺氧, 缺氧又刺激局部组胺分泌, 加重吻合管扩张, 导致静脉血流淤滞, 内痔更加充血肿胀, 形成恶性循环, 使内痔症状不断加重; (3)盆底动力学改变: 关于盆底动力障碍对内痔的影响, Wexner等^[7]提出肌源性高肛压和痔源性高肛压2个概念。肌源性高肛压指括约肌高张力压迫影响血液回流导致肛垫充血肥厚; 痔源性高肛压是肛垫充血肥大引起肛管压升高, 不管哪种高压形式都将增大排便阻力, 势必通过增加腹压来完成排便, 粪便强力通过高压的肛管时, 不但影响肛垫内血液回流, 造成严重的

充血, 还会拉长或撕裂肛垫的支持组织, 导致肛垫失去支持而位置下移, 从而使肛垫由间歇性脱发展为持续性脱出。

2 手术机制

PPH治疗III-IV度内痔的基础是建立在肛垫学说之上的。按照Thomson的解释: 人体肛管内齿状线上方有宽1.5-2.0 cm的环形组织带, 是一种高度特化的血管性垫衬, 为平滑肌、结缔组织及血管丛构成的复合体。依据此理论, PPH通过吻合器环形切除齿状线上方部分直肠黏膜及黏膜下层组织, 并将其对端吻合, 使脱垂的肛垫重新回复到正常的解剖位置, 缩短松弛的直肠黏膜, 恢复肛管黏膜与括约肌之间的局部解剖关系, 从而消除痔体脱垂的症状, 起到“悬吊”的作用, 而未切除肛垫、肛管皮肤及齿状线等组织, 保留了肛管黏膜层, 恢复了肛门的自制排便功能, 减少了术后肛门狭窄、失禁及精细控便障碍等的发生几率。同时, 由于切断了黏膜下层供应内痔的直肠上动脉和直肠中动脉的分支, 使痔体逐渐萎缩, 从而减轻了粪便对黏膜的创伤性摩擦所致的痔体出血, 起到了“断流”、“减积”的作用^[8]。

3 技术方法及疗效

3.1 操作要点 术中尽量不用指法扩肛, 最好选用特制的环形肛管扩张器内栓进行扩肛, 避免损伤肛门括约肌, 同时有利于肛管扩张器的置入, 减少术后反应性水肿所致疼痛。荷包缝合的高度应在齿状线上3-4 cm处, 以确保吻合口在齿状线上1.5-2.0 cm。若缝合位置过高, 则对肛垫向上的牵拉和悬吊作用减少, 痔体回缩不全, 影响手术效果, 反之过低则易引起术后疼痛和出血, 严重者会出现感觉性便失禁。缝合的深度在黏膜下层, 有时候可达浅肌层。太浅易引起黏膜撕脱, 吻合不完整, 影响手术效果; 过深则易损伤括约肌, 引起吻合口狭窄或大便失禁。缝合时缝线一定要选择光滑的可吸收肠线或丝线, 否则容易导致黏膜下血肿, 引起术后感染。荷包缝线保持在同一水平面, 可根据脱垂的实际程度行单荷包或双荷包缝合。

女性患者应分别于缝合直肠前壁、关闭吻合器及吻合器击发前做阴道指诊, 检查阴道后壁是否被牵拉至吻合器内, 防止阴道后壁损伤, 引起直肠阴道瘘。取出吻合器后, 检查吻合口, 看是否完整、有无出血点。若有活动性出血点,

■相关报道

PPH手术的临床应用已10余年, 国内外对于该手术方法的报道较多, 短期疗效显著, 但对于其远期的临床疗效有待于进一步研究。

■创新盘点

本文详实地介绍了PPH手术机制、应用范围、注意事项以及目前存在的问题,为该手术方法的合理应用提供较好的意见和建议。

一定要缝扎止血。对于渗血,可局部压迫止血。术后肛内放置引流管一枚,以降低肛管直肠内压,防止吻合口瘘,减轻腹胀,同时便于术后观察^[9]。

3.2 临床疗效 PPH手术遵循了内痔的现代概念,旨在消除内痔的症状,在保证肛门功能的同时明显减少了并发症的发生。国内外报道其临床疗效差异很大。任东林等^[10]报道1 000例总结:PPH术能明显减轻术后肛门疼痛,缩短住院时间,不影响或者少影响肛门功能,不易发生肛门狭窄,术后患者能较快的恢复正常生活,远期复发率低。Stolfi等^[11]报道95例,平均随访34.8 mo±15.6 mo,治疗效果明显,无肛门狭窄及大便失禁发生。而Jongen等^[12]回顾分析1 233例,约10%的患者因术后并发症的出现或复发而进行再次或者多次手术,Jayaraman等^[13]报道其远期复发率为8.5%,并认为与传统治疗方法相比PPH的复发率较高。

4 并发症及原因分析

4.1 术中并发症

4.1.1 腹痛:有部分患者击发吻合器时出现下腹坠胀不适或痉挛性疼痛,其发生多与吻合过程中牵扯肠壁,悬吊过紧及刺激内脏神经有关。Ravo等^[14]回顾分析1 107例,报道其术中发生率为5.0%。杨向东等^[15]认为原因主要有:直肠黏膜在切除过程中肠壁肌肉受牵拉;切除组织较多;荷包缝合较深;麻醉不充分;内脏神经张力过高。

4.1.2 出血:当击发吻合器完成,取出后,经过仔细检查,多数情况下可见吻合口上下存在不同程度的活动性出血或渗血。Raahave等^[16]报道术中出血发生率为93.2%。常见原因为:荷包缝合位置较浅;吻合器吻合后取出时操作粗暴;吻合器击发过程中未完全切割痔上黏膜,取出吻合器过程中过度牵拉,导致吻合口撕裂。

4.2 术后并发症

4.2.1 肛门坠胀感:多见于术后当天,一般不需特殊处理,次日可自行缓解,其诱发原因可能有:在愈合过程中吻合口发生炎性水肿;直肠功能性损伤;直肠黏膜下神经节侵犯^[17]。

4.2.2 疼痛:Ohana等^[18]回顾性研究234例患者,通过视觉模拟评分法来评价PPH术后患者疼痛情况,认为所有患者术后第1天均存在不同程度的疼痛,1 wk后仍有37.0%的患者存在疼痛。术后疼痛多与以下几种情况有关^[19,20]: (1)吻合口位置过低,吻合口肿胀压迫或损伤到齿状线以下组

织而引起,因为齿状线以下组织由脊神经支配,对疼痛反应敏感; (2)暴力或过度扩肛,引起肛裂或损伤肛门括约肌; (3)吻合口感染; (4)荷包缝合靠近盆底以致切除组织中带有肌肉; (5)术后吻合口水肿,造成牵张直肠壁的疼痛。

4.2.3 吻合口出血:吻合口出血是PPH术后最常见的并发症^[21]。Fueglister等^[22]随访198例,平均随访时间为28 mo,发生率为20.0%。经分析,引起吻合口出血的原因有: (1)术中止血不彻底或吻合完毕后动脉血管被压闭,而未缝扎,此类出血多发生于术后12 h以内; (2)吻合口位置过低或内痔痔核过大,术中切除了部分肛垫组织,当患者用力排便时吻合钉脱落以致黏膜出血; (3)吻合时吻合器旋钮旋得过紧,致使直肠黏膜坏死;或过松致使吻合钉易撕脱; (4)吻合口裂开后也导致出血。

4.2.4 残留皮赘:Pescatori等^[23]认为皮赘残留是PPH术后较为常见的并发症,Chen等^[24]报道发生率为13.0%。皮赘残留主要是由于:对于内痔为主及黏膜脱垂为主的肛门皮赘,PPH术后效果较为理想,但对于外痔为主的,效果较内痔为主的差;荷包缝合的黏膜下组织不够,达不到向上提拉所需程度,或荷包缝合不完整,深浅不均;巨大的混合痔,尤其是伴有黏膜脱垂较重者^[25-27]。

4.2.5 尿潴留:PPH术后尿潴留较为常见^[28],Uras等^[29]报道445例,有8.0%的患者出现术后尿潴留。尿潴留常与以下因素有关: (1)麻醉影响,麻醉后对膀胱逼尿肌功能的影响会存在一段时间,尤其是对前列腺肥大的老年患者; (2)术后患者会阴部不适,包括术后疼痛和惧怕心理; (3)术后患者行动不便,在床上排尿不习惯; (4)肛内填塞止血纱布等。

4.2.6 精细排便障碍:Riss等^[30]报道手术前后便排空值与便失控值未见明显的改变,但精细排便障碍确实存在,发生率为4.5%,并与手术相关,然而不影响术后患者的正常活动和满意度。同时也有研究结果显示PPH荷包缝合的高度与便失控发生的风险呈负相关^[31]。分析原因认为其合理解释为:由于PPH术使直肠黏膜上提,改变了直肠肛管的解剖位置,而降低了排便刺激的阈值^[32]。

4.2.7 吻合口狭窄:多由于吻合口处瘢痕挛缩所致。Yao等^[33]回顾性分析489例,报道吻合口狭窄的出现率为2.5%,并总结发生原因可能有: (1)吻合口位置过低,易造成鳞状长皮细胞皱缩,瘢痕化致吻合口狭窄; (2)吻合口感染是导致吻合口狭窄的最主要因素,而引起吻合口组织增生变

厚痉挛; (3)荷包缝合太深, 将肠壁肌肉组织钉合太多; (4)既往有注射硬化剂治疗内痔。

4.2.8 直肠阴道瘘: 直肠阴道瘘是PPH术后较严重的一种并发症, 较罕见。多为医源性损伤所致。其他并发症的报道, 如: 盆腔感染^[34]、血栓性外痔形成、肛门失禁、肛瘘、肛旁脓肿、前列腺损伤、肠痿、女性患者术后性交痛等, 国外有报道术后出现肠腔闭塞^[35], 吻合钉残留致直肠炎^[36]及乙状结肠血肿^[37]出现的病例。我们根据临床病例随访发现, 少数患者可出现肛乳头肥大这一并发症, 可能为肛管部炎症或长期慢性刺激所致。

5 PPH的发展现状及存在问题

5.1 发展现状 PPH于1998年应用于临床, 由意大利学者Longo首先报道。2000年国内姚庆礼于中山医院率先开展该技术, 目前已在国内外广泛开展, 主要以治疗III-IV度内痔及反复出血的II度内痔为主^[38]。任东林等^[10]认为对于急性内痔嵌顿, 未能及时复位者, 实施PPH最好控制在24 h以内, 当疑有血栓形成或伴有感染时最好放弃PPH治疗。另外PPH也开始用于治疗由直肠内套叠和直肠前突引起的出口梗阻型便秘, 通过减少直肠内黏膜堆积改善梗阻症状, 并取得一定疗效^[39]。禁忌证主要有: (1)直肠壁全层脱垂是绝对禁忌证; (2)肛管黏膜纤维化导致整个肛管黏膜层不易复位; (3)既往有肛管手术致肛管瘢痕严重畸形者; (4)单纯外痔; (5)女性直肠阴道隔薄弱, 属于相对禁忌证。

国内外学者通过大量临床实践, 认为PPH的关键步骤是直肠黏膜的荷包处理^[40]。荷包缝合的高度、深度、进针次数及方式决定了PPH的手术效果^[31,41,42]。荷包缝合的高度上欧美国家主张在距齿状线上5 cm左右^[43], 傅传刚等^[9]则认为对于亚洲人群, 高度应在4 cm左右。国内报道PPH通常采用单一荷包、单一荷包加对侧牵拉缝线、单荷包四点牵引法及双荷包4种方式^[39]。胡丰良等^[44]采用“四点牵引”法, 即双侧半荷包加前后牵引, 应用于PPH术中, 取得良好效果。

一般认为, 内痔脱出严重者: 长度 ≥ 3.0 cm应行双荷包缝合; 反之, 长度 ≤ 3.0 cm者可行单荷包缝合。目前多采用双荷包缝合, 以调整切除直肠黏膜的宽度^[45]。关于荷包缝合的深度, 有的学者认为缝合过浅会影响“断流”效果, 而无法阻断行于黏膜深层的血管而导致断流不全, 侯文英等^[43]的观点则不同, 认为如果PPH为了阻

断血流达到治疗痔的目的, 同样影响了肛垫的功能, 这与PPH保护肛垫功能是矛盾的, 说明缝合过浅主要影响悬吊的效果。

5.2 存在的问题 理论上, PPH阻断了内痔血供, 也就阻断了肛垫血供, 影响了肛垫功能, 这与PPH的作用机制是相矛盾的, PPH的“断流”问题尚待于进一步研究。临幊上, 尽管PPH具有较多优势, 国内外报道其近期疗效显著^[46-48], 但远期疗效还需进一步观察^[49]。Jayaraman等^[13]在一项多中心的研究中报道, PPH与传统手术相比其远期疗效不具有优越性。国外学者在随访中发现PPH术后复发率不同, Pescatori等^[23]报道术后1年内复发率5.7%, 远期复发率为8.5%; Zacharakis等^[50]通过随访56例IV度内痔患者6年, 报道其远期复发率达58.9%。同时吻合器为一次性使用器械, 且价格昂贵, 很难为大多数患者所接受, 制约了该项技术的广泛开展。

6 结论

PPH作为一项新的外科技术, 具有术后疼痛轻, 愈合快, 并发症少, 住院时间短等优点, 但也存在一定得并发症和风险。相信随着肛肠外科新理念的融入和PPH技术和器械的不断完善, 该手术将更趋合理, 有望成为治疗内痔的主要术式, 但远期疗效和远期并发症有待于进一步研究。

7 参考文献

- Efthimiadis C, Kosmidis C, Grigoriou M, Anthimidis G, Vasiliadou K, Baka S, Gerasimidou D, Basdaniis G. The stapled hemorrhoidopexy syndrome: a new clinical entity? *Tech Coloproctol* 2011; 15 Suppl 1: S95-S99
- Corman ML, Gravié JF, Hager T, Loudon MA, Mascagni D, Nyström PO, Seow-Choen F, Abcarian H, Marcello P, Weiss E, Longo A. Stapled haemorrhoidopexy: a consensus position paper by an international working party - indications, contraindications and technique. *Colorectal Dis* 2003; 5: 304-310
- Tjandra JJ, Chan MK. Systematic review on the procedure for prolapse and hemorrhoids (stapled hemorrhoidopexy). *Dis Colon Rectum* 2007; 50: 878-892
- Haas PA, Fox TA, Haas GP. The pathogenesis of hemorrhoids. *Dis Colon Rectum* 1984; 27: 442-450
- Thomson WH. The nature and cause of haemorrhoids. *Proc R Soc Med* 1975; 68: 574-575
- 谢德金, 许建衡. 痔发病机制的研究进展. 临幊和实验医学杂志 2008; 7: 165-167
- Wexner SD, Baig K. The evaluation and physiologic assessment of hemorrhoidal disease: a review. *Tech Coloproctol* 2001; 5: 165-168
- 张有生, 李春雨. 实用肛门外科学. 北京: 人民军医出版社, 2009: 152-154
- 傅传刚, 丁健华. PPH术治疗痔病的适应证与注意事项. *结直肠肛门外科* 2003; 9: 151

■应用要点
本文系统地阐述了该手术方法的优缺点, 以及常见并发症的发生、处理, 对临幊治疗有借鉴作用。

■同行评价

本综述内容比较全面,也介绍了一些PPH手术近年来出现的新问题,有一定的参考价值。

- 10 任东林,罗湛滨,赵杰.吻合器痔上粘膜环切钉合术1000例临床总结.中国中西医结合外科杂志2005;11:204-205
- 11 Stolfi VM, Sileri P, Micossi C, Carbonaro I, Venza M, Gentileschi P, Rossi P, Falchetti A, Gaspari A. Treatment of hemorrhoids in day surgery: stapled hemorrhoidopexy vs Milligan-Morgan hemorrhoidectomy. *J Gastrointest Surg* 2008; 12: 795-801
- 12 Jongen J, Eberstein A, Bock JU, Peleikis HG, Kahlke V. Complications, recurrences, early and late reoperations after stapled haemorrhoidopexy: lessons learned from 1,233 cases. *Langenbecks Arch Surg* 2010; 395: 1049-1054
- 13 Jayaraman S, Colquhoun PH, Malthaner RA. Stapled hemorrhoidopexy is associated with a higher long-term recurrence rate of internal hemorrhoids compared with conventional excisional hemorrhoid surgery. *Dis Colon Rectum* 2007; 50: 1297-1305
- 14 Ravo B, Amato A, Bianco V, Bocca P, Bottini C, Carriero A, Milito G, Dodi G, Mascagni D, Orsini S, Pietroletti R, Ripetti V, Tagariello GB. Complications after stapled hemorrhoidectomy: can they be prevented? *Tech Coloproctol* 2002; 6: 83-88
- 15 杨向东,魏雨,颜景颖.痔PPH术常见并发症防治的研究进展.结直肠肛门外科2008;14:127-131
- 16 Raahave D, Jepsen LV, Pedersen IK. Primary and repeated stapled hemorrhoidopexy for prolapsing hemorrhoids: follow-up to five years. *Dis Colon Rectum* 2008; 51: 334-341
- 17 姚礼庆,钟芸诗,许剑民,周平红,刘厚宝,徐美东.吻合器痔上黏膜钉合术并发症的原因及对策.中国实用外科杂志2006;26:222-224
- 18 Ohana G, Myslakova B, Ariche A, Dreznik Z, Koren R, Rath-Wolfsen L. Mid-term results of stapled hemorrhoidopexy for third- and fourth-degree hemorrhoids—correlation with the histological features of the resected tissue. *World J Surg* 2007; 31: 1336-1342
- 19 Sileri P, Stolfi VM, Palmieri G, Mele A, Falchetti A, Di Carlo S, Gaspari AL. Stapled hemorrhoidopexy: a prospective study from pathology to clinical outcome. *J Gastrointest Surg* 2007; 11: 1662-1668
- 20 梁正,孙晓光,夏加增,张翔,马涛,邱明远.吻合器痔上黏膜环切术的并发症及防治对策.中国现代医学杂志2006;16:1417-1418,1420
- 21 Ceci F, Picchio M, Palimento D, Cali B, Corelli S, Spaziani E. Long-term outcome of stapled hemorrhoidopexy for Grade III and Grade IV hemorrhoids. *Dis Colon Rectum* 2008; 51: 1107-1112
- 22 Fueglister P, Guenin MO, Montali I, Kern B, Peterli R, von Flue M, Ackermann C. Long-term results after stapled hemorrhoidopexy: high patient satisfaction despite frequent postoperative symptoms. *Dis Colon Rectum* 2007; 50: 204-212
- 23 Pescatori M, Gagliardi G. Postoperative complications after procedure for prolapsed hemorrhoids (PPH) and stapled transanal rectal resection (STARR) procedures. *Tech Coloproctol* 2008; 12: 7-19
- 24 Chen CW, Kang JC, Wu CC, Hsiao CW, Jao SW. Modified Longo's stapled hemorrhoidopexy with additional traction sutures for the treatment of residual prolapsed piles. *Int J Colorectal Dis* 2008; 23: 237-241
- 25 Koh PK, Seow-Choen F. Mucosal flap excision for treatment of remnant prolapsed hemorrhoids or skin tags after stapled hemorrhoidopexy. *Dis Colon Rectum* 2005; 48: 1660-1662
- 26 Naldini G, Martellucci J, Talento P, Caviglia A, Moraldi L, Rossi M. New approach to large haemorrhoidal prolapse: double stapled haemorrhoidopexy. *Int J Colorectal Dis* 2009; 24: 1383-1387
- 27 Gaj F, Trecca A. Hemorrhoids and rectal internal mucosal prolapse: one or two conditions? A national survey. *Tech Coloproctol* 2005; 9: 163-165
- 28 徐一栋,任元满,蔺春芳.吻合器痔上黏膜环切术后尿潴留原因分析及防治.临床医药实践2008;17:449-450
- 29 Uras C, Baca B, Boler DE. Circular stapled hemorrhoidopexy: experience of a single center with 445 cases. *World J Surg* 2008; 32: 1783-1788
- 30 Riss S, Riss P, Schuster M, Riss T. Impact of stapled hemorrhoidopexy on stool continence and anorectal function: long-term follow-up of 242 patients. *Langenbecks Arch Surg* 2008; 393: 501-505
- 31 Pigot F, Dao-Quang M, Castinel A, Juguet F, Bouchard D, Bockle J, Allaert FA. Low hemorrhoidopexy staple line does not improve results and increases risk for incontinence. *Tech Coloproctol* 2006; 10: 329-333
- 32 De Nardi P, Corsetti M, Passaretti S, Squillante S, Castellaneta AG, Staudacher C, Testoni PA. Evaluation of rectal sensory and motor function by means of the electronic barostat after stapled hemorrhoidopexy. *Dis Colon Rectum* 2008; 51: 1255-1260
- 33 Yao L, Zhong Y, Xu J, Xu M, Zhou P. Rectal stenosis after procedures for prolapse and hemorrhoids (PPH)—a report from China. *World J Surg* 2006; 30: 1311-1315
- 34 Maw A, Eu KW, Seow-Choen F. Retroperitoneal sepsis complicating stapled hemorrhoidectomy: report of a case and review of the literature. *Dis Colon Rectum* 2002; 45: 826-828
- 35 Giordano P, Bradley BM, Peiris L. Obliteration of the rectal lumen after stapled hemorrhoidopexy: report of a case. *Dis Colon Rectum* 2008; 51: 1574-1576
- 36 Garg P, Lakhtaria P, Song J, Ismail M. Proctitis due to retained staples after stapler hemorrhoidopexy and a review of literature. *Int J Colorectal Dis* 2010; 25: 289-290
- 37 De Santis G, Gola P, Lancione L, Sista F, Pietroletti R, Leardi S. Sigmoid intramural hematoma and hemoperitoneum: an early severe complication after stapled hemorrhoidopexy. *Tech Coloproctol* 2011; Jun 16. [Epub ahead of print]
- 38 喻德洪,王汉涛.吻合器痔固定术的地位和前景.中国中西医结合外科杂志2005;11:4-5
- 39 赵燕,崔彦.吻合器痔上黏膜环切术临床研究进展.实用医学杂志2008;24:3984-3985
- 40 Bozdag AD, Nazli O, Tansug T, Derici H, Deniz V. Special anoscope for easy purse-string suture application in stapled hemorrhoidopexy. *World J Surg* 2007; 31: 538-541
- 41 张振勇,张霓,蔡碧波,谢敏,谢坚,甄艳.重视痔上黏膜环形切除钉合术中的荷包处理.中华胃肠外科杂志2006;9:180
- 42 Plocek MD, Kondylis LA, Duhan-Floyd N, Reilly JC, Geisler DP, Kondylis PD. Hemorrhoidopexy staple line height predicts return to work. *Dis Colon Rectum* 2006; 49: 1905-1909
- 43 侯文英,李玉玮,陈景良.痔上黏膜环形切除钉合术(PPH)中荷包缝合的改进.结直肠肛门外科2008;14:14-15
- 44 胡丰良,李玉英,李洪杰,罗维民,伍凯盈.四点牵引法在痔PPH术中的应用(附39例报告).结直肠肛门外科2003;9:97-99
- 45 徐建军,丁健民,金嗣松,荀宁军,章仲铭,何承祥,吴宣泽.PPH手术切除直肠黏膜宽度的探讨.结直肠肛门外科2003;9:26-27

- 46 Grigoropoulos P, Kalles V, Papapanagiotou I, Mekras A, Argyrou A, Papageorgiou K, Derian A. Early and late complications of stapled haemorrhoidopexy: a 6-year experience from a single surgical clinic. *Tech Coloproctol* 2011; 15 Suppl 1: S79-S81
- 47 李胜龙, 尹廷宝, 张熙, 宁杰. 吻合器痔上黏膜钉合术治疗重度混合痔的临床应用价值. 中国实用外科杂志 2005; 25: 167-169
- 48 丁培霖, 唐武, 施展, 樊福珍, 陈平. PPH结合痔切除术与Milligan术治疗重度痔的对比观察. 实用全科医学 2010; 8: 558-559
- 49 Lan P, Wu X, Zhou X, Wang J, Zhang L. The safety and efficacy of stapled hemorrhoidectomy in the treatment of hemorrhoids: a systematic review and meta-analysis of ten randomized control trials. *Int J Colorectal Dis* 2006; 21: 172-178
- 50 Zacharakis E, Kanellos D, Pramateftakis MG, Kanellos I, Angelopoulos S, Mantzoros I, Betsis D. Long-term results after stapled haemorrhoidopexy for fourth-degree haemorrhoids: a prospective study with median follow-up of 6 years. *Tech Coloproctol* 2007; 11: 144-147; discussion 144-147

编辑 张姗姗 电编 鲁亚静

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2012年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》修回稿须知

本刊讯 为了保证作者来稿及时发表, 同时保护作者与世界华人消化杂志的合法权益, 本刊对修回稿要求如下.

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、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版权转让给本刊编辑部.

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, 本刊编辑部将把原稿连同审稿意见、编辑意见寄回给作者修改, 而作者必须于15 d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寄回编辑部, 同时将修改后的电子稿件上传至在线办公系统; 逾期寄回的, 作重新投稿处理.

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. 编辑部可将文章在《中国学术期刊光盘版》等媒体上长期发布; 作者允许该文章被美国《化学文摘》、《荷兰医学文摘库/医学文摘》、俄罗斯《文摘杂志》、《中国生物学文摘》等国内外相关文摘与检索系统收录.

针刺对功能性便秘ENS-ICC调节机制的研究进展

任驰, 周思远, 牟建蛟, 李瑛

■背景资料

功能性便秘(FC)是一种常见疾病, 现在中医临床多采用针灸治疗为主。FC存在多种发病机制, 病因病理学研究显示其是肠神经系统功能及Cajal间质系统的异常, 关于“肠神经病”的作用机制的研究已成为针刺治疗FC实验研究的突破点。

任驰, 周思远, 牟建蛟, 李瑛, 成都中医药大学针灸推拿学院四川省成都市 610075
国家重点基础研究发展计划(973计划)基金资助项目, No. 2011CB505205
四川省科技厅基金资助项目, No. 2012jY0039
作者贡献分布: 本文综述由任驰、周思远和牟建蛟完成; 李瑛审核。
通讯作者: 李瑛, 教授, 610075, 四川省成都市, 成都中医药大学针灸推拿学院, jialee@mail.sc.cninfo.net
电话: 028-66875811
收稿日期: 2012-03-24 修回日期: 2012-05-02
接受日期: 2012-06-16 在线出版日期: 2012-07-08

Progress in understanding mechanisms underlying the regulatory effect of acupuncture on functional constipation

Chi Ren, Si-Yuan Zhou, Jian-Jiao Mu, Ying Li

Chi Ren, Si-Yuan Zhou, Jian-Jiao Mu, Ying Li, Acupuncture and Tuina College, Chengdu University of TCM, Chengdu 610075, Sichuan Province, China

Supported by: the Major State Basic Research Development Program of China (973 Program), No. 2011CB505205; Fundation of Science and Technology Project in Sichuan Province, No. 2012jY0039

Correspondence to: Ying Li, Professor, Acupuncture and Tuina College, Chengdu University of TCM, Chengdu 610075, Sichuan Province, China, jialee@mail.sc.cninfo.net
Received: 2012-03-24 Revised: 2012-05-02
Accepted: 2012-06-16 Published online: 2012-07-08

Abstract

Functional constipation is a common and frequently-occurring disease whose etiology and pathogenesis are still not very clear. Experimental studies using animal models of cathartic colon have shown abnormalities in ultrastructural plexus of enteric nervous system (ENS), expression of multiple receptors, and interstitial cells of Cajal (ICC). Currently, there has been no consensus reached yet with regard to the mechanisms underlying the regulatory effect of acupuncture therapy on functional constipation, and the interaction among different regulatory mechanisms is not examined in depth. Future research should address this issue to better understand how acupuncture exerts therapeutic effects against functional constipation.

■同行评议者
王富春, 教授, 长春中医药大学

Key Words: Functional constipation; Enteric nervous system; Interstitial cells of Cajal

Ren C, Zhou SY, Mu JJ, Li Y. Progress in understanding mechanisms underlying the regulatory effect of acupuncture on functional constipation. Shijie Huaren Zazhi 2012; 20(19): 1758-1762

摘要

功能性便秘(functional constipation, FC)是临床常见病和多发病, 其病因和发病机制尚不清楚, 存在多种学说。实验研究表明, “泻药性结肠”动物模型结肠表现为肠神经系统神经丛超微结构、多种受体与ICC表达的异常。我们通过检索和分析近年来针刺治疗FC的实验研究文献, 发现目前针刺对FC的调节机制的研究偏于单一化, 多种机制之间的调控关系没有进行深入研究。今后的研究应侧重针刺对各机制之间相互关系的阐释以及对其关键机制的探讨, 使针刺作用机制的研究进一步深入, 从而更好地服务于临床。

关键词: 功能性便秘; 肠神经系统; Cajal间质细胞

任驰, 周思远, 牟建蛟, 李瑛. 针刺对功能性便秘ENS-ICC调节机制的研究进展. 世界华人消化杂志 2012; 20(19): 1758-1762
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1758.asp>

0 引言

功能性便秘(functional constipation, FC), 也称单纯性便秘、习惯性便秘或特发性便秘, 按罗马III标准^[1], 被定义为排便持续困难, 便次减少或排便不尽感, 且不符合肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)的诊断标准。研究表明, 正常结肠的协同收缩主要由肠道神经系统(enteric nervous system, ENS)和间质星形胶质细胞即哈尓细胞(Cajal cell)控制^[2]。近年来, 对结肠慢传输性便秘(slow transit constipation, STC)的病因病理学研究显示其是“肠神经病”, 即肠神经系统功能及Cajal间质系统的异常^[3]。关于“肠神经病”的作用机制的研究已成为针刺治疗功能性

便秘实验研究的突破点, 通过查阅相关文献, 现将针刺调控ENS-ICC机制治疗功能性便秘的研究现状进行分析述评如下。

1 针刺对肠神经系统的调控

肠神经系统是存在于胃肠壁内一个独立于大脑之外的完整神经网络, 由黏膜下神经丛和肌间神经丛组成^[4]。ENS具有高度的自主性, 可以感知、启动和调控胃肠运动, 因此被称作胃肠道的“微型脑”(little brain)^[5]。研究发现肠神经系统的功能状态主要受肌间神经丛和肠神经节细胞的影响较大, 其病理性改变可能会降低肠神经传递的敏感性, 影响肠道的运动。

1.1 肠神经节细胞

1.1.1 肠神经节细胞与功能性便秘的关系: 肠神经系统的功能状态与肠动力是直接相关的。有研究^[6-8]发现STC患者平均每个肠段的神经节面積和平均每个神经节中神经元的数量在肌间神经丛和深部黏膜下丛都明显减少。国外学者^[9]利用嗜银性反应、神经微丝抗体或采用PGP 9.5^[10]进行标记均可发现肌间丛神经元胞体及突起的数量均明显减少。

1.1.2 针刺对肠神经节细胞的影响: 丁曙晴等^[11]通过观察针刺治疗便秘模型大鼠肠神经系统神经元标志物(PGP 9.5)的变化, 探讨肠神经系统神经元作用途径。发现针刺组治疗前环纵肌纤维增粗, 排列紊乱, 空泡样改变, 神经节细胞减少, 节细胞阳性表达染色下降; 治疗后环纵肌修复好转, 神经节细胞空泡样改变好转, 通过多组对照^[12]比较证实了针刺有助于改善肠神经系统神经元破坏后神经节细胞的功能, 为治疗功能性便秘提供了一定的实验室依据。

1.2 肠肌间神经丛

1.2.1 肠肌间神经丛与功能性便秘的关系: 目前普遍认为肌间神经丛对肠蠕动的调节起重要作用。STC患者的结肠切除病理结果显示几乎都存在不同程度的肌间神经丛数量减少、变形、变性等退行性变和间质代偿性增生^[9]。在临床治疗过程中不断有STC患者结肠超微结构异常的报道^[13], 与其超微结构改变相似的动物实验进一步揭示了STC发病机制的复杂性^[14]。王梅等^[15]通过建立“泻药性结肠”的动物模型, 应用电镜技术发现模型大鼠的结肠肌间神经丛可见神经元细胞线粒体轻度肿胀, 神经纤维轴突内线粒体肿胀破裂, “嵴”状结构不完整, 神经束轴突及树突扩张, 电子密度不均匀, 部分明显扩张形成空泡。

由此可知结肠肌间神经丛超微结构的改变可能是功能性便秘发展和加重的病理基础之一。

1.2.2 针刺对肠肌间神经丛的调控:

李红岩等^[16]利用大黄制作大鼠STC动物模型, 发现大黄模型组结肠传输功能缓慢, 肌间神经丛神经细胞空泡变性、减少。针刺后发现肌间神经丛超微结构有所改善, 结肠传输功能恢复。周惠芬等^[17]也发现, 针刺一侧足三里、照海穴(隔日交换对侧)对泻药性结肠大鼠结肠肌电呈双向调节作用, 可使振幅适当增高, 频率适当加快或减慢。

2 针刺对肠动力的调控-Cajal间质细胞

2.1 ICC与功能性便秘的关系: 在功能性便秘的诸多发病机制相关因素的研究中, 胃肠始动细胞Cajal间质细胞(interstitial cells of Cajal, ICC)的作用受到格外重视^[18-20], 其具有潜在的控制胃肠道动力的作用^[21,22]。ICC是介于肠神经系统和平滑肌细胞之间的一类极其特殊的间质细胞, 解剖上与ENS关系最为密切^[23,24]。ICC有3种功能, 即胃肠基本电节律的起搏细胞^[25,26], 介导电活动的传播及参与胃肠道神经递质的信号转导^[2,27], 调节神经递质^[28]。ICC在结肠中的分布和功能异常是STC结肠慢波频率减慢的直接或间接原因^[29-34]。研究发现STC患者结肠内的ICC密度下降明显^[33,35,36], 全结肠ICC的体积也缩小, 尤以乙状结肠内的ICC减少为著^[37-39]。Wedel等^[6]发现STC患者结肠组织中除外纵行肌以外, 全层ICC的数目都显著减少, 形态及其网状结构改变。国内学者^[40,41]亦发现STC小鼠肠道存在结肠ICC数量的减少、抑制性神经递质表达增加。童卫东等^[42]经一系列研究后发现STC患者各个区域ICC均明显减少, 部分病例黏膜下环肌表面ICC几乎消失, 黏膜层和黏膜下层细胞凋亡明显增多。小肠起搏区域ICC缺失能导致自发性电节律性活动缺失, 肠蠕动波消失, 而增加肠道ICC细胞数量, 肠壁收缩活动及慢波频率增加、肠道传输速度加快^[43-45]。

从Cajal发现ICC开始, ICC已不再是起填充作用的一般间质细胞。一个突破性的研究进展是发现其细胞表达受酪氨酸激酶受体c-kit及其配体干细胞因子(stem cell factor, SCF)调控, c-kit是ICC细胞的特异性标志物^[46]。我们可以利用c-kit免疫组织化学技术特异地观察ICC在胃肠道的分布, 为一系列胃肠动力紊乱性疾病的研究带来曙光。国内学者Tong等^[47]进一步研究发现STC患者结肠内发现4类ICC亚

■ 相关报道

Ward等曾指出正常结肠的协同收缩主要由肠道神经系统(ENS)和间质星形胶质细胞即哈默细胞(Cajal cell)控制。近年来, 对功能性便秘的病因病理学研究显示其是“肠神经病”。

■创新盘点

本文分别对针刺调节ENS和ICC两种作用途径进行了总结,系统地分析了近年来针刺对功能性便秘ENS-ICC调节机制的实验研究进展,为今后实验研究提供方向。

群数量均明显减少, c-kit mRNA和蛋白表达降低,提示c-kit信号通路在STC患者ICC减少过程中起着很重要的作用。SCF/Kit信号通路异常使Kit阳性间质前体细胞分化为平滑肌表型细胞,与ICC的减少有关。贾后军等^[48]进一步研究发现,通过阻断结肠内c-kit信号,使RNA和c-kit蛋白表达降低,导致小鼠小肠ICC缺失。有研究^[49,50]用中和抗体封闭c-kit受体后,发现ICC表型再分化呈平滑肌细胞表型,ICC的数目因此减少甚至消失,肠慢波消失。该研究提示我们可以通过靶向治疗纠正ICC异常功能,促使其表型逆转,重建网络结构来恢复结肠动力,这应该是治疗STC的一个新的思路。

2.2 针刺调控ICC的表达 泻药性结肠动物模型的结肠病理表现与慢传输型便秘患者的结肠病理表现相似,其中包括ICC表达的异常。孙建华等^[51]观察电针天枢穴对STC大鼠结肠平滑肌结构及ICC的影响,发现模型组ICC着色较淡、模糊,网络结构不连续;电针治疗后,ICC形态、分布、细胞着色及网络结构的完整性均接近于正常组($P>0.05$),提示电针天枢穴不但能改善STC模型大鼠结肠平滑肌的结构,同时也改善STC结肠平滑肌ICC的病理改变,提高其阳性表达以达到治疗目的。衣运玲^[52]以泻药性结肠大鼠为模型,观察针刺从核转录水平与翻译水平调控ICC的作用特点,揭示针刺对泻药性结肠中c-kit、SCF蛋白与基因表达调控特点及针刺治疗便秘的ICC作用途径,为针刺治疗以ICC减少为背景的便秘奠定理论基础,说明了针刺可以从核转录水平调节以ICC减少为背景的便秘,使其结肠SCF/c-kit蛋白表达在生理范围内提高。

3 结论

目前国内关于针刺治疗功能性便秘的机制探讨取得了一定的成果,近来对ICC及其网络的缺失或缺陷及对不同类型的肠神经元释放的神经递质的研究增多。功能性便秘的发病涉及中枢与外周多个方面,其调节机制包括神经、体液、肌源性、食物等多方面因素,构成复杂网络调控系统。研究发现,ICC在慢传输型便秘结肠中发生表型转化^[53],如何使发生表型转化的ICC通过重建c-kit信号通路实现表型逆转,是目前研究的重点。我们可以利用现代科技手段努力发掘和发展其治疗途径,利用c-kit免疫组织化学技术特异地观察ICC在胃肠道的分布,从而通过c-kit通路更具有靶向性地促使发生表型转化的ICC

逆转,阻断了功能性便秘的进一步发展,为一系列胃肠动力紊乱性疾病的研究带来曙光。

针刺治疗功能性便秘的机制尚有许多待揭示的地方,其物质基础(基因、递质、信号转导、蛋白表达)需要进一步探索。其治疗的作用机制与多个机制有关,因此对单一机制的研究结果就不可避免地带有局限性和片面性。对结肠超微结构的实验观察显示单靶点治疗功能性便秘存在一定的缺陷性,这就提示任何一种针对单一机制的治疗都存在一定的局限性,未来的研究应不仅仅只针对一、两个机制进行,而应该侧重针灸对各机制之间相互关系的阐释,对相关的多个机制进行综合研究,揭示针刺治疗功能性便秘的系统性机制和规律,采取综合性整体治疗,从而更好地服务于临床。

4 参考文献

- Drossman DA. The functional gastrointestinal disorders and the Rome III process. *Gastroenterology* 2006; 130: 1377-1390
- Ward SM. Interstitial cells of Cajal in enteric neuro-transmission. *Gut* 2000; 47 Suppl 4: iv40-iv43; discussion iv52
- Bassotti G, Villanacci V. Slow transit constipation: a functional disorder becomes an enteric neuropathy. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 4609-4613
- Wallace AS, Burns AJ. Development of the enteric nervous system, smooth muscle and interstitial cells of Cajal in the human gastrointestinal tract. *Cell Tissue Res* 2005; 319: 367-382
- 李端午, 李翠红, 郭莹, 葛文津, 夏立营. 针刺对大鼠胃肠肌间神经丛NO能神经元的影响. 上海针灸杂志 2002; 21: 40-42
- Wedel T, Spiegler J, Soellner S, Roblick UJ, Schieck TH, Bruch HP, Krammer HJ. Enteric nerves and interstitial cells of Cajal are altered in patients with slow-transit constipation and megacolon. *Gastroenterology* 2002; 123: 1459-1467
- Tomita R, Fujisaki S, Ikeda T, Fukuzawa M. Role of nitric oxide in the colon of patients with slow-transit constipation. *Dis Colon Rectum* 2002; 45: 593-600
- Tomita R, Tanjoh K, Fujisaki S, Ikeda T, Fukuzawa M. Regulation of the enteric nervous system in the colon of patients with slow transit constipation. *Hepatogastroenterology* 2002; 49: 1540-1544
- El-Salhy M. Chronic idiopathic slow transit constipation: pathophysiology and management. *Colorectal Dis* 2003; 5: 288-296
- 刘丽, 施诚仁, 李敏, 张忠德, 张文竹. PGP9.5在SD大鼠肠神经节细胞成熟度评价中的作用. 中华小儿外科杂志 2003; 24: 254-257
- 丁曙晴, 丁义江, 季新涛, 韩恬梅, 孙明明, 霍维宇, 黄书亮, 耿建祥. 针刺对便秘模型大鼠PGP9.5表达的影响. 世界华人消化杂志 2009; 17: 2184-2187
- 王伟. 排便动力性便秘患者肛管直肠敏感性及心理的研究. 北京: 北京协和医学院, 2009
- 高峰, 张胜本, 张连阳, 蔡文琴, 童卫东, 李发智, 李文惠. 慢传输型便秘结肠肌间神经丛超微结构改变. 世界华人消化杂志 1999; 7: 1049-1051
- 张燕, 李红岩. 便秘大鼠结肠超微结构的改变. 北京中

- 医药大学学报 2005; 28: 63-65
- 15 王梅, 吕宾, 范一宏, 杨林, 许毅. 刺激性泻剂对大鼠结肠肌间神经丛超微结构的影响. 基础医学与临床 2005; 25: 434-436
- 16 李红岩, 张燕, 卞红磊. 慢传输型便秘大鼠结肠肌间神经丛变化的研究. 河北医药 2009; 31: 2384-2386
- 17 周惠芬, 王玲玲, 衣运玲, 余芝, 鞠传慧, 马飞翔. 针刺结合西沙必利对慢传输便秘大鼠结肠肌电的影响. 世界华人消化杂志 2009; 17: 3402-3407
- 18 张丹, 夏志伟, 韩亚京. 长期慢性束缚水浸应激对大鼠胃窦Cajal间质细胞数量的影响. 世界华人消化杂志 2010; 18: 920-925
- 19 包呈梅, 胡森, 陆江阳, 武彦. 卡巴胆碱对缺血/再灌注损伤肠道Cajal间质细胞的影响. 中国病理生理杂志 2009; 25: 1845-1847
- 20 李凡, 黄颖, 童卫东, 刘宝华. 雌激素诱导小鼠肠道Cajal间质细胞内ERK快速活化研究. 重庆医学 2009; 38: 1354-1356
- 21 Streutker CJ, Huizinga JD, Driman DK, Riddell RH. Interstitial cells of Cajal in health and disease. Part I: normal ICC structure and function with associated motility disorders. *Histopathology* 2007; 50: 176-189
- 22 Farrugia G. Interstitial cells of Cajal in health and disease. *Neurogastroenterol Motil* 2008; 20 Suppl 1: 54-63
- 23 Daigo Y, Takayama I, Ward SM, Sanders KM, Fujino MA. Novel human and mouse genes encoding a shank-interacting protein and its upregulation in gastric fundus of W/WV mouse. *J Gastroenterol Hepatol* 2003; 18: 712-718
- 24 Min KW, Sook Seo I. Intestinal cells of Cajal in the human small intestine: immunochemical and ultrastructural study. *Ultrastruct Pathol* 2003; 27: 67-78
- 25 Huizinga JD, Robinson TL, Thomsen L. The search for the origin of rhythmicity in intestinal contraction; from tissue to single cells. *Neurogastroenterol Motil* 2000; 12: 3-9
- 26 Thomsen L, Robinson TL, Lee JC, Farraway LA, Hughes MJ, Andrews DW, Huizinga JD. Intestinal cells of Cajal generate a rhythmic pacemaker current. *Nat Med* 1998; 4: 848-851
- 27 Wang XY, Sanders KM, Ward SM. Intimate relationship between interstitial cells of cajal and enteric nerves in the guinea-pig small intestine. *Cell Tissue Res* 1999; 295: 247-256
- 28 Powell DW, Mifflin RC, Valentich JD, Crowe SE, Saada JI, West AB. Myofibroblasts. II. Intestinal subepithelial myofibroblasts. *Am J Physiol* 1999; 277: C183-C201
- 29 Iino S, Ward SM, Sanders KM. Intestinal cells of Cajal are functionally innervated by excitatory motor neurones in the murine intestine. *J Physiol* 2004; 556: 521-530
- 30 Sanders KM, Ordög T, Koh SD, Torihashi S, Ward SM. Development and plasticity of interstitial cells of Cajal. *Neurogastroenterol Motil* 1999; 11: 311-338
- 31 Wang LM, McNally M, Hyland J, Sheahan K. Assessing interstitial cells of Cajal in slow transit constipation using CD117 is a useful diagnostic test. *Am J Surg Pathol* 2008; 32: 980-985
- 32 Jain D, Moussa K, Tandon M, Culpepper-Morgan J, Proctor DD. Role of interstitial cells of Cajal in motility disorders of the bowel. *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 618-624
- 33 Lee JL, Park H, Kamm MA, Talbot IC. Decreased density of interstitial cells of Cajal and neuronal cells in patients with slow-transit constipation and acquired megacolon. *J Gastroenterol Hepatol* 2005; 20: 1292-1298
- 34 孙金山, 王宝西. Cajal间质细胞与胃肠动力疾病. 中国当代儿科杂志 2006; 8: 164-168
- 35 Geramizadeh B, Hayati K, Rahsaz M, Hosseini SV. Assessing the interstitial cells of Cajal, cells of enteric nervous system and neurotransmitters in slow transit constipation, using immunohistochemistry for CD117, PGP9.5 and serotonin. *Hepatogastroenterology* 2009; 56: 1670-1674
- 36 于彬, 梅峰, 童卫东, 孙榆, 何扬涛, 周德山. 慢传输型便秘患者结肠壁内Cajal细胞的形态学研究. 消化外科 2004; 3: 185-189
- 37 He CL, Burgart L, Wang L, Pemberton J, Young-Fadok T, Szurszewski J, Farrugia G. Decreased interstitial cell of cajal volume in patients with slow-transit constipation. *Gastroenterology* 2000; 118: 14-21
- 38 Fox IJ, Chowdhury JR. Hepatocyte transplantation. *Am J Transplant* 2004; 4 Suppl 6: 7-13
- 39 Lyford GL, He CL, Soffer E, Hull TL, Strong SA, Senagore AJ, Burgart LJ, Young-Fadok T, Szurszewski JH, Farrugia G. Pan-colonic decrease in interstitial cells of Cajal in patients with slow transit constipation. *Gut* 2002; 51: 496-501
- 40 包云光, 舒小莉, 李小兵, 顾伟忠, 应爱娟, 赵婵, 欧强, 江米足. 肠神经系统递质和Cajal间质细胞在大鼠慢传输型便秘中的作用. 中国当代儿科杂志 2009; 11: 481
- 41 姜柳琴, 林琳, 张红杰, 胡晔东, 林征, 王美峰. 血红素氧化酶2在吗啡诱导的结肠慢传输型便秘小鼠结肠中的表达及意义. 世界华人消化杂志 2008; 16: 422-425
- 42 童卫东, 刘宝华, 张连阳, 张胜本. 慢传输性便秘患者乙状结肠组织中cajal间质细胞的分布. 中华外科杂志 2004; 42: 853-856
- 43 Nakagawa T, Misawa H, Nakajima Y, Takaki M. Absence of peristalsis in the ileum of W/W(V) mutant mice that are selectively deficient in myenteric interstitial cells of Cajal. *J Smooth Muscle Res* 2005; 41: 141-151
- 44 Ward SM, Baker SA, de Faoite A, Sanders KM. Propagation of slow waves requires IP3 receptors and mitochondrial Ca²⁺ uptake in canine colonic muscles. *J Physiol* 2003; 549: 207-218
- 45 Bellier S, Da Silva NR, Aubin-Houzelstein G, Elbaz C, Vanderwinden JM, Panthier JJ. Accelerated intestinal transit in inbred mice with an increased number of interstitial cells of Cajal. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 288: G151-G158
- 46 Huizinga JD. Neural injury, repair, and adaptation in the GI tract. IV. Pathophysiology of GI motility related to interstitial cells of Cajal. *Am J Physiol* 1998; 275: G381-G386
- 47 Tong WD, Liu BH, Zhang LY, Xiong RP, Liu P, Zhang SB. Expression of c-kit messenger ribonucleic acid and c-kit protein in sigmoid colon of patients with slow transit constipation. *Int J Colorectal Dis* 2005; 20: 363-367
- 48 贾后军, 刘宝华, 童卫东, 张连阳, 文亚渊, 刘韧. 阻断c-kit对小鼠小肠Cajal间质细胞的影响及机制初探. 结直肠肛门外科 2006; 12: 6-9
- 49 Muraca M, Gerunda G, Neri D, Vilei MT, Granato A, Feltracco P, Meroni M, Giron G, Burlina AB. Hepatocyte transplantation as a treatment for glycogen storage disease type 1a. *Lancet* 2002; 359: 317-318
- 50 Sokal EM, Smets F, Bourgois A, Van Maldergem L, Buts JP, Reding R, Bernard Otte J, Evrard V, Latinne D, Vincent MF, Moser A, Soriano HE. Hepatocyte transplantation in a 4-year-old girl with peroxisomal biogenesis disease: technique, safety, and meta-

■同行评价

本文全面而系统地总结了近年来针刺对功能性便秘ENS-ICC调节机制的实验研究进展, 选题的角度比较准确, 而且符合现阶段对针刺治疗功能性便秘机制研究的最新研究成果。

- 51 bolic follow-up. *Transplantation* 2003; 76: 735-738
孙建华, 郭慧, 陈璐, 吴晓亮, 李浩, 裴丽霞, 彭拥军, 陆斌. 电针天枢穴对慢传输型便秘大鼠结肠平滑肌结构及Cajal间质细胞的影响. 针刺研究 2011; 36: 171-175
- 52 衣运玲. 针刺治疗慢传输型便秘的SCF/c-kit信号通路研究. 南京中医药大学, 2010
53 Chang IY, Glasgow NJ, Takayama I, Horiguchi K, Sanders KM, Ward SM. Loss of interstitial cells of Cajal and development of electrical dysfunction in murine small bowel obstruction. *J Physiol* 2001; 536: 555-568

编辑 曹丽鸥 电编 鲁亚静

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2012年版权归世界华人消化杂志

• 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), CN 14-1260/R]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/wcjcd/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. 编辑部主任每周一组织定稿会, 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核对, 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》保证每篇文章四个月内完成. (编辑部主任: 李军亮 2010-01-18)

CRF通过CRF2受体介导肠上皮细胞中TLR4的表达

杨丽, 郑鹏远, 刘志强

杨丽, 郑鹏远, 刘志强, 郑州大学第二附属医院消化内科 郑州大学医学微生态学研究所 河南省郑州市 450014
杨丽, 副主任医师, 现工作在郑州人民医院消化内科, 主要从事炎症性肠病的研究。

973计划前期研究专项课题基金资助项目, No. 2011CB512006
作者贡献分布: 此课题由杨丽与郑鹏远设计; 研究过程由杨丽与刘志强完成; 数据分析由杨丽完成; 论文撰写由杨丽与郑鹏远完成。

通讯作者: 郑鹏远, 教授, 主任医师, 博士生导师, 450014, 河南省郑州市经八路2号, 郑州大学第二附属医院消化内科; 郑州大学医学微生态学研究所. medp7123@126.com

电话: 0371-63921467

收稿日期: 2012-02-18 修回日期: 2012-03-24

接受日期: 2012-04-19 在线出版日期: 2012-07-08

Activation of TLR4 by CRF in human intestinal epithelial cells is mediated by the CRF2 receptor

Li Yang, Peng-Yuan Zheng, Zhi-Qiang Liu

Li Yang, Peng-Yuan Zheng, Zhi-Qiang Liu, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Zhengzhou University; Institute of Medical Microecology, Zhengzhou University, Zhengzhou 450014, Henan Province, China
Supported by: the Preliminary Special Research Project of 973 Program, No. 2011CB512006

Correspondence to: Peng-Yuan Zheng, Professor, Chief Physician, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Zhengzhou University; Institute of Medical Microecology, 2 Jingba Road, Zhengzhou 450014, Henan Province, China. medp7123@126.com

Received: 2012-02-18 Revised: 2012-03-24

Accepted: 2012-04-19 Published online: 2012-07-08

Abstract

AIM: To investigate the effect of corticotrophin-releasing factor (CRF) on the expression of toll-like receptor 4 (TLR4) in human intestinal epithelial cell line HT-29.

METHODS: HT-29 cells were divided into eight groups: non-treated group, LPS group (treated with 20 μg/L LPS for 24 h), CRF group (treated with 20 μg/L CRF for 24 h), LPS plus CRF group (pretreated with 20 μg/L CRF for 12 h and then treated with 20 μg/L LPS for 12 h), Astressin 2B plus CRF group (pretreated with 20 μg/L Astressin 2B for 12 h and then treated with 20 μg/L CRF), Antalarmin plus CRF group (pretreated with 20 μg/L Antalarmin for 12 h and then treated with 20 μg/L CRF), Astressin 2B plus LPS group (pretreated with 20 μg/L Astressin 2B for 12 h and then treated with 20 μg/L LPS), and Antalarmin plus LPS group (pretreated with 20 μg/L Antalarmin for 12 h and then treated with 20 μg/L LPS). The expression of TLR4 mRNA and protein was detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blotting, respectively. The secretion of interleukin-8 in the culture supernatants was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

with 20 μg/L Antalarmin for 12 h and then treated with 20 μg/L CRF), Astressin 2B plus LPS group (pretreated with 20 μg/L Astressin 2B for 12 h and then treated with 20 μg/L LPS), and Antalarmin plus LPS group (pretreated with 20 μg/L Antalarmin for 12 h and then treated with 20 μg/L LPS). The expression of TLR4 mRNA and protein was detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blotting, respectively. The secretion of interleukin-8 in the culture supernatants was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

■背景资料

越来越多临床观察及实验数据发现, 心理压力不仅可以导致功能性肠病的发生, 也可诱发或加剧器质性疾病如炎症性肠病的产生, 但是压力等应激因素是如何导致肠黏膜免疫紊乱并不清楚。

RESULTS: CRF could induce the expression of TLR4 in HT-29 cells and result in increased interleukin-8 secretion ($P < 0.05$). CRFR2 antagonist Astressin 2B inhibited the expression of LR4 ($P < 0.05$, CRF+LPS group vs CRF group), while CRF1 antagonist Antalarmin had no significant effect on the expression of TLR4 ($P > 0.05$, CRF+LPS group vs CRF group).

CONCLUSION: The induction of TLR4 expression by CRF in human intestinal epithelial cells is mediated by the CRF2 receptor.

Key Words: Corticotrophin-releasing factor; Toll-like receptor; Intestinal epithelial cells

Yang L, Zheng PY, Liu ZQ. Activation of TLR4 by CRF in human intestinal epithelial cells is mediated by the CRF2 receptor. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(19): 1763-1767

摘要

目的: 研究促肾上腺皮质释放因子(CRF)介导肠上皮细胞中Toll样受体4(toll-like receptor 4, TLR4)的表达, 并探讨其可能通过的受体途径。

方法: 常规培养人结肠上皮细胞株HT-29细胞, 将HT-29细胞分为正常对照组(不加刺激剂), 脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)刺激组(LPS 20 μg/L刺激24 h), 促肾上腺皮质释放因子(corticotrophin-releasing factor, CRF)刺激组(CRF 20 μg/L刺激24 h), CRF+LPS刺激组(预先CRF 20 μg/L刺激12 h, 更换细胞液后再与LPS 20 μg/L刺激12 h), CRF+Antalarmin

■同行评议者

杜奕奇, 副教授,
中国人民解放军
第二军医大学长
海医院

■研发前沿

促肾上腺皮质释放因子(CRF)是一个重要的应激因子,不仅中枢组织中有表达,周围组织也存在,近年已发现肠黏膜组织中也有CRF的表达,并发现其与炎症发生有关。

组(CRF与Antalarmin 20 $\mu\text{g}/\text{L}$ 共刺激24 h),CRF+LPS+Antalarmin组(CRF与Antalarmin 20 $\mu\text{g}/\text{L}$ 共刺激12 h后再以LPS刺激12 h),CRF+Astressin2B组(CRF与Astressin2B 20 $\mu\text{g}/\text{L}$ 共刺激24 h),CRF+LPS+Astressin2B组(CRF与Astressin2B 20 $\mu\text{g}/\text{L}$ 共刺激12 h后再以LPS刺激12 h)。刺激结束后,收取各组HT-29细胞,RT-PCR法和免疫印迹法检测各组上皮细胞中TLR4 mRNA和蛋白的表达,ELISA法检测各组细胞上清液中IL-8的表达。

结果: CRF可以诱导人结肠上皮细胞株HT-29细胞中TLR4表达导致IL-8分泌增多($P<0.05$),CRF1受体拮抗剂不能有效地阻滞CRF对TLR4的诱导($P>0.05$, CRF+LPS组 vs CRF组),CRF2受体拮抗剂可阻滞CRF对TLR4的诱导($P<0.05$, CRF+LPS组 vs CRF组)。

结论: CRF通过CRF2受体通路介导肠上皮细胞中TLR4的表达。

关键词: 促肾上腺皮质释放因子; Toll样受体; 肠上皮细胞

杨丽, 郑鹏远, 刘志强. CRF通过CRF2受体介导肠上皮细胞中TLR4的表达. 世界华人消化杂志 2012; 20(19): 1763-1767
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1763.asp>

0 引言

大量研究发现精神心理压力不仅可以诱发和/或加剧炎症性肠病症状^[1],还可以促进实验性结肠炎的产生^[2],促肾上腺皮质释放因子(corticotrophin-releasing factor, CRF)是一个重要的应激效应因子,下丘脑中枢中的CRF通过诱导乙酰胆碱(acetylcholine, ACTH)促进糖皮质激素生成限制炎症介质的释放,进而限制炎症反应,而周围组织中的CRF则由免疫细胞、神经纤维等其他细胞释放局部发挥着促炎作用^[3]。周围型的CRF已不局限于应激因子,更多的是一种促炎因子,CRF通过与其不同受体(CRF-R1或CRF-R2)结合而发挥不同生物学效应。胃肠道中普遍存在着CRF-R1和CRF-R2,溃疡性结肠炎组织中亦发现CRF的表达增高^[4,5],但增高的CRF是如何导致肠黏膜炎症并不清楚,有研究显示CRF可诱导巨噬细胞中TLR4表达^[6],而Toll样受体4(toll-like receptor 4, TLR4)在肠黏膜上皮组织中的先天性免疫调节中发挥着重要作用^[7],与炎症性肠病肠黏膜炎症的发生密切相关,本实验通过CRF及脂多糖(lipopolsaccharide, LPS)以及CRF-R1受体拮抗剂

Antalarmin和CRF-R2受体拮抗剂Astressin2B干预刺激结肠上皮细胞系HT-29细胞,观察各组上皮细胞中TLR4的表达情况,探讨CRF在肠上皮细胞中对TLR4的影响及可能通过的受体途径。

1 材料和方法

1.1 材料 HT-29细胞株购自中国科学院细胞库,CRF购自Sigma公司; LPS购自Sigma公司;兔抗人Toll4受体多克隆抗体购自Santa Cruz公司;辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG,兔抗人 β -actin单克隆抗体,化学发光试剂盒, RPMI 1640培养液等。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: 结肠癌上皮细胞株HT-29细胞复苏后,接种培养于含100 mL/L小牛血清、100 U/mL青霉素、链霉素的RPMI 1640培养基中,置于37 °C、50 mL/L CO₂孵箱中培养,每天更换培养液,4-5 d后以0.25%的胰酶消化传代。取对数生长期细胞,以 5×10^5 的密度接种于50 mL培养瓶,细胞生长至 5×10^6 后,换不含小牛血清的RPMI 1640培养液。实验共分8组,正常对照组(不加刺激剂),LPS刺激组(LPS 20 $\mu\text{g}/\text{L}$ 刺激24 h),CRF刺激组(CRF 20 $\mu\text{g}/\text{L}$ 刺激24 h),CRF+LPS刺激组(预先CRF 20 $\mu\text{g}/\text{L}$ 刺激12 h,更换细胞液后再与LPS 20 $\mu\text{g}/\text{L}$ 刺激12 h),CRF+Antalarmin组(CRF与Antalarmin 20 $\mu\text{g}/\text{L}$ 共刺激24 h),CRF+LPS+Antalarmin组(CRF与Antalarmin 20 $\mu\text{g}/\text{L}$ 共刺激12 h后再以LPS刺激12 h),CRF+Astressin2B组(CRF与Astressin2B 20 $\mu\text{g}/\text{L}$ 共刺激24 h),CRF+LPS+Astressin2B组(CRF与Astressin2B 20 $\mu\text{g}/\text{L}$ 共刺激12 h后再以LPS刺激12 h)。刺激结束后,收取各组HT-29细胞,PBS洗涤2次,分别用来提取RNA,RT-PCR法检测各组TLR4受体mRNA;提取总蛋白,免疫印迹法检测各组TLR4蛋白量。

1.2.2 RT-PCR法检测HT-29细胞TLR4 mRNA的表达:按照Triregent产品说明书提取RNA,设计并合成人TLR4和人GAPDH(内参照)引物(表1)。RT-PCR反应按照试剂盒说明书进行,94 °C预变性2 min;94 °C变性30 s,58 °C(内参58 °C)退火30 s,72 °C延伸2 min,35个循环;72 °C补延伸6 min。阴性对照用RNase-free Water代替cDNA进行反应,琼脂糖凝胶电泳、凝胶图像系统处理分析测定。

1.2.3 免疫印迹法检测各组HT-29细胞TLR4蛋白的表达:将刺激后的各组HT-29细胞,分别加入细胞蛋白裂解液提取蛋白,Bradford方法测定蛋白

表 1 引物序列

引物名称	引物序列(5'-3')	引物大小(bp)
TLR4		
sense	TGGATACGTTCTTATAAG	507
Anti-asense	GAAATGGAGGCACCCCTTC	
GAPDH		
sense	GCACCGTCAAGGCTGAGAAC	138
Anti-asense	TGGTGAAGACGCCAGTCCA	

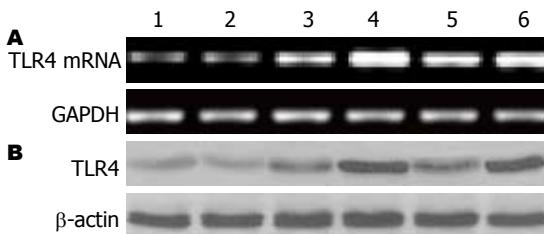


图 1 各组HT-29细胞中TLR4 mRNA和蛋白表达及CRF1受体拮抗剂干预结果. A: TLR4 mRNA; B: TLR4蛋白. 1: 对照组; 2: LPS组; 3: CRF组; 4: CRF+LPS组; 5: CRF+Antalarmin组; 6: CRF+LPS+Antalarmin组.

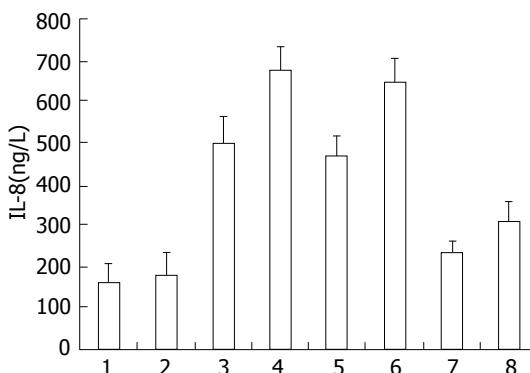


图 3 各组细胞中IL-8的表达. 1: 对照组; 2: LPS组; 3: CRF组; 4: CRF+LPS组; 5: CRF+Antalarmin组; 6: CRF+LPS+Antalarmin组; 7: CRF+Astressin2B组; 8: CRF+LPS+Astressin2B组.

浓度, 配置8%的SDS-PAGE凝胶, 将总蛋白加样, 恒压电泳, 恒流转膜, 加入5%的脱脂奶粉封闭过夜, 加一抗兔抗人Toll4受体多克隆抗体, 孵育2 h, PBS洗涤2次, 加辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG, 孵育2 h, ECL显色, 暗室曝光. 凝胶图像分析.

1.2.4 ELSIA法检测IL-8: 取各组细胞上清液, 按照说明书进行检测.

统计学处理 所有数据计量资料用mean±SD表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 采用SPSS13.0软件做统计学分析, $P<0.05$ 有统计学意义.

2 结果

2.1 CRF对HT-29细胞中TLR4表达的影响 LPS刺

■相关报道

TLR4作为先天性免疫与获得性免疫的桥梁, 在肠上皮细胞对腔内共栖菌的稳定中起着关键作用. 肠黏膜TLR4的表达调控异常可导致肠黏膜炎症的发生.

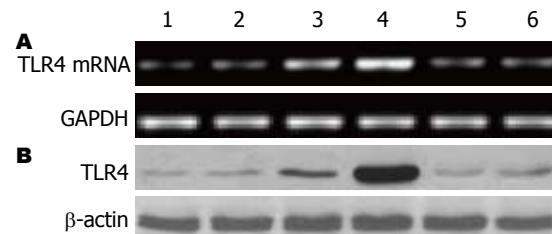


图 2 各组HT-29细胞中TLR4 mRNA和蛋白表达及CRF2受体拮抗剂干预结果. A: TLR4 mRNA; B: TLR4蛋白. 1: 对照组; 2: LPS组; 3: CRF组; 4: CRF+LPS组; 5: CRF+Astressin2B组; 6: CRF+LPS+Astressin2B组.

激组TLR4 mRNA(0.31 ± 0.04 vs 0.28 ± 0.02)和蛋白表达水平(0.48 ± 0.17 vs 0.45 ± 0.12)与对照组相比较, 差异无统计学意义($P>0.05$); CRF组TLR4 mRNA(1.05 ± 0.06 vs 0.28 ± 0.02)和蛋白表达水平(1.08 ± 0.21 vs 0.45 ± 0.12)与对照组相比较, 差异有统计学意义($P<0.05$), 而CRF+LPS组则更高于CRF组(1.68 ± 0.05 vs 1.05 ± 0.06 , 1.81 ± 0.18 vs 1.08 ± 0.21), 两组之间差异有统计学意义($P<0.05$, 图1, 2). 进一步检测各组细胞中IL-8水平, 发现与TLR4活化一致, 也相应增高(图3).

2.2 CRF1受体拮抗剂Antalarmin对CRF诱导的TLR4表达的影响 CRF+Antalarmin组中TLR4 mRNA和蛋白表达水平与CRF组比较, 差异无统计学意义(1.01 ± 0.03 vs 1.05 ± 0.06 , 1.01 ± 0.16 vs 1.08 ± 0.21 , $P>0.05$); CRF+LPS+Antalarmin组与CRF+LPS相比较, 亦无显著性差异(1.62 ± 0.04 vs 1.68 ± 0.05 , 1.78 ± 0.21 vs 1.81 ± 0.18 , 图1).

2.3 CRF2受体拮抗剂Astressin2B对CRF诱导的TLR4表达的影响 CRF+Astressin2B组中TLR4 mRNA和蛋白表达水平与CRF组比较, 两组之间差异有统计学意义(0.29 ± 0.03 vs 1.05 ± 0.06 , 0.48 ± 0.26 vs 1.08 ± 0.21 , $P<0.05$), CRF+LPS+Astressin2B组与CRF+LPS组比较, 两组之间差异亦有统计学意义(0.31 ± 0.06 vs 1.68 ± 0.05 , 0.51 ± 0.22 vs 1.81 ± 0.18 , $P<0.05$, 图2).

■创新盘点

本实验通过研究CRF在结肠上皮中对TLR4的调节作用以及通过的受体途径, 将为明确应激导致炎症的发生提供理论基础。

3 讨论

近年研究发现CRF信号系统活化可能是压力诱发或加剧炎症性肠病的机制^[8], 已经证实肠道活化的CRF信号可以导致促炎反应, 并有研究发现肽聚糖诱导的结肠炎组织中CRF表达是增高的; 相反CRF缺陷小鼠肠道炎症反应会减轻^[9], 溃疡性结肠炎组织中CRF表达也增高, 但是增高的CRF是如何导致炎症发生并不清楚。已有研究显示CRF可以促进单核细胞释放趋化因子, 巨噬细胞释放IL-6、TNF- α 、IL-1^[10], 但对肠上皮细胞的作用了解甚少。

肠上皮细胞暴露于高浓度的细菌及其共栖菌, 对腔内细菌的识别是肠腔内环境稳定的关键。而TLR对宿主的保护起着重要作用, 他们通过启动先天性免疫反应调整对细菌病毒的适应性免疫^[11,12]。研究显示, 正常结肠上皮细胞中TLR4呈低表达水平, 对LPS反应很弱, 但在炎症性肠病肠黏膜组织中呈现显著高表达^[13,14]。TLR4低水平表达及信号微弱是肠上皮细胞的适应性免疫调节, 使肠上皮免遭对腔内细菌不必要的免疫反应所引起的组织破坏, 因此TLR4与腔内共栖菌之间的调节信号对于增强保护, 促进损伤修复, 维持肠黏膜的正常屏障作用至关重要^[15]。

本研究显示正常肠上皮细胞中LPS不能刺激TLR4表达增高, 但是CRF刺激组TLR4 mRNA和蛋白表达水平则增高, 提示CRF可以促进肠上皮细胞中TLR4表达, 而CRF刺激后再次以LPS刺激则TLR4 mRNA和蛋白表达水平显著增高, 提示CRF不仅可直接刺激结肠上皮TLR4增高, 还可促进结肠上皮对LPS反应增加, 进而促进TLR4表达增高。而肠上皮细胞中TLR4表达增高可导致对腔内细菌免疫耐受异常, 导致对LPS的反应增加, 引起促炎因子IL-8释放增多^[16]。我们进一步检测各组细胞中IL-8水平, 发现与TLR4活化一致, 也相应增高。

CRF肽家族的受体分为CRF1型受体和CRF2型受体, 二者均属于G蛋白耦联受体, 胃肠组织中均有CRF1受体和CRF2受体分布, CRF与不同受体结合而发挥不同的生物学效应。例如胃排空与CRF2受体有关, 结肠动力与CRF1受体有关^[17], CRF2受体缺陷性小鼠肠道炎症是减轻的^[18]。但是CRF在结肠上皮中对TLR4的调节作用通过何种受体尚不清楚。我们对以上实验分别以CRF1受体拮抗剂和CRF2受体拮抗剂进行干预阻滞发现, CRF2受体拮抗剂可有效阻滞CRF对TLR4的诱导表达, 而CRF1受体拮抗剂不

能有效地阻滞, 与TLR4表达水平一致的肠上皮细胞分泌IL-8的变化, 均提示CRF对结肠上皮细胞TLR4的诱导有可能是通过CRF2受体通路。

近年已有发现TLR4抗体可以减轻实验性结肠炎中的炎症反应^[19], 有效阻滞TLR4的活化已成为近年为减轻炎症性肠病中肠道炎症的治疗热点。而本实验明确CRF在结肠上皮中对TLR4的调节作用以及通过的受体途径, 将为明确应激导致炎症的发生以及可能的治疗提供理论基础。

4 参考文献

- 1 Mawdsley JE, Rampton DS. Psychological stress in IBD: new insights into pathogenic and therapeutic implications. *Gut* 2005; 54: 1481-1491
- 2 Melgar S, Engström K, Jägervall A, Martinez V. Psychological stress reactivates dextran sulfate sodium-induced chronic colitis in mice. *Stress* 2008; 11: 348-362
- 3 Lightman SL. The neuroendocrinology of stress: a never ending story. *J Neuroendocrinol* 2008; 20: 880-884
- 4 Gross KJ, Pothoulakis C. Role of neuropeptides in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2007; 13: 918-932
- 5 Kawahito Y, Sano H, Mukai S, Asai K, Kimura S, Yamamura Y, Kato H, Chrousos GP, Wilder RL, Kondo M. Corticotropin releasing hormone in colonic mucosa in patients with ulcerative colitis. *Gut* 1995; 37: 544-551
- 6 Tsatsanis C, Androulidaki A, Alissafi T, Charalampopoulos I, Dermitzaki E, Roger T, Gravanis A, Margioris AN. Corticotropin-releasing factor and the urocortins induce the expression of TLR4 in macrophages via activation of the transcription factors PU.1 and AP-1. *J Immunol* 2006; 176: 1869-1877
- 7 Abreu MT, Thomas LS, Arnold ET, Lukasek K, Michelsen KS, Arditi M. TLR signaling at the intestinal epithelial interface. *J Endotoxin Res* 2003; 9: 322-330
- 8 Paschos KA, Kolios G, Chatzaki E. The corticotropin-releasing factor system in inflammatory bowel disease: prospects for new therapeutic approaches. *Drug Discov Today* 2009; 14: 713-720
- 9 Gay J, Kokkotou E, O'Brien M, Pothoulakis C, Karalis KP. Corticotropin-releasing hormone deficiency is associated with reduced local inflammation in a mouse model of experimental colitis. *Endocrinology* 2008; 149: 3403-3409
- 10 Moss AC, Anton P, Savidge T, Newman P, Cheifetz AS, Gay J, Paraschos S, Winter MW, Moyer MP, Karalis K, Kokkotou E, Pothoulakis C. Urocortin II mediates pro-inflammatory effects in human colonocytes via corticotropin-releasing hormone receptor 2alpha. *Gut* 2007; 56: 1210-1217
- 11 Takahashi K, Sugi Y, Nakano K, Tsuda M, Kurihara K, Hosono A, Kaminogawa S. Epigenetic control of the host gene by commensal bacteria in large intestinal epithelial cells. *J Biol Chem* 2011; 286: 35755-35762
- 12 Groschwitz KR, Hogan SP. Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 124: 3-20; quiz 21-22
- 13 Abreu MT, Arnold ET, Thomas LS, Gonsky R, Zhou Y, Hu B, Arditi M. TLR4 and MD-2 expression is regulated by immune-mediated signals in human intestinal

- epithelial cells. *J Biol Chem* 2002; 277: 20431-20437
- 14 Suzuki M, Hisamatsu T, Podolsky DK. Gamma interferon augments the intracellular pathway for lipopolysaccharide (LPS) recognition in human intestinal epithelial cells through coordinated up-regulation of LPS uptake and expression of the intracellular Toll-like receptor 4-MD-2 complex. *Infect Immun* 2003; 71: 3503-3511
- 15 Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, Edberg S, Medzhitov R. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* 2004; 118: 229-241
- 16 Bhattacharyya S, Borthakur A, Pant N, Dudeja PK, Tobacman JK. Bcl10 mediates LPS-induced activation of NF-kappaB and IL-8 in human intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; 293: G429-G437
- 17 Mayer EA, Collins SM. Evolving pathophysiologic models of functional gastrointestinal disorders. *Gastroenterology* 2002; 122: 2032-2048
- 18 Kokkotou E, Torres D, Moss AC, O'Brien M, Grigoriadis DE, Karalis K, Pothoulakis C. Corticotropin-releasing hormone receptor 2-deficient mice have reduced intestinal inflammatory responses. *J Immunol* 2006; 177: 3355-3361
- 19 Ungaro R, Fukata M, Hsu D, Hernandez Y, Breglio K, Chen A, Xu R, Sotolongo J, Espana C, Zaias J, Elson G, Mayer L, Kosco-Vilbois M, Abreu MT. A novel Toll-like receptor 4 antagonist antibody ameliorates inflammation but impairs mucosal healing in murine colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009; 296: G1167-G1179

■同行评价

本研究立意较新, 研究结果对阐明IBD的发病机制有一定意义, 结论可靠, 统计学正确, 为今后进一步开展体内研究奠定了基础.

编辑 张姗姗 电编 鲁亚静

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2012年版权归世界华人消化杂志

•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), 国内统一刊号CN 14-1260/R, *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi/World Chinese Journal of Digestology*], 是一本由来自国内23个省、市、自治区、特别行政区的370位胃肠病学和肝病学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学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学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、中医药学、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.

PgP、TP、GST-π、MRP在食管癌组织中的表达及与化疗的关系

李明, 张成辉, 张永喜

■背景资料

食管癌的多药耐药基因对化疗的影响如何, 可以通过分析化疗疗效与耐药基因表达之间的关系, 进而指导临床化疗的目的性。耐药基因的表达是化疗研究的重点, 长期以来众多学者都做出了很多的努力, 发表了很多方面的报道, 但食管癌上较少, 且病理分型上不同, 需要更细化的分析和化疗疗效的关系。

李明, 张成辉, 南阳市中心医院肿瘤科 河南省南阳市 473000
张永喜, 新乡医学院第三附属医院肿瘤科 河南省新乡市 453003
李明, 主治医师, 主要从事恶性肿瘤临床内科治疗和研究。
作者贡献分布: 李明与张永喜对本文所作贡献均等; 此课题由李明、张成辉及张永喜设计; 研究过程由李明与张永喜操作完成; 研究标本、所用试剂及分析工具由李明与张永喜提供; 数据分析由张永喜完成; 本论文写作由李明、张成辉及张永喜完成。
通讯作者: 张永喜, 主治医师, 453003, 河南省新乡市华兰大道, 新乡医学院第三附属医院肿瘤科. mungli@sina.com
收稿日期: 2012-03-27 修回日期: 2012-05-05
接受日期: 2012-06-16 在线出版日期: 2012-07-08

Correlation between PgP, TP, GST-π and MRP expression and response to chemotherapy in patients with esophageal cancer

Ming Li, Cheng-Hui Zhang, Yong-Xi Zhang

Ming Li, Cheng-Hui Zhang, Department of Oncology, Nanyang Central Hospital, Nanyang 473000, Henan Province, China

Yong-Xi Zhang, Department of Oncology, the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical College, Xinxiang 453003, Henan Province, China

Correspondence to: Yong-Xi Zhang, Attending Physician, Department of Oncology, the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical College, Xinxiang 453003, Henan Province, China. mungli@sina.com

Received: 2012-03-27 Revised: 2012-05-05

Accepted: 2012-06-16 Published online: 2012-07-08

Abstract

AIM: To study the relationship between expression of P-glycoprotein (PgP), thymidine phosphorylase (TP), glutathione S-transferase-π (GST-π), and multidrug resistance-associated protein (MRP) and response to chemotherapy in patients with esophageal cancer.

METHODS: Fifty-eight patients gastroscopically and pathologically diagnosed with esophageal cancer were included in this study. Esophageal cancer samples collected from these patients were used to detect the expression of PgP, TP, GST-π, and MRP by immunohistochemistry. All the patients underwent neoadjuvant chemother-

apy with double-platinum regimen. Response to chemotherapy and expression of PgP, TP, GST-π, and MRP was analyzed.

RESULTS: PgP-positive particles were distributed in the membrane and cytoplasm, TP-positive particles in the cytoplasm and nucleus, GST-π-positive particles in the cytoplasm, and MRP-positive particles in the cytoplasm. The positive rates of PgP, TP, GST-π, and MRP expression in esophageal cancer were 41.37%, 32.76%, 20.69% and 37.93%, respectively. Compared to patients not responding to chemotherapy, the positive rates of PgP, GSH and MRP expression were significantly lower and that of TP was significantly higher in patients having response to chemotherapy.

CONCLUSION: Low expression of PgP, GST-π, and MRP and high expression of TP are conducive to chemotherapy in patients with esophageal cancer.

Key Words: Immunohistochemistry; P-glycoprotein; Thymidine phosphorylase; Glutathione S-transferase-π; Multidrug resistance-associated protein; Chemotherapy

Li M, Zhang CH, Zhang YX. Correlation between PgP, TP, GST-π and MRP expression and response to chemotherapy in patients with esophageal cancer. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(19): 1768-1772

摘要

目的: 检测食管癌组织中P-糖蛋白(P-glycoprotein, PgP)、胸苷磷酸化酶(thymidine phosphorylase, TP)、谷胱甘肽-S-转移酶π(glutathione S-transferase π, GST-π)、多药耐药相关蛋白(multidrug resistance-associated protein, MRP)表达情况, 探讨其与食管癌化疗敏感性的关系。

方法: 选取我院食管癌患者58例, 用免疫组织化学方法检测食管癌组织中多药耐药相关蛋白PgP、TP、GST-π、MRP蛋白的表达情

况; 行双铂方案新辅助化疗, 分析化疗疗效与PgP、TP、GST- π 、MRP蛋白表达差异的关系.

结果: PgP阳性颗粒分布于胞膜和胞浆; TP阳性颗粒分布于细胞胞浆和胞核; GST- π 阳性颗粒分布于胞浆; MRP阳性颗粒分布于胞膜和胞浆, 他们在食管癌组织中都存在一定的表达率, 表达率分别为41.37%、32.76%、20.69%和37.93%. 化疗有效组患者与化疗无效组患者相比较, 食管癌组织中PgP、GSH和MRP的阳性表达率低, TP阳性表达率高, 两组之间有显著性差异.

结论: 食管癌组织中PgP、TP、GST- π 、MRP存在一定的表达率; PgP、GST- π 、MRP表达率低而TP表达率高, 化疗治疗的效果好.

关键词: 免疫组织化学; P-糖蛋白; 胸苷酸磷酸化酶; 谷胱甘肽-S-转移酶 π ; 多药耐药相关蛋白; 化疗

李明, 张成辉, 张永壹. PgP、TP、GST- π 、MRP在食管癌组织中的表达及与化疗的关系. 世界华人消化杂志 2012; 20(19): 1768-1772
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1768.asp>

0 引言

肿瘤细胞多药耐药是肿瘤患者化疗失败的常见原因, 是肿瘤细胞逃逸和抵御化疗药物杀伤的内在基础. 他通过直接将药物排出、降低药物毒性、破坏药物作用靶点等方式参与肿瘤细胞的耐药. 食管癌是一种对化疗较敏感的实体瘤, 但临幊上发现部分难治性食管癌对化疗极不敏感, 预后较差, 可能是内在性耐药机制作用的结果. 为了解食管癌患者肿瘤细胞的耐药机制及其对化疗的影响, 我们利用敏感的免疫组织化学技术, 对食管癌组织中的P-糖蛋白(P-glycoprotein, PgP)、胸苷酸磷酸化酶(thymidine phosphorylase, TP)、谷胱甘肽-S-转移酶 π (glutathione S-transferase π , GST- π)、多药耐药相关蛋白(multidrug resistance-associated protein, MRP)进行测定, 观察其表达情况及与化疗疗效的关系.

1 材料和方法

1.1 材料 58例取自2002-2005年在我院不能接受手术治疗的食管癌患者, 其中男32例, 女26例, 平均年龄52.4岁±10.9岁, 所有患者治疗前均未接受过放射和化学药物治疗. 行胃镜活检肿瘤组织, 行常规HE染色, 组织病理学确诊为食管癌, 其中鳞癌52例, 腺癌6例. 在化疗前, 行

免疫组织化学染色测定PgP、TP、GSH、MRP的蛋白表达, 所用试剂鼠源性抗PgP、鼠抗人TP单克隆抗体、GST- π 多克隆抗体、MRP1单克隆抗体、SP试剂盒、防脱片剂APES、显色剂DAB均购自北京中山生物技术有限公司. 化疗给予双铂方案, 具体用药为: CBP 300 mg/(m²·d), d1 iv; DDP 25 mg/(m²·d), d2-5 iv; 5-Fu 500 mg/(m²·d), d1-5 iv. 21 d为1周期, 至少2个周期.

1.2 方法 将选取固定好的肿瘤标本经脱水、常规石蜡包埋, 制成4 μm连续组织切片, 按照常规的步骤进行免疫组织化学染色(SP法), 以已知染色阳性切片为阳性对照, PBS代替一抗为阴性对照. 光学显微镜400倍下随机计数5个高倍视野的癌细胞, 以细胞膜、浆、核中存在粗细一致的棕黄色颗粒为阳性, 其中PgP阳性颗粒分布于胞膜胞浆呈黄褐色, TP阳性颗粒分布于胞浆和/或胞核呈棕黄色, GST- π 阳性颗粒分布于胞浆及胞核呈黄褐色或棕黄色, MRP阳性颗粒分布于胞浆呈黄褐色. 根据染色的分布范围和显色程度, 即阳性细胞数比例分为4级: 1级(-)阳性细胞<25%, 2级(+)阳性细胞25%-49%, 3级(++)阳性细胞50%-74%, 4级(++++)阳性细胞>75%, 结果由2位病理医师双盲读片判定. 疗效评价参照WHO关于可测定或可评价病变标准进行评定; 疗效分为完全缓解(CR)、部分缓解(PR)、稳定(SD)以及进展(PD); 临床有效为CR+PR; 临床受益为CR+PR+SD.

统计学方法 应用SPSS17.0统计软件进行处理, 率的比较采用 χ^2 检验, 检验水准 $\alpha = 0.05$ 或0.01, $P < 0.05$ 时认为两组之间的差异有显著性, $P < 0.01$ 时认为两组之间的差异有极显著性.

2 结果

2.1 食管癌组织中PgP、TP、GST- π 、MRP的表达 58例食管癌标本全部进行免疫组织化学染色检测, PgP阳性颗粒分布于胞膜胞浆, 其表达率为24/58(41.37%); TP阳性颗粒分布于细胞胞浆和胞核, 呈棕黄色至深棕色染色, 强阳性染色的细胞大多位于肿瘤浸润的边缘部位, 其表达率为19/58(32.76%); GST- π 阳性颗粒分布于胞浆, 其表达率为12/58(20.69%); MRP阳性颗粒分布于胞浆, 其表达率为22/80(37.93%)(图1).

2.2 食管癌中PgP、TP、GST- π 、MRP的表达与化疗疗效的关系 58例患者在第2个疗程结束后3 wk进行化疗疗效评价, 其中缓解者(完全缓解及部分缓解)有41例, 有效率为70.69%(41/58);

■研究前沿
 本研究中的几个耐药基因都比较常见, 但是他们在食管癌中同时表达的研究少, 以及他们对化疗疗效的影响鲜有报道, 本文旨在这两方面做出研究.

■应用要点

本研究用免疫组织化学的方法检测耐药蛋白在食管癌组织中的表达，并分析和化疗疗效间的关系，有助于指导化疗药物的选择。

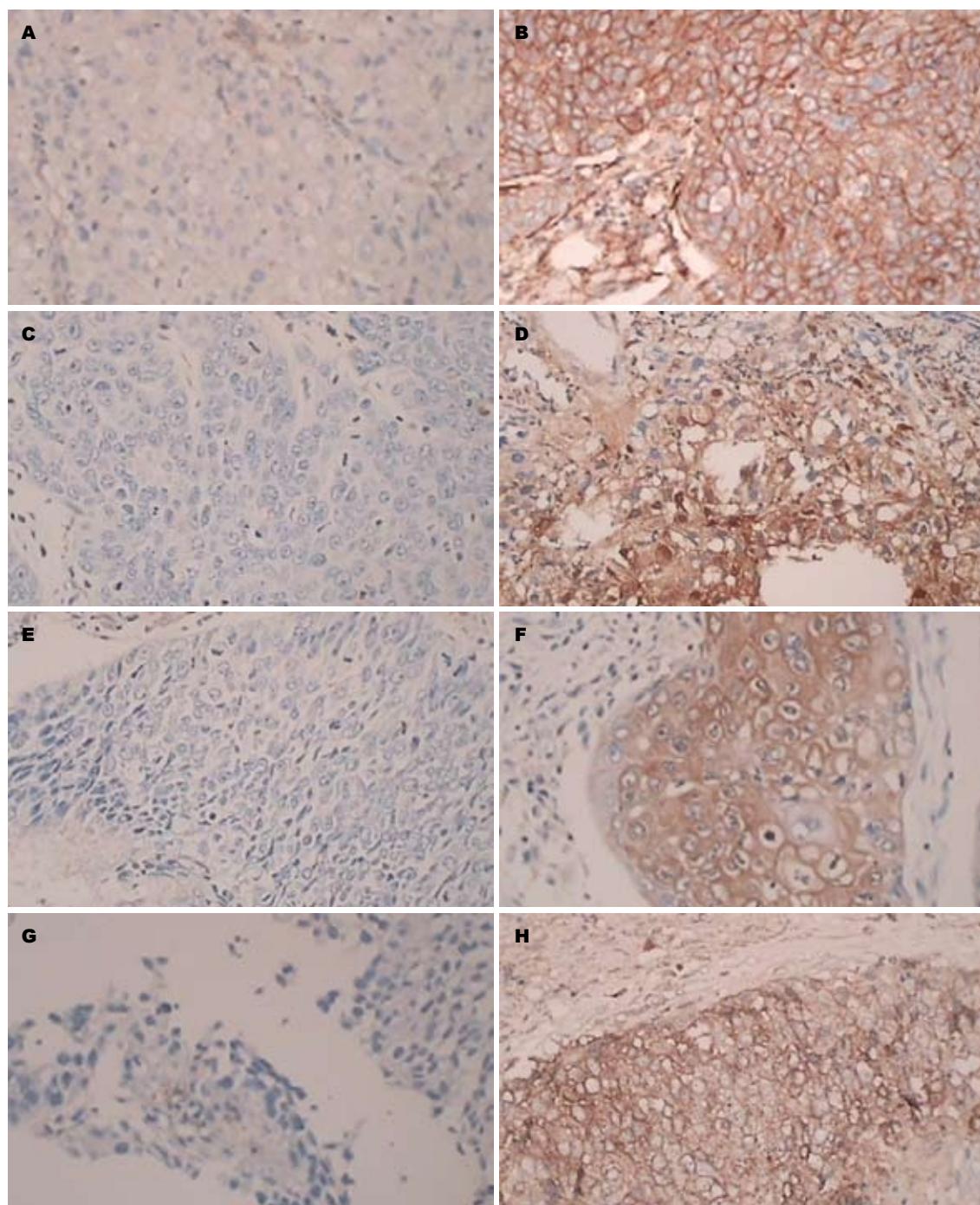


图 1 PgP, TP, GST- π , MRP 分别在食管癌组织中的阴、阳性表达(SP $\times 200$). A: PgP阴性; B: PgP阳性; C: TP阴性; D: TP阳性; E: GST- π 阴性; F: GST- π 阳性; G: MRP阴性; H: MRP阳性.

无缓解者17例(无变化及进展)，占29.31%。分析有效组患者和无效组患者癌组织中PgP、TP、GSH、MRP的表达情况：PgP在有效组中(完全缓解及部分缓解的41例患者)的阳性表达率为26.83%(11/41)，在无效组中(无变化及进展的17例患者)的阳性表达率为76.47%(13/17)，两组间差异有显著性($P<0.01$)；TP在有效组的阳性表达率为43.90%(18/41)，在无效组中的阳性表达率为5.88%(1/17)，两组间差异有显著性($P<0.01$)；

GST- π 在有效组的阳性表达率为7.32%(3/41)，在无效组中的阳性表达率为52.94%(9/17)，两组间差异有显著性($P<0.01$)；MRP在有效组的阳性表达率为24.39%(10/41)，在无效组中的阳性表达率为70.59%(12/17)，两组间差异有显著性($P<0.01$ ，表1)。

3 讨论

根据资料报道^[1]，90%的化疗失败和耐药有关，

表 1 食管癌组织中PgP、TP、GST- π 、MRP的表达与化疗疗效的关系

	有效组		无效组		χ^2 值	P值
	%	n	%	n		
PgP阳性表达	26.83	11	76.47	13	12.21	<0.01
TP阳性表达	43.90	18	5.88	1	7.89	<0.01
GST- π 阳性表达	7.32	3	52.94	9	12.59	<0.01
MRP阳性表达	24.39	10	70.59	12	10.89	<0.01

肿瘤的多药耐药是指肿瘤细胞可耐受结构、功能和杀伤机制不同的多种药物的致死剂量, 耐药的根本原因是多药耐药基因MDR表达升高。他可使抗癌药物泵出细胞致细胞内药物浓度降低, 还可直接与药物结合, 使药物无法进入细胞发挥杀伤作用, 使肿瘤细胞产生耐药性。

Juliano等^[2]最早在研究MDR表型的中国仓鼠卵巢细胞(cHo)发现一种分子量为170 kDa的细胞膜糖蛋白过度表达, 同时发现该耐药细胞对药物的摄入与亲代细胞无明显差异, 但细胞外排药物的能力显著增强, 他们推测细胞的多药耐药现象是由于该糖蛋白降低了细胞膜的通透性使药物外排增加, 细胞内药物积聚减少而产生多药耐药现象, 人们将此糖蛋白称为PgP。Goldstein等^[3]采用狭缝印迹分析法检测了400多例各种肿瘤组织的MDR1 mRNA表达水平, 食管癌低度表达, 本实验与其相符。肿瘤细胞的耐药性可以存在于化疗之前, 即内在性耐药, 也可以在化疗中产生, 即获得性耐药^[4]。过去认为MDR是一种获得性耐药, 是多次反复化疗后药物诱发的结果, 但随着对MDR的深入研究, 有学者^[5]对此观点提出疑问, 他们认为存在有先天耐药。我们对未行化疗药物治疗的食管癌贲门癌患者的P-糖蛋白进行检测, 发现阳性表达存在, 表明食管癌和贲门癌患者中有部分存在内在性耐药。这与临幊上食管癌贲门癌化疗效果欠佳, 化疗只起一定辅助作用的表现是一致的^[6,7]。因此, 在食管癌的综合治疗中仍应强调手术的作用, 同时合理制定化疗方案, 包括选择化疗药物的种类、剂量和应用时机。本组资料显示, PgP在食管癌的表达中, 阳性组较对照组化疗反应率偏低, 差别有显著性。治疗时, 应选用合适的PgP阴性的患者, 或者已被临床证明有效的MDR-1基因逆转剂或PgP阻断剂进行联合应用, 使化疗发挥更有效的作用。

5-Fu经胸苷酸磷酸化酶(thymidine phos-

phorylase, TP)作用转化为核苷酸类似物FDUMP, 抑制胸苷酸合成酶(thymidylate synthetase, TS), 干扰dTMP合成与DNA复制, 从而杀伤肿瘤细胞。因此, TP作为5-Fu代谢途径中的关键酶, 其在肿瘤组织中的表达水平, 直接决定化疗的疗效。TP是一种同型二聚体酸性蛋白, 基因位于人染色体22q13, 每条单链含有482个氨基酸, TP分子以其丝氨酸残基与核苷的磷酸通过共价键结合, 但不能与肝素结合。TP催化胸腺嘧啶核苷, 脱氧尿嘧啶核苷及其类似物可逆性磷酸化为相应的碱基和2-脱氧右旋核糖¹, 也催化脱氧核糖基转移形成新的核, 可促进5-Fu代谢, 他可能是5-Fu的关键基因, 催化药物前体5-DFUR去磷酸化转变为5-Fu, 增强药物的效应, 而5-Fu已广泛应用于临床作为食管癌的辅助治疗, 因此, 对癌组织中TP的表达进行检测, 有助于选择合适的化疗方案。本研究发现: TP蛋白表达越高, 5-FU作用后, 化疗的效应就越好, 这于Mader等^[8]在大肠癌中的研究结论相一致, TP可反映大肠癌对5-FU的化疗敏感性, 抑制TP活性可使该药细胞毒性下降79%。

MRP是分子量为190 kDa的膜糖蛋白, 具有能量依赖性药物外排泵作用, 参与某些亲电子药物的跨膜转运。MRP位于人染色体16p13.1区^[9], 为ATP结合的盒式膜转运蛋白(ATP-binding cassette, ABC)家族成员, 由相互融合的5个相对独立的结构域组成: 3个疏水的跨膜区(membrane spanning domain, MSD)和2个核苷酸结合功能区(nucleotide binding domain, NBD)组成, 后者袋状结构中含两个ATP结合基团, 通过水解ATP供能逆浓度梯度转运相适底物。用流式细胞仪观察柔红霉素在MRP过表达的多种细胞系中药代动力学的变化, 发现同敏感株相比, 药物在耐药细胞内蓄积的量明显减少, 胞吐和/或药物外排加快, 因而认为加快抗癌药物从靶细胞中排出, 降低药物浓度是MRP介导MDR的主要作用机制^[10-12]。本实验结果显示, MRP的表达对化疗影响较大, 患者MRP的表达率越高, 其化疗反应性越差, 化疗前MRP的表达越少, 化疗效果越好。

谷胱甘肽-S-转移酶(glutathione S transferase, GST)是一组具有多种生物功能的蛋白质, 能够催化谷胱甘肽与多种亲电子物质结合, 在细胞解毒和代谢中起重要作用^[13]。GST- π 是5个亚型中最重要的一型, 广泛存在于动植物中的酶, 分为 α 、 μ 、 π 3类, 主要催化还原型谷胱甘肽与亲电性物质间的反应, 对生物

■同行评价
本文研究思路明晰, 方法经典, 总体评价良好。

细胞起保护作用。有文献报道^[14], GST-π是谷胱甘肽S-转移酶系统中的一个亚类, 在体内与各种电离化合物及细胞毒药物结合, 从而使之代谢、减毒。GST-π的表达在肿瘤发生起始阶段就已存在, 而与病变进展及肿瘤分期无关, GST-π可能是食管上皮癌变的一个早期标志物, 它是细胞内主要的非蛋白肽, 可使结合到细胞DNA的铂类减少, 使DNA-铂加合物修饰增强而导致瘤细胞对顺铂等铂制剂耐药。本研究发现: GST-π蛋白表达越高, 顺铂化疗后的效果就越差, 这与Wang等^[15]的研究结果“GST-π在耐烷基化物(包括铂类)药联合化疗中起重要作用”相符合。

化疗耐药是III、IV期食管癌化疗效果不佳的一个重要原因, 通过以上PgP、TP、GST-π、MRP的表达的测定, 我们可以初步判断食管癌可能存在的化疗耐药状况, 从而在临床治疗时选择合适的化疗方案。

4 参考文献

- 1 Loe DW, Deeley RG, Cole SP. Biology of the multidrug resistance-associated protein, MRP. *Eur J Cancer* 1996; 32A: 945-957
- 2 Juliano RL, Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta* 1976; 455: 152-162
- 3 Goldstein LJ. MDR1 gene expression in solid tumours. *Eur J Cancer* 1996; 32A: 1039-1050
- 4 孙晓东, 钟雪云. 肿瘤的多药耐药性. 肿瘤防治研究 1997; 24: 255-259
- 5 戴建华, 李国仁, 刘晓峰, 苗福禄, 陈光辉, 邵仲凡, 王燕清, 白玲. 食管贲门癌组织相关耐药基因表达水平及其临床意义. 医学理论与实践 2002; 15: 137-139
- 6 Nooter K, Herweijer H. Multidrug resistance (mdr) genes in human cancer. *Br J Cancer* 1991; 63: 663-669
- 7 al-Awqati Q. Regulation of ion channels by ABC transporters that secrete ATP. *Science* 1995; 269: 805-806
- 8 Mader RM, Sieder AE, Braun J, Rizovski B, Kalipciyan M, Mueller MW, Jakesz R, Rainer H, Steger GG. Transcription and activity of 5-fluorouracil converting enzymes in fluoropyrimidine resistance in colon cancer in vitro. *Biochem Pharmacol* 1997; 54: 1233-1242
- 9 Cole SP, Bhardwaj G, Gerlach JH, Mackie JE, Grant CE, Almquist KC, Stewart AJ, Kurz EU, Duncan AM, Deeley RG. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* 1992; 258: 1650-1654
- 10 van der Kolk DM, Vellenga E, Müller M, de Vries EG. Multidrug resistance protein MRP1, glutathione, and related enzymes. Their importance in acute myeloid leukemia. *Adv Exp Med Biol* 1999; 457: 187-198
- 11 Stride BD, Valdimarsson G, Gerlach JH, Wilson GM, Cole SP, Deeley RG. Structure and expression of the messenger RNA encoding the murine multidrug resistance protein, an ATP-binding cassette transporter. *Mol Pharmacol* 1996; 49: 962-971
- 12 Zaman GJ, Flens MJ, van Leusden MR, de Haas M, Mulder HS, Lankelma J, Pinedo HM, Schepers RJ, Baas F, Broxterman HJ. The human multidrug resistance-associated protein MRP is a plasma membrane drug-efflux pump. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 8822-8826
- 13 Hamada S, Kamada M, Furumoto H, Hirao T, Aono T. Expression of glutathione S-transferase-pi in human ovarian cancer as an indicator of resistance to chemotherapy. *Gynecol Oncol* 1994; 52: 313-319
- 14 Sasano H, Miuzaki S, Shiga K, Goukon Y, Nishihira T, Nagura H. Glutathione S-transferase in human esophageal carcinoma. *Anticancer Res* 1993; 13: 363-368
- 15 Wang LS, Chow KC, Wu YC, Lin TY, Li WY. Inverse expression of dihydrodiol dehydrogenase and glutathione-S-transferase in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 2004; 111: 246-251

编辑 曹丽鸥 电编 鲁亚静

《世界华人消化杂志》栏目设置

本刊讯 本刊栏目设置包括述评, 基础研究, 临床研究, 焦点论坛, 文献综述, 研究快报, 临床经验, 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。

磁控胶囊内镜胃部检查55例

杜凡, 曹辉琼, 杨铁一, 邓桂林

杜凡, 南昌大学医学院第三附属医院消化内科 江西省南昌市 330000

曹辉琼, 惠州市第三人民医院消化内科 广东省惠州市 516001

杨铁一, 南昌大学医学院第三附属医院消化内科 江西省南昌市 330000

邓桂林, 惠州市第三人民医院 广东省惠州市 516001

杜凡, 南昌大学第三附属医院北院消化科, 主要从事消化临床及消化内镜研究。

作者贡献分布: 杜凡、曹辉琼及杨铁一对此文所作贡献均等; 本文由杜凡与曹辉琼查阅整理文献资料; 由邓桂林收集病例, 资料分析; 杜凡与曹辉琼完成写作; 杨铁一校审。

通讯作者: 曹辉琼, 516001, 广东省惠州市惠城区桥东学背街部1号, 惠州市第三人民医院消化内科, caoyuq@163.com

收稿日期: 2012-02-08 修回日期: 2012-05-03

接受日期: 2012-06-16 在线出版日期: 2012-07-08

sites of the esophagus and stomach.

RESULTS: Fifty-four volunteers completed the endoscopic procedure, and the mean operating time was 24.5 ± 5.5 min. One volunteer prematurely ended the examination because his gastric emptying was too fast and the capsule endoscope entered into the duodenum in five minutes. Of all the 55 volunteers, 45 were diagnosed with superficial gastritis, 3 with superficial gastritis with bile reflux, 1 with gastric antral tumor, and 4 showed no abnormality. All volunteers had no discomfort in the examination process.

■背景资料

胶囊内镜的优势在于完全无痛苦检查, 但其姿态不可操控的局限性限制其应用于胃部检查, 通过2年多的研究, 对胶囊内镜改造, 利用磁控原理可以在2-20 cm内控制其姿态。应用于胃部检查已经人体试验成功多例。

CONCLUSION: Magnetically guided capsule endoscopy is effective and safe in conducting gastric examination.

Key Words: Magnetically guided capsule endoscopy; External magnetic field control device; Gastric examination

Du F, Cao HQ, Yang TY, Deng GL. Gastric examination with a magnetically guided capsule endoscope: An analysis of 55 volunteers. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(19): 1773-1777

摘要

目的: 探讨磁控胶囊内镜体外磁场控制装置的操作方法。

方法: 选55名志愿者, 通过磁控胶囊内镜的体外磁场控制装置对胶囊内镜的控制, 使其在胃腔内作出平移、仰视、俯视、旋转及上下移动, 替代有创胃镜来诊断胃部疾病。

结果: 被检者之中54人经磁控胶囊内镜后达到胃内各个观察部位观察完毕, 操作时间 24.5 ± 5.5 min。1人因胃排空过快, 磁控胶囊内镜后5 min排至十二指肠而结束检查。其中检出浅表性胃炎45例, 浅表性胃炎伴胆汁返流3例, 十二指肠球部溃疡2例, 胃窦肿瘤1例, 未见异常4例。所有受试者在吞服磁控胶囊内镜后, 在体外磁场控制装置的控制下, 磁控胶囊内镜在食管及胃内均到达并观察到各个检查部位。检查过程中所有受试者均无任何不适。

Gastric examination with a magnetically guided capsule endoscope: An analysis of 55 volunteers

Fan Du, Hui-Qiong Cao, Tie-Yi Yang, Gui-Lin Deng

Fan Du, Department of Gastroenterology, the Third Affiliated Hospital of Nanchang University School of Medicine, Nanchang 330000, Jiangxi Province, China

Hui-Qiong Cao, Department of Gastroenterology, the Third People's Hospital of Huizhou, Huizhou 516001, Guangdong Province, China

Tie-Yi Yang, Department of Gastroenterology, the Third Affiliated Hospital of Nanchang University School of Medicine, Nanchang 330000, Jiangxi Province, China

Gui-Lin Deng, the Third People's Hospital of Huizhou, Huizhou 516001, Guangdong Province, China

Correspondence to: Hui-Qiong Cao, Department of Gastroenterology, the Third People's Hospital of Huizhou, 1 Qiaodongxuebei Road, Huicheng District, Huizhou 516001, Guangdong Province, China. caohuq@163.com

Received: 2012-02-08 Revised: 2012-05-03

Accepted: 2012-06-16 Published online: 2012-07-08

Abstract

AIM: To investigate the feasibility of conducting gastric examination with a magnetically guided capsule endoscope.

METHODS: Fifty-five volunteers who underwent gastric examination with a magnetically guided capsule endoscope were included in this study. All participants swallowed the capsule endoscope, which was controlled by an external magnetic field control device to reach various

■同行评议者

刘海峰, 主任医师, 北京市武警总医院消化科

■研发前沿

目前现有的磁控胶囊内镜脱胎于普通胶囊内镜,由于省电及数据量的原因,普通胶囊内镜图像传输为每秒1~2帧,这在胃部检查实际操作中缺乏连贯动态的图像,给操作者带来一定的难度,切胶囊头端LED发光亮度不足,致使胃腔内远景观察不清,影响诊断观察。

结论: 磁控胶囊内镜应用于胃部检查,通过体外磁场控制装置对磁控胶囊内镜的控制,能达到检查食管、胃、十二指肠的检查目的,且安全、无痛苦。

关键词: 磁控胶囊内镜; 体外磁场控制装置; 胃部检查

杜凡, 曹辉琼, 杨铁一, 邓桂林. 磁控胶囊内镜胃部检查55例. 世界华人消化杂志 2012; 20(19): 1773-1777
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1773.asp>

0 引言

内窥镜的发展经历了旧式内窥镜、纤维内窥镜、电子内窥镜3个时期,十几种类别。消化内镜医师诊察使用最多的是软式插入式内镜。选择一种非侵入性的胃镜检查方式是广大内镜工作者研究的课题。胶囊内镜是以胃肠蠕动为前进动力,由于其方便、舒适,并能清晰的观察到肠黏膜病变,在小肠病变的诊断中具有独特优势,优于传统各项技术^[1,2]。一直以来,胶囊内镜主要应用于小肠检查。文献报道^[3,4],胶囊内镜对小肠病变的检出率较小肠钡餐提高59%,其中对有临床意义的出血病灶的检出率提高36%,对具有临床意义的病灶检出率比双气囊小肠镜高19%,对于早期和轻症小肠Cronh's疾病的诊断具有明显优越性^[5-7],显示其对目前小肠疾病检查的显著优越性。因其对胃及食管的检查不够全面,只能观察到部分胃黏膜,胶囊内镜在胃及食管检查中有很大的局限性^[8,9]。但是此前的内窥微机电系统还存在着无法定位工作的问题,基本不能单独用于胃及食管检查。为了使胶囊内镜能用于胃腔及食管检查,经过对现有胶囊胃镜的技术改造,应用磁控技术,对胶囊内镜的姿态加以控制,使其在胃腔及食管内任意移动及改变不同的姿态,达到非侵入性、真正无痛的观察胃腔及食管的目的。

1 材料和方法

1.1 材料 通过人体外磁场装置控制人体内的磁控胶囊内镜,对胃部进行检查,替代有创胃镜检查,能达到观察并诊断贲门、胃底、胃体、胃角、胃窦、幽门等的各种黏膜病变的效果。选用2011-03/2011-11于南昌大学第三附属医院行胶囊内镜的55例志愿者纳入本研究。其中:男31例,女24例,年龄22-78岁,平均年龄43.5岁±15.2岁。所有志愿者无消化道梗阻、吞咽困难、妊娠、安装起搏器等,检测前均已签知情同意书。磁控胶囊内镜为重庆金山科技公司的OMOM无线智能胶囊改装。体外磁场控制装置参数:质量:2 kg; 尺寸: 210 mm×50 mm×50 mm; 有效控制距离: ≤20 cm; 工作面磁场强度: ≤0.5 T; 非工作面磁场强度: ≤0.3 T; 工作环境湿度: ≤85%; 工作环境温度: 0 °C-40 °C。

1.2 方法

1.2.1 作用原理: 利用目前的微机电无线胶囊内镜无痛苦吞服检查及其光源、图像采集、图像处理、图像发射等系统,将胃内黏膜病变情况实时传输至体外图像工作站。通过对目前的微机电无线胶囊内镜的改造,使其成为姿态可磁控胶囊,与体外磁场控制装置匹配工作。利用数块磁铁组合构成磁场同斥异吸的原理操控其在胃腔内运动并改变各种姿态。

1.2.2 体外磁场控制装置操作实施控制方法^[10]: 受检者吞服姿态可控制胶囊后,卧于检查床上。将体外磁场控制装置的工作面靠近受检者上腹部腹壁,使磁控胶囊内镜在体外磁场控制装置中的磁铁磁场控制范围内,如同图1中的位置关系。

1.2.3 操作步骤: (1)所有受试者行检查前禁食8-10 h,检查前口服二甲基硅油,然后一次性饮水400-500 mL后吞服姿态可控制胶囊内镜,通过姿态控制驱动器在腹壁表面移动改变外部磁场,控制胃内胶囊移动及改变姿态,通过姿态可控制胶囊内部的图像采集及发射系统,在体外的图像工作站观察食管、胃底、贲门、胃体、胃角、幽门及十二指肠球部、降部等。检查结束后嘱受试者排便后观察胶囊内镜是否排出,必要时行腹部X线检查; (2)食管内检查。由于吞咽力加食管蠕动力的关系,磁控胶囊内镜2-4 s左右就通过贲门进入胃腔。通过变换体位可使胶囊在食管内停留时间加长^[11]。吞服磁控胶囊内镜后采取平卧位,故检查食管应在被检者吞服磁控胶囊内镜时将体外磁场控制装置放置于胸骨柄处,利用磁力牵引使磁控胶囊内镜停滞于食管内,再移动体外磁场控制装置控制磁控胶囊内镜在食管内移动达到检查食管目的。当磁控胶囊位于食管内时,体外磁场控制装置可使磁控胶囊内镜在食管内完成平移及旋转等动作。移动磁控胶囊内镜下行靠近贲门时观察齿状线,图像十分清晰。但沿食管上行磁控胶囊内镜时有一定的阻力; (3)胃内检查。食管检查完毕后,撤除体外磁场控制装置,让受检者坐起,少量饮水,待磁控胶囊内镜进入胃内后恢复平卧,进行

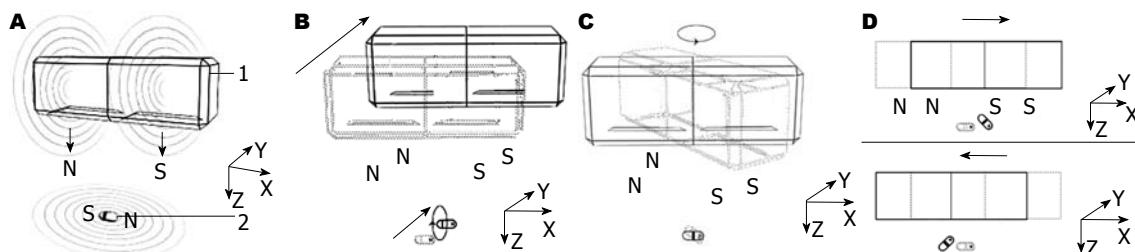


图 1 磁控胶囊内镜与体外磁场控制装置的位置关系图. A: 1为控制器, 2为胶囊; 磁控胶囊内镜的纵轴会与体外磁场控制器的纵轴平行, 设定该轴为X轴; 那么磁控胶囊内镜与体外磁场控制装置的横轴为Y轴; 磁控胶囊内镜与体外磁场控制装置之间的垂直距离为Z轴; 沿Z轴上下移动体外磁场控制器, 调整体外磁场控制装置与磁控胶囊内镜之间的距离, 可以使磁控胶囊内镜沿Z轴上下移动; B: 平移, 沿Y轴平行移动体外磁场控制装置, 可使其下方的磁控胶囊内镜被磁场牵引, 会随体外磁场控制装置的移动而沿Y轴同步滚动平移; C: 旋转, 顺时针、逆时针水平旋转体外磁场控制装置, 其下方的磁控胶囊内镜会随旋转体外磁场控制装置的旋转而同步做出旋转动作, 从而改变磁控胶囊内镜镜头所指水平方向; D: 仰视及俯视, 沿X轴水平横移体外磁场控制装置, 其下方的磁控胶囊内镜将被磁场牵引, 会随体外磁场控制装置的移动而做出仰视、俯视的动作.

胃的检查. 适当调整体外磁场控制装置与腹壁的距离增大, 使胶囊落于胃后壁, 通过移动体外磁场控制装置, 使胶囊内镜在胃后壁上移动并仰视, 检查胃前壁黏膜情况. 减小体外磁场控制装置与腹壁的距离, 使胶囊内镜吸附与胃前壁, 仍然通过平移、旋转体外磁场控制装置的方法, 可以检查胃后壁的情况. 左侧卧位时将体外磁场控制装置移至左侧腹部, 旋转体外磁场控制装置同步控制胶囊的轴向, 使其镜头方向对准右上腹, 可以观察胃角、胃底及胃窦. 胃腔的大小及形态因各人体形不同而不同. 根据常规插入式胃镜操作经验, 不难判断胶囊内镜在胃腔内所处位置及所观察到的部位. 将体外磁场控制装置移至右侧腹部, 可让胶囊内镜移动至幽门附近, 观察胃窦及幽门情况. 将体外磁场控制装置移至左上腹, 可使胶囊内镜靠近贲门, 观察贲门及胃底情况. 寻腔而移、寻腔而进, 可以控制胶囊内镜从贲门到幽门方向任何角度的观察.

2 结果

被检者中54人经体外磁场控制装置控制磁控胶囊内镜后达到胃内各个观察部位观察完毕, 1人因胃排空过快, 吞服胶囊后5 min排至十二指肠而结束检查, 未能往复检查胃底及胃体. 检查时间5-30 min, 平均24.5 min±5.5 min.

55例被检查其中检出浅表性胃炎45例, 浅表性胃炎伴胆汁反流3例, 十二指肠球部溃疡2例, 胃窦肿瘤1例, 未见异常4例. 受试者胶囊内镜图像清晰, 近景深观察黏膜细节表现良好(图2). 所有患者在整个过程中均顺应性良好, 吞服胶囊内镜无任何困难, 检查过程中无任何不适, 受试者均于第2、3天排出胶囊内镜.

1例胃窦肿瘤患者, 因胃窦被肿瘤侵犯, 致胃窦及幽门变形狭窄, 检查时恐发生胶囊内镜梗

阻于胃腔. 检查第2天行腹部透视见胶囊已排至右侧结肠, 胶囊于第3天排出.

3 讨论

从图像、操控性、受检者接受度3个方面评价插入式胃镜、胶囊内镜、磁控胶囊内镜用于胃部检查, 磁控胶囊内镜优于普通胶囊内镜, 总体评价优于插入式胃镜. 相比插入式胃镜患者检查时的痛苦和胶囊内镜姿态不可控制, 观察不能重复的缺点, 通过体外磁场控制装置控制磁控胶囊内镜用于胃及食管腔的检查, 克服了插入式胃镜的痛苦感、继承了胶囊内镜安全、无痛苦的优点, 能控制其在胃及食管腔内移动, 达到诊察目的. 所有55名志愿者主观上对于选择插入式胃镜或磁控胶囊内镜检查, 均全部表示愿意接受后者.

对于一项新的胃镜检查设备, 仅有受检者的认可还不足以说明他的可行性和实用性. 下面就医师检查时操作磁控胶囊内镜的几点感受加以阐述: (1)胃腔靠检查前饮水撑开, 较食管腔大, 故胶囊在胃腔内移动比在食管腔内容易, 更能做出各种姿态动作. 但多个受试者均在检查15 min左右时胃内水排空大半, 胃窦黏膜及胃体黏膜皱襞皱缩, 胶囊姿态改变时摩擦胃壁的阻力增大; (2)部分受检者因胃排空过快, 胶囊5 min左右迅速排入十二指肠. 胶囊进入十二指肠降部后无法控制其返回胃腔检查; (3)受数字射频发射图像带宽影响, 目前的胶囊内镜每分钟只能传输1-2幅图像信息, 图像延迟明显, 成为影响操作医师操作的难点. 有经验的胃镜操作医师通过胃镜影像中黏膜参照可以判断出胶囊所处的位置, 但不连贯的图像影像控制胶囊作出更细微而精准的位移和角度变换. 克服该难点需要操作医师对于设备原理的培训及操作训练后适应; (4)

■相关报道

由英国、美国和以色列学者合作, 首次对一名65岁男性志愿者进行人体测试. 结果显示, 磁控胶囊内镜具有很好的可操作性, 不仅可增强诊断效果, 还可能有治疗作用.

■应用要点

在确保检查安全的前提下,能无任何痛苦的进行胃部检查,而且其检查图像效果与目前的插入式胃镜相似。让该项技术拥有更广阔的医学和市场前景。

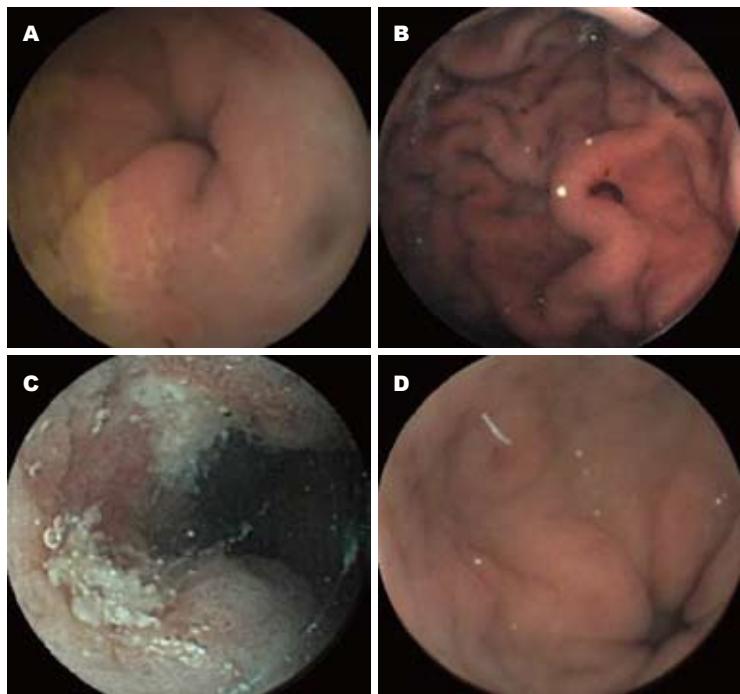


图2 受试者胶囊内镜图像清晰,近景深观察黏膜细节表现良好。A: 胃窦胆汁可见斑块及点状糜烂; B: 胃底可见点片状糜烂; C: 胃窦前壁小弯侧见黏膜不规则隆起,表面结节状,有深浅不一的溃疡形成,病变侵犯至胃角; D: 胃窦部可见疣状的隆起,顶部凹陷。

目前的胶囊内镜采用6枚白光LED照明,镜头景深5-50 MM,镜头贴近处黏膜图像清晰,细节锐利,但远景较目前插入式胃镜模糊且光亮度明显变差。研究表明,肠内液体透明度是影响胶囊内镜诊断能力的危险因素^[12,13],因此,泻药或祛泡剂常用于胶囊内镜检查前以提高肠道清洁度。此外,肠道清洁度不理想是小肠检查不完全的独立危险因素^[14],理论上可通过肠道准备提高CR。但有研究者认为,肠道准备可延迟胃肠道转运时间,后者是不能CSE的危险因素,因此,推测肠道准备不利于CSE;(5)胶囊内镜在临床应用中,需把握好其适用范围。胶囊内镜主要并发症有:胶囊嵌顿、胃肠内滞留及进行性肠梗阻,最常见不良反应是内镜胶囊排出延迟。若发生肠梗阻时解决的常见方法是手术或者小肠镜取出等^[15,16]。文献上已有报道发生穿孔可能^[17],因此对于有消化系梗阻、畸形、穿孔、狭窄或瘘管形成者,体内植入含钢铁金属器械,高分子材料过敏、不能配合吞咽者禁用。

总之,磁控胶囊内镜应用于胃部检查比较插入式胃镜、胶囊内镜有独特的优势,该技术安全、操作简便、成本低廉。当然,任何事物都具有两面性,磁控胶囊内镜需要在远景成像质量及操控性上进一步作出改进,并且尽可能完善组织活检功能,也许能带给胃镜检查革命性的改变。

4 参考文献

- 1 辛磊,廖专,李兆申.胶囊内镜与其他小肠检查技术的比较.世界华人消化杂志 2009; 17: 1972-1977
- 2 袁晋华,辛磊,廖专,李兆申.胶囊内镜全小肠检查的研究进展.世界华人消化杂志 2010; 18: 3662-3666
- 3 Leighton JA, Triester SL, Sharma VK. Capsule endoscopy: a meta-analysis for use with obscure gastrointestinal bleeding and Crohn's disease. *Gastrointest Endosc Clin N Am* 2006; 16: 229-250
- 4 Pasha SF, Leighton JA, Das A, Harrison ME, Decker GA, Fleischer DE, Sharma VK. Double-balloon enteroscopy and capsule endoscopy have comparable diagnostic yield in small-bowel disease: a meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2008; 6: 671-676
- 5 戈之铮,胡运彪,萧树东.胶囊内镜诊断小肠克罗恩病的应用研究.中华消化内镜杂志 2004; 21: 96-99
- 6 戈之铮.胶囊内镜检查对小肠疾病的诊断价值及其不足.诊断学 2008; 7: 12-15
- 7 Tillack C, Seiderer J, Brand S, Göke B, Reiser MF, Schaefer C, Diepolder H, Ochsenkühn T, Herrmann KA. Correlation of magnetic resonance enteroclysis (MRE) and wireless capsule endoscopy (CE) in the diagnosis of small bowel lesions in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2008; 14: 1219-1228
- 8 Lapalus MG, Dumortier J, Fumex F, Roman S, Lot M, Prost B, Mion F, Ponchon T. Esophageal capsule endoscopy versus esophagogastroduodenoscopy for evaluating portal hypertension: a prospective comparative study of performance and tolerance. *Endoscopy* 2006; 38: 36-41
- 9 Bhuket T, Takami M, Fisher L. The use of wireless capsule endoscopy in clinical diagnostic gastroenterology. *Expert Rev Med Devices* 2005; 2: 259-266
- 10 杜凡,曹辉琼,杨铁一.姿态控制系统联合姿态可控智能胶囊内镜应用于胃部检查的初步研究.中华消化内镜杂志 2012; 29: 35-38
- 11 陈孝,张子其,张钰,邵勇,张建萍.胶囊内镜对食管疾病的诊断价值.中国临床医学 2009; 16: 209-211
- 12 Esaki M, Matsumoto T, Kudo T, Yanaru-Fujisawa R, Nakamura S, Iida M. Bowel preparations for capsule endoscopy: a comparison between simethicone and magnesium citrate. *Gastrointest Endosc* 2009; 69: 94-101
- 13 Koornstra JJ. Bowel preparation before small bowel capsule endoscopy: what is the optimal approach?

- 14 *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2009; 21: 1107-1109
Westerhof J, Weersma RK, Koornstra JJ. Risk factors for incomplete small-bowel capsule endoscopy. *Gastrointest Endosc* 2009; 69: 74-80
- 15 Fry LC, De Petris G, Swain JM, Fleischer DE. Impaction and fracture of a video capsule in the small bowel requiring laparotomy for removal of the capsule fragments. *Endoscopy* 2005; 37: 674-676
- 16 Tanaka S, Mitsui K, Shirakawa K, Tatsuguchi A, Nakamura T, Hayashi Y, Sakamoto C, Terano A. Successful retrieval of video capsule endoscopy retained at ileal stenosis of Crohn's disease using double-balloon endoscopy. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21: 922-923
- 17 De Palma GD, Masone S, Persico M, Siciliano S, Salvatori F, Maione F, Esposito D, Persico G. Capsule impaction presenting as acute small bowel perforation: a cases series. *J Med Case Rep* 2012; 6: 121

■同行评价
关于磁控胶囊内镜操作方法的研究鲜有报道, 本文有一定的新意.

编辑 曹丽鸥 电编 鲁亚静

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2012年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》正文要求

本刊讯 本刊正文标题层次为 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. 以下逐条陈述: (1)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. (2)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. (3)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. (4)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, 并有足够的自明性的信息, 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 , $t/\text{°C}$ 表达. 黑白图请附黑白照片, 并拷入光盘内; 彩色图请提供冲洗的彩色照片, 请不要提供计算机打印的照片. 彩色图片大小 $7.5\text{ cm} \times 4.5\text{ cm}$, 必须使用双面胶条粘贴在正文内, 不能使用浆糊粘贴. (5)志谢 后加冒号, 排在讨论后及参考文献前, 左齐.

SLP-2在胃癌中的表达及意义

张剑, 李建生, 吴敏, 赵晔

■背景资料

SLP-2基因是2000年由美国耶鲁大学首次发现并命名的一个新基因, 属于stomatin基因超家族的一个新成员, 近年来发现其在肺癌、子宫内膜癌、结直肠癌等恶性肿瘤中高表达。但目前国内、外有关SLP-2基因的研究较少, 尚无有关SLP-2基因在胃癌中表达情况的报道。

张剑, 李建生, 赵晔, 郑州大学第一附属医院消化内科 河南省高等学校临床医学重点学科开放实验室 河南省郑州市 450052

张剑, 吴敏, 郑州大学第五附属医院肿瘤科 河南省郑州市 450052
张剑, 主治医师, 在读博士, 主要从事消化系肿瘤研究。

作者贡献分布: 本文由张剑与赵晔撰写; 李建生与吴敏审校。
通讯作者: 李建生, 主任医师, 教授, 450052, 河南省郑州市建设东路1号, 郑州大学第一附属医院消化内科, 河南省高等学校临床医学重点学科开放实验室。lijiansheng@medmail.com.cn
收稿日期: 2012-02-27 修回日期: 2012-05-03
接受日期: 2012-06-01 在线出版日期: 2012-07-08

Significance of SLP-2 expression in gastric adenocarcinoma

Jian Zhang, Jian-Sheng Li, Min Wu, Ye Zhao

Jian Zhang, Jian-Sheng Li, Ye Zhao, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China
Jian Zhang, Min Wu, Department of Oncology, the Fifth Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China

Correspondence to: Jian-Sheng Li, Professor, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, 1 Jianshe East Road, Zhengzhou 450052, Henan Province, China. lijiansheng@medmail.com.cn

Received: 2012-02-27 Revised: 2012-05-03

Accepted: 2012-06-01 Published online: 2012-07-08

Abstract

AIM: To investigate the expression of stomatin-like protein 2 (SLP-2) in gastric adenocarcinoma and to analyze its significance.

METHODS: The expression of SLP-2 mRNA and protein was detected by RT-PCR in 40 cases and by immunohistochemistry in 45 cases of human gastric adenocarcinoma and adjacent tumor-free tissue, respectively. The relationship between SLP-2 expression and clinicopathologic characteristics of gastric adenocarcinoma was then analyzed.

RESULTS: The expression of SLP-2 mRNA and protein in gastric adenocarcinoma was significantly higher than that in adjacent tumor-free tissue (68.9% vs 26.7%, 1.12 ± 0.47 vs 0.63 ± 0.31, both $P < 0.01$). SLP-2 expression in gastric adenocarcinoma was associated with lymph node

metastasis and TNM stage ($\chi^2 = 5.32, 4.78$, both $P < 0.05$), but not with other clinicopathologic characteristics (all $P > 0.05$).

CONCLUSION: The expression of SLP-2 is increased in gastric adenocarcinoma. SLP-2 may play important roles in the occurrence, development and metastasis of gastric adenocarcinoma.

Key Words: Gastric adenocarcinoma; Stomatin-like protein 2; TNM staging; Lymph node metastasis

Zhang J, Li JS, Wu M, Zhao Y. Significance of SLP-2 expression in gastric adenocarcinoma. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(19): 1778-1781

摘要

目的: 研究SLP-2基因在胃腺癌及正常胃黏膜中的表达情况。

方法: 应用免疫组织化学法及RT-PCR法分别检测45例及40例胃腺癌及其癌旁正常胃黏膜中SLP-2基因的表达, 并结合免疫组织化学结果及胃癌患者的临床病理资料进行分析。

结果: 免疫组织化学和RT-PCR结果均显示SLP-2在胃腺癌组织中的表达高于正常配对胃黏膜(68.9% vs 26.7%, 1.12 ± 0.47 vs 0.63 ± 0.31, 均 $P < 0.01$), 且SLP-2的表达与胃癌TNM分期及有无淋巴结转移相关($\chi^2 = 5.32, 4.78$, 均 $P < 0.05$)。

结论: SLP-2基因在胃腺癌组织中高表达, 可能参与胃腺癌的发生发展和转移。

关键词: 胃腺癌; SLP-2; TNM分期; 淋巴结转移

张剑, 李建生, 吴敏, 赵晔. SLP-2在胃癌中的表达及意义. 世界华人消化杂志 2012; 20(19): 1778-1781

<http://www.wjnet.com/1009-3079/20/1778.asp>

0 引言

胃癌是世界上最为常见的恶性肿瘤之一, 居男性恶性肿瘤发病率的第3位, 女性恶性肿瘤发病率的第4位。包括中国在内的东亚地区是世界上

胃癌发病率和死亡率最高的地区^[1], 胃癌的病理类型主要为腺癌。恶性肿瘤的发生是涉及多基因、多分子水平变化、多阶段的一个复杂过程, 而癌基因的激活和抑癌基因的失活是该过程的重要事件之一。SLP-2基因是2000年由美国耶鲁大学病理科首次发现并命名的, 属于stomatin基因超家族的一个新成员^[2], 其具体特性和功能尚未查明。中国医学科学院张立勇等^[3]首次发现SLP-2基因在食管鳞状细胞癌中过表达, 其在食管鳞癌中的表达水平是正常食管黏膜中的6倍以上, 并发现其与肿瘤的发生发展关系密切。本研究采用免疫组织化学法和RT-PCR法检测SLP-2在人胃腺癌组织中的表达, 并结合患者的临床病理资料进行分析, 旨在探讨SLP-2在胃腺癌中的表达特点及其意义。

1 材料和方法

1.1 材料 收集郑州大学第五附属医院2010-05/2011-04手术切除的胃癌标本45例, 取癌组织及癌旁正常组织(距离癌组织边缘>5 cm)。所有标本均经病理学检查确诊为胃腺癌, 术前未接受过放、化疗。其中男27例, 女18例; 年龄45-78岁, 中位年龄63岁。临床分期按TNM分期标准(AJCC 2010年第7版)。TRIzol试剂盒和cDNA第一链合成逆转录试剂盒购自美国Invitrogen公司; 一抗为鼠抗人SLP-2单克隆抗体购自美国proteintech公司; 即用型一步法(非生物素)检测试剂盒购自迈新公司。

1.2 方法

1.2.1 组织总RNA的提取和cDNA第一链的合成: 细胞总RNA的提取按照TRIzol试剂盒说明书进行操作。经紫外分光光度仪检测波长为260 nm和280 nm时的吸光度(*A*)值, A_{260}/A_{280} 为1.8-2.0时, 说明RNA纯度良好; 用1%琼脂糖凝胶电泳, 若28S和18S条带清楚, 比值约为2:1, 则表明总RNA没有被降解, 为完整的总RNA。cDNA第一链合成按逆转录试剂盒说明书进行操作。cDNA产物-20 °C保存。

1.2.2 半定量RT-PCR: 用于扩增SLP-2基因的上游引物5'-CTGGAGCCTGGTTGAACAT-3'; 下游引物为5'-AGGATCTGGCCTGTTCTT-3'; 扩增片断长度为500 bp。以β-actin为内对照, 上游引物为5'-ACACTGTGCCCATCTACGACC-3'; 下游引物为5'-AGGGGCCGGACTCGTCATA-GA-3', 扩增片断长度为242 bp。PCR反应体系: 2 × Taq PCR Master Mix 12.5 μL, β-actin上、下游引物各1 μL, SLP-2上、下游引物各1 μL, cDNA

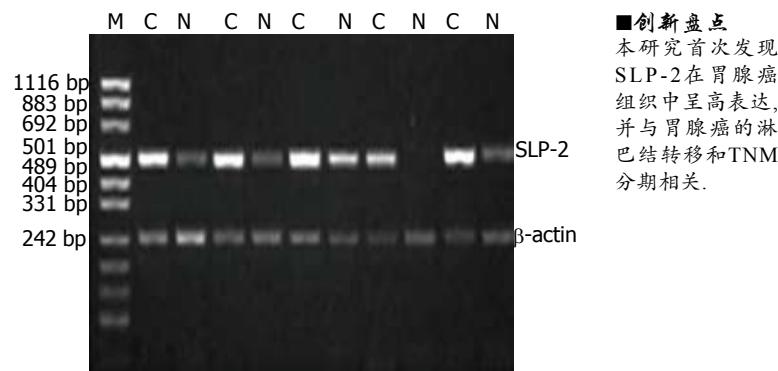


图1 胃腺癌及正常胃黏膜组织中SLP-2 mRNA的表达。M: Marker; C: 胃腺癌组织; N: 正常胃黏膜组织。

2 μL, ddH₂O补至25 μL。PCR反应在2400型PCR仪(美国PE公司产品)上进行, 94 °C预变性5 min; 进入循环: 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 50 s, 共30个循环; 最后72 °C延伸7 min, 获取扩增片断。扩增产物进行1.5%琼脂糖凝胶电泳后, 电泳条带图像用Fluor-S MultiImager凝胶成像仪(美国Bio-Rad公司产品)扫描, 用Multi-Analyst软件包(美国Bio-Rad公司产品)定量分析电泳分离的各特异扩增条带的原始*A*值, 以SLP-2与β-actin的*A*值的比值表示SLP-2 mRNA的相对表达水平。

1.2.3 免疫组织化学染色: 所有组织均用10%甲醛溶液固定, 经脱水、包埋、3 μm厚连续切片。鼠抗人SLP-2单克隆抗体稀释度为1:200。操作步骤按即用型一步法(非生物素)检测试剂盒说明书进行。用PBS代替一抗作阴性对照, 用已知阳性片作阳性对照。免疫组织化学染色由2位高年资病理科医师在双盲条件下进行评定, 判定标准参照文献[4], 每张切片根据阳性细胞染色程度及细胞阳性百分数的多少进行分级。计数阳性细胞百分数: 没有阳性细胞赋值为0, 1%-25%为1, 26%-50%为2, 51%-75%为3, >75%为4。染色程度根据每张切片的大多数细胞染色特征决定: 细胞膜及细胞浆无着色赋值为0, 浅黄色为1, 黄色为2, 棕黄色为3。最终评分由两者分数相乘得到, 总值≥8分为高表达,<8分为阴性或低表达。

统计学处理 应用SPSS16.0统计软件进行统计分析。采用χ²检验及t检验, *P*<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SLP-2 mRNA在胃癌及癌旁正常胃黏膜中的表达 胃癌组织中SLP-2 mRNA表达水平为1.12±0.47, 正常胃黏膜组织为0.63±0.31, 两者比较, 差异有统计学意义(*t*=4.77, *P*<0.01, 图1)。

■创新点
本研究首次发现SLP-2在胃腺癌组织中呈高表达, 并与胃腺癌的淋巴结转移和TNM分期相关。

■应用要点

恶性肿瘤的分期及是否有淋巴结转移和远处转移是决定其预后的重要因素，因此，SLP-2可能作为胃癌的一个有意义的预后指标，指导胃癌患者的预后生存，并有可能作为一个新的肿瘤靶向治疗的靶点。

表 1 SLP-2的表达与胃腺癌临床病理参数的关系

	n	SLP-2蛋白表达		χ^2 值	P值
		高	低		
性别				0.85	> 0.05
男	27	20	7		
女	18	11	7		
年龄(岁)				0.09	> 0.05
≤50	10	6	4		
>50	35	25	10		
肿瘤大小(cm)				1.20	> 0.05
≤5	32	20	12		
>5	13	11	2		
分化程度				0.12	> 0.05
高-中分化	29	21	8		
低分化	16	10	6		
淋巴结转移				4.78	< 0.05
有	31	25	6		
无	14	6	8		
临床分期				5.32	< 0.05
I + II	11	4	7		
III + IV	34	27	7		

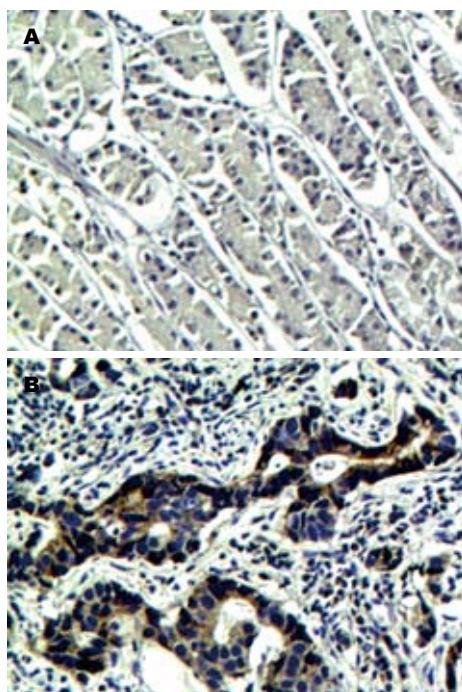


图 2 正常胃黏膜及胃腺癌组织中SLP-2蛋白的表达(×100). A: 瘤旁正常胃组织; B: 胃癌组织.

2.2 SLP-2蛋白在胃癌及癌旁正常胃黏膜中的表达 SLP-2在癌旁正常胃黏膜中多为低表达，在胃腺癌组织中则多呈高表达。SLP-2在胃腺癌和癌旁正常胃黏膜中的高表达率分别为68.9%(31/45)和26.7%(12/45)，差异有统计学意义($\chi^2=16.08, P<0.01$, 图2)。

2.3 SLP-2蛋白表达与胃腺癌临床病理特征之间的关系 SLP-2蛋白的表达与淋巴结转移及TNM分期密切相关(均 $P<0.05$, 表1)；与患者年龄、性别、肿瘤大小、分化程度无关。

3 讨论

SLP-2基因是2000年首次发现并命名的一个新基因，并在当时被鉴定为细胞膜相关蛋白^[2]。SLP-2因其含有stomatin家族的保守序列而被认为是stomatin家族的一个新成员。Stomatin蛋白广泛存在于不同种属的多种组织中，是一种整合膜蛋白，stomatin及其同源物可能作为离子通道和细胞骨架之间的连接分子，从而影响细胞信号传导通路和细胞骨架^[5,6]。SLP-2基因定位在染色体9P13.1，长约3 250 bp，SLP-2蛋白具有stomatin基因家族所共有的SPFH(stomatin/prohibitin/flotillin/hflk)结构域，但不具有其他stomatin家族成员所共有的N-端疏水结构域^[2]，因此推测，SLP-2蛋白可能是一种细胞质膜相关蛋白，但不直接整合到细胞膜脂质双层结构中，可能

作为外周膜蛋白起作用，调控离子通道和脂筏结构^[2,7]。近年来关于线粒体的蛋白组学研究发现，SLP-2存在于细胞的线粒体中^[8]，并与一些线粒体内膜相关蛋白有直接结合，可能参与调节与其结合的线粒体膜相关蛋白的稳定性^[9,10]。

张立勇等^[3]首次发现SLP-2基因在食管鳞状细胞癌中过表达，并与肿瘤的发生、发展关系密切。此后的一些研究表明，SLP-2基因在肺癌、子宫内膜癌、结直肠癌^[11-16]等恶性肿瘤中也存在高表达。推测其在恶性肿瘤中的高表达是一个较为普遍的现象，SLP-2可能是一个新的癌基因。但目前关于SLP-2基因的研究较少，国内、外尚无有关SLP-2基因在胃癌中表达情况的报道。本实验采用RT-PCR法检测40对人胃腺癌及癌旁正常胃黏膜组织中SLP-2 mRNA表达水平，用免疫组织化学法检测45对人胃腺癌及癌旁正常胃黏膜组织中SLP-2蛋白表达水平，结果均显示，SLP-2基因表达在胃腺癌中较正常胃黏膜组织有较明显升高(均 $P<0.01$)。结合免疫组织化学结果和患者临床病理资料进行分析发现，SLP-2蛋白的高表达与胃腺癌的临床分期和有无淋巴结转移相关(均 $P<0.05$)，即较晚期病例的胃腺癌组织SLP-2蛋白的表达水平高于较早期病例的胃腺癌组织，有淋巴结转移的病例相对应的胃腺癌组织中SLP-2蛋白的表达水平高于无淋巴结转移的病例；而SLP-2蛋白的表达与其

他临床病理变量没有显著相关性。提示SLP-2可能是一个与胃腺癌分期和转移相关的指标，在胃腺癌的发展和转移中起一定的促进作用。

总之，本研究首次发现SLP-2在胃腺癌组织中呈高表达，并与胃腺癌的淋巴结转移和TNM分期相关。恶性肿瘤的分期及是否有淋巴结转移和远处转移是决定其预后的重要因素，因此，SLP-2可能作为胃癌的一个有意义的预后指标，指导胃癌患者的预后生存，并有可能作为一个新的肿瘤靶向治疗的靶点。目前对SLP-2的研究不多，SLP-2在胃癌中的表达情况及其对肿瘤细胞的调节机制有待大样本量实验及肿瘤体内外实验进一步深入研究。

4 参考文献

- 1 Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011; 61: 69-90
- 2 Wang Y, Morrow JS. Identification and characterization of human SLP-2, a novel homologue of stomatin (band 7.2b) present in erythrocytes and other tissues. *J Biol Chem* 2000; 275: 8062-8071
- 3 张立勇, 王涛, 丁芳, 刘仲敏, 刘芝华, 李衍达. SLP-2基因在食管鳞癌中的差异表达及其生物信息学分析. 世界华人消化杂志 2004; 12: 1517-1521
- 4 Wang Y, Cao W, Yu Z, Liu Z. Downregulation of a mitochondria associated protein SLP-2 inhibits tumor cell motility, proliferation and enhances cell sensitivity to chemotherapeutic reagents. *Cancer Biol Ther* 2009; 8: 1651-1658
- 5 Stewart GW, Hepworth-Jones BE, Keen JN, Dash BC, Argent AC, Casimir CM. Isolation of cDNA coding for an ubiquitous membrane protein deficient in high Na⁺, low K⁺ stomatocytic erythrocytes. *Blood* 1992; 79: 1593-1601
- 6 Hiebl-Dirschmid CM, Entler B, Glotzmann C, Maurer-Fogy I, Stratowa C, Prohaska R. Cloning and nucleotide sequence of cDNA encoding human erythrocyte band 7 integral membrane protein. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1090: 123-124
- 7 Sprenger RR, Speijer D, Back JW, De Koster CG, Pannekoek H, Horrevoets AJ. Comparative proteomics of human endothelial cell caveolae and rafts using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Electrophoresis* 2004; 25: 156-172
- 8 Chevallet M, Lescuyer P, Diemer H, van Dorsselaer A, Leize-Wagner E, Rabiloude T. Alterations of the mitochondrial proteome caused by the absence of mitochondrial DNA: A proteomic view. *Electrophoresis* 2006; 27: 1574-1583
- 9 Hájek P, Chomyn A, Attardi G. Identification of a novel mitochondrial complex containing mitofusin 2 and stomatin-like protein 2. *J Biol Chem* 2007; 282: 5670-5681
- 10 Da Cruz S, Parone PA, Gonzalo P, Bienvenut WV, Tonnerre D, Jourdain A, Quadroni M, Martinou JC. SLP-2 interacts with prohibitins in the mitochondrial inner membrane and contributes to their stability. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1783: 904-911
- 11 苏雷, 张建, 魏秀琴, 支修益, 许庆生, 刘芝华. Slp2基因的差异表达与肺癌的分化和转移. 中国肿瘤临床 2005; 32: 678-680
- 12 Chang D, Ma K, Gong M, Cui Y, Liu ZH, Zhou XG, Zhou CN, Wang TY. SLP-2 overexpression is associated with tumour distant metastasis and poor prognosis in pulmonary squamous cell carcinoma. *Biomarkers* 2010; 15: 104-110
- 13 冯旺琴, 崔竹梅, 冯凤芝, 祁秀娟, 丁芳, 李文东, 刘芝华. SLP-2 mRNA在子宫内膜癌中的表达及其意义. 中华妇产科杂志 2005; 40: 553-557
- 14 祁代华, 李建生, 王康康. SLP-2和CDC42蛋白在结直肠癌组织中的表达及临床意义. 中华消化杂志 2009; 29: 191-192
- 15 曹文枫, 张立勇, 张斌, 王跃琦, 刘芝华, 孙保存. SLP-2蛋白在食管鳞状细胞癌中的表达及其与肿瘤侵袭转移的关系. 中华肿瘤杂志 2010; 32: 830-833
- 16 Cao W, Zhang B, Liu Y, Li H, Zhang S, Fu L, Niu Y, Ning L, Cao X, Liu Z, Sun B. High-level SLP-2 expression and HER-2/neu protein expression are associated with decreased breast cancer patient survival. *Am J Clin Pathol* 2007; 128: 430-436

■同行评价

本研究选取了一定数量的胃癌病例进行研究，结果可信，具有一定的学术价值。

编辑 曹丽鸥 电编 鲁亚静

胃大部切除术后3年胃癌患者生活质量的EORTC QLQ-C30与QLQ-STO22联合评价

周燕燕, 席淑华

■背景资料

欧洲癌症研究与治疗组织于1993年推出了用于评价肿瘤患者生活质量的QLQ-C30量表, 随后又开发了针对胃癌患者的QLQ-STO22量表。这两个量表已经广泛用于肿瘤(包括胃癌)患者的生活质量调查。

周燕燕, 中国人民解放军第二军医大学附属长征医院普通外科 上海市 200433

席淑华, 中国人民解放军第二军医大学附属长征医院护理部 上海市 200433

作者贡献分布: 本研究由周燕燕设计; 周燕燕与席淑华组织实施; 统计分析由周燕燕完成; 文章撰写由周燕燕与席淑华共同完成。

通讯作者: 席淑华, 主任护师, 200433, 上海市黄浦区凤阳路415号, 中国人民解放军第二军医大学附属长征医院护理部。

xishuhua@126.com

收稿日期: 2012-03-08 修回日期: 2012-05-20

接受日期: 2012-06-14 在线出版日期: 2012-07-08

Combined use of EORTC QLQ-C30 and QLQ-STO22 for assessment of quality of life in patients with gastric cancer after surgery for 3 years

Yan-Yan Zhou, Shu-Hua Xi

Yan-Yan Zhou, Department of General Surgery, Changzheng Hospital, the Second Military Medical University of Chinese PLA, Shanghai 200433, China

Shu-Hua Xi, Department of Nursing, Changzheng Hospital, the Second Military Medical University of Chinese PLA, Shanghai 200433, China

Corresponding to: Shu-Hua Xi, Department of Nursing, Changzheng Hospital, the Second Military Medical University of Chinese PLA, 415 Fengyang Road, Huangpu District, Shanghai 200433, China. xishuhua@126.com

Received: 2012-03-08 Revised: 2012-05-20

Accepted: 2012-06-14 Published online: 2012-07-08

Abstract

AIM: To evaluate the quality of life (QOL) in patients with gastric cancer (GC) after surgery for 3 years with EORTC QLQ-C30 and QLQ-STO22.

METHODS: Ninety-six GC patients who underwent gastrectomy 3 years ago and 90 healthy subjects were recruited into the present study. The mean age was 53.2 ± 8.1 years for GC patients and 54.8 ± 7.9 years for healthy subjects, and 88.5% of patients were diagnosed with stage I GC. There were no differences in age and gender between the two groups. QLQ-C30 and QLQ-STO22 were employed to evaluate the QOL in these subjects.

RESULTS: The QLQ-C30 global QOL was comparable between GC patients and healthy subjects (60.1 ± 18.5 vs 58.3 ± 17.2 , $P > 0.05$). The QOL with regard to cognitive functioning (71.0 ± 11.4 vs 63.6 ± 12.8), emotional functioning (79.4 ± 13.7 vs 71.2 ± 12.6) and fatigue (33.9 ± 10.6 vs 40.9 ± 11.3) of GC patients was superior to that of healthy subjects (all $P < 0.05$). However, the QOL with regard to nausea and vomiting (17.6 ± 10.4 vs 10.2 ± 8.7), financial difficulties (32.8 ± 14.3 vs 10.1 ± 8.6), reflux (19.4 ± 14.3 vs 11.1 ± 14.7), eating restrictions (15.9 ± 14.6 vs 10.2 ± 7.8) and body image (30.8 ± 16.5 vs 15.7 ± 10.2) was inferior to those of healthy subjects. No marked differences were observed in the scores of other domains/items between the two groups.

CONCLUSION: The QOL of GC patients nearly returns to normal level 3 years after surgery. The QOL related to upper gastrointestinal symptoms is significantly impaired in GC patients compared to healthy subjects.

Key Words: Gastric cancer; Quality of life; European Organization for Research and Treatment of Cancer Quality of Life C30; EORTC QLQ-STO22 stomach module

Zhou YY, Xi SH. Combined use of EORTC QLQ-C30 and QLQ-STO22 for assessment of quality of life in patients with gastric cancer after surgery for 3 years. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(19): 1782-1786

摘要

目的: 采用欧洲癌症研究与治疗组织(EORTC)生活质量核心30问卷调查(QLQ-C30)和QLQ-STO22评价胃癌术后3年患者的生活质量(QOL)。

方法: 对96名胃大部切除术后3年的胃癌患者和90名年龄和性别相匹配的门诊体检健康者进行研究。胃癌患者和健康者平均年龄分别为53.2岁±8.1岁和54.8岁±7.9岁。88.5%患者为I期胃癌术后。患者自行完成QLQ-C30量表和QLQ-STO22量表, 对各评分进行统计分析。

结果: 胃癌患者和健康者EORTC QLQ-C30整体健康状况和QOL评分无显著差异。胃癌患者的认知功能、情绪功能和疲劳要优于对照健康者。但胃癌患者恶心和呕吐评分、经济困难、反流、进食受限和体型评分较健康者差。其他评分未见显著差异。

结论: 胃癌术后3年, 患者的QOL整体评分基本恢复至正常水平, 但在某些方面, 特别是与上消化道相关的症状(如恶心呕吐、反流、进食受限等)与健康者存在差距。有必要基于这些差异采取针对性的措施进行治疗和护理。

关键词: 胃癌; 生活质量; EORTC QLQ-C30; QLQ-STO22

周燕燕, 席淑华. 胃大部切除术后3年胃癌患者生活质量的EORTC QLQ-C30与QLQ-STO22联合评价. 世界华人消化杂志 2012; 20(19): 1782-1786

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1782.asp>

0 引言

随着诊断技术的不断进步, 胃癌的早期发现率呈现逐年上升的趋势, 同时随着外科技术的改进, 胃癌患者的生存时间也逐渐延长。虽然肿瘤已经切除, 而且患者认为已经“治愈”, 但术后仍然存在有一定的症状和功能缺失(如上消化道症状), 从而对患者的生活质量产生影响^[1,2]。因此, 有必要对胃癌术后患者的生存质量进行客观评价。已有一些研究对胃癌患者术后的生活质量进行了研究, 但大多数比较的是不同术式对胃癌患者生活质量的影响, 如比较是否淋巴切除及不同胃癌切除术对患者生活质量的影响^[3-6]。目前, 临床使用的胃癌患者生活质量评价量表包括Spitzer评定量表、Wu等介绍的测试评分表、疾病负面影响概要、欧洲癌症研究与治疗组织(EORTC)生活质量核心30问卷调查、胃肠生活指数等^[7]。比较常用的量表是EORTC QLQ-C30及其胃癌特异性评价量表EORTC QLQ-STO22^[8,9]。EORTC QLQ-C30为针对肿瘤患者生活质量综合评定量表, 而EORTC QLQ-STO22为针对胃癌患者而设计。研究认为, 联合使用综合评定量表和疾病特异性量表, 有助于针对性的调整治疗, 改善患者生活质量^[10]。目前为止, 国内较少有研究采用EORTC QLQ-C30和QLQ-STO22对胃癌患者生活质量进行评价。EORTC QLQ-C30已经翻译成中文, 其效度也在癌症患者中进行了研究^[11], 结果认为该量表各项心理测量学特性均达到

要求, 临床效度和实用性也比较好, 在中国大陆的癌症患者中是可行的、可信的、有效的和敏感的。此外, EORTC QLQ-STO22也译成中文, 在胃癌患者中尝试对其生活质量进行评价^[12], 其结论为QLQ-STO22中文版具有较好的信度和效度。本研究对胃大部切除术后3年的胃癌患者, 采用中文版的EORTC QLQ-C30和QLQ-STO22对其生活质量进行评价, 以期对术后胃癌患者的治疗和护理带来帮助。

1 材料和方法

1.1 材料 本研究入选本院门诊随访的2010-2011年胃大部切除术后3年的胃癌患者96名和门诊体检健康者90名。有胃癌复发及检查指标异常的胃癌患者排除本研究。胃癌患者包括女42名和男54名, 平均年龄为53.2岁±8.1岁。基于国际抗癌联盟(UICC)分类标准对胃癌分期, 其中包括85名(88.5%)患者为I期胃癌, 8名(8.3%)患者为II期胃癌, 3名(3.2%)患者为III期胃癌。所有患者采用Billroth I式胃十二指肠切除术, 同时实施D2淋巴结清扫或扩大淋巴结清扫。健康者包括41名女性和49名男性, 平均年龄为54.8岁±7.9岁。胃癌患者与健康者在年龄和性别上无显著差异。

1.2 方法 受试者生活质量采用中文版EORTC QLQ-C30和QLQ-STO22进行评价。EORTC QLQ-C30由30个项目组成, 包括5个功能量表(躯体功能、角色功能、认知功能、情绪功能和社会功能)、3个症状量表(疲劳、恶心和呕吐、疼痛)、6个单项测量项目和1个整体生活质量量表^[11]。EORTC QLQ-STO22包括22个项目, 由9个量表组成, 包括吞咽困难、疼痛、反流、饮食受限、焦虑、口干、味觉、体型和脱发^[12]。在由专人对患者进行介绍后, 受试者本人填写调查表。基于EORTC QLQ-C30评分和EORTC-STO22评分手册说明, 将每个量表的原始数据转换成0-100。

统计学处理 对于EORTC QLQ-C30问卷调查, 整体健康状态评分越高, 表明生活质量越高; 功能性量表评分越高, 表明生活质量越高; 症状量表评分越高, 表明生活质量越差。对于EORTC QLQ-STO22问卷调查, 评分越高, 表明生活质量越差。采用t检验, 比较胃癌术后患者与健康者生活质量评分, $P<0.05$ 认为有统计学差异。

2 结果

2.1 EORTC QLQ-C30生活质量评分 对于EORTC

■相关报道
王建平等于2000年将EORTC QLQ-C30量表翻译成中文, 也在癌症患者中研究了该量表的效度。结果显示, 该量表各项心理测量学特性均达到要求, 临床效度和实用性也比较好, 在中国大陆的癌症患者中是可行的、可信的、有效的和敏感的。

■应用要点

本研究发现胃癌术后无复发的患者与健康者生活质量上存在的差异,有助于在临床医疗和护理工作中采取针对性的措施,改善胃癌术后的生活质量,进一步延长生存期。

表1 EORTC QLQ-C30检测的胃癌患者和健康者生活质量

	胃癌患者	健康者	P值
整体健康状况	60.1±18.5	58.3±17.2	0.28
功能量表			
躯体功能	76.8±13.3	75.2±14.5	0.11
认知功能	71.0±11.4	63.6±12.8	<0.05
情绪功能	79.4±13.7	72.2±12.6	<0.05
角色功能	81.7±14.9	83.2±16.4	0.321
社会功能	78.8±16.3	75.2±13.7	0.551
症状量表			
疲劳	33.9±10.6	40.9±11.3	<0.05
恶心和呕吐	17.6±10.4	10.2±8.7	<0.05
疼痛	16.3±14.5	14.4±13.7	0.085
6个单项测量项目			
呼吸困难	23.6±15.4	21.4±14.5	0.526
失眠	22.3±21.3	20.5±19.6	0.352
食欲下降	18.3±15.7	16.8±15.4	0.285
便秘	21.7±18.9	19.6±15.8	0.472
腹泻	29.5±18.8	23.2±14.7	0.166
经济困难	32.8±14.3	10.1±8.6	<0.05

QLQ-C30问卷调查,胃癌患者和健康者的整体健康状态评分分别为60.1±18.5和58.3±17.2,统计分析未显示显著性差异($P = 0.28$)。对于功能性量表,胃癌患者在情绪和认知功能($P<0.05$)上的评分优于健康者;对于症状量表,胃癌患者在疲劳($P<0.05$)评分上优于健康者,但在恶性和呕吐($P<0.05$)及经济困难($P<0.05$)评分上差于健康者(表1)。

2.2 EORTC QLQ-STO22生活质量评分 对于EORTC QLQ-STO22问卷调查,胃癌患者在反流、进食受限和体型上($P<0.05$)的评分差于健康者。此外,胃癌患者在吞咽困难、疼痛、口干、味觉上差于健康者,在焦虑和脱发上稍优于健康者,但均无显著性差异($P>0.05$,表2)。

3 讨论

癌症患者生活质量的评价量表包括一般性量表和疾病特异性量表。如仅采用疾病特异性的量表,可以有较高的灵敏度,但不同病种的研究结果比较起来比较困难,甚至影响了生活质量调查的普及。采用一般性的癌症生活质量量表测量可以解决这个问题,便于进行不同人群研究结果之间的比较,但一般性量表的灵敏度往往不够高,难以测查出生活质量的微小差别,而这种差别可能更具有临床意义。因此,研究者倾向于采用组合模式,即联合使用一般性量表和特异性量表,既提高了灵敏度,又便于不同研究结

表2 EORTC QLQ-STO22检测胃癌患者和健康者生活质量

	胃癌患者	健康者	P值
吞咽困难	6.5±8.1	5.7±6.3	0.085
疼痛	13.2±10.7	12.4±13.5	0.427
反流	19.4±14.3	11.1±14.7	<0.05
进食受限	15.9±14.6	10.2±7.8	<0.05
焦虑	26.6±16.2	28.8±17.5	0.454
口干	27.1±22.0	24.5±18.7	0.673
味觉	12.8±8.7	10.7±8.9	0.577
体型	30.8±16.5	15.7±10.2	<0.05
脱发	25.1±18.3	28.0±16.4	0.342

果之间的比较^[10,13,14]。

欧洲癌症研究与治疗组织于1993年推出了QLQ-C30^[15]。该量表可在短时间内由评价者单独完成,无需调查人员帮助,易为患者接受,并且患者对调查指标的内容比较满意,具有较高的依从性。为解决QLQ-C30敏感性较低,EORTC针对胃癌的临床及治疗特点,对近400名不同分期、不同手术方法和不同化疗方案的胃癌患者进行了调查评估,分阶段式地对问卷模块进行论证,于1998年制定出一种胃癌特异性生存质量临床评估量表,即患者在完成一个核心问卷(EORTC QLQ-C30)的同时,还辅以补充量表QLQ-ST022^[16]。

目前,两个量表已经在不同语言和文化背景国家和地区的癌症患者中应用^[9,14]。虽然国内也有研究者将其翻译成中文版,对其评价癌症(胃癌)患者生活质量的信度和效度也进行了很好的研究,但目前为止,报道很少。虽然也有研究采用EORTC QLQ-C30对胃癌患者术后生活质量进行评价,但主要为比较不同胃癌术式对患者生活质量的影响^[4,17]及术后不同阶段患者生活质量的比较^[18]。

本研究采用EORTC QLQ-C30和QLQ-ST022对胃癌术后3年的患者生活质量进行了评价,同时,将其与同期的健康者生活质量比较,以期找到影响胃癌术后患者生活质量的原因,以便采取针对性的措施进行治疗与护理。

EORTC QLQ-C30评价显示,胃癌术后患者与健康者整体健康状态未见显著差异。胃癌术后患者在认知和情绪功能、疲劳上的评分要显著优于健康者,但症状量表中的恶心和呕吐、经济评分明显差于健康者。虽然在其他疾病相关项目(包括疼痛、呼吸困难、便秘、腹泻等)评分上也稍差于健康者,但无显著差异。这

些结果与Lee等^[14]的研究相似,但所有评分均稍低于后一研究。胃癌术后患者的认知和情绪功能及疲劳评分优于健康者,这可能与胃癌患者经过3年的术后治疗,未出现复发或其他并发症,认为已经治愈,因此生理、心理调整较好。同时这些患者因为存在重大疾病,往往是家庭和社会关注的焦点,得到多方支持和关心,因此,整体上的认知和情绪评分较好。而对于健康体检者,家庭和/或工作上的事情可能对其产生一定的负面影响。由于工作和家庭事务的影响,某些健康者处于一种亚健康状态,担心出现某些疾病。这些都会对受试者的认知和情绪产生影响。这些因素也直接会导致疲劳的出现。经济评分上,胃癌术后患者差于健康者。虽然大部分的受试者均加入了医疗保险,但是,胃癌作为重大疾病,其造成的直接或间接开支,远远超过健康者每年的体检开支,从而给胃癌术后患者造成一定的经济压力。胃癌术后患者的其他相关项目差于健康者,这主要与手术对消化道的破坏有关。但经过3年的调整,患者已基本适应,因此,两者之间在这些项目上无显著差异。

QLQ-ST022评价显示,胃癌患者在进食受限、反流和体型上明显差于健康者。这也与Lee等^[14]的研究相似。进食受限和反流症状主要还是消化系手术的影响。至于体型上,胃癌术后患者一般都注意饮食,相对其他健康者来说,体型上稍差也是可以理解的。Korenaga等^[4]对胃癌术后长期存活患者的QOL进行了评价。评价的指标主要有术后1-3年、3-6年、6-10年和10年以上的饮食一致性、饮食量、食欲、体质量变化和体能状态。大部分患者饮食与以前一致,但超过一半以上的患者存在饮食量和食欲的下降。该研究还显示,大部分患者出现体质量减轻,但体能状态呈现逐步改善;其他指标评分虽然较健康者稍差,但无统计学差异。与Lee等研究不同的是,本研究未观察到两组受试者在脱发评分上的差异,而Lee等^[14]研究显示,胃癌患者的脱发评分优于健康者。这可能与本研究中患者并未长期使用化疗、放疗,而且健康者中,由于生理、心理压力源的存在,导致一定比例的脱发,因此,两者间并未出现显著差异。

刘春晓^[19]在其论文中也对胃癌患者的生活质量采用相同的量表进行了评估,他研究的胃癌患者整体健康评分为 40.95 ± 16.63 ,这显著低于本研究的患者整体健康评分,可能与其入选患者大部分(90.71%)为晚期胃癌患者有关,其显

示晚期胃癌的健康评分为 27.68 ± 16.94 。虽然本研究也观察到胃癌术后3年的整体健康评分,随着肿瘤分级增加而呈现下降趋势,但因III期胃癌患者人数很少,未进行统计分析。此外,刘春晓等的研究还对胃癌患者生活质量的影响因素进行了研究。其结果显示,在吞咽困难、躯体功能、疼痛、进食受限等评分上,随着年龄增加而呈现显著下降,而焦虑评分则随年龄增加而下降。本研究受试者因为年龄相对较集中,因而也未进行年龄分层分析。此外,本研究未对受试者的文化水平、婚姻、不良生活习惯(饮酒、吸烟等)、收入来源及性格类型等是否影响胃癌术后患者生活质量进行分析以及入选的患者为术后无复发者,这些也是本研究的不足之处。计划在以后的研究中进一步深入、细化。

总之,我们结果显示,胃癌患者术后3年生活质量整体评分基本恢复至正常,但在某些方面,特别是与上消化道相关的症状(如恶心呕吐、反流、进食受限等)与健康者存在差距,说明手术对患者的影响至少存在3年。因此,对于这些患者,有必要采取针对性的措施(包括对症治疗和心理治疗)对其进行治疗和护理,以改善胃癌术后患者的生活质量。

■名词解释

EORTC QLQ-C30:由欧洲癌症研究与治疗组织于1993年推出。该量表可在短时间内由评价者单独完成,无需调查人员帮助,易为患者接受。并且患者对调查指标的内容比较满意,具有较高的依从性。

QLQ-ST022:为解决QLQ-C30敏感性较低,EORTC针对胃癌的临床及治疗特点,对近400名不同分期、不同手术方法和不同化疗方案的胃癌患者进行了调查评估,分阶段式地对问卷模块进行论证,于1998年制定出一种胃癌特异性生存质量临床评估量表。

4 参考文献

- Blazeby JM. The role of quality of life assessment in gastric cancer. *Jpn J Clin Oncol* 2000; 30: 246
- Kaptein AA, Morita S, Sakamoto J. Quality of life in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 3189-3196
- Jentschura D, Winkler M, Strohmeier N, Rumstadt B, Hagemüller E. Quality-of-life after curative surgery for gastric cancer: a comparison between total gastrectomy and subtotal gastric resection. *Hepatogastroenterology* 1997; 44: 1137-1142
- Korenaga D, Orita H, Okuyama T, Moriguchi S, Maehara Y, Sugimachi K. Quality of life after gastrectomy in patients with carcinoma of the stomach. *Br J Surg* 1992; 79: 248-250
- 林华鹏, 章由贤, 章志翔. 全胃切除术后消化道重建对生活质量影响的对比研究. 天津医科大学学报 2011; 17: 230-232
- 覃谦, 李洪, 王力斌, 李爱辉, 欧阳杰, 梁卓红, 谢书勤. 全胃切除术后3种不同空肠构建贮存袋与保持十二指肠连续性消化道重建患者生活质量的比较. 中华临床营养杂志 2010; 18: 305-309
- 詹文华. 胃癌术后的生活质量评分. 临床外科杂志 2008; 16: 10-11
- Kobayashi D, Kodera Y, Fujiwara M, Koike M, Nakayama G, Nakao A. Assessment of quality of life after gastrectomy using EORTC QLQ-C30 and STO22. *World J Surg* 2011; 35: 357-364
- Oñate-Ocaña LF, Alcántara-Pilar A, Vilar-Compte D, García-Hubard G, Rojas-Castillo E, Alvarado-Aguilar S, Carrillo JF, Blazeby JM, Aiello-Crocifoglio V. Validation of the Mexican Spanish version of the

■ 同行评价

本研究采用EORTC QLQ-C30和QLQ-STO22对胃癌术后3年的患者生活质量进行了评价,对于胃癌手术的预后判定和疗效评价具有应用意义。

- EORTC C30 and STO22 questionnaires for the evaluation of health-related quality of life in patients with gastric cancer. *Ann Surg Oncol* 2009; 16: 88-95
- 10 Borgaonkar MR, Irvine EJ. Quality of life measurement in gastrointestinal and liver disorders. *Gut* 2000; 47: 444-454
- 11 王建平, 陈仲庚, 林文娟, 崔俊南. 中国癌症病人生活质量的测定--EORTC QLQ-C30在中国的试用. 心理学报 2000; 32: 438-432
- 12 姜宝法, 徐涛, 刘春晓, 徐敏, 崔永春, 王家林, 杜君, J. Blazby. 胃癌患者生活质量问卷(QLQ-STO22)中文版的制定. 中国心理卫生杂志 2005; 19: 310-312
- 13 WHO. The development of the WHO quality of life assessment instrument. Geneva: WHO, 1993
- 14 Lee SS, Chung HY, Yu W. Quality of life of long-term survivors after a distal subtotal gastrectomy. *Cancer Res Treat* 2010; 42: 130-134
- 15 Aaronson NK, Ahmedzai S, Bergman B, Bullinger M, Cull A, Duez NJ, Filiberti A, Flechtner H, Fleishman SB, de Haes JC. The European Organization for Research and Treatment of Cancer QLQ-C30: a quality-of-life instrument for use in international clinical trials in oncology. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85: 365-376
- 16 Vickery CW, Blazeby JM, Conroy T, Arraras J, Sezer O, Koller M, Rosemeyer D, Johnson CD, Alderson D. Development of an EORTC disease-specific quality of life module for use in patients with gastric cancer. *Eur J Cancer* 2001; 37: 966-971
- 17 Takiguchi S, Yamamoto K, Hirao M, Imamura H, Fujita J, Yano M, Kobayashi K, Kimura Y, Kurokawa Y, Mori M, Doki Y. A comparison of postoperative quality of life and dysfunction after Billroth I and Roux-en-Y reconstruction following distal gastrectomy for gastric cancer: results from a multi-institutional RCT. *Gastric Cancer* 2012; 15: 198-205
- 18 Avery K, Hughes R, McNair A, Alderson D, Barham P, Blazeby J. Health-related quality of life and survival in the 2 years after surgery for gastric cancer. *Eur J Surg Oncol* 2010; 36: 148-154
- 19 刘春晓. 胃癌患者的生存质量研究. 山东大学, 2004: 20-22

编辑 曹丽鸥 电编 鲁亚静

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2012年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》参考文献要求

本刊讯 本刊采用“顺序编码制”的著录方法,即以文中出现顺序用阿拉伯数字编号排序。提倡对国内同行近年已发表的相关研究论文给予充分的反映,并在文内引用处右上角加方括号注明角码。文中如列作者姓名,则需在“Pang等”的右上角注角码号;若正文中仅引用某文献中的论述,则在该论述的句末右上角注码号。如马连生^[1]报告……,潘伯荣等^[2-5]认为……;PCR方法敏感性高^[6-7]。文献序号作正文叙述时,用与正文同号的数字并排,如本实验方法见文献[8]。所引参考文献必须以近2-3年SCIE, PubMed,《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊为准,通常应只引用与其观点或数据密切相关的国内外期刊中的最新文献,包括世界华人消化杂志(<http://www.wjgnet.com/1009-3079/index.jsp>)和World Journal of Gastroenterology(<http://www.wjgnet.com/1007-9327/index.jsp>)。期刊:序号,作者(列出全体作者). 文题, 刊名, 年, 卷, 起页-止页, PMID编号;书籍:序号,作者(列出全部),书名,卷次,版次,出版社,年,起页-止页。

模拟肝段与超声图像的比较及其在教学中的应用

李银燕, 王学梅, 欧国成, 高宁宁

李银燕, 王学梅, 欧国成, 高宁宁, 中国医科大学附属第一医院超声科 辽宁省沈阳市 110001

李银燕, 讲师, 主要从事腹部超声与乳腺超声诊断研究.

作者贡献分布: 此课题由李银燕与王学梅设计; 研究过程由李银燕、王学梅、欧国成及高宁宁操作完成; 研究工具由欧国成提供; 本文写作由李银燕与高宁宁共同完成.

通讯作者: 王学梅, 教授, 110001, 辽宁省沈阳市和平区南京北街155号, 中国医科大学附属第一医院超声科.

wxmlmt@yahoo.com.cn

电话: 024-83282098

收稿日期: 2012-03-13 修回日期: 2012-04-26

接受日期: 2012-06-01 在线出版日期: 2012-07-08

Application of simulated liver segments in medical teaching

Yin-Yan Li, Xue-Mei Wang, Guo-Cheng Ou, Ning-Ning Gao

Yin-Yan Li, Xue-Mei Wang, Guo-Cheng Ou, Ning-Ning Gao, Department of Ultrasound Diagnostics, the First Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Correspondence to: Xue-Mei Wang, Professor, Department of Ultrasound Diagnostics, the First Hospital of China Medical University, 155 Nanjing North Street, Heping District, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. wxmlmt@yahoo.com.cn

Received: 2012-03-13 Revised: 2012-04-26

Accepted: 2012-06-01 Published online: 2012-07-08

Abstract

AIM: To explore the application of simulated liver segments in medical teaching by comparing them with corresponding ultrasonic images.

METHODS: Eight plasticine liver segments were developed according to anatomical proportion to make a model of the liver. The liver model was cut in accordance with the intercostal scanning angle. A man in a normal figure was scanned in three sections (the sixth-eighth intercostal space). The acquired ultrasonic images were compared with the three sections of the simulated liver to analyze the structure of the liver.

RESULTS: The intercostal sections of the simulated liver were in good agreement with the ultrasonic images. Sections A and B of the simulated liver showed SV, SVIII and SVII liver segments, while ultrasonic sections a and b showed the hepatic portal vein and the hepatic vein. The results

showed that the part above the portal vein is SV, below the hepatic vein is SVII, and between them is SVIII. Section C of the simulated liver showed SV, SVI and SVII liver segments, while ultrasonic section c showed the cross-section of the hepatic vein and the hepatic portal vein. The results showed that the part from the portal vein to the cross-section of the hepatic vein is SV, the part from the cross-section of the hepatic vein to the portal vein is SVI, and the part below the cross-section of the portal vein is SVII.

CONCLUSION: Cutting the plasticine liver model can help better understand the liver segments on the ultrasonic images, representing a good method to learn ultrasonic intercostal sections.

Key Words: Hepatic segments; Ultrasonic image; Teaching

Li YY, Wang XM, Ou GC, Gao NN. Application of simulated liver segments in medical teaching. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(19): 1787-1790

摘要

目的: 探讨模拟肝段与超声图像的比较及其在教学中的应用.

方法: 使用橡皮泥按肝段的解剖比例, 按标准形态制作8个橡皮泥肝段, 然后组合成完整的模拟肝脏模型. 按照肋间扫查的角度切割模拟肝脏. 标准体型的人仰卧位, 按照肋间隙从右上往左下依次扫查(第6-8肋间隙)3个切面. 然后与模拟解剖肝脏的3个切面进行比较并分析所显示的肝段结构.

结果: 模拟肝脏的肋间切面与超声肋间切面能很好的吻合: 橡皮泥肝脏A切面与B切面从上往下依次显示SV、SVIII、SVII肝段, 超声图像a与b切面显示肝门静脉及肝静脉, 门静脉以上部分为SV, 门静脉与肝静脉之间部分为SVIII, 肝静脉以下部分为SVII; 橡皮泥肝脏C切面从上往下依次显示SV、SVI、SVII肝段, 超声图像c切面显示肝静脉断面及肝门静脉断面, 门静脉右干至肝静脉断面部分为SV, 肝静脉断面至门静脉断面部分为SVI, 门静脉断面以

■背景资料

现代影像学对肝叶、肝段的精确划分提出了更高要求, 但是肋间切面标志难找, 比较抽象, 不容易理解. 目前在这方面的参考文献以及书籍很少供实习生及初学者们参考.

■同行评议者
钱林学, 主任医师,
首都医科大学附属北京友谊医院

■研发前沿

随着术中超声技术的应用以及肝胆外科医生对肝脏解剖的进一步认识,肝脏切除技术也从既往的大面积肝叶切除发展到更为准确的肝段切除,从而最大限度保留正常的肝脏。因此,现代影像学对肝叶、肝段的精确划分提出了更高的要求。

下部分为SVII。

结论:通过切割橡皮泥肝脏模型,使超声断面上的肝段一目了然,对于学习超声肋间切面是个很好的学习方法,值得在教学中展开研究并应用。

关键词:肝段;超声图像;教学

李银燕,王学梅,欧国成,高宁宁.模拟肝段与超声图像的比较及其在教学中的应用.世界华人消化杂志 2012; 20(19): 1787-1790

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1787.asp>

0 引言

随着术中超声技术的应用以及肝胆外科医生对肝脏解剖的进一步认识,肝脏切除技术也发生了巨大变化,从既往的大面积肝叶切除发展到更为准确的肝段切除,从而最大限度保留正常的肝脏,对残肝影响少,术后肝功能恢复较快,并发症较少^[1-3]。因此,现代影像学对肝叶、肝段的精确划分提出了更高的要求^[4,5]。对于超声科实习生及初学者来说,快速、精确判断肝段比较困难,内容繁琐而抽象。剑突下切面、肋下斜切面血管标志明显,肝段比较好区分,容易理解,但是肋间切面标志难找,而且比较抽象,不容易理解^[6]。目前在这方面的参考文献以及书籍很少,难以供实习生及初学者们参考^[7],因此为了使他们能更直观地认识并能更加牢固、灵活地掌握超声肋间切面图像上的肝段,本文使用8个不同颜色的橡皮泥代表不同的肝段制作了肝脏模型,并做了切割,为实习生及初学者们理解超声肋间切面的图像提供帮助。

1 材料和方法

1.1 材料 橡皮泥,刀,彩色超声仪: IU22(Philips, USA),配有凸阵腹部探头,频率为2-5 MHz。

1.2 方法 使用橡皮泥按肝段的解剖比例^[8,9],按标准形态制作8个橡皮泥肝段,然后组合成完整的模拟肝脏模型。按照肋间扫查的角度切割模拟肝脏。从右上往左下依次命名为A切面(SV、VI、VII、VIII段的交叉点以上)、B切面(经过SV、VI、VII、VIII段的交叉点)、C切面(SV、VI、VII、VIII段的交叉点以下)。标准体型的人仰卧位,按照肋间隙从右上往左下依次扫查(第6-8肋间隙)3个切面,从上往下依次命名为a、b、c切面。然后与模拟解剖肝脏的3个切面进行比较并分析所显示的肝段结构。

■创新盘点

本研究使用8个不同颜色的橡皮泥代表不同的肝段制作了肝脏模型,并进行切割,为实习生及初学者们理解超声肋间切面的图像提供帮助。

2 结果

按标准形态用橡皮泥制作的模拟肝脏模型切面如图1。模拟肝脏的肋间切面与超声肋间切面能很好的吻合: A切面与B切面均显示,从上往下依次为SV、SVIII、SVII肝段(图2)。a与b切面超声图像显示肝门静脉及肝静脉(图3),门静脉以上部分为SV,门静脉与肝静脉之间部分为SVIII,肝静脉以下部分为SVII; C切面显示,从上往下依次为SV、SVI、SVII肝段(图4),c切面超声图像显示肝静脉断面及肝门静脉断面(图5),门静脉右干至肝静脉断面部分为SV,肝静脉断面至门静脉断面部分为SVI,门静脉断面以下部分为SVII。

3 讨论

肝脏是人体内唯一具有4套管道系统的器官,这些管道的走行分布构成了不同肝段划分方法的解剖基础。Couinaud根据Glisson系统的分布规律和肝静脉的走行,进行了肝段的划分^[10,11]。Glisson系统为互相伴行的肝门静脉、肝动脉、肝内胆管在肝内的各级分支被结缔组织纤维鞘包围而形成的三联管道系统,似树枝状分布于肝段内,其中,门静脉管径最粗,易于显示和观察,且分支相对恒定,较肝动脉和肝内胆管变异少,因此,以他为中心代表肝动脉和肝内胆管作为划分肝段的解剖基础和标志^[12,13]。

Couinaud肝段划分法是个三维概念^[14-16],而超声受声窗大小的限制,在单一切面上只能显示部分肝脏及其肝内管道的二维断面。超声医师需要通过多方位扫查,将若干个二维断面图像在脑内经过三维空间想象,分析出病变与肝静脉和门静脉的空间位置关系,从而判断出肝脏病变的位置。由此可见,肝段的超声图像与解剖学图像的真实情况相差甚远,超声初学者们难以理解,也需要一种超声学上确定肝段解剖的更准确、快速的方法,满足今后临床工作的需要。

A与B切面均显示,从上往下依次为SV、SVIII、SVII肝段,a与b切面超声图像显示肝门静脉及肝静脉。由于SV与SVIII以门静脉的右前叶支为界,SVIII与SVII以肝静脉为界,我们分析超声图像的门静脉应作为SV与SVIII的分界线,而肝静脉应作为SVIII与SVII的分界线,因此门静脉以上部分为SV,门静脉与肝静脉之间部分为SVIII,肝静脉以下部分为SVII。C切面显示,从上往下依次为SV、SVI、SVII肝段,c切面超声图像显示肝静脉断面及肝门静脉断面,我们分析超声图像的肝静脉断面应作为SV与SVI的分界线,而门

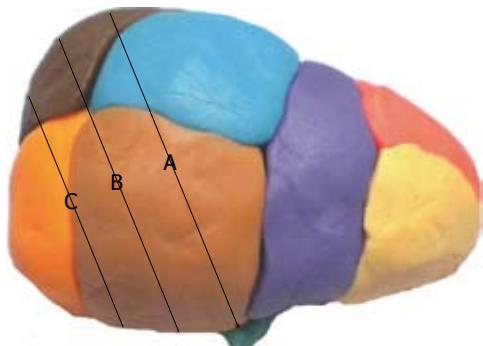


图 1 肝脏分段模型. 从上往下依次切割A、B、C3个切面.

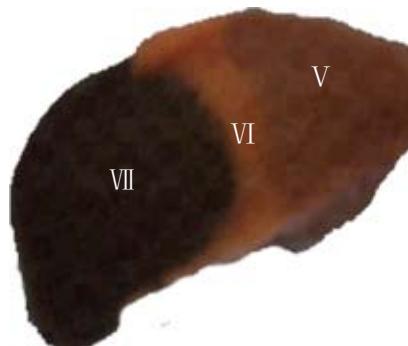


图 4 肝段模型切面C. 从上往下依次为S V、S VI、S VII肝段.

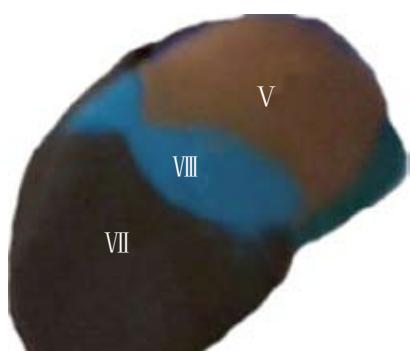


图 2 肝段模型切面A和B. 从上往下依次为S V、S VIII、S VII肝段.



图 5 超声肋间切面c. 粗箭头代表肝静脉断面, 细箭头代表门静脉断面; 门静脉右干至肝静脉断面部分为S V, 肝静脉断面至门静脉断面部分为S VI, 门静脉断面以下部分为S VII.



图 3 超声肋间切面a和b. 粗箭头代表门静脉, 细箭头代表肝静脉; 门静脉以上部分为S V, 门静脉与肝静脉之间部分为S VIII, 肝静脉以下部分为S VII.

静脉断面应作为S VI与S VII的分界线, 因此, 门静脉右干至肝静脉断面部分为S V, 肝静脉断面至门静脉断面部分为S VI, 门静脉断面以下部分为S VII。虽然只切了3个典型切面, 但是我们可以得知: 任意一个肋间切面不是S V、S VIII、S VII 3个肝段, 就是S V、S VI、S VII 3个肝段。

如果能使用尸体标本来完成这项研究会更有说服力, 但是尸体比较昂贵。因此, 我们使用了橡皮泥制作肝脏模型, 并模拟超声解剖断面, 这种方式既经济又直观地展现了肝脏的超声切面图像, 有助于超声学习者们理解比较抽象的肝脏肋间切面图像。

■名词解释

肝段: 依Glisson系统的分支及分布和肝静脉的走行, 将肝分为若干区域, 各区域内均有独立的Glisson系统的一、二、三级及逐渐变细的分(属)支和引流相应区域胆汁的管道, 并有相应的肝静脉属支引流相邻区域的静脉血, 这些区域是肝的功能单位称肝段。

本文总结了典型超声肋间切面上肝段以及肝段划分的解剖标志, 以期能够为超声学习者们将肝脏病变准确分段及为手术切除平面的精确定位提供有价值的资料。通过制作橡皮泥肝脏模型, 断面上的肝段一目了然, 对于学习超声肋间切面是个很好的学习方法, 值得在教学中展开研究并应用。但在实际应用中, 肝脏血管变异情况复杂多变, 使肝段形态、大小变化较大, 必须认真辨识和追踪肝内血管走行, 据此来划分的肝段才是可靠的。

4 参考文献

- 陈焕伟, 刘允怡, 颖作均, 苏树英. 超声引导下以肝段为本的解剖性肝切除术. 中华肝胆外科杂志 2006; 12: 378-380
- 黄志强. 肝脏外科技术的发展. 消化外科 2002; 1: 1-6
- 沈中锋, 郭盖章. 肝段切除术临床应用体会. 肝胆外科杂志 2009; 17: 117-119
- 赵振美, 刘树伟. 肝段的解剖及其虚拟化研究进展. 中华肝胆外科杂志 2006; 12: 430-432
- 郑楠, 隋鸿锦. 右半肝肝段解剖研究进展. 解剖科学进展 2012; 18: 83-86
- 张建飞, 于胜波. 肝段的解剖学及影像学划分. 国外医学(临床放射学分册) 2006; 29: 388-391, 411
- 程果, 郭燕丽. 肝段影像学研究进展. 中国医学影像技术 2009; 25: 1313-1315
- Li YM, Lv F, Xu X, Ji H, Gao WT, Lei TJ, Ren GB, Bai ZL, Li Q. Evaluation of liver functional reserve by combining D-sorbitol clearance rate and CT

■ 同行评价

本文是很好的基础教学文章,为实习生及初学者们理解超声肋间切面的图像提供帮助,该方法值得在教学中展开研究并应用。

- measured liver volume. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 2092-2095
- 9 饶利兵, 陈良富, 谢开汉, 向长和, 谢正兰. 肝裂的定位与肝段的划分. *解剖学杂志* 2005; 28: 352-354, i003
- 10 Ungvary G, Faller J. [The portobilary lobe of the liver and the glisson system]. *Acta Morphol Acad Sci Hung* 1963; 12: 189-200
- 11 Couinaud C. [Anatomic principles of left and right regulated hepatectomy: technics]. *J Chir (Paris)* 1954; 70: 933-966
- 12 杨建荣, 云玉珍, 张宝林. 肝段解剖学影像学研究进展. *内蒙古医学院学报* 2004; 26: 61-65
- 13 赵振美, 刘树伟, 林祥涛, 刘学静, 李振平, 汤煜春, 马刚, 娄丽. 国人肝段的再认识. *解剖学杂志* 2008; 31: 400-403
- 14 程果, 郭燕丽, 张绍祥, 谭立文, 李锐, 李恺, 陈刚. 肝脏三维可视化模型在肝脏超声影像学肝段划分中的应用价值. *中国医学影像技术* 2009; 25: 129-131
- 15 李恺, 张绍祥, 刘正津, 谭立文, 邱明国, 李七渝, 张伟国, 陈金华. 可视化肝脏横断面解剖与MR影像对照研究. *中国医学影像技术* 2005; 21: 138-142
- 16 林科灿, 刘景丰, 曾金华, 池润辉, 曾永毅. 基于肝脏三维图像的肝段自动划分及虚拟解剖性肝切除. *中国普外基础与临床杂志* 2011; 18: 694-697

编辑 张姗姗 电编 鲁亚静

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2012年版权归世界华人消化杂志

• 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索量、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。

《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! (编辑部主任: 李军亮 2012-03-08)。

胆管腺瘤临床病理特点

方三高, 马强, 林俐, 李艳青, 曾英, 肖华亮

方三高, 马强, 林俐, 李艳青, 曾英, 肖华亮, 中国人民解放军第三军医大学大坪医院野战外科研究所病理科 重庆市 400042

方三高, 主治医师, 主要从事病理学方面的研究工作.

作者贡献分布: 此课题由方三高与马强设计; 研究过程由方三高、马强及林俐完成; 研究所用新试剂及分析工具由肖华亮提供; 数据分析由方三高、马强、李艳青及曾英完成; 本论文写作由方三高完成.

通讯作者: 方三高, 主治医师, 400042, 重庆市, 中国人民解放军第三军医大学大坪医院野战外科研究所病理科.

fangsangaode@163.com

电话: 023-68757648

收稿日期: 2012-03-22 修回日期: 2012-05-22

接受日期: 2012-06-16 在线出版日期: 2012-07-08

Analysis of clinicopathological features of bile duct adenoma of the liver

San-Gao Fang, Qiang Ma, Li Lin, Yan-Qing Li, Ying Zeng, Hua-Liang Xiao

San-Gao Fang, Qiang Ma, Li Lin, Yan-Qing Li, Ying Zeng, Hua-Liang Xiao, Department of Pathology, Institute of Surgical Research, Daping Hospital, the Third Military Medical University of Chinese PLA, Chongqing 400042, China

Correspondence to: San-Gao Fang, Attending Physician, Department of Pathology, Institute of Surgical Research, Daping Hospital, the Third Military Medical University, Chongqing 400042, China. fangsangaode@163.com

Received: 2012-03-22 Revised: 2012-05-22

Accepted: 2012-06-16 Published online: 2012-07-08

Abstract

AIM: To analyze the clinicopathological characteristics, diagnosis and differential diagnosis of bile duct adenoma (BDA) of the liver.

METHODS: Two cases of BDA of the liver were reported. Their clinical data, pathologic features, and immunophenotypes were analyzed. A review of related literature was also performed.

RESULTS: Asymptomatic nodular masses of the liver were revealed incidentally during a CT scan in both cases. Grossly, the masses were described as firm white lesions with well-defined margins, but were not encapsulated. Histologically, the tumors were composed of round ductal or irregular glandular structures and abundant fibrous stroma. Those adenoid components

showed no obvious dilatation and were lined by columnar or cuboidal cells that have regular nuclei and lack dysplasia. Immunohistochemically, the tumor cells were positive for epithelial markers such as CK (pan), CK7 and E-cadherin.

CONCLUSION: BDA of the liver is a rare benign tumor with unique clinicopathological features. It should be distinguished from some mimics such as well-differentiated intrahepatic cholangiocarcinoma (ICC) and Von Meyenburg's complex.

Key Words: Liver neoplasms; Bile duct adenoma; Clinicopathology; Immunohistochemistry; Differential diagnosis

Fang SG, Ma Q, Lin L, Li YQ, Zeng Y, Xiao HL. Analysis of clinicopathological features of bile duct adenoma of the liver. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(19): 1791-1795

摘要

目的: 探讨胆管腺瘤(bile duct adenoma, BDA)的临床病理特点、诊断及鉴别诊断.

方法: 报道2例肝脏BDA并结合文献分析其临床资料、形态学和免疫表型特征.

结果: 2例结节样肝脏肿块均在CT扫描被无意中发现, 患者无临床症状. 肉眼见肿块呈灰白色, 质硬, 其边界完整但无包膜. 组织学显示肿瘤由或圆或不规则的腺管状结构及丰富的纤维性间质构成. 这些腺样结构扩张不明显, 内衬柱状或立方上皮, 细胞核圆而规则, 缺乏异型性. 免疫组织化学显示CK(pan)、CK7及E-cadherin表达阳性.

结论: 胆管腺瘤是一种罕见的独具临床病理特点的良性肝脏肿瘤, 应与高分化胆管细胞癌及Von Meyenburg综合征等相鉴别.

关键词: 肝肿瘤; 胆管腺瘤; 临床病理; 免疫组织化学; 鉴别诊断

方三高, 马强, 林俐, 李艳青, 曾英, 肖华亮. 胆管腺瘤临床病理特点. 世界华人消化杂志 2012; 20(19): 1791-1795

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1791.asp>

■背景资料

胆管腺瘤(BDA)发生于肝脏被膜下, 极为罕见. 肿块较小, 多无临床症状, 如临床及病理医生对BDA的临床病理特征缺乏认识, 对肝细胞背景中出现灶性密集的腺管状结构感到困惑, 容易误诊.

■同行评议者

邵升, 副教授, 哈尔滨医科大学附属二院肝胆外科

■创新盘点

本文主要对2例肝脏BDA的临床资料、病理形态学特征及免疫表型进行总结，并复习相关文献，分析肝脏BDA临床及病理形态学特征，重点探讨其病理诊断及鉴别诊断。

0 引言

胆管腺瘤(bile duct adenoma, BDA)非常罕见，自1946年Bleyer^[1]首次描述以来，临床仅见个案报道^[1-5]。病理学检查尤其是在术中冷冻检查时，易与胆管癌或肝脏转移癌相混淆，可能引起过诊断(over-diagnosis)^[6]而导致治疗过度(excessive medical treatment)。本文观察了2例BDA，分析其临床资料、形态学改变及免疫组织化学表达特点，结合文献探讨其诊断及鉴别诊断。

1 材料和方法

1.1 材料 患者1，男，61岁，因“急性胃肠炎”就诊。CT显示肝右叶后下段不均质性结节影，增强后病变有强化(图1A)，考虑肝癌可能性大。肝脏形态、轮廓无改变，肝内胆管未见明显扩张，肝外胆道无异常，腹主动脉、肝动脉及其分支走行好，无狭窄及充盈缺损改变。未见腹水及明显肿大淋巴结。入院后行“剖腹探查，肝脏肿瘤切除术”。术中见右肝后下叶肿块与门静脉相连，切除部分肝脏及肿瘤送病理检查。术中及术后病理诊断：(肝右叶)非典型性胆管腺瘤(一种错构瘤)(病理号：0812424)。随访44 mo未见肿瘤复发。患者2，女，39岁，门诊以“贫血原因待查”收住。B超发现胰头部实性肿物，CT提示胰头、十二指肠曲交界处见一大小约2.6 cm×2.2 cm的稍低密度结节影，边界清楚，增强后肿块强化，而病灶周围强化更明显。左肝内叶见一1.0 cm×0.8 cm的略低密度区，增强后可强化，呈结节状(图1B)。胰管、肝内、外胆管无明显狭窄及扩张。肝脏外形、大小正常。胆囊黏膜粗糙，囊内见斑片状高密度灶。脾不大，质均匀。腹腔及腹膜后未见肿大淋巴结，无腹水。印象：胰头、十二指肠曲交界处占位，考虑：(1)胰头癌肝转移？胃肠间质瘤？(2)左肝占位；(3)胆囊结石；遂于2011-09-09行胰头部肿块及部分左肝组织切除术。术中冷冻病理诊断：(胰头)梭形细胞肿瘤，倾向良性；(肝左叶)胆管腺瘤。术后病理诊断：(1)(胰头)胃肠道间质瘤(低危险度)；(2)(肝左叶)胆管腺瘤(病理号：1112079)。随访6 mo，患者恢复良好。

1.2 方法 送检标本均由诊断医师规范化取材，快速冷冻切片观察。冷冻剩余组织及重新取材标本经40 g/L甲醛固定，常规脱水，石蜡包埋，4 μm厚切片，HE染色，光镜观察。免疫组织化学采用EnVision法。所选用抗体CK(pan)、CK7、CK20、HepPar-1、AFP、CEA、SAM、E-cadherin、

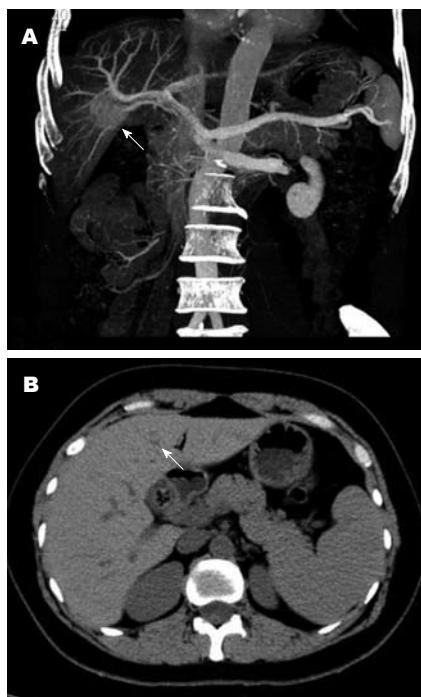


图1 胆管腺瘤的影像学。A: DSA示肝右叶类圆形肿块呈不规则性增强，界限尚清(箭头)；B: CT示左肝被膜下实质性低密度影(箭头)。

P63、c-Myc及Ki-67均为美国DAKO公司产品。操作步骤按照试剂盒说明书进行。用PBS代替一抗作空白对照。阳性细胞数占总细胞数的比例>10%时即判为阳性。Ki-67及P63胞核阳性，其余抗体胞膜或胞质阳性。

2 结果

2.1 巨检 例1的标本为灰白灰褐色组织1块，大小1.2 cm×0.8 cm×0.5 cm；例2送检物为右肝V、VI及VII段，大小15.0 cm×11.0 cm×6.0 cm，其内见一结节样肿块，大小4.0 cm×3.0 cm×3.0 cm，灰红色及灰白色，质地中等，界限清楚，无包膜。

2.2 镜检 瘤组织与正常肝组织界限欠清，呈实质性小管状或腺样排列(图2A)，弥漫分布于纤维间质中。增生的胆管密集，管腔可有可无，不扩张或扩张不明显，能产生黏液，个别区域可见胆栓(图2B)。瘤细胞呈立方形或矮柱状，大小比较一致，异型性不明显，胞浆中等，红染，界限清楚。核圆形或椭圆形，染色质淡染，部分可见小核仁，未见核分裂(图2C)。肿瘤中央区域间质有不同程度的纤维化及透明变性，外周慢性炎细胞浸润，灶性肝细胞团被包绕或夹入(图2D)。肿块周围肝组织未见压迫及萎缩。

2.3 免疫组织化学 例1患者肝脏肿块增生的胆管上皮CK(pan)(+)(图2E)、CK7(+)、CK20(-)、

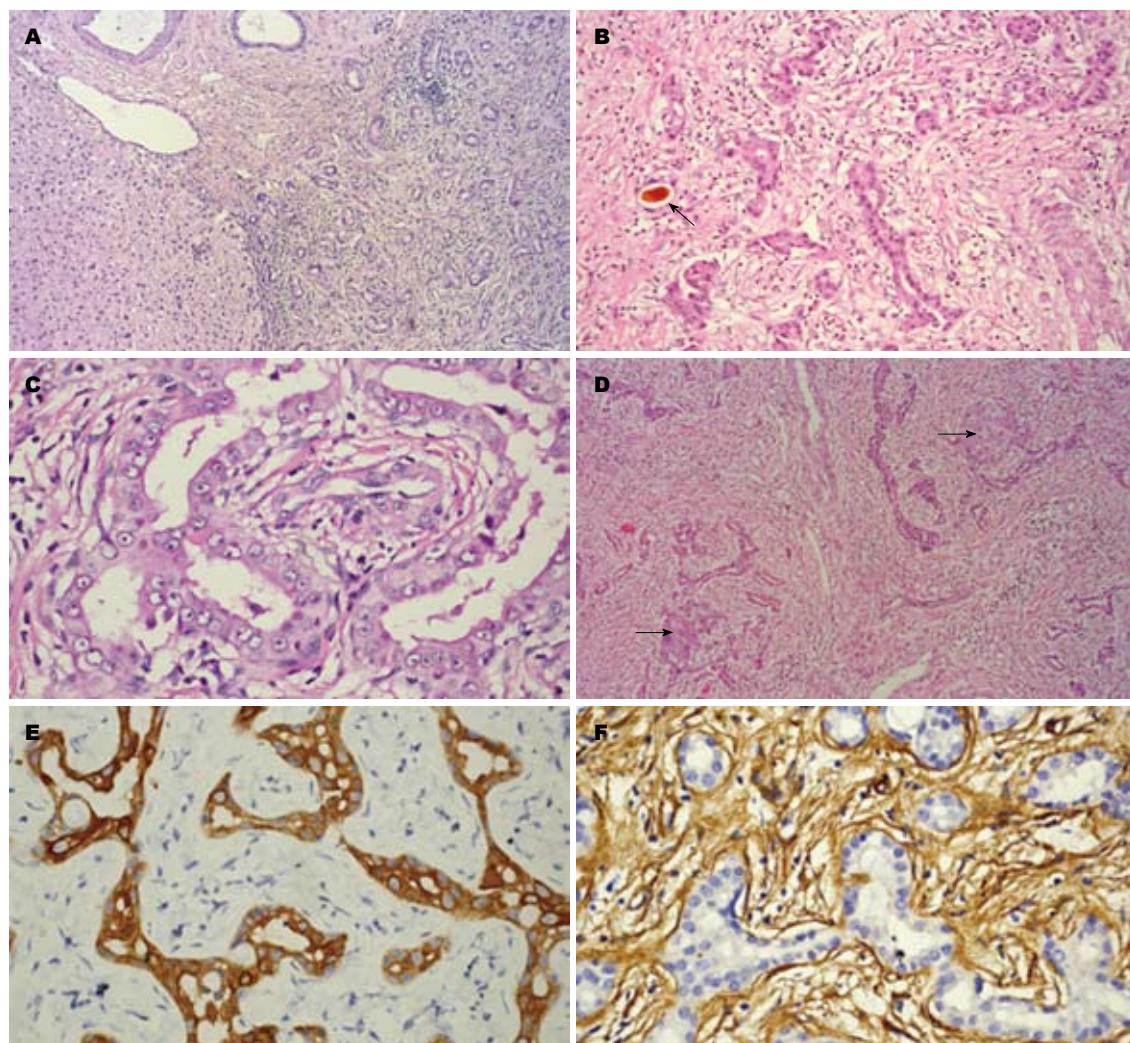


图 2 胆管腺瘤的形态学表现. A: 肿块无明显包膜, 增生的小胆管密集杂乱分布, 间质纤维组织增生及淋巴细胞浸润(HE \times 100); B: 大多数胆管无扩张, 偶见胆栓形成(箭头)(HE \times 200); C: 上皮无异型, 胞质嗜酸, 核规则, 核仁明显(HE \times 400); D: 可见残存的肝细胞岛(箭头)(HE \times 200); E: 免疫组织化学示胆管上皮CK7(+)(EnVision \times 200); F: 而间质SMA(+)(EnVision \times 200).

CD10(+)、P53(-)、P63(-)、C-myc(-)、CEA(-), SAM(间质+)(图2F), Ki-67约2%(+);而胰头肿块CD34(+++)、CD117(+++)、SAM(-)、S-100(-).例2患者肝脏结节显示CK(pan)(+), CD10(+/-)、P53(-)、CEA(-), HepPar-1(-)、AFP(-)、E-cad(+)、SAM(间质+), Cerb-B2(+), Ki-67约3%(+).

3 讨论

胆管腺瘤是由类似小叶间胆管或腺管样结构组成的良性或错构瘤性肝脏肿瘤, 比较罕见, 患者常无显著症状, 于影像学检查、腹部手术或尸检偶然发现。组织学起源尚不明确, 有人认为BDA是一种肝脏错构瘤, 是胆管上皮对损伤作用的一种反应性增生性病变^[3], 也有人认为是真性上皮肿瘤, 起源于胆管的异常增生^[6,7]. 随着干细胞理论的兴起, 目前认为BDA可能起源于具

有多种分化潜能的肝脏肿瘤干细胞。正如将胆管细胞癌归于肝癌一样, 一般认为BDA是肝脏而不是胆管系统病变。随着影像学技术进展, 临床检出率逐渐增多, 但经手术证实的较少, 往往表现为肝脏周边部较小的占位性病变。BDA见于任何年龄, 多位于肝膜下, 肿块小, 质地实, 境界清楚, 但无包膜, 内衬单层立方上皮, 细胞形态规则, 无明显异型性^[3,6]. 本研究2例均由影像学检查发现, 尤其是患者2, CT发现胰头部占位及肝脏结节性病变, 临床考虑胰头癌肝转移。术中快速冷冻病理检查见肿块呈腺管状结构, 形态规则, 细胞温和, 经过反复观察, 权衡再三, 诊断为非典型性胆管腺瘤, 随后石蜡切片及免疫组织化学证实这样报告的必要性。如果观察者缺乏经验, 对其形态学认识不足, 极易误诊为高分化胆管细胞癌或转移性腺癌, 这也是本文展开论述的初衷。值得一提的是胆管腺瘤与胆管

■应用要点
通过病例报道, 将肝脏中可能形成或者混杂有腺管样结构的疾病或病变进行纵向和横向对比, 拓展病理诊断思路, 防止误诊漏诊, 杜绝形态学诊断过头进而由此引起的临床治疗过度。

■同行评价

文章内容新颖，病例资料完整，鉴别诊断详细，对胆管腺瘤的病理诊断有一定帮助。

腺纤维瘤的临床表现相似，形态学改变相近，抗体表达谱几乎相同，二者关系非常密切^[8]。本研究中例2胆管腺瘤的间质增生显著，诊断为胆管腺纤维瘤也未尝不可，他们的腺管变化几乎无异，只不过其大小及间质有点区别，提示胆管腺纤维瘤很可能是在胆管腺瘤的基础上肌纤维母细胞增生进而间质纤维化形成，或者两者为同一病变的不同发展阶段。

胆管腺瘤的形态学特点为：(1)病变较小，一般直径0.1-1.0 cm(平均0.58 cm)^[3]；(2)病变常位于肝包膜下，多为单发性结节，少数多发，病变界限清楚，无包膜；(3)病变内可见大量增生的小胆管，腔内无胆汁，可分泌黏液，但管腔不扩张。上皮细胞分化良好，无明显的异型性，伴多量慢性炎细胞浸润；(4)随着病变进展，增生的胆管和炎细胞逐渐减少，有的仅见少量胆管成分，而纤维组织逐渐增多并胶原化，偶见钙化^[2]。

胆管腺瘤需要与下列疾病鉴别：(1)高分化胆管细胞癌：分化良好的腺管呈浸润性生长，癌性腺体形如略扩大的闰管，成角并见间质反应，被覆立方或低柱状胆管上皮，细胞轻度异型，可见核分裂，有时呈乳头状生长突入腔内，可侵犯肝窦、血管或神经。高分化胆管细胞癌CEA表达阳性、CD56阴性^[9]；而BDA恰恰相反，CEA表达阴性、CD56表达阳性；(2)Von Meyenberg综合征：又叫微小错构瘤，认为是胆管系统尤其小叶间胆管对损伤的局灶性反应，往往与胆管梗阻或慢性淤胆有关，实质上为外周小叶间胆管畸形^[10]。绝大多数发生于小儿，偶有青少年患者的报道。患者平均年龄15 mo，男女比例2：1，以肝右叶多见，病变更小(平均直径0.5 cm)，多发。镜下在纤维或者玻璃样变的间质中可见不规则或圆形的腺管样结构，有轻微的扩张，被覆扁平或立方上皮，可有鳞状上皮化生；而胆管腺瘤体积较大，管腔不扩张，腔内可见黏液；(3)胆管腺纤维瘤(biliary adenofibroma, BAF)：与BDA关系非常密切，呈膨胀性生长，切面实性，可见微囊，镜下病灶中的胆管或小腺管紧密排列，大小及形态与小胆管相似，腔内可见胆汁，但缺乏黏液，胆管上皮局部可成簇排列，可见一定异型性，偶见核分裂。间质伴有丰富的纤维母细胞成分并致密胶原化^[8,11]，伴散在的淋巴细胞、浆细胞浸润；(4)胆管囊腺瘤(bile duct cystadenoma)：临幊上有时把胆管囊腺瘤简称为胆管腺瘤，虽一字之差，但他们的形态学及生物学行为截然不同。胆管囊腺瘤起源于肝外胆管，肿块较大，呈多中

心性囊实性，囊壁除上皮及纤维外，可夹杂平滑肌、血管及小胆管。囊腔大小不等，内含浆液或黏液^[12]。囊内可见乳头或绒毛样新生物，被覆不同程度异型增生的分泌性柱状或立方上皮，可见杯状细胞。实质性区腺腔大小不一，可呈锯齿状或囊性扩张，有时上皮形态温和，貌似良性，但可复发，甚至发生侵袭。而BDA起源于肝内胆管，体积小，腺管小而规则、密集，扩张不明显；(5)肝转移性腺癌：有消化系等处原发病灶，结节通常靠近肝表面，常多发，呈浸润性生长，细胞异型性明显，核分裂易见。腺体大小不等，管腔扩张，中央可见中性粒细胞浸润及其碎片，背景“脏”，坏死明显。增强扫描显示环状强化呈“牛眼征”。免疫组织化学villin, CDX2阳性^[13]；(6)肝脏间叶性错构瘤：可能与19号染色体异常转位有关^[14]。通常发生于2岁以下的幼儿，女性多见， AFP可升高。肿瘤多为单发巨块，早期呈实性，随着肿瘤生长，逐渐分隔为多个囊肿。镜下病灶由排列紊乱的原始间叶组织、血管及胆管构成，但无肝小叶结构。胆管扩张，上皮细胞呈柱状，分化成熟，无核分裂；(7)原发性硬化性胆管炎：可能是由免疫介导的进展性疾病，可出现黄疸、血清学IgG4等异常并可见多脏器病变^[15]。以肝内、外胆管的弥漫性进行性炎性反应、纤维化和多发性狭窄为主要病理特征，胆管增厚、僵硬及胶原化，可见成角或扭曲、变形，管壁周围同心圆样纤维素沉积，管腔狭窄，病变不均匀时呈串珠样改变。胆管上皮往往萎缩，形态学易与胆管细胞癌间质反应或纤维化的胆管腺瘤混淆，但BDA病变局限，一般无临床症状；(8)炎性假瘤：常由肥胖的(肌)纤维母细胞和大量慢性炎细胞组成。病变成份复杂，多样性显著，瘤组织排列疏密不均，并可见不等量的泡沫细胞。除非个别散在的小胆管被包绕，一般无上皮成分；(9)肝脏胚胎性肿瘤：如肝母细胞瘤，主要见于婴幼儿，肿块较大，恶性，呈浸润性生长，组织结构复杂多变，有上皮型(包括胎儿型、胚胎型)、上皮-间叶混合型和间叶型等亚型。有时可见鳞状上皮灶及髓外造血。免疫组织化学显示肿瘤细胞双向分化，表达CK(pan)及vimentin；(10)肝局灶性结节性再生：异常增生的肝细胞索组成，血窦丰富，病灶边界清晰，但无包膜。瘢痕性纤维从中间向周围将病灶分割，呈结节状。临幊或影像学可能类似BDA，但组织学容易鉴别：再生结节的小胆管一般散在位于增生的肝细胞结节汇管区，而BDA的腺管非常密集，位于正常肝组织内。

胆管腺瘤的治疗首选手术, 可行局部切除, 关键是明确诊断, 为此, 预约术中冷冻且判断安全手术切缘是必要的。患者一般预后良好, 文献上尚未见有肿瘤复发和恶变的报道^[3,6]。本文患者术后分别随访6 mo及51 mo, 恢复良好, 均未见复发。

4 参考文献

- 1 Bleyer LF. Multiple bile duct adenoma. *Proc Inst Med Chic* 1946; 16: 205
- 2 蒋昭实, 陈杰. 肝内胆管腺瘤1例. 诊断病理解剖学杂志 1998; 5: 117-118
- 3 Allaire GS, Rabin L, Ishak KG, Sesterhenn IA. Bile duct adenoma. A study of 152 cases. *Am J Surg Pathol* 1988; 12: 708-715
- 4 Kim YS, Rha SE, Oh SN, Jung SE, Shin YR, Choi BG, Byun JY, Jung ES, Kim DG. Imaging findings of intrahepatic bile duct adenoma (peribiliary gland hamartoma): a case report and literature review. *Korean J Radiol* 2010; 11: 560-565
- 5 Bhathal PS, Hughes NR, Goodman ZD. The so-called bile duct adenoma is a peribiliary gland hamartoma. *Am J Surg Pathol* 1996; 20: 858-864
- 6 Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND. Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System. Lyon: IARC Press, 2010: 233-238
- 7 Takahashi S, Takada K, Kawano Y, Miyanishi K, Ishiwatari H, Hayashi T, Sagawa T, Sato T, Sato Y, Takimoto R, Kobune M, Kuroiwa G, Hirayama M, Tobioka H, Hirata K, Omatsu M, Hasegawa T, Kato J. [Cholangiocarcinoma with bile duct adenoma and hamartoma-like lesion in the bile duct]. *Nihon Shokakibyo Gakkai Zasshi* 2010; 107: 461-469
- 8 Tsui WM, Loo KT, Chow LT, Tse CC. Biliary adenofibroma. A heretofore unrecognized benign biliary tumor of the liver. *Am J Surg Pathol* 1993; 17: 186-192
- 9 Gütgemann I, Haas S, Berg JP, Zhou H, Büttner R, Fischer HP. CD56 expression aids in the differential diagnosis of cholangiocarcinomas and benign cholangiocellular lesions. *Virchows Arch* 2006; 448: 407-411
- 10 Salles VJ, Marotta A, Netto JM, Speranzini MB, Martins MR. Bile duct hamartomas--the von Meyenburg complex. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2007; 6: 108-109
- 11 Gurrera A, Alaggio R, Leone G, Aprile G, Magro G. Biliary adenofibroma of the liver: report of a case and review of the literature. *Patholog Res Int* 2010; 2010: 504584
- 12 Zen Y, Pedica F, Patcha VR, Capelli P, Zamboni G, Casaril A, Quaglia A, Nakanuma Y, Heaton N, Portmann B. Mucinous cystic neoplasms of the liver: a clinicopathological study and comparison with intraductal papillary neoplasms of the bile duct. *Mod Pathol* 2011; 24: 1079-1089
- 13 Hughes NR, Goodman ZD, Bhathal PS. An immunohistochemical profile of the so-called bile duct adenoma: clues to pathogenesis. *Am J Surg Pathol* 2010; 34: 1312-1318
- 14 Shehata BM, Gupta NA, Katzenstein HM, Steelman CK, Wulkan ML, Gow KW, Bridge JA, Kenney BD, Thompson K, de Chadarévian JP, Abramowsky CR. Undifferentiated embryonal sarcoma of the liver is associated with mesenchymal hamartoma and multiple chromosomal abnormalities: a review of eleven cases. *Pediatr Dev Pathol* 2011; 14: 111-116
- 15 Fujita T, Kojima M, Gotohda N, Takahashi S, Nakagohri T, Konishi M, Ochiai A, Kinoshita T. Incidence, clinical presentation and pathological features of benign sclerosing cholangitis of unknown origin masquerading as biliary carcinoma. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 2010; 17: 139-146

编辑 曹丽鸥 电编 鲁亚静

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2012年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

中国科技信息研究所发布《世界华人消化杂志》 影响因子 0.694

本刊讯 2011-12-02, 一年一度的中国科技论文统计结果由中国科技信息研究所(简称中信所)在北京发布。《中国科技期刊引证报告(核心版)》统计显示, 2010年《世界华人消化杂志》总被引频次3458次, 影响因子0.694, 综合评价总分60.6分, 分别位居内科学类49种期刊的第5位、第7位、第6位, 分别位居1 998种中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)的第79位、第320位、第190位; 其他指标: 他引率0.83, 被引半衰期4.9, 来源文献量712, 文献选出率0.90, 参考文献量17963, 平均引文数25.23, 平均作者数4.35, 地区分布数29, 机构分布数349, 基金论文比0.45, 海外论文比0.01。(编辑部主任: 李军亮 2012-01-01)

微生态制剂枯草杆菌、肠球菌二联活菌肠溶胶囊治疗溃疡性结肠炎58例

刘红, 姚萍

■背景资料

目前溃疡性结肠炎(UC)治疗方面及发病机制方面是研究重点, 而其中肠道菌群紊乱及微生态制剂治疗UC是研究的热点, 本文就微生态制剂美沙拉嗪治疗UC进行相关临床研究。

刘红, 姚萍, 新疆医科大学第一附属医院消化科 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830054

刘红, 在读硕士, 主要从事消化系病学的研究。

作者贡献分布: 刘红与姚萍对此文所作贡献均等; 此课题由姚萍与刘红设计; 研究过程由刘红操作完成; 本论文写作及数据分析由姚萍指导刘红完成。

通讯作者: 姚萍, 副教授, 830054, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市鲤鱼山路137号, 新疆医科大学第一附属医院消化内科。

pingyaozh@sina.com

电话: 0991-4366064

收稿日期: 2012-03-29 修回日期: 2012-04-25

接受日期: 2012-06-16 在线出版日期: 2012-07-08

Treatment of ulcerative colitis with a microecological preparation comprising Bacillus subtilis and Enterococcus: An analysis of 58 cases

Hong Liu, Ping Yao

Hong Liu, Ping Yao, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China
Correspondence to: Ping Yao, Associate Professor, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, 137 Liyushan Road, Urumqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China. pingyaozh@sina.com

Received: 2012-03-29 Revised: 2012-04-25

Accepted: 2012-06-16 Published online: 2012-07-08

Abstract

AIM: To observe the clinical effects of a microecological preparation comprising Bacillus subtilis and Enterococcus in the treatment of mild and moderate ulcerative colitis.

METHODS: The clinical data for 139 patients treated with mesalazine, alone or in combination with Bacillus subtilis plus Enterococcus viable enteric-coated capsules during the past two years in our hospital, were analyzed and compared in terms of the time of clinical remission, clinical remission rate, relapse-free time and relapse rate.

RESULTS: There were statistical differences be-

tween the two groups in clinical remission rate, relapse-free time and relapse rate ($\chi^2 = 4.481, F = 3.435, \chi^2 = 4.757$, all $P < 0.05$). There was no difference between the two groups in the time of clinical remission ($P > 0.05$).

CONCLUSION: Combined use of Bacillus subtilis plus Enterococcus viable enteric-coated capsules is associated with a higher clinical remission rate, longer relapse-free time, and a lower relapse rate in the treatment of mild and moderate active ulcerative colitis.

Key Words: Microecological preparation; Mesalamine; Ulcerative colitis

Liu H, Yao P. Treatment of ulcerative colitis with a microecological preparation comprising Bacillus subtilis and Enterococcus: An analysis of 58 cases. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(19): 1796-1799

摘要

目的: 观察微生态制剂枯草杆菌、肠球菌二联活菌肠溶胶囊对轻、中度溃疡性结肠炎(Ulcerative colitis, UC)的疗效。

方法: 本研究收集我科2年住院治疗的轻、中度UC患者139例, 按随机、对照分为美沙拉嗪治疗组81人与枯草杆菌、肠球菌二联活菌肠溶胶囊+美沙拉嗪治疗组58人, 比较两组在达到缓解时间、缓解率、维持缓解时间、复发率等方面的差异, 并对结果进行统计学分析。

结果: 枯草杆菌、肠球菌二联活菌肠溶胶囊+美沙拉嗪与美沙拉嗪相比, 两组在缓解率、维持缓解时间、复发率的比较, 枯草杆菌、肠球菌二联活菌肠溶胶囊+美沙拉嗪组缓解率、维持缓解时间、复发率方面差异有统计学意义($\chi^2 = 4.481, F = 3.435, \chi^2 = 4.757$, 均 $P < 0.05$); 达到缓解时间的比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。

结论: 在治疗轻、中度UC中, 枯草杆菌、肠球菌二联活菌肠溶胶囊+美沙拉嗪与美沙拉嗪

相比, 具有缓解率高、维持缓解时间长、复发率低等优点.

关键词: 微生态制剂; 美沙拉嗪; 溃疡性结肠炎

刘红, 姚萍. 微生态制剂枯草杆菌、肠球菌二联活菌肠溶胶囊治疗溃疡性结肠炎58例. 世界华人消化杂志 2012; 20(19): 1796-1799

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1796.asp>

0 引言

溃疡性结肠炎(Ulcerative colitis, UC)又名非特异性溃疡性结肠炎, 是一种目前发病原因尚不明确的直肠和结肠炎性疾病. 病变主要局限于大肠黏膜和黏膜下层. 主要临床症状有血性腹泻、黏液脓血便和轻中度腹痛, 并可有其他脏器、组织, 如关节、皮肤、眼、口及肝胆等肠外表现. 病情轻重不等, 多呈反复发作慢性病程. 而我国近年报道的炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)病例数激增, 近15年的3 000多篇UC文献报道中已累计超过12万次, 而基于我国多家医院病例统计推测, 目前我国UC的患病率是11.6/10万人^[1], 且有可能被低估. UC的发病高峰多在20-40岁, 儿童及老年人较少见. 男女发病率无明显差异. 近些年患者数较前有所增加. 早期诊断及治疗对该病具有重要意义. UC的发病机制目前尚未完全明确, 大量流行病学研究显示遗传因素、环境因素、免疫调节紊乱、感染、肠道菌群紊乱等多因素参与其发病过程^[2]. 目前, 氨基水杨酸制剂已成为轻、中度UC药物治疗的首选, 美沙拉嗪为常用药物之一. 但近期临床研究发现, UC患者肠道菌群失调, 肠道菌群在发病机制中起着重要作用, 益生菌能够抵抗胃酸和肠道酶的消化, 黏附于肠道黏膜表面并调节黏膜免疫反应, 进而通过改变肠道微生物之间的平衡而起治疗IBD的作用^[2], 调节肠道菌群失调是目前治疗UC的新方法, 枯草杆菌、肠球菌二联活菌肠溶胶囊为临床常用益生菌类药物.

1 材料和方法

1.1 材料 收集我院2009-01/2011-06住院的轻、中度UC患者139例, 主要临床表现为腹泻、黏液脓血便、腹痛、里急后重, 部分患者有肠外表现, UC的诊断符合2007-05中华消化疾病学术会议上通过的《我国炎症性肠病诊治规范共识意见》随机分为实验组及对照组两组. 实验组: 给予枯草杆菌、肠球菌二联活菌肠溶胶囊+美沙拉

嗪治疗, 此组患者58例中, 男34例, 女24例, 年龄13-72岁, 平均45.50岁±14.43岁, 轻度31例, 中度27例. 对照组: 给予美沙拉嗪口服, 此组患者81例中, 男45例, 女36例, 年龄17-72岁, 平均44.48岁±15.36岁, 轻度37例, 中度44例. 排除重度或难治UC患者, 排除依从性差的患者, 排除对水杨酸类药物过敏者, 排除妊娠及哺乳妇女. 枯草杆菌、肠球菌二联活菌肠溶胶囊, 主要成分: 枯草杆菌及粪肠球菌二联活菌制剂; 规格: 250 mg/粒. 美沙拉嗪缓释颗粒, 主要成分: 美沙拉嗪缓释颗粒; 规格: 500 mg/袋.

1.2 方法

1.2.1 治疗: 对照组按常规治疗量给予美沙拉嗪颗粒冲剂1 g/次, 4次/d, 缓解后给予1 g/次, 2次/d. 试验组在上述治疗基础上加用枯草杆菌、肠球菌二联活菌肠溶胶囊2粒/次, 3次/d, 三餐后口服. 治疗前、治疗后随访观察血常规、尿常规、大便常规、血沉、C-反应蛋白以及肝肾功能, 结肠镜检查及病变部位病理检查.

1.2.2 疗效评定: 有效: 临床表现完全或基本消失, 结肠镜检查可见肠道黏膜基本正常、肠道黏膜轻度炎症或假息肉形成; 无效: 经治疗后临床症状、结肠镜检查提和病理检查均未见明显改善.

统计学处理 利用SPSS17.0统计软件, 计量资料用mean±SD表示, 组间比较采用t检验. 两组计数资料用率表示, 率的比较采用χ²检验, 检验水准α=0.05, P<0.05有统计学差异.

2 结果

2.1 一般资料的比较 两组资料在性别、年龄、严重程度上差异无统计学意义(均P>0.05, 表1). 两组资料在性别、年龄、严重程度上差异无统计学意义(均P>0.05), 可以认为两组资料在性别、年龄、严重程度上无明显差异, 可以进一步进行疗效方面比较.

2.2 两种治疗方法效果的比较 枯草杆菌、肠球菌二联活菌肠溶胶囊+美沙拉嗪组共58例, 平均达临床缓解时间为53.60 d±10.09 d, 缓解率82.76%, 维持缓解时间为236.00 d±14.97 d, 复发率24.14%. 美沙拉嗪组共81例, 平均达临床缓解时间为56.20 d±11.35 d, 缓解率66.67%, 维持缓解时间为197.00 d±32.63 d, 复发率41.98%(表2). 两组缓解率、复发率之间差异有统计学意义(P<0.05, 表3, 4).

3 讨论

UC是一种目前原因尚不十分明确的慢性非特异

■相关报道

目前UC在肠道菌群研究方面, 已有大量实验室研究发现UC患者肠道内双歧杆菌、乳杆菌等益生菌群较健康人群明显减少, 而肠杆菌及厌氧菌较正常人群有所增加, 此为微生态制剂治疗UC提供的依据.

■创新盘点

这篇文章基于临床实践, 并对患者进行随访, 对枯草杆菌二联活菌制剂联合美沙拉嗪治疗轻中度UC疗效进行了全面评价.

■应用要点

本实验提示了微生物制剂对轻中度UC有一定的疗效, 对临床应用微生物制剂治疗UC提供参考。下一步研究单独使用微生物制剂治疗UC。

表1 两组一般资料比较

分组	性别		年龄(岁)	程度(n)	
	男	女		轻度	中度
枯草杆菌、肠球菌	34	24	45.50 ± 14.43	31	27
胶囊+美沙拉嗪					
美沙拉嗪	45	36	44.48 ± 15.36	37	44
P值			0.719	0.693	0.366

表3 两种方法治疗缓解率的比较 n(%)

分组	n	疗效	
		有效	无效
枯草杆菌、肠球菌胶	58	48(82.76)	10(17.24)
胶囊+美沙拉嗪	81	54(66.67)	27(33.34)
χ ² 值		4.481	
P值		0.034	

表2 两组临床缓解时间及维持缓解时间比较

分组	n	临床缓解时间(d)	维持缓解时间(d)
枯草杆菌、肠球菌	58	53.6 ± 10.09	236 ± 14.97
胶囊+美沙拉嗪			
美沙拉嗪	81	56.2 ± 11.35	197 ± 32.63
F值		0.093	3.435
P值		0.595	0.003

性结肠炎症性疾病。UC的发病机制非常复杂, 目前其发病机制尚未完全清楚, 大量流行病学研究显示遗传因素、环境因素、免疫调节紊乱、感染、肠道菌群紊乱等多种因素参与其发病过程^[3]。在肠道菌群紊乱方面, 孙勇等^[4]对27例活动期UC患者、27例缓解期UC患者及10例正常人群肠道菌群进行对比分析, 试验结果提示活动期UC患者肠道内的双歧杆菌、乳杆菌等益生菌数量均较健康人群明显下降, 而肠杆菌菌群数较健康人群明显增加, 其余肠道内菌群却无明显差别。缓解期UC患者肠道内几种菌群数量与健康人群相比基本无变化。刘伟等^[5]选取广州地区40例肠道病变仅局限于乙状结肠以下的UC患者, 用荧光定量PCR法检测标本中乳酸杆菌、大肠杆菌、双歧杆菌的含量。结果显示UC患者病变肠段双歧杆菌、乳酸杆菌均较健康人为低, 大肠杆菌均较健康人为高。

综上, UC患者急性期肠道内双歧杆菌、乳杆菌等益生菌数量较健康人群明显减少, 而肠杆菌和肠球菌菌群数量则较健康人群有所增加, 此为微生物制剂治疗UC提供了依据。Bibiloni等^[6]在2005年发现, 每日口服 3.6×10^{12} 个益生菌, 对于轻、中度UC患者的临床治疗缓解率达到77%, 且无任何不良反应。岐红阳等^[7]应用以双歧杆菌为主的4种活菌的益生菌制剂联合美沙拉嗪治疗轻中度UC患者, 其疗效优于单用美沙拉嗪。秦荣等^[8]尝试应用枯草杆菌二联活菌肠溶胶囊(美常安)联用5-氨基水杨酸(美迪莎)治疗轻中度UC患者, 其缓解率明显高于单用美迪莎。汤绍辉

表4 两种方法复发率的比较 n(%)

分组	n	疗效	
		有效	无效
枯草杆菌、肠球菌胶	58	14(24.14)	44(75.86)
胶囊+美沙拉嗪			
美沙拉嗪	81	34(41.98)	47(58.02)
χ ² 值		4.757	
P值		0.029	

等^[9]对益生菌治疗UC疗效进行了Meta分析, 结论提示对于活动期UC患者, 在应用传统药物治疗的同时合用益生菌制剂可明显提高临床缓解率; 对于缓解期UC患者, 益生菌制剂可作为维持治疗药物, 其疗效与美沙拉嗪相当, 并优于安慰剂。本实验提示益生菌可协同5-氨基水杨酸类制剂提高治疗UC的疗效。

益生菌治疗UC的作用机制目前认为可能是益生菌能够抵抗胃酸侵蚀及肠道内各种消化酶的消化, 黏附并定植于肠道黏膜表面, 在肠道内生长繁殖, 进而通过调整肠道内各菌群之间的动态平衡而发挥治疗UC的疗效^[10,11]。其主要作用机制: (1)维持肠道内菌群动态平衡: 临床应用的益生菌制剂一般为双歧杆菌、嗜酸乳杆菌、肠球菌等活菌胶囊, 这些有益菌在肠道内生长、繁殖可以增加肠道内对人体有益的细菌, 阻止对人体有害的致病菌生长繁殖, 达到调整肠道内菌群动态平衡; (2)增强肠黏膜免疫功能: 益生菌能够提高肠道内巨噬细胞对致病菌的吞噬功能, 可以增加肠道内IgA的分泌, 益生菌还可以抑制肠道内巨噬细胞释放TNF-α, 从多方面提高肠黏膜免疫功能; 白爱平等^[12]给小鼠预先服用双歧杆菌, 发现其能有效抑制病变肠段炎症细胞转录因子核因子κB(NF-κB)的活化剂炎症细胞因子的分泌, 减轻肠道黏膜炎症反应; (3)生物拮抗作用: 益生菌与肠道内致病微生物竞争肠上皮细胞的结合位点, 抑制致病微

生物与肠上皮结合从而抑制致病微生物的生长繁殖, 以维持肠道菌群平衡, 并且产生营养肠道的物质; 而肠道内乳杆菌还可以产生细菌素、 H_2O_2 、生物表面活性剂等物质, 这些物质可直接或间接杀灭致病菌^[13]; (4)增强肠道黏膜屏障: 益生菌黏附于肠黏膜表面, 与肠上皮细胞紧密结合, 形成菌膜屏障, 益生菌促进上皮细胞分泌黏液, 使其在肠黏膜和微生物之间形成防护膜, 阻止致病微生物的定植和入侵, 并通过阻止致病微生物黏附肠壁、易位或产生抗菌物质来抑制致病微生物; 同时益生菌在肠道内代谢产生的乳酸、乙酸等酸性物质, 降低了肠道内pH值, 一定程度上抑制肠道内致病微生物的生长繁殖。

4 参考文献

- 1 Ouyang Q, Hu PJ, Qian JM, Zheng JJ, Hu RW. Consensus on the management of inflammatory bowel disease in China in 2007. *J Dig Dis* 2008; 9: 52-62
- 2 于海食, 洪缨, 王玉蓉. 溃疡性结肠炎发病机制. 实用医学杂志 2010; 26: 323-325
- 3 Hanauer SB. Inflammatory bowel disease: epidemiology, pathogenesis, and therapeutic opportunities. *Inflamm Bowel Dis* 2006; 12 Suppl 1: S3-S9
- 4 孙勇, 丁彦青. 溃疡性结肠炎患者肠道菌群与病理变化关系的探讨. 现代消化及介入治疗 2009; 14: 26-28
- 5 刘伟, 刘翔, 林漫鹏, 郑雪玲, 杨涛. 溃疡性结肠炎患者正常与病变肠段肠道菌群比较. 湖北民族学院学报(医学版) 2011; 28: 4-6
- 6 Bibiloni R, Fedorak RN, Tannock GW, Madsen KL, Gionchetti P, Campieri M, De Simone C, Sartor RB. VSL#3 probiotic-mixture induces remission in patients with active ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 1539-1546
- 7 歧红阳, 王云溪, 肖占宇. 美沙拉嗪联合双歧杆菌四联活菌治疗溃疡性结肠炎的临床效果评价. 职业与健康 2011; 27: 1431-1432.
- 8 秦荣, 朱淑军, 王光恺. 枯草杆菌二联活菌肠溶胶囊联用5-氨基水杨酸治疗溃疡性结肠炎64例. 广东医学 2010; 31: 1739-1740
- 9 汤绍辉, 冯淑芬, 姚艳芳. 益生菌对溃疡性结肠炎诱导缓解及维持治疗疗效的Meta分析. 解放军医学杂志 2010; 35: 521-525
- 10 白平平, 秦俊杰, 孙远杰, 颜波群. 美沙拉嗪口服联合麦滋林保留灌肠治疗溃疡性结肠炎. 中国厂矿医学 2009; 22: 297-298
- 11 宋丰前, 邓天好. 美沙拉嗪颗粒联合培菲康胶囊治疗溃疡性结肠炎的临床观察. 中国实用医药 2008; 3: 65-67
- 12 白爱平, 欧阳钦, 胡仁伟. 双歧杆菌抑制小鼠实验性结肠炎肠道炎症反应的研究. 中华消化杂志 2005; 25: 344-347
- 13 韩英. 益生菌治疗炎症性肠病的作用机制研究进展. 中华内科杂志 2007; 46: 76-77

■同行评价

本文观察了枯草杆菌二联活菌制剂治疗UC的疗效, 研究结果对治疗UC有临床参考价值。

编辑 曹丽鸥 电编 鲁亚静

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2012年版权归世界华人消化杂志

•消息•

WJG 总被引频次排名第 174 名

本刊讯 *World Journal of Gastroenterology* (WJG)被Science Citation Index Expanded (SCIE)和MEDLINE等国际重要检索系统收录, 在国际上享有较高声誉和影响力。WJG在PubMed Central (PMC)统计, 单月独立IP地址访问58 257次, 全文网络版(HTML Full Text)下载94 888次, 全文PDF下载59 694次。另外根据基本科学指标库(essential science indicators)统计, 2000-01-01/2010-12-31, SCIE检索的临床医学(clinical medicine)期刊有1 105种, 总被引频次排名, WJG位于第174名。(2011-05-14 马连生 董事长/总编辑)

《世界华人消化杂志》投稿须知

《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核心期刊、中文核心期刊要目总览收录的学术类期刊。

1 投稿总则

1.1 性质 《世界华人消化杂志》[ISSN 1009-3079 (print), ISSN 2219-2859 (online), CN 14-1260/R]是一份同行评议性和开放获取(open access, OA)的旬刊。OA最大的优点是面向全国本领域专家及公众开放无需注册, 免费获取PDF等格式的全文, 切实破除了传统性期刊阻碍科学研究成果快速传播的障碍。OA是一项真正意义上的公益性科学传播工具, 编委、作者和读者利益的最大化的目标, 努力推进本学科的繁荣和发展。

《世界华人消化杂志》定价68.00元, 全年2448.00元, 邮发代号82-262, 由世界华人消化杂志编辑部出版。《世界华人消化杂志》主要报道胃肠病学、肝胆病学、胰腺病学、内镜介入与消化外科等多学科的评论及基础研究和临床实践等各类文章, 具体内容涉及: 食管疾病, 如反流性食管炎、Barret's食管、食管静脉曲张和食管癌等; 胃部疾病, 胃食管反流性疾病、胃炎、胃动力障碍、胃出血、胃癌和幽门螺杆菌感染等; 肠道疾病, 如肠道出血、肠穿孔、肠梗阻、肠道炎症(如IBD/CD等)、肠道感染、大肠癌和大肠腺瘤等; 肝胆部疾病如病毒性肝炎、肝硬化、脂肪肝、肝纤维化、肝衰竭、胆石病、胆汁郁积、梗阻性黄疸、肝癌、胆囊癌、胆管癌和门静脉高压等; 胰腺疾病, 如胰腺炎和胰腺癌等; 全身性疾病涉及消化系统, 如自身免疫性及瘀胆性疾病、腹腔疾病、消化不良和代谢性疾病等; 以及与以上疾病相关的基因及基因组学、微生物及分子生物学、病因学、流行病学、免疫学、临床内外科诊断与治疗(如影像、化疗、移植、营养等); 除以上外, 本刊也报道诊断与筛选、内窥镜检查法、影像及先进技术。

《世界华人消化杂志》被国际检索系统美国《化学文摘》(Chemical Abstracts, CA)、荷兰《医学文摘库/医学文摘(EMBase/Excerpta Medica, EM)》和俄罗斯《文摘杂志(Abstract Journal, AJ)》收录。国内为中国科技论文统计与分析期刊(科技部列选为中国科技论文统计源期刊)、《中文核心期刊要目总览》(2011年版)内科学类的核心期刊、《中国学术期刊评价研究报告-RCCS权威、核心期刊排行榜与指南》

和中国知识资源总库收录。《中国科技期刊引证报告(核心版)》统计显示, 2010年《世界华人消化杂志》总被引频次3 458次, 影响因子0.694, 综合评价总分60.6分, 分别位居内科学类49种期刊的第5位、第7位、第6位, 分别位居1 998种中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)的第79位、第320位、第190位; 其他指标: 他引率0.83, 被引半衰期4.9, 来源文献量712, 文献选出率0.90, 参考文献量17 963, 平均引文数25.23, 平均作者数4.35, 地区分布数29, 机构分布数349, 基金论文比0.45, 海外论文比0.01。

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, 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 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_{1/2}, Vmax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+、一及后列出。在±前后均要列出, 如37.6 °C ± 1.2 °C, 45.6岁±24岁, 56.4 d±0.5 d, 3.56±0.27 pg/ml应为3.56 ng/L±0.27 ng/L。BP用kPa(mmHg), RBC数用 $1 \times 10^{12}/L$, WBC数用 $1 \times 10^9/L$, WBC构成比用0.00表示, Hb用g/L. M_r 明确的体内物质以nmol/L或mmol/L表示, 不明确者用g/L表示. 1 M硫酸, 改为1 mol/L硫酸, 1 N硫酸, 改为0.5 mol/L硫酸. 长10 cm, 宽6 cm, 高4 cm, 应写成10 cm×6 cm×4 cm. 生化指标一律采用法定计量单位表示, 例如, 血液中的总蛋白、清蛋白、球蛋白、脂蛋白、血红蛋白、总脂用g/L, 免疫球蛋白用mg/L; 葡萄糖、钾、尿素、尿素氮、CO₂结合力、乳酸、磷酸、胆固醇、胆固醇酯、三酰甘油、钠、钙、镁、非蛋白氮、氯化物; 胆红素、蛋白结合碘、肌酸、肌酐、铁、铅、抗坏血酸、尿胆元、氨、维生素A、维生素E、维生素B1、维生素B2、维生素B6、尿酸; 氢化可的松(皮质醇)、肾上腺素、汞、孕酮、甲状腺素、睾酮、叶酸用nmol/L; 胰岛素、雌二醇、促肾上腺皮质激素、维生素B12用pmol/L. 年龄的单位有日龄、周龄、月龄和岁。例如, 1秒, 1 s; 2分钟, 2 min; 3小时, 3 h; 4天, 4 d; 5周, 5 wk; 6月, 6 mo; 雌性♀, 雄性♂, 酶活性国际单位IU = 16.67 nkat, 对数log, 紫外uv, 百分比%, 升L, 尽量把 1×10^{-3} g与 5×10^{-7} g之类改成1 mg与0.5 mg, hr改成h, 重量γ改成mg, 长度m改成mm. 国际代号不用于无数字的文句中, 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、复数的区别, 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

《世界华人消化杂志》为中国科技论文统计源核心期刊(2010年)和中文核心期刊要目总览(北京大学图书馆, 2011年版)收录的学术期刊。

《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: 010-5908-0035, 传真: 010-8538-1893, Email: wcd@wjgnet.com; http://www.wjgnet.com

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 v ; (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±标准差表示为mean±SD, 平均数±标准误为mean±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 ± 0.5 mmol/L等. 测量的数据不能超过其测量仪器的精密度, 例如6347意指6000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mean±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±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±0.4 kg, 过多的位数并无意义. 又如8.4 cm±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→23.5→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≤分母≤1 000, 百分数到小数点后1位; 余类推. 小数点前后的阿拉伯数字, 每3位间空1/4阿拉伯数字距离, 如1 486 800.475 65. 完整的阿拉伯数字不移行!

2.7 标点符号 遵照国家标准GB/T 15834-1995标点符号用法的要求, 本刊论文中的句号都采用黑圆点; 数字间的起止号采用“-”字线, 并列的汉语词间用顿号分开, 而并列的外文词、阿拉伯数字、外文缩略词及汉语拼音字母拼写词间改用逗号分开, 参考文献中作者间一律用逗号分开; 表示终了的标点符号, 如句号、逗号、顿

号、分号、括号及书名号的后一半, 通常不用于一行之首; 而表示开头的标点符号, 如括号及书名号的前一半, 不宜用于一行之末. 标点符号通常占一格, 如顿号、逗号、分号、句号等; 破折号应占两格; 英文连字符只占一个英文字符的宽度, 不宜过长, 如5-FU. 外文字符下划一横线表示用斜体, 两横线表示用小写, 三横线表示用大写, 波纹线表示用黑体.

3 稿件格式

3.1 题名 简明确切地反映论文的特定内容, 鲜明而有特色, 阿拉伯数字不宜开头, 不用副题名, 一般20个字. 避免用“的研究”或“的观察”等非特定词.

3.2 作者 论文作者的署名, 按照国际医学杂志编辑委员会(ICMJE, International Committee of Medical Journal Editors)作者资格标准执行. 作者标准为: (1)对研究的理念和设计、数据的获得、分析和解读做出重大贡献; (2)起草文章, 并对文章的重要的知识内容进行批评性修改; (3)接受对准备发表文章的最后一稿. 作者应符合条件1, 2, 3, 对研究工作有贡献的其他人可放入志谢中. 作者署名的次序按贡献大小排列, 多作者时姓名间用逗号, 如是单名, 则在姓与名之间空1格(正文和参考文献中不空格). 《世界华人消化杂志》要求所有署名人写清楚自己对文章的贡献. 世界华人消化杂志不设置共同第一作者和共同通信作者.

3.3 单位 作者后写单位的全称空1格后再写省市及邮政编码. 格式如: 张旭晨, 梅立新, 承德医学院病理教研室 河北省承德市 067000

3.4 第一作者简介 格式如: 张旭晨, 1994年北京中医药大学硕士, 讲师. 主要从事消化系统疾病的病理研究.

3.5 作者贡献分布 格式如: 陈湘川与庞丽娟对本文所作贡献均等; 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.

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, 并有足够的具有自明性的信息, 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(^cP>0.05 不注). 如同一表中另有一套P值, 则^dP<0.05, ^eP<0.01; 第3套为^fP<0.05, ^gP<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/(mol/L), p/kPa, V/mL, t/℃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

《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. 北京报刊发行局发行, 邮发代号: 82-262.

《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。

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/jdlr.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/lcjy.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 d。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。接受后的稿件作者需缴纳稿件发表费, 文章发表后可获得1本样刊及10套单行本(稿酬)。

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, 本刊编辑部将把原稿连同审稿意见、编辑意见寄回给作者修改, 而作者必须于15 d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寄回编辑部, 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>

2012年国内国际会议预告

2012-06-22/25

第十四届国际病毒性肝炎和肝病大会
会议地点: 上海市
联系方式: info@isvhld2012.org

2012-06-29/07-01

第二十四次全国中西医结合消化学术会议
会议地点: 宁波市
联系方式: qgzxyjhxh@163.com

2012-06-30/07-01

中华医学会肝病与代谢学术研讨会
会议地点: 哈尔滨市
联系方式: lilyjia@163.com

2012-07-01/31

第一届全国普通外科青年医师学术论坛
会议地点: 北京市
联系方式: cmacjs@cma.org.cn

2012-07-01/31

第二届全国普通外科手术技术学术会议
会议地点: 青岛市
联系方式: lining@126.com

2012-07-12/15

第六届地坛国际感染病会议
会议地点: 北京市
联系方式: info@bjditan.org

2012-07-27/29

第十届全国胃病学术大会
会议地点: 哈尔滨市
联系方式: xiaohuahuiyi2012@163.com

2012-08-17/19

第九届中国人民解放军肿瘤学术大会(长征肿瘤大会)
会议地点: 重庆市
联系方式: huangxiaoyu@stapricot.com

2012-08-29/09-01

中华医学会第十一次全国内分泌学学术会议
会议地点: 广州市
联系方式: lilyjia@163.com

2012-08-30/09-02

2012年中华医学会全国麻醉学术年会
会议地点: 重庆市
联系方式: csa2012@live.cn

2012-09-01/30

中华医学会第三次全国肝纤维化、肝硬化学术会议
会议地点: 郑州市
联系方式: lijiuyi@cma.org.cn

2012-09-01/30

第十五届全国中西医结合大肠肛门病学术交流会
会议地点: 济南市
联系方式: doclf@163.com

2012-09-06/09

第七届中国肿瘤学术大会暨第十一届海峡两岸肿瘤学术会议
会议地点: 北京市
联系方式: shengwangyan@163.com

2012-09-14/16

中华医学会第十二次全国超声医学学术会议
会议地点: 青岛市
联系方式: lilyjia@163.com

2012-09-20/23

2012中国消化病学大会
会议地点: 上海市
联系方式: abstract@ccdd2012.org

2012-09-21/30

2012中华影像技术第20次全国学术大会暨国际影像技术论坛
会议地点: 长春市
联系方式: ting@dxyer.com

2012-10-21/11-10

第十四次全国中医肛肠学术交流大会
会议地点: 长沙市
联系方式: gcfh2012@163.com

2012-10-25/28

第13届亚太临床微生物暨感染病会议(APCCMI)
会议地点: 北京市
联系方式: bianxiaoxue@mpco.cn

2012-10-31/11-03

第十届中国介入放射学学术大会(2012CSIR)暨2012国际栓塞会议
会议地点: 南京市
联系方式: liufang@cyberzone.cn

2012-11-13/17

肿瘤微环境(冷泉港亚洲、国际癌症的微环境学会联合承办)
会议地点: 苏州市
联系方式: qxue@csh-asia.org

• 谢谢 •

志谢世界华人消化杂志编委

本期文章审稿中(包括退稿),我刊编委付出了宝贵的时间和大量的精力,提高了《世界华人消化杂志》的学术质量,在此表示衷心感谢!

白爱平 副教授
中山大学附属第一医院消化内科

南极星 教授
延边大学药学院

崔云甫 教授
哈尔滨医科大学第二附属医院普外一科

沈薇 教授
重庆医科大学附属第二医院消化内科

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

孙学英 教授
哈尔滨医科大学第一附属医院黑龙江省肝脾外科中心

杜奕奇 副教授
中国人民解放军第二军医大学长海医院

谭晓冬 教授
中国医科大学附属盛京医院

樊晓明 主任医师
复旦大学附属金山医院消化科

田文静 副教授
哈尔滨医科大学

范学工 教授
中南大学湘雅医院感染病科

王俊平 教授
山西省人民医院消化科

顾国利 副主任医师
中国人民解放军空军总医院普通外科

夏时海 副教授
中国人民解放军武警后勤学院附属医院肝胆胰脾科(中心)

胡国信 副教授
南昌大学第一附属医院

徐辉雄 教授
同济大学附属第十人民医院暨上海市第十人民医院超声科

黄颖秋 教授
本溪钢铁(集团)总医院消化内科

徐泱 副教授
复旦大学附属中山医院肝外科复旦大学肝癌研究所

李淳 副教授
汕头大学医学院病理学教研室

许文燮 教授
上海交通大学基础医学院, 病理、生理与病理生理系

李勇 副教授
上海中医药大学附属市中医医院消化科

颜宏利 教授
中国人民解放军第二军医大学医学遗传学教研室

梁力建 教授
中山大学附属第一医院肝胆外科

杨建民 教授
浙江省人民医院消化内科

刘宝林 教授
中国医科大学附属盛京医院

于颖彦 教授
上海市瑞金医院消化外科研究所与器官移植中心

刘丽江 教授
江汉大学肿瘤研究所

张俊 副教授
上海交通大学医学院附属瑞金医院普外科

吕宾 教授
浙江中医药大学附属医院(浙江省中医院、浙江省东方医院)消化科

郑培永 副研究员
上海中医药大学脾胃病研究所, 上海中医药大学附属龙华医院消化内科