

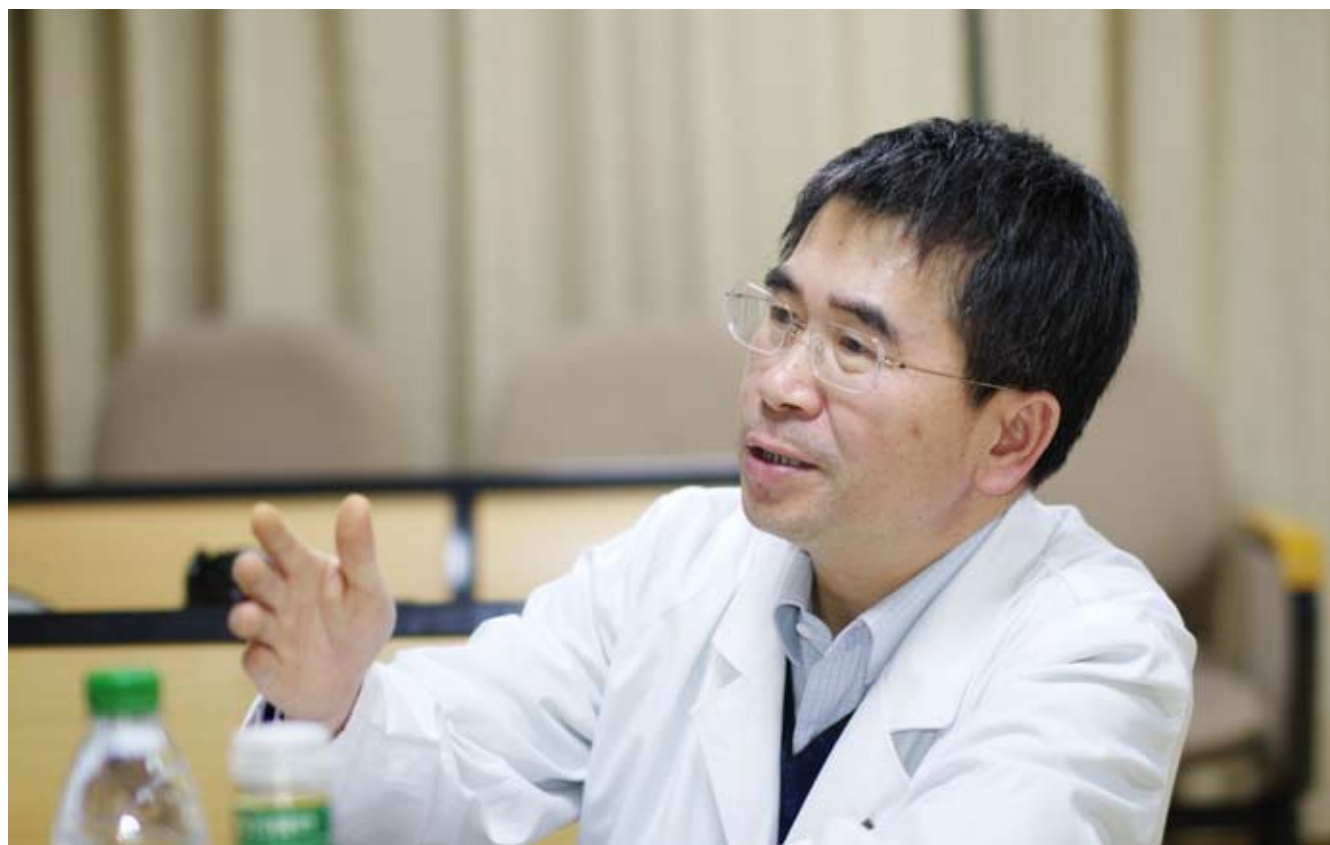
ISSN 1009-3079 (print)
ISSN 2219-2859 (online)
CN 14-1260/R

世界华人消化杂志®

**WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY**

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2012 年 7 月 28 日 第 20 卷 第 21 期 (Volume 20 Number 21)



21 / 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

2012-01-01/2014-12-31

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
陈胎胜教授
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
田宇彬教授
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
陈凇教授
陈汝福教授
陈亚军主任医师
陈钟教授
程爱国教授
程树群副教授
崔亚甫教授
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
孙诚谊教授
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
李璦教授
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
徐辉雄教授
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
黄文林教授
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
任晓峰副教授
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
阴赅宏研究员
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 28 日 第 20 卷 第 21 期 (总第389期)

述 评

1913 microRNA与胰腺发育以及干细胞分化的研究进展

赵荷琚, 魏蕊, 洪天配

基础 研究

1919 鸟苷酸环化酶C基因沉默对人胃癌裸鼠皮下种植瘤的影响

孟海, 张健锋, 毛振彪, 薛世民, 吴信华, 鞠少卿

临床 研究

1927 sICAM-1和GPC-3 mRNA对肝癌诊断与转移监测的临床价值

姚敏, 杨君伶, 蔚丹丹, 严晓娣, 陈洁, 姚登福

文 献 综 述

1933 MRI评价肝脏铁过载的应用进展

宋晓丽, 赵俊功, 程英升

1939 肝细胞癌自发消退的机制

黄天明, 罗国容

1949 上皮细胞间质转化在大肠癌发生发展中的研究进展

朱庆超, 秦环龙

1957 体质量指数与结直肠癌相关性的研究现状

路明亮, 黄华

研究 快报

1961 清热化痰中药对急性肝衰竭模型大鼠肝功能及生存期的影响

张杨, 扈晓宇, 骆建兴, 陈果, 高舒迪

1967 趋化因子CXCL11及其受体CXCR3在重症急性胰腺炎相关肺损害中的作用

吴兴, 张海峰, 丁晓凌, 强晖, 曹维, 周国雄

1973 水通道蛋白3与紧密连接的相关性

张文杰, 徐勇, 王斌, 徐皓

临床 经验

1978 云南省首次爆发流行巨片形吸虫感染10例

邹静, 顾伟, 焦建明, 杜茜茹, 何连福, 张平

1982 脂联素基因多态性和血清脂联素水平与非酒精性脂肪肝的相关性

石胜利, 聂玉强, 李瑜元, 周永健

1987 英夫利昔单抗-类克在激素抵抗及激素依赖溃疡性结肠炎治疗中的应用

李懿璇, 李世荣, 李俊霞, 杨欣艳, 王化虹

1993 外周血CK20 mRNA表达与结直肠癌临床病理和预后的关系

李国胜, 颜登国, 张汝一, 甄运寰, 姬清华, 程海玉

1998 欠发达地区结核性腹膜炎40例

宋怀宇, 王波

2006 益生菌预防成人抗生素相关性腹泻的荟萃分析

张春东, 戴冬秋, 赵哲明

附 录	2012 《世界华人消化杂志》投稿须知 2017 2012年国内国际会议预告
志 谢	2018 志谢世界华人消化杂志编委
消 息	1918 《世界华人消化杂志》出版流程 1926 《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) 1938 《世界华人消化杂志》栏目设置 1948 《世界华人消化杂志》2011年开始不再收取审稿费 1956 《世界华人消化杂志》性质、刊登内容及目标 1966 《世界华人消化杂志》正文要求 1972 《世界华人消化杂志》外文字符标准 1977 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 1981 《世界华人消化杂志》被评为中国精品科技期刊 1986 《世界华人消化杂志》参考文献要求 1992 《世界华人消化杂志》修回稿须知 1997 WJG成功通过评审被PMC收录
封面故事	《世界华人消化杂志》编委, 洪天配, 教授, 主任医师, 100191, 北京市, 北京大学第三医院内分泌科
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>世界华人消化杂志</p> <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)</p> <p>创 刊 1993-01-15 改 刊 1998-01-25 出 版 2012-07-28 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, 福建医科大学附属医院协和医院消化内科 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/wcjd/ch/index.aspx), 所有办公流程一律可以在线进行, 包括投稿、审稿、编辑、审读, 以及作者、读者、编者之间的信息反馈交流.</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 21

EDITORIAL	1913 Progress in understanding the relationship of microRNAs with pancreas development and stem cell differentiation <i>Zhao HJ, Wei R, Hong TP</i>
BASIC RESEARCH	1919 GC-C gene silencing inhibits the growth of subcutaneously implanted gastric tumors in nude mice <i>Meng H, Zhang JF, Mao ZB, Xue SM, Wu XH, Ju SQ</i>
CLINICAL RESEARCH	1927 Clinical significance of circulating sICAM-1 and GPC-3 mRNA expression in the diagnosis and prognostic evaluation of hepatocellular carcinoma <i>Yao M, Yang JL, Wei DD, Yan XD, Chen J, Yao DF</i>
REVIEW	1933 MRI evaluation of hepatic iron overload: Recent advances <i>Song XL, Zhao JG, Cheng YS</i> 1939 Mechanisms underlying spontaneous regression of hepatocellular carcinoma <i>Huang TM, Luo GR</i> 1949 Progress in understanding the role of epithelial-mesenchymal transition in the pathogenesis of colorectal tumors <i>Zhu QC, Qin HL</i> 1957 Association between body mass index and colorectal cancer: Recent research progress <i>Lu ML, Huang H</i>
RAPID COMMUNICATION	1961 Effect of herbs for clearing heat and resolving stasis on liver function and survival in rats with acute liver failure <i>Zhang Y, Hu XY, Luo JX, Chen G, Gao SD</i> 1967 Expression of CXCL11 and CXCR3 in acute lung injury associated with severe acute pancreatitis <i>Wu X, Zhang HF, Ding XL, Qiang H, Cao W, Zhou GX</i> 1973 Lentiviral-mediated delivery of shRNA targeting aquaporin 3 alters tight junction protein expression and distribution in Caco-2 cells <i>Zhang WJ, Xu Y, Wang B, Xu H</i>
CLINICAL PRACTICE	1978 First outbreak of <i>Fasciola gigantica</i> infection in Yunnan province: An clinical analysis of 10 cases <i>Zou J, Gu W, Jiao JM, Du QR, He LF, Zhang P</i> 1982 Association of single nucleotide polymorphisms of the adiponectin gene and plasma levels of adiponectin with risk of nonalcoholic fatty liver disease <i>Shi SL, Nie YQ, Li YY, Zhou YJ</i> 1987 Efficacy of infliximab in the management of steroid-refractory or steroid-dependent ulcerative colitis <i>Li YX, Li SR, Li JX, Yang XY, Wang HH</i> 1993 Correlation between expression of CK20 mRNA in peripheral blood and clinicopathological features and prognosis in patients with colorectal cancer <i>Li GS, Yan DG, Zhang RY, Zhen YH, Ji QH, Cheng HY</i> 1998 Tuberculous peritonitis in patients from an underdeveloped region: A retrospective analysis of 40 cases <i>Song HY, Wang B</i>

	2006 Probiotics for the prevention of antibiotic-associated diarrhea in adult patients: A meta-analysis <i>Zhang CD, Dai DQ, Zhao ZM</i>
APPENDIX	2012 Instructions to authors of <i>World Chinese Journal of Digestology</i> 2017 Meeting events calendar in 2012
ACKNOWLEDGMENT	2018 Acknowledgments to reviewers of <i>World Chinese Journal of Digestology</i>
COVER	Editorial Board Member of <i>World Chinese Journal of Digestology</i> , Tian-Pei Hong, Professor, Department of Endocrinology, Peking University Third Hospital, Beijing 100191, China
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

Founded on January 15, 1993
Renamed on January 25, 1998
Publication date July 28, 2012

NAME OF JOURNAL
World Chinese Journal of Digestology

RESPONSIBLE INSTITUTION
Department of Science and Technology
of Shanxi Province

SPONSOR
Taiyuan Research and Treatment Center
for Digestive Diseases, 77 Shuangta Xijie,
Taiyuan 030001, Shanxi Province, China

EDITING
Editorial Board of *World Chinese Journal of Digestology*, 77 Shuangta Xijie, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China
Telephone: +86-351-4078656
E-mail: wjcd@wjgnet.com

PRINTING
Beijing Kexin Printing House

PUBLISHING
Editorial Department of *World Chinese Journal of Digestology*, 77 Shuangta Xijie, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China
Telephone: +86-351-4078656
E-mail: wjcd@wjgnet.com
<http://www.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)

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, Changhai 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

SCIENCE EDITORS

Director: Jun-Liang Li

SUBSCRIPTION

RMB 68 Yuan for each issue
RMB 2448 Yuan for one year

CSSN

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

COPYRIGHT

© 2012 Published by *World Chinese Journal of Digestology (WCJD)*. 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.

SPECIAL STATEMENT

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

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

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

Copyright © 2012 by Editorial Department of *World Chinese Journal of Digestology*

microRNA与胰腺发育以及干细胞分化的研究进展

赵荷琨, 魏蕊, 洪天配

赵荷琨, 魏蕊, 洪天配, 北京大学第三医院内分泌科 北京市 100191

洪天配, 教授, 主任医师, 博士生导师, 主要从事糖尿病、干细胞分化研究.

国家自然科学基金资助项目, No. 81070701, No. 81000315

国家973计划基金资助项目, No. 2012CB517502

高等学校博士学科点专项科研基金资助项目, No. 20100001110083

作者贡献分布: 本文设计和指导由洪天配完成; 写作由赵荷琨与魏蕊完成.

通讯作者: 洪天配, 教授, 主任医师, 100191, 北京市海淀区花园北路49号, 北京大学第三医院内分泌科. tpho66@bjmu.edu.cn

电话: 010-82265515 传真: 010-62017700

收稿日期: 2012-04-11 修回日期: 2012-05-24

接受日期: 2012-06-28 在线出版日期: 2012-07-28

Progress in understanding the relationship of microRNAs with pancreas development and stem cell differentiation

He-Jun Zhao, Rui Wei, Tian-Pei Hong

He-Jun Zhao, Rui Wei, Tian-Pei Hong, Department of Endocrinology, Peking University Third Hospital, Beijing 100191, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, Nos. 81070701 and 81000315; the Major State Basic Research Development Program of China (973 Program), No. 2012CB517502; and the Specialized Research Fund For the Doctoral Program of Higher Education, No. 20100001110083

Correspondence to: Tian-Pei Hong, Professor, Department of Endocrinology, Peking University Third Hospital, 49 Huayuan North Road, Haidian District, Beijing 100191, China. tpho66@bjmu.edu.cn

Received: 2012-04-11 Revised: 2012-05-24

Accepted: 2012-06-28 Published online: 2012-07-28

Abstract

MicroRNAs (miRNAs), a class of non-coding small RNAs involved in post-transcriptional gene regulation, play important roles in embryonic development, cell fate determination, and growth regulation. It has been shown that miRNAs contribute to the embryonic pancreas development by regulating several important transcriptional factors. Stem cells can be induced to differentiate into insulin-producing cells *in vitro* by mimicking the development of pancreatic β cells *in vivo*. MiRNAs may have regulatory roles in the maintenance and differentiation of stem cells. Therefore, elucidation of the mechanisms

by which miRNAs regulate pancreas development and stem cell differentiation will provide novel insights into the development of therapeutic approach for diabetes.

Key Words: MicroRNAs; Stem cell differentiation; Pancreas development

Zhao HJ, Wei R, Hong TP. Progress in understanding the relationship of microRNAs with pancreas development and stem cell differentiation. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(21): 1913-1918

摘要

microRNA(miRNA)是一类参与基因转录后调控的非编码小分子RNA, 其在胚胎发育、细胞命运决定、生长调控等方面发挥重要作用. 业已证实, 一些特定的miRNA通过靶向调控某些胰腺发育相关的重要转录因子而参与胰腺胚胎发育过程. 通过模拟体内胰岛发育过程, 可将干细胞在体外诱导定向分化为胰岛素分泌细胞. 此外, miRNA在干细胞的维持和分化中也可能具有调控作用. 因此, miRNA在胰腺发育和干细胞分化中的作用及其机制值得深入研究, 这将为胰岛功能重建治疗糖尿病策略提供新的思路.

关键词: microRNA; 干细胞分化; 胰腺发育

赵荷琨, 魏蕊, 洪天配. microRNA与胰腺发育以及干细胞分化的研究进展. *世界华人消化杂志* 2012; 20(21): 1913-1918

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1913.asp>

0 引言

microRNA(miRNA)是一类参与基因转录后调控的非编码RNA, 其表达具有高度的发育阶段特异性和组织特异性, 并在胚胎发育、生长调控、细胞增殖或凋亡、疾病发生发展等方面发挥重要作用^[1]. 研究证实, 一些特定的miRNA作为复杂调控网络的一员, 可参与胰腺胚胎发育过程. 此外, miRNA与胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)某些多潜能性相关基因存在相互作用, 并且靶向调控其中的部分重要基因, 参

■背景资料

microRNA是一类参与基因转录后调控的非编码小分子RNA. 研究显示, 一些特定的miRNA可参与胰腺胚胎发育过程; 此外, miRNA还参与干细胞的自我更新和定向分化的调控.

■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

■ 研发前沿

研究显示,某些特定的miRNA在胰腺发育和功能调控中发挥重要作用。然而,这些miRNA如何发挥调控作用,在哪个阶段发挥调控作用等方面的问题尚待深入研究。同时,在干细胞定向分化过程中,miRNA表达谱的变化规律、调节分化作用及其机制也有待阐明。

与干细胞的自我更新和定向分化的调控^[2]。本文就miRNA在胰腺发育和干细胞分化中的作用及其机制方面的研究进展进行评论。

1 miRNA简介

miRNA是一种高度保守的、长度在19-22个核苷酸之间的非编码小分子RNA。迄今为止,Sanger数据库已收录了超过900条成熟的人类miRNA序列^[3]。400多个编码各种miRNA的基因分散在人类基因组中,其中某些定位于编码蛋白质基因的边缘^[4]。转录组学和蛋白质组学的研究证实,一个miRNA可能有200个以上的靶基因序列,这就意味着一个miRNA能够影响上百个靶基因的表达^[5,6],同时每个靶基因也受到多个miRNA的调控,彼此之间构成复杂的分子调控网络。miRNA基因可被RNA聚合酶II转录为长度大约数千个碱基的初始转录产物pri-miRNA^[7]。进而在细胞核内被由Drosha(一种RNA酶III)等组成的复合体加工成约70个核苷酸的发夹状前体pre-miRNA。后者在输出蛋白5(expotin-5)作用下,从细胞核转运到细胞质,然后在Dicer(一种RNA酶III)作用下,被剪切成约含有22个碱基的双链RNA分子,接着该分子被解链,缺少稳定5'氢键的单链miRNA进入核糖蛋白复合体miRNP,又称RNA诱导的沉默复合体(RNA-induced silencing complex, RISCs)。当miRNA在RISCs的介导下与其对应的靶mRNA的3'非翻译区(3'-untranslated region, 3'UTR)完全互补结合时,可裂解对应的mRNA;当二者不完全互补结合时,则抑制翻译的发生;miRNA还可通过介导去腺苷酸化反应将其对应的mRNA降解^[8]。业已证实,miRNA对于靶基因表达的控制和整合具有非常重要的意义,可参与胚胎发育、器官生成、细胞增殖或凋亡、疾病的发生发展等生理和病理生理过程^[9]。

2 胰腺发育与干细胞分化

在胚胎发育过程中,原肠作用使胚胎形成内、中、外3个胚层。内胚层的分层形成原始的消化管,最终发育形成胰芽。人类胚胎胰腺发生的过程大致如下:胚胎第4周末,前肠末端的背、腹两侧壁上各突出一内胚层芽,即胰腺的2个原基。背胰芽来自脊索下面、近胃部的内胚层,而腹胰芽来自肝脏附近的内胚层。第6-7周时,腹胰芽和背胰芽融合,形成细胞索,后者在间充质内反复分支并中空,形成原始胰腺导管。9 wk左右,胰

腺导管上皮细胞中个别细胞开始表达胰岛素、胰高糖素及生长抑素,其数目随后逐渐增多。第12周时,胰腺外分泌部各级导管和腺泡开始出现,导管旁的间充质内开始出现由迁移离开导管的多个已分化细胞聚集所形成的细胞团,即原始胰岛。14-20 wk,较大导管旁可见结缔组织包绕的第1代大型胰岛,外分泌部各级导管和腺泡逐渐成熟,胰腺小叶形成。20 wk后,胰腺小叶内形成第2代胰岛,其内分泌细胞分布与成人胰岛相似。已有研究提示,胰腺的发育过程为胰腺前体细胞所组成的胰腺原基逐渐形成原始胰腺导管上皮,后者进而分化为内分泌细胞、导管及腺泡细胞^[10]。

在人ESCs向胰岛细胞的诱导分化过程中,模拟体内胰岛发育过程是最常采用的体外定向分化策略。2006年,D'Amour等^[11]报道了经定型内胚层途径的定向诱导分化方案,即人ESCs→定型内胚层→肠管内胚层→胰腺内胚层和内分泌前体细胞→胰腺内分泌细胞,该方案可将人ESCs诱导分化为产生胰岛素、胰高糖素、生长抑素、胰多肽及ghrelin的胰腺内分泌细胞,其胰岛素合成水平接近成人胰岛β细胞,但C-肽释放能力仅类似于胎儿胰岛β细胞。将胰腺内胚层阶段的细胞移植到糖尿病小鼠体内后,可进一步分化成熟,这些移植物在特异性转录因子表达、胰岛素原加工、成熟分泌颗粒等方面表现出功能性胰岛β细胞的特征,不仅能分泌胰岛素和C-肽,而且具有明显的降血糖效应^[12]。在上述诱导方案中,活化素A和全反式维甲酸在人ESCs向定型内胚层和随后向胰腺内分泌前体细胞的分化中分别发挥重要的作用^[13]。此外,成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)通过抑制SHH(sonic hedgehog),上调胰十二指肠同源盒因子-1(pancreatic and duodenal homeobox 1, Pdx1)表达和活性,从而使干细胞向胰腺前体细胞分化,并形成细胞集落^[14];表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)通过激活细胞表面受体的蛋白酪氨酸激酶活性,从而促进细胞的增殖、分化及存活^[15]。诸多研究显示,诱导因子、细胞外基质及多个信号通路参与ESCs的上述定向分化过程,但现行的体外诱导方案仍面临分化效率低且不稳定、分化细胞成熟度差等难题,并且定向分化的分子机制尚未完全清楚。

业已证实,某些在胰岛发育过程中起关键作用的转录因子可促进ESCs向胰腺前体细胞和/或胰岛素分泌细胞分化。这些转录因子包括:

(1)Pdx1: 其在胰腺发育的全过程中均有表达, 是胰腺发育和胰腺前体细胞分化为 β 细胞的主要调控因子. 在成熟胰岛 β 细胞中, Pdx1也是胰岛素基因表达的调控因子^[16,17]; (2)神经元素-3(neurogenin 3, Ngn3): 位于配对盒因子4(Pax4)、Nkx2.2、Nkx6.1等特异性转录因子的上游, 对启动胰腺内分泌细胞分化必不可少. Ngn3在成熟的成年胰腺内分泌细胞中不表达, 故被认为是胰腺内分泌前体细胞的标志物^[18-20]; (3)神经源性分化因子(neurogenic differentiation, NeuroD): 是胰岛素转录的重要调控因子, 主要在 β 细胞中表达, 但在其他胰腺内分泌细胞中也有弱表达, 对于胰岛发育也必不可少^[21,22]; (4)Nkx2.2和Nkx6.1: 是早期胰腺上皮的标志物, Nkx6.1只在胎儿胰岛 β 细胞中表达, 而Nkx2.2在晚期胚胎 α 、 β 及PP细胞中都有表达. Nkx6.1位于Nkx2.2的下游, 两者对于 β 细胞的最终分化和功能调控是必要的^[23,24]; (5)叉头盒因子a2(forkhead boxa2, Foxa2): 在胰腺发育中具有重要作用, 并且参与葡萄糖代谢和胰岛素分泌的调节, 后者与其调控下游基因Pdx1、ATP敏感性钾离子通道2个亚基内向整流钾通道(Kir6.2)和磺脲类受体1(Sur1)的表达有关^[25,26]; (6)Hes1: 是Notch信号通路的主要下游靶基因, 可通过侧向作用抑制胰腺内分泌细胞的分化^[27,28]; (7)胰腺特异性转录因子1a(pancreas specific transcription factor 1a, Ptf1a): 是外分泌细胞谱系分化和增殖所必需的, 是胰腺外分泌细胞的标志物, 胰腺外分泌部的发生为胰腺内分泌部提供必要的存在空间^[29,30].

总之, 转录因子在胰腺发育和干细胞分化中的重要性是毋庸置疑的. 各种转录因子之间存在相互调控, 并且这些转录因子还受表观遗传学(如DNA甲基化和miRNA)等机制的调控. 因此, 转录因子相关调控网络在胰腺发育和正常生理功能的维持以及疾病的发生发展中均发挥了重要作用.

3 miRNA在胰腺发育和干细胞分化中的作用

3.1 miRNA在胰腺发育中的作用 Lynn等^[31]发现小鼠胰腺发育过程中有超过125种miRNA表达. Dicer是miRNA形成所必需的重要分子, 小鼠胰腺前体细胞特异性敲除Dicer基因后, 不仅抑制胰岛 β 和 δ 细胞的发育, 而且抑制胰腺腺泡和导管细胞的发育.

miR-375基因定位于人类2号染色体和小鼠1号染色体, 受多种胰腺发育相关转录因子

(如Pdx1、NeuroD等)的共同调控. 研究表明, miR-375在斑马鱼胚胎胰腺发育中具有重要作用, 抑制miR-375可导致胰腺发育异常, 胰岛结构散乱分布^[32]. miR-375在E14.5 d小鼠胰腺内分泌前体细胞中表达, 且与Pdx1共表达, miR-375敲低可导致胰岛形态异常, α 和 β 细胞总量降低, 胰岛素分泌减少和血糖升高^[33].

miR-124a最初被发现主要在神经细胞中高表达^[34], 近年来的研究显示其在胰岛 β 细胞中的表达也很高. 通过miRNA表达谱差异分析发现, 在小鼠胰腺发育过程中, 胰腺miR-124a的表达在E18.5 d较E14.5 d有明显升高, 提示miR-124a可能在细胞分化过程中具有重要作用. 业已证实, 转录因子Foxa2是miR-124a的一个靶基因^[35]. 在小鼠胰岛 β 细胞系MIN6细胞中, 过表达miR-124a可下调Foxa2表达, 引起下游基因Pdx1、Kir6.2及Sur1表达的降低, 这些基因在胰腺发育、胰岛素分泌及葡萄糖代谢的调控中起重要作用^[36].

miR-23b在神经元的发育中可调控Hes1的表达, Hes1通过侧向作用抑制胰腺内分泌细胞的分化^[37], 提示miR-23b对胰岛发育可能也具有重要意义.

miR-7在胎儿和成人胰腺中高表达, 且在胰岛细胞中的表达水平比腺泡细胞高200多倍, 提示miR-7可能在胰岛细胞的分化和功能调控中具有重要作用. 通过动态观察miR-7在人类胚胎发育中的时空特异性表达发现, 胰腺miR-7表达从第9周开始出现, 第14-18周达到峰值, 与胰腺内分泌激素表达的指数增长相一致^[38]. 在小鼠胚胎发育的E10.5 d抑制miR-7表达, 可导致 β 细胞数量降低, 胰岛素分泌减少, 出生后的小鼠发生糖耐量异常^[39].

miR-18a、miR-145及miR-495在分化前的小鼠胰腺上皮中高表达, 在开始分化的胰腺上皮中表达急剧下调, 与转录因子Ptf1a的表达水平呈负相关. 上述结果提示, miR-18a、miR-145及miR-495在小鼠胰腺上皮分化前可抑制Ptf1a的表达, 进而抑制胰腺上皮的分化^[40].

miR-17-92家族被认为与多种器官发育和肿瘤形成有关. 研究发现, miR-19b在胰腺前体细胞中高表达, 且其可抑制NeuroD表达, 进而下调胰岛素基因表达^[41], 提示其可能参与 β 细胞分化和功能的控制.

miR-495和miR-218在发育中的肝脏和胰腺中呈现动态的表达变化, 可降低内源性肝细胞

■创新盘点

本文就胰腺发育和干细胞分化进行讨论, 并对miRNA在其中的作用进行阐述, 这将有助于凝练胰腺发育和干细胞分化的分子机制研究的新方向.

■应用要点

深入研究miRNA在干细胞向胰岛素分泌细胞分化、成熟及分泌功能中的作用,不仅有助于阐明ESCs向胰岛素分泌细胞分化的分子机制,也有助于建立诱导ESCs向胰岛素分泌细胞定向分化的新策略,为糖尿病治疗方案的变革提供一种新的思路。

核因子6(hepatocyte nuclear factor 6, Hnf6)和one-cut2的表达水平,提示miR-495和miR-218参与调节肝脏和胰腺的发育^[42]。

此外,miR-216、miR-217、miR-9及miR-376a均在发育中的胰腺或成年胰腺组织中表达丰富,提示其在胰腺发育中也可能起重要作用^[34]。

3.2 miRNA在干细胞分化中的作用 小鼠ESCs表达丰富的miR-290-295和miR-302,这两者均受多潜能性基因Oct4、Nanog及Sox2的调控,同时Sox2也可能是上述miRNA的靶基因^[43]。Xu等^[44]的研究显示,miR-145可负性调控Oct4、Sox2及Klf4的表达,从而影响人ESCs的自我更新和分化状态;同时miR-145的活性又受Oct4的抑制。上述结果表明,miRNA与维持干细胞多潜能性的基因之间存在双向抑制,从而控制着人ESCs的自我更新和分化。

迄今为止,小鼠和人ESCs的miRNA表达谱特征已见到报道^[45],ESCs自发分化形成包含3个胚层的拟胚体(embryoid bodies, EBs)的miRNA表达谱也已有文献记载。近年来,多篇文献报道了ESCs定向分化过程中的miRNA表达谱变化,其中包括向内胚层^[46]、胚外内胚层^[45]、定型内胚层^[47]或外胚层方向分化,以及向心肌细胞、平滑肌细胞和神经细胞方向分化等方面的研究结果^[48,49]。此外,功能学研究还证实,miR-124a和miR-9可调控大鼠ESCs向神经元和星形胶质细胞分化^[48],而miR-1和miR-133则可调控小鼠ESCs向心肌细胞分化^[49]。

有关miRNA在ESCs向胰岛细胞分化的表达谱及其作用则鲜见报道。最近,有研究者使用Taqman MicroRNA测定方法分析了人ESCs分化而来的胰岛样细胞团中的miRNA表达谱,并且与人ESCs和EBs进行了比较^[50]。然而,该研究并未分析miRNA在分化过程中的动态变化,未对分化过程中起关键作用的miRNA进行筛选和确认,未开展相关的功能学研究和分子机制探讨。因此,miRNA在ESCs向胰岛β细胞定向分化过程中的变化规律、调节作用及分子机制值得深入进行研究。

4 结论

miRNA可调控多种与胰腺发育相关的特异性转录因子的表达,miRNA反过来又受到转录因子的调控,两者之间构成一个复杂的分子调控网络,从而在胰腺发育的调控中发挥重要作用。另一方面,miRNA在干细胞的自我更新和定向分化中同

样也具有重要作用。因此,深入研究miRNA在干细胞向胰岛素分泌细胞分化、成熟及分泌功能中的作用,不仅有助于阐明ESCs向胰岛素分泌细胞分化的分子机制,也有助于建立诱导ESCs向胰岛素分泌细胞定向分化的新策略,为糖尿病治疗方案的变革提供一种新的思路。

5 参考文献

- 1 Stefani G, Slack FJ. Small non-coding RNAs in animal development. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9: 219-230
- 2 Shkumatava A, Stark A, Sive H, Bartel DP. Coherent but overlapping expression of microRNAs and their targets during vertebrate development. *Genes Dev* 2009; 23: 466-481
- 3 Duroux-Richard I, Presumey J, Courties G, Gay S, Gordeladze J, Jorgensen C, Kyburz D, Apparailly F. MicroRNAs as new player in rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine* 2011; 78: 17-22
- 4 Saini HK, Griffiths-Jones S, Enright AJ. Genomic analysis of human microRNA transcripts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 17719-17724
- 5 Baek D, Villén J, Shin C, Camargo FD, Gygi SP, Bartel DP. The impact of microRNAs on protein output. *Nature* 2008; 455: 64-71
- 6 Selbach M, Schwanhäusser B, Thierfelder N, Fang Z, Khanin R, Rajewsky N. Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature* 2008; 455: 58-63
- 7 Bushati N, Cohen SM. microRNA functions. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2007; 23: 175-205
- 8 Zeng Y. Principles of micro-RNA production and maturation. *Oncogene* 2006; 25: 6156-6162
- 9 Couzin J. MicroRNAs make big impression in disease after disease. *Science* 2008; 319: 1782-1784
- 10 Reichert M, Rustgi AK. Pancreatic ductal cells in development, regeneration, and neoplasia. *J Clin Invest* 2011; 121: 4572-4578
- 11 D'Amour KA, Bang AG, Eliazer S, Kelly OG, Agulnick AD, Smart NG, Moorman MA, Kroon E, Carpenter MK, Baetge EE. Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 2006; 24: 1392-1401
- 12 Kroon E, Martinson LA, Kadoya K, Bang AG, Kelly OG, Eliazer S, Young H, Richardson M, Smart NG, Cunningham J, Agulnick AD, D'Amour KA, Carpenter MK, Baetge EE. Pancreatic endoderm derived from human embryonic stem cells generates glucose-responsive insulin-secreting cells in vivo. *Nat Biotechnol* 2008; 26: 443-452
- 13 Jiang W, Shi Y, Zhao D, Chen S, Yong J, Zhang J, Qing T, Sun X, Zhang P, Ding M, Li D, Deng H. In vitro derivation of functional insulin-producing cells from human embryonic stem cells. *Cell Res* 2007; 17: 333-344
- 14 Wong RS. Extrinsic factors involved in the differentiation of stem cells into insulin-producing cells: an overview. *Exp Diabetes Res* 2011; 2011: 406182
- 15 Chao KC, Chao KF, Fu YS, Liu SH. Islet-like clusters derived from mesenchymal stem cells in Wharton's Jelly of the human umbilical cord for transplantation to control type 1 diabetes. *PLoS One* 2008; 3: e1451
- 16 Bramswig NC, Kaestner KH. Organogenesis and

- functional genomics of the endocrine pancreas. *Cell Mol Life Sci* 2012; 69: 2109-2123
- 17 Khoo C, Yang J, Weinrott SA, Kaestner KH, Naji A, Schug J, Stoffers DA. Research resource: the pdx1 cisrome of pancreatic islets. *Mol Endocrinol* 2012; 26: 521-533
 - 18 Wang S, Jensen JN, Seymour PA, Hsu W, Dor Y, Sander M, Magnuson MA, Serup P, Gu G. Sustained Neurog3 expression in hormone-expressing islet cells is required for endocrine maturation and function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 9715-9720
 - 19 Juhl K, Sarkar SA, Wong R, Jensen J, Hutton JC. Mouse pancreatic endocrine cell transcriptome defined in the embryonic Ngn3-null mouse. *Diabetes* 2008; 57: 2755-2761
 - 20 Oropez D, Horb M. Transient expression of Ngn3 in *Xenopus* endoderm promotes early and ectopic development of pancreatic beta and delta cells. *Genesis* 2012; 50: 271-285
 - 21 Gu C, Stein GH, Pan N, Goebbels S, Hörnberg H, Nave KA, Herrera P, White P, Kaestner KH, Sussel L, Lee JE. Pancreatic beta cells require NeuroD to achieve and maintain functional maturity. *Cell Metab* 2010; 11: 298-310
 - 22 Anderson KR, Torres CA, Solomon K, Becker TC, Newgard CB, Wright CV, Hagman J, Sussel L. Cooperative transcriptional regulation of the essential pancreatic islet gene NeuroD1 (beta2) by Nkx2.2 and neurogenin 3. *J Biol Chem* 2009; 284: 31236-31248
 - 23 Anderson KR, White P, Kaestner KH, Sussel L. Identification of known and novel pancreas genes expressed downstream of Nkx2.2 during development. *BMC Dev Biol* 2009; 9: 65
 - 24 Schaffer AE, Freude KK, Nelson SB, Sander M. Nkx6 transcription factors and Ptf1a function as antagonistic lineage determinants in multipotent pancreatic progenitors. *Dev Cell* 2010; 18: 1022-1029
 - 25 Gao N, Le Lay J, Qin W, Doliba N, Schug J, Fox AJ, Smirnova O, Matschinsky FM, Kaestner KH. Foxa1 and Foxa2 maintain the metabolic and secretory features of the mature beta-cell. *Mol Endocrinol* 2010; 24: 1594-1604
 - 26 Gao N, LeLay J, Vatamaniuk MZ, Rieck S, Friedman JR, Kaestner KH. Dynamic regulation of Pdx1 enhancers by Foxa1 and Foxa2 is essential for pancreas development. *Genes Dev* 2008; 22: 3435-3448
 - 27 Kopinke D, Brailsford M, Shea JE, Leavitt R, Scaife CL, Murtaugh LC. Lineage tracing reveals the dynamic contribution of Hes1+ cells to the developing and adult pancreas. *Development* 2011; 138: 431-441
 - 28 Coad RA, Dutton JR, Tosh D, Slack JM. Inhibition of Hes1 activity in gall bladder epithelial cells promotes insulin expression and glucose responsiveness. *Biochem Cell Biol* 2009; 87: 975-987
 - 29 Hesselson D, Anderson RM, Stainier DY. Suppression of Ptf1a activity induces acinar-to-endocrine conversion. *Curr Biol* 2011; 21: 712-717
 - 30 Yang Y, Ding L, An Y, Zhang ZW, Lang Y, Tai S, Guo F, Teng CB. MiR-18a regulates expression of the pancreatic transcription factor Ptf1a in pancreatic progenitor and acinar cells. *FEBS Lett* 2012; 586: 422-427
 - 31 Lynn FC, Skewes-Cox P, Kosaka Y, McManus MT, Harfe BD, German MS. MicroRNA expression is required for pancreatic islet cell genesis in the mouse. *Diabetes* 2007; 56: 2938-2945
 - 32 Kloosterman WP, Lagendijk AK, Ketting RF, Moulton JD, Plasterk RH. Targeted inhibition of miRNA maturation with morpholinos reveals a role for miR-375 in pancreatic islet development. *PLoS Biol* 2007; 5: e203
 - 33 Poy MN, Hausser J, Trajkovski M, Braun M, Collins S, Rorsman P, Zavolan M, Stoffel M. miR-375 maintains normal pancreatic alpha- and beta-cell mass. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 5813-5818
 - 34 Joglekar MV, Joglekar VM, Hardikar AA. Expression of islet-specific microRNAs during human pancreatic development. *Gene Expr Patterns* 2009; 9: 109-113
 - 35 Baroukh N, Ravier MA, Loder MK, Hill EV, Bounacer A, Scharfmann R, Rutter GA, Van Obberghen E. MicroRNA-124a regulates Foxa2 expression and intracellular signaling in pancreatic beta-cell lines. *J Biol Chem* 2007; 282: 19575-19588
 - 36 Baroukh NN, Van Obberghen E. Function of microRNA-375 and microRNA-124a in pancreas and brain. *FEBS J* 2009; 276: 6509-6521
 - 37 Fukuda A, Kawaguchi Y, Furuyama K, Kodama S, Horiguchi M, Kuhara T, Koizumi M, Boyer DF, Fujimoto K, Doi R, Kageyama R, Wright CV, Chiba T. Ectopic pancreas formation in Hes1 -knockout mice reveals plasticity of endodermal progenitors of the gut, bile duct, and pancreas. *J Clin Invest* 2006; 116: 1484-1493
 - 38 Correa-Medina M, Bravo-Egana V, Rosero S, Ricordi C, Edlund H, Diez J, Pastori RL. MicroRNA miR-7 is preferentially expressed in endocrine cells of the developing and adult human pancreas. *Gene Expr Patterns* 2009; 9: 193-199
 - 39 Nieto M, Hevia P, Garcia E, Klein D, Alvarez-Cubela S, Bravo-Egana V, Rosero S, Molano RD, Vargas N, Ricordi C, Pileggi A, Diez J, Domínguez-Bendala J, Pastori RL. Anti sense miR-7 impairs insulin expression in developing pancreas and in cultured pancreatic buds. *Cell Transplant* 2011 Dec 20. [Epub ahead of print]
 - 40 安洋, 杨艳坤, 高飞, 朱宽钰, 慕谭伟, 滕春波. 调节小鼠胰腺发育中Ptf1a基因表达的microRNAs的鉴定研究. *生物化学与生物物理进展* 2009; 36: 1607-1612
 - 41 Zhang ZW, Zhang LQ, Ding L, Wang F, Sun YJ, An Y, Zhao Y, Li YH, Teng CB. MicroRNA-19b down-regulates insulin 1 through targeting transcription factor NeuroD1. *FEBS Lett* 2011; 585: 2592-2598
 - 42 Simion A, Laudadio I, Prévot PP, Raynaud P, Lemaigre FP, Jacquemin P. MiR-495 and miR-218 regulate the expression of the Onecut transcription factors HNF-6 and OC-2. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 391: 293-298
 - 43 Marson A, Levine SS, Cole MF, Frampton GM, Brambrink T, Johnstone S, Guenther MG, Johnston WK, Wernig M, Newman J, Calabrese JM, Dennis LM, Volkert TL, Gupta S, Love J, Hannett N, Sharp PA, Bartel DP, Jaenisch R, Young RA. Connecting microRNA genes to the core transcriptional regulatory circuitry of embryonic stem cells. *Cell* 2008; 134: 521-533
 - 44 Xu N, Papagiannakopoulos T, Pan G, Thomson JA, Kosik KS. MicroRNA-145 regulates OCT4, SOX2, and KLF4 and represses pluripotency in human embryonic stem cells. *Cell* 2009; 137: 647-658
 - 45 Laurent LC, Chen J, Ulitsky I, Mueller FJ, Lu C, Shamir R, Fan JB, Loring JF. Comprehensive microRNA profiling reveals a unique human embryonic stem cell signature dominated by a single seed sequence. *Stem Cells* 2008; 26: 1506-1516

同行评价

本文较全面系统地介绍了miRNA在胰腺胚胎发育和调控干细胞定向分化中的作用, 能帮助读者较充分地了解该领域的相关知识, 对从事本领域研究的人员有一定的指导价值。

- 46 Tzur G, Levy A, Meiri E, Barad O, Spector Y, Bentwich Z, Mizrahi L, Katzenellenbogen M, Ben-Shushan E, Reubinoff BE, Galun E. MicroRNA expression patterns and function in endodermal differentiation of human embryonic stem cells. *PLoS One* 2008; 3: e3726
- 47 Hinton A, Afrikanova I, Wilson M, King CC, Maurer B, Yeo GW, Hayek A, Pasquinelli AE. A distinct microRNA signature for definitive endoderm derived from human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev* 2010; 19: 797-807
- 48 Krichevsky AM, Sonntag KC, Isacson O, Kosik KS. Specific microRNAs modulate embryonic stem cell-derived neurogenesis. *Stem Cells* 2006; 24: 857-864
- 49 Ivey KN, Muth A, Arnold J, King FW, Yeh RF, Fish JE, Hsiao EC, Schwartz RJ, Conklin BR, Bernstein HS, Srivastava D. MicroRNA regulation of cell lineages in mouse and human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 2008; 2: 219-229
- 50 Chen BZ, Yu SL, Singh S, Kao LP, Tsai ZY, Yang PC, Chen BH, Shoen-Lung Li S. Identification of microRNAs expressed highly in pancreatic islet-like cell clusters differentiated from human embryonic stem cells. *Cell Biol Int* 2011; 35: 29-37

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》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/wcjd/ch/index.aspx>), 提交稿件中出现问题可以发送E-mail至submission@wjgnet.com咨询, 编务将在1个工作日内回复。

第二步 审稿: 送审编辑对所有来稿进行课题查新, 并进行学术不端检测, 对不能通过预审的稿件直接退稿, 通过预审的稿件送交同行评议专家进行评议。编辑部主任每周一组织定稿会, 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进行核对, 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》保证每篇文章四月内完成。(编辑部主任: 李军亮 2010-01-18)

鸟苷酸环化酶C基因沉默对人胃癌裸鼠皮下种植瘤的影响

孟海, 张健锋, 毛振彪, 薛世民, 吴信华, 鞠少卿

孟海, 江苏省滨海县人民医院 江苏省滨海县 224500
张健锋, 毛振彪, 薛世民, 南通大学附属医院消化内科 江苏省南通市 226001
吴信华, 鞠少卿, 南通大学附属医院外科综合实验室 江苏省南通市 226001
孟海, 硕士, 主治医师, 主要从事消化系统肿瘤的防治研究。
南通市社会发展计划基金资助项目, No. S2008016
作者贡献分布: 张健锋和孟海对此文贡献均等; 此课题由张健锋、孟海及毛振彪设计; 研究过程由孟海与张健锋操作完成; 吴信华、鞠少卿及薛世民参与实验指导; 研究所用试剂及分析工具由张健锋与毛振彪提供; 数据分析由孟海与张健锋完成; 本文写作由孟海、张健锋及毛振彪完成。
通讯作者: 毛振彪, 教授, 主任医师, 226001, 江苏省南通市西寺路20号, 南通大学附属医院消化内科。mzb63@163.com
电话: 0513-81161806 传真: 0513-85519820
收稿日期: 2012-04-23 修回日期: 2012-06-12
接受日期: 2012-06-29 在线出版日期: 2012-07-28

GC-C gene silencing inhibits the growth of subcutaneously implanted gastric tumors in nude mice

Hai Meng, Jian-Feng Zhang, Zhen-Biao Mao, Shi-Min Xue, Xin-Hua Wu, Shao-Qing Ju

Hai Meng, People's Hospital of Binhai, Binhai 224500, Jiangsu Province, China
Jian-Feng Zhang, Zhen-Biao Mao, Shi-Min Xue, Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China
Xin-Hua Wu, Shao-Qing Ju, Comprehensive Surgical Laboratory, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China
Supported by: the Social Development Foundation of Nantong City, No. S2008016
Correspondence to: Zhen-Biao Mao, Professor, Chief Physician, Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Nantong University, 20 Xisi Road, Nantong 226001, Jiangsu Province, China. mzb63@163.com
Received: 2012-04-23 Revised: 2012-06-12
Accepted: 2012-06-29 Published online: 2012-07-28

Abstract

AIM: To study the effect of GC-C gene silencing on the biological behaviors of subcutaneously implanted gastric tumors and to explore the possible mechanisms involved.

METHODS: Non-transfected SGC-7901 cells (SGC-7901 group), SGC-7901 cells transfected cell with an empty plasmid (PRNA group), and those transfected with a shRNA targeting the GC-C gene (GC-C-shRNA group) were sub-

cutaneously inoculated into nude mice. Then, the histologically intact xenograft tissues were subcutaneously transplanted to nude mice to observe the condition of nude mice and determine the rate of tumor survival and growth velocity. The levels of GC-C mRNA and protein were determined by RFQ-PCR and Western blot, respectively. The heteromorphism and necrosis of tumor cells were observed after HE staining. The expression of CXCR4 protein was detected by Western blot and immunohistochemistry.

RESULTS: The rate of tumor survival and the condition of nude mice did not differ significantly among the three groups. Compared to the SGC-7901 group and PRNA group, the tumors grew more slowly and became smaller in the GC-C-shRNA group (all $P < 0.05$). The reduced rate of tumor growth velocity and volume in the GC-C-shRNA group were 33.7% and 33.2%, respectively, and GC-C gene silencing efficiency was 66.8% and 64.4%, respectively ($P < 0.05$). The expression of GC-C protein decreased by 50.0% and 49.6%, respectively ($P < 0.05$), and the degree of tumor heteromorphism and necrosis and expression of CXCR4 protein in the GC-C-shRNA group decreased obviously (all $P < 0.05$).

CONCLUSION: GC-C gene silencing slows the growth velocity of gastric tumors *in vivo* possibly in a CXCR4-dependent manner.

Key Words: GC-C gene silencing; Nude mice; Gastric cancer; Subcutaneously implanted tumors; Chemokine receptor 4

Meng H, Zhang JF, Mao ZB, Xue SM, Wu XH, Ju SQ. GC-C gene silencing inhibits the growth of subcutaneously implanted gastric tumors in nude mice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(21): 1919-1926

摘要

目的: 探讨鸟苷酸环化酶C(GC-C)基因沉默对人胃癌裸鼠皮下种植瘤的影响及其机制。

方法: 将SGC-7901细胞(SGC-7901组)、空质粒转染的细胞(PRNA组)、GC-C基因稳定沉

■背景资料

大量研究表明, 鸟苷酸环化酶C(GC-C)、趋化因子受体(CXCR4)高表达能促进肿瘤发生, 但有关GC-C作用机制及两者相关性鲜见报道。

■同行评议者

姜相君, 主任医师, 青岛市市立医院消化科

■研究前沿

大量研究报道, GC-C、CXCR4在食管癌、胃癌、肝癌等多种恶性肿瘤中高表达, 但对其发生机制仍存在争议, GC-C基因沉默对CXCR4表达及胃癌的影响报道甚少, 需进一步探讨、研究。

默的细胞(GC-C-shRNA组)悬液先在裸鼠皮下接种成瘤, 再取瘤组织块分别接种到裸鼠皮下, 建立3种胃癌裸鼠皮下种植瘤模型。观察裸鼠一般情况、肿瘤的成瘤率、生长速度, 描绘肿瘤的生长曲线, 计算肿瘤的抑瘤率; 采用实时荧光定量PCR(RFQ-PCR), Western blot和免疫组织化学法检测GC-C和趋化因子受体4(CXCR4)在各组移植瘤组织中的表达。

结果: 与SGC-7901组和PRNA组比较, GC-C-shRNA组裸鼠移植瘤生长速度明显减慢、体积明显变小(抑制率分别为33.7%、33.2%), 肿瘤异型性、坏死程度明显降低, 差异具有统计学意义(均 $P<0.05$), 且移植瘤组织中GC-C和CXCR4 mRNA和蛋白均明显下调(GC-C mRNA: 7.47 ± 1.70 vs 11.18 ± 0.60 , 11.28 ± 0.85 ; GC-C蛋白: 0.52 ± 0.15 vs 1.04 ± 0.19 , 1.03 ± 0.24 ; CXCR4蛋白: 0.67 ± 0.13 vs 1.02 ± 0.21 , 1.03 ± 0.23 , 均 $P<0.05$)。

结论: GC-C基因稳定沉默在体内能保持稳定, 且能抑制裸鼠移植瘤生长, 该过程可能与CXCR4下调有关。

关键词: 鸟苷酸环化酶C基因沉默; 裸鼠; 胃癌; 皮下种植瘤; 趋化因子受体4

孟海, 张健峰, 毛振彪, 薛世民, 吴信华, 鞠少卿. 鸟苷酸环化酶C基因沉默对胃癌裸鼠皮下种植瘤的影响. 世界华人消化杂志 2012; 20(21): 1919-1926
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1919.asp>

0 引言

胃癌(gastric cancer, GC)是消化系统最常见的恶性肿瘤, 我国每年胃癌新发病例占全部恶性肿瘤的17%以上, 死亡率占全部恶性肿瘤的20%以上^[1]。该病因缺乏特异性的初筛指标以及早期症状不明显, 大多数患者在就诊时已经处于进展期。传统手术及放化疗对进展期胃癌的疗效仍不理想, 研究表明, 早期胃癌术后5年生存率可达90%以上^[2], 但在我国胃癌的早期诊断率很低($<10\%$)^[3], 进展期胃癌术后5年生存率仅有30%-40%。Correa^[4]提出的正常胃黏膜→浅表性胃炎→萎缩性胃炎→肠上皮化生→异型增生→肠型胃癌是目前较为普遍接受的观点。肠上皮化生和异型增生被认为是胃癌癌前病变。胃癌发生、发展的过程涉及遗传学和表观遗传学^[5]。鸟苷酸环化酶C(guanylyl cyclase C, GC-C)正常组织中仅存在于肠黏膜细胞, 而不在正常胃黏膜中表达。但在肠上皮化生、异型增生到胃癌

过程中, 胃黏膜出现GC-C异位表达的现象。

趋化因子(chemokines)过去认为是一类控制细胞向炎症定向迁移的细胞因子, 目前研究发现趋化因子与肿瘤发生也密切相关, 肿瘤细胞在生长过程中能够分泌多种趋化因子并且表达其受体, 进而刺激肿瘤细胞生长。Singh等^[6]研究发现趋化因子受体4(chemokine receptor 4, CXCR4)及其配体CXCL12与肿瘤转移关系密切。孙梯业等^[7]研究认为CXCR4和VEGF-C的表达水平与胃癌密切相关, 并与患者的组织学类型、分化程度、肿瘤浸润深度和淋巴结转移等有相关性。前期我们建立稳定干扰GC-C基因的细胞模型^[8], 通过基因芯片技术筛选出差异基因表达谱变化, 本实验通过建立人胃癌裸鼠皮下种植瘤模型, 利用生长曲线、HE染色、定量PCR(RFQ-PCR)、Western blot、免疫组织化学染色研究GC-C基因沉默对肿瘤生物学行为的影响, 同时选择具有明显差异表达的CXCR4在体内进一步验证, 旨在探讨GC-C基因在人胃癌发生发展中的作用机制, 为胃癌的预防和治疗提供新思路和方法。

1 材料和方法

1.1 材料 裸鼠(Balb/c/nu/nu)购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司, 代养于南通大学实验动物中心无特殊致病原(special pathogen free, SPF)屏障环境。雌雄兼用, 5-6 wk, 体质量 $17\text{ g}\pm2.5\text{ g}$, 分笼饲养(每笼3只)。实验过程中裸鼠均饲养在SPF屏障环境内。肿瘤种植前1 wk购入裸鼠, 使之适应新环境。SGC-7901细胞系购自中科院上海细胞所; DMEM培养基(高糖)为Invitrogen公司产品; 胎牛血清购自杭州四季青公司; 0.25%胰酶、BCA蛋白浓度测定试剂盒、细胞裂解液、G418抗生素、PMSF、Glycine、SDS-PAGE凝胶试剂盒、SDS-PAGE上样缓冲液、PVDF膜、ECL化学发光剂、显影定影试剂盒和Tris等均为碧云天公司产品; RISOTM RNA提取试剂和EzO-mics one-step qPCR购自mix Biomics公司; GC-C抗体、Tublin抗体购自Santa Cruz公司; CXCR4抗体购自ABCAM公司; HRP标记山羊抗小鼠IgG购自博士德公司; 纤维连接蛋白购自BD公司; 荧光定量PCR试剂盒购自宝生物工程(上海)有限公司; DEPC为上海捷瑞公司产品。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: SGC-7901细胞用DMEM高糖培养基培养; 空载体组及GC-C基因沉默组细胞用

含G418(浓度为200 mg/L)的DMEM高糖培养基培养.细胞复苏后,当细胞生长1-2 d,弃细胞培养上清,用PBS润洗细胞2-3次,重新加入适量含100 mL/L FBS的DMEM高糖培养基,将瓶盖旋松1/4圈,37℃、50 mL/L CO₂恒温培养箱中培养.弃细胞培养上清,用PBS润洗细胞2-3次.加入适量0.25%胰蛋白酶,37℃消化5-10 min至所有细胞变圆,露出细胞间隙时终止反应,将消化下来的细胞用滴管轻轻吹打成单细胞悬液.将瓶盖旋松1/4圈,37℃、50 mL/L CO₂恒温培养箱中培养.

1.2.2 分组及造模:将18只裸鼠随机分为3组,每组6只,即A:SGC-7901组;B:空载体组(PRNA组);C:GC-C基因沉默组(GC-C-shRNA组).将处于生长对数期的SGC-7901细胞、空质粒转染的细胞株、GC-C基因沉默的细胞株分别用0.25%的胰蛋白酶消化使细胞脱壁、分散,用无血清培养液离心洗涤2次,计数活细胞数,将细胞悬于PBS中,制成单细胞悬液,调整细胞浓度至 1×10^8 /mL.无菌条件下,用1 mL注射器将3种肿瘤细胞分别接种于3组裸鼠右侧腋部皮下,接种量为每只0.1 mL(含 10^7 个活细胞),每组接种6只.待肿瘤在皮下生长到约1 cm³大小,皮下传代1次.脱颈处死裸鼠,并用75%乙醇浸泡消毒5 min.无菌操作解剖裸鼠,完整取出皮下肿瘤,去除坏死部分,选取鱼肉状组织置于生理盐水中,剪成直径1-2 mm瘤块备用.用18号套管针吸取1-2块瘤组织接种于裸鼠前侧腋下,每周观察裸鼠2-3次,记录裸鼠的全身状况、饮食、运动情况.每周测量1次肿瘤的长径(a)、短径(b)并记录,根据 $V = 1/2ab^2$ 求出体积.

标本的采集:当荷瘤鼠生长到7 wk时,脱颈处死裸鼠取肿瘤,肿瘤称质量计算抑瘤率.所取标本部分迅速放进-80℃冰箱冷冻保存待检,部分以10%甲醛固定.描绘肿瘤的生长曲线,计算抑瘤率:抑瘤率=(对照组瘤质量-实验组瘤质量)/对照组瘤重 $\times 100\%$.进行HE染色光镜观察摄片.

1.2.3 实时荧光定量PCR检测GC-C mRNA的表达:从GeneBank查取基因序列,以Primer 5.0设计软件分别设计GC-C、 β -actin引物各1对,其序列及扩增片段大小分别为:GC-C-F:CAACCTGACCAGTTCTACGG,GC-C-R:AATGTGC-CATCAGGGTAGGA; β -actin-F:TGACGTGACATCCGCAAAG, β -actin-R:CTGGAAGGTGGACAGCGAGG.上述引物均由上海博彩生物科技有限公司合成.称取从-80℃冰箱中取出解冻后的肿瘤组织60-100 mg,置入无菌匀浆器中,

加入1 mL TRIzol,室温下充分匀浆后倒入1.5 mL离心管,静置5 min;加入0.2 mL氯仿,振荡15 s,室温静置10 min;4℃ 12 000 r/min $\times 15$ min条件下离心后,取上清液至另1个1.5 mL离心管;加入0.5 mL异丙醇,将管中液体轻轻混匀,室温静置10 min;4℃ 12 000 r/min $\times 10$ min条件下离心后弃上清;加入1 mL 4℃预冷过的75%乙醇,轻轻洗涤沉淀,4℃ 7 500 r/min $\times 5$ min,弃上清,同法再洗1遍;开盖室温晾干后,加入适量DEPC水溶解(可65℃促溶15 min).

反转录反应条件如下:37℃ 15 min,85℃ 5 s(反转录酶失活反应).实时荧光定量PCR反应体系:SYBR Premix Ex TaqTM 12.5 μ L,PCR Forward Primer 1.0 μ L,PCR Reverse Primer 1.0 μ L,模板(cDNA溶液)2.0 μ L,无菌双蒸水8.5 μ L,总体积25 μ L.PCR扩增程序:95℃预变性30 s;95℃ 5 s,72℃ 30 s.GC-C的沉默效率=(1-R) $\times 100\%$, $R(\text{GC-C mRNA的相对表达量}) = 2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-[Ct(\text{目标-目标}) - Ct(\text{对照-对照})]}$.

1.2.4 Western blot检测GC-C和CXCR4蛋白表达:从-80℃取出组织,按100 g/L加入蛋白裂解液,剪碎,将离心管放冰水混合液中使组织复温30 min;冰浴匀浆,将组织打碎;冰浴静置30 min后在4℃ 12 000 r/min离心20 min,取上清分装于0.5 mL离心管中,用紫外分光光度仪测定蛋白质的含量,-80℃保存.SDS-PAGE凝胶电泳过程:GC-C用8%分离胶,CXCR4用10%分离胶;电泳时的电压及时间GC-C积层胶100 V 30 min,分离胶130 V 90 min;CXCR4积层胶80 V 30 min,分离胶120 V 60 min.350 mA 150 min恒流转膜至PVDF膜,5%脱脂牛奶4℃摇床封闭过夜,TBST洗膜5 min后,加入5%脱脂牛奶稀释的一抗(GC-C为1:200,CXCR4为1:400),置4℃摇床24-72 h;加入辣根过氧化物酶标记二抗(1:5 000),室温放置2 h(β -actin一抗为1:2 000,二抗为1:1 000).TBST洗膜5 min $\times 6$ 次;化学增强发光剂ECL显影、定影,室温下晾干后扫描,用图像处理系统分析目标带.

1.2.5 免疫组织化学染色(En Vision两步法):固定、脱水、透明、浸蜡、包埋、切片、脱蜡和水化.抗原修复后磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤2次;每张切片加1滴3%过氧化酶阻断溶液,室温下孵育10 min,以阻断内源性过氧化物酶的活性;PBS冲洗3次,每次5 min;除去PBS液,每张切片加1滴正常非免疫动物血清,室温下孵育30 min;除去血清,每张切片分别加1滴羊抗兔GCC多克

■名词解释

鸟苷酸环化酶C(GC-C):具有催化GTP形成cGMP的作用,可分为膜结合型和胞浆可溶型2种亚型.GC-C基因定位于人类12号染色体,正常组织中仅存在于肠黏膜细胞.但在肠上皮化生、异型增生到胃癌过程中,胃黏膜出现GC-C异常表达的现象.

■应用要点

GC-C基因沉默的胃癌癌细胞生长速度减慢, 异形性及恶性程度降低, 该基因可能通过上调CXCR4的表达而影响胃癌的生物学行为。GC-C基因有望成为胃癌基因治疗的新的分子靶点。



图1 3组裸鼠肿瘤模型及肿瘤实体图像。A: SGC-7901组; B: PRNA组; C: GC-C-shRNA组。

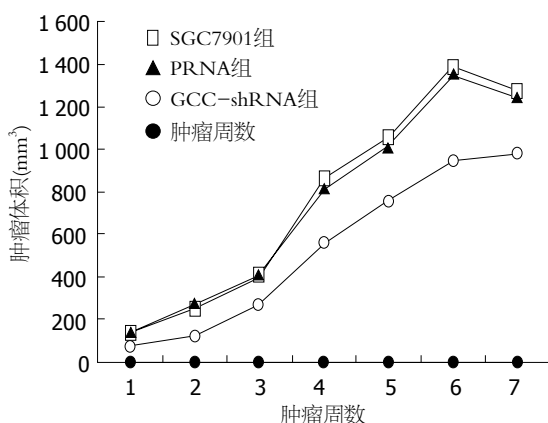


图2 3组裸鼠种植瘤的生长曲线图。

隆抗体(工作浓度1:100)或羊抗兔CXCR4多克隆抗体(工作浓度1:50), 室温作用60 min; PBS冲洗3次, 每次5 min; 除去PBS液, 每张切片加1滴生物素标记的二抗, 室温下孵育45 min; PBS冲洗3次, 每次5 min; 除去PBS液, 每张切片加2滴新鲜配制的3,3'-二氨基联苯胺(DAB)溶液显色, 显色时间8 min; 自来水冲洗10 min。苏木素复染2 min, 置于盐酸酒精分化; 自来水冲洗10 min; 2次无水酒精脱水干燥, 二甲苯透明, 干燥后中性树脂封片, 光镜观察摄片。

结果根据染色阳性细胞数和染色强度综合评定, 阳性细胞均为胞浆中出现黄色至棕褐色颗粒。染色细胞参照邢传平等^[9]的标准, 阳性染色细胞数以4级分法, 即阳性细胞≤25%为(+), 26%-50%为(++), >50%为(+++), 无阳性细胞为(-), 分别记为1、2、3、0分; 染色强度: 浅黄色为(+), 棕黄色为(++), 棕褐色为(+++), 无着色为(-), 分别记为1、2、3、0分。二者分数相加, 总分1-2分计为弱阳性(+), 3-4分为阳性(++), 5-6分为强阳性(+++), 0分阴性(-)。先在低倍镜下(×100)选择有代表性的区域, 随机观察5个视野, 计算阳性细胞数的平均百分数作为该切片的阳性细胞百分比进行分级, 染色强度以多数阳性细

表1 肿瘤的平均体积 (mm³, mean ± SD)

周数	SGC7901组	PRNA组	GC-C-shRNA组
1	151.7 ± 11.3	139.7 ± 9.6	80.4 ± 8.4 ^a
2	241.2 ± 11.9	249.8 ± 11.7	124.2 ± 11.6 ^a
3	408.7 ± 16.5	407.7 ± 17.6	369.6 ± 14.4 ^a
4	856.2 ± 11.9	823.3 ± 14.8	759.3 ± 11.3 ^a
5	1 056.3 ± 28.5	1 017.8 ± 56.2	753.4 ± 13.0 ^a
6	1 383.0 ± 13.8	1 360.0 ± 37.4	948.6 ± 15.9 ^a
7	1 237.5 ± 14.0	1 250.3 ± 14.2	985.2 ± 17.3 ^a

^aP<0.05 vs GC-C-shRNA组。

胞呈现的染色特征为标准。判断时摒除非特异性着色和背景着色。切片结果均经2名经验丰富的病理科医生进行诊断。

统计学处理 所有数据用SPSS11.5统计软件进行分析, 数据资料用mean±SD表示, 采用t检验、方差分析进行统计学处理。P<0.05表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 裸鼠的成瘤率及一般情况 SGC7901组、PRNA组6只均成瘤, 成瘤率100%(6/6); GC-C-shRNA组5只成瘤, 成瘤率83.3%(5/6), 3组之间成瘤率无明显差异。3组裸鼠的饮食、活动情况及精神状态均正常, 无明显差异(图1)。

2.2 肿瘤的生长情况 肿瘤体积的变化如表1。肿瘤质量的变化SGC7901组、PRNA组和GC-C-shRNA组依次为: 1 073.3 mg±16.4 mg、1 064.5 mg±17.4 mg、711.6 mg±19.7 mg。根据肿瘤体积绘制肿瘤生长曲线图(图2)。结果提示, GC-C-shRNA组较SGC7901组和PRNA组肿瘤的体积和质量均明显减小, 生长速度减缓。HE染色提示, SGC7901组和PRNA组均可见大片细胞坏死, 异型性明显, 核分裂相多见; 而GC-C-shRNA组仅见少量坏死, 异型性较低, 核分裂相少见(图3)。

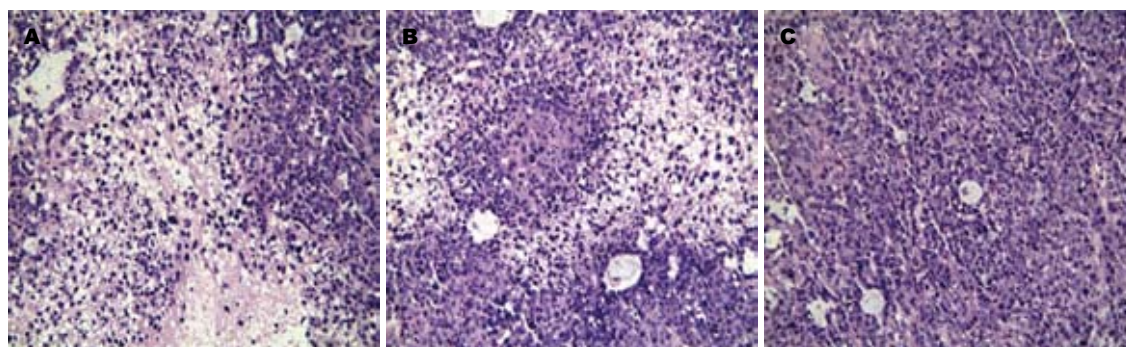


图 3 3组肿瘤组织HE染色($\times 200$). A: SGC7901组; B: PRNA组; C: GC-C-shRNA组.

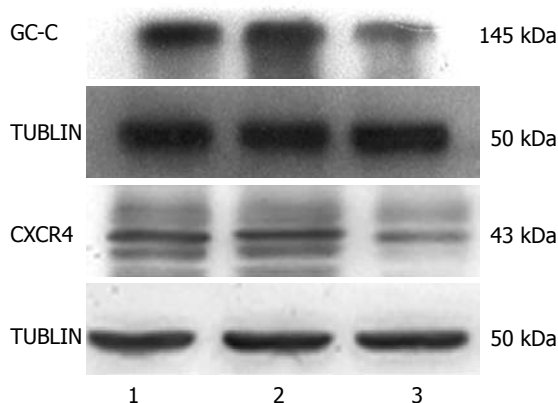


图 4 Western blot检测各组肿瘤GC-C和CXCR4蛋白表达. 1: SGC7901组; 2: PRNA组; 3: GC-C-shRNA组.

2.3 GC-C mRNA沉默效果检测 实时荧光定量PCR检测3组肿瘤GC-C mRNA的表达, 结果提示GC-C-shRNA组(7.47 ± 1.70)较SGC7901组(11.18 ± 0.60)和PRNA组(11.28 ± 0.85)明显降低, 差异具有统计学意义($P < 0.05$); 而SGC7901组与PRNA组之间无明显差异($P > 0.05$). GC-C的沉默效率为64.4%.

2.4 Western blot检测 GC-C-shRNA组的GC-C蛋白相对表达量(0.52 ± 0.15)明显低于SGC7901组(1.04 ± 0.19)和PRNA组(1.03 ± 0.24), 差异具有统计学意义($P < 0.05$); 而SGC7901组与PRNA组比较无明显差异($P > 0.05$). GC-C蛋白的沉默效率为50.0%. GC-C-shRNA组的CXCR4蛋白表达量(0.67 ± 0.13)亦明显低于SGC7901组(1.02 ± 0.21)和PRNA组(1.03 ± 0.23), 差异具有统计学意义($P < 0.05$). SGC7901组与PRNA组比较, 两者之间无明显差异($P > 0.05$, 图4).

2.5 CXCR4的免疫组织化学染色 GC-C-shRNA组CXCR4蛋白阳性细胞表达率及强度与SGC7901组、PRNA组相比明显降低, 用秩变换方差分析发现差异具有显著性($P < 0.05$); SGC7901组与PRNA组相比, CXCR4蛋白阳性细

胞表达率及强度无明显差异($P > 0.05$, 图5).

3 讨论

鸟苷酸环化酶(guanylyl cyclase, GC)家族具有催化GTP形成环磷酸鸟苷(cyclic guanosine monophosphate, cGMP)的作用, 可分为膜结合型和胞浆可溶型2种亚型. GC受体在哺乳动物组织中表达, 家族有7个成员, 即GC-A-GC-G, 其中GC-C基因定位于人类12号染色体. GC-C^[10-12]通过与配体激活, 使细胞内cGMP升高, 进而直接激活cGMP依赖的信号通路. Park等^[13]和Birbe等^[14]研究表明所有肠型异型增生和肠型胃癌均表达GC-C, 而正常胃黏膜不表达GC-C. 研究还发现, 胃腺癌组织GC-C异位表达与CDX2对其激活有关^[15,16]. 近年来Debruyne等^[17]研究证明, 胆汁酸可以通过NF- κ B及CDX-2途径使GC-C在食管细胞肠化生中异位表达. 最近Mao等^[18]研究表明GC-C基因在胃癌SGC-7901细胞中高表达, 靶向GC-C基因的siRNA可以有效抑制人胃癌细胞株SGC-7901生长, 促进凋亡, 并抑制癌细胞的侵袭和转移能力, 提示GC-C基因与胃腺癌的发生、发展有密切关系. 因此认为GC-C可能是一潜在的癌基因, 在胃腺癌发生、发展过程中发挥重要作用.

近来研究显示转移性结直肠癌细胞中, GC-C表达是正常肠上皮细胞的2-10倍^[19,20]. 毛振彪等^[16]研究30例胃癌样本, 结果发现, GC-C mRNA及蛋白的阳性率分别为20/30和19/30, 且肠型胃癌较弥漫型胃癌阳性率高($P < 0.05$), 并通过RNA干扰人SGC-7901细胞株GC-C基因表达, 发现GC-C基因抑制后SGC-7901细胞株的增殖、迁移、黏附、侵袭力降低, 细胞凋亡增加. 我们前期^[16,18]检测发现GC-C在肠上皮化生组织中表达率为39.1%, 异型增生组织为55.6%, 胃癌组织为56.7%, 而远癌胃组织中不表达, 靶向GC-C基因的siRNA瞬间转染肿瘤细胞可以抑制

■同行评价

本文探讨GC-C基因沉默对人胃癌裸鼠皮下种植瘤的影响及其机制, 思路清晰, 实验设计合理, 结果可信, 论据可靠.

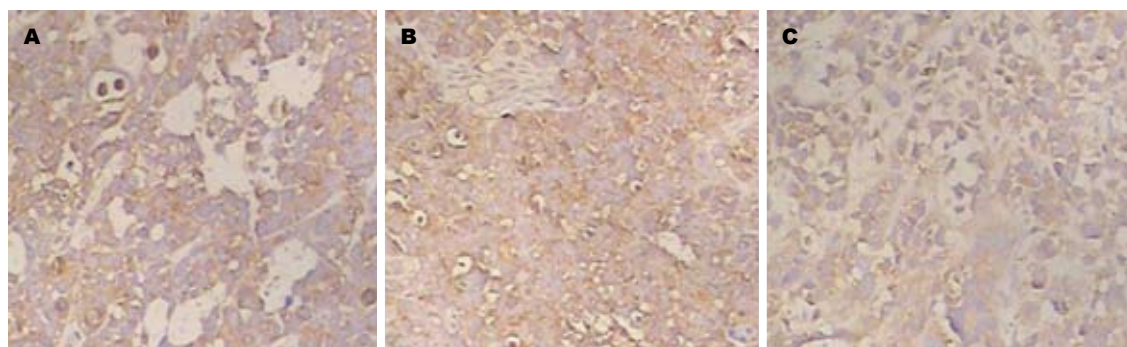


图5 CXCR4蛋白免疫组织化学染色($\times 200$)。A: SGC7901组; B: PRNA组; C: GCC-shRNA组。

肿瘤生长和促进其凋亡。进一步发现,胃癌组织中GC-C表达与其内生性配体鸟苷素的表达和幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)感染正相关,推测*H. pylori*感染导致胃酸分泌减少, pH值上升,诱发GN基因表达上调,在HNF-4、CDX2、GATA-4和NF-IL6等转录因子共同作用下,激活GC-C基因异位表达参与肠型胃癌的发生^[21]。因此,提示GC-C基因在胃癌发生发展中具有重要作用。

本研究中,3组裸鼠活动自如,饮食及精神状态正常,成瘤率无明显差异。与SGC7901组、PRNA组相比,GC-C-shRNA组肿瘤生长速度和体积均明显变小($P<0.05$);HE染色显示,GC-C-shRNA组肿瘤仅见少量坏死,异型性较低,核分裂相少见,这一结果表明GC-C基因沉默可明显抑制肿瘤生长,减低胃腺癌细胞的异型性及恶性程度。GC-C mRNA和蛋白的沉默效率分别为64.4%和50.0%($P<0.05$),这一结果表明GC-C基因沉默在人胃癌裸鼠种植瘤内能保持相对稳定。GC-C基因沉默对于胃腺癌的治疗可能具有重要的作用。

趋化因子是一类控制细胞向炎症定向迁移的细胞因子,目前研究发现其与肿瘤的发生亦密切相关,肿瘤细胞在生长过程中能够自主分泌多种趋化因子并且表达其受体,促进肿瘤细胞生长。CXCR4是趋化因子SDF-1(stromal cell derived factor-1)受体,为编码352个氨基酸且高度保守的G蛋白耦联受体,是组织表达最为广泛的细胞因子受体之一,在多种恶性肿瘤细胞的生长、播散和器官特异性转移中都有很重要的作用。Kryczek等^[22]提出,CXCL12和CXCR4构成的生物轴可能在包括乳腺癌在内的多种实体瘤的生长、转移中发挥重要作用,与恶性肿瘤的发生、发展及预后密切相关。Yasumoto等^[23]研究发现,胃癌细胞系NUGC4中CXCR4 mRNA呈高

丰度转录。

CXCR4指引着不同类型干细胞的趋化迁移,其功能有:(1)造血干细胞归巢,骨髓基质细胞分泌SDF-1,趋化CXCR4阳性的造血干细胞的归巢;(2)胚胎发育,胚胎发育期间组织干细胞在SDF-1-CXCR4引领下定位于相应的组织器官,进而分化发育成熟。CXCL12是CXC趋化因子亚家族的成员之一,他的趋化作用是由趋化因子受体CXCR4调节,是已知CXCR4的惟一配体,两者之间结合具有专属性^[24]。Scotton等^[25]报道在上皮性卵巢癌中筛选14种趋化因子受体,结果仅CXCR4在卵巢癌中表达,同时在卵巢癌患者的腹水中检测出其配体CXCL12,证实了CXCL12可以促进卵巢癌细胞生长、趋化、侵袭,阐明了CXCL12-CXCR4在卵巢癌的腹膜转移中具有重要作用。Oonakahara等^[26]报道CXCL12-CXCR4轴在非小细胞肺癌的胸膜腔播散中亦发挥重要作用。Brand等^[27]研究表明,CXCR4表达与胃癌分期、分化程度及淋巴结转移呈正相关,CXCR4在胃癌组织中的表达随胃癌细胞分化程度上升而下降,随胃癌临床分期进展而上升。推测CXCR4与其配体CXCL12结合后能抑制胃癌细胞分化,促进胃癌生长及转移。Luo等^[28]报道应用趋化因子受体拮抗剂,抑制趋化因子受体与其配体结合,可抑制肿瘤生长及转移。Woo等^[29]检测107例胃癌患者血清中CXCL12和VEGF浓度,结果发现胃癌患者血清CXCL12和VEGF浓度均高于对照组,CXCL12与胃癌远处转移及血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)水平呈正相关,推测CXCL12、VEGF可能在胃癌新生血管形成及肿瘤转移过程中发挥着协同作用。马向涛等^[30]应用Western blot法检测40例胃癌组织中CXCL12/CXCR4的表达,结果显示胃癌组织中CXCL12/CXCR4表达水平明显高于正常胃黏膜($P<0.05$),32例淋巴结转移

癌组织中CXCL12/CXCR4蛋白表达高于原发癌,表明CXCL12/CXCR4可能在胃癌淋巴结转移过程中发挥重要作用。

胃癌细胞生长的原因可能与以下几个因素有关: (1)CXCL12与配体SDF-1结合导致G蛋白结构改变,激活MAPK、ERK1/2和SAPK/JNK通路等。目前研究发现SDF-1激活ERK-1/2和Akt信号通路,降解胶原纤维,破坏基底膜,减少肿瘤细胞的凋亡,促进细胞增殖^[27]; (2)SDF-1增加肿瘤细胞内增殖细胞核抗原的同时,下调裂解的caspase-3并抑制凋亡^[31]; (3)促进新生血管形成,是促进肿瘤细胞增殖和生长的主要因素之一^[32]; (4)CXCL12能促进胃癌细胞生成和分泌基质金属蛋白酶9(matrix metalloproteinases, MMP9),使肿瘤细胞易于跨膜迁移,促进VEGF的分泌,促进肿瘤细胞穿过血管基底膜,导致肿瘤细胞侵袭力增强^[33]。

本研究检测3组肿瘤CXCR4蛋白表达, Western blot法检测显示, GC-C-shRNA组与SGC-7901组、PRNA组相比, CXCR4蛋白表达明显降低; 免疫组织化学方法检测显示, GC-C-shRNA组CXCR4蛋白阳性细胞表达率及强度明显低于SGC-7901组和PRNA组($P<0.05$)。推测GC-C基因可能通过上调CXCR4参与胃癌的发生、发展, GC-C与CXCL12-CXCR4生物轴相互作用可能存在交叉对话(cross-talk), 但具体机制尚不完全清楚, 有待进一步深入探讨。

总之, GC-C基因沉默的胃腺癌细胞生长速度减慢, 异形性及恶性程度降低; GC-C基因可能通过上调CXCR4的表达而影响胃腺癌的生物行为, 为研究GC-C基因在体内的作用机制提供了新的思路和方法; GC-C基因有望成为胃癌基因治疗的新的分子靶点。

4 参考文献

- 1 Yang L. Incidence and mortality of gastric cancer in China. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 17-20
- 2 Yuasa N, Nimura Y. Survival after surgical treatment of early gastric cancer, surgical techniques, and long-term survival. *Langenbecks Arch Surg* 2005; 390: 286-293
- 3 上海市早期胃癌临床协作组. 上海市不同等级10个医疗机构早期胃癌的筛选结果比较. *中华消化内镜杂志* 2007; 24: 19-22
- 4 Correa P. A human model of gastric carcinogenesis. *Cancer Res* 1988; 48: 3554-3560
- 5 Jones PA, Baylin SB. The epigenomics of cancer. *Cell* 2007; 128: 683-692
- 6 Singh S, Sadanandam A, Singh RK. Chemokines in tumor angiogenesis and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 2007; 26: 453-467
- 7 孙梯业, 赵永亮, 颜伟, 石彦, 曾冬竹, 余佩武. CXCR4在VEGF-C介导的胃癌淋巴道转移中的作用. *第三军医大学学报* 2008; 30: 161-165
- 8 张健锋, 印红军, 张弘, 朱惠君, 毛振彪. 稳定干扰鸟苷酸环化酶C基因表达的人胃腺癌细胞株的筛选和建立. *胃肠病学* 2011; 16: 429-431
- 9 邢传平, 刘斌, 董亮. 免疫组织化学标记结果的判断方法. *中华病理学杂志* 2001; 30: 318
- 10 Kaupp UB, Seifert R. Cyclic nucleotide-gated ion channels. *Physiol Rev* 2002; 82: 769-824
- 11 Münzel T, Feil R, Mülsch A, Lohmann SM, Hofmann F, Walter U. Physiology and pathophysiology of vascular signaling controlled by guanosine 3',5'-cyclic monophosphate-dependent protein kinase [corrected]. *Circulation* 2003; 108: 2172-2183
- 12 Rybalkin SD, Yan C, Bornfeldt KE, Beavo JA. Cyclic GMP phosphodiesterases and regulation of smooth muscle function. *Circ Res* 2003; 93: 280-291
- 13 Park J, Schulz S, Haaf J, Kairys JC, Waldman SA. Ectopic expression of guanylyl cyclase C in adenocarcinomas of the esophagus and stomach. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002; 11: 739-744
- 14 Birbe R, Palazzo JP, Walters R, Weinberg D, Schulz S, Waldman SA. Guanylyl cyclase C is a marker of intestinal metaplasia, dysplasia, and adenocarcinoma of the gastrointestinal tract. *Hum Pathol* 2005; 36: 170-179
- 15 Park J, Schulz S, Waldman SA. Intestine-specific activity of the human guanylyl cyclase C promoter is regulated by Cdx2. *Gastroenterology* 2000; 119: 89-96
- 16 毛振彪, 许钟, 张健锋, 朱慧君, 章建国, 潘正平. 鸟苷酸环化酶C和尾型同源盒转录因子2在胃癌及癌前病变组织中的表达及意义. *中华消化杂志* 2008; 28: 673-677
- 17 Debruyne PR, Witek M, Gong L, Birbe R, Chervoneva I, Jin T, Domon-Cell C, Palazzo JP, Freund JN, Li P, Pitari GM, Schulz S, Waldman SA. Bile acids induce ectopic expression of intestinal guanylyl cyclase C Through nuclear factor-kappaB and Cdx2 in human esophageal cells. *Gastroenterology* 2006; 130: 1191-1206
- 18 Mao ZB, Zhang JF, Xu Z, Zhu HJ, Zhang JG, Pan ZP, Xiao F, Yang JL. Ectopic expression of guanylyl cyclase C in gastric cancer as a potential biomarker and therapeutic target. *J Dig Dis* 2009; 10: 272-285
- 19 Schulz S, Hyslop T, Haaf J, Bonaccorso C, Nielsen K, Witek ME, Birbe R, Palazzo J, Weinberg D, Waldman SA. A validated quantitative assay to detect occult micrometastases by reverse transcriptase-polymerase chain reaction of guanylyl cyclase C in patients with colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 4545-4552
- 20 Witek ME, Nielsen K, Walters R, Hyslop T, Palazzo J, Schulz S, Waldman SA. The putative tumor suppressor Cdx2 is overexpressed by human colorectal adenocarcinomas. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 8549-8556
- 21 Zhang JF, Mao ZB, Li ZL, Xue SM, Zhu HJ, Zhang H, Ni RZ. Ectopic expression of guanylyl cyclase C and endogenous ligand guanylin correlates significantly with Helicobacter pylori infection in gastric carcinogenesis. *Med Oncol* 2011 Oct 5. [Epub ahead of print]
- 22 Kryczek I, Wei S, Keller E, Liu R, Zou W. Stromaderived factor (SDF-1/CXCL12) and human tumor pathogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007; 292: C987-C995
- 23 Yasumoto K, Koizumi K, Kawashima A, Saitoh Y, Arita Y, Shinohara K, Minami T, Nakayama T, Sak-

- urai H, Takahashi Y, Yoshie O, Saiki I. Role of the CXCL12/CXCR4 axis in peritoneal carcinomatosis of gastric cancer. *Cancer Res* 2006; 66: 2181-2187
- 24 Horuk R. Chemokine receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 2001; 12: 313-335
- 25 Scotton CJ, Wilson JL, Milliken D, Stamp G, Balkwill FR. Epithelial cancer cell migration: a role for chemokine receptors? *Cancer Res* 2001; 61: 4961-4965
- 26 Oonakahara K, Matsuyama W, Higashimoto I, Kawabata M, Arimura K, Osame M. Stromal-derived factor-1alpha/CXCL12-CXCR 4 axis is involved in the dissemination of NSCLC cells into pleural space. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004; 30: 671-677
- 27 Brand S, Dambacher J, Beigel F, Olszak T, Diebold J, Otte JM, Göke B, Eichhorst ST. CXCR4 and CXCL12 are inversely expressed in colorectal cancer cells and modulate cancer cell migration, invasion and MMP-9 activation. *Exp Cell Res* 2005; 310: 117-130
- 28 Luo Y, Cai J, Xue H, Miura T, Rao MS. Functional SDF1 alpha/CXCR4 signaling in the developing spinal cord. *J Neurochem* 2005; 93: 452-462
- 29 Woo IS, Hong SH, Byun JH, Kang JH, Jeon HM, Choi MG. Circulating stromal cell derived factor-1alpha (SDF-1alpha) is predictive of distant metastasis in gastric carcinoma. *Cancer Invest* 2008; 26: 256-261
- 30 马向涛, 余力伟, 王杉, 杜如昱, 崔志荣. 趋化因子受体 CXCR4/CXCL12信号转导通路与胃癌淋巴结转移关系的研究. *中国肿瘤临床* 2007; 34: 544-546, 549
- 31 Kollmar O, Rupertus K, Scheuer C, Junker B, Tilton B, Schilling MK, Menger MD. Stromal cell-derived factor-1 promotes cell migration and tumor growth of colorectal metastasis. *Neoplasia* 2007; 9: 862-870
- 32 Salvucci O, Yao L, Villalba S, Sajewicz A, Pittaluga S, Tosato G. Regulation of endothelial cell branching morphogenesis by endogenous chemokine stromal-derived factor-1. *Blood* 2002; 99: 2703-2711
- 33 陈治军, 刘君炎. CXCL12促进人胃癌AGS细胞体外侵袭及其机制研究. *咸宁医学院学报* 2008; 22: 290-293

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

《世界华人消化杂志》在编委、作者和读者的支持下, 期刊学术水平稳步提升, 编校质量稳定, 再次被北京大学图书馆《中文核心期刊要目总览》(2011年版)收录。在此, 向关心、支持《世界华人消化杂志》的编委、作者和读者, 表示衷心的感谢! (编辑部主任: 李军亮 2012-03-08)。

sICAM-1和GPC-3 mRNA对肝癌诊断与转移监测的临床价值

姚敏, 杨君伶, 蔚丹丹, 严晓娣, 陈洁, 姚登福

姚敏, 南通大学医学院免疫学教研室 江苏省南通市 226001
杨君伶, 蔚丹丹, 严晓娣, 陈洁, 姚登福, 南通大学附属医院
临床医学研究中心 江苏省南通市 226001
姚敏, 医学博士, 副教授, 主要从事感染、免疫与肿瘤的研究。
南通市社会发展基金资助项目, No. S2010039, No. SH2011012
江苏省卫生科技基金资助项目, No. H2009025
江苏省高校优势学科建设(PADA)基金资助项目
作者贡献分布: 此课题由杨君伶与姚敏设计, 且二人对本文所作
贡献均等; 研究过程由蔚丹丹、严晓娣及陈洁操作完成; 数据分
析由姚敏与杨君伶完成; 论文写作由姚登福完成。
通讯作者: 姚登福, 教授, 226001, 江苏省南通市西寺路20号, 南
通大学附属医院临床医学研究中心. yaodf@ahnmc.com
电话: 0513-85052297
收稿日期: 2012-04-28 修回日期: 2012-06-07
接受日期: 2012-06-30 在线出版日期: 2012-07-28

Clinical significance of circulating sICAM-1 and GPC-3 mRNA expression in the diagnosis and prognostic evaluation of hepatocellular carcinoma

Min Yao, Jun-Ling Yang, Dan-Dan Wei, Xiao-Di Yan, Jie Chen, Deng-Fu Yao

Min Yao, Department of Immunology, Medical School of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China
Jun-Ling Yang, Dan-Dan Wei, Xiao-Di Yan, Jie Chen, Deng-Fu Yao, Research Center of Clinical Medicine, the Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China
Supported by: the Social Development Foundation of Nantong, Nos. S2010039 and SH2011012; the Foundation of Department of Jiangsu Health and Technology, No. H2009025; and the Priority Academic Program Development (PAPD) of Jiangsu Higher Education Institutions
Correspondence to: Deng-Fu Yao, Professor, Research Center of Clinical Medicine, the Affiliated Hospital of Nantong University, 20 Xisi Road, Nantong 226001, Jiangsu Province, China. yaodf@ahnmc.com
Received: 2012-04-28 Revised: 2012-06-07
Accepted: 2012-06-30 Published online: 2012-07-28

Abstract

AIM: To quantitatively detect the levels of circulating soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1) and glypican-3 (GPC-3) mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) in patients with liver diseases for exploring their significance in the diagnosis and prognostic evaluation for hepatocellular carcinoma (HCC).

noma (HCC).

METHODS: Total RNA was extracted from circulating PBMCs collected from patients with liver diseases. GPC-3 cDNA was synthesized by reverse transcription and amplified by fluorescent quantitative PCR. The levels of circulating ICAM-1 were quantitatively detected by enzyme-linked immunosorbent assay.

RESULTS: The levels of sICAM-1 were increasing during the development of liver diseases, significantly higher in HCC patients than in those with liver cirrhosis ($t = 3.184$, $P = 0.002$) or chronic hepatitis ($t = 3.962$, $P < 0.001$). sICAM-1 levels were significantly associated with periportal cancerous embolus ($t = 2.941$, $P = 0.005$) and extrahepatic metastasis ($t = 3.282$, $P = 0.002$), but not with patients' age, sex, AFP level, HBsAg positivity, or tumor size. The positive expression of GPC-3 mRNA in PBMCs was found only in HCC patients (70.9%, 39 of 55), and not in patients with liver cirrhosis, chronic hepatitis, metastatic liver cancer, non-liver tumors, or normal controls ($\chi^2 = 26.773$, $P < 0.001$). The expression of GPC-3 mRNA in PBMCs was associated with HBV infection ($\chi^2 = 14.601$, $P < 0.001$), TNM stage ($\chi^2 = 17.732$, $P < 0.001$), periportal cancerous embolus, and extrahepatic metastasis ($\chi^2 = 22.271$, $P < 0.001$), and not with tumor size, tumor number, AFP level or differentiation degree. Combined detection of GPC-3 mRNA and serum AFP level could improve the detection rate of HCC.

CONCLUSION: Detection of circulating sICAM-1 and GPC-3 mRNA in PBMCs could be used for the diagnosis and metastasis monitoring of HCC, especially in AFP-negative patients with HCC.

Key Words: Hepatocellular carcinoma; Glypican-3 mRNA; Soluble intercellular adhesion molecule-1; Diagnosis; Metastasis

Yao M, Yang JL, Wei DD, Yan XD, Chen J, Yao DF. Clinical significance of circulating sICAM-1 and GPC-3 mRNA expression in the diagnosis and prognostic evaluation of hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren*

■背景资料

肝细胞癌(HCC)为血供丰富、传统疗法易耐受、术后易复发、预后极差的高度恶性实体瘤。肝癌虽然诊治进展研究较快,但其转移复发仍是临床上HCC防治的难题,术后转移复发监测仍是肝癌防治研究的热点。

■同行评议者

唐南洪, 教授, 福建医科大学附属协和医院肝胆外科研究所

■研究前沿

随着基因组学、蛋白组学、转录组学等多种“组学”技术的发展,与肝细胞恶性转化相关的分子如肝癌特异性蛋白被发现,肝癌相关基因转录水平的检测可用于肝癌微小转移的临床诊断。

Xiaohua Zazhi 2012; 20(21): 1927-1932

摘要

目的: 定量分析肝病患者血可溶性细胞间粘附分子-1(sICAM-1)浓度和外周血单核细胞磷脂酰肌醇蛋白多糖-3(GPC-3)mRNA, 探讨对肝癌(HCC)诊断与预后的价值。

方法: 收集住院肝病患者外周血, 分离单核细胞, 制备总RNA, 经逆转录合成GPC-3 cDNA, 以荧光定量PCR扩增; 并以酶联免疫吸附法(ELISA)定量分析血ICAM-1水平。

结果: 肝病发展过程中血ICAM-1表达呈梯度增加, HCC患者血ICAM-1表达显著高于肝硬化($t = 3.184, P = 0.002$)和慢性肝炎患者($t = 3.962, P < 0.001$), 与伴门脉癌栓($t = 2.941, P = 0.005$)及肝外转移($t = 3.282, P = 0.002$)明显相关, 与患者年龄、性别、HBsAg阳性与否、AFP浓度及肿瘤大小间未见明显相关。GPC-3 mRNA阳性仅见肝癌患者(70.9%); 肝硬化、慢性肝炎患者及正常对照组中未检出($\chi^2 = 26.773, P < 0.001$)。GPC-3 mRNA阳性表达与HBsAg阳性($\chi^2 = 14.601, P < 0.001$)、肝癌TNM分期($\chi^2 = 17.732, P < 0.001$)、伴门脉癌栓及肝外转移($\chi^2 = 22.271, P < 0.001$)显著相关, 与瘤体直径、数目、AFP浓度及分化程度未见明显相关; 两者可互补诊断, 提高诊断肝癌阳性率。

结论: sICAM-1和GPC-3 mRNA检测是肝癌诊断和转移监测的良好标志物, 且对AFP阴性肝癌具有互补诊断价值。

关键词: 肝细胞癌; 磷脂酰肌醇蛋白多糖-3信使核糖核酸; 可溶性细胞间粘附分子-1; 诊断; 转移

姚敏, 杨君伶, 蔚丹丹, 严晓娣, 陈洁, 姚登福. sICAM-1和GPC-3 mRNA对肝癌诊断与转移监测的临床价值. 世界华人消化杂志 2012; 20(21): 1927-1932

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1927.asp>

0 引言

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是一种血供丰富、传统疗法易耐受、预后极差的高度恶性实体瘤^[1-3]。虽然HCC诊治进展较快, 但他的转移复发仍是临床上HCC防治的难题。HCC侵袭和转移是肝癌治疗失败和患者致死的主要原因^[4,5], 肝癌细胞脱落、侵入基质、进入脉管系统、瘤栓形成、在继发组织器官定位生长及侵袭的多步骤复杂生物学过程中, 多种机制参与转移调控^[6,7], 如癌基因表达上调、抑癌基因

失活、免疫基因失调、癌细胞间黏附作用丧失、新生血管形成、蛋白水解酶合成、细胞迁移能力增强、癌细胞和基底膜黏附等, 都是促进HCC转移复发的重要因素^[8]。肝癌的预后取决于早期诊断和是否转移。本文收集肝病患者外周血标本, 定量检测了磷脂酰基醇蛋白多糖-3(glypican-3, GPC-3)mRNA和可溶性细胞间粘附分子(soluble intercellular adhesion molecule-1, sICAM-1)浓度, 分析其临床病理学特征, 探讨对肝癌诊断和转移监测中的临床价值。

1 材料和方法

1.1 材料 收取南通大学附属医院2010-2011年HCC、肝硬化、肝炎正常人新鲜抗凝血5 mL, 包括肝癌患者55例(男46例, 女9例), 平均年龄57.5岁, 经临床、AFP、影像学(B超、CT或MRI检查)和/或病理学确诊; 肝硬化患者20例(男10例, 女10例), 平均年龄55.4岁; 慢性肝炎患者20例(男14例, 女6例), 平均年龄47.5岁; 健康对照20例(男10例, 女10例), 平均年龄53.1岁。所有病例均有完整病理诊断、住院记录和随访资料, 并按全国肝癌防治协作组制定的标准核实诊断^[9]。

1.2 方法

1.2.1 单核细胞分离与总RNA制备: 采用淋巴细胞分离液(Cedarlane, 加拿大)分离外周血单核细胞。抗凝血于2 h内, 以淋巴细胞分离液及密度梯度离心法分离有核细胞, 经生理盐水洗涤2次后进行有核细胞计数。细胞或肝组织50 mg置于无RNAase匀浆器中, 加入TRIzol(MRC, 美国)1.0 mL匀浆2 min; 制备总RNA, 最后加入TE缓冲液100 μ L。经紫外分光扫描鉴定已纯化的RNA未受到污染或降解, 并以紫外分光光度计定量总RNA浓度, 置于-85 $^{\circ}$ C保存备用。

1.2.2 cDNA合成及引物设计: 取总RNA 1.0 μ g及cDNA合成试剂盒(Fermentas, 立陶宛), 经随机引物和逆转录酶合成GPC-3 cDNA。参照文献GPC-3序列, 设计引物并由上海英骏公司(Invitrogen, 美国)合成。GPC-3上游引物为5'-TGCCTGATTACGCCTTG GAC-3'(nt 757-776, GPC-3P1), 下游引物5'-CCTAGTGACTTG-CAGTGACTTG-3'(nt 857-878, GPC-3P2), 大小122 bp; GAPDH内参引物: 上游5'-CACTGGC GTCTTCACCACCAT-3'(nt 396-416), 下游5'-GTGCAGGAGGCATTGCTGAT-3'(nt 541-560), 扩增产物大小165 bp。

1.2.3 GPC-3 mRNA扩增: cDNA合成后, 进行巢

表 1 肝癌及对照组患者的临床资料

分组	n	男/女	年龄(岁)	HBsAg(+/-)	AFP(μg/L)		
					≤20	21-399	≥400
肝癌	55	46/9	41-81	39/16	12	18	25
肝硬化	20	10/10	20-82	14/6	16	4	0
慢性肝炎	20	14/6	18-80	16/4	17	3	0
正常对照	20	10/10	40-69	0/30	20	0	0

■ 相关报道

Yao等以肝细胞发生恶性转化的大鼠为模型, 动态观察了磷脂酰基醇蛋白多糖-3(GPC-3) mRNA和GPC-3的表达与改变, 发现GPC-3具有癌胚性, 与肝细胞的恶性转化显著相关, 是肝癌早期诊断的特异性生物标志物。

式PCR. 第一阶段PCR反应体系(25 μL): 1 μL cDNA(0.1 μg/μL); 外部引物P1和P2各0.5 μL(20 μmol/L); Premix Taq 12.5 μL, 加双蒸水至2 μL. 扩增条件: 94 °C预变性5 min; 94 °C变性25 s, 55 °C退火30 s, 72 °C延伸90 s, 30个循环; 72 °C延伸10 min, 4 °C保存. 第二阶段PCR反应体系(25 μL): 第一阶段PCR产物(稀释100倍)1 μL; 内部引物P3和P4各0.5 μL(20 mmol/L); PreMix Taq 12.5 μL, 加双蒸水至25 μL. 扩增条件: 94 °C预变性5 min; 94 °C变性25 s, 55 °C退火30 s, 72 °C延伸90 s, 30个循环; 72 °C延伸10 min, 4 °C保存.

1.2.4 GPC-3 mRNA定量分析: 以染料法定量PCR反应体系: SYBR Premix Ex Taq™ 12.5 μL, PCR正向引物(10 μmol/L)和反向引物(10 μmol/L)各0.5 μL, GPC-3 cDNA 2 μL, 双蒸水9.5 μL. 反应条件: 95 °C 2 min; 95 °C 12 s, 60 °C 40 s, 扩增40个循环.

1.2.5 GPC-3 mRNA相对表达率计算: 以GPC-3和GAPDH cDNA的Ct值进行相对定量: $\Delta Ct = Ct(\text{目的基因}) - Ct(\text{内参基因})$, 相对表达量 = $2^{-\Delta Ct}$; $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{实验组}) - \Delta Ct(\text{对照组平均值})$, 相对表达率 = $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

1.2.6 DNA测序分析: 取含目的DNA凝胶, 以Montage™ DNA装置提取DNA(4 °C离心, 9 000 r/min离心10 min), 以DYEnamic ET Dye末端循环测序试剂盒制备测序标本. 反应体系: 待测DNA 0.2-2.0 μg, 2 μmol/L引物(上游引物或下游引物)2.5 μL, 测序混合试剂8.0 μL, 加双蒸水至20 μL. 扩增条件: 95 °C预变性30 s; 95 °C变性20 s, 50 °C退火15 s, 60 °C延伸1 min, 30个循环, 15 °C保存备用. 产物经醋酸铵、乙醇沉淀, 即可在MegaBACE DNA测序仪上检测DNA序列, 以MegaBACE系统软件(Version 3.0)分析DNA序列, 并与Gene Bank中基因源序列进行比对.

1.2.7 sICAM-1测定及结果计算: 肝病患者按临床诊断资料分为肝癌、肝硬化及正常对照组. 在酶标包被板上待测样品孔中先加已用样品稀释液

稀释的样品100 μL, 酶标板加上盖, 37 °C反应90 min. 甩去酶标板内液体, 用吸水纸拍干, 将准备好的生物素抗人sICAM-1抗体工作液100 μL加入酶标板(空白显色孔除外), 37 °C反应60 min. 洗涤液洗涤3次, 每次浸泡1 min左右, 每孔加入ABC工作液100 μL(空白显色孔除外), 37 °C温育30 min. 洗涤液洗涤3次, 每次浸泡1-2 min, 每孔加入显色液90 μL, 37 °C避光反应17-22 min. 取出酶标板, 每孔加终止液100 μL终止反应, 此时蓝色立转黄色. 在酶标仪上, 以450 nm波长检测其吸光度(A)值. 检测前2 h内配制标准品, 浓度分别为: 10.000、5.000、2.500、1.250、0.625、0.313、0.156及0.000 ng/L, 标准品孔中加入稀释好的标准品100 μL. 参照以上方法同时检测, 将检测的A值和对应的标准浓度绘制标准曲线, 计算样品中sICAM-1的浓度.

统计学处理 计量资料以mean±SD表示, 以t检验分析; 计数资料以 χ^2 检验分析, 以 $P<0.05$ 表示有显著性差异.

2 结果

2.1 肝病患者HBV感染及AFP浓度 所采集的外周血标本, 各组患者的年龄、HBV感染及AFP浓度等临床资料见表1. 肝癌和肝硬化患者按Child-pugh A、B和C分类, 分别为30、19、6例和11、6、3例. 慢性肝病患者中69例HBsAg阳性(72.6%), 肝癌患者中25例血AFP浓度≥400 μg/L(45.5%).

2.2 GPC-3 mRNA扩增与测序 肝病患者血GPC-3 mRNA和GAPDH基因片段的扩增图谱见图1A. 取PCR产物测序结果显示, 肝癌及癌周组织、外周血PBMC中GPC-3 mRNA扩增片段的序列(图1B)均与Gene Bank中GPC-3基因相应的源序列完全一致, 证实所扩增基因即为GPC-3基因片段.

2.3 肝病患者外周血GPC-3 mRNA及sICAM-1表达水平 55例肝细胞癌者血中39例阳性(70.9%, 表2), 在肝硬化、慢性肝炎及健康对照组中未检出阳性例($P<0.001$). GPC-3 mRNA在26例不伴肝

■应用要点

血行转移是肝癌的主要转移途径, GPC-3 mRNA检出率和sICAM-1异常与肝癌的TNM分期、伴门脉癌栓和肝外转移有关, 两者检测是监测肝癌转移或术后复发的可靠分子标志。

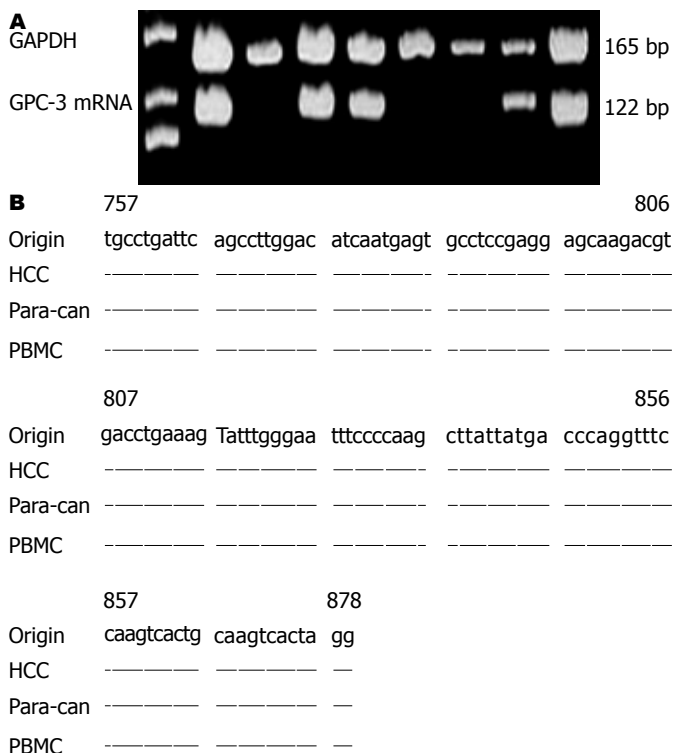


图 1 GPC-3 mRNA扩增图谱与测序分析. A: DNA分子量与基因扩增片段电泳; B: 基因片段序列分析.

表 2 肝病患者外周血GPC-3 mRNA及sICAM-1表达水平 (mean ± SD)

分组	n	GPC-3 mRNA(%)	χ^2 值	P值	sICAM-1(μ g/L)	t值	P值
肝细胞癌	55	70.9	—	—	140.0 ± 31.3	—	—
肝硬化	20	0	26.773	<0.001	114.8 ± 27.3	3.184	0.002
慢性肝炎	20	0	26.773	<0.001	107.0 ± 28.0	3.962	<0.001
正常对照	20	0	26.773	<0.001	57.5 ± 11.3	11.476	<0.001

外转移组阳性率38.46%, GPC-3 mRNA相对表达量为 0.0036 ± 0.0013 ; 29例肝癌伴肝外转移组阳性率为100%, GPC-3 mRNA相对表达量为 0.0277 ± 0.0003 , 两组相对表达量平均相差7倍以上($t = 3.190$, $P = 0.003$). 健康对照组sICAM-1表达水平低于慢性肝炎($t = 7.331$, $P < 0.001$)、肝硬化($t = 8.673$, $P < 0.001$)和肝癌($t = 11.476$, $P < 0.001$).

2.4 sICAM-1和GPC-3 mRNA表达的临床病理学特征 肝癌患者GPC-3 mRNA检出率与TNM分期($\chi^2 = 17.732$, $P < 0.001$), III-IV肝癌(91.2%)显著高于I-II肝癌(38.1%); 与HBV相关($\chi^2 = 14.601$, $P < 0.001$), HBsAg阳性肝癌(87.2%)显著高于HBsAg阴性肝癌(31.3%); 肝癌患者伴有门脉癌栓者全数异常(100%)显著高于不伴有门脉癌栓者(20%)及有无肝外转移($\chi^2 = 22.271$, $P < 0.001$)密切相关, 而与性别、年龄、分化程度、AFP浓度和肿瘤大小间未见明显相关(表3), 肝癌患者sICAM-1浓度与肝癌TNM分期($t = 2.750$, $P = 0.008$)、门脉癌栓($t = 2.941$, $P = 0.005$)及肝外转

移($t = 3.282$, $P = 0.002$)显著相关.

2.5 sICAM-1、GPC-3 mRNA和AFP对肝癌的诊断价值 肝癌患者sICAM-1、GPC-3 mRNA和AFP异常表达, 对肝癌的诊断价值见表4. 如以sICAM-1 $>115 \mu$ g/L和AFP $>50 \mu$ g/L为界, 对肝癌的阳性率为74.5%和63.6%, 但在良性肝病有30%左右的假阳性; 外周血GPC-3 mRNA仅见于肝癌患者(70.9%). 从表4可见3种标志物对肝癌诊断率均在70%左右, 如将sICAM-1 $>115 \mu$ g/L、GPC-3 mRNA阳性和AFP $>50 \mu$ g/L联合诊断肝癌, 其综合评价见表5. 若以GPC-3 mRNA和AFP联合, 阳性率为87.2%(48/55); 若以sICAM-1、GPC-3 mRNA和AFP联检, 阳性率为92.7%(51/55). GPC-3 mRNA、sICAM-1和与AFP分析, 对肝癌具有互补诊断价值.

3 讨论

AFP诊断肝癌虽被广泛应用, 但单AFP难以满足临床需要, 且敏感性和特异性均难令人满

表 3 肝癌sICAM-1和GPC-3 mRNA表达的病理学特征 (mean ± SD)

分组	n	GPC-3 mRNA(n)		sICAM-1(μg/L)
		阳性	阴性	
TNM分期				
I-II	21	8	13	125.6 ± 32.4
III-IV	34	31 ^b	3	148.3 ± 28.0 ^b
分化程度				
高	16	6	10	120.3 ± 20.3
中	25	15	10	155.0 ± 38.5
低	14	8	6	134.1 ± 30.1
肿瘤大小				
≥5 cm	30	21	9	132.2 ± 31.5
<5 cm	25	18	7	140.9 ± 29.8
AFP(μg/L)				
≥400	25	18	7	137.6 ± 29.1
<400	30	21	9	142.5 ± 34.0
HBsAg				
阳性	39	34 ^b	5	140.7 ± 30.6
阴性	16	5	11	136.0 ± 37.1
门脉癌栓				
有	35	35 ^b	0	153.4 ± 28.7 ^b
无	20	4	16	128.5 ± 32.7
肝内外转移				
有	29	29 ^b	0	157.1 ± 27.2 ^b
无	26	10	16	131.7 ± 30.2

^bP<0.01 vs 对应组。

表 4 外周血sICAM-1、GPC-3 mRNA和AFP对肝癌的诊断价值n (%)

分组	n	sICAM-1 (>115 μg/L)	GPC-3 mRNA	AFP (>50 μg/L)	总阳性率
肝癌	55	41(74.5)	39(70.9)	35(63.6)	51(92.7)
肝硬化	20	5(25.0) ^b	0(0.0) ^b	3(15.0) ^b	7(35.0) ^b
慢性肝炎	20	6(30.0) ^b	0(0.0) ^b	2(10.0) ^b	6(30.0) ^b
正常对照	20	0(0.0) ^b	0(0.0) ^b	0(0.0) ^b	0(0.0) ^b

^bP<0.01 vs 肝癌组。

意^[10,11]。随着基因组学、蛋白组学、转录组学等多种“组学”技术的发展,越来越多与肝细胞恶性转化相关的分子如肝癌特异性蛋白被发现,可改进肝癌诊断特异性;肝癌相关基因转录异常,可监测肝癌微小转移^[12,13]。早期诊断与术后转移复发监测,仍是肝癌防治研究的热点^[14]。研究发现GPC-3和ICAM-1过表达与肝癌发生发展关系密切^[15,16]。所以,定量检测肝病患者血GPC-3 mRNA和sICAM-1浓度,可探讨其临床病理学特征和在肝癌诊断和转移监测中的临床价值。

表 5 sICAM-1、GPC-3 mRNA和AFP联合诊断肝癌的综合评价 (%)

	sICAM-1 (>115 μg/L)	GPC-3 mRNA(阳性)	AFP>50 μg/L	三者联合
灵敏度	74.5	70.9	63.6	92.7
特异性	72.5	100	87.5	67.5
真阳性	76.7	100	87.5	79.6
真阴性	67.4	71.4	63.6	87.0
准确度	73.6	83.1	73.6	82.1

GPC-3基因位于人染色体X26.10,由8个外显子组成,启动子区含多个转录因子结合位点,核苷酸为2 130 bp,编码580个氨基酸。在HCC发生、发展过程中,GPC-3基因被再次激活。GPC-3表达位于胞质和胞膜,癌旁定位于胞质^[17]。肝癌组织GPC-3表达强度高于癌旁和远癌组织^[18]。肝癌模型发现肝细胞GPC-3过表达与肝细胞恶性转化相关,是肝细胞恶性改变的早期事件^[5,19]。GPC-3过表达与基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMP)显著相关,抑制GPC-3可下调MMP的表达;GPC-3可致胞核/胞质β-catenin显著增高,进而与MMP及增殖信号结合,促进HCC进展^[20]。HCC患者中GPC-3 mRNA阳性率为70.9%,而在肝硬化、肝炎及正常对照组均未检出,提示GPC-3 mRNA是肝癌特异诊断的有用分子标志物。

分子结构为单链糖蛋白的粘附分子由723-748个氨基酸构成,胞浆区高度保守,肝病患者sICAM-1水平与肝细胞坏死严重程度和肝功能受损程度相关。正常肝细胞缺乏sICAM-1表达,仅在窦状隙内皮细胞和散在的炎症单核细胞上有ICAM-1微弱表达,肝病时表达增加。sICAM-1除介导粘附外,可从癌细胞表面脱落进入循环系统,可助癌细胞逃逸CTL和NK细胞监视,促进转移^[21]。肝癌患者sICAM-1水平能反映其病情进展及预后^[22]。sICAM-1、GPC-3 mRNA及AFP联合阳性率达92.7%,对AFP阴性肝癌具有互补诊断价值。

血行转移是肝癌的主要转移途径^[6,11],GPC-3 mRNA检出率与TNM分期、门脉癌栓、肝外转移有关。III-IV肝癌显著高于I-II肝癌;HBsAg阳性肝癌显著高于HBsAg阴性肝癌;肝癌患者伴有门脉癌栓者全数异常显著高于不伴有门脉癌栓者及肝外转移密切相关;sICAM-1浓度与肝癌TNM分期、门脉癌栓及肝外转移显著相关,sICAM-1和GPC-3 mRNA是监测肝癌转移或术

■名词解释

GPC-3基因:位于人染色体X26.10,由8个外显子组成,启动子区含多个转录因子结合位点,核苷酸为2 130 bp,编码580个氨基酸,在HCC发生发展过程中,GPC-3基因被再次激活,导致癌胚型的GPC-3过表达。

■同行评价

本研究旨在探讨 sICAM-1 和 GPC-3 mRNA 在肝癌诊断中的临床价值, 具有一定的科研意义。

后复发的可靠分子标志^[23]。肝癌早诊早治和术后复发监测, 可能是提高患者存活率的唯一途径。随着对肝细胞恶性转化关键信号通路的机制阐明, 多种具诊断特异性标志物的应用^[24,25], 将更有利于早期发现 AFP 阴性或低浓度肝癌, 为以分子标志为基础发病机制转化医学和分子靶向治疗研究奠定基础^[25-27]。

4 参考文献

- 1 Aravalli RN, Steer CJ, Cressman EN. Molecular mechanisms of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2008; 48: 2047-2063
- 2 Qian J, Yao D, Dong Z, Wu W, Qiu L, Yao N, Li S, Bian Y, Wang Z, Shi G. Characteristics of hepatic igf-ii expression and monitored levels of circulating igf-ii mRNA in metastasis of hepatocellular carcinoma. *Am J Clin Pathol* 2010; 134: 799-806
- 3 Zhou JY, Zhang L, Li L, Gu GY, Zhou YH, Chen JH. High hepatitis B virus load is associated with hepatocellular carcinomas development in Chinese chronic hepatitis B patients: a case control study. *Virol J* 2012; 9: 16
- 4 Qiao SS, Cui ZQ, Gong L, Han H, Chen PC, Guo LM, Yu X, Wei YH, Ha SA, Kim JW, Jin ZT, Li S, Peng JR, Leng XS. Simultaneous measurements of serum AFP, GPC-3 and HCCR for diagnosing hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology* 2011; 58: 1718-1724
- 5 Yao M, Yao DF, Bian YZ, Zhang CG, Qiu LW, Wu W, Sai WL, Yang JL, Zhang HJ. Oncofetal antigen glypican-3 as a promising early diagnostic marker for hepatocellular carcinoma. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2011; 10: 289-294
- 6 蔡荣耀, 黄志勇, 梁宾勇, 李开艳, 陈孝平. 原发性肝细胞癌根治术后肿瘤复发的影响因素及预后. *中华消化外科杂志* 2011; 10: 263-266
- 7 Helaly GF, Abou Shamaa LA. Influence of hepatitis C virus infection on circulating levels of sICAM-1 and VEGF in patients with hepatitis C and hepatocellular carcinoma (HCC) and their role in enhancing detection of HCC. *Egypt J Immunol* 2006; 13: 27-38
- 8 Moriyama M, Matsumura H, Shioda J, Aoki H, Nakamura H, Arakawa Y, Nirei K, Yamagami H, Kaneko M, Tanaka N, Arakawa Y. Measurement of human intercellular adhesion molecule 1 in the blood is useful for predicting the occurrence of hepatocellular carcinomas from chronic hepatitis C and liver cirrhosis. *Intervirolgy* 2006; 49: 327-338
- 9 中国抗癌协会肝癌专业委员会. 原发性肝癌的临床诊断与分期标准. *中华肝脏病杂志* 2001; 9: 324
- 10 Qin LX, Tang ZY. Recent progress in predictive biomarkers for metastatic recurrence of human hepatocellular carcinoma: a review of the literature. *J Cancer Res Clin Oncol* 2004; 130: 497-513
- 11 樊嘉, 史颖弘. 肝癌复发和转移的新理念. *中华消化外科杂志* 2010; 9: 10-11
- 12 Jung CW, Song TJ, Lee KO, Choi SB, Kim WB, Suh SO, Kim YC, Choi SY. Characterization of hepatocellular carcinoma cell lines based on cell adhesion molecules. *Int J Mol Med* 2012; 29: 1158-1164
- 13 姚敏, 姚登福. 肝细胞恶性转化与肝癌诊断的特异性标志物. *中华肝脏病杂志* 2011; 19: 244-246
- 14 Whittaker S, Marais R, Zhu AX. The role of signaling pathways in the development and treatment of hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2010; 29: 4989-5005
- 15 Wang Y, Shen Z, Zhu Z, Han R, Huai M. Clinical values of AFP, GPC3 mRNA in peripheral blood for prediction of hepatocellular carcinoma recurrence following OLT: AFP, GPC3 mRNA for prediction of HCC. *Hepat Mon* 2011; 11: 195-199
- 16 Ho M. Advances in liver cancer antibody therapies: a focus on glypican-3 and mesothelin. *BioDrugs* 2011; 25: 275-284
- 17 Yang D, Yang J, Lu F, Li C, Yang J, Liang J. A new membrane re-anchored protein originating from GPC3 against hepatoma cells HepG2. *Mol Med Report* 2011; 4: 1067-1073
- 18 Ozkan H, Erdal H, Koçak E, Tutkak H, Karaeren Z, Yakut M, Köklü S. Diagnostic and prognostic role of serum glypican 3 in patients with hepatocellular carcinoma. *J Clin Lab Anal* 2011; 25: 350-353
- 19 Sun CK, Chua MS, He J, So SK. Suppression of glypican 3 inhibits growth of hepatocellular carcinoma cells through up-regulation of TGF- β 2. *Neoplasia* 2011; 13: 735-747
- 20 Nobuoka D, Motomura Y, Shirakawa H, Yoshikawa T, Kuronuma T, Takahashi M, Nakachi K, Ishii H, Furuse J, Gotohda N, Takahashi S, Nakagohri T, Konishi M, Kinoshita T, Komori H, Baba H, Fujiwara T, Nakatsura T. Radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma induces glypican-3 peptide-specific cytotoxic T lymphocytes. *Int J Oncol* 2012; 40: 63-70
- 21 Raskopf E, Gerceker S, Vogt A, Standop J, Sauerbruch T, Schmitz V. Plasminogen fragment K1-3 inhibits expression of adhesion molecules and experimental HCC recurrence in the liver. *Int J Colorectal Dis* 2009; 24: 837-844
- 22 O'Beirne J, Farzaneh F, Harrison PM. Generation of functional CD8+ T cells by human dendritic cells expressing glypican-3 epitopes. *J Exp Clin Cancer Res* 2010; 29: 48
- 23 Yao DF, Dong ZZ, Yao M. Specific molecular markers in hepatocellular carcinoma. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2007; 6: 241-247
- 24 Chan SL, Yeo W. Targeted therapy of hepatocellular carcinoma: present and future. *J Gastroenterol Hepatol* 2012; 27: 862-872
- 25 Kudo M. Molecular targeted therapy for hepatocellular carcinoma: bench to bedside. *Dig Dis* 2011; 29: 273-277
- 26 Tazi el M, Essadi I, M'rabti H, Touyar A, Errihani PH. Systemic treatment and targeted therapy in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *N Am J Med Sci* 2011; 3: 167-175
- 27 姚宁华, 姚登福, 钱静, 董志珍, 邱历伟, 蔚丹丹. miRNA 干扰质粒的构建及其对肝癌 HepG2 细胞 IGF-II 表达的抑制作用. *世界华人消化杂志* 2011; 19: 1015-1021

编辑 张姗姗 电编 鲁亚静

MRI评价肝脏铁过载的应用进展

宋晓丽, 赵俊功, 程英升

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

宋晓丽, 在读硕士, 主要从事腹部疾病的影像学诊断的研究。

作者贡献分布: 本文由宋晓丽完成; 赵俊功与程英升审核。

通讯作者: 赵俊功, 主任医师, 200233, 上海市宜山路600号, 上海交通大学附属第六人民医院放射科。

zhaojungong@yahoo.com.cn

电话: 021-64369181

收稿日期: 2012-05-04 修回日期: 2012-06-14

接受日期: 2012-06-30 在线出版日期: 2012-07-28

MRI evaluation of hepatic iron overload: Recent advances

Xiao-Li Song, Jun-Gong Zhao, Ying-Sheng Cheng

Xiao-Li Song, Jun-Gong Zhao, Ying-Sheng Cheng, Department of Radiology, Shanghai Sixth People's Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200233, China

Correspondence to: Jun-Gong Zhao, Chief Physician, Department of Radiology, Shanghai Sixth People's Hospital, Shanghai Jiaotong University, 600 Yishan Road, Shanghai 200233, China. zhaojungong@yahoo.com.cn

Received: 2012-05-04 Revised: 2012-06-14

Accepted: 2012-06-30 Published online: 2012-07-28

Abstract

Many studies show that hepatic iron overload has a close association with hepatitis, hepatic fibrosis, cirrhosis, and hepatic tumors. Methods currently used for detection of hepatic iron overload, such as plasma ferritin detection, liver biopsy, and superconducting quantum interface device, have some limitations. Improvement in software and hardware has enabled MRI to become a safe, noninvasive and accurate method for detecting hepatic iron overload. This article aims to summarize the performance and application of MRI in the evaluation of hepatic iron overload.

Key Words: Hepatic; Iron; Iron overload; Magnetic resonance imaging

Song XL, Zhao JG, Cheng YS. MRI evaluation of hepatic iron overload: Recent advances. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(21): 1933-1938

摘要

许多研究表明, 肝脏铁过载与肝炎、肝纤维化、肝硬化及肿瘤具有密切关系。目前检测

铁过载的方法, 如血浆铁蛋白检测、肝脏穿刺活检以及无创检查超导量子干涉仪等均具有一定的局限性。磁共振检查技术(magnetic resonance imaging, MRI)是目前公认的, 能够无创、安全、准确的检查肝脏铁含量的方法。本文对肝脏铁过载及MRI在肝脏铁过载中的应用进展进行综述。

关键词: 肝脏; 铁; 铁过载; 磁共振

宋晓丽, 赵俊功, 程英升. MRI评价肝脏铁过载的应用进展. 世界华人消化杂志 2012; 20(21): 1933-1938

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1933.asp>

0 引言

肝脏铁过载与肝炎、肝纤维化、肝硬化及肿瘤具有密切关系^[1-4]。目前检测肝铁过载的主要方法有血浆铁蛋白、肝穿刺活检技术以及超导量子干涉仪(superconducting quantum interface device, SQUIDS)^[5]等。血浆铁蛋白检测不能精确反映肝脏铁含量, 尤其是严重超载患者^[6]。肝穿刺活检虽是金标准, 但是作为一种有创检查, 会产生一定并发症。而SQUIDS设备特殊, 不能广泛应用于临床^[7], 故三者铁过载检测中的价值非常有限。利用肝脏内铁与磁敏感性弛豫呈线性关系, 对肝脏铁进行检测并量化的磁共振(magnetic resonance imaging, MRI)弛豫技术是一项无创、简便、安全、准确的检测肝铁过载的技术, 在临床应用中显示出巨大的潜力。这篇综述将总结肝脏铁过载以及MRI在肝脏铁过载的应用进展。

1 肝脏铁过载

1.1 正常铁代谢及铁代谢的调节 铁作为人体必需的微量元素, 广泛参与机体生命代谢活动, 如氧运输、电子传递、DNA及蛋白质的合成等。人体每天需要吸收1-2 mg外源性铁。人体铁代谢包括5个阶段: 吸收、转运、利用、储存和排泄^[8]。近端小肠是铁吸收的主要部位, 肝脏和网状内皮系统是铁储存的主要部位, 而铁的主要利用部位是骨髓。外源性铁分为非血红素铁和血红素铁, 小肠吸收两者的机制不同, 非血红素

■背景资料

肝脏铁过载与肝炎、肝纤维化、肝硬化及肿瘤具有密切关系, 目前监测铁过载的方法, 如血浆铁蛋白检测、肝脏穿刺活检以及无创检查超导量子干涉仪等均具有一定的局限性而应用受限。

■同行评议者

官泳松, 教授, 四川大学华西医院放射科

■ 研发前沿

磁共振成像技术(MRI)对肝脏铁过载具有无创、安全、简便、重复性好等特点,在临床应用中显示出巨大的潜力。

铁中的 Fe^{3+} 被十二指肠细胞色素b还原成 Fe^{2+} [9],然后在二价金属离子转移蛋白(divalent metal transport 1, DMT1)介导下进入肠黏膜细胞。而血红素铁是在血红素载体蛋白1的介导下进入黏膜细胞,在血红素氧化酶的作用下,游离的 Fe^{2+} 释放入非血红素铁池内。铁进入小肠黏膜细胞后,一部分以铁蛋白的形式储存在黏膜细胞内,另一部分被膜铁转运辅助蛋白氧化为 Fe^{3+} ,然后通过膜铁转运蛋白(ferroportin 1, FPN1)转移到血浆中[10]。FPN1广泛分布于机体多个组织,尤其是在十二指肠细胞、肝细胞单核巨噬细胞及胎盘的合体滋养层细胞等铁转运部位大量表达。

转铁蛋白结合铁是血液中铁的主要转运形式。铁进入血液后绝大部分与血浆中的转铁蛋白结合,经转铁蛋白-转铁蛋白受体(transferring receptor, TFR)系统转运首先通过门脉系统到达肝,继而转运到骨髓及其他需铁组织。血浆中的绝大部分铁经过内吞、酸化、释放和移位等步骤进入胞质,最终被细胞利用。剩余部分的铁以铁蛋白和含铁血黄素的形式储存于骨髓、肝和脾的单核巨噬细胞中,巨噬细胞内的铁可在FPN1作用下运出细胞进入血浆。铁主要随肠道上皮细胞、胆汁、泌尿生殖道、皮肤、汗液等排出,每天丢失总量约为1-2 mg。

由肝脏产生的富含半胱氨酸的抗菌多肽铁调素(hepcidin)[11]是一种调节组织铁储备及血清铁的主要激素,与血浆转铁蛋白饱和度呈正相关。FPN1是铁调素的靶分子,铁调素可与FPN1直接结合,导致FPN1内吞和降解,调节细胞内铁的外运[12]。当机体的铁水平增高时肝产生的铁调素增多,循环至小肠的铁调素结合肠上皮细胞膜的FPN1并使之降解,继而减少肠上皮细胞内的铁向血浆转运,因此吸收的铁大部分储存于肠上皮细胞内。在1-2 d内肠上皮细胞衰老脱离肠上皮,最后排除体外。在巨噬细胞中,铁调素通过调控FPN1的表达调节巨噬细胞铁的释放。

1.2 肝脏铁过载的原因及机制 在正常情况下,血浆的铁与转铁蛋白结合(由转铁蛋白受体1、转铁蛋白受体2和独立转铁蛋白受体参与),主要被运送至骨髓参与造血,少部分至肝脏。衰老的红细胞主要被脾脏的巨噬细胞吞噬,然后分解释放出铁,这部分铁再次被转铁蛋白摄取继续参与铁的再循环。肝脏过量的铁主要以铁蛋白的形式存在。也可被网状内皮系统的kuppfer细胞吞噬,以含铁血黄素形式沉积在网状内皮系统内[13]。或在肝细胞内以非转铁蛋白结合的血浆铁(non-

transferrin-bound plasma iron, NTBI)形式出现(当转铁蛋白的饱和度超过45%)[14,15]。NTBI的主要靶器官是肝脏、心脏和胰腺,他在DMT1和锌铁调控蛋白14(ZIP14)协助下以柠檬酸铁的形式被肝细胞摄取[16,17]。肝脏摄取NTBI不受肝细胞铁过载的下调,铁螯合剂去铁胺和去铁酮主要是针对NTBI摄取的抑制,而不是对作为储存形式NTBI的动员和清除[18]。

引起肝细胞内铁过载的疾病主要是原发性血色素沉着症等疾病,原发性血色素沉着症是使肠道铁吸收过多,导致肝脏以及其他器官铁过载[19]。骨髓增生异常综合征等疾病因骨髓不能有效造血,通过铁调素和FPN1使肠道的铁吸收增加[20]。另外反复大量输血可以加重网状内皮系统的负担,导致巨噬细胞吞噬的铁增加。骨髓的抑制治疗使得造血能力降低、铁的利用率降低[21]。这些均使转铁蛋白的饱和度增加,进而引起血浆及肝脏等器官的NTBI升高,最终导致组织器官铁过载。病毒性肝硬化、酒精性肝硬化、血管内容血等也能导致肝细胞内铁过载,但程度较轻。

1.3 肝脏铁过载的损伤机制及肝脏疾病 铁在生物体内表现出复杂多变的氧化、还原、磁性特征,可影响生物活性并产生一定的毒性。人体无主动排铁系统,长时间铁累积可致铁中毒。铁损伤肝细胞机制可能为:(1)铁催化剂增强自由基介导的氧化应激,产生有害自由基以及高反应羟基,加剧细胞色素P4502E(cytochrome P2E, CYP2E)诱导的氧化应激,导致肝细胞亚细胞膜磷脂过氧化反应,特别是对线粒体和微粒体膜产生的过氧化损伤[22];(2)通过干扰电子转移导致能量减少,并影响T细胞和Kuffer细胞的功能导致肝细胞损伤;(3)在氧化亚铁的氧化反应时,可以产生一些超铁或高铁活性基团,损伤溶酶体膜和线粒体,导致肝脏炎症反应和纤维化的形成[23,24];(4)铁还可以引起DNA的损伤促进肝脏肿瘤的发生[25]。肝脏铁过载可引起导致细胞、组织损伤[26],最终发展为引起肝纤维化、肝硬化乃至肝癌[27]。在我国肝硬化主要由乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)引发,Lustbader等[28]认为,含有大量铁的肝细胞容易被HBV感染,有利于病毒复制,铁与肝炎病毒具有协同毒性作用,影响慢性肝炎患者对干扰素的应答,影响肝炎的治疗效果。

2 MRI测量肝脏铁过载的应用

2.1 MRI测量肝脏铁过载的原理及方法 铁因有顺磁性,MRI检测组织铁是依赖于局部邻近氢质子

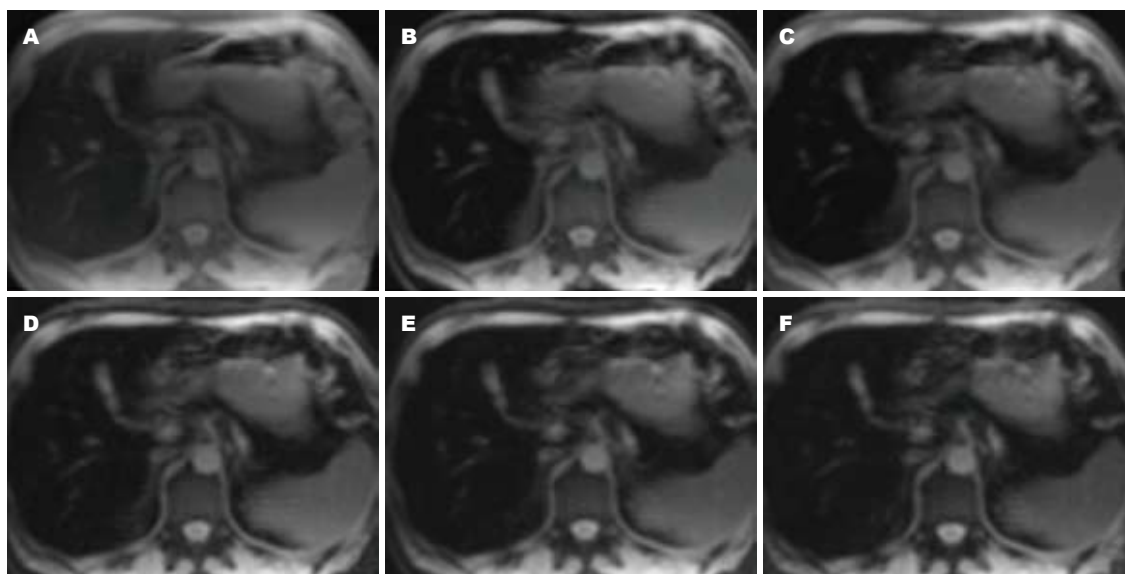


图1 诊断为骨髓异常增殖综合征5年的男性患者. 单次屏气多回波GRE序列: A-F的回波时间TE分别为1 ms, 2.5 ms, 3.6 ms, 4.8 ms, 5.9 ms, 7.1 ms. 随着回波时间的延长, 肝脏的信号不断降低, 可符合肝脏铁过载表现. 测得 T_2^* 约为0.9 ms, 血清铁蛋白浓度为3 170 mg/L, 均属于重度水平, 两者基本平行.

■应用要点

本文介绍并指出MRI技术已逐渐成为一种安全、有效检测肝脏铁含量的方法, 能够有效测量不同疾病中肝脏铁浓度, 对肝脏铁过载程度进行分级评估, 进而评估病情的发展以及评估肝脏铁过载整合治疗效果, 预防并发症的产生.

与顺磁性铁之间的相互作用对弛豫时间产生的影响. 人体内铁蛋白及含铁血黄素具有顺磁性强化作用, 使SE(spin echo)序列横向弛豫时间 T_2 和GRE(gradient recalled-echo)序列上的 T_2^* 缩短, 相对地弛豫率(R_2 或 R_2^*)增加^[29,30]. 随着回波时间的延长, 由于铁的顺磁性作用, 肝脏信号逐渐衰减(图1)^[31]. 多次屏气单次回波的快速SE序列和单次屏气多次回波的GRE序列是目前测量肝脏铁浓度(liver iron concentration, LIC)使用的主要序列, 通过快速SE序列和GRE序列分别得到回波弛豫时间 T_2 和 T_2^* , 进而得到弛豫率 $R_2(1/T_2)$ 和 $R_2^*(1/T_2^*)$. 利用 T_2^* 、 T_2 和铁浓度的负性关系实现对肝脏铁过载的评估及定量测量^[32]. T_2^* 和 T_2 的关系可以用公式 $1/T_2^* = 1/T_2 + 1/T_2'$ 来表达, T_2' 是由磁场不均匀引起的弛豫时间变化, 这也证明 T_2^* 对磁场不均匀更加敏感^[33]. 但是, 也有相关文献报道 R_2 和 R_2^* 肝脏铁过载测量方面具有相同敏感性, 测量结果与穿刺结果的相关性基本平行^[34].

肝 R_2 和 R_2^* 都可以用来评估肝脏铁过载, 且均具有一定的优点及局限性^[35]. 快速SE序列扫描时间较长, 易受呼吸运动影响, 需要呼吸门控, 图像质量易受到影响, 导致测量结果的准确性降低. 但是在肝脏纤维化及肝脏炎症等情况下, R_2 与肝脏铁浓度保持高度的相关性, 而 R_2^* 的测量则会受到一定影响, 并且 R_2 在一定程度上可以反映心脏铁沉积的情况^[36]. GRE序列具有可以较快速的获得图像、对磁场的不均匀更加敏感

以及不易受呼吸运动影响等优点. 因此, 在临床上, 单次屏气多次回波的GRE序列更为常用, 这种方法的测量结果更为准确, 具有良好的可比性和可重复性^[37].

在MRI序列的不同回波时间下产生多幅图像, 通过测量肝脏感兴趣区域的信号强度, 测量感兴趣区信号强度时要避免肝内管道系统走形的区域, 不同回波时间下测得的信号强度呈指数衰减, 继而进一步通过相应软件分析信号强度得到肝脏的 $R_2(1/T_2)$ 和 $R_2^*(1/T_2^*)$ ^[38], 并对LIC进行量化. Anderson公式($\log_e \text{LIC} = 2.65 - 1.07 \log_e T_2^*$)^[39]或Wood公式($\text{LIC} = 0.0254 \times R_2^* + 0.202$)^[40]表明了 T_2^* 和 R_2^* 与LIC的定量关系, 这些铁浓度校验公式均来源于配对的磁共振活检标本. 另外, 还可以利用肝脏与其他器官组织(不易铁过载组织, 如竖脊肌)的信号比实现肝脏铁浓度的测量, 在网站[http://www. radio.univrennesl. fr/Sourse/EN/HemoRseult. htmy](http://www.radio.univrennes.fr/Sourse/EN/HemoRseult.htm)提供了相应换算系统, 这是较早的利用MRI评估LIC的方法, 目前逐步被 T_2 和 T_2^* 替代.

目前, 1.5T磁共振成像技术是比较成熟的肝脏铁过载的测量技术. 随着MRI的不断发展, 3.0T磁共振成像技术亦逐渐应用于临床中. 虽然随着场强的提高, 图像的信噪比得以提高, 但是图像伪影也会随之增多, 并且在严重铁过载的患者中, 由于信号衰减速度较快, 场强高的磁共振设备在信号捕捉方面显示出不足, 这些不足可以通过缩短最短TE时间以及回波间隔、较小

■名词解释

T2、R2(1/T2): T2多次屏气单次回波SE序列的弛豫时间, T2值与肝脏的铁沉积严重程度呈负相关, R2与T2互为倒数关系, 为弛豫率, R2值与肝脏的铁沉积严重程度呈正相关。T2*、R2*(1/T2*): T2*单次屏气多次回波GRE序列的弛豫时间, T2*值与肝脏的铁沉积严重程度呈负相关, R2*与T2*互为倒数关系, 为弛豫率, R2*值与肝脏的铁沉积严重程度呈正相关。

的翻转角度来尽量弥补。

值得注意的是, 并不是所有形式的铁都具有相同的顺磁性能力。血池型铁, 虽然对机体有害, 磁力确是寂静的, 不易被检测出。作为防御循环铁的最初防线, 铁蛋白在细胞浆内自由弥散时只能被MRI微弱地检测到。当铁蛋白积聚或其崩解产物-含铁血黄素, 对组织的R2和R2*产生压倒性的影响。含铁血黄素代表铁的主要存储形式, 其浓度变化非常缓慢, 而R2*主要是由含铁血黄素浓度决定^[19], R2则保存了对溶解铁蛋白的敏感性, 这也更好地说明了临床上为什么静脉注射去铁胺后患者的心律失常很快被抑制、心功能很快得到改善而心脏组织的铁沉积减低很晚才能被R2反映出来。当然, 应用“降低R2”的技术可以分开估算铁蛋白和含铁血黄素的浓度。

2.2 MRI检查方法的临床应用 通过定量测定静脉切开的放血量, 人们发现血浆铁蛋白和机体铁的总的储存量密切相关。虽然尚不知血浆铁蛋白是如何产生的, 但是目前他仍然是评估机体铁总的储存量的最便捷方法, 不过这一方法的测量结果容易受到炎症、感染和恶性肿瘤的影响, 因此在临床上的应用受到限制^[41]。肝脏穿刺活检是肝脏铁过载测量的金标准, 可以直接反应肝脏的铁过载情况, 检测肝脏铁过载情况, 指导整合治疗。但是作为一项有创检查有产生并发症的可能。由于肝脏不同部位铁沉积量不同, 更是需要对肝脏进行多点穿刺才能使检测结果更加准确, 这样大大增加了并发症的发生率。另外, 需要多次穿刺才能对肝脏铁过载情况进行检测, 指导整合治疗。肝脏穿刺活检虽然是肝脏铁过载检测金标准, 但是在临床上的应用具有很大的局限性^[42,43]。

磁共振作为一种无创检查技术, 在检测肝脏铁过载中的价值逐渐被重视。他能够有效测量不同疾病中肝脏铁浓度, 对肝脏铁过载程度进行分级评估, 进而评估病情的发展以及监测铁过载整合治疗的效果。许多研究表明测量横向弛豫率R2*(1/T2*)并应用相关软件对其进行量化, 最终得出的肝脏铁浓度结果与肝脏活检结果有高度的相关性^[44]。Gianesin等^[45]在97位铁过载病患中证实横向弛豫率R2*与肝穿刺活检的相关系数(r) = 0.72。St Pierre等^[46]在100多例铁过载患者中检测肝脏的R2*值, 发现R2*值与铁水平呈显著相关, 相关系数(r) = 0.981, 可预测的误差与肝穿刺活检相当。Hankins等^[47]在43位患者中(包括镰刀细胞贫血患者、重度地中海贫血患者以及骨髓异

常增殖综合患者)中证实横向弛豫率R2*与肝穿刺活检的相关系数(r) = 0.96-0.98, 说明磁共振是一种安全、有效的检测肝脏铁过载的检查技术。MRI能评估整个器官的铁浓度并准确测量LIC, 这种能力在具有不同铁来源的铁过载患者中尤为突出。MRI还可用于显示体内铁过载的三维分布情况。通过对LIC的检测, 可以对肝纤维化程度进行分级。评估体内铁总量, 体内铁总量(mg/g) = $10.6 \times \text{LIC}(\text{mg/g干重})$ ^[48], Brown等^[49]报道在40名患者中采用R2对患者LIC进行监测, 指导临床及时进行铁螯合治疗, 进而降低患者机体铁过载, 提高患者的生存率; 评估铁剂螯合治疗的效果, 指导临床治疗, 还可以确定肝脏铁浓度对心脏以及其他器官的影响。Kirk等^[50]研究表明当LIC > 15 mg/g干重时, 发生心力衰竭的几率会增高。Cassinero等^[51]报道27名地中海贫血患者在接受规律不同铁螯合治疗后, 心脏的T2*明显上升, 左心室射血分数也得到一定提高。

2.3 MRI检测肝铁过载的局限性 磁共振是一种无创检查方法, 在临床应用上较其他检查方法具有一定优势。然而, MRI在肝脏那个铁过载评估方面仍存在一定局限性。首先, MRI检查不能直接反映肝脏铁浓度, 得到的肝脏铁浓度是间接测量结果; 其次, 肝脏纤维化以及脂肪变性会对测量结果产生影响, Joe等^[52]报道双源CT检测肝铁可以避免脂肪变性对检测结果的影响; 再次, 随着肝脏铁浓度的上升, 肝脏信号的衰减速率会加快, 磁共振对衰减信号的捕捉能力会下降, 在1.5T磁共振上肝铁浓度的检测上限是30-40 mg/g干重^[53]。此外, 不同场强的磁共振设备对信号的获取会产生不同影响。文献报道, 1.5T与3.0T测量得出的T2*近似2倍的关系^[18], 但是目前此方面的研究较少, 这个结论还需要进一步证实。我们在3.0T设备的初步应用结果表现, 与1.5T设备相比, 虽然图像信噪比得以提高, 但是缺乏相应的软件将T2*量化为肝脏铁浓度, 因此高场强MRI设备检测肝脏铁浓度的技术需要进一步改进。最后, 儿童及老年患者往往因配合欠佳, 在进行MRI检查时受到一定限制。

3 结论

肝脏铁过载可导致肝纤维化和肝硬化, 甚至可诱导肿瘤。血浆铁蛋白浓度测定、肝穿刺活检技术以及无创检查SQUIDS在肝铁过载铁沉积量的测量中的价值非常有限。MRI具有无创、简便、安全、准确等优势, 更加适合用来对肝脏

铁过载进行评估和指导治疗,从而达到提高治疗疗效、提高患者生存质量的效果。相信随着铁代谢分子生物学的深入和MRI软、硬件的完善,用MRI来评价铁过载将越来越普遍。

4 参考文献

- Lim RP, Tuvia K, Hajdu CH, Losada M, Gupta R, Parikh T, Babb JS, Taouli B. Quantification of hepatic iron deposition in patients with liver disease: comparison of chemical shift imaging with single-echo T2*-weighted imaging. *AJR Am J Roentgenol* 2010; 194: 1288-1295
- Eisenbach C. HFE Gene Mutations, Iron Overload and Cryptogenic Liver Cirrhosis. *Hepat Mon* 2012; 12: 209-210
- Szurowska E, Sikorska K, Izycka-Swieszevska E, Nowicki T, Romanowski T, Bielawski KP, Studniarek M. The role of MR imaging in detection of hepatic iron overload in patients with cirrhosis of different origins. *BMC Gastroenterol* 2010; 10: 13
- 刘敏, 汪之頊, 谷貽光, 荫士安. 铁过量对慢性疾病的影响. *国外医学·老年医学分册* 2005; 26: 82-85
- 李秋柏, 邹萍. 铁过载检测与祛铁治疗. *内科理论与实践* 2010; 5: 306-309
- Fischer R, Harmatz PR. Non-invasive assessment of tissue iron overload. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2009: 215-221
- Angelucci E, Barosi G, Camaschella C, Cappellini MD, Cazzola M, Galanello R, Marchetti M, Piga A, Tura S. Italian Society of Hematology practice guidelines for the management of iron overload in thalassemia major and related disorders. *Haematologica* 2008; 93: 741-752
- Siddique A, Kowdley KV. Review article: the iron overload syndromes. *Aliment Pharmacol Ther* 2012; 35: 876-893
- 李蓉生. 正常铁代谢及血红蛋白的合成. *中国全科医学* 2006; 9: 1579-1580
- Graham RM, Chua AC, Herbison CE, Olynyk JK, Trinder D. Liver iron transport. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 4725-4736
- Ganz T, Nemeth E. The hepcidin-ferroportin system as a therapeutic target in anemias and iron overload disorders. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2011; 2011: 538-542
- Schmidt PJ, Fleming MD. Transgenic HFE-dependent induction of hepcidin in mice does not require transferrin receptor-2. *Am J Hematol* 2012; 87: 588-595
- Hankins JS, Smeltzer MP, McCarville MB, Aygun B, Hillenbrand CM, Ware RE, Onciu M. Patterns of liver iron accumulation in patients with sickle cell disease and thalassemia with iron overload. *Eur J Haematol* 2010; 85: 51-57
- Kohgo Y, Ikuta K, Ohtake T, Torimoto Y, Kato J. Body iron metabolism and pathophysiology of iron overload. *Int J Hematol* 2008; 88: 7-15
- Brissot P, Ropert M, Le Lan C, Loréal O. Non-transferrin bound iron: A key role in iron overload and iron toxicity. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1820: 403-410
- Prus E, Fibach E. Uptake of non-transferrin iron by erythroid cells. *Anemia* 2011; 2011: 945289
- Hider RC, Silva AM, Podinovskaia M, Ma Y. Monitoring the efficiency of iron chelation therapy: the potential of nontransferrin-bound iron. *Ann N Y Acad Sci* 2010; 1202: 94-99
- Pepe A, Meloni A, Capra M, Cianciulli P, Prossomariti L, Malaventura C, Putti MC, Lippi A, Romeo MA, Bisconte MG, Filosa A, Caruso V, Quarta A, Pitrolo L, Missere M, Midiri M, Rossi G, Positano V, Lombardi M, Maggio A. Deferasirox, deferiprone and desferrioxamine treatment in thalassemia major patients: cardiac iron and function comparison determined by quantitative magnetic resonance imaging. *Haematologica* 2011; 96: 41-47
- Musallam KM, Cappellini MD, Wood JC, Taher AT. Iron overload in non-transfusion-dependent thalassemia: a clinical perspective. *Blood Rev* 2012; 26 Suppl 1: S16-S19
- Sockel K, Ehninger G, Hofbauer LC, Platzbecker U. Optimizing management of myelodysplastic syndromes post-allogeneic transplantation. *Expert Rev Hematol* 2011; 4: 669-680
- Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, Fenaux P, Morel P, Sanz G, Sanz M, Vallespi T, Hamblin T, Oscier D, Ohyashiki K, Toyama K, Aul C, Mufti G, Bennett J. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood* 1997; 89: 2079-2088
- Zaccone V, Gasbarrini G. [From iron accumulation to organ damage]. *Minerva Med* 2012; 103: 123-140
- 韩巍, 王朝旭. 铁负荷与人体健康. *国外医学·卫生学分册* 2008; 35: 52-56
- 韩丹丹. 血清铁蛋白的检测在肝脏疾病的应用. *中华中西医结合杂志* 2007; 5: 52-53
- Gopakumar G, Belanzoni P, Baerends EJ. Hydroxylation catalysis by mononuclear and dinuclear iron oxo catalysts: a methane monooxygenase model system versus the Fenton reagent Fe(IV)O(H₂O)₅(2+). *Inorg Chem* 2012; 51: 63-75
- Deugnier Y, Turlin B. Pathology of hepatic iron overload. *Semin Liver Dis* 2011; 31: 260-271
- Andrews NC. Disorders of iron metabolism. *N Engl J Med* 1999; 341: 1986-1995
- Lustbader ED, Hann HW, Blumberg BS. Serum ferritin as a predictor of host response to hepatitis B virus infection. *Science* 1983; 220: 423-425
- Chandarana H, Lim RP, Jensen JH, Hajdu CH, Losada M, Babb JS, Huffman S, Taouli B. Hepatic iron deposition in patients with liver disease: preliminary experience with breath-hold multiecho T2*-weighted sequence. *AJR Am J Roentgenol* 2009; 193: 1261-1267
- Ghugre NR, Coates TD, Nelson MD, Wood JC. Mechanisms of tissue-iron relaxivity: nuclear magnetic resonance studies of human liver biopsy specimens. *Magn Reson Med* 2005; 54: 1185-1193
- Henninger B, Kremser C, Rauch S, Eder R, Zoller H, Finkenstedt A, Michaely HJ, Schocke M. Evaluation of MR imaging with T1 and T2* mapping for the determination of hepatic iron overload. *Eur Radiol* 2012 May 30. [Epub ahead of print]
- Kim D, Jensen JH, Wu EX, Sheth SS, Brittenham GM. Breathhold multiecho fast spin-echo pulse sequence for accurate R2 measurement in the heart and liver. *Magn Reson Med* 2009; 62: 300-306
- Queiroz-Andrade M, Blasbalg R, Ortega CD, Rodstein MA, Baroni RH, Rocha MS, Cerri GG. MR imaging findings of iron overload. *Radiographics* 2009; 29: 1575-1589
- Song R, Lin W, Chen Q, Asakura T, Wehrli FW, Song HK. Relationships between MR transverse relaxation parameters R*(2), R(2) and R'(2) and hepatic iron content in thalassemic mice at 1.5 T and 3

■同行评价

本文主要对肝脏铁过载及MRI在肝脏铁过载中的应用进展进行综述,内容较丰富,对肝脏病的防治有一定的临床应用价值。

- T. *NMR Biomed* 2008; 21: 574-580
- 35 Juchems MS, Cario H, Schmid M, Wunderlich AP. Liver iron content determined by MRI: spin-echo vs. gradient-echo. *Rofo* 2012; 184: 427-431
 - 36 Fernandes JL, Sampaio EF, Verissimo M, Pereira FB, da Silva JA, de Figueiredo GS, Kalaf JM, Coelho OR. Heart and liver T2 assessment for iron overload using different software programs. *Eur Radiol* 2011; 21: 2503-2510
 - 37 McCarville MB, Hillenbrand CM, Loeffler RB, Smeltzer MP, Song R, Li CS, Hankins JS. Comparison of whole liver and small region-of-interest measurements of MRI liver R2* in children with iron overload. *Pediatr Radiol* 2010; 40: 1360-1367
 - 38 Tziomalos K, Perifanis V. Liver iron content determination by magnetic resonance imaging. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 1587-1597
 - 39 Anderson LJ, Holden S, Davis B, Prescott E, Charrier CC, Bunce NH, Firmin DN, Wonke B, Porter J, Walker JM, Pennell DJ. Cardiovascular T2-star (T2*) magnetic resonance for the early diagnosis of myocardial iron overload. *Eur Heart J* 2001; 22: 2171-2179
 - 40 Wood JC, Enriquez C, Ghugre N, Tyzka JM, Carson S, Nelson MD, Coates TD. MRI R2 and R2* mapping accurately estimates hepatic iron concentration in transfusion-dependent thalassemia and sickle cell disease patients. *Blood* 2005; 106: 1460-1465
 - 41 Büyükaşık NS, Nadir I, Akin FE, Cakal B, Kav T, Ersoy O, Büyükaşık Y. Serum iron parameters in cirrhosis and chronic hepatitis: detailed description. *Turk J Gastroenterol* 2011; 22: 606-611
 - 42 Crisponi G, Ambu R, Cristiani F, Mancosu G, Nurchi VM, Pinna R, Faa G. Does iron concentration in a liver needle biopsy accurately reflect hepatic iron burden in beta-thalassemia? *Clin Chem* 2000; 46: 1185-1188
 - 43 Villeneuve JP, Bilodeau M, Lepage R, Côté J, Lefebvre M. Variability in hepatic iron concentration measurement from needle-biopsy specimens. *J Hepatol* 1996; 25: 172-177
 - 44 Vasanawala SS, Yu H, Shimakawa A, Jeng M, Brittain JH. Estimation of liver T2 in transfusion-related iron overload in patients with weighted least squares T2 IDEAL. *Magn Reson Med* 2012; 67: 183-190
 - 45 Giancesin B, Zefiro D, Musso M, Rosa A, Bruzzzone C, Balocco M, Carrara P, Bacigalupo L, Banderali S, Rollandi GA, Gambaro M, Marinelli M, Forni GL. Measurement of liver iron overload: noninvasive calibration of MRI-R2* by magnetic iron detector susceptometer. *Magn Reson Med* 2012; 67: 1782-1786
 - 46 St Pierre TG, Clark PR, Chua-anusorn W, Fleming AJ, Jeffrey GP, Olynyk JK, Pootrakul P, Robins E, Lindeman R. Noninvasive measurement and imaging of liver iron concentrations using proton magnetic resonance. *Blood* 2005; 105: 855-861
 - 47 Hankins JS, McCarville MB, Loeffler RB, Smeltzer MP, Onciu M, Hoffer FA, Li CS, Wang WC, Ware RE, Hillenbrand CM. R2* magnetic resonance imaging of the liver in patients with iron overload. *Blood* 2009; 113: 4853-4855
 - 48 Angelucci E, Brittenham GM, McLaren CE, Ripalti M, Baronciani D, Giardini C, Galimberti M, Polchi P, Lucarelli G. Hepatic iron concentration and total body iron stores in thalassemia major. *N Engl J Med* 2000; 343: 327-331
 - 49 Brown GC, Patton WN, Tapp HE, Taylor DJ, St Pierre TG. Spin-density-projection-assisted R2 magnetic resonance imaging of the liver in the management of body iron stores in patients receiving multiple red blood cell transfusions: an audit and retrospective study in South Australia. *Intern Med J* 2012 May 30. [Epub ahead of print]
 - 50 Kirk P, Roughton M, Porter JB, Walker JM, Tanner MA, Patel J, Wu D, Taylor J, Westwood MA, Anderson LJ, Pennell DJ. Cardiac T2* magnetic resonance for prediction of cardiac complications in thalassemia major. *Circulation* 2009; 120: 1961-1968
 - 51 Cassinerio E, Roghi A, Pedrotti P, Brevi F, Zanaboni L, Graziadei G, Pattoneri P, Milazzo A, Cappellini MD. Cardiac iron removal and functional cardiac improvement by different iron chelation regimens in thalassemia major patients. *Ann Hematol* 2012 May 10. [Epub ahead of print]
 - 52 Joe E, Kim SH, Lee KB, Jang JJ, Lee JY, Lee JM, Han JK, Choi BI. Feasibility and accuracy of dual-source dual-energy CT for noninvasive determination of hepatic iron accumulation. *Radiology* 2012; 262: 126-135
 - 53 Wood JC. Impact of iron assessment by MRI. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2011; 2011: 443-450

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》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.

肝细胞癌自发消退的机制

黄天明, 罗国容

黄天明, 罗国容, 广西医科大学组织学与胚胎学教研室 广西
壮族自治区南宁市 530021

黄天明, 硕士, 讲师, 主要从事肝癌诊断和治疗的研究.

国家自然科学基金资助项目, No. 81160264

广西自然科学基金资助项目, No. 2010GXNSFD013048

作者贡献分布: 本文由黄天明构思、设计并撰写; 罗国容教授进行修改和审校.

通讯作者: 黄天明, 硕士, 讲师, 530021, 广西壮族自治区南宁市
双拥路22号, 广西医科大学组织学与胚胎学教研室.

tianminghuang@yahoo.com.cn

电话: 0771-6170242

收稿日期: 2012-04-11 修回日期: 2012-06-11

接受日期: 2012-07-20 在线出版日期: 2012-07-28

Mechanisms underlying spontaneous regression of hepatocellular carcinoma

Tian-Ming Huang, Guo-Rong Luo

Tian-Ming Huang, Guo-Rong Luo, Department of Histology and Embryology, Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 81160264; and the Natural Science Foundation of Guangxi, No. 2010GXNSFD013048

Correspondence to: Tian-Ming Huang, Department of Histology and Embryology, Guangxi Medical University, 22 Shuangyong Road, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. tianminghuang@yahoo.com.cn

Received: 2012-04-11 Revised: 2012-06-11

Accepted: 2012-07-20 Published online: 2012-07-28

Abstract

We searched MEDLINE and identified 85 cases of spontaneous regression of hepatocellular carcinoma (HCC). Analysis of these cases found that immunity is the most likely cause of spontaneous regression of HCC, and the elimination of immunosuppressive microenvironment may play a key role in this process. Ischemia, ethanol abstinence, and blood transfusion might lead to regression of HCC through the elimination of immunosuppression and activation of antitumor immunity.

Key Words: Hepatocellular carcinoma; Spontaneous regression; Immunity; Microenvironment

Huang TM, Luo GR. Mechanisms underlying spontaneous regression of hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(21): 1939-1948

摘要

本文通过对Medline的搜索, 获取自1982年以来肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)自发消退病例85例, 对所得病例进行整理、统计和分析, 结果显示: 免疫是最有可能导致HCC自发消退的原因, 其中又以免疫抑制微环境的解除更为关键. 缺血、戒酒、输血等都有可能通过解除免疫抑制并激活抗肿瘤免疫而导致HCC的消退.

关键词: 肝细胞癌; 自发消退; 免疫; 微环境

黄天明, 罗国容. 肝细胞癌自发消退的机制. 世界华人消化杂志 2012; 20(21): 1939-1948

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1939.asp>

0 引言

“恶性肿瘤的自发消退(spontaneous regression of cancer, SRC)”指的是恶性肿瘤在未经任何治疗, 或只经一般性治疗(即通常认为与恶性肿瘤消退无明显关系者)的情况下发生部分或全部消失, 这种消退可发生在原发灶和/或转移灶^[1]. Cole认为其发生的概率大约为1/60 000-100 000, 较常见于肾细胞癌、神经母细胞瘤、恶性黑色素瘤等^[2,3]. Epstein等^[4]认为, 自发消退现象在HCC中也是较为常见的, Oquiena等^[5]估计其发生率约为0.406%.

为了探讨HCC自发消退的机制, 我们在Medline用关键词”(hepatocellular carcinoma [Title]) AND (spontaneous regression [Title])”进行搜索, 并结合关联文献, 共获取自1982年以来HCC自发消退的相关报道72篇, 共计85例, 其中77例为英文资料, 所获取信息较为详细, 而有8例为其他语种资料, 可获取信息较少. 在这些文献中, 有报道诊断方法的共79例, 其中有病理诊断的58例, 其余主要靠影像学方法确诊. 根据EASL(The European Association for the Study of the Liver)的诊断标准^[6]对所得资料进行筛查确认, 并按原文发稿时报道的肿瘤消退程度及复发情况对病例进行分组(表1). 目前认为可能引起HCC自发消退的主要有各种原因导致的肿瘤

■背景资料

尽管近年来人们对肝细胞癌(HCC)的治疗方法进行了大量研究与改进, 也取得了一定的成果, 但整体预后仍不尽如人意. 然而有些患者在未接受有效治疗的情况下却可以发生HCC的自发消退, 对这种有趣的现象进行研究有可能开辟HCC治疗的一个全新领域.

■同行评议者

高润平, 教授, 吉林大学第一医院肝胆胰内科

■研究前沿

目前认为导致自发消退的原因主要有:各种原因导致的肿瘤缺血坏死、戒酒的影响、使用一些未被确认有明确疗效的药物、输血、精神因素、免疫等,但对这些原因背后的可能作用机制尚未有具体的分析和报道。

表 1 85例肝细胞癌自发消退患者的特征

参考文献	性别	年龄	危险因素	病理特点	诊断方法	AFP变化情况	消退程度	可能的机制	备注
[7]	M	65	No	IHM	CT,AFP	Acc	完全	缺血	肿瘤的快速生长导致缺血
[8]	M	52	Sot,Cirr	LM	病理	Acc	完全	戒酒,免疫	肿块坏死且有慢性炎症细胞浸润
[9]	M	60	HCT	IHM, PVM, CLNM	CT,MRI, AFP	Acc	完全	缺血	癌栓栓塞导致肿块缺血
[10]	M	67	C, SD, Cirr	PD, PVM, Ascites, PE	病理	Acc	完全	戒酒, 缺血, CAMs	肝硬化基础上肿瘤快速生长导致缺血
[10]	M	67	C, SD, Cirr	PD, LM, IVCN, Ascites	病理	Acc	完全	戒酒, 缺血, CAMs	肝硬化基础上肿瘤快速生长导致缺血
[11]	M	56	C, Sot	PD, IHM, PVM	病理	Acc	完全	免疫, 缺血	癌栓栓塞导致肿块缺血/发生了系统性的严重感染
[12]	F	72	Cirr	MPD,PM,SM	病理	Acc	完全	输血,CAMs	使用了替加氟和 尿嘧啶进行治疗
[13]	M	53	B, Cirr	SL	病理	NE	完全	免疫	肿块呈现完全坏死
[14]	M	73	Sot, Cirr	SL	病理	SE, Acc	完全	缺血	肿块呈现完全坏死/ PIVKA与肿瘤的进展呈正相关关系
[15]	M	76	C, Cirr	MD,IHM	病理	NE	完全	免疫	细胞因子升高, 免疫细胞活性增强/ PIVKA与肿瘤的进展呈正相关关系
[16]	M	63	Cirr	IVCM	病理	Acc	完全	中草药,缺血	食管静脉曲张破裂大出血导致肿块缺血
[17]	M	50	B	LM	病理	NR	完全	中草药,免疫	肿块发生严重的感染
[18]	M	62	FHHCC, B, Cirr	SL	病理	NE	完全	高热, 免疫	患者持续3 mo高热/肿块呈现完全坏死
[19]	F	63	Cirr	IHM,LM	病理	Acc	完全	NR	
[20]	M	65	B, Cirr	PVM	病理	Acc	完全	中草药	
[21]	M	73	No	WD,SL	病理	NE	完全	NR	通过临床病案记录及保存的标本回顾分析确认的病例
[22]	M	42	B	PD,SL	病理	NE	完全	"natural healing"	所谓的“natural healing”包括锻炼、宗教信仰、使用VitB等
[23]	M	74	NR	IHM	病理	NE	完全	免疫	由于胆总管结石导致严重的胆管炎/肿瘤呈现完全坏死/ PIVKA与肿瘤的进展呈正相关关系
[24]	M	69	C	PVM	病理	Acc	完全	缺血	门脉的癌栓栓塞导致肿块缺血
[25]	M	69	C, Sot	SL	CT, MRI, PIVKA	NE	完全	缺血	肿块外包着厚的被膜, 影响了肿块周边部位的血液供应/ PIVKA与肿瘤的进展呈正相关关系
[26]	M	52	Sot,Cirr	IHM	病理	Acc	完全	西利马林, 戒酒	确诊后戒酒
[27]	M	72	C	SL	CT, US, AFP, PIVKA	Acc	完全	免疫, 缺血	肿瘤的快速生长导致缺血/肿块坏死且有炎症细胞浸润/PIVKA与肿瘤的进展呈正相关关系
[28]	M	62	B, Cirr	SL	CT,AFP	Acc	完全	缺血, 免疫	肝动脉-门脉分流导致肿块缺血/肿块坏死且有炎症细胞浸润
[29]	M	70	SD, B, Parasite	SL	病理	NE	完全	缺血	供血动脉栓塞导致肿块缺血/肿块呈现完全坏死
[30]	M	65	Sot, Cirr	IHM	病理	NE	完全	戒酒	确诊后戒酒
[31]	M	67	Sot, Cirr	SL	AGG, CT, US, AFP	Acc	完全	缺血	血管造影术导致的供血动脉损伤或肿瘤的快速生长导致肿块缺血
[32]	M	65	C, Cirr	SL	病理	Acc	完全	缺血	供血动脉栓塞导致肿块缺血/肿块呈现完全坏死
[33]	M	50	C	SL	病理	NE	完全	缺血	肿块外形成厚的被膜, 影响了肿块的血液供应
[34]	M	53	Sot,Smo ke, Cirr	WD, Ascites	病理	SE,Acc	完全	他莫西芬, 奥曲肽	HCC消退后, 发生肺鳞状细胞癌伴脑转移

[35]	M	79	C, Cirr	SL	病理	Acc	完全	缺血, 输血	胃溃疡大出血造成肿块缺血并输血
[36]	F	71	C	PVM, TFAM	病理	Acc	完全	缺血	供血动脉栓塞导致肿块缺血
[37]	F	54	B, Cirr	WD, SL	病理	NE	完全	NR	
[38]	F	72	Sot, F-HHCC	SL	病理	NE	完全	NR	确诊后加量喝酒且开始吸烟
[39]	M	79	C, Cirr	LM	病理	Acc	完全	桑黄	摄食桑黄1 mo/ PIVKA与肿瘤的进展呈正相关关系
[40]	F	23	NR	CHCC, IHM	病理	NR	完全	NR	对肝原发灶行手术切除后转移灶自发消退
[41]	M	66	C, Cirr	WD, BM, PM	病理	NE	完全	免疫, S-AMET	肌肉注射S-腺苷-L-甲硫氨酸
[42]	F	52	C, Dep-ression	SL	CT, AFP	Acc	完全	免疫	行“精神-神经-免疫治疗”/NK细胞的活性及细胞因子水平恢复正常
[43]	F	70	C, Cirr	LM	病理	NE	完全	免疫	对肝原发灶行经导管动脉栓塞术后, 转移灶发生消退/PIVKA与肿瘤的进展呈正相关关系
[44]	M	74	SD	MD, SL	病理	Acc	完全	中草药	中药成分有龙胆、连翘、砂仁、皂角刺、番泻叶、栀子、黄水茄、仙草、萱草等
[45]	M	77	Smoke	LM	CT, X线, PIVKA, AFP	Acc	完全	戒烟	确诊后戒烟/ PIVKA与肿瘤的进展呈正相关关系
[46]	M	78	CH	BM	病理	Acc	完全	输血, 手术创伤	因胃肠道大出血及股骨骨折手术而输血
[47]	F	69	Cirr	SL	CT, AFP	Acc	完全	NR	肿块呈现完全坏死
[45]	M	72	C, Smoke	IHM	CT, AFP, PIVKA	Not Acc	部分	中草药	摄食一种名为“Ukon”的中草药/PIVKA水平与肿瘤的进展呈正相关, 但AFP在肿块消退后却升高到原来的2倍
[48]	M	76	Sot, Cirr	IHM	病理	Acc	部分	戒酒, 缺血	癌栓栓塞导致肿块缺血
[49]	F	72	C	PD, IHM	病理	Acc	部分	缺血	肿瘤的快速生长导致缺血
[50]	M	57	B, Cirr	MWD	病理	NE	部分	免疫	肿块有大量的炎症细胞浸润
[51]	M	82	C, Cirr	MD, LM	病理	Acc	部分	免疫	转移灶发生消退且有大量炎症细胞浸润, 但肝原发灶未见消退
[52]	M	85	B, C, Cirr	IHM, PVM, HVM	CT, AFP, AFP-L3	Acc	部分	VitK, 缺血	每日服用Vit K245mg/缺血可能由于肿瘤的快速生长所致
[53]	M	65	C, Sot	BM	病理	Acc	部分	桑黄, 放疗, 缺血	摄食桑黄/对颌骨转移灶行放疗/缺血可能由于肿瘤的快速生长所致
[54]	M	72	Sot	CHCC, PVM, BM, CWM	病理	Acc	部分	戒酒	确诊后戒酒
[55]	M	64	Sot, Cirr	WD, IHM, PM	病理	Acc	部分	免疫, 戒酒	确诊后戒酒/肿块坏死且有大量炎症细胞浸润
[55]	F	70	Sot, Cirr	IHM, PM, Ascites	CT, AFP	Acc	部分	他莫西芬, 免疫, 戒酒, 输血	确诊后戒酒/食管静脉曲张破裂导致大出血, 并输血
[56]	M	65	C, Sot, Cirr	PD, IHM, PVM	病理	Acc	部分	缺血, 免疫	肿块坏死并有大量炎症细胞浸润/门脉栓塞/ PIVKA与肿瘤的进展呈正相关关系
[57]	M	76	C, Cirr	WD, IHM, BM	病理	Acc	部分	免疫, 放疗	对骨转移灶行放疗后肝原发灶消退/ TNF- α 等细胞因子升高/ PIVKA与肿瘤的进展呈正相关关系
[58]	F	56	C, Cirr	MD, SL	病理	SE, Acc	部分	缺血, 免疫	肿块坏死且有大量炎症细胞浸润/缺血由于肿瘤的快速生长所致
[59]	M	61	Cirr	LM, BM	AFP, CT	Acc	部分	免疫	对骨转移灶行放疗后肝原发灶消退
[60]	M	56	No	WD, IHM	病理	NE	部分	免疫	发生脓毒性高热及关节炎/肿块呈现完全坏死
[60]	M	74	B	CHCC, IHM	病理	Acc	部分	免疫	发生脓毒性高热/肿块呈现完全坏死
[61]	M	38	B	SL	病理	Acc	部分	缺血	血管造影术导致肝总动脉损伤并栓塞

■相关报道

Kraman等首次证实了某些基质细胞能通过分泌FAP蛋白, 将恶性肿瘤伪装成伤口, 从而避免了免疫攻击; 如去除这些基质细胞, 则具有免疫原性的肿瘤基质细胞和癌细胞在IFN- γ 及TNF- α 介导下均可迅速发生缺氧性坏死。

■创新盘点

本文首次对近30年国内外报道的HCC自发消退病例进行了收集和整理,并对可能导致自发消退的原因进行了分析和探讨。首次提出因肿瘤局部免疫抑制微环境改善所激活的抗肿瘤免疫是导致HCC自发消退的主要原因,从而为今后肿瘤治疗的研究提供了新的参考。

[61]	F	58	Cirr	IHM	病理	NE	部分	缺血	血管造影术导致肝固有动脉损伤并栓塞
[62]	M	66	C, Cirr	PVM	病理	Acc	部分	西利马林,免疫	肿块坏死并有大量炎症细胞浸润
[63]	F	78	B, Cirr	WD, SL	病理	Acc	部分	免疫	肿块坏死并有大量炎症细胞浸润
[64]	F	71	C, Cirr	MD	病理	Acc	部分	缺血	肿瘤的快速生长或肿块外包着的厚被膜导致肿块缺血/AFP-L3 显著升高
[9] ¹	M	54	B, Cirr	SL	AFP, CT, US	Acc	完全	缺血	门脉有血栓栓塞/复发灶为2个新发的病灶
[9] ¹	M	61	Sot, Cirr	SL	MRI, CT	Acc	完全	缺血	肿瘤的快速生长、经动脉栓塞术损伤血管或门脉血栓栓塞导致肿块缺血/复发灶为一AFP水平正常的新发病灶
[65] ¹	M	66	Sot, Cirr	IHM	病理	Acc	完全	NR	无瘤时间达4年/复发灶为一新发病灶
[66] ¹	M	68	C, Sot, Cirr	IHM, PVM, Ascites	病理	Acc	完全	中草药	摄食姬松茸的粗提物和一种名为“tahibo”的茶/复发灶为一AFP水平正常的新发病灶
[10] ¹	M	70	C, Sot, Cirr	MD, IHM, PVM	病理	Acc	部分	戒酒,缺血,输血	肝硬化、肿瘤的快速生长或食管静脉曲张破裂大出血导致肿块缺血
[10] ¹	M	75	C, Cirr	LM	CT, AGG, AFP	Acc	部分	缺血	肝硬化及在此基础上肿瘤的快速生长导致缺血/肝内病灶消退后复发,但转移灶则持续消退
[65] ¹	F	75	C, Cirr	IHM	病理	Acc	部分	NR	无瘤期为17 mo/复发灶为一新发病灶
[67] ¹	M	70	C, Cirr	IHM, LM, BM	NR	Acc	部分	免疫	IL-18水平升高
[67] ¹	M	65	C, Cirr	IHM, LM, BM	NR	Acc	部分	免疫	IL-18水平升高
[67] ¹	F	65	C, Cirr	IHM, LM, LNM	NR	Acc	部分	免疫	IL-18水平升高
[68] ¹	M	44	C, SD	IHM, PVM	CT, AFP	Acc	部分	戒酒	确诊后戒酒/复发灶为一新发病灶
[68] ¹	M	63	B	IHM, IVCN	CT, AFP	Acc	部分	缺血	血管造影损伤供血动脉造成肿块缺血/复发灶为一AFP水平正常的新发病灶
[69] ¹	M	75	C	IHM, LM	CT, AGG, AFP	Acc	部分	NR	肝内病灶消退后复发,但肺转移灶则持续消退
[70] ¹	M	80	Sot, Cirr	WD, IHM	病理	NE	部分	缺血	肿瘤的快速生长导致缺血/肝内病灶部分消退后复发/PIVKA与肿瘤的进展呈正相关关系
[71] ²	M	71	Sot, Cirr	NA	CT, US, AFP	Acc	完全	NA	
[72] ²	NA	NA	C, Cirr	NA	CT, US, AFP	Acc	完全	NR	
[73] ²	M	53	NA	NA	病理		完全	免疫	因肺炎持续2 wk高热/肿块呈现完全坏死
[74] ²	M	67	B	LM	病理	Acc	完全	免疫	
[75] ²	F	65	NA	PVM	病理	Acc	部分	免疫	肝内原发灶外有大量淋巴细胞浸润,但肿块内未见坏死区/转移灶呈现完全坏死
[76] ²	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
[77] ²	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
[78] ²	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	

NA: 未获知; NR: 未报道; No: 无; 危险因素: B: HBV感染; C: HCV感染; CH: 慢性肝炎; Cirr: 肝硬化; FHHCC: 肝细胞癌家族史; HCT: 血色沉着病; SD: 饮酒; Sot: 嗜酒; 病理特点: BM: 骨转移; CHCC: 肝透明细胞癌; CLNM: 腹腔淋巴结转移; CWM: 胸壁转移; HVM: 肝静脉转移; IHM: 肝内转移; IVCN: 下腔静脉转移; LM: 肺转移; LNM: 淋巴结转移; MD: 中度分化; MPD: 中-低度分化; MWD: 中-高度分化; PD: 低分化; PE: 胸腔积液; PM: 腹膜转移; PVM: 门静脉转移; SL: 单发病灶; SM: 脾转移; TFAM: 肿瘤供血动脉转移; WD: 高分化; 诊断方法: AGG: 血管造影术; PIVKA: 维生素K缺乏诱导蛋白; MRI: 核磁共振成像; US: 超声诊断; AFP变化情况: Acc: 伴随变化; NE: 不升高; SE: 轻微升高; 可能的机制: CAMs: 未被确认有明确疗效的药物; ¹: 自发消退后复发病例; ²: 其他语种文献。

缺血坏死、戒酒的影响、使用一些未被确认有明确疗效的药物、输血、精神因素、免疫等。为了探讨这些可能原因背后的关键机制,我们对其相关机理进行了进一步的分析。

1 可能导致HCC自发消退的因素

1.1 缺血 许多报道认为,肿瘤的缺血坏死是导致HCC自发消退的直接原因,而导致肿瘤缺血的原因包括: (1)肿瘤的快速生长(在或不在肝硬化

基础上); (2)血管造影术或经动脉栓塞术等损伤供血动脉并造成栓塞; (3)食管静脉曲张破裂或消化性溃疡造成的大出血; (4)肿瘤供血动脉的癌栓栓塞; (5)肿块外包裹着的厚被膜阻碍了血液供应; (6)肝动脉-门脉分流。

缺血在HCC进展中是较常见的现象, 一般会引起肿瘤组织的部分坏死, 但通常不足以使肿瘤完全消退, 原因在于: (1)肿瘤内的血液分配并不均衡, 各种原因所致的相对供血不足可使部分血供较差的组织坏死, 而血供较好的组织仍能获得足够的营养而存活下来, 且部分肿瘤组织的坏死还可减少消耗而使存活的组织获得更多的营养; (2)在肿瘤包膜内、外等存在一些复合供血区, 临床对肿瘤栓塞治疗的研究表明, 即使主要的供血动脉完全堵塞, 也总有一些位于复合供血区的癌细胞能获得足够的营养而存活, 这些残存的癌细胞增殖更快, 恶性程度更高, 且栓塞后肿瘤组织缺氧和缺血再灌注损伤可明显上调血管内皮生长因子的分泌, 刺激肿瘤边缘和瘤体坏死区周围的微血管形成, 从而为肿瘤的快速复发创造条件^[79], 故即使人为地进行栓塞并配合化疗, 肿瘤的完全坏死率也是很低的, 且极易复发^[80]; (3)有些患者的病灶为多发或已发生远处转移, 其自发消退更不可能是局部缺血造成的, 因此, 单纯的缺血本身几乎不可能导致HCC的完全消退。

1.2 戒酒 Storey等^[8]和Gottfried等^[30]报道了几例酒精相关的HCC患者在戒酒后肿瘤发生了自发消退, 他们将其归因于戒酒的影响; 然而van Halteren^[38]所报道的患者在确诊后加量饮酒, HCC也发生了消退。

酒精主要通过诱导异常的免疫反应导致肝细胞的损伤。在酒精性肝病患者中普遍存在体液免疫和细胞免疫的异常: (1)酒精通过抑制成熟效应细胞的形成, 改变免疫系统的调节环路等, 使CD4+/CD8+比例、细胞毒性T细胞的数量及反应性降低而丙种球蛋白增高; (2)长期的酒精摄入能通过诱导细胞色素P-450转化系统等导致各种加和物的产生和积累, 从而损伤肝细胞; 而各种异常抗原被抗原呈递细胞吞噬、提呈后, 又可诱导并通过正反馈机制加重慢性炎症反应, 并最终导致HCC的发生^[81]。

对HCC患者而言, 戒酒一方面可解除酒精对免疫系统的抑制, 消除局部慢性炎症反应, 并使紊乱的免疫系统恢复正常; 同时, 有助于改善肝细胞的营养状态并修复损伤的细胞, 从而抑

制肿瘤的发生和发展^[82]。而另一方面, 也可解除酒精对肿瘤细胞及变异肝细胞再生的抑制, 促进肿瘤的进展^[83]。从总体上来说, 尽管许多证据表明戒酒在某种程度上可改善患者的预后, 但一般情况下尚不足以使得HCC完全消退。

1.3 使用一些未被确认有明确疗效的药物 发生自发消退的患者许多都曾使用过一些未被确认有明确疗效的药物, 这些药物在一般患者中也大量使用, 但却极少观察到肿瘤的消退。为了尽可能减少巧合现象的干扰, 我们仅对2例或以上自发消退患者均使用过的药物进行分析。

1.3.1 他莫西芬(Tamoxifen): Tamoxifen的抗肿瘤作用主要通过影响雌激素受体或非雌激素受体介导的细胞凋亡信号通路实现; 另外可能还与改变线粒体的通透性、氧化应激、转化生长因子以及改变细胞膜的流动性等有关^[84-86]。

1.3.2 西利马林(Silymarin): Silymarin具有广泛的抗肿瘤活性。首先, 可通过抗炎作用消除局部慢性炎症微环境; 其次, 可通过作用于癌变过程的不同阶段, 抑制癌细胞的侵入和转移, 从而发挥抗肿瘤作用; 此外Silymarin还具有抗脂质过氧化、抗肝纤维化、膜稳定和免疫调节作用, 并能促进肝脏再生。体外研究表明, Silymarin对雄激素依赖性和非依赖性HCC均具有抑制作用^[87]。

1.3.3 桑黄(Phellinus linteus): Phellinus linteus主要通过提高免疫器官指数及血清白介素2(interleukin-2, IL-2)、 γ -干扰素(interferon- γ , IFN- γ)水平, 刺激巨噬细胞分泌肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α)等, 改善机体的免疫状态并发挥抗肿瘤效应^[88,89]。

1.3.4 中草药: Lam等^[17]和Chien等^[20]分别报道了患者由于服用某些中草药而发生HCC的完全消退, 但拿同样的药用于其他HCC患者时, 却均未发现任何疗效。这说明, 导致消退的并非中草药本身的直接作用。目前认为, 合理的使用中草药可改善肿瘤患者的免疫状态并提高生存质量。但由于复合中药构成复杂, 较难确定是何种成分在其中发挥了主要作用。

上述药物通常作为HCC的二线或辅助治疗药物, 与一线治疗方法配合使用, 可发挥一定的抗癌作用, 改善患者生存质量。但单独使用时, 目前尚没有证据表明他们能导致HCC的完全消退。

1.4 精神因素 Jozuka等^[42]报道了1例伴有抑郁症的晚期HCC患者, 进行抗抑郁治疗后, HCC发生了自发消退。有研究表明, 精神压抑的人较易患上癌症。抑郁等心理反应可作为应激源刺激机

■应用要点

本综述对于正确认识HCC的自然转归有重要意义, 且可为将来HCC的治疗提供有意义的参考。

■名词解释

恶性肿瘤自发消退: 恶性肿瘤在未经任何治疗, 或只经一般性治疗(即通常认为与恶性肿瘤消退无明显关系者)的情况下发生部分或全部的消失, 这种消退可发生在原发灶和/或转移灶。

体产生一种非特异性的应激反应, 导致末端循环障碍, 并通过神经-内分泌-免疫轴的作用, 导致机体免疫监视异常, 表现为粒细胞数目增多, 而淋巴细胞总数下降, 尤其是CD3⁺、CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺比值和NK细胞明显减少, 且NK细胞活性降低。此时, 在致癌因子的参与下, 便可促进肿瘤的发生和发展^[90,91]。而改善患者精神状态, 解除抑郁, 则有可能使紊乱的免疫系统恢复正常, 并改善患者的预后^[92]。

1.5 输血 Tocchi等所报道的病例都有因消化道大出血所致的输血史, 除了Kondo等^[10]报道的1例为红细胞及血浆输血外, 其余皆为全血输血。他们认为HCC的自发消退可能跟输血有关。

输血对机体的影响主要体现在免疫的增强或抑制上, 大多数研究者认为其以抑制为主, 主要由血液中的白细胞介导, 包括对细胞免疫和体液免疫的抑制^[93]。首先, 输血可刺激前列腺素E2(prostaglandin E2, PGE2)的产生及下调IL-2的表达。IL-2的减少影响了依赖IL-2的NK细胞活性, 使其杀伤作用显著下降; 同时也抑制了巨噬细胞对细菌及异物的吞噬、提呈和清除能力, 抗原提呈的异常使得T淋巴细胞反应性降低, 不能发挥有效的功能, 甚至发生克隆衰竭。PGE2则具有广泛的免疫抑制效应, 可抑制淋巴细胞的转化和淋巴因子的生成, 使淋巴细胞亚群改变、数量下降, 表现为CD2⁺、CD3⁺、CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺ T细胞亚群均显著降低。此外, 输血还能导致B淋巴细胞数量及反应性下降, 从而使抗体的分泌减少^[93,94]。故目前临床上普遍认为, 输血可阻碍机体对肿瘤的免疫应答, 导致肿瘤发生免疫逃逸, 从而促进肿瘤的生长和复发^[93]。

1.6 免疫 部分发生自发消退的患者都曾有过严重的感染史; 许多自发消退后的肿瘤病理活检发现有大量免疫细胞尤其是T淋巴细胞浸润; Abiru等^[67]所报道的3个病例均发现IL-18的升高, 这些都提示免疫与HCC自发消退之间可能有很密切的关系。

机体的抗肿瘤免疫以特异性细胞免疫最为重要。其以CD8⁺和CD4⁺ T淋巴细胞为主导, 有MHC限制性, 可识别由抗原呈递细胞提呈的抗原, 并发挥特异性抗肿瘤效应。大量的体外实验表明, 许多的肿瘤相关抗原, 如AFP^[95]、Glypican-3^[96]、NY-ESO-1(New York esophageal squamous cell carcinoma 1)^[97,98]、SSX-2(synovial sarcoma, X breakpoint 2)^[99]、MAGE-A(melanoma antigen A)^[99,100]、TERT(telomerase reverse tran-

scriptase)^[101]等都能被抗原呈递细胞提呈并激活T淋巴细胞, 发挥有效的抗肿瘤免疫。

肿瘤细胞则可通过下调MHC、共刺激分子及抗原的表达, 躲避免疫系统的攻击; 同时改变表面受体的结构和分布, 以摆脱信号分子的调控; 最新的研究还表明, 基质细胞分泌的纤维活化蛋白(fibroblast activation protein, FAP)可将肿瘤伪装成伤口, 从而阻止免疫细胞的攻击^[102]; 肿瘤微环境中还有大量具有抑制功能的免疫细胞群体, 包括调节性T细胞、髓性前体抑制细胞、肿瘤相关的巨噬细胞等及大量免疫抑制性细胞因子, 可直接抑制T淋巴细胞的免疫功能, 并使抗原呈递细胞的分化、成熟、迁移异常, 功能缺陷^[103,104]; 髓系来源的慢性炎症细胞还可通过分泌核转录因子、炎症介质、趋化因子及细胞因子等促进细胞的增殖、存活、浸润、转移及新生血管形成, 从而促进肿瘤的发生和发展^[105]。

由此可见, 免疫与肿瘤的关系非常复杂, 一方面免疫系统能通过杀伤癌细胞抑制肿瘤的进展; 另一方面, 慢性炎症反应所营造的微环境又可促进肿瘤的发生和发展, 并使癌细胞逃避免疫系统的杀伤。而HCC的转归将取决于这两方面效应的力量对比, 从理论上说, 如能有效的解除免疫抑制并激活机体的抗肿瘤免疫, 则使HCC完全消退是有可能的。

2 讨论

缺血、戒酒、输血等的单独作用效应一般情况下都不足以使得肿瘤完全消退, 但他们都可通过各种机制影响HCC的进展, 而其中大部分都与免疫有关。同时, 免疫也可以很好地解释HCC自发消退过程中的一些现象: (1)原发灶和转移灶均可发生持续的消退, 说明导致自发消退的应为一全身性的作用机制, 且触发后可持续发挥作用; (2)有克隆特异性。HCC转移灶的克隆来源于原发灶, 但由于肿瘤多中心发生的特点, 原发灶包含有转移灶的克隆, 但却不一定与转移灶完全相同, 即{转移灶的克隆}⊆{原发灶的克隆}。按此关系, 如原发灶因特异性抗肿瘤免疫的作用而发生消退, 则转移灶也必然消退^[40], 目前未见原发灶消退而转移灶不消退的报道; 但如果转移灶先发生消退, 原发灶却不一定完全消退^[51,53,57,59,75]。另外, 大部分自发消退后复发的病例, 复发灶都为新发, 且与原肿瘤有着完全不同的生物学特性(如原肿瘤通常伴AFP的升高, 但复发肿瘤AFP不升高), 故原已形成的针对原肿瘤克隆的特异性

免疫不能有效的遏制复发的肿瘤. 由上特点, 并结合免疫机制的效应可知, 其应该是最有可能导致HCC自发消退的原因.

然而, 如前所述, 尽管大量的体外实验表明, 许多肿瘤相关抗原都能有效激活抗肿瘤免疫, 但在活体内免疫系统却往往不能有效地抑制肿瘤进展, 这可能与体内微环境的免疫抑制作用有关; 而前期对HCC自发消退的流行病学研究也表明, 伴有肝硬化的患者自发消退发生率偏低, 而酒精相关的患者则较高, 考虑与肝硬化微环境作为滋生HCC的“土壤”会持续存在不易消除, 而酒精则较易戒除有关(待发表). 以上均提示肿瘤局部微环境在HCC转归中的重要性, 而如何有效地消除微环境对免疫的抑制有可能成为激活抗肿瘤免疫的关键. Kraman等^[102]在鼠身上的实验表明, 如去除表达FAP的基质细胞, 具有免疫原性的肿瘤基质细胞和癌细胞在IFN- γ 及TNF- α 介导下均可迅速发生缺氧性坏死. 这提示, 如果解除了局部的免疫抑制, 依靠免疫系统的作用是有可能会使得肿瘤发生完全消退的.

缺血、戒酒、抗抑郁、输血等有可能正是通过改善肿瘤的局部微环境而发挥作用: (1)缺血所致的坏死可解除局部肿瘤细胞对免疫系统的抑制, 同时坏死的细胞还可被抗原呈递细胞吞噬并提呈, 从而激发机体的抗肿瘤免疫. 临床研究表明, 射频消融、化疗栓塞等原位摧毁肿瘤组织的方法通常能改善患者的免疫状态并取得较好疗效^[106,107]; (2)酒精、精神抑郁等导致的HCC普遍存在免疫调控异常及慢性炎症反应, 去除危险因素后, 有可能改善免疫状态并消除慢性炎症微环境而导致肿瘤的消退; (3)输血对免疫系统的抑制是普遍的, 其对细胞免疫的抑制固然不利于HCC的消退, 但对慢性炎症的抑制反而有可能消除微环境的不利影响, 激活特异性的抗肿瘤免疫; (4)中草药、西利马林、桑黄等均对免疫有一定的调节作用, 其中已证实西利马林可通过抗炎作用改善局部慢性炎症微环境.

3 结论

HCC的自发消退是一种很有趣的现象, 说明人体自身即存在能使肿瘤发生完全消退的机制. 探讨这种机制, 有可能开辟HCC治疗的一个全新领域. 目前研究工作较难开展, 最主要的瓶颈在于: HCC的自发消退是一个小概率事件, 且事先难以预测, 而到目前为止, 在实验室亦没能做

出相应的实验动物模型. 故很难获得合适的样本进行研究. 对已报道的病例进行统计分析不失为一种较好的方法.

本文通过对已报道的英文文献进行整理、统计, 并对自发消退的特点和各种可能的机制进行了分析. 结果显示: 免疫是最有可能导致HCC自发消退的原因, 其中又以免疫抑制微环境的解除更为关键; 缺血、戒酒、输血等都有可能通过解除免疫抑制并激活特异性抗肿瘤免疫而发挥作用, 但其具体的作用机制仍有待进一步的实验室研究才能阐明.

4 参考文献

- 1 Cole WH, Everson TC. Spontaneous regression of cancer: preliminary report. *Ann Surg* 1956; 144: 366-383
- 2 Cole WH. Relationship of causative factors in spontaneous regression of cancer to immunologic factors possibly effective in cancer. *J Surg Oncol* 1976; 8: 391-411
- 3 Cole WH. Efforts to explain spontaneous regression of cancer. *J Surg Oncol* 1981; 17: 201-209
- 4 Epstein RJ, Leung TW. Reversing hepatocellular carcinoma progression by using networked biological therapies. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 11-17
- 5 Oquiénena S, Guillen-Grima F, Iñarrairaegui M, Zozaya JM, Sangro B. Spontaneous regression of hepatocellular carcinoma: a systematic review. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2009; 21: 254-257
- 6 Gomaa AI, Khan SA, Leen EL, Waked I, Taylor-Robinson SD. Diagnosis of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 1301-1314
- 7 Alqutub A, Peck D, Marotta P. Spontaneous regression of a large hepatocellular carcinoma: case report. *Ger Med Sci* 2011; 9: Doc07
- 8 Storey RE, Huerta AL, Khan A, Laber DA. Spontaneous complete regression of hepatocellular carcinoma. *Med Oncol* 2011; 28: 948-950
- 9 Oquiénena S, Iñarrairaegui M, Vila JJ, Alegre F, Zozaya JM, Sangro B. Spontaneous regression of hepatocellular carcinoma: three case reports and a categorized review of the literature. *Dig Dis Sci* 2009; 54: 1147-1153
- 10 Kondo S, Okusaka T, Ueno H, Ikeda M, Morizane C. Spontaneous regression of hepatocellular carcinoma. *Int J Clin Oncol* 2006; 11: 407-411
- 11 Randolph AC, Tharalson EM, Gilani N. Spontaneous regression of hepatocellular carcinoma is possible and might have implications for future therapies. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2008; 20: 804-809
- 12 Terasaki T, Hanazaki K, Shiohara E, Matsunaga Y, Koide N, Amano J. Complete disappearance of recurrent hepatocellular carcinoma with peritoneal dissemination and splenic metastasis: a unique clinical course after surgery. *J Gastroenterol Hepatol* 2000; 15: 327-330
- 13 Li AJ, Wu MC, Cong WM, Shen F, Yi B. Spontaneous complete necrosis of hepatocellular carcinoma: a case report. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2003; 2: 152-154
- 14 Morimoto Y, Tanaka Y, Itoh T, Yamamoto S, Mizuno H, Fushimi H. Spontaneous necrosis of hepato-

■同行评价

本文对临床医生全面正确认识HCC的自然转归具有实际意义, 而且对于进一步探索 and 发现新型抗肿瘤的方法有一定的启迪作用.

- cellular carcinoma: a case report. *Dig Surg* 2002; 19: 413-418
- 15 Nakai T, Shimomura T, Hirokawa F. Spontaneous regression of recurrent hepatocellular carcinoma after TAE: possible mechanisms of immune mediation. *Int J Clin Oncol* 2001; 6: 149-152
- 16 Gaffey MJ, Joyce JP, Carlson GS, Esteban JM. Spontaneous regression of hepatocellular carcinoma. *Cancer* 1990; 65: 2779-2783
- 17 Lam KC, Ho JC, Yeung RT. Spontaneous regression of hepatocellular carcinoma: a case study. *Cancer* 1982; 50: 332-336
- 18 Markovic S, Ferlan-Marolt V, Hlebanja Z. Spontaneous regression of hepatocellular carcinoma. *Am J Gastroenterol* 1996; 91: 392-393
- 19 Ayres RC, Robertson DA, Dewbury KC, Millward-Sadler GH, Smith CL. Spontaneous regression of hepatocellular carcinoma. *Gut* 1990; 31: 722-724
- 20 Chien RN, Chen TJ, Liaw YF. Spontaneous regression of hepatocellular carcinoma. *Am J Gastroenterol* 1992; 87: 903-905
- 21 Kaczynski J, Hansson G, Remotti H, Wallerstedt S. Spontaneous regression of hepatocellular carcinoma. *Histopathology* 1998; 32: 147-150
- 22 Lin TJ, Liao LY, Lin CL, Shih LS, Chang TA, Tu HY, Chen RC, Wang CS. Spontaneous regression of hepatocellular carcinoma: a case report and literature review. *Hepatogastroenterology* 2004; 51: 579-582
- 23 Ohta H, Sakamoto Y, Ojima H, Yamada Y, Hibi T, Takahashi Y, Sano T, Shimada K, Kosuge T. Spontaneous regression of hepatocellular carcinoma with complete necrosis: case report. *Abdom Imaging* 2005; 30: 734-737
- 24 Iiai T, Sato Y, Nabatame N, Yamamoto S, Makino S, Hatakeyama K. Spontaneous complete regression of hepatocellular carcinoma with portal vein tumor thrombus. *Hepatogastroenterology* 2003; 50: 1628-1630
- 25 Ohtani H, Yamazaki O, Matsuyama M, Horii K, Shimizu S, Oka H, Nebiki H, Kioka K, Kurai O, Kawasaki Y, Manabe T, Murata K, Matsuo R, Inoue T. Spontaneous regression of hepatocellular carcinoma: report of a case. *Surg Today* 2005; 35: 1081-1086
- 26 Grossmann M, Hoermann R, Weiss M, Jauch KW, Oertel H, Staebler A, Mann K, Engelhardt D. Spontaneous regression of hepatocellular carcinoma. *Am J Gastroenterol* 1995; 90: 1500-1503
- 27 Matsuo R, Ogata H, Tsuji H, Kitazono T, Shimada M, Taguchi K, Fujishima M. Spontaneous regression of hepatocellular carcinoma--a case report. *Hepatogastroenterology* 2001; 48: 1740-1742
- 28 Misawa K, Hata Y, Manabe K, Matsuoka S, Saito M, Takada J, Sano F. Spontaneous regression of hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol* 1999; 34: 410-414
- 29 Lee SC, Chung HW, Chung JB, Park YN, Ahn SH, Park SW, Chun CY, Moon YM, Kang JK, Park IS. Total necrosis of hepatocellular carcinoma due to spontaneous occlusion of feeding artery. *Yonsei Med J* 2002; 43: 123-127
- 30 Gottfried EB, Steller R, Paronetto F, Lieber CS. Spontaneous regression of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 1982; 82: 770-774
- 31 Suzuki M, Okazaki N, Yoshino M, Yoshida T. Spontaneous regression of a hepatocellular carcinoma--a case report. *Hepatogastroenterology* 1989; 36: 160-163
- 32 Imaoka S, Sasaki Y, Masutani S, Ishikawa O, Furukawa H, Kabuto T, Kameyama M, Ishiguro S, Hasegawa Y, Koyama H. Necrosis of hepatocellular carcinoma caused by spontaneously arising arterial thrombus. *Hepatogastroenterology* 1994; 41: 359-362
- 33 Izuishi K, Ryu M, Hasebe T, Kinoshita T, Konishi M, Inoue K. Spontaneous total necrosis of hepatocellular carcinoma: report of a case. *Hepatogastroenterology* 2000; 47: 1122-1124
- 34 Senturk H, Canbakan B, Cumali R. Regression of a hepatocellular carcinoma following treatment with octreotide and tamoxifen in a patient with advanced alcoholic cirrhosis. *J Gastroenterol Hepatol* 2004; 19: 719-720
- 35 Tocci G, Conte A, Guarascio P, Visco G. Spontaneous remission of hepatocellular carcinoma after massive gastrointestinal haemorrhage. *BMJ* 1990; 300: 641-642
- 36 Feo CF, Marrosu A, Scanu AM, Ginesu GC, Fancellu A, Migaleddu V, Porcu A. Spontaneous regression of hepatocellular carcinoma: report of a case. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004; 16: 933-936
- 37 Jang TJ, Lee JI, Kim DH, Kim JR, Lee HK. Spontaneous regression of hepatocellular carcinoma--a case report. *Korean J Intern Med* 2000; 15: 147-150
- 38 van Halteren HK, Salemans JM, Peters H, Vreugdenhil G, Driessen WM. Spontaneous regression of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 1997; 27: 211-215
- 39 Kojima H, Tanigawa N, Kariya S, Komemushi A, Shomura Y, Sawada S, Arai E, Yokota Y. A case of spontaneous regression of hepatocellular carcinoma with multiple lung metastases. *Radiat Med* 2006; 24: 139-142
- 40 McDermott WV, Khetry U. Clear cell carcinoma of the liver with spontaneous regression of metastases. *J Surg Oncol* 1994; 57: 206-209
- 41 Gómez Sanz R, Moreno Gonzalez E, Colina Ruiz-Delgado F, Garcia-Muñoz H, Ochando Cerdan F, Gonzalez-Pinto I. Spontaneous regression of a recurrent hepatocellular carcinoma. *Dig Dis Sci* 1998; 43: 323-328
- 42 Jozuka H, Jozuka E, Suzuki M, Takeuchi S, Takatsu Y. Psycho-neuro-immunological treatment of hepatocellular carcinoma with major depression--a single case report. *Curr Med Res Opin* 2003; 19: 59-63
- 43 Heianna J, Miyauchi T, Suzuki T, Ishida H, Hashimoto M, Watarai J. Spontaneous regression of multiple lung metastases following regression of hepatocellular carcinoma after transcatheter arterial embolization. A case report. *Hepatogastroenterology* 2007; 54: 1560-1562
- 44 Cheng HM, Tsai MC. Regression of hepatocellular carcinoma spontaneous or herbal medicine related? *Am J Chin Med* 2004; 32: 579-585
- 45 Kato H, Nakamura M, Muramatsu M, Orito E, Ueda R, Mizokami M. Spontaneous regression of hepatocellular carcinoma: two case reports and a literature review. *Hepatol Res* 2004; 29: 180-190
- 46 Sato Y, Fujiwara K, Nakagawa S, Kanishima S, Ohta Y, Oka Y, Hayashi S, Oka H. A case of spontaneous regression of hepatocellular carcinoma with bone metastasis. *Cancer* 1985; 56: 667-671
- 47 Ozeki Y, Matsubara N, Tateyama K, Kokubo M, Shimoji H, Katayama M. Spontaneous complete necrosis of hepatocellular carcinoma. *Am J Gastroenterol* 1996; 91: 391-392
- 48 Sibartie V, Moriarty J, Crowe J. Spontaneous regression of hepatocellular carcinoma. *Am J Gastroenterol* 2008; 103: 1050-1051
- 49 Iwasaki M, Furuse J, Yoshino M, Moriyama N, Kanemoto H, Okumura H. Spontaneous regression

- of hepatocellular carcinoma: a case report. *Jpn J Clin Oncol* 1997; 27: 278-281
- 50 Park HS, Jang KY, Kim YK, Cho BH, Moon WS. Hepatocellular carcinoma with massive lymphoid infiltration: a regressing phenomenon? *Pathol Res Pract* 2009; 205: 648-652
 - 51 Toyoda H, Sugimura S, Fukuda K, Mabuchi T. Hepatocellular carcinoma with spontaneous regression of multiple lung metastases. *Pathol Int* 1999; 49: 893-897
 - 52 Nouse K, Uematsu S, Shiraga K, Okamoto R, Harada R, Takayama S, Kawai W, Kimura S, Ueki T, Okano N, Nakagawa M, Mizuno M, Araki Y, Shiratori Y. Regression of hepatocellular carcinoma during vitamin K administration. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 6722-6724
 - 53 Nam SW, Han JY, Kim JI, Park SH, Cho SH, Han NI, Yang JM, Kim JK, Choi SW, Lee YS, Chung KW, Sun HS. Spontaneous regression of a large hepatocellular carcinoma with skull metastasis. *J Gastroenterol Hepatol* 2005; 20: 488-492
 - 54 Jeon SW, Lee MK, Lee YD, Seo HE, Cho CM, Tak WY, Kweon YO. Clear cell hepatocellular carcinoma with spontaneous regression of primary and metastatic lesions. *Korean J Intern Med* 2005; 20: 268-273
 - 55 Blondon H, Fritsch L, Cherqui D. Two cases of spontaneous regression of multicentric hepatocellular carcinoma after intraperitoneal rupture: possible role of immune mechanisms. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004; 16: 1355-1359
 - 56 Uenishi T, Hirohashi K, Tanaka H, Ikebe T, Kinoshita H. Spontaneous regression of a large hepatocellular carcinoma with portal vein tumor thrombi: report of a case. *Surg Today* 2000; 30: 82-85
 - 57 Ohba K, Omagari K, Nakamura T, Ikuno N, Saeki S, Matsuo I, Kinoshita H, Masuda J, Hazama H, Sakamoto I, Kohno S. Abscopal regression of hepatocellular carcinoma after radiotherapy for bone metastasis. *Gut* 1998; 43: 575-577
 - 58 Meza-Junco J, Montañó-Loza AJ, Martínez-Benítez B, Cabrera-Aleksandrova T. Spontaneous partial regression of hepatocellular carcinoma in a cirrhotic patient. *Ann Hepatol* 2007; 6: 66-69
 - 59 Mochizuki T, Takehara Y, Nishimura T, Takahashi M, Kaneko M. Regression of hepatocellular carcinoma. *AJR Am J Roentgenol* 1991; 156: 868-869
 - 60 Stoelben E, Koch M, Hanke S, Lossnitzer A, Gaertner HJ, Schentke KU, Bunk A, Saeger HD. Spontaneous regression of hepatocellular carcinoma confirmed by surgical specimen: report of two cases and review of the literature. *Langenbecks Arch Surg* 1998; 383: 447-452
 - 61 Takayasu K, Muramatsu Y, Shima Y, Moriyama N, Yamada T, Yoshida T, Makuuchi M, Kishi K. Necrosis of hepatocellular carcinoma as a result of subintimal injury incurred by hepatic angiography: report of two cases. *Am J Gastroenterol* 1986; 81: 979-983
 - 62 Hsu CY, Sun PL, Chang HC, Perng DS, Chen YS. Spontaneous regression of advanced hepatocellular carcinoma: a case report. *Cases J* 2009; 2: 6251
 - 63 Arakawa Y, Mori H, Ikegami T, Hanaoka J, Kanamoto M, Kanemura H, Morine Y, Imura S, Shimada M. Hepatocellular carcinoma with spontaneous regression: report of the rare case. *Hepatogastroenterology* 2008; 55: 1770-1772
 - 64 Yano Y, Yamashita F, Kuwaki K, Fukumori K, Kato O, Kiyomatsu K, Sakai T, Yamamoto H, Yamasaki F, Ando E, Sata M. Partial spontaneous regression of hepatocellular carcinoma: a case with high concentrations of serum lens culinaris agglutinin-reactive alpha fetoprotein. *Kurume Med J* 2005; 52: 97-103
 - 65 Magalotti D, Gueli C, Zoli M. Transient spontaneous regression of hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology* 1998; 45: 2369-2371
 - 66 Takeda Y, Togashi H, Shinzawa H, Miyano S, Ishii R, Karasawa T, Takeda Y, Saito T, Saito K, Haga H, Matsuo T, Aoki M, Mitsuhashi H, Watanabe H, Takahashi T. Spontaneous regression of hepatocellular carcinoma and review of literature. *J Gastroenterol Hepatol* 2000; 15: 1079-1086
 - 67 Abiru S, Kato Y, Hamasaki K, Nakao K, Nakata K, Eguchi K. Spontaneous regression of hepatocellular carcinoma associated with elevated levels of interleukin 18. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 774-775
 - 68 Lee HS, Lee JS, Woo GW, Yoon JH, Kim CY. Recurrent hepatocellular carcinoma after spontaneous regression. *J Gastroenterol* 2000; 35: 552-556
 - 69 Ikeda M, Okada S, Ueno H, Okusaka T, Kuriyama H. Spontaneous regression of hepatocellular carcinoma with multiple lung metastases: a case report. *Jpn J Clin Oncol* 2001; 31: 454-458
 - 70 Nakajima T, Moriguchi M, Watanabe T, Noda M, Fuji N, Minami M, Itoh Y, Okanoue T. Recurrence of hepatocellular carcinoma with rapid growth after spontaneous regression. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 3385-3387
 - 71 Garrido Serrano A, Guerrero Igea FJ, Lepe Jiménez JA, Palomo Gil S. [Spontaneous regression of hepatocellular carcinoma in a cirrhotic patient]. *Gastroenterol Hepatol* 2001; 24: 503-505
 - 72 Herrera Abián A, Erdozain Sosa JC, Muñoz Núñez F, Cerezo López E, Presa Valle M, Molina Pérez E, Lizasoain Urkola J, Segura Cabral JM. [Hepatocellular carcinoma: is spontaneous regression possible?]. *Rev Esp Enferm Dig* 1995; 87: 476-479
 - 73 Lee S, Kim C, Lee SC, Kim SE, Park YN, Song KH, Han KH, Chon CY, Moon YM. A case of spontaneous necrosis of hepatocellular carcinoma after development of pneumonia. *Korean J Hepatol* 2001; 7: 330-335
 - 74 Hong JH, Seo DD, Jeon TJ, Oh TH, Shin WC, Choi WC, Cho HS. [A case of spontaneous regression of hepatocellular carcinoma with multiple lung metastases]. *Korean J Gastroenterol* 2010; 55: 133-138
 - 75 Matsumata T, Takesue F, Suehiro T, Maeda T, Itasaka H, Yoshida K. [Spontaneous regression of hepatocellular carcinoma: a case report]. *Fukuoka Igaku Zasshi* 1998; 89: 20-27
 - 76 Barreca G, Lucisano A, Lauria A, Abbagnara F, Colletti G. [Spontaneous regression of hepatocellular carcinoma. Report of a case]. *Radiol Med* 2000; 99: 482-484
 - 77 Ledesma S, Boada L, Titó L, Armengol S, Torres M. [Spontaneous regression of hepatocellular carcinoma]. *Gastroenterol Hepatol* 1998; 21: 469-470
 - 78 Reñé Espinet JM, Ruiz González A, Buenestado García J, Rubio Caballero M. [The spontaneous regression of a hepatocellular carcinoma]. *Rev Esp Enferm Dig* 1992; 81: 60-61
 - 79 廖晓锋, 易继林, 杨志芳, 李兴睿. 肝细胞癌化疗栓塞后肿瘤微血管密度的变化. *华中科技大学学报(医学版)* 2002; 31: 544-546
 - 80 韩国宏, 黄高升, 郭庆林, 郭宇良. 肝细胞癌栓塞后坏死的病理学观察. *解放军医学杂志* 1995; 20: 55
 - 81 李爱华, 赵刚. 酒精性肝病发病机制的研究进展. *吉林医学* 2010; 31: 2670-2672
 - 82 李春英, 邹金海, 刘晨第, 黄青霞, 宋慧. 戒酒与酒精性

- 肝纤维化. 临床消化病杂志 2008; 20: 309-311
- 83 Kato K, Nishimura D, Sano H, Katada N, Sugimoto Y, Noba H, Yoshino M, Samori T, Mitani Y, Takeichi M. [Long-term follow-up study of alcoholic liver disease]. *Nihon Shokakibyo Gakkai Zasshi* 1990; 87: 1829-1836
 - 84 Lu YS, Hsu C, Li CC, Kuo SH, Yeh KH, Yang CH, Hsu CH, Wu CY, Cheng AL. Phase II study of combination doxorubicin, interferon-alpha, and high-dose tamoxifen treatment for advanced hepatocellular carcinoma. *Hepato-gastroenterology* 2004; 51: 815-819
 - 85 Taylor OM, Benson EA, McMahon MJ. Clinical trial of tamoxifen in patients with irresectable pancreatic adenocarcinoma. The Yorkshire Gastrointestinal Tumour Group. *Br J Surg* 1993; 80: 384-386
 - 86 Mandlekar S, Kong AN. Mechanisms of tamoxifen-induced apoptosis. *Apoptosis* 2001; 6: 469-477
 - 87 鲁小梅, 王盛, 刘瑞江, 范如霖, 宋勤华. 水飞蓟素抗肿瘤作用及其机制研究进展. 中国药理学与毒理学杂志 2009; 23: 320-324
 - 88 张问, 焦燕, 李航, 李敬轩, 蔡云, 李红, 杨世杰. 裂隙木层孔菌抗肿瘤作用及其机制研究. 中草药 2011; 42: 2047-2050
 - 89 张爽, 李红, 杨世杰. 缝裂层孔菌对小鼠的抑瘤及免疫调节作用. 吉林大学学报(医学版) 2006; 32: 964-967
 - 90 马博, 李中琦, 马志敏. 消化系统癌症病人抑郁情绪和细胞免疫的研究. 中国行为医学科学与脑科学杂志 2002; 11: 49-50
 - 91 Eschwege F. Depression and Cancer. *Encephale* 1994; 20: 657
 - 92 伍志臻, 陈福国. 五项细胞免疫指标与抑郁性神经症的相关性研究. 上海医学检验杂志 1999; 14: 280-281
 - 93 郭雅春, 林琼林, 章霞, 彭燕, 郑全荣, 徐晶心. 临床输血对患者免疫功能的影响及意义. 临床血液学杂志 2011; 24: 614-616
 - 94 贾文焯, 韦军民. 输血对免疫系统的影响. 中国实用外科杂志 2007; 27: 171-173
 - 95 Thimme R, Neagu M, Boettler T, Neumann-Haefelin C, Kersting N, Geissler M, Makowiec F, Obermaier R, Hopt UT, Blum HE, Spangenberg HC. Comprehensive analysis of the alpha-fetoprotein-specific CD8+ T cell responses in patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2008; 48: 1821-1833
 - 96 Komori H, Nakatsura T, Senju S, Yoshitake Y, Motomura Y, Ikuta Y, Fukuma D, Yokomine K, Harao M, Beppu T, Matsui M, Torigoe T, Sato N, Baba H, Nishimura Y. Identification of HLA-A2- or HLA-A24-restricted CTL epitopes possibly useful for glypican-3-specific immunotherapy of hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 2689-2697
 - 97 Korangy F, Ormandy LA, Bleck JS, Klempnauer J, Wilkens L, Manns MP, Greten TF. Spontaneous tumor-specific humoral and cellular immune responses to NY-ESO-1 in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 4332-4341
 - 98 Shang XY, Chen HS, Zhang HG, Pang XW, Qiao H, Peng JR, Qin LL, Fei R, Mei MH, Leng XS, Gnjatich S, Ritter G, Simpson AJ, Old LJ, Chen WF. The spontaneous CD8+ T-cell response to HLA-A2-restricted NY-ESO-1b peptide in hepatocellular carcinoma patients. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 6946-6955
 - 99 Bricard G, Bouzourene H, Martinet O, Rimoldi D, Halkic N, Gillet M, Chaubert P, Macdonald HR, Romero P, Cerottini JC, Speiser DE. Naturally acquired MAGE-A10- and SSX-2-specific CD8+ T cell responses in patients with hepatocellular carcinoma. *J Immunol* 2005; 174: 1709-1716
 - 100 Zerbini A, Pilli M, Soliani P, Ziegler S, Pelosi G, Orlandini A, Cavallo C, Uggeri J, Scandroglio R, Crafa P, Spagnoli GC, Ferrari C, Missale G. Ex vivo characterization of tumor-derived melanoma antigen encoding gene-specific CD8+ cells in patients with hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2004; 40: 102-109
 - 101 Mizukoshi E, Nakamoto Y, Marukawa Y, Arai K, Yamashita T, Tsuji H, Kuzushima K, Takiguchi M, Kaneko S. Cytotoxic T cell responses to human telomerase reverse transcriptase in patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2006; 43: 1284-1294
 - 102 Kraman M, Bambrough PJ, Arnold JN, Roberts EW, Magiera L, Jones JO, Gopinathan A, Tuveson DA, Fearon DT. Suppression of antitumor immunity by stromal cells expressing fibroblast activation protein-alpha. *Science* 2010; 330: 827-830
 - 103 Ahmad M, Rees RC, Ali SA. Escape from immunotherapy: possible mechanisms that influence tumor regression/progression. *Cancer Immunol Immunother* 2004; 53: 844-854
 - 104 Yang L, Carbone DP. Tumor-host immune interactions and dendritic cell dysfunction. *Adv Cancer Res* 2004; 92: 13-27
 - 105 王李杰, 白莉. 原发性肝癌与炎症关系的研究进展. 癌症进展 2010; 8: 357-365
 - 106 姜春林, 匡铭. 肝癌热消融治疗引起免疫增强机制的研究进展. 中国病理生理杂志 2011; 27: 1020-1024
 - 107 郑映斌, 郑云. 肝癌局部消融治疗的研究进展. 癌症 2009; 28: 1219-1224

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》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)

上皮细胞间质转化在大肠癌发生发展中的研究进展

朱庆超, 秦环龙

朱庆超, 秦环龙, 上海交通大学附属第六人民医院普外科 上海市 200233

作者贡献分布: 本文综述由朱庆超完成; 秦环龙审校。

通讯作者: 秦环龙, 教授, 主任医师, 200233, 上海市, 上海交通大学附属第六人民医院普外科. huanlongqin2012@yahoo.cn

电话: 021-64361349

收稿日期: 2012-05-01 修回日期: 2012-07-09

接受日期: 2012-07-20 在线出版日期: 2012-07-28

Progress in understanding the role of epithelial-mesenchymal transition in the pathogenesis of colorectal tumors

Qing-Chao Zhu, Huan-Long Qin

Qing-Chao Zhu, Huan-Long Qin, Department of Surgery, Shanghai Sixth People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200233, China

Correspondence to: Huan-Long Qin, Professor, Chief Physician, Department of Surgery, Shanghai Sixth People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200233, China. huanlongqin2012@yahoo.cn

Received: 2012-05-01 Revised: 2012-07-09

Accepted: 2012-07-20 Published online: 2012-07-28

Abstract

Epithelial-mesenchymal transition is a well established biological event that plays an important role not only in the normal development of tissues and organs but also in the pathogenesis of many diseases. Increasing evidence has established its presence in the human colon during colorectal carcinogenesis and cancer invasion, chronic inflammation-related fibrosis, and mucosal healing. A large body of evidence supports the role of transforming growth factor- β and its downstream Smad signaling, the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt/mTOR axis, the Ras/mitogen-activated protein kinase/Snail/Slug and FOXC2 pathway, and Hedgehog signaling and microRNAs in epithelial-mesenchymal transition in the development of colorectal cancers. Here we discuss the role of these pathways in the initiation and development of the transition events. A better understanding of their induction and regulation may lead to the identification of pathways and factors that could be potent therapeutic targets.

Key Words: Epithelial-mesenchymal transition; Colorectal cancer; Key molecule; Signal pathway

Zhu QC, Qin HL. Progress in understanding the role of epithelial-mesenchymal transition in the pathogenesis of colorectal tumors. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(21): 1949-1956

摘要

上皮间质转化是一种已知的分子事件, 他不仅在正常组织器官发育过程中起着重要的作用, 而且在疾病状态也发挥着重要的作用. 越来越多的证据显示在人类大肠癌形成和肿瘤侵袭过程中发生了上皮间质转化, 而且其也参与了慢性炎症相关性纤维化和黏膜的修复过程. 在大肠癌发生发展过程中越来越多的证据支持转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β)和他下游的Smad信号传导、磷酸酰肌醇3'激酶/Akt/mTOR轴、Ras丝裂原活化蛋白激酶/Snail/Slug/FOXC2途径、Hedgehog信号通路和microRNAs等介导的上皮细胞间质转化(epithelial-to-mesenchymal transition, EMT)所发挥的重要作用. 现将对这些途径在大肠癌上皮细胞间质转化启动和发展过程中的作用进行综述. 对EMT在大肠癌发生发展过程中所起到的诱导和调控作用进行深入了解, 将会促进对相关信号通路和潜在治疗靶点分子的认识.

关键词: 上皮间质转化; 大肠癌; 关键分子; 信号通路

朱庆超, 秦环龙. 上皮细胞间质转化在大肠癌发生发展中的研究进展. *世界华人消化杂志* 2012; 20(21): 1949-1956
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1949.asp>

0 引言

目前, 大肠癌已是欧洲排名第2位的肿瘤致死性疾病, 占肿瘤致死性疾病的10%左右. 引起大肠癌发生的原因众多, 如基因突变引起的家族性腺瘤性息肉病(familial adenomatous polyposis, FAP)、DNA错配修复基因(MMR)突变引起的遗传性非息肉性结肠癌(hereditary nonpolyposis colorectal cancer, HNPCC)、Crohn's病、溃疡性结肠

■背景资料

大肠癌是一种多因素、长期形成的、复杂的病变过程, 其发病机制复杂, 近来研究发现上皮细胞间质转化(EMT)在大肠癌发生发展过程中起着重要作用, 并与肿瘤细胞的浸润和转移有着非常密切的关系.

■同行评议者

王娅兰, 教授, 重庆医科大学基础医学院病理教研室

■ 研究前沿

EMT 主要是由 E-cadherin 的转录抑制因子诱发的, 因此借助靶向抑制 Snail 等转录因子的治疗方法为防止肿瘤进展提供了可能。而 EMT 信号传导通路中的关键分子 GSK-3 β 、PAK、TGF β 等也有可能成为阻断 EMT 的重要靶点。

炎、上皮细胞内癌基因激活和抑癌基因失活等均与大肠癌的发生发展密切相关^[1]。上皮细胞间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)是指在生理或病理情况下发生细胞上皮-间质转变, 同时伴随细胞形态与相关基因表达的改变。EMT在胚胎形成以及组织器官发育过程中也起着重要作用(如中胚层和神经冠结构形成以及心脏形态发生过程^[2]), 但也可引起器官纤维化和参与肿瘤形成过程, 在此过程中上皮细胞顶-底极性改变、桥粒等紧密连接结构消失、细胞骨架重组, 波形蛋白表达上调、角蛋白表达下调, 从而使细胞离体、获得迁移能力, 并能抵抗细胞凋亡^[3]。近来研究发现EMT在大肠癌发生发展过程中起着重要作用, 并与肿瘤细胞的浸润和转移有着非常密切的关系。

1 EMT在炎症促进大肠癌发生发展中的作用

慢性炎症被认为是包括大肠癌在内的许多种人类肿瘤疾病的原因之一, 流行病学和临床研究均证实两种主要的炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD): 溃疡性结肠炎和Crohn's病^[4]发展成大肠癌的风险明显升高。慢性炎症可以通过诱导细胞DNA修饰导致肠上皮细胞发育不良, 此外还可通过DNA甲基化和组蛋白修饰等作用影响肠上皮发育过程^[5]。Bataille等^[6]在Crohn's病瘻管形成过程中发现肠道上皮标志物E-cadherin和 β -catenin表达降低(β -catenin在EMT的起始阶段合成增加, 而在EMT最终阶段合成明显减少^[7]); 间质标志物 β -integrin表达增多(TGF- β 激活EMT的过程依赖于 β -integrin, 然后通过Smad3依赖性的转录过程或者非Smad3依赖性、p38MAPK激活和GTP酶调节的信号传导途径^[8]), 而该蛋白随着EMT的进展逐渐由胞膜向胞质、胞核转移, β -catenin移位被认为是Crohn's病发展过程中EMT的关键分子步骤。

在肿瘤相关炎症(cancer related inflammation, CRI)相关分子中发现一些重要的始动因子, 包括NF- κ B、STAT3^[9]、IL-1 β 、IL-6、IL-10和TNF- α 等。NF- κ B是一种关键的炎症/免疫调节因子^[10]。Douglas等在大肠癌细胞中发现了异常的NF- κ B调节, 且证实在结肠肿瘤起始和发展中NF- κ B和CRI之间存在密切联系, 通过靶向灭活IkappaB使肿瘤浸润白细胞中NF- κ B失活抑制了炎症相关大肠癌的发生, 从而为结肠肿瘤中NF- κ B和炎症细胞的作用提供了基因水平证据。IL-6是NF- κ B激活的一个主要效应分子, 并且与

STAT3存在密切关系, 它具有促进生长和抗凋亡能力^[11]。研究发现IL-6能保护正常肠上皮细胞和癌前细胞免受凋亡, 并促进肿瘤起始细胞增殖, 在此过程中NF- κ B-IL-6-STAT3通路起着重要作用。Lee等^[12]发现大肠癌中NF- κ B的活化状态需要STAT3维持, 提示STAT3是肿瘤细胞增殖和存活的关键因子, 并调控了c-Myc、Mcl-1、Cyclin D和Bcl-2表达^[13]。抑制因子从不同水平上调NF- κ B信号通路, Tir8是表达于肠黏膜上IL-1R家族的一员, 他能够通过阻止IRAK-1和TRAF-6, 抑制信号从IL-1R/TLR复合物传导^[14]。在小鼠大肠癌肿瘤模型中发现NF- κ B下游分子CCL2、CCL3、IL-1和IL-6能够促进炎症相关的肿瘤形成, 并发现NF- κ B激活过程中Tir8的缺失直接导致了大肠癌形成^[15]。肿瘤相关巨噬细胞(tumor associated macrophages, TAM)分泌的TNF通过抑制GSK-3 β 促进了Wnt/ β -catenin信号传导, 促进了结肠上皮细胞向间质转化, 此过程在大肠癌发展中起着重要作用^[16]。此外, 炎症细胞中NF- κ B激活也造成了COX-2和ROS水平升高, ROS能诱导DNA损伤、DNA甲基化、转录后修饰和肿瘤抑制基因突变等^[7]; 控制炎症反应和诱导肿瘤细胞凋亡的TGF- β 和低氧诱导因子-1(hypoxia-inducible factor-1, HIF-1)同样是炎症微环境中促使上皮细胞发生间质转化的潜在诱导因子^[17]。

Grivennikov等^[17]证实IL-6与其受体sIL-6 α 结合后停留在细胞表面并能借助胞内TGF- β 通路促进结肠上皮向恶性转化; IL-10激活STAT3(信号传导蛋白-转录激活物)后通过与IL-6相似的途径介导细胞恶性转变^[18]。TGF- β 作为炎症因子可造成包括肠道在内的多器官自身免疫性疾病, 且可激活多种信号通路如Erk、c-Jun、JNK、PI3K和RhoA等^[19], 也能诱导某些转录因子和转录调节因子在EMT中的表达, 包括 δ EF1、SIP1和Snail等, 从而有利于结肠上皮EMT的发生^[20]。TNF- α 在IBD发病机制中是一种重要的炎症因子, 在炎症相关大肠癌(colitis associated colorectal cancer, CAC)中也起着重要作用^[21], TNF- α 在CAC中主要依赖激活胞内转录因子NF- κ B进行信号传导, 通过NF- κ B的多向性转录激活作用(NF- κ B可以结合至靶基因MMP-9、IL-8、uPA、VEGF、CXCR4、骨桥蛋白等的启动子或增强子之上进行调控^[22])诱导结肠上皮细胞向肿瘤细胞分化、增殖, 并抑制细胞凋亡、促进肿瘤侵袭和转移^[23]。此外, 其他炎症因子如IL-12、IL-13和INF- γ 等在慢性大肠炎发展过程

中也参与了肿瘤形成过程, 而TGF- β 、IL-10则能在此过程中发挥协同作用^[24].

目前已证实上述参与炎症发生和发展的各种细胞因子如, TGF- β 、TNF- α 和NF- κ B等均是EMT信号通路的关键因子, 可见EMT参与了炎症促进大肠癌发生和发展的相关过程, 但是EMT在此过程中的详尽机制尚待进一步研究.

2 EMT在腺瘤性息肉病相关的大肠癌发生发展中的作用

FAP在结肠腺瘤性息肉疾病中占有主要地位, 相关研究证实位于染色体5q21的APC突变失活是FAP的主要原因^[25], APC突变被认为启动了大肠癌发生的多步骤过程, 最终FAP往往发展成为大肠癌^[26]. 与FAP相同的是绝大多数散发大肠癌病例起源于结肠腺瘤且同时伴有APC突变. Vécsey-Semjén等^[27]证实小鼠敲除APC外显子exon14后可导致结肠腺瘤发生, 免疫组织化学检测该模型结肠上皮细胞中可见Wnt信号通路的关键因子 β -catenin在胞质和胞核中积累, 且编码C-Myc和Cyclin D1的mRNA也显著增加. APC是一种肿瘤抑制基因, 可以作为Wnt/ β -catenin的负性调控因子, 在正常结肠上皮细胞APC/ β -catenin复合物被丝氨酸-苏氨酸激酶(GSK3 β)磷酸化, 导致 β -catenin降解, 而在APC突变失活及Wnt信号转导通路开启时GSK3 β 的磷酸化作用被抑制^[28], 使其不能诱发 β -catenin降解, 从而造成胞质内的 β -catenin持续累积, 后者作用于靶基因C-Myc和Cyclin D1等, 最终导致Wnt通路介导的EMT发生, 正常结肠黏膜上皮向间质转化, 最终结肠上皮细胞发生恶性转化^[29,30].

Lochter等^[31]利用COGA-8结肠上皮细胞培养发现Cyclin D1与CDK4、CDK6结合, 诱导生成Cyclin A和Cyclin E, 再与CDK2结合从而使结肠上皮细胞从G₁期进入S期. C-Myc启动子区域有 β -catenin结合位点, 因此C-Myc表达可以被Wnt通路上调, C-Myc过表达使其结合至Cyclin D2启动子特定的DNA序列并促进Cyclin D2的转录过程^[32]. Wnt通路还能直接上调Cyclin D1, 因为Cyclin D1启动子区域包含LEF-1结合位点, 而该位点被认为是Wnt通路的直接作用靶点^[33]. β -catenin在胞核内与淋巴细胞增强子结合因子1(LEF-1)和T细胞因子-4(Tcf-4)结合并作为转录共激活子启动下游基因(Slug、Cdx-1、Id2和ENC1等)表达. APC上 β -catenin结合位点的减少程度与Wnt通路中 β -catenin/LEF-1/Tcf-4复合

物增加的程度呈负相关^[34], 而 β -catenin/LEF-1/Tcf-4的增加导致了结肠上皮细胞间紧密连接蛋白ZO-1减少、胞间桥粒等连接蛋白降解、细胞骨架重组、细胞离体和获得迁移能力^[35], 还可以直接作用于AP-1转录因子复合物中c-jun和fra-1的启动子部位使该转录复合物增多、上调uPAR转录^[36]. 此外, 该复合物还能上调ZEB1表达(高表达于FAP腺瘤、结肠腺瘤上皮细胞, 且与胞核 β -catenin水平呈正相关^[37]), 而ZEB1能抑制E-cadherin生成^[38], 且该转录激活复合物参与了腺瘤转变为腺癌甚至肿瘤转移的全过程^[39]. 以上过程最终使结肠上皮细胞经历EMT过程(如细胞间连接蛋白降解、细胞迁移能力增强和获得间质表型等)并向恶性转化.

另外, CK2 α 是一种高度保守的丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶, 可以磷酸化多种底物并在多种生理病理过程中起重要作用^[40]. 正常结肠上皮细胞逐渐演变成腺瘤或腺癌的过程被认为与EMT及E-cadherin、Vimentin和 β -catenin等基因表达改变紧密相关. Zou等^[40]发现CK2 α 表达于正常结肠上皮细胞和结肠腺瘤/腺癌细胞, 通过调节参与细胞周期的癌基因*c-myc*和抑癌基因*p53*和*p21*等影响了大肠癌的演变过程. CK2 α 敲除或转染CK2 α SiRNA后上皮标志物E-cadherin表达显著升高、间质标志物vimentin表达降低, 还能造成细胞中转录因子Snail1、Smad 2/3和癌基因*c-myc*的表达下降, 以上结果说明CK2 α 能够对上皮间质转变起到某种程度的抑制作用, 但是CK2 α 影响结肠腺瘤向大肠癌转变的具体机制尚未完全明确.

3 microRNAs介导的EMT在大肠癌发生发展中的作用

microRNAs是一类长度在18-25 nt的单链寡核糖核苷酸的非编码RNA, 具有高度的保守性、组织特异性和发育时序性^[41], 在转录后水平通过负向调节mRNA发挥其功能, 与mRNA的靶向识别以与3'末端UTR互补性结合为基础^[42]. microRNAs翻译水平的抑制作用常伴随由poly(A)尾加速脱腺苷化和后续核酸外切消化导致的靶mRNA水平减少^[43], 而且microRNAs控制其靶点特异性的关键区域在5'末端2-7个碱基对的种子序列^[44], 可以在细胞增殖、分化、凋亡、新陈代谢及胚胎发育等过程中起调控作用^[45], 部分microRNAs通过调控癌基因和肿瘤抑制基因的表达; 部分通过直接作为癌基因或肿瘤抑制基

■ 相关报道

有研究发现在多种细胞系中加入过氧化氢(H₂O₂)能够激活NF- κ B, 此外细胞中激活NF- κ B的物质也造成了ROS水平明显升高, 而ROS能够诱导DNA损伤、转变细胞信号传导通路; 由于DNA损伤是肿瘤形成的原因之一, 因此由炎症生成的ROS被认为参与了肿瘤形成的过程.

■创新盘点

本文系统综述了EMT在大肠癌发生发展中的研究进展,重点总结了慢性肠道炎症、大肠腺瘤性息肉病、microRNAs在大肠癌发生发展中的作用以及EMT的有关信号通路(包括Wnt/ β -catenin、FGF、Ras、PI3K、Notch和Hedgehog信号通路),其他文献并未对上述方面进行过系统的总结,并明确其重要意义。

因参与了大肠癌的病理过程^[46]。虽然microRNAs参与大肠癌发生发展的相关研究较多,但有关microRNAs在大肠癌中介导EMT的研究仍较少。研究证实在许多原发肿瘤及相应转移瘤中存在不同程度的microRNA表达,在蛋白酪氨酸磷酸酶(PTP)Pez诱导MDCK的细胞系中发现了TGF- β 参与EMT的过程,因为在该细胞系中发现了细胞间连接缺失和间质表型过表达。此外通过RT-PCR还发现miR-200家族(miR-200a、miR-200b、miR-200c、miR-141和249)及miR-205表达的下调,而稳定的miR-200s过表达可以阻止TGF- β 诱导的EMT,提示miR-200s是EMT的关键调控因子,且miR-200s是通过抑制ZEB1和SIP1的翻译来调控EMT的^[47]。关于miR-200家族、ZEB1和SIP1,我们推测上皮细胞和间质细胞表型之间的转化是由ZEB1和SIP1的水平决定的。ZEB1和SIP1结合至目的基因如上皮细胞关键基因E-cadherin启动子成对的ZEB样E-Boxs(CACCTG)上从而抑制这些基因的转录^[48]。以上证据提示miR-200s的丢失可能导致肿瘤的侵袭性增强,甚至造成远处转移。TGF β 、TNF α 由浸润的炎症细胞或肿瘤细胞产生,已被证实能够诱导结肠癌细胞发生EMT,在结肠癌SW480细胞系中通过miRNA表达分析发现稳定敲除ZEB1能够导致胞间连接蛋白E-cadherin表达上调、细胞迁移和侵袭的能力下降,而miR-141、miR-200b和miR-200c的表达水平明显升高,且miR-141、miR-200c的表达上调最为明显。此结果也被RT-PCR检测所证实,提示这两种miRNA参与了结肠癌EMT过程^[49]。而Colwell^[50]利用TGF β /TNF α 诱导LIM1863大肠癌细胞发生EMT的过程中发现miR-21和miR-31表达水平明显升高;蛋白定量分析发现miR-21和miR-31促进了TGF β 诱导的EMT的过程,与miR-200抑制EMT上游调控因子ZEB1/2不同,miR-21和miR-31主要作用于EMT下游因子T淋巴瘤侵袭转移蛋白1(TIAM1),后者是一种Rac GTPase交换因子^[51]。此外,miR-9和miR-335通过直接抑制E-cadherin和SOX4合成促进了大肠癌细胞转移。以上结果说明某些microRNA可以在TGF- β 信号通路的下游发挥作用从而促进结直肠癌的发生和转移。

启动子超甲基化和肿瘤抑制基因沉默是肿瘤形成的重要分子标志。Davalos等^[52]通过大肠癌原发肿瘤微切除证实5'-CpG岛超甲基化相关的miR-200b/200a/429和miR-200c/141多顺反子转录

沉默是调节EMT和MET转变的重要步骤,也是大肠癌肿瘤进展的关键,并发现miR-200超甲基化和ZEB1/ZEB2上调与CDH1、CRB3和LGL2表达下调相关;TGF β 诱导的EMT中miR-200超甲基化失活伴随着E-cadherin丢失和Vimentin增加^[53], Twist基因启动子获得CpG岛超甲基化后即可诱导结肠上皮细胞发生间质转化。此外,其他组蛋白修饰基因,如LSD1、CREB结合蛋白、SIRT1等也参与了EMT过程。de Krijger等^[46]发现36%的大肠癌原发肿瘤中miR-34a表达下降,部分归因于TP53的突变,部分是由于启动子甲基化;EMT激活因子TGF β 上调也促进了miR-21和miR-31表达,后两者在大肠癌中促进了TGF β 诱导的EMT过程。此外,miR-373、miR-126和miR-196a转染的大肠癌细胞则显示出明显肺转移潜能。

Sreekumar等^[54]证实E-cadherin表达受miR-9直接调控而转录抑制,miR-199和miR-218则是间质特征性蛋白N-cadherin的潜在直接调控microRNA。miR-138、miR-488和miR-151能够在EMT过程中调节FAK的表达水平从而影响大肠癌肿瘤细胞的迁移能力。

4 大肠癌中EMT的有关信号通路

在EMT介导大肠癌发生发展过程中伴随着众多信号通路的激活,将胞外信号传导入胞内引起E-cadherin、Vimentin等异常、表型改变、基底膜降解、上皮细胞向间质转变和细胞迁移等一系列变化,最终导致正常结肠上皮细胞转变为大肠癌细胞。

4.1 Wnt/ β -catenin和FGF信号传导通路

Wnt信号需要通过标准和非标准的信号通路传导,FGF信号通过PI3K-AKT、MAPK和PLC γ 通路传导。GSK3 β 是Wnt标准信号传导通路和FGF依赖性PI3K-AKT信号传导通路的关键分子。

标准的Wnt信号通路决定细胞的分化方向,非标准的信号通路控制细胞的极性和运动潜能,前者通过卷曲家族受体(Frizzled)和LRP5/LRP6受体进行信号转导,后者通过Frizzled和ROR1/2共同受体进行信号转导。LRP5和LRP6是LDL家族的蛋白分子,胞外有Wnt结合位点,胞内有Axin模体结构。除Wnt信号外, β -catenin为实现在蛋白化及蛋白酶体介导的降解而与GSK3 β 结合并被后者磷酸化^[55],标准的Wnt信号诱导Frizzled-Dishevelled复合物与LRP5/LRP6-AXIN-FRAT结合,使 β -catenin从GSK3 β 释放,最终在胞核中稳定的累积。 β -catenin与TCF/LEF、BCL9/

9L结合成TCF/LEF- β -catenin-Legless-PYGO复合物, 作为Wnt信号通路的效应物^[56]. 非标准Wnt信号通路中ROR1和ROR2是受体型络氨酸激酶, 胞外为Wnt结合位点, 胞内为CKI ϵ 结合结构域, RhoA、c-JUN、N末端激酶(JNK)、Nemo样激酶(NLK)是非标准Wnt信号通路的效应物. FGF与受体结合后诱导受体二聚化、络氨酸激酶活化及受体自身磷酸化, FRS2、FRS3和PLC γ 与磷酸络氨酸残基相互作用被募集至FGF受体, 然后FRS2/3招募GRB2、SHP2, FRS2/SHP2/GRB2复合物募集GAB1激活PI3K, 导致GSK3 β 活性下降、Snail-EMT级联反应激活、E-cadherin/ α -catenin表达下调、结肠上皮细胞恶性转化, 最终参与了大肠癌的发生发展过程^[57]. 基因分析发现Dishevelled是Wnt通路的正向调控蛋白, 它发挥作用时处于受体下游、 β -catenin的上游, 能导致c-Myc和cyclin D基因在结肠癌细胞中出现扩增^[58].

4.2 Ras信号传导通路 Ras蛋白在调节大肠癌发生发展的信号通路中起着重要作用. 生长因子活化的受体激活后, 活化的Ras通过Raf激酶激活MAPK激酶(MEK1、MEK2), 导致胞外ERK1、ERK2激活^[59]. ERKs位移至细胞核并激活核转录因子, 如Elk-1、ATF-2、ETS1/2, 使癌基因转录迅速开启. 首先, BRAF是Raf家族的一员, 他的突变与增强的激酶活性有关, 且在9%-11%的结直肠癌中发现此现象; 其次, 在30%-40%的腺瘤和76%的结直肠癌肿瘤中证实MEK磷酸化及激活; 再次, 结直肠癌中呈现ERK的高度激活, 且证实ERK1、ERK2活性在肠道肿瘤中明显升高; 最后, 试验证实阻断MEK/ERK抑制了结肠癌细胞的生长, 表明ERK参与了结肠癌细胞的增殖. MEK1通过Egr-1、Fra-1增强Snail1/2表达而下调E-cadherin^[60]. 另有研究证实结肠上皮细胞表达活化的MEK1获得了向肿瘤细胞转变及转移的潜质. 除MAPK途径外, Ras还可通过PI3K和Rho GTPase或与TGF- β 协同诱导大肠癌EMT. PI3K激活后影响EMT过程的机制如前所述; 此外, PI3K/Akt能够使Rho GTPase激活, 也能与TGF β 通路相互作用从而影响大肠癌EMT过程^[61].

4.3 PI3K信号传导通路 磷酸酰肌醇3激酶(PI3K)通路对正常细胞代谢、生长及肿瘤进展起着重要作用. PI3K的抑制因子PTEN缺失(10号染色体上磷酸酶和张力蛋白同源敲除)与结肠肿瘤相关, 证实PI3K信号通路在大肠癌发生过程中起着重要作用. 近年来研究提示66%-70%的大肠

癌中PTEN表达下调, 且与微卫星不稳定紧密相关. 此外还证实TNF α 造成了PTEN下调. IEC-6和HIE细胞敲除PTEN后 β -catenin表达水平明显升高, 大肠癌SW480细胞中V-catenin表达也有轻度升高, 提示 β -catenin的表达受PTEN调控. 利用LY294002或Wortmannin抑制PI3K降低了c-Myc和cyclin D1表达, 而在RIE-1细胞中敲除PTEN则显著上调了上述蛋白的表达; 同样在IEC-6和HIE细胞中使PTEN沉默增加了c-Myc和cyclin D1的表达, 说明PTEN丢失可以通过促进细胞增殖、抑制凋亡而影响大肠癌的发生^[62]. Bowen等^[63]发现在野生型PTEN结肠肿瘤细胞中Akt2过表达导致了肿瘤微转移的形成, 提示Akt可能是作为TGF- β 1下游调控因子发挥作用的. PI3K/Akt通路下游的效应分子mTOR激酶调控着CRC肿瘤的发生, 且证实mTORC1和mTORC2通过RhoA和Rac1通路调控着结肠癌细胞的迁移能力.

4.4 Notch和Hedgehog信号传导通路 Notch通路在胚胎发育和内环境稳定中发挥着重要作用, 其异常激活参与了多种肿瘤的发展过程. 该通路激活是由Notch配体(Jag1、Jag2、DLL1、DLL3和DLL4)结合至相应受体上引起的. 配体在细胞外被蛋白酶裂解、在胞内被 γ -分泌酶裂解^[64], 使得Notch胞内结构域(NICD)转至细胞核, 在胞核中与CSL和其他共刺激因子如Mam1 1、2、3构成转录激活复合物, 最终激活Notch通路的靶基因Hes和Hey1, 使上皮细胞恶性转化. 研究显示大肠癌EMT的诱导因子ZEB1可通过抑制miR-200表达而稳定Notch通路的Jag1、Mam12和Mam13, 并证实ZEB1通过提高Jag1的表达而增强Notch通路激活^[65].

Hedgehog通路与通过抑制E-cadherin表达而参与EMT过程的Wnt、EGR/FGR和TGF β /Activin/Nodal/BMP通路存在交互作用^[66]. 虽有研究^[67]证实Hedgehog通路能诱导Snail 1表达上调, 但是尚未证实Hedgehog对Snail 1有直接转录激活作用. 另外Hedgehog能诱导JAG2表达上调、促进TGF β 分泌^[68], TGF- β 1激活使胞核内NF- κ B调控的ZEB1和ZEB2表达上调, 同样使Smad-Sp1调控的间质标志物Vimentin等表达上调从而促进大肠癌细胞迁移及侵袭.

5 结论

在胚胎发育中EMT是必需的生理过程, 而肿瘤组织诱导产生的EMT则是肿瘤浸润和转移的重要机制之一. 目前, 越来越多的证据表明EMT在

■应用要点

随着对EMT作用机制的研究不断深入以及对其信号通路和关键分子的逐步了解, 相关的研究结果为临床治疗肿瘤提供了重要的靶点与途径.

■名词解释

上皮细胞间质转化: 指在生理或病理情况下发生上皮细胞与间质细胞之间的转变, 同时伴随细胞形态与相关基因表达的改变, 在此过程中上皮细胞顶-底极性改变、桥粒等紧密连接结构消失、细胞骨架重组, 波形蛋白表达上调、角蛋白表达下调, 从而使细胞离体、获得迁移能力, 并能抵抗细胞凋亡。

肿瘤发生、发展机制中起着重要的作用, 随着对EMT作用机制的研究不断深入以及对其信号通路和关键分子的逐步了解, 相关的研究结果为临床治疗肿瘤提供了重要的靶点与途径。由于EMT主要是由E-cadherin的转录抑制因子诱发的, 因此借助靶向抑制Snail等的治疗方法为防止肿瘤进展提供了可能。此外, EMT信号传导通路中的关键分子GSK-3 β 、PAK和TGF β 等将来也有可能成为阻断EMT的重要靶点。虽然目前对EMT发生机制的研究尚未完全清楚, 但是随着相关研究的不断深入, 人们对EMT的了解将会变得更加清晰。

6 参考文献

- Bates RC, Mercurio AM. The epithelial-mesenchymal transition (EMT) and colorectal cancer progression. *Cancer Biol Ther* 2005; 4: 365-370
- Matsuzaki S, Darcha C. Epithelial to mesenchymal transition-like and mesenchymal to epithelial transition-like processes might be involved in the pathogenesis of pelvic endometriosis. *Hum Reprod* 2012; 27: 712-721
- Micalizzi DS, Farabaugh SM, Ford HL. Epithelial-mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2010; 15: 117-134
- Rubin DC, Shaker A, Levin MS. Chronic intestinal inflammation: inflammatory bowel disease and colitis-associated colon cancer. *Front Immunol* 2012; 3: 107
- Colotta F, Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis* 2009; 30: 1073-1081
- Bataille F, Rohrmeier C, Bates R, Weber A, Rieder F, Brenmoehl J, Strauch U, Farkas S, Fürst A, Hofstädter F, Schölmerich J, Herfarth H, Rogler G. Evidence for a role of epithelial mesenchymal transition during pathogenesis of fistulae in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2008; 14: 1514-1527
- Jang TJ. Epithelial to mesenchymal transition in cutaneous squamous cell carcinoma is correlated with COX-2 expression but not with the presence of stromal macrophages or CD10-expressing cells. *Virchows Arch* 2012; 460: 481-487
- Margadant C, Sonnenberg A. Integrin-TGF-beta crosstalk in fibrosis, cancer and wound healing. *EMBO Rep* 2010; 11: 97-105
- Xiong H, Hong J, Du W, Lin YW, Ren LL, Wang YC, Su WY, Wang JL, Cui Y, Wang ZH, Fang JY. Roles of STAT3 and ZEB1 proteins in E-cadherin down-regulation and human colorectal cancer epithelial-mesenchymal transition. *J Biol Chem* 2012; 287: 5819-5832
- Gavert N, Vivanti A, Hazin J, Brabletz T, Ben-Ze'ev A. L1-mediated colon cancer cell metastasis does not require changes in EMT and cancer stem cell markers. *Mol Cancer Res* 2011; 9: 14-24
- Erreni M, Mantovani A, Allavena P. Tumor-associated Macrophages (TAM) and Inflammation in Colorectal Cancer. *Cancer Microenviron* 2011; 4: 141-154
- Lee H, Herrmann A, Deng JH, Kujawski M, Niu G, Li Z, Forman S, Jove R, Pardoll DM, Yu H. Persistently activated Stat3 maintains constitutive NF-kappaB activity in tumors. *Cancer Cell* 2009; 15: 283-293
- Yoon SN, Kim KS, Cho JH, Ma W, Choi HJ, Kwon SJ, Han JS. Phospholipase D1 mediates bFGF-induced Bcl-2 expression leading to neurite outgrowth in H19-7 cells. *Biochem J* 2012; 441: 407-416
- Kadota C, Ishihara S, Aziz MM, Rumi MA, Oshima N, Mishima Y, Moriyama I, Yuki T, Amano Y, Kinoshita Y. Down-regulation of single immunoglobulin interleukin-1R-related molecule (SIGIRR)/TIR8 expression in intestinal epithelial cells during inflammation. *Clin Exp Immunol* 2010; 162: 348-361
- Sarkar FH, Li Y, Wang Z, Kong D. NF-kappaB signaling pathway and its therapeutic implications in human diseases. *Int Rev Immunol* 2008; 27: 293-319
- López-Novoa JM, Nieto MA. Inflammation and EMT: an alliance towards organ fibrosis and cancer progression. *EMBO Mol Med* 2009; 1: 303-314
- Grivnenkov S, Karin E, Terzic J, Mucida D, Yu GY, Vallabhapurapu S, Scheller J, Rose-John S, Cheroutre H, Eckmann L, Karin M. IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer. *Cancer Cell* 2009; 15: 103-113
- Hoentjen F, Sartor RB, Ozaki M, Jobin C. STAT3 regulates NF-kappaB recruitment to the IL-12p40 promoter in dendritic cells. *Blood* 2005; 105: 689-696
- Wang H, Wu J, Zhang Y, Xue X, Tang D, Yuan Z, Chen M, Wei J, Zhang J, Miao Y. Transforming growth factor β -induced epithelial-mesenchymal transition increases cancer stem-like cells in the PANC-1 cell line. *Oncol Lett* 2012; 3: 229-233
- Thuault S, Tan EJ, Peinado H, Cano A, Heldin CH, Moustakas A. HMGA2 and Smads co-regulate SNAIL1 expression during induction of epithelial-to-mesenchymal transition. *J Biol Chem* 2008; 283: 33437-33446
- Bassaganya-Riera J, Viladomiu M, Pedragosa M, De Simone C, Hontecillas R. Immunoregulatory mechanisms underlying prevention of colitis-associated colorectal cancer by probiotic bacteria. *PLoS One* 2012; 7: e34676
- Prud'homme GJ. Cancer stem cells and novel targets for antitumor strategies. *Curr Pharm Des* 2012; 18: 2838-2849
- Greten FR, Eckmann L, Greten TF, Park JM, Li ZW, Egan LJ, Kagnoff MF, Karin M. IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell* 2004; 118: 285-296
- Yan F, Wang L, Shi Y, Cao H, Liu L, Washington MK, Chaturvedi R, Israel DA, Cao H, Wang B, Peek RM, Wilson KT, Polk DB. Berberine promotes recovery of colitis and inhibits inflammatory responses in colonic macrophages and epithelial cells in DSS-treated mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2012; 302: G504-G514
- Iarumov N, Toshev S, Petrova D, Angelov K, Gribnev P, Sokolov M. [Genetic counseling, surgical prophylaxis and treatment for familial adenomatous polyposis and hereditary nonpolyposis colorectal cancer]. *Khirurgiia (Sofia)* 2007; (3): 46-53
- Nishisho I, Nakamura Y, Miyoshi Y, Miki Y, Ando H, Horii A, Koyama K, Utsunomiya J, Baba S, Hedge P. Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients. *Science* 1991; 253: 665-669

- 27 Vécsey-Semjén B, Becker KF, Sinski A, Blennow E, Vietor I, Zatloukal K, Beug H, Wagner E, Huber LA. Novel colon cancer cell lines leading to better understanding of the diversity of respective primary cancers. *Oncogene* 2002; 21: 4646-4662
- 28 Naghibalhossaini F, Zamani M, Mokarram P, Khalili I, Rasti M, Mostafavi-Pour Z. Epigenetic and genetic analysis of WNT signaling pathway in sporadic colorectal cancer patients from Iran. *Mol Biol Rep* 2012; 39: 6171-6178
- 29 Polakis P. Wnt signaling and cancer. *Genes Dev* 2000; 14: 1837-1851
- 30 He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* 1998; 281: 1509-1512
- 31 Lochter A, Werb Z, Bissell MJ. Transcriptional regulation of stromelysin-1 gene expression is altered during progression of mouse mammary epithelial cells from functionally normal to malignant. *Matrix Biol* 1999; 18: 455-467
- 32 Pascreau G, Churchill ME, Maller JL. Centrosomal localization of cyclins E and A: structural similarities and functional differences. *Cell Cycle* 2011; 10: 199-205
- 33 Bouchard C, Thieke K, Maier A, Saffrich R, Hanley-Hyde J, Ansorge W, Reed S, Sicinski P, Bartek J, Eilers M. Direct induction of cyclin D2 by Myc contributes to cell cycle progression and sequestration of p27. *EMBO J* 1999; 18: 5321-5333
- 34 Prieve MG, Waterman ML. Nuclear localization and formation of beta-catenin-lymphoid enhancer factor 1 complexes are not sufficient for activation of gene expression. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 4503-4515
- 35 Mann B, Gelos M, Siedow A, Hanski ML, Gratchev A, Ilyas M, Bodmer WF, Moyer MP, Riecken EO, Buhr HJ, Hanski C. Target genes of beta-catenin-T cell-factor/lymphoid-enhancer-factor signaling in human colorectal carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 1603-1608
- 36 Milde-Langosch K, Röder H, Andritzky B, Aslan B, Hemminger G, Brinkmann A, Bamberger CM, Löning T, Bamberger AM. The role of the AP-1 transcription factors c-Fos, FosB, Fra-1 and Fra-2 in the invasion process of mammary carcinomas. *Breast Cancer Res Treat* 2004; 86: 139-152
- 37 Liu Z, Sun B, Qi L, Li H, Gao J, Leng X. Zinc finger E-box binding homeobox 1 promotes vasculogenic mimicry in colorectal cancer through induction of epithelial-to-mesenchymal transition. *Cancer Sci* 2012; 103: 813-820
- 38 Sánchez-Tilló E, de Barrios O, Siles L, Cuatrecasas M, Castells A, Postigo A. β -catenin/TCF4 complex induces the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT)-activator ZEB1 to regulate tumor invasiveness. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108: 19204-19209
- 39 Hlubek F, Spaderna S, Schmalhofer O, Jung A, Kirchner T, Brabletz T. Wnt/FZD signaling and colorectal cancer morphogenesis. *Front Biosci* 2007; 12: 458-470
- 40 Zou J, Luo H, Zeng Q, Dong Z, Wu D, Liu L. Protein kinase CK2 α is overexpressed in colorectal cancer and modulates cell proliferation and invasion via regulating EMT-related genes. *J Transl Med* 2011; 9: 97
- 41 Aslam MI, Patel M, Singh B, Jameson JS, Pringle JH. MicroRNA manipulation in colorectal cancer cells: from laboratory to clinical application. *J Transl Med* 2012; 10: 128. [Epub ahead of print]
- 42 Paterson EL, Kolesnikoff N, Gregory PA, Bert AG, Khew-Goodall Y, Goodall GJ. The microRNA-200 family regulates epithelial to mesenchymal transition. *Scientific World Journal* 2008; 8: 901-904
- 43 Wu L, Fan J, Belasco JG. MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 4034-4039
- 44 Schetter AJ, Okayama H, Harris CC. The Role of MicroRNAs in Colorectal Cancer. *Cancer J* 2012; 18: 244-252
- 45 Wienholds E, Koudijs MJ, van Eeden FJ, Cuppen E, Plasterk RH. The microRNA-producing enzyme Dicer1 is essential for zebrafish development. *Nat Genet* 2003; 35: 217-218
- 46 de Krijger I, Mekenkamp LJ, Punt CJ, Nagtegaal ID. MicroRNAs in colorectal cancer metastasis. *J Pathol* 2011; 224: 438-447
- 47 Liu YN, Yin JJ, Abou-Kheir W, Hynes PG, Casey OM, Fang L, Yi M, Stephens RM, Seng V, Sheppard-Tillman H, Martin P, Kelly K. MiR-1 and miR-200 inhibit EMT via Slug-dependent and tumorigenesis via Slug-independent mechanisms. *Oncogene* 2012 Feb 27. [Epub ahead of print]
- 48 Oztas E, Avci ME, Ozcan A, Sayan AE, Tulchinsky E, Yagci T. Novel monoclonal antibodies detect Smad-interacting protein 1 (SIP1) in the cytoplasm of human cells from multiple tumor tissue arrays. *Exp Mol Pathol* 2010; 89: 182-189
- 49 Burk U, Schubert J, Wellner U, Schmalhofer O, Vincan E, Spaderna S, Brabletz T. A reciprocal repression between ZEB1 and members of the miR-200 family promotes EMT and invasion in cancer cells. *EMBO Rep* 2008; 9: 582-589
- 50 Colwell CS. Light and serotonin interact in affecting the circadian system of Aplysia. *J Comp Physiol A* 1990; 167: 841-845
- 51 Reid JF, Sokolova V, Zoni E, Lampis A, Pizzamiglio S, Bertan C, Zanutto S, Perrone F, Camerini T, Gallino G, Verderio P, Leo E, Pilotti S, Gariboldi M, Pierotti MA. miRNA profiling in colorectal cancer highlights miR-1 involvement in MET-dependent proliferation. *Mol Cancer Res* 2012; 10: 504-515
- 52 Davalos V, Moutinho C, Villanueva A, Boque R, Silva P, Carneiro F, Esteller M. Dynamic epigenetic regulation of the microRNA-200 family mediates epithelial and mesenchymal transitions in human tumorigenesis. *Oncogene* 2012; 31: 2062-2074
- 53 Kenney PA, Wszolek MF, Rieger-Christ KM, Neto BS, Gould JJ, Harty NJ, Mosquera JM, Zeheb R, Loda M, Darling DS, Libertino JA, Summerhayes IC. Novel ZEB1 expression in bladder tumorigenesis. *BJU Int* 2011; 107: 656-663
- 54 Sreekumar R, Sayan BS, Mirnezami AH, Sayan AE. MicroRNA Control of Invasion and Metastasis Pathways. *Front Genet* 2011; 2: 58
- 55 Katoh M, Katoh M. Cross-talk of WNT and FGF signaling pathways at GSK3 β to regulate beta-catenin and SNAIL signaling cascades. *Cancer Biol Ther* 2006; 5: 1059-1064
- 56 Katoh M. WNT/PCP signaling pathway and human cancer (review). *Oncol Rep* 2005; 14: 1583-1588
- 57 Hua Y, Duan S, Murmann AE, Larsen N, Kjems J, Lund AH, Peter ME. miRConnect: identifying effector genes of miRNAs and miRNA families in cancer cells. *PLoS One* 2011; 6: e26521
- 58 Polakis P. Drugging Wnt signalling in cancer. *EMBO J* 2012; 31: 2737-2746

同行评价

本文对EMT在大肠癌发生发展中的作用及其相关信号传导途径的相关研究进行了综述, 对于进一步认识EMT与大肠癌的关系有较好的参考价值。

- 59 Levidou G, Saetta AA, Gigelou F, Karlou M, Papanastasiou P, Stamatelli A, Kavantzias N, Michalopoulos NV, Agrogiannis G, Patsoiris E, Korkolopoulou P. ERK/pERK expression and B-raf mutations in colon adenocarcinomas: correlation with clinicopathological characteristics. *World J Surg Oncol* 2012; 10: 47
- 60 Lemieux E, Bergeron S, Durand V, Asselin C, Saucier C, Rivard N. Constitutively active MEK1 is sufficient to induce epithelial-to-mesenchymal transition in intestinal epithelial cells and to promote tumor invasion and metastasis. *Int J Cancer* 2009; 125: 1575-1586
- 61 Guarino M. Epithelial-mesenchymal transition and tumour invasion. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39: 2153-2160
- 62 Sipos F, Galamb O. Epithelial-to-mesenchymal and mesenchymal-to-epithelial transitions in the colon. *World J Gastroenterol* 2012; 18: 601-608
- 63 Bowen KA, Doan HQ, Zhou BP, Wang Q, Zhou Y, Rychahou PG, Evers BM. PTEN loss induces epithelial-mesenchymal transition in human colon cancer cells. *Anticancer Res* 2009; 29: 4439-4449
- 64 Peignon G, Durand A, Cacheux W, Ayrault O, Terris B, Laurent-Puig P, Shroyer NF, Van Seuning I, Honjo T, Perret C, Romagnolo B. Complex interplay between β -catenin signalling and Notch effectors in intestinal tumorigenesis. *Gut* 2011; 60: 166-176
- 65 Brabletz S, Bajdak K, Meidhof S, Burk U, Niedermann G, Firat E, Wellner U, Dimmler A, Faller G, Schubert J, Brabletz T. The ZEB1/miR-200 feedback loop controls Notch signalling in cancer cells. *EMBO J* 2011; 30: 770-782
- 66 Maitah MY, Ali S, Ahmad A, Gadgeel S, Sarkar FH. Up-regulation of sonic hedgehog contributes to TGF- β 1-induced epithelial to mesenchymal transition in NSCLC cells. *PLoS One* 2011; 6: e16068
- 67 Zhou BP, Hung MC. Wnt, hedgehog and snail: sister pathways that control by GSK-3 β and β -Trcp in the regulation of metastasis. *Cell Cycle* 2005; 4: 772-776
- 68 Choi SS, Omenetti A, Witek RP, Moylan CA, Syn WK, Jung Y, Yang L, Sudan DL, Sicklick JK, Michelotti GA, Rojkind M, Diehl AM. Hedgehog pathway activation and epithelial-to-mesenchymal transitions during myofibroblastic transformation of rat hepatic cells in culture and cirrhosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009; 297: G1093-G1106

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》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位胃肠病学和肝病专家支持的开放存取的同行评议的旬刊杂志, 旨在推广国内各地的胃肠病学和肝病领域临床实践和基础研究相结合的最具有临床意义的原创性及各类评论性的文章, 使其成为一种公众资源, 同时科学家、医生、患者和学生可以通过这样一个不受限制的平台来免费获取全文, 了解其领域的所有的关键的进展, 更重要的是这些进展会为本领域的医务工作者和研究者服务, 为他们的患者及基础研究提供进一步的帮助。

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

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

《世界华人消化杂志》的目标是出版高质量的胃肠病学和肝病领域的专家评论及临床实践和基础研究相结合具有实践意义的文章, 为内科学、外科学、感染病学、中医药学、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。

体质量指数与结直肠癌相关性的研究现状

路明亮, 黄华

路明亮, 黄华, 昆明医科大学第二附属医院消化内科 云南省昆明市 650101

路明亮, 主要从事胃肠道动力及肿瘤的研究。

作者贡献分布: 本文综述由路明亮完成; 黄华审校。

通讯作者: 黄华, 主任医师, 硕士生导师, 650101, 云南省昆明市, 昆明医科大学第二附属医院消化内科. hhtrq@163.com

电话: 0871-5351281

收稿日期: 2012-04-09 修回日期: 2012-07-08

接受日期: 2012-07-20 在线出版日期: 2012-07-28

Association between body mass index and colorectal cancer: Recent research progress

Ming-Liang Lu, Hua Huang

Ming-Liang Lu, Hua Huang, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650101, Yunnan Province, China

Correspondence to: Hua Huang, Chief Physician, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650101, Yunnan Province, China. hhtrq@163.com

Received: 2012-04-09 Revised: 2012-07-08

Accepted: 2012-07-20 Published online: 2012-07-28

Abstract

Colorectal cancer (CRC) is a common digestive system disease posing a serious threat to people's health. There are about 1.2 million new cases of CRC diagnosed worldwide each year, and the figure in China is 130 thousand. The socio-economic development and changes in diet and habits in China have led to a significant increase in both the incidence and mortality of CRC. The average age of onset of CRC in China is about 20 years old lower than that in Western countries, ranking second among all malignant tumors. The incidence and mortality of CRC in some developed regions of China, however, is close to those in Western developed countries. The development of CRC results from multiple factors, and nearly a quarter of patients with CRC could have avoided suffering from this disease by making favorable lifestyle habits. Nowadays, two-thirds of adults are fighting against overweight and obesity. Numerous recent studies indicate that high body mass index (BMI) is related with colorectal cancer. This article will

review recent advances in understanding the relationship between BMI and CRC.

Key Words: Colorectal cancer; Body mass index; Obesity

Lu ML, Huang H. Association between body mass index and colorectal cancer: Recent research progress. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(21): 1957-1960

摘要

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是消化系统常见的严重危害人们健康的杀手, 全球每年约有120万新发病例, 其中中国约有13万。随着我国社会经济发展和饮食结构的改变, CRC的发病率和死亡率呈逐年上升趋势, 且平均发病年龄低于西方国家约20岁, 居所有恶性肿瘤中的第2位, 在中国发达地区已经接近西方发达国家。CRC的发病是多种因素综合作用的结果, 近四分之一的CRC患者可以通过良好的生活习惯来避免患病。目前全球有2/3的成年人正在与超重和肥胖做斗争。近期大量研究表明, 高体质量指数(body mass index, BMI)与结直肠癌的发病具有一定关系。本文就BMI与CRC相关性的研究现状作一综述。

关键词: 结直肠癌; 体质量指数; 肥胖

路明亮, 黄华. 体质量指数与结直肠癌相关性的研究现状. *世界华人消化杂志* 2012; 20(21): 1957-1960

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1957.asp>

0 引言

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是大肠中常见的恶性肿瘤, 其发病率呈逐年上升的趋势, 在美国为第3大最常见肿瘤, 2011年约141 210名新发病例和49 380名患者死亡^[1], 而在我国每年约有13万新发病例, 半数以上的CRC起源于大肠腺瘤^[2,3]。CRC的发生是正常肠上皮-增生改变/微小腺瘤-早期腺瘤-中期腺瘤-后期腺瘤-癌-癌转移的演变过程。这一演变过程中癌基因与抑癌基因的变化已经明确, 基因突变是由于环境因素尤其是饮食因素与遗传因素等综合作用的结果,

■背景资料

结直肠癌(CRC)的发生是多种因素综合作用的结果。超重或肥胖使患某些肿瘤的风险增加, 其中包括CRC。近期, 国内外对体质量(BMI)与CRC的相关性研究备受关注。

■同行评议者

万军, 教授, 中国人民解放军总医院南楼老年消化科

■研究前沿

随着研究的不断深入, BMI除与CRC的发病有关外, 还发现与肥胖人群的CRC筛查与CRC预后有着一定关系, 科学有效的目标干预BMI, 从而提高CRC的早期诊断及治疗或许将成为今后CRC研究的热点.

如高蛋白、高脂肪和低纤维素的饮食结构和超重、肥胖已经成为当今社会不容忽视的问题, 超重或肥胖对健康的威胁包括患某些肿瘤的风险增加^[4,5], 其中包括CRC. 近期, 国内外对体质指数(body mass index, BMI)与CRC相关性的研究异常活跃, 现就BMI与CRC相关性的研究现状作一综述.

1 BMI和肥胖

1997年在日内瓦召开的世界卫生组织专家会议上通过了超重和肥胖的国际标准, BMI是世界公认的一种评定肥胖程度的分级方法, BMI具体计算方法: $BMI = \text{体重(kg)} / \text{身高}^2(\text{m}^2)$. 根据2001年中国肥胖问题工作组推荐的中国成年人超重肥胖BMI诊断标准^[6]: $BMI < 18.5 \text{ kg/m}^2$ 为低体重, $18.5-24.0 \text{ kg/m}^2$ 为正常体重, $24.0-28.0 \text{ kg/m}^2$ 为超重, $> 28.0 \text{ kg/m}^2$ 为肥胖, 以男性腰围 $\geq 85 \text{ cm}$, 女性腰围 $\geq 80 \text{ cm}$ 为腹型肥胖判断标准. 在欧美等经济发达国家肥胖已经成为严重威胁公众健康的社会公共卫生问题. 在我国随着经济的飞速发展和人民生活水平的提高, 高脂肪高碳水化合物饮食结构的改变, 人们出行方式的改变及劳动强度的下降等原因造成肥胖率在我国呈现逐年增加的趋势. 2005年据武阳丰等^[7]进行的中国居民超重和肥胖流行现状调查发现, 我国居民超重率和肥胖率之和为23.2%, 已接近总人口的1/4. 时至今日, 肥胖人群的数量仍在不断增加, 2010年张丽等^[8]对乌鲁木齐市成年女性超重和肥胖调查分析显示: 超重率为27.62%, 肥胖率为7.16%, 两者之和为34.78%, 高于2005年全国水平近11个百分点, 这可能与当地饮食习惯、生活方式及性别差异有关. 我们可以看到超重及肥胖的发病率正在逐年上升, 已成为我国目前面临的最大的公共卫生挑战之一.

2 BMI和CRC的发病、筛查及预后的相关性

2.1 BMI和CRC的发病 在欧洲, 使用世界卫生组织和癌症登记数据的癌症发病率和死亡率的估计显示, CRC是继男性肺癌和女性乳腺癌后第2个最常见的肿瘤^[9]. CRC的发生是由于癌基因、抑癌基因的变化及与环境因素、遗传因素相互作用的结果, 其中饮食结构的改变, 尤其是高脂肪高蛋白低纤维素食物的大量摄入导致的超重或肥胖与CRC的发病有关^[10,11]. Wei等^[12]的研究发现, 在中国南方城市, $BMI \geq 24.0 \text{ kg/m}^2$, 同时有家族史的人群患CRC的风险明显增加. 半

数以上的CRC起源于大肠腺瘤. 近期的研究表明吸烟、高脂肪、低纤维素饮食和运动缺乏与大肠腺瘤的发生相关^[13]. Hong等^[14]对于腹型肥胖与大肠腺瘤风险的一项荟萃分析显示: 无论男性或女性, 腹型肥胖均可能会增加大肠腺瘤的发生风险, 但是男性和女性在腰围影响大肠腺瘤发生风险方面具有明显差异, 这可能与性别差异导致的脂肪和睾酮浓度的差异有关. Park等^[15]的研究发现, 测量身高、腰围和腰臀比与女性患CRC的风险密切相关. Siddiqui等^[16]对2 903名经过大肠镜检查病理证实为大肠腺瘤性息肉的患者进行的回顾性的研究表明, BMI在 30 kg/m^2 以上时, BMI每增加一个单位发现进展性大肠腺瘤性息肉的几率就增加1%, 而且指出肥胖可能是通过促进进展性大肠腺瘤性息肉的发展而增加患CRC的几率. Win等^[17]的研究显示, DNA错配修复基因突变的携带者和非携带者患CRC的风险与BMI有着十分密切的联系, 如对于携带者而言, BMI每增加5个数值, 患CRC的风险增加30%. Zhao等^[18]对加拿大纽芬兰和拉布拉多州的一项病例的对照研究表明, 肥胖的患者中饮酒者可能和患CRC的几率明显增加有关. 关于体质指数和患CRC的风险之间的关系在已有的报道中并没有出现一致的结论. 为此, Ben等^[19]基于Medline数据库、EMBASE数据库和ISI科学网的已有的资料和检索有关文献的参考目录来确定相关符合条件的36个独立研究并对其进行了荟萃分析显示, 增大的BMI增加了患结肠腺癌而不是直肠腺癌的风险, 与CRC不同, 增大的BMI同CRC风险间的关系在性别上并没有表现出差异性.

2.2 BMI和CRC筛查 筛查可以发现癌前病变和早期癌症, 通过对癌前病变的干预和对早期癌症的处理不仅对疾病具有治疗作用, 也具有预防作用, 可大大提高5年生存率. 因此, 筛查是必要的^[20], 是早期发现和诊断最有效的方法. 2012年来自于美国内科医师协会的CRC筛查指南建议^[21]在进行筛查之前, 对所有成人的CRC风险进行个体化评估, 同时应当权衡筛查手段的风险与收益, 并综合考虑检查可及性和患者倾向性, 然后选择筛查方式. Anderson等^[22]采用横断面研究BMI和CRC之间的关系显示, 随着BMI的增加, 女性患CRC的风险逐渐增加, 尤其对于 $BMI \geq 40 \text{ kg/m}^2$ 女性, 而在男性中并不存在这种关系. 所以对肥胖女性进行结肠镜筛查显得尤为重要. 美国目前人群CRC 5年生存率为64%, 早期的达

90%。Soerjomataram等^[23]对超质量CRC幸存者进行目标干预研究发现, 减轻体质量是最重要的一个干预措施, 尤其是对于那些经历过化疗和处于较低社会经济地位的男性患者。目前CRC的筛查方法主要有粪便检测和结肠结构的检测, 每种筛查方法具有各自的优势及局限性, 其效果的优劣最终取决于检测的准确度和患者的依从性。2004年Heo等^[24]对美国≥50岁的成年人进行研究显示, 体质量和CRC筛查行为是有关系的, 但是在男性和女性之间是有差异的, 尤其是超质量或肥胖的女性接受乙状结肠镜的筛查较正常体质量指数的女性更少。Messina等^[25]的研究指出, 超质量或肥胖的女性患CRC的风险更大, 因为她们有更高的BMI值以及不愿行CRC的筛查。有证据显示, 对处于一般风险水平的人群进行筛查, 可通过发现和切除癌前病变, 降低死亡率并阻止癌症的发生和发展^[26]。最近Cohen等^[27]关于成年白种人与黑种人肥胖和CRC筛查的关系发现, BMI过高并不是整个人口CRC筛查的威胁。对于CRC筛查率低的国家, 应该致力于公共卫生倡议增加个体的筛查。由此可见, CRC的筛查需要进行结直肠癌风险的个体化评估, 同时还需要根据BMI的不同, 以及性别的差异等制定不同的筛查方式, 以期早发现早诊断, 从而大大提高5年生存率。

2.3 BMI和CRC的预后 影响CRC预后的因素很多, 包括年龄、性别、肿瘤部位、肿瘤大体类型和病理类型及生物学特征等, 对这些因素加以重视并进行正确的干预, 以期提高CRC的治愈率, 改善生活质量, 延长生存时间。Linebarger等^[28]对不同BMI的CRC手术切除患者进行分组, 发现各组淋巴结的发现率在统计学上没有差异, 尽管高BMI会使手术的难度及时间增加, 但不会影响淋巴结的获取。研究还发现, 尽管BMI≥30.0 kg/m²和BMI处于正常范围的患者相比, 腹腔镜手术会增加手术时间、失血量和术后并发症, 但是在临床上仍然可行, 并不是腹腔镜手术的禁忌^[29,30]。Simkens等^[31]对796名接受化疗的CRC患者, 根据BMI数值分为4组, <18.5 kg/m²、18.5-24.9 kg/m²、25.0-29.9 kg/m²和≥30.0 kg/m², 4组的中位生存期分别为8.0、14.9、18.4和19.5 mo, 表明BMI数值越高, 预示着较长的中位生存期, 是一个独立的生存预后因素, 而对于同时接受化疗和靶向治疗的患者并不存在这种关系。Morikawa等^[32]分析了1980-2004年的955例I、II、III或IV期的CRC患者数据, 得出BMI≥30.0 kg/m²时, β-

连环素(β-catenin)阳性可较好预测患有结肠癌的肥胖患者存活率, 但对非肥胖患者无预后价值。但是Garcia-Oria Serrano等^[33]通过多变量分析显示, BMI并不是在无转移的结肠癌患者长期生存的独立预后因素, 而TNM分期、ASA评分、手术技术、手术时的年龄以及细胞的免疫反应可以作为预后因素。随着医学技术的进步, 微创医学日趋成熟并得到广泛应用, Balentine等^[34]的回顾性研究显示, 肥胖CRC的微创手术是安全有效的, 且肠功能恢复迅速, 如能保证良好的肿瘤护理质量, 可以明显缩短住院日。Sinicrope等^[35]通过对2 693名II期或III期大肠癌患者回顾性研究发现, 肥胖者发生DNA错配修复缺陷的概率低于正常体质量者, 且在多变量分析中, 该结论仍成立。肥胖患者的复发率高, 无瘤存活时间均较正常体质量者短。影响CRC预后的因素是多方面的, 近期的研究显示BMI可能会影响分子水平的表达, 而进一步影响临床生物学行为, 从而导致CRC预后的差异。

3 结论

最近的研究表明, 虽然CRC的患病是多因素多步骤综合作用的结果, 但只要对其中任何一个致病因素加以干预就有可能明显降低CRC的发生。BMI和患大肠腺瘤及CRC的风险增加有关, 同时与肥胖人群的CRC筛查及CRC预后有着一定关系, 这其中也有一些不一致的观点, 需要更进一步深入的研究。设计考虑区域差异、种族差异、性别差异及扩大样本量等在内的实验验证, 希望通过科学有效的目标干预BMI提高CRC的早期诊断及治疗, 延长CRC患者的无病生存期及生活质量, 这或许将成为今后CRC研究的热点。

4 参考文献

- 1 Siegel R, Ward E, Brawley O, Jemal A. Cancer statistics, 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths. *CA Cancer J Clin* 2011; 61: 212-236
- 2 王向阳, 张克难, 冯安明, 龚治林, 黄烨, 庞典付. 大肠癌粪便p53、K-ras基因及端粒酶活性联合检测的临床研究. *实用医学杂志* 2010; 26: 2566-2568
- 3 徐艳松, 唐卫中, 高枫, 龙陈艳. 散发性结直肠癌APC、K-ras、p53、MMR基因突变检测. *结直肠肛门外科* 2009; 15: 229-232
- 4 Bianchini F, Kaaks R, Vainio H. Overweight, obesity, and cancer risk. *Lancet Oncol* 2002; 3: 565-574
- 5 Renehan AG, Tyson M, Egger M, Heller RF, Zwahlen M. Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *Lancet* 2008; 371: 569-578
- 6 中国肥胖问题工作组数据汇总分析协作组. 我国成人体重指数和腰围对相关疾病危险因素异常的预测价值: 适宜体重指数和腰围切点的研究. *中华流行病学杂志*

■创新盘点

从BMI与患大肠腺瘤及CRC的风险增加, 尤其与肥胖人群的CRC筛查及CRC预后等方面全面系统的综述了BMI与CRC的研究历程, 有助于临床全面认识BMI和CRC的关系。

■同行评价

- 本文有较好的学术价值,对临床全面认识BMI和CRC的关系,并针对BMI的变化导致CRC发病危险增加的可能机制开展包括区域差异、种族差异、性别差异及扩大样本量等在内的实验研究提供了依据。
- 7 武阳丰, 马冠生, 胡永华, 李艳平, 李贤, 崔朝辉, 陈春明, 孔灵芝. 中国居民的超重和肥胖流行现状. *中华预防医学杂志* 2005; 39: 316-320
 - 8 张丽, 刘伟, 杨晓燕, 秦良安. 乌鲁木齐市成年女性超重、肥胖与高血压关系的调查分析. *广东医学* 2010; 31: 1861-1863
 - 9 Bray F, Sankila R, Ferlay J, Parkin DM. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 1995. *Eur J Cancer* 2002; 38: 99-166
 - 10 Calle EE, Thun MJ. Obesity and cancer. *Oncogene* 2004; 23: 6365-6378
 - 11 Bener A, Moore MA, Ali R, El Ayoubi HR. Impacts of family history and lifestyle habits on colorectal cancer risk: a case-control study in Qatar. *Asian Pac J Cancer Prev* 2010; 11: 963-968
 - 12 Wei YS, Lu JC, Wang L, Lan P, Zhao HJ, Pan ZZ, Huang J, Wang JP. Risk factors for sporadic colorectal cancer in southern Chinese. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 2526-2530
 - 13 Wolin KY, Yan Y, Colditz GA. Physical activity and risk of colon adenoma: a meta-analysis. *Br J Cancer* 2011; 104: 882-885
 - 14 Hong S, Cai Q, Chen D, Zhu W, Huang W, Li Z. Abdominal obesity and the risk of colorectal adenoma: a meta-analysis of observational studies. *Eur J Cancer Prev* 2012 Feb 14. [Epub ahead of print]
 - 15 Park JY, Mitrou PN, Keogh RH, Luben RN, Wareham NJ, Khaw KT. Self-reported and measured anthropometric data and risk of colorectal cancer in the EPIC-Norfolk study. *Int J Obes (Lond)* 2012; 36: 107-118
 - 16 Siddiqui A, Pena Sahdala HN, Nazario HE, Mahgoub A, Patel M, Cipher D, Spechler S. Obesity is associated with an increased prevalence of advanced adenomatous colon polyps in a male veteran population. *Dig Dis Sci* 2009; 54: 1560-1564
 - 17 Win AK, Dowty JG, English DR, Campbell PT, Young JP, Winship I, Macrae FA, Lipton L, Parry S, Young GP, Buchanan DD, Martínez ME, Jacobs ET, Ahnen DJ, Haile RW, Casey G, Baron JA, Lindor NM, Thibodeau SN, Newcomb PA, Potter JD, Le Marchand L, Gallinger S, Hopper JL, Jenkins MA. Body mass index in early adulthood and colorectal cancer risk for carriers and non-carriers of germline mutations in DNA mismatch repair genes. *Br J Cancer* 2011; 105: 162-169
 - 18 Zhao J, Zhu Y, Wang PP, West R, Buehler S, Sun Z, Squires J, Roebbothan B, McLaughlin JR, Campbell PT, Parfrey PS. Interaction between alcohol drinking and obesity in relation to colorectal cancer risk: a case-control study in Newfoundland and Labrador, Canada. *BMC Public Health* 2012; 12: 94
 - 19 Ben Q, An W, Jiang Y, Zhan X, Du Y, Cai QC, Gao J, Li Z. Body mass index increases risk for colorectal adenomas based on meta-analysis. *Gastroenterology* 2012; 142: 762-772
 - 20 王新颖. 对当前大肠癌筛查策略和方法的评析. *现代消化及介入诊疗* 2011; 16: 71-76
 - 21 Qaseem A, Denberg TD, Hopkins RH, Humphrey LL, Levine J, Sweet DE, Shekelle P. Screening for colorectal cancer: a guidance statement from the American College of Physicians. *Ann Intern Med* 2012; 156: 378-386
 - 22 Anderson JC, Messina CR, Dakhllalah F, Abraham B, Alpern Z, Martin C, Hubbard PM, Grimson R, Shaw RD. Body mass index: a marker for significant colorectal neoplasia in a screening population. *J Clin Gastroenterol* 2007; 41: 285-290
 - 23 Soerjomataram I, Thong MS, Korfage IJ, Polinder S, van der Heide A, de Vries E, Rietjens JA, Otto SJ, van de Poll-Franse LV. Excess weight among colorectal cancer survivors: target for intervention. *J Gastroenterol* 2012 Mar 17. [Epub ahead of print]
 - 24 Heo M, Allison DB, Fontaine KR. Overweight, obesity, and colorectal cancer screening: disparity between men and women. *BMC Public Health* 2004; 4: 53
 - 25 Messina CR, Lane DS, Anderson JC. Body mass index and screening for colorectal cancer: Gender and attitudinal factors. *Cancer Epidemiol* 2012; 36: 400-408
 - 26 Levin B, Lieberman DA, McFarland B, Smith RA, Brooks D, Andrews KS, Dash C, Giardiello FM, Glick S, Levin TR, Pickhardt P, Rex DK, Thorson A, Winawer SJ. Screening and surveillance for the early detection of colorectal cancer and adenomatous polyps, 2008: a joint guideline from the American Cancer Society, the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer, and the American College of Radiology. *CA Cancer J Clin* 2008; 58: 130-160
 - 27 Cohen SS, Murff HJ, Signorello LB, Blot WJ. Obesity and colorectal cancer screening among black and white adults. *Cancer Causes Control* 2012; 23: 709-716
 - 28 Linebarger JH, Mathiason MA, Kallies KJ, Shapiro SB. Does obesity impact lymph node retrieval in colon cancer surgery? *Am J Surg* 2010; 200: 478-482
 - 29 Akiyoshi T, Ueno M, Fukunaga Y, Nagayama S, Fujimoto Y, Konishi T, Kuroyanagi H, Yamaguchi T. Effect of body mass index on short-term outcomes of patients undergoing laparoscopic resection for colorectal cancer: a single institution experience in Japan. *Surg Laparosc Endosc Percutan Tech* 2011; 21: 409-414
 - 30 Karahasanoglu T, Hamzaoglu I, Baca B, Aytac E, Kirbiyik E. Impact of increased body mass index on laparoscopic surgery for rectal cancer. *Eur Surg Res* 2011; 46: 87-93
 - 31 Simkens LH, Koopman M, Mol L, Veldhuis GJ, Ten Bokkel Huinink D, Muller EW, Derleyn VA, Teerenstra S, Punt CJ. Influence of body mass index on outcome in advanced colorectal cancer patients receiving chemotherapy with or without targeted therapy. *Eur J Cancer* 2011; 47: 2560-2567
 - 32 Morikawa T, Kuchiba A, Yamauchi M, Meyerhardt JA, Shima K, Nosho K, Chan AT, Giovannucci E, Fuchs CS, Ogino S. Association of CTNNB1 (beta-catenin) alterations, body mass index, and physical activity with survival in patients with colorectal cancer. *JAMA* 2011; 305: 1685-1694
 - 33 Garcia-Oria Serrano MJ, Armengol Carrasco M, Caballero Millán A, Ching CD, Codina Cazador A. [Is body mass index a prognostic factor of survival in colonic cancer? A multivariate analysis]. *Cir Esp* 2011; 89: 152-158
 - 34 Balentine CJ, Marshall C, Robinson C, Wilks J, Anaya D, Albo D, Berger DH. Obese patients benefit from minimally invasive colorectal cancer surgery. *J Surg Res* 2010; 163: 29-34
 - 35 Sinicrope FA, Foster NR, Yoon HH, Smyrk TC, Kim GP, Allegra CJ, Yothers G, Nikcevich DA, Sargent DJ. Association of obesity with DNA mismatch repair status and clinical outcome in patients with stage II or III colon carcinoma participating in NCCTG and NSABP adjuvant chemotherapy trials. *J Clin Oncol* 2012; 30: 406-412

清热化痰中药对急性肝衰竭模型大鼠肝功能及生存期的影响

张 扬, 扈晓宇, 骆建兴, 陈 果, 高舒迪

张扬, 骆建兴, 高舒迪, 成都中医药大学 四川省成都市 610075

扈晓宇, 陈果, 成都中医药大学附属医院感染科 四川省成都市 610075

张扬, 医学硕士, 医师, 主要从事感染性疾病的中西医结合防治研究.

国家“十一五”科技重大专项课题基金资助项目, No. 2008ZX10005, No. 2009ZX10005

作者贡献分布: 扈晓宇对此课题所做贡献最多; 课题由扈晓宇与张扬共同设计; 研究过程由扈晓宇、张扬、骆建兴、陈果及高舒迪共同完成; 数据分析由张扬完成; 本论文写作由张扬与扈晓宇完成.

通讯作者: 扈晓宇, 教授, 主任医师, 610075, 四川省成都市十二桥路39号, 成都中医药大学附属医院感染科.

meddmail@yahoo.com.cn

电话: 028-87765459

收稿日期: 2012-05-04 修回日期: 2012-06-07

接受日期: 2012-06-30 在线出版日期: 2012-07-28

Effect of herbs for clearing heat and resolving stasis on liver function and survival in rats with acute liver failure

Yang Zhang, Xiao-Yu Hu, Jian-Xing Luo, Guo Chen, Shu-Di Gao

Yang Zhang, Jian-Xing Luo, Shu-Di Gao, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, Sichuan Province, China

Xiao-Yu Hu, Guo Chen, Department of Infectious Diseases, Affiliated Hospital of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, Sichuan Province, China

Supported by: the National Science and Technology Major Project of the Ministry of Science and Technology of China, Nos. 2008ZX10005 and 2009ZX10005

Correspondence to: Xiao-Yu Hu, Professor, Chief Physician, Department of Infectious Diseases, Affiliated Hospital of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, 39 Shierqiao Road, Chengdu 610075, Sichuan Province, China. meddmail@yahoo.com.cn

Received: 2012-05-04 Revised: 2012-06-07

Accepted: 2012-06-30 Published online: 2012-07-28

Abstract

AIM: To investigate the effect of herbs for clearing heat and resolving stasis on liver function and survival in rats with acute liver failure (ALF).

METHODS: Rats were intraperitoneally injected with D-GalN (1.4 g/kg) to induce ALF. One hundred and twenty-five SD rats were

randomly divided into four group: normal group, model group, Stronger Neo-Minophagen C (SNMC) group, and Qingre Huayu herbs group according to whether or not to undergo ALF induction and interventional drugs. Each group was further randomly divided into two subgroups for testing at different time points. One subgroup was used to collect blood and liver tissue samples, while the other was applied to observe the survival of rats 96 h after ALF induction. Serum alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), total bilirubin (TBIL), albumin (ALB), cholinesterase (CHE) and plasma prothrombin time (PT) were measured, and hepatic histopathological changes were observed by microscopy after HE staining.

RESULTS: After 96-hour treatment, mean survival time of rats in the three groups were 64.6, 71.9, and 83.3 h, respectively. The cumulative survival rate of rats in the Qingre Huayu herbs group was higher than that of rats in the model group ($\chi^2 = 4.428$, $P < 0.05$). Compared to the model group, the levels of serum ALT, AST, TBIL and plasma PT were remarkably reduced in the normal group, Qingre Huayu herbs group, and SNMC group (all $P < 0.01$). The levels of serum ALT, AST, TBIL and plasma PT were significantly lower in the Qingre Huayu herbs group than in the SNMC group (all $P < 0.01$). Compared to the model group, liver pathological score was significantly lower in the Qingre Huayu herbs group and SNMC group (1.84 ± 0.13 , 2.85 ± 0.20 vs 3.56 ± 0.24 , both $P < 0.01$), and in the Qingre Huayu herbs group than in the SNMC group ($P < 0.01$). In contrast, the levels of serum ALB and CHE were significantly higher in the normal group, Qingre Huayu herbs group, and SNMC group (all $P < 0.01$) than in the model group, and in the Qingre Huayu herbs group than in the SNMC group ($P < 0.01$).

CONCLUSION: Qingre Huayu herbs can significantly relieve liver cell's damage, improve liver function and liver pathology, reduce mortality,

■背景资料

急性肝衰竭(ALF)是一种暴发性、严重的临床综合征,病死率极高.近年随着肝移植和人工肝技术的快速发展,其存活率明显改善,但总体死亡率仍达40%,故探索更为有效的治疗方案意义重大.

■同行评议者

刘成海, 研究员, 上海中医药大学附属曙光医院(东部)肝病研究所

■研究前沿

ALF归属中医“急黄”、“天行发黄”等范畴,其病因病机关键在于“毒”和“瘀”。解毒化瘀为ALF的基本治法,观察清热化瘀中药对ALF模型大鼠的生存影响,提示使用清热化瘀中药可能会明显改善ALF临床预后。

extend survival time in D-GalN-induced acute liver failure rats, which indicated its potential use in patients with ALF.

Key Words: Chinese herbs; Acute liver failure; Clearing heat and resolving stasis; Survival rate; Syndrome

Zhang Y, Hu XY, Luo JX, Chen G, Gao SD. Effect of herbs for clearing heat and resolving stasis on liver function and survival in rats with acute liver failure. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(21): 1961-1966

摘要

目的: 探讨清热化瘀中药对急性肝衰竭(acute liver failure, ALF)模型大鼠肝功能及生存期的影响。

方法: 采用D-氨基半乳糖(D-GalN)单次腹腔注射构建ALF大鼠模型, 125只SD大鼠以是否接受造模和药物干预随机分为空白组、模型组、复方甘草酸苷组和清热化瘀中药组; 每组再以36、96 h两个时间点继续随机分为1、2两个亚组, 共8组, 其中亚组1用于造模后36 h取血及肝组织标本, 亚组2用于观察96 h内大鼠的生存率。以全自动生化分析法检测血清丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、门冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)、总胆红素(total bilirubin, TBIL)、白蛋白(albumin, ALB)和胆碱酯酶(cholinesterase, CHE), 全自动血凝分析法检测血浆凝血酶原时间(prothrombin time, PT), 常规HE染色作肝组织病理学观察。

结果: 模型组、复方甘草酸苷组及清热化瘀中药组估计平均生存时间分别为64.6、71.9、83.3 h; log-rank检验提示清热化瘀中药组累积生存率高于模型组($\chi^2 = 4.428$, $P < 0.05$)。与模型组相比, 空白组、清热化瘀中药组和复方甘草酸苷组血清ALT、AST、TBIL及血浆PT水平均显著下降($P < 0.01$), 清热化瘀中药组低于复方甘草酸苷组($P < 0.01$)。与模型组相比, 空白组、清热化瘀中药组和复方甘草酸苷组在血清ALB和CHE水平均明显升高($P < 0.01$), 清热化瘀中药组高于复方甘草酸苷组($P < 0.01$)。与模型组相比, 清热化瘀中药组和复方甘草酸苷组肝组织损伤程度积分明显下降(1.84 ± 0.13 , 2.85 ± 0.20 vs 3.56 ± 0.24 , 均 $P < 0.01$), 清热化瘀中药组低于复方甘草酸苷组($P < 0.01$)。

结论: 清热化瘀中药可显著减轻D-GalN诱导急性肝衰竭大鼠肝细胞的损伤, 改善肝功能及肝脏病理并降低ALF模型大鼠的病死率、延长生存期, 对ALF患者有潜在的临床应用价值。

关键词: 中草药; 急性肝衰竭; 清热化瘀; 生存率; 证候

张杨, 扈晓宇, 骆建兴, 陈果, 高舒迪. 清热化瘀中药对急性肝衰竭模型大鼠肝功能及生存期的影响. *世界华人消化杂志* 2012; 20(21): 1961-1966

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1961.asp>

0 引言

急性肝衰竭(acute liver failure, ALF)是由多种原因引起的肝脏代谢及免疫功能急剧丧失, 出现以肝性脑病、凝血障碍等为特征的一种暴发性、严重的临床综合征, 部分可进展为多脏器功能衰竭, 未经肝移植者死亡率往往超过90%^[1]。近年来, 随着人工肝支持系统为基础的内科综合治疗的不断进步, 临床疗效有所提高, 但总体病死率仍高达40%^[2], 所以寻找一种切实可行的干预方法, 具有重要的临床价值。本单位2007-09/2010-01应用前瞻性、队列研究方法, 对清热化瘀中药复方“清肝方”治疗ALF的临床疗效进行了初步验证^[3]。为进一步明确其作用环节, 本研究构建D-氨基半乳糖(D-GalN)诱导的大鼠ALF模型, 观察其对ALF模型大鼠肝功指标、凝血指标、肝脏病理及生存期等的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 SD大鼠(共125只, ♀, 体质量180 g \pm 20 g, 清洁级), 购自成都中医药大学实验动物中心[合格证号为SCXK(川)2008-011]; D-GalN购自上海弘邦医药科技有限公司(批号: HB-S0009-20111202); 复方甘草酸苷片(商品名: 美能, 25 mg/片 \times 100片/盒)购自日本米诺发源制药株式会社(批号: 10111), 用前加蒸馏水稀释为1.56 g/L; 清热化瘀中药复方(茵陈-败酱草-黄芩-虎杖-生大黄-赤芍: 2:4:4:4:1:4)购自成都中医药大学附属医院药局, 经成都中医药大学药学院中药鉴定教研室严铸云教授鉴定为正品药材后, 水煎、过滤、浓缩至2.97 g生药/mL, 4℃保存备用; ALT、AST检测试剂盒购自中生北控生物科技股份有限公司(批号: 110401); TBIL检测试剂盒购自四川迈克生物科技股份有限公司(批号: 0911051); ALB检测试剂盒购自四川迈克生物科技股份有限公司(批号: 1211051); CHE检测试剂盒购自宁波美康生物科技股份有限公司(批号: 20120209); PT检测试剂盒购自美国STAGO公司(批号: STA-NEOCIPUS107206); BCD-236H型-70℃电冰箱(中国海尔集团有限公司); KDC-2046型低速冷冻离心机(科大创新股份有

限公司); 7170A型全自动生化分析仪(日本日立公司); STA-EVOLUTION型全自动血凝分析仪(法国STAGO公司); Z7-12P2型组织脱水机(孝感亚光医用电子技术有限公司); RM2245型组织切片机(德国LEICA公司); BMJ-III型组织包埋机和PHY-III型摊片机/烘片机(常州中威电子仪器厂).

1.2 方法

1.2.1 D-GalN造模剂量的筛选及动物模型的构建: 分别以D-GalN 1.2、1.4、1.6、1.8 g/kg单次腹腔注射进行建模预实验, 根据动物死亡率、肝脏病理、肝功能损害及相关文献[4,5], 确定1.4 g/kg为建模最佳剂量. 建模前12 h禁食, 以D-GalN 1.4 g/kg单次腹腔注射建立大鼠ALF模型. 建模后正常饮水、进食.

1.2.2 动物分组及给药: 125只SD大鼠随机分为空白组、模型组、复方甘草酸苷组和清热化瘀中药组, 每组再以36、96 h两个时间点继续随机分为1、2两个亚组, 共8组. 其中空白组中的两个亚组各有10只, 其他各组中的亚组1、2各有20、15只.

所有给药剂量均为《医用实验动物学》“动物与人体的每公斤体重剂量折算系数表”^[6]折算出的大鼠等效剂量. 给药如下: 清热化瘀中药组: 每只大鼠给予10 mL/(kg·d)“清肝方”灌胃, 每毫升含药2.97 g; 复方甘草酸苷组: 每只大鼠给予10 mL/(kg·d)“美能”灌胃, 每毫升含药1.56 mg; 空白组与模型组给予10 mL/(kg·d)灭菌蒸馏水灌胃. 从造模前的第3天起定时灌胃, 1次/d.

1.2.3 标本采集及处理: 动物处死前12 h, 禁食不禁水. D-GalN造模36 h后, 取亚组1存活大鼠, 经股动脉取血6 mL, 其中4 mL置于干燥管中, 另2 mL置于枸橼酸钠抗凝管中, 由成都中医药大学附属医院检验科分离血清作肝功能和凝血功能检测. 断颈处死动物后, 沿腹正中线剖开皮肤, 分离出肝组织, 取肝左叶相同部位(1.0 cm×1.0 cm×0.2 cm)存放于10%中性福尔马林液固定, 送成都里来生物医学实验中心作常规HE染色. 亚组2大鼠用于造模后96 h生存率的统计.

1.2.4 观察指标及检测: (1)一般情况: 观察造模96 h内各组大鼠行为学变化; (2)生存率: 以腹腔注射的时间为标准点, 观察各组大鼠造模后96 h的存活情况, 并记录其生存时间; (3)肝功能检测: 血清丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、门冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)、总胆红素(total bilirubin,

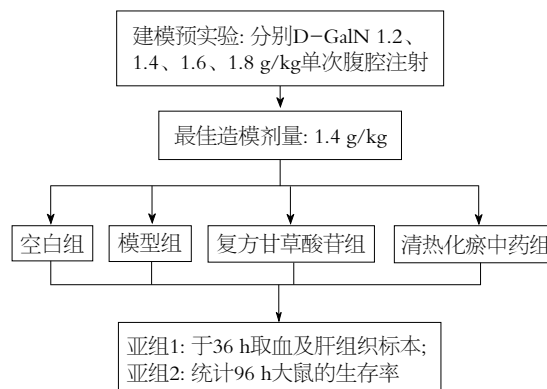


图1 研究流程图.

TBIL)、白蛋白(albumin, ALB)和胆碱酯酶(cholinesterase, CHE)测定用全自动生化分析法; (4)凝血功能检测: 血浆凝血酶原时间(prothrombin time, PT)测定用全自动血凝分析法; (5)肝脏病理组织学观察: 常规脱水石蜡包埋切片后, 作HE染色, 光镜下观察, 同时对肝组织损伤程度作半定量分析. 半定量分析赋值标准^[7]: “-”为组织结构正常, 记0分; “+”为可见肝细胞点状坏死, 记1分; “++”为肝细胞坏死范围<1/3, 记2分; “+++”为肝细胞坏死范围占肝小叶1/3-2/3, 记3分; “++++”为肝细胞坏死范围>2/3, 记4分. 由2位工作3年以上的病理医生读片, 结果判定不一致的大鼠不纳入此研究. 具体研究流程见图1.

统计学处理 计量资料用mean±SD表示, 组间差异用单因素方差分析进行比较, 方差齐性用LSD检验, 方差不齐用Dunnett's检验; 计数资料采用RC检验. 应用Kaplan-Meier法估计各组大鼠的生存时间, 采用log-rank检验进行组间生存分布比较. 全部统计分析采用SPSS17.0统计软件进行计算, $P<0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 各组大鼠行为学的比较 模型组于造模后12 h出现进食及活动减少, 反应迟钝, 毛蓬松、竖立, 或全身皮毛为汗液浸湿, 部分伴尿失禁、尿黄, 精神萎靡、嗜睡, 也可呈激惹状态; 40 h可发展至昏睡状态, 痛觉反应迟钝或消失, 尿深黄; 终末期可见四肢或全身抽搐, 口腔、四肢末端出血. 24 h时动物开始出现死亡, 在40-72 h内动物死亡最多, 72 h后大鼠一般状态逐渐好转, 对外界反应渐趋正常. 复方甘草酸苷组及清热化瘀中药组大鼠, 出现上述症状的次数较少, 程度较轻, 且持续时间更短. 空白组大鼠一切正常.

2.2 各组大鼠生存率、生存期的比较 各亚组

■相关报道

本课题组前期的研究工作表明, 清热化瘀中药可显著改善乙型肝炎相关性慢加急性肝衰竭患者的肝功能和凝血功能等, 减少并发症, 提高疗效, 降低病死率.

■创新盘点

本研究采用公认的ALF动物模型,通过药理学实验,了解清热化瘀中药对ALF的生存影响。

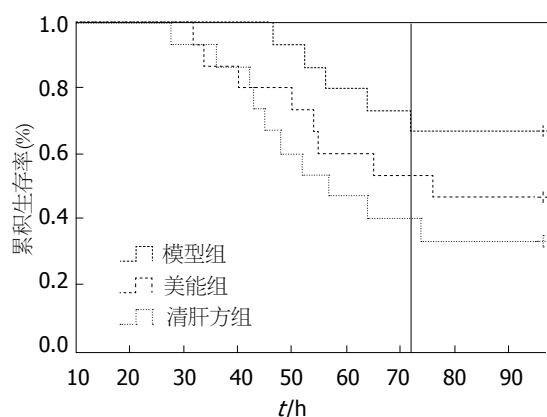


图2 大鼠造模后96 h的生存曲线。

2 大鼠观察至造模后96 h, 模型组($n = 15$)死亡10例(66.7%), 复方甘草酸苷组($n = 15$)死亡8例(53.3%), 清热化瘀中药组($n = 15$)死亡5例(33.3%), 经RC检验, 3组存活及死亡大鼠数比较, 差异无统计学意义($\chi^2 = 3.379, P > 0.05$)。模型组、复方甘草酸苷组及清热化瘀中药组估计平均生存时间分别为64.6、71.9、83.3 h; log-rank检验提示清热化瘀中药组累积生存率高于对照组($\chi^2 = 4.428, P < 0.05$), 而复方甘草酸苷组与模型组、清热化瘀中药组差异均无统计学意义($\chi^2 = 0.635, 1.455, P > 0.05$, 图2)。

2.3 各组大鼠血清ALT、ALB、AST、CHE、TBIL水平及凝血功能的比较 与模型组相比, 空白组、清热化瘀中药组和复方甘草酸苷组血清ALT、AST、TBIL和血浆PT水平均显著下降($P < 0.01$), 清热化瘀中药组低于复方甘草酸苷组($P < 0.01$); 而这3组的血清ALB和CHE水平较模型组相比均明显升高($P < 0.01$), 清热化瘀中药组高于复方甘草酸苷组($P < 0.01$), 均有统计学意义(表1)。

2.4 各组大鼠肝脏组织病理学的比较 空白组肝小叶结构正常, 肝索及肝窦清楚, 肝细胞以中央静脉为中心呈放射状排列, 肝窦状隙未见扩张; 肝细胞大小较均匀, 肝细胞质丰富, 细胞核圆形、丰满, 汇管区结构正常。模型组肝小叶结构紊乱, 肝索及肝窦形态不清楚, 部分肝细胞极度肿胀或有脂肪空泡, 并进一步胞核消失、肝细胞坏死, 坏死区域呈大片状分布, 坏死灶内有孤立成团炎细胞, 残余汇管区内亦可见炎细胞。复方甘草酸苷组肝小叶结构紊乱, 部分肝细胞明显肿胀或有脂肪空泡, 细胞间界限不清, 胞浆淡染, 肝细胞呈灶状坏死、崩解, 坏死灶内有孤立成团炎细胞。清热化瘀中药组肝小叶结构正常, 肝索及肝窦清楚, 部分肝细胞浆轻度浊肿, 细胞

间尚有界限, 胞浆淡染; 肝小叶内可见散在的肝细胞坏死, 汇管区结构正常, 个别汇管区内有少许炎细胞分布(图3)。

2.5 肝组织病理评分 与模型组相比, 清热化瘀中药组和复方甘草酸苷组肝组织损害程度积分明显下降($P < 0.01$), 清热化瘀中药组低于复方甘草酸苷组($P < 0.01$)。具有统计学意义(表2)。

3 讨论

ALF是一种以肝脏功能严重损害, 出现凝血障碍和黄疸、肝性脑病为特征的暴发性临床综合征^[1,8]。不同地区的致病因素有所差异: 在美国, 对乙酰氨基酚中毒是ALF最常见的病因, 据统计, 对乙酰氨基酚引起的ALF占肝衰竭总数的50%; 国内则以各型肝炎病毒感染为主, 占52.83%-75.00%。其临床预后差: 采用包括人工肝支持系统、肝移植在内的内外科综合治疗, 其总体死亡率仍高达40%, 未经肝移植的ALF患者死亡率更超过90%^[2,9,10]。目前中药或中药复方在治疗ALF方面的动物与临床研究报道较多^[11-15]。

本研究主要观察清热化瘀中药复方(茵陈、败酱草、黄芩、虎杖、生大黄、赤芍)对ALF大鼠模型的疗效。祖国医学将其归为“急黄”、“瘟黄”、“天行发黄”等范畴。隋·巢元方《诸病源候论》云:“脾胃有热, 谷气郁蒸, 因热毒所加, 故卒然发黄, 心满气喘, 命在顷刻, 故云急黄也。”本病病因主要是外感湿热疫毒之邪, 内有乖戾之气。病机责之于毒热炽盛内陷, 湿浊蒙蔽清窍, 少阳枢机不利, 气机升降失常, 终致毒、热互结, 迫血妄行; 湿热熏蒸肝胆, 胆汁不循常道而外溢; 气机逆乱, 水裹血阻。故清热化瘀是中医治疗ALF的治疗大法。方中以大剂茵陈为君, 功专清利肝胆湿热, 为退黄之要药。配大剂生大黄、败酱草、黄芩为臣, 其中生大黄味苦性寒, 功擅泻下攻积, 荡涤积滞, 畅阳明谷道而引湿热之毒从后阴而出; 败酱草、黄芩苦寒燥湿解毒, 加强利湿退黄之功。伍以大剂虎杖、赤芍为佐, 其中虎杖利湿退黄、泻火解毒, 又活血祛瘀, 与茵陈相配消除湿浊; 赤芍凉血清热, 活血散瘀, 利于黄疸消退。诸药合用, 势大力宏, 共奏清热通下, 和解祛瘀之功。

本研究结果表明: 清热化瘀中药组累计生存率优于复方甘草酸苷组($P < 0.05$), 血清ALT、AST和TBIL水平低于复方甘草酸苷组($P < 0.01$), 血清ALB和CHE水平高于复方甘草酸苷组($P < 0.01$), 血浆PT水平低于复方甘草酸苷组

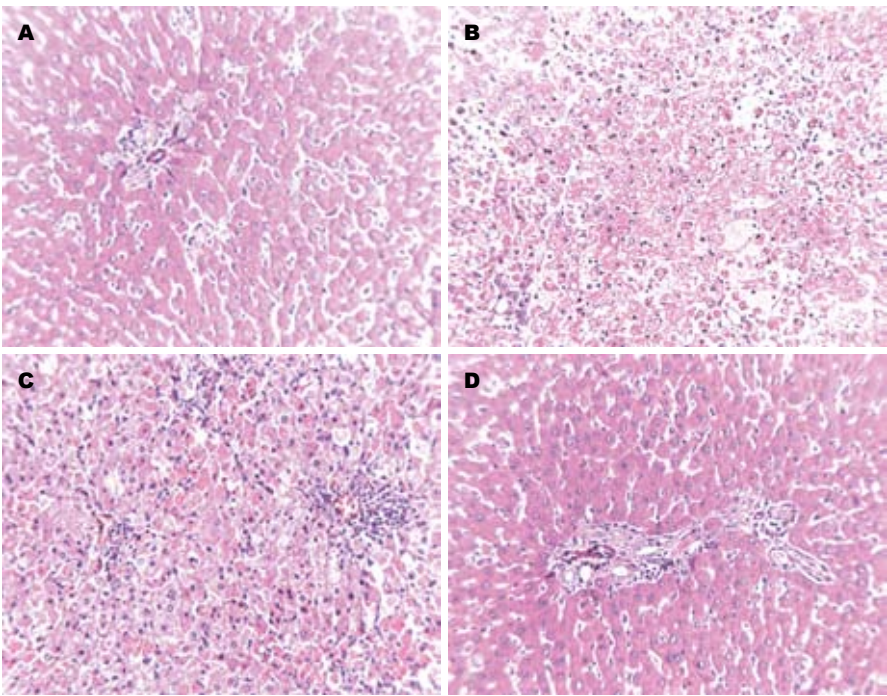


图 3 1.4 g/kg D-GalN 诱导36 h后各组大鼠肝组织病理学观察(HE, × 200). A: 空白组; B: 模型组; C: 复方甘草酸苷组; D: 清热化瘀中药组.

■应用要点
清热化瘀中药能显著改善ALF模型大鼠肝细胞的损伤, 显著延长实验动物的生存时间, 显著降低实验动物的死亡率, 为临床上应用清热化瘀中药治疗ALF提供理论依据.

表 1 6个指标在各组中的变化 (mean ± SD)

分组	n	ALT(U/L)	AST(U/L)	TBIL(μmol/L)	ALB(g/L)	CHE(U/L)	PT(s)
空白组	10	35.02 ± 3.41	148.30 ± 13.54	1.61 ± 0.29	35.92 ± 2.48	562.45 ± 30.67	13.56 ± 1.15
模型组	20	442.09 ± 36.04 ^b	913.67 ± 77.57 ^b	36.97 ± 3.62 ^b	23.17 ± 2.24 ^b	340.60 ± 39.28 ^b	32.10 ± 2.43 ^b
复方甘草酸苷组	20	256.93 ± 24.37 ^d	384.03 ± 23.28 ^d	23.41 ± 2.42 ^d	25.16 ± 2.47 ^d	420.00 ± 49.14 ^d	30.24 ± 2.11 ^d
清热化瘀中药组	20	138.53 ± 14.14 ^{df}	313.13 ± 39.48 ^{df}	18.93 ± 1.87 ^{df}	29.41 ± 2.12 ^{df}	524.41 ± 47.60 ^{df}	24.83 ± 2.16 ^{df}

^bP<0.01 vs 空白组; ^dP<0.01 vs 模型组; ^fP<0.01 vs 复方甘草酸苷组.

表 2 肝组织病理评分

分组	n	病理变化分级(n)					病理损伤程度积分 (mean ± SD)
		-	+	++	+++	++++	
空白组	10	10	0	0	0	0	0
模型组	20	0	0	0	11	9	3.56 ± 0.24 ^b
复方甘草酸苷组	20	0	4	9	7	0	2.85 ± 0.20 ^d
清热化瘀中药组	20	4	11	5	0	0	1.84 ± 0.13 ^{df}

^bP<0.01 vs 空白组; ^dP<0.01 vs 模型组; ^fP<0.01 vs 复方甘草酸苷组.

($P<0.01$), 肝组织损伤程度积分显著低于复方甘草酸苷组($P<0.01$). 提示: 清热化瘀中药可减轻ALF模型大鼠肝细胞的损伤, 改善肝功能及肝脏病理, 延长生存时间, 降低死亡率, 疗效优于复方甘草酸苷, 值得临床医生重视.

但是, 本文也有研究不足之处. 首先本文没能详细阐述清热化瘀中药治疗ALF的作用机制; 其次, D-GalN大鼠肝衰竭模型本身的局限性决定了实验结果的说服力有限. 本文结果究竟属

偶然性还是必然性, 需要从更大样本的多中心临床研究中得到证实, 这也正是我们未来的工作方向.

4 参考文献

1 Bernal W, Auzinger G, Dhawan A, Wendon J. Acute liver failure. *Lancet* 2010; 376: 190-201
2 Lee WM. Acute liver failure. *Semin Respir Crit Care Med* 2012; 33: 36-45
3 Hu XY, Zhang Y, Chen G, Zhong S, Fan XJ. [A prospective cohort study on the influence of high doses

■同行评价

该研究通过制备ALF大鼠模型,并观察清热化痰中药对其肝功能及生存期的影响,选题具有一定科学性和创新性。

- of herbs for clearing heat and resolving stasis on survival rates in patients with hepatitis B-related acute-on-chronic liver failure]. *Zhongxiyi Jiehe Xuebao* 2012; 10: 176-185
- 4 Zhang L, Kang W, Lei Y, Han Q, Zhang G, Lv Y, Li Z, Lou S, Liu Z. Granulocyte colony-stimulating factor treatment ameliorates liver injury and improves survival in rats with D-galactosamine-induced acute liver failure. *Toxicol Lett* 2011; 204: 92-99
- 5 张金良, 曾辉, 王宪波. 急性肝衰竭模型中医证型探讨. *中国中西医结合杂志* 2011; 31: 659-662
- 6 施新猷. 医用实验动物学. 西安: 陕西科学技术出版社, 1989: 417-421
- 7 张建军, 戴丹. 抗肝衰复方对急性肝衰竭大鼠高迁移率族蛋白-1和增殖细胞核抗原表达的影响. *中西医结合肝病杂志* 2009; 19: 38-41
- 8 中华医学会感染病学分会肝衰竭与人工肝学组, 中华医学会肝病学会重型肝病与人工肝学组. 肝衰竭诊疗指南. *中华肝脏病杂志* 2006; 14: 643-646
- 9 郭利民. 急性肝衰竭、MODS与人工肝治疗. *透析与人工器官* 2005; 16: 40-46
- 10 刘晓燕, 胡瑾华, 王慧芬, 陈菊梅. 1977例急性、亚急性、慢加急性肝衰竭患者的病因与转归分析. *中华肝脏病杂志* 2008; 16: 772-775
- 11 O'Grady JG. Acute liver failure. *Postgrad Med J* 2005; 81: 148-154
- 12 陈学兵, 朱霞, 唐红. 终末期肝病3种评分体系对急性肝衰竭患者预后的评估. *世界华人消化杂志* 2011; 19: 855-859
- 13 范敬静, 李东良. 骨髓间充质干细胞治疗急性肝衰竭的研究进展. *世界华人消化杂志* 2011; 19: 2141-2145
- 14 陈海鸥, 傅爱. 急性肝衰竭TNF- α 、Caspase-3及TGF- β 1 mRNA的表达及罗格列酮的干预. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 1185-1189
- 15 刘凤超, 贺永文, 喻佛定. 天晴甘平减轻急性肝衰竭小鼠肝细胞损伤的机制. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 1014-1017

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》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, 并有足够具有自明性的信息, 使读者不查阅正文即可理解该表的内容. 表内每一栏均应有表头, 表内非公知通用缩写应在表注中说明, 表格一律使用三线表(不用竖线), 在正文中该出现的地方应注出. 图应有图序、图题和图注, 以使其容易被读者理解, 所有的图应在正文中该出现的地方注出. 同一个主题内容的彩色图、黑白图、线条图, 统一用一个注解分别叙述. 如: 图1 萎缩性胃炎治疗前后病理变化. A: ...; B: ...; C: ...; D: ...; E: ...; F: ...; G: ... 曲线图可按●、○、■、□、▲、△顺序使用标准的符号. 统计学显著性用: $^aP<0.05$, $^bP<0.01$ ($P>0.05$ 不注). 如同一表中另有一套P值, 则 $^cP<0.05$, $^dP<0.01$; 第3套为 $^eP<0.05$, $^fP<0.01$. P值后注明何种检验及其具体数字, 如 $P<0.01$, $t=4.56$ vs 对照组等, 注在表的左下方. 表内采用阿拉伯数字, 共同的计量单位符号应注在表的右上方, 表内个位数、小数点、±、-应上下对齐. “空白”表示无此项或未测, “-”代表阴性未发现, 不能用同左、同上等等. 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/°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 cm×4.5 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.

趋化因子CXCL11及其受体CXCR3在重症急性胰腺炎相关肺损害中的作用

吴兴, 张海峰, 丁晓凌, 强晖, 曹维, 周国雄

吴兴, 泗洪县人民医院消化科 江苏省宿迁市 223900
张海峰, 丁晓凌, 强晖, 曹维, 周国雄, 南通大学附属医院消化内科 江苏省南通市 226001
吴兴, 主要从事急性胰腺炎的研究。
南通市社会发展基金资助项目, No. S5054
作者贡献分布: 此课题由吴兴与周国雄设计; 吴兴与张海峰为共同第一作者, 主要负责资料收集和论文写作; 由吴兴、张海峰、丁晓凌、强晖及曹维进行实验操作; 数据分析由吴兴、张海峰及强晖完成。
通讯作者: 周国雄, 教授, 主任医师, 226001, 江苏省南通市西寺路20号, 南通大学附属医院消化内科。
zhouguoxiong@medmail.com.cn
电话: 0513-81161826
收稿日期: 2012-04-27 修回日期: 2012-06-14
接受日期: 2012-06-30 在线出版日期: 2012-07-28

Expression of CXCL11 and CXCR3 in acute lung injury associated with severe acute pancreatitis

Xing Wu, Hai-Feng Zhang, Xiao-Ling Ding, Hui Qiang, Wei Cao, Guo-Xiong Zhou

Xing Wu, Department of Gastroenterology, the People's Hospital of Sihong, Suqian 223900, Jiangsu Province, China
Hai-Feng Zhang, Xiao-Ling Ding, Hui Qiang, Wei Cao, Guo-Xiong Zhou, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China
Supported by: the Social Development Foundation of Nantong, No. S5054
Correspondence to: Guo-Xiong Zhou, Professor, Chief Physician, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Nantong University, 20 Xisi Road, Nantong 226001, Jiangsu Province, China. zhouguoxiong@medmail.com.cn
Received: 2012-04-27 Revised: 2012-06-14
Accepted: 2012-06-30 Published online: 2012-07-28

Abstract

AIM: To investigate the expression of chemokine CXCL11 and its receptor CXCR3 in acute lung injury associated with severe acute pancreatitis (SAP).

METHODS: Forty-eight SD rats were randomly and equally divided into two groups: control group and SAP group. SAP was induced in rats of the SAP group by retrograde injection of 4% sodium taurocholate into the bili-pancreatic duct. Each group was further randomly and

equally divided into four subgroups for testing at different time points. The rats were randomly selected to be executed at 1, 3, 6, and 12 h after induction of SAP. Serum amylase, wet/dry weight ratio of the lung, and histological changes of the lung were measured. Expression of CXCL11 and CXCR3 proteins in the lung was detected by immunohistochemistry. Serum levels of CXCL11 were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

RESULTS: Serum amylase was significantly higher in the SAP group than in the control group ($P < 0.01$). The lung wet/dry weight ratio was significantly higher at 3, 6, and 12 h in the SAP group than in the control group (all $P < 0.05$). The expression of CXCL11 and CXCR3 in the lung (all $P < 0.05$) and serum levels of CXCL11 at various time points (all $P < 0.01$) were significantly higher in the SAP group than in the control group (all $P < 0.05$).

CONCLUSION: CXCL11 and CXCR3 may play important roles in the pathogenesis of acute lung injury in SAP.

Key Words: Severe acute pancreatitis; CXCL11; CXCR3; Acute lung injury

Wu X, Zhang HF, Ding XL, Qiang H, Cao W, Zhou GX. Expression of CXCL11 and CXCR3 in acute lung injury associated with severe acute pancreatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(21): 1967-1972

摘要

目的: 制作大鼠重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)模型, 检测不同时间点趋化因子CXCL11及其受体CXCR3在SAP肺组织中的动态变化, 探讨他们在SAP肺功能损害过程中的作用。

方法: 48只SD大鼠, 雌雄不限, 随机分为2组: 对照组(C组), SAP组(P组), 每组24只。4%牛黄胆酸钠逆行胰胆管注射建立SAP大鼠模型, 剂量为1 mL/kg, C组打开腹腔后仅仅翻动胰腺

■背景资料

重症急性胰腺炎(SAP)易出现全身炎症反应综合征(SIRS), 可导致多器官损害, 而肺脏是最常受累的体外器官之一, 出现肺功能损害其死亡率明显升高。

■同行评议者

夏时海, 副教授, 副主任医师, 中国人民解放军武警后勤学院附属医院肝胆胰脾科(中心)

■研究前沿

多项研究表明多种炎症趋化因子参与了SAP急性肺功能受损的发生、发展过程,但在SAP中CXCL11是否参与及其机制尚不清楚。

组织数次。每组随机分为4个亚组,每个亚组6只。4个组分别在1、3、6、12 h抽血、处死,留取组织标本。分别检测各不同时间点组的血清淀粉酶、肺湿干重比、胰腺组织、肺组织病理,免疫组织化学法检测肺CXCL11及CXCR3的表达,酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血清中的CXCL11的水平。

结果: P组各亚组血清淀粉酶值明显升高($P<0.01$ vs C组);肺湿干重比值: P组3、6、12 h组较C组明显升高($P<0.05$);胰腺组织、肺组织病理: 3、6、12 h P组肺组织损伤明显;免疫组织化学显示P组CXCL11与CXCR3蛋白表达较C组表达明显增强($P<0.05$), ELISA显示: 1、3、6、12 h P组血清CXCL11蛋白较C组明显增高($P<0.01$)。

结论: CXCL11/CXCR3可能参与大鼠SAP急性肺功能损害的发病过程。

关键词: 重症急性胰腺炎; CXCL11; CXCR3; 急性肺损伤

吴兴, 张海峰, 丁晓凌, 强晖, 曹维, 周国雄. 趋化因子CXCL11及其受体CXCR3在重症急性胰腺炎相关肺损害中的作用. 世界华人消化杂志 2012; 20(21): 1967-1972

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1967.asp>

0 引言

重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)病情重,可出现全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS),常累及肝、肺、肾、肠、胃等器官,导致多器官损害,而肺脏是最常受累的胰外器官之一。SAP患者大约60%伴有肺损伤或急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)^[1]。目前对于SAP合并肺损伤(acute lung injury, ALI)的机制仍不确切。Rinderknecht等^[2]首次提出异常激活的胰酶在造成胰腺组织损伤的过程中,产生一系列炎性介质,这些炎症介质进入血液和淋巴管,继而进入全身,激活其他组织的炎性细胞,进一步释放大量的炎性介质,从而产生SIRS,甚至多器官功能障碍综合征包括急性肺功能受损。可见,在AP形成与发展过程中,炎性细胞的浸润与活化起着关键作用,而炎性细胞的浸润与活化需要趋化因子的参与。

有研究表明在慢性胰腺炎中CXCL11及CXCR3表达有明显增加,但在SAP中CXCL11是否参与及机制尚不清楚。本实验通过制作SAP大鼠模型,检测肺组织中CXCL11、CXCR3的表达

情况,探讨CXCL11及CXCR3在SAP急性肺损伤中的作用,为临床早期判断SAP肺功能损伤的严重程度提供一个新指标,为今后临床工作中SAP肺功能损伤的治疗方案提供新的理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料 健康SD大鼠,清洁级,雌雄不限,体重 $220\text{ g}\pm 20\text{ g}$,由南通大学实验动物中心提供;牛磺胆酸钠(T86339-1G)购自美国Sigma公司;兔抗鼠CXCL11抗体(1:100)、兔抗鼠CXCR3抗体(1:50)、ABC免疫组织化学试剂盒、大鼠CXCL11 ELISA试剂盒购自上海劲马生物公司。

1.2 方法

1.2.1 动物模型的建立及实验分组: 48只健康SD大鼠随机分成2组:对照组(C组)、SAP组(P组),每组24只大鼠。每组再随机分成4个亚组,每个亚组6只大鼠。参照Lankisch等^[3]和苗明等^[4]的方法经改良制作而成。大鼠术前禁食12 h,不禁水,用10%水合氯醛(300 mg/kg 体质量)腹腔内注射麻醉、备皮,腹部皮肤消毒,正中切口进腹,胆胰管十二指肠开口处予无损伤金属夹夹闭,注射器针头向十二指肠开口方向插入胆胰管,以 0.1 mL/min 的速度向胆胰管内注射4%牛磺胆酸钠,剂量为 1 mL/kg ,5 min后拔除注射针,松开金属夹,缝合关腹。C组仅翻动胰腺2次后关腹。各组分别随机选取6只大鼠于1、3、6、12 h予以抽血处死,取材检测有关指标。

1.2.2 淀粉酶测定: 采用碘-淀粉比色法,操作按照试剂提供商的说明书进行,用深圳迈瑞半自动生化分析仪测定。

1.2.3 肺湿干重比测定: 取大鼠的右肺组织,拭去血迹后称重,所得数量为湿重;将肺组织放入 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 烤箱内72 h,取出称重,所得数量为干重。肺湿干重比为肺湿重/肺干重,反映肺组织水肿程度。

1.2.4 病理组织学检测: 胰腺组织、肺组织经HE染色后,由2位专业的病理医师双盲阅片,每组随机取3张切片,每张切片随机选取10个高倍镜视野,以水肿、中性粒细胞浸润、出血、细胞坏死来评价胰腺组织、肺组织损伤的程度。

1.2.5 免疫组织化学检测: 切片常规脱蜡至水,高温高压组织抗原修复, CXCL11、CXCR3抗体按1:200稀释,常规脱蜡、水化、微波恢复抗原,最后经DAB显色,常规复染封片。用试剂公司提供的阳性切片作为阳性对照,以PBS代替一抗作为阴性对照,结果用彩色病理图像分析系统采集图像。所有免疫组织化学染色结果均由2位病

表 1 各组不同时间点血清淀粉酶值(U/L)

分组	1 h	3 h	6 h	12 h
C组	172±61	212±53	180±42	176±49
P组	2950±500 ^a	3344±732 ^a	6155±322 ^a	7735±113 ^a

^a*P*<0.01 vs C组.

表 2 不同时间点肺湿干重比

分组	1 h	3 h	6 h	12 h
C组	2.82±0.07	2.85±0.07	2.88±0.07	2.86±0.05
P组	2.88±0.05	3.22±0.10 ^a	3.22±0.09 ^a	3.45±0.10 ^a

^a*P*<0.05 vs C组.

理医生在双盲条件下完成,在高倍镜(×400)下检测,以细胞浆、核膜或胞膜呈现棕黄色颗粒为阳性细胞,每张切片随机观察10个不同视野,计数阳性细胞占所有细胞的百分数.按阳性细胞数<5%为(-),5%-10%为(+),11%-50%为(++),>50%为(+++)进行数据统计.

1.2.6 酶联免疫吸附试验检测:采用双抗体夹心法测定大鼠CXCL11水平,即将抗大鼠CXCL11单抗包被于酶标板上,标准品和大鼠血清标本中的CXCL11与单抗结合,加入生物素化的抗大鼠CXCL11抗体,形成免疫复合物连接在酶标板上,辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素与生物素结合,加入酶底物,出现黄色,加终止液硫酸终止反应,颜色变深.测出吸光度(*A*)值,CXCL11质量浓度与其*A*值呈正比,绘制标准曲线,然后再求出大鼠血清标本中CXCL11的质量浓度.

统计学处理 实验数据采用mean±SD表示,采用SPSS13.0统计软件处理.采用单因素方差分析对各组均数进行比较,*P*<0.05具有显著性差异.

2 结果

2.1 血清淀粉酶 1、3、6、12 h时间点的P组血清淀粉酶与C组比较均明显升高,有统计学意义(*P*<0.01,表1).

2.2 肺湿干重比 3、6、12 h时间点的P组与C组相比,肺湿干重比明显升高,有统计学意义(*P*<0.05,表2).

2.3 胰腺组织、肺组织病理学改变 胰腺组织: C组胰腺、胰周脂肪组织、网膜均无异常,胰腺粉红色有弹性,无腹水. P组6 h后肉眼可见大量血性腹水,胰腺水肿,有出血灶、坏死,呈深棕

表 3 各不同时间点胰腺组织病理积分

分组	1 h	3 h	6 h	12 h
C组	0.26±0.08	0.27±0.09	0.33±0.12	0.50±0.15
P组	5.17±0.75 ^a	6.67±0.52 ^a	9.00±0.63 ^a	11.33±0.84 ^a

^a*P*<0.05 vs C组.

表 4 各不同时间点肺组织病理积分

分组	1 h	3 h	6 h	12 h
C组	0.20±0.05	0.30±0.07	0.35±0.10	0.46±0.13
P组	4.68±0.66 ^a	6.22±0.68 ^a	8.12±0.72 ^a	10.12±0.80 ^a

^a*P*<0.05 vs C组.

红色,胰周及网膜可见皂化斑,与周围组织黏连(图1A, B).胰腺组织的病理积分:1、3、6、12 h时间点的P组与C组相比明显升高,有统计学意义(*P*<0.05,表3).

肺组织: C组各时间点肺组织病理未见肺间质水肿、肺泡细胞坏死,也未见肺泡出血、肺泡间质炎性细胞浸润.大体标本粉红色,无出血,富有弹性.光镜下见肺泡结构清晰,肺泡壁薄,肺泡内未见红细胞及渗出液. P组1 h组标本未见明显变化,亦无间质水肿;3 h组可见肺间质水肿,有少量炎细胞浸润,亦可见少量坏死;6 h组和12 h组大体标本失去弹性,颜色灰暗,可见胸水,镜下见肺间质水肿,肺泡结构紊乱,肺泡内见红细胞,大量肺泡细胞坏死,有大量炎性细胞浸润(图1C, D).肺组织的病理积分:1、3、6、12 h时间点的P组与C组相比明显升高,有统计学意义(*P*<0.05,表4).

2.4 肺组织CXCL11免疫组织化学染色 C组大鼠各时间点肺组织免疫组织化学染色未见CXCL11蛋白的阳性表达,细胞着淡蓝色,未见炎性细胞浸润,未见阳性表达细胞. P组术后3、6、12 h组可见CXCL11蛋白的阳性表达,着色加深,可见深棕色染色,表达面积增加;与C相比,差异具有统计学意义(*P*<0.05,图2A, B).

2.5 肺组织CXCR3的表达 C组各时间点CXCR3蛋白的表达不明显,偶见单个核细胞表达CXCR3,着色较浅. P组3、6、12 h时间点的CXCR3表达明显增强,细胞着色明显加深呈棕黄色,与C组相比,差异具有统计学意义(*P*<0.05,图2C, D).

2.6 血清ELISA检测 C组各时间点血清CXCL11

■相关报道

研究表明趋化因子在AP以及伴发的急性肺功能损伤中扮演了重要角色,如白介素8(IL-8)、单核细胞趋化蛋白-1、生长相关原癌基因、正常T细胞表达和分泌的活化调节蛋白等.

■创新盘点

研究SAP肺组织中CXCL11、CXCR3的表达情况,探讨CXCL11及CXCR3对SAP急性肺损伤发生、发展的影响,为临床工作提供新的理论依据.

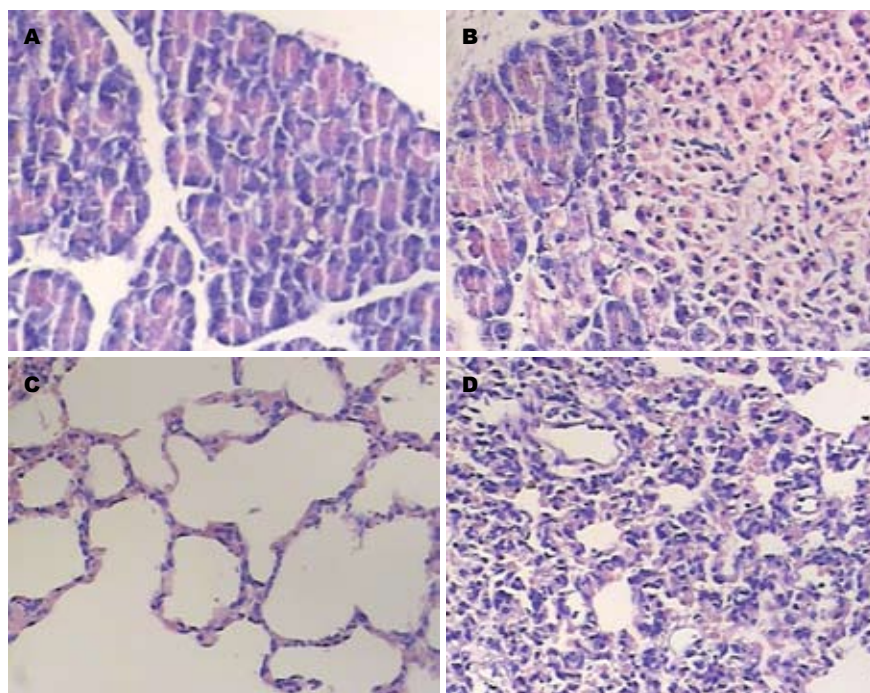


图 1 大鼠胰腺组织和肺组织的HE染色($\times 200$). A, C: C组(对照组); B, D: P组(胰腺炎组).

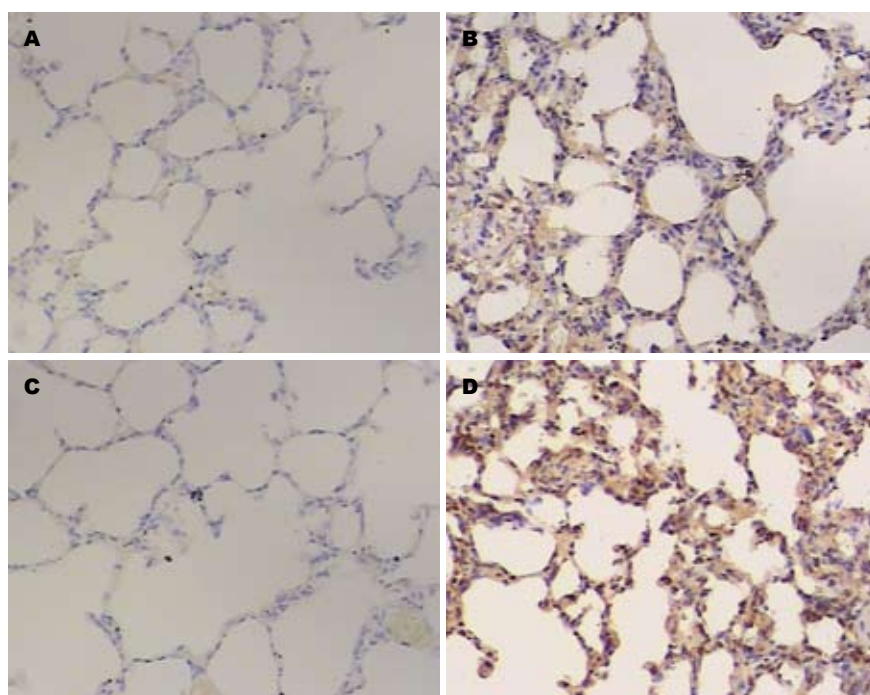


图 2 肺组织CXCL11和CXCR3的免疫组织化学染色($\times 400$). A, C: C组(对照组); B, D: P组(胰腺炎组).

的值变化不大,均较低;P组1、3、6、12 h组随时间变化逐渐升高,与C组相应时间点比较CXCL11表达明显升高,有统计学意义($P<0.01$,表5).

3 讨论

急性肺功能损伤是AP常见并发症,多种机制参与其发生,其确切的发生率尚未确定.趋化因子及其受体在急性肺功能损伤发病中的作用已经成为研究急性肺功能损伤病因、发病机制及诊

疗的热点问题^[5,6].趋化因子是一类控制细胞定向迁移的因子,其功能的行使有赖于趋化因子及其受体的介导.二者之间相互作用具有交叉性,一种趋化因子能与多个趋化因子受体结合,一种趋化因子受体也可有几个高亲和性配体,趋化因子与趋化因子受体结合后具有广泛的生物学功能,影响多种生理和病理过程.趋化因子相互作用控制着各种免疫细胞的定向迁移,使免疫细胞到达感染、创伤和细胞异常增殖的部位,执行清除感染、促进创伤愈合和消灭异常

表 5 各组不同时间点血清CXCL11浓度 (ng/L)

分组	1 h	3 h	6 h	12 h
C组	58.33 ± 4.30	52.00 ± 7.50	57.66 ± 4.36	58.10 ± 8.68
P组	83.17 ± 18.24 ^a	96.00 ± 9.20 ^a	110.22 ± 15.13 ^a	105.50 ± 16.22 ^a

^aP<0.01 vs C组.

增殖细胞, 维持组织细胞的平衡等功能. 趋化因子及其受体的表达和功能异常, 将导致免疫细胞不能在正确的位置行使正确的功能. 多个研究表明趋化因子在AP以及伴发的急性肺功能损伤中扮演了重要角色, 如白介素8(interleukin-8, IL-8)、单核细胞趋化蛋白-1、生长相关原癌基因、正常T细胞表达和分泌的活化调节蛋白等^[7-13].

CXCL11是其中非ELR类趋化因子, 主要表达在正常个体胸腺、脾、肺、胰腺等器官或组织的星形胶质细胞、支气管内皮细胞、血管内皮细胞等^[14], 正常情况其表达量较少. 干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ)是其强烈诱导剂, 肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)、脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)、IL-1与其有协同作用. CXCR3是CXCL11的受体, 有7个含疏水氨基酸的 α 螺旋穿膜结构, 经异源三聚体G蛋白传递信号, 属视紫红质样G蛋白偶联受体超家族. CXCR3主要表达在T细胞上, 而且Th1>Th2, 其配体有CXCL9、CXCL10与CXCL11, 其中CXCL11与其结合最牢固, 且可阻断另2个配体的结合^[15,16]. CXCL11-CXCR3在炎症、感染、肿瘤、应激、自身免疫、变态反应、移植排斥反应、艾滋病(AIDS)、淋巴细胞归巢以及新生血管形成等众多病理生理的发生发展过程中均有参与^[17,18]. 在炎症、感染等条件下, IFN刺激血管内皮细胞等产生CXCL11, 后者刺激活化的T细胞迁移, 同时产生IFN等细胞因子, 形成正反馈回路.

有资料表明, CXCL11-CXCR3系统的细胞趋化作用是免疫炎症反应的一个重要环节^[19,20]. 本次实验结果显示CXCL11的变化符合胰腺炎病程及免疫学变化, 对照组CXCL11蛋白在血清中的表达也很少, 肺组织免疫组织化学显示CXCR3及CXCL11也很少表达, 该组大鼠肺组织结构正常, 血清淀粉酶正常. 而模型组肺组织免疫组织化学显示CXCR3及CXCL11表达明显增强, 血清CXCL11表达也增加, 并逐渐升高, 且与肺组织的病理损伤呈正比, 统计学处理示存在明显差异.

上述结果提示, CXCL11可能是AP早期的炎症介质, 参与了AP早期的急性炎症反应过程, 可能在SAP早期的急性肺功能损伤中起到了重要的作用. 检测CXCL11蛋白的动态变化, 或许可以帮助判断AP早期急性肺功能损伤的发生.

总之, 本实验显示在SAP早期, CXCL11-CXCR3参与了胰腺炎急性肺损害过程, 增加其病理损伤.

4 参考文献

- 1 Surbatović M, Jovanović K, Radaković S, Filipović N. [Pathophysiological aspects of severe acute pancreatitis-associated lung injury]. *Srp Arh Celok Lek* 2005; 133: 76-81
- 2 Rinderknecht H. Fatal pancreatitis, a consequence of excessive leukocyte stimulation? *Int J Pancreatol* 1988; 3: 105-112
- 3 Lankisch PG, Ihse I. Bile-induced acute experimental pancreatitis. *Scand J Gastroenterol* 1987; 22: 257-260
- 4 苗明, 朱飞鹏. 常用医药动物模型. 北京: 人民卫生出版社, 2007: 143-144
- 5 胡光龙, 赵国海. 趋化因子与急性胰腺炎相关性肺损伤关系的研究进展. *医学综述* 2010; 16: 3574-3576
- 6 许威, 夏时海, 陈虹. 炎症介质与急性胰腺炎相关性肺损伤. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 1188-1192
- 7 Brady M, Bhatia M, Christmas S, Boyd MT, Neoptolemos JP, Slavin J. Expression of the chemokines MCP-1/JE and cytokine-induced neutrophil chemoattractant in early acute pancreatitis. *Pancreas* 2002; 25: 260-269
- 8 Shokuhi S, Bhatia M, Christmas S, Sutton R, Neoptolemos JP, Slavin J. Levels of the chemokines growth-related oncogene alpha and epithelial neutrophil-activating protein 78 are raised in patients with severe acute pancreatitis. *Br J Surg* 2002; 89: 566-572
- 9 Rau B, Baumgart K, Krüger CM, Schilling M, Beger HG. CC-chemokine activation in acute pancreatitis: enhanced release of monocyte chemoattractant protein-1 in patients with local and systemic complications. *Intensive Care Med* 2003; 29: 622-629
- 10 Bhatia M, Brady M, Zagorski J, Christmas SE, Campbell F, Neoptolemos JP, Slavin J. Treatment with neutralising antibody against cytokine induced neutrophil chemoattractant (CINC) protects rats against acute pancreatitis associated lung injury. *Gut* 2000; 47: 838-844
- 11 Bhatia M, Hegde A. Treatment with antileukinate, a CXCR2 chemokine receptor antagonist, protects mice against acute pancreatitis and associated lung injury. *Regul Pept* 2007; 138: 40-48
- 12 Osman MO, Kristensen JU, Jacobsen NO, Lausten

同行评价

本文有一定的创新性, 并能为今后临床工作中SAP肺功能损伤的治疗方案提供新的理论依据, 具有一定的应用价值.

- SB, Deleuran B, Deleuran M, Gesser B, Matsushima K, Larsen CG, Jensen SL. A monoclonal anti-interleukin 8 antibody (WS-4) inhibits cytokine response and acute lung injury in experimental severe acute necrotizing pancreatitis in rabbits. *Gut* 1998; 43: 232-239
- 13 Zhou GX, Zhu XJ, Ding XL, Zhang H, Chen JP, Qiang H, Zhang HF, Wei Q. Protective effects of MCP-1 inhibitor on a rat model of severe acute pancreatitis. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2010; 9: 201-207
 - 14 祝先进, 苏东辉. 一种新的趋化因子. *国际免疫学杂志* 2006; 29: 330-334
 - 15 Clark-Lewis I, Mattioli I, Gong JH, Loetscher P. Structure-function relationship between the human chemokine receptor CXCR3 and its ligands. *J Biol Chem* 2003; 278: 289-295
 - 16 Liu L, Callahan MK, Huang D, Ransohoff RM. Chemokine receptor CXCR3: an unexpected enigma. *Curr Top Dev Biol* 2005; 68: 149-181
 - 17 Petrai I, Rombouts K, Lasagni L, Annunziato F, Cosmi L, Romanelli RG, Sagrinati C, Mazzinghi B, Pinzani M, Romagnani S, Romagnani P, Marra F. Activation of p38(MAPK) mediates the angiostatic effect of the chemokine receptor CXCR3-B. *Int J Biochem Cell Biol* 2008; 40: 1764-1774
 - 18 陈欢, 张桂英. 趋化因子受体CXCR3的研究进展. *实用预防医学* 2010; 17: 1466-1468
 - 19 陈晓理, 黄兴兰, 吴浩, 吴晓娟. 常用免疫抑制剂对急性胰腺炎免疫异常的调节作用. *中国普外基础与临床杂志* 2002; 9: 384-387
 - 20 Müller M, Carter S, Hofer MJ, Campbell IL. Review: The chemokine receptor CXCR3 and its ligands CXCL9, CXCL10 and CXCL11 in neuroimmunity-a tale of conflict and conundrum. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2010; 36: 368-387

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》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, T_{1/2}不能写成tl/2或T_{1/2}, V_{max}不能写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*ln*-(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}, *V*_d, *T*_{1/2} *CI*等. 基因符号通常用小写斜体, 如*ras*, *c-myc*; 基因产物用大写正体, 如P16蛋白.

水通道蛋白3与紧密连接的相关性

张文杰, 徐勇, 王斌, 徐皓

张文杰, 徐勇, 王斌, 徐皓, 南京医科大学第一附属医院胃肠外科 江苏省南京市 210029

张文杰, 硕士, 主要从事胃肠道屏障及消化系统肿瘤的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30901421

江苏省卫生厅开放课题基金资助项目, No. XK03200903

作者贡献分布: 此课题由徐皓设计; 研究过程由张文杰与徐勇操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由王斌提供; 数据分析由张文杰与徐皓完成; 本文写作由张文杰与徐勇完成。

通讯作者: 徐皓, 主治医师, 210029, 江苏省南京市广州路300号, 南京医科大学第一附属医院胃肠外科. brightmoon_1@sina.com
电话: 025-85038505

收稿日期: 2011-12-04 修回日期: 2012-01-06

接受日期: 2012-06-30 在线出版日期: 2012-07-28

Lentiviral-mediated delivery of shRNA targeting aquaporin 3 alters tight junction protein expression and distribution in Caco-2 cells

Wen-Jie Zhang, Yong Xu, Bin Wang, Hao Xu

Wen-Jie Zhang, Yong Xu, Bin Wang, Hao Xu, Department of Gastrointestinal Surgery, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30901421; and the Foundation of Health Department of Jiangsu Province, No. XK03200903

Correspondence to: Hao Xu, Attending Physician, Department of Gastrointestinal Surgery, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, 300 Guangzhou Road, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China. brightmoon_1@sina.com

Received: 2011-12-04 Revised: 2012-01-06

Accepted: 2012-06-30 Published online: 2012-07-28

Abstract

AIM: To investigate the effect of lentiviral-mediated delivery of short hairpin RNA (shRNA) targeting aquaporin 3 (AQP3) on the barrier function of intestinal tight junctions and to explore the possible mechanisms involved.

METHODS: A lentiviral vector expressing shRNA targeting AQP3 was constructed and transfected into Caco-2 cells. The cells were divided into three groups: blank group, negative control group, and AQP3 shRNA group. Western blot and immunocytochemistry were used to detect the expression of occludin and claudin-1 proteins in transfected cells.

RESULTS: RT-PCR and Western blot results showed that AQP3 expression was down-regulated in Caco-2 cells transfected with the lentiviral vector expressing shRNA targeting AQP3. Western blot analysis revealed that the expression levels of occludin and claudin-1 proteins were significantly decreased in Caco-2 cells transfected with the lentiviral vector expressing shRNA targeting AQP3. Immunocytochemistry showed that occludin and claudin-1 were mainly distributed in the cytoplasm and membrane. The structure of tight junctions was destroyed in cells transfected with the lentiviral vector expressing shRNA targeting AQP3.

CONCLUSION: Lentiviral-mediated delivery of shRNA targeting AQP3 causes abnormal distribution of tight junction proteins and destruction of tight junctions in Caco-2 cells.

Key Words: Aquaporin 3; Caco-2; Tight junction

Zhang WJ, Xu Y, Wang B, Xu H. Lentiviral-mediated delivery of shRNA targeting aquaporin 3 alters tight junction protein expression and distribution in Caco-2 cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(21): 1973-1977

摘要

目的: 探讨水通道蛋白3(aquaporin 3, AQP3)对肠黏膜上皮细胞间紧密连接(tight junction, TJ)的影响, 并探讨其可能的作用机制。

方法: 应用Caco-2细胞系在体外构建肠黏膜上皮屏障, 构建沉默AQP3的shRNA慢病毒载体, 建立稳定转染细胞系。实验分为3组: 空白对照组(BLANK)、阴性对照组(NC)、AQP3干扰组(AQP3 shRNA)。Western blot验证TJ相关蛋白Occludin以及Claudin-1的表达情况; 并且采用免疫细胞化学法观察TJ相关蛋白的分布和结构变化。

结果: RT-PCR及Western blot结果显示在Caco-2细胞系中成功沉默AQP3的表达。干扰组与对照组相比下降约75%。Western blot结果显示AQP3干扰组TJ相关蛋白Occludin以及Claudin-1的表达明显降低。免疫细胞化学结

■背景资料

肠道作为应激反应的中心器官之一, 在创伤、手术、严重感染等应激状态时, 也起着重要作用。当机体应激反应过度或失调时, 肠黏膜功能将受到损害, 原先寄生于肠道内的微生物及其毒素越过受损的肠黏膜屏障, 导致肠道细菌及其毒素移位。

■同行评议者

唐世刚, 教授, 湖南省人民医院

■研发前沿

肠黏膜屏障的具体机制非常复杂,至今尚不十分清楚,可能与肠黏膜机械屏障、局部生物学因素、化学因素及免疫功能有关。缺氧、炎症、外伤等损伤均可导致肠黏膜屏障功能障碍。

果显示Caco-2细胞间Occludin以及Claudin-1主要表达在细胞膜和/或胞浆中, Occludin和Claudin-1细胞间棕褐色颗粒减少,结构变模糊。相邻Caco-2细胞间TJ结构遭到破坏。

结论: 靶向AQP3的shRNA技术可以引起TJ的结构变化和相关蛋白的表达分布的异常。

关键词: 水通道蛋白3; Caco-2; 紧密连接

张文杰, 徐勇, 王斌, 徐皓. 水通道蛋白3与紧密连接的相关性. 世界华人消化杂志 2012; 20(21): 1973-1977

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1973.asp>

0 引言

近年来,随着研究的深入和细胞分子生物学技术的发展和运用,肠道在烧伤、严重感染、休克等应激状态下的重要作用越来越受到重视。肠黏膜屏障的具体机制非常复杂,至今尚不十分清楚,可能与肠黏膜机械屏障、局部生物学因素、化学因素及免疫功能有关^[1]。缺氧、炎症、外伤等损伤均可导致肠黏膜屏障功能障碍。紧密连接(tight junction, TJ)通常位于上皮顶端两相邻细胞间,在TJ处的细胞质膜几乎融合并紧紧结合在一起。他们形成连续纤维将相邻细胞间连接起来并封闭了细胞间空隙,控制着离子及小分子可溶性物质通过,在毒性分子和微生物的侵入过程中起着重要的防御作用^[2-4]。水通道蛋白(aquaporins, AQP)是一组分子量约30 kDa(单体)疏水性膜转运蛋白家族, AQP3在消化系中主要参与水及甘油的运输^[5]。然而, AQP3与TJ的关系及可能的分子机制仍不十分清楚。为深入研究这一问题,为此我们设计了本实验,体外构建肠上皮屏障,观察干扰AQP3的表达后其对TJ主要构成蛋白Occludin和Claudin-1的影响并探讨其可能机制。

1 材料和方法

1.1 材料 人结肠癌细胞系Caco-2(上海细胞生物研究所); 体式显微镜(Nikon公司); DMEM细胞培养液(美国GIBCO公司); 胎牛血清(GIBCO公司); 非必需氨基酸(GIBCO); 胰蛋白酶(Invitrogen公司); 嘌呤霉素(Sigma-Aldrich); AMV反转录试剂盒(Promega); Transwell小室(Corning公司); TRIzol(美国Invitrogen公司); 兔抗人AQP3、Occludin多克隆抗体, 鼠抗人Claudin-1、GAPDH单克隆抗体及酶标抗鼠、抗兔IgG(辣根过氧化物酶标记的抗小鼠、抗兔IgG抗体)均为美国

Santa Cruz公司产品。慢病毒干扰载体由上海生博公司设计构建合成。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: Caco-2细胞维持于含100 mL/L胎牛血清、50 mg/L青霉素和100 mg/L链霉素的DMEM全培养液中,于37℃、50 mL/L CO₂培养箱中培养。

1.2.2 稳定转染: 分别用干扰AQP3表达的慢病毒和对照病毒以感染复数(multiplicity of infection, MOI) = 50感染Caco-2结肠腺癌细胞,37℃孵育24 h后更换完全培养基,继续培养3-5 d后病毒基因可整合到宿主细胞基因组,倒置显微镜下观察可见细胞出现绿色荧光,证明感染成功。嘌呤霉素5 mg/L筛选1 wk得到稳定干扰AQP3表达的Caco-2细胞系。

1.2.3 RT-PCR检测AQP3 mRNA的表达: TRIzol法提取细胞总RNA,用AMV(Promega)反转录试剂盒进行cDNA合成和PCR扩增。检测AQP3的上游引物序列为5'-CACAGCCGGCATCTTT-GCTA-3',下游引物序列为5'-TGGCCAGCACA-CACACGATA-3',扩增片段长度为107 bp;内参β-actin基因的上游引物序列为5'-TCACCCA-CACTGTGCCCATCTACGA-3',下游引物序列为5'-CAGCGGAACCGCTCATTGCCAATGG-3',扩增片段长度为295 bp。退火温度均为60.0℃。扩增得到的产物经1%的琼脂糖凝胶电泳。

1.2.4 Western blot检测: 用预冷的RIPA裂解缓冲液裂解细胞,用细胞刮匙(scraper)将细胞从培养皿或培养板中刮落,收集于Eppendorf管中,13 000 r/min 4℃离心15 min,收集上清液用于Western blot实验。加入上样缓冲液,100℃处理5 min; BCA法测定蛋白浓度。取20 μg蛋白上样进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)电泳2-2.5 h;电泳完毕后用湿转法将分离的蛋白条带转移到PVDF膜(Millipore);含5%脱脂奶粉的TBS封闭1 h,加入含有anti-AQP3(1:1 000)、anti-Occludin(1:1 000)、anti-Claudin-1(1:1 000)的一抗液中室温摇动1-2 h; TBST(0.05% Tween-20)洗3次,用含IgG-HRP(1:5 000)的封闭液摇动1 h, TBST洗3次,将膜晾干,加显色液于膜上,用封口膜将膜包住放入暗盒内,加入X光胶片,进行曝光、显影和定影。用Bio-Rad公司的Quantity One软件对结果进行灰度分析。

1.2.5 免疫细胞化学染色: 将细胞以一定数量接种于内含灭菌盖玻片的6孔培养板内,待细胞长至单层后取出盖玻片,丙酮室温下固定10 min,

■相关报道

Kawedia等用Hg²⁺阻断水通道蛋白(AQP)后发现,紧密连接(TJ)相关蛋白Occludin表达水平下降50%,其具体机制可能是通过磷酸激酶途径调控TJ相关蛋白的表达,初步阐明了AQP可能调控TJ相关蛋白的表达。

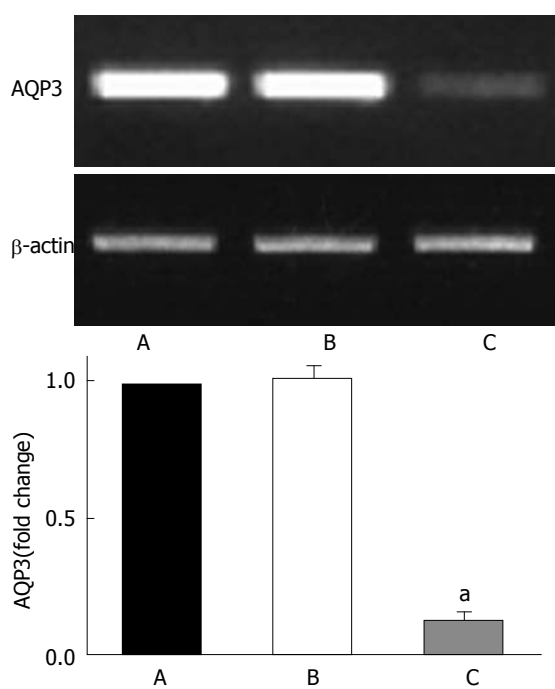


图1 mRNA水平检测AQP3基因的干扰效果。A: 空白对照组(BLANK); B: 阴性对照组(NC); C: AQP3干扰组(AQP3 shRNA)。* $P<0.05$ 。

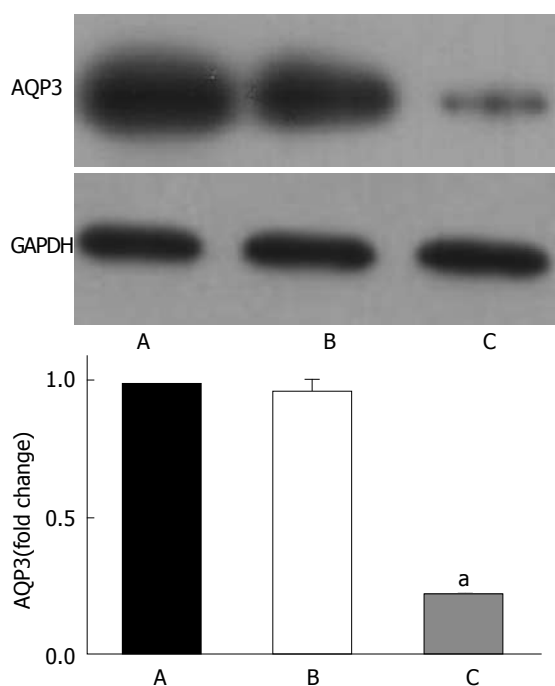


图2 蛋白水平检测AQP3基因的干扰效果。A: 空白对照组(BLANK); B: 阴性对照组(NC); C: AQP3干扰组(AQP3 shRNA)。* $P<0.05$ 。

PBS漂洗3次。采用两步法免疫组织化学染色, 单抗1:100-400稀释, 4℃过夜; 二抗1:200, 37℃孵育1h, PBS漂洗, DAB染色后苏木精复染。

统计学处理 用SPSS10.0统计学软件进行统计学分析。结果以mean±SD表示, 采用单因素

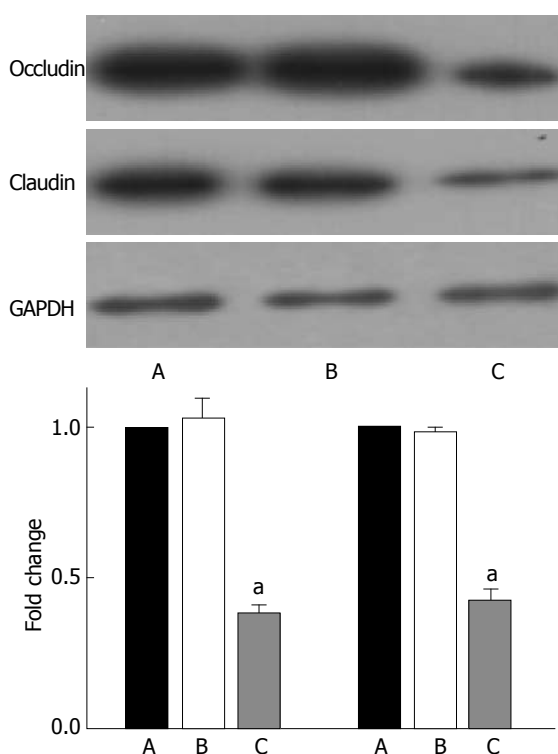


图3 紧密连接相关蛋白Occludin和Claudin-1的表达。A: 空白对照组(BLANK); B: 阴性对照组(NC); C: AQP3干扰组(AQP3 shRNA)。* $P<0.05$ 。

方差分析(ANOVA)比较不同处理组之间的差异。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 AQP3 shRNA对Caco-2细胞AQP3 mRNA的影响 半定量RT-PCR结果经过灰度分析后显示, 干扰组AQP3 mRNA的表达与对照组相比下降约85%左右, 结果有统计学意义($P<0.05$), 而空白对照组与阴性对照组间差异无统计学意义($P>0.05$)。提示此干扰序列能够成功沉默AQP3 mRNA的表达(图1)。

2.2 AQP3 shRNA对Caco-2细胞AQP3蛋白的影响 稳定转染细胞系建立后行Western blot检测, 灰度值分析结果与RT-PCR结果一致, 干扰组AQP3蛋白的表达与对照组相比, 下降约75%左右($P<0.05$), 有统计学意义(图2)。

2.3 紧密连接相关蛋白表达的变化 Western blot分析显示, RNA干扰组中TJ相关蛋白Occludin和Claudin-1的表达水平降低, 下降约60%左右, 说明干扰AQP3的表达能够下调Occludin和Claudin-1的表达(图3)。

2.4 紧密连接蛋白的免疫组织化学染色 Caco-2细胞在AQP3干扰后, Occludin和Claudin-1细胞间棕褐色颗粒减少, 结构变模糊, 表明相应蛋白

■创新盘点

本研究首次阐述AQPs与小肠黏膜屏障的关系, 为严重疾病状态下肠黏膜屏障功能异常的机制研究提供了有意义的实验依据。

■名词解释

水通道蛋白(AQP): 一组分子量约30 kDa(单体)的疏水性膜转运蛋白家族, 属于主要固有蛋白(MIP)家族. AQPs在细胞膜上以四聚体形式构成选择性水通道, 介导水渗透压依赖性跨生物膜转运.

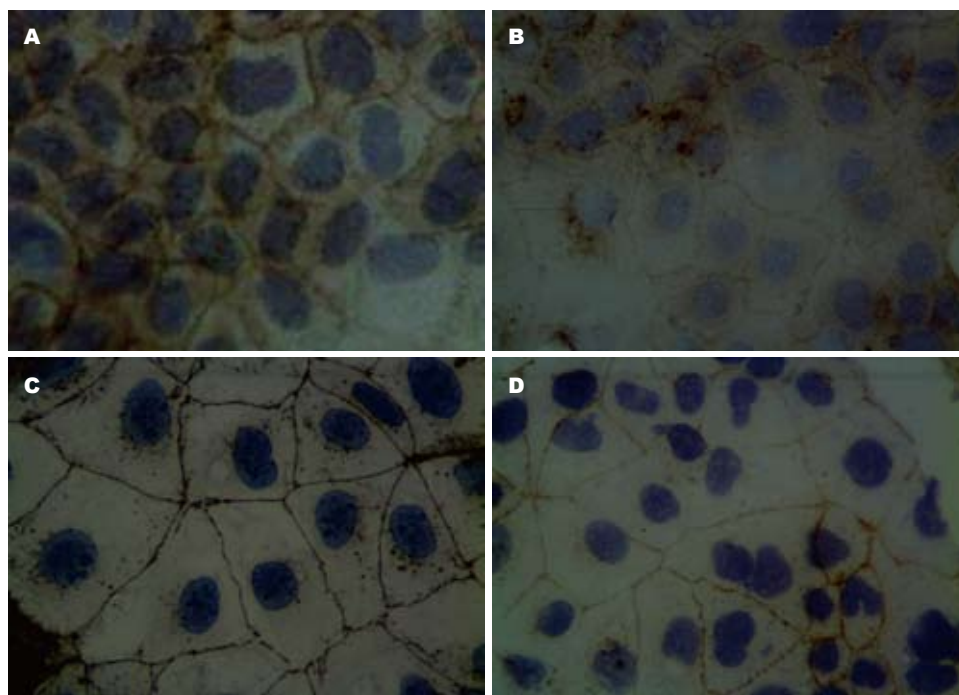


图4 紧密连接蛋白Occludin和Claudin-1的免疫组织化学染色(200×). A: Occludin 未处理组; B: Occludin RNA干扰组; C: Claudin-1未处理组; D: Claudin-1 RNA干扰组.

表达减少(图4).

3 讨论

AQPs广泛分布于动物与植物界, 自上个世纪80年代末Agre^[6]在人红细胞克隆第1种水通道蛋白(AQP1), 迄今已在哺乳动物中发现13种AQPs, AQP0-AQP12. 由于在细胞膜水通道领域的杰出贡献, Agre获得2003年度诺贝尔化学奖. 在AQPs中AQP3、AQP7、AQP9、AQP10与AQP12组成1个亚族, 他们不仅能转运水, 亦能转运甘油、尿素等小分子物质, 故又称水甘油通道蛋白(aquaglyceroporin)^[7]. 研究显示AQPs在尿液浓缩、腺体分泌、脂肪代谢、神经信号传导、皮肤保湿等生理功能中发挥重要作用^[8,9].

TJ和肠上皮细胞共同构成肠道的选择性屏障, 是肠道机械屏障的重要组成部分. TJ至少由3类跨膜蛋白组成: Occludin、Claudin家族与连接粘附分子. 这些分子均参与调节TJ的功能^[10]. Kawedia等^[11]用Hg²⁺阻断AQPs后发现, TJ相关蛋白occludin表达水平下降50%, 其具体机制可能是通过磷酸激酶途径调控TJ相关蛋白的表达. Sidhaye等^[12]发现AQP5调控气管上皮细胞间的通透性, 直接影响气管上皮的屏障功能. Kawedia等^[13]又在AQP5^{-/-}小鼠模型上发现, 唾液腺TJ相关蛋白Claudin-7、Claudin-3和Occludin表达均降低, 黏膜对FITC标记的葡聚糖通透性明显升高. AQP4基因敲除的小鼠大脑血管的显微结构、TJ和血管周围星型细胞突触明显改变^[14].

Caco-2细胞来源于人结肠癌细胞, 与人小肠上皮细胞有相同的细胞极性和TJ, 是国际上公认的研究TJ和药物小肠吸收的体外模型^[15]. 为了研究AQPs在肠道中与TJ的关系, 我们通过Western blot法检测Occludin以及Claudin-1的蛋白表达水平. 发现靶向干扰AQP3的表达后, Occludin和Claudin-1的表达水平与对照组相比明显降低, 免疫组织化学同样证实了我们的结果, 说明跨细胞途径(AQPs)和旁细胞途径(TJ)在Caco-2细胞中是紧密联系在一起的.

研究显示蛋白激酶C(protein kinase C, PKC)通路在TJ中发挥着重要的作用, Suzuki等^[16]发现PKC可使occludin中C端结构域苏氨酸磷酸化, 调节TJ功能; 还有研究发现PKC可磷酸化人claudin-4的第194个丝氨酸, 进而影响TJ功能^[17]. 因此AQPs也可能是通过PKC通路影响TJ功能, 但其具体机制仍需进一步研究.

总之, 降低AQP3的表达能引起TJ结构蛋白occludin, claudin-1表达的减弱, 从而引起肠黏膜通透性升高, 肠黏膜屏障功能的损害.

4 参考文献

- 1 牛海静, 王邦茂. 肠黏膜屏障与功能. 解剖与临床 2007; 12: 138-140
- 2 Shin K, Fogg VC, Margolis B. Tight junctions and cell polarity. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2006; 22: 207-235
- 3 González-Mariscal L, Betanzos A, Nava P, Jaramillo BE. Tight junction proteins. *Prog Biophys Mol Biol* 2003; 81: 1-44
- 4 刘冬妍, 崔巍. NO体外对肠上皮细胞表达紧密连接蛋白Occludin的影响. 世界华人消化杂志 2007; 15:

- 2295-2299
- 5 郭晓强. 水甘油通道3介导的甘油运输与皮肤功能. 第二军医大学学报 2009; 30: 1416-1419
- 6 Agre P. The aquaporin water channels. *Proc Am Thorac Soc* 2006; 3: 5-13
- 7 Virreira M, Perret J, Delporte C. Pancreatic beta-cells: Role of glycerol and aquaglyceroporin 7. *Int J Biochem Cell Biol* 2011; 43: 10-13
- 8 Larsen HS, Aure MH, Peters SB, Larsen M, Messelt EB, Kanli Galtung H. Localization of AQP5 during development of the mouse submandibular salivary gland. *J Mol Histol* 2011; 42: 71-81
- 9 Rao KV, Jayakumar AR, Reddy PV, Tong X, Curtis KM, Norenberg MD. Aquaporin-4 in manganese-treated cultured astrocytes. *Glia* 2010; 58: 1490-1499
- 10 Turner JR. Molecular basis of epithelial barrier regulation: from basic mechanisms to clinical application. *Am J Pathol* 2006; 169: 1901-1909
- 11 Kawedia JD, Jiang M, Kulkarni A, Waechter HE, Matlin KS, Pauletti GM, Menon AG. The protein kinase A pathway contributes to Hg²⁺-induced alterations in phosphorylation and subcellular distribution of occludin associated with increased tight junction permeability of salivary epithelial cell monolayers. *J Pharmacol Exp Ther* 2008; 326: 829-837
- 12 Sidhaye VK, Schweitzer KS, Caterina MJ, Shimoda L, King LS. Shear stress regulates aquaporin-5 and airway epithelial barrier function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 3345-3350
- 13 Kawedia JD, Nieman ML, Boivin GP, Melvin JE, Kikuchi K, Hand AR, Lorenz JN, Menon AG. Interaction between transcellular and paracellular water transport pathways through Aquaporin 5 and the tight junction complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 3621-3626
- 14 Zhou J, Kong H, Hua X, Xiao M, Ding J, Hu G. Altered blood-brain barrier integrity in adult aquaporin-4 knockout mice. *Neuroreport* 2008; 19: 1-5
- 15 Artursson P, Palm K, Luthman K. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. *Adv Drug Deliv Rev* 2001; 46: 27-43
- 16 Suzuki T, Elias BC, Seth A, Shen L, Turner JR, Giorgianni F, Desiderio D, Guntaka R, Rao R. PKC ϵ regulates occludin phosphorylation and epithelial tight junction integrity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 61-66
- 17 Aono S, Hirai Y. Phosphorylation of claudin-4 is required for tight junction formation in a human keratinocyte cell line. *Exp Cell Res* 2008; 314: 3326-3339

■同行评价

本研究设计合理, 方法可靠, 实验结果可信, 且文笔流畅, 内容翔实, 有一定的创新和很好的实用价值。

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 •

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)

云南省首次爆发流行巨片形吸虫感染10例

邹静, 顾伟, 焦建明, 杜茜茹, 何连福, 张平

■背景资料

巨片形吸虫是寄生于哺乳动物胆管的大型吸虫, 是一种人畜共患寄生虫, 多寄生于羊、牛、马草食动物体内, 人体感染者较少见, 且危害严重, 又易误诊。

邹静, 顾伟, 焦建明, 杜茜茹, 何连福, 张平, 大理学院附属医院内二科 云南省大理市 671000

邹静, 学士, 主要从事呼吸与感染性疾病研究。

作者贡献分布: 邹静与顾伟在此临床工作中, 从诊断到治疗均作出了同样贡献; 焦建明教授从临床诊断到治疗给予了总体指导; 杜茜茹、何连福及张平在论文撰写中给予极大帮助。

通讯作者: 顾伟, 副教授, 医学硕士, 671000, 云南省大理市嘉仕伯大道32号, 大理学院附属医院内二科. 446248522@qq.com
电话: 0872-2201149

收稿日期: 2012-02-17 修回日期: 2012-05-08

接受日期: 2012-07-20 在线出版日期: 2012-07-28

First outbreak of *Fasciola gigantica* infection in Yunnan province: An clinical analysis of 10 cases

Jing Zou, Wei Gu, Jian-Ming Jiao, Qian-Ru Du, Lian-Fu He, Ping Zhang

Jing Zou, Wei Gu, Jian-Ming Jiao, Qian-Ru Du, Lian-Fu He, Ping Zhang, Department of Internal Medicine (Division II), Affiliated Hospital of Dali University, Dali 671000, Yunnan Province, China

Correspondence to: Wei Gu, Associate Professor, Department of Internal Medicine (Division II), Affiliated Hospital of Dali University, 32 Carlsberg Road, Dali 671000, Yunnan Province, China. 446248522@qq.com

Received: 2012-02-17 Revised: 2012-05-08

Accepted: 2012-07-20 Published online: 2012-07-28

Abstract

AIM: To investigate the incidence, clinical manifestations, epidemiology, imaging and biochemical characteristics, diagnosis, and treatment of fascioliasis by analyzing an outbreak of *Fasciola gigantica* infection in Binchuan County, Dali Prefecture, Yunnan Province.

METHODS: The clinical data for 10 patients with *Fasciola gigantica* infection who were treated at our hospital from December 2011 to February 2012 were analyzed.

RESULTS: *Fasciola gigantica* infection in humans is rare both in China and abroad. Main clinical manifestations include high fever, increased eosinophils, varying degrees of gastrointestinal symptoms, and liver injury. Our 10 cases had similar clinical manifestations, epidemiological characteristics, imaging and biochemical charac-

teristics, and disease course.

CONCLUSION: *Fasciola gigantica* infection is rare and is easily misdiagnosed. Attention should be paid to patients with suspected symptoms.

Key Words: *Fasciola gigantica*; Infection; Liver injury

Zou J, Gu W, Jiao JM, Du QR, He LF, Zhang P. First outbreak of *Fasciola gigantica* infection in Yunnan province: An clinical analysis of 10 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(21): 1978-1981

摘要

目的: 探讨云南省爆发的巨片形吸虫感染的发病情况、临床表现及该病的流行病学、影像学、生化特点。

方法: 对我院2011-12/2012-02收治的10例感染巨片形吸虫患者临床资料进行分析和总结。

结果: 巨片形吸虫感染人体在国内外少见, 主要以高热起病, 均有嗜酸性粒细胞增高, 伴有不同程度的消化系症状, 肝脏损伤等表现。感染的10例病例具有相似的临床表现、流行病学特征、影像学、生化特点, 病程也相近。

结论: 巨片形吸虫感染人体少见, 这给临床诊治带来较大的困难, 临床工作中极易误诊, 所以在临床工作中遇到类似病例需要引起重视。

关键词: 巨片形吸虫; 感染; 肝脏损伤

邹静, 顾伟, 焦建明, 杜茜茹, 何连福, 张平. 云南省首次爆发流行巨片形吸虫感染10例. 世界华人消化杂志 2012; 20(21): 1978-1981

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1978.asp>

0 引言

大理州是寄生虫高发区域, 从1997-2006年共收治6 856例寄生虫病患者, 病种包括血吸虫病、囊虫病、猪带绦虫病、旋毛虫病、恙虫病、包

■同行评议者

刘森, 副教授, 安徽医科大学病原生物学

虫病、粪类圆线虫病和肠道蝇蛆病^[1],但还未报道巨片形吸虫感染的患者。巨片形吸虫是寄生于哺乳动物胆管的大型吸虫,是一种人畜共患寄生虫^[2,3],多寄生于羊、牛、马草食动物体内,人体感染者较少见,且危害严重,又易误诊,现将我院收治10例患者诊治做一分析。

1 材料和方法

1.1 材料 收集自2011-12/2012-02就诊于我院的10例感染患者的临床资料,根据以下标准作出判断:(1)具有相同的流行病学特征,都在同一区域患病,有生食水生植物史,病程相近;(2)具有相似的临床表现和体征,大数以高热起病,伴不同程度的消化系症状,恶心、呕吐、腹痛、纳差,体征有肝肿大、肝区叩痛,后期有贫血貌;(3)辅助资料所有患者嗜酸性粒细胞均升高,肝脏CT均有不同程度肝脏损伤。2例腹腔镜下肝组织活检证实为寄生虫感染,国家卫生部检测片形吸虫抗体阳性;(4)2012-02-14在其中一患者粪便中找到片形吸虫虫卵;(5)使用三氯达苯唑治疗后症状体征好转。

1.2 方法 采集患者以下临床资料:(1)临床特征:患者性别、年龄、临床症状、体征;(2)生化指标:包括总蛋白(total protein, TP)、白蛋白(albumin, ALB)、球蛋白(globulin, GLB)、谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)、谷草转氨酶(oxaloacetic transaminase, AST)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)、凝血酶原时间(prothrombin time, PT)、活化部分凝血酶原时间(activated partial thromboplastin time, APTT)、免疫球蛋白G(immunoglobulin G, IgG);(3)血液指标:白细胞(white blood cell, WBC)、嗜酸性粒细胞百分比(eosinophil ratio, EO%)、嗜酸性粒细胞绝对值(eosinophil, EO#)、红细胞(red blood cell count, RBC)、血红蛋白(haemoglobin, HGB);(4)影像学检查主要为上腹部(computer tomography, CT);(5)腹腔镜下肝组织活检病理。

2 结果

2.1 临床特征 巨片形吸虫感染患者共10例,男2例,女7例,儿童1例,年龄9-45岁,均有吃水生植物接触史,所有病例均以高热起病(体温38℃-40℃),多伴有右上腹胀痛、纳差、乏力、恶心、呕吐、腹胀与消化系症状;3例伴有咳嗽、咳痰症状,体征共同有上腹剑下压痛,肝脏肿大,肝区叩痛,后期查体有贫血貌,1例移动性浊音阳性。



图1 肝脏CT示肝脏实质内散在不规则低密度影,肝脏密度降低。



图2 肝脏CT示增强后低密度区未见明显的早期强化样改变影,呈不均匀强化。

2.2 血液生化指标 WBC 4.80-22.94×10⁹/L; EO% 0.66-49.40; EO# 13.81-50.61; ALP 177-16 U/L; ALT 20-220 U/L; AST 28-140 U/L; TP 49.6-85.2 g/L; ALB 75.1-38.9 g/L; GLB 21.8-60.8; A/G 0.5-1.3; IgG 10.66-46.33 g/L; PT 13.7-18.1 S; APTT 33.0-40.1 S; ESR 75-139 mm/h. 肝片形吸虫抗体检测阳性。

2.3 影像学资料 彩超示:10例均有肝回声不均匀质,3例胆囊壁水肿,3例肝脏肿大。肝脏CT示:肝脏实质内散在不规则低密度影,肝脏密度降低(图1),增强后低密度区未见明显早期强化样改变影,呈不均匀强化(图2),9例少量腹水,1例大量腹水。腹部CT:7例均有双肺感染征象,1例自发性气胸。

2.4 病理检查与资料 2例行腹腔镜:腹腔镜下肝脏满布灰白色结节,大小0.3-1.0 cm,少量腹水。2例肝活检病理报告:[右肝]在送检肝组织充血水肿、汇管区及肝窦内散在嗜酸性粒细胞及淋巴细胞浸润背景上,可见多数散在不规则囊腔,囊内有嗜酸性粒细胞碎片残影,未见确切虫体成分,囊壁为炎性肉芽组织带伴嗜酸性粒细胞、淋巴及浆细胞浸润,并见肉芽肿形成。综上,病变符合寄生虫感染,倾肝肺吸虫病(图3)。

■相关报道

我国自1921年报道首例来自福建省的片形吸虫感染患者以来,有记载的确诊病例报道只有50余例,且多为肝片形吸虫感染。

■同行评价

因巨片形吸虫感染病例较少,故该论著有一定的学术价值。

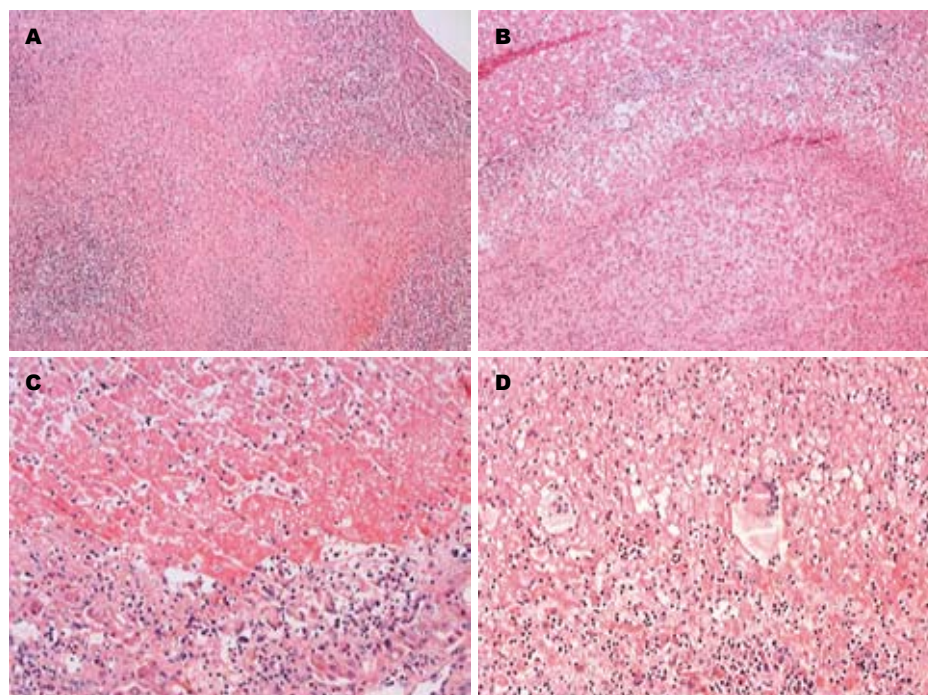


图3 肝活检后的病理切片HE染色。A: 肝细胞呈不规则腔隙、隧道样坏死,坏死组织溶解液化;B: 肝细胞坏死呈不规则腔隙状,周围炎症细胞反应带形成;C: 肝细胞坏死呈不规则腔隙状,坏死组织溶解液化(上方),周围炎症细胞反应带形成(下方);D: 坏死组织中查见可疑寄生虫残体。

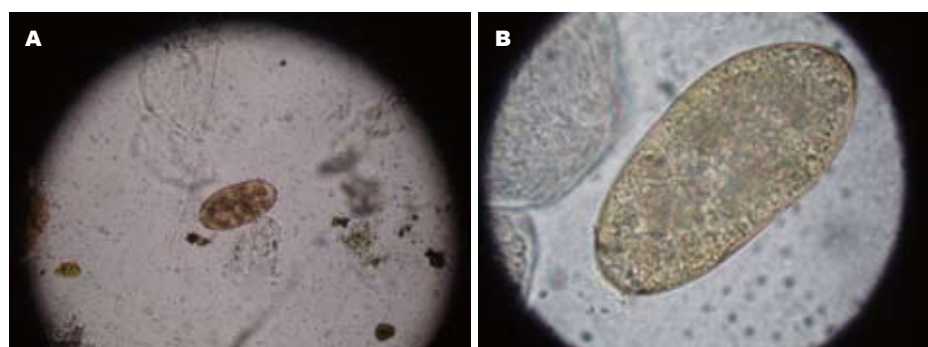


图4 从患者粪便中找到大片吸虫虫卵。A: 低倍镜下($\times 10$); B: 高倍镜下($\times 100$)。

2.5 粪便常规 2012-02-14在其中4名患者粪便中找到片形吸虫虫卵(图4)。中国疾控中心对该病例粪便中的虫卵进行分子生物学(PCR)特异性鉴定,结果也证实为片形吸虫。免疫学辅助诊断进一步显示,26个患者血清中,大片形吸虫抗体阳性率为100%,肝片形吸虫抗体阳性率为84.6%。

2.6 流行病学特点 专家在牛羊粪便中查见片形吸虫虫卵;在水沟环境中查见椎实螺,并在其体内查见片形吸虫幼虫,证实当地为片形吸虫病自然疫源地。调查发现,部分农户在沟壑中种植鱼腥草,并在鱼腥草水田中施用牛羊粪便;水田中孳生有大量椎实螺;当地居民普遍存在食用凉拌鱼腥草习惯,佐料是香菜、大葱,且香菜、大葱在收获销售前也常被泡在有椎实螺孳生的水洼中。因此,当地存在完整的片形吸虫病的传播环节。

3 讨论

人体片形吸虫感染如不及时治疗,可引起肝脏损

伤,严重者可致肝肾衰竭甚至死亡。另外,持续和严重的感染会引起肝纤维化和肝硬化,可能引起肝胆管型肝癌El-Shazly^[4]。我国自1921年报道首例来自福建省的片形吸虫感染患者以来,有记载的确诊病例报道只有50余例^[5],且多为肝片形吸虫感染。此次宾川县确诊26例巨片形吸虫感染,人数之众,在国内外都属罕见。巨片形吸虫病是一种人畜共患病,成虫通常寄生于牛、羊及其他哺乳动物胆道内,人体感染极为少见。多由于食用被肝片形吸虫囊蚴污染的水生植物或饮用被肝片形吸虫囊蚴污染的水等而被感染^[6]。急性期临床表现:急性期一般表现为高热与腹痛,多数患者会有胃肠道症状,如呕吐、腹胀、腹泻、便秘等,可有肝、脾肿大,血液嗜酸性粒细胞增多,当虫体进入胆囊后病变逐渐转为慢性,此时主要表现为血浆蛋白的改变,出现低蛋白血症和高IgG血症,晚期白、红蛋白减少,出现贫血。该病主要诊断靠粪便或十二指肠引流液沉淀检查虫卵并结合临床表现作出诊断,或在外科

手术探查在胆管或胆汁中发现成虫或虫卵也可确诊^[7], 很少能因看到寄生虫本身而确诊^[8]. 因巨片形吸虫感染时肝病变严重而虫少^[9], 巨片形吸虫病本身较少见, 以及部分病检人员并未认真查找, 使大便常规虫卵检出率很低^[10,11]. 另外自宿主感染囊蚴到粪便中找到虫卵的最短时间约10-11 wk^[12], 在现实条件下, 估计片形吸虫生活史约需5 mo, 这给早期诊断及治疗带来一定困难. 而且即便找到虫卵, 肝片形吸虫与巨片形吸虫虫卵极为相似, 难以鉴别. 需要通过形态学、生活史、染色体和同工酶等技术, 对两种片形吸虫作出鉴别^[13,14].

本文中所有病例住院时病程不足5 mo, 所以粪便中未曾有患者检出虫卵, 在云南也是首次出现爆发流行, 这些都是给诊断及治疗带来不便的原因. 早期诊断主要根据生吃水生植物史, 同一地区患病等共同流行病学特征, 共同以发热、嗜酸性粒细胞增多, 肝肿大, 肝损伤为临床表现, 片形吸虫抗体阳性, 三氯达苯唑治疗有效为依据以作出诊断, 后期在一患者大便中找到巨片形吸虫虫卵, 对虫卵进行分子生物学(PCR)特异性鉴定及免疫学辅助诊断后确诊. 临床工作中极易误诊为肝脏占位及其他寄生虫感染, 使用吡喹酮治疗普遍没有效果^[15], 易耽误治疗机会, 造成患者死亡. 所以在临床工作中遇到类似病例需要引起重视.

4 参考文献

1 王月一. 云南省大理州寄生虫病防治研究所1997-2006

- 2 年住院寄生虫病病例统计分析. 中国病原生物学杂志 2007; 2: 397, 399
- 3 陈绩彰, 徐凤翔, 吴让庄, 郭仁能, 邢昭忠, 黄定良, 李善文, 林绍雄, 黄捷敏, 刘姚若, 陈冬燕. 海南省肝片形吸虫和巨片形吸虫感染报告. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志 1994; 12: 243
- 4 向才碧, 张青松, 张登斌, 杜礼义. 我国人群感染片形吸虫的调查分析. 职业与健康 2003; 19: 90
- 5 el-Shazly AM, Soliman M, Gabr A, Haseeb AN, Morsy AT, Arafa MA, Morsy TA. Clinico-epidemiological study of human fascioliasis in an endemic focus in Dakahlia Governorate, Egypt. *J Egypt Soc Parasitol* 2001; 31: 725-736
- 6 赵慰先. 人体寄生虫学. 第2版. 北京: 人民卫生出版社, 1994: 427
- 7 杜晓冬, 廖琳, 马莹, 陈静先, 陈达丽. 肝片形吸虫病误诊1例. 预防医学情报杂志 2011; 27: 73-74
- 8 陈佩惠. 人体寄生虫学. 第4版. 北京: 人民卫生出版社, 1997; 95-96
- 9 Harinasuta T, Pungpak S, Keystone JS. Trematode infections. Opisthorchiasis, clonorchiasis, fascioliasis, and paragonimiasis. *Infect Dis Clin North Am* 1993; 7: 699-716
- 10 黄维义, 张为宇, 吴文德, 王冬英, 黄中邹. 两种片形吸虫感染山羊的对比试验. 中国兽医杂志 2006; 42: 12-14
- 11 王敏, 王光西. 11例肝吸虫病的误诊、漏诊分析. 中国人兽共患病杂志 2001; 17: 90, 85
- 12 汪邵平, 霍枫, 刘波, 彭伟. 肝吸虫性胆管炎的临床特点. 世界华人消化杂志 2004; 12: 1478-1489
- 13 李雍龙. 人体寄生虫学. 第7版. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 99-102
- 14 尹怀志. 两种片形吸虫鉴别与比较. 海峡预防医学杂志 1995; 1: 24-25
- 15 尹怀志, 叶冰莹, 汪涛钦. 肝片吸虫和巨片吸虫染色体和同工酶的研究. 福建师范大学学报(自然科学版) 1990; 6: 85-90
- 16 Pearson RD. Parasitic diseases: Helminths. In: Yamada T, Alpers DH, Kaplowitz N, Laine L, Owyang C, Powell DW, editors. Textbook of gastroenterology. 4th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams Wilkins, 2003: 2608-2612

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)

脂联素基因多态性和血清脂联素水平与非酒精性脂肪肝的相关性

石胜利, 聂玉强, 李瑜元, 周永健

■背景资料

脂联素作为一种新发现的由脂肪细胞分泌的激素, 具有降低血脂、降低血糖、改善胰岛素敏感性以及拮抗动脉粥样硬化的作用, 目前还不清楚脂联素基因是否与非酒精性脂肪肝 (NAFLD) 相关。

石胜利, 南方医科大学附属小榄医院消化内科 广东省中山市 528415

聂玉强, 李瑜元, 周永健, 广州医学院附属广州市第一人民医院消化内科 广东省广州市 510180

石胜利, 副主任医师, 主要从事肝病诊治的研究。

作者贡献分布: 此课题由聂玉强与李瑜元设计; 研究过程由石胜利与周永健操作完成; 数据分析由石胜利与周永健完成; 本论文写作由石胜利完成。

通讯作者: 聂玉强, 主任医师, 510180, 广东省广州市盘福路1号, 广州医学院附属广州市第一人民医院消化内科。

nieyq@medmail.com.cn

电话: 020-81045106

收稿日期: 2012-03-27 修回日期: 2012-07-10

接受日期: 2012-07-20 在线出版日期: 2012-07-28

Association of single nucleotide polymorphisms of the adiponectin gene and plasma levels of adiponectin with risk of nonalcoholic fatty liver disease

Sheng-Li Shi, Yu-Qiang Nie, Yu-Yuan Li, Yong-Jian Zhou

Sheng-Li Shi, Department of Gastroenterology, Xiaolan Hospital Nanfang Medical University, Zhongshan 528415, Guangdong Province, China

Yu-Qiang Nie, Yu-Yuan Li, Yong-Jian Zhou, Department of Gastroenterology, Guangzhou First Municipal People's Hospital, Guangzhou Medical College, Guangzhou 510180, Guangdong Province, China

Correspondence to: Yu-Qiang Nie, Chief Physician, Department of Gastroenterology, Guangzhou First Municipal People's Hospital, Guangzhou Medical College, Guangzhou 510180, Guangdong Province, China. nieyq@medmail.com.cn

Received: 2012-03-27 Revised: 2012-07-10

Accepted: 2012-07-20 Published online: 2012-07-28

Abstract

AIM: To investigate the relationship among the adiponectin gene polymorphisms, plasma levels of adiponectin, and risk of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) in Cantonese Han people.

METHODS: We measured the adiponectin gene polymorphisms and plasma adiponectin levels in 106 NAFLD patients and 106 controls with comparable age, sex and body-mass index (BMI) and analyzed their correlation with anthropometric, biochemical, hormonal and metabolic parameters.

RESULTS: The T/T, T/G and G/G genotypes of the SNP 45 locus were found in 64.2%, 23.6% and 12.2% of NAFLD patients, and in 54.7%, 38.7% and 16.6% of controls, respectively. The frequency of GG genotyp in NAFLD patients was higher than that in controls ($\chi^2 = 6.47, P < 0.05$). The allelic frequency between two groups showed no significant difference ($\chi^2 = 0.20, P > 0.05$). The G/G, T/G and T/T genotypes of the SNP 276 locus were found in 64.2%, 27.3% and 8.5% of NAFLD patients, and in 47.2%, 36.8% and 16% of controls, respectively. The frequency of T/T genotype in NAFLD patients was higher than that in controls ($\chi^2 = 6.68, P < 0.05$). There was a significant difference in the allelic frequency between the two groups ($\chi^2 = 7.86, P < 0.05$). Plasma adiponectin levels were significantly lower in NAFLD patients than in controls ($3.75 \text{ mg/L} \pm 3.94 \text{ mg/L}$ vs $6.18 \text{ mg/L} \pm 4.12 \text{ mg/L}$, $P < 0.05$). Moreover, NAFLD patients had more significant insulin resistance (2.19 ± 1.35 vs 1.33 ± 0.93 , $P < 0.05$). Logistic regression analysis showed that BMI, waist to hip ratio (WHR), HOMA-IR, adiponectin were main risk factors for NAFLD.

CONCLUSION: The SNP 45G/G and SNP 276T/T genotypes of the adiponectin gene are associated with risk of NAFLD. High BMI, high WHR, elevated HOMA-IR, and hypoadiponectin are main risk factors for NAFLD.

Key Words: Adiponectin; Nonalcoholic fatty liver disease; Gene polymorphism; Insulin resistance

Shi SL, Nie YQ, Li YY, Zhou YJ. Association of single nucleotide polymorphisms of the adiponectin gene and plasma levels of adiponectin with risk of nonalcoholic fatty liver disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(21): 1982-1986

摘要

目的: 探讨脂联素基因单核苷酸多态性及血清脂联素水平与汉族人非酒精性脂肪肝 (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD) 的关系。

方法: 根据性别、年龄和体质量指数 (body-

■同行评议者

黄恒青, 主任医师, 福建省第二人民医院消化内科

mass index, BMI)配对入选NAFLD患者和对照组,各106例。测定基因多态性和血清脂联素水平,分析其与人体测量参数、生化、激素和代谢的关系。

结果:在NAFLD和对照者中, SNP+45位点T/T、T/G和G/G基因型分别为64.2%、54.7%和23.6%、38.7%和12.2%、6.6%, NAFLD组G/G基因型频率比对照组高($\chi^2 = 6.47$, $P < 0.05$), 但两组等位基因型频率($\chi^2 = 0.64$, $P > 0.05$)差异无显著性; SNP+276位点中G/G、T/G和T/T基因型分别为4.2%、47.2%和27.3%、36.8%和8.5%、16.0%, NAFLD组T/T基因型频率高于对照组($\chi^2 = 6.68$, $P < 0.05$), 两组等位基因频率差异有显著性($\chi^2 = 7.86$, $P < 0.05$)。NAFLD组的血清脂联素水平较对照组显著降低($3.75 \text{ mg/L} \pm 3.94 \text{ mg/L}$ vs $6.18 \text{ mg/L} \pm 4.12 \text{ mg/L}$), 而且有更高的胰岛素抵抗(2.19 ± 1.35 vs 1.33 ± 0.93)。Logistic回归分析显示: BMI、WHR、HOMA-IR、脂联素是NAFLD的主要危险因素。

结论:SNP45G/G和SNP276T/T基因型可能是中国汉族人NAFLD的易感基因, 高BMI、WHR、HOMA-IR、低脂联素血症是NAFLD的主要危险因素。

关键词:脂联素; 非酒精性脂肪肝; 基因多态性; 胰岛素抵抗

石胜利, 聂玉强, 李瑜元, 周永健. 脂联素基因多态性和血清脂联素水平与非酒精性脂肪肝的相关性. 世界华人消化杂志 2012; 20(21): 1982-1986
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1982.asp>

0 引言

非酒精性脂肪性肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)是遗传-环境-代谢应激相关性疾病, 包括单纯性脂肪肝以及由其演变的脂肪性肝炎和脂肪性肝硬化3种类型。NAFLD是一种与肥胖、高胰岛素血症、2型糖尿病密切相关的临床病理综合征^[1]。脂联素作为一种新发现的由脂肪细胞分泌的激素, 具有许多生理功能: 降低血脂、降低血糖、改善胰岛素敏感性以及拮抗动脉粥样硬化的作用, 其与肥胖、2型糖尿病和胰岛素抵抗密切相关, 本文探讨脂联素基因45和276两个位点基因多态性与NAFLD的相关性。

1 材料和方法

1.1 材料 所有研究对象均来自2005-04/07广州市两个社区筛检的汉族人群, 参照中华医学会肝

表 1 脂肪肝组和对照组临床资料比较 (mean \pm SD)

	NAFLD组	对照组	P值
男/女	53/53	53/53	
年龄(岁)	57 \pm 12	56 \pm 13	0.307
体质量(kg)	60.3 \pm 8.5	57.8 \pm 9.3	0.002
BMI(kg/m ²)	26.0 \pm 3.4	22.5 \pm 2.8	<0.001
身高(m)	1.59 \pm 0.09	1.60 \pm 0.10	0.290
腰臀比	0.90 \pm 0.06	0.85 \pm 0.08	<0.001
收缩压(mmHg)	133.3 \pm 20.0	124.6 \pm 18.3	<0.001
舒张压(mmHg)	84.3 \pm 10.3	79.6 \pm 9.8	0.002

脏病学分会制定的诊断标准^[2], 根据性别、年龄和体质量指数配对入选NAFLD和对照组各106例, 临床资料见表1, 两组均排除病毒性肝炎, B超检查无肝胆系统疾病且每周摄入乙醇量<40 g, 为排除高脂血症、糖尿病、高血压对试验的影响, 对照者与NAFLD组在高脂血症、糖尿病、高血压病的构成比一致。所有对象均履行知情同意。

1.2 方法 所有对象均进行人体测量, 包括身高、体质量、腰围、臀围, 计算体质量指数(body mass index, BMI), 腰臀比。禁食12 h, 次日采集空腹静脉血用于血糖、肝功能、血脂检测, 用酶联免疫吸附法检测空腹胰岛素(FINs)、脂联素(试剂盒购自美国R&D公司), 胰岛素抵抗采用稳态模式评估法的胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)。用NAFLD和对照组外周血白细胞, 提取基因组DNA, 置于-20 $^{\circ}\text{C}$ 长期保存, 脂联素基因T45G扩增: 以基因组DNA为模板在30 μL 反应体系内进行PCR, 所用上下游引物分别为5'GAAG-TAGACTCTGCTGAGATGG3', 5'TATCAGTG-TAGGAGGTCTGTGATG3', 在PCR仪中反应条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性5 min后按以下设置循环30次: 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性30 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 退火30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸1 min, 最后72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸10 min。2%琼脂糖电泳鉴定PCR产物, 以100-600 bp的DNA Marker为参照。用限制性内切酶Sma I进行酶切, 含G等位基因的片段被酶切为156 bp和216 bp的两个片段, 脂联素基因SNP276扩增: 以基因组DNA为模板在50 μL 反应体系内进行PCR, 所用上下游引物分别为5'GGCCTCTTTTCATCACAGACC3', 5'AGATG-CAGCAAAGCCAAAGT3', 在PCR仪中反应条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性4 min后按以下设置循环30次: 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性45s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 退火45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸45 s, 最后72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸5 min。取8 μL PCR产物, 加限制性内切酶(Sma I), 含G等位基因的片段被酶切为

■ 相关报道

研究表明70%的糖尿病患者肝功能异常是由于并发NAFLD所致, 肝活检显示75%以上的肥胖者患有NAFLD。脂联素作为一种新发现的脂肪激素, 与肥胖、糖尿病、NAFLD有关, 但其作用机制尚不明确。

■创新盘点

本研究不但分析高BMI、WHR、HOMA-IR和低脂联素血症是NAFLD的主要危险因素,而且分析脂联素基因45和276位点单核苷酸多态性与汉族人NAFLD相关。

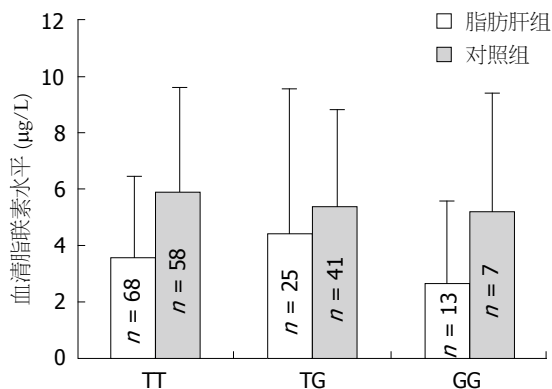


图1 脂肪肝组和对照组SNP45位点3种基因型血清脂联素水平比较。

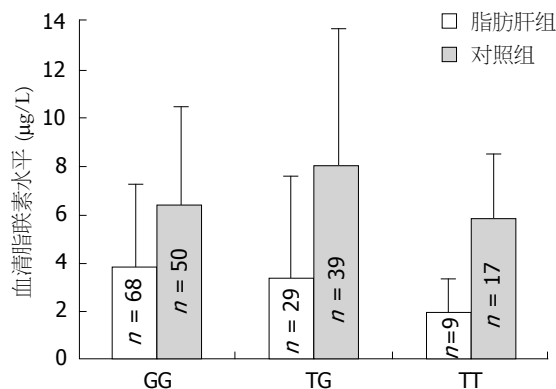


图2 脂肪肝组和对照组SNP276位点3种基因型血清脂联素水平比较。

表2 脂肪肝组和对照组脂联素基因和等位基因分布

基因多态性	基因类型n(%)			P值	等位基因n(%)		P值
45	T/T	T/G	G/G	0.04	T	G	0.65
NAFLD组	68(64.2)	25(23.6)	13(12.2)		161(75.9)	51(24.1)	
对照组	58(54.7)	41(38.7)	7(6.6)		157(74.1)	55(25.9)	
276	G/G	G/T	T/T	0.035	G	T	0.005
NAFLD组	68(64.2)	29(27.3)	9(8.5)		165(77.8)	47(22.2)	
对照组	50(47.2)	39(36.8)	17(16)		139(65.6)	73(34.4)	

196 bp片断。

统计学处理 计量资料用mean±SD表示,基因型及等位基因的频率比较用 χ^2 检验, NAFLD组和对照组之间的比较用配对设计t检验, 脂联素与各参数的关系用spearman等级相关分析, NAFLD的危险因素用多因素非条件Logistic回归分析, 所有数据用SPSS13.0软件处理。

2 结果

2.1 脂联素基因SNP45和SNP276基因型和等位基因分布 SNP45两组间基因型频率差异有显著性, NAFLD组GG基因型频率显著高于对照组($\chi^2 = 6.47, P < 0.05$), 但等位基因频率差异无显著性($\chi^2 = 0.20, P > 0.05$), SNP276两组间基因型频率差异有显著性, NAFLD组TT基因型频率显著高于对照组($\chi^2 = 6.68, P < 0.05$), 等位基因频率差异有显著性($\chi^2 = 7.86, P < 0.05$), NAFLD组SNP45和SNP276基因型血清脂联素水平明显低于对照组(表2, 图1, 2)。

2.2 NAFLD组和对照组临床生物化学指标的比较 NAFLD组血糖(FBG)、FINS、ALT、WHR、BMI、甘油三酯(TG)、胆固醇(TC)、低密度脂蛋白(LDL)、HOMA-IR、舒张压(DBP)和收缩压(SBP)明显高于对照组($P < 0.01$), 血清脂联素水平

显著低于对照组($P < 0.01$), 年龄、高密度脂蛋白(LDL)、身高在两组间差异无统计学意义(表3)。

2.3 血清脂联素水平与临床各指标之间的相关性 血清脂联素与TC呈正相关($r = 0.147, P = 0.003$); 与年龄、WHR、BMI、AST、ALT、HDL、LDL、TG、FINS、FBG和HOMA-IR呈负相关(均 $P < 0.05$, 表4)。

2.4 NAFLD的危险因素分析 在所研究对象中, 以是否患脂肪肝为应变变量, 以WHR、BMI、SBP、DBP、TC、HDL、LDL、TG、ALT、FBG、FINS、HOMA-IR和脂联素作为自变量进行Logistic回归分析, 结果显示BMI、WHR、HOMA-IR和脂联素是脂肪肝形成的主要危险因素(表5)。

3 讨论

脂联素基因位于人体第3号染色体3q27区, 该区域与代谢综合征和2型糖尿病密切相关。迄今为止, 在不同的人群中均发现该基因存在10个以上位点的单核苷酸多态性, 其中脂联素基因+45位点(外显子2)存在T-G转换(Gly15Gly), 该多态性最为常见, 关于脂联素基因45和276位点SNP的研究主要集中在2型糖尿病和代谢综合征方面, 多项研究显示该位点基因多态性与2型糖尿

表 3 脂肪肝组和对照组的生化指标比较

	NAFLD组	对照组	P值
FBG (mmol/L)	5.44 ± 1.09	4.94 ± 0.74	<0.001
FINS (mU/L)	8.97 ± 4.95	6.16 ± 4.69	<0.001
TC (mmol/L)	5.69 ± 2.55	5.01 ± 1.10	0.018
HDL (mmol/L)	2.04 ± 0.98	2.02 ± 0.91	0.845
LDL (mmol/L)	3.60 ± 0.88	3.24 ± 0.68	0.002
TG (mmol/L)	3.38 ± 2.79	2.09 ± 1.44	<0.001
HOMA-IR	2.19 ± 1.35	1.33 ± 0.93	<0.001
AST (U/L)	24.2 ± 14.8	20.7 ± 7.5	0.04
ALT (U/L)	30.1 ± 19.4	24.0 ± 17.5	0.019
γ-GT (U/L)	38.7 ± 23.6	25.9 ± 17.5	<0.001
脂联素(mg/L)	3.75 ± 3.94	6.18 ± 4.12	<0.001

表 4 脂肪肝组血清脂联素水平和临床参数相关分析

	r值	P值
年龄	-0.272	<0.001
BMI	-0.425	<0.001
腰臀比	-0.141	<0.001
收缩压	-0.182	0.061
舒张压	-0.170	0.081
AST	-0.143	0.04
ALT	-0.156	0.002
TC	0.147	0.003
HDL	-0.328	<0.001
LDL	-0.331	<0.001
TG	-0.174	0.001
FPG	-0.189	<0.001
FINS	-0.211	<0.001
HOMA-IR	-0.233	<0.001

病和代谢综合征密切相关. 脂联素基因单核苷酸多态性可影响脂联素基因表达从而影响脂联素水平^[3], 2型糖尿病和NAFLD作为代谢综合征的重要组成部分, 我们推测该位点基因多态性可增加NAFLD易感性, 我们的研究证实这一结论. Musso等^[4]证实NASH人群中脂联素单核苷酸多态性(SNP)45TT与276GT基因型明显多于一般人群, 这两种基因型与肝病的严重程度相关, 本研究结果还证实SNP45G和SNP276T等位基因有更低的脂联素水平, 脂联素基因变化与血脂联素水平之间的关系还不清楚, 可能该位点基因多态性影响脂联素基因的转录活性, 降低血浆脂联素的浓度.

我们的研究发现NAFLD比对照组有更高的胰岛素抵抗, 这与以前的研究一致^[5,6]. 与对照组相比, NAFLD的血糖、胰岛素、腰臀比、体质

表 5 脂肪肝危险因素的Logistic回归分析

	回归系数	SE	P值	OR	95% CI
截距	-20.76	3.66	<0.01		
BMI	0.39	0.07	<0.01	1.47	1.29-1.69
HOMA-IR	0.70	0.17	<0.01	1.53	1.43-1.89
腰臀比	1.23	0.36	<0.01	2.17	1.81-2.59
脂联素	-0.14	0.05	<0.01	0.87	0.78-0.96

量指数、甘油三酯、胆固醇、收缩压和舒张压增加更高, 这些生化参数支持NAFLD是代谢综合征在肝中的表现形式, 胰岛素抵抗是肥胖、糖尿病、高血压和NAFLD共同因素.

Vuppalachchi等^[7]通过对21例NAFLD和19名配对者研究发现: NAFLD患者血清脂联素明显低于对照组(4.9 g/L ± 2.7 g/L vs 7.3 g/L ± 3.5 g/L, $P = 0.02$), 且患者肝脏中脂联素受体2的mRNA表达比正常肝脏组织高, 故建议脂联素作为非酒精性脂肪性肝炎的候选基因做进一步研究. Pagano等^[8]测量了17例NAFLD患者及20例年龄、BMI和性别相匹配的正常志愿者的血清脂联素含量, 发现前者明显低于后者. Targher等^[9]的研究结果显示, NAFLD患者不仅脂联素水平显著低于正常组, 且低水平的脂联素与肝脏脂肪变性和炎症坏死程度相关, 但与纤维化程度无关. 本研究结果也显示NAFLD组血清脂联素水平明显低于对照组, 这与石光英等^[10]研究一致. 在维吾尔族NAFLD脂联素水平降低, 亦是其独立危险因素.

血浆脂联素浓度与体质指数、空腹胰岛素、胰岛素抵抗指数、甘油三酯呈显著负相关. Xu等^[11]发现给脂肪性肝病小鼠饲以脂联素, 2 wk后可以明显改善其胰岛素抵抗现象. 脂联素改善胰岛素抵抗的作用可能源于他使参与骨骼肌脂肪酸摄取和氧化能量代谢分子, 如CD36、乙酰CoA氧化酶、解偶联蛋白-2、3以及脂肪酸转运蛋白1的表达量增加, 从而增加骨骼肌脂肪酸氧化, 降低骨骼肌内甘油三酯含量. 相关分析显示脂联素与胰岛素抵抗、血糖、腰臀比、体质指数呈负相关, 肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor- α , TNF- α)和白介素-6等炎性因子是脂联素分泌拮抗剂, 能抑制脂联素的表达^[12], NAFLD时肝脏能分泌大量的炎性因子, 这些炎性因子的增加也成为脂联素进一步减少的重要因素.

在校正了性别、年龄、SBP、DBP、HDL、

应用要点

脂联素基因的研究对NAFLD发病机制有重要临意义. 高BMI、WHR、HOMA-IR和低脂联素血症是NAFLD的主要危险因素, 血清脂联素水平升高能促进脂肪酸的氧化从而预防肝脏脂肪病变. 对脂联素的研究为脂肪肝的防治提供新的思路和方法.

■同行评价

脂联素具有增强胰岛素敏感性、改善肝细胞脂肪变和减轻炎症反应等作用,具有良好的应用前景。

LDL、TC、TG、HDL、FBG、PBG、FINS和PINS影响的情况下, Logistic回归分析结果提示BMI、IR、WHR和脂联素水平降低是NAFLD的独立危险因素。脂联素的发现为NAFLD的发病机制增加了另一种可能, TNF- α 在胰岛素抵抗的形成中起着非常重要的作用, 而且是参与“二次打击”的重要炎症因子, 研究发现脂联素与TNF- α 的结构十分相似, 他们能分别与对方的受体结合, 而且共享一个信号同道, 但发挥的生物学效应却完全相反。体内外实验显示脂联素与TNF- α 互相抑制对方的产生并互相拮抗对方的功能^[1]。

总之, 脂联素与NAFLD有着密切的联系。增强胰岛素敏感性、改善肝细胞脂肪变和减轻炎症反应等作用, 具有良好的应用前景, 脂联素可能成为临床上用于治疗NAFLD的有效药物, 将成为胰岛素抵抗和NAFLD防治的新靶点。

4 参考文献

- 1 丁效蕙, 赵景民. 非酒精性脂肪性肝炎的发病机制及治疗的研究进展. 世界华人消化杂志 2005; 13: 371-375
- 2 中华医学会肝病学分会脂肪肝和酒精性肝病学组. 非酒精性脂肪性肝病诊疗指南. 中华肝脏病杂志 2006; 14: 161-163
- 3 兰彩莲, 玉西珍. 脂联素基因多态性与2型糖尿病. 中外医疗 2009; 28: 8-9
- 4 Musso G, Gambino R, De Micheli F, Durazzo M, Pagano G, Cassader M. Adiponectin gene polymorphisms modulate acute adiponectin response

to dietary fat: Possible pathogenetic role in NASH. *Hepatology* 2008; 47: 1167-1177

- 5 Chitturi S, Abeygunasekera S, Farrell GC, Holmes-Walker J, Hui JM, Fung C, Karim R, Lin R, Samarasinghe D, Liddle C, Weltman M, George J. NASH and insulin resistance: Insulin hypersecretion and specific association with the insulin resistance syndrome. *Hepatology* 2002; 35: 373-379
- 6 Seppälä-Lindroos A, Vehkavaara S, Häkkinen AM, Goto T, Westerbacka J, Sovijärvi A, Halavaara J, Yki-Järvinen H. Fat accumulation in the liver is associated with defects in insulin suppression of glucose production and serum free fatty acids independent of obesity in normal men. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 3023-3028
- 7 Vuppalanchi R, Marri S, Kolwankar D, Considine RV, Chalasani N. Is adiponectin involved in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis? A preliminary human study. *J Clin Gastroenterol* 2005; 39: 237-242
- 8 Pagano C, Soardo G, Esposito W, Fallo F, Basan L, Donnini D, Federspil G, Sechi LA, Vettor R. Plasma adiponectin is decreased in nonalcoholic fatty liver disease. *Eur J Endocrinol* 2005; 152: 113-118
- 9 Targher G, Bertolini L, Rodella S, Zoppini G, Scala L, Zenari L, Falezza G. Associations between plasma adiponectin concentrations and liver histology in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2006; 64: 679-683
- 10 石光英, 郭新文, 王隼, 冯慧, 许爱云, 何方平. 脂联素与维吾尔族非酒精性脂肪肝病的关系. 世界华人消化杂志 2009; 17: 672-676
- 11 Xu A, Wang Y, Keshaw H, Xu LY, Lam KS, Cooper GJ. The fat-derived hormone adiponectin alleviates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in mice. *J Clin Invest* 2003; 112: 91-100
- 12 孙伟, 姜政, 王丕龙. 脂联素及其在非酒精性脂肪性肝病中的作用研究进展. 中华肝脏病杂志 2006; 14: 952-954

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角码号。如马连生^[1]报告……, 潘伯荣等^[2-5]认为……; PCR方法敏感性高^[6-7]。文献序号作正文叙述时, 用与正文同号的数字并排, 如本实验方法见文献[8]。所引参考文献必须以近2-3年SCIE, PubMed, 《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊为准, 通常应只引用与其观点或数据密切相关的国内外期刊中的最新文献, 包括世界华人消化杂志(<http://www.wjgnet.com/1009-3079/index.jsp>)和*World Journal of Gastroenterology*(<http://www.wjgnet.com/1007-9327/index.jsp>)。期刊: 序号, 作者(列出全体作者), 文题, 刊名, 年, 卷, 起页-止页, PMID编号; 书籍: 序号, 作者(列出全部), 书名, 卷次, 版次, 出版地, 出版社, 年, 起页-止页。

英夫利昔单抗-类克在激素抵抗及激素依赖溃疡性结肠炎治疗中的应用

李懿璇, 李世荣, 李俊霞, 杨欣艳, 王化虹

李懿璇, 李俊霞, 王化虹, 北京大学第一医院消化内科 北京市 100034

李世荣, 杨欣艳, 中国人民解放军北京军区总医院消化内科 北京市 100700

李懿璇, 博士, 主治医师, 主要从事消化系统疾病研究.

作者贡献分布: 李懿璇、李世荣及王化虹对此文所作贡献占大部分; 此课题由王化虹与李世荣设计; 研究过程由李懿璇、李俊霞及杨欣艳完成; 数据分析及论文写作由李懿璇完成.

通讯作者: 王化虹, 主任医师, 100034, 北京市西城区西什库大街8号, 北京大学第一医院消化内科.

wanghuahong@medmail.com.cn

电话: 010-83572226

收稿日期: 2012-02-22 修回日期: 2012-06-20

接受日期: 2012-06-30 在线出版日期: 2012-07-28

Efficacy of infliximab in the management of steroid-refractory or steroid-dependent ulcerative colitis

Yi-Xuan Li, Shi-Rong Li, Jun-Xia Li, Xin-Yan Yang, Hua-Hong Wang

Yi-Xuan Li, Jun-Xia Li, Hua-Hong Wang, Department of Gastroenterology, Peking University First Hospital, Beijing 100034, China

Shi-Rong Li, Xin-Yan Yang, Department of Gastroenterology, General Hospital of Beijing Military Command of Chinese PLA, Beijing 100700, China

Correspondence to: Hua-Hong Wang, Chief Physician, Department of Gastroenterology, Peking University First Hospital, 8 Xishiku Street, Xicheng District, Beijing 100034, China. wanghuahong@medmail.com.cn

Received: 2012-02-22 Revised: 2012-06-20

Accepted: 2012-06-30 Published online: 2012-07-28

Abstract

AIM: To evaluate the efficacy of infliximab (Remicade) in the management of steroid-refractory and steroid-dependent moderate to severe ulcerative colitis (UC).

METHODS: The clinical data for 19 steroid-refractory or steroid-dependent moderate to severe UC patients who accepted treatment with infliximab in the Peking University First Hospital and the General Hospital of Beijing Military Command of Chinese PLA from April 2009 to November 2011 were analyzed retrospectively.

RESULTS: Ten patients achieved clinical remis-

sion, of whom 2 achieved mucosal healing, and 7 achieved clinical response. The total response rate was 89.47%, and remission rate was 52.63%. In all the patients responding to the treatment, Hb and ALB rose apparently, and ESR and CRP decreased obviously. The extraintestinal symptoms in 5 patients with extraintestinal manifestations were improved. No serious adverse events occurred.

CONCLUSION: Infliximab is effective and safe in the management of steroid-refractory or steroid-dependent moderate to severe UC patients.

Key Words: Ulcerative colitis; Steroid-refractory; Steroid-dependent; Infliximab(Recamide)

Li YX, Li SR, Li JX, Yang XY, Wang HH. Efficacy of infliximab in the management of steroid-refractory or steroid-dependent ulcerative colitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(21): 1987-1992

摘要

目的: 评价英夫利昔单抗(类克)对于激素抵抗及激素依赖的中重度溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)的治疗效果.

方法: 回顾性分析2009-04/2011-11在北京大学第一医院及中国人民解放军北京军区总医院消化内科住院治疗的, 因激素抵抗或激素依赖而接受类克治疗的中重度UC患者共19例的临床资料.

结果: 19例患者中10例达到临床缓解, 其中2例达到黏膜愈合, 7例治疗有效, 治疗总有效率是89.47%, 缓解率是52.63%; 治疗有效者, 血红蛋白(hemoglobin, Hb)及白蛋白(albumin, ALB)均明显上升, 血沉(erythrocyte sedimentation rate, ESR)及C反应蛋白(C reaction protein, CRP)明显下降. 5例具有肠外表现者的肠外症状都得到改善. 观察期间未发生严重不良反应.

结论: 类克对于激素抵抗及激素依赖的中重

■背景资料

英夫利昔单抗(类克)是一种人鼠嵌合体抗TNF- α 的单克隆抗体, 随着近期大规模临床试验的研究结果发表, 其在溃疡性结肠炎(UC)中的治疗作用越来越受到重视, 尤其对激素抵抗及激素依赖的患者. 但国内尚缺乏相关研究资料.

■同行评议者

秦成勇, 教授, 山东省立医院消化内科

■相关报道

Rutgeerts等的研究成果表明,中重度活动性UC患者第0、2、6周接受英夫利昔单抗治疗,以后每8 wk为1个疗程,在第8、30、54 wk实验组较安慰剂组都明显出现临床效果。由此肯定了英夫利昔单抗在中重度UC患者中的疗效,为难治性UC患者的治疗提供了新的有效方法。

度UC国人具有良好的治疗效果,同时安全性较好,为难治性UC患者的治疗开拓了新途径。

关键词: 溃疡性结肠炎; 激素抵抗; 激素依赖; 英夫利昔单抗(类克)

李懿璇, 李世荣, 李俊霞, 杨欣艳, 王化虹. 英夫利昔单抗-类克在激素抵抗及激素依赖溃疡性结肠炎治疗中的应用. 世界华人消化杂志 2012; 20(21): 1987-1992

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1987.asp>

0 引言

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是一类慢性反复发作的肠道炎症性疾病,目前主要的治疗药物包括氨基水杨酸类、激素以及免疫抑制剂等;基于激素治疗的有效性,对于中重度UC,全身应用激素仍然是经典治疗方法中的一线选择。但在临床实践中发现大约16%-34%的患者存在激素抵抗^[1,2]以及大约22%的患者存在激素依赖^[1]。为这部分患者寻找最佳的治疗手段,尽量避免手术,并达到缓解疾病、改善生活质量、降低病死率是迫切需要解决的问题。肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)在炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)发病机制中的作用已被广泛研究。英夫利昔单抗(类克)是一种人鼠嵌合体抗TNF- α 的单克隆抗体,可以诱导表达TNF- α 的炎症细胞凋亡,从而抑制炎症过程^[3]。已有很多研究证实类克对于克罗恩病(Crohn's disease, CD)的诱导缓解和维持治疗有效,对瘘管型CD有促进瘘管愈合作用。近期,随着ACT1及ACT2的研究发表^[4],类克在UC中的治疗作用越来越受到重视,但国内尚缺乏相关研究资料。本文将观察类克对19例激素抵抗或激素依赖的UC患者治疗效果。

1 材料和方法

1.1 材料 本观察为双中心回顾性研究。以2009-04/2011-11在北京大学第一医院及中国人民解放军北京军区总医院消化内科住院,因激素抵抗或激素依赖而接受类克治疗的中重度UC患者共19例为研究对象。

1.2 方法

1.2.1 激素抵抗及激素依赖UC的诊断: 所有患者依据2007年我国IBD诊断治疗规范的共识意见^[5],具有典型的临床表现、结肠镜检查及黏膜组织学检查结果,明确诊断为UC。病情分期及严重程度依据Mayo指数分为轻度活动(3-5分)、中度活动(6-10分)、重度活动(11-12分)及缓解

期(0-2分)^[6]。部分患者在治疗观察过程中无结肠镜检查结果,则依据Truelove和Witts标准分为轻度、中度、重度^[6]。泼尼松0.75 mg/(kg·d)应用4 wk症状不缓解,或静脉足量激素应用7-10 d症状无改善者为激素抵抗^[6-8];3 mo内不能将泼尼松减至10 mg/d,或停用激素后3 mo内疾病复发者为激素依赖^[6]。

1.2.2 给药剂量及途径: 因激素抵抗或激素依赖而治疗无效的患者按照每周减5 mg强的松的剂量逐渐减量并停用激素,并改用类克治疗。类克以5 mg/(kg·次)的剂量静脉输注,于0、2、6 wk作为诱导期治疗,其后每8 wk给药一次巩固治疗。

1.2.3 疗效观察: 患者于治疗前及每次类克治疗后都予以临床症状的评价,并比较血红蛋白(hemoglobin, Hb)、白蛋白(albumin, ALB)、血沉(erythrocyte sedimentation rate, ESR)及C反应蛋白(C reaction protein, CRP)的变化及内镜下黏膜愈合的情况。临床缓解指患者的临床症状完全缓解,包括每日大便次数不超过3次,无血便及里急后重感^[6];黏膜愈合指内镜下所有炎症部位的黏膜愈合修复,全结肠黏膜无质脆、出血、糜烂及溃疡^[9];治疗有效指经过治疗后Mayo评分较前下降30%,并便血减轻、内镜下评分改善^[6];无效指经过治疗后达不到上述标准。同时观察类克治疗过程中出现的不良反应。

统计学处理 采用SPSS19.0软件进行分析,应用配对资料Wilcoxon秩和检验比较治疗前后Hb、ALB、ESR及CRP的变化, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况 本研究共19例患者,男12例,女7例,平均年龄 31.89 ± 8.28 岁(18-44岁),平均病程 53.95 ± 51.15 mo(2-204 mo)。临床类型:慢性复发型10例、慢性持续型7例、初发型2例;病变范围:全结肠型15例,其余广泛型、左半结肠型、直乙结肠型、直肠型各1例。其中中度活动者8例,重度活动者11例;激素抵抗者9例,激素依赖者10例。另外,伴发UC肠外表现者5例,包括:多发外周大关节炎2例,强直性脊柱炎1例,多发口腔溃疡1例,同时存在外周关节炎及口腔溃疡者1例(表1)。

2.2 疗效

2.2.1 临床及内镜评价: 本组患者平均使用类克次数 5.58 ± 3.02 次(2-14次)。10例患者达到临床缓解,缓解率为52.63%,达到临床缓解时平均用类

表 1 19例患者类克治疗前的基本临床特征

	性别	年龄(岁)	病程(mo)	病变范围	病情分期	治疗前mayo评分(分)	激素治疗效果	肠外病变
FYX	F	40	72	全结肠型	慢性持续型	11	激素依赖型	多发外周大关节炎
WR	F	32	36	全结肠型	慢性持续型	11	激素依赖型	多发外周大关节炎、口腔溃疡
CSQ	F	44	60	全结肠型	慢性复发型	11	激素依赖型	
LPX	F	21	2	全结肠型	初发型	12	激素抵抗型	
MDH	M	18	12	全结肠型	慢性复发型	8	激素依赖型	口腔溃疡
YCJ	M	43	60	全结肠型	慢性复发型	12	激素依赖型	
WWL	M	23	24	全结肠型	慢性复发型	7	激素抵抗型	
YWS	M	27	12	全结肠型	慢性持续型	6	激素抵抗型	
ZYQ	M	31	60	直乙结肠型	慢性复发型	9	激素依赖型	
TZJ	M	44	36	广泛型	慢性持续型	11	激素依赖型	多发外周大关节炎
LSY	F	27	120	全结肠型	慢性复发型	12	激素抵抗型	
TX	M	33	204	左半结肠型	慢性复发型	7	激素依赖型	强直性脊柱炎
FRS	M	25	12	全结肠型	慢性持续型	11	激素抵抗型	
SJH	F	31	24	全结肠型	慢性复发型	9	激素抵抗型	
HFC	M	39	36	全结肠型	慢性复发型	9	激素依赖型	
GJ	M	23	3	全结肠型	初发型	11	激素抵抗型	
FYX	F	33	96	全结肠型	慢性复发型	12	激素抵抗型	
FSX	M	43	120	直肠型	慢性持续型	8	激素抵抗型	
WYB	M	29	36	全结肠型	慢性持续型	11	激素依赖型	

■创新盘点

本研究为双中心的回顾性研究, 虽然在国际上已有多中心大规模的临床试验肯定了英夫利昔单抗的疗效, 但对于国人, 其用药时间、剂量、疗程、有效率及不良反应还需要我们自己去摸索总结。本文为此开创新篇章, 并希望以后有国人的多中心大规模临床试验来证实。

克次数为4.30次 \pm 2.50次(2-11次); 其中2例患者达到黏膜愈合, 都是在使用类克4次时, 黏膜愈合率为10.53%; 另外有2例患者在达到临床缓解后, 长期用类克维持治疗(1例至今用了14次, 另1例至今用了10次), 并维持疾病缓解状态, 但由于患者拒绝肠镜复查, 故其黏膜愈合情况不详。7例患者治疗有效, 有效率为36.84%, 达到治疗有效的标准时平均使用类克次数为3.14次 \pm 0.90次(2-4次), Mayo评分平均下降4.14分 \pm 0.69分(3-5分)。本组患者经类克治疗后的总有效率(临床缓解率+有效率)达89.47%。2例患者在用药4次后, 症状无改善, 治疗无效, 无效率为10.53%; 其中1例为中度活动溃疡性直肠炎, 改用5-氨基水杨酸(5-aminosalicylic acid, 5-ASA)和激素局部灌肠治疗; 另1例为重度活动全结肠型, 改用环孢素A治疗。

2.2.2 实验室结果评价: 本组患者凡治疗有效甚至达到临床缓解者, 其Hb及ALB均明显上升, 而炎症指标ESR及CRP则明显下降, 与临床转归相一致。10例达到临床缓解的患者, Hb平均上升15.50 g/L, $Z = -2.803(P < 0.05)$; ALB平均上升8.75 g/L, $Z = -2.805(P < 0.05)$; ESR平均下降21.60 mm/h, $Z = -2.550(P < 0.05)$; CRP平均下降44.52 mg/L, $Z = -2.666(P < 0.05)$ 。7例治疗有效的患者, Hb平均上升14.00 g/L, $Z = -2.371(P < 0.05)$; ALB平均上升7.87 g/L, $Z = -2.366(P < 0.05)$; ESR平均下降22.43 mm/h, $Z = -2.371(P < 0.05)$; CRP平均下降

23.15 mg/L, $Z = -2.366(P < 0.05)$ 。2例治疗无效的患者, Hb、ALB、ESR及CRP则无明显变化趋势(表2)。

2.2.3 对肠外表现的疗效: 类克对本组患者的肠外表现治疗效果良好; 4例伴有外周关节炎和/或口腔溃疡的患者应用类克后关节症状消失、口腔溃疡愈合; 另外1例伴有强直性脊柱炎的患者, 关节痛的症状消失, 关节功能较前有所改善。

2.3 不良反应 本组患者均未发生严重不良反应。只有1例患者在治疗过程中, 出现一过性巨细胞病毒(cytomegalovirus, CMV)和单纯疱疹病毒(herpes simplex virus, HSV)感染, 经抗病毒、对症治疗后很快好转, 并未影响其继续使用类克。所有患者均未出现输液反应、严重感染特别是机会感染及结核感染、新的自身抗体或狼疮样综合征、充血性心力衰竭、神经系统障碍以及严重的肝损伤, 所有患者观察期间无肿瘤发生; 但有5例患者在筛查过程中, 依据胸片、结核抗体及 γ 干扰素释放分析T-SPOT.TB等结果怀疑有潜伏性结核的可能, 故给予了预防性抗结核治疗。

3 讨论

中重度UC特别是难治性UC的治疗目前来说仍然是难点。大约有15%的患者在整个病程中的某段时间会发展为重症, 并需要住院、接受静脉药物治疗, 甚至行结肠切除术^[10]。尽管各种治疗

■应用要点

本研究初步分析总结了英夫利昔单抗对激素抵抗及激素依赖的中重度UC患者的治疗效果,并为这部分患者尽量避免手术、达到疾病缓解、改善生活质量、降低病死率提供了新的治疗方法。

表 2 19例患者类克治疗后的疗效

	用类克总 次数(次)	临床疗效	达到疗效时 类克次数(次)	是否达到黏 膜愈合	HB治疗前 /后(g/L)	ALB治疗前 /后(g/L)	ESR治疗前/后 (mm/h)	CRP治疗前 /后(mg/L)
FYX	14	临床缓解	11		61/89	35.7/45	79/12	22.5/4.69
WR	7	临床缓解	3	是	114/118	31.2/41.1	43/18	104.0/5.34
CSQ	5	临床缓解	5		99/110	26.3/38	57/13	54.4/2.81
LPX	6	临床缓解	3		79/113	23.9/42.4	32/5	49.3/1
MDH	6	临床缓解	4		81/107	31.3/42.2	18/20	72.0/9.6
YCJ	10	临床缓解	4	是	106/128	29.1/42.5	44/15	111.0/5.8
WWL	3	临床缓解	2		95/107	34.0/38.5	7/5	15.3/1.8
YWS	10	临床缓解	4		141/146	48.3/48.9	3/2	1.0/1.0
ZYQ	3	临床缓解	3		119/122	39.4/43.6	13/6	33.3/6.2
TZJ	6	临床缓解	4		110/120	36.3/40.8	18/2	22.1/1.5
LSY	3	有效	3		91/98	31.1/36.9	23/15	20.7/8.6
TX	5	有效	3		88/110	41.1/45.2	50/21	12.3/3.04
FRS	6	有效	4		76/120	22.0/41.5	82/14	76.9/11.3
SJH	5	有效	4		104/108	28.8/38.4	34/14	36.5/2.72
HFC	2	有效	2		84/95	28.9/29.4	25/15	13.8/9.72
GJ	5	有效	4		72/78	31.3/38.4	8/6	16.1/4.8
FYX	2	有效	2		91/95	29.6/35.7	40/20	84.7/58.8
FSX	4	无效	4		158/149	42.4/41.6	7/5	1.8/2.3
WYB	4	无效	4		87/85	26.7/24.9	10/12	23.7/19.6

方式在不断改进,但对于中、重度UC的治疗选择仍然有限,尤其当患者出现激素抵抗或依赖时,很可能面临结肠切除手术的各种风险。

类克作为TNF- α 单抗-一种生物制剂,在IBD方面最早被美国FDA批准治疗瘻管型CD及常规治疗无效的中重度活动期CD,2002年FDA将其适应症扩大至作为缓解期CD的维持治疗,但当时始终缺乏类克对UC疗效的大规模临床研究。2005年, Rutgeerts等^[4]发表了ACT1和ACT2多中心、随机双盲、安慰剂对照的临床研究,提示类克组较安慰剂组达到治疗有效及临床缓解的比例明显增高,另外类克组患者在达到临床缓解后停用激素的比例也较安慰剂组明显增高;基于这两项研究结果,同年9月FDA即批准类克治疗难治性中、重度UC。国内的研究资料尚少,但也有李世荣等^[11]的研究提示类克治疗UC效果良好,7例UC患者中,3例达到症状缓解、4例好转、2例黏膜愈合。本研究结果显示类克对于激素抵抗及激素依赖的中重度UC患者有良好的治疗效果,19例患者中17例疗效显著,总有效率为89.47%,其中10例达到临床缓解,临床缓解率为52.63%,平均用类克次数4.30次 \pm 2.50次,2例在用类克4次后达到黏膜愈合,黏膜愈合率为10.53%。本组资料中的有效率与临床缓解率略高于ACT1和ACT2(有效率89.47% vs 69.4%,

64.5%; 缓解率52.63% vs 38.8%, 33.9%),但黏膜愈合率明显低于ACT1和ACT2(10.53% vs 62.0%, 60.3%)。一方面,有2例患者虽然治疗效果良好、长期处于临床缓解状态,但未随访结肠镜结果,其黏膜愈合情况不详,导致可能丢失部分黏膜愈合的患者;另一方面,本组患者Mayo平均分较ACT1和ACT2中患者高(9.9 vs 8.5, 8.3),且病变范围更广,导致本组患者黏膜愈合更困难或者需要更长的治疗时间。

UC的实验室检查结果往往与临床转归相一致,CRP作为一种急性时相蛋白,其升高与疾病活动度、ESR增快、贫血及低蛋白血症密切相关^[12]。类克治疗UC后的临床转归往往能通过实验室检查有所体现,对类克治疗有效的患者与治疗无效的患者相比,其HB和ALB水平更高,ESR和CRP更低^[13]。本研究结果显示类克治疗有效者,Hb及ALB均明显上升,而炎症指标ESR及CRP明显下降,2例治疗无效的患者,Hb、ALB、ESR及CRP则无此变化趋势,提示实验室结果不但可以作为疾病严重程度的辅助判断指标,也可以作为治疗后应答与否的标识。

IBD患者中大约20%-40%的人群会出现肠外表现,包括关节、皮肤、眼睛及肝胆系统的损害;部分肠外表现与肠道炎症过程相平行,如外周关节炎、结节性红斑及外层巩膜炎,治疗

肠道炎症的同时肠外表现可以得到同步缓解;而另外部分肠外表现如强直性脊柱炎、坏疽性脓皮病、葡萄膜炎及原发硬化性胆管炎则具有相对独立的临床过程,其对IBD的治疗药物反应不一,治疗也更加困难^[14,15]。本研究资料显示5例患者具有肠外表现,比例为26.32%,与国外报道相一致;同时证实类克对UC伴随的关节炎及口腔溃疡具有良好疗效,4例伴有外周关节炎和/或口腔溃疡的患者在应用类克治疗后关节症状消失、口腔溃疡愈合,其病情改善的速度均快于肠道病变的修复,提示类克对于UC伴随的全身炎症的控制是迅速的;1例伴有强制性脊柱炎的患者,在应用3次类克治疗后关节痛症状消失,关节功较之前有较明显改善。已有多个研究证实,伴有外周关节炎的活动期IBD患者接受类克治疗的同时,关节症状可以得到很好地改善;对于强直性脊柱炎,虽然其疾病过程与IBD相独立,但大量研究已证实类克对强直性脊柱炎治疗有效,可诱导并长期维持缓解,因此对于伴有强直性脊柱炎的IBD患者,类克是较好的适应症^[15]。

本组患者中有1例在治疗过程中出现一过性CMV-IgM和HSV-IgM阳性,经抗病毒、对症治疗很快好转,并未影响其继续使用类克。ECCO对于IBD患者在治疗过程中出现病毒感染给出如下意见:如在重症结肠炎患者的结肠黏膜中检测出CMV,应开始抗病毒治疗并考虑停用免疫调节药物直至结肠炎症状改善,如出现全身系统性CMV感染,则必须立即终止免疫调节治疗^[16,17]。目前已有报道在类克治疗过程中出现HSV感染,但类克是否较其他治疗IBD的药物增加HSV复燃的风险尚不明确,目前推荐意见为推迟类克的治疗时间直到皮肤疱疹愈合并适当给予抗病毒治疗^[16,17]。本研究中的患者虽然出现一过性CMV-IgM和HSV-IgM阳性,但未在结肠黏膜中检测出CMV,未发生皮肤疱疹,也未出现全身系统性感染,对症治疗后很快好转,也未影响继续使用类克。所有患者均未出现输液反应、严重的感染特别是机会感染及结核感染、新的自身抗体或狼疮样综合征、充血性心力衰竭、神经系统障碍以及严重的肝损伤,所有患者观察期间无肿瘤发生;但有5例患者在筛查过程中怀疑有潜伏性结核的可能,给予了9 mo异烟肼及利福平的预防性抗结核治疗。

总之,类克对于激素抵抗及激素依赖的中重度UC国人具有良好的治疗效果,有效率及临床缓解率均较高,部分患者可以很快达到黏膜

愈合;除了抑制肠道炎症,类克对于肠外表现也有良好的治疗作用。另外,国人对类克耐受性好,治疗过程未出现严重并发症。因此,类克为中重度顽固性UC患者的治疗开拓了新途径。本组所有患者目前都在密切随访当中,无一失访病例,但本研究包含病例数尚少,仍需要大规模多中心随机对照临床研究结果给予支持。

4 参考文献

- 1 Faubion WA, Loftus EV, Harmsen WS, Zinsmeister AR, Sandborn WJ. The natural history of corticosteroid therapy for inflammatory bowel disease: a population-based study. *Gastroenterology* 2001; 121: 255-260
- 2 Lindgren SC, Flood LM, Kilander AF, Löfberg R, Persson TB, Sjö Dahl RI. Early predictors of glucocorticosteroid treatment failure in severe and moderately severe attacks of ulcerative colitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1998; 10: 831-835
- 3 Danese S. Mechanisms of action of infliximab in inflammatory bowel disease: an anti-inflammatory multitasker. *Dig Liver Dis* 2008; 40 Suppl 2: S225-S228
- 4 Rutgeerts P, Sandborn WJ, Feagan BG, Reinisch W, Olson A, Johanns J, Travers S, Rachmilewitz D, Hanauer SB, Lichtenstein GR, de Villiers WJ, Present D, Sands BE, Colombel JF. Infliximab for induction and maintenance therapy for ulcerative colitis. *N Engl J Med* 2005; 353: 2462-2476
- 5 中华医学会消化病学分会炎症性肠病协作组. 对我国炎症性肠病诊断治疗规范的共识意见(2007年, 济南). *中华消化杂志* 2007; 27: 545-550
- 6 Stange EF, Travis SP, Vermeire S, Reinisch W, Geboes K, Barakauskiene A, Feakins R, Fléjou JF, Herfarth H, Hommes DW, Kupcinskas L, Lakatos PL, Mantzaris GJ, Schreiber S, Villanacci V, Warren BF; for the European Crohn's and Colitis Organisation (ECCO). European evidence-based Consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis: Definitions and diagnosis. *J Crohns Colitis* 2008; 2: 1-23
- 7 Creed TJ, Probert CS. Review article: steroid resistance in inflammatory bowel disease - mechanisms and therapeutic strategies. *Aliment Pharmacol Ther* 2007; 25: 111-122
- 8 Travis SP, Stange EF, Lémann M, Oresland T, Bemelman WA, Chowers Y, Colombel JF, D'Haens G, Ghosh S, Marteau P, Kruis W, Mortensen NJ, Penninckx F, Gassull M; for the European Crohn's and Colitis Organisation (ECCO). European evidence-based Consensus on the management of ulcerative colitis: Current management. *J Crohns Colitis* 2008; 2: 24-62
- 9 Pineton de Chambrun G, Peyrin-Biroulet L, Lémann M, Colombel JF. Clinical implications of mucosal healing for the management of IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2010; 7: 15-29
- 10 Levin A, Shibolet O. Infliximab in ulcerative colitis. *Biologics* 2008; 2: 379-388
- 11 李世荣, 陆晓娟, 盛剑秋, 范如英, 李恕军, 赵晓军. 溃疡性结肠炎和克罗恩病的英夫利西(类克)治疗效果比较. *胃肠病学和肝病杂志* 2010; 19: 644-647
- 12 Solem CA, Loftus EV, Tremaine WJ, Harmsen WS,

■名词解释

英夫利昔单抗: 是一种人鼠嵌合体抗肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的单克隆抗体,可以诱导表达TNF- α 的炎症细胞凋亡,从而抑制炎症过程。目前主要应用于炎症性肠病(IBD)、强直性脊柱炎、类风湿性关节炎的患者治疗。

■同行评价

本文总结分析了英夫利昔单抗治疗激素抵抗及激素依赖性UC患者的疗效,文章具有较好的创新性和临床应用价值,可读性较强。

- Zinsmeister AR, Sandborn WJ. Correlation of C-reactive protein with clinical, endoscopic, histologic, and radiographic activity in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2005; 11: 707-712
- 13 Actis GC, Bruno M, Pinna-Pintor M, Rossini FP, Rizzetto M. Infliximab for treatment of steroid-refractory ulcerative colitis. *Dig Liver Dis* 2002; 34: 631-634
- 14 Siemanowski B, Regueiro M. Efficacy of infliximab for extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease. *Curr Treat Options Gastroenterol* 2007; 10: 178-184
- 15 Barrie A, Regueiro M. Biologic therapy in the management of extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2007; 13: 1424-1429
- 16 Miehsler W, Novacek G, Wenzl H, Vogelsang H, Knoflach P, Kaser A, Dejaco C, Petritsch W, Kapitan M, Maier H, Graninger W, Tilg H, Reinisch W. A decade of infliximab: The Austrian evidence based consensus on the safe use of infliximab in inflammatory bowel disease. *J Crohns Colitis* 2010; 4: 221-256
- 17 Rahier JF, Ben-Horin S, Chowers Y, Conlon C, De Munter P, D'Haens G, Domènech E, Eliakim R, Eser A, Frater J, Gassull M, Giladi M, Kaser A, Lémann M, Moreels T, Moschen A, Pollok R, Reinisch W, Schunter M, Stange EF, Tilg H, Van Assche G, Vige N, Vucelic B, Walsh A, Weiss G, Yazdanpanah Y, Zabana Y, Travis SP, Colombel JF; on behalf of the European Crohn's and Colitis Organisation (ECCO). European evidence-based Consensus on the prevention, diagnosis and management of opportunistic infections in inflammatory bowel disease. *J Crohns Colitis* 2009; 3: 47-91

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的利益冲突; (3)所有作者均审阅过该文并同意发表,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、补充或删除时,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。

外周血CK20 mRNA表达与结直肠癌临床病理和预后的关系

李国胜, 颜登国, 张汝一, 甄运寰, 姬清华, 程海玉

李国胜, 颜登国, 张汝一, 甄运寰, 姬清华, 程海玉, 贵阳医学院附属医院肛肠外科 贵州省贵阳市 550004

李国胜, 硕士, 副主任医师, 主要从事肛肠外科的临床和基础研究。贵州省优秀科技教育人才省长专项基金资助项目, No. 2006-61
作者贡献分布: 此课题由李国胜、颜登国及张汝一共同设计; 试验过程由李国胜、姬清华及程海玉完成; 试验结果判定由甄运寰完成; 数据统计分析由李国胜与颜登国完成; 本论文写作由李国胜、颜登国及甄运寰完成。

通讯作者: 李国胜, 副主任医师, 550004, 贵州省贵阳市, 贵阳医学院附属医院肛肠外科. liguoshengliushu@163.com

电话: 0851-6855119

收稿日期: 2012-05-14 修回日期: 2012-06-30

接受日期: 2012-07-20 在线出版日期: 2012-07-28

Correlation between expression of CK20 mRNA in peripheral blood and clinicopathological features and prognosis in patients with colorectal cancer

Guo-Sheng Li, Deng-Guo Yan, Ru-Yi Zhang, Yun-Huan Zhen, Qing-Hua Ji, Hai-Yu Cheng

Guo-Sheng Li, Deng-Guo Yan, Ru-Yi Zhang, Yun-Huan Zhen, Qing-Hua Ji, Hai-Yu Cheng, Department of Colorectal-Anal Surgery, the Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou Province, China

Supported by: the Guizhou Province Governor Special Fund for Excellent Science Technology and Education Talents, No. 2006-61

Correspondence to: Guo-Sheng Li, Associate Chief Physician, Department of Colorectal-Anal Surgery, the Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou Province, China. liguoshengliushu@163.com

Received: 2012-05-14 Revised: 2012-06-30

Accepted: 2012-07-20 Published online: 2012-07-28

Abstract

AIM: To investigate the clinical significance of cytokeratin 20 (CK20) mRNA expression in peripheral venous blood of patients with colorectal carcinoma.

METHODS: The expression of CK20 mRNA was detected by RT-PCR in peripheral venous blood samples from 20 healthy volunteers, 10 patients with colorectal polyps, and 61 patients with colorectal cancer.

RESULTS: The positive rate of CK20 mRNA in peripheral venous blood of patients with colorectal cancer was 41.0% (25/61). CK20 mRNA expression in peripheral venous blood was asso-

ciated with TNM stage, local lymph node metastasis, distant metastasis, and depth of invasion (all $P < 0.05$). The expression of CK20 mRNA was not detected in peripheral venous blood of healthy volunteers and patients with colorectal polyps. Seventeen cases died during the follow-up period, of whom 10 had positive expression of CK20 in peripheral blood.

CONCLUSION: CK20 is a specific marker for blood micrometastasis of colorectal cancer. The expression of CK20 mRNA in the blood of patients with colorectal cancer is related with the invasion and metastasis of colorectal cancer. Detection of CK20 mRNA in peripheral blood seems to be of relevance for prognosis in colorectal cancer.

Key Words: Colorectal cancer; Cytokeratin 20; Micrometastasis; Peripheral venous blood; Prognosis

Li GS, Yan DG, Zhang RY, Zhen YH, Ji QH, Cheng HY. Correlation between expression of CK20 mRNA in peripheral blood and clinicopathological features and prognosis in patients with colorectal cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(21): 1993-1997

摘要

目的: 探讨外周静脉血中CK20 mRNA表达及其与结直肠癌临床病理及预后的关系。

方法: 选取结直肠癌术前患者61例、健康志愿者20例和结直肠息肉患者10例, 采用RT-PCR法检测其外周静脉血中CK20 mRNA的表达, 并结合其临床病理特点和随访资料进行综合分析。

结果: 61例结直肠癌患者术前外周血CK20 mRNA阳性率为41.0%(25/61); 其表达与肿瘤TNM分期、浸润深度、远处转移和区域淋巴结转移有关($P < 0.05$)。20例健康志愿者和10例结直肠息肉患者外周血均无CK20 mRNA表达。在61例结直肠癌患者中, 术后46 mo完整随访的有37例, 其中有17例死亡, 有10例外周血CK20 mRNA表达阳性。

结论: 外周静脉血中CK20 mRNA的表达与结直肠癌患者的肿瘤分期和浸润转移有关。血液中CK20是反映结直肠癌患者发生肿瘤微转

■背景资料

结直肠癌是最常见的消化系统恶性肿瘤之一, 且发病率呈逐年上升的趋势。虽然目前临床上对结直肠癌采取了规范的综合性治疗措施, 但其死亡率仍居恶性肿瘤的前列。

■同行评议者

顾国利, 副主任医师, 中国人民解放军空军总医院普外科

■创新盘点

本研究采取外周静脉血检测CK20 mRNA的表达, 并进行了长期的随访, 进一步证明了外周血中CK20 mRNA的表达可以作为结直肠癌侵袭转移和预后判定的指标, 具有一定的创新性和实用价值。

移较为特异的肿瘤标志物, 外周血液中CK20 mRNA的表达可作为评估患者预后的指标。

关键词: 结直肠癌; 细胞角蛋白20; 微转移; 外周血; 预后

李国胜, 颜登国, 张汝一, 甄运震, 姬清华, 程海玉. 外周血CK20 mRNA表达与结直肠癌临床病理和预后的关系. 世界华人消化杂志 2012; 20(21): 1993-1997

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1993.asp>

0 引言

结直肠癌是最常见的消化系恶性肿瘤之一, 且发病率呈逐年上升的趋势^[1]. 虽然目前临床上对结直肠癌采取了规范的综合性治疗措施, 但其死亡率仍居恶性肿瘤的前列. 部分结直肠癌患者预后不佳的一个重要原因是: 患者在获得诊断、接受综合性治疗之前, 肿瘤经血行途径已发生了广泛的微转移^[2]. 目前临床上尚缺乏一种能够在疾病早期即可有效判定结直肠癌微转移, 进而预测结直肠癌患者预后的外周血检测指标. 研究发现^[3-6]: 细胞角蛋白20(cytokeratin 20, CK20)具有严格的上皮组织特异性, 其在癌变的上皮组织以及转移灶中均有表达, 而在正常血液、淋巴结及骨髓中均为阴性. 因此, 外周血中CK20 mRNA的表达状况可能成为一个预示结直肠癌发生血行微转移和预后不良的重要指标. 本研究采用RT-PCR技术检测结直肠癌患者外周静脉血中CK20 mRNA的表达, 旨在探讨外周血中CK20 mRNA表达与结直肠癌临床病理特征和预后的关系, 这有助于为结直肠癌的预后判断提供客观的参考指标。

1 材料和方法

1.1 材料 随机选取2006-08/2007-01贵阳医学院附属医院肛肠外科收治的结直肠癌患者61例组成实验组, 所有病例均经组织学确诊, 且未接受放化疗治疗. 选取同期在门诊体检的20例健康志愿者组成阴性对照组, 选取在门诊行结肠镜检查并且组织学证实为腺瘤性息肉的10例结直肠息肉患者组成阳性对照组. 41例直肠癌患者分别行Dixon术27例、Miles术8例、Dixon术+肝转移灶切除1例、肿瘤姑息性切除术1例和单纯乙状结肠造口4例. 20例结肠癌患者分别行乙状结肠癌根治术8例、根治性右半结肠切除术8例和癌灶姑息性切除术4例。

1.2 方法

1.2.1 标本采集和制备: 分别采取结直肠癌术前患者61例、结直肠息肉患者10例和健康志愿者

20例的肘前静脉血 5 mL采用红细胞溶解法分离有核细胞^[6], 将标本在室温下7 000 g离心5 min, 弃上清液. 加入5倍体积的生理盐水混匀; 室温下7 000 g离心5 min, 弃上清液. 加入5倍体积的双蒸水混匀, 静置5 min, 室温下10 000 g离心10 min. 弃去上层溶解的红细胞, 保留下层2 mL液体. 加入5倍体积的双蒸水混匀, 室温下10 000 g离心10 min, 去上清液. 采用异硫氰酸胍法提取RNA. 紫外分光光度计测定总RNA浓度, A_{260}/A_{280} 比值在1.7-2.0之间, 用1.5%琼脂糖凝胶电泳检测总RNA质量. 总RNA于-80 °C保存备用。

1.2.2 RT-PCR检测CK20 mRNA的表达: 总RNA在20 μL反应体系中逆转录成cDNA. 反应体系组成如下: dNTPs 2 μL, 5×RNA PCR缓冲剂4 μL, RNA酶抑制剂1 μL, AMV逆转录酶XL 1 μL, Oligo d(T)-Adaptor引物1 μL(2.5 pmol/μL), 总RNA 5 μL, RNase Free H₂O 6 μL.

逆转录反应条件: 70 °C反应5 min, 4 °C反应5 min. 取出加入M-MuLV RT 1 μL, 42 °C孵育60 min, 70 °C加热10 min灭活逆转录酶, 4 °C结束反应. 取上述逆转录反应产物于25 L反应体系中进行PCR反应. 反应体系如下: 5×PCR缓冲剂5 μL, RT反应液5 μL, dNTP 2.0 μL, Taq DNA多聚酶0.2 μL, 上下游引物各1 μL, ddH₂O 10.8 μL. CK20引物序列^[6]: 上游引物5'-CAGACACCGGTGAACCTATGG-3', 下游引物5'-GATCAGCTTCCACTGTTAGACG-3', 扩增片段长度为370 bp. 内参照MTHFR引物序列^[6]: 上游引物5'-TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA-3', 下游引物: 5'-AGGACGGTGCGGTGAGAGTG-3', 扩增片段长度为198 bp. PCR扩增条件: 94 °C变性1 min, 57 °C退火1 min, 72 °C延伸1 min, 共35个循环. 最后72 °C延伸7 min结束反应. 本实验设阴性对照, 每个标本在不加逆转录酶时进行RT-PCR, 以确定扩增产物来自cDNA模板而非基因组DNA. 同一标本至少进行2次RT-PCR反应, 所得PCR反应产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳, 紫外灯下观察有无预期的扩增产物。

统计学处理 应用SPSS15.0统计软件包进行统计分析. 计数资料采用两个(或多个)样本率比较的 χ^2 检验, 正态分布、方差齐的计量资料采用随机设计的两总体均数的 t 检验, 年龄资料采用单因素多个样本均数比较的 q 检验. 生存率曲线采用寿命表法. $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3组临床资料和CK20 mRNA表达 入组病例的临床资料见表1. 3组病例在年龄、性别方面

表 1 3组病例的临床资料和CK20mRNA表达

分组	n	年龄(mean, 岁)	性别		肿瘤部位		TNM分期				分化类型(腺癌)				CK20 mRNA表达	
			男	女	结肠	直肠	I	II	III	IV	高	中	低	黏液	阳性	阴性
试验组	61	31-79(61.1)	39	21	41	20	10	18	23	10	8	39	9	5	25	36
阳性对照组	10	38-78(60.5)	7	3	8	2									0	10
阴性对照组	20	30-74(60.3)	14	6											0	20

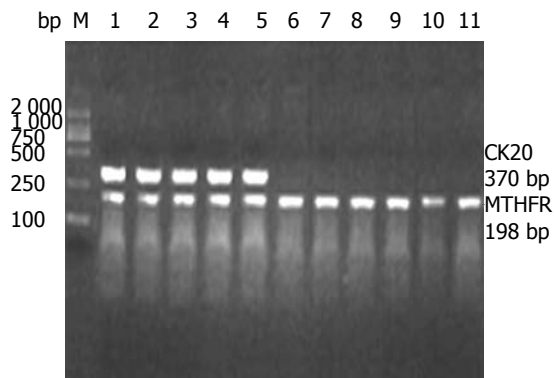


图 1 结直肠癌患者外周血中CK20 mRNA表达的凝胶电泳图. 1-5: 阳性表达, 片段长度为370 bp. 6-11: 阴性表达.

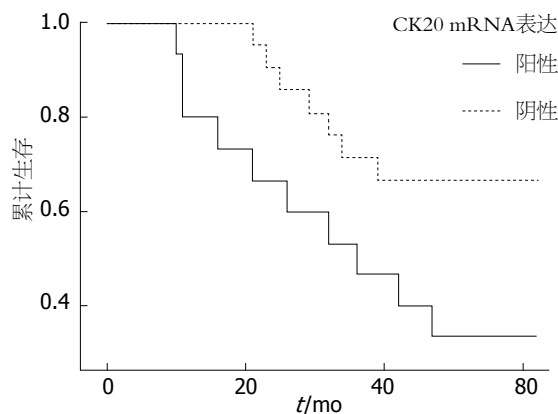


图 2 结直肠癌患者外周血CK20 mRNA表达情况的生存率曲线图.

表 2 外周血CK20 mRNA阳性表达与结直肠癌患者临床病理因素的关系

项目	n	CK20 mRNA阳性表达	χ^2 值	P值
TNM分期			12.01	<0.01
I	10	1		
II	18	5		
III	23	11		
IV	10	8		
侵袭深度			8.48	<0.05
肌层	13	2		
浆膜内	25	9		
浆膜外	23	14		
远处转移			5.91	<0.05
无	52	18		
有	9	7		
淋巴结转移			6.49	<0.05
无	29	7		
有	32	18		
分化类型			1.96	>0.05
好	47	17		
差	14	8		
肿瘤大小			0.08	>0.05
≤5 cm	28	12		
>5 cm	33	13		

无统计学差异($P>0.05$), 结直肠癌组和结直肠息肉组在肿瘤分布方面无统计学差异($P>0.05$). CK20 mRNA在3组中表达差异显著($\chi^2 = 16.95$,

■应用要点

外周血中CK20 mRNA的表达可以作为判断结直肠癌侵袭能力及预后的一个指标. 本研究为临床判定结直肠癌预后和指导化疗提供了一些有益的参考指标.

$P<0.01$, 图1).

2.2 CK20 mRNA表达与结直肠癌患者临床病理特征的关系 CK20 mRNA在61例结直肠癌患者外周血中表达阳性率与肿瘤TNM分期、浸润深度、远处转移和区域淋巴结转移有关($P<0.05$); 而与肿瘤大小和分化程度无关($P>0.05$, 表2).

2.3 CK20 mRNA表达与结直肠癌患者预后的关系 全部结直肠癌病例采用电话、信访或门诊检查的方式进行随访, 无失访病例. 随访时间: 6-62 mo(平均47.2 mo), 随访期内死亡27例, 死亡原因: 肝转移、腹腔转移和肺转移. 外周血中CK20 mRNA表达与死亡病例及其生存期的关系见表3和图2.

3 讨论

临床上常用CK20与CK7联合检测以鉴别恶性肿瘤的组织来源. 因为CK20主要位于胃肠道的正常黏膜上皮细胞和陷窝细胞, 具有严格的上皮组织特异性. 研究显示^[3-7]: 包括转移瘤在内的所有结直肠癌组织均表达CK20, 而在正常血液、淋巴结、骨髓中则为阴性. 因此, 从理论上讲, 通过检测血液或区域淋巴结中CK20 mRNA的表达, 就能够反应结直肠癌患者血液或区域淋巴结微转移情况^[8-11], 这有助于为患者选择合适的治疗方式和预后评估提供帮助. 本研究发现: 结直肠癌患者外周静脉血CK20 mRNA表达阳性率

■ 同行评价

本文发现CK20 mRNA在外周血中的表达对于预测结直肠癌的预后及血液中微转移具有标志物作用,具有一定临床实用价值.

表 3 外周血中CK20 mRNA表达与结直肠癌患者预后的关系

CK20 mRNA表达	n	死亡(n)	生存率	χ^2 值	P值	生存期(mo)	值	P值
阳性	15	10	33.33%	4.36	<0.05	35.80 ± 5.12	10.25	<0.01
阴性	22	7	68.18%			50.43 ± 3.58		

为41.0%,与报道^[6-10]一致.而其在健康人和结直肠息肉患者的外周血中无表达.这说明通过RT-PCR法检测外周血中CK20 mRNA的表达对判定血行微转移具有较高的特异性和灵敏度,具有一定的临床实用价值.

本研究发现:结直肠癌患者外周血中CK20 mRNA的表达与肿瘤分期和浸润转移密切相关.这说明随着结直肠癌细胞侵袭肠壁深度的加深,肿瘤细胞发生血行微转移的比例也在明显增加.肿瘤细胞进入外周血的途径可以是直接侵入脉管系统而直接入血,也可以通过腹腔播散后经腹膜吸收入血^[12-14].而肿瘤细胞到达肝脏后容易被肝脏Kupffer细胞所吞噬^[15,16].因此,外周血中CK20 mRNA的阳性检出率还取决于肝脏免疫系统的功能.

临床上约有30%-50%的结直肠癌患者在根治术后会出现局部复发和远处转移,甚至那些肿瘤尚局限在肠壁且没有淋巴结转移的TNM分期I、II期患者,仍有约30%患者在5年内死于局部复发和远处转移^[17-23],这说明这些患者体内存在常规方法不能发现的癌细胞.本研究发现:TNM分期为I、II期的结直肠癌患者外周血中CK20 mRNA阳性表达率分别为10.0%和27.8%.这说明结直肠癌在早期就已可发生血液微转移的现象,而这些患者通常是不进行化疗治疗的.因此,外周血中CK20 mRNA的表达应作为一个复发转移的高危因素予以重视.

4 参考文献

- 1 El-Tawil AM. Colorectal cancer and pollution. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 3475-3477
- 2 Wang YD, Wu P, Mao JD, Huang H, Zhang F. Relationship between vascular invasion and microvessel density and micrometastasis. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 6269-6273
- 3 熊兵红,程勇,王严庆.细胞角蛋白20检测在大肠癌微转移中的临床意义. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 1394-1402
- 4 Tsouma A, Aggeli C, Lembessis P, Zografos GN, Korkolis DP, Pectasides D, Skondra M, Pissimissis N, Tzonou A, Koutsilieris M. Multiplex RT-PCR-based detections of CEA, CK20 and EGFR in colorectal cancer patients. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 5965-5974
- 5 康悦,蒋伟,杨维良.直肠癌直肠系膜中CK20的表达

- 6 及临床意义. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 3143-3146
- 6 颜登国,张汝一,甄运寰,李国胜,姬清华.结直肠癌患者血液中CK20 mRNA的表达. *中国普外基础与临床杂志* 2011; 18: 164-167
- 7 Wentz SC, Vnencak-Jones C, Chopp WV. Neuroendocrine and squamous colonic composite carcinoma: case report with molecular analysis. *World J Gastroenterol* 2011; 17: 4729-4733
- 8 Satoh Y, Mori K, Kitano K, Kitayama J, Yokota H, Sasaki H, Uozaki H, Fukayama M, Seto Y, Nagawa H, Yatomi Y, Takai D. Analysis for the combination expression of CK20, FABP1 and MUC2 is sensitive for the prediction of peritoneal recurrence in gastric cancer. *Jpn J Clin Oncol* 2012; 42: 148-152
- 9 Auf FA, El-Eibdy GK, Mosaad YM, El-Ghannam DM, El-Masry EE. Cytokeratin 20 and vascular endothelial growth factor as molecular markers in Egyptian patients with colorectal cancer. *J Oncol Pharm Pract* 2011; 17: 160-167
- 10 Lagoudianakis EE, Kataki A, Manouras A, Memos N, Papadima A, Derwentzi A, Zografos G, Papadopoulos S, Katergiannakis V, Konstadoulakis MM. Detection of epithelial cells by RT-PCR targeting CEA, CK20, and TEM-8 in colorectal carcinoma patients using OncoQuick density gradient centrifugation system. *J Surg Res* 2009; 155: 183-190
- 11 Shen C, Hu L, Xia L, Li Y. Quantitative real-time RT-PCR detection for survivin, CK20 and CEA in peripheral blood of colorectal cancer patients. *Jpn J Clin Oncol* 2008; 38: 770-776
- 12 王科伟,范海银,孔凡民,董明.结直肠癌肝转移的预后因素. *世界华人消化杂志* 2011; 19: 3088-3093
- 13 Lim SW, Huh JW, Kim YJ, Kim HR. Laparoscopic low anterior resection for hematogenous rectal metastasis from gastric adenocarcinoma: a case report. *World J Surg Oncol* 2011; 9: 148
- 14 Huh JW, Kim YJ, Kim HR. Complete peritonectomy and intraperitoneal chemotherapy for recurrent rectal cancer with peritoneal metastasis. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 756-757
- 15 Georges R, Bergmann F, Hamdi H, Zepp M, Eyol E, Hielscher T, Berger MR, Adwan H. Sequential bi-phasic changes in claudin1 and claudin4 expression are correlated to colorectal cancer progression and liver metastasis. *J Cell Mol Med* 2012; 16: 260-272
- 16 Paschos KA, Majeed AW, Bird NC. Role of Kupffer cells in the outgrowth of colorectal cancer liver metastases. *Hepatol Res* 2010; 40: 83-94
- 17 刘彦龙,杨艳梅,王锡山.314例直肠癌患者术后复发转移形式及其预后. *中华胃肠外科杂志* 2010; 13: 572-576
- 18 Su BB, Shi H, Wan J. Role of serum carcinoembryonic antigen in the detection of colorectal cancer before and after surgical resection. *World J Gastroenterol* 2012; 18: 2121-2126
- 19 Mescoli C, Albertoni L, Pucciarelli S, Giacomelli L, Russo VM, Fassan M, Nitti D, Rugge M. Isolated tumor cells in regional lymph nodes as relapse predictors in stage I and II colorectal cancer. *J Clin*

- Oncol* 2012; 30: 965-971
- 20 Zeestraten EC, Maak M, Shibayama M, Schuster T, Nitsche U, Matsushima T, Nakayama S, Gohda K, Friess H, van de Velde CJ, Ishihara H, Rosenberg R, Kuppen PJ, Janssen KP. Specific activity of cyclin-dependent kinase 1 is a new potential predictor of tumour recurrence in stage II colon cancer. *Br J Cancer* 2012; 106: 133-140
- 21 Shanmugam C, Hines RB, Jhala NC, Katkooi VR, Zhang B, Posey JA, Bumpers HL, Grizzle WE, El-toum IE, Siegal GP, Manne U. Evaluation of lymph node numbers for adequate staging of Stage II and III colon cancer. *J Hematol Oncol* 2011; 4: 25
- 22 Lips DJ, Koebrugge B, Liefers GJ, van de Linden JC, Smit VT, Puijdt HF, Putter H, van de Velde CJ, Bosscha K. The influence of micrometastases on prognosis and survival in stage I-II colon cancer patients: the Enroute® Study. *BMC Surg* 2011; 11: 11
- 23 Grothey A. Does stage II colorectal cancer need to be redefined? *Clin Cancer Res* 2011; 17: 3053-3055

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 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)

欠发达地区结核性腹膜炎40例

宋怀宇, 王波

■背景资料

结核性腹膜炎(TBP)是我国常见的肺外结核之一,其症状隐匿多变,实验室和辅助检查缺乏特异性,诊断和鉴别诊断仍是临床的难点。

宋怀宇, 王波, 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

宋怀宇, 医学博士, 主任医师, 主要从事消化疾病尤其是肠道屏障功能的基础和临床研究。

作者贡献分布: 宋怀宇负责数据分析、总结和文章撰写; 王波负责病例资料的收集、整理。

通讯作者: 宋怀宇, 主任医师, 530021, 广西壮族自治区南宁市桃源路6号, 广西壮族自治区人民医院消化内科。

huaiyu_song@sina.com

电话: 0771-2186184

收稿日期: 2012-05-02 修回日期: 2012-06-09

接受日期: 2012-06-30 在线出版日期: 2012-07-28

Tuberculous peritonitis in patients from an underdeveloped region: A retrospective analysis of 40 cases

Huai-Yu Song, Bo Wang

Huai-Yu Song, Bo Wang, Department of Gastroenterology, People's Hospital of Guangxi, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Correspondence to: Huai-Yu Song, Chief Physician, Department of Gastroenterology, People's Hospital of Guangxi, 6 Taoyuan Road, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. huaiyu_song@sina.com

Received: 2012-05-02 Revised: 2012-06-09

Accepted: 2012-06-30 Published online: 2012-07-28

Abstract

AIM: To investigate the characteristics of tuberculous peritonitis in patients from an underdeveloped region.

METHODS: The clinical data for 40 patients with tuberculous peritonitis were analyzed to summarize the features of tuberculosis peritonitis in terms of its history, clinical manifestations, laboratory testing, auxiliary examination, diagnosis, and differential diagnosis.

RESULTS: In our series, tuberculous peritonitis was more common in patients between 20-40 years old (57.5%), and only 22.5% of patients had a previous history of tuberculosis or chronic diseases. Tuberculous peritonitis usually had a chronic onset (85%). Common manifestations were abdominal distention (85%), anorexia

(67.5%), fever (52.5%), and abdominal pain (47.5%). The signs of ascites (67.5%) and abdominal tenderness (65%) were common. Serological tests had low specificity. Ascites was exudative. Ascites ADA > 33 U/L and monocyte predominance may contribute to the diagnosis of tuberculous peritonitis. The positive rates of ascites acid-fast bacillus smear and Mycobacterium tuberculosis culture were low (4.75% and 0%, respectively). The positive rate of PPD test and abnormal rate of chest X-ray were both 37.5%. The abnormal rate of abdominal CT and B-mode ultrasound scan were both 78%. The uterus and annexes were involved in 72.7% of female TBP patients. Five cases (12.5%) were misdiagnosed, of whom 3 were misdiagnosed as gynecologic tumors. Only 4 cases (10%) were confirmed by microbiology or pathology, and the remaining 36 cases (90%) relies on experimental anti-TB treatment to achieve the diagnosis.

CONCLUSION: In underdeveloped regions, the vast majority of tuberculous peritonitis cases are diagnosed by experimental anti-TB treatment due to the limited availability of laparoscopy or B ultrasound-guided biopsy.

Key Words: Tuberculous peritonitis; Retrospective analysis; Literature review

Song HY, Wang B. Tuberculous peritonitis in patients from an underdeveloped region: A retrospective analysis of 40 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(21): 1998-2005

摘要

目的: 总结结核性腹膜炎(tuberculous peritonitis, TBP)临床特点, 进一步提高临床医生对TBP的认识水平。

方法: 收集40例TBP患者的病例资料, 对其发病情况、临床表现、实验室和辅助检查、诊疗经过等方面进行回顾性分析并复习文献。

结果: 本组TBP患者年龄以20-40岁为高发(57.5%), 仅22.5%的病例既往有结核病史或慢性疾病史。发病以慢性起病多见(85.0%), 症状以腹胀(85.0%)、食欲减退(67.5%)、发

■同行评议者

陆伦根, 教授, 上海交通大学附属第一人民医院消化科

热(52.5%)、腹痛(47.5%)常见。体征以腹水(67.5%)、腹痛(65.0%)多见, 腹壁柔韧感少见(35.0%)。血清学检查特异性低, 腹水多呈渗出液的特点, 但腹水ADA>33 U/L, 单核细胞占优势等有助于诊断TBP的特点较少见(16.0%-34.0%)。腹水抗酸杆菌涂片和结核菌培养阳性率低(4.75%, 0%)。PPD实验和胸部X线的阳性率均为37.5%。CT和B超检查多数表现为腹水、腹膜增厚、粘连等(78%), 女性患者子宫、附件受累常见(72.7%)。本组TBP患者误诊5例, 误诊率为12.5%, 最常见是误诊为妇科肿瘤($n=3$)。仅4例患者(10%)获病原学或病理确诊, 其余90%依靠试验性抗结核治疗获得诊断。

结论: 在欠发达地区, 目前依靠腹腔镜、B超引导下活检等手段获得病理标本, 确诊TBP的比例仍很低。绝大部分TBP病例诊断主要依靠试验性抗结核治疗及对疗效的动态观察。临床医生能够怀疑到TBP的可能并积极试验性抗结核治疗是TBP诊断的关键。对2 wk试验性抗结核治疗效果不好的病例, 要动员患者接受更积极的腹腔镜检查, 以免贻误病情。

关键词: 结核性腹膜炎; 回顾性分析; 文献复习

宋怀宇, 王波. 欠发达地区结核性腹膜炎40例. 世界华人消化杂志 2012; 20(21): 1998-2005
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1998.asp>

0 引言

结核性腹膜炎(tuberculous peritonitis, TBP)是由结核杆菌引起的慢性弥漫性腹膜感染, 是临床常见的肺外结核之一, 在世界范围内, TBP占全部结核病例的0.1%-0.7%^[1]。随着更多诊断手段的出现, 当前对TBP的诊断水平较以前有所提高。但TBP的临床表现隐匿多样而不典型, 目前常用的实验室检查及辅助检查虽能提供一些诊断线索, 但特异性较差; 而结核菌的病原学检出率低, 腹腔镜或超声引导下的活检虽能确诊, 但在临床实践中难以普及, 临床依靠病理确诊的病例较少, 即使有经验的临床医师对TBP的诊断和鉴别诊断也感到棘手。本研究拟对近5年来广西壮族自治区人民医院消化内科收治的TBP病例进行回顾性分析并结合文献复习, 尝试从临床角度对TBP的一些疾病特点进行总结, 希望对临床医生加深TBP的了解, 完善诊断思维有一定的启发和帮助。

1 材料和方法

1.1 材料 2006-01/2010-12在广西壮族自治区人

民医院消化科住院, 有完整住院病历资料, 并诊断为“结核性腹膜炎”的患者。病例的纳入标准: 符合确诊和拟诊标准的病例纳入本次研究。确诊标准: 腹水结核菌培养获得结核菌; 腹水涂片抗酸杆菌染色阳性; 腹腔镜检查或手术探查病理发现干酪样肉芽肿或结核结节, 符合上述任一点的视为确诊。拟诊标准: 综合临床表现、实验室检查、辅助检查拟诊为结核性腹膜炎, 经2 wk试验性抗结核治疗有效。病例的排除标准: (1)腹腔恶性肿瘤或转移癌; (2)其他非结核原因导致的腹膜炎; (3)能够引起腹水的其他非结核疾病; (4)经2 wk标准4联抗结核药物治疗, 病情无好转, 患者无法继续检查以明确诊断的。符合上述几种情况之一的予以排除。

1.2 方法

1.2.1 对象筛选: 采用回顾性研究的方法, 从广西壮族自治区人民医院病历资料库中选取符合上述纳入标准的TBP患者共40例, 其中男18例, 女22例, 男女比例为1:1.22。最小年龄13岁, 最大年龄75岁, 平均年龄34.1岁±4.7岁。

1.2.2 观察项目及指标: (1)流行病学: 本组TBP患者的住院发病率、性别比例、发病年龄及职业特点等; (2)TBP患者的既往史或合并其他疾病情况, TBP患者的既往诊疗经过; (3)TBP的临床表现, 包括主诉、临床症状及体征诸因素; (4)TBP的实验室检查, 包括血常规、肿瘤抗原指标、血沉、抗结核抗体, 腹水常规、腹水特殊检查、结核菌培养及腹水抗酸染色等; (5)TBP的辅助检查, 包括腹部、盆腔超声、腹部CT、腹腔镜检查、PPD试验等; (6)TBP的治疗经过和疗效判定。

1.2.3 试验性抗结核治疗的疗效判定标准: (1)治愈: 临床症状, 体征消失, 各项检查指标恢复正常; (2)好转: 临床症状, 体征改善伴各项异常检查指标降低; (3)无效: 临床症状, 体征无变化, 各项异常指标无好转; (4)恶化: 临床症状或体征加重, 各项指标无好转或恶化。

统计学处理 主要采用百分率和均数的分析。计量资料采用mean±SD表示, 用SPSS13.0统计软件进行处理。

2 结果

2.1 本组TBP患者的信息统计 本组TBP患者5年期间的平均住院患病率为0.737%(40/5422), 患者主诉的发病时间为11-90 d, 平均37.55 d±25.94 d; 本组TBP的患者好发年龄主要集中在20-40岁

■研究前沿

本研究回顾性总结少数民族、欠发达地区40例TBP的临床诊疗特点并结合文献复习TBP的诊疗现状, 以帮助临床医生加深对TBP的了解。

■相关报道

目前,国内也有对TBP临床总结的文章,但总的来讲,只偏重于个人临床经验总结,没有结合文献复习,无法让人较为全面地了解TBP的诊疗进展。

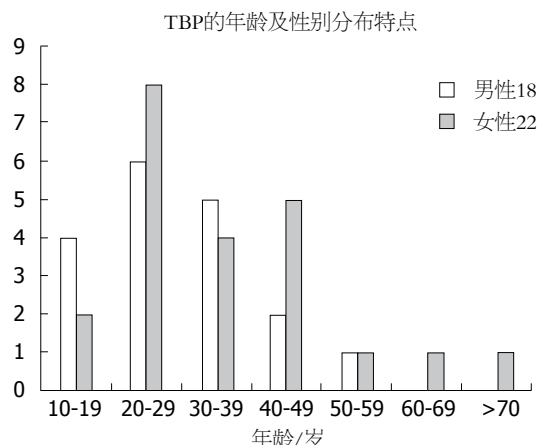


图1 本组TBP患者性别、年龄段分布特点.

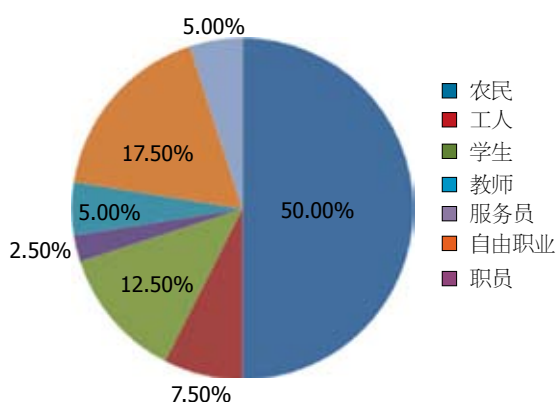


图2 本组TBP患者职业分布特点.

(57.5%, 23/40), 男女比例为1:1.22(图1); 本组TBP农民和工人占总发病者的57.5%, 提示低收入、卫生条件差是TBP的易患因素之一(图2); 本组TBP患者中77.5%既往无基础疾病, 既往有结核病史或其他慢性病史的患者仅占总人数的22.5%, 提示既往结核病史或慢性疾病不是诊断TBP的必要条件(图3).

2.2 本组TBP患者临床症状、体征出现的频率和百分比 本组TBP患者的主要症状依次是腹胀、食欲减退、发热和腹痛(47.5%-85%), 而典型的结核全身症状如盗汗、干咳、乏力等的比例较低(15.7%-37.5%). 体征以腹水征、腹部压痛为主(65%), 仅35%的患者具有腹壁柔韧感(表1).

2.3 本组TBP患者的腹水检查 本组TBP患者的腹水多表现为渗出液的特点, WBC $>500 \times 10^6/L$, 李凡他实验(+), 腹水蛋白 $>25 g/L$, 而腹水单核细胞占优势, 血清腺苷脱氨酶(adenosine deaminase, ADA) $>33 U$ 等对结核具有一定提示意义的指标阳性率较低(16%-34%). 直接腹水抗酸杆菌涂片的阳性率很低(4.75%), 而2例腹水结核菌培养的阳性率为0%(图4).

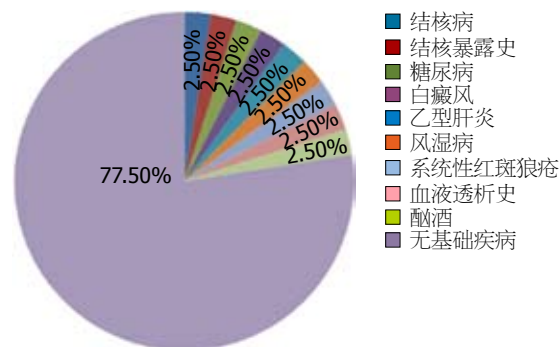


图3 本组TBP患者合并基础疾病情况.

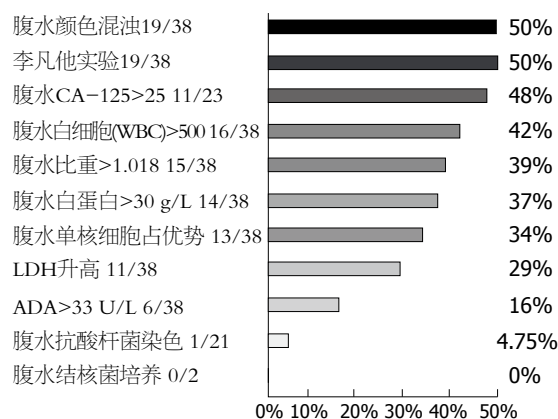


图4 本组TBP患者腹水检查结果分析.

2.4 本组TBP患者的血清学检查 本组TBP患者的血清学检查以非特异性的血红蛋白(hemoglobin, Hgb)降低, C反应蛋白(C reaction protein, CRP)、血沉(ESR)增高多见(47.5%-72.5%); 血清抗结核抗体、ADA $>33 U$ 的阳性率仅10%-17.5%. 而值得注意的是本组患者血清CA125、CA19-9的阳性率均在40%左右, 尚需进一步研究(图5).

2.5 本组TBP患者的辅助检查 本组TBP患者胸部X线和PPD的阳性率均为37.5%, 但活动性肺结核的比例仅5.0%. 腹部、盆腔B超和腹部CT的异常率为78%, 主要表现为腹水、腹膜增厚、粘连等. 本组22例女性患者经B超和CT发现子宫、附件异常的比例分别为72.7%、55.0%, 说明女性TBP患者子宫附件受累非常常见(表2).

2.6 本组TBP患者诊治经过的分析 本组40例TBP患者, 35例(87.5%)属转诊患者, 其中25例(62.5%)在1家基层医院住院未获确诊, 10例(25%)入住2家基层医院未获确诊. 入住我院后, 入院初诊和最后诊断符合率为87.5%. 误诊5例, 包括妇科肿瘤3例、乙肝肝硬化腹水1例、急性化脓性腹膜炎1例. 住院天数为8-60 d, 平均 $21.52 d \pm 9.56 d$; 入院后开始试验性抗结核治疗的天数为5-15 d, 平均 $8.57 d \pm 2.69 d$. 本组40例TBP患者,

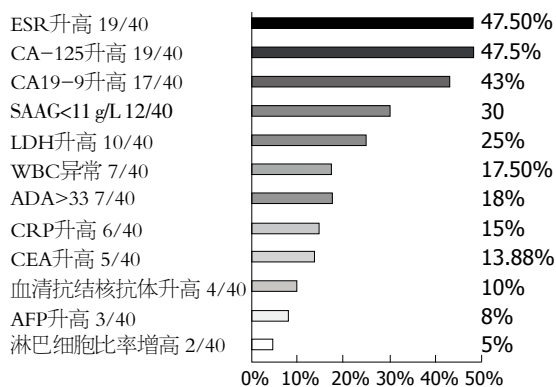


图 5 本组TBP患者血清学检查结果分析.

表 1 本组TBP患者的症状和体征表

项目	出现的频次和百分率(%)
主诉出现的时间	
急性起病(7 d以内)	0/40(0)
亚急性起病(7-14 d)	6/40(15)
慢性起病(>14 d)	32/40(85)
临床症状	
腹胀	34/40(85)
食欲减退	27/40(67.5)
发热	21/40(52.5)
腹痛	19/40(47.5)
体质量减轻	18/40(45)
厌食	17/40(42.5)
乏力	15/40(37.5)
畏寒	12/40(30)
盗汗	8/40(20)
干咳	6/40(15)
恶心, 呕吐	5/40(12.5)
肠梗阻	2/40(5)
体征	
腹水	27/40(67.5)
腹部压痛	26/40(65)
腹壁柔韧感	14/40(35)
肝脾肿大	6/40(15)
周围淋巴结肿大	3/40(7.5)
腹部、盆腔包块	0/40(0.0)

确诊4例(10.0%), 病原学诊断1例(2.5%), 病理诊断病例3例(7.5%). 其中腹腔镜观察并活检干酪样结节2例, 1例系临床怀疑妇科肿瘤, 经手术探查确认为结核性腹膜炎. 其余36例(90.0%)均采用试验性抗结核治疗的方法, 经4联抗结核治疗2 wk, 取得临床好转.

3 讨论

本组TBP病例来自我国少数民族、经济欠发达地区. 本文结果显示TBP任何年龄均可发病, 但

表 2 本组TBP患者辅助检查情况表

项目	总异常率(%)	异常的项目	百分比(%)
腹盆腔B超	28/36(78)	腹水	19/36(52.77)
		肝脾大	5/36(13.89)
		腹膜萎缩	3/36(8.30)
		腹膜增厚	3/36(8.30)
		钙化点	2/36(5.6)
		卵巢肿大	16/22(72.7)
		腹部包块	3/40(7.5)
腹、盆腔CT	25/32(78)	腹水	18/32(56)
		腹膜增厚	14/32(43.75)
		腹膜粘连	8/32(25)
		腹腔淋巴结肿大	6/32(18.7)
		大网膜粘连	5/32(15.6)
		腹部包块	3/32(9.3)
		卵巢肿大	11/20(55)
胸部X线	15/40(37.5)	胸膜增厚, 粘连	6/40(15)
		胸腔积液	6/40(15)
		活动性肺结核	2/40(5)
		肺感染	1/40(2.5)
PPD试验	15/40(37.5)		
腹腔镜	2/40(5)	腹膜增厚	100
		粟粒样结节	100
		粘连	50
		腹水	100

以20-40岁为高发年龄段, 男女比例为1:1.22, 无明显性别差异. TBP的易患人群主要为生活贫困、卫生条件相对较差的农民、工人, 共占57.5%, 这与报道相一致^[2,3]. 有报道提及在有慢性肝病、糖尿病、自身免疫性疾病、酗酒者, 应用糖皮质激素、化疗及艾滋病等患者人群发病率增加^[4-6]. 本研究的结果支持这一结论, 但也要注意到本研究中77.5%的患者并没有合并慢性疾病, 提示我们既往结核感染暴露史和/或合并慢性疾病不是诊断TBP的必要条件.

TBP的发病一般是急性或慢性的过程, 其症状的出现从数周到数月不等^[3], 本组患者的主诉发病时间11-90 d, 平均37.5 d, 其中亚急性发病15%, 慢性发病85%, 与之相符. TBP根据其腹腔镜下形态可分为腹水型、干酪型和粘连型3种^[7]. 他们的临床症状基本相同, 只是干酪型腹胀症状不明显. 常见的TBP以腹水型最多, 干酪型次之, 粘连型最少, 在TBP的实际发病过程中, 常是1-2种亚型共存. 有报道TBP症状的主要表现是: 腹水(73.0%)、腹痛(64.5%)、体质量减轻(61.0%)、发热(59.0%)、腹壁柔韧感(47.7%)、肝脾大(42.5%)、腹泻(21.4%)、肠梗阻(11.0%)^[3], 本组的症状基本与之相符. 但本研究发现有盗汗、

■创新盘点

本研究是少数民族、欠发达地区TBP诊疗特点的临床总结, 并结合文献复习, 能让人较为全面地了解TBP的诊疗现状.

■应用要点

本研究有助于临床医生全面了解TBP的诊疗进展,并对欠发达地区TBP的诊疗有一定的借鉴意义。

乏力、消瘦等典型全身结核中毒症状的患者比例较低。有报道低热存在于59%的患者,但很多患者并不感觉发热,只有在住院密切观察体温时才有发热记录^[4,8],本研究中,发热患者占52.5%,35.0%的患者表现为弛张热,17.5%表现为稽留热。TBP患者的腹痛常表现为模糊的、定位不清的隐痛,考虑和结核所致炎症对腹膜和大网膜的刺激有关,但有不全梗阻时,可表现为间歇性钝痛^[3]。腹壁柔韧感是腹膜遭受轻度刺激或慢性炎症的一种表现,其他情况如细菌性腹膜炎或腹膜癌时也可有类似发现,只是在后者腹部压痛会更加明显,因此,腹部柔韧感不是TBP的特征性体征。TBP如果只根据临床表现诊断,其准确性只有35%-50%^[9],有一组报道TBP的确诊时间为6-26 d不等^[10],本研究开始试验性抗结核治疗的平均天数是8.5 d,平均住院天数21.5 d,与之基本相符,这也充分说明了TBP诊断的复杂性。

由于TBP起病隐匿,临床表现复杂多变,因此及时、准确的诊断TBP始终是临床面临的一个挑战,人们试图从多个方面进行诊断。TBP患者的血清学实验室指标主要表现出慢性炎症的一些特点,如贫血、ESR增快、CRP增高,并无明显特异性^[11]。有研究表明血清癌症抗原125(cancer antigen 125, CA125)、ADA与TBP的关系密切。CA125在正常人血清中含量甚微,但在机体有炎症或癌变时,便可释放到浆膜腔液中并进入体循环,导致血清及浆膜腔液CA125升高^[12]。ADA分布于在人体各组织中, T淋巴细胞比B淋巴细胞含量高。由于结核患者的T淋巴细胞含量显著高于其他患者,因此ADA含量在TBP中升高^[13]。但随后的研究显示血清CA125、ADA可在各种良恶性肿瘤、肝硬化腹水、结核性腹膜炎等疾病患者中升高,虽然敏感性较高,但其特异性较低,因此对鉴别TBP的意义不大^[14]。但在抗结核治疗的随访过程中, CA125可作为疗效评判指标^[15]。本组研究中,血清糖类抗原19-9(carbohydrate antigen 19-9, CA19-9)异常的患者达43%,但Sari等^[16]报道指出,血清CA19-9鉴别良恶性腹水的敏感性仅33.3%,特异性仅21.8%,推测本组中的血清CA19-9升高是非特异性的。

大部分TBP患者的腹水混浊, WBC在 $500-1\,500 \times 10^6/L$ 之间,腹水白蛋白 $>25-30\text{ g/L}$, 68%的患者以单核细胞为主^[3],我们的研究基本与之相符。但本组研究中腹水单核细胞占优势的比率仅32%,从我们有限的治疗经验来看,对一些腹水以多形核细胞占优势,临床不排除细

菌性腹膜炎的TBP患者,在经过7-10 d的抗生素治疗后,单核细胞分类会重新占优势,提示部分TBP患者可能会合并其他的细菌感染。但单核细胞占优势并不是可信赖的TBP诊断依据,只是有助于我们向TBP考虑。TBP时腹膜和大网膜由于慢性炎症的刺激,渗出增加,因此TBP患者腹水蛋白的含量常 $>25\text{ g/L}$,但并不具特异性。有报道TBP的患者100%出现血-腹水白蛋白梯度(serum ascites albumin gradient, SAAG) $<11\text{ g/L}$,但其特异性仍很低^[17,18];然而本组仅30%的患者SAAG $<11\text{ g/L}$ 。目前认为SAAG最有价值的用处在于判断是否存在门静脉高压, SAAG $>11\text{ g/L}$ 往往提示门静脉高压,其准确率达97%^[18],但对TBP的诊断价值有限。

Shakli等^[19]报道只要是腹膜存在炎症,腹水中的乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)就会升高,因为炎症导致LDH从中性粒细胞中释放出来,以LDH $>90\text{ U/L}$ 诊断TBP的敏感性达到90%,但特异性只有14%。综合多个研究报道,LDH测定TBP的敏感性约77%^[3],但本研究仅29%的患者LDH升高,LDH升高同样可以出现在肝硬化、细菌性或癌性腹水^[20],因此LDH测定诊断TBP的意义并不明确。

腹水CA125升高,曾一度被认为对TBP的诊断有帮助,但随后的研究证明所有腹水的患者都有腹水CA125不同程度的升高^[21,22],因此,腹水CA125对TBP诊断的特异性非常有限。

Bhargava等^[13]发现结核性腹水患者血清及腹水中ADA活性均显著升高, Hong等^[23]的研究也有类似的结论。Harlan等^[24]研究发现通过检测腹水中ADA活性诊断结核性腹水的敏感性为100%,特异性为94.1%-99.0%的特异性和敏感性分别达97%、100%^[25,26]。ADA的诊断价值除与实验方法有关外,还与是否是结核菌的高发感染区有关,有报道在美国腹水ADA测定的特异性只有30%,作者分析可能和美国是结核低感染区有关^[27]。但本组仅16%的患者腹水ADA $>33\text{ U/L}$,推测可能和测定方法的不同有关。但目前认为,与腹水LDH、CA125、腹水常规检查等相比,腹水ADA检测TBP的价值还是较受肯定^[28]。

腹水抗酸杆菌染色(ziehl-neelsen stain)的阳性率0%-6%不等^[29],有报道称如欲获得腹水抗酸杆菌涂片染色阳性,每毫升腹水抗酸杆菌至少需5 000条以上。综合615例TBP患者,腹水抗酸杆菌染色只有2.93%的阳性率^[3],本组资料的阳性率为4.75%,可能和入选人数太少有关。因此

这项检查对TBP的诊断价值不能期望太高。

结核杆菌(*mycobacterium tuberculosis*, MTB)培养的阳性率报道不一, 综合多家文献报道, 腹水MTB培养的阳性率在34.75%^[3], 一般是常规取10-15 mL腹水送检, 但MTB常规的培养方法周期较长, 约4-8 wk, 另加7 d的药敏实验时间^[3]。有报道采用腹水浓缩的办法可以提高腹水涂片和培养的阳性率^[29], 方法是收集1 L腹水, 离心浓缩后送检, 但TBP本身腹水量较少, 况且如此多的腹水只能分次离心, 因此在临床难以推广。另外一种方法就是BACTEC radiometric system, 据报道平均检测时间是14 d^[29], 但对于临床患者和医生来说, 这仍是一个较长的时间概念, 而且如果单纯等待培养结果而推迟开始治疗的时间, 将导致病死率的增加^[29]。

PPD试验是判断是否有结核菌感染的传统方法, 但其阳性率临床报道差别较大, 不同国家和地区的报道由15%-100%各不相同, 综合的阳性率大概在53%^[3]。导致结果差异大的原因和PPD试验方法、PPD抗原强度以及阳性概念的解释有关。为此, 美国胸科协会2000年建议PPD试验在低感染可能地区的阳性标准为15 mm, 在中等感染可能的地区阳性标准为10 mm, 而在高感染可能的地区阳性标准为5 mm^[30]。近年来发展出了一种基于干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ)检测的实验手段, 据报道其敏感性达89%^[31]。这种实验原理是基于已经被MTB致敏的T淋巴细胞被PPD刺激时会释放IFN- γ , 以此来定量检测及判断是否感染MTB, 其敏感性和特异性均较PPD为佳。但不管怎样, 这2种方法仍无法鉴别是既往还是现症活动性结核感染。Saleh等^[32]采用QuantiFERON-Gold (QFT-G) assay测定41例TBP患者血中的IFN- γ , 认为此方法快速诊断TBP的敏感性达92.9%, 特异性达100%。而Sharma等^[33]报道测定31例TBP腹水和88例非TBP腹水, 认为测定腹水IFN- γ 对TBP敏感性和特异性均达97%, 但这种实验方法尚未在我国临床普及。

TBP患者胸部X线检查报道的阳性率差别较大, 19%-83%不等, 综合数个研究报道1 000例患者胸部X线阳性率在38.5%, 但只有14%的患者被证实有活动性肺结核^[3]。本组患者胸部X线的阳性率为37.5%, 活动性肺结核仅5.0%, 与之基本相符。

由于TBP腹水的量多为少-中量, 部分患者体检不易发现, Marshall报道有18%的TBP患者, 其腹水首先被影像学检查发现或在手术中

发现^[2], 另有5%-13%的TBP患者是“非腹水型TBP”。因此我们在临床上要强调B超的作用, B超价廉、无辐射, 本组B超发现异常的几率为78%, 对慢性腹痛、腹胀主诉的患者, 要进行腹部B超的检查, 对女性要加做子宫、附件和盆腔的B超, 以提高TBP的发现率。本组研究女性TBP患者, 子宫附件受累及的比率高达72.5%。TBP患者B超的图像表现为^[34,35]: (1)腹部淋巴结肿大并低回声区; (2)局限或分隔的腹水; (3)不同程度的粘连现象; (4)包块; (5)大网膜与腹膜增厚。需要指出的是, 腹水分隔征象可出现于肿瘤、淋巴瘤和任何非结核性的腹水, 因此并不具有特异性^[36]。

有研究采用影像学引导下的腹膜活检来诊断TBP, 18例TBP患者中84%的活检组织发现结核性肉芽肿, 100%的活检组织抗酸杆菌涂片阳性^[37]。另一组报道采用B超引导下穿刺诊断114例TBP患者, 认为其敏感性和特异性分别达95.6%和92.9%, 特别适用于腹膜增厚或盆腹腔包块的患者, 刘东屏等^[38]和Que等^[39]的研究也有类似的结论。

TBP腹部CT的主要表现为^[17,40-42]: (1)腹部淋巴结肿大, 边缘增强; (2)腹膜弥漫性不规则增厚; (3)肠系膜和肠壁增厚; (4)腹水; (5)粘连、结核结节或包块等。其显示效果较B超更清晰, 结合B超可作出更准确的判断, 本组研究腹部CT异常的比率在78%。

腹腔镜作为TBP的诊断手段, 不仅可以直视下观察腹膜、网膜的病变, 还可以取病理活检, 是确诊TBP的关键。有研究曾将TBP腹腔镜下的检查所见分3型: (1)渗出型: 腹膜增厚、充血伴腹水和弥漫性分布于腹膜、大网膜和器官的3-5 mm的黄白色粟粒状结节, 占66%; (2)粘连型: 腹膜增厚伴腹水, 可有或无粘连, 占21%; (3)干酪型: 显著增厚的壁层腹膜有黄白色结节状干酪样物质, 伴多发性粘连, 占13%^[3,7]。有报道总结397例TBP患者腹腔镜下直视的诊断敏感率为92.7%, 402例患者腹腔镜下病理活检的敏感率为93.0%, 可见腹腔镜在诊断TBP的优势^[3]。但腹腔镜价格昂贵, 并且需要麻醉, 系有创性检查, 其并发症包括出血、感染、肠穿孔等, 发生率2.0%-6.5%不等^[23], 这使得欠发达地区的许多患者望而却步。本组40例患者中仅2例(5%)是行腹腔镜检查并行腹膜活检病理见干酪性肉芽肿而确诊, 1例患者行剖腹探查明确诊断。

TBP的治疗一般给予标准4联抗结核治疗

■同行评价

本研究回顾性分析了40例欠发达地区TBP患者的发病过程、临床特点、诊断方法和诊疗过程, 从中总结出该地区新时期TBP的发病规律和特点, 并比较了各种检查手段在TBP诊断中的意义, 具有较好的创新性和临床参考价值。

方案,对于初治患者,异烟肼(INH)、利福平(RFP)、吡嗪酰胺(PZA)、乙胺丁醇(EMB)联合用药2 mo后,再给予异烟肼、利福平服用4 mo,总疗程6 mo。有研究比较6 mo和9 mo,9 mo和12 mo抗结核方案治疗TBP的疗效,认为6 mo的总疗程足够^[4,17]。有人认为有严重腹水或病变严重的病例可以考虑短期糖皮质激素的治疗,在抗结核治疗的同时辅助短期激素可以有一定的抗炎作用,并可防止炎症继发的肠粘连和肠梗阻,降低TBP的并发症^[43];但总的来看,辅助激素治疗尚缺乏严谨的循证医学证据支持。本组40例患者在给予2 wk的HREZ方案抗结核治疗后,均获临床好转。

此外,我们也充分了解到本研究的局限性:(1)本组研究获得明确病原学或病理证实的病例太少(10%),绝大部分病例是通过试验性抗结核的疗效来评判,主观因素偏多;(2)缺乏长时间的随访,特别是为期6 mo的长期抗结核疗效的随访,这些都使得本组研究TBP诊断的可靠性下降。但我们认为,本研究5%的腹腔镜检查率、87.5%的转诊率、25.0%的患者辗转3家医院始得确诊、即使是上级医院仍有12.5%的误诊率,也是我国少数民族、欠发达地区TBP治疗现状的真实反映。

在少数民族、欠发达地区,由于人民生活水平和医疗资源等方面的限制,从目前来看,要求TBP的患者都靠腹腔镜获取病理结果来确诊既不可能也不现实。由于中国是结核病的高发区^[44],因此在结核高发的欠发达地区,基层医院的临床医师要充分了解并考虑到TBP的可能性,在采用排除法排除心、肝、胰腺、肾及肿瘤等常见原因的腹水后,要积极采用试验性抗结核治疗的方法,在2 wk的观察期内初步判断抗结核治疗的疗效,以决定下一步的诊疗方案。过分依赖各种实验室及辅助检查的结果或犹豫不决可能导致病情的恶化,有报道TBP患者在等待明确诊断期间,有80%的患者临床情况恶化^[29]。对于2 wk试验性抗结核治疗效果不明显的病例,则要果断地建议患者接受更为积极的腹腔镜探查等措施,以免贻误病情。对于女性TBP患者要特别警惕和子宫、附件和盆腔肿瘤的鉴别。

4 参考文献

- 1 Chow KM, Chow VC, Szeto CC. Indication for peritoneal biopsy in tuberculous peritonitis. *Am J Surg* 2003; 185: 567-573
- 2 Marshall JB. Tuberculosis of the gastrointestinal tract and peritoneum. *Am J Gastroenterol* 1993; 88:

989-999

- 3 Sanai FM, Bzeizi KI. Systematic review: tuberculous peritonitis--presenting features, diagnostic strategies and treatment. *Aliment Pharmacol Ther* 2005; 22: 685-700
- 4 Aguado JM, Pons F, Casafont F, San Miguel G, Valle R. Tuberculous peritonitis: a study comparing cirrhotic and noncirrhotic patients. *J Clin Gastroenterol* 1990; 12: 550-554
- 5 Braun MM, Byers RH, Heyward WL, Ciesielski CA, Bloch AB, Berkelman RL, Snider DE. Acquired immunodeficiency syndrome and extrapulmonary tuberculosis in the United States. *Arch Intern Med* 1990; 150: 1913-1916
- 6 Rieder HL, Kelly GD, Bloch AB, Cauthen GM, Snider DE. Tuberculosis diagnosed at death in the United States. *Chest* 1991; 100: 678-681
- 7 Bhargava DK, Shriniwas P, Nijhawan S, Dasarathy S, Kushwaha AK. Peritoneal tuberculosis: laparoscopic patterns and its diagnostic accuracy. *Am J Gastroenterol* 1992; 87: 109-112
- 8 Bastani B, Shariatzadeh MR, Dehdashti F. Tuberculous peritonitis--report of 30 cases and review of the literature. *Q J Med* 1985; 56: 549-557
- 9 al-Hadeedi S, Walia HS, al-Sayer HM. Abdominal tuberculosis. *Can J Surg* 1990; 33: 233-237
- 10 Singh-Ranger D, Rockall T, Narward AH, Haldane M, Abrahams R, McDonald P. Abdominal tuberculosis: the problem of diagnostic delay. *Scand J Infect Dis* 1999; 31: 517
- 11 Uygur-Bayramicli O, Dabak G, Dabak R. A clinical dilemma: abdominal tuberculosis. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 1098-1101
- 12 Visser CE, Brouwer-Steenbergen JJ, Betjes MG, Koomen GC, Beelen RH, Krediet RT. Cancer antigen 125: a bulk marker for the mesothelial mass in stable peritoneal dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 1995; 10: 64-69
- 13 Bhargava DK, Gupta M, Nijhawan S, Dasarathy S, Kushwaha AK. Adenosine deaminase (ADA) in peritoneal tuberculosis: diagnostic value in ascitic fluid and serum. *Tubercle* 1990; 71: 121-126
- 14 Sevinc A, Camci C, Turk HM, Buyukberber S. How to interpret serum CA 125 levels in patients with serosal involvement? A clinical dilemma. *Oncology* 2003; 65: 1-6
- 15 Mas MR, Cömert B, Sağlamkaya U, Yamanel L, Kuzhan O, Ateşkan U, Kocabalkan F. CA-125; a new marker for diagnosis and follow-up of patients with tuberculous peritonitis. *Dig Liver Dis* 2000; 32: 595-597
- 16 Sari R, Yildirim B, Sevinc A, Bahceci F, Hilmioglu F. The importance of serum and ascites fluid alpha-fetoprotein, carcinoembryonic antigen, CA 19-9, and CA 15-3 levels in differential diagnosis of ascites etiology. *Hepatogastroenterology* 2001; 48: 1616-1621
- 17 Demir K, Okten A, Kaymakoglu S, Dincer D, Basisik F, Cevikbas U, Ozdil S, Bostas G, Mungan Z, Cakaloglu Y. Tuberculous peritonitis--reports of 26 cases, detailing diagnostic and therapeutic problems. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001; 13: 581-585
- 18 Runyon BA, Montano AA, Akriviadis EA, Antillon MR, Irving MA, McHutchison JG. The serum-ascites albumin gradient is superior to the exudate-transudate concept in the differential diagnosis of ascites. *Ann Intern Med* 1992; 117: 215-220
- 19 Shakil AO, Korula J, Kanel GC, Murray NG, Reynolds TB. Diagnostic features of tuberculous perito-

- nititis in the absence and presence of chronic liver disease: a case control study. *Am J Med* 1996; 100: 179-185
- 20 Sevinc A, Sari R, Fadillioglu E. The utility of lactate dehydrogenase isoenzyme pattern in the diagnostic evaluation of malignant and nonmalignant ascites. *J Natl Med Assoc* 2005; 97: 79-84
 - 21 Xiao WB, Liu YL. Elevation of serum and ascites cancer antigen 125 levels in patients with liver cirrhosis. *J Gastroenterol Hepatol* 2003; 18: 1315-1316
 - 22 Devarbhavi H, Kaese D, Williams AW, Rakela J, Klee GG, Kamath PS. Cancer antigen 125 in patients with chronic liver disease. *Mayo Clin Proc* 2002; 77: 538-541
 - 23 Hong KD, Lee SI, Moon HY. Comparison between laparoscopy and noninvasive tests for the diagnosis of tuberculous peritonitis. *World J Surg* 2011; 35: 2369-2375
 - 24 Harlan WR, Grimm IS. Tuberculous peritonitis: can ADA keep the laparoscope away? *Gastroenterology* 1997; 113: 687-689
 - 25 Dwivedi M, Misra SP, Misra V, Kumar R. Value of adenosine deaminase estimation in the diagnosis of tuberculous ascites. *Am J Gastroenterol* 1990; 85: 1123-1125
 - 26 Voigt MD, Kalvaria I, Trey C, Berman P, Lombard C, Kirsch RE. Diagnostic value of ascites adenosine deaminase in tuberculous peritonitis. *Lancet* 1989; 1: 751-754
 - 27 Hillebrand DJ, Runyon BA, Yasmineh WG, Rynders GP. Ascitic fluid adenosine deaminase insensitivity in detecting tuberculous peritonitis in the United States. *Hepatology* 1996; 24: 1408-1412
 - 28 Riquelme A, Calvo M, Salech F, Valderrama S, Pattillo A, Arellano M, Arrese M, Soza A, Viviani P, Letelier LM. Value of adenosine deaminase (ADA) in ascitic fluid for the diagnosis of tuberculous peritonitis: a meta-analysis. *J Clin Gastroenterol* 2006; 40: 705-710
 - 29 Chow KM, Chow VC, Hung LC, Wong SM, Szeto CC. Tuberculous peritonitis-associated mortality is high among patients waiting for the results of mycobacterial cultures of ascitic fluid samples. *Clin Infect Dis* 2002; 35: 409-413
 - 30 Targeted tuberculin testing and treatment of latent tuberculosis infection. This official statement of the American Thoracic Society was adopted by the ATS Board of Directors, July 1999. This is a Joint Statement of the American Thoracic Society (ATS) and the Centers for Disease Control and Prevention (CDC). This statement was endorsed by the Council of the Infectious Diseases Society of America (IDSA), September 1999, and the sections of this statement. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: S221-S247
 - 31 Pouchot J, Grasland A, Collet C, Coste J, Esdaile JM, Vinceneux P. Reliability of tuberculin skin test measurement. *Ann Intern Med* 1997; 126: 210-214
 - 32 Saleh MA, Hammad E, Ramadan MM, Abd El-Rahman A, Enein AF. Use of adenosine deaminase measurements and QuantiFERON in the rapid diagnosis of tuberculous peritonitis. *J Med Microbiol* 2012; 61: 514-519
 - 33 Sharma SK, Tahir M, Mohan A, Smith-Rohrberg D, Mishra HK, Pandey RM. Diagnostic accuracy of ascitic fluid IFN-gamma and adenosine deaminase assays in the diagnosis of tuberculous ascites. *J Interferon Cytokine Res* 2006; 26: 484-488
 - 34 Lingenfelter T, Zak J, Marks IN, Steyn E, Halkett J, Price SK. Abdominal tuberculosis: still a potentially lethal disease. *Am J Gastroenterol* 1993; 88: 744-750
 - 35 Demirkazik FB, Akhan O, Ozmen MN, Akata D. US and CT findings in the diagnosis of tuberculous peritonitis. *Acta Radiol* 1996; 37: 517-520
 - 36 Sheikh A. TB or not TB. *BMJ* 1999; 318: 979
 - 37 Vardareli E, Kebapci M, Saricam T, Pasaoglu O, Açikalin M. Tuberculous peritonitis of the wet ascitic type: clinical features and diagnostic value of image-guided peritoneal biopsy. *Dig Liver Dis* 2004; 36: 199-204
 - 38 刘东屏, 贺庆娟, 王学梅, 孙明军. 经皮超声引导下腹膜穿刺活检诊断结核性腹膜炎的临床实用性分析. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 567-569
 - 39 Que Y, Wang X, Liu Y, Li P, Ou G, Zhao W. Ultrasound-guided biopsy of greater omentum: an effective method to trace the origin of unclear ascites. *Eur J Radiol* 2009; 70: 331-335
 - 40 Malik A, Saxena NC. Ultrasound in abdominal tuberculosis. *Abdom Imaging* 2003; 28: 574-579
 - 41 Suri S, Gupta S, Suri R. Computed tomography in abdominal tuberculosis. *Br J Radiol* 1999; 72: 92-98
 - 42 Rasheed S, Zinicola R, Watson D, Bajwa A, McDonald PJ. Intra-abdominal and gastrointestinal tuberculosis. *Colorectal Dis* 2007; 9: 773-783
 - 43 Alrajhi AA, Halim MA, al-Hokail A, Alrabiah F, al-Omran K. Corticosteroid treatment of peritoneal tuberculosis. *Clin Infect Dis* 1998; 27: 52-56
 - 44 Chan ED, Iseman MD. Current medical treatment for tuberculosis. *BMJ* 2002; 325: 1282-1286

编辑 张姗姗 电编 鲁亚静

益生菌预防成人抗生素相关性腹泻的荟萃分析

张春东, 戴冬秋, 赵哲明

■背景资料

近年来, 世界范围内的抗生素滥用现象普遍, 导致抗生素相关性腹泻(AAD)的发生率呈上升趋势, 而益生菌的合理使用在很大程度上可以降低AAD的发生。

张春东, 戴冬秋, 赵哲明, 中国医科大学附属第四医院胃肠外科 辽宁省沈阳市 110032

张春东, 在读硕士, 主要从事胃癌及大肠癌的基础与临床研究。
作者贡献分布: 此研究由张春东、戴冬秋及赵哲明共同设计; 数据收集由张春东完成; 数据整理分析由张春东与赵哲明完成; 论文写作由张春东、戴冬秋及赵哲明共同完成; 戴冬秋负责论文写作全过程的指导。

通讯作者: 戴冬秋, 教授, 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胃肠外科, 肿瘤治疗中心。daidq63@126.com

电话: 024-62043110

收稿日期: 2012-05-11 修回日期: 2012-06-28

接受日期: 2012-07-20 在线出版日期: 2012-07-28

Probiotics for the prevention of antibiotic-associated diarrhea in adult patients: A meta-analysis

Chun-Dong Zhang, Dong-Qiu Dai, Zhe-Ming Zhao

Chun-Dong Zhang, Dong-Qiu Dai, Zhe-Ming Zhao, Department of Gastrointestinal Surgery, the Fourth Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110032, Liaoning Province, China

Correspondence to: Dong-Qiu Dai, Professor, Chief Physician, Department of Gastrointestinal Surgery, the Fourth Affiliated Hospital of China Medical University, 4 Chongshan East Road, Huanggu District, Shenyang 110032, Liaoning Province, China. daidq63@126.com

Received: 2012-05-11 Revised: 2012-06-28

Accepted: 2012-07-20 Published online: 2012-07-28

Abstract

AIM: To systematically investigate whether current clinical trails can clarify the association between probiotic administration and adult antibiotic-associated diarrhea (AAD), and to evaluate the efficacy and safety of probiotic administration in preventing AAD in both inpatient and outpatient adults.

METHODS: PubMed, Embase, CINAHL, AMED, the Cochrane database of Systematic Reviews, the Cochrane Controlled Trials Register, and the China National Knowledge Infrastructure (CNKI) electronic databases were searched for studies published between January 1966 and April 2012. Only prospective, randomized, controlled trials involving patients older than 18 years were included. Furthermore, only the trials which combined

antibiotic administration and probiotic therapy for the prevention of AAD were extracted.

RESULTS: The data of the present study showed a significantly decreased risk of adult AAD: relative risk (RR) = 0.45, 95% confidence interval (CI), 0.29-0.69, $P < 0.001$. Similar results were obtained from the subgroup analysis of particular types of probiotics (RR = 0.42, 95%CI: 0.20-0.85, $P = 0.003$).

CONCLUSION: Our study suggests that adult patients can benefit from probiotics co-administered with antibiotics.

Key Words: Probiotics; Antibiotics; Antibiotic-associated diarrhea; Meta-analysis

Zhang CD, Dai DQ, Zhao ZM. Probiotics for the prevention of antibiotic-associated diarrhea in adult patients: A meta-analysis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(21): 2006-2011

摘要

目的: 探讨益生菌的使用与成人抗生素相关性腹泻(AAD)的关联, 分析益生菌预防AAD的有效性及其安全性。

方法: 系统检索PubMed, Embase, CINAHL, AMED, the Cochrane database of Systematic Reviews, the Cochrane Controlled Trials Register和中国期刊全文数据库(CNKI), 检索时间跨度从1966-01/2012-04。我们只纳入随机对照试验, 研究对象>18周岁, 研究内容为服用抗生素的同时服用益生菌预防AAD。

结果: 本研究结果表明, $RR = 0.45$, 95%CI: 0.29-0.69, $P < 0.001$, 益生菌可以显著降低服用抗生素后发生腹泻的机率。基于益生菌种类的亚组分析的结果($RR = 0.42$, 95%CI: 0.20-0.85, $P = 0.003$)同样证明了益生菌预防AAD的有效性。

结论: 益生菌可以显著降低服用抗生素后发生成人AAD的机率。

关键词: 益生菌; 抗生素; 抗生素相关性腹泻; 荟萃分析

■同行评议者

王俊平, 教授, 山西省人民医院消化科

张春东, 戴冬秋, 赵哲明. 益生菌预防成人抗生素相关性腹泻的荟萃分析. 世界华人消化杂志 2012; 20(21): 2006-2011
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/2006.asp>

0 引言

目前, 世界范围内的抗生素滥用现象十分普遍, 此现象在中国尤其严重^[1], 导致了以抗生素相关性腹泻(antibiotic-associated diarrhea, AAD)为主的一系列临床症状. Siegel等^[2]统计, 美国仅仅在2011年, 消化系统新增肿瘤患者的数量就高达284 680人, 外科手术治疗仍然是目前治疗消化系统恶性肿瘤的最重要手段, 而消化系统恶性肿瘤手术术后需要使用抗生素进行抗炎治疗, 一旦抗生素使用时间过长, 就可能引起AAD. 能引起AAD的抗生素种类繁多, 例如 β -内酰胺类/青霉素类^[3,4]、克拉霉素类^[5]、大环内酯类^[6], 尤其是抗厌氧菌类的抗生素如硝唑类^[7]. 抗生素的使用可导致肠道菌群失调, 引起以腹泻为主的一系列症状. AAD的相关危险因素包括: 患者年龄、健康状况、抗生素使用周期的长短等^[7,8]. 国外一些临床试验结果表明, 使用抗生素后AAD的发生率为3%-60%^[7-9]. 另外, 文献报道^[10], AAD严重时甚至可以导致患者死亡. 无论入院或门诊患者, 年轻或年老患者, 只要使用抗生素, 都有获得AAD的风险^[11,12].

益生菌指奶制品或饮品中含有的那些对肠道有益的细菌, 他们能调节肠道微生态, 调整菌群比例, 降低AAD发生的机率. 另外, 益生菌也存在胶囊和粉末两种形态. Salminen等^[13]将益生菌定义为: 能够调节肠道菌群并有益于人体健康的活的微生物. 这些益生菌调节肠道内“有益”与“无益”的细菌比例, 达到预防或改善肠道内菌群失调, 减少腹泻的发生率. 益生菌可以有效地改善腹泻性疾病^[14], 同时, 也被证实可以用来改善便秘, 并逐渐受到越来越多的重视^[15]. 临床中比较常用的益生菌产品有整肠生、金双歧等, 外科系统中, 胃肠外科使用此类产品较多, 疗效显著, 并可以推广使用.

临床有大量的研究证实, 在使用抗生素的同时服用益生菌, 可以有效地降低成人AAD的发生率. 在国外的一些随机对照试验(randomized controlled trials, RCT)中, 多种益生菌已经被证实可以预防成人AAD, 当然, 也有一些没有被证实^[5,11,16-18]. Johnston等^[19]的研究数据表明: 益生菌同样可以降低儿童使用抗生素后发生AAD的机率. 众多国外RCT研究证明了益生菌预防儿童AAD的有效性和安全性^[9,10,16]. 然而目前尚无关

于益生菌用于预防成人AAD方面的荟萃分析. 我们的荟萃分析恰恰是关于益生菌用于预防成人AAD并得出结论: 在使用抗生素的同时使用益生菌, 可以降低成人AAD的发生率.

1 材料和方法

1.1 材料 电子检索了发表的以及未发表的文献, 检索的数据库及年限如下: PubMed(1966-2012), Embase(1980-2012), CINAHL(1982-2012), AMED(1985-2012), the Cochrane database of Systematic Reviews(1990-2012), the Cochrane Controlled Trials Register(1990-2012)和CNKI(1990-2012). 检索时间范围1966-01/2012-04, 我们只纳入那些关于益生菌预防成人AAD, 并同时具有前瞻性、随机性、对照性的试验.

1.2 方法

1.2.1 文献检索: 主要包括汉语检索和英文检索, 收集国内外相关文献(含硕士、博士学位论文), 同时辅以文献追溯法. 此外, 我们从一些灰色文献中进行筛选, 例如, 会议摘要、被拒稿的文章等. 另外, 手工筛选一些即将发表、或被录用但暂未刊登的文章. 对于部分资料缺失的研究, 给作者致电或发邮件加以补充和完善. 检索关键词如下: (1)腹泻(diarrhea/diarrhoea/diarrh*/antibiotic-associated/antibiotic associated/antibiotic-associated diarrhea/AAD); (2)益生菌(probiotic*/yeast/milk*/kifir/ferment*/milk product*/yogurt*/bifidobacter/lactobacill*/streptococc*/enterococc*/LGG/Lactobacillus GG/lactococc*/saccharomyces*/b longum*/bidifobacter*/S. boulardii/Saccharomyces boulardii); (3)抗生素(anti-bacteri*/beta-lactam antibiotics/penicillins/cephalosporins/carbapenems/fluoroquinolones/macrolides/aminoglycosides/glycopeptides/tetracycline/azoles/amoxicillin/clavulanate potassium/cefprozil/clarithomycin); (4)治疗(treatment/therapy/biotherapeutic agent/cure/curing/treat/treating/prevent/prevention/prophylaxis/helpful/useful/effect/influence*/effectiveness/benefit*/improve*); (5)年龄(adult*/adult patients/adult people/adult man/man/men/woman/women/middle aged/old/old*/elderly/elderly*/people/person).

1.2.2 文献纳入和排除标准: 2名检索者(Zhang、Zhao)分别独立地进行检索, 包括关键词、标题、必要时检索全文, 对比检索结果, 经过讨论后决定取舍. 文献纳入及排除标准: (1)文献满

■研发前沿

目前市场上有以整肠生、金双歧等为代表的益生菌产品, 然而如何合理选择及如何正确使用益生菌产品需要深入研究.

■相关报道

1999年Arvola等报道益生菌产品可以有效降低儿童使用抗生素后发生AAD的机率; 2003年La Rosa等、2006年Johnston等分别报道了益生菌用来预防儿童AAD的有效性和安全性.

■创新盘点

在临床实践中,往往在发生AAD后才会适当使用益生菌产品,而本文得出的结论是益生菌与抗生素同时使用可以发挥最佳效果,该结论可以指导临床实践。

表 1 7篇RCT被排除的具体原因

研究	年份	排除原因
Siitonen等 ^[21]	1990	Jadad评分<2分
Cindoruk等 ^[22]	2007	
Duman等 ^[23]	2005	
Schellenberg等 ^[24]	1994	未采用盲法
Gao等 ^[25]	2010	不单纯为AAD
Tankanow等 ^[26]	1990	非成人AAD
Wenus等 ^[27]	2008	失访率: 27.6%>20%

足随机、对照、盲法(双盲或三盲),病例类型为随机对照研究;(2)研究对象为年龄 ≥ 18 岁人群;(3)文献内容须为益生菌预防抗生素相关性腹泻;(4)文献能直接提供RR值及95%CI,或根据原始数据可以进行计算;(5)若有相同作者重复发表的研究数据,只纳入资料信息最全的研究;(6)Jadad评分^[20]高于1分,且研究对象的失访率低于20%;(7)研究中发生腹泻原因非使用抗生素造成;(8)不限制研究对象的民族及国家,亦不限定抗生素及益生菌使用的种类。

统计学处理 本研究采用Meta分析软件Rev-Man5.0对数据进行分析,益生菌组和对照组的比较以RR值为效应指标,异质性检验按 $\alpha = 0.05$ 标准对纳入的研究进行 χ^2 检验。若 $P > 0.05$,则采用固定效应模型,若 $P \leq 0.05$,则采用随机效应模型合并数据。数据的合并方法采取Z检验,按 $\alpha = 0.05$ 标准,计算合并的RR值及95%CI。检验发表偏倚采用漏斗图进行检测。敏感性分析通过采用随机或者固定效应模型进行分析,需找异质性来源,最后对各研究进行相关性分析。

2 结果

初级检索出1 157篇潜在满足条件的文章,同时,利用手工检索、Cochrane数据库、灰色文献及专家论坛等其他方面增加额外20篇文章,总计1 177篇。首先,1 159篇文章被排除,包括:深入研究发现不是绝对相关,或非RCT($n = 977$),重复($n = 117$),非AAD($n = 46$),进一步评价不满足其他条件($n = 19$)。最后排除了7篇RCT(表1),总计有11篇满足条件的RCT被纳入本研究。

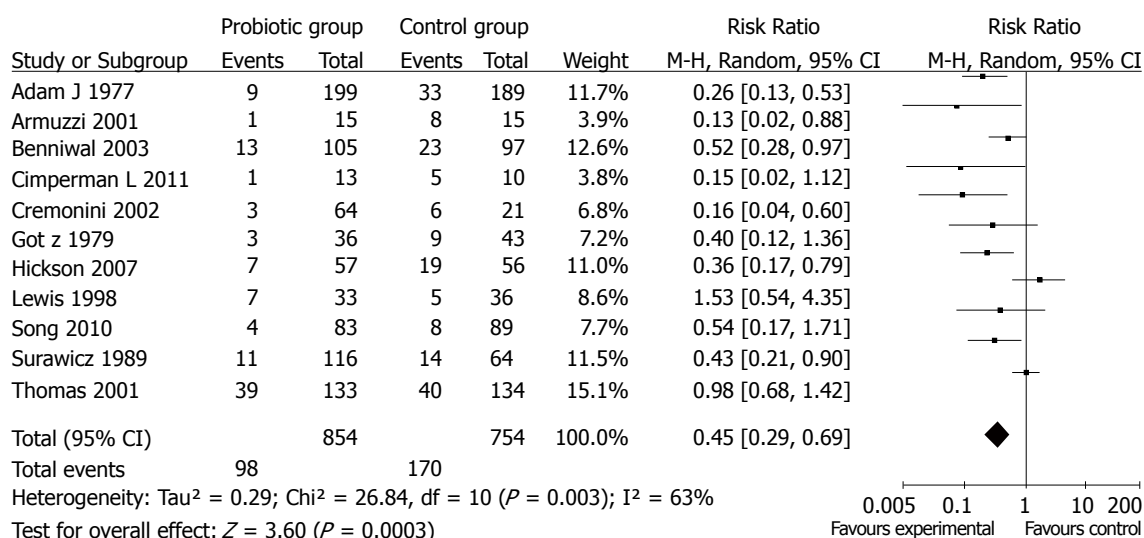
2.1 被纳入的RCT特点 所有被纳入的研究均为RCT。11个研究共包括1 608名研究对象(实验组854人,对照组754人)。在每一个RCT中,益生菌的使用周期与抗生素的使用周期相同(7-14 d);抗生素的使用目的包括:输尿管感染、上、下呼吸道感染、软组织或皮肤感染、消化系感染以及

其他感染性疾病^[4-6,11,22,28];研究对象的国籍包括:美国^[4,11,18,29,30]、英国^[17]、韩国^[6]、意大利^[5,28]、土耳其^[22];研究对象均为成年人(年龄 ≥ 18 周岁);研究对象包括住院患者^[4,6,11,17]、门诊患者^[18,28-30]以及医院内的工作人员等^[5];抗生素的使用途径包括:单纯口服、单纯静脉^[11]或二者联合^[6,11]。11个研究中使用的抗生素包括单一抗生素应用^[29]、2种或2种以上抗生素联合使用。

2.2 益生菌干预 11个RCT中的益生菌使用方案包括:布拉氏酵母菌(*S. boulardii*)^[22,28,30]、鼠李糖乳杆菌(LGG)^[4,5,28]、嗜酸乳杆菌^[28]、嗜酸乳杆菌+保加利亚乳杆菌^[29]、鼠李糖乳杆菌+嗜酸乳杆菌^[6]、干酪乳杆菌+保加利亚乳杆菌+嗜热链球菌^[17]、嗜酸乳杆菌+保加利亚乳杆菌+嗜热链球菌^[11]等。异质性检验结果($P = 0.02$, $I^2 = 76\%$)显示各研究之间存在统计学异质性,故采用随机效应模型。按方案分析(PP分析)的结果(RR = 0.45, 95%CI: 0.29-0.69, $P = 0.003$)证明:益生菌的使用可以显著降低AAD的发生率。益生菌的每日用量从每日 10^9 - 100×10^9 菌落形成单位(colony-forming units, CFU)。

本荟萃分析搜索策略严谨,文章检索全面,发表偏倚相对较低。Johnston等^[19]报道益生菌可以预防儿童AAD,然而我们的研究证明益生菌同样可以预防成人AAD,并且无论是门诊或入院患者均可以通过服用益生菌而降低AAD的发生率。

本研究采用PP分析11篇RCT中共包含1 608名研究对象(益生菌组854人,对照组754人)。各个RCT之间的异质性检验结果为: $I^2 = 63\% > 50\%$, $P = 0.003$,因此,我们采用随机效应模型,得出的结果(RR = 0.45, 95%CI: 0.29-0.69, $P = 0.0003$)同先一篇荟萃分析的结果(RR = 0.56, 95%CI: 0.44-0.71, $P < 0.05$)一致^[31],证明了益生菌可以降低服用抗生素后发生AAD的机率(图1)。另外,基于抗生素的种类,本研究作了一个亚组的PP分析,得到的结果*S. boulardii*(异质性检验: $I^2 = 65\%$, $P = 0.03$)、LGG(异质性检验: $I^2 = 82\%$, $P = 0.003$),表明抗生素种类的不同可能是各研究之间存在异质性的原因。亚组分析得出的结果为: *S. boulardii*(RR = 0.45, 95%CI: 0.19-1.03, $P = 0.06$)、LGG(RR = 0.32, 95%CI: 0.06-1.68, $P = 0.18$),益生菌组和对照组无明显的统计学差异,可能是纳入的研究数目少,样本量小,存在发表偏倚等原因。McFarland等^[32]的研究却证实了*S. boulardii*可以降低成人在服用抗生素后发生AAD的概率(图2)。



■应用要点

益生菌可以广泛用于临床, 尤其是以胃肠外科为代表的外科系统, 降低外科术后使用抗生素后发生AAD的机率, 极大地改善患者的生存质量。

图 1 益生菌组与对照组发生成人AAD的相对危险度(RR)比较。

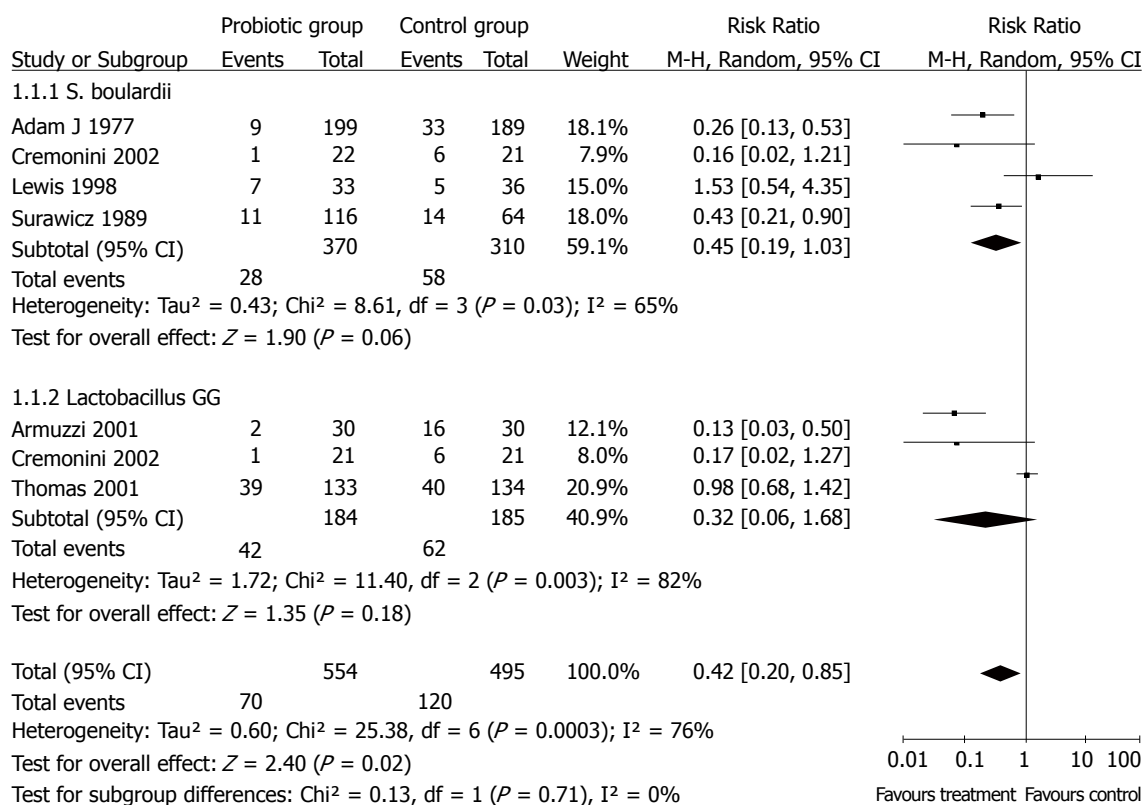


图 2 依据益生菌种类的亚组分析。

3 讨论

本荟萃分析证明了使用抗生素的同时服用益生菌可以显著降低成人AAD的发生率, 结论与先前几篇荟萃分析的结论相似, 然而却有不同之处。首先, 本荟萃分析中所有纳入研究的对象均为年纪>18岁的成人, 其他几篇荟萃分析的研究对象为成人和儿童^[28,33]或者仅儿童^[19,34]; 其次, 本荟萃分析讨论的不是单一益生菌的有效性, 而是将益生菌作为一个整体, 讨论其共同的效果,

这也区别于其他几篇荟萃分析^[32-35]。

为了进一步证实益生菌对于降低使用抗生素后AAD发生率的效果, 本研究又作了一个亚组分析, 发现单一菌种*S. boulardii*和LGG与对照组在降低AAD发生率上并未体现出显著的统计学差异, 只是表现出一个可以降低使用抗生素后发生AAD的趋势, 这个结果不同于McFarland等^[32]的荟萃分析结果($RR = 0.47$, 95%CI: 0.35-0.63, $P < 0.001$), 这暗示我们多种益生菌联

■名词解释

益生菌: 奶制品或饮品中含有的那些对肠道有益的细菌, 他们能调节肠道微生态, 调整菌群比例, 降低AAD发生的机率。另外, 益生菌也存在胶囊和粉末两种形态。

合使用的效果可能要优于单一菌种使用的效果, 此猜测在之前的荟萃分析中并未提出^[32-35]。为了证明单一菌种, 例如*S. boulardii*和LGG等对于降低使用抗生素后发生AAD的几率, 需要更多高质量的RCT。

在本荟萃分析纳入的11个RCT中, 未报道使用抗生素的同时联合服用益生菌发生严重不良反应(例如中毒、严重感染、死亡等)的案例, 证明服用益生菌预防AAD是相对安全的。

本荟萃分析有几个显著的优势: 我们不仅分析了益生菌作为一个整体, 并且同时分析了特定种类的益生菌对于预防AAD的有效性; 在进行文献检索前, 我们制定了一套严密的检索策略, 且文章纳入和排除的标准极其严格; 所有被纳入的研究均为RCT; 所有纳入的研究失访率均低于20%; 所有RCT均为双盲或三盲, 纳入的研究Jadad评分均>1分。本荟萃分析的研究对象均为年龄>18周岁的成人, 使用抗生素的同时服用益生菌, 本研究包含先前荟萃分析中^[6,18]没有引用的2个RCT研究。

本荟萃分析尚存在不足之处: 部分以法语、日语、德语等发表的文献并未检索; 文献并未采用意愿治疗分析(ITT分析); 部分RCT中未定义AAD及阐明抗生素使用的具体周期, 而我们认为这2个指标很重要, 甚至可以影响到试验的最终数据; 有文献报道^[36-38]每日排便频率这一指标至关重要, 然而大部分RCT中并未提及。另外一些指标, 例如, 研究对象的年龄、健康状况, 抗生素的种类等也是重要的影响因素, 以后的RCT研究应该充分考虑到这些因素, 纳入到评价的指标中; 11个RCT研究中提到的腹泻的定义不统一, 这势必会影响到判断阳性事件发生的数量。因此, 未来的研究应采用一个共同的标准, 例如, 可以采用世界卫生组织(WHO)对于腹泻的定义; 倒漏斗图对于发表偏倚的检测十分关键, 我们的荟萃分析纳入的11个RCT, 7个RCT位于倒漏斗图的左侧, 4个位于右侧, 提示我们: 本荟萃分析存在一定的偏倚。并非所有的益生菌的作用相同, 因此本荟萃分析中得出的结论未必适用于所有的益生菌。

益生菌可以降低胃肠手术使用抗生素^[39]后发生AAD机率, 并且无论对于其他门诊或住院患者, 其作用都是有效且安全的。本荟萃分析所纳入的研究中, 益生菌的平均使用周期为7-14 d, 每日用量为不少于 10^8 CFU; 并未发现严重的不良反应事件。未来需要更多高质量、大样本的

RCT研究, 从而更加准确的分析益生菌预防成人AAD的有效性和安全性。随着临床研究的不断深入, 以及益生菌产品的不断推新及推广使用, 相信AAD会得到越来越有效的控制。

4 参考文献

- 1 Currie J, Lin W, Zhang W. Patient knowledge and antibiotic abuse: Evidence from an audit study in China. *J Health Econ* 2011; 30: 933-949
- 2 Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2012; 62: 10-29
- 3 McFarland LV, Surawicz CM, Greenberg RN, Elmer GW, Moyer KA, Melcher SA, Bowen KE, Cox JL. Prevention of beta-lactam-associated diarrhea by *Saccharomyces boulardii* compared with placebo. *Am J Gastroenterol* 1995; 90: 439-448
- 4 Thomas MR, Litin SC, Osmon DR, Corr AP, Weaver AL, Lohse CM. Lack of effect of *Lactobacillus GG* on antibiotic-associated diarrhea: a randomized, placebo-controlled trial. *Mayo Clin Proc* 2001; 76: 883-889
- 5 Armuzzi A, Cremonini F, Bartolozzi F, Canducci F, Candelli M, Ojetti V, Cammarota G, Anti M, De Lorenzo A, Pola P, Gasbarrini G, Gasbarrini A. The effect of oral administration of *Lactobacillus GG* on antibiotic-associated gastrointestinal side-effects during *Helicobacter pylori* eradication therapy. *Aliment Pharmacol Ther* 2001; 15: 163-169
- 6 Song HJ, Kim JY, Jung SA, Kim SE, Park HS, Jeong Y, Hong SP, Cheon JH, Kim WH, Kim HJ, Ye BD, Yang SK, Kim SW, Shin SJ, Kim HS, Sung JK, Kim EY. Effect of probiotic *Lactobacillus (Lacidofil® cap)* for the prevention of antibiotic-associated diarrhea: a prospective, randomized, double-blind, multicenter study. *J Korean Med Sci* 2010; 25: 1784-1791
- 7 McFarland LV. Epidemiology, risk factors and treatments for antibiotic-associated diarrhea. *Dig Dis* 1998; 16: 292-307
- 8 Bartlett JG. Clinical practice. Antibiotic-associated diarrhea. *N Engl J Med* 2002; 346: 334-339
- 9 La Rosa M, Bottaro G, Gulino N, Gambuzza F, Di Forti F, Inì G, Tornambè E. [Prevention of antibiotic-associated diarrhea with *Lactobacillus sporogens* and fructo-oligosaccharides in children. A multicentric double-blind vs placebo study]. *Minerva Pediatr* 2003; 55: 447-452
- 10 Arvola T, Laiho K, Torkkeli S, Mykkänen H, Salminen S, Maunula L, Isolauri E. Prophylactic *Lactobacillus GG* reduces antibiotic-associated diarrhea in children with respiratory infections: a randomized study. *Pediatrics* 1999; 104: e64
- 11 Beniwal RS, Arena VC, Thomas L, Narla S, Imperiale TF, Chaudhry RA, Ahmad UA. A randomized trial of yogurt for prevention of antibiotic-associated diarrhea. *Dig Dis Sci* 2003; 48: 2077-2082
- 12 Merenstein DJ, Foster J, D'Amico F. A randomized clinical trial measuring the influence of kefir on antibiotic-associated diarrhea: the measuring the influence of Kefir (MILK) Study. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2009; 163: 750-754
- 13 Salminen S, Bouley C, Boutron-Ruault MC, Cummings JH, Franck A, Gibson GR, Isolauri E, Moreau MC, Roberfroid M, Rowland I. Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *Br J Nutr* 1998; 80 Suppl 1: S147-S171

- 14 Gratz SW, Mykkanen H, El-Nezami HS. Probiotics and gut health: a special focus on liver diseases. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 403-410
- 15 Chmielewska A, Szajewska H. Systematic review of randomised controlled trials: probiotics for functional constipation. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 69-75
- 16 Corrêa NB, Péret Filho LA, Penna FJ, Lima FM, Nicoli JR. A randomized formula controlled trial of *Bifidobacterium lactis* and *Streptococcus thermophilus* for prevention of antibiotic-associated diarrhea in infants. *J Clin Gastroenterol* 2005; 39: 385-389
- 17 Hickson M, D'Souza AL, Muthu N, Rogers TR, Want S, Rajkumar C, Bulpitt CJ. Use of probiotic *Lactobacillus* preparation to prevent diarrhoea associated with antibiotics: randomised double blind placebo controlled trial. *BMJ* 2007; 335: 80
- 18 Cimperman L, Bayless G, Best K, Diligente A, Mordarski B, Oster M, Smith M, Vatakis F, Wiese D, Steiber A, Katz J. A randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study of *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 for the prevention of antibiotic-associated diarrhea in hospitalized adults. *J Clin Gastroenterol* 2011; 45: 785-789
- 19 Johnston BC, Supina AL, Vohra S. Probiotics for pediatric antibiotic-associated diarrhea: a meta-analysis of randomized placebo-controlled trials. *CMAJ* 2006; 175: 377-383
- 20 Jadad AR, Moore RA, Carroll D, Jenkinson C, Reynolds DJ, Gavaghan DJ, McQuay HJ. Assessing the quality of reports of randomized clinical trials: is blinding necessary? *Control Clin Trials* 1996; 17: 1-12
- 21 Siitonen S, Vapaatalo H, Salminen S, Gordin A, Saxelin M, Wikberg R, Kirkkola AL. Effect of *Lactobacillus GG* yoghurt in prevention of antibiotic associated diarrhoea. *Ann Med* 1990; 22: 57-59
- 22 Cindoruk M, Erkan G, Karakan T, Dursun A, Unal S. Efficacy and safety of *Saccharomyces boulardii* in the 14-day triple anti-*Helicobacter pylori* therapy: a prospective randomized placebo-controlled double-blind study. *Helicobacter* 2007; 12: 309-316
- 23 Duman DG, Bor S, Özütemiz O, Sahin T, Oğuz D, Iştan F, Vural T, Sandkci M, Işksal F, Şimşek I, Soytürk M, Arslan S, Sivri B, Soykan I, Temizkan A, Beşşk F, Kaymakoglu S, Kalayc C. Efficacy and safety of *Saccharomyces boulardii* in prevention of antibiotic-associated diarrhoea due to *Helicobacter pylori* eradication. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2005; 17: 1357-1361
- 24 Schellenberg D, Bonington A, Champion CM, Lancaster R, Webb S, Main J. Treatment of *Clostridium difficile* diarrhoea with brewer's yeast. *Lancet* 1994; 343: 171-172
- 25 Gao XW, Mubasher M, Fang CY, Reifer C, Miller LE. Dose-response efficacy of a proprietary probiotic formula of *Lactobacillus acidophilus* CL1285 and *Lactobacillus casei* LBC80R for antibiotic-associated diarrhea and *Clostridium difficile*-associated diarrhea prophylaxis in adult patients. *Am J Gastroenterol* 2010; 105: 1636-1641
- 26 Tankanow RM, Ross MB, Ertel IJ, Dickinson DG, McCormick LS, Garfinkel JF. A double-blind, placebo-controlled study of the efficacy of Lactinex in the prophylaxis of amoxicillin-induced diarrhea. *DICP* 1990; 24: 382-384
- 27 Wenus C, Goll R, Loken EB, Biong AS, Halvorsen DS, Florholmen J. Prevention of antibiotic-associated diarrhoea by a fermented probiotic milk drink. *Eur J Clin Nutr* 2008; 62: 299-301
- 28 Cremonini F, Di Caro S, Covino M, Armuzzi A, Gabrielli M, Santarelli L, Nista EC, Cammarota G, Gasbarrini G, Gasbarrini A. Effect of different probiotic preparations on anti-*helicobacter pylori* therapy-related side effects: a parallel group, triple blind, placebo-controlled study. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 2744-2749
- 29 Gotz V, Romankiewicz JA, Moss J, Murray HW. Prophylaxis against ampicillin-associated diarrhea with a *lactobacillus* preparation. *Am J Hosp Pharm* 1979; 36: 754-757
- 30 Surawicz CM, Elmer GW, Speelman P, McFarland LV, Chinn J, van Belle G. Prevention of antibiotic-associated diarrhea by *Saccharomyces boulardii*: a prospective study. *Gastroenterology* 1989; 96: 981-988
- 31 Avadhani A, Miley H. Probiotics for prevention of antibiotic-associated diarrhea and *Clostridium difficile*-associated disease in hospitalized adults--a meta-analysis. *J Am Acad Nurse Pract* 2011; 23: 269-274
- 32 McFarland LV. Systematic review and meta-analysis of *Saccharomyces boulardii* in adult patients. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 2202-2222
- 33 Hawrelak JA, Whitten DL, Myers SP. Is *Lactobacillus rhamnosus GG* effective in preventing the onset of antibiotic-associated diarrhoea: a systematic review. *Digestion* 2005; 72: 51-56
- 34 Szajewska H, Mrukowicz J. Meta-analysis: non-pathogenic yeast *Saccharomyces boulardii* in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea. *Aliment Pharmacol Ther* 2005; 22: 365-372
- 35 Kale-Pradhan PB, Jassal HK, Wilhelm SM. Role of *Lactobacillus* in the prevention of antibiotic-associated diarrhea: a meta-analysis. *Pharmacotherapy* 2010; 30: 119-126
- 36 Johnston BC, Supina AL, Ospina M, Vohra S. Probiotics for the prevention of pediatric antibiotic-associated diarrhea. *Cochrane Database Syst Rev* 2007; (2): CD004827
- 37 [Controlled double blind clinical trials of lyophilized Ultra-Levure. Multiple-center study by 25 physicians of 388 cases]. *Med Chir Dig* 1976; 5: 401-406
- 38 Lewis SJ, Potts LF, Barry RE. The lack of therapeutic effect of *Saccharomyces boulardii* in the prevention of antibiotic-related diarrhoea in elderly patients. *J Infect* 1998; 36: 171-174
- 39 马振海, 戴冬秋, 徐惠绵. 胃肠癌术后应用抗生素致伪膜性肠炎. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 2294-2296

同行评价

本研究课题选取角度新颖, 符合当前研究热点, 文章的科学性、创新性和可读性能较好地反映胃肠病学临床研究的先进水平, 有一定的临床实用性。

编辑 张姗姗 电编 鲁亚静

《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文摘编写规则, GB7714文后参考文献著录规则, GB/T 3179科学技术期刊编排格式等要求; 同时遵照国际医学期刊编辑委员会(International Committee of Medical Journal Editors)制定的《生物医学期刊投稿的统一要求(第5版)》(Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals)。见: *Ann Intern Med* 1997; 126: 36-47。

2.2 名词术语 应标准化, 前后统一, 如原词过长且多次出现者, 可于首次出现时写出全称加括号内注简称, 以后直接用简称。医学名词以全国自然科学名词审定委员会公布的《生理学术名词》、《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 $T_{1/2}^1$, V_{max} 不能Vmax, μ 不写为英文u. 需排斜体的外文字, 用斜体表示. 如生物学中拉丁学名的属名与种名, 包括亚属、亚种、变种. 如幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*), *Ilex pubescens* Hook, et Arn. var. *glaber* Chang(命名者勿划横线); 常数K; 一些统计学符号(如样本数n, 均数mean, 标准差SD, F检验, t检验和概率P, 相关系数r); 化学名中标明取代位的元素、旋光性和构型符号(如N, O, P, S, d, l)如n-(normal, 正), N-(nitrogen, 氮), o-(ortho, 邻), O-(oxygen, 氧, 习惯不译), d-(dextro, 右旋), p-(para, 对), 例如n-butyl acetate(醋酸正丁酯), N-methylacetanilide(N-甲基乙酰苯胺), o-cresol(邻甲酚), 3-O-methyl-adrenaline(3-O-甲基肾上腺素), d-amphetamine(右旋苯丙胺), l-dopa(左旋多巴), p-aminosalicylic acid(对氨基水杨酸). 拉丁字及缩写in vitro, in vivo, in situ; Ibid, et al, po, vs; 用外文字母代表的物理量, 如m(质量), V(体积), F(力), p(压力), W(功), v(速度), Q(热量), E(电场强度), S(面积), t(时间), z(酶活性, kat), t(摄氏温度, °C), D(吸收剂量, Gy), A(放射性活度, Bq), ρ (密度, 体积质量, g/L), c(浓度, mol/L), ϕ (体积分数, mL/L), w(质量分数, mg/g), b(质量摩尔浓度, mol/g), l(长度), b(宽度), h(高度), d(厚度), R(半径), D(直径), T_{max} , C_{max} , Vd, $T_{1/2}$ CI等. 基因符号通常用小写斜体, 如ras, c-myc; 基因产物用大写正体, 如P16蛋白.

2.4 计量单位 采用国际单位制并遵照有关国家

标准, GB3100-3102-93量和单位. 原来的“分子量”应改为物质的相对分子质量. 如30 kD改为 M_r 30 000或30 kDa(M大写斜体, r小写正体, 下角标); “原子量”应改为相对原子质量, 即 A_r (A大写斜体, r小写正体, 下角标); 也可采用原子质量, 其单位是u(小写正体). 计量单位在+、-及后列出. 在±前后均要列出, 如37.6 °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 1×10^{12} /L, WBC数用 1×10^9 /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值的文句中, 例如每天不写每d, 但每天8 mg可写8 mg/d. 在一个组合单位符号内不得有1条以上的斜线, 例如不能写成mg/kg/d, 而应写成mg/(kg·d), 且在整篇文章内应统一. 单位符号没有单、复数的区分, 例如, 2 min不是2 mins, 3 h不是3 hs, 4 d不是4 ds, 8 mg不是8 mgs. 半个月, 15 d; 15克, 15 g; 10%福尔马林, 40 g/L甲醛; 95%酒精, 950 mL/L乙醇; 5% CO₂, 50 mL/L CO₂; 1 : 1 000肾上腺素, 1 g/L肾上腺素; 胃黏膜含促胃液素36.8 pg/mg, 改为胃黏膜蛋白含促胃液素36.8 ng/g; 10%葡萄糖改为560 mmol/L或100 g/L葡萄糖; 45 ppm = 45×10^{-6} ; 离心的旋转频率(原称转速)用r/min, 超速者用g; 药物剂量若按体质量计算, 一律以“/kg”表示.

2.5 统计学符号 (1)t检验用小写t; (2)F检验用英

《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: wjcd@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 ν ; (6)样本数用英文小写 n ; (7)概率用英文斜体大写 P . 在统计学处理中在文字叙述时平均数 \pm 标准差表示为 $\text{mean} \pm \text{SD}$, 平均数 \pm 标准误为 $\text{mean} \pm \text{SE}$. 统计学显著性用^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ ($P > 0.05$ 不注). 如同一表中另有一套 P 值, 则^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$; 第三套为^e $P < 0.05$, ^f $P < 0.01$ 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1000-1500 kg, 3.5 mmol/L \pm 0.5 mmol/L等. 测量的数据不能超过其测量仪器的精密度, 例如6347意指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 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 应考虑到个体的变差, 一般以SD的1/3来定位数, 例如 $3614.5 \text{ g} \pm 420.8 \text{ g}$, SD的1/3达一百多g, 平均数波动在百位数, 故应写成 $3.6 \text{ kg} \pm 0.4 \text{ kg}$, 过多的位数并无意义. 又如 $8.4 \text{ cm} \pm 0.27 \text{ cm}$, 其 $\text{SD}/3 = 0.09 \text{ cm}$, 达小数点后第2位, 故平均数也应补到小数点后第2位. 有效位数以后的数字是无效的, 应该舍. 末尾数字, 小于5则舍, 大于5则进, 如恰等于5, 则前一位数逢奇则进, 逢偶(包括“0”)且5之后全为0则舍. 末尾时只可1次完成, 不得多次完成. 例如23.48, 若不要小数点, 则应成23, 而不应该 $23.48 \rightarrow 23.5 \rightarrow 24$. 年月日采用全数字表达法, 请按国家标准GB/T 7408-94书写. 如1985年4月12日, 可写作1985-04-12; 1985年4月, 写作1985-04; 从1985年4月12日23时20分50秒起至1985年6月25日10时30分止, 写作1985-04-12 T23:20:50/1985-06-25 T10:30:00; 从1985年4月12日起至1985年6月15日止, 写作1985-04-12/06-16, 上午8时写作08:00, 下午4时半写作16:30. 百分数的有效位数根据分母来定: 分母 ≤ 100 , 百分数到个位; $101 \leq \text{分母} \leq 1000$, 百分数到小数点后1位; 余类推. 小数点前后的阿拉伯数字, 每3位间空1/4阿拉伯数字距离, 如1486800.475 65. 完整的阿拉伯数字不移行!

2.7 标点符号 遵照国家标准GB/T 15834-1995标点符号用法的要求, 本刊论文中的句号都采用黑圆点; 数字间的起止号采用“-”字线, 并列的汉语词间用顿号分开, 而并列的外文词、阿拉伯数字、外文缩略词及汉语拼音字母拼写词间改用逗号分开, 参考文献中作者间一律用逗号分开; 表示终了的标点符号, 如句号、逗号、顿

号、分号、括号及书名号的后一半, 通常不用于一行之首; 而表示开头的标点符号, 如括号及书名号的前一半, 不宜用于一行之末. 标点符号通常占一格, 如顿号、逗号、分号、句号等; 破折号应占两格; 英文连字符只占一个英文字符的宽度, 不宜过长, 如5-FU. 外文字符下划一横线表示用斜体, 两横线表示用小写, 三横线表示用大写, 波纹线表示用黑体.

3 稿件格式

3.1 题名 简明确切地反映论文的特定内容, 鲜明而有特色, 阿拉伯数字不宜开头, 不用副题名, 一般20个字. 避免用“的研究”或“的观察”等非特定词.

3.2 作者 论文作者的署名, 按照国际医学杂志编辑委员会(ICMJE, International Committee of Medical Journal Editors)作者资格标准执行. 作者标准为: (1)对研究的理念和设计、数据的获得、分析和解读做出重大贡献; (2)起草文章, 并对文章的重要的知识内容进行批评性修改; (3)接受对准备发表文章的最后一稿. 作者应符合条件1, 2, 3, 对研究工作有贡献的其他人可放入志谢中. 作者署名的次序按贡献大小排列, 多作者时姓名间用逗号, 如是单名, 则在姓与名之间空1格(正文和参考文献中不空格). 《世界华人消化杂志》要求所有署名人写清楚自己对文章的贡献. 世界华人消化杂志不设置共同第一作者和共同通信作者.

3.3 单位 作者后写单位的全称空1格后再写省市及邮政编码. 格式如: 张旭晨, 梅立新, 承德医学院病理教研室 河北省承德市 067000

3.4 第一作者简介 格式如: 张旭晨, 1994年北京中医药大学硕士, 讲师. 主要从事消化系统疾病的病理研究.

3.5 作者贡献分布 格式如: 陈湘川与庞丽娟对此文所作贡献两均等; 此课题由陈湘川、庞丽娟、陈玲、杨兰、张金芳、齐妍及李洪安设计; 研究过程由陈玲、杨兰、张金芳、蒋金芳、杨磊、李锋及曹秀峰操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由曹秀峰提供; 数据分析由陈湘川、杨兰及庞丽娟完成; 本论文写作由陈湘川、庞丽娟及李洪安完成.

3.6 同行评议者 为了确保刊出文章的质量, 本刊即将开始实行接受稿件的同行评议公开策略, 将同行评议者姓名, 职称, 机构的名称与文章一同在脚注出版. 格式如: 房静远, 教授, 上海交通大学医学院附属医院仁济医院, 上海市消化疾

病研究所。

3.7 基金资助项目 格式如: 国家自然科学基金资助项目, No. 30224801

3.8 通讯作者 格式如: 通讯作者: 黄缘, 教授, 330006, 江西省南昌市民德路1号, 南昌大学第二附属医院消化内科, 江西省分子医学重点实验室. huang9815@yahoo.com

电话: 0351-4078656 传真: 0351-4086337

收稿日期: 修回日期:

3.9 英文摘要

题名 文章的题名应言简意赅, 方便检索, 英文题名以不超过10个实词为宜, 应与中文题名一致。

作者 作者姓名汉语拼音拼写法规定为: 先名, 后姓; 首字母大写, 双名之间用半字线“-”分开, 多作者时姓名间加逗号。格式如: “潘伯荣”的汉语拼写法为“Bo-Rong Pan”。

单位 先写作者, 后写单位的全称及省市邮政编码。例如: Xu-Chen Zhang, Li-Xin Mei, Department of Pathology, Chengde Medical College, Chengde 067000, Hebei Province, China

基金资助项目 格式如: Supported by National Natural Science Foundation of China, No.30224801

通讯作者 格式如: Correspondence to: Dr. Lian-Sheng Ma, Taiyuan Research and Treatment Center for Digestive Diseases, 77 Shuangta Xijie, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China. wcjd@wjgnet.com

收稿及修回日期 格式如: Received: Revised:

摘要 包括目的、方法、结果、结论, 书写要求与中文摘要一致。

3.10 中文摘要 必须在300字左右, 内容应包括目的(应阐明研究的背景和设想、目的), 方法(必须包括材料或对象, 应描述课题的基本设计, 双盲、单盲还是开放性, 使用什么方法, 如何进行分组和对照, 数据的精确程度。研究对象选择条件与标准是否遵循随机化、齐同化的原则, 对照组匹配的特征。如研究对象是患者, 应阐明其临床表现, 诊断标准。如何筛选分组, 有多少例进行过随访, 有多少例因出现不良反应而中途停止研究), 结果(应列出主要结果, 包括主要数据, 有什么新发现, 说明其价值和局限, 叙述要真实、准确、具体, 所列数据经用何种统计学方法处理; 应给出结果的置信区间和统计学显著性检验的确切值; 概率写 P , 后应写出相应显著性检验值), 结论(全文总结, 准确无误的观点及价值)。

3.11 正文标题层次 0 引言; 1 材料和方法, 1.1 材料, 1.2 方法; 2 结果; 3 讨论; 4 参考文献。序号一

律左顶格写, 后空1格写标题; 2级标题后空1格接正文。正文内序号连排用(1), (2), (3)。以下逐条陈述。

0 引言 应包括该研究的目的和该研究与其他相关研究的关系。

1 材料和方法 应尽量简短, 但应让其他有经验的研究者能够重复该实验。对新的方法应该详细描述, 以前发表过的方法引用参考文献即可, 有关文献中或试剂手册中的方法的改进仅描述改进之处即可。

2 结果 实验结果应合理采用图表和文字表示, 在结果中应避免讨论。

3 讨论 要简明, 应集中对所得的结果做出解释而不是重复叙述, 也不应是大量文献的回顾。

图表的数量要精选。表应有表序和表题, 并有足够具有自明性的信息, 使读者不查阅正文即可理解该表的内容。表内每一栏均应有表头, 表内非公知通用缩写应在表注中说明, 表格一律使用三线表(不用竖线), 在正文中该出现的地方应注出。图应有图序、图题和图注, 以使其容易被读者理解, 所有的图应在正文中该出现的地方注出。同一个主题内容的彩色图、黑白图、线条图, 统一用一个注解分别叙述。如: 图1 萎缩性胃炎治疗前后病理变化。A: …; B: …; C: …; D: …; E: …; F: …; G: …。曲线图可按●、○、■、□、▲、△顺序使用标准的符号。统计学显著性用: ^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ ($P>0.05$ 不注)。如同一表中另有一套 P 值, 则^c $P<0.05$, ^d $P<0.01$; 第3套为^e $P<0.05$, ^f $P<0.01$ 。 P 值后注明何种检验及其具体数字, 如 $P<0.01$, $t = 4.56$ vs 对照组等, 注在表的左下方。表内采用阿拉伯数字, 共同的计量单位符号应注在表的右上方, 表内个位数、小数点、±、-应上下对齐。“空白”表示无此项或未测, “-”代表阴性未发现, 不能用同左、同上等。表图勿与正文内容重复。表图的标目尽量用 t/min , $c/(\text{mol/L})$, p/kPa , V/mL , $t/^\circ\text{C}$ 表达。

志谢 后加冒号, 排在讨论后及参考文献前, 左齐。

4 参考文献 本刊采用“顺序编码制”的著录方法, 即以文中出现顺序用阿拉伯数字编号排序。提倡对国内同行近年已发表的相关研究论文给予充分的反映, 并在文内引用处右上角加方括号注明角码。文中如列作者姓名, 则需在“Pang等”的右上角注角码号; 若正文中仅引用某文献中的论述, 则在该论述的句末右上角注码号。如马连生^[1]报告……, 潘伯荣等^[2-5]认为……; PCR方法敏感性高^[6-7]。文献序号作正

《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/jdlt.asp>

4.4 文献综述写作格式实例

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

4.5 研究快报写作格式实例

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

4.6 临床经验写作格式实例

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/lcgy.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的利益冲突; (3)所有作者均审读过该文并同意发表, 所有作者均符合作者条件, 所有作者均同意该文代表其真实研究成果, 保证文责自负; (4)列出通讯作者的姓名、职称、地址、电话、传真和电子邮件; 通讯作者应负责与其他作者联系, 修改并最终审核复核稿; (5)列出作者贡献分布; (6)来稿应附有作者工作单位的推荐信, 保证无泄密, 如果是几个单位合作的论文, 则需要提供所有参与单位的推荐信; (7)愿将印刷版和电子版出版权转让给本刊编辑部。

6.2 稿件修改 来稿经同行专家审查后, 认为内容需要修改、补充或删除时, 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

2012-07-27/29

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

2012-07-30/08-08

国际中医药与亚健康学术大会

会议地点: 加拿大蒙特利尔市

联系方式: wuping@126.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

2012-08-25/29

第八届世界华人药物化学研讨会

会议地点: 北京市

联系方式: liangren@bjmu.edu.cn

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: lijuyi@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大会

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

2012-10-19/21

中欧胰腺外科专业新技术、新进展学术研讨会

会议地点: 长沙市

联系方式: yu198610@163.com

2012-10-19/10-21

2012年(第二届)中日国际消化疾病论坛暨挑战直肠癌-战略与艺术综合研讨会

会议地点: 北京市

联系方式: cjds@htbr.cn

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

2012-11-25/27

第九届国际糖尿病联盟西太平洋地区学术大会暨第四届亚洲糖尿病学会学术年会

会议地点: 日本京都

联系方式: meeting@bimtdoctor.com

2012-11-25/30

2012北美放射学年会RSNA

会议地点: 美国芝加哥

联系方式: panting_expo@126.com

2012-12-21/23

2012生物医学工程生物信息学国际会议

会议地点: 昆明市

联系方式: beb2012@126.com

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

白雪巍 副教授
哈尔滨医科大学第一临床医学院肝胆胰外科陈洪

陈卫昌 教授
苏州大学附属第一医院消化内科

崔云甫 教授
哈尔滨医科大学第二附属医院普外一科

董蕾 教授
西安交通大学第二附属医院消化内科

樊红 教授
东南大学医学院发育与疾病相关基因教育部重点实验室

顾国利 副主任医师
中国人民解放军空军总医院普通外科

郭晓钟 教授
中国人民解放军沈阳军区总医院消化内科

何敏 教授
广西医科大学医学科学实验中心

何裕隆 教授
中山大学附属第一医院胃肠胰腺外科

何晓顺 教授
中山大学附属第一医院器官移植科

黄缘 教授
南昌大学第二附属医院消化内科 江西省分子医学重点实验室

李胜 研究员
山东省肿瘤防治研究院肝胆外科

刘平 教授
南京医科大学第一附属医院(江苏省人民医院)肿瘤科

潘秀珍 教授
福建省立医院消化内科

朴云峰 教授
吉林大学第一临床医院消化科

邱伟华 副主任医师
上海交通大学医学院附属瑞金医院普外科

任粉玉 副教授
延边大学附属医院消化内科

任晓峰 教授
东北农业大学动物医学学院微生物室

沈柏用 副教授
上海交通大学医学院附属瑞金医院肝胆胰外科中心

沈琳 主任医师
北京大学临床肿瘤医院消化内科

孙殿兴 主任医师
白求恩国际和平医院肝病科

邵升 副教授
哈尔滨医科大学附属二院肝胆外科

唐南洪 教授
福建医科大学附属协和医院省肝胆外科研究所

王文跃 主任医师
中日友好医院普通外科

王振宁 教授
中国医科大学附属第一医院肿瘤外科

邢建峰 副教授
西安交通大学医学院

徐迅迪 教授
中南大学湘雅二医院肝胆胰外科

薛东波 教授
哈尔滨医科大学附属第一医院微创胆道外科

杨柏霖 副主任医师
南京中医药大学附属医院结直肠外科