

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11月28日 第20卷 第33期 (Volume 20 Number 33)



33 / 2012

ISSN 1009-3079



《世界华人消化杂志》是一份同行评议性的旬刊，是一份被《中国科技论文统计源期刊》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

wcj@wjgnet.com www.wjgnet.com

《世界华人消化杂志》编辑委员会成员，由483位专家组成，分布在30个省市，自治区，特别行政区。其中，上海市81位、北京市70位、广东省40位、江苏省38位、辽宁省24位、陕西省22位、黑龙江省20位、湖北省18位、天津市16位、吉林省15位、湖南省14位、福建省13位、山东省13位、广西壮族自治区11位、河北省10位、四川省10位、浙江省10位、重庆市9位、安徽省8位、江西省8位、贵州省7位、新疆维吾尔自治区6位、云南省6位、海南省2位、河南省3位、甘肃省2位、宁夏回族自治区2位、山西省2位、内蒙古自治区1位和香港特别行政区1位。

总顾问

陈可冀教授
黄志强教授
纪小龙教授
王宝恩教授
王苑本教授
杨春波教授
杨思凤教授
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
白岚教授
卜平教授
陈国忠主任医师
陈洪副教授
陈其奎教授
陈卫昌教授
陈贻胜教授
程斌教授
迟宝荣教授
崔立红教授
邓鑫教授
丁士刚教授
董蕾教授
杜雅菊主任医师
杜奕奇副教授
樊冬梅副主任医师
樊晓明教授
房静远教授

冯志杰主任医师
傅春彬主任医师
甘华田教授
高凌副教授
戈之铮教授
关玉盘教授
关晓辉主任医师
郭晓钟教授
郝建宇教授
郝丽萍副教授
何继满教授
何松教授
洪天配教授
黄培林教授
黄晓东主任医师
黄颖秋教授
黄缘教授
季国忠教授
江米足教授
姜春萌教授
姜慧卿教授
姜相君主任医师
金瑞教授
蓝宇教授
李淑德教授
李瑜元教授
李玉民教授
廖家智副主任医师
林志辉教授
刘冰熔教授
刘凤斌教授
刘改芳主任医师
刘海峰主任医师
刘海林主任医师
刘亮明副教授
陆伦根教授
马红主任医师
马欣主任医师
毛恩强教授
毛高平教授
孟庆华教授
缪应雷主任医师
倪润洲教授
欧希龙副教授
潘秀珍教授
潘阳林副教授
朴云峰教授
秦成勇教授

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

消化外科学

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

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

李胜研究员
李涛副主任医师
李文岗教授
李小荣教授
李旭副教授
李永翔教授
李正荣副教授
李志霞教授
李宗芳教授
梁力建教授
刘宝林教授
刘超教授
刘宏鸣副教授
刘建教授
刘亮副主任医师
刘颖斌主任医师
卢军华教授
陆云飞教授
禄韶英副教授
吕凌副教授
吕云福教授
麻勇副研究员
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
崔清波副教授
单云峰副主任医师
沈柏用副教授
施宝民教授
施诚仁教授
施晓雷副主任医师
石毓君副研究员
宋新明教授
宋振顺教授
孙诚谊教授
孙文兵教授
孙星副教授
孙学英教授
邵升副教授
谭晓冬教授
汤朝晖副主任医师
汤绍涛教授
唐南洪教授
田晓峰教授

世界华人消化杂志®

编辑委员会

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

消化感染病学

白浪副教授
陈国凤主任医师
陈红松研究员
陈建杰教授
陈志辉副主任医师

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

消化中医药学

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

邢建峰副教授
徐列明教授
许玲教授
徐庆教授
袁红霞研究员
张声生教授

消化肿瘤学

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

消化影像学

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

消化内镜及介入治疗学

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

余日胜主任医师
袁友红副教授
张火俊副教授

消化中西医结合学

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

消化基础研究

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

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

消化病理学

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

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ● 2012年11月28日 第20卷 第33期 (总第401期)

述 评	3181 胆囊功能的新认识 孙诚谊, 朱海涛 3186 胰岛移植的临床与科研现状及展望 刘宝林, 刘世庆, 曹献馗
基础研究	3191 1,25-二羟基维生素D ₃ 对小鼠非酒精性脂肪肝性肝纤维化进程的抑制作用 李艳芳, 唐夕岚, 凌文华 3197 黄芩苷对肝癌细胞GJIC及Cx26、Cx43表达的影响 郭昱, 王娜, 高咏梅, 姚金锋, 李元, 尹崇娇, 张文娟 3203 两歧双歧杆菌干预周期对IL-10基因敲除小鼠结肠上皮屏障保护作用的影响 韩华中, 梁勇, 石忱长, 杨俊 3211 鞘氨醇激酶1对结肠癌细胞血管生成拟态的影响及其机制 李梦婷, 黄杰安, 周巧, 苏颖洁, 刘诗权, 覃蒙斌
临床研究	3218 hMLH-1和hMSH-2蛋白在新疆汉族散发性大肠癌中的表达及意义 于静, 赵峰, 梁丽萍, 石雪迎
文献综述	3225 介入治疗肝癌对免疫功能影响的研究进展 张功霖, 赵卫 3231 TGF- β 1及其受体与肝癌转移复发关系的研究进展 程林, 向广阳, 陈德 3237 急性肝衰竭的综合治疗 宋传芳, 刘冰熔
研究快报	3244 离体消化法分离原代肝星状细胞 樊文梅, 刘德忠, 肖漓, 马锡慧, 石炳毅 3248 不同胆道引流方式对梗阻性黄疸大鼠肠屏障功能的影响 李秋, 彭燕, 邹玲, 付文广
临床经验	3252 鼻胃镜直视下食管支架置入术40例 叶武, 刘鹏飞, 项斌, 张伟, 沈卫东, 孙芳 3256 多西他赛化疗联合放疗治疗食管癌疗效的系统评价 胡学军, 张虎, 邵国安, 王尚前, 刘贵峰, 王洛昆, 徐永耀 3266 S100A11和自噬基因Beclin1在胃癌组织中的表达及临床意义 马陆军, 林瑶光 3272 内镜下经皮胃造瘘术对患者营养及生活质量的改善作用 卢杰夫, 姜海行, 覃山羽 3277 手术治疗外伤性肝破裂23例 詹慧春, 徐早华, 曾卫华, 丁华民, 傅华群

附 录	3280 《世界华人消化杂志》投稿须知 3285 2012年国内国际会议预告
志 谢	3286 志谢世界华人消化杂志编委
消 息	3185 《世界华人消化杂志》栏目设置 3190 WJG总被引频次排名位于第174名 3196 《世界华人消化杂志》正文要求 3210 《世界华人消化杂志》外文字符标准 3217 WJG成功通过评审被PMC收录 3224 《世界华人消化杂志》性质、刊登内容及目标 3230 《世界华人消化杂志》出版流程 3243 百世登出版集团推出12种开放获取生物医学期刊全部被PubMed和PMC收录 3247 《世界华人消化杂志》参考文献要求 3251 《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) 3255 《世界华人消化杂志》修回稿须知 3265 2011年度《世界华人消化杂志》发文情况 3271 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
封面故事	《世界华人消化杂志》编委, 孙诚谊, 教授, 550001, 贵州省贵阳市, 贵阳医学院附属医院肝胆外科
本期责任人	编务 马帅; 送审编辑 田滢, 翟欢欢; 组版编辑 鲁亚静; 英文编辑 王天奇; 责任编辑 田滢; 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

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

吴阶平 题写封面刊名

陈可冀 题写版权刊名

(旬刊)

创 刊 1993-01-15

改 刊 1998-01-25

出 版 2012-11-28

原刊名 新消化病学杂志

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 太原消化病研究中心

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

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

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

编辑部主任 李军亮

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

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

特别声明

本刊刊出的所有文章不代表本刊编辑部和本刊编委会的观点, 除非特别声明。本刊如有印装质量问题, 请向本刊编辑部调换。

2012年版版权归世界华人消化杂志所有

World Chinese Journal of Digestology

November 2012 Contents in Brief Volume 20 Number 33

EDITORIAL	<p>3181 New understandings about gallbladder function <i>Sun CY, Zhu HT</i></p> <p>3186 Basic research and clinical application of islet transplantation: Current status and future prospects <i>Liu BL, Liu SQ, Cao XK</i></p>
BASIC RESEARCH	<p>3191 1,25-dihydroxyvitamin D₃ inhibits fibrosis in mice with NAFLD induced by a methionine-choline-deficient diet <i>Li YF, Tang XL, Ling WH</i></p> <p>3197 Treatment with baicalin up-regulates the expression of connexin 26 and connexin 43 in human hepatocellular carcinoma cell line SMMC-7721 <i>Guo Y, Wang N, Gao YM, Yao JF, Li Y, Yin CJ, Zhang WJ</i></p> <p>3203 Influence of treatment with <i>Bifidobacteria bifidum</i> on gut barrier function in IL-10 knockout mice <i>Han HZ, Liang Y, Shi CZ, Yang J</i></p> <p>3211 Sphingosine kinase 1 induces vasculogenic mimicry formation by up-regulating VEGF expression and secretion in human colon cancer cell line HT-29 <i>Li MT, Huang JA, Zhou Q, Su YJ, Liu SQ, Qin MB</i></p>
CLINICAL RESEARCH	<p>3218 Clinical significance of expression of hMLH-1 and hMSH-2 in sporadic colorectal carcinoma in Chinese Han patients in Xinjiang <i>Yu J, Zhao F, Liang LP, Shi XY</i></p>
REVIEW	<p>3225 Recent progress in understanding the effect of interventional therapy for hepatic carcinoma on immune function <i>Zhang GL, Zhao W</i></p> <p>3231 Role of TGF-β1 and its receptors in malignant progression of hepatocellular carcinoma <i>Cheng L, Xiang GY, Chen D</i></p> <p>3237 Combined therapy for acute hepatic failure <i>Song CF, Liu BR</i></p>
RAPID COMMUNICATION	<p>3244 Isolation of hepatic stellate cells by <i>in vitro</i> digestion <i>Fan WM, Liu DZ, Xiao L, Ma XH, Shi BY</i></p> <p>3248 Effect of different biliary drainage methods on intestinal barrier function in rats with obstructive jaundice <i>Li Q, Peng Y, Zou L, Fu WG</i></p>
CLINICAL PRACTICE	<p>3252 Implantation of esophageal stents under transnasal gastroscopy: An analysis of 40 cases <i>Ye W, Liu PF, Xiang B, Zhang W, Shen WD, Sun F</i></p> <p>3256 Clinical effects of docetaxel chemotherapy combined with radiotherapy in the treatment of esophageal cancer: A systematic review <i>Hu XJ, Zhang H, Shao GA, Wang SQ, Liu GF, Wang LK, Xu YY</i></p> <p>3266 Clinical significance of expression of S100A11 and Beclin1 in gastric carcinoma <i>Ma LJ, Lin YG</i></p> <p>3272 Improvement in nutritional status and quality of life in patients after percutaneous endoscopic gastrostomy <i>Lu JF, Jiang HX, Qin SY</i></p>

	3277 Surgical treatment of patients with traumatic liver rupture: An analysis of 23 cases <i>Zhan HC, Xu ZH, Zeng WH, Ding HM, Fu HQ</i>
APPENDIX	3280 Instructions to authors of <i>World Chinese Journal of Digestology</i> 3285 Meeting events calendar in 2012
ACKNOWLEDGMENT	3286 Acknowledgments to reviewers of <i>World Chinese Journal of Digestology</i>
COVER	Editorial Board Member of <i>World Chinese Journal of Digestology</i> , Cheng-Yi Sun, Professor, Department of Hepatic and Biliary Surgery, Affiliated Hospital of Guiyang Medical University, Guiyang 550001, Guizhou Province, China
RESPONSIBLE EDITORS FOR THIS ISSUE	Assistant Editor: <i>Shuai Ma</i> Review Editor: <i>Ying Tian, Huan-Huan Zhai</i> Electronic Page Editor: <i>Ya-Jing Lu</i> English Language Editor: <i>Tian-Qi Wang</i> Editor-in-Charge: <i>Ying Tian</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 November 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*

胆囊功能的新认识

孙诚谊, 朱海涛

孙诚谊, 朱海涛, 贵阳医学院附属医院肝胆外科 贵州省贵阳市 550001

孙诚谊, 教授, 博士生导师, 主任医师, 主要从事肝胆胰脾疾病的基础与临床研究。

作者贡献分布: 孙诚谊负责本文的构思立意与文章审核; 朱海涛负责收集参考文献与整理书写。

通讯作者: 孙诚谊, 教授, 550001, 贵州省贵阳市贵医街28号, 贵阳医学院附属医院肝胆外科. chengyisun@medmail.com.cn
电话: 0851-6771326

收稿日期: 2012-06-28 修回日期: 2012-09-06

接受日期: 2012-10-23 在线出版日期: 2012-11-28

New understandings about gallbladder function

Cheng-Yi Sun, Hai-Tao Zhu

Cheng-Yi Sun, Hai-Tao Zhu, Department of Hepatic and Biliary Surgery, Affiliated Hospital of Guiyang Medical University, Guiyang 550001, Guizhou Province, China

Correspondence to: Cheng-Yi Sun, Professor, Department of Hepatic and Biliary Surgery, Affiliated Hospital of Guiyang Medical University, 28 Guiyi Street, Guiyang 550001, Guizhou Province, China. chengyisun@medmail.com.cn
Received: 2012-06-28 Revised: 2012-09-06

Accepted: 2012-10-23 Published online: 2012-11-28

Abstract

The function of the gallbladder is to store and concentrate bile. Due to the high incidence of diseases such as gallstones, cholecystectomy has become one of the most common surgical procedures. Although cholecystectomy is a successful treatment for most patients, the loss of gallbladder function may contribute to chronic diarrhea and increase the incidence of proximal colon cancer, pancreatic cancer, hepatocellular carcinoma and esophageal adenocarcinoma. With the development of endoscopic technology and introduction of drugs that may prevent recurrence of gallstones, cholecystolithotomy with gall bladder preservation has become another choice for symptomatic gallstones, and it preserves the function of the gallbladder after the removal of gallstones. This may avoid the complications associated with the loss of gallbladder function.

Key Words: Gallbladder; Cholecystectomy; Cholecystolithotomy with gallbladder preservation; Laparoscopy; Cholangioscopy

Sun CY, Zhu HT. New understandings about gallbladder function. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(33): 3181-3185

摘要

胆囊的功能是浓缩和储存胆汁, 由于胆囊结石等疾病的高发病率, 胆囊切除术已成为最常见的外科手术之一。尽管对于多数患者来说, 胆囊切除术是一种成功的治疗, 但胆囊功能的丧失也可能导致慢性腹泻及近端结肠癌、胰腺癌、肝细胞癌、食管腺癌发病率升高等问题。随着内镜技术的发展和防止胆囊结石复发药物的使用, 保胆取石术已成为治疗胆囊结石的另一种选择。这种手术方式在治疗胆囊结石的同时也保留了胆囊的功能, 而这也可能可以避免因胆囊功能丧失所导致的问题。

关键词: 胆囊; 胆囊切除术; 保胆取石术; 腹腔镜; 胆道镜

孙诚谊, 朱海涛. 胆囊功能的新认识. *世界华人消化杂志* 2012; 20(33): 3181-3185

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3181.asp>

0 引言

众所周知, 胆囊的主要功能是浓缩和储存胆汁, 进餐后胆囊收缩, Oddi括约肌松弛, 胆汁排入十二指肠, 并以此在消化过程中发挥作用。由于胆囊结石等疾病多发, 胆囊切除术已成为普通外科最常见的手术之一。胆囊切除术治疗胆囊结石由德国名医Langenbuch于1882年创立。他认为“胆囊切除不仅因为胆囊内含有结石, 而且还因为他能生长结石”, 这就是著名的“温床学说”。但是该学说也备受质疑, 因为胆囊结石的成因目前多用Small三角代谢学说解释, 该学说认为胆囊胆汁中胆固醇浓度过饱和, 析出了固态的胆固醇结晶形成胆固醇结石, 但胆固醇是由肝脏分泌而来, 所以胆囊结石很可能是由于肝脏代谢障碍所致^[1,2]。胆囊切除术忽视了胆囊作为一个器官的功能, 随着胆囊切除术的广泛开展, 因为胆囊功能丧失而可能导致的慢

■背景资料

胆囊切除术多年来被奉为治疗有症状胆囊结石的“金标准”。而胆囊切除术后由于胆囊功能丧失而导致的慢性腹泻、结肠癌发病率升高等问题逐渐引起人们的关注。保胆取石术可以在祛除胆囊结石的同时保留胆囊, 但以往研究发现术后结石复发率升高而一度被否定。随着胆道镜等内镜技术的发展, 微创内镜保胆取石术成为了研究的热点, 这是因为内镜技术的发展可以很好地解决胆囊结石残留的问题, 而且目前的研究发现微创内镜保胆取石术后胆囊结石的复发率其实并不高, 以往研究发现保胆取石术后胆囊结石复发率高其实是术中取石不尽所致。同时保胆取石术后胆囊功能得到了保留, 从而可以避免很多由于胆囊功能丧失而导致的问题。

■同行评议者

宋振顺, 教授, 西京医院肝胆外科

■ 研发前沿

微创内镜保胆取石术已被证实是一种安全的手术,且目前研究发现由于胆囊功能得到保留所以慢性腹泻、结肠癌等的发病率较胆囊切除术后患者显著降低,但目前微创内镜保胆取石术的研究多为回顾性研究,缺乏前瞻性研究的资料和足够的循证医学证据,这需要在今后的研究中弥补。

性腹泻及结肠癌等恶性肿瘤发病率升高等问题早在20世纪就已经引起人们的注意。保胆取石术曾因为术后胆囊结石复发率高而一度被否定,但由于当时没有胆道镜等技术而很难保证术中取净结石,这也是以往保胆取石术后胆囊结石复发率高的原因之一。内镜技术的发展使保胆取石术后结石的残留率大大地降低,也使微创保胆取石术的开展成为可能。而同时随着预防术后胆囊结石复发药物的出现,保胆取石术已经成为治疗有症状胆囊结石的另一种治疗手段,而且这种治疗手段在治疗疾病的同时还保留了胆囊的功能,也在某种程度上避免了很多由于胆囊功能丧失而导致的问题。

1 胆囊切除术后消化功能的异常

尽管大多数患者认为胆囊切除术是一种成功的治疗,但是仍有近50%的患者术后会出现持续的消化不良症状。慢性腹泻是胆囊切除术后常见的消化功能异常^[3-5]。有报道报道大约17%的患者在胆囊切除术后会出现慢性腹泻^[6]。这可能是由于:(1)胆汁持续排入十二指肠及胆酸吸收障碍导致大肠胆酸量增加而导致的分泌性腹泻;(2)结肠运动加速;(3)身心的因素影响了肠的运动。在很多胆囊切除术后患者的大便中发现胆酸分泌增加,因此就认为胆酸在胆囊切除术后腹泻中起到了重要作用。而消胆胺的使用能使很多胆囊切除术后患者的腹泻症状得到迅速缓解也支持该假说^[7]。但是,在胆囊切除术后水样腹泻患者的大便中胆酸的浓度被发现远低于分泌水平^[8]。而胆酸吸收不良对胆囊切除术后腹泻的影响也受到了质疑,因为在肠蠕动正常的患者中也发现了胆酸的吸收不良^[9]。而实际上胆囊切除术后慢性腹泻目前并没有得到很有效的治疗,对胆囊切除术后腹泻治疗的改善还有待对其机制的进一步深入了解。胆囊切除术后慢性腹泻一般认为会导致患者出现腹胀、对某些食物耐受性差及体质量增加等不适^[10]。而这些不适对不同人群的生活会造成不同程度的影响,其中并不乏因慢性腹泻而严重影响生活和工作者。

2 胆囊切除术与恶性肿瘤发生

2.1 胆囊切除术与结肠癌及直肠癌的关系 胆囊切除术后胆汁的分泌由原来的进餐时周期性分泌变成了持续的胆汁分泌,从而增加了初级胆酸的脱羟基作用和脱氢作用而形成了致癌的次级

胆酸,而这些改变可能使结肠、直肠黏膜暴露在致癌的次级胆酸中^[11,12]。流行病学研究也发现了胆囊切除术与结肠癌可能存在的联系^[13,14]。Shao等^[15]通过对1987-05/2002-04英国40岁以上的55 960名胆囊切除术后患者及574 668名无胆囊结石人群的随访研究中发现,胆囊切除术后患者的结肠癌发病率有轻度上升,但胆囊切除术却与直肠癌的发病无关,进一步的分析发现胆囊切除术与近端结肠癌的发生相关,却与远端结肠癌的发生无关。结肠癌患者大便中胆酸的浓度也被发现要明显高于非结肠癌患者^[16]。此外,胆囊切除术后大便中的脂肪含量可能升高。也有假说认为结肠黏膜暴露于次级胆酸及未消化的脂肪中的时间增加可能导致黏膜破坏及随之而来的细胞增殖可能导致癌症的发生^[17,18]。

2.2 胆囊切除术与胰腺癌的关系 胰腺癌是恶性程度最高的恶性肿瘤之一,其5年生存率低于5%。有Meta分析发现胆囊切除术可能会增加胰腺癌发生的风险,且这种胰腺癌发生增加的风险与地域、性别、研究设计无关,而几个可能的生物学机制为:(1)胆囊切除术后循环中的胆囊收缩素水平会上升,而这可能会导致仓鼠胰腺癌的发生和刺激人胰腺癌细胞系的生长;(2)胆囊切除术后胆盐降解为次级胆酸增加(尤其是脱氧胆酸)。而次级胆酸或胆汁中的代谢产物可能在动物模型中对胰腺有致癌作用^[19,20]。

2.3 胆囊切除术与食管腺癌的关系 胆囊切除术后由于胆囊储存胆汁功能的缺失而使十二指肠内胆胆汁增多,胃内的胆汁也随之增多,进而使胆酸反流至食管的机会也增加^[21]。而在动物模型中发现胆汁对食管黏膜的致癌性超过了单纯的酸性液体反流^[22]。而食管腺癌与胃-食管反流及肥胖密切相关^[23,24]。Lagergren等^[25]通过对1965-2008年间在瑞典行胆囊切除术的共计345 251例患者长达平均15年的随访发现126例新发食管腺癌病例,胆囊切除术后食管腺癌的发病风险明显增高,而食管鳞状细胞癌的发病风险却没有明显增高。这是因为食管鳞状细胞癌的发病与反流无关。而在有胆囊结石却未行胆囊切除术的患者中,食管腺癌的发病风险并未增加。

2.4 胆囊切除术与肝细胞癌的关系 肝细胞癌常见的病因包括:肝炎、肝硬化、黄曲霉毒素、酒精、糖尿病、肥胖等。而最近胆囊切除术与肝细胞癌的关系也逐渐地引起了人们的重视。Lagergren等^[26]通过对1965-2008年在瑞典行胆囊

■ 相关报道

张宝善等重点论述了经过腹腔镜微创保胆取石术后胆囊结石的复发率并不高,对于胆囊疾患,医师应该首先考虑保护人体的器官功能,维持内环境的平衡,必要时再考虑切除胆囊,更不要无理由的“预防”和“顺便”切除胆囊。

切除术的共计345 251例患者平均长达15.1年的随访发现胆囊切除术后患者从长期来看存在肝细胞癌发生风险的增加. 其可能的机制为: 胆囊切除术后胆道压力会增加, 而肝内胆管会随之扩张, 这可能会导致肝组织周围的慢性炎症^[27]. 而这种慢性炎症可能会导致肝细胞的增殖和最终导致癌变^[28].

3 腹腔镜、胆道镜联合保胆取石术

直到19世纪晚期胆囊切除术成为一种安全的手术之前, 胆囊造瘘并取净结石都是胆囊结石并急性胆囊炎的外科治疗手段. Norrby等与Gibney等^[29,30]报道在15年的随访中发现保胆取石术后患者有约83%的复发率, 所以自1970年以后, 保胆取石术已经不被人们所提及. 在其后的外科治疗中, 保胆取石仅限于患者局部炎症重或身体状况差而不适宜行胆囊切除术者, 但术后的结石复发在这类患者中仍然是个大问题^[31]. 胆囊切除术不仅可以有效地治疗胆囊的急性炎症, 也不存在术后胆囊结石复发的风险, 且对大多数患者来说是一种安全而简单的手术, 但胆囊切除术仍存在约0.38%-0.80%的胆道损伤发生率等保胆取石术所不存在的风险^[32,33]. 胆道损伤是胆囊切除术永远不可避免的一个风险, 而他会严重影响患者生活质量, 甚至危及生命^[34]. 而且随着胆囊切除术的广泛开展, 胆囊切除术后诸如慢性腹泻、结肠癌发病率升高等问题也逐渐引起了人们的重视.

以往的保胆取石术由于没有胆道镜等设备, 导致术中结石残留率高, 且无有效的药物防止结石复发, 这些都是造成术后结石复发率高的原因. 现在的研究发现牛磺熊去氧胆酸等药物能有效地防止保胆取石术后结石的复发^[35]. 而微创外科、胆道镜等技术的发展也使保胆取石手术成为了一种微创、结石残留率低, 且较胆囊切除术更安全, 又能够保留胆囊功能的一种手术方式^[36,37]. 刘京山等^[38]在对612例胆囊结石患者行纤维胆道镜下行保胆取石术后的1-15年随访中发现: 术后1年胆囊结石的复发率为0.49%, 2年复发率为4.39%, 3年复发率为5.83%, 5年复发率为6.60%, 7年复发率为7.21%, 9年复发率为8.38%, 10年和15年复发率均为10.11%. 张宝善等^[39]在对612例内镜微创保胆取石术后患者15年的随访中发现其复发率为5.39%. 荣万水等^[40]在对6 750例胆囊切除术后和3 699例内镜微创保胆取石术后患者进行平均3.42年的随访后发现

保胆取石术后结肠癌的发生率较胆囊切除术后患者显著降低. 而对于保胆取石术后胰腺癌等其余恶性肿瘤的发生率是否与胆囊切除术后患者有显著差异的研究尚未见报道, 这可能是因为保胆取石术开展的例数及术后随访时间尚有限所致. 保胆取石术后胆囊功能的评估是评价其疗效的重要指标之一. 李云等^[41]在对80例保胆取石术后患者的随访中发现, 患者术后6 mo及半年的胆囊壁厚较术前有明显变薄, 胆囊收缩面积也明显增加, 且消化功能未见异常, 这提示保胆取石术后胆囊的功能得到了保存.

采用保胆取石术治疗胆囊结石亦存争议. 有人认为保胆取石术后胆囊壁厚虽有显著变薄, 但仅仅提示可能是急性炎症确有消退, 并不能从组织病理学层面证明慢性炎症及其后续进展过程已经根本逆转或不再复现. 此外, 目前对保胆取石术后胆囊功能的评价尚无统一标准, 也就是说保胆取石术后究竟保留了多少胆囊功能还无法准确界定. 胆囊癌虽然发病率低, 但一旦发生后果严重, 所以应“切胆”, 而非“保胆”. 而更重要的是保胆取石术治疗胆囊结石目前尚缺乏可靠的循证医学证据^[42]. 对于以上几点质疑, 我们认为: (1)关于保胆取石术后炎症改变因为无法取组织样本, 所以很难用病理学检查去证实, 而只有用长期的随访去评价其影响; (2)胆囊功能目前多采用B超测定空腹及脂餐后胆囊收缩面积>30%、口服胆囊造影、ECT检查等来评估^[43-46]. 虽然保胆取石术后胆囊功能的评价目前的确尚无统一的标准, 这还有待进一步的研究后再建立, 但这并不能否认保胆取石术后保留了胆囊的功能; (3)胆囊癌的发生与胆囊结石之间的关系尚存争议, 所以因胆囊结石而切除胆囊以防止胆囊癌发生的说法还值得商榷^[47]; (4)而保胆取石术治疗胆囊结石的研究目前多为回顾性病例分析, 描述性研究, 且保胆取石术缺乏相应的循证医学证据^[48]. 但保胆取石术的循证医学证据则需要积累了一定的病例数及随访时间后才可能得出. 所以, 我们认为以上质疑并不能说明保胆取石术不合理. 同时我们也应该认识到, 并非所有的胆囊结石患者都适合行保胆取石术. 如萎缩性胆囊炎、胆囊壁钙化、胆囊结石合并Mirizzi综合征、胆囊结石合并胆囊癌、胆囊结石合并胆囊腺肌症等目前认为不适合行保胆取石术^[49].

我们自2011-05以来, 开展了36例腹腔镜、胆道镜联合保胆取石术, 目前我们采用的手术

■创新盘点

本文集中回顾了胆囊切除术后慢性腹泻及结肠癌、胰腺癌、食管腺癌、肝细胞癌等恶性肿瘤可能升高的研究报道, 并在本课题组所行的微创保胆取石术后患者随访中未发现慢性腹泻的出现, 而结肠癌、胰腺癌、食管腺癌、肝细胞癌等恶性肿瘤的发生率是否较胆囊切除术后患者降低, 则有待更长时间、更多病例验证.

■应用要点

并非所有的有症状胆囊结石患者都适合行微创内镜保胆取石术, 本文中提出了手术适应症, 并在术后的随访中并未发现患者出现慢性腹泻及结石复发等现象.

■名词解释

腹腔镜、胆道镜联合保胆取石术: 采用腹腔镜在微创下打开胆囊用胆道镜取尽胆囊结石后缝合胆囊, 以尽量保留胆囊功能的一种手术方式。

适应症是: (1)患者年龄20-75岁; (2)术前胆囊功能测定显示胆囊收缩功能良好(脂肪餐后2 h胆囊收缩>30%); (3)无合并急性胆囊炎、胰腺炎、胆总管结石、胆总管梗阻等情况, 无上腹部手术史; (4)B超提示胆囊壁厚 ≤ 4 mm; (5)无合并严重心肺肝功能疾患, 无凝血机制障碍, 非结核病活动期; (6)非怀孕期及哺乳期妇女。术后第一个月患者口服牛磺熊去氧胆酸250 mg早晚各1次, 其后5 mo口服牛磺熊去氧胆酸250 mg早晚各1次每5 d停10 d。其中随访期达6 mo以上的为21例, 在9.24 mo \pm 2.62 mo的随访时间内尚无患者发现胆囊结石复发。而且所有保胆取石术后患者均未发现出现慢性腹泻现象。徐新保等^[50]对53例腹腔镜保胆取石术和息肉摘除术患者的临床分析中也发现患者术后饮食、大便均未见异常。

4 结论

胆囊切除术作为有症状胆囊结石等胆囊疾病治疗手段已被广泛接受。毫无疑问, 胆囊切除术的确在消除如胆囊结石导致急性胆囊炎等方面有着立竿见影的效果, 但其术中存在胆道损伤等风险, 术后也由于胆囊功能的丧失而可能产生诸如近期的慢性腹泻和远期的近端结肠癌、胰腺癌、肝细胞癌等发病率上升等一些问题。由此可见, 胆囊切除术是治疗有症状胆囊结石等胆囊疾病的一种治疗手段, 但胆囊切除术忽略了胆囊作为一个人体器官的功能。保胆取石术可以在祛除胆囊结石的同时也保留了胆囊的功能。而且在同样微创的情况下, 保胆取石术不存在如胆囊切除术中胆道损伤等对患者伤害极大的风险。当然, 保胆取石术并非适用于所有的胆囊结石患者, 保胆取石术的适应证和禁忌证也需要在不断的工作实践和总结中去完善。在对行保胆取石术患者的术后随访中, 我们尚未发现有慢性腹泻的病例, 这可能是由于胆囊功能得以保留的结果。由此可见, 保留胆囊功能的保胆取石术是较胆囊切除术更符合生理的一种治疗选择。

5 参考文献

- 1 张宝善. 腹腔镜微创保胆取石新思维的讨论. 腹腔镜外科杂志 2009; 14: 241-243
- 2 冉瑞图. 关于胆囊切除术的几点意见. 中国普外基础与临床杂志 2008; 15: 81-82
- 3 曾仲, 王曙光, 别平, 陈耿, 董家鸿. 腹腔镜胆囊切除术后远期疗效评价(附3 200例报告). 腹腔镜外科杂志 2006; 11: 344-345
- 4 刘京山, 荣万水, 邓勇, 刘衍民, 乔铁, 周望先, 胡乃海, 李志东, 贺宪, 胡海, 孙文生, 杨玉龙, 张阳德, 张宝善.

- 胆石症术后不良反应多中心联合调查分析. 中国内镜杂志 2011; 17: 1009-1013
- 5 刘志强, 吕金寿, 徐兵. 胆囊切除术后腹泻分析. 中国医药指南 2010; 8: 166-167
- 6 Fisher M, Spiliadis DC, Tong LK. Diarrhoea after laparoscopic cholecystectomy: incidence and main determinants. *ANZ J Surg* 2008; 78: 482-486
- 7 Sciarretta G, Furno A, Mazzoni M, Malaguti P. Post-cholecystectomy diarrhea: evidence of bile acid malabsorption assessed by SeHCAT test. *Am J Gastroenterol* 1992; 87: 1852-1854
- 8 Fromm H, Tunuguntla AK, Malavolti M, Sherman C, Ceryak S. Absence of significant role of bile acids in diarrhea of a heterogeneous group of postcholecystectomy patients. *Dig Dis Sci* 1987; 32: 33-44
- 9 Suhr O, Danielsson A, Nyhlin H, Truedsson H. Bile acid malabsorption demonstrated by SeHCAT in chronic diarrhoea, with special reference to the impact of cholecystectomy. *Scand J Gastroenterol* 1988; 23: 1187-1194
- 10 Qureshi MA, Burke PE, Brindley NM, Leahy AL, Osborne DH, Broe PJ, Bouchier-Hayes DJ, Grace PA. Post-cholecystectomy symptoms after laparoscopic cholecystectomy. *Ann R Coll Surg Engl* 1993; 75: 349-353
- 11 Chiong C, Cox MR, Eslick GD. Gallstones are associated with colonic adenoma: a meta-analysis. *World J Surg* 2012; 36: 2202-2209
- 12 Malagelada JR, Go VL, Summerskill WH, Gamble WS. Bile acid secretion and biliary bile acid composition altered by cholecystectomy. *Am J Dig Dis* 1973; 18: 455-459
- 13 Schernhammer ES, Leitzmann MF, Michaud DS, Speizer FE, Giovannucci E, Colditz GA, Fuchs CS. Cholecystectomy and the risk for developing colorectal cancer and distal colorectal adenomas. *Br J Cancer* 2003; 88: 79-83
- 14 Giovannucci E, Colditz GA, Stampfer MJ. A meta-analysis of cholecystectomy and risk of colorectal cancer. *Gastroenterology* 1993; 105: 130-141
- 15 Shao T, Yang YX. Cholecystectomy and the risk of colorectal cancer. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 1813-1820
- 16 Hepner GW, Hofmann AF, Malagelada JR, Szczepanik PA, Klein PD. Increased bacterial degradation of bile acids in cholecystectomized patients. *Gastroenterology* 1974; 66: 556-564
- 17 Narisawa T, Magadia NE, Weisburger JH, Wynder EL. Promoting effect of bile acids on colon carcinogenesis after intrarectal instillation of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in rats. *J Natl Cancer Inst* 1974; 53: 1093-1097
- 18 Roda E, Aldini R, Mazzella G, Roda A, Sama C, Festi D, Barbara L. Enterohepatic circulation of bile acids after cholecystectomy. *Gut* 1978; 19: 640-649
- 19 Ura H, Makino T, Ito S, Tsutsumi M, Kinugasa T, Kamano T, Ichimiya H, Konishi Y. Combined effects of cholecystectomy and lithocholic acid on pancreatic carcinogenesis of N-nitrosobis(2-hydroxypropyl)amine in Syrian golden hamsters. *Cancer Res* 1986; 46: 4782-4786
- 20 Lin G, Zeng Z, Wang X, Wu Z, Wang J, Wang C, Sun Q, Chen Y, Quan H. Cholecystectomy and risk of pancreatic cancer: a meta-analysis of observational studies. *Cancer Causes Control* 2012; 23: 59-67
- 21 Kunsch S, Neesse A, Huth J, Steinkamp M, Klaus J, Adler G, Gress TM, Ellenrieder V. Increased Duodeno-Gastro-Esophageal Reflux (DGER) in

- symptomatic GERD patients with a history of cholecystectomy. *Z Gastroenterol* 2009; 47: 744-748
- 22 Marshall RE, Anggiansah A, Owen WJ. Bile in the oesophagus: clinical relevance and ambulatory detection. *Br J Surg* 1997; 84: 21-28
- 23 Lagergren J, Bergström R, Lindgren A, Nyrén O. Symptomatic gastroesophageal reflux as a risk factor for esophageal adenocarcinoma. *N Engl J Med* 1999; 340: 825-831
- 24 Hampel H, Abraham NS, El-Serag HB. Meta-analysis: obesity and the risk for gastroesophageal reflux disease and its complications. *Ann Intern Med* 2005; 143: 199-211
- 25 Lagergren J, Mattsson F. Cholecystectomy as a risk factor for oesophageal adenocarcinoma. *Br J Surg* 2011; 98: 1133-1137
- 26 Lagergren J, Mattsson F, El-Serag H, Nordenstedt H. Increased risk of hepatocellular carcinoma after cholecystectomy. *Br J Cancer* 2011; 105: 154-156
- 27 Tanaka M, Ikeda S, Nakayama F. Change in bile duct pressure responses after cholecystectomy: loss of gallbladder as a pressure reservoir. *Gastroenterology* 1984; 87: 1154-1159
- 28 El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology* 2007; 132: 2557-2576
- 29 Norrby S, Schönebeck J. Long-term results with cholecystolithotomy. *Acta Chir Scand* 1970; 136: 711-713
- 30 Gibney RG, Chow K, So CB, Rowley VA, Cooperberg PL, Burhenne HJ. Gallstone recurrence after cholecystolithotomy. *AJR Am J Roentgenol* 1989; 153: 287-289
- 31 Zou YP, Du JD, Li WM, Xiao YQ, Xu HB, Zheng F, Huang H, Liu HR, Li HC. Gallstone recurrence after successful percutaneous cholecystolithotomy: a 10-year follow-up of 439 cases. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2007; 6: 199-203
- 32 Karvonen J, Salminen P, Grönroos JM. Bile duct injuries during open and laparoscopic cholecystectomy in the laparoscopic era: alarming trends. *Surg Endosc* 2011; 25: 2906-2910
- 33 闵志钧, 叶敏, 徐明. 腹腔镜胆囊切除术并发症原因分析. *肝胆胰外科杂志* 2009; 21: 65-67
- 34 陈祖兵, 沈世强, 丁佑铭, 鄢善敏, 张爱民, 王卫星. 胆囊切除术胆道损伤20例的Strasberg分型、处理与预后. *腹部外科* 2010; 23: 346-347
- 35 骆助林, 陈理国, 苗建国, 闫洪涛, 任建东, 肖乐, 田伏洲. 口服泻罗特预防保胆取石术后结石复发的临床观察. *中国内镜杂志* 2012; 18: 166-168
- 36 张同领, 吴浩荣. 腹腔镜联合硬性胆道镜微创保胆取石(息肉)术60例临床分析. *中国内镜杂志* 2011; 17: 625-628
- 37 刘建辉, 李全福, 邵青龙, 魏银江, 梁捷. 腹腔镜辅助胆道镜保胆取石术与腹腔镜胆囊切除术的比较. *中国内镜杂志* 2012; 18: 199-202
- 38 刘京山, 李晋忠, 赵期康, 金斗, 侯郑生, 黄坤全, 杜文, 于景波, 张宝善, 康晓平. 纤维胆道镜下胆囊切开取石保胆治疗胆囊结石612例随访结果分析. *中华外科杂志* 2009; 47: 279-281
- 39 张宝善, 刘京山. 内镜微创保胆取石1520例临床分析. *中国普通外科手术学杂志(电子版)* 2009; 3: 410-414
- 40 荣万水, 吴建华, 曾庆敏, 孔德明, 刘京山. 胆囊切除术与保胆术治疗胆囊结石的比较. *中国普通外科杂志* 2011; 20: 814-817
- 41 李云, 许建平, 简锋, 庾智华, 陈际. 腹腔镜下保胆取石术治疗有功能胆囊结石80例. *中华普通外科科学文献(电子版)* 2010; 4: 47-48
- 42 张永杰. 对现阶段倡导保胆取石的几点质疑. *肝胆胰外科杂志* 2010; 22: 355-357
- 43 刘锦新, 韩伟, 陈海. 微创保胆取石术与腹腔镜胆囊切除术治疗胆囊结石的疗效对比. *中国普通外科杂志* 2009; 18: 303-305
- 44 曹中伟, 陈剑秋, 张生彬, 张阳德. 腹腔镜联合纤维胆道镜保胆取石的临床分析. *中国内镜杂志* 2009; 15: 648-650
- 45 李晋忠, 刘京山, 赵期康, 姜雅聪, 孔德志, 胡子文. 术前肝胆囊静态显像胆囊未显影行微创保胆取石术33例临床分析. *中国内镜杂志* 2009; 15: 1271-1273, 1276
- 46 刘建辉, 邵青龙, 魏银江, 梁捷, 李全福. 腹腔镜联合胆道镜保胆取石的临床研究. *中国普通外科杂志* 2009; 18: 829-879
- 47 Shrikhande SV, Barreto SG, Singh S, Udwadia TE, Agarwal AK. Cholelithiasis in gallbladder cancer: coincidence, cofactor, or cause! *Eur J Surg Oncol* 2010; 36: 514-519
- 48 王惠群, 傅贤波. 我国内镜微创保胆取石术的发展现状分析. *中国微创外科杂志* 2010; 10: 481-485
- 49 王坚, 王昊陆, 李可为. 胆囊结石治疗策略的争论与选择: 胆囊切除还是保胆取石. *中国实用外科杂志* 2011; 31: 44-46
- 50 徐新保, 张辉, 张洪义, 刘承利, 何晓军, 肖梅, 张宏义, 冯志强. 腹腔镜保胆取石术和息肉切除术临床分析53例. *世界华人消化杂志* 2012; 20: 1889-1894

■同行评价

本文回顾部分文献,并结合自己的临床实践,提出保留胆囊功能的保胆取石术是较胆囊切除术更符合生理的一种治疗选择;对胆囊结石的不同外科治疗选择具有一定的临床指导意义。

编辑 李军亮 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。

胰岛移植的临床与科研现状及展望

刘宝林, 刘世庆, 曹献馗

■背景资料

2000年后, 自EDMONTON方案发表以来, 世界再次掀起胰岛移植研究临床及基础研究的高潮, 但5年以后, 当EDMONTON的5年随访结果发表后, 人们开始审视所作的努力, 使我们再次从基础到临床, 甚或免疫等方面审视及探索胰岛移植未来的方向。

刘宝林, 刘世庆, 曹献馗, 中国医科大学附属盛京医院外科辽宁省沈阳市 110004

刘宝林, 教授, 主任医师, 博士研究生导师, 主要从事肝胆胰疾病诊治、结直肠微创外科、肝及胰岛移植等的临床及基础研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30972908

沈阳市科委自然科学基金资助项目, No. F10-205-1-36

作者贡献分布: 刘宝林与刘世庆设计课题及设施; 刘世庆与曹献馗收集、整理、分析数据; 刘世庆与刘宝林撰写草稿, 刘宝林审校稿件。

通讯作者: 刘宝林, 教授, 主任医师, 110004, 辽宁省沈阳市和平区三好街36号, 中国医科大学附属盛京医院外科。

liubl55@hotmail.com

电话: 024-96615-31914

收稿日期: 2012-06-29 修回日期: 2012-09-01

接受日期: 2012-10-23 在线出版日期: 2012-11-28

Basic research and clinical application of islet transplantation: Current status and future prospects

Bao-Lin Liu, Shi-Qing Liu, Xian-Kui Cao

Bao-Lin Liu, Shi-Qing Liu, Xian-Kui Cao, Department of Surgery, Shengjing Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China

Supported by: National Nature Science Foundation of China, No. 30972908; and the Natural Science Foundation of Shenyang Science and Technology Committee, No. F10-205-1-36

Correspondence to: Bao-Lin Liu, Professor, Department of Surgery, Shengjing Hospital, China Medical University, 36 Sanhao Street, Heping District, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. liubl55@hotmail.com

Received: 2012-06-29 Revised: 2012-09-01

Accepted: 2012-10-23 Published online: 2012-11-28

Abstract

Type 1 diabetes mellitus is a chronic autoimmune disease. Although treatment with insulin is effective in most patients with type 1 diabetes mellitus, it can result in severe hypoglycemia which can be even deadly in some patients. Beta cell replacement, which can be achieved by whole pancreas transplantation or isolated islet cell transplantation, is usually used to restore physiologic glucose homeostasis. Compared with pancreas transplantation, islet transplantation has certain advantages. However, there was not a great breakthrough in islet transplantation until 2000 when the Edmonton protocol was published. However, some investigators believe

that progressive graft loss and lack of reproducibility are fatal flaws of the Edmonton protocol. Thus, the protocol needs some improvements. In this article, we briefly describe the Edmonton protocol and its improvements and review the current status and future prospects of islet transplantation.

Key Words: Islet transplantation; Stem cells; Xenotransplantation; Immunologic tolerance

Liu BL, Liu SQ, Cao XK. Basic research and clinical application of islet transplantation: Current status and future prospects. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(33): 3186-3190

摘要

1型糖尿病是一种慢性自身免疫性疾病, 胰岛素对于绝大多数患者有效, 然而许多1型糖尿病患者有发生严重的低血糖的风险, 甚至危及生命。目前临床上使用β细胞替代治疗的方法来恢复血糖的生理稳态, 包括胰腺移植和胰岛移植。与胰腺移植相比, 胰岛移植有很多优点, 但移植后效果一直不理想, 直至2000年EDMONTON方案的提出才为胰岛移植带来革命性的突破。然而, 一些研究者将移植胰岛的进行性丧失和该方案的不可复制性视为EDMONTON方案的致命缺陷, 因此其需要进行进一步改善。本文将简述EDMONTON方案和对它的改进, 重点讲述胰岛移植的临床和科研现状及展望。

关键词: 胰岛移植; 干细胞; 异种移植; 免疫耐受

刘宝林, 刘世庆, 曹献馗. 胰岛移植的临床与科研现状及展望. *世界华人消化杂志* 2012; 20(33): 3186-3190
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3186.asp>

0 引言

1型糖尿病是一种慢性自身免疫性疾病, 其选择性地破坏胰岛β细胞, 导致胰岛素的绝对缺乏, 从而产生一系列代谢障碍, 尤其会削弱人体的血糖稳态功能^[1]。胰岛素对于治疗1型糖尿病至关重要, 糖尿病的控制和并发症试验(DCCT)证实严格控制血糖能够预防甚至逆转1型糖尿病

■同行评议者

洪天配, 教授, 北京大学第三医院内分泌科; 傅志仁, 主任医师, 上海长征医院器官移植科

的长期并发症^[2,3]。然而外源性的胰岛素治疗只能控制血糖水平,不能治愈1型糖尿病,使血糖恢复生理稳态。此外,许多1型糖尿病患者有一定程度的无症状低血糖倾向,即不能感知低血糖的发生,不对这些患者进行严格的血糖控制则有可能导致严重的低血糖,甚至危及生命^[4]。据统计,因1型糖尿病死亡的患者中10%以上是无症状性低血糖导致的^[5]。尽管近年来胰岛素治疗取得了很大的进展,然而无症状性低血糖的发生率在过去20年没有下降^[6]。因此,迫切需要其他治疗方法来解决这一问题。临床上使用 β 细胞替代治疗的方法来恢复血糖的生理稳态,这包括胰腺移植和胰岛移植。目前肾-胰联合移植适用于糖尿病终末期肾病患者,肾移植后胰腺移植适用于已经成功进行肾移植的1型糖尿病患者,对于肾功能正常但有严重的无症状性低血糖和血糖不稳定的患者也可以进行单纯胰腺移植。成功的胰腺移植,可以使患者脱离胰岛素,改善生活质量,减少甚至逆转高血糖相关的并发症(如糖尿病肾病)。然而,胰腺移植是一把双刃剑,不仅为患者带来益处,与之相伴随的是长期服用免疫抑制剂,手术并发症以及移植器官排斥反应^[7]。与胰腺移植相比,胰岛移植手术操作相对简单,围术期并发症率低。同时,胰岛移植的供体来源更加广泛,可以使用不适于胰腺移植的胰腺进行胰岛分离、体外胰岛扩增、或生物工程技术制备胰岛细胞系,并且供体胰岛可以冷冻保存便于运输和贮存。1972年,通过胰岛移植逆转了大鼠的糖尿病,这开启了现代胰岛移植的序幕^[8]。从此,胰岛移植取得了许多重大进展,包括移植部位的选择、胰岛的分离技术等。然而此后近30年间临床胰岛移植的效果并不理想,直至2000年EDMONTON方案的提出才为胰岛移植带来革命性的突破^[9]。本文将简述EDMONTON方案及其改进,重点讲述胰岛移植的临床和科研现状及展望。

1 EDMONTON方案及其改进

1.1 EDMONTON方案 1999年,EDMONTON小组为7位反复发生严重低血糖的1型糖尿病患者进行了胰岛移植,移植后使用达珠单抗行免疫抑制诱导,应用不含糖皮质激素的方案(包括他克莫司和西罗莫司)维持免疫抑制。胰岛移植后1年进行随访,所有的7位患者都脱离了胰岛素,血糖波动减小,且无任何人发生严重的低血糖。2000年EDMONTON方案提出后,在全世界引起

了巨大轰动,极大的增加了人们对应用胰岛移植治疗1型糖尿病的信心^[9]。

1.2 EDMONTON方案面临的问题 2004年EDMONTON小组进行的一项包括65位患者的临床研究随访发现,胰岛移植后患者的 β 细胞功能随着时间进行性丧失。胰岛移植5年后,尽管80%的患者的胰岛仍存在部分功能,但是只有10%完全脱离胰岛素^[10]。2006年一项包括36名患者的国际多中心实验对EDMONTON方案进行验证,不同中心的结果有很大差异。移植1年后随访,只有16位患者完全脱离胰岛素,10位患者的移植植物有部分功能,而其余10位患者移植植物的胰岛功能完全丧失。移植3年后,只有1位患者完全脱离胰岛素^[11]。

一些研究者将移植胰岛的进行性丧失和该方案的不可复制性视为EDMONTON方案的致命缺陷。意大利的研究者提出他克莫司和西罗莫司可能会抑制 β 细胞的再生,长期使用有肾毒性。此外,胰岛移植失败后所产生的同种抗体可能会影响将来进行的胰肾联合移植。鉴于上述理由,他们认为这是对有限的胰腺供体的浪费,并终止了其胰岛移植项目^[12-14]。对于这些反对意见,EDMONTON小组做出了回应,他们认为胰岛移植最大的目的就是预防无症状性低血糖和睡眠中死亡事件的发生,因此只要有部分移植胰岛的功能存在,可能会达到这个目的^[15]。

1.3 EDMONTON方案的改进 2004年在美国国立卫生研究院(NIH)和食品及药物管理局(FDA)的领导下,8家美国学术中心联合成立了临床胰岛移植协会。目前该协会正在从事两项临床胰岛移植研究工作,他们对EDMONTON方案做了重大的改进,包括以下4个方面:(1)使用改进的胶原酶混合物进行统一和标准化的胰岛分离;(2)使用多克隆抗胸腺细胞球蛋白ATG和TNF- α 拮抗剂进行免疫抑制诱导;(3)采用不含糖皮质激素的免疫抑制维持方案(包括低剂量他克莫司和雷帕霉素);(4)在移植前对胰岛进行体外培养。该协会进行这两项研究的主要目的是证实胰岛移植对于治疗1型糖尿病患者严重的无症状性低血糖的有效性,研究的主要终点为移植后1年患者脱离胰岛素、不发生严重低血糖以及糖化血红蛋白(HbA1c)低于7%所占的比例。这两项研究预计在2012-2013年结束,其研究结果对临床胰岛移植可能会产生较大的影响^[16]。

2 胰岛移植所面临的问题与展望

尽管在过去的数十年中胰岛移植取得了许多重

■ 研发前沿
研究回顾胰岛移植临床及基础研究热点、难点,现在面临的困境,未来可能的方向等。尤其国内面临的困难更多,研究者要立足现实,针对胰岛移植的困难,应对所面临的挑战,才能柳暗花明又一村。

■创新盘点

文章对国内外胰岛移植的前沿及困境、面临的挑战进行盘点,针对目前问题,提出思路,对未来研究方向提出展望。

大的突破,然而仍有许多问题亟待解决,其中最主要的问题包括供体短缺和移植物难以长期存活。如何解决供体短缺问题,提高移植物的长期存活率,已经成为当前胰岛移植领域临床和科学研究的热点和难点。

2.1 胰岛移植的供体来源 目前临床上常用的供体主要为同种尸体供体,通常需要2-4个供体胰腺才能分离出一次胰岛移植所需要的胰岛,尽管胰岛分离的技术不断改进,并且已有单个供体胰岛移植成功的报道,但供体数量仍远远不能满足临床需求。为了解决这个问题,人们将目光转向了其他潜在的供体来源,包括干细胞移植和异种胰岛移植。

2.1.1 干细胞移植: 干细胞在理论上可以取之不尽并可以进行免疫修饰,因此干细胞移植被寄予厚望。研究发现,人胚胎干细胞(hESCs)可以在体外诱导分化成胰腺前体细胞,人胰腺导管细胞也可以转分化成 β 细胞^[17,18]。与之相似的,小鼠实验也表明胆管上皮细胞,腺泡细胞以及肝细胞都可以转分化成 β 细胞^[19-21]。上述来源为胰岛供体来源提供了光明的前景,但目前仍处于基础研究阶段,距临床应用尚有很多问题需要解决。

2.1.2 异种胰岛移植: 由于猪与人的胰岛素非常接近,用猪作为胰岛来源已经成为当前异种胰岛移植的研究热点。动物实验表明,对非人类的灵长类进行猪胰岛移植取得了令人振奋的结果。异种移植后的糖尿病灵长类动物可以维持正常血糖长达数月,而使用表达hCD46(一种人类补体调节蛋白)的转基因猪胰岛并且联合应用免疫抑制剂可以使糖尿病猴维持正常血糖超过1年^[22]。与成年猪胰岛相比,新生猪胰岛(尤其是转基因猪)更加容易分离纯化,移植后更容易增殖,并且可以降低成本,因此更适于成为异种胰岛移植的供体。在有限的几项临床研究中,一些科研人员将微囊化新生猪胰岛移植给1型糖尿病患者,并且移植后不使用免疫抑制剂,取得了一定的效果,并且无明显的不良反应发生,这证明了进行猪胰岛移植的可行性^[23]。在安全性方面,进行猪胰岛移植有可能感染猪体内的逆转录病毒,然而有研究表明这些病毒不会对接受移植的患者及其接触者产生太大的风险。尽管如此,在安全性方面仍未有定论,需要进一步研究。目前异种胰岛移植面临的主要问题是缺少临床经验,尚无适合的免疫抑制方案,选择更适于反复进行胰岛移植的部位以及心理、伦理等方面的问题等,仍需要大量的基础和临床研究^[24]。

2.2 移植物的长期存活问题 至今为止,绝大多数的临床胰岛移植的长期结果都不理想,最主要的原因是移植胰岛难以长期存活,移植物的功能逐渐丧失。其原因较为复杂,但主要包括两方面:一方面,目前胰岛移植的主要途径是通过门脉系统输注胰岛,移植物的植入率较低,通常需要单次输入大量的胰岛才能达到目的,但即便如此,移植物的微血管化效果仍较差,长期存活率极低^[25];另一方面,胰岛移植后需要同时抑制异体免疫排斥和自身免疫反应,然而目前在移植领域使用的经典免疫抑制剂对胰岛几乎都有毒性,因此对免疫抑制方案的要求更苛刻^[26]。为了解决上述两个问题,目前有两个研究热点:一是诱导受体产生仅针对移植胰岛的特异性免疫耐受;二是微囊化胰岛移植。

2.2.1 诱导受体产生特异性免疫耐受: 在器官移植的基础和临床研究中,通过向受体输注供体骨髓干细胞,可以使受体成为造血嵌合体,这可以减少甚至是避免免疫抑制剂的使用^[27-29]。通过这种方式,还可以减少不良反应、调节免疫、改善移植物的存活。这对于胰岛移植很具有吸引力,理论上这可以使移植物长期存活,并且可以减少或避免长期使用免疫抑制剂的不良反应。这种方式对于胰岛移植是可行的,然而目前临床资料较少,且临床效果不可靠,因此仍有待于进一步研究^[26]。联合输注供体的骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)和胰岛可以提高植入率并有利于胰岛长期存活,值得深入研究^[30]。此外,将供体的骨髓干细胞和胰岛同时输入受体的骨髓也可能是将来的一种选择^[31]。但骨髓移植需要的诱导治疗及其可能的毒性及相应降低不良反应的措施,需要临床研究提供有效及安全性的方案才可实施,并需要伦理学的进一步证据支持。

2.2.2 微囊化胰岛移植: 微囊化胰岛移植是指通过使用多聚体材料将胰岛微囊化,只允许氧气、葡萄糖、胰岛素、营养物质通过,而不允许抗体和细胞活素通过,为胰岛创造一个免疫豁免的人工微环境。目前该技术的最大问题是微囊内胰岛的氧供不足,导致微囊中心的细胞缺血坏死,影响移植物的长期存活,因此该技术有待于进一步改进。并且微囊化胰岛因其体积庞大,作为人同种异体移植的合适植入部位尚需进一步研究^[32,33]。

3 国内的现状及发展方向

国内在20世纪90年代前曾有胎胰胰岛移植的报

道, 但后续的工作因伦理学的质疑而终止, 在2000年后因EDMONTON方案的发展, 国内也出现了一些中心再次尝试临床同种异体及异种猪胰岛移植^[34], 并有中心在国外同行的帮助下建立了GMP标准实验室, 但国内因胰岛分离技术问题和研究经费等困难, 难以建立标准的移植质量控制体系, 导致移植后的近期效果不佳, 而其远期效果更待加强, 研究结果也因诸多原因仅限于国内会议交流, 使得国内胰岛移植研究滞后, 未能有较好的数据进入国际报告, 临床研究亟待提高. 实验性研究诸如微囊化胰岛、干细胞分化及移植、免疫耐受研究等相对来说开展了相应的工作, 可以看到相应报道, 近年来得到各界基金支持也逐年增多^[35,36].

4 结论

在过去的数十年中, 胰岛移植取得了许多突破性的进展, EDMONTON方案的提出, 使胰岛移植进入了一个全新的发展时代. 然而胰岛移植仍是一个年轻的学科, 面临着许多问题, 最主要的是供体短缺和移植物难以长期存活, 而胰岛分离技术及分离的标准化可能是制约胰岛移植发展的瓶颈技术, 需要各研究中心花费心血培养成熟的胰岛分离团队. 因此, 仍需要进行大量的基础和临床研究来解决上述问题. 随着转基因技术的发展, 移植免疫理论和方法的不断完善, 大量基础和临床研究的不断积累, 胰岛移植一定会摆脱困境, 在治疗1型糖尿病的过程中发挥更大的作用.

5 参考文献

- Eisenbarth GS. Type I diabetes mellitus. A chronic autoimmune disease. *N Engl J Med* 1986; 314: 1360-1368
- The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. *N Engl J Med* 1993; 329: 977-986
- Nathan DM, Cleary PA, Backlund JY, Genuth SM, Lachin JM, Orchard TJ, Raskin P, Zinman B. Intensive diabetes treatment and cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes. *N Engl J Med* 2005; 353: 2643-2653
- Hanas R. Dead-in-bed syndrome in diabetes mellitus and hypoglycaemic unawareness. *Lancet* 1997; 350: 492-493
- Cryer PE. The barrier of hypoglycemia in diabetes. *Diabetes* 2008; 57: 3169-3176
- McCrimmon RJ, Sherwin RS. Hypoglycemia in type 1 diabetes. *Diabetes* 2010; 59: 2333-2339
- White SA, Shaw JA, Sutherland DE. Pancreas transplantation. *Lancet* 2009; 373: 1808-1817
- Ballinger WF, Lacy PE. Transplantation of intact pancreatic islets in rats. *Surgery* 1972; 72: 175-186
- Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, Korbutt GS, Toth E, Warnock GL, Kneteman NM, Rajotte RV. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med* 2000; 343: 230-238
- Ryan EA, Paty BW, Senior PA, Bigam D, Alfadhli E, Kneteman NM, Lakey JR, Shapiro AM. Five-year follow-up after clinical islet transplantation. *Diabetes* 2005; 54: 2060-2069
- Shapiro AM, Ricordi C, Hering BJ, Auchincloss H, Lindblad R, Robertson RP, Secchi A, Brendel MD, Berney T, Brennan DC, Cagliero E, Alejandro R, Ryan EA, DiMercurio B, Morel P, Polonsky KS, Reems JA, Bretzel RG, Bertuzzi F, Froud T, Kandaswamy R, Sutherland DE, Eisenbarth G, Segal M, Preiksaitis J, Korbutt GS, Barton FB, Viviano L, Seyfert-Margolis V, Bluestone J, Lakey JR. International trial of the EDMONTON protocol for islet transplantation. *N Engl J Med* 2006; 355: 1318-1330
- Bromberg JS, Kaplan B, Halloran PF, Robertson RP. The islet transplant experiment: time for a reassessment. *Am J Transplant* 2007; 7: 2217-2218
- Ruggenenti P, Remuzzi A, Remuzzi G. Decision time for pancreatic islet-cell transplantation. *Lancet* 2008; 371: 883-884
- Campbell PM, Senior PA, Salam A, Labranche K, Bigam DL, Kneteman NM, Imes S, Halpin A, Ryan EA, Shapiro AM. High risk of sensitization after failed islet transplantation. *Am J Transplant* 2007; 7: 2311-2317
- Shapiro AM. Islet transplantation--the imperative need for continued clinical trials. *Nat Clin Pract Nephrol* 2008; 4: 662-663
- Jamiolkowski RM, Guo LY, Li YR, Shaffer SM, Naji A. Islet transplantation in type I diabetes mellitus. *Yale J Biol Med* 2012; 85: 37-43
- Chen S, Borowiak M, Fox JL, Maehr R, Osafune K, Davidow L, Lam K, Peng LF, Schreiber SL, Rubin LL, Melton D. A small molecule that directs differentiation of human ESCs into the pancreatic lineage. *Nat Chem Biol* 2009; 5: 258-265
- Bonner-Weir S, Taneja M, Weir GC, Tatarkiewicz K, Song KH, Sharma A, O'Neil JJ. In vitro cultivation of human islets from expanded ductal tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 7999-8004
- Nagaya M, Katsuta H, Kaneto H, Bonner-Weir S, Weir GC. Adult mouse intrahepatic biliary epithelial cells induced in vitro to become insulin-producing cells. *J Endocrinol* 2009; 201: 37-47
- Zhou Q, Brown J, Kanarek A, Rajagopal J, Melton DA. In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells. *Nature* 2008; 455: 627-632
- Aviv V, Meivar-Levy I, Rachmut IH, Rubinek T, Mor E, Ferber S. Exendin-4 promotes liver cell proliferation and enhances the PDX-1-induced liver to pancreas transdifferentiation process. *J Biol Chem* 2009; 284: 33509-33520
- van der Windt DJ, Bottino R, Casu A, Campanile N, Smetanka C, He J, Murase N, Hara H, Ball S, Loveland BE, Ayares D, Lakkis FG, Cooper DK, Trucco M. Long-term controlled normoglycemia in diabetic non-human primates after transplantation with

■应用要点

研究者应针对所面临的研究方向、困境, 具体分析, 科学总结, 找到突破口, 探索对胰岛移植发展有意义的研究策略.

■同行评论

本文阐述了全球胰岛移植所面临的主要问题,并结合国内现状,探讨了未来的发展方向,对临床医生和科研工作者,有一定参考意义。

- hCD46 transgenic porcine islets. *Am J Transplant* 2009; 9: 2716-2726
- 23 Elliott RB, Escobar L, Tan PL, Muzina M, Zwain S, Buchanan C. Live encapsulated porcine islets from a type 1 diabetic patient 9.5 yr after xenotransplantation. *Xenotransplantation* 2007; 14: 157-161
- 24 Ekser B, Ezzelarab M, Hara H, van der Windt DJ, Wijkstrom M, Bottino R, Trucco M, Cooper DK. Clinical xenotransplantation: the next medical revolution? *Lancet* 2012; 379: 672-683
- 25 Korsgren O, Lundgren T, Felldin M, Foss A, Isaksson B, Permert J, Persson NH, Rafael E, Rydén M, Salmela K, Tibell A, Tufveson G, Nilsson B. Optimising islet engraftment is critical for successful clinical islet transplantation. *Diabetologia* 2008; 51: 227-232
- 26 Fotino C, Ricordi C, Lauriola V, Alejandro R, Pileggi A. Bone marrow-derived stem cell transplantation for the treatment of insulin-dependent diabetes. *Rev Diabet Stud* 2010; 7: 144-157
- 27 Scandling JD, Busque S, Dejbakhsh-Jones S, Benike C, Millan MT, Shizuru JA, Hoppe RT, Lowsky R, Engleman EG, Strober S. Tolerance and chimerism after renal and hematopoietic-cell transplantation. *N Engl J Med* 2008; 358: 362-368
- 28 Kawai T, Cosimi AB, Spitzer TR, Tolkoff-Rubin N, Suthanthiran M, Saidman SL, Shaffer J, Preffer FI, Ding R, Sharma V, Fishman JA, Dey B, Ko DS, Hertl M, Goes NB, Wong W, Williams WW, Colvin RB, Sykes M, Sachs DH. HLA-mismatched renal transplantation without maintenance immunosuppression. *N Engl J Med* 2008; 358: 353-361
- 29 Sykes M. Immune tolerance: mechanisms and application in clinical transplantation. *J Intern Med* 2007; 262: 288-310
- 30 Berman DM, Willman MA, Han D, Kleiner G, Kenyon NM, Cabrera O, Karl JA, Wiseman RW, O'Connor DH, Bartholomew AM, Kenyon NS. Mesenchymal stem cells enhance allogeneic islet engraftment in nonhuman primates. *Diabetes* 2010; 59: 2558-2568
- 31 Cantarelli E, Melzi R, Mercalli A, Sordi V, Ferrari G, Lederer CW, Mrak E, Rubinacci A, Ponzoni M, Sitia G, Guidotti LG, Bonifacio E, Piemonti L. Bone marrow as an alternative site for islet transplantation. *Blood* 2009; 114: 4566-4574
- 32 O'Sullivan ES, Vegas A, Anderson DG, Weir GC. Islets transplanted in immunoisolation devices: a review of the progress and the challenges that remain. *Endocr Rev* 2011; 32: 827-844
- 33 Vaithilingam V, Tuch BE. Islet transplantation and encapsulation: an update on recent developments. *Rev Diabet Stud* 2011; 8: 51-67
- 34 Jiang X, Qian T, Linn T, Cao L, Xiang G, Wang Y, Peng H, Xue P, Zhang L, Chen D, Yang X. Islet isolation and purification from inbred Wuzhishan miniature pigs. *Xenotransplantation* 2012; 19: 159-165
- 35 Chu X, Kilpatrick E, Xiao X, Liu W, Demirci G, Exley M, Li XC. Islet allograft tolerance in the absence of invariant natural killer T cells. *Clin Immunol* 2011; 141: 268-272
- 36 Li L, Shen S, Ouyang J, Hu Y, Hu L, Cui W, Zhang N, Zhuge YZ, Chen B, Xu J, Zhu D. Autologous hematopoietic stem cell transplantation modulates immunocompetent cells and improves β -cell function in Chinese patients with new onset of type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2012; 97: 1729-1736

编辑 李军亮 电编 鲁亚静

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

• 消息 •

WJG 总被引频次排名位于第 174 名

本刊讯 *World Journal of Gastroenterology (WJG)* 被 Science Citation Index Expanded (SCIE) 和 MEDLINE 等国际重要检索系统收录, 在国际上享有较高声誉和影响力。WJG 在 PubMed Central (PMC) 统计, 单月独立 IP 地址访问 58 257 次, 全文网络版 (HTML Full Text) 下载 94 888 次, 全文 PDF 下载 59 694 次。另外根据基本科学指标库 (essential science indicators) 统计, 2000-01-01/2010-12-31, SCIE 检索的临床医学 (clinical medicine) 期刊有 1 105 种, 总被引频次排名, WJG 位于第 174 名。(2011-05-14 马连生 董事长/总编辑)

1,25-二羟基维生素D₃对小鼠非酒精性脂肪肝性肝纤维化进程的抑制作用

李艳芳, 唐夕岚, 凌文华

李艳芳, 唐夕岚, 凌文华, 中山大学公共卫生学院营养系 广东省广州市 510080

李艳芳, 在读硕士, 主要从事脂肪肝营养膳食防治方面的研究。国家重点基础研究发展计划(973计划)基金资助项目, No. 2012CB517506

作者贡献分布: 此课题由凌文华设计; 研究过程由李艳芳与唐夕岚操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由凌文华提供; 数据分析由李艳芳完成; 本论文写作由李艳芳完成。

通讯作者: 凌文华, 教授, 510080, 广东省广州市越秀区中山二路74号, 中山大学公共卫生学院营养系. lingwh@mail.sysu.edu.cn 电话: 020-87331597

收稿日期: 2012-09-20 修回日期: 2012-10-21

接受日期: 2012-11-07 在线出版日期: 2012-11-28

1,25-dihydroxyvitamin D₃ inhibits fibrosis in mice with NAFLD induced by a methionine-choline-deficient diet

Yan-Fang Li, Xi-Lan Tang, Wen-Hua Ling

Yan-Fang Li, Xi-Lan Tang, Wen-Hua Ling, Department of Nutrition Sciences, School of Public Health, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China

Supported by: the National Basic Research Program of China (973 Program), No. 2012CB517506

Correspondence to: Wen-Hua Ling, Professor, Department of Nutrition Sciences, School of Public Health, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China. lingwh@mail.sysu.edu.cn

Received: 2012-09-20 Revised: 2012-10-21

Accepted: 2012-11-07 Published online: 2012-11-28

Abstract

AIM: To investigate whether 1,25-dihydroxyvitamin D₃ (1,25(OH)₂D₃), the active form of vitamin D, inhibits fibrosis induced by a methionine-choline-deficient (MCD) diet in C57BL/6J mice and to explore the possible mechanisms involved.

METHODS: Male C57BL/6J mice (*n* = 30) were divided randomly into control group, MCD group, and MCD + 1,25(OH)₂D₃ group. The MCD and MCD + 1,25(OH)₂D₃ groups were fed a MCD diet. All the mice were intraperitoneally injected with 1,25(OH)₂D₃ (5 μg/kg) or equal volume of saline twice weekly. After 8 wk, the

mice were sacrificed to take serum samples for biochemical measurements and liver samples for HE staining and RT-PCR.

RESULTS: Serum levels of alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, and mRNA expression of transforming growth factor beta1 (TGF-β1), α-smooth muscle actin (α-SMA) and collagen I a1 of MCD group significantly increased in the MCD group compared to the control group (*P* = 0.000, 0.000, 0.044, 0.003, 0.027). In the MCD + 1,25(OH)₂D₃ group, all the above parameters significantly decreased (*P* = 0.000, 0.005, 0.020, 0.027) except the mRNA expression of TGF-β1, which showed no significant change, compared to the MCD group. Steatosis was significantly improved, as revealed by the presence of fewer lipid drops in the cytoplasm and less inflammatory cell infiltration around the vessels, in the MCD + 1,25(OH)₂D₃ group compared to the MCD group.

CONCLUSION: 1,25(OH)₂D₃ can improve liver function and inhibit fibrosis possibly by down-regulating the mRNA expression of α-SMA and collagen I a1 in mice with NAFLD induced by a MCD diet.

Key Words: 1,25-dihydroxyvitamin D₃; Methionine-choline-deficient; Fibrosis; Transforming growth factor beta 1; α-smooth muscle actin; Collagen I a1

Li YF, Tang XL, Ling WH. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ inhibits fibrosis in mice with NAFLD induced by a methionine-choline-deficient diet. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(33): 3191-3196

摘要

目的: 探讨1,25-二羟基维生素D₃[1,25-dihydroxyvitamin D₃, 1,25(OH)₂D₃]对蛋氨酸-胆碱缺乏(methionine-choline-deficient, MCD)饮食诱导的非酒精性脂肪肝性肝纤维化的抑制作用及其可能机制。

方法: 将30只C57BL/6J小鼠随机分为正常

■背景资料

非酒精性脂肪肝病(NAFLD)在人群中的高发病率以及发展为肝硬化和肝功能衰竭的可能性使其受到重视。而肝纤维化是进展为肝硬化的重要阶段。因此,开展有关抗肝纤维化的研究对于防治NAFLD具有重要意义。

■同行评议者

高泽立, 副教授, 周浦医院消化科, 上海交大医学院九院周浦分院

■ 研发前沿

越来越多的研究表明, 维生素D或其类似物在肺、肾及肝脏等组织器官中均具有抗纤维化作用。但是1,25-二羟基维生素D₃[1,25(OH)₂D₃]能否减缓非酒精性脂肪肝性肝纤维化的进程尚未见报道。

组、模型组和干预组, 每组10只。采用MCD饮食诱导建立非酒精性脂肪肝性肝纤维化模型。其中, 模型组和干预组饲以MCD饲料。干预组给予1,25(OH)₂D₃(5 μg/kg)腹腔注射, 正常组和模型组给予同样剂量的生理盐水腹腔注射, 2次/wk。干预8 wk后, 试剂盒检测小鼠血清谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)和谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)水平; 肝组织苏木素和伊红(hematoxylin and eosin, HE)染色观察组织形态学变化; RT-PCR检测转化生长因子β(transforming growth factor beta, TGF-β)、α-平滑肌肌动蛋白(α-smooth muscle actin, α-SMA)和I型胶原mRNA的表达。

结果: 与正常组相比, 模型组小鼠ALT和AST水平以及TGF-β1, α-SMA和I型胶原mRNA的表达均明显升高($P = 0.000$, $P = 0.000$, $P = 0.044$, $P = 0.003$, $P = 0.027$); 而与模型组相比, 1,25(OH)₂D₃干预组除了TGF-β1 mRNA的表达无变化外, 其他指标均显著下降($P = 0.000$, $P = 0.005$, $P = 0.020$, $P = 0.027$)。HE染色结果显示, 模型组肝组织可见大量脂肪变性(胞质内充满大小较一致的脂滴空泡), 且血管周围炎症细胞浸润严重; 而干预组两者程度都有减轻, 但后者效果更明显。

结论: 1,25(OH)₂D₃可改善肝功能, 且可能通过对α-SMA和I型胶原基因的调控达到减缓MCD饮食诱导的非酒精性脂肪肝性肝纤维化进程的目的。

关键词: 1,25-二羟基维生素D₃; 蛋氨酸-胆碱缺乏; 肝纤维化; 转化生长因子β; α-平滑肌肌动蛋白; I型胶原

李艳芳, 唐夕岚, 凌文华. 1,25-二羟基维生素D₃对小鼠非酒精性脂肪肝性肝纤维化进程的抑制作用. 世界华人消化杂志 2012; 20(33): 3191-3196
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3191.asp>

0 引言

非酒精性脂肪肝(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)是以肝细胞脂肪变为主要特征的临床病理综合征^[1]。其疾病谱包括单纯性脂肪肝、脂肪性肝炎(nonalcoholic steatohepatitis, NASH), 进一步可发展为肝纤维化和肝硬化, 甚至导致肝细胞癌^[2]。随着人们生活水平的提高以及生活饮食方式的改变等, NAFLD的发病率日益升高。在欧美等发达国家, 普通民众NAFLD的患病率高达20%-30%^[3-6]。而在我国, 多项流行病学研究结

果显示脂肪肝的患病率不断升高。在我国较发达的地区如上海、广州等, NAFLD的发病率分别高达17%和15%^[7,8]。而肝纤维化是进展为肝硬化的重要阶段, 且被认为是肝损伤最客观的指标以及肝脏疾病发病率和死亡率最好的预后指标^[9]。其主要特征是以I型胶原为主的细胞外基质(extracellular matrix, ECM)在窦周间隙的大量沉积^[10]。肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSCs)在肝纤维化的发生发展中起着关键作用, 主要是因为其活化分泌大量的ECM。α-平滑肌肌动蛋白(α-smooth muscle actin, α-SMA)是迄今为止被广泛认可的HSCs活化的可靠指标, 而转化生长因子β(transforming growth factor beta, TGF-β)是最有效的促纤维化的细胞因子, 可以促进ECM组分的合成及沉积^[11,12]。

1,25-二羟基维生素D₃[1,25-dihydroxyvitamin D₃, 1,25(OH)₂D₃]作为维生素D(vitamin D, VD)在体内最终的生物活性形式, 一直以来被认为与机体内钙及骨盐平衡密切相关。但事实上, 1,25(OH)₂D₃调控着数百不同的基因, 在许多正常或恶性肿瘤细胞的增殖、分化以及凋亡中发挥着重要作用^[13-16]。最近有研究证实VD或其类似物在肺及肾等组织器官中均具有抗纤维化作用^[17,18]。Abramovitch等^[19]的最新研究显示, 1,25(OH)₂D₃能减轻硫代乙酰胺诱导的δ Wistar大鼠肝纤维化的程度。但1,25(OH)₂D₃能否减缓非酒精性脂肪肝性肝纤维化的进程尚未见报道。MCD(methionine-choline-deficient)饮食诱导的C57BL/6J小鼠模型是经典的NASH模型, 主要用于NASH和肝纤维化的研究。本实验将通过建立MCD饮食诱导的非酒精性脂肪肝性肝纤维化模型, 探讨1,25(OH)₂D₃的抗肝纤维化作用。

1 材料和方法

1.1 材料 离心机(Eppendorf, 德国), 酶标仪(Bio-Tek, 美国), 石蜡切片机(Leica, 德国), 倒置荧光显微镜(Nikon, 日本), 生物分光光度计(Eppendorf, 德国), PCR仪(Bio-Rad, 美国), 实时荧光定量PCR仪(ViiA 7, Applied Biosystems, 美国), 1,25(OH)₂D₃(Cayman, 美国), 血清谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)和谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)试剂盒(南京建成生物工程研究所), HE染色剂(广州秀威贸易有限公司), TRIzol(Invitrogen, 美国), 逆转录试剂盒(DRR047A, TaKaRa, 日本)和PCR反应试剂盒(DRR081A, TaKaRa, 日本)。

表 1 各组小鼠血清ALT和AST变化 ($n = 7$, mean \pm SD)

分组	ALT(U/L)	AST(U/L)
正常组	18.996 \pm 10.689 ^d	7.286 \pm 3.352 ^d
模型组	92.401 \pm 28.282 ^b	29.356 \pm 8.743 ^b
干预组	42.536 \pm 21.983 ^d	14.943 \pm 6.719 ^{bd}

ALT: 血清谷丙转氨酶; AST: 谷草转氨酶; ^b $P < 0.01$ vs 正常组; ^d $P < 0.01$ vs 模型组.

1.2 方法

1.2.1 动物分组与处理: 健康8 wk的SPF级♀ C57BL/6J小鼠(由广东省动物中心提供), 体重18-25 g. 随机分为正常组(control)、模型组(MCD)和干预组[MCD+1,25(OH)₂D₃], 每组10只. 其中, 正常组小鼠饲以蛋氨酸和胆碱充足的正常饲料, 模型组和干预组小鼠饲以MCD饲料. 1,25(OH)₂D₃ 1 mg溶于1 mL二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)中, 再用医用生理盐水稀释至所需浓度. 干预组给予相应剂量的1,25(OH)₂D₃ (5 μ g/kg)腹腔注射, 正常组和模型组给予同样剂量的生理盐水腹腔注射, 2次/wk. 干预8 wk后, 实验动物禁食12 h, 称质量, 眼球取血, 取出肝脏并称取质量. 4 $^{\circ}$ C离心分离血清, 分装保存, 以用于肝功能检测. 部分肝组织以40 g/L中性甲醛固定, 备做病理切片, 其余肝组织用液氮快速冷冻, 置于-80 $^{\circ}$ C冰箱保存, 备提取mRNA.

1.2.2 血清ALT和AST水平检测: 按南京建成生物工程研究所的ALT和AST试剂盒说明书进行.

1.2.3 组织切片HE染色: 标本用40 g/L中性甲醛固定, 石蜡包埋并切片; 切片脱蜡并经HE染色后, 用中性树胶封片; 最后在倒置显微镜下观察拍照.

1.2.4 RT-PCR: 用TRIzol一步抽提法提取肝脏组织总RNA, 根据产品说明书操作. 用生物分光光度计测定RNA浓度和纯度. 取2 μ g RNA样本, 用逆转录试剂盒进行逆转录合成cDNA, 并以此为模板进行PCR扩增反应. 逆转录和PCR反应条件按照试剂盒说明书设置. 扩增引物由上海生工生物工程公司合成. TGF- β 1的上游引物5'-GTC AGA CAT TCG GGA AGC AG-3', 下游引物5'-GCG TAT CAG TGG GGG TCA-3'; α -SMA的上游引物5'-AAA CAG GAA TAC GAC GAA G-3', 下游引物5'-CAG GAA TGA TTT GGA AAG GA-3'; I型胶原的上游引物5'-GAG CGG AGA GTA CTG GAT CG-3', 下游引物5'-GCT TCT TTT CCT TGG GGT TC-3'; β -actin的上游引

物5'-GAG ACC TTC AAC ACC CCA GC-3', 下游引物5'-ATG TCA CGC ACG ATT TCC C-3'. 利用Applied Biosystems ViiA7型实时荧光定量PCR仪自带软件ViiA 7 RUO Software1.0进行相关数据处理, 以 β -actin为内参基因, 采用2^{- $\Delta\Delta$ Ct}法计算基因表达的相对变化.

统计学处理 实验结果以mean \pm SD表示, 多组间比较首先进行方差齐性检验(方差不齐时, 采用对数转换以满足方差齐性条件), 然后进行单因素方差分析(one-way ANOVA), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义. 当 $P < 0.05$ 时, 两组间比较采用最小有意义差异 t 检验(least significance difference t test, LSD- t). 所有数据的统计分析均借助统计软件SPSS16.0完成.

2 结果

2.1 血清ALT和AST水平的变化 为了观察研究MCD饮食对C57BL/6J小鼠肝功能的影响, 以及1,25(OH)₂D₃是否对肝功能有改善作用, 我们检测了实验小鼠血清ALT和AST的水平(表1). 与正常组相比, 模型组ALT和AST水平均明显升高, 分别是正常组的5倍和4倍, 且差异均具有统计学意义($P = 0.000$). 而1,25(OH)₂D₃干预组显著地抑制了模型组ALT和AST水平的升高. 与模型组相比, 其ALT水平下降了54%, 且差异具有统计学意义($P = 0.000$), 尽管平均水平高于正常组, 但没有统计学差异; 而AST水平下降了49%, 且差异具有统计学意义($P = 0.005$), 但其AST水平还是高于正常组, 且差异具有统计学意义($P = 0.005$).

2.2 肝组织病理形态学观察 各组肝组织切片经HE染色后, 在倒置显微镜下观察. 可见正常组肝组织形态结构均正常, 无脂肪变性, 血管周围无炎症细胞浸润; 模型组肝组织可见大量脂肪变性, 胞质内充满大小较一致的脂滴空泡, 血管周围炎症细胞浸润严重; 而干预组与模型组相比, 脂肪变性程度稍有减轻, 但血管周围炎症细胞浸润程度明显减轻(图1).

2.3 TGF- β 1、 α -SMA和I型胶原mRNA表达的变化 与正常组相比, 模型组TGF- β 1 mRNA水平升高, 接近正常组的2倍, 且差异具有统计学意义($P = 0.044$). 但与模型组相比, 干预组TGF- β 1 mRNA水平只是略有下降, 且无统计学意义. 与正常组相比, 模型组 α -SMA和I型胶原mRNA水平均明显升高, 分别接近正常组的5倍和4倍, 且差异均具有统计学意义($P = 0.003$, $P = 0.027$).

■ 相关报道

研究显示, 1,25(OH)₂D₃能减轻硫代乙酰胺诱导的雄性Wistar大鼠肝纤维化的程度, 并且能够抑制肝星状细胞的增殖及促纤维化标志物的表达. 且能抑制转化生长因子 β 1诱导的鼠肺纤维细胞 α 平滑肌肌动蛋白(α -SMA)的表达, 阻止胶原表达的正向调节.

■ 创新盘点

本实验通过生化检测、形态学观察以及分子水平的研究,发现 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 可改善肝功能,且可能通过对 $\alpha\text{-SMA}$ 和I型胶原基因的调控达到减缓MCD饮食诱导的非酒精性脂肪肝病性肝纤维化进程的目的。

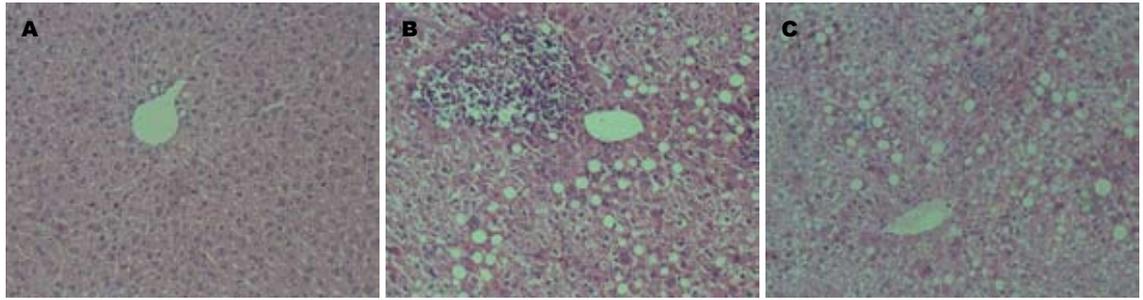


图1 各组小鼠肝组织HE染色($\times 200$)。A: 正常组; B: 模型组; C: 干预组。

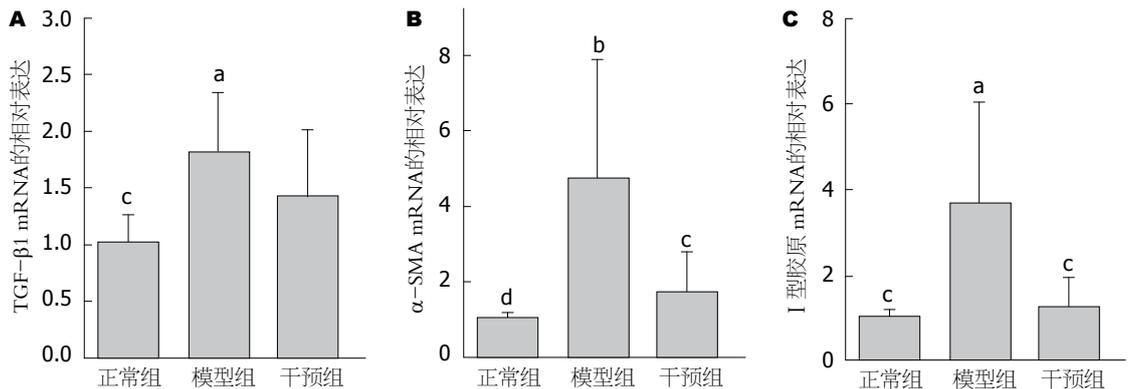


图2 各组TGF- β 1, $\alpha\text{-SMA}$ 和I型胶原mRNA的表达。A: 转化生长因子 β (TGF- β 1); B: α -平滑肌肌动蛋白($\alpha\text{-SMA}$); C: I型胶原。^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 正常组; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs 模型组。

而干预组显著地降低了这两者的mRNA水平,且差异均具有统计学意义($P = 0.020$, $P = 0.027$)。与模型组相比,干预组 $\alpha\text{-SMA}$ 和I型胶原mRNA水平分别下降了60%和70%左右(图2)。

3 讨论

随着肥胖和II型糖尿病等疾病的发病率越来越高,NAFLD的发病率急速上升,且已成为欧美等西方发达国家最常见的慢性肝病^[4,20]。而其在人群中的高发病率以及发展为肝硬化和肝功能衰竭的可能性使对其的研究具有临床意义^[21]。作为NAFLD发展为肝硬化的重要阶段,如何减缓非酒精性脂肪肝病性肝纤维化的进程,成为减轻NAFLD危害的重要手段。随着国内外学者的深入研究,1,25(OH) $_2\text{D}_3$ 的各种非传统功能被发现。而1,25(OH) $_2\text{D}_3$ 与NAFLD之间的联系也为越来越多的研究证明^[22-28],且VD受体在包括HSC等在内的肝非实质细胞中表达^[29]的研究发现更是支持了这一现象。

本研究发现1,25(OH) $_2\text{D}_3$ 可显著降低MCD饮食诱导的非酒精性脂肪肝病性肝纤维化模型的ALT和AST水平,表明1,25(OH) $_2\text{D}_3$ 具有改善肝功能的作用。而通过肝组织切片HE染色,我

们观察到1,25(OH) $_2\text{D}_3$ 干预组的脂肪变性程度稍有减轻,而炎症细胞浸润程度显著降低,显示1,25(OH) $_2\text{D}_3$ 可能能够减缓肝纤维化进程。此结果与Abramovitch等^[19]的研究结果一致。他们在硫代乙酰胺诱导的 δ Wistar大鼠肝纤维化模型中发现,1,25(OH) $_2\text{D}_3$ 可显著减少I型胶原沉积、减轻肝纤维化程度。Ramirez等^[17]观察了1,25(OH) $_2\text{D}_3$ 对TGF- β 1处理的鼠肺纤维细胞的影响,发现1,25(OH) $_2\text{D}_3$ 抑制了TGF- β 1诱导的 $\alpha\text{-SMA}$ 的表达,阻止了胶原表达的正向调节;而Tan等^[18]发现,VD的类似物帕立骨化醇通过减少包括I、III型胶原在内的间质基质的表达和沉积,显著地减轻了大鼠梗阻肾模型的纤维化病变。因此,本实验检测了TGF- β 1、 $\alpha\text{-SMA}$ 和I型胶原的mRNA表达水平。结果显示,1,25(OH) $_2\text{D}_3$ 显著降低了 $\alpha\text{-SMA}$ 和I型胶原的mRNA表达水平,且有统计学意义,但并未发现统计学意义上TGF- β 1的降低,提示1,25(OH) $_2\text{D}_3$ 可能通过抑制肝星状细胞的活化以及I型胶原mRNA的合成,降低I型胶原和其他纤维化相关因子的表达,进而减轻肝纤维化程度,从而改善MCD饮食诱导的非酒精性脂肪肝病性肝纤维化程度。本研究未发现1,25(OH) $_2\text{D}_3$ 对TGF- β 1 mRNA水平的抑

制作用, 可能是因为1,25(OH)₂D₃通过对TGF-β/Smad信号通路的下游基因进行调控, 从而影响肝纤维化进程, 且已有研究发现1,25(OH)₂D₃与TGF-β/Smad信号通路之间的相互作用^[30,31].

迄今为止, 临床上缺乏非酒精性脂肪肝性肝纤维化的有效治疗方法. 阐明1,25(OH)₂D₃影响肝纤维化的作用机制, 可能对防治NAFLD这一日益威胁人类健康的疾病提供新的经济实惠以及不良反应小的有效方法.

志谢: 感谢郭红辉、蒋鑫炜及李真同志在本实验中给予的大力帮助.

4 参考文献

- Sanyal AJ. AGA technical review on nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2002; 123: 1705-1725
- Guha IN, Parkes J, Roderick P, Chattopadhyay D, Cross R, Harris S, Kaye P, Burt AD, Ryder SD, Aithal GP, Day CP, Rosenberg WM. Noninvasive markers of fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease: Validating the European Liver Fibrosis Panel and exploring simple markers. *Hepatology* 2008; 47: 455-460
- Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, Nuremberg P, Horton JD, Cohen JC, Grundy SM, Hobbs HH. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology* 2004; 40: 1387-1395
- Bedogni G, Miglioli L, Masutti F, Tiribelli C, Marchesini G, Bellentani S. Prevalence of and risk factors for nonalcoholic fatty liver disease: the Dionysos nutrition and liver study. *Hepatology* 2005; 42: 44-52
- Neuschwander-Tetri BA, Caldwell SH. Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD Single Topic Conference. *Hepatology* 2003; 37: 1202-1219
- Bellentani S, Saccoccio G, Masutti F, Croce LS, Brandi G, Sasso F, Cristanini G, Tiribelli C. Prevalence of and risk factors for hepatic steatosis in Northern Italy. *Ann Intern Med* 2000; 132: 112-117
- Fan JG, Zhu J, Li XJ, Chen L, Li L, Dai F, Li F, Chen SY. Prevalence of and risk factors for fatty liver in a general population of Shanghai, China. *J Hepatol* 2005; 43: 508-514
- Zhou YJ, Li YY, Nie YQ, Ma JX, Lu LG, Shi SL, Chen MH, Hu PJ. Prevalence of fatty liver disease and its risk factors in the population of South China. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 6419-6424
- Adams LA, Sanderson S, Lindor KD, Angulo P. The histological course of nonalcoholic fatty liver disease: a longitudinal study of 103 patients with sequential liver biopsies. *J Hepatol* 2005; 42: 132-138
- Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem* 2000; 275: 2247-2250
- Moreira RK. Hepatic stellate cells and liver fibrosis. *Arch Pathol Lab Med* 2007; 131: 1728-1734
- Friedman SL. Cytokines and fibrogenesis. *Semin Liver Dis* 1999; 19: 129-140
- Holick MF. Resurrection of vitamin D deficiency and rickets. *J Clin Invest* 2006; 116: 2062-2072
- Nagpal S, Na S, Rathnachalam R. Noncalcemic actions of vitamin D receptor ligands. *Endocr Rev* 2005; 26: 662-687
- Bikle D. Nonclassic actions of vitamin D. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94: 26-34
- Barreto AM, Schwartz GG, Woodruff R, Cramer SD. 25-Hydroxyvitamin D₃, the prohormone of 1,25-dihydroxyvitamin D₃, inhibits the proliferation of primary prostatic epithelial cells. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000; 9: 265-270
- Ramirez AM, Wongtrakool C, Welch T, Steinmeyer A, Zügel U, Roman J. Vitamin D inhibition of profibrotic effects of transforming growth factor beta1 in lung fibroblasts and epithelial cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2010; 118: 142-150
- Tan X, Li Y, Liu Y. Paricalcitol attenuates renal interstitial fibrosis in obstructive nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17: 3382-3393
- Abramovitch S, Dahan-Bachar L, Sharvit E, Weisman Y, Ben Tov A, Brazowski E, Reif S. Vitamin D inhibits proliferation and profibrotic marker expression in hepatic stellate cells and decreases thioacetamide-induced liver fibrosis in rats. *Gut* 2011; 60: 1728-1737
- Bellentani S, Marino M. Epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Ann Hepatol* 2009; 8 Suppl 1: S4-S8
- Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med* 2002; 346: 1221-1231
- Nakano T, Cheng YF, Lai CY, Hsu LW, Chang YC, Deng JY, Huang YZ, Honda H, Chen KD, Wang CC, Chiu KW, Jawan B, Eng HL, Goto S, Chen CL. Impact of artificial sunlight therapy on the progress of non-alcoholic fatty liver disease in rats. *J Hepatol* 2011; 55: 415-425
- Roth CL, Elfers CT, Figlewicz DP, Melhorn SJ, Morton GJ, Hoofnagle A, Yeh MM, Nelson JE, Kowdley KV. Vitamin D deficiency in obese rats exacerbates nonalcoholic fatty liver disease and increases hepatic resistin and Toll-like receptor activation. *Hepatology* 2012; 55: 1103-1111
- Terrier B, Carrat F, Geri G, Pol S, Piroth L, Halfon P, Poynard T, Souberbielle JC, Cacoub P. Low 25-OH vitamin D serum levels correlate with severe fibrosis in HIV-HCV co-infected patients with chronic hepatitis. *J Hepatol* 2011; 55: 756-761
- Petta S, Cammà C, Scazzone C, Tripodo C, Di Marco V, Bono A, Cabibi D, Licata G, Porcasi R, Marchesini G, Craxi A. Low vitamin D serum level is related to severe fibrosis and low responsiveness to interferon-based therapy in genotype 1 chronic hepatitis C. *Hepatology* 2010; 51: 1158-1167
- Barchetta I, Angelico F, Del Ben M, Baroni MG, Pozzilli P, Morini S, Cavallo MG. Strong association between non alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and low 25(OH) vitamin D levels in an adult population with normal serum liver enzymes. *BMC Med* 2011; 9: 85
- Targher G, Bertolini L, Scala L, Cigolini M, Zenari L, Falezza G, Arcaro G. Associations between serum 25-hydroxyvitamin D₃ concentrations and liver histology in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2007; 17: 517-524
- Manco M, Ciampalini P, Nobili V. Low levels of 25-hydroxyvitamin D(3) in children with biopsy-proven nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2010; 51: 2229; author reply 2230

■应用要点

迄今为止, 临床上缺乏非酒精性脂肪肝性肝纤维化的有效治疗方法. 阐明1,25(OH)₂D₃影响肝纤维化的作用机制, 可能对防治NAFLD这一日益威胁人类健康的疾病提供新的经济实惠以及不良反应小的有效方法.

■同行评价

本研究设计合理, 统计方法得当, 参考文献较新, 值得临床医师阅读.

- 29 Gascon-Barré M, Demers C, Mirshahi A, Néron S, Zalzal S, Nanci A. The normal liver harbors the vitamin D nuclear receptor in nonparenchymal and biliary epithelial cells. *Hepatology* 2003; 37: 1034-1042
- 30 Aschenbrenner JK, Sollinger HW, Becker BN, Hullett DA. 1,25-(OH₂)D₃ alters the transforming growth factor beta signaling pathway in renal tissue. *J Surg Res* 2001; 100: 171-175
- 31 Subramaniam N, Leong GM, Cock TA, Flanagan JL, Fong C, Eisman JA, Kouzmenko AP. Cross-talk between 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and transforming growth factor-beta signaling requires binding of VDR and Smad3 proteins to their cognate DNA recognition elements. *J Biol Chem* 2001; 276: 15741-15746

编辑 翟欢欢 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: ^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. 黑白图请附黑白照片, 并拷入光盘内; 彩色图请提供冲洗的彩色照片, 请不要提供计算机打印的照片. 彩色图片大小 $7.5 \text{ cm} \times 4.5 \text{ cm}$, 必须使用双面胶条粘贴在正文内, 不能使用浆糊粘贴. (5) 志谢 后加冒号, 排在讨论后及参考文献前, 左齐.

黄芩苷对肝癌细胞GJIC及Cx26、Cx43表达的影响

郭昱, 王娜, 高咏梅, 姚金锋, 李元, 尹崇娇, 张文娟

郭昱, 姚金锋, 李元, 尹崇娇, 张文娟, 河北医科大学第二医院消化内科 河北省石家庄市 050000
王娜, 保定市第三医院消化内科 河北省保定市 071000
高咏梅, 河北北方学院附属第一医院消化内科 河北省张家口市 075000
河北省自然科学基金资助项目, No. C2009001123
作者贡献分布: 郭昱与王娜对此文所做贡献均等; 此课题由郭昱与王娜设计; 研究过程由王娜、高咏梅、姚金锋、李元、尹崇娇及张文娟操作完成; 研究所用新试剂与分析工具由郭昱与王娜提供; 数据分析由王娜完成; 本论文写作由郭昱与王娜完成。
通讯作者: 郭昱, 副教授, 050000, 河北省石家庄市和平西路215号, 河北医科大学第二医院消化内科. guoyu123123@sina.com
电话: 0311-66002951
收稿日期: 2012-09-20 修回日期: 2012-10-23
接受日期: 2012-11-07 在线出版日期: 2012-11-28

Treatment with baicalin up-regulates the expression of connexin 26 and connexin 43 in human hepatocellular carcinoma cell line SMMC-7721

Yu Guo, Na Wang, Yong-Mei Gao, Jin-Feng Yao, Yuan Li, Chong-Jiao Yin, Wen-Juan Zhang

Yu Guo, Jin-Feng Yao, Yuan Li, Chong-Jiao Yin, Wen-Juan Zhang, Department of Gastroenterology, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China
Na Wang, Department of Gastroenterology, the Third Hospital of Baoding, Baoding 071000, Hebei Province, China
Yong-Mei Gao, the First Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou 075000, Hebei Province, China
Supported by: the Natural Science Foundation of Hebei Province, No. C2009001123
Correspondence to: Yu Guo, Associate Professor, Department of Gastroenterology, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China. guoyu123123@sina.com
Received: 2012-09-20 Revised: 2012-10-23
Accepted: 2012-11-07 Published online: 2012-11-28

Abstract

AIM: To investigate the effect of treatment with baicalin on the expression of connexin 26 (Cx26) and connexin 43 (Cx43) in human hepatocellular cell line SMMC-7721.

METHODS: SMMC-7721 cells were randomly divided into 4 groups: normal control group, low-dose (10 mg/L) baicalin group, medium-dose (20 mg/L) baicalin group, and high-dose (40 mg/L) baicalin group. Gap junction intercellular

communication (GJIC) was measured by scrap loading/dye transfer assay (SL/DT). The expression of Cx26 and Cx43 mRNAs in SMMC-7721 cells was determined by RT-PCR. The expression of Cx26 protein was detected by Western blot, and that of Cx43 protein was detected by immunohistochemistry.

RESULTS: Compared to the normal control group, the expression of Cx26 mRNA and protein was significantly enhanced in SMMC-7721 cells treated with low, medium and high concentrations of baicalin (mRNA: 0.148 ± 0.111 , 10.253 ± 0.222 , 17.283 ± 0.024 vs 0.138 ± 0.111 ; all $P < 0.05$; protein: 0.516 ± 0.029 , 0.759 ± 0.020 , 1.019 ± 0.076 vs 0.367 ± 0.029 ; all $P < 0.05$). Compared to the normal control group, the expression of Cx43 mRNA showed no significant changes, but the expression of Cx43 protein was significantly enhanced in SMMC-7721 cells treated with different concentrations of baicalin.

CONCLUSION: Restoration or enhancement of GJIC induced by up-regulation of Cx26 and Cx43 is likely to be an important molecular mechanism by which baicalin inhibits tumor growth.

Key Words: Baicalin; Hepatoma carcinoma cell; Gap junction intercellular communication; Connexin26; Connexin43

Guo Y, Wang N, Gao YM, Yao JF, Li Y, Yin CJ, Zhang WJ. Treatment with baicalin up-regulates the expression of connexin 26 and connexin 43 in human hepatocellular carcinoma cell line SMMC-7721. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(33): 3197-3202

摘要

目的: 探讨黄芩苷对肝癌细胞缝隙连接细胞间通讯(gap junction intercellular communication, GJIC)及细胞间隙连接蛋白26(connexin26, Cx26)、细胞间隙连接蛋白43(connexin43, Cx43)表达的影响。

方法: 人肝癌细胞株SMMC-7721分为黄芩苷10、20、40 mg/L组和对照组。划痕染料示踪技术检测GJIC的变化。用RT-PCR法检测肝

■背景资料

黄芩苷是传统中药黄芩的主要有效成分之一,具有抗炎、抗变态反应、抗肿瘤等多种药理作用。本课题组以往的系列研究显示黄芩苷可以抑制肝癌细胞增殖,诱导其凋亡,但其作用机制是否通过影响缝隙连接细胞间通讯(GJIC)尚无报道。

■同行评议者

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

■研发前沿

细胞间隙连接蛋白(Cx)是存在于细胞之间的负责物质及信息交换的通道蛋白,对细胞增殖、分化及机体的生长发育至关重要。Cx的正常或异常表达,可直接影响到细胞及组织、器官的功能状态,最新研究发现他与肿瘤的发生发展密切相关。

癌细胞Cx26、Cx43基因表达,用Western blot法检测Cx26蛋白表达,用免疫细胞化学检测Cx43蛋白表达。

结果: 对照组细胞的染料局限于划痕两侧的细胞内,无明显的荧光染料传输现象。随着黄芩苷浓度的增强,LY染料传输范围逐渐增大。黄芩苷10、20、40 mg/L各浓度组Cx26 mRNA表达水平与对照组比较显著提高(0.148 ± 0.111 , 10.253 ± 0.222 , 17.283 ± 0.024 vs 0.138 ± 0.111 ; $P < 0.05$)。Cx26蛋白表达量与对照组比较明显增加(0.516 ± 0.029 , 0.759 ± 0.020 , 1.019 ± 0.076 vs 0.367 ± 0.029 ; $P < 0.05$)。黄芩苷各浓度组Cx43 mRNA表达量与对照组比较无显著变化。而Cx43蛋白的表达水平与对照组比较明显增加(5.512 ± 0.003 , 5.844 ± 0.046 , 6.216 ± 0.015 vs 4.316 ± 0.032 ; $P < 0.05$)。

结论: 黄芩苷促进肝癌细胞Cx26及Cx43表达,导致肝癌细胞GJIC功能的恢复,这很可能是黄芩苷抑制肿瘤生长的分子机制之一。

关键词: 黄芩苷; 肝癌; 肝癌细胞缝隙连接细胞间通讯; 细胞间隙连接蛋白26; 细胞间隙连接蛋白43

郭昱, 王娜, 高咏梅, 姚金锋, 李元, 尹崇娇, 张文娟. 黄芩苷对肝癌细胞GJIC及Cx26、Cx43表达的影响. 世界华人消化杂志 2012; 20(33): 3197-3202

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3197.asp>

0 引言

黄芩苷为传统中药黄芩的主要有效成分,具有广泛的药理活性,除传统意义上的抗炎、抗病毒以及解热和保肝作用外,近年来发现其具有显著的抗肿瘤效应^[1-4]。我们以往的系列研究发现黄芩苷能抑制肝癌细胞增殖,诱导肝癌细胞分化,且具有抗侵袭、抗黏附作用^[5-7]。缝隙连接蛋白介导的缝隙连接细胞间通讯(gap junction intercellular communication, GJIC)是细胞间最重要的信息交流形式。缝隙连接在多种肿瘤中常发生异常改变,与肿瘤的发生、转移等密切相关,是目前抗肿瘤药物治疗的新靶点^[8-13]。本研究旨在观察黄芩苷对肝癌细胞GJIC及缝隙连接蛋白26(connexin26, Cx26)、缝隙连接蛋白43(connexin43, Cx43)表达的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 人肝癌SMMC-7721细胞株由河北医科大学药理学实验室惠赠;黄芩苷购自成都曼斯特生物科技有限公司;罗氏黄(lucifer yellow, LY)

购自美国Sigma公司;山羊抗Cx26多克隆抗体购自美国Santa Cruz公司;兔抗Cx43多克隆抗体购自Bioworld公司;免疫组织化学染色试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司;逆转录酶AMV购自美国Promega公司;DNA marker购自北京赛百盛基因有限公司;Cx26引物设计检索文献依据检索结果,由赛百盛公司合成与纯化。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: 将人肝癌细胞株SMMC-7721接种于RPMI 1640培养液中,内含100 μg/mL链霉素、100 U/mL青霉素、10%胎牛血清,37 °C、50 mL/L CO₂,恒温密闭式孵箱内培养,2-3 d后细胞融合达到80%-90%时,用37 °C预热的消化液消化3-5 min即可,传代比例为1:2或1:3。

1.2.2 黄芩苷处理及GJIC变化检测: 传代后将人肝癌细胞株SMMC-7721以 2×10^5 个/mL接种于培养皿中,每皿2 mL,24 h后分为4组,分别加入黄芩苷至终浓度10、20、40 mg/L,设空白对照组。细胞继续培养48 h后吸出培养液,PBS冲洗培养皿3次,加入1 mL 0.5 g/L的LY染料,用手术刀在培养皿表面作3道划痕,室温静置3 min,吸除染料,再用PBS冲洗除去多余染料,滴加少许PBS,荧光倒置显微镜下观察染料在划痕垂直方向上的迁移距离,每组实验重复3次。半定量结果判定:罗氏黄通过缝隙连接(gap junctions, GJ)传递,在蓝色激发光下显绿色荧光。荧光只出现划痕旁1列细胞中(-),出现在划痕旁2列细胞中(+),3列中(++),4列或更远(+++)。

1.2.3 Cx26、Cx43 mRNA表达分析: 将细胞以密度为 5×10^4 /mL接种于细胞培养瓶,作用48 h后收集细胞,每 1×10^7 个细胞加入TRIzol 1 mL提取总的RNA,按照逆转录试剂盒说明书进行逆转录。Cx26正义:5'-GCTGCAAGAACGTGTGCTAC-3',反义:5'-TGGGTTTTGATCTCCTC-GAT-3',扩增的目的片段长度为185 bp,PCR的具体循环参数为:94 °C 2 min;94 °C 30 s;56 °C 40 s;58 °C 30 s,经过35个循环,以后72 °C延伸10 min。Cx43正义:5'-GGCTGCTCCTCAC-CAACCGC-3',反义:5'-GCTGGCTCTGCTT-GAAGGTCG-3',扩增的目的片段长度为298 bp,PCR的具体循环参数为:94 °C 4 min;94 °C 30 s;58 °C 30 s;72 °C 30 s,经过35个循环,以后72 °C延伸10 min。GAPDH正义:5'-CAAGGTCATC-CATGACAACCTTTG-3',反义:5'-GTCCAC-CACCCTGTTGCTGTAG-3',扩增的目的片段长度为359 bp,PCR的具体循环参数为:95 °C 5

■相关报道

1991年, Eghbali等率先报道将Cx32 cDNA转染人肝癌细胞株后,使细胞GJIC状态由“无”转为“正常化”,同时细胞生长明显受到抑制。

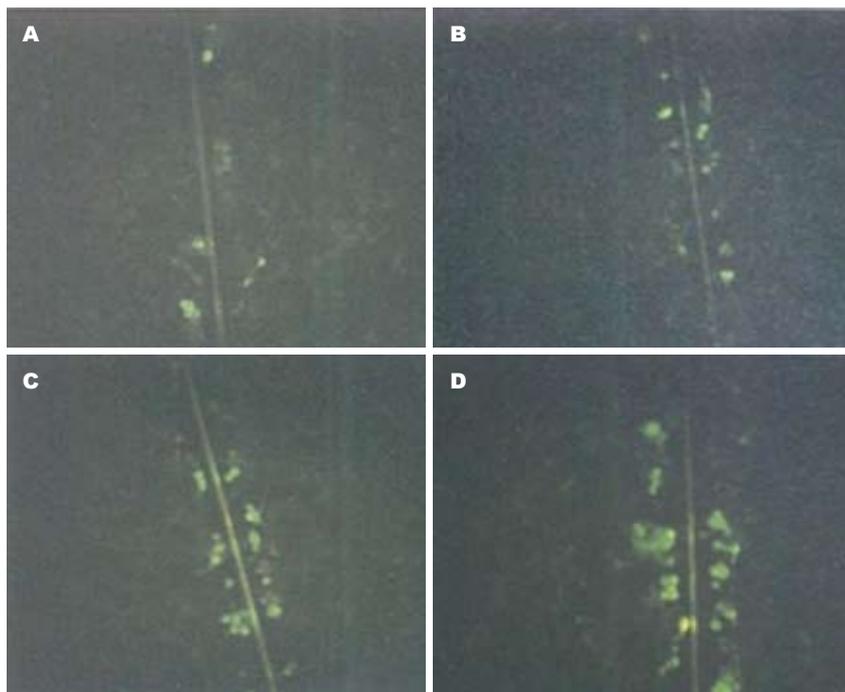


图1 黄芩苷对肝癌细胞缝隙连接细胞间通讯的影响($\times 200$)。A: 对照组; B: 黄芩苷(10 mg/L); C: 黄芩苷(20 mg/L); D: 黄芩苷(40 mg/L)。

■创新盘点

本研究首次从黄芩苷对肝癌细胞GJIC的影响方面探讨黄芩苷抗肿瘤的作用机制。他克服了传统肿瘤治疗中单一追求彻底杀死瘤细胞的指导思想, 丰富和完善了抗肿瘤理论。

min; 94 °C 30 s; 54 °C 45 s; 72 °C 30 s, 循环33次, 以后72 °C延伸1 min. 用美国ST公司AlphaImager™ 1200型读胶仪分析灰度值, 以目标基因与GAPDH扩增产物的灰度值的比值来表示基因表达水平。

1.2.4 Western blot法检测Cx26蛋白表达: 黄芩苷作用48 h后收集分别提取对照细胞和加药作用后细胞总蛋白, 加入细胞裂解液, 冰上静置0.5-1.0 h, 4 °C, 12 000 r/min离心15 min后, 取其上清液分装, -80 °C冰箱保存备用. 将蛋白煮沸变性后, 经SDS-PAGE凝胶电泳将蛋白转移至NC膜上, 脱脂奶粉封闭1 h, 与山羊抗Cx26多克隆抗体稀释浓度为(1 : 500)4 °C冰箱过夜, 再加入(1 : 1 000)比例稀释的二抗, 与化学发光试剂ECL于暗室中进行反应, 待胶片曝光显影后分析结果. 采用美国Image JA软件对Western blot结果进行定量分析, 灰度值以累积吸光度值表示, 结果以目的蛋白与 β -actin的累积吸光度的比值表示。

1.2.5 Cx43蛋白的表达分析: 各组细胞干预48 h后, 收集细胞爬片, 4 °C多聚甲醛固定30 min, 按SP免疫组织化学试剂盒实验步骤进行, 然后DAB显色, 封片后用JEDA-801D形态学图像分析系统自动选取染为棕黄色的阳性区域计算积分吸光度值, 反映蛋白表达量的变化。

统计学处理 用SPSS13.0软件统计分析, 所有计量资料数据均采用 $\text{mean} \pm \text{SD}$, 同一个指标的各组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异有显著性。

2 结果

2.1 黄芩苷对肝癌细胞GJIC的影响 细胞处理48 h后, 对照组细胞的荧光染料局限于划痕两侧的细胞内, 无明显的荧光染料传输现象, GJIC半定量(-), 黄芩苷10 mg/L组半定量为(+), 20 mg/L组半定量为(++), 40 mg/L组半定量为(+++), 结果显示随着黄芩苷浓度的增强, LY染料传输范围逐渐增大, SMMC-7721肝癌细胞GJIC功能逐渐增强, 呈剂量依赖关系(图1)。

2.2 黄芩苷对肝癌细胞Cx26、Cx43 mRNA表达的影响 黄芩苷各处理组Cx26 mRNA表达量明显高于对照组, 且随着黄芩苷浓度的增加表达量随之增加, 有明显的剂量依赖关系(图2, 表1, $P < 0.05$)。黄芩苷组各处理组Cx43 mRNA表达量与对照组比较有增加的趋势, 但差异无显著性。

2.3 黄芩苷对肝癌细胞Cx26蛋白表达的影响 Western blot分析显示, 不同浓度黄芩苷作用于肝癌细胞SMMC-7721 48 h后, Cx26蛋白表达水平增高, 有明显的剂量依赖关系(图3, 表2, $P < 0.05$)。

2.4 黄芩苷对肝癌细胞Cx43蛋白表达的影响 黄芩苷各处理组肝癌细胞SMMC-7721 Cx43蛋白表达量与实验对照组比较有显著增加, 且有明显的剂量依赖关系(图4, 表2, $P < 0.05$)。

3 讨论

GJIC是相邻细胞间普遍存在的直接通讯方式。对细胞的新陈代谢及许多生理过程(如增殖、

应用要点

本研究结果进一步加深了对黄芩苷抗肿瘤作用机制的认识, 对其开发应用提供了理论基础。

表 1 缝隙连接蛋白26和缝隙连接蛋白43 mRNA在肝癌细胞SMMC-7721中的表达

分组	对照组	10 mg/L	20 mg/L	40 mg/L
Cx26	0.138 ± 0.111	0.148 ± 0.111 ^a	10.253 ± 0.222 ^a	17.283 ± 0.024 ^a
Cx43	0.318 ± 0.111	0.322 ± 0.050	0.337 ± 0.346	0.341 ± 0.442

^a*P* < 0.05 vs 对照组. Cx: 缝隙连接蛋白.

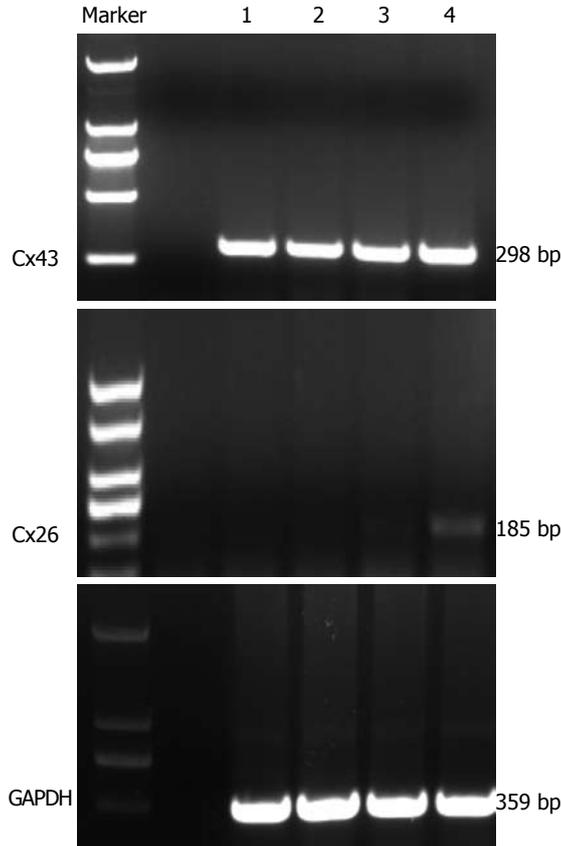


图 2 缝隙连接蛋白26和缝隙连接蛋白43 mRNA在肝癌细胞SMMC-7721的表达. 1: 对照组; 2: 黄芩苷(10 mg/L); 3: 黄芩苷(20 mg/L); 4: 黄芩苷(40 mg/L). Cx: 缝隙连接蛋白.

凋亡、转移等)发挥着重要的调节作用. GJIC在几乎所有的实体瘤中表达下调或丧失^[14-18], Krutovskikh等^[19]用致癌剂诱导建立大鼠肝癌模型, 发现肝癌细胞与癌周组织细胞间无细胞间通讯活动存在. 既然多数肿瘤组织中存在瘤细胞之间或瘤细胞与正常细胞之间的通讯功能障碍, 推测如果恢复GJIC功能有可能逆转瘤细胞表型使之良性化. 恢复GJIC可以通过以下机制达到肿瘤治疗的目的: (1)直接抑制细胞增殖, 有学者将Cx26转染肿瘤细胞, GJIC功能恢复表现出肿瘤生长的抑制和转化表型抑制; (2)增加肿瘤细胞对化疗药物的敏感. 药物通过缝隙连接运送到远处细胞, 这样使药物在肿瘤组织中弥散, 增强了化疗效果^[20]; (3)许多肿瘤实验中自杀基因

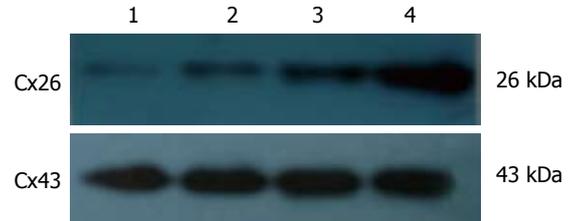


图 3 缝隙连接蛋白26在肝癌细胞SMMC-7721的表达. 1: 对照组; 2: 黄芩苷(10 mg/L); 3: 黄芩苷(20 mg/L); 4: 黄芩苷(40 mg/L). Cx: 缝隙连接蛋白.

表 2 缝隙连接蛋白26和43在肝癌细胞SMMC-7721的表达

分组	对照组	10 mg/L	20 mg/L	40 mg/L
Cx26	0.367 ± 0.029	0.516 ± 0.029 ^a	0.759 ± 0.020 ^a	1.019 ± 0.076 ^a
Cx43	4.316 ± 0.032	5.512 ± 0.003 ^a	5.844 ± 0.046 ^a	6.216 ± 0.015 ^a

^a*P* < 0.05 vs 对照组. Cx: 缝隙连接蛋白.

有明显的旁观者效应, 增强旁观者效应可以通过缝隙连接发挥间接杀瘤作用^[21,22].

GJIC的物质基础是相邻细胞膜上连接子耦联形成的通讯通道, 只允许相对分子质量 < 1 000 000物质通过, 每个连接子含6个连接蛋白(connexon, Cx). Cx是一个较保守的蛋白家族, 至今在人类中已经发现21种, 依据相对分子质量命名, 如Cx26、Cx32、Cx43等. Cx的表达与肿瘤的生物全学过程包括细胞转化、肿瘤发生、生长及演进等都密切相关, 被誉为“第二类抑癌基因”^[23-25]. Cx26、Cx43是重要的缝隙连接通道蛋白, Cx43是间隙连接家族中分布最广的分子, 几乎对所有组织细胞具有生长调控的作用, 其功能也最为复杂和重要. 许多肿瘤如大肠癌、神经胶质瘤、胃癌、肝癌、乳腺癌等均显示Cx26、Cx43表达减少或缺失, 而且表达水平和肿瘤分级成反比. Cx26在正常肝组织的表达高于其在肝癌组织中的表达, 在高分化组织中的表达高于其在低分化组织中的表达, 提示Cx26表达可能与肝癌的分化程度有关^[26]. 上

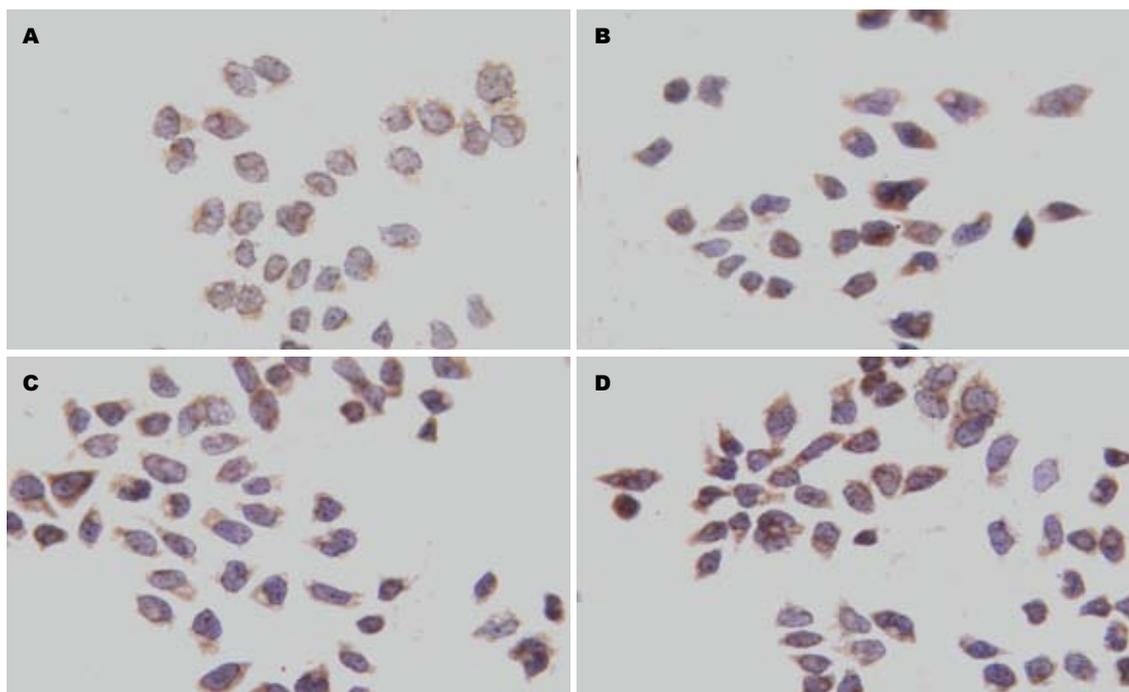


图 4 缝隙连接蛋白43在肝癌细胞SMMC-7721的表达($\times 400$)。A: 对照组; B: 黄芩苷(10 mg/L); C: 黄芩苷(20 mg/L); D: 黄芩苷(40 mg/L)。

■名词解释

间隙连接细胞间通讯(GJIC): 生物体内相邻细胞间主要通过细胞间隙连接通道互相传递离子、代谢物质极小的信号分子等, 从而控制细胞间的协调生长。这种由间隙连接介导的细胞间物质、能量及信息的交换活动称为间隙连接细胞间通讯。

调Cx蛋白的表达, 恢复细胞间缝隙连接通讯可抑制肿瘤的生长和转移^[27]。Muramatsu等^[28]在人肝细胞癌中转染Cx26基因, 研究发现其表达可抑制癌细胞的增殖, 甚至进一步引起细胞的凋亡。有趣的是因Cx26基因转染而“正常化”的肝癌Hela细胞再次转入突变的Cx26 cDNA, 细胞表型重新“恶化”。

有研究结果显示胃癌组织中Cx43表达减少或缺失, 并随细胞分化程度的下降而表达降低, Cx43表达阴性者更易发生淋巴结转移。因此, Cx43表达下降或缺失对判断胃癌预后有一定的价值^[29]。Zhu等^[30]组成的研究小组将Cx43 cDNA转染神经胶质瘤细胞C6提高该细胞Cx43蛋白的表达水平, 结果发现在导致C6细胞增值率降低的同时部分细胞的胞质中出现了肌动蛋白张力丝, 且细胞体积变大、形态扁平, 恶性表型特征变模糊, 有向良性转化的趋势。

已有大量研究发现某些物质如绿茶提取物、类胡萝卜素、类维生素A、维甲酸、姜黄素等通过上调靶组织Cx表达, 促进GJIC恢复, 发挥抑制肿瘤生长作用^[26]。但黄芩苷对GJIC功能及Cx表达的影响尚未见文献报道。本实验研究结果显示肝癌细胞间无GJIC, 黄芩苷能促进肝癌细胞GJIC恢复。Cx在翻译、转录或者转录后的蛋白水平的几个过程中均可以调控GJIC的状

态。黄芩苷能提高Cx26 mRNA及蛋白表达, 并与浓度呈剂量依赖关系, 从而认为黄芩苷对Cx26的作用靶点可能是在转录水平。黄芩苷对肝癌细胞Cx43 mRNA的表达无明显影响, 而免疫组织化学研究结果证实在SMMC-7721肝癌细胞中, Cx43蛋白定位于细胞浆, 随着黄芩苷浓度的增加Cx43蛋白表达也随之增加。故推测黄芩苷对Cx43作用靶点可能在Cx43转录后水平。

因此, 可以认为黄芩苷通过促进Cx的表达, 而建立细胞间GJ通道, 从而恢复细胞的GJIC功能, 可能是其抗肿瘤作用机制之一。

4 参考文献

- Zheng J, Hu JD, Chen YY, Chen BY, Huang Y, Zheng ZH, Liu TB. Baicalin induces apoptosis in leukemia HL-60/ADR cells via possible down-regulation of the PI3K/Akt signaling pathway. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012; 13: 1119-1124
- Chen WC, Kuo TH, Tzeng YS, Tsai YC. Baicalin induces apoptosis in SW620 human colorectal carcinoma cells in vitro and suppresses tumor growth in vivo. *Molecules* 2012; 17: 3844-3857
- Zhang X, Tang X, Liu H, Li L, Hou Q, Gao J. Autophagy induced by baicalin involves downregulation of CD147 in SMMC-7721 cells in vitro. *Oncol Rep* 2012; 27: 1128-1134
- Chiu YW, Lin TH, Huang WS, Teng CY, Liou YS, Kuo WH, Lin WL, Huang HI, Tung JN, Huang CY, Liu JY, Wang WH, Hwang JM, Kuo HC. Baicalein inhibits the migration and invasive properties of human hepatoma cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 2011;

■同行评价

本研究结果有一定创新性, 具有较高的学术价值.

- 255: 316-326
- 5 郭昱, 霍瑞静, 姚金锋. 黄芩苷对肝癌细胞SMMC-7721 JAK-STAT信号通路STAT3的影响. *世界华人消化杂志* 2011; 19: 2363-2367
 - 6 郭昱, 姚树坤. 黄芩甙对人肝癌BEL-7402细胞系侵袭和转移的影响. *第三军医大学学报* 2006; 28: 594-597
 - 7 郭霞, 郭昱. 黄芩甙体外对人肝癌细胞BEL-7402的诱导分化作用. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 1119-1123
 - 8 Sun P, Liu Y, Ying H, Li S. Action of db-cAMP on the bystander effect and chemosensitivity through connexin 43 and Bcl-2-mediated pathways in medulloblastoma cells. *Oncol Rep* 2012; 28: 969-976
 - 9 Czyż J, Szpak K, Madeja Z. The role of connexins in prostate cancer promotion and progression. *Nat Rev Urol* 2012; 9: 274-282
 - 10 Ding L, Hu HG, Zheng S. [Effects of osteopontin on gap junctional intercellular communication in colon cancer cell lines]. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2011; 91: 2578-2581
 - 11 Hao J, Zhang C, Zhang A, Wang K, Jia Z, Wang G, Han L, Kang C, Pu P. miR-221/222 is the regulator of Cx43 expression in human glioblastoma cells. *Oncol Rep* 2012; 27: 1504-1510
 - 12 Bodenstine TM, Vaidya KS, Ismail A, Beck BH, Diers AR, Edmonds MD, Kirsammer GT, Landar A, Welch DR. Subsets of ATP-sensitive potassium channel (KATP) inhibitors increase gap junctional intercellular communication in metastatic cancer cell lines independent of SUR expression. *FEBS Lett* 2012; 586: 27-31
 - 13 Hong X, Wang Q, Yang Y, Zheng S, Tong X, Zhang S, Tao L, Harris AL. Gap junctions propagate opposite effects in normal and tumor testicular cells in response to cisplatin. *Cancer Lett* 2012; 317: 165-171
 - 14 Yu SC, Xiao HL, Jiang XF, Wang QL, Li Y, Yang XJ, Ping YF, Duan JJ, Jiang JY, Ye XZ, Xu SL, Xin YH, Yao XH, Chen JH, Chu WH, Sun W, Wang B, Wang JM, Zhang X, Bian XW. Connexin 43 reverses malignant phenotypes of glioma stem cells by modulating E-cadherin. *Stem Cells* 2012; 30: 108-120
 - 15 Zhang X, Liu Y, Si YJ, Chen XH, Li ZJ, Gao L, Gao L, Zhang C. Effect of Cx43 gene-modified leukemic bone marrow stromal cells on the regulation of Jurkat cell line in vitro. *Leuk Res* 2012; 36: 198-204
 - 16 Baltaziak M, Kańczuga-Koda L, Rutkowski R, Musiatowicz M, Koda M, Leśniewicz R, Sulkowska U, Baltaziak M, Leśniewicz T, Sulkowski S. [Gap junction intercellular communication in carcinogenesis of endometrial cancer]. *Ginek Pol* 2011; 82: 520-524
 - 17 Bernzweig J, Heiniger B, Prasain K, Lu J, Hua DH, Nguyen TA. Anti-breast cancer agents, quinolines, targeting gap junction. *Med Chem* 2011; 7: 448-453
 - 18 Losa D, Chanson M, Crespin S. Connexins as therapeutic targets in lung disease. *Expert Opin Ther Targets* 2011; 15: 989-1002
 - 19 Krutovskikh VA, Troyanovsky SM, Piccoli C, Tsuda H, Asamoto M, Yamasaki H. Differential effect of subcellular localization of communication impairing gap junction protein connexin43 on tumor cell growth in vivo. *Oncogene* 2000; 19: 505-513
 - 20 Bier A, Oviedo-Landaverde I, Zhao J, Mamane Y, Kandouz M, Batist G. Connexin43 pseudogene in breast cancer cells offers a novel therapeutic target. *Mol Cancer Ther* 2009; 8: 786-793
 - 21 Huang Q, Liu XZ, Kang CS, Wang GX, Zhong Y, Pu PY. The anti-glioma effect of suicide gene therapy using BMSC expressing HSV/TK combined with overexpression of Cx43 in glioma cells. *Cancer Gene Ther* 2010; 17: 192-202
 - 22 Liu X, Wu J, Zhang S, Li C, Huang Q. Novel strategies to augment genetically delivered immunotoxin molecular therapy for cancer therapy. *Cancer Gene Ther* 2009; 16: 861-872
 - 23 Shishido SN, Nguyen TA. Gap junction enhancer increases efficacy of Cisplatin to attenuate mammary tumor growth. *PLoS One* 2012; 7: e44963
 - 24 Ionta M, Rosa MC, Almeida RB, Freitas VM, Rezende-Teixeira P, Machado-Santelli GM. Retinoic acid and cAMP inhibit rat hepatocellular carcinoma cell proliferation and enhance cell differentiation. *Braz J Med Biol Res* 2012; 45: 721-729
 - 25 Hagemann IS, Pasha TL, Roberts SA, Yum SW, Zhang PJ. Aberrant connexin 43 and 26 expression in cervical dysplasia. *Anal Quant Cytol Histol* 2012; 34: 28-40
 - 26 李学东, 尚西亮, 刘锡文, 黄长文, 傅华群. 三七总皂甙对人肝癌细胞缝隙连接细胞间通讯的调节机制. *中国组织工程研究与临床康复* 2007; 38: 7609-7612
 - 27 Govindarajan R, Chakraborty S, Johnson KE, Falk MM, Wheelock MJ, Johnson KR, Mehta PP. Assembly of connexin43 into gap junctions is regulated differentially by E-cadherin and N-cadherin in rat liver epithelial cells. *Mol Biol Cell* 2010; 21: 4089-4107
 - 28 Muramatsu A, Iwai M, Morikawa T, Tanaka S, Mori T, Harada Y, Okanou T. Influence of transfection with connexin 26 gene on malignant potential of human hepatoma cells. *Carcinogenesis* 2002; 23: 351-358
 - 29 田志华, 丁慧荣, 张宏, 张伟, 李振甫. 不同恶性程度胃癌细胞系的细胞间隙通讯功能及Cx43表达的差异. *北京师范大学学报* 2011; 47: 63-68
 - 30 Zhu D, Caveney S, Kidder GM, Naus CC. Transfection of C6 glioma cells with connexin 43 cDNA: analysis of expression, intercellular coupling, and cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 1883-1887

编辑 翟欢欢 电编 鲁亚静

两歧双歧杆菌干预周期对IL-10基因敲除小鼠结肠上皮屏障保护作用的影响

韩华中, 梁勇, 石忱长, 杨俊

韩华中, 苏州大学医学部 江苏省苏州市 215325
梁勇, 石忱长, 杨俊, 上海交通大学附属上海第六人民医院
普外科 上海市 200233
韩华中, 硕士, 主要从事外科临床营养与肠屏障功能方面的研究。
黎介寿院士肠道屏障研究专项基金资助项目, No. LJS-2009001
作者贡献分布: 此课题由杨俊与梁勇设计; 研究过程由韩华中与
石忱长操作完成; 数据分析及论文写作由韩华中完成; 杨俊与梁
勇负责审阅。
通讯作者: 杨俊, 副主任医师, 200233, 上海市宜山路600号, 上
海第六人民医院普外科. yangjuns@foxmail.com
电话: 021-64361349
收稿日期: 2012-09-20 修回日期: 2012-11-06
接受日期: 2012-11-07 在线出版日期: 2012-11-28

Influence of treatment with *Bifidobacteria bifidum* on gut barrier function in IL-10 knockout mice

Hua-Zhong Han, Yong Liang, Chen-Zhang Shi,
Jun Yang

Hua-Zhong Han, School of Medicine, Soochow University, Suzhou 215325, Jiangsu Province, China
Yong Liang, Chen-Zhang Shi, Jun Yang, Department of Surgery, Shanghai Sixth People's Hospital, Shanghai 200233, China
Supported by: the Special Intestinal Barrier Research Foundation of Academician Jie-Shou Li, No. LJS-2009001
Correspondence to: Jun Yang, Associate Chief Physician, Department of Surgery, Shanghai Sixth People's Hospital, Shanghai 200233, China. yangjuns@foxmail.com
Received: 2012-09-20 Revised: 2012-11-06
Accepted: 2012-11-07 Published online: 2012-11-28

Abstract

AIM: To explore the protective effect of different cycles of intervention with *Bifidobacterium bifidum* (*B. bifidum*) on colonic epithelial mucosal barrier in IL-10 knockout mice.

METHODS: Female IL-10 knockout (IL-10^{-/-}) mice and wild type (WT) mice were divided into four groups: WT group, WT + *B. bifidum* (BBf) group, IL-10^{-/-} group, and IL-10^{-/-} + *B. bifidum* group. The WT + *B. bifidum* and IL-10^{-/-} + *B. bifidum* groups were administered with *B. bifidum* by gavage at a dose of 10⁹ cells/d per mice for 2 wk, 4 wk, and 6 wk. The other groups were given

en phosphate buffered saline solution. The expression of tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-1 β , and interferon (INF)- γ in the colon was measured at the end of the experiment. Colonic tissues were collected for measurement of colonic epithelial permeability, transepithelial electrical resistance (TER), and expression of tight junction protein.

RESULTS: The expression of TNF- α , IL-1 β , and INF- γ , and tight junction protein, colonic epithelial permeability, and TER in mice treated with *B. bifidum* for 4 wk were significantly different from those in control mice and mice treated with *B. bifidum* for 2 wk (all $P < 0.01$), but showed no significant differences with those in mice treated with *B. bifidum* for 6 wk.

CONCLUSION: *B. bifidum* intervention for 4 wk had a significant protective effect on colonic epithelial mucosal barrier in IL-10 knockout mice, and prolonged intervention did not significantly improve the protective effect of *B. bifidum*.

Key Words: *Bifidobacterium bifidum*; Intestinal barrier; Tight junction protein

Han HZ, Liang Y, Shi CZ, Yang J. Influence of treatment with *Bifidobacterium bifidum* on gut barrier function in IL-10 knockout mice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(33): 3203-3210

摘要

目的: 探讨不同两歧双歧杆菌菌株(*Bifidobacterium bifidum*, *B. bifidum* S17)干预周期对IL-10^{-/-}小鼠结肠上皮肠屏障功能保护作用的影响。

方法: 分成4组: WT组、WT+BBf(*B. bifidum*)组、IL-10^{-/-}组和IL-10^{-/-}+BBf组, 周期设为2、4、6 wk, 5只/组, 分别灌饲PBS液或*B. bifidum*溶液, 检测结肠组织肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白介素1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)和干扰素 γ (interferon- γ , INF- γ)浓度, 小鼠结肠上皮通透性和TER, 紧密连接蛋白的表达。

背景资料

微生态制剂, 包括益生菌及其代谢产物和生长促进因子, 目前已被确认的几种益生菌有双歧杆菌、嗜酸乳杆菌、粪肠球菌、鼠李糖乳杆菌等。益生菌利用他们在人体中形成优势菌群, 对致病菌进行抑制, 从而减少疾病的发生。同时, 益生菌在发酵过程中产生的复合代谢物以及多种营养物质, 促使人体肠道微生态达到平衡。微生态制剂在临床已广泛用于改善肠道功能, 预防和治疗腹泻; 治疗肠易激综合征及炎症性肠病; 预防和治疗泌尿生殖系统感染; 增强人体免疫力; 缓解变态反应等, 取得了良好的临床效果。

同行评议者

杨桦, 教授, 重庆市第三军医大学新桥医院

■ 研究前沿

肠杆菌-双歧杆菌穿梭质粒载体(pBBAD-Xs),将重组人白介素-10(hIL-10)基因克隆入该表达载体,筛选并鉴定携带hIL-10的分泌型转基因双歧杆菌(BL-hIL-10),通过体内和体外试验,验证所分泌的hIL-10蛋白是否具有生物学活性和治疗功能,探索B.BL-hIL-10治疗溃疡性结肠炎的相关机制研究。

结果: *B. bifidum*干预4 wk的小鼠结肠组织TNF- α 、IL-1 β 、INF- γ 浓度,结肠黏膜上皮通透性、TER和紧密连接蛋白表达较对照组、干预2 wk有显著性差异(均 $P < 0.01$),与干预6 wk相比较无显著性差异。

结论: *B. bifidum*干预4 wk可检测明确的肠屏障保护作用,增加干预周期,并不能增加肠屏障保护效果。

关键词: 双歧杆菌; 肠屏障; 紧密连接蛋白

韩华中, 梁勇, 石枕长, 杨俊. 两歧双歧杆菌干预周期对IL-10基因敲除小鼠结肠上皮屏障保护作用的影响. 世界华人消化杂志 2012; 20(33): 3203-3210

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3203.asp>

0 引言

微生态制剂,包括益生菌及其代谢产物和生长促进因子。目前已被确认的几种益生菌有双歧杆菌、嗜酸乳杆菌、粪肠球菌和鼠李糖乳杆菌等。益生菌利用他们在人体中形成优势菌群,对致病菌进行抑制,从而减少疾病的发生。同时,益生菌在发酵过程中产生的复合代谢物以及多种营养物质,促使人体肠道微生态易于达到一种平衡。微生态制剂已在临床广泛用于改善肠道功能,预防和治疗腹泻;治疗肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)及炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD);预防和治疗泌尿生殖系统感染;增强人体免疫力;缓解变态反应等,并取得了良好的临床效果^[1]。但临床应用周期目前尚缺乏系统完整的临床应用指南,也较难对益生菌制剂的效用作量化评价,其中临床应用周期是一个临床迫切需要解决的问题,如果能得到解决,将对其临床应用产生深刻的影响。IL-10^{-/-}小鼠可自发形成类似于人类结肠炎,是IBD研究中最常用的基因缺陷动物模型,该模型小鼠在无菌饲养条件下并不发生结肠炎症,而转移至有菌环境下则迅速发展成Th1占优势的肠道炎症,与人类CD非常相似的病理改变^[2,3],且利用抗生素和益生菌干预肠道菌群能有效减轻该模型小鼠结肠炎症,缓解临床症状^[4,5],所以,IL-10^{-/-}是用以益生菌干预实验的理想动物模型。本实验围绕双歧杆菌(*Bifidobacterium bifidum*, *B. bifidum*)不同干预周期对IL-10^{-/-}结肠上皮肠屏障保护作用效果进行研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 双歧杆菌菌株及培养: 两歧双歧杆菌菌株(*Bifidobacterium bifidum*, *B. bifidum* S17)^[6]由上海信谊药厂提供,以低压冻干菌粉的形式在-20 °C以下保存,菌粉用PBS稀释后2 h内经MRS (Man-Rogosa-Sharpe, Difco, BD公司)液体培养基,37 °C厌氧培养48 h。

1.1.2 实验动物及分组: 129品系IL-10^{-/-}小鼠及野生型(WT)小鼠均购自美国Jackson Laboratories公司。本实验所使用的小鼠均为8 wk ♀小鼠,共60只,并以IL-10^{-/-}小鼠作为IBD模型。随机分为WT组、WT+BBf(*B. bifidum*)组、IL-10^{-/-}组、IL-10^{-/-}+BBf组,采用不同的干预周期,周期设为2、4、6 wk,每周期均为5只/组。

1.1.3 试剂和仪器: ZO-1抗体(Abcam, CA, USA), occludin、claudin-1抗体(San Francisco CA, USA). Dye-800或IRDye-700标记的二抗, LI-COR Bioscience, Lincoln, NE. PBS缓冲液和MRS培养基,上海市疾病预防控制中心。肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor alpha, TNF- α)、白介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)和干扰素- γ (interferon- γ , INF- γ)检测试剂盒(BD Pharmingen, Oxford, UK); 高效冷冻离心机、紫外分光光度计、KODAK凝胶图像分析仪、Microscan Autoscan-4细菌鉴定系统、RA-ID板、Dade Behring公司和Ultra-Turrax匀浆仪(IRK-WERKE, Germany); Ussing Chamber、EasyMount Chamber、Physiologic Instruments(San Diego, CA, USA); Odyssey Infrared图像分析系统(LICOR Bioscience, Lincoln, NE)。

1.2 方法

1.2.1 *B. bifidum*溶液的配制: *B. bifidum*菌株于MRS液体培养基中37 °C厌氧培养12 h, 5 000 r/min离心5 min后除去上清液,菌体重悬于无菌PBS中,利用分光光度法配制成 2.0×10^9 CFU/mL浓度的*B. bifidum*悬液。

1.2.2 动物处理: BBf干预组每日灌胃0.5 mL *B. bifidum*液(1.0×10^9 CFU),其余灌胃PBS 0.5 mL,持续6 wk,分别于实验第2、4、6周用颈椎脱臼法处死小鼠(5只/组)。具体操作方法为每日新配制浓度为 2.0×10^9 CFU/mL的两歧双歧杆菌菌液,并用1 mL注射器取该菌液0.5 mL,充分混匀后,接用小鼠灌胃针头将菌液全部灌入胃内。每周各组小鼠处死后,留取结肠中段行Ussing

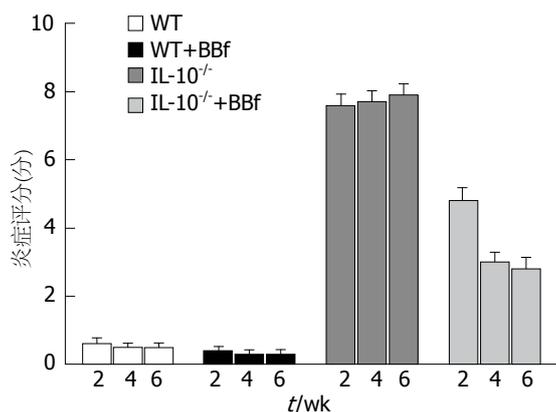


图1 炎症评分. IL-10^{-/-}组炎症评分明显高于WT组($P < 0.0001$); 虽然IL-10^{-/-}+BBf组较IL-10^{-/-}组炎症评分明显降低, 但并未恢复正常水平; WT组与WT+BBf组的炎症评分比较无统计学意义; IL-10^{-/-}+BBf组的4 wk和6 wk间无显著性差异, 但较2 wk的有显著性差异($P = 0.0025$, $P = 0.0014$). IL-10^{-/-}+BBf组与IL-10^{-/-}的炎症评分有显著性差异($P < 0.0001$).

Chamber实验, 测试结肠黏膜通透性和TER, 取材, 置于40 g/L甲醛和新鲜标本固定.

1.2.3 炎症评分: 结肠组织用40 g/L甲醛固定, 经常规处理、6 μm 切片、HE染色后镜检, 观察黏膜溃疡、炎症细胞的浸润、肌层的增厚、杯状细胞的减少、出血等现象, 根据每一项出现的现象逐一打分, 并根据其分数总和来判断炎症发生的轻重程度^[7].

1.2.4 ELISA法检测TNF- α 、IL-1 β 和INF- γ 浓度: 将切取的结肠组织置于800 μL 含有PBS、2% FCS和0.5%溴化十六烷基三甲胺的冷匀浆液中, 用Ultra-Turrax匀浆仪匀浆后在4 $^{\circ}\text{C}$ 离心15 min(3 000 r/min). 按照ELISA试剂盒说明检测上清液中TNF- α 、IL-1 β 和INF- γ 浓度, 以pg/mg组织表示.

1.2.5 Western blot法检测紧密连接蛋白的表达: 将结肠组织超声粉碎后置于冷的裂解液中[1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 缓冲液, 50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4, 150 mmol/L NaCl, 1%NP-40(Igepal CA-630), 0.5%脱氧胆酸盐, 0.1%十二烷基硫酸钠和5 mmol/L EDTA], 裂解60 min. 按照Zeissig等^[8]方法将提取蛋白分离, 一抗(ZO-1、occludin、claudin-1), 用Dye-800或IRDye-700标记的二抗孵育, 以 β -tubulin作为内参, Odyssey Infrared图像分析系统进行荧光定量分析, 结果以相对丰度表示.

1.2.6 免疫荧光法定位紧密连接蛋白的表达: 将小鼠新鲜结肠组织经PBS冲洗后用组织包埋剂包埋(Sakura, USA), 并置于-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存. 将冰冻组织10 μm 切片后在95 $^{\circ}\text{C}$ 10 mmol/L枸橼酸钠

溶液中孵育5 min, 冷却至室温. 用含有5%牛血清白蛋白和5%胎牛血清的PBS室温下孵育30 min以消除非特异性背景. 将以上切片与紧密连接蛋白ZO-1、occludin和claudin-1一抗(Abcom company小鼠抗兔)在4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜, 再用异硫氰酸荧光素标记的次毒蕈环肽室温下染色1 h. 再经相应荧光素标记的二抗(Beyond time兔抗鼠), 孵育1 h之后进行ECL(Thermo Pierce化学发光底物)化学发光.

1.2.7 Ussing Chamber检测肠上皮屏障: 根据Madsen^[4]的方法, 检测肠上皮细胞跨膜电阻(trans epithelial electrical resistance, TER)和细胞旁路甘露醇通透性, 以此反映肠上皮的屏障功能. 将新鲜剥离的结肠黏膜组织固定于Ussing Chamber, 两侧室灌注3 mL 37 $^{\circ}\text{C}$ 氧合Krebs缓冲液. 调节电压钳零电压, 以1 mv刺激电压每隔60 s刺激0.5 s, 记录跨膜电流(ΔIsc)和电压(PD), $\text{TER} = \text{PD}/\Delta\text{Isc}$. 为检测肠上皮细胞旁路甘露醇通透性, 将3%甘露醇添加到黏膜面侧溶液中, 平衡30 min后, 每隔30 min抽取浆膜面溶液200 μL , 持续2 h, 并置于液氮中保存. 实验结束后利用HPLC检测甘露醇浓度.

统计学处理 采用Graphpad Prism软件进行统计, 计量数据以mean \pm SD表示, 采用单因素方差分析(One-Way ANOVA), 组间比较采用SNK法, 检验水准 $\alpha = 0.05$.

2 结果

2.1 结肠炎炎症程度比较结果 IL-10^{-/-}组炎症评分明显高于WT组($P < 0.0001$); 虽然IL-10^{-/-}+BBf组较IL-10^{-/-}组炎症评分明显降低, 但并未恢复正常水平; WT组与WT+BBf组的炎症评分比较无统计学意义; IL-10^{-/-}+BBf组的4 wk和6 wk间无显著性差异, 但较2 wk的有显著性差异($P = 0.0025$, $P = 0.0014$), IL-10^{-/-}+BBf组与IL-10^{-/-}的炎症评分有显著性差异($P < 0.0001$, 图1).

2.2 细胞因子浓度的改变 IL-10^{-/-}组小鼠促炎细胞因子TNF- α 、IL-1 β 和INF- γ 浓度较WT组显著增高($P < 0.0001$); BBf干预后, IL-10^{-/-}+BBf组小鼠较IL-10^{-/-}组TNF- α 、IL-1 β 和INF- γ 浓度明显降低($P = 0.0031$, $P = 0.0023$, $P = 0.0025$), 干预4 wk和6 wk间无统计学差异, 但较2 wk的均有显著性差异($P = 0.0085$, $P = 0.0047$, 图2).

2.3 紧密连接蛋白的表达

2.3.1 Western blot法检测结果: IL-10^{-/-}组小鼠肠上皮细胞紧密连接蛋白ZO-1、occludin和clau-

■ 相关报道

Preising等的研究证实两歧双歧杆菌(*B. bifidum*S17)在体外表现出较强的粘附性、抗炎能力. De Palma等研究证实*B. bifidum*通过降低INF- γ 的浓度来降低Caco-2细胞屏障通透性, 影响炎症性疾病的进程.

■ 创新盘点

目前大多数研究利用益生菌干预的时间选在4 wk左右,本研究利用益生菌不同的干预周期(2、4和6 wk),结果发现选用4 wk的干预时间是合理的;同时延长给药干预时间,并没有相应的改善保护肠屏障作用的效果。

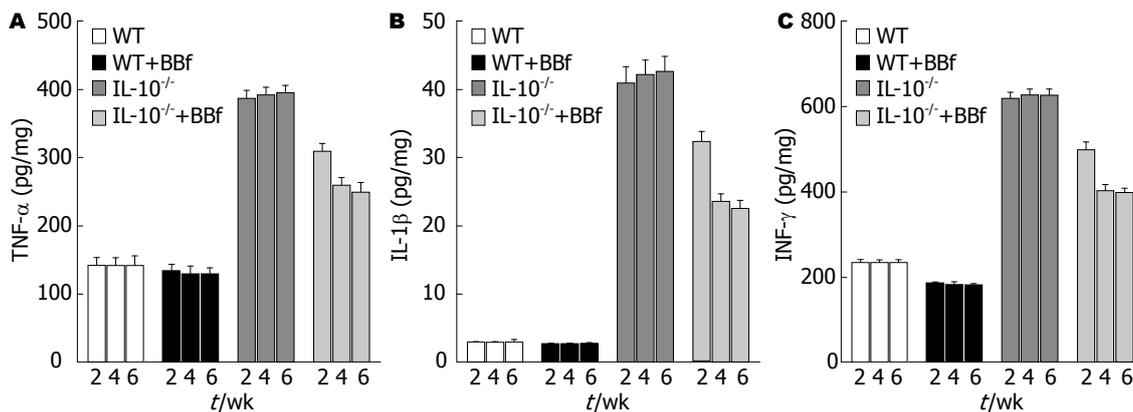


图2 各组细胞因子浓度比较结果。A: 肿瘤坏死因子 α ; B: 白介素-1 β ; C: 干扰素- γ 。

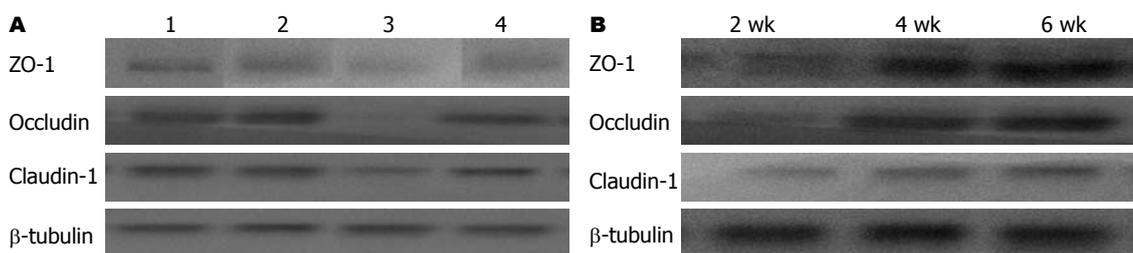


图3 Western blot法检测*B. bifidum*对紧密连接蛋白表达影响的定性结果。A: 1: WT组; 2: WT+BBf组; 3: IL-10^{-/-}组; 4: IL-10^{-/-}+BBf组; B: *B. bifidum*干预IL-10^{-/-}周期分别为2、4和6 wk。

din-1表达较WT组均出现下降; 而经*B. bifidum*干预治疗后, IL-10^{-/-}+BBf组均较IL-10^{-/-}组紧密连接蛋白ZO-1、occludin和claudin-1表达均显著增加; BBf干预4 wk和6 wk间无显著性差异, 但较2 wk均有显著性差异(图3)。

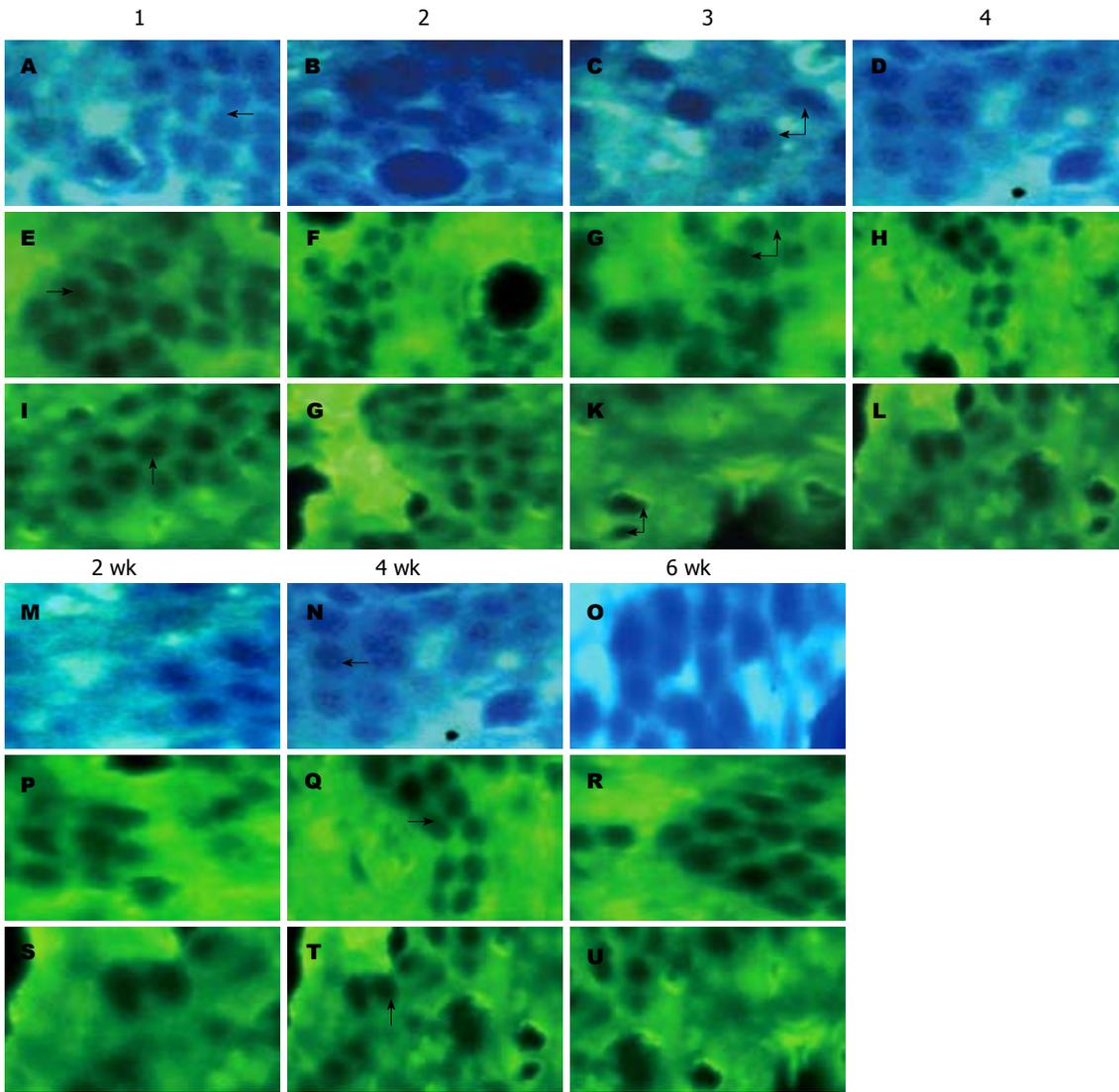
2.3.2 各组免疫荧光检测结果: WT组和WT+BBf组紧密连接蛋白ZO-1、occludin和claudin-1主要分布在肠上皮细胞顶膜, 呈连续性分布; IL-10^{-/-}组小鼠则表现出紧密连接蛋白ZO-1、occludin和claudin-1在细胞顶膜的荧光强度减弱和不连续性分布, 而经*B. bifidum*干预治疗后, IL-10^{-/-}+BBf组均较IL-10^{-/-}组紧密连接蛋白ZO-1、occludin和claudin-1荧光强度增强, 分布较连续, 但均未达到正常水平; *B. bifidum*干预4 wk和6 wk间无明显差异, 但较2 wk的有一定的差异(图4)。

2.4 各组肠上皮细胞旁路甘露醇通透性结果 IL-10^{-/-}组小鼠肠上皮细胞旁路对甘露醇的累积通透性明显高于WT组(2.28 ± 0.27 vs 0.78 ± 0.00 , $P = 0.0013$, 图5A), 且TER出现了明显降低(37.47 ± 3.59 vs 74.89 ± 4.25 , $P < 0.0001$, 图5B); 而*B. bifidum*干预4 wk后, IL-10^{-/-}+BBf组较IL-10^{-/-}组的甘露醇累积通透性显著降低(1.08 ± 0.16 vs 2.28 ± 0.27 , $P = 0.0086$, 图5A), TER明显增加

(59.34 ± 4.81 vs 37.47 ± 3.59 , $P = 0.0025$, 图5B); *B. bifidum*干预4 wk和6 wk间上述指标均无显著性差异, 但较2 wk的有显著性差异($P = 0.041$, $P = 0.021$, 图5C)。

3 讨论

近年来, 益生菌对IBS和IBD的治疗作用, 大多数学者已经认可。但关于益生菌制剂的给药剂量、间隔时间和总疗程等问题, 尚未形成共识。*B. bifidum*是肠道内常见的益生菌, 对维持肠道的微生态平衡以及机体的健康起重要作用, 如降血脂、抗衰老、抗炎、抗感染、免疫调节作用、维持肠黏膜稳定等^[9-11]。*B. bifidum*与肠黏膜屏障功能及IBD之间关系的研究越来越受广大国内外医学科学人员的重视^[12-14]。有文献报道^[15,16]致病菌的存在刺激机体先天免疫应答并分泌大量促炎因子, 如: IL-1 β 、IL-6、IL-8、IL-18和TNF- α , 他们集中作用在肠道上皮细胞, 从而促进肠道炎症发展。来自异常肠道菌群的大量抗原能透过受损的肠上皮细胞屏障持续刺激肠黏膜下免疫细胞, 引起肠上皮损伤, 导致肠炎的发生、发展。Preising等^[6]的研究证实两歧双歧杆菌(*B. bifidum* S17)在体外研究中表现出



应用要点
目前选用的益生菌干预时间大多在4 wk左右, 通过本研究证实, 延长给药干预时间, 并没有相应的改善保护肠屏障作用的效果, 从而为临床用药时间提供参考。

图 4 *B. bifidum*对紧密连接蛋白表达的影响(免疫荧光结果×20)。A-L: 1: WT组; 2: WT+BBf组; 3: IL-10^{-/-}组; 4: IL-10^{-/-}+BBf组; 单箭头表示肠上皮细胞顶膜呈现连续性分布紧密连接蛋白; 双箭头表示肠上皮细胞顶膜呈不连续性分布紧密连接蛋白; M-U: *B. bifidum*干预IL-10^{-/-}周期分别为2 wk、4 wk和6 wk; 箭头表示呈较连续性分布, 免疫荧光较强; A-D, M-O: ZO-1; E-H, P-R: Claudin-1; I-L, S-U: Occludin。

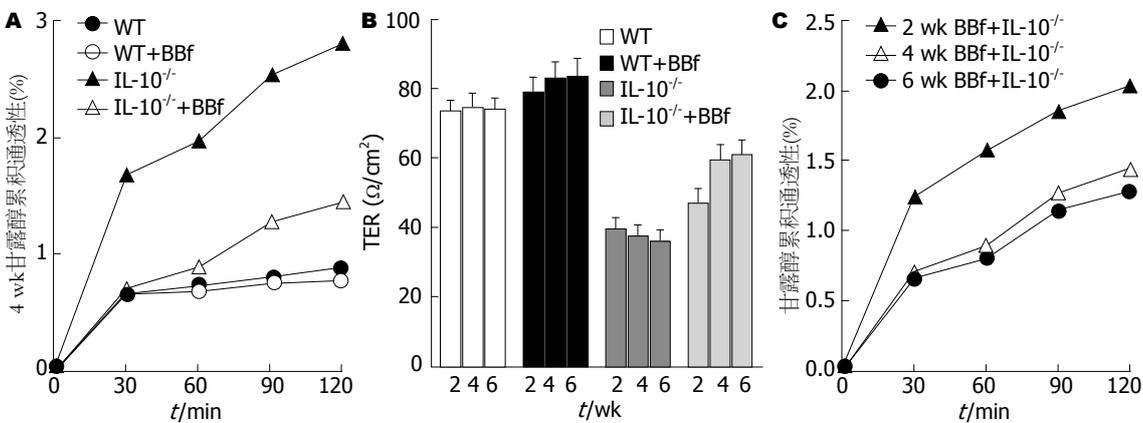


图 5 各组肠上皮细胞旁路甘露醇通透性结果。A: 各组小鼠肠上皮细胞旁路的甘露醇的累积通透性结果; B: 各组小鼠肠上皮细胞跨膜电阻比较结果; C: IL-10^{-/-}+BBf组不同周期的肠上皮细胞旁路甘露醇通透性结果。

较强的黏附性、抗炎能力。耐氧性双歧杆菌(*Bifidobacterium animalis*)DN-173 010, 青春双歧杆

■名词解释

肠易激综合征: 一种以腹痛或腹部不适伴排便习惯改变为特征的胃肠道功能性疾病, 病理生理学基础是胃肠动力障碍和内脏感知异常。

菌属(*Bifidobacterium adolescentis*)DN-150 017, 或多形拟杆菌(*Bacteroides thetaiotaomicron*), 其中一种处理DCs, 通过减少CD4⁺效应T细胞增殖和IFN- γ 的分泌刺激原始T细胞成熟和发挥其功能^[17]. VSL#3^[18](4种混合的乳酸菌, 包括LGG、3种双歧杆菌和一种链球菌)通过减少P38活性或其磷酸化调节IEC MAPK通路. Fujie等^[19]在体内试验中证实使用短双歧杆菌(*B. breve* MCC-117)能有效防止大肠杆菌引起的肠道炎症. Laparra等^[20]发现双歧杆菌能抑制麦醇溶蛋白诱发的细胞毒性, 并且抑制肠上皮细胞促炎症反应, 从而引起炎症标志物NF- κ B、TNF- α 和IL-1 β 明显降低, 可能对克罗恩病患者存在肠上皮屏障功能障碍有一定的修复作用. 在IL-10基因敲除诱导的UC模型小鼠中, 研究者发现双歧杆菌对结肠及盲肠炎炎症可以产生显著的降低作用, 并且可以降低促炎症因子IFN- γ 、TNF- α 及IL-12, 而抗炎因子TGF- β 的水平保持不变^[21]. 同样, Mc-Carthy等^[22]发现在IL-10基因敲除的IBD模型中, 用*B. infantis*及*Lactobacillus. salivarius*治疗可以降低上述3种促炎因子的水平. De Palma等^[23]研究证实双歧杆菌(*B. bifidum* IATA-ES2和*B. longum* ATCC-15707)通过调节单核细胞吸收麦醇溶蛋白刺激反应的黏液并降低IFN- γ 的浓度来降低Caco-2细胞屏障通透性, 影响炎症疾病的进程. 与Madsen等^[24]研究结果相一致. 本研究发现IL-10^{-/-}小鼠是存在肠道炎症表现, 表现为结肠黏膜溃疡、糜烂和大量中性粒细胞和淋巴细胞浸润; 而双歧杆菌干预后, IL-10^{-/-}+BBF组小鼠仅表现为轻度中性粒细胞和淋巴细胞浸润, 同时IL-10^{-/-}小鼠的促炎细胞因子TNF- α 、IL-1 β 和INF- γ 的浓度显著增高, 利用双歧杆菌治疗后上述3种促炎因子出现显著降低, 干预4 wk的较干预2 wk的降低有显著差异性, 而较干预6 wk的无显著性差异, 表明双歧杆菌能减轻肠道炎症, 但干预4 wk和6 wk的肠道炎症均未恢复到正常水平. 干预4 wk和2 wk比较, *B. bifidum*肠屏障保护作用较好, 增加干预周期至6 wk, 未检测到肠屏障保护作用增强.

目前大多数研究利用益生菌干预的时间选在4 wk左右, 金丹等^[25]选用从健康幼儿粪便中分离的特定*B. bifidum*对小鼠进行处理4 wk后, 表明所用的双歧杆菌菌株减轻了DSS诱导的小鼠肠道炎症反应, 并且增强了肠道免疫细胞IL-10的表达及分泌. Whorwell等^[26]的进一步研究表明, 持续4 wk的最适剂量的实验结果证

实*B. infantis* 35624治疗IBS的最有效剂量为10⁸ CFU/mL, 而IBS的所有特征都得到了显著性改变, 在治疗的最后阶段对IBS的全部特征进行评价, 发现益生菌的有效剂量治疗效果好于安慰剂大约20%. 燕善军^[27]对84例IBS患者进行口服*B. bifidum*治疗, 研究结果发现, *B. bifidum*对IBS常见的腹痛、腹胀、排便频率异常及里急后重等主要症状有明显的改善作用, 治疗4 wk后效果更加明显. 本研究利用益生菌不同的干预周期(2、4和6 wk), 结果发现选用4 wk的干预时间是合理的; 同时延长给药干预的时间, 并没有相应的增加保护肠屏障作用的效果. 从而为临床应用用药时间提供一个参考, 但真正应用到临床, 还需要大量临床实验证明. Resta-Lenert等^[28]发现, 乳酸菌和*B. bifidum*通过维护细胞骨架和ZO-1蛋白及occludin表达, 对表皮生长因子刺激作用增强, 修复EPEC引起的破坏作用. Qin等^[29]研究证实, LP能通过增强紧密连接蛋白(ZO-1、claudin-1、occludin、JAMA-1)在细胞顶膜的表达来阻止EPEC对Caco-2细胞屏障功能的破坏作用. Chen等^[30]研究发现LP干预IL-10^{-/-}小鼠4 wk后促进紧密连接蛋白ZO-1、occludin、claudin-1和 β -catenin的表达, 从而发挥其对肠屏障功能的修复作用. 本实验显示IL-10^{-/-}小鼠肠上皮细胞紧密连接蛋白ZO-1、occludin和claudin-1表达较WT组均出现下降; 而经*B. bifidum*干预治疗后, 肠上皮细胞的上述3种紧密连接蛋白表达均显著增加, 因此肠上皮细胞间连接更加紧密, 肠道细胞屏障功能得到了保护.

本实验利用Ussing Chamber技术, 检测肠上皮TER和细胞旁路甘露醇通透性, 发现IL-10^{-/-}组小鼠肠上皮细胞旁路对甘露醇的累积通透性明显高于WT组, 且TER出现了明显降低; 而*B. bifidum*干预后, IL-10^{-/-}+BBF组较IL-10^{-/-}组的甘露醇累积通透性显著降低, 细胞TER明显增加; *B. bifidum*干预4 wk和6 wk间上述指标无显著性差异, 但较2 wk的有显著性差异. 表明*B. bifidum*干预治疗炎症性小鼠后, 会明显增加肠上皮细胞TER和降低肠道上皮细胞的通透性, 从而起到了保护肠道屏障的功能.

总之, IL-10^{-/-}小鼠是存在肠道炎症表现, 屏障功能障碍, 表现为肠上皮细胞间紧密连接超微结构破坏、肠上皮细胞TER降低和甘露醇通透性增加. *B. bifidum*干预后能明显减轻肠道炎症, 降低肠上皮细胞间通透性, 阻止肠上皮细胞及细胞间紧密连接超微结构的破坏; 降低促炎细

胞因子TNF- α 、IL-1 β 和INF- γ 的浓度, 促进紧密连接蛋白ZO-1、occludin和claudin-1的表达, 从而发挥肠屏障功能的保护作用。而*B. bifidum*干预4 wk和6 wk后均较干预2 wk后有在上述指标发现明显的差异, 而干预6 wk后较干预4 wk后的并没有在上述指标发现明显的差异。

目前需要益生菌干预的时间大多研究选在4 wk左右, 通过本研究证实, 延长给药干预的时间, 并没有相应的增加保护肠屏障作用的效果; 同时本实验再次证实益生菌*B. bifidum*具有保护IL-10基因敲除小鼠结肠上皮屏障的作用。

4 参考文献

- 1 秦环龙, 梁勇. 肠道微生态变化及临床应用. 中国普外基础与临床杂志 2011; 18: 1237-1241
- 2 Kennedy RJ, Hoper M, Deodhar K, Erwin PJ, Kirk SJ, Gardiner KR. Interleukin 10-deficient colitis: new similarities to human inflammatory bowel disease. *Br J Surg* 2000; 87: 1346-1351
- 3 Madsen KL, Malfair D, Gray D, Doyle JS, Jewell LD, Fedorak RN. Interleukin-10 gene-deficient mice develop a primary intestinal permeability defect in response to enteric microflora. *Inflamm Bowel Dis* 1999; 5: 262-270
- 4 Madsen KL. Inflammatory bowel disease: lessons from the IL-10 gene-deficient mouse. *Clin Invest Med* 2001; 24: 250-257
- 5 Madsen K, Cornish A, Soper P, McKaigney C, Jijon H, Yachimec C, Doyle J, Jewell L, De Simone C. Probiotic bacteria enhance murine and human intestinal epithelial barrier function. *Gastroenterology* 2001; 121: 580-591
- 6 Preising J, Philippe D, Gleinser M, Wei H, Blum S, Eikmanns BJ, Niess JH, Riedel CU. Selection of bifidobacteria based on adhesion and anti-inflammatory capacity in vitro for amelioration of murine colitis. *Appl Environ Microbiol* 2010; 76: 3048-3051
- 7 McCafferty DM, Miampamba M, Sihota E, Sharkey KA, Kubes P. Role of inducible nitric oxide synthase in trinitrobenzene sulphonic acid induced colitis in mice. *Gut* 1999; 45: 864-873
- 8 Zeissig S, Bürgel N, Günzel D, Richter J, Mankertz J, Wahnschaffe U, Kroesen AJ, Zeitz M, Fromm M, Schulzke JD. Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease. *Gut* 2007; 56: 61-72
- 9 Rhee YK, Han MJ, Choi EC, Kim DH. Hypocholesterolemic activity of Bifidobacteria isolated from a healthy Korean. *Arch Pharm Res* 2002; 25: 681-684
- 10 Hart AL, Lammers K, Brigidi P, Vitali B, Rizzello F, Gionchetti P, Campieri M, Kamm MA, Knight SC, Stagg AJ. Modulation of human dendritic cell phenotype and function by probiotic bacteria. *Gut* 2004; 53: 1602-1609
- 11 Sekine K, Ohta J, Onishi M, Tatsuki T, Shimokawa Y, Toida T, Kawashima T, Hashimoto Y. Analysis of antitumor properties of effector cells stimulated with a cell wall preparation (WPG) of Bifidobacterium infantis. *Biol Pharm Bull* 1995; 18: 148-153
- 12 Wang Z, Xiao G, Yao Y, Guo S, Lu K, Sheng Z. The role of bifidobacteria in gut barrier function after thermal injury in rats. *J Trauma* 2006; 61: 650-657
- 13 Ruan X, Shi H, Xia G, Xiao Y, Dong J, Ming F, Wang S. Encapsulated Bifidobacteria reduced bacterial translocation in rats following hemorrhagic shock and resuscitation. *Nutrition* 2007; 23: 754-761
- 14 Ruiz PA, Hoffmann M, Szczesny S, Blaut M, Haller D. Innate mechanisms for Bifidobacterium lactis to activate transient pro-inflammatory host responses in intestinal epithelial cells after the colonization of germ-free rats. *Immunology* 2005; 115: 441-450
- 15 Moue M, Tohno M, Shimazu T, Kido T, Aso H, Saito T, Kitazawa H. Toll-like receptor 4 and cytokine expression involved in functional immune response in an originally established porcine intestinal epitheliocyte cell line. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1780: 134-144
- 16 Blumberg RS. Inflammation in the intestinal tract: pathogenesis and treatment. *Dig Dis* 2009; 27: 455-464
- 17 Baba N, Samson S, Bourdet-Sicard R, Rubio M, Sarfati M. Commensal bacteria trigger a full dendritic cell maturation program that promotes the expansion of non-Tr1 suppressor T cells. *J Leukoc Biol* 2008; 84: 468-476
- 18 Jijon H, Backer J, Diaz H, Yeung H, Thiel D, McKaigney C, De Simone C, Madsen K. DNA from probiotic bacteria modulates murine and human epithelial and immune function. *Gastroenterology* 2004; 126: 1358-1373
- 19 Fujie H, Villena J, Tohno M, Morie K, Shimazu T, Aso H, Suda Y, Shimosato T, Iwabuchi N, Xiao JZ, Yaeshima T, Iwatsuki K, Saito T, Numasaki M, Kitazawa H. Toll-like receptor-2-activating bifidobacteria strains differentially regulate inflammatory cytokines in the porcine intestinal epithelial cell culture system: finding new anti-inflammatory immunobiotics. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2011; 63: 129-139
- 20 Laparra JM, Sanz Y. Bifidobacteria inhibit the inflammatory response induced by gliadins in intestinal epithelial cells via modifications of toxic peptide generation during digestion. *J Cell Biochem* 2010; 109: 801-807
- 21 Quigley EM. Prebiotics and probiotics; modifying and mining the microbiota. *Pharmacol Res* 2010; 61: 213-218
- 22 McCarthy J, O'Mahony L, O'Callaghan L, Sheil B, Vaughan EE, Fitzsimons N, Fitzgibbon J, O'Sullivan GC, Kiely B, Collins JK, Shanahan F. Double blind, placebo controlled trial of two probiotic strains in interleukin 10 knockout mice and mechanistic link with cytokine balance. *Gut* 2003; 52: 975-980
- 23 De Palma G, Cinova J, Stepankova R, Tuckova L, Sanz Y. Pivotal Advance: Bifidobacteria and Gram-negative bacteria differentially influence immune responses in the proinflammatory milieu of celiac disease. *J Leukoc Biol* 2010; 87: 765-778
- 24 Madsen KL, Doyle JS, Jewell LD, Tavernini MM, Fedorak RN. Lactobacillus species prevents colitis in interleukin 10 gene-deficient mice. *Gastroenterology* 1999; 116: 1107-1114
- 25 金丹, 孟繁平, 崔逢德, 李红花, 金寿起. 特定双歧杆菌菌株对炎症性肠病小鼠的影响. 微生物学通报 2011; 38: 383-387
- 26 Whorwell PJ, Altringer L, Morel J, Bond Y, Charbonneau D, O'Mahony L, Kiely B, Shanahan F, Quigley EM. Efficacy of an encapsulated probiotic Bifidobacterium infantis 35624 in women with irri-

■同行评价

本文有一定的创新性, 通过IL-10基因敲除小鼠研究了微生态制剂益生菌双歧杆菌不同的干预周期对结肠肠黏膜屏障功能的保护作用, 研究设计合理, 讨论条理较清楚。

- table bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 1581-1590
- 27 燕善军. 双歧杆菌对肠易激综合征的治疗价值. 蚌埠医学院学报 2005; 30: 394-395
- 28 Resta-Lenert S, Smitham J, Barrett KE. Epithelial dysfunction associated with the development of colitis in conventionally housed *mdr1a*^{-/-} mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 289: G153-G162
- 29 Qin HL, Zhang ZW, Hang XM, Jiang YQ. *plan-*tarum prevents enteroinvasive *Escherichia coli*-induced tight junction proteins changes in intestinal epithelial cells. *BMC Microbiol* 2009; 9: 63
- 30 Chen HQ, Yang J, Zhang M, Zhou YK, Shen TY, Chu ZX, Zhang M, Hang XM, Jiang YQ, Qin HL. *Lactobacillus plantarum* ameliorates colonic epithelial barrier dysfunction by modulating the apical junctional complex and PepT1 in IL-10 knockout mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2010; 299: G1287-G1297

编辑 翟欢欢 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t_{1/2}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.

鞘氨醇激酶1对结肠癌细胞血管生成拟态的影响及其机制

李梦婷, 黄杰安, 周巧, 苏颖洁, 刘诗权, 覃蒙斌

李梦婷, 黄杰安, 周巧, 苏颖洁, 刘诗权, 覃蒙斌, 广西医科大学第一附属医院消化内科 广西壮族自治区南宁市 530021
李梦婷, 在读硕士, 主要从事结肠癌发病机制的研究。
广西卫生厅基金资助项目, 桂卫重No. 2010016
广西卫生厅基金资助项目, 桂卫No. GZKZ10-107
作者贡献分布: 此课题由黄杰安与刘诗权设计; 研究过程由李梦婷、周巧及苏颖洁操作完成; 研究所用试剂及分析工具由黄杰安提供; 数据分析由李梦婷完成; 本论文由李梦婷与覃蒙斌完成。
通讯作者: 黄杰安, 教授, 530021, 广西壮族自治区南宁市双拥路6号, 广西医科大学第一附属医院消化内科, jh23229@gmail.com
电话: 0771-5356501
收稿日期: 2012-07-25 修回日期: 2012-09-09
接受日期: 2012-11-07 在线出版日期: 2012-11-28

Sphingosine kinase 1 induces vasculogenic mimicry formation by up-regulating VEGF expression and secretion in human colon cancer cell line HT-29

Meng-Ting Li, Jie-An Huang, Qiao Zhou, Ying-Jie Su, Shi-Quan Liu, Meng-Bin Qin

Meng-Ting Li, Jie-An Huang, Qiao Zhou, Ying-Jie Su, Shi-Quan Liu, Meng-Bin Qin, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Supported by: the Scientific Research Foundation of the Health Department of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Gui Wei Zhong No. 2010016 and Gui Wei No. GZKZ10-107
Correspondence to: Jie-An Huang, Professor, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. jh23229@gmail.com
Received: 2012-07-25 Revised: 2012-09-09
Accepted: 2012-11-07 Published online: 2012-11-28

Abstract

AIM: To investigate the role of sphingosine kinase 1 (Sphk1) in vasculogenic mimicry (VM) formation in human colon cancer cell line HT-29 *in vitro*.

METHODS: HT-29 cells were divided into three groups and treated with 100 nm/L of phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, Sphk1 activation group), 50 μmol/L of N,N-dimethyl-D-erythro-sphingosine (DMS, suppression group), and equal volume of culture medium (control group), respectively. After treatment, cell proliferation was determined by MTT assay, and

cell invasiveness and migration were assessed by Transwell chamber assays. Cell apoptosis was observed by transmission electron microscopy (TEM). VM formation was observed in a three-dimensional culture system. The mRNA and protein expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) was evaluated by QT-PCR and Western blot, respectively. The secretion of VEGF was detected by ELISA.

RESULTS: Treatment with DMS significantly suppressed cell proliferation, invasion and migration, promoted apoptosis, down-regulated VEGF mRNA and protein expression and secretion, and did not induce VM formation. In contrast, treatment with PMA significantly promoted cell proliferation, invasion (112.00 ± 6.25 vs 57.00 ± 8.00 , 142.00 ± 5.57 , both $P < 0.05$) and migration (69.33 ± 4.04 vs 42.00 ± 4.16 , 111.00 ± 8.03 , both $P < 0.05$), suppressed apoptosis, up-regulated VEGF mRNA (1.000 vs 0.740 ± 0.122 , 1.220 ± 0.075 , both $P < 0.05$) and protein (0.39 ± 0.05 vs 0.23 ± 0.02 , 0.65 ± 0.06 , both $P < 0.05$) expression and secretion (103.00 ± 8.96 vs 63.89 ± 8.44 , 201.01 ± 17.93 , both $P < 0.05$), and induced the formation of tubular VM.

CONCLUSION: Sphk1 promotes cell proliferation, invasion and migration, suppresses cell apoptosis, and induces VM formation possibly by up-regulating VEGF expression and secretion in human HT-29 colon cancer cell line.

Key Words: Vasculogenic mimicry; Sphingosine kinase 1; Human colon cell; Vascular endothelial growth factor; Invasion

Li MT, Huang JA, Zhou Q, Su YJ, Liu SQ, Qin MB. Sphingosine kinase 1 induces vasculogenic mimicry formation by up-regulating VEGF expression and secretion in human colon cancer cell line HT-29. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(33): 3211-3217

摘要

目的: 研究鞘氨醇激酶1(sphingosine kinase 1, Sphk1)对人结肠癌HT-29细胞生成血管拟态(vasculogenic mimicry, VM)的影响及其可能的机制。

背景资料

血管拟态(VM)是由肿瘤细胞变形构成的管腔样结构,与预后不良及高死亡率密切相关,形成VM的机制目前尚未清楚;1-磷酸鞘氨醇(S1P)可调控血管内皮生长因子(VEGF)转录与表达,而VEGF与VM形成密切相关;鞘氨醇激酶1(Sphk1)作为S1P合成的催化酶,对VEGF的调控以及对结肠癌细胞VM生成的影响目前尚未见报道。

同行评议者

卢晓梅, 教授, 研究员, 新疆医科大学第一附属医院临床医学研究院

■ 研发前沿

现有的资料表明, VEGF-a \rightarrow EphA2 \rightarrow MMPs \rightarrow VM是VM形成的主要途径, S1P可促进VEGF表达, Sphk1作为调节S1P的关键酶是否可通过调节VEGF进而形成VM尚不清楚。

方法: 将人结肠癌HT-29细胞分为Sphk1抑制组、Sphk1激活组、对照组。Sphk1抑制组加入N,N-二甲基鞘氨醇(N,N-dimethyl-D-erythro-sphingosine, DMS)50 μ mol/L; Sphk1激活组加入佛波醇-12-豆蔻酸酯-13-乙酸酯(phorbol 12-myristate-13-acetate, PMA)100 nmol/L; 对照组加入等量的培养基。采用MTT法检测细胞生长增殖; 透射电镜观察细胞形态学变化; Matrigel三维培养法观察VM形成能力; Transwell小室模型观察细胞侵袭迁移能力的变化, QT-PCR、Western blot及ELISA技术检测血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的表达。

结果: DMS显著抑制细胞的增殖、侵袭、迁移并促进细胞凋亡; 透射电镜可见典型的凋亡特征; 三维培养中不能形成管状VM; 明显减弱VEGF mRNA及蛋白表达。PMA则显著促进HT-29细胞的增殖、侵袭、迁移并抑制细胞的凋亡; 透射电镜可观察到细胞增殖特征; 促进三维培养中管状VM的形成; 明显增强VEGF mRNA及蛋白表达。对照组、DMS组及PMA组的侵袭细胞数: 112.00 ± 6.25 vs 57.00 ± 8.00 , 142.00 ± 5.57 ; 迁移细胞数: 69.33 ± 4.04 vs 42.00 ± 4.16 , 111.00 ± 8.03 ; VEGF mRNA表达量: 1.000 vs 0.740 ± 0.122 , 1.220 ± 0.075 ; VEGF蛋白表达: 0.39 ± 0.05 vs 0.23 ± 0.02 , 0.65 ± 0.06 ; VEGF蛋白分泌: 103.00 ± 8.96 vs 63.89 ± 8.44 , 201.01 ± 17.93 , 均 $P < 0.05$ 。

结论: Sphk1可促进HT-29细胞增殖、侵袭、迁移并抑制细胞的凋亡, 诱导VM的形成, 其机制可能是通过增强结肠癌细胞的侵袭迁移能力并促进VEGF表达而发挥作用。

关键词: 血管生成拟态; 鞘氨醇激酶-1; 人结肠癌细胞; 血管内皮生长因子; 侵袭能力

李梦婷, 黄杰安, 周巧, 苏颖洁, 刘诗权, 覃蒙斌. 鞘氨醇激酶1对结肠癌细胞血管生成拟态的影响及其机制. 世界华人消化杂志 2012; 20(33): 3211-3217

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3211.asp>

0 引言

鞘脂类物质, 特别是神经酰胺(ceramide, Cer), 鞘氨醇以及1-磷酸鞘氨醇(sphingosine-1-phosphate, S1P)在调节肿瘤细胞生长增殖过程中发挥着重要作用, S1P促进细胞增殖并抑制细胞凋亡, 调节血管生成, 而Cer与鞘氨醇则抑制细胞生长, 加速细胞凋亡^[1]。鞘氨醇激酶(sphingosine kinase, Sphk)磷酸化鞘氨醇成S1P, 其中Sphk1是调节

S1P/Cer平衡的关键酶^[2], 许多研究表明Sphk1/S1P信号传导通路参与肿瘤发生发展^[3]。

血管拟态(vasculogenic mimicry, VM)是一种由肿瘤细胞变形而构成并能传导血液的管腔样结构^[4], 近年在恶性程度高的肿瘤中陆续发现他的存在^[4-8], 这种管腔样结构其管壁不是由内皮细胞组成, 却表现出内皮细胞特性, 他的出现与预后不良及高死亡率密切相关^[9], 然而, 形成VM的机制目前尚未清楚。既往研究表明血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)在体外可促进肿瘤细胞排列成管道结构, 抑制VEGF表达可减少VM形成^[10,11], 研究发现S1P可通过Gai/o、PLC、胞内钙通路提高VEGF的转录水平, 并受MAPK、PI-3K、Akt、Erk等分子或信号途经调控^[12], Sphk1作为S1P合成的催化酶, 对VEGF的调控以及对结肠癌细胞VM生成的影响目前尚未见报道。

本研究试图通过调控Sphk1的活性, 观察Sphk1对结肠癌细胞株HT-29形成VM的影响及对VEGF表达的影响, 以期探讨Sphk1对VM的形成的作用及其分子机制。

1 材料和方法

1.1 材料 人结肠癌HT-29细胞购自中国科学院细胞库; 佛波醇-12-豆蔻酸酯-13-乙酸酯(phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA)及McCOY's 5A培养液购自Sigma-Aldrich公司; 鼠抗人VEGF单克隆抗体和 β -actin抗体购自Santa Cruz公司; N,N-二甲基鞘氨醇(N,N-dimethyl-D-erythro-sphingosine, DMS)购自Merck-Calbiochem公司; 四氮唑蓝(MTT)购自北京索莱宝科技有限公司; 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)试剂购自Fermentas公司; TRIzol购自Invitrogen公司; 胎牛血清购自Gibco公司; 人工基质Matrigel购自BD Biosciences公司; FastStart universal SYBR Green master(Rox)购自Roche公司; VEGF ELISA试剂盒购自上海依科赛生物制品有限公司; 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: 人结肠癌HT-29细胞株置于含10%胎牛血清、100 U/mL青霉素和100 μ g/mL链霉素的McCOY's 5A培养液中, 37 $^{\circ}$ C、50 mL/L CO₂、饱和温度条件下培养。细胞单层生长, 铺满培养瓶约80%-90%时传代。传代时常规吸去培养液, 用含0.25%胰蛋白酶消化液消化, 按所需浓度接种。

1.2.2 MTT比色法检测细胞增殖活性: 取对数生长期细胞, 接种于96孔培养板, 12 h后细胞贴壁, 分成3组: 分别加入100 nmol/L的PMA(PMA组)和50 μ mol/L DMS(DMS组), 以等量培养基代药物为对照, 空白调零孔为无细胞等体积的培养基, 每组设3个复孔, 培养0、6、12、24 h后进行MTT检测. 用酶联免疫检测仪在490 nm波长下测定各孔吸光度(A)值.

1.2.3 透射电镜超微结构观察: 取对数生长期细胞, 分组同前, 干预24 h后胰酶消化离心收集细胞, 2.5%戊二醛及锇酸固定, 丙酮梯度脱水, 树脂618包埋. LKB-V超薄切片机切片, 透射电镜下观察.

1.2.4 基质胶Matrigel三维培养: 将1 cm \times 1 cm盖玻片放入24孔培养板底壁后每孔中加入50 μ L Matrigel原液, 37 $^{\circ}$ C培养箱内温育1 h, 再加入约含 1×10^5 个细胞的完全培养基1 mL, 待细胞贴壁后进行分组, 于37 $^{\circ}$ C培养0、6、12、24、48 h时, 用倒置显微镜进行观察拍照.

1.2.5 细胞迁移试验: 细胞经Sphk1活性调节剂干预24 h后, 胰蛋白酶消化细胞, 使细胞浓度调整为 5×10^5 个/mL, Transwell上室加200 μ L细胞悬液, 下室加入600 μ L细胞培养基, 37 $^{\circ}$ C孵育24 h, 棉签擦去上室上面的非迁移细胞, 移去Transwell, 倒置风干, 0.1%结晶紫37 $^{\circ}$ C染色30 min后取出, PBS清洗, 相差显微镜观察并拍照, 每个样片随机取4个视野拍照并计数迁移细胞, 计算平均值, 以空白试剂为对照, 分析数据. 细胞侵袭试验时, 用无血清的冷细胞培养基McCOY's 5A稀释Matrigel胶至8 mg/mL, 取100 μ L稀释胶加至Transwell小室后, 细胞药物处理及其余操作均同迁移试验.

1.2.6 QT-PCR检测: Sphk1活性调节剂处理后细胞中VEGF mRNA的表达: 细胞分组处理24 h后采用TRIzol提取细胞总RNA, 用M-MLV逆转录酶合成cDNA. VEGF上游引物5'-CCAG-CAGAAAGAGGAAAGAGGTAG-3', 下游引物5'-CCCCAAAAGCAGGTCAC-3', 扩增片段长度133 bp; β -actin上游引物5'-TGAC-GTGGACATCCGCAAAG-3', 下游引物5'-CTG-GAAGGTGGACAGCGAGG-3', 扩增片段长度203 bp. 20 μ L PCR反应体系: 2 \times FastStart universal SYBR Green master (Rox) 10 μ L, Rnase Free ddH₂O 8 μ L, 上、下游引物各0.5 μ L, cDNA 1 μ L. PCR反应条件: 起始变性95 $^{\circ}$ C 10 min, 95 $^{\circ}$ C 30 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 重复40个循环; 以 β -actin作为

管家基因, 针对每个基因的每个样品设3个重复扩增管. 采用相对双Delta Ct法, 公式: $2^{-\Delta\Delta Ct}$, 进行定量分析.

1.2.7 Western blot法检测Sphk1活性调节剂处理后细胞中VEGF蛋白的表达: 各组细胞培养24 h后提取总蛋白, 行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)并转至PVDF膜上, 5%脱脂牛奶封闭1 h, 加入抗VEGF抗体(1:200), 4 $^{\circ}$ C过夜, TBST洗涤3次. 再用荧光标记的二抗杂交1 h, TBST洗涤3次, Odyssey红外荧光扫描成像系统进行扫描分析, 以目的条带与内参条带的灰度值比值作为目的蛋白的相对表达水平.

1.2.8 ELISA检测药物处理后细胞培养液中VEGF蛋白的含量: 按 1×10^4 个细胞/孔接种至96孔板, 待细胞贴壁后在无血清培养基内加入药物进行处理, 作用24 h后收集细胞培养液上清. 倍比稀释标准品, 取100 μ L标准品加入标准孔. 取培养基上清100 μ L加入待测孔, 37 $^{\circ}$ C孵育90 min; 弃液体, 每孔加入350 μ L洗涤液, 静置30 s后弃去, 重复洗涤5次, 每孔加入生物素化抗体工作液100 μ L, 37 $^{\circ}$ C孵育60 min; 弃液体, 洗涤同前, 每孔加入酶结合物工作液100 μ L, 37 $^{\circ}$ C避光孵育30 min; 弃液体, 洗板同前, 每孔加入显色底物100 μ L, 37 $^{\circ}$ C避光孵育15 min, 每孔加入终止液100 μ L, 混匀后于酶标仪上450 nm波长处测定A值, 570 nm波长校正, 根据标准品浓度及对应A值绘制标准曲线, 计算每孔待测品浓度.

统计学处理 使用统计软件为SPSS13.0, 以上实验均重复3次, 数据以mean \pm SD差表示. 统计分析采用t检验和单因素方差分析. 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 DMS和PMA对HT-29细胞增殖活力的影响 DMS呈时间依赖性地抑制HT-29的增殖, PMA则呈时间依赖性地诱导HT-29的增殖(图1).

2.2 透射电镜观察DMS和PMA干预下HT-29的形态学改变 对照组细胞轮廓清晰, 表面有微绒毛, 胞浆丰富, 胞核形态规则, 核膜完整, 染色质分布均匀. DMS组可见典型的凋亡特征: 细胞变圆, 表面微绒毛消失, 胞质空泡化, 染色质浓缩, 边集. PMA组细胞表面有绒毛, 细胞核较大, 核仁明显(2个), 细胞器丰富(图2).

2.3 DMS和PMA对HT-29细胞侵袭迁移能力的影响 与对照组相比(表1, 图3), DMS抑制Sphk1活性后细胞侵袭与迁移能力明显减弱, 数量减少

■ 相关报道

Heo等研究发现S-1P可通过G α i/o、PLC、胞内钙通路提高VEGF的转录水平, 并受MAPK、ERK、PI-3K、Akt等分子及信号途径调控; Wang等发现VEGF在VM形成过程中起关键作用, 其作用途径为VEGF-a \rightarrow EphA2 \rightarrow MMPs \rightarrow VM; 我们的前期研究证明Sphk1可活化ERK1/2通路, 上调MMP-2、MMP-9和uPA的表达和分泌.

■ 创新盘点

通过调控Sphk1的活性,观察Sphk1对结肠癌细胞株HT-29形成VM的影响及对VEGF表达的影响,以期阐明Sphk1对VM的形成的作用及其分子机制。

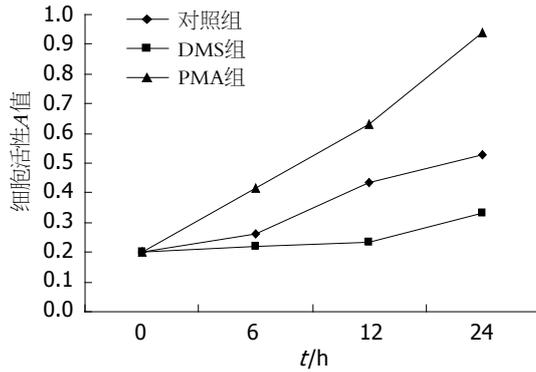


图1 DMS和PMA对结肠癌HT-29生长增殖的影响. DMS: N, N-二甲基鞘氨醇; PMA: 佛波醇-12-豆蔻酸酯-13-乙酸酯。

($P = 0.020, 0.002$); PMA激活Sphk1活性后细胞侵袭与迁移能力明显增强,数量增多($P = 0.013, 0.010$).

2.4 DMS和PMA对HT-29细胞管状VM形成的影响 对照组在三维培养48 h后可初步形成环状结构,但并不完全形成明显的管状VM(图4A)。DMS明显抑制结肠癌细胞的增殖、迁移、变形能力,三维培养48 h后不能形成管状VM(图4B)。PMA作用于结肠癌细胞6 h至24 h,已可初步形成环状和网络状结构,而在48 h时则形成明显的管状VM(图4C-F)。

2.5 DMS和PMA对HT-29结肠癌细胞VEGF mRNA及蛋白表达的影响 DMS降低VEGF mRNA的表达水平并明显抑制VEGF蛋白表达,而PMA上调VEGF mRNA的表达水平同时明显增强VEGF蛋白表达(表2, 图5)。与对照组相比, DMS组和PMA组的VEGF mRNA拷贝量分别为 1.000 vs $0.740 \pm 0.122, 1.220 \pm 0.075$ ($P = 0.019, 0.006$); 与对照组相比, DMS组和PMA组VEGF总蛋白表达强度分别为: 0.23 ± 0.02 vs $0.23 \pm 0.02, 0.65 \pm 0.06$ ($P = 0.035, 0.012$)。

2.6 DMS和PMA对细胞分泌VEGF的影响 PMA显著促进VEGF的分泌,而DMS显著抑制VEGF的分泌(图6)。对照组、PMA组和DMS组细胞培养上清液中VEGF分泌量(ng/L)分别为: 103.00 ± 8.96 vs $63.89 \pm 8.44, 201.01 \pm 17.93$ (均 $P = 0.000$)。

3 讨论

Sphk1/S1P不仅调控正常细胞生命活动,同时参与肿瘤发生发展、转移过程。Sphk1在胃癌中表达量与淋巴结转移、远处播散及预后不良关系密切^[13]。而抑制Sphk1的表达则能抑制胃癌细胞的增殖^[14],并提高卵巢癌细胞对姜黄素治疗的

表1 激活或抑制鞘氨醇激酶后HT-29细胞侵袭和迁移的数量

分组	侵袭细胞数	迁移细胞数
DMS组	112.00 ± 6.25	69.33 ± 4.04
PMA组	57.00 ± 8.00^a	42.00 ± 4.16^b
对照组	142.00 ± 5.57^b	111.00 ± 8.03^a

DMS: N, N-二甲基鞘氨醇; PMA: 佛波醇-12-豆蔻酸酯-13-乙酸酯; ^a $P < 0.05$ vs 对照组; ^b $P < 0.01$ vs 对照组。

表2 激活或抑制鞘氨醇激酶对血管内皮生长因子mRNA表达的影响 (mean \pm SD)

分组	$2^{-\Delta\Delta CT}$	P值
对照组	1	
DMS组	0.740 ± 0.122	0.019
PMA组	1.220 ± 0.075	0.006

DMS: N, N-二甲基鞘氨醇; PMA: 佛波醇-12-豆蔻酸酯-13-乙酸酯; $\Delta\Delta CT = (CT_{VEGF} - CT_{\beta-actin})_{PMA组} - (CT_{VEGF} - CT_{\beta-actin})_{对照组}$ 。

敏感性^[15]。S1P与受体结合后,激活MAPK、PI-3K、Akt等分子或信号通路来促进内皮细胞增殖、迁移及管腔化形成,敲除Sphk1基因后,小鼠在胚胎期由于内皮细胞发育不全而无法生成血管^[16]。血供是肿瘤赖以生存、生长的关键环节,但目前针对血管内皮细胞靶基因的抗肿瘤血管生成的治疗效果并不理想。后来研究相继在多种高度侵袭性肿瘤中发现肿瘤细胞在无内皮细胞参与下,通过自身变形及与细胞外基质相互作用形成环状并具有肿瘤血供作用的图案样网络,并将其称为VM, VM具有管型和图案样基质型两种类型,由3个部分组成:肿瘤细胞、重组的细胞外基质、与宿主的微循环系统的联接部分^[4, 17-19]。多个研究证实VM存在实体瘤中:乳腺癌移植瘤中央区血流与VM-内皮依赖性血管之间相互连接^[6], VM作为血液循环的一部分出现在尤文肉瘤中^[20],血液通过渗漏方式进入肿瘤细胞所形成的图案并在其中流通^[18],而脱落的肿瘤细胞则可经过血液循环流到其他部位发生转移。现有的研究表明VM仅出现在高度侵袭性的肿瘤中,与转移早、预后差,生存率低,复发率高密切相关^[9]。本研究采用化学方法来调节Sphk1的活性,发现激活Sphk1可增强细胞增殖侵袭迁移能力,同时在三维培养中可形成管腔样VM,而抑制Sphk1后细胞侵袭迁移能力变弱,48 h内不能形成管腔样VM。激活Sphk1/S1P

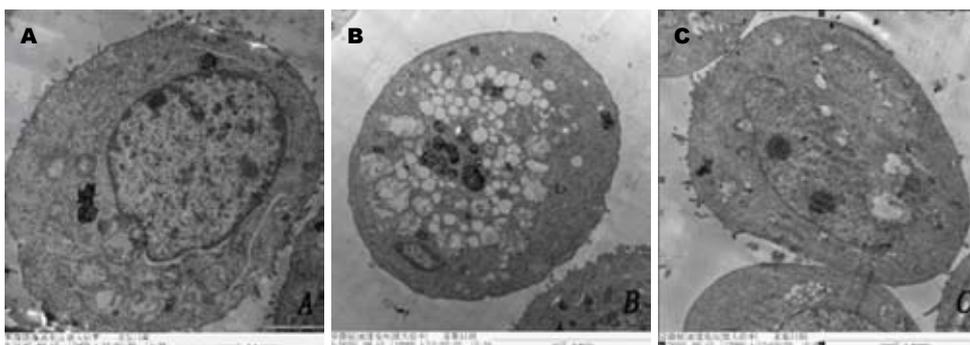


图 2 HT-29透射电镜图. A: 对照组; B: N, N-二甲基鞘氨醇组; C: 佛波醇-12-豆蔻酸酯-13-乙酸酯组.

应用要点
Sphk1调控VEGF及下游因子可能是VM形成的机制之一, Sphk1作为其中的调节关键点, 可成为结肠癌治疗新的靶点.

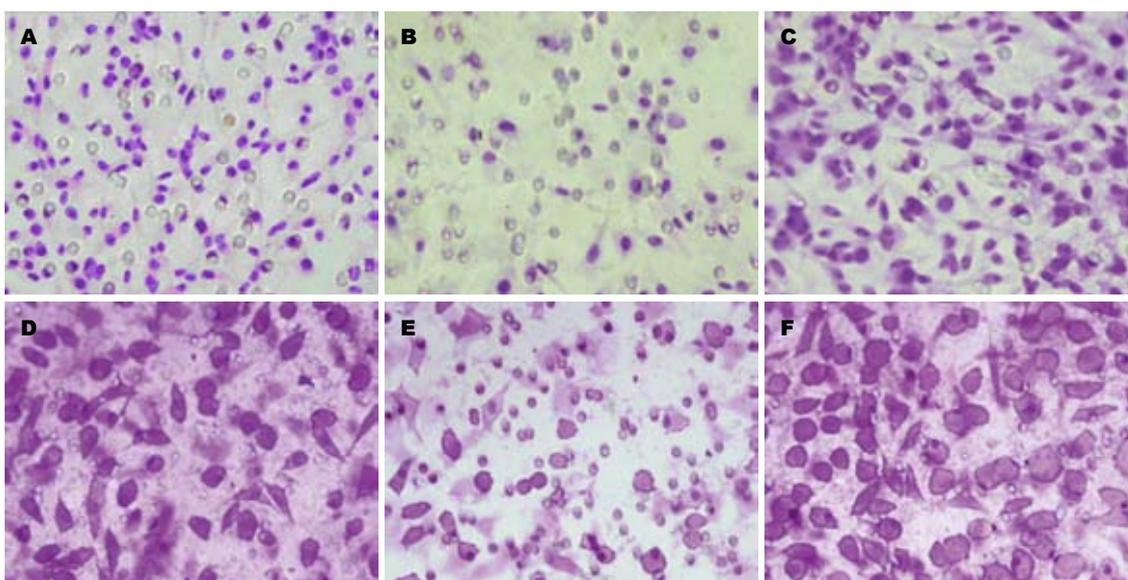


图 3 N, N-二甲基鞘氨醇和佛波醇-12-豆蔻酸酯-13-乙酸酯对HT-29细胞侵袭和迁移能力的影响(HE, × 400). A: 对照组侵袭细胞; B: DMS组侵袭细胞; C: PMA组侵袭细胞; D: 对照组迁移细胞; E: DMS组迁移细胞; F: PMA组迁移细胞. DMS: N, N-二甲基鞘氨醇; PMA: 佛波醇-12-豆蔻酸酯-13-乙酸酯.

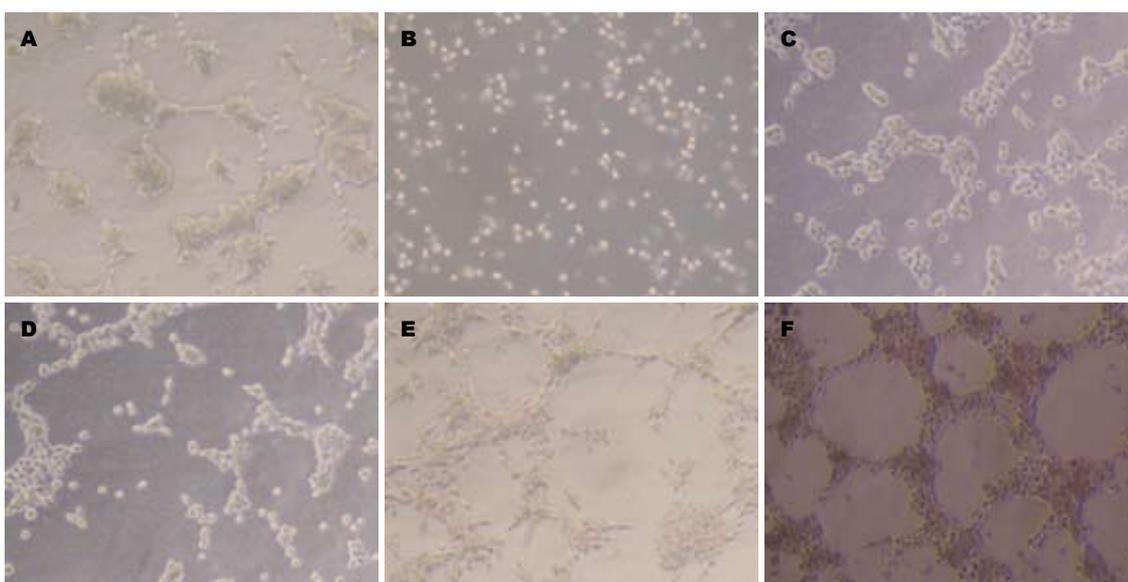


图 4 N, N-二甲基鞘氨醇和佛波醇-12-豆蔻酸酯-13-乙酸酯对HT-29形成血管生成拟态的影响(× 200). A: 对照组48 h; B: DMS组48 h; C: PMA组6 h; D: PMA组12 h; E: PMA组24 h; F: PMA组48 h. ADMS: N, N-二甲基鞘氨醇; PMA: 佛波醇-12-豆蔻酸酯-13-乙酸酯.

同行评价

该研究有一定的新意,研究相对完整,为VM相关机制的研究提供了较为有力的数据支持。

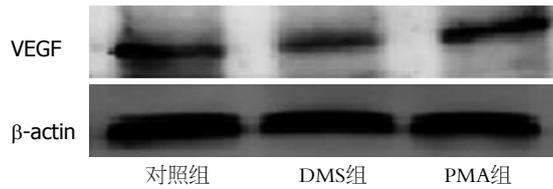


图 5 HT-29细胞中血管内皮生长因子蛋白表达情况. VEGF: 血管内皮生长因子; DMS: N, N-二甲基鞘氨醇; PMA: 佛波醇-12-豆蔻酸酯-13-乙酸酯。

信号通路不仅增加肿瘤细胞增殖、侵袭迁移能力,同时可促进VM形成,在肿瘤细胞生长转移中起重要作用。之前有研究表明PMA不仅可以促进乳腺癌细胞形成管状结构,同时上调VEGFR-2及VEGFR-3的表达^[21],而在结肠癌细胞中,Sphk1参与形成VM的机制是否与VEGF相关尚不明确。

VEGF是目前研究最多,与血管形成关系最密切的促血管生成因子,在胚胎发育、缺血性疾病和肿瘤血管生成中均发挥着关键调节作用。VEGF亦是调节肿瘤VM形成的一个关键因素:已有研究以siRNA沉默VEGF基因后证实VEGF在骨肉瘤细胞形成VM过程中起关键作用^[22],VEGF-A可在体外促进卵巢癌细胞及肝癌PLC细胞体外形成VM^[23,24],而经VEGF抗体阿伐斯汀(avastin)干预后原可形成VM的乳腺癌细胞则不能再形成VM^[21]。VEGF在基因表达及转录水平上受到各种刺激因子影响,包括缺氧、生长因子、激素、血管源性生长因子等。研究发现S1P可通过G α i/o、PLC、胞内钙通路提高VEGF的转录水平,并受MAPK、Erk、PI-3K、Akt等分子及信号途径调控^[12],而Sphk1是S1P的关键催化酶,通过调节Sphk1活性进而影响S1P生成。本研究发现VEGF mRNA表达与蛋白表达随Sphk1活性的增加而增强,随其减弱而降低,因此Sphk1的活性不但与VEGF的转录水平而且与蛋白表达密切相关。在细胞体外三维培养中Sphk1激活后形成VM,其上清液中VEGF蛋白浓度明显增高,表明VEGF参与Sphk1调控VM形成。

研究证实VEGF-a \rightarrow EphA2 \rightarrow MMPs \rightarrow VM是VM形成的主要途径^[23],基质金属蛋白酶-9(matrix-metalloproteinase-9, MMP-9)激活VEGFR-2/VEGFR-3来促进乳腺癌细胞管状结构的形成^[21]。另有研究表明在侵袭性黑色素瘤细胞中破坏黏着斑激酶(focal adhesion kinase, FAK)信号可下调ERK1/2磷酸化,导致尿型酶原激活物(urokinase-type plasminogen activator, UPA)和

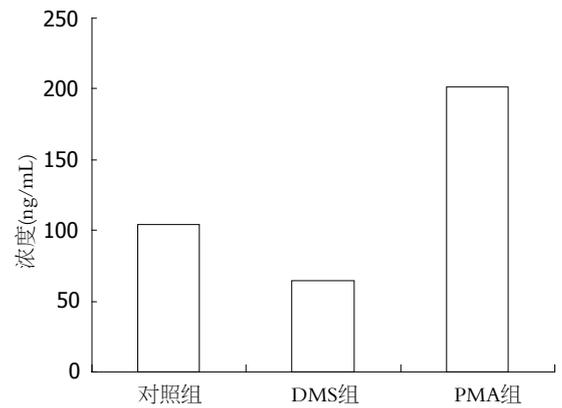


图 6 细胞培养液中血管内皮生长因子的浓度. DMS: N, N-二甲基鞘氨醇; PMA: 佛波醇-12-豆蔻酸酯-13-乙酸酯; VEGF: 血管内皮生长因子。

MMP-2/MT2-MMP下调,从而抑制VM形成^[25]。我们前期的研究已证实Sphk1与FAK信号通路密切相关,激活Sphk1可活化ERK1/2通路,上调MMP-2、MMP-9和UPA的表达和分泌^[26,27]。因此,Sphk1可能通过ERK1/2通路调控VEGF、MMP2及MMP9分泌,进而促进结肠癌HT-29细胞体外生成VM。Sphk1作为其中的调节关键点,可成为结肠癌新的治疗靶点。

4 参考文献

- Ogretmen B, Hannun YA. Biologically active sphingolipids in cancer pathogenesis and treatment. *Nat Rev Cancer* 2004; 4: 604-616
- Liu H, Chakravarty D, Maceyka M, Milstien S, Spiegel S. Sphingosine kinases: a novel family of lipid kinases. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 2002; 71: 493-511
- Xia P, Gamble JR, Wang L, Pitson SM, Moretti PA, Wattenberg BW, D'Andrea RJ, Vadas MA. An oncogenic role of sphingosine kinase. *Curr Biol* 2000; 10: 1527-1530
- Maniotis AJ, Folberg R, Hess A, Sefter EA, Gardner LM, Pe'er J, Trent JM, Meltzer PS, Hendrix MJ. Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. *Am J Pathol* 1999; 155: 739-752
- Cai XS, Jia YW, Mei J, Tang RY. Tumor blood vessels formation in osteosarcoma: vasculogenesis mimicry. *Chin Med J (Engl)* 2004; 117: 94-98
- Shirakawa K, Kobayashi H, Heike Y, Kawamoto S, Brechbiel MW, Kasumi F, Iwanaga T, Konishi F, Terada M, Wakasugi H. Hemodynamics in vasculogenic mimicry and angiogenesis of inflammatory breast cancer xenograft. *Cancer Res* 2002; 62: 560-566
- Sood AK, Fletcher MS, Zahn CM, Gruman LM, Coffin JE, Sefter EA, Hendrix MJ. The clinical significance of tumor cell-lined vasculature in ovarian carcinoma: implications for anti-vasculogenic therapy. *Cancer Biol Ther* 2002; 1: 661-664
- Sun B, Zhang S, Zhao X, Zhang W, Hao X. Vasculogenic mimicry is associated with poor survival in patients with mesothelial sarcomas and alveolar

- rhabdomyosarcomas. *Int J Oncol* 2004; 25: 1609-1614
- 9 Folberg R, Hendrix MJ, Maniotis AJ. Vasculogenic mimicry and tumor angiogenesis. *Am J Pathol* 2000; 156: 361-381
- 10 Sun B, Zhang D, Zhang S, Zhang W, Guo H, Zhao X. Hypoxia influences vasculogenic mimicry channel formation and tumor invasion-related protein expression in melanoma. *Cancer Lett* 2007; 249: 188-197
- 11 郝希山, 孙保存, 张诗武, 赵秀兰. 双向分化肿瘤血管生成拟态的组织微阵列研究. *中华医学杂志* 2002; 82: 1298-1302
- 12 Heo K, Park KA, Kim YH, Kim SH, Oh YS, Kim IH, Ryu SH, Suh PG. Sphingosine 1-phosphate induces vascular endothelial growth factor expression in endothelial cells. *BMB Rep* 2009; 42: 685-690
- 13 Zhuge YH, Tao HQ, Wang YY. [Relationship between sphingosine kinase 1 expression and tumor invasion, metastasis and prognosis in gastric cancer]. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2011; 91: 2765-2768
- 14 Xia J, Wu Z, Yu C, He W, Zheng H, He Y, Jian W, Chen L, Zhang L, Li W. miR-124 inhibits cell proliferation in gastric cancer through down-regulation of SPHK1. *J Pathol* 2012; 227: 470-480
- 15 Yang YL, Ji C, Cheng L, He L, Lu CC, Wang R, Bi ZG. Sphingosine kinase-1 inhibition sensitizes curcumin-induced growth inhibition and apoptosis in ovarian cancer cells. *Cancer Sci* 2012; 103: 1538-1545
- 16 Mizugishi K, Yamashita T, Olivera A, Miller GF, Spiegel S, Proia RL. Essential role for sphingosine kinases in neural and vascular development. *Mol Cell Biol* 2005; 25: 11113-11121
- 17 Folberg R, Maniotis AJ. Vasculogenic mimicry. *AP-MIS* 2004; 112: 508-525
- 18 Frenkel S, Barzel I, Levy J, Lin AY, Bartsch DU, Majumdar D, Folberg R, Pe'er J. Demonstrating circulation in vasculogenic mimicry patterns of uveal melanoma by confocal indocyanine green angiography. *Eye (Lond)* 2008; 22: 948-952
- 19 Zhang S, Guo H, Zhang D, Zhang W, Zhao X, Ren Z, Sun B. Microcirculation patterns in different stages of melanoma growth. *Oncol Rep* 2006; 15: 15-20
- 20 van der Schaft DW, Hillen F, Pauwels P, Kirschmann DA, Castermans K, Egbrink MG, Tran MG, Sciort R, Hauben E, Hogendoorn PC, Delattre O, Maxwell PH, Hendrix MJ, Griffioen AW. Tumor cell plasticity in Ewing sarcoma, an alternative circulatory system stimulated by hypoxia. *Cancer Res* 2005; 65: 11520-11528
- 21 Karroum A, Mirshahi P, Faussat AM, Therwath A, Mirshahi M, Hatmi M. Tubular network formation by adriamycin-resistant MCF-7 breast cancer cells is closely linked to MMP-9 and VEGFR-2/VEGFR-3 over-expressions. *Eur J Pharmacol* 2012; 685: 1-7
- 22 Mei J, Gao Y, Zhang L, Cai X, Qian Z, Huang H, Huang W. VEGF-siRNA silencing induces apoptosis, inhibits proliferation and suppresses vasculogenic mimicry in osteosarcoma in vitro. *Exp Oncol* 2008; 30: 29-34
- 23 Wang JY, Sun T, Zhao XL, Zhang SW, Zhang DF, Gu Q, Wang XH, Zhao N, Qie S, Sun BC. Functional significance of VEGF-a in human ovarian carcinoma: role in vasculogenic mimicry. *Cancer Biol Ther* 2008; 7: 758-766
- 24 李蕊, 孙保存, 孙丹, 刘铁菊, 赵秀兰, 董学易. VEGF-A 对人肝癌细胞体外形成血管生成拟态能力的影响. *山东医药* 2011; 51: 1-3
- 25 Hess AR, Postovit LM, Margaryan NV, Seftor EA, Schneider GB, Seftor RE, Nickoloff BJ, Hendrix MJ. Focal adhesion kinase promotes the aggressive melanoma phenotype. *Cancer Res* 2005; 65: 9851-9860
- 26 刘诗权, 覃蒙斌, 钟月圆, 黄杰安, 唐国都, 姜海行. 鞘氨醇激酶-1调控ERK和NF- κ B通路促进HT-29细胞的增殖和侵袭. *中国现代医学杂志* 2011; 21: 1849-1853
- 27 苏颖洁, 黄杰安, 刘诗权, 钟月圆, 覃蒙斌. Sphk1对结肠癌Iovo细胞的增殖、迁移和凋亡的影响. *世界华人消化杂志* 2012; 20: 276-281

编辑 翟欢欢 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)

hMLH-1和hMSH-2蛋白在新疆汉族散发性大肠癌中的表达及意义

于静, 赵峰, 梁丽萍, 石雪迎

■背景资料

结直肠癌的发生是一个多阶段的过程, 涉及错配修复基因、癌基因、抑癌基因等的改变。尤其是以hMLH-1和hMSH2为代表的错配修复基因, 作为生物进化过程中的保守基因, 在识别和修复DNA碱基错配、增强DNA复制忠实性、维持基因组稳定性和降低自发性等方面发挥着重要作用。

于静, 赵峰, 梁丽萍, 新疆医科大学附属肿瘤医院病理科 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830011

石雪迎, 北京大学医学部病理系 北京市 100191

于静, 在读硕士, 主要从事错配修复基因与散发性大肠癌关系的研究。

作者贡献分布: 本研究由于静、赵峰、石雪迎及梁丽萍设计; 研究过程由赵峰指导, 由于静完成; 结果判读由梁丽萍与石雪迎完成; 数据分析及论文撰写由赵峰、梁丽萍及于静完成。

通讯作者: 赵峰, 主任医师, 830011, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市苏州东街789号, 新疆医科大学附属肿瘤医院病理科。fengzh_688@126.com

电话: 0991-781901

收稿日期: 2012-09-13 修回日期: 2012-11-07

接受日期: 2012-11-07 在线出版日期: 2012-11-28

Clinical significance of expression of hMLH-1 and hMSH-2 in sporadic colorectal carcinoma in Chinese Han patients in Xinjiang

Jing Yu, Feng Zhao, Li-Ping Liang, Xue-Ying Shi

Jing Yu, Feng-Zhao, Li-Ping Liang, Department of Pathology, the Affiliated Tumor Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Xue-Ying Shi, Department of Pathology, Peking University Health Science Center, Beijing 100191, China

Correspondence to: Feng-Zhao, Chief Physician, Department of Pathology, the Affiliated Tumor Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China. fengzh_688@126.com

Received: 2012-09-13 Revised: 2012-11-07

Accepted: 2012-11-07 Published online: 2012-11-28

Abstract

AIM: To investigate the clinical significance of expression of hMLH-1 and hMSH-2 in sporadic colorectal carcinoma (SCC) in Chinese Han patients in Xinjiang.

METHODS: Expression of hMLH-1 and hMSH-2 was detected by immunohistochemistry in 95 cases of SCC specimens collected from Chinese Han patients in Xinjiang and 65 cases of normal colorectal mucosa (NCM) specimens.

RESULTS: The positive rates of hMLH-1 and

hMSH-2 expression in NCM were both 100%. The negative rates of hMLH-1 (31.6%) and hMSH-2 (18.9%) expression were significantly higher in SCC than in NCM (both $P < 0.05$). The negative rates of hMLH-1 and hMSH-2 protein expression were significantly higher in right-sided tumors than in left-sided and rectal tumors ($P = 0.006, 0.002$), and in poorly differentiated tumors than in well differentiated tumors ($P = 0.014, 0.008$). There was a positive correlation between the expression of hMLH-1 and hMSH-2 proteins in SCC.

CONCLUSION: Loss of expression of hMLH-1 and hMSH-2 proteins in SCC was observed in some Chinese Han patients in Xinjiang. Loss of expression of hMLH-1 and hMSH-2 proteins correlates with tumor differentiation and location. Combined detection of hMLH-1 and hMSH-2 expression may be used for evaluating the severity and prognosis of colorectal cancer.

Key Words: Sporadic colorectal carcinoma; hMLH-1; hMSH-2; Immunohistochemistry

Yu J, Zhao F, Liang LP, Shi XY. Clinical significance of expression of hMLH-1 and hMSH-2 in sporadic colorectal carcinoma in Chinese Han patients in Xinjiang. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(33): 3218-3224

摘要

目的: 探讨错配修复基因hMLH-1和hMSH-2蛋白在新疆汉族散发性大肠癌(sporadic colorectal carcinoma, SCC)中的表达情况及其与SCC病理参数的关系。

方法: 采用免疫组织化学方法检测95例汉族SCC组织和65例正常结直肠组织(normal colorectal mucosa, NCM)中hMLH-1和hMSH-2蛋白的表达情况。

结果: hMLH-1和hMSH-2在NCM中均表达。hMLH-1蛋白在SCC组织中缺失率为(31.6%)与NCM比较有显著差异($P < 0.05$); hMSH-2蛋

■同行评议者

郝立强, 副教授, 上海长海医院普外科

白在SCC组织中缺失率(18.9%)与NCM比较有显著差异($P < 0.05$)。hMLH-1在右半结肠癌中缺失率高于左半结肠癌和直肠癌($P = 0.006$),在低分化腺癌和黏液腺癌中缺失率明显高于高-中分化腺癌($P = 0.014$); hMSH-2蛋白在右半结肠癌中缺失率高于左半结肠癌和直肠癌($P = 0.002$),低分化腺癌和黏液腺癌中缺失率显著高于高-中分化腺癌($P = 0.008$)。在SCC组织中, hMLH-1和hMSH-2蛋白表达呈正相关性($r = 0.224, P < 0.05$)。

结论: hMLH-1和hMSH-2蛋白在新疆地区汉族散发性大肠癌中有一定比例的缺失,且与肿瘤分化程度和发生部位密切相关, hMLH-1和hMSH-2蛋白联合检测可能为判断散发性直肠癌恶性程度和临床预测提供重要参考。

关键词: 散发性结直肠癌; hMLH-1; hMSH-2; 免疫组织化学

于静, 赵峰, 梁丽萍, 石雪迎. hMLH-1和hMSH-2蛋白在新疆汉族散发性大肠癌中的表达及意义. 世界华人消化杂志 2012; 20(33): 3218-3224
http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3218.asp

0 引言

结直肠癌是消化系常见肿瘤之一,其发病率逐年升高。结直肠肿瘤的发生发展是一个复杂的动态过程,其中涉及许多肿瘤相关因子参与和调控。除了与癌基因激活和抑癌基因失活密切相关外,与错配修复基因(mismatch repair gene, MMR)亦有密切关系。hMLH-1和hMSH-2蛋白是MMR家族中的主要成员,在结直肠癌发生演变中起重要作用。本文用免疫组织化学法检测新疆汉族散发性结直肠癌(sporadic colorectal carcinoma, SCC)组织中hMLH-1和hMSH-2蛋白的表达,进行统计分析,探讨hMLH-1和hMSH-2蛋白在新疆汉族SCC组织中的表达情况及其与临床病理参数的关系及意义。

1 材料和方法

1.1 材料 收集2010-01/2012-01新疆医科大学附属肿瘤医院病理科经手术切除SCC标本汉族95例,结肠癌41例,直肠癌54例;男49例,女46例;年龄37-81岁,平均年龄62.38岁;高分化腺癌18例,中分化腺癌28例,低分化腺癌26例,黏液腺癌23例;右半结肠癌(回盲部癌、升结肠癌、结肠肝曲癌及横结肠癌)22例,左半结肠癌(结肠脾曲癌、降结肠癌、乙状结肠癌)27例,直肠癌46

例;淋巴结有转移者36例,无转移者59例;Dukes分期A期15例, B期34例, C期38例, D期8例。65例正常结直肠组织作为对照。所有患者术前均未行放疗化疗,无任何肿瘤家族史。

1.2 方法 将40 g/L中性甲醛固定,石蜡包埋的标本4 μm 连续切片,采用PV-9000二步法,一抗分别为MLH1、MSH2鼠抗人单克隆抗体购自北京中杉金桥生物有限公司,工作浓度均为1:150;通用型两步法(HRP)检测试剂盒购自福建迈新生物制品有限公司。用PBS替代一抗做阴性对照,以正常结直肠黏膜上皮和/或浸润的淋巴细胞为阳性对照。hMLH-1和hMSH-2阳性表达均在细胞核,结果判断标准参考许良中等^[1]的免疫组织化学反应结果的判断标准,镜下肿瘤细胞显示核染色为阳性,结合染色强度和阳性细胞百分比判定阳性表达程度。光镜下每张切片中选取癌细胞较多的5个高倍镜视野,每个视野计数100个细胞,按染色强度分级:无着色为0分,淡黄色1分,黄色2分,棕黄色3分;按阳性细胞百分比分级:无阳性细胞为0分,阳性细胞数 $\leq 10\%$ 为1分,11%-50%为2分,51%-75%为3分, $> 75\%$ 为4分。两项得分相乘结果 ≥ 2 分为阳性表达病例, < 2 分为阴性表达病例。阳性对照为正常结直肠黏膜上皮和/或浸润的淋巴细胞阳性核染色。阳性对照核表达阳性而肿瘤细胞核缺乏染色则判为阴性。

统计学处理 采用SPSS19.0统计软件,计数资料率的比较采用 χ^2 检验、Fisher确切概率法、Spear-man等级相关检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 hMLH-1和hMSH-2蛋白在2种组织中的表达 在正常结直肠黏膜组织(normal colorectal mucosa, NCM)中hMLH-1和hMSH-2均表达;在SCC中, hMLH-1缺失表达30例, hMSH-2缺失表达18例, hMLH-1和hMSH-2共同缺失的有10例。根据表达程度不同, hMLH-1在SCC中阴性率(31.6%, 30/95)明显高于NCM且差异显著($P < 0.05$)。hMSH-2在SCC中阴性率高于NCM(18.9%, 18/95)且差异显著($P < 0.05$, 图1)。

2.2 hMLH-1和hMSH-2蛋白在SCC组织中的表达与临床病理参数的关系 在SCC组织中, hMLH-1蛋白在SCC组织中表达缺失与肿瘤发生部位及分化程度有关(均 $P < 0.05$, 表1); hMLH-1蛋白在汉族、维族、哈族SCC组织中阴性率分别

■ 研发前沿

结直肠癌患者的生存率是临床治疗中的重点, hMLH-1和hMSH2蛋白表达的情况与患者的预后密切相关。本实验中涉及到的维、哈等少数民族患者,仅限于小范围的检查,实验结论基于此研究之上,若需进一步研究,需要扩大检查样本量。

■ 相关报道

CpG甲基化与右半结肠,女性,高龄,细胞分化程度,微卫星稳定等因素有关。大约有一半以上的肿瘤显示CpG甲基化会导致微卫星不稳定。微卫星不稳定仅出现在肿瘤中,与细胞的恶性转化有关。

■创新盘点

本研究新疆地区散发性的大肠癌组织中hMLH-1和hMSH-2蛋白表达情况,与内地相关实验比较差异不大。本实验中少数民族样本仅是小范围研究,实验结论仅基于该实验。维、哈少数民族的发病率较低,探讨具体机制,有待于扩大样本量进行进一步研究。

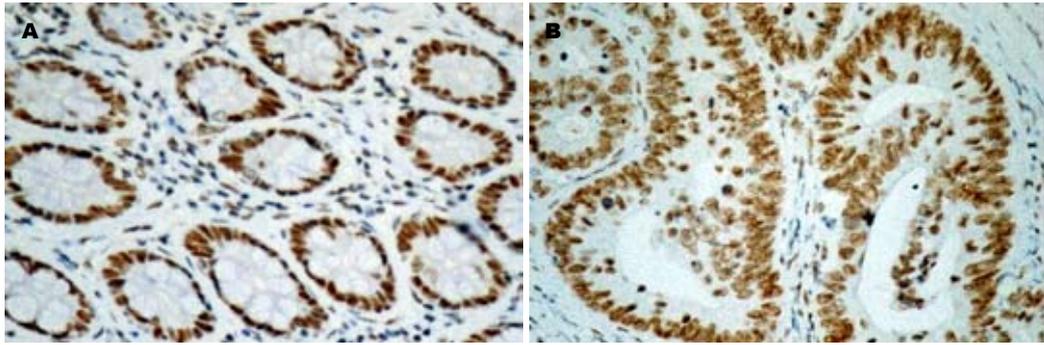


图1 hMLH-1和hMSH-2在2种组织中的表达(pv=9000, ×200)。A: 结直肠正常组织; B: 癌组织。

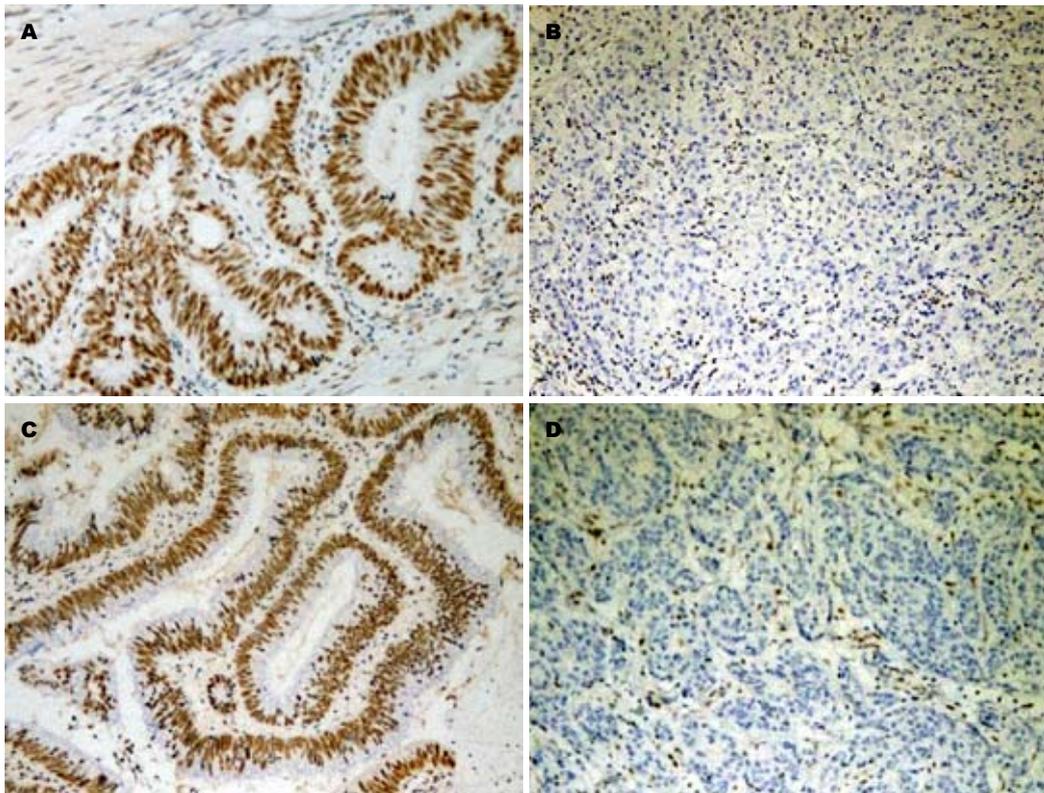


图2 hMLH-1/hMSH-2在癌组织中的表达(pv=9000, ×200)。A: hMLH-1表达正常; B: hMLH-1表达缺失; C: hMSH-2表达正常; D: hMSH-2表达缺失。

为31.6%、25.0%、27.8%,但无明显差异;与性别、年龄、肿瘤最大径、浸润深度、淋巴结有无转移及Dukes分期无关;hMSH-2蛋白在SCC组织中表达缺失与达肿瘤发生部位及分化程度有关($P < 0.01$, 表1);hMSH-2蛋白在汉族、维族、哈族SCC组织中缺失率分别为18.9%、35.0%、33.3%,但无明显差异;与年龄、性别、民族、肿瘤最大径、浸润深度、淋巴结有无转移及Dukes分期无关($P > 0.05$, 图2, 表1)。hMLH-1或hMSH-2蛋白缺失表达在汉、维、哈族无差异($P > 0.05$, 表2)。

2.3 hMLH-1和hMSH-2蛋白在SCC组织中表达的

相关性 在SCC组织中,hMLH-1和hMSH-2表达呈正相关性($r = 0.224, P < 0.05$, 表3)

3 讨论

MMR是生物进化过程中的保守基因,属于管家基因,具有识别和修复DNA碱基错配、增强DNA复制忠实性、维持基因组稳定性和降低自发性突变的功能。目前发现MMR包括hMLH-1、hMSH-2、hPMS-1、hPMS-2等,其中起主要作用的基因hMLH-1和hMSH-2^[2-5]。hMLH-1基因位于染色体3p21-23,全长100 kb,含19个外显子,cDNA有2 268 bp的开放阅读框架(open reading

表 1 hMLH-1和hMSH-2蛋白在新疆汉族散发性大肠癌组织中的表达与临床病例参数的关系

病理特征	n	hMLH-1		χ^2	P值	hMSH-2		χ^2	P值
		+	-			+	-		
性别									
男	49	35	14	0.424	0.515	39	10	0.141	0.708
女	46	30	16			38	8		
民族									
汉族	95	65	30	0.392	0.822	77	18	3.753	0.159
维吾尔族	20	15	5			13	7		
哈萨克族	18	13	5			12	6		
年龄(岁)									
≥60	55	36	19	0.532	0.466	45	10	0.050	0.823
<60	40	29	11			32	8		
肿瘤最大径(cm)									
>5	35	21	14	1.189	0.177	25	10	3.342	0.068
≤5	60	44	16			52	8		
部位									
右半结肠	22	9	13	10.168	0.006	12	10	11.809	0.002
左半结肠	27	20	7			23	4		
直肠	46	36	10			42	4		
浸润深度									
肌层以内	26	15	11	1.907	0.167	20	6	0.8564	0.355
肌层以外	69	50	19			57	12		
分化程度									
高-中分化腺癌	46	38	8	8.480	0.014	43	3	9.514	0.008
低分化腺癌	26	15	11			18	8		
黏液腺癌	23	12	11			16	7		
淋巴结转移									
有	36	28	8	2.349	0.125	28	8	0.405	0.525
无	59	37	22			49	10		
Dukes分期									
A+B	49	36	13	1.194	0.275	42	7	1.432	0.231
C+D	46	29	17			35	11		

■应用要点

本研究用免疫组化检查hMLH-1和hMSH-2在结直肠癌组织中的表达,有助于探讨其在结直肠癌发生、发展中的作用,并为结直肠癌恶性程度判断和评估预后提供参考。

frame, ORF), hMLH-1与hPMS-2蛋白构成异源二聚体hMutL α , 该异源二聚体能够提高与错配碱基结合效率和切除含有错配碱基的一段DNA链的功能, 从而保证DNA复制忠实性和稳定性及防止微卫星不稳定(microsatellite instability, MSI)的产生. hMSH-2基因是1993年分离克隆到的第1个人类MMR基因. hMSH-2基因定位于人类染色体2p1-22, 其基因组全长约73 kb(不包括启动子), 含16个外显子; cDNA全长3 111 bp, ORF长2 727 bp; hMSH-2与hMSH6或hMSH-3结合形成异源二聚体hMutS α 或hMutS β , 两个异源二聚体均可识别新合成的DNA核苷酸链上的剪辑错配, 并与错配位点结合, hMutL α 二聚体与结合到DNA链上的hMutS α 或hMutS β 形成一种暂时的复合物, 启动错配修复, 与相关酶配合, 切除含有错配碱基的

DNA链, 以代替被切除的DNA链, 从而完成错配碱基DNA核酸链修复.

大肠癌的发生分为遗传性和散发性^[6-8]. 研究发现, 部分散发性大肠癌(sporadic colorectal carcinoma, SCC)中有hMLH-1与hMSH-2蛋白缺失, 主要是hMLH-1基因启动子过度甲基化导致基因转录和翻译沉默表达^[9-11]. MMR基因失活并不直接导致肿瘤发生, 而是导致基因组不稳定, 特别是一些简单的核苷酸重复序列. MMR系统失活导致肿瘤发生主要通过以下途径: (1)在DNA复制过程中简单的重复序列长度变异, 表现为肿瘤细胞中出现MSI, 继而引发癌基因的激活或抑癌基因失活, 诱发癌变; (2)MMR缺陷会使发生在某些原癌基因和抑癌基因中的突变快速积累, 最终影响到正常细胞的增殖调控^[12,13].

■名词解释

微卫星不稳定: 基因组中简单重复序列次数的增加或减少, 可表现在多种不同的肿瘤中, 且仅在肿瘤中出现. 提示MSI的出现与细胞的恶性转化有关. 发生在左半结肠的癌症更容易出现微卫星不稳定, 有的个体上皮内出现淋巴细胞, 这种类型的患者预后不理想.

表 2 汉、维、哈散发性大肠癌组织中hMLH-1或hMSH-2蛋白失表达比较

	汉族	维族	哈族	χ^2	P值
性别					
男	24	7	7	0.803	0.669
女	24	5	4		
年龄(岁)					
≥50	29	5	7	1.571	0.481
<50	19	7	4		
肿瘤最大径(cm)					
>5	24	8	6	1.077	0.583
≤5	24	4	5		
部位					
右半结肠	23	3	3	3.430	0.491
左半结肠	11	4	3		
直肠	14	5	5		
浸润深度					
肌层以内	17	6	6	1.938	0.388
肌层以外	31	6	5		
分化程度					
高一中分化腺癌	11	5	6	4.788	0.312
低分化腺癌	19	4	3		
黏液腺癌	18	3	2		
淋巴结转移					
有	16	8	6	5.104	0.078
无	32	4	5		
Dukes分期					
A+B	20	6	8	3.486	0.175
C+D	28	6	3		

近年来研究发现, hMLH-1和hMSH-2蛋白的表达变化结果可以很好的预示MMR功能缺陷和MSI的存在^[14-16]. Lindor等^[17]检测114例SCC中hMLH-1和hMSH-2表达情况, 发现hMLH-1阴性率明显高于hMSH-2. Wheeler^[18]检测38例早期和40例晚期SCC的MSI情况时, 有71.4%的MSI-H病例出现hMLH-1高度甲基化, 说明hMLH-1基因突变在SCC的发生发展过程中有重要作用. 在本研究中, SCC组织中hMLH-1缺失率高于hMSH-2, 与NCM比较有差异, 且hMLH-1和hMSH-2蛋白在SCC组织中表达呈正相关. 提示在SCC组织中, hMLH-1和hMSH-2蛋白共同参与了肿瘤发生, 其中hMLH-1突变率高于hMSH-2, 主要是由于hMLH-1基因启动子区域CpG岛被高度甲基化以致基因的转录和翻译障碍而出现hMLH-1蛋白的表达缺失^[19-24], hMSH-2蛋白表达缺失机制尚不明确.

本研究结果中hMLH-1和hMSH-2蛋白表达情况与SCC临床病理特征关系显示, hMLH-1及

表 3 hMLH-1与hMSH-2蛋白在散发性大肠癌组织组织中表达的相关性分析 (n)

hMLH-1	n	hMSH-2	
		-	+
-	30	10	20
+	65	8	57
合计	95	18	77

hMSH-2蛋白阴性率在>60岁年龄组中均高于≤60岁年龄组, 但无显著差异. 文献报道^[25], 年龄有可能是hMLH-1发生过甲基化的因素之一, 且高龄人群中SCC多发, 本研究结果与其基本一致. 本研究结果显示hMLH-1和hMSH-2蛋白表达情况与肿瘤最大径、浸润深度、淋巴结转移及Dukes分期均不相关, 提示在肿瘤发生的初始阶段可能已经发生hMLH-1和hMSH-2基因突变, hMLH-1和hMSH-2蛋白缺失可能是发生SCC的早期事件之一. 在本研究中, 发现hMLH-1或hMSH-2蛋白缺失表达在汉、维、哈族无差异; 提示hMLH-1和hMSH-2蛋白在不同民族SCC组织中表达无差异, 可能与样本容量等因素有关, 本结论仅基于本研究之上, 对于大人群该指标的研究尚未开展, 有待进一步研究. 本组实验结果还显示hMLH-1、hMSH-2蛋白与肿瘤分化程度及发生部位有关, 随着SCC分化程度降低, hMLH-1、hMSH-2蛋白阴性率逐渐升高, 提示在低分化SCC中hMLH-1、hMSH-2蛋白更易表达缺失. hMLH-1、hMSH-2蛋白在右半结肠中的阴性率高于左半结肠和直肠, 且差异显著, 这与国内学者蔡崎等^[26]和国外学者Tanaka等^[27]研究基本一致. 提示发生在右半结肠SCC的MMR系统缺陷途径可能不同于左半结肠和直肠, 在右半结肠SCC组织中更有可能出现hMLH-1基因启动子的过度甲基化, 导致MSI发生. MSI可表现在多种不同的肿瘤中, 而且仅在肿瘤中出现, 提示MSI与细胞的恶性转化有关. 对hMLH-1蛋白表达缺失的SCC组织采用PCR技术检测MSI^[28-31], 可以提示hMLH-1蛋白缺失可能是反应SCC组织生物学行为和预测预后的重要参数之一. 有实验研究^[32,33], 存在hMLH-1和hMSH-2基因功能缺陷的大肠癌细胞株对5-Fu和顺铂等多种化疗药物具有耐药性, 说明检测hMLH-1和hMSH-2蛋白表达情况对于肿瘤患者的个体化治疗和预测预后有一定的指导意义.

综上所述, 新疆地区SCC病例中部分存在

hMLH-1和hMSH-2蛋白表达缺失, 且与肿瘤发生部位及分化程度密切相关, 有助于在肿瘤高发人群中筛选和早期诊断SCC. 在临床治疗中, 通过检测hMLH-1和hMSH-2蛋白表达的情况, 对于判断肿瘤发生发展及临床预测有重要指导意义. 总而言之, 联合检测hMLH-1和hMSH-2蛋白表达情况对于患者临床治疗和预后判断有重要参考价值.

4 参考文献

- 1 许良中, 杨文涛. 免疫组织化学反应结果的判读标准. 中国癌症杂志 1996; 6: 229-231
- 2 Peltomäki P. Deficient DNA mismatch repair: a common etiologic factor for colon cancer. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 735-740
- 3 王双双, 关景明, 范玉晶. 大肠癌发病的相关因素. 世界华人消化杂志 2005; 13: 534-536
- 4 Kolodner RD, Marsischky GT. Eukaryotic DNA mismatch repair. *Curr Opin Genet Dev* 1999; 9: 89-96
- 5 Adé J, Haffani Y, Beizile FJ. Functional analysis of the Arabidopsis thaliana mismatch repair gene MSH2. *Genome* 2001; 44: 651-657
- 6 Peltomäki P. Lynch syndrome genes. *Fam Cancer* 2005; 4: 227-232
- 7 Barrow E, Alduaij W, Robinson L, Shenton A, Clancy T, Lalloo F, Hill J, Evans DG. Colorectal cancer in HNPCC: cumulative lifetime incidence, survival and tumour distribution. A report of 121 families with proven mutations. *Clin Genet* 2008; 74: 233-242
- 8 Holinski-Feder E, Morak M. [Hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma: state of the art]. *Dtsch Med Wochenschr* 2008; 133: 1690-1695
- 9 Kneitz B, Cohen PE, Avdievich E, Zhu L, Kane MF, Hou H, Kolodner RD, Kucherlapati R, Pollard JW, Edelmann W. MutS homolog 4 localization to meiotic chromosomes is required for chromosome pairing during meiosis in male and female mice. *Genes Dev* 2000; 14: 1085-1097
- 10 Gupta S, Gellert M, Yang W. Mechanism of mismatch recognition revealed by human MutS β bound to unpaired DNA loops. *Nat Struct Mol Biol* 2012; 19: 72-78
- 11 Kazama Y, Watanabe T, Kanazawa T, Tanaka J, Tanaka T, Nagawa H. Poorly differentiated colorectal adenocarcinomas show higher rates of microsatellite instability and promoter methylation of p16 and hMLH1: a study matched for T classification and tumor location. *J Surg Oncol* 2008; 97: 278-283
- 12 Youn CK, Cho HJ, Kim SH, Kim HB, Kim MH, Chang IY, Lee JS, Chung MH, Hahm KS, You HJ. Bcl-2 expression suppresses mismatch repair activity through inhibition of E2F transcriptional activity. *Nat Cell Biol* 2005; 7: 137-147
- 13 Park IJ, Kim HC, Kim JS, Yu ES, Yu CS, Kim JC. Correlation between hMLH1/hMSH2 and p53 protein expression in sporadic colorectal cancer. *Hepato-gastroenterology* 2005; 52: 450-454
- 14 肖秀英, 周晓燕, 孙孟红, 颜歌, 杜翔. 散发性结直肠癌中微卫星不稳定性及临床病理意义. 中华肿瘤杂志 2006; 28: 289-293
- 15 Gryfe R, Gallinger S. Microsatellite instability, mismatch repair deficiency, and colorectal cancer. *Surgery* 2001; 130: 17-20
- 16 Shia J. Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing for screening colorectal cancer patients at risk for hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome. Part I. The utility of immunohistochemistry. *J Mol Diagn* 2008; 10: 293-300
- 17 Lindor NM, Burgart LJ, Leontovich O, Goldberg RM, Cunningham JM, Sargent DJ, Walsh-Vockley C, Petersen GM, Walsh MD, Leggett BA, Young JP, Barker MA, Jass JR, Hopper J, Gallinger S, Bapat B, Redston M, Thibodeau SN. Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing in phenotyping colorectal tumors. *J Clin Oncol* 2002; 20: 1043-1048
- 18 Wheeler JM. Epigenetics, mismatch repair genes and colorectal cancer. *Ann R Coll Surg Engl* 2005; 87: 15-20
- 19 Miyakura Y, Sugano K, Konishi F, Ichikawa A, Maekawa M, Shitoh K, Igarashi S, Kotake K, Koyama Y, Nagai H. Extensive methylation of hMLH1 promoter region predominates in proximal colon cancer with microsatellite instability. *Gastroenterology* 2001; 121: 1300-1309
- 20 Jin HY, Liu X, Li VK, Ding Y, Yang B, Geng J, Lai R, Ding S, Ni M, Zhao R. Detection of mismatch repair gene germline mutation carrier among Chinese population with colorectal cancer. *BMC Cancer* 2008; 8: 44
- 21 Poynter JN, Siegmund KD, Weisenberger DJ, Long TI, Thibodeau SN, Lindor N, Young J, Jenkins MA, Hopper JL, Baron JA, Buchanan D, Casey G, Levine AJ, Le Marchand L, Gallinger S, Bapat B, Potter JD, Newcomb PA, Haile RW, Laird PW. Molecular characterization of MSI-H colorectal cancer by MLH1 promoter methylation, immunohistochemistry, and mismatch repair germline mutation screening. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008; 17: 3208-3215
- 22 Bendardaf R, Lamlum H, Ristamäki R, Syrjänen K, Pyrhönen S. Oncoprotein Bcl-2 and microsatellite instability are associated with disease-free survival and treatment response in colorectal cancer. *Oncol Rep* 2008; 20: 999-1004
- 23 Hampel H, Frankel WL, Martin E, Arnold M, Khanduja K, Kuebler P, Clendenning M, Sotamaa K, Prior T, Westman JA, Panescu J, Fix D, Lockman J, LaJeunesse J, Comeras I, de la Chapelle A. Feasibility of screening for Lynch syndrome among patients with colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008; 26: 5783-5788
- 24 Deng G, Peng E, Gum J, Terdiman J, Slesinger M, Kim YS. Methylation of hMLH1 promoter correlates with the gene silencing with a region-specific manner in colorectal cancer. *Br J Cancer* 2002; 86: 574-579
- 25 马坚妹, 刘敏, 王岩, 范凯, 吕申, 许国旺. hMLH1和MSH2蛋白表达与散发性大肠癌. 中国肿瘤临床与康复 2004; 11: 395-397
- 26 蔡崎, 陆洪芬, 孙孟红, 张太明, 施达仁. 散发性结直肠癌hMLH-1和hMSH2蛋白表达. 临床与实验病理学杂志 2003; 19: 521-525
- 27 Tanaka J, Watanabe T, Kanazawa T, Tada T, Kazama Y, Tanaka T, Nagawa H. Left-Sided microsatellite unstable colorectal cancers show less frequent methylation of hMLH1 and CpG island methylator phenotype than right-sided ones. *J Surg Oncol* 2007; 96: 611-618
- 28 陆小军, 贾水前. PCR-DGGE法检测DNA碱基突变及多态性的方法学评价. 四川大学学报(医学版) 2007;

■同行评价

本文联合检测hMLH-1和hMSH2在结直肠癌中的表达, 更有助于结直肠癌预后的判断, 立意新颖, 数据可信, 论证有据.

- 38: 882-884
- 29 胡俊. 变性高效液相色谱法检测单核苷酸多态性的研究进展. *临床检验杂志* 2005; 23: 308-309
- 30 Shen XS, Zhao B, Wang ZJ. Clinical features and hMSH2/hMLH1 germ-line mutations in Chinese patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Chin Med J (Engl)* 2008; 121: 1265-1268
- 31 Herman JG, Graff JR, Myöhänen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 9821-9826
- 32 Arnold CN, Goel A, Boland CR. Role of hMLH1 promoter hypermethylation in drug resistance to 5-fluorouracil in colorectal cancer cell lines. *Int J Cancer* 2003; 106: 66-73
- 33 Hawkins N, Norrie M, Cheong K, Mokany E, Ku SL, Meagher A, O'Connor T, Ward R. CpG island methylation in sporadic colorectal cancers and its relationship to microsatellite instability. *Gastroenterology* 2002; 122: 1376-1387

编辑 翟欢欢 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, 以及胃肠运动对神经的影响、传递、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。

介入治疗肝癌对免疫功能影响的研究进展

张功霖, 赵卫

张功霖, 赵卫, 昆明医科大学第一附属医院医学影像科 云南省昆明市 650032

张功霖, 在读硕士, 主要从事肿瘤介入治疗的研究。

作者贡献分布: 本文综述由张功霖完成; 赵卫审校。

通讯作者: 赵卫, 主任医师, 650032, 云南省昆明市西昌路295号, 昆明医科大学医学影像科. kyyzhaowei@vip.km169.net
电话: 0871-5311675

收稿日期: 2012-09-26 修回日期: 2012-11-07

接受日期: 2012-11-15 在线出版日期: 2012-11-28

Recent progress in understanding the effect of interventional therapy for hepatic carcinoma on immune function

Gong-Lin Zhang, Wei Zhao

Gong-Lin Zhang, Wei Zhao, Department of Medical Imaging, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650032, Yunnan Province, China

Correspondence to: Wei Zhao, Chief Physician, Department of Medical Imaging, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, 295 Xichang Street, Kunming 650032, Yunnan Province, China. kyyzhaowei@vip.km169.net

Received: 2012-09-26 Revised: 2012-11-07

Accepted: 2012-11-15 Published online: 2012-11-28

Abstract

Liver cancer is a common highly malignant tumor in China, with a high rate of recurrence and metastasis. The body's immune function is closely related with the occurrence and development of liver cancer, and low immunological function is an important reason why hepatic carcinoma is hard to cure and tend to recur and metastasize. At present, surgery-based comprehensive therapy plays a dominant role in the treatment of hepatic carcinoma; however, the majority of patients had lost their opportunities for surgical treatment when a definitive diagnosis was established. Interventional therapy is regarded as the first choice of nonsurgical treatment for hepatic carcinoma. Interventional therapy can not only result in coagulative tumor necrosis but also promote apoptosis of tumor cells. The body's immune function can be enhanced to improve the anti-tumor ability by interventional therapy,

especially the cellular immune function. As a result, the metastasis and recurrence of hepatic carcinoma may be inhibited. The purpose of this article is to review the progress in understanding the effect of interventional therapy for hepatic carcinoma on immune function.

Key Words: Hepatic carcinoma; Interventional therapy; Immune function

Zhang GL, Zhao W. Recent progress in understanding the effect of interventional therapy for hepatic carcinoma on immune function. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(33): 3225-3230

摘要

肝癌是我国常见的恶性肿瘤之一, 因其恶性程度高, 易于复发和转移而被广泛关注。肝癌的发生、发展及预后与机体的免疫功能密切相关, 肝癌患者一般免疫功能低下, 这也是肝癌复发和转移的重要因素。目前, 肝癌的治疗多是以外科切除为基础的综合治疗, 但患者就诊时多属于中晚期, 错过了外科手术机会。肝癌的介入治疗被认为是非外科治疗的首选方法。介入治疗在破坏肿瘤组织的同时, 也促进了肿瘤细胞的凋亡, 特别是提高了细胞免疫功能, 增强机体抗肿瘤的免疫力, 免疫功能的提高可能起到抑制肿瘤复发和转移的作用。本文就近年来国内外介入治疗对患者免疫功能的影响作一综述。

关键词: 肝癌; 介入治疗; 免疫功能

张功霖, 赵卫. 介入治疗肝癌对免疫功能影响的研究进展. *世界华人消化杂志* 2012; 20(33): 3225-3230

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3225.asp>

0 引言

肝癌是常见的恶性肿瘤之一, 传统治疗以外科手术为主, 但患者就诊时大多数已为中晚期, 错过了手术机会。介入治疗是治疗不可手术切除肝癌的首选治疗方法, 在治疗肝癌的同时提高了患者的免疫功能, 有利于控制肿瘤的复发与

■背景资料

外科切除是治疗肝癌的首选方案, 但患者就诊时多属中晚期, 错过了手术机会。介入治疗是不可手术中晚期肝癌的首选治疗方法, 并能提高患者的免疫功能。免疫功能的提高有望在控制肿瘤的复发、转移方面起到积极作用, 但目前有关介入治疗肝癌后对免疫功能影响的确切机制仍未明确。

■同行评议者

麻勇, 副研究员, 哈尔滨医科大学附属第一医院肝脏外科

■研发前沿

目前针对介入治疗肝癌对患者免疫功能影响机制,以及细胞免疫的研究已成为热点、重点。

转移. 本文就介入治疗肝癌对患者免疫功能的影响作一综述.

1 肝癌患者机体免疫功能状态

机体抗肿瘤免疫以细胞免疫为主,主要的免疫细胞为T淋巴细胞、自然杀伤细胞(natural killer cell, NK)、特异性细胞毒T细胞(cytotoxic T-lymphocyte, CTL),以上细胞可以特异性识别肿瘤抗原,刺激机体产生抗肿瘤效应细胞的增殖和分化,并分泌多种细胞因子,引起抗肿瘤免疫反应. T细胞分为Th1、Th2两个亚群,其可分泌不同的免疫因子. Th1主要分泌白介素2(interleukin-2, IL-2)、干扰素 γ (interferon- γ , IFN- γ)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α); Th2主要分泌IL-4、IL-10. NK细胞则对各种肿瘤细胞具有直接杀伤作用,并且对血行转移的肿瘤细胞产生较强的杀伤作用,在抑制肿瘤的转移方面起到积极作用. CD4⁺细胞是机体免疫应答的主要细胞,其分泌的细胞因子可调节抗肿瘤免疫反应; CD8⁺细胞分泌的抑制性T淋巴细胞因子,发挥特异性免疫抑制作用. 肝癌患者外周血抗肿瘤细胞及细胞因子情况: (1)肝癌患者外周血中CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺比值、NK细胞数量明显下降, CD8⁺细胞数量明显增加,均提示肝癌患者存在免疫抑制状态; (2)CD4⁺CD25⁺Treg细胞是最重要的免疫抑制细胞^[1],通过抑制CD4⁺CD25⁺、CD8⁺CD25⁺T细胞、NK细胞的增殖及IL-2的分泌功能,抑制CD8⁺记忆性T细胞的反应力,降低抗原提呈效率^[2,3]. 另有研究提示肝癌患者CD4⁺CD25⁺T细胞比例明显高于正常人群,而淋巴细胞总数偏低,同样提示肝癌患者存在不同程度的免疫抑制^[4,5]. CD4⁺CD25⁺T细胞的表达与肝癌TNM分期显著相关, TNM分期越晚, CD4⁺CD25⁺T细胞的表达越高,患者预后越差^[6]; (3)肝癌患者外周血中Th1型细胞因子IL-2、IFN- γ 的含量均降低, Th2型细胞因子IL-4、IL-10的含量均增高,并存在Th1/Th2漂移现象,使外周血中Th2型细胞占优势,抑制了Th1型细胞抗肿瘤免疫效应^[7]; (4)肝癌患者肿瘤组织内外的NK细胞、T细胞及巨噬细胞浸润均降低,且外周血清中SIL-2R水平也明显升高^[8].

2 常用介入治疗方法治疗肝癌后患者免疫功能的变化

2.1 血管介入 经肝动脉化疗栓塞(transcatheter arterial chemoembolization, TACE)是不可手术

切除中晚期肝癌的首选治疗方法之一^[9], TACE在促进肿瘤坏死的同时也造成机体的免疫功能抑制,尤其是化疗药物的不良反应会造成机体免疫抑制,这会促进肿瘤的复发和转移. 单纯行TACE治疗肝癌,对延长患者的生存期方面仍存在争议,故目前肝癌的介入治疗多是以TACE为基础的综合介入治疗^[10]. 既往TACE治疗肝癌所使用的化疗药物剂量较大,化疗药物全身不良反应较大,对机体的免疫抑制作用也较强;目前TACE治疗时所使用的化疗药物使用剂量日趋规范,在减少剂量的同时并没有影响TACE治疗肝癌的疗效,这使得化疗药物全身的不良反应较之前明显降低,免疫抑制作用也明显减轻; TACE治疗肝癌后随着肿瘤的坏死,肿瘤细胞分泌的免疫抑制因子减少,对机体的免疫抑制作用减轻,机体免疫功能在TACE术后1 mo可逐渐得到恢复,故TACE治疗肝癌后患者的免疫功能降低是暂时的^[11].

2.2 物理消融 物理消融主要包括射频消融(radio-frequency ablation, RFA)、微波消融(microwave coagulation treatment, MCT)、高聚焦超声消融(high intensity focused ultrasound, HIFU)、冷冻消融(cryoablation)等. 以上方法均是通过高温或低温的方法使肿瘤组织发生凝固性坏死,以达到治疗肝癌的目的. 据国内外文献综合分析,物理消融治疗肝癌对患者免疫功能影响的作用机制主要有: (1)肿瘤坏死组织作为特异性抗原活化抗原提呈细胞,诱导肿瘤特异性淋巴细胞反应,改善机体的免疫耐受状态; (2)肿瘤细胞坏死后所分泌的免疫抑制因子减少,使肝癌患者的免疫抑制状态减轻; (3)高水平的甲胎蛋白(alpha fetoprotein, AFP)对机体有免疫抑制作用,物理消融后AFP明显下降,可减轻肿瘤对机体的免疫抑制作用; (4)肿瘤细胞灭活后产生大量热休克蛋白(heat shock protein, HSP),残存肿瘤组织内的HSP明显增多^[12,13], HSP可诱发机体的抗肿瘤免疫功能,参与肿瘤抗原提呈和激发T细胞介导的细胞免疫反应^[14,15]; (5)肿瘤局部造成炎性环境,有利于抗原提呈细胞聚集,诱导抗肿瘤免疫作用.

常用物理消融治疗肝癌的临床研究: (1) RFA治疗肝癌后患者抗肿瘤免疫力明显增强, T细胞Th1亚群分泌的细胞因子(IL-2、TNF- α)明显升高, Th2亚群分泌的细胞因子(IL-4、IL-10)明显下降^[16]. 王艳滨等^[17]用RFA治疗26例是肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)患者后,血清IL-4、IL-10含量较治疗前明显下降, IL-2和

■相关报道

小样本的动物实验和临床研究已证实,介入治疗肝癌可提高患者的细胞免疫功能.

IFN- γ 含量均增高, NK细胞数量也较术前有所升高. 研究表明, NK细胞可分泌的IFN- γ 和IL-2能增强NK细胞的杀伤活性并诱导其活化与增殖, 进一步增强机体抗肿瘤的细胞免疫功能^[18], 也有RFA治疗肝癌后IL-2明显升高和sIL-2R明显降低的报道^[19]; (2)MCT消融肝癌后CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺、NK细胞数目明显上升, CD8⁺细胞明显降低, 与正常健康者相比, 体液免疫无明显差异, 虽然术后IgG、IgM、IgA含量较术前均有不同程度的升高, 但无显著差异性, 提示MCT对肝癌患者体液免疫功能影响较小^[20]; (3)HIFU是近年来发展起来利用超声波的可视性、软组织穿透性和可聚焦性物理特点治疗实质性肿瘤的新技术. HIFU治疗是一种非侵入性治疗方法^[21,22], 具有对肿瘤周围组织损伤小或者无损伤的特点, 可有效避免经皮介入技术所引起的并发症, 如RFA、MCT等引起的出血、感染、针道转移. HIFU通过高温使肿瘤组织发生不可逆性坏死^[23], 肿瘤坏死组织可作为抗原刺激机体产生特异性抗肿瘤的免疫力^[24,25]; (4)冷冻消融在治疗肝癌的同时, 肿瘤坏死组织释放肿瘤抗原, 刺激机体免疫应答, 产生抗肿瘤的免疫力. 冷冻治疗后Treg细胞比例可轻度下降, CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺、NK细胞明显升高, CD8⁺细胞降低, 均具有显著性差异^[26].

2.3 局部放疗 放射性粒子植入是内放疗, 不但没有外放疗引起的并发症, 并且提高了局部放疗效果. 放射性粒子植入可提高肝癌患者的免疫功能, 其机制主要有: (1)内放疗后肿瘤细胞坏死可减少肿瘤产生的免疫抑制因子, 减轻了机体的免疫抑制状态; (2)治疗后AFP明显下降, 可解除AFP对机体免疫功能的抑制作用^[27,28]; (3)内放疗后炎症介导因子激活免疫系统细胞, 最终激活适应性免疫反应, 起到免疫调节作用^[29]; (4)放疗后产生放疗特异性蛋白, 活化淋巴细胞释放细胞因子, 提高机体抗肿瘤的免疫力. 目前有关放射性粒子植入可提高肝癌患者免疫功能方面的研究较少, 研究的最终目的是要延长患者的生存期, 故需要大量的临床随机对照研究来支持这一观点^[30].

3 综合介入治疗肝癌患者免疫功能的变化

因肝癌的恶性程度高, 较早即可发生转移, 肝癌的这一生物学特性决定了肝癌的治疗用单一方法难以取得满意的疗效, 故目前对手术不可切

除肝癌的治疗多是以TACE为主的综合介入治疗. TACE联合其他方法综合治疗肝癌的依据有: (1)联合物理消融治疗, TACE可使肿瘤大部分血供被阻断, 可减少RFA、HIFU等物理消融时热量随血流的丢失, 提高物理消融的疗效. 物理消融可以治疗TACE栓塞后的残存病灶, 其热效应增加细胞的通透性, 可使化疗药物进入肿瘤细胞内, 提高了化疗药物的疗效, 故TACE联合物理消融可发挥优势互补的作用^[31,32]; (2)TACE联合分子靶向药物, TACE术后残存病灶仍可复发, 且术后极易促进肿瘤周边侧枝循环的建立. TACE联合分子靶向药物治疗肝癌, 可有效抑制肿瘤血管的生成, 起到抑制肿瘤复发与转移的作用^[33,34]. 以下为TACE为主的常用综合介入治疗方法治疗肝癌后患者免疫功能变化的研究.

3.1 TACE+冷冻消融 HCC非手术治疗的首选, 因肝癌经过TACE治疗后存在肿瘤坏死不彻底、易复发和转移的特点. 单纯TACE治疗肝癌病灶完全坏死率低, 且化疗药物对机体免疫功能的抑制作用对患者预后产生不良影响. 冷冻消融是采用超低温直接杀伤肿瘤细胞的方法, 短时间内可降低肿瘤负荷, 在一定程度上激活了机体抗肿瘤免疫反应^[35]. 冷冻消融后, 肿瘤坏死细胞碎片被吸收后, 形成肿瘤细胞特异性抗原, 刺激CTL和树突状细胞增殖, 激发机体产生特异性抗肿瘤免疫, 进一步抑制肿瘤的复发与转移^[36]. TACE联合冷冻消融治疗肝癌后患者外周血中CD3⁺、CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺比值上升, CD8⁺和Treg细胞数目及AFP下降明显, 均明显优于单纯TACE治疗^[37].

3.2 TACE+HIFU Li等^[38]经临床随机对照试验证明TACE联合HIFU治疗肝癌的坏死率和中位生存期明显优于单独TACE. HIFU治疗肿瘤后, 坏死组织为机体提供了自体灭活肿瘤疫苗, 成为特异性抗原刺激机体产生免疫应答, HIFU的高温效应可解除肿瘤细胞分泌的免疫抑制因子对机体免疫的抑制作用^[39,40]. 单纯HIFU与单纯TACE治疗肝癌后, HIFU治疗肿瘤可使外周血中CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺、NK细胞明显升高, 而单纯TACE治疗后上述细胞短期内会出现轻度下降^[41]. HIFU治疗肝癌后提高了患者抗肿瘤的免疫力. 由此推断, HIFU治疗肝癌引起的免疫功能的提高可以对抗由TACE治疗所使用的化疗药物带来的对机体的免疫抑制作用, 但目前缺少TACE联合HIFU与单纯HIFU治疗肝癌方面疫功

■创新盘点

本文对介入治疗肝癌对免疫功能影响机制的研究进展进行综述, 以期为广大读者提供更大的思考空间.

■应用要点

本文对介入治疗肝癌对患者免疫功能影响机制的研究进展进行综述,为相关研究提供方向和思路。

能方面的对比研究。

3.3 TACE+RFA RFA单独治疗直径为2-5 cm的肝癌即可达到满意的疗效^[42],但大肝癌需要TACE联合RFA才能达到治疗目的^[43]。RFA产生的高温能使肝肿瘤组织发生凝固性坏死,坏死组织作为抗原能够产生持续性的局部炎症反应,活化抗原提呈细胞,诱导肿瘤特异性T淋巴细胞反应,可改善机体抗肿瘤免疫耐受状态^[44]。Osada等^[45]报道,RFA治疗肝癌后能观察到非治疗区域肿瘤坏死,这种现象的出现和IL-10降低,TNF- α 和Th1/Th2比值升高有关。Napoleitano等^[46]报道,RFA治疗转移性肝癌能够诱导CD62L(+)T细胞从循环进入局部组织,增强机体的抗肿瘤细胞免疫功能,但治疗HCC未观察到类似现象。

3.4 TACE+索拉非尼 索拉非尼是多激酶抑制剂,具有双重抗肿瘤作用即直接抑制肿瘤增殖和抑制肿瘤血管生成的作用^[47],还具有提高肝癌患者免疫功能的作用。Strebel等^[48]提出TACE治疗肿瘤后造成缺氧环境,诱导血管内皮细胞生长因子过度表达、新生血管生成,肿瘤易出现复发与转移,TACE联合索拉非尼治疗肝癌可有效抑制肿瘤血管再生,减少肿瘤的复发和转移,提高肝癌的治疗效果。动物实验证明,索拉非尼增强机体免疫功能的作用机制是索拉非尼可降低肝癌患者外周血中免疫抑制细胞的数量,起到免疫调节作用^[49]。目前有关索拉非尼增强肝癌患者免疫功能的研究较少,故索拉非尼提高肝癌患者免疫功能的具体机制有待进一步研究。

4 结论

目前有关介入治疗对患者免疫功能影响方面的实验及临床研究已取得一定成果,并且肝癌的免疫治疗也有较好的研究基础^[50,51],但缺乏临床循证医学的有力证据证明疗效或性价比,实际上这也是本文的不足之处。随着多种介入治疗方法在临床的广泛应用,介入治疗肝癌免疫功能变化的机制将更加明确,有望在杀灭残癌细胞,降低术后复发率,提高远期疗效方面发挥积极作用,并为肝癌的免疫治疗提供有力的理论依据。

5 参考文献

- 1 Chen X, Du Y, Huang Z. CD4+CD25+ Treg derived from hepatocellular carcinoma mice inhibits tumor immunity. *Immunol Lett* 2012; 148: 83-89
- 2 Almeida AR, Ciernik IF, Sallusto F, Lanzavecchia A. CD4+ CD25+ Treg regulate the contribution of

CD8+ T-cell subsets in repopulation of the lymphopenic environment. *Eur J Immunol* 2010; 40: 3478-3488

- 3 McNally A, Hill GR, Sparwasser T, Thomas R, Stepstone RJ. CD4+CD25+ regulatory T cells control CD8+ T-cell effector differentiation by modulating IL-2 homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108: 7529-7534
- 4 陈中, 晏建军, 黄亮, 严以群. 肝癌微环境中CD4+CD25+调节性T细胞与T细胞免疫的关系. *临床肝胆病杂志* 2008; 1: 38-40
- 5 Zhao F, Korangy F, Greten TF. Cellular immune suppressor mechanisms in patients with hepatocellular carcinoma. *Dig Dis* 2012; 30: 477-482
- 6 Shen X, Li N, Li H, Zhang T, Wang F, Li Q. Increased prevalence of regulatory T cells in the tumor microenvironment and its correlation with TNM stage of hepatocellular carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2010; 136: 1745-1754
- 7 Qiu FB, Wu LQ, Lu Y, Zhang S, Zhang BY. Predominant expression of Th1-type cytokines in primary hepatic cancer and adjacent liver tissues. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2007; 6: 63-66
- 8 El-Shanawani FM, Abdel-Hadi AA, Abu Zikri NB, Ismail A, El-Ansary M, El-Raai A. Clinical significance of aflatoxin, mutant P53 gene and sIL-2 receptor in liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *J Egypt Soc Parasitol* 2006; 36: 221-239
- 9 Llovet JM, Bruix J. Novel advancements in the management of hepatocellular carcinoma in 2008. *J Hepatol* 2008; 48 Suppl 1: S20-S37
- 10 Cabibbo G, Latteri F, Antonucci M, Craxi A. Multimodal approaches to the treatment of hepatocellular carcinoma. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2009; 6: 159-169
- 11 侯恩存, 陆运鑫. 中药联合肝动脉化疗栓塞术治疗原发性肝癌临床研究. *中国中西医结合杂志* 2009; 29: 225-227
- 12 Rai R, Richardson C, Flecknell P, Robertson H, Burt A, Manas DM. Study of apoptosis and heat shock protein (HSP) expression in hepatocytes following radiofrequency ablation (RFA). *J Surg Res* 2005; 129: 147-151
- 13 Schueller G, Kettenbach J, Sedivy R, Bergmeister H, Stift A, Fried J, Gnant M, Lammer J. Expression of heat shock proteins in human hepatocellular carcinoma after radiofrequency ablation in an animal model. *Oncol Rep* 2004; 12: 495-499
- 14 Kruse DE, Mackanos MA, O'Connell-Rodwell CE, Contag CH, Ferrara KW. Short-duration-focused ultrasound stimulation of Hsp70 expression in vivo. *Phys Med Biol* 2008; 53: 3641-3660
- 15 欧霞, 邹建中. 高强度聚焦超声生物学效应的研究进展. *中国医学影像技术* 2010; 26: 974-976
- 16 李刚, 寸英丽, 杨丽春. 肝癌患者射频消融后血清Th1、Th2型细胞因子的变化. *肝胆胰外科杂志* 2010; 22: 94-96
- 17 王艳滨, 吴后男, 严昆, 陈敏华, 柯杨. 肝细胞癌射频治疗前后淋巴细胞亚群及T细胞功能的变化. *中国介入影像与治疗学* 2006; 3: 115-121
- 18 Armeanu S, Krusch M, Baltz KM, Weiss TS, Smirnow I, Steinle A, Lauer UM, Bitzer M, Salih HR. Direct and natural killer cell-mediated antitumor effects of low-dose bortezomib in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 3520-3528
- 19 成建萍, 倪雪君, 周国雄, 于秀, 丁晓凌, 张海峰. 超声引导下射频消融治疗肝癌对免疫功能的影响. *南通大*

- 学学报 2010; 30: 74-76
- 20 魏云涛, 郭大伟, 侯学忠, 梁健. 微波固化治疗对肝癌患者免疫功能的影响. *现代肿瘤医学* 2009; 17: 1301-1302
- 21 Orgera G, Monfardini L, Della Vigna P, Zhang L, Bonomo G, Arnone P, Padrenostro M, Orsi F. High-intensity focused ultrasound (HIFU) in patients with solid malignancies: evaluation of feasibility, local tumour response and clinical results. *Radiol Med* 2011; 116: 734-748
- 22 Zhang L, Zhu H, Jin C, Zhou K, Li K, Su H, Chen W, Bai J, Wang Z. High-intensity focused ultrasound (HIFU): effective and safe therapy for hepatocellular carcinoma adjacent to major hepatic veins. *Eur Radiol* 2009; 19: 437-445
- 23 Jang HJ, Lee JY, Lee DH, Kim WH, Hwang JH. Current and Future Clinical Applications of High-Intensity Focused Ultrasound (HIFU) for Pancreatic Cancer. *Gut Liver* 2010; 4 Suppl 1: S57-S61
- 24 Zhang Y, Deng J, Feng J, Wu F. Enhancement of antitumor vaccine in ablated hepatocellular carcinoma by high-intensity focused ultrasound. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 3584-3591
- 25 Deng J, Zhang Y, Feng J, Wu F. Dendritic cells loaded with ultrasound-ablated tumour induce in vivo specific antitumour immune responses. *Ultrasound Med Biol* 2010; 36: 441-448
- 26 李小丽, 司同国, 于海鹏, 郭志. 冷冻消融对肝癌患者外周血CD4 CD25调节T细胞影响的初步研究. *中国肿瘤临床* 2008; 35: 453-454
- 27 罗开元, 毛文源, 何晓明, 杨嵘, 李波, 杨国凯, 邵庆华. 125I粒子组织间内放射治疗在大肝癌治疗中的临床应用. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 1636-1638
- 28 郭锐芳, 杨少奇. 甲胎蛋白阴性肝Ca的临床特点及预后分析. *临床肝胆病杂志* 2009; 25: 454-455
- 29 Galluzzi L, Maiuri MC, Vitale I, Zischka H, Castedo M, Zitvogel L, Kroemer G. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death Differ* 2007; 14: 1237-1243
- 30 彭齐荣, 肖必, 陈芳妮, 唐海泳, 程涛, 刘莉莉, 罗鹏飞. 125I粒子植入对肝癌患者免疫功能的影响. *广东医学* 2010; 31: 2782-2784
- 31 Cao H, Xu Z, Long H, Zhang LL, Zhang J, Peng ZP, Li SL. Transcatheter arterial chemoembolization in combination with high-intensity focused ultrasound for unresectable hepatocellular carcinoma: a systematic review and meta-analysis of the chinese literature. *Ultrasound Med Biol* 2011; 37: 1009-1016
- 32 Yan S, Xu D, Sun B. Combination of radiofrequency ablation with transarterial chemoembolization for hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. *Dig Dis Sci* 2012; 57: 3026-3031
- 33 Qu XD, Chen CS, Wang JH, Yan ZP, Chen JM, Gong GQ, Liu QX, Luo JJ, Liu LX, Liu R, Qian S. The efficacy of TACE combined sorafenib in advanced stages hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer* 2012; 12: 263
- 34 Park JW, Koh YH, Kim HB, Kim HY, An S, Choi JI, Woo SM, Nam BH. Phase II study of concurrent transarterial chemoembolization and sorafenib in patients with unresectable hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2012; 56: 1336-1342
- 35 Zhou L, Fu JL, Lu YY, Fu BY, Wang CP, An LJ, Wang XZ, Zeng Z, Zhou CB, Yang YP, Wang FS. Regulatory T cells are associated with post-cryoablation prognosis in patients with hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol* 2010; 45: 968-978
- 36 Ravindranath MH, Wood TF, Soh D, Gonzales A, Muthugounder S, Perez C, Morton DL, Bilchik AJ. Cryosurgical ablation of liver tumors in colon cancer patients increases the serum total ganglioside level and then selectively augments antiganglioside IgM. *Cryobiology* 2002; 45: 10-21
- 37 杨茂, 郭志, 司同国, 邢文阁, 李保国, 刘方. 化疗栓塞联合冷冻对肝癌患者免疫功能的影响. *放射学实践* 2011; 26: 534-537
- 38 Li CX, Wu PH, Fan WJ, Huang JH, Zhang FJ, Zhang L, Gu YK, Zhao M, Gao F, Jiao DC. [Clinical effect of transcatheter arterial chemoembolization combined with high intensity focused ultrasound ablation in treatment of large hepatocellular carcinoma]. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2009; 89: 754-757
- 39 Wu F, Wang ZB, Lu P, Xu ZL, Chen WZ, Zhu H, Jin CB. Activated anti-tumor immunity in cancer patients after high intensity focused ultrasound ablation. *Ultrasound Med Biol* 2004; 30: 1217-1222
- 40 Xia JZ, Xie FL, Ran LF, Xie XP, Fan YM, Wu F. High-intensity focused ultrasound tumor ablation activates autologous tumor-specific cytotoxic T lymphocytes. *Ultrasound Med Biol* 2012; 38: 1363-1371
- 41 黄耀, 张卫星, 彭淮都, 魏杨辉. HIFU、TACE治疗原发性肝癌对患者免疫功能影响的比较. *浙江临床医学* 2010; 12: 337-339
- 42 Siriapisith T, Siwasattayanon P, Tongdee T. Radiofrequency ablation alone versus radiofrequency ablation combined with chemoembolization in unresectable hepatocellular carcinoma. *J Med Assoc Thai* 2012; 95: 430-436
- 43 Fan WZ, Yang JY, Lu MD, Xie XY, Yin XY, Huang YH, Kuang M, Li HP, Xu HX, Li JP. [Transcatheter arterial chemoembolization plus percutaneous thermal ablation in large hepatocellular carcinoma: clinical observation of efficacy and predictors of prognostic factors]. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2011; 91: 2190-2194
- 44 Zerbini A, Pilli M, Fagnoni F, Pelosi G, Pizzi MG, Schivazappa S, Laccabue D, Cavallo C, Schianchi C, Ferrari C, Missale G. Increased immunostimulatory activity conferred to antigen-presenting cells by exposure to antigen extract from hepatocellular carcinoma after radiofrequency thermal ablation. *J Immunother* 2008; 31: 271-282
- 45 Osada S, Imai H, Tomita H, Tokuyama Y, Okumura N, Matsushashi N, Sakashita F, Nonaka K. Serum cytokine levels in response to hepatic cryoablation. *J Surg Oncol* 2007; 95: 491-498
- 46 Napoletano C, Taurino F, Biffoni M, De Majo A, Coscarella G, Bellati F, Rahimi H, Pauselli S, Pellicciotta I, Burchell JM, Gaspari LA, Ercoli L, Rossi P, Rughetti A. RFA strongly modulates the immune system and anti-tumor immune responses in metastatic liver patients. *Int J Oncol* 2008; 32: 481-490
- 47 Liu LP, Ho RL, Chen GG, Lai PB. Sorafenib inhibits hypoxia-inducible factor-1 α synthesis: implications for antiangiogenic activity in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2012; 18: 5662-5671
- 48 Strebel BM, Dufour JF. Combined approach to hepatocellular carcinoma: a new treatment concept for nonresectable disease. *Expert Rev Anticancer Ther* 2008; 8: 1743-1749
- 49 Cao M, Xu Y, Youn JI, Cabrera R, Zhang X, Gabrielovich D, Nelson DR, Liu C. Kinase inhibitor

同行评价

本文深入探讨介入治疗肝癌对免疫功能的影响, 比较详实地对当前该领域的研究作以客观综述, 具有较好的借鉴价值。

- Sorafenib modulates immunosuppressive cell populations in a murine liver cancer model. *Lab Invest* 2011; 91: 598-608
- 50 Morozov AV, Morozov VA, Astakhova TM, Timofeev AV, Karpov VL. [DNA vaccine encoding alpha-fetoprotein with fused ornithine decarboxylase degradation signal significantly suppresses hepato-
- cellular carcinoma growth in mice]. *Mol Biol (Mosk)* 2012; 46: 434-451
- 51 Tada F, Abe M, Hirooka M, Ikeda Y, Hiasa Y, Lee Y, Jung NC, Lee WB, Lee HS, Bae YS, Onji M. Phase I/II study of immunotherapy using tumor antigen-pulsed dendritic cells in patients with hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol* 2012; 41: 1601-1609

编辑 翟欢欢 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)

TGF-β1及其受体与肝癌转移复发关系的研究进展

程林, 向广阳, 陈德

程林, 向广阳, 陈德, 广州医学院第二附属医院肝胆外科 广东省广州市 510260

程林, 硕士, 主要从事肝癌复发与转移分子机制的研究。

广东省科技计划基金资助项目, No. 2010B060900088

作者贡献分布: 本文文献查阅及撰写由程林完成; 初稿修改由向广阳完成; 陈德负责审核。

通讯作者: 陈德, 教授, 主任医师, 510260, 广东省广州市海珠区昌岗东路250号, 广州医学院第二附属医院肝胆外科。

drchende@163.com

电话: 020-34153901

收稿日期: 2012-09-05 修回日期: 2012-10-21

接受日期: 2012-11-07 在线出版日期: 2012-11-28

Role of TGF-β1 and its receptors in malignant progression of hepatocellular carcinoma

Lin Cheng, Guang-Yang Xiang, De Chen

Lin Cheng, Guang-Yang Xiang, De Chen, Department of Hepatobiliary Surgery, Guangzhou Medical College, Guangzhou 510260, Guangdong Province, China

Supported by: the Science and Technology Program of Guangdong Province, No. 2010B060900088

Correspondence to: De Chen, Professor, Department of Hepatobiliary Surgery, Guangzhou Medical College, Guangzhou 510260, Guangdong Province, China. drchende@163.com

Received: 2012-09-05 Revised: 2012-10-21

Accepted: 2012-11-07 Published online: 2012-11-28

Abstract

Transforming growth factor-beta 1 (TGF-β1) is a cytokine which exerts a wide range of biological activities by initiating downstream signaling. As transmembrane receptors, TGFBR I, TGFBR II and TGFBR III have been shown to play an important role in mediating TGF-β1 signal transduction. Owing to roles in promoting cell growth and development, alterations in TGF-β1 and its receptors may result in many diseases, especially tumors. Hepatocellular carcinoma (HCC) is a common malignant solid tumor with high risk of metastasis and recurrence and is associated with a high fatality. Recent studies point to a close relationship between hepatocellular carcinoma and the dysregulation of TGF-β1 signaling pathway. The changes in the levels of TGF-β1 and its receptors in tumor microenvironment may facilitate the invasive potential of

HCC. In this article we mainly summarize the structure and function of TGF-β1 and its receptors and assess their role in metastasis and recurrence of hepatocellular carcinoma.

Key Words: Transforming growth factor-beta 1; Receptor; Hepatocellular carcinoma; Metastasis; Recurrence

Cheng L, Xiang GY, Chen D. Role of TGF-β1 and its receptors in malignant progression of hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(33): 3231-3236

摘要

转化生长因子β1(transforming growth factor-beta 1, TGF-β1)是一种具有多向生物学效应的多肽类细胞调节因子,其膜受体I型转化生长因子-β受体(transforming growth factor-beta type I receptor, TGFBR I)、TGFBR II以及TGFBR III在TGF-β1的跨膜信号转导过程中发挥极其重要的作用。TGF-β1及其受体种类较多、功能较为复杂,其表达异常可导致多种疾病,尤其在肿瘤性疾病中更为常见。肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是一种恶性程度较高的实体性肿瘤,高转移和易复发的特性是导致患者病死率高的重要原因。近期研究表明TGF-β1信号通路功能紊乱与HCC的发生发展密切相关,HCC微环境中TGF-β1及其受体表达水平的改变可通过多种途径促进HCC的恶性进展。本文将对TGF-β1及其受体的结构功能以及在肝癌复发转移方面的研究进展进行综述。

关键词: 转化生长因子β1; 转化生长因子β受体; 肝癌; 转移; 复发

程林, 向广阳, 陈德. TGF-β1及其受体与肝癌转移复发关系的研究进展. *世界华人消化杂志* 2012; 20(33): 3231-3236

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3231.asp>

0 引言

转化生长因子β1(transforming growth factor-beta 1, TGF-β1)信号通路在多种肿瘤的发生发展中

■背景资料

近年来,多种研究表明TGF-β1信号通路在肿瘤的发生发展中扮演重要角色。然而,在肿瘤进展的不同时期,TGF-β1却起着截然相反的生物学作用,其具体机制尚不清楚。

■同行评议者

代智, 副研究员, 复旦大学附属中山医院肝癌研究所

■研发前沿

TGF- β 1信号通路不是一个孤立的系统,在机体内有一个庞大的信号通路网,各种信号通路间相互作用、相互影响,才最终导致机体生理或病理的改变。因此,TGF- β 1信号通路与其他通路间相互作用机制的研究越来越受到关注。

扮演重要的角色,然而,在肿瘤发展的不同时期所起作用却不同:在肿瘤发生早期对肿瘤的生长起抑制作用,进展到后期,TGF- β 1信号通路又表现出促进肿瘤侵袭及转移的作用^[1,2]。研究表明,TGF- β 1信号通路可调节肿瘤的多种生物学特性:细胞凋亡、细胞周期调控、血管形成、免疫抑制、上皮-间充质转化、肿瘤迁徙和转移等^[3,4]。由于他在肿瘤中的重要调节作用,使得该信号通路中的多个成员成为肿瘤治疗的理想靶点。

1 TGF- β 1及其受体的结构和功能

1.1 TGF- β 1的结构及其生物学效应 TGF- β 超家族包括TGF- β s、活化素(activins)、抑制素(inhibins)、骨形态发生蛋白(bone morphogenetic proteins, BMPs)及肌肉生长抑制素(myostatins)等多种成员^[5]。TGF- β 是TGF- β 超家族的重要一员,他是一种多肽类细胞因子,具有多种生物学效应,序列分析表明他在生物进化的长期过程中高度保守^[6,7]。TGF- β 的蛋白前体都是由一个同源二聚体构成,在细胞内可被酶解为大片的C-末端潜态相关蛋白(latency-associated protein, LAP)以及小片段的N-末端成熟TGF- β ^[8,9]。在体内,LAP以非共价键与成熟的TGF- β 结合并阻止TGF- β 与高亲和力受体结合而激活下游的信号通路,然而创伤后胞外基质的调节紊乱可导致TGF- β 异常活化。成熟的TGF- β 有5种亚型,即TGF- β 1-5,都是由分子量为25 kDa并通过二硫键相连的同源二聚体构成^[6,9]。在哺乳动物体内存在TGF- β 1-3 3种类型,其中TGF- β 1与肿瘤的发生发展的关系较为密切^[5,10]。TGF- β 1激活后通过多种途径发挥作用,包括Smad(drosophila mothers against decapentaplegic protein, Smad)依赖性、非Smad依赖性 & 非受体依赖性等途径,其中TGF- β 1/Smads信号通路是TGF- β 1发挥生物学功能最重要的途径之一。

最初,人们发现TGF- β 在表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)存在的情况下,可以诱导正常大鼠肾脏纤维母细胞的增殖,因此被描述为一种细胞因子,此后又相继发现了他在多种细胞中复杂多样的生物学功能^[6]。在上皮细胞的研究中发现,TGF- β 1对上皮细胞生长增殖起抑制作用,因此被认为是一种肿瘤抑制因子^[11];然而,在肿瘤细胞中,TGF- β 1的表达升高则促进恶性肿瘤的进展^[12]。其具体机制尚不完全明确,可从两方面分析:一方面,TGF- β 1可作

用于肿瘤基质细胞并抑制局部免疫细胞而促进肿瘤的发展;另一方面,部分肿瘤细胞已经逃避TGF- β 1的抑制作用而表现恶性进展的特点^[13]。

1.2 TGF- β 1的受体

1.2.1 TGF- β 1受体的分类: TGF- β 1受体属于丝氨酸/苏氨酸激酶家族成员,人类基因组编码7种I型转化生长因子- β 受体(transforming growth factor-beta type I receptor, TGFBR I),即ALK1-7(activin receptor-like kinase1-7);以及5种II型转化生长因子 β 受体(TGFBR II): TGFBR II、活化素受体IIa(activin receptor type II a),活化素受体IIb(activin receptor type II b),骨形态发生蛋白受体II(bone morphogenetic protein type II receptor)和抗缪勒氏激素受体II(anti-müllerian hormone receptor type II)^[1,14]。此外,还有TGF- β 1辅助性受体(又称为TGFBR III),是3种膜受体中数量最多的一种,包括endoglin(CD105)、 β -多糖(beta glycan)以及CD109等多种类型^[15]。通常,辅助性受体不能直接介导TGF- β 1信号的跨膜转运,但是他们可通过调节配体与受体的亲和力、活化受体的内化途径以及功能受体的激活等多种途径而影响TGF- β 1信号通路的功能发挥^[15]。

1.2.2 TGFBR II与TGFBR I的结构及功能: TGFBR II定位于人类基因组3p22,成熟的TGFBR II(70/80 kDa)是一种跨膜受体,胞外部分是含12个半胱氨酸的配体结合区,中间是跨膜疏水区,胞内是丝氨酸/苏氨酸激酶活性区,靠近C-末端是由22个丝氨酸/苏氨酸构成的短尾结构,此短尾结构的存在使得TGFBR II可自我激活。TGFBR II可直接与配体结合,再与TGFBR I形成受体复合物,TGFBR II自身磷酸化后通过转磷酸化激活TGFBR I,随后,激活的受体复合物可通过依赖Smad和非依赖Smad的途径发挥生物学作用^[12,16]。研究表明,TGFBR II在多种肿瘤疾病中表达缺失或下降,重新表达后可抑制肿瘤的发生,因此被认为是一种抑癌基因^[15,17]。在低分化、高转移、恶性程度高的肝癌细胞株中,TGFBR II在mRNA及蛋白水平都明显低于低转移的肝癌细胞株,因此,TGFBR II表达缺失或下降可能是导致肝癌高侵袭性和转移性的重要原因之一^[18]。

TGFBR I定位在基因组9q22.33,包括9个外显子共5 600 bp。成熟的TGFBR I大约由500个氨基酸残基构成,包括N-末端的胞外配体结合区域和C-末端的丝氨酸/苏氨酸激酶活性区域,在胞内区域紧靠激酶活性区域的N端侧有一段

■相关报道

2011年,Ceballos等研究发现,用TGF- β 1处理肝癌细胞可显著抑制细胞增殖并促进肿瘤细胞凋亡;然而,2012年,Morris等却发现敲除p53基因所诱导的小鼠肝癌模型中,TGF- β 1信号通路可促进肿瘤的形成。

高度保守的特异性SGSGSG序列, 称为GS区^[3,14]. 与BMPs不同, TGF- β 1和activin与TGFBR II有很高亲和力, 但是不能和TGFBR I直接作用, 需要激活的TGFBR II通过转磷酸化TGFBR I的GS区才能将其激活, 受体复合物中TGFBR I决定信号通路的性质. 在肝癌细胞株HLE和HLF的研究中发现, TGFBR I 激酶抑制剂LY2109761通过两种途径减少肿瘤血管的形成从而限制肝癌的发生发展: (1)减少血管的数目和弯曲度, 这两者是肿瘤汲取氧气和疏散药物的形态学基础; (2)阻断微环境中肿瘤与机体的相互作用^[19]. 此外, 在鸡胚模型中也同样发现LY2109761对肿瘤生长、侵袭和转移的抑制作用^[20,21]. TGFBR I 异常在肝癌中报道很少, 其保守稳定的性质给药物靶向治疗提供了保障, 此类研究也为临床靶向药物的研发提供了新思路.

通常, 信号跨膜转导过程中, TGF- β 1需要先与TGFBR II结合形成复合物, TGFBR I才能与复合物中的TGFBR II结合形成受体杂聚肽, 在某些情况下, 受体杂聚肽的形成也可不依赖于配体TGF- β 1^[22]. 激活的TGFBR I可磷酸化Smad2、Smad3, 随后与Smad4形成Smad2/3/4复合物, 进入细胞核对靶基因的转录进行调节^[23]. 此外, TGF- β 1还通过非Smad依赖的信号通路发挥作用, 包括ERK(extracellular-regulated kinase)途径、MAPK(mitogen-activated protein kinase)途径、Rho GTP酶(ras homologous oncogenes-like guanosine triphosphate phosphohydrolase)途径、NF- κ B(nuclear factor kappa B)途径以及PI3K/AKT(phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B)通路等^[9,24,25].

1.2.3 TGF- β 1辅助性受体在TGF- β 1信号通路中的作用: CD105分膜结合性和可溶性endoglin两种. 膜结合性endoglin由658个氨基酸组成, 是分子量为180 kDa的同型二聚体结构, 包括胞外区域、跨膜区域及胞质区域3个部分^[1]. 此外, 根据胞内区域的大小可将endoglin分为L-endoglin和S-endoglin, 两种亚型的区别在于前者胞内部分有47个氨基酸残基, 而后者仅有14个^[26]. 在大多数组织中, L-endoglin亚型是endoglin的主要存在形式, 其胞内部分含有多个丝氨酸/苏氨酸残基, 可与TGFBR I-TGFBR II受体复合物结合而被激活, 在血管形成及血管重塑方面起重要作用. 在激活的肿瘤血管上皮细胞中, endoglin的表达含量显著升高, 对肿瘤血管的生成起促进作用, 因此有人认为其可作为分析血管的生成或者作

为肿瘤微血管密度(microvessel density, MVD)标志物^[27]. 此外, endoglin在肿瘤细胞的增殖、黏附及迁徙等方面也起到一定作用^[28]. 但是, endoglin对肿瘤的调节作用具体机制尚不清楚, 可能是通过TGF- β 依赖性信号通路, 也可能是通过尚不完全清楚的非TGF- β 依赖性信号通路而发挥作用^[27]. 可溶性endoglin是膜结合性endoglin胞外部分被蛋白酶水解后得到的游离片段, 他可与TGF- β 超家族的多种配体结合并阻断配体与功能受体的有效结合, 从而对TGF- β 信号通路抑制肿瘤血管生成的功能起到负向调节作用^[29]. 肝癌是一种富含血管的肿瘤, 研究发现肝癌组织中CD105在mRNA和蛋白水平都明显高于正常肝组织, 因此, CD105不但可以充当肝癌血管生成的生物标志物还可以作为肝癌血管生成方面的基因治疗靶点^[30].

β -多糖是TGFBR III的另一种重要形式, 其基因定位在1p31-32, 包括16个外显子和2个启动子^[31]. 作为辅助性受体, β -多糖可直接与TGF- β 1-3结合, 并且提高TGF- β 1与TGFBR II的亲和力, 从而激活Smad依赖性信号通路. 然而, 最近研究表明, 在TGFBR II缺失的情况下, TGF- β 2也可通过TGFBR III/TGFBR I复合物激活非Smad依赖性的TRAF6/TAK1/p38-MAPK信号通路, 进而抑制神经嵴起源的细胞增殖, 从而导致腭裂的发生^[32]. 基于 β -多糖在TGF- β 1信号通路中的功能以及在肿瘤生物学上的监视上皮表型变化、抑制肿瘤和转移等作用, β -多糖通常被认为是一种肿瘤抑制因子^[31]. 目前尚无关于TGFBR III突变的报道, 但是在某些恶性肿瘤中发现有TGFBR III区域的染色体丢失.

2 TGF- β 1及TGFBR II在肝癌中的作用

2.1 TGF- β 1在肝癌中的作用 肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是一种富含血管的实体性肿瘤, 全世界每年约有75万新发肝癌患者, 并约有70万患者死于肝癌^[33]. 肝癌的发生是一种多因素、多环节的复杂病理过程, 多种细胞因子及信号通路可相互作用在肝癌的发生发展中发挥重要作用. 肝癌的治疗受到很大限制, 仅30%的患者可以接受手术切除和肝脏移植等有效治疗手段, 即便如此, 这部分患者的5年复发率也高达60%-70%^[34]. 因此, 寻求其他有效的分子水平的治疗方法成为肝癌研究的新重点. 研究表明, TGF- β 1在多种实体肿瘤晚期如肝癌^[18], 肺腺癌^[35]、结肠癌^[36]、乳腺癌^[3]等表达量上升, 通

■创新盘点

本文就TGF- β 1及其受体的结构、功能以及在肝癌方面的研究进行综述, 比较全面地阐述TGF- β 1信号通路的跨膜转导机制以及其在肝癌发生发展中的作用.

■应用要点

本文总结了TGF- β 1及多种受体的结构和功能,并阐述近年来其在肝癌方面的研究进展,使读者对TGF- β 1信号通路有一个基础了解,对今后研究TGF- β 1信号通路在肿瘤方面的作用机制有一定指导作用。

过作用于肿瘤细胞本身、局部免疫细胞、肿瘤基质细胞或者肿瘤血管可能是TGF- β 1发挥肿瘤调节作用的主要途径。在正常肝组织中, TGF- β 1由间质细胞合成分泌,然而在病理条件下肝癌细胞也可以表达TGF- β 1,从而导致TGF- β 1的异常升高^[37]。TGF- β 1信号通路的异常改变在肝癌中较为常见, TGF- β 1在40%的肝癌中过度表达^[12]。用2 ng/mL TGF- β 1处理肝癌细胞系HepG2和Huh7, 48 h后增殖细胞核抗原PCNA显著下降,而Caspase3、细胞色素C则明显升高,并且IFN- α 2b可增强此效应,说明TGF- β 1/Smad信号通路可抑制肿瘤细胞增殖,促进肿瘤细胞凋亡^[23]。另有研究发现, CD4+CD25+T细胞(Treg细胞)与肝癌的恶性进展密切相关,在肝癌患者体内Treg细胞数量升高,并且肿瘤微环境中Treg细胞数量明显高于外周血^[38,39]。Treg细胞具有潜在免疫调节作用,在免疫耐受调节中起重要作用: Treg含量不足可引起自身免疫性疾病,然而过多Treg细胞则破坏机体抗菌抗肿瘤等免疫反应^[40]。FoxP3(叉头型转录因子3)对于Treg细胞功能和产生起着关键性的作用,然而TGF- β 1/Smad信号通路又是调节FoxP3转录表达的重要途径之一,因此, TGF- β 1/Smad途径对Treg细胞功能的维持不可或缺。近来的研究也表明, TGF- β 1可刺激CD4+T细胞向CD4+CD25+Treg细胞转化并维持其功能, TGF- β 1通过促进Treg细胞的产生从而抑制机体的抗肿瘤免疫反应,导致肿瘤的恶性进展^[38,39,41]。因此,肝癌患者体内缺少有效的抗肿瘤免疫不是因为机体免疫能力低下,可能是由于在TGF- β 1的存在下,肝癌相关抗原刺激CD4+T细胞向CD4+CD25+ Treg细胞转化而抑制抗肿瘤免疫的缘故。

TGF- β 1也可以作用于肿瘤细胞及基质细胞从而促进肿瘤的发生和发展:一方面, TGF- β 1可刺激肿瘤细胞自身分泌有丝分裂因子而促进肿瘤的增殖生长;另一方面,他还可通过诱导上皮-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)过程而促进肿瘤的转移和侵袭^[27,42]。在EMT过程中,上皮细胞逐渐失去细胞极性和细胞间的黏附性,并且获得运动和侵袭的能力,这一过程在纤维化疾病及恶性肿瘤的发生发展中起重要作用^[27,43]。此外,在TGF- β 的3种亚型中, TGF- β 1是血管壁重建过程中的重要细胞因子之一^[44,45]。因此, TGF- β 1对于富含血管的肝癌的恶性进展也起到了非常重要的作用。

2.2 TGFBR II在肝癌中的作用 TGFBR II是

TGF- β 1信号转导过程中的重要组分,他的功能改变会显著影响TGF- β 1信号通路的功能发挥。TGFBR II在肝癌中的表达水平存在争议,有研究表明肝癌组织中TGFBR II含量与癌周正常肝组织没有差别^[46],但也有人认为他在37%-70%的肝癌中表达下降^[12]。运用免疫组织化学方法(IHC)检测肝癌组织病理切片发现TGFBR II在25%的患者体内表达下降,并且肝癌在这些患者中表现出低分化、高门静脉侵袭、高肝内转移以及无瘤生存期较短等特点^[18]。此外,酪氨酸激酶受体C(TrkC)可通过与TGFBR II结合而抑制TGF- β 1信号通路功能发挥,并促进肿瘤的发生、侵袭和转移^[47]。因此,认为TGFBR II的缺失或下调与肝癌的恶性转化及复发转移密切相关。此外, TGF- β 1信号通路对肿瘤的调节作用还取决于肿瘤的遗传背景,某些特殊基因的突变也可影响此信号通路的功能发挥^[12]。甲胎蛋白(alpha-fetoprotein, AFP)在70%以上的HCC患者体内含量上升,与HCC的发生发展以及转移复发关系密切,被广泛应用于临床作为肿瘤标志物。AFP是TGF- β 1信号通路的靶基因之一,研究表明AFP转录调节需要TGFBR II与p53共同存在,因此,即使TGFBR II表达正常, P53的缺失也会影响TGFBR II肿瘤抑制作用的发挥^[12,48,49]。在小鼠肝癌模型的研究中发现,在TGF- α 过表达的情况下, TGF- β 1信号通路对肿瘤的抑制作用主要体现在抑制细胞增殖,而促进细胞凋亡的作用并不明显^[50]。因此,在TGF- α 水平较高时, TGFBR II的表达缺失主要引起细胞的过度增殖而导致肝癌的发生。

3 结论

TGF- β 1在多种恶性肿瘤患者体内表达上调,尤其在肿瘤微环境中水平更高。一方面,可能是肿瘤细胞自身的细胞因子促进癌周组织释放TGF- β 1;另一方面,也可能是TGF- β 1的受体表达含量下降,下游信号转导受阻,转录调节功能缺失等原因导致机体反应性增加TGF- β 1的表达有关。TGFBR II在HCC中的表达水平尚存在争议,但是近期多项研究都表明, TGFBR II的下调对于肝癌的恶性进展以及复发转移有着密切关系。对于TGFBR II表达缺失引起HCC恶性进展的具体机制尚不明确,有学者认为在TGFBR II表达下降的HCC中,一种不依赖受体的TGF- β 通路JNK-SMAD3在肝癌的进展过程中起主导作用^[51],除此之外,是否有其他的通路参与此过程,

有待进一步研究。

TGF- β 1信号转导有多种途径, 涉及多种成分, 对于肿瘤的调节机制也及其复杂, 并且机体内各种信号通路形成强大的信号转导网络。通路间相互作用、相互影响, 从而对机体的生长发育和病理生理过程进行调节。因此, TGF- β 1信号通路并不是独立发挥作用的, 对于他的研究有待进一步完善, 从而为肿瘤的基因治疗提供理论依据。

4 参考文献

- Zakrzewski PK, Cygankiewicz AI, Mokrosiński J, Nowacka-Zawisza M, Semczuk A, Rechberger T, Krajewska WM. Expression of endoglin in primary endometrial cancer. *Oncology* 2011; 81: 243-250
- Guilloton F, Jean C, de Thonel A, Laurent G, Quillet-Mary A. Granzyme B induction signalling pathway in acute myeloid leukemia cell lines stimulated by tumor necrosis factor alpha and Fas ligand. *Cell Signal* 2007; 19: 1132-1140
- Moore-Smith L, Pasche B. TGFBR1 signaling and breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2011; 16: 89-95
- Zhong Z, Carroll KD, Policarpio D, Osborn C, Gregory M, Bassi R, Jimenez X, Prewett M, Liebisch G, Persaud K, Burtrum D, Wang S, Surguladze D, Ng S, Griffith H, Balderes P, Doody J, Schwartz JD, Yousoufian H, Rowinsky EK, Ludwig DL, Witte L, Zhu Z, Wu Y. Anti-transforming growth factor beta receptor II antibody has therapeutic efficacy against primary tumor growth and metastasis through multieffects on cancer, stroma, and immune cells. *Clin Cancer Res* 2010; 16: 1191-1205
- Lampropoulos P, Zizi-Sermpetzoglou A, Rizos S, Kostakis A, Nikiteas N, Papavassiliou AG. TGF-beta signalling in colon carcinogenesis. *Cancer Lett* 2012; 314: 1-7
- Lin HY, Wang XF, Ng-Eaton E, Weinberg RA, Lodish HF. Expression cloning of the TGF-beta type II receptor, a functional transmembrane serine/threonine kinase. *Cell* 1992; 68: 775-785
- Bissell DM, Roulot D, George J. Transforming growth factor beta and the liver. *Hepatology* 2001; 34: 859-867
- 王秀梅, 刘成敏, 张成仁, 谢晓华, 徐旭光, 王玲, 杨宝峰. TGF- β /Smads信号传导通路与肿瘤关系的研究. *现代肿瘤医学* 2009; 17: 1568-1571
- Caraci F, Spampinato S, Sortino MA, Bosco P, Battaglia G, Bruno V, Drago F, Nicoletti F, Copani A. Dysfunction of TGF- β 1 signaling in Alzheimer's disease: perspectives for neuroprotection. *Cell Tissue Res* 2012; 347: 291-301
- Chen Y, Yu G, Yu D, Zhu M. PKC α -induced drug resistance in pancreatic cancer cells is associated with transforming growth factor-beta1. *J Exp Clin Cancer Res* 2010; 29: 104
- Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signaling. *Nature* 2003; 425: 577-584
- Morris SM, Baek JY, Koszarek A, Kanngurn S, Knoblaugh SE, Grady WM. Transforming growth factor-beta signaling promotes hepatocarcinogenesis induced by p53 loss. *Hepatology* 2012; 55: 121-131
- Bierie B, Stover DG, Abel TW, Chytil A, Gorska AE, Aakre M, Forrester E, Yang L, Wagner KU, Moses HL. Transforming growth factor-beta regulates mammary carcinoma cell survival and interaction with the adjacent microenvironment. *Cancer Res* 2008; 68: 1809-1819
- Shi Y, Massagué J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 2003; 113: 685-700
- Bizet AA, Liu K, Tran-Khanh N, Saksena A, Vorstenbosch J, Finnson KW, Buschmann MD, Philip A. The TGF- β co-receptor, CD109, promotes internalization and degradation of TGF- β receptors. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1813: 742-753
- Caraci F, Battaglia G, Bruno V, Bosco P, Carbonaro V, Giuffrida ML, Drago F, Sortino MA, Nicoletti F, Copani A. TGF- β 1 pathway as a new target for neuroprotection in Alzheimer's disease. *CNS Neurosci Ther* 2011; 17: 237-249
- Yamamoto N, Imai J, Watanabe M, Hiroi N, Sugano S, Yoshino G. Restoration of transforming growth factor-beta type II receptor reduces tumorigenicity in the human adrenocortical carcinoma SW-13 cell line. *Horm Metab Res* 2006; 38: 159-166
- Mamiya T, Yamazaki K, Masugi Y, Mori T, Effendi K, Du W, Hibi T, Tanabe M, Ueda M, Takayama T, Sakamoto M. Reduced transforming growth factor-beta receptor II expression in hepatocellular carcinoma correlates with intrahepatic metastasis. *Lab Invest* 2010; 90: 1339-1345
- Mazzocca A, Fransvea E, Lavezzari G, Antonaci S, Giannelli G. Inhibition of transforming growth factor beta receptor I kinase blocks hepatocellular carcinoma growth through neo-angiogenesis regulation. *Hepatology* 2009; 50: 1140-1151
- Fransvea E, Mazzocca A, Santamato A, Azzariti A, Antonaci S, Giannelli G. Kinase activation profile associated with TGF- β -dependent migration of HCC cells: a preclinical study. *Cancer Chemother Pharmacol* 2011; 68: 79-86
- Fransvea E, Mazzocca A, Antonaci S, Giannelli G. Targeting transforming growth factor (TGF)-betaRI inhibits activation of beta1 integrin and blocks vascular invasion in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2009; 49: 839-850
- Li X, Liu B, Xiao J, Yuan Y, Ma J, Zhang Y. Roles of VEGF-C and Smad4 in the lymphangiogenesis, lymphatic metastasis, and prognosis in colon cancer. *J Gastrointest Surg* 2011; 15: 2001-2010
- Ceballos MP, Parody JP, Alvarez Mde L, Ingaramo PI, Carnovale CE, Carrillo MC. Interferon- α 2b and transforming growth factor- β 1 treatments on HCC cell lines: Are Wnt/ β -catenin pathway and Smads signaling connected in hepatocellular carcinoma? *Biochem Pharmacol* 2011; 82: 1682-1691
- Zhang YE. Non-Smad pathways in TGF-beta signaling. *Cell Res* 2009; 19: 128-139
- Li J, Wang J, Zou Y, Zhang Y, Long D, Lei L, Tan L, Ye R, Wang X, Zhao Z. The influence of delayed compressive stress on TGF- β 1-induced chondrogenic differentiation of rat BMSCs through Smad-dependent and Smad-independent pathways. *Biomaterials* 2012; 33: 8395-8405
- Pérez-Gómez E, Eleno N, López-Novoa JM, Ramirez JR, Velasco B, Letarte M, Bernabéu C, Quintanilla M. Characterization of murine S-endoglin isoform and its effects on tumor development. *Oncogene* 2005; 24: 4450-4461

■ 名词解释

Smad蛋白: 一种胞内信使, 可介导TGF- β 1信号从细胞膜受体到细胞核的传导。在细胞核内, 活化的smad蛋白可调节TGF- β 1信号通路的靶基因转录。至今, 已发现至少9种smad蛋白, 根据功能可分为活化型、共同通路型和抑制型3类。

■同行评价

论文选题很好, 有一定的新颖性, 组织结构也比较合理, 对读者有一定参考价值.

- 27 Pérez-Gómez E, Del Castillo G, Juan Francisco S, López-Novoa JM, Bernabéu C, Quintanilla M. The role of the TGF- β coreceptor endoglin in cancer. *Scientific World Journal* 2010; 10: 2367-2384
- 28 Fonsatti E, Nicolay HJ, Altomonte M, Covre A, Maio M. Targeting cancer vasculature via endoglin/CD105: a novel antibody-based diagnostic and therapeutic strategy in solid tumours. *Cardiovasc Res* 2010; 86: 12-19
- 29 Hawinkels LJ, Kuiper P, Wiercinska E, Verspaget HW, Liu Z, Pardali E, Sier CF, ten Dijke P. Matrix metalloproteinase-14 (MT1-MMP)-mediated endoglin shedding inhibits tumor angiogenesis. *Cancer Res* 2010; 70: 4141-4150
- 30 Yu D, Zhuang L, Sun X, Chen J, Yao Y, Meng K, Ding Y. Particular distribution and expression pattern of endoglin (CD105) in the liver of patients with hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer* 2007; 7: 122
- 31 Gatza CE, Oh SY, Blobe GC. Roles for the type III TGF-beta receptor in human cancer. *Cell Signal* 2010; 22: 1163-1174
- 32 Iwata J, Hacia JG, Suzuki A, Sanchez-Lara PA, Urata M, Chai Y. Modulation of noncanonical TGF- β signaling prevents cleft palate in Tgfr2 mutant mice. *J Clin Invest* 2012; 122: 873-885
- 33 Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011; 61: 69-90
- 34 Llovet JM. Updated treatment approach to hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol* 2005; 40: 225-235
- 35 Xu CC, Wu LM, Sun W, Zhang N, Chen WS, Fu XN. Effects of TGF- β signaling blockade on human A549 lung adenocarcinoma cell lines. *Mol Med Report* 2011; 4: 1007-1015
- 36 Liu XQ, Rajput A, Geng L, Ongchin M, Chaudhuri A, Wang J. Restoration of transforming growth factor-beta receptor II expression in colon cancer cells with microsatellite instability increases metastatic potential in vivo. *J Biol Chem* 2011; 286: 16082-16090
- 37 Rossmanith W, Schulte-Hermann R. Biology of transforming growth factor beta in hepatocarcinogenesis. *Microsc Res Tech* 2001; 52: 430-436
- 38 Feng X, Li B, Ye H, Long D. Increased frequency of CD4+CD25(high)FoxP3+ regulatory T cells in patients with hepatocellular carcinoma. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2011; 59: 309-314
- 39 Yang XH, Yamagiwa S, Ichida T, Matsuda Y, Sugahara S, Watanabe H, Sato Y, Abo T, Horwitz DA, Aoyagi Y. Increase of CD4+ CD25+ regulatory T-cells in the liver of patients with hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2006; 45: 254-262
- 40 Grant C, Oh U, Yao K, Yamano Y, Jacobson S. Dysregulation of TGF-beta signaling and regulatory and effector T-cell function in virus-induced neuro-inflammatory disease. *Blood* 2008; 111: 5601-5609
- 41 Thomas DA, Massagué J. TGF-beta directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance. *Cancer Cell* 2005; 8: 369-380
- 42 Giannelli G, Fransvea E, Marinosci F, Bergamini C, Colucci S, Schiraldi O, Antonaci S. Transforming growth factor-beta1 triggers hepatocellular carcinoma invasiveness via alpha3beta1 integrin. *Am J Pathol* 2002; 161: 183-193
- 43 Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 2009; 139: 871-890
- 44 Grainger DJ. Transforming growth factor beta and atherosclerosis: so far, so good for the protective cytokine hypothesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 399-404
- 45 Ji GZ, Wang XH, Miao L, Liu Z, Zhang P, Zhang FM, Yang JB. Role of transforming growth factor-beta1-smad signal transduction pathway in patients with hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 644-648
- 46 Abou-Shady M, Baer HU, Friess H, Berberat P, Zimmermann A, Graber H, Gold LI, Korc M, Büchler MW. Transforming growth factor betas and their signaling receptors in human hepatocellular carcinoma. *Am J Surg* 1999; 177: 209-215
- 47 Jin W, Yun C, Kwak MK, Kim TA, Kim SJ. TrkC binds to the type II TGF-beta receptor to suppress TGF-beta signaling. *Oncogene* 2007; 26: 7684-7691
- 48 Wilkinson DS, Tsai WW, Schumacher MA, Barton MC. Chromatin-bound p53 anchors activated Smads and the mSin3A corepressor to confer transforming-growth-factor-beta-mediated transcription repression. *Mol Cell Biol* 2008; 28: 1988-1998
- 49 Wilkinson DS, Ogden SK, Stratton SA, Piechan JL, Nguyen TT, Smulian GA, Barton MC. A direct intersection between p53 and transforming growth factor beta pathways targets chromatin modification and transcription repression of the alpha-fetoprotein gene. *Mol Cell Biol* 2005; 25: 1200-1212
- 50 Baek JY, Morris SM, Campbell J, Fausto N, Yeh MM, Grady WM. TGF-beta inactivation and TGF-alpha overexpression cooperate in an in vivo mouse model to induce hepatocellular carcinoma that recapitulates molecular features of human liver cancer. *Int J Cancer* 2010; 127: 1060-1071
- 51 Murata M, Matsuzaki K, Yoshida K, Sekimoto G, Tahashi Y, Mori S, Uemura Y, Sakaida N, Fujisawa J, Seki T, Kobayashi K, Yokote K, Koike K, Okazaki K. Hepatitis B virus X protein shifts human hepatic transforming growth factor (TGF)-beta signaling from tumor suppression to oncogenesis in early chronic hepatitis B. *Hepatology* 2009; 49: 1203-1217

编辑 翟欢欢 电编 鲁亚静

急性肝衰竭的综合治疗

宋传芳, 刘冰熔

宋传芳, 刘冰熔, 哈尔滨医科大学附属第二医院消化内科 黑龙江省哈尔滨市 150001

作者贡献分布: 本文综述由宋传芳完成; 刘冰熔负责审校。

通讯作者: 刘冰熔, 教授, 主任医师, 150001, 黑龙江省哈尔滨市南岗区学府路246号, 哈尔滨医科大学附属第二医院消化内科。songchuanfang1988@163.com

电话: 0451-866056562

收稿日期: 2012-09-22 修回日期: 2012-11-06

接受日期: 2012-11-15 在线出版日期: 2012-11-28

Combined therapy for acute hepatic failure

Chuan-Fang Song, Bing-Rong Liu

Chuan-Fang Song, Bing-Rong Liu, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China

Correspondence to: Bing-Rong Liu, Professor & Chief Physician, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China. songchuanfang1988@163.com

Received: 2012-09-22 Revised: 2012-11-06

Accepted: 2012-11-15 Published online: 2012-11-28

Abstract

Acute hepatic failure (AHF) is a devastating clinical syndrome characterized by rapid impairment of liver functions and development of encephalopathy, multiple organ failure, and in most cases cerebral edema. AHF has a high mortality rate. Although advances in drug treatment, artificial liver and liver transplantation have significantly improved the prognosis of AHF, there is still a lack of effective treatment for AHF because of its complicated etiopathogenesis, rapid progression and less clinical knowledge about managing the disease. There is an urgent need to develop effective treatments for AHF. This article aims to review recent advances in the treatment of AHF.

Key Words: Acute hepatic failure; Treatment; Antivirus; Artificial liver; Liver transplantation

Song CF, Liu BR. Combined therapy for acute hepatic failure. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(33): 3237-3243

摘要

急性肝衰竭(acute hepatic failure, AHF)是一种严重的临床综合征,其特征是肝功能损伤迅速、肝性脑病的发生、多器官衰竭及多数情况下脑水肿的出现,其病死率极高。目前药物治疗、人工肝和肝移植的快速发展,AHF治疗效果有明显提高,但是由于其病因复杂,病情进展迅速,临床研究较少,对于AHF的治疗一直缺乏有效的方案。因此,AHF的有效治疗仍是临床亟待解决的问题,本文就AHF的治疗做一综述。

关键词: 急性肝衰竭; 治疗; 抗病毒; 人工肝; 肝移植

宋传芳, 刘冰熔. 急性肝衰竭的综合治疗. 世界华人消化杂志 2012; 20(33): 3237-3243

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3237.asp>

0 引言

急性肝衰竭(acute hepatic failure, AHF)是指多种因素造成的肝脏损伤导致肝细胞大量坏死或功能丧失发生急性严重肝功能不全,引起以黄疸迅速加深、肝性脑病(hepatic encephalopathy, HE)、凝血功能障碍和腹水等为主要特征的临床综合征。目前国内对AHF多采用内科综合治疗,包括支持、抑制肝细胞坏死和促进肝细胞再生,去除病因、调节免疫功能和防治各种并发症等,但疗效并不满意。近年来国内外学者对AHF的治疗致力于人工肝支持系统及肝/干细胞移植的尝试,收到了一定的疗效。

1 重症监护与一般支持治疗

1.1 重症监护 AHF患者应置于重症监护病房,每天检查肝脏的大小、神志变化及其他生命体征。监测肝、肾功能、电解质、凝血酶原时间等指标。

1.2 营养支持 AHF患者一般存在严重的代谢异常,体内大量代谢产物蓄积导致胃肠道功能紊乱,肠道营养摄入困难,导致营养不良,患者呈显著的负氮平衡,能量储备耗竭,免疫功能低下,

■背景资料

急性肝衰竭(AHF)是指多种因素造成的肝脏损伤导致肝细胞大量坏死或功能丧失,发生急性严重肝功能不全,引起以黄疸迅速加深、肝性脑病、凝血功能障碍和腹水等为主要特征的临床综合征。目前,AHF的治疗仍是世界性的难题,对于众多治疗方案国内外学者意见不一致,故在国内外的肝病会议上AHF仍是重要的议题。

■同行评议者

郑素军, 副教授, 副主任医师, 首都医科大学附属北京佑安医院人工肝中心

■ 研发前沿

近年来多项研究表明人工肝支持系统及肝/干细胞移植可有效改善AHF患者生存质量。特别是肝/干细胞移植因具有相对细胞来源简单、移植技术简单、对受体危害小等优点而发展迅速,但其仍需进行更加严密的试验及增加病例数以进一步证明其有效性。

不利于肝恢复,早期积极合理的肠内营养支持能够增加肝衰竭患者的能量和氮摄入量,促进蛋白质合成,恢复氮平衡,降低感染率,促进肝脏修复,改善患者预后^[1,2]。由于肝糖原的储备减少、糖异生功能降低及高胰岛素血症等,患者往往容易出现低血糖。研究表明,在Child A级患者中蛋白质营养不良的发生率约为20%,而在C级患者中则超过60%^[3]。经口摄入营养较少是病死率升高的预测因素^[4,5]。总的来说,应保证肝衰竭患者104.60-125.52 kJ/(kg·dL)的能量供给,在患者不能耐受肠内营养时,及时给予肠外营养,以保证能量需求。

葡萄糖是肠外营养的首选供能物质,每日摄入葡萄糖100 g就能显著降低蛋白质分解。肝衰竭患者在应激状态下利用糖的能力很差,未被及时氧化可能引起或加重肝脏的脂肪变性;少数合并有糖尿病的患者过快、过量输入糖类可导致高血糖、糖尿,甚至高渗性非酮性昏迷。血糖较高的患者可给予适量的果糖代替葡萄糖,以减少胰岛素的用量^[6]。肝衰竭患者易应用支链氨基酸提供氮源。目前复方氨基酸液除标准配方外,又研制出高支链氨基酸,其特点为支链氨基酸(L-亮氨酸、L-异亮氨酸和L-缬氨酸)的浓度较高,占总氨基酸量的40%-50%,而芳香族氨基酸(AAA)(色氨酸、L-酪氨酸和苯丙氨酸)的浓度较低。由于高支链氨基酸是唯一可经外周代谢的氨基酸,增加其浓度并不增加肝脏负担,且可与芳香族氨基酸竞争性进入血脑屏障,用于肝功能衰竭和HE,但对其在AHF及合并严重感染等伴有严重分解代谢病例中的节氮效果,尚难确定是否优于标准配方^[7]。

2 病因治疗和发病机制的治疗

2.1 抗病毒治疗 在我国引起肝衰竭的主要病因是肝炎病毒感染,其中主要以乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)为常见。HBV相关性肝衰竭的发病机制十分复杂,至今未能完全阐明。目前认为主要是由于宿主免疫系统对HBV感染的过度应答(免疫亢进)^[8]。所以在早期进行有效地抗病毒治疗有助于改善HBV相关肝衰竭患者的生存率。我国肝衰竭诊疗指南和亚太肝病学会均推荐对于HBV相关的肝衰竭尽早应用核苷类似物进行抗病毒治疗。干扰素不适合用于肝衰竭患者的抗病毒治疗^[9-13]。目前应用于临床的核苷类似物主要有拉米夫定、阿德福韦酯、恩替

卡韦、替比夫定。替诺福韦和恩曲他汀还处于临床前期试验。

2.1.1 拉米夫定:拉米夫定是最先正式应用于临床治疗慢性乙型肝炎的口服核苷类药物。他的作用机制在于作为核苷(酸)类似物,与天然胞嘧啶核苷起竞争抑制作用,从而抑制HBV多聚酶反转录活性,使病毒反转录过程中止。但拉米夫定仅能阻断HBV DNA的反转录过程,而对HBV基因模板-共价闭合环状DNA(cccDNA)毫无影响,这是核苷(酸)类似物只能抑制而不能清除HBV的根本原因。拉米夫定主要缺点是长期使用易引起HBV DNA聚合酶酪氨酸-蛋氨酸-天冬氨酸-天冬氨酸变异导致耐药,有可能诱发肝衰竭/重型肝炎或使其加重^[14]。相关研究提示拉米夫定治疗并不能改善肝衰竭患者预后,经多因素分析表明影响肝衰竭患者预后的独立因素是血清总胆红素和凝血酶原活动度水平,但拉米夫定治疗可以持续改善存活患者的肝功能,并能延缓病情向肝硬化进展,因此具有远期效益。

2.1.2 阿德福韦酯:阿德福韦酯是腺嘌呤磷酸酯化合物阿德福韦的前药,在体内转化为阿德福韦发挥抗病毒作用。通过竞争脱氧腺苷三磷酸底物和终止病毒DNA链延长而抑制HBV DNA多聚酶或反转录酶是其发挥作用的主要机制^[15]。阿德福韦酯起效相对缓慢并可能具有肾毒性,所以在治疗HBV相关性肝衰竭中不作为抗病毒首选药物。近年来的研究表明,对于HBV相关性肝衰竭患者,拉米夫定联合阿德福韦酯具有协同抗病毒的作用,最大限度地降低了HBV的耐药性,有效地降低患者的病死率,是可应用的抗病毒的治疗方案^[16]。

2.1.3 恩替卡韦:恩替卡韦为鸟苷类似物,在体内转化为三磷酸盐活性成分,从3个环节(HBV聚合酶的启动、前基因组RNA反转录为负链DNA以及HBV DNA正链的合成)与三磷酸脱氧鸟嘌呤核苷竞争性抑制HBV的复制^[17]。近年来多项研究表明恩替卡韦能效强、快速抑制HBV复制且耐药发生率低。在治疗HBV相关性的肝衰竭中能改善肝功能和降低其病死率^[18,19]。

2.1.4 替比夫定:替比夫定是一种人工合成的天然脱氧胸腺嘧啶核苷对映体,可被细胞激酶磷酸化生成具有活性的三磷酸盐形式。替比夫定通过与天然底物脱氧胸腺嘧啶核苷竞争,掺入病毒DNA链中,导致DNA链延长终止,中断HBV的复制。其安全性和耐受性好,主要不良反应是

肌酸激酶升高^[20].

2.1.5 替诺福韦酯: 替诺福韦酯(tenofovir, TDF)美国FDA已批准将其应用于HBV感染者的治疗, 国内尚未上市. TDF在体内代谢后的产物是替诺福韦二磷酸可与5'-三磷酸脱氧腺苷酸竞争进入病毒DNA链, 导致DNA延长受阻, 进而阻断病毒的复制. 国外有研究报道TDF应用于HBV相关肝衰竭患者, 各项指标如HBV DNA、转氨酶、胆红素等得到明显改善, 降低了患者死亡率^[21].

目前对于HBV相关性肝衰竭的抗病毒治疗缺乏相关大标本的临床研究. 一般是在治疗过程中评估患者的整体病情及药物反应根据以往病毒性肝炎/肝硬化抗病毒的丰富经验选择抗病毒方案. 2012年ESAL版指南^[22]对于HBV肝硬化, 包括代偿性和失代偿性肝硬化的治疗推荐意见也进行了部分修改, 但指南仍然保留了干扰素和核苷(酸)类似物的推荐意见, 仍然推荐优先选择替诺福韦和恩替卡韦, 并提高推荐级别为A1. 同时还明确提出不推荐选用拉米夫定, 指南中还提出了代偿性肝硬化患者的停药指征, 如乙型肝炎e抗原(hepatitis B e antigen, HBeAg)阳性患者达到血清转换或HBeAg阳性和阴性患者达到HBsAg消失的患者在巩固治疗至少12 mo后可停药观察. 这和目前国内外指南所提的停药指征相同, 尽管如此, 在指南中强调了无论是否达到停药指征都应长期治疗, 并且这和我国指南提出的延长治疗, 减少复发的理念相似.

最近Zoulim和Locarnini^[23]专门论述了关于慢性HBV治疗失败的处理, 其中对恩替卡韦或替诺福韦治疗后部分病毒学应答患者提出的处理建议是更换或最好加用其他药物以达到HBV DNA在检测水平以下的目标.

2.2 药物性肝衰竭治疗 对于药物性肝衰竭治疗的关键是停用和防止再使用引起肝损伤的药物, 也应尽可能避免使用与致病药物在生化结构和/或药物作用属于同一类的药物, 仅给予必须的药物. 服了大剂量肝毒性药物的患者, 宜早期洗胃、导泻, 并加用吸附剂, 以清除胃肠内残留的药物, 可采取血液透析、利尿等措施, 以促进其排泄和清除. 对于过量服用对乙酰氨基酚的患者, 早期使用N-乙酰半胱氨酸(N-acetylcysteine, NAC)治疗, 肝衰竭的发生率明显低于晚期使用或不适用NAC治疗的患者^[24]. 异烟肼引起的肝损伤可应用大剂量维生素B6静脉点滴. 其他防治肝损伤药物的种类繁多, 但多数药物的治疗效果尚需进行循证医学研究评价. 非特异

解毒剂可选用NAC、还原型谷胱甘肽; 抗炎、抗脂质过氧化、调节免疫和稳定溶酶体可选用甘草酸制剂; 对药物所致的胆汁代谢障碍、淤胆可选用S-腺苷蛋氨酸、熊去氧胆酸; 减轻氧化应激和脂质过氧化反应, 稳定肝细胞膜性结构, 抑制细胞凋亡可选多烯磷脂酰胆碱. 除非怀疑有超敏反应或者肝内胆汁淤积, 否则不推荐使用皮质醇激素.

2.3 免疫调节治疗 α 1-胸腺素是一种人工合成的由28个氨基酸组成的多肽, 有多种生物学活性, 可增加Th1应答、促进淋巴细胞成熟、增加T细胞功能、增加NK细胞介导的细胞毒作用从而增强细胞抗感染能力. 肾上腺糖皮质激素的应用尚存在争议. 大多数学者主张AHF早期可以慎选中晚期肝衰竭则禁忌使用. 静脉用免疫球蛋白, 具有免疫替代和免疫调节的双重治疗作用, 对于预防和控制肝衰竭患者发生各类感染及减少炎症反应具有重要作用, 目前多推荐使用.

2.4 其他治疗 肝细胞生长因子、生长激素、胰岛素-胰高糖素疗法及前列腺素E1能够促进肝细胞再生, 减少肝细胞坏死. 口服乳果糖及使用改善微循环药物及抗氧化剂药如还原型谷胱甘肽、易善复和NAC, 能够调整肠道菌群, 抗内毒素治疗, 减少内毒素吸收.

3 并发症的防治

3.1 感染 肝衰竭患者由于机体免疫功能低下、肠道微生态失调及侵袭性操作较多等原因容易合并感染. 较常见的感染有肺感染、自发性腹膜炎和败血症等. 早期、有效、联合应用抗生素可有效控制感染并减少感染的发生率, 但患者的生存率未见明显提高, 故目前不推荐预防性常规使用抗生素. 对于发生感染概率较高的肝衰竭患者(如II/III HE、顽固的低血压或全身炎症反应综合征), 应根据经验性给予抗生素治疗^[25]. 在应用抗生素时要考虑到肝衰竭患者的高动力循环的血流动力学状态及胸腹水存在等特点.

3.2 HE HE的治疗原则主要包括: 积极的去除诱因如上消化道出血、严重感染、水电解质紊乱等, 限制蛋白摄入, 抑制肠道细菌可选用新霉素、甲硝唑等, 高位弱酸性液体灌肠或口服乳果糖. 视情况选择精氨酸、L-鸟氨酸门冬氨酸等降氨药物; 酌情应用支链氨基酸. 近年来研究表明左卡尼汀是机体脂肪代谢必需的辅助因子, 能促进脂肪酸氧化, 并促使脂肪转化为能量, 通

■ 相关报道

Pietrosi等收集并总结了全世界27例接受干细胞移植的肝衰竭患者的临床资料, 结果显示肝细胞移植中多数患者病情有不同程度的改善. Stutchfield等收集并总结了在9个研究中心进行干细胞移植的53例患者的情况, 患者通过外周静脉、门静脉或肝动脉进行干细胞移植, 对其进行随访3-18 mo后, 发现MELD评分、Child-Pugh评分、血清胆红素、血清白蛋白和国际标准化比值均有明显改善.

■创新盘点

本文综述了近几年来国内外对AHF的一般支持及治疗方法,发现人工支持系统及肝/干细胞移植可有效地改善患者预后,从而为治疗AHF寻找到了新的方向。

过加强代谢能量的产生来降低血氨和促进尿素的生成,并为肝细胞修复和再生提供所需要的能量,有效改善肝脏的脂质代谢、减少脂肪的沉积,对肝衰竭的患者有一定的治疗价值^[26-29]。

3.3 脑水肿 目前研究表明肝衰竭并发脑水肿是由多因素造成,并与HE的发病密切相关。体内氨触发了星形胶质细胞聚集谷氨酰胺,导致渗透物的代偿性缺失形成细胞毒性水肿引发脑水肿^[30,31]。

根据上述原理降血氨控制HE是治疗脑水肿的基础。口服乳果糖或弱酸液灌肠清洁肠道,可降低氨在肠道的吸收从而减少脑水肿的发生^[32]。有动物实验研究发现,L-鸟氨酸苯乙酸盐可降低血氨水平,进而缓解颅内高压^[33]。米诺环素具有抗氧化、减少ALF脑并发症的作用^[34]。有关低温疗法治疗脑水肿或颅内高压的报道较多^[35],适度降低体温可有效降低颅内压,使脑血流恢复自我调节能力,而且可能通过抑制氧化应激反应来缓解肝损伤^[36-40]。

3.4 出血 上消化道出血是AHF后期较常见的并发症,起病急,死亡率高,且一般发生上消化道出血后肝损害均有不同程度的加重,易诱发腹水、HE、肝肾综合征(hepatorenal syndrome, HRS)、电解质紊乱等提示预后差。一般AHF患者预防性给予H₂受体拮抗剂或质子泵抑制剂以预防应急状况下的酸相关胃肠道出血^[41]。

3.5 HRS 在对HRS病理生理机制认识的基础上,近年来大多采用血管活性药物(特利加压素、血管加压素、去甲肾上腺素或奥曲肽等)联合血浆扩容(多采用人血白蛋白)进行治疗HRS以肾血管收缩为特点^[42],却采用血管收缩剂治疗,这似乎是矛盾的。但其合理性在于HRS发病初期内脏血管扩张,激活了内源性血管收缩物质。此外,肝衰竭患者常存在有效血容量不足,导致肾灌注不足。因此,液体复苏在早期HRS的治疗中非常重要。但应注意的是,过多的液体可引起脑水肿及肺水肿,伴有严重低蛋白血症的肝衰竭患者更易发生此类情况^[43]。持续血液净化技术的应用,已在治疗危重症方面取得了显著疗效。对于急性肾衰竭,早期应用肾脏替代治疗有利于防止出现严重的电解质紊乱、酸中毒及液体过多等并发症。目前研究表明,持续性血液滤过优于间断滤过^[44]。

4 人工肝支持治疗

人工肝支持治疗(artificial liver support system,

ALSS)可有效地清除血液中的毒素,适当补充凝血因子、白蛋白等物质,保持内环境平衡,为肝细胞再生营造良好的环境;患者通过ALSS治疗,能延长其生存时间,提高其接受肝移植的几率。有关人工肝的研究证实人工肝治疗可使患者死亡率降低,改善患者生存质量^[45-48]。

人工肝分为非生物型、生物型和混合型。非生物型人工肝包括血浆置换、血液灌流、血液滤过、血液透析、连续性血液透析滤过、血液透析吸附、血浆滤过透析、血浆胆红素吸附等。依据临床具体情况选择合适的方法。上述方法单用或联合应用:重型肝炎伴有HE时,可选用血浆置换和血液灌流联合;伴有肾功能衰竭时,选用连续性血液透析滤过联合血浆置换或血浆滤过透析;伴有高胆红素血症时,选用血浆胆红素吸附联合血浆滤过透析;伴有水电解质紊乱时,选用连续性血液透析滤过联合血浆置换或血液透析吸附;有时可选择3种以上方法联合使用。目前非生物人工肝技术已经比较成熟,但替代肝脏功能目前仍不够全面。除了以上组合应用之外,治疗条件、模式的优化是今后的研究方向,目的是为了取得最佳的疗效,并适用于不同的个体。与非生物型人工肝临床应用日益普遍相比,生物型人工肝(bioartificial liver, BAL)进展缓慢,尤其在临床方面。从目前国内外主要的BAL临床试验研究的结果来看,经过半个世纪的不断努力,BAL已经越来越接近于临床应用。总体来说,虽然只有HepatAssist和ELAD BAL显示了一定程度的改善预后的作用,但大多数人工肝都能不同程度地改善患者的神经系统功能、血氨和胆红素等生化指标,并协助患者过渡到肝移植。在安全性方面,只有ELAD、BLSS、HepatAssist、AMC-BAL 4种生物人工肝在治疗中曾出现一过性低血压,均在补液和升压药物治疗后好转,没有发现其他严重的不良反应。令人担心的异源性肝细胞引起动物源性疾病和永生化细胞株引起人体肿瘤等问题没有成为现实,患者对治疗的耐受性良好。目前ELAD-BAL已进行到治疗后3年的随访,治疗组并没有显示出致癌性的增加,同时治疗组3年的无肝移植生存率高于对照组^[49]。混合型人工肝一直被认为是今后人工肝领域的重要发展方向,其今后的发展令人瞩目。

5 肝移植及肝/干细胞移植

肝衰竭患者肝脏移植术后近期存活率已达90%

以上, 5年存活率接近80%^[50]. 急性肝功能衰竭进行急诊肝移植的适应证如下(综合London和Clichy标准)^[4,51]: 一是扑热息痛引起的AHF, 若动脉血pH[7.3(不管脑病分期)]或III、IV期HE伴有PT>100 s和血清肌酐>300 pmol/L者; 二是非扑热息痛引起的AHF, 不管脑病分期, 若PT>100 s, 或下列5项中具备任何3项者, 宜作肝移植: (1)年龄<10岁或>40岁; (2)病因是丙型肝炎、氟烷诱发的肝炎或特异体质药物反应; (3)脑病开始前黄疸持续时间>7 d; (4)PT>50 s; (5)血清胆红素>300 μmol/L; 三是病毒性肝炎, 出现昏迷或精神错乱, 凝血因子V<20%(<30岁); 或凝血因子V<30%(>30岁)^[51,52]. 但由于供体器官的紧缺, 在等待供体器官的过程中很多患者发生死亡. 移植肝细胞能在受体内提供有效的肝功能, 促进自身肝细胞再生, 延长患者等待供体器官的时间. 甚至是可以代替肝移植治疗肝衰竭有效手段^[53]. Pietrosi等^[54]收集并总结了全世界27例接受干细胞移植的肝衰竭患者的临床资料, 结果表明肝细胞移植中多数患者病情有不同程度的改善. Stutchfield等^[55]收集并总结了在9个研究中心进行干细胞移植的53例患者的情况, 患者通过外周静脉、门静脉或肝动脉进行干细胞移植, 对其进行随访3-18 mo后, 可发现MELD评分、Child-Pugh评分、血清胆红素、血清白蛋白和国际标准化比值均有了明显改善. 目前多项试验研究表明肝/干细胞移植治疗肝衰竭具有细胞来源广、移植技术简单、对受体危害小等优点, 但其仍需进行更加严密的试验及增加病例数以进一步证明其有效性.

6 结论

AHF是一种凶险的临床综合征, 尽管AHF治疗一直是国内外会议及研究的热点, 但至今未能找到特效的治疗办法. 近年来随着人工肝和肝/干细胞移植的研究和发展, 人工肝及肝/干细胞移植逐渐登上AHF治疗的舞台, 但是使人工肝及肝/干细胞移植替代肝功能具有更加全面性、针对性、普遍性、安全性仍是今后研究的重点和难点. 就目前国内外AHF治疗的研究发展来看, 寻找治疗AHF的有效方法仍任重而道远.

7 参考文献

- 1 Wiles A, Woodward JM. Recent advances in the management of intestinal failure-associated liver disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2009; 12: 265-272
- 2 Cottrell DB, Asturi E. Gastric intubation: assess-

- ment and intervention. *Crit Care Nurs Clin North Am* 2004; 16: 489-493
- 3 O'Brien A, Williams R. Nutrition in end-stage liver disease: principles and practice. *Gastroenterology* 2008; 134: 1729-1740
- 4 Cabre E, Gonzalez-Huix F, Abad-Lacruz A, Esteve M, Acero D, Fernandez-Bañares F, Xiol X, Gassull MA. Effect of total enteral nutrition on the short-term outcome of severely malnourished cirrhotics. A randomized controlled trial. *Gastroenterology* 1990; 98: 715-720
- 5 Kondrup J, Müller MJ. Energy and protein requirements of patients with chronic liver disease. *J Hepatol* 1997; 27: 239-247
- 6 Chen SS, Santomango TS, Williams PE, Lacy DB, McGuinness OP. Glucagon-mediated impairments in hepatic and peripheral tissue nutrient disposal are not aggravated by increased lipid availability. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009; 296: E1172-E1178
- 7 Satyanarayana A, Klarmann KD, Gavrilova O, Keller JR. Ablation of the transcriptional regulator Id1 enhances energy expenditure, increases insulin sensitivity, and protects against age and diet induced insulin resistance, and hepatosteatosis. *FASEB J* 2012; 26: 309-323
- 8 陈国民, 袁平戈. 乙型肝炎病毒致病机制新概念. *现代医药卫生* 2007; 23: 1581
- 9 Sarin SK, Kumar A, Almeida JA, Chawla YK, Fan ST, Garg H, de Silva HJ, Hamid SS, Jalan R, Komolmit P, Lau GK, Liu Q, Madan K, Mohamed R, Ning Q, Rahman S, Rastogi A, Riordan SM, Sakhuja P, Samuel D, Shah S, Sharma BC, Sharma P, Takikawa Y, Thapa BR, Wai CT, Yuen MF. Acute-on-chronic liver failure: consensus recommendations of the Asian Pacific Association for the study of the liver (APASL). *Hepatol Int* 2009; 3: 269-282
- 10 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
- 11 Miyake Y, Iwasaki Y, Takaki A, Fujioka S, Takaguchi K, Ikeda H, Kobashi H, Sakaguchi K, Shiratori Y. Lamivudine treatment improves the prognosis of fulminant hepatitis B. *Intern Med* 2008; 47: 1293-1299
- 12 Tillmann HL, Hadem J, Leifeld L, Zachou K, Canbay A, Eisenbach C, Graziadei I, Encke J, Schmidt H, Vogel W, Schneider A, Spengler U, Gerken G, Dalekos GN, Wedemeyer H, Manns MP. Safety and efficacy of lamivudine in patients with severe acute or fulminant hepatitis B, a multicenter experience. *J Viral Hepat* 2006; 13: 256-263
- 13 Yu JW, Sun LJ, Zhao YH, Kang P, Li SC. The study of efficacy of lamivudine in patients with severe acute hepatitis B. *Dig Dis Sci* 2010; 55: 775-783
- 14 Thompson AJ, Ayres A, Yuen L, Bartholomeusz A, Bowden DS, Iser DM, Chen RY, Demediuk B, Shaw G, Bell SJ, Watson KJ, Locarnini SA, Desmond PV. Lamivudine resistance in patients with chronic hepatitis B: role of clinical and virological factors. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22: 1078-1085
- 15 裕海明, 王儒强. 阿德福韦酯国内研究进展. *安徽医药* 2008; 12: 1098-1099
- 16 邓艳, 陈芳, 李雷, 夏杰, 黄辉煌, 闫大伟, 孙李建. 拉米夫定联合阿德福韦酯治疗肝衰竭疗效观察. *人民军医* 2012; 55: 981-982
- 17 Palumbo E. Entecavir for chronic hepatitis B: a review. *Ther Drug Monit* 2008; 30: 1-4

■应用要点

随着近年来AHF发病率的增高, 作为治疗AHF的有效办法肝移植的需求逐年增高, 而供体器官紧缺限制了AHF治疗的发展. 随着对肝/干细胞移植研究的深入, 使细胞移植技术逐渐成熟, 拓宽了治疗AHF的道路, 也为患者带了福音.

■名词解释

人工肝支持系统: 通过借助体外的机械、化学或生物性装置, 暂时辅助或代替肝脏的功能, 清除各种有害物质, 从而协助治疗肝功能不全、肝衰竭或相关疾病的方法。

- 18 Jochum C, Gieseler RK, Gawlista I, Fiedler A, Man-
ka P, Saner FH, Roggendorf M, Gerken G, Canbay
A. Hepatitis B-associated acute liver failure: im-
mediate treatment with entecavir inhibits hepatitis B
virus replication and potentially its sequelae. *Digestion*
2009; 80: 235-240
- 19 赵红, 王桂爽, 谢雯, 闫杰, 王艳斌, 程丹颖, 欧蔚妮, 冯
亮, 成军. 恩替卡韦治疗慢性乙型肝炎肝衰竭的疗效
观察. 中华实验和临床感染病杂志(电子版) 2011; 5:
188-194
- 20 Amarapurkar DN. Telbivudine: a new treatment for
chronic hepatitis B. *World J Gastroenterol* 2007; 13:
6150-6155
- 21 Garg H, Sarin SK, Kumar M, Garg V, Sharma BC,
Kumar A. Tenofovir improves the outcome in pa-
tients with spontaneous reactivation of hepatitis B
presenting as acute-on-chronic liver failure. *Hepato-
logy* 2011; 53: 774-780
- 22 European Association For The Study Of The Liver.
EASL clinical practice guidelines: Management of
chronic hepatitis B virus infection. *J Hepatol* 2012;
57: 167-185
- 23 Zoulim F, Locarnini S. Management of treatment
failure in chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2012; 56
Suppl 1: S112-S122
- 24 Whyte IM, Francis B, Dawson AH. Safety and
efficacy of intravenous N-acetylcysteine for acet-
aminophen overdose: analysis of the Hunter Area
Toxicology Service (HATS) database. *Curr Med Res
Opin* 2007; 23: 2359-2368
- 25 Stravitz RT, Kramer AH, Davern T, Shaikh AO,
Caldwell SH, Mehta RL, Blei AT, Fontana RJ, Mc-
Guire BM, Rossaro L, Smith AD, Lee WM. Intensive
care of patients with acute liver failure: recom-
mendations of the U.S. Acute Liver Failure Study
Group. *Crit Care Med* 2007; 35: 2498-2508
- 26 陈静, 尹定丛. 左卡尼汀的临床应用进展. 中国医药导
报 2010; 7: 9-10
- 27 贾梦山. 酒精性肝病70例临床诊治分析. 中国医药导
报 2009; 6: 42
- 28 刘震, 沈洪亮, 张建表. 水飞蓟素与左卡尼汀对非酒
精性脂肪性肝病的临床研究. 中国当代医药 2009; 16:
19-20
- 29 尹海平. 左卡尼汀治疗老年冠心病心衰的疗效观察.
中国现代医生 2010; 48: 73-93
- 30 Detry O, De Roover A, Honore P, Meurisse M. Brain
edema and intracranial hypertension in fulminant
hepatic failure: pathophysiology and management.
World J Gastroenterol 2006; 12: 7405-7412
- 31 Raghavan M, Marik PE. Therapy of intracranial
hypertension in patients with fulminant hepatic
failure. *Neurocrit Care* 2006; 4: 179-189
- 32 Stravitz RT, Kramer DJ. Management of acute liver
failure. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2009; 6: 542-553
- 33 Ytrebø LM, Kristiansen RG, Maehre H, Fuskevåg
OM, Kalstad T, Revhaug A, Cobos MJ, Jalan R, Rose
CF. L-ornithine phenylacetate attenuates increased
arterial and extracellular brain ammonia and pre-
vents intracranial hypertension in pigs with acute
liver failure. *Hepatology* 2009; 50: 165-174
- 34 Jiang W, Desjardins P, Butterworth RF. Minocycline
attenuates oxidative/nitrosative stress and cerebral
complications of acute liver failure in rats. *Neuro-
chem Int* 2009; 55: 601-605
- 35 Jalan R, Rose C. Hypothermia in acute liver failure.
Metab Brain Dis 2004; 19: 215-221
- 36 Stravitz RT, Larsen FS. Therapeutic hypothermia for
acute liver failure. *Crit Care Med* 2009; 37: S258-S264
- 37 Jiang W, Desjardins P, Butterworth RF. Hypother-
mia attenuates oxidative/nitrosative stress, enceph-
alopathy and brain edema in acute (ischemic) liver
failure. *Neurochem Int* 2009; 55: 124-128
- 38 Stravitz RT, Lee WM, Kramer AH, Kramer DJ,
Hynan L, Blei AT. Therapeutic hypothermia for
acute liver failure: toward a randomized, controlled
trial in patients with advanced hepatic enceph-
alopathy. *Neurocrit Care* 2008; 9: 90-96
- 39 Vaquero J, Butterworth RF. Mild hypothermia for
the treatment of acute liver failure--what are we
waiting for? *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*
2007; 4: 528-529
- 40 Dmello D, Cruz-Flores S, Matuschak GM. Moderate
hypothermia with intracranial pressure monitor-
ing as a therapeutic paradigm for the management
of acute liver failure: a systematic review. *Intensive
Care Med* 2010; 36: 210-213
- 41 刘晓峰, 孙自勤. 美国肝病研究学会(AASLD)急性肝衰
竭诊治指南(2011更新版)简介. 医学与哲学 2012; 33:
20-22
- 42 Mackelaite L, Alsaukas ZC, Ranganna K. Renal
failure in patients with cirrhosis. *Med Clin North Am*
2009; 93: 855-869, viii
- 43 Canabal JM, Kramer DJ. Management of sepsis in
patients with liver failure. *Curr Opin Crit Care* 2008;
14: 189-197
- 44 Auzinger G, Wendon J. Intensive care management
of acute liver failure. *Curr Opin Crit Care* 2008; 14:
179-188
- 45 Kjaergard LL, Liu J, Als-Nielsen B, Gluud C. Artifi-
cial and bioartificial support systems for acute and
acute-on-chronic liver failure: a systematic review.
JAMA 2003; 289: 217-222
- 46 Patzer II JF, Lopez RC, Zhu Y, Wang ZF, Mazar-
iegos GV, Fung JJ. Bioartificial liver assist devices in
support of patients with liver failure. *Hepatobiliary
Pancreat Dis Int* 2002; 1: 18-25
- 47 Abe T, Kobata H, Hanba Y, Kitabata Y, Narukawa N,
Hasegawa H, Abe T, Fukagawa M. Study of plasma
exchange for liver failure: beneficial and harmful
effects. *Ther Apher Dial* 2004; 8: 180-184
- 48 Demetriou AA, Brown RS, Busuttill RW, Fair J,
McGuire BM, Rosenthal P, Am Esch JS, Lerut J, Ny-
berg SL, Salizzoni M, Fagan EA, de Hemptinne B,
Broelsch CE, Muraca M, Salmeron JM, Rabkin JM,
Metselaar HJ, Pratt D, De La Mata M, McChesney
LP, Everson GT, Lavin PT, Stevens AC, Pitkin Z,
Solomon BA. Prospective, randomized, multicenter,
controlled trial of a bioartificial liver in treating
acute liver failure. *Ann Surg* 2004; 239: 660-667; dis-
cussion 660-667
- 49 段忠平, 陈煜. 肝衰竭诊疗: 进展与展望. 临床肝胆病
杂志 2012; 28: 721-725
- 50 彭志海, 邢同海, 戴德坚, 陈国庆, 徐军明, 钟林, 李涛,
孙星, 王书云, 王兆文. 肝移植治疗急性肝功能衰竭的
临床疗效分析. 中华医学杂志 2007; 87: 953-955
- 51 Paar WD, Müller A, Spengler U, Fischer HP,
Hertfelder HJ, Hirner A, Sauerbruch T. [Prog-
ress of acute liver failure and indications for liver
transplantation]. *Dtsch Med Wochenschr* 1998; 123:
549-555
- 52 茹素娟. 暴发性肝功能衰竭的原位肝移植. 国外医学:
消化系统分册 1995; 15: 212
- 53 Dhawan A, Puppi J, Hughes RD, Mitry RR. Hu-
man hepatocyte transplantation: current experience

and future challenges. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2010; 7: 288-298

54 Pietrosi G, Vizzini GB, Gruttadauria S, Gridelli B. Clinical applications of hepatocyte transplantation.

World J Gastroenterol 2009; 15: 2074-2077

55 Stutchfield BM, Forbes SJ, Wigmore SJ. Prospects for stem cell transplantation in the treatment of hepatic disease. *Liver Transpl* 2010; 16: 827-836

编辑 翟欢欢 电编 鲁亚静

■同行评价
本文选题好, 符合当前研究热点, 思路清晰, 对AHF临床治疗有一定参考意义。

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 •

百世登出版集团推出 12 种开放获取生物医学期刊全部被 PubMed 和 PMC 收录

本刊讯 由美国国立医学图书馆(U.S. National Library of Medicine, 简称NLM), 美国国立生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, 简称NCBI)和美国国立卫生研究院(National Institutes of Health, 简称NIH), 共同于2010-2011年, 收录了百世登出版集团有限公司(Baishideng Publishing Group Co., Limited, 简称BPG)出版的12种开放获取生物医学期刊. 12种期刊被NLM, NCBI和NIH共同主办的PubMed Central和PubMed平台, 公开面向全球发布, 读者免费阅读和下载全文. 12种期刊被收录的名称及网址如下:

- 1 World Journal of Biological Chemistry (世界生物化学杂志)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/1495/>
- 2 World Journal of Cardiology (世界心脏病学杂志)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/1320/>
- 3 World Journal of Clinical Oncology (世界临床肿瘤学杂志)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/1494/>
- 4 World Journal of Diabetes (世界糖尿病杂志)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/1498/>
- 5 World Journal of Gastrointestinal Endoscopy (世界胃肠内镜杂志)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/1323/>
- 6 World Journal of Gastrointestinal Oncology (世界胃肠肿瘤学杂志)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/1324/>
- 7 World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology (世界胃肠病理生理学杂志)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/1496/>
- 8 World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics (世界胃肠药理学与治疗杂志)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/1497/>
- 9 World Journal of Gastrointestinal Surgery (世界胃肠外科杂志)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/1325/>
- 10 World Journal of Hepatology (世界肝病学杂志)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/1321/>
- 11 World Journal of Radiology (世界放射学杂志)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/1322/>
- 12 World Journal of Stem Cells (世界干细胞杂志)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/1470/>

(总编辑: 马连生2011-05-30)

离体消化法分离原代肝星状细胞

樊文梅, 刘德忠, 肖漓, 马锡慧, 石炳毅

■背景资料

肝星状细胞(HSCs)是肝纤维化发生发展的中心环节, 然而其分离步骤繁琐、条件严格, 初学者不易获得成功, 作者参考中外文献, 经过多次实验, 摸索出一套稳定、经济的分离方法。

樊文梅, 肖漓, 马锡慧, 石炳毅, 中国人民解放军第三零九医院器官移植研究所 北京市 100091

刘德忠, 中国人民解放军第二炮兵总医院泌尿外科 北京市 100091

樊文梅, 博士, 主要从事肝纤维化方面的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30800509

北京市科技专项2011阶梯计划基金资助项目, No. Z111102055311086

作者贡献分布: 本课题由樊文梅与石炳毅设计; 研究过程由樊文梅、刘德忠、肖漓及马锡慧完成; 本论文写作由樊文梅与石炳毅完成。

通讯作者: 石炳毅, 教授, 100091, 北京市海淀区黑山扈路甲17号, 中国人民解放军第三零九医院器官移植研究所。

shibingyi@medmail.com.cn

电话: 010-66775188

收稿日期: 2012-09-20 修回日期: 2012-11-05

接受日期: 2012-11-07 在线出版日期: 2012-11-28

Isolation of hepatic stellate cells by *in vitro* digestion

Wen-Mei Fan, De-Zhong Liu, Li Xiao, Xi-Hui Ma, Bing-Yi Shi

Wen-Mei Fan, Li Xiao, Xi-Hui Ma, Bing-Yi Shi, Institute of Organ Transplantation, the 309th Hospital of Chinese PLA, Beijing 100091, China

De-Zhong Liu, the Second Artillery General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100091, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30800509; and the Beijing Science and Technology Special Foundation, No. Z111102055311086

Correspondence to: Bing-Yi Shi, Professor, Institute of Organ Transplantation, the 309th Hospital of Chinese PLA, Jia 17 Heishanhu Road, Haidian District, Beijing 100091, China. shibingyi@medmail.com.cn

Received: 2012-09-20 Revised: 2012-11-05

Accepted: 2012-11-07 Published online: 2012-11-28

Abstract

AIM: To improve the Weiskirchen's method for isolation of hepatic stellate cells (HSCs) and increase cell purity and rate of survival.

METHODS: HSCs were isolated based on the Weiskirchen's method with some modifications. The rat liver was perfused with 0.25% pronase E after separating *in vitro*. After digestion with 0.025% collagen IV and 0.01% DNase I, cell homogenates were filtered using a cell mesh and centrifuged. Cell pellet was then subjected to density gradient centrifugation in the presence of 18% Nycodenz stock solution. The white cell

layer was HSCs. Cell viability was assessed by trypan blue exclusion staining. The purity of HSCs was evaluated by immunocytochemistry to detect the expression of desmin.

RESULTS: The yield rate of HSCs was 2.7×10^7 per rat. The purity of HSCs was 90% and cell viability was 99%. This method could effectively reduce cell contamination and increase cell viability.

CONCLUSION: Our improved method for isolation of HSCs by *in vitro* digestion is simple and efficient, because it can avoid contamination and increase cell purity and survival.

Key Words: Hepatic stellate cells; Cell isolation; Cell culture

Fan WM, Liu DZ, Xiao L, Ma XH, Shi BY. Isolation of hepatic stellate cells by *in vitro* digestion. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(33): 3244-3247

摘要

目的: 改进大鼠肝星状细胞的分离方法, 提高肝星状细胞分离的纯度和活力。

方法: 本研究主要依据Weiskirchen的方法并加以改进, 灌注后即将肝脏从原位分离, 随之使用0.25%的链霉蛋白酶E和0.025%的胶原酶IV消化, 经DNA酶I分散, 筛网过滤、离心, 将细胞沉淀用18%Nycodenz密度梯度离心, 获取肝星状细胞。台盼蓝染色鉴定细胞活率, Desmin免疫细胞化学染色法鉴定肝星状细胞纯度。

结果: 本方法所建立的离体消化分离肝星状细胞方法, 每只大鼠肝约获取 2.7×10^7 个肝星状细胞, 活率、纯度分别为99%、90%。该方法可有效减少细胞污染、提高细胞活力, 值得广泛应用。

结论: 本文所建立的大鼠离体消化法分离肝星状细胞, 方法简单可行, 较大程度避免了细胞污染, 提高了细胞的存活率和纯度。

■同行评议者

季菊玲, 副教授, 南通大学医学院病理教研室

关键词: 肝星状细胞; 细胞分离; 细胞培养

樊文梅, 刘德忠, 肖漓, 马锡慧, 石炳毅. 离体消化法分离原代肝星状细胞. 世界华人消化杂志 2012; 20(33): 3244-3247
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3244.asp>

0 引言

自从1876年由德国人Kupffer^[1]用氯化金染色的方法鉴定出富含维生素A的细胞以来, 先后被称为肝储脂细胞、Ito细胞、维生素A储存细胞等不同名称. 1996年美国肝病会议将其正式命名为肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSCs)^[2]. 虽然他在肝组织中含量极少, 但却是肝纤维化中的主要效应细胞, 因此HSCs的分离培养成为肝纤维化研究的基础工作之一. HSCs首先在20世纪80年代初由Knook等^[3]用链霉菌蛋白酶、胶原酶原位循环灌注法首先由大鼠体内成功分离HSCs, 从此人们开始了对HSCs的研究. HSCs是肝纤维化发生发展的中心环节, 然而其分离步骤繁琐、条件严格, 初学者不易分离成功, 作者参考中外文献, 经过多次实验, 摸索出一套稳定、经济的分离方法, 现报道如下.

1 材料和方法

1.1 材料 SD大鼠(♀, 体质量350-450 g, 清洁级), 由北京维通利化实验动物技术有限公司提供, 普通饲料喂养, 自由进食进饮, 实验前禁食12 h. 链霉菌蛋白酶E、IV型胶原酶、DNase I 和Nycodenz均购自sigma公司; DMEM、胎牛血清、胰蛋白酶均购自invitrogen公司; 鼠抗人desmin单克隆抗体(与大鼠有交叉反应)购自DAKO公司; 即用型SABC免疫组织化学染色试剂盒、DAB显色试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司; Hank's平衡盐溶液(含Ca²⁺Mg²⁺): 0.185 g CaCl₂·H₂O, 0.4 g KCl, 0.06 g KH₂PO₄, 0.1 g MgSO₄·7H₂O, 8 g NaCl, 0.35 g NaHCO₃, 0.048 g Na₂HPO₄, 1 g葡萄糖, 溶于1 000 mL的超纯水中, 过滤除菌. Hank's平衡盐溶液(不含Ca²⁺Mg²⁺): 0.4 g KCl, 0.06 g KH₂PO₄, 8 g NaCl, 0.35 g NaHCO₃, 0.048 g Na₂HPO₄, 1 g葡萄糖, 定容至1 000 mL的超纯水中. 链霉菌蛋白酶溶液: 链霉菌蛋白酶250 mg溶于100 mL含Ca²⁺Mg²⁺的HBSS溶液中, 过滤除菌, 4 °C保存备用. 胶原酶消化灌注液: 胶原酶25 mg溶于100 mL含Ca²⁺Mg²⁺的HBSS溶液中, 过滤除菌, 4 °C保存备用. DNA酶 I 溶液: 10 mg DNA酶 I 溶于100 mL含Ca²⁺Mg²⁺的HBSS溶液中, 过

滤除菌, 4 °C保存备用. 18%Nycodenz的配制: 称取18 g Nycodenz溶于100 mL无NaCl有Ca²⁺Mg²⁺的HBSS溶液中, 过滤除菌.

1.2 方法

1.2.1 原位消化: 大鼠以2%戊巴比妥那2 mL/kg腹腔麻醉后, 仰卧固定. 750 mL/L乙醇消毒皮毛, 而后十字型剖腹暴露内脏, 将肠管推向左侧, 暴露门静脉, 于近肝脏处穿丝线并打活结, 22号静脉留置针行门静脉穿刺, 退出针芯, 近肝门处用结扎线固定留置针, 先灌注无Ca²⁺Mg²⁺的HBSS, 并迅速剪开下腔静脉放血, 肝脏迅速变为黄白色, 约灌注10 min后, 小心将肝脏从原位分离, 保持灌注系统, 置于无菌布氏漏斗上, 换为0.25%链霉菌蛋白酶灌注液, 消化肝实质细胞. 灌注完毕后续用0.025%胶原酶灌注液, 消化肝脏胶原等结缔组织成份, 肝脏软化后停止灌注.

1.2.2 细胞分散: 快速取下肝脏, 撕除肝包膜及结缔组织, 放入盛有DNA酶 I 分散液的硅化三角烧瓶内, 200 r/min, 37 °C, 恒温震荡20 min.

1.2.3 细胞纯化: 将震荡分散后的细胞悬液通过250目和100目的尼龙网过滤在50 mL聚丙烯离心管. 1 500 r/min离心7 min, 弃上清, 将细胞沉淀合为一管, 加入2倍体积的18%Nycodenz, 上覆有Ca²⁺Mg²⁺的HBSS 2-3 mL, 2 600 r/min离心22 min, 仔细吸取HBSS和Nycodenz界面细胞层, 放入离心管内, 加入HBSS, 1 500 r/min, 离心7 min, 洗涤两次后, 去上清液, 将细胞悬浮在含20%胎牛血清的DMEM内.

1.2.4 细胞纯度及活力鉴定: 0.4%台盼蓝染色法检测细胞活力; 以Desmin抗体(1:100)鉴定HSCs的纯度.

1.2.5 培养及传代方法: HSCs培养48 h后首次以含10%胎牛血清DMEM换液. 培养14 d左右细胞融合, 0.25%胰蛋白酶消化, 1 500 r/min离心7 min, 以1:3传代培养.

2 结果

2.1 HSCs的得率、活力和纯度 1只SD大鼠HSCs的得率为 2.7×10^7 , 经台盼蓝染色, 细胞活力为99%. 在倒置显微镜下见刚分离的HSCs呈圆形, 胞浆有较多脂滴, 接种24 h后, 部分细胞贴壁, 呈多边形, 活率、纯度分别为99%和90%.

2.2 HSCs形态学观察 在倒置显微镜下观察新分离的HSCs, HSCs呈圆形, 胞浆中含较多脂滴, 具有很强的折光性, 且大小小于肝细胞. 培养48 h后部分细胞已伸展, 7 d后细胞几乎全部活化(图

■研发前沿

HSCs是肝纤维化发生发展中最重要的细胞, 因此他的分离培养成为进行肝纤维化研究的一项必备技术. 国内外学者在这方面已进行了不懈的探索, 但是由于其分离步骤繁琐、易污染, 细胞不易存活等原因, 初学者不易掌握. 因此, 发展一种简便易行的分离方法十分必要.

■相关报道

HSCs分离常用Ficoll、Optiprep、Nycodenz等进行密度梯度离心, Ficoll和Optiprep均需调整浓度, 浓度配制的准确性将直接影响HSC得率和纯度. 本研究经过数十次的摸索, 采用2倍体积的18%的Nycodenz进行密度梯度离心, 细胞得率与纯度均可满足实验要求.

■创新盘点

本研究的创新之处在于肝脏链酶蛋白酶E灌注后即从原位分离,置于布氏漏斗上再进行胶原酶的循环灌注,一方面有利于胶原酶的有效消化、防止消化不均匀;另一方面减少了污染。

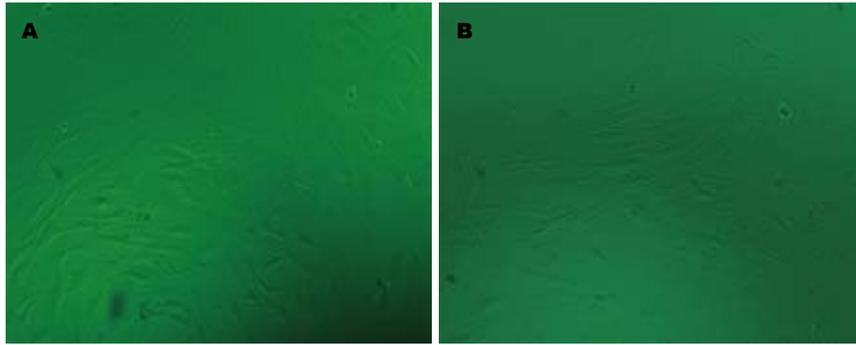


图1 原代星形细胞及性质鉴定($\times 100$)。A: 原代分离7 d的肝星形细胞; B: 传代培养4 d的肝星型细胞。

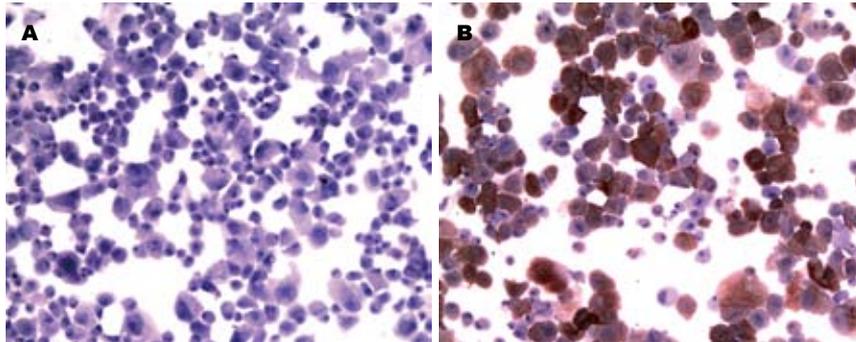


图2 原代Desmin免疫细胞化学检测。A: 肝星型细胞免疫组织化学对照; B: 原代肝星形细胞培养14 d Desmin免疫组织化学染色。

1A),呈纤维样细胞,14 d时细胞融合成片,经0.25%胰酶消化后,次日细胞全部伸展生长,传代4 d后细胞如图1B,约7 d后细胞长成单层。

2.3 HSCs的纯度鉴定 光镜下新分离未贴壁的HSCs胞浆中含丰富的脂滴,折光性强,在327 nm波长下具蓝绿色荧光,但很快淬灭。原代培养14 d的Desmin阳性率在90%左右(图2)。

3 讨论

Weiskirchen等^[4]的方法采用了自制的体外循环灌注系统,并不适合我们国内的实验条件,我们加以改良并成功地分离出大鼠的HSCs。国内一些作者采用原位灌注法分离HSCs酶的用量较大,且因门静脉穿刺的好坏、肝脏灌注的是否充分、胶原酶消化的程度都直接影响了HSCs的得率、活力和纯度,本文HSCs分离方法是我们参照国内外文献[4-7],经过数十次摸索出的简单、稳定的方法,得率为 2.7×10^7 个左右/肝脏。

HSCs分离对于初学者难以掌握,主要与门静脉插管的熟练程度、肝脏消化程度的判断和密度梯度离心后HSCs的吸取有关。为成功分离大鼠HSCs,应注意以下几点:(1)一般选用体质量350-450 g左右营养状况较好的大鼠,这样细胞得率会较高,这是国内学者普遍认同的观点^[8-10];(2)大鼠的门静脉较小,门静脉穿刺不易成功,容易刺破血管引起大出血,门脉插管处不可离肝脏太近,否则容易刺破肝脏,且门静脉插管必须

一次成功,分别在远肝端与近肝端结扎固定,防止静脉留置针中途脱落。如果大鼠因出血等原因死亡,进一步的灌流消化所得HSCs将很难贴壁;(3)充分的灌流对后续酶的消化至关重要,本方法使用无 $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$ 的HBSS灌流肝脏,对肝脏的灌流较为充分,灌洗干净的肝脏外观呈均匀的黄白色。如果灌洗不均匀,可以将静脉留置针向远肝方向拽一下,或通过棉签按摩灌洗不均匀的肝叶、或疏通下腔静脉的方式尽可能使肝脏充分的灌流干净;(4)灌洗干净的肝脏随之从原位分离,此步为本方法的创新之处。多数学者多在链酶蛋白酶消化后从原位分离^[11-13],此时肝脏已软化,不易从原位分离,操作过程的延长会增加污染风险,在分离过程还易导致静脉留置针脱落。基于原代HSCs分离步骤之繁琐,细胞污染是HSCs分离培养失败的常见原因,所以本文采用灌注后离体方式消化,既避免了肝脏在原位消化不易剥离的情况,而且防止了消化后软化的肝脏易污染的弊端,这一方法是作者经多次摸索实践证明可有效防止污染。国内学者冷希圣等^[14]和郑伟达等^[6]亦采用离体灌注法成功分离到HSCs,但所用消化酶、Nycodenz浓度皆不同,初学者不易把握,作者亦经数十次试验,所建立的离体消化法分离原代HSCs,不仅可有效避免污染、同时能够保证细胞的得率、纯度和活力,适合广泛应用;(5)胶原酶循环灌注3-4次,肉眼观察肝包膜下组织几乎呈液化状态,即可停止消化。消化过度,

■应用要点

本实验所建立的HSCs分离方法,和其他已建立的方法相比,使初学者更易掌握,所用材料均容易获得,大大节省了实验成本,提高了实验的可重复性,未来可考虑制备成试剂盒。

直接影响HSCs活力, 致后续细胞培养中不易存活^[5], 初学者在判断肝脏消化程度方面往往没有经验, 作者总结出一般消化3-4次细胞得率和活力最高。

新分离的星状细胞含有大量脂滴, 在328 nm 波长激发下, 呈蓝绿色荧光, 但在数秒内即淬灭。Desmin免疫组织化学是鉴定HSCs的可靠指标, 本试验分离的HSCs经Desmin抗体免疫组织化学鉴定, 细胞纯度达90%。总之, 我们摸索出的离体消化分离原代HSCs培养及鉴定方法, 经多次实验证实, 在保证HSCs纯度的同时, 提高了产量和活力, 较大程度避免了细胞污染, 为进一步研究肝纤维化的发生发展奠定了基础。

4 参考文献

- 1 Kupffer C. Ueber Sternzellen der Leber Briefliche Mittheilung an Prof. Waldeyer. *Archiv für Mikroskopische Anatomie* 1876; 12: 353-358
- 2 Kumagai A, Dunphy WG. Molecular mechanism of the final steps in the activation of MPF. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1991; 56: 585-589
- 3 Knook DL, Seffelaar AM, de Leeuw AM. Fat-storing cells of the rat liver. Their isolation and purification. *Exp Cell Res* 1982; 139: 468-471
- 4 Weiskirchen R, Gressner AM. Isolation and culture of hepatic stellate cells. *Methods Mol Med* 2005; 117: 99-113
- 5 王文兵, 戴立里, 郑元义. 改良原位循环灌注法大鼠肝星状细胞分离培养及鉴定. *中华肝脏病杂志* 2004; 12: 629-630
- 6 郑伟达, 王小众, 张莉娟, 史美娜. 分离肝星形细胞的简便方法. *福建医科大学学报* 2004; 38: 71-74
- 7 罗云, 戴立里, 沈鼎明, 姚云清, 张大志, 王波. 原位循环灌注法分离大鼠肝星状细胞. *重庆医科大学学报* 2002; 27: 48-49, 52
- 8 王文兵, 戴立里, 郑元义. 改良大鼠肝星状细胞分离及性质鉴定. *胃肠病学和肝病学杂志* 2005; 14: 239-242
- 9 丁芹, 顾琳, 马会慧, 姚春澜, 符娟, 崇雨田, 杨绍基. SD大鼠肝脏星状细胞分离培养及方法的改进. *实用医学杂志* 2007; 23: 2830-2832
- 10 吴婷, 滕泉军. 大鼠肝星状细胞的分离培养鉴定. *现代医学* 2004; 32: 303-306
- 11 姚敏捷, 梁兆祥, 李艳. 大鼠肝贮脂细胞的分离、培养和鉴定. *细胞与分子免疫学杂志* 2003; 19: 297-298
- 12 翁山耕, 冷希圣, 魏玉华, 彭吉润, 郑恩涛, 程继华, 张佑彬, 吕建锋, 杜如昱. 改良法大鼠肝星状细胞的分离培养及鉴定. *北京大学学报(医学版)* 2001; 33: 83-86
- 13 彭小东, 田德安, 王波, 王天才, 赵秋. 大鼠肝星状细胞的分离培养鉴定. *中国现代医学杂志* 2005; 15: 205-207
- 14 冷希圣, 翁山耕, 李涛, 魏玉华, 彭吉润, 杜如昱. 大鼠肝星状细胞系的建立及其生物学特性的研究. *解剖学报* 2003; 34: 369-274
- 15 许伟华, 赵延英, 杨海燕, 吴文秀. 肝星状细胞的分离和培养. *中华临床医学实践杂志* 2003; 2: 587-588

■同行评价

原代肝星状细胞的分离和培养是一个多步骤、比较复杂的过程, 初学者不易掌握, 作者结合国内外文献, 经数十次摸索并加以改进, 为初学者提供了一些有益的经验, 具有一定的应用价值。

编辑 翟欢欢 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.

不同胆道引流方式对梗阻性黄疸大鼠肠屏障功能的影响

李秋, 彭燕, 邹玲, 付文广

■背景资料

梗阻性黄疸时, 肝脏功能受到明显损伤, 表现为血清胆红素、转氨酶等生化指标的升高, 随着梗阻时间的延长进一步出现凝血功能异常、蛋白合成降低、免疫功能障碍等改变. 解除胆道梗阻是恢复肝脏功能最直接有效的办法.

李秋, 彭燕, 邹玲, 付文广, 泸州医学院附属医院肝胆外科 四川省泸州市 646000

李秋, 主要从事肝胆外科方面的研究.

四川省卫生厅科研基金资助项目, No. 080195

作者贡献分布: 本文由李秋完成, 彭燕、邹玲及付文广协助完成部分实验.

通讯作者: 李秋, 646000, 四川省泸州市太平街25号, 泸州医学院附属医院肝胆外科. liqiu646@163.com

收稿日期: 2012-10-11 修回日期: 2012-11-15

接受日期: 2012-11-16 在线出版日期: 2012-11-28

Effect of different biliary drainage methods on intestinal barrier function in rats with obstructive jaundice

Qiu Li, Yan Peng, Ling Zou, Wen-Guang Fu

Qiu Li, Yan Peng, Ling Zou, Wen-Guang Fu, Department of Hepatobiliary Surgery, Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000, Sichuan Province, China
Supported by: the Scientific Research Project of Department of Health of Sichuan Province, No. 080195

Correspondence to: Qiu Li, Department of Hepatobiliary Surgery, Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000, Sichuan Province, China. liqiu646@163.com
Received: 2012-10-11 Revised: 2012-11-15
Accepted: 2012-11-16 Published online: 2012-11-28

Abstract

AIM: To investigate the effect of different biliary drainage methods on intestinal barrier function in rats with obstructive jaundice.

METHODS: Sixty healthy SD rats were divided into four groups: sham-operation (SO) group, obstructive jaundice (OJ) group, internal drainage (ID) group, and external drainage (ED) group. One week after surgery, specimens from the rats of the SO and OJ groups were collected. Biliary drainage was performed using different methods in the ID and ED groups, and the specimens were harvested seven days after drainage. The levels of alanine aminotransferase (ALT), total bilirubin (TBIL), direct bilirubin (DBIL), and total bile acids (TBA) in serum, and sIgA in intestine mucus were determined and compared between different groups.

RESULTS: Serum levels of ALT, TBIL, DBIL,

and TBA were significantly higher in the OJ group than in the SO, ID, and ED groups. The levels of sIgA in intestine mucus were significantly higher in the ID group than in the OJ and ED groups (0.272 ± 0.182 vs 0.160 ± 0.150 , 0.191 ± 0.113 , both $P < 0.05$).

CONCLUSION: Both ID and ED effectively relieve biliary obstruction and improve liver function. ID significantly increases intestinal mucus sIgA. The effect of ID on intestinal barrier function is better than that of ED.

Key Words: Biliary drainage; Obstructive jaundice; Intestinal mucosal barrier; Intestine mucus sIgA

Li Q, Peng Y, Zou L, Fu WG. Effect of different biliary drainage methods on intestinal barrier function in rats with obstructive jaundice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(33): 3248-3251

摘要

目的: 探讨不同胆道引流方式对梗阻性黄疸大鼠肠屏障功能的影响.

方法: 60只SD大鼠随机分为假手术组(sham operation, SO组)、梗阻性黄疸组(obstructive jaundice, OJ组)、内引流组(internal biliary drainage, ID组)和外引流组(external biliary drainage, ED组). 制备OJ模型, SO组、OJ组在术后第7天处死大鼠并采集标本, ID组、ED组则行不同引流手术, 在引流术后第7天处死大鼠并采集标本. 检测血清丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、总胆红素(total bilirubin, TBIL)、直接胆红素(direct bilirubin, DBIL)、胆汁酸(total bile acids, TBA)及小肠黏液sIgA含量, 并对结果进行统计学分析.

结果: OJ组较SO组血清ALT、TBIL、DBIL、TBA均明显升高, 小肠黏液sIgA含量(0.160 ± 0.150)明显减少. ED、ID组血清中ALT、TBIL、DBIL、TBA明显低于OJ组; ID组小肠黏液sIgA含量明显高于OJ组及ED组(0.272 ± 0.182 vs 0.160 ± 0.150 , 0.191 ± 0.113 , 均 $P < 0.05$).

■同行评议者

巩鹏, 教授, 大连医科大学附属第一医院普外二科

结论: 胆道内、外引流均能有效解除胆道梗阻, 改善肝功能. 但内引流可明显增加肠道黏液sIgA, 其改善肠道屏障功能的效果优于外引流.

关键词: 胆道引流; 梗阻性黄疸; 肠屏障; 小肠黏液sIgA

李秋, 彭燕, 邹玲, 付文广. 不同胆道引流方式对梗阻性黄疸大鼠肠屏障功能的影响. 世界华人消化杂志 2012; 20(33): 3248-3251
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3248.asp>

0 引言

梗阻性黄疸(obstructive jaundice, OJ)是常见的临床综合征. OJ的病理生理改变主要与肠道细菌易位造成的肠源性内毒素血症和多脏器损伤密切相关, 而肠屏障功能(intestinal barrier function, IBF)受损是内毒素血症和细菌易位形成的主要原因^[1]. 通过引流解除胆道梗阻是治疗OJ的根本方法. 但OJ时肠道功能的改变及机制目前尚不十分清楚, 本实验通过观察OJ时肠屏障功能的改变和内、外引流后肠屏障功能的变化, 为临床选择治疗方法提供更好的理论依据.

1 材料和方法

1.1 材料 健康♂SD大鼠60只, 体质量200-250 g, 由泸州医学院动物科提供, 遵守实验动物使用及管理原则. 术前禁食12 h, 不禁水. 肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)放射免疫试剂盒购自北京北方生物技术研究所; sIgA的ELISA试剂盒购自上海西塘生物科技有限公司.

1.2 方法

1.2.1 分组: (1)假手术组(shame operation, SO组), 大鼠上腹部正中切口开腹后, 暴露肝门, 游离胆总管后关腹; (2)梗阻性黄疸组(obstructive jaundice, OJ组), 游离胆总管后在两处不同的部位分别用5-0缝合线结扎, 致胆总管完全梗阻; (3)胆道内引流组(internal biliary drainage, ID组), 胆总管结扎7 d后在扩张的胆总管内置入一长约5 cm的细硬膜外导管, 带线结扎固定, 导管一端置幽门下方2 cm的十二指肠内, 缝合固定; (4)胆道外引流组(external biliary drainage, ED组), 胆总管结扎7 d后在扩张的胆总管内置入一长约5 cm的细硬膜外导管, 将胆汁经皮引出体外, 带线结扎固定.

1.2.2 标本采取: SH组和OJ组在手术后第7天处死大鼠并采集标本, ID组和ED组在行引流术后

第7天处死大鼠并采集标本. 大鼠于取材前禁食12 h, 以0.3%戊巴比妥钠1 mL/100 g腹腔注射麻醉. 固定大鼠于手术板, 备皮后常规消毒铺巾. 心脏穿刺采血3 mL, 室温静置30 min, 离心3 000 r/min \times 10 min, 收集血清-70 °C保存, 用于检测肝功能. 经上腹正中切口逐层开腹, 无菌操作取近端空肠10 cm, 用冷蒸馏水和磷酸盐缓冲液(PBS)交替冲洗后平铺于滤纸上, 纵向剪开, 暴露黏膜面, 4 °C PBS冲洗, 用清洁载玻片轻轻刮取肠黏膜表面黏液, 用微量注射器收集刮取物0.5 mL, 然后用1.0 mL PBS稀释并小心搅拌, 使其完全溶解, 恒低温离心5 min, 收集上清液, 4 °C贮存备用.

1.2.3 检测指标: 用免疫酶联吸附实验检测小肠黏液sIgA. 用全自动生化分析仪检测大鼠丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、总胆红素(total bilirubin, TBIL)、直接胆红素(direct bilirubin, DBIL)、胆汁酸(total bile acids, TBA). 集距回盲部2 cm末段回肠组织做病理学检查.

统计学处理 结果用SPSS13.0统计软件分析, 各组数据以mean \pm SD表示, 多组样本均数之间比较当方差齐时采用单因素方差分析, 方差不齐时采用秩和检验. $P<0.05$ 认为差异有统计学意义.

2 结果

各种原因导致实验动物死亡7只, 其中OJ组2只, ID组2只, ED组3只. 其余均存活并采集相应标本进行预定指标的检测, 结果如下.

2.1 肝功能检测 OJ组肝功能受损严重, OJ组所有肝功能指标均显著高于SH组($P<0.05$); 引流术后肝功能明显恢复, ID组、ED组全部4项肝功能指标均显著低于OJ组($P<0.05$); ED组血清ALT高于ID组, 但差异不具有统计学意义($P>0.05$); ED组血清TB与ID组之间差异不具有统计学意义($P>0.05$); ED组血清DBIL与ID组之间差异不具有统计学意义($P>0.05$); ED组血清TBA与ID组之间差异不具有统计学意义($P>0.05$, 表1).

2.2 各组大鼠小肠黏液sIgA结果 OJ组小肠黏液sIgA含量较SH组显著降低(0.160 ± 0.150 vs 0.345 ± 0.010 , $P<0.05$); ID组(0.272 ± 0.182)及ED组(0.191 ± 0.113)小肠黏液sIgA含量较OJ组显著增高 ($P<0.05$); ID组小肠黏液sIgA含量明显高于ED组($P<0.05$).

2.3 回肠组织病理学 SO组黏膜完整无损, 绒毛排列整齐, 组织结构完整, 无炎性细胞浸润. OJ组黏膜萎缩, 绒毛稀疏、凌乱、脱落、腺体断

应用要点
通过引流解除胆道梗阻是治疗梗阻性黄疸的根本方法.

■相关报道

Kurude等结扎大鼠胆总管后发现大鼠盲肠中G-肠道杆菌的数量增加了100倍,大肠埃希菌及需氧菌的水平较对照组明显升高。

表 1 各组大鼠肝功能检测结果 (mean ± SD)

分组	ALT(U/L)	TB (μmol/L)	DB(μmol/L)	TBA(μmol/L)
SH组	75.01 ± 19.87	1.04 ± 0.49	0.43 ± 0.24	6.53 ± 2.65
OJ组	560.23 ± 103.65	157.14 ± 51.43	137.49 ± 45.37	113.91 ± 17.67
ID组	128.53 ± 17.66	1.24 ± 0.78	0.46 ± 0.41	8.06 ± 2.16
ED组	137.23 ± 23.74	1.34 ± 0.35	0.64 ± 0.68	7.47 ± 3.04

ALT: 丙氨酸氨基转移酶; TB: 总胆红素; DB: 直接胆红素; TBA: 胆汁酸。

裂,上皮的连续性破坏,炎性细胞浸润明显。ID组黏膜完整无损,绒毛稍稀疏,上皮的连续性更好,更接近SH组,无炎性细胞浸润。ED组黏膜完整性略恢复,绒毛稀疏有破坏,上皮的连续性略恢复,有炎性细胞浸润。其结果显示OJ组肠黏膜机械屏障损伤明显, ID组肠黏膜机械屏障较ED组改善更明显。

3 讨论

梗阻性黄疸时,肝脏功能受到明显损伤,表现为血清胆红素、转氨酶等生化指标的升高,随着梗阻时间的延长进一步出现凝血功能异常、蛋白合成降低、免疫功能障碍等改变。解除胆道梗阻是恢复肝脏功能最直接有效的办法,从本组数据看, OJ后ALT、TBIL、DBIL、TBA均出现数以倍计的急剧上升,一旦施行引流术后便迅速下降。

OJ时肠屏障功能会发生以下改变: (1)化学屏障改变:胆汁是肠黏膜化学屏障的重要组成部分,对人体有多重保护作用,而OJ时胆汁进入肠道受阻导致肠黏膜化学屏障受损。胆汁酸缺乏,肠道菌群大量繁殖和黏附,直接造成肠黏膜屏障损伤并可发生细菌易位诱发机体炎症反应,加重肠壁损伤^[2]而且可能造成肠源性内毒素血症^[3,4]; (2)机械屏障改变:本实验OJ组回肠组织病理学显示黏膜萎缩,绒毛稀疏、凌乱、脱落、腺体断裂,上皮的连续性破坏,炎性细胞浸润明显。这可能是由于胆汁缺乏,肠道细胞凋亡增加、细胞增殖受到抑制,肠壁细胞之间的紧密连接复合体被破坏最终导致小肠通透性增高,肠黏膜机械屏障受损。有其他实验也得出类似结果^[5]; (3)生物屏障改变: Kuru等^[6]结扎大鼠胆总管后发现大鼠盲肠中G-肠道杆菌的数量增加了100倍,大肠埃希菌及需氧菌的水平较对照组明显升高; (4)免疫屏障改变:肠道免疫系统中起核心作用的是分泌型IgA(sIgA), sIgA来自于胆

汁和肠黏膜固有层内产IgA细胞。是肠道分泌物中含量最丰富的免疫球蛋白,是人类黏膜免疫的主要抗体,能中和酶、毒素、病菌和其他生物活性抗原,并刺激肠道黏液的分泌。由于胆道梗阻胆汁不能进入肠道,故本实验中OJ组肠道sIgA分泌量较SO组明显减少,国内其他研究^[7,8]也有相似结果。此外OJ时肝脏损伤后合成蛋白能力下降、肝脏Kupffer细胞功能受损、肝硬化等均可影响肠道免疫屏障功能。

胆汁外引流后,缓解了梗阻时增高的胆盐对肝脏造成的损伤,改善了肝脏功能,但胆汁的丢失导致脂肪、维生素等多种营养物质吸收不良,同时伴随一些免疫物质的丢失及水电解质紊乱^[9-11],降低了机体抵抗力,机体屏障可直接破坏肠道上皮细胞;胆汁外引流,肠道缺乏胆盐进入,肠道内微生态平衡受到破坏,细菌的过度繁殖产生大量内毒素,这些内毒素没有胆盐结合难以形成复合物,容易穿过肠黏膜屏障进入门静脉循环,从而造成IBF障碍^[12-16]。

内引流后胆道梗阻解除,肝脏Kupffer细胞功能得以恢复,内毒素灭活增多;内引流后胆汁重新进入肠道,胆汁对机体的诸多有利作用得以发挥,内引流保持着正常的肠肝循环。本组实验显示:尽管胆道内、外引流均能很好解除胆道梗阻,改善大鼠肝功能。与外引流相比,内引流能更好的保护和恢复肠黏膜机械屏障,而且能使小肠黏液sIgA明显增加维护肠道免疫屏障,其改善肠屏障功能的效果优于外引流。

4 参考文献

- 1 Yamaguchi J, Toledo A, Bass BL, Celeste FA, Rao JN, Wang JY, Strauch ED. Taurodeoxycholate increases intestinal epithelial cell proliferation through c-myc expression. *Surgery* 2004; 135: 215-221
- 2 Schmitz H, Fromm M, Bentzel CJ, Scholz P, Detjen K, Mankertz J, Bode H, Eppe HJ, Riecken EO, Schulzke JD. Tumor necrosis factor-alpha (TNFalpha) regulates the epithelial barrier in the human intestinal cell line HT-29/B6. *J Cell Sci* 1999; 112 (Pt 1): 137-146

- 3 孙秀凤, 单若冰. 梗阻性黄疸与细菌/内毒素移位的关系及微生态制剂干预. 中国微生物学杂志 2008; 20: 95-96
- 4 沈顺利, 彭宝岗. 胆道恶性肿瘤多学科综合诊治. 中国实用内科杂志 2012; 32: 171-174
- 5 Assimakopoulos SF, Scopa CD, Zervoudakis G, Mylonas PG, Georgiou C, Nikolopoulou V, Vagianos CE. Bombesin and neurotensin reduce endotoxemia, intestinal oxidative stress, and apoptosis in experimental obstructive jaundice. *Ann Surg* 2005; 241: 159-167
- 6 Kuru B, Dinc S, Altinok G, Aksoz T, Camlibel M, Gulcelik MA, Alagol H. Effect of different enteral nutrients on bacterial translocation in experimental obstructive jaundice. *Eur Surg Res* 2004; 36: 45-52
- 7 姜旭, 李哲浩, 翟晓芳, 崔凤奎. 梗阻性黄疸大鼠小肠组织IgA及白介素-6表达减少. 基础医学与临床 2008; 28: 196-197
- 8 蒋唯松, 龚彪, 别里克. 良性胆管狭窄治疗进展. 中国实用内科杂志 2011; 31: 956-958
- 9 Sano T, Ajiki T, Takeyama Y, Kuroda Y. Internal biliary drainage improves decreased number of gut mucosal T lymphocytes and MAdCAM-1 expression in jaundiced rats. *Surgery* 2004; 136: 693-699
- 10 侯森林, 乔占英, 康建省, 吕海涛, 李玉英, 高永平. 支架与手术引流对梗阻性黄疸患者免疫功能的影响. 中华消化内镜杂志 2005; 22: 46-47
- 11 劳敏曦, 锦辉, 陈洁, 王淑冰, 陈湖. 肝淀粉样变性合并重度淤胆及角膜K-F环1例报告并文献复习. 中国实用内科杂志 2012; 32: 721-723
- 12 曹阳, 赵闯, 徐锋, 戴朝六. 白介素-10对梗阻性黄疸大鼠肝组织转化生长因子 β 1表达和肝细胞凋亡的影响. 世界华人消化杂志 2011; 19: 1773-1779
- 13 余水平, 李坚, 侯冰宗, 苏永辉, 李培平, 张百萌. 急慢性大鼠梗阻性黄疸模型的建立. 世界华人消化杂志 2011; 19: 1285-1289
- 14 Lalisang TJ, Sjamsuhidajat R, Siregar NC, Taher A. Profile of hepatocyte apoptosis and bile lakes before and after bile duct decompression in severe obstructive jaundice patients. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2010; 9: 520-523
- 15 Crespo S, Raimondo M. The long term use of covered metal stents in managing malignant biliary obstruction. Are we changing outcomes? *Dig Liver Dis* 2010; 42: 765-766

■同行评价

本文通过动物实验探讨不同胆道引流方式对梗阻性黄疸大鼠肠屏障功能的影响, 所述内容条理清楚, 思路清晰, 分析全面.

编辑 李军亮 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).

鼻胃镜直视下食管支架置入术40例

叶武, 刘鹏飞, 项斌, 张伟, 沈卫东, 孙芳

■背景资料

置入食管金属支架可缓解晚期食管癌和贲门癌患者的吞咽困难, 改善其营养状况并提高其生活质量。如何方便、安全、准确的置入食管支架, 提高支架置入的成功率, 并减轻患者的痛苦, 是目前国内外研究的重点。

叶武, 刘鹏飞, 项斌, 张伟, 沈卫东, 孙芳, 东南大学医学院附属江阴医院消化科 江苏省江阴市 214400

叶武, 硕士, 副主任医师, 主要从事食管癌的研究。

作者贡献分布: 此课题由叶武设计; 研究过程由叶武、刘鹏飞、项斌、张伟及孙芳操作完成; 论文写作由叶武与沈卫东完成。

通讯作者: 叶武, 副主任医师, 214400, 江苏省江阴市寿山路163号, 东南大学医学院附属江阴医院消化科。jytm@163.com

电话: 0510-86879460

收稿日期: 2012-08-06 修回日期: 2012-09-11

接受日期: 2012-11-26 在线出版日期: 2012-11-28

Implantation of esophageal stents under transnasal gastroscopy: An analysis of 40 cases

Wu Ye, Peng-Fei Liu, Bin Xiang, Wei Zhang, Wei-Dong Shen, Fang Sun

Wu Ye, Peng-Fei Liu, Bin Xiang, Wei Zhang, Wei-Dong Shen, Fang Sun, Department of Gastroenterology, Jiangyin Hospital, Affiliated Hospital of Southeast University, Jiangyin 214400, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Wu Ye, Associate Chief Physician, Jiangyin Hospital, Affiliated Hospital of Southeast University, 163 Shoushan Road, Jiangyin 214400, Jiangsu Province, China. jytm@163.com

Received: 2012-08-06 Revised: 2012-09-11

Accepted: 2012-11-26 Published online: 2012-11-28

Abstract

AIM: To assess the clinical value of transnasal gastroscopy in the implantation of esophageal stents.

METHODS: Forty patients with advanced esophageal or cardiac carcinoma developed dysphagia and received implantation of esophageal stents under transnasal gastroscopy. Pre-dilatation to 7 mm was performed in cases of severe esophageal stenosis with a cone-shaped Savary-gilliard expander. X-ray monitoring was not used during the whole procedure. The success rate, accuracy, complications of implantation, and improvement of dysphagia were analyzed.

RESULTS: The success rate of implantation of esophageal stents was 100%. The stents was accurately placed and well self-expanded. Dysphagia was improved significantly (dysphagia score: 3.52 ± 0.41 vs 1.05 ± 0.38 , $P < 0.05$). One case developed late-onset perforation, and the

rate of severe complications was 2.5%.

CONCLUSION: Implantation of esophageal stents under transnasal gastroscopy is simple, safe, and has a high success rate and good patient compliance.

Key Words: Transnasal gastroscopy; Esophageal stenosis; Stent; Therapy

Ye W, Liu PF, Xiang B, Zhang W, Shen WD, Sun F. Implantation of esophageal stents under transnasal gastroscopy: An analysis of 40 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(33): 3252-3255

摘要

目的: 探讨鼻胃镜在食管支架置入中的临床价值。

方法: 对40例晚期食管癌、贲门癌患者行鼻胃镜直视下食管支架置入术。狭窄严重者应用Savary-gilliard锥形硅胶扩张器预扩张至7 mm, 经鼻胃镜观察狭窄部位后计算支架推送器插入深度, 并在鼻胃镜直视下调节支架推送器以保证支架位置准确, 全程无需X线监控。分析支架置放成功率、定位准确性、并发症情况以及吞咽困难改善的效果。

结果: 40例患者均一次性成功放置食管支架, 支架置入成功率100%, 定位准确, 膨胀满意, 术后吞咽困难显著改善(3.52 分 ± 0.41 分 vs 1.05 分 ± 0.38 分, $P < 0.05$), 有1例发生迟发穿孔, 严重并发症发生率2.5%。

结论: 鼻胃镜直视下食管支架置入术成功率高, 操作简单、安全、定位准确, 患者依从性好。

关键词: 鼻胃镜; 食管狭窄; 支架; 治疗

叶武, 刘鹏飞, 项斌, 张伟, 沈卫东, 孙芳. 鼻胃镜直视下食管支架置入术40例. *世界华人消化杂志* 2012; 20(33): 3252-3255
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3252.asp>

0 引言

对于晚期食管癌和贲门癌患者, 最大的痛苦是

■同行评议者

刘海峰, 主任医师, 北京市武警总医院消化科

因吞咽困难造成的不能进食, 导致营养状况进一步恶化, 同时严重影响患者的生活质量. 随着内镜及工业技术的进步, Frimberger^[1]首先报道了采用金属支架治疗食管狭窄获得成功, 开创了采用支架治疗的新方法, 目前该方法已在国内外广泛开展, 可有效改善晚期食管癌、贲门癌患者及其他食管狭窄患者的吞咽困难症状^[2-4]. 目前置入食管支架的方法主要有: X线透视下置入、内镜直视下置入和X线-内镜联合置入. 其中内镜直视下置入具有操作直观, 易于调整, 定位准确, 不会受X线照射等优点. 但由于普通胃镜管径粗, 不能直接通过狭窄段, 在置入支架前需多次进镜以置入导丝、扩张狭窄段、测量狭窄段, 此过程繁琐且给患者造成很大的痛苦. 随着内镜技术的发展, 出现了管径很细的鼻胃镜, 应用鼻胃镜能通过绝大多数的肿瘤狭窄段^[5], 可显著简化操作流程、缩短操作时间、减轻患者痛苦、减少术后并发症. 我们应用OLYMPUS GIF-XP260N型鼻胃镜直视下置入镍钛记忆合金覆膜食管支架40例, 现将应用体会报告如下.

1 材料和方法

1.1 材料 2010-04/2012-06, 因吞咽困难于本院行食管金属支架置入的患者40例, 晚期食管癌33例, 晚期贲门癌7例. 其中男28例, 女12例, 年龄52-85岁, 平均68.6岁. 狭窄部位: 食管上段8例, 食管中段15例, 食管下段10例, 贲门7例. 狭窄长度为3-8 cm, 平均5.2 cm. 吞咽困难程度参照Stooler分级进行评分: 0分, 能进普食; 1分, 能进软食; 2分, 能进半流质; 3分, 能进流质; 4分, 进食流质困难. 本组患者中2分2例, 3分16例, 4分22例, 平均为3.52分±0.41分. 主要器械: OLYMPUS GIF-XP260N前视式鼻胃镜, 视野角120度, 焦距3-100 mm, 插入部直径5 mm, 工作长度1 100 mm, 活检钳孔道径2 mm, 弯角向上210度, 下90度, 左右100度. Savary-gilliard锥形硅胶扩张器一套及超硬导丝. 镍钛记忆合金覆膜食管支架(直径18 mm)及配套支架推送器(南京微创医学科技有限公司).

1.2 方法 术前常规检查心电图、凝血功能和血常规, 签署植入性医疗器械同意书. 禁食8 h. 术前15 min口服利多卡因胶浆10 mL, 同时使用1%利多卡因注射液与呋喃滴鼻液混合液进行鼻腔麻醉. 鼻胃镜经口进镜行常规胃镜检查观察狭窄部位、程度及长度, 据此选择相应规格的镍钛记忆合金覆膜食管支架, 经鼻胃镜置入超硬

导丝后退镜, 导丝头端最好能到达十二指肠部, 退镜时同时向内进导丝, 防止导丝跟出至狭窄段以上, 退镜后由一助手于门齿部固定导丝. 对于狭窄严重, 鼻胃镜通过困难者, 可于鼻胃镜钳道中预留专用活检钳再进镜(头端在钳道内), 可增加通过率. 仍无法通过者, 经钳道置入超硬导丝, 再以外径7 mm的Savary-gilliard锥形硅胶探条扩张狭窄段一次, 保留导丝, 再进镜确定狭窄部位、程度及长度. 据情况选择支架直径18-20 mm, 支架长度=狭窄长度+3-4 mm, 支架于出厂时均已置于配套的透明推送器中. 以胶布标记推送器的支架段, 胶布距推送器内支架上口的距离=(推送器内支架的长度-狭窄段的长度)/2. 沿导丝将支架推送器插入狭窄部位, 鼻胃镜经鼻进镜, 直视下调整支架推送器, 使其标记的胶布对齐病灶上端, 释放支架, 期间可在鼻胃镜直视下适当调整支架位置(通过透明的推送器可看到支架上口), 保证支架完全撑开后两端超出狭窄段2 cm左右. 退出导丝及支架推送器, 鼻胃镜下观察支架上下端位置和膨胀情况, 了解出血、穿孔等并发症情况. 术毕退镜, 术后禁食2 h, 予以补液对症处理, 然后由流质渐过渡至软食, 禁食冷饮及块状食物. 术后3 d摄右斜位胸片观察支架位置及直径.

2 结果

2.1 一般情况 所有患者均一次性置入食管支架, 成功率100%. 本组40例患者中, 有5例需Savary-gilliard锥形硅胶探条扩张后鼻胃镜才能通过, 35例无需预扩张鼻胃镜即能通过, 通过率为87.5%(35/40). 术后3 d支架位置良好, 未发生支架移位和脱落, 支架直径13-17 mm, 平均15.2 mm±1.35 mm. 置入食管支架1 wk后, 所有患者均能进食半流质, 10 d后大部分患者(39/40)能进食软食. 吞咽困难评分由3.52分±0.41分降至1.05分±0.38分($P<0.05$), 吞咽困难得到明显改善.

2.2 并发症情况 本组患者中有12例发生术后胸骨后疼痛, 但均能耐受, 无需使用止痛药物, 持续3-5 d后缓解. 有1例食管上段癌放疗后肿瘤组织再次浸润增生致食管狭窄, 鼻胃镜无法直接通过, 探条扩张置入食管支架后6 h出现血便, 术后3 d出现皮下气肿, 但无胸闷、气急等, 予以吸氧、止血补液及预防感染处理, 10 d后大便转黄、皮下气肿吸收消退, 能进食半流质. 所有患者随访2 mo, 无支架移位、脱落或吞咽困难加重发生.

■ 研发前沿

目前置入食管支架的方法主要有: X线透视下置入、内镜直视下置入和X线-内镜联合置入. 其中内镜直视下置入具有操作直观、易于调整、定位准确, 不受X线照射等优点. 但由于普通胃镜管径粗, 不能直接通过狭窄段, 故操作过程繁琐且给患者造成很大的痛苦.

■ 相关报道

Borgulya等通过对20例患者的前瞻性研究发现, 无X线透视引导的经鼻胃镜直视下放置食管自膨金属支架位置精确, 操作简单(平均13.4 min, 可在ICU床边进行), 且无近期并发症发生.

■创新盘点

随着内镜技术的发展,出现了管径很细的鼻胃镜(插入部直径仅5 mm),应用鼻胃镜能通过绝大多数的肿瘤狭窄段,可显著简化操作流程,缩短操作时间,减轻患者痛苦,减少术后并发症。

3 讨论

对于晚期食管癌、贲门癌患者,如能维持进食,将能很好地改善其营养状况,极大地提高患者的生活质量,食管支架置入就可以达到以上目的。成功置入食管支架的关键在于:明确狭窄部位及长度,导丝顺利通过狭窄段进入胃内,准确定位并释放支架。因此出现了X线引导及胃镜直视下引导食管支架置入两种方法。X线引导由于操作繁琐,且术者与患者均受X线照射等缺点,目前已很少采用;而胃镜直视下引导食管支架置入可很好地解决置入食管支架的3个关键问题。但是,普通胃镜镜身较粗,常不易直接通过食管、贲门的狭窄段,需反复多次扩张后再进镜观察狭窄长度,选择合适支架^[6]。狭窄扩张成功的前提是导丝顺利通过狭窄段,由于普通胃镜无法通过狭窄段,导丝常需盲插,在反复试插中易使局部组织损伤出血,偶可造成假道,引起食管穿孔等严重并发症。

随着胃镜技术的发展,20世纪90年代出现了新型的胃镜-鼻胃镜,使用超细胃镜经鼻插入,改善患者检查时恶心、呕吐等不适感,减轻患者胃镜检查的痛苦,而且减少了对心血管的影响,耐受性更好^[7-10]。我们利用鼻胃镜极细的镜身(GIF-XP260N,插入部直径仅5 mm),大部分患者(35/40)无需经扩张,鼻胃镜就能通过狭窄段,对于狭窄程度较重者,可用配套活钳置入鼻胃镜钳道内加强镜身硬度,有利于扩张进镜通过狭窄段。镜身通过狭窄段后就可直视下放置导丝于十二指肠,避免了盲插导丝的不良反应及风险。对于少数鼻胃镜无法通过者,仍需进行预扩张,但使用鼻胃镜后可显著减少探条的扩张次数,本组5例均是扩张一次后即能通过鼻胃镜,从而减轻因多次扩张引起狭窄段、咽部的损伤出血,减少消化道穿孔的风险,减少患者的痛苦,保证视野清楚,同时明显缩短操作时间。

胃镜直视下置入食管支架,需胃镜及支架推送器同时通过口咽部,患者非常痛苦,且进镜时胃镜与支架推送器互相影响,操作难度增加,而鼻胃镜可经鼻进镜,可明显减轻患者的痛苦。同时,支架装入推送器后因轴向压缩而延长,释放后又相应回缩,回缩时受不规则肿瘤组织的影响常不按正常比例,故操作前在支架推送器上做标记仅作为参考,操作时应在胃镜直视下据支架撑开后两端超出狭窄段2 cm。鼻胃镜由于镜身细,在置入支架过程中占据较少的空间,有利

于推送器的调整,减小了操作难度。在支架膨胀后,普通胃镜常难于通过支架腔,强行通过可能会造成支架向下移位,退出时又会造成支架向上移位,而鼻胃镜较细,在支架放置后可以顺利通过支架腔,方便对于支架下口的观察,必要时仍可进一步调整支架位置。由于金属支架的固有特性,置入的食管支架在体温的作用下,会继续膨胀,本组40例患者的吞咽困难症状均得到明显改善。

食管支架置放后的主要并发症有胸痛、出血和穿孔等^[11,12]。本组40例中有12例发生术后胸骨后疼痛,但均能耐受,无需使用止痛药物,持续3-5 d后缓解。有1例发生术后出血及迟发穿孔,严重并发症的发生率为2.5%,该患者为食管上段癌放疗后肿瘤组织再次浸润增生致食管狭窄,食管壁在放疗后脆性增加,操作中易发生出血,在支架的逐渐膨胀中易出现穿孔,对于此类患者行食管支架置入应慎重。亦有报道发生食物嵌顿或支架移位和脱落,需经内镜取出异物或支架^[13-15]。应用控释系统的内放疗支架则可减少肿瘤组织浸润增生所致的支架再狭窄^[16]。

总之,鼻胃镜直视下置入食管支架可简化操作,提高患者依从性,同时安全、准确、有效,较普通胃镜有更多优点。

4 参考文献

- 1 Frimberger E. Expanding spiral--a new type of prosthesis for the palliative treatment of malignant esophageal stenoses. *Endoscopy* 1983; 15 Suppl 1: 213-214
- 2 裴庆山, 刘吉勇. 食管支架研究进展. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 3410-3415
- 3 Hirdes MM, Vleggaar FP, Siersema PD. Stent placement for esophageal strictures: an update. *Expert Rev Med Devices* 2011; 8: 733-755
- 4 Schembre D. Advances in esophageal stenting: the evolution of fully covered stents for malignant and benign disease. *Adv Ther* 2010; 27: 413-425
- 5 Borgulya M, Ell C, Pohl J. Transnasal endoscopy for direct visual control of esophageal stent placement without fluoroscopy. *Endoscopy* 2012; 44: 422-424
- 6 何建华, 朱锐冰, 丁惠玲, 胡复兴, 章顺面. 内镜直视下置放金属支架治疗上消化道狭窄. *中华消化内镜杂志* 2001; 18: 120-121
- 7 戈之铮, 王晓青, 戴军, 薛寒冰, 李晓波, 宋燕. 经鼻胃镜检查的临床应用评估及对照研究. *中华消化内镜杂志* 2008; 25: 397-401
- 8 Gu Q, Wu C, Gu L, Yu C, Fang Y, Cai S, Youming L. Comparison of the cardiovascular impacts of transnasal versus transoral gastroscopy in the aged patients with or without hypertension. *Hepatogastroenterology* 2009; 56: 1562-1565
- 9 Hu CT. Remaining in an upright position is suboptimal for transnasal gastroscopy. *Am J Gastroenterol* 2010; 105: 2295-2296; author reply 2295-2296

■应用要点

在鼻胃镜直视下放置食管金属支架可保证释放支架的位置精确,且明显简化了操作流程,缩短了操作时间,并且减轻了患者痛苦,可在重症患者的床边进行操作,扩大了应用范围,可解决重症患者的治疗。

- 10 Tatsumi Y, Harada A, Matsumoto T, Tani T, Nishida H. Current status and evaluation of transnasal esophagogastroduodenoscopy. *Dig Endosc* 2009; 21: 141-146
- 11 钟捷, 吴云林. 食管金属支架演进及临床应用. *世界华人消化杂志* 2001; 9: 797-800
- 12 Kujawski K, Stasiak M, Rysz J. The evaluation of esophageal stenting complications in palliative treatment of dysphagia related to esophageal cancer. *Med Sci Monit* 2012; 18: CR323-CR329
- 13 Sharma N, Mahdi AA, Khanna R, Khan HM, Kumar H, Ahmad S. Biochemical studies on mouse liver following *Plasmodium berghei* infection. *Indian J Med Res* 1992; 95: 84-87
- 14 Molina-Infante J, Fernandez-Bermejo M, Perez-Gallardo B. Removal of a migrated covered metallic stent through an esophageal stricture, with multiple endoloops. *Endoscopy* 2010; 42 Suppl 2: E268-E269
- 15 van Heel NC, Haringsma J, Wijnhoven BP, Kuipers EJ. Endoscopic removal of self-expandable metal stents from the esophagus (with video). *Gastrointest Endosc* 2011; 74: 44-50
- 16 van Boeckel PG, Repici A, Vleggaar FP, Solito B, Rando G, Cortelezzi C, Rossi M, Pagano N, Malesci A, Siersema PD. A new metal stent with a controlled-release system for palliation of malignant dysphagia: a prospective, multicenter study. *Gastrointest Endosc* 2010; 71: 455-460

■同行评价

本文探讨鼻胃镜在食管支架置入中的作用, 对临床医生具有一定的指导意义。

编辑 田滢 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本表其真实研究成果, 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, 修改并最终审核核稿; (5)列出作者贡献分布; (6)来稿应附有作者工作单位的推荐信, 保证无泄密, 如果是几个单位合作的论文, 则需要提供所有参与单位的推荐信; (7)愿将印刷版和电子版版权转让给本刊编辑部。

2 稿件修改

来稿经同行专家审查后, 认为内容需要修改、补充或删节时, 本刊编辑部将把原稿连同审稿意见、编辑意见寄回给作者修改, 而作者必须于15 d内将单位介绍信、作者符合要点承诺书、版权转让信等书面材料寄回编辑部, 同时将修改后的电子稿件上传至在线办公系统; 逾期寄回的, 作重新投稿处理。

3 版权

本论文发表后作者享有非专有权, 文责由作者自负。作者可在本单位或本人著作集中汇编出版以及用于宣讲和交流, 但应注明发表于《世界华人消化杂志》××年; 卷(期); 起止页码。如有国内外其他单位和个人复制、翻译出版等商业活动, 须征得《世界华人消化杂志》编辑部书面同意, 其编辑版权属本刊所有。编辑部可将文章在《中国学术期刊光盘版》等媒体上长期发布; 作者允许该文章被美国《化学文摘》、《荷兰医学文摘库/医学文摘》、俄罗斯《文摘杂志》、《中国生物学文摘》等国内外相关文摘与检索系统收录。

多西他赛化疗联合放疗治疗食管癌疗效的系统评价

胡学军, 张虎, 邵国安, 王尚前, 刘贵峰, 王洛昆, 徐永耀

■背景资料

食管癌是临床常见的恶性肿瘤, 死亡率居恶性肿瘤的第6位, 70%的食管癌患者失去手术机会。近年来国内外文献报道多西他赛化疗联合放疗对患者有较好的疗效。通过采用同期放疗, 从而增强对局部肿瘤的杀伤作用, 避免肿瘤细胞在放疗后的快速增殖。理论上可通过化疗消除微小隐匿转移灶, 并且降低远处转移率。

胡学军, 张虎, 邵国安, 王尚前, 刘贵峰, 王洛昆, 徐永耀, 新疆医科大学第五附属医院肿瘤中心 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830011

胡学军, 副主任医师, 主要从事肿瘤基础与临床方面的研究。

作者贡献分布: 胡学军与邵国安对此文所作贡献均等; 此课题由胡学军、邵国安及张虎设计; 研究过程由胡学军、张虎、邵国安、王尚前、刘贵峰、王洛昆及徐永耀操作完成; 数据分析由张虎、王尚前及王洛昆完成; 本论文写作由胡学军、张虎、刘贵峰及徐永耀完成。

通讯作者: 邵国安, 主任医师, 830011, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市新市区河南路118号, 新疆医科大学第五附属医院肿瘤诊疗中心。gzbdz@tom.com

收稿日期: 2012-07-17 修回日期: 2012-10-22

接受日期: 2012-11-15 在线出版日期: 2012-11-28

Clinical effects of docetaxel chemotherapy combined with radiotherapy in the treatment of esophageal cancer: A systematic review

Xue-Jun Hu, Hu Zhang, Guo-An Shao, Shang-Qian Wang, Gui-Feng Liu, Luo-Kun Wang, Yong-Yao Xu

Xue-Jun Hu, Hu Zhang, Guo-An Shao, Shang-Qian Wang, Gui-Feng Liu, Luo-Kun Wang, Yong-Yao Xu, Center of Oncology, the Fifth Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Correspondence to: Guo-An Shao, Chief Physician, Center of Oncology, the Fifth Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, 118 Henan Road, Xinshi District, Urumqi 830011, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China. gzbdz@tom.com

Received: 2012-07-17 Revised: 2012-10-22

Accepted: 2012-11-15 Published online: 2012-11-28

Abstract

AIM: To compare the efficacy and safety of docetaxel chemotherapy combined with radiotherapy versus radiotherapy only in the treatment of esophageal cancer.

METHODS: Controlled trials that evaluated clinical effects of docetaxel chemotherapy combined with radiotherapy versus radiotherapy alone in the treatment of esophageal cancer were electronically searched from the CBM (1978-2011) and CNKI (1979-2011) databases, and the relevant published and unpublished data and their references in Chinese were also searched manually. The data were extracted and the methodological

quality of the incorporated research was evaluated by two reviewers independently. The RevMan 5.1 software was used for meta-analysis.

RESULTS: Ten controlled trials involving 378 patients were included. Meta-analysis showed that compared with radiotherapy alone, docetaxel chemotherapy combined with radiotherapy was associated with better complete remission [RR = 2.12, 95% confidence interval (CI) (1.39, 3.25), $P = 0.0005$], short-term efficacy [RR = 3.56, 95% CI (1.97, 6.42), $P < 0.0001$], 1-year survival rate [RR = 2.64, 95% CI (1.17, 5.97), $P = 0.02$], and significantly improved grade 1 gastrointestinal reactions [RR = 0.37, 95% CI (0.17, 0.80), $P = 0.01$]. There were no significant differences in the rate of partial remission [RR = 1.05, 95% CI (0.69, 1.59), $P = 0.83$], 3-year survival rate [RR = 2.21, 95% CI (1.16, 4.22), $P = 0.02$], grades 0, 1, 2 and 3 gastrointestinal reactions [RR = 0.78, 95% CI (0.35, 1.73), $P = 0.55$; RR = 2.05, 95% CI (0.92, 4.59), $P = 0.08$; RR = 1.08, 95% CI (0.49, 2.39), $P = 0.84$; RR = 1.45, 95% CI (0.54, 3.90), $P = 0.46$], grades 0, 1, 2, 3 and 4 hematologic toxicities [RR = 0.55, 95% CI (0.26, 1.13), $P = 0.10$; RR = 1.00, 95% CI (0.48, 2.10), $P = 1.00$; RR = 1.26, 95% CI (0.58, 2.74), $P = 0.56$; RR = 1.29, 95% CI (0.48, 3.51), $P = 0.61$; RR = 3.09, 95% CI (0.31, 30.50), $P = 0.33$], and grades 2 and 3 esophageal mucosal reactions [RR = 1.20, 95% CI (0.60, 2.39), $P = 0.60$; RR = 1.27, 95% CI (0.49, 3.30), $P = 0.63$].

CONCLUSION: Docetaxel chemotherapy combined with radiotherapy is better than radiotherapy only in the treatment of esophageal cancer in terms of the overall curative effect. Because of a small number of studies in the incorporated research, the above conclusion is still validated by carrying out reasonably more randomized controlled trials with the multiple center sample.

Key Words: Docetaxel; Chemotherapy and radiotherapy; Esophageal cancer; Controlled trial; Systematic review; Meta-analysis

Hu XJ, Zhang H, Shao GA, Wang SQ, Liu GF, Wang LK, Xu YY. Clinical effects of docetaxel chemotherapy combined with radiotherapy in the treatment of esophageal cancer: A systematic review. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012;

■同行评议者

官泳松, 教授, 四川大学华西医院放射科

20(33): 3256-3265

摘要

目的: 评价多西他赛化疗联合放疗与单纯放疗治疗食管癌的有效性及安全性。

方法: 计算机检索CBM(1978-2011)和CNKI(1979-2011)并手工检索发表的资料和会议论文并追索纳入文献的参考文献, 查找国内比较多西他赛化疗联合放疗与单纯放疗治疗食管癌的相关病例-对照试验。对纳入研究进行方法学质量评价之后, 采用RevMan 5.1软件进行Meta分析。

结果: 共纳入6个国内相关病例-对照研究, 合计378例患者。Meta分析结果表明: 与单纯放疗治疗食管癌相比, 多西他赛化疗联合放疗提高完全缓解率[RR = 2.12, 95%CI(1.39, 3.25), $P = 0.0005$], 提高近期治疗有效率[RR = 3.56, 95%CI(1.97, 6.42), $P < 0.0001$]及1年生存率[RR = 2.64, 95%CI(1.17, 5.97), $P = 0.02$], 并明显缓解食管黏膜1级反应[RR = 0.37, 95%CI(0.17, 0.80), $P = 0.01$]。而在部分缓解率[RR = 1.05, 95%CI(0.69, 1.59), $P = 0.83$]、3年生存率比较[RR = 2.21, 95%CI(1.16, 4.22), $P = 0.02$]、消化道反应0、1、2、3级[RR = 0.78, 95%CI(0.35, 1.73), $P = 0.55$; RR = 2.05, 95%CI(0.92, 4.59), $P = 0.08$; RR = 1.08, 95%CI(0.49, 2.39), $P = 0.84$; RR = 1.45, 95%CI(0.54, 3.90), $P = 0.46$]、血液毒性[RR = 0.55, 95%CI(0.26, 1.13), $P = 0.10$; RR = 1.00, 95%CI(0.48, 2.10), $P = 1.00$; RR = 1.26, 95%CI(0.58, 2.74), $P = 0.56$; RR = 1.29, 95%CI(0.48, 3.51), $P = 0.61$; RR = 3.09, 95%CI(0.31, 30.50), $P = 0.33$]、食管黏膜反应2、3级[RR = 1.20, 95%CI(0.60, 2.39), $P = 0.60$; RR = 1.27, 95%CI(0.49, 3.30), $P = 0.63$]等方面没有显著性差异。

结论: 多西他赛化疗联合放疗治疗食管癌的有效性及安全性总体疗效明显优于单纯放疗。由于纳入研究数量少, 上述结论尚需开展更多设计合理的多中心大样本的随机对照试验加以验证。

关键词: 多西他赛; 放疗联合; 食管癌; 对照试验; 系统评价; Meta分析

胡学军, 张虎, 邵国安, 王尚前, 刘贵峰, 王洛昆, 徐永耀. 多西他赛化疗联合放疗治疗食管癌疗效的系统评价. 世界华人消化杂志 2012; 20(33): 3256-3265

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3256.asp>

www.wjgnet.com

0 引言

食管癌是临床常见的恶性肿瘤, 位列常见恶性肿瘤的第8位, 全世界每年新增病例超过40万, 其中死于该病患者超过35万, 死亡率居恶性肿瘤的第6位^[1], 手术切除是目前唯一能够根治食管癌的方法, 但食管癌早期症状不典型, 检出率低, 70%的食管癌患者失去手术机会^[2]。近年来国内外文献报道多西他赛化疗联合放疗对患者有较好的疗效。多西他赛作为紫杉醇类药物, 通过促进微管双聚体装配成微管, 同时通过防止去多聚化过程而使微管稳定, 阻滞细胞于G₂、M期, 从而抑制癌细胞的有丝分裂和增殖^[2]。通过采用同期放化疗, 也可能存在其他放射增敏作用如: 细胞周期再氧合、放射诱导细胞凋亡和协同抗血管生成作用等^[3]。

理论上可通过化疗消除微小隐匿转移灶, 并且降低远处转移率^[4]。本研究采用Cochrane系统评价方法, 通过搜集国内关于多西他赛化疗联合放疗与单纯放疗治疗食管癌的资料, 比较分析两种治疗方式的疗效, 进一步指导临床工作。

1 材料和方法

1.1 材料 选取年龄40-80岁的患者, 所有病例均行纤维胃镜检查取活检, 病变长度在3-9 cm, 明确组织学诊断为食管癌, 均为初次放疗, 且为食管癌晚期无法手术治疗者(表1)。

1.2 方法

1.2.1 干预措施: 对照组患者均采用单纯放疗进行治疗, 而试验组在治疗开始即给予化疗, 化疗采用多西他赛40 mg/次, 1次/wk, 共用4-6 wk。同时予以常规止吐和抗过敏治疗, 如出现血象下降则予以G-CSF对症处理。

1.2.2 排除标准: 远处转移, 食管穿孔, 治疗前肝、肾功能及血常规明显异常者。

1.2.3 观察指标: 包括完全缓解(complete remissions, CR)、部分缓解(partial remissions, PR)、稳定(stable disease, SD)、进展(progressive disease, PD)和近期总有效率(CR+PR)。

1.2.4 文献检索: 计算机检索CBM(1978-2011)和CNKI(1979-2011)并手工检索发表的资料和会议论文并追索纳入文献的参考文献, 查找国内比较多西他赛化疗联合放疗与单纯放疗治疗食管癌的相关病例-对照试验。中文检索词包括: 多西他赛、放化疗联合、食管癌、对照试验、系统评价和Meta分析。

1.2.5 资料提取与文献质量评价: 由2位评价者独

■ 研究前沿

近年来国内外文献报道多西他赛化疗联合放疗有较好的疗效。通过采用同期放化疗, 从而增强对局部肿瘤的杀伤作用, 避免肿瘤细胞在放疗后的快速增殖。理论上可通过化疗消除微小隐匿转移灶, 并且降低远处转移率。

■ 相关报道

国内许多学者,如付方现、郑玮薇、张国政等通过研究发现多西他赛化疗联合放疗治疗晚期食管癌有一定疗效,不良反应可耐受,有较高的临床获益率,特别是复治病例仍有一定效果,值得进一步临床应用和观察。国外学者Pasini等用多西他赛诱导化疗加同步放疗治疗食管癌,结果显示59.6%患者病理分期明显下降,而且近期有效率及1年生存率均明显高于单放组。

表 1 纳入研究的基本情况

纳入研究	病例总例数 (试验组/对照组)	男/女 (n)	治疗方案	
			化疗	放疗
宋飞翔等 ^[7]	46(23/23)	27/19	多西他赛40 mg, 1次/wk, 共6次	未提及
丁华等 ^[8]	96(48/48)	52/44	多西他赛25 mg/m ² , 1次/wk, 共4次	采用三维适形放射治疗DT64-70 Gy/33-35Fr/6-7次/wk
郝永光等 ^[2]	60(30/30)	37/23	多西他赛40 mg, 1次/wk, 共6次	未提及
陈丽等 ^[9]	44(22/22)	未提及	多西他赛40 mg, 1次/wk, 共6次	直线加速器常规分割法6MV或15MVX线, 总剂量达DT 60-68 Gy, 1次/d, 2 Gy/次, 5次/wk
杨振华 ^[10]	68(34/34)	56/10	多西他赛20 mg/次, 1次/wk, 总量为120-140 mg	采用常规放疗技术, 颈段病变采用双前斜加楔形板技术, 胸段病变采用三野等中心照射技术, 总剂量60-70 Gy/6-7 wk
李佳等 ^[11]	64(32/32)	52/12	多西他赛40 mg, 1次/wk, 共4-6次	采用调强适形放射治疗技术DT60-70 Gy, 1次/d, 2 Gy/次, 5次/wk

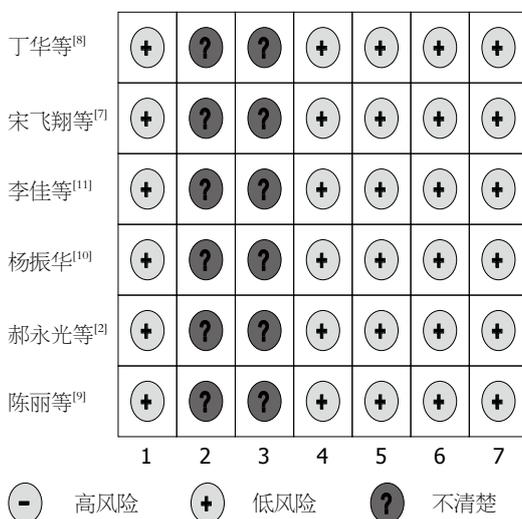


图 1 纳入研究的偏倚风险评价: 1: 随机方法; 2: 隐蔽分组; 3: 医生和患者的盲法; 4: 数据统计者的盲法; 5: 不完整资料偏倚; 6: 选择性报告结果; 7: 其他潜在影响真实性的因素。

立检索文献、提取资料并再次核对, 如有分歧则通过征求第3方意见进行解决。纳入研究的方法学质量评价采用Cochrane Reviewer Handbook 5.1的RCT质量标准^[5]和吴泰相等^[6]对隐蔽分组和盲法的描述, 具体评价标准包括随机方法、隐蔽分组、医生和患者的盲法、数据统计者的盲法、不完整资料偏倚、选择性报告结果和其他潜在影响真实性的因素7项。如7项指标均符合则说明该研究的质量较高, 否则有产生相应偏倚的可能性。

统计学处理 采用Cochrane协作网提供的RevMan 5.1软件进行Meta分析。计数资料用相对危险度(relative risk, RR)及95%可信区间(confidence interval, CI)表示, 对度量衡单位相同的计量资料采用加权均数差值(weighted mean dif-

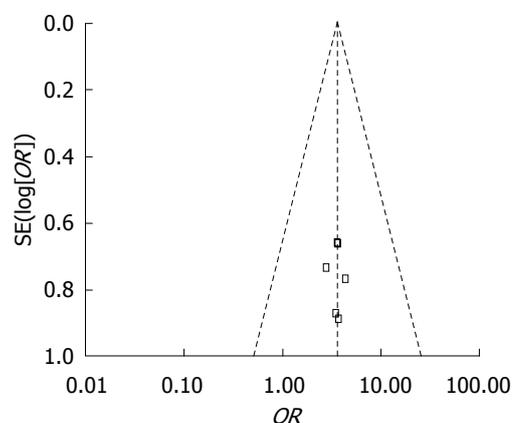


图 2 两种治疗有效率比较漏斗图。

ference, WMD), 单位不同者采用标化均数差值(standardized mean difference, SMD)。数据合并之前先对各研究的数据进行异质性检验, 若各研究间无异质性存在, 采用固定效应模型进行分析; 若各研究结果间存在异质性, 首先分析异质性来源, 如无临床异质性, 可采用随机效应模型分析。对无法定量合成者, 则通过描述予以定性评价。

2 结果

2.1 纳入研究的特征 按照预先制定的检索策略, 通过电子和手工检索本研究, 搜到相关文献20篇^[2,7-24], 通过参考题目和摘要最终纳入中文文献6篇^[2,7-11], 共378例患者, 试验组行多西他赛化疗联合放疗治疗食管癌189例; 对照组采用单纯放疗治疗食管癌189例。所纳入研究的基本情况如表1, 其方法学质量并不高(图1), 所有纳入的文献采用漏斗图评估发表偏移(图2), 结果显示未见明显发表偏倚。

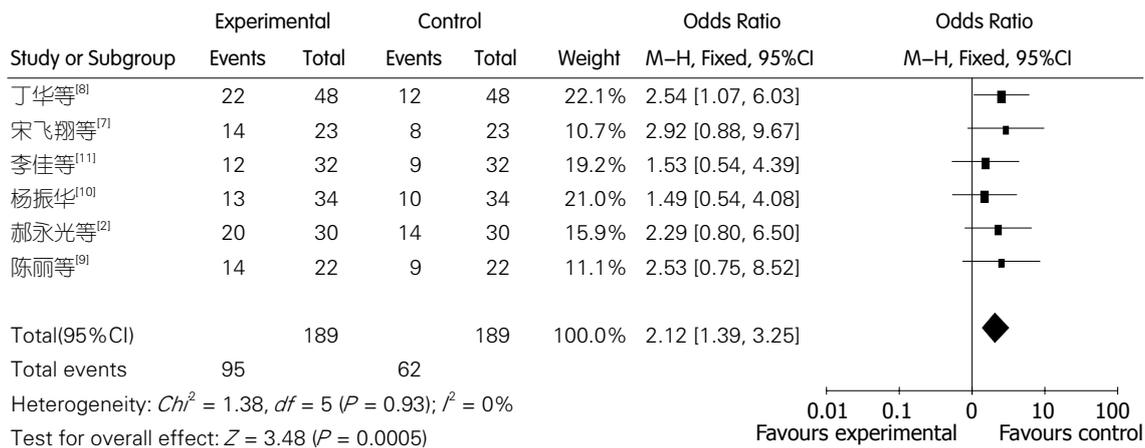


图 3 多西他赛化疗联合放疗与单纯放疗治疗食管癌完全缓解比较的Meta分析。

■ 创新点
 对于无法手术治疗的食管癌晚期患者治疗仍较为棘手, 目前认为姑息性外照射放疗可缓解吞咽困难, 几乎无不良反应, 但疗效显现很慢。对于不能行手术或已转移的食管癌患者, 姑息性化疗可缓解症状, 提高患者生活质量; 对食管鳞癌、腺癌和未分化癌, 姑息性联合化疗与最佳支持治疗相比, 可改善患者的生存率。

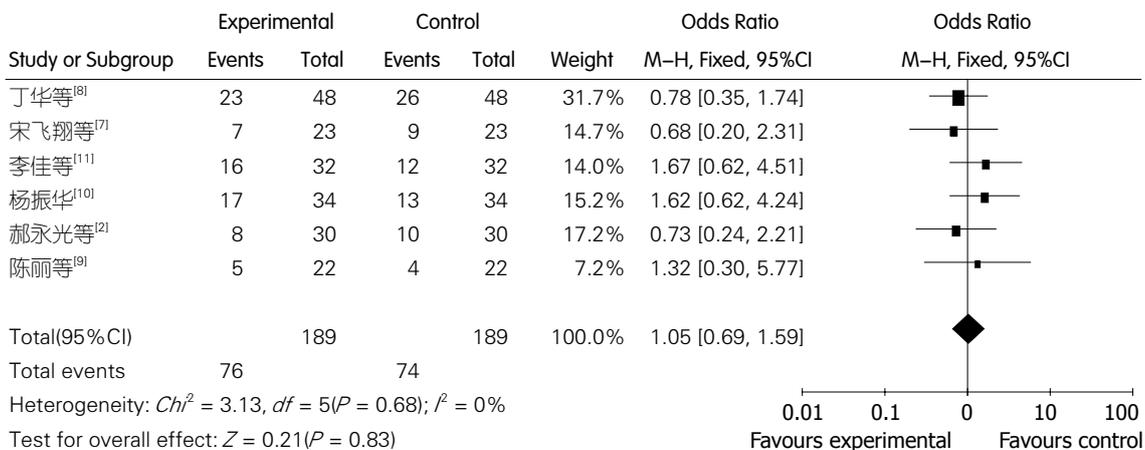


图 4 多西他赛化疗联合放疗与单纯放疗治疗食管癌部分缓解比较的Meta分析。

2.2 Meta分析

2.2.1 完全缓解比较: 纳入的6个研究均比较了多西他赛化疗联合放疗治疗与采用单纯放疗治疗食管癌完全缓解情况, 异质性检验结果显示各研究间无统计学异质性($P = 0.93, I^2 = 0\%$), 故采用固定效应模型进行Meta分析, 结果显示两组差异有统计学意义[RR = 2.12, 95%CI(1.39, 3.25), $P = 0.0005$](图3)。

2.2.2 部分缓解比较: 纳入的6个研究均比较了多西他赛化疗联合放疗治疗与采用单纯放疗治疗食管癌部分缓解情况, 异质性检验结果显示各研究间无统计学异质性($P = 0.68, I^2 = 0\%$), 故采用固定效应模型进行Meta分析, 结果显示两组差异无统计学意义[RR = 1.05, 95%CI(0.69, 1.59), $P = 0.83$](图4)。

2.2.3 近期治疗有效率比较: 纳入的6个研究均比较了多西他赛化疗联合放疗治疗与采用单纯放疗治疗食管癌近期有效率情况, 异质性检验结果显示各研究间无统计学异质性($P = 1.00,$

$I^2 = 0\%$), 故采用固定效应模型进行Meta分析, 结果显示两组差异有统计学意义[RR = 3.56, 95%CI(1.97, 6.42), $P < 0.0001$](图5)。

2.2.4 1年生存率比较: 纳入的2个研究均比较了多西他赛化疗联合放疗治疗与采用单纯放疗治疗食管癌1年生存率情况, 异质性检验结果显示各研究间无统计学异质性($P = 0.20, I^2 = 38\%$), 故采用固定效应模型进行Meta分析, 结果显示两组差异有统计学意义[RR = 2.64, 95%CI(1.17, 5.97), $P = 0.02$](图6)。

2.2.5 3年生存率比较: 纳入的2个研究均比较了多西他赛化疗联合放疗治疗与采用单纯放疗治疗食管癌3年生存率情况, 异质性检验结果显示各研究间无统计学异质性($P = 0.38, I^2 = 0\%$), 故采用固定效应模型进行Meta分析, 结果显示两组差异有统计学意义[RR = 2.21, 95%CI(1.16, 4.22), $P = 0.02$](图7)。

2.2.6 消化系反应比较: 纳入的2个研究均比较了多西他赛化疗联合放疗治疗与采用单纯放疗治

■应用要点

放疗联合化疗的综合治疗是目前中晚期食管癌治疗的发展趋势。越来越多的人关注多西他赛化疗联合放疗治疗晚期食管癌,目前采用3DCRT技术联合多西他赛为主的化疗同步治疗局部晚期食管癌的近期疗效较好,能明显缓解患者的临床症状,提高患者的生活质量,值得进一步研究。

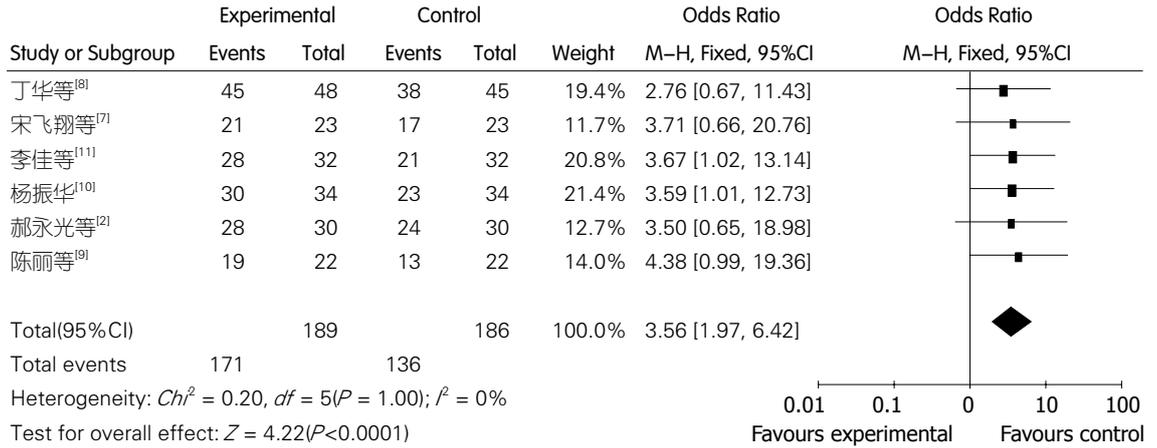


图 5 多西他赛化疗联合放疗与单纯放疗治疗食管癌近期治疗有效率比较的Meta分析。

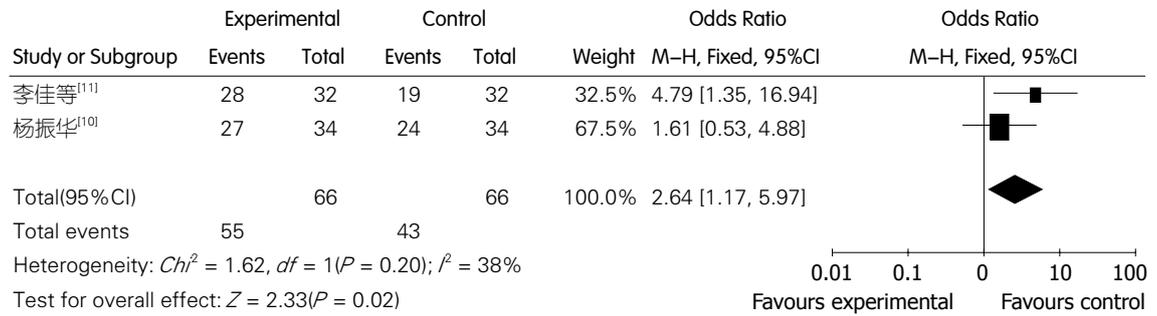


图 6 多西他赛化疗联合放疗与单纯放疗治疗食管癌1年生存率比较的Meta分析。

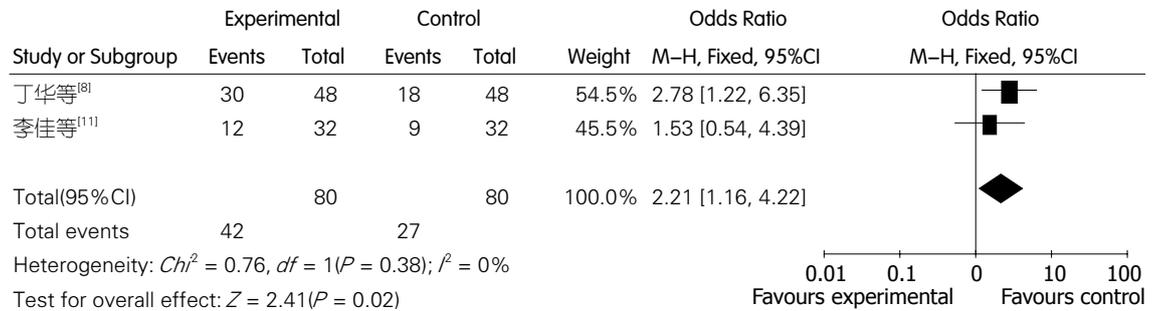


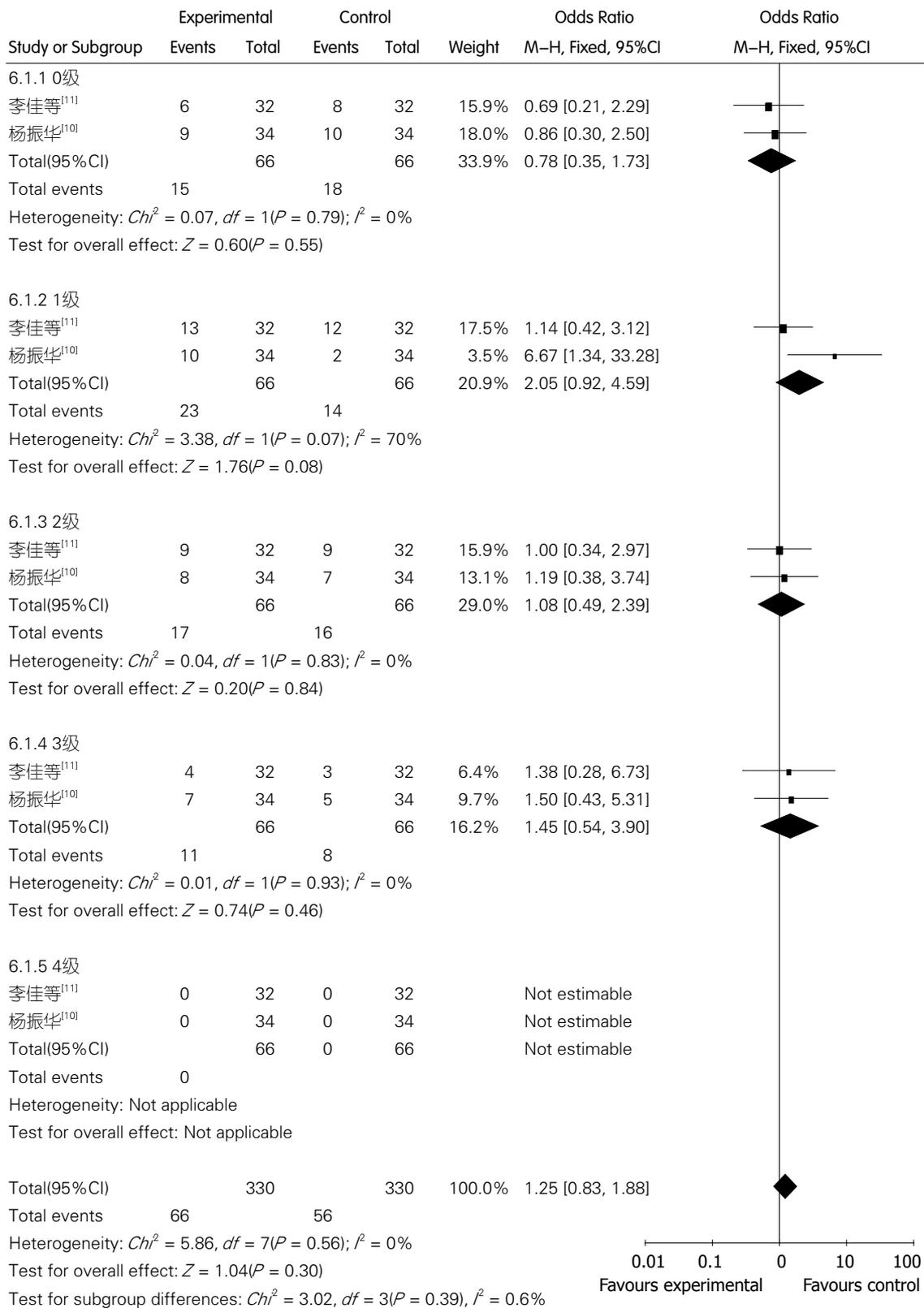
图 7 多西他赛化疗联合放疗与单纯放疗治疗食管癌3年生存率比较的Meta分析。

疗食管癌消化系反应情况, 异质性。3行Meta分析, 将消化道反应0、1、2、3、4共5级设为5个亚组, 消化系反应0、1、2、3、4级5组差异均无统计学意义[RR = 0.78, 95%CI(0.35, 1.73), $P = 0.55$; RR = 2.05, 95%CI(0.92, 4.59), $P = 0.08$; RR = 1.08, 95%CI(0.49, 2.39), $P = 0.84$; RR = 1.45, 95%CI(0.54, 3.90), $P = 0.46$](图8)。

2.2.7 血液毒性比较: 纳入的2个研究均比较了多西他赛化疗联合放疗治疗与采用单纯放疗治疗食管癌血液毒性情况, 异质性检验结果显示各研究间无统计学异质性($P = 0.71, I^2 = 0\%$), 故采用固定效应模型进行Meta分析, 结

果显示血液毒性0、1、2、3、4级5组差异均无统计学意义[RR = 0.55, 95%CI(0.26, 1.13), $P = 0.10$; RR = 1.00, 95%CI(0.48, 2.10), $P = 1.00$; RR = 1.26, 95%CI(0.58, 2.74), $P = 0.56$; RR = 1.29, 95%CI(0.48, 3.51), $P = 0.61$; RR = 3.09, 95%CI(0.31, 30.50), $P = 0.33$](图9)。

2.2.8 食管黏膜反应比较: 纳入的2个研究均比较了多西他赛化疗联合放疗治疗与采用单纯放疗治疗食管癌食管黏膜反应情况, 异质性检验结果显示各研究间无统计学异质性($P = 0.09, I^2 = 48\%$), 故采用固定效应模型进行Meta分析, 结果显示食管黏膜反应1级组差异有统计学意义



同行评价
 本文从总体上比较了单纯放疗与放疗联合多西他赛这两种方法, 对临床有一定指导意义。

图 8 多西他赛化疗联合放疗与单纯放疗治疗食管癌消化道反应比较的Meta分析.

[RR = 0.37, 95%CI(0.17, 0.80), $P = 0.01$]; 2、3级组差异均无统计学意义[RR = 1.20, 95%CI(0.60, 2.39), $P = 0.60$; RR = 1.27, 95%CI(0.49, 3.30), $P = 0.63$](图10).

3 讨论

对于无法手术治疗的食管癌晚期患者的治疗仍较为棘手, 目前认为姑息性外照射放疗可缓解吞咽困难, 几乎无不良反应, 但疗效显现较慢。

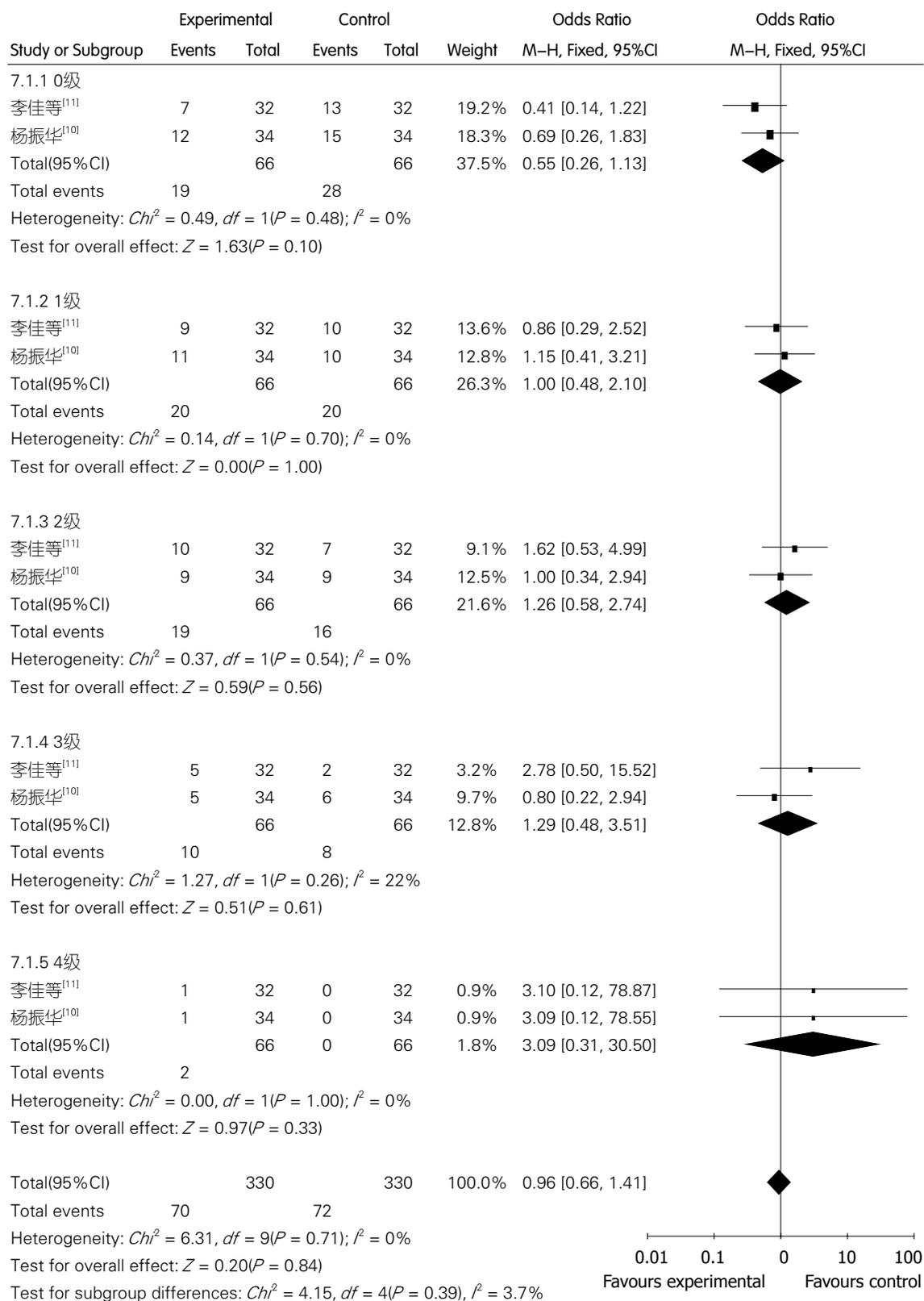


图9 多西他赛化疗联合放疗与单纯放疗治疗食管癌血液毒性的Meta分析。

对于不能行手术或已转移的食管癌患者,姑息性化疗可缓解症状,提高患者生活质量.对食管鳞癌、腺癌和未分化癌,姑息性联合化疗与最佳支持治疗相比,可改善患者的生存率。

目前学者普遍认为单纯化疗效果差,单纯化疗主要作为中晚期食管癌姑息性治疗措施之一,对转移性亚临床病灶也有效,因此在食管癌综合治疗中依然占有重要地位^[25].国内外研究已证

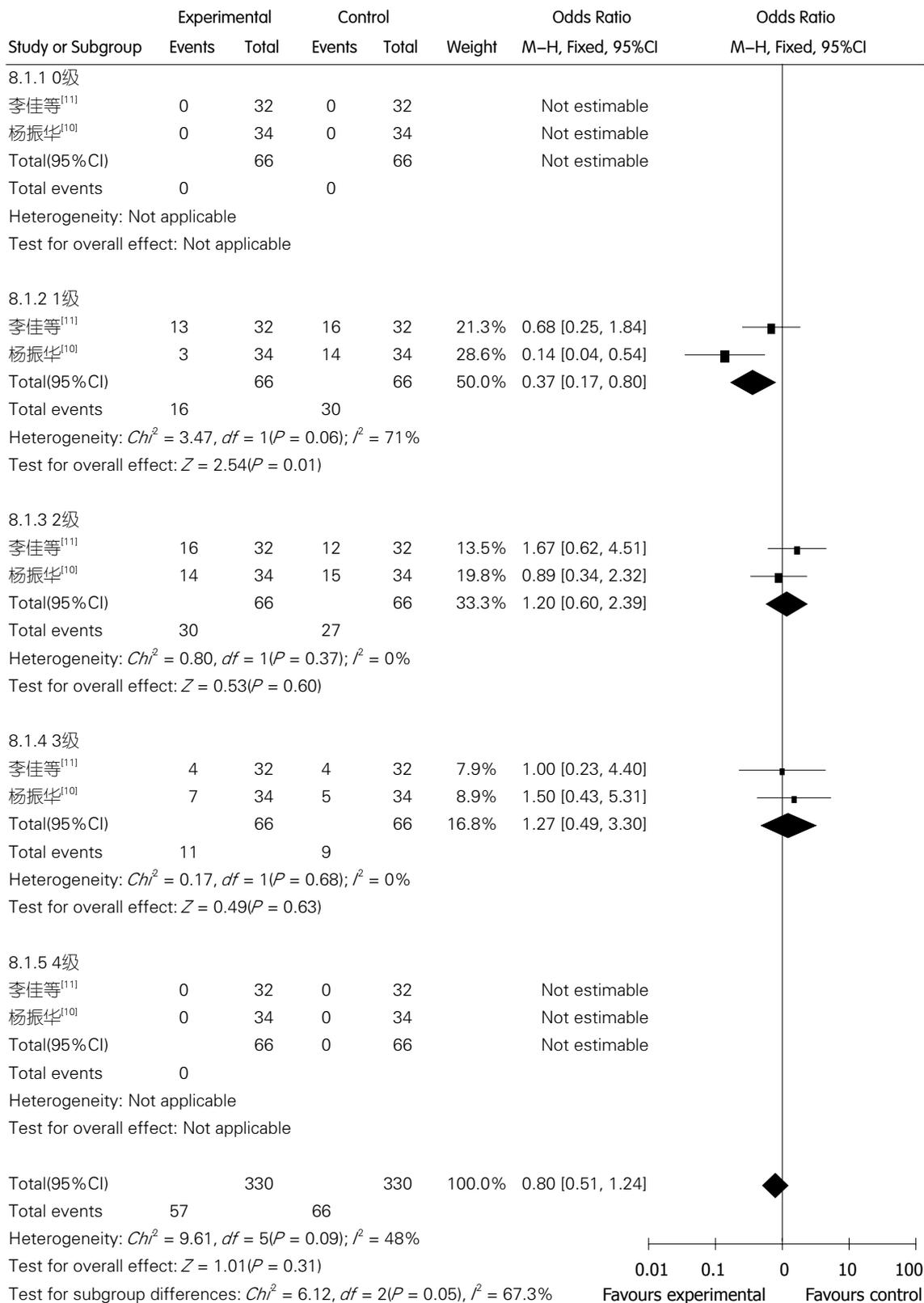


图 10 多西他赛化疗联合放疗与单纯放疗治疗食管癌食管黏膜反应比较的Meta分析.

明紫杉类药物有明显的放射增敏作用, 并呈时间依赖性, 与药物浓度无相关性, 提高放射增敏效应的主要因素取决于药物作用时间的延长而不是药物浓度的增加^[26,27].

放疗联合化疗是目前中晚期食管癌治疗的发展趋势^[28]. 国内许多学者, 如付方现等^[29]通过对行多西他赛联合DDP治疗晚期食管癌的患者进行研究, 发现主要不良反应为骨髓抑制、

皮肤毒性反应和胃肠道反应。骨髓抑制中III度白细胞减少22例(20%), IV度白细胞减少8例(7.27%), 给予粒细胞集落刺激因子后恢复正常, 其中8例延期化疗; 胃肠道反应中, III度恶心呕吐10例(9.1%), IV度恶心呕吐2例(1.8%), 给予水化利尿、5-羟色胺3受体拮抗剂及纠正水电解质紊乱治疗症状改善, 认为多西他赛联合DDP治疗晚期食管癌有一定疗效, 不良反应可耐受, 有较高的临床获益率, 特别是复治病例仍有一定效果, 值得进一步临床应用和观察。郑玮薇等^[30]通过多西他赛联合奈达铂化疗同步放射治疗局部中晚期食管癌, 也取得了良好的近期疗效。张国政等^[31]通过采用3DCRT技术联合多西他赛为主的化疗同步治疗局部晚期食管癌的近期疗效较好, 能明显缓解患者的临床症状, 提高患者的生活质量, 且不良反应可耐受, 值得临床进一步研究。国外学者Pasini等^[32]用多西他赛诱导化疗加同步放疗治疗食管癌, 结果显示59.6%患者病理分期明显下降, 而且近期有效率及1年生存率均明显高于单放组。另外, 放疗中应用增敏药物也可以增加疗效。吴剑等^[33]用小剂量的顺铂对食管癌放疗的增敏研究, 结果显示: 完全缓解率和长期生存率方面, 放疗增敏组均优于单纯放疗组, 说明放疗中应用增敏药物是有意义的。国外Kim等^[34]指出, 当多西他赛与放疗结合治疗食管癌时, 一般给予20-30 mg/wk, 连用6-7 wk; 放疗按常规放疗, 总量达60-70 Gy, 可以使总疗效提高到80%以上, 且不良反应可以耐受。

本研究显示: 国内临床上多西他赛化疗联合放疗与单纯放疗治疗食管癌的随机对照研究数量较少, 仅有的6篇文献^[2,7-11]按照Cochrane Reviewer Handbook 5.1的RCT质量标准和吴泰相等的质量评价, 结果都属于较低质量文献, 目前相关文献存在如下不足, 随机和盲法的实施存在不足, 6篇文献^[2,7-11]中均未提到随机分组的具体方法、采用具体分配隐藏方案及盲法的实施, 故无法避免人为因素对结果产生的影响及实施和结果测量偏倚的产生, 从而影响结果的论证强度, 6个研究^[2,7-11]报告结果数据均完整且均报告所有预先指定的主要结局指标, 不存在报告偏倚和随访偏倚。6个研究^[2,7-11]均来自中国, 样本量相对于每年全世界患者样本量偏少, 有可能存在选择性偏倚, 影响了结果的普遍性。本研究大多数试验例数在50例以下且都是单中心的研究。综上所述, 本研究使结论的论证强度和可信度受到一定程度的限制。

本系统评价结果显示, 与单纯放疗治疗食管癌相比, 多西他赛化疗联合放疗提高完全缓解率, 提高近期治疗有效率及1年生存率, 并明显缓解食管黏膜1级反应。而在部分缓解率、3年生存率比较、消化系反应0、1、2、3、4级、血液毒性、食管黏膜反应2、3级等方面没有显著性差异。鉴于纳入研究质量低, 使论证强度受到一定限制, 有必要进一步开展前瞻性临床随机试验和远期疗效观察的循证医学进行验证, 例如: 采取多中心随机分组并进行隐蔽分组, 扩大样本量, 采用盲法, 随访期足够长, 进行高质量的随机对照试验来进一步提升结论的论证强度和可信度。

4 参考文献

- 1 Parkin DM, Bray FI, Devesa SS. Cancer burden in the year 2000. The global picture. *Eur J Cancer* 2001; 37 Suppl 8: S4-S66
- 2 郝永光. 多西他赛化疗联合放疗治疗食管癌临床观察. *山东医药* 2010; 50: 76-77
- 3 Hennequin C. [Association of taxanes and radiotherapy: preclinical and clinical studies]. *Cancer Radiother* 2004; 8 Suppl 1: S95-S105
- 4 Nakagawa S, Kanda T, Kosugi S, Ohashi M, Suzuki T, Hatakeyama K. Recurrence pattern of squamous cell carcinoma of the thoracic esophagus after extended radical esophagectomy with three-field lymphadenectomy. *J Am Coll Surg* 2004; 198: 205-211
- 5 Higgins JPT, Green S. *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions* Version. West Sussex: John Wiley & Sons Ltd, 2008
- 6 吴泰相, 刘关键. 隐蔽分组(分配隐藏)和盲法的概念实施与报告. *中国循证医学杂志* 2007; 7: 203-207
- 7 宋飞翔, 崔玉梅, 阮新建, 张侠, 李红英, 于忠和. 多西他赛化疗联合放疗治疗食管癌临床观察. *药物与临床* 2011; 8: 59-60
- 8 丁华, 蔡晶, 谢国栋, 赵季忠, 何晓军. 三维适形放疗联合多西他赛同步化疗治疗中晚期食管癌的临床研究. *齐齐哈尔医学院学报* 2010; 31: 3546-3547
- 9 陈丽, 陈滨. 多西他赛与放疗联合对食管癌放射增敏的疗效观察. *山东医药* 2010; 50: 41-42
- 10 杨振华. 多西他赛同步放化疗治疗食管癌疗效观察. *赣南医学院学报* 2008; 28: 925-925
- 11 李佳, 戴鹏, 姜晓东. 多西他赛与调强适形放疗同步治疗食管癌临床疗效观察. *齐齐哈尔医学院学报* 2011; 32: 24-25
- 12 陈俊强, 陈明强, 朱坤寿, 李云英, 潘建基, 陈文娟, 邱素芳, 邵凌东, 吴君心. 多西他赛联合顺铂同期放化疗治疗食管癌术后复发转移的临床观察. *中华肿瘤防治杂志* 2008; 15: 1092-1120
- 13 付方现, 李永锋, 刘俊叶, 韩文青, 冯献明. 多西他赛联合顺铂治疗晚期食管癌临床观察. *中华肿瘤防治杂志* 2008; 15: 1506-1507
- 14 卞志远. 多西他赛为主联合化疗治疗晚期食管癌的临床研究. *中国实用医药* 2009; 4: 166-167
- 15 许均, 陈俊强, 陈明强. 多西他赛加顺铂同期放化疗治疗60例复发转移食管癌疗效观察. *福建医药杂志* 2009; 31: 125-125
- 16 肖建新, 郭贺, 陈雷. 多西他赛联合奥沙利铂治疗复治

- 晚期食管癌的临床研究. 中华肿瘤防治杂志 2011; 18: 216-218
- 17 周明, 徐岗, 杨嵘皓. 奈达铂联合多西他赛并同期放疗治疗不可手术食管癌疗效的研究. 南方医科大学学报 2010; 30: 908-909
- 18 丁颖, 苏琼菲, 杨帆, 刘晓清, 彭苗, 莫凯岚, 王希成. 食管癌术前同步多西他赛联合顺铂化疗的临床观察. 中华肿瘤防治杂志 2012; 19: 679-682
- 19 周莉华, 吴瑾, 蒋晓东. 多西他赛联合放疗治疗中晚期食管癌的疗效观察. 实用肿瘤学杂志 2010; 24: 68-73
- 20 林丹霞, 邱希辉, 江艺, 陈志明, 杨钰贤, 林慧. 多西他赛联合顺铂与多西他赛单药治疗复治晚期食管癌的临床研究. 陕西肿瘤医学 2010; 18: 1544-1546
- 21 戴圣斌, 王鹏, 仇春勤, 许万松, 孙光志. 三维适形放疗联合TP方案化疗治疗中晚期食管癌疗效分析. 山东医药 2010; 50: 6
- 22 郑玮薇, 朱玉亮. 多西他赛联合奈达铂化疗同步放疗治疗局部中晚期食管癌的近期疗效分析. 医学信息 2011; 24: 183-184
- 23 吕杰. 多西他赛联合顺铂治疗食管癌的疗效分析. 中国医药指南 2012; 10: 599-600
- 24 李国忠, 张绍华, 张志, 王瑞林. 每周一次多西他赛同步放疗治疗食管癌临床疗效观察. 中国肿瘤临床 2007; 34: 754-757
- 25 李方儒. 食管癌的放射治疗和化学治疗. 世界华人消化杂志 2000; 8: 1024-1026
- 26 Chen Y, Pandya K, Keng PP, Feins R, Raubertas R, Smudzin T, Rosenblatt J, Okunieff P. Schedule-dependent pulsed paclitaxel radiosensitization for thoracic malignancy. *Am J Clin Oncol* 2001; 24: 432-437
- 27 唐秋, 李光. 多西紫杉醇的细胞毒性和体外放射增敏作用. 中国科技大学学报 2004; 33: 30
- 28 谭新劲, 刘晋湘, 任丽, 周生焰. 低剂量每周一次多西他赛同步放疗治疗食管癌的临床疗效. 实用癌症杂志 2009; 24: 388-390
- 29 付方现, 李永锋, 刘俊叶, 韩文青, 冯献明. 多西他赛联合顺铂治疗晚期食管癌临床观察. 中华肿瘤防治杂志 2008; 15: 1506-1507
- 30 郑玮薇, 朱玉亮. 多西他赛联合奈达铂化疗同步放疗治疗局部中晚期食管癌的近期疗效分析. 医学信息 2011; 24: 183-184
- 31 张国政. 三维适形放疗联合多西他赛为主的化疗同步治疗局部晚期食管癌疗效观察. 肿瘤基础与临床 2012; 25: 301-303
- 32 Pasini F, de Manzoni G, Pedrazzani C, Grandinetti A, Durante E, Gabbani M, Tomezzoli A, Griso C, Guglielmi A, Pelosi G, Maluta S, Cetto GL, Cordinano C. High pathological response rate in locally advanced esophageal cancer after neoadjuvant combined modality therapy: dose finding of a weekly chemotherapy schedule with protracted venous infusion of 5-fluorouracil and dose escalation of cisplatin, docetaxel and concurrent radiotherapy. *Ann Oncol* 2005; 16: 1133-1139
- 33 吴剑, 戴慧, 翁欣然, 林权冰, 卢晓红. 小剂量顺铂对中晚期食管癌放疗增敏作用的近期疗效观察. 中国肿瘤临床 2006; 33: 768-770
- 34 Kim ES, Khuri FR. Docetaxel and radiation as combined-modality therapy. *Oncology (Williston Park)* 2002; 16: 97-105

编辑 田滢 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 •

2011年度《世界华人消化杂志》发文情况

本刊讯 2011-01-01/2011-12-31,《世界华人消化杂志》共收到稿件1576篇,退稿932篇,退稿率59.13%,发表文章644篇,所有文章均经过编委专家同行评议.其中,发表述评35篇(5.43%),基础研究135篇(20.96%),临床研究71篇(11.02%),焦点论坛17篇(2.64%),文献综述111篇(17.24%),研究快报58篇(9.01%),临床经验189篇(29.35%),病例报告24篇(3.73%);文章作者分布遍及全国各地,绝大多数来自高等院校及附属医院.在此,特别感谢为《世界华人消化杂志》进行同行评议的各位编委专家,你们的同行评价对文章发表质量做出了重要贡献;也希望各位编委踊跃为《世界华人消化杂志》继续撰写高质量的评论性文章,为科学知识的传播做出贡献!(编辑部主任:李军亮 2012-01-01)

S100A11和自噬基因Beclin1在胃癌组织中的表达及临床意义

马陆军, 林瑶光

■背景资料

肿瘤的发生、发展受诸多因素调控。近年来, 细胞生长因子与肿瘤的关系已日益受到重视, 钙囊素(S100A11)是S100家族成员之一, 研究证明其与肿瘤的发生关系密切。近年研究证明, 动物实验、细胞学研究、临床实验和流行病学研究证明自噬基因Beclin1能够阻止胃癌的发生, 是抑癌基因。

马陆军, 林瑶光, 广西医科大学第一附属医院老年消化内科
广西壮族自治区南宁市 530021

马陆军, 在读硕士, 主要从事消化系统肿瘤的早期诊断和治疗方面的研究。

作者贡献分布: 马陆军与林瑶光对此文所作贡献均等; 本课题由马陆军与林瑶光共同设计完成; 林瑶光为课题总负责人; 标本制作、实验研究过程、数据处理、统计分析及论文写作由马陆军完成; 林瑶光审核; 研究所用的试剂及分析工具由林瑶光提供。

通讯作者: 林瑶光, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 530021, 广西壮族自治区南宁市双拥路6号, 广西医科大学第一附属医院老年消化内科。lyg57@163.com

电话: 0771-5356596

收稿日期: 2011-08-23 修回日期: 2012-11-01

接受日期: 2012-11-15 在线出版日期: 2012-11-28

Clinical significance of expression of S100A11 and Beclin1 in gastric carcinoma

Lu-Jun Ma, Yao-Guang Lin

Lu-Jun Ma, Yao-Guang Lin, Department of Geriatric Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Correspondence to: Yao-Guang Lin, Department of Geriatric Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. lyg57@163.com

Received: 2012-08-23 Revised: 2012-11-01

Accepted: 2012-11-15 Published online: 2012-11-28

Abstract

AIM: To investigate the clinical significance of expression of S100A11 and Beclin1 in gastric carcinoma.

METHODS: The expression of S100A11 and Beclin1 proteins were determined using the streptavidin-peroxidase immunohistochemical method in 50 cases of gastric carcinoma, 30 cases of precancerous lesions, and 20 cases of chronic non-atrophic gastritis.

RESULTS: The expression level of S100A11 was significantly lower in gastric carcinoma and precancerous lesions than in chronic non-atrophic gastritis (132.9209 ± 5.6490 , 133.6706 ± 5.8348 vs

138.0480 ± 3.5902 , both $P < 0.05$), but there was no significant difference between gastric carcinoma and precancerous lesions. Expression of S100A11 was significantly correlated with tumor grade, infiltration depth, lymph node metastasis, and TNM stage (all $P < 0.05$), but not with tumor position or size. The expression level of Beclin1 was significantly higher in gastric carcinoma (140.9705 ± 6.2019) than in precancerous lesions (136.7110 ± 5.5759) and chronic non-atrophic gastritis (130.8024 ± 2.5363), and in precancerous lesions than in chronic non-atrophic gastritis (all $P < 0.05$). Expression of Beclin1 was significantly correlated with tumor grade and lymph node metastasis (both $P < 0.05$), but not with tumor location, size, infiltration depth, or TNM stage. There is a negative correlation between expression of S100A11 and that of Beclin1 in gastric carcinoma ($r = -0.156$, $P < 0.05$).

CONCLUSION: S100A11 is lowly and Beclin1 is highly expressed in gastric carcinoma. The expression of S100A11 and Beclin1 is closely related with the biological behavior of gastric carcinoma. There is a negative correlation between expression of S100A11 and that of Beclin1 in gastric carcinoma, indicating that the unbalance of S100A11 and Beclin1 expression is a possible molecular biological mechanism behind the development of gastric carcinoma.

Key Words: Gastric carcinoma; S100A11; Beclin1

Ma LJ, Lin YG. Clinical significance of expression of S100A11 and Beclin1 in gastric carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(33): 3266-3271

摘要

目的: 探讨S100A11和自噬基因Beclin1在胃癌组织中的表达及临床意义。

方法: 采用免疫组织化学超敏两步法(S-P法)分别检测50例胃癌组织、30例胃癌前病变(中、重度非典型增生)和20例慢性非萎缩性

■同行评议者

葛海燕, 教授, 同济大学附属第十人民医院普通外科

胃炎组织中S100A11和Beclin1蛋白的表达. 使用病理图像分析仪分析S100A11和Beclin1蛋白表达在3种组织中的阳性信号灰度值.

结果: S100A11蛋白在胃癌组织及胃癌前病变组织中表达的灰度值分别为 132.9209 ± 5.6490 和 133.6706 ± 5.8348 , 两者均明显低于慢性非萎缩性胃炎中的灰度值 138.048 ± 3.5902 , 差异均有统计学意义($P < 0.01$), 胃癌与胃癌前病变组织中S100A11蛋白表达比较差异无统计学意义; S100A11蛋白的表达与胃癌的分化程度、浸润深度、淋巴结转移及TNM分期有关($P < 0.05$), 与肿瘤的部位、大小无关. Beclin1蛋白在胃癌组织中表达的灰度值为 140.9705 ± 6.2019 , 明显高于胃癌前病变(136.711 ± 5.5759)和慢性非萎缩性胃炎(130.8024 ± 2.5363), 三者两两比较, 差异均有统计学意义($P < 0.05$); Beclin1的表达与胃癌的分化程度及淋巴结转移有关($P < 0.05$), 与肿瘤的部位、大小、浸润深度及TNM分期无关. S100A11和Beclin1在胃癌组织中的表达呈负相关($r = -0.156, P < 0.05$).

结论: S100A11在胃癌组织中高表达, Beclin1在胃癌组织中低表达, S100A11和Beclin1与胃癌的部分生物学行为关系密切, 胃癌组织中S100A11和Beclin1的表达呈负相关, 提示S100A11和Beclin1在胃组织中的表达失衡, 可能是胃癌发生的分子生物学机制之一.

关键词: 胃癌; S100A11; Beclin1

马陆军, 林瑶光. S100A11和自噬基因Beclin1在胃癌组织中的表达及临床意义. 世界华人消化杂志 2012; 20(33): 3266-3271
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3266.asp>

0 引言

胃癌是消化系最常见的恶性肿瘤, 近年来其发病率和死亡率逐年上升. 虽然在治疗方法上取得一定进展, 但胃癌的早期诊断和根治方法尚未突破, 如何预防和早期发现、提高患者生存率仍面临着挑战. 胃癌的生长、分化受诸多因素的调控, 是一个多因素、多阶段逐步演化的过程, 是细胞无限增殖和凋亡受抑的结果. 近年研究发现, S100A11(钙囊素, Calcizzarin)和自噬基因Beclin1(也称BECN1)与肿瘤的发生、发展关系密切. 本研究采用免疫组织化学S-P法检测S100A11和自噬基因Beclin1蛋白在胃癌、胃癌前病变和慢性非萎缩性胃炎中的表达, 分析各指标与胃癌生物学行为的关系, 探讨他们在胃

癌发生、发展过程中的作用机制, 为胃癌的早期诊断和治疗提供新的理论依据.

1 材料和方法

1.1 材料 选取广西医科大学第一附属医院2008-04/2010-05手术切除的胃癌标本及内镜下活检取得胃癌前病变组织和慢性非萎缩性胃炎组织, 均经手术及病理组织学检查证实. 所有胃癌标本术前均未接受放、化疗治疗或肿瘤其他相关治疗. 分为3组: (1)胃癌组50例, 男33例, 女17例, 年龄33-77岁, 中位年龄57.0岁. 其中高、中分化腺癌20例, 低、未分化腺癌30例; 未侵及浆膜层者31例, 侵及浆膜层及浆膜外者19例; 发生局部淋巴结转移者29例, 无局部淋巴结转移者21例; 肿瘤临床病理分期采用2010年国际抗癌联盟/美国癌症联合委员会(UICC/AJCC)TNM分期标准, 其中I+II期20例, III+IV期30例; (2)胃癌前病变组(中、重度不典型增生)30例: 男23例, 女7例, 年龄28-77岁, 中位年龄51.5岁; (3)对照组(慢性非萎缩性胃炎)20例, 男10例, 女10例, 年龄22-76岁, 中位年龄46.5岁. 所有的标本均用10%中性福尔马林固定, 石蜡包埋后4 μm 连续切片. 所有标本的临床和病理资料均完整. 试剂采用兔抗人S100A11多克隆抗体(即用型), 购自美国Proteintech Group; 兔抗人Beclin1多克隆抗体(即用型), 购自武汉博士德生物科技开发公司; S-P免疫组织化学试剂盒(PV9000), 购自北京中杉金桥公司; DAB显色剂购自福州迈新生物技术有限公司.

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学检测: 将所有标本切片常规脱蜡、水化, 采用免疫组织化学超敏两步法(S-P法)染色, DAB显色, 苏木素复染, 吹干, 中性树胶封片, 具体操作按说明书进行. 阴性对照采用生理盐水磷酸盐缓冲液(PBS)替代一抗, 余步骤相同.

1.2.2 结果判断: 使用德国Leica Qwin DMR+Q550病理图像分析仪进行分析. S100A11及Beclin1的表达均主要位于细胞浆内, 以出现淡黄色至棕褐色颗粒且染色强度高于背景非特异性着色者为阳性细胞. 每例于阳性表达区域取5个高倍视野($\times 400$ 倍), 确保每个取图位置不存在重叠、交叉, 所有切片均在同一条件下进行灰度值分析, 对阳性染色的强度(灰度值)进行半定量测定, 然后取5个图像的平均灰度值作为该病例的灰度值, 用 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示, 灰度值与阳性表达强度成反比, 即灰度值越小, 说明其阳性

■ 研发前沿

运用免疫组织化学超敏两步法(S-P法), 从蛋白水平来研究S100A11和自噬基因Beclin1在胃癌组织中的表达及意义, 探讨两者在胃癌发生过程中的作用机制及协同作用.

■ 相关报道

王妍与贺修胜等应用RT-PCR和Western blot技术检测到胃癌中S100A11的表达量明显高于正常组织,提示其与胃癌的发生、发展有关。该研究有一定的学术价值和新颖性。

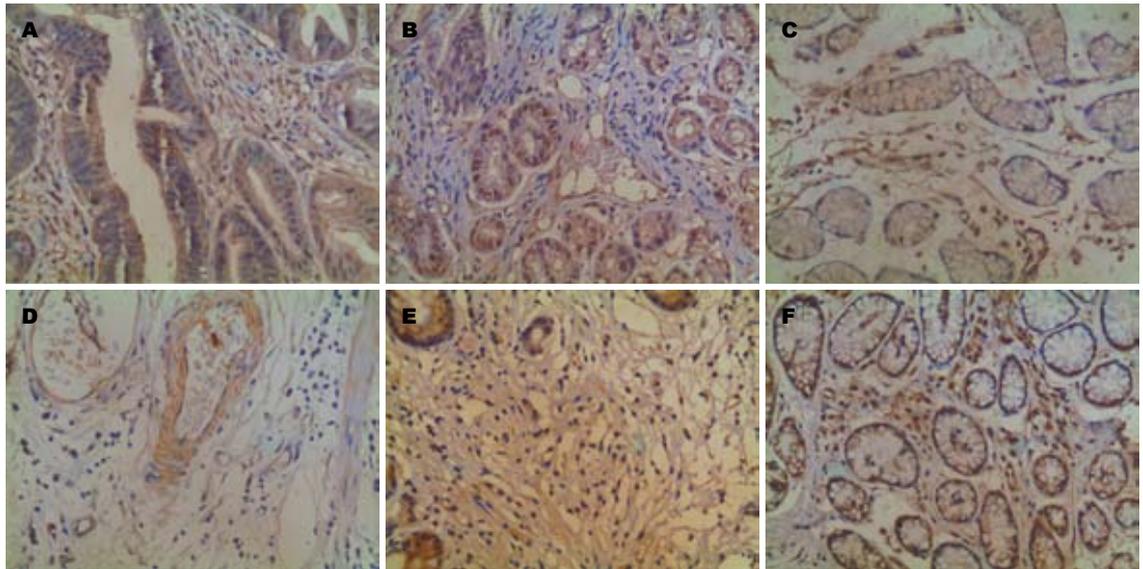


图1 胃癌组织S100A11和Beclin1蛋白的表达($\times 400$)。A: 胃癌S100A11; B: 胃癌前病变S100A11; C: 慢性非萎缩性胃炎S100A11; D: 胃癌Beclin1; E: 胃癌前病变Beclin1; F: 慢性非萎缩性胃炎Beclin1。

表达量越高,反之,则表达量越低。

统计学处理 采用统计学软件SPSS13.0进行分析。两组数据间均数比较,采用 t 检验,多组均数的比较,用 F 检验,S100A11和Beclin1在胃癌组织中表达的相关关系,用Pearson积差相关系数表示。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 S100A11和Beclin1蛋白在各组中的表达情况及与临床病理特征的关系 S100A11蛋白在胃癌组表达强度较对照组明显增加($P < 0.01$),且与胃癌的分化、淋巴结转移、浸润及TNM分期密切相关($P < 0.05$),与部位、大小无关。Beclin1在胃癌组、胃癌前病变和对照组中的表达强度逐渐增强,3组两两比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$),Beclin1的表达强度与胃癌的分化程度和淋巴结转移密切相关($P < 0.05$),与肿瘤的部位、大小、浸润深度和TNM分期无关(图1和表1,2)。

2.2 S100A11和Beclin1蛋白表达的相关性分析 S100A11和Beclin1蛋白在胃癌组织中表达呈负相关($r = -0.156, P < 0.05$)。

3 讨论

S100A11是S100蛋白超家族成员之一,最初由猪的心肌细胞和鸡砂囊平滑肌细胞中纯化出来,又叫S100C或者钙囊素^[1]。S100蛋白属于EF手型 Ca^{2+} 结合蛋白超家族,其分子量是在10-12 kDa的低相对分子量、高酸性蛋白。1965年Moore将第一个成员从牛脑中鉴定出来,主要在脊椎动物

中发现^[2]。人类S100蛋白的基因主要集中在染色体1q21区,肿瘤在此区的基因常频繁重组,易引起S100基因表达失控^[2]。

S100A11在一般的肿瘤组织中都有高表达,且通过核与质的易位表达,从而直接影响细胞的增殖。Torres-Cabala等^[3]发现S100A11在良性病变中是存在于细胞核中,而恶性病变中是定位在胞浆中的。S100A11与钙离子结合后,蛋白发生构象改变,暴露出疏水区,然后与相应的靶蛋白合,其主要功能是转导钙依赖性的细胞调节信号,参与细胞的增殖、分化,与肿瘤的形成和发展相关。近年研究表明S100A11在多种恶性肿瘤组织中高表达。Wulfkuhle等^[4]利用蛋白质组学方法对乳腺导管原位癌及与之相匹配的正常腺体组织进行分析,发现S100A11在癌组织中高表达。李春成等^[5]对24例结肠癌及正常肠黏膜中S100A11的表达进行检测,发现S100A11在结肠癌组织中表达量高于正常肠黏膜组织。在本实验中,胃癌组的S100A11表达强度显著高于慢性非萎缩性胃炎组,差异有统计学意义($P < 0.01$),提示S100A11在胃癌中高表达,与文献报道相符。同时,胃癌前病变组表达强度高于慢性非萎缩性胃炎组($P < 0.01$),而胃癌与癌前病变组相比,差异无统计学意义,提示S100A11在胃癌前病变阶段表达即明显增强,且通过核与质的异位表达直接调节细胞的增殖,参与肿瘤的发生,是胃癌发生的早期分子事件,可能是监测胃癌发生的有效指标之一,因此检测非胃癌患者S100A11蛋白水平变化,对胃癌的早期诊断和防治具有

表 1 S100A11和Beclin1蛋白在各组织中的表达灰度值 (mean ± SD)

分组	n	S100A11	Beclin1
胃癌组	50	132.9209 ± 5.6490 ^a	140.9705 ± 6.2019 ^a
胃癌前病变组	30	133.6706 ± 5.8348 ^a	136.7110 ± 5.5759 ^a
对照组	20	138.0480 ± 3.5902	130.8024 ± 2.5363 ^a

^aP<0.05 vs 对照组; ^aP<0.05 vs 三者两两比较.

表 2 S100A11和Beclin1蛋白的表达与临床病理特征的关系灰度值 (mean ± SD)

临床病理特征	n	S100A11	Beclin1
肿瘤部位			
胃窦	24	131.2016 ± 4.2149	139.3857 ± 5.6891
胃体	16	135.4110 ± 7.7566	140.8516 ± 6.8927
胃底、贲门	10	133.0632 ± 3.0268	141.0781 ± 6.0384
肿瘤大小(cm)			
≥5	22	131.1580 ± 3.6670	141.3113 ± 5.8238
<5	28	134.1975 ± 6.4984	140.7028 ± 6.1825
分化程度			
高、中分化	20	133.3857 ± 4.2853 ^a	138.0258 ± 5.5482 ^a
低、未分化	30	128.6110 ± 6.4535	142.5836 ± 5.3847
浸润深度			
达浆膜层以外	19	129.4282 ± 2.1760 ^a	142.7285 ± 6.9095
未达浆膜层以外	31	135.6423 ± 5.6472	139.8931 ± 5.5697
淋巴结转移			
无	21	134.1761 ± 6.4692 ^a	138.0369 ± 5.9548 ^a
有	29	131.4257 ± 2.8454	143.0948 ± 6.5546
TNM分期			
I + II	20	135.5272 ± 4.2855 ^a	139.0213 ± 5.8652
III + IV	30	131.7499 ± 4.6025	142.2700 ± 6.1712

^aP<0.05; ^aP<0.05.

重要意义.

S100A11蛋白对判断肿瘤生物学行为有重要的参考意义. Wang等^[6]应用蛋白质组学方法证实S100A11随结直肠癌的发展而表达增强, 该实验结果对判断结直肠癌的分期有重要意义. Mori等^[7]用cDNA微阵列方法从8 000个cDNA克隆中发现并分析(RT-PCR)S100A11基因的表达, 结果发现S100A11的表达在胃癌有淋巴结转移组显著高于无淋巴结转移组, S100A11可作为评估胃癌有无淋巴结转移的一个精确的指标. 李万锋等^[8]采用免疫组织化学方法检测S100A11在55例女性乳腺癌及癌旁乳腺组织中的表达, 研究发现S100A11在早期浸润性乳腺癌与浸润性非特殊癌的阳性表达率差异有统计学意义, 提示该蛋白与乳腺癌的浸润程度有关. 浸润和转移是恶性肿瘤生物学行为的重要标志. 其中胃癌最

常见的转移方式是淋巴结转移, 而浸润的深度和类型分别反映了癌灶在胃壁内侵袭的深度和广度. 本研究结果亦提示, S100A11表达与胃癌的侵袭程度和淋巴结转移密切相关, 其高表达是癌灶高侵袭力的象征, 推测可能S100A11蛋白通过细胞核与质的异位表达调解细胞增殖, 并增强转导钙依赖性细胞调节信号, 有利于肿瘤细胞的转移; 另一方面, 肿瘤分化程度和TNM分期是国际公认的评价病情进展、判断患者预后的重要参考指标. 本实验结果提示低分化、未分化胃癌S100A11表达强度较高、中分化组强, 可能是S100A11蛋白通过转导细胞信号, 参与细胞分化调节, 提示该指标在某种程度上反映癌细胞的恶性潜能; 另外随着TNM分期的升高, S100A11的表达呈上升趋势, S100A11在TNM III/IV期的表达强度显著高于I/II期($P<0.01$), 而

■创新盘点

S100A11和自噬基因Beclin1在胃癌中的相关性目前尚未见报道, 本文初步探讨两者在胃癌发生过程中交互作用机制.

■应用要点

将S100A11和自噬基因Beclin1作为靶向治疗的靶点,为胃癌的早期诊断、治疗提供理论依据。

I期和II期相比、III期和IV期相比差异无显著性。由此推测,S100A11的表达某种程度上反映胃癌的病程进展和患者的预后。

自噬性细胞死亡是一种选择性非Caspase依赖的II型程序性细胞死亡,Beclin1(也称BECN1)是近年来才发现的与自噬相关的一种抑癌基因,是诱导自噬的关键因子,而且还通过凋亡相关因子参与凋亡通路的调节,诱发肿瘤细胞凋亡^[9]。研究发现,Beclin1作为一种抑癌基因在多种肿瘤组织中存在基因缺失或低表达,肿瘤细胞能够逃脱自噬性死亡^[10,11]。Zhou等^[12]通过检测胃癌组织中Beclin1基因的表达水平,发现与癌旁组织相比,胃癌标本Beclin1基因表达显著下调,同时发现,胃癌中Beclin1的启动子区域和第二个内含子区域存在异常甲基化和杂合子缺失。温英武等^[13]用免疫组织化学EnVision法检测Beclin1在膀胱移行细胞癌(BTCC)组织中的表达,发现Beclin1在BTCC组织中表达下调,明显低于正常膀胱黏膜组织中的表达($P<0.01$),同时还发现Beclin1的表达与病理分级、淋巴转移有关,可以作为预测肿瘤发生发展和判断预后的生物学标志物。然而,亦有研究发现Beclin1在肝癌^[14]、大肠癌^[15]中高表达,但具体机制尚不明了,推测可能机制有如下几个方面:(1)肿瘤细胞受到诸如氧化、缺血/再灌注、毒性化合物、TNF2 α 刺激下,线粒体释放凋亡因子,此时细胞启动自噬来清除受损线粒体,阻断了线粒体的凋亡信号级联传导,同时提高细胞对低氧的耐受力,对细胞起到一定保护作用;(2)Beclin1通过Bcl-2家族可能与凋亡相互拮抗,使得癌细胞能够无限增殖;(3)内质网中的Beclin1在调节自噬方面起主要作用,不同的肿瘤组织是否存在Beclin1在细胞器中分布的差异性,导致其虽然高表达,但不能发挥抗肿瘤作用。本实验中,Beclin1在慢性非萎缩性胃炎、癌前病变、胃癌组中的表达强度逐渐减弱,3组两两比较差异均有统计学意义($P<0.05$),一方面提示可能由于Beclin1在慢性非萎缩性胃炎、癌前病变、胃癌的发展过程中表达活性逐渐降低,通过自噬性细胞死亡和凋亡途径死亡的细胞减少,同时由于细胞DNA损伤、染色体非整倍性等基因组的不稳定性,使细胞基因组癌性突变率增加,进而促进了肿瘤的发生;另一方面,胃癌前病变与慢性非萎缩性胃炎相比,差异显著($P<0.05$),提示在胃癌前病变阶段Beclin1的表达即明显减弱,可以推测Beclin1表达下调可能在胃癌发生过程中起关键作

用,是胃癌发生的一个早期事件,随着Beclin1表达进一步减弱,胃癌前病变向胃癌转变的机率逐渐增加,因此对胃癌前病变患者监测Beclin1蛋白水平,有助于实现胃癌的早期诊断。实验还表明,Beclin1的表达与胃癌的分化、淋巴结转移有关,其中,高、中分化组表达强度高于低、未分化组,无淋巴结转移组高于有淋巴转移组,差异有统计学意义($P<0.05$),提示Beclin1可能参与了胃癌细胞的分化,且随表达活性的降低,肿瘤细胞逃脱自噬性死亡,有利于肿瘤细胞的增殖和转移。Beclin1不仅与胃癌的发生有关,而且在胃癌的发展过程中扮演着重要角色,与胃癌的恶性程度、转移和侵袭潜能密切相关,提示Beclin1可作为预测胃癌的发生发展和评估患者预后的生物学指标。

本实验提示,S100A11和Beclin1在胃癌组织中的表达呈负相关($r = -0.156, P<0.05$),提示两者的表达失衡可能在胃癌的发生发展过程中起重要作用,共同促进了肿瘤的发生。由于S100A11蛋白功能复杂,目前对其研究主要集于促进细胞增殖、分化和肿瘤形成的作用,而与细胞凋亡及其致癌具体机制尚不明。S100A11与Ca²⁺结合,转导钙依赖性的细胞调节信号,参与细胞的增殖、分化、细胞凋亡和肿瘤的形成,与Beclin1关系密切。研究证实^[16]S100A11与S100家族其他蛋白不同,主要分布在细胞核中,增加细胞内钙离子的浓度,即可诱发S100A11蛋白的细胞内转位。S100A11蛋白核与质的异位表达,从而对癌细胞的增殖有直接的影响。因此,S100A11与Beclin1在肿瘤形成过程中交互作用的可能机制:NF- κ B信号通路存在于多种细胞内,具有多向性调节作用的核转录因子,参与炎症、免疫、细胞增殖和细胞凋亡等多种生理、病理过程的基因调控,还参与肿瘤的生成及其生物学行为^[17]。Beclin1是细胞癌变的早期分子事件,当细胞受到诸如缺血缺氧、缺血再灌注、化学毒物或电离辐射的损伤时,即启动自噬和凋亡,以修复损伤。随着刺激因素的持续存在和细胞内钙超载,一方面NF- κ B信号通路激活,通过NF- κ B与Bcl-2上位点结合,抑制自噬的活性和凋亡的发生,同时避免了因Ca²⁺超载导致的组织细胞迟发性坏死,增加了细胞癌变的机率;另一方面,由于细胞内发生钙超载,S100A11蛋白呈现核与质的异位表达,与Ca²⁺结合后,转导钙依赖性的细胞调节信号,参与细胞的增殖、分化、细胞凋亡和癌症的形成,导致自噬活性及相关因子

的下调.

总之, 随着研究的深入, S100A11和Beclin1交互作用的机制会逐渐的明了, 两者表达失衡存在于胃癌发生发展的整个过程, 且均与胃癌的生物学行为关系密切, 检测两者的表达水平对胃癌的早期诊断和评估患者预后具有重要的参考价值.

4 参考文献

- 1 Arcuri C, Giambanco I, Bianchi R, Donato R. Subcellular localization of S100A11 (S100C, calgizzarin) in developing and adult avian skeletal muscles. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1600: 84-94
- 2 Salama I, Malone PS, Mihaimeed F, Jones JL. A review of the S100 proteins in cancer. *Eur J Surg Oncol* 2008; 34: 357-364
- 3 Torres-Cabala C, Bibbo M, Panizo-Santos A, Barazi H, Krutzsch H, Roberts DD, Merino MJ. Proteomic identification of new biomarkers and application in thyroid cytology. *Acta Cytol* 2006; 50: 518-528
- 4 Wulfkuhle JD, Sgroi DC, Krutzsch H, McLean K, McGarvey K, Knowlton M, Chen S, Shu H, Sahin A, Kurek R, Wallwiener D, Merino MJ, Petricoin EF, Zhao Y, Steeg PS. Proteomics of human breast ductal carcinoma in situ. *Cancer Res* 2002; 62: 6740-6749
- 5 李春成, 贺修胜, 王妍, 陈苏琼, 姚旭炯, 李丽. S100A11在结肠癌的表达及其与临床特征的关系. *现代生物医学进展* 2011; 11: 338-341
- 6 Wang G, Wang X, Wang S, Song H, Sun H, Yuan W, Cao B, Bai J, Fu S. Colorectal cancer progression correlates with upregulation of S100A11 expression in tumor tissues. *Int J Colorectal Dis* 2008; 23: 675-682
- 7 Mori M, Shimada H, Gunji Y, Matsubara H, Hayashi H, Nimura Y, Kato M, Takiguchi M, Ochiai T, Seki N. S100A11 gene identified by in-house cDNA microarray as an accurate predictor of lymph node metastases of gastric cancer. *Oncol Rep* 2004; 11:

1287-1293

- 8 李万锋, 张彬, 贾泓瑶, 张士福, 范志民. S100A11在乳腺癌和癌旁组织中的表达及其与临床特征的关系. *中国妇幼保健* 2009; 24: 539-541
- 9 郑海燕, 王兴芬, 孙保存, 张晓阳, 许丽萍. 大肠癌发生发展中自噬基因Beclin1的表达及其与增殖和凋亡相关基因的关系探讨. *中国肿瘤临床* 2011; 38: 620-625
- 10 Miracco C, Cosci E, Oliveri G, Luzi P, Pacenti L, Monciatti I, Mannucci S, De Nisi MC, Toscano M, Malagnino V, Falzarano SM, Pirtoli L, Tosi P. Protein and mRNA expression of autophagy gene Beclin 1 in human brain tumours. *Int J Oncol* 2007; 30: 429-436
- 11 黄新, 李宾, 白红民, 卢亦成. 微管相关蛋白LC3B-II和自噬基因Beclin1在星形细胞肿瘤中的表达及其意义. *中华神经医学杂志* 2011; 10: 360-365
- 12 Zhou WH, Tang F, Xu J, Wu X, Yang SB, Feng ZY, Ding YG, Wan XB, Guan Z, Li HG, Lin DJ, Shao CK, Liu Q. Low expression of Beclin 1, associated with high Bcl-xL, predicts a malignant phenotype and poor prognosis of gastric cancer. *Autophagy* 2012; 8: 389-400
- 13 温英武, 陈文轩, 李连印. 自噬基因Beclin1与膀胱癌发生发展及其预后相关性分析. *实用预防医学* 2011; 18: 1544-1547
- 14 康凯夫, 王晓蔚, 陈小伍, 石祥呈. Beclin1和NF-kB p65在肝癌中的表达及其临床意义. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 2244-2247
- 15 郑海燕, 王兴芬, 孙保存, 张晓阳, 许丽萍. 大肠癌发生发展中自噬基因Beclin1的表达及其与增殖和凋亡相关基因的关系探讨. *中国肿瘤临床* 2011; 38: 617-620
- 16 Cross SS, Hamdy FC, Deloulme JC, Rehman I. Expression of S100 proteins in normal human tissues and common cancers using tissue microarrays: S100A6, S100A8, S100A9 and S100A11 are all overexpressed in common cancers. *Histopathology* 2005; 46: 256-269
- 17 杨盛力, 张小玲, 刘利平, 熊枝繁, 曹仕琼, 郭锋伟. 乙型肝炎病毒X蛋白通过激活NF-kB信号通路上调肺耐药相关蛋白的表达. *华中科技大学学报(医学版)* 2012; 41: 54-63

■同行评价

本文应用免疫组织化学的方法研究了S100A11和Beclin1蛋白在胃癌组织中的表达及其意义, 并对S100A11和Beclin1交互作用的机制进行了比较深入的探讨, 具有一定的创新性, 可读性强, 学术价值较好.

编辑 田滢 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1998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)

内镜下经皮胃造瘘术对患者营养及生活质量的改善

卢杰夫, 姜海行, 覃山羽

■背景资料

经皮内镜下胃造瘘术(PEG), 作为一种微创胃肠造瘘手术, 经过30多年临床应用及不断地改进和革新已经日趋成熟, 目前已被广泛接受使用, 是不同于以往以鼻胃管为主的肠内营养输入途径。对于需要长期肠内营养供给的患者, 从方法学上看, 与传统的外科胃肠造瘘相比, 内镜胃造瘘有明显优势。

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

卢杰夫, 广西医科大学在读博士, 主要从事消化内镜的诊断及介入治疗方面的研究。

广西卫生厅重点课题基金资助项目, No. 2011059

作者贡献分布: 此课题由姜海行、卢杰夫及覃山羽设计; 研究过程由卢杰夫、姜海行及覃山羽操作完成; 数据分析由卢杰夫完成; 本论文写作由卢杰夫完成。

通讯作者: 姜海行, 教授, 博士生导师, 530021, 广西壮族自治区南宁市东葛路89-9, 广西医科大学第一附属医院消化内科。jihaxi@263.net

电话: 0771-5356501 传真: 0771-5353668

收稿日期: 2012-10-09 修回日期: 2012-11-09

接受日期: 2012-11-25 在线出版日期: 2012-11-28

Improvement in nutritional status and quality of life in patients after percutaneous endoscopic gastrostomy

Jie-Fu Lu, Hai-Xing Jiang, Shan-Yu Qin

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

Supported by: the Key Research Project of Guangxi Health Department, No. 2011059

Correspondence to: Hai-Xing Jiang, Professor, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, 89-9 Doge Road, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. jihaxi@263.net

Received: 2012-10-09 Revised: 2012-11-09

Accepted: 2012-11-25 Published online: 2012-11-28

Abstract

AIM: To evaluate the nutritional status and quality of life in patients after percutaneous endoscopic gastrostomy (PEG).

METHODS: Seventy-three patients who had undergone PEG were followed at 1 mo, 3 mo and 6 mo after feeding tube placement to determine the changes in white blood cell count, lymphocyte count, plasma hemoglobin, total protein, albumin, transferrin protein, body weight, and body mass index (BMI). The incidence of complications such as pneumonia and reflux esophagitis was also recorded. Changes in quality of life before and after PEG were measured with the Short Form 36 Health Survey questionnaire.

■同行评议者

甘华田, 教授, 四川大学华西医院老年消化内科; 黄缘, 教授, 南昌大学第二附属医院消化内科, 江西省分子医学重点实验室

RESULTS: A total of 107 PEG procedures were performed in 73 patients. Nutritional status and weight loss were significantly improved after PEG. The levels of hemoglobin, total protein, albumin, transferrin, and body mass index significantly improved at 1 mo, 3 mo and 6 mo after enteral nutrition, showing significant differences before and after PEG (all $P < 0.05$). The incidence of pulmonary infection decreased from 63.0% preoperatively to 16.7% postoperatively, and that of reflux esophagitis decreased from 27.4% to 7.6%. At 1 mo, 3 mo and 6 mo after feeding tube placement, there was a significant improvement in patients' physical health and mental health, as well as physiological function, social function.

CONCLUSION: The nutritional status, levels of hemoglobin, total protein, albumin and transferrin, as well as body mass index significantly improved in patients after PEG. The incidence of complications and quality of life also improved in patients after PEG.

Key Words: Gastroscopy; Gastrostomy; Nutrition; Quality of life

Lu JF, Jiang HX, Qin SY. Improvement in nutritional status and quality of life in patients after percutaneous endoscopic gastrostomy. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(33): 3272-3276

摘要

目的: 评价内镜下经皮胃造瘘术(percutaneous endoscopic gastrostomy, PEG)对患者营养及生活质量的改善作用。

方法: 对73例行PEG患者进行回顾性分析, 观察患者PEG置管前、置管后1、3及6 mo的营养指标结果, 包括白细胞、淋巴细胞计数、血浆血红蛋白、总蛋白、白蛋白及转铁蛋白变化及体质量、体质量指数的改变。记录置管前后患者并发肺炎、反流性食管炎情况。同时采用SF-36生活质量量表调查患者PEG术前后生活质量的变化。

结果: 73例患者共完成PEG操作107例次, 患者术后体质量增加, 营养状况明显改善, 肠内

营养1 mo、3 mo及6 mo后血红蛋白、总蛋白、白蛋白及转铁蛋白及体质量、体质指数均有不同程度的改善, 置管前、后组内比较差异有统计学意义($P < 0.05$). 肺部感染的发生率由PEG术前的63.0%(46/73), 术后降低至16.7%(11/66); 反流性食管炎由PEG术前的27.4%(20/73)降至术后的7.6%(5/66). PEG置管术后1 mo、3 mo及6 mo患者的生理健康和心理健康均较术前有明显改善, 生理功能、社会功能明显高于PEG术前.

结论: PEG术后患者营养状况明显改善, 体质指数增加, 血红蛋白、总蛋白、白蛋白及转铁蛋白明显改善. 同时PEG可减少因留置鼻胃管引起的反流性食管炎及肺部感染, 患者耐受性好, 生活质量提高.

关键词: 胃镜; 胃造瘘术; 营养; 生活质量

卢杰夫, 姜海行, 覃山羽. 内镜下经皮胃造瘘术对患者营养及生活质量的改善. 世界华人消化杂志 2012; 20(33): 3272-3276
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3272.asp>

0 引言

胃肠道功能正常而吞咽功能丧失或吞咽困难的患者, 行全胃肠内营养(total enteral nutrition, TEN)支持更安全、经济, 有利于维护患者肠道功能. 建立TEN通道传统的方法是放置鼻饲管鼻饲及开腹行胃造瘘术, 而通过胃镜介导放置胃造瘘管, 即内镜下经皮胃造瘘术(percutaneous endoscopic gastrostomy, PEG)进行肠内营养是一项无需外科手术及全身麻醉的微创胃造瘘新技术, 自1980年以来, 临床应用广泛, 适应症不断扩大, 是一项比较成熟的技术^[1]. 我院2001-03/2012-06开始用美国Wilson-Cook公司生产的PEG-24-Pull型一次性胃造瘘包为73例患者进行共107例次PEG治疗, 取得较满意的效果.

1 材料和方法

1.1 材料 本组患者73例, 男51例, 女22例, 年龄20-93岁, 平均66岁. 其中, 脑血管病(脑出血或脑梗塞)后遗症39例, 动脉硬化性脑病6例, 食管气管痿4例, 行气管切开13例(其中重症颅脑外伤昏迷6例, 慢性阻塞性肺部疾病合并呼吸衰竭7例), 鼻咽癌放疗后4例, 食管癌7例. 所有患者行PEG前均曾放置鼻饲管鼻饲, 鼻饲管鼻饲时间15 d-11年. 其中20例患者胃镜提示反流性食管炎, 46例伴有吸入性肺炎.

1.2 方法

1.2.1 术前准备: 常规检查出凝血时间、心电图, 停止鼻饲8 h. 张口困难的患者应用开口器辅助放入牙垫. 常规心电监护, 脉搏、氧饱和度、血压监测, 开放静脉通道, 以保持操作过程安全顺利. 患者取仰卧位, 头偏左侧, 对部分不配合的患者, 在心电监护下给予丙泊酚静脉注射, 使患者处于麻醉状态.

1.2.2 手术: 胃造瘘部位定位于左锁骨中线, 剑突至脐上1/3水平交界处. 胃镜进患者胃腔后对胃、十二指肠行常规检查, 然后将胃镜视野对准胃体前壁充气, 使胃充分膨胀, 确定胃壁紧贴腹壁后, 通过腹壁观察胃镜灯光, 将胃镜灯光调整至拟造瘘部位后, 选择血管较少的区域为穿刺点, 皮肤消毒, 局部浸润麻醉, 直至局麻注射针进入胃腔, 退出注射针, 于穿刺部位皮肤作约0.8 cm切口, 用套管针经腹壁穿刺入胃腔, 置导丝进入胃腔, 通过胃镜活检孔放圈套器, 抓住导丝连同胃镜一同拔出. 将导丝与胃造瘘管连接后, 从腹壁牵引导丝使胃造瘘管经口腔、食管进入胃腔. 再次插入胃镜至胃内观察造瘘管情况, 使胃造瘘管蘑菇头与胃壁紧密接触后, 固定胃造瘘管, 并使造瘘管盘片与腹壁保持轻度紧张状态.

1.2.3 PEG术后处理: (1)PEG术后当天输液支持治疗, 3 d内应用抗生素并适当应用止血药; (2)注意观察术后并发症如出血、感染及瘘管周围渗出情况等, 术后10 d每天瘘孔周围清洁消毒; (3)术后次日注入10%葡萄糖250 mL左右了解有无异常. 如无异常, 第3天即可“进食”, 开始时速度要慢, 量要少, 待患者适应后可以逐渐增加; (4)每天进食前后用温开水冲洗导管, 以免堵管. 使患者处于半卧位或坐位30-60 min, 以减少胃食管反流、误吸等并发症引起肺部感染的发生.

1.2.4 观察指标: (1)计算患者PEG置管前、置管后1 mo、3 mo及6 mo的营养指标结果, 包括白细胞、淋巴细胞计数、血浆血红蛋白、总蛋白、白蛋白及转铁蛋白变化及体质量、体质量指数的改变; (2)记录置管前后患者并发肺炎、反流性食管炎情况; (3)采用汉化版SF-36生活质量量表调查患者生活质量的变化. 比较患者PEG置管前、置管后1 mo、3 mo及6 mo的生理健康、心理健康、社会功能及生活质量总分之间的差异. SF-36量表包括11项内容36个问题, 反映生理健康(physical health, PH)和心理健康(mental health, MH)两个方面, 涉及8个纬度, 生理健康包括生理功能(physical function, PF)、生理角色限制(role

■应用要点
PEG进行肠内营养是一项无需外科手术及全身麻醉的微创胃造瘘新技术, 自1980年以来, 临床应用广泛, 适应症不断扩大, 是一项比较成熟的技术.

■同行评价

本文设计合理, 条理清晰, 对临床有一定的指导意义.

表 1 内镜下经皮胃造瘘术患者的营养指标及体质指数变化

	术前	术后(mo)		
		1	3	6
<i>n</i>	73	73	70	66
白细胞($10^9/L$)	8.64 ± 2.47	7.32 ± 2.55	7.69 ± 3.03	6.85 ± 2.78
淋巴细胞($10^9/L$)	1.32 ± 0.68	1.75 ± 0.36^a	1.54 ± 0.65^a	1.59 ± 0.47^a
血红蛋白(g/L)	92.42 ± 12.11	116.10 ± 13.06^a	119.62 ± 14.49^a	116.42 ± 15.13^a
总蛋白(g/L)	63.22 ± 6.05	71.91 ± 5.24^a	70.32 ± 9.46^a	70.26 ± 4.77^a
白蛋白(g/L)	30.64 ± 3.20	36.93 ± 3.13^a	36.44 ± 4.12^a	39.83 ± 3.27^a
转铁蛋白(g/L)	1.90 ± 0.33	2.31 ± 0.47^a	2.44 ± 0.32^a	2.52 ± 0.58^a
体质指数(kg/m^2)	19.31 ± 1.66	19.82 ± 1.85^a	19.90 ± 1.74^a	20.18 ± 1.70^a

^a $P < 0.05$ vs 内镜下经皮胃造瘘术前.

physical, RP)、躯体疼痛(bodily pain, BP)和总体健康(general health, GH) 4个纬度; 心理健康包括活力(vitality, VT)、社会功能(social function, SF)、情感角色限制(role emotional, RE)和精神健康(mental health, MH)4个纬度.

统计学处理 采用SPSS11.5软件, 对营养指标及生活质量量表转化评分行 t 检验, 并发症行 χ^2 检验.

2 结果

2.1 术后患者营养情况 73例患者共完成了107例次PEG操作. 平均操作时间为15-25 min. 所有患者进行随访, 其中1例食管癌患者PEG术后5 mo死于癌转移, 2例重症颅脑外伤昏迷及1例慢性阻塞性肺部疾病合并呼吸衰竭患者行PEG术后2 mo死于原发疾病加重, 3例失去随访, 6 mo总计完成观察指标为66例. 6-30 mo更换造瘘管. 73例中有31例进行了造瘘管置换术, 其中1例脑出血患者自2001年第1次PEG后每1-2年置换胃造瘘管1次, 至2011年死亡期间共换管6次. 术后患者营养状况有所改善, 体质减轻得到控制, 肠内营养1 mo、3 mo及6 mo后, 白细胞、淋巴细胞计数、血浆血红蛋白、总蛋白、白蛋白及转铁蛋白变化及体质、体质指数均有明显改善, 置管前、后组内比较差异有统计学意义($P < 0.05$, 表1).

73例中, 7例患者恢复经口进食而拔除瘘管. 肺部感染的发生率由PEG术前的63.0%(46/73), 术后降低至16.7%(11/66); 术前术后比较差异有统计学意义($\chi^2 = 5.33, P < 0.05$); 反流性食管炎由PEG术前的27.4%(20/73)降至术后的7.6%(5/66). 术前术后比较差异有统计学意义($\chi^2 = 4.26, P < 0.05$).

2.2 术后并发症 术后出现造瘘口周围皮肤局部红肿渗液7例、低热3例, 喂食后呕吐5例、腹泻7例、便秘4例, 局部疼痛4例、气腹3例、吸入性肺炎9例, 6例患者无意识拔出造瘘管导致瘘口少量渗血. 经对症处理后症状均得到缓解. 本组所有病例均未出现胃结肠瘘、腹膜炎及造瘘管蘑菇头嵌顿等严重并发症. 无营养管堵塞现象.

2.3 生活质量评分 PEG置管术后1 mo、3 mo及6 mo患者的生理健康和心理健康均较术前有明显改善, 生理功能、社会功能明显高于PEG术前(表2).

3 讨论

各种原因引起的疾病都不会在没有良好营养支持的情况下得到好转, 提供足够的营养支持是疾病治疗的基石, 也是临床危重症患者治疗的一部分. 营养不良会导致器官功能恢复缓慢, 感染风险增加^[2-4]. 营养不是简单地对生命的支持, 也是判断社会状态、健康状态, 甚至快乐状态的重要标志. 临床上对于疾病造成吞咽困难需要营养支持的患者, 一般情况下是放置鼻胃管及深静脉全胃肠外营养(total parenteral nutrition, TPN), 盲视下鼻胃管放置对胃肠道结构正常者是容易的, 但是导管插入深度和位置只能凭插管的深度和插管后抽吸试验确定是否到胃, 对于要求定位置管或胃肠道结构变异, 如食管穿孔、狭窄、食管瘘以及术后吻合口瘘要求准确定位置管, 盲目插管在临床实际操作过程中通常难以达到满意的效果. 此外, 留置鼻胃管者常因鼻胃管管腔内径小, 只能鼻饲全流质饮食, 容易引起返流、误吸, 而且所提供营养成分单调,

表 2 内镜下经皮胃造瘘术患者生活质量评分变化

	术前	术后(mo)		
		1	3	6
<i>n</i>	73	73	70	66
生理健康	49.17 ± 12.75	68.44 ± 24.69 ^b	66.54 ± 13.56 ^b	71.20 ± 21.32 ^b
心理健康	46.42 ± 11.88	59.50 ± 16.57 ^b	60.47 ± 11.19 ^b	61.37 ± 9.22 ^b
生理功能	56.94 ± 11.12	83.47 ± 10.64 ^b	85.01 ± 11.31 ^b	84.92 ± 12.59 ^b
社会功能	33.50 ± 15.34	63.03 ± 21.78 ^b	62.12 ± 14.73 ^b	67.50 ± 15.44 ^b

^b*P*<0.01 vs 内镜下经皮胃造瘘术前.

很难满足患者对各种营养物质的长期需要. 深静脉的人工营养供给途径虽然有效, 然而需要价格昂贵的特殊营养液, 而且患者需要住院, 处于医护人员的严密监护之下, 同时也存在置管技术、营养进入体内后代谢不良, 容易引起胃粘膜萎缩, 电解质代谢紊乱, 肝功能衰竭, 静脉炎, 败血症等. 难以广泛应用于需要长期非经口营养支持治疗.

Gauderer与Ponsky^[5]于1980年首先报道了经皮内镜下胃造瘘术. 作为一种微创胃肠造瘘手术, 经过30多年临床应用及不断地改进和革新已经日趋成熟, 目前已被广泛接受使用^[6-8], 是不同于以往以鼻胃管为主的肠内营养输入途径. 对于需要长期肠内营养供给的患者, 从方法学上看, 与传统的外科胃肠造瘘相比, 内镜胃造瘘具有以下优点: (1)操作简单、快捷安全, 不需开腹, 术后并发症少; (2)不需特殊麻醉, 只需少量局部麻醉即可进行操作, 术后并发症低; (3)不需特殊的施行场所, 既可以在胃镜室进行, 也可以在病房进行; (4)术后早期即可投与营养流质饮食; (5)术后易于护理, 患者可以回家, 自己控制使用, 长期置放, 同时较大管腔的PEG胃管可以“进食”近乎富含纤维素的膳食营养制剂, 患者易于接受, 痛苦少; 有研究表明PEG可保证肠内营养, 提高细胞免疫功能^[9,10]. 从营养供给上看, 与全静脉营养供给相比, 内镜造瘘进行肠内营养, 具有易于为人体正常消化道吸收, 肠内营养不仅为患者提供能量来源, 而且给胃肠道以机械刺激诱导肠黏膜代谢增强, 保持和增加肠道和肝脏的血流量, 避免肠道黏膜萎缩, 保持黏膜屏障和网状内皮细胞正常功能, 防止肠道内细菌和内毒素移位, 因而可以较好保持肠道及机体免疫功能, 可以防止肠道细菌的易位, 减少肠源性感染发生, 从而可进一步防止多器官功能的衰竭^[11]. 这类患者的肠内营养支持是其康

复的重要前提. 而且营养物美价廉, 易于广泛使用. 美国胃肠协会将PEG作为不能经口进食且需要长期供给营养患者的首选方法^[12], 美国每年行PEG治疗的患者达20余万例^[13]. 2010年一项关于了解急性缺血性中风患者美国国立卫生研究所脑卒中评分(National Institute of Healthstroke scale, NIHSS)与PEG关系的研究发现, NIHSS以及是否有中风后吸入性肺炎的出现可以预测是否开始PEG治疗, 其中吸入性肺炎可以作为需用PEG的独立因素^[14]. 2011年关于颅内出血中风患者的研究显示: PEG的放置与中风的严重程度相关, 预测因素分析显示: NIHSS分值高、格拉斯哥昏迷评分(Glasgow coma scale, GCS)低, 以及并发闭塞性脑水肿、败血症或需要机械通气的患者更需要PEG的治疗^[15]. 在我国, 2009年中华神经科杂志神经系统疾病营养支持工作组发布了《神经系统疾病营养支持适应证共识》^[16], 2011年中华医学会肠外肠内营养学会神经疾病营养支持学组成立, 对共识内容进行了修改与完善, 并标明了证据级别^[17]. 共识意见提出任何原因引起的不能正常进食的患者, 短期(4 wk内)推荐NGT喂养, 长期(4 wk后)有条件情况下采用PEG喂养.

日本学者Onishi等^[18]报道了家庭病床施行PEG术的可行性和有效性, PEG置管后1年生存期为64.0%. 2年生存期为55.5%. 认为家庭病床中施行PEG后可改善患者的生活质量, 延长患者的寿命, 减轻了家庭护理的负担, 对很多慢性患者来说, 家庭营养是患者能做出的最好选择, 患者可以离开医院环境, 回到熟悉的家庭环境, 回到家人身边, 患者及其家属非常乐意接受. 李俊峰等^[19]对70例吞咽障碍的患者分成鼻饲管鼻饲及PEG管进食两组研究, 发现经PEG管进食组明显优于鼻饲组. 认为对那些需要经肠道营养且没有胃肠梗阻的患者行PEG术是适合的.

本研究发现PEG方法肠内营养6 mo, 患者营养状况改善明显, 体质量指数增加, PEG前后差异有统计学意义; PEG治疗后患者的血红蛋白、白蛋白、总蛋白及转铁蛋白增高, 反映肝脏蛋白质合成功能增强, 为机体提供了更多用于修复所需的蛋白质及能量, 使机体的营养状态得到改善。同时PEG肠内营养可减少因长期留置鼻胃管而引起的反流性食管炎及肺部感染, 与文献报道^[20]相符。

SF-36量表是美国医学结局研究组开发的一个生命质量普适性测定量表。我们采用汉化版SF-36量表调查发现, PEG置管术后经过一段时间肠内营养支持, 患者的体力都有明显的改善, 生理功能接近正常水平, 总体健康, 生理角色、精神健康明显改善, 社会功能明显提高。一些患者甚至在需要的时候参加一些社会活动, 提高了生活质量^[21,22]。

但是, 关于PEG的临床应用还有些问题需要探讨。姜跃龙等^[23]分析了近年来的研究并对比了早期的研究认为, 对于PEG置管的问题, 实际操作中往往涉及社会道德观念、伦理、法律和法规等诸多问题。应该非常慎重, 需多方共同参与的情况下制定治疗的方案, 个体化综合分析才能使患者从中获益。

4 参考文献

- Marks JM, Ponsky JL, Pearl JP, McGee MF. PEG "Rescue": a practical NOTES technique. *Surg Endosc* 2007; 21: 816-819
- Chandra RK. Graying of the immune system. Can nutrient supplements improve immunity in the elderly? *JAMA* 1997; 277: 1398-1399
- Fiatarone MA, Evans WJ. The etiology and reversibility of muscle dysfunction in the aged. *J Gerontol* 1993; 48 Spec No: 77-83
- Gariballa SE, Parker SG, Taub N, Castleden M. Nutritional status of hospitalized acute stroke patients. *Br J Nutr* 1998; 79: 481-487
- Gauderer MW, Ponsky JL. A simplified technique for constructing a tube feeding gastrostomy. *Surg Gynecol Obstet* 1981; 152: 83-85
- 卢杰夫, 黎波, 彭卓崙, 梁雪. 经皮内镜下胃造瘘术后的肠内营养62例. *世界华人消化杂志* 2010; 18: 3140-3143
- Gutt CN, Held S, Paolucci V, Encke A. Experiences with percutaneous endoscopic gastrostomy. *World J Surg* 1996; 20: 1006-1008; discussion 1006-1008

- 刘启胜, 董卫国. 经皮内镜下胃造瘘患者的循证治疗. *世界华人消化杂志* 2011; 19: 2185-2189
- 张瑛华, 曾志刚, 李友佳. 老年人经皮内镜下胃造瘘和小肠造瘘术后长期肠内营养支持的应用. *中华老年医学杂志* 2007; 26: 507-509
- Wu Y, Kudsk KA, DeWitt RC, Tolley EA, Li J. Route and type of nutrition influence IgA-mediated intestinal cytokines. *Ann Surg* 1999; 229: 662-667; discussion 662-667
- Bengmark S, Jeppsson B. Gastrointestinal surface protection and mucosa reconditioning. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 1995; 19: 410-415
- Sant SM, Gilvarry J, Shannon R, O'Morain C. Percutaneous endoscopic gastrostomy--its application in patients with neurological disease. *Ir J Med Sci* 1993; 162: 450-451
- Duszak R, Mabry MR. National trends in gastrointestinal access procedures: an analysis of Medicare services provided by radiologists and other specialists. *J Vasc Interv Radiol* 2003; 14: 1031-1036
- Alshekhlee A, Ranawat N, Syed TU, Conway D, Ahmad SA, Zaidat OO. National Institutes of Health stroke scale assists in predicting the need for percutaneous endoscopic gastrostomy tube placement in acute ischemic stroke. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 2010; 19: 347-352
- Kiphuth IC, Kuramatsu JB, Lücking H, Kloska S, Schwab S, Huttner HB. Predictive factors for percutaneous endoscopic gastrostomy in patients with spontaneous intracranial hemorrhage. *Eur Neurol* 2011; 65: 32-38
- 宿英英, 黄旭升, 彭斌, 潘速跃, 张运周. 神经系统疾病肠内营养支持适应证共识. *中华神经科杂志* 2009; 42: 639-641
- 中华医学会肠外肠内营养学分会神经疾病营养支持学组. 神经系统疾病营养支持适应证共识(2011版). *中华神经科杂志* 2011; 44: 785-787
- Onishi J, Masuda Y, Kuzuya M, Ichikawa M, Hashizume M, Iguchi A. [Long-term prognosis and satisfaction after percutaneous endoscopic gastrostomy in a general hospital]. *Nihon Ronen Igakkai Zasshi* 2002; 39: 639-642
- 李俊峰, 汤绍辉, 杨见权, 钟健, 杨冬华, 李兆申. 经皮内镜下胃造瘘患者营养状况及耐受性临床研究. *中华消化杂志* 2007; 27: 633-634
- 岑荣英, 刘腕薇, 王启仪. 经内镜下胃造瘘术对吞咽困难患者营养支持的疗效评价. *现代消化及介入诊疗* 2002; 7: 43-44
- Li L, Wang HM, Shen Y. Chinese SF-36 Health Survey: translation, cultural adaptation, validation, and normalisation. *J Epidemiol Community Health* 2003; 57: 259-263
- 胡雯, 于凤梅. 合理营养支持治疗经济学评价. *中国实用内科杂志* 2011; 31: 191-193
- 姜跃龙, Xin-Sheng Liu, Daniel KY Chan. 经皮内镜下胃造瘘在治疗中风后患者中的应用进展. *世界华人消化杂志* 2012; 20: 2162-2166

编辑 李军亮 电编 鲁亚静

手术治疗外伤性肝破裂23例

詹慧春, 徐早华, 曾卫华, 丁华民, 傅华群

詹慧春, 徐早华, 曾卫华, 丁华民, 江西省乐安县第二人民医院 江西省抚州市 344301
傅华群, 南昌大学第二附属医院肝胆外科 江西省南昌市 330006
詹慧春, 副主任医师, 主要从事肝胆外科方面的研究工作。
作者贡献分布: 詹慧春为本文负责人; 徐早华、曾卫华及丁华民参加手术并搜集、整理资料; 傅华群指导手术及审阅文章。
通讯作者: 詹慧春, 副主任医师, 344301, 江西省乐安县第二人民医院。zhanhuiichun@163.com
收稿日期: 2012-10-23 修回日期: 2012-11-10
接受日期: 2012-11-13 在线出版日期: 2012-11-28

Surgical treatment of patients with traumatic liver rupture: An analysis of 23 cases

Hui-Chun Zhan, Zao-Hua Xu, Wei-Hua Zeng, Hua-Min Ding, Hua-Qun Fu

Hui-Chun Zhan, Zao-Hua Xu, Wei-Hua Zeng, Hua-Min Ding, the Second People's Hospital of Le'an County, Fuzhou 344301, Jiangxi Province, China
Hua-Qun Fu, Department of Hepatobiliary Surgery, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China
Correspondence to: Hui-Chun Zhan, the Second People's Hospital of Le'an County, Fuzhou 344301, Jiangxi Province, China. zhanhuiichun@163.com
Received: 2012-10-23 Revised: 2012-11-10
Accepted: 2012-11-13 Published online: 2012-11-28

Abstract

AIM: To summarize our experience with surgical treatment of 23 patients with traumatic liver rupture.

METHODS: The clinical data for 23 patients with traumatic liver rupture who were surgically treated from 2006 to 2011 at our hospital were retrospectively analyzed.

RESULTS: Of 23 patients with traumatic liver rupture, 20 were cured and 3 died. One patient died of multiple organ injury. Rupture of the liver, spleen and kidney, and pelvic fracture occurred in this patient. One patient died of severe chest trauma with acute respiratory distress syndrome (ARDS), and the other patient died of multiple organ failure (MOF) after surgery for liver rupture. The death rate was higher in patients with serious liver rupture or with com-

bined MOF. Early and accurate diagnosis and proper and timely surgical treatment are key to saving the lives of patients and improving the cure rate and death rate.

CONCLUSION: Proper and timely surgical treatment can improve survival and reduce complications in patients with traumatic liver rupture who require surgical treatment.

Key Words: Traumatic; Liver rupture; Surgery

Zhan HC, Xu ZH, Zeng WH, Ding HM, Fu HQ. Surgical treatment of patients with traumatic liver rupture: An analysis of 23 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(33): 3277-3279

摘要

目的: 总结外伤性肝破裂的手术治疗经验。

方法: 收集我院2006-2011年手术治疗的23例外伤性肝破裂患者临床资料, 进行回顾性分析。

结果: 23例外伤性肝破裂患者手术治愈20例, 死亡3例。死亡病例中, 1例死于多脏器联合损伤, 肝、脾、肾均破裂, 骨盆粉碎性骨折; 1例死于胸部严重创伤急性呼吸窘迫综合征; 1例死亡于Ⅵ级肝破裂术后继发多器官功能衰竭(multiple organ failure, MOF)。肝破裂严重或合并MOF患者死亡率高。早期准确的诊断和正确及时的手术治疗是抢救患者生命、提高治愈率、减少死亡率的关键。

结论: 对于需手术治疗的患者用最简单的术式, 在最短的时间内完成手术能提高存活率, 减少并发症。

关键词: 外伤; 肝破裂; 手术

詹慧春, 徐早华, 曾卫华, 丁华民, 傅华群. 手术治疗外伤性肝破裂23例. *世界华人消化杂志* 2012; 20(33): 3277-3279
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3277.asp>

0 引言

腹部外伤中, 肝破裂的发病率仅次于脾破裂, 居

■背景资料

在基层医院, 由于血源不足, 专业技术人员缺乏, 相关科室的支持力度不够。因此, 外科医生应在平时认真学习、积极训练; 临床过程中仔细分析、精确判断, 不盲目地为保守而保守治疗, 置患者于危险不顾, 也不为推卸责任随意地将患者推上手术台; 在外伤性肝破裂的手术处理过程中, 应该遵循损伤控制性手术的原则。

■同行评议者

麻勇, 副研究员, 哈尔滨医科大学附属第一医院肝胆外科; 王德盛, 副主任医师, 中国人民解放军第四军医大学西京医院肝胆外科

■相关报道

国内苏氏提出了改良带蒂网膜套包裹加填塞缝合的方法治疗重度肝裂伤;姜德清等使用膈肌包埋法治疗重度肝破裂;卢灿荣等介绍了可吸收网套包裹治疗肝外伤,都取得了较好的效果。

第2位,占腹部损伤的15%-20%,严重肝外伤病死率高,治疗棘手。肝创伤是临床最常见的外伤之一,在交通事故等暴力损伤中占较大比例^[1-3]。外伤性肝破裂是临床急症,尤其是锐器伤所致的开放性肝破裂,病势凶险,且常在医疗条件较差的基层医院出现,为此要求基层的外科医师有丰富的经验及熟练的技巧^[4,5]。本文收集2006-2011年本院手术探查的23例外伤性肝破裂患者的临床资料,分析报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料 本组患者共23例,其中男19例,女4例;因锐器刺伤14例,交通外伤3例,矿石挤压伤2例,墙体倒塌砸伤1例,奔跑撞在桌上1例;其中入院后经处理血流动力学稳定者3例;伴发其他脏器损伤8例;存活20例,死亡3例;按1994年美国ASAT肝脏外伤分级标准,Ⅰ级0例,Ⅱ级9例,Ⅲ级10例,Ⅳ级4例。

1.2 方法

1.2.1 诊断: 根据外伤史、临床表现、体征,结合B超、CT等检查结果,诊断多不难。

1.2.2 治疗: 因为肝破裂的保守治疗已成为一种趋势,所以很多肝破裂的患者我们都根据受伤原因、临床表现等具体情况先行保守治疗,必要时中转手术治疗,本组资料中有3例为腹腔内积液动态增多改行手术探查,其余患者均为入院即迅速做好术前准备入手术室剖腹探查。其中手术治疗的标准为^[6]: (1)入院时生命体征即不平稳腹腔内出血估计在1 000 mL以上; (2)入院后经迅速足量补液2 h,休克症状不能改善者; (3)保守治疗输血800 mL以上,生命体征不能维持平稳; (4)入院时即估计有肝脏较大血管或胆管损伤的。

2 结果

23例外伤性肝破裂患者手术治愈20例,死亡3例。死亡病例中1例死于多脏器联合损伤,肝、脾、肾均破裂,骨盆粉碎性骨折,1例死于胸部严重创伤急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS),1例死亡于Ⅵ级肝破裂术后继发多器官功能衰竭(multiple organ failure, MOF)。肝破裂严重或合并多脏器损伤者死亡率高。早期准确的诊断和正确及时的手术治疗是抢救患者生命、提高治愈率、减少病死率的关键;及时手术是治疗外伤性肝破裂的主要方法。

3 讨论

本组病例中,有3例锐器伤患者入院时血压稍低,腹腔内积液估计在800-1 000 mL,当时行剖腹探查发现,肝脏破裂处的出血已基本停止,应该可以行保守治疗的。黎洁良^[2]曾指出,近20年来的大量文献证实手术时50%-80%的患者肝损伤已不再出血。

传统的切口的选择,肋缘下切口、上腹正中切口都基本能满足需要,遇到同时伴有脾脏破裂时,改成帐篷样切口都可以。本组病例锐器伤较多,故手术探查时多根据伤口、伤道走行方向综合考虑,但很多时候传统的手术切口不能满足探查的需要,不能拘泥刻板。本组有1例患者右下腹刀刺伤,行右肋缘下切口,术中见肝右叶边缘贯通伤,斜向内上方向,出血量不大,但腹腔内总有不凝血流出,根据伤道走行将切口直接向上延伸,进入胸腔,见膈肌有一破口,可见搏动性出血,部分出血进入胸腔,少量流入腹腔,右肺下叶肺组织有一破口,遂行肺破裂处褥式缝合、膈肌修补结束手术,本例切口虽不规范,但用于探查效果良好。

最常用的手术方式还是裂伤的直接缝合;若有坏死组织时应予清除,很多学者习惯于指捏法。我们较多使用彭氏吸刮刀能轻易吸除细小的无活力组织,对于稍大块的组织也较易识别界限,且副损伤较少,不易加重肝组织的裂伤,锐器伤这种方法使用较少,对于钝性伤这可以被理解为不规则形肝叶切除;基于快速结束手术的目的,规则性肝叶切除并不被推荐;但对于多发的星芒状裂伤,难以缝合止血时,我们使用了以可吸收缝线网兜状缝合包裹肝脏的方法处理1例车祸伤所致的重度肝裂伤,效果良好。国内苏氏提出了改良带蒂网膜套包裹加填塞缝合的方法治疗重度肝裂伤^[3,6-9];姜德清等^[4]使用膈肌包埋法治疗重度肝破裂;卢灿荣等^[5]介绍了可吸收网套包裹治疗肝外伤,都取得了可靠的效果。肝周纱布填塞在近年来又作为一种救治复杂难以处理的肝破裂出血的方法受到重视,尤其是伴有第二、第三肝门的血管损伤时,其要点是:纱布的取出要1 wk以后,且做好再出血的手术准备,在麻醉下完成取出才较为稳妥。本组中有1例伴腔静脉损伤的行了血管破裂处的直接缝合,虽术后造成血管腔的狭窄,但挽救了生命,为日后转往上级医院行进一步治疗争取了机会。

缝合技术非常重要,肝脏组织质地脆弱,裂

■应用要点

外伤性肝破裂是临床急症,尤其是锐器伤所致的开放性肝破裂,病势凶险,且常在医疗条件较差的基层医院出现,为此要求基层的外科医师有丰富的经验及熟练的技巧。

伤部位又往往较深,而且肝脏会随呼吸动作上下移动,因此要求在缝合时动作精确敏捷,不能有撕扯,缝合时尽量将肝包膜拉回原位便于打结避免割裂,缝合时要使用Z字垂直褥式缝合,每一针的进针与出针都在伤口的同侧,这样打结时就可以将断裂的血管或胆管扎住,不能使用横褥式缝合;打结时要做到原位作结,避免扯动肝脏导致缝线对肝组织的切割,造成二次的肝损伤,明胶海绵及大网膜的填塞、衬垫对于保护组织,促进止血作用良多^[10-13]。

器械的使用,肝脏位于肋下,位置深在,暴露不佳,所以选择合适的工具非常重要。本组有1例也是肝右叶的刺伤,在近膈肌处有一裂伤,可见血管波动性出血,用常规持针钳难以完成缝合,后改用一把胸科持针钳,手柄较长,手柄处有一符合手生理结构的弯曲,刚好符合肝表面的弧度,且钳尖夹持针处刻意弯曲了,便于视线经过又利于远处出针,很快完成缝合动作;另外肝脏组织离边缘越远厚度越增加,有的肝边缘裂伤向中心延伸较多时,常用的大圆针有时难以完成这么厚组织的缝合,我们用缝衣针改制的直针缝合操作起来更便捷。

外伤性肝破裂往往伴有其他脏器的复合伤,原则上复合伤的处理顺序是胸、腹、脑、脊柱、四肢^[14-16]。本组有1例车祸伤患者,术前发现肝破裂、脾破裂,左胸腔少量积液,当时考虑腹腔内两个脏器出血,故麻醉成功后先行腹腔探查,当腹腔手术快结束时,患者sPaO₂急剧下降,同时行左胸腔穿刺,大量鲜血流出,最终死亡,没有胸腔探查的机会。

总之,在基层医院,由于血源不足,专业技术人员缺乏,相关科室的支持力度不够。因此,外科医生应在平时认真学习、积极训练;临床过程中仔细分析、精确判断,不盲目地为保守而保守治疗,置患者于危险不顾,也不为推卸责任随意地将患者推上手术台;在外伤性肝破裂的手术处理过程中,应该遵循损伤控制性手术的原则:(1)采用快速临时的措施控制出血与污染,随后快速关闭腹腔;(2)进行致死性三联征的进一步纠正;(3)最后进行有计划的再次手术对损

伤脏器以确定性修复。以力求手术简单有效为目的,争取在最短的时间内,用最简单的动作控制出血,依靠良好的精确缝合技术、熟练的原位打结技术、烂熟于胸的肝脏解剖和最新的肝脏外科的进展与理论指导操作,争取尽快结束手术,才能取得较好的临床效果。

4 参考文献

- 1 陈战, 窦科峰, 王德盛, 杨平, 蔡佳辰, 李霄, 刘志佳, 李小磊. 川芎嗪对肝创伤后早期大鼠残肝组织保护作用的评价. 世界华人消化杂志 2011; 19: 3291-3296
- 2 侯凤琴, 霍娜, 刘霞, 王泰龄, 王贵强. 慢性药物性肝损伤33例临床特点分析. 中国实用内科杂志 2011; 31: 941-943
- 3 苏联春, 何应芹. 改良带蒂网膜套在严重外伤性肝破裂手术中的应用研究. 中国医学创新 2010; 7: 59-60
- 4 姜德清, 黄继超, 郝占伟, 立全晰, 柯群刚, 李大柱, 赵华北. 膈肌包埋法救治重度肝破裂出血. 创伤外科杂志 2010; 12: 182-182, 185
- 5 卢灿荣, 黄志强. 可吸收网套包裹治疗肝外伤的进展. 中国实用外科杂志 2006; 26: 971-972
- 6 黎介寿. 腹部损伤控制性手术. 中国实用外科杂志 2006; 26: 561-562
- 7 Corigliano N, Mercantini P, Amodio PM, Balducci G, Caterino S, Ramacciato G, Ziparo V. Hemoperitoneum from a spontaneous rupture of a giant hemangioma of the liver: report of a case. *Surg Today* 2003; 33: 459-463
- 8 Terkivatan T, de Wilt JH, de Man RA, van Rijn RR, Tilanus HW, IJzermans JN. Treatment of ruptured hepatocellular adenoma. *Br J Surg* 2001; 88: 207-209
- 9 Steinke K, Terraciano L, Wiesner W. Unusual cross-sectional imaging findings in hepatic peliosis. *Eur Radiol* 2003; 13: 1916-1919
- 10 吕新生, 陈能志. 肝外伤治疗方法的进展. 中国现代手术学杂志 2003; 7: 17-19
- 11 陈孝平, 吴在德, 严群. 肝脏损伤的外科治疗. 中华外科杂志 1994; 6: 354-355
- 12 黎鸿昌, 杨平. 钝性肝破裂151例治疗分析. 浙江创伤外科杂志 2005; 7: 223
- 13 Miller PR, Croce MA, Bee TK, Malhotra AK, Fabian TC. Associated injuries in blunt solid organ trauma: implications for missed injury in nonoperative management. *J Trauma* 2002; 53: 238-242; discussion 242-244
- 14 Clancy TV, Gary Maxwell J, Covington DL, Brinker CC, Blackman D. A statewide analysis of level I and II trauma centers for patients with major injuries. *J Trauma* 2001; 51: 346-351
- 15 Bardenheuer M, Obertacke U, Waydhas C, Nast-Kolb D. [Epidemiology of the severely injured patient. A prospective assessment of preclinical and clinical management. AG Polytrauma of DGU]. *Unfallchirurg* 2000; 103: 355-363
- 16 李伟军, 周伟平, 李林华, 姚永庭. 外伤性肝破裂156例治疗分析. 肝胆胰外科杂志 2007; 19: 248-249

■同行评价

本文为基层医院探讨肝外伤手术处理的经验总结,虽选题不是很新颖,但值得鼓励进一步探索。

编辑 李军亮 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《生理学名词》、《生物化学名词与生物物理学名词》、《化学名词》、《植物学名词》、《人体解剖学名词》、《细胞生物学名词》及《医学名词》系列为准,药名以《中华人民共和国药典》和卫生部药典委员会编的《药名词汇》为准,国家食品药品监督管理局批准的新药,采用批准的药名;创新性新药,请参照我国药典委员会的“命名原则”,新译名词应附外文。公认习用缩略语可直接应用(建议第一次也写出全称),如ALT, AST, mAb, WBC, RBC, Hb, T, P, R, BP,

PU, GU, DU, ACTH, DNA, LD50, HBsAg, HCV RNA, AFP, CEA, ECG, IgG, IgA, IgM, TCM, RIA, ELISA, PCR, CT, MRI等. 为减少排印错误, 外文、阿拉伯数字、标点符号必须正确打印在A4纸上. 中医药名词英译要遵循以下原则: (1)有对等词者, 直接采用原有英语词, 如中风stroke, 发热fever; (2)有对应词者应根据上下文合理选用原英语词, 如八法eight principal methods; (3)英语中没有对等词或相应词者, 宜用汉语拼音, 如阴yin, 阳yang, 阴阳学说yinyangology, 人中renzhong, 气功qigong; 汉语拼音要以词为单位分写, 如weixibao nizhuanwan(胃细胞逆转丸), guizhitang(桂枝汤). 通常应小写.

2.3 外文字符 注意大小写正斜体与上下角标. 静脉注射iv, 肌肉注射im, 腹腔注射ip, 皮下注射sc, 脑室注射icv, 动脉注射ia, 口服po, 灌胃ig. s(秒)不能写成S, kg不能写成Kg, mL不能写成ML, lcpm(应写为1/min)÷E%(仪器效率)÷60 = Bq, pH不能写PH或P^H, *H. pylori*不能写成HP, $T_{1/2}$ 不能写成tl/2或T_{1/2}, Vmax不能Vmax, μ 不写为英文u. 需排斜体的外文文字, 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 $1 \times 10^{12}/L$, WBC数用 $1 \times 10^9/L$, WBC构成比用0.00表示, Hb用g/L. M_r 明确的体内物质以nmol/L或mmol/L表示, 不明确者用g/L表示. 1 M硫酸, 改为1 mol/L硫酸, 1 N硫酸, 改为0.5 mol/L硫酸. 长10 cm, 宽6 cm, 高4 cm, 应写成10 cm × 6 cm × 4 cm. 生化指标一律采用法定计量单位表示, 例如, 血液中的总蛋白、清蛋白、球蛋白、脂蛋白、血红蛋白、总脂用g/L, 免疫球蛋白用mg/L; 葡萄糖、钾、尿素、尿素氮、CO₂结合力、乳酸、磷酸、胆固醇、胆固醇酯、三酰甘油、钠、钙、镁、非蛋白氮、氯化物; 胆红素、蛋白结合碘、肌酸、肌酐、铁、铅、抗坏血酸、尿胆元、氨、维生素A、维生素E、维生素B1、维生素B2、维生素B6、尿酸; 氢化可的松(皮质醇)、肾上腺素、汞、孕酮、甲状腺素、睾酮、叶酸用nmol/L; 胰岛素、雌二醇、促肾上腺皮质激素、维生素B12用pmol/L. 年龄的单位有日龄、周龄、月龄和岁. 例如, 1秒, 1 s; 2分钟, 2 min; 3小时, 3 h; 4天, 4 d; 5周, 5 wk; 6月, 6 mo; 雌性♀, 雄性♂, 酶活性国际单位IU = 16.67 nkat, 对数log, 紫外uv, 百分比%, 升L, 尽量把 1×10^{-3} g与 5×10^{-7} g之类改成1 mg与0.5 mg, hr改成h, 重量 γ 改成mg, 长度m改成mm. 国际代号不用于无数值的文句中, 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: wcyj@wjgnet.com; http://www.wjgnet.com

文大写*F*; (3)卡方检验用希腊小写 χ^2 ; (4)样本的相关系数用英文小写*r*; (5)自由度用希腊小写*v*; (6)样本数用英文小写*n*; (7)概率用英文斜体大写*P*. 在统计学处理中在文字叙述时平均数±标准差表示为mean±SD, 平均数±标准误为mean±SE. 统计学显著性用^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±0.5 mmol/L等. 测量的数据不能超过其测量仪器的精密度, 例如6347意指6000分之一的精密度. 任何一个数字, 只允许最后一位有误差, 前面的位数不应有误差. 在一组数字中的mean±SD应考虑到个体的变差, 一般以SD的1/3来定位数, 例如3614.5 g±420.8 g, SD的1/3达一百多g, 平均数波动在百位数, 故应写成3.6 kg±0.4 kg, 过多的位数并无意义. 又如8.4 cm±0.27 cm, 其SD/3 = 0.09 cm, 达小数点后第2位, 故平均数也应补到小数点后第2位. 有效位数以后的数字是无效的, 应该舍. 末尾数字, 小于5则舍, 大于5则进, 如恰等于5, 则前一位数逢奇则进, 逢偶(包括“0”)且5之后全为0则舍. 末尾时只可1次完成, 不得多次完成. 例如23.48, 若不要小数点, 则应成23, 而不应该23.48→23.5→24. 年月日采用全数字表达法, 请按国家标准GB/T 7408-94书写. 如1985年4月12日, 可写作1985-04-12; 1985年4月, 写作1985-04; 从1985年4月12日23时20分50秒起至1985年6月25日10时30分止, 写作1985-04-12 T23:20:50/1985-06-25 T10:30:00; 从1985年4月12日起至1985年6月15日止, 写作1985-04-12/06-16, 上午8时写作08:00, 下午4时半写作16:30. 百分数的有效位数根据分母来定: 分母≤100, 百分数到个位; 101≤分母≤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!

2.7 标点符号 遵照国家标准GB/T 15834-1995标点符号用法的要求, 本刊论文中的句号都采用黑圆点; 数字间的起止号采用“-”字线, 并列的汉语词间用顿号分开, 而并列的外文词、阿拉伯数字、外文缩略词及汉语拼音字母拼写词间改用逗号分开, 参考文献中作者间一律用逗号分开; 表示终了的标点符号, 如句号、逗号、顿

号、分号、括号及书名号的后一半, 通常不用于一行之首; 而表示开头的标点符号, 如括号及书名号的前一半, 不宜用于一行之末. 标点符号通常占一格, 如顿号、逗号、分号、句号等; 破折号应占两格; 英文连字符只占一个英文字符的宽度, 不宜过长, 如5-FU. 外文字符下划一横线表示用斜体, 两横线表示用小写, 三横线表示用大写, 波纹线表示用黑体.

3 稿件格式

3.1 题名 简明确切地反映论文的特定内容, 鲜明而有特色, 阿拉伯数字不宜开头, 不用副题名, 一般20个字. 避免用“的研究”或“的观察”等非特定词.

3.2 作者 论文作者的署名, 按照国际医学杂志编辑委员会(ICMJE, International Committee of Medical Journal Editors)作者资格标准执行. 作者标准为: (1)对研究的理念和设计、数据的获得、分析和解读做出重大贡献; (2)起草文章, 并对文章的重要的知识内容进行批评性修改; (3)接受对准备发表文章的最后一稿. 作者应符合条件1, 2, 3, 对研究工作有贡献的其他人可放入致谢中. 作者署名的次序按贡献大小排列, 多作者时姓名间用逗号, 如是单名, 则在姓与名之间空1格(正文和参考文献中不空格). 《世界华人消化杂志》要求所有署名人写清楚自己对文章的贡献. 世界华人消化杂志不设置共同第一作者和共同通信作者.

3.3 单位 作者后写单位的全称空1格后再写省市及邮政编码. 格式如: 张旭晨, 梅立新, 承德医学院病理教研室 河北省承德市 067000

3.4 第一作者简介 格式如: 张旭晨, 1994年北京中医药大学硕士, 讲师. 主要从事消化系统疾病的病理研究.

3.5 作者贡献分布 格式如: 陈湘川与庞丽娟对此文所作贡献两均等; 此课题由陈湘川、庞丽娟、陈玲、杨兰、张金芳、齐妍及李洪安设计; 研究过程由陈玲、杨兰、张金芳、蒋金芳、杨磊、李锋及曹秀峰操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由曹秀峰提供; 数据分析由陈湘川、杨兰及庞丽娟完成; 本论文写作由陈湘川、庞丽娟及李洪安完成.

3.6 同行评议者 为了确保刊出文章的质量, 本刊即将开始实行接受稿件的同行评议公开策略, 将同行评议者姓名, 职称, 机构的名称与文章一同在脚注出版. 格式如: 房静远, 教授, 上海交通大学医学院附属医院仁济医院, 上海市消化疾

病研究所。

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

《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

2012-08-29/09-01

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学术交流会

会议地点: 济南市

联系方式: doclf@163.com

2012-09-06/09

第七届中国肿瘤学术大会暨第十一届海峡两岸肿瘤学术会议

会议地点: 北京市

联系方式: shengwangyan@163.com

2012-09-14/16

中华医学会第十二次全国超声医学学术会议

会议地点: 青岛市

联系方式: lilyjia@163.com

2012-09-20/23

2012中国消化病学大会

会议地点: 上海市

联系方式: abstract@ccdd2012.org

2012-09-21/30

2012中华影像技术第20次全国学术大会暨国际影像技术论坛

会议地点: 长春市

联系方式: ting@dxyer.com

2012-09-28/10-02

第37届欧洲临床肿瘤学会年会(ESMO2012)

会议地点: 奥地利维也纳

lhgj_jihcc@163.com

2012-10-11/14

第三届国际肿瘤表观遗传学研讨会

会议地点: 北京市

联系方式: epigeneticmeeting2012@gmail.com

2012-10-12/15

国腹腔镜技术新进展与改良后手术治疗2型糖尿病手术教学研讨会

会议地点: 齐齐哈尔市

联系方式: bjgzgt@163.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

2012-10-19/21

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

2012-10-19/21

中日友好医院国际肠胃外科高峰论坛

会议地点: 北京市

联系方式: lckyh@126.com

2012-10-19/21

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

2012-10-21/11-10

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

2012-10-31/11-03

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

2012-11-09/11

2012中国结直肠肛门外科学术会议暨中华医学会外科学分会结直肠肛门外科学组学术年会

会议地点: 广州市

联系方式: 15813300382

2012-11-16/18

2012中华消化病学年度讲坛

会议地点: 北京市

联系方式: cma_spa@163.com

2012-12-07/11

第十二届全国消化道恶性病变介入诊疗研讨会暨2012内镜/介入/放射及肿瘤微创外科新技术国际论坛

会议地点: 昆明市

联系方式: 283409817@qq.com或7420hjh@sohu.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!

陈国忠 主任医师

广西中医学院第一附属医院消化内科

陈海龙 教授

大连医科大学附属第一医院院办

陈亚军 教授

首都医科大学附属北京儿童医院普外科

杜群 副研究员

广州中医药大学脾胃研究所药理室

樊冬梅 副主任医师

广州中医药大学第一附属医院消化内科

樊晓明 教授

复旦大学附属金山医院消化科

傅思源 副教授

东方肝胆外科医院肝外三科

傅晓辉 副教授

东方肝胆外科医院

郭晓钟 教授

中国人民解放军沈阳军区总医院消化内科

胡国信 主任医师

南昌大学第一附属医院传染科

黄志勇 教授

华中科技大学同济医院普外科

姜慧卿 教授

河北医科大学第二医院消化科

李涛 副主任医师

北京大学人民医院肝胆外科

刘丽江 教授

江汉大学医学院病理学

刘连新 教授

哈尔滨医科大学第一临床医学院

刘平 教授

南京医科大学第一附属医院(江苏省人民医院)肿瘤内科

毛高平 教授

中国人民解放军空军总医院

秦成勇 教授

山东省立医院消化内科

孙星 副教授

上海交通大学附属第一人民医院普外科

王炳元 教授

中国医科大学附属第一医院消化内科

王德盛 副主任医师

中国人民解放军第四军医大学西京医院肝胆外科

王文跃 主任医师

中日友好医院普通外科

王小众 教授

福建医科大学附属协和医院消化内科

王铮 副研究员

西安交通大学医学院第一附属医院肝胆病医院肝胆外科

谢丹 教授

中山大学肿瘤防治中心-华南肿瘤学国家重点实验室

徐辉雄 教授

同济大学附属第十人民医院暨上海市第十人民医院超声科

薛东波 教授

哈尔滨医科大学附属第一医院

杨江华 副教授

皖南医学院弋矶山医院感染科

殷正丰 教授

中国人民解放军第二军医大学东方肝胆外科医院

于聪慧 教授

中国人民解放军北京军区总医院肝胆外科