

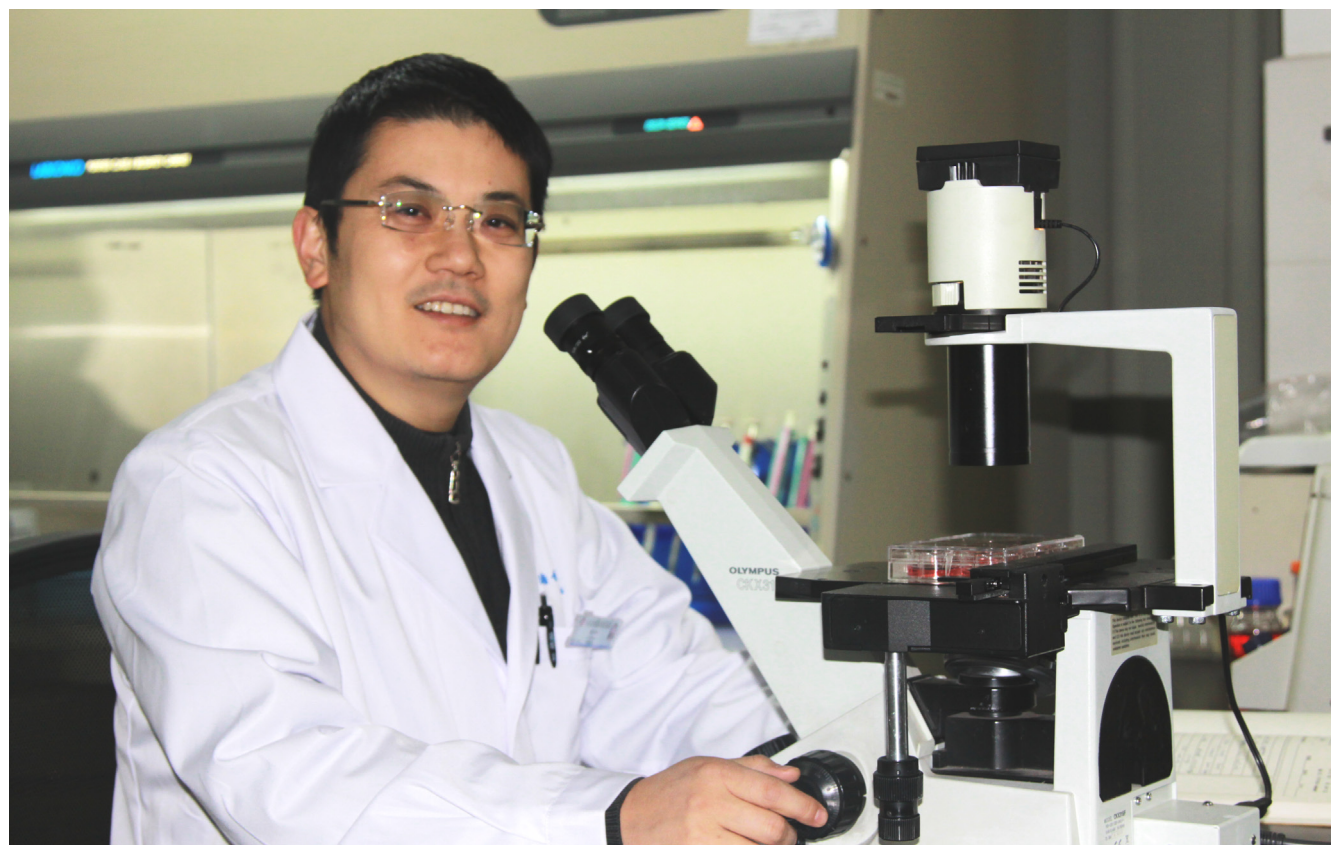
ISSN 1009-3079 (print)
ISSN 2219-2859 (online)
CN 14-1260/R

世界华人消化杂志®

WORLD CHINESE JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2012 年 12 月 18 日 第 20 卷 第 35 期 (Volume 20 Number 35)



35 / 2012

ISSN 1009-3079



9 771009 307056

《世界华人消化杂志》是一份同行评议性的旬刊，是一份被《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊。《世界华人消化杂志》的英文摘要被美国《化学文摘》，荷兰《医学文摘库/医学文摘》和俄罗斯《文摘杂志》收录。

世界华人消化杂志®

编辑委员会

2012-01-01/2014-12-31

wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

《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
李国忠教授
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
崔云南教授
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
吴泰璜教授
伍晓汀教授
谢敏主任医师
徐迅迪教授
徐泱副主任医师
许戈良教授
许剑民教授
薛东波教授
杨柏霖副主任医师
杨桦教授
杨家和主任医师
杨银学教授
殷正丰教授
于聪慧教授
俞继卫副主任医师
于则利教授
禹正杨副教授
喻春钊教授
张必翔主任医师
张宏伟教授
张佳林教授
张进祥副教授
张俊副研究员
张力为副教授
张伟辉主任医师
赵刚副教授
赵青川主任医师
智绪亭教授
周伟平教授
周翔宇副主任医师
邹小明教授

消化感染病学

白浪副教授
陈国凤主任医师
陈红松研究员
陈建杰教授
陈志辉副主任医师

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

消化中医药学

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

邢建峰副教授
徐列明教授
许玲教授
徐庆教授
袁红霞研究员
张声生教授

消化肿瘤学

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

滕旭副教授
田文静副教授
汪思应教授
王钦红教授
王书奎教授
魏继福研究员
文彬研究员
吴道澄教授
吴江锋副教授
吴军研究员
吴俊华副教授
吴志强副教授
夏敏教授
徐健副主任医师
徐宁志研究员
许文燮教授
杨晓明教授
阴赓宏研究员
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 12 月 18 日 第 20 卷 第 35 期 (总第403期)

述 评

3413 关于食管鳞癌若干临床问题的思考

李苏宜, 曹鹏

基础 研究

3417 大黄素对兔胃电的影响及其作用机制

黄伟锋, 张慧, 欧阳守, 卢春敬

3424 GM-CSF基因增强HCV核心蛋白基因DNA疫苗的免疫应答

翟永贞, 王岩, 冯国和

3431 靶向SMAD3基因的shRNA重组慢病毒对大鼠肝再生的作用

张莹, 孔贺利, 郑素军, 刘梅, 陈煜, 刘霜, 段钟平

3439 甘草酸二铵对溃疡性结肠炎大鼠M30表达的影响

原皓, 王鹤鸣, 赵雪曼

3445 葡聚糖硫酸钠致溃疡性结肠炎大鼠模型的肠道微生态

韩晓霞, 侯天舒, 杨阳, 赵纪岚, 吴巧凤, 余曙光

3452 MiR-451作用于MIF对大肠癌细胞株LoVo的影响

孔帅, 陶凯雄, 王国斌

临 床 研 究

3457 *Runx3*、*Rassfla*基因启动子在胃癌组织中的高甲基化及*Dnmt1*的表达

姜相君, 初蕾蕾, 崔艳欣, 宋明全, 解祥军, 田宇彬

3464 TMEM16A在结肠癌组织中的表达及其意义

杨军, 刘妮, 康安静, 赵世平, 黄晓钟, 苏宝山, 陈晓黎, 李宗芳

焦 点 论 坛

3470 食管癌相关研究进展

傅剑华, 傅小龙, 樊青霞, 李苏宜, 刘进康, 殷咏梅, 曹鹏, 霍介格, 邵永丰, 杨弘, 刘洋腾宇, 周晖, 张玉, 丁蓉, 李向柯, 周越, 林琳

3471 以手术为主的食管癌综合治疗的进展

杨弘, 傅剑华

3476 放射治疗参与的食管癌多学科综合治疗的进展

傅小龙

3482 食管癌药物治疗的研究进展

李向柯, 樊青霞

3488 食管鳞癌预后评估及疗效预测分子靶标的临床研究进展

李苏宜

3494 食管癌CT灌注成像诊断的进展

刘洋腾宇, 周晖, 刘进康

3499 食管癌分子靶向治疗临床研究的新进展

殷咏梅, 周越, 邵永丰

3505 放化疗结合中医药治疗食管癌的临床研究进展

林琳, 曹鹏

3510 中医药在食管癌中的应用与研究的进展

张玉, 丁蓉, 曹鹏, 霍介格

文 献 综 述

3515 三种消化道重建方式治疗胃癌合并2型糖尿病的研究进展

裴明毓, 王震, 陈俊强

	<p>3521 核苷(酸)类似物抗病毒治疗对慢性乙型肝炎患者细胞免疫功能的影响 陈宇, 邱隆敏, 姚新生, 庄勤建, 吕红</p> <p>3529 丙型肝炎病毒基因分型的研究进展 黄超群, 王福祥</p> <p>3536 尾加压素 II 在肝硬化门脉高压及侧支循环中的作用 郭晓会, 冯志杰</p> <p>3542 胆汁酸的代谢、生理作用及其临床意义 尹凯歌, 冯志杰</p> <p>3549 中医药在脊髓损伤神经源性肠道功能障碍的研究进展 朱黎婷, 朱毅, 张文毅, 俞君, 谢斌</p> <p>3558 锌指蛋白Metallopanstimulin-1在肿瘤中的研究进展 杨中印, 顾琴龙</p>
研究快报	<p>3564 瑞舒伐他汀钙对慢性梗阻性黄疸大鼠肝脏纤维化的影响 余水平, 周雪玲</p> <p>3570 半乳糖-羧化壳聚糖-十四酸纳米粒的制备及其肝靶向性 寇昌华, 钱海鑫, 韩锡林, 汤仁仙, 温相如, 赵子明, 宋远见, 戚大石, 刘红芝, 刘雯, 马向东</p> <p>3575 考来烯胺对2型糖尿病大鼠胆汁酸代谢的影响 王晓凌, 崔海平</p>
临床经验	<p>3580 C-Jun蛋白在食管鳞癌组织中的表达及临床意义 赵俊刚, 任开明, 汤隽, 张磊</p> <p>3584 急诊重症患者的胃肠功能障碍与胃泌素水平 段宝民, 李兵, 王纪东</p> <p>3588 肝细胞癌中wwox基因启动子甲基化与蛋白表达的关系 陈军, 吴飞翔, 杨春, 覃思繁</p> <p>3594 孤立性胰腺结核国内文献的荟萃分析 李俊霞, 王化虹, 尹洪芳, 刘新光</p> <p>3599 结肠镜下电切治疗高风险息肉的预处理 刘杰民, 李国胜, 胡浩, 刘哲, 韩斌, 叶莉娜</p> <p>3603 白介素-10基因819T/C多态性与克罗恩病相关性的Meta分析 谭诗云, 吴鹏波, 张国, 罗和生, 叶会兰</p> <p>3609 乙状结肠扭转的CT征象诊断 杨栋梁, 郑可国, 刘红艳, 周学付, 冉慕光</p>
附录	<p>3614 《世界华人消化杂志》投稿须知</p> <p>3619 2012年国内国际会议预告</p>
志谢	<p>3620 志谢世界华人消化杂志编委</p>
消息	<p>3416 中国科技信息研究所发布《世界华人消化杂志》影响因子0.775</p> <p>3438 2011年度《世界华人消化杂志》发文情况</p> <p>3444 《世界华人消化杂志》性质、刊登内容及目标</p> <p>3463 《世界华人消化杂志》修回稿须知</p> <p>3469 《世界华人消化杂志》外文字符标准</p> <p>3481 《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)</p> <p>3504 《世界华人消化杂志》参考文献要求</p>

	<p>3520 《世界华人消化杂志》被评为中国精品科技期刊</p> <p>3528 <i>WJG</i>成功通过评审被PMC收录</p> <p>3535 <i>WJG</i>总被引频次排名位于第174名</p> <p>3548 《世界华人消化杂志》栏目设置</p> <p>3557 《世界华人消化杂志》2011年开始不再收取审稿费</p> <p>3563 《世界华人消化杂志》出版流程</p> <p>3593 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</p> <p>3608 《世界华人消化杂志》入选《中国学术期刊评价研究报告-RCCSE权威、核心期刊排行榜与指南》</p> <p>3613 《世界华人消化杂志》正文要求</p>
封面故事	《世界华人消化杂志》编委, 曹鹏, 研究员, 210028, 江苏省南京市, 江苏省中医药研究院细胞与分子生物学实验室
本期责任人	编务 马帅; 送审编辑 田滢, 翟欢欢; 组版编辑 闫晋利; 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

<p>世界华人消化杂志</p> <p>Shijie Huaren Xiaohua Zazhi</p> <p>吴阶平 题写封面刊名 陈可冀 题写版权刊名 (旬刊)</p> <p>创 刊 1993-01-15 改 刊 1998-01-25 出 版 2012-12-18 原刊名 新消化病学杂志</p> <p>期刊名称 世界华人消化杂志 主管单位 山西省科学技术厅 主办单位 太原消化病防治中心</p> <p>编辑 世界华人消化杂志编辑委员会 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com</p> <p>出版 世界华人消化杂志编辑部 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com</p>	<p>主编 程英升, 教授, 200072, 上海市, 同济大学附属第十人民医院影像临床医学中心 党双锁, 教授, 710004, 陕西省西安市, 西安交通大学医学院第二附属医院感染科 江学良, 教授, 250031, 山东省济南市, 中国人民解放军济南军区总医院消化科 刘连新, 教授, 150001, 黑龙江省哈尔滨市, 哈尔滨医科大学第一临床医学院普外科 刘占举, 教授, 200072, 上海市, 同济大学附属第十人民医院消化内科 吕宾, 教授, 310006, 浙江省杭州市, 浙江中医药大学附属医院(浙江省中医院)消化科 马大烈, 教授, 200433, 上海市, 中国人民解放军第二军医大学附属长海医院病理科 王小众, 教授, 350001, 福建省福州市, 福建医科大学附属医院协和医院消化内科 姚登福, 教授, 226001, 江苏省南通市, 南通大学附属医院临床医学研究中心 张宗明, 教授, 100016, 北京市, 清华大学第一附属医院消化医学中心</p> <p>编辑部主任 李军亮</p>	<p>印刷 北京科信印刷厂 发行 国内: 北京报刊发行局 国外: 中国国际图书贸易总公司 (100044, 北京市399信箱) 订购 全国各地邮电局</p> <p>《世界华人消化杂志》是一份同行评议性的旬刊, 是一份被《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊.《世界华人消化杂志》的英文摘要被美国《化学文摘》, 荷兰《医学文摘库/医学文摘》和俄罗斯《文摘杂志》收录.</p> <p>《世界华人消化杂志》正式开通了在线办公系统(http://www.baishideng.com/wcjd/ch/index.aspx), 所有办公流程一律可以在线进行, 包括投稿、审稿、编辑、审读, 以及作者、读者、编者之间的信息反馈交流.</p> <p>特别声明 本刊刊出的所有文章不代表本刊编辑部和本刊编委会的观点, 除非特别声明. 本刊如有印装质量问题, 请向本刊编辑部调换.</p> <p>2012年版权归世界华人消化杂志所有</p>
--	---	--

World Chinese Journal of Digestology

December 2012 Contents in Brief Volume 20 Number 35

EDITORIAL	3413 Pondering several clinical issues concerning esophageal squamous cell carcinoma <i>Li SY, Cao P</i>
BASIC RESEARCH	<p>3417 Effect of emodin on rabbit gastric electric activity and mechanisms involved <i>Huang WF, Zhang H, Ou-Yang S, Lu CJ</i></p> <p>3424 Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor genetic adjuvant enhances the immune stimulatory effects of plasmid DNA encoding the hepatitis C virus core protein <i>Zhai YZ, Wang Y, Feng GH</i></p> <p>3431 Lentiviral-mediated delivery of shRNA targeting the SMAD3 gene promotes liver regeneration in rats <i>Zhang Y, Kong HL, Zheng SJ, Liu M, Chen Y, Liu S, Duan ZP</i></p> <p>3439 Treatment with diammonium glycyrrhizinate down-regulates M30 expression in ulcerative colitis in rats <i>Yuan H, Wang HM, Zhao XM</i></p> <p>3445 Intestinal microecology in rats with ulcerative colitis <i>Han XX, Hou TS, Yang Y, Zhao JL, Wu QF, Yu SG</i></p> <p>3452 Effect of miR-451-mediated regulation of MIF expression on cell proliferation in human colon carcinoma cell line LoVo <i>Kong S, Tao KX, Wang GB</i></p>
CLINICAL RESEARCH	<p>3457 Relationship between promoter methylation of the <i>Runx3</i> and <i>Rassf1a</i> genes and <i>Dnmt1</i> expression in gastric cancer <i>Jiang XJ, Chu LL, Cui YX, Song MQ, Xie XJ, Tian ZB</i></p> <p>3464 Significance of TMEM16A expression in colorectal carcinoma <i>Yang J, Liu N, Kang AJ, Zhao SP, Huang XZ, Su BS, Chen XL, Li ZF</i></p>
TOPIC HIGHLIGHT	<p>3470 Progress in treatment of esophageal cancer <i>Fu JH, Fu XL, Fan QX, Li SY, Liu JK, Yin YM, Cao P, Huo JG, Shao YF, Yang H, Liu YTY, Zhou H, Zhang Y, Ding R, Li XK, Zhou Y, Lin L</i></p> <p>3471 Progress in surgery-based multimodality therapy for resectable esophageal cancer <i>Yang H, Fu JH</i></p> <p>3476 Radiotherapy as a component of multidisciplinary treatment for esophageal cancer: Recent research progress <i>Fu XL</i></p> <p>3482 Progress in medication treatment of esophageal cancer <i>Li XK, Fan QX</i></p> <p>3488 Molecular targets for prediction of prognosis and treatment response in esophageal squamous cell carcinoma <i>Li SY</i></p> <p>3494 CT perfusion imaging in the diagnosis of esophageal cancer <i>Liu YTY, Zhou H, Liu JK</i></p> <p>3499 Targeted therapies for esophageal cancer <i>Yin YM, Zhou Y, Shao YF</i></p> <p>3505 Advances in clinical research of radiotherapy and chemotherapy combined with Chinese medicine treatment for esophageal cancer <i>Lin L, Cao P</i></p> <p>3510 Progress in treatment of esophageal cancer by traditional Chinese medicine <i>Zhang Y, Ding R, Cao P, Huo JG</i></p>

REVIEW	<p>3515 Advances in three digestive tract reconstruction methods for gastric cancer patients with DM2 <i>Pei MY, Wang Z, Chen JQ</i></p> <p>3521 Effect of antiviral treatment with nucleoside and nucleotide analogues on cellular immune function in patients with chronic hepatitis B <i>Chen Y, Qiu LM, Yao XS, Zhuang QJ, Lv H</i></p> <p>3529 Progress in research of genotypes of hepatitis C virus <i>Huang CQ, Wang FX</i></p> <p>3536 Role of urotensin- II in the pathogenesis of liver cirrhosis and portal hypertension and collateral circulation <i>Guo XH, Feng ZJ</i></p> <p>3542 Bile acids: Metabolism, physiology and clinical significance <i>Yin KG, Feng ZJ</i></p> <p>3549 Chinese medicine for bowel dysfunction after spinal cord injury: Recent advances <i>Zhu LT, Zhu Y, Zhang WY, Yu J, Xie B</i></p> <p>3558 Advances in understanding the role of metallopeptidase-1 in tumors <i>Yang ZY, Gu QL</i></p>
RAPID COMMUNICATION	<p>3564 Treatment with rosuvastatin calcium improves liver fibrosis in a rat model of chronic obstructive jaundice <i>Yu SP, Zhou XL</i></p> <p>3570 Preparation of liver-targeted galactose-carboxyl chitosan-myristic acid nanoparticles <i>Kou CH, Qian HX, Han XL, Tang RX, Wen XR, Zhao ZM, Song YJ, Qi DS, Liu HZ, Liu W, Ma XD</i></p> <p>3575 Cholestyramine therapy alters bile acid metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats <i>Wang XL, Cui HP</i></p>
CLINICAL PRACTICE	<p>3580 Significance of C-Jun expression in esophageal squamous cell carcinoma <i>Zhao JG, Ren KM, Tang J, Zhang L</i></p> <p>3584 Relationship between serum gastrin levels and severe gastrointestinal dysfunction in emergency intensive care unit patients <i>Duan BM, Li B, Wang JD</i></p> <p>3588 Relationship between promoter methylation status and protein expression of the wwox gene in hepatocellular carcinoma <i>Chen J, Wu FX, Yang C, Qin SF</i></p> <p>3594 Solitary pancreatic tuberculosis: A case report and literature review <i>Li JX, Wang HH, Yin HF, Liu XG</i></p> <p>3599 Colonoscopic electrosurgical resection of high-risk polyps: Pretreatment methods <i>Liu JM, Li GS, Hu H, Liu Z, Han B, Ye LN</i></p> <p>3603 Association between interleukin-10-819 promoter polymorphism and susceptibility to Crohn's disease: A meta-analysis <i>Tan SY, Wu PB, Zhang G, Luo HS, Ye HL</i></p> <p>3609 CT features of sigmoid volvulus <i>Yang DL, Zheng KG, Liu HY, Zhou XF, Ran MG</i></p>
APPENDIX	<p>3614 Instructions to authors of <i>World Chinese Journal of Digestology</i></p> <p>3619 Meeting events calendar in 2012</p>
ACKNOWLEDGMENT	<p>3620 Acknowledgments to reviewers of <i>World Chinese Journal of Digestology</i></p>

COVER	Editorial Board Member of <i>World Chinese Journal of Digestology</i> , Peng Cao, Laboratory of Cell and Molecular Biology, Jiangsu Province Academy of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210028, Jiangsu 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>Jin-Li Yan</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 December 18, 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*

关于食管鳞癌若干临床问题的思考

李苏宜, 曹 鹏

李苏宜, 东南大学附属中大医院 江苏省南京市 210009
曹鹏, 江苏省中医药研究院细胞与分子生物学实验室 江苏省南京市 210028
李苏宜, 博士, 教授, 主任医师, 主要从事晚期食管癌内科临床及应用型基础研究.
曹鹏, 博士, 研究员, 主要从事消化系统肿瘤转化医学的研究.
南京市医学科技发展基金资助项目, No. YKK1060
国家自然科学基金资助项目, No. 81274150
作者贡献分布: 本文由李苏宜与曹鹏共同起草并完成写作.
通讯作者: 曹鹏, 研究员, 210028, 江苏省南京市红山路十字街100号, 江苏省中医药研究院细胞与分子生物学实验室.
pciao79@yahoo.com
收稿日期: 2012-08-28 修回日期: 2012-12-02
接受日期: 2012-12-17 在线出版日期: 2012-12-18

Pondering several clinical issues concerning esophageal squamous cell carcinoma

Su-Yi Li, Peng Cao

Su-Yi Li, Zhongda Hospital of Southeast University, Nanjing 210009, Jiangsu Province, China
Peng Cao, Laboratory of Cell and Molecular Biology, Jiangsu Province Academy of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210028, Jiangsu Province, China
Supported by: the Medical Science and Technology Foundation of Nanjing, No. YKK1060; National Natural Science Foundation of China, No. 81274150
Correspondence to: Peng Cao, Laboratory of Cell and Molecular Biology, Jiangsu Province Academy of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210028, Jiangsu Province, China. pciao79@yahoo.com
Received: 2012-08-28 Revised: 2012-12-02
Accepted: 2012-12-17 Published online: 2012-12-18

Abstract

Evidence-based medicine is the integration of best research evidence with clinical expertise and patient values. Based on the principle of evidence-based medicine, literature review, and our 20-year experience in clinical oncology, we raise the following clinical issues about esophageal squamous cell carcinoma: What does long-term survival of some patients tell us? What is the cost for local lesion control? Whether should nutrition therapy be a component of comprehensive treatment for esophageal cancer? How is the principle of evidence-based medicine used to formulate the best chemotherapy plan? Is there any preference to methods for chemotherapy dose escalation? The clinical problems on esophageal squamous

carcinoma that need to be solved are far more than these. Although a few problems (e.g., survival extension can achieved by preoperative concurrent chemoradiotherapy) have obtained the best medical evidence support, most needs to be solved based on the doctor's professional knowledge and clinical skills and the patient's willingness. Clueless "clinical innovation" and immature guidelines on esophageal squamous cell carcinoma should be discouraged.

Key Words: Esophageal cancer; Evidence-based medicine

Li SY, Cao P. Pondering several clinical issues concerning esophageal squamous cell carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(35): 3413-3416

摘要

循证医学是由最佳研究证据、临床技能和患者价值观三元素构成。基于循证医学原理和文献学习, 结合我们20余年肿瘤内科医教研阅历, 本文认为食管鳞癌临床实践中有诸多问题值得商榷, 如: 部分患者长期存活给我们什么启示? 追逐局部病灶控制, 代价可以是多大? 营养治疗是否应该融入食管癌综合治疗中? 如何利用循证医学原理制定最佳解救化疗方案? 选择提升化疗药物剂量强度的方法是否存在偏好? 然而, 食管鳞癌需要解决的临床问题远不止这些, 其中少数问题, 例如术前同期化放疗的生存期延长等已经具有最佳医学证据的支持, 大多数问题在我国还是需要依据更多非最佳证据、医生的专业知识、临床技能和思维、患者的意愿来逐步解决, 不赞成毫无章法的“临床创新”, 更要放弃权威指南有关食管鳞癌临床路径部分的某些不成熟指引的保守遵循。

关键词: 食管癌; 循证医学

李苏宜, 曹鹏. 关于食管鳞癌若干临床问题的思考. *世界华人消化杂志* 2012; 20(35): 3413-3416
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3413.asp>

0 引言

循证医学(evidence-based medicine, EBM): 审

■背景资料

循证医学是由最佳研究证据、临床技能和患者价值观三元素构成。基于循证医学原理和文献学习, 结合二十余年肿瘤内科医教研经验, 本文认为食管鳞癌临床实践中有诸多问题值得商榷。

■同行评议者

邵先玉, 教授, 泰山医学院附属医院消化内科

■应用要点

解救化疗治疗食管鳞癌作用肯定。对于药物选择和组合方案,应该科学利用已有依据,在传承临床技能及专业理论、缜密思考总结和关注循证证据变迁的基础上进行探索创新发展。

慎、明确和批判地应用现有最佳证据为每个患者制定诊疗决策。实践过程是搜寻并评估相关信息用于医疗方案,并形成循环往复和提升的过程。因而,循证医学是由最佳研究证据、临床技能和患者价值观三元素构成。基于循证医学原理和文献学习,结合二十余年肿瘤内科医教研经验,本文认为在食管鳞癌临床实践中有如下几个问题值得商榷。

1 部分患者长期存活给我们什么启示?

手术联合放疗和化疗的综合治疗是目前食管鳞癌标准治疗模式,5年生存率8%-30%,其中IIA、III期患者5年生存率也在25%左右,10年生存率5.2%-24.0%。不难看出,5年生存者中多数还能再存活5年甚至更长的时间。认识这些长期生存患者临床及分子遗传特征,甄别不良预后患者并探索合理对策,是提高食管癌疗效的切入点之一^[1-3]。

食管鳞癌生物特性异质大,临床上表现为预后转归、化疗疗效等诸多方面迥异,其原因归纳为肿瘤临床因素和肿瘤组织遗传学特征差异。不良预后临床因素包括:III、IV期病例、差分化、髓质型和溃疡型、食管-支气管/纵膈瘘、双源或多源癌、流体食物下咽不利、大气道受压通气障碍者、体质量丢失、血色素下降等。其中部分特征缺乏最佳证据支持,依据专业理论和临床技能可以做出接近甚至完全符合实践规律推断。三十余年的癌组织遗传学特征与不良预后国内外研究,涉及抑癌基因、细胞增生及周期调节、细胞黏附和转移以及血管生成等多个角度,虽说也缺乏最佳证据,却是小样本II期临床研究的数量充分,且其中不乏重复性较佳者:肿瘤组织细胞EGFR、突变型P53、VEGF等蛋白水平的过表达以及Ki-67高分值($\geq 45\%$)等,做出了一些较为明确的提示^[2]。

重视临床预后相关因素的评估,结合遗传学特征改变,在最适合的患者治疗中的最适合的时机采用最适合的方法,获得最佳获益/风险比。

2 追逐局部病灶控制,代价可以是多大?

手术是主要根治性治疗方法。最佳研究证据:治疗非广泛期患者应以局部控制原发灶为重,良好的术前局部病灶控制是延长患者生存期的保障^[4]。为追逐病理完全缓解(pathological complete response, pCR)的最佳目标,高危患者通常都采用术前同期化放疗+手术、诱导化疗+同期化放疗+手术的方式。术前同期化放疗的有效率在

70%左右(pCR 10%-25%),可以将单纯手术5年生存率20%提高到30%左右,不过相关围手术期死亡率却最高报道超过10%,这与同期化放疗较为突出的血液学和胃肠道毒性有关,在换来疗效有限提高的同时付出代价也是惊人的。另外,其他代价还包括:非致命的手术相关并发症发生也提升,术后患者恢复近远期负面影响(通常是疏于评估的),给化放疗不敏感患者下一步治疗带来的麻烦。代价显然是太高了些^[5]。

应对举措,分析患者及其肿瘤病灶的临床特征和遗传因素特征,从个体化治疗的角度确定是否有必要采用上述高风险治疗模式、预测治疗的肿瘤组织反应性如何以及评估身体承受能力。运用这些临床和遗传特征的循证证据来自最佳证据,或者充足的非最佳证据且重复性强,或者学科理论和临床技能支撑,甚至患者的意愿。以安全有效为出发点,认真平衡治疗代价与生存获益之间的联系,争取最低代价/效益比。

3 营养治疗是否应该融入食管癌综合治疗中?

我国约75%食管癌患者可见热量-蛋白质缺乏营养不良,起因于疾病本身和各种抗肿瘤治疗,死亡患者营养不良发生率几乎达100%。肿瘤浸润食管壁约2/3周径/或压迫喉返神经、侵犯膈神经/压迫气道等均可显著直接干扰进食。食管癌荷瘤机体能耗增加明显,脂肪分解加快,蛋白分解率升高。同时,吻合口瘘/狭窄、“反流”等术后并发症和普遍发生的放射性食管炎及化疗消化系不良反应,致患者出现反胃、恶心、食管疼痛、厌食、恐进食,严重干扰热量和营养素摄入。机体呈现消耗增加而热量营养素摄入反而明显减少的异常代谢状态。

2011年ASCO大会公布一项III期临床研究结果(No. 4088),化疗时患者差体力状态(ECOG ≥ 2)、低白蛋白血清水平(≤ 3.5 g/L)及体质量丢失(3 mo内 $\geq 10\%$)分别与差PFS($P < 0.05$)和差OS($P < 0.05$)相关。尽管食管癌患者常现营养不良、贫血、甚至恶病质体征,而我国食管癌临床却普遍忽视营养治疗,很多患者是在这种状态下反复多次地进行化疗、放疗。因机体放疗、化疗耐受性显著下降,抗肿瘤治疗实施受到严重影响,营养不良因此成为食管癌综合治疗疗效提升的瓶颈^[6]。

重视上述现象,树立新理念。营养治疗保证足够热量和营养素摄入满足机体活动、维持正常代谢,改善脏器功能,提高化放疗耐受性,是

另外一条提高疗效的有效途径, 应为食管癌综合治疗不可或缺的组成部分. 最佳医学证据显示营养治疗有助于食管癌放疗患者保持体质量, 保证放疗顺利完成. 众多临床研究均证实, 食管癌患者术后早期营养支持可减少术后并发症^[7]. 食管癌营养治疗分为: (1)支持性营养治疗: 降低营养不良患者手术危险性, 提高对放疗、化疗的耐受性; (2)辅助性营养治疗: 改善营养状况, 促瘘口、伤口尽快愈合; (3)依赖性营养治疗: 维持患者生命并保持良好营养状态.

4 如何利用循证医学原理制定最佳解救化疗方案?

半数以上晚期和疗后复发患者只能采用解救化疗的治疗方式, 中晚期食管鳞癌解救化疗近期有效率为30%-60%, 中位生存期12 mo左右, 与晚期非小细胞肺癌解救化疗疗效接近, 但起效相对较快, 应属化疗较敏感肿瘤. 不过由于缺乏最佳医学证据的支持, 令许多国内同行在药物及方案的选择方面感到困惑.

无最佳医学证据, 并不意味着解救化疗可肆意选择用药及组合方案, 亦不可机械照搬来自低发地区西方国家的权威指南推荐. 国内外长达40年左右临床研究, 产生众多II期临床研究结果, 其中不乏重复性好的药物及方案, 有些已经得到公认. 5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-Fu)、顺铂的食管鳞癌一、二线化疗中重复性最好, 联合组成方案被公认, 现有非最佳医学证据显示, 含新化疗药物方案均未超越之. 重复性较好的还有紫杉醇(2011年被国家食管癌医保化疗用药收录)、奈达铂, 通常联合5-Fu+/-顺铂. 含长春瑞滨、卡培他滨、S-1联合化疗在东亚裔人种的治疗中也被看好. 欧美地区用伊力替康、多西紫杉醇联合化疗治疗食管鳞癌也获得确切疗效^[3,4]. 充足详实的非最佳医学证据结合高超临床技能和专业知识水准, 国内专业医师目前普遍认可5-Fu、顺铂、紫杉醇、奈达铂和长春瑞滨等的疗效.

总之, 解救化疗治疗食管鳞癌作用肯定. 对于药物选择和组合方案, 应该科学利用已有依据, 在传承临床技能及专业理论, 缜密思考总结 and 关注循证证据变迁的基础上探索创新发展.

5 选择提升化疗药物剂量强度的方法是否存在偏好?

临床普遍可见药物敏感性低、化疗耐受差的患者, 常常因提升单次给药剂量受限而影响疗效. 如何兼顾患者耐受性、药物剂量提升和保证疗

效之间的平衡? 探索低毒高效的化疗药物给药方式显然成为食管鳞癌疗效提升的又一个突破口.

药物剂量本身是由单次给药剂量和给药频次两元素构成, 无论增加单次给药剂量或者提高给药频次(缩短给药的间歇时间)均应被视为增加药物剂量. 细胞周期特异性/非特异性化疗药细胞毒作用分别具有侧重时相依赖性/剂量依赖性的细胞毒作用的特点. 因此, 增加细胞周期特异性化疗药剂量倾向选择增加给药频次方式及延长给药时间的方式, 增加细胞周期非特异性化疗药剂量倾向采取增加单次给药剂量的方式. 令人不解的是, 前者在食管鳞癌化疗临床实践中却很少被人关注.

铂类药物是细胞周期非特异性化疗药物, 呈现明显剂量依赖型的剂量效应特征. 5-Fu、紫杉醇从基础和临床研究角度均支持时相依赖型的剂量效应特点. 5-Fu发挥细胞毒作用途径较多, 主要途径是通过其代谢产物FdUMP致TS酶失活, 抑制DNA合成. 常规注药5-Fu主要以RNA为靶向, 持续滴注才是以DNA为靶向. 5-Fu半衰期短, 具S期特异性, 持续滴注使肿瘤细胞暴露于5-Fu时间延长, 抑制TS酶时间延长, 有显著时间依赖性特点. 近二十年国内外5-Fu长期持续静脉滴注治疗食管鳞癌研究提示“低毒高效”, 基本达到较高“化疗境界”, 尤其适合体弱、年长患者和多线化疗者. 紫杉醇作用于微管蛋白阻断细胞周期G₂/M期, 致有丝分裂停止. 持续滴注可减少肿瘤耐药细胞克隆出现, 且以线性形式自由进入组织, 提高肿瘤组织内分布, 发挥最大抗肿瘤生物学效应. 非最佳临床证据显示, 紫杉醇持续静脉滴注在支气管肺泡癌/非小细胞肺癌^[8,9], 难治性食管鳞癌^[10]化疗中取得令人鼓舞的疗效, 毒性反应不大.

顾及单纯时相依赖性给药可能会带来疾病缓解期短的情况, 联合化疗中可采用剂量依赖联合时相依赖给药方式. 作者将采用剂量依赖给药奈达铂/顺铂, 采取时相依赖给药5-Fu^[11]用于食管鳞癌的化疗初步取得“低毒高效”的结果.

6 结论

食管鳞癌需要解决的临床问题远不止这些, 其中少数问题例如术前同期化放疗的生存期延长等已经具有最佳医学证据的支持, 大多数问题在我国还是需要依据更多非最佳证据、医生的专业知识、临床技能和思维、患者的意愿来逐步解决, 不赞成毫无章法的“临床创新”, 更要

■同行评价
本文有较好的临床意义.

放弃对权威指南有关食管鳞癌临床路径部分某些不成熟指引的保守遵循。

7 参考文献

- 1 张思维, 陈万青, 郑荣寿, 李霓, 曾红梅, 李光琳, 魏文强, 赵平. 2003-2007年中国癌症死亡分析. 中国肿瘤 2012; 21: 171-178
- 2 Enzinger PC, Maye Robert J. Esophageal Cancer. *N Engl J Med* 2003; 349: 2241-2252
- 3 Ajani JA, Barthel JS, Bentrem DJ, D'Amico TA, Das P, Denlinger CS, Fuchs CS, Gerdes H, Glasgow RE, Hayman JA, Hofstetter WL, Ilson DH, Keswani RN, Kleinberg LR, Korn WM, Lockhart AC, Mulcahy MF, Orringer MB, Osarogiagbon RU, Posey JA, Sasson AR, Scott WJ, Shibata S, Strong VE, Varghese TK, Warren G, Washington MK, Willett C, Wright CD. Esophageal and esophagogastric junction cancers. *J Natl Compr Canc Netw* 2011; 9: 830-887
- 4 中国抗癌协会食管癌专业委员会. 食管癌规范化诊治指南. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2011
- 5 Herskovic A, Russell W, Liptay M, Fidler MJ, Al-Sarraf M. Esophageal carcinoma advances in treatment results for locally advanced disease: review. *Ann Oncol* 2012; 23: 1095-1103
- 6 Al-Batran SE, Ajani JA. Impact of chemotherapy on quality of life in patients with metastatic esophagogastric cancer. *Cancer* 2010; 116: 2511-2518
- 7 沈颖, 许可敏, 邱家学. 食道癌术后不同营养支持方式临床效果的META分析. 中国药物经济学杂志 2010; (2): 11-25
- 8 West HL, Crowley JJ, Vance RB, Franklin WA, Livingston RB, Dakhil SR, Giguere JK, Rivkin SE, Kraut M, Chansky K, Gandara DR. Advanced bronchioalveolar carcinoma: a phase II trial of paclitaxel by 96-hour infusion (SWOG 9714): a Southwest Oncology Group study. *Ann Oncol* 2005; 16: 1076-1080
- 9 Breathnach OS, Georgiadis MS, Schuler BS, Pizzella P, Llorens V, Kasturi V, Steinberg SM, O'Neil K, Takimoto CH, Johnson BE. Phase II trial of paclitaxel by 96-hour continuous infusion in combination with cisplatin for patients with advanced non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 2670-2676
- 10 林岩, 成红艳, 顾明, 李苏宜. 紫杉醇持续滴注联合方案二线治疗难治性晚期食管鳞癌. 肿瘤学杂志 2010; 16: 889-891
- 11 李苏宜, 万里新, 凌扬, 袁保兰, 顾明, 张丰林, 李醒亚, 童建东, 吴正东, 刘琳, 徐建忠, 汪竹. 减量奈达铂联合顺铂一线治疗晚期食管癌. 肿瘤 2008; 28: 446-449

编辑 李军亮 电编 闫晋利

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

• 消息 •

中国科技信息研究所发布《世界华人消化杂志》 影响因子 0.775

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3871次, 影响因子0.775, 综合评价总分65.5分, 分别位居内科学类52种期刊的第5位、第7位、第5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65位、第238位、第138位; 其他指标: 即年指标0.081, 他引率0.82, 引用刊数526种, 扩散因子13.59, 权威因子1260.02, 被引半衰期4.3, 来源文献量642, 文献选出率0.93, 地区分布数29, 机构分布树302, 基金论文比0.45, 海外论文比0.01。(编辑部主任: 李军亮 2012-12-27)

大黄素对兔胃电的影响及其作用机制

黄伟锋, 张慧, 欧阳守, 卢春敬

黄伟锋, 张慧, 欧阳守, 厦门市医药研究所生理室 福建省厦门市 361008

卢春敬, 厦门市妇幼保健院输血科 福建省厦门市 361008

黄伟锋, 主要从事消化系统疾病的研究.

福建省科技厅重点项目基金资助, No. 2009D026

作者贡献分布: 黄伟锋与张慧对此文贡献均等; 此课题由黄伟锋、张慧及欧阳守设计; 研究过程由张慧、黄伟锋及卢春敬操作完成; 研究所用新试剂及相关分析工具由黄伟锋及张慧提供; 数据分析由黄伟锋、张慧及卢春敬完成; 本论文写作主要由黄伟锋完成; 欧阳守指导课题研究完成.

通讯作者: 黄伟锋, 361008, 福建省厦门市会展路2009号, 厦门市医药研究所. hwf0625@163.com

电话: 0592-5957214 传真: 0592-5957214

收稿日期: 2012-11-06 修回日期: 2012-12-04

接受日期: 2012-12-17 在线出版日期: 2012-12-18

Effect of emodin on rabbit gastric electric activity and mechanisms involved

Wei-Feng Huang, Hui Zhang, Shou Ou-Yang, Chun-Jing Lu

Wei-Feng Huang, Hui Zhang, Shou Ou-Yang, Xiamen Medical Research Institute, Xiamen 361008, Fujian Province, China

Chun-Jing Lu, Xiamen Maternal and Child Health Hospital, Xiamen 361008, Fujian Province, China

Supported by: the Key Project of Department of Science and Technology of Fujian Province, No. 2009D026

Correspondence to: Wei-Feng Huang, Xiamen Medical Research Institute, 2009 Huizhan Road, Xiamen 361008, Fujian Province, China. hwf0625@163.com

Received: 2012-11-06 Revised: 2012-12-04

Accepted: 2012-12-17 Published online: 2012-12-18

Abstract

AIM: To observe the effect of emodin on rabbit gastric electric activity (GEA) by microinjecting emodin in the medial reticular formation (MRF) of the medulla oblongata (MO) and injecting emodin in external system, and to discuss the possible mechanisms responsible for the effect of emodin on gastrointestinal movement.

METHODS: Rabbits were treated by intravenously injecting emodin in external system and microinjecting emodin in the MRF of MO, and giving electrical stimulation with a gastric pacemaker. Four pairs of bipolar Ag-AgCl electrodes were positioned under the serosa along the gastric greater curve to record GEA synchronously,

and one pair of Pt stimulating electrodes were used for gastric pacing. The microinjection and stimulation of MRF were carried out using a brain stereo-localizer. Tested parameters included frequency (F), phase difference (PD), ratio of negative PD (RNPD) and corresponding rate of waves (CRW).

RESULTS: The normal frequency of GEA ranged from 3.48 to 3.77 cycles per minute (cpm) two hours after surgery, which could be driven by gastric pacing. The frequency of GEA at corpus 1 ($P = 0.001$) and corpus 2 ($P = 0.021$) and the RNPD of corpus 2 ($P = 0.007$) were increased, and the PD of corpus 3 ($P = 0.037$) and the CRW of corpus 3 ($P = 0.001$) and corpus 4 ($P = 0.046$) were decreased after pacing. Intravenous injection of emodin could decrease the frequency of corpus 1 ($P = 0.031$) and corpus 2 ($P = 0.047$) and the CRW of corpus 4 ($P = 0.035$), but had no effect on gastric electrical stimulation-driven GEA. The effects of emodin could be partly reversed by gastric pacing. Microinjection of 7 μ L emodin could decrease the frequency of corpus 2 in P7 ($P = 0.026$), the frequency of corpus 1 in P8.5 ($P = 0.045$), which could be reversed by atropine, the frequency of antrum in P9.5 ($P = 0.029$), and greatly increased the frequency of corpus 1 in P11 ($P = 0.011$). In the control group, microinjection of 0.9% saline in P8.5, P9.5 and P11 had no effect on the GEA, except the frequency of corpus 2 in P7, which was increased (pH 8.5).

CONCLUSION: Gastric pacing had notable "driven effects" on the GEA. The GEA could be greatly inhibited by intravenous injection of emodin. The frequency and PD of the GEA were decreased by microinjection of emodin in MRF of nuclei raphe magnus (P7-P9.5). But in the P11, the frequency of the GEA was increased.

Key Words: Emodin; Gastric electric activity; Phase difference; Medial reticular formation

Huang WF, Zhang H, Ou-Yang S, Lu CJ. Effect of emodin on rabbit gastric electric activity and mechanisms involved. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(35): 3417-3423

■背景资料

中药大黄是中医临床常用的泻下药物, 他能抑菌、抗炎、抗氧化、保护肝肾、抑制血小板聚集、改善微循环、抗肿瘤等, 具有较好的临床应用价值. 经研究证实大黄素有很好的促胃肠动力的作用.

■同行评议者

任超世, 研究员, 中国医学科学院, 中国协和医科大学生物医学工程研究所; 竺亚斌, 研究员, 宁波大学医学院人体解剖与组胚学系

■研究前沿

延脑内侧网状结构存在着可使胃电产生兴奋、抑制、兴奋/抑制3种类型变化的结构。故本文以浆膜胃电各指标(包括独创的相位差指标)为研究对象,考察中枢和外周注射大黄素对兔胃电活动的影响,并探讨其作用机制。

摘要

目的:观察外周及延脑内侧网状结构注射大黄素、胃电起搏对新西兰白兔胃电的影响,探讨大黄素对胃肠运动的作用机制。

方法:采用外周注射及延脑内侧网状结构(P7、P8.5、P9.5、P11)脑立体定位微量注射大黄素、电刺激胃起搏点,胃浆膜双极四导联同步记录的方法,分析胃体及胃窦部胃电的平均频率、相位差、负相位比率、波形对应率、幅度等指标。

结果:外周注射大黄素胃体1($P = 0.031$)、胃体2($P = 0.047$)频率减慢,胃体4($P = 0.035$)波形对应率降低。胃起搏可有效驱动胃电频率:胃体1($P = 0.001$)、胃体2($P = 0.021$)频率明显加快,胃体3相位差减小($P = 0.037$),胃体2负相位比率升高($P = 0.007$),胃体3($P = 0.001$)、胃窦($P = 0.046$)波形对应率降低。大黄素对于胃起搏引起的效应并无作用,但胃起搏可部分抑制大黄素引起的频率减慢。中枢不同部位微量注射大黄素的作用:P7:胃体2($P = 0.026$)频率明显减慢;P8.5:胃体1($P = 0.045$)频率明显减慢,阿托品可“翻转”大黄素引起的频率变慢效应;P9.5:胃窦($P = 0.029$)频率减慢;而P11:胃体1($P = 0.011$)频率明显加快。对照组中枢注射生理盐水,P7:胃体2的频率加快($pH 8.5$),其余部位胃电没有变化。

结论:胃起步点起搏对胃电的驱动效应明显。外周注射大黄素对兔胃电主要起抑制作用,而中枢注射大黄素在不同的部位表现出不同的效应。

关键词:大黄素;胃电;相位差;内侧网状结构

黄伟锋, 张慧, 欧阳守, 卢春敬. 大黄素对兔胃电的影响及其作用机制. 世界华人消化杂志 2012; 20(35): 3417-3423
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3417.asp>

0 引言

中药大黄(rhubarb)是中医临床常用的泻下药物,他能抑菌、抗炎、抗氧化、保护肝肾、抑制血小板聚集、改善微循环、抗肿瘤等^[1-5],具有较好的临床应用价值。经研究证实大黄素有很好的促胃肠动力的作用^[6]。对于大黄素促进胃肠动力的机制研究目前主要集中在通过升高胞内 Ca^{2+} 浓度^[7],抑制钾通道^[8],抑制 Na^+ , K^+ -ATP酶等途径,激素、神经肽在大黄素促进胃肠动力方面也起到一定的作用^[9-13]。延脑内侧网状结构作为中枢神经系统一个很重要且很特殊的部位,

在调节胃肠道功能方面起重要作用^[14,15]。延脑内侧网状结构结构复杂,其中中缝核区主要含有中缝大核(nucleus raphe magnus, Rm)、中缝苍白核(nucleus raphe pallidus, Rpa)、中缝隐核、中缝巨细胞核等多种核团。延脑内侧网状结构存在着可使胃电产生兴奋、抑制、兴奋/抑制3种类型变化的结构^[16-18]。本实验考察大黄素对兔胃电活动的影响,探讨大黄素对胃电活动调控的作用机制,进而为临床新疗法及新药的开发提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料 大黄素购自宝鸡市虹源生物科技有限公司,用DMSO助融(终浓度 $<0.1\%$),终浓度为1 mg/mL,用HCl调整PH值至8.5。硫酸阿托品注射液、氯醛糖、乌拉坦等为国产分析纯。健康新西兰白兔35只,雌雄不限,体质量 $2.0 \text{ kg} \pm 0.2 \text{ kg}$ (中国生旺实验动物养殖有限公司,生产许可证号:SCXK(沪)2002-0011)。

1.2 方法

1.2.1 手术:术前禁食18 h以上,可自由饮水。耳缘静脉注射2%氯醛糖(40 mg/kg)与20%乌拉坦(0.5 g/kg)混合液。腹部剪毛后,从剑突下2 cm沿腹白线作一约10 cm的纵行切口,尽量避开血管,钝性分离,暴露大部分胃。胃浆膜下植入双极电极,共埋5对。第一对为刺激电极,白金丝自制成针形,埋于胃起步点上方,负极在尾端,正极在头端。另外四对为记录电极,为Ag-AgCl针形电极,直径1 mm,分别埋在胃起步点下方(胃体1)、胃大弯处(胃体2)、胃大弯与胃窦之间(胃体3)和胃窦(胃体4)。每对电极的双极间距大约3-5 mm,沿着胃环形肌方向与纵形肌相垂直,用缝线作2点固定。将兔头部固定于脑立体定位仪(日本成茂)上,剪去颅顶毛。用微型电钻在颅顶延人字缝,分别在中缝大核(P7、P8.5、P9.5、P11)钻出4个小洞(尽量不要弄破脑膜,使脑部少出血)以备微注射器的插入。

1.2.2 实验记录:(1)胃体部实验:连接4对胃体记录电极到MP100WSW十六导生物信号采集分析系统,动物术后恢复2-3 h后,开始记录胃电,作为正常对照。耳缘静脉给予大黄素(4 mg/kg),记录和观察此时胃电(同时设生理盐水组做对照)。然后以正弦波刺激胃体,记录和观察此时的胃电。待动物胃电恢复正常后,先以正弦波刺激胃体,再在耳缘静脉给予大黄素,记录观察此时胃电;(2)脑部实验:动物固定于脑立体定位仪,按

表 1 正常胃电 ($n = 30$)

	频率	相位差	负相位比率	波形对应率
胃体1	3.60 ± 0.36	—	—	0.91 ± 0.08
胃体2	3.69 ± 0.48	0.46 ± 2.50	0.41 ± 0.30	0.86 ± 0.09
胃体3	3.48 ± 0.33	1.03 ± 3.89	0.37 ± 0.32	0.84 ± 0.11
胃窦	3.77 ± 0.45	0.25 ± 2.55	0.42 ± 0.27	0.87 ± 0.09

表 2 外周注射大黄素胃电 ($n = 23$)

	频率		相位差		负相位比率		波形对应率	
	前	后	前	后	前	后	前	后
胃体1	3.69 ± 0.40	3.58 ± 0.35^a	—	—	—	—	0.92 ± 0.07	0.89 ± 0.08
胃体2	3.80 ± 0.54	3.68 ± 0.44^a	0.63 ± 2.32	0.51 ± 2.19	0.39 ± 0.28	0.35 ± 0.25	0.86 ± 0.08	0.84 ± 0.09
胃体3	3.50 ± 0.33	3.55 ± 0.41	1.28 ± 4.11	1.38 ± 3.80	0.32 ± 0.31	0.37 ± 0.44	0.83 ± 0.11	0.83 ± 0.10
胃窦	3.84 ± 0.47	3.84 ± 0.47	0.10 ± 2.63	0.10 ± 2.50	0.46 ± 0.25	0.53 ± 0.42	0.86 ± 0.08	0.83 ± 0.09^a

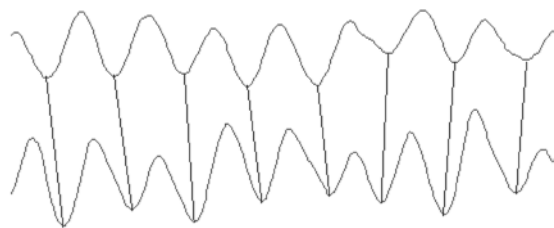
^a $P < 0.05$ vs 注射前。

图 1 胃相位差示意图。

脑立体定位图谱分别在P7、P8.5、P9.5、P11插入注射器后待动物胃电稳定后记录一段胃电作为对照(应考虑脑注射器的插入对中缝核团的机械性刺激的影响)。待胃电恢复正常后,在脑部通过微量注射器注射微量大黄素(生理盐水对照),观察并记录1 h胃电变化。在大黄素的有效作用时间内微量注射硫酸阿托品继续观察和记录胃电变化。脑部实验全部结束后,再在部分动物的脑刺激电极通以阳极电流损毁,耳缘静脉注射含1%亚铁氰化钾溶的5%甲醛溶液。待第2日刺激部位脑组织固定后,做组织切片,显微镜下观察刺激电极的真实位置(呈普鲁士兰的反应点)。

1.2.3 观察参数: (1)相位差: 四导同时记录胃起步点(胃体1)、胃体2、胃体3、胃窦部胃电,以同一波形在该导出现时相对于起步点出现时的时间差计算。如果远端波形落后于起步点者为正相位差,先于起步点者为负相位差,单位: s(图1); (2)波形对应率: 各导记录的波形与起步点记录的波形,互相对应的波数占整体出现波数的比值; (3)负相位比率: 在每个记录中,负相位差出

现的次数占该记录中相位差总个数的比率; (4)平均频率: 稳定记录15 min平均每分钟出现波形的个数; (5)幅度(峰-峰, P-P)值: 选择稳定记录15 min的波形,由Acqknowledge3.7自动处理生成,本实验仅作效应类型参考,不作统计学处理。

统计学处理 各组实验数据以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示,差异显著性检验用配对 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 正常胃电 术后2 h恢复后的正常胃电频率为3.48-3.77 cpm,与以往的实验相同。相位差均为正值,各项指标均正常(表1,图2)。

2.2 耳缘静脉注射大黄素 外周耳缘静脉注射大黄素(4 mg/kg)后胃体1($P = 0.031$)、胃体2($P = 0.047$)频率明显减慢,胃窦($P = 0.035$)波形对应率下降,相位差和负相位比率变化不明显(表2)。注射大黄素对兔胃电主要起抑制作用。

2.3 外周注射生理盐水 外周注射生理盐水对照,胃电频率、相位差等各项参数均未有明显变化(数据没有显示)。

2.4 胃起搏 胃起步点给予正弦波刺激(胃起搏)后“驱动”效应明显(表3),胃体1($P = 0.001$)、胃体2($P = 0.021$)频率明显加快,胃体3相位差减小($P = 0.037$),胃体2负相位比率升高($P = 0.007$),胃体3($P = 0.001$)、胃窦($P = 0.046$)波形对应率降低。

2.5 大黄素与胃起搏的相互影响 从表4可以看出

■相关报道

大黄素促进胃肠动力的机制研究目前主要集中在通过升高胞内 Ca^{2+} 浓度,抑制钾通道,抑制 Na^+ , K^+ -ATP酶等途径,激素,神经肽在大黄素促进胃肠动力方面也起到一定的作用。延脑内侧网状结构作为中枢神经系统一个很重要且很特殊的部位,在调节胃肠道功能方面起重要作用。

■创新盘点

以胃浆膜电为研究对象,观察中枢和外周注射大黄素对胃电的影响及其与胃起搏、中枢电刺激对胃电的相互作用。进一步证实胃起步点电起搏对胃电有很好的“驱动效应”。

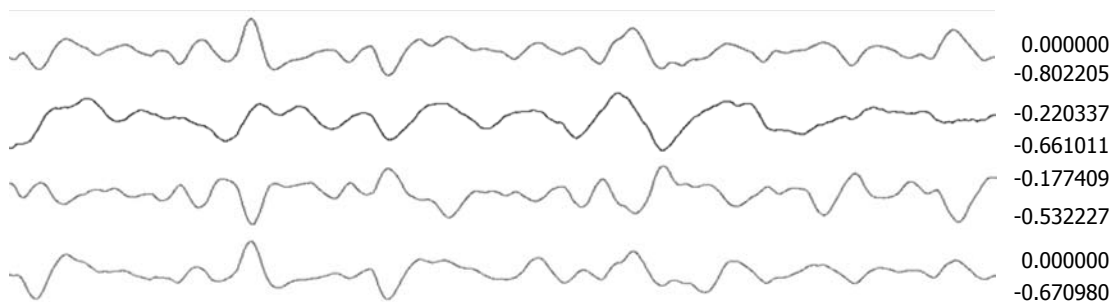


图2 正常胃电.

表3 胃起搏胃电 ($n = 30$)

	频率		相位差		负相位比率		波形对应率	
	前	后	前	后	前	后	前	后
胃体1	3.56 ± 0.38	3.75 ± 0.35^b	—	—	—	—	0.96 ± 0.05	0.96 ± 0.06
胃体2	3.54 ± 0.33	3.65 ± 0.32^a	1.89 ± 3.05	1.42 ± 2.72	0.29 ± 0.22	0.40 ± 0.28^b	0.93 ± 0.07	0.91 ± 0.08
胃体3	3.55 ± 0.37	3.57 ± 0.32	1.74 ± 3.38	1.20 ± 3.18^a	0.33 ± 0.29	0.40 ± 0.37	0.93 ± 0.07	0.89 ± 0.08^b
胃窦	3.63 ± 0.24	3.63 ± 0.29	1.38 ± 2.77	0.95 ± 2.23	0.41 ± 0.26	0.42 ± 0.22	0.92 ± 0.08	0.89 ± 0.07^a

^b $P < 0.01$, ^a $P < 0.05$ vs 同组起搏前.

表4 胃起搏后外周注射大黄素胃电 ($n = 20$)

	频率		相位差		负相位比率		波形对应率	
	前	后	前	后	前	后	前	后
胃体1	3.93 ± 0.40	3.90 ± 0.57	—	—	—	—	0.90 ± 0.09	0.92 ± 0.08
胃体2	3.71 ± 0.48	3.66 ± 0.45	0.22 ± 3.18	0.61 ± 2.83	0.44 ± 0.26	0.45 ± 0.21	0.77 ± 0.12	0.79 ± 0.12
胃体3	4.09 ± 0.68	3.96 ± 0.65	-0.75 ± 2.21	-0.27 ± 2.34	0.58 ± 0.27	0.53 ± 0.26	0.85 ± 0.09	0.85 ± 0.09
胃窦	3.91 ± 0.50	3.84 ± 0.56	0.08 ± 2.84	-0.08 ± 2.68	0.49 ± 0.20	0.50 ± 0.20	0.83 ± 0.12	0.82 ± 0.11

表5 注射大黄素后行胃起搏胃电 ($n = 14$)

	频率		相位差		负相位比率		波形对应率	
	前	后	前	后	前	后	前	后
胃体1	3.62 ± 0.38	3.87 ± 0.59	—	—	—	—	0.89 ± 0.09	0.91 ± 0.10
胃体2	3.60 ± 0.41	4.01 ± 0.39^b	0.49 ± 2.19	0.40 ± 0.77	0.38 ± 0.25	0.40 ± 0.15	0.83 ± 0.11	0.82 ± 0.09
胃体3	3.49 ± 0.34	3.95 ± 0.42^a	2.43 ± 3.55	1.25 ± 2.12	0.26 ± 0.26	0.36 ± 0.17	0.82 ± 0.11	0.82 ± 0.08
胃窦	3.90 ± 0.55	3.75 ± 0.35	0.32 ± 1.85	0.99 ± 1.64	0.43 ± 0.22	0.40 ± 0.15	0.84 ± 0.08	0.80 ± 0.08

^b $P < 0.01$, ^a $P < 0.05$ vs 同组起搏前.

胃起搏后外周注射大黄素(4 mg/kg)对胃电活动没有显著影响.

在耳缘静脉注射大黄素(4 mg/kg)的同时给予电刺激(表5),兔胃体的频率均有所增大(胃体2: $P = 0.001$, 胃体3: $P = 0.012$),但胃窦频率减小,胃体相位差减小而胃窦相位差增大,波形对应率几乎无变化.可见胃起搏在胃体能恢复大黄

素产生的抑制作用,但在胃窦无此作用,胃窦部仍维持大黄素的效应.

2.6 中缝大核P7微量注射大黄素 P7注射大黄素胃体部胃电频率多下降(表6),以胃体2为著($P = 0.026$),相位差增大,负相位比率降低,波形对应率降低,但对胃窦部胃电频率的作用似以兴奋为主. P7注射生理盐水后胃体2的频率明显加快

表 6 P7注射大黄素胃电 ($n = 21$)

	频率		相位差		负相位比率		波形对应率	
	前	后	前	后	前	后	前	后
胃体1	3.62 ± 0.31	3.60 ± 0.35	—	—	—	—	0.92 ± 0.07	0.92 ± 0.09
胃体2	3.70 ± 0.41	3.56 ± 0.29 ^a	0.45 ± 2.74	0.91 ± 3.25	0.41 ± 0.23	0.38 ± 0.25	0.88 ± 0.08	0.86 ± 0.09
胃体3	3.55 ± 0.32	3.49 ± 0.26	0.45 ± 3.28	1.45 ± 4.00	0.37 ± 0.27	0.31 ± 0.28	0.87 ± 0.07	0.86 ± 0.10
胃窦	3.67 ± 0.33	3.83 ± 0.47	0.11 ± 2.33	0.95 ± 3.06	0.43 ± 0.23	0.37 ± 0.26	0.87 ± 0.09	0.89 ± 0.10

^a $P < 0.05$ vs 插入注射器。表 7 P8.5注射大黄素胃电 ($n = 26$)

	频率		相位差		负相位比率		波形对应率	
	前	后	前	后	前	后	前	后
胃体1	3.70 ± 0.36	3.62 ± 0.42 ^a	—	—	—	—	0.93 ± 0.07	0.91 ± 0.10
胃体2	3.72 ± 0.43	3.71 ± 0.38	1.37 ± 2.90	0.84 ± 2.48	0.35 ± 0.25	0.39 ± 0.24	0.87 ± 0.09	0.84 ± 0.10
胃体3	3.63 ± 0.36	3.65 ± 0.44	1.31 ± 3.51	0.43 ± 3.42	0.32 ± 0.25	0.39 ± 0.30	0.83 ± 0.11	0.83 ± 0.10
胃窦	3.84 ± 0.36	3.84 ± 0.37	0.42 ± 2.59	-0.01 ± 2.10	0.44 ± 0.22	0.45 ± 0.23	0.86 ± 0.09	0.85 ± 0.11

^a $P < 0.05$ vs 插入注射器。表 8 P8.5注射阿托品胃电 ($n = 9$)

	频率		相位差		负相位比率		波形对应率	
	前	后	前	后	前	后	前	后
胃体1	3.43 ± 0.28	3.65 ± 0.27 ^a	—	—	—	—	0.83 ± 0.07	0.89 ± 0.07
胃体2	3.76 ± 0.42	3.83 ± 0.34	1.10 ± 1.98	1.21 ± 1.87	0.34 ± 0.21	0.34 ± 0.15	0.77 ± 0.08	0.84 ± 0.07
胃体3	3.81 ± 0.52	3.65 ± 0.28	1.19 ± 1.95	1.39 ± 2.36	0.28 ± 0.19	0.25 ± 0.14	0.80 ± 0.07	0.82 ± 0.07
胃窦	4.03 ± 0.31	3.85 ± 0.48	0.79 ± 1.57	1.77 ± 2.01	0.43 ± 0.19	0.31 ± 0.17	0.78 ± 0.09	0.80 ± 0.07

^a $P < 0.05$ vs 注射阿托品前。

($P < 0.05$)(数据没有显示), 这可能是由于本实验中未考虑pH值的影响, 将生理盐水pH值上调至8.5, 与大黄素的pH一样所致。其余各导均无统计学意义。

2.7 中缝大核P8.5微量注射大黄素 P8.5注射大黄素后胃体1频率明显减慢($P = 0.045$), 其余3导无显著意义(表7), 此外注射大黄素后, 各导相位差减少, 负相位比率升高, 波形对应率下降但无统计学意义。从表8可知, P8.5注射阿托品后, 胃体1频率增快($P = 0.032$), 说明阿托品可“翻转”大黄素引起的频率变慢效应。P8.5注射生理盐水, 各导参数改变均没有统计学意义(数据没有显示)。

2.8 中缝大核P 9.5微量注射大黄素 P9.5注射大黄素除胃体2外, 胃体1、3和胃窦($P = 0.029$)频率减慢。其他参数改变没有统计学意义(表9)。

P9.5注射生理盐水, 各导参数改变均没有统计学意义(数据没有显示)。

2.9 中缝大核P11微量注射大黄素 P11注射大黄素除胃体3频率变慢外, 其余胃电频率变快(其中胃体1: $P = 0.011$), 相位差增大, 负相位比率均略降低, 但无统计学意义(表10)。说明P11微注射大黄素对胃电的影响与前几个脑平面有所不同。P11注射生理盐水, 各导参数改变均没有统计学意义(数据没有显示)。

3 讨论

实验中新西兰白兔正常胃电频率为3.48-3.77 cpm, 与以往实验结果相同, 说明在胃体埋植双极电极记录兔胃电的方法是可靠的。相位差可能是表示胃电传导(扩布)的一个较好的指标。4导同时记录胃体起步点(胃体1)、胃体2、胃体3

■应用要点

以中枢神经为靶点可以作为治疗胃肠道疾病的一个途径, 大黄素可以用于治疗功能性胃肠道疾病。

■名词解释

相位差: 4导同时记录胃起步点(胃体1)、胃体2、胃体3、胃窦部胃电, 以同一波形在该导出现时相对于起步点出现时的时间差计算。如果远端波形落后于起步点者为正相位差, 先于起步点者为负相位差, 单位: s。

表 9 P9.5注射大黄素胃电 ($n = 22$)

	频率		相位差		负相位比率		波形对应率	
	前	后	前	后	前	后	前	后
胃体1	3.67 ± 0.42	3.59 ± 0.44	—	—	—	—	0.95 ± 0.06	0.94 ± 0.07
胃体2	3.63 ± 0.35	3.66 ± 0.44	0.10 ± 2.95	1.27 ± 3.05	0.38 ± 0.28	0.35 ± 0.29	0.88 ± 0.09	0.89 ± 0.10
胃体3	3.56 ± 0.37	3.52 ± 0.33	1.16 ± 4.01	0.23 ± 4.04	0.32 ± 0.31	0.43 ± 0.36	0.88 ± 0.08	0.87 ± 0.09
胃窦	3.82 ± 0.39	3.67 ± 0.25 ^a	0.53 ± 2.08	0.06 ± 2.43	0.42 ± 0.26	0.44 ± 0.24	0.90 ± 0.07	0.87 ± 0.10

^a $P < 0.05$ vs 插入注射器。

表 10 P11注射大黄素胃电 ($n = 22$)

	频率		相位差		负相位比率		波形对应率	
	前	后	前	后	前	后	前	后
胃体1	3.67 ± 0.39	3.82 ± 0.46 ^a	—	—	—	—	0.90 ± 0.08	0.94 ± 0.08
胃体2	3.76 ± 0.38	3.81 ± 0.53	1.24 ± 2.88	1.62 ± 2.99	0.39 ± 0.27	0.37 ± 0.28	0.87 ± 0.07	0.86 ± 0.07
胃体3	3.69 ± 0.46	3.61 ± 0.35	1.24 ± 3.86	1.25 ± 3.30	0.37 ± 0.27	0.35 ± 0.28	0.85 ± 0.08	0.84 ± 0.08
胃窦	3.84 ± 0.39	3.92 ± 0.39	0.96 ± 2.06	1.18 ± 1.68	0.41 ± 0.19	0.38 ± 0.17	0.87 ± 0.10	0.87 ± 0.11

^a $P < 0.05$ vs 插入注射器。

和胃窦部胃电, 如果远端波形先于起步点者即为负相位差, 说明胃电传导(扩布)异常, 相位差若由负转正则说明胃电传导转向正常。本研究不仅证实4导同时记录的正常胃电存在相位差(0.25-1.03 s), 根据以往的实验正常胃电相位差在2 s左右, 两者结果基本一致。胃起步点电起搏、中枢电刺激、大黄素外周、中枢注射及本实验室前期实验中的多种神经阻断剂, 即中枢和外周诸多因素都可能影响相位差。脑-肠轴共同对胃电传导(扩布)的精细调节, 是胃肠道正常功能活动的保障^[19,20]。此外, 我们发现, 外周或中枢刺激(胃起步点电起搏、大黄素注射), 致胃电相位差增大(或减小)时, 负相位差比率则降低(升高), 两者呈负相关关系。

胃体起步点起搏后胃体频率明显加快, 相位差减小, 负相位比率升高, 波形对应率降低, 进一步验证了前期的研究, 即胃起步点电起搏对胃电有很好的“驱动效应”^[21-23]。本研究波形变差, 可能是频率过快导致的节律紊乱。外周注射大黄素胃体频率明显减慢。胃窦波形对应率降低, 说明大黄素对胃电主要起抑制作用。

中枢神经系统对胃肠运动的调控起重要作用^[24-26]。当体内外环境变化时, 中枢调节能够使胃肠运动与人体各个器官系统之间的活动保持动态平衡、胃肠各段的运动、消化液的分泌、吸收、排泄等功能, 在空间和时间上能保持协

调一致^[27]。近年来本课题组作了一系列中枢对胃电相位差的影响的实验: 观察心得安、酚妥拉明等神经阻断剂以及联合电刺激对胰高血糖素造模的胃节律紊乱动物模型相位差的影响, 初步表明以上阻断剂能改变胃电相位差等参数, 提示用于治疗胃节律紊乱综合征(gastric dysrhythmia syndrome, GDS)的可能; 本课题组研究还发现延脑内侧网状结构微量注射5-HT可以抑制胃运动和胃电^[28,29]。延脑内侧网状结构的5-HT递质可能参与中枢对胃电以及胃电起搏的调控。哈尔滨医大陈香梅等^[30]“家兔胃运动及胃电活动变化与Rm内不同药物微量注射的关系”的慢性实验, 在Rm微量注入5-HT、P物质可抑制家兔的胃运动和胃电慢波。Rm微量注入赛庚啶、P物质拮抗剂后可使家兔的胃运动和胃电慢波增强。Rm微量注入吗啡、去甲肾上腺素后对家兔的胃运动和胃电均无影响; Rm微量注入生理盐水(2 μ L/min)对胃运动和胃电无影响。本实验发现P8.5微量注射大黄素后胃体1频率明显减慢, 相位差减小, 当再注射阿托品后可“翻转”大黄素对胃电频率的抑制和相位差降低的效应。P8.5对应的结构是Rm核心部分, 说明Rm可能是大黄素在延脑内侧网状结构中的有效作用部位, 并与胆碱能受体有关。P7-P9.5微量注射大黄素主要起抑制作用(频率减慢)、P11微量注射大黄素则主要起兴奋作用(频率加快); 由于

P7、P8.5、P9.5主要位于Rm, 而P11位于Rpa, 故我们推测可能是大黄素在不同的两个核团起不同的作用. 试验中个别动物注射pH 8.5的生理盐水(7 μ L)也使胃体频率变快(P7: 胃体2变快), 是否与高pH、注入速度较快、颅内压增高有关有待进一步研究.

总之, 大黄素可通过外周和中枢两条途径起作用, 外周注射大黄素的效应以抑制为主. 本实验数据表明, 在胃体起步点行电起搏后, 胃体和胃窦的跟随效应明显. 另外, 实验发现每当胃电频率加快的同时, 相位差通常发生紊乱、波形对应率较差, 说明频率是影响相位差及波形的一个重要因素. 胃电活动的“跟随”可能有一个“调整”与“适应”的过程, 这对临床电起搏治疗功能性胃肠道疾病无疑具有很好的指导意义. 单纯P7-P9.5中缝大核处微量注射大黄素可抑制胃电, 但在P11中缝苍白核头端则使频率加快. P8.5中枢微量注射阿托品后可翻转大黄素的作用, 切断迷走神经后P8.5再注射大黄素对胃电抑制的影响减弱或转为兴奋, 相位差增大, 负相位比率减小, 提示大黄素在P8.5可能通过胆碱能途径起作用. 胃电相位差增大(或减小)时, 负相位比率则降低(升高), 两者呈负相关关系. 此发现对临床诊断治疗有一定指导意义.

4 参考文献

- 1 Lu C, Chen Y, Zeng Z. [Research progress of the anti-proliferation effect of emodin on VSMCs]. *Zhongguo Zhongyao Zazhi* 2012; 37: 417-420
- 2 Xia QS, Sun RY, Xiu RJ. [Progress of research on molecular mechanisms in antitumor effect of emodin]. *Zhongguo Zhongxiyi Jiehe Zazhi* 2009; 29: 85-88
- 3 Li F, Wang SC, Wang X, Ren QY, Wang W, Shang GW, Zhang L, Zhang SH. [Novel exploration of cathartic pharmacology induced by rhubarb]. *Zhongguo Zhongyao Zazhi* 2008; 33: 481-484
- 4 Xu XC, Lin SZ. [Experimental advance of applying emodin for prevention and treatment of liver diseases]. *Zhongguo Zhongxiyi Jiehe Zazhi* 2008; 28: 91-93
- 5 Srinivas G, Babykutty S, Sathiadevan PP, Srinivas P. Molecular mechanism of emodin action: transition from laxative ingredient to an antitumor agent. *Med Res Rev* 2007; 27: 591-608
- 6 靳珠华, 马德录, 林秀珍, 李锡铭. 大黄素对豚鼠离体肠管作用的影响. *中国中西医结合杂志* 1994; 14: 429-431
- 7 戴芸. 钙离子在胃肠平滑肌收缩机制中的作用. *国外医学·消化系疾病分册* 2002; 22: 17-20
- 8 李世英, 欧阳守. 大黄素对大鼠近端结肠平滑肌细胞电压依赖性钾通道的影响. *药理学学报* 2005; 40: 801-809
- 9 朱金照, 冷恩仁, 史洪涛, 张捷. 大黄促进肠道运动的机制探讨. *解放军药理学学报* 2002; 18: 339-340, 346
- 10 Garay RP. [Cellular mechanisms of smooth muscle contraction]. *Rev Mal Respir* 2000; 17: 531-533
- 11 邱轶伟, 马涛, 吴双虎, 薛承锐. 大黄素收缩大鼠结肠平滑肌细胞的信号转导机制研究. *天津医科大学学报* 2005; 11: 205-207, 209
- 12 李俊英, 杨文修, 胡文卫, 王津, 金正根, 王新宇, 许文胜. 大黄素对豚鼠结肠带平滑肌细胞钾通道活性的影响. *药理学学报* 1998; 33: 321-325
- 13 周成华, 武玉清, 许正新, 张洪泉. 大黄素对小肠运动的影响及其机制. *中国药理学通报* 2003; 19: 1421-1424
- 14 延鹏翔, 郭连魁. 大鼠脑中缝核群向额前皮质的传入投射-HRP法研究. *神经解剖学杂志* 1995; 11: 56-60
- 15 孔哲, 高萱, 崔庚寅, 管振龙. 大鼠前庭核向迷走神经背侧复合体的间接投射. *解剖学杂志* 2005; 28: 678-681
- 16 欧阳守, 许冠荪, 李小华, 李淼. 刺激延脑内侧网状结构对猫胃电慢波影响的定位与猫胃电慢波的FFT分析. *动物学报* 1987; 33: 27-34
- 17 欧阳守, 孙东, 许冠荪. 电针及刺激延脑中缝大核对猫胃电的影响. *生理学报* 1983; 35: 34-41
- 18 张经济, 石守谦, 李碧春. 刺激尾核对狗胃电的影响. *生理学报* 1981; 33: 88-89
- 19 张莉华, 方步武. 脑肠轴及其在胃肠疾病发病机制中的作用. *中国中西医结合外科杂志* 2007; 13: 199-201
- 20 张洪领, 杨春敏. 功能性消化不良的脑肠轴机制研究进展. *实用医学杂志* 2010; 26: 3265-3266
- 21 欧阳守. 胃肠起搏. *临床内科杂志* 1999; 16: 70-72
- 22 欧阳守, 章锦芝, 侯淑兰, 吴翠明. 模拟胃生物电信经由体表驱动胃节律的临床实验研究. *福建医药杂志* 1999; 21: 94-96
- 23 黄伟锋, 欧阳守. 体表胃肠起搏治疗功能性胃肠道疾病的研究. *实用医学杂志* 2012; 28: 1077-1080
- 24 王礼建, 周吕, 张春玥. 延髓最后区(AREA POSTREMA)对狗胃肠电活动的调节作用. *基础医学与临床* 2001; 21: 85
- 25 李兆东. 脑肠肽在中枢水平对胃肠运动功能的影响. *国外医学* 1998; 18: 225-228
- 26 杨玥, 张丹华, 陈媛, 余曙光, 曾芳. 脑肠互动与针刺治疗功能性胃肠病的相关性. *世界华人消化杂志* 2012; 20: 491-496
- 27 藤本一真, 岡田由纪子. 胃肠道生理功能与脑-肠相关及病理生理学之关联性 六、中枢神经系统在小肠粘膜生长与凋亡中的作用. *日本医学介绍* 2002; 23: 414-415
- 28 黄伟锋, 张慧, 欧阳守, 卢春敬. 5-HT及电刺激对胃节律紊乱模型新西兰白兔胃电活动的影响. *世界华人消化杂志* 2011; 19: 2486-2491
- 29 张慧, 欧阳守, 黄伟锋. 5-HT及其阻断剂脑内微注射和微电刺激对家兔胃电活动的影响. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 3189-3196
- 30 陈香梅, 柳滨, 刘志敏. 家兔胃运动及胃电活动变化与中缝大核内不同药物微量注射的关系. *中国临床康复* 2005; 9: 207-209

■同行评价

本文选题好, 研究具有一定的新颖性和科学价值.

编辑 田滢 电编 闫晋利

GM-CSF基因增强HCV核心蛋白基因DNA疫苗的免疫应答

翟永贞, 王岩, 冯国和

■背景资料

丙型肝炎病毒(HCV)感染是严重危害人类健康的公共卫生问题,是导致肝硬化、肝癌的重要原因,目前还没有有效的丙肝疫苗问世。因此,对丙肝疫苗的研究,非常具有现实意义。

翟永贞, 王岩, 冯国和, 中国医科大学附属盛京医院感染科辽宁省沈阳市 110004

翟永贞, 主治医师, 主要从事黄病毒感染与防治方面的研究。

作者贡献分布: 翟永贞与冯国和对此文所作贡献均等; 此课题由冯国和设计; 研究过程由翟永贞与王岩操作完成; 研究所用试剂及分析工具由冯国和提供; 数据分析由翟永贞与王岩完成; 本论文写作由翟永贞与王岩完成; 冯国和负责修改审校。

通讯作者: 冯国和, 教授, 主任医师, 博士生导师, 110004, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学附属盛京医院感染科。

fenggh@sj-hospital.org

电话: 024-96615-62101

收稿日期: 2012-10-11 修回日期: 2012-11-15

接受日期: 2012-12-03 在线出版日期: 2012-12-18

Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor genetic adjuvant enhances the immune stimulatory effects of plasmid DNA encoding the hepatitis C virus core protein

Yong-Zhen Zhai, Yan Wang, Guo-He Feng

Yong-Zhen Zhai, Yan Wang, Guo-He Feng, Department of Infectious Diseases, Sheng Jing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China
Correspondence to: Guo-He Feng, Professor, Chief Physician, Department of Infectious Diseases, Sheng Jing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. fenggh@sj-hospital.org

Received: 2012-10-11 Revised: 2012-11-15

Accepted: 2012-12-03 Published online: 2012-12-18

Abstract

AIM: To study the effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) genetic adjuvant on immune response induced by plasmid DNA encoding the hepatitis C virus (HCV) core (C) protein.

METHODS: The gene encoding the HCV C protein was amplified by PCR from HCV 1b genotype and inserted into the pUC119 vector. The HCV C gene was then subcloned into the pCMH6K eukaryotic vector, and the resulting plasmid was named pCMH6K/HCV-C. The recombinant vector was confirmed by restriction enzyme analysis and DNA sequencing, and transfected into China hamster ovary (CHO) cells with Lipofectamine 2000. Distribution of

the HCV C protein in transfected CHO cells was detected by immunofluorescence. Balb/c mice were vaccinated with the recombinant plasmid with or without the GM-CSF gene. HCV C-specific antibody in serum was measured by ELISA. The changes in T lymphocyte subsets and levels of Th cell intracellular cytokines interferon- γ (IFN- γ) and interleukin-4 (IL-4) in splenic cell suspension from immunized mice were evaluated by flow cytometric analysis. CTL activity was assessed by LDH assay.

RESULTS: Restrict enzyme digestion and DNA sequencing indicated that the recombinant pCMH6K/HCV-C was successfully constructed. The expression of plasmid-encoded protein was mainly distributed in membrane and scarcely in cytoplasm of transfected CHO cells. The percentage of CD4⁺ T cells in spleen cells in the pCMH6K/HCV-C+pGM-CSF co-vaccination group was significantly higher than those in other groups (all $P < 0.05$). The percentage of CD8⁺ T cells showed no significant differences among each group ($P > 0.05$). CTL activity induced by GM-CSF DNA co-vaccination was significantly higher than that immunized with the same amount of other naked DNA ($P < 0.05$). The ratio of IFN- γ to IL-4 in spleen cells from GM-CSF DNA co-vaccination group was significantly higher than those in other groups (all $P < 0.05$).

CONCLUSION: GM-CSF DNA could enhance the immune stimulatory effects of HCV DNA vaccine and induce Th1-type immune response.

Key Words: Hepatitis C virus; Core protein; DNA vaccines; Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

Zhai YZ, Wang Y, Feng GH. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor genetic adjuvant enhances the immune stimulatory effects of plasmid DNA encoding the hepatitis C virus core protein. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(35): 3424-3430

■同行评议者

王凯, 教授, 山东大学齐鲁医院肝病科

摘要

目的: 研究粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(granulocyte-macrophage colony-stimulating

factor, GM-CSF)编码基因对丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)核心(core, C)蛋白编码基因重组质粒诱导的免疫应答有无增强作用。

方法: 人工合成HCV核心蛋白基因至克隆载体pUC119上, 酶切后与真核表达质粒pCMH6K连接, 测序正确后将重组质粒pCMH6K/HCV-C转染中华仓鼠卵巢(China hamster ovary, CHO)细胞。免疫荧光检测转染的CHO细胞中HCV C蛋白分布与表达。将已构建成功的GM-CSF编码基因重组子(pGM-CSF)联合pCMH6K/HCV-C肌注免疫Balb/c鼠, ELISA法检测免疫小鼠血清抗HCV C特异性抗体水平, 经流式细胞仪检测不同免疫原免疫鼠后脾T淋巴细胞亚群及Th细胞内细胞因子[干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ)、白介素-4(interleukin-4, IL-4)]变化, LDH法测定CTL活性。

结果: pCMH6K/HCV-C经鉴定构建正确。所编码的蛋白主要分布于胞膜, 少量分布于胞浆。pGM-CSF+pCMH6K/HCV-C联合免疫组和pCMH6K/HCV-C单独免疫组均产生抗HCV C特异性抗体, 两组间比较差异无统计学意义; 联合免疫组CD4⁺T淋巴细胞比例为44.90% \pm 5.99%, 明显高于其他组($P<0.05$)。不同免疫组CD8⁺T细胞比例变化不大, 与空载体pcDNA3.1(+)组比较, 差异无统计学意义($P>0.05$)。联合免疫组CTL活性为56.48% \pm 4.68%, 明显高于其他组($P<0.05$)。联合免疫组IFN- γ /IL-4比值为18.20 \pm 2.36, 明显高于其他组($P<0.05$)。

结论: GM-CSF编码基因可增强HCV C基因DNA疫苗的细胞免疫应答, 并能够诱导Th1型免疫应答。

关键词: 丙型肝炎病毒; 核心蛋白; DNA疫苗; 粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子

翟永贞, 王岩, 冯国和. GM-CSF基因增强HCV核心蛋白基因DNA疫苗的免疫应答. 世界华人消化杂志 2012; 20(35): 3424-3430

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3424.asp>

0 引言

丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)侵入机体常引起慢性持续性感染^[1-5], 严重威胁人类健康。目前还没有针对HCV的有效疫苗, 在抗HCV保护性疫苗研究中, 发现核心(core, C)蛋白氨基酸序列上有多数B、CTL和Th细胞的抗原表位, 能诱导不同病毒株的交叉免疫应答。HCV核心区

是HCV进行基因和血清分型的靶基因区, 也是从基因水平上治疗HCV感染和进行疫苗研究的重要区域^[6-11], 深入研究HCV C蛋白分子生物学特性, 研发新型丙型肝炎生物疫苗, 对丙型肝炎的预防和治疗具有重要意义^[12]。

粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF)能够募集抗原提呈细胞到达抗原合成部位, 并能够刺激树突状细胞的成熟, 其编码基因作为DNA免疫佐剂并用于DNA疫苗增强效应的研究^[13-17]。

本研究旨在探究GM-CSF编码基因重组子与HCV C基因DNA疫苗联合肌注免疫Balb/c鼠所致的体液和细胞免疫应答强度和特征, 为HCV DNA疫苗的深入研究提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料 本实验室构建的含GM-CSF蛋白基因重组质粒被命名为pGM-CSF。克隆载体pUC119[Code No. D3219]购自Takara公司, 用于HCV C蛋白编码基因测序。丙型肝炎核心蛋白真核载体pCMH6K由感染科实验室保存, 用于HCV C蛋白编码基因重组子的构建。中华仓鼠卵巢(China hamster ovary, CHO)细胞购自中国科学研究院上海细胞库, 生长于37℃, 5%CO₂及含10%胎牛血清(fetal calf serum, FCS)的D-MEM(dulbecos modified eagle medium)中, 脂质体(Lipofectamine 2000)购自Invitrogen公司, 分别用于转染实验中受体细胞及转染试剂; 质粒小剂量提取试剂盒(Takara, product No. DV801A), 大肠杆菌JM109与DH5 α , 限制性内切酶BamH I 及EcoR I 等均购自Takara公司, 用于重组质粒构建、转化及酶切鉴定; 鼠源性抗HCV C蛋白单克隆抗体[Code No. sc-69937]、山羊抗鼠GM-CSF以及FITC标记的山羊抗鼠IgG[Code No. sc-2010]均购自Santa公司, 用于重组质粒转染后的免疫荧光检测; 乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)测定试剂盒购自美国Promega公司; 荧光标记的抗体(CD3-PerCP, CD4-FITC, CD8-PE, IFN- γ -FITC, IL-4-APC)、小鼠细胞表面Fc受体抗体CD16/CD32均购自美国BD公司。

1.2 方法

1.2.1 GM-CSF编码基因的构建和转染分析: 从Balb/c鼠脾脏获取细胞总RNA, 采用套式-RT-PCR法扩增GM-CSF CDS区域序列(471 bp)。反转录引物: 5'-CAGGCACAAAAGCAGCAGTC-3';

■ 研发前沿

HCV感染的控制和清除与有效持久的免疫应答相关, 特别是针对相对保守的核心蛋白Core的细胞免疫应答。由于单用核心蛋白基因不能产生有效的保护性抗体反应, 因此近年研究有采用C抗原基因加膜抗原基因, 或与乙型肝炎病毒(HBV)表面抗原基因融合, 以及HCV DNA与细胞因子编码基因结合构建的疫苗免疫小鼠。

■相关报道

Chen等最近研究表明, GM-CSF编码基因能够明显抑制乙型肝炎DNA疫苗诱导的特异性抗体和Th1型细胞因子分泌水平, 此种抑制作用与GM-CSF编码基因的表达水平有关, 呈剂量依赖性。HCV与乙型肝炎病毒均属于黄病毒属, 深入研究GM-CSF基因在HCV DNA疫苗中的作用特点有重要意义。

PCR外引物: 上游引物为5'-CAGAGAGA-AAGGCTAAGGTC-3', 下游引物为上述反转录引物; PCR内引物: 上游引物为5'-GAATTCGTGGAGGCGGTTTCAGGTGGAGGTGGTTCAGGAGGAGGTGGATCGATGTGGCTGCAGAATTTAC-3', 下游引物为5'-GCGGCCGCTCATTTTTGGCCTGGTTTTTTT-3', 用于PCR内引物的上游引物和下游引物的5'端分别引入EcoR I 和Not I 酶切位点。1%琼脂糖凝胶电泳并回收最终PCR产物, 后者与pMD19-T simple连接构建重组子pMD-GM-CSF, 转化大肠埃希菌JM109, 筛选阳性克隆并送至大连宝生物工程公司测序鉴定。将上述测序正确的目的基因亚克隆至pcDNA3.1(+), 形成重组子pGM-CSF。脂质体法转染pGM-CSF于CHO细胞^[13], 6孔组织培养板培养pGM-CSF转染的CHO细胞, 待细胞密度达到70%时, 4%多聚甲醛固定细胞1 h, 0.1%Triton-100打孔10 min, 10%BSA封闭1 h, 山羊抗鼠GM-CSF 4 °C温育过夜, FITC标记的兔抗山羊CD32 37 °C避光温育1 h, 荧光显微镜检测质粒转染的CHO细胞内编码蛋白的分布与表达。

1.2.2 HCV C蛋白编码基因重组子的构建: 根据 GenBank中登录的HCV 1b基因型核心基因序列片段, 以扩增出核心蛋白1-573共573 bp的碱基。引物设计P1: 5'-CCGGGATCCTATGAGCACAAATCCAAAAC-3', P2: 5'-CGGAATTC-CAGACCTTACCCAAATTACGC-3', 下划线者分别为BamH I 和EcoR I 的酶切位点。使用DNA片断纯化试剂盒(Takara, product No. DV807)对扩增的DNA片段进行纯化, 使用琼脂糖凝胶DNA纯化试剂盒(Takara, product No. DV805)进行切胶回收DNA, 按照DNA连接试剂盒(Takara, product No. D6023)说明书要求, 合成至pUC119载体上(pUC119HCV-C), 转化大肠埃希菌JM109。质粒小剂量提取试剂盒(Takara, product No. DV801A)提取重组质粒并经BamH I /EcoR I 进行酶切鉴定, 采用ABI PRISM™ 310Genetic Analyzer(Pekin-Elmer/Applied)及引物M13对重组质粒进行测序分析。将测序正确的目的基因经BamH I /EcoR I 双酶切并亚克隆到真核表达载体pCMH6K, 将此重组子命名为pCMH6K/HCV-C。

1.2.3 HCV C蛋白编码基因重组质粒瞬时转染CHO细胞: 采用脂质体转染法将pCMH6K/HCV-C转染CHO细胞, 同时设空载体pCMH6K转染细胞为阴性对照, 方法见文献[17]。

1.2.4 免疫荧光检测: 6孔组织培养板培养pCMH6K/HCV-C转染的CHO细胞, 待细胞密度达到60%-70%时, 4%多聚甲醛固定细胞1 h, 0.1% Triton-100打孔10 min, 10%BSA封闭1 h, 鼠源性抗HCV C蛋白单克隆抗体4 °C过夜孵育, FITC标记的山羊抗鼠IgG于37 °C避光孵育1 h, 50%甘油封片后于荧光显微镜下观察转染的CHO细胞内编码蛋白的分布与表达。

1.2.5 动物免疫: 每组5只Balb/c鼠(购自中国医学科学院实验动物研究所)共4组。分别将溶于100 μL 灭菌PBS的不同免疫原鼠后肢肌肉内注射, 包括: pCMH6K/HCV-C(100 μg)+pGM-CSF(50 μg)、pCMH6K/HCV-C(100 μg)、pGM-CSF(50 μg)、pcDNA3.1(+)(100 μg), 共免疫4次, 间隔2 wk。

1.2.6 免疫小鼠血清中抗体水平的测定: 最后一次免疫结束, 同时剪尾取血, 离心后收集上清作为检测标本, 按ELISA试剂盒操作说明, 检测免疫鼠血清抗HCV C抗体的表达水平。

1.2.7 脾CD3⁺CD4⁺/CD3⁺CD8⁺T淋巴细胞亚群检测: 流式细胞仪直接免疫荧光法测定免疫后Balb/c鼠CD3⁺CD4⁺/CD3⁺CD8⁺T淋巴细胞亚群变化。方法见文献[13]。

1.2.8 脾Th细胞内细胞因子IFN-γ和IL-4分泌水平的检测: 最后一次免疫结束, 取脾制备淋巴细胞悬液, 调整细胞浓度为4×10⁷/mL。取25 μL脾细胞悬液, 加入4 μL佛波脂(1 mg/L), 2 μL离子霉素(500 mg/L), 1 μL莫能菌素以及710 μL RPMI-10%FBS至终体积为1 mL, 37 °C、5%CO₂温育5 h, 按照胞内因子测定试剂盒说明书进行操作, 利用CellQuest软件对获得的数据进行分析。

1.2.9 CTL杀伤活性的测定: 采用LDH释放实验试剂盒检测CTL活性, 方法见文献[13]。

统计学处理 数据以mean±SD表示, 各組间是否存在差异有统计学意义采用单因素方差分析, 进一步两组之间比较用最小显著差值法。P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 重组表达质粒pCMH6K/HCV-C、pGM-CSF的构建与鉴定 经0.8%琼脂糖凝胶电泳显示, 重组表达质粒pCMH6K/HCV-C约为5.0 kb, 重组质粒经EcoR I 和EcoR I 双酶切可见1条约573 bp的DNA片段, 与目的基因大小一致(图1 2泳道), 重组质粒经测序后证实与目的基因序列一致。套式RT-PCR法获得的GM-CSF基因测序分析与发表的GM-CSF CDS区域序列相符合, pGM-CSF

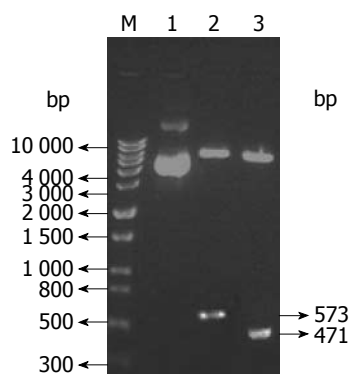


图1 pCMH6K/HCV-C和pGM-CSF酶切鉴定. M: 1Kb ladder DNA size Marker; 1: pCMH6K/HCV-C; 2: enzyme-cutting map of pCMH6K/HCV-C with *Bam*H I/*Eco*R I; 3: enzyme-cutting map of pGM-CSF with *Eco*R I/*Not* I.

经*Eco*R I/*Not* I酶切释出插入子, 与GM-CSF基因(471 bp)大小相一致(图1 3泳道).

2.2 pCMH6K/HCV-C、pGM-CSF重组质粒转染的CHO细胞的免疫荧光鉴定 pCMH6K/HCV-C转染的CHO细胞可见较显著的绿色荧光标记, 主要分布在胞膜, 也可见于胞浆(图2A), pGM-CSF转染的CHO细胞可见较显著绿色荧光标记, 主要分布在胞质, 也可见于胞膜(图2B), 空载体转染的CHO细胞中未见特异性绿色荧光标记, 仅见散在的无特异性绿色荧光杂质(图2C).

2.3 免疫小鼠抗体水平的测定 联合免疫组pCMH6K/HCV-C+pGM-CSF和单独免疫组pCMH6K/HCV-C均具有较强的免疫活性. 两个实验组产生的抗HCV C特异性抗体(A_{450} 值)明显高于pcDNA3.1(+)对照组($P<0.05$), 进一步研究发现, pCMH6K/HCV-C+pGM-CSF和pCMH6K/HCV-C两组之间无显著性差异($P>0.05$, 图3).

2.4 脾CD3⁺CD4⁺/CD3⁺CD8⁺T淋巴细胞亚群分析 pCMH6K/HCV-C+pGM-CSF组CD3⁺CD4⁺T淋巴细胞比例为44.90%±5.99%, 明显高于其他组($P<0.05$); pcDNA3.1(+)组CD3⁺CD4⁺T淋巴细胞比例为12.99%±2.32%, 低于其他组($P<0.05$); pCMH6K/HCV-C组CD3⁺CD4⁺T淋巴细胞比例为30.70%±0.51%, 高于pGM-CSF组18.11%±1.23%($P<0.05$). pCMH6K/HCV-C+pGM-CSF、pCMH6K/HCV-C组CD3⁺CD8⁺T淋巴细胞比例较pcDNA3.1(+)组升高, 两组间差异无统计学意义($P>0.05$), pcDNA3.1(+)组、pGM-CSF组CD3⁺CD8⁺T淋巴细胞比例低于其他各组($P<0.05$), 两组间无显著性差异($P>0.05$, 表1).

2.5 脾Th细胞内细胞因子IFN- γ 和IL-4分泌水平的测定 pCMH6K/HCV-C+pGM-CSF和pC-

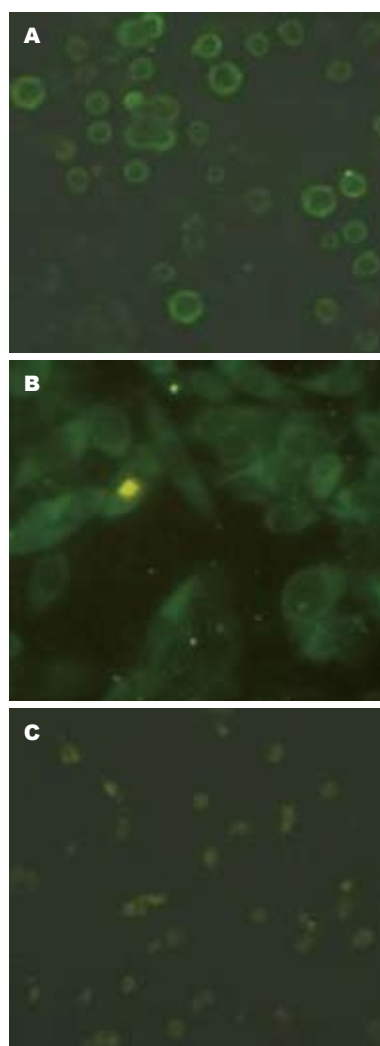


图2 间接免疫荧光分析转染的CHO细胞($\times 400$). A: pCMH6K/HCV-C转染的CHO细胞; B: pGM-CSF转染的CHO细胞; C: pC-MH6K转染的CHO细胞.

■创新盘点

本文首次将GM-CSF编码基因应用于HCV C基因DNA疫苗研究, 并揭示GM-CSF编码基因作为基因佐剂的复杂性、多样性, 为进一步探究HCV感染的致病机制及相关治疗方案提供了理论基础, 为研发HCV DNA疫苗提供实验依据.

MH6K/HCV-C组均可诱导CD4⁺T淋巴细胞产生相对高的IFN- γ 水平, 高于pcDNA3.1(+)与pGM-CSF组($P<0.05$), 两组间比较联合免疫组更能促进IFN- γ 的分泌($P<0.05$); CD4⁺T淋巴细胞分泌的IL-4在pGM-CSF与pcDNA3.1(+)两组间无显著性差异($P>0.05$), 其余各组间均有显著性差异($P<0.05$); IFN- γ /IL-4的比值在pCMH6K/HCV-C+pGM-CSF组为(18.20±2.36), 较其余各组有显著性意义($P<0.05$, 表1).

2.6 CTL杀伤活性的测定 当效/靶细胞比例为10:1时, pCMH6K/HCV-C+pGM-CSF和pCMH6K/HCV-C组中CTL的杀伤率均较pGM-CSF、pcDNA3.1(+)对照组明显增高($P<0.05$), 两组之间比较有显著性差异($P<0.05$, 图4).

2.7 不同剂量pGM-CSF免疫小鼠的免疫水平 为进一步明确GM-CSF编码基因表达水平与HCV C蛋白编码基因重组子诱导的免疫应答之间的关系, 我们将不同剂量pGM-CSF(10、25、50、100 μ g)分别联合HCV C蛋白编码基因重组子免疫Balb/c鼠. 结果表明, pGM-CSF接种剂量与目

■应用要点

慢性HCV感染者体内存在一系列免疫缺陷,包括T细胞不能有效活化、单核细胞炎症反应过度级联放大以及树突状细胞功能的改变等,深入探究GM-CSF编码基因在HCV DNA疫苗中的作用机制以及免疫学特征,将为抗HCV疫苗的研发和创新提供理论和实验依据。

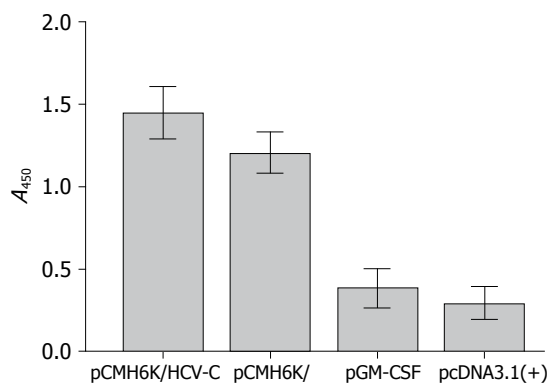


图3 不同免疫组诱导的抗HCV C蛋白抗体水平($n = 4$, mean ± SD).

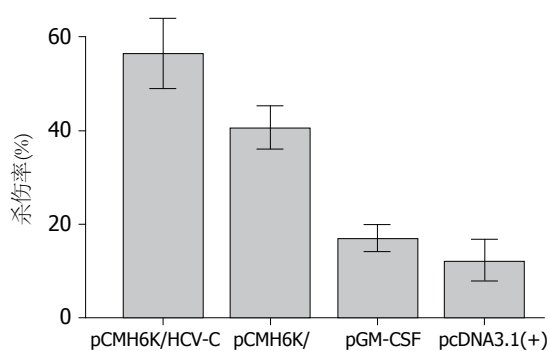


图4 不同免疫组小鼠脾T细胞特异性CTL的活性(E: T = 10 : 1, $n = 4$, mean ± SD).

的基因诱导的抗体水平、IFN- γ /IL-4比值以及CTL活性存在相关性, pCMH6K/HCV-C+pGM-CSF(50 μ g)免疫组明显促进IFN- γ 分泌,并能抑制IL-4的表达,获得了最高的抗原特异性CTL活性(均 $P < 0.05$). pCMH6K/HCV-C+pGM-CSF(50 μ g)免疫组诱导产生最高的抗HCV C蛋白抗体水平,各组间比较差异无统计学意义(均 $P > 0.05$,图5).

3 讨论

HCV特异性T细胞免疫应答在HCV感染的控制中发挥了关键作用.慢性HCV感染者体内存在一系列免疫缺陷,包括T细胞不能有效活化、单核细胞炎症反应过度级联放大以及树突状细胞功能的改变等^[18-22].由于单用核心蛋白基因不能产生有效的保护性抗体反应^[23-26],因此近年的研究有采用C抗原基因加膜抗原基因,或与乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)表面抗原基因融合,以及HCV DNA与表达Th1样细胞因子基因结合构建的疫苗免疫小鼠后,既可产生高滴度的抗体反应,又可诱导明显的脾细胞对HCV抗原增值反应和CTL杀伤活性^[27,28],本研究采用GM-CSF编码基因重组子联合pCMH6K/HCV-C肌注免疫

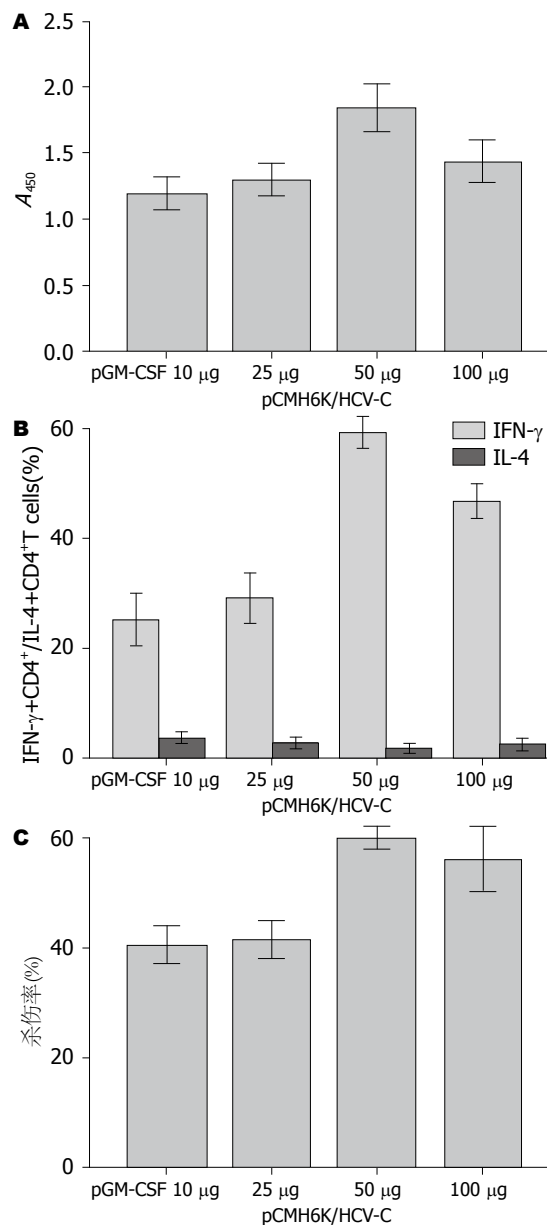


图5 GM-CSF编码基因重组子不同剂量免疫组抗HCV C蛋白特异性细胞免疫和体液免疫水平($n = 4$, mean ± SD).

Balb/c鼠探究GM-CSF编码基因免疫佐剂效应。

本实验将HCV C蛋白编码基因亚克隆至真核表达载体pCMH6K中, pCMH6K/HCV-C经酶切释出的插入子符合预期片段大小, DNA测序证明目的基因在真核表达载体中正常连接,提示pCMH6K/HCV-C构建成功.在pCMH6K/HCV-C转染的CHO细胞内,免疫荧光法检测到阳性的绿色荧光标记主要分布在胞膜,说明真核表达载体编码的HCV C蛋白可在CHO细胞表达。

体液免疫研究结果表明, pGM-CSF+pCMH6K/HCV-C联合免疫组与pCMH6K/HCV-C单独免疫组均能够诱导产生抗HCV C蛋白特异性抗体,明显高于pGM-CSF对照组及pcDNA3.1(+)空载体组,进一步研究发现GM-CSF编码基因并没

表 1 不同免疫组小鼠脾CD3⁺CD4⁺/CD3⁺CD8⁺T淋巴细胞亚群及Th细胞内细胞因子IFN- γ 和IL-4分泌水平分析 ($n=4$, mean \pm SD)

分组	CD3 ⁺ CD4 ⁺ (%)	CD3 ⁺ CD8 ⁺ (%)	CD4 ⁺ IFN- γ (%)	CD4 ⁺ IL-4(%)	Th1/Th2
pCMH6K/HCV- C+pGM-CSF	44.90 \pm 5.99 ^{ac}	13.47 \pm 0.28 ^d	45.50 \pm 2.09 ^{ef}	2.50 \pm 0.03 ^g	18.20 \pm 2.36
pCMH6K/HCV-C	30.70 \pm 0.51 ^{abc}	13.06 \pm 0.18 ^d	25.17 \pm 1.39 ^e	3.68 \pm 0.07 ^g	6.84 \pm 1.50 ^h
pGM-CSF	18.11 \pm 1.23 ^{ab}	9.15 \pm 0.66	2.34 \pm 0.35	23.29 \pm 1.06	0.10 \pm 0.02 ^h
pcDNA3.1(+)	12.99 \pm 2.32 ^b	8.30 \pm 0.24	5.54 \pm 0.13	26.84 \pm 2.36	0.21 \pm 0.06 ^h

^a $P<0.05$ vs pcDNA3.1(+); ^b $P<0.05$ vs pCMH6K/HCV-C+pGM-CSF组; ^c $P<0.05$ vs pGM-CSF组; ^d $P<0.05$ vs pGM-CSF组、pcDNA3.1(+); ^e $P<0.05$ vs pcDNA3.1(+); ^f $P<0.05$ vs pCMH6K/HCV-C组; ^g $P<0.05$ vs pcDNA3.1(+); ^h $P<0.05$ vs pCMH6K/HCV-C+pGM-CSF组。

有增强抗HCV-C蛋白特异性抗体水平, Alekseeva等^[29]为明确HCV C基因疫苗接种剂量对HCV C蛋白表达水平以及HCV DNA疫苗免疫应答的影响程度,将相同剂量的HCV C蛋白编码基因重组子单次或分成多次肌注免疫Balb/c鼠,结果发现多次免疫接种方式并没有增强HCV C蛋白特异性免疫应答,相反能够下调HCV C蛋白特异性抗体和细胞因子表达水平。Zhu等^[6]通过对HCV C蛋白基因不同区段研究发现, HCV核心蛋白本身可能抑制DNA疫苗诱导的免疫应答。相反,剪切的HCV C蛋白基因疫苗能够显著增强细胞免疫和抗HCV C蛋白特异性抗体应答。据此推测, HCV C蛋白基因不同区段的选取以及免疫接种方式均能够影响HCV C蛋白基因疫苗诱导的体液免疫应答, GM-CSF编码基因对HCV DNA疫苗诱导的体液免疫应答可能没有影响。

已有研究表明CD4⁺T细胞在增强CTL杀伤活性方面起着关键作用^[30,31]。我们的研究表明pGM-CSF+pCMH6K/HCV-C免疫组获得了较理想的CD3⁺CD4⁺T细胞比例和HCV特异性CTL杀伤活性, CD3⁺CD4⁺T细胞比例与HCV特异性CTL杀伤活性有相关性。此外,我们的研究也发现CD3⁺CD8⁺T细胞比例与CTL活性缺乏一致性,各组间CD3⁺CD8⁺T细胞比例无明显差异,但各组所致HCV特异性CTL杀伤活性各不相同。本项研究提示GM-CSF编码基因可显著增加抗原特异性CD4⁺T细胞比例、增强CTL杀伤活性。

基于活化的CD4⁺T细胞分泌的细胞因子能够改变Th1/Th2细胞因子平衡; DNA疫苗免疫鼠脾CD4⁺T细胞内细胞因子IFN- γ 、IL-4的水平能够分别反应Th1与Th2细胞数量。本实验我们通过检测免疫鼠脾CD4⁺T细胞内细胞因子IFN- γ 和IL-4的水平探究了GM-CSF基因佐剂对HCV C基因疫苗免疫应答的影响。我们的实验结果表明,

单独免疫组能够促进IFN- γ 和IL-4的分泌水平,联合免疫组能够明显促进IFN- γ 的分泌水平、抑制IL-4的产生,诱导产生Th1型免疫应答。

Chen等^[32]最近研究表明, GM-CSF编码基因能够明显抑制乙型肝炎DNA疫苗诱导的特异性抗体和Th1型细胞因子分泌水平,进一步研究发现,此种抑制作用与GM-CSF编码基因表达水平有关,呈剂量依赖性,我们的研究也发现,随pGM-CSF接种剂量增加, pCMH6K/HCV-C+pGM-CSF(100 μ g)免疫组并没有进一步增强HCV C蛋白特异性细胞免疫和体液免疫应答水平,相反明显抑制细胞免疫和体液免疫相关指标,据此推测GM-CSF生物活性以及GM-CSF基因佐剂的多样性应用于DNA疫苗有待深入研究。

本项研究提示GM-CSF编码基因能够增强HCV DNA疫苗诱导的细胞免疫应答,并能够改变Th免疫应答平衡,随GM-CSF基因表达水平的增加,抗HCV C蛋白特异性细胞免疫和体液免疫水平呈现先升高后抑制的趋势。我们的研究为进一步探究HCV感染的致病机制及相关治疗方案提供了理论基础,为研发HCV DNA疫苗提供实验依据。

4 参考文献

- Alberti A, Vario A, Ferrari A, Pistis R. Review article: chronic hepatitis C--natural history and cofactors. *Aliment Pharmacol Ther* 2005; 22 Suppl 2: 74-78
- Zarski JP. [Natural history of viral hepatitis]. *Rev Prat* 2011; 61: 33-38
- Manea I, Manea CN, Miron N, Cristea V. Immunological aspects in viral hepatitis B and C infection. *Roum Arch Microbiol Immunol* 2011; 70: 97-100
- Negro F. HCV infection and metabolic syndrome: which is the chicken and which is the egg? *Gastroenterology* 2012; 142: 1288-1292
- Hsu CS, Kao JH. Hepatitis C infection and metabolic syndrome. *J Formos Med Assoc* 2010; 109: 403-407
- Zhu W, Chang Y, Wu C, Han Q, Pei R, Lu M, Chen X. The wild-type hepatitis C virus core inhibits

■名词解释

GM-CSF: 一种促进正常造血细胞增殖和分化的多肽类激素,对粒细胞和单核/巨噬细胞的生成起主要作用。此外, GM-CSF能够募集树突状细胞到达注射部位,促进树突状细胞的分化与成熟,在维持外周免疫耐受方面发挥重要作用。

同行评价

研发抗HCV保护性疫苗对于治疗和预防HCV感染具有重要意义。该文选题明确, 创新性可, 统计分析恰当, 具有一定应用价值。

- initiation of antigen-specific T- and B-cell immune responses in BALB/c mice. *Clin Vaccine Immunol* 2010; 17: 1139-1147
- 7 Nguyen H, Sankaran S, Dandekar S. Hepatitis C virus core protein induces expression of genes regulating immune evasion and anti-apoptosis in hepatocytes. *Virology* 2006; 354: 58-68
- 8 Echeverria I, Pereboev A, Silva L, Zabaleta A, Riezu-Boj JI, Bes M, Cubero M, Borrás-Cuesta F, Lasarte JJ, Esteban JI, Prieto J, Sarobe P. Enhanced T cell responses against hepatitis C virus by ex vivo targeting of adenoviral particles to dendritic cells. *Hepatology* 2011; 54: 28-37
- 9 Rehmann B, Nascimbeni M. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nat Rev Immunol* 2005; 5: 215-229
- 10 Alvarez-Lajonchere L, Dueñas-Carrera S. Advances in DNA immunization against hepatitis C virus infection. *Hum Vaccin* 2009; 5: 568-571
- 11 Thimme R, Neumann-Haefelin C, Boettler T, Blum HE. Adaptive immune responses to hepatitis C virus: from viral immunobiology to a vaccine. *Biol Chem* 2008; 389: 457-467
- 12 窦晓光, 丁洋. 慢性丙型肝炎抗病毒治疗的新策略和新方法. *中国实用内科杂志* 2010; 30: 217-219
- 13 Zhai YZ, Li XM, Zhou Y, Ma L, Feng GH. Intramuscular immunization with a plasmid DNA vaccine encoding prM-E protein from Japanese encephalitis virus: enhanced immunogenicity by co-administration of GM-CSF gene and genetic fusions of prM-E protein and GM-CSF. *Intervirology* 2009; 52: 152-163
- 14 Wang J, Snider DP, Hewlett BR, Lukacs NW, Gauldie J, Liang H, Xing Z. Transgenic expression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induces the differentiation and activation of a novel dendritic cell population in the lung. *Blood* 2000; 95: 2337-2345
- 15 Fischer HG, Frosch S, Reske K, Reske-Kunz AB. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor activates macrophages derived from bone marrow cultures to synthesis of MHC class II molecules and to augmented antigen presentation function. *J Immunol* 1988; 141: 3882-3888
- 16 Chang CH, Furue M, Tamaki K. B7-1 expression of Langerhans cells is up-regulated by proinflammatory cytokines, and is down-regulated by interferon-gamma or by interleukin-10. *Eur J Immunol* 1995; 25: 394-398
- 17 冯国和, 王玉梅, 刘沛, 王占英, 乔光彦. 乙型肝炎病毒 prME、E蛋白基因表达与DNA免疫效率对比研究. *中华传染病杂志* 2005; 34: 297-300
- 18 Szabo G, Chang S, Dolganiuc A. Altered innate immunity in chronic hepatitis C infection: cause or effect? *Hepatology* 2007; 46: 1279-1290
- 19 Bode JG, Brenndörfer ED, Häussinger D. Hepatitis C virus (HCV) employs multiple strategies to subvert the host innate antiviral response. *Biol Chem* 2008; 389: 1283-1298
- 20 Irshad M, Khushboo I, Singh S, Singh S. Hepatitis C virus (HCV): a review of immunological aspects. *Int Rev Immunol* 2008; 27: 497-517
- 21 Hiroishi K, Ito T, Imawari M. Immune responses in hepatitis C virus infection and mechanisms of hepatitis C virus persistence. *J Gastroenterol Hepatol* 2008; 23: 1473-1482
- 22 Moriya K, Koike K. [Chronic hepatitis C: virologic and immunologic aspects]. *Nihon Rinsho* 2004; 62 Suppl 7: 405-407
- 23 Tokushige K, Wakita T, Pachuk C, Moradpour D, Weiner DB, Zurawski VR, Wands JR. Expression and immune response to hepatitis C virus core DNA-based vaccine constructs. *Hepatology* 1996; 24: 14-20
- 24 Hu GJ, Wang RY, Han DS, Alter HJ, Shih JW. Characterization of the humoral and cellular immune responses against hepatitis C virus core induced by DNA-based immunization. *Vaccine* 1999; 17: 3160-3170
- 25 Lagging LM, Meyer K, Hoft D, Houghton M, Belshe RB, Ray R. Immune responses to plasmid DNA encoding the hepatitis C virus core protein. *J Virol* 1995; 69: 5859-5863
- 26 Shirai M, Okada H, Nishioka M, Akatsuka T, Wychowski C, Houghton R, Pendleton CD, Feinstone SM, Berzofsky JA. An epitope in hepatitis C virus core region recognized by cytotoxic T cells in mice and humans. *J Virol* 1994; 68: 3334-3342
- 27 Ip PP, Nijman HW, Wilschut J, Daemen T. Therapeutic vaccination against chronic hepatitis C virus infection. *Antiviral Res* 2012; 96: 36-50
- 28 Geissler M, Gesien A, Tokushige K, Wands JR. Enhancement of cellular and humoral immune responses to hepatitis C virus core protein using DNA-based vaccines augmented with cytokine-expressing plasmids. *J Immunol* 1997; 158: 1231-1237
- 29 Alekseeva E, Sominskaya I, Skrastina D, Egorova I, Starodubova E, Kushners E, Mihailova M, Petrakova N, Bruvere R, Kozlovskaya T, Isagulians M, Pumpens P. Enhancement of the expression of HCV core gene does not enhance core-specific immune response in DNA immunization: advantages of the heterologous DNA prime, protein boost immunization regimen. *Genet Vaccines Ther* 2009; 7: 7
- 30 Wild J, Grusby MJ, Schirmbeck R, Reimann J. Priming MHC-I-restricted cytotoxic T lymphocyte responses to exogenous hepatitis B surface antigen is CD4+ T cell dependent. *J Immunol* 1999; 163: 1880-1887
- 31 Ahmed KA, Wang L, Munegowda MA, Mulligan SJ, Gordon JR, Griebel P, Xiang J. Direct in vivo evidence of CD4+ T cell requirement for CTL response and memory via pMHC-I targeting and CD40L signaling. *J Leukoc Biol* 2012; 92: 289-300
- 32 Chen H, Gao N, Fan D, Wu J, Zhu J, Li J, Wang J, Chen Y, An J. Suppressive effects on the immune response and protective immunity to a JEV DNA vaccine by co-administration of a GM-CSF-expressing plasmid in mice. *PLoS One* 2012; 7: e34602

编辑 田滢 电编 闫晋利

靶向SMAD3基因的shRNA重组慢病毒对大鼠肝再生的作用

张莹, 孔贺利, 郑素军, 刘梅, 陈煜, 刘霜, 段钟平

张莹, 中国人民解放军第302医院 北京市 100039
孔贺利, 郑素军, 刘梅, 陈煜, 刘霜, 段钟平, 首都医科大学附属北京佑安医院 北京市 100069
张莹, 硕士, 主要从事重型肝炎衰竭防治方面的研究。
国家125科技重大专项“艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治”基金资助项目, No. 2012ZX10002004-006; No. 2012ZX10004904-003-001
国家自然科学基金资助项目, No. 30800979
北京自然科学基金资助项目, No. 7102085
北京市科技新星基金资助项目, No. 2007B055
北京市卫生系统高层次卫生技术人才基金资助项目, No. 2011-3-083
作者贡献分布: 张莹与孔贺利对此文所作贡献均等, 为共同第一作者; 此课题由郑素军与段钟平设计并给实验指导; 研究过程由张莹、孔贺利及刘梅操作完成; 数据分析由张莹完成; 陈煜与刘霜给予实验指导; 论文写作由张莹完成; 郑素军审核。
通讯作者: 郑素军, 副教授, 100069, 北京市丰台区右安门外西头条8号, 首都医科大学附属北京佑安医院。
zhengsujun003@126.com
电话: 010-63291007
收稿日期: 2012-10-22 修回日期: 2012-11-15
接受日期: 2012-12-03 在线出版日期: 2012-12-18

Lentiviral-mediated delivery of shRNA targeting the SMAD3 gene promotes liver regeneration in rats

Ying Zhang, He-Li Kong, Su-Jun Zheng, Mei Liu, Yu Chen, Shuang Liu, Zhong-Ping Duan

Ying Zhang, the 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China
He-Li Kong, Su-Jun Zheng, Mei Liu, Yu Chen, Shuang Liu, Zhong-Ping Duan, Beijing Youan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100069, China
Supported by: the Key National Science and Technology Project on “Major Infectious Diseases such as HIV/AIDS, Viral Hepatitis Prevention and Treatment”, Nos. 2012ZX10002004-006 and 2012ZX10004904-003-001; National Natural Science Foundation of China, No. 30800979; the Beijing Natural Science Foundation, No. 7102085; the Beijing New Star Project on Science & Technology, No. 2007B055; and the High Technical Talent Training Foundation of Beijing Health System, No. 2011-3-083
Correspondence to: Su-Jun Zheng, Associate Professor, Beijing Youan Hospital, Capital Medical University, 8 Youan Menwai Xitoutiao, Fengtai District, Beijing 100069, China, zhengsujun003@126.com
Received: 2012-10-22 Revised: 2012-11-15
Accepted: 2012-12-03 Published online: 2012-12-18

Abstract

AIM: To investigate the effect of lentiviral-mediated delivery of shRNA targeting the SMAD3 gene on liver regeneration in rats.

METHODS: Sixty male rats were randomly divided into three groups: SMAD3 shRNA group ($n = 20$), shRNA control group ($n = 20$), and normal saline group ($n = 20$). Intraperitoneal injection of lentivirus carrying the SMAD3 shRNA or control shRNA at a dose of 1.0×10^8 TU per rat was performed in rats of the SMAD3 shRNA group and shRNA control group, respectively, while the normal saline group was given equal volume of normal saline. After 96 h, 2/3 partial hepatectomy was performed to develop a rat model of liver regeneration. Seven rats of each group were sacrificed at 96 h, and the rest were sacrificed at 144 h after hepatectomy. Liver tissue specimens were collected. SMAD3 expression was detected using real-time PCR and immunohistochemistry. Proliferation of hepatocytes was evaluated by detecting Ki67 by immunohistochemistry. The ratio of liver weight to body weight was determined to observe its role in liver regeneration *in vivo*.

RESULTS: At 96 h and 144 h after hepatectomy, SMAD3 mRNA expression decreased by 73% and 63% in the SMAD3 shRNA group compared to the shRNA control group. The expression of SMAD3 protein also decreased obviously. More active proliferation of hepatocytes was observed after SMAD3 down-regulation. The liver weight/body weight in the SMAD3 shRNA group was higher than those in the normal saline control group and shRNA control group (96 h: 4.50 ± 0.43 vs 3.97 ± 0.55 vs 3.98 ± 0.40 , 144 h: 4.66 ± 0.54 vs 4.15 ± 0.51 vs 4.20 ± 0.34), but there was no statistically significance between them (all $P > 0.05$).

CONCLUSION: Down-regulation of SMAD3 expression could moderately promote liver regeneration in rats.

Key Words: SMAD3; ShRNA; Lentiviral vector; Liver regeneration

Zhang Y, Kong HL, Zheng SJ, Liu M, Chen Y, Liu S, Duan ZP. Lentiviral-mediated delivery of shRNA targeting the SMAD3 gene promotes liver regeneration in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(35): 3431-3438

■背景资料

TGF- β 和Activin A参与了抑制肝再生的过程, SMAD3是TGF- β 和Activin在SMAD信号通路中共同的关键信号蛋白。用siRNA技术阻断SMAD3表达有可能促进肝再生。

■同行评议者

汤华, 研究员, 重庆医科大学感染性疾病分子生物学重点实验室

■ 研发前沿

目前已有大量研究证明,靶向SMAD3基因的siRNA可抑制肝纤维化,但在肝再生中作用鲜见报道。

摘要

目的:应用大鼠肝大部切除肝再生模型,将前期构建好的靶向SMAD3基因的shRNA重组慢病毒注射入大鼠体内,观察SMAD3 shRNA对大鼠肝再生的影响。

方法:将60只♂ Wistar大鼠随机分为3组: SMAD3 shRNA组(20只)、shRNA对照组(20只)、生理盐水对照组(20只),通过脾脏注射方法给药,慢病毒给药剂量为 1.0×10^8 TU/只,生理盐水对照组给予等体积500 μ L生理盐水。给药96 h后行2/3肝大部切除,构建大鼠肝再生模型;肝大部切除术后96 h各组分别除死大鼠7只,剩余大鼠于144 h处死,收集肝脏标本,Real-Time PCR、免疫组织化学检测肝组织SMAD3表达,免疫组织化学检测肝组织Ki67表达,测定大鼠肝质量/体质量,观察SMAD3 shRNA对肝再生的影响。

结果:Real-Time PCR检测显示,通过脾脏注射慢病毒,在96、144 h处死时间点,SMAD3 shRNA组SMAD3 mRNA分别较shRNA对照组平均下降73%、63%。免疫组织化学检测显示SMAD3蛋白表达明显下降。Ki67免疫组织化学结果显示,肝大部切除术后96、144 h, SMAD3 shRNA组Ki67表达阳性细胞数均明显多于生理盐水对照组及shRNA对照组,表明抑制SMAD3表达后肝细胞增殖活跃。大鼠肝质量与体质量比值显示, SMAD3 shRNA组分别较生理盐水对照组及shRNA对照组有增加趋势(96 h: 4.50 ± 0.43 vs 3.97 ± 0.55 vs 3.98 ± 0.40 , 144 h: 4.66 ± 0.54 vs 4.15 ± 0.51 vs 4.20 ± 0.34),但没有统计学意义($P > 0.05$)。

结论:SMAD3 shRNA在大鼠体内可一定程度上促进肝细胞增殖,但对肝再生的促进作用尚弱。

关键词: SMAD3; shRNA; 慢病毒; 肝再生

张莹, 孔贺利, 郑素军, 刘梅, 陈煜, 刘霜, 段钟平. 靶向SMAD3基因的shRNA重组慢病毒对大鼠肝再生的作用. 世界华人消化杂志 2012; 20(35): 3431-3438

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3431.asp>

0 引言

如何促进持久和强大的肝再生,对于肝癌肝切除术后、肝衰竭等肝脏疾病的自然康复有着重要意义。肝再生可分为启动、增生和终止阶段。研究表明,在肝再生终止阶段,转化生长因子- β (transforming growth factor β , TGF- β)和激活素

A(Activin A)具有抑制肝细胞增殖,诱导肝细胞凋亡的作用,是肝再生的重要的负调控因子^[1,2]。TGF- β 及Activin A发挥作用,主要通过SMAD信号通路实现细胞内信号转导,其中SMAD3是TGF- β 和Activin A在SMAD信号通路中共同的关键信号蛋白^[3,4]。如果特异性阻断SMAD3蛋白表达,有可能同时解除TGF- β 和Activin A的作用,从而起到促进肝细胞增殖,达到肝再生目的。

小干扰RNA(small interfering RNA, siRNA)是基因功能研究和治疗的高效工具,可以高效特异的阻断基因表达。siRNA在RNA依赖RNA聚合酶(RdRp)作用下,以靶mRNA为模板合成dsRNA,后者可被降解形成新的siRNA;新生成的siRNA又可进入上述循环,从而使靶mRNA渐进性减少^[5]。研究表明, siRNA较之单链反义寡核苷酸、核酶和脱氧核酶具有独特的、高效的基因表达调控效果^[6-9]。目前siRNA已应用于抗肝炎病毒、肝纤维化及肝衰竭的治疗研究^[10-12]。

高效的siRNA导入手段是确保疗效的另一关键,以HIV-1为基础构建的慢病毒载体系统具有可感染分裂细胞和非分裂细胞、免疫反应小等优点,还可以通过将其携带的基因片段整合到宿主细胞的基因组,实现目的基因的稳态表达,而且感染效率高、免疫原性低,是具有广阔应用前景的RNAi载体^[13]。本研究拟使用的pLKO.1慢病毒载体就属于这一系统。将带RNA pol III启动子的shRNA序列插入到载体pLKO.1-Puro-GFP中,并与包装成分的重组质粒共转染细胞(如人肾293FT细胞),收获包装细胞上清中具有一次性感染能力而无复制能力的、携带靶shRNA序列的HIV-1载体颗粒,用来感染靶细胞进行治疗,可在细胞内表达shRNA,并进一步裂解为siRNA发挥作用。

在我们前期的研究中,以大鼠SMAD3为靶基因,成功筛选了siRNA作用靶位点、并构建了SMAD3 shRNA慢病毒表达系统^[14],在体外显示了显著的抗肝纤维化作用^[15]。本研究拟利用大鼠肝大部切除肝再生模型,探讨上述SMAD3 shRNA对肝再生的影响,从而为重型肝炎肝衰竭等疾病治疗提供新的思路。

1 材料和方法

1.1 材料 PCR引物(上海生物化工有限公司合成); RNA提取试剂盒TRIzol Reagent(美国invitrogen公司); TaKaRa RNA PCR Kit(AMV) Ver.3.0(宝生物工程(大连)有限公司); SYBR®Premix

Ex Taq™(Perfect Real Time)(宝生物工程有
限公司); 荧光定量PCR仪7500(美国ABI公司); Poly-
brene(美国Sigma公司); SMAD3抗体(美国Cell
Signaling公司); Ki67抗体(美国Epitomics公司);
辣根过氧化物酶标记羊抗小鼠二抗(北京中杉金桥
公司); 辣根过氧化物酶标记兔二抗工作液(北京
康为世纪生物科技有限公司); LEICA RM2235超
薄切片机(上海徕卡仪器有限公司); CX40RF200
光学显微镜(日本OLYMPUS)。

1.2 方法

1.2.1 慢病毒的包装和滴定: 我们先前工作中应
用PLL3.7-shRNA慢病毒4质粒系统, 已成功筛
选、构建了靶向大鼠SMAD3基因的shRNA重组
慢病毒^[14,15]。SMAD3shRNA靶向的序列为5'-UG-
GUGCGAGAAGGCGGUCAAdTdT-3'(根据Gen-
bank提供的SMAD3基因序列NM_013095, 靶向
SMAD3碱基位点289-308)。shRNA对照的序列
为5'-TTCTCCGAACGTGTCTACGT-3'(使用上海
吉玛公司提供的ctrl siRNA序列, 该序列已被证
实与大鼠和人基因组缺乏序列同源性)。将构建
好的载体质粒交给上海吉玛公司, 委托其进行
慢病毒大规模包装、滴定。

1.2.2 肝再生模型构建及慢病毒感染: ♂ Wistar
大鼠60只, 体质量150-200 g(中国军事医学科学
院实验动物中心提供)。随机分为3组: SMAD3
shRNA组(20只)、shRNA对照组(20只)、生理盐
水对照组(20只), 上述各组通过脾脏注射给予慢
病毒, 具体过程为: 大鼠称质量后, 给予10%水
合氯醛4 mg/kg麻醉, 备皮。大鼠仰卧, 四肢固定,
碘酊消毒大鼠腹部脾区, 用剪刀剪开一直径约
1.5-2.0 cm的小口, 小心寻找并暴露脾脏, 经脾
脏注射给药, SMAD3 shRNA组、shRNA对照组
慢病毒注射剂量均为 1×10^8 TU/只。慢病毒组应
用生理盐水稀释至500 μ L, 并加入慢病毒感染增
强剂Polybrene(使终浓度为8 ng/mL), 生理盐水
对照组应用等体积500 μ L生理盐水。注射时
可以看到注射点脾脏颜色先发白, 后变成粉
红色, 注射后颜色迅速恢复。96 h后, 将上述
各组存活大鼠行肝大部切除术, 建立肝再生
模型。手术方法: 大鼠称质量、麻醉过程同前。
碘酊消毒大鼠腹部。沿下腹部剪一小口, 后
沿此小口向上, 用剪刀将大鼠腹部皮肤及肌
肉组织钝性分离, 边分离边剪开皮肤, 后沿
腹白线将肌肉层剪开, 止血钳固定两侧皮
肤、肌肉, 暴露内脏器官, 暴露内脏器官后,
剪断部分肝上韧带和全部肝下韧带。用7号
线将大鼠肝左叶和中叶固定结扎, 观察肝

叶是否淤血, 同时观察另外两叶肝脏的血
流情况。如另外两叶肝脏血供良好, 则将结
扎肝叶剪除, 并修剪剩余面。逐层缝合腹部
切口。

1.2.3 标本收集: 肝大部切除术后96 h, SMAD3
shRNA组、shRNA对照组、生理盐水对照
组各取大鼠7只, 称质量、麻醉, 经下腔静
脉抽血10-15 mL, 分离血清放置于-80 $^{\circ}$ C
冰箱中保存备检。进一步暴露腹腔, 取出
完整肝脏称质量, 计算肝质量与大鼠体质量
比值, 即肝质量/体质量。取1 cm \times 1 cm
大小肝组织放入40 g/L甲醛溶液中固定,
其余肝组织生理盐水冲洗后剪成200 mg
左右的组织块放入冻存管中, 并留取肾、脾、
肺、骨骼肌组织, 均储存于-80 $^{\circ}$ C冰箱备
用。术后144 h时将各组剩余存活大鼠处死,
称取肝质量并收集标本。

1.2.4 检测指标: (1)实时荧光定量PCR法
检测肝组织中SMAD3 mRNA的表达按照TRIzol
试剂说明提取肝组织总RNA, TaKaRa逆转录
酶进行逆转录合成cDNA, Primer5软件设计
目的基因引物。SMAD3引物序列为Up: 5'-GACGCAG-
GCTCTCCAAACCT-3', Down: 5'-TTGGACAG-
CAGGCCAGACA-3', 扩增位置为803-1029碱
基位点。GAPDH引物序列为Up: 5'-GCACCAC-
CAACTGCTTAGC-3', Down: 5'-TCCACGAT-
GCCAAAGTTGTCAT-3', 扩增位置为411-650
碱基位点。反应体系20 μ L, 设立2个复孔, 按
两步法扩增: 预变性: 95 $^{\circ}$ C 30 s; PCR反应:
95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 循环数40次; 反应结
束后确认扩增曲线和溶解曲线, 以GAPDH为
内参, 计算目的基因SMAD3 mRNA的相对表
达量, 计算公式如下: SMAD3 mRNA =
 $\text{Power}(2, \text{Ct}_{\text{GAPDH}} - \text{Ct}_{\text{SMAD3}})$; (2)免疫组
织化学方法检测肝脏SMAD3和Ki67的表达:
将2-3 mm厚肝组织甲醛固定, 石蜡包埋, 按
3 μ m厚度切片。石蜡切片常规脱蜡, PBS洗
涤, 用0.01 mol/L的枸橼酸缓冲液(pH 6.0)微
波加热至92 $^{\circ}$ C-96 $^{\circ}$ C修复抗原15 min。3%
H₂O₂甲醇室温孵育15 min, 滴加封闭用正
常羊血清工作液, 室温孵育15 min, 倾去, 勿
洗。滴加SMAD3抗体, 抗体浓度为1:200, 4
 $^{\circ}$ C过夜, PBS洗涤。滴加辣根过氧化物酶标
记的兔二抗工作液, 37 $^{\circ}$ C 15 min, PBS洗
涤。选用DAB显色。常规乙醇脱水、二甲苯
透明, 中性树胶封片保存。肝组织Ki67免疫
组织化学检测步骤同上, 其中Ki67抗体工作
浓度为1:100。

统计学处理 计量数据以mean \pm SD表示,
采用SPSS16.0 for Windows统计软件进行统
计处理, 统计方法同一时刻多组间的比较采
用单因

■ 相关报道

研究显示, 有效阻断TGF- β 或Activin A的作用,
有可能促进肝再生。小鼠肝脏部分切除后, 注
入TGF- β 抗体能抑制TGF- β mRNA的表达, 提
高了小鼠的存活率; 如果手术前连续注入TGF- β
的抗体, 那么肝脏再生速度明显加快。用Ac-
tivin A的反义寡核苷酸处理人肝癌细胞株, 刺
激了肝细胞增值。folistatin腹腔给药或用腺
病毒载体的形式过度表达folistatin, 从而抑
制Activin的作用, 导致肝细胞DNA合成增加
和正常大鼠肝体积增大。

■创新盘点

针对TGF- β 和Activin在SMAD信号转导通路中的共同关键信号蛋白SMAD3,应用shRNA慢病毒来抑制SMAD3表达,该方面的研究尚未见报道。

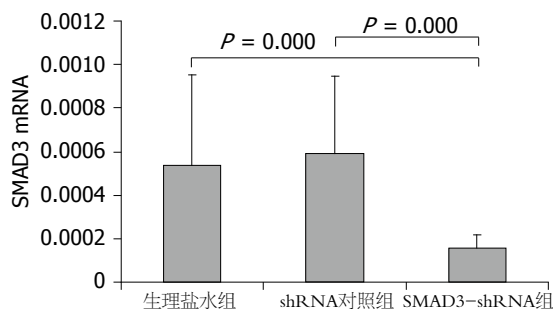


图1 造模96 h各组SMAD3 mRNA的变化。

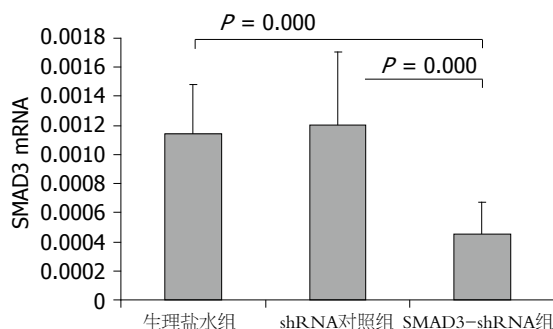


图2 造模144 h各组SMAD3 mRNA的变化。

素方差分析,若方差不齐,或某样本不服从正态分布,选用Kruskal-Wallis秩和检验,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。若方差分析或秩和检验结果有统计学意义,进一步选择Bonferonni、LSD等方法进行两两比较。

2 结果

2.1 实时荧光定量PCR检测各组SMAD3 mRNA表达情况 96 h时间点肝脏SMAD3 mRNA表达情况如图1。因为方差不齐,选用Kruskal-Wallis秩和检验,各组间差异具有统计学意义($P = 0.002$)。各组间采用非参数检验-2独立样本非参数检验进行两两比较,结果显示,SMAD3 shRNA组分别和生理盐水对照组、shRNA对照组相比,SMAD3 mRNA表达量明显下降(均 $P = 0.000 < \alpha'$, $\alpha' = 0.05/3$),而shRNA对照组和生理盐水对照组两组间无明显差别($P = 0.539$)。144 h时间点肝脏SMAD3 mRNA表达情况见图2,各组间差异具有统计学意义($P = 0.001$)。各组间采用非参数检验-2独立样本非参数检验进行两两比较,结果显示,SMAD3 shRNA组分别和生理盐水对照组、shRNA对照组相比,SMAD3 mRNA表达量明显下降(均 $P = 0.000 < \alpha'$, $\alpha' = 0.05/3$),而shRNA对照组和生理盐水对照组两组间无明显差别($P = 0.481$)。

2.2 免疫组织化学测定SMAD3和Ki67在肝脏中

表1 96 h大鼠残肝质量及与体质量比值的变化 ($n = 7$)

分组	肝质量(g)	肝质量/体质量(%)
生理盐水对照组	7.07 ± 0.72	3.97 ± 0.55
shRNA对照组	6.98 ± 0.84	3.98 ± 0.40
SMAD3 shRNA组	7.69 ± 0.91	4.50 ± 0.43

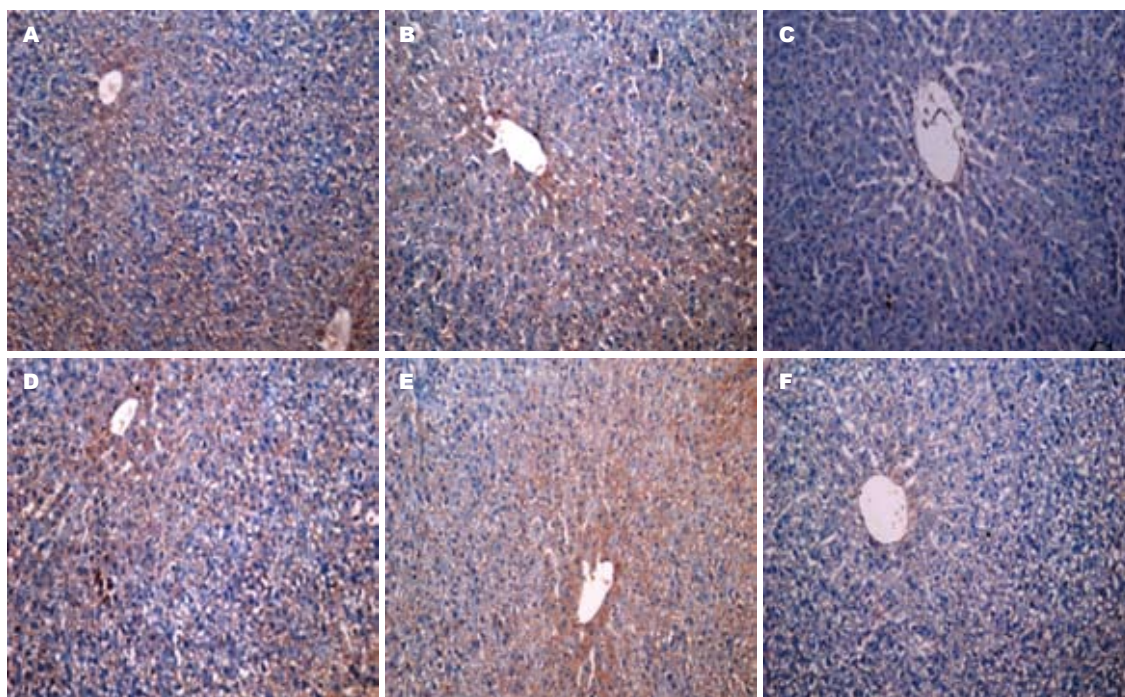
的表达 SMAD3多定位于肝细胞胞浆,免疫组织化学染色为棕黄色。肝大部切除术造模后96 h和144 h时间点,SMAD3 shRNA组分别和生理盐水对照组、shRNA对照组相比,SMAD3表达被显著抑制(图3)。Ki67定位于细胞核,阳性细胞可见细胞核染色为棕黄色或棕褐色,与被苏木素衬染成蓝色的阴性细胞核区别明显。免疫组织化学显示,SMAD3 shRNA组相对于生理盐水对照组和shRNA对照组,处于细胞增殖期的细胞明显增多,且96 h时间点处于增殖期的细胞明显多于144 h时间点(图4)。

2.3 大鼠肝质量变化 造模后96 h和144 h时间点,SMAD3 shRNA组、shRNA对照组、生理盐水对照组的肝脏均有不同程度增生,增生的肝脏形状不规则。144 h时间点各组肝脏基本恢复原有肝脏大小(图5,6)。

表1显示,96 h时间点SMAD3 shRNA组肝质量/体质量比值,分别较生理盐水对照组、shRNA对照组稍增加,单因素方差分析显示,各组之间差别无统计学意义($F = 1.726$, $P = 0.216$)。同样如表2显示,144 h时间点各组之间肝质量/体质量差别无统计学意义($F = 2.001$, $P = 0.17$)。

3 讨论

Xu等将大鼠2/3肝大部切除后肝再生分为早期(术后2-6 h)、前期(术后6-24 h)、后期(术后24-36 h)、终止期(术后72-168 h)等4个时期^[16-18]。研究表明,TGF- β 在肝再生过程从增生阶段进入终止阶段发挥了重要的作用^[19]。虽然在大鼠2/3肝脏切除术后,TGF- β 随着肝再生的启动上调,但是在肝再生早期肝细胞对TGF- β 信号的刺激作用不敏感,肝脏仍然能持续增生,其主要原因是肝细胞TGF- β 受体(transforming growth factor- β receptor, TGF- β R)表达下调,导致肝细胞在TGF- β 浓度增高的情况下仍能进行增生^[20]。而Activin A在肝再生早期信号减弱,细胞受体水平下降,而在肝再生终止阶段表达升高,提示Activin A也是一个重要的肝再生终止因子^[21]。因此我们选择肝大部切除术后96 h及144 h(肝



■应用要点
该研究为促进肝再生的基因治疗的相关研究提供了新的思路。

图 3 造模96 h及144 h各组SMAD3免疫组织化学结果($\times 100$)。A: 生理盐水对照组造模96 h大鼠肝组织SMAD3的表达; B: shRNA对照组造模96 h大鼠肝组织SMAD3的表达; C: SMAD3 shRNA组造模96 h大鼠肝组织SMAD3的表达; D: 生理盐水对照组造模144 h大鼠肝组织SMAD3的表达; E: shRNA对照组造模144 h肝组织SMAD3的表达; F: SMAD3 shRNA组造模144 h大鼠肝组织SMAD3的表达。

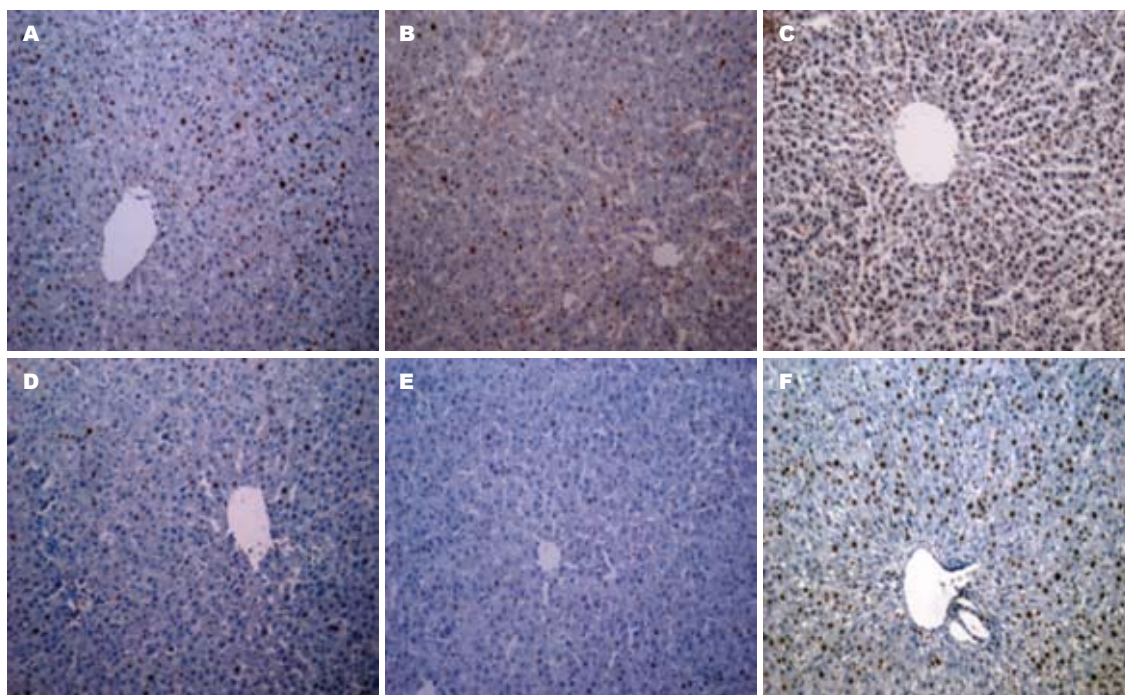


图 4 造模96 h及144 h各组Ki67免疫组织化学结果($\times 100$)。A: 生理盐水对照组造模96 h大鼠肝组织Ki67的表达; B: shRNA对照组造模96 h大鼠肝组织Ki67的表达; C: SMAD3 shRNA组造模96 h大鼠肝组织Ki67的表达; D: 生理盐水对照组造模144 h大鼠肝组织Ki67表达; E: shRNA对照组造模144 h大鼠肝组织Ki67的表达; F: SMAD3 shRNA组造模144 h大鼠肝组织Ki67表达。

再生终止阶段中的2个时间点)处死大鼠, 观察阻断TGF- β 和Activin A信号转导通路共同的下

游信号蛋白SMAD3, 是否能有效解除TGF- β 和Activin A对肝再生的终止作用。本实验中Real-Time PCR和SMAD3免疫组织化学结果表明, 经

脾脏注射SMAD3 shRNA能在不同水平有效抑

■同行评价

本文针对肝再生终止阶段的重要细胞因子TGF- β 和Activin,应用shRNA慢病毒来抑制SMAD3这一共同信号蛋白的表达,观察其对肝再生的作用,有一定的创新性和参考价值。

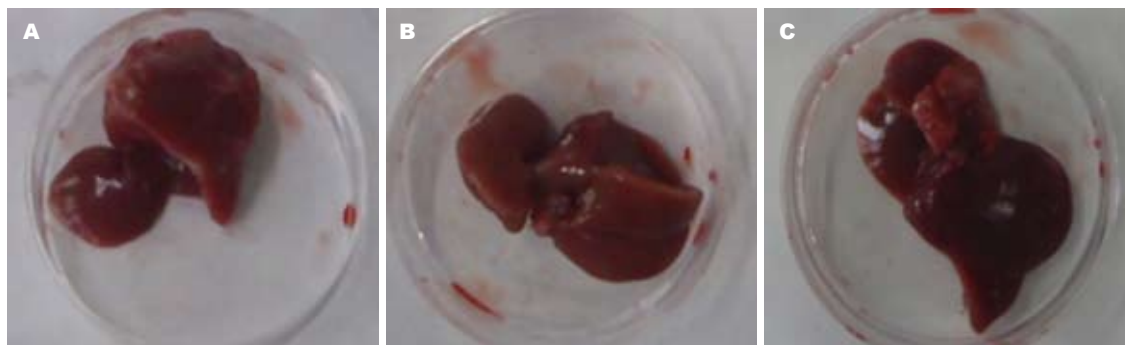


图 5 造模96 h各组大鼠肝脏情况. A: 生理盐水对照组; B: shRNA对照组; C: SMAD3 shRNA组.

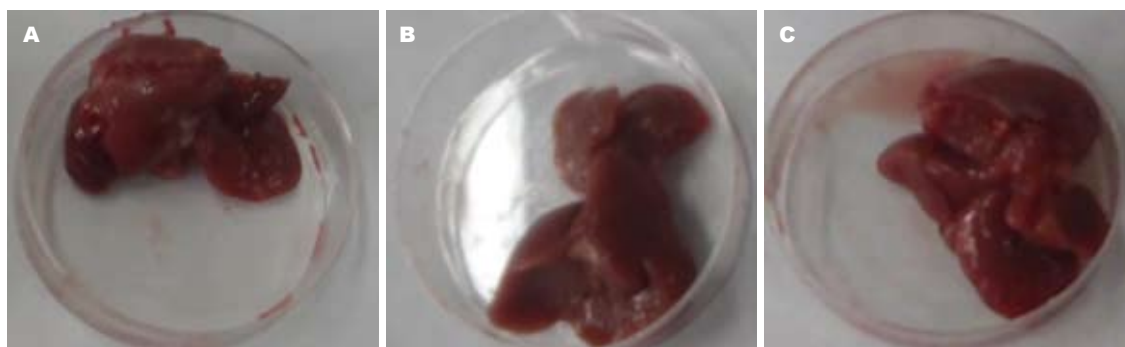


图 6 造模144 h各组大鼠肝脏情况. A: 生理盐水对照组; B: shRNA对照组; C: SMAD3 shRNA组.

表 2 144 h大鼠残肝质量及与体质量比值的变化

分组	<i>n</i>	肝质量(g)	肝质量/体质量(%)
生理盐水对照组	9	7.87 \pm 0.76	4.15 \pm 0.51
shRNA对照组	6	7.51 \pm 0.82	4.20 \pm 0.34
SMAD3 shRNA组	8	8.34 \pm 0.88	4.66 \pm 0.54

制SMAD3的表达,其中Real-Time PCR结果显示,shRNA SMAD3组与shRNA对照组相比,SMAD3 mRNA在96 h表达量下降73%,在144 h下降63%。

Ki-67抗原是一种和细胞增殖密切相关的细胞标志物^[22-24],他只存在于细胞核中,除G₀期外,其他细胞周期都表达Ki-67,且半衰期很短,在有丝分裂期结束后就迅速降解消失,所以被认为是较为理想的检测细胞增殖活性的指标之一^[22,25]。本研究Ki67免疫组织化学结果显示,分别和生理盐水对照组、shRNA对照组相比,SMAD3 shRNA组中处于细胞增殖期的细胞明显增多,说明抑制TGF- β 和Activin A共同的下游细胞信号蛋白SMAD3,可以有效打破TGF- β 和Activin A抑制肝细胞增殖的作用。同时可以看到96 h时间点处于增殖期的细胞明显多于144 h时间点,表明肝大部切除术后144 h处于增殖阶段的细胞已不多,肝再生接近终止阶段。

本文通过大鼠残肝质量及与体质量比值的变化发现,在96 h和144 h 2个时间点,与生理盐水对照组及shRNA对照组相比,SMAD3 shRNA组肝质量/体质量有上升趋势,但没有统计学意义。对于这种结果,考虑可能原因有:(1)对于TGF- β ,除了SMAD途径外,TGF- β 还可通过其他途径参与肝再生的终止过程。譬如TGF- β 还可通过调节JNK/AP-1活性来实现诱导肝细胞凋亡^[26],也可通过死亡相关蛋白(death-associated protein, Daxx)途径诱导肝细胞凋亡;(2)非TGF- β 途径也参与肝再生的终止。研究发现,细胞周期素抑制因子,细胞周期依赖性激酶抑制素(cyclin-dependent kinase inhibitors, CKI)^[27,28],下调IL-6/STAT3信号通路活性的细胞因子信号抑制因子(suppressors of cytokine signalling, SOCS)等^[29],均在肝再生终止阶段均发挥了重要的负调控作用;(3)Boulton等^[30]在对IL-1的研究中发现,2/3肝大部切除术后,IL-1 mRNA在肝细胞正进入细胞周期和DNA合成开始启动的术后10 h下调,而在肝细胞增殖旺盛的术后24-48 h上调,在肝细胞DNA合成基本完成的术后72 h IL-1 mRNA水平又下调。因此,有学者认为IL-1是除TGF- β 之外的又一个强有力的肝细胞增殖抑制因子。

总之,肝再生的启动与终止是一个复杂的过

程, 本研究通过阻断SMAD3表达, 在大鼠肝大部切除术后96 h和144 h 2个时间点, 观察大鼠残肝质量及与体质量比值的变化发现, 与生理盐水对照组及shRNA对照组相比, SMAD3 shRNA组肝质量/体质量有上升趋势, 但没有统计学意义。考虑在肝再生终止阶段, 非SMAD的途径和非TGF- β 途径也参与了肝再生的终止, 使SMAD3的阻断作用不明显。促进肝再生还需要从多种因素调控入手, 这需要进行进一步研究。

志谢 感谢赵军、丁美同志等在本试验中给予的大力帮助。

4 参考文献

- Zhang YQ, Mashima H, Kanzaki M, Shibata H, Kojima I. Assessment of the role of activin A and transforming growth factor beta in the regulation of AML12 cell growth. *Hepatology* 1997; 25: 1370-1375
- Schwarte-Waldhoff I, Volpert OV, Bouck NP, Sipos B, Hahn SA, Klein-Scory S, Lüttges J, Klöppel G, Graeven U, Eilert-Micus C, Hintelmann A, Schmiegel W. Smad4/DPC4-mediated tumor suppression through suppression of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 9624-9629
- Jones CP, Gregory LG, Causton B, Campbell GA, Lloyd CM. Activin A and TGF- β promote T(H)9 cell-mediated pulmonary allergic pathology. *J Allergy Clin Immunol* 2012; 129: 1000-1010. e3
- Moffatt MF, Gut IG, Demenais F, Strachan DP, Bouzigon E, Heath S, von Mutius E, Farrall M, Lathrop M, Cookson WO. A large-scale, consortium-based genome-wide association study of asthma. *N Engl J Med* 2010; 363: 1211-1221
- Lipardi C, Wei Q, Paterson BM. RNAi as random degradative PCR: siRNA primers convert mRNA into dsRNAs that are degraded to generate new siRNAs. *Cell* 2001; 107: 297-307
- 郑素军, 林汝仙, 夏云, 黄爱龙, 钟森, 王升启, 任红. KDR为靶的反义寡核苷酸、siRNA活性比较. 重庆医科大学学报 2005; 30: 340-344, 382
- Caplen NJ, Parrish S, Imani F, Fire A, Morgan RA. Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 9742-9747
- 夏云, 林汝仙, 郑素军, 张敏丽, 王升启. 靶向端粒酶逆转录酶(hTERT)RNAi载体的构建及活性评价. 生物化学与生物物理进展 2004; 31: 1079-1084
- 郑素军, 夏云, 任红, 钟森, 杨英, 陶鹏, 王升启. 端粒酶逆转录酶小干扰RNA对肝癌细胞的体外抑制作用. 中华肝脏病杂志 2004; 12: 530-533
- Zender L, Hutker S, Liedtke C, Tillmann HL, Zender S, Mundt B, Waltemathe M, Gosling T, Flemming P, Malek NP, Trautwein C, Manns MP, Kuhnel F, Kubicka S. Caspase 8 small interfering RNA prevents acute liver failure in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 7797-7802
- Ying RS, Zhu C, Fan XG, Li N, Tian XF, Liu HB, Zhang BX. Hepatitis B virus is inhibited by RNA interference in cell culture and in mice. *Antiviral Res* 2007; 73: 24-30
- George J, Tsutsumi M. siRNA-mediated knock-down of connective tissue growth factor prevents N-nitrosodimethylamine-induced hepatic fibrosis in rats. *Gene Ther* 2007; 14: 790-803
- Nishitsuji H, Kohara M, Kannagi M, Masuda T. Effective suppression of human immunodeficiency virus type 1 through a combination of short- or long-hairpin RNAs targeting essential sequences for retroviral integration. *J Virol* 2006; 80: 7658-7666
- 陈鹏, 郑素军, 王世美, 张建军, 邢欣悦, 张莹, 刘梅, 段钟平. 靶向大鼠Smad3基因的siRNA筛选及其shRNA重组慢病毒的构建. 临床肝胆病杂志 2011; 27: 533-537
- 郑素军, 邢欣悦, 武聚山, 王世美, 张莹, 韩源平, 俞豪, 陈煜, 刘梅, 段钟平. Smad3 shRNA抑制TGF β 1对HSC-T6细胞活化的抗肝纤维化作用. 临床肝胆病杂志 2012; 28: 289-295
- Fukuhara Y, Hirasawa A, Li XK, Kawasaki M, Fujino M, Funeshima N, Katsuma S, Shiojima S, Yamada M, Okuyama T, Suzuki S, Tsujimoto G. Gene expression profile in the regenerating rat liver after partial hepatectomy. *J Hepatol* 2003; 38: 784-792
- Xu CS, Chang CF, Yuan JY, Li WQ, Han HP, Yang KJ, Zhao LF, Li YC, Zhang HY, Rahman S, Zhang JB. Expressed genes in regenerating rat liver after partial hepatectomy. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 2932-2940
- Sato Y, Igarashi Y, Hakamata Y, Murakami T, Kaneko T, Takahashi M, Seo N, Kobayashi E. Establishment of Alb-DsRed2 transgenic rat for liver regeneration research. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 311: 478-481
- Nakamura T, Ueno T, Sakamoto M, Sakata R, Torimura T, Hashimoto O, Ueno H, Sata M. Suppression of transforming growth factor-beta results in upregulation of transcription of regeneration factors after chronic liver injury. *J Hepatol* 2004; 41: 974-982
- Chari RS, Price DT, Sue SR, Meyers WC, Jirtle RL. Down-regulation of transforming growth factor beta receptor type I, II, and III during liver regeneration. *Am J Surg* 1995; 169: 126-131; discussion 131-132
- Oe S, Lemmer ER, Conner EA, Factor VM, Levéen P, Larsson J, Karlsson S, Thorgeirsson SS. Intact signaling by transforming growth factor beta is not required for termination of liver regeneration in mice. *Hepatology* 2004; 40: 1098-1105
- Soares A, Govender L, Hughes J, Mavakla W, de Kock M, Barnard C, Pienaar B, Janse van Rensburg E, Jacobs G, Khomba G, Stone L, Abel B, Scriba TJ, Hanekom WA. Novel application of Ki67 to quantify antigen-specific in vitro lymphoproliferation. *J Immunol Methods* 2010; 362: 43-50
- Zhang Y, Zhang Y, Bone RN, Cui W, Peng JB, Siegal GP, Wang H, Wu H. Regeneration of pancreatic non- β endocrine cells in adult mice following a single diabetes-inducing dose of streptozotocin. *PLoS One* 2012; 7: e36675
- Rahmanzadeh R, Hüttmann G, Gerdes J, Scholzen T. Chromophore-assisted light inactivation of pKi-67 leads to inhibition of ribosomal RNA synthesis. *Cell Prolif* 2007; 40: 422-430
- Schmidt SC, Schumacher G, Klage N, Chopra S, Neuhaus P, Neumann U. The impact of carbon dioxide pneumoperitoneum on liver regeneration after liver resection in a rat model. *Surg Endosc* 2010; 24: 1-8
- Granado-Serrano AB, Martín MA, Bravo L, Goya

- L, Ramos S. Quercetin modulates NF-kappa B and AP-1/JNK pathways to induce cell death in human hepatoma cells. *Nutr Cancer* 2010; 62: 390-401
- 27 Poon RY, Toyoshima H, Hunter T. Redistribution of the CDK inhibitor p27 between different cyclin. CDK complexes in the mouse fibroblast cell cycle and in cells arrested with lovastatin or ultraviolet irradiation. *Mol Biol Cell* 1995; 6: 1197-1213
- 28 Iavarone A, Massagué J. Repression of the CDK activator Cdc25A and cell-cycle arrest by cytokine TGF-beta in cells lacking the CDK inhibitor p15. *Nature* 1997; 387: 417-422
- 29 Riehle KJ, Dan YY, Campbell JS, Fausto N. New concepts in liver regeneration. *J Gastroenterol Hepatol* 2011; 26 Suppl 1: 203-212
- 30 Boulton RA, Alison MR, Golding M, Selden C, Hodgson HJ. Augmentation of the early phase of liver regeneration after 70% partial hepatectomy in rats following selective Kupffer cell depletion. *J Hepatol* 1998; 29: 271-280

编辑 田滢 电编 闫晋利

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

• 消息 •

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)

甘草酸二铵对溃疡性结肠炎大鼠M30表达的影响

原皓, 王鹤鸣, 赵雪曼

原皓, 王鹤鸣, 赵雪曼, 潍坊医学院临床学院 山东省潍坊市 261042

原皓, 副教授, 主要从事消化系统疾病的研究。

山东省自然科学基金资助项目, No. ZR2010HM089

作者贡献分布: 此课题由原皓设计; 研究过程由王鹤鸣与赵雪曼共同完成; 数据分析由王鹤鸣完成; 论文写作由原皓与王鹤鸣完成。

通讯作者: 原皓, 副教授, 261042, 山东省潍坊市虞河路465号, 潍坊医学院临床学院消化内科。91chuhan@163.com

电话: 0536-8068912

收稿日期: 2012-09-04 修回日期: 2012-12-10

接受日期: 2012-12-17 在线出版日期: 2012-12-18

Treatment with diammonium glycyrrhizinate down-regulates M30 expression in ulcerative colitis in rats

Hao Yuan, He-Ming Wang, Xue-Man Zhao

Hao Yuan, He-Ming Wang, Xue-Man Zhao, Clinical College of Weifang Medical University, Weifang 261042, Shandong Province, China

Supported by: the National Natural Science Foundation of Shandong Province, No. ZR2010HM089

Correspondence to: Hao Yuan, Associate Professor, Department of Gastroenterology, Clinical College of Weifang Medical University, 465 Yuhe Avenue, Weifang 261042, Shandong Province, China. 91chuhan@163.com

Received: 2012-09-04 Revised: 2012-12-10

Accepted: 2012-12-17 Published online: 2012-12-18

Abstract

AIM: To assess the therapeutic effect of diammonium glycyrrhizinate (DG) on 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)-induced ulcerative colitis in rats and to explore the underlying mechanisms by detecting the expression of M30 and Fas/FasL.

METHODS: Thirty Wistar rats were equally randomized into a normal control group, a model group and a DG group. Ulcerative colitis was induced in the DG group and model group with TNBS by enema. After ten days, all rats were killed. Disease activity index (DAI), colon macroscopic damage score (CMDs) and histological damage score were calculated, and the expression of M30 and Fas/FasL in the colonic mucosa was detected by immunohistochemistry.

RESULTS: Compared to normal controls, the

DAI, CMDs and histological damage score significantly increased in model rats (7.06 ± 0.80 vs 0.32 ± 0.14 ; 6.03 ± 0.61 vs 0.19 ± 0.16 ; 5.84 ± 0.53 vs 0.22 ± 0.11 , $P < 0.01$). Compared to the model group, the above parameters were significantly improved in the DG group (3.33 ± 0.27 vs 7.06 ± 0.80 ; 3.29 ± 0.36 vs 6.03 ± 0.61 ; 2.98 ± 0.24 vs 5.84 ± 0.53 , $P < 0.05$). Compared to the normal control group, the expression of M30 and Fas/FasL was up-regulated in the model group and DG group (5.76 ± 0.66 vs 0.42 ± 0.18 ; 26.62 ± 4.20 vs 10.81 ± 2.20 ; 17.11 ± 3.12 vs 6.02 ± 1.02 , $P < 0.01$). Compared to the model group, the expression of M30 and Fas/FasL was remarkably decreased in the DG group (2.24 ± 0.48 vs 5.76 ± 0.66 ; 17.23 ± 3.20 vs 26.62 ± 4.20 ; 11.02 ± 2.12 vs 17.11 ± 3.12 , $P < 0.05$).

CONCLUSION: Treatment with DG could reduce inflammatory injury in rats with experimental ulcerative colitis possibly by reducing the expression Fas/FasL and inhibiting apoptosis of cells in the colonic mucosa.

Key Words: Ulcerative colitis; Diammonium glycyrrhizinate; M30; Fas/FasL; Apoptosis

Yuan H, Wang HM, Zhao XM. Treatment with diammonium glycyrrhizinate down-regulates M30 expression in ulcerative colitis in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(35): 3439-3444

摘要

目的: 观察甘草酸二铵(diammonium glycyrrhizinate, DG)对2, 4, 6-三硝基苯磺酸(2, 4, 6-trinitrobenzene sulfonic acid, TNBS)诱导的大鼠溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)的疗效及其对大鼠结肠组织M30及Fas/FasL蛋白表达的影响, 继而从细胞凋亡方面探讨DG治疗大鼠UC可能的作用机制。

方法: ♀ Wistar大鼠30只, 随机分为正常对照组、模型组和DG组, 每组10只。用TNBS/乙醇灌肠法复制大鼠UC模型, 10 d后收集结肠标本, 观察大鼠疾病活动指数(disease activity index, DAI)、结肠大体形态损伤评分和组织学改变, 用免疫组织化学法观察大鼠结肠黏膜中M30及Fas/FasL蛋白的表达。

■背景资料

甘草酸二铵(DG)对大鼠溃疡性结肠炎(UC)有较好的治疗作用, 能够降低炎症因子的表达, 显著抑制炎症反应, 减轻结肠黏膜损伤。

■同行评议者

任粉玉, 教授, 延边大学附属医院消化内科

■研究前沿

UC的发病率及复发率有升高的趋势,其传统治疗的不良反应逐渐显现,寻找新的、更有效的治疗方法一直是近几年的研究热点。

结果:与正常对照组相比, DG组、模型组DAI评分、结肠大体形态损伤评分和组织学损伤评分均显著增高(7.06 ± 0.80 vs 0.32 ± 0.14 ; 6.03 ± 0.61 vs 0.19 ± 0.16 ; 5.84 ± 0.53 vs 0.22 ± 0.11 , $P < 0.01$); 而与模型组相比, DG治疗组能显著改善UC症状(3.33 ± 0.27 vs 7.06 ± 0.80 ; 3.29 ± 0.36 vs 6.03 ± 0.61 ; 2.98 ± 0.24 vs 5.84 ± 0.53 , $P < 0.05$)。模型组大鼠M30及Fas/FasL蛋白表达水平明显高于正常组(5.76 ± 0.66 vs 0.42 ± 0.18 ; 26.62 ± 4.20 vs 10.81 ± 2.20 ; 17.11 ± 3.12 vs 6.02 ± 1.02 , $P < 0.01$); 与模型组相比, DG治疗组M30及Fas/FasL蛋白表达显著降低(2.24 ± 0.48 vs 5.76 ± 0.66 ; 17.23 ± 3.20 vs 26.62 ± 4.20 ; 11.02 ± 2.12 vs 17.11 ± 3.12 , $P < 0.05$)。

结论:DG对TNBS诱导的大鼠UC有较好的疗效, DG通过下调Fas/FasL的表达抑制结肠上皮细胞的凋亡, 这可能是其减轻结肠黏膜损伤的机制之一。

关键词:溃疡性结肠炎; 甘草酸二铵; Fas/FasL; M30; 细胞凋亡

原皓, 王鹤鸣, 赵雪曼. 甘草酸二铵对溃疡性结肠炎大鼠M30表达的影响. 世界华人消化杂志 2012; 20(35): 3439-3444
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3439.asp>

0 引言

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是一种由免疫介导的结肠慢性炎症性疾病, 以腹痛、腹泻及黏液脓血便为临床特点, 多表现为发作期与缓解期交替。肠道免疫系统功能障碍是UC炎症反应的主要机制^[1,2]。已有研究表明, 结肠上皮细胞异常凋亡参与UC的发生^[3-6]。上皮细胞过度凋亡导致黏膜脱落缺失, 在UC病理过程中起重要的作用。尽管针对UC病理过程中免疫途径及炎症反应的治疗已取得实质性的进展, 但尚无有效的治愈UC且不良作用小的特效药物^[7,8]。传统的治疗药物, 包括5-氨基水杨酸、糖皮质激素及免疫抑制剂等已出现了令人不满的效果, UC的复发率正逐渐上升^[9]。因此, 寻找新的、更有效的治疗方法一直是近几年研究的热点。我们之前的研究已经证实, 甘草酸二铵(diammonium glycyrrhizinate, DG)对大鼠UC有较好的治疗作用, 能够显著抑制炎症反应, 减轻结肠黏膜损伤^[10,11]。进一步的研究表明, 其抗炎机制与降低炎症因子的表达, 影响炎症反应信号通路等因素有关^[12-14]。本研究旨在进一步证实DG对UC疗效的基础上, 通过观察DG对结肠黏膜M30及

Fas/FasL蛋白表达的影响, 从影响上皮细胞凋亡的角度来探讨其减轻结肠黏膜损伤的作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料 健康♀Wistar大鼠30只, 体质量200 g \pm 10 g, 由山东中医药大学动物中心提供; 2, 4, 6-三硝基苯磺酸(2, 4, 6-trinitrobenzene sulfonic acid, TNBS, 美国Sigma公司); DG注射液(商品名: 甘利欣, 江苏正大天晴药业股份有限公司); 兔抗大鼠Fas、FasL多克隆抗体(北京博奥森生物技术有限公司); M30单克隆抗体(瑞士PEVIVA公司); 免疫组织化学SP试剂盒、浓缩型DAB显色剂(北京中杉金桥生物有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 造模与分组: 30只健康♀Wistar大鼠适应性喂养1 wk后随机分为正常对照组、模型组和DG组, 每组10只, 常规禁食24 h, 10%水合氯醛4.5 mL/kg腹腔麻醉后, 按照文献所述^[15], 将TNBS与无水乙醇等比例混匀, DG组和模型组大鼠用聚乙烯导管由肛门缓慢插入结肠约8 cm, 然后将混合药液2 mL(以50 mg/kg计算)缓慢注入, 正常组大鼠灌注等量生理盐水。根据人与大鼠的药物剂量折算系数算出DG的应用剂量40 mg/(kg·d), 用生理盐水稀释至2 mL, 缓慢腹腔注入; 造模当天作为第1天, DG组第1-10天腹腔注射DG; 正常对照组及模型组第1-10天腹腔注射2 mL生理盐水。

1.2.2 标本制备: 造模10 d后, 10%水合氯醛麻醉大鼠, 称质量后处死动物, 迅速剖取距肛门8 cm结肠组织, 沿肠系膜纵轴切开, 于冷生理盐水中冲洗干净, 分别在距肛门3、5和8 cm处留取结肠组织, 另于溃疡或炎症严重处留取组织, 用4%多聚甲醛固定, 常规石蜡包埋、切片, 行HE染色及免疫组织化学检测。

1.2.3 结肠炎症评价: 采用疾病活动指数(disease activity index, DAI)、大体形态损伤评分及组织学损伤评分来评价结肠炎症。(1)DAI评分: 造模后10 d, 综合大鼠体质量下降百分率、大便性状和大便出血情况, 根据Maines等^[16]提出的评分标准进行积分(表1); (2)大体形态损伤评分参考Wallace等提出的评分标准, 并稍作修改^[17,18]: 0分, 无炎症; 1分, 局部充血, 无溃疡; 2分, 溃疡不伴充血; 3分, 1处溃疡伴黏连; 4分, 2处或多处溃疡伴炎症; 5分, >2处溃疡和/或溃疡>1 cm; 6-8分, 溃疡>2 cm, 病变范围每增加1 cm, 增加1分; (3)组织学损伤评分^[19]: 选10个视野($\times 100$)平均评分。评分标准: 0分, 正常结肠黏膜; 1分, 隐窝缺

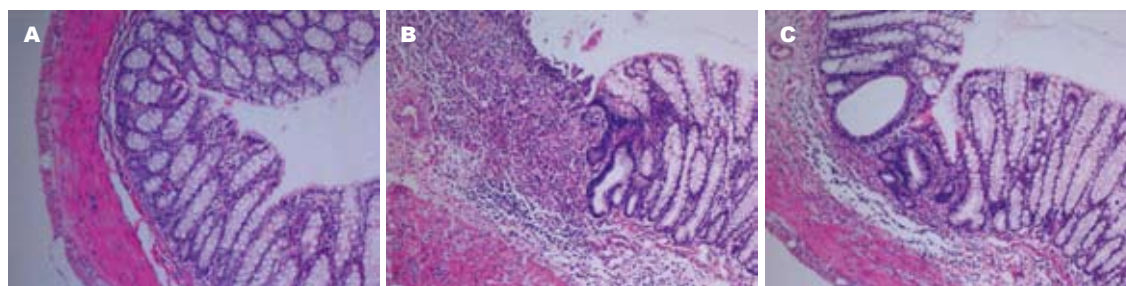


图 1 各组大鼠的结肠病理组织(HE, ×100). A: 正常组; B: 模型组; C: 甘草酸二铵组.

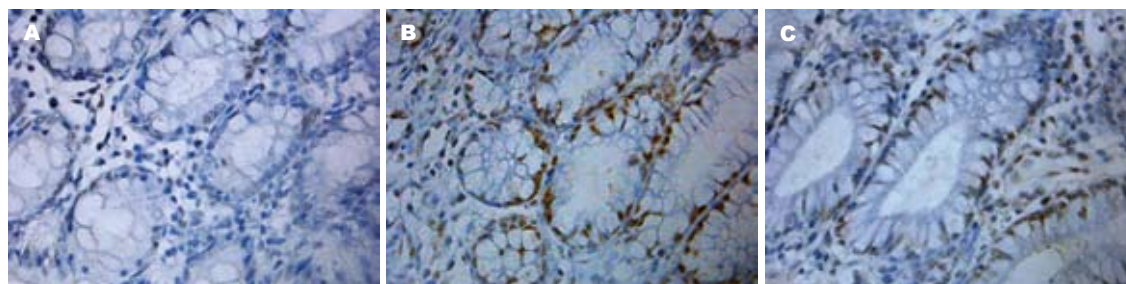


图 2 各组大鼠结肠黏膜M30的表达(SP, ×400). A: 正常组; B: 模型组; C: 甘草酸二铵组.

■ 相关报道

研究表明, 肠上皮细胞异常凋亡在UC病理过程中起重要作用, Fas/FasL系统是诱导其细胞凋亡的重要途径之一.

表 1 疾病活动指数评分标准

得分	体质量下降百分率(%)	大便性状	大便出血
0	0	正常	阴性
1	1-5		
2	6-10	松散大便	阳性
3	11-15		
4	>15	腹泻	显性出血

损1/3时; 2分, 隐窝缺损2/3; 3分, 固有层覆盖单层上皮伴轻度炎性细胞浸润; 4分, 黏膜糜烂、溃疡伴显著炎性细胞浸润.

1.2.4 M30及Fas/FasL蛋白的检测: 采用免疫组织化学SP法检测M30及Fas/FasL蛋白的表达. 按照试剂盒操作步骤进行. 结果判断: 封片后, 每张切片随机选取5个高倍视野, 计数1 000个细胞, 计算阳性细胞百分比.

统计学处理 数据用 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示, 用SPSS17.0软件进行统计分析, 对数据行单因素方差分析(one-way analysis of variance, one-way ANOVA), 再用SNK- q 检验进行组间比较. $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 大鼠一般状况及结肠炎症评分 TNBS组大鼠造模后出现进食及活动明显减少, 体质量下降, 伴有稀便、黏液脓血便, 肛周污秽. 肉眼可见结肠肠腔扩张, 肠壁增厚, 充血水肿明显, 有溃疡

形成, 病变严重处肠段呈黑褐色. 光镜下见上皮缺损, 隐窝脓肿, 腺体破坏, 杯状细胞减少, 大量炎性细胞浸润, 病变符合UC病理改变, 说明造模成功. 治疗10 d后, DG组体质量增加, 大便性状明显改善, 肉眼见肠壁充血水肿明显减轻, 光镜见下上皮及溃疡得到不同程度修复, 炎症细胞浸润减轻. 与正常对照组相比, DG组、模型组大鼠DAI评分、结肠大体形态损伤评分及组织学损伤评分显著升高($P < 0.01$), 而与模型组相比, DG组显著改善($P < 0.05$, 表2, 图1).

2.2 M30免疫组织化学染色结果 M30阳性表现为细胞浆染色. 在正常结肠黏膜偶见M30阳性凋亡细胞出现在肠腔黏膜表面, 而在溃疡黏膜及其周围可见较多M30阳性凋亡细胞呈小灶性聚集出现, 肠腔表面及整个结肠隐窝的上皮细胞都可见到凋亡细胞. DG干预治疗后, 凋亡细胞明显减少, 且主要分布于肠腔表面, 与模型组相比, M30阳性细胞率显著降低($P < 0.05$). 结果说明DG能明显抑制结肠上皮细胞早期的凋亡(表3, 图2).

2.3 Fas/FasL免疫组织化学染色结果 Fas阳性在上皮细胞表现为胞浆染色, 在炎性细胞表现为细胞膜染色. 正常组和造模组, 结肠黏膜肠腔表面上皮细胞Fas均有表达, 呈连续性分布. 模型组Fas在整个结肠隐窝底部、隐窝两侧的上皮细胞都有表达, 且炎性细胞(淋巴细胞、单核细胞等)表达Fas也明显增多. DG组中, 无论是上皮细胞还是固有层炎症细胞Fas阳性表达显著减少, Fas

■创新盘点

本研究用DG治疗UC大鼠,通过观察其对肠黏膜M30蛋白表达的影响检测其对肠上皮细胞凋亡的影响,探讨其治疗大鼠UC的作用机制。

表 2 各组大鼠结肠炎症评分 (mean \pm SD)

分组	疾病活动指数	大体形态损伤评分	组织学损伤评分
模型组	7.06 \pm 0.80 ^b	6.03 \pm 0.61 ^b	5.84 \pm 0.53 ^b
甘草酸二铵组	3.33 \pm 0.27 ^{bc}	3.29 \pm 0.36 ^{bc}	2.98 \pm 0.24 ^{bc}
正常对照组	0.32 \pm 0.14	0.19 \pm 0.16	0.22 \pm 0.11

^b P <0.01 vs 正常对照组; ^c P <0.05 vs 模型组。

表 3 M30及Fas/FasL蛋白在各组大鼠结肠中的表达 (mean \pm SD)

分组	M30阳性细胞率(%)	Fas阳性细胞率(%)	FasL阳性细胞率(%)
模型组	5.76 \pm 0.66 ^b	26.62 \pm 4.20 ^b	17.11 \pm 3.12 ^b
甘草酸二铵组	2.24 \pm 0.48 ^{bc}	17.23 \pm 3.20 ^{bc}	11.02 \pm 2.12 ^{bc}
正常对照组	0.42 \pm 0.18	10.81 \pm 2.20	6.02 \pm 1.02

^b P <0.01 vs 正常对照组; ^c P <0.05 vs 模型组。

阳性细胞率较模型组均明显降低(P <0.05, 表3), 提示DG抑制了Fas表达。

FasL阳性表现为细胞浆染色。正常对照组中, 仅在固有层内的少许单核细胞中表达。模型组中, FasL在固有层内淋巴细胞、浆细胞、单核细胞及上皮细胞表达明显增加。DG组中, FasL的阳性表达较模型组明显减轻, 主要见于淋巴细胞, 与模型组相比, FasL阳性细胞率显著降低(P <0.05, 表3), 说明DG能抑制FasL表达。

2.4 各指标相关性分析 模型组结肠黏膜M30、Fas及FasL的表达程度与组织损伤评分, 均有一定的相关性($r = 0.38, 0.42, 0.40, P$ <0.05)。造模后大鼠结肠黏膜Fas表达与上皮细胞M30表达具有相关性($r = 0.38, P$ <0.05)。

3 讨论

本实验通过对各组大鼠结肠炎症评分进行比较, 显示DG对UC大鼠的DAI、结肠大体形态损伤和组织学损伤评分有明显的改善作用, 说明DG对TNBS诱导的大鼠UC有良好的治疗作用。

细胞凋亡是一种由基因控制的细胞程序性死亡的过程^[20], 能调控机体发育, 维护内环境稳定。虽然UC的发病机制尚不明确, 但大量的研究表明, 在UC病理过程中, 细胞凋亡参与了UC结肠黏膜的损伤, 大量的炎性细胞因子, 如肿瘤坏死因子、白细胞介素和干扰素家族等, 能够诱发结肠上皮细胞异常凋亡^[16,21]。UC结肠黏膜的凋亡主要见于肠腔上皮细胞, 在活动期UC急性炎症部位及临近的隐窝上皮细胞凋亡明显

增加^[22,23], 过度的上皮细胞凋亡可以破坏肠黏膜的完整性和屏障功能导致结肠黏膜的损伤和溃疡形成^[24,25]。因此, 抑制UC肠黏膜细胞的凋亡, 将会起到对UC结肠黏膜的保护作用。

在上皮细胞凋亡早期, 半胱天冬蛋白酶Caspase能够特异性裂解细胞角蛋白18(CK18), 引导凋亡发生, Caspase裂解的CK18暴露出新的抗原表位(M30蛋白), 能够被M30单克隆抗体特异性的识别, 而M30抗体不会与正常细胞或坏死细胞上未断裂的CK18结合^[26]。因此, M30抗体能够特异性检测上皮细胞早期凋亡, M30阳性细胞百分率可作为凋亡指数^[27]。用M30抗体检测细胞凋亡较传统的终端脱氧核糖核苷酸转移酶介导的缺口末端标记法和原位末端标记法操作简便、灵敏, 因此本实验采用M30蛋白作为检测指标, 来观察DG对UC大鼠结肠上皮细胞凋亡的影响。结果显示DG能显著降低M30蛋白的产生, 说明DG对UC大鼠结肠上皮细胞的凋亡有显著的抑制作用。

Fas/FasL是一种死亡受体介导的细胞凋亡途径, 正常结肠上皮细胞表达Fas, 其配体FasL与Fas结合形成死亡诱导信号复合物诱导细胞凋亡, 这一机制在维持肠上皮细胞增殖和凋亡平衡过程中起重要作用^[28]。Fas/FasL在肠上皮细胞主要是通过caspase介导细胞凋亡信号的转导^[29]。而且研究发现, Fas/FasL系统也是UC上皮细胞异常凋亡的重要途径之一, 在UC病变组织中, FasL阳性细胞数量明显增加, 从而导致表达Fas的结肠上皮细胞凋亡增加^[30]。本研究结果显

示, DG能显著抑制Fas及FasL的表达, 提示DG对这一凋亡途径有抑制作用。

本研究结果还显示, UC结肠黏膜M30、Fas及FasL的表达程度与组织损伤评分均有一定的相关性, 进一步证明了细胞凋亡参与了UC结肠黏膜的病理变化过程, 抑制细胞凋亡就能够减小UC对黏膜的损伤; 结果还显示结肠黏膜Fas表达与上皮细胞M30表达也具有相关性, 而且M30与Fas的阳性表达部位一致, 提示UC时结肠上皮细胞的早期凋亡也是通过Fas/FasL途径介导, 这也与已有的研究结果相符^[31]。而且这也提示, DG对UC结肠黏膜上皮细胞凋亡的抑制作用是通过Fas/FasL表达的抑制实现的。

总之, DG对TNBS诱导的大鼠UC具有良好的治疗作用, 通过抑制Fas/FasL途径介导的结肠上皮细胞的早期凋亡, 减少肠上皮细胞缺失、损伤, 增强肠黏膜屏障作用, 可能是其治疗机制之一。

4 参考文献

- Jin Y, Hofseth AB, Cui X, Windust AJ, Poudyal D, Chumanevich AA, Matesic LE, Singh NP, Nagarkatti M, Nagarkatti PS, Hofseth LJ. American ginseng suppresses colitis through p53-mediated apoptosis of inflammatory cells. *Cancer Prev Res (Phila)* 2010; 3: 339-347
- 温杨, 万朝敏. 益生菌大肠埃希菌EcN研究进展. *中国实用内科杂志* 2012; 32: 714-716
- Yu QT, Saruta M, Papadakis KA. Visilizumab induces apoptosis of mucosal T lymphocytes in ulcerative colitis through activation of caspase 3 and 8 dependent pathways. *Clin Immunol* 2008; 127: 322-329
- Salim SY, Söderholm JD. Importance of disrupted intestinal barrier in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis* 2011; 17: 362-381
- Günther C, Neumann H, Neurath MF, Becker C. Apoptosis, necrosis and necroptosis: cell death regulation in the intestinal epithelium. *Gut* 2012 Jun 27. [Epub ahead of print]
- Buczyński J, Spychalski M, Ławska-Wierchniewska A, Dziki A. Higher apoptosis index and proliferation index in colonocytes of patients with ulcerative colitis in remission. *Pol Przegl Chir* 2012; 84: 271-275
- Jun CD, Kim Y, Choi EY, Kim M, Park B, Youn B, Yu K, Choi KS, Yoon KH, Choi SC, Lee MS, Park KI, Choi M, Chung Y, Oh J. Gliotoxin reduces the severity of trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in mice: evidence of the connection between heme oxygenase-1 and the nuclear factor-kappaB pathway in vitro and in vivo. *Inflamm Bowel Dis* 2006; 12: 619-629
- Cheon JH, Kim JS, Kim JM, Kim N, Jung HC, Song IS. Plant sterol guggulsterone inhibits nuclear factor-kappaB signaling in intestinal epithelial cells by blocking IkappaB kinase and ameliorates acute murine colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2006; 12: 1152-1161
- Liu X, Wang JM. Iridoid glycosides fraction of *Folium syringae* leaves modulates NF- κ B signal pathway and intestinal epithelial cells apoptosis in experimental colitis. *PLoS One* 2011; 6: e24740
- Yuan H, Ji WS, Wu KX, Jiao JX, Sun LH, Feng YT. Anti-inflammatory effect of Diammonium Glycyrhizinate in a rat model of ulcerative colitis. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 4578-4581
- 原皓, 林三仁, 吴克香, 顾芳, 张红梅, 高志星, 焦建新. 甘草酸二铵对大鼠结肠炎的抗炎作用机制研究. *中华消化杂志* 2006; 26: 22-25
- 原皓, 吴克香, 史有奎, 高志星, 冯玉光, 李蕾. 甘草酸二铵对溃疡性结肠炎大鼠促炎细胞因子IL-6、IL-8、TNF- α 的影响. *山东医药* 2006; 46: 5-6
- 原皓, 崔慎茹, 李时光. 甘草酸二铵对溃疡性结肠炎大鼠Foxp3 mRNA表达的影响. *世界华人消化杂志* 2010; 18: 3301-3305
- 原皓, 李时光, 崔慎茹. 甘草酸二铵对溃疡性结肠炎大鼠炎症及MCP-1表达的影响. *山东医药* 2010; 50: 41-42
- Li XL, Cai YQ, Qin H, Wu YJ. Therapeutic effect and mechanism of proanthocyanidins from grape seeds in rats with TNBS-induced ulcerative colitis. *Can J Physiol Pharmacol* 2008; 86: 841-849
- Maines LW, Fitzpatrick LR, French KJ, Zhuang Y, Xia Z, Keller SN, Upson JJ, Smith CD. Suppression of ulcerative colitis in mice by orally available inhibitors of sphingosine kinase. *Dig Dis Sci* 2008; 53: 997-1012
- Wallace JL, Keenan CM, Gale D, Shoupe TS. Exacerbation of experimental colitis by nonsteroidal anti-inflammatory drugs is not related to elevated leukotriene B4 synthesis. *Gastroenterology* 1992; 102: 18-27
- Bobin-Dubigeon C, Collin X, Grimaud N, Robert JM, Le Baut G, Petit JY. Effects of tumour necrosis factor-alpha synthesis inhibitors on rat trinitrobenzene sulphonic acid-induced chronic colitis. *Eur J Pharmacol* 2001; 431: 103-110
- Kriegelstein CF, Cerwinka WH, Laroux FS, Grisham MB, Schürmann G, Brüwer M, Granger DN. Role of appendix and spleen in experimental colitis. *J Surg Res* 2001; 101: 166-175
- 刘迎春, 冀润利, 王献坤. 肠安康胶囊对大鼠溃疡性结肠炎结肠组织细胞凋亡及细胞因子表达的影响. *山东医药* 2009; 49: 37-39
- Qiu W, Wu B, Wang X, Buchanan ME, Regueiro MD, Hartman DJ, Schoen RE, Yu J, Zhang L. PU-MA-mediated intestinal epithelial apoptosis contributes to ulcerative colitis in humans and mice. *J Clin Invest* 2011; 121: 1722-1732
- Iwamoto M, Koji T, Makiyama K, Kobayashi N, Nakane PK. Apoptosis of crypt epithelial cells in ulcerative colitis. *J Pathol* 1996; 180: 152-159
- Hagiwara C, Tanaka M, Kudo H. Increase in colorectal epithelial apoptotic cells in patients with ulcerative colitis ultimately requiring surgery. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17: 758-764
- Schulzke JD, Bojarski C, Zeissig S, Heller F, Gitter AH, Fromm M. Disrupted barrier function through epithelial cell apoptosis. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1072: 288-299
- Han X, Ren X, Jurickova I, Groschwitz K, Pasternak BA, Xu H, Wilson TA, Hogan SP, Denson LA. Regulation of intestinal barrier function by signal transducer and activator of transcription 5b. *Gut* 2009; 58: 49-58
- West NJ, Courtney ED, Poullis AP, Leicester RJ.

■应用要点

DG能够抑制大鼠UC肠上皮细胞的过度凋亡, 保护肠黏膜屏障功能, 对大鼠UC有良好的治疗作用, 可进一步扩展其临床应用。

■同行评价

本研究观察了甘草酸二铵对溃疡性结肠炎大鼠M30表达的影响, 课题设计合理, 研究结果具有一定的学术意义和价值。

- Apoptosis in the colonic crypt, colorectal adenoma-ta, and manipulation by chemoprevention. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009; 18: 1680-1687
- 27 严瑾, 欧阳钦, 刘卫平, 李甘地, 李俸媛. 溃疡性结肠炎肠上皮细胞的凋亡和增殖. *中华消化内镜杂志* 2001; 18: 161-163
- 28 Souza HS, Tortori CJ, Castelo-Branco MT, Carvalho AT, Margallo VS, Delgado CF, Dines I, Elia CC. Apoptosis in the intestinal mucosa of patients with inflammatory bowel disease: evidence of altered expression of FasL and perforin cytotoxic pathways. *Int J Colorectal Dis* 2005; 20: 277-286
- 29 Liu D, Huang X, Cheng S, Tong W, Wan P, Guan Y, Zhao H. [Regulation of sishen wan on Bax/Bcl-2 mRNA, Fas/FasL in colonic tissue from rats with colitis]. *Zhongguo Zhongyao Zazhi* 2011; 36: 3484-3488
- 30 Hofseth LJ, Hussain SP, Harris CC. p53: 25 years after its discovery. *Trends Pharmacol Sci* 2004; 25: 177-181
- 31 严瑾, 欧阳钦, 陈代云, 刘卫平, 李甘地. 溃疡性结肠炎中Fas/FasL介导的结肠上皮细胞凋亡. *中华消化杂志* 2001; 21: 397-399

编辑 翟欢欢 电编 闫晋利

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》性质、刊登内容及目标

本刊讯 《世界华人消化杂志》[国际标准刊号ISSN 1009-3079 (print), ISSN 2219-2859 (online), 国内统一刊号CN 14-1260/R, Shijie Huaren Xiaohua Zazhi/World Chinese Journal of Digestology], 是一本由来自国内23个省、市、自治区、特别行政区的370位胃肠病学和肝病专家支持的开放存取的同行评议的旬刊杂志, 旨在推广国内各地的胃肠病学和肝病领域临床实践和基础研究相结合的最具有临床意义的原创性及各类评论性的文章, 使其成为一种公众资源, 同时科学家、医生、患者和学生可以通过这样一个不受限制的平台来免费获取全文, 了解其领域的所有的关键的进展, 更重要的是这些进展会为本领域的医务工作者和研究者服务, 为他们的患者及基础研究提供进一步的帮助。

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

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

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

葡聚糖硫酸钠致溃疡性结肠炎大鼠模型的肠道微生态

韩晓霞, 侯天舒, 杨阳, 赵纪岚, 吴巧凤, 余曙光

韩晓霞, 侯天舒, 杨阳, 赵纪岚, 吴巧凤, 余曙光, 成都中医药大学针灸推拿学院 四川省成都市 610075

韩晓霞, 四川新津县中医院 四川省新津市 611430

杨阳, 河南邓州市第三人民医院 河南省邓州市 474150

韩晓霞, 主要从事针灸作用机制方面的研究。

作者贡献分布: 此课题由吴巧凤设计; 余曙光指导; 研究过程由吴巧凤、赵纪岚、韩晓霞、侯天舒及杨阳操作完成; 论文写作由韩晓霞完成。

通讯作者: 吴巧凤, 副研究员, 610075, 四川省成都市十二桥路37号, 成都中医药大学针灸推拿学院. qiaofengwu@yahoo.cn

收稿日期: 2012-08-09 修回日期: 2012-08-30

接受日期: 2012-12-16 在线出版日期: 2012-12-18

Intestinal microecology in rats with ulcerative colitis

Xiao-Xia Han, Tian-Shu Hou, Yang Yang, Ji-Lan Zhao, Qiao-Feng Wu, Shu-Guan Yu

Xiao-Xia Han, Tian-Shu Hou, Yang Yang, Ji-Lan Zhao, Qiao-Feng Wu, Shu-Guan Yu, College of Acupuncture and Tuina, Chengdu University of TCM, Chengdu 610075, Sichuan Province, China

Xiao-Xia Han, Xinjin Traditional Chinese Hospital, Xinjin 611430, Sichuan Province, China

Yang Yang, the Third People's Hospital of Dengzhou, Dengzhou 474150, Henan Province, China

Correspondence to: Qiao-Feng Wu, College of Acupuncture and Tuina, Chengdu University of TCM, 37 Shierqiao Road, Chengdu 610075, Sichuan Province, China. qiaofengwu@yahoo.cn

Received: 2012-08-09 Revised: 2012-08-30

Accepted: 2012-12-16 Published online: 2012-12-18

Abstract

AIM: To study the abundance and diversity of the gut flora in rats with dextran sulfate sodium (DSS)-induced ulcerative colitis (UC) to provide new knowledge about the pathogenesis of this disease.

METHODS: Twenty-six healthy male SD rats were randomly divided into a control group and a model group. UC was induced by giving 40g/L of DSS for 7 days. Fecal samples were collected from the rats and polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) was employed to analyze the composition and diversity of gut flora. The specific bands were recovered and sequenced, and data were analyzed using Quantity-one, Chromas, SIMCA-P+, MGAE5 and SPSS18.0.

RESULTS: After 7 days of treatment with DSS, rats showed typical symptoms and characteristics of UC. DGGE results showed that gut floras in both group mainly belonged to *Bacteroidetes*, *Firmicutes* and *Proteobacteria*. Compared to the control group, the numbers of *Lactobacillus* sp. and *Lachnospiraceae* bacterium significantly decreased and the number of *Clostridium bifermentans* increased significantly in the model group (all $P < 0.05$).

CONCLUSION: The abundance and diversity of the intestinal floras obviously decrease in rats with UC. The numbers of *Lactobacillus* sp., *Lachnospiraceae* bacterium and *Clostridium bifermentans* change significantly in the intestinal tract of rats with UC.

Key Words: Intestinal microecology; Ulcerative colitis; Polymerase chain reaction- denaturing gradient gel electrophoresis; Dextran sulfate sodium; Rat model

Han XX, Hou TS, Yang Y, Zhao JL, Wu QF, Yu SG. Intestinal microecology in rats with ulcerative colitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(35): 3445-3451

摘要

目的: 采用多聚酶链反应-变性梯度凝胶电泳 (polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis, PCR-DGGE) 技术研究葡聚糖硫酸钠 (dextran sulfate sodium, DSS) 所致溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 模型大鼠肠道菌群的多样性和丰度, 从“肠道微生态”这一全新角度为该模型提供更丰富的数据, 也为深入探讨UC的发生发展提供新的实验依据。

方法: 26只健康♂SD大鼠随机分为空白组和UC模型组, 模型组饮用4%的DSS溶液7 d复制UC模型。收集两组大鼠粪便排泄物, 采用PCR-DGGE法研究肠道菌群的多样性、相似性及丰度; 对优势条带进行回收测序, 鉴定菌种。所得结果及数据采用Quantity one、Chromas、MGAE5、SIMCA-P+及SPSS18.0等软件进行分析。

■背景资料

溃疡性结肠炎 (UC) 是一种慢性非特异性炎症性肠病, 其发病机制与遗传、免疫、环境等多个因素有关。流行病学调查显示, 肠道菌群改变与UC的发生存在相关性。通过了解肠道菌群与UC的关系有助于认识肠道微生态在疾病发生发展中的重要作用。葡聚糖硫酸钠 (DSS) 所致的UC模型是科研工作中使用较多的一种UC模型, 但相关的微生态数据还比较缺乏。

■同行评议者

江学良, 教授, 主任医师, 中国人民解放军济南军区总医院消化科

■ 研究前沿

有研究发现:人为给无菌小鼠移植螺杆菌将引发严重的肠炎,而同时移植脆弱拟杆菌则保护宿主免受侵害。

结果: DSS诱导UC后7 d, 模型大鼠出现便血、病理形态学改变等典型的UC炎性病变特征。样本优势条带菌种鉴定显示大鼠的肠道细菌主要归属于拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、厚壁菌门(*Firmicutes*)及变形菌门(*Proteobacteria*)3大类,但与空白组相比,模型组肠道菌群的丰度及多样性指数明显降低($P<0.05$)。菌种鉴定表明UC组乳酸杆菌(*Lactobacillus sp*)和毛螺科菌(*Lachnospiraceae bacterium*)菌种显著较少,而双酶梭菌(*Clostridium bifementans*)等菌种含量明显增多(均 $P<0.05$)。

结论: 饮用4%DSS溶液7 d造成的UC大鼠模型的肠道微生态存在显著失衡,多样性和丰度均下降,含量变化较为显著的是乳酸杆菌、毛螺科菌和双酶梭菌。

关键词: 溃疡性结肠炎; 肠道微生态; PCR-DGGE; 葡聚糖硫酸钠; 动物模型

韩晓霞, 侯天舒, 杨阳, 赵纪岚, 吴巧凤, 余曙光. 葡聚糖硫酸钠致溃疡性结肠炎大鼠模型的肠道微生态. 世界华人消化杂志 2012; 20(35): 3445-3451
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3445.asp>

0 引言

肠道是微生物的王国,不同种类和数量的肠道细菌相互协调、相互制约,共同构成庞大的微生态系统,参与宿主营养物质的消化吸收、能量代谢、免疫调节等诸多过程^[1-4]。肠道菌群紊乱会造成肠道防御、免疫调节功能降低,引发各种肠道疾病^[3,5,6]。近来研究表明,溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)、克罗恩氏病(crohn disease, CD)、肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)等肠道疾病的发生与肠道菌群失调、肠黏膜屏障功能缺陷、肠道通透性增高以及肠道内成分诱发的异常免疫反应等因素有关^[7-9]。其中UC的发病率无论在国外还是国内均有逐年增高的趋势^[10,11]。最近研究认为,肠道菌群改变可能是UC发生和发展的关键因素^[12-15]。因此,通过了解肠道菌群与UC的关系有助于认识肠道微生态在疾病发生发展中的重要作用。葡聚糖硫酸钠(dextran sulfate sodium, DSS)所致的UC模型是科研工作中使用较多的一种UC模型,但相关的微生态数据还比较缺乏^[16-18]。本实验运用多聚酶链反应-变性梯度凝胶电泳(polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis, PCR-DGGE)技术,从“肠道微生态”的角度研究了DSS所致UC模型大鼠肠道微生态的改变,

以期为进一步认识该模型与人类UC的相似性提供证据,也为揭示UC的发病机制提供更为丰富的实验数据。

1 材料和方法

1.1 材料 DSS(分子量36 000-50 000, MP Bio-medicals公司); DNA提纯试剂盒(北京赛百盛); pEASY-T3 Cloning Kit试剂盒(北京全式金生物技术有限公司); PCR引物(北京基诺来普生物科技有限公司)。光学显微镜(莱卡DM600M); 凝胶成像系统(Bio-rad公司Gel-Doc2000); 变性梯度凝胶电泳仪(Bio-Rad公司PowerPac); 测序仪(Hitachi公司3730xlDNA Analyzer)。清洁级健康♂SD大鼠26只,体质量200 g \pm 20 g(由简阳市动物中心提供,合格证号: SCXK(川)2008-24)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组与造模: 动物在实验前进行适应性驯养,自由进食和饮水。室温控制在20℃左右,相对湿度70%,驯养期模拟捕捉所有大鼠,1次/d,大鼠驯养2 wk后采用随机数字表法按体质量随机分为空白组和UC模型组,UC组大鼠自由饮用浓度为4%的DSS溶液,7 d诱发急性UC模型,之后改为正常饮水。

1.2.2 一般指标检测方法: 实验过程中观察并记录各组大鼠的体质量变化、大便性状及出血情况,比较各组大鼠的一般活动状况;采用联苯胺法评价各组大鼠的粪便隐血情况;造模后7 d取大鼠盲部和远端结肠组织观察病理形态学改变。

1.2.3 肠道微生态研究: 造模7 d收集大鼠粪便排泄物,提取粪便DNA,采用PCR-DGGE方法进行研究。(1)PCR引物: PCR通用引物, GC338F&518R(GC-338F: 5'-CGCCCGCCGCGCGCGGCGGGCGGGCGGGGGCAC-GGGGGGCCTACGGGAGGCAGCAG-3', 518R: 5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'); 测序通用引物: M13F&M13R(M13F: 5'-CGC-CAGGGTTTCCCAGTCAGG AC-3' M13R: 5'-CAG GAA ACAGCT ATGACC-3'); (2)总DNA的提取: 参照说明书和文献报道^[10]提取粪便总DNA,具体过程为: 取冻存的200-220 mg粪便至2 mL离心管,加800 mL 1 \times TE缓冲液并捣碎涡旋,使之充分溶解,9 000 r/min离心1-3 min后去上清留沉淀,加800 μ L裂解液使沉淀充分混匀,室温放置5 min,13 000 r/min离心1 min,上清液倒入吸附柱,13 000 r/min再离心1 min,吸附柱下的液体倒回吸附柱内,再次离心,上述步骤

重复2-3次, 用0.5 mL漂洗液清洗吸附柱2-3次, 13 000 r/min离心30 s, 将漂洗完的离心纯化柱再离心1-2 min, 彻底除去漂洗液, 将离心纯化柱套入干净、空的1.5 mL离心管中, 加入50 μ L TE缓冲液到硅胶膜上, 静置10 min后13 000 r/min离心1 min, 离心管中的洗脱液再次洗脱后收集、保存, 测定DNA浓度, 并用1%的琼脂糖凝胶电泳检测其质量, 所有DNA样本保存于-20 $^{\circ}$ C以用于后续的PCR分析; (3)细菌16S rDNA片段的扩增: PCR扩增体系为: 5 μ L 10 \times PCR缓冲液; 3.2 μ L dNTP(2.5 mmol/L); 0.4 μ L Taq酶(5 U/ μ L); 1 μ L GC-338F(20 mmol/L); 1 μ L 518R(20 mmol/L); 50 ng模板DNA; 补ddH₂O至50 μ L, 扩增程序: 94 $^{\circ}$ C预变性5 min; 94 $^{\circ}$ C变性1 min; 55 $^{\circ}$ C复性45 s; 72 $^{\circ}$ C延伸1 min, 30个循环; 最终72 $^{\circ}$ C延伸10 min; 4 $^{\circ}$ C保存, PCR产物用2%的琼脂糖凝胶进行电泳, 以检测是否出现条带; (4)变性梯度凝胶电泳(DGGE)用抽滤法纯化PCR产物, 取10 μ L纯化后的PCR产物上样于8%的(变性梯度40%-60%)聚丙烯酰胺凝胶上, 60 $^{\circ}$ C 200 V预电泳10 min, 然后加入PCR样品15 μ L, 200 V电泳4 h, 电泳结束后用银染法对DGGE胶进行染色, 显影, 用灭菌手术刀切下待回收的DGGE条带, 放于纯水中, 4 $^{\circ}$ C备用; (5)基因克隆与测序: 将重新扩增的DNA片段切胶回收、纯化后, 连接到pEASY-T3载体上, 并转化至*Trans*-T1感受态细胞中, 菌液铺板, 培养过夜, 挑选阳性克隆, 用M13F、M13R、T7promoter引物测序, 进行序列分析; (6)构建系统进化树及优势菌种鉴定: 利用“载体序列去除软件”去除拼接好的阳性克隆序列中载体序列, 获得阳性克隆中完整的细菌16S rDNA序列, 并与NCBI数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)中已知细菌比较, 利用ClustalX-MEGA 4软件对序列进行同源性分析后, 构建系统发育进化树(采用NJ算法, Bootstrap为1 000次), 进一步对各优势菌群在各组中含量进行分析, 筛选得到含量发生明显变化的细菌。

1.2.4 图像分析与数据处理: 用Quantity One(Bio-Rad Laboratories, USA)数字化DGGE指纹图谱上的条带, 采用非加权配对算数聚类法(UP-GAMA)对细菌群落进行聚类分析, 不同组间微生物群落结构的相似性通过Dice相似系数比较。Dice相似系数 $S = 2N_{AB}/(N_A + N_B)$, N_{AB} 表示两站点的共有谱带数, N_A 和 N_B 分别代表样品A和B的特有谱带数。采用Shannon-Weaver指数H对细菌群落的多样性进行分析。Shannon-Weaver指数 $H =$

$-\sum P_i \ln P_i$ 式中 $P_i = n_i/N$, P_i 代表某一泳道的第*i*个条带的光密度的百分含量。

统计学处理 所有数据以mean \pm SD表示, 采用SPSS18.0软件进行统计学分析, 组间样本数据比较采用独立样本*t*检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 造模结果

2.1.1 一般状况: 空白组大鼠在整个实验过程中毛发有光泽, 精神状态良好, 较活跃, 大便正常。模型组大鼠逐渐出现拱背、厌食、大便性状改变以及体质量明显减轻等现象; 造模3 d后模型组大鼠大便隐血实验阳性, 造模7 d后模型大鼠出现黏液血便或脓血便, 有典型的UC症状。造模7 d后, 剖腹观察可见模型组结肠缩短, 充血水肿明显, 肠壁明显增厚, 肠黏膜广泛充血、水肿, 局部有糜烂出血, 并以回盲部及远端结肠为重, 空白组结肠长度正常, 各部位肠壁光滑, 无水肿、充血及溃疡面。

2.1.2 肠道病理形态学改变: 光学显微镜下观察可见空白组肠黏膜组织完整, 腺体排列整齐, 柱状上皮细胞、固有层和黏膜肌层的腺体排列整齐; 模型组黏膜层结构破坏, 并可见溃疡面, 黏膜下层充血水肿, 大量炎细胞浸润, 可见游离的坏死组织(图1), 表明UC模型复制成功。

2.2 肠道微生态结果

2.2.1 总DNA的抽提: 琼脂糖凝胶电泳结果显示样本总DNA片段大小在20 kb以上, 条带清晰可见, 说明提取的总DNA质量好, 无拖尾, 降解, 符合继续进行实验的要求。

2.2.2 16S rDNA片段的扩增: 16S rDNA序列扩增后获得唯一目的条带, 条带清晰, 片段大小约为230 bp, 说明扩增产物纯度高, 符合DGGE电泳实验要求。

2.2.3 DGGE电泳结果: 空白组与模型组的样品DGGE带谱在条带的数量、位置及条带的亮度上均存在着较大的差异(图2), 一定程度上反应了各组样本中细菌种类的复杂多样性, 丰度及多样性指数统计结果显示, 两组样品的丰度在11-15之间, 多样性指数(H值)在2.28-2.72之间, 模型组的丰度值及多样性指数明显低于空白组($P < 0.05$, 表1), 说明DSS诱导的UC模型对肠道菌群的丰度及多样性有显著影响。DGGE电泳图谱优势条带回收测序后与NCBI数据库进行序列比对, 并根据最相似的菌株名称、相似度及分

■创新盘点

本实验运用多聚酶链反应-变性梯度凝胶电泳(PCR-DGGE)技术, 从“肠道微生态”的角度研究了DSS所致UC模型大鼠肠道微生态的改变。

■应用要点

本研究为深入认识该模型与人类UC的相似性提供证据,也为揭示UC的发病机制提供更为丰富的实验数据.

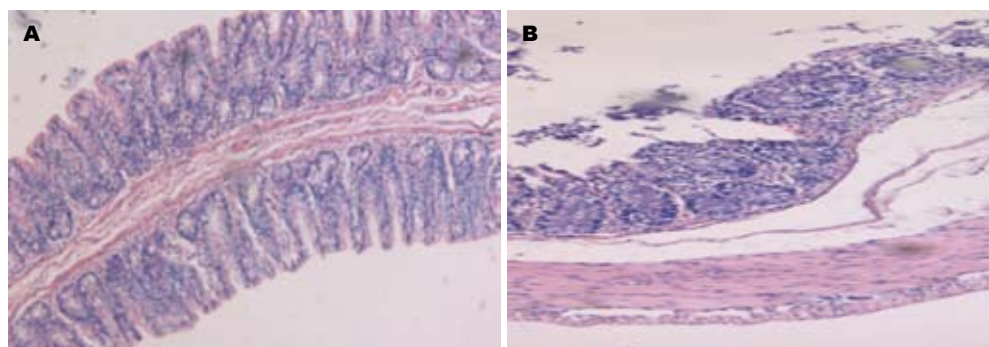


图1 造模后光镜下观察回盲部组织(H&E, ×100). A: 空白组; B: 模型组.

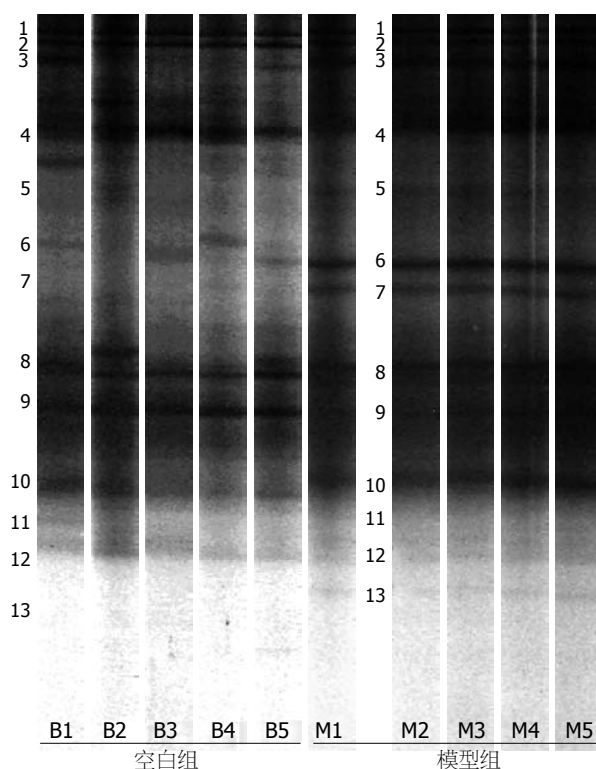


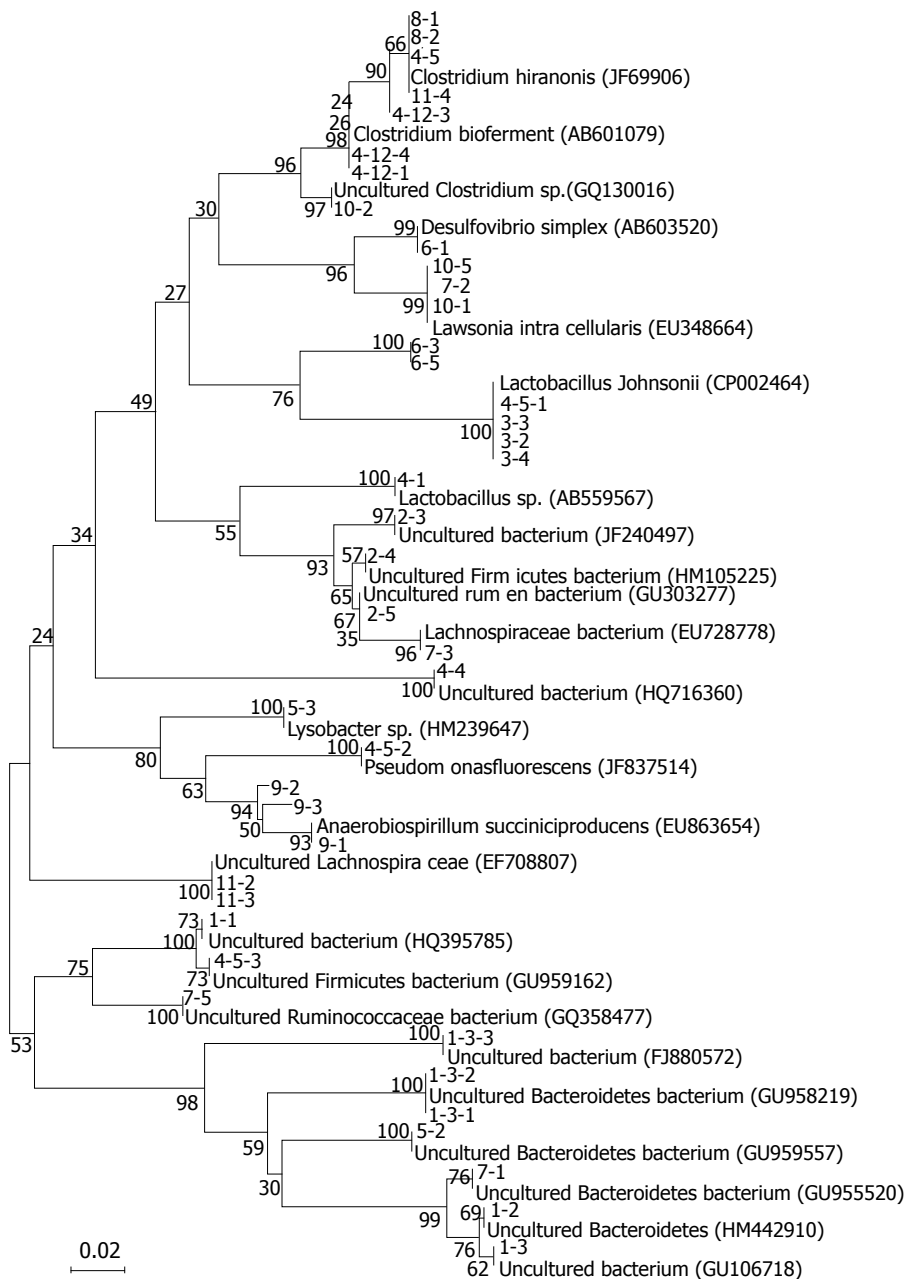
图2 空白组与模型组DGGE电泳图.

类群构建系统发育树,结果显示回收的条带所代表的细菌与数据库中的细菌大部分有97%同源性,有的同源性甚至达到了100%(表2),鉴定按细菌分类主要属于3大优势类群:厚壁菌门(*Firmicutes*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*),及变形菌门(*Proteobacteria*)(图3),与空白组相比,模型组*Bacteroidetes*和*Proteobacteria*细菌含量降低(均 $P<0.05$);模型组*Firmicutes*总含量增加,差异有统计学意义($P<0.05$).

进一步对各优势菌群在各组中含量进行分析,结果发现:*Lactobacillus sp.*与*Lachnospiraceae bacterium*含量在模型组中显著降低,与空白组比较,差异有统计学意义($P<0.05$).*Clostridium bifermentans*的含量在模型组则显著升高,高于空白组,差异有统计学意义($P<0.05$,表3).

3 讨论

越来越多的证据表明,栖息于宿主体内的肠道菌群与肠道疾病的发生发展密切相关,菌群与人共同形成了“超生物体”,共同发挥稳定肠道免疫、炎症水平和局部微环境的作用.因此,深入认识肠道菌群在肠道疾病中的作用及变化规律将为治疗肠道疾病带来新的机遇. UC是一种慢性非特异性炎症性肠病,其发病机制与遗传、免疫、环境等多个因素有关.流行病学调查显示,肠道菌群改变与UC的发生存在相关性^[19,20]. UC患者肠道内正常细菌数量减少,活动性UC较非活动性UC的菌群总数也明显减少,并且有意义的厌氧菌(包括双歧杆菌、真菌和梭菌)、兼性厌氧菌和微需氧菌(肠杆菌、乳酸杆菌)均减少^[11],表明肠道微生态是UC发生发展中不可忽视的重



同行评价

本研究应用PCR-DGGE技术分析DSS所致的UC大鼠肠道微生态的变化,了解DSS对肠道菌群多样性和丰度的影响,并进一步分析鉴定了对UC有影响的相关菌种,这为将来采用DSS诱导的UC模型在相关研究中的应用提供了可靠的数据。

图 3 优势菌系统发育树。

表 1 细菌丰度与多样性指数分析 (mean ± SD)

分组	丰度(S)	多样性指数(H)
空白组	13.0 ± 1.41 ^a	2.43 ± 0.008 ^a
模型组	11.4 ± 0.53	2.29 ± 0.182

^aP<0.05 vs 模型组。

要因素。DSS所致的UC模型不仅具有典型的UC临床症状的特点,并且人为反复运用DSS刺激,可诱导大鼠出现类似人类急性期和缓解期交替出现的变化,与人类UC的反复发作,迁延难愈的疾病特点极为相似^[21]。因此,很有必要从肠道微

生态的角度进一步认识该模型的病变特点,以期在今后采用DSS诱导的UC模型的应用提供更为丰富的证据。

本研究首先从一般情况、组织形态学等方面观察了DSS诱导的UC模型,结果与文献报道一致^[17,21],说明该模型符合研究目的,然后重点对UC模型大鼠肠道菌群的多样性和丰度进行了研究,模型组的丰度值及多样性指数明显低于空白组,与空白组比较P<0.05,差异有统计学意义,说明DSS诱导UC模型对肠道菌群的丰富度及多样性有一定的影响;菌群的多样性是反应物种丰富度的重要指标,菌群多样性越高,不同细菌的关联度也越高,说明菌群具有较强的自

表 2 优势条带测序结果与Genbank数据库进行序列比对结果

条带编号	最相似细菌名称	登录号	相似度	分类类群
1	<i>Uncultured bacterium</i>	HQ395785	100%	<i>Bacteroidetes</i>
2	<i>Uncultured Firmicutes bacterium</i>	HM105225	100%	<i>Bacteroidetes</i>
3	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	CP002464	100%	<i>Firmicutes</i>
4	<i>Uncultured bacterium</i>	HQ716360	100%	<i>Firmicutes</i>
5	<i>Uncultured Bacteroidetes bacterium</i>	GU959557	100%	<i>Bacteroidetes</i>
6	<i>Lactobacillus sp.</i>	AB559567	100%	<i>Bacteroidetes</i>
7	<i>Lachnospiraceae bacterium</i>	EU728778	99%	<i>Firmicutes</i>
8	<i>Clostridium hiranonis</i>	JF693906	100%	<i>Firmicutes</i>
9	<i>Anaerobiospirillum succiniciproducens</i>	EU863654	98%	<i>Gammaproteobacteria</i>
10	<i>Lawsonia intracellularis</i>	EU348664	100%	<i>Deltaproteobacteria</i>
11	<i>Uncultured Lachnospiraceae</i>	EF708807	100%	<i>Firmicutes</i>
12	<i>Uncultured bacterium</i>	HM124330	100%	<i>Firmicutes</i>
13	<i>Clostridium bifermentans</i>	AB601079	100%	<i>Firmicutes</i>

表 3 肠道细菌含量的统计分析 (mean \pm SD)

	<i>Lachnospiraceae bacterium</i>	<i>Lactobacillus sp.</i>	<i>Clostridium bifermentans</i>
空白组	0.066 \pm 0.091 ^a	0.107 \pm 0.007 ^a	0.173 \pm 0.002 ^a
模型组	0.043 \pm 0.003	0.064 \pm 0.003	0.214 \pm 0.007

^a $P < 0.05$ vs 模型组。

身稳定性和较强的抗定植能力,从而很好地维持机体的健康;而当病变发生时,多样性指数往往会下降,稳定性会降低,抗定植能力减弱,从而造成肠道微生态失调^[22,23]。本研究进一步培养和鉴定了主要的菌种。结果表明,UC模型大鼠肠道优势菌群主要为*Bacteroidetes*、*Firmicutes*及*Proteobacteria*大类,其中对*Lachnospiraceae bacterium*、*L.sp.*、*C. bifermentans*在两组中含量进行统计学分析,结果发现:*Lachnospiraceae bacterium*与*L.sp.*含量在模型组中显著降低,与空白组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。对优势菌种的培养和鉴定表明UC组乳酸杆菌(*Lactobacillus sp.*)和*L. johnsonii*菌种显著较少,而双酶梭菌(*Clostridium bifermentans*)等菌种含量明显增多。乳酸杆菌属于*Firmicutes*,可作为益生菌在体内通过发酵碳水化合物产生乳酸,从而促进消化和吸收,还可以对肠内环境的酸化起到良性调节作用,抑制有害细菌黏附于肠上皮。此外,乳酸杆菌还可以刺激肠道产生免疫球蛋白增强宿主的免疫能力^[24-28],加强肠道屏障功能、降低通透性等,是目前应用最为广泛的益生菌菌种之一,临床研究表明对UC具有保护作用。毛螺科菌也属于*Firmicutes*。Frank等^[27]对190名CD、UC和

非IBD受试者肠道组织样本的研究发现,属于梭菌目毛螺菌科的一些产酪酸菌在IBD患者的样本中减少了24%-34%。Amit-Romach等^[28]也发现毛螺旋菌在IBD患者肠道中的相对数量少于正常人群。由此可见,毛螺科菌与乳酸杆菌同样属于益生菌,对治疗UC具有积极作用^[29],但其机制仍有待于进一步研究。双酶梭菌是一种消化系常见的梭状菌,本研究中其含量增高,这与Hans等^[30]采用腹腔注射抗生素的方法观察到DSS小鼠肠道菌群中拟杆菌和梭状芽胞杆菌增多的结果基本一致,但目前有关双酶梭菌的具体作用研究尚少,其意义还不甚清楚。

综上所述,本研究应用PCR-DGGE技术分析DSS所致的UC大鼠肠道微生态的变化,了解DSS对肠道菌群多样性和丰度的影响,并进一步分析鉴定了对UC有影响的相关菌种,这为将来采用DSS诱导的UC模型在相关研究中的应用提供了可靠的数据。本研究结果只提示肠道菌群变化可能是继发性改变,对肠道菌群变化与UC之间关系还需要进一步研究。

4 参考文献

- 1 Campieri M, Gionchetti P. Bacteria as the cause of

- ulcerative colitis. *Gut* 2001; 48: 132-135
- 2 Bäckhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A, Semenkovich CF, Gordon JI. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 15718-15723
- 3 Kelly D, Conway S, Aminov R. Commensal gut bacteria: mechanisms of immune modulation. *Trends Immunol* 2005; 26: 326-333
- 4 Hooper LV, Gordon JI. Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science* 2001; 292: 1115-1118
- 5 沈冰冰, 钱家鸣. 肠道菌群与溃疡性结肠炎. 实用医院临床杂志 2008; 5: 6-8
- 6 Dignass A, Preiss JC, Aust DE, Autschbach F, Ballauff A, Barretton G, Bokemeyer B, Fichtner-Feigl S, Hagel S, Herrlinger KR, Jantschek G, Kroesen A, Kruis W, Kucharzik T, Langhorst J, Reinshagen M, Rogler G, Schleiermacher D, Schmidt C, Schreiber S, Schulze H, Stange E, Zeitz M, Hoffmann JC, Stallmach A. [Updated German guideline on diagnosis and treatment of ulcerative colitis, 2011]. *Z Gastroenterol* 2011; 49: 1276-1341
- 7 Sasaki M, Klapproth JM. The role of bacteria in the pathogenesis of ulcerative colitis. *J Signal Transduct* 2012; 2012: 704953
- 8 Kim IW, Myung SJ, Do MY, Ryu YM, Kim MJ, Do EJ, Park S, Yoon SM, Ye BD, Byeon JS, Yang SK, Kim JH. Western-style diets induce macrophage infiltration and contribute to colitis-associated carcinogenesis. *J Gastroenterol Hepatol* 2010; 25: 1785-1794
- 9 李玥, 朱峰. 克罗恩病的治疗. 中国实用内科杂志 2011; 31: 239-240
- 10 郑红斌. 溃疡性结肠炎全球发病情况比较. 中华消化杂志 2001; 21: 242-243
- 11 Karlinger K, Györke T, Makö E, Mester A, Tarján Z. The epidemiology and the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Eur J Radiol* 2000; 35: 154-167
- 12 Guarner F. Microecology as a target for therapeutic intervention in inflammatory bowel disease. *IDrugs* 2003; 6: 868-873
- 13 Kinross JM, von Roon AC, Holmes E, Darzi A, Nicholson JK. The human gut microbiome: implications for future health care. *Curr Gastroenterol Rep* 2008; 10: 396-403
- 14 Saric J, Wang Y, Li J, Coen M, Utzinger J, Marchesi JR, Keiser J, Veselkov K, Lindon JC, Nicholson JK, Holmes E. Species variation in the fecal metabolome gives insight into differential gastrointestinal function. *J Proteome Res* 2008; 7: 352-360
- 15 Mazmanian SK, Round JL, Kasper DL. A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease. *Nature* 2008; 453: 620-625
- 16 Perše M, Cerar A. Dextran sodium sulphate colitis mouse model: traps and tricks. *J Biomed Biotechnol* 2012; 2012: 718617
- 17 Yan Y, Kolachala V, Dalmasso G, Nguyen H, Laroui H, Sitaraman SV, Merlin D. Temporal and spatial analysis of clinical and molecular parameters in dextran sodium sulfate induced colitis. *PLoS One* 2009; 4: e6073
- 18 Macfarlane S, Steed H, Macfarlane GT. Intestinal bacteria and inflammatory bowel disease. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2009; 46: 25-54
- 19 Lepage P, Häslér R, Spehlmann ME, Rehman A, Zvirbliene A, Begun A, Ott S, Kupcinskas L, Doré J, Raedler A, Schreiber S. Twin study indicates loss of interaction between microbiota and mucosa of patients with ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2011; 141: 227-236
- 20 Ohkusa T, Yoshida T, Sato N, Watanabe S, Tajiri H, Okayasu I. Commensal bacteria can enter colonic epithelial cells and induce proinflammatory cytokine secretion: a possible pathogenic mechanism of ulcerative colitis. *J Med Microbiol* 2009; 58: 535-545
- 21 Trivedi PP, Jena GB. Dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis leads to increased hematopoiesis and induces both local as well as systemic genotoxicity in mice. *Mutat Res* 2012; 744: 172-183
- 22 孙勇, 丁彦青. 溃疡性结肠炎患者肠道菌群与病理变化关系的探讨. 现代消化及介入诊疗 2009; 14: 26-28
- 23 魏华. 不同外源扰动因素对肠道菌群组成结构影响的研究. 上海交通大学生命科学技术学院, 2008
- 24 Robosky LC, Wells DF, Egnash LA, Manning ML, Reily MD, Robertson DG. Communication regarding metabonomic identification of two distinct phenotypes in Sprague-Dawley (CrI: CD(SD)) rats. *Toxicol Sci* 2006; 91: 309
- 25 Zocco MA, dal Verme LZ, Cremonini F, Piscaglia AC, Nista EC, Candelli M, Novi M, Rigante D, Cazzato IA, Ojetti V, Armuzzi A, Gasbarrini G, Gasbarrini A. Efficacy of Lactobacillus GG in maintaining remission of ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 23: 1567-1574
- 26 张美玲. 两种肠道疾病中肠道菌群结构变化的分子生态学研究. 上海交通大学生命科学技术学院, 2007
- 27 Frank DN, St Amand AL, Feldman RA, Boedeker EC, Harpaz N, Pace NR. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 13780-13785
- 28 Amit-Romach E, Sklan D, Uni Z. Microflora ecology of the chicken intestine using 16S ribosomal DNA primers. *Poult Sci* 2004; 83: 1093-1098
- 29 Ye J, Lee JW, Presley LL, Bent E, Wei B, Braun J, Schiller NL, Straus DS, Borneman J. Bacteria and bacterial rRNA genes associated with the development of colitis in IL-10(-/-) mice. *Inflamm Bowel Dis* 2008; 14: 1041-1050
- 30 Hans W, Schölmerich J, Gross V, Falk W. The role of the resident intestinal flora in acute and chronic dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2000; 12: 267-273

编辑 田滢 电编 闫晋利

MiR-451作用于MIF对大肠癌细胞株LoVo的影响

孔 帅, 陶凯雄, 王国斌

■背景资料

大肠癌是消化系统最常见的恶性肿瘤之一, 现代分子生物学研究发现大肠癌的发生发展与许多基因和细胞因子有关。巨噬细胞迁移抑制因子(MIF)是近年来研究较多的一种多能性的细胞因子, 与肿瘤的生长、增殖、转移等有密切联系。

孔帅, 陶凯雄, 王国斌, 华中科技大学同济医学院附属协和医院胃肠外科 湖北省武汉市 430022

孔帅, 在读博士, 主要从事胃肠道疾病的研究。

作者贡献分布: 此课题由孔帅与陶凯雄设计; 研究过程及数据分析由孔帅完成; 陶凯雄与王国斌提供实验材料及分析工具, 并审阅论文、指导论文修改。

通讯作者: 陶凯雄, 教授, 主任医师, 博士生导师, 430022, 湖北省武汉市解放大道1277号, 华中科技大学同济医学院附属协和医院胃肠外科. tao_kaixiongwhuh@163.com

收稿日期: 2012-09-27 修回日期: 2012-11-15

接受日期: 2012-12-03 在线出版日期: 2012-12-18

Effect of miR-451-mediated regulation of MIF expression on cell proliferation in human colon carcinoma cell line LoVo

Shuai Kong, Kai-Xiong Tao, Guo-Bin Wang

Shuai Kong, Kai-Xiong Tao, Guo-Bin Wang, Department of Gastrointestinal Surgery, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China

Correspondence to: Kai-Xiong Tao, Professor, Chief Physician, Department of Gastrointestinal Surgery, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, 1277 Jiefang Avenue, Wuhan 430022, Hubei Province, China. tao_kaixiongwhuh@163.com

Received: 2012-09-27 Revised: 2012-11-15

Accepted: 2012-12-03 Published online: 2012-12-18

Abstract

AIM: To investigate the effect of miR-451-mediated regulation of macrophage migration inhibitory factor (MIF) expression on cell proliferation in human colon carcinoma cell line LoVo.

METHODS: A lentiviral vector overexpressing hsa-mir-451a was designed and used to infect LoVo cells. Real-time quantitative PCR and Western blot were utilized to detect the expression levels of MIF mRNA and protein in LoVo cells and fetal colon cells. Cell proliferation was determined by MTT assay after infection.

RESULTS: The expression of MIF mRNA and protein decreased significantly and cell proliferation was significantly inhibited in LoVo cells infected with the lentiviral vector overexpressing hsa-mir-451a compared to non-infected LoVo cells and fetal colon cells.

CONCLUSION: MIF is a potential target gene of miR-451. Overexpression of miR-451 could suppress LoVo cell proliferation by down-regulating MIF expression.

Key Words: Colon carcinoma; Lentivirus; MicroRNA; Macrophage migration inhibitory factor

Kong S, Tao KX, Wang GB. Effect of miR-451-mediated regulation of MIF expression on cell proliferation in human colon carcinoma cell line LoVo. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(35): 3452-3456

摘要

目的: 研究MicroRNA-451(MiR-451)作用于巨噬细胞迁移抑制因子(macrophage migration inhibitory factor, MIF)对人大肠癌细胞株LoVo的影响。

方法: 构建包含有MiR-451过表达的慢病毒(hsa-mir-451a), 感染LoVo细胞株, 采用实时荧光定量PCR及Western blot技术检测MIF mRNA及蛋白在人大肠癌细胞LoVo及人大肠上皮细胞FHC中的表达变化情况, MTT法检测各组细胞的增殖能力。

结果: 与未感染组及对照组相比, 感染组中MIF在mRNA及蛋白水平的表达均显著降低, 感染组细胞的增殖活性明显受到抑制。

结论: MIF可能是miR-451的直接作用靶点, 高表达miR-451可以有效抑制LoVo中MIF的表达, 进而抑制了LoVo的增殖。

关键词: 结肠肿瘤; 慢病毒; 微小RNA; 巨噬细胞迁移抑制因子

孔帅, 陶凯雄, 王国斌. MiR-451作用于MIF对大肠癌细胞株LoVo的影响. *世界华人消化杂志* 2012; 20(35): 3452-3456
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3452.asp>

0 引言

大肠癌是消化系统最常见的恶性肿瘤之一, 随着分子生物学研究的进展, 大肠癌的发生发展被发现与许多基因和细胞因子有关。微小

■同行评议者

曹秀峰, 教授, 南京医科大学附属南京第一医院肿瘤中心

RNA(microRNA, miRNA)是一种在转录后水平调控基因表达的长度约为22 nt的非编码单链小RNA分子^[1], 他可以通过增加mRNA的降解或抑制翻译来调控目的基因^[2,3], 在调节细胞的增殖、分化和凋亡方面有重要作用^[1,4], 且许多miRNA在肿瘤的发生发展过程中或者肿瘤抑制方面扮演重要角色^[5-7]. MicroRNA-451(MiR-451)是在血液系统疾病、神经系统疾病、癌症等发生过程中有重要意义的一个miRNA^[8-10], 其在胶质母细胞瘤、胃癌、大肠癌等组织及细胞系中表达降低^[10,11]. 巨噬细胞迁移抑制因子(macrophage migration inhibitory factor, MIF)是近年来研究较多的一个细胞因子, 他是一种多能性的细胞因子, 被认为与免疫及炎症反应广泛相关^[12]. 有研究表明MIF与肿瘤的生长、增殖、转移等有密切联系, 而且其在乳腺癌、肺癌、肝癌、前列腺癌等肿瘤中表达明显上调^[13,14]. 我们在前期的实验中也已经证实在大肠癌细胞中MIF呈高表达. Bandres等^[10]研究发现MiR-451在胃癌和大肠癌细胞中有抑癌作用, 并且通过生物信息学分析和芯片技术发现MIF可能是MiR-451的潜在靶点. 本实验通过构建包含MiR-451的过表达慢病毒(hsa-mir-451a)并感染大肠癌细胞LoVo, 检测MIF基因和蛋白的表达变化情况, 并观察其对大肠癌细胞增殖的影响.

1 材料和方法

1.1 材料 人大肠癌细胞LoVo和人大肠上皮细胞FHC均购自中国典型培养物保藏中心; DMEM(高糖)、DMEM/F12 1:1细胞培养基、10%胎牛血清以及青霉素、链霉素双抗均购自Gibco公司; MiR-451的高表达慢病毒由上海吉凯基因化学技术有限公司构建, 含有编码增强型绿色荧光蛋白(EGFP)的报告基因, 同时构建不包含特异性miRNA的慢病毒作为阴性对照; 感染添加剂Polybrene也由上海吉凯基因化学技术有限公司提供; TRIzol Reagent、逆转录试剂盒购自Invitrogen公司; SYBR Green mix购自BIO-RAD公司; 蛋白裂解液购自碧云天公司; 一抗和二抗分别为武汉博士德生物技术有限公司(BA20580)和GE-Healthcare公司(NA934-1ML)产品; 显影液、定影液均购自苏星公司; 噻唑蓝(MTT)、二甲基亚砷(DMSO)为Sigma公司产品.

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: LoVo细胞使用含10%胎牛血清的DMEM/F12 1:1培养基培养, 添加1%的青霉

素、链霉素双抗, FHC细胞使用含10%胎牛血清的DMEM高糖培养基培养, 添加1%的双抗, 在37℃、50 mL/L CO₂、相对湿度为90%的培养箱中培养, 48-72 h换液1次, 用0.25%胰蛋白酶常规消化, 按1:4或1:5比例传代, 在对数生长期进行实验.

1.2.2 慢病毒感染细胞: 参照上海吉凯基因化学技术有限公司的Lentivirus使用操作手册进行操作. 将处于对数生长期的LoVo细胞接种于96孔细胞培养板, 当细胞融合大约50%时进行感染. 感染实验分为3组: 感染组(MiR-451)、阴性对照组(Control)、未感染组(Empty). 以感染复数MOI为10的条件进行实验, 在加入慢病毒的同时在培养基中添加8 μg/mL的polybrene, 感染24 h后更换含血清的培养基. 72 h后在荧光显微镜下观察感染效果.

1.2.3 Real-time PCR检测MIF mRNA的表达: 收集感染后72 h的细胞, 用TRIzol法提取感染实验各组及FHC组细胞的总RNA, 逆转录合成cDNA. Real-time PCR扩增引物由安基生物提供, MIF上游引物为5'-AGAACCGCTCCTACAG-CAAGCT-3', 下游引物为5'-GGAGTTGTTC-CAGCCCACATTG-3', 以GAPDH为内参, 上游引物为5'-GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG-3', 下游引物为5'-ACCACCCTGTTGCTGTAGC-CAA-3'. 应用美国BIO-RAD CFX96实时荧光定量PCR仪进行扩增, Real-time PCR总反应体系为25 μL, 其中SYBR Green mix 12.5 μL, 上下游引物(5 pmol/μL)各1 μL, ddH₂O 8 μL, cDNA(10倍稀释)2.5 μL. 反应条件为: 95℃预变性3 min, 95℃变性10 s, 60℃退火30 s, 65℃延伸5 s, 反应40个循环. 采用2^{-ΔΔC_t}法分析结果得到标本中MIF mRNA的相对表达水平. 每组设5个复孔, 每孔3个平行样, 取平均值.

1.2.4 Western blot检测MIF蛋白的表达: 收集感染后72 h的细胞, 取适量RIPA裂解液冰上裂解30 min, 14 000 r/min 4℃离心15 min, 取上清, 加入2×SDS Loading Buffer. 根据蛋白分子量配12%的PAGE胶电泳. 根据预染Marker显示判断目的蛋白得到充分分离后, 停止电泳. 用湿转法200 mA电流转膜80 min后, 用含5%脱脂奶粉的TBST浸泡PVDF膜, 室温摇床封闭2 h. 然后用洗涤液1:500稀释相应的一抗, 将PVDF膜浸泡于一抗孵育液中, 4℃孵育过夜. TBST充分洗涤PVDF膜5-6次, 5 min/次. 用封闭液1:20 000稀释相应的二抗, 将PVDF膜浸泡于二抗孵育液中,

■研发前沿

MicroRNA在肿瘤的发生发展中起重要作用, 对肿瘤基因具有重要的调控作用, 是当前分子生物学和肿瘤学研究的热点, 而探索其作用靶点及调控机制是当前亟待研究的问题.

■相关报道

Calandra等研究发现MIF与肿瘤的生长、增殖、转移等有密切联系. Bandres等研究发现MiR-451在胃癌和大肠癌细胞中有抑癌作用, MIF在大肠癌细胞中表达增高, 并且通过生物信息学分析和芯片技术发现MIF可能是MiR-451的潜在靶点.

■创新盘点

本文首次应用慢病毒感染LoVo细胞稳定高表达MiR-451,通过抑制MIF的表达,抑制了LoVo细胞的增殖,在体外实验中进一步证实了MIF可能是MiR-451的直接作用靶点。

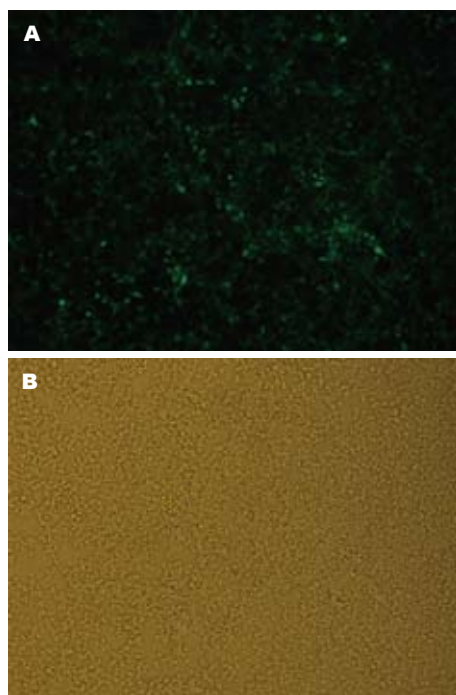


图1 慢病毒感染后的LoVo细胞的结果图片($\times 200$)。

室温摇床孵育2 h. TBST充分洗涤PVDF膜5-6次, 5 min/次. 每张膜滴加适量的ECL底物液, 孵育数分钟. 待荧光带明显后, 用滤纸吸去多余的底物液, 覆上保鲜膜, X光胶片压片后依次放入显影液显影、定影液定影. 用BIO-RAD Quantity One软件扫描胶片灰度值以分析各组细胞的相对蛋白表达值, 以 β -actin为内参对照.

1.2.5 噻唑蓝(MTT)法检测肿瘤细胞的增殖: 在96孔细胞培养板中接种细胞, 2×10^3 个细胞/孔, 每孔体积100 μ L. 感染后72 h, 每孔加入MTT溶液(5 mg/mL), 孵育4 h, 终止培养, 去上清, 每孔加入100 μ L二甲基亚砷(DMSO), 震荡30 min. 选择492 nm波长, 在酶联免疫检测仪上测定各孔光的吸收值, 记录结果.

统计学处理 应用SPSS13.0进行分析, 数据以mean \pm SD表示, 组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 慢病毒感染效果 感染慢病毒的LoVo细胞在荧光显微镜下可激发绿色荧光, 相同视野不同光线下的照片见图1. 感染效率约为80%.

2.2 MIF mRNA的表达变化情况 Real-time PCR结果显示(图2), MiR-451组细胞MIF mRNA表达量较Empty组($P = 0.006$)和Control组($P = 0.001$)均明显下调, 与FHC组比较无显著性差异($P = 0.997$). Control组和Empty组比较差异无统计学

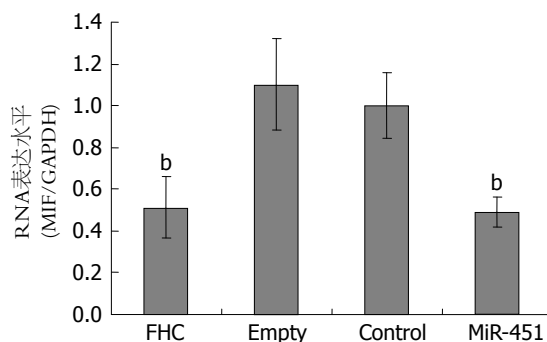


图2 慢巨噬细胞迁移抑制因子mRNA的表达水平. $^b P < 0.01$ vs Empty.

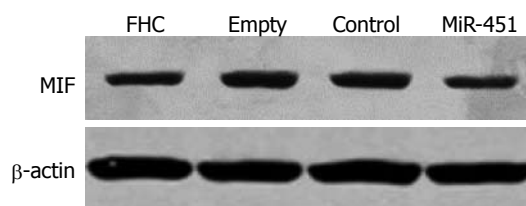


图3 Western blot检测结果.

意义.

2.3 MIF蛋白的表达变化情况 Western blot条带如图3, 结果显示, MiR-451组细胞MIF蛋白的表达量较Empty组($P = 0.001$)和Control组($P = 0.003$)均明显下调, 与FHC组比较无显著性差异($P = 0.237$). Control组和Empty组比较差异无统计学意义($P = 0.503$, 图4).

2.4 细胞增殖活性的变化情况 MTT结果显示, MiR-451组细胞较Empty组和Control组增殖活性明显受到抑制($P = 0.006$), Control组和Empty组比较差异无统计学意义($P = 0.532$, 图5).

3 讨论

miRNA是一类进化上保守的非编码小分子RNA, 编码他的DNA在细胞核内转录成较长的初始产物pri-miRNA, 然后被Drosha RNase切割成具有发夹结构的前体pre-miRNA, 之后通过Exportin5核输出蛋白转运到细胞质中, 再被Dicer酶切割成成熟的miRNA产物. 他通过形成非对称的基因沉默复合物, 与序列基本互补(非完全互补)的mRNA结合并阻止其翻译^[15]. 他可以在转录水平调控基因表达, 具有全局性的调控作用. miRNA在正常细胞功能的形成和维持过程中起重要作用, 其表达的改变可以导致肿瘤的发生发展. 大肠癌中有很多miRNA呈异常表达, 起类似癌基因或抑癌基因的作用, 而且其表达可能与大肠癌的微卫星不稳定有关^[16]. miR-

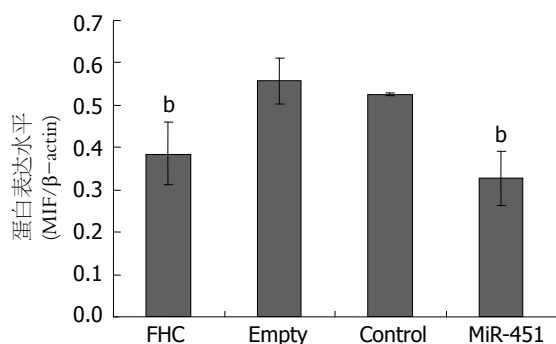


图4 巨噬细胞迁移抑制因子蛋白的表达水平. ^b $P < 0.01$ vs Empty.

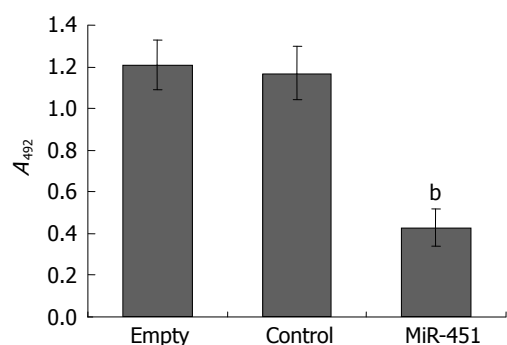


图5 细胞增殖活性. ^b $P < 0.01$ vs Empty.

NA-451是一个在大肠癌中低表达的miRNA^[17]. Bitarte等^[18]发现miR-451可以抑制结肠肿瘤干细胞的自我复制、致癌性和对化疗药物的抵抗。

MIF是一种多功能性的细胞因子, 来源于垂体前叶和单核巨噬细胞。他有催化活性、信号调整和促炎等多种作用, 并参与淋巴免疫、内分泌调节等^[12], 其调节异常是很多炎症和自身免疫性疾病发病的关键因素^[19,20]。近年来, 很多研究发现MIF与恶性肿瘤的发生发展有密切关系。MIF可以通过激活CD74和促分裂原活化蛋白激酶MAPK家族成员, 促进细胞外调节蛋白激酶ERK的持续活化作用, 后者进而促进了RAS基因的突变^[21]。MIF还可以破坏抑癌基因p53的肿瘤抑制作用^[22]。另有研究表明, MIF可以促进血管内皮生长因子生成、促进血管的再生进而促进肿瘤的生长和转移^[23,24]。还有学者发现通过增加外源性的MIF可以促进肿瘤细胞的生长增殖并且抑制细胞凋亡。多个研究发现其在鼻咽癌、前列腺癌、胃癌等肿瘤组织中呈高表达^[25-30]。

本研究采用体外实验的方法, 应用慢病毒感染LoVo细胞稳定高表达MiR-451, 结果表明相对于未感染组和对照组, 感染组细胞中MIF的表达被明显抑制, 而且感染组细胞的增殖活性也明显受到抑制。Lee等^[31]在2008年的研究表明: 大

肠癌患者血清中的MIF水平显著升高, 而且MIF相对CEA在大肠癌的早期检测中更加敏感。这与我们前期实验中证实LoVo细胞中MIF高表达的结论相一致。Brandres等^[10]将pre-miR-451转染入大肠癌细胞中, 发现抑制了肿瘤细胞的生长, 增加了其对放射线的敏感性, 并且他们提出MIF可能是MiR-451的潜在靶点。因此我们推测, 感染慢病毒前后LoVo细胞中MIF的表达变化, 可能是由于其作为MiR-451的直接作用靶点被沉默, 进而导致了肿瘤细胞的增殖活性下降。一个miRNA可能有多个靶基因, 而一个靶基因又可能由多个miRNA调控, 二者的关系错综复杂, miR-451对大肠癌细胞的抑制作用是否还存在其他的调控靶点, MIF在大肠癌细胞中是否也受其他miRNA的调控, 我们可以通过进一步的实验研究其调控机制, 进一步了解其在大肠癌发生发展中的作用, 以期为大肠癌的分子靶向治疗提供理论基础和新的思路。

4 参考文献

- Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature* 2004; 431: 350-355
- Engels BM, Hutvagner G. Principles and effects of microRNA-mediated post-transcriptional gene regulation. *Oncogene* 2006; 25: 6163-6169
- Lim LP, Lau NC, Garrett-Engle P, Grimson A, Schelter JM, Castle J, Bartel DP, Linsley PS, Johnson JM. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* 2005; 433: 769-773
- Hwang HW, Mendell JT. MicroRNAs in cell proliferation, cell death, and tumorigenesis. *Br J Cancer* 2006; 94: 776-780
- Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, Magri E, Pedriali M, Fabbri M, Campiglio M, Ménard S, Palazzo JP, Rosenberg A, Musiani P, Volinia S, Nenci I, Calin GA, Querzoli P, Negrini M, Croce CM. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res* 2005; 65: 7065-7070
- 刘娜, 严海东, 李雪竹. 质粒表达型小分子干扰RNA对人肾小管上皮细胞单核细胞趋化蛋白-1抑制作用的研究. *中国实用内科杂志* 2007; 27: 449-451
- Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, Seike M, Kumamoto K, Yi M, Stephens RM, Okamoto A, Yokota J, Tanaka T, Calin GA, Liu CG, Croce CM, Harris CC. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell* 2006; 9: 189-198
- Bruchova-Votavova H, Yoon D, Prchal JT. miR-451 enhances erythroid differentiation in K562 cells. *Leuk Lymphoma* 2010; 51: 686-693
- Zhang Z, Chang H, Li Y, Zhang T, Zou J, Zheng X, Wu J. MicroRNAs: potential regulators involved in human anencephaly. *Int J Biochem Cell Biol* 2010; 42: 367-374
- Bandres E, Bitarte N, Arias F, Agorreta J, Fortes P, Agirre X, Zarate R, Diaz-Gonzalez JA, Ramirez N,

■名词解释

巨噬细胞迁移抑制因子(MIF): 一种多功能性的细胞因子, 与恶性肿瘤的发生发展有密切关系, 其在大肠癌细胞中高表达, 与大肠癌的发生发展有一定联系。

同行评价

本文研究目的明确, 统计学方法合理, 数据及结论可信, 对指导临床有重要意义.

- 11 Nan Y, Han L, Zhang A, Wang G, Jia Z, Yang Y, Yue X, Pu P, Zhong Y, Kang C. MiRNA-451 plays a role as tumor suppressor in human glioma cells. *Brain Res* 2010; 1359: 14-21
- 12 Lue H, Kleemann R, Calandra T, Roger T, Bernhagen J. Macrophage migration inhibitory factor (MIF): mechanisms of action and role in disease. *Microbes Infect* 2002; 4: 449-460
- 13 Kamimura A, Kamachi M, Nishihira J, Ogura S, Isobe H, Dosaka-Akita H, Ogata A, Shindoh M, Ohbuchi T, Kawakami Y. Intracellular distribution of macrophage migration inhibitory factor predicts the prognosis of patients with adenocarcinoma of the lung. *Cancer* 2000; 89: 334-341
- 14 Ren Y, Tsui HT, Poon RT, Ng IO, Li Z, Chen Y, Jiang G, Lau C, Yu WC, Bacher M, Fan ST. Macrophage migration inhibitory factor: roles in regulating tumor cell migration and expression of angiogenic factors in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 2003; 107: 22-29
- 15 Gregory RI, Shiekhattar R. MicroRNA biogenesis and cancer. *Cancer Res* 2005; 65: 3509-3512
- 16 How I manage my difficult problems. *Aust Fam Physician* 1991; 20: 365-448
- 17 王炎, 宋贵霞, 李琦. microRNA与大肠癌关系的研究进展. *世界华人消化杂志* 2011; 19: 3426-3431
- 18 Bitarte N, Bandres E, Boni V, Zarate R, Rodriguez J, Gonzalez-Huarriz M, Lopez I, Javier Sola J, Alonso MM, Fortes P, Garcia-Foncillas J. MicroRNA-451 is involved in the self-renewal, tumorigenicity, and chemoresistance of colorectal cancer stem cells. *Stem Cells* 2011; 29: 1661-1671
- 19 Calandra T, Roger T. Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 791-800
- 20 Flaster H, Bernhagen J, Calandra T, Bucala R. The macrophage migration inhibitory factor-glucocorticoid dyad: regulation of inflammation and immunity. *Mol Endocrinol* 2007; 21: 1267-1280
- 21 Kyriakis JM. Thinking outside the box about Ras. *J Biol Chem* 2009; 284: 10993-10994
- 22 Murakami M, Suzuki H, Nakamoto H, Kageyama Y, Naitoh M, Sakamaki Y, Saruta T. Calcitonin gene-related peptide modulates adrenal hormones in conscious dogs. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1991; 124: 346-352
- 23 Han I, Lee MR, Nam KW, Oh JH, Moon KC, Kim HS. Expression of macrophage migration inhibitory factor relates to survival in high-grade osteosarcoma. *Clin Orthop Relat Res* 2008; 466: 2107-2113
- 24 Amin MA, Volpert OV, Woods JM, Kumar P, Harlow LA, Koch AE. Migration inhibitory factor mediates angiogenesis via mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol kinase. *Circ Res* 2003; 93: 321-329
- 25 Li Z, Ren Y, Wu QC, Lin SX, Liang YJ, Liang HZ. Macrophage migration inhibitory factor enhances neoplastic cell invasion by inducing the expression of matrix metalloproteinase 9 and interleukin-8 in nasopharyngeal carcinoma cell lines. *Chin Med J (Engl)* 2004; 117: 107-114
- 26 Meyer-Siegler KL, Iczkowski KA, Leng L, Bucala R, Vera PL. Inhibition of macrophage migration inhibitory factor or its receptor (CD74) attenuates growth and invasion of DU-145 prostate cancer cells. *J Immunol* 2006; 177: 8730-8739
- 27 Zheng YX, Yang M, Rong TT, Yuan XL, Ma YH, Wang ZH, Shen LS, Cui L. CD74 and macrophage migration inhibitory factor as therapeutic targets in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2012; 18: 2253-2261
- 28 Tomiyasu M, Yoshino I, Suemitsu R, Okamoto T, Sugimachi K. Quantification of macrophage migration inhibitory factor mRNA expression in non-small cell lung cancer tissues and its clinical significance. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 3755-3760
- 29 Rendon BE, Roger T, Teneng I, Zhao M, Al-Abed Y, Calandra T, Mitchell RA. Regulation of human lung adenocarcinoma cell migration and invasion by macrophage migration inhibitory factor. *J Biol Chem* 2007; 282: 29910-29918
- 30 Shun CT, Lin JT, Huang SP, Lin MT, Wu MS. Expression of macrophage migration inhibitory factor is associated with enhanced angiogenesis and advanced stage in gastric carcinomas. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 3767-3771
- 31 Lee H, Rhee H, Kang HJ, Kim HS, Min BS, Kim NK, Kim H. Macrophage migration inhibitory factor may be used as an early diagnostic marker in colorectal carcinomas. *Am J Clin Pathol* 2008; 129: 772-779

编辑 翟欢欢 电编 闫晋利

Runx3、Rassf1a基因启动子在胃癌组织中的高甲基化及Dnmt1的表达

姜相君, 初蕾蕾, 崔艳欣, 宋明全, 解祥军, 田字彬

姜相君, 初蕾蕾, 崔艳欣, 宋明全, 青岛大学医学院附属青
岛市市立医院消化内二科 山东省青岛市 266011

解祥军, 青岛大学医学院附属青
岛市市立医院消化内一科
山东省青岛市 266011

田字彬, 青岛大学医学院附属医院消化内科 山东省青岛市
266003

姜相君, 教授, 在读博士, 主要从事消化系统肿瘤早期诊断的研究。
青岛市科技局基金资助项目, No. 2012-1-3-1-(10)

作者贡献分布: 姜相君与田字彬对此文所作贡献均等; 田字彬设计课题; 姜相君与初蕾蕾收集病历; 崔艳欣完成实验操作; 初蕾蕾与解祥军完成数据分析; 姜相君与宋明全完成论文撰写。

通讯作者: 田字彬, 主任医师, 266003, 山东省青岛市江苏路16号, 青岛大学医学院附属医院消化内科。

tianzb@qdmh.qd.sd.cn

电话: 0532-82911304

收稿日期: 2012-09-28 修回日期: 2012-11-17

接受日期: 2012-12-03 在线出版日期: 2012-12-18

Relationship between promoter methylation of the Runx3 and Rassf1a genes and Dnmt1 expression in gastric cancer

Xiang-Jun Jiang, Lei-Lei Chu, Yan-Xin Cui,
Ming-Quan Song, Xiang-Jun Xie, Zi-Bin Tian

Xiang-Jun Jiang, Lei-Lei Chu, Yan-Xin Cui, Ming-Quan Song, Department of Gastroenterology (Division II), Qingdao Municipal Hospital, Qingdao 266011, Shandong Province, China

Xiang-Jun Xie, Department of Gastroenterology (Division I), Qingdao Municipal Hospital, Qingdao 266011, Shandong Province, China

Zi-Bin Tian, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Qingdao University Medical College, Qingdao 266003, Shandong Province, China

Supported by: the Foundation of Science and Technology Bureau of Qingdao, No. 2012-1-3-1-(10)

Correspondence to: Zi-Bin Tian, Chief Physician, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Qingdao University Medical College, 16 Jiangsu Road, Qingdao 266003, Shandong Province, China. tianzb@qdmh.qd.sd.cn

Received: 2012-09-28 Revised: 2012-11-17

Accepted: 2012-12-03 Published online: 2012-12-18

Abstract

AIM: To analyze the promoter methylation of the human runt-related transcription factor 3 (*Runx3*) and ras-association domain family 1a (*Rassf1a*) genes and *Dnmt1* protein expression in gastric cancer and to analyze their relationship with gastric carcinogenesis.

METHODS: Methylation status of the *Runx3* and *Rassf1a* genes in 68 gastric carcinoma tissues and 68 paired surgical marginal normal gastric tissues was detected using methylation-specific PCR. Real-time RT-PCR was used to detect the expression of *Runx3*, *Rassf1a*, and *Dnmt1* mRNAs, and immunohistochemistry was used to detect the expression of RUNX3, RASSF1a, and DNMT1 proteins in the above samples.

RESULTS: The positive rates of promoter methylation of the *Runx3* and *Rassf1a* genes were significantly higher in gastric cancer than in normal tissue (45.59% vs 10.29%; 64.70% vs 7.35%; both $P < 0.0001$). The positive rates of *Runx3* and *Rassf1a* mRNA expression in gastric cancer were significantly lower than those in normal tissue (36.76% vs 100%; 27.94% vs 97.06%; both $P < 0.0001$), while that of *Dnmt1* mRNA expression was higher compared to normal tissue (80.88% vs 17.65%, $P < 0.0001$). The expression patterns of RUNX3, RASSF1a, and DNMT1 proteins were consistent with those of *Runx3*, *Rassf1a*, and *Dnmt1* mRNAs. The negative rates of *Runx3* and *Rassf1a* mRNA expression in gastric cancer were significantly higher in the methylation group than in the non-methylation group (72.09% vs 0%; 85.71% vs 2.94%; both $P < 0.0001$). There was a negative correlation between the expression of RUNX3 and RASSF1a proteins and that of DNMT1 protein in gastric cancer tissue ($r = -0.627$, $P < 0.0001$; $r = -0.477$, $P < 0.0001$).

CONCLUSION: The promoter methylation of the *Runx3* and *Rassf1a* genes and high expression of *Dnmt1* may be associated with the occurrence of gastric cancer.

Key Words: Gastric cancer; Methylation-specific PCR; Human runt-related transcription factor 3; RAS-association domain family 1 A; DNA methyltransferase 1

Jiang XJ, Chu LL, Cui YX, Song MQ, Xie XJ, Tian ZB. Relationship between promoter methylation of the *Runx3* and *Rassf1a* genes and *Dnmt1* expression in gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(35): 3457-3463

■背景资料

胃癌是多种基因(包括原癌基因、抑癌基因)参与的多阶段多途径的基因调节异常疾病。表观遗传学异常是胃癌发生发展过程中较普遍的现象,即不改变基因序列的情况下通过调控DNA-组蛋白之间的相互作用来改变基因的表达。

■同行评议者

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

■研究前沿

目前国内外关于胃癌的甲基化研究多集中在单个基因,随着胃癌相关基因的异常甲基化被不断报道,提示胃癌可能同时存在多个基因的异常甲基化,多个肿瘤相关基因CpG位点甲基化的联合检测更有利于揭示肿瘤分子病理机制,进而为临床胃癌的早期诊断提供方法和依据。

摘要

目的: 探讨人类相关转录因子3(human runt-related transcription factor 3, *Runx3*)、Ras相关区域家族1A(ras-association domain family 1a, *Rassfla*)基因启动子区的甲基化和甲基转移酶1(DNA methyltransferase 1, *Dnmt1*)基因的表达与胃癌发生的关系及临床意义。

方法: 采用甲基化特异性聚合酶链反应(methylation specific PCR, MSP)检测68例胃癌组织及其相应癌旁正常组织中*Runx3*、*Rassfla*基因启动子区甲基化状态;同时应用实时荧光定量逆转录-多聚合酶链反应(real-time RT-PCR)和免疫组织化学SP法分别检测基因的*Runx3*、*Rassfla*、*Dnmt1* 3个基因mRNA和蛋白的表达情况。

结果: 胃癌组织中*Runx3*、*Rassfla*基因的甲基化阳性率较正常组织明显升高(45.59% vs 10.29%; 64.70% vs 7.35%)。胃癌组织中*Runx3*和*Rassfla* mRNA阳性表达率明显低于正常组织(36.76% vs 100%; 27.94% vs 97.06%),而胃癌组织中*Dnmt1* mRNA阳性表达率则明显高于正常组织(80.88% vs 17.65%),差异均有统计学意义。胃癌组织与正常组织RUNX3、RASSF1a、DNMT1蛋白与mRNA表达基本相一致。*Runx3* mRNA、*Rassfla* mRNA阴性表达的胃癌组织中其基因启动子的甲基化率较阳性表达者明显升高(72.09% vs 0; 85.71% vs 2.94%),差异具有统计学意义。胃癌组织中RUNX3、RASSF1a与DNMT1蛋白的表达均呈负相关($r = -0.627, P < 0.0001$; $r = -0.477, P < 0.0001$)。

结论: *Runx3*、*Rassfla*基因启动子区的高甲基化及*Dnmt1*基因高表达可能与胃癌发生有关。

关键词: 胃癌; 甲基化特异性PCR; *Runx3*; *Rassfla*; *Dnmt1*

姜相君, 初蕾蕾, 崔艳欣, 宋明全, 解祥军, 田宇彬. *Runx3*、*Rassfla*基因启动子在胃癌组织中的高甲基化及*Dnmt1*的表达. 世界华人消化杂志 2012; 20(35): 3457-3463
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3457.asp>

0 引言

胃癌的发生是一个多基因、多阶段变异累积的过程^[1],其中涉及基因机制和表观遗传学机制,而表观遗传机制中最常见的是DNA甲基化^[2]。DNA甲基化是在甲基转移酶(DNA methyltransferase, *Dnmt*)催化作用下,将甲基基团转移至某些基因

的碱基上并进行转录水平调控,其中*Dnmt1*是维持机体现有DNA甲基化模式的关键因素。大量证据表明,肿瘤的发生与抑癌基因启动子区异常高甲基化有关^[3]。我们之前的研究结果表明:人类相关转录因子3(human runt-related transcription factor 3, *Runx3*)、Ras相关区域家族1A(ras-association domain family 1a, *Rassfla*)基因在胃癌组织中表达低下甚至缺失^[4,5],而胃癌组织中*Runx3*、*Rassfla*基因的低表达与*Dnmt1*的关系如何,则未见相关文献报道。本实验通过采用甲基化特异性PCR检测68例胃癌组织及其相应癌旁正常组织中*Runx3*、*Rassfla*基因启动子区甲基化状态;同时应用实时荧光定量逆转录-多聚合酶链反应(real-time RT-PCR)和免疫组织化学SP法分别检测*Runx3*、*Rassfla*、*Dnmt1* 3个基因mRNA和蛋白的表达情况,探讨*Runx3*、*Rassfla*基因启动子区的甲基化与*Dnmt1*基因的表达在胃癌发生发展中的作用及可能的机制,进一步完善胃癌发生中甲基化修饰理论,也为胃癌的靶向治疗提供新的思路。

1 材料和方法

1.1 材料 收集青岛大学医学院附属青岛市市立医院普外科(2011-04/2012-05)手术切除的肿瘤标本68例,标本均经深资病理科医师复核并确诊为原发性胃癌,其中男40例,女28例,年龄37-87岁,平均年龄63.76岁±11.89岁,中位年龄62岁。胃癌组织取自癌灶中央非坏死区域,正常组织取自与之配对的距离癌组织5 cm以上区域,所有标本均取双份,一份立即置RNA保存液中, -80℃冰箱保存,用于提取DNA和RNA;另一份置于40 g/L中性甲醛溶液,固定24 h,用于免疫组织化学检测。入选患者术中均行淋巴结清扫,术前未行放化疗,拥有完整的临床资料。

1.2 方法

1.2.1 组织DNA提取: 组织DNA提取严格按照离心柱试剂盒(北京天根)操作说明书进行。核酸蛋白分析仪测其A值, A_{260/280}在1.8-2.0之间,符合纯度要求,表明提取的DNA无蛋白质及RNA污染。凝胶电泳检测提取DNA的质量,剩余DNA置于-20℃冻存。

1.2.2 组织DNA修饰及甲基化特异性PCR(methylation specific PCR): 取组织DNA 500 ng,采用EZ DNA Methylation-GOLD Kit(D5005)试剂盒(美国Zymo Research)进行DNA亚硫酸氢盐修饰与纯化,经此步后, DNA序列中未甲基化的胞嘧啶

(C)转变为尿嘧啶(U). 取修饰后DNA, 根据试剂盒(北京天根)的说明书进行PCR反应. *Runx3*、*Rassfla*引物设计参照文献[6,7], 由上海生工合成. PCR反应体系包括: 2×Master Mix 12.5 μL, 上下游引物(10 μmol/L)各1 μL, DNA模板1 μg, 加ddH₂O补足至25 μL. PCR反应条件设定为94 °C预变性5 min, 94 °C变性30 s, 甲基化64 °C/非甲基化59 °C退火, 72 °C延伸45 s, 共35个循环, 72 °C延伸10 min. 取PCR产物5 μL, 1.5%琼脂糖凝胶电泳, 紫外线下观察拍照分析.

1.2.3 组织RNA提取: 取组织100 mg研磨棒充分研磨, 加入RNA提取试剂(日本TakaRa公司)1 mL, 并严格按照试剂说明书进行操作. 提取的RNA经1.0%琼脂糖凝胶电泳检测完整性, 核酸蛋白分析仪测其浓度及A值, 测得 $1.80 < A_{260/280} < 2.00$, 符合纯度要求, -80 °C冻存备用.

1.2.4 逆转录-多聚合酶链反应: 取1 μg RNA严格按照逆转录试剂盒(日本TaKaRa公司)说明书合成cDNA, -20 °C保存备用. 以β-actin作为内参进行PCR扩增, 其上游引物5'-AAA TCG TGC GTG ACA TTA A-3', 下游引物5'-CTC GTC ATA CTC CTG CTT G-3', *Runx3*上游引物5'-TCT GTA AGG CCC AAA GTG GGT A-3', 下游引物5'-ACC TCA GCA TGA CAA TAT GTC ACA A-3'; *Rassfla*上游引物5'-ACT TGC GGA AGC TGT TGG A-3', 下游引物5'-CGC TGC AGG ATA CGT AGG AA-3'; *Dnmt1*上游引物5'-CGG TTC TTC CTC CTG GAG AAT GTC A-3'下游引物5'-CAC TGA TAG CCC ATG CGG ACC A-3', 引物均由上海生工生物工程有限公司设计并合成. PCR反应体系为25 μL, 体系中含SYBR® Premix Ex Taq™ II (×2) 12.5 μL(日本TaKaRa公司), 上下游引物各1.0 μL, cDNA模板2 μL, ROX Reference Dye (×50) 0.5 μL, dH₂O 8.0 μL; 反应参数: 94 °C 30 s预变性; 94 °C 5 s、55 °C 30 s、72 °C 45 s共40个循环. ABI 7300 Real-time PCR仪实时检测扩增过程中产生的荧光信号, 扩增结束后自动分析溶解曲线. 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析数据结果, 样品中Ct值>30视为阴性表达.

1.2.5 免疫组织化学SP法: 常规石蜡包埋, 组织蜡块4 μm厚连续切片, 常规脱蜡水化, 3% H₂O₂ 37 °C孵育15 min, 消除内源性过氧化物酶活性, 95 °C微波15 min修复抗原后, 按照SP试剂盒说明书进行操作. SP试剂盒购自北京博奥森生物技术有限公司, 一抗工作液浓度为1:100. 采用PBS代替一抗作阴性对照, 已知的RUNX3、

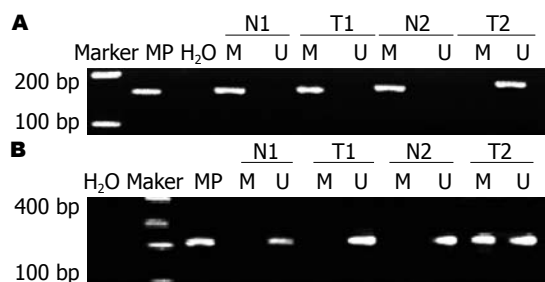


图1 *Runx3*和*Rassfla*基因MSP反应产物的电泳图谱. A: *Runx3*基因; B: *Rassfla*基因; MP: 甲基化阳性对照; H₂O: 灭菌双蒸水代替DNA作为空白对照; M: 甲基化条带; U: 非甲基化条带; N: 正常组织; T: 胃癌组织.

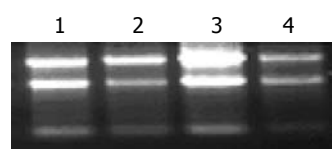


图2 总RNA的琼脂糖凝胶电泳图谱. 1, 3: 正常组织; 2, 4: 胃癌组织.

■ 相关报道

林海等研究发现胃癌组织中*Runx3*、*Rassfla*启动子区甲基化率分别为69.4%和66.1%, 较正常组织26.8%和23.1%明显升高, *Runx3*和*Rassfla*高甲基化可能是导致其表达降低的原因.

RASSF1a和DNMT1阳性的正常标本作阳性对照.

1.2.6 免疫组织化学结果判定: 每张切片随机选取5个视野, 每个视野计数200个细胞, RUNX3、RASSF1a、DNMT1阳性表达部位主要在腺体细胞的胞浆中, 部分细胞核中也有表达. 采用半定量积分法判断结果, 阳性细胞密度<5%为0分, 6%-25%为1分, 26%-50%为2分, 51%-75%为3分, >75%为4分; 免疫组织化学显色强度以多数细胞呈色反应为准, 淡黄色为1分, 棕黄色为2分, 棕褐色为3分两积分相乘, 0分为阴性(-), 1-4分为弱阳性(+), 5-8分为阳性(++), 9-12分为强阳性(+++), 将阴性与弱阳性视为阴性表达, 阳性与强阳性视为阳性表达.

统计学处理 应用SPSS17.0软件包进行统计学处理, 计量资料数据组间比较采用t检验, 计数资料比较采用 χ^2 检验, P为双侧性检验, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 胃癌组织与正常组织中*Runx3*、*Rassfla*启动子区的甲基化情况 胃癌组织中*Runx3*启动子区甲基化率为45.59%(31/68), 明显高于正常组织10.29%(7/68), 差异有统计学意义($\chi^2 = 21.035$, $P < 0.0001$). 胃癌组织中*Rassfla*启动子区甲基化率为64.70%(44/68), 明显高于正常组织7.35%(5/68), 差异有统计学意义($\chi^2 = 48.524$, $P < 0.0001$, 图1).

2.2 胃癌组织与正常组织中*Runx3*、*Rassfla*、*Dnmt1*的mRNA表达情况 RNA的完整性检测见图2, 可见5S、18S和28S rRNA 3条清晰的

■创新盘点

本研究发现胃癌组织中*Runx3*和*Rassfla*表达降低与其基因启动子区发生甲基化有关,且*Runx3*和*Rassfla*基因启动子区甲基化的发生与*Dnmt1*的表达增加有关,在此基础上深入研究甲基化与胃癌的关系,建立胃癌相关基因甲基化谱。

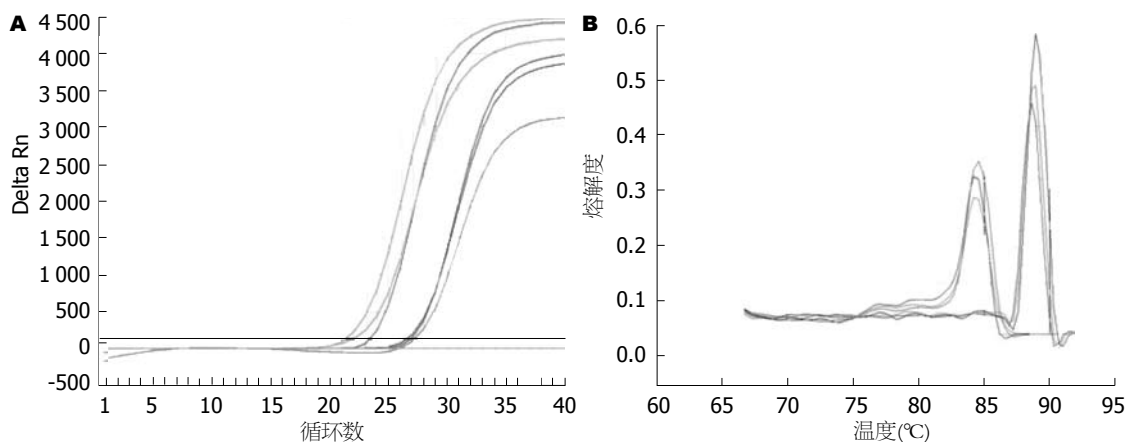


图3 Real-time RT-PCR目的基因与内参基因的扩增曲线(A)和熔解曲线(B).

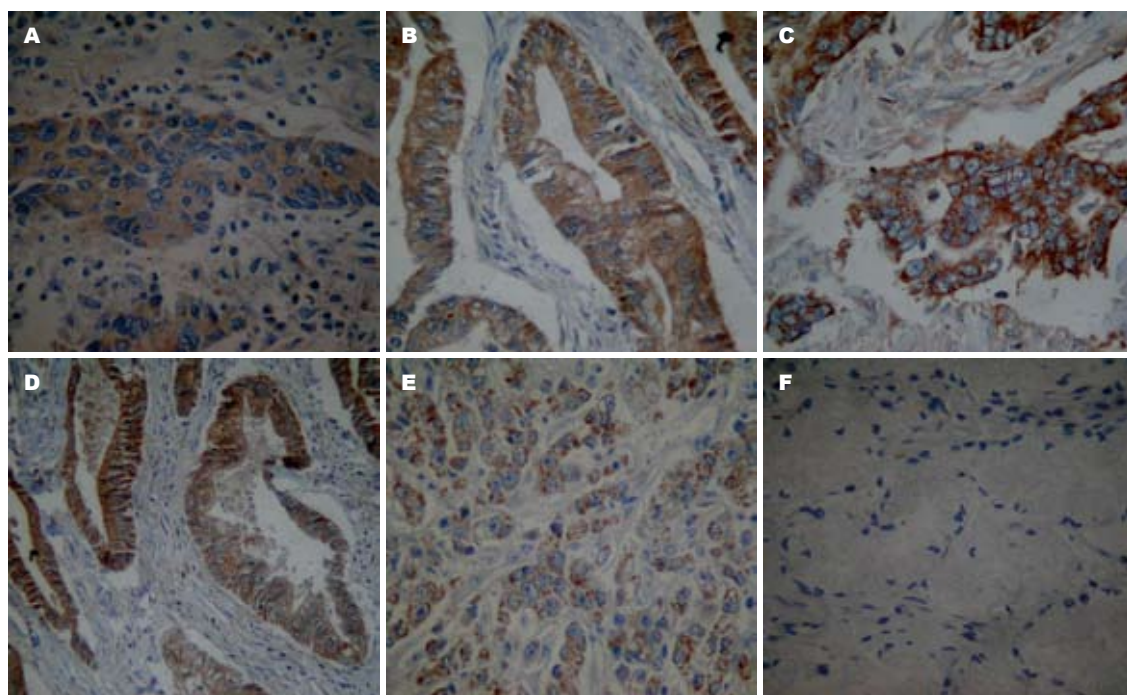


图4 RUNX3、RASSFLA、DNMT1的免疫组织化学结果(SP×400). A, B: RUNX3在胃癌组织与癌旁正常组织中的表达; C, D: RASSFLA在胃癌组织与癌旁正常组织中的表达; E, F: DNMT1在胃癌组织与癌旁正常组织中的表达.

条带. 荧光定量PCR的扩增曲线均呈典型的S型, 融解曲线呈单峰(图3), 可以排除引物二聚体及非特异性扩增, 得到的Ct值可信. 癌组织中*Runx3*和*Rassfla* mRNA阳性表达率分别为36.76%(25/68)、27.94%(19/68), 明显低于正常组织100%(68/68)、97.06%(66/68), 差异有统计学意义($\chi^2 = 30.63$, $P < 0.0001$; $\chi^2 = 69.30$, $P < 0.0001$). 而胃癌组织中*Dnmt1* mRNA阳性表达率为80.88%(55/68), 明显高于正常组织17.65%(12/68), 差异有统计学意义($\chi^2 = 57.80$, $P < 0.0001$).

2.3 胃癌组织与正常组织RUNX3、RASSFLA、DNMT1蛋白表达情况 胃癌组织与正常组织

RUNX3、RASSFLA、DNMT1蛋白的阳性表达率与mRNA基本相一致. RUNX3在正常组织中的表达阳性率为91.18%(62/68), 明显高于胃癌组织29.76%(20/68), 差异有统计学意义($\chi^2 = 54.18$, $P < 0.001$). RASSFLA在正常组织中的表达阳性率为86.76%(66/68), 明显高于胃癌组织25.00%(17/68), 差异有统计学意义($\chi^2 = 74.23$, $P < 0.001$). DNMT1在胃癌组织的表达阳性率82.35%(56/68), 明显高于正常组织14.71%(10/68), 差异具有统计学意义($\chi^2 = 62.29$, $P < 0.001$, 图4).

2.4 胃癌组织中*Runx3*、*Rassfla*基因启动子甲基化状态与*Runx3* mRNA、*Rassfla* mRNA表

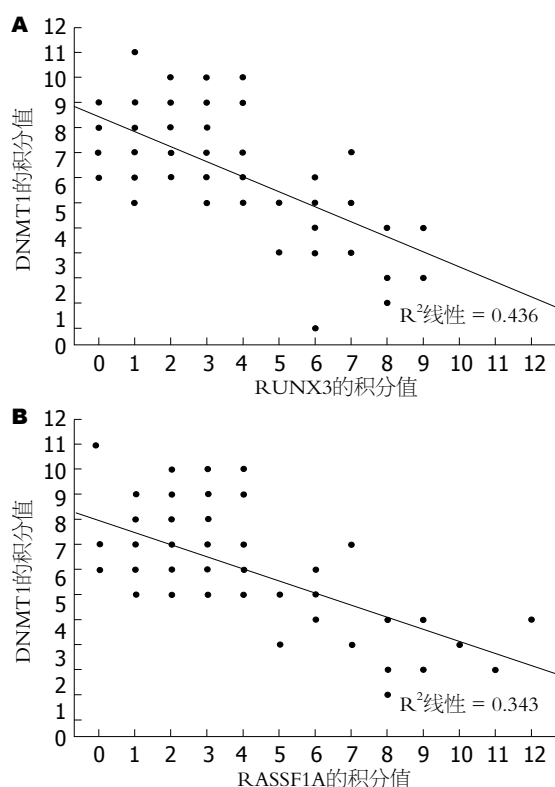


图5 胃癌组织中DNMT1与RUNX3(A)、RASSF1A(B)表达的散点图。

达之间的关系 在43例*Runx3* mRNA阴性表达的胃癌组织中, 检测出31例该基因启动子甲基化, 甲基化率为72.09%; 而在25例*Runx3* mRNA阳性表达的胃癌组织中, 则未检测出该基因启动子存在甲基化, 差异具有统计学意义($\chi^2 = 33.124$, $P < 0.0001$)。在49例*Rassf1a* mRNA表达阴性的胃癌组织中, 检测出42例该基因启动子甲基化, 甲基化率为85.71%; 而在19例*Rassf1a* mRNA阳性表达的胃癌组织中, 只检测出2例存在该基因启动子区甲基化, 差异具有统计学意义($\chi^2 = 33.892$, $P < 0.0001$)。

2.5 胃癌组织中RUNX3、RASSF1a与DNMT1蛋白表达之间的关系 Spearman相关性分析相关提示: 胃癌组织中RUNX3与DNMT1蛋白的表达呈负相关($r = -0.627$, $P < 0.0001$), RASSF1a与DNMT1蛋白的表达呈负相关($r = -0.477$, $P < 0.0001$, 图5)。

3 讨论

*Runx3*基因定位于人染色体1号短臂1p36.1, 是转录生长因子 β (transforming growth factor, TGF- β)信号通路下游的一个转录因子^[8,9]。在TGF- β 介导的凋亡信号转导通路中, 激活的Smad复合物必须在RUNX蛋白的指导下才能从细胞质转入

细胞核, 并准确结合和激活特定靶位点, 其表达失活, 可以使细胞凋亡受抑制而无限增殖, 从而形成肿瘤^[10,11]。*Rassf1a*是新近发现的候选肿瘤抑癌基因, 是一种Ras的效应分子, 既可以促进细胞生长和分化, 又可以抑制细胞生长、促进凋亡和衰老^[12-15]。研究发现:*Runx3*、*Rassf1a*几乎在全身所有组织中都有表达, 而在绝大多数恶性肿瘤中(如结直肠癌、食管癌、鼻咽癌及乳腺癌等)则表达沉默^[16-18]。本研究发现: RUNX3、RASSF1a蛋白的表达与mRNA的表达基本一致, 即: 胃癌组织中的RUNX3、RASSF1a蛋白的阳性表达率较正常组织明显减少, 差异具有统计学意义。因此推测: *Runx3*、*Rassf1a*基因沉默可能参与胃癌的发生发展。

本研究发现: 胃癌组织中*Runx3*和*Rassf1a*启动子区的甲基化率较正常组织明显升高, 差异具有统计学意义。这一研究结果与国内外学者的研究结果一致^[19-24], 也支持我们之前的实验结果。为了更好地阐明*Runx3*、*Rassf1a*基因甲基化与表达之间的关系, 我们将*Runx3* mRNA、*Rassf1a* mRNA阴性表达和阳性表达的分开统计甲基化率, 结果显示: *Runx3* mRNA、*Rassf1a* mRNA阴性表达的胃癌组织中其基因启动子的甲基化率较阳性表达者明显升高, 差异具有统计学意义。推测*Runx3*、*Rassf1a*表达缺失与该因子基因启动子的甲基化有关^[25-29], 抑癌基因高甲基化可能是降低的原因。对于胃癌中个别不存在*Runx3*和*Rassf1a*启动子甲基化而基因表达阴性, 考虑可能解释的原因是有点突变、杂合性缺失等机制共同调节作用。

在研究*Runx3*及*Rassf1a*甲基化状况的同时, 我们还对其可能的机制进行了初步的探索。*Dnmt1*是人类DNMTs家族中的成员之一, 目前的研究结果表明*Dnmt1*与基因的甲基化关系密切, 具有维持甲基化的作用。丁雯瑾等^[30]研究发现DNMT1蛋白在胃癌组织中的表达阳性率为81.6%, 显著高于正常组织10.5%, 差异具有统计学意义。而我们的研究结果显示: DNMT1蛋白在胃癌组织中的表达率较正常组织明显升高, 其mRNA的表达同蛋白表达基本一致, 差异具有统计学意义。与他们的研究结果基本一致。本实验还发现: 胃癌组织中DNMT1与RUNX3、RASSF1A蛋白的表达均呈负相关, 差异具有统计学意义。综合以上研究结果, 我们初步推测: 胃癌组织中DNMT1的mRNA及蛋白表达显著增高, 导致抑癌基因*Runx3*及*Rassf1a*基因启动子区发生

■应用要点

本研究通过对*Runx3*、*Rassf1a*基因启动子区的甲基化与*Dnmt1*基因的表达在胃癌发生发展中的作用及可能机制的探讨, 进一步完善胃癌发生中甲基化修饰理论, 为胃癌的靶向治疗提供了新的思路; 某些CpG岛的异常甲基化特异地出现在癌或癌前病变中, 对其进行检测有助于肿瘤的早期诊断。

■名词解释

DNA甲基化: 指由DNA甲基化转移酶家族Dnmts介导、以S-腺苷甲硫氨酸作为甲基化供体, 将胞嘧啶转变为5-甲基胞嘧啶的一种反应, 其中Dnmt 1是维持机体现有DNA甲基化模式的关键因素。

异常甲基化, 使抑癌基因mRNA及蛋白表达减少, 失去对肿瘤发生的抑制作用。这仅是本实验的一些初步推测, 具体的发生机制, 还有待于大样本实验的进一步证实。

目前胃癌是仍是亚洲地区第二大致死性疾病, 虽然外科治疗是胃癌目前的主要治疗手段, 但早期诊断及早期手术是降低胃癌病死率的关键^[31]。由于DNA甲基化贯穿于肿瘤发生发展的全过程, 并具有一定组织特异性, 所以今后在本实验的基础上, 深入研究甲基化与胃癌的关系, 建立起胃癌相关基因的甲基化谱, 并研究DNMTs家族的作用及具体机制, 为胃癌的预防、早期诊断和抗甲基化治疗提供实验和理论依据。另外, 胃癌的发生不但与抑癌基因启动子甲基化有关, 还与幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)感染有一定关系, 那么抑癌基因启动子甲基化*H. pylori*与之间是否有关, 为我们今后的胃癌研究提供了新的思路。

4 参考文献

- Jang BG, Kim WH. Molecular pathology of gastric carcinoma. *Athobiology* 2011; 78: 302-310
- Goswami UC, Sharma N. Efficiency of a few retinoids and carotenoids in vivo in controlling benzo[a]pyrene-induced forestomach tumour in female Swiss mice. *Br J Nutr* 2005; 94: 540-543
- Kurkjian C, Kummer S, Murgo AJ. DNA methylation: its role in cancer development and therapy. *Curr Probl Cancer* 2008; 32: 187-235
- 杨阅楼, 张梅, 姜相君. 人胃癌组织中RUNX3、DNMT1的表达及其与HP感染的相关性研究. *现代肿瘤医学* 2012; 20: 1212-1215
- 任希才, 姜相君. 抑癌基因RASSF1A mRNA在胃癌中的表达及临床意义. *现代肿瘤医学* 2011; 19: 501-504
- Li WQ, Pan KF, Zhang Y, Dong CX, Zhang L, Ma JL, Zhou T, Li JY, You WC. RUNX3 methylation and expression associated with advanced precancerous gastric lesions in a Chinese population. *Carcinogenesis* 2011; 32: 406-410
- 刘培, 姜相君, 葛银林. RASSF1A基因启动子区甲基化在胃癌组织中的检测. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 3144-3147
- Ito Y. RUNX genes in development and cancer: regulation of viral gene expression and the discovery of RUNX family genes. *Adv Cancer Res* 2008; 99: 33-76
- Zhao C, Bu X. Promoter methylation of tumor-related genes in gastric carcinogenesis. *Histol Histopathol* 2012; 27: 1271-1282
- Subramaniam MM, Chan JY, Yeoh KG, Quek T, Ito K, Salto-Tellez M. Molecular pathology of RUNX3 in human carcinogenesis. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1796: 315-331
- Ito K. RUNX3 in oncogenic and anti-oncogenic signaling in gastrointestinal cancers. *J Cell Biochem* 2011; 112: 1243-1249
- 黄定鹏, 赵亚刚. RASSF1A与胃癌的研究进展. *华南国防医学杂志* 2011; 25: 542-544
- Pijnenborg JM, Dam-de Veen GC, Kisters N, Delvoux B, van Engeland M, Herman JG, Groothuis PG. RASSF1A methylation and K-ras and B-raf mutations and recurrent endometrial cancer. *Ann Oncol* 2007; 18: 491-497
- Song MS, Chang JS, Song SJ, Yang TH, Lee H, Lim DS. The centrosomal protein RAS association domain family protein 1A (RASSF1A)-binding protein 1 regulates mitotic progression by recruiting RASSF1A to spindle poles. *J Biol Chem* 2005; 280: 3920-3927
- Dammann R, Schagdarsurengin U, Liu L, Otto N, Gimm O, Dralle H, Boehm BO, Pfeifer GP, Hoang-Vu C. Frequent RASSF1A promoter hypermethylation and K-ras mutations in pancreatic carcinoma. *Oncogene* 2003; 22: 3806-3812
- Soong R, Shah N, Peh BK, Chong PY, Ng SS, Zeps N, Joseph D, Salto-Tellez M, Iacopetta B, Ito Y. The expression of RUNX3 in colorectal cancer is associated with disease stage and patient outcome. *Br J Cancer* 2009; 100: 676-679
- Lo PH, Xie D, Chan KC, Xu FP, Kuzmin I, Lerman MI, Law S, Chua D, Sham J, Lung ML. Reduced expression of RASSF1A in esophageal and nasopharyngeal carcinomas significantly correlates with tumor stage. *Cancer Lett* 2007; 257: 199-205
- Li Y, Wei Q, Cao F, Cao X. Expression and promoter methylation of the RASSF1A gene in sporadic breast cancers in Chinese women. *Oncol Rep* 2008; 19: 1149-1153
- Fan XY, Hu XL, Han TM, Wang NN, Zhu YM, Hu W, Ma ZH, Zhang CJ, Xu X, Ye ZY, Han CM, Pan WS. Association between RUNX3 promoter methylation and gastric cancer: a meta-analysis. *BMC Gastroenterol* 2011; 11: 92
- Homma N, Tamura G, Honda T, Matsumoto Y, Nishizuka S, Kawata S, Motoyama T. Spreading of methylation within RUNX3 CpG island in gastric cancer. *Cancer Sci* 2006; 97: 51-56
- Dammann R, Schagdarsurengin U, Seidel C, Strunnikova M, Rastetter M, Baier K, Pfeifer GP. The tumor suppressor RASSF1A in human carcinogenesis: an update. *Histol Histopathol* 2005; 20: 645-663
- Ben Ayed-Guerfali D, Benhaj K, Khabir A, Abid M, Bayrouiti MI, Sellami-Boudawara T, Gargouri A, Mokdad-Gargouri R. Hypermethylation of tumor-related genes in Tunisian patients with gastric carcinoma: clinical and biological significance. *J Surg Oncol* 2011; 103: 687-694
- Guo W, Dong Z, Chen Z, Yang Z, Wen D, Kuang G, Guo Y, Shan B. Aberrant CpG island hypermethylation of RASSF1A in gastric cardia adenocarcinoma. *Cancer Invest* 2009; 27: 459-465
- Hu SL, Huang DB, Sun YB, Wu L, Xu WP, Yin S, Chen J, Jiang XD, Shen G. Pathobiologic implications of methylation and expression status of Runx3 and CHFR genes in gastric cancer. *Med Oncol* 2011; 28: 447-454
- Chen W, Gao N, Shen Y, Cen JN. Hypermethylation downregulates Runx3 gene expression and its restoration suppresses gastric epithelial cell growth by inducing p27 and caspase3 in human gastric cancer. *J Gastroenterol Hepatol* 2010; 25: 823-831
- Tang GH, Sun SW, He XS. [Correlation of CpG methylation status of Runx3 with pathogenesis of gastric carcinoma]. *Zhonghua Binglixue Zazhi* 2012; 41: 314-319
- Lu XX, Yu JL, Ying LS, Han J, Wang S, Yu QM,

- Wang XB, Fang XH, Ling ZQ. Stepwise cumulation of RUNX3 methylation mediated by Helicobacter pylori infection contributes to gastric carcinoma progression. *Cancer* 2012; 118: 5507-5517
- 28 林海, 曹俊, 张斌, 吴育美, 邹晓平. RUNX3、RASS-F1A启动子高甲基化与胃癌进展转移的关系. *世界华人消化杂志* 2010; 18: 889-896
- 29 Yao D, Shi J, Shi B, Wang N, Liu W, Zhang G, Ji M, Xu L, He N, Hou P. Quantitative assessment of gene methylation and their impact on clinical outcome in gastric cancer. *Clin Chim Acta* 2012; 413: 787-794
- 30 丁雯瑾, 房静远, 陈晓宇, 彭延申. DNA甲基转移酶1蛋白在人胃癌黏膜组织中的表达及其临床意义. *胃肠病学* 2007; 12: 200-203
- 31 Leung WK, Wu MS, Kakugawa Y, Kim JJ, Yeoh KG, Goh KL, Wu KC, Wu DC, Sollano J, Kachintorn U, Gotoda T, Lin JT, You WC, Ng EK, Sung JJ. Screening for gastric cancer in Asia: current evidence and practice. *Lancet Oncol* 2008; 9: 279-287

■同行评价

本文选题很好, 课题设计合理, 实验过程缜密, 结果详实可信, 有一定的临床指导价值。

编辑 翟欢欢 电编 闫晋利

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》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代表其真实研究成果, 保证文责自负; (4)列出通讯作者的姓名、地址、电话、传真和电子邮件; 通讯作者应负责与其他作者联系, 修改并最终审核复核稿; (5)列出作者贡献分布; (6)来稿应附有作者工作单位的推荐信, 保证无泄密, 如果是几个单位合作的论文, 则需要提供所有参与单位的推荐信; (7)愿将印刷版和电子版版权转让给本刊编辑部。

2 稿件修改

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

3 版权

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

TMEM16A在结肠癌组织中的表达及其意义

杨军, 刘妮, 康安静, 赵世平, 黄晓钟, 苏宝山, 陈晓黎, 李宗芳

■背景资料

结肠癌是胃肠道中常见的恶性肿瘤, 研究结肠癌的发病机制、寻找新的分子靶标具有重要意义。近年来研究发现氯离子通道对于细胞内外离子和体液转运、维持细胞膜的稳定性具有重要作用。

杨军, 刘妮, 康安静, 赵世平, 黄晓钟, 苏宝山, 陈晓黎, 西安交通大学医学院第二附属医院病理科 陕西省西安市 710004
李宗芳, 西安交通大学医学院第二附属医院外科 陕西省西安市 710004

杨军, 副教授, 主要从事肿瘤病理学方面的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. NNSFC 30872403

教育部新世纪优秀人才计划基金资助项目, No. NCET-10-0647

教育部“长江学者和创新团队发展计划”创新团队基金资助项目, No. IRT1171

作者贡献分布: 此课题设计、数据整理统计、论文写作由杨军完成; 实验操作由刘妮、赵世平、黄晓钟及苏宝山完成; 论文校正由康安静、陈晓黎及李宗芳完成。

通讯作者: 杨军, 副教授, 副主任医师, 710004, 陕西省西安市西五路157号, 西安交通大学医学院第二附属医院病理科。

yangjundr@yahoo.com.cn

电话: 029-87679466

收稿日期: 2012-09-14 修回日期: 2012-11-12

接受日期: 2012-12-03 在线出版日期: 2012-12-18

Significance of TMEM16A expression in colorectal carcinoma

Jun Yang, Ni Liu, An-Jing Kang, Shi-Ping Zhao, Xiao-Zhong Huang, Bao-Shan Su, Xiao-Li Chen, Zong-Fang Li

Jun Yang, Ni Liu, An-Jing Kang, Shi-Ping Zhao, Xiao-Zhong Huang, Bao-Shan Su, Xiao-Li Chen, Department of Pathology, the Second Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, Shaanxi Province, China

Zong-Fang Li, Department of Surgery, the Second Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, Shaanxi Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30872403; the Program for New Century Excellent Talents in University, No. NCET-10-0647; and the Program for Changjiang Scholars and Innovative Research Team in University, No. IRT1171

Correspondence to: Jun Yang, Associate Professor, Associate Chief Physician, Department of Surgery, the Second Hospital of Xi'an Jiaotong University, 157 West-Fifth Road, Xi'an 710004, Shaanxi Province, China. yangjundr@yahoo.com.cn

Received: 2012-09-14 Revised: 2012-11-12

Accepted: 2012-12-03 Published online: 2012-12-18

Abstract

AIM: To investigate the expression of transmembrane protein 16A (TMEM16A) in colorectal carcinoma.

METHODS: The expression of TMEM16A was detected by immunohistochemistry in 67 surgi-

cal colorectal carcinoma specimens and matched tumor-adjacent colorectal specimens.

RESULTS: TMEM16A was expressed in both cytoplasm and cell membrane. Among 67 colorectal carcinoma specimens, TMEM16A expression was negative in 4 cases (5.97%), weakly positive in 11 cases (16.42%), positive in 20 cases (29.85%), and strongly positive in 32 cases (47.76%). Among 67 tumor-adjacent healthy tissue specimens, TMEM16A expression was negative in 27 cases (40.30%), weakly positive in 35 cases (52.24%), positive in 3 cases (4.48%), and strongly positive in 2 cases (2.99%). The positive ("positive" plus "strongly positive") rate of TMEM16A expression was significantly higher in colorectal carcinoma tissue than in tumor-adjacent healthy tissue (77.61% vs 7.46%, $P < 0.005$).

CONCLUSION: Aberrant expression of TMEM16A is a frequent feature in colorectal carcinoma. TMEM16A can be used as a new candidate target for diagnosis and treatment of colorectal carcinoma.

Key Words: Colorectal carcinoma; Ca^{2+} -activated Cl-channels; TMEM16A; Immunohistochemistry

Yang J, Liu N, Kang AJ, Zhao SP, Huang XZ, Su BS, Chen XL, Li ZF. Significance of TMEM16A expression in colorectal carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(35): 3464-3469

摘要

目的: 探讨 Ca^{2+} 激活的氯离子通道(Ca^{2+} -activated Cl-channels, CaCC)蛋白TMEM16A在结肠癌中的表达和意义。

方法: 收集67例结肠癌标本, 采用免疫组织化学SP法检测TMEM16A的表达, 以癌旁结肠黏膜组织和6例结肠腺瘤组织作为对照, 1例胃间质瘤组织作为阳性对照。

结果: TMEM16A表达于结肠癌细胞胞膜和胞质内, 在67例结肠癌中TMEM16A呈不同程度阳性表达, 其中阴性占5.97%(4/67)、弱阳性占16.42%(11/67)、阳性占29.85%(20/67)、

■同行评议者

关玉盘, 教授, 首都医科大学附属北京朝阳医院消化科; 白雪, 副主任医师, 中国人民解放军北京军区总医院普通外科

强阳性占47.76%(32/67);在癌旁结肠黏膜腺体内大多呈阴性和弱阳性表达,其中阴性占40.30%(27/67)、弱阳性占52.24%(35/67)、阳性占4.48%(3/67)、强阳性占2.99%(2/67);在6例结肠腺瘤中均呈阳性表达。将阴性和弱阳性表达分为阴性组,将阳性和强阳性表达分为阳性组进行分析,在67例结肠癌中TMEM16A表达的总阳性率(“阳性”和“强阳性”)占77.61%(52/67),而在相应的癌旁组织中TMEM16A表达的总阳性率(“阳性”和“强阳性”)仅占7.46%(5/67),两者之间差异显著($P<0.005$)。

结论: TMEM16A可高表达于结肠癌组织,可作为结肠癌的分子诊断和靶向治疗的一个新的候选靶点。

关键词: 结肠癌; Ca^{2+} 激活的氯离子通道; TMEM16A; 免疫组织化学

杨军, 刘妮, 康安静, 赵世平, 黄晓钟, 苏宝山, 陈晓黎, 李宗芳. TMEM16A在结肠癌组织中的表达及其意义. 世界华人消化杂志 2012; 20(35): 3464-3469
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3464.asp>

0 引言

结肠癌是胃肠道中常见的恶性肿瘤,以40-50岁年龄组发病率最高,全球每年新发病例约800万例,占有恶性肿瘤的10%-15%。死亡率仅次于肺癌和肝癌,占我国恶性肿瘤第3位。因此,研究结肠癌的发病机制、寻找新的分子靶标具有重要意义。近年来研究发现氯离子通道对于细胞内外离子和体液转运、维持细胞膜的稳定性具有重要作用^[1],而 Ca^{2+} 激活的氯离子通道(Ca^{2+} -activated Cl-channels, CaCC)广泛分布于人体的多种组织,尤其是分泌器官上皮细胞,如气管和消化道黏膜上皮,与上皮组织的跨膜体液转运、细胞复极、黏附、药物代谢等多种生理过程密切相关, TMEM16A蛋白作为新近发现的氯离子通道蛋白备受关注^[2-8]。本研究探讨TMEM16A在结肠癌中的表达和意义,为结肠癌的防治提供新的思路和方法。

1 材料和方法

1.1 材料 收集西安交通大学医学院第二附属医院病理科2008-05/2011-12经外科切除并经病理检查证实为结肠癌标本67例,结肠管状腺瘤6例,间质瘤1例作为阳性对照。TMEM16A抗体购自Dako公司,SP试剂盒购自中福州迈新生物技术

开发有限公司。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学染色: 所有标本均经4%中性甲醛固定,石蜡包埋,4 μm 切片,HE染色,光学显微镜观察,按照免疫组织化学SP法染色,柠檬酸盐缓冲液(pH 6.0)高温高压进行抗原修复, DAB显色。以癌旁结肠黏膜组织和非肿瘤结肠黏膜组织作为对照,用PBS代替一抗作空白对照。

1.2.2 判定标准: 阳性染色为胞膜和/或胞质内出现棕黄色着色。采用阳性细胞率作为评价指标:按切片中阳性细胞占全部细胞数的百分数对表达强度进行分级,阳性细胞率 = 切片中瘤阳性细胞数(面积)/切片中瘤细胞总面积 $\times 100\%$: 阳性细胞数 $<5\%$,不着色定为阴性(-), 5%-25%阳性细胞为弱阳性(+), 26%-50%阳性细胞定为阳性(++), 阳性细胞 $>50\%$ 则为强阳性(+++)。以(-)和(+)为阴性组,以(++)和(+++)为阳性组进行分析。

统计学处理 采用SPSS14.0软件进行统计学处理,对胃癌组织和癌旁组织中的TMEM16A表达的阳性率进行比较并采用 χ^2 检验, $P<0.05$ 认为有统计学意义。

2 结果

2.1 临床及病理学特点 67例结肠癌标本中男38例,女19例。年龄39-68岁,平均48.2岁。患者多表现为大便次数增多、大便带血和黏液、腹痛、腹泻或便秘、肠梗阻以及全身乏力、体质量减轻和贫血等症状。其中乳头状腺癌12例、管状腺癌37例、黏液腺癌10例,印戒细胞癌6例、未分化癌2例。另外结肠腺瘤6例、间质瘤1例作为阳性对照。

2.2 免疫组织化学检测结果 TMEM16A阳性信号位于细胞膜和胞质内,在胃间质瘤中呈阳性表达,阴性对照中无表达。在67例结肠癌中TMEM16A呈不同程度阳性表达,其中阴性占5.97%(4/67)、弱阳性占16.42%(11/67)、阳性占29.85%(20/67)、强阳性占47.76%(32/67);在癌旁结肠黏膜腺体内大多呈阴性和弱阳性表达(图1),其中,阴性占40.30%(27/67)、弱阳性占52.24%(35/67)、阳性占4.48%(3/67)、强阳性占2.99%(2/67,表1);在6例结肠腺瘤中均呈阳性表达。将阴性和弱阳性表达分为阴性组,将阳性和强阳性表达分为阳性组进行分析,在67例结肠癌中TMEM16A阳性率占77.61%(52/67),而在相应的癌旁组织中TMEM16A阳性率仅占7.46%(5/67),两者之间差异显著($P<0.005$,表2)。

■ 研发前沿

TMEM16A蛋白作为新近发现的探讨 Ca^{2+} 激活的氯离子通道(CaCC)蛋白而受到关注,与上皮组织的跨膜体液转运、细胞复极、黏附、药物代谢等多种生理过程密切相关,在肿瘤细胞内外离子交换、体液转运、维持细胞膜的稳定性方面具有重要作用。本研究探讨TMEM16A在结肠癌中的表达和意义,为结肠癌的防治提供新的思路和方法。

■相关报道

TMEM16A是钙离子激活的跨膜氯离子通道家族成员,参与肿瘤增殖、凋亡、侵袭、转移等过程,是胃肠道间质瘤的特异性分子诊断靶标,在头颈部肿瘤、膀胱癌、乳腺癌、胃癌等上皮性肿瘤细胞中呈现高水平表达。

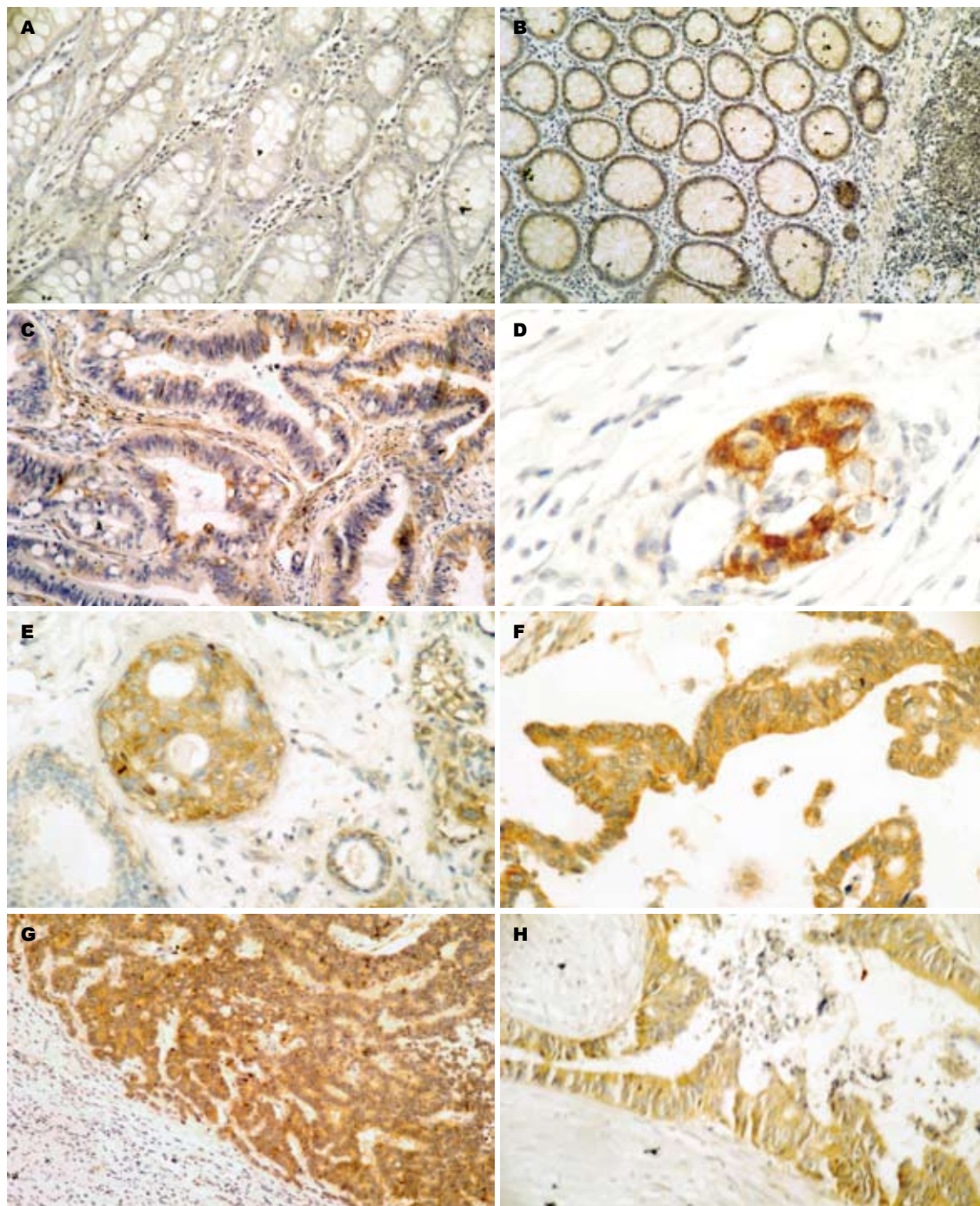


图1 免疫组织化学法检测TMEM16A在结肠癌中的表达. A: TMEM16A在癌旁组织中呈阴性($\times 10$); B: TMEM16A在癌旁组织中呈弱阳性表达($\times 10$); C, E, H: TMEM16A在结肠腺癌组织中呈阳性表达($\times 20$); D, F, G: TMEM16A在结肠腺癌组织中呈强阳性表达($\times 20$).

同时,在结肠癌组织中,除去2例未分化癌外, TMEM16A在高、中、低分化的结肠癌中的表达并无显著差异。

3 讨论

肿瘤细胞在内外离子交换、体液转运、细胞膜稳定性等方面与正常细胞具有明显不同的分子生物学特征,而导致这一变化的分子机制和临床意义无疑引起肿瘤研究领域学者的关注,

并有望作为肿瘤诊断和治疗的重要靶点. 已有研究证实离子通道对于细胞内外离子交换、体液转运、维持细胞膜的稳定性方面具有重要作用^[9]. 而氯离子通道(chloride channels)是机体内含量最多、最富有生理意义的阴离子-氯离子的主要转运通道,是一大类广泛存在于各种细胞胞膜、细胞器上的离子通道蛋白,在细胞兴奋性调节、跨上皮物质转运、细胞容积调节、离子稳态平衡和细胞器酸化等过程中发挥重要作

表 1 TMEM16A在结肠腺瘤和结肠癌和癌旁组织中的表达 $n(\%)$

组织学分型		TMEM16A				合计(n)
		-	+	++	+++	
结肠腺癌	乳头状腺癌	0(0.00)	3(4.48)	3(4.48)	6(8.96)	12
	管状腺癌	0(0.00)	1(1.49)	13(19.40)	23(34.33)	37
	黏液腺癌	0(0.00)	3(4.48)	4(5.97)	3(4.48)	10
	印戒细胞癌	3(4.48)	3(4.48)	0(0.00)	0(0.00)	6
	未分化癌	1(1.49)	1(1.49)	0(0.00)	0(0.00)	2
	合计 $n(\%)$	4(5.97)	11(16.42)	20(29.85)	32(47.76)	67
癌旁组织	/	27(40.30)	35(52.24)	3(4.48)	2(2.99)	67
结肠腺瘤	/	0(0.00)	0(0.00)	6(8.96)	0(0.00)	6

■创新盘点

本研究利用免疫组织化学方法证实TMEM16A在结肠癌中呈广泛阳性表达,提示TMEM16A可作为高特异性和高敏感性候选分子靶标。

表 2 TMEM16A在结肠腺瘤、结肠癌中的表达与癌(瘤)旁组织间表达的差异 $n(\%)$

组织学分型		TMEM16A		n	χ^2	P 值
		(-)-(+)	(++)-(+++)			
结肠腺癌	乳头状腺癌	3(4.48)	9(13.43)	12	73.80069	$P < 0.005$
	管状腺癌	1(1.49)	36(53.73)	37		
	黏液腺癌	3(4.48)	7(10.45)	10		
	印戒细胞癌	6(8.96)	0(0.00)	6		
	未分化癌	2(2.96)	0(0.00)	2		
	合计 $n(\%)$	15(22.39)	52(77.61)	67		
癌旁组织	/	62(92.56)	5(7.46)	67	1.690684	$0.1 < P < 0.25$
结肠腺瘤	/	0(0.00)	6(8.96)	6		

用. 现已证实氯离子通道可在多种肿瘤中呈现高水平表达, 并参与肿瘤增殖、凋亡、侵袭、转移等过程.

CaCC是一类广泛分布于人体多种组织, 尤其是分泌器官上皮细胞, 如气管和消化道黏膜上皮细胞的离子通道蛋白, 与上皮组织的跨膜体液转运、细胞复极、黏附等多种生理过程密切相关. 新近发现TMEM16A(Ano1, 也称DOG1)是一型新的钙离子激活的跨膜氯离子通道家族成员^[2,10], DOG1基因定位于人类染色体11q13的CCND1-EMS1, 包含26个外显子, 编码的蛋白产物DOG1蛋白是具有8个跨膜区段的膜蛋白, 含986个氨基酸, 分子量为114 kDa^[11,12]. 现已证实DOG1是胃肠道间质瘤的特异性分子诊断靶^[13-15]. 同时, 还发现TMEM16A还可高表达于头颈部肿瘤、膀胱癌、乳腺癌、胃癌等上皮性肿瘤细胞中^[16-19]. 该研究证实, TMEM16A在结肠癌中呈广泛阳性表达, 其阳性表达率(阳性和强阳性强度表达率之和)为77.61%(52/67), 而在相应癌旁结肠黏膜腺体内大多呈阴性和弱阳性表达(图1), 其阳性率(阳性和强阳性强度表达率

之和)仅为7.46%(5/67), 两者之间差异显著. 提示TMEM16A可能与癌细胞的高功能状态. 在本研究中, 癌组织与腺瘤之间未见显著差异. 而在6例印戒细胞癌中TMEM16A呈阴性和弱阳性表达. 显示TMEM16A表达较低可能与癌细胞黏液形成异常有关. 然而, 目前对于CaCC在结肠癌中广泛高表达的机制和作用并不清楚. 有学者认为CaCC的高表达或许也只是源于该基因所在的染色体区域(11q13)的其他癌基因的扩增效应^[20-24]. 尽管如此, 目前普遍认为TMEM16A的高表达可能会通过影响肿瘤细胞内外的离子流而在肿瘤细胞增殖、迁移转移以及癌细胞对凋亡信号的耐受性及肿瘤演化等方面发挥重要作用. 现已证实TMEM16A通过诱导MAPK通路或直接参与肿瘤发生和发展、选择性抑制CaCC可抑制细胞增殖^[25,26]. 这类似于电压门控性氯离子通道在肿瘤细胞的作用机制. 早已证实电压门控性氯离子通道可通过多种途径和机制影响肿瘤的生物学行为. 例如电压门控性氯离子通道可调控ERK1/2和AKT1磷酸化水平影响癌细胞的增殖及细胞周期; CLC-3可能通过caspase-3信号转导

■应用要点

本研究为结肠癌的分子诊断和生物靶向治疗提供了新的候选靶标。

途径调控细胞凋亡、通过细胞调节性体积下降 (regulatory volume decrease, RVD) 来调控鼻咽癌细胞的迁移潜能、通过提高细胞内囊泡酸化能力从而调节肿瘤细胞的耐药性等机制影响肿瘤细胞的生物学行为^[27-30]。

总之, 虽然目前对于CaCC在结肠癌发生、发展中的作用及其机制仍不清楚, 但是, 这并不影响将TMEM16A作为高特异性和高敏感性免疫表型标志和生物靶向治疗的候选分子靶标, 用于结肠癌的分子诊断和生物靶向治疗。

4 参考文献

- Verkman AS, Galiotta LJ. Chloride channels as drug targets. *Nat Rev Drug Discov* 2009; 8: 153-171
- Yang YD, Cho H, Koo JY, Tak MH, Cho Y, Shim WS, Park SP, Lee J, Lee B, Kim BM, Raouf R, Shin YK, Oh U. TMEM16A confers receptor-activated calcium-dependent chloride conductance. *Nature* 2008; 455: 1210-1215
- Hartzell HC, Yu K, Xiao Q, Chien LT, Qu Z. Anoctamin/TMEM16 family members are Ca²⁺-activated Cl⁻ channels. *J Physiol* 2009; 587: 2127-2139
- Schroeder BC, Cheng T, Jan YN, Jan LY. Expression cloning of TMEM16A as a calcium-activated chloride channel subunit. *Cell* 2008; 134: 1019-1029
- Caputo A, Caci E, Ferrera L, Pedemonte N, Barsanti C, Sondo E, Pfeffer U, Ravazzolo R, Zegar-Moran O, Galiotta LJ. TMEM16A, a membrane protein associated with calcium-dependent chloride channel activity. *Science* 2008; 322: 590-594
- Tian Y, Schreiber R, Kunzelmann K. Anoctamins are a family of Ca²⁺ activated Cl⁻ channels. *J Cell Sci* 2012 Sep 3. [Epub ahead of print]
- Ferrera L, Caputo A, Galiotta LJ. TMEM16A protein: a new identity for Ca(2+)-dependent Cl⁻ channels. *Physiology (Bethesda)* 2010; 25: 357-363
- Duran C, Hartzell HC. Physiological roles and diseases of Tmem16/Anoctamin proteins: are they all chloride channels? *Acta Pharmacol Sin* 2011; 32: 685-692
- Kunzelmann K. Ion channels and cancer. *J Membr Biol* 2005; 205: 159-173
- Stanich JE, Gibbons SJ, Eisenman ST, Bardsley MR, Rock JR, Harfe BD, Ordog T, Farrugia G. Ano1 as a regulator of proliferation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2011; 301: G1044-G1051
- Katoh M, Katoh M. Characterization of human TMEM16G gene in silico. *Int J Mol Med* 2004; 14: 759-764
- Miller C. ClC chloride channels viewed through a transporter lens. *Nature* 2006; 440: 484-489
- West RB, Corless CL, Chen X, Rubin BP, Subramanian S, Montgomery K, Zhu S, Ball CA, Nielsen TO, Patel R, Goldblum JR, Brown PO, Heinrich MC, van de Rijn M. The Novel Marker, DOG1, Is Expressed Ubiquitously in Gastrointestinal Stromal Tumors Irrespective of KIT or PDGFRA Mutation Status. *Am J Pathol* 2004; 165: 107-113
- Espinosa I, Lee CH, Kim MK, Rouse BT, Subramanian S, Montgomery K, Varma S, Corless CL, Heinrich MC, Smith KS, Wang Z, Rubin B, Nielsen TO, Seitz RS, Ross DT, West RB, Cleary ML, van de Rijn M. A novel monoclonal antibody against DOG1 is a sensitive and specific marker for gastrointestinal stromal tumors. *Am J Surg Pathol* 2008; 32: 210-218
- 中国胃肠道间质瘤专家组. 中国胃肠道间质瘤诊断治疗共识. *中华病理学杂志* 2009; 38: 697-702
- Galindo BE, Vacquier VD. Phylogeny of the TMEM16 protein family: some members are over-expressed in cancer. *Int J Mol Med* 2005; 16: 919-924
- Liu W, Lu M, Liu B, Huang Y, Wang K. Inhibition of Ca(2+)-activated Cl(-) channel ANO1/TMEM16A expression suppresses tumor growth and invasiveness in human prostate carcinoma. *Cancer Lett* 2012; 326: 41-51
- 柏文霞, 施瑞华, 王建宁, 郝波, 刘伟. TMEM16A在食管鳞癌中的表达及意义. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 1513-1516
- 杨军, 刘妮, 康安静, 靳耀峰, 王军宁, 苏宝山, 陈晓黎, 李宗芳. TMEM16A在胃癌中的表达及意义. *南方医科大学学报* 2012; 32: 794-797
- Rodrigo JP, García-Carracedo D, García LA, Menéndez S, Allonca E, González MV, Fresno MF, Suárez C, García-Pedrero JM. Distinctive clinicopathological associations of amplification of the cortactin gene at 11q13 in head and neck squamous cell carcinomas. *J Pathol* 2009; 217: 516-523
- Reshmi SC, Huang X, Schoppy DW, Black RC, Saunders WS, Smith DI, Gollin SM. Relationship between FRA11F and 11q13 gene amplification in oral cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 2007; 46: 143-154
- Gibcus JH, Kok K, Menkema L, Hermens MA, Mastik M, Kluin PM, van der Wal JE, Schuurin E. High-resolution mapping identifies a commonly amplified 11q13.3 region containing multiple genes flanked by segmental duplications. *Hum Genet* 2007; 121: 187-201
- Sugahara K, Michikawa Y, Ishikawa K, Shoji Y, Iwakawa M, Shibahara T, Imai T. Combination effects of distinct cores in 11q13 amplification region on cervical lymph node metastasis of oral squamous cell carcinoma. *Int J Oncol* 2011; 39: 761-769
- Huang X, Godfrey TE, Gooding WE, McCarty KS, Gollin SM. Comprehensive genome and transcriptome analysis of the 11q13 amplicon in human oral cancer and synteny to the 7F5 amplicon in murine oral carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2006; 45: 1058-1069
- Duvvuri U, Shiwerski DJ, Xiao D, Bertrand C, Huang X, Edinger RS, Rock JR, Harfe BD, Henson BJ, Kunzelmann K, Schreiber R, Seethala RS, Egloff AM, Chen X, Lui VW, Grandis JR, Gollin SM. TMEM16A induces MAPK and contributes directly to tumorigenesis and cancer progression. *Cancer Res* 2012; 72: 3270-3281
- Mazzone A, Eisenman ST, Strega PR, Yao Z, Ordog T, Gibbons SJ, Farrugia G. Inhibition of cell proliferation by a selective inhibitor of the Ca(2+)-activated Cl(-) channel, Ano1. *Biochem Biophys Res Commun* 2012; 427: 248-253
- Mao J, Chen L, Xu B, Wang L, Li H, Guo J, Li W, Nie S, Jacob TJ, Wang L. Suppression of ClC-3 channel expression reduces migration of nasopharyngeal carcinoma cells. *Biochem Pharmacol* 2008; 75: 1706-1716
- Cuddapah VA, Sontheimer H. Molecular interaction and functional regulation of ClC-3 by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) in human malignant glioma. *J Biol Chem* 2010; 285: 11188-11196

- 29 Li M, Wang Q, Lin W, Wang B. Regulation of ovarian cancer cell adhesion and invasion by chloride channels. *Int J Gynecol Cancer* 2009; 19: 526-530
- 30 Weylandt KH, Nebrig M, Jansen-Rosseck N, Amey

JS, Carmena D, Wiedenmann B, Higgins CF, Sardini A. CIC-3 expression enhances etoposide resistance by increasing acidification of the late endocytic compartment. *Mol Cancer Ther* 2007; 6: 979-986

编辑 翟欢欢 电编 闫晋利

■同行评价

本文探讨TME-M16A在结肠癌中的表达意义,为结肠癌防治提供了新的思路和方法,该研究设计合理,结论明确,有较系统的理论分析,具有一定的科学性。

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》外文字符标准

本刊讯 本刊论文出现的外文字符应注意大小写、正斜体与上下角标。静脉注射iv, 肌肉注射im, 腹腔注射ip, 皮下注射sc, 脑室注射icv, 动脉注射ia, 口服po, 灌胃ig。s(秒)不能写成S, kg不能写成Kg, mL不能写成ML, lcpm(应写为1/min)÷E%(仪器效率)÷60=Bq, pH不能写PH或P^H, *H pylori*不能写成HP, T_{1/2}不能写成tl/2或T_{1/2}, Vmax不能Vmax, μ不写为英文u。需排斜体的外文字, 用斜体表示。如生物学中拉丁学名的属名与种名, 包括亚属、亚种、变种。如幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*), *Ilex pubescens* Hook, et Arn. var. *glaber* Chang(命名者勿划横线); 常数K; 一些统计学符号(如样本数n, 均数mean, 标准差SD, F检验, t检验和概率P, 相关系数r); 化学名中标明取代位的元素、旋光性和构型符号(如N, O, P, S, d, l)如n-(normal, 正), N-(nitrogen, 氮), o-(ortho, 邻), O-(oxygen, 氧, 习惯不译), d-(dextro, 右旋), p-(para, 对), 例如n-butyl acetate(醋酸正丁酯), N-methylacetanilide(N-甲基乙酰苯胺), o-cresol(邻甲酚), 3-O-methyl-adrenaline(3-O-甲基肾上腺素), d-amphetamine(右旋苯丙胺), l-dopa(左旋多巴), p-aminosalicylic acid(对氨基水杨酸)。拉丁字及缩写in vitro, in vivo, in situ; Ibid, et al, po, vs; 用外文字母代表的物理量, 如m(质量), V(体积), F(力), p(压力), W(功), v(速度), Q(热量), E(电场强度), S(面积), t(时间), z(酶活性, kat), t(摄氏温度, °C), D(吸收剂量, Gy), A(放射性活度, Bq), ρ(密度, 体积质量, g/L), c(浓度, mol/L), φ(体积分数, mL/L), w(质量分数, mg/g), b(质量摩尔浓度, mol/g), l(长度), b(宽度), h(高度), d(厚度), R(半径), D(直径), T_{max}, C_{max}, Vd, T_{1/2} CI等。基因符号通常用小写斜体, 如ras, c-myc; 基因产物用大写正体, 如P16蛋白。

食管癌相关研究进展

傅剑华, 傅小龙, 樊青霞, 李苏宜, 刘进康, 殷咏梅, 曹鹏, 霍介格, 邵永丰, 杨弘, 刘洋腾宇, 周晖, 张玉, 丁蓉, 李向柯, 周越, 林琳

编者按 食管癌是中国人群中常见的恶性消化系统肿瘤之一, 全国每年有近20万人死于食管癌, 全球每年死于食管癌的人数超过40万。如何降低食管癌的死亡率是广大医务工作者的一项重大课题。

本编辑部特邀请曹鹏主任和李苏宜教授共同组织此次焦点论坛。曹鹏, 博士, 研究员, 江苏省中医药研究院细胞与分子生物学实验室主任, 江苏省中医药领军人才。近年来一直从事消化系统肿瘤转化医学研究, 取得了一系列较为重要的科研成果, 已在*PloS One*, *Cancer Lett*, *Semin Immunol*, *J Am Chem Soc*, *J Cell Biochem*, *Immuno Rev*, *Phytomedicine*, *Bioorgan Med Chem*, *Evid-Based Compl Alt*等本领域国际知名学术刊物上发表SCI论文53篇, 其中通讯作者或者第一作者38篇; 并申请药物相关国家发明专利13项, 先后主持国家自然科学基金3项、江苏省中医药领军人才培养项目和多项省级基金; 曾获江苏省中医药领军人才、江苏省333高层次人才培养工程中青年科学技术带头人、江苏省好青年百人榜、省十佳青年中医之星、省级青年岗位能手等荣誉; 部分科研工作获得南京市科技进步奖二等奖; 同时担任*Curr Pharm Biotech(SCI)*, *Curr Protein Pept Sc(SCI)*, *Tang*, 《药学报》, 《世界华人消化杂志》, 《中南医学科学杂志》等杂志的编委或客座编委, 美国化学学会、中国环境诱变剂学会活性氧生物学效应专业委员会、世界中医药联合会亚健康专业委员会委员、以及江苏省中医药学会、江苏省细胞与发育生物学会理事等; 李苏宜, 临床医学教授, 西医肿瘤内科主任医师, 肿瘤学博士。2002年以学科带头人人才引进方式进入到东南大学附属中大医院工作, 负责创建了东南大学临床肿瘤学学科。李苏宜教授长期从事晚期食管癌内科临床及应用型基础研究工作, 积累了丰富的临床诊疗和研究经验。

- 1 以手术为主的食管癌综合治疗的进展.....3471
- 2 放射治疗参与的食管癌多学科综合治疗进展.....3476
- 3 食管癌药物治疗的研究进展..... 3482
- 4 食管鳞癌预后评估及疗效预测分子靶标的临床研究进展..... 3488
- 5 食管癌CT灌注成像诊断的进展.....3494
- 6 食管癌分子靶向治疗临床研究的新进展.....3499
- 7 放化疗结合中医药治疗食管癌的临床研究进展.....3505
- 8 中医药在食管癌中的应用与研究的进展.....3510

以手术为主的食管癌综合治疗的进展

杨弘, 傅剑华

杨弘, 傅剑华, 中山大学肿瘤防治中心 广东省广州市 510060
傅剑华, 教授, 主要从事胸部肿瘤包括: 食管癌、肺癌、纵隔肿瘤等的外科诊治及综合治疗的研究。

作者贡献分布: 本文由杨弘综述; 傅剑华审校。

通讯作者: 傅剑华, 教授, 510060, 广东省广州市东风东路651号, 中山大学肿瘤防治中心. fujh@sysucc.org.cn

收稿日期: 2012-08-28 修回日期: 2012-12-07

接受日期: 2012-12-17 在线出版日期: 2012-12-18

Progress in surgery-based multimodality therapy for resectable esophageal cancer

Hong Yang, Jian-Hua Fu

Hong Yang, Jian-Hua Fu, Department of Thoracic Oncology, Cancer Center, Sun Yat-Sen University; State Key Laboratory of Oncology in Southern China, Guangzhou 510060, Guangdong Province, China

Correspondence to: Jian-Hua Fu, Professor, Department of Thoracic Oncology, Cancer Center, Sun Yat-Sen University; State Key Laboratory of Oncology in Southern China, Guangzhou 510060, Guangdong Province, China. fujh@sysucc.org.cn

Received: 2012-08-28 Revised: 2012-12-07

Accepted: 2012-12-17 Published online: 2012-12-18

Abstract

The incidence of esophageal cancer is rather high in China. For patients with resectable esophageal cancer, surgery is the standard treatment. However, the overall survival of patients with locally advanced esophageal cancer remains low, which necessitates the development of multimodality therapies for this malignancy. Among currently available multimodality treatments, preoperative chemoradiotherapy followed by surgery is the most promising strategy in terms of improving the prognosis of advanced esophageal cancer. Postoperative chemotherapy or radiotherapy is also feasible for selected patients. The aim of this article is to provide a complete review of the current status of esophageal cancer treatment with the addition of chemotherapy and radiotherapy to the surgical management of resectable disease.

Key Words: Esophageal cancer; Treatment; Evidence-based medicine

Yang H, Fu JH. Progress in surgery-based multimodality

therapy for resectable esophageal cancer. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(35): 3471-3475

摘要

中国是食管癌的高发国家, 外科手术是我国食管癌的主要治疗手段, 但单纯手术对于中晚期食管癌的治疗效果不尽如人意。为了提高食管癌的疗效, 国内外学者进行了多种综合治疗模式的探索, 包括术前放疗、术前化疗、术后放疗等, 其中术前新辅助治疗的治疗模式特别引人关注, 术前新辅助治疗, 包括术前放化疗和术前化疗, 尤其是前者有望提高食管癌患者的预后。术后化疗、术后放疗在我国也有应用的经验, 本文拟对以手术为主的食管癌综合治疗的循证医学证据作一综述。

关键词: 食管癌; 手术; 循证医学

杨弘, 傅剑华. 以手术为主的食管癌综合治疗的进展. 世界华人消化杂志. 2012; 20(35): 3471-3475

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3471.asp>

0 引言

在我国, 手术是治疗食管癌的主要手段, 但局部晚期食管癌患者的预后不尽如人意, II A-III期的食管鳞癌单纯手术切除治疗的5年生存率仅为20.64%-34.00%^[1,2], 多数患者在手术后3年内出现转移或局部复发。中晚期食管癌单纯手术的不良预后促使医生们探索在治疗方案中加入放疗、化疗或放化疗, 但从目前的研究结果显示, 术前放疗^[3]未能提高食管癌患者的预后, 目前少有应用; 而术前放化疗和术前化疗, 尤其是前者有望提高食管癌患者的预后, 是当前研究的热点; 术后辅助治疗, 包括术后化疗或术后放疗虽然尚没有有力的循证医学证据支持其疗效, 但在临床实践亦有应用。本文拟对食管癌综合治疗近年的研究进展作一综述。

1 新辅助放化疗和新辅助化疗的理论基础

新辅助治疗有以下优点^[4]: (1)肿瘤血运完整, 有利于保持靶病灶局部化疗药物强度和氧浓度;

■背景资料

食管癌是全球第8大肿瘤疾病, 中国是食管癌高发国家。长期以来, 治疗以单纯手术为主, 但局部中晚期的食管癌疗效欠佳。促使医生们探索在治疗方案中加入放疗、化疗或放化疗。目前的研究结果显示, 术前放化疗和术前化疗, 尤其是前者有望提高食管癌患者的预后, 是当前研究的热点。

■同行评议者

张力为, 副教授, 新疆医科大学第一附属医院胸外科

■相关报道

2012年荷兰的CROSS试验进一步明确了术前放化疗的疗效;术后辅助治疗,包括术后化疗或术后放疗虽然尚没有有力的循证医学证据支持其疗效,但在临床实践中亦有应用。

(2)术前患者耐受性较好,对比术后辅助治疗,术前新辅助治疗更容易完成;(3)可降低肿瘤病期,提高R0切除率;(4)早期消灭亚临床远处转移灶;(5)减少术中肿瘤种植转移;(6)术前放化疗还具有互相增敏的协同作用;(7)可作为肿瘤对化疗药物体内敏感性的评价。对于新辅助治疗过程中出现远处转移的食管癌患者,有的学者归咎于新辅助治疗延误手术切除的时机,导致出现病情进展,也有学者持不同观点^[5],认为新辅助治疗的2-3 mo内即出现远处转移的患者,即使首先采取手术的局部治疗手段,可能预后也不佳,新辅助治疗过程中的观察也可发现这部分患者,使其避免接受手术的创伤。多年的研究显示,病理完全缓解(pathologic complete response, pCR)率与安全性是影响和评价新辅助治疗疗效的两个关键因素。pCR是最为确切的评价食管癌综合治疗预后的独立因子, pCR患者的术后5年生存率可以提高到40%-60%^[6-8],影响安全性的因素主要是放疗及化疗不良与围术期死亡率,安全性的保证亦是提高预后的关键。

2 新辅助化疗

20世纪80年代开始多应用以顺铂、5-氟尿嘧啶(5-Fluorouracil, 5-Fu)为基础的术前联合化疗方案,目前已成为标准方案,有效率40%-58%^[9-13]。术前化疗一般为2-3个疗程, pCR率为2.5%-5.0%^[11,13,14],术前化疗与手术之间的间歇期为2-4 wk。

2011年, Sjoquist等^[15]报道的Meta分析,收集了1982-1995的10个随机研究($n = 1981$)比较新辅助化疗并手术与单纯手术的疗效,其中7个研究入组鳞癌患者,1个研究入组腺癌,另外2个研究鳞癌、腺癌患者都入组。该Meta分析选择2年生存率进行评价,结果表明,术前化疗可降低死亡风险(HR 0.87; 95%CI 0.79-0.96; $P = 0.005$),进一步分层分析显示,术前化疗可降低腺癌患者的死亡风险(HR 0.83; 95%CI 0.71-0.95; $P = 0.01$),但未能降低鳞癌患者的死亡风险(HR 0.92; 95%CI 0.81-1.04; $P = 0.18$)。这提示,术前化疗对于食管腺癌的患者疗效更为确切。关于围术期死亡率,该文献对比单纯手术组与新辅助化疗组之间的差异,结果显示,新辅助化疗并无增加患者的围术期死亡率。术前化疗具有不良反应较小,患者较易耐受,但对比术前放化疗,其有效率与病理完全缓解率均较低,因此,近年来较少见术前化疗的III期临床研究,更多的研

究关注术前放化疗的疗效。

进入20世纪90年代后期,随着紫杉醇、多西紫杉醇、伊立替康、奈达铂等新一代化疗药物的开发应用,亦应用于食管癌的新辅助化疗。Poole等^[16]的II期临床试验中,运用紫杉醇+DDP(紫杉醇180 mg/m² i.v.d. d1和DDP 60 mg/m² i.v.d. d1 每14 d)的新辅助化疗方案治疗50例食管癌患者(47例鳞癌,3例腺癌),II A期1例,II B期16例,III期21例,12例分期不详,患者接受3疗程化疗,有效的患者再接受3疗程化疗,之后接受手术,结果显示,化疗有效率为59%,MST为20 mo,1年生存率68%,3年生存率30%。

3 新辅助放化疗

近年来,食管癌的术前放化疗越来越受关注。从治疗后的pCR率来评价,术前放化疗的疗效优于术前化疗,目前的研究表明,术前放化疗的pCR率可以达到20%-35%^[17]。

2011年Sjoquist等^[15]的Meta分析也比较了新辅助放化疗并手术与单纯手术的疗效,收集了1983-2004的12个随机研究($n = 1854$),其中7个研究入组鳞癌患者,1个研究入组腺癌,另外5个研究鳞癌、腺癌患者都入组。该文献结果表明,术前放化疗可降低死亡风险(HR 0.78; 95%CI 0.70-0.88; $P < 0.0001$),提高2年生存率8.7%。进一步分层分析显示,术前放化疗既可降低腺癌患者的死亡风险(HR 0.75; 95%CI 0.59-0.95; $P = 0.02$),但也能降低鳞癌患者的死亡风险(HR 0.80; 95%CI 0.68-0.93; $P = 0.004$)。由此可见,对于食管鳞癌,术前放化疗的疗效优于术前化疗,而且该Meta分析选择了2年生存率进行评价,如果应用3年或5年生存率,术前放化疗的优势可能更为明显。关于围术期死亡率,该文献对比单纯手术组与新辅助放化疗组之间的差异,结果显示,新辅助放化疗并无增加患者的围术期死亡率。然而,目前对术前放化疗疗效的评价,分析依据主要来源于20世纪90年代的临床研究,仅反映当时的诊治水平,普遍存在以下问题:术前分期不准确,缺乏食管超声内镜、胸腹CT、PET/CT等有效手段;入组条件未限制分期,新辅助治疗可能对于局部晚期食管癌患者的作用更大;化疗方案多为顺铂联合5-Fu等传统药物,放疗技术多为常规照射,各研究之间放疗剂量各异;各研究之间手术方式不同,缺乏对区域淋巴结清扫的重视。目前从检查手段、化疗药物、放疗技术、外科技术都有很大的发展,亟待新的高

质量的临床研究进一步明确术前放化疗的作用。

荷兰2004年启动的术前放化疗并手术与单纯手术治疗食管癌和食管胃交界癌的III期随机对照临床研究(CROSS研究)^[18], 该项目共随机入组368例T2-3N0-1M0期的患者, 最终纳入分析366例, 腺癌275例, 鳞癌84例, 大细胞癌7例, 术前放化疗组采用泰素+卡铂每周方案化疗, 同期放疗, 总剂量41.4 Gy. 该研究结果显示: 术前放化疗组的pCR率为29%, R0切除率为92%, 而单纯手术组仅为69%, 术前放化疗组的中位生存期明显长于单纯手术组(49.4 mo vs 24.0 mo), 术前放化疗组的总生存优于单纯手术组(HR 0.657; 95%CI 0.495-0.871; $P = 0.003$). 两组患者的术后并发症发生率没有明显差异, 最常见的是肺部并发症(试验组46%; 对照组44%), 吻合口瘘的发生率分别是: 试验组22%, 对照组30%. 两组患者的围术期死亡率也没有明显差异(试验组6%, 对照组7%).

中山大学肿瘤防治中心自2007年开展III期随机对照临床研究^[19], 合作中心包括: 上海交通大学附属胸科医院、上海复旦大学附属肿瘤医院、天津肿瘤医院、汕头大学附属肿瘤医院、浙江省肿瘤医院、浙江省台州医院和四川省肿瘤医院. 入组II B、III期胸段食管鳞癌患者, 随机分组为试验组(术前放化疗组)与对照组(单纯手术组). 试验组术前放化疗方案: 去甲长春花碱联合顺铂化疗, 同期采用常规分割放疗2.0 Gy/d, 5 d/wk, 总量40 Gy. 放化疗结束4-6 wk后, 施行三切口食管癌切除术. 对照组患者直接接受手术. 该项目2011年中期分析主要评价术前放化疗并手术的近期疗效与安全性, 结果显示, 已入组患者123例, 试验组54例, 对照组69例. 术前放化疗并手术的近期疗效十分确切, 试验组术前放化疗的临床有效率(PR+CR)高达90.7%, 试验组的R0切除率高于对照组(96.0% vs 85.5%, $P = 0.015$), 病理完全缓解率为29.6%. 术前放化疗对患者有明显的降期疗效. 生存分析结果显示, 术前放化疗有延长总生存与无瘤生存的趋势, 随着该研究的进一步开展, 有望取得阳性结果. 此次中期分析结果也证实了术前放化疗方案的安全性, 术前放化疗并没有增加试验组的围术期并发症发生率, 全组患者均没有出现治疗期间死亡.

总之, 术前放化疗并手术的治疗模式有望提高局部晚期食管癌的预后, 关键在于如何提高pCR率与控制围术期死亡率.

4 术前新辅助治疗的原则

针对我国食管鳞癌高发的实际情况, 由中国抗癌协会食管癌专业委员会2011编辑出版的《中国食管癌规范化诊治指南》中提出以下建议^[20]: 治疗前临床分期为T3N0M0、T1-T2伴淋巴结转移、T3-T4伴或不伴淋巴结转移的可切除的胸段食管癌患者尤其是鳞癌患者, 可采用术前放化疗, 但如何在治疗前能预先识别病人的治疗效应, 即实现个体化治疗, 有待于分子生物学或相关基因的研究. 鉴于术前化疗的作用尚无定论, 建议有条件的单位可以开展临床试验以明确其作用.

术前放化疗方案推荐: 铂类(顺铂、奈达铂、草酸铂)、5-Fu/卡培他滨、长春瑞滨、紫杉醇/多西紫杉醇, 2药联合, 3 wk重复1次, 共2个疗程; 同期进行放疗, 放射剂量: CTV剂量40 Gy(36-46 Gy).

术前放化疗中治疗相关的急性毒性来自照射区内部(如食管和胃黏膜、肺、心脏)和外部(如骨髓)快速分裂细胞的生物学效应. 血液系统毒性是最常见的毒性, 其主要是影响治疗的时限, 基本上为可逆性毒性, 同时应注意肺、食管、心脏的毒性.

因此, 由中国抗癌协会食管癌专业委员会2011编辑出版的《中国食管癌规范化诊治指南》, 已把术前新辅助治疗提到重要的地位,

5 术后辅助化疗

术后辅助化疗的机制是消除根治性手术后残留在食管癌患者体内的微小转移灶, 预防其局部复发与远处转移. 既往研究多采用顺铂联合5-Fu的化疗方案, 手术与化疗的间歇约为3-4 wk, 约为2-4疗程.

2012年毛伟敏等^[21]的Meta分析比较了手术并辅助化疗与单纯手术的疗效, 收集了1996-2010的9个随机研究, 其中6个研究入组鳞癌患者, 另外3个研究鳞癌、腺癌患者都入组. 该文献结果表明, 辅助化疗可延长患者的3年无进展生存(RR 1.225; 95%CI 1.012-1.482; $P = 0.037$), 但并未提高患者的3年、5年生存率. Ando等^[22]的JCOG9204研究比较手术并两程PF方案辅助化疗与单纯手术的疗效, 总共入组242例食管鳞癌患者, 结果显示, 辅助化疗组的5年无瘤生存率高于单纯手术组(55% vs 45%, $P = 0.037$), 而5年生存率两组差异无统计学意义(61% vs 52%, $P = 0.13$), 进一步分层分析发

■同行评价

本文对我国目前食管癌的综合治疗现状进行综述, 具有一定的临床参考价值.

现, 术后辅助化疗无法使区域淋巴结阴性的食管癌患者生存获益, 提示区域淋巴结转移的患者更可能从辅助化疗中获益. Ando等^[23]随后开展的JCOG9907研究比较新辅助化疗并手术与手术并辅助化疗的疗效, 化疗方案均为两程PF方案, 入组330例II/III期胸段食管鳞癌患者, 结果显示, 术前化疗组的5年生存率优于术后化疗组(55% vs 43%; HR 0.73; 95%CI 0.54-0.99; $P = 0.04$).

6 术后辅助放疗

局部区域淋巴结复发是食管癌术后的主要失败模式. 因此, 许多学者寄望于术后辅助放疗能控制局部复发. 毛伟敏等^[21]的Meta分析也比较了手术并辅助放疗与单纯手术的疗效, 收集了2003-2010的7个对照研究, 其中5个研究入组鳞癌患者, 另外2个研究鳞癌、腺癌患者都入组. 该文献结果显示, 辅助放疗组的3年死亡风险高于单纯手术组(RR 0.935; 95%CI 0.879-0.994; $P = 0.033$), 两组的5年生存率差异没有统计学意义(RR 0.998; 95%CI 0.821-1.188; $P = 0.897$). Chen等^[24]回顾性分析了福建省肿瘤医院1 715例食管癌患者, 均接受食管癌切除与三野淋巴结清扫术, 其中1 277例接受单纯手术, 438例接受手术并辅助放疗, 放疗总剂量为50 Gy, 常规分割25次. 结果显示: 两组患者的总生存差异没有统计学意义. 但亚组分析研究发现, 在合并不良预后因素(包括: 3个以上区域淋巴结转移、III/IV期、肿瘤巨大或深度浸润)的患者之中, 辅助放疗组的预后优于单纯手术组. 这提示, 对于高危患者, 辅助放疗可能改善其预后, 但有待于前瞻性随机对照研究进一步探索.

7 结论

对于局部可手术的食管癌治疗, 术前新辅助化疗或术前放化疗均有使患者显著获益的证据, 但新辅助放化疗可使病人获益更多; 而且新辅助放化疗对鳞癌和腺癌病人均可获益, 而新辅助化疗仅对腺癌病人有利. 可见, 对于95%以上的食管癌为鳞癌的中国, 推动开展术前放化疗并手术的治疗模式, 患者的获益将更大.

本文所引用的研究资料多开始于1994年以前, 因此诊断、分期、治疗和疗效评价的方法仅反映那一时期的临床实践. 目前临床研究计划中所关注的重要问题, 如效应大小的论证、统计学分析方法、样本大小和研究持续时间等

问题在那一时期并未严格应用. 尽管Meta分析已包含了独立估计作为敏感性检验, 但结论的可靠性有待于更加严格的、大样本量的临床随机对照研究加以验证.

治疗前应用CT、PET/CT、食管超声内镜进行更准确的分期; 加强食管癌预后及预测因子的分子生物学研究, 筛选出对放化疗敏感的合适的患者; 选择化疗活性更强的新一代的药物, 应用现代的放疗技术, 减少其不良反应; 充分的术前准备, 手术质量的严格控制, 加强围术期并发症的预防, 保障手术安全, 以上措施均有望进一步提高术前综合治疗的疗效. 我国属于食管癌高发国家, 与西方国家的食管癌相比, 在病因及发病学、病理类型、手术方式等诸多方面都有很大差异, 我们必须加快开展高质量的临床研究, 积累自己的经验, 探索出有中国特色的治疗模式, 提高我国食管癌的治疗水平.

8 参考文献

- 1 平育敏, 张毓德, 杜喜群, 张慕纲, 严嘉顺, 王其彰, 张明道, 李文起, 宋玉忱, 白世祥, 王福顺, 李保庆, 王增林, 孟宪利, 刘俊峰, 何明, 王瑞. 食管癌和贲门癌20000例外科治疗经验. 中国首届国际食管癌学术会议暨第七届全国食管癌学术会议论文集 2005: 167-171
- 2 邵令方, 高宗人, 许金良, 陈明耀, 程金华, 务森, 闫明, 王国磊, 王文光, 陈宇航, 李冰, 刘先本, 何山宏, 邢文群, 秦子敏. 食管癌和贲门癌的外科治疗15707例总结-附河南省食管癌的防治研究概况. 中国首届国际食管癌学术会议暨第七届全国食管癌学术会议论文集 2005: 40-45
- 3 Arnott SJ, Duncan W, Gignoux M, Hansen HS, Lanois B, Nygaard K, Parmar MK, Rousell A, Spilopoulos G, Stewart G, Tierney JF, Wang M, Rhugang Z. Preoperative radiotherapy for esophageal carcinoma. *Cochrane Database Syst Rev* 2005; (4): CD001799
- 4 Campbell NP, Villalor VM. Neoadjuvant treatment of esophageal cancer. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 3793-3803
- 5 Hyngstrom JR, Posner MC. Neoadjuvant strategies for the treatment of locally advanced esophageal cancer. *J Surg Oncol* 2010; 101: 299-304
- 6 Berger AC, Farma J, Scott WJ, Freedman G, Weiner L, Cheng JD, Wang H, Goldberg M. Complete response to neoadjuvant chemoradiotherapy in esophageal carcinoma is associated with significantly improved survival. *J Clin Oncol* 2005; 23: 4330-4337
- 7 Forastiere AA, Orringer MB, Perez-Tamayo C, Urbas SG, Zahurak M. Preoperative chemoradiation followed by transhiatal esophagectomy for carcinoma of the esophagus: final report. *J Clin Oncol* 1993; 11: 1118-1123
- 8 Vallböhmer D, Hölscher AH, DeMeester S, DeMeester T, Salo J, Peters J, Lerut T, Swisher SG, Schröder W, Bollschweiler E, Hofstetter W. A multicenter study of survival after neoadjuvant radiotherapy/chemotherapy and esophagectomy for ypT0N0M0R0 esophageal cancer. *Ann Surg* 2010;

- 252: 744-749
- 9 Schlag PM. Randomized trial of preoperative chemotherapy for squamous cell cancer of the esophagus. The Chirurgische Arbeitsgemeinschaft Fuer Onkologie der Deutschen Gesellschaft Fuer Chirurgie Study Group. *Arch Surg* 1992; 127: 1446-1450
- 10 Law S, Fok M, Chow S, Chu KM, Wong J. Preoperative chemotherapy versus surgical therapy alone for squamous cell carcinoma of the esophagus: a prospective randomized trial. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1997; 114: 210-217
- 11 Kelsen DP, Ginsberg R, Pajak TF, Sheahan DG, Gunderson L, Mortimer J, Estes N, Haller DG, Ajani J, Kocha W, Minsky BD, Roth JA. Chemotherapy followed by surgery compared with surgery alone for localized esophageal cancer. *N Engl J Med* 1998; 339: 1979-1984
- 12 Ancona E, Ruol A, Santi S, Merigliano S, Sileni VC, Koussis H, Zaninotto G, Bonavina L, Peracchia A. Only pathologic complete response to neoadjuvant chemotherapy improves significantly the long term survival of patients with resectable esophageal squamous cell carcinoma: final report of a randomized, controlled trial of preoperative chemotherapy versus surgery alone. *Cancer* 2001; 91: 2165-2174
- 13 Medical Research Council Oesophageal Cancer Working Group. Surgical resection with or without preoperative chemotherapy in oesophageal cancer: a randomised controlled trial. *Lancet* 2002; 359: 1727-1733
- 14 Urschel JD, Vasan H, Blewett CJ. A meta-analysis of randomized controlled trials that compared neoadjuvant chemotherapy and surgery to surgery alone for resectable esophageal cancer. *Am J Surg* 2002; 183: 274-279
- 15 Sjoquist KM, Burmeister BH, Smithers BM, Zalcberg JR, Simes RJ, Barbour A, Gebbski V. Survival after neoadjuvant chemotherapy or chemoradiotherapy for resectable oesophageal carcinoma: an updated meta-analysis. *Lancet Oncol* 2011; 12: 681-692
- 16 Poley MB, Tilanus HW, Eskens FA, Hoekstra R, Van der Burg ME, Siersema PD, Stoter G, Van der Gaast A. Phase II study of neo-adjuvant chemotherapy with paclitaxel and cisplatin given every 2 weeks for patients with a resectable squamous cell carcinoma of the esophagus. *Ann Oncol* 2003; 14: 1253-1257
- 17 Geh JI, Crellin AM, Glynne-Jones R. Preoperative (neoadjuvant) chemoradiotherapy in oesophageal cancer. *Br J Surg* 2001; 88: 338-356
- 18 van Hagen P, Hulshof MC, van Lanschot JJ, Steyerberg EW, van Berge Henegouwen MI, Wijnhoven BP, Richel DJ, Nieuwenhuijzen GA, Hospers GA, Bonenkamp JJ, Cuesta MA, Blaisse RJ, Busch OR, ten Kate FJ, Creemers GJ, Punt CJ, Plukker JT, Verheul HM, Spillenaar Bilgen EJ, van Dekken H, van der Sangen MJ, Rozema T, Biermann K, Beukema JC, Piet AH, van Rij CM, Reinders JG, Tilanus HW, van der Gaast A. Preoperative chemoradiotherapy for esophageal or junctional cancer. *N Engl J Med* 2012; 366: 2074-2084
- 19 杨弘, 傅剑华, 刘孟忠, 方文涛, 王家明, 陈于平, 陈志坚, 相加庆, 杨焕军, 毛伟敏, 郑晓, 朱成楚, 孔敏, 韩泳涛, 李涛. 术前放化疗并手术与单纯手术治疗局部晚期食管鳞癌的多中心随机对照临床研究. *中华医学杂志* 2012; 92: 1028-1033
- 20 中国抗癌协会食管癌专业委员会. 食管癌规范化诊治指南. 第1版. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2011: 99-104
- 21 毛伟敏, 程蕾. 食管癌术后辅助治疗的Meta分析. *肿瘤学杂志* 2012; 18: 94-99
- 22 Ando N, Iizuka T, Ide H, Ishida K, Shinoda M, Nishimaki T, Takiyama W, Watanabe H, Isono K, Aoyama N, Makuuchi H, Tanaka O, Yamana H, Ikeuchi S, Kabuto T, Nagai K, Shimada Y, Kinjo Y, Fukuda H. Surgery plus chemotherapy compared with surgery alone for localized squamous cell carcinoma of the thoracic esophagus: a Japan Clinical Oncology Group Study--JCOG9204. *J Clin Oncol* 2003; 21: 4592-4596
- 23 Ando N, Kato H, Igaki H, Shinoda M, Ozawa S, Shimizu H, Nakamura T, Yabusaki H, Aoyama N, Kurita A, Ikeda K, Kanda T, Tsujinaka T, Nakamura K, Fukuda H. A randomized trial comparing postoperative adjuvant chemotherapy with cisplatin and 5-fluorouracil versus preoperative chemotherapy for localized advanced squamous cell carcinoma of the thoracic esophagus (JCOG9907). *Ann Surg Oncol* 2012; 19: 68-74
- 24 Chen J, Zhu J, Pan J, Zhu K, Zheng X, Chen M, Wang J, Liao Z. Postoperative radiotherapy improved survival of poor prognostic squamous cell carcinoma esophagus. *Ann Thorac Surg* 2010; 90: 435-442

编辑 李军亮 电编 闫晋利

放射治疗参与的食管癌多学科综合治疗的进展

傅小龙

■背景资料

食管癌是中国常见的严重危害国人健康的恶性肿瘤之一。然而,由于发病率在不同国家和地区的差异性明显,以及食管所处解剖位置的特殊性,食管癌的多学科综合治疗临床研究较少,特别是高证据水平的研究更少,多数期别食管癌治疗并无翔实的循证医学证据支持。

傅小龙, 复旦大学上海医学院肿瘤学系 复旦大学附属肿瘤医院 上海市 200032

傅小龙, 教授, 主任医师, 博士研究生导师, 主要从事肿瘤学的研究工作。

通讯作者: 傅小龙, 教授, 主任医师, 博士研究生导师, 200032, 上海市医学院路138号, 复旦大学上海医学院肿瘤学系, 复旦大学附属肿瘤医院. xlfu1964@126.com

收稿日期: 2012-08-28 修回日期: 2012-12-12

接受日期: 2012-12-17 在线出版日期: 2012-12-18

Radiotherapy as a component of multidisciplinary treatment for esophageal cancer: Recent research progress

Xiao-Long Fu

Xiao-Long Fu, Department of Oncology, Shanghai Medical College, Fudan University; Fudan University Cancer Hospital, Shanghai 200032, China

Correspondence to: Xiao-Long Fu, Professor, Chief Physician, Department of Oncology, Shanghai Medical College, Fudan University, Fudan University Cancer Hospital, Shanghai 200032, China. xlfu1964@126.com

Received: 2012-08-28 Revised: 2012-12-12

Accepted: 2012-12-17 Published online: 2012-12-18

Abstract

Surgery is the standard therapy for early esophageal cancer; however, the optimal therapeutic modality for patients with advanced disease remains unclear. In this article, we collect clinical data on multidisciplinary treatment for esophageal cancer in recent years and discuss the role of neoadjuvant therapy, the value of postoperative radiotherapy, the clinical effects of radiotherapy versus surgery, new radiotherapy techniques, and targeted therapy in patients with advanced esophageal cancer.

Key Words: Esophageal cancer; Radiotherapy; Targeted therapy

Fu XL. Radiotherapy as a component of multidisciplinary treatment for esophageal cancer: Recent research progress. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(35): 3476-3481

摘要

早期食管癌以手术治疗为主,然而进展期和局

部晚期患者,最佳综合治疗策略尚不明确。本文综述了近年来食管癌综合治疗新的临床证据,就早期食管癌的食管保存生活质量提高,新辅助治疗和术后辅助放疗的临床价值,以手术为基础的多学科综合治疗和以放疗为基础的多学科综合治疗疗效差异性,放疗技术研究进展以及靶向药物的临床价值进行了总结,为进一步临床研究提供参考。

关键词: 食管癌; 放射治疗; 靶向治疗

傅小龙. 放射治疗参与的食管癌多学科综合治疗的进展. *世界华人消化杂志* 2012; 20(35): 3476-3481

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3476.asp>

0 引言

食管癌是中国常见,仍然是严重危害国人健康的常见恶性肿瘤之一。然而,由于发病率在不同国家和地区的差异性明显,以及食管所处解剖位置的特殊性,食管癌的多学科综合治疗临床研究较少,特别是高证据水平的研究更少,多数期别食管癌治疗并无翔实的循证医学证据支持。本文总结了近年来有放疗参与的食管癌多学科综合治疗的临床研究新的信息,就临床所关心的问题进行了总结,为进一步开展相应的临床研究提供一些参考。

1 食管癌NCCN 2012治疗指引

食管癌初次治疗的总体策略制定主要依赖于患者一般情况、原发病灶所在部位以及治疗前的临床分期。其中最主要参考指标为临床分期。对于T1s或T1aN0M0患者,可以采取内镜下黏膜切除术(endoscopic mucosal resection, EMR)或食管癌切除术;对于T1bN0或Nx患者的治疗方法为食管癌切除术。依据术后不同病理残留状态来确定后续的辅助治疗。若为R0者,术后仅给以观察,若为R1, R2残留者,术后给以化放疗。近年来,一些新的手术方式用于早期食管癌的治疗,主要是微创手术方法如胸腔镜下食管癌切除术,纵隔镜辅助下食管拔脱术和EMR。但食管手术是否能真的做到微创以及能否达到与开放性手

■同行评议者

王健生, 教授, 西安交通大学医学院第一附属医院肿瘤外科

术同样的根治效果一直存在争议,尚待前瞻性工作的验证。Pech等^[1]的多中心临床对照研究则分别比较了手术治疗组和内镜下切除组,结果显示,组间生存率无显著差异,但手术治疗组的手术相关死亡率更高。除以上早期和远处转移的晚期食管癌患者外,其他各期别进展期和局部晚期的食管癌患者,临床上所采取的综合治疗策略为两种:(1)化放疗综合治疗,根据治疗后肿瘤状态再考虑下步治疗;(2)采取新辅助化疗,若未出现疾病的进展,可以考虑接受手术切除治疗。

2 食管癌综合治疗策略研究进展

2.1 早期食管癌非手术治疗可以为初始治疗 早期食管癌(Tis, T1N0或Nx)手术切除是其标准治疗。不过采用何种手术治疗方式在学术界存在较大争议。但考虑到食管所处的特殊解剖部位和生理功能,手术特别是食管癌根治性切除术后所造成的对患者的生理功能影响较大,因此有学者在探讨是否能以保存器官的非手术治疗方式作为早期食管癌的初始治疗方式,待非手术治疗后出现局部和区域性失败时,再考虑应用手术进行挽救性治疗。这种综合治疗策略可能达到在不影响总体疗效的情况下提高器官保存进而提高生活质量的目的。Yamamoto等^[2]比较了分别使用放化疗和手术治疗 I 期食管癌的两组患者,发现化放疗组患者总生存率与手术组类似,但局部复发率较高,而这些局部复发患者多数可以使用内镜下切除进行治疗,对总生存没有明显影响。一项来自于日本的临床调查,收集了1999-2003年在日本九家放疗中心实施根治性放疗患者的疗效。入组患者的总条件:PS = 0-2,实施50 Gy及以上放疗剂量。所入组的患者可以分为:A组:临床 I 期接受放疗或化放疗者;B组:可切除的 II-III 化放疗综合治疗;C组:不可切除的 III-IVa 化放综合治疗。结果显示 A 组的 5 年生存率为 56%,在临床分期为 I 期患者中通过化放疗能取得 5 年生存率达 56% 疗效仍是可喜的^[3]。

考虑到 I 期放疗或化放疗患者的失败表型与手术治疗组有显著差异性,前者以局部区域性复发为主要,因此对于 T1bN0M0 食管癌患者,在治疗方法选择时若能考虑到潜在淋巴结转移高危人群,从而将该高危患者挑出并排除将有助于提高早期食管癌化放疗综合治疗的疗效,提高食管的保存率和生活质量^[4]。

2.2 新辅助治疗的临床价值 综合国内外研究所提供信息,进展期和局部晚期食管癌治疗不再以单纯手术为其标准的治疗,临床上开展了大量围手术特别是新辅助治疗的临床研究。但每项研究的样本量均偏小,因此近年来不断有新的 Meta 分析来显示食管癌新辅助治疗的临床价值。

2011 年所发表的两项 Meta 分析进一步明确了新辅助治疗在食管癌多学科综合治疗中价值。一项 Meta 分析涵盖 1980-2010 年所发表的临床随机对照研究,纳入了 9 项随机研究,共 1 981 例患者入组。结果显示:新辅助化疗能显著提高食管腺癌患者的生存疗效,但并不能提高鳞癌患者的疗效。然而,新辅助化疗则能提高腺癌和鳞癌患者的生存疗效^[5]。另一项 Meta 分析得出了相似的临床结论,该 Meta 分析还补充了新辅助治疗不良反应的信息。与新辅助化疗相比,新辅助化放疗有增加 30 d 围手术死亡率的倾向性,但新辅助化放疗总体不良反应水平仍被临床所接受^[6]。

因此,食管腺癌可以从新辅助化疗或化放疗中获益,而食管鳞癌只能从新辅助化放疗中获得生存提高的益处。

2.3 术后放疗临床价值 手术作为食管癌的初始治疗固然有其优点,尤其是在中国国情条件下是一常见的临床现象。手术作为初始治疗的优点表现在:(1)术后病理分期明确;(2)可以避免因为分期不准造成的过度治疗;(3)避免手术机会延迟或丧失;(4)减轻肿瘤负荷改善患者吞咽状况,可以提高营养状况;(5)肿瘤负荷减轻,可以提高残留灶对治疗反应性。然而,食管癌单纯手术后局部复发率高达 40%-60%,食管癌患者术后一旦复发再行放疗效果较差。Nemoto 等^[7]报道 33 例食管癌术后复发再行放疗,结果中位生存期仅 7 mo, 3 年生存率 12%。因此,若能发现术后高复发的高危人群,临床上给以术后辅助放疗,可能提高手术参与的食管癌生存疗效。表 1 中所列前期所做的具有代表性的术后放疗随机对照研究。总体结果显示:术后放疗提高局部区域性控制率,但在提高总生存方面是微弱的或是不确定的。

仔细评估以往的临床研究,以往的临床研究存在以下诸多的问题:(1)入组患者的指征不够明确和统一;(2)没有分层;(3)时间跨度大;(4)样本量未进行统计学估计;(5)放疗设备落后,技术指标不够明确;(6)机器陈旧,技术落后,放疗范围不够明确和统一;(7)放疗剂量要求不一致。

近年来一些新的临床资料似乎对食管癌术后是否需要辅助放疗提供了新的诠释。首

■**研发前沿**
早期食管癌(Tis, T1N0或Nx)手术切除是其标准治疗。不过采用何种手术治疗方式在学术界存在较大争议。

■相关报道

Yamamoto比较了分别使用放化疗和手术治疗Ⅰ期食管癌的两组患者,发现化放疗组患者总生存率与手术组相近,但局部复发率较高,而这些局部复发患者多数可以使用内镜下切除进行治疗,对总生存没有明显影响。

表 1 具有代表性的术后放疗随机对照研究

试验	入组患者	患者数	放疗技术	局控	生存率
1	0和Ⅰ期除外	430	两锁骨上+全纵隔	全组局控提高(N0,1)	N0提高; N1未提高
2	N0,1,2分层	221	两锁骨上+全纵隔	全组局控率提高	生存率未提高
3		130		提高局控率	生存率降低不良作用增加
4	胸段鳞癌 年龄<70岁 长度>4 cm	495-549	T形野	全组局控率提高	提高Ⅲ期或N1或淋巴结>3个转移的生存率

先是来自于中国医学科学院肿瘤医院的资料^[8]。该研究为随机对照的前瞻性工作。1986-1997年收治了549例患者。从全组患者上看,术后放疗并未提高患者的生存。但在亚组分析时发现临床分期为Ⅲ期或区域性淋巴结有转移特别是转移淋巴结数目在3个及以上情况下,术后放疗能显著提高患者的总生存疗效;其次是来自于美国SEER数据库资料,1998年到2005年,接受食管癌切除术,术后病理为T3-4N0M0, T1-4N1M0的腺癌或鳞癌患者入组^[9]。1 046例患者符合上述条件,683例接受了单纯手术,363例接受了手术+术后放疗。结果显示:(1)对于Ⅲ期无论鳞癌还是腺癌,术后放疗均能提高生存疗效;(2)术后放疗未能提高Ⅱ期患者疗效;(3)术后放疗价值尚待前瞻性研究来确认。另外,来自于福建省肿瘤医院的资料同样显示术后放疗提高了食管癌患者的生存疗效,尤其是淋巴结转移数目≥3的情况下^[10]。

以往术后放疗的临床研究可以总结为以下2条。(1)食管癌术后复发的高危因素包括:T分期晚者;N转移者;N转移密度高者;(2)食管癌术后放疗可能获益人群:Ⅲ(T3N1, T4N0-1);Ⅲ期或淋巴结转移数目超过3个;淋巴结转移数目超过3个或者与淋巴结转移数目相关。

2.4 以手术为基础的多学科综合治疗和以放疗为基础的多学科综合治疗,孰优孰劣? NCCN治疗指引中,对于进展期和局部晚期的食管癌所给予的治疗推荐则为以下两者中选一,以手术为基础的多学科综合治疗或以放疗为基础的多学科综合治疗。然而两者多学科综合治疗的疗效之间是否存在差异,在以往开展了多项临床前瞻性研究。2012年所发表的一项Meta分析收集了6项前瞻性研究共929例患者^[11]。所收集的6项前瞻性临床研究中手术参与组并不是单纯手术,而是以手术为基础的多学科综合治疗。该Meta分析结果显示:两种治疗策略所收治的患

者总体生存疗效无显著差异性,然而,以放疗为基础的多学科综合治疗的肿瘤相关死亡率有高于以手术为基础的多学科综合治疗组的趋势,放疗为基础的多学科综合治疗组的治疗失败的主要原因为局部区域性复发。该Meta分析最后结论:食管癌化放同步治疗是安全的,疗效不差于以手术为基础多学科综合治疗,是进展期和局部晚期食管癌治疗另一选择,特别是适合于含有夹杂病的食管癌鳞癌患者。

3 食管癌放疗技术进展

3.1 放疗布野 根据术后病理分析,食管癌易出现淋巴结转移,而且转移常无明显的规律性以弥散性转移为多见,弥散程度尤其是位于中或下胸段的食管癌为明显。若食管癌患者采取以放疗为基础的化放疗综合治疗时,是否需要进行治疗淋巴结引流区域的预防性照射?这仍然是悬而未决重要的临床问题。

淋巴引流区域是否需要预防性照射,取决于两个方面:一是食管癌淋巴引流是否具有规律性?二是从治疗失败表型分析若不进行预防性放疗,发生在淋巴引流区域复发的风险和对患者造成的影响进而来观察预防性照射的必要性。

复旦大学附属肿瘤医院分析了该院1999-01/2009-04年所行食管鳞癌三野清扫术的患者(三野三切口,右胸入口)术后病理资料,所清扫淋巴结数目≥15个。上胸段66例,中胸段267例,下胸段81例。上胸段食管癌淋巴结转移主要集中在中上纵隔和双侧锁骨上。而中下胸段食管癌的淋巴结转移则以向上和下转移均为常见,无明显的规律性。因此,若需要考虑淋巴结引流区域的预防性照射主要针对位于上胸段和部分中胸段的食管癌患者,预防性照射区域为中上纵隔和双侧锁骨上。余部位的食管癌则

不做淋巴引流区域性预防性照射。

从以放疗为基础的多学科综合治疗后失败表型看淋巴引流区域是否进行预防性治疗? 一项来自于复旦大学附属肿瘤医院的研究, 观察了食管癌单纯三维适形放疗后复发表型从而推测食管癌淋巴引流区域预防性放疗的必要性^[12]。该研究中食管癌放疗靶区定义: GTV(大体肿瘤病灶): 由多种方法(包括影像学 and 体检)参与确定; CTV1(临床肿瘤病灶)食管纵向往近端和远端各放3 cm; 横向往为0 cm; CTV2食管纵向往近端和远端各放1 cm; 横向往为0 cm; PTV(计划靶体积): CTV1或CTV2外各放1 cm。放疗剂量: 1.8 Gy×23 F(QD)+1.5 Gy×18 F, 总放疗剂量68.4 Gy/41F/44D。结果: 53例患者能很好耐受, 无IV-V级不良反应。39例治疗失败原因: 野内: 17/39(44%); 远处转移(含野内复发): 18/39(46%); 单纯野外复发: 3/39(8%), 不明: 1/39(2%)。结论: 食管癌不做淋巴引流区域预防性放疗的适形放疗失败原因中单纯放射野外淋巴结复发并不常见, 这些提示食管癌适形放疗不做淋巴引流区域预防性照射是安全的。但值得注意的是此研究为回顾性分析, 患者样本量小。另一项来自于英国的回顾性分析企图也想根治性化放疗同步治疗后首发失败部位的分析, 来评价食管癌放疗外放范围是否适合^[13]? 145例患者入组。GTV: 也是依据多种影像来确定(CT和EUS); CTV: GTV上下2 cm, GTV前后左右1 cm, PTV: CTV上下1 cm, CTV前后左右0.5 cm。不做淋巴引流区域的预防性照射。放疗总剂量为50 Gy/25F联合应用3-4周期化疗。结果: 全组的中位生存: 15 mo。照射野内失败: 55例; 远处转移(或合并局部复发): 27例; 野外淋巴引流区域复发: 3例。结论: 依据以上布野原则, 食管癌的边界外放是足够的。今后需要重点处理食管癌的GTV复发和远处转移问题。本研究同样也支持食管癌化放疗综合治疗中不做淋巴引流区域预防性放疗是可行的。

3.2 放疗剂量 食管癌化放疗同步治疗中放疗剂量应给多少一直存在较大争议。美国RTOG依据该组织所做的临床研究认为与化疗同步应用放疗的总剂量应为50.4 Gy, 因此NCCN治疗指引中一直推荐食管癌化放疗同步治疗中放疗采取常规分割, 总剂量为50.4 Gy的方式。

此剂量是否合适? 近期美国MD Anderson 肿瘤中心报道了以放疗为基础的食管癌综合治

疗的失败表型, 进而为提示如何提高食管癌综合治疗疗效提供参考依据^[14]。239例接受化放疗同步治疗者入组, 所有患者接受IMRT。放疗的技术参数为: GTV: 依据各种临床资料所确定的; CTV: 食管纵向3 cm, 横断面外放1 cm; PTV: CTV外放0.5 cm; 处方剂量50.4 Gy/28F, 同步化疗以5-Fu为基础。治疗失败的定义: 局部: 在放射野内; 远处: 所有在放射野外。局部失败又细分为GTV、CTV和PTV内复发(复发的CT融合到治疗前的模拟CT上)结果: 中位随访时间: 52.6 mo; 局部失败: 119例(50%), 远处失败: 114例(48%), 无失败74(31%)。预测治疗失败的因子: T分期, 食管病灶长度, 治疗后PET/CT所显示的SUV值下降程度。结论: 食管癌化放疗后的局部失败绝大多数发生在GTV内, 因此需要考虑如何提高局控。首先需要考虑的是在新的放疗技术条件下, 放疗精确性提高了正常组织器官放射性损伤风险下降了, 放疗总剂量仍为50.4 Gy是否合理?

一项来自于英国较早期的临床研究同样也显示: 若外放射放疗总剂量为50.4 Gy, 食管癌放疗后失败也主要表现在放射野内或血道转移^[13]。因此作者提出控制放射野内失败和降低远处转移是提高食管癌生存疗效的关键。同样这一研究也提示放疗总剂量是否合理的? 来自于日本的一项调查: 在食管癌根治性化放疗中的中位放疗剂量为60-66 Gy, 没有任何中心采取50.4 Gy^[3]。

3.3 靶向药物的临床价值 正如头颈部肿瘤和非小细胞肺癌一样, 食管癌的原发病灶EGFR表达率也达到40%-80%, 随着EGFR抑制剂在头颈肿瘤治疗以及非小细胞肺癌治疗中取得明显进展, 因此, 有学者在探索这些药物是否在食管癌综合治疗中也存在一定的临床价值?

临床前期的研究显示EGFR抑制剂有放疗增敏作用, 无论小分子还是单克隆抗体的EGFR抑制剂的放射增敏最主要作用机制是几乎完全一致的。增敏机制包括: (1)使S期肿瘤细胞的比例降低, G₂/M期和G₀/G₁期细胞比例增加, 使肿瘤作为整体的放射敏感性提高; (2)增加放疗后肿瘤细胞的凋亡肿瘤杀灭作用增加(通过Ras介导的PI3K-AKT通路, EGFR-TK抑制P-AKT通路); (3)抑制细胞放疗后损伤的修复, 固化放射损伤; (4)抑制EGFR信号传导系统多环节的磷酸化, 减少肿瘤细胞的增殖和加速再增殖, 放射效应增加(放射直接激活EGFR-TK信号)。

■应用要点

本文总结了近年来有放疗参与的食管癌多学科综合治疗的临床研究的新信息, 就临床所关心的问题进行了总结, 为进一步开展相应的临床研究提供一些参考。

■同行评价

本文选题贴近临床, 可以引起很多临床的思考, 具有较高的学术价值。

一项临床 II 期研究探讨了小分子 EGFR 抑制剂易瑞沙参与局部晚期食管癌综合治疗的不良作用和疗效^[15]。治疗方法为术前采取化放疗联合易瑞沙, 术后补充放疗 30 Gy, 易瑞沙维持治疗 2 年。结果显示: 易瑞沙治疗组中 48% 患者并未能按照计划完成其维持治疗, 该组的远处转移率并未明显减少, 但该组患者生存疗效有提高的趋势。单克隆抗体的 EGFR 抑制剂用于与放疗结合的临床研究较早。RTOG 0436 研究是一项临床 III 期研究。在局部晚期食管癌患者中, 放疗与泰素加 DDP 联合应用基础上, 比较加和不加西妥昔单抗(C225)的临床疗效差异性。目前该研究正在进行中。复旦大学附属肿瘤医院应用尼妥珠单抗(泰新生)开展了多项临床研究。一项是泰新生联合化放疗治疗局部晚期食管癌的剂量递增 I 期临床研究。泰新生从 1 次/wk, 100 mg/次, 递增至 200 mg/次和 400 mg/次 3 个剂量组。联合化放疗方案: 放疗为 1.8 Gy/FX, 61.2 Gy/34FX(适形技术), 化疗: DDP 25 mg/m², D1-3, 5-Fu 600 mg/m², D1-3, CIV; q4w, 4 疗程。结果显示: 尼妥珠单抗 400 mg/w 和放化疗合用可为患者耐受, 尼妥珠单抗的最大耐受剂量还没有获得, 未发生严重不良事件及非预期严重不良事件, 近期疗效是令人满意的。另一项是尼妥珠单抗联合放化疗治疗局部晚期食管鳞癌前瞻、随机、双盲、对照、多中心临床研究。此为临床 III 期研究, 目前已经完成入组, 等待随访总结。

4 结论

(1) 早期食管癌非手术治疗为初始治疗? 可以研究; (2) 新辅助治疗的临床价值? 在腺癌更明确, 鳞癌需要新辅助放疗; (3) 术后放疗临床价值? 术后病理显示 T 分期晚和/或区域性淋巴结有转移者, 术后辅助放疗有价值; (4) 以手术为基础的多学科综合治疗和以放疗为基础的多学科综合治疗, 孰优孰劣? 现有临床研究显示两者疗效相似, 但仍需要大样本设计好的随机对照研究来说明; (5) 化放综合治疗中放疗剂量? 总剂量 50 Gy 可能偏低, 新的时间剂量分割值得探索, 尤其是加速分割; (6) 靶向药物在放疗为基础多学科综合治疗价值? 非常值得进一步研究。

5 参考文献

- 1 Pech O, Bollschweiler E, Manner H, Leers J, Ell C, Hölscher AH. Comparison between endoscopic and surgical resection of mucosal esophageal adenocar-

cinoma in Barrett's esophagus at two high-volume centers. *Ann Surg* 2011; 254: 67-72

- 2 Yamamoto S, Ishihara R, Motoori M, Kawaguchi Y, Uedo N, Takeuchi Y, Higashino K, Yano M, Nakamura S, Iishi H. Comparison between definitive chemoradiotherapy and esophagectomy in patients with clinical stage I esophageal squamous cell carcinoma. *Am J Gastroenterol* 2011; 106: 1048-1054
- 3 Nishimura Y, Koike R, Ogawa K, Sasamoto R, Murakami Y, Itoh Y, Negoro Y, Itasaka S, Sakayauchi T, Tamamoto T. Clinical practice and outcome of radiotherapy for esophageal cancer between 1999 and 2003: the Japanese Radiation Oncology Study Group (JROSG) Survey. *Int J Clin Oncol* 2012; 17: 48-54
- 4 Motoori M, Yano M, Ishihara R, Yamamoto S, Kawaguchi Y, Tanaka K, Kishi K, Miyashiro I, Fujiwara Y, Shingai T, Noura S, Ohue M, Ohigashi H, Nakamura S, Ishikawa O. Comparison between radical esophagectomy and definitive chemoradiotherapy in patients with clinical T1bN0M0 esophageal cancer. *Ann Surg Oncol* 2012; 19: 2135-2141
- 5 Sjoquist KM, Burmeister BH, Smithers BM, Zalcberg JR, Simes RJ, Barbour A, Gebski V. Survival after neoadjuvant chemotherapy or chemoradiotherapy for resectable oesophageal carcinoma: an updated meta-analysis. *Lancet Oncol* 2011; 12: 681-692
- 6 Kranzfelder M, Schuster T, Geinitz H, Friess H, Büchler P. Meta-analysis of neoadjuvant treatment modalities and definitive non-surgical therapy for oesophageal squamous cell cancer. *Br J Surg* 2011; 98: 768-783
- 7 Nemoto K, Ariga H, Kakuto Y, Matsushita H, Takeda K, Takahashi C, Takai Y, Yamada S, Hosoi Y. Radiation therapy for loco-regionally recurrent esophageal cancer after surgery. *Radiother Oncol* 2001; 61: 165-168
- 8 Xiao ZF, Yang ZY, Miao YJ, Wang LH, Yin WB, Gu XZ, Zhang DC, Sun KL, Chen GY, He J. Influence of number of metastatic lymph nodes on survival of curative resected thoracic esophageal cancer patients and value of radiotherapy: report of 549 cases. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2005; 62: 82-90
- 9 Schreiber D, Rineer J, Vongtama D, Wortham A, Han P, Schwartz D, Choi K, Rotman M. Impact of postoperative radiation after esophagectomy for esophageal cancer. *J Thorac Oncol* 2010; 5: 244-250
- 10 Chen J, Pan J, Zheng X, Zhu K, Li J, Chen M, Wang J, Liao Z. Number and location of positive nodes, postoperative radiotherapy, and survival after esophagectomy with three-field lymph node dissection for thoracic esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2012; 82: 475-482
- 11 Pöttgen C, Stuschke M. Radiotherapy versus surgery within multimodality protocols for esophageal cancer--a meta-analysis of the randomized trials. *Cancer Treat Rev* 2012; 38: 599-604
- 12 Zhao KL, Ma JB, Liu G, Wu KL, Shi XH, Jiang GL. Three-dimensional conformal radiation therapy for esophageal squamous cell carcinoma: is elective nodal irradiation necessary? *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2010; 76: 446-451
- 13 Button MR, Morgan CA, Croydon ES, Roberts SA, Crosby TD. Study to determine adequate margins in radiotherapy planning for esophageal carcinoma by detailing patterns of recurrence after definitive chemoradiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2009; 73: 818-823

- 14 Welsh J, Settle SH, Amini A, Xiao L, Suzuki A, Hayashi Y, Hofstetter W, Komaki R, Liao Z, Ajani JA. Failure patterns in patients with esophageal cancer treated with definitive chemoradiation. *Cancer* 2012; 118: 2632-2640
- 15 Rodriguez CP, Adelstein DJ, Rice TW, Rybicki LA, Videtic GM, Saxton JP, Murthy SC, Mason DP, Ives DI. A phase II study of perioperative concurrent chemotherapy, gefitinib, and hyperfractionated radiation followed by maintenance gefitinib in locoregionally advanced esophagus and gastroesophageal junction cancer. *J Thorac Oncol* 2010; 5: 229-235

编辑 李军亮 电编 闫晋利

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》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、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)。

食管癌药物治疗的研究进展

李向柯, 樊青霞

■背景资料

本文主要介绍食管癌新辅助治疗、辅助治疗、根治性化疗以及靶向药物联合化疗的临床研究进展, 结合2012年NCCN指南和ASCO有关食管癌临床试验, 为临床制定合理的食管癌综合治疗方案和如何选择辅助药物提供参考。

李向柯, 樊青霞, 郑州大学第一附属医院肿瘤科 河南省郑州市 450052

李向柯, 在读研究生, 主要从事恶性肿瘤基础与临床的研究。

河南省医学科技攻关计划基金资助项目, No. 201203011

作者贡献分布: 文献检索、资料分析由李向柯完成; 论文撰写由李向柯与樊青霞共同完成; 审校由樊青霞完成。

通讯作者: 樊青霞, 教授, 主任医师, 博士生导师, 450052, 河南省郑州市建设东路1号, 郑州大学第一附属医院肿瘤科。fqx2243@yahoo.com.cn

收稿日期: 2012-08-28 修回日期: 2012-12-04

接受日期: 2012-12-17 在线出版日期: 2012-12-18

Progress in medication treatment of esophageal cancer

Xiang-Ke Li, Qing-Xia Fan

Xiang-Ke Li, Qing-Xia Fan, Department of Oncology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China

Supported by: the Medical Science and Technology Foundation of Henan Province, No. 201203011

Correspondence to: Qing-Xia Fan, Professor, Chief Physician, Department of Oncology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, 1 Jianshe East Road, Zhengzhou 450052, Henan Province, China. fqx2243@yahoo.com.cn

Received: 2012-08-28 Revised: 2012-12-04

Accepted: 2012-12-17 Published online: 2012-12-18

Abstract

Esophageal cancer is one of the common malignant tumors. Multimodality treatment (including surgery, chemotherapy and radiotherapy) of esophageal cancer has become a consensus. Although there is currently no standard treatment, neoadjuvant chemoradiotherapy followed by surgery and postoperative adjuvant radiotherapy or chemotherapy based on risk factors, such as positive surgical margin and lymph node metastasis, and definitive chemoradiotherapy when inoperable, has been recommended by the NCCN Guidelines. In recent years, clinical trials show that targeted drugs can further improve the prognosis of esophageal cancer. How to choose chemotherapy drugs and develop reasonable treatment modality has become a hotspot of clinical research. This article aims to review recent progress in medication treatment of esophageal cancer.

■同行评议者

姜春萌, 教授, 大连医科大学附属第二医院消化科

Key Words: Esophageal cancer; Neoadjuvant therapy; Adjuvant therapy; Definitive Chemoradiotherapy

Li XK, Fan QX. Progress in medication treatment of esophageal cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(35): 3482-3487

摘要

食管癌是我国常见的恶性肿瘤之一, 临床应用手术、化疗及放疗等相结合的综合治疗模式治疗食管癌已成为共识, 尽管还没有标准的治疗方案, 但术前行新辅助放化疗, 再手术(三联治疗), 其中术后切缘阳性、淋巴结转移等高危因素者, 积极行术后辅助治疗, 不能手术者可行根治性放化疗, 已成为NCCN指南推荐的综合治疗模式。近年来, 临床试验研究证实靶向药物能进一步改善食管癌的预后。如何选择化疗药物、制定合理的治疗模式成为临床研究的热点, 本文就食管癌药物治疗的临床研究进展作一综述。

关键词: 食管癌; 新辅助治疗; 术后辅助治疗; 根治性放化疗

李向柯, 樊青霞. 食管癌药物治疗的研究进展. *世界华人消化杂志* 2012; 20(35): 3482-3487

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3482.asp>

0 引言

食管癌是我国常见的恶性消化系肿瘤之一, 2008年WHO资料显示, 中国食管癌发病率为16.7/10万, 居全国各类恶性肿瘤第5位, 死亡率为13.4/10万, 居第4位。食管癌早期症状不典型, 确诊时多数进入中晚期, 以手术为主的综合治疗策略已成为共识, 手术切除的5年生存率维持在30%左右^[1,2]。多项临床试验显示食管癌可以从新辅助治疗中临床获益, 但对于行根治性切除的食管癌患者, 能否从术后辅助治疗中获益, 尚存在争议, 术后存在切缘阳性、淋巴结转移等高危因素者, 建议积极行术后辅助放化疗。结合2012年食管癌NCCN指南和ASCO有关食管癌

的临床研究, 对食管癌临床药物的研究进展作一简述。

1 新辅助治疗的临床依据

TNM分期是决定食管癌临床治疗方案的主要依据之一, 2012年NCCN和国内食管癌规范化指南推荐EUS联合PET-CT可以提高临床分期的准确性, EMR有助于指导早期食管癌分期。对于局部中晚期食管癌, 近年来, 多项随机的III期临床试验和Meta分析表明新辅助治疗: (1)术前控制原发灶, 缩小原发肿瘤体积, 降低肿瘤临床前分期, 尤其是N分期, 近而提高R0切除率; (2)提高术后病理完全缓解率, 术前尽可能控制和消除微小或隐匿性远处转移灶, 延长生存期; (3)有利于指导术后辅助药物的选择。另一方面, 应该注意的是新辅助治疗有可能错过切除局部病灶的最佳时机, 尤其是治疗失败后造成转移范围扩大。

2 新辅助治疗的药物选择

2.1 新辅助化疗联合放疗药物的选择 2012年NCCN指南推荐新辅助放化疗的主要化疗药物方案: 1级证据支持, 顺铂/氟尿嘧啶(5-FU或卡培他滨)、紫杉醇/卡铂; 2A级证据, 顺铂/紫杉醇、奥沙利铂/氟尿嘧啶(5-FU或卡培他滨); 2B级证据, 卡铂/5-FU、伊立替康/顺铂、多西他赛或紫杉醇/氟尿嘧啶(5-FU或卡培他滨)、奥沙利铂/多西他赛/卡培他滨。

自1992年Herskovic等^[3]报道食管癌术前放化疗的临床研究以来, 新辅助放化疗临床获益得到越来越多的试验支持。基于2项随机的III期临床试验肯定了术前应用顺铂/氟尿嘧啶方案化疗联合放疗的临床获益, 首先是Walsh等^[4]报道的多中心、随机临床试验, 试验组术前接受顺铂/氟尿嘧啶方案化疗联合放疗, 对照组单纯手术, 中位随访时间分别为16 mo和11 mo($P = 0.01$), 1、2、3年生存率分别为52%、37%、32%, 对照组为44%、26%、6%, 显示食管腺癌患者接受术前放化疗有较好的生存优势。CALGB9781试验研究评价顺铂与氟尿嘧啶联合同步放疗的三联治疗对照单纯手术治疗 I-III期食管癌(鳞癌或腺癌), 中位随访6年, 结果显示试验组与对照组的中位生存期4.48年和1.79年, 5年生存率(39% vs 16%), 提示新辅助放化疗联合手术的三联治疗有可能是局部晚期食管癌患者的标准治疗方案^[5]。但FFCD9901试验表明, 对于局限

的I和II期食管癌, 与单纯手术相比, 术前给予顺铂/氟尿嘧啶方案化疗联合放疗再手术并不能延长总生存, 却能增加术后死亡率^[6]。

来自澳大利亚胃肠道肿瘤研究组的一项Meta分析中入选10个随机新辅助放化疗对比单纯手术试验, 共计1 209例, 2年生存率绝对值提高13%, 表明新辅助放化疗可以明显临床获益^[7]。该研究组更新的Meta分析结果同样表明: 新辅助放化疗的生存获益(HR 0.78, 95%CI 0.70-0.88, $P < 0.0001$), 尚未确定新辅助放化疗相对于新辅助化疗的生存优势(HR 0.88, 95%CI 0.76-1.01, $P = 0.07$), 仍需要进一步的多中心、大样本临床试验予以证实^[8]。还有一些Meta分析也显示出新辅助放化疗再手术可以明显降低3年死亡率, 减少局部复发, 并能降低肿瘤分期, 延长生存期, 表明新辅助放化疗可以明显临床获益^[9,10]。

其他可供选择的一线药物还包括卡铂/紫杉醇, CROSS试验肯定该方案联合放疗治疗可切除的食管癌和食管胃结合部癌的临床获益, 与单纯手术组比较, 试验组可以提高R0切除率(92% vs 65%), 延长中位生存期(49 mo vs 26 mo), 1、2、3年生存率分别为82%、67%、59%, 而对照组依次为70%、52%、48%, 总生存优于手术组^[11]。Jodie等^[12]在2012年的ASCO会议上报道卡铂/紫杉醇方案进行新辅助的临床疗效, 结果显示该方案是可以耐受的, 且不良反应发生率较氟尿嘧啶/顺铂方案组有优势, 但两方案疗效差异未见相关报道。

近年来, 抗肿瘤新药如S-1、多西他赛、伊立替康、奥沙利铂等药物在食管癌新辅助治疗中也取得了较好的效果。Emi等^[13]研究表明, 多西他赛/顺铂/氟尿嘧啶联合放疗, 进行术前新辅助放化疗, 耐受性好, 治疗总有效率86%(完全缓解57%, 部分缓解29%), 有更高的病理完全缓解率, 值得临床进一步研究。该项研究结果与Eisler等^[14]进行的II期临床研究结果相似, 提示该方案进行新辅助治疗, 是安全、可行、有效的。

2012年ASCO会议上, Byoung等^[15]报道的一项II期临床试验评估S-1/顺铂为基础的化疗联合放疗在局部晚期可切除的食管鳞癌中的疗效和安全性, 结果令人鼓舞, 中位随访34.6 mo, 预计OS和PFS将分别得到56.5%和45.9%, 并且有更高的病理完全缓解率, 临床获益优于传统的5-FU/顺铂为基础的方案, 将进入III期临床研究进一步证实其生存优势。

2.2 围手术期新辅助化疗药物的选择 2012年

■研发前沿

鉴于西方国家食管癌病理类型以腺癌为主, 而中国绝大多数为鳞癌, 因此, NCCN指南并不完全适用于国内临床实践。

■同行评价

本文对食管癌的术前、术后化疗方案、新辅助化疗、化疗+放疗的药物治疗方案进行了详细综述,引用循证医学证据,反映了当前的学术动态,对临床工作具有一定的指导意义。

NCCN指南建议围手术期化疗仅适用于食管下段和食管胃结合部腺癌,推荐ECF方案或ECF改良方案术前和术后辅助化疗(I类证据支持)。

ECF方案(表阿霉素/顺铂/氟尿嘧啶)在围手术期化疗的临床获益是基于英国开展的III期试验(MAGIC试验)研究结果,试验组在术前和术后给予ECF方案化疗3周期,对照组单纯手术,5年生存率(36% vs 23%),研究表明ECF方案化疗提高可切除食管下段和食管胃结合部腺癌的总生存期和无疾病生存率^[16]。

顺铂/氟尿嘧啶方案围手术期化疗也得到临床试验的支持,MRCOEO2试验纳入802例可切除食管癌患者(鳞癌或腺癌),随机分为试验组接受5-FU/DDP方案术前化疗联合手术,对照组单纯手术,2年随访结果显示:2组R0切除率(60% vs 54%, $P < 0.0001$),并显示出3.5 mo的生存优势(16.8 mo vs 13.3 mo)^[17]。长期随访结果6年OS及DFS均优于单纯手术组,亚组分析显示无论腺癌和鳞癌均有生存获益^[18],与INT0113试验结论不同,可能与入组的患者病理类型有关,还需要大样本的随机对照试验进一步证实。最近法国的一项III期临床研究(FFCD9703试验),入组224例可切除的食管下段和食管胃结合部腺癌,随机分为术前接受5-FU/DDP方案再手术组和单独手术组,术前化疗有效者再进行术后化疗3或4周期,中位随访时间5.7年,试验组5年DFS为(34% vs 19%),5年OS(38% vs 24%),表明5-FU/DDP方案围手术期化疗能提高可根治性切除的食管下段和食管胃结合部腺癌的DFS和OS^[19]。

围手术期化疗显示出较好的生存优势,为进一步评价局部晚期食管癌新辅助化疗和术后辅助化疗的临床疗效,日本开展了JCOG9907试验,入组II/III期食管鳞癌患者330例,化疗方案(5-FU每天800 mg/m² d1-5和DDP 80 mg/m² d1, q3W),随机分为2组,新辅助化疗组术前化疗2周期,然后手术,术后化疗组先行根治性手术,再辅助化疗2周期。结果显示新辅助化疗组对比术后化疗组5年OS有明显生存优势(55% vs 43%, $P = 0.04$),基于此项研究结果,日本推荐术前顺铂/氟尿嘧啶方案联合手术成为食管癌II-III期鳞癌患者的新的标准治疗方案^[20]。

其他可供选择的新辅助化疗方案还有依托泊苷/顺铂,一项III期临床试验^[21],入组169例食管鳞癌,随机分为2组,一组接受2-4周期依托泊苷/顺铂方案化疗再手术,对照组单纯手术,初步的研究结果,中位OS(16 mo vs 12 mo),2年生存

率(42% vs 30%),长期随访结果5年OS(26% vs 17%, $P = 0.03$),结果表明依托泊苷/顺铂方案术前化疗可以提高食管鳞癌的OS。

2.3 诱导化疗序贯新辅助放化疗的药物选择 此类新辅助治疗模式的III期临床试验研究还较少,根据已有报道的临床试验结果,主要可供选择的有效药物包括顺铂、氟尿嘧啶、紫杉醇、多西他赛、伊立替康、S-1等,2012版NCCN指南推荐伊立替康/顺铂、紫杉醇/顺铂、多西他赛/顺铂、氟尿嘧啶/顺铂、氟尿嘧啶/紫杉醇(均为2A级证据)。

Stahl等^[22]进行的一项针对食管下段和贲门腺癌的III期试验,对照组采用顺铂/氟尿嘧啶/亚叶酸钙方案诱导化疗再手术,试验组同方案诱导化疗后序贯同步放化疗、再手术。试验组显示出较高的病理缓解率(15.6% vs 2.0%),3年生存率从27.7%提高到47.7%,尽管没有得到统计学的差异,但有延长生存期的优势,与另一项III期试验结果相似^[23]。

伊立替康/顺铂诱导化疗序贯该方案联合放疗的临床疗效也得到一些临床试验的支持,Rivera等^[24]进行的一项II期临床评估术前伊立替康/顺铂方案诱导化疗序贯放化疗再手术治疗可切除的食管胃结合部癌和胃癌的临床疗效,结果显示R0切除率65%,2年生存率35%,出现III-IV级不良反应可以耐受,显示出该方案较好的生存获益和耐受性。Ilson等^[25]进行的II期临床研究伊立替康/顺铂方案诱导化疗联合放化疗再手术治疗可切除的食管癌的临床疗效,在可评价的55例患者中,结果显示试验组R0切除率69%,中位OS 31.7 mo, PET评价诱导化疗有效者, PFS和OS较无效者都有所延长。

在2012年ASCO会议上,一项II期临床试验评价S-1/奥沙利铂方案诱导化疗联合新辅助放化疗治疗可切除食管癌的疗效,试验组与对照组的2年PFS分别为63.8%和55.2%($P = 0.626$), OS(70.1% vs 62.6%, $P = 0.515$),结果表明增加S-1/奥沙利铂方案诱导化疗并没有显示临床获益^[26]。

3 术后辅助治疗的药物选择

3.1 术后辅助化疗 多数学者认为手术后是否需要进行辅助治疗主要取决于组织病理学类型,手术切缘、淋巴结转移情况以及术前是否接受新辅助治疗等。NCCN指南推荐术后辅助化疗的常用方案为DDP/5-FU、DDP/CF/5-FU、DDP/

PTX(或TXT), 一般用4-6周期. 术前曾接受化疗或化放疗者, 术后需要根据癌残留程度判断术前化疗或化放疗的有效性, 再决定是用原治疗方案或更换新方案进行术后辅助治疗.

日本JCOG9204试验表明, 顺铂/氟尿嘧啶方案术后辅助化疗能够降低食管鳞癌患者的复发率. 辅助化疗组的5年OS为61%, 单纯治疗组为52%, 虽然差异无统计学意义($P = 0.13$), 但也有一定的提高, 辅助化疗有一定的生存优势^[27]. Armanios等^[28]研究认为食管及食管胃交界部腺癌根治术后患者给予紫杉醇/顺铂方案辅助化疗4个周期, 2年OS为60%, 明显高于历史对照, 需要III期临床试验进一步研究.

3.2 术后辅助放化疗 NCCN指南推荐的方案是5-FU/LV(I类证据), 还可以选择的方案包括DDP/5-FU、多西他赛/顺铂、紫杉醇/卡铂等.

美国西南肿瘤协作组INT0116临床试验肯定了术后放化疗的价值, 术后治疗组采用5-FU/LV方案联合放疗, 此研究显示3年的总生存率治疗组较观察组明显提高, 分别为50%和41%($P = 0.005$), 无病生存率(48% vs 31%, $P < 0.001$), 基于该研究, NCCN指南推荐其作为胃部和胃食管结合部癌切除术后新的标准治疗方案^[29,30]. Kofoed等^[31]进一步研究食管胃结合部腺癌根治性手术切除后, 辅助放化疗的疗效, 结果显示辅助放化疗组的3年生存率与单纯手术组分别为37%和24%, 中位生存期较单纯手术组延长10 mo(26 mo vs 16 mo), 控制混杂效应年龄和淋巴结因素后, 只在术后淋巴结阳性的患者有统计学意义, 表明食管胃结合部癌根治性术后淋巴结阳性的患者给予放化疗是合理的选择.

4 根治性放化疗

2012年NCCN指南推荐根治性放化疗的主要化疗药物方案: 1级证据支持, 顺铂/氟尿嘧啶(5-FU或卡培他滨); 2A级证据, 奥沙利铂/氟尿嘧啶(5-FU或卡培他滨)、顺铂/紫杉醇或多西他赛; 2B级证据, 卡铂/紫杉醇、多西他赛或紫杉醇/氟尿嘧啶(5-FU或卡培他滨)、奥沙利铂/多西他赛/卡培他滨, 联合放疗剂量50.0-50.4 Gy.

近年的研究主要以顺铂或氟尿嘧啶为基础方案联合放疗进行研究^[32,33], 表明对于局部晚期食管癌, 根治性放化疗是可以耐受的, 可以作为手术的替代治疗. 基于RTOG8501试验和INT0123试验的研究结果, 更新NCCN指南推荐的食管癌根治性放化疗标准方案为顺铂/氟尿嘧

啶方案联合放疗剂量50.4 Gy.

5 靶向治疗药物

多项研究证实表皮生长因子受体2(epidermal growth factor receptor-2, HER2)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)等与食管癌的预后关系密切. 基于ToGA试验结果, 推荐曲妥珠单抗联合顺铂/氟尿嘧啶方案治疗HER2/neu阳性的局部晚期食管胃结合部癌和胃癌的新的标准方案^[34]. 另外, 多项II期临床试验评价靶向治疗药物西妥昔单抗、曲妥珠单抗、吉非替尼、贝伐单抗等在晚期食管癌的疗效和安全性^[35-38], 仍需要多中心的III期临床试验进一步研究证实.

在2012年的ASCO会议上, 多项I期和II期临床研究评价靶向药物联合新辅助放化疗和新辅助化疗的临床疗效. FFCD-PRODIGE3试验评价西妥昔单抗联合5-FU/顺铂方案(5-FU 500 mg/m², d1-4和DDP 40 mg/m², d1)联合放疗治疗可手术切除的局部晚期食管癌的有效性和安全性, 结果显示中位OS 15.7 mo, 中位无复发时间13.7 mo, 可能与化疗的剂量有关, 并没有增加病理缓解率, 因此不建议进行III期临床研究^[39]. Baruch等^[40]进行的一项前瞻性I b/II期临床试验评价西妥昔单抗联合术前放化疗5-FU/顺铂方案(5-FU 1 000 mg/m², d1-5和DDP 100 mg/m², d1)治疗可手术切除的局部晚期食管癌, 初步结果显示R0切除率89%, 病理完全缓解率32%, 增加西妥昔单抗联合标准放化疗是安全和有效的, 有更高的R0切除率、病理完全缓解率和局部控制率, 鳞癌获益更大, 仍需III期临床试验进一步研究. 另一项评价帕尼单抗联合新辅助放化疗(顺铂/多西他赛方案联合放疗)联合手术治疗局部晚期食管远端腺癌患者的II期临床研究, pCR 32.8%, 近似pCR 22.4%, 结果表明该方案是有效的、可行的, 值得进一步研究^[41].

6 结论

新辅助和术后辅助治疗的临床研究结果不尽相同, 可能与入组病理类型、分期、治疗方案、样本大小等因素有关, 但新辅助放化疗联合手术在局部中晚期食管癌临床获益得到越来越多的证据支持, 鉴于西方国家食管癌病理类型以腺癌为主, 而中国绝大多数为鳞癌. 因此, NCCN指南并不完全适用于国内临床实践, 期待国内更多的随机对照临床研究, 进一步探究靶向药

物联合放化疗的疗效,提供更多的循证医学依据,以期不断完善中国版的食管癌规范化指南,更好的指导临床药物选择和制定合理的综合治疗方案,不断提高食管癌的临床治疗水平。

7 参考文献

- 1 Hyngstrom JR, Posner MC. Neoadjuvant strategies for the treatment of locally advanced esophageal cancer. *J Surg Oncol* 2010; 101: 299-304
- 2 方文涛, 冯键, 茅腾, 傅世杰, 陈文虎. 新版食管癌 TNM分期对外科治疗的指导意义. *中华肿瘤杂志* 2011; 33: 687-691
- 3 Herskovic A, Martz K, al-Sarraf M, Leichman L, Brindle J, Vaitkevicius V, Cooper J, Byhardt R, Davis L, Emami B. Combined chemotherapy and radiotherapy compared with radiotherapy alone in patients with cancer of the esophagus. *N Engl J Med* 1992; 326: 1593-1598
- 4 Walsh TN, Noonan N, Hollywood D, Kelly A, Keeling N, Hennessy TP. A comparison of multimodal therapy and surgery for esophageal adenocarcinoma. *N Engl J Med* 1996; 335: 462-467
- 5 Tepper J, Krasna MJ, Niedzwiecki D, Hollis D, Reed CE, Goldberg R, Kiel K, Willett C, Sugarbaker D, Mayer R. Phase III trial of trimodality therapy with cisplatin, fluorouracil, radiotherapy, and surgery compared with surgery alone for esophageal cancer: CALGB 9781. *J Clin Oncol* 2008; 26: 1086-1092
- 6 Mariette C, Seitz JF, Maillard E, Mornex F, Thomas PA, Raoul J, Boige V, Pezet D, Genet C, Bedenne L, Federation Francaise de Cancerologie Digestive. Surgery alone versus chemoradiotherapy followed by surgery for localized esophageal cancer: Analysis of a randomized controlled phase III trial FFCD 9901. 2010 ASCO Annual Meeting; 2010 June 4-8; Chicago, USA. 2010: abstr 4005
- 7 Gebski V, Burmeister B, Smithers BM, Foo K, Zalberg J, Simes J. Survival benefits from neoadjuvant chemoradiotherapy or chemotherapy in oesophageal carcinoma: a meta-analysis. *Lancet Oncol* 2007; 8: 226-234
- 8 Sjoquist KM, Burmeister BH, Smithers BM, Zalberg JR, Simes RJ, Barbour A, Gebski V. Survival after neoadjuvant chemotherapy or chemoradiotherapy for resectable oesophageal carcinoma: an updated meta-analysis. *Lancet Oncol* 2011; 12: 681-692
- 9 Fiorica F, Di Bona D, Schepis F, Licata A, Shahied L, Venturi A, Falchi AM, Craxi A, Cammà C. Preoperative chemoradiotherapy for oesophageal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Gut* 2004; 53: 925-930
- 10 Jin HL, Zhu H, Ling TS, Zhang HJ, Shi RH. Neoadjuvant chemoradiotherapy for resectable esophageal carcinoma: a meta-analysis. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 5983-5991
- 11 Gaast AV, van Hagen P, Hulshof M, Richel D, van Berge H, Nieuwenhuijzen GA, Plukker JJ, Bonenkamp JJ, Steyerberg EW, Tilanus HW, CROSS Study Group. Effect of preoperative concurrent chemoradiotherapy on survival of patients with resectable esophageal or esophagogastric junction cancer: Results from a multicenter randomized phase III study. 2010 ASCO Annual Meeting; 2010 June 4-8; Chicago, USA. 2010: abstr 4004
- 12 Jodie EB, Margaret OK, Erica M, Seamus OR, Michael WB, Criostoir OS, Aileen F, Thomas JM, Derek GP. Chemoradiotherapy for locally advanced esophageal cancer using carboplatin, paclitaxel. 2012 ASCO Annual Meeting; 2012 June 1-5; Chicago, USA. 2012: abstr e14666
- 13 Emi M, Hihara J, Hamai Y, Aoki Y, Okada M, Kenjo M, Murakami Y. Neoadjuvant chemoradiotherapy with docetaxel, cisplatin, and 5-fluorouracil for esophageal cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 2012; 69: 1499-1505
- 14 Eisterer W, DE Vries A, Kendler D, Spechtenhauser B, Königsrainer A, Nehoda H, Virgolini I, Lukas P, Bechter O, Wöll E, Ofner D. Triple induction chemotherapy and chemoradiotherapy for locally advanced esophageal cancer. A phase II study. *Anticancer Res* 2011; 31: 4407-4412
- 15 Byoung CC, Hyun C, Yong C L, Dae J K, Mi JY, Sung KS, Hyun KK, Han SK, Sun ML, Joo-Hang K. A prospective phase II trial of a S-1/cisplatin-based chemoradiotherapy for locoregionally advanced esophageal cancer. 2012 ASCO Annual Meeting; 2012 June 1-5; Chicago, USA. 2012: abstr e14559
- 16 Cunningham D, Allum WH, Stenning SP, Thompson JN, Van de Velde CJ, Nicolson M, Scarffe JH, Lofts FJ, Falk SJ, Iveson TJ, Smith DB, Langley RE, Verma M, Weeden S, Chua YJ. Perioperative chemotherapy versus surgery alone for resectable gastroesophageal cancer. *N Engl J Med* 2006; 355: 11-20
- 17 Medical Research Council Oesophageal Cancer Working Group. Surgical resection with or without preoperative chemotherapy in oesophageal cancer: a randomised controlled trial. *Lancet* 2002; 359: 1727-1733
- 18 Allum WH, Stenning SP, Bancewicz J, Clark PI, Langley RE. Long-term results of a randomized trial of surgery with or without preoperative chemotherapy in esophageal cancer. *J Clin Oncol* 2009; 27: 5062-5067
- 19 Ychou M, Boige V, Pignon JP, Conroy T, Bouché O, Lebreton G, Ducourtieux M, Bedenne L, Fabre JM, Saint-Aubert B, Genève J, Lasser P, Rougier P. Perioperative chemotherapy compared with surgery alone for resectable gastroesophageal adenocarcinoma: an FNCLCC and FFCD multicenter phase III trial. *J Clin Oncol* 2011; 29: 1715-1721
- 20 Ando N, Kato H, Igaki H, Shinoda M, Ozawa S, Shimizu H, Nakamura T, Yabusaki H, Aoyama N, Kurita A, Ikeda K, Kanda T, Tsujinaka T, Nakamura K, Fukuda H. A randomized trial comparing postoperative adjuvant chemotherapy with cisplatin and 5-fluorouracil versus preoperative chemotherapy for localized advanced squamous cell carcinoma of the thoracic esophagus (JCOG9907). *Ann Surg Oncol* 2012; 19: 68-74
- 21 Boonstra JJ, Kok TC, Wijnhoven BP, van Heijl M, van Berge Henegouwen MI, Ten Kate FJ, Siersema PD, Dinjens WN, van Lanschot JJ, Tilanus HW, van der Gaast A. Chemotherapy followed by surgery versus surgery alone in patients with resectable oesophageal squamous cell carcinoma: long-term results of a randomized controlled trial. *BMC Cancer* 2011; 11: 181
- 22 Stahl M, Walz MK, Stuschke M, Lehmann N, Meyer HJ, Riera-Knorrenschild J, Langer P, Engenhart-Cabillic R, Bitzer M, Königsrainer A, Budach W, Wilke H. Phase III comparison of preoperative chemotherapy compared with chemoradiotherapy in patients with locally advanced adenocarcinoma of the esophagogastric junction. *J Clin Oncol* 2009; 27: 851-856

- 23 Stahl M, Wilke H, Lehmann N, Stuschke M. Long-term results of a phase III study investigating chemoradiation with and without surgery in locally advanced squamous cell carcinoma (LA-SCC) of the esophagus. 2008 ASCO Annual Meeting; 2008; May 30-June 3; Chicago, USA. 2008: abstr 4530
- 24 Rivera F, Galán M, Taberero J, Cervantes A, Vega-Villegas ME, Gallego J, Laquente B, Rodríguez E, Carrato A, Escudero P, Massutí B, Alonso-Orduña V, Cardenal A, Sáenz A, Giralt J, Yuste AL, Antón A, Aranda E. Phase II trial of preoperative irinotecan-cisplatin followed by concurrent irinotecan-cisplatin and radiotherapy for resectable locally advanced gastric and esophagogastric junction adenocarcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2009; 75: 1430-1436
- 25 Ilson DH, Minsky BD, Ku GY, Rusch V, Rizk N, Shah M, Kelsen DP, Capanu M, Tang L, Campbell J, Bains M. Phase 2 trial of induction and concurrent chemoradiotherapy with weekly irinotecan and cisplatin followed by surgery for esophageal cancer. *Cancer* 2012; 118: 2820-2827
- 26 Dok HY, Geundoo J, Jong HK, Yong HK, Seyoung S, Jiyoung KIM, Seung-II P, Hyeong RK, Hwoon-Yong J, Gin-Hyug L, Kee DC, Ho JS, Ho YS, Ji HS, Kyung-Ja C, Sung-Bae K. Randomized phase II study of preoperative concurrent chemoradiotherapy with or without induction chemotherapy with S-1 and oxaliplatin in patients with resectable esophageal cancer. 2012 ASCO Annual Meeting; 2012 June 1-5; Chicago, USA. 2012: abstr 4093
- 27 Ando N, Iizuka T, Ide H, Ishida K, Shinoda M, Nishimaki T, Takiyama W, Watanabe H, Isono K, Aoyama N, Makuuchi H, Tanaka O, Yamana H, Ikeuchi S, Kabuto T, Nagai K, Shimada Y, Kinjo Y, Fukuda H. Surgery plus chemotherapy compared with surgery alone for localized squamous cell carcinoma of the thoracic esophagus: a Japan Clinical Oncology Group Study--JCOG9204. *J Clin Oncol* 2003; 21: 4592-4596
- 28 Armanios M, Xu R, Forastiere AA, Haller DG, Kugler JW, Benson AB. Adjuvant chemotherapy for resected adenocarcinoma of the esophagus, gastro-esophageal junction, and cardia: phase II trial (E8296) of the Eastern Cooperative Oncology Group. *J Clin Oncol* 2004; 22: 4495-4499
- 29 Macdonald JS, Smalley SR, Benedetti J, Hundahl SA, Estes NC, Stemmermann GN, Haller DG, Ajani JA, Gunderson LL, Jessup JM, Martenson JA. Chemoradiotherapy after surgery compared with surgery alone for adenocarcinoma of the stomach or gastroesophageal junction. *N Engl J Med* 2001; 345: 725-730
- 30 Macdonald JS, Benedetti J, Smalley S, Haller D, Hundahl S, Jessup J, Ajani J, Gunderson L, Goldman B, Martenson J. Chemoradiotherapy of resected gastric cancer: A 10-year follow-up of the phase III trial INT0116 (SWOG). 2009 ASCO Annual Meeting; 2009 May 29-June 2; Florida, USA. 2009: abstr 4515
- 31 Kofoed SC, Muhic A, Baeksgaard L, Jendresen M, Gustafsen J, Holm J, Bardram L, Brandt B, Brenø J, Svendsen LB. Survival after adjuvant chemoradiotherapy or surgery alone in resectable adenocarcinoma at the gastro-esophageal junction. *Scand J Surg* 2012; 101: 26-31
- 32 Gwynne S, Hurt C, Evans M, Holden C, Vout L, Crosby T. Definitive chemoradiation for oesophageal cancer--a standard of care in patients with non-metastatic oesophageal cancer. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 2011; 23: 182-188
- 33 Conroy T, Yataghène Y, Etienne PL, Michel P, Senellart H, Raoul JL, Mineur L, Rives M, Mirabel X, Lamezec B, Rio E, Le Prisé E, Peiffert D, Adenis A. Phase II randomised trial of chemoradiotherapy with FOLFOX4 or cisplatin plus fluorouracil in oesophageal cancer. *Br J Cancer* 2010; 103: 1349-1355
- 34 Bang YJ, Van Cutsem E, Feyereislova A, Chung HC, Shen L, Sawaki A, Lordick F, Ohtsu A, Omuro Y, Satoh T, Aprile G, Kulikov E, Hill J, Lehle M, Rüschoff J, Kang YK. Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. *Lancet* 2010; 376: 687-697
- 35 Homs MY, Voest EE, Siersema PD. Emerging drugs for esophageal cancer. *Expert Opin Emerg Drugs* 2009; 14: 329-339
- 36 Chan JA, Blazskowsky LS, Enzinger PC, Ryan DP, Abrams TA, Zhu AX, Temel JS, Schrag D, Bhargava P, Meyerhardt JA, Wolpin BM, Fidias P, Zheng H, Florio S, Regan E, Fuchs CS. A multicenter phase II trial of single-agent cetuximab in advanced esophageal and gastric adenocarcinoma. *Ann Oncol* 2011; 22: 1367-1373
- 37 Ilson DH, Kelsen D, Shah M, Schwartz G, Levine DA, Boyd J, Capanu M, Miron B, Klimstra D. A phase 2 trial of erlotinib in patients with previously treated squamous cell and adenocarcinoma of the esophagus. *Cancer* 2011; 117: 1409-1414
- 38 Shah MA, Jhaver M, Ilson DH, Lefkowitz RA, Robinson E, Capanu M, Kelsen DP. Phase II study of modified docetaxel, cisplatin, and fluorouracil with bevacizumab in patients with metastatic gastroesophageal adenocarcinoma. *J Clin Oncol* 2011; 29: 868-874
- 39 Laetitia D, Christophe M, Marc Y, Tan DN, Rosine G, Thomas A, Veronique V, Xavier d'Journo, Fabien S, Franck B, Antoine A, Jean FS. Neoadjuvant chemoradiotherapy with 5-fluorouracil-cisplatin combined with cetuximab in patients with resectable locally advanced esophageal carcinoma: A prospective phase I/II trial (FFCD-PRODIGE3)-Preliminary phase II results. 2012 ASCO Annual Meeting; 2012 June 1-5; Chicago, USA. 2012: abstr 4091
- 40 Baruch B, Yulia K, Ofer P, Gal M, Liran O, Hanoch K, Nikolai M, Eyal F, Aaron S, Efraim I. Preoperative chemoradiation and cetuximab for resectable, locally advanced esophageal cancer: Preliminary results of a prospective phase Ib/II trial. 2012 ASCO Annual Meeting; 2012 June 1-5; Chicago, USA. 2012: abstr e14571
- 41 Carolyn ER, Paul A. D, Tracey E. S, Bryan FM, Mark K. F, Amy RO, Joe B. P, Stephen DC, A. Craig L, American College of Surgeons Oncology Group. A phase II study of neoadjuvant therapy with cisplatin, docetaxel, panitumumab plus radiation therapy followed by surgery in patients with locally advanced adenocarcinoma of the distal esophagus (ACOSOG Z4051). 2012 ASCO Annual Meeting; 2012 June 1-5; Chicago, USA. 2012: abstr 4062

编辑 李军亮 电编 闫晋利

食管鳞癌预后评估及疗效预测分子靶标的临床研究进展

李苏宜

■背景资料

食管癌居我国恶性肿瘤发病率和死因第4位, 绝大多数是鳞癌(ESCC), 以手术为主的综合治疗5年生存率25%-30%、10年生存率15%左右。分子水平发现不良预后者及放化疗不敏感者, 采取相应对策是改善疗效的重要途径。

李苏宜, 东南大学附属中大医院 江苏省南京市 210009
李苏宜, 博士, 教授, 主任医师, 主要从事食管鳞癌内科诊治、肿瘤营养代谢治疗方面的研究。

南京市医学科技发展基金资助项目, No. YKK1060
通讯作者: 李苏宜, 教授, 主任医师, 210009, 江苏省南京市湖南路丁家桥87号, 东南大学附属中大医院, njlisuyi@sina.com

收稿日期: 2012-08-28 修回日期: 2012-12-08

接受日期: 2012-12-17 在线出版日期: 2012-12-18

Molecular targets for prediction of prognosis and treatment response in esophageal squamous cell carcinoma

Su-Yi Li

Su-Yi Li, Zhongda Hospital of Southeast University, Nanjing 210009, Jiangsu Province, China

Supported by: the Medical Science and Technology Foundation of Nanjing, No. YKK1060

Correspondence to: Su-Yi Li, Professor, Chief Physician, Zhongda Hospital of Southeast University, 87 Dingjiaqiao, Hunan Road, Nanjing 210009, Jiangsu Province, China. njlisuyi@sina.com

Received: 2012-08-28 Revised: 2012-12-08

Accepted: 2012-12-17 Published online: 2012-12-18

Abstract

In recent years, molecular targets for prediction of prognosis and chemotherapy efficacy in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) have been increasingly identified, which involve up-regulation of growth signals, down-regulation of inhibitory growth signals, death avoidance, limitless replicative potential, continuous eternal angiogenesis, invasion, and metastasis. Typical molecular targets include mutant p53, vascular endothelial growth factor, epidermal growth factor receptor, and Ki-67. The clinical value of currently available molecular targets in prediction of prognosis and treatment response in ESCC needs to be further evaluated.

Key Words: Esophageal squamous cell carcinoma; Molecular targets; P53; Epidermal growth factor receptor; Vascular endothelial growth factor; Ki-67

Li SY. Molecular targets for prediction of prognosis and treatment response in esophageal squamous cell carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(35): 3488-3493

摘要

研究鳞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)预后评估及化疗敏感预测相关分子靶点的成果不断涌现, 涉及生长信号上调、抑制生长信号下调、死亡逃避、无限复制潜能、持续永恒血管生成和组织浸润转移方面的数十种分子靶标。其中突变型p53基因、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、表皮生长因子受体家族(epidermal growth factor receptor, EGFR)和Ki-67等的临床价值研究相对成熟。现有分子靶标临床价值的评价需要和更值得深入探索和完善。

关键词: 食管鳞癌; 分子靶标; P53; 表皮生长因子受体家族; 血管内皮生长因子; Ki-67

李苏宜. 食管鳞癌预后评估及疗效预测分子靶标的临床研究进展. *世界华人消化杂志* 2012; 20(35): 3488-3493

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3488.asp>

0 引言

食管癌居我国恶性肿瘤发病率和死因第4位, 其中绝大多数是鳞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC), 多采用以手术为主的综合治疗, 我国食管鳞癌患者5年生存率25%-30%、10年生存率15%左右。那么, 为什么有些病例会有良好预后, 或因放化疗敏感而生存获益呢? 因此, 在分子水平上发现不良预后者及放化疗不敏感者, 采取相应对策改善其疗效为目前食管癌临床研究重要方向。随着人们对细胞周期调节、凋亡、血管生成和肿瘤增殖相关细胞分子事件认识程度的快速提升, 对ESCC发生发展分子机制研究在不断深入, 化疗敏感预测及预后评估相关分子靶点探索的成果不断涌现, 涉及生长信号上调、抑制生长信号下调、死亡逃避、无限复制潜能、持续永恒血管生成和组织浸润转移6个方面。其中突变型p53基因、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)等分子靶标临床价值探索相对成熟。

■同行评议者

张志坚, 教授, 福州总医院消化内科

1 *p53*基因突变

*p53*基因位于人类染色体17p13.1, 全长20 kb核内磷酸化蛋白, 是重要抑癌基因和细胞周期调节基因。食管癌*p53*突变最常见是A:T基因位点突变。*p53*基因突变后发挥癌基因作用, 致癌细胞周期失控, 增加浸润转移危险性和影响放化疗疗效^[1]。*p53*基因突变是ESCC发生的早期事件, 发生率为17%-40%, 个别文献达70%^[2], *P53*蛋白沉积在肿瘤细胞内, 其阳性表达与淋巴结转移和TNM分期显著增高相关^[3]。Murtaza等^[4]发现, 突变型*p53*食管鳞癌细胞表达与分化程度有关, 高分化鳞癌组织*p53*低表达, 而低分化鳞癌组织*p53*高表达。*p53*突变与ESCC不良预后密切, *p53*基因发生突变后会导致患者预后差。国内褚廷广等^[5]68例ESCC术后标本免疫组织化学研究, *P53*蛋白染色主要位于肿瘤细胞胞核内, 阳性率72.06%, 与肿瘤细胞分化程度、淋巴结转移、TNM分期成正相关。突变型*p53*阳性具有较强的转移特性: 阳性表达者/阴性者转移率分别为85.366和37.037% ($P < 0.01$)。Blanchard等^[6]同期化放疗治疗57例ESCC患者, 发现尽管患者血清*P53*抗体水平与近期疗效无关, 多因素分析结果却显示高浓度血清*P53*抗体水平是预测患者不良预后独立因子。Takahashi等^[7]发现119例食管癌术后患者不良预后与*p53*基因突变相关, 也认为*p53*突变型表达是ESCC患者不良预后因子。Cescon等^[8]发现在未区分鳞癌或腺癌的371位食管癌患者中, 肿瘤组织中突变型*p53*表达与不表达者中位生存期分别为11.8 mo和29.1 mo ($P < 0.0001$)。不过, 也有学者却认为肿瘤组织中突变型*p53*过表达是ESCC的早期时间, 与疾病进展并无关联^[9,10]。

较多研究发现食管癌组织*P53*蛋白或/和血清中*P53*-Ab阳性的食管癌患者术前放化疗敏感性差, 并对其机制做了进一步探索。日本学者Yamasaki等^[11]研究77例ESCC患者, 结果显示化疗敏感性反应者当中突变型*p53*和野生型*p53*的比例分别是16.7%和65.9%, 显示突变型*p53*与ESCC化疗敏感性降低存在关联。Yang等^[11]对100例ESCC患者的研究发现, *p53*突变高表达者化疗耐药性提高, 机制与survivin也高表达有关。Makino等^[12]治疗64例ESCC患者, 野生型*p53*表达者的放/化疗敏感性显著增高 ($P < 0.05$), 认为突变型*p53*因失去诱导细胞凋亡作用致放化疗敏感性下降。

Okawa等^[13]研究发现: *p53*突变后可上调ESCC的VEGF表达, 即*p53*突变率增加会导致肿

瘤微血管数量增加。Leeuwenburgh等^[14]一项未区分腺癌还是鳞癌恶病质食管癌患者研究: 146例免疫组织化学标本, 重度恶病质患者突变型*P53*过表达率为82%, 轻度恶病质患者过表达率仅67%, 非肿瘤恶病质者则仅为10%, 提示突变型*P53*过表达与食管癌患者恶病质发生发展可能存在关联。

ESCC过表达突变型*p53*可加速肿瘤浸润转移、致细胞凋亡抑制、促肿瘤血管生成, 可能促恶病质发生发展。因此, 过表达突变型*p53*与ESCC不良预后, 和放化疗敏感性下降关系均密切。检测ESCC组织突变型*P53*蛋白表达和患者血清突变型*P53*抗体水平, 一定程度可以预测ESCC患者的预后和放化疗效果。

2 ESCC组织过表达VEGF

VEGF表达水平直接反映肿瘤生长速度和转移倾向。VEGF家族有VEGF-A, -B, -C, -D, -E和PlGF, 其中VEGF-A(通常称作VEGF)是该家族的最基本成员, 是功能最强的内皮生长因子, 与VEGF-C, -D一起被认为与肿瘤关系密切; VEGF-A使实体瘤血管化、促进肿瘤生长还参与了肿瘤的血道转移; VEGF-C, -D结构相似, 能促进实体瘤淋巴管形成和淋巴道转移(淋巴生长因子)^[15]。VEGF蛋白在正常食管黏膜组织、癌周组织和ESCC组织中表达各异, 表达率也呈逐步递增势态。国内林英诚^[16]课题组免疫组织化学法分析60例ESCC组织、20例癌旁组织、10例正常食管黏膜, VEGF表达阳性率分别为: 36.7%、15.0%、10.0%, 差异显著 ($P < 0.05$)。ESCC组织VEGF-C, -D也呈过表达状态。多项研究证实, ESCC组织VEGF-C表达率50%左右, 正常食管黏膜组织可能不表达VEGF-C、-D。Kozlowski等^[17]免疫组织化学法研究73例ESCC手术标本和10例正常对照组织VEGF-C表达, 正常食管黏膜不表达VEGF-C, 而ESCC组织40例阳性 ($P < 0.01$)。国内张晖等^[18]RT-PCR法分析52例ESCC组织及20例正常食管组织VEGF-D mRNA水平: ESCC组织VEGF-D mRNA阳性率61.5% (32/52), 正常食管黏膜皆为阴性 ($\chi^2 = 22.154, P < 0.05$)。

ESCC组织VEGF过表达及中晚期患者VEGF血清水平升高, 可能与不良预后相关。Mukherjee等^[19]免疫组织化学法检测: 55例ESCC组织标本38例VEGF-A过表达, 是淋巴浸润独立预测因子 ($P = 0.002$), 5年无瘤生存率降低 ($P = 0.004$)。Kii等^[20]同期放化疗治疗51例III、III

■ 研发前沿

尽管该领域国内外研究颇多, 真正具单独应用于ESCC预后评估和疗效预测价值的分子靶标目前几乎没有一个得到公认。

■应用要点

研究相对成熟的主要有 $p53$ 基因突变、EGFR家族基因过表达、ESCC组织过表达VEGF和Ki-67等。通常预后较差预后/放化疗敏感性下降分子靶标在ESCC组织或患者血清中表达愈多,预后/放化疗敏感性愈差。完善评价现有分子靶标临床价值是深入研究的主要方向。

期ESCC患者,肿瘤组织VEGF-A低表达者中位生存669 d,高表达者仅352 d($P = 0.0474$),认为VEGF-A过表达影响患者预后($P = 0.0515$)。王修身等^[21]ELISA法分析89例ESCC患者血清VEGF水平发现, S-VEGF<475 pg/mL和>475 pg/mL的1年无进展生存率分别为66%和24%($\chi^2 = 12.31$, $P = 0.000$),肿瘤进展风险相差2.65倍, Cox回归分析S-VEGF浓度是独立预后因素。

Tanaka等^[22]106例ESCC术后标本组织VEGF-C mRNA检测后发现,过表达者存活率明显低于低表达者($P = 0.0065$),多因素回归分析VEGF-C过表达提示预后不良,尚不能独立预测患者预后。而Okazawa等^[23]分析100例ESCC患者的组织VEGF-C表达发现,过表达者预后明显差($P = 0.036$),多因素分析结果显示VEGF-C为预后决定因子。Kozlowski等^[24]检测110例ESCC患者血清VEGF-C、-D水平认为,高VEGF-C血清水平是术后复发和淋巴结转移独立危险因子,多因素回归分析高VEGF-D血清水平能独立预测患者术后生存(HR 1.738, 95%CI 1.035-2.920, $P = 0.035$)。近年来发现ESCC过表达NF- κ B并与不良预后及放化疗抵抗相关,主要机制是抑制细胞凋亡和VEGF-C过表达依赖肿瘤转移加速^[25]。日本学者Kozlowski等^[17]免疫组织化学检测73例ESCC术后组织标本, 54.7%(40/73)和65.7%(48/73)患者分别过表达VEGF-C和VEGF-D,分别均与组织差分化、浸润深度、淋巴转移相关。多因素分析结果,过表达VEGF-C和VEGF-D分别均与远期不良生存状态关系密切,且过表达VEGF-C与淋巴转移有关。作者据此认为,ESCC组织过表达VEGF-C和VEGF-D可以预测患者的不良预后(包括治疗有效者)。

现有文献还提示,ESCC组织VEGF表达及患者血清VEGF水平与手术、化疗效果存在关联。Choi等^[26]手术治疗51例ESCC患者:30例不表达VEGF(58.8%),21例表达VEGF者(41.2%),5年无瘤生存率分别为60.3%±10.0%和57.1%±11.6%,单因素回归显示VEGF表达是生存重要预测因子($P < 0.05$),多因素回归分析VEGF是总生存独立预测因子(hazard ratio, HR 7.21, 95%CI 1.71-30.4, $P = 0.007$)。ESCC组织VEGF表达及患者血清VEGF水平变化与化疗效果存在一定的关联性。Orditura等^[27]新辅助化疗治疗45例ESCC患者,治疗有反应组(CR+PR)S-VEGF水平明显低于无反应组(SD+PD)(315.3±95.3 vs 689.58 pg/mL±132.1 pg/mL, $P = 0.001$)。

血管生成相关因子表达状态与ESCC预后、化疗疗效关联性研究领域近年来十分活跃。目前认为,VEGF-A的ESCC组织表达率高于癌旁和正常食管黏膜组织,而后者却不表达VEGF-C、VEGF-D。VEGF-A、-C、-D过表达与ESCC的不良分化、临床高分期密切相关,提示差预后。ESCC组织VEGF表达及患者血清VEGF水平变化与手术、化疗等抗肿瘤治疗效果不佳存在一定关联。需要提及的是,近期越来越多的学者在进行ESCC抗血管生成治疗的基础和临床研究。

3 EGFR家族基因过表达

表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)家族属于I型跨膜酪氨酸激酶生长因子受体,包括EGFR、Her-2、Her-3、Her-4 4个成员,分别是原癌基因C-erbB-1-4的表达产物。ESCC组织稳定过表达EGFR,表达率约60%,与肿瘤细胞增殖、侵袭、转移、血管生长及细胞凋亡抑制有关。一个有趣的现象是,从正常食管黏膜,食管上皮轻、中、重度不典型增生,到I、II、III级分化ESCC组织,EGFR阳性率从0逐步递增达80%,形成一种随食管黏膜分化程度的恶化程度逐级增高而EGFR阳性表达率明显增加的关联状态,且与EGFR基因扩增比率相一致^[28,29]。ESCC过表达Her-2多认为在30%以内,Her-3过表达与食管癌分化程度及局部淋巴转移相关。食管癌组织Her-4表达研究文献罕见^[30-32]。

EGFR高表达引起ESCC细胞分化异常,细胞间黏附力下降,肿瘤易发生淋巴道及远处转移^[33],有研究发现EGFR过表达与食管癌血管侵袭呈正相关,并与局部高复发率相一致^[34],因而,多数研究者认为食管癌EGFR过表达与ESCC不良预后密切相关,倾向认为EGFR过表达为ESCC不良预后因子。

尽管ESCC的Her-2过表达率不高,但较为稳定,与临床分期和恶性程度存在一致性。Schoppmann等^[35]在包含79例ESCC患者的研究发现,ESCC原发灶与淋巴转移灶HER2表达状态一致性高达99%,且所有发生转移的ESCC均为HER2过表达状态。Her-2过表达与抑制凋亡、促增殖、增强肿瘤转移潜能相关联,会通过诱导血管内皮生长因子的表达,促肿瘤血管形成,研究发现,Her-2蛋白表达与其基因扩增之间有显著的一致性,均与ESCC的不良预后明显相关^[36]。因此,Her-2过表达/Her-2基因扩增有望为ESCC的预后不良提示因子。

Her-3酪氨酸激酶活性较低, 不大可能直接参与跨膜信号转导作用, 但可调节EGFR和Her-2信号通路. 文献报道ESCC组织中Her-3表达率约50%-60%, 高于癌旁组织^[32]. Her-3过表达与食管癌分化程度及局部淋巴结的转移有相关关系, 与年龄、性别、肿瘤的大小、部位和浸润深度之间的关系不大. Xu等^[37]研究发现正常食管上皮组织不表达Her-4, ESCC胞膜、胞质及胞核均有Her-4染色, 总阳性率84%(51/61), 其中有37例(61%)核内表达阳性, 与其临床分期增高及短生存期相关. 该研究还提示: Her-4核外表达抑制肿瘤的进展.

EGFR家族表达状况预测ESCC化放疗效果的临床价值, 目前尚不明确. 日本学者Yamamoto等^[38]采用多西紫杉醇+顺铂+氟尿嘧啶联合化疗治疗88例ESCC: 其中37例为新辅助化疗, EGFR过表达与其病理完全缓解有关($P=0.004$); 在51例单纯化疗者中, 多因素分析显示EGFR过表达是化疗敏感的独立预测因子. 国内李强等^[39]同期化放疗一线治疗35例ESCC患者, EGFR阳性者完全缓解率57.7%(15/26)而阴性者仅11.1%(1/9)($P=0.022$), 认为EGFR可能有助于预测同步放化疗敏感性. 不过, 曾经有研究不支持EGFR表达状况为ESCC放化疗敏感性预测因子^[40]. Akamatsu等^[41]则认为HER-2过表达似与食管癌放化疗抵抗有关($P=0.02$).

总之, ESCC过度表达EGFR、HER-2与多种不良肿瘤生物学行为均存在关联, 倾向认为EGFR家族过表达为ESCC不良预后预测的参考指标. 同时, 还应关注EGFR、HER-2过表达对ESCC化放疗敏感性影响的研究进展.

4 Bmi-1基因与食管鳞癌的关系

原癌基因Bmi-1(B-cell-specific Moloney murine leukemia virus insertion site 1, B细胞特性莫洛尼鼠白血病毒插入位点1)在1991年被首次报道, 人类Bmi-1基因位于第10号染色体短臂1区3带(10p13), 含有14个外显子和10个内含子, 直接参与细胞生长、增殖的调节, 为成体干细胞和白血病干细胞的自我更新所必需. 从胚胎期到成人期, 神经祖细胞的增殖和发育越来越依赖于Bmi-1^[42,43].

不过, Bmi-1过表达致多种肿瘤抑制因子, 细胞黏附分子, 分化相关因子的表达下调, 人类多种肿瘤发生、发展均与Bmi-1基因表达异常有关. 体外促鳞状细胞癌发生. Bmi-1表达失调致角质化细胞变质、肿瘤化, 可能机制是缩短

细胞周期和增加细胞移动性. 研究发现, ESCC组织中Bmi-1 mRNA和蛋白的表达明显高于邻近非肿瘤组织, 且与细胞分化和病理分期有关. Bmi-1表达不是ESCC发生阶段必须的, 却是进展过程中必须的. 其大部分存在于细胞质, 核中含量少甚至无. Bmi-1过表达与ESCC细胞分化差、临床分期晚和短生存期紧密联系在一起. 研究发现, Bmi-1多在干细胞中高表达, ESCC组织Bmi-1表达显著增高往往提示ESCC干细胞比例较高, 而Bmi-1含量低的ESCC攻击性弱原因系干细胞含量少^[44,45].

日本学者Fujiwara采用氟尿嘧啶联合顺铂同期放疗治疗78例ESCC患者, 其中24例过表达Bmi-1者预后较不表达者差(中位无疾病生存期16.8 mo vs 71.2 mo, 总生存期21.8 mo vs 76.6 mo, $P<0.001$)^[46].

依据现有文献报道, Bmi-1过表达也是ESCC干细胞相关分子靶标. Bmi-1的mRNA水平升高与蛋白表达的提升通常是一致的, 均与ESCC不良生物学行为有关, 为预测ESCC不良预后的潜在因子, 至于Bmi-1基因过表达与ESCC对放化疗疗效变化之间是否存在关联性还需进一步探讨.

5 其他的预后评估/疗效预测分子靶标

手术切除的食管癌组织中或食管癌患者的血液中寻找与ESCC预后相关分子靶标临床研究, 较常见报道: 细胞增生及细胞周期相关因子: Ki-67、Cyclin D1; 细胞解毒功能相关因子: GST- π (glutathione s-transferase- π)、P-gp(P-glycoprotein)、TS(thymidylate synthase)、MT(metallothionein); 细胞黏附和转移相关因子: nm-23, CD44, 细胞黏和素E; 其他: CRFRA21-1、SCC、CEA、C-反应蛋白、MVD. 其中, 发现预示食管癌较差预后者: MVD, Cyclin D1高表达, nm-23蛋白免疫组织化学染色阴性, Ki-67 LI(Ki-67 labelling index) $>45\%$, MT、P-gp和GST- π 及TS高表达等; 血清中CYFRA21-1 $>1.5 \mu\text{g/L}$ 或 $>2 \mu\text{g/L}$, C-反应蛋白.

与术前放化疗敏感性有关分子靶标探索研究结果还有: GST- π 、P-gp、TS、MT、Cyclin D1等. 这些标志物中, MT和GST- π 及P-gp可能与DDP(cisplatin)的解毒功能和耐药性的产生有关; TS可能与5-FU的解毒功能和耐药性的产生有关. 较多作者报道术前食管癌组织P53蛋白和/或血清中P53-Ab阳性的食管癌患者尤其伴有MT或GST- π 高表达者, 术前放化疗敏感性更差, 疗

■同行评价

这是一篇较好的综述, 思路清晰, 文字表述流畅, 且能紧跟学科发展前沿, 提供了许多最新的研究成果.

前食管镜活检组织GST- π 和P-gp过度表达可能为化疗耐药标志。此外, 疗前镜活检组织Cyclin D1过度表达也可能预示ESCC放化疗敏感性差。

6 结论

ESCC预后评估和疗效预测因子国内外研究颇多, 真正具有单独临床应用价值者却很少, 甚至目前几乎没有一个分子靶标临床价值得以公认。不过如何将现有研究成果转化为临床实践应用, 倒是有一种做法确实很实用, 也已经得到临床学者们得青睐, 那就是目前发现的预示较差预后分子靶标中在ESCC组织中或患者血清中表达愈多, 患者预后愈差。那些预测放化疗敏感性下降的分子靶标中在ESCC组织中或患者血清中表达愈多, 患者对放化疗敏感性减低的可能性就会越大。尽管这样做的盲目性较大, 也会造成一定的检验资源浪费, 但是目前阶段, 将这种做法作为临床TNM分期的补充, 应用于临床会更准确地预估患者预后和为综合治疗提供正确依据。完善评价现有分子靶标的临床价值, 探索发现ESCC特异相关基因/蛋白是该领域进一步研究的方向。

7 参考文献

- 1 Yamasaki M, Miyata H, Fujiwara Y, Takiguchi S, Nakajima K, Nishida T, Yasuda T, Matsuyama J, Mori M, Doki Y. p53 genotype predicts response to chemotherapy in patients with squamous cell carcinoma of the esophagus. *Ann Surg Oncol* 2010; 17: 634-642
- 2 Liu YS, Yu CH, Li L, Zhang BF, Fang J, Zhou Q, Hu Y, Li YM, Jun Gao H. Expression of p53, p16 and cyclooxygenase-2 in esophageal cancer with tissue microarray. *J Dig Dis* 2007; 8: 133-138
- 3 Weston AP, Banerjee SK, Sharma P, Tran TM, Richards R, Cherian R. p53 protein overexpression in low grade dysplasia (LGD) in Barrett's esophagus: immunohistochemical marker predictive of progression. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 1355-1362
- 4 Murtaza I, Mushtaq D, Margoob MA, Dutt A, Wani NA, Ahmad I, Bhat ML. A study on p53 gene alterations in esophageal squamous cell carcinoma and their correlation to common dietary risk factors among population of the Kashmir valley. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 4033-4037
- 5 褚廷广, 万里新, 蔡政, 陈沛, 吴会芳, 周文鹏, 李琮宇. p53、TSP-1在食管鳞癌中的表达及临床意义. *现代肿瘤* 2008; 16: 1148-1151
- 6 Blanchard P, Quero L, Pacault V, Schlageter MH, Baruch-Hennequin V, Hennequin C. Prognostic significance of anti-p53 and anti-KRas circulating antibodies in esophageal cancer patients treated with chemoradiotherapy. *BMC Cancer* 2012; 12: 119
- 7 Takahashi K, Miyashita M, Makino H, Akagi I, Orita H, Hagiwara N, Nomura T, Gabrielson EW, Tajiri T. Expression of Akt and Mdm2 in human esophageal squamous cell carcinoma. *Exp Mol Pathol* 2009; 87: 42-47
- 8 Cescon DW, Bradbury PA, Asomaning K, Hopkins J, Zhai R, Zhou W, Wang Z, Kulke M, Su L, Ma C, Xu W, Marshall AL, Heist RS, Wain JC, Lynch TJ, Christiani DC, Liu G. p53 Arg72Pro and MDM2 T309G polymorphisms, histology, and esophageal cancer prognosis. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 3103-3109
- 9 Lin HC, Cheng MF, Yu CP, Lee SC, Lee HS, Nieh S, Jin JS. p53, Ki67, and Histone deacetylase 4 Expression Associated with Clinicopathological Characteristics in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *J Med Sci* 2011; 31: 17-26
- 10 Egashira A, Morita M, Yoshida R, Saeki H, Oki E, Sadanaga N, Kakeji Y, Tsujitani S, Maehara Y. Loss of p53 in esophageal squamous cell carcinoma and the correlation with survival: analyses of gene mutations, protein expression, and loss of heterozygosity in Japanese patients. *J Surg Oncol* 2011; 104: 169-175
- 11 Yang X, Xiong G, Chen X, Xu X, Wang K, Fu Y, Yang K, Bai Y. Survivin expression in esophageal cancer: correlation with p53 mutations and promoter polymorphism. *Dis Esophagus* 2009; 22: 223-230
- 12 Makino T, Yamasaki M, Miyata H, Yoshioka S, Takiguchi S, Fujiwara Y, Nakajima K, Nishida T, Mori M, Doki Y. p53 Mutation status predicts pathological response to chemoradiotherapy in locally advanced esophageal cancer. *Ann Surg Oncol* 2010; 17: 804-811
- 13 Okawa T, Michaylira CZ, Kalabis J, Stairs DB, Nakagawa H, Andl CD, Johnstone CN, Klein-Szanto AJ, El-Deiry WS, Cukierman E, Herlyn M, Rustgi AK. The functional interplay between EGFR overexpression, hTERT activation, and p53 mutation in esophageal epithelial cells with activation of stromal fibroblasts induces tumor development, invasion, and differentiation. *Genes Dev* 2007; 21: 2788-2803
- 14 Leeuwenburgh I, Gerrits MM, Capello A, van den Bogert B, van Dekken H, Steyerberg EW, Siersema PD, Kuipers EJ. Expression of p53 as predictor for the development of esophageal cancer in achalasia patients. *Dis Esophagus* 2010; 23: 506-511
- 15 Kleespies A, Guba M, Jauch KW, Bruns CJ. Vascular endothelial growth factor in esophageal cancer. *J Surg Oncol* 2004; 87: 95-104
- 16 林丹霞, 林英城, 况丽平, 吴贤英, 吴铭耀, 李德锐. 食管鳞癌组织VEGF和Angiopoietin-2表达及其临床意义的研究. *中华肿瘤防治杂志* 2008; 15: 268-271
- 17 Kozłowski M, Naumnik W, Niklinski J, Milewski R, Dziegielewska P, Laudanski J. Vascular endothelial growth factor C and D expression correlates with lymph node metastasis and poor prognosis in patients with resected esophageal cancer. *Neoplasma* 2011; 58: 311-319
- 18 张晖, 陈宏存, 王圣应. VEGF-D和VEGFR-3表达与食管鳞癌淋巴结转移相关性的探讨. *中华肿瘤防治杂志* 2008; 15: 1808-1811
- 19 Mukherjee T, Kumar A, Mathur M, Chattopadhyay TK, Ralhan R. Ets-1 and VEGF expression correlates with tumor angiogenesis, lymph node metastasis, and patient survival in esophageal squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2003; 129: 430-436
- 20 Kii T, Takiuchi H, Kawabe S, Gotoh M, Ohta S, Tanaka T, Kuwakado S, Nishitani H, Katsu K. Evaluation of prognostic factors of esophageal squamous cell carcinoma (stage II-III) after concurrent

- chemoradiotherapy using biopsy specimens. *Jpn J Clin Oncol* 2007; 37: 583-589
- 21 王修身, 刘孟忠, 王建华, 崔念基. 食管癌患者治疗前 S-VEGF 表达水平与临床因素的关系. *中华放射肿瘤学杂志* 2006; 15: 307-311
 - 22 Tanaka T, Ishiguro H, Kuwabara Y, Kimura M, Mitsui A, Katada T, Shiozaki M, Naganawa Y, Fujii Y, Takeyama H. Vascular endothelial growth factor C (VEGF-C) in esophageal cancer correlates with lymph node metastasis and poor patient prognosis. *J Exp Clin Cancer Res* 2010; 29: 83
 - 23 Okazawa T, Yoshida T, Shirai Y, Shiraishi R, Harada T, Sakaida I, Abe T, Oka M. Expression of vascular endothelial growth factor C is a prognostic indicator in esophageal cancer. *Hepatogastroenterology* 2008; 55: 1503-1508
 - 24 Kozłowski M, Kowalczyk O, Milewski R, Chyćewski L, Niklinski J, Lauński J. Serum vascular endothelial growth factors C and D in patients with esophageal cancer. *Eur J Cardiothorac Surg* 2010; 38: 260-267
 - 25 Su C, Chen Z, Luo H, Su Y, Liu W, Cai L, Wang T, Lei Y, Zhong B. Different patterns of NF- κ B and Notch1 signaling contribute to tumor-induced lymphangiogenesis of esophageal squamous cell carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res* 2011; 30: 85
 - 26 Choi JY, Jang KT, Shim YM, Kim K, Ahn G, Lee KH, Choi Y, Choe YS, Kim BT. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor expression and microvessel density in esophageal squamous cell carcinoma: comparison with positron emission tomography. *Ann Surg Oncol* 2006; 13: 1054-1062
 - 27 Orditura M, Martinelli E, Morgillo F. Serum vegf levels in patients with esophageal cancer undergoing preoperative chemoradiation correlate with prognosis and efficacy of treatment. *Annals of Oncology* 2008; 19: 166-186
 - 28 付建华, 杨达宽, 黄云超, 胡国强. EGFR 和 E-cadherin 在食管癌组织中的表达及两者的相关性. *癌症* 2005; 24: 241-245
 - 29 Hanawa M, Suzuki S, Dobashi Y, Yamane T, Kono K, Enomoto N, Ooi A. EGFR protein overexpression and gene amplification in squamous cell carcinomas of the esophagus. *Int J Cancer* 2006; 118: 1173-1180
 - 30 Wei Q, Chen L, Sheng L, Nordgren H, Wester K, Carlsson J. EGFR, HER2 and HER3 expression in esophageal primary tumours and corresponding metastases. *Int J Oncol* 2007; 31: 493-499
 - 31 Sunpaweravong P, Sunpaweravong S, Puttawibul P, Mitarnun W, Zeng C, Barón AE, Franklin W, Said S, Varella-Garcia M. Epidermal growth factor receptor and cyclin D1 are independently amplified and overexpressed in esophageal squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2005; 131: 111-119
 - 32 葛棣, 郑如恒, 曾亮, 冯明祥. HER3 在食管癌表达的临床意义. *胃肠病学* 2003; 8: 148-150
 - 33 Jawhari AU, Farthing MJ, Pignatelli M. The E-cadherin/epidermal growth factor receptor interaction: a hypothesis of reciprocal and reversible control of intercellular adhesion and cell proliferation. *J Pathol* 1999; 187: 155-157
 - 34 Gibault L, Metges JP, Conan-Charlet V, Lozac'h P, Robaszkievicz M, Bessaguet C, Lagarde N, Volant A. Diffuse EGFR staining is associated with reduced overall survival in locally advanced oesophageal squamous cell cancer. *Br J Cancer* 2005; 93: 107-115
 - 35 Schoppmann SF, Jesch B, Zacherl J, Wrba F, Hejna M, Maresch J, Langer FB, Riegler MF, Pluschnig U, Birner P. HER-2 status in primary oesophageal cancer, lymph nodes and distant metastases. *Br J Surg* 2011; 98: 1408-1413
 - 36 Sato-Kuwabara Y, Neves JL, Fregnani JH, Sallum RA, Soares FA. Evaluation of gene amplification and protein expression of HER-2/neu in esophageal squamous cell carcinoma using Fluorescence in situ Hybridization (FISH) and immunohistochemistry. *BMC Cancer* 2009; 9: 6
 - 37 Xu S, Kitayama J, Yamashita H, Souma D, Nagawa H. Nuclear translocation of HER-4/c-erbB-4 is significantly correlated with prognosis of esophageal squamous cell carcinoma. *J Surg Oncol* 2008; 97: 44-50
 - 38 Yamamoto Y, Yamai H, Seike J, Yoshida T, Takechi H, Furukita Y, Kajiura K, Minato T, Bando Y, Tangoku A. Prognosis of esophageal squamous cell carcinoma in patients positive for human epidermal growth factor receptor family can be improved by initial chemotherapy with docetaxel, fluorouracil, and cisplatin. *Ann Surg Oncol* 2012; 19: 757-765
 - 39 李强, 杨哲, 赵瑛, 韩俊庆. EGFR 对食管癌同步放化疗敏感性预测价值的初步观察. *山东大学学报(医学版)* 2012; 50: 96-99
 - 40 Sarbia M, Ott N, Pühringer-Oppermann F, Brücher BL. The predictive value of molecular markers (p53, EGFR, ATM, CHK2) in multimodally treated squamous cell carcinoma of the oesophagus. *Br J Cancer* 2007; 97: 1404-1408
 - 41 Akamatsu M, Matsumoto T, Oka K, Yamasaki S, Sonoue H, Kajiya Y, Tsurumaru M, Sasai K. c-erbB-2 oncoprotein expression related to chemoradioresistance in esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003; 57: 1323-1327
 - 42 Fasano CA, Dimos JT, Ivanova NB, Lowry N, Lemischka IR, Temple S. shRNA knockdown of Bmi-1 reveals a critical role for p21-Rb pathway in NSC self-renewal during development. *Cell Stem Cell* 2007; 1: 87-99
 - 43 Wang Q, Li WL, You P, Su J, Zhu MH, Xie DF, Zhu HY, He ZY, Li JX, Ding XY, Wang X, Hu YP. Onco-protein BMI-1 induces the malignant transformation of HaCaT cells. *J Cell Biochem* 2009; 106: 16-24
 - 44 He XT, Cao XF, Ji L, Zhu B, Lv J, Wang DD, Lu PH, Cui HG. Association between Bmi1 and clinicopathological status of esophageal squamous cell carcinoma. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 2389-2394
 - 45 Huang SD, Yuan Y, Liu XH, Gong DJ, Bai CG, Wang F, Luo JH, Xu ZY. Self-renewal and chemotherapy resistance of p75NTR positive cells in esophageal squamous cell carcinomas. *BMC Cancer* 2009; 9: 9
 - 46 Fujiwara Y, Yoshikawa R, Tao L, Tsujimura T, Sasaki M. Stemness signature of BMI1 and clinical outcome in esophageal cancer patients undergoing neoadjuvant chemoradiotherapy. 2009 ASCO Annual Meeting; 2009 May 29-June 2; Florida, USA. 2009: abstr 4572

编辑 李军亮 电编 闫晋利

食管癌CT灌注成像诊断的进展

刘洋腾宇, 周晖, 刘进康

■背景资料

食管癌是中国人群常见的恶性肿瘤之一, 其早期症状往往缺乏特异性而不能引起足够的重视, 患者确诊为食管癌时往往已进入中晚期, 因而如何及早、准确、无创地诊断食管癌, 越来越为广大临床医生和研究者所重视。

刘洋腾宇, 周晖, 刘进康, 中南大学湘雅医院放射科 湖南省长沙市 410008

刘洋腾宇, 研究生, 主要从事心胸影像学基础及临床研究。

中南大学创新训练基金资助项目, No. CL11261

作者贡献分布: 本文综述由刘洋腾宇与周晖完成; 刘进康审校。

通讯作者: 刘进康, 教授, 主任医师, 410008, 湖南省长沙市湘雅路87号, 中南大学湘雅医院放射科. standzhou97@gmail.com

电话: 0731-84327448

收稿日期: 2012-08-28 修回日期: 2012-12-02

接受日期: 2012-12-17 在线出版日期: 2012-12-18

CT perfusion imaging in the diagnosis of esophageal cancer

Yang-Teng-Yu Liu, Hui Zhou, Jin-Kang Liu

Yang-Teng-Yu Liu, Hui Zhou, Jin-Kang Liu, Department of Radiology, Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410008, Hunan Province, China

Supported by: the Innovation Training Project of Central South University, No. CL11261

Correspondence to: Jin-Kang Liu, Professor, Chief Physician, Department of Radiology, Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410008, Hunan Province, China. standzhou97@gmail.com

Received: 2012-08-28 Revised: 2012-12-02

Accepted: 2012-12-17 Published online: 2012-12-18

Abstract

Esophageal cancer is one of the most common malignant tumors in China. The symptoms of early esophageal cancer often tend to be unspecific and are easily ignored. Diagnosis of esophageal cancer at early stage can improve its therapy and prognosis. Currently, there are still limitations for the application of digestive barium meal examination and endoscopic pathological biopsy in diagnosis of esophageal cancer. CT perfusion imaging, a technique developed in recent years, can assess tissue microcirculation quickly, conveniently, and non-invasively. These unique advantages have led to its gradual application to tumor diagnosis and prognosis evaluation. In this article, we review the application of CT perfusion imaging in the diagnosis of esophageal cancer.

Key Words: Esophageal cancer; CT perfusion imaging; Diagnosis

Liu YTY, Zhou H, Liu JK. CT perfusion imaging in the diagnosis of esophageal cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(35): 3494-3498

摘要

食管癌是中国人群中常见的恶性消化系统肿瘤之一, 其早期症状往往不明显, 无法引起足够重视, 发现时肿瘤常已进入中晚期, 早期诊断对食管癌的治疗和预后具有重要的意义。目前用于诊断食管癌的消化系钡餐造影和内镜下病理组织活检等手段还存在一些局限。近年来迅速发展的CT灌注成像技术具有快速、方便、无创反映组织微循环的独特优势, 使其逐渐被临床应用于肿瘤诊断和判断预后。本文就CT灌注成像应用于食管癌的原理、技术手段和应用前景作一综述。

关键词: 食管癌; CT灌注成像; 诊断

刘洋腾宇, 周晖, 刘进康. 食管癌CT灌注成像诊断的进展. *世界华人消化杂志* 2012; 20(35): 3494-3498

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3494.asp>

0 引言

食管癌是常见的消化系统恶性肿瘤之一, 全国每年有近20万人死于食管癌, 全球每年死于食管癌的人数超过40万^[1]。食管癌早期症状多不明显, 缺乏特异性, 常常无法引起患者的警惕, 许多患者在确诊食管癌时已进入中晚期^[2]。如何能够及早、准确、无创地诊断食管癌, 越来越为广大临床医生和研究者所重视。

近年来, 越来越多的CT新技术如多层螺旋扫描、三维重建、CT灌注成像等开始被广大医务工作者所接受和熟知。自Miles等^[3]于1991年提出CT灌注成像以来, 其发展与应用十分的迅速, 经过20余年的发展, 目前已公认CT灌注成像在无创性观测组织微循环方面具有独特优势, 是一种具有广阔临床应用前景的功能影像学手段。目前CT灌注技术的应用领域已扩展到脑、肝、肾、肺、食管、肠道、甲状腺、乳腺、胰腺等多个器官的肿瘤^[4-9], 尤其是在脑、肺、肝脏等

■同行评议者

官泳松, 教授, 四川大学华西医院放射科

脏器已得到了广泛的应用. 但由于食管是一个管状空腔性器官, 受其本身解剖结构的限制, 使得CT灌注应用于食管癌的研究起步较晚, 近年来才逐渐有学者开始探讨CT灌注应用于诊断食管癌和判断预后的应用价值, 本文就此方面的初步研究作一综述.

1 CT灌注成像的基本原理

CT灌注成像技术是通过静脉团注对比剂后, 在对比剂的首过期内对选定层面进行无间断动态扫描, 以获得该层面内每一像素的时间-密度曲线(time-density curve, TDC), 根据该曲线利用不同的数学模型计算出各种灌注参数, 其反映的是血流通过毛细血管网将携带的氧及其他物质输送给周围组织的功能, 以此来评价组织器官的灌注状态. 目前用于灌注分析的模型主要有两类, 非去卷积模型和去卷积模型. 前者假设流经组织的对比剂未经静脉流出而损失, 再用组织TDC的最大初始斜率除以动脉增强峰值即得到组织的血流量, 其优点为概念简单易理解, 但由于其忽略了静脉流出的部分对比剂, 其计算得到的血流量值较真实值偏低. 临床上为了解决这个问题, 通常行对比剂高速注射, 虽然能减少误差, 但其临床应用受限^[10,11]. 去卷积模型^[12]计算方法复杂, 能解决非去卷积模型的人为偏差, 但其对噪声敏感, 需尽量抑制噪声才能保证其结果的准确性. 随后有多名学者对去卷积模型进行了进一步的改进, 以提高模型的临床应用分析价值^[13,14].

CT灌注成像通过上述方法, 获得感兴趣区域(region of interest, ROI)内每个像素的TDC, 再通过上述模型计算得到多个灌注参数, 通过后处理软件对图像进行重建并进行伪彩图的处理, 即得到相应的血流灌注图, 从而直观地反映相应组织的血流灌注情况. CT灌注图像处理可得到的主要参数有: (1)血容量(blood volume, BV): 反映血液在肿瘤中的容量和灌注量, 单位: mL/100 g; (2)对比剂的平均通过时间(mean transit time, MTT): 指对比剂随着血液从动脉流如到静脉流出经过的时间, 主要反映的是对比剂经过毛细血管所需的时间, 单位: s; (3)血流量(blood flow, BF): 指血液在肿瘤内流动的速率, 由BV除以MTT得到, 通常可以反映对比剂到达肿瘤的快慢, 单位: mL/(min·100 g); (4)表面通透性(permeability surface, PS): 指血液通过毛细血管内皮到达组织间隙内的速率, 反映肿瘤内血

管内皮完整性和通透性的情况, 单位: mL/(min·100 g).

2 食管癌CT灌注的扫描和后处理

CT灌注扫描需进行CT平扫以对肿瘤进行定位, 并选取扫描的靶平面, 之后再对选取的肿瘤平面行动态增强扫描. 扫描的范围应涵盖整个肿瘤, 若肿瘤体积>10 cm时可以只扫描10 cm的范围^[13]. 扫描时应注意让患者屏住呼吸, 以减少呼吸运动带来的运动伪影. CT灌注扫描一般采用非离子型含碘造影剂, 通常从肘前静脉注入, 其进入血管后的首过时间一般为45-60 s, 具体时间受患者心输出量和循环血容量的影响, 故一般从注入对比剂后40 s开始进行图像的采集, 每5 s采集一次图像. 对比剂的用量和注入速率在国内外研究中都大同小异, Hayano等^[14]的研究中以5 mL/s的速度注入40 mL对比剂, 而Song等^[15]的研究中则是以5 mL/s的速度从静脉注入50 mL对比剂. 对于扫描的管电压, 国内外研究中均采用120 kV, 但是对于电流的设置却各有差异, 大部分研究采用的是100 mA的电流, 均能获得满意的图像^[13,14,16,17]. 而Chen等^[13]提出采用50 mA的低电流, 也能保证图像的质量及数据的准确, 但能将辐射剂量减半, 有利于患者的健康.

扫描完成后, 将图像传送至后处理工作站, 通过手工画取病灶ROI后, 灌注软件根据获得的TDC曲线进行分析处理, 得到前文所述的灌注参数, 包括BF、BV、MTT和PS等, 以进行后续的进一步数据分析. 对于ROI的选择, 许多研究表明肿瘤中央和边缘部分的血管数量是不同的, ROI的选择对实验结果的影响至关重要. 一般来说ROI的面积覆盖越大, 则反映的肿瘤特点越全面, 结果也越接近真实值, 但由于食管本身的空腔性结构的限制, ROI的面积不能太大. Chen等^[13]提出以20 mm²为ROI大小进行扫描, 能获得满意的结果. 而郭君武等^[18]采取ROI>15 mm²进行扫描也能采集到满意的数据. 国内也有学者采取从5-20 mm²的多个ROI大小进行扫描, 并进行统计学分析之后发现结果并无明显差异^[18]. 由此可见, 对于食管癌ROI的选择, 仍以在可接受范围内尽可能大的面积为准.

3 CT灌注在诊断食管癌中的应用价值

目前诊断食管癌常用的技术手段主要是消化系内镜检查和钡餐造影, 虽然在内镜下取组织活检可以作为诊断食管癌的金标准, 但是一方面

■研发前沿

目前对于CT灌注成像在食管癌方面的研究主要集中在CT灌注成像获得的灌注参数与食管癌免疫组织化学标志物之间是否存在相关性, 从而以灌注参数来量化肿瘤的血管生成情况.

■相关报道

国内外多个研究表明, CT灌注成像获得的灌注参数与反映肿瘤血管生成情况的免疫组织化学标志物和肿瘤微血管密度之间存在一定的相关性, 因此这些灌注参数也能和组织病理学方法一样反映肿瘤内部的血管生成情况.

■创新盘点

本文既介绍了CT灌注成像的主要原理,又对国内外目前针对CT灌注成像应用于食管癌的研究热点进行综述,以期为广大读者提供深入的了解,为临床诊断食管癌提供新的思路与手段。

内镜检查需要在患者一般情况良好、依从性好的情况下进行,另一方面内镜下取组织活检是一个有创性操作,可能造成病变局部的出血和肿瘤细胞的转移^[19];狭窄型食管癌是无法进行内镜检查的;对于无法手术的食管癌患者,目前缺乏一种无创伤性、简单易行的可有效观察放疗和化疗疗效的手段;由于术后复发患者吻合口狭窄不能行内镜检查,目前仍然缺乏一种有效的方法来诊断和定量分析术后复发的情况^[20]。

肿瘤的生长和转移高度依赖肿瘤内部的血供情况,恶性结节内部的新生血管数量明显高于良性结节,若肿瘤组织内的新生血管数量不足,则会导致肿瘤组织的缺血缺氧从而坏死。肿瘤细胞主要通过异常高表达促血管生成因子和减少抗血管生成因子的表达来调控新生血管的形成,前者主要包括血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial cell growth factor, VEGF),大量新生血管的产生,从而进一步促进的肿瘤的生长和转移^[21]。CT灌注成像作为一种间接评价肿瘤内部血管生成情况的技术手段,能够快速、方便、无创地准确反映肿瘤的血流灌注情况^[22-24],这也是CT灌注成像应用于肿瘤诊断的理论基础。国内外多个研究^[25-28]表明,CT灌注成像获得的灌注参数与反映肿瘤血管生成情况的免疫组织化学标志物(如VEGF、EphB4和ephrinB2等)和肿瘤微血管密度(microvascular density, MVD)之间存在一定的相关性,从而可以得出结论这些灌注参数也能和组织病理学方法一样反映肿瘤内部的血管生成情况,而且CT灌注成像检查是无创性的。

多个关于食管癌的免疫组织化学标志物的研究发现,VEGF不仅参与调节肿瘤组织的血管生成,而且与食管癌的组织侵袭程度和淋巴结转移呈现一定的相关性,提示VEGF可以作为判断食管癌患者预后的因素^[29]。Chen等^[30]的研究发现CT灌注成像获得的灌注参数中,VEGF阳性组的BV值要显著高于VEGF阴性组,表明BV值一定程度上可以反映肿瘤细胞表达VEGF的水平,其敏感性和特异性分别为94.4%和92.9%,从而可以进一步反映肿瘤血管生成的情况。而国内的一项针对CT灌注成像和食管癌临床病理因素、MVD和VEGF的相关性研究^[31]中却发现,VEGF阳性组的PS值要显著高于VEGF阴性组,而BV值却无明显相关性。由此表明CT灌注成像的参数与VEGF存在一定的相关性,提示其可以和VEGF一样用于判断食管癌患者的预后情况。

有研究^[32,33]表明,食管癌组织的MVD是一个反映肿瘤血管生成情况的免疫组织化学标志物,其体现了肿瘤内部的血流灌注水平,从而可以作为食管癌患者的独立预后因素评估手术切除肿瘤后的预后情况。宋涛等^[34]的研究表明食管癌患者的BV、BF和PS值均与MVD之间存在相关性,结果具有统计学意义,表明管癌CT灌注成像能够在一定程度上反映活体的肿瘤血管生成状况。而其另一项研究^[14]不仅表明BV和PS均与食管癌的MVD之间存在相关性,同时发现有淋巴结浸润的患者的PS值要显著高于无淋巴结浸润者,由此表明CT灌注成像可能不仅可以用于诊断食管癌,还可以一定程度上提示食管癌的恶性生物学行为,并可能可以一定程度上反映食管癌患者术后的预后情况。Chen等^[13]的研究也发现BV值可以反映食管癌的MVD情况,从而评价肿瘤血管生成的水平。而另一项国内的研究的结果与以上两项研究的结果略有不同,袁刚等^[35]对31例食管癌的病人进行CT灌注扫描后发现BF值和PS值与肿瘤的MVD存在具有统计学意义的相关性,但BV值与MVD的相关性结果无统计学意义。

通过上述的研究不难发现,CT灌注成像获得的灌注参数,可以定量的反映肿块内部的血管生成情况,由此推断恶性肿瘤的恶性程度,如侵袭周围组织的能力和发生淋巴结转移的可能性,进而判断食管癌患者的预后情况。对于接受放疗和化疗的食管癌患者,放疗时放射线在损伤肿瘤细胞的同时也损伤了肿瘤组织内的血管;而化疗药物对肿瘤组织发挥作用的大小直接取决于到达肿瘤组织的药物浓度,后者则依赖于肿瘤组织内部血管的数目。由此可以看出,肿瘤内部的微循环情况可以影响放化疗的效果并用于评价放疗的疗效。Yoon等^[36]的研究发现VEGF可以用于预测食管癌患者化疗的疗效,VEGF表达越高的患者对于化疗的反应性越好。而前文提到的研究提示CT灌注参数与VEGF之间存在一定的相关性,因而CT灌注成像可能也可以用于食管癌患者化疗疗效的预测。Hayano等^[14]对31名接受放化疗的食管癌患者行CT灌注扫描,分析其灌注参数与放化疗敏感性之间的关系,发现对放化疗敏感组患者的BF和BV值显著高于不敏感组,而MTT显著低于不敏感组,从而表明CT灌注可以帮助判断对哪些食管癌患者进行放化疗将更加有效。王承伟等^[37]的研究对食管癌患者放疗前后行CT灌注扫描,发现PS和强化峰

值明显降低, 表明CT灌注成像可以用于评价食管癌放疗的疗效。

但是从目前的研究来看, 不同的研究者得到的结果是有差异的, 其主要原因之一可能是他们应用的CT机型及附带的灌注软件不同. 不同厂家的CT设备及灌注软件的计算方法存在差异, 所提供的灌注参数也不尽相同, 以Siemens(Erlangen, Germany)Functional CT体部灌注软件和Philips(Best, Netherlands)CT灌注软件为例, Siemens灌注成像采用的是斜率法和Patlak法, 可以得到的灌注参数包括BF、BV、PS和PBV等. Philips灌注成像分析采用的是斜率法, 可以得到的灌注参数包括BF、BV、PEI、MTT等. 由此可见虽然各厂家根据不同的数据模型推出了各自的CT灌注软件, 所获取的灌注参数基本相似, 但是不同的厂家的CT灌注软件得到的参数值具有独立性, 不具备可比性^[38]. 另一方面, 以上的研究均是对食管鳞状细胞癌进行的研究, 其结论能否应用于食管腺癌的诊断, 目前仅有印隆林等^[39]的一项针对44例食管癌和贲门癌患者的研究发现鳞癌组和腺癌组之间的灌注参数值无显著差异, 关于不同病理类型食管癌灌注值是否存在差别需要进一步扩大样本进行研究方能得到更确切的结论。

CT灌注成像主要的优势在于显示病变组织的血流灌注情况, 同时前文提到的研究提示灌注参数与反映肿瘤组织血管生成情况的免疫组织化学标志物存在相关性, 从而可能反映肿瘤血管生成的情况. 与目前应用于食管癌诊断最多的消化系内镜和钡餐造影方法相比, CT灌注成像本身也存在一定的局限性, CT灌注成像主要是一种功能成像检查手段, 其优势在于显示病变部位的血供情况, 但此手段为一种间接的检查方法, 无法直观地看到病变组织的大体及细微结构样貌, 故无法取代消化系内镜取活检作为诊断金标准的地位; 另一方面CT灌注成像无法对组织本身进行动态的观察, 在这一点上与钡餐造影可以动态观察消化系运动情况的优势无法比拟。

4 结论

CT灌注成像在反映肿瘤组织血流灌注方面具有独特的优势, 其灌注参数与反映肿瘤组织血管生成情况的免疫组织化学标志物, 如VEGF等因子也存在相关性, 可能提示肿瘤的血管生成情况, 快速、准确、无创是其主要的优点. 目前食

管癌CT灌注成像的研究还有待进一步深入, 比如在判断肿瘤的良恶性及恶性程度方面尚无研究成果, 又如其对非富血供型肿瘤如溃疡性食管癌的诊断意义尚需进一步研究论证, 但其良好的应用前景与诊断价值仍是值得关注的. 相信在不久的将来, 随着研究样本的扩大和研究的更加深入, CT灌注成像有望与消化系内镜、钡餐造影一起, 各自发挥其在反映病变特点上的不同优势, 共同应用于食管癌的诊断、疗效和预后判断。

5 参考文献

- 1 赫捷, 邵康. 中国食管癌流行病学现状、诊疗现状 & 未来对策. 中国癌症杂志 2011; 21: 501-504
- 2 Cha S, Knopp EA, Johnson G, Wetzel SG, Litt AW, Zagzag D. Intracranial mass lesions: dynamic contrast-enhanced susceptibility-weighted echo-planar perfusion MR imaging. *Radiology* 2002; 223: 11-29
- 3 Miles KA, Hayball M, Dixon AK. Colour perfusion imaging: a new application of computed tomography. *Lancet* 1991; 337: 643-645
- 4 Xyda A, Haberland U, Klotz E, Bock HC, Jung K, Knauth M, Schramm R, Psychogios MN, Erb G, Schramm P. Brain volume perfusion CT performed with 128-detector row CT system in patients with cerebral gliomas: a feasibility study. *Eur Radiol* 2011; 21: 1811-1819
- 5 Yang L, Zhang XM, Tan BX, Liu M, Dong GL, Zhai ZH. Computed tomographic perfusion imaging for the therapeutic response of chemoembolization for hepatocellular carcinoma. *J Comput Assist Tomogr* 2012; 36: 226-230
- 6 Xiong Z, Liu JK, Hu CP, Zhou H, Zhou ML, Chen W. Role of immature microvessels in assessing the relationship between CT perfusion characteristics and differentiation grade in lung cancer. *Arch Med Res* 2010; 41: 611-617
- 7 Khan S, Goh V, Tam E, Wellsted D, Halligan S. Perfusion CT assessment of the colon and rectum: feasibility of quantification of bowel wall perfusion and vascularization. *Eur J Radiol* 2012; 81: 821-824
- 8 Reiner CS, Goetti R, Eberli D, Klotz E, Boss A, Pfammatter T, Frauenfelder T, Moch H, Sulser T, Alkadhi H. CT perfusion of renal cell carcinoma: impact of volume coverage on quantitative analysis. *Invest Radiol* 2012; 47: 33-40
- 9 Delrue L, Blanckaert P, Mertens D, Cesmeli E, Ceelen WP, Duyck P. Assessment of tumor vascularization in pancreatic adenocarcinoma using 128-slice perfusion computed tomography imaging. *J Comput Assist Tomogr* 2011; 35: 434-438
- 10 Klotz E, König M. Perfusion measurements of the brain: using dynamic CT for the quantitative assessment of cerebral ischemia in acute stroke. *Eur J Radiol* 1999; 30: 170-184
- 11 Koenig M, Klotz E, Luka B, Venderink DJ, Spittler JF, Heuser L. Perfusion CT of the brain: diagnostic approach for early detection of ischemic stroke. *Radiology* 1998; 209: 85-93
- 12 Cenic A, Nabavi DG, Craen RA, Gelb AW, Lee TY. Dynamic CT measurement of cerebral blood flow: a validation study. *AJNR Am J Neuroradiol* 1999; 20:

■名词解释

CT灌注成像: CT灌注成像技术是通过静脉团注对比剂后, 在对比剂的首过期内对选定层面进行无间断动态扫描, 以获得该层面内每一像素的时间-密度曲线, 根据该曲线利用不同的数学模型计算出各种灌注参数, 从而反映血流通过毛细血管网将携带的氧及其他物质输送给周围组织的功能, 以此来评价组织器官的灌注状态。

■同行评价

本文综述全面, 条理清晰, 具有一定的可读性.

- 63-73
- 13 Chen TW, Yang ZG, Wang QL, Li Y, Qian LL, Chen HJ. Whole tumour quantitative measurement of first-pass perfusion of oesophageal squamous cell carcinoma using 64-row multidetector computed tomography: correlation with microvessel density. *Eur J Radiol* 2011; 79: 218-223
- 14 Hayano K, Okazumi S, Shuto K, Matsubara H, Shimada H, Nabeya Y, Kazama T, Yanagawa N, Ochiai T. Perfusion CT can predict the response to chemoradiation therapy and survival in esophageal squamous cell carcinoma: initial clinical results. *Oncol Rep* 2007; 18: 901-908
- 15 Song T, Shen YG, Jiao NN, Li XH, Hu HT, Qu JR, Chen XJ, Feng W, Zhang X, Li HL. Esophageal squamous cell carcinoma: assessing tumor angiogenesis using multi-slice CT perfusion imaging. *Dig Dis Sci* 2012; 57: 2195-2202
- 16 Chen TW, Yang ZG, Dong ZH, Li Y, Yao J, Wang QL, Qian LL. Whole tumour first-pass perfusion using a low-dose method with 64-section multidetector row computed tomography in oesophageal squamous cell carcinoma. *Eur J Radiol* 2011; 80: 284-291
- 17 Chen TW, Yang ZG, Li Y, Li ZL, Yao J, Sun JY. Quantitative assessment of first-pass perfusion of oesophageal squamous cell carcinoma using 64-section MDCT: initial observation. *Clin Radiol* 2009; 64: 38-45
- 18 郭君武, 翟冬枝, 马宏君, 冯广森, 刘小玲, 水少锋, 王淑珍. 多层螺旋CT灌注成像在食管癌诊断中的应用价值. *放射学实践* 2006; 7: 670-673
- 19 Klopffleisch R, Sperling C, Kershaw O, Gruber AD. Does the taking of biopsies affect the metastatic potential of tumours? A systematic review of reports on veterinary and human cases and animal models. *Vet J* 2011; 190: e31-e42
- 20 尹映丽, 吴晶涛, 孙继全, 韩义. 64层CT灌注成像在食管癌诊断方面的应用探讨. *放射学实践* 2010; 11: 1238-1240
- 21 Sakurai T, Kudo M. Signaling pathways governing tumor angiogenesis. *Oncology* 2011; 81 Suppl 1: 24-29
- 22 Liu JK, Wang XY, Xiong Z, Zhou H, Zhou JH, Fu CY, Li B. [Construction of 2-dimensional tumor microvascular architecture phenotype in non-small cell lung cancer]. *Zhongnan Daxue Xuebao Yixueban* 2008; 33: 712-717
- 23 Liu JK, Hu CP, Zhou ML, Zhou H, Xiong Z, Xia Y, Chen W. [Significance and mechanism of MSCT perfusion scan on differentiation of NSCLC]. *Zhonghua Zhongliu Zazhi* 2009; 31: 460-464
- 24 Zhou H, Liu JK, Chen SX, Xiong Z, Lin GQ, Zhou ML, Chen W, Liu YT. Lymphatic microvessel density combined with CT used in the diagnosis of mediastinal and hilar lymph node metastasis of non-small cell lung cancer. *Arch Med Res* 2012; 43: 132-138
- 25 Zhou H, Xiong Z, Liu J, Chen S, Zhou M, Liu Y. [Correlation between podoplanin-positive lymphatic microvessel density and CT characteristics of non-small cell lung cancer]. *Zhongguo Feiai Zazhi* 2012; 15: 34-38
- 26 Xiong Z, Hu CP, Liu JK, Lu RL, Zhou H, Zhou ML, Chen W. [Evaluating the short-term effect of gefitinib in advanced lung adenocarcinoma with positive EGFR-mutant by dual source volume perfusion CT]. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2011; 91: 2824-2827
- 27 Xiong Z, Liu JK, Zhou ML, Hu CP, Zhou H, Chen W. [Relationship between multi-slice spiral CT pulmonary perfusion imaging and the expression of EphB4 and ephrinB2 in non-small cell lung cancer]. *Zhonghua Zhongliu Zazhi* 2011; 33: 192-196
- 28 Liu P, Zhou J, Zhu H, Xie L, Wang F, Liu B, Shen W, Ye W, Xiang B, Zhu X, Shi R, Zhang S. VEGF-C promotes the development of esophageal cancer via regulating CNTN-1 expression. *Cytokine* 2011; 55: 8-17
- 29 Kozłowski M, Naumnik W, Niklinski J, Milewski R, Dziegielewska P, Laudanski J. Vascular endothelial growth factor C and D expression correlates with lymph node metastasis and poor prognosis in patients with resected esophageal cancer. *Neoplasma* 2011; 58: 311-319
- 30 Chen TW, Yang ZG, Chen HJ, Li Y, Tang SS, Yao J, Dong ZH, He D. Quantitative assessment of first-pass perfusion using a low-dose method at multidetector CT in oesophageal squamous cell carcinoma: correlation with VEGF expression. *Clin Radiol* 2012; 67: 746-753
- 31 宋涛. 食管癌多排螺旋CT灌注成像与临床病理因素、MVD及VEGF表达的相关性研究. 郑州大学, 2010
- 32 Choi JY, Jang KT, Shim YM, Kim K, Ahn G, Lee KH, Choi Y, Choe YS, Kim BT. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor expression and microvessel density in esophageal squamous cell carcinoma: comparison with positron emission tomography. *Ann Surg Oncol* 2006; 13: 1054-1062
- 33 El-Shahat M, Loffy M, Fahmy L, Abouel-Nour MF, El-Kenawy Ael-M. Prognostic value of microvessel density, matrix metalloproteinase-9 and p53 protein expression in esophageal cancer. *J Egypt Natl Canc Inst* 2004; 16: 224-230
- 34 宋涛, 黎海亮, 窦新民, 吴越, 刘予东. 食管癌螺旋CT灌注成像与肿瘤血管生成的相关性研究. *临床放射学杂志* 2011; 30: 1006-1009
- 35 袁刚, 周胜利, 白玲, 黄连庆, 刘雨成. 食管癌MSCT灌注参数与微血管密度相关性研究. *医学影像学杂志* 2010; 20: 265-269
- 36 Yoon MS, Nam TK, Lee JS, Cho SH, Song JY, Ahn SJ, Chung IJ, Jeong JU, Chung WK, Nah BS. VEGF as a predictor for response to definitive chemoradiotherapy and COX-2 as a prognosticator for survival in esophageal squamous cell carcinoma. *J Korean Med Sci* 2011; 26: 513-520
- 37 王承伟, 胡曙东, 程茵. 64层螺旋CT灌注成像在食管癌放疗中的应用. *江苏大学学报* 2008; 18: 435-437
- 38 Goh V, Halligan S, Bartram CI. Quantitative tumor perfusion assessment with multidetector CT: are measurements from two commercial software packages interchangeable? *Radiology* 2007; 242: 777-782
- 39 印隆林, 杨志刚, 李媛, 李真林, 余建群, 白红利. 食管及贲门癌多层螺旋CT灌注成像的初步研究. *四川大学学报* 2008; 39: 788-791

编辑 李军亮 电编 闫晋利

食管癌分子靶向治疗临床研究的新进展

殷咏梅, 周越, 邵永丰

殷咏梅, 周越, 江苏省人民医院肿瘤科 江苏省南京市 210029
邵永丰, 江苏省人民医院胸外科 江苏省南京市 210029
殷咏梅, 博士, 硕士生导师, 主要从事肿瘤科的临床和基础研究。
作者贡献分布: 邵永丰与殷咏梅对此文所作贡献均等; 论文写作由邵永丰、殷咏梅及周越共同完成。
通讯作者: 邵永丰, 主任医师, 210029, 江苏省南京市广州路300号, 江苏省人民医院胸外科, yongfengshao30@hotmail.com
收稿日期: 2012-08-28 修回日期: 2012-12-02
接受日期: 2012-12-17 在线出版日期: 2012-12-18

Targeted therapies for esophageal cancer

Yong-Mei Yin, Yue Zhou, Yong-Feng Shao

Yong-Mei Yin, Yue Zhou, Department of Oncology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China
Yong-Feng Shao, Department of Thoracic Surgery, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China
Correspondence to: Yong-Feng Shao, Chief Physician, Department of Thoracic Surgery, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, 300 Guangdong Road, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China. yongfengshao30@hotmail.com
Received: 2012-08-28 Revised: 2012-12-02
Accepted: 2012-12-17 Published online: 2012-12-18

Abstract

Esophageal cancer is a highly frequent malignancy, being the fourth leading cause of cancer-related deaths in China. Most patients are initially diagnosed with advanced disease. Despite recent advances in surgical techniques and adjuvant/neoadjuvant radiotherapy and chemotherapy, the prognosis of esophageal cancer is still poor. An emerging understanding of molecular pathways that characterizes cell growth, cell cycle, apoptosis, angiogenesis, and invasion has provided novel targets for cancer therapy. This review focuses on novel targeted treatments for esophageal cancer.

Key Words: Esophageal cancer; Targeted therapies

Yin YM, Zhou Y, Shao YF. Targeted therapies for esophageal cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(35): 3499-3504

摘要

食管癌是最常见的恶性肿瘤之一, 早期诊断率

较低, 大部分患者在就诊时已属晚期。虽然近几年外科手术技术的提高、化疗新药的出现以及术前新辅助放化疗均可提高晚期食管癌的生存率, 但晚期食管癌的预后仍差, 仍需要新的治疗手段来提高晚期食管癌的疗效。随着肿瘤分子生物学的研究进展, 分子靶向治疗已经在食管癌的治疗中初显成效。目前, 食管癌的分子靶向治疗已经成为国内外的研究热点之一。

关键词: 食管癌; 靶向治疗

殷咏梅, 周越, 邵永丰. 食管癌分子靶向治疗临床研究的新进展. 世界华人消化杂志 2012; 20(35): 3499-3504
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3499.asp>

0 引言

食管癌是常见的消化系恶性肿瘤之一, 我国为食管癌高发区, 中国大陆13.4亿人口食管癌每年新发病例为25.9万例, 发病率为16.7/10万, 居全国各类恶性肿瘤第5位; 死亡病例每年为21.1万例, 死亡率为13.4/10万, 居第4位^[1]。我国食管癌一直以食管鳞癌为主, 食管腺癌的发病率未见明显增长, 食管鳞癌现已成为我国卫生部确定的十大特色肿瘤之一^[2]。早期食管癌往往由于其症状的非特异性, 多数患者未能引起重视, 故在就诊时已属疾病的中晚期, 其5年生存率在30%左右^[3]。就目前而言, 对晚期食管癌患者以放化疗配合的姑息治疗为主。随着最近几年分子肿瘤学的蓬勃发展, 分子靶向治疗在食管癌中也初露锋芒。分子靶向治疗(molecular targeted therapy)是指利用肿瘤细胞与正常细胞之间的分子生物学差异, 针对肿瘤细胞的恶性表型分子, 采用封闭受体、抑制血管新生、阻断信号传导通路等方法, 从而促进抑制肿瘤生长, 促进肿瘤凋亡, 具有特异性强、不良反应小、与放化疗协同及不易耐药等优点, 是肿瘤治疗的新希望。本文就对目前国内外的食管癌分子靶向治疗临床研究的最新进展作一综述。

1 EGFR抑制剂

上皮生长因子受体(epidermal growth factor re-

■背景资料

食管癌是我国常见的恶性肿瘤, 就目前的医疗状况, 大部分食管癌患者就诊时已经属于晚期, 尽管现在的医疗水平较以前已经有大幅度的提高, 但晚期食管癌的生存率仍然较低, 而分子靶向治疗作为一项新兴的治疗方法, 因其靶向性、不良反应小等特点给食管癌的患者带来了新的希望。

■同行评议者

陈洪, 主任医师, 副教授, 东南大学附属中大医院消化科

■研发前沿

本文主要介绍了目前在国内外临床上或临床试验中应用的一些分子靶向药物,包括EGFR抑制剂、VEGFR抑制剂等,部分药物已经显现出其较好的疗效,但部分药物的效果却差强人意。目前还有很多针对肿瘤信号通路的药物还处于细胞研究阶段,这无疑给广大的食管癌患者带来了生存的希望。

ceptor, EGFR)是ERBB家族成员之一,是一种6 kDa的多肽,由186个氨基酸组成,在血液和组织中广泛分布,其具有酪氨酸激酶活性,是重要的跨膜受体,可被配体激活导致受体的二聚体化,从而启动细胞内信号传导过程和基因活化,通过抑制细胞凋亡、促进细胞增殖、促进细胞去分化、促进血管生成以及促进细胞转移及侵袭等加速肿瘤生长。既往研究发现通过免疫组织化学法检测约50%-80%的食管癌患者EGFR过表达,并与较差的预后呈正相关^[4]。目前以EGFR为靶点的药物主要包括以下3种。

1.1 EGFR单克隆抗体 该类药物是针对EGFR细胞外结构域的IgG1药物,可与人体细胞胞外EGFR特异性结合,从而阻断受体内区域TK磷酸化,抑制细胞生长,诱导细胞凋亡,而且可以减少基质金属蛋白酶和血管内皮生长因子的产生。

目前临床上常用的是西妥昔单抗(爱必妥, C225),它是一种重组的人鼠嵌合型单克隆抗体,可以阻断肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TGF- α)和表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)与表皮生长因子受体(epithelial growth factor receptor, EGFR)的结合,其与EGFR的亲和力是内源性配体的5-10倍,还可引起EGFR的内吞,导致细胞表面受体数量下降。同时,一些研究还证实西妥昔单抗可以通过抗体介导的细胞毒性作用发挥其抗肿瘤功效^[5]。陆敬超^[6]应用TP方案联合爱必妥对食管癌术后肿瘤组织EGFR表达阳性且病理分期为晚期的患者联合治疗,共治疗了23名患者,评价了西妥昔单抗的近期疗效及不良反应。结果显示其临床疗效较好,最常见的不良反应为座疮样皮疹,且II/III级皮疹者疾病进展时间(TTP, 中位时间为13 mo)比I级皮疹者TTP(中位时间6 mo)明显延长,但遗憾的是没有单纯化疗组和联合西妥昔单抗治疗组的对比。SAKK75/06研究局部进展期食管癌患者联合西妥昔单抗与放疗同时治疗,在可评价的20例中有13例达到了完全缓解,且未出现严重的不良反应^[7]。De Vita等^[8]对41例局部进展的食管癌患者行Folfox-4联合爱必妥后续放疗联合爱必妥治疗,其中有30名患者进行了手术,达到病理完全缓解的患者有8例。Moehler等^[9]应用IF方案联合爱必妥一线治疗晚期的食管胃肿瘤患者共48例,结果显示总反应率(overall response rate, ORR)为46%,疾病控制率(disease control rate, DCR)为79%;中位无进展生

存时间(progression-free survival, PFS)为9.0 mo, 中位总生存时间(overall survival, OS)为16.5 mo, 同时发现EGFR表达阳性的患者反应率更高,结果令人振奋,其扩大样本的临床研究最终结果将在Expand III期临床试验中显现。爱必妥联合放疗的临床试验结果是令人鼓舞的,但是两项爱必妥单药治疗进展期食管腺癌患者的结果却令人沮丧,其中位OS在3.1-4.0 mo, 中位PFS在1.6-1.8 mo^[10,11]。目前正在进行的一项大型临床试验SCOPE1 II期试验正在进行中,该实验拟入主420例食管癌患者,按1:1的比例随机分为单纯放疗组和放疗联合爱必妥组,若结果令人满意,III期临床试验将每组各增加120名患者来进一步验证爱必妥在食管癌中举足轻重的作用^[12]。

其他的EGFR单克隆抗体还有尼妥珠单抗(泰欣生)、帕尼单抗以及尚未在临床上应用的马妥珠单抗等。泰欣生是我国第一个用于治疗恶性肿瘤的功能性单抗药物,于2008年上市,同样是以EGFR为靶点,通过抑制血管生成因子的合成来抑制肿瘤血管生成,还可通过降低S期肿瘤细胞的生物合成,使肿瘤细胞在G₁期停滞并诱发细胞凋亡等机制抑制肿瘤的生长和转移,即主要通过抗体依赖细胞介导的细胞毒性和补体依赖的细胞毒性等机制发挥抗肿瘤作用^[13]。国内的一项研究显示尼妥珠单抗配合放疗治疗病理证实不能手术的晚期食管癌患者,共52例,其中完全缓解的患者为10例,部分缓解的患者有36例,疾病稳定的患者有6例,总有效率为88.46%,且患者耐受程度好,显示出其高效低毒的优势^[13]。目前江苏省内正在进行一项尼妥珠单抗(泰欣生)联合放疗治疗局部晚期食管鳞癌的前瞻、双盲、随机对照、多中心扩大适应证的临床研究,其最终结果令人期待。今年ASCO会议报道的REAL3(表柔比星、奥沙利铂、卡培他滨(EOC)联合帕妥珠单抗治疗晚期食管癌的随机多中心试验)的研究结果显示未筛选的食管癌患者不能从帕尼单抗的治疗中获益^[14],帕尼单抗联合化疗治疗初治的转移或局部进展的食管癌患者,结果显示与单纯化疗组相比,中位生存时间分别为8.8、11.3 mo($P=0.013$);中位无进展生存分别为6.0、7.6 mo($P=0.068$),结论为在未经选择的食管为肿瘤患者中,EOC联合帕妥珠单抗并不能获益;OS获益降低可能源于mEOC-P组中降低了化疗剂量:低

剂量的奥沙利铂和卡培他滨以及较低的中位化疗数导致联合帕妥珠单抗没有在PFS以及OS的获益。

1.2 EGFR-TKI抑制剂 EGFR酪氨酸激酶抑制剂(tyrosinekinase inhibitor, TKIs)是一类能作用于细胞内受体酪氨酸激酶区的小分子药物,大部分是喹唑啉类衍生物,他们与三磷酸腺苷(Adenosine triphosphate, ATP)竞争性结合胞外配体,抑制ATP与TK结合,阻断酪氨酸自身的磷酸化和下游信号的传导,从而加速细胞的凋亡,减少肿瘤的浸润和转移。目前应用于临床上应用较多的有Gefitinib(易瑞沙, Iressa)和Erlotinib(特罗凯, Tarceva)两种。

目前对吉非替尼在食管癌的靶向治疗研究较多。在一项临床II期研究中, Rodriguez等^[15]发现易瑞沙联合放化疗对照单纯放化疗($n = 173$), 实验组($n = 80$)3年总生存率达到了40%, 而不良反应没有增加, 获得了鼓舞人心的结果。Richel等^[16]研究组使用易瑞沙(500 mg/d)一线治疗36例食管癌患者, 结果显示10%PR、23%SD, 中位进展时间1.8 mo, 中位生存期6.4 mo。Janmaat等^[17]报道36例食管癌患者一线化疗失败后口服易瑞沙(500 mg/d)结果示2.8%PR、27.8%SD, 中位进展时间59 d, 中位生存时间164 d, 其他也有一些类似的临床报道^[18,19]。总体来看, 女性、鳞癌和高表达EGFR的患者似乎可获得较高的控制率。

Dobelbower等^[20] I 期研究厄洛替尼联合放化疗的结果显示厄洛替尼的剂量达到150 mg/d是安全有效的, 患者能够耐受, 且联合放疗能明显提高疗效, 其主要不良反应是皮疹、腹泻、恶心以及脱水, 并且没有报道相关的剂量限制性毒性, 目前II期临床试验正在进行中。另一些临床研究显示单药厄洛替尼治疗食管癌也有一定的疗效^[21,22]。但Ison等^[23]最新的一项权威的临床研究结果却显示厄洛替尼单药治疗既往曾接受过化疗的转移性食管癌患者的疗效差强人意, 且仅限于食管鳞癌的患者, 这无疑使人们对EGFR-TKI的疗效信心大减。同时Zhang等^[24]曾报道近几年在西方国家食管腺癌的发病率在急速上升, 相应的食管鳞癌的发病率却在逐年下降, 这也许是造成近两年西方国家对EGFR-TKI在食管癌上疗效研究热度降低的原因。

1.3 抗HER-2单抗/酪氨酸激酶抑制剂 人表皮生长因子受体-2(HER-2)属于EGFR家族, 是一种具有酪氨酸激酶活性的跨膜蛋白, 主要参与细

胞信号的转导, 编码p185蛋白, 即HER-2/neu蛋白。既往大量实验研究显示, 食管癌中HER-2过表达为10%-25%。与乳腺癌不同的是, Her-2阳性状态与不良预后无关。曲妥珠单抗(赫赛汀)是以HER-2/neu抗原为靶点的人类IgG1抗体, 赫赛汀能下调HER-2水平, 促进细胞凋亡, 同时还能增强化疗药物的敏感性。Safran等^[25]对没有远处转移的食管腺癌患者给予紫杉醇联合顺铂化疗同时配合放疗6 wk后, 再接受曲妥珠单抗治疗, 5 wk后结果显示入选的19例患者中有14例患者HER-2/neu过表达, 基因数量扩增, 所有患者中位生存时间为24 mo, 两年生存率为50%。这一研究为HER-2阳性的食管腺癌患者提供了又一治疗的希望, 但仍需大样本的临床研究来证实。

拉帕替尼(lapatinib)是一种口服的小分子表皮生长因子酪氨酸激酶抑制剂, 目前拉帕替尼进行的3个临床试验显示无论是一线还是二线治疗晚期食管癌, 总有效率均<10%, 结果令人沮丧, 但是目前正在进行的LOGIC(拉帕替尼联合奥沙利铂和卡培他滨治疗局部进展或转移的HER-2阳性的食管癌、食管胃结合部癌及胃癌)III期临床试验的结果却值得关注。

2 VEGF抑制剂

肿瘤血管生成是一个复杂的过程, 需要大量的细胞因子参与, 而血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是在其中起重要作用的正调节因子。VEGF属于血小板衍生生长因子超基因家族, VEGF受体属于酪氨酸蛋白激酶家族, 主要分布于血管内皮细胞。VEGF特异性作用于VEGFR胞外区, 使胞内区酪氨酸激酶磷酸化激活, 触发下游一系列的蛋白级联活化, 通过调控基因表达而发挥效应, 主要是催化新生血管的生成, 增加局部微血管的通透性等。约30%-60%的食管癌过表达VEGF, 并且和较差的预后相关^[26], 抗肿瘤血管生成已经成为另一个晚期食管癌的治疗思路。

2.1 抗VEGF抗体 贝伐单抗(Bevacizumab, Avastin)是重组的人源化、人鼠嵌合的抗VEGF单克隆抗体, 能与VEGF受体1和受体2特异性结合, 阻碍VEGF生物活性形式的产生, 从而抑制肿瘤新生血管的生成。当贝伐单抗与化疗药物联合使用时, 可使肿瘤血管通透性增加, 促进药物向肿瘤内渗透, 达到增敏的效果。目前对贝伐单抗在食管癌中的分子靶向治疗临床研究大部

■ 相关报道

目前国内外均有进行食管癌分子靶向治疗的临床研究, 并初步显现出可喜的治疗效果, 但一些实验所得出的结论因其样本量小等特点, 实验数据倚赖较大, 如Shah等报道的贝伐单抗在晚期食管癌中的研究, 结果令人鼓舞, 但样本量只有23例, 所以需要更多的临床研究来证实。尼妥珠单抗和恩度是我国自主研发的分子靶向药物, 其在晚期食管癌中的疗效仍需要更多的临床研究来证实。

■应用要点

本文总结了国内外对食管癌分子靶向治疗的最新进展,并汇总了每个分子靶向药物已经完成或正在进行的临床试验,客观报道了每个试验的结果,并总结了试验可能存在的不足之处。

分局限在食管腺癌的患者。Shah等^[27]在Ⅱ期临床试验中发现23例转移的食管胃交界处腺癌的患者应用贝伐单抗配合化疗,总反应率达到了65%,中位生存时间提高至12.3 mo,为贝伐单抗在食管癌的靶向治疗中赢取了一定的地位。但Okines等^[28]却发现贝伐单抗联合化疗相比单纯化疗而言,并没有更长的生存时间获益。这些结果显示对于贝伐单抗在食管癌分子靶向治疗中的地位有待更多更大的临床研究进一步证实。

2.2 VEGF酪氨酸激酶抑制剂 舒尼替尼(Sunitinib, 索坦)、索拉非尼(Sorafenib tosylate多吉美)是选择性抑制肿瘤细胞增殖和阻止肿瘤血管生成的多靶点分子靶向药物。舒尼替尼作为二线治疗晚期食管癌的一项多中心Ⅱ期临床试验显示4.7%PR, 35.7%SD, 中位生存期为12.7 mo。在今年的ACSO会议上D.lison等报道了索拉非尼在食管和食管胃连接处肿瘤的Ⅱ期临床试验,结果显示索拉非尼在食管癌的治疗中完全反应及疾病稳定效果显著^[14]。

血管内皮抑素(Endostar, 恩度)是一种广谱的多靶点的血管生成抑制剂,特异性地作用于内皮细胞,尤其是微血管的内皮细胞,抑制其迁移,诱导其凋亡,能全面阻断新生血管的生成,是我国自主研发的分子靶向治疗药物,但其在食管癌治疗上的应用尚未见到有说服力的报道。

3 其他分子靶向药物

3.1 环氧化酶-2抑制剂 环氧化酶(COX)是催化花生四烯酸转变为前列腺素(PGE)的限速酶,由3个成员组成: COX-1、COX-2和COX-3。其中COX-2已经证实多种肿瘤,尤其是消化系统肿瘤组织及其细胞株中呈高表达^[29]。COX-2属于诱导型基因,静息时不表达,但在致癌物质等相关诱导因子的刺激下可快速表达,其结果是直接刺激肿瘤细胞及新生血管的生长,并可通过催化花生四烯酸产生前列腺素,抑制抗肿瘤的免疫,促进肿瘤生成。最近很多研究表明,COX-2不仅在食管癌组织中高表达,而且其表达水平与病理过程、转移、复发及预后明显相关。在COX-2抑制剂中,最具代表性的是塞来昔布(西乐葆),属于新型非甾体类抗炎药,他可以高选择性地抑制COX-2,目前也是临床上常用的第一阶梯镇痛药。既往的多项临床研究显示,西乐葆联合化疗治疗中晚期食管癌患者显示出了明显提

高的疗效^[30,31]。在与化疗药物协同治疗的过程中,西乐葆还可以抑制化疗药物引起的一些不良反应,如静脉炎、黏膜炎、腹泻及神经肌肉毒性等,从而增加患者对化疗的耐受性。这些研究促使很多学者开始重视特异性COX-2抑制剂在食管癌辅助治疗中的作用,但经过长期的临床验证发现该药物的局限性在于在实际临床工作中长期大剂量的塞来昔布会加重患者心脏毒性,导致心血管事件发生率的增加。另一种临床常用的非特异性COX-2抑制剂是阿司匹林,Corley等^[32]综合分析9个流行病学研究资料后发现,非选择性非类固醇类抗炎药(其中50%为阿司匹林)能够降低食管癌的发生率,并且这种作用呈明显的剂量依赖性。

3.2 尚未经临床药物验证的分子靶向药物 在食管癌的分子靶向治疗中,有很多药物从其机制上看显示了很好的抗肿瘤活性,比如说mTOR激酶抑制剂(依维莫司)、泛素-蛋白酶体抑制剂(雷帕霉素、西罗莫司)、IGFR1激酶抑制剂、Bcr-abl酪氨酸激酶抑制剂伊马替尼、法尼基转移酶抑制剂Tipifarnib、细胞周期蛋白依赖激酶抑制剂夫拉平度等,但至今尚未有临床研究来证实。还有针对EpCAM、MMP以及E-cadherin的基础研究尚在进行中。

4 结论

食管癌患者是一群特殊的群体,他们除了要忍受癌症本身带来的痛苦外,很多晚期的患者往往由于食管肿瘤压迫甚至堵塞食管造成进食困难,不仅身体受到伤害,精神上也会受到很大的打击。对于此种患者,选择一种高效低毒的治疗方法无疑是广大患者所期盼的,靶向治疗就在这种背景下应运而生。综上所述,食管癌的靶向治疗道路是一条希望与挑战并存的道路,还需要我们进一步的努力来不断开拓这条道路,为食管癌患者带来更多的希望!

5 参考文献

- 1 赫捷,邵康. 中国食管癌流行病学现状、诊疗现状及未来对策. 中国癌症杂志 2011; 21: 501-504
- 2 Shibata A, Matsuda T, Ajiki W, Sobue T. Trend in incidence of adenocarcinoma of the esophagus in Japan, 1993-2001. *Jpn J Clin Oncol* 2008; 38: 464-468
- 3 解明然,张旭,林鹏,林勇斌,戎铁华,张兰军,温浙盛,李小东. 新辅助化疗在局部晚期食管癌中的疗效分析. 中华医学杂志 2009; 89: 2906-2909
- 4 Dragovich T, Campen C. Anti-EGFR-Targeted Therapy for Esophageal and Gastric Cancers: An Evolving Concept. *J Oncol* 2009; 2009: 804108

- 5 Kawaguchi Y, Kono K, Mimura K, Sugai H, Akaike H, Fujii H. Cetuximab induce antibody-dependent cellular cytotoxicity against EGFR-expressing esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 2007; 120: 781-787
- 6 陆敬超. 西妥昔单抗联合化疗治疗EGFR阳性表达中晚期食管癌患者的疗效分析. *中国医药指南* 2011; 9: 113-114
- 7 Ruhstaller T, Pless M, Dietrich D, Kranzbuehler H, von Moos R, Moosmann P, Montemurro M, Schneider PM, Rauch D, Gautschi O, Mingrone W, Widmer L, Inauen R, Brauchli P, Hess V. Cetuximab in combination with chemoradiotherapy before surgery in patients with resectable, locally advanced esophageal carcinoma: a prospective, multicenter phase IB/II Trial (SAKK 75/06). *J Clin Oncol* 2011; 29: 626-631
- 8 De Vita F, Orditura M, Martinelli E, Vecchione L, Innocenti R, Sileni VC, Pinto C, Di Maio M, Farella A, Troiani T, Morgillo F, Napolitano V, Ancona E, Di Martino N, Ruol A, Galizia G, Del Genio A, Ciardiello F. A multicenter phase II study of induction chemotherapy with FOLFOX-4 and cetuximab followed by radiation and cetuximab in locally advanced oesophageal cancer. *Br J Cancer* 2011; 104: 427-432
- 9 Moehler M, Mueller A, Trarbach T, Lordick F, Seufferlein T, Kubicka S, Geissler M, Schwarz S, Galle PR, Kanzler S. Cetuximab with irinotecan, folinic acid and 5-fluorouracil as first-line treatment in advanced gastroesophageal cancer: a prospective multi-center biomarker-oriented phase II study. *Ann Oncol* 2011; 22: 1358-1366
- 10 Chan JA, Blaszkowsky LS, Enzinger PC, Ryan DP, Abrams TA, Zhu AX, Temel JS, Schrag D, Bhargava P, Meyerhardt JA, Wolpin BM, Fidias P, Zheng H, Florio S, Regan E, Fuchs CS. A multicenter phase II trial of single-agent cetuximab in advanced esophageal and gastric adenocarcinoma. *Ann Oncol* 2011; 22: 1367-1373
- 11 Gold PJ, Goldman B, Iqbal S, Leichman LP, Zhang W, Lenz HJ, Blanke CD. Cetuximab as second-line therapy in patients with metastatic esophageal adenocarcinoma: a phase II Southwest Oncology Group Study (S0415). *J Thorac Oncol* 2010; 5: 1472-1476
- 12 Hurt CN, Nixon LS, Griffiths GO, Al-Mokhtar R, Gollins S, Staffurth JN, Phillips CJ, Blazeby JM, Crosby TD. SCOPE1: a randomised phase II/III multicentre clinical trial of definitive chemoradiation, with or without cetuximab, in carcinoma of the oesophagus. *BMC Cancer* 2011; 11: 466
- 13 张海霖, 张健, 杨青, 陈怡. 尼妥珠单抗联合同步放化疗治疗局部晚期食管癌的副反应观察与护理. *肿瘤预防与治疗* 2012; 25: 98-101
- 14 王迈. ASCO 2012研究精选-消化道肿瘤. Available from: <http://www.cmt.com.cn/detail/49797.html>
- 15 Rodriguez CP, Adelstein DJ, Rice TW, Rybicki LA, Videtic GM, Saxton JP, Murthy SC, Mason DP, Ives DI. A phase II study of perioperative concurrent chemotherapy, gefitinib, and hyperfractionated radiation followed by maintenance gefitinib in locoregionally advanced esophagus and gastroesophageal junction cancer. *J Thorac Oncol* 2010; 5: 229-235
- 16 Richel DJ, Vervenne WL. Systemic treatment of oesophageal cancer. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004; 16: 249-254
- 17 Janmaat ML, Gallegos-Ruiz MI, Rodriguez JA, Meijer GA, Vervenne WL, Richel DJ, Van Groenigen C, Giaccone G. Predictive factors for outcome in a phase II study of gefitinib in second-line treatment of advanced esophageal cancer patients. *J Clin Oncol* 2006; 24: 1612-1619
- 18 Ferry DR, Anderson M, Beddard K, Tomlinson S, Atherfold P, Obszynska J, Harrison R, Jankowski J. A phase II study of gefitinib monotherapy in advanced esophageal adenocarcinoma: evidence of gene expression, cellular, and clinical response. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 5869-5875
- 19 Adelstein DJ, Rice TW, Rybicki LA, Saxton JP, Videtic GM, Murthy SC, Zuccaro G, Vargo JJ, Dumot JA, Carroll MA. A phase II trial of accelerated multimodality therapy for locoregionally advanced cancer of the esophagus and gastroesophageal junction: the impact of clinical heterogeneity. *Am J Clin Oncol* 2007; 30: 172-180
- 20 Dobelbower MC, Russo SM, Raisch KP, Seay LL, Clemons LK, Suter S, Posey J, Bonner JA. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, erlotinib, and concurrent 5-fluorouracil, cisplatin and radiotherapy for patients with esophageal cancer: a phase I study. *Anticancer Drugs* 2006; 17: 95-102
- 21 Siegel-Lakshai WS, Beijnen JH, Schellens JH. Current knowledge and future directions of the selective epidermal growth factor receptor inhibitors erlotinib (Tarceva) and gefitinib (Iressa). *Oncologist* 2005; 10: 579-589
- 22 Pande AU, Iyer RV, Rani A, Maddipatla S, Yang GY, Nwogu CE, Black JD, Levea CM, Javle MM. Epidermal growth factor receptor-directed therapy in esophageal cancer. *Oncology* 2007; 73: 281-289
- 23 Ilson DH, Kelsen D, Shah M, Schwartz G, Levine DA, Boyd J, Capanu M, Miron B, Klimstra D. A phase 2 trial of erlotinib in patients with previously treated squamous cell and adenocarcinoma of the esophagus. *Cancer* 2011; 117: 1409-1414
- 24 Zhang HZ, Jin GF, Shen HB. Epidemiologic differences in esophageal cancer between Asian and Western populations. *Chin J Cancer* 2012; 31: 281-286
- 25 Safran H, Dipetrillo T, Akerman P, Ng T, Evans D, Steinhoff M, Benton D, Purviance J, Goldstein L, Tantravahi U, Kennedy T. Phase I/II study of trastuzumab, paclitaxel, cisplatin and radiation for locally advanced, HER2 overexpressing, esophageal adenocarcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2007; 67: 405-409
- 26 Kleespies A, Guba M, Jauch KW, Bruns CJ. Vascular endothelial growth factor in esophageal cancer. *J Surg Oncol* 2004; 87: 95-104
- 27 Shah MA, Jhawer M, Ilson DH, Lefkowitz RA, Robinson E, Capanu M, Kelsen DP. Phase II study of modified docetaxel, cisplatin, and fluorouracil with bevacizumab in patients with metastatic gastroesophageal adenocarcinoma. *J Clin Oncol* 2011; 29: 868-874
- 28 Okines AF, Reynolds AR, Cunningham D. Targeting angiogenesis in esophagogastric adenocarcinoma. *Oncologist* 2011; 16: 844-858
- 29 Liu JF, Jamieson G, Wu TC, Zhang SW, Wang QZ, Drew P. Cyclooxygenase-2 expression in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Dis Esophagus* 2006; 19: 350-354
- 30 Dawson SJ, Michael M, Biagi J, Foo KF, Jefford M,

■同行评价

本文汇聚了目前在临床上应用成熟的分子靶向药物在晚期食管癌治疗中的疗效, 对临床工作具有一定的指导意义。

- Ngan SY, Leong T, Hui A, Milner AD, Thomas RJ, Zalcberg JR. A phase I/II trial of celecoxib with chemotherapy and radiotherapy in the treatment of patients with locally advanced oesophageal cancer. *Invest New Drugs* 2007; 25: 123-129
- 31 Hur C, Broughton DE, Ozanne E, Yachinski P, Nishioka NS, Gazelle GS. Patient preferences for the chemoprevention of esophageal adenocarcinoma in Barrett's esophagus. *Am J Gastroenterol* 2008; 103: 2432-2442
- 32 Corley DA, Kerlikowske K, Verma R, Buffler P. Protective association of aspirin/NSAIDs and esophageal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Gastroenterology* 2003; 124: 47-56

编辑 李军亮 电编 闫晋利

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》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。

放化疗结合中医药治疗食管癌的临床研究进展

林琳, 曹鹏

林琳, 江苏省中医药研究院消化科 江苏省南京市 210028
曹鹏, 江苏省中医药研究院细胞与分子生物学实验室 江苏省南京市 210028
林琳, 博士, 主要从事中医药防治消化系统肿瘤免疫机制的研究。
国家自然科学基金资助项目, No. 81274150
2011年度江苏省国家中医临床研究基地(脾胃病)开发课题基金资助项目, No. JD11037
作者贡献分布: 本文综述由林琳完成; 曹鹏审核。
通讯作者: 曹鹏, 研究员, 210028, 江苏省南京市迈皋桥十字街100号, 江苏省中医药研究院细胞与分子生物学实验室。
pcao79@yahoo.com
电话: 025-85608666
收稿日期: 2012-08-28 修回日期: 2012-12-02
接受日期: 2012-12-17 在线出版日期: 2012-12-18

Advances in clinical research of radiotherapy and chemotherapy combined with Chinese medicine treatment for esophageal cancer

Lin Lin, Peng Cao

Lin Lin, Department of Gastroenterology, Jiangsu Province Academy of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210028, Jiangsu Province, China
Peng Cao, Laboratory of Cell and Molecular Biology, Jiangsu Province Academy of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210028, Jiangsu Province, China
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 81274150; the Development Topics Foundation Projects of 2011 Annual National TCM Clinical Research Base (Stomach Disease) in Jiangsu Province
Correspondence to: Peng Cao, Laboratory of Cell and Molecular Biology, Jiangsu Province Academy of Traditional Chinese Medicine, 100 Shizi Street, Maigaoqiao, Nanjing 210028, Jiangsu Province, China. pcao79@yahoo.com
Received: 2012-08-28 Revised: 2012-12-02
Accepted: 2012-12-17 Published online: 2012-12-18

Abstract

Currently available therapeutic modalities for esophageal cancer include radiotherapy, chemotherapy, and Chinese medicine treatment. Radiotherapy and chemotherapy have some limitations and inadequacies. Radiation esophagitis and radiation pneumonitis inevitably occur during radiotherapy. The side effects of chemotherapy, such as gastrointestinal reactions, bone marrow suppression, liver and kidney dysfunction, will reduce the quality of life of cancer patients and interrupt the treatment. Chinese medicine

can significantly alleviate the side effects of radiotherapy and chemotherapy, improve patients' quality of life, and prolong their survival. This review aims to review the advances in clinical research of radiotherapy and chemotherapy combined with Chinese medicine treatment for esophageal cancer.

Key Words: Esophageal cancer; Chinese medicine; Radiotherapy; Chemotherapy

Lin L, Cao P. Advances in clinical research of radiotherapy and chemotherapy combined with Chinese medicine treatment for esophageal cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(35): 3505-3509

摘要

食管癌的非手术治疗手段目前有放疗、化疗、中医药治疗。放疗及化疗都有其局限性和不足之处: 放疗过程中不可避免会出现放射性食管炎、放射性肺炎等不良反应; 化疗的不良反应, 尤其是消化系统反应、骨髓抑制、肝肾功能损害等, 使部分肿瘤患者生活质量降低, 甚至造成化疗疗程中断, 影响治疗效果。中医药能明显减轻放化疗治疗的不良反应、提高患者生存质量、延长生存期。本文就近年来放化疗结合中医药治疗食管癌的临床研究作一综述。

关键词: 食管癌; 中医药; 放疗; 化疗

林琳, 曹鹏. 放化疗结合中医药治疗食管癌的临床研究进展. *世界华人消化杂志* 2012; 20(35): 3505-3509
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3505.asp>

0 引言

食管癌是一种常见的消化系统肿瘤, 全世界每年约30万人死于食管癌, 我国食管癌的发病率和死亡率均居世界之首。由于就诊时大部分患者已处于食管癌的中晚期, 故其临床治疗效果并不令人满意, 5年生存率仅为20%-73%^[1]。食管癌的非手术治疗除放疗、化疗外, 中药作为辅助疗法逐渐受到人们的关注, 中医药与现代医学的结合能取长补短, 从而提高治疗的效果。本文

■背景资料

食管癌的非手术治疗手段目前有放疗、化疗、中医药治疗, 放疗及化疗都有其局限性和不足之处, 如放射性食管炎、消化系统反应、骨髓抑制等, 中医药配合运用能减轻放化疗治疗的不良反应、提高患者的生存质量。

■同行评议者

袁建业, 副研究员, 上海中医药大学附属龙华医院/脾胃病研究所

■研发前沿

在进行放疗和/或化疗治疗中晚期食管癌时,能够有效的降低其相关急性不良反应,对提高患者的治疗效果至关重要,如何减轻同步放疗的不良反应是目前食管癌临床研究的重点和急需解决的问题,中医药在这方面显现了其优势。

■相关报道

陈高阳等研究启动膈散加减联合同步放化疗治疗中晚期食管癌患者,治疗结果表明联合用药组较单纯放化疗组总有效率高,骨髓抑制、放射性食道炎及胃肠道等不良反应小。

拟对近年来放化疗结合中医药治疗食管癌的临床研究作一综述。

1 放疗结合中医药治疗

放疗是非手术治疗的食管癌患者的主要治疗手段之一,主要不良反应为放射性食管炎、放射性气管炎、胃肠道反应以及对骨髓的抑制等。食管癌患者本身就处于免疫功能低下的状态,放疗在杀灭肿瘤细胞的同时也会使一部分正常细胞受到损伤,加重了机体的免疫失衡,当放疗所引起的不良反应对机体造成损害使患者不能耐受,就会导致治疗中断。中药与放疗配合可以达到减毒增效的目的。

有学者研究发现扶正固本类中药可以增强食管癌化疗患者机体的免疫功能,从而减轻放疗的不良反应。吴少兵等^[2]将40例食管癌患者,随机分成治疗组和对照组,治疗组放疗期间静脉输注参芪扶正注射液,对照组行单纯放疗,治疗前后分别检测T淋巴细胞亚群、NK细胞、血常规和食管钡餐造影摄片,结果发现治疗组的免疫功能高于对照组($P<0.05$),治疗组放射性食管炎较对照组减轻($P<0.05$),结果说明:食管癌患者在放疗过程中使用参芪扶正注射液可以减少放疗的不良反应,改善患者临床症状和提高免疫力。苏丽等^[3]观察复方守宫散(人参、三七、何首乌、守宫、没药、梅花)联合放疗对中晚期食管癌患者T细胞亚群和白介素(interleukin 2, IL-2)表达的影响。结果显示:复方守宫散不仅可调节、提高中晚期食管癌放疗患者的免疫功能,亦可减轻放疗对机体免疫功能的损害。

放射性食管炎、放射性肺炎是食管癌化疗中常见的不良反应,不少研究者尝试用清热解毒、养阴生津、滋养肺肾、益气健脾、活血化瘀等组方防治这些不良反应,取得了较好的疗效。张碧媛等^[4]研究结果显示,食管癌患者在放疗同时服用青地合剂(生地黄、麦冬、玄参、黄芩、连翘、赤芍、丹皮、党参、茯苓)对放射性食管炎具有良好的防治作用,与单纯化疗患者相比,明显降低了2级以上放射性食管炎的发生率,且放射性食管炎发生时间晚,持续时间短,严重程度轻;同时有效率明显高于单纯化疗患者,提示青地合剂不仅可以减毒,还可能增效。杨琳^[5]对52例食管癌放疗患者进行研究,结果提示患者放疗期间口服甘露饮加味(熟地黄、生地黄、天冬、麦冬、石斛、黄芩、枇杷叶、茵

陈、枳壳、甘草)降低了放射性食管炎的严重程度,推迟了食管炎的发生时间,减少了症状持续时间,保证了治疗的持续进行。燕忠生等^[6]对32例食管癌放疗患者进行研究,将放疗同时接受中医辨证治疗的16例作为观察组,单纯放疗的16例作为对照组,结果:放射性食管炎、放射性肺炎、咽部不适发生率,观察组依次为18.8%、6.3%、25.0%;对照组依次为31.3%、18.8%、43.8%;三者发生率观察组均显著低于对照组($P<0.05$),说明食管癌患者放疗时同时辨证应用清热生津中药及其加减复方,能有效降低放射性食管炎、放射性肺炎、咽部不适的发生率。

另有学者研究了中药对食管癌放疗患者生存质量的影响。陈志峰等^[7]在食管癌高发区开展了增生平(山豆根、白蓟皮、拳参、败酱草、夏枯草、黄药子)提高食管癌放疗患者远期生存的前瞻性观察,用COX风险比例模型分析各因素对患者远期生存的影响,得出结论:中药增生平可以提高食管鳞癌III期和IV期远期生存。黄辉等^[8]研究发现,在食管癌放疗期间配合服用中药扶正减毒颗粒可以起到明显的减毒、改善临床症状的作用,尤其在口干、纳呆、乏困、咽下疼痛和心烦失眠方面,扶正减毒颗粒可以明显减轻放疗引起的不良反应。李志^[9]观察资料显示,食管癌放疗同时加用复方苦参注射液后,与单纯放疗组比较,近期有效率的差异虽无统计学意义,但可减轻放疗的急性放射反应,提高患者生存质量,且苦参对患者肝肾没有不良反应。

2 中医药结合化疗治疗

在中晚期食管癌中,化疗是缓解病情、延长生存期的主要治疗手段。但化疗的不良反应,尤其是消化系反应、骨髓抑制、肝肾功能损害等,使部分肿瘤患者生活质量降低,甚至造成化疗疗程中断,影响治疗效果,因此,探讨减轻化疗的不良反应,提高患者对化疗的耐受性,具有重要的临床意义,而中医药在这方面有其独特的优势。

近年很多学者运用中药汤剂辨证施治配合化疗治疗食管癌取得了显著疗效。唐书生等^[10]采用自拟中药汤剂祛瘀解毒消肿汤和补气健脾扶正汤辨证施治配合化疗PVPC方案治疗食管癌53例患者,结果显示:完全缓解(complete response, CR)6例(11.3%),部分缓解(partial response, PR)37例(69.8%),无变化(no change, NC)7例(13.2%),扩展3例(5.7%),总有效

率(CR+PR)81.1%。华远铎^[11]对40例中晚期食管癌患者运用中药清热解毒、化痰散结、温补肾阳,结合辨证论治配合化疗治疗,结果为:CR8例(20%),PR16例(40%),CR+PR为60%。均说明中药辨证施治配合化疗治疗食管癌的疗效显著。李志刚等^[12]研究发现消膈汤(全瓜蒌、半夏、陈皮、党参、急性子、茯苓、莪术、三棱、半枝莲、丹参、山楂、白花蛇舌草、壁虎、三七粉、旋复花、代赭石)联合GP方案治疗中晚期食管癌与单纯运用GP方案治疗相比稳定以上率有显著差异,骨髓抑制及不良反应例数对比亦有统计学意义。王玲玲^[13]发现涤痰化痰方(陈皮、半夏、茯苓、制南星、黄药子、三棱、文术、当归、青礞石、露蜂房、丹参、桃仁、甘草)配合化疗治疗中晚期食道癌能明显改善患者的近期疗效,提高其生存质量,近期疗效明显优于单纯化疗组。杨国武^[14]运用启膈散(沙参、丹参、茯苓、川贝母、郁金、砂仁壳、荷叶蒂、杵头糠、蒲黄、黄连)加减联合DM方案治疗中晚期食管癌,减少了化疗药物带来的不良反应,能减少患者痛苦,提高生活质量,甚至使相当一部分患者可长期荷瘤生存。杨得振等^[15]用疏肝降逆法(旋覆花、代赭石、半夏、人参、当归、白芍、陈皮、柴胡、郁金、川楝子、瓦楞子、甘草)配合DF方案治疗晚期食管癌,用WHO实体瘤近期客观疗效标准及不良反应分度标准评价疗效和不良反应,用卡氏评价身体状况变化,发现单纯DF方案组与配合中药组有效率差异无统计学意义($P>0.05$),但配合中药组不良反应明显降低($P<0.05$),生存质量显著提高。李惠东等^[16]探讨桃红四物汤(桃仁、红花、当归、生地、赤芍、川芎)联合MVP方案化疗治疗瘀血内结型食管癌的疗效,发现配合中药组较单纯化疗组在治疗效果上有一定优势,特别是吞咽哽噎、吐黏液等症状的改善较为明显。王新杰^[17]运用通噎汤(党参、冬凌草、藤梨根、山豆根、鸡血藤、刺五加、郁金、焦三仙)联合TP方案治疗晚期食管癌,能明显改善患者的一般状况和症状体征、提高患者的生活质量,减轻患者的临床症状。

另有学者对中成药联合化疗治疗食管癌进行了研究:张盛奇等^[18]比较参芪扶正注射液联合化疗与单纯化疗治疗晚期食管癌的疗效及不良反应,结果显示:参芪扶正注射液可减轻晚期食管癌患者DDP+CF/5-氟尿嘧啶方案化疗所致不良反应,改善生活质量。在贞芪扶正胶囊配合

化疗治疗中晚期食管癌的临床观察^[19]中,治疗组白细胞下降及胃肠道反应发生率均明显低于对照组($P<0.05$),提示贞芪扶正胶囊配合化疗能降低化疗药物对骨髓的抑制,减轻消化系反应。吴幼莲等^[20]在对中药鸦胆子油联合化疗治疗晚期食管癌的临床观察中发现,代表客观外界观察者的KPS评分、患者自身感受的QLQ-C30量表的结果中,鸦胆子治疗组效果优于对照组($P<0.05$),在化疗不良反应方面,鸦胆子治疗组的不良反应较对照组轻($P<0.05$)。说明鸦胆子油注射液可用于辅助治疗晚期食管癌,部分改善患者症状,提高生活质量。朱利楠等^[21]研究复方苦参注射液在中晚期食管癌化疗中的作用时,发现治疗组化疗后临床受益率明显优于对照组,对化疗引起的神经毒性及肌肉关节疼痛的有效缓解率明显优于对照组,且能起到有效保护肝脏的作用,化疗后生活质量评分提高率与对照组比较差异有显著性,证明复方苦参注射液对中晚期食管癌患者能提高临床受益率,抑制肿瘤发展,减轻化疗的不良反应,改善生活质量,可作为晚期肿瘤患者减毒增效的有效辅助用药。

3 中医药结合放化疗治疗

食管癌同期放化疗试验始于20世纪70年代,单纯放疗或化疗,不能对病变较局限的食管癌患者提供长期控制效果,很难提高患者的长期生存率,而同时应用化疗药物和放疗,则可获得单一治疗无法获得的抗肿瘤效果。其机制可能是^[22]:化疗可能使一些肿瘤细胞从放疗不敏感的细胞周期进入敏感期;放化疗作用于肿瘤细胞的不同时相,干扰肿瘤细胞增殖动力学;化疗能够抑制细胞在放疗后产生的加速再增殖;化疗能缩小肿瘤,改善肿瘤细胞的氧供,从而增强了乏氧细胞的放射敏感性;化疗能抑制肿瘤细胞亚致死性损伤和潜在致死性损伤的修复,放化疗的结合要优于单纯放疗。多项临床研究都表明^[23],同步放化疗治疗食管癌明显减少了死亡风险,1年和2年绝对生存获益可达9%和4%,局部复发也可减少12%。但同时放化疗治疗的不良反应也较单纯放疗或单纯化疗明显增加。在放化疗治疗中,发生骨髓抑制的患者较单纯的放疗患者显著增加;同时还认为放化疗患者的III级及以上的急性治疗不良反应发生率显著增加,即使采用了较低的化疗药物用量,同时放化疗的不良反应较单纯放疗也有所增加。所以,在进行放化疗治疗中晚期食管癌时,能够有效的降

■创新盘点

在放疗和/或化疗治疗食管癌患者的同时,在辨证基础上使用清热解毒、养阴生津、活血化痰、扶正固本类中药能增强放疗的敏感性,减轻放化疗对机体的损害,提高患者生存质量,延长生存期。

■名词解释

扶正固本: 是中医治病的主要治则之一, 扶正就是扶助正气, 固本就是调护人体抗病之本。通过扶正固本以促进生理机能的恢复, 以达到正复邪退治疗疾病的目的, 中医的扶正固本就是西医的增强免疫力。

低其相关急性不良反应对提高患者治疗效果至关重要。如何减轻同步放化疗的不良反应也是目前食管癌临床研究的重点和急需解决的问题, 中医药在这方面也体现了其优势。

近年来有学者在辨证基础上使用清热解毒、养阴生津、活血化瘀、扶正固本类中药配合放化疗治疗食管癌取得了显著疗效。陈高阳等^[24]研究启膈散(丹参、郁金、茯苓、北沙参、川贝、荷叶蒂、砂仁)加减联合同步放化疗治疗中晚期食管癌患者, 治疗结果表明联合用药组较单纯放化疗组总有效率高, 骨髓抑制、放射性食管炎及胃肠道反应等不良反应小。袁文俊等^[25]对72例食管癌患者中晚期病变者应用中药减瘤通噎方(旋复花、代赭石、太子参、血竭、三七、莪术、元胡、石见穿)与放化疗协同治疗作用的疗效进行观察与研究, 其中42例患者采用中药减瘤通噎方与放化疗协同治疗效果良好、不良反应低, 比单纯放化疗效果显著。陈东基等^[26]观察扶正固本颗粒(黄芪、党参、山楂、陈皮、女贞子、补骨脂、白术、枸杞子、云茯苓、神曲、麦芽、鸡血藤、茵陈蒿、菟丝子)联合周剂量紫杉醇同步放化疗治疗中晚期食管癌的近期疗效和不良反应, 中药配合组与单纯放化疗组有效率分别为80.0%、60.0%, 单纯放化疗组发生放射性食管炎、肝肾功能损害、消化系反应及骨髓抑制的程度重于中药配合组。

也有学者对中成药联合放化疗治疗食管癌进行了研究: 濮娟^[27]评价参麦注射液联合同步放化疗治疗中晚期食管癌的近期疗效和放化疗不良反应, 结果发现试验组的近期有效率为83.0%, 对照组为72.3%, 两组差异具有统计学意义($P<0.05$), 试验组的III/IV级消化系不良反应、白细胞不良反应发生率与对照组比较, 均明显减轻($P<0.05$), 从而得出结论: 参麦注射液能够有效提高中晚期食管癌同步放化疗的临床疗效, 且能显著减少放化疗的不良反应。夏环玲^[28]研究了复方斑蝥胶囊联合放化疗治疗晚期食管癌的疗效, 发现虽然两组在近期疗效方面未见显著差异, 但复方斑蝥胶囊治疗组生活质量提高及放化疗不良反应降低, 表明联合使用复方斑蝥胶囊减轻了放化疗的骨髓抑制、放射性肺损伤及放射性食管炎等不良反应, 提高了晚期食管癌患者的放化疗耐受性。蒲志勇^[29]研究复方苦参注射液联合放化疗治疗中晚期食管癌患者, 结果发现联合用药组患者近期疗效明显高于单纯放化疗组, 且消化系不良反应、白细胞不良反

应、血小板不良反应均显著低于单纯放化疗组。尚春香等^[30]研究表明复方苦参注射液联合放化疗治疗在食管癌中晚期患者的治疗要优于单纯放化疗, 能减轻化疗的不良反应, 提高患者生活质量, 无明显不良反应和反应。谢春英等^[31]采用鸦胆子油乳注射液结合同步放化疗治疗老年食管癌患者, 结果观察组1、2、3年局控率和生存率明显优于对照组, 观察组在放射性食管炎、骨髓抑制胃肠道反应等不良反应发生率与对照组相比, 差异不显著, 提示应用鸦胆子油乳注射液结合同步放化疗治疗老年食管癌患者, 可提高食管癌患者局控率及生存率, 且不增加不良反应。

4 结论

中医认为气滞血瘀是肿瘤的病因之一, 由于肿瘤细胞生长速度过快, 肿瘤血管的生长相对缓慢, 使得实体瘤中血液循环较差, 肿瘤细胞本身又能分泌某些活性物质, 通过抗纤溶、促血小板聚集等途径, 使患者对外来或内源性致凝因素的敏感性增加, 处于一种血液高凝状态。而电离辐射又可造成机体微循环障碍, 血液浓缩, 黏滞性增加, 血流缓慢, 加重血瘀状态, 以致肿瘤局部血供障碍, 供氧不足而产生乏氧肿瘤细胞。在缺氧条件下细胞生化代谢状态的紊乱, 使得乏氧细胞对放射线的敏感性比常氧细胞低, 严重影响了放疗效果。近年来许多学者研究发现活血化瘀类方药可改善肿瘤细胞的微循环, 减少乏氧肿瘤细胞, 增强放疗的敏感性。

中医认为放射线属“热毒之邪”, 可耗气伤阴, 损伤机体津液, 造成气阴亏虚证, 使放疗的效果不佳; 化疗作为祛邪攻毒治疗肿瘤的重要方法, 虽有可能使机体达到“邪去正自安”, 但化疗药为有毒之品, 在其“以毒攻毒”治疗恶性肿瘤的同时, 更加重了正气的耗损, 对各个脏器和气血津液皆有严重的毒害作用。因此, 在放疗和/或化疗的同时, 能固护机体的正气、保护好机体的免疫功能直接关系到放化疗效果。许多扶正固本类药, 如黄芪、人参、冬虫夏草、女贞子、枸杞子、补骨脂、薏苡仁等, 能改善血象和细胞免疫功能, 促进网状内皮系统吞噬功能, 调整机体免疫状态, 增强对外界恶性刺激的抵抗力, 并有利于保护骨髓, 增强放疗和化疗的效果。

总之, 在放疗和/或化疗治疗食管癌患者的同时, 在辨证基础上使用清热解毒、养阴生

津、活血化瘀、扶正固本类中药能增强放疗的敏感性,减轻放化疗对机体的损害,提高患者生存质量,延长生存期。中医学有着科学而完备的理论体系,有着极其丰富的经验积累,中药药源广泛、使用安全,但也有许多问题有待我们去研究,如中医治疗缺乏客观性,中医用药缺乏统一的标准等。充分发挥中西医各自的优势,进行严密的临床观察,同时加强实验研究,筛选出有效的药物,探求最佳的治疗方案,相信放化疗结合中医药治疗食道癌的理论 and 实践会有新的成果不断出现,取得更加理想的临床疗效。

5 参考文献

- 1 古铁之, 殷蔚伯, 刘泰福. 肿瘤放射治疗学. 北京: 中国科学医学院, 中国协和医科大学联合出版社, 2008: 553
- 2 吴少兵, 朱红梅, 韦敏, 柏会明, 陈春. 参芪扶正注射液配合食管癌放疗的疗效观察. 肿瘤基础与临床 2011; 24: 309-310
- 3 苏丽, 夏黎明, 李平, 张梅. 中药联合放疗对中晚期食管癌患者T细胞亚群和IL-2表达的影响. 现代肿瘤医学 2011; 19: 1988-1989
- 4 张碧媛, 王梅, 赵园园, 闫超, 何信佳, 于丽. 青地合剂食管癌放疗中的减毒增效作用. 青岛大学医学院学报 2012; 48: 64-66
- 5 杨琳. 甘露饮加味防治放射性食管炎的临床研究. 医学信息 2011; 24: 3362-3363
- 6 燕忠生, 孟庆常, 张慧渊, 魏千程, 丁辉, 闫向勇, 徐进, 田种泽, 岳养军. 中药对食管癌患者放射性局部损伤的防治作用. 西北国防医学杂志 2011; 32: 54
- 7 陈志峰, 林培中, 宋国慧, 王岩, 丁镇伟, 侯浚. 放疗合并中药治疗食管鳞癌的远期疗效. 肿瘤防治研究 2012; 39: 335-338
- 8 黄辉, 郭明, 徐鹏飞, 魏鹏飞. 扶正减毒颗粒在肺癌及食管癌放疗中的应用观察. 现代肿瘤医学 2011; 19: 1134-1136
- 9 李志. 复方苦参注射液在食管癌放疗中的临床效果观察. 西南军医 2012; 14: 152-153
- 10 唐书生, 董瑞霞. 中药配合化疗治疗食管癌53例临床疗效观察. 中国医药指南 2011; 9: 122-123
- 11 华远铎. 中药配合化疗治疗中晚期食管癌. 医药论坛杂志 2009; 30: 76-77
- 12 李志刚, 樊青霞. 消膈汤联合GP方案治疗中晚期食管癌的临床研究. 医药论坛杂志 2012; 33: 14-16
- 13 王玲玲. 涤痰化痰方配合化疗治疗中晚期食道癌60例临床观察. 中国中医基础医学杂志 2012; 18: 457
- 14 杨国武. 启膈散加减联合化疗治疗中晚期食管癌临床观察. 中国中医药信息杂志 2011; 18: 77-78
- 15 杨得振, 杨洋. 疏肝降逆法配合DF方案治疗晚期食管癌30例. 云南中医中药杂志 2010; 31: 36-37
- 16 李惠东, 葛昕, 邓勤, 黄玫, 谢建兴. 桃红四物汤联合MVP方案化疗治疗瘀血内结型食管癌. 医学综述 2010; 16: 2531-2532
- 17 王新杰. 通膈汤联合TP方案对晚期食管癌QOL KPS及近期疗效的影响. 中华中医药学刊 2010; 28: 2455-2457
- 18 张盛奇, 林丽芳, 丘希辉, 郑泓斌, 方孜孜. 参芪扶正注射液联合化疗治疗晚期食管癌的临床观察. 中国医药导报 2011; 8: 74-76
- 19 武四超, 马杰. 贞芪扶正胶囊配合化疗治疗中晚期食管癌的临床观察. 医学信息 2011; 24: 4949
- 20 吴幼莲, 任春花. 中药鸦胆子油联合化疗治疗晚期食管癌临床观察. 中国临床研究 2011; 3: 50-51
- 21 朱利楠, 樊青霞. 复方苦参注射液在中晚期食管鳞癌化疗中的作用分析. 中国肿瘤临床与康复 2011; 18: 278-279
- 22 蔡群榕, 王小东. TP方案同步放化疗治疗中晚期食管癌疗效观察. 山东医药 2010; 50: 52-52
- 23 Wong R, Malthaner R. Combined chemotherapy and radiotherapy (without surgery) compared with radiotherapy alone in localized carcinoma of the esophagus. *Cochrane Database Syst Rev* 2006; 25: 2092
- 24 陈高阳, 张志胜, 曹乃宪. 启膈散加减联合同步放化疗治疗中晚期食管癌30例临床研究. 江苏中医药 2011; 43: 31-32
- 25 袁文俊, 赵西翻, 苏德易. 食管癌中药减瘤通噎与放化疗协同治疗研究观察. 社区中医药 2011; 13: 129-130
- 26 陈东基, 李小军, 付国翠, 罗好曾. 同期放化疗联合扶正固本颗粒治疗中晚期食管癌临床观察. 中成药 2012; 34: 406-409
- 27 濮娟. 参麦注射液联合同步放化疗治疗中晚期食管癌的临床观察. 湖南中医药大学学报 2011; 31: 30-34
- 28 夏环玲. 复方斑蝥胶囊联合放化疗治疗晚期食管癌的疗效观察. 中国肿瘤临床与康复 2012; 19: 167-168
- 29 蒲志勇. 复方苦参注射液联合放、化疗治疗中晚期食管癌. 中国医药指南 2011; 9: 134-135
- 30 尚春香, 付宏伟. 复方苦参注射液联合放化疗治疗某地区食管鳞癌患者的临床观察. 中医医药指南 2012; 10: 30-31
- 31 谢春英, 娄思源, 罗晓东. 鸦胆子油乳注射液结合同步放化疗治疗老年食管癌患者40例. 中国老年学杂志 2011; 31: 3408-3409

同行评价

本文综述了近几年放、化疗治疗食管癌过程中配合应用中医药治疗的相关研究文献,立意很好,可以对中医药在食管癌放、化疗过程中的应用价值进行全面客观的评价,有助于中西医同行正确认识中医药,合理的应用中医药,也可更好的指导进一步的研究工作。

编辑 李军亮 电编 闫晋利

中医药在食管癌中的应用与研究的进展

张玉, 丁蓉, 曹鹏, 霍介格

■背景资料

食管癌是临床常见的恶性肿瘤, 患者5年生存率低, 中医药治疗及中西医结合治疗能改善患者生活质量, 提高患者的总生存期, 许多专家学者在临床上将中医药运用于各期食管癌的治疗, 取得了良好疗效, 并尝试进一步分析研究其作用机制, 以期为中医药抗食管癌治疗提供理论依据。

张玉, 丁蓉, 曹鹏, 霍介格, 江苏省中医药研究院 江苏省南京市 210028

张玉, 博士, 主治医师, 主要从事肿瘤中西医结合的临床与研究。国家自然科学基金资助项目, No. 81274150

作者贡献分布: 本课题由曹鹏立题设计; 张玉完成; 霍介格审阅; 丁蓉负责校正。

通讯作者: 霍介格, 副教授, 研究生导师, 210028, 江苏省南京市红山路十字街100号, 江苏省中医药研究院肿瘤科。

hjj1668@yahoo.com.cn

电话: 025-85637121

收稿日期: 2012-08-28 修回日期: 2012-12-02

接受日期: 2012-12-17 在线出版日期: 2012-12-18

Progress in treatment of esophageal cancer by traditional Chinese medicine

Yu Zhang, Rong Ding, Peng Cao, Jie-Ge Huo

Yu Zhang, Rong Ding, Peng Cao, Jie-Ge Huo, Department of Oncology, Jiangsu Province Academy of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210028, Jiangsu Province, China
Supported by: National Nature Science Foundation of China, No. 81274150

Correspondence to: Jie-Ge Huo, Associate Professor, Department of Oncology, Jiangsu Province Academy of Traditional Chinese Medicine, 100 Shizi Street, Hongshan Road, Nanjing 210028, Jiangsu Province, China. hjj1668@yahoo.com.cn

Received: 2012-08-28 Revised: 2012-12-02

Accepted: 2012-12-17 Published online: 2012-12-18

Abstract

Esophageal cancer is a common malignant tumor. Surgery is the radical treatment for esophageal cancer. However, only patients with early stage disease are suitable for surgery. Despite the improvement in radiotherapy and chemotherapy in recent years, the 5-year survival rate of esophageal cancer remains low. In view of adverse side effects associated with surgery, radiotherapy, and chemotherapy, traditional Chinese medicine (TCM) can be used to promote the recovery of postoperative patients and integrated into Western medicine treatment regimens. This article summarizes recent progress in treatment of esophageal cancer by TCM in terms of etiology and pathogenesis, TCM treatment, integrated TCM and Western medicine treatment, and mechanisms of TCM treatment.

■同行评议者

唐文富, 副教授, 四川大学华西医院中西医结合科

Key Words: Esophageal cancer; Traditional Chinese medicine; Treatment

Zhang Y, Ding R, Cao P, Huo JG. Progress in treatment of esophageal cancer by traditional Chinese medicine. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(35): 3510-3514

摘要

食管癌是临床常见的恶性肿瘤, 外科切除手术为本病的根治方法。然而, 只有早期患者才适合作手术治疗, 尽管放射治疗和化学治疗技术近年不断改进, 但是患者5年生存率很低, 鉴于手术、放化疗的不良副作用, 中医药治疗尤适合于帮助食管癌术后患者的调理和恢复, 并能配合西医治疗手段, 以达相辅相成之效。本文从病因病机、单纯中医药治疗、中西医结合治疗及中医药治疗食管癌的机制研究等几个方面, 阐述目前食管癌治疗与研究的最新进展。

关键词: 食管癌; 中医药治疗; 治疗

张玉, 丁蓉, 曹鹏, 霍介格. 中医药在食管癌中的应用与研究的进展. *世界华人消化杂志* 2012; 20(35): 3510-3514

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3510.asp>

0 引言

食管癌是临床常见的恶性肿瘤, 我国是食管癌的高发区, 又是死亡率最高的国家^[1]。手术切除是唯一能够根治食管癌的方法, 但70%的患者就诊时已失去手术机会, 术后5年生存率仅在30%左右^[2], 化放同步治疗是进展期和局部晚期食管癌治疗的另一选择^[3]。食管癌的发病原因非常复杂, 目前尚不明确。中医药治疗在缓解食管癌梗阻, 促进食管癌术后恢复, 减轻化放疗反应等方面有确切疗效, 以下就食管癌中医药治疗及研究进展, 综述如下。

1 病因病机认识

食管癌的病因目前尚不清楚。祖国医学认为食管癌属“噎膈”、“关格”、“反胃”等范畴, 以内伤饮食、情志不遂为主因且相互影响,

互为因果,共同致病,使气滞、痰阻、瘀血阻于食道,而致食管狭窄。张代钊认为正气亏虚是食管癌的内在病因,并且与饮食和情志有密切的关系^[4]。徐灵胎评《临证指南医案·噎膈》说:“噎膈之证,必有瘀血、顽痰、逆气,阻隔胃气。”说明食管癌的发病是在全身正气虚弱的情况下,复因情志不遂、饮食不节而致痰凝、瘀血阻滞于食管而发。陈玉龙等^[5]对近20年来公开发表的治疗食管癌的方药进行了分析,结果显示用药频次较多的有补益药、活血化瘀药、清热药、化痰药、解毒药;总体都以补药为最多,特别是补气药,所占比例较大,从而推论在食管癌发病过程中正气亏虚为主要矛盾,与痰、瘀、热关系密切。

2 中医药辨治思路

2.1 病症期结合分型证治 辨证施治体现了中医理、法、方、药的高度统一,是中药医治疗食管癌的主要方法。张代钊将食管癌的突出症状与证候相结合,归纳总结了食管癌的5大主症,即“噎-吐-痛-梗-衰”,并且从“痰、气、瘀、热”论治噎、吐;应用活血化瘀治癌痛;运用降气化痰、活血软坚治梗阻;以益气养血治衰竭,临床具有较强的实用性^[4]。曹志成^[6]认为食管癌发病与痰瘀交结、脾肾亏虚有关,在治疗方面,先察其标本虚实,抓住痰、瘀、虚这些主要病理因素,辨证分为四型治疗:痰湿内阻者,治宜健脾理气,燥湿化痰,以旋覆代赈汤加减;气滞血瘀者,治宜理气化痰,活血祛瘀,以通幽汤化裁;津亏血枯者,治宜养阴生津,补血润燥,以百合固金汤加减;晚期食管癌气虚阳微者治宜健脾益气,温阳散结,以补气温脾汤加减等。王永炎^[7]以病证结合的原理将食管癌的证候与临床分期相结合,创新性地将其分为早期的痰气交阻型,中期瘀血内结型,晚期津亏热结型及终末期的气虚阳微型,分别予启膈散以开郁化痰、润燥降气,通幽汤以破结行瘀、滋阴养血,五汁安中饮以滋养津液、泻热散结以及补气温脾汤或温肾右归丸以温补脾肾、益气回阳,这实为临床应用及预后判断提供了准则和指南。

2.2 专方专病 为便于观察疗效,总结经验,不少医家根据食管癌的基本病机制定专方专药或稍作加减治疗本病也取得一定疗效。如李勇等^[8]观察噎膈二号方(由生半夏、生姜、急性子、石见穿、代赈石、仙鹤草、莪术、水蛭、守宫粉等组成)治疗中晚期食管癌120例,结果,噎

膈方治疗组对吞咽梗阻有效率为85.3%,对癌性疼痛有效率为83.3%,与放化疗组相仿;对纳差消瘦的有效率达到82.7%,高于放化疗组的67.6%($P<0.05$);1、2、3年生存率分别为75%、62%、33%,高于放化疗组的70%、51%、21%($P<0.05$)。施兰英等^[9]运用星半通膈散(由半夏、胆南星、代赈石、蜂房、丹参、蟾皮等共研末,蜜调为丸)治疗痰瘀互结型中晚期食管癌20例,并与单纯5-氟尿嘧啶治疗20例对照观察,结果显示,治疗组治疗后在症状积分差值变化,控制食物反流、疼痛方面明显优于对照组($P<0.05$),治疗组血液流变学较治疗前有明显改善($P<0.05$)。上述研究均显示出了单/专方对食管癌的治疗有较高的应用价值。

3 中西医结合治疗

3.1 促进术后的康复及减少并发症 手术根治性切除是治疗食管癌最有效的方法,胃排空障碍、腹泻、肺部感染是食管术后常见并发症,严重影响患者术后恢复及生活质量。张保良^[10]在常规西医治疗基础上加自拟中药健脾开胃方(由吴茱萸、黄连、炙甘草、木香、大黄、党参、茯苓、半夏、陈皮、白芍、白术、蒲公英、瓦楞子组成),经胃管注入后闭管2 h以上,发现中西医结合治疗优于单纯西医治疗($P<0.05$)。陈明^[11]采用自拟香砂吴茱萸汤(由木香、砂仁、吴茱萸、党参、生姜、大枣组成,经胃管注入)治疗食管癌术后胃排空障碍30例,结果治疗组疗效优于对照组($P<0.05$)。王文龙^[12]观察使用补脾益肠丸联合双歧杆菌四联活菌片治疗食管癌术后腹泻患者20例,与单纯应用双歧杆菌四联活菌片治疗相比,治疗组总有效率为90.90%,对照组总有效率为77.80%($P<0.05$)。刘浩等^[13]观察应用痰热清注射液治疗老年食管癌术后急性呼吸窘迫综合征31例,结果显示治疗组在痰量和痰的性状方面较对照组均有显著改善。

3.2 对化疗及放疗的减毒增效作用 食管癌单药化疗的有效率低,缓解期短,现有多数化疗方案,都是由单药治疗食管癌有效的药物所组成,如顺铂、奈达铂、紫杉醇、伊立替康、5-氟尿嘧啶等。化疗所引起得骨髓抑制、呕吐、食欲低下等消化道反应,严重影响患者的生活质量。尽管集落刺激生长因子和有效的止吐剂问世以来情况已大有改善,但患者严重的食欲低下及疲乏感等相关症状依然存在。此时配合中药,往往

■研究前沿

祖国医学认为食管癌的发病是在全身正气虚弱的情况下,复因情志不遂、饮食不节而致痰凝、瘀血阻滞于食管而发。辨证论治是中医治疗食管癌的主要方法;中西医结合治疗提高了各期食管癌的治疗疗效。中医药抗食管癌作用机制可能为:对肿瘤细胞有抑制或杀灭作用;能显著提高机体细胞和体液免疫作用;具有诱导细胞凋亡;抗肿瘤血管生成以及抑制癌基因转录和表达的作用。

■相关报道

多项研究提示,中医药治疗对于食管癌患者术后恢复,配合放化疗的减毒增效以及改善食管癌患者症状,提高生活质量方面有确切疗效。

能改善症状,加快机体恢复。刘怀民等^[14]应用华蟾素注射液配合NP方案化疗治疗中晚期食管癌35例,结果显示治疗组和对照组的有效率分别为62.8%、48.5%($P<0.01$),生存质量的改善程度也具有显著性差异($P<0.01$),治疗组的不良反应发生率低于对照组。

同样,放射治疗也是食管癌非手术治疗的主要手段,中医认为,放射线属热毒邪,能伤阴耗气,在食管癌原有的病因病机基础上,经放疗后原有病机则转化为毒热内炽,极易伤津耗液,甚至导致血脉运行不畅,瘀血内停。放射性肺炎、食管炎、骨髓抑制、消化道反应等是食管癌放疗常见的不良反应。研究表明中医药配合放疗有增效、解毒作用。陈俊强等^[15]选择淋巴结阳性胸段食管癌术后中医辨证气虚、血虚、气血两虚证患者60例,随机分为试验组和对照组,每组30例。试验组进行放化疗,并给予八珍颗粒,对照组只进行放化疗,结果显示试验组可明显降低中性粒细胞减少的发生率,提高机体免疫,改善中医证候及生活质量。何丽佳等^[16]观察鸦胆子油乳注射液联合放射治疗对中晚期食管癌的疗效,结果在总有效率、生存质量相关评价、常见的放疗不良反应如恶心呕吐、白细胞下降、放射性食管炎等方面均显示出了较好的效果。王良花等^[17]选择100例行放射治疗的胸部肿瘤(肺癌、食管癌)患者,在放疗同时服用遵循中医学益气养阴理论拟定的放肺I号方,与100例单纯放疗患者相比较,结果表明急性放射性肺炎与严重急性放射性肺炎总发生率与对照组相比均有统计学意义($P<0.05$)。

3.3 配合介入疗法,提高生活质量 动脉灌注化疗可以大大提高肿瘤内的药物浓度,较全身化疗疗效明显提高并且不良反应少,已得到广泛认同。崔晓蕾等^[18]应用复方苦参注射液联合动脉灌注化疗治疗食管癌23例,结果显示,治疗组和对照组有效率分别为78.3%、56.5%,平均TTP分别为11、8 mo;治疗组KPS评分优于对照组;治疗组消化道反应、发热等不良反应较对照组明显减轻,均有统计学意义($P<0.05$)。对于高危、高龄、不能或不宜手术治疗且又恐惧放疗和化疗者,内镜介入治疗不失为一种最佳选择。赵巧梅等^[19]自拟扶正消瘤汤(由人参、黄芪、白术、半夏、枸杞子、女贞子、半枝莲、重楼、莪术等组成)配合支架植入治疗晚期食管癌61例,与单纯放疗相比,结果显示治疗组能够快速改善临床症状,提高患者的生存质量,延长生存期。

4 中医药治疗食管癌的机制研究

随着中医药在食管癌治疗中的广泛应用,中医药抗食管癌作用机制研究也有较大进展,研究证实,中药复方、单药或由此制成的新制剂,对肿瘤细胞有抑制或杀灭作用,能显著提高机体细胞和体液免疫作用,具有诱导细胞凋亡,抗肿瘤血管生成以及抑制癌基因转录和表达的作用。

4.1 提高机体免疫功能 肿瘤的发生和发展与整个机体的免疫功能衰退密切相关,肿瘤一旦发生又会反过来加深对机体免疫功能的抑制,助长肿瘤的发展。此外,放疗、化疗也会降低患者自身的免疫功能。因此,提高肿瘤患者的免疫功能已成为肿瘤防治工作中的重要一环。陈德轩等^[20]等通过食管癌术后应用艾迪注射液后监测血浆sCD44s水平,发现艾迪注射液可提高机体红细胞免疫功能,食管癌患者红细胞C3b受体(CR1)活性下降,黏附肿瘤细胞能力下降,红细胞免疫功能受抑制,艾迪注射液可增强红细胞CR1活性,有效清除肿瘤细胞抗原与血中抗体形成的循环免疫复合物(CIC)。张东兴^[21]采用化痰除湿方(由党参、黄芪、当归、川芎、苍术、厚朴、苏梗、冬凌草、瓜蒌、壁虎等组成)配合FP方案(奈达铂联合5-氟尿嘧啶)化疗治疗中晚期食管癌24例,结果显示治疗组细胞免疫($CD3^+$ 、 $CD4^+$ 、 $CD4^+/CD8^+$ 、 $CD16^+$ 、 $CD56^+$)指标较治疗前均有明显改善($P<0.05$),而对照组较治疗前降低,两组比较差异显著($P<0.05$)。

4.2 诱导肿瘤细胞凋亡 当诱导凋亡的基因失活突变或抑制凋亡的基因过度表达,肿瘤细胞便通过某种途径逃避凋亡,发生转移。有学者研究用中药诱导肿瘤细胞凋亡,从而达到治疗肿瘤生长和转移目的。国宏莉等^[22]观察藤梨根正丁醇提取物可通过下调Bcl-2表达,激活Caspase-9、Caspase-3诱导Eca-109细胞凋亡。颜晰等^[23]发现清热解毒中药连翘的提取物有较广泛的抗肿瘤作用,其根醇提取物(FSEER)对食管癌TE-3细胞有明显的增殖抑制作用($P<0.05$),经FSEER作用后的TE-3细胞显示典型的凋亡形态变化,与对照组相比凋亡率明显增高($P<0.05$),PARP蛋白出现了裂解片段的表达,且呈现一定的剂量和时间依赖性。姜黄素也可以通过Caspase-3这一经典途径诱导细胞凋亡,并下调Cyclin D1的表达;进一步研究发现姜黄素可以抑制Notch-1活化,从而导致 γ -secretase蛋白复合物如Presenilin1和Nicastrin下调,姜黄素还可以下调Jagged-1和其下游靶HES-1表达,从而显著抑制食管癌细胞系

增殖^[24].

4.3 抗肿瘤血管生成 肿瘤的生长依赖血管供应的氧和营养物质的支持,同时血管内皮细胞分泌多种生长因子促进肿瘤细胞增殖,肿瘤血管生成是肿瘤转移的重要环节.因此,抑制肿瘤血管生成已成为治疗肿瘤的重要策略. Liu等^[25]研究发现干壁虎体外可抑制EC9706和食管癌EC1细胞系的生长,体内可抑制小鼠肉瘤S180生长,对免疫系统无影响;可降低肿瘤组织VEGF、bFGF蛋白的表达,抑制肿瘤血管生成. 司富春^[26]研究发现启膈散及其拆方能够抑制肿瘤血管生成,其作用机制与抑制EGFR、PDGFR、VEGF及PLC- γ 1蛋白表达相关.

4.4 调控细胞信号转导通路分子 绝大多数的癌基因表达产物都是细胞信号转导系统的组成成分,他们可以从多个环节干扰细胞信号转导过程,导致肿瘤细胞增殖分化异常.在基因表达调控过程中核转录因子起着启动和关闭的作用,其中的NF- κ B是核转录因子中关键性因子.田芳等^[27]实验研究发现姜黄素可以通过抑制pI κ B α 的磷酸化阻断NF- κ B信号通路,促进食管癌细胞凋亡,从而抑制食管癌细胞的增殖. Wnt/ β -catenin信号转导通路是细胞发育和生长调节的关键途径, β -catenin是Wnt/ β -catenin信号转导通路的中枢成分, Cyclin D1和Survivin为下游基因. 刘晓霞等^[28]证实香加皮单体成分宝藿苷-I能下调人食管癌细胞Eca-109 Wnt/ β -catenin信号转导通路中 β -catenin、CyclinD1、Survivin mRNA及其蛋白表达. PLC- γ 1是多种细胞生长因子信号传导的细胞内效应分子,在生长因子信号通路中起着重要作用^[29]. 贾永森等^[30]实验研究噎膈证方对人表皮生长因子刺激的食管癌EC9706细胞生长信号转导的影响,结果显示除补气运脾汤外,噎膈证方启膈散(Q)、沙参麦冬汤(S)、通幽汤(T)均可抑制hEGF刺激的EC9706细胞的生长;可抑制PLC- γ 1信号通路相关蛋白EGFR、PLC- γ 1、P-tyr、PKC α 及MARCKS蛋白表达,抑制作用强度: T>Q>S.

5 结论

随着临床观察及实验研究的深入,中医药在食管癌的治疗上取得了一定的疗效.但是由于食管癌早期症状不明显,就诊时大部分患者已处于中晚期,故其总生存期并不令人满意;目前的中医药治疗食管癌的临床研究尚缺乏大样本的系统性观察,更缺乏多学科、多中心、随机开

放的协作且缺少对照,大多数临床研究缺少可比性和说服力,循证医学证据级别较低.

尽管已经发现许多中药单体或复方对食管癌有一定的效果,但缺乏特异性,若单独赖其发挥治疗食管癌的作用尚有难度.总体而言,中医药在食管癌的治疗中仍是起辅助性治疗作用,如对围手术期的加速康复及减少并发症,对放化疗及介入的减毒增效,对晚期食管癌患者生活质量的改善.

如前所述,某些中药具有诱导食管癌细胞凋亡,抗肿瘤血管生成及调控细胞信号转导通路分子的作用,但因中药内的多组份,其确切的作用靶点或网络机制研究得尚不够深入,不够系统,一些实验研究的结果尚不能在临床上复制.因此,早期发现、早期诊断、早期治疗仍是提高食管癌治愈率和改善预后的有效手段,而早期发现又是其中关键所在.制定严格的诊疗及疗效标准,进行严密的临床观察,充分发挥中西医各自的优势,才能提高临床疗效.同时深究机制,探求病本,加强实验研究,筛选出有效的药物,明确其作用机制,探求最佳的治疗方案,可能会收到更理想的临床效果.

6 参考文献

- 1 郑荣寿, 张思维, 吴良有, 李光琳, 赵平, 赫捷, 陈万青. 中国肿瘤登记地区2008年恶性肿瘤发病和死亡分析. 中国肿瘤 2012; 21: 1-12
- 2 孙燕. 临床肿瘤学高级教程. 北京: 人民军医出版社, 2011: 475
- 3 Pöttgen C, Stuschke M. Radiotherapy versus surgery within multimodality protocols for esophageal cancer--a meta-analysis of the randomized trials. Cancer Treat Rev 2012; 38: 599-604
- 4 崔慧娟, 张培宇. 张代钊治疗食管癌经验. 中医杂志 2011; 52: 821-823
- 5 陈玉龙, 司富春. 中医药治疗食道癌方药分析. 时珍国医国药 2008; 19: 401-402
- 6 曹志成. 中西医理论治疗食管癌进展. 世界华人消化杂志 2006; 14: 709-713
- 7 王永炎. 中医内科学. 上海: 上海科学技术出版社, 1997: 192
- 8 李勇, 杨雪飞, 丁纪元, 黄维娜, 黄伶. 噎膈二号方治疗中晚期食管癌临床疗效观察. 肿瘤学杂志 2012; 18: 397-398
- 9 施兰英, 张美云, 严容, 刘华东. 星半通膈散治疗痰瘀互结型中晚期食管癌20例. 江西中医药 2008; 39: 29-30
- 10 张保良. 食管癌、贲门癌术后胃瘫综合征中西医结合治疗临床观察. 河北医药 2010; 32: 3571-3572
- 11 陈明. 自拟香砂吴茱萸汤治疗食管癌术后胃排空障碍30例. 浙江中医杂志 2011; 44: 330
- 12 王文龙. 中西医治疗食管癌术后腹泻22例. 亚太传统医药 2011; 7: 86-87
- 13 刘浩, 太祥, 洪志鹏. 痰热清注射液治疗老年食管癌术后急性呼吸窘迫综合征31例. 中国中医急症 2011; 20: 132-133

■创新盘点

收集筛选了近5年来来自国内外关于食管癌中医药治疗及中西医结合治疗的相关文献,从病因病机认识、中医药治疗、中西医结合疗效评价、中医药治病机制研究等方面阐述目前食管癌治疗与研究

■同行评价

本文从病因病机认识、中医药治疗、中西医结合疗效评价、中医药治病机制研究等方面总结食管癌的中西医结合进展,有一定的临床与实验指导意义。

- 14 刘怀民, 郑玉玲, 刘晓莉, 杨旭初. 华蟾素联合化疗治疗中晚期食管癌. 中国实验方剂学杂志 2011; 17: 235-237
- 15 陈俊强, 刘健, 钟连花, 陈明强, 朱坤寿, 孔祥泉. 食管癌术后放化疗联合中药八珍颗粒的临床观察. 中医杂志 2010; 23: 405-407
- 16 何丽佳, 罗惠群, 向莉. 鸦胆子油乳注射液联合放疗治疗中晚期食管癌. 中国实验方剂学杂志 2010; 16: 212-214
- 17 王良花, 戴安伟, 邢玉刚. 益气养阴法预防急性放射性肺炎疗效观察. 新中医 2012; 8: 77-78
- 18 崔晓蕾, 张扶莉, 靳建旭. 复方苦参注射液联合动脉灌注化疗治疗食管癌23例疗效观察. 河北中医 2011; 33: 869-870
- 19 赵巧梅, 郝宋喜, 江中太. 扶正消瘤汤配合支架植入治疗晚期食管癌的临床观察. 现代消化及介入诊疗 2009; 14: 191-193
- 20 陈德轩, 肇毅, 姜宏, 潘立群. 艾迪注射液对食管癌术后血浆sCD44s水平影响的临床研究. 中医药导报 2006; 12: 6-7
- 21 张东兴. 化痰除湿方对中晚期食管癌患者免疫功能的影响. 中国中医药科技 2011; 18: 337-338
- 22 国宏莉, 李江华, 李斌, 度长海, 张丽. 藤梨根诱导人食管癌Eca-109细胞凋亡的调节机制. 实用癌症杂志 2011; 26: 120-123
- 23 颜晰, 赵连梅, 孙佳玮, 单保恩. 连翘提取物体外抗肿瘤活性的初步研究. 癌变·畸变·突变 2012; 24: 20-25
- 24 Subramaniam D, Ponnurangam S, Ramamoorthy P, Standing D, Battaferano RJ, Anant S, Sharma P. Curcumin induces cell death in esophageal cancer cells through modulating Notch signaling. *PLoS One* 2012; 7: e30590
- 25 Liu F, Wang JG, Wang SY, Li Y, Wu YP, Xi SM. Antitumor effect and mechanism of Gecko on human esophageal carcinoma cell lines in vitro and xenografted sarcoma 180 in Kunming mice. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 3990-3996
- 26 司富春. 启膈散及其拆方对人食管癌Eca109细胞裸鼠移植瘤血管生成的抑制作用. 世界华人消化杂志 2008; 16: 3139-3145
- 27 田芳, 宋敏. 姜黄素阻断NF- κ B信号通路促进食管癌鳞癌细胞凋亡的体外研究. 中国癌症 2008; 27: 566-570
- 28 刘晓霞, 张永泽, 李振红, 李菊梅, 陈剑华, 单保恩. 宝藿苈-I 对人食管癌细胞Eca-109 Wnt/ β -catenin信号转导通路的影响. 中草药 2011; 42: 124-126
- 29 闰智勇, 张天娥, 彭佳, 张占平, 秦晋之, 陈畅. 蜘蛛香对焦虑模型大鼠行为学及脑组织神经递质含量的影响. 中药药理与临床 2008; 24: 67-69
- 30 贾永森, 王媛媛, 司富春. 噎膈证方对人表皮生长因子刺激的食管癌EC9706细胞生长信号转导的影响. 中国实验方剂学杂志 2010; 16: 100-103

编辑 李军亮 电编 闫晋利

三种消化道重建方式治疗胃癌合并2型糖尿病的研究进展

裴明毓, 王震, 陈俊强

裴明毓, 王震, 陈俊强, 广西医科大学第一附属医院胃肠腺体外科 广西壮族自治区南宁市 530021

裴明毓, 在读硕士, 主要从事胃肠腺体疾病方面的研究.

广西自然科学基金资助项目, No. 桂科自0832113

广西医疗卫生重点科研课题基金资助项目, No. 重2012067

广西教育厅科研基金资助项目, No. 桂教201012MS062

作者贡献分布: 本文综述由裴明毓完成; 王震与陈俊强修改; 陈俊强负责审校.

通讯作者: 陈俊强, 教授, 主任医师, 530021, 广西壮族自治区南宁市青秀区双拥路22号, 广西医科大学第一附属医院胃肠腺体外科. gxmufh@163.com

电话: 0771-5351990

收稿日期: 2012-10-05 修回日期: 2012-11-15

接受日期: 2012-12-03 在线出版日期: 2012-12-18

Advances in three digestive tract reconstruction methods for gastric cancer patients with DM2

Ming-Yu Pei, Zhen Wang, Jun-Qiang Chen

Ming-Yu Pei, Zhen Wang, Jun-Qiang Chen, Department of Gastrointestinal Surgery, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Supported by: Natural Science Foundation of Guangxi, No. 0832113; the Key Research Project of Guangxi Health Bureau, No. 2012067; and the Research Project of Guangxi Education Department, No. 201012MS062

Correspondence to: Jun-Qiang Chen, Professor, Chief Physician, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, 22 Shuangyong Road, Qingxiu District, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. gxmufh@163.com

Received: 2012-10-05 Revised: 2012-11-15

Accepted: 2012-12-03 Published online: 2012-12-18

Abstract

Until now, there is no efficient and standard surgery available for gastric cancer (GC) patients with type 2 diabetes mellitus (DM2). In recent years, new progress has been achieved in research of three digestive tract reconstruction methods (BI, BII, and Roux-en-Y) after radical gastrectomy for GC patients with DM2 in terms of possible mechanisms, efficacy evaluation, and postoperative complications. Roux-en-Y should be the preferred reconstruction method for GC patients with DM2 who received radical gastrectomy, and esophagojejunum end-to-side (Roux-en-Y) anastomosis is the best choice. However, most of the existing stud-

ies are retrospective, and randomized controlled trials are lacking. To further assess the clinical efficiency of the three digestive tract reconstruction methods for GC patients with DM2, randomized controlled trials should be conducted in future.

Key Words: Gastric cancer; Type 2 diabetes mellitus; Digestive tract reconstruction; BI; BII; Roux-en-Y

Pei MY, Wang Z, Chen JQ. Advances in three digestive tract reconstruction methods for gastric cancer patients with DM2. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(35): 3515-3520

摘要

目前胃癌合并2型糖尿病患者的手术治疗在国内外尚缺乏有效、规范的治疗方案. 近几年国内外研究在不同的消化道重建方式治疗胃癌合并2型糖尿病患者的可能机制, 疗效, 术后并发症情况等有了新发现. 据此, 我们对胃癌根治术后3种常见的消化道重建方式(毕I、毕II及Roux-en-Y吻合术)治疗胃癌合并2型糖尿病患者的可能机制, 术后血糖控制效果, 术后并发症情况等进行了探讨. 结合当前研究结果, 我们认为胃癌合并2型糖尿病的患者行胃癌根治性胃切除术, Roux-en-Y式吻合应为首选的消化道重建方式, 其中以Roux-en-Y食管空肠端侧吻合为最佳术式. 然现有的研究多为回顾性病例分析, 缺乏临床随机对照研究的支持. 因此, 开展前瞻性临床随机对照研究以进一步验证上述3种重建方式治疗2型糖尿病的疗效, 是我们今后努力的方向.

关键词: 胃癌; 2型糖尿病; 消化道重建; 毕I式; 毕II式; Roux-en-Y式

裴明毓, 王震, 陈俊强. 三种消化道重建方式治疗胃癌合并2型糖尿病的研究进展. *世界华人消化杂志* 2012; 20(35): 3515-3520

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3515.asp>

0 引言

胃癌是世界范围内最常见的恶性肿瘤之一, 占所有恶性肿瘤死亡病例的10%, 位居癌症死因的第2位, 超过70%的新发和死亡病例发生在发展

■背景资料

近来胃癌及糖尿病发病率均呈上升趋势, 临床上胃癌合并2型糖尿病的患者也不少见. 目前胃癌合并2型糖尿病患者的手术治疗在国内外尚缺乏有效、规范的治疗方案. 最近国内外研究在不同的消化道重建方式治疗胃癌合并2型糖尿病患者的可能机制、疗效及术后并发症情况等方面有了新的进展.

■同行评议者

刘宝林, 教授, 中国医科大学附属盛京医院

■ 研发前沿

结合近年来国内外的研究,我们对胃癌根治术后3种常见的消化道重建方式治疗胃癌合并2型糖尿病患者的可能机制,术后血糖控制效果,术后并发症情况等进行了探讨。根据研究结果,我们认为胃癌合并2型糖尿病的患者行胃癌根治性胃切除术后,Roux-en-Y式吻合应为首选的消化道重建方式,但目前尚缺乏临床随机对照研究的支持。开展临床随机对照研究以进一步验证上述3种重建方式治疗2型糖尿病的疗效,是我们今后努力的方向。

中国,以东亚的日本、韩国以及中国的发病率为最高^[1,2]。与此同时,全世界糖尿病患者数量呈现逐年增多趋势,其中2型糖尿病占糖尿病总数的95%左右^[3]。国际糖尿病联盟数据显示,2011年全世界糖尿病患者数已达3.66亿,较2009年的2.85亿增加近30%^[4]。2007年在我国20岁以上的人群中,总体糖尿病患病率为9.7%^[5],未来10年因糖尿病而死亡的人数会增加50.0%^[6,7]。近年来,我国胃癌和糖尿病的发病率均呈上升趋势,临床上胃癌合并2型糖尿病的患者也不少见,两种疾病同时存在,在很大程度上影响了患者的疗效及预后。然而,目前胃癌合并2型糖尿病患者的手术治疗在国内外尚缺乏有效、规范的方案。近来研究发现,胃癌合并2型糖尿病患者在行根治性胃切除术后,不同的消化道重建方式对患者术后血糖的影响差异显著,部分患者术后糖尿病甚至获得治愈^[8-11]。这提示术后消化道重建方式的选择对合并2型糖尿病的胃癌患者至关重要,如果手术方式选择恰当,可以达到“一箭双雕”的目的,既可手术治愈胃癌,又可治愈糖尿病。为此,我们对胃癌根治术后3种常见的消化道重建方式(毕I、毕II及Roux-en-Y吻合术)对胃癌合并2型糖尿病患者术后血糖控制影响的研究进展进行了探讨。

1 消化道重建治疗2型糖尿病的历史沿革

胃癌根治术后消化道重建能控制胃癌合并2型糖尿病患者的血糖,这一治疗理念,于21世纪初源于减肥手术中胃肠转流术能有效治疗2型糖尿病。胃肠转流手术治疗2型糖尿病是一种已被认可的外科治疗方法,其对2型糖尿病治愈率达82%-98%^[12,13]。胃癌根治术后消化道重建同样引起食物通过消化道的改变,类似于胃转流手术,理论上胃癌根治术后消化道重建应同样具有治疗2型糖尿病的效果。那么,临床上的治疗效果是否真正如此呢?近年来,学者们对3种常用的消化道重建方式毕I、毕II及Roux-en-Y吻合术在胃癌合并2型糖尿病患者的血糖控制效果进行了研究并取得了初步的成果。2008年,禹凤普与李守森等^[14,15]均发现合并2型糖尿病的胃癌患者,毕II吻合术及Roux-en-Y吻合术对患者血糖控制效果显著优于毕I吻合术。2009年,何苗等^[16]对46例胃癌合并2型糖尿病患者术后血糖控制情况进行研究,结果显示,毕I、毕II、Roux-en-Y吻合术的有效率分别为24%、69%和77%。从此,胃癌合并2型糖尿病患者选用不同的消化道重建方式获得不同的血糖控制效果的事实逐渐受

到广大学者的关注,后续也相继出现了许多相关的研究报道^[17-20]。总体而言,目前研究认为,在有效控制血糖方面,毕II、Roux-en-Y吻合术显著优于毕I吻合术。

2 胃切除术后消化道重建治疗2型糖尿病的机制

目前国内外对于消化道重建术能有效治疗2型糖尿病的机制尚无定论,如下几种机制最为广大学者认可。

2.1 进食量减少及体质量下降 胃癌根治性胃切除术后消化道重建引起代胃容量减小,患者摄食量受限,继而出现体质量下降。有研究认为,体质量下降可以引起肌肉内胰岛素受体表达增加和脂连素水平升高,从而降低高血糖对胰岛β细胞的糖毒性与脂毒性,降低胰岛素抵抗,改善β细胞功能,糖尿病的控制是体质量减轻后的继发作用^[21]。然而,也有研究认为,消化道重建术后患者摄食受限、体质量下降与合并2型糖尿病患者血糖恢复无关^[22,23]。临床研究结果也表明,毕I、毕II及Roux-en-Y吻合术这3种术式对于胃癌合并2型糖尿病患者的术后血糖的影响差异有显著性。由此可见,胃癌根治性胃切除消化道重建术后对2型糖尿病的控制与患者进食量减少及体质量下降关系不大。

2.2 肠-胰岛轴神经内分泌学说 这是被国内外多数学者认可的机制。肠道在食物特别是碳水化合物刺激下通过内分泌传递作用促使胰岛素释放,这种胃肠激素与胰岛素分泌之间的关系称为“肠-胰岛轴”。Rubino等^[22]认为在肠道中同时存在产生肠促胰岛素与抗-肠促胰岛素的部位,前者主要分布在远端小肠,即远端空肠及回肠,能促使胰岛素分泌并增加胰岛素反应,后者主要分布在近端小肠,即十二指肠与近端空肠,能对抗胰岛素活性形成胰岛素抵抗。正常生理情况下,食物通过消化道过程中,产生的促胰岛素激素及抗-肠胰岛素激素通过相互协调、相互作用从而维持进食前后血糖水平的平稳,而这种平衡一旦被破坏,则会出现血糖的改变。此外,Pories等^[24]认为2型糖尿病是由于在近端小肠过多地产生了某些激素拮抗胰岛素的活性,导致胰岛素抵抗,从而引起糖耐量下降及血糖升高;而在远端小肠,又产生了某些激素,增强了胰岛素的作用,达到降低血糖的作用,使血糖恢复正常。目前已经证实,降血糖作用的激素包括胰高血糖素样肽和抑胃肽,其他相关激素如肽YY、瘦素、脂连素和胰岛素样生长因子-1等^[25]均参与

其作用中^[26,27]。在胃癌根治性胃切除行毕Ⅱ、Roux-en-Y吻合术后患者,食物过早到达远端空肠,使近端小肠分泌激素减少,降低了胰岛素抵抗,同时远端小肠分泌激素增加,增加了胰岛素敏感性,促进胰岛素分泌,增强胰岛素的作用,从而有效控制血糖。

2.3 脂肪-胰岛素轴学说 有学者认为2型糖尿病患者血糖的变化与脂肪组织通过释放脂肪因子参与调节葡萄糖与胰岛素的代谢相关,这种关系称为“脂肪-胰岛轴”^[16,28]。已知的脂肪因子有瘦素、脂联素和抵抗素。瘦素产生于脂肪细胞,其血浆浓度与脂肪储存量成正比。目前已经证实胰岛β细胞上有瘦素受体。正常状态下,脂肪瘦素分泌的增加,抑制了胰岛素的分泌,减少脂肪的同化作用,从而减少脂肪的储存。病理状态下,某些原因使瘦素敏感性下降,使其对胰岛素分泌的抑制作用减轻,正常的脂肪-胰岛轴的反馈机制被破坏,高胰岛素血症随之出现。瘦素水平升高,则可加剧胰岛素抵抗。孙晓芳等^[29]研究发现空腹血浆瘦素在术后能起到降糖作用,由于胃癌根治性胃切除行毕Ⅱ、Roux-en-Y吻合术后患者体质量显著性降低,瘦素水平随之降低,可引起肌肉内胰岛素受体表达及胰岛素敏感性的增加,从而达到缓解2型糖尿病的作用。

2.4 其他可能机制 有学者认为2型糖尿病血糖升高的机制是由于十二指肠、近端空肠在食物刺激下产生过多的促炎性细胞因子,引起下丘脑-垂体-肾上腺轴产生促肾上腺皮质激素,使促肾上腺皮质激素水平升高所致。消化道重建手术后,食物经过通道发生改变,未经过近端小肠就直接进入远端小肠,解除了促炎性细胞因子对下丘脑-垂体-肾上腺轴的刺激,使促肾上腺皮质激素水平下降,从而影响术后血糖的恢复^[30]。胃切除行毕Ⅱ及Roux-en-Y吻合术式后,食物经过十二指肠与空肠通道发生改变,从而引起下丘脑-垂体-肾上腺轴分泌激素水平的改变,促使血糖恢复正常。而毕Ⅰ吻合术式未发生食物转流,故未能显著改善胃癌合并2型糖尿病患者的术后血糖。

3 胃癌根治术后常见的三种消化道重建方式在治疗2型糖尿病方面的优势与局限性

3.1 毕Ⅰ式吻合 理论上,毕Ⅰ式吻合方法简单,符合生理要求,有利于食物的消化和吸收,患者术后营养状况及生活质量理应高于食物不经过十二指肠的吻合方式。传统的毕Ⅰ式吻合中,患

者术后出现残胃食道反流性炎症的发生率约25%-35%不等^[31]。Fukuhara等^[32]对92例施行了根治性远端胃切除毕Ⅰ式吻合术的胃癌患者进行了研究,有24%的发生率患者有明显反流不适症状,诸如心前区灼痛、恶心、反胃等不适。此外,Montesani等^[33]发现胃切除毕Ⅰ式吻合术后,患者出现反流性残胃食道炎的发生率为33%,残胃黏膜活检正常率仅为40%,慢性浅表性残胃炎的发生率为60%。然而,对于合并2型糖尿病的胃癌患者,很多学者的研究显示,在胃癌根治术后行毕Ⅰ式吻合未能显著改善患者的血糖。李川等^[34]研究结果显示,与术前相比,行毕Ⅰ式吻合术的胃癌患者术后2 wk及半年的血糖无显著差异。黄三雄等^[17]对行胃癌根治术毕Ⅰ吻合术式术后随访9 mo,患者空腹血糖与术前比较差异无统计学意义。朱胜利等^[18]也获得类似结果。据此,合并2型糖尿病的胃癌患者行胃癌根治胃切除毕Ⅰ式吻合术,可能由于患者的血糖没能有效改善,增加患者术后并发症的发生率,从而影响患者术后的恢复、生活质量和生存率。

3.2 毕Ⅱ式吻合 据目前的研究,胃癌根治性胃切除毕Ⅱ式吻合对胃癌合并2型糖尿病的患者有惊人的疗效,患者术后血糖下降甚至恢复正常。李磊等^[8]发现胃癌根治性胃切除毕Ⅱ式吻合对胃癌合并2型糖尿病的患者糖代谢产生了积极的影响,改善甚至治愈患者的糖尿病。张永成等^[35]对46例胃癌合并2型糖尿病的患者行胃癌根治性胃切除毕Ⅱ式吻合术后随访半年,患者术后近期血糖升高、胰岛素用量加大,1 mo后患者空腹血糖和餐后血糖基本回复术前水平,3 mo和6 mo空腹和餐后血糖均明显下降($P<0.05$),以餐后血糖下降最为显著。郑羽等^[36]研究显示,胃癌合并2型糖尿病的患者术前空腹血糖($10.54 \text{ mmol/L} \pm 1.68 \text{ mmol/L}$)升高,胃癌根治毕Ⅱ式吻合术后1 wk患者的空腹血糖($8.17 \text{ mmol/L} \pm 1.12 \text{ mmol/L}$, $P<0.05$)有所改善,术后1 mo患者空腹血糖($6.58 \text{ mmol/L} \pm 0.56 \text{ mmol/L}$, $P<0.05$)改善更为显著。均表现为患者术后远期血糖缓解较为明显,可能与患者内分泌反馈机制变化促使远期的胰岛素敏感指数上升及血糖的变化相关^[37]。然而,因胃肠道生理紊乱,患者术后的并发症较多,其中以吻合口瘘多见^[38]。朱正纲等^[31]研究显示,传统的毕Ⅱ式吻合术,患者术后出现残胃食道反流性炎症的发生率约25%-35%不等,与毕Ⅰ式吻合的发生率相当。Fukuhara等^[32]发现胃癌根治性胃切除毕Ⅱ式吻合术后,有41%的患者出现

■ 相关报道

目前研究认为胃癌根治术后消化道重建治疗2型糖尿病的主要机制有:进食量减少及体质量下降、肠-胰岛轴神经内分泌学说及脂肪-胰岛素轴学说。从临床疗效考虑,Roux-en-Y式吻合应为胃癌合并2型糖尿病患者行根治术后首选的消化道重建方式,其中以Roux-en-Y食管空肠端侧吻合为最佳术式。

■创新盘点

本文对胃癌根治术后3种常见的消化道重建方式治疗胃癌合并2型糖尿病患者的可能机制、术后血糖控制效果、术后并发症情况等方面进行了综合探讨,并根据现有的研究结果,得出“Roux-en-Y式吻合应为胃癌合并2型糖尿病患者行根治术后首选的消化道重建方式”这一结论,为临床医师提供一定的参考。

明显反流不适症状。此外, Montesani等^[33]发现胃切除毕Ⅱ式吻合术后,患者反流性残胃食管炎的发生率为47%,残胃黏膜活检正常率仅为33%,慢性浅表性残胃炎的发生率为27%。结果显示,胃切除毕Ⅱ式吻合术后的并发症发生率高于毕Ⅰ式吻合术。据此,胃癌根治性胃切除毕Ⅱ式吻合术能显著改善胃癌合并2型糖尿病患者的术后血糖,但有可能增加患者术后部分并发症的发生率。

3.3 Roux-en-Y式吻合 目前已证实Roux-en-Y式胃肠转流术能有效治疗2型糖尿病^[39-41],而胃癌根治性胃切除Roux-en-Y式吻合术与Roux-en-Y胃肠转流术的区别在于前者切除了远端胃大部分或全胃。同时国内外文献报道均未有提及远端胃对胰岛素的调节有重要作用。国内很多学者研究显示,胃癌合并2型糖尿病的患者行胃癌根治性胃切除Roux-en-Y式吻合能显著改善术后的血糖^[42],有效率达73.6%-87.5%^[17,34,43,44],这与毕Ⅱ式吻合术无显著差异。Kim等^[45]发现,与其他吻合术式相比,全胃切除术后食管空肠吻合可使2型糖尿病患者的体质量指数显著下降,同时也使糖尿病得到显著缓解。Lanzarini等^[46]对23例2型糖尿病患者行胃切除Roux-en-Y式吻合术,患者术前空腹平均血糖为8.41 mmol/L,术后有15例患者(65.2%)空腹血糖<7 mmol/L,且不需口服药或胰岛素控制血糖,有7例患者(30.4%)仅用口服药而不用胰岛素便可很好控制术后血糖,患者术后2型糖尿病的总体缓解率为95.6%。此外,该种术式能较好地预防胆汁、胰液返流,降低了返流性食管炎的发生^[47]。Fukuhara等^[32]发现运用胃癌根治性胃切除Roux-en-Y式吻合术后,只有17%的患者出现明显反流不适症状,餐后发生倾倒综合征症状基本消失,而毕Ⅰ、毕Ⅱ式吻合出现倾倒综合征的发生率分别为17%、24%。Montesani等^[33]发现胃切除Roux-en-Y式吻合术后,患者发生反流性残胃食管炎发生率仅为13%,残胃黏膜活检正常率高达80%,发生慢性浅表性残胃炎发生率为20%。Roux-en-Y式吻合降低了患者术后并发症的发生率,显著减少胃酸反流症状和返流性胃炎和食管炎,且患者的生活质量相比于毕Ⅰ、毕Ⅱ式吻合有明显改善^[48]。该吻合术式的缺点是若不同时切断迷走神经,易引起吻合口溃疡^[47]。有文献显示,全胃切除食管空肠端端吻合术后有16%的患者可发生吻合口瘘,而食管空肠端侧吻合术后吻合口瘘的发生率仅4%^[38]。Lee等^[49]研究显示,行胃肠

转流术(毕Ⅱ、Roux-en-Y式吻合术)的胃癌合并2型糖尿病患者术后血糖的缓解率显著高于毕Ⅰ式吻合术(67.2% vs 49.5%, $P<0.022$),其中胃癌根治性全胃切除食管空肠Roux-en-Y式吻合术相对远端胃切除术更能显著改善患者的术后血糖(50.0% vs 17.3%, $P<0.002$)。陈开运等^[50]研究显示胃大部分切除术后患者血糖控制及糖化血红蛋白的恢复速度,以Roux-en-Y吻合重建手术效果较毕Ⅱ式吻合重建更为显著。据此,胃癌合并2型糖尿病患者行胃癌根治性胃切除毕Ⅱ、Roux-en-Y式吻合术均能显著改善术后的血糖,但考虑到患者术后并发症的发生率和术后恢复情况,Roux-en-Y式吻合术优于毕Ⅱ式吻合术,其中以Roux-en-Y食管空肠端侧吻合术对患者的疗效最为显著。

4 结论

胃癌是我国最常见的恶性肿瘤之一,其病死率居恶性肿瘤首位。2型糖尿病患者的发病率逐年升高,胃癌合并2型糖尿病的患者也在逐年增加。胃旁路术可维持2型糖尿病患者的血糖及胰岛素的浓度水平,恢复胰岛素敏感性,控制糖耐量减退,降低糖尿病的死亡率^[51],可使糖尿病患者病死率下降92%^[52]。结合近年来学者们的研究作综合分析,我们认为:胃癌合并2型糖尿病的患者行胃癌根治性胃切除术,Roux-en-Y式吻合应为首选的消化道重建方式,其中以Roux-en-Y食管空肠端侧吻合为最佳术式。胃肠转流术已被认为是治疗肥胖症合并2型糖尿病的金标准^[53],然而胃癌根治性胃切除Roux-en-Y食管空肠端侧吻合术可否成为治疗胃癌合并2型糖尿病的金标准?因目前国内外的研究大多为回顾性病例分析,缺乏临床随机对照研究的支持,尚无定论。此外,以上3种重建方式治疗2型糖尿病的机制目前亦不明确。因此,开展前瞻性临床随机对照研究以进一步验证上述3种胃肠转流重建方式治疗2型糖尿病的疗效,同时进行上述3种重建方式治疗2型糖尿病机制方面的探讨,是我们今后努力的方向。

5 参考文献

- 1 Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011; 61: 69-90
- 2 吴开春, 陈瑜. 胃癌疫苗的研究现状. *中国实用内科杂志* 2006; 26: 1917-1920
- 3 叶任高, 陆再英, 谢毅, 王辰. 内科学. 第6版. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 788
- 4 刘焯, 张琳, 洪天配. 2011年糖尿病学领域的研究进展

- 和热点回顾. 中国医学前沿杂志(电子版) 2011; 3: 28-31
- 5 Yang W, Lu J, Weng J, Jia W, Ji L, Xiao J, Shan Z, Liu J, Tian H, Ji Q, Zhu D, Ge J, Lin L, Chen L, Guo X, Zhao Z, Li Q, Zhou Z, Shan G, He J. Prevalence of diabetes among men and women in China. *N Engl J Med* 2010; 362: 1090-1101
- 6 李威杰. 全球手术治疗糖尿病最新进展. 中国实用外科学杂志 2010; 30: 571-573
- 7 刘石平, 陈晶. 新诊断2型糖尿病患者合并非酒精性脂肪性肝病的危险因素分析. 中国实用内科杂志 2007; 27: 205-207
- 8 李磊, 李际辉, 郑成竹, 柯重伟, 印慨, 陈丹磊, 胡旭光, 蔡景理, 吴金声. 胃癌Billroth II式胃切除术对合并2型糖尿病患者治疗价值. 中国微创外科杂志 2008; 10: 951-953
- 9 吴义岗, 任易峰, 华农标. 胃癌患者不同术式对糖尿病的影响. 医学信息 2009; 11: 46
- 10 张学利, 陈宗祐, 黄文海, 李先玮, 黄志明, 周联明, 章勇. 胃旁路术对2型糖尿病的临床治疗作用. 中国临床医学 2009; 3: 480-482
- 11 应敏刚, 黄峰, 周东. 胃转流术对合并2型糖尿病胃癌患者血糖的影响: 附67例临床报告. 中华内分泌外科杂志 2009; 1: 32-34
- 12 Cummings DE, Overduin J, Foster-Schubert KE. Gastric bypass for obesity: mechanisms of weight loss and diabetes resolution. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 2608-2615
- 13 Buchwald H, Estok R, Fahrbach K, Banel D, Jensen MD, Pories WJ, Bantle JP, Sledge I. Weight and type 2 diabetes after bariatric surgery: systematic review and meta-analysis. *Am J Med* 2009; 122: 248-256. e5
- 14 禹凤普, 李守淼, 李保中. 胃癌患者Roux-en-Y胃空肠吻合术对糖尿病的影响. 河南外科学杂志 2008; 14: 59-60
- 15 李守淼, 李保中, 管建云, 刘志强. 远端胃癌患者不同吻合术对糖尿病的影响. 医学信息 2008; 21: 298-299
- 16 何苗, 王子卫. 不同消化道重建术对胃癌合并糖尿病患者的效果. 中华消化外科杂志 2009; 8: 467-468
- 17 黄三雄, 徐菊玲, 冯文明, 唐成武, 马博, 朱炜. 三种消化道重建方式对合并2型糖尿病胃癌患者血糖的影响. 肿瘤学杂志 2010; 16: 548-550
- 18 朱胜利. 胃癌根治消化道重建术对2型糖尿病的治疗作用. 中国现代药物应用 2011; 5: 27-29
- 19 蔡景理, 李宝清, 郑超, 林孝坤, 殷凯, 许家谔, 徐鲁白. 不同胃肠道重建方式对2型糖尿病患者术后胰岛功能的影响. 中华胃肠外科杂志 2011; 14: 415-418
- 20 宫庆, 丁印鲁, 纪志鹏, 周勇, 王金庆, 张朋, 张建良. 胃癌合并2型糖尿病消化道重建后血糖变化观察. 中国现代普通外科进展 2011; 5: 380-383
- 21 Nannipieri M, Mari A, Anselmino M, Baldi S, Barsotti E, Guarino D, Camastra S, Bellini R, Berta RD, Ferrannini E. The role of beta-cell function and insulin sensitivity in the remission of type 2 diabetes after gastric bypass surgery. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96: E1372-E1379
- 22 Rubino F, Forgione A, Cummings DE, Vix M, Gnudi D, Mingrone G, Castagneto M, Marescaux J. The mechanism of diabetes control after gastrointestinal bypass surgery reveals a role of the proximal small intestine in the pathophysiology of type 2 diabetes. *Ann Surg* 2006; 244: 741-749
- 23 李杭, 张红亚, 梁伟, 李保东, 李东飞, 戴景兴, 原林. Roux-en-Y胃肠道重建改善非肥胖性糖尿病胃癌患者的糖脂代谢. 中华普通外科杂志 2010; 25: 4-8
- 24 Pories WJ. Diabetes: the evolution of a new paradigm. *Ann Surg* 2004; 239: 12-13
- 25 Vidal J, Nicolau J, Romero F, Casamitjana R, Momblan D, Conget I, Morínigo R, Lacy AM. Long-term effects of Roux-en-Y gastric bypass surgery on plasma glucagon-like peptide-1 and islet function in morbidly obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94: 884-891
- 26 Garcia-Fuentes E, Garrido-Sanchez L, Garcia-Almeida JM, Garcia-Arnes J, Gallego-Perales JL, Rivas-Marin J, Morcillo S, Cardona I, Soriguer F. Different effect of laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass and open biliopancreatic diversion of Scopinaro on serum PYY and ghrelin levels. *Obes Surg* 2008; 18: 1424-1429
- 27 Strader AD, Vahl TP, Jandacek RJ, Woods SC, D'Alessio DA, Seeley RJ. Weight loss through ileal transposition is accompanied by increased ileal hormone secretion and synthesis in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005; 288: E447-E453
- 28 张惠卿, 郭兰栓. 胃旁路术治疗2型糖尿病. 中国现代普通外科进展 2010; 13: 881-883
- 29 孙晓芳, 王道荣, 赵长勇. 两种手术方式治疗2型糖尿病机制的研究. 中华内分泌外科杂志 2010; 4: 155-160
- 30 邓治洲, 王瑜, 王烈, 焦亚彬, 戴露捷. 胃肠转流手术对非胰岛素依赖型糖尿病的疗效及其机制探讨. 中国现代普通外科进展 2009; 12: 702-705
- 31 朱正纲. 胃大部切除术后消化道重建方式对胃癌病人生活质量的影响. 中国实用外科杂志 2004; 24: 519-521
- 32 Fukuhara K, Osugi H, Takada N, Takemura M, Higashino M, Kinoshita H. Reconstructive procedure after distal gastrectomy for gastric cancer that best prevents duodenogastroesophageal reflux. *World J Surg* 2002; 26: 1452-1457
- 33 Montesani C, D'Amato A, Santella S, Pronio A, Giovannini C, Cristaldi M, Ribotta G. Billroth I versus Billroth II versus Roux-en-Y after subtotal gastrectomy. Prospective [correction of prespective] randomized study. *Hepatogastroenterology* 2002; 49: 1469-1473
- 34 李川, 戚峰, 刘彤. 不同消化道重建方式对胃癌合并2型糖尿病患者血糖的影响. 天津医药 2010; 38: 489-491
- 35 张永成, 谢庆. 毕Ⅱ式手术对胃癌合并糖尿病患者远期血糖变化的影响. 浙江实用医学 2009; 14: 484, 503
- 36 郑羽, 黄良祥, 曾长青. 胃大部切除Billroth II式吻合术对2型糖尿病影响的临床观察研究. 福建医药杂志 2010; 19: 45-46
- 37 曾锋. 胃癌根治消化道重建对合并2型糖尿病胃癌患者糖代谢影响. 中国当代医药 2011; 18: 30-31
- 38 刘凤林, 秦新裕. 重视胃癌术后并发症的预防. 腹部外科 2006; 19: 269-270
- 39 张惠卿, 郭兰栓. 胃旁路术治疗2型糖尿病. 中国现代普外科进展 2010; 13: 881-883
- 40 魏伟明, 胡旭光, 陈丹磊, 印慨, 柯重伟, 郑成竹. 胃旁路术对非肥胖型2型糖尿病疗效的前瞻性对照研究. 中华消化外科杂志 2011; 10: 206-209
- 41 Thaler JP, Cummings DE. Minireview: Hormonal and metabolic mechanisms of diabetes remission after gastrointestinal surgery. *Endocrinology* 2009; 150: 2518-2525
- 42 邓建武, 李建业, 李国宾. 全胃切除术对胃癌合并2型糖尿病患者血糖的影响. 医学理论与实践 2012; 25: 1819-1820
- 43 汪慧访, 叶钢, 王涌, 陈晓岗, 钮雁文, 赖邻宁, 武爱文. 胃切除术后不同消化道重建方式对胃癌合并2型糖尿病患者血糖影响的临床回顾性研究. 中国医师进修杂志 2011; 34: 32-34
- 44 张鹏, 王岭, 李南林, 尚培中, 刘景章, 李兴杰, 张金江. 胃大部切除术后消化道重建术式对2型糖尿病患者血

■应用要点

胃癌合并2型糖尿病患者行根治性手术后以Roux-en-Y食管空肠端侧吻合方式重建消化道能更有效地控制患者的术后血糖, 并具有并发症少的优点, 可供临床参考. 但目前尚缺乏临床随机对照研究的支持, 所得结论有待进一步研究证实.

■同行评价

本文立意新颖, 思路清晰, 所得结论真实客观, 具有一定的指导意义.

- 糖控制的研究. 临床外科杂志 2010; 18: 603-606
- 45 Kim JW, Cheong JH, Hyung WJ, Choi SH, Noh SH. Outcome after gastrectomy in gastric cancer patients with type 2 diabetes. *World J Gastroenterol* 2012; 18: 49-54
- 46 Lanzarini E, Csendes A, Lembach H, Molina J, Gutiérrez L, Silva J. Evolution of type 2 diabetes mellitus in non morbid obese gastrectomized patients with Roux en-Y reconstruction: retrospective study. *World J Surg* 2010; 34: 2098-2102
- 47 陈孝平, 石应康, 邱贵兴. 外科学(八年制). 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 563-564
- 48 Zong L, Chen P. Billroth I vs. Billroth II vs. Roux-en-Y following distal gastrectomy: a meta-analysis based on 15 studies. *Hepatogastroenterology* 2011; 58: 1413-1424
- 49 Lee W, Ahn SH, Lee JH, Park do J, Lee HJ, Kim HH, Yang HK. Comparative study of diabetes mellitus resolution according to reconstruction type after gastrectomy in gastric cancer patients with diabetes mellitus. *Obes Surg* 2012; 22: 1238-1243
- 50 陈开运, 向国安, 王汉宁, 萧金丰, 李鹏. 胃大部分切除术后Roux-en-Y吻合及毕Ⅱ式吻合对2型糖尿影响. 南方医科大学学报 2010; 30: 1288-1290
- 51 陈伟杰, 胡三元, 张光永. 胃大部切除术对非肥胖2型糖尿病的治疗作用. 腹腔镜外科杂志 2009; 14: 211-214
- 52 李心翔, 郑成竹. 腹腔镜Roux-en-Y胃分流术治疗病态性肥胖合并2型糖尿病. 中华消化外科杂志 2009; 8: 24-26
- 53 Kashyap SR, Daud S, Kelly KR, Gastaldelli A, Win H, Brethauer S, Kirwan JP, Schauer PR. Acute effects of gastric bypass versus gastric restrictive surgery on beta-cell function and insulinotropic hormones in severely obese patients with type 2 diabetes. *Int J Obes (Lond)* 2010; 34: 462-471

编辑 翟欢欢 电编 闫晋利

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》被评为中国精品科技期刊

本刊讯 2011-12-02, 中国科学技术信息研究所在北京发布2010年中国科技论文统计结果, 经过中国精品科技期刊遴选指标体系综合评价, 《世界华人消化杂志》被评为2011年度中国精品科技期刊. 中国精品科技期刊以其整体的高质量示范作用, 带动我国科技期刊学术水平的提高. 精品科技期刊的遴选周期为三年. (编辑部主任: 李军亮 2012-01-01)

核苷(酸)类似物抗病毒治疗对慢性乙型肝炎患者细胞免疫功能的影响

陈宇, 邱隆敏, 姚新生, 庄勤建, 吕红

陈宇, 邱隆敏, 庄勤建, 吕红, 遵义医学院附属医院感染科 贵州省遵义市 563003

姚新生, 遵义医学院免疫学教研室 贵州省遵义市 563003

作者贡献分布: 本综述由陈宇完成; 邱隆敏与姚新生负责审校; 庄勤建与吕红协助发表。

通讯作者: 邱隆敏, 主任医师, 563003, 贵州省遵义市大连路149号, 遵义医学院附属医院感染科. qiu128@163.com

收稿日期: 2012-07-29 修回日期: 2012-11-30

接受日期: 2012-12-16 在线出版日期: 2012-12-18

Effect of antiviral treatment with nucleoside and nucleotide analogues on cellular immune function in patients with chronic hepatitis B

Yu Chen, Long-Min Qiu, Xin-Sheng Yao,
Qin-Jian Zhuang, Hong Lv

Yu Chen, Long-Min Qiu, Qin-Jian Zhuang, Hong Lv,
Department of Infectious Diseases, Affiliated Hospital of
Zunyi Medical College, Zunyi 563003, Guizhou Province,
China

Xin-Sheng Yao, Department of Immunology, Zunyi Medical
College, Zunyi 563003, Guizhou Province, China

Correspondence to: Long-Min Qiu, Chief Physician, Department of Infectious Diseases, Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, 149 Dalian Road, Zunyi 563003, Guizhou Province, China. qiu128@163.com

Received: 2012-07-29 Revised: 2012-11-30

Accepted: 2012-12-16 Published online: 2012-12-18

Abstract

China is a country where hepatitis B virus (HBV) infection is highly endemic, and a large sample survey shows that chronic HBV infection affects as many as 120 million people in China. Since immune response dysregulation caused by persistent HBV infection and replication is the underlying cause of disease progression in patients with chronic hepatitis B (CHB), effective antiviral therapy should be given to halt the progression of the disease. Nucleoside and nucleotide analogues have been generally accepted as effective anti-HBV drugs and widely used in the clinical setting. They exert antiviral effects against HBV mainly by inhibition of DNA polymerase-mediated DNA replication. In addition, nucleoside and nucleotide analogues

also have an impact on the body's immune function. In this article we review recent progress in understanding the effect of antiviral treatment with nucleoside and nucleotide analogues on cellular immune function in CHB patients.

Key Words: Nucleoside and nucleotide analogues; Chronic hepatitis B; Cellular immunity

Chen Y, Qiu LM, Yao XS, Zhuang QJ, Lv H. Effect of antiviral treatment with nucleoside and nucleotide analogues on cellular immune function in patients with chronic hepatitis B. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(35): 3521-3528

摘要

我国是乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染的高流行区, 大样本的调查显示我国慢性HBV感染者高达1.2亿人。由于持续HBV感染及复制激发的免疫应答失调是慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)患者病情进展的根本原因, 要阻止疾病进展, 应进行有效的抗病毒治疗。核苷(酸)类似物是目前公认有效的抗HBV的药物之一, 被广泛应用于临床, 主要通过抑制DNA聚合酶的复制从而发挥抗HBV作用。其在有效抗病毒治疗的同时对机体细胞免疫功能有何影响。本文就近年来此方面的研究进展进行综述。

关键词: 核苷(酸)类似物; 慢性乙型肝炎; 细胞免疫

陈宇, 邱隆敏, 姚新生, 庄勤建, 吕红. 核苷(酸)类似物抗病毒治疗对慢性乙型肝炎患者细胞免疫功能的影响. *世界华人消化杂志* 2012; 20(35): 3521-3528

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3521.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染人体后, 机体的免疫反应决定疾病的发生、发展与转归, 细胞免疫功能异常是造成HBV持续感染的主要原因之一。近年的研究发现核苷类似物在抑制病毒复制的同时, 可能会使慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)患者的细胞免疫功

■背景资料

我国是乙型肝炎病毒(HBV)感染的高发区。目前认为宿主免疫调控的异常是导致慢性肝损伤的主要原因, 而持续HBV感染及复制激发的免疫应答失调是慢性乙型肝炎(CHB)病情进展的根本原因, 抗病毒治疗是阻止疾病进展有效的治疗方法。核苷(酸)类似物是目前公认有效的抗HBV的药物之一。核苷(酸)类似物在抑制病毒复制的同时对细胞免疫的功能有何影响成为研究热点。

■同行评议者

王怡, 主任医师, 天津市传染病医院, 天津市肝病研究所

■相关报道

国内外大量研究发现CHB患者核苷(酸)类似物抗病毒治疗后对CD8⁺T淋巴细胞、树突状细胞(DC)、Tregs细胞及辅助T细胞在一定程度上有所影响。

能得到一定程度的恢复。

1 CHB患者核苷类似物抗病毒治疗后CD8⁺T淋巴细胞的变化

慢性HBV感染中, 机体清除HBV分为特异性和非特异性两种方式。目前认为: 机体内病毒特异性细胞毒性T淋巴细胞(cytotoxic lymphocyte, CTL)清除HBV主要是通过细胞毒途径和非溶胞途径^[1]。而非溶胞途径特异性T淋巴细胞只是清除了靶细胞内的病毒, 而对靶细胞本身并无损害。实验研究表明在CTL清除病毒过程中, 非溶胞途径可能扮演着更重要的作用^[2]。当机体HBV特异性CTL反应不足, 不能有效清除HBV时, 启动非特异性CTL产生肝脏炎症反应引起肝细胞损伤。Zhou等^[3]对70例HBV DNA阳性的CHB患者(其中45例HBeAg阳性)给予阿德福韦酯治疗, 10 mg口服, 1次/d。治疗12 mo后观察HBeAg的血清转换和HBV特异性CTL之间的关系; 结果表明阿德福韦酯治疗12 mo, HBV特异性CTL明显高于治疗前。在45例e抗原阳性病例中, e抗原转阴13例, HBeAg发生血清学转换8例, HBeAg血清学转换的患者HBV特异性CTL比未发生HBeAg血清学转换的患者高, 得出结论阿德福韦酯可提高CHB患者HBV特异性细胞免疫功能, 同时治疗后发生HBeAg血清转换与HBV特异性CTL水平增加有关。陈月等^[4]观察了15例阿德福韦酯抗病毒治疗有效的CHB患者动态T淋巴细胞数量的变化。治疗6 mo和1年时, CD4⁺T及CD4⁺/CD8⁺T比值显著提高。表明阿德福韦酯能在一定程度上改善CHB患者淋巴细胞亚群的功能活性。Boni等^[5]研究显示拉米夫定抗病毒治疗也可恢复CHB患者的CTL反应。

T细胞在HBV感染中作为主要的效应细胞, 与病毒的清除及由此造成的免疫病理损伤直接相关。程序性细胞死亡受体1(programmed death 1, PD-1)是新发现的免疫抑制性共刺激分子, 与其配体PD-L1和PD-L2结合, 可削弱、限制或终止T细胞的功能^[6,7]。近年研究^[8,9]表明, 长期的HBV抗原刺激可能诱导了CD8⁺ CTL上PD-1的表达, 且PD-1表达与血清HBV DNA载量呈正相关, 目前认为HBV特异性CD8⁺ CTL功能衰竭现象与PD-1/PD-L1抑制性信号通路密切相关, 阻断PD-1/PD-L1信号通路可部分恢复CD8⁺ CTL的增殖能力。夏娟等^[10]对20例HBeAg阳性 CHB患者予恩替卡韦抗病毒治疗并随访51 wk。根据是否发生e抗原血清学转换分为HBeAg未转换

组(14例)和HBeAg转换组(6例)。在治疗前及治疗后不同时间点检测外周血T淋巴细胞表面PD-1的表达水平、血清HBV DNA载量、丙氨酸转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)水平; 结果显示恩替卡韦抗病毒治疗后两组患者血清HBV DNA载量、ALT水平的下降与CD4⁺和CD8⁺T细胞表面PD-1表达的下调呈明显正相关。在相同随访时间段内HBeAg转换组血清HBV DNA载量、ALT水平的下降与CD4⁺和CD8⁺T细胞表面PD-1表达下降程度均高于HBeAg未转化组。研究证实HBeAg阳性CHB患者经恩替卡韦抗病毒治疗后外周血CD8⁺T细胞表面PD-1表达的快速下调可作为预测后期HBeAg血清学转换的指标之一。Evans等^[11]通过对18例HBeAg阳性CHB患者进行抗病毒治疗, 观察e抗原血清转换和病毒载量水平变化对T细胞表面PD-1表达的影响。研究发现治疗过程中, 在降低病毒载量和抗原数量的同时, 可以有效地降低T细胞表面PD-1的表达。上述研究发现有效抗病毒治疗可下调CHB患者CD8⁺T细胞上PD-1表达, 且与疗效相关。但目前的研究对CD8⁺CTL上PD-1/PD-L1通路与其他免疫细胞间的关系及其在抗HBV中的具体机制仍未阐明。

2 CHB患者核苷类抗病毒治疗后树突状细胞的变化

树突状细胞(dendritic cells, DC)是哺乳动物体内功能最强也是唯一能激活静止型T细胞的抗原递呈细胞(antigen-presenting cell, APC), 能诱导特异性的免疫应答。在激活T细胞, 介导的免疫应答中具有关键作用^[12,13]。造血干细胞产生两种DC亚群: 髓细胞样DC(myeloid DC, mDC)及浆细胞样DC(plasmacytoid DC, pDC)。mDC产生白介素(interleukin, IL)-12及IL-15。这两个细胞因子会刺激自然杀伤细胞(natural killer cell, NK)分泌干扰素(interferon, IFN)- γ 。促进CD4⁺辅助T细胞(helper T cells, Th)分化为Th1细胞, 还促进CD8⁺T细胞分化为细胞毒性T淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL); 这些细胞通过释放细胞溶解介质如颗粒酶等直接杀伤受感染细胞, 或通过分泌Th1型细胞因子来间接杀伤受感染细胞, 最终达到清除病毒的作用^[14]。在循环中DC有两种前体: DC1和DC2, 慢性HBV感染者外周血DC功能缺陷或表型不成熟, 可能导致DC不能有效递呈HBV抗原而造成细胞免疫功能异常, 导致机体不能发挥免疫清除效应^[15,16]。研究也表明,

HBV感染者外周血DC在数量、特异性免疫应答功能以及表达共刺激分子上均呈现不同程度的低下^[17-19]。这也是造成HBV持续感染的主要原因之一。

Beckebaum等^[20]研究显示CHB患者与正常人相比, pDC总量无明显变化, 但pDC1与pDC2的比值明显降低; 经培养显示, DC1表面共刺激分子和主要组织相容性抗原系统(major histocompatibility system, MHC)分子表达下降, 经刺激混合淋巴细胞反应(mixed lymphocyte reaction, MLR)降低, 而非病毒性慢性肝损伤患者DC1及MLR正常, 表明CHB患者的DC1功能缺陷不是因为肝细胞炎症所致, 而是病毒感染的结果。何登明等^[21]通过对29例CHB患者给予拉米夫定抗病毒治疗, 检测拉米夫定治疗前后血清IL-12水平的变化, 探讨拉米夫定治疗对机体免疫功能的影响。结果证实完全应答组在治疗第3月血清IL-12水平达到高峰, 提示高水平的IL-12有助于机体发挥免疫清除HBV的作用, 促使HBeAg/HBeAb转换; 6例完全应答者在第3-6月均已经出现了HBeAg/HBeAb转换, 转换后血清IL-12仍保持一定水平, 以维持机体对HBV的免疫压力, 保证疗程结束后完全应答的实现。HBeAg阴性的CHB患者拉米夫定治疗后血清IL-12水平升高幅度较低, 有些时向点与治疗前比较并无差异, 以至于不能维持有效的抗HBV免疫, 可能是此类患者治疗效果差的原因之一。血清IL-12水平在拉米夫定疗程中的变化提示他可能在预测早期疗效方面有一定的指导意义。在治疗的第3-6月时评价机体Th1细胞恢复的程度, 可间接反映机体免疫功能的恢复情况。Akbar等^[22]通过对拉米夫定治疗前及治疗后1、3、12 mo. 从23例CHB患者的外周血中分离出DC细胞(DC细胞的非抗原特异性增殖是通过同种异体混合白细胞反应检测法进行评估的)。将HBsAg与DC细胞共培养, 以制备HBsAg冲击DC细胞。继而, 对HBsAg冲击DC细胞中IL-12和IFN- γ 的增殖能力和合成进行了评估。旨在考察抗原递呈DC在此类患者免疫恢复过程中所起的作用。得出结论: 拉米夫定治疗前与治疗1 mo后相比, 后者HBsAg冲击DC细胞在促进T细胞增殖的能力方面显著增高($P<0.05$)。同时, HBsAg冲击DC细胞产生的IL-12和IFN- γ 水平也显著升高($P<0.05$)。经拉米夫定治疗, 患者体内的HBsAg冲击DC细胞以抗原特异性的方式诱导了CHB患者体内的T细胞增殖($P<0.05$)。然而,

与拉米夫定治疗后1 mo相比, 治疗后3、12 mo的DC细胞对T细胞的刺激能力并无明显增高。拉米夫定治疗引起的机体免疫功能恢复可能部分是受活化的DC细胞调节的。然而, 随着治疗时间的延长, 患者体内DC活性并未见不断增强。这表明DC细胞在有效清除HBV方面还存在一定的局限性。

Li等^[23]对16例拉米夫定抗病毒治疗有效的CHB患者动态观察48 wk, 16例患者中, 11例治疗持续有效, 未发生YMDD变异, 5例发生病毒变异。观察发现: 拉米夫定治疗持续有效组, DC表面共刺激分子CD80、CD40的表达可随着HBV被长时间有效抑制而得到部分恢复, 同时伴随有外周血CD4⁺T细胞比例上升和NK细胞比例下降。而发生YMDD变异组, DC表面HLA-DR呈现持续性降低。淋巴细胞亚群均无明显变化。抗病毒48 wk时, 11例抗病毒有效患者DC1周围的树突明显增多, 簇聚现象明显, DC1的数量明显增加。促进Th1细胞分化。介导细胞免疫应答。有利于HBV DNA清除。而5例抗病毒后出现病毒变异患者DC1形态、数量变化不明显, 且Chen等^[24]研究证实: 在HBV持续感染期间, CHB患者DC的表型变化及表达下调与外周血HBV DNA载量间差异无统计学意义, 由此推测可能在抗病毒过程中由于变异株的出现使DC不能被活化, 对DC功能产生了影响。而变异株是通过什么免疫机制对DC功能进行影响, 目前这方面尚无报道。是否可通过上调DC表面某些共刺激分子, 在抗病毒过程中阻止病毒发生变异, 达到更好的疗效, 还有待进一步临床研究。

3 CHB患者核苷类似物抗病毒治疗后Tregs细胞的变化

Tregs细胞是近年发现的具有免疫抑制功能的细胞亚群。约占正常人外周血CD4⁺T细胞的5%-10%, 也是目前发现最重要的专职免疫抑制性T细胞, 他以免疫负向调节的方式来抑制自身免疫反应, 对多种刺激呈低反应状态^[25]。天然调节T细胞表达标志性叉头翼状螺旋转录因子Foxp3。对Tregs的产生、发育以及在控制T细胞活化、维护自身稳定方面发挥关键作用^[26-28]。

近年研究表明, CD4⁺CD25⁺T调节性细胞可以抑制HBV特异性CD4⁺与CD8⁺T细胞的活化与增殖。一方面导致病毒的持续感染^[29]; 另一方面有利于抑制过度的免疫病理损伤。Xu等^[30]通过对16例AHB患者、76例CHB患者和

■创新盘点

本文对核苷(酸)类似物抗病毒治疗对CHB患者细胞免疫功能影响的相关研究进行了总结, 并探讨核苷(酸)类似物抗病毒效果与CHB患者免疫状态的关系, 进一步为CHB患者核苷(酸)类似物与免疫调节的联合治疗奠定基础。

■应用要点

从4个方面分析核苷(酸)类似物治疗CHB时,对患者细胞免疫功能的影响,进一步探讨核苷(酸)类似物抗病毒效果与CHB患者免疫状态的关系,并为CHB的抗病毒治疗提供理论基础和新的思路,并为个体化治疗提供新的策略。

29例慢性肝衰竭患者外周血循环和肝脏中浸润的CD4⁺CD25⁺调节性T细胞的频率、表型特征和对抗病毒应答的影响等研究发现,慢性肝衰竭患者外周血循环和肝脏中浸润的CD4⁺CD25⁺调节性T细胞的频率显著增加。AHB患者CD4⁺CD25⁺调节性T细胞的频率最初较低,随着时间推移,恢复期循环CD4⁺CD25⁺调节性T细胞数量增加,最终恢复到正常水平。CHB患者外周血中Treg细胞的水平明显升高,且随着外周血中病毒载量的下降,Treg细胞的含量也逐渐减少。Treg细胞水平与其病毒载量呈正相关,分离得到的Treg细胞具有诱导形成HBV抗原特异性Treg的能力,HBV抗原特异性Treg则促进HBV感染的慢性化。巫翠萍等^[31]采用流式细胞术检测50例CHB患者和20例健康对照组外周血中CD4⁺CD25^{high}、CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Tregs的表达。同时采用荧光定量PCR法检测血清HBV DNA含量。结果显示:CHB患者外周血中CD4⁺CD25^{high}Tregs明显高于健康对照组,且随着血清HBV DNA载量增加,患者外周血中CD4⁺CD25^{high}Tregs的水平也逐渐升高。CHB患者外周血中CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Tregs也相应增高,且与CD4⁺CD25^{high}Tregs的变化成正相关。多数研究表明外周血中Treg细胞的数量在CHB患者是明显增加的,这可能与抗原的反复刺激有关。但也有报道^[32]提示CD4⁺CD25⁺T调节性细胞的数量在CHB患者与正常人并无明显差异。

Treg细胞对DC共刺激分子表达及致炎细胞因子分泌具有阻遏作用,处于待激活状态的Treg细胞能明显抑制由Toll受体介导骨髓来源DC的成熟。DC的成熟障碍导致DC功能明显低下,抗原递呈能力不足,使得机体无法发挥正常的免疫功能是CHB产生免疫耐受的原因之一。研究表明,Treg细胞可在体外诱导DC共刺激分子CD80和CD86的下调,且下调幅度非常明显,其原因是Treg抑制了DC对T细胞增殖反应的诱导。进一步分析发现,Treg的下调作用可被细胞毒性T淋巴细胞关联基因4(cytotoxic T-lymphocyte associated gene-4, CTLA-4)快速阻断^[33],因此认为,Treg对DC的下调是通过CTLA-4依赖途径对DC共刺激分子进行下调实现的。尽管目前已经在人类肝脏中检出Treg细胞的存在。但对于Treg细胞在肝组织中募集和驻留的分子基础仍不清楚。有研究发现:与外周血Treg细胞相比,肝脏浸润的Treg细胞表达相似水平的Foxp3、CTLA-4

和CD127,但表达更高水平的CD27。Stoop等^[34]对CHB患者肝内Treg细胞的表型进行研究。结果发现患者肝内存在CD4⁺Foxp3⁺细胞,但是不表达CD25,而且低表达HLA-DR和CTLA-4。肝内Treg细胞的数量与HBV DNA呈正相关。

Stoop等^[35]对应用阿德福韦降低病毒载量对Treg细胞和HBV特异性T细胞的影响进行了观察。结果发现随着病毒载量的下降,Treg细胞的数量明显减少。同时伴随HBcAg特异性IFN- γ 的产生或增殖水平的升高,但IL-10的产生并没有减少。阿德福韦治疗使病毒载量下降,导致循环中Treg细胞数量减少,同时伴随免疫应答的部分恢复。张梦军等^[36]对替比夫定抗病毒治疗22例CHB患者,在治疗前及治疗后3、6 mo时,分别以流式细胞仪检测外周血CD4⁺CD25⁺CD127^{low}T细胞和CD8⁺CD25⁺T细胞比例,分析其与HBV DNA、HBeAg、ALT等指标之间的关系,结果显示CHB患者外周血中CD4⁺CD25⁺CD127^{low}T细胞和CD8⁺CD25⁺T细胞比例显著高于对照组,替比夫定治疗3 mo时,这两群细胞比例显著下降,Foxp3 mRNA的表达也显著下降。对于HBV DNA水平降至检测水平以下的CHB患者,其CD4⁺CD25⁺CD127^{low}T细胞也降至正常水平。治疗3、6 mo后,HBeAg转阴率分别为9.1%和18.2%,发生HBeAg血清学转换者CD4⁺CD25⁺CD127^{low}T细胞和CD8⁺CD25⁺T细胞比例均降至正常水平。因此替比夫定在快速抑制病毒复制的同时CD4⁺CD25⁺CD127^{low}T细胞和CD8⁺CD25⁺T细胞比例显著下调,可能降低了Treg对HBV特异性T淋巴细胞的抑制作用,增强了机体的免疫应答。Pan等^[37]研究也发现替比夫定抗病毒治疗过程中,能降低CHB患者外周血Tregs比例,治疗早期Tregs比例下降的患者HBeAg血清学转换率更高。有研究对CHB患者进行恩替卡韦或阿德福韦酯抗HBV病毒治疗^[38],观察治疗前及治疗后12、24、36、48 wk调节性T细胞变化。在治疗后24 wk观察到恩替卡韦组及阿德福韦酯组Tregs细胞均开始下降。通过上述研究发现CHB患者抗病毒治疗后可使Treg频率下降,免疫耐受现象得以逆转。但是Tregs在HBV感染过程中是怎样发挥免疫抑制作用,是通过影响患者体内的免疫状态从而影响Treg的频率,还是本身就具有抑制Treg的能力,现在仍不清楚。在CHB患者抗病毒治疗过程中是否可以通过降低Treg的频率从而达到更高的HBeAg血清学转换,尚有待于进一步研究。

4 CHB患者核苷类似物抗病毒治疗后辅助T细胞的变化

4.1 Th1/Th2细胞 Th1/Th2细胞失衡在乙型肝炎慢性化的发生机制中起着重要作用。既往研究对HBV慢性感染者外周血中Th1、Th2细胞的数量和Th1/Th2细胞的比值报道不一^[39-41]。Böcher等^[42]认为HBV的持续存在与HBsAg特异性的Th1细胞的缺陷密切相关。有学者对Th1类细胞清除HBV的机制作了进一步的研究。Gao等^[43]的研究结果表明, 在体外HBcAg特异性的HLA-DR13限制的Th1类细胞可以溶解携带HBcAg肽段的EB病毒转染的淋巴母细胞, 相同类型的Th1类细胞在体内能溶解HBcAg结合或特异性的B细胞, 从而起到清除HBV感染的作用。Zhang等^[44]对HBeAg阳性CHB患者进行替比夫定抗病毒治疗后血清T淋巴细胞亚群Th1/Th2细胞因子水平进行动态观察。于0、4、8、12、24、48 wk时检测IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、IFN- γ 及TNF- α 水平。观察到完全应答组Th1细胞因子水平高于其他3组, 而Th2细胞因子则低于其他各组, 但各组之间差异无统计学意义。完全应答组IL-2、IFN- γ 、TNF- α 在替比夫定治疗12 wk起及其后各时间点较基线时明显升高, 差异有统计学意义。部分应答组IFN- γ 水平在替比夫定治疗24 wk起明显升高。无应答组于治疗48 wk时IL-6、IL-10水平较基线时明显升高。在病毒学突破组自服药24 wk起的IL-4水平及服药12 wk起的IL-6水平与基线相比, 逐渐升高, 且差异具有统计学意义。因此, Th1/Th2细胞因子水平对替比夫定治疗HBeAg阳性CHB患者的转归有一定相关性。这可能与替比夫定治疗后CHB患者免疫功能在一定程度上有所改善有关。Piao等^[45]研究22例CHB患者接受阿德福韦酯治疗, 每日口服10 mg。监测治疗前后血液中的IL-2、IFN- γ 、TNF- α 、IL-4、IL-6和IL-10细胞因子变化, 以10名健康志愿者作为对照组。观察到在CHB患者的6种细胞因子与健康对照组比较明显降低, 并在接受阿德福韦酯治疗后4、12和24 wk显著增加; 完全应答组的6种细胞因子的水平明显高于部分应答组。结果表明阿德福韦酯治疗可增加Th1/Th2细胞的功能。这同罗芳琼等^[46]研究结果一致。Th1、Th2型细胞因子在治疗后均上升, 分析可能是抗病毒治疗后Th1细胞因子的升高, 有利于HBV清除, 而Th2细胞因子升高, 抑制过强免疫反应, 减轻肝细胞炎症, 使HBV不能彻底清除。虽然阿德福韦酯具体通过何种途径调节免疫还不清楚,

但细胞因子网络是一个复杂、相互抑制、相互协调的网络系统, 因此出现了在Th1型细胞因子增加的过程中, Th2分泌的细胞因子亦增加, 而这与Zhang等^[44]的研究结果不一致, 推测可能与检测方法不同或选择病例的轻重不同有关。朱斌等^[47]研究结果显示: T细胞亚群Th1/Th2细胞因子与慢性乙肝替比夫定抗病毒治疗后血清ALT恢复正常, HBV DNA含量下降及HBeAg阴转及血清学转换相关, Th1/Th2亚群细胞因子平衡是促进肝功能ALT恢复、HBV DNA载量下降的重要因素之一, HBeAg阴转及血清学转换率可能与替比夫定能上调Th1细胞因子表达水平有关。宋春辉等^[48]对恩替卡韦抗病毒治疗与CHB患者外周血Th1及Th2细胞变化的研究发现ETV在有效抑制病毒复制的同时, 体内Th1类免疫反应下降而Th2类免疫反应不足, 提示体内炎症反应减轻, 但同时机体清除病毒的能力也被削弱。核苷酸类似物抗病毒治疗在抑制HBV复制、改善患者肝细胞功能的同时, 也改善了患者Th1/Th2细胞因子平衡。这种细胞因子的改善是病毒抑制的结果还是存在其他原因, 还有待于进一步研究。

4.2 Th17细胞 IL-17是Th17细胞分泌的免疫调节因子。而IL-23是维持Th17分化及功能的细胞因子。IL-23/IL-17信号通路是Th17细胞的活化和维持的关键通路。其在多种炎症性疾病中都起重要作用。有研究表明: IL-17也参与HBV在人体中的致病过程^[49]。Wang等^[50]通过对39例急性肝衰竭患者、71例CHB患者和32例健康对照。分析Foxp3表达模式和IL-23/IL-17通路在HBV感染中的作用。CHB患者外周血及肝组织内FOXP3 mRNA表达明显升高。肝内的FOXP3表达水平与患者血液中的HBV DNA水平及乙肝表面抗原(Hepatitis B surface antigen, HBsAg)浓度明显呈正相关。与健康对照组相比, CHB患者肝脏内的IL-23/IL-17信号通路相关的促炎因子也明显升高, 且与FOXP3的表达水平升高呈正相关。HBV感染的肝脏内IL-23/IL-17信号通路的活化并没有有效地被宿主的Treg细胞所抑制。因此, IL-23/IL-17信号通路可能是维持HBV病毒持续性感染的另一个机制。然而FOXP3⁺Treg细胞与Th17细胞(IL-23/IL-17信号通路)在HBV感染患者体内的关系至今尚未见报道。

Zhang等^[51]通过对9例HBeAg阳性CHB患者采用恩替卡韦治疗12 mo, 对Treg细胞和Th17细胞比率进行研究, 发现在恩替卡韦抑制病毒复

■同行评价

本文讨论了核苷(酸)类似物抗病毒治疗对CHB患者细胞免疫功能的影响, 具有一定新意, 条理清晰, 有较好的临床指导意义。

制的同时Th17细胞于1、9 mo时均高于基线水平, 12 mo时下降到基线水平。Treg细胞减少, 导致Treg/Th17比率显著下降。Th17细胞升高可能意味着患者体内免疫平衡被打破, 出现了强烈的炎症反应有助于HBV清除, 但也可能由于促进炎症发展而引起肝细胞的损害, 而在后期出现的下降则可能是由于恩替卡韦对病毒复制的持续抑制, 使体内清除病毒的免疫反应消失, 从而降低体内的炎症反应, 延缓疾病的进程。这可能是恩替卡韦抗病毒治疗过程中, HBV持续存在的原因。核苷类似物抗病毒治疗, 并不能彻底清除病毒, 当停止用药或出现耐药时随着病毒载量的升高, Th17细胞就有可能再次升高, 加重肝脏炎症反应。因此, 核苷类似物抗病毒治疗能够有效抑制HBV的复制, 同时抑制体内过强的免疫反应, 避免肝细胞进一步损害, 但同时削弱机体清除病毒的能力, 需要和其他免疫治疗联合应用以达到清除病毒、保护肝脏的目的。

5 结论

核苷类似物抗HBV治疗主要是通过抑制DNA聚合酶的复制, 从而抑制HBV DNA的合成, 理论上他并不会改善机体的免疫功能。目前的研究表明, 随着HBV被长期的抑制, CHB患者的细胞免疫功能会得到一定程度的提高, 免疫耐受被打破^[52]。但是对于CHB患者免疫功能的增强在核苷类似物抗病毒治疗过程中到底扮演了什么样的角色, 对疾病的恢复及疗效的判断有无临床指导意义, 能否作为长期治疗患者停药的一个参考指标, 是否能作为预测病毒耐药的指标, 都有待于更深入的研究。

全面地认识免疫细胞在抗病毒感染方面的重要作用, 有助于更深刻地理解HBV持续感染的免疫学机制, 并为CHB的抗病毒治疗提供理论基础和新的思路, 并为个体化治疗提供新的策略。临床上不同的CHB患者对核苷(酸)类似物抗病毒治疗的反应差别很大, 了解免疫效应细胞与免疫抑制细胞间关系对维持正常免疫应答清除HBV的作用, 更好地评价CHB患者的免疫状态, 能够为核苷(酸)类似物抗病毒治疗与免疫调节的联合治疗奠定基础。

6 参考文献

- Rehermann B. Intrahepatic T cells in hepatitis B: viral control versus liver cell injury. *J Exp Med* 2000; 191: 1263-1268
- Bertoletti A, Ferrari C. Kinetics of the immune response during HBV and HCV infection. *Hepatology* 2003; 38: 4-13
- Zhou YL, Wang XC, Wu YT, Tan YF, Zhao YP, Tang JM, Pan JQ, Yang ZX, Gu XB. [Relationship between HBeAg seroconversion with genotypes and HBV specific CTL in patients with chronic hepatitis B treated with Adefovir dipivoxil]. *Zhonghua Shiyian He Linchuang Bingduxue Zazhi* 2011; 25: 220-223
- 陈月, 陈洪涛, 吴诗品, 周雅莹, 方爱萍. 阿德福韦酯对慢性乙型肝炎患者外周血树突状细胞和淋巴细胞亚群的影响. *广东医学* 2010; 31: 72-74
- Boni C, Penna A, Ogg GS, Bertoletti A, Pilli M, Cavallo C, Cavalli A, Urbani S, Boehme R, Panbianco R, Fiaccadori F, Ferrari C. Lamivudine treatment can overcome cytotoxic T-cell hyporesponsiveness in chronic hepatitis B: new perspectives for immune therapy. *Hepatology* 2001; 33: 963-971
- Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH. The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol* 2005; 23: 515-548
- Barber DL, Wherry EJ, Masopust D, Zhu B, Allison JP, Sharpe AH, Freeman GJ, Ahmed R. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* 2006; 439: 682-687
- Boni C, Fiscaro P, Valdatta C, Amadei B, Di Vincenzo P, Giuberti T, Laccabue D, Zerbini A, Cavalli A, Missale G, Bertoletti A, Ferrari C. Characterization of hepatitis B virus (HBV)-specific T-cell dysfunction in chronic HBV infection. *J Virol* 2007; 81: 4215-4225
- Maier H, Isogawa M, Freeman GJ, Chisari FV. PD-1: PD-L1 interactions contribute to the functional suppression of virus-specific CD8+ T lymphocytes in the liver. *J Immunol* 2007; 178: 2714-2720
- 夏娟, 许林, 刘勇. 恩替卡韦治疗后慢性乙型肝炎患者外周血T淋巴细胞表面程序性死亡受体1表达与HBeAg血清学转换的关系. *中华肝脏病杂志* 2011; 19: 93-97
- Evans A, Riva A, Cooksley H, Phillips S, Puranik S, Nathwani A, Brett S, Chokshi S, Naoumov NV. Programmed death 1 expression during antiviral treatment of chronic hepatitis B: Impact of hepatitis B e-antigen seroconversion. *Hepatology* 2008; 48: 759-769
- Nair S, Babu JS, Dunham RG, Kanda P, Burke RL, Rouse BT. Induction of primary, antiviral cytotoxic, and proliferative responses with antigens administered via dendritic cells. *J Virol* 1993; 67: 4062-4069
- Akbar SM, Onji M, Inaba K, Yamamura K, Ohta Y. Low responsiveness of hepatitis B virus-transgenic mice in antibody response to T-cell-dependent antigen: defect in antigen-presenting activity of dendritic cells. *Immunology* 1993; 78: 468-475
- 王文博, 张绪清, 陈晓玲, 张梦军, 尚小云, 牛薇, 刘东, 舒驰, 王莉, 吴玉章. 重庆地区慢性HBV感染与HLA-A超型相关性研究. *免疫学杂志* 2010; 26: 1048-1051
- Arima S, Akbar SM, Michitaka K, Horiike N, Nuriya H, Kohara M, Onji M. Impaired function of antigen-presenting dendritic cells in patients with chronic hepatitis B: localization of HBV DNA and HBV RNA in blood DC by in situ hybridization. *Int J Mol Med* 2003; 11: 169-174
- van der Molen RG, Sprengers D, Binda RS, de Jong EC, Niesters HG, Kusters JG, Kwekkeboom J, Janssen HL. Functional impairment of myeloid and plasmacytoid dendritic cells of patients with chronic hepatitis B. *Hepatology* 2004; 40: 738-746
- 刘树人, 彭齐荣, 李灼亮. 慢性乙型肝炎患者树突状细胞表型和抗原提呈能力的测定. *中国现代医学杂志* 2003;

- 13: 30-32
- 18 Hilleman MR. Critical overview and outlook: pathogenesis, prevention, and treatment of hepatitis and hepatocarcinoma caused by hepatitis B virus. *Vaccine* 2003; 21: 4626-4649
- 19 Bertoletti A, Gehring AJ. The immune response during hepatitis B virus infection. *J Gen Virol* 2006; 87: 1439-1449
- 20 Beckebaum S, Cicinnati VR, Dworacki G, Müller-Berghaus J, Stolz D, Harnaha J, Whiteside TL, Thomson AW, Lu L, Fung JJ, Bonham CA. Reduction in the circulating pDC1/pDC2 ratio and impaired function of ex vivo-generated DC1 in chronic hepatitis B infection. *Clin Immunol* 2002; 104: 138-150
- 21 何登明, 毛青, 王宇明. 慢性乙型肝炎患者拉米夫定治疗前后血清白细胞介素-12水平变化. *中华肝病杂志* 2003; 10: 619
- 22 Akbar SM, Horiike N, Chen S, Michitaka K, Abe M, Hiasa Y, Matsuura B, Onji M. Mechanism of restoration of immune responses of patients with chronic hepatitis B during lamivudine therapy: increased antigen processing and presentation by dendritic cells. *J Viral Hepat* 2011; 18: 200-205
- 23 Li HW, Wang HF, Wang FS, Jin B, Duan XZ. [Clinical profiles of circulating dendritic cell phenotype and lymphocyte subsets in patients chronically infected with HBV during lamivudine treatment]. *Zhonghua Shiyan He Linchuang Bingduxue Zazhi* 2006; 20: 43-46
- 24 Chen MQ, Shi GF, Lu Q, Li Q, Zhang QH, Qin Q, Weng XH. [Phenotypes and functions of dendritic cells derived from peripheral blood monocytes of chronic hepatitis B patients with different HBV DNA loads]. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2007; 15: 19-23
- 25 Komiyama Y, Nakae S, Matsuki T, Nambu A, Ishigame H, Kakuta S, Sudo K, Iwakura Y. IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2006; 177: 566-573
- 26 Campbell DJ, Ziegler SF. FOXP3 modifies the phenotypic and functional properties of regulatory T cells. *Nat Rev Immunol* 2007; 7: 305-310
- 27 Haiqi H, Yong Z, Yi L. Transcriptional regulation of Foxp3 in regulatory T cells. *Immunobiology* 2011; 216: 678-685
- 28 Beres A, Komorowski R, Mihara M, Drobyski WR. Instability of Foxp3 expression limits the ability of induced regulatory T cells to mitigate graft versus host disease. *Clin Cancer Res* 2011; 17: 3969-3983
- 29 Stoop JN, Woltman AM, Biesta PJ, Kusters JG, Kuipers EJ, Janssen HL, van der Molen RG. Tumor necrosis factor alpha inhibits the suppressive effect of regulatory T cells on the hepatitis B virus-specific immune response. *Hepatology* 2007; 46: 699-705
- 30 Xu D, Fu J, Jin L, Zhang H, Zhou C, Zou Z, Zhao JM, Zhang B, Shi M, Ding X, Tang Z, Fu YX, Wang FS. Circulating and liver resident CD4+CD25+ regulatory T cells actively influence the antiviral immune response and disease progression in patients with hepatitis B. *J Immunol* 2006; 177: 739-747
- 31 巫翠萍, 覃西, 王华民, 巫翠云, 李文广, 林丹, 朱洪, 李一. 乙型肝炎患者外周血CD4⁺CD25⁺Treg与CD4⁺和CD8⁺T淋巴细胞亚群的相关研究. *中国免疫学杂志* 2010; 26: 273-277
- 32 Franzese O, Kennedy PT, Gehring AJ, Gotto J, Williams R, Maini MK, Bertoletti A. Modulation of the CD8⁺-T-cell response by CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in patients with hepatitis B virus infection. *J Virol* 2005; 79: 3322-3328
- 33 Oderup C, Cederbom L, Makowska A, Cilio CM, Ivars F. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4-dependent down-modulation of costimulatory molecules on dendritic cells in CD4⁺ CD25⁺ regulatory T-cell-mediated suppression. *Immunology* 2006; 118: 240-249
- 34 Stoop JN, Claassen MA, Woltman AM, Binda RS, Kuipers EJ, Janssen HL, van der Molen RG, Boonstra A. Intrahepatic regulatory T cells are phenotypically distinct from their peripheral counterparts in chronic HBV patients. *Clin Immunol* 2008; 129: 419-427
- 35 Stoop JN, van der Molen RG, Kuipers EJ, Kusters JG, Janssen HL. Inhibition of viral replication reduces regulatory T cells and enhances the antiviral immune response in chronic hepatitis B. *Virology* 2007; 361: 141-148
- 36 张梦军, 周吉军, 傅晓岚, 王莉, 李杰, 牛微, 张小敏, 吴玉章. 替比夫定对慢性乙型肝炎患者外周血CD4⁺CD25⁺CD127^(low)T和CD8⁺CD25⁺细胞频率的影响及临床意义. *免疫学杂志* 2010; 26: 594-597
- 37 Pan XC, Yang F, Chen M. [The effect of telbivudine on peripheral blood CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells and its significance in patients with chronic hepatitis B]. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2008; 16: 885-888
- 38 Jiang Y, Li W, Yu L, Liu J, Xin G, Yan H, Sun P, Zhang H, Xu D, Niu J. Enhancing the antihepatitis B virus immune response by adefovir dipivoxil and entecavir therapies. *Cell Mol Immunol* 2011; 8: 75-82
- 39 辛永宁, 宣世英, 孙霞. 慢性乙型肝炎Th1/Th2细胞的免疫功能研究进展. *临床肝胆病杂志* 2005; 21: 182-184
- 40 Falasca K, Ucciferri C, Dalessandro M, Zingariello P, Mancino P, Petrarca C, Pizzigallo E, Conti P, Vecchiet J. Cytokine patterns correlate with liver damage in patients with chronic hepatitis B and C. *Ann Clin Lab Sci* 2006; 36: 144-150
- 41 Ariyasu T, Tanaka T, Fujioka N, Yanai Y, Yamamoto S, Yamauchi H, Ikegami H, Ikeda M, Kurimoto M. Effects of interferon-alpha subtypes on the TH1/TH2 balance in peripheral blood mononuclear cells from patients with hepatitis virus infection-associated liver disorders. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2005; 41: 50-56
- 42 Böcher WO, Galun E, Marcus H, Daudi N, Terkieltaub D, Shouval D, Löhr HF, Reisner Y. Reduced hepatitis B virus surface antigen-specific Th1 helper cell frequency of chronic HBV carriers is associated with a failure to produce antigen-specific antibodies in the trimera mouse. *Hepatology* 2000; 31: 480-487
- 43 Cao T, Meuleman P, Desombere I, Sällberg M, Le-rox-Roels G. In vivo inhibition of anti-hepatitis B virus core antigen (HBcAg) immunoglobulin G production by HBcAg-specific CD4(+) Th1-type T-cell clones in a hu-PBL-NOD/SCID mouse model. *J Virol* 2001; 75: 11449-11456
- 44 Zhang L, Zhang DZ, Chen M, He H, Guo SH. [Dynamic changes of Th1/Th2 type cytokines in peripheral blood of patients with hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B treated with telbivudine]. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2009; 17: 175-179
- 45 Piao RL, Liu YY, Tian D, Ma ZH, Zhang M, Zhao C, Niu JQ. Adefovir dipivoxil modulates cytokine

- expression in Th1/Th2 cells in patients with chronic hepatitis B. *Mol Med Report* 2012; 5: 184-189
- 46 罗芳琼, 潘煜, 刘晶晶, 张鹏, 牛俊奇, 姜艳芳. 阿德福韦酯对慢性乙型肝炎患者Th1/Th2型细胞因子的影响. *临床肝胆病杂志* 2010; 26: 19-21
- 47 朱斌, 张平, 王天宝, 禹萌. 替比夫定治疗慢性乙肝血清Th1/Th2亚群细胞因子的水平变化. *临床肝胆病杂志* 2009; 25: 415-417
- 48 宋春辉, 杨斌, 陈黎明, 张纪元, 王福生. 恩替卡韦抗病毒治疗与慢性乙型肝炎患者外周血Th1及Th2细胞变化的研究. *解放军医学杂志* 2010; 35: 1465-1467
- 49 Zhang JY, Zhang Z, Lin F, Zou ZS, Xu RN, Jin L, Fu JL, Shi F, Shi M, Wang HF, Wang FS. Interleukin-17-producing CD4(+) T cells increase with severity of liver damage in patients with chronic hepatitis B. *Hepatology* 2010; 51: 81-91
- 50 Wang Q, Zheng Y, Huang Z, Tian Y, Zhou J, Mao Q, Wu Y, Ni B. Activated IL-23/IL-17 pathway closely correlates with increased Foxp3 expression in livers of chronic hepatitis B patients. *BMC Immunol* 2011; 12: 25
- 51 Zhang JY, Song CH, Shi F, Zhang Z, Fu JL, Wang FS. Decreased ratio of Treg cells to Th17 cells correlates with HBV DNA suppression in chronic hepatitis B patients undergoing entecavir treatment. *PLoS One* 2010; 5: e13869
- 52 缪晓辉. 对2010年第二版中国《慢性乙型肝炎防治指南》和修订指南的几点个人看法. *中国实用内科杂志* 2011; 31: 430-432

编辑 田滢 电编 闫晋利

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

• 消息 •

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)

丙型肝炎病毒基因分型的研究进展

黄超群, 王福祥

黄超群, 王福祥, 哈尔滨医科大学附属第四医院感染科 黑龙江省哈尔滨市 150001

黄超群, 主要从事艾滋病与病毒性肝炎的临床研究.

作者贡献分布: 黄超群完成文章的撰写; 王福祥负责审校.

通讯作者: 王福祥, 150001, 黑龙江省哈尔滨市南岗区颐园街37

号, 哈尔滨医科大学附属第四医院感染科. 343562888@qq.com

收稿日期: 2012-08-29 修回日期: 2012-11-22

接受日期: 2012-12-03 在线出版日期: 2012-12-18

Progress in research of genotypes of hepatitis C virus

Chao-Qun Huang, Fu-Xiang Wang

Chao-Qun Huang, Fu-Xiang Wang, Department of Infectious Diseases, the Fourth Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China

Correspondence to: Fu-Xiang Wang, Department of Infectious Diseases, the Fourth Affiliated Hospital of Harbin Medical University, 37 Yiyuan Street, Nangang District, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China. 343562888@qq.com

Received: 2012-08-29 Revised: 2012-11-22

Accepted: 2012-12-03 Published online: 2012-12-18

Abstract

Hepatitis C virus (HCV), belonging to the Flaviviridae family, is divided into six genotypes and different subtypes. There are four nomenclatures for HCV, of which the nomenclature system proposed by Simmonds *et al.* is widely applied overseas in recent years. HCV genotypes have obvious geographical variation and show significant epidemiological differences. Five methods are currently available for genotyping HCV, and each has its own advantages and disadvantages. HCV genotypes closely correlate with the severity, course, progression, treatment, and outcome of hepatitis C. The therapeutic effect for different HCV genotypes varies, and IL-28B polymorphism is a predictor of sustained virological response to treatment among various HCV genotypes. The diversity of HCV genotypes brings certain difficulty to vaccine development. Some success has been achieved in the development of HCV vaccine in animals. The main purpose of the present article is to review the recent progress in research of genotypes of HCV in terms of genotyping methods, associations between gen-

otypes and epidemiological significance, severity of disease, and antiviral treatment response, and vaccine development.

Key Words: Hepatitis C virus; Genotype

Huang CQ, Wang FX. Progress in research of genotypes of hepatitis C virus. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(35): 3529-3535

摘要

丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)属于黄病毒科, 分为6个基因型与不同的亚型. HCV的命名系统分为4种, 但近年来Simmonds命名系统在国外得到广泛应用. HCV基因分型有明显的地理差异, 其流行病学意义较为显著. HCV基因分型的检测方法有5种, 每种方法有其各自的优缺点并适合应用于不同的实验研究. HCV基因分型与疾病严重性、病程、病情进展和治疗转归密切相关, 但研究者尚未获得一致的意见. 不同的HCV基因分型抗病毒治疗的疗效不同, 白介素(interleukin, IL)-28B的多态性是不同HCV基因分型治疗后产生持续病毒学应答的预测指标. 不同的HCV基因分型给疫苗研制带来一定困难, 目前国内外对HCV疫苗的研究在动物身上取得一定成果, 现对以上内容作一综述.

关键词: 丙型肝炎病毒; 基因分型

黄超群, 王福祥. 丙型肝炎病毒基因分型的研究进展. 世界华人消化杂志 2012; 20(35): 3529-3535

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3529.asp>

0 引言

丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)是单股正链RNA病毒, 属于黄病毒科嗜肝病毒属, 1989年美国科学家Houghton等^[1]利用分子生物学方法克隆出了HCV, 并命名本病及其病毒为丙型肝炎和HCV. 目前全世界约有1.7亿人感染HCV^[2], 每年大约有300-400万新发感染者^[3], 其感染率在世界各地分布差异较大^[4-6], 流行率最高的国家

■背景资料

目前丙型肝炎病毒(HCV)肝炎严重威胁人类健康, 感染的人数在逐年上升. 丙型肝炎在北方以血液传播为主, 在南方以吸毒传播为主. 丙型肝炎治疗方法为干扰素联合利巴韦林. HCV基因分型在丙型肝炎的流行病学研究、病毒载量、病情转归及抗病毒治疗等方面均有重要意义.

■同行评议者

范学工, 教授, 中南大学湘雅医院感染病科.

■ 研发前沿

HCV基因分型的研究热点为IL-28B的多态性对于HCV为1型的患者抗病毒治疗后的SVR的预测有意义,但对于2型和3型SVR的预测意义存在争议,目前丙型肝炎疫苗的动物实验取得一定进展,但对人类的不同HCV株是否有疗效有待进一步研究。

是埃及,大约20%的献血员源-HCV呈阳性。我国属HCV的中、高流行区,普通人群中抗-HCV阳性率平均为3.2%^[7]。HCV是慢性肝病的主要病原之一,HCV感染后大约10%-15%的感染者能通过病毒特异性免疫应答清除病毒而呈自限性过程,但仍有超过80%的HCV感染者不能清除HCV而最终发展成为慢性丙型肝炎患者^[8],而这些慢性患者中又分别有8%-46%和11%-19%会发展成肝硬化和肝细胞癌^[2],严重危害患者的健康和生命。HCV具有高度异质性,基因型繁多且分布有明显地理差异,给HCV感染的诊断和防治带来了不少难题。本文综合国内外学者的研究资料,就HCV的基因分型研究进展作一综述。

1 HCV基因分型

HCV是一种球形带脂蛋白包膜的病毒,病毒颗粒直径约为55-65 nm,为单股正链RNA病毒,基因组全长约9.6 kDa。基因组两侧分别为5'和3'非编码区,中间为开放性读码框(open Reading Frame, ORF)^[9]。从基因的5'端基因序列为:5'NTR-C-E1-E2/NS1-NS2-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B-3'NTR。由于HCV的RNA聚合酶缺乏校对功能,使HCV在复制时突变率很高,而这也是HCV基因组分型的基础。目前至少有4种不同的HCV基因型命名系统:Okamoto系统、Kanazawa系统、Cha系统、Simmonds系统^[10],缺乏统一的鉴定标准,致使命名混乱。因此,第二届HCV与相关病毒国际讨论会将Simmonds系统制定为统一的HCV基因型命名系统。Simmonds命名系统是由Simmonds等^[10]根据基因序列的差异建立的针对HCV基因组C区、E1区和NS5区的核苷酸序列分析,将HCV分为6个基因型及不同亚型。根据2005年新达成的HCV基因型命名规则共识,以HCV的基因型发现先后次序用阿拉伯数字表示(如1、2、3等),基因亚型用英文小写字母表示(如1a、2b、3c等)。近年来Simmonds命名系统在国外得到广泛应用,但国内仍有相当一部分研究人员以Okamoto和Kanazawa命名系统进行HCV基因分型。

2 HCV基因型全球分布及流行病学研究

HCV基因型分布复杂,存在明显地理差异,不同地区的HCV基因型也有所不同。从全球分布来看,5种常见基因型(1a、1b、2a、2b、3a)分布广泛,以1型最多见。其中美国、巴西和欧洲西北部以1a型占优势;1b型分布于世界各地是当前最

主要的基因型^[11];北美、欧洲和日本多以2a型和2b型为主;2c型在意大利北部地区较多;西方一些国家以及泰国、新加坡则以3a型多见。其他少见基因型的分布则局限于某些特殊地区,如4型在中非和中东占优势,南非和香港分别发现5型和6型^[12]。中国HCV主要的基因亚型是1b和2a,其中以1b型最多见,占66%;2a型次之,占14%;某些地区有1a、2b和3b型报道;在广州和昆明地区还发现了少量的6型患者^[13]。

HCV基因型的地区分布为流行病学研究提供了帮助。近些年由于受到人口流动和毒品注射者增多的影响,HCV在一国家或地区的基因型和亚型的分布会有相应的改变。在我国,HCV感染者仍以1b基因型为主,但南北分布有差异,北方仍以1b、2a为主,如严艳等^[14]应用RT-PCR和特异性引物法对310例北京地区慢性丙型肝炎患者标本进行基因分型。结果显示:HCV 1b型有217例(70%),2a型74例(23.9%),2b型8例(2.6%),1b/2a混合型5例(1.6%),未分型6例(1.9%)。而南方其他基因型的种类在增多,比例呈上升趋势,可能与近年来报道中国南部地区静脉药瘾者感染HCV的人数激增有关。如雷华等^[15]应用RT-PCR方法对昆明地区176例慢性丙型肝炎患者进行基因分型检3b、3a、1b、6a和2a 5种基因型,11例不能分型,检出率93.75%。其中3b(43.18%)、3a(22.73%)、1b(18.75%)为主要基因型。未发现4、5基因型,未发现混合基因型感染。

3 HCV基因型分型方法

3.1 核苷酸序列分析法 核苷酸序列分析是通过PCR扩增有代表性的基因片段如5'NCR、C、NS5B,再进行核苷酸序列测定。核苷酸序列分析法是HCV基因分型中最经典、可靠的方法,许多其他的分型方法都将此方法作为参考标准,但该技术要求高、耗时多、成本高,难以在临床工作上使用。

3.2 型特异性引物扩增法 此方法是目前国内外学者较为广泛应用的方法。根据核苷酸片段某区域内序列变异的特点,设计一系列型特异性引物进行扩增,不同的型可扩增出长短不一的片段进行分型。型特异性引物扩增法较DNA序列分型简单、快速,但检测一份样本需使用多个引物,费用较高。

3.3 型特异性探针杂交法 根据HCV基因组5'NCR或者NS5区序列设计多个具有型特异性

的探针, 并使之呈线状平行固定在杂交膜上. 然后把PCR扩增产物标记生物素, 进行反向杂交后分型. 这种方法可以分辨6种基因型和相关的亚型, 但需要制备很多条探针进行杂交, 较为繁琐.

3.4 限制性片段长度多态性 该技术的原理是检测DNA在限制性内切酶酶切后形成的特定DNA片段的大小. 因此, 凡是可以引起酶切位点变异的突变如点突变和一段DNA的重新组织等均可导致限制性片段长度多态性的产生. 不同HCV基因型某一区段个别碱基的变异会直接导致某些酶切位点的改变, 然后将PCR扩增靶基因(一般选5'NTR区和NS5B保守区作为靶基因)得到的产物用*Hae* III、*Rsa* I、*Mva* I、*Hinf* I、*Scr* I等限制性内切酶进行酶切, 不同型HCV或亚型HCV得到不同长度大小的酶切产物, 并以此对HCV进行基因分型.

3.5 遗传发育关系进化树 遗传发育关系分析法在1993年被首次提出, 其建立的基础是核苷酸序列分析法. 2005年新达成的HCV基因型命名规则共识^[10]认为检测HCV基因型最准确的方法是对基因组的某个区进行PCR扩增、测序及进化树分析. Lu等^[13]对中国9个地区139例血清HCV-RNA阳性标本进行Core区、E1区、NS5B区测序和进化树分析, 分型结果显示1b型、2a型、6a型是HCV最普遍的基因型, 所占比例分别为66%(92/139)、14%(19/139)、10%(14/139). 同时还检测出少量1a型、2c型、3a型、3b型. 此外, 在昆明和广州还检出6型新的亚型(6v).

4 HCV基因型的意义

4.1 HCV基因型与疾病严重程度 目前HCV基因型与肝病严重程度的关系尚未获得一致意见. 近年来较多文献报道1b型HCV与重度慢性肝炎、肝硬化和肝细胞癌有密切关系, 且1b型HCV占到重型肝炎的80%. Roffi等^[16]研究发现, 对2 307例丙型肝炎患者临床诊治资料回顾性研究发现1b型患者发生肝硬化和肝癌的比例也明显高于其他型患者, 且整体存活率也明显低于其他基因型患者. 长春地区一项关于78例HCV-RNA阳性患者的研究发现, 在丙肝硬化和丙型肝炎相关肝癌患者中1b基因型比例明显高于其他基因型, 差异具有显著统计学意义. 数据显示4例1a型患者均为慢性肝炎; 38例1b型HCV感染中, 有慢性肝炎22例, 肝硬化12例, 肝癌4例; 26例2a型HCV感染者中有慢性肝炎20例, 肝硬化5例, 肝癌1例; 9例2b型HCV感染中, 有慢性肝炎

8例, 肝硬化1例; 1例3a型HCV感染为慢性肝炎. 此研究结果提示1b型HCV感染是发展为肝硬化和肝癌的独立危险因素. 但Arens等^[17]研究发现HCV基因型与肝脏疾病严重程度无关. 国内一项研究对92例慢性肝炎、肝硬化、肝癌(均为HCV感染者)患者中基因型的分布进行比较均未发现HCV基因型因肝病严重程度而有所不同. 从以上研究可发现大多数学者认为不同HCV基因型在病毒致病力与肝病严重程度等方面有着明显的差异, 但结论存在争议. 因此, 需要大样本的前瞻性研究及询证医学证据来进一步澄清争议.

4.2 HCV基因型与抗病毒治疗及持续病毒学应答率的预测 国内外研究结果表明经抗病毒治疗HCV应答率达20%-40%. 干扰素(interferon, IFN)是目前公认的用于丙型肝炎治疗的抗病毒生物制剂, 是治疗慢性丙型肝炎第一个里程碑式药物, 被广泛应用于临床. 临床上常用的IFN包括普通IFN- α 、复合IFN和聚乙二醇化干扰素 α (PEG-IFN- α). 目前有学者将PEG-IFN- α 联合利巴韦林(RBV)方案作为治疗慢性丙型肝炎的标准治疗方案^[18]. 影响IFN/RBV疗效的因素包括IFN剂量、疗程、血清HCV-RNA水平和宿主本身身体状况^[19], 近年来国内外研究资料表明HCV基因型对IFN抗病毒疗效有明显影响^[20,21]. IFN对1b型患者疗效明显低于其他常见基因型患者. IFN治疗2a型患者的SVR为90%左右, 而治疗1b型患者的长期缓解率仅为40%左右. Fried等^[18]研究发现慢性丙型肝炎患者在接受PEG-IFN- α /RBV治疗后2型和3型患者SVR明显高于1型患者, 而后来研究也证实了Fried等的研究结果^[22]. 于建武等^[23]研究结果显示在黑龙江地区慢性丙型肝炎以1型和2型为主, 2型和3型对干扰素疗效较好, 占52.3%. Kadokura等^[24]的研究结果也表明, PEG-IFN- α /RBV对慢性丙型肝炎患者的病毒学应答在很大程度上受HCV基因型的影响. 另外, 血清HCV-RNA水平、进展期的肝硬化、较高的年龄、肥胖及黑种人等这些指标被证实为PEG-IFN- α /RBV治疗后应答差的预测指标^[25-28]. 但如果更好的预测丙型肝炎患者病毒学应答的潜力, 可能会影响到是否启动抗病毒治疗、抗病毒药物的选择以及抗病毒治疗的时间^[29-31]. 目前, 国内外将IL-28B基因多态性作为各型的HCV感染者应用PEG-IFN- α /RBV治疗效果的预测指标. Ge等^[32]给予1型HCV患者PEG-IFN- α /RBV治疗, 结果该患者中IL-28B基因多

■创新盘点

HCV基因分型有明显的地理差异, 其流行病学意义较为显著, 在临床上不同的HCV基因分型决定抗病毒治疗的时间, 另外IL-28B的多态性可预测抗病毒治疗的效果. 法国在疫苗研究上取得一定成果, 但来源于HCV基因组高变区域的蛋白可诱发保护性免疫, 研制预防HCV的有效疫苗是个重要挑战.

■应用要点

在流行病学方面, 基因分型可作为追查其根源的有效工具. 不同地区各基因型在传播途径、疾病临床轻重程度之间的差异性, 为丙型肝炎的临床诊断和预防提供帮助. 在临床抗病毒治疗方面, HCV基因分型是制定抗病毒治疗方案、预测抗病毒疗效的重要依据.

态性为rs12979860的位点为C/C基因型的SVR是该位点为T/T基因型的2倍. 这个结果在不同的种族通过意向性分析也被证实^[33]. Tanaka等^[34]也对1型HCV患者PEG-IFN- α /RBV治疗后的SVR分析显示IL-28B基因多态性为rs8099917的位点为T/T基因型的SVR为64%, G/T基因型的SVR为13%, G/G基因型为空应答. 瑞士全基因组研究协会发现1型HCV患者的治疗失败与IL-28B基因多态性为rs8099917的位点为G/G基因型密切相关^[35]. 日本的一些研究也证实了rs8099917的T/T基因型是1型HCV最强的独立的SVR预测指标, 而G等位基因是最强的唯一的空病毒学应答的预测指标^[36]. 由于基因1型患者的早期病毒学应答(early virologic response, EVR)能影响到SVR, 因此对于未获得EVR者应尽快停药, 这样可以减轻患者的经济负担和药物不良反应^[37]. 欧洲研究者发现1型HCV合并人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)感染者rs12979860的C/C基因型与rs8099917的T/T基因型是患者治疗后产生SVR的预测指标^[38-40]. 目前, 1型HCV患者给予PEG-IFN- α /RBV治疗后无应答的患者, 继续应用三联法治疗(PEG-IFN- α /RBV联合telaprevir或boceprevir)正在实验中, IL-28B基因多态性对其治疗后SVR的预测存在争议^[41]. 而IL-28B基因多态性与2型和3型HCV患者治疗后的SVR没有明显的预测关联, 数据有待进一步实验证实^[42,43].

4.3 HCV基因分型与疫苗研制 由于HCV各种基因型、亚型、准种变异的存在和免疫逃避现象, 使病毒得以逃脱宿主免疫系统的作用而造成病毒的持续感染. 通过对黑猩猩的研究显示, HCV的体液免疫应答具有高度的病毒株变异性, 由于HCV的高频率的变异率, 对HCV抗体发生耐受的变异株可逃避机体的体液免疫应答而维持HCV的感染^[44], HCV感染慢性化有不同机制, 如HCV特异性的T细胞免疫反应被调节性T细胞(regulatory T cells, Treg)^[45]或程序性死亡受体1(programmed death receptor 1, PD-1)^[46]下调, 即在慢性HCV感染中, Treg细胞频率明显高于急性HCV感染, 要研制疫苗就要克服慢性HCV感染者体内的T细胞免疫反应的损伤或抑制. 除此之外, 也有研究表明慢性丙型肝炎患者体内CTL细胞可以特异识别HCV C、E1、E2/NS-1、NS-3、NS-5区所编码的抗原位点, 特别是C区和NS-5区, CTL细胞能够杀伤表达上述抗原的靶细胞. 然而, HCV感染者仍转化为慢性, 这可能是病毒基因高度变异发生免疫逃避, 或者是病毒

滴度低引发机体CTL细胞反应太弱. HCV各种基因型、亚型、准种变异的存在给丙型肝炎疫苗的研制工作带来很大的困难. 近几年Ezelle等^[47]运用能表达HCV结构区蛋白(C, E1, E2)的重组的水泡口炎病毒(VSV)载体免疫动物, 结果发现免疫小鼠产生较强的针对所有HCV结构区蛋白的细胞免疫和体液免疫, 尤其是针对HCV-E2的体液免疫. 因而得出, 表达HCV结构区蛋白的VSV重组病毒疫苗是可作为研制抗HCV感染和治疗性疫苗的一种方法. Baryluk等^[48]用含有HCV/E1的质粒和重组腺病毒进行的治疗性疫苗的研究, 已进行了临床研究, 在I期临床研究证明安全性的基础上并已进入II期临床研究. 圣路易斯的疫苗I期临床试验为重组HCV疫苗候选阶段, 用糖蛋白E1和E2在人类志愿者体内治疗, E1/E2蛋白质重组体表现出适度的免疫原性^[49,50]. 目前, 法国科学家^[51]利用类病毒颗粒开发出一种丙型肝炎疫苗, 这种疫苗被注入小鼠和猕猴体内后, 会与E2和/或E1 HCV的包膜糖蛋白的假病毒颗粒诱导高滴度抗-E2和/或抗-E1的抗体, 以及对抗HCV的中和抗体(neutralizing antibodies, Nabs), 这些抗体能中和各种HCV变异株的感染性, 从而起到预防作用. 这种疫苗对5种HCV变异株都有效, 该疫苗需要进一步实验明确应用于人类的效果.

5 结论

丙型肝炎由于其患者基数大、分布广、难治性等特点已成为世界性公共卫生问题^[52]. 目前HCV分为6个型, 68个亚型, 其分布存在明显地理差异. HCV基因分型可能在HCV急性感染慢性化中起重要作用, 其与肝病严重程度关系目前仍存在争议. 目前研究认为HCV基因型对抗病毒治疗疗效有明显影响作用, 一般认为IFN对1b型疗效明显低于其他常见基因型, IL-28B的多态性对于HCV基因型为1型的抗病毒治疗后SVR预测有意义, 但对于2型和3型SVR预测意义不显著. 此外, 由于HCV基因分型的不同给疫苗的研制也带来很大的困难. 目前在疫苗研制方面虽有一定进展, 但疫苗针对于人类HCV各基因型的预防效果尚有待于进一步研究实验. 因此, 通过基因型的比较和分析, 有助于了解各地区、不同人种HCV的流行分布及遗传变异趋势, 为HCV诊断、治疗和疫苗的研制提供理论依据.

6 参考文献

- 1 Houghton M. The long and winding road leading

- to the identification of the hepatitis C virus. *J Hepatol* 2009; 51: 939-948
- 2 Lemon SM, McKeating JA, Pietschmann T, Frick DN, Glenn JS, Tellinghuisen TL, Symons J, Furman PA. Development of novel therapies for hepatitis C. *Antiviral Res* 2010; 86: 79-92
 - 3 de Bruijne J, Weegink CJ, Jansen PL, Reesink HW. New developments in the antiviral treatment of hepatitis C. *Vox Sang* 2009; 97: 1-12
 - 4 Shepard CW, Ortega-Sanchez IR, Scott RD, Rosenstein NE. Cost-effectiveness of conjugate meningococcal vaccination strategies in the United States. *Pediatrics* 2005; 115: 1220-1232
 - 5 Khatib MA, Ferenci P, Hadziyannis SJ, Colombo M, Manns MP, Almasio PL, Esteban R, Abdo AA, Harrison SA, Ibrahim N, Cacoub P, Eslam M, Lee SS. Management of hepatitis C virus genotype 4: recommendations of an international expert panel. *J Hepatol* 2011; 54: 1250-1262
 - 6 Attaullah S, Khan S, Ali I. Hepatitis C virus genotypes in Pakistan: a systemic review. *Virol J* 2011; 8: 433
 - 7 Gao X, Cui Q, Shi X, Su J, Peng Z, Chen X, Lei N, Ding K, Wang L, Yu R, Wang N. Prevalence and trend of hepatitis C virus infection among blood donors in Chinese mainland: a systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis* 2011; 11: 88
 - 8 Marcellin P, Boyer N. Transition of care between paediatric and adult gastroenterology. Chronic viral hepatitis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2003; 17: 259-275
 - 9 Sugimoto K, Stadanlick J, Ikeda F, Brensinger C, Furth EE, Alter HJ, Chang KM. Influence of ethnicity in the outcome of hepatitis C virus infection and cellular immune response. *Hepatology* 2003; 37: 590-599
 - 10 Simmonds P, Bukh J, Combet C, Deléage G, Enomoto N, Feinstone S, Halfon P, Inchauspé G, Kuiken C, Maertens G, Mizokami M, Murphy DG, Okamoto H, Pawlotsky JM, Penin F, Sablon E, Shin-I T, Stuyver LJ, Thiel HJ, Viazov S, Weiner AJ, Widell A. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* 2005; 42: 962-973
 - 11 Zein NN. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13: 223-235
 - 12 Tanaka Y, Agha S, Saady N, Kurbanov F, Orito E, Kato T, Abo-Zeid M, Khalaf M, Miyakawa Y, Mizokami M. Exponential spread of hepatitis C virus genotype 4a in Egypt. *J Mol Evol* 2004; 58: 191-195
 - 13 Lu L, Nakano T, He Y, Fu Y, Hagedorn CH, Robertson BH. Hepatitis C virus genotype distribution in China: predominance of closely related subtype 1b isolates and existence of new genotype 6 variants. *J Med Virol* 2005; 75: 538-549
 - 14 严艳, 李卓, 郭向华, 林尊会. 北京地区慢性丙型肝炎患者血清HCV-RNA定量检测与基因分型的研究. 医学理论与实践 2007; 20: 756-757
 - 15 雷华, 戴静毅, 柏保利, 庄林. 昆明地区丙型肝炎患者基因分型及其临床意义. 肝脏 2011; 16: 48-49
 - 16 Roffi L, Redaelli A, Colloredo G, Minola E, Donada C, Picciotto A, Riboli P, Del Poggio P, Rinaldi G, Paris B, Fornaciari G, Giusti M, Marin R, Morales R, Sangiovanni A, Belloni G, Pozzi M, Poli G, Mascoli N, Corradi C, Pioltelli P, Scalori A, Mancina G. Outcome of liver disease in a large cohort of histologically proven chronic hepatitis C: influence of HCV genotype. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001; 13: 501-506
 - 17 Arens M. Clinically relevant sequence-based genotyping of HBV, HCV, CMV, and HIV. *J Clin Virol* 2001; 22: 11-29
 - 18 Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, Smith C, Marinos G, Gonçales FL, Häussinger D, Diago M, Carosi G, Dhumeaux D, Craxi A, Lin A, Hoffman J, Yu J. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2002; 347: 975-982
 - 19 Kau A, Vermehren J, Sarrazin C. Treatment predictors of a sustained virologic response in hepatitis B and C. *J Hepatol* 2008; 49: 634-651
 - 20 El-Shamy A, Shoji I, Kim SR, Ide Y, Imoto S, Deng L, Yoon S, Fujisawa T, Tani S, Yano Y, Seo Y, Azuma T, Hotta H. Sequence heterogeneity in NS5A of hepatitis C virus genotypes 2a and 2b and clinical outcome of pegylated-interferon/ribavirin therapy. *PLoS One* 2012; 7: e30513
 - 21 Manns MP, Wedemeyer H, Cornberg M. Treating viral hepatitis C: efficacy, side effects, and complications. *Gut* 2006; 55: 1350-1359
 - 22 Sarasin-Filipowicz M. Interferon therapy of hepatitis C: molecular insights into success and failure. *Swiss Med Wkly* 2010; 140: 3-11
 - 23 于建武, 赵勇华, 李树臣. 丙型肝炎病毒血清型对慢性丙型肝炎患者早期病毒学应答和生化应答的影响. 肝脏 2007; 12: 7-9
 - 24 Kadokura M, Maekawa S, Sueki R, Miura M, Komase K, Shindo H, Amemiya F, Uetake T, Inoue T, Sakamoto M, Nakagawa M, Sakamoto N, Watanabe M, Enomoto N. Analysis of the complete open reading frame of hepatitis C virus in genotype 2a infection reveals critical sites influencing the response to peginterferon and ribavirin therapy. *Hepatol Int* 2011; 5: 789-799
 - 25 Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC, Rustgi VK, Shiffman M, Reindollar R, Goodman ZD, Koury K, Ling M, Albrecht JK. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet* 2001; 358: 958-965
 - 26 Hadziyannis SJ, Sette H, Morgan TR, Balan V, Diago M, Marcellin P, Ramadori G, Bodenheimer H, Bernstein D, Rizzetto M, Zeuzem S, Pockros PJ, Lin A, Ackrill AM. Peginterferon-alpha2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C: a randomized study of treatment duration and ribavirin dose. *Ann Intern Med* 2004; 140: 346-355
 - 27 McHutchison JG, Lawitz EJ, Shiffman ML, Muir AJ, Galler GW, McCone J, Nyberg LM, Lee WM, Ghalib RH, Schiff ER, Galati JS, Bacon BR, Davis MN, Mukhopadhyay P, Koury K, Noviello S, Pedicone LD, Brass CA, Albrecht JK, Sulkowski MS. Peginterferon alfa-2b or alfa-2a with ribavirin for treatment of hepatitis C infection. *N Engl J Med* 2009; 361: 580-593
 - 28 Muir AJ, Bornstein JD, Killenberg PG. Peginterferon alfa-2b and ribavirin for the treatment of chronic hepatitis C in blacks and non-Hispanic whites. *N Engl J Med* 2004; 350: 2265-2271
 - 29 McHutchison JG, Everson GT, Gordon SC, Jacobson IM, Sulkowski M, Kauffman R, McNair L, Alam J, Muir AJ. Telaprevir with peginterferon and ribavirin for chronic HCV genotype 1 infection. *N Engl J Med* 2009; 360: 1827-1838

同行评价

本文较好的介绍了HCV基因分型的研究情况, 使本领域医生更好的认识HCV基因型的意义, 了解到目前与HCV基因分型有关的最新进展, 文章条理清晰, 逻辑性强, 是一篇有价值的综述。

- 30 Hézode C, Forestier N, Dusheiko G, Ferenci P, Pol S, Goeser T, Bronowicki JP, Bourlière M, Gharakhani S, Bengtsson L, McNair L, George S, Kieffer T, Kwong A, Kauffman RS, Alam J, Pawlotsky JM, Zeuzem S. Telaprevir and peginterferon with or without ribavirin for chronic HCV infection. *N Engl J Med* 2009; 360: 1839-1850
- 31 Kwo PY, Lawitz EJ, McCone J, Schiff ER, Vierling JM, Pound D, Davis MN, Galati JS, Gordon SC, Ravendhran N, Rossaro L, Anderson FH, Jacobson IM, Rubin R, Koury K, Pedicone LD, Brass CA, Chaudhri E, Albrecht JK. Efficacy of boceprevir, an NS3 protease inhibitor, in combination with peginterferon alfa-2b and ribavirin in treatment-naïve patients with genotype 1 hepatitis C infection (SPRINT-1): an open-label, randomised, multicentre phase 2 trial. *Lancet* 2010; 376: 705-716
- 32 Ge D, Fellay J, Thompson AJ, Simon JS, Shianna KV, Urban TJ, Heinzen EL, Qiu P, Bertelsen AH, Muir AJ, Sulkowski M, McHutchison JG, Goldstein DB. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature* 2009; 461: 399-401
- 33 Thompson AJ, Muir AJ, Sulkowski MS, Ge D, Fellay J, Shianna KV, Urban T, Afdhal NH, Jacobson IM, Esteban R, Poordad F, Lawitz EJ, McCone J, Shiffman ML, Galler GW, Lee WM, Reindollar R, King JW, Kwo PY, Ghalib RH, Freilich B, Nyberg LM, Zeuzem S, Poynard T, Vock DM, Pieper KS, Patel K, Tillmann HL, Noviello S, Koury K, Pedicone LD, Brass CA, Albrecht JK, Goldstein DB, McHutchison JG. Interleukin-28B polymorphism improves viral kinetics and is the strongest pretreatment predictor of sustained virologic response in genotype 1 hepatitis C virus. *Gastroenterology* 2010; 139: 120-129. e18
- 34 Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M, Kurosaki M, Matsuura K, Sakamoto N, Nakagawa M, Korenaga M, Hino K, Hige S, Ito Y, Mita E, Tanaka E, Mochida S, Murawaki Y, Honda M, Sakai A, Hiasa Y, Nishiguchi S, Koike A, Sakaida I, Imamura M, Ito K, Yano K, Masaki N, Sugauchi F, Izumi N, Tokunaga K, Mizokami M. Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nat Genet* 2009; 41: 1105-1109
- 35 Rauch A, Kutalik Z, Descombes P, Cai T, Di Iulio J, Mueller T, Bochud M, Battegay M, Bernasconi E, Borovicka J, Colombo S, Cerny A, Dufour JF, Furrer H, Günthard HF, Heim M, Hirschel B, Malinverni R, Moradpour D, Müllhaupt B, Witteck A, Beckmann JS, Berg T, Bergmann S, Negro F, Telenti A, Bochud PY. Genetic variation in IL28B is associated with chronic hepatitis C and treatment failure: a genome-wide association study. *Gastroenterology* 2010; 138: 1338-1345, 1345. e1-e7
- 36 Kurosaki M, Tanaka Y, Nishida N, Sakamoto N, Enomoto N, Honda M, Sugiyama M, Matsuura K, Sugauchi F, Asahina Y, Nakagawa M, Watanabe M, Sakamoto M, Maekawa S, Sakai A, Kaneko S, Ito K, Masaki N, Tokunaga K, Izumi N, Mizokami M. Pre-treatment prediction of response to pegylated-interferon plus ribavirin for chronic hepatitis C using genetic polymorphism in IL28B and viral factors. *J Hepatol* 2011; 54: 439-448
- 37 Marcellin P, Roberts SK, Reddy KR, Harrison SA, Jensen DM, Hadziyannis S, Diago M, Weltman M, Messinger D, Tatsch F, Rizzetto M. Safety profile of standard- vs. high-dose peginterferon alfa-2a plus standard-dose ribavirin in HCV genotype 1/4 patients: pooled analysis from 5 randomized studies. *Expert Opin Drug Saf* 2012; 11: 901-909
- 38 Rallón NI, Naggie S, Benito JM, Medrano J, Restrepo C, Goldstein D, Shianna KV, Vispo E, Thompson A, McHutchison J, Soriano V. Association of a single nucleotide polymorphism near the interleukin-28B gene with response to hepatitis C therapy in HIV/hepatitis C virus-coinfected patients. *AIDS* 2010; 24: F23-F29
- 39 Pineda JA, Caruz A, Rivero A, Neukam K, Salas I, Camacho A, Palomares JC, Mira JA, Martínez A, Roldán C, de la Torre J, Macías J. Prediction of response to pegylated interferon plus ribavirin by IL28B gene variation in patients coinfecting with HIV and hepatitis C virus. *Clin Infect Dis* 2010; 51: 788-795
- 40 Aparicio E, Parera M, Franco S, Pérez-Alvarez N, Tural C, Clotet B, Martínez MA. IL28B SNP rs8099917 is strongly associated with pegylated interferon-α and ribavirin therapy treatment failure in HCV/HIV-1 coinfecting patients. *PLoS One* 2010; 5: e13771
- 41 Akuta N, Suzuki F, Hirakawa M, Kawamura Y, Yatsuji H, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Chayama K, Nakamura Y, Kumada H. Amino acid substitution in hepatitis C virus core region and genetic variation near the interleukin 28B gene predict viral response to telaprevir with peginterferon and ribavirin. *Hepatology* 2010; 52: 421-429
- 42 Stättermayer AF, Stauber R, Hofer H, Rutter K, Beinhardt S, Scherzer TM, Zinobier K, Datz C, Maieron A, Dulic-Lakovic E, Kessler HH, Steindl-Munda P, Strasser M, Krall C, Ferenci P. Impact of IL28B genotype on the early and sustained virologic response in treatment-naïve patients with chronic hepatitis C. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2011; 9: 344-350. e2
- 43 Montes-Cano MA, García-Lozano JR, Abad-Molina C, Romero-Gómez M, Barroso N, Aguilar-Reina J, Núñez-Roldán A, González-Escribano MF. Interleukin-28B genetic variants and hepatitis virus infection by different viral genotypes. *Hepatology* 2010; 52: 33-37
- 44 Shoukry NH, Grakoui A, Houghton M, Chien DY, Ghayeb J, Reimann KA, Walker CM. Memory CD8+ T cells are required for protection from persistent hepatitis C virus infection. *J Exp Med* 2003; 197: 1645-1655
- 45 Cabrera R, Tu Z, Xu Y, Firpi RJ, Rosen HR, Liu C, Nelson DR. An immunomodulatory role for CD4(+)CD25(+) regulatory T lymphocytes in hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2004; 40: 1062-1071
- 46 Ma CJ, Ni L, Zhang Y, Zhang CL, Wu XY, Atia AN, Thayer P, Moorman JP, Yao ZQ. PD-1 negatively regulates interleukin-12 expression by limiting STAT-1 phosphorylation in monocytes/macrophages during chronic hepatitis C virus infection. *Immunology* 2011; 132: 421-431
- 47 Ezelle HJ, Markovic D, Barber GN. Generation of hepatitis C virus-like particles by use of a recombinant vesicular stomatitis virus vector. *J Virol* 2002; 76: 12325-12334
- 48 Baryluk A, Polz-Dacewicz M, Sendek M, Piecyk-Sidor M. [Modern achievements in research on hepatitis C vaccine]. *Postępy Hig Med Dosw (Online)* 2005; 59: 98-104

- 49 Frey SE, Houghton M, Coates S, Abrignani S, Chien D, Rosa D, Pileri P, Ray R, Di Bisceglie AM, Rinella P, Hill H, Wolff MC, Schultze V, Han JH, Scharschmidt B, Belshe RB. Safety and immunogenicity of HCV E1E2 vaccine adjuvanted with MF59 administered to healthy adults. *Vaccine* 2010; 28: 6367-6373
- 50 Ray R, Meyer K, Banerjee A, Basu A, Coates S, Abrignani S, Houghton M, Frey SE, Belshe RB. Characterization of antibodies induced by vaccination with hepatitis C virus envelope glycoproteins. *J Infect Dis* 2010; 202: 862-866
- 51 Garrone P, Fluckiger AC, Mangeot PE, Gauthier E, Dupeyrot-Lacas P, Mancip J, Cangialosi A, Du Chéné I, LeGrand R, Mangeot I, Lavillette D, Bellier B, Cosset FL, Tangy F, Klatzmann D, Dalba C. A prime-boost strategy using virus-like particles pseudotyped for HCV proteins triggers broadly neutralizing antibodies in macaques. *Sci Transl Med* 2011; 3: 94ra71
- 52 杨松, 成军. 丙型肝炎病毒直接作用抗病毒药物及其耐药研究进展. *解放军医学杂志* 2011; 36: 427-430

编辑 田滢 电编 闫晋利

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

• 消息 •

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)

尾加压素 II 在肝硬化门脉高压及侧支循环中的作用

郭晓会, 冯志杰

■背景资料

肝硬化门脉高压与肝内、全身和门体侧支循环的血流动力学紊乱相关, 血管活性物质在其中发挥了重要作用。尾加压素 II (U II) 作为体内重要的血管活性物质, 在门脉高压症的发生和侧支循环形成中起重要作用。

郭晓会, 冯志杰, 河北医科大学第二医院消化内科 河北省石家庄市 050000

郭晓会, 硕士, 主要从事肝脏-内镜方面的研究。

作者贡献分布: 本文综述由郭晓会完成; 冯志杰负责审核。

通讯作者: 冯志杰, 教授, 050000, 河北省石家庄市和平西路25号, 河北医科大学第二医院消化内科。

zhijiefeng2005@163.com

电话: 0311-66002955

收稿日期: 2012-05-10 修回日期: 2012-07-05

接受日期: 2012-08-01 在线出版日期: 2012-12-18

Role of urotensin-II in the pathogenesis of liver cirrhosis and portal hypertension and collateral circulation

Xiao-Hui Guo, Zhi-Jie Feng

Xiao-Hui Guo, Zhi-Jie Feng, Department of Gastroenterology, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China

Correspondence to: Zhi-Jie Feng, Professor, Department of Gastroenterology, the Second Hospital of Hebei Medical University, 25 Heping West Road, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China. zhijiefeng2005@163.com

Received: 2012-05-10 Revised: 2012-07-05

Accepted: 2012-08-01 Published online: 2012-12-18

Abstract

Urotensin-II (U-II) is a somatostatin-like cyclic peptide which has a potent vasoactive effect and can promote vascular reconstruction and hyperplasia. Research shows that U-II plays an important role in the development of liver cirrhosis and portal hypertension. U-II influences intrahepatic resistance and splanchnic hemodynamics through a variety of pathways, causing portal hypertension and participating in the formation of esophageal and gastric varices. U-II receptor antagonists can reduce portal pressure in cirrhotic rats, but this finding need to be confirmed clinically.

Key Words: Urotensin II; Liver cirrhosis; Portal hypertension

Guo XH, Feng ZJ. Role of urotensin-II in the pathogenesis of liver cirrhosis and portal hypertension and collateral circulation. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(35): 3536-3541

摘要

尾加压素(urotensin-II, U II)是一种生长抑素样环肽, 具有强有效的血管活性作用, 并能促进血管重建和增生。研究显示, U II与肝硬化门脉高压的形成有关, 通过多种途径影响肝内血管阻力和外周循环血量, 引起门脉压力升高, 参与食管胃静脉曲张等侧支循环形成。应用U II受体拮抗剂能降低肝硬化大鼠的门脉压力, 但有待于在临床上做进一步研究。

关键词: 尾加压素; 肝硬化; 门脉高压

郭晓会, 冯志杰. 尾加压素 II 在肝硬化门脉高压及侧支循环中的作用. *世界华人消化杂志* 2012; 20(35): 3536-3541

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3536.asp>

0 引言

肝硬化门脉高压与肝内、全身和门体侧支循环的血流动力学紊乱相关^[1], 肝内血管阻力增加和全身高动力循环状态在门脉高压发病机制中发挥了重要作用。门脉高压是食管胃静脉曲张等门体侧支循环形成和发展的重要因素。尾加压素(urotensin-II, U II)作为体内重要的血管活性物质, 在肝硬化门体侧支循环的建立与开放中发挥一定作用, 并可能成为新的、潜在的治疗靶点, 肝硬化和门脉高压症患者血浆U II水平明显增高在一些研究中已经证实, 本文将其对肝硬化门脉系统及食管侧支血流动力学的影响作一综述。

1 U II 的结构及生物学活性

1.1 U II 的结构 U II是一种生长抑素样环肽, 最早是在1985年由Bern自硬骨鱼的脊髓尾部神经分离出来的, 属于神经肽范围^[2,3]。U II由11个氨基酸组成, 相对分子质量为1 388 kDa, 编码U II的基因位于1p36, 有5个外显子^[4]。U II及其受体广泛分布于人类神经系统、心血管、肾脏、肝脏等组织, 并与许多疾病的发生发展有关^[5-8]。

1.2 U II 的生物学活性 U II是一种强有效的血管活性介质, 通过与特异性的孤儿G蛋白偶联受

■同行评议者

李国威, 教授, 西安交通大学医学院第二附属医院普外科

体14(G protein-coupled receptor, GPR14)(后被命名为UT)结合,引起血管收缩和血管舒张两种效应. Ames等^[9]研究发现U II能够引起离体大鼠胸主动脉的强烈收缩,其亲和力指数为 9.09 ± 0.19 ,比内皮素(7.90 ± 0.11)、去甲肾上腺素(7.58 ± 0.11)、血清素(6.27 ± 0.12)有更强的血管收缩作用. U II的血管收缩作用与生物物种和局部血管床种类有关. 在人类, U II能够引起胸主动脉、主动脉弓收缩,但在外围血管如腹主动脉、肾动脉、股动脉收缩作用逐渐减弱甚至消失^[10,11]. 在灵长类动物, U II对所有外周血管均有收缩作用. U II对冠状动脉、肺动脉、桡动脉、乳动脉等内皮完整和去除内皮的血管均有收缩效应,同时也能引起脐静脉、面静脉、隐静脉的收缩,但其收缩作用要比动脉低很多^[12]. U II对血管的影响具有疾病特异性,研究发现U II在正常人的前臂血管能引起血管舒张,而在心力衰竭、高血压、肝硬化等患者中却能引起血管收缩. 此外,研究发现在清醒♂SD大鼠分别以3、30、300、3 000 pmol/kg静脉注射兔或人U II,在肠系膜动脉及大鼠尾部血管床可引起剂量依赖性的血管舒张效应^[13].

近年来, U II致有丝分裂及促纤维化作用研究日益增多. U II不仅能促进血管平滑肌细胞和血管外膜成纤维细胞增殖、迁移和表型转换,而且能促进胶原合成和分泌,促进巨噬细胞向泡沫细胞转化,参与血管重塑及心肌纤维化的形成^[14,15]. 近期研究发现U II还是一种血管生成因子,可以促进血管重建和增生^[16-18],可能在肝硬化门脉高压侧支循环的建立中起一定作用.

2 U II 在肝硬化门脉高压门脉系统及侧支循环中的作用

2.1 U II 与门脉高压肝内血管阻力

肝硬化门脉高压形成的主要机制是肝内阻力增加和体循环血流量增多,肝内阻力增加是始动因素. 其中,肝内纤维组织增生及肝脏结构改变所致阻力增加是固定不变的,但外周血或循环中的血管活性物质可增强或减弱肝内阻力的变化^[19]. U II是新近发现的一种血管活性介质,已被证实在肝纤维化、肝硬化及相关并发症的发生发展中起重要作用.

Kemp等^[20]对80例肝硬化患者同时进行了血浆U II和门静脉压力测定,结果发现肝硬化患者血浆U II水平明显升高,伴有腹水的肝硬化患者血浆U II水平明显高于无腹水者,难治性腹水患

者较随访期间新出现腹水患者血浆U II水平要高,肝肾综合征患者血浆U II水平较难治性腹水患者明显升高,血浆U II水平与门静脉压力及疾病严重程度(Child-Pugh分级)成正比,血浆U II水平越高,Child-Pugh分级越严重,患者生存率越低. Heller等^[21]的研究支持以上观点,同时发现肝静脉血浆U II水平明显高于门静脉,且血浆U II水平与血肌酐水平无关,这说明U II水平升高主要源于肝脏产生过多而非肾脏清除减少所致. Charles等^[22]测定了麻醉状态下正常和心力衰竭绵羊中血浆U II水平的动静脉差异,结果发现冠状窦、肝静脉、肾静脉血浆U II水平较颈动脉明显升高,但在颈静脉、下腔静脉、股静脉血浆U II水平与颈动脉相比无明显变化. 以上实验均提示肝硬化时升高的U II主要来源于肝脏,推测肝脏在长期慢性炎症和肝细胞不断再生过程中产生U II,引起肝内血管收缩,致使肝内血管阻力增加.

U II及其受体UT是相互关联的, U II只有与UT结合,才能发挥其生物学效应. Liu等^[23]研究了乙肝肝硬化患者肝脏组织中U II/UT的表达情况,结果显示与正常对照组比较,在肝硬化患者血浆U II水平升高,肝脏U II mRNA及UT蛋白表达明显增加,血浆U II水平升高与门静脉压力和U II mRNA成正相关. 另外, UT蛋白表达主要集中在肝脏库普弗细胞和肝窦内皮细胞. 还有研究显示在胆管结扎肝硬化大鼠,血浆U II水平较假手术组明显升高,与U II在肝脏血管、库普弗细胞、门静脉等内皮细胞的过表达有关,推测这些部位可能是U II升高的主要来源,而其受体除在肝内血管和门静脉内皮细胞表达明显升高外,在门静脉血管平滑肌细胞表达也明显增高^[24].

肝内阻力增加主要来源于血管因素和肝脏纤维化. 有研究表明应用 $0.1 \mu\text{mol/L}$ 的U II就可上调激活RhoA/Rho-kinase信号通路,促进其磷酸化,通过抑制肌球蛋白轻链磷酸酶而增强肌球蛋白轻链磷酸化,同时引起细胞内 Ca^{2+} 浓度升高和 Ca^{2+} 敏感性增加,导致血管平滑肌细胞收缩^[25-27]. 肝内血管阻力增加主要来源于肝血窦,肝硬化患者U II/UT在肝窦内皮细胞表达明显增加, U II通过与UT结合引起肝窦内皮细胞收缩使肝内血管阻力增加. 血浆U II水平升高和分泌敏感性增加可激活肝星状细胞, Iizuka等^[28]研究发现肝星状细胞激活使 α -平滑肌肌动蛋白、肌球蛋白轻链激酶(myosin light chain kinase, MLCK)、蛋白激酶C磷酸化底物(17-kDa PKC-potentiated

■ 研发前沿
U II促进血管重建和增生的作用近年来引起重视和研究,为U II拮抗剂在肝硬化门脉高压的应用前景中提供了新思路.

■相关报道

Trebicka研究显示胆管结扎肝硬化大鼠, 血浆U II水平较对照组明显升高, 肝脏可能是U II升高的主要来源, 其拮抗剂可明显降低门脉压力。

protein phosphatase 1 inhibitor protein, CPI-17)、Rho激酶2(Rho-kinase 2, ROCK2)表达增高, 通过 Ca^{2+} 依赖性的MLCK信号通路和 Ca^{2+} 敏感性的CPI-17及Rho激酶的调节亚单位(myosin phosphatase targeting subunit 1, MYPT1)信号通路引起肝窦内皮细胞和肝星状细胞收缩, 使肝血窦直径变小, 导致肝内微循环障碍, 发生缺血缺氧性损害, 以致形成恶性循环。因此, 在肝硬化门脉高压发展过程中U II通过不同途径影响肝内阻力的变化, 使肝内阻力不断增高, 促使门脉压力进行性升高, 为了缓解门脉压力, 门体侧支循环尤其是食管胃静脉曲张形成, 若不加干涉, 最终将会导致静脉曲张破裂出血甚至危及生命。

U II除有上述作用外, 还具有致有丝分裂及促纤维化作用。在肝脏组织中, U II能促进肝星状细胞增殖, 促进肝纤维化指标血浆透明质酸和层粘连蛋白水平表达, 提高肝脏I、III型胶原以及肝脏羟脯氨酸合成, 并上调金属蛋白酶抑制物-1(tissue inhibitor of metalloproteinase-1, TIMP-1)mRNA和转化生长因子 β 1(transforming growth factor- β , TGF β 1)mRNA表达, 加速肝纤维化发展^[29]。此外, U II还可使血小板衍生生长因子 β (platelet-derived growth factor- β , PDGF- β)、结缔组织衍生生长因子(connective tissue-derived growth factor)表达增高, 在肝纤维化形成过程中起重要作用^[30]。

2.2 U II与门脉高压高动力循环 肝硬化门脉高压的形成除受肝内阻力影响外, 全身高动力循环状态对于促进并维持门脉高压的形成至关重要。全身高动力循环状态的形成主要由于血管扩张所致外周血管阻力下降和钠水潴留共同作用所致。

有研究证实血浆U II水平在肝硬化患者明显升高, 通过增加肝内阻力加重门脉压力, 同时, U II也可通过影响外周循环血流量促进并维持门脉压力形成。有研究报道通过在大鼠脑室和静脉内注入U II, 发现脑室内注入U II能明显增加心率、心肌收缩力、心输出量和动脉血压, 推测中枢给药主要通过激活垂体-肾上腺皮质和交感肾上腺髓质神经系统使促肾上腺素和肾上腺素升高引起心率增快和心肌收缩力增强, 而静脉内给药除使心率增快外, 还可使外围血管舒张引起平均动脉压下降^[31,32]。

肝硬化循环紊乱以全身高动力循环状态为特点, 高动力循环状态主要包括心输出量增加, 心率增快, 外周血管阻力降低, 这些变化都归因于外周或内脏血管舒张, 过度外周血管舒张可

导致肾素-血管紧张素-醛固酮系统激活、钠水潴留和腹水形成。Bottrill等^[33]研究发现U II可引起5-HT预收缩左前降冠状动脉、甲氧胺预收缩肠系膜动脉、KCL预收缩的脑基底动脉内皮和浓度依赖性血管舒张效应, 这种舒张作用可能通过内皮源性超极化因子和一氧化氮(nitric oxide, NO)共同实现。Stirrat等^[34]研究认为U II在内径为170-200 μm 的人肺小动脉和腹部动脉, 可引起血管舒张而非血管收缩效应, 这种效应与U II促进NO和前列环素等舒血管物质产生有关。在肝硬化患者随着血浆U II水平升高, 平均动脉压呈下降趋势, 提示U II通过对外周血管舒张作用引起外周血管阻力下降, 使外周循环血流量增多, 对门脉高压的发生发展起重要作用。

U II及其受体分布广泛, 心、肝、肾被认为是U II的主要来源, 并在其相关疾病的发生发展中起主要作用^[35-38]。肝硬化时血浆U II水平明显升高, U II与肾内UT结合参与门脉侧支和腹水的形成。Song等^[39]在大鼠股静脉内注射U II, 结果发现U II引起肾小球滤过率减少, 尿钠、尿量减少, 1 h后当肾小球滤过率已恢复到正常水平时, 尿钠排泄依然比正常减少, 推测U II可能有钠水潴留作用。Shi等^[40]在自发性高血压大鼠静脉内注射U II(15 nmol/kg)后30 min能引起与平均动脉压降低及肾血流量减少相关的肾小球滤过率、尿流率、尿钠、尿钾的降低, 持续以0.2 nmol/(kg·h)灌注并以0.3 nmol/kg静脉注射, 在平均动脉压、肾小球滤过率、肾血流量、尿钾不变和醛固酮及血管紧张素水平不变的情况下, 仍可表现出钠潴留, 说明U II本身具有钠水潴留作用。此外, 研究发现U II还可参与渗透调节, 刺激机体从细胞液摄取钠、氯, 阻止钠、氯向细胞内转运导致钠、水、氯潴留^[41]。在肝硬化腹水患者血浆U II水平比无腹水患者明显增高, 难治性腹水患者血浆U II水平比新近出现腹水的患者显著增高, 这些实验说明血浆U II在肝硬化腹水形成中的作用。与上述研究结果相反, Zhang等^[42]对麻醉SD大鼠的肾动脉分别以2.5、5.0、10.0、20.0 ng/(kg·min)持续灌注U II 1 h, 结果发现引起NO依赖性的血管扩张而使肾血流量、肾小球滤过率增加, 尿量和尿钠增多, 这可能与给药方式、给药时间和药物剂量不同有关。

2.3 U II在门脉高压门体侧支循环 门体分流及食管胃侧支循环的形成是对门脉高压的一种代偿反应, 侧支循环形成能够降低门脉压力, 但侧支血管血流量增加, 可导致食管胃静脉曲张破裂

出血甚至危及生命, 同时侧支循环建立与开放使药物、毒素、激素进入肝内代谢较少, 直接通过侧支进入体循环, 进而引起肝性脑病、败血症等并发症发生. 侧支循环的建立与开放除与肝内阻力增加、肝外血流量增多有关外, 近期研究表明, 还与血管重建和再生有关.

血管生成主要是通过内皮细胞和平滑肌细胞激活、增殖、迁移, 重建形成新的血管和血管网. 研究表明血管生成受血管生成因子尤其是血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的影响^[43,44], VEGF可通过NO途径及非NO途径促进血管舒张、血管重建和血管生成. 有实验报道在门脉高压大鼠的腹部血管和肝硬化患者腹膜巨噬细胞中VEGF表达明显增加并有大量新生血管生成^[45,46]. Fernandez等^[47]研究发现在门脉高压大鼠的十二指肠、小肠、肠系膜内皮细胞VEGF/VEGF receptor-2蛋白表达增加、新生血管生成明显增加, 证实门脉高压侧支血管的形成是依赖VEGF的血管生成过程. 已有研究证实U II是一种血管生成因子. Albertin等^[48,49]通过应用U II孵育人脐静脉内皮细胞发现U II具有较强的血管生成活性, U II从10-8 mol/L开始就有显著的血管生成活性, 一方面通过激活磷脂酶C和引起细胞内Ca²⁺浓度升高, 引起快速直接的血管生成作用, 另一方面通过激活EPK1/2和P13K/Akt信号通路上调VEGF、内皮素、肾上腺髓质素3种血管生成因子mRNA及其蛋白水平的表达引起间接的血管生成作用, 表明U II比VEGF可能具有更强的促血管生成作用. 刘殿刚等通过对62例肝炎肝硬化门脉高压患者和23例健康体检人员比较, 结果显示肝硬化门静脉充血指数及血浆U II水平均明显高于对照组, 随食管静脉曲张程度加重, 门静脉充血指数和血浆U II水平逐渐增高. Chikamori等^[50]研究了53位不同程度食管胃静脉曲张患者, 结果表明食管胃静脉曲张程度越重, 心脏指数越高, 外周阻力越低, 血氨水平越高, 动静脉氧含量差越小, 推测血浆U II与食管胃静脉等侧支形成的发生发展有密切关系, 并在一定程度上可预测静脉曲张的程度、肝性脑病、肝肺综合征等并发症的发生.

3 U II 受体拮抗剂的应用

U II作为体内重要的血管活性物质, 在肝硬化门脉高压和门体侧支循环发生中发挥重要作用, 应用U II受体拮抗剂是否会改善肝硬化门脉高压已成为研究的一个热点.

Liu等^[29]研究发现UT拮抗剂SB-710411可以降低CCl₄诱导肝硬化大鼠肝纤维化评分, 减少 α -平滑肌肌动蛋白表达, 降低血浆透明质酸、层粘连蛋白水平和肝脏羟脯氨酸含量, 降低I、III型胶原mRNA、TIMP-1 mRNA、TGF- β mRNA表达, 并抑制UT蛋白表达和肝星状细胞增殖活化, 改善CCl₄诱导肝硬化大鼠高动力循环状态, 提示UT拮抗剂SB-710411可以抑制肝纤维化, 降低门静脉压力. Trebicka等^[24]研究发现应用UT拮抗剂Palosuran处理后的胆管结扎肝硬化大鼠的肠系膜动脉RhoA及Rho激酶mRNA表达明显增加, Rho激酶活性增强, 一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)和NO产生减少, 一氧化氮/环磷酸鸟苷/蛋白激酶G(NO/cGMP/PKG)信号通路减弱, 从而使内脏血管阻力增加, 门静脉血流量减少, 门脉压力降低; 研究还发现Palosuran可增加肾小球过滤率, 肾血流量, 促进水钠排泄. 最近研究报道显示, 特异性UT拮抗剂Palosure和EPK1/2及P13K信号通路阻断剂PD98059或LY294002能够阻断U II的血管生成作用, 减少新生血管生成, 可能会对侧支循环的建立有一定的抑制作用, 为肝硬化的治疗提供另一种选择^[44].

Patacchini等^[51]报道Urantide是目前在大鼠离体胸主动脉中发现的最强的选择性U II受体拮抗剂, 其能与UT高选择性结合, 在较低浓度抑制U II的血管收缩效应. Urantide可增加心肌缺血区的血流, 改善缺血/再灌注心肌损伤程度^[52], 但是会降低门脉高压目前尚无研究. 有研究显示, 应用U II受体拮抗剂0.02 nmol/(kg·min) Urantide灌注, 30 min后肾小球滤过率较对照组 $[1.2 \text{ mL}/(\text{min} \cdot 100 \text{ g}) \pm 0.2 \text{ mL}/(\text{min} \cdot 100 \text{ g}) \text{ vs } 0.8 \text{ mL}/(\text{min} \cdot 100 \text{ g}) \pm 0.1 \text{ mL}/(\text{min} \cdot 100 \text{ g}), P < 0.05]$ 明显增加, 尿流率明显增加, 钠排泄率较对照组 $[6.9 \mu\text{mol}/(\text{min} \cdot 100 \text{ g}) \pm 1.0 \mu\text{mol}/(\text{min} \cdot 100 \text{ g}) \text{ vs } 4.1 \mu\text{mol}/(\text{min} \cdot 100 \text{ g}) \pm 0.4 \mu\text{mol}/(\text{min} \cdot 100 \text{ g}), P < 0.01]$ 明显增加, 表明Urantide可抵抗U II的钠水潴留作用, 引起利尿、钠水排泄效应^[39]. 但是Urantide是否会降低门脉高压, 改善门脉侧支循环目前尚未见报道.

U II受体拮抗剂的研究对于理解U II在肝硬化门脉高压的病理生理作用, 以及揭示其特异性受体拮抗剂治疗潜力具有重要意义. U II受体拮抗剂的研究还限于动物实验, 是否能够有效缓解肝硬化患者门脉压力, 减少食管胃静脉曲张出血的发生, 还需进一步研究.

■创新盘点

本文综合大量文献, 较系统的阐述U II的生物学活性, 并重点探讨了门脉高压症的发生和侧支循环形成中的作用和地位, 以及总结U II受体拮抗剂应用的研究现状, 这对门脉高压症发生机制和治疗应用研究具有一定的参考价值.

■应用要点

U II/UT系统与肝硬化门脉高压的形成发展关系密切, UT拮抗剂可能成为治疗肝硬化门脉高压的潜在靶点, 为降低门脉压力提供另一种选择。

4 结论

血浆U II水平在肝硬化门脉高压患者明显升高, U II在促进门脉高压和侧支血管形成中发挥重要作用, 并在一定程度上反映食管胃静脉曲张程度. U II受体拮抗剂的应用可以降低动物肝硬化门脉压力, 但有待于临床进一步研究。

5 参考文献

- Kim MY, Baik SK, Lee SS. Hemodynamic alterations in cirrhosis and portal hypertension. *Korean J Hepatol* 2010; 16: 347-352
- Bern HA, Pearson D, Larson BA, Nishioka RS. Neurohormones from fish tails: the caudal neurosecretory system. I. "Urophysiology" and the caudal neurosecretory system of fishes. *Recent Prog Horm Res* 1985; 41: 533-552
- Conlon JM, Yano K, Waugh D, Hazon N. Distribution and molecular forms of urotensin II and its role in cardiovascular regulation in vertebrates. *J Exp Zool* 1996; 275: 226-238
- Ong KL, Lam KS, Cheung BM. Urotensin II: its function in health and its role in disease. *Cardiovasc Drugs Ther* 2005; 19: 65-75
- Kemp W, Roberts S, Krum H. Urotensin II: a vascular mediator in health and disease. *Curr Vasc Pharmacol* 2005; 3: 159-168
- Matsumoto Y, Abe M, Watanabe T, Adachi Y, Yano T, Takahashi H, Sugo T, Mori M, Kitada C, Kurokawa T, Fujino M. Intracerebroventricular administration of urotensin II promotes anxiogenic-like behaviors in rodents. *Neurosci Lett* 2004; 358: 99-102
- Suguro T, Watanabe T, Ban Y, Kodate S, Misaki A, Hirano T, Miyazaki A, Adachi M. Increased human urotensin II levels are correlated with carotid atherosclerosis in essential hypertension. *Am J Hypertens* 2007; 20: 211-217
- Abdel-Razik AE, Balment RJ, Ashton N. Enhanced renal sensitivity of the spontaneously hypertensive rat to urotensin II. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008; 295: F1239-F1247
- Ames RS, Sarau HM, Chambers JK, Willette RN, Aiyar NV, Romanic AM, Loudon CS, Foley JJ, Sauermeier CF, Coatney RW, Ao Z, Disa J, Holmes SD, Stadel JM, Martin JD, Liu WS, Glover GI, Wilson S, McNulty DE, Ellis CE, Elshourbagy NA, Shabon U, Trill JJ, Hay DW, Ohlstein EH, Bergsma DJ, Douglas SA. Human urotensin-II is a potent vasoconstrictor and agonist for the orphan receptor GPR14. *Nature* 1999; 401: 282-286
- Itoh H, McMaster D, Lederis K. Functional receptors for fish neuropeptide urotensin II in major rat arteries. *Eur J Pharmacol* 1988; 149: 61-66
- Maguire JJ, Kuc RE, Davenport AP. Orphan-receptor ligand human urotensin II: receptor localization in human tissues and comparison of vasoconstrictor responses with endothelin-1. *Br J Pharmacol* 2000; 131: 441-446
- Camarda V, Rizzi A, Calò G, Gendron G, Perron SI, Kostenis E, Zamboni P, Mascoli F, Regoli D. Effects of human urotensin II in isolated vessels of various species; comparison with other vasoactive agents. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol* 2002; 365: 141-149
- Gardiner SM, March JE, Kemp PA, Davenport AP,

- Bennett T. Depressor and regionally-selective vasodilator effects of human and rat urotensin II in conscious rats. *Br J Pharmacol* 2001; 132: 1625-1629
- Zhang Y, Li Y, Wei R, Wang Z, Bu D, Zhao J, Pang Y, Tang C. Urotensin II is an autocrine/paracrine growth factor for aortic adventitia of rat. *Regul Pept* 2008; 151: 88-94
- Watanabe T, Suguro T, Kanome T, Sakamoto Y, Kodate S, Hagiwara T, Hongo S, Hirano T, Adachi M, Miyazaki A. Human urotensin II accelerates foam cell formation in human monocyte-derived macrophages. *Hypertension* 2005; 46: 738-744
- Spinazzi R, Albertin G, Nico B, Guidolin D, Di Liddo R, Rossi GP, Ribatti D, Nussdorfer GG. Urotensin-II and its receptor (UT-R) are expressed in rat brain endothelial cells, and urotensin-II via UT-R stimulates angiogenesis in vivo and in vitro. *Int J Mol Med* 2006; 18: 1107-1112
- Guidolin D, Albertin G, Ribatti D. Urotensin-II as an angiogenic factor. *Peptides* 2010; 31: 1219-1224
- Albertin G, Guidolin D, Sorato E, Spinazzi R, Mascarin A, Oselladore B, Montopoli M, Antonello M, Ribatti D. Pro-angiogenic activity of Urotensin-II on different human vascular endothelial cell populations. *Regul Pept* 2009; 157: 64-71
- Gatta A, Bolognesi M, Merkel C. Vasoactive factors and hemodynamic mechanisms in the pathophysiology of portal hypertension in cirrhosis. *Mol Aspects Med* 2008; 29: 119-129
- Kemp W, Krum H, Colman J, Bailey M, Yandle T, Richards M, Roberts S. Urotensin II: a novel vasoactive mediator linked to chronic liver disease and portal hypertension. *Liver Int* 2007; 27: 1232-1239
- Heller J, Schepke M, Neef M, Woitas R, Rabe C, Sauerbruch T. Increased urotensin II plasma levels in patients with cirrhosis and portal hypertension. *J Hepatol* 2002; 37: 767-772
- Charles CJ, Rademaker MT, Richards AM, Yandle TG. Urotensin II: evidence for cardiac, hepatic and renal production. *Peptides* 2005; 26: 2211-2214
- Liu D, Chen J, Wang J, Zhang Z, Ma X, Jia J, Wang Y. Increased expression of urotensin II and GPR14 in patients with cirrhosis and portal hypertension. *Int J Mol Med* 2010; 25: 845-851
- Trebicka J, Leifeld L, Hennenberg M, Biecker E, Eckhardt A, Fischer N, Pröbsting AS, Clemens C, Lammert F, Sauerbruch T, Heller J. Hemodynamic effects of urotensin II and its specific receptor antagonist palosuran in cirrhotic rats. *Hepatology* 2008; 47: 1264-1276
- Sauzeau V, Le Mellionec E, Bertoglio J, Scalbert E, Pacaud P, Loirand G. Human urotensin II-induced contraction and arterial smooth muscle cell proliferation are mediated by RhoA and Rho-kinase. *Circ Res* 2001; 88: 1102-1104
- Watanabe T, Kanome T, Miyazaki A, Katagiri T. Human urotensin II as a link between hypertension and coronary artery disease. *Hypertens Res* 2006; 29: 375-387
- Zhu YC, Zhu YZ, Moore PK. The role of urotensin II in cardiovascular and renal physiology and diseases. *Br J Pharmacol* 2006; 148: 884-901
- Iizuka M, Murata T, Hori M, Ozaki H. Increased contractility of hepatic stellate cells in cirrhosis is mediated by enhanced Ca^{2+} -dependent and Ca^{2+} -sensitization pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2011; 300: G1010-G1021
- Liu DG, Wang J, Zhang ZT, Wang Y. The uroten-

- sion II antagonist SB-710411 arrests fibrosis in CCL4 cirrhotic rats. *Mol Med Report* 2009; 2: 953-961
- 30 Kemp W, Kompa A, Phrommintikul A, Herath C, Zhiyuan J, Angus P, McLean C, Roberts S, Krum H. Urotensin II modulates hepatic fibrosis and portal hemodynamic alterations in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009; 297: G762-G767
- 31 Watson AM, Lambert GW, Smith KJ, May CN. Urotensin II acts centrally to increase epinephrine and ACTH release and cause potent inotropic and chronotropic actions. *Hypertension* 2003; 42: 373-379
- 32 Lin Y, Tsuchihashi T, Matsumura K, Abe I, Iida M. Central cardiovascular action of urotensin II in conscious rats. *J Hypertens* 2003; 21: 159-165
- 33 Bottrill FE, Douglas SA, Hiley CR, White R. Human urotensin-II is an endothelium-dependent vasodilator in rat small arteries. *Br J Pharmacol* 2000; 130: 1865-1870
- 34 Stirrat A, Gallagher M, Douglas SA, Ohlstein EH, Berry C, Kirk A, Richardson M, MacLean MR. Potent vasodilator responses to human urotensin-II in human pulmonary and abdominal resistance arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 280: H925-H928
- 35 Balsamo A, Calderone V, Rapposelli S. New emerging prospects in the pharmacotherapy of hypertension. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem* 2008; 6: 1-19
- 36 Wang YX, Ding YJ, Zhu YZ, Shi Y, Yao T, Zhu YC. Role of PKC in the novel synergistic action of urotensin II and angiotensin II and in urotensin II-induced vasoconstriction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 292: H348-H359
- 37 Mori N, Hirose T, Nakayama T, Ito O, Kanazawa M, Imai Y, Kohzuki M, Takahashi K, Totsune K. Increased expression of urotensin II-related peptide and its receptor in kidney with hypertension or renal failure. *Peptides* 2009; 30: 400-408
- 38 Matsushita M, Shichiri M, Fukai N, Ozawa N, Yoshimoto T, Takasu N, Hirata Y. Urotensin II is an autocrine/paracrine growth factor for the porcine renal epithelial cell line, LLCPK1. *Endocrinology* 2003; 144: 1825-1831
- 39 Song W, Abdel-Razik AE, Lu W, Ao Z, Johns DG, Douglas SA, Balment RJ, Ashton N. Urotensin II and renal function in the rat. *Kidney Int* 2006; 69: 1360-1368
- 40 Shi Y, Cao YX, Lu N, Yao T, Zhu YC. Hemodynamic-independent anti-natriuretic effect of urotensin II in spontaneously hypertensive rats. *Peptides* 2008; 29: 783-794
- 41 Winter MJ, Ashworth A, Bond H, Brierley MJ, McCrohan CR, Balment RJ. The caudal neurosecretory system: control and function of a novel neuroendocrine system in fish. *Biochem Cell Biol* 2000; 78: 193-203
- 42 Zhang AY, Chen YF, Zhang DX, Yi FX, Qi J, Andrade-Gordon P, de Garavilla L, Li PL, Zou AP. Urotensin II is a nitric oxide-dependent vasodilator and natriuretic peptide in the rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003; 285: F792-F798
- 43 Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 1997; 18: 4-25
- 44 Gille H, Kowalski J, Li B, LeCouter J, Moffat B, Zioncheck TF, Pelletier N, Ferrara N. Analysis of biological effects and signaling properties of Flt-1 (VEGFR-1) and KDR (VEGFR-2). A reassessment using novel receptor-specific vascular endothelial growth factor mutants. *J Biol Chem* 2001; 276: 3222-3230
- 45 Cejudo-Martín P, Ros J, Navasa M, Fernández J, Fernández-Varo G, Ruiz-del-Arbol L, Rivera F, Arroyo V, Rodés J, Jiménez W. Increased production of vascular endothelial growth factor in peritoneal macrophages of cirrhotic patients with spontaneous bacterial peritonitis. *Hepatology* 2001; 34: 487-493
- 46 Pérez-Ruiz M, Ros J, Morales-Ruiz M, Navasa M, Colmenero J, Ruiz-del-Arbol L, Cejudo P, Clària J, Rivera F, Arroyo V, Rodés J, Jiménez W. Vascular endothelial growth factor production in peritoneal macrophages of cirrhotic patients: regulation by cytokines and bacterial lipopolysaccharide. *Hepatology* 1999; 29: 1057-1063
- 47 Fernandez M, Mejias M, Angermayr B, Garcia-Pagan JC, Rodés J, Bosch J. Inhibition of VEGF receptor-2 decreases the development of hyperdynamic splanchnic circulation and portal-systemic collateral vessels in portal hypertensive rats. *J Hepatol* 2005; 43: 98-103
- 48 Albertin G, Guidolin D, Sorato E, Oselladore B, Tortorella C, Ribatti D. Urotensin-II-stimulated expression of pro-angiogenic factors in human vascular endothelial cells. *Regul Pept* 2011; 172: 16-22
- 49 Guidolin D, Albertin G, Oselladore B, Sorato E, Rebuffat P, Mascarin A, Ribatti D. The pro-angiogenic activity of urotensin-II on human vascular endothelial cells involves ERK1/2 and PI3K signaling pathways. *Regul Pept* 2010; 162: 26-32
- 50 Chikamori F, Inoue A, Okamoto H, Kuniyoshi N, Kawashima T, Takase Y. Relationships between types of esophagogastric varices and systemic hemodynamics in patients with liver cirrhosis. *Hepato-gastroenterology* 2011; 58: 909-915
- 51 Patacchini R, Santicioli P, Giuliani S, Grieco P, Novellino E, Rovero P, Maggi CA. Urotensin II antagonist peptide in the rat aorta. *Br J Pharmacol* 2003; 140: 1155-1158
- 52 Bousette N, Hu F, Ohlstein EH, Dhanak D, Douglas SA, Giaid A. Urotensin-II blockade with SB-611812 attenuates cardiac dysfunction in a rat model of coronary artery ligation. *J Mol Cell Cardiol* 2006; 41: 285-295

■同行评价

本综述内容重点突出, 主题明确, 逻辑性强, 对门脉高压症的发生机制和临床应用研究具有一定的参考价值。

编辑 李军亮 电编 闫晋利

胆汁酸的代谢、生理作用及其临床意义

尹凯歌, 冯志杰

■背景资料

检测血清、胆汁和尿液中总胆汁酸水平或胆汁酸谱对肝胆和肠道疾病的筛查、诊断和鉴别诊断具有重要价值。然而, 在临床上对胆汁酸检测的应用认识不够, 常常忽视对胆汁酸的检测。

尹凯歌, 冯志杰, 河北医科大学第二医院消化内科 河北省石家庄市 050000

尹凯歌, 在读研究生, 主要从事梗阻性黄疸方面的研究。

作者贡献分布: 尹凯歌与冯志杰对此文贡献均等; 本综述写作由尹凯歌完成; 冯志杰负责审核与修改。

通讯作者: 冯志杰, 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。zhijiefeng2005@163.com 电话: 0311-66002951

收稿日期: 2012-03-27 修回日期: 2012-12-12

接受日期: 2012-12-17 在线出版日期: 2012-12-18

Bile acids: Metabolism, physiology and clinical significance

Kai-Ge Yin, Zhi-Jie Feng

Kai-Ge Yin, Zhi-Jie Feng, Department of Gastroenterology, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China

Correspondence to: Zhi-Jie Feng, Professor, Department of Gastroenterology, the Second Hospital of Hebei Medical University, 215 Heping West Road, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China. zhijiefeng2005@163.com

Received: 2012-03-27 Revised: 2012-12-12

Accepted: 2012-12-17 Published online: 2012-12-18

Abstract

Enterohepatic circulation of bile acids can promote lipid digestion and absorption, prevent gallstone formation, and increase the secretion of bile. Measurement of serum bile acids can be used to predict the progression from acute hepatitis to chronic hepatitis and evaluate the degree of inflammation and fibrosis in patients with chronic hepatitis and the degree of portal hypertension and severe hepatitis. Serum bile acids are also an early and sensitive predictor of the relief of biliary obstruction in patients with obstructive jaundice. In addition, serum bile acids can be used for the diagnosis of inflammatory bowel disease, intrahepatic cholestasis during pregnancy, congenital biliary tract disease, and liver transplantation.

Key Words: Serum bile acids; Bile acid spectrum; Enterohepatic circulation; Hepatitis; Liver cirrhosis; Obstructive jaundice

Yin KG, Feng ZJ. Bile acids: Metabolism, physiology and clinical significance. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(35): 3542-3548

摘要

胆汁酸通过肠肝循环代谢, 具有促进脂类消化吸收、防止胆道结石生成、增加胆汁分泌、排泄等多种生物学作用。血清胆汁酸测定可反映急性肝炎慢性化、慢性肝炎炎症和纤维化程度、肝硬化门脉高压以及重症肝炎的病情演变, 是梗阻性黄疸患者梗阻解除的早期敏感指标。另外, 血清胆汁酸测定对炎症性肠病、妊娠期肝内胆淤积、先天性胆道疾病、肝移植等疾病的诊断也有一定价值。

关键词: 血清胆汁酸; 胆汁酸谱; 肠肝循环; 肝炎; 肝硬化; 梗阻性黄疸

尹凯歌, 冯志杰. 胆汁酸的代谢、生理作用及其临床意义. *世界华人消化杂志* 2012; 20(35): 3542-3548

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3542.asp>

0 引言

胆汁酸是胆汁中主要的固体物质, 是一类24碳胆烷酸羟基衍生物的总称, 属于内源性有机阴离子。人类胆汁中胆汁酸有15种, 主要有胆酸、鹅脱氧胆酸、脱氧胆酸、少量石胆酸及微量熊脱氧胆酸^[1]。肝胆、肠道疾病影响胆汁酸的代谢和转运, 导致血清、胆汁和尿中总胆汁酸水平和胆汁酸谱(胆汁酸的各成分)发生变化。检测血清、胆汁和尿液中总胆汁酸水平或胆汁酸谱对肝胆和肠道疾病的筛查、诊断和鉴别诊断具有重要价值。然而, 在临床上对胆汁酸检测的应用认识不够, 常常忽视对胆汁酸的观察, 现将胆汁酸测定的临床意义作一综述。

1 胆汁酸的代谢和生理功能

1.1 胆汁酸的代谢 胆汁酸在肝细胞内由胆固醇转化而来, 人胆汁中胆汁酸以结合型为主, 胆汁酸分泌进入肝细胞间的毛细胆管, 从远端流入近端胆道, 过夜空腹后肝脏所分泌一半的胆汁酸进入胆囊, 余下的进入小肠。进入小肠的胆汁酸95%被主动或被动重吸收进入门静脉血中, 肝脏高效的从门静脉血中将胆汁酸摄取, 新合成和从门静脉血中摄取的胆汁酸再次分泌进入胆

■同行评议者

刘超, 教授, 主任医师, 中山大学孙逸仙纪念医院(附属第二医院)肝胆胰外科

道. 这时, 大多胆汁酸再次储存进入胆囊. 进餐后, 胆囊逐渐排空, 胆汁酸被排入肠腔, 同样经历上述肠道重吸收、肝脏摄取和分泌过程. 这种胆汁酸在肠道和肝脏之间的转运被称为胆汁酸的肠肝循环, 这些循环的胆汁酸形成胆汁酸池. 胆汁酸在胆囊切除者中同样有肠肝循环, 推测胆汁酸池储存在过夜空腹的小肠腔内^[2]. 未被重吸收的胆汁酸(主要为石胆酸)随粪便排出, 每天约0.4-0.6 g^[1].

健康人群中胆汁酸池的大小是相似的, 空腹时血清胆汁酸水平较稳定, 无明显波动, 由于肝脏对胆汁酸的高效摄取使得系统循环中胆汁酸的含量很少, 一般不超过10 $\mu\text{mol/L}$. 进餐后, 胆囊收缩, 胆囊胆汁排入肠腔, 胆汁酸肠肝循环增加, 重吸收进入门静脉血中胆汁酸增加, 超过肝脏摄取能力, 胆汁酸进入系统循环增加, 从而使血清中胆汁酸浓度增加. 其中结合型鹅脱氧胆酸在60 min达峰, 浓度为2.07 $\mu\text{mol/L} \pm 0.30 \mu\text{mol/L}$, 结合型胆酸在90 min达峰, 浓度为1.50 $\mu\text{mol/L} \pm 0.24 \mu\text{mol/L}$ ^[3]. 空腹时血清初级结合胆汁酸水平随月经周期波动而波动. 胆酸和鹅脱氧胆酸在周期初期明显增加. 因此在临床应用中, 应该注意月经周期对血清胆汁酸尤其是初级胆汁酸的影响^[4].

1.2 胆汁酸生理功能 胆汁酸有亲水和疏水两个侧面, 具有较强的界面活性, 能降低油水之间的界面张力, 促进脂类乳化, 同时能够扩大脂肪和脂肪酶之间的接触面积, 加速脂类的消化吸收. 胆汁酸还具有防止胆道结石生成的作用, 如果胆汁酸及卵磷脂与胆固醇的比值降低, 可使胆固醇过饱和而以结晶形式析出形成结石^[5]. 胆汁酸是胆汁中主要的渗透活性物质, 具有利胆作用, 能够增强胆汁分泌、排泄, 在胆道和小肠中胆汁酸发挥抗微生物作用, 防止胆道和肠道细菌过增长及肠道菌群移位. 胆汁酸能够增强大肠的正向推动能力促进排便. 另外, 胆汁酸还是一种信号调节分子, 在转录和转录后水平调节许多代谢过程^[6].

2 不同种类胆汁酸测定的意义

2.1 血清胆汁酸 血清胆汁酸是肝胆疾病的一个敏感指标, 肝胆病患者中其他肝功能指标正常时, 可出现血清胆汁酸升高^[7]. 理论上, 空腹时胆汁酸储存在胆囊中, 胆汁酸肠肝循环停止, 重吸收进入门静脉血中胆汁酸总量较少, 肝损伤较轻时, 剩余的正常肝功能能代偿的将门静脉中

较少的胆汁酸摄取. 因此, 空腹时血清胆汁酸浓度不增加, 进食后胆囊收缩, 肠肝循环的存在, 重吸收进入门静脉血的胆汁酸总量明显增多, 损伤的肝脏摄取胆汁酸的功能不能被代偿, 血清胆汁酸增高^[8]. 因此理论上肝病患者中测定餐后血清胆汁酸较空腹血清胆汁酸敏感. 有研究表明, 空腹联合餐后血清胆汁酸的测定比其他常规肝功能检测敏感, 当分别评估空腹和餐后血清胆汁酸的敏感性时发现, 与常规肝功能指标相比, 空腹血清胆汁酸的异常率较低, 而餐后血清胆汁酸的异常率较高. 肝病恢复时, 当其他肝功能指标明显降至正常时, 餐后血清胆汁酸水平仍然较高^[9], 餐后血清胆汁酸是肝胆疾病敏感的筛查指标, 在怀疑患有肝病但尚未证实和肝病恢复期治疗随访中特别有价值^[8]. 但是, 尽管应用标准餐, 餐后血清胆汁酸水平仍受许多因素影响. 例如, 胆囊排空时间, 食物通过肠道的快慢, 肝病导致的厌食和呕吐等消化道症状^[10], 维生素C等对血清胆汁酸变化都有影响^[11]. 由于个体间餐后胆汁酸水平相差较大, 餐后不同时间胆汁酸变化差异较大, 参考值范围和餐后测量时间不好确定. 因此, 临床上多用空腹血清胆汁酸评估肝胆疾病.

2.2 胆汁酸谱 空腹血清胆汁酸对肝胆疾病诊断较敏感, 但是由于不同肝胆疾病血清胆汁酸都升高. 无论急慢性亲脂性化合物中毒, 还是急慢性病毒性肝炎、肝硬化和非病毒性肝炎、肝硬化, 还是肝外胆道梗阻, 血清胆汁酸都升高. 升高的血清胆汁酸在不同肝胆疾病中诊断特异性较差, 其对肝胆疾病的鉴别诊断价值较小. 不同肝胆疾病中血清胆汁酸谱变化不同, 血清胆汁酸谱的检测, 将会提高胆汁酸在肝胆疾病中的鉴别诊断价值^[12].

血清三羟基胆汁酸和二羟基胆汁酸比值等价于血清胆酸和鹅脱氧胆酸比值, 用于描述血清初级胆汁酸的比例. 随着肝细胞损伤加重, 肝细胞内12 α 羟化酶受损加重, 鹅脱氧胆酸增加. 胆道梗阻时, 保护性胆酸增加反应了机体代偿保护机制. 因此, 肝硬化等肝细胞损伤患者血清三羟基胆汁酸和二羟基胆汁酸比值明显<1, 然而梗阻性黄疸等胆汁淤积患者此值>1^[13,14]. 上述研究中由于血清三羟基胆汁酸/二羟基胆汁酸比值的正常范围波动较大, 各疾病之间有很大重叠, 此值的鉴别诊断价值受到置疑^[15]. 改良的气液色谱分析法使此值的正常范围为0.5-1.0, 较前明显变窄, 使他可以将无黄疸的慢性肝病(范

■ 研发前沿

胆汁酸是临床较常用的生化指标, 而实际临床工作中常常忽视对其的判读.

■相关报道

Toshihide等研究显示,与其他肝功能指标相比,血清胆汁酸水平更准确的反映了组织学改善情况。慢性丙型肝炎患者在对药物应答方面,常规肝功能检测提供信息有限,他们和肝组织学分级无相关性。

围为0.1-0.5)、梗阻性黄疸(0.96-3.6)和正常个体鉴别开来,然而此方法未发现血清三羟基胆汁酸/二羟基胆汁酸比值在肝内胆汁淤积和肝外梗阻中的鉴别价值^[16]。血清三羟基胆汁酸/二羟基胆汁酸比值在婴儿中可鉴别胆道闭锁(高比值)和肝内胆汁淤积综合征(低比值)^[17]。急性黄疸性肝炎、慢性活动性肝炎、肝硬化、肝癌4种普通肝病患者血清三羟基胆汁酸和二羟基胆汁酸的比值互不相同,分别为0.51、1.28、0.08、0.55,可用于各型肝炎的鉴别诊断^[18]。

血清三羟基胆汁酸/二羟基胆汁酸比值亦应用于疾病的分期,肝硬化患者血清三羟基胆汁酸/二羟基胆汁酸比值低提示预后不良^[19]。发性胆汁性肝硬化患者随着疾病进展血清三羟基胆汁酸/二羟基胆汁酸比值降低,<1提示终末期^[20]。酒精性肝病的研究中发现,血清三羟基胆汁酸/二羟基胆汁酸比值在活动性肝硬化患者中较低,在非活动性肝硬化患者中较高^[21]。相似研究,血清三羟基胆汁酸/二羟基胆汁酸比值在慢性肝病中随疾病活动逐渐由高到低,肝衰竭时此值明显降低^[16]。

肝衰竭患者胆汁酸明显增高,以二羟基胆汁酸升高为主,三羟基胆汁酸/二羟基胆汁酸比值明显降低,治疗后血清胆汁酸明显降低,同时,三羟基/二羟基比值明显升高^[22]。

2.3 尿胆汁酸 如上述,理论上餐后血清胆汁酸较空腹血清胆汁酸在肝胆疾病诊断中敏感,但是干扰因素多限制其临床应用。肝胆疾病时血清胆汁酸升高,胆汁酸经尿液的排泄增加。尿液胆汁酸测定不受上述干扰因素影响,检测24 h尿胆汁酸水平亦不受胆汁酸水平昼夜波动影响和检测时间的干扰,并且患者可免受静脉采血的痛苦,是筛查肝胆疾病的较好指标。动物实验表明,尿胆汁酸测定在预测胆汁淤积方面和碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)具有相似功能,慢性肝损伤中,当血清标志正常时,尿胆汁酸升高,他是胆汁淤积和慢性肝损伤较敏感的指标^[23]。临床工作中尿胆汁酸的应用价值尚需进一步研究。

3 胆汁酸测定对不同疾病的诊断价值

3.1 急性肝炎 急性肝炎,肝细胞摄取和分泌胆汁酸功能受损血清胆汁酸明显增加,他是反映急性肝细胞损伤的敏感指标。急性黄疸性肝炎患者在起病1 wk内血清胆汁酸明显增高,大于正常的2-10倍,甚至在血清谷丙转氨酶(alanine transaminase, ALT)尚未达到高峰时,血清胆汁酸已

明显升高^[24]。在恢复期血清胆汁酸浓度下降,下降越快,提示肝功能恢复快,预后好,下降越慢,提示肝细胞损伤持续存在,预后就越差,转变为慢性肝炎可能性就越大,对于其他肝功能指标降至正常,血清胆汁酸持续升高患者,需密切监测、随访,必要时行肝活检。血清胆汁酸是急性肝炎患者肝细胞损伤敏感指标,可作为急性肝炎转为慢性的预测指标,对监测急性肝炎病程进展有重要意义^[25]。

3.2 慢性肝炎 慢性肝炎中,血清胆汁酸、ALT、谷草转氨酶(aspartate transaminase, AST)、ALP、总胆红素(total bilirubin, TBIL)的异常率在轻度患者中分别为41.7%、55.6%、50.0%、38.9%、44.4%,中、重度患者中分别为89.8%、64.1%、69.8%、54.2%、64.4%。轻度患者血清胆汁酸升高不明显,敏感性不如ALT、胆红素等其他常规肝功能指标,中、重度患者血清胆汁酸明显升高,敏感性高于其他常规肝功能指标^[26]。慢性活动性肝炎血清胆汁酸的值得明显高于慢性迁延性肝炎,慢性肝炎恢复期血清胆汁酸的值下降,约为 $17.5 \mu\text{mol/L} \pm 3.52 \mu\text{mol/L}$,若持续升高要警惕肝炎肝硬化的发生^[26]。血清胆汁酸测定对发现早期慢性活动性肝炎具有一定价值^[27]。

对慢性肝炎患者血清胆汁酸和肝脏组织学相关性研究中发现,血清胆汁酸水平与慢性肝炎患者肝组织纤维化程度有一致性,对血清胆汁酸进行连续监测可了解肝组织纤维化进程^[28]。对慢性肝炎肝脏病变程度的评估,血清胆汁酸要比常规肝功指标敏感,慢性肝炎患者血清胆汁酸水平随肝脏炎症分级与纤维化分期的增加呈上升趋势,并与病理学改变呈正相关^[29,30]。有研究亦发现,血清胆汁酸水平和肝小叶内的淋巴细胞数量具有相关性,提示血清胆汁酸水平能够直接或间接反映肝组织细胞免疫状态,但是血清胆汁酸水平是否能成为反映慢性病毒性肝炎患者免疫状态的指标值得进一步研究^[31]。

Shima等^[32]研究显示,与其他肝功能指标相比,血清胆汁酸水平更准确反映了组织学改善情况。慢性丙型肝炎患者在对药物应答方面,常规肝功能检测提供信息有限,他们和肝组织学分级无相关性。血清胆汁酸水平在对照组和持续应答组较低,而在非应答组和复发组较高,他和肝组织学分级呈正相关($r = 0.720, P = 0.029$)。对干扰素治疗的慢性丙型肝炎患者,不应答或复发者的血清胆汁酸预测值是 $>15 \mu\text{mol/L}$ ^[33]。血清胆汁酸是中、重度慢性肝炎患者肝细胞损伤的敏感指

标, 能够反映慢性肝炎炎症和纤维化程度, 预测肝硬化的发生。

3.3 肝硬化 肝硬化时, 一方面肝损伤使得肝细胞对胆汁酸的摄取和分泌受损; 另一方面门静脉高压门体分流的存在使得肠道重吸收的胆汁酸部分直接进入体循环, 导致血清胆汁酸浓度增加。血清胆汁酸的浓度和ALT活力可能并无相关性, 在肝硬化早期, ALT和其他常规肝功能指标未发生明显变化时, 血清胆汁酸已经明显升高; 在ALT和其他常规肝功能指标恢复正常时, 血清胆汁酸仍然保持在较高水平; 在肝硬化后期, 血清胆汁酸浓度升高更为明显, 表明血清胆汁酸较ALT和其他常规肝功能指标能更敏感的反映肝硬化患者的病情^[34]。乙型肝炎肝硬化患者血清胆汁酸水平随着肝脏纤维化程度的加重, 血清胆汁酸水平升高, 二者之间具有相关性^[35]。由此推测, 血清胆汁酸水平一定程度上能够反映肝硬化患者病变的严重程度, 预测肝硬化患者的预后。有研究表明, 肝硬化患者随着Child-Pugh分级的加重, 血清胆汁酸水平升高, 血清胆汁酸一定程度上能够反映肝硬化的严重程度^[36]。胆汁酸可能成为肝硬化患者的生存预后参数。一些研究表明, 胆汁酸单独或结合其他相关参数可预示肝硬化患者1或3年的生存率^[37]。表明胆汁酸可能为反映肝硬化严重程度和肝病者生存预后的指标。

3.4 门脉高压症 门脉高压症患者, 由于门体分流存在, 门静脉血中的胆汁酸部分未经过肝脏直接进入体循环, 致使血清胆汁酸水平升高。在门体分流术中, 不经过肝脏直接进入体循环的胆汁酸增加使得血清胆汁酸水平较术前升高, 间接反映吻合口分流是否完全。在断流术中, 未经肝脏而直接进入体循环的胆汁酸较前减少, 血清胆汁酸水平较术前降低, 间接反映贲门周围血管离断是否完全。因此, 在门脉高压症行门体分流术或断流术中, 检测血清胆汁酸具有一定的临床意义, 它能够间接的评价手术效果^[38]。

3.5 重型肝炎 重型肝炎患者肝细胞对胆汁酸的摄取、转运、分泌严重受损, 血清胆汁酸浓度明显升高, 他和TBIL、凝血酶原(prothrombin activity, PTA)、白蛋白(albumin, ALB)等指标具有较好的一致性, 血清胆汁酸水平与病情有一定关系, 与肝损伤程度成正比^[39]。理论上重型肝炎患者, 血清胆汁酸与TBIL变化平行, 但是, 事实上两者的变化并不一定平行, 肝损伤到一定程度, 血清胆汁酸并不随TBIL的升高而升高, 其增高幅度减缓, 对重型肝炎严重程度的判断不及

TBIL敏感^[40], 其不平行原因可能为重型肝炎中, 肝细胞受损严重, 胆汁酸成分发生改变, 经尿液排泄胆汁酸增加, 由于胆汁酸经尿液的排泄, 使的血清胆汁酸并不随严重肝细胞的损伤加重而明显加重, 从而导致血清胆汁酸和TBIL的变化并不平行。因此, 重型肝炎患者检测尿液胆汁酸水平可能会更好的反应病情的严重程度。

3.6 毒物药物造成的肝损伤 对于有肝毒性物质接触史的患者, 及时发现早期的肝损伤并积极治疗十分重要。肝脏是人体的解毒器官, 许多职业接触物质损伤肝脏。血清胆汁酸是判断毒物引起早期肝功能损伤的敏感指标。血清胆汁酸在苯乙烯、卤代溶剂等肝毒性物质介导的肝损伤中较敏感, 但是特异性不高, 不同种类的肝毒性物质均可导致胆汁酸浓度的升高^[41,42]。血清胆汁酸对完全肠外营养引起胆汁淤积的检测较其他肝功能指标更加敏感^[43]。因此, 对接触有毒物质的工种和应用某些损肝药物者, 定期进行血清胆汁酸检测, 能够发现早期肝损伤, 及时指导治疗。

3.7 胆囊疾病 空腹时胆汁酸储存于胆囊中, 进食后胆囊收缩, 胆囊中胆汁酸经十二指肠乳头进入肠道, 进行肠肝循环。理论上, 胆囊切除、慢性胆囊炎、胆石症等疾病造成的胆囊功能障碍将会影响胆汁酸的肠肝循环, 进而影响到血清胆汁酸的浓度, 然而, 目前研究表明, 血清胆汁酸在评估胆囊功能方面无作用^[44]。胆汁酸在胆囊切除者同样有肠肝循环, 推测胆汁酸池储存在过夜空腹的小肠腔内^[2]。

3.8 梗阻性黄疸 胆道阻塞时, 胆汁逆流入血, 使得血清胆汁酸明显增高, 血清胆汁酸是反映阻塞性黄疸的重要参考指标之一^[45]。其与TBIL、直接胆红素、ALP、谷氨酰转移酶的变化相一致。恶性梗阻患者血清胆汁酸水平较良性梗阻者高, 但是血清胆汁酸水平在两者之间存在很大重叠^[46], 使其对良恶性梗阻性黄疸的鉴别价值有限。梗阻性黄疸患者梗阻解除后, 血清胆汁酸下降最快, 降至正常水平最早, 其在术后第3、4天就降至正常。血清胆汁酸是反映梗阻性黄疸患者早期梗阻解除后敏感指标^[47]。

3.9 炎症性肠病 餐后血清胆汁酸浓度可能是反映克罗恩患者回肠炎症的指标, 胆汁酸的肠道吸收主要是在回肠末端主动转运, 克罗恩患者回肠损伤, 餐后肠肝循环中胆汁酸进入外周血减少, 从而使餐后血清胆汁酸浓度降低^[48]。

3.10 其他肠道疾病 随着小肠移植患者的增加,

■同行评价

本文层次清楚, 表达准确, 参考文献收集较完整, 对于分析血清胆汁酸的异常改变有一定临床指导意义。

肠道排斥反应发生增多,早期发现肠道排斥反应并及时干预对患者的预后十分重要。肠道排斥反应早期血清总胆汁酸和次级胆汁酸明显增加,他们在肠道移植物排斥反应中可能具有诊断价值^[49]。肠道细菌过增长者,由于过增长细菌的去结合作用,血清非结合胆汁酸增加10-20倍,非结合胆汁酸可用于肠道细菌过增长的检测^[50]。

3.11 妊娠期肝内胆汁淤积 血清胆汁酸是具有瘙痒症状妊娠者的一项重要检测指标。妊娠末期瘙痒和升高的血清胆汁酸预示着妊娠期肝内胆汁淤积的诊断^[51]。妊娠期肝内胆汁淤积对母体和胎儿会产生影响,特别是胎儿甚至是致死性的,患妊娠期肝内胆汁淤积母亲的新生儿往往具有较低的出生体重和胎龄。血清胆汁酸能够预测胎儿并发症的发生率,胆汁酸水平 $>40\text{ }\mu\text{mol/L}$ 时胎儿并发症的发生率将明显增加^[52]。口服熊去氧胆酸可改善妊娠期肝内胆汁淤积患者的肝功能指标,但是能否降低胎儿的死亡率尚不清楚。血清石胆酸检测在评价熊去氧胆酸治疗效果方面较血清总胆汁酸敏感^[53]。

3.12 先天性胆道疾病 新生儿胆道闭锁应该尽早进行手术,最好在出生60 d内,否则容易发展成为不可逆转的肝脏损伤而需要肝移植。胆道闭锁尽早诊断非常重要,对于血清胆汁酸高于 $111\text{ }\mu\text{mol/L}$,胆道直径 $<2.1\text{ mm}$,直接胆红素 $>2.5\text{ mg/dL}$ 的新生儿更可能患有胆道闭锁而非胆道先天性扩张,这时应尽早外科探查并校正畸形^[54]。出生后第3周,血清直接胆红素可用于筛查肝胆疾病,但是静脉采血对新生儿十分不方便,进行尿胆汁酸测定是一个敏感快速的筛查方法,可避免静脉采血的不便。然而尿胆汁酸对各肝胆疾病的鉴别诊断不特异,胆道闭锁和其他肝胆疾病中尿胆汁酸水平都升高。因此,尿胆汁酸升高患儿应进一步检查明确病因^[55]。

3.13 肝移植 肝移植后急性排斥反应早期血清胆汁酸浓度升高,抗排斥治疗成功后第1天升高的血清胆汁酸水平明显下降,而胆红素和转氨酶以排斥反应无明显相关性。表明血清胆汁酸检测能够早期发现急性排斥反应,并能及时的反映抗排斥治疗成功与否^[56]。血清胆汁酸在鉴别肝移植物抗宿主反应和静脉闭塞引起的胆汁淤积方面较胆红素更加敏感^[57]。胆汁中胆汁酸是肝移植后原发性肝功能不全的敏感指标,在肝移植排斥反应早期明显升高,早于肝活检异常3 d^[58]。术后第7天移植物受者和供者胆汁中牛磺结合胆汁酸的比值可作为移植后排斥反应的预

测指标,此比值 ≥ 0.5 提示排斥反应发生率较低,预后较好^[59]。胆汁中胆汁酸浓度是一种简单、可靠的反应广泛肝脏切除术后剩余肝功能状态敏感指标^[60]。

4 结论

胆汁酸通过肠肝循环代谢,具有促进脂类消化吸收、防止胆道结石生成、增加胆汁分泌、排泄等多种生物学作用。血清胆汁酸测定可反映急性肝炎慢性化、慢性肝炎炎症和纤维化程度、肝硬化门脉高压以及重症肝炎的病情演变,是梗阻性黄疸患者梗阻解除的早期敏感指标。另外,血清胆汁酸测定对炎症性肠病、妊娠期肝内胆汁淤积、先天性胆道疾病、肝移植等疾病的诊断也有一定价值。

5 参考文献

- 1 陈诗书,孔良曼,章有章. 医学生物化学. 第1版. 上海: 复旦大学出版社, 2002: 375-380
- 2 Hofmann AF, Hagey LR. Bile acids: chemistry, pathochemistry, biology, pathobiology, and therapeutics. *Cell Mol Life Sci* 2008; 65: 2461-2483
- 3 Ponz De Leon M, Murphy GM, Dowling RH. Physiological factors influencing serum bile acid levels. *Gut* 1978; 19: 32-39
- 4 Pennington CR, Ross PE, Murison J, Bouchier IA. Fluctuations of serum bile acid concentrations during the menstrual cycle. *J Clin Pathol* 1981; 34: 185-186
- 5 陆伦根, 曾民德. 胆汁淤积性肝病. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 2007: 121-122
- 6 Maillette de Buy Wenniger L, Beuers U. Bile salts and cholestasis. *Dig Liver Dis* 2010; 42: 409-418
- 7 Bouchier IA, Pennington CR. Serum bile acids in hepatobiliary disease. *Gut* 1978; 19: 492-496
- 8 Barnes S, Gallo GA, Trash DB, Morris JS. Diagnostic value of serum bile acid estimations in liver disease. *J Clin Pathol* 1975; 28: 506-509
- 9 Fausa O, Gjone E. Serum bile acid concentrations in patients with liver disease. *Scand J Gastroenterol* 1976; 11: 537-543
- 10 Bridger N, Glanemann B, Neiger R. Comparison of postprandial and ceruletide serum bile acid stimulation in dogs. *J Vet Intern Med* 2008; 22: 873-878
- 11 Kallner A. Serum bile acids in man during vitamin C supplementation and restriction. *Acta Med Scand* 1977; 202: 283-287
- 12 Reichel C, Sauerbruch T. Serum bile acids: physiology and clinical relevance. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1995; 7: 951-953
- 13 Carey JB. The serum trihydroxy-dihydroxy bile acid ratio in liver and biliary tract disease. *J Clin Invest* 1958; 37: 1494-1503
- 14 Rudman D, Kendall FE. Bile acid content of human serum. I. Serum bile acids in patients with hepatic disease. *J Clin Invest* 1957; 36: 530-537
- 15 Neale G, Lewis B, Weaver V, Panveliwalla D. Serum bile acids in liver disease. *Gut* 1971; 12: 145-152
- 16 Pennington CR, Ross PE, Bouchier IA. Serum bile acids in the diagnosis of hepatobiliary disease. *Gut* 1977; 18: 903-908

- 17 Javitt NB, Morrissey KP, Siegel E, Goldberg H, Gartner LM, Hollander M, Kok E. Cholestatic syndromes in infancy: diagnostic value of serum bile acid pattern and cholestyramine administration. *Pediatr Res* 1973; 7: 119-125
- 18 东云华, 李金祥, 向双林. 血清胆汁酸谱在肝病鉴别诊断中的应用研究. *华西医学报* 1997; 28: 69-72
- 19 Osborn EC, Wootton ID, da Silva L, Sherlock S. Serum-bile-acid levels in liver disease. *Lancet* 1959; 2: 1049-1053
- 20 Bloomer JR, Allen RM, Klatskin G. Serum bile acids in primary biliary cirrhosis. *Arch Intern Med* 1976; 136: 57-61
- 21 Milstein HJ, Bloomer JR, Klatskin G. Serum bile acids in alcoholic liver disease. Comparison with histological features of the disease. *Am J Dig Dis* 1976; 21: 281-285
- 22 Pazzi P, Morsiani E, Vilei MT, Granato A, Rozga J, Demetriou AA, Muraca M. Serum bile acids in patients with liver failure supported with a bioartificial liver. *Aliment Pharmacol Ther* 2002; 16: 1547-1554
- 23 Kawai H, Kudo N, Kawashima Y, Mitsumoto A. Efficacy of urine bile acid as a non-invasive indicator of liver damage in rats. *J Toxicol Sci* 2009; 34: 27-38
- 24 谢志萍, 惠康柏. 血清总胆汁酸与肝脏疾病的临床分析. *上海医药* 1996; 19: 20-22
- 25 陈秀琴, 刘树业, 高秀登. 肝病患者的血清总胆汁酸测定的临床意义. *天津医药* 2002; 30: 413-414
- 26 薛容, 姜长林, 詹裕娥. 测定病毒性肝炎患者血清总胆汁酸对判断疾病预后的意义. *江苏医药* 1999; 25: 553-554
- 27 Korman MG, Hofmann AF, Summerskill WH. Assessment of activity in chronic active liver disease. Serum bile acids compared with conventional tests and histology. *N Engl J Med* 1974; 290: 1399-1402
- 28 陈靖, 朱月永. 血清胆碱酯酶和总胆汁酸与慢性乙型肝炎患者肝脏病理损害的关系探讨. *实用肝病杂志* 2008; 11: 87-89
- 29 梁柱石, 陈祝英, 谢崇嘉. 慢性肝炎血清总胆汁酸水平与肝组织炎症程度的关系. *中华传染病杂志* 2003; 41: 139-140
- 30 宋光平, 林艳. 血清CHE、TBA与慢性乙型肝炎肝组织病理损害关系的研究. *临床肝胆病杂志* 2006; 22: 448-449
- 31 莫穆隆, 梁柱石, 甘楚林. 慢性病毒性肝炎血清胆汁酸与肝组织细胞成分变化的相关性研究. *内科* 2010; 5: 577-579
- 32 Shima T, Tada H, Morimoto M, Nakagawa Y, Obata H, Sasaki T, Park H, Nakajo S, Nakashima T, Okanoue T, Kashima K. Serum total bile acid level as a sensitive indicator of hepatic histological improvement in chronic hepatitis C patients responding to interferon treatment. *J Gastroenterol Hepatol* 2000; 15: 294-299
- 33 Jorquera F, Monte MJ, Guerra J, Sanchez-Campos S, Merayo JA, Olcóz JL, González-Gallego J, Marin JJ. Usefulness of combined measurement of serum bile acids and ferritin as additional prognostic markers to predict failure to reach sustained response to antiviral treatment in chronic hepatitis C. *J Gastroenterol Hepatol* 2005; 20: 547-554
- 34 项岳香. 三种肝病血清TBA、ALT测定结果的比较. *临床检验杂志* 2000; 18: 251-252
- 35 杨才生, 方坚, 李东良. 罕见影像表现特发性门静脉高压症1例. *解放军医学杂志* 2010; 35: 473
- 36 张丽娟, 王晓鸿, 徐金华. 肝硬化患者肝功能分级及预后判断的实验研究. *中国热带医学* 2010; 10: 1192-1193
- 37 Siciliano M, Barbesino G, Marra L, Milani A, Rossi L. Long-term prognostic value of serum bile acids in liver cirrhosis: a prospective study. *Z Gastroenterol* 1989; 27: 653-656
- 38 陆玉华, 王志伟, 朱铭岩, 王勇. 门静脉高压症行分流、断流术治疗前后血清胆汁酸变化及意义. *南通医学院学报* 2004; 24: 88-89
- 39 张琳, 刘勇鹏. 重型肝炎病人动态检测TBA的临床意义. *中国医疗前沿* 2010; 5: 70-71
- 40 辜淑英, 冯绪淑, 高娟. 血清胆汁酸测定的价值及其局限性. *国际检验医学杂志* 2010; 31: 1179-1180
- 41 Franco G. New perspectives in biomonitoring liver function by means of serum bile acids: experimental and hypothetical biochemical basis. *Br J Ind Med* 1991; 48: 557-561
- 42 Edling C, Tagesson C. Raised serum bile acid concentrations after occupational exposure to styrene: a possible sign of hepatotoxicity? *Br J Ind Med* 1984; 41: 257-259
- 43 Demircan M, Ergun O, Avanoğlu S, Yilmaz F, Ozok G. Determination of serum bile acids routinely may prevent delay in diagnosis of total parenteral nutrition-induced cholestasis. *J Pediatr Surg* 1999; 34: 565-567
- 44 Pennington CR, Ross PE, Bouchier IA. Influence of the gallbladder on serum bile acids. *J Clin Pathol* 1982; 35: 754-756
- 45 徐万青, 薛萍, 古宁. 梗阻性黄疸病人血清胆汁酸的测定. *西南国防医药* 2005; 15: 639-640
- 46 黄汇慧, 陈延演. 血清胆汁酸测定在梗阻性黄疸鉴别诊断中的临床应用. *华北国防医药* 2006; 18: 105-107
- 47 陈玉堂, 邵国良, 邝平定, 郑家平, 夏启荣, 姚征, 吕蕾, 郑亚兵. 122例恶性梗阻性黄疸患者介入引流术后总胆汁酸检测的意义. *肿瘤学杂志* 2008; 14: 462-463
- 48 Suchy FS, Balistreri WF. Ileal dysfunction in Crohn's disease assessed by the postprandial serum bile acid response. *Gut* 1981; 22: 948-952
- 49 Yandza T, Gerhardt MF, Saint-Paul MC, Braud V, Gugenheim J, Hébuterne X. Significance of serum bile acids in small bowel allograft rejection in pigs. *Transplantation* 2009; 87: 24-28
- 50 Melgarejo T, Williams DA, O'Connell NC, Setchell KD. Serum unconjugated bile acids as a test for intestinal bacterial overgrowth in dogs. *Dig Dis Sci* 2000; 45: 407-414
- 51 Barth A, Rost M, Kindt A, Peiker G. Serum bile acid profile in women during pregnancy and childbed. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2005; 113: 372-375
- 52 Glantz A, Marschall HU, Mattsson LA. Intrahepatic cholestasis of pregnancy: Relationships between bile acid levels and fetal complication rates. *Hepatology* 2004; 40: 467-474
- 53 Lucangioli SE, Castaño G, Contin MD, Tripodi VP. Lithocholic acid as a biomarker of intrahepatic cholestasis of pregnancy during ursodeoxycholic acid treatment. *Ann Clin Biochem* 2009; 46: 44-49
- 54 Tanaka N, Ueno T, Takama Y, Fukuzawa M. Diagnosis and management of biliary cystic malformations in neonates. *J Pediatr Surg* 2010; 45: 2119-2123
- 55 Muraji T, Harada T, Miki K, Moriuchi T, Obatake M, Tsugawa C. Urinary sulfated bile acid concentrations in infants with biliary atresia and breastfeeding jaundice. *Pediatr Int* 2003; 45: 281-283
- 56 Janssen H, Lange R, Erhard J, Testa G, Malagó M, Janssen P, Eigler FW, Broelsch CE. Serum bile acids in liver transplantation--early indicator for acute

- rejection and monitor for antirejection therapy. *Transpl Int* 2001; 14: 429-437
- 57 Zakrzewski JL, Ballauff A, Wieland R, Basu O, Kremens B. Differential diagnosis of cholestasis following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in children: the contribution of serum bile acid levels in relation to other liver function tests. *Pediatr Hematol Oncol* 2004; 21: 697-705
- 58 Vilca Melendez H, Rela M, Setchell KD, Murphy GM, Heaton ND. Bile acids analysis: a tool to assess graft function in human liver transplantation. *Transpl Int* 2004; 17: 286-292
- 59 Hedaya MS, El Moghazy WM, Yasutomo Y, Kiyoshi T, Kaido T, Egawa H, Uemoto S, Takada Y. Is biliary bile acid a good predictor for acute cellular rejection in living donor liver transplantation? *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2009; 8: 474-478
- 60 Kurumiya Y, Nagino M, Nozawa K, Kamiya J, Uesaka K, Sano T, Yoshida S, Nimura Y. Biliary bile acid concentration is a simple and reliable indicator for liver function after hepatobiliary resection for biliary cancer. *Surgery* 2003; 133: 512-520

编辑 李军亮 电编 闫晋利

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》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.

中医药在脊髓损伤神经源性肠道功能障碍的研究进展

朱黎婷, 朱毅, 张文毅, 俞君, 谢斌

朱黎婷, 复旦大学基础医学院中西医结合基础系 上海市 200032

朱毅, 南京中医药大学第二临床医学院康复教研室 江苏省 南京市 210046

张文毅, 江苏省人民医院钟山康复分院 江苏省南京市 210046

俞君, 无锡市第九人民医院康复科 江苏省无锡市 214000

谢斌, 南京中医药大学 江苏省南京市 210046

朱黎婷, 主要从事针刺神经内分泌机制方面的研究.

2012年国家自然科学基金资助项目, No. 81202735

江苏省青蓝工程优秀骨干教师基金资助项目

作者贡献分布: 朱黎婷与朱毅负责文章构思; 朱黎婷、朱毅及张文毅负责文章撰写; 朱黎婷、俞君及谢斌负责文献检索、数据统计和图表制作.

通讯作者: 朱毅, 210046, 江苏省南京市栖霞区仙林大道138号, 南京中医药大学第二临床医学院康复教研室, 江苏省第二中医院针灸康复科. zhuyi1010@163.com

收稿日期: 2012-10-24 修回日期: 2012-11-08

接受日期: 2012-11-15 在线出版日期: 2012-12-18

Chinese medicine for bowel dysfunction after spinal cord injury: Recent advances

Li-Ting Zhu, Yi Zhu, Wen-Yi Zhang, Jun Yu, Bin Xie

Li-Ting Zhu, Department of Integrated Chinese and Western Medicine, School of Basic Medical Sciences, Fudan University, Shanghai 200032, China

Yi Zhu, Department of Rehabilitation, the Second Clinical Medical College, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, Jiangsu Province, China

Wen-Yi Zhang, Jiangsu Provincial People's Hospital Zhongshan Rehabilitation Branch, Nanjing 210046, Jiangsu Province, China

Jun Yu, Wuxi Hand Surgery Hospital, Wuxi 214000, Jiangsu Province, China

Bin Xie, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, Jiangsu Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 81202735; and the Blue Project in Jiangsu Province Excellent Teachers Project

Correspondence to: Yi Zhu, Department of Rehabilitation, the Second Clinical Medical College, Nanjing University of Chinese Medicine, 138 Xianlin Dadao, Xixia District, Nanjing 210046, Jiangsu Province, China. zhuyi1010@163.com

Received: 2012-10-24 Revised: 2012-11-18

Accepted: 2012-11-15 Published online: 2012-12-08

Abstract

Neurogenic bowel dysfunction after spinal cord injury (SCI) has a significant impact on both patients' physical and mental health, severely impairing their quality of life. Although this condition has attracted wide attention in the world,

there have been few studies on it in China. So far, the theory of Chinese medicine for the treatment of SCI and neurogenic bowel dysfunction after SCI has not been established. Fortunately, Chinese medicine for the treatment of gastrointestinal autonomic nervous system dysfunction has been recognized. The finding that Chinese medicine is effective in the treatment of bowel dysfunction and can improve patients' quality of life lays a foundation for further studies on neurogenic bowel dysfunction. In this paper, we review recent advances in treatment of neurogenic bowel dysfunction after SCI by Chinese medicine.

Key Words: Spinal cord injury; Neurogenic bowel dysfunction; Flaccidity syndrome; Constipation; Fecal incontinence; Treatment by Chinese medicine

Zhu LT, Zhu Y, Zhang WY, Yu J, Xie B. Chinese medicine for bowel dysfunction after spinal cord injury: Recent advances. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(35): 3549-3557

摘要

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)后神经源性肠道功能障碍对患者身心健康和生活质量的严重影响, 目前越来越受到国际关注. 但国内对此尚未普遍开展. 中医理论在SCI及SCI后出现的排便异常尚未作相关总结. 现有研究中医药对肠道自主神经系统已经成熟, 其有效性获得国内外普遍承认, 并较药物更易接受. 为SCI肠道功能障碍的研究打下基础. 但目前国内对SCI后排便异常缺乏专业认识、项目资助和人员管理, 临床研究欠规范, 中医理论有待完善. 现主要针对SCI神经源性肠道功能障碍出现的排便异常, 在中医病名、病机、主要方法、有效性、优势及存在问题作一综述.

关键词: 脊髓损伤; 神经源性肠道功能障碍; 痿证; 便秘; 大便失禁; 中医药治疗

朱黎婷, 朱毅, 张文毅, 俞君, 谢斌. 中医药在脊髓损伤神经源性肠道功能障碍的研究进展. *世界华人消化杂志* 2012; 20(35): 3549-3557
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3549.asp>

■背景资料

脊髓损伤(SCI)后神经源性肠道功能障碍严重影响患者的身心健康和生活质量, 因而越来越受到关注, 但国内对此尚未开展普遍的研究. 中医理论在SCI及SCI后出现的排便异常尚未作相关总结. 国内对SCI后排便异常缺乏专业认识、项目资助和人员管理, 临床研究欠规范, 中医理论有待完善.

■同行评议者

唐文富, 副教授, 四川大学华西医院中西医结合科

■相关报道

朱毅等的研究证明电针治疗可改善脊髓全横断大鼠早期的膀胱逼尿肌低反射状态和排尿功能。针刺能在一定程度上改善SCI后神经源性膀胱尿潴留患者膀胱容积状态,提高患者生活质量。

0 引言

我国古代对脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)病名病机的完整认识始于《灵枢·寒热病》,其中记载“身有所伤血出多及中风寒,若有所堕坠,四肢懈惰不收,名为体墮”^[1]。古人对神经源性肠功能障碍(neurogenic bowel dysfunction)从督脉论病,《难经·二十八难》云:“督脉者,起于下极之命,并于脊里,上至风府,入属于脑”^[2],认为肾开窍于二阴而司二便,肾阳不足气化失司则致二便潴留或失禁。但对SCI肠功能障碍病机及辨证论治并无专门论述,主要将其归于便秘或泄泻辩证。国内临床内科治疗中,针灸、腹部推拿、穴位注射、汤药口服及中药灌肠仍占较大比例,现代多与康复盆底肌训练等综合治疗,疗效显著。可见中医药在SCI肠功能障碍的国内运用存在优势,并逐渐融入多学科结合的综合治疗策略。但在如今电针、中药成为国外功能性胃肠病热点研究时期^[3],却极少涉及腹部按摩、中药使用,临床研究主要为个案报道,无法评估疗效^[4-6]。为何中医药在国内SCI临床发展得到疗效支持,却无法在国外推广;为何在国际中医药的胃肠道功能性疾病疗效获得赞同,却难以在SCI肠功能障碍开展研究。我们将整理SCI肠功能障碍病名、病机、辩证、治疗方法变化及疗效,对中医药在SCI肠功能障碍研究的发展优势和困难总结分析。

1 中医对神经源性肠功能障碍的认识

SCI肠功能障碍的病因和病机(病位、病理因素、病理性质、病理变化)总结,均建立在中医对SCI认识的基础上。

1.1 与SCI及神经源性肠功能障碍相关病名由来 与SCI相关的中医病名最早见于《灵枢·寒热病》的“体墮”,因其症状“若有所堕,四肢懈惰不收”命名。《素问·痿论》与SCI相关病名有“痿留”、“肉痿”、“脉痿”、“筋痿”、“骨痿”,其他相关的病名还有“痿”、“痿易”、“痿臂”主要指肢体筋脉迟缓、软弱无力,不能随意运动,或伴有肌肉萎缩,或筋急而挛。现代总结为“痿症”并沿用至今。故中医对SCI病名的确定主要来源于SCI各期症状和脏腑病理性质。中医对SCI并发的大便异常,仍按症状命名、病理性质,归于中医内科的“便秘”或“泄泻”范畴,故无单独病名,但后人针对SCI肠功能障碍的特殊病因,对其病机进行详细总结。

1.2 SCI肠功能障碍的病因和病机总结 根据损伤部位,SCI肠功能障碍病因归为督脉损伤,故病位在督脉。病机概括为督脉受损,肾阳不足。《难经·二十八难》云:“督脉者,起于下极,并于脊里,上于风府,入属于脑”,提示古人已经认为SCI,主要为脊里的督脉受损。《素问·骨空论》认为督脉“贯脊,属肾”。督脉又为“阳脉之海”,故督脉损伤则致肾阳不足。肾开窍于二阴,司二便,故SCI并发二便潴留或失禁乃肾阳不足,气化失司所致。《医宗金鉴·正骨心法要旨》曰:“伤损腰痛,脊痛之症,或因打扑,瘀血留于太阳经中所致。”因此SCI,涉及督脉、膀胱经损伤,病位在肾,肾阳不足这一病机贯穿SCI的全过程,并决定疾病性质。

SCI造成的肠功能障碍病位在肾与大肠。从经络-经络、脏腑-经络功能联系,督脉受损,则手足三阳经阳气不足,气血化生缺乏,则足阳明胃经、足太阴脾经在腹部所过之处温煦、濡养皆不足,以致肠道气损津亏。或气虚血滞、气滞血瘀,血不行则为水,导致湿盛泄泻,甚至久泻伤气,气失固摄,造成滑脱。早期患者正气尚盛,气虚血滞,而“大肠主津”功能异常,津液代谢不利,故早期多为虚实夹杂,气虚血瘀,水湿内停。水湿内停者,久郁化火可转化为湿热,使秽浊之物不能排出。患病不久即元气大伤,气血亏虚,肠燥津亏,故中后期多为虚证。若正气已虚,水湿之邪留恋不去,仍可造成脾虚湿热的虚实夹杂证(图1)。此外,SCI对患者造成严重精神创伤,情志失调,肝气郁结,壅滞肠道,而形成便秘。病理因素则与气、血、湿、热、虚有关。证型实证以瘀热内结、气滞型多见,虚证以气虚型、血虚型、阳虚型多见,并相互转化。

2 SCI肠功能障碍的中医治疗及有效性

中医药在SCI肠功能障碍的运用,古代以针灸、中药汤剂、推拿、中药栓剂和灌肠相结合为主,在以上方法都无效的基础上也采用手工排空的方法。前三者可用于SCI后出现的便秘和排便失禁,后者主要针对便秘。这些方法至今在国内外仍然使用。近10年(2002-10/2012-10)国内SCI并发症的研究中,虽然在肠功能障碍所临床研究开展较少,但中医药在SCI后肠功能障碍的临床报道占有较大比例[中医药(中药+针灸): 14.29%, 康复训练: 7.94%, 手术治疗: 6.35%, 西药: 1.59%](图2)。20世纪末国外调查示:约1/3的SCI患者认为SCI稳定后直、结肠功能障碍比膀

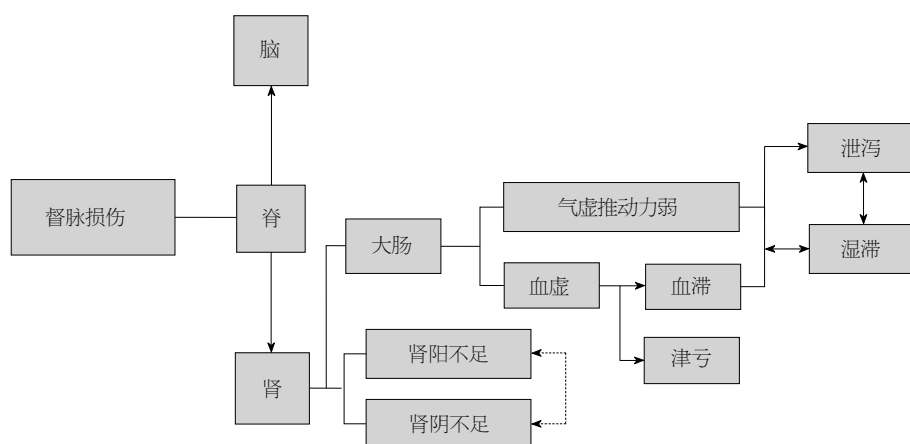


图1 脊髓损伤肠功能障碍相关病理变化。

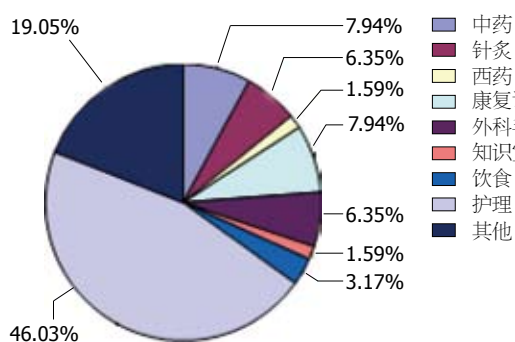


图2 脊髓损伤神经源性肠功能障碍各治疗方法所占百分比(%)。

胱及性功能障碍对身心健康的影响更严重,其中41%患者认为排便功能障碍是中等或严重影响寿命的问题^[7]。目前国内外大量研究已证明针灸、中药在促进胃肠蠕动,促进排便的有效性,因此在神经源性肠功能障碍的诊治刻不容缓。以下介绍目前中医药临床试验结果,并通过物理治疗循证数据库量表(physiotherapy evidence database score, PEDro score)^[8,9]评估临床随机对照试验(randomized controlled trial, RCT)文献质量(表1-3)。PEDro量表总分10分,9-10分:极好,6-8分:好,4-5分:一般,<4分:差^[10]。根据PEDro量表评分分级:1级 = PEDro评分 ≥ 6 的RCT试验;2级 = PEDro评分 ≤ 5 且为非随机性、前瞻性试验的RCT试验,或队列研究;3级 = 病例对照研究;4级 = 前后对照或临床病例系列;5级 = 观察报告或病案报道^[11]。非RCT试验用Downs and Black清单,又称质量指数(quality index)评价,共27个条目,评分越高则研究质量越高^[12,13]。

2.1 针灸及传统相关技术的运用 针灸传统理论在SCI肠道功能障碍从脏腑辨证、经络辨证角度,对病机已有全面的认识。在治疗上即可补肾培元以治本,选取关元、命门、肾俞等;又能行

气活血,选用足三里、合谷等改善腹胀、腹痛等症状;还可通过针刺百会、印堂、三阴交等,宁心安神,调节情绪。《灵枢·寒热病》曰:“取其小腹脐下三结交。三结交者,阳明、太阴也,脐下三寸关元也”。《灵枢·经脉》曰:“足少阳之别,名曰光明,去踝五寸,别走厥阴,下络足跗。实则厥,虚则痿痹,坐不能起。取之所别也。”《灵枢·癫狂病》曰:“骨酸体重,懈惰不能动,补足少阴。”《灵枢·口问》曰:“筋脉懈惰则行阴用力,气不能复,故为瘖。因其所在,补分肉间。”《灵枢·根结》曰:“故痿疾者,取之阳明,视有余不足。”古人所选穴位包括关元、光明等特定穴,以及阳明经穴,治在补肾、补其分肉。

从国内研究得出目前临床取穴多为华佗夹脊穴、膀胱经背部一侧线(脏腑俞穴、腰骶部穴位)、脏腑募穴,以及足三里等在排便功能调节的特效穴^[13-16]。研究穴位的使用频次,发现主穴使用频次为:大椎25次,命门25次,背俞穴22次,夹脊穴20次,关元18次,中极14次,气海11次;配穴使用频次分别为:足三里22次,环跳17次、三阴交17次,阳陵泉16次,合谷14次,八髎13次,曲池13次,太冲12次,委中12次,阴陵泉11次,外关10次,悬钟10次,承山8次,解溪7次、伏兔6次,涌泉5次,太溪5次^[17]。温萍等^[14]对75例胸腰椎骨折造成SCI并发便秘患者,进行穴位注射(维生素B1 100 mg+维生素B12 1.0 mg)双侧足三里、内关,连续7次(1次/d)后,24例患者腹胀、腹痛消失,正常排气、排便,仅6例腹胀腹痛仍存在,无自主排便。杨涛等^[15]对30例SCI后大便失禁患者进行长针深刺次髎、会阳,加电针刺激(20-40 Hz)30 min,2 wk后,23例患者大便控制。余瑾等用对60例SCI后便秘患者在基本康复治疗基础上采用隔盐隔玉灸神阙、命门法,治疗2 mo后参考

■创新盘点

本文是第一篇从中医角度认识神经源性肠功能障碍的综述,对近十年国内SCI神经源性肠功能障碍各种治疗方法,在数量上进行比较,对病机进行总结,并对中医药的临床报道进行文献质量评估。

■应用要点

通过文献质量评估,使读者对国内中医药在SCI神经源性肠功能障碍运用的有效性,和临床研究质量有一定了解。虽然中医药疗法目前在神经源性肠功能障碍运用上未受到重视,但总结近十年国内使用针灸、中药复方的情况,发现使用次数大于康复训练、缓泻药、外科手术和饮食调理等,提示中医药在治疗神经源性肠功能障碍中具有较大临床价值。

表 1 针灸疗法临床研究质量

作者	n	评分/分级	方法	结果
温苒等 ^[14]	75	PEDro = 6/4级	研究对象: 平均年龄: 42岁; 范围: 28-76岁; SCI平面: 胸腰椎骨 治疗方法: 维生素B1/B12穴位注射夹脊穴、足三里、内关 观察指标: 肠道管理事件发生例数	治疗组总有效率94.4%, 对照组总有效率84.6%
杨涛等 ^[15]	9	Downs & Black = 11	研究对象: 平均年龄: 52.1岁; 范围: 3-75岁; SCI平面: 未描述 治疗方法: 双侧次髂、会阳电针 观察指标: 肠道管理事件发生例数	大便失禁总有效率 50.0%
李向红等 ^[16]	67	Downs & Black = 15	研究对象: 平均年龄: 未描述; 范围: 18-71岁; SCI平面: 未描述 治疗方法: 电针水道穴、归来穴、天枢穴 观察指标: 功能独立性评定法在大肠管理项的评分	治疗8 wk后, 无效1例, 占2.86%, 有效7例, 达 20%, 显效27例, 达 77.14%. 总有效率为 97.14%.
余瑾等 ^[19]	60	PEDro = 6/4级	研究对象: 平均年龄: 33岁; 范围: 未描述; SCI平面: 上运动神经元损伤型50例, 下运动神经元损伤型10例 治疗方法: 隔盐隔玉灸、排便功能训练 观察指标: 胃肠疾病中医证候评分表的疗效指数计算方法	治疗组: 显效率50.0%, 总有效率90.0%; 对照组: 显效率13.33%, 总有效率76.67%

《美国成年脊髓损伤患者神经源性肠道功能障碍的处理指南》^[18]评估排便功能, 治疗后治疗组排便障碍评分低于对照组($P \leq 0.05$), 提示隔盐隔玉灸神阙命门能较好地改善SCI康复期便秘, 有助于SCI后排便功能的重建^[19]。

2.2 中药方剂的运用 中药制剂形式多样, 选择灵活, 可兼顾多组症状。汤药在选药和药量控制运用灵活, 可根据肠道功能障碍程度变化, 以及腹胀腹痛、焦虑、失眠等伴随症状加减药味、药量。中成药(如丸剂、口服液)与汤药相比, 服用剂量小, 可适用于胃肠道传输均减弱, 表现为胃胀、食欲减退的患者。中药栓剂多为蜜煎导方, 除了具有直肠局部刺激作用, 还可养阴润肠通便。在汤药选方配伍上, 清代叶天士在便秘的治疗原则较系统, 其中《临证指南医案·肠痹》总结为: “若燥屎坚闭, 则有三承气、润肠丸、通幽汤及温脾汤之类主之……斯时胃气未复, 元气已虚……用蜜煎导法, 设不通爽, 虚者间二三日再导, 余见有渐导渐去燥粪五六枚, 或七八枚, 直至二旬以外第七次, 导去六十余枚而愈者”^[20]。对于SCI后便秘, 现代中医伤科认为选方难处在于既要解除了患者肠道症状, 又要为骨伤疾病的治疗创造了良好的条件。SCI这类患者元气大伤, 体质羸弱, 不宜攻下, 故中期应治以补肾通络, 润肠通便^[21]。在辨证选方过程中, 瘀热内结者多选用承气汤加减^[22], 因元气大伤, 以肾阳不足为主者, 可用大成汤合五苓散加味, 肾阴不足、肠燥津亏者可用化瘀通脉方合六味地黄汤

或复元活血汤加减^[23,24], 气滞型便秘可用六磨汤加减, 以气虚为主者宜健脾升阳、润肠通便, 可选黄芪汤或补中益气汤加减, 血虚型可用润肠丸加味或麻子仁丸加减, 阳虚型可选济川煎加减^[21,25,26]。

目前少量国内研究者针对SCI便秘研制出相关中成药口服液。王建伟与吴毛等^[27,28]采用院内制剂“脊髓康”口服液(黄芪30 g, 当归、赤芍各12 g, 川芎、水蛭、制军、泽兰、泽泻、炒枳实、厚朴、肉苁蓉、仙灵脾、地鳖虫、茯苓、车前子各10 g, 蜈蚣1条), 对SCI后便秘患者治疗, 72.2%患者在服药后2-6 h内腹痛及大便不畅症状缓解, 4 wk后50%患者有便感、能自主控制排便。针对SCI病程变化证型的改变, 早期使用化瘀通脉口服液, 中晚期加用益肾养肝口服液或六味地黄丸, 88.2%患者(15/17)转归良好^[23]。国外研究者发现藏药Padma Lax(2片/d, 顿服, 持续8 wk), 可使SCI(C3、C4、L3)损伤后肠功能障碍出现的便秘、腹胀等症状明显改善^[4]。

古人对大便燥结, 用承气汤、更衣丸等均无效者, “先以胆汁或蜜煎导之, 俟粪既至肛门”(《临证指南医案·便闭》)。仍就无效者, “令病者亲手以中指染油, 探入肛门内, 将燥粪渐渐挖碎而出, 中指须要有指甲者为妙。竟有大便一次, 燥粪挖作百余块而出者。”《临证指南医案·便闭》可见宿便也是导致肠道气滞的继发性病因。古人使用的栓剂主要为蜜煎导方。国内器械灌肠首见于明·虞抟的《医学正传》, 并自创肠溶

表 2 中药治疗临床研究质量

作者	n	评分/分级	方法	结果
邹崇祺 ^[22]	165	Downs & Black = 9	研究对象: 平均年龄: 33岁; 范围: 7-74岁; SCI平面: 颈段20例, 胸段22例, 胸腰段58例, 下腰段65例 治疗方法: 瘀热内结型: 大承气汤加減; 气滞 型: 六磨汤加減; 气虚型: 黄芪汤加減; 血虚 型: 润肠丸加減; 阳虚型: 济川煎加減 观察指标: 未描述	治愈96例, 显效67例, 无效2例. 有 效率98.79%. 治疗时间最短1 d, 最长15 d, 平均7 d.
李瓦里等 ^[24]	28	Downs & Black = 14	研究对象: 平均年龄: 41.2岁; 范围: 18-76岁; SCI平面: 胸腰段骨折15例, 腰段骨折13例 治疗方法: 以复元活血汤为基本方, 瘀热内结 型合大承气汤, 气滞型合六磨汤, 气虚型合黄 芪汤, 血虚型合润肠丸, 阳虚型合济川煎 观察指标: 肠道管理事件发生例数	治愈25例, 有效2例, 无效1例, 总 有效率为96.43%
丁光红等 ^[26]	100	PEDro = 9/1级	研究对象: 平均年龄: 26.24岁; 范围: 20-50 岁; SCI平面: 中颈脊髓损伤12例, 胸脊髓损伤 6例, 腰脊髓损伤32例 治疗方法: 疗组服麻子仁丸, 对照组口服潘泻 叶 观察指标: 肠道管理事件发生例数	治疗组: 显效66%, 好转26%, 无 效8%, 总有效率92%(腹胀减轻: 92%, 食欲减退缓解: 88%, 精神 萎靡缓解: 86%) 对照组: 显效20%, 好转32%, 无 效50%, 总有效率50%(腹胀减轻: 44%, 食欲减退缓解: 40%, 精神 萎靡缓解: 32%)
王建伟等 ^[27]	18	Downs & Black = 12	研究对象: 平均年龄: 38岁; 范围: 23-55岁; SCI平面: 颈椎骨折1例, 胸椎骨折2例, 腰椎骨 折15例 治疗方法: "脊髓康"口服液, 排便训练 观察指标: 肠道管理事件发生例数	72.2%患者服药2-6 h内腹胀腹 痛、大便不通症状明显缓解或消 失27.8%患者大便通畅, 偶有腹胀
吴毛等 ^[28]	48	Downs & Black = 14	研究对象: 平均年龄: 40.56岁; 范围: 20-67 岁; SCI平面: 颈髓10例, 胸髓2例, 腰骶髓28 例; 马尾8例 治疗方法: "脊髓康"口服液 观察指标: 大便功能级别评分	治疗前: 0级(6人), 1级(20人), 2级 (14人), 3级(8人) 治疗后: 0级(20 人), 1级(16人), 2级(6人), 3级(2人)
Feldhaus ^[4]	3	5级	研究对象: 69岁, 男, C4节段损伤; 58岁, 女, C5节段损伤; 61岁, 女, L3节段损伤 治疗方法: Padma Lax口服: 颈髓损伤者2片 /d, 腰髓损伤者1片/d, 均持续8 wk 观察指标: 排便次数及腹部伴随症状	腹胀减轻, 能定时排便, 无需其他 辅助排便措施
付知勤等 ^[48]	46	Downs & Black = 11	研究对象: 平均年龄: 36.7岁; 范围: 17-76岁; SCI平面: 胸段骨折10例, 胸腰段骨折21例, 腰段骨折15例 治疗方法: 疏肝活血汤加減 观察指标: 48 h内排便例数	8 h便秘解除者16例, 24 h通便者 22例, 48 h内通便者10例

■名词解释

神经源性肠道功能障碍: 是SCI后肠道失中枢神经支配造成感觉运动障碍, 使结肠活动和肛门直肠功能发生紊乱, 导致结肠通过时间延长, 肛门括约肌失去自主控制, 直肠平滑肌与盆底横纹肌协调性被打乱, 表现为便秘、大便失禁等肠道并发症。

剂, 虞氏“令侍婢口含香油, 以小竹筒一个套入肛门, 以油吹入肛内. 过半时许, 病者自云‘其油入肠内, 如蚯蚓渐渐上行’, 再过片刻许, 下黑粪一二升止, 困睡而安”^[29]. 现代针对SCI后便秘患者国内外仍主要使用甘油灌肠剂通便^[6], 国内黄术灌肠液、牙皂蜜煎剂、肠毒清等中药煎剂作为补充治疗, 也起到良好的即时效果^[30-32].

现代中药药理研究也进一步证明了中药

复方标本兼顾的优势. 丹参有抑制神经细胞凋亡、抑制兴奋性氨基酸毒性、抑制脂质过氧化和自由基产生、诱导干细胞分化的作用, 以达到中医理论“活血化瘀”、“去瘀生新”的作用^[33-36]. 汉防己中的汉防己甲素凋亡调控基因的表达有明显的积极干预作用, 可显著减少神经细胞凋亡, 且越早使用, 抑制神经元凋亡作用越明显^[37,38]. 对慢性传输性Wistar大鼠进行2 wk

■同行评价

本文基于临床实践、中医文献和现代研究总结SCI的中医药病名、病因病机和病理过程。就中医药治疗进展与困难及可利用的治疗方法,提出了问题和研究建议,具有一定的价值。

表 3 中医综合治疗的临床研究质量

作者	n	评分/分级	方法	结果
占琼英等 ^[41]	123	PEDro = 6/1 级	研究对象: 平均年龄: 未描述; 范围: 20-66岁; SCI平面: 胸腰椎 治疗方法: 穴位按摩+腹部按摩 观察指标: 比较两组首次排便的时间及排便情况	治疗组/对照组: 首次排便时间: 术后1 d: 13.8%/15.5%, 术后2 d: 29.2%/17.2%, 术后3d: 41.5%/13.7%, 术后>3 d: 15.3%/53.4%. 首次排便情况: 使用缓泻剂: 18.4%/67.2%, 排便困难: 24.6%/65.5%, 排便费时: 27.6%/68.9%, 大便干结: 12.3%/62.1%, 有残留感: 16.9%/56.9%
刘红敏等 ^[46]	125	Downs & Black = 13	研究对象: 平均年龄: 32岁; 范围: 7-71岁; SCI平面: 颈段15例, 胸段17例, 胸腰段48例, 腰段45例 治疗方法: 瘀热内结型: 大成汤加减, 气滞型: 六磨汤加味, 气虚型: 黄芪汤加味, 阴虚型: 增液承气汤加味 观察指标: 腹胀便秘症状	78例患者腹胀便秘症状消失, 47例患者腹胀便秘症状明显减轻
徐明春等 ^[51]	12	Downs & Black = 11	研究对象: 平均年龄: 37.5岁; 范围: 20-55岁; SCI平面: 胸髓损伤9例, 腰髓损伤3例 治疗方法: 针刺, 口服中药, 模拟定时排便和手指直肠刺激的方法 观察指标: 排便次数及腹部伴随症状	2 mo后10例患者可每1-2 d排便1次, 无效2例, 有效率83.3%

的中药复方(黄芪、白术、枳壳等)灌胃治疗后, 与对照组相比, 肠道传输时间缩短(治疗组: $337.2 \text{ min} \pm 74.7 \text{ min}$, 便秘组: $420.3 \text{ min} \pm 129.5 \text{ min}$, $P < 0.05$), 远端NO含量增加($P < 0.05$)^[39]. 对SD大鼠慢性传输性大鼠模, 用复方白术汤灌胃治疗15 d后, 与模型组相比, 一氧化氮合成酶(nitric oxide synthase, NOS)神经元显著减少^[40].

2.3 推拿的运用 对SCI后肠功能障碍患者通常采用穴位与腹部推拿相结合的策略. 穴位多选用: 足三里、三阴交、支沟、合谷、天枢, 采用点按法或指揉法, 便秘为主用顺时针摩腹, 大便失禁者采用逆时针摩腹^[41]. 国内多将推拿作为护理干预项目, 国外对SCI肠功能障碍的手法治疗以康复手法为主.

3 中医药在SCI神经源性肠功能障碍治疗的特点

3.1 注重体质辨证 中医治疗从古至今均注重体质辨证, 即达到了将方、证、人合而为一的效果^[42]. 运用最多的即为六经辨证. 在现代经方(主要指张仲景在《伤寒杂病论》介绍的方)运用中, 将人的外貌特征、发病症状结合分析, 通过六经辨证总结为某一条经的病变^[43], 且有是证, 用是药, 将外貌特征与发病特征直接指导选方用药. 如黄芪体质的外貌特征表现为: 体型中

等、肥胖, 肌肉松软、中等, 面色以白为主, 下肢易浮肿; 腹部柔软而无抵抗感(黄芪腹); 舌质淡、暗、淡红, 舌苔以薄白润为主, 为以缓、细脉主, 好发症状: 疲倦、汗多、腹胀、便溏、排便感不畅; 也有肢麻、肢痉挛、口干、口苦、口臭、咽痛; 月经期胁痛、烦躁、腰酸坠痛等^[44]. 而临床常用的其他辨证(脏腑辨证、气血津液辨证)多在疾病辨证的基础上选方用药, 再在患者体质基础上做药味加减. 临床治疗SCI神经源性肠功能障碍应视其元气亏损程度, 决定补肾药的选择、用量和行气活血药的使用力度. 老年人偏瘦者多阴液亏虚, 用药使多注意阴阳双补, 并以补肾阴为主. 王天宇等^[45]对22例胸腰椎骨折患者(平均年龄64.7岁), 服用复元活血汤加肉苁蓉、牛膝、肉桂等补肾阳、益精血、润肠通便药后, 与19例仅常规治疗患者比较, 总有效率为90.91%($P < 0.05$). 刘红敏^[46]总结SCI后便秘的老年患者多表现为大便坚涩, 排出困难, 面色无华, 或腰脊酸冷, 舌淡苔薄白, 脉细涩. 因此在治疗上选用含玄参、麦冬、生地的增液承气汤, 稍加肉苁蓉、牛膝温补肾阳, 当归养血通便. 中青年患者形体迅速消瘦多为元气大伤, 以益气活血为主, 并通过健脾来益气血. 赵淑芳等^[47]用白术当归导滞汤益气养血, 治疗包括SCI在内的伤

科便秘(平均年龄32岁),服用3剂后排便频率、腹胀、食欲均较治疗前改善。付知勤等^[48]疏肝活血汤加味,治疗46例胸腰椎骨折后早期便秘(最短者2 h,最长者7 d,平均2.3 d)患者(平均年龄36.7岁),服用后8 h便秘解除者16例,24 h通便者22例,48 h内通便者10例。

3.2 多样化的治疗形式 中医针灸、中药、推拿既可作为专业科室单独治疗,又可作为康复医学中传统康复治疗部分深入临床各科(包括骨科、脊柱外科、护理)治疗,实现多学科交融与合作。随着技术发展,针灸延伸出针刺相关技术(包括电针、耳针、红外穴位照射、经皮神经电刺激、新砭石疗法)^[49,50],根据汤药成分研制出颗粒剂、片剂、口服液等方便携带、服用的形式,并可通过电针、汤药、推拿综合管理,达到治疗方式上因人制宜。徐明春^[51]对12例C级以上SCI患者采用针刺大肠俞、胃俞、足三里、阳陵泉,摩腹,口服中药木香、番泻叶,模拟定时排便和手指直肠刺激的方法,2 mo后10例患者可每1-2 d排便1次。刘红敏^[46]根据患者症状分为瘀热内结型、气滞型、气虚型和阴虚型,对证治疗,平均8 d后,78例(共125例)患者腹胀便秘症状消失,47例患者腹胀便秘症状明显减轻。

3.3 中医药在SCI神经源性肠功能障碍的疗效 目前国内外研究都显示针刺能有效调节肠道自主神经系统功能,并有双向调节作用,使肠道自主神经系统恢复正常^[52]。德国一项针刺治疗肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)研究中得出真针刺组较假针刺组在唾液分泌的皮质醇和心率都显著降低($P \leq 0.05$),并维持在正常水平,生活质量也有所改善^[53]。研究发现通过针刺不同穴位,能引起不同自主神经反应,提示脑内核团对来自不同节段的刺激偏好不同^[40]。最新一项关于IBS的Meta分析显示针刺叫抗痉挛药效果更好,并且更有效提高患者生活质量^[54]。

从近10年中医药在SCI后神经源性肠功能障碍治疗所占百分比(图2),以及上述针灸、中药、推拿等治疗的有效性^[16,17,22,23,28,32],结合国外针刺在肠道自主神经功能紊乱相关疾病研究^[52-54],中医药能有效改善排便功能,较西药更易被患者接受,并更显著的提高患者生活质量。肠道除脊髓、大脑的中枢控制外,自身肠神经系统也可对本身基础电节律起到调节作用,被称为“第三脑”。韩济生等^[55]研究大鼠SCI发现第10或11胸椎处切断脊髓后,给3 V恒频电针足三里一律无效,只有用3 V变频电针或9 V强电针

时才能使用尾反射潜伏期(tail-flick latency, TFL)轻度升高。说明在高频电针刺激下,传入信息上传至脊髓以上的结构(例如低位脑干),再通过下行抑制通路,产生对尾反射的抑制作用。因此中医药干预仍可通过肠自主神经系统及脊髓微弱的信号传递作用共同调节肠道功能。

4 中医药在SCI神经源性肠功能障碍面临的挑战

国内SCI后的肠功能障碍虽对患者身心健康及生活质量带来严重影响^[7],但近10年国内仅64篇文章对其进行报道,并且缺乏高质量中医临床研究,难以为中医药治疗SCI肠道功能障碍专科的疗效提供循证医学证据,因此这些方法难以向国外推广。不仅在研究量上远落后于国外(PubMed显示近10年7 387篇文献,6 309篇为临床研究)。临床研究质量也难以保证。分析国内中医临床在SCI肠道功能障碍发展缓慢原因。总结为以下3个方面:(1)专科医生倾向于研究SCI急性期炎症控制,而忽略急性期过后或过程中即出现的便秘或大便失禁对患者生活质量的影响,仅给予泻药或直肠造瘘术接粪袋处理,忽略患者因长期依赖药物或粪袋对身心的影响;(2)国内专科医生尚未认识到SCI后二便功能恢复的研究意义。在国外广泛开展相关研究至今,在国内尚未形成关注的新热点,若要推广中医药在肠功能障碍的管理还有一定困难;(3)目前在SCI后出现的神经源性膀胱尿潴留、神经源性肠功能障碍,均无足够的资金投入。国内近10年SCI后肠功能障碍的研究资助中,仅3篇共涉及4项资助(国家重点基础研究发展、国家自然科学基金、广东省中医药管理局基金、北京市自然科学基金各1项)^[56-58],即使中医科、康复科、脊柱外科等专科医生愿意付出精力研究,也难维持完整研究周期,更难以完成持续性研究。

目前已有的临床研究中,尚存在以下问题^[59]:

(1)部分研究未进行入选对象的基数统计;(2)排便功能测定无统一标准,仅有一项研究给出评估依据,即参考《美国成年脊髓损伤患者神经源性肠道功能障碍的处理指南》评估排便功能^[12];(3)各干预方法结束后未报道随访情况;(4)缺乏大样本、多中心,使用盲法的高质量研究。

5 结论

国内SCI肠道功能障碍的中医临床研究显示,针灸、中药可在控制排便、腹胀腹痛、焦虑样情绪上具有一定有效性。但临床研究多为4-5级依

据, Downs和Black清单评分均不超过15分, 支持中医药的有效性证据尚不充分, 故难以在国外推广。虽然针灸、中药在功能性胃肠病上取得良好效果, 并有较高治疗循证医学证据支持, 但因神经源性肠功能障碍病因不同, 涉及中枢对肠道周围神经的控制和肠道自主神经功能紊乱等复杂机制, 需要通过针对神经源性肠功能障碍的中医临床研究提供直接证据。除此以外, 中医理论在SCI后肠功能障碍缺乏治疗策略的总结。SCI神经源性肠道功能障碍是否需要另立中医病名? 是否需要急性期和急性期过后出现的排便功能异常分期辨证? 是否需要软瘫期和硬瘫期出现的排便功能障碍分期辨证? 是否需要确定中医药、康复功能训练介入的时期? 这些都有待进一步研究。

6 参考文献

- 1 王冰. 黄帝内经. 第1版. 北京: 中国科学技术出版社, 1997: 610
- 2 南京中医学院. 难经校释. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 1979: 70
- 3 Manheimer E, Cheng K, Wieland LS, Min LS, Shen X, Berman BM, Lao L. Acupuncture for treatment of irritable bowel syndrome. *Cochrane Database Syst Rev* 2012; 5: CD005111
- 4 Feldhaus S. [Treatment of a tetraplegic patient with chronic constipation with the Tibetan remedy Padma Lax--a case report]. *Forsch Komplementmed* 2006; 13 Suppl 1: 31-32
- 5 Ayaş S, Leblebici B, Sözü S, Bayramoğlu M, Niron EA. The effect of abdominal massage on bowel function in patients with spinal cord injury. *Am J Phys Med Rehabil* 2006; 85: 951-955
- 6 Ebert E. Gastrointestinal involvement in spinal cord injury: a clinical perspective. *J Gastrointest Liver Dis* 2012; 21: 75-82
- 7 王红, 周士枋. 脊髓损伤后肠道功能障碍. *中国康复理论与实践* 2002; 8: 174-177
- 8 Moseley AM, Herbert RD, Sherrington C, Maher CG. Evidence for physiotherapy practice: a survey of the Physiotherapy Evidence Database (PEDro). *Aust J Physiother* 2002; 48: 43-49
- 9 曾宪涛, 包翠萍, 曹世义, 刘菊英. 分析系列之三: 随机对照试验的质量评价工具. *中国循证心血管医学杂志* 2012; 4: 183-185
- 10 Foley NC, Teasell RW, Bhogal SK, Speechley MR. Stroke Rehabilitation Evidence-Based Review: methodology. *Top Stroke Rehabil* 2003; 10: 1-7
- 11 Sackett DL. Evidence-based medicine and treatment choices. *Lancet* 1997; 349: 570, author reply 572-573
- 12 Lam T, Eng JJ, Wolfe DL, Hsieh JT, Whittaker M, SCIRE Research Team. A systematic review of the efficacy of gait rehabilitation strategies for spinal cord injury. *Top Spinal Cord Inj Rehabil* 2007; 13: 32-57
- 13 陈泽鑫, 刘慧, 潘益峰, 余运贤. 试验性和观察性研究相关医学文献质量评价方法. *中国循证医学杂志* 2011; 11: 1229-1236
- 14 温萍, 李旭方, 李智, 刘满芬. 穴位注射疗法治疗胸腰椎骨折后腹胀便秘疗效观察. *吉林中医药* 2006; 26: 38-39
- 15 杨涛, 刘志顺, 刘元石. 电针次髎、会阳穴治疗神经源性二便失禁30例. *新中医* 2001; 33: 43
- 16 李向红. 针灸推拿治疗脊髓损伤后肠道功能紊乱. *中国临床康复* 2005; 9: 30-36
- 17 何竟, 李齐寅, 丁明甫, 何成奇. 针灸治疗脊髓损伤文献计量分析. *中国康复医学杂志* 2010; 25: 1093-1094
- 18 谢青, 陆廷仁, 熊健, 顾琳. 脊髓损伤ASIA2000神经功能评定介绍. *中华物理医学与康复杂志* 2007; 29: 210-213
- 19 余瑾, 黄顺仪, 李莉, 谭进芝. 隔盐隔玉灸神阙命门治疗脊髓损伤恢复期便秘的疗效观察. *新中医* 2011; 43: 110-112
- 20 叶天士. 临证指南医案. 第1版. 山西: 山西科学技术出版社, 2006: 185
- 21 覃纯初. 伤科便秘的辨证治疗. *湖南中医杂志* 1990; 6: 7-9
- 22 邹崇祺. 辨证治疗脊柱、脊髓损伤后腹胀便秘165例. *广西中医药* 2000; 23: 36-40
- 23 王志红, 王晓鹏. 外伤性脊髓损伤致截瘫的中医康复治疗. *中国康复* 2003; 18: 310
- 24 李瓦里, 张建梅, 古恩鹏. 复元活血汤加减治疗脊椎骨折患者便秘的临床体会. *天津中医药* 2006; 23: 453
- 25 王晶, 靳冬. 补中益气汤化裁治疗脊髓损伤后便秘1例. *中医研究* 2012; 25: 43-44
- 26 丁光红, 苟坤婷. 麻子仁丸治疗脊髓损伤便秘患者疗效观察. *贵阳中医学院学报* 2012; 32: 45-46
- 27 王建伟, 吴毛. “脊髓康”治疗脊髓损伤后便秘18例. *实用临床医药杂志* 2005; 9: 59
- 28 吴毛, 冯骅. 中西医结合治疗急性脊髓损伤后便秘48例. *现代中西医结合杂志* 2008; 17: 5483-5484
- 29 虞抟. 医学正传. 第1版. 北京: 中医古籍出版社, 2002: 341
- 30 胡团敏, 张丽婷, 黄永德. 黄术灌肠液结合大肠水疗治疗老年性便秘疗效探讨. *医学理论与实践* 2010; 23: 15-16, 29
- 31 季林香. 牙皂蜂蜜煎剂灌肠治疗良性前列腺增生术后便秘205例. *浙江中医杂志* 2001; 36: 348
- 32 韩艳, 马红梅, 朱亚萍. 中药肠毒清保留灌肠治疗老年顽固性便秘的体会. *湖南中医药导报* 2003; 9: 29-30
- 33 Yin X, Yin Y, Cao FL, Chen YF, Peng Y, Hou WG, Sun SK, Luo ZJ. Tanshinone IIA attenuates the inflammatory response and apoptosis after traumatic injury of the spinal cord in adult rats. *PLoS One* 2012; 7: e38381
- 34 Chen X, Zhou C, Guo J, Sun K, Zhao N, Yang J, Sun Y, Liu X, Hibi T, Liu Z, Han J. Effects of dihydroxyphenyl lactic acid on inflammatory responses in spinal cord injury. *Brain Res* 2011; 1372: 160-168
- 35 刘世清, 赵东明, 王海斌, 周华. 复方丹参对大鼠脊髓损伤后细胞凋亡及诱导型一氧化氮合酶表达的影响. *中国脊柱脊髓杂志* 2005; 15: 109-111
- 36 余永桂, 张功礼, 施永彦, 邓长康, 杨洪平, 禹志宏, 张磊, 张昊, 黄振华. 丹参注射液椎管内局部灌注对急性脊髓损伤的保护作用. *中华实验外科杂志* 2004; 21: 993-994
- 37 王远政, 田晓滨, 李波, 孙立, 韩伟, 汪雷, 张一. 汉防己甲素对大鼠急性脊髓损伤后神经细胞凋亡和相关基因表达的影响. *中华创伤杂志* 2012; 28: 460-465
- 38 罗春山, 田晓滨, 汪雷, 李波, 彭智, 周焯家, 简月奎, 赵伟峰. 汉防己甲素干预急性损伤脊髓神经元凋亡及bcl-2和bax表达: 与甲基强的松龙的比较. *中国组织工程研究与临床康复* 2012; 14: 7770-7774
- 39 陈飞波, 包云光, 舒小莉, 顾伟忠, 赵焯, 姚敏华, 欧弼悠, 江米足. 一氧化氮在慢传输型便秘大鼠中的作用及中药治疗评估. *临床儿科杂志* 2009; 27: 580-584
- 40 卢敏, 郑晨果, 金纯. 复方白术汤对慢传输型便秘大鼠肠道肌间神经丛内NOS的影响. *北京中医药* 2009; 28:

- 58-60
- 41 占琼英, 刘评. 穴位按揉及腹部按摩对胸腰椎术后患者排便的影响. 中华现代护理杂志 2009; 15: 3052-3053
- 42 任灵贤, 黄煌. 经方起源考. 南京中医药大学学报 2011; 27: 10-12
- 43 古求知, 老膺荣, 范宇鹏, 黄煌. 黄煌教授运用经方治疗肠易激综合征经验简介. 新中医 2012; 44: 208-209
- 44 魏玉凤, 林煜, 连新福. 黄煌体质学说之“药人”646例临床资料相关性分析. 中医杂志 2012; 53: 1112-1115
- 45 王天宇, 孙波, 李瓦里, 刘世琰. 复元活血汤加味治疗阳虚型胸腰椎骨折后腹胀便秘22例. 中国中医骨伤科杂志 2012; 20: 60-61
- 46 刘红敏. 中药辨证治疗脊柱、脊髓损伤后腹胀便秘. 中医正骨 1999; 11: 38
- 47 赵淑芳, 马国忠. 白术当归导滞汤治疗创伤后便秘62例. 实用中医药杂志 1999; 15: 19, 21
- 48 付知勤, 宋莉. 疏肝活血汤加味治疗胸腰椎骨折后早期便秘46例. 四川中医 2004; 22: 83-84
- 49 Han JS. Acupuncture analgesia: areas of consensus and controversy. *Pain* 2011; 152: S41-S48
- 50 谢衡辉, 谷世喆. 新砭石疗法作用特点. 中国针灸 2002; 22: 17-25
- 51 徐明春. 不完全脊髓损伤致神经源性肠道功能紊乱的康复护理. 吉林医学 2010; 30: 3169-3170
- 52 Choi W, Lee S, Cho S, Park K. Differential autonomic response to acupuncture at wood and metal of five-shu acupoints. *J Altern Complement Med* 2012; 18: 959-964
- 53 Schneider A, Weiland C, Enck P, Joos S, Streitberger K, Maser-Gluth C, Zipfel S, Bagheri S, Herzog W, Friederich HC. Neuroendocrinological effects of acupuncture treatment in patients with irritable bowel syndrome. *Complement Ther Med* 2007; 15: 255-263
- 54 Lim B, Manheimer E, Lao L, Ziea E, Wisniewski J, Liu J, Berman B. Acupuncture for treatment of irritable bowel syndrome. *Cochrane Database Syst Rev* 2006; (4): CD005111
- 55 韩济生, 张敏, 任民峰. 横断大鼠脊髓对电针镇痛和吗啡镇痛的影响. 科学通报 1986; 31: 228
- 56 彭小苑, 谷忠建, 黄丽娇. 改良式护理干预对脊髓损伤患者便秘的影响. 当代护理 2012; 8: 69-70
- 57 孟志勇, 霍速, 岳月红, 刘霖, 宋为群. 磁刺激在脊髓损伤康复中的应用. 医学综述 2012; 18: 1964-1967
- 58 李文成, 肖传国. 腰骶脊髓损伤患者肛管直肠功能障碍的研究. 中华创伤杂志 2006; 22: 194-197
- 59 王连仲, 尹忠民, 闻华, 王永才, 张军, 张隼, 陈哲, 胡祥. 自体骨髓干细胞联合脐血单个核细胞移植治疗胸段慢性脊髓损伤27例报告. 解放军医学杂志 2012; 37: 788-792

编辑 田滢 电编 闫晋利

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》2011年开始不再收取审稿费

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

锌指蛋白Metallopanstimulin-1在肿瘤中的研究进展

杨中印, 顾琴龙

■背景资料

随着肿瘤相关抗原筛选方法的发展,越来越多的肿瘤相关抗原被发现并证实与肿瘤的发生发展密切相关。肿瘤抗原能够被细胞和体液效应器识别的特性为恶性肿瘤的治疗开辟了一条新的途径,许多肿瘤抗原已经被鉴定并开展了相应的临床实验。MPS-1即是多种肿瘤组织中筛选出的肿瘤相关抗原基因。

杨中印, 顾琴龙, 上海交通大学医学院附属瑞金医院 上海消化外科研究所 上海市 200025

杨中印, 主要从事胃癌生物学治疗方面的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 81201915; No. 30972871

高等学校博士学科点专项科研基金资助项目, No. 20120073120098

作者贡献分布: 本文综述由杨中印完成; 顾琴龙负责审核。

通讯作者: 顾琴龙, 教授, 200025, 上海市瑞金二路197号, 上海交通大学医学院附属瑞金医院, 上海消化外科研究所。

qlgu@shsmu.edu.cn

电话: 021-37763440 传真: 021-63846480

收稿日期: 2012-10-15 修回日期: 2012-11-11

接受日期: 2012-11-15 在线出版日期: 2012-12-18

Advances in understanding the role of metallopanstimulin-1 in tumors

Zhong-Yin Yang, Qin-Long Gu

Zhong-Yin Yang, Qin-Long Gu, Department of General Surgery, Shanghai Institute of Digestive Surgery, Ruijin Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China

Supported by: National Natural Science Foundation, Nos. 81201915 and 30972871; and the Specialized Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education of China, No. 20120073120098

Correspondence to: Qin-Long Gu, Professor, Department of General Surgery, Shanghai Institute of Digestive Surgery, Ruijin Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, 197 Ruijin Er Road, Shanghai 200025, China. qlgu@shsmu.edu.cn

Received: 2012-10-15 Revised: 2012-11-11

Accepted: 2012-11-15 Published online: 2012-12-18

Abstract

Metallopanstimulin-1 (MPS-1), belonging to the ribosomal protein S27E family, is ubiquitously expressed in all normal tissues except the brain and placenta. In addition, MPS-1 is highly expressed in malignant tumors and cells. MPS-1 as a tumor marker or tumor-associated antigen has been extensively studied in head and neck cancer and breast cancer. MPS-1 is highly expressed in gastric cancer. Knockdown of MPS-1 expression inhibits the growth of cancer cells both *in vitro* and *in vivo* and induces spontaneous apoptosis of gastric cancer cells by repressing the NF- κ B signaling pathway. In addition, MPS-1 is also highly expressed in colonic cancer and has a close relationship with the degree of malignancy and prog-

nosis. Therefore, MPS-1 may be a novel potential therapeutic target for cancers.

Key Words: MPS-1; Head and neck carcinoma; Breast cancer; Gastric cancer; Cancer therapy

Yang ZY, Gu QL. Advances in understanding the role of metallopanstimulin-1 in tumors. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(35): 3558-3563

摘要

Metallopanstimulin-1(MPS-1)是核糖体蛋白S27E家族的一个成员,其在除胎盘和脑以外的全身组织广泛表达,但恶性增殖的组织和细胞中MPS-1的表达水平明显升高。MPS-1作为肿瘤标志物和肿瘤相关抗原在头颈部肿瘤和乳腺癌中被广泛研究。在胃癌中研究结果显示MPS-1在胃癌组织中高表达,其下调能够在体内和体外实验中抑制胃癌细胞的增殖和生长。同时,MPS-1的下调能够通过抑制NF- κ B信号通路进而促进胃癌细胞的自发性凋亡。此外,MPS-1在结肠癌中也高表达且与肿瘤的恶性程度和预后密切相关。因此,MPS-1可能成为肿瘤治疗的新靶点。

关键词: MPS-1; 头颈部肿瘤; 乳腺癌; 胃癌; 肿瘤治疗

杨中印, 顾琴龙. 锌指蛋白Metallopanstimulin-1在肿瘤中的研究进展. 世界华人消化杂志 2012; 20(35): 3558-3563

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3558.asp>

0 引言

肿瘤的发生是一个多阶段、多因素参与的复杂过程,其中涉及到一系列肿瘤相关基因的表达和结构异常,肿瘤抗原就是这些异常基因的表达产物^[1-3]。肿瘤抗原能够被细胞和体液效应器识别的特性为恶性肿瘤的治疗开辟了一条新的途径,许多的肿瘤抗原已经被鉴定并开展了相应的临床实验^[4-8]。肿瘤抗原筛选的方法有CTL克隆法和多肽洗脱法等,但由于需要建立肿瘤特异性CTL克隆和操作技术难度大等局限性,限制了其广泛应用^[9,10]。最近出现的重组cDNA表

■同行评议者

张国梁, 主任医师, 天津市第一中心医院消化内科

达文库血清学分析法(serological analysis of recombinant cDNA expression libraries, SEREX)利用肿瘤患者体内的体液免疫反应筛选肿瘤抗原, 避开了以往需要体外建立细胞株等实验难题, 可以应用于几乎所有类型的人类肿瘤相关抗原的鉴定^[11-14]. 目前, 已有数千种肿瘤抗原基因通过SEREX方法被发现, 其中一些已被证实与肿瘤的发生、发展及肿瘤免疫具有一定的相关性^[15-17]. MPS-1即是利用SEREX方法在多种肿瘤组织中筛选出的肿瘤相关抗原基因^[18,19]. MPS-1是1993年Fernandez-Pol等^[20]用TGF- β s和cAMP类似物刺激人乳腺癌MDA-MB-468细胞时发现的一个新基因. 目前, 关于MPS-1的研究主要集中在头颈部肿瘤、乳腺癌、前列腺癌^[19,21,22]. 近期有报道MPS-1在胃癌细胞凋亡方面发挥了重要的作用, 下调MPS-1的表达能够抑制NF- κ B的活性进而影响NF- κ B下游的靶基因的表达而促进细胞的凋亡^[23,24], 现就MPS-1在各领域的研究作一综述.

1 MPS-1的结构、功能和作用机制

MPS-1编码的蛋白又名核糖体蛋白S27, 是一种多功能蛋白, 由84个氨基酸组成, 分子量为9.4 kDa, 属于核糖体蛋白S27E家族, 与鼠S27核糖体蛋白具有高度的同源性. MPS-1蛋白含有一个转录调控的DNA结合结构域, 分析发现他含有4个半胱氨酸残基以-Cys-X2-Cys-X15-Cys-X2-Cys-的形式排列, 从而形成一个锌指结构域, MPS-1蛋白可以通过这个结构域与含有cAMP反应元件(cAMP responsive element, CRE)的基因特异结合并调控他们的表达^[25]. 此外, MPS-1还参与DNA损伤修复及异常改变mRNA的识别与结合^[20]. 基因表达分析显示, MPS-1 mRNA在除脑和胎盘以外的正常组织中有着广泛的表达, 而在多种肿瘤如头颈部肿瘤、乳腺癌、前列腺癌及胃癌中高表达. 在增殖旺盛的细胞特别是起源于外胚层的细胞如黑色素瘤中MPS-1表达也明显增高^[26,27].

针对MPS-1蛋白的免疫荧光、免疫组织化学结合Western blot等检测方法发现MPS-1蛋白在细胞浆和细胞核内都有表达, 且在不同的细胞中其定位并不一致^[23,25]. 这可能是由于其在不同的细胞中的分布及所受刺激不同所致. 近来, 越来越多的报道显示核糖体蛋白除了作为细胞内蛋白质合成的场所外他还发挥了许多“核糖体外”的功能^[28-30]. MPS-1所含的锌指结构域使其能够

和特定的核酸结合从而调控他们的转录和翻译.

最近, He与Xiong等^[31,32]发现MPS-1和他同一家族成员RPS27L都是转录因子p53的反应性靶蛋白. MPS-1和RPS27L的N末端都能与MDM2中间的酸性结构域结合. 因此, MPS-1或RPS27L与MDM2-p53形成三聚体的结构从而与p53竞争结合MDM2. 外源性表达的MPS-1能够抑制MDM2介导的p53泛素化降解^[33-35], 并通过延长p53的半衰期, 使得p53表达水平升高.

2 MPS-1在乳腺癌中的研究

Atsuta等^[19]利用乳腺癌组织中抽提的mRNA构建了乳腺癌的cDNA表达文库, 并用SEREX方法筛选出肿瘤相关基因MPS-1, 并以此为基础进行研究. 免疫组织化学显示在所研究的125例乳腺癌患者组织中有50.4%的组织MPS-1呈阳性表达, Western blot显示在所有的乳腺癌细胞系中MPS-1高表达. 外周血淋巴细胞(peripheral blood lymphocyte, PBL)中MPS-1表达较低, 而在刀豆素(ConA)刺激下PBL中MPS-1的表达升高. Northern blot进一步证实MPS-1在增殖旺盛的组织、恶性组织和细胞中表达增加. 通过对大规模乳腺癌组织MPS-1蛋白表达水平的检测, 可以预见MPS-1能够作为一种肿瘤相关抗原, 并可能作为肿瘤疫苗用于肿瘤的免疫治疗.

3 MPS-1在头颈部肿瘤中的研究

Stack等^[36]利用免疫组织化学方法对30例头颈部鳞状细胞癌(head and neck squamous cellcarcinoma, HNSCC)患者的癌组织中MPS-1的表达进行检测, 发现MPS-1在HNSCC中高表达, 并且运用放射免疫分析技术(radioimmunoassay, RIA), 蛋白芯片表面增强激光吸收/离子化飞行质谱(surface-enhanced laserdesorption/ionization-time of flight-mass spectra, SELDI-TOF-MS)等方法检测MPS-1在早期HNSCC患者中的表达, 并研究其是否能成为一个检测早期肿瘤的肿瘤标志物^[21,37,38].

3.1 RIA检测HNSCC患者血清中MPS-H水平
通过在可控条件下对血清进行热变性, 那些被MPS-1前体或载体蛋白激活和释放出来的MPS-1和MPS-1样蛋白统称为MPS-H, 通过RIA检测以确定MPS-1和MPS-1样蛋白的表达水平. Stack等^[21]在实验中用RIA方法对125例HNSCC患者和25例正常不吸烟者、64例正常吸烟者为对照组的血清进行了MPS-H的检测, 发现HNSCC患者的MPS-H值为41.5 ng/mL, 而对照组分

■研究前沿

肿瘤的病因及相关致病危险因素复杂多样, 肿瘤相关抗原MPS-1的识别为进一步研究肿瘤发生的机制提供了理论依据, 也为肿瘤的靶向治疗提供了一个潜在的靶点.

■相关报道

目前关于MPS-1的研究主要集中于头颈部肿瘤、乳腺癌和胃癌等,尤其在胃癌中MPS-1下调能够通过抑制NF- κ B的活性进而影响NF- κ B下游靶基因的表达而促进胃癌细胞的凋亡,进而影响胃癌的发生和发展。

别为10.2 ng/mL和12.8 ng/mL,患病组MPS-H水平明显高于对照组($P<0.001$)。对于已经成功治愈的患者,其第1年MPS-H水平明显低于临床确诊且未经治疗的患者。此外,很多的临床病例都证实成功治愈后HNSCC患者的MPS-H水平明显降低,而对治疗无反应的患者血清内的MPS-H水平呈持续性升高。

正离子发射成像技术(fluorodeoxyglucose positron emission tomography, FDG-PET)的出现使得HNSCC的诊断和检测有了革命性的变化。有报道称FDG-PET检测肿瘤的敏感性已达90%,是检测肿瘤复发和转移的最准确的方法之一^[39-41]。Scurry等^[42]分别运用FDG-PET和RIA监测MPS-H的方法对HNSCC患者进行对比检查,发现所检查的183例HNSCC患者中有103例2者的检查结果相符,有12例MPS-H水平升高但是FDG-PET检查并没有发现肿瘤,提示可能处于肿瘤早期的患者血液中MPS-H有变化但不能被影像检查出来,另外48例患者的FDG-PET检查阳性而MPS-H并不升高,提示可能是由于放疗对肿瘤细胞的影响使其不能产生MPS-H,也可能是PET的假阳性结果造成。通过以上结果可以看出RIA方法检测MPS-H和FDG-PET之间有很好的符合度和精确性,并且与PET相比MPS-H检测具有费用低、方便和快捷的优势。所以,MPS-H检测有可能成为除FDG-PET之外的又一辅助诊断和检测手段。该检测方法能否成为临床上的常用筛查手段还需要大规模的临床实验的进一步验证,但其改进后的检测方法作为辅助的检测手段值得推荐。

3.2 SELDI-TOF-MS检测MPS-1水平 SELDI-TOF-MS是新近兴起的蛋白质组学技术,利用该技术可以准确的鉴定出患者血清样本中相关蛋白的表达图谱^[43-45]。通过运用该技术对HNSCC患者的血清进行检测,质谱检测发现血清中有一10.68 kDa的峰值。进一步用抗MPS-1 IgG做IMAC3蛋白芯片(SELDI免疫方法)^[46,47]检测,得到的同样的蛋白峰值而阴性对照则没有,这些数据显示10.68 kDa这条蛋白质谱即为MPS-1蛋白^[42]。

SELDI-TOF-MS是从传统的肿瘤检测手段向现代检测技术转变的一个范例^[45,48]。该技术能够以半定量方式对肿瘤标志物进行检测,更为有意义的是他利用蛋白的结构而不是个体蛋白的改变来区分HNSCC患者和正常人群。由于具有非常高的特异性和敏感性,而且其收集的数据易于整理和分析,因此具有很好的临床应用前景。

4 MPS-1在胃癌中的研究

Wang等^[18]通过构建2个胃癌cDNA表达文库,然后使用SEREX方法对文库进行筛选,共得到阳性克隆18个,经测序得到18个cDNA片断序列的信息,经筛查这些片段序列共代表14个基因,其中13个为已知基因1个为未知基因,包括MPS-1、PHF10、ENO1、RHOA、SMARCA4等,并选取了MPS-1做进一步的研究。通过RT-PCR、Western blot和免疫组织化学检测发现MPS-1在胃癌组织和6株胃癌细胞中高表达。然后,对90例胃癌患者胃癌组织的mRNA表达水平与临床病理特征进行了统计分析,发现mRNA表达水平与肿瘤患者的性别、年龄、肿瘤大小、分化程度无关,但与肿瘤临床分期具有相关性($P<0.05$),TNM分期为III、IV期患者标本中MPS-1的表达明显高于I、II期的表达。为了进一步研究MPS-1在胃癌的形成和进展中所起的作用,通过运用siRNA干扰技术将胃癌细胞SGC-7901细胞中的MPS-1特异性下调,胃癌细胞的增殖和克隆形成能力都受到明显的抑制。通过流式细胞仪、荧光显微镜观察发现MPS-1下调的胃癌细胞自发性凋亡明显增加。荧光显微镜下,10%-15%的细胞出现了典型的凋亡形态,主要表现为细胞核染色质的浓缩和核破裂。Western blot显示,细胞饥饿刺激后MPS-1下调的胃癌细胞中的Caspase3蛋白活化。裸鼠体内成瘤实验观察30 d发现MPS-1下调组胃癌细胞成瘤的体积明显减小,通过TUNEL检测移植瘤切片发现其中胃癌细胞的凋亡也明显增加。继而用凋亡诱导剂Etoposide处理MPS-1下调的胃癌细胞发现相对于对照组,MPS-1下调组胃癌细胞对凋亡诱导剂的敏感性明显升高,基因表达谱分析提示MPS-1下调后凋亡相关基因发生了差异性表达,且生物信息学分析发现NF- κ B及其下游的靶基因Gadd45 β 在MPS-1下调引起的胃癌细胞凋亡中起了重要的作用^[49-51]。MPS-1下调抑制了NF- κ B的活性并对Gadd45 β 起到负调控的作用,从而激活该通路下游JNK的磷酸化进而促进胃癌细胞的凋亡^[24]。

综上所述,MPS-1下调能够通过抑制NF- κ B的活性进而促进胃癌细胞的凋亡并能在体内和体外抑制胃癌细胞的增殖和生长。

5 MPS-1在结肠癌中的研究

Ganger等^[52]报道了一例17岁的男性患者,因腹痛入院治疗,肠镜检查结果为升结肠结肠高分化

腺癌。遂行右半结肠切除术, 术中发现由2枚淋巴结阳性。术后化疗和放疗6 mo后复查发现肝脏出现多发性转移灶。随后行肝动脉栓塞治疗后, 肝脏转移灶大小未见变化但是肿瘤癌胚抗原(carcino-embryonic antigen, CEA)明显降低, 结肠镜检查显示在吻合口旁未发现明显病灶, 取吻合口旁组织活检, 免疫组织化学染色显示腺体局部异型性和腺窝变形, 未见明显复发肿瘤, 但活检组织中MPS-1的表达较正常结肠黏膜组织明显增加。该患者随后又进行了腹腔镜探查术, 发现有腹膜转移, 并于疾病诊断18 mo后去世。因此, 我们推测该例结肠癌患者病情进展快速的原因与MPS-1的高表达有直接的关系。同样, 在结肠癌的其中MPS-1家族的其他成员也发挥了非常重要的作用, Wong等^[53]发现核糖体蛋白RPS27a在结直肠癌中高表达并可作为一个早期反应基因。因此, MPS-1的表达与结肠癌的发展及恶性程度密切相关。

6 结论

作为一种在胃癌中新发现的肿瘤相关基因, 结合其与其他肿瘤如乳腺癌、HNSCC等的形成中可能起到的重要作用和其作为肿瘤标志物的特性, MPS-1可能成为肿瘤治疗的一个新的靶点。但是目前尚不清楚MPS-1通过哪些途径在肿瘤的发生发展中发挥作用, 其作用机制需要进一步的研究。

7 参考文献

- Boyse EA, Old LJ, Stockert E, Shigeno N. Genetic origin of tumor antigens. *Cancer Res* 1968; 28: 1280-1287
- Disis ML, Cheever MA. Oncogenic proteins as tumor antigens. *Curr Opin Immunol* 1996; 8: 637-642
- Inoda S, Hirohashi Y, Torigoe T, Nakatsugawa M, Kiriya K, Nakazawa E, Harada K, Takasu H, Tamura Y, Kamiguchi K, Asanuma H, Tsuruma T, Terui T, Ishitani K, Ohmura T, Wang Q, Greene MI, Hasegawa T, Hirata K, Sato N. Cep55/c10orf3, a tumor antigen derived from a centrosome residing protein in breast carcinoma. *J Immunother* 2009; 32: 474-485
- van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, De Plaen E, Van den Eynde B, Knuth A, Boon T. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 1991; 254: 1643-1647
- Marchand M, Weynants P, Rankin E, Arienti F, Belli F, Parmiani G, Cascinelli N, Boulond A, Vanwijck R, Humblet Y. Tumor regression responses in melanoma patients treated with a peptide encoded by gene MAGE-3. *Int J Cancer* 1995; 63: 883-885
- Salgaller ML, Marincola FM, Cormier JN, Rosenberg SA. Immunization against epitopes in the human melanoma antigen gp100 following patient immunization with synthetic peptides. *Cancer Res* 1996; 56: 4749-4757
- Jäger E, Ringhoffer M, Dienes HP, Arand M, Karbach J, Jäger D, Ilsemann C, Hagedorn M, Oesch F, Knuth A. Granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor enhances immune responses to melanoma-associated peptides in vivo. *Int J Cancer* 1996; 67: 54-62
- Takayama R, Nakagawa H, Sawaki A, Mizuno N, Kawai H, Tajika M, Yatabe Y, Matsuo K, Uehara R, Ono K, Nakamura Y, Yamao K. Serum tumor antigen REG4 as a diagnostic biomarker in pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Gastroenterol* 2010; 45: 52-59
- Mandelboim O, Berke G, Fridkin M, Feldman M, Eisenstein M, Eisenbach L. CTL induction by a tumour-associated antigen octapeptide derived from a murine lung carcinoma. *Nature* 1994; 369: 67-71
- Nagata Y, Hanagiri T, Takenoyama M, Fukuyama T, Mizukami M, So T, Ichiki Y, Sugaya M, Sugio K, Yasumoto K. Identification of the HLA-Cw*0702-restricted tumor-associated antigen recognized by a CTL clone from a lung cancer patient. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 5265-5272
- Sahin U, Türeci O, Schmitt H, Cochlovius B, Johannes T, Schmits R, Stenner F, Luo G, Schobert I, Pfreundschuh M. Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 11810-11813
- Ishida T, Obata Y, Ohara N, Matsushita H, Sato S, Uenaka A, Saika T, Miyamura T, Chayama K, Nakamura Y, Wada H, Yamashita T, Morishima T, Old LJ, Nakayama E. Identification of the HERV-K gag antigen in prostate cancer by SEREX using autologous patient serum and its immunogenicity. *Cancer Immun* 2008; 8: 15
- Ono T, Sato S, Kimura N, Tanaka M, Shibuya A, Old LJ, Nakayama E. Serological analysis of BALB/C methylcholanthrene sarcoma Meth A by SEREX: identification of a cancer/testis antigen. *Int J Cancer* 2000; 88: 845-851
- Obata Y, T Akahashi T H, Tominaga S, Murai H, Iwase T, Iwata H, Mizutani M, Chen YT, Old LJ, Miura S. Identification of Cancer Antigens in Breast Cancer by the SEREX Expression Cloning Method. *Breast Cancer* 1999; 6: 305-311
- Okada H, Attanucci J, Giezeman-Smits KM, Bissette-Storkus C, Fellows WK, Gambotto A, Pollack LF, Pogue-Geile K, Lotze MT, Bozik ME, Chambers WH. Immunization with an antigen identified by cytokine tumor vaccine-assisted SEREX (CAS) suppressed growth of the rat 9L glioma in vivo. *Cancer Res* 2001; 61: 2625-2631
- Shimada H, Shiratori T, Yasuraoka M, Kagaya A, Kuboshima M, Nomura F, Takiguchi M, Ochiai T, Matsubara H, Hiwasa T. Identification of Makorin 1 as a novel SEREX antigen of esophageal squamous cell carcinoma. *BMC Cancer* 2009; 9: 232
- 刘宇虎, 张振书, 钟东, 武金宝, 但汉雷, 赖卓胜, 王亚东, 张亚历, 肖冰. 人源性大肠癌抗原基因的serex筛选. *世界华人消化杂志* 2003; 11: 1378-1381
- Wang Y, Gu Q, Liu B, Zhu Z. Perspectives of SEREX-defined antigens in diagnosis and immunotherapy for gastric cancer. *Cancer Biol Ther* 2004; 3: 806-811
- Atsuta Y, Aoki N, Sato K, Oikawa K, Nochi H, Miyokawa N, Hirata S, Kimura S, Sasajima T, Katagiri

■创新盘点

本文对核糖体蛋白家族成员MPS-1与头颈部肿瘤、乳腺癌、前列腺癌、胃癌和结肠癌等肿瘤的相关性作了详细阐述。

■应用要点

本文较为系统的总结了MPS-1在不同肿瘤中的相关研究,为研究肿瘤的发生机制提供了理论支持,并为肿瘤的生物学的治疗提供了一个新的靶点。

- M. Identification of metallopanstimulin-1 as a member of a tumor associated antigen in patients with breast cancer. *Cancer Lett* 2002; 182: 101-107
- 20 Fernandez-Pol JA, Klos DJ, Hamilton PD. A growth factor-inducible gene encodes a novel nuclear protein with zinc finger structure. *J Biol Chem* 1993; 268: 21198-21204
- 21 Stack BC, Hollenbeak CS, Lee CM, Dunphy FR, Lowe VJ, Hamilton PD. Metallopanstimulin as a marker for head and neck cancer. *World J Surg Oncol* 2004; 2: 45
- 22 Fernandez-Pol JA. Metallopanstimulin as a novel tumor marker in sera of patients with various types of common cancers: implications for prevention and therapy. *Anticancer Res* 1996; 16: 2177-2185
- 23 Wang YW, Qu Y, Li JF, Chen XH, Liu BY, Gu QL, Zhu ZG. In vitro and in vivo evidence of metallopanstimulin-1 in gastric cancer progression and tumorigenicity. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 4965-4973
- 24 Yang ZY, Qu Y, Zhang Q, Wei M, Liu CX, Chen XH, Yan M, Zhu ZG, Liu BY, Chen GQ, Wu YL, Gu QL. Knockdown of metallopanstimulin-1 inhibits NF- κ B signaling at different levels: the role of apoptosis induction of gastric cancer cells. *Int J Cancer* 2012; 130: 2761-2770
- 25 Fernandez-Pol JA, Klos DJ, Hamilton PD. Metallopanstimulin gene product produced in a baculovirus expression system is a nuclear phosphoprotein that binds to DNA. *Cell Growth Differ* 1994; 5: 811-825
- 26 Ganger DR, Hamilton PD, Klos DJ, Jakate S, McChesney L, Fernandez-Pol JA. Differential expression of metallopanstimulin/S27 ribosomal protein in hepatic regeneration and neoplasia. *Cancer Detect Prev* 2001; 25: 231-236
- 27 Santa Cruz DJ, Hamilton PD, Klos DJ, Fernandez-Pol JA. Differential expression of metallopanstimulin/S27 ribosomal protein in melanocytic lesions of the skin. *J Cutan Pathol* 1997; 24: 533-542
- 28 Wilson DM, Deutsch WA, Kelley MR. Drosophila ribosomal protein S3 contains an activity that cleaves DNA at apurinic/apyrimidinic sites. *J Biol Chem* 1994; 269: 25359-25364
- 29 Khanna N, Sen S, Sharma H, Singh N. S29 ribosomal protein induces apoptosis in H520 cells and sensitizes them to chemotherapy. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 304: 26-35
- 30 Shi Y, Zhai H, Wang X, Han Z, Liu C, Lan M, Du J, Guo C, Zhang Y, Wu K, Fan D. Ribosomal proteins S13 and L23 promote multidrug resistance in gastric cancer cells by suppressing drug-induced apoptosis. *Exp Cell Res* 2004; 296: 337-346
- 31 He H, Sun Y. Ribosomal protein S27L is a direct p53 target that regulates apoptosis. *Oncogene* 2007; 26: 2707-2716
- 32 Xiong X, Zhao Y, He H, Sun Y. Ribosomal protein S27-like and S27 interplay with p53-MDM2 axis as a target, a substrate and a regulator. *Oncogene* 2011; 30: 1798-1811
- 33 Honda R, Yasuda H. Activity of MDM2, a ubiquitin ligase, toward p53 or itself is dependent on the RING finger domain of the ligase. *Oncogene* 2000; 19: 1473-1476
- 34 Fang S, Jensen JP, Ludwig RL, Vousden KH, Weissman AM. Mdm2 is a RING finger-dependent ubiquitin protein ligase for itself and p53. *J Biol Chem* 2000; 275: 8945-8951
- 35 Honda R, Tanaka H, Yasuda H. Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Lett* 1997; 420: 25-27
- 36 Stack BC, Dalsaso TA, Lee C, Lowe VJ, Hamilton PD, Fletcher JW, Fernandez-Pol JA. Overexpression of MPS antigens by squamous cell carcinomas of the head and neck: immunohistochemical and serological correlation with FDG positron emission tomography. *Anticancer Res* 1999; 19: 5503-5510
- 37 Wadsworth JT, Somers KD, Stack BC, Cazares L, Malik G, Adam BL, Wright GL, Semmes OJ. Identification of patients with head and neck cancer using serum protein profiles. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2004; 130: 98-104
- 38 Lee WJ, Keefer K, Hollenbeak CS, Stack BC. A new assay to screen for head and neck squamous cell carcinoma using the tumor marker metallopanstimulin. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2004; 131: 466-471
- 39 Daouk J, Leloire M, Fin L, Bailly P, Morvan J, El Esper I, Saidi L, Moullart V, François G, Jounieaux V, Meyer ME. Respiratory-gated 18F-FDG PET imaging in lung cancer: effects on sensitivity and specificity. *Acta Radiol* 2011; 52: 651-657
- 40 Khandani AH, Whitney KD, Keller SM, Isasi CR, Donald Blaufox M. Sensitivity of FDG PET, GLUT1 expression and proliferative index in bronchioalveolar lung cancer. *Nucl Med Commun* 2007; 28: 173-177
- 41 Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 1977; 33: 159-174
- 42 Scurry WC, Stack BC. Role of metalloproteins in the clinical management of head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck* 2007; 29: 1144-1155
- 43 Wadsworth JT, Somers KD, Cazares LH, Malik G, Adam BL, Stack BC, Wright GL, Semmes OJ. Serum protein profiles to identify head and neck cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 1625-1632
- 44 Issaq HJ, Veenstra TD, Conrads TP, Felschow D. The SELDI-TOF MS approach to proteomics: protein profiling and biomarker identification. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 292: 587-592
- 45 Hu Y, Zhang S, Yu J, Liu J, Zheng S. SELDI-TOF-MS: the proteomics and bioinformatics approaches in the diagnosis of breast cancer. *Breast* 2005; 14: 250-255
- 46 Wang Q, Shen J, Li ZF, Jie JZ, Wang WY, Wang J, Zhang ZT, Li ZX, Yan L, Gu J. Limitations in SELDI-TOF MS whole serum proteomic profiling with IMAC surface to specifically detect colorectal cancer. *BMC Cancer* 2009; 9: 287
- 47 McLerran D, Grizzle WE, Feng Z, Thompson IM, Bigbee WL, Cazares LH, Chan DW, Dahlgren J, Diaz J, Kagan J, Lin DW, Malik G, Oelschlager D, Partin A, Randolph TW, Sokoll L, Srivastava S, Srivastava S, Thornquist M, Troyer D, Wright GL, Zhang Z, Zhu L, Semmes OJ. SELDI-TOF MS whole serum proteomic profiling with IMAC surface does not reliably detect prostate cancer. *Clin Chem* 2008; 54: 53-60
- 48 Gast MC, Bonfrer JM, van Dulken EJ, de Kock L, Rutgers EJ, Schellens JH, Beijnen JH. SELDI-TOF MS serum protein profiles in breast cancer: assessment of robustness and validity. *Cancer Biomark* 2006; 2: 235-248
- 49 Zazzeroni F, Papa S, Algeciras-Schimmich A, Alvarez K, Melis T, Bubici C, Majewski N, Hay N, De Smaele E, Peter ME, Franzoso G. Gadd45 beta mediates the protective effects of CD40 costimula-

- tion against Fas-induced apoptosis. *Blood* 2003; 102: 3270-3279
- 50 Papa S, Zazzeroni F, Bubici C, Jayawardena S, Alvarez K, Matsuda S, Nguyen DU, Pham CG, Nelsbach AH, Melis T, De Smaele E, Tang WJ, D'Adamio L, Franzoso G. Gadd45 beta mediates the NF-kappa B suppression of JNK signalling by targeting MKK7/JNKK2. *Nat Cell Biol* 2004; 6: 146-153
- 51 Tornatore L, Marasco D, Dathan N, Vitale RM, Benedetti E, Papa S, Franzoso G, Ruvo M, Monti SM. Gadd45 beta forms a homodimeric complex that binds tightly to MKK7. *J Mol Biol* 2008; 378: 97-111
- 52 Ganger DR, Hamilton PD, Fletcher JW, Fernandez-Pol JA. Metallopanstimulin is overexpressed in a patient with colonic carcinoma. *Anticancer Res* 1997; 17: 1993-1999
- 53 Wong JM, Mafune K, Yow H, Rivers EN, Ravikumar TS, Steele GD, Chen LB. Ubiquitin-ribosomal protein S27a gene overexpressed in human colorectal carcinoma is an early growth response gene. *Cancer Res* 1993; 53: 1916-1920

■同行评价

本文立题较好, 引用文献较多, 对胃癌及其他肿瘤的研究有一定指导作用。

编辑 田滢 电编 闫晋利

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

•消息•

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

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

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

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

《世界华人消化杂志》从收稿到发行每一步都经过严格审查, 保证每篇文章高质量出版, 是消化病学专业人士发表学术论文首选的学术期刊之一。为保证作者研究成果及时公布, 《世界华人消化杂志》保证每篇文章四月内完成。(编辑部主任: 李军亮 2010-01-18)

瑞舒伐他汀钙对慢性梗阻性黄疸大鼠肝脏纤维化的影响

余水平, 周雪玲

■背景资料

氧化低密度脂蛋白(Ox-LDL)通常被认为是致动脉粥样硬化的关键作用物, 近年来研究发现Ox-LDL在梗阻性黄疸和肝脏的纤维化中发挥重要的作用。

余水平, 周雪玲, 桂林医学院附属医院肝胆外科 广西壮族自治区桂林市 541000

余水平, 主治医师, 主要从事肝胆外科疾病的综合研究。

作者贡献分布: 此实验由设计、写作由余水平完成; 数据统计与分析由周雪玲完成。

通讯作者: 余水平, 主治医师, 541000, 广西壮族自治区桂林市秀峰区乐群路15号, 桂林医学院附属医院肝胆外科。

478517575@qq.com

电话: 0773-2824373

收稿日期: 2012-08-26 修回日期: 2012-09-20

接受日期: 2012-11-07 在线出版日期: 2012-12-18

Treatment with rosuvastatin calcium improves liver fibrosis in a rat model of chronic obstructive jaundice

Shui-Ping Yu, Xue-Ling Zhou

Shui-Ping Yu, Xue-Ling Zhou, Department of General Surgery, the Affiliated Hospital of Guilin Medical College, Guilin 541000, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China
Correspondence to: Shui-Ping Yu, Attending Physician, Department of General Surgery, the Affiliated Hospital of Guilin Medical College, 15 Lequn Road, Guilin 541000, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. 478517575@qq.com

Received: 2012-08-26 Revised: 2012-09-20

Accepted: 2012-11-07 Published online: 2012-12-18

Abstract

AIM: To investigate the effect of treatment with rosuvastatin calcium on expression of Ox-LDL and liver fibrosis in a rat model of chronic obstructive jaundice.

METHODS: Ninety Sprague-Dawley rats were randomly and equally divided into three groups: control group, and chronic obstructive jaundice group, and rosuvastatin calcium group. Each group was further divided into five subgroups for testing at different time points. Liver function was determined. Expression of Ox-LDL was tested by immunofluorescence, and liver fibrosis was assessed by radioimmunoassay. Pathological changes in liver tissue were observed by optical microscopy at weeks 1, 2, 3, 4, and 5 after model induction. Choledochoduodenostomy was performed at week 4.

RESULTS: Rats with chronic obstructive jaun-

dice showed remarkable jaundice and obvious degeneration and hyperplasia of liver cells. There were also significant changes in expression of Ox-LDL and three liver fibrosis indicators. Jaundice slowly subsided after choledochoduodenostomy. Total bilirubin, expression of Ox-LDL and three liver fibrosis indicators differed significantly at different time points between the chronic obstructive jaundice group and rosuvastatin calcium group (all $P < 0.05$).

CONCLUSION: There was a significant relation between expression of Ox-LDL and liver fibrosis in rats with chronic obstructive jaundice. Treatment with rosuvastatin calcium could regulate the expression of Ox-LDL and improve liver fibrosis in rats with chronic obstructive jaundice.

Key Words: Obstructive jaundice; Ox-LDL; Rosuvastatin calcium; Liver fibrosis

Yu SP, Zhou XL. Treatment with rosuvastatin calcium improves liver fibrosis in a rat model of chronic obstructive jaundice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(35): 3564-3569

摘要

目的: 探讨慢性梗阻性黄疸大鼠中瑞舒伐他汀钙对氧化低密度脂蛋白(Ox-LDL)表达的调节及肝脏纤维化影响。

方法: 90只SD大鼠随机分成对照组(A组)、慢性梗阻性黄疸组(B组)和慢性梗阻性黄疸+瑞舒伐他汀钙组(C组), 每组每时段6只。分别于造模后第1、2、3、4和5周抽取大鼠静脉血检查肝功能, 免疫荧光法检测Ox-LDL在肝脏的表达, 放射免疫法检测肝纤维3项, 光学显微镜观察肝组织的病理改变。第4周行胆总管十二指肠吻合再通。

结果: B组大鼠术后总胆红素明显升高, 组织病理学检查显示肝细胞变性, 并有纤维增生性改变。与A组比较, 慢性梗阻性黄疸组肝组织Ox-LDL的表达增强, 肝纤维3项术后第3周起明显升高。C组大鼠术后胆红素升高, 组织病理学检查显示肝脏有纤维增生改变。与B组比

■同行评议者

党双锁, 教授, 西安交通大学医学院第二附属医院感染科

较, 肝脏Ox-LDL的表达与肝纤维3项减弱. 术后Ox-LDL的表达及肝纤维化3项差异有统计学意义($P<0.05$).

结论: 慢性梗阻性黄疸大鼠中瑞舒伐他汀钙能调节Ox-LDL的表达, 延缓肝纤维化的发生.

关键词: 梗阻性黄疸; 氧化低密度脂蛋白; 瑞舒伐他汀钙; 肝纤维化

余水平, 周雪玲. 瑞舒伐他汀钙对慢性梗阻性黄疸大鼠肝脏纤维化的影响. 世界华人消化杂志 2012; 20(35): 3564-3569
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3564.asp>

0 引言

慢性梗阻性黄疸是普外科常见的临床症状群, 可引起诸多组织、器官的损害, 其中最主要的是肝脏损伤, 随着胆梗阻时间的延长可由肝细胞坏死发展到纤维组织增生甚至胆性肝硬化, 严重危害机体健康甚至危及生命. 氧化低密度脂蛋白(Ox-LDL)通常被认为是致动脉粥样硬化的关键作用物, 近年来研究发现肝脏的内皮细胞中存在Ox-LDL特定的受体, 在梗阻性黄疸和肝脏的纤维化中发挥重要的作用^[1,2]. 瑞舒伐他汀钙是一种选择性HMG-CoA还原酶抑制剂, 可以通过抑制循环血中单核巨噬细胞对血管内皮的黏附聚集, 抑制单核巨噬细胞对LDL的氧化修饰, 减少泡沫细胞的形成. Fellström等^[3]的研究发现瑞舒伐他汀钙可以降低终末期肾病的血液透析患者血浆中Ox-LDL的水平. 本研究在建立慢性梗阻性黄疸大鼠模型的基础上, 探讨瑞舒伐他汀钙对梗阻性黄疸大鼠中Ox-LDL表达的调节, 从而改善肝脏纤维化的发生, 为临床治疗梗阻性黄疸并发肝纤维化提供一种新的途径.

1 材料和方法

1.1 材料 ♀SD大鼠90只, 体质量 $180\text{ g}\pm 20\text{ g}$, 随机被分成对照组(A组)、慢性梗阻性黄疸组(B组)和慢性梗阻性黄疸+瑞舒伐他汀钙组(C组), 每组每时段6只, 平均分5个时段, 每时段6只. 大鼠均由中山大学北校区实验动物中心提供.

1.2 方法

1.2.1 慢性大鼠梗阻性黄疸模型的建立: 6-0 VICRYL可吸收线经碘仿纱布术前处理备用, 实验大鼠术前12 h禁食、禁水. 乙醚吸入麻醉. 剑突下正中切口进腹, SXP-1C显微镜下显露胆总管, 距十二指肠上缘1 cm处纵行缝过胆总管, 将碘仿纱

布处理的6-0 VICRYL可吸收线贯通置于胆总管内, 长度0.5 cm, 固定. 随后关腹, 结束手术.

1.2.2 胆总管十二指肠端侧吻合: 模型建立后第4周. 术前12 h禁食、禁水. 乙醚吸入麻醉. 剑突下正中切口进腹, 显露胆总管及十二指肠降部, SXP-1C显微镜下用8-0 PROLENE线将胆总管与十二指肠降部端侧吻合. 随后关腹结束手术. 对照组仅行开、关腹手术.

1.2.3 大鼠药物灌胃: 瑞舒伐他汀钙+慢性梗阻性黄疸组大鼠予以瑞舒伐他汀钙0.5 mg+NS 1 mL, 灌胃, 2次/d. 慢性梗阻性黄疸组及对照组大鼠予以NS 1 mL灌胃, 2次/d.

1.2.4 标本采集: 分别于造模后第1、2、3、4和5周乙醚麻醉下处理各组大鼠, 心脏采血行肝功能及肝纤3项检查. 肝脏冰冻组织切片行Ox-LDL检测. 取出部分肝脏左叶组织行光镜检查.

1.2.5 免疫荧光检测肝组织氧化低密度脂蛋白: Ox-LDL抗体购自广州英韦创津试剂公司. 冰冻切片冷丙酮固定10 min, 滴加0.01 mol/L, pH 7.4的PBS于未知抗原标本片, 10 min后弃去, 使标本片保持一定湿度. 用含0.05%血清的PBS封闭60 min. 滴加以0.01 mol/L, pH 7.4的PBS 1:100稀释的一抗, 覆盖未知抗原标本片. 将玻片置于有盖搪瓷盒内, 4℃过夜. 取出玻片, 置于玻片架上, 先用0.01 mol/L, pH 7.4的PBS冲洗1-2次, 然后按顺序过0.01 mol/L, pH 7.4的PBS 3缸浸泡, 每缸5 min, 不时振荡. 取出玻片, 用滤纸吸去多余水分, 但不使标本干燥, 滴加一滴一定稀释度的荧光标记二抗. 将玻片平放在有盖搪瓷盒内, 37℃保温30 min. 0.01 mol/L, pH 7.4的PBS冲洗1-2次, 然后按顺序过0.01 mol/L, pH 7.4的PBS 3缸浸泡, 每缸5 min, 不时振荡. 用滤纸吸去多余水分, 滴加一滴DAPI, 再覆以盖玻片. 荧光显微镜高倍视野下观察, 结果判定同直接法.

1.2.6 结果判定: 通过荧光显微镜下观察肝组织的荧光阳性比率与强度进行评分. (1)阳性细胞比率评分为: 阳性细胞数占总细胞数<10%为0分; 阳性细胞数占总细胞数11%-25%为1分; 阳性细胞数占总细胞数26%-50%为2分; 阳性细胞数占总细胞数51%-75%为3分; 阳性细胞数占总细胞数>75%为4分; (2)强度评分为: (-)为0分; (±)高倍镜下隐约可见为1分; +低倍镜下隐约可见为2分; (++)为高倍镜下清晰可见为3分; (+++)为低倍镜下清晰可见为4分; (++++为低倍镜耀眼, 高倍镜下刺眼为5分; (3)总评分 = 阳性细胞比率评分+强度评分.

■ 相关报道

Fellstrom等研究发现瑞舒伐他汀钙可以降低终末期肾病的血液透析患者血浆中Ox-LDL的水平.

■创新盘点

本研究发现瑞舒伐他汀钙能下调Ox-LDL在肝脏的表达, 和肝脏的纤维化也存在一定的联系。

表 1 各组大鼠各时段血清肝功能检测结果比较 (mean \pm SD, $n = 6$, $\mu\text{mol/L}$)

分组	谷氨酸转氨酶	直接胆红素	总胆红素
第1周			
A组	28.17 \pm 4.02 ^a	9.54 \pm 2.39 ^b	13.74 \pm 1.78 ^b
B组	72.67 \pm 43.67	33.93 \pm 17.36	42.43 \pm 23.56
C组	65.52 \pm 34.26	30.25 \pm 16.38	38.54 \pm 25.25
第2周			
A组	30.17 \pm 3.98	12.65 \pm 2.69	14.72 \pm 2.07
B组	28.33 \pm 9.58	19.29 \pm 9.41	24.87 \pm 6.78
C组	25.52 \pm 4.25	15.25 \pm 6.30	28.54 \pm 5.28
第3周			
A组	31.67 \pm 3.93 ^a	15.30 \pm 3.24 ^a	19.09 \pm 2.24 ^a
B组	90.67 \pm 43.14	34.38 \pm 38.99	48.53 \pm 37.78
C组	82.39 \pm 33.76	24.36 \pm 18.66	42.25 \pm 38.42
第4周			
A组	28.34 \pm 6.05 ^a	10.56 \pm 2.88 ^a	15.74 \pm 3.76 ^a
B组	65.62 \pm 42.68	32.91 \pm 17.56	36.52 \pm 16.28
C组	58.62 \pm 36.36	28.63 \pm 19.53	32.25 \pm 17.14
第5周			
A组	30.62 \pm 3.65 ^a	16.50 \pm 4.25 ^a	19.65 \pm 3.25 ^a
B组	60.63 \pm 41.25	24.42 \pm 18.15	32.15 \pm 13.20
C组	45.26 \pm 27.53	18.16 \pm 16.24	30.27 \pm 11.25

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs B组.

统计学处理 数据采用SPSS13.0统计软件处理. 实验数据以mean \pm SD表示. 均数用方差分析中的多个样本均数的两两检验. $P < 0.05$ 被视为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 肉眼观察改变 慢性梗阻性黄疸大鼠术后精神萎靡, 活动及纳食减少, 术后第3天出现尿液及尾巴黄染, 1 wk后尿液黄染消失, 至第2周尿液再次出现黄染, 呈波动性, 且黄染逐渐加深. 标本采集时发现肝脏黄染肿胀, 部分质地变硬. 第4周胆总管十二指肠吻合再通后尿液黄染逐渐消失. 慢性梗阻性黄疸+瑞舒伐他汀钙组大鼠术后黄疸呈现波动性, 黄疸缓慢加重.

2.2 肝功能检查 慢性梗阻性黄疸大鼠与慢性梗阻性黄疸+瑞舒伐他汀钙组大鼠谷氨酸转氨酶 (glutamate transaminase, AST)、总胆红素 (total bilirubin, TB)、直接胆红素 (direct bilirubin, DB) 呈波动性增高. 与对照组比较, 慢性梗阻性黄疸大鼠除第2周组外, 其余各组AST、TB、DB明显升高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$). 与慢性梗阻性黄疸+瑞舒伐他汀钙组大鼠比较, AST、TB、DB升高不明显, 术后差异无统计学意义 ($P < 0.05$). 肝功能检查结果见表1.

2.3 肝脏氧化低密度脂蛋白表达 慢性梗阻性黄疸大鼠肝细胞胞膜及胞浆中可见Ox-LDL的荧光颗粒表达, 随着梗阻时间的延长, 表达强度呈现波动性增强. 慢性梗阻性黄疸+瑞舒伐他汀钙组可见Ox-LDL在肝细胞膜及胞浆中的荧光表达. 对照组中未见明显的Ox-LDL荧光颗粒表达. 肝脏Ox-LDL免疫荧光表达见图1, 表2.

2.4 血清肝纤3项检测结果 放射免疫法检测大鼠血清透明质酸 (hyaluronic acid, HA)、层黏蛋白 (laminin, LN) 和III型前胶原 (procollagen III, PC III). 慢性梗阻性黄疸大鼠术后第3周明显升高, 与对照组相比差异均有统计学意义 ($P < 0.05$). 慢性梗阻性黄疸+瑞舒伐他汀钙组大鼠术后第3周升高, 与慢性梗阻性黄疸组大鼠相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$). 血清肝纤维化3项的检测检测结果见表3.

2.5 肝组织的光镜检查 慢性梗阻性黄疸大鼠术后1 wk肝细胞出现水样变性, 随后可见恢复, 第3周后肝细胞可见点状坏死, 肝小叶中央出现淤胆, 小胆管增生明显, 汇管区纤维化明显, 肝组织部分出现纤维增生. 第5周胆总管再通后仍见肝组织部分纤维化. 慢性梗阻性黄疸+瑞舒伐他汀钙组大鼠术后第3周可见肝细胞点状坏死, 小胆管增生, 淤胆, 肝组织部分出现纤维组织增生.

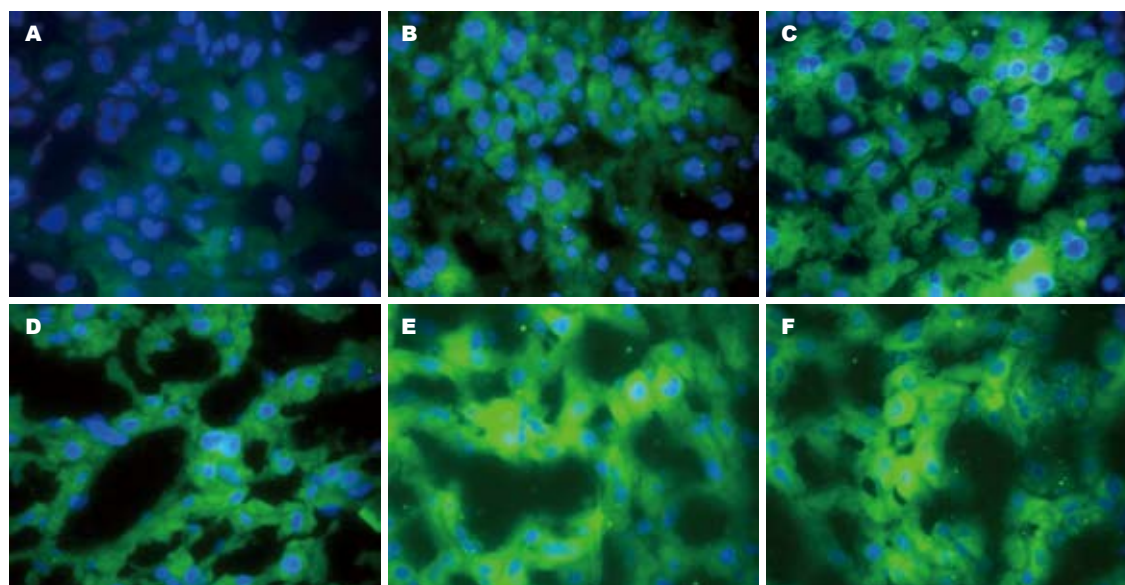


图 1 肝脏氧化低密度脂蛋白的表达(免疫荧光, $\times 400$). A: (-); B: (\pm); C: (+); D: (++) E: (+++); F: (++++).

同行评价

本实验设计合理, 紧密结合临床, 方法正确, 结果分析恰当, 对临床使用瑞舒伐他汀钙治疗慢性梗阻性黄疸大鼠肝脏纤维化提供了一定的实验依据。

表 2 各组大鼠氧化低密度脂蛋白检测结果比较

分组	第1周	第2周	第3周	第4周	第5周
A组	1.17 ± 0.75	1.17 ± 0.41	1.17 ± 0.75^b	1.17 ± 0.41^b	0.83 ± 0.89^b
B组	1.00 ± 0.63	1.33 ± 0.52	3.33 ± 1.03	4.00 ± 0.60	5.33 ± 1.03
C组	0.83 ± 0.41	1.17 ± 0.75	2.00 ± 0.63^a	2.33 ± 1.21^a	2.67 ± 0.81^b

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs B组.

3 讨论

瑞舒伐他汀钙作为一种强效的新型他汀类药物, 属于3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶A(HMG-CoA)还原酶抑制剂, 是目前常规治疗剂量下降低LDL作用最强的他汀类降脂药, 具有丰富的降脂外抗动脉粥样硬化作用^[4,5]. Tan等^[6]研究发现在冠心病合并糖尿病患者中使用瑞舒伐他汀钙可降低炎症因子 γ -干扰素(γ -interferon, IFN- γ)、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)及C反应蛋白(C-Reactive protein, CRP). 穆伟^[7]用瑞舒伐他汀10 mg/d治疗不稳定型心绞痛患者4 wk后, 瑞舒伐他汀钙组高敏C反应蛋白(high-sensitivity C-reactive proteins, CRP)浓度较治疗前有明显下降($P < 0.05$)均表明瑞舒伐他汀钙在冠心病的防治中占有重要地位, 他不仅强效降脂、还具有逆转斑块、抗炎、抗氧化、免疫调节. 近年来研究还发现他汀类药物可以降低终末期肾病的血液透析患者血浆中Ox-LDL的水平, 虽然在大样本的临床试验中还未发现可以明显改善预后^[8]. Resch等^[9]在研究瑞舒伐他汀钙抗氧化及对Ox-LDL自身

抗体调节的研究中发现, 治疗24 wk, 血浆内源性的过氧化物浓度及过氧化物酶活性明显下降, 血浆中Ox-LDL复合物浓度显著下降, 证实瑞舒伐他汀钙对Ox-LDL有明显的调节作用. 在我们的实验中也发现造模后3 wk, 在慢性梗阻性黄疸+瑞舒伐他汀钙组中Ox-LDL在肝脏中的表达比慢性梗阻性黄疸组的表达减弱(3.33 ± 1.03 vs 1.17 ± 0.75), 差异有统计学意义($P < 0.05$). 随着梗阻时间的延长, 差异越来越明显($P < 0.01$), 表明在大鼠慢性梗阻性黄疸模型中瑞舒伐他汀钙能减低Ox-LDL在肝脏中的表达.

Ox-LDL是LDL在过量自由基及其他致氧因素作用下发生脂质过氧化, 产生丙二醛(malondialdehyde, MDA), MDA与LDL载脂蛋白B(ApoB)中的赖氨酸残基结合发生化学修饰而形成. Ox-LDL近年来被认为是动脉粥样硬化发生发展的关键步骤^[10]. 现在研究发现他在多种疾病过程中都有异常, 肖华等^[11]研究发现Ox-LDL不仅能减少胶原的合成, 同时也能增加胶原的降解, 使细胞外基质发生紊乱, 从而可能参与心室的重构. Lee与Hong等^[12,13]研究发现Ox-LDL在系膜

表 3 各组大鼠各时段血清肝纤维化3项检测结果比较 (mean \pm SD, $n = 6$, ng/mL)

分组	血清透明质酸	层黏蛋白	Ⅲ型前胶原
第1周			
A组	46.50 \pm 24.26	63.05 \pm 36.25	29.40 \pm 12.36
B组	62.67 \pm 33.68	52.56 \pm 25.20	23.93 \pm 17.45
C组	52.67 \pm 35.66	42.36 \pm 28.15	22.39 \pm 15.58
第2周			
A组	38.65 \pm 13.24	51.86 \pm 31.35	12.56 \pm 12.20
B组	58.33 \pm 19.05	39.35 \pm 25.32	18.20 \pm 9.46
C组	48.36 \pm 15.28	32.65 \pm 21.28	16.15 \pm 8.50
第3周			
A组	35.60 \pm 23.36 ^b	59.35 \pm 21.65 ^a	25.32 \pm 13.26
B组	90.64 \pm 43.16	88.65 \pm 35.86	53.35 \pm 26.15
C组	70.18 \pm 33.24 ^a	68.36 \pm 31.52 ^a	43.35 \pm 18.64 ^a
第4周			
A组	48.06 \pm 15.25 ^b	31.65 \pm 13.42 ^a	30.63 \pm 22.47 ^a
B组	365.35 \pm 132.35	80.46 \pm 64.34	62.91 \pm 17.56
C组	258.25 \pm 128.66 ^b	65.24 \pm 36.35 ^a	45.17 \pm 21.36 ^a
第5周			
A组	50.62 \pm 23.45 ^b	58.65 \pm 32.46 ^b	56.25 \pm 14.20 ^b
B组	630.25 \pm 342.65	118.35 \pm 25.52	124.20 \pm 68.35
C组	435.26 \pm 245.54 ^b	78.45 \pm 35.68 ^a	94.33 \pm 48.62 ^a

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs B组.

细胞内可通过血管紧张素 II (angiotensins II, Ang II)、转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β)和Ras依赖的NADPH氧化酶增加胞内活性氧自由基的生成,从而激活细胞外信号调节激酶(extracellular signal regulated kinase, ERK)信号转导途径,导致Smad最大程度的活化和TGF- β 1靶基因表达,增加细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的生成和结缔组织生长因子的表达,如纤维连接蛋白, I、III和IV型胶原和纤维蛋白溶酶原激活物抑制剂-1(plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1)等来促进肾小球硬化及间质纤维化. Karadeniz等^[2]研究发现Ox-LDL在梗阻性黄疸大鼠中肝脏纤维化、甚至肝硬化中起着重要的作用.

我们前期的研究发现慢性大鼠梗阻性模型黄疸症状及肝功能变化表现呈现慢性、波动性发展的特征表现,更加接近于临床梗阻性黄疸病例表现^[4]. 梗阻性黄疸最主要的病理表现是肝脏的纤维化,近来研究发现Ox-LDL的表达与肝脏纤维化的发生并逐渐加重存在一定的联系^[1]. 我们的实验也发现,造模后3 wk Ox-LDL在肝脏的表达明显增强,差异有显著性意义($P < 0.01$),随着时间的延长及梗阻恢复再通,差异仍有显著性意义. 慢性梗阻性黄疸模型组肝纤维化3项与

对照组相比也均有统计学意义,表明慢性梗阻性黄疸模型自3 wk后, Ox-LDL的表达与肝脏纤维化的发生并逐渐加重存在一定的联系. 慢性梗阻性黄疸+瑞舒伐他汀钙组中Ox-LDL在肝脏的表达较慢性梗阻性黄疸组减弱,差异有统计学意义($P < 0.05$),肝纤维化3项相比也均有统计学意义($P < 0.05$).

肝纤维化是梗阻性黄疸的常见表现,也是肝硬化的必经阶段,其发病机制仍不清楚,尽早明确肝纤维化的发病机制能有效逆转肝纤维化的发展. 本研究发现瑞舒伐他汀钙能下调Ox-LDL在肝脏的表达和肝脏的纤维化也存在一定的联系,为临床能合理提供一个防治慢性梗阻性黄疸引发的肝脏纤维化途径.

4 参考文献

- 1 Cömert M, Tekin IO, Acikgöz S, Ustündağ Y, Uçan BH, Acun Z, Barut F, Sümbüloğlu V. Experimental bile-duct ligation resulted in accumulation of oxidized low-density lipoproteins in BALB/c mice liver. *J Gastroenterol Hepatol* 2004; 19: 1052-1057
- 2 Karadeniz G, Acikgoz S, Tekin IO, Tascılar O, Gun BD, Cömert M. Oxidized low-density-lipoprotein accumulation is associated with liver fibrosis in experimental cholestasis. *Clinics (Sao Paulo)* 2008; 63: 531-540
- 3 Fellström BC, Jardine AG, Schmieder RE, Holdaas H,

- Bannister K, Beutler J, Chae DW, Chevaile A, Cobbe SM, Grönhagen-Riska C, De Lima JJ, Lins R, Mayer G, McMahon AW, Parving HH, Remuzzi G, Samuelsson O, Sonkodi S, Sci D, Süleymanlar G, Tsakiris D, Tesar V, Todorov V, Wiecek A, Wüthrich RP, Gottlow M, Johnsson E, Zannad F. Rosuvastatin and cardiovascular events in patients undergoing hemodialysis. *N Engl J Med* 2009; 360: 1395-1407
- 4 Verreth W, De Keyzer D, Davey PC, Geeraert B, Mertens A, Herregods MC, Smith G, Desjardins F, Balligand JL, Holvoet P. Rosuvastatin restores superoxide dismutase expression and inhibits accumulation of oxidized LDL in the aortic arch of obese dyslipidemic mice. *Br J Pharmacol* 2007; 151: 347-355
- 5 Naito Y, Katada K, Takagi T, Tsuboi H, Isozaki Y, Handa O, Kokura S, Yoshida N, Ichikawa H, Yoshikawa T. Rosuvastatin, a new HMG-CoA reductase inhibitor, reduces the colonic inflammatory response in dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Int J Mol Med* 2006; 17: 997-1004
- 6 Tan LG, Berk LS, Tan SA. Combined effects of rosuvastatin and pioglitazone in attenuating interferon gamma, tumor necrosis factor alpha, interleukin-6, C-reactive protein, and increasing interleukin-4 may provide cardioprotection for patients with diabetes. *Chest* 2006; 130: 191S
- 7 穆伟. 瑞舒伐他汀对不稳定性心绞痛患者高敏C反应蛋白的影响. *新医学导刊* 2008; 7: 2-3
- 8 Tsimihodimos V, Dounousi E, Siamopoulos KC. Dyslipidemia in chronic kidney disease: an approach to pathogenesis and treatment. *Am J Nephrol* 2008; 28: 958-973
- 9 Resch U, Tatzber F, Budinsky A, Sinzinger H. Reduction of oxidative stress and modulation of auto-antibodies against modified low-density lipoprotein after rosuvastatin therapy. *Br J Clin Pharmacol* 2006; 61: 262-274
- 10 Matsuura E, Hughes GR, Khamashta MA. Oxidation of LDL and its clinical implication. *Autoimmun Rev* 2008; 7: 558-566
- 11 肖华, 季爱民, 李志梁, 宋旭东, 陈爱华. 氧化低密度脂蛋白对大鼠心肌成纤维细胞胶原的影响. *第三军医大学学报* 2008; 30: 1252-1255
- 12 Lee HS, Song CY. Oxidized low-density lipoprotein and oxidative stress in the development of glomerulosclerosis. *Am J Nephrol* 2009; 29: 62-70
- 13 Hong HK, Song CY, Kim BC, Lee HS. ERK contributes to the effects of Smad signaling on oxidized LDL-induced PAI-1 expression in human mesangial cells. *Transl Res* 2006; 148: 171-179
- 14 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

编辑 田滢 电编 闫晋利

半乳糖-羧化壳聚糖-十四酸纳米粒的制备及其肝靶向性

寇昌华, 钱海鑫, 韩锡林, 汤仁仙, 温相如, 赵子明, 宋远见, 戚大石, 刘红芝, 刘雯, 马向东

■背景资料

纳米技术是20世纪90年代初发展起来的新兴前沿学科; 纳米生物医学正在迅速形成一个崭新的研究领域, 通过纳米粒基团的生物靶向性将药物输送到靶向器官发挥作用, 在恶性肿瘤的靶向治疗中显示出巨大的潜力。

寇昌华, 钱海鑫, 苏州大学附属第一医院普外科 江苏省苏州市 215006

寇昌华, 韩锡林, 马向东, 徐州市中心医院肿瘤外科 江苏省徐州市 221009

汤仁仙, 温相如, 赵子明, 宋远见, 戚大石, 刘红芝, 刘雯, 徐州医学院基础学院 江苏省徐州市 221004

寇昌华, 硕士, 主治医师, 主要从事肝胆胰肿瘤的临床及基础研究。国家自然科学基金资助项目, No. 81102381, 31100762

作者贡献分布: 寇昌华负责制备纳米粒和细胞转染实验; 钱海鑫、赵子明及韩锡林等负责实验设计; 其余作者负责细胞培养、数据整理和论文撰写等。

通讯作者: 钱海鑫, 教授, 215006, 江苏省苏州市十梓街188号, 苏州大学附属第一医院普外科。qianhaixin1@hotmail.com

收稿日期: 2012-08-27 修回日期: 2012-11-25

接受日期: 2012-12-03 在线出版日期: 2012-12-18

Preparation of liver-targeted galactose-carboxyl chitosan-myristic acid nanoparticles

Chang-Hua Kou, Hai-Xin Qian, Xi-Lin Han, Ren-Xian Tang, Xiang-Ru Wen, Zi-Ming Zhao, Yuan-Jian Song, Da-Shi Qi, Hong-Zhi Liu, Wen Liu, Xiang-Dong Ma

Chang-Hua Kou, Hai-Xin Qian, Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215006, Jiangsu Province, China

Chang-Hua Kou, Xi-Lin Han, Xiang-Dong Ma, Department of Oncology Surgery, Xuzhou Central Hospital, Xuzhou 221009, Jiangsu Province, China

Ren-Xian Tang, Xiang-Ru Wen, Zi-Ming Zhao, Yuan-Jian Song, Da-Shi Qi, Hong-Zhi Liu, Wen Liu, Xuzhou Medical College, Xuzhou 221004, Jiangsu Province, China
Supported by: the National Natural Science Foundation of China, Nos. 81102381 and 31100762

Correspondence to: Hai-Xin Qian, Professor, Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215006, Jiangsu Province, China. qianhaixin1@hotmail.com

Received: 2012-08-27 Revised: 2012-11-25

Accepted: 2012-12-03 Published online: 2012-12-18

Abstract

AIM: To prepare galactose-carboxyl chitosan-myristic acid (GCCMA) nanoparticles and to observe their targeting of hepatoma carcinoma cells (HCCs).

METHODS: GCCMA nanoparticles were prepared by self-assembled technology, and their stability and biocompatibility were assessed. After fluorescent labeling, GCCMA nanoparticles of different concentrations were transfected into HCCs and HT22 hippocampal neurons.

Non-transfected HCCs and HT22 hippocampal neurons were used as controls. Based on the concentrations of GCCMA nanoparticles, HCCs transfected with GCCMA nanoparticles were divided into low-, medium- and high-concentration groups. The cellular uptake of nanoparticles was determined at 1, 2 and 4 h after transfection.

RESULTS: The cellular uptake of nanoparticles in the HCC group was much higher than that in the HT22 hippocampal neuron group. The uptake of nanoparticles in the HCC group was dose-dependent. The highest uptake of nanoparticles in the HCC group was observed at 4 hours after transfection.

CONCLUSION: GCCMA nanoparticles show hepatic targeting and are therefore a potential drug-carrier or administration route for chemotherapy drugs or targeted gene therapy for hepatic tumors.

Key Words: Galactose-carboxyl chitosan-myristic acid; Nanotechnology; Hepatic targeting; Hepatic tumors

Kou CH, Qian HX, Han XL, Tang RX, Wen XR, Zhao ZM, Song YJ, Qi DS, Liu HZ, Liu W, Ma XD. Preparation of liver-targeted galactose-carboxyl chitosan-myristic acid nanoparticles. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(35): 3570-3574

摘要

目的: 制备半乳糖-羧化壳聚糖-十四酸纳米粒(galactose carboxyl chitosan myristic acid nanoparticles, GCCMA), 观察GCCMA纳米粒在肝癌细胞中的靶向性。

方法: 本实验组采用自组装法制备GCCMA纳米粒, 优化制备条件, 并经过本实验组鉴定稳定性及生物相容性, 纳米粒经荧光标记后分别取不同浓度转染肝癌细胞及HT22海马神经细胞, 对照组、HT22海马神经细胞组和肝癌细胞组, 以及对照组、肝癌细胞-low组、肝癌细胞-mid组和肝癌细胞-high组(置入的GCCMA纳米粒浓度由低到高), 分别于1、2和4 h时间点测定在细胞摄取纳米粒情况。

■同行评议者

吴道澄, 教授, 西安交通大学生命学院

结果: 相同浓度的GCCMA纳米粒, Huh7肝癌细胞摄取量显著高于HT22海马神经细胞, 肝癌细胞摄取量在特定区间有剂量依赖性, 较高浓度时摄取量较大, 在1、2和4 h时间点所测定的结果显示, 4 h时肝癌细胞的摄取量最大。

结论: GCCMA纳米粒有肝靶向性, 为肝脏肿瘤的靶向性基因治疗或化疗药物提供很好的药物载体及给药途径。

关键词: 半乳糖-羧化壳聚糖-十四酸纳米粒; 纳米技术; 肝靶向性; 肝肿瘤

寇昌华, 钱海鑫, 韩锡林, 汤仁仙, 温相如, 赵子明, 宋远见, 戚大石, 刘红芝, 刘雯, 马向东. 半乳糖-羧化壳聚糖-十四酸纳米粒的制备及其肝靶向性. 世界华人消化杂志 2012; 20(35): 3570-3574

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3570.asp>

0 引言

原发性肝癌及继发性肝癌临床上均较为常见, 肝脏的靶向给药能够改善此类患者的预后. 纳米技术是20世纪80年代末发展起来的交叉性新兴前沿学科. 纳米科技已涉及到医学研究的众多方面, 纳米生物医学正在迅速形成一个崭新的研究领域^[1]. 纳米药物可提高药物的靶向性, 从而提高疗效, 减少对其他正常器官、组织的不良反应^[2]. 本实验组以自组装法合成半乳糖-羧化壳聚糖-十四酸纳米粒(galactose carboxyl chitosan myristic acid nanoparticles, GCCMA), 既往通过核磁、红外、热重、X光衍射等方法鉴定和表征了纳米粒^[3,4]. GCCMA在体内通过水解作用而降解, 浓度控制适当, 其降解产物对人体基本无毒性^[5], 本研究旨在对GCCMA肝靶向性的探讨, 为后续研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料 乳糖酸钠, 苏州亚科化学试剂股份有限公司; 羧化壳聚糖(20 000 kDa), 浙江金壳生物化学有限公司; 十四酸、罗丹明B、1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐(EDC·HCl)、N-羟基琥珀酰亚胺(HOSU)、阿拉丁试剂; Huh7肝癌细胞由徐州医学院基础学院汤仁仙教授提供; SK3200H超声波清洗器(超声波清洗器); R-134旋转蒸发仪(瑞士Buchi公司); FD-1冷冻干燥机(北京博医康实验仪器有限公司); DF-101S集热式磁力搅拌器(巩义市科华仪器有限公司); 3162CO₂培养箱(美国Sheldon公司); 5417R高速冷冻离心机(德国Eppendorf公司); CK2倒置相差

显微镜(日本Olympus公司); CKX41-F32FL荧光显微镜(日本Olympus公司); YJ-1450超净工作台(苏州净化设备公司)。

1.2 方法

1.2.1 纳米粒的制备: 称取羧化壳聚糖溶于水中, 搅拌使之溶解均匀, 制得羧化壳聚糖溶液. 另称取十四酸、HOSU和EDC·HCl溶于二氯甲烷中, 室温下搅拌反应1 h, 旋转蒸发使之干燥后, 以无水乙醇溶解, 搅拌中滴加到羧化壳聚糖溶液中, 搅拌反应2 h, 将反应所得溶液倒入透析袋中透析24 h. 称取乳糖酸钠、HOSU和EDC·HCl溶于水中, 搅拌反应1 h, 再与透析液混合, 搅拌反应后将反应液倒入透析袋透析24 h, 即得GCCMA悬液(亲水部向外, 疏水部向外, 自组装成纳米粒), 冷冻干燥后即得冻干粉末。

1.2.2 细胞培养及试剂配制: Huh7肝癌细胞及HT22海马神经细胞以含10%小牛血清的DMEM细胞培养液于37℃、5%CO₂的培养箱中培养; 3-4 d细胞长满瓶底80%, 采用0.25%胰蛋白酶消化进行细胞传代, 取对数生长期的细胞悬液, 测定活细胞数95%以上, 稀释为 $2 \times 10^5/0.2$ mL, 铺于24孔板, 每孔0.2 mL, GCCMA稀释至2 mg/mL, 避光保存备用, 待细胞培养24 h贴壁后加入GCCMA观察。

1.2.3 实验分组: (1)Control组、HT22海马神经细胞组和肝癌细胞组; 每组样本量为5个, HT22海马神经细胞组为HT22海马神经细胞加入罗丹明标记的GCCMA 150 μL, 肝癌细胞组为Huh7肝癌细胞加入罗丹明标记的GCCMA 150 μL, Control组为Huh7肝癌细胞仅加入同浓度的罗丹明, 分别于1、2和4 h时间点测定细胞摄取纳米粒情况; (2)Control组、肝癌细胞-low组、肝癌细胞-mid组和肝癌细胞-high组; 每组样本量为5个, 肝癌细胞-low组、肝癌细胞-mid组和肝癌细胞-high组分别加入罗丹明标记的GCCMA(浓度为2 mg/mL)75、150、300 μL, 分别于1、2和4 h时间点用PBS洗涤3次, 每次5 min, 测定细胞摄取纳米粒情况, Control组仅加入等浓度的罗丹明, 转染2 h作对照。

1.2.4 罗丹明B标记纳米粒: 罗丹明B(rhodamine B, RB)标记纳米粒的制备: 称取5 mg RB溶于10 mL稀醋酸(pH 4.5-5.0)中, 加入2 mg EDC·HCl和2 mg N-羟基琥珀酰亚胺(N-hydroxysuccinimide, NHS), 避光搅拌1 h, 加入10 mg GCCMA的水溶液(2 mg/mL), 常温避光搅拌24 h. 以12 000 r/min离心20 min, 弃上清, 沉淀以20 mL水复溶, 再次以

■研发前沿

本研究设计合成了半乳糖-羧化壳聚糖-十四酸纳米粒(GCCMA), 并通过核磁、红外、热重、X光衍射等方法鉴定和表征了纳米粒, 在细胞水平证实GCCMA有高度的肝靶向性及生物安全性, 还需要在纳米粒携带药物可行性及在活体内的肝靶向性及生物安全性方面做进一步研究。

■相关报道

2008年, 有学者制备一种新型双亲性高分子材料O-羧甲基壳聚糖十八烷基季铵盐(OQCMC), 采用不同方法分别制备经基团修饰的OQCMC靶向缓释微球, 并将其用于药物/基因载体取得成功。

■创新盘点

GCCMA为本课题组自行设计合成,未见相关报道, GCCMA具有高度的肝靶向性及生物安全性.

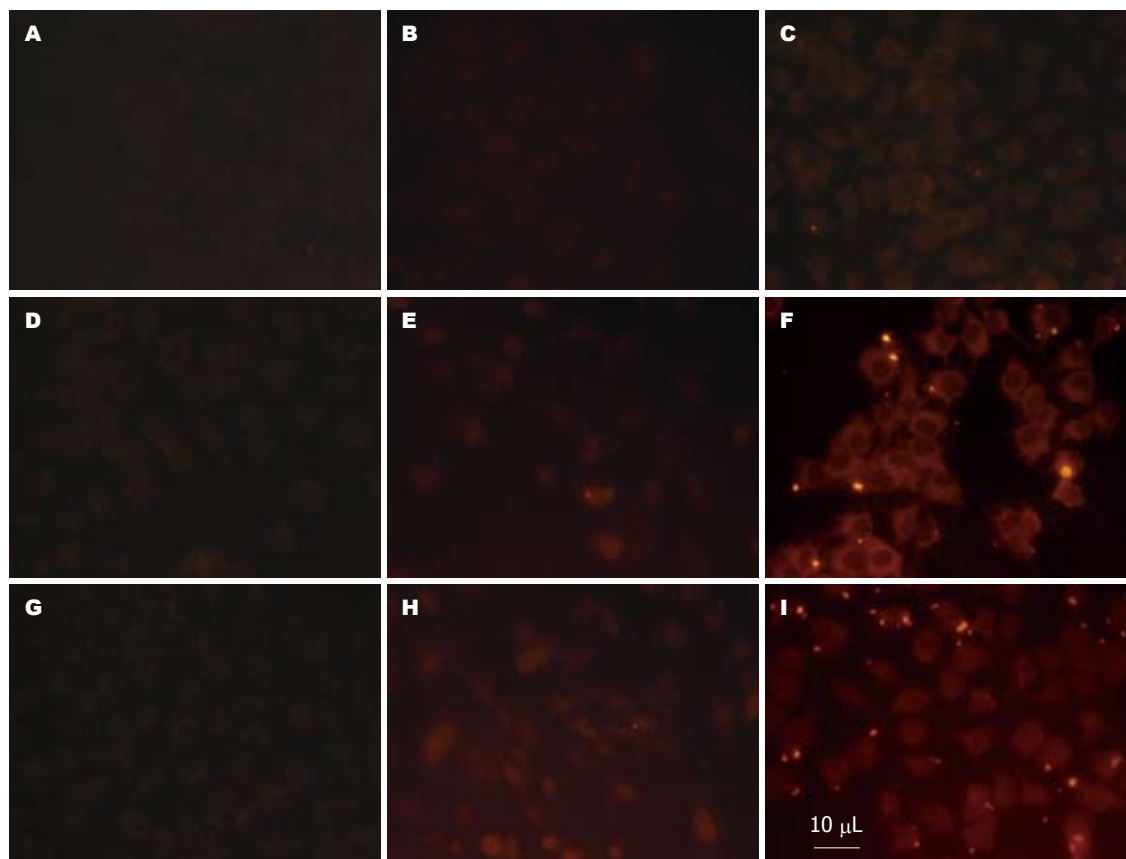


图1 肝癌细胞及HT22海马神经细胞对纳米粒的摄取. A, D, G: 罗丹明水溶液转染肝癌细胞, 转染时间分别为1、2、4 h; B, E, H: 罗丹明标记的GCCMA转染HT22细胞, 转染时间分别为1、2、4 h; C, F, I: 罗丹明标记的GCCMA转染肝癌细胞, 转染时间分别为1、2、4 h.

12 000 r/min离心20 min, 弃上清, 重复洗至上清液测不出游离RB的荧光.

1.2.5 荧光显微观察: 荧光显微照片. 观察纳米粒在细胞质和细胞核中均有分布, 以纳米粒荧光强度, 统计细胞对纳米粒的摄取量.

统计学处理 采用SPSS16.0统计软件, 组间比较采用方差分析.

2 结果

2.1 GCCMA纳米粒的肝靶向性 图1显示: 肝癌细胞(图1C, F, I)及HT22海马神经细胞(图1B, E, H)摄取纳米粒的对比, 各组分别转染1 h(图1A, B, C)、2 h(图1D, E, F)和4 h(图1G, H, I)时, 肝癌细胞组的荧光强度均显著高于相应时间点的HT22海马神经细胞中的荧光强度, 表明该纳米粒有明确的肝靶向性.

2.2 纳米粒浓度对细胞摄取的影响 图2显示肝癌细胞-low组(图2B, C, D)、肝癌细胞-mid组(图2F, G, H)和肝癌细胞-high组(图2J, K, L), 分别加入纳米粒(浓度为2 mg/mL)75、150、300 μL. 洗涤后观察荧光强度, 随纳米粒浓度的增加, 细胞摄

取纳米粒也随之增高. 结果表明: 在试验所选取的浓度, 细胞摄取纳米粒的量随GCCMA纳米粒浓度升高而渐增加.

2.3 培育时间对细胞摄取的影响 图2显示试验各组分别在加入纳米粒1 h(图2B, F, J)、2 h(图2C, G, K)、4 h(图2D, H, L)后观察, 在加入纳米粒1 h, 细胞摄取纳米粒较少; 在加入纳米粒2 h细胞浆荧光强度较高, 细胞核荧光强度仍较低; 4 h细胞浆核荧光强度进一步增高, 细胞核荧光强度高, 与细胞浆荧光强度相近. 结果表明: 细胞摄取GCCMA纳米粒在转染时间分别为1、2、4 h 3个时间点, 摄取量随时间延长而增加.

3 讨论

纳米粒子(nanoparticles, Nps)是直径在10-1 000 nm之间的固态胶体粒子, 纳米粒的大小及分子结构使得纳米粒载药系统肿瘤的治疗具有很多优势, 纳米粒可通过各种物理、化学及生物作用包载药物, 改变给药途径, 并在给药途中保护药物不被降解, 提高药物稳定性, 降低药物的不良反应, 并能通过多种生物屏障^[6,7], 提高药物作用

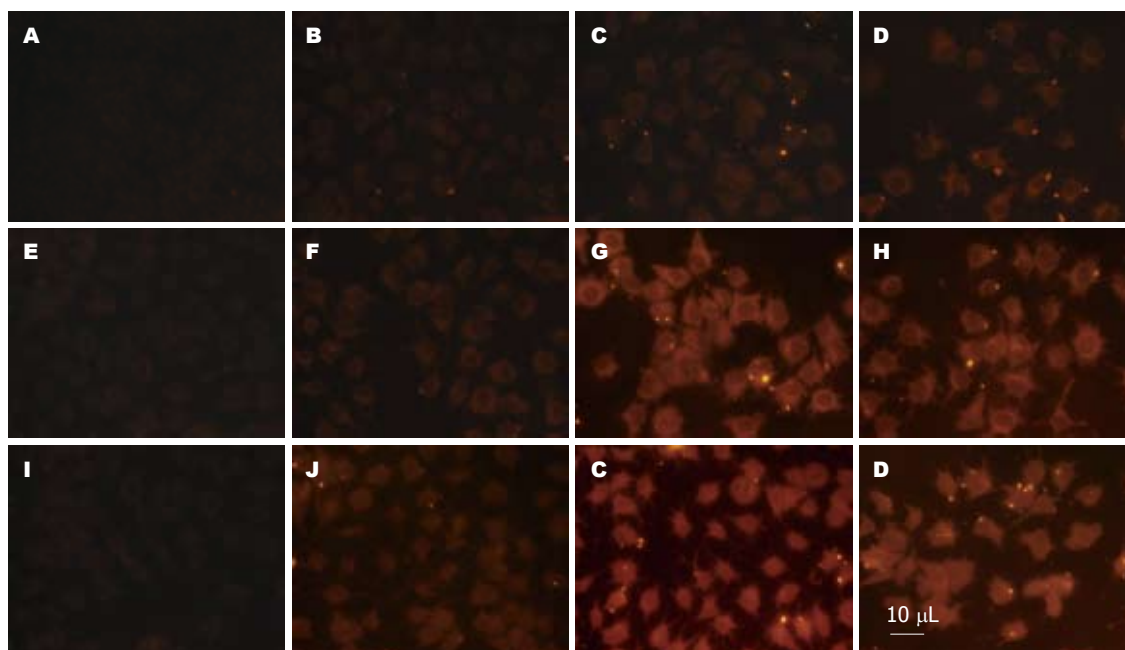


图2 各组在不同时间点对入纳米粒的摄取. A, E, I: 罗丹明水溶液转染肝癌细胞, 浓度由低到高; B, F, J: 罗丹明标记的GC-CMA转染肝癌细胞1 h, 浓度由低到高; C, G, K: 罗丹明标记的GCCMA转染肝癌细胞2 h, 浓度由低到高; D, H, L: 罗丹明标记的GCCMA转染肝癌细胞4 h, 浓度由低到高.

■名词解释

纳米材料的靶向性: 将药物/基因治疗分子包裹在纳米颗粒之中或吸附在其表面, 并在纳米粒表面耦联特异性的靶向分子, 如特异性配体、单克隆抗体、基团等, 通过靶向分子与细胞表面特异性受体结合, 通过不同的途径进入细胞内, 实现安全有效的靶向性药物/基因治疗.

的靶向性, 还有缓释的作用, 提高药物纳米粒载药系统的开发, 为肝肿瘤的治疗开辟了新的给药途径. 通过纳米粒可延长药物在靶向器官内的存留时间, 增加局部药物浓度, 从而在不同细胞周期发挥持续的抗肿瘤作用. 他与游离药物相比明显提高了药物疗效, 并可省去肝脏介入给药治疗的不便和费用. 特别是随着对原发性肝癌基因治疗的深入研究, 利用纳米载体介导的基因治疗已成为一个重要发展趋势.

纳米粒多由天然或人工合成的高分子聚合物构成. 天然材料的NPs结构和成分不均一, 使药物的释放不均一、性能不稳定、不易长期保存. 人工合成的高分子聚合物具有生物降解好、载药量高、性能稳定、易于制备及保存的特点^[2]. NPs中的药物可通过沥滤、渗透和扩散或通过基质的溶蚀而缓慢释放出来^[8]. 纳米结构介导的药物输送是一个关键技术. 理想的NPs载体应具有较高的载药量及药物包封率、特异靶向性、药物释放可控性、载体材料可生物降解、毒性较低或无毒等特点; 并有提高药物的生物可利用度、改进药物的时间控制释放性能等特性^[4]. 当前研究的用于制备药物输送载体的NPs主要包括: (1)天然高分子聚合物: 蛋白、壳聚糖、明胶、海藻酸钠、多糖等生物型粒子; (2)人工合成的可生物降解的聚合物体系: 聚氰基丙烯酸酯、聚乳酸、聚乙醇酸、乳酸-乙醇

酸共聚物、聚己内酯等; 其他: 硅基粒子、碳基粒子以及金属粒子等^[8,9].

壳聚糖是一种具有优良的生物相容性及易于降解的聚合物, 其代谢产物为人体内正常的代谢产物^[10,11], 本研究采用自组装法合成GC-CMA, 为人工合成的可生物降解的聚合物体系, 合成成分能安全降解, 生物安全性高, 为其在体内广泛应用打下了基础; 制备方法简单、方便, 但影响因素较多, 应根据不同要求和不同药物确定最佳制备工艺, 制备的纳米粒粒径在300-400 nm, 为进一步研究奠定了基础. 本实验组合成的GCCMA, 通过核磁、红外、热重及X光衍射等方法鉴定纳米粒的稳定性及生物相容性. 研究表明: 半乳糖有肝细胞的选择性^[12,13], GC-CMA为耦联特异性的靶向分子半乳糖, GCCMA纳米粒主动与细胞表面特异性受体结合^[14,15], 从而提高肝脏药物浓度, 提高疗效, 减少对其他正常器官、组织的不良反应.

实验中我们将Huh7肝癌细胞与HT22海马神经细胞对GCCMA的选择性摄取做了对比实验. 从图1中发现: Huh7肝癌细胞对GCCMA纳米粒的选择性摄取显著高于HT22海马神经细胞及对照组, 能够较好的表明GCCMA纳米粒的肝靶向性. 并且我们在不同纳米粒浓度及作用时间对肝癌细胞摄取GCCMA纳米量的影响做了研究, 图2提示: 在4 h内, 随着实验时间的延长, 摄

■同行评价

本研究设计合理, 实验结果可靠, 设计与合成GCCMA作为药物/基因载体有一定的意义。

取量增加, 时间的延长能够增加肝癌细胞摄取GCCMA的量, 在我们选择的GCCMA浓度区间内, 即浓度在0.4-1.2 mg/mL左右, 浓度较高肝癌细胞摄取GCCMA的量较大。

随着纳米技术的飞速发展, NPs将在肝癌的治疗中发挥越来越重要的作用。特别是作为一种良好的化疗药物及基因载体, NPs可有效解决目前药物载体的免疫原性、安全性、低转染率和靶向性等诸多问题, 具有广阔的应用前景^[16]。

4 参考文献

- Lin X, Xie J, Niu G, Zhang F, Gao H, Yang M, Quan Q, Aronova MA, Zhang G, Lee S, Leapman R, Chen X. Chimeric ferritin nanocages for multiple function loading and multimodal imaging. *Nano Lett* 2011; 11: 814-819
- Sánchez-Moreno P, Ortega-Vinuesa JL, Martín-Rodríguez A, Boulaiz H, Marchal-Corrales JA, Peula-García JM. Characterization of different functionalized lipidic nanocapsules as potential drug carriers. *Int J Mol Sci* 2012; 13: 2405-2424
- Seo SJ, Kim IY, Choi YJ, Akaike T, Cho CS. Enhanced liver functions of hepatocytes cocultured with NIH 3T3 in the alginate/galactosylated chitosan scaffold. *Biomaterials* 2006; 27: 1487-1495
- Feng ZQ, Chu X, Huang NP, Wang T, Wang Y, Shi X, Ding Y, Gu ZZ. The effect of nanofibrous galactosylated chitosan scaffolds on the formation of rat primary hepatocyte aggregates and the maintenance of liver function. *Biomaterials* 2009; 30: 2753-2763
- Mahapatro A, Singh DK. Biodegradable nanoparticles are excellent vehicle for site directed in-vivo delivery of drugs and vaccines. *J Nanobiotechnology* 2011; 9: 55
- Siddiqui IA, Adhami VM, Ahmad N, Mukhtar H. Nanochemoprevention: sustained release of bioactive food components for cancer prevention. *Nutr Cancer* 2010; 62: 883-890
- 全俊, 周建亮, 谢建萍, 肖平, 潘一峰. β -雌二醇纳米粒的制备及其肝脏靶向性的动物实验. *中华传染病杂志* 2008; 26: 78-79
- Vanpouille-Box C, Lacoëuille F, Roux J, Aubé C, Garcion E, Lepareur N, Oberti F, Bouchet F, Noiret N, Garin E, Benoît JP, Couturier O, Hindré F. Lipid nanocapsules loaded with rhenium-188 reduce tumor progression in a rat hepatocellular carcinoma model. *PLoS One* 2011; 6: e16926
- Ghosn B, Singh A, Li M, Vlassov AV, Burnett C, Puri N, Roy K. Efficient gene silencing in lungs and liver using imidazole-modified chitosan as a nano-carrier for small interfering RNA. *Oligonucleotides* 2010; 20: 163-172
- 李晓昱, 梁晓飞, 朱明洁, 孙彦明, 段友容. 羧甲基壳聚糖季铵盐作为基因载体及动物体内分布研究. *中国癌症杂志* 2011; 21: 495-498
- Yao HT, Luo MN, Hung LB, Chiang MT, Lin JH, Lii CK, Huang CY. Effects of chitosan oligosaccharides on drug-metabolizing enzymes in rat liver and kidneys. *Food Chem Toxicol* 2012; 50: 1171-1177
- Mukthavaram R, Marepally S, Venkata MY, Vegi GN, Sistla R, Chaudhuri A. Cationic glycolipids with cyclic and open galactose head groups for the selective targeting of genes to mouse liver. *Biomaterials* 2009; 30: 2369-2384
- Nakamura K, Okuno K, Hirohata T, Shigeoka H, Jinnai H, Yasutomi M. [Selective effectiveness of galactose-containing liposome IL-2 on liver lymphocytes]. *Gan To Kagaku Ryoho* 1994; 21: 2105-2107
- Massimi M, Devirgiliis LC, Kolb-Bachofen V, Dini L. Independent modulation of galactose-specific receptor expression in rat liver cells. *Hepatology* 1995; 22: 1819-1828
- Dini L, Falasca L, Lentini A, Mattioli P, Piacentini M, Piredda L, Autuori F. Galactose-specific receptor modulation related to the onset of apoptosis in rat liver. *Eur J Cell Biol* 1993; 61: 329-33
- Liu M, Li ZH, Xu FJ, Lai LH, Wang QQ, Tang GP, Yang WT. An oligopeptide ligand-mediated therapeutic gene nanocomplex for liver cancer-targeted therapy. *Biomaterials* 2012; 33: 2240-2250

编辑 田滢 电编 闫晋利

考来烯胺对2型糖尿病大鼠胆汁酸代谢的影响

王晓凌, 崔海平

王晓凌, 邢台医学高等专科学校生化教研室 河北省邢台市 054000

崔海平, 河北省荣誉军人康复医院妇产科 河北省邢台市 054017

河北省卫生厅医学科研基金资助项目, No. 20090593

作者贡献分布: 此课题由王晓凌设计; 研究过程由王晓凌与崔海平合作完成; 数据分析由崔海平完成; 本论文写作由王晓凌与崔海平共同完成。

通讯作者: 王晓凌, 副教授, 054000, 河北省邢台市钢铁北路618号, 邢台医学高等专科学校生化教研室。

smallbookworm@163.com

电话: 0319-2233285

收稿日期: 2012-10-06 修回日期: 2012-11-16

接受日期: 2012-12-03 在线出版日期: 2012-12-18

Cholestyramine therapy alters bile acid metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats

Xiao-Ling Wang, Hai-Pin Cui

Xiao-Ling Wang, Department of Biochemistry, Xingtai Medical College, Xingtai 054000, Hebei Province, China

Hai-Pin Cui, Department of Obstetrics and Gynecology, Hebei Provincial Disabled Soldier Hospital, Xingtai 054017, Hebei Province, China

Supported by: the Medical Science Research Foundation of Health Department of Hebei Province, No. 20090593

Correspondence to: Xiao-Ling Wang, Associate Professor, Department of Biochemistry, Xingtai Medical College, 618 Gangtie Road, Xingtai 054000, Hebei Province, China. smallbookworm@163.com

Received: 2012-10-06 Revised: 2012-11-16

Accepted: 2012-12-03 Published online: 2012-12-18

Abstract

AIM: To investigate the effect of cholestyramine therapy on bile acid metabolism in rats with type 2 diabetes.

METHODS: Type 2 diabetes was induced in Sprague-Dawley (SD) rats by feeding a high-fat diet and intraperitoneally injecting streptozotocin (30 mg/kg). The rats were then randomly divided into diabetes mellitus group (DM group) and cholestyramine treatment group (CT group), with 10 rats in each group. Rats in the DM group and CT group were fed a high-fat diet and a high-fat diet containing 2.5% cholestyramine, respectively. Ten normal male SD rats were used as controls (Con group) and fed standard rodent

chow. Four weeks later, rats of each group were euthanized, and artery blood and liver samples were taken for further analysis. The mRNA levels of LXR α , FXR, SHP, CYP7A1, CYP27A1, ABCG5 and ABCG8, which are involved in bile acid metabolism, were evaluated by RT-PCR. The expression of CYP7A1 and CYP27A1 protein was detected by Western blot.

RESULTS: Compared to the Con group, rats in the DM group had increased mRNA levels of LXR α , CYP7A1, ABCG5 and ABCG8 (all $P < 0.05$), and reduced mRNA levels of FXR and SHP (both $P < 0.05$). Compared to the DM group, the CT group had increased mRNA levels of LXR α and CYP7A1 (both $P < 0.05$), reduced mRNA levels of FXR and RXR (both $P < 0.05$), and non-significantly changed expression of ABCG5 and ABCG8 mRNAs. The mRNA level of CYP27A1 showed no significant difference among each group. Western blot analysis showed that the protein expression of CYP7A1 was increased most significantly in the Con group, followed by the DM group and CT group (all $P < 0.05$), and that of CYP27A1 showed no significant difference among each group.

CONCLUSION: In type 2 diabetic rats, hepatic bile acid synthesis increases possibly as a result of increased expression of CYP7A1. Cholestyramine therapy further promotes the expression of CYP7A1. The increased mRNA expression of LXR α and decreased mRNA expression of FXR are related to the increased expression of CYP7A1.

Key Words: Bile acids; Cholestyramine; Type 2 diabetes mellitus

Wang XL, Cui HP. Cholestyramine therapy alters bile acid metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(35): 3575-3579

摘要

目的: 探讨考来烯胺对2型糖尿病大鼠肝胆汁酸代谢的影响。

方法: 高脂饲料和小剂量链脲佐菌素(streptoz-

■背景资料

近十年来发现胆汁酸不仅能促进脂类物质的消化吸收,而且还是一种信号分子,通过核受体法尼醇X受体和膜受体TGR5,调节糖、脂类和能量代谢。最近的观察表明2型糖尿病存在胆汁酸平衡失调,考来烯胺通过改变胆汁酸肠肝循环状态对物质代谢发挥调节作用。

■同行评议者

于珮, 主任医师, 天津医科大学代谢病医院

■相关报道

Shang等揭示免CYP7A1基因启动子区的肝X受体 α (LXR α)结合区内含有FTF结合元件, 激活FXR可能通过SHP/FTF异源二聚体消除LXR α 对CYP7A1基因表达的调控作用, 提示FXR和LXR α 在调节CYP7A1表达时可能存在关联。

otocin, STZ)注射成功诱导2型糖尿病后, SD δ 大鼠随机分糖尿病组(diabetes mellitus group, DM组)和考来烯胺治疗组(cholestyramine treatment group, CT组)各10只, 分别喂以高脂饲料和含2.5%考来烯胺的高脂饲料。另外10只正常SD δ 大鼠作为对照组(control group, Con组), 喂养标准饲料。继续饲养4 wk, 各组大鼠麻醉后, 股动脉采血并留取部分肝组织。RT-PCR检测胆汁酸代谢有关基因LXR α 、FXR、SHP、CYP7A1、CYP27A1、ABCG5和ABCG8的mRNA表达, Western blot检测CYP7A1和CYP27A1的蛋白表达。

结果:与Con组相比, DM组大鼠LXR α 、CYP7A1、ABCG5和ABCG8的mRNA表达增加(均 $P<0.05$), 而FXR和RXR的mRNA表达减少(均 $P<0.05$)。与DM组相比, CT组LXR α 和CYP7A1 mRNA表达进一步增加(均 $P<0.05$), FXR和SHP的mRNA进一步减少(均 $P<0.05$), ABCG5和ABCG8的mRNA表达不变。各组CYP27A1的mRNA表达没有差异。Western blot表明Con组、DM组、CT组CYP7A1的蛋白表达依次增加(均 $P<0.05$), 而各组CYP27A1蛋白表达均未改变。

结论:2型糖尿病状态下, 肝胆汁酸合成增加是CYP7A1表达增加的结果, 而与CYP27A1无关, 考来烯胺治疗进一步促进了CYP7A1表达。核受体LXR α 的mRNA表达增加, FXR的mRNA表达减少与CYP7A1表达增加有关。

关键词:胆汁酸; 考来烯胺; 2型糖尿病

王晓凌, 崔海平. 考来烯胺对2型糖尿病大鼠胆汁酸代谢的影响. 世界华人消化杂志 2012; 20(35): 3575-3579
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3575.asp>

0 引言

2型糖尿病患者常合并血胆固醇水平增高和脂质沉积^[1,2]。胆汁酸合成是胆固醇最主要的转化排泄途径, 促进胆汁酸的排泄能间接减少肝胆固醇的含量, 必然对胆固醇和胆汁酸代谢平衡产生影响。胆汁酸除能促进脂类物质的消化吸收外, 也是一种信息物质, 通过其受体调节物质代谢和能量代谢^[3], 因此胆汁酸的变化对糖尿病患者的糖脂代谢会产生影响, 从而影响糖尿病的发展。考来烯胺是一种阴离子交换树脂, 在肠道中能与多种胆汁酸结合, 使胆汁酸不再重吸收而随粪便排出, 改变胆汁酸肠肝循环状态, 降低血胆固醇水平, 提高外周组织胰岛素敏感

性, 改善糖尿病症状^[4,5]。正常生理条件下考来烯胺可通过改变肝细胞中某些核受体的表达, 促进胆固醇转化为胆汁酸^[6]。糖尿病状态下考来烯胺对胆汁酸代谢有关基因的影响如何, 缺乏报道。我们利用考来烯胺促进2型糖尿病肥胖大鼠胆汁酸的排泄, 对肝胆汁酸代谢有关基因的表达变化进行研究, 旨在明确考来烯胺对2型糖尿病大鼠肝胆汁酸代谢的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 SD δ 大鼠购自河北省实验动物中心; OptiumTM血糖/血酮仪为美国Abbott Diabetes Care INC.生产; Mastercycler Pro PCR仪为德国Eppendorf公司产品; GIS-1000凝胶成像分析系统为天能科技(上海)有限公司生产; AMV逆转录酶、Taq DNA聚合酶购自Fermentas; 链脲佐菌素(STZ)为Sigma公司产品; 胰岛素放射免疫试剂盒购自北方生物技术研究所以; 血糖、甘油三酯和胆固醇测定试剂盒购自浙江东瓯生物工程有限公司; 胰高血糖素样肽-1(glucagon-like peptide 1, GLP-1)的ELISA试剂盒为美国Millipore公司产品; 一抗和HRP标记的二抗购自美国Santa Cruz公司; 考来烯胺为南京厚生药业产品。

1.2 方法

1.2.1 分组和建模:3 mo δ SD大鼠用高脂饲料(热量组成为糖20.1%, 脂肪59.8%, 蛋白质20.1%, 其中脂肪主要为猪油)喂养8 wk, 通过口服糖耐量实验(oral glucose tolerance test, OGTT)和胰岛素释放实验(insulin releasing test, IRT)、胰岛素敏感指数(insulin sensitivity index, ISI)验证是否产生胰岛素抵抗, 胰岛素敏感指数 = $\ln 1 / (\text{空腹血糖浓度} \times \text{空腹血胰岛素浓度})$ 。产生胰岛素抵抗的大鼠空腹注射小剂量STZ(30 mg/kg), 3 d后禁食12 h, 测定空腹血糖。血糖值 >7.8 mmol/L的大鼠随机分为糖尿病组(diabetes mellitus group, DM组)和考来烯胺治疗组(cholestyramine treatment group, CT组)。DM组大鼠继续喂养高脂饲料, CT组喂养高脂添加2.5%考来烯胺的高脂饲料, 共4 wk。另有平行饲养的10只 δ SD大鼠作为对照组(control group, Con组), 喂养标准饲料(热量组成为糖65.5%, 脂肪0.3%, 蛋白质24.2%)。

1.2.2 取材:分别从Con组、DM组和CT组随机选取10只大鼠, 1.2 g/kg乌拉坦腹腔注射麻醉, 股动脉采血, 3 000 r/min分离血清, 用于检测血液生化指标; 从相同部位迅速留取部分肝组织, 置于液氮中, 分装后-80 $^{\circ}\text{C}$ 冻存, 用于测定胆汁酸代

谢有关基因的表达。

1.2.3 血清生化指标的测定: 按试剂盒说明, 用HITACHI 7170A型全自动生化分析仪测定血清葡萄糖、甘油三酯、总胆固醇浓度。人工放射免疫法测定胰岛素水平, GLP-1采用酶联免疫吸附法测定。

1.2.4 胆汁酸代谢有关基因的mRNA表达: 用TRIzol法提取肝组织总RNA, 用随机引物进行逆转录, 以逆转录的单链cDNA为模板, PCR扩增以下基因: (1)调节脂质代谢的肝核受体 α (liver x receptor α , LXR α), LXR α Forward, ACAACCTGGGAGTGAGA, LXR α Reverse, TAGCATCCGTGGGAACAT; (2)胆汁酸的核受体法尼醇X受体(farnesoid X receptor, FXR)及其靶基因微小异源二聚体伙伴基因(small heterodimer partner gene, SHP), FXR Forward, CAAGTGACCTCCACGACCAAG, FXR Reverse, TCCGCTGAA CGAAGGAACAT, SHP Forward, AAGGCACTATCTCTTCAACC, SHP Reverse, ATGCTCCCATCCCTACCC; (3)胆汁酸经典合成途径的限速酶-胆固醇7 α 羟化酶(Cholesterol 7 α -hydroxylase, CYP7A1)和替代合成途径的限速酶-胆固醇27 α 羟化酶(CYP27A1), CYP7A1 Forward, TGCCTTCTGTTACCGAGTG, CYP7A1 Reverse, AATAGCGAGGTGCGTCTT, CYP27A1 Forward, TCTACGAGGCTATGTGCT, CYP27A1 Reverse, ATCCGCTGATTCAAACCTA; (4)参与肝细胞将胆固醇转移到胆汁中的ATP结合盒转运体G5和G8(ABCG5和ABCG8), ABCG5 Forward, TGCCAGATTGGATACTTC, ABCG5 Reverse, GACAAGAGTCGGGATGAA, ABCG8 Forward, CCTCGCTACAGCAACCCT, ABCG8 Reverse, GCGTGGCCGTAGTAAAGG; (5)内参基因 β -actin, β -actin Forward, GCCATGTACGTAGCCATCCA, β -actin Reverse, GAACCGCTCATTGCCGATAG. PCR产物经2%琼脂糖凝胶电泳, 经成像分析系统分析, 分别得到目的基因扩增产物与内参照 β -actin基因扩增产物的积分光密度值(I_A), 以二者的比值作为目的基因的相对表达量。

1.2.5 Western bolt检测肝CYP7A1和CYP27A1的表达: 100 mg肝组织加入1 mL RIPA裂解液, 冰浴匀浆, 12 000 g离心10 min, 吸取上清液, 测定蛋白浓度。采用10%聚丙烯酰胺分离胶不连续系统进行电泳分离样品蛋白质, 胶中蛋白质电转移至PVDF膜, 50 g/L的脱脂奶粉于37 °C封

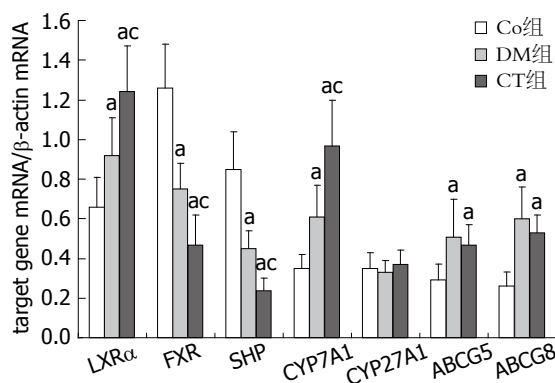


图1 肝胆汁酸代谢有关基因的mRNA水平(mean ± SD, $n = 6$). Con: 对照组; DM: 糖尿病组; CT: 考来烯胺治疗组。^a $P < 0.05$ vs Con组, ^{ac} $P < 0.05$ vs DM组。

闭1 h。印迹膜分别浸入兔抗人CYP7A1多抗、羊抗人CYP27A1多抗和兔抗大鼠 β -actin多抗溶液, 4 °C结合过夜。TTBS溶液洗膜, 然后分别加入HRP标记羊抗兔二抗或HRP标记驴抗羊二抗, 37 °C反应1 h。TTBS溶液洗膜, 化学发光法处理。X片感光成像后, 经成像分析系统分析。

统计学处理 所有数据均用mean ± SD表示, 采用SPSS13.0软件进行统计学处理分析, 多组间比较用单因素方差分析, 两两比较采用LSD法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血中生化指标 与Con组相比, DM组大鼠空腹血糖、甘油三酯、胆固醇明显升高, 胰岛素敏感指数下降, 体质量明显增高($P < 0.05$), 表明该模型大鼠为2型糖尿病肥胖大鼠。使用考来烯胺后, 空腹血糖、胆固醇有所下降, 胰岛素敏感指数有所升高($P < 0.05$)。DM组GLP-1浓度下降, 使用考来烯胺后, GLP-1浓度有所上升($P < 0.05$, 表1)。

2.2 肝组织胆汁酸代谢有关基因的mRNA表达 与Con组相比, DM组大鼠LXR α 、CYP7A1、ABCG5和ABCG8的mRNA表达增加($P < 0.05$), 而FXR和SHP的mRNA表达减少($P < 0.05$)。与DM组相比, CT组LXR α 和CYP7A1 mRNA表达进一步增加($P < 0.05$), FXR和SHP的mRNA进一步减少($P < 0.05$, 图1), ABCG5和ABCG8的mRNA表达不变。CYP27A1在各组中的mRNA没有差异。

2.3 肝组织CYP7A1和CYP27A1的蛋白表达 Western bolt结果显示, DM组CYP7A1的蛋白表达量明显高于Con组(1.06 ± 0.06 vs 0.79 ± 0.04 , $P < 0.01$), CT组CYP7A1的表达量(1.16 ± 0.04)比DM组进一步增加($P < 0.05$, 图2)。而CYP27A1在各组的蛋白表达量无差异。

■ 创新点

本研究发现考来烯胺引起2型糖尿病大鼠胆汁酸生成增加是通过“经典途径”完成的, 而“替代途径”没有改变。核受体LXR α 的mRNA表达增加, FXR的mRNA表达减少与“经典途径”的限速酶CYP7A1表达增加有关。

■ 应用要点

本研究对考来烯胺影响糖和脂类代谢的机制进行了探讨, 对于探索胆汁酸螯合剂在代谢性疾病中的应用有一定参考价值。

■名词解释

肝X受体 α (LXR α): 属于核受体超家族成员, 主要在肝、肾等组织表达. 主要通过对其下游基因的调控, 调节胆固醇的吸收、转运和转化. LXR α 除了与胆固醇代谢有关外, 还与脂肪酸的生成有关. 脂肪酸生成的关键酶乙酰CoA羧化酶、脂肪酸合成酶都是他的下游基因.

表 1 大鼠血生化指标 (mean \pm SD, $n = 10$)

项目	对照组	糖尿病组	考来烯胺治疗组
体质量(g)	441.50 \pm 32.60	483.40 \pm 34.50 ^a	461.70 \pm 26.60
空腹血糖(mmol/L)	5.29 \pm 0.46	15.84 \pm 2.47 ^a	10.83 \pm 1.9 ^{ac}
甘油三酯(mmol/L)	1.01 \pm 0.30	2.23 \pm 0.51 ^a	2.11 \pm 0.41 ^a
胆固醇(mmol/L)	1.75 \pm 0.15	2.95 \pm 0.49 ^a	1.82 \pm 0.12 ^c
胰岛素(μ U/mL)	18.69 \pm 3.95	20.97 \pm 5.32	22.02 \pm 5.17
胰岛素敏感指数	-4.57 \pm 0.26	-5.76 \pm 0.37 ^a	-5.43 \pm 0.30 ^{ac}
GLP-1(pmol/L)	12.69 \pm 2.30	6.18 \pm 1.22 ^a	9.67 \pm 2.08 ^{ac}

^a $P < 0.05$ vs 对照组; ^c $P < 0.05$ vs 糖尿病组.

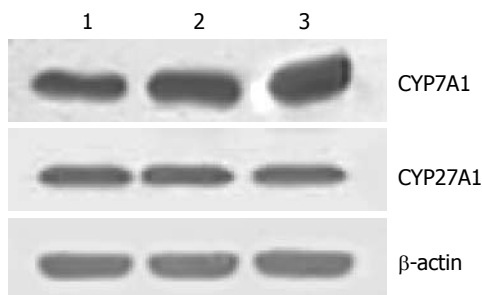


图 2 肝组织CYP7A1和CYP27A1蛋白质表达变化. 1: 对照组; 2: 糖尿病组; 3: 考来烯胺治疗组.

3 讨论

GLP-1是肠道上皮内分泌L细胞分泌的一种肠促胰岛素, 是胰高血糖素原基因表达后的加工产物. GLP-1与细胞膜表面受体结合发挥作用, 可促进胰腺分泌胰岛素, 并抑制胰高血糖素的分泌, GLP-1也可促进肝细胞中糖原合成酶由磷酸化形式转变为脱磷酸化形式, 促进了糖原的合成, 因此有明显的降低血糖的效应^[7]. 本研究表明糖尿病情况下大鼠血中GLP-1水平降低, 使用考来烯胺后GLP-1水平明显升高, 这可能与CT组空腹血糖水平的下降和胰岛素抵抗的改善有关. 作为一种信号分子, 胆汁酸主要通过激活细胞膜受体TGR5和肝X受体(liver X receptor, LXR)来发挥作用. TGR5属于G蛋白偶联受体家族, 与胆汁酸结合后可激活下游的cAMP信号通路^[8]. TGR5在多种组织和细胞有表达, 例如人的胆囊上皮细胞、单核/吞噬细胞, 鼠的肝血窦内皮细胞、枯否细胞、树突状细胞、肠道L细胞等. 文献报道^[9], 肠道L细胞主要存在于大肠, 胆汁酸可通过激活L细胞的膜受体TGR5信号传递系统促进GLP-1的分泌. 正常情况下胆汁酸主要在小肠下端被重吸收, 只有很少的胆汁酸可以到达大肠, 考来烯胺与胆汁酸结合形成不吸收形式, 使大量胆汁酸到达大肠, 这可能是其促进

GLP-1分泌明显增加的原因.

胆汁酸是机体胆固醇转化排出体外的最主要形式, 考来烯胺增加了随粪便排出的胆汁酸量, 促进了胆固醇转变为胆汁酸, 可降低血胆固醇含量. 与对照组相比糖尿病大鼠血清胆固醇浓度升高, 经考来烯胺治疗后胆固醇浓度有明显下降. 肝通过“经典途径”和“替代途径”合成胆汁酸, 经典途径是主要途径, 限速酶是CYP7A1, 替代途径是次要途径, 其限速酶之一为CYP27A1^[10]. LXR α 是CYP7A1的正性调控因子, FXR是其负性调控因子^[11,12]. CYP7A1是核受体LXR α 的下游基因, LXR α 被其配体激活后, 先与维甲酸X受体(retinoid X receptor, RXR)形成异二聚体, 再作用到下游基因CYP7A1的顺式元件, 促进CYP7A1转录. 羟化胆固醇是LXR α 的内源性配体, 糖尿病状态下肝细胞可能生成大量羟化胆固醇, 从而激活LXR α ^[13]. 胆汁酸是内源性FXR配体, 二者结合后通过SHP、JNK和FGF-15抑制CYP7A1的表达^[14]. 本研究结果表明糖尿病状态下LXR α 表达增加, 而FXR、SHP表达减少, 使用考来烯胺后这种变化进一步增大, 因此DM组和CT组CYP7A1表达增加与核受体LXR α 的mRNA表达增加和FXR的mRNA表达减少有关. 有文献报道小鼠胆汁酸替代合成途径不受肠道胆汁酸含量的变化的影响^[15], 本研究中胆汁酸替代合成途径的关键酶CYP27A1在DM组和CT组均未发生变化, 说明胆汁酸替代合成途径没有发生改变, 因此, DM组和CT组胆汁酸合成增加是经典途径代谢增强引起的. ABCG5、ABCG8是ABC转运蛋白G家族的成员, 在二者的启动子部位存在LXR α 的顺式作用元件^[16]. 糖尿病状态下ABCG5、ABCG8表达增加, 促进肝细胞中的胆固醇排入胆汁, 使用考来烯胺后ABCG5、ABCG8的表达没有进一步增加, 其机制尚需进

一步研究.

总之, 考来烯胺在肠道与多种胆汁酸结合, 改变了胆汁酸肠肝循环状态, 能降低2型糖尿病大鼠血糖和血脂水平, 提高组织对胰岛素的敏感性. 2型糖尿病状态下肝胆汁酸合成增加是CYP7A1表达增加的结果, 而与CYP27A1无关, 考来烯胺治疗进一步促进了CYP7A1表达. 核受体LXR α 的mRNA表达增加, FXR的mRNA表达减少与CYP7A1表达增加有关.

4 参考文献

- Loomba R, Abraham M, Unalp A, Wilson L, Lavine J, Doo E, Bass NM. Association between diabetes, family history of diabetes, and risk of nonalcoholic steatohepatitis and fibrosis. *Hepatology* 2012; 56: 943-951
- 刘石平, 陈晶. 新诊断2型糖尿病患者合并非酒精性脂肪性肝病的危险因素分析. *中国实用内科杂志* 2007; 27: 205-207
- Prawitt J, Caron S, Staels B. Bile acid metabolism and the pathogenesis of type 2 diabetes. *Curr Diab Rep* 2011; 11: 160-166
- Takebayashi K, Aso Y, Inukai T. Role of bile acid sequestrants in the treatment of type 2 diabetes. *World J Diabetes* 2010; 1: 146-152
- 洪珊珊, 钱荣立. BAS作为降糖药-降糖机制、临床疗效及应用前景. *中国糖尿病杂志* 2012; 20: 235-238
- 邱冬妮, 孙旭, 钟良, 毛奇琦, 孙大裕. 考来烯胺对胆汁酸合成的基因调节作用. *肝脏* 2008; 13: 390-392
- Lee YS, Shin S, Shigihara T, Hahm E, Liu MJ, Han J, Yoon JW, Jun HS. Glucagon-like peptide-1 gene therapy in obese diabetic mice results in long-term cure of diabetes by improving insulin sensitivity and reducing hepatic gluconeogenesis. *Diabetes* 2007; 56: 1671-1679
- Polis TW, Noriega LG, Nomura M, Auwerx J, Schoonjans K. The bile acid membrane receptor TGR5: a valuable metabolic target. *Dig Dis* 2011; 29: 37-44
- Harach T, Polis TW, Nomura M, Maida A, Watanabe M, Auwerx J, Schoonjans K. TGR5 potentiates GLP-1 secretion in response to anionic exchange resins. *Sci Rep* 2012; 2: 430
- Norlin M, Wikvall K. Enzymes in the conversion of cholesterol into bile acids. *Curr Mol Med* 2007; 7: 199-218
- Wootton-Kee CR, Coy DJ, Athippozhy AT, Zhao T, Jones BR, Vore M. Mechanisms for increased expression of cholesterol 7 α -hydroxylase (Cyp7a1) in lactating rats. *Hepatology* 2010; 51: 277-285
- Shang Q, Pan L, Saumoy M, Chiang JY, Tint GS, Salen G, Xu G. An overlapping binding site in the CYP7A1 promoter allows activation of FXR to override the stimulation by LXR α . *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; 293: G817-G823
- Guan JZ, Tamasawa N, Murakami H, Matsui J, Yamato K, Suda T. Clofibrate, a peroxisome-proliferator, enhances reverse cholesterol transport through cytochrome P450 activation and oxysterol generation. *Tohoku J Exp Med* 2003; 201: 251-259
- Chiang JY. Bile acids: regulation of synthesis. *J Lipid Res* 2009; 50: 1955-1966
- Schwarz M, Russell DW, Dietschy JM, Turley SD. Alternate pathways of bile acid synthesis in the cholesterol 7 α -hydroxylase knockout mouse are not upregulated by either cholesterol or cholestyramine feeding. *J Lipid Res* 2001; 42: 1594-1603
- Freeman LA, Kennedy A, Wu J, Bark S, Remaley AT, Santamarina-Fojo S, Brewer HB. The orphan nuclear receptor LXR-1 activates the ABCG5/ABCG8 intergenic promoter. *J Lipid Res* 2004; 45: 1197-1206

■同行评价

本论文研究了考来烯胺在肠道与多种胆汁酸结合, 改变了胆汁酸肠肝循环状态, 能降低2型糖尿病大鼠血糖和血脂水平, 提高组织对胰岛素的敏感性. 结果科学, 结论明确, 实验证据较充足.

编辑 翟欢欢 电编 闫晋利

C-Jun蛋白在食管鳞癌组织中的表达及临床意义

赵俊刚, 任开明, 汤隽, 张磊

■背景资料

在许多肿瘤中都存在C-Jun蛋白的异常表达。本文探讨其在食管鳞癌患者组织中的表达及其与临床生物行为之间的关系。

赵俊刚, 任开明, 汤隽, 张磊, 中国医科大学附属盛京医院胸外科 辽宁省沈阳市 110004

赵俊刚, 博士, 副教授, 主要从事胸外伤、肺部肿瘤、食管肿瘤及纵隔肿瘤的基础与临床研究。

辽宁省博士科研启动基金资助项目, No. 20091108

作者贡献分布: 此课题由赵俊刚设计; 研究过程由赵俊刚与任开明操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由汤隽提供; 数据分析由赵俊刚、汤隽及张磊完成; 本论文写作由赵俊刚与张磊完成。

通讯作者: 赵俊刚, 副教授, 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胸外科。

zhaoy3@sj-hospital.org

电话: 024-66601267

收稿日期: 2012-10-23 修回日期: 2012-12-04

接受日期: 2012-12-13 在线出版日期: 2012-12-18

Significance of C-Jun expression in esophageal squamous cell carcinoma

Jun-Gang Zhao, Kai-Ming Ren, Jun Tang, Lei Zhang

Jun-Gang Zhao, Kai-Ming Ren, Jun Tang, Lei Zhang, Department of Thoracic Surgery, Shengjing Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China

Supported by: the Doctor Startup Foundation of Liaoning Province, No. 20091108

Correspondence to: Jun-Gang Zhao, Associate Professor, Department of Thoracic Surgery, Shengjing Hospital, China Medical University, 36 Sanhao Street, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. zhaoy3@sj-hospital.org

Received: 2012-10-23 Revised: 2012-12-04

Accepted: 2012-12-13 Published online: 2012-12-18

Abstract

AIM: To investigate the relationship between C-Jun protein expression and clinical biological behavior of esophageal squamous cell carcinoma (ESCC).

METHODS: Immunohistochemistry and RT-PCR were used to detect the expression of C-Jun protein and mRNA in 96 cases of ESCC tissue and matched tumor-adjacent esophageal tissue. The correlation between C-Jun protein expression and clinical biological behavior of ESCC was analyzed.

RESULTS: C-Jun expression in ESCC was significantly higher in ESCC tissue than in matched tumor-adjacent esophageal tissue (0.7703 ± 0.3330 vs 0.2546 ± 0.1328 , $t = -11.23$, $P < 0.05$). C-Jun

protein expression was correlated with lymph node metastasis and TNM stage in ESCC (both $P < 0.05$).

CONCLUSION: C-Jun protein is highly expressed in ESCC, which correlates with lymph node metastasis and TNM stage. This finding suggests that high expression C-Jun protein may be related to the occurrence and development of ESCC.

Key Words: Esophageal squamous cell carcinoma; C-Jun; TNM

Zhao JG, Ren KM, Tang J, Zhang L. Significance of C-Jun expression in esophageal squamous cell carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(35): 3580-3583

摘要

目的: 探讨C-Jun蛋白在食管鳞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)患者组织中的表达及其与临床生物行为之间的关系。

方法: 运用免疫组织化学及RT-PCR方法检测96例ESCC患者癌组织及相应癌旁组织中C-Jun蛋白的表达情况, 分析C-Jun蛋白表达与ESCC临床生物学行为的关系。

结果: C-Jun在ESCC患者癌组织中的表达(0.7703 ± 0.3330)高于癌旁组织(0.2546 ± 0.1328), 差异有统计学意义($t = -11.23$, $P < 0.05$), 并且C-Jun蛋白在ESCC组织中的表达与肿瘤淋巴转移及TNM分期相关($P < 0.05$)。

结论: C-Jun蛋白在ESCC组织中高表达, 与肿瘤淋巴转移及TNM分期相关, 可能与ESCC的发生发展相关。

关键词: 食管鳞癌; C-Jun蛋白; TNM分期

赵俊刚, 任开明, 汤隽, 张磊. C-Jun蛋白在食管鳞癌组织中的表达及临床意义. *世界华人消化杂志* 2012; 20(35): 3580-3583
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3580.asp>

■同行评议者

邓昊, 副教授, 江汉大学医学院病理学与病理生理学教研室

0 引言

食管鳞癌(esophageal squamous cell carcinoma,

ESCC)是世界第6大肿瘤死亡原因,在我国排名位于肿瘤死因的第4位,而目前在我国的食管癌的病理类型80%以上为鳞癌. C-Jun原癌基因属于核内转录因子,其编码的C-Jun蛋白是早期转录活化因子(activator protein 1, AP-1)家族的成员之一^[1],他可以结合在许多基因的启动子上参与基因转录的调控^[2],在许多肿瘤中都存在C-Jun蛋白的异常变化,其异常表达是肿瘤形成的重要因素之一^[3],但在食管鳞癌中的报道较少.为了探讨其在食管鳞癌患者组织中的表达及其与临床生物行为之间的关系,本实验应用免疫组织化学法和RT-PCR法检测ESCC患者肿瘤组织及其对应癌旁组织中C-Jun蛋白及mRNA的表达,并探讨与ESCC发生及转移的可能关系及临床意义.

1 材料和方法

1.1 材料 收集2006-09/2011-09中国医科大学附属盛京医院手术获得的食管鳞癌标本96例.患者术前均未接受放、化疗治疗.其中男60例,女36例,年龄42-77岁(平均62.3岁),其中I期20例,II期24例,III期32例,IV期20例,区域淋巴结转移66例,肿瘤 ≥ 3 cm 50例.全部肿瘤组织经病理诊断证实为鳞状细胞癌,癌旁组织标本来源于距肿瘤5 cm以上的食管黏膜组织.术中取得的新鲜标本一式三份,一份送病理检查,一份迅速切成0.5 cm \times 0.5 cm \times 0.8 cm大小组织块,放入灭酶、灭菌的冻存管中,-80℃保存备用,一份40 g/L甲醛固定后石蜡包埋. RT-PCR试剂盒为TakaRa公司产品,应用Premier 5.0软件设计引物,引物由上海生物工程公司提供.鼠抗人C-Jun多克隆抗体购自Santacruz公司,抗体工作浓度为1:150, SP-9001免疫组织化学试剂盒, PAB显色系统购自北京中杉金桥生物技术有限公司.

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化染色试剂、方法及结果判定:免疫组织化学检查此采用SP三步法,具体步骤参考说明书进行,以PBS缓冲液替代抗体作为空白对照,用已知阳性照片作阳性对照.所有的切片处理方式一致,同时所有步骤处理时间均相同.结果判定:由两位病理医师采用双盲法观察每张切片, C-Jun在ESCC组织中表达主要定位于细胞核,在癌旁组织中表达主要定位于细胞浆.阳性判定如下:首先按切片中瘤细胞染色强度计分:0分:细胞无显色;1分:呈淡黄色;2分:呈棕黄色;3分:呈棕褐色.再按切片中阳性癌细胞数所占的百分比计分:0分为阴性;1分为癌细胞

$\leq 10\%$; 2分为11%-50%; 3分为51%-74%; 4分为75%以上.染色强度与阳性细胞百分比的乘积 >3 为免疫组织化学反应阳性.

1.2.2 RT-PCR试剂、方法及结果判定: C-Jun上游引物: 5'-ATGACTGCAAAGATGGAAAC-GACC-3', 下游引物: 5'-GATGTGCCCCGTTGCTGGACTGGAT-3', 扩增片段长度为264 bp; 内参 β -actin上游引物: 5'-CGAGCGGGAAATCGTGCGTGACATTAAGGAGA-3', 下游引物: 5'-CGTCATACTCCTGCTTGCTGATCCACATCTGC-3', 扩增片段长度为479 bp. 组织RNA提取: 组织标本放入研钵中并倒入液氮研磨,组织磨碎后加入1 mL TRIzol研磨成粉状,移至1.5 mL的经DEPC水处理过的无菌离心管中,其余步骤严格按TRIzol RNA提取试剂说明书进行,所得RNA经紫外分光光度仪测定 A_{260} 和 A_{280} ,检测总RNA的纯度和含量. RT-PCR扩增: 逆转录总体体系为20 μ L严格按照试剂盒说明书步骤合成cDNA.以cDNA为模板进行PCR扩增.扩增条件为94℃预变性3 min; 94℃变性40 s,退火温度53.5℃,40 s,72℃延伸40 s,35个循环;72℃,7 min. PCR产物于15 g/L的琼脂糖凝胶做电泳,采用凝胶成像系统对电泳条带进行扫描和半定量分析,检测图像灰度值进行图像分析.用C-Jun目的基因与 β -actin光密度的比值来代表目的基因的相对表达含量.

统计学处理 应用SPSS11.0软件统计学软件,率的比较用 χ^2 检测,均数比较用 t 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 C-Jun蛋白在ESCC及癌旁组织中的表达: ESCC及对应癌旁组织中C-Jun蛋白呈阳性表达的患者分别为84例(87.50%), 14例(14.58%). ESCC及癌旁组织中C-Jun蛋白阳性表达率的差异有统计学意义($P<0.05$,图1).

2.2 C-Jun蛋白表达与ESCC组织临床生物学行为的关系 C-Jun蛋白表达与肿瘤淋巴转移及TNM分期及淋巴结转移相关($P<0.05$),与肿瘤大小无关($P>0.05$,表1).

2.3 C-Jun mRNA在ESCC及其对应癌旁组织中的表达 C-Jun mRNA在癌组织和癌旁组织中平均灰度值分别是 0.7703 ± 0.3330 和 0.2546 ± 0.1328 ,两者平均灰度值比较有统计学意义($t = -11.23$, $P<0.05$)(图2).表明C-Jun mRNA在ESCC组织中表达上调.

■研究前沿

本实验应用免疫组织化学法和RT-PCR法检测ESCC患者肿瘤组织及其对应癌旁组织中C-Jun蛋白和mRNA的表达,并探讨其与ESCC发生及转移的可能关系及临床意义.

■相关报道

侯巧燕等发现在舌鳞癌组织中的C-Jun蛋白表达显著高于正常舌组织和舌良性肿瘤组织($P<0.05$), C-Jun在淋巴结未转移组和临床I、II期组舌癌组织的表达(8/10)明显低于淋巴结转移组和临床III、IV组(10/10).

■创新盘点

检测ESCC患者肿瘤组织及其对应癌旁组织中C-Jun蛋白及mRNA的表达,并探讨与ESCC发生及转移可能的关系及临床意义。

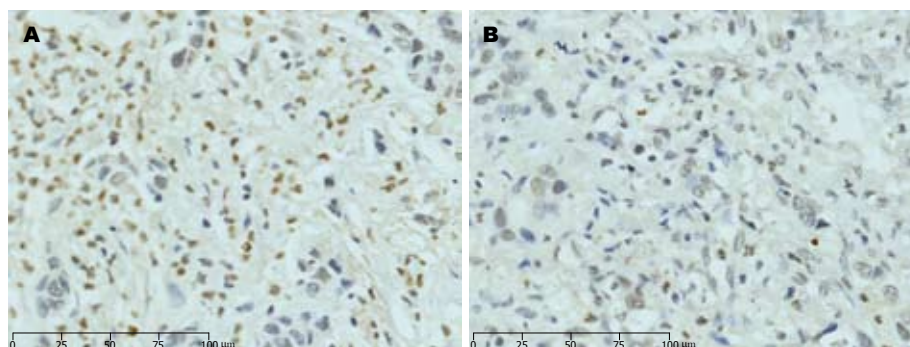


图1 C-Jun在食管鳞癌及癌旁组织中的表达($\times 400$)。A: 食管鳞癌; B: 癌旁组织。

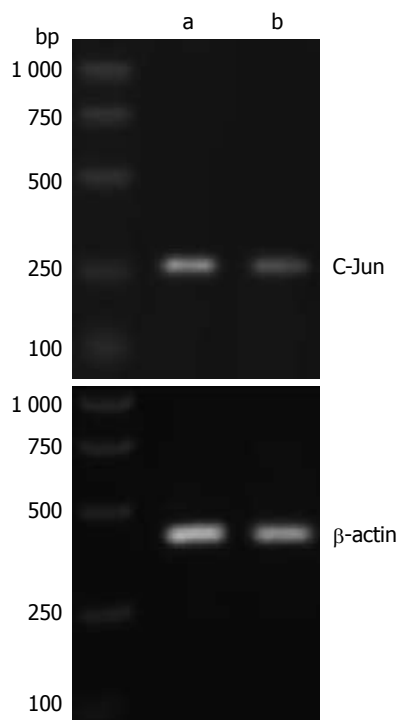


图2 C-Jun mRNA在癌旁组织及食管鳞癌中的表达。a: 食管鳞癌; b: 癌旁组织。

3 讨论

肿瘤的发生发展是一个多阶段、多因素的过程,其中一条重要途径就是各种刺激和因素作用于转录因子,继而转录因子控制其靶基因的表达^[4]。C-Jun基因是1987年Bohmann发现的转录因子,是从RNA肿瘤病毒中分离的癌基因。C-Jun基因编码的蛋白分子量均为39 kDa, C-Jun蛋白由C端的基本亮氨酸拉链(B-21P)DNA结合区和N端的转录激活区组成^[5]。C-Jun通过亮氨酸拉链与FOS形成异源二聚体或与其他C-Jun相关蛋白形成同源/异源二聚体来发挥其功能^[6]。C-Jun主要通过使许多靶基因转录失调而发挥细胞转录的作用,因刺激和诱导因素的不同,组织和细胞的不同会对不同的靶基因进行调节,所以产生的调节作用也不同^[7]。侯巧燕等^[8]发现在舌鳞癌组织的C-Jun蛋白表达显著高于正常舌组织和舌良

表1 C-Jun蛋白表达与食管鳞癌组织临床生物学行为的关系

临床病理指标	阳性数(<i>n</i>)	阳性率 η (%)	<i>P</i> 值
TNM分期			
早期 I + II	44	13(29.55)	<0.05
中晚期 III + IV	52	3(5.77)	
淋巴结转移			
阳性	66	2(3.03)	<0.05
阴性	30	15(50.00)	
肿瘤大小(cm)			
<3	46	9(19.57)	>0.05
≥ 3	50	8(16.60)	

性肿瘤组织($P<0.05$), C-Jun在淋巴结未转移组和临床 I、II 期组舌癌组织的表达(8/10)明显低于淋巴结转移组和临床 III、IV 组(10/10)。

为了解C-Jun基因及蛋白表达与ESCC的关系,我们采用免疫组织化学方法和RT-PCR法检测C-Jun在ESCC中的表达。表明两种方法检测结果一致,即C-Jun蛋白在ESCC组织中的表达明显高于癌旁组织中的表达($P<0.05$),提示了C-Jun可能参与了ESCC的发生发展机制,其异常表达增加了细胞的恶性转化程度和肿瘤的形成。C-Jun的主要作用就是编码癌基因的核蛋白,其表达的产物主要定位细胞核中,在遇到刺激后可以产生Ap-1,后者可以和DNA结合,然后通过转录水平来调节其下游相对应的靶基因表达,使其发生改变,进而参与细胞的增殖及转化^[9,10],这种情况在癌变的早期出现,促进细胞发生癌变^[11],这与我们的研究结果相吻合。同时在C-Jun蛋白表达与ESCC组织临床生物学行为的关系中的结果显示C-Jun表达与淋巴结转移及TNM分期相关($P<0.05$),这说明C-Jun在ESCC发生发展中有至关重要的作用,表明早期细胞增殖活跃,在ESCC中表达上调可能与C-Jun的泛素化有关^[12],其具体作用机制有待进一步研究。有淋巴结转移组的阳性率要低于无淋巴结转移组,说明

在ESCC的生物学特性中转移肿瘤和原发肿瘤是不同的. C-Jun的表达与ESCC的肿瘤大小无关.

C-Jun对细胞恶性转变的决定主要取决于刺激的性质, 细胞类型和微环境^[13], C-Jun作为AP-1转录因子的主要成分和细胞信号网络的枢纽, 与其他核因子共同调控细胞增殖、分化、凋亡和侵袭^[14,15], 因此C-Jun在ESCC中扮演何种角色主要与其调控的下游靶基因有关, 还有待于进一步研究, 但已证实其与食管鳞癌的发生关系密切. 如能阻断其表达或破坏其活性, 或许可以收到良好的治疗效果, 为抗肿瘤药物的研发提供一定的思路.

4 参考文献

- 1 刘亮, 左静, 赵丽, 王静, 郭建文, 刘江惠, 左连富. ABCG₂食管癌耐药细胞系Eca109/ABCG₂的建立. 解放军医学杂志 2010; 35: 32-34
- 2 Guma M, Firestein GS. c-Jun N-Terminal Kinase in Inflammation and Rheumatic Diseases. *Open Rheumatol J* 2012; 6: 220-231
- 3 Sundaresan NR, Vasudevan P, Zhong L, Kim G, Samant S, Parekh V, Pillai VB, Ravindra PV, Gupta M, Jeevanandam V, Cunningham JM, Deng CX, Lombard DB, Mostoslavsky R, Gupta MP. The sirtuin SIRT6 blocks IGF-Akt signaling and development of cardiac hypertrophy by targeting c-Jun. *Nat Med* 2012; 18: 1643-1650
- 4 Herrmann JL, Byekova Y, Elmets CA, Athar M. Liver kinase B1 (LKB1) in the pathogenesis of epithelial cancers. *Cancer Lett* 2011; 306: 1-9
- 5 Nagahara Y, Suzuki E, Sekine Y, Uchiro H, Yoshimi Y, Shinomiya T, Ikekita M. SUTAF, a novel β -methoxyacrylate derivative, promotes neurite outgrowth with extracellular signal-regulated kinase and c-jun N-terminal kinase activation. *Eur J Pharmacol* 2012; 694: 53-59
- 6 Wang S, Li KJ, Lin XW, Jiang CZ, Chen DH, Wu Q, Hua ZC. Using c-Fos/c-Jun as hetero-dimer interaction model to optimize donor to acceptor concentration ratio range for three-filter fluorescence resonance energy transfer (FRET) measurement. *J Microsc* 2012; 248: 58-65
- 7 Yang QH, Hu SP, Zhang YP, Ping HH, Yang HW, Chen TY, Liu HT. Effects of different therapeutic methods and typical recipes of Chinese medicine on activation of c-Jun N-terminal Kinase in Kupffer cells of rats with fatty liver disease. *Chin J Integr Med* 2012; 18: 769-774
- 8 侯巧燕, 王国华, 黄健, 侯菊花. 组织芯片检测舌鳞状细胞癌组织中KLF6、p21及c-Jun的表达. 中国现代医学杂志 2010; 20: 3534-3538
- 9 Zhou X, Meng Q, Xu X, Zhi T, Shi Q, Wang Y, Yu R. Bex2 regulates cell proliferation and apoptosis in malignant glioma cells via the c-Jun NH2-terminal kinase pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2012; 427: 574-580
- 10 Schonhaler HB, Guinea-Viniegra J, Wagner EF. Targeting inflammation by modulating the Jun/AP-1 pathway. *Ann Rheum Dis* 2011; 70 Suppl 1: i109-i112
- 11 Shaulian E. AP-1--The Jun proteins: Oncogenes or tumor suppressors in disguise? *Cell Signal* 2010; 22: 894-899
- 12 Takabe W, Li R, Ai L, Yu F, Berliner JA, Hsiai TK. Oxidized low-density lipoprotein-activated c-Jun NH2-terminal kinase regulates manganese superoxide dismutase ubiquitination: implication for mitochondrial redox status and apoptosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010; 30: 436-441
- 13 Han CY, Hien TT, Lim SC, Kang KW. Role of Pin1 in UVA-induced cell proliferation and malignant transformation in epidermal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2011; 410: 68-74
- 14 Arthur-Farraj PJ, Latouche M, Wilton DK, Quintes S, Chabrol E, Banerjee A, Woodhoo A, Jenkins B, Rahman M, Turmaine M, Wicher GK, Mitter R, Greensmith L, Behrens A, Raivich G, Mirsky R, Jessen KR. c-Jun reprograms Schwann cells of injured nerves to generate a repair cell essential for regeneration. *Neuron* 2012; 75: 633-647
- 15 刘世政, 王要军. 远端上游元件结合蛋白1在食管癌中的表达及意义. 解放军医学杂志 2012; 37: 449-451

■同行评价

本文具有一定指导意义.

编辑 田滢 电编 闫晋利

急诊重症患者的胃肠功能障碍与胃泌素水平

段宝民, 李兵, 王纪东

■背景资料

本组病例以合并胃肠功能障碍的急诊重症患者为背景, 研究血清胃泌素(GAS)水平与胃肠功能障碍严重程度和疾病严重程度的关系, 以期找到胃肠功能障碍早期预警指标。

段宝民, 李兵, 开封市第一人民医院急诊科(开封市120急救指挥中心) 河南省开封市 475000

王纪东, 开封市第一人民医院消化内科 河南省开封市 475000

段宝民, 副主任医师, 主要从事急诊内科和危重病的研究。

作者贡献分布: 段宝民与王纪东对此文所作贡献均等; 此课题由段宝民设计; 研究统计过程由段宝民、李兵及王纪东操作完成; 研究所用试剂、分析工具及病历资料由王纪东、李兵及段宝民提供; 数据分析由段宝民完成; 本论文写作由段宝民完成。

通讯作者: 段宝民, 副主任医师, 475000, 河南省开封市河道街85号, 开封市第一人民医院急诊科(开封市120急救指挥中心)。

dbm1@163.com

电话: 0378-5672915

收稿日期: 2012-08-28 修回日期: 2012-11-20

接受日期: 2012-12-03 在线出版日期: 2012-12-18

Relationship between serum gastrin levels and severe gastrointestinal dysfunction in emergency intensive care unit patients

Bao-Min Duan, Bing Li, Ji-Dong Wang

Bao-Min Duan, Bing Li, Department of Emergency, Kaifeng First People's Hospital (Kaifeng 120 Emergency Command Center), Kaifeng 475000, Henan Province, China

Ji-Dong Wang, Department of Gastroenterology, Kaifeng First People's Hospital, Kaifeng 475000, Henan Province, China

Correspondence to: Bao-Min Duan, Associate Chief Physician, Department of Emergency, Kaifeng First People's Hospital (Kaifeng 120 Emergency Command Center), 85 Hedao Street, Kaifeng 475000, Henan Province, China. dbm1@163.com

Received: 2012-08-28 Revised: 2012-11-20

Accepted: 2012-12-03 Published online: 2012-12-18

Abstract

AIM: To detect serum gastrin (GAS) levels and calculate APACHE II score in emergency intensive care unit (EICU) patients with gastrointestinal dysfunction and to analyze the clinical significance of GAS levels in the occurrence of early gastrointestinal dysfunction.

METHODS: Eighty-four patients were divided into three groups: gastrointestinal function impairment group ($n = 23$), early gastrointestinal failure group ($n = 22$), and gastrointestinal failure group ($n = 39$). Twenty healthy persons were used as normal controls. Serum GAS levels were

detected and APACHE II scores were calculated on the 1st, 3rd, and 5th day after admission, and patients were divided into three groups based on APACHE II score: < 15 , $15-25$, and > 25 .

RESULTS: Except that there was no significant difference in serum GAS levels between the gastrointestinal failure group and early gastrointestinal failure group on day 5 ($q = 2.456$, $P = 0.086$), significant differences were noted at all time points in pairwise comparisons between various groups (all $P < 0.05$). There was a significant correlation between GAS levels and severity of gastrointestinal functional disorders at various time points ($r = 0.855$, 0.895 , 0.682 , all $P = 0.000$). There was a significant difference in GAS levels among groups with different APACHE II scores ($P < 0.05$), and pairwise comparisons of these groups also showed significant differences (all $P < 0.05$). GAS levels were significantly correlated with APACHE II score ($r = 0.805$, $P = 0.000$).

CONCLUSION: Elevated GAS levels in early stage could help judge the presence and severity of early gastrointestinal dysfunction in EICU patients.

Key Words: Gastrin; Multiple organ dysfunction syndrome; Gastrointestinal dysfunction; Stress

Duan BM, Li B, Wang JD. Relationship between serum gastrin levels and severe gastrointestinal dysfunction in emergency intensive care unit patients. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(35): 3584-3587

摘要

目的: 检测合并胃肠功能障碍的急诊重症患者血胃泌素(gastrin, GAS)水平和对急诊重症患者APACHE II评分进行断面分析, 探讨GAS水平在胃肠功能障碍发生早期的临床意义。

方法: 共84例患者入选, 其中胃肠功能受损组23例, 胃肠衰竭早期组22例, 胃肠衰竭组39例, 设同期健康体检者20例为对照组, 84例患者在入院第1、3、5天进行血GAS水平检测和APACHE II评分, 按评分 <15 、 $15-25$ 、 >25 进行断面分组。

■同行评议者

阴赅宏, 研究员, 首都医科大学附属北京友谊医院感染与急救医学

结果: 除第5天胃肠衰竭组与胃肠衰竭早期组GAS水平两两比较无统计学意义外($q = 2.456$, $P = 0.086$), 第1、3、5天各组GAS水平两两比较均有统计学差异, $P < 0.05$; 第1、3、5天GAS与胃肠功能障碍严重程度分组有显著相关性($r = 0.855$ 、 0.895 、 0.682 , $P = 0.000$). 按APACHE II评分断面分组GAS水平总体比较有统计学差异, $P < 0.05$; 各组GAS水平两两比较均有统计学差异, $P < 0.05$; 各组GAS水平与APACHE II评分有显著相关性($r = 0.805$, $P = 0.000$).

结论: 急诊重症患者GAS水平与重症患者疾病严重程度相关, GAS水平可以早期提示胃肠功能障碍的存在和判定胃肠功能障碍严重程度.

关键词: 胃泌素; 多器官功能障碍综合征; 胃肠功能障碍; 应激

段宝民, 李兵, 王纪东. 急诊重症患者的胃肠功能障碍与胃泌素水平. 世界华人消化杂志 2012; 20(35): 3584-3587
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3584.asp>

0 引言

急诊重症患者有急剧起病和高死亡率特点, 胃肠功能障碍是重症患者常见并发症之一, 同时也是多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)的启动和致病原因^[1-4]. 研究表明, 机体遭受严重打击时各种应激因素作用于中枢神经和胃肠道, 通过神经、内分泌系统与消化系统相互作用, 血清胃泌素(gastrin, GAS)增高、产生胃黏膜病变^[5,6], 导致胃肠功能障碍; 本文通过检测合并胃肠功能障碍的急诊重症患者GAS水平和对急性生理学与慢性健康状况评分II(APACHE II)断面分析, 探讨GAS在胃肠功能障碍发生早期的临床意义.

1 材料和方法

1.1 材料 研究对象来自2011-01/2012-07我院急诊科EICU收治的急诊重症患者, 共有84例合并胃肠功能障碍的患者入选. 原发疾病为脓毒症休克、重症肺炎、多发伤、急性呼衰、急性心梗、心肺复苏术后等; 入选标准: 胃肠功能障碍诊断按照1995年中国危重病急救医学“MODS病情分期诊断及严重程度评分标准”^[7]; 按胃肠功能障碍严重程度分为胃肠功能受损组: 腹部胀气、肠鸣音减弱. 胃肠衰竭早期组: 高度腹部胀气、肠鸣音近于消失. 胃肠衰竭组: 麻痹性肠梗阻, 应激性溃疡出血; 每组具备2项中1项者即

可确诊. 排除标准: 急性脑血管病、颅脑外伤、消化道出血原因为药物、酗酒、原发胃肠疾病、出血性疾病、肿瘤、观察期内死亡, 近两周手术等. 经医院伦理委员会同意所有受试者均签署知情同意书.

1.2 方法

1.2.1 分组: 84例患者, 男46例, 女38例, 年龄52.6岁 \pm 11.3岁. 其中23例为胃肠功能受损组, 男11例, 女12例, 年龄48.8岁 \pm 10.6岁; 22例胃肠衰竭早期组, 男10例, 女12例, 年龄54.2岁 \pm 12.3岁; 39例为胃肠衰竭组, 男10例, 女12例, 年龄52.1岁 \pm 9.5岁. 在入院第1、3、5天对84例患者分别进行APACHE II评分, 形成252个断面, 按评分 <15 、 $15-25$ 、 >25 进行断面分组; 设同期体检科健康体检者20例为对照组.

1.2.2 试验及处理: 所有患者均接受ICU诊治, 初始予以禁食、胃肠减压, 应以质子泵抑制剂^[8,9], 胃肠道情况好转后给予少量肠内营养液; 所有患者入院后次日晨经前臂肘正中抽取静脉血标本2-3 mL, 抽后的静脉血立即分离血清并在2 h内进行测定(血清胃泌素放射免疫分析测定盒均由中国科学院原子能研究所提供); 同时对患者进行APACHE II评分. 在入院后第3、5天重新检测GAS水平和进行APACHE II评分. 对照组隔日抽取空腹静脉血3次做相应检测.

1.2.3 观察项目: 胃肠功能障碍临床表现: 腹部胀气、肠鸣音、麻痹性肠梗阻、应激性溃疡出血等; 常规监测体温、呼吸、心率, 并做血常规、血气分析等.

统计学处理 以SPSS17.0统计软件包进行统计学分析. 计量资料用mean \pm SD表示, 符合正态分布; 组间采用SNK总体比较 F 检验, 两两比较 q 检验; 双变量相关分析采用Pearson积差、Spearman等级相关系数 r 检验. $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 胃肠功能受损组、衰竭早期组、衰竭组 GAS、Plat、APTT、血乳酸比较 各组GAS、Plat、活化部分凝血活酶时间(activated partial thromboplastin time, APTT)、血乳酸间总体比较均有统计学差异, $P < 0.05$; 除第5天胃肠衰竭组与胃肠衰竭早期组两两比较无统计学意义外($q = 2.456$, $P = 0.086$), 第1、3、5天各组GAS水平两两比较均有统计学差异, $P < 0.05$; 第1、3、5天GAS水平与胃肠功能障碍严重程度分组有显著

■ 研发前沿

重症医学是当前疾病研究的热点, 合并胃肠功能障碍增加重症患者的死亡风险. 胃肠功能的保护和早期发现、治疗胃肠功能障碍在危重病的治疗中显得尤为重要, 找到简便、客观的早期识别方法是亟待研究的问题.

■创新盘点

通过本组病例的研究,揭示GAS水平与胃肠功能障碍严重程度和疾病严重程度的关系,以期找到胃肠功能障碍早期预警指标。

表 1 不同程度胃肠功能障碍患者的相关指标 (mean ± SD)

分组	n	胃泌素(ng/L)			Plat (×10 ⁹)	APTT (s)	血乳酸 (mmol/L)
		第1天	第3天	第5天			
对照组	20	52.67 ± 14.07	53.72 ± 13.48	54.18 ± 9.80	180 ± 25	28 ± 6	0.9 ± 0.5
胃肠功能受损组	23	96.70 ± 12.29	113.35 ± 12.85	109.37 ± 20.38	175 ± 27	31 ± 8	1.2 ± 0.6
胃肠衰竭早期组	22	117.11 ± 26.32	146.32 ± 28.25	213.11 ± 32.93	112 ± 33	33 ± 8	1.9 ± 0.8
胃肠衰竭组	39	180.58 ± 24.96	279.89 ± 36.86	224.19 ± 24.89	76 ± 35	38 ± 12	2.9 ± 1.8
		<i>F</i> = 180.106	<i>F</i> = 365.403	<i>F</i> = 293.430	<i>F</i> = 73.744	<i>F</i> = 5.777	<i>F</i> = 15.678
		<i>P</i> < 0.001	<i>P</i> < 0.001	<i>P</i> < 0.001	<i>P</i> < 0.001	<i>P</i> = 0.001	<i>P</i> < 0.001

表 2 APACHE II 评分断面分组与胃泌素水平 (mean ± SD)

分组	n	胃泌素(ng/L)
APACHE II 评分<15	122	110.54 ± 15.84
APACHE II 评分15-25	87	160.23 ± 18.67
APACHE II 评分>25	43	260.12 ± 16.45
		<i>F</i> = 1246.523
		<i>P</i> < 0.001

相关性($r = 0.855$ 、 0.895 、 0.682 , $P = 0.000$, 表1)。

2.2 APACHE II 评分断面分组后和GAS水平比较 按APACHE II 评分断面分组GAS水平总体比较有统计学差异, $P < 0.05$; 各组GAS两两比较均有统计学差异, $P < 0.05$ (表2); 各断面组GAS水平与APACHE II 评分有显著相关性($r = 0.805$, $P = 0.000$)。

3 讨论

GAS是胃酸分泌的主要调节激素, 也对胃黏膜具有一种生长因子功能。胃泌素的分泌可由胃泌素释放肽介导的途径所引起^[10]。GAS刺激细胞分泌生长抑素, GAS、组胺、生长抑素、甲状腺释放激素、内皮素-1等之间具有交互性作用。随着对危重病不断的研究, 胃肠功能在危重病的发展中起着重要的作用。胃肠功能障碍是MODS较常见并发症之一, 同时胃肠功能障碍也是MODS的启动和致病原因。在SIRS到MODS这一进程中, 失控的自我持续放大和自我破坏的全身性炎症反应使机体始终处于过度应激状态, 机体产生大量内源性促炎因子而形成“瀑布效应”。因过度应激被释放的肾上腺素能促进GAS、胰高血糖素、生长抑素的释放, 这种过度应激最终结果之一是引起急性胃肠黏膜病变^[11-13]。本组病例以合并胃肠功能障碍的急诊重症患者为背景, 研究GAS水平与胃肠功能障碍严重程度和疾病严重程度的关系, 以期找到胃

肠功能障碍早期预警指标。

重症患者血液的重新分布引起的肠缺血、缺氧, 肠黏膜损伤, 肠黏膜屏障功能下降, 通透性增加; 肠道细菌移位, 肠道细菌和内毒素进入血循环, 形成内毒素血症, 更加剧了炎症反应而进展为MODS。在以胃肠功能障碍严重程度分组的病例中Plat、APTT、血乳酸间总体比较均有统计学差异, 说明胃肠功能障碍严重程度可能和全身状况有关。GAS水平第1、3、5天与上述指标有一致的结果, 并且第1、3、5天GAS与胃肠功能障碍严重程度分组有显著相关性。从而提示GAS水平升高不仅仅是重症患者胃肠功能障碍的早期表现而且和胃肠功能障碍严重程度有关, 胃肠功能障碍越严重GAS水平越高^[14]。入院后第5天胃肠衰竭组与胃肠衰竭早期组两两比较无显著性差异的原因可能和针对胃肠功能衰竭的治疗、改善应激状态有关^[15]。

急性胃黏膜病变是应激所致的全身反应的一部分, 大量释放的促肾上腺皮质激素、糖皮质激素、肾上腺素等会引起胃肠激素水平的变化。同时应激状态下迷走神经兴奋也可引起GAS分泌增加, 在引起消化道应激损伤的诸多因素中, 胃酸分泌增多被认为是与应激有关的黏膜损伤发病机制的一个主要原因。因此重症患者易发生消化道出血可能与高GAS血症促使胃酸分泌增多, 导致胃黏膜损伤有关。从全身疾病严重程度断面分组分析, 不同APACHE II 评分各组间GAS水平统计学有显著差异, 且GAS水平与APACHE II 评分正相关^[16], 全身疾病越严重GAS水平越高。GAS水平的高低在一定程度上反映了机体的应激状态; GAS的水平可能成为早期胃肠功能障碍发生的检测指标, 从而指导临床对胃肠功能障碍的预测和提前预防提供参考。

由于胃肠道解剖结构及功能的复杂性, 胃肠功能衰竭目前尚无特效的药物治疗且治疗手段有限, 又因为胃肠功能受多因素的影响, 因此重

■应用要点

急诊重症患者GAS水平与重症患者疾病严重程度相关, GAS水平可以早期提示胃肠功能障碍的存在和判定胃肠功能障碍严重程度。

症患者早期检测GAS水平可能对早期发现胃肠功能障碍的存在和判定胃肠功能障碍严重程度有一定的帮助, 进而早期进行胃肠功能保护和治疗. 由于本组病例样本量较少, 且选材以合并胃肠功能障碍的重症患者为主, 因此存在一定的局限性, 今后可能会需要更大的样本量和以MODS患者为背景, 对GAS与胃肠功能障碍的关系做进一步的研究.

4 参考文献

- 1 王利营, 杨云生, 张雷, 蔡赐河, 蔡顺天, 曹晓鹏. 农村地区功能性胃肠病及其相关因素的调查研究. 解放军医学杂志 2012; 37: 876-878
- 2 白雪歌, 穆洪, 常文秀, 曹书华. 胃肠道功能不全在多器官功能障碍综合征中的意义. 中国综合临床 2007; 23: 318-319
- 3 韩红, 王厚力, 于学忠, 郭树彬. 胃肠功能障碍/衰竭与危重病. 中国医学科学院学报 2008; 30: 224-227
- 4 丁连安, 黎介寿. 胃肠道生理功能的再认识与肠衰竭. 世界华人消化杂志 2005; 13: 1650-1651
- 5 蓝宇, 尹洪民. 胃泌素和血管内皮生长因子在老年消化性溃疡中的表达及意义. 现代中西医结合杂志 2011; 20: 1723-1724
- 6 周育洋, 周金保, 郭敏, 王茁. 消化性溃疡患者治疗前后血清Gas、TGF- α 和IL-8检测的临床意义. 放射免疫学杂志 2007; 20: 527-528
- 7 王今达, 王宝恩. 多脏器功能失常综合征(MODS)病情分期诊断及严重程度评分标准. 中国危重病急救医学 1995; 7: 346-346
- 8 Leontiadis GI, Howden CW. The role of proton pump inhibitors in the management of upper gastrointestinal bleeding. *Gastroenterol Clin North Am* 2009; 38: 199-213
- 9 Yachinski PS, Farrell EA, Hunt DP, Reid AE. Proton pump inhibitors for prophylaxis of nosocomial upper gastrointestinal tract bleeding: effect of standardized guidelines on prescribing practice. *Arch Intern Med* 2010; 170: 779-783
- 10 Tu S, Chi AL, Lim S, Cui G, Dubeykovskaya Z, Ai W, Fleming JV, Takaishi S, Wang TC. Gastrin regulates the TFF2 promoter through gastrin-responsive cis-acting elements and multiple signaling pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; 292: G1726-G1737
- 11 崔进昌. 脑出血并发应激性溃疡患者血清胃泌素水平的变化. 中国实用神经疾病杂志 2010; 13: 66-67
- 12 叶月仙. 消化性溃疡患者治疗前后血清Gas、IL-6和IL-10检测的临床意义. 放射免疫学杂志 2009; 22: 473-475
- 13 厉琴, 王震凯, 仇学明, 樊荣, 罗红来, 王莹, 陶亮亮. 消化性溃疡患者外周血红细胞免疫功能的变化和血清胃泌素水平的相关性分析. 放射免疫学杂志 2011; 24: 494-496
- 14 何晃养. 危重症胃肠功能衰竭时两种胃肠激素水平变化的研究. 海南医学院学报 2009; 15: 1271-1274
- 15 高晨, 程刚, 刘耀明, 马宝平, 周海燕. 依达拉奉对颅脑损伤患者血清胃泌素水平及疗效的影响. 临床神经病学杂志 2009; 22: 222-223
- 16 侯大鹏, 韩承河, 李华卿, 张志强. 应激性溃疡与APACHE II评分的相关性研究. 中国急救医学 2006; 27: 827-828

■同行评价

本文的新意在于将患者按照胃肠功能障碍损伤、衰竭早期、衰竭期进行了分组观察, 并按APACHE II评分分组进行了分析, 发现早期GAS水平与胃肠功能障碍严重程度分组有显著相关性, 且GAS水平与APACHE II评分有显著相关性.

编辑 田滢 电编 闫晋利

肝细胞癌中*Wwox*基因启动子甲基化与蛋白表达的关系

陈军, 吴飞翔, 杨春, 覃思繁

■背景资料

Wwox 也称为 *wox1* 或 *for II*, 是一个候选抑癌基因, 已发现其在多种肿瘤中低表达或缺失。DNA 甲基化状态的改变是肝癌相关基因调控的一种方式, 属于肝癌发生的早期事件, *wwox* 的低表达和失活可能与其启动子区甲基化有关, 检测其启动子区甲基化状态可能对肝癌的发生机制、早期诊断、评价预后以及指导临床治疗有重要意义。

陈军, 覃思繁, 广西医科大学附属肿瘤医院病理科 广西壮族自治区南宁市 530021

吴飞翔, 广西医科大学附属肿瘤医院肝胆外科 广西壮族自治区南宁市 530021

杨春, 广西医科大学附属肿瘤医院实验研究部 广西壮族自治区南宁市 530021

陈军, 副主任医师, 主要从事肿瘤病理诊断及研究。

广西自然科学基金资助项目, No. 2012GXNSFAA053162

作者贡献分布: 陈军与吴飞翔对此文所作贡献均等; 此课题由陈军设计; 研究过程由陈军、吴飞翔及覃思繁操作完成; 研究所用试剂及分析工具由杨春提供; 数据分析由陈军与杨春完成; 本文写作由陈军完成。

通讯作者: 陈军, 副主任医师, 530021, 广西壮族自治区南宁市青秀区河堤路71号, 广西医科大学附属肿瘤医院病理科。

chenjun2826@163.com

电话: 0771-5332699

收稿日期: 2012-10-21 修回日期: 2012-11-09

接受日期: 2012-11-15 在线出版日期: 2012-12-18

Relationship between promoter methylation status and protein expression of the *wwox* gene in hepatocellular carcinoma

Jun Chen, Fei-Xiang Wu, Chun Yang, Si-Fan Qin

Jun Chen, Si-Fan Qin, Department of Pathology, the Affiliated Tumor Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Fei-Xiang Wu, Department of Hepatobiliary Surgery, the Affiliated Tumor Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Chun Yang, Experimental Research Institute, the Affiliated Tumor Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Supported by: the Guangxi Natural Science Foundation, No. 2012GXNSFAA053162

Correspondence to: Jun Chen, Associate Chief Physician, Department of Pathology, the Affiliated Tumor Hospital of Guangxi Medical University, 71 Hedi Road, Qingxiu District, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. chenjun2826@163.com

Received: 2012-10-21 Revised: 2012-11-09

Accepted: 2012-11-15 Published online: 2012-12-18

Abstract

AIM: To investigate the promoter methylation status and protein expression of the *wwox* gene in hepatocellular carcinoma (HCC).

METHODS: Promoter methylation status and protein expression of the *wwox* gene were ana-

lyzed in 60 cases of HCC tissues and matched tumor-adjacent liver tissues by methylation specific polymerase chain reaction (MSP) and immunohistochemistry (IHC), respectively.

RESULTS: The positive rate of *wwox* gene promoter methylation in tumor tissues was significantly higher than that in matched tumor-adjacent liver tissues (41.67% vs 8.33%, $P = 0.000$), while the positive rate of WWOX protein in tumor tissues was significantly lower than that in matched tumor-adjacent liver tissues (35.00% vs 70.00%, $P = 0.001$). Promoter methylation of the *wwox* gene was correlated with extrahepatic metastasis, tumor diameter, and tumor differentiation. WWOX protein expression was significantly correlated with clinical stage, tumor diameter, and tumor differentiation. Promoter methylation and protein expression of the *wwox* gene showed a significantly negative correlation ($\gamma = -0.408$, $P = 0.001$).

CONCLUSION: Promoter methylation is a crucial mechanism of inactivation of the *wwox* gene. Promoter methylation of the *wwox* gene might be involved in carcinogenesis, development, and progression of HCC.

Key Words: Hepatocellular carcinoma; Tumor suppressor gene; WWOX; Methylation; Immunohistochemistry

Chen J, Wu FX, Yang C, Qin SF. Relationship between promoter methylation status and protein expression of the *wwox* gene in hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(35): 3588-3593

摘要

目的: 探讨*wwox*基因启动子甲基化及蛋白表达与肝细胞性肝癌的关系。

方法: 通过甲基化特异性PCR(methylation specific polymerase chain reaction, MSP)方法及免疫组织化学(immunohistochemistry, IHC)法分别检测60例肝细胞性肝癌组织和癌旁组织中*wwox*基因启动子甲基化状态和蛋白表达水平。

■同行评议者

王阔, 教授, 中国人民解放军第三军医大学第三附属医院

结果: 癌组织及癌旁组织中 *wwox* 基因启动子甲基化阳性率分别为 41.67%(25/60) 和 8.33%(5/60) ($P = 0.000$). WWOX 蛋白在癌和癌旁组织中的表达具有显著性差异 [35.00%(21/60) vs 70.00%(42/60), $P = 0.001$]. *wwox* 基因启动子甲基化和蛋白表达与肝外转移、肿瘤直径、肿瘤细胞分化密切相关 ($P = 0.007, 0.014, 0.011$); WWOX 蛋白表达与临床分期、肿瘤直径、肿瘤细胞分化密切相关 ($P = 0.018, 0.023, 0.001$). *wwox* 基因启动子甲基化与蛋白表达显著负相关 ($\gamma = -0.408, P = 0.001$).

结论: 启动子区甲基化是 *wwox* 基因失活的重要机制. *wwox* 启动子区异常甲基化可能参与了肝癌的发生发展, 在肝癌的进展发挥重要作用.

关键词: 肝细胞癌; 抑癌基因; WWOX; 甲基化; 免疫组织化学

陈军, 吴飞翔, 杨春, 覃思繁. 肝细胞癌中 *wwox* 基因启动子甲基化与蛋白表达的关系. 世界华人消化杂志 2012; 20(35): 3588-3593

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3588.asp>

0 引言

原发性肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)的发生是一个涉及多基因、多步骤的复杂过程, 相关癌基因的激活和抑癌基因的失活的致病模式逐渐为人们所认识. 真核生物基因组DNA甲基化模式的异常改变可以导致细胞癌变, 如抑癌基因或错配修复基因启动区的甲基化会使基因发生沉默或失活, 从而诱发肿瘤的形成^[1]. DNA甲基化状态的改变是肝癌相关基因调控的一种方式, 属于肝癌发生的早期事件. 因此, 揭示其规律对肝癌的发生机制、早期诊断、评价预后以及指导临床治疗有重要意义. *wwox* (WW domain-containing oxidoreductases), 也称为 *wox1* 或称 *for II*, 是2000年由Bednarek等^[2]鉴定出的一个候选抑癌基因, 已被发现在多种肿瘤中低表达或缺失, 可能与肿瘤的发生进展有密切关系. 我们检测肝细胞癌组织中 *wwox* 启动子区甲基化状态和蛋白的表达情况, 并对他们的临床病理特征进行分析, 探讨 *wwox* 启动子区甲基化状态与肝癌发生、发展的关系.

1 材料和方法

1.1 材料 60例肝癌组织, 取自广西医科大学附属肿瘤医院2008-08/2009-08肝癌患者手术切除的

标本, 经术后病理诊断为肝细胞癌. 其中男42例, 女18例, 年龄22-65岁, 平均年龄42.3岁 \pm 12.1岁, 中位年龄46岁. 所有患者术前均未行任何治疗. 按UICC 2002年TNM分期, 根据按Edmondeon病理分级标准进行组织学分级. 每例均取癌及对应癌旁肝组织(距肿瘤边缘至少2 cm). 手术切下后一部分迅速放入液氮速冻, 之后移至-80 °C冰箱冻存用于DNA的提取, 备甲基化特异性PCR(methylation specific polymerase chain reaction, *MSP*)检测; 另一部分立即放入40 g/L甲醛内固定后石蜡包埋, 用于HE染色及免疫组织化学染色. WWOX浓缩型鼠抗人单克隆抗体购自美国Santa Cruz公司; 即用型快速免疫组织化学MaxVision™检测试剂盒及DAB染色试剂盒均购自福州迈新生物技术有限公司; 平衡酚、氯仿、蛋白酶K、无水乙醇、乙酸钠、对苯二酚购自上海试剂厂; 引物购自上海生物工程公司; EZDNA Methylation Kit购自Zymo公司; TaqDNA聚合酶及甲基化特异性PCR引物购自上海捷瑞生物技术有限公司.

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学: 免疫组织化学(immunohistochemistry, IHC)检查采用酶标聚合物法(labeled dextran polymer, LDP). 操作步骤按照说明书进行, WWOX抗体稀释浓度为1:100. 每批染色均设已知阳性切片作阳性对照, 用磷酸盐缓冲液(phosphatic buffered saline, PBS)代替一抗作阴性对照.

1.2.2 *wwox* 基因启动子甲基化检测: 所选标本按常规进行蛋白酶K消化、酚/氯仿抽提DNA, 紫外分光光度计定量, $A_{260/280}$ 值均为1.7-1.8. 抽提后DNA保存在-20 °C冰箱备用. 基因组DNA的亚硫酸氢盐修饰用Zymo公司EZDNA Methylation Kit, 按说明书操作. 分别设计针对启动子区非甲基化和甲基化DNA引物, 非甲基化特异性引物: 上游5'-TATGGGTGTTGTTTTTTTAHTT-3', 下游5'-CAATCTCCACAATATCACAACA-3', 扩增产物347 bp; 甲基化特异性引物: 上游5'-TATGGGCGTCGTTTTTTTAGTT-3', 下游5'-CAATCTCCGCAAT ATCGCGACA-3', 扩增产物347 bp. PCR反应体系(12.5 μ L): 10 \times Buffer 2.50 μ L, 25 mmol/L MgCl₂ 1.50 μ L, 10 μ mol/L Dntp 0.50 μ L, 5 U/ μ L TaqE 0.40 μ L, 灭菌水13.1 μ L, 甲基化或非甲基化特异性上下游引物10 μ mol/L各1.0 μ L, 模板DNA 5 μ L. PCR反应条件: 95 °C预变性5 min; 95 °C 40 s, 55 °C 45 s, 72 °C

■ 研发前沿

目前国内外对各种肿瘤中WWOX的表达情况的研究成为热点, 而其启动子区甲基化可能是WWOX失活的重要方式之一, 值得进一步研究.

■ 相关报道

目前 *WWOX* 基因启动子区甲基化在食管癌、乳腺癌、胃癌等肿瘤中的陆续报道说明其与这些肿瘤的发生与进展密切相关。

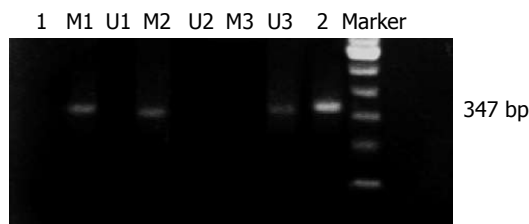


图1 肝癌组织 *WWOX* MSP电泳结果. 1: 阴性对照; M1, U1: 甲基化标本, 甲基化扩增条带阳性; M2, U2: 甲基化标本, 甲基化扩增条带阳性; M3, U3: 非甲基化标本, 非甲基化扩增条带阳性; 2: 甲基化扩增条带阳性对照.

45 s, 共40个循环; 72 °C 延伸10 min. 以已做出甲基化阳性组织作为阳性对照, 未经甲基化酶处理的正常人外周血DNA做非甲基化阳性对照, 阴性对照用灭菌双蒸水代替DNA模板进行PCR. 取5 μ L PCR反应产物, 2 μ L 6 \times Loading buffer, 于2%琼脂糖凝胶上电泳, 自动电泳凝胶成像分析系统扫描分析.

1.2.3 结果判定: (1)免疫组织化学检测: *WWOX* 表达产物定位于胞质, 以胞质出现棕黄色颗粒为阳性细胞. 由两位医师采用双盲法观察每张切片. 判断阳性反应根据以下两个方面: A按切片中显色癌细胞数比例计分: 0分无癌细胞显色; 1分显色癌细胞占癌细胞总数<25%; 2分显色细胞超过切片中癌细胞总数的25%但<50%; 3分显色细胞超过切片中细胞总数的50%. B按切片中癌细胞显色强度计分: 0分细胞无显色; 1分呈浅黄色(弱染色); 2分呈棕黄色(中等染色); 3分呈棕褐色(强染色). A+B>3分记为阳性, \leq 3分记为阴性; (2)甲基化特异性产物扩增产物存在为甲基化阳性. 反之, 其不存在且特异性扩增产物非甲基化为阴性则判定为甲基化阴性.

统计学处理 采用SPSS11.0统计学 χ^2 检验, 相关性分析采用Spearman法, $P<0.05$ 为有统计学意义.

2 结果

2.1 *Wwox* 基因启动子甲基化状态 肝癌组织及癌旁组织中 *Wwox* 基因启动子甲基化检测阳性率分别为41.67%(25/60)和8.33%(5/60)(图1), 两组间差异有统计学意义($P=0.000$). 癌组织中 *Wwox* 甲基化阳性率在肝外转移、肿瘤大小、肿瘤分化程度等分组中比较有显著性差异($P<0.05$), 在临床分期、脉管癌栓、术后复发、肿瘤个数、HBsAg、血清AFP等组间差异无统计学意义($P>0.05$, 表1).

2.2 *WWOX* 蛋白表达 *WWOX* 蛋白表达阳性为胞

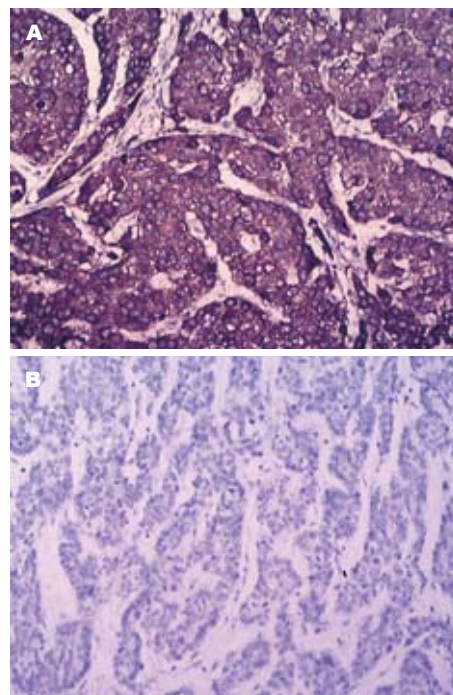


图2 *WWOX*在肝癌组织中的表达($\times 100$). A: 肝癌组织 *WWOX*表达阳性; B: 肝癌组织 *WWOX*表达阴性.

浆出现棕黄色染色(图2). 肝癌组织及癌旁组织中 *WWOX* 蛋白阳性率分别为35.00%(21/60)和癌旁70.00%(42/60), 两组间差异有统计学意义($P=0.000$). *WWOX* 蛋白表达阳性在临床分期、肿瘤直径、肿瘤细胞分化等分组间比较有显著性差异($P<0.05$); 在脉管癌栓、术后复发、肝外转移、肿瘤个数、HBsAg及血清AFP值等分组中比较没有显著性差异($P>0.05$, 表1).

2.3 *Wwox* 基因启动子甲基化状态与蛋白表达的关系 39例蛋白表达阴性的标本中有22例启动子区甲基化阳性(56.41%), 25例甲基化阳性标本中有22例蛋白表达阴性(88.00%). 经Spearman相关性分析, 启动子甲基化与蛋白表达呈显著负相关($\gamma=-0.408$, $P=0.001$, 表2).

3 讨论

Wwox 基因是2000年由Bednarek等^[2]应用鸟枪基因测序技术结合对感兴趣区域对应的转录子进行分离并分析的方法鉴定出的一个新基因. *Wwox* 基因位于染色体16q23.3-24.1区域并跨越了整个常见染色体脆性部位FRA16D. *WWOX* 的氨基末端有两个WW结构域, WW功能域主要与蛋白之间相互作用有关, 与 *WWOX* 作用有关的蛋白如P53^[3]、P73^[4]、ERBB4^[5]、C-Jun^[6]等均作为信号转导途径的关键点, 说明 *WWOX* 在抑制转录、细胞生长和诱导凋亡等信号转导途径中

表 1 $wwox$ 基因启动子甲基化状态和蛋白表达情况与肝癌临床病理特征的关系

临床参数	<i>n</i>	$wwox$ 启动子区甲基化	χ^2 值	<i>P</i> 值	WWOX蛋白表达阳性	χ^2 值	<i>P</i> 值
临床分期							
I – II 期	43	15	2.873	0.09	19	5.629	0.018
III 期	17	10			2		
血管癌栓							
有	24	13	2.571	0.109	5	3.529	0.06
无	36	12			16		
术后复发							
有	25	14	3.623	0.057	7	0.923	0.337
无	35	11			14		
肝外转移							
有	10	8	7.255	0.007	1	3.296	0.069
无	50	17			20		
肿瘤直径 (cm)							
≥5	32	18	6.000	0.014	7	5.192	0.023
<5	28	7			14		
肿瘤个数							
1	41	16	0.372	0.542	13	0.617	0.432
≥2	19	9			8		
血清AFP (μg/L)							
≥400	37	17	0.727	0.394	11	1.178	0.278
<400	23	8			10		
HBsAg							
阳性	39	18	0.923	0.337	11	2.261	0.133
阴性	21	7			10		
肿瘤细胞分化							
I – II 级	26	6	6.524	0.011	15	10.385	0.001
III – IV 级	34	19			6		

■ 创新盘点

国内外关于肝细胞癌组织中 $wwox$ 启动子区甲基化状态及蛋白表达情况的报道较少。本文通过甲基化特异性PCR(MSP)方法及免疫组织化学(IHC)法分别检测60例肝细胞性肝癌组织和癌旁组织中 $wwox$ 基因启动子甲基化状态和蛋白表达水平, 分析探讨 $wwox$ 基因启动子甲基化及蛋白表达与肝细胞性肝癌的临床病理参数关系。

表 2 肝癌组织中 $wwox$ 基因启动子甲基化状态和蛋白表达的关系 (*n*)

WWOX蛋白表达	$wwox$ 启动子区甲基化		合计
	阴性	阳性	
阴性	17	22	39
阳性	18	3	21
合计	35	25	60

有重要作用。研究显示, $wwox$ 和 $thit$ 基因在许多肿瘤中表达量减低或缺失, 提示在肿瘤形成中, $wwox$ 与 $thit$ 基因的作用相似, 参与了肿瘤的发生与进展^[7]。

CpG岛的高甲基化是肿瘤中普遍现象, 是除突变和缺失外肿瘤中抑癌基因失活的第3种机制^[8]。Iliopoulos等^[9]通过MSP检测肺鳞癌组织、侵袭性乳腺癌、膀胱癌组织及对应的癌旁组织, 发现WWOX在肿瘤中表达减少和DNA甲基化有关。Wang等^[10]研究结果显示在20例乳腺癌组织中WWOX甲基化率为55%, 而对应的癌旁组

织未检测出甲基化, 而且WWOX发生CpG岛甲基化的mRNA及蛋白表达显著低于非甲基化的mRNA及蛋白表达。Gao等^[11]研究食管鳞状细胞癌发现 $wwox$ 启动子及外显子1(exon1)超甲基化在发育不良的上皮中表达, 且在食管鳞状细胞癌中WWOX的甲基化频率显著高于相应的癌旁组织, 并且与具有上消化道癌家族史密切相关。在我们的研究中, 用MSP法检测出肝癌组织 $wwox$ 启动子区甲基化阳性率为41.67%(25/60), 与国外的研究结果类似, 同时我们检测癌组织及癌旁组织中甲基化阳性率存在显著性差异,

■应用要点

研究发现肝细胞癌组织及癌旁组织中 *wwox* 基因启动子甲基化状态及 WWOX 蛋白表达在癌和癌旁组织中有显著差异; *wwox* 基因启动子甲基化与肝外转移、肿瘤直径、肿瘤细胞分化密切相关; WWOX 蛋白表达与临床分期、肿瘤直径、肿瘤细胞分化密切相关。 *wwox* 基因启动子甲基化与蛋白表达呈显著负相关, 说明肝癌中启动子区甲基化是 *wwox* 基因失活的重要机制, 针对性的检测其甲基化状态, 采取相应的基因靶向治疗, 将为肝癌的检测和治疗提供新的途径。

提示其甲基化可能参与了肝癌的发生过程。Yan 等^[12]用 MSP 法检测 *wwox* 基因启动子区域的甲基化状态显示 50 例胃癌手术标本中 35 例存在启动子区域甲基化, 并进一步通过对幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*, *H. pylori*) 感染的胃癌细胞系的研究发现 *H. pylori* 感染与 *wwox* 基因甲基化有密切关系。而 HBsAg 是引起肝细胞癌的重要危险因素之一, 其引发的炎症反应与癌变之间的关系一直是研究的热点。我们对 HBsAg 阳性及阴性的肝癌组织进行了对比分析, 但未发现 HBsAg 感染与 *wwox* 基因甲基化有密切关系。

Donati 等^[13]检测到 85% 非小细胞性肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 中 WWOX 蛋白表达减少或缺失, 并且 WWOX 表达缺失与肺癌的侵袭性、病理分级密切相关, 证实 WWOX 对 NSCLC 的肿瘤形成过程及肿瘤预后有重要意义。Kuroki 等^[14]使用免疫组织化学方法检测 81 例原发性胃腺癌, 证实 65% 的腺癌组织中 WWOX 表达减少, 并发现其表达与肿瘤的组织学分级密切相关。Lan 等^[15]用免疫组织化学法检测 112 例卵巢癌组织中 WWOX 表达情况, 有 32 例表达缺失, WWOX 的表达缺失与 ER、PR 阴性、FIGO 分期和淋巴结转移密切相关。而我们的研究显示 *wwox* 启动子区甲基化与肝外转移、肿瘤直径、肿瘤细胞分化有显著相关, 其蛋白表达显示亦与临床分期、肿瘤直径、肿瘤细胞分化有显著相关, 提示其可能在肝癌的进展中也有重要作用。 *wwox* 启动子区甲基化是否在不同肿瘤中作用的机制重点不同, 是在肿瘤的发生或在肿瘤的发展或在两者都起着重要作用有待试验研究进一步证明。

此外, 我们的研究发现, *wwox* 启动子区甲基化与其蛋白表达呈显著负相关, 说明在肝癌中启动子区甲基化是 *wwox* 基因失活的重要机制之一。值得一提的是我们发现部分甲基化阳性的病例中也检测到了非甲基化特异性产物的扩增, 这可能是癌组织中混杂了非甲基化的肝细胞或炎症细胞; 另一种可能是 2 个等位基因的半甲基化状态 (hemimethylation)。此外, 部分甲基化阳性病例免疫组织化学结果也呈阳性, 可能是因为基因转录的表达抑制依赖 CpG 岛甲基化的积累剂量。有报道指出 CpG 岛甲基化只有达到一定比例 (>60%) 时才足以完全抑制基因表达, 而低比例的甲基化只能降低基因的转录表达^[16]。

总之, 肝癌发病机制的是一个复杂的过程, DNA 甲基化是其中一个重要的环节。 *wwox* 基因

在抑制肿瘤形成中起着重要作用, 肝癌中启动子区甲基化是 *wwox* 基因失活的重要机制, 针对性的检测其甲基化状态, 采取相应的基因靶向治疗, 将为肝癌的检测和治疗提供新的途径。

4 参考文献

- Robertson KD, Wolffe AP. DNA methylation in health and disease. *Nat Rev Genet* 2000; 1: 11-19
- Bednarek AK, Laflin KJ, Daniel RL, Liao Q, Hawkins KA, Aldaz CM. WWOX, a novel WW domain-containing protein mapping to human chromosome 16q23.3-24.1, a region frequently affected in breast cancer. *Cancer Res* 2000; 60: 2140-2145
- Chang NS, Hsu LJ, Lin YS, Lai FJ, Sheu HM. WW domain-containing oxidoreductase: a candidate tumor suppressor. *Trends Mol Med* 2007; 13: 12-22
- Aqeilan RI, Pekarsky Y, Herrero JJ, Palamarchuk A, Letofsky J, Druck T, Trapasso F, Han SY, Melino G, Huebner K, Croce CM. Functional association between Wwox tumor suppressor protein and p73, a p53 homolog. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 4401-4406
- Määttä JA, Sundvall M, Junttila TT, Peri L, Laine VJ, Isola J, Egeblad M, Elenius K. Proteolytic cleavage and phosphorylation of a tumor-associated ErbB4 isoform promote ligand-independent survival and cancer cell growth. *Mol Biol Cell* 2006; 17: 67-79
- Gaudio E, Palamarchuk A, Palumbo T, Trapasso F, Pekarsky Y, Croce CM, Aqeilan RI. Physical association with WWOX suppresses c-Jun transcriptional activity. *Cancer Res* 2006; 66: 11585-11589
- O'Keefe LV, Richards RI. Common chromosomal fragile sites and cancer: focus on FRA16D. *Cancer Lett* 2006; 232: 37-47
- Olatunji BO, Sawchuk CN, Lee TC, Lohr JM, Tolin DF. Information processing biases in spider phobia: application of the Stroop and "White Noise" Paradigm. *J Behav Ther Exp Psychiatry* 2008; 39: 187-200
- Iliopoulos D, Guler G, Han SY, Johnston D, Druck T, McCorkell KA, Palazzo J, McCue PA, Baffa R, Huebner K. Fragile genes as biomarkers: epigenetic control of WWOX and FHIT in lung, breast and bladder cancer. *Oncogene* 2005; 24: 1625-1633
- Wang X, Chao L, Jin G, Ma G, Zang Y, Sun J. Association between CpG island methylation of the WWOX gene and its expression in breast cancers. *Tumour Biol* 2009; 30: 8-14
- Guo W, Wang G, Dong Y, Guo Y, Kuang G, Dong Z. Decreased expression of WWOX in the development of esophageal squamous cell carcinoma. *Mol Carcinog* 2011 Dec 27. [Epub ahead of print]
- Yan J, Zhang M, Zhang J, Chen X, Zhang X. Helicobacter pylori infection promotes methylation of WWOX gene in human gastric cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2011; 408: 99-102
- Donati V, Fontanini G, Dell'Omodarme M, Prati MC, Nuti S, Lucchi M, Mussi A, Fabbri M, Basolo F, Croce CM, Aqeilan RI. WWOX expression in different histologic types and subtypes of non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 884-891
- Kuroki T, Tajima Y, Furui J, Kanematsu T. Common fragile genes and digestive tract cancers. *Surg Today* 2006; 36: 1-5
- Lan C, Chenggang W, Yulan B, Xiaohui D, Junhui Z, Xiao W. Aberrant expression of WWOX protein in epithelial ovarian cancer: a clinicopathologic and

- immunohistochemical study. *Int J Gynecol Pathol* 2012; 31: 125-132
- 16 Belinsky SA, Nikula KJ, Palmisano WA, Michels R, Saccomanno G, Gabrielson E, Baylin SB, Herman

JG. Aberrant methylation of p16(INK4a) is an early event in lung cancer and a potential biomarker for early diagnosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 11891-11896

■同行评价

本文具有一定的创新性, 为肝癌的发生、进展及治疗提供了可靠理论依据。

编辑 田滢 电编 闫晋利

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

• 消息 •

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)

孤立性胰腺结核国内文献的荟萃分析

李俊霞, 王化虹, 尹洪芳, 刘新光

■背景资料

目前在全球范围内, 由于耐药结核菌的产生与扩展, 人体免疫缺陷病毒感染增加以及不少国家结核病控制规则的不完善, 使得全球结核病病情呈明显上升趋势。常见的有肺结核、淋巴结核、骨结核、肠结核, 而胰腺结核非常罕见, 而病灶局限仅有胰腺、相邻器官及周围淋巴结受累。孤立性胰腺结核更少报道。国内外的报道大多为个案, 发病率尚无确切统计。

■同行评议者

宋振顺, 教授, 西京医院肝胆外科; 赵刚, 副教授, 协和医院胰腺病研究所

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

尹洪芳, 北京大学第一医院病理科 北京市 100034

作者贡献分布: 文献检索、数据收集、论文撰写由李俊霞与王化虹完成; 此课题由李俊霞与王化虹设计; 病理资料整理由尹洪芳完成; 刘新光参与论文修改。

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

收稿日期: 2012-11-01 修回日期: 2012-12-01

接受日期: 2012-12-16 在线出版日期: 2012-12-18

Solitary pancreatic tuberculosis: A case report and literature review

Jun-Xia Li, Hua-Hong Wang, Hong-Fang Yin, Xin-Guang Liu

Jun-Xia Li, Hua-Hong Wang, Xin-Guang Liu, Department of Gastroenterology, the First Hospital of Peking University, Beijing 100034, China

Hong-Fang Yin, Department of Pathology, Peking University First Hospital, Beijing 100034, China

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

Received: 2012-11-01 Revised: 2012-12-01

Accepted: 2012-12-16 Published online: 2012-12-18

Abstract

AIM: To analyze the clinical characteristics of and diagnostic methods for solitary pancreatic tuberculosis.

METHODS: A case of solitary pancreatic tuberculosis was reported. In addition, 48 similar cases in published Chinese literature were identified to conduct a literature review. The data were identified by searching CNKI and CBM databases and browsing the relevant reference lists. The keywords were "pancreatic tuberculosis" and "tuberculosis and pancreas". The clinical manifestations were analyzed by descriptive methods. Criteria for the diagnosis of solitary pancreatic tuberculosis were: all lesions localized only in the pancreas and neighboring tissues, no other detectable foci of tuberculosis, no history of tuberculosis, having a clear chest radiograph, and a positive histological diagnosis.

RESULTS: Predominant symptoms consisted of abdominal pain (63.27%), weight loss (59.18%), fever (36.73%), jaundice (34.69%), and abdominal distention/bloating, without night sweats. Most patients were misdiagnosed with pancreatic tumors, and other misdiagnoses were pseudo-pancreatic cysts, chronic cholecystitis with pancreatitis, and cholecystic tumors. Erythrocyte sedimentation rate was elevated in 85.71% (12/14) of cases; PPD test was strongly positive in 55.56% (5/9); and CA19-9 was mildly elevated in 25% (2/8). CT scans showed a pancreatic mass (31/41) with heterogeneous hypodensity focus (9/41), calcification (6/41), or peripancreatic nodal enlargement (14/41). Ultrasound or CT-guided biopsies were performed in 8.16% (4/49) of cases, including one undergoing EUS-guided fine needle aspiration for cytologic diagnosis. Laparotomy was performed in 45 of 49 cases, and most received combined antituberculosis therapy. Anti-tuberculosis therapy was successful in 42 of 49 cases.

CONCLUSION: Solitary pancreatic tuberculosis is a rare condition with no specific clinical manifestations. The possibility of solitary pancreatic tuberculosis should be considered in patients presenting with a pancreatic mass and irregular pancreas enlargement. Diagnosis should be made cytologically, and laparotomy can be avoided if a definitive diagnosis was established before surgery. Solitary pancreatic tuberculosis can be effectively cured by antituberculosis therapy.

Key Words: Solitary; Pancreatic; Tuberculosis; Literature review

Li JX, Wang HH, Yin HF, Liu XG. Solitary pancreatic tuberculosis: A case report and literature review. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(35): 3594-3598

摘要

目的: 探讨孤立性胰腺结核的临床特征和诊断方式。

方法: 报告1例孤立性胰腺结核, 并结合国内

34篇文献共49例孤立性胰腺结核病例进行荟萃分析。

结果: 49例病例中男25例, 女24例, 男女之比1:1.08。平均年龄36.65岁±12.73岁。平均病程4.06 mo±3.15 mo。临床主要表现为腹痛(63.27%)、体质量下降(59.18%)、发热(36.73%)、黄疸(34.69%)等, 其他表现有腹胀、恶心呕吐、盗汗、乏力等。实验室检查呈血沉增快(85.71%)、PPD阳性(5/9)、CA19-9升高(2/8)。在CT检查中75.61%的病例显示有胰腺多发低密度结节样病灶, 多伴有胰腺周围淋巴结增大(34.15%), 少数表现有钙化影像、肝内外胆管及胰管扩张和胰腺假性囊肿等。在B超检查中51.06%的病例显示有胰腺肿大和胰腺不规则低回声区, 少数病例伴有胰管扩张、肝内外胆管扩张等。确诊前55.1%的病例被误诊为胰腺肿瘤, 其他误诊为胰腺假性囊肿、胰腺炎、胆总管癌等。全部病例均经病理组织学检查确诊, 其中CT或B超引导下活体组织检查各2例, 45例经剖腹探查术后经病理学确诊, 病理组织学可见干酪样坏死或干酪样肉芽肿形成, 82.22%的病例伴有胰腺周围淋巴结结核。正规的抗结核药物治疗有效者占95.92%, 其中剖腹探查病例除抗结核药物治疗外, 选择病灶引流(15.56%)、局部病变切除(8.89%)和胰十二指肠切除(8.89%)的手术方式。

结论: 孤立性胰腺结核极为少见, 确诊前多被误诊。临床上缺乏典型的结核中毒症状, 多表现有腹痛、体质量下降和血沉增快, 少数表现有发热、黄疸和乏力等。易被误诊为胰腺肿瘤、胰腺炎等。腹部CT等影像学检查是重要的诊断手段, 确诊主要依据病理组织学检查。抗结核药物对孤立性胰腺结核治疗有效, 必要时可选择手术治疗。

关键词: 孤立性; 胰腺; 结核; 荟萃分析

李俊霞, 王化虹, 尹洪芳, 刘新光. 孤立性胰腺结核国内文献的荟萃分析. 世界华人消化杂志 2012; 20(35): 3594-3598
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3594.asp>

0 引言

胰腺结核是一种少见的肺外结核, 临床表现复杂且缺乏特异性, 易被忽视。孤立性胰腺结核更为罕见, 是指胰腺受侵犯而无全身其他器官结核病灶, 该病更易被误诊为胰腺肿瘤或胰腺炎症而延误治疗。目前虽报道病例数在不断增多, 但仍以个案报道为主^[1]。本文对我院诊治的1例胰腺结核患者和收集近20年国内34篇文献报道

共49例病例的临床资料进行荟萃分析, 旨在提高临床医师对孤立性胰腺结核的诊治水平。

1 材料和方法

1.1 材料 我院收治孤立性胰腺结核病例1例。收集1994-2009年国内正式刊物公开发表的胰腺结核病例报告, 符合胰腺结核的诊断标准的文献34篇, 其中符合孤立性胰腺结核诊断的病例48例。

1.2 方法 以“胰腺结核”为检索词, 检索CNKI中国期刊全文数据库及CBM光盘数据库, 并辅以文献追溯、手工检索等方法, 选择经手术或活检病理证实的、病灶仅局限在胰腺的、可伴有相邻器官及周围淋巴结受累的胰腺结核病例, 排除具有其他部位结核病灶的胰腺结核病例, 剔除无全文的、数据不完整的、综述性的、重复发表的文献资料, 结合本病例资料共49例进行病例分析。

2 结果

2.1 我院收治病例情况 男, 44岁, 因间断发热2 mo入院。2 mo前无明显诱因出现发热, 最高体温39.2℃, 伴畏寒、寒战、乏力、关节肌肉酸痛, 无盗汗、无腹痛、腹泻, 体质量降低约3 kg。既往无免疫抑制疾病史, 无应用免疫抑制剂或激素史。查体: 无浅表淋巴结肿大; 双肺呼吸音清, 未闻及明显干、湿啰音; 心律齐; 腹平软, 无压痛, 肠鸣音活跃; 双下肢无浮肿。入院后检查: Hb 143 g/L, WBC $6.09 \times 10^9/L$, NE 76.1%, PLT $132 \times 10^9/L$, ESR 21 mm/h, CRP 39.57 mg/L; 黄色软便, 镜检未见异常, 粪隐血(-); 丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT) 16 IU/L, 谷氨酸转氨酶(glutamate transaminase, AST) 16 IU/L, 乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH) 133 IU/L, Alb 41.8 g/L, A/G 1.81, ALP 60 IU/L, GGT 43 IU/L, TBIL 7.4 $\mu\text{mol/L}$, GLU 5.88 mmol/L; 痰找结核菌(-); PPD(-); 血清抗结核杆菌抗体IgM(-), IgG<200.0 U/mL, CEA、CA19-9正常。X线胸片两肺未见异常; 腹部B检查超声示门静脉轻度增宽, 腹膜后多发淋巴结肿大, 慢性胆囊炎; 腹部增强CT检查示胰腺头颈部占位性病变, 侵及肝动脉, 平扫可见胰头部肿大, 增强后可见多发低密度病灶, 周边可见环形强化, 伴腹腔及腹膜后多发淋巴结肿大, 考虑胰腺癌可能性大(图1); 腹部MRCP检查示胰腺头部不均匀信号, 呈团块状, 伴周围淋巴结肿大, 考虑胰头肿瘤可能性大; 超声内镜示胰头部稍肿大, 可见直径约2 cm, 边界

■ 研发前沿

胰腺位于腹膜后, 易为腹内其他脏器结核病灶所掩盖被忽视; 胰腺对结核杆菌存在特殊的屏障, 结核菌血行扩散很少侵犯胰腺组织; 胰酶可抵御结核菌的定植, 阻止其对胰腺的损害; 胰腺结核感染不排除结核杆菌耐药及变异的因素。胰腺结核的感染途径不清, 可能与肠道结核感染有关。

■ 相关报道

孤立性胰腺结核极为少见, 确诊前多被误诊。临床上缺乏典型的结核中毒症状, 多表现有腹痛、体质量下降和血沉增快, 少数表现有发热、黄疸和乏力等。易被误诊为胰腺肿瘤、胰腺炎等。腹部CT等影像学检查是重要的诊断手段, 确诊主要依据病理组织学检查。抗结核药物对孤立性胰腺结核治疗有效, 完善检查争取术前诊断, 尽量避免手术治疗。

■应用要点

胰腺结核可以与肺结核等其他结核感染并存,但孤立性胰腺结核易被误诊,提高对孤立性胰腺结核的认识对临床医师有重要的临床意义。

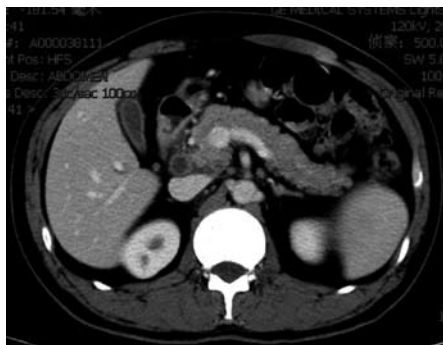


图1 胰腺结核腹部增强CT. 可见胰头部肿大, 多发低密度病灶, 周边可见环形强化, 伴腹腔及腹膜后多发淋巴结肿大。

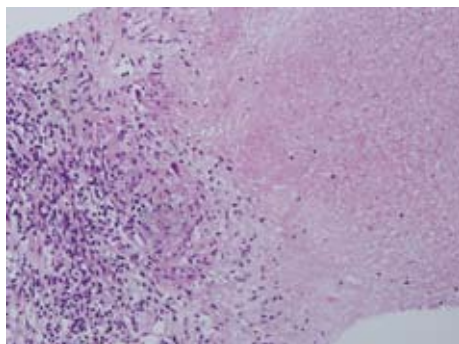


图2 胰腺结核病理表现(HE × 20). 胰腺周围淋巴结活检病理可见片状干酪样坏死, 周围可见少数多核巨细胞、淋巴细胞及纤维母细胞。

不清、回声不均匀的低回声区, 末端胆管扩张, 胰管未见明显扩张, 超声内镜引导下行胰腺穿刺活体组织检查, 病理组织学见纤维素性物、凝血及胶原纤维样组织, 少许中性粒细胞, 呈胰腺炎性改变; B超引导下行腹膜后淋巴结穿刺, 活体病理组织学检查可见片状干酪样坏死, 周围可见少数多核巨细胞、淋巴细胞及纤维母细胞见图2, 抗酸染色(+), PAS(-), 符合结核。给予链霉素、乙胺丁醇和雷米封抗结核药物治疗, 未再出现发热, ESR、CRP下降, 体质量增加4 kg。半年及1年后复查: 腹部Bus显示腹腔淋巴结较前缩小。腹部增强CT示: 胰头部病灶消失, 胰腺颈部病变缩小, 可见钙化灶。腹部淋巴结变化不明显。ESR 3 mm/h, CRP 1.99 mg/L。最终诊断: 孤立性胰腺结核。

2.2 文献收集病例一般情况 入组49例, 男25例, 女24例, 男女之比1:1.08。年龄15-70岁, 平均36.65岁±12.73岁。病程10 d-12 mo, 平均4.06 mo±3.15 mo。45例术前曾被误诊, 多被误诊为胰腺肿瘤(55.1%), 其他误诊为胰腺假性囊肿、慢性胆管炎、胰腺炎、胆总管癌和胆囊癌等。

2.3 临床表现 49例病例中伴有腹痛症状者占

63.27%、体质量下降者占59.18%、发热者占36.73%、黄疸者占34.69%、腹胀者占24.49%、恶心呕吐者占10.20%、乏力者占8.16%、盗汗者占6.125%、上消化道出血者占2.04%。40.82%的病例有腹部压痛, 12.24%的病例可触及腹部包块, 多位于右上腹。17例出现黄疸的病例中有7例ALT明显高于正常2倍以上(平均315.11 IU/L±278.90 IU/L), 未出现黄疸者肝酶正常。有血沉检查记录的病例中, 有85.71%的病例血沉增快(21-105 mm/h), 9例行PPD试验的病例中, 有5例呈强阳性。所有病例均未报告血糖异常。8例CA19-9检测病例中有2例轻度升高。

2.4 影像学检查 有CT检查报告的41例病例中, 32例(75.61%)表现为胰腺多发低密度结节灶, 伴有不规则强化, 5例呈弥漫性胰腺增大, 14例显示胰腺周围淋巴结增大(34.15%), 6例有胰腺或胰腺周围淋巴结的钙化, 5例肝内外胆管扩张, 2例胰管扩张。4例行MRCP检查者均发现有胰腺占位、不同程度的肝内外胆管及胰管扩张。4例ERCP检查者有3例显示为胆管狭窄, 2例显示胰管狭窄, 多为外压性改变。47例行B超检查显示胰腺内不规则低回声区者24例(51.06%)、胰腺肿大者8例、胰管扩张者3例、肝内外胆管扩张者4例。

2.5 病理学检查 49例患者中经CT或B超引导下活体组织检查明确诊断各2例, 其他45例患者均经剖腹探查手术后经病理学检查确诊。术中发现伴胰腺结核伴周围淋巴结结核者37例(82.22%), 胰腺呈弥漫性肿胀、伴有结节或质地变硬者19例(42.22%), 病灶分布在胰头部20例(44.44%), 头体部3例、胰体部2例, 胰尾部1例。病理组织学检查见干酪样坏死或干酪样肉芽肿形成, 其中5例患者抗酸染色阳性。

2.6 治疗方式 49例患者均接受了正规的抗结核药物治疗, 有效率为95.92%。其中4例采取单纯抗结核药物治疗, 45例选择手术联合抗结核药物治疗, 手术方式选择病灶引流(15.56%)、局部病变切除(8.89%)和胰十二指肠切除(8.89%)等。在随访6 mo以上的20例患者中, 有7例CT或B超检查显示胰腺包块减小或消失, 1例治疗情况记录不详, 1例患者因术后并发胰漏、胆漏及上消化道大出血死亡。

3 讨论

目前, 由于全球范围内耐药结核杆菌的产生与扩展, 人体免疫缺陷病毒感染的增加及有些国

国家对结核病控制机制的不完善,使得全球结核病的病情呈明显上升趋势,常见有肺结核、淋巴结核、骨结核和肠结核等。胰腺结核比较罕见,国内外多为个案报道,发病率尚无确切统计,其原因可能为:(1)胰腺位于腹膜后,易被腹内其他脏器结核病灶掩盖或忽视;(2)胰腺对结核杆菌存在特殊的屏障,结核杆菌血行扩散很少侵犯胰腺组织;(3)胰酶可抵御结核杆菌的定植,阻止其对胰腺的损害;(4)不排除结核杆菌耐药及其变异的因素^[2]。孤立性胰腺结核的感染途径:孤立性胰腺结核是结核病灶仅局限在胰腺、相邻器官及其周围淋巴结的一类胰腺结核,临床少有报道。孤立性胰腺结核的感染途径目前尚不清楚,可能与肠道结核杆菌感染有关^[3],也可能由于淋巴结常是结核的好发部位,胰腺周围淋巴结及淋巴管十分丰富,通过直接扩散,导致感染^[4]。孤立性胰腺结核病理学改变与其他器官的结核病灶一样,早期发生结核性结节,逐渐出现结节干酪样坏死、液化及融合,最终形成冷脓肿。结核结节可累及胰腺大部或整个胰腺,亦可波及胰腺组织周围淋巴结。部分患者尽管在胰腺未发现结核的典型病变,但由于结核杆菌的免疫毒性反应,引起广泛的纤维组织增生及钙盐沉积等,导致胰腺增大、质地变硬、凹凸不平,呈现反应性慢性胰腺炎的表现^[5],此类呈增殖性结核病理表现的患者临床上更容易被误诊。

孤立性胰腺结核的临床表现:由于缺乏发热、盗汗、消瘦等典型的结核中毒症状,因此容易导致延误胰腺结核的诊断。孤立性胰腺结核多以腹痛为主要临床表现,呈上腹部间歇性或持续性隐痛,可伴有恶心、呕吐等非特异性消化不良症状及腰背部疼痛等,无明显的症状加重或缓解因素。胰腺结核病灶侵犯周围器官可能出现胆管受压、黄疸等表现,压迫胰管可能出现胰腺炎表现,压迫十二指肠可能出现腹胀、恶心呕吐,长期压迫脾静脉可能出现脾静脉血栓、脾大、食管下段静脉曲张、区域性门脉高压症及上消化道出血等^[6]。本组患者多以腹痛、腹胀、黄疸等症状为主,结核中毒症状不典型,盗汗、乏力等更为少见,全身结核好发部位与器官均未发现有结核病灶,因此被误诊为胰腺肿瘤、胰腺假性囊肿、胆囊炎、胰腺炎、胆总管及胆囊癌等,与文献报道类似^[7]。

孤立性胰腺结核的诊断方法:(1)实验室检查:孤立性胰腺结核可血沉增快。PPD皮肤试验已广泛用于结核杆菌感染患者的筛查,具有一

定的敏感性和特异性。在本组9例行PPD试验的病例中,有5例呈强阳性,认为有活动性结核或潜在结核杆菌感染的依据,给予抗结核药物治疗^[8]。CA19-9常作为胰腺癌的肿瘤标记物,但也可见于结核杆菌感染^[9]。本组部分病例表现有CA19-9增高;(2)影像学检查:胰腺结核的影像学需与胰腺癌、胰腺假性囊肿、胰腺脓肿等相鉴别。腹部CT和超声检查可显示胰腺肿大、回声不均匀增强或胰腺占位性病变,CT检查可显示胰腺多灶性低密度肿块,增强扫描可发现边缘有强化,中央为低密度的坏死病灶,并可伴有胰腺周围淋巴结的增大、坏死液化或钙化斑,活动性淋巴结核的典型CT表现为环状强化的肿大淋巴结,愈合过程或愈合后出现钙化,可作为诊断胰腺结核的依据。胰腺周围淋巴结坏死液化呈现低密度,是与胰腺癌淋巴结转移的重要特征^[10,11]。胰腺癌与胰腺结核均可表现为胰腺占位性病变和胰管的破坏,但胰腺癌早期即可有胰管的破坏,而胰腺结核多侵犯胰腺实质,胰管受累较轻。当胰腺结核导致胆管狭窄时,可选择胰胆管造影检查,包括ERCP、MRCP。ERCP有助于观察胰腺病变、判断胰管受累的情况,还可获取胆汁、胰液涂片行细菌培养和细胞学检查。胰腺占位病变若有以下情况存在时应考虑胰腺结核,如中青年、发病缓慢、病程长、有结核中毒表现、血沉增快、结核抗体阳性、PPD阳性和CA19-9阴性等。本组有CT检查报告的41例病例中,32例表现为胰腺多发低密度结节灶,并伴有不规则强化,多数呈弥漫性胰腺增大、胰腺周围淋巴结增大或钙化,少数表现为肝内外胆管扩张、胰管扩张或外压性改变;(3)病理组织学检查:影像学检查及实验室检查^[12]虽然对胰腺癌与胰腺结核鉴别诊断有所帮助,但无法得到确切的诊断,确诊仍需有病理组织学的证据。剖腹探查手术、超声内镜或B超引导经皮细针穿刺活检^[13,14]是临床上获取病理诊断的重要手段。本组病例中均经活体组织或手术标本获得干酪样坏死或干酪样肉芽肿形成的证据,做出胰腺结核的最后诊断。本文报告的个案病例活体病理组织学检查呈现胰腺炎的表现,尽管在胰腺没显示有典型的干酪样坏死或干酪样肉芽肿形成等结核病灶,但依据胰腺周围淋巴结有结核性干酪样坏死,经抗结核药物治疗后体温正常,血沉、CRP下降,体质量增加,胰腺结核病灶缩小并出现钙化而确定诊断。

孤立性胰腺结核的治疗:胰腺结核在明确

■名词解释

孤立性胰腺结核:是指结核病灶仅局限在胰腺内、或可伴有相邻器官及周围淋巴结受累的胰腺结核。

■同行评价

文章数据充分, 分析合理, 讨论深入, 整体写作质量很高, 具有一定的临床指导意义。

诊断后, 应积极采取综合性抗结核治疗, 包括休息、营养支持、对症性处理、合理的抗结核药物治疗(早期、规律、全程、适量、联合用药), 多可取得满意的疗效。手术治疗可以选择结核病灶切除、结核脓肿引流和姑息手术等治疗方式^[15]。本组49例患者均接受了正规的抗结核药物治疗, 其中4例采取单纯抗结核药物治疗, 45例选择手术联合抗结核药物治疗, 均获得较为满意的效果, 有效率为95.92%。

孤立性胰腺结核极为少见, 诊断前多被误诊为胰腺肿瘤、胰腺假性囊肿等。一般缺乏典型的结核中毒症状, 临床上多表现有腹痛、体质量下降和血沉增快, 少数可表现有发热、黄疸和乏力等。诊断前多被误诊为胰腺肿瘤、胰腺假性囊肿等。CT检查是重要的诊断手段, 确诊主要依据病理组织学。抗结核药物对孤立性胰腺结核治疗有效。

4 参考文献

- 1 Woodfield JC, Windsor JA, Godfrey CC, Orr DA, Officer NM. Diagnosis and management of isolated pancreatic tuberculosis: recent experience and literature review. *ANZ J Surg* 2004; 74: 368-371
- 2 Xia F, Poon RT, Wang SG, Bie P, Huang XQ, Dong JH. Tuberculosis of pancreas and peripancreatic lymph nodes in immunocompetent patients: experience from China. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 1361-1364
- 3 Franco-Paredes C, Leonard M, Jurado R, Blumberg HM, Smith RM. Tuberculosis of the pancreas: report of two cases and review of the literature. *Am J Med Sci* 2002; 323: 54-58
- 4 谢建强. 胰腺结核和胰周淋巴结结核的CT表现. 当代医学 2009; 15: 32-33
- 5 Stock KP, Riemann JF, Stadler W, Rösch W. Tuberculosis of the pancreas. *Endoscopy* 1981; 13: 178-180
- 6 Schneider A, von Birgelen C, Dührsen U, Gerken G, Rünzi M. Two cases of pancreatic tuberculosis in nonimmunocompromised patients. A diagnostic challenge and a rare cause of portal hypertension. *Pancreatol* 2002; 2: 69-73
- 7 Chaudhary A, Negi SS, Sachdev AK, Gondal R. Pancreatic tuberculosis: still a histopathological diagnosis. *Dig Surg* 2002; 19: 389-392
- 8 Mario C. Raviglione, Richard J. O'Brien. Tuberculosis. chapter 150. Dennis LK, Anthony S.F, Dan LL, Eugene B, Stephen LH, Jameson J L. Harrison's principles of internal medicine; 16th edition, The McGraw-Hill Companies, ISBN 0-07-140235-7, 2004: 956-965
- 9 Panzuto F, D'Amato A, Laghi A, Cadau G, D'Ambra G, Aguzzi D, Iannaccone R, Montesani C, Caprilli R, Delle Fave G. Abdominal tuberculosis with pancreatic involvement: a case report. *Dig Liver Dis* 2003; 35: 283-287
- 10 任小波, 刘恒顺. 胰腺结核的影像学诊断(附4例报告). 临床放射学杂志 1997; 16: 158-160
- 11 Arora A, Mukund A, Garg H. Isolated pancreatic tuberculosis: a rare occurrence. *Am J Trop Med Hyg* 2012; 87: 1-2
- 12 Kim SH, Cho OH, Park SJ, Ye BD, Sung H, Kim MN, Lee SO, Choi SH, Woo JH, Kim YS. Diagnosis of abdominal tuberculosis by T-cell-based assays on peripheral blood and peritoneal fluid mononuclear cells. *J Infect* 2009; 59: 409-415
- 13 王鹏, 刘鲁明, 孟志强, 陈震, 徐益语, 林钧华, 王龙富, 黄雅芳, 王柏华. 超声引导细针穿刺细胞学检查在胰腺癌诊断中的应用. 临床肿瘤学杂志 2007; 12: 915-918
- 14 Cheng R, Grieco VS, Shuhart MC, Rulyak SJ. EUS-guided FNA diagnosis of pancreatic tuberculosis. *Gastrointest Endosc* 2006; 64: 660-663
- 15 Rolny P, Falk A, Olofsson J. Obstructive jaundice due to isolated tuberculosis of the pancreas: endoscopic treatment instead of surgery? *Endoscopy* 2006; 38: 90-92

编辑 田滢 电编 闫晋利

结肠镜下电切治疗高风险息肉的预处理

刘杰民, 李国胜, 胡浩, 刘哲, 韩斌, 叶莉娜

刘杰民, 胡浩, 刘哲, 韩斌, 叶莉娜, 贵州省人民医院消化内镜中心 贵州省贵阳市 550002

李国胜, 贵阳医学院附属医院普通外科 贵州省贵阳市 550004 刘杰民, 副主任医师, 博士, 主要从事消化内镜的诊断和治疗。

作者贡献分布: 刘杰民与李国胜对本文作出主要贡献; 李国胜提供思路、方法并修改论文; 刘杰民进行内镜下治疗及论文写作; 胡浩与刘哲配合内镜治疗及收集资料; 韩斌与叶莉娜配合内镜治疗。

通讯作者: 李国胜, 副主任医师, 550004, 贵州省贵阳市贵医街28号, 贵阳医学院附属医院普通外科, liujm0851@126.com

收稿日期: 2012-10-25 修回日期: 2012-11-19

接受日期: 2012-12-03 在线出版日期: 2012-12-18

Colonoscopic electrosurgical resection of high-risk polyps: Pretreatment methods

Jie-Min Liu, Guo-Sheng Li, Hao Hu, Zhe Liu, Bin Han, Li-Na Ye

Jie-Min Liu, Hao Hu, Zhe Liu, Bin Han, Li-Na Ye, Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang 550002, Guizhou Province, China

Guo-Sheng Li, Department of General Surgery, Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou Province, China

Correspondence to: Guo-Sheng Li, Associate Chief Physician, Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, 28 Guiyi Street, Guiyang 550004, Guizhou Province, China. liujm0851@126.com

Received: 2012-10-25 Revised: 2012-11-19

Accepted: 2012-12-03 Published online: 2012-12-18

Abstract

AIM: To discuss the pretreatment techniques and methods for colonoscopic electrosurgical resection of high-risk polyps.

METHODS: This study comprised 131 patients, who had a total of 145 high-risk colorectal polyps, including wide-pedicle polyps, large polyps, and those with a hyperemic surface, obvious blood vessels through the base, or poor endoscopic exposure). For wide-pedicle polyps (pedicle diameter > 1 cm), nylon snare ligation was performed before electrosurgical resection. For large pedunculated polyps (>2 cm, pedicle diameter < 1 cm), titanium clipping was performed before electrosurgical resection. For 2.0-3.0 cm wide-base/Artie polyps, fully lifting of polyps was achieved by basal submucosal injection of liquid before the resection of polyps.

For polyps with a hyperemic surface, obvious blood vessels through the base, or poor endoscopic exposure, trial colonoscopic resection was initially performed. If the resection was difficult, immediate laparoscopic treatment was given. Intestinal bleeding, intestinal perforation and other complications were recorded.

RESULTS: Nylon snare ligation was performed in 10 polyps, metal titanium clamping in 32 polyps, basal submucosal injection in 60 polyps, colonoscopic resection in 31 polyps, and laparoscopic resection in 12 polyps. No intestinal bleeding, intestinal perforation or other severe complications occurred.

CONCLUSION: Effective pretreatment can improve the management of high-risk intestinal polyps, and endoscopic treatment can improve the safety of treatment and avoid the occurrence of intestinal bleeding, intestinal perforation and other complications.

Key Words: High-risk polyps; Colonoscopy; High-frequency electric resection; Nylon snare; Metal titanium clamp; Complications

Liu JM, Li GS, Hu H, Liu Z, Han B, Ye LN. Colonoscopic electrosurgical resection of high-risk polyps: Pretreatment methods. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(35): 3599-3602

摘要

目的: 探讨结肠镜下电切治疗高风险息肉的预处理技巧、方法和效果。

方法: 本组患者131例,发现高风险息肉共145枚(包括大肠宽蒂息肉、大息肉、表面充血显著、基底有明显血管通过、内镜下暴露不佳等息肉);对于大肠宽蒂息肉(蒂部直径>1 cm)电切治疗前用尼龙圈套器套扎息肉蒂部;对于>2 cm有蒂息肉电切前(蒂部直径<1 cm)金属钛夹闭息肉蒂部;对于2.0-3.0 cm广基/亚蒂息肉先于息肉基底部黏膜下注射,充分抬举后进行切除;对于息肉表面充血显著、基底有明显血管通过、内镜下暴露不充分的大息肉,术前联系手术室,先试行结肠镜下切除,如果

■背景资料

近年来,随着内镜设备的发展、内镜医师水平的提高,高风险息肉的检出率明显升高,如何安全、微创治疗成为研究的热点。

■同行评议者

顾国利, 副主任医师, 中国人民解放军空军总医院普通外科; 刘宝林, 教授, 中国医科大学附属盛京医院

■创新盘点

针对不同结直肠息肉,采取相应科学、合理的预处理方法,提高了内镜下高频电切除的安全性,降低了风险。

切除困难,立即腹腔镜治疗,观察肠出血、肠穿孔等并发症的发生。

结果: 经尼龙圈套器套扎后切除10枚,经金属钛夹钳夹后切除32枚,经息肉基底部黏膜下注射后切除60枚,于手术室结肠镜切除31枚,于手术室腹腔镜切除12枚,所有患者均未出现肠大出血及肠穿孔等严重并发症。

结论: 有效的预处理有助于高风险肠息肉内镜下高频电切的治疗,可提高治疗的安全性,避免肠出血、肠穿孔等并发症的发生,值得临床应用。

关键词: 高风险息肉; 结肠镜; 高频电切除; 尼龙圈套器; 金属钛夹; 并发症

刘杰民, 李国胜, 胡浩, 刘哲, 韩斌, 叶莉娜. 结肠镜下电切治疗高风险息肉的预处理. 世界华人消化杂志 2012; 20(35): 3599-3602

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3599.asp>

0 引言

结肠息肉中带蒂宽>1 cm、息肉直径>2 cm、表面充血显著、基底有明显血管通过、内镜下暴露不佳等,如果处置不当,极易发生肠出血、肠穿孔等并发症,对患者造成严重危害,因此以往被视为肠镜治疗禁忌证^[1],临床多选择外科手术治疗。近年来,随着内镜诊疗技术^[2]的提高,结肠镜下治疗大息肉已有报道^[3,4]。我们研究发现,有效的预处理可明显提高结肠镜下电切高风险息肉的安全性,降低并发症的发生,现报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料 本组131例均来自住院患者,其中男92例,女39例,年龄2-80岁,评价年龄46.5岁,其中临床表现便血或黏液血便68例,腹泻12例,便秘15例,消瘦15例,结直肠癌术后复查21例,共检出高风险息肉145枚,其中大肠宽蒂息肉10枚,>2 cm有蒂息肉32枚,2-3 cm广基/亚蒂息肉60枚,息肉表面充血显著、基底有明显血管通过、内镜下暴露不充分的大息肉共43枚。所用器械有Olympus GIF HD-260电子结肠镜; ERBE 200D高频电工作站、Olympus SD-210L-25电圈套器、Olympus HX-20U-1尼龙圈套器、HX250R21金属钛夹推送器和钛夹。

1.2 方法

1.2.1 患者准备: 术前评估患者,查血常规、凝血机制、心电图等,询问近期有无服用抗凝药物。

若凝血机制异常或服用抗凝药物应暂缓手术,直至凝血机制恢复正常。术前两日进食无渣饮食,禁食蔬菜、水果、辣椒等粗纤维或带籽的食物。术日晚8时服用恒康正清1盒(复方聚乙二醇电解质散69.56 g加水配成1 000 mL溶液),术晨6点再服用恒康正清1盒(药物使用方法同前)。肠道清洁至排便为清水样,禁用甘露醇准备肠道,避免治疗中产生爆炸。

1.2.2 手术: 内镜直视下发现息肉后,对于大肠宽蒂息肉(蒂部直径>1 cm),经钳道送入尼龙圈套器推送器,用尼龙圈套器套住息肉根部(注意尽量贴近基底部,远离息肉端,便于使用金属圈套器圈套电切),慢慢收紧,直至息肉发绀但避免机械切割,释放尼龙圈套器,拔出推送器,再调节好高频发生器各项参数,经钳道送入电圈套器,在尼龙圈套器固定位置的上方套住息肉,通电进行切除。对于>2 cm有蒂息肉(蒂部直径<1 cm)经钳道送入钛夹推送器,调节钛夹口瓣方向,与息肉蒂部垂直,用金属钛夹夹闭息肉蒂部后,释放金属钛夹,若蒂部大时,再于此枚钛夹的对侧释放另外一枚,两枚或多枚钛夹交叉钳夹,可有效阻断息肉血流,当瘤体颜色发紫后经钳道送入电圈套器,在钛夹固定位置的上方套住息肉,通电进行切除。对于2-3 cm广基/亚蒂息肉先于息肉基底部行黏膜下注射,待息肉充分抬举后进行切除。对于息肉表面充血显著、基底有明显血管通过、内镜下暴露不充分的大息肉,术前联系手术室,于手术室内镜科与胃肠外科协作,先试行结肠镜下切除,如果切除困难,立即腹腔镜治疗,观察肠大出血、肠穿孔等并发症的发生。

2 结果

2.1 疗效 本组131例患者(共145枚高风险息肉)均顺利切除(图1, 2),切除后8例创面有少许渗血,立即用氩气刀或金属钛夹处理,术后均无肠大出血及穿孔发生。

2.2 病理 本组131例患者(共145枚高风险息肉),包括腺瘤性息肉88枚(其中中度非典型性增生25枚,重度非典型性增生10枚,癌变2枚追加手术治疗),幼年性息肉15枚,潴留性息肉20枚,增生性息肉10枚,家族性多发性息肉12枚。

3 讨论

近年来,随着内镜器械和诊断技术的发展以及内镜医生操作水平的提高,结肠镜下息肉的检

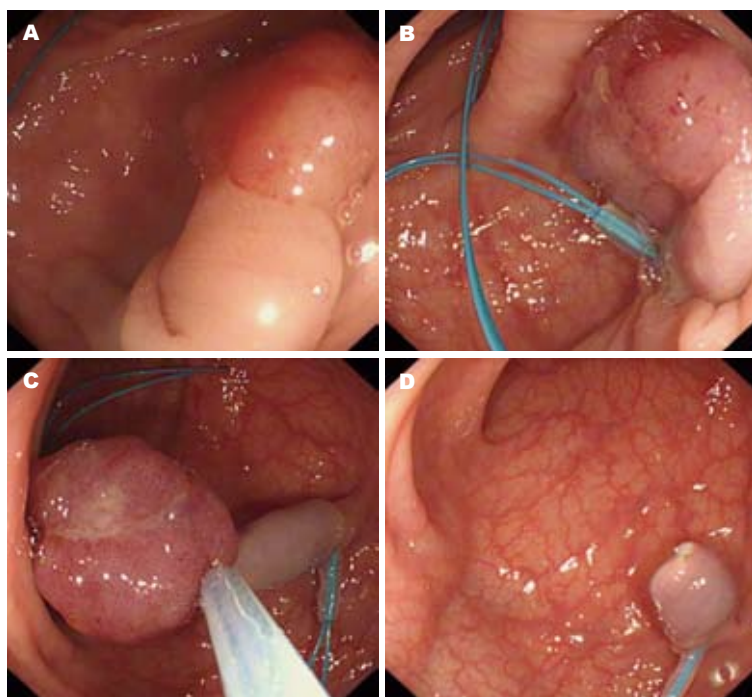


图 1 尼龙圈套器预处理法. A: 结肠宽蒂大息肉; B: 尼龙圈套器套扎; C: 高频电切治疗; D: 息肉残端.

■应用要点
对于结肠高风险息肉, 只要做好预处理, 内镜下高频电切除是一种手术损伤小、痛苦轻、花费少、术后恢复快、安全简便、效果肯定的方法, 值得临床推广应用.

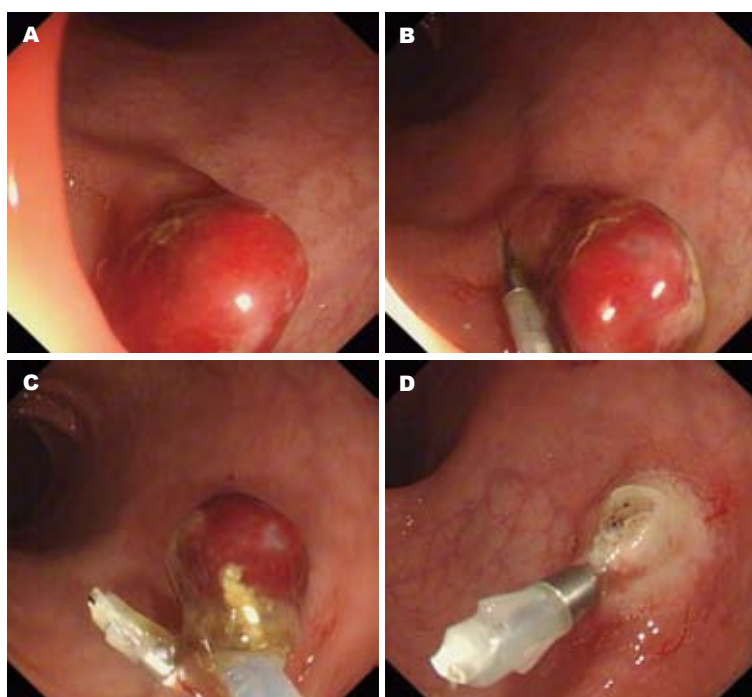


图 2 钛夹预处理法. A: 结肠有蒂息肉; B: 钛夹夹闭蒂部; C: 高频电切治疗; D: 息肉残端.

出率明显增加. 现已研究证实腺瘤性息肉与大肠癌的关系密切^[5], 故发现息肉后进行切除治疗已成共识. 内镜下高频电切除肠息肉是一种手术损伤小、痛苦轻、花费少、术后恢复快、安全简便、效果肯定的方法^[6-8]. 但对大肠宽蒂息肉(蒂部直径>1 cm)、>2 cm息肉(蒂部直径<1 cm)、表面充血显著、基底有明显血管通过、内镜下暴露不佳等高风险息肉, 电切后发生肠出血及肠穿孔等并发症发生率较高^[9-12], 因此, 限制了其广泛应用.

为探讨高风险息肉安全、顺利内镜下微创切除的方法, 我科做了许多有益的尝试. 依据息肉的特点、形态、大小、有蒂、无蒂、粗蒂、亚蒂, 采取相应的预处理措施. 如对于大肠宽蒂息肉(蒂部直径>1 cm)电切治疗前用尼龙圈套器套扎息肉蒂部; 对于>2 cm有蒂息肉电切前(蒂部直径<1 cm)金属钛夹闭息肉蒂部; 对于2-3 cm广基/亚蒂息肉先于息肉基底地部黏膜下注射, 充分抬举后进行切除; 对于息肉表面充血显著、基底有明显血管通过、内镜下暴露不充分的大

■同行评价

本文样本量较大, 研究技术方法有一定创新和改进, 研究内容紧贴临床实际, 对临床工作具有一定的指导意义。

息肉, 术前联系手术室, 先试行结肠镜下切除, 如果切除困难, 立即腹腔镜治疗。本组131例患者, 共145枚高风险息肉均安全顺利治疗, 未发生肠大出血及穿孔等并发症。本研究结果表明, 预处理可提高息肉切除的安全性, 减少并发症的发生, 对于保证患者安全起到了重要的作用。

值得重视的是, 所有患者应术后禁食1-2 d, 如无异常方可进食流质、半流质饮食2-3 d, 禁食粗纤维食物; 1 wk内避免饮酒及其他刺激性食物、饮料等; 2 wk内避免剧烈活动或重体力劳动; 保持大便通畅, 避免长时间用力下蹲腹压增高, 引发结痂脱落导致迟发性肠出血、肠穿孔^[13-16]。

4 参考文献

- 1 许国铭. 消化道良性肿瘤. 消化内镜培训教程. 上海: 上海科技教育出版社, 2000: 184-185
- 2 李鹏, 冀明, 张澍田. 无痛消化内镜操作共识. 中国实用内科杂志 2010; 30: 605-607
- 3 王萍, 吴杰, 黄晓东, 孙圣斌, 张姮, 郑丹, 宋敏, 刘文敏. 经结肠镜高频电圈套器联合尼龙绳套扎和/或钛夹钳夹治疗大肠宽蒂和大息肉156例. 世界华人消化杂志 2010; 18: 1838-1841
- 4 高丽江. 结肠镜下高频电加钛夹切除结肠大息肉的护理. 齐齐哈尔医学院学报 2011; 32: 843
- 5 王娜娜, 潘文胜, 沈虹, 陈丽荣, 张顽军, 武良琴, 徐翔. 大肠息肉内镜下治疗的临床研究. 实用肿瘤杂志 2009; 24: 280
- 6 苏鲁, 潘洪珍, 翁敬飏, 徐艺华, 陈芳, 洪梅燕. 美蓝染色放大电子结肠镜观察结肠息肉与组织病理学的关系. 世界华人消化杂志 2003; 11: 1227-1229
- 7 苏鲁. 美蓝染色放大电子结肠镜观察结肠息肉与组织病理学的关系. 世界华人消化杂志 2002; 10: 252-257
- 8 王石林, 顾国利. 遗传性结直肠肿瘤研究进展. 世界华人消化杂志 2009; 17: 3075-3085
- 9 姚蓝, 宋家武. 肠息肉发生的细胞和分子生物学研究进展. 世界华人消化杂志 2006; 14: 2958-2961
- 10 McGarrity TJ, Peiffer LP, Amos CI, Frazier ML, Ward MG, Howett MK. Overexpression of cyclooxygenase 2 in hamartomatous polyps of Peutz-Jeghers syndrome. *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 671-678
- 11 Haidinger M, Werzowa J, Weichhart T, Säemann MD. Targeting the dysregulated mammalian target of rapamycin pathway in organ transplantation: killing 2 birds with 1 stone. *Transplant Rev (Orlando)* 2011; 25: 145-153
- 12 Brugarolas J, Kaelin WG. Dysregulation of HIF and VEGF is a unifying feature of the familial hamartoma syndromes. *Cancer Cell* 2004; 6: 7-10
- 13 Klumpen HJ, Queiroz KC, Spek CA, van Noesel CJ, Brink HC, de Leng WW, de Wilde RF, Mathus-Vliegen EM, Offerhaus GJ, Alleman MA, Westermann AM, Richel DJ. mTOR inhibitor treatment of pancreatic cancer in a patient With Peutz-Jeghers syndrome. *J Clin Oncol* 2011; 29: e150-e153
- 14 Rosner M, Hanneder M, Siegel N, Valli A, Fuchs C, Hengstschläger M. The mTOR pathway and its role in human genetic diseases. *Mutat Res* 2008; 659: 284-292
- 15 McGarrity TJ, Peiffer LP, Billingsley ML. Overexpression of epidermal growth factor receptor in Peutz-Jeghers syndrome. *Dig Dis Sci* 1999; 44: 1136-1141
- 16 De Leng WW, Westerman AM, Weterman MA, De Rooij FW, Dekken Hv Hv, De Goeij AF, Gruber SB, Wilson JH, Offerhaus GJ, Giardiello FM, Keller JJ. Cyclooxygenase 2 expression and molecular alterations in Peutz-Jeghers hamartomas and carcinomas. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 3065-3072

编辑 田滢 电编 闫晋利

白介素-10基因819T/C多态性与克罗恩病相关性的Meta分析

谭诗云, 吴鹏波, 张国, 罗和生, 叶会兰

谭诗云, 吴鹏波, 罗和生, 武汉大学人民医院消化内科 湖北省武汉市 430060

张国, 叶会兰, 广西壮族自治区人民医院消化内科 广西壮族自治区南宁市 530021

谭诗云, 教授, 主任医师, 博士生导师, 主要从事消化内科方面的研究。

作者贡献分布: 此课题由谭诗云与张国策划设计; 吴鹏波与叶会兰负责资料收集、分析研究; 数据分析由吴鹏波与叶会兰完成; 本论文写作由吴鹏波与谭诗云完成; 罗和生与张国审阅。

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

zhangguogx@hotmail.com

收稿日期: 2012-10-15 修回日期: 2012-11-12

接受日期: 2012-11-15 在线出版日期: 2012-12-18

Association between interleukin-10-819 promoter polymorphism and susceptibility to Crohn's disease: A meta-analysis

Shi-Yun Tan, Peng-Bo Wu, Guo Zhang, He-Sheng Luo, Hui-Lan Ye

Shi-Yun Tan, Peng-Bo Wu, He-Sheng Luo, Department of Gastroenterology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei Province, China

Guo Zhang, Hui-Lan Ye, Department of Gastroenterology, the People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Correspondence to: Guo Zhang, Professor, Chief Physician, Department of Gastroenterology, the People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. zhangguogx@hotmail.com

Received: 2012-10-15 Revised: 2012-11-12

Accepted: 2012-11-15 Published online: 2012-12-18

Abstract

AIM: To explore the association between interleukin-10 (IL-10) 819T/C polymorphism and Crohn's disease susceptibility.

METHODS: A systematic search of electronic databases such as CBM, CNKI, PubMed, Elsevier and EMBASE was performed to retrieve relevant studies. Pooled odds ratios (ORs) with 95% confidence intervals (95% CI) were calculated using the RevMan 5.1.4 software, and publication bias was tested by Egger's regression test and Begg's test.

RESULTS: A total of 11 studies involving 1670 patients with Crohn's disease and 3312 healthy controls were identified. The results of meta-analyses showed no significant association between IL-10 819T/C polymorphism and susceptibility to Crohn's disease (for T/T vs C/C: OR = 0.90, 95% CI: 0.70 to 1.17; T/C vs C/C: OR = 0.84, 95% CI: 0.56 to 1.27; for dominant inheritance model: OR = 0.97, 95% CI 0.86 to 1.10; for recessive inheritance model: OR = 0.90, 95% CI: 0.71 to 1.14).

CONCLUSION: Current evidence strongly suggests that there is no significant association between IL-10 819T/C polymorphism and susceptibility to Crohn's disease.

Key Words: Crohn's disease; Interleukin-10; 819T/C; Polymorphism; Meta-analysis

Tan SY, Wu PB, Zhang G, Luo HS, Ye HL. Association between interleukin-10-819 promoter polymorphism and susceptibility to Crohn's disease: A meta-analysis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(35): 3603-3608

摘要

目的: 探讨白介素-10(interleukin-10, IL-10)基因819T/C多态性与克罗恩病(crohn's disease, CD)风险的相关性。

方法: 计算机检索CBM、CNKI、PubMed和EMbase数据库, 收集从建库至2012-08关于IL-10基因819T/C多态性与CD风险相关性的病例对照研究。采用RevMan 5.1.4软件计算合并效应量OR及其95%CI, 运用Egger's回归法、Begg秩相关法检测论文发表偏倚。

结果: 共纳入11个研究, 1 670例患者和3 312例对照。各遗传模型Meta分析结果显示IL-10基因819T/C多态性与CD风险的相关性无统计学意义[共显性遗传模型T/T vs C/C: OR = 0.90, 95%CI(0.70, 1.17); T/C vs C/C: OR = 0.84, 95%CI(0.56, 1.27); 显性遗传模型: OR = 0.97, 95%CI(0.86, 1.10); 隐性遗传模型: OR = 0.90, 95%CI(0.71, 1.14)]。

■背景资料

克罗恩病(CD)是常见的慢性胃肠道非特异性炎症性疾病, 目前对于CD的病因和发病机制尚未完全明了, 其发生与可能与精神心理因素、感染、免疫异常、等多种因素有关。白介素-10(IL-10)的功能基因多态性可以通过影响其表达高低调节宿主炎症反应强弱及炎症转归结果, 最终改变其罹患CD的风险。

■同行评议者

白爱平, 副教授, 江西省南昌大学第一附属医院消化病研究所

■研究前沿

IL-10作为体内免疫反应的重要调节因子,在肠道炎症反应中起重要作用,研究证明其与乙型肝炎发病密切相关。

结论:基于目前研究结果显示,IL-10基因819T/C多态性与CD风险无明显相关性。受纳入研究质量和数量限制,上述结论尚待更多高质量的前瞻性研究进一步验证。

关键词:克罗恩病;白介素-10;819T/C;基因多态性;Meta分析

谭诗云,吴鹏波,张国,罗和生,叶会兰.白介素-10基因819T/C多态性与克罗恩病相关性的Meta分析.世界华人消化杂志 2012; 20(35): 3603-3608
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3603.asp>

0 引言

克罗恩病(crohn's disease, CD)是一种病因尚不十分明确的非特异性慢性胃肠道炎性肉芽肿疾病,目前认为其发病与环境、遗传、微生物及免疫等因素有关。CD的家族聚集现象和CD发病的种族差异性提示遗传因素在CD发病过程中起着至关重要的作用。自从Hugot等^[1]确定CARD15/NOD2为CD易感基因以来,已发现多个基因的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)位点与CD发病相关,表明CD是一种复杂的多基因病。白介素-10(interleukin-10, IL-10)基因定位于染色体1q31-32上^[2],其启动子区域-819点为多态性位点。相关研究表明IL-10启动子区的-819位点基因多态性与IL-10的表达高低相关性^[3-5]。到目前为止,已有很多研究探讨了IL-10基因-819T/C多态性与CD风险的关系,但由于单个研究样本量小和地区差异,导致各研究结论不一。为解决这些分歧,我们对已发表的相关研究进行Meta分析,以明确IL-10-819T/C多态性与CD风险的相关性。

1 材料和方法

1.1 材料 计算机检索EMbase(1966/2011-08)、PubMed(2000-04/2011-08)、CBM(1978/2011-08)和CNKI(1994/2011-08)。英文检索式:“interleukin 10 or interleukin-10 or IL10 or IL-10” and “mutation or variant or polymorphism” and “Crohn's disease or CD or inflammatory bowel disease or IBD”;中文检索式:“白细胞介素10或IL-10”和“基因多态性或突变”和“克罗恩病或炎性肠疾病”。所有研究的研究对象限人类,文种限中、英文,同时追溯所获文献的参考文献以及手工检索相关杂志。

1.2 方法

1.2.1 纳入标准:(1)涉及IL-10基因819 T/C多态性

与CD相关性的文献;(2)公开发表的病例对照研究或巢式病例对照研究;(3)全文发表;(4)有足够的计算比值比(odds ratio, OR)和95%CI;(5)病例均为经确诊CD患者,其诊断符合文献[6-9]诊断标准,或者经病理联合内镜诊断;(6)对照组基因分布必须服从Hardy-Weinberg平衡(H-W平衡)。

1.2.2 排除标准:(1)研究未设立对照组;(2)具体数据描述不清;(3)重复报道;(4)CD相关的综述以及动物实验。

1.2.3 资料提取:由2位评价者独立根据纳入标准,对文献进行筛选,通过讨论达成一致。对原始文献记录数据的收集也由两位评阅人独立完成。对检出的文献提取以下信息:第一作者姓名、出版年份、国家、病例组对照组基因型分布及其频率、对照组是否符合H-W平衡($P < 0.05$ 认为不符合H-W平衡)。

1.2.4 质量评价:采用Newcastle-Ottawa Scale(NOS)标准^[10]评价纳入各个研究的质量。该评分系统采取星级对3部分进行评价:(1)病例组和对对照组研究对象选择;(2)病例组和对对照组研究对象的可比性;(3)危险因素的暴露情况。得分 > 7 分(含)的研究为高质量。

统计学处理 采用RevMan 5.1.4和Stata 11.0软件进行统计分析。合并效应量选用OR及其95%CI。OR值的计算分别根据共显性遗传模型(T/T vs C/C; T/C vs C/C)、显性遗传模型(T/T+T/C vs C/C)和隐性遗传模型(T/T vs T/C+C/C)。对纳入研究进行异质性检验,各研究结果间无异质性采用固定效应模型进行合并分析,否则采用随机效应模型进行合并分析。各研究结果间的异质性检验采用Q检验和 I^2 统计量, $P < 0.1$ 或 $I^2 > 50\%$ 提示各研究间存在异质性。敏感性分析为依次排除单个文献后重新进行Meta分析,估计综合效应大小。发表偏倚通过Egger回归法、Begg秩相关法进行量化检测($P < 0.05$ 认为存在发表)。

2 结果

2.1 文献检索结果 根据检索策略,初检出476篇文献,其中中文4篇,英文472篇。通过初步阅读文题和摘要,排除456篇不符合纳入标准的文献经初步筛查。进一步阅读全文,3篇文献缺少对照组,1篇文献重复报道,5篇文献涉及动物研究。最终纳入11篇文献的11个病例-对照研究被纳入本研究。研究时间分布1998-2011年,研究人群分

表 1 纳入本次研究的11篇病例对照研究文献基本特征

作者	地区	发表年份	克罗恩病			对照			NOS 评分	H-W平衡 (P值)
			TT	TC	CC	TT	TC	CC		
Crusius等 ^[11]	Netherlands	1998	6	24	58	3	35	71	5	0.591
Wang等 ^[12]	New Zealand	2011	14	121	206	32	205	365	7	0.617
Kim等 ^[13]	Korea	2003	31	30	1	96	85	18	6	0.895
Fernandez等 ^[14]	Spain	2005	13	89	126	42	185	293	8	0.099
Castro-Santos等 ^[15]	Spain	2006	15	57	74	31	122	190	8	0.081
Andersen等 ^[16]	Denmark	2010	9	111	216	37	259	483	7	0.763
Ahirwar等 ^[17]	India	2012	9	16	11	40	106	61	8	0.616
Sanchez等 ^[18]	Canada	2009	14	39	64	7	37	50	6	0.966
Koss等 ^[19]	UK	2000	3	9	16	7	18	27	8	0.833
Amre等 ^[20]	Canada	2009	15	94	158	28	132	172	8	0.708
Garza-González等 ^[21]	Mexico	2010	1	13	7	15	40	20	7	0.536

■ 相关报道

Franke等^[1]项研究纳入了1 851名CD患者, 结果显示CD发病机制中涉及到细胞因子IL-10的参与。

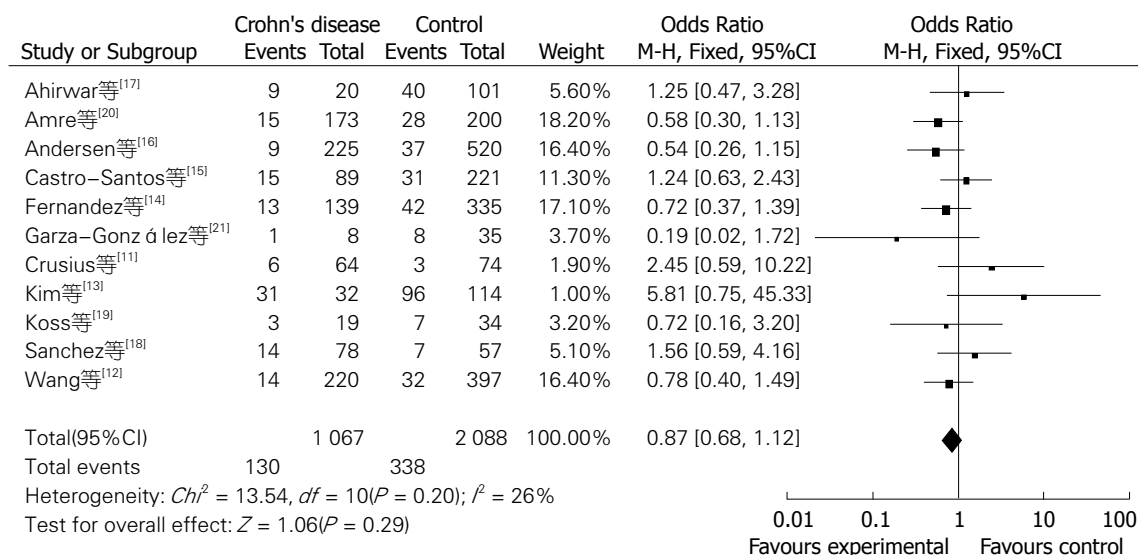


图 1 总人群IL-10-819T/C基因多态性与克罗恩病风险相关性T/T vs C/C的Meta分析。

布亚洲、欧洲、大洋洲和北美洲。各个纳入研究的基本特征见表1^[11-21]。

2.2 Meta分析结果 Meta分析的结果见表1。NOS评分结果显示平均得分为7.1(5-9分), 提示纳入的研究质量较好。当11个研究合并分析时显示IL-10-819T/C基因多态性与CD风险的相关性无统计学意义[共显性遗传模型T/T vs C/C: $OR = 0.87$, 95%CI(0.68, 1.12); T/C vs C/C: $OR = 0.84$, 95%CI(0.58, 1.23); 显性遗传模型: $OR = 0.96$, 95%CI(0.85, 1.09); 隐性遗传模型: $OR = 0.87$, 95%CI(0.69, 1.10)](图1-4)。

2.3 敏感性分析 依次单独剔除1篇文献后, 各遗传模型合并效应量均无明显改变。

2.4 发表偏倚分析 Egger回归法分析结果显示:共显性遗传模型(T/T vs C/C: $P = 0.99$; T/C vs C/C: $P = 0.96$)、显性遗传模型($P = 0.96$)、隐性遗传

模型($P = 0.97$)。Begg秩相关法分析结果显示:共显性遗传模型(T/T vs C/C: $P = 0.99$; T/C vs C/C: $P = 0.35$)、显性遗传模型($P = 0.53$)、隐性遗传模型($P = 0.76$)。Egger回归法、Begg秩相关法量化检测也未见发表偏倚。

3 讨论

IL-10主要由辅助性T细胞亚群Th2细胞、单核细胞、巨噬细胞及基质细胞等各种免疫激活状态下分泌的细胞因子, 它具有抑制Th1细胞功能的作用, 处于机体免疫调节的中心环节, 对机体免疫具有抑制和促进双重作用^[22]。国外学者Reuss等^[23]发现不同个体的全血细胞产生IL-10的能力不同, 其可能原因是IL-10基因启动子的多态性导致其mRNA合成率不同^[24]。

众所周知, CD发病是由于肠道黏膜内环境

■创新盘点

近年来,有大量关于IL-10-819T/C基因多态性与CD患者易感性的关系的研究,但结论不一致,所以本文就此进行研究,分析IL-10-819T/C基因多态性与CD易感性的关系。

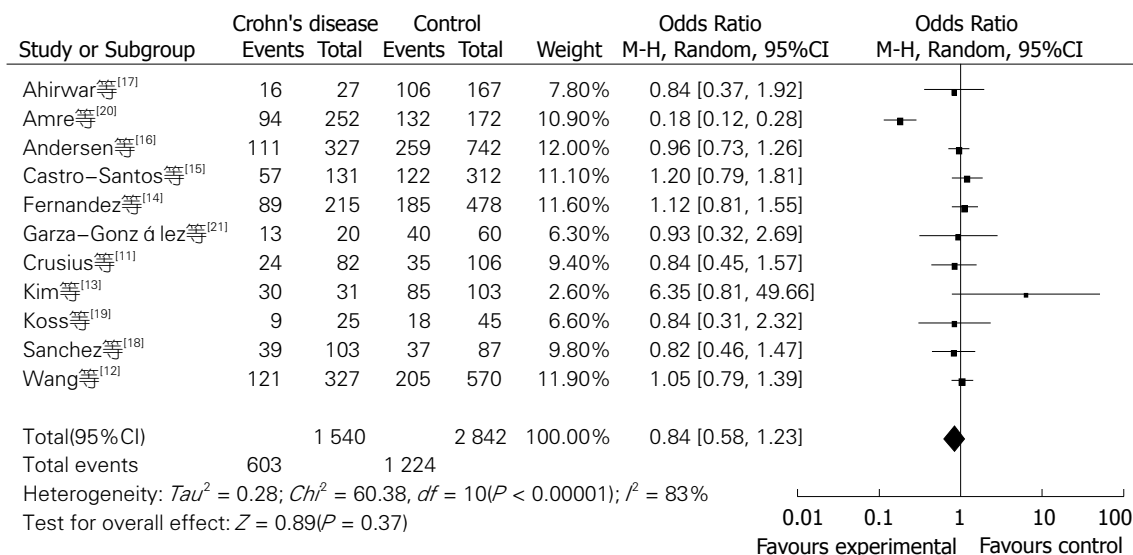


图 2 总人群IL-10-819T/C基因多态性与克罗恩病风险相关性T/C vs C/C的Meta分析。

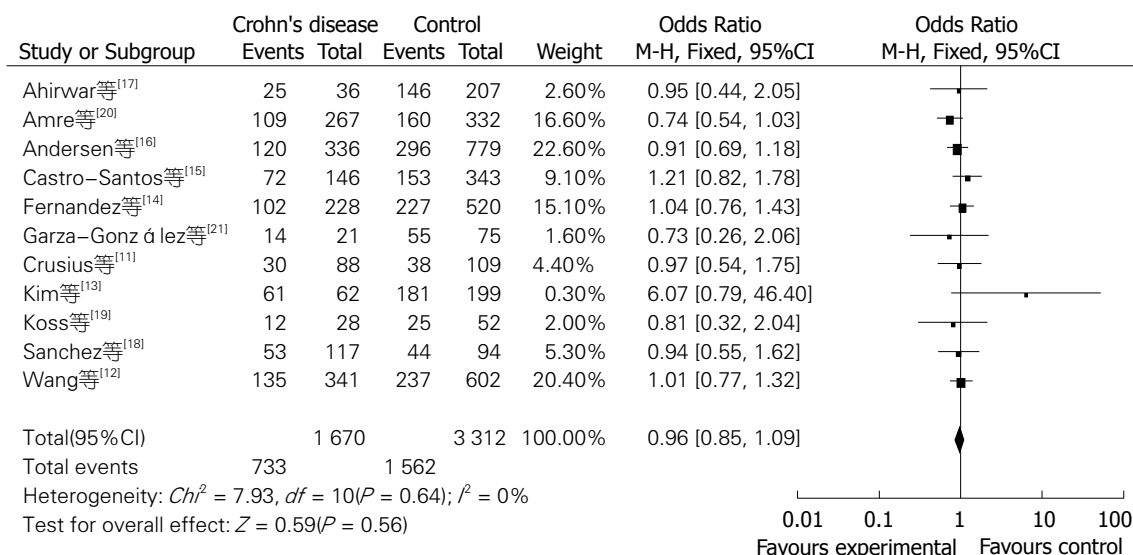


图 3 总人群IL-10-819T/C基因多态性与克罗恩病风险相关性显性遗传模型的Meta分析。

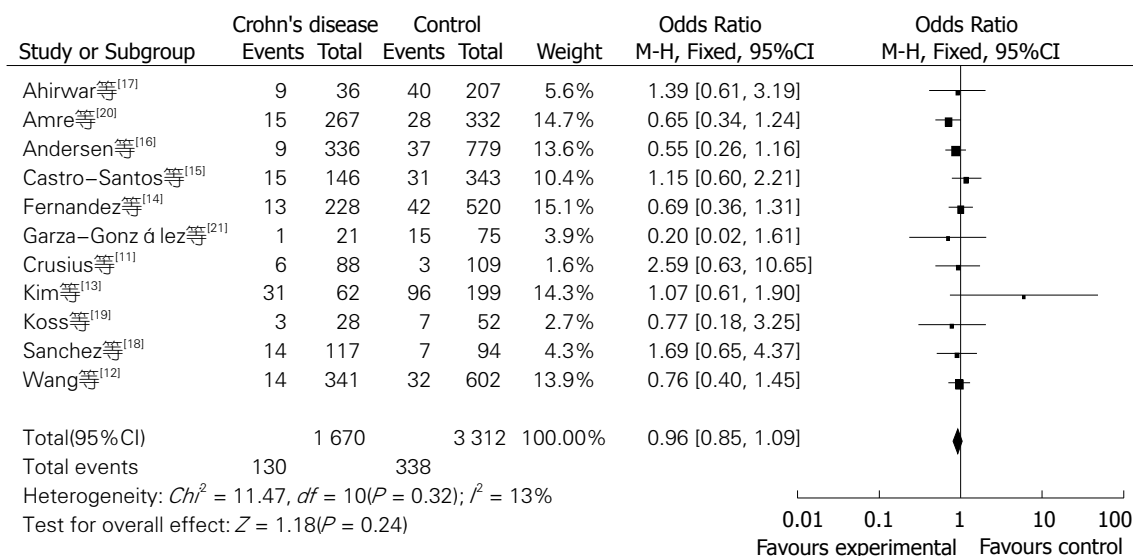


图 4 总人群IL-10-819T/C基因多态性与克罗恩病风险相关性隐性遗传模型的Meta分析。

紊乱导致促进和抑制炎症反应两者失衡造成的。虽然CD具体的发病机制尚不明确, 但国内外学者一致认为CD的发生以及发展与CD4⁺ T细胞过度激活有关。鉴于IL-10能抑制在CD患者肠道黏膜CD4⁺ T细胞活化^[25,26], IL-10细胞因子在CD发生发展的作用得到前所未有的重视。以往研究发现各IL-10-819T/C基因型CD患者组血清IL-10低于健康人群组, 这提示IL-10-819T/C基因多态性是通过降低机体内能够抑制CD发生以及发展的IL-10起作用的。但是近来有学者发现CD患者组血清IL-10浓度高于健康对照组人群^[12,27]。

本文结果分析显示IL-10-819T/C多态性与CD发病风险无明显相关性, 这一结果与Parkes等^[28]结果相似。得出上述结果的可能原因有以下几点: (1)IL-10基因819T/C多态性与CD的易感性确实无关; (2)IL-10-819位点与其他基因位点等位基因紧密连锁, 可能共同作用于CD的病变, 而不仅仅与IL-10基因的819T/C位点多态性有关; (3)CD患者的肠道黏膜炎症是众多细胞因子作用的结果, 而不仅仅是IL-10。

Meta分析能够将研究目的相同的多个病例一对对照研究结果进行定量合并分析和综合评价, 以提高统计检验功效, 解决研究结果不一致的问题, 他克服了单个研究样本量小、地区局限的不足^[29]。异质性是影响Meta分析结果可靠性的主要因素, 4个遗传模型经异质性检验显示T/C vs C/C模型存在异质性, 我们试图通过敏感性分析寻找异质性所在。但未能通过敏感性分析发现异质性来源。另外, 本研究虽然设计了科学研究方案, 本次分析仍存在一定的局限性, 其原因如下: (1)本Meta分析只检索了国内外几个代表性数据库, 检索语言仅为中文和英文, 且只限于公开发表的文献, 影响了纳入研究的全面性; (2)纳入研究的人群分布限于亚洲、欧洲、大洋洲、北美洲; (3)未根据遗传背景做亚组分析。

总之, 可以认为IL-10基因819T/C多态性可能与CD易感性不相关。然而, 受研究数量所限, 仍需开展更多高质量、大样本、包括不同种族群体的针对IL-10基因819T/C多态性和CD易感性之间关系的研究以进一步验证819T/C多态性与CD易感性的关系。

4 参考文献

- 1 Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cézard JP, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain CA, Gassull M, Binder V, Finkel Y, Cortot A, Modigliani R, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Macry J, Colombel JF, Sahbatou M, Thomas G. Association

- of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001; 411: 599-603
- 2 Eskdale J, Kube D, Tesch H, Gallagher G. Mapping of the human IL10 gene and further characterization of the 5' flanking sequence. *Immunogenetics* 1997; 46: 120-128
- 3 Tesse R, Del Vecchio GC, De Mattia D, Sangerardi M, Valente F, Giordano P. Association of interleukin-(IL)10 haplotypes and serum IL-10 levels in the progression of childhood immune thrombocytopenic purpura. *Gene* 2012; 505: 53-56
- 4 Zhang G, Manaca MN, McNamara-Smith M, Mayor A, Nhabomba A, Berthoud TK, Khoo SK, Wiertsema S, Aguilar R, Barbosa A, Quintó L, Candelaria P, Schultz EN, Hayden CM, Goldblatt J, Guinovart C, Alonso PL, Lesouëf PN, Dobaño C. Interleukin-10 (IL-10) polymorphisms are associated with IL-10 production and clinical malaria in young children. *Infect Immun* 2012; 80: 2316-2322
- 5 Holtzman S, Abbey SE, Chan C, Bargman JM, Stewart DE. A genetic predisposition to produce low levels of IL-10 is related to depressive symptoms: a pilot study of patients with end stage renal disease. *Psychosomatics* 2012; 53: 155-161
- 6 Lennard-Jones JE. Classification of inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1989; 170: 2-6; discussion 16-19
- 7 Best WR, Beckett JM, Singleton JW, Kern F. Development of a Crohn's disease activity index. National Cooperative Crohn's Disease Study. *Gastroenterology* 1976; 70: 439-444
- 8 Podolsky DK. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 2002; 347: 417-429
- 9 Silverberg MS, Satsangi J, Ahmad T, Arnott ID, Bernstein CN, Brant SR, Caprilli R, Colombel JF, Gasche C, Geboes K, Jewell DP, Karban A, Loftus Jr EV, Peña AS, Riddell RH, Sachar DB, Schreiber S, Steinhart AH, Targan SR, Vermeire S, Warren BF. Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: Report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. *Can J Gastroenterol* 2005; 19 Suppl A: 5-36
- 10 Stang A. Critical evaluation of the Newcastle-Ottawa scale for the assessment of the quality of nonrandomized studies in meta-analyses. *Eur J Epidemiol* 2010; 25: 603-605
- 11 Crusius JBA, Pérez Centeno CM, Keijsers V, Bouma G, Meuwissen SGM, Huizinga TWJ, Peña AS. Interleukin 10 gene polymorphisms in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gastroenterology* 1998; 114: A957
- 12 Wang AH, Lam WJ, Han DY, Ding Y, Hu R, Fraser AG, Ferguson LR, Morgan AR. The effect of IL-10 genetic variation and interleukin 10 serum levels on Crohn's disease susceptibility in a New Zealand population. *Hum Immunol* 2011; 72: 431-435
- 13 Kim TH, Kim BG, Shin HD, Kim JW, Kim CG, Kim JS, Jung HC, Song IS. [Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 gene polymorphisms in Korean patients with inflammatory bowel disease]. *Korean J Gastroenterol* 2003; 42: 377-386
- 14 Fernandez L, Martinez A, Mendoza JL, Urcelay E, Fernandez-Arquero M, Garcia-Paredes J, Diaz-Rubio M, de la Concha EG. Interleukin-10 polymorphisms in Spanish patients with IBD. *Inflamm Bowel Dis* 2005; 11: 739-743
- 15 Castro-Santos P, Suarez A, López-Rivas L, Mozo

■应用要点

相同的基因位点, 不同的研究结论可能与样本量大小、环境因素及种族遗传变异有关。本文将IL-10-819位点与CD的功能基因多态性文章进行荟萃分析, 为以后科研和临床研究提供一定的思路。

■同行评价

本文对IL-10基因819T/C多态性与CD发病相关性进行了荟萃分析,结果显示,二者之间无明显相关性。文章选题准确,结论可靠。

- 16 Andersen V, Ernst A, Christensen J, Østergaard M, Jacobsen BA, Tjønneland A, Krarup HB, Vogel U. The polymorphism rs3024505 proximal to IL-10 is associated with risk of ulcerative colitis and Crohns disease in a Danish case-control study. *BMC Med Genet* 2010; 11: 82
- 17 Ahirwar DK, Kesarwani P, Singh R, Ghoshal UC, Mittal RD. Role of tumor necrosis factor-alpha (C-863A) polymorphism in pathogenesis of inflammatory bowel disease in Northern India. *J Gastrointest Cancer* 2012; 43: 196-204
- 18 Sanchez R, Levy E, Costea F, Sinnett D. IL-10 and TNF-alpha promoter haplotypes are associated with childhood Crohn's disease location. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 3776-3782
- 19 Koss K, Satsangi J, Fanning GC, Welsh KI, Jewell DP. Cytokine (TNF alpha, LT alpha and IL-10) polymorphisms in inflammatory bowel diseases and normal controls: differential effects on production and allele frequencies. *Genes Immun* 2000; 1: 185-190
- 20 Amre DK, Mack DR, Morgan K, Israel D, Lambrette P, Costea I, Krupoves A, Fegury H, Dong J, Grimaud G, Deslandres C, Levy E, Seidman EG. Interleukin 10 (IL-10) gene variants and susceptibility for paediatric onset Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2009; 29: 1025-1031
- 21 Garza-González E, Pérez-Pérez GI, Mendoza-Ibarra SI, Flores-Gutiérrez JP, Bosques-Padilla FJ. Genetic risk factors for inflammatory bowel disease in a North-eastern Mexican population. *Int J Immunogenet* 2010; 37: 355-359
- 22 Chen YX, Man K, Ling GS, Chen Y, Sun BS, Cheng Q, Wong OH, Lo CK, Ng IO, Chan LC, Lau GK, Lin CL, Huang F, Huang FP. A crucial role for dendritic cell (DC) IL-10 in inhibiting successful DC-based immunotherapy: superior antitumor immunity against hepatocellular carcinoma evoked by DC devoid of IL-10. *J Immunol* 2007; 179: 6009-6015
- 23 Reuss E, Fimmers R, Kruger A, Becker C, Rittner C, Höhler T. Differential regulation of interleukin-10 production by genetic and environmental factors--a twin study. *Genes Immun* 2002; 3: 407-413
- 24 Bialecka M, Klodowska-Duda G, Kurzawski M, Slawek J, Opala G, Bialecki P, Safranow K, Drozdziak M. Interleukin-10 gene polymorphism in Parkinson's disease patients. *Arch Med Res* 2007; 38: 858-863
- 25 Ranatunga DC, Ramakrishnan A, Uprety P, Wang F, Zhang H, Margolick JB, Brayton C, Bream JH. A protective role for human IL-10-expressing CD4+ T cells in colitis. *J Immunol* 2012; 189: 1243-1252
- 26 Mandaric S, Walton SM, Rüllicke T, Richter K, Girard-Madoux MJ, Clausen BE, Zurunic A, Kamanaka M, Flavell RA, Jonjic S, Oxenius A. IL-10 suppression of NK/DC crosstalk leads to poor priming of MCMV-specific CD4 T cells and prolonged MCMV persistence. *PLoS Pathog* 2012; 8: e1002846
- 27 Kucharzik T, Stoll R, Lügering N, Domschke W. Circulating antiinflammatory cytokine IL-10 in patients with inflammatory bowel disease (IBD). *Clin Exp Immunol* 1995; 100: 452-456
- 28 Parkes M, Satsangi J, Jewell D. Contribution of the IL-2 and IL-10 genes to inflammatory bowel disease (IBD) susceptibility. *Clin Exp Immunol* 1998; 113: 28-32
- 29 伍丽萍, 赵锐, 王一平. 序贯治疗根除幽门螺杆菌感染的Meta分析. *解放军医学杂志* 2010; 35: 1141-1144

编辑 田滢 电编 闫晋利

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》入选《中国学术期刊评价研究报告—RCCSE权威、核心期刊排行榜与指南》

本刊讯 《中国学术期刊评价研究报告-RCCSE权威、核心期刊排行榜与指南》由中国科学评价研究中心、武汉大学图书馆和信息管理学院联合研发,采用定量评价和定性分析相结合的方法,对我国万种期刊大致浏览、反复比较和分析研究,得出了65个学术期刊排行榜,其中《世界华人消化杂志》位居396种临床医学类期刊第45位。(编辑部主任:李军亮 2010-01-08)

乙状结肠扭转的CT征象诊断

杨栋梁, 郑可国, 刘红艳, 周学付, 冉慕光

杨栋梁, 郑可国, 中山大学附属第一医院 广东省广州市 510080

杨栋梁, 刘红艳, 周学付, 冉慕光, 清远市人民医院 广东省清远市 511500

杨栋梁, 在职研究生, 主要从事腹部CT诊断方面的研究。

作者贡献分布: 此课题由杨栋梁与郑可国设计; 研究过程由杨栋梁、郑可国、刘红艳、周学付及冉慕光完成; 论文写作由杨栋梁、郑可国及刘红艳完成。

通讯作者: 杨栋梁, 511500, 广东省清远市B24号区, 清远市人民医院CT磁共振科。55355953@qq.com

电话: 0763-3113882

收稿日期: 2012-09-18 修回日期: 2012-11-16

接受日期: 2012-12-07 在线出版日期: 2012-12-18

CT features of sigmoid volvulus

Dong-Liang Yang, Ke-Guo Zheng, Hong-Yan Liu, Xue-Fu Zhou, Mu-Guang Ran

Dong-Liang Yang, Ke-Guo Zheng, the First Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China

Dong-Liang Yang, Hong-Yan Liu, Xue-Fu Zhou, Mu-Guang Ran, Department of Radiology, Qingyuan People's Hospital, Qingyuan 511500, Guangdong Province, China

Correspondence to: Dong-Liang Yang, Department of Radiology, Qingyuan People's Hospital, Qingyuan 511500, Guangdong Province, China. 55355953@qq.com

Received: 2012-09-18 Revised: 2012-11-16

Accepted: 2012-12-07 Published online: 2012-12-18

Abstract

AIM: To assess the imaging characteristics of sigmoid volvulus using multislice computed tomography (MSCT) to improve the preoperative diagnostic accuracy of CT scan in patients with sigmoid volvulus.

METHODS: The CT imaging characteristics of sigmoid volvulus in six patients who underwent surgery were analyzed retrospectively.

RESULTS: In all six cases, the sigmoid dilated with large amounts of gas, and the bowel manifested as an inverted U-shape. Five cases showed significant thinning of the bowel wall with small amount of liquid inside, and the remaining one case showed increased density of the bowel wall with large amount of liquid inside. The climax of the inverted U-shaped loop of the colon was located above the lower edge of the liver in six

cases and above the transverse colon in 2 cases. "Double bird-beak" sign and "X" sign were seen in all six cases. The afferent loop was located on the top of the efferent loops in 5 cases, except one case in whom the afferent loop was below the efferent loop. Whirl sign was seen in six cases, and the whirl was counter-clockwise in five cases and clockwise in one case.

CONCLUSION: Inverted U-shaped intestinal loop combined with the X sign and "double bird-beak" sign are reliable CT features of sigmoid volvulus. Careful observation and evaluation of CT manifestations can increase the preoperative diagnostic accuracy in sigmoid volvulus.

Key Words: Sigmoid; Volvulus; X-ray computed Tomography

Yang DL, Zheng KG, Liu HY, Zhou XF, Ran MG. CT features of sigmoid volvulus. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(35): 3609-3613

摘要

目的: 探讨乙状结肠扭转(sigmoid volvulus, SV)的CT征象, 以提高术前CT诊断水平。

方法: 搜集经手术证实的6例SV的病例, 回顾性分析其CT征象。

结果: 乙状结肠扩张、积气, 呈倒“U”形肠袢共6例; 5例肠壁明显变薄, 肠腔含有少量液体, 1例肠壁密度增高, 肠腔含有大量液体; 倒“U”形肠袢最高点位于肝下缘以上水平者6例, 位于横结肠上方者2例。双鸟嘴征6例。X征6例, 输入端位于输出端上方者5例, 下方者1例。漩涡征6例, 其中逆时针5例, 顺时针1例。

结论: 倒“U”型肠袢结合X征及双鸟嘴征是诊断SV可靠的CT征象。

关键词: 乙状结肠; 扭转; 体层摄影; X线计算机

杨栋梁, 郑可国, 刘红艳, 周学付, 冉慕光。乙状结肠扭转的CT征象诊断。世界华人消化杂志 2012; 20(35): 3609-3613
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3609.asp>

■背景资料

乙状结肠扭转(SV)既往主要通过腹平片结合临床病史进行诊断, 但腹部平片具有局限性, 容易出现假阳性或假阴性导致临床误诊、漏诊, CT可以弥补腹平片不足, 具有明显优势。

■同行评议者

陈海龙, 教授, 大连医科大学附属第一医院院办

■研发前沿

目前SV的CT诊断方面的研究热点多集中在对其CT表现的阐述,各家对其特征性CT表现意见尚不统一。

■相关报道

国内文献多认为肠系膜血管漩涡征为其特征性CT表现,但近几年也有学者提出质疑。国外有部分文献提示X征为其特征性表现。

0 引言

乙状结肠扭转(sigmoid volvulus, SV)占成人机械性肠梗阻的6.6%^[1],是大肠扭转最常见的类型,是导致成人大肠梗阻的主要原因之一^[2],以往主要通过X线腹部立位和卧位平片结合临床病史进行诊断,但部分SV患者在X线腹部平片表现为阴性,导致临床误诊。而CT具有较高的密度分辨力,能发现许多X线平片不能显示的影像征象。我们搜集了2007-01/2012-06经手术证实的SV病例6例,回顾性分析其CT表现,旨在找出CT的特征性征象,以提高术前CT诊断水平。

1 材料和方法

1.1 材料 本组6例均为男性,年龄61-90岁,平均年龄75岁,6例患者均有腹痛、腹胀伴肛门停止排气排便,其中5例有恶心、呕吐,1例有发热。体格检查6例患者腹部均有压痛,无明显反跳痛,5例腹肌紧张,2例可见肠型。6例既往均有便秘史。起病至CT检查时间3-7 d; CT检查至急诊手术时间3-15 h。

1.2 方法 采用GE公司Lightspeed 16层螺旋CT扫描,层厚7.5 mm,螺距1.3,管电流200 mA,管电压120 kV,扫描范围从膈顶至耻骨联合,只做CT平扫,未行肠道准备和增强扫描。6例均行多平面重组,1例行曲面重组。

2 结果

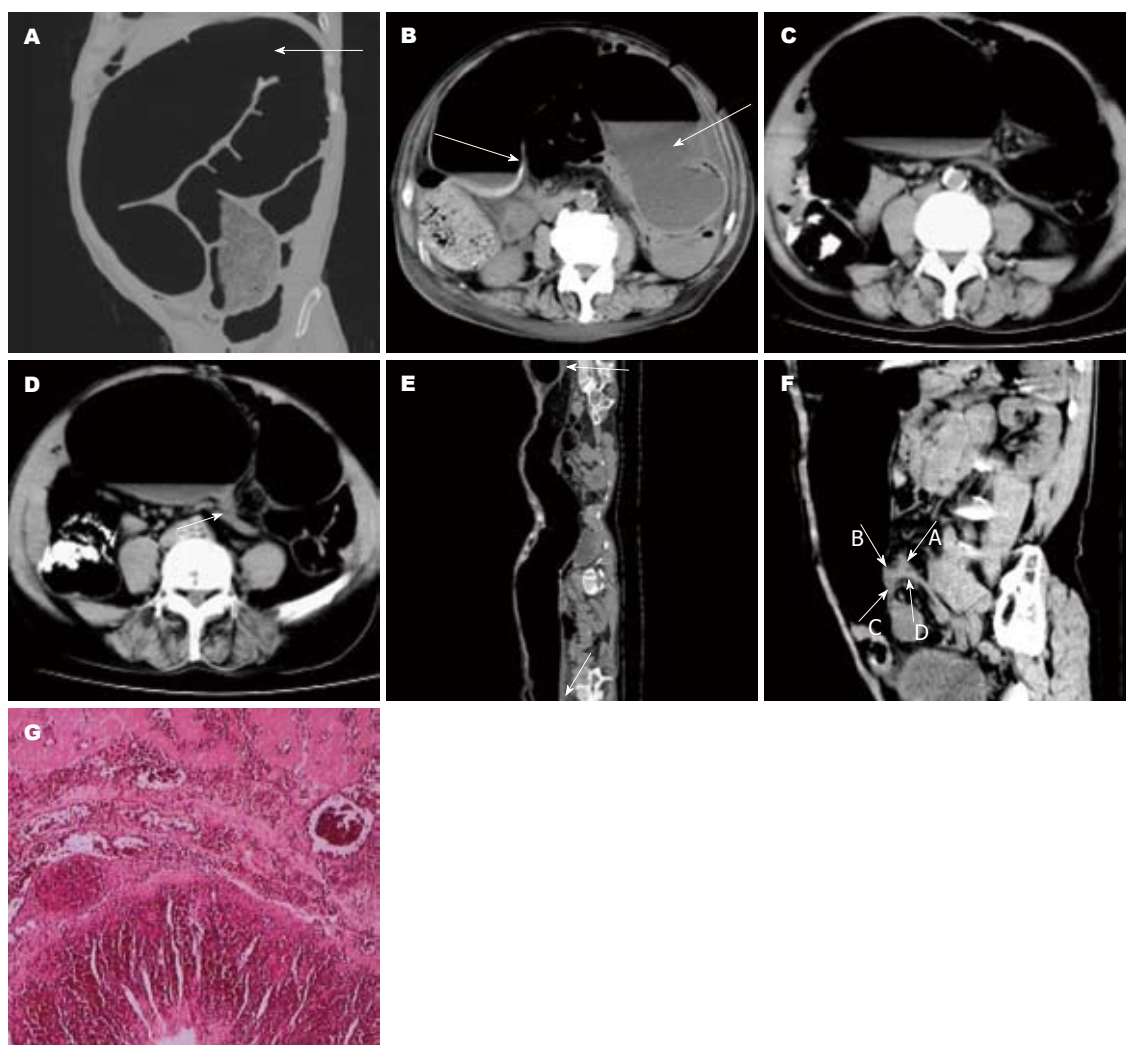
2.1 CT征象 CT检测结果表明:(1)乙状结肠明显扩张、积气,呈倒“U”形肠袢6例(图1A),扩张乙状结肠直径约7.3-11.2 cm,平均9.6 cm;肠壁明显变薄,倒“U”形肠腔可见液气平面,其中5例肠腔内为少量积液,1例肠壁密度增高、壁内可见少量气泡影,肠腔内为大量积液(图1B)。6例倒“U”形肠袢最高点位置均位于肝下缘以上水平(肝缘重叠征),其中2例位于横结肠上方。6例扩张倒“U”形肠袢为闭袢,分别从降结肠向远段肠管以及直肠向近段两个方向追踪观察,在两个方向上发现肠管梗阻点。近段结肠均有不同程度扩张,直径5.0-7.7 cm,远端直肠均塌陷不含气;(2)双鸟嘴征6例,自扩张的U形肠袢顶端分别向近端及远端两个方向追踪观察,在梗阻部管腔呈鸟嘴样渐进性狭窄闭塞(图1C-E);(3)X征6例,输入端(降结肠-乙状结肠移行区)与输出端(直肠-乙状结肠移行区)管腔闭塞呈条状软组织密度影,两者相互靠拢呈X形交叉走行。矢状位重组图像发现输入端位于输出端上方者5例

(图1F),输入端位于输出端下方者1例;(4)漩涡征6例,显示肠系膜血管成漩涡状排列,在冠状位重组图像上从后向前连续多个层面观察,漩涡征呈逆时针方向5例,顺时针方向1例;(5)乙状结肠系膜水肿和腹水5例,表现为倒“U”形肠袢内缘脂肪间隙密度增高、模糊,腹腔少量积液。

2.2 手术结果 6例均行剖腹探查术,术中发现乙状结肠高度扩张、积气,肠管沿乙状结肠系膜轴扭转,逆时针方向扭转5例,顺时针方向扭转1例,扭转角度270-720度;1例术中发现肠壁坏死且闭袢肠管内含有大量血性积液,行坏死肠段切除,术后病理证实肠壁弥漫性出血、坏死(图1G);5例行乙状结肠复位术;除1例患者术后出现呼吸、循环衰竭死亡,其余患者均康复出院。

3 讨论

乙状结肠属于腹膜内位器官,根部附着于左侧髂窝,呈倒U形,左支起自髂外动脉中部,向内上方在骶髂关节上端内折,右支向内下方延伸至第3骶椎前方^[3]。SV确切的发病机制至今尚不完全清楚,目前主流观点认为冗长的乙状结肠和相对狭窄的系膜基底部是发病的解剖学基础。乙状结肠冗长必然导致系膜游离缘延长,而系膜基底部由于受血管、系膜结构束缚延长受限,这样产生了系膜游离缘与基底部长度不成比例,由于这种比例失衡,乙状结肠容易沿系膜旋转以抵消这种失衡^[4],当扭转度数<180度时,一般不引起肠梗阻,称为生理性扭转。当扭转度数为180度时,长轴本身旋转360度,若长轴旋转的360度均匀分布于乙状结肠全长,则不引起梗阻,但若乙状结肠积气、扩张,绕乙状结肠长轴旋转的360度则不可能均匀分布在乙状结肠全长,必然引起肠腔狭窄,造成梗阻^[5]。而当扭转度数超过360度时几乎均出现乙状结肠闭袢。乙状结肠闭袢形成后,血管受压狭窄,引起肠壁缺血,闭袢的厌氧环境促进了细菌的大量繁殖,细菌发酵产生大量气体,引起乙状结肠扩张,扩张的乙状结肠腔内压力增高导致肠壁毛细血管灌注下降和引起静脉回流受阻,进一步加重了肠壁缺血^[6]。随着病程进展,闭袢肠管的动静脉闭塞、血栓形成,肠壁出血、坏死将不可避免。本组病例SV均见于老年男性患者,与文献报道相似。原因是男性与女性乙状结肠系膜长宽比例不同,女性系膜长宽比例较男性低,系膜短不容易发生扭转^[4],而且女性骨盆宽大,腹壁松弛,即使发生扭转,也容易自行复位。国外文献报道SV



■创新盘点
国内外文献报道SV的CT诊断方面的文章不多,多集中在对其CT表现的阐述,很少从发病机制、流行病学、病理基础等方面系统的介绍SV的CT表现。

图1 乙状结肠扭转的CT及病理图片结果(HE, $\times 40$)。A: 多平面重组重组可见乙状结肠明显扩张、积气,呈倒“U”型肠袢; B: 轴位见乙状结肠闭袢内肠壁局部密度明显增高,肠腔可见大量积液(白箭头); C, D: 乙状结肠扭转轴位图,显示闭袢肠管两端呈鸟嘴样狭窄(白箭头); E: 曲面重组图像,可见闭袢近端、远端呈双鸟嘴征(双白箭头); F: 矢状位重组图,可见X征, A, B, C, D箭头所指分别为输入端、闭袢远端、闭袢近端、输出端,输入端位于输出端上方,手术证实为逆时针扭转; G: 患者病理图片,提示肠壁弥漫性出血、坏死。

与长期便秘、高纤维素饮食相关^[4],可能是生活习惯加重乙状结肠负荷,导致乙状结肠扩张、冗长。本组6例患者均有便秘病史,与国外文献报道相符。国内文献报道肠腔蛔虫、肠粘连、肠道肿瘤及体位改变亦可诱发病^[7]。Northeast等^[8]认为本病与遗传相关,国内也有文献报道家族起病的病例。SV也具有明显的地域分布特征,在非洲、中东、拉丁美洲发病率较高,而在发达国家发病率较低^[9],这亦可能与饮食及其生活习惯有关。

SV根据临床发病缓急分为亚急性渐进型和急性爆发型^[10]。前者多见于老年人,发病天数2-9 d,后者多见于年轻人,起病急,病情发展快。本组6例全部属于亚急性渐进型。文献报道,腹痛、腹胀、便秘三联征是SV的主要临床症状^[11],

本组6例全部出现典型的SV三联征,与文献报道相符。

SV根据发病的解剖机制分为系膜轴扭转和器官轴扭转^[4],系膜轴扭转指乙状结肠沿系膜方向发生扭转,多为逆时针方向,是临床最常见的类型,本组患者全部为系膜轴扭转。器官轴扭转指沿乙状结肠纵轴发生的扭转,临床上罕见。器官轴扭转可以形成一个梗阻点(非闭袢性SV),也可以形成两个梗阻点(闭袢性SV),但他所形成的闭袢性SV与系膜轴的闭袢性SV截然不同,后者两个梗阻点扭结在一起,非常靠近,CT上可见X征,而前者两个梗阻点相互分离,距离较远,不会形成X征。器官轴扭转的发病机制至今尚不明瞭,但乙状结肠沿着系膜轴每旋转1度,必然沿着器官轴旋转2度(双倍度数),所以器官轴扭转

■同行评价

本文主要探讨了乙状结肠扭转的CT征象,选题准确,思路清晰,紧密结合临床,图片真实,分析比较透彻,有一定临床指导意义和实用价值。

一般都伴有系膜轴方向发生的旋转,因此器官轴扭转是否能作为一种独立的扭转形式而区别于系膜轴扭转,至今尚存争议^[9]。

SV临床上有非手术治疗和手术治疗两种治疗手段。非手术治疗即使病情缓解,复发率高达77%-92%^[12],且复发后的病死率接近10%^[13],因此早期外科手术是提高患者预后的关键。CT可作为术前诊断SV较准确的影像检查手段,指导临床早期手术。

关于系膜轴SV的CT表现,常见的CT征象有倒置“U”型肠袢、双鸟嘴征和“X”征等。本组6例患者均出现倒“U”型肠袢征象,CT因密度分辨力较高,能显示“U”型肠袢的内容物含量,本研究发现SV闭袢内气体含量多,液体含量少,与小肠闭袢扭转截然相反,推测原因,可能是因为结肠是吸收水分的重要器官,而结肠壁分泌消化液能力又极低。因此,乙状结肠闭袢内液体含量较少;但结肠内含有大量细菌,细菌发酵产生大量气体导致扭转闭袢肠腔扩张;本组6例患者有5例属于此种表现。另1例患者闭袢内含有大量液体,肠壁密度弥漫性增高、肠壁积气,手术及病理证实为肠壁弥漫性出血、坏死。我们认为,SV闭袢内一般液体较少,气体较多,当发现扭转闭袢肠管内含有大量液体时,应注意观察肠壁情况,若发现肠壁密度明显增高,则提示肠壁出血、坏死可能。肠壁积气常提示肠壁坏死,原因是肠壁坏死后,闭袢内肠管压力过高,将气体从坏死破损的黏膜挤入肠壁所致^[14]。关于倒置“U”形肠袢顶点的位置,本组6例均位于肝下缘以上平面,其中2例位于横结肠上方;文献报道当“U”形肠袢顶点位于横结肠以上平面时,高度提示SV。因为结肠单纯性梗阻所致的乙状结肠扩张,压力均匀分布于乙状结肠、降结肠及右半结肠,乙状结肠压力不足以挣脱周围组织束缚上移到横结肠上方,而乙状结肠闭袢性梗阻时,压力局限在闭袢内,当压力足够大时则有可能上移至横结肠上方^[15],本组6例有2例出现此征象。双鸟嘴征指“U”形肠袢近端及远端分别渐进性狭窄直至管腔闭塞形成鸟嘴样,本组6例均出现此征象,双鸟嘴征的部位即为扭转肠袢的梗阻点。X征是指扭转闭袢输入端(降结肠-乙状结肠移行区)与输出端(直肠-乙状结肠移行区)管腔闭塞呈条状软组织密度影,两者在扭转处相互靠拢呈X形交叉走行,本组6例患者均出现此征象,作者认为此征象为系膜轴SV的特征性表现。此征象多数不能在同一个层

面显示,因此连续多个层面观察以及多平面重组显得尤为重要,对于判定输入端、输出端交叉走行方向时,矢状位观察必不可少;5例逆时针方向扭转的患者,输入端均位于输出端上方,而1例顺时针方向扭转的患者输入端位于输出端下方,推测原因,可能是发生逆时针方向扭转时,乙状结肠近段扭结在乙状结肠远段上方,随着扭转圈数增加,乙状结肠近段、远段交替位于上下方,但输入端始终在输出端上方。同理发生顺时针方向扭转时,乙状结肠输入端始终位于输出端下方;但由于本组样本量较少,因此扭转方向与X交叉走行方向实际上是否存在此种规律,有待以后大样本病例的证实。

肠系膜血管漩涡征,本组6例患者均出现此征象,此征既往作为肠扭转特征性征象,但近年来有学者指出漩涡征并不是肠扭转所特有,因为在部分粘连性肠梗阻、腹内疝、腹茧症病例中也出现此征象,但漩涡征在肠扭转的患者出现率较高。关于漩涡征的方向,采用冠状位从后向前连续观察较佳,首先,冠状位对漩涡征显示率较高;其次,从后向前的观察方向符合闭袢内近段肠管走行方向,通过这种方法判定出的漩涡征方向与实际扭转方向比较吻合,本组6例患者通过此法判定的扭转方向与手术所见完全吻合。

总之,乙状结肠明显扩张、积气,出现倒“U”型肠袢,结合“X”征及双鸟嘴征,是诊断SV较为可靠的CT征象,依据上述征象,通过仔细观察和分析,可提高SV的CT诊断水平,为临床提供更多的术前参考信息。

4 参考文献

- 1 楼文晖,秦新裕.城市老年人和成年人急性肠梗阻的病因及诊断治疗分析.中华胃肠外科杂志 2001; 4: 37-39
- 2 魏振.乙状结肠扭转的急诊手术治疗.中国中西医结合外科杂志 2010; 16: 70-72
- 3 张晓鹏.胃肠道CT诊断学.沈阳:辽宁科学技术出版社, 2001: 221-300
- 4 Osiro SB, Cunningham D, Shoja MM, Tubbs RS, Gielecki J, Loukas M. The twisted colon: a review of sigmoid volvulus. *Am Surg* 2012; 78: 271-279
- 5 廖正银,王建锦,张金山,赵红.乙状结肠扭转的CT表现.中国医学影像技术 2003; 19: 128
- 6 顾晓方,黄渊全,史彩平,邱建国,吴雨岗.多层螺旋CT对乙状结肠扭转的诊断价值.江苏医药 2012; 38: 855-856
- 7 何博华,薛福龙,高洁贤,朱永湘,钱聚标,谭国钊.乙状结肠扭转36例临床分析及文献复习.中国现代医学杂志 2003; 13: 103-104
- 8 Northeast AD, Dennison AR, Lee EG. Sigmoid volvulus: new thoughts on the epidemiology. *Dis Colon Rectum* 1984; 27: 260-261
- 9 Raveenthiran V, Madiba TE, Atamanalp SS, De U. Volvulus of the sigmoid colon. *Colorectal Dis* 2010; 12: e1-e17

- 10 杨维良, 王秀海, 邱云峰, 于俊杰. 乙状结肠扭转的病因诊断及治疗. 中国急救医学 1989; 9: 7-10
- 11 安大力, 李志霞, 陈佛来. 乙状结肠扭转的诊断与治疗. 中国胃肠外科杂志 1999; 2: 85-87
- 12 吴允明, 芮友臣. 乙状结肠扭转的手术治疗. 实用外科杂志 1983; 3: 183
- 13 金国翔, 喻德洪. 乙状结肠扭转的近代处理. 国外医学 外科学分册 1986; 13: 275-276
- 14 李文华, 曹庆选, 杨世锋, 陆升林, 张强, 吴天, 李建海. 绞窄性肠梗阻肠系膜及血管改变的CT研究. 中华放射学杂志 2006; 40: 81-85
- 15 Javors BR, Baker SR, Miller JA. The northern exposure sign: a newly described finding in sigmoid volvulus. Am J Roentgenol 1999; 173: 571-574

编辑 翟欢欢 电编 闫晋利

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》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¹ $P<0.05$, ² $P<0.01$; 第3套为³ $P<0.05$, ⁴ $P<0.01$. 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. 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)致谢 后加冒号, 排在讨论后及参考文献前, 左齐.

《世界华人消化杂志》投稿须知

《世界华人消化杂志》为保证期刊的学术质量, 对所有来稿均进行同行评议, 是一份被中国科技论文统计源核心期刊、中文核心期刊要目总览收录的学术类期刊。

1 投稿总则

1.1 性质 《世界华人消化杂志》[ISSN 1009-3079 (print), ISSN 2219-2859 (online), CN 14-1260/R]是一份同行评议性和开放获取(open access, OA)的旬刊。OA最大的优点是面向全国本领域专家及公众开放无需注册, 免费获取PDF等格式的全文, 切实破除了传统性期刊阻碍科学研究成果快速传播的障碍。OA是一项真正意义上的公益性科学传播工具, 编委、作者和读者利益的最大化的目标, 努力推进本学科的繁荣和发展。

《世界华人消化杂志》定价68.00元, 全年2448.00元, 邮发代号82-262, 由世界华人消化杂志编辑部出版。《世界华人消化杂志》主要报道胃肠病学、肝胆病学、胰腺病学、内镜介入与消化外科等多学科的评论及基础研究和临床实践等各类文章, 具体内容涉及: 食管疾病, 如反流性食管炎、Barret's食管、食管静脉曲张和食管癌等; 胃部疾病, 胃食管反流性疾病、胃炎、胃动力障碍、胃出血、胃癌和幽门螺杆菌感染等; 肠道疾病, 如肠道出血、肠穿孔、肠梗阻、肠道炎症(如IBD/CD等)、肠道感染、大肠癌和大肠腺瘤等; 肝胆部疾病如病毒性肝炎、肝硬化、脂肪肝、肝纤维化、肝衰竭、胆石病、胆汁郁积、梗阻性黄疸、肝癌、胆囊癌、胆管癌和门静脉高压等; 胰腺疾病, 如胰腺炎和胰腺癌等; 全身性疾病涉及消化系统, 如自身免疫性及瘀胆性疾病、腹腔疾病、消化不良和代谢性疾病等; 以及与以上疾病相关的基因及基因组学、微生物及分子生物学、病因学、流行病学、免疫学、临床内外科诊断与治疗(如影像、化疗、移植、营养等); 除以上外, 本刊也报道诊断与筛选、内窥镜检查法、影像及先进技术。

《世界华人消化杂志》被国际检索系统美国《化学文摘》(Chemical Abstracts, CA)、荷兰《医学文摘库/医学文摘(EMBase/Excerpta Medica, EM)》和俄罗斯《文摘杂志(Abstract Journal, AJ)》收录。国内为中国科技论文统计与分析期刊(科技部列选为中国科技论文统计源期刊)、《中文核心期刊要目总览》(2011年版)内科学类的核心期刊、《中国学术期刊评价研究报告-RCCS权威、核心期刊排行榜与指南》

和中国知识资源总库收录。《中国科技期刊引证报告(核心版)》统计显示, 2010年《世界华人消化杂志》总被引频次3 458次, 影响因子0.694, 综合评价总分60.6分, 分别位居内科学类49种期刊的第5位、第7位、第6位, 分别位居1 998种中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)的第79位、第320位、第190位; 其他指标: 他引率0.83, 被引半衰期4.9, 来源文献量712, 文献选出率0.90, 参考文献量17 963, 平均引文数25.23, 平均作者数4.35, 地区分布数29, 机构分布数349, 基金论文比0.45, 海外论文比0.01。

1.2 栏目 述评, 基础研究, 临床研究, 焦点论坛, 文献综述, 研究快报, 临床经验, 病例报告, 会议纪要。文稿应具科学性、先进性、可读性及实用性, 重点突出, 文字简练, 数据可靠, 写作规范, 表达准确。

2 撰稿要求

2.1 总体标准 文稿撰写应遵照国家标准GB7713科学技术报告、学位论文和学术论文的编写格式, GB6447文摘编写规则, GB7714文后参考文献著录规则, GB/T 3179科学技术期刊编排格式等要求; 同时遵照国际医学期刊编辑委员会(International Committee of Medical Journal Editors)制定的《生物医学期刊投稿的统一要求(第5版)》(Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals)。见: *Ann Intern Med* 1997; 126: 36-47。

2.2 名词术语 应标准化, 前后统一, 如原词过长且多次出现者, 可于首次出现时写出全称加括号内注简称, 以后直接用简称。医学名词以全国自然科学名词审定委员会公布的《生理学术名词》、《生物化学名词与生物物理学名词》、《化学名词》、《植物学名词》、《人体解剖学名词》、《细胞生物学名词》及《医学名词》系列为准, 药名以《中华人民共和国药典》和卫生部药典委员会编的《药名词汇》为准, 国家食品药品监督管理局批准的新药, 采用批准的药名; 创新性新药, 请参照我国药典委员会的“命名原则”, 新译名词应附外文。公认习用缩略语可直接应用(建议第一次也写出全称), 如ALT, AST, mAb, WBC, RBC, Hb, T, P, R, BP,

PU, GU, DU, ACTH, DNA, LD50, HBsAg, HCV RNA, AFP, CEA, ECG, IgG, IgA, IgM, TCM, RIA, ELISA, PCR, CT, MRI等. 为减少排印错误, 外文、阿拉伯数字、标点符号必须正确打印在A4纸上. 中医药名词英译要遵循以下原则: (1)有对等词者, 直接采用原有英语词, 如中风stroke, 发热fever; (2)有对应词者应根据上下文合理选用原英语词, 如八法eight principal methods; (3)英语中没有对等词或相应词者, 宜用汉语拼音, 如阴yin, 阳yang, 阴阳学说yinyangology, 人中renzhong, 气功qigong; 汉语拼音要以词为单位分写, 如weixibao nizhuanwan(胃细胞逆转丸), guizhitang(桂枝汤). 通常应小写.

2.3 外文字符 注意大小写正斜体与上下角标. 静脉注射iv, 肌肉注射im, 腹腔注射ip, 皮下注射sc, 脑室注射icv, 动脉注射ia, 口服po, 灌胃ig. s(秒)不能写成S, kg不能写成Kg, mL不能写成ML, lcpm(应写为1/min)÷E%(仪器效率)÷60 = Bq, pH不能写PH或P^H, *H. pylori*不能写成HP, $T_{1/2}$ 不能写成tl/2或 $T_{1/2}^1$, Vmax不能Vmax, μ 不写为英文u. 需排斜体的外文字, 用斜体表示. 如生物学中拉丁学名的属名与种名, 包括亚属、亚种、变种. 如幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*), *Ilex pubescens* Hook, et Arn.var.*glaber* Chang(命名者勿划横线); 常数K; 一些统计学符号(如样本数n, 均数mean, 标准差SD, F检验, t检验和概率P, 相关系数r); 化学名中标明取代位的元素、旋光性和构型符号(如N, O, P, S, d, l)如n-(normal, 正), N-(nitrogen, 氮), o-(ortho, 邻), O-(oxygen, 氧, 习惯不译), d-(dextro, 右旋), p-(para, 对), 例如n-butyl acetate(醋酸正丁酯), N-methylacetanilide(N-甲基乙酰苯胺), o-cresol(邻甲酚), 3-O-methyl-adrenaline(3-O-甲基肾上腺素), d-amphetamine(右旋苯丙胺), l-dopa(左旋多巴), p-aminosalicylic acid(对氨基水杨酸). 拉丁字及缩写in vitro, in vivo, in situ; Ibid, et al, po, vs; 用外文字母代表的物理量, 如m(质量), V(体积), F(力), p(压力), W(功), v(速度), Q(热量), E(电场强度), S(面积), t(时间), z(酶活性, kat), t(摄氏温度, °C), D(吸收剂量, Gy), A(放射性活度, Bq), ρ (密度, 体积质量, g/L), c(浓度, mol/L), ϕ (体积分数, mL/L), w(质量分数, mg/g), b(质量摩尔浓度, mol/g), l(长度), b(宽度), h(高度), d(厚度), R(半径), D(直径), T_{\max} , C_{\max} , Vd, $T_{1/2}$ CI等. 基因符号通常用小写斜体, 如ras, c-myc; 基因产物用大写正体, 如P16蛋白.

2.4 计量单位 采用国际单位制并遵照有关国家

标准, GB3100-3102-93量和单位. 原来的“分子量”应改为物质的相对分子质量. 如30 kD改为 M_r 30 000或30 kDa(M大写斜体, r小写正体, 下角标); “原子量”应改为相对原子质量, 即 A_r (A大写斜体, r小写正体, 下角标); 也可采用原子质量, 其单位是u(小写正体). 计量单位在+、-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: wjcd@wjgnet.com; http://www.wjgnet.com

文大写 F ; (3)卡方检验用希文小写 χ^2 ; (4)样本的相关系数用英文小写 r ; (5)自由度用希文小写 ν ; (6)样本数用英文小写 n ; (7)概率用英文斜体大写 P . 在统计学处理中在文字叙述时平均数 \pm 标准差表示为 $\text{mean} \pm \text{SD}$, 平均数 \pm 标准误为 $\text{mean} \pm \text{SE}$. 统计学显著性用 $^aP < 0.05$, $^bP < 0.01$ ($P > 0.05$ 不注). 如同一表中另有一套 P 值, 则 $^cP < 0.05$, $^dP < 0.01$; 第三套为 $^eP < 0.05$, $^fP < 0.01$ 等.

2.6 数字用法 遵照国家标准GB/T 15835-1995出版物上数字用法的规定, 作为汉语词素者采用汉字数字, 如二氧化碳、十二指肠、三倍体、四联球菌、五四运动、星期六等. 统计学数字采用阿拉伯数字, 如1000-1500 kg, 3.5 mmol/L \pm 0.5 mmol/L等. 测量的数据不能超过其测量仪器的精密度, 例如6347意指6000分之一的精密度. 任何一个数字, 只允许最后一位有误差, 前面的位数不应有误差. 在一组数字中的 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 应考虑到个体的变差, 一般以SD的1/3来定位数, 例如 $3614.5 \text{ g} \pm 420.8 \text{ g}$, SD的1/3达一百多g, 平均数波动在百位数, 故应写成 $3.6 \text{ kg} \pm 0.4 \text{ kg}$, 过多的位数并无意义. 又如 $8.4 \text{ cm} \pm 0.27 \text{ cm}$, 其 $\text{SD}/3 = 0.09 \text{ cm}$, 达小数点后第2位, 故平均数也应补到小数点后第2位. 有效位数以后的数字是无效的, 应该舍. 末尾数字, 小于5则舍, 大于5则进, 如恰等于5, 则前一位数逢奇则进, 逢偶(包括“0”)且5之后全为0则舍. 末尾时只可1次完成, 不得多次完成. 例如23.48, 若不要小数点, 则应成23, 而不应该 $23.48 \rightarrow 23.5 \rightarrow 24$. 年月日采用全数字表达法, 请按国家标准GB/T 7408-94书写. 如1985年4月12日, 可写作1985-04-12; 1985年4月, 写作1985-04; 从1985年4月12日23时20分50秒起至1985年6月25日10时30分止, 写作1985-04-12 T23:20:50/1985-06-25 T10:30:00; 从1985年4月12日起至1985年6月15日止, 写作1985-04-12/06-16, 上午8时写作08:00, 下午4时半写作16:30. 百分数的有效位数根据分母来定: 分母 ≤ 100 , 百分数到个位; $101 \leq \text{分母} \leq 1000$, 百分数到小数点后1位; 余类推. 小数点前后的阿拉伯数字, 每3位间空1/4阿拉伯数字距离, 如1486800.475 65. 完整的阿拉伯数字不移行!

2.7 标点符号 遵照国家标准GB/T 15834-1995标点符号用法的要求, 本刊论文中的句号都采用黑圆点; 数字间的起止号采用“-”字线, 并列的汉语词间用顿号分开, 而并列的外文词、阿拉伯数字、外文缩略词及汉语拼音字母拼写词间改用逗号分开, 参考文献中作者间一律用逗号分开; 表示终了的标点符号, 如句号、逗号、顿

号、分号、括号及书名号的后一半, 通常不用于一行之首; 而表示开头的标点符号, 如括号及书名号的前一半, 不宜用于一行之末. 标点符号通常占一格, 如顿号、逗号、分号、句号等; 破折号应占两格; 英文连字符只占一个英文字符的宽度, 不宜过长, 如5-FU. 外文字符下划一横线表示用斜体, 两横线表示用小写, 三横线表示用大写, 波纹线表示用黑体.

3 稿件格式

3.1 题名 简明确切地反映论文的特定内容, 鲜明而有特色, 阿拉伯数字不宜开头, 不用副题名, 一般20个字. 避免用“的研究”或“的观察”等非特定词.

3.2 作者 论文作者的署名, 按照国际医学杂志编辑委员会(ICMJE, International Committee of Medical Journal Editors)作者资格标准执行. 作者标准为: (1)对研究的理念和设计、数据的获得、分析和解读做出重大贡献; (2)起草文章, 并对文章的重要的知识内容进行批评性修改; (3)接受对准备发表文章的最后一稿. 作者应符合条件1, 2, 3, 对研究工作有贡献的其他人可放入志谢中. 作者署名的次序按贡献大小排列, 多作者时姓名间用逗号, 如是单名, 则在姓与名之间空1格(正文和参考文献中不空格). 《世界华人消化杂志》要求所有署名人写清楚自己对文章的贡献. 世界华人消化杂志不设置共同第一作者和共同通信作者.

3.3 单位 作者后写单位的全称空1格后再写省市及邮政编码. 格式如: 张旭晨, 梅立新, 承德医学院病理教研室 河北省承德市 067000

3.4 第一作者简介 格式如: 张旭晨, 1994年北京中医药大学硕士, 讲师. 主要从事消化系统疾病的病理研究.

3.5 作者贡献分布 格式如: 陈湘川与庞丽娟对此文所作贡献两均等; 此课题由陈湘川、庞丽娟、陈玲、杨兰、张金芳、齐妍及李洪安设计; 研究过程由陈玲、杨兰、张金芳、蒋金芳、杨磊、李锋及曹秀峰操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由曹秀峰提供; 数据分析由陈湘川、杨兰及庞丽娟完成; 本论文写作由陈湘川、庞丽娟及李洪安完成.

3.6 同行评议者 为了确保刊出文章的质量, 本刊即将开始实行接受稿件的同行评议公开策略, 将同行评议者姓名, 职称, 机构的名称与文章一同在脚注出版. 格式如: 房静远, 教授, 上海交通大学医学院附属医院仁济医院, 上海市消化疾

病研究所。

3.7 基金资助项目 格式如: 国家自然科学基金资助项目, No. 30224801

3.8 通讯作者 格式如: 通讯作者: 黄缘, 教授, 330006, 江西省南昌市民德路1号, 南昌大学第二附属医院消化内科, 江西省分子医学重点实验室. huang9815@yahoo.com

电话: 0351-4078656 传真: 0351-4086337

收稿日期: 修回日期:

3.9 英文摘要

题名 文章的题名应言简意赅, 方便检索, 英文题名以不超过10个实词为宜, 应与中文题名一致。

作者 作者姓名汉语拼音拼写法规定为: 先名, 后姓; 首字母大写, 双名之间用半字线“-”分开, 多作者时姓名间加逗号。格式如: “潘伯荣”的汉语拼写法为“Bo-Rong Pan”。

单位 先写作者, 后写单位的全称及省市邮政编码。例如: Xu-Chen Zhang, Li-Xin Mei, Department of Pathology, Chengde Medical College, Chengde 067000, Hebei Province, China

基金资助项目 格式如: Supported by National Natural Science Foundation of China, No.30224801

通讯作者 格式如: Correspondence to: Dr. Lian-Sheng Ma, Taiyuan Research and Treatment Center for Digestive Diseases, 77 Shuangta Xijie, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China. wcjd@wjgnet.com

收稿及修回日期 格式如: Received: Revised:

摘要 包括目的、方法、结果、结论, 书写要求与中文摘要一致。

3.10 中文摘要 必须在300字左右, 内容应包括目的(应阐明研究的背景和设想、目的), 方法(必须包括材料或对象, 应描述课题的基本设计, 双盲、单盲还是开放性, 使用什么方法, 如何进行分组和对照, 数据的精确程度。研究对象选择条件与标准是否遵循随机化、齐同化的原则, 对照组匹配的特征。如研究对象是患者, 应阐明其临床表现, 诊断标准。如何筛选分组, 有多少例进行过随访, 有多少例因出现不良反应而中途停止研究), 结果(应列出主要结果, 包括主要数据, 有什么新发现, 说明其价值和局限, 叙述要真实、准确、具体, 所列数据经用何种统计学方法处理; 应给出结果的置信区间和统计学显著性检验的确切值; 概率写 P , 后应写出相应显著性检验值), 结论(全文总结, 准确无误的观点及价值)。

3.11 正文标题层次 0 引言; 1 材料和方法, 1.1 材料, 1.2 方法; 2 结果; 3 讨论; 4 参考文献。序号一

律左顶格写, 后空1格写标题; 2级标题后空1格接正文。正文内序号连排用(1), (2), (3)。以下逐条陈述。

0 引言 应包括该研究的目的和该研究与其他相关研究的关系。

1 材料和方法 应尽量简短, 但应让其他有经验的研究者能够重复该实验。对新的方法应该详细描述, 以前发表过的方法引用参考文献即可, 有关文献中或试剂手册中的方法的改进仅描述改进之处即可。

2 结果 实验结果应合理采用图表和文字表示, 在结果中应避免讨论。

3 讨论 要简明, 应集中对所得的结果做出解释而不是重复叙述, 也不应是大量文献的回顾。

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

志谢 后加冒号, 排在讨论后及参考文献前, 左齐。

4 参考文献 本刊采用“顺序编码制”的著录方法, 即以文中出现顺序用阿拉伯数字编号排序。提倡对国内同行近年已发表的相关研究论文给予充分的反映, 并在文内引用处右上角加方括号注明角码。文中如列作者姓名, 则需在“Pang等”的右上角注角码号; 若正文中仅引用某文献中的论述, 则在该论述的句末右上角注码号。如马连生^[1]报告……, 潘伯荣等^[2-5]认为……; PCR方法敏感性高^[6-7]。文献序号作正

《世界华人消化杂志》自2006-01-01起改为旬刊发行, 每月8、18、28日出版。北京报刊发行局发行, 邮发代号: 82-262。

《世界华人消化杂志》坚持开放获取(open access, OA)的出版模式, 编辑出版高质量文章, 努力实现编委、作者和读者利益的最大化, 努力推进本学科的繁荣和发展, 向专业化、特色化和品牌化方向迈进。

文叙述时, 用与正文同号的数字并排, 如本实验方法见文献[8]。所引参考文献必须以近2-3年SCIE, PubMed, 《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊为准, 通常应只引用与其观点或数据密切相关的国内外期刊中的最新文献。期刊: 序号, 作者(列出全体作者), 文题, 刊名, 年, 卷, 起页-止页, PMID和DOI编号; 书籍: 序号, 作者(列出全部), 书名, 卷次, 版次, 出版地, 出版社, 年, 起页-止页。

5 网络版的发表前链接 本刊即将开始实行网络版的每篇文章上都有该文发表前纪录的链接, 包括首次提交的稿件, 同行评议人报告, 作者给审稿人回信和作者修回稿, 以PDF格式上传。读者可以针对论文、审稿意见和作者的修改情况发表意见, 指出问题与不足; 作者也可以随时修改完善自己发表的论文, 使文章的发表成为一个编者、同行评议者、读者、作者互动的动态过程。

4 写作格式实例

4.1 述评写作格式实例

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

4.2 研究原著写作格式实例

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

4.3 焦点论坛写作格式实例

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

4.4 文献综述写作格式实例

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

4.5 研究快报写作格式实例

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

4.6 临床经验写作格式实例

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

4.7 病例报告写作格式实例

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

5 投稿方式

接受在线投稿, 不接受其他方式的投稿, 如E-mail、打印稿。在线投稿网址: <http://www.baishideng.com/wcjd/ch/index.aspx>。无法在线提交的通过submission@wjgnet.com, 电话: 010-8538-1892, 传真: 010-8538-1893寻求帮助。投稿须知下载网址<http://www.wjgnet.com/1009-3079/tgxz.pdf>。审稿过程平均时间需要14-28 d。所有的来

稿均经2-3位同行专家严格评审, 2位或以上通过为录用, 否则将退稿或修改后再审。接受后的稿件作者需缴纳稿件发表费, 文章发表后可获得1本样刊及10套单行本(稿酬)。

6 修回稿须知

6.1 修回稿信件 来稿包括所有作者签名的作者投稿函。内容包括: (1)保证无重复发表或一稿多投; (2)是否有经济利益或其他关系造成的利益冲突; (3)所有作者均审读过该文并同意发表, 所有作者均符合作者条件, 所有作者均同意该文代表其真实研究成果, 保证文责自负; (4)列出通讯作者的姓名、职称、地址、电话、传真和电子邮件; 通讯作者应负责与其他作者联系, 修改并最终审核复核稿; (5)列出作者贡献分布; (6)来稿应附有作者工作单位的推荐信, 保证无泄密, 如果是几个单位合作的论文, 则需要提供所有参与单位的推荐信; (7)愿将印刷版和电子版出版权转让给本刊编辑部。

6.2 稿件修改 来稿经同行专家审查后, 认为内容需要修改、补充或删除时, 本刊编辑部将把原稿连同审稿意见、编辑意见寄回给作者修改, 而作者必须于15 d内将单位介绍信、作者符合要点承诺书、版权转让信等书面材料寄回编辑部, 同时将修改后的电子稿件上传至在线办公系统; 逾期寄回, 所造成的问题由作者承担责任。

6.3 版权 本论文发表后作者享有非专有权, 文责由作者自负。作者可在本单位或本人著作集中汇编出版以及用于宣讲和交流, 但应注明发表于《世界华人消化杂志》××年; 卷(期): 起止页码。如有国内外其他单位和个人复制、翻译出版等商业活动, 须征得《世界华人消化杂志》编辑部书面同意, 其编辑版权属本刊所有。

《世界华人消化杂志》编辑部

北京百世登生物医学科技有限公司
100025, 北京市朝阳区东四环中路62号
远洋国际中心D座903室
电话: 010-5908-0035
传真: 010-8538-1893
E-mail: wcjd@wjgnet.com
<http://www.wjgnet.com>

2012年国内国际会议预告

2012-08-29/09-01

中华医学会第十一次全国内分泌学学术会议

会议地点: 广州市

联系方式: lilyjia@163.com

2012-08-30/09-02

2012年中华医学会全国麻醉学术年会

会议地点: 重庆市

联系方式: csa2012@live.cn

2012-09-01/30

中华医学会第三次全国肝纤维化、肝硬化学术会议

会议地点: 郑州市

联系方式: lijuyi@cma.org.cn

2012-09-01/30

第十五届全国中西医结合大肠肛门病学术交流会

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@dxer.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: lckhy@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12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!

程树群 副教授
中国人民解放军第二军医大学东方肝胆外科医院综合治疗三科

林志辉 教授
福建省立医院消化内科

崔云甫 教授
哈尔滨医科大学第二附属医院普外一科

龙学颖 副主任医师
中南大学湘雅医院放射科

樊红 教授
东南大学基础医学院遗传与发育生物学系

倪才方 教授
苏州大学附属第一医院介入科

傅晓辉 副教授
东方肝胆外科医院

孙星 副教授
上海交通大学附属第一人民医院普外科

高润平 教授
吉林大学第一医院肝病科

王文跃 主任医师
中日友好医院普通外科

戈之铮 教授
上海交通大学医学院附属仁济医院消化科

王小众 教授
福建医科大学附属协和医院消化内科

顾国利 副主任医师
中国人民解放军空军总医院普通外科

王铮 副研究员
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

官泳松 教授
四川大学华西医院放射科

魏睦新 教授
南京医科大学第一附属医院

韩天权 教授
上海交通大学医学院附属瑞金医院外科, 上海消化外科研究所

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

何裕隆 教授
中山大学附属第一医院胃肠胰腺外科

徐泱 副主任医师
复旦大学附属中山医院肝外科复旦大学肝癌研究所

黄志勇 教授
华中科技大学同济医院普外科

杨钦河 教授
暨南大学医学院中医系

姜慧卿 教授
河北医科大学第二医院消化科

姚树坤 教授
卫生部中日友好医院消化内科

金瑞 教授
首都医科大学附属北京佑安医院消化科

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

李瑗 教授
广西肿瘤研究所

于聪慧 教授
中国人民解放军北京军区总医院肝胆外科

李志霞 教授
首都医科大学附属北京同仁医院普外科

禹正杨 副教授
南华大学附属第一医院