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

世界华人消化杂志

世界华人消化杂志®

WORLD CHINESE JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2012 年 12 月 28 日　第 20 卷　第 36 期　(Volume 20 Number 36)

www.wjgnet.com

二零一二年十二月二十八日　第二十卷　第三十六期

36/2012

ISSN 1009-3079
36>
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
季国忠教授
江米足教授
姜春萌教授
姜慧卿教授
姜相君主任医师
金瑞教授
蓝宇教授
李淑德教授
李瑜元教授
李玉民教授
廖家智副主任医师
林志辉教授
刘冰熔教授
刘凤斌教授
刘改芳主任医师
刘海峰主任医师
刘海林主任医师
刘亮明副教授
陆伦根教授
马红主任医师
马欣主任医师
毛恩强教授
毛高平教授
孟庆华教授
缪应雷主任医师
倪润洲教授
欧希龙副教授
潘秀珍教授
潘阳林副教授
朴云峰教授
秦成勇教授
任粉玉教授
任建林教授
邵先玉教授
沈琳主任医师
沈薇教授
施瑞华教授
宋军副教授
唐世刚教授
田宇彬教授
庹必光教授
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
陈凛教授
陈汝福教授
陈亚军主任医师
陈钟教授
程爱国教授
程树群副教授
崔云甫教授
戴朝六教授
戴冬秋教授
丁义涛教授
杜顺达副教授
房林教授
傅红副教授
傅华群教授
傅思源副教授
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
英卫东教授
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
邰升副教授
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
侯凤刚副教授
江建新副主任医师
蒋敬庭教授
李瑗教授
刘宝瑞教授
刘炳亚研究员
刘平教授
刘云鹏教授
卢宁副主任医师
卢晓梅教授
朴龙镇副教授
沈克平主任医师
王阁教授
王锐副主任医师
吴建兵教授
向德兵副教授
肖文华主任医师
肖秀英副主任医师
谢丹教授
张凤春教授

消化影像学

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

消化内镜及介入治疗学

郝俊鸣副主任医师
李家平教授
刘杰民副主任医师
茅爱武教授
孙明军教授
万军教授
吴沛宏教授
余日胜主任医师
袁友红副教授
张火俊副教授

消化中西医结合学

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

消化基础研究

曹洁副教授
曹鹏副研究员
陈敬贤教授
陈志龙教授
崔莲花副教授
段义农教授
樊红教授
高国全教授
高英堂研究员
管冬元副教授
郭长江研究员
郭俊明教授
何红伟副研究员
何敏教授
黄昆教授
黄文林教授
黄园教授
洪艳教授
李刚教授
李君文研究员
李孟森教授
李文贵副教授
李焱副研究员
李增山副教授
刘长征副教授
刘克辛教授
刘淼副教授
宁钧宇副研究员
彭宗根副研究员
任超世研究员
任浩副教授
任晓峰副教授
邵华副主任药师
沈东炎副教授
沈涛副教授
斯坎德尔·白克力教授
台桂香教授
谭学瑞教授
汤静主管药师
滕旭副教授
田文静副教授
汪思应教授
王钦红教授
王书奎教授
魏继福研究员
文彬研究员
吴道澄教授
吴江锋副教授
吴军研究员
吴俊华副教授
吴志强副教授
夏敏教授
徐健副主任医师
徐宁志研究员
许文燮教授
杨晓明教授
阴赖宏研究员
郁卫东副研究员
喻荣彬教授
曾柱教授
张红教授
张淑坤副研究员
赵平教授
赵铁建教授
周南进研究员
周素芳教授
周晓武副主任医师
朱益民教授
竺亚斌研究员

消化病理学

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

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目　次 ●　2012 年 12 月 28 日　第 20 卷　第 36 期　(总第404期)

述　评

3621 蛋白质乙酰化与肝纤维化
张锦生

基础研究

3625 幽门螺杆菌感染对食管上皮细胞的影响
王淑君, 王蔚虹, 滕贵根, 戴芸, 褚云香, 李江

3632 莫沙比利通过p38/MAPK通路保护氯吡格雷所致胃黏膜上皮细胞损伤
吴海露, 张振玉, 段兆涛, 袁芳岑, 高欣, 王劲松, 黄文斌

3638 糖基化终末产物及其受体在胃肠道中的分布
陈朋民, 赵静波, Hans Gregersen

3644 高频超声对正常SD大鼠肝脏血流动力学的检测
杨蕗璐, 马琳, 陈克霏, 王红, 卢强, 凌文武, 全杰荣, 李加伍, 罗燕

3649 二苯乙烯苷对急性酒精性肝损伤小鼠炎症相关因子的影响
熊章鄂, 仝巧云, 郑世华, 李中艳, 王婷

3656 糖原合成酶激酶-3β在D-GalN/LPS诱导的小鼠急性肝衰竭中的作用
杨丙章, 任锋, 温韬, 殷继明, 王欣欣, 朴正福, 陈德喜, 郑素军, 张晶, 陈煜, 段钟平, 师水生

3663 PI3K抑制剂对急性胰腺炎细胞因子和组织病理学评分的影响
陈诚, 徐萍, 王静, 娄晓丽

3670 重症急性胰腺炎与中性粒细胞凋亡蛋白质的相关性
臧宪华, 吴彦彦, 许兰涛

3678 红花注射液对溃疡性结肠炎大鼠IL-4和IL-1β表达的影响
原皓, 赵雪曼, 原子英, 王鹤鸣, 赵文花

临床研究

3683 KLF6在胃癌和癌前病变中的表达及其意义
马歆花, 周英发, 郑鹏远, 于洋, 张庆, 张令巧

3689 Th17与Foxp3^{+}Treg在胃癌患者外周血中的表达
叶妮, 张光波, 高楠, 黄语嫣, 钱夷婷, 李伏超, 朱一凡, 陈卫昌

3695 临床隐匿性胃癌的FDG-PET/CT征象
王欣, 于丽娟, 陆佩欧, 田墨涵, 李迎辞, 王洪

3701 Caspase-3在慢性病毒性乙、丙型肝炎及非酒精性肝炎中的表达及意义
杨海峰, 薛玲, 郑彩娟, 幺作义, 张艳淑, 姚林, 李佳

文献综述

3707 Barrett's食管微创治疗的研究进展
刘敬杨, 刘冰熔

3713 胃食管反流病的发病机制及其诊治的进展
史燕妹, 赵公芳, 黄华

3719 肝细胞癌诊治的新起点
陈鹏, 李菲

3725 抑瘤素M与肝脏再生、肝脏疾病关系的研究进展
彭菊聪, 苌新明

3732 法尼醇X受体对甘油三酯的代谢调节
何道同, 陈珺明, 王兵

3737 急性胰腺炎硬膜外治疗的研究进展
刘小龙, 陈国忠
3742 炎症性肠病治疗的新进展
高树娟, 施瑞华
3748 结直肠肿瘤中医药治疗的研究进展
李宇飞, 李华山
3754 结直肠癌肝转移治疗的研究进展
李华山, 李宇飞

研究快报

3761 Fas/FasL、Bcl-2/Bax、Caspase-8在大鼠非酒精性脂肪性肝病中的作用机制
何双艳, 李珏宏, 李昌平, 李鹏, 钟晓琳
3767 利用荷H22腹水瘤小鼠恶性腹水模型比较培美曲塞腹腔用药与静脉用药的疗效
李永强, 潘琦津, 刘志辉, 胡晓桦, 廖小莉, 黄世庆

临床经验

3773 mir-21在食管鳞癌中的表达及其与临床病理行为的关系
赵俊刚, 任开明, 汤隽, 张磊
3777 1979-2008年青海地区经胃镜检出胃癌6 362例
荣光宏, 熊元治, 杨永耿, 刘芝兰, 赵相, 逯艳艳
3782 百草枯中毒患者肝功能损害及血液净化治疗对预后的影响
孙国庆, 孙昊, 吕清泉, 张劲松
3787 实时剪切波弹性成像检测肝脏硬度与血清肝纤维化指标及其与肝脏病理的相关性
王利慧, 徐芸, 孙璐璐, 保洁
3791 血清肝纤维化HA、Ⅳ-C、PCⅢ和LN联合检测在布加综合征导致的肝纤维化诊断中的价值
王磊, 魏宁, 徐浩, 祖茂衡, 肖晋昌, 张静, 张科, 傅宇飞
3795 结直肠子宫内膜异位症术前活检病理误诊分析6例
余俊, 李燕, 潘华雄, 贺骏, 聂秀
3801 CD40在溃疡性结肠炎组织中的表达及意义
赵毅, 陆志平, 曹建凡, 陈卫昌
3804 达芬奇机器人手术系统与腹腔镜手术在直肠癌TME中疗效的Meta分析
袁殿宝, 文西年, 许新才, 李涛
3811 结直肠癌线粒体基因组的微卫星不稳定性
崔海宏, 黄平, 赵婷, 张振华, 徐伟, 王小鹏, 韩英
3816 Ⅱa期结肠癌的预后因素
王林, 顾晋, 彭亦凡

病例报告

3822 胃肠道多发结核1例
刘立玺, 雷坚, 向德雨, 文萍, 文剑波

附　　录

3824 《世界华人消化杂志》投稿须知
3829 2012年国内国际会议预告

志　　谢

3830 志谢世界华人消化杂志编委

消　　息

3631 《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)
3637 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
3648 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
3662 2011年度《世界华人消化杂志》发文情况

3677 《世界华人消化杂志》2011年开始不再收取审稿费
3688 《世界华人消化杂志》被评为中国精品科技期刊
3712 《世界华人消化杂志》性质、刊登内容及目标
3718 《世界华人消化杂志》修回稿须知
3736 《世界华人消化杂志》出版流程
3741 *WJG*总被引频次排名位于第174名
3772 《世界华人消化杂志》外文字符标准
3776 《世界华人消化杂志》正文要求
3786 《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》
3800 《世界华人消化杂志》参考文献要求
3810 *WJG*成功通过评审被PMC收录
3821 《世界华人消化杂志》栏目设置

封面故事

《世界华人消化杂志》编委, 张锦生, 教授, 200032, 上海市, 复旦大学基础医学院病理学系

本期责任人

编务 马帅; 送审编辑 田滢, 翟欢欢; 组版编辑 鲁亚静; 英文编辑 王天奇; 责任编辑 田滢; 形式规范审核编辑部主任 李军亮; 最终清样审核总编辑 马连生

世界華人消化雜志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

吴阶平 题写封面刊名
陈可冀 题写版权刊名
(旬刊)
创 刊 1993-01-15
改 刊 1998-01-25
出 版 2012-12-28
原刊名 新消化病学杂志

期刊名称 世界华人消化杂志
主管单位 山西省科学技术厅
主办单位 太原消化病研治中心

编辑 世界华人消化杂志编辑委员会
030001, 山西省太原市双塔西街77号
电话: 0351-4078656
E-mail: wcjd@wjgnet.com
http://www.wjgnet.com

出版 世界华人消化杂志编辑部
030001, 山西省太原市双塔西街77号
电话: 0351-4078656
E-mail: wcjd@wjgnet.com
http://www.wjgnet.com

主编
程英升, 教授, 200072, 上海市, 同济大学附属第十人民医院影像临床医学中心
党双锁, 教授, 710004, 陕西省西安市, 西安交通大学医学院第二附属医院感染科
江学良, 教授, 250031, 山东省济南市, 中国人民解放军济南军区总医院消化科
刘连新, 教授, 150001, 黑龙江省哈尔滨市, 哈尔滨医科大学第一临床医学院普外科
刘占举, 教授, 200072, 上海市, 同济大学附属第十人民医院消化内科
吕宾, 教授, 310006, 浙江省杭州市, 浙江中医药大学附属医院(浙江省中医院)消化科
马大烈, 教授, 200433, 上海市, 中国人民解放军第二军医大学附属长海医院病理科
王小众, 教授, 350001, 福建省福州市, 福建医科大学附属协和医院消化内科
姚登福, 教授, 226001, 江苏省南通市, 南通大学附属医院临床医学研究中心
张宗明, 教授, 100016, 北京市, 清华大学第一附属医院消化医学中心

编辑部主任 李军亮

印刷 北京科信印刷厂
发行 国内: 北京报刊发行局
国外: 中国国际图书贸易总公司
(100044, 北京市399信箱)
订购 全国各地邮电局

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

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

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

2012年版权归世界华人消化杂志所有

中国标准连续出版物号 **ISSN** 1009-3079 (print) **ISSN** 2219-2859 (online) **CN** 14-1260/**R**
邮发代号 82-262
国外代号 **M** 4481
国内定价 每期68.00元 全年2448.00元
广告经营许可证 1401004000050

World Chinese Journal of Digestology

December 2012 Contents in Brief Volume 20 Number 36

EDITORIAL

3621 Role of lysine acetylation of proteins in the pathogenesis of hepatic fibrosis
Zhang JS

BASIC RESEARCH

3625 Effect of *Helicobacter pylori* infection on esophageal epithelial cells *in vitro*
Wang SJ, Wang WH, Teng GG, Dai Y, Chu YX, Li J

3632 Mosapride protects against clopidogrel-induced gastric mucosal epithelium cell damage via the p38 MAPK signaling pathway
Wu HL, Zhang ZY, Duan ZT, Yuan FC, Gao X, Wang JS, Huang WB

3638 Distribution of advanced glycation end products and their receptor in the gastrointestinal tract
Chen PM, Zhao JB, Hans Gregersen

3644 Assessment of hepatic hemodynamics using high-frequency ultrasound in normal rats
Yang LL, Ma L, Chen KF, Wang H, Lu Q, Ling WW, Quan JR, Li JW, Luo Y

3649 Tetrahydroxystilbene glucoside protects against ethanol-induced liver injury in mice by inhibition of expression of inflammation-related factors
Xiong ZE, Tong QY, Zheng SH, Li ZY, Wang T

3656 Role of glycogen synthase kinase 3β in the pathogenesis of D-GalN/LPS-induced acute liver injury in mice
Yang BZ, Ren F, Wen T, Yin JM, Wang XX, Piao ZF, Chen DX, Zheng SJ, Zhang J, Chen Y, Duan ZP, Shi SS

3663 Effect of PI3K inhibitor wortmannin on cytokine levels and pancreatic histopathological scores in rats with severe acute pancreatitis
Chen C, Xu P, Wang J, Lou XL

3670 Relationship between development and progression of severe acute pancreatitis and neutrophil apoptosis-related proteins in rats
Zang XH, Wu YY, Xu LT

3678 Treatment with Carthamus Tinctorius Injection up-regulates IL-4 expression and down-regulates IL-1β expression in ulcerative colitis in rats
Yuan H, Zhao XM, Yuan ZY, Wang HM, Zhao WH

CLINICAL RESEARCH

3683 Expression of KLF6 in gastric carcinoma and premalignant gastric lesions
Ma XH, Zhou YF, Zheng PY, Yu Y, Zhang Q, Zhang LQ

3689 Clinical significance of number of Th17 and Foxp3^{+}Treg cells in peripheral blood of patients with gastric cancer
Ye N, Zhang GB, Gao N, Huang YY, Qian YT, Li FC, Zhu YF, Chen WC

3695 FDG-PET/CT diagnosis of clinically occult gastric cancer
Wang X, Yu LJ, Lu PO, Tian MH, Li YC, Wang H

3701 Significance of expression of caspase-3 in chronic hepatitis B and C and nonalcoholic steatohepatitis
Yang HF, Xue L, Zheng CJ, Yao ZY, Zhang YS, Yao L, Li J

REVIEW

3707 Minimally invasive treatments for Barrett's esophagus
Liu JY, Liu BR

3713 Recent progress in research of gastroesophageal reflux disease: Pathogenesis, diagnosis and treatment
Shi YM, Zhao GF, Huang H

3719 Diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma: A new beginning
Chen P, Li F

3725 Advances in understanding the relationship between oncostatin M, liver regeneration, and liver diseases
Peng JC, Chang XM
3732 Regulation of triglyceride metabolism by the Farnesoid X receptor
He DT, Chen JM, Wang B
3737 Recent advances in the use of epidural anesthesia for acute pancreatitis
Liu XL, Chen GZ
3742 Recent progress in treatment of inflammatory bowel disease
Gao SJ, Shi RH
3748 Advances in treatment of colorectal cancer by traditional Chinese medicine
Li YF, Li HS
3754 Advances in treatment of liver metastases of colorectal cancer
Li HS, Li YF

RAPID COMMUNICATION

3761 Role of Fas/FasL, Bcl-2/Bax and caspase-8 in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease in rats
He SY, Li JH, Li CP, Li P, Zhong XL
3767 Efficacy of intraperitoneal versus intravenous pemetrexed administration in management of malignant ascites in mice bearing ascitic hepatoma-22
Li YQ, Pan QJ, Liu ZH, Hu XH, Liao XL, Huang SQ

CLINICAL PRACTICE

3773 Relationship between mir-21 expression and clinical and pathological features of esophageal squamous cell carcinoma
Zhao JG, Ren KM, Tang J, Zhang L
3777 Epidemiological features of gastric cancer detected by gastroscopy in Qinghai between 1979 and 2008
Rong GH, Xiong YZ, Yang YG, Liu ZL, Zhao X, Lu YY
3782 Relationship between hepatic dysfunction and prognosis in patients with paraquat poisoning: Clinical effects of hemopurification therapy
Sun GQ, Sun H, Lv QQ, Zhang JS
3787 Correlation between liver stiffness measured by supersonic shear imaging and serum fibrosis markers and liver pathology
Wang LH, Xu Y, Sun LL, Bao J
3791 Detection of serum levels of HA, IV-C, PCIII and LN in patients with Budd-Chiari syndrome
Wang L, Wei N, Xu H, Zu MH, Xiao JC, Zhang J, Zhang K, Fu YF
3795 Rectosigmoid endometriosis: Practical approaches to improve the possibility of obtaining a definite preoperative biopsy diagnosis
Yu J, Li Y, Pan HX, He J, Nie X
3801 Significance of expression of CD40 in ulcerative colitis
Zhao Y, Lu ZP, Cao JF, Chen WC
3804 Robotic versus laparoscopic total mesorectal excision for rectal cancer: A meta-analysis
Yuan DB, Wen XN, Xu XC, Li T
3811 Mitochondrial DNA microsatellite instability in colorectal cancer
Cui HH, Huang P, Zhao T, Zhang ZH, Xu W, Wang XP, Han Y
3816 Prognostic factors of stage Ⅱa colon cancer
Wang L, Gu J, Peng YF

CASE REPORT

3822 Multifocal gastrointestinal tuberculosis: A case report
Liu LX, Lei Jian, Xiang DY, Wen P, Wen JB

APPENDIX	3824 Instructions to authors of *World Chinese Journal of Digestology* 3829 Meeting events calendar in 2012
ACKNOWLEDGMENT	3830 Acknowledgments to reviewers of *World Chinese Journal of Digestology*
COVER	Editorial Board Member of *World Chinese Journal of Digestology,* Jin-Sheng Zhang, Professor, Department of Pathology, School of Basic Medical Sciences, Fudan University, Shanghai 200032, China
RESPONSIBLE EDITORS FOR THIS ISSUE	Assistant Editor: *Shuai Ma* Review Editor: *Ying Tian, Huan-Huan Zhai* Electronic Page Editor: *Ya-Jing Lu* English Language Editor: *Tian-Qi Wang* Editor-in-Charge: *Ying Tian* Proof Editor: *Jun-Liang Li* Layout Editor: *Lian-Sheng Ma*

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 28, 2012

NAME OF JOURNAL
World Chinese Journal of Digestology

RESPONSIBLE INSTITUTION
Department of Science and Technology of Shanxi Province

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

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

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2012年12月28日; 20(36): 3621-3624
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

述评 EDITORIAL

蛋白质乙酰化与肝纤维化

张锦生

张锦生, 复旦大学基础医学院病理学系 上海市 200032
张锦生, 教授, 博士生导师, 主要从事肝病病理方面的研究.
通讯作者: 张锦生, 教授, 200032, 上海市医学院路138号, 复旦大学基础医学院病理学系. jszhang44@shmu.edu.cn
电话: 021-54237049　传真: 021-54237596
收稿日期: 2012-10-29　修回日期: 2012-12-09
接受日期: 2012-12-28　在线出版日期: 2012-12-28

Role of lysine acetylation of proteins in the pathogenesis of hepatic fibrosis

Jin-Sheng Zhang

Jin-Sheng Zhang, School of Basic Medical Sciences, Fudan University, Shanghai 200032, China
Correspondence to: Jin-Sheng Zhang, Professor, Department of Pathology, School of Basic Medical Sciences, Fudan University, 138 Yixueyuan Road, Shanghai 200032, China. jszhang44@shmu.edu.cn
Received: 2012-10-29　Rivised: 2012-12-09
Accepted: 2012-12-28　Published online: 2012-12-28

Abstract
Protein acetylation is a widely studied covalent modification that affects gene regulation in eukaryotic cells. The post-translational ε-amino lysine acetylation of proteins is highly reversible and catalyzed by many lysine acetyltransferases (KATs). The opposing process of acetylation is deacetylation which is governed by histone deacetylases (HDACs). The ε-amino lysine acetylation is a reversible post-translational modification with the potential to rival phosphorylation and plays important roles in diverse physiological and pathological processes. Many studies have been performed on potentials of ε-amino lysine acetylation in carcinogenesis, especially in hematological malignancies. Two HDAC inhibitors, romidepsin (Istodax) and vorinostat (SAHA), have been recently approved by the US FDA to treat skin T cell lymphoma. It is expected that ε-amino lysine acetylation will be the hot spot in research on solid tumors and non-tumor diseases. Following is a review regarding the role of lysine acetylation in the pathogenesis of hepatic fibrosis.

Key Words: Lysine acetylation; Liver fibrosis; Hepatic stellate cells; Histone deacetylase inhibitor

Zhang JS. Role of lysine acetylation of proteins in the pathogenesis of hepatic fibrosis. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(36): 3621-3624

摘要
蛋白质中赖氨酸ε氨基(Nε)乙酰化, 是多肽侧链上氨基的乙酰化, 由赖氨酸乙酰转移酶(acetyltransferases, KATs)催化. 该过程是可逆的, 去乙酰化是由组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylases, HDACs)催化完成. Nε乙酰化(以下简称K乙酰化)是与磷酸化同等重要的蛋白质修饰, 参与各种生理病理过程. 蛋白乙酰化参与肿瘤, 尤其是造血系统肿瘤的发生已有大量研究. 近来, 美国FDA批准HDACs抑制剂romidepsin(Istodax)和vorinostat(SAHA)用于临床治疗皮肤T细胞淋巴瘤. 蛋白乙酰化与实体肿瘤和非肿瘤性疾病发生的关系必将会成为今后研究的热点, 现将蛋白乙酰化在肝纤维化发生中的作用作一概述.

关键词: 蛋白质赖氨酸乙酰化; 肝纤维化; 肝星状细胞; 组蛋白去乙酰化酶抑制剂

张锦生. 蛋白质乙酰化与肝纤维化. 世界华人消化杂志 2012; 20(36): 3621-3624
http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/3621.asp

0 引言
蛋白质修饰是细胞功能表观遗传学调节的重要环节之一, 包括蛋白质磷酸化、乙酰化、甲基化、糖基化、羟基化、泛素化、SUMO化等. 真核细胞80%-90%的蛋白质(组蛋白和非组蛋白)有乙酰化. 蛋白质乙酰化有3种类型, 即蛋白质N-端α氨基(Nα)乙酰化(不可逆)、ε氨基(Nε)乙酰化(可逆)和O-乙酰化. 第1种是多肽主链上α氨基的乙酰化, 在蛋白翻译过程中完成, 与保护蛋白质不受降解, 维持蛋白质功能有关; 第2种即本文要讨论的蛋白K乙酰化; O-乙酰化是酪氨酸/丝氨酸/苏氨酸羟基的乙酰化, 为近年发现的另一个具有重要调节作用的蛋白乙酰化[1-4]. 用

■背景资料
蛋白质赖氨酸乙酰化与去乙酰化是组蛋白及非组蛋白重要的修饰机制. 该机制的紊乱与肿瘤和许多非肿瘤疾病(包括器官纤维化)的发生相关, 用组蛋白去乙酰化抑制剂治疗肿瘤已取得一些成果. 蛋白质K乙酰化在肝纤维化发生中的作用虽已有一些研究, 然只是浅层次地接触, 还有待于进一步的研究.

■同行评议者
张小晋, 主任医师, 北京积水潭医院

■创新盘点
蛋白乙酰化与实体肿瘤和非肿瘤性疾病发生的关系必将会成为今后研究的热点，本文对蛋白乙酰化在肝纤维化发生中的作用做了较为全面的阐述.

高分辨率质谱检出肝脏中K乙酰化蛋白质高达1 047个, 除组蛋白外, K乙酰化还涉及与染色质重构、DNA复制、DNA修复有关的蛋白、转录因子和转录调节因子、信号转导中的信号分子、凋亡相关蛋白、三大代谢的酶, 一些结构蛋白甚至蛋白乙酰化酶和去乙酰化酶本身. 可见K乙酰化在调节蛋白功能, 继而在调节细胞各种生理和病理过程中起重要作用[5,6].

K乙酰化是在赖氨酸乙酰转移酶(acetyl-transferases, KATs)催化下将Acetyl CoA的乙酰基转移到赖氨酸ε位的氨基上, 该过程是可逆的, 在组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylases, HDACs)催化下可以去掉赖氨酸的乙酰基.

KATs分A和B两大类, A类位于细胞核, B类位于细胞质. 人及哺乳动物中已鉴定出20余种, 主要有: (1)P300/CBP(CREB-binding protein)家族, 又名KAT3B/KAT3A, 有>75个非组蛋白底物, 为通用的KAT, 与细胞分化与凋亡关系密切, 其变异与癌症发生有关; (2)MYST家族, 有MOF、Tip60(KAT5)、HBO1、 MOZ、MORF等, 与进化有关; (3)GNAT超家族, 包括GcN5L、PCAF(KAT2B)、ElP3、Hat1、ARD1、Eco1、MCM3AP等; (4)TAFⅡ230/250家族, 在人类中是TAFⅡ250, 为TBP(TATA box-binding protein)相关因子, 是转录因子复合体TAFⅡD的组成部分; (5)P160家族, 是一组核受体辅转录激活因子, 有ACTR、SRCI等[7].

近年, KATs的抑制剂已有不少报道, 如抑制P300的有赖氨酰辅酰A、槚如酸(anacardic acid)、聚异丙烯酸化二苯酮(garcinol, 提取于印度藤黄)、姜黄素、白花丹素(plumbagin)、异噻唑啉酮(isothiazolones)、LTK14; 抑制CBP的有槚如酸、聚异丙烯酸化二苯酮、姜黄素和γ-丁内酯(butyrolactones); 抑制PCAF的有H3-CoA-20、槚如酸、聚异丙烯酸化二苯酮、异噻唑啉酮等. 而表没食子酚儿茶素3-没食子酸盐(epigallocatechin3-gallate)对KATs的抑制作用则无明显的选择性[8,9].

组蛋白去乙酰化酶有4组: ClassⅠ, 包括HDAC 1、2、3、8与酵母Rpd3同源. 该组HDAC分子较小, 在40-55 kd间. HDAC 1、2、3位于细胞核内, 他们的底物包括p53、myo-D、STAT-3、E2F1、Rel-A、YY1等. HDAC 8在细胞核和细胞质均有分布, 底物尚不清楚. ClassⅡ, 与酵母Hda 1同源, 该组HDAC分子较大, 在70-130 kd, 又可分为ClassⅡA(HDAC 4、5、7、9)和ClassⅡB(HDAC 6、10). ClassⅡA在细胞分裂信号的刺激下, 可在质-核之间穿梭, 而ClassⅡB主要位于细胞质. ClassⅡ HDAC对非组蛋白(如GATA-1、GCMa、HP-1、SMAD-7、FLAG-1、-2等)也有去乙酰化作用, 其中HDAC 6是α-微管蛋白和热休克蛋白-90最主要的去乙酰化酶. 因此, HDAC 6与细胞运动有关, 并通过热休克蛋白-90来增强癌基因蛋白, 如: EGFR、RAF-1、ABL的稳定性. Class Ⅲ为SIRT 1-7, 与酵母sir 2基因同源; Class Ⅳ仅有HDAC 11, 实际上是第1、2组HDACs的催化功能域的保守区. 第1、2、4组为依赖Zn+2的金属酶, 属经典的组蛋白去乙酰化酶. 而第3组是NAD+依赖的酶[10].

近年, 寻找HDACs的抑制剂已成为研究热点, 抑制剂按分子结构可分为4类: (1)短链脂肪酸, 有丁酸钠、丙戊酸(valproic acid, VPA)等; (2)氧肟酸类, 常用的是曲古抑菌素(TSA)和辛二酰苯胺异羟肟酸(SAHA), 后者常用作判断抑制效应的金标准. 还有辛二酸双异羟肟酸盐(suberic bishydroxamate, SBHA), m-羧基肉桂酸双异羟肟酸盐(m-Carboxy cinnamic acid bishydroxamate, CBHA)和N-羟基-N'-3-吡啶基辛二酰胺(pyrox-amide)等; (3)环形四肽类, 有Trapoxin、Apicidin和FR901128等; (4)苯甲酰胺类, 如4-乙酰氨基-N-(2'-氨基苯基)-苯甲酰胺(CI994)和MS275等, 两者均有抗肿瘤作用. 值得一提的是, VPA对ClassⅠHDACs的抑制效应要强于TSA, 而尼克酰胺, 即Vit. PP, 可抑制ClassⅢ去乙酰化酶(SIRT)[10,11].

K乙酰化与肿瘤发生关系密切, 已有大量报道, 尤其是造血系统肿瘤. 近来, 美国FDA批准HDACs抑制剂romidepsin(Istodax)和vorinostat用于临床治疗皮肤T细胞淋巴瘤. 但某些实体肿瘤及非肿瘤疾病(如纤维化)中K乙酰化的研究还处于基础研究或初步的临床试验阶段, 现将K乙酰化在肝纤维化发生中的作用及潜在的应用前景的研究进展作一综述.

1 K乙酰化在肝星状细胞激活中的作用

肝纤维化时产生细胞外基质(extracellular matrix, ECM)最主要的细胞是肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC). 十多年前, 已有研究表明, TSA加入分离培养第3天的大鼠HSC培液中, 可部分阻止静止的HSC向肌成纤维细胞转化, 抑制α-SMA表达, 降低Ⅰ、Ⅲ型胶原蛋白的产生, 且这种作用可能与组蛋白H4过度乙酰化有关[12]. 另外,

小鼠原代HSC在体外自行激活过程中, ClassⅠHDACs表达的变化有一定规律, 静止时(分离培养4 d前)HDAC 8不表达, 激活开始时(培养4 d)即一直表达; 而HDAC 1、2在HSC静止状态却明显表达, 激活时(培养10 d)则下降甚至不表达; HDAC 3在静止时表达, 激活时仍表达, 其水平不变. 用2.5 mmol/L的VPA从培养第0天开始处理HSC, 可全面抑制培养第4、7、10天时HDAC 1、2、3、8的表达, 同时明显抑制HSC表达α-SMA. EdU掺入标记和免疫细胞化学染色显示, VPA还可抑制HSC的增殖和刺激核内组蛋白H4的乙酰化. 在mRNA水平, VPA可抑制HSC激活的标志物, 如α-SMA、赖氨酸氧化酶(Lox)、分泌磷蛋白1或骨桥蛋白(Spp1)、平滑肌肌球蛋白(Myh11)等的表达[13]. 在硫代乙酰胺(thioacetamide, TAA)小鼠肝纤维化模型中, 与TAA急性肝损伤模型相比, MMP-9、MMP-12、MMP-13和MMP-14的mRNA表达分别下降90%、75%、68%和50%. 同时, 在体外观察到静止的大鼠HSC(原代培养3 d)高表达MMP-9及MMP-13, 激活后(原代培养10 d), 两者明显下降. 激活的大鼠HSC细胞染色质免疫沉淀(ChIP)显示, 在IL-1刺激下, 虽然JNK和ERK信号转导通路处于激活状态, 但下游的转录因子c-Jun以及转录必需的RNA聚合酶Ⅱ却不能很好地与MMP-9及MMP-13基因的启动子结合. ChIP还显示, 与他们启动子相近的组蛋白H4乙酰化水平明显下降, 导致该处染色质构象改变, 阻止转录因子及RNA聚合酶与启动子结合, 从而静默两者的基因. 该过程依赖于组蛋白去乙酰化酶ClassⅡA组中表达增强的HDAC 4的作用[14].

以上实验结果明确了在HSC激活过程中, 蛋白质K乙酰化起重要作用, 其中组蛋白H4的乙酰化改变似乎是关注的焦点.

2 K乙酰化可通过调控TGF-β1信号转导通路影响肝纤维化

转化生长因子β1(transforming growth factor-β1, TGF-β1)信号转导通路的激活是肝纤维化发生机制的关键, 也是HSC激活并维持激活的关键. K乙酰化同样可调控肝脏TGF-β1信号转导通路而影响肝纤维化的发生发展. 如: 用1 mmol/L的VPA(相当于临床用药的血清浓度)作用于人HSC细胞系L190可明显抑制TGF-β1和Ⅰ型胶原mRNA及蛋白水平的表达, 但对L190的增殖却无作用[15].

AMP激活的蛋白激酶(adenosine monophosphate-activated protein kinase, AMPK)的激活(如用其激活剂AICAR或metformin)抑制人(LX-2)及大鼠(CFSC-2G)HSC的功能是通过AMPK竞争性抑制TGF-β1信号转导通路中Smad3与赖氨酸乙酰转移酶P300之间的相互作用, 从而抑制Smad3的乙酰化并诱导P300的降解, 由于P300同时是Smad3重要的辅转录因子, 故P300的降解会导致TGF-β1信号转导通路最后阶段促转录功能的失效[16].

上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)可能在肝纤维化发生中起一定作用, EMT分3型: Ⅰ型发生在胚胎发育时期; Ⅱ型是慢性损伤时, 上皮向成纤维细胞样细胞转化; Ⅲ型发生在癌肿浸润转移过程中. 慢性肝损伤时, 部分肝细胞可发生Ⅱ型EMT, 可能是产生ECM细胞的来源之一. TGF-β1信号通路激活是EMT最重要的促进因素, 实验结果显示: 使用不引起细胞凋亡的剂量(400 nmol/L)时, TSA可以抑制TGF-β1诱导的小鼠肝细胞AML12发生EMT, 同时抑制该细胞Ⅰ型胶原基因的表达, 部分恢复该细胞因TGF-β1作用而消失的合成白蛋白的功能. 进一步研究证实: TSA抑制肝细胞TGF-β1信号通路的重要作用点是Smad3, 他不仅抑制Sp-1与磷酸化的Smad3(P-Smad3)结合, 导致Smad3-Sp-1复合物下降, 干预Smad3的促转录活性; 而且下调P300的表达、核转位以及与P-Smad3的结合, 进一步干预Smad3的促转录活性. 根据Ⅰ型胶原基因启动子中Smad3结合元件的寡核苷酸序列合成探针, 对TGF-β1+TSA处理后的AML12肝细胞核提取物进行电泳迁移率变动分析(electrophoresismobilityshift assay, EMSA)和超迁移率变动分析[(supershift assay, SS), 在细胞核提取物中加入相关抗体, 再作EMSA], 结果显示Smad3与Ⅰ型胶原基因启动子的结合受到明显抑制, 该结果有力地印证了上述的TSA抑制TGF-β1信号通路的作用机制[17].

以上资料提示, K乙酰化可通过影响TGF-β1信号转导通路来干预肝纤维化, 其中对Smad3和P300的作用可能是关键点.

3 调控K乙酰化对肝纤维化的干预作用

四氯化碳诱导的小鼠肝纤维化模型, 在首次注射四氯化碳2 d后, 2次/wk给小鼠饮含0.4% VPA的水, 连续4 wk, 可明显减轻肝纤维化(天狼猩红

■应用要点
本文对蛋白乙酰化在肝纤维化发生中的作用做了较为全面的阐述, 能够为后续的研究提供一定的理论指导.

■同行评价
本文是一篇以基础研究为主的综述, 文章内容及参考文献较新, 结论明确, 具有一定的指导意义.

染+图象分析半定量), 肝组织α-SMA、Ⅰ型胶原、TIMP-Ⅰ的mRNAs的水平明显下降. 但肝功能没有改善[13].

4 结论

蛋白质赖氨酸乙酰化与去乙酰化是组蛋白及非组蛋白重要的修饰机制. 该机制的紊乱参与肿瘤和许多非肿瘤疾病(包括器官纤维化)的发生, 用组蛋白去乙酰化抑制剂治疗肿瘤已取得一些成果. 蛋白质K乙酰化在肝纤维化发生中的作用虽已有一些研究, 然而只是浅层次地接触, 如要全面解决该科学问题, 必须要在3个方面进一步探索: (1)全面完成肝脏主要组成细胞(如肝细胞、库普弗细胞、HSC等)在正常和纤维化状态下蛋白质K乙酰化组学的分析, 尤其是在肝纤维化发生中起关键作用的蛋白质的乙酰化状态; (2)全面了解肝脏主要组成细胞在正常和纤维化状态下HDACs表达谱的改变; (3)研究各种KATs抑制剂及HDACs抑制剂的抑制谱(inhibitory profile). 将来可根据K乙酰化组学和HDACs表达谱提供的信息, 有的放矢地使用这些抑制剂, 以提高防治肝纤维化的疗效, 减轻不良反应.

5 参考文献

1 Polevoda B, Sherman F. The diversity of acetylated proteins. *Genome Biol* 2002; 3: reviews0006

2 Lee TY, Hsu JB, Lin FM, Chang WC, Hsu PC, Huang HD. N-Ace: using solvent accessibility and physicochemical properties to identify protein N-acetylation sites. *J Comput Chem* 2010; 31: 2759-2771

3 Yang XJ, Seto E. HATs and HDACs: from structure, function and regulation to novel strategies for therapy and prevention. *Oncogene* 2007; 26: 5310-5318

4 Yang XJ, Grégoire S. Metabolism, cytoskeleton and cellular signalling in the grip of protein Nepsilon - and O-acetylation. *EMBO Rep* 2007; 8: 556-562

5 Choudhary C, Kumar C, Gnad F, Nielsen ML, Rehman M, Walther TC, Olsen JV, Mann M. Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science* 2009; 325: 834-840

6 Zhao S, Xu W, Jiang W, Yu W, Lin Y, Zhang T, Yao J, Zhou L, Zeng Y, Li H, Li Y, Shi J, An W, Hancock SM, He F, Qin L, Chin J, Yang P, Chen X, Lei Q, Xiong Y, Guan KL. Regulation of cellular metabolism by protein lysine acetylation. *Science* 2010; 327: 1000-1004

7 Yang XJ. The diverse superfamily of lysine acetyltransferases and their roles in leukemia and other diseases. *Nucleic Acids Res* 2004; 32: 959-976

8 Heery DM, Fischer PM. Pharmacological targeting of lysine acetyltransferases in human disease: a progress report. *Drug Discov Today* 2007; 12: 88-99

9 Ravindra KC, Selvi BR, Arif M, Reddy BA, Thanuja GR, Agrawal S, Pradhan SK, Nagashayana N, Dasgupta D, Kundu TK. Inhibition of lysine acetyltransferase KAT3B/p300 activity by a naturally occurring hydroxynaphthoquinone, plumbagin. *J Biol Chem* 2009; 284: 24453-24464

10 Schrump DS. Cytotoxicity mediated by histone deacetylase inhibitors in cancer cells: mechanisms and potential clinical implications. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 3947-3957

11 Gridelli C, Rossi A, Maione P. The potential role of histone deacetylase inhibitors in the treatment of non-small-cell lung cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 2008; 68: 29-36

12 Niki T, Rombouts K, De Bleser P, De Smet K, Rogiers V, Schuppan D, Yoshida M, Gabbiani G, Geerts A. A histone deacetylase inhibitor, trichostatin A, suppresses myofibroblastic differentiation of rat hepatic stellate cells in primary culture. *Hepatology* 1999; 29: 858-867

13 Mannaerts I, Nuytten NR, Rogiers V, Vanderkerken K, van Grunsven LA, Geerts A. Chronic administration of valproic acid inhibits activation of mouse hepatic stellate cells in vitro and in vivo. *Hepatology* 2010; 51: 603-614

14 Qin L, Han YP. Epigenetic repression of matrix metalloproteinases in myofibroblastic hepatic stellate cells through histone deacetylases 4: implication in tissue fibrosis. *Am J Pathol* 2010; 177: 1915-1928

15 Watanabe T, Tajima H, Hironori H, Nakagawara H, Ohnishi I, Takamura H, Ninomiya I, Kitagawa H, Fushida S, Tani T, Fujimura T, Ota T, Wakayama T, Iseki S, Harada S. Sodium valproate blocks the transforming growth factor (TGF)-β1 autocrine loop and attenuates the TGF-β1-induced collagen synthesis in a human hepatic stellate cell line. *Int J Mol Med* 2011; 28: 919-925

16 Lim JY, Oh MA, Kim WH, Sohn HY, Park SI. AMP-activated protein kinase inhibits TGF-β-induced fibrogenic responses of hepatic stellate cells by targeting transcriptional coactivator p300. *J Cell Physiol* 2012; 227: 1081-1089

17 Kaimori A, Potter JJ, Choti M, Ding Z, Mezey E, Koteish AA. Histone deacetylase inhibition suppresses the transforming growth factor beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition in hepatocytes. *Hepatology* 2010; 52: 1033-1045

编辑 田滢 电编 鲁亚静

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com
世界华人消化杂志 2012年12月28日; 20(36): 3625-3631
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

基础研究 BASIC RESEARCH

幽门螺杆菌感染对食管上皮细胞的影响

王淑君, 王蔚虹, 滕贵根, 戴 芸, 褚云香, 李 江

王淑君, 王蔚虹, 滕贵根, 戴芸, 褚云香, 李江, 北京大学第一医院消化内科 北京市 100034
王淑君, 主要从事幽门螺杆菌感染相关疾病的研究.
国家自然科学基金资助项目, No. 81172271
作者贡献分布: 王蔚虹与王淑君对此文所作贡献均等; 此课题由王蔚虹设计; 实验操作由王淑君、滕贵根、戴芸、褚云香及李江完成; 数据分析由王淑君与王蔚虹完成; 本论文写作由王淑君与王蔚虹完成.
通讯作者: 王蔚虹, 教授, 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.
wangweihong@medmail.com.cn
电话: 010-66551122-2581 传真: 010-66518105
收稿日期: 2012-11-05 修回日期: 2012-12-05
接受日期: 2012-12-20 在线出版日期: 2012-12-28

Effect of *Helicobacter pylori* infection on esophageal epithelial cells *in vitro*

Shu-Jun Wang, Wei-Hong Wang, Gui-Gen Teng, Yun Dai, Yun-Xiang Chu, Jiang Li

Shu-Jun Wang, Wei-Hong Wang, Gui-Gen Teng, Yun Dai, Yun-Xiang Chu, Jiang Li, Department of Gastroenterology, Peking University First Hospital, Beijing l00034, China
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 81172271
Correspondence to: Wei-Hong Wang, Professor, Chief Physician, Department of Gastroenterology, Peking University First Hospital, 8 Xishiku Avenue, Xicheng District, Beijing 100034, China. wangweihong@medmail.com.cn
Received: 2012-11-05 Revised: 2012-12-05
Accepted: 2012-12-20 Published online: 2012-12-28

Abstract

AIM: To investigate the effect of *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) exposure on esophageal cell line OE33 *in vitro*.

METHODS: Human esophageal adenocarcinoma cell line OE33 was cultured and treated with 200 μmol/L acidified deoxycholic acid (pH 6.0) or infected with *H. pylori* 26695. After treatment or infection, cell viability was tested by CCK-8 assay; cell apoptosis was determined by flow cytometric analysis with Annexin V-FITC/7-AAD; the mRNA expression of CDX2 and MUC2 was assessed by real time-PCR; nuclear factor-κB (NF-κB)-associated proteins were examined by Western blot; and the DNA binding activity of NF-κB was evaluated by electrophoretic mobility shift assay (EMSA).

RESULTS: The viability of OE33 cells was reduced significantly after treatment with acidified deoxycholic acid or infection with *H. pylori* compared with negative controls (both $P < 0.01$). Treatment with acidified deoxycholic acid or infection with *H. pylori* induced apoptosis and increased the mRNA expression of CDX2 and MUC2 (all $P < 0.01$). Both *H. pylori* infection and treatment with acidified deoxycholic acid enhanced the DNA binding activity of NF-κB and the protein expression of phosphorylated IκBα and P65 in esophageal epithelial cells.

CONCLUSION: *H. pylori* infection reduces cell viability, induces apoptosis, and increases the expression of CDX2 and MUC2 and the activation of NF-κB in esophageal epithelial cells.

Key Words: *Helicobacter pylori*; Barrett's metaplasia; nuclear factor-κB; Caudal-related homeobox transcription factor 2; Mucin

Wang SJ, Wang WH, Teng GG, Dai Y, Chu YX, Li J. Effect of *Helicobacter pylori* infection on esophageal epithelial cells *in vitro*. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(36): 3625-3631

摘要

目的: 在体外幽门螺杆菌感染(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)模型中, 研究*H. pylori*感染对食管上皮细胞的影响.

方法: 体外培养人食管腺癌细胞OE33, 经酸化脱氧胆酸[(deoxycholic acid, DCA), 200 μmol/L, pH 6.0)]、*H. pylori* 26695及阴性对照处理. CCK-8检测细胞增殖活性, AnnexinV-FITC/7-AAD双染流式细胞术检测细胞凋亡, 实时定量PCR检测尾型同源框转录因子2(caudal-related homeobox transcription factor 2, CDX2)和黏蛋白-2(mucin-2, MUC2)mRNA表达, 电泳凝胶迁移实验和Western blot检测核因子κB(nuclear factor kappa, NF-κB)的DNA结合活性及蛋白表达.

■**背景资料**
幽门螺杆菌(*H. pylori*)是胃癌的Ⅰ型致癌因子, 他可以通过激活胃上皮细胞核因子-κB继而引起包括炎症反应及肠化相关的多种下游基因的表达, 进而促进细胞转化. 但他对食管炎及食管腺癌的影响尚不清楚. 本实验探讨*H. pylori*对食管上皮细胞的体外影响.

■**同行评议者**
杜奕奇, 副教授, 中国人民解放军第二军医大学长海医院

■研发前沿
CDX2是肠化最重要的分子之一. 诸多研究表明, 他可以调节下游肠化基因, 如: 黏蛋白的表达, 在上皮细胞的肠化中发挥作用. CDX2在食管腺癌发病中的作用成为热点.

结果: 与对照组相比, 酸化DCA和*H. pylori*处理后OE33细胞增殖活性均明显下降(46.504%, 56.147% *vs* 100%, DCA组, *H. pylori*组 *vs* 对照组), 凋亡增加明显(15.68%, 76.41% *vs* 4.25%, DCA组, *H. pylori*组 *vs* 对照组, $P<0.01$); 酸化DCA和*H. pylori*均可增加CDX2和MUC2 mRNA表达. 并且, 二者均增加磷酸化IκBα及磷酸化P65表达, 增加NF-κB的DNA结合活性.

结论: 体外*H. pylori*感染抑制食管上皮细胞的增殖活性并诱导其凋亡, 增加食管上皮细胞CDX2和MUC2表达及NF-κB的活性.

关键词: 幽门螺杆菌; Barrett食管; 核因子κB; 尾型同源转录因子2; 黏蛋白

王淑君, 王蔚虹, 滕贵根, 戴芸, 褚云香, 李江. 幽门螺杆菌感染对食管上皮细胞的影响. 世界华人消化杂志 2012; 20(36): 3625–3631
http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3625.asp

0 引言

食管腺癌是一种恶性度高、病死率高的肿瘤, 其发生与食管下端慢性炎症及肠上皮化生相关[1]. 研究表明, Barrett化生与胃内容物及胆酸的慢性反流有关[2]. 作为胃食管反流物的主要组分, 酸和胆盐在诱导食管黏膜损伤中起着协同作用[3,4]. 胆酸, 尤其是脱氧胆酸(deoxycholic acid, DCA)具有基因毒性, 可以诱导活性氧自由基产生, 激活核转录因子κB进而诱导多种与炎症及肠化有关的基因表达, 参与Barrett食管以及食管腺癌的发生[5-7].

幽门螺杆菌感染(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)在胃内定植可以激活胃上皮细胞核因子κB(nuclear factor kappa, NF-κB), 释放炎性细胞因子, 诱发炎症及肿瘤的生成[8]. 尾型同源盒转录因子2(caudal-related homeobox transcription factor 2, CDX2)是维持肠型上皮细胞早期分化特性的关键转录因子, 也是标志肠化发生的最重要的转录因子[9]. CDX2异常表达参与上皮的肠化及腺癌的发生, NF-κB可调节CDX2表达[10]. 杯状细胞是肠化生的组织学标志, CDX2可上调杯状细胞特异分子黏蛋白-2(mucin-2, MUC2)[11]. 早期的研究显示, *H. pylori*可定植于发生胃上皮化生的食管下段黏膜[12]. 然而, *H. pylori*在食管下段定植对食管疾病发生的影响尚不清楚. 我们既往的动物实验发现, 食管*H. pylori*的定植与食管黏膜的炎症损伤程度、Barrett食管以及食管腺癌的发生相关[9], 提示食管*H. pylori*定植可能与胃内*H. pylori*定植的致病作用相似. 本研究旨在体外*H. pylori*感染的食管上皮细胞模型中, 探讨*H. pylori*感染对食管上皮细胞炎症及肠化相关分子表达的影响.

1 材料和方法

1.1 材料 标准菌株*H. pylori* 26695购自ATCC(American type culture collection), 由中国疾病预防控制中心流行病研究所张建中教授惠赠; 食管腺癌细胞OE33购自ECACC(European collection of cell cultures); DCA购自美国Sigma公司, 溶于酸化的1640培养基中(pH 6.0), 浓度为200 μmol/L; CCK-8试剂盒(Cell Counting Kit-8)购自日本同仁化学研究所; AnnexinV-FITC/7-AAD检测试剂盒购自美国BD公司; SYBR Green Real-time PCR Master Mix购自美国Applied Biosystems公司; 兔抗p-IκBα mAb、兔抗p-P65、P65 mAb、HRP标记的山羊抗兔IgG和HRP标记的山羊抗小鼠IgG购自cell signaling technology; 小鼠抗β-actin单克隆抗体购自北京中杉金桥生物技术有限公司; 细胞核蛋白提取试剂盒NE-PER购自Thermo; EMSA检测试剂盒DIG Gel Shift Kit购自Roche.

1.2 方法

1.2.1 *H. pylori*培养: *H. pylori* 26695接种于含8%羊血的哥伦比亚琼脂培养基中, 37 ℃, 微需氧条件生长48 h, 收集至PBS中(pH 7.4), 调整细菌浓度至10^8 CFU/mL, 按细菌和细胞比例200∶1加入细胞培养皿中.

1.2.2 细胞培养及处理: 人食管腺癌细胞株OE33种植于含100 mL/L胎牛血清的1640培养基中, 37 ℃, 50 mL/L CO_2的条件下培养至70%融合度, 分别加入DCA(200 μmol/L, pH 6.0)、*H. pylori* 26695及PBS阴性对照.

1.2.3 细胞增殖活性检测: 经上述处理12 h的细胞, 用酶标仪检测450 nm吸光度(A)值.

1.2.4 流式细胞仪分析细胞凋亡情况: 收集经上述处理6 h的细胞, 加入Annexin-V 5 μL、7-AAD 5 μL混匀, 室温避光放置15 min, 加入1×binding buffer 400 μL, 过滤到流式管中, 流式细胞术检测细胞凋亡率. 实验设4组: 未标记细胞组、单标记Annexin-V FITC组、单标记7-AAD组、Annexin-V FITC和7-AAD双标记组.

1.2.5 总RNA提取与逆转录: 经上述处理12 h的OE33细胞, TRIzol一步法提取总RNA, 紫外分光光度仪检测RNA浓度. 按照ABI公司高通量反

表 1 OE33细胞的增殖活性

	对照组	DCA组	*H. pylori*组
A_{450}	1.156 ± 0.04	0.562 ± 0.01[b]	0.695 ± 0.04
增值活性(%)	100	43.504[b]	56.147[ab]

[a]P<0.05 *vs* DCA组; [b]P<0.01 *vs* 对照组. DCA: 脱氧胆酸.

表 2 OE33细胞凋亡 (%)

凋亡率	对照组	DCA组	*H. pylori*组
晚期凋亡率	2.68 ± 0.21	8.48 ± 0.03[b]	8.11 ± 0.35[b]
早期凋亡率	1.57 ± 0.05	7.20 ± 0.01[b]	68.3 ± 0.02[ab]
总凋亡率	4.25	15.68[b]	76.41[ab]

[a]P<0.05 *vs* DCA组; [b]P<0.01 *vs* 对照组. DCA: 脱氧胆酸.

■**相关报道**
很多报道探讨*H. pylori*与食管炎以及食管腺癌的关系, 但尚无定论.

转录试剂盒说明书反转录: 1 μg RNA溶于10 μL DEPC水中, 加无RNase水4.2 μL, 10×RT Buffer 2.0 μL, 10×Random Primers 2.0 μL, Multi Scribe Reverse Transcriptase 1.0 μL, 25×dNTP Mix 0.8 μL, 25 ℃ 10 min, 37 ℃ 2 h, 85 ℃ 5 min. cDNA放-20 ℃保存.

1.2.6 实时定量PCR: 内参为GAPDH, 引物设计采用Primer Express 3.0软件, CDX2: Sense 5'-CAGTCGCTACATCACCATCC-3', Antisense 5'-CTCCTTTGCTCTGCGGTTCT-3'; MUC2: Sense 5'-TGCTCCTACGTGGCTGTTCA-3', Antisense 5'-GACGTTCTCGGTGATGATGCT-3'; GAPDH: Sense 5'-GCCTGGTCACCAGGGCT-3', Antisense 5'-AATTTGCCATGGGTGGAATC-3', 由北京天一辉远生物科技公司合成. Real-time PCR反应在ABI PRISM 7300 Detector System进行, 25 μL反应体系包括: SYBR Green Real-time PCR Master Mix (ABI)12.5 μL, 上下游引物各1 μL(5 pmol/L), cDNA 2.5 μL, DEPC水补至25 μL. 反应循环参数95 ℃ 10 min, 预变性, 95 ℃ 15 s, 60 ℃ 1 min, 40个循环; 熔解曲线95 ℃ 15 s, 60 ℃ 30 s, 96 ℃ 15 s. 经定量PCR得到相应Ct值, 运用$2^{-\triangle\triangle Ct}$法计算实验组目的基因的表达相对于对照组的变化倍数, $\triangle\triangle Ct = (Ct_{目的基因}-Ct_{内参基因})$实验组-$(Ct_{目的基因}-Ct_{内参基因})$对照组.

1.2.7 Western印迹法: OE33处理1 h后, 提取细胞总蛋白, 裂解缓冲液为RIPA和磷酸化酶抑制剂. BCA定量试剂盒测定蛋白浓度. 取等量蛋白10%聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 4 ℃电转至PVDF膜上. 5%脱脂牛奶封闭后, 分别加1∶1 000的抗β-actin、兔抗p-IκBα mAb、兔抗p-P65和P65 mAb, 4 ℃过夜. PBST洗膜后, 再加1∶3 000 HRP标记的IgG, 室温孵育1 h. 曝光, 显影.

1.2.8 凝胶电泳迁移率实验: OE33细胞经上述处理1 h, 提取细胞核蛋白, BCA法测定蛋白浓度. 含有NF-κB结合位点的引物核苷酸序列: 5'-AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3'; 5'-GCCTGGGAAAGTCCCCTCAACT-3', 由上海生工生物工程技术服务有限公司合成. DIG末端标记探针. 8%聚丙烯酰胺胶预电泳15 min, 取核蛋白12 μg与探针结合反应15 min后, 加入上样孔, 电泳50 V, 2 h. 以Bio-Rad电转仪200 mA, 30 min转至Hybond+尼龙膜, 紫外1 200×100 μJ/cm^{2}交联. 抗DIG抗体反应, 曝光.

统计学处理 SPSS16.0医学统计软件统计分析. 每组实验重复3次. 实验结果采用mean±SD, 两组间比较采用独立样本t检验, 3组间比较采用单一因素方差分析(LSD法). 以P<0.05为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 *H. pylori*对OE33细胞生长的影响 酸化DCA和*H. pylori*处理12 h后, OE33细胞增殖活性分别为43.504%和56.147%, 与阴性对照组相比, 增殖活性明显下降(P<0.01). 提示酸化DCA及*H. pylori*对OE33细胞生长均有抑制作用(表1).

2.2 *H. pylori*对OE33细胞凋亡的影响 流式细胞术检测OE33经酸化DCA和*H. pylori*处理6 h细胞凋亡情况. 结果显示, *H. pylori*增加OE33细胞凋亡比例(76.41%), 以早期凋亡(LR)为主(68.3%±0.02%), 与对照组相比, 差异具有统计学意义(P<0.01, 表2, 图1).

2.3 *H. pylori*对OE33细胞肠化相关基因表达的影响 RT-PCR结果显示(图2), 酸化DCA和*H. pylori*处理后CDX2 mRNA的相对表达量明显高于对照组(P<0.01), 提示酸化DCA和*H. pylori*均上调CDX2 mRNA表达, 且酸化DCA对CDX2表达的诱导作用高于*H. pylori*(P<0.05). 酸化DCA和*H. pylori*处理后MUC2 mRNA的相对表达量明显高于对照组(P<0.01), 提示酸化DCA和*H. pylori*均上调MUC2 mRNA表达.

2.4 *H. pylori*对OE33细胞NF-κB活性的影响 OE33细胞处理1 h后, Western blot方法检测NF-κB相关蛋白的表达(图3A), 与对照组相比, 酸化DCA和*H. pylori*均分别增加磷酸化IκBα、磷

■**创新盘点**
本文采用增殖、凋亡、Real-time PCR、Western blot以及EMSA多种技术从多方面研究*H. pylori*对食管细胞的影响, 首次探究了*H. pylori*对食管肠化相关基因表达的影响.

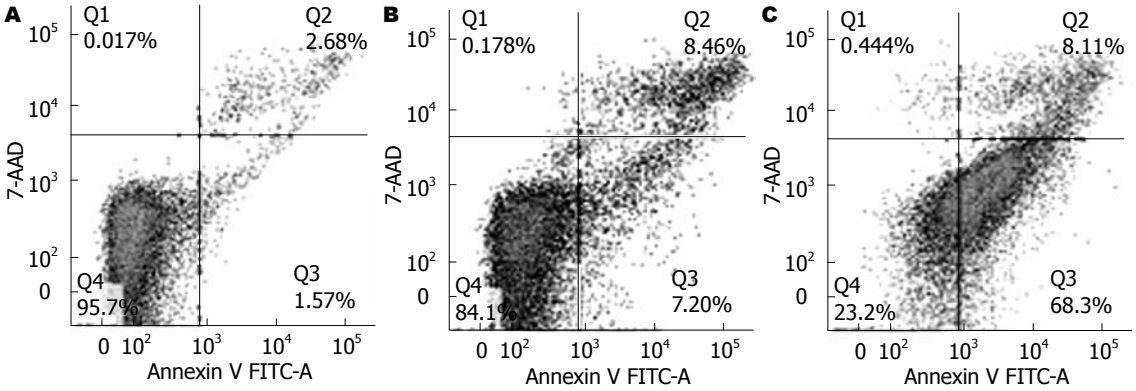


图 1 流式细胞仪检测*H. pylori*诱导食管上皮细胞凋亡. A: 对照组; B: DCA组; C: *H. pylori*组.

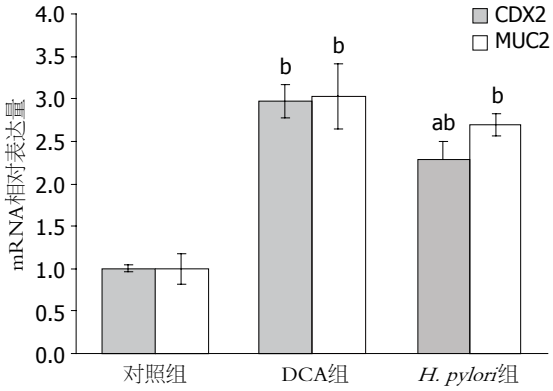


图 2 酸化脱氧胆酸及*H. pylori*对OE33肠化相关基因表达的影响. $^{b}P<0.01$ *vs* 对照组; $^{a}P<0.05$ *vs* CDX2组. CDX2: 尾型同源框转录因子2; MUC2: 黏蛋白-2.

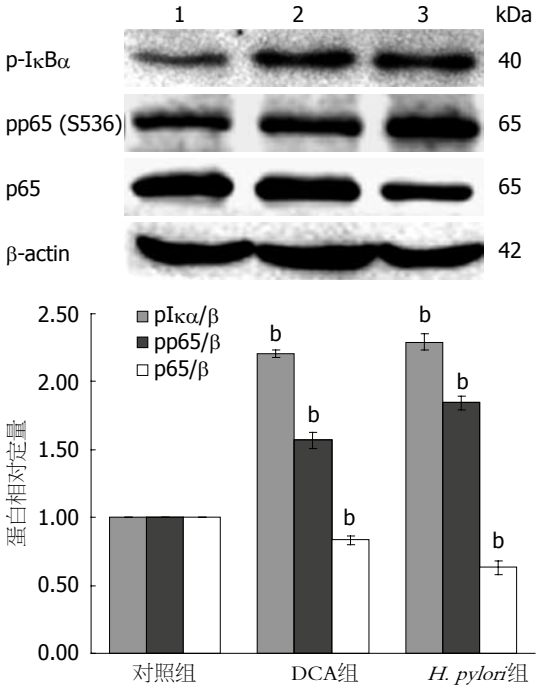


图 3 酸化脱氧胆酸及*H. pylori*对OE33细胞NF-κB相关蛋白的影响. $^{b}P<0.01$ *vs* 对照组. 1: 对照组; 2: DCA组; 3: *H. pylori*组.

酸化P65表达($P<0.01$), 降低P65表达($P<0.01$, 图3B). EMSA方法对核蛋白的检测发现, 酸化DCA和*H. pylori*处理后, 与对照组相比, NF-κB的DNA结合活性均明显增加(图4).

3 讨论

*H. pylori*是胃癌Ⅰ型致癌因子, 他可以通过促进肠化相关基因CDX2等的表达促进胃上皮肠化, 参与胃癌发生的进程[13]. *H. pylori*感染对食管Barrett化生以及食管腺癌的发生存在争议. 然而, 反流性食管炎患者*H. pylori*感染率并不低, 大约为5%-51%[14,15], *H. pylori*可能作为反流物的一部分进入食管, 对食管疾病的发生产生一定影响. 既往研究显示, *H. pylori*确实可定植于发生胃上皮化生的食管下段黏膜, 其在食管下段的感染率为15.09%-50.00%[12,16]. 既往的动物实验也发现, *H. pylori*可定植于食管下段黏膜, 且*H. pylori*的定植可上调食管黏膜环氧化酶2(cyclooxygenase-2, COX-2)以及前列腺素E2(prostaglandin E2, PGE2)的表达, 食管*H. pylori*定植与食管黏膜的炎症损伤程度、Barrett食管以及食管腺癌的发生相关. 本研究在体外*H. pylori*感染的细胞模型上, 进一步发现*H. pylori*可降低食管上皮细胞增值活性, 诱导食管上皮细胞凋亡, 并诱导食管上皮细胞表达肠化相关分子CDX2、MUC2表达, 提示*H. pylori*在食管下段黏膜定植可能导致与其在胃黏膜定植相似的致病过程.

NF-κB是一种多效应的转录调节因子, 可以激活多种细胞进程的基因转录, 包括炎症、 细胞增殖、分化以及凋亡等[17]. NF-κB在很多炎症相关肿瘤的进程中被激活. 典型的NF-κB复合体是由P50-P65异源二聚体组成, 在大多数细胞的静息状态下, P50和P65(RelA)与其抑制分子IκBα结合存在于胞浆, 各种刺激因素例如脂多

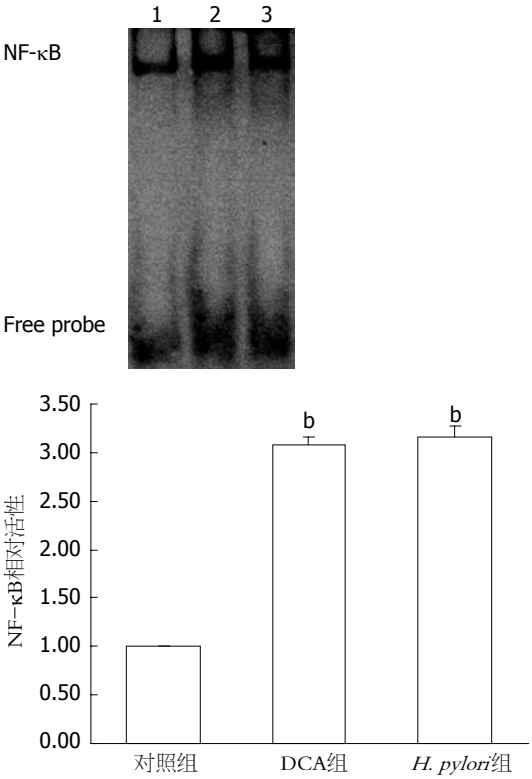


图 4 EMSA检测NF-κB的DNA结合活性. $^{b}P<0.01$ *vs* 对照组. 1: 对照组; 2: DCA组; 3: *H. pylori*组.

糖(lipopolysaccharide, LPS)、特异的细胞因子等可激活细胞内特异信号通路, 随后激活IκB激酶复合物, 促使IκBα磷酸化进而被蛋白酶体降解[18], 使P50-P65磷酸化并转移至细胞核与DNA上的κB位点结合, 激活并启动下游基因的表达, 从而导致广泛的生物学效应. 磷酸化的P65亚单位决定NF-κB介导的转录反应强度以及持续时间[19,20]. 本研究检测到食管上皮细胞与*H. pylori*共培养后, NF-κB DNA结合活性增强伴随磷酸化的IκBα、磷酸化的P65表达增加. 既往研究显示, 从正常食管到食管炎, 以及从Barrett食管到食管腺癌, NF-κB表达活性是增加的[21]. cagA阳性*H. pylori*可激活胃上皮细胞NF-κB活性, 参与胃腺癌的发生进程[22]. Abdel-Latif等[23]的研究显示, cagA阳性*H. pylori*及其提取物可增强食管腺癌细胞NF-κB的DNA结合活性, 降低IκBα的表达, 并诱导炎症相关分子COX-2, 转录因子AP-1(activator protein-1, AP-1)和白介素-8(interleukin 8, IL-8)的表达. 抗氧化剂维生素C则抑制*H. pylori*诱导的NF-κB, 表明*H. pylori*可能参与GERD和食管炎的发生. *H. pylori*诱导NF-κB的活性在1 h最强, 而酸化DCA则在2 h的活性最强[1]. 本研究显示*H. pylori*不仅诱导食管腺癌细胞NF-κB的激活, 伴随磷酸化IκBα和磷酸化P65增加, 还可诱导食管肠化相关分子CDX2及下游MUC2的表达, 提示*H. pylori*可能参与食管肠化以及腺癌的发生.

NF-κB与CDX基因关系密切, CDX2启动子上有2个NF-κB的结合位点, 突变后的CDX2启动子失活[24,25]. NF-κB在调节CDX2表达中起核心作用, 提示炎症可以诱导肠化的发生[26,27]. 脱氧胆酸可以激活NF-κB并诱导炎症和肠化相关基因如COX-2[28]、CDX2[29]、MUC2[11]等表达, 促进Barrett食管以及食管腺癌的发生[30]. 脱氧胆酸的pKa为6.2, 其在pH 6.0时可以产生最大的生物活性[31]. 本研究以脱氧胆酸处理为阳性对照, 观察*H. pylori*感染对食管上皮细胞的影响, 与酸化的脱氧胆酸相似, *H. pylori*可降低细胞增殖活性, 诱导食管上皮细胞凋亡. Jones等[32]采用Hoechst染色研究*H. pylori*对正常食管上皮细胞和OE33细胞的凋亡作用发现: 与正常食管上皮细胞相比, 完整的cagA阳性*H. pylori*以剂量依赖的方式增加OE33细胞凋亡, 而*H. pylori*提取物则产生较低的凋亡率. 此外, *H. pylori*还可增加OE33细胞Fas蛋白的表达, 提示*H. pylori*通过Fas级联反应诱导OE33细胞发生凋亡, 而NF-κB激活则可以调节Fas级联反应进而促进肿瘤细胞产生凋亡[33].

食管腺癌在我国发病率日益增高[34], 其5年生存率仅有5%-13%[35], 明确病因并阻断其发展至关重要. 胃食管反流物中的酸和胆盐被认为是导致食管腺癌的致病因子, 本研究结果表明, DCA和*H. pylori*均可抑制食管上皮细胞OE33的增殖, 诱导凋亡, 并增加CDX2和MUC2的表达. DCA对细胞增殖的抑制作用较*H. pylori*显著; *H. pylori*对凋亡的诱导较DCA显著; DCA对CDX2表达的诱导作用较*H. pylori*明显. 体外实验的结果可能与DCA及*H. pylori*的浓度、处理时间有关. 体内DCA及*H. pylori*可能同时作用于食管上皮细胞, 推测二者同时存在时对食管上皮细胞动力及肠化相关基因表达的诱导作用会更加明显, 这有待后续的研究进一步证实. 本研究提示, *H. pylori*与酸化胆盐均可能参与Barrett食管及食管腺癌的发生. 因此, 临床上应重视对合并食管*H. pylori*感染的胃食管反流病或Barrett患者的治疗及随访, 以防食管下段疾病的恶性转化.

■应用要点

本研究发现, *H. pylori*在食管上皮细胞可以诱导NF-κB的活性, 也可以激活肠化相关基因的表达, 为临床合并*H. pylori*感染的食管炎患者随访提供依据.

4 参考文献

1 Abdel-Latif MM, O'Riordan J, Windle HJ, Carton E, Ravi N, Kelleher D, Reynolds JV. NF-kappaB activation in esophageal adenocarcinoma: relationship to Barrett's metaplasia, survival, and response

■同行评价
本实验设计合理，研究具有一定创新性，结论有一定的参考价值.

to neoadjuvant chemoradiotherapy. *Ann Surg* 2004; 239: 491-500

2 Appelman HD, Umar A, Orlando RC, Sontag SJ, Nandurkar S, El-Zimaity H, Lanas A, Parise P, Lambert R, Shields HM. Barrett's esophagus: natural history. *Ann N Y Acad Sci* 2011; 1232: 292-308

3 Nehra D, Howell P, Williams CP, Pye JK, Beynon J. Toxic bile acids in gastro-oesophageal reflux disease: influence of gastric acidity. *Gut* 1999; 44: 598-602

4 Bajpai M, Liu J, Geng X, Souza RF, Amenta PS, Das KM. Repeated exposure to acid and bile selectively induces colonic phenotype expression in a heterogeneous Barrett's epithelial cell line. *Lab Invest* 2008; 88: 643-651

5 Jenkins GJ, D'Souza FR, Suzen SH, Eltahir ZS, James SA, Parry JM, Griffiths PA, Baxter JN. Deoxycholic acid at neutral and acid pH, is genotoxic to oesophageal cells through the induction of ROS: The potential role of anti-oxidants in Barrett's oesophagus. *Carcinogenesis* 2007; 28: 136-142

6 Jenkins GJ, Cronin J, Alhamdani A, Rawat N, D'Souza F, Thomas T, Eltahir Z, Griffiths AP, Baxter JN. The bile acid deoxycholic acid has a non-linear dose response for DNA damage and possibly NF-kappaB activation in oesophageal cells, with a mechanism of action involving ROS. *Mutagenesis* 2008; 23: 399-405

7 Wu J, Gong J, Geng J, Song Y. Deoxycholic acid induces the overexpression of intestinal mucin, MUC2, via NF-kB signaling pathway in human esophageal adenocarcinoma cells. *BMC Cancer* 2008; 8: 333

8 Ng MT, Van't Hof R, Crockett JC, Hope ME, Berry S, Thomson J, McLean MH, McColl KE, El-Omar EM, Hold GL. Increase in NF-kappaB binding affinity of the variant C allele of the toll-like receptor 9 -1237T/C polymorphism is associated with Helicobacter pylori-induced gastric disease. *Infect Immun* 2010; 78: 1345-1352

9 Liu FX, Wang WH, Wang J, Li J, Gao PP. Effect of Helicobacter pylori infection on Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma formation in a rat model of chronic gastroesophageal reflux. *Helicobacter* 2011; 16: 66-77

10 Takeshima E, Tomimori K, Kawakami H, Ishikawa C, Sawada S, Tomita M, Senba M, Kinjo F, Mimuro H, Sasakawa C, Fujita J, Mori N. NF-kappaB activation by Helicobacter pylori requires Akt-mediated phosphorylation of p65. *BMC Microbiol* 2009; 9: 36

11 Hu Y, Jones C, Gellersen O, Williams VA, Watson TJ, Peters JH. Pathogenesis of Barrett esophagus: deoxycholic acid up-regulates goblet-specific gene MUC2 in concert with CDX2 in human esophageal cells. *Arch Surg* 2007; 142: 540-544; discussion 540-544

12 李渊, 周丽雅, 林三仁, 金珠, 崔荣丽,王洪源. 反流性食管炎与幽门螺杆菌感染的相关性研究. 中国实用内科杂志 2009; 29: 833-835

13 Jang BG, Kim WH. Molecular pathology of gastric carcinoma. *Pathobiology* 2011; 78: 302-310

14 Henihan RD, Stuart RC, Nolan N, Gorey TF, Hennessy TP, O'Morain CA. Barrett's esophagus and the presence of Helicobacter pylori. *Am J Gastroenterol* 1998; 93: 542-546

15 Newton M, Bryan R, Burnham WR, Kamm MA. Evaluation of Helicobacter pylori in reflux oesophagitis and Barrett's oesophagus. *Gut* 1997; 40: 9-13

16 Peitz U, Hackelsberger A, Günther T, Clara L, Malfertheiner P. The prevalence of Helicobacter pylori infection and the pattern of gastritis in Barrett's esophagus. *Dig Dis* 2001; 19: 164-169

17 Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002; 420: 860-867

18 Chen LF, Greene WC. Shaping the nuclear action of NF-kappaB. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004; 5: 392-401

19 Viatour P, Merville MP, Bours V, Chariot A. Phosphorylation of NF-kappaB and IkappaB proteins: implications in cancer and inflammation. *Trends Biochem Sci* 2005; 30: 43-52

20 Bohuslav J, Chen LF, Kwon H, Mu Y, Greene WC. p53 induces NF-kappaB activation by an IkappaB kinase-independent mechanism involving phosphorylation of p65 by ribosomal S6 kinase 1. *J Biol Chem* 2004; 279: 26115-26125

21 Colleypriest BJ, Palmer RM, Ward SG, Tosh D. Cdx genes, inflammation and the pathogenesis of Barrett's metaplasia. *Trends Mol Med* 2009; 15: 313-322

22 Yang GF, Deng CS, Xiong YY, Gong LL, Wang BC, Luo J. Expression of nuclear factor-kappa B and target genes in gastric precancerous lesions and adenocarcinoma: association with Helicobactor pylori cagA (+) infection. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 491-496

23 Abdel-Latif MM, Windle H, Terres A, Eidhin DN, Kelleher D, Reynolds JV. Helicobacter pylori extract induces nuclear factor-kappa B, activator protein-1, and cyclooxygenase-2 in esophageal epithelial cells. *J Gastrointest Surg* 2006; 10: 551-562

24 Kim S, Domon-Dell C, Wang Q, Chung DH, Di Cristofano A, Pandolfi PP, Freund JN, Evers BM. PTEN and TNF-alpha regulation of the intestinal-specific Cdx-2 homeobox gene through a PI3K, PKB/Akt, and NF-kappaB-dependent pathway. *Gastroenterology* 2002; 123: 1163-1178

25 Kazumori H, Ishihara S, Rumi MA, Kadowaki Y, Kinoshita Y. Bile acids directly augment caudal related homeobox gene Cdx2 expression in oesophageal keratinocytes in Barrett's epithelium. *Gut* 2006; 55: 16-25

26 Baeuerle PA, Henkel T. Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol* 1994; 12: 141-179

27 Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* 1997; 336: 1066-1071

28 Shirvani VN, Ouatu-Lascar R, Kaur BS, Omary MB, Triadafilopoulos G. Cyclooxygenase 2 expression in Barrett's esophagus and adenocarcinoma: Ex vivo induction by bile salts and acid exposure. *Gastroenterology* 2000; 118: 487-496

29 Hu Y, Williams VA, Gellersen O, Jones C, Watson TJ, Peters JH. The pathogenesis of Barrett's esophagus: secondary bile acids upregulate intestinal differentiation factor CDX2 expression in esophageal cells. *J Gastrointest Surg* 2007; 11: 827-834

30 Morita S, Matsumoto Y, Okuyama S, Ono K, Kitamura Y, Tomori A, Oyama T, Amano Y, Kinoshita Y, Chiba T, Marusawa H. Bile acid-induced expression of activation-induced cytidine deaminase during the development of Barrett's oesophageal adenocarcinoma. *Carcinogenesis* 2011; 32: 1706-1712

31 McQuaid KR, Laine L, Fennerty MB, Souza R, Spechler SJ. Systematic review: the role of bile acids in the pathogenesis of gastro-oesophageal reflux disease and related neoplasia. *Aliment Pharmacol Ther* 2011; 34: 146-165

32 Jones AD, Bacon KD, Jobe BA, Sheppard BC, Deveney CW, Rutten MJ. Helicobacter pylori induces

apoptosis in Barrett's-derived esophageal adenocarcinoma cells. *J Gastrointest Surg* 2003; 7: 68-76
33 Liu F, Bardhan K, Yang D, Thangaraju M, Ganapathy V, Waller JL, Liles GB, Lee JR, Liu K. NF-κB directly regulates Fas transcription to modulate Fas-mediated apoptosis and tumor suppression. *J Biol Chem* 2012; 287: 25530-25540
34 庄惠军; 王雯; 沈许德. 驻南方某部军人胃食管反流病的流行病学研究. 解放军医学杂志 2010; 35: 744-747
35 Eloubeidi MA, Mason AC, Desmond RA, El-Serag HB. Temporal trends (1973-1997) in survival of patients with esophageal adenocarcinoma in the United States: a glimmer of hope? *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 1627-1633

编辑 田滢 电编 鲁亚静

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》再次入选《中文核心期刊要目总览》(2011年版)

本刊讯 依据文献计量学的原理和方法, 经研究人员对相关文献的检索、计算和分析, 以及学科专家评审, 《世界华人消化杂志》再次入选《中文核心期刊要目总览》2011年版(即第六版)核心期刊.

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

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

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2012年12月28日; 20(36): 3632-3637
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

基础研究 BASIC RESEARCH

莫沙比利通过p38/MAPK通路保护氯吡格雷所致胃黏膜上皮细胞损伤

吴海露, 张振玉, 段兆涛, 袁芳岑, 高 欣, 王劲松, 黄文斌

■背景资料
随着氯吡格雷的广泛使用, 其胃肠道并发症发生率正逐年上升. 目前临床通常联合质子泵抑制剂以预防其相关的胃肠道损伤, 但研究显示联合质子泵抑制剂可增加心脑血管事件的发生率和死亡率. 有关氯吡格雷引起的胃肠道损伤的防治引起了国内外临床医生的共同关注.

吴海露, 张振玉, 段兆涛, 袁芳岑, 高欣, 南京医科大学附属南京医院消化科 江苏省南京市 210006
王劲松, 黄文斌, 南京医科大学附属南京医院病理科 江苏省南京市 210006
吴海露, 硕士, 主要从事胃黏膜损伤与保护的研究.
南京市医学科技发展专项基金资助项目, No. YKK10107
作者贡献分布: 此课题由吴海露与张振玉设计; 研究操作过程及论文撰写由吴海露与段兆涛完成; 资金提供、课题申请由张振玉完成; 数据分析由袁芳岑与高欣完成; 病理及免疫组织化学染色操作由王劲松与黄文斌完成.
通讯作者: 张振玉, 主任医师, 210006, 江苏省南京市秦淮区长乐路68号, 南京医科大学附属南京医院消化科.
zhangzhenyu808@126.com
电话: 025-87726246
收稿日期: 2012-11-15 修回日期: 2012-12-21
接受日期: 2012-12-22 在线出版日期: 2012-12-28

Mosapride protects against clopidogrel-induced gastric mucosal epithelium cell damage via the p38 MAPK signaling pathway

Hai-Lu Wu, Zhen-Yu Zhang, Zhao-Tao Duan, Fang-Cen Yuan, Xin Gao, Jin-Song Wang, Wen-Bin Huang

Hai-Lu Wu, Zhen-Yu Zhang, Zhao-Tao Duan, Fang-Cen Yuan, Xin Gao, Department of Gastroenterology, Nanjing First Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Nanjing 210006, Jiangsu Province, China
Jin-Song Wang, Wen-Bin Huang, Department of Pathology, Nanjing First Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Nanjing 210006, Jiangsu Province, China
Supported by: the Nanjing Medical Technology Development Fund, No. YKK10107
Correspondence to: Zhen-Yu Zhang, Chief Physician, Department of Gastroenterology, Nanjing First Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Nanjing 210006, Jiangsu Province, China. zhangzhenyu808@126.com
Received: 2012-11-15 Revised: 2012-12-21
Accepted: 2012-12-22 Published online: 2012-12-28

Abstract

AIM: To investigate whether mosapride has a protective effect against clopidogrel-induced gastric mucosal epithelium cells (GES-1) damage and to explore the underlying mechanisms.

METHODS: GES-1 cells were cultured *in vitro* and divided into control group, clopidogrel group (treated with clopidogrel at a concentration of IC_{50}, 0.36 mmol/L) and clopidogrel plus mosapride groups (treated with clopidogrel and 0.4, 0.5, or 0.6 μmol/L of mosapride). MTT assay and flow cytometry were used to detect the proliferation and apoptosis of cells of each group. The expression of phosphorylated P38 (p-P38), occludin and ZO-1 proteins in GES-1 cells was detected by Western blot.

RESULTS: Compared to the control group, p-P38 expression was significantly up-regulated in the clopidogrel group ($P < 0.05$). The expression of p-P38 in the clopidogrel plus mosapride groups was significantly lower than that in the clopidogrel group (all $P < 0.05$). With the decrease in p-P38 expression, the expression of occludin and ZO-1 were gradually increased.

CONCLUSION: Mosapride exerts a protective effect against clopidogrel-induced GES-1 cell damage probably by inhibiting p38/MAPK phosphorylation and up-regulating the expression of tight junction proteins occludin and ZO-1.

Key Words: Mosapride; GES-1; p38/MAPK; Occludin; ZO-1

Wu HL, Zhang ZY, Duan ZT, Yuan FC, Gao X, Wang JS, Huang WB. Mosapride protects against clopidogrel-induced gastric mucosal epithelium cell damage via the p38 MAPK signaling pathway. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(36): 3632-3637

摘要

目的: 探讨莫沙比利对氯吡格雷所致人胃黏膜上皮细胞(gastric mucosal epithelium cells, GES-1)损伤的保护作用及其机制.

方法: 建立GES-1单层细胞模型, 将细胞分为阴性对照组、氯吡格雷IC_{50}浓度(0.36 mmol/L)损伤组及不同浓度莫沙比利(0.4、0.5、0.6 μmol/L)联合氯吡格雷IC_{50}浓度组, 噻唑蓝比色法(MTT)和流式细胞仪检测各组细胞增殖、

■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

凋亡情况; 采用Western blot检测各细胞组p-P38以及紧密连接蛋白Occludin、ZO-1的表达量.

结果: 莫沙比利对氯吡格雷致GES-1细胞损伤有抑制作用(P<0.05); 与阴性对照组相比, 氯吡格雷损伤组p-P38表达显著增加, 而莫沙比利组p-P38表达量较氯吡格雷损伤组减少(P<0.05); 同时随着p-P38表达量的减少, Occludin、ZO-1表达量逐渐增加.

结论: 莫沙比利能够抑制氯吡格雷所致GES-1细胞损伤, 可能是通过抑制p38MAPK的磷酸化、上调紧密连接蛋白Occludin、ZO-1的表达, 从而达到保护胃黏膜的作用.

关键词: 莫沙比利; 人胃黏膜上皮细胞; p38/MAPK; Occludin; ZO-1

吴海露, 张振玉, 段兆涛, 袁芳岑, 高欣, 王劲松, 黄文斌. 莫沙比利通过p38/MAPK通路保护氯吡格雷所致胃黏膜上皮细胞损伤. 世界华人消化杂志 2012; 20(36): 3632-3637
http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3632.asp

0 引言

氯吡格雷作为新型噻吩吡啶类药物已广泛用于缺血性心脑血管疾病, 但随之而来的胃肠道损伤亦引起临床医师的广泛关注[1-3], 目前临床通常联合使用质子泵抑制剂(proton pump inhibitor, PPI)预防氯吡格雷引起的消化道损伤[4,5], 但有研究显示联合使用质子泵抑制剂会增加急性冠脉综合征患者死亡和再住院的风险[6-10], 因此有必要寻找其他能减轻氯吡格雷引起的消化道损伤的药物. 近年来有文献报道5-HT4受体激动剂有胃黏膜保护作用[11,12], 但具体机制尚不明确. 其中莫沙比利是目前最常用的5-HT4受体激动剂之一. 因此本研究在细胞水平上初步探讨莫沙比利对人胃黏膜保护作用及可能的机制.

1 材料和方法

1.1 材料 硫酸氯吡格雷购自北京诺德恒信化工技术有限公司(批号: NDS0060513); 枸橼酸莫沙比利由成都康弘药业有限公司馈赠(批号: 100901); 噻唑蓝(MTT)购自美国Sigma公司; Annexin V FITC/PI凋亡检测试剂盒购自美国BD公司; β-actin、ZO-1抗体购自Santa Cruz; p-P38、Occludin抗体购自cell signal公司.

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: 将人胃黏膜上皮细胞(gastric mucosal epithelium cells, GES-1)细胞置于含DMEM培养液(含10%小牛血清, pH 7.4)的细胞培养瓶内, 于37 ℃、50 mL/L CO_2温箱中培养, 隔天更换培养液, 每3天按1∶3比例传代, 实验时取对数生长期细胞.

1.2.2 细胞生长抑制试验: 应用MTT比色法, 将处于对数生长期的GES-1细胞用胰蛋白酶消化后, 以每孔2×10^5个细胞接种于96孔培养板中, 每孔体积200 μL, 培养24 h, 吸净培养液. 分别换上含氯吡格雷IC_{50}[13](0.36 mmol/L)浓度的培养液200 μL, 为氯吡格雷损伤组; 含不同浓度莫沙比利(0.4、0.5、0.6 μmol/L)联合氯吡格雷IC_{50}(0.36 mmol/L)浓度的培养液200 μL, 为莫沙比利联合氯吡格雷组. 每组设4个复孔, 同时设只加DMEM培养液的空白对照组、不加药物的阴性对照组. 继续培养24 h后, 加入50 μL MTT. 继续培养4 h, 吸净培养液, 每孔加入150 μL DMSO, 室温平板摇床摇匀10 min后以490 nm为测定波长, 用酶标仪检测吸光度(A)值, 计算抑制率. 抑制率 = (阴性对照孔A值-加药孔A值)/(阴性对照组A值)×100%. 每次实验重复3次.

1.2.3 流式细胞仪检测: 取对数生长期的细胞,将细胞浓度调至3×10^5/mL、每孔3 mL体积接种于6孔板, 细胞贴壁后, 设1组为阴性对照组, 1组为氯吡格雷(0.36 mmol/L)损伤组, 另外3组分别为莫沙比利(0.4、0.5、0.6 μmol/L)联合氯吡格雷(0.36 mmol/L)组. 培养24 h, 用不含EDTA的胰酶消化后离心收集细胞, PBS液洗涤两遍, 加入500 μL Binding buffer及Annexin V-FITC和PI各5 μL, 混匀后室温避光反应15 min, 流式细胞仪检测细胞凋亡情况. 实验重复3次取均值. 正常活细胞Annexin Ⅴ及PI均低染(Annexin Ⅴ-PI-), 分布在流式细胞分析图的左下区; 凋亡早期细胞Annexin Ⅴ高染而PI低染(Annexin Ⅴ+PI-), 分布在图的右下区; 凋亡晚期细胞或死亡细胞Annexin Ⅴ及PI均高染(Annexin Ⅴ+PI+), 分布在图的右上区.

1.2.4 Western blot 检测: 取对数生长期的细胞, 以每孔5×10^6个细胞接种于6孔板, 各组分别加药后培养24 h, 加入蛋白裂解液, 4 ℃裂解, 14 000 r/min离心15 min, 取上清为全蛋白提取物, BCA法进行蛋白浓度测定, 每孔蛋白浓度在10-20 μg/μL. 将蛋白提取物与蛋白上样缓冲液混合, 煮沸5 min, 分装保存于-80 ℃冰箱. 进行SDS-PAGE凝胶电泳, 转膜, 封闭后加入一抗4 ℃过夜. 再加入辣根过氧化物酶标记的二抗, 孵育后ECL法显

■研发前沿
研究显示5-HT4受体激动剂有胃黏膜保护作用, 但具体机制尚不明确, 其中莫沙比利是目前最常用的5-HT4受体激动剂之一.

■相关报道
Masahiko等多位研究者已通过动物实验证实莫沙比利可减轻非甾体类抗炎药引起的胃黏膜损伤.

■**创新盘点**
目前有关莫沙比利对氯吡格雷相关的胃肠道损伤是否具有保护作用的研究甚少, 该文通过体外实验进行初步证实, 并对其可能的机制进行了探讨.

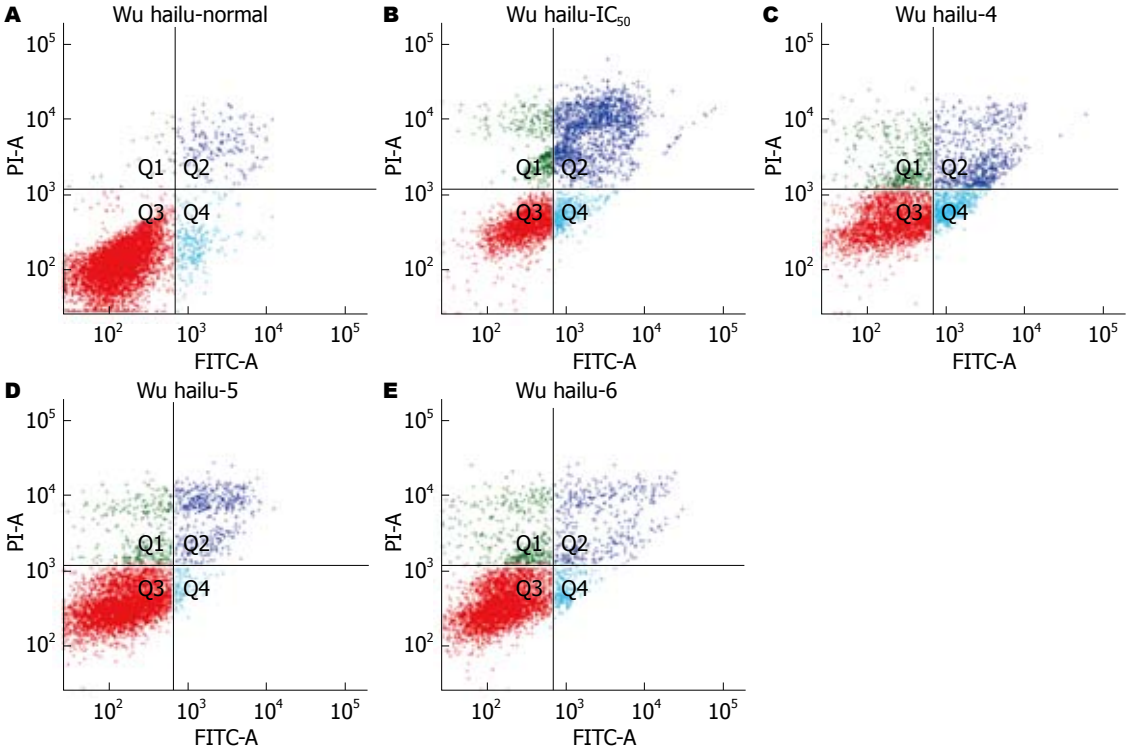


图 1 流式细胞仪结果. A: 阴性对照组; B: 氯吡格雷IC_{50}(0.36 mmol/L)损伤组; C−E: 0.4、0.5、0.6 μmol/L莫沙比利联合氯吡格雷IC_{50}(0.36 mmol/L)组.

色于X光片后照相, 以β-actin作为内参照, 使用ImageJ 1.38x软件分析处理. 各组蛋白表达水平均以实际灰度值/β-actin灰度值的比值来表示.

统计学处理 实验数据用mean±SD表示, 多组间比较采用One-way ANOVA分析, SPSS11.5软件进行数据处理及分析, 以$P<0.05$为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 细胞生长抑制实验 氯吡格雷IC_{50}(0.36 mmol/L)损伤组、莫沙比利(0.4、0.5、0.6 μmol/L)联合氯吡格雷IC_{50}(0.36 mmol/L)组对细胞的增殖抑制率分别是49.13%±0.27%, 38.08%±2.00%, 33.51%±2.78%, 34.71%±3.87%. 3种不同浓度莫沙比利联合氯吡格雷IC_{50}组对细胞的抑制率均低于氯吡格雷IC_{50}损伤组($P<0.05$).

2.2 各组对GES-1细胞凋亡的影响 流式细胞仪显示(图1): 阴性对照组凋亡率为2.9%(早期凋亡率为2.6%, 晚期凋亡率为0.3%); 氯吡格雷损伤组凋亡率为39.9%(早期凋亡率为26.1%, 晚期凋亡率为13.8%); 莫沙比利0.4 μmol/L联合氯吡格雷IC_{50}组凋亡率为13.5%(早期凋亡率为6.2%, 晚期凋亡率为7.3%); 莫沙比利0.5 μmol/L联合氯吡格雷IC_{50}组凋亡率为5.9%(早期凋亡率为4.5%, 晚期凋亡率为1.4%); 莫沙比利0.6 μmol/L联合氯吡格雷IC_{50}组组凋亡率为6.3%(早期凋亡率为3.9%, 晚期凋亡率为2.4%).

2.3 Western blot结果 Western blot结果显示(图2, 3), 氯吡格雷IC_{50}损伤组与阴性对照组相比, Occludin与ZO-1蛋白表达减少、p-P38表达显著增加; 而氯吡格雷IC_{50}联合莫沙比利0.4、0.5、0.6 μmol/L各组与氯吡格雷IC_{50}损伤组相比, Occludin与ZO-1蛋白表达均增加, 而p-P38表达显著降低, 呈递减趋势.

3 讨论

氯吡格雷作为一种新型抗血小板药物, 已成为心脑血管疾病抗血小板治疗的基石, 但临床应用氯吡格雷常引起胃肠道不适或消化道出血风险升高, 我们在前期的研究中已证实氯吡格雷对人胃黏膜上皮细胞株GES-1具有直接损伤作用, 诱导细胞发生凋亡, 并且呈现剂量依赖性[13]. 为了预防氯吡格雷引起的胃肠道损伤事件, 临床广泛合用质子泵抑制剂, 但近来许多研究发现, PPIs合用氯吡格雷会增加患者心血管不良事件的风险, 这引起了临床医师的普遍关注.

最近有研究显示5-HT4受体激动剂具有胃黏膜保护作用: Akimoto等[14]的研究表明大剂量促胃肠动力药西沙比利可增加胃黏膜NO含量, NO可扩张胃黏膜血管, 加速损伤物质的清除, 抑

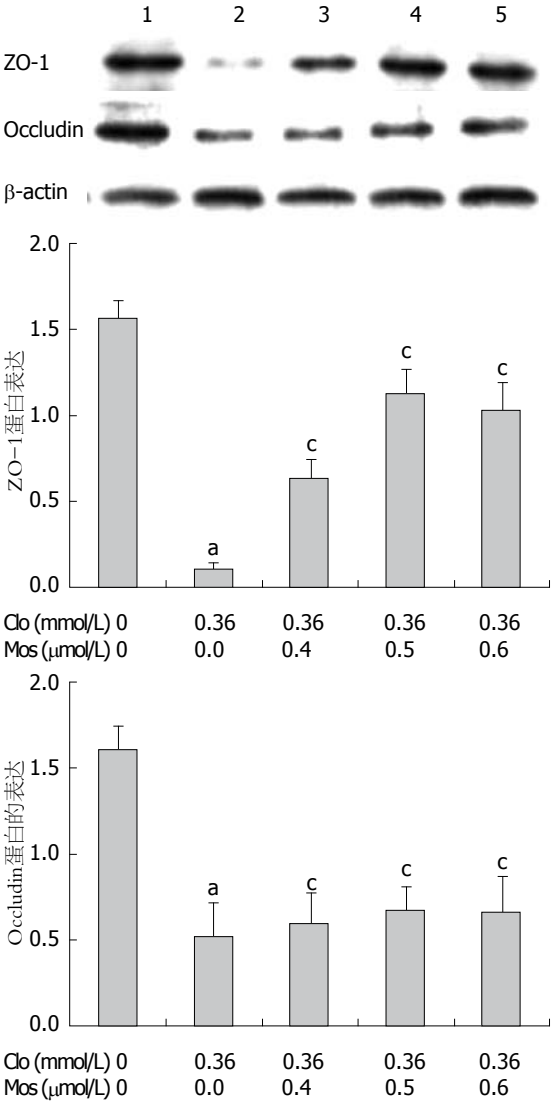


图 2 Western blot检测各组ZO-1和Occludin蛋白表达. 1: 阴性对照组; 2: 氯吡格雷IC_{50}(0.36 mmol/L)损伤组; 3-5: 0.4, 0.5, 0.6 μmol/L莫沙比利联合氯吡格雷IC_{50}(0.36 mmol/L)组. $^aP<0.05$ *vs*阴性对照组; $^cP<0.05$ *vs*氯吡格雷IC_{50}(0.36 mmol/L)损伤组.

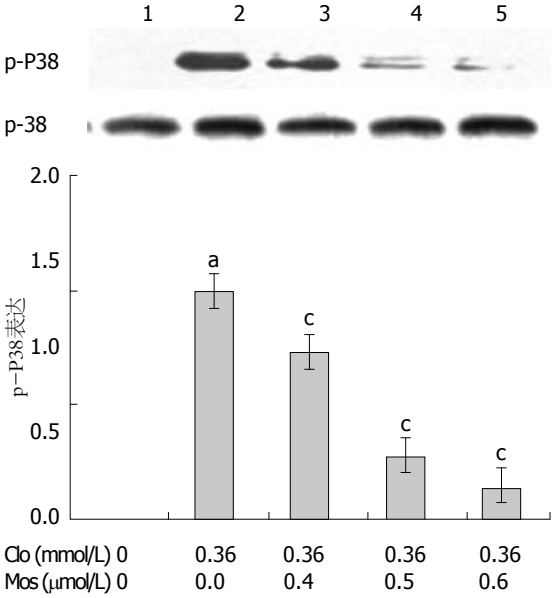


图 3 Western blot检测各组p-P38蛋白表达. 1: 阴性对照组; 2: 氯吡格雷IC_{50}(0.36mmol/L)损伤组; 3-5: 0.4、0.5、0.6 μmol/L莫沙比利联合氯吡格雷IC_{50}(0.36 mmol/L)组. $^aP<0.05$ *vs*阴性对照组; $^cP<0.05$ *vs*氯吡格雷IC_{50}(0.36 mmol/L)损伤组.

■应用要点

本文为莫沙比利新的临床领域的开拓提供了一定的理论依据, 为临床更好的应用氯吡格雷, 减少其胃肠道不良反应提供了新思路.

制血小板聚集, 促进HCO_3^-分泌, 从而起到胃黏膜保护作用; Fujisawa等[15]的研究显示莫沙比利可通过5-HT4受体激活减轻NSAID的促溃疡作用, 此效应可能是通过促进副交感神经释放ACh而激活免疫细胞, 特别是ED1-阳性巨噬细胞实现的. 本实验中MTT结果示莫沙比利对氯吡格雷损伤GES-1细胞具有明显抑制作用, 流式细胞术检测结果的趋势与MTT相似.

胃肠黏膜的损伤常由胃肠黏膜屏障受损所致[16,17]. 研究表明胃肠黏膜上皮屏障功能主要由细胞内紧密连接复合体维持, 紧密连接复合体包括紧密连接蛋白、黏附因子和桥粒[18,19]. 紧密连接蛋白主要包括跨膜蛋白Occludin、Claudins、JAMs, 胞质附着蛋白ZO家族(zonulaoccludensprotein)及与其相连的细胞骨架蛋白[20]. 其中以Occludin与ZO-1尤为重要. 跨膜蛋白Occludin直接参与TJs的构成, 是目前研究较多的紧密连接蛋白. ZO-1, 位于多种上皮细胞和内皮细胞间的闭锁小带中, 他的氨基端与Occludin的羧基端的coiled-coil结构域结合. Occludin与ZO-1结合后, 将跨膜蛋白和细胞骨架连接在一起, 并调节细胞内外信号转导途径, 改变肌动蛋白收缩性, 影响细胞间紧密连接功能, 调节其通透性. 因此我们在本课题的研究中, 选择以Occludin、ZO-1作为研究对象. 而丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号传导通路能够通过调节多种紧密连接蛋白的表达并因此改变紧密连接复合体的分子组成[21-23]. 在人类MAPK信号传导通路主要由p38/MAPK、ERK/MAPK、JNK/MAPK这3个家族组成. 其中p38/MAPK是目前最主要、研究最深入的MAPK家族成员之一, 被认为是多条信号途径的交汇点和共同通道, 生理条件下p38/MAPK表达活性很低, 可被应激和各种刺激因素磷酸化激活, 在应激和炎症反应调控中具有极其重要的作用[24]. 在对增殖、凋亡的调节中p38/MAPK也发挥了重要作用[25,26], p38/MAPK既可被生长因子类刺激激活来参与细胞分化与增殖的调控, 也可被应激刺激和病理性损伤信号所激活来介导细胞凋亡反应. 故目前已有较多研究报道p38/

■名词解释
丝裂原活化蛋白激酶(MAKP): 细胞内的一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶. 研究证实, MAPK信号转导通路存在于大多数细胞内, 将细胞外刺激信号转导至细胞及其核内, 并引起生物学反应(如细胞增殖、分化、转化及凋亡等)的过程中具有至关重要的作用.

MAPK在调节胃上皮增生、分化、凋亡中发挥重要作用[27,28], 且与溃疡的发生密切相关[29]. 国外已有研究报道阿司匹林可通过磷酸化激活p38/MAPK信号通路导致紧密连接蛋白Claudin-7的表达量下降从而引起胃黏膜上皮损伤[30].

通过Western blot结果我们发现: 氯吡格雷损伤组与阴性组相比p-P38表达量明显增高, 莫沙比利预处理组与氯吡格雷损伤组相比, 随着莫沙比利浓度的增高p-P38的表达量逐渐下降; 同时Occludin、ZO-1亦随着p-P38表达量的下降逐渐上升. 因此本实验认为莫沙比利可能是通过抑制了p38的活化, 使紧密连接蛋白Occludin、ZO-1破坏减少, 维持了胃黏膜细胞的紧密连接结构, 从而保证了胃黏膜上皮的屏障功能、减轻了胃黏膜的损伤. 但细胞因子激活的信号转导过程是极其复杂的, 通路之间互相存在着交联, 信号转导过程中又受到体内较多因素的调控, 形成一个复杂的信号传导网络. 因此, 莫沙比利对胃黏膜保护作用的机制还有待进一步研究.

4 参考文献

1 Chan FK, Ching JY, Hung LC, Wong VW, Leung VK, Kung NN, Hui AJ, Wu JC, Leung WK, Lee VW, Lee KK, Lee YT, Lau JY, To KF, Chan HL, Chung SC, Sung JJ. Clopidogrel versus aspirin and esomeprazole to prevent recurrent ulcer bleeding. *N Engl J Med* 2005; 352: 238-244

2 Shin JS, Abah U. Is routine stress ulcer prophylaxis of benefit for patients undergoing cardiac surgery? *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 2012; 14: 622-628

3 Uotani T, Sugimoto M, Nishino M, Kodaira C, Yamade M, Sahara S, Yamada T, Osawa S, Sugimoto K, Tanaka T, Umemura K, Watanabe H, Miyajima H, Furuta T. Ability of rabeprazole to prevent gastric mucosal damage from clopidogrel and low doses of aspirin depends on CYP2C19 genotype. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2012; 10: 879-885. e2

4 Bhatt DL, Scheiman J, Abraham NS, Antman EM, Chan FK, Furberg CD, Johnson DA, Mahaffey KW, Quigley EM. ACCF/ACG/AHA 2008 expert consensus document on reducing the gastrointestinal risks of antiplatelet therapy and NSAID use: a report of the American College of Cardiology Foundation Task Force on Clinical Expert Consensus Documents. *Circulation* 2008; 118: 1894-1909

5 Fontes-Carvalho R, Albuquerque A, Araújo C, Pimentel-Nunes P, Ribeiro VG. Omeprazole, but not pantoprazole, reduces the antiplatelet effect of clopidogrel: a randomized clinical crossover trial in patients after myocardial infarction evaluating the clopidogrel-PPIs drug interaction. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2011; 23: 396-404

6 Juurlink DN, Gomes T, Ko DT, Szmitko PE, Austin PC, Tu JV, Henry DA, Kopp A, Mamdani MM. A population-based study of the drug interaction between proton pump inhibitors and clopidogrel. *CMAJ* 2009; 180: 713-718

7 Ho PM, Maddox TM, Wang L, Fihn SD, Jesse RL, Peterson ED, Rumsfeld JS. Risk of adverse outcomes associated with concomitant use of clopidogrel and proton pump inhibitors following acute coronary syndrome. *JAMA* 2009; 301: 937-944

8 Gilard M, Arnaud B, Le Gal G, Abgrall JF, Boschat J. Influence of omeprazol on the antiplatelet action of clopidogrel associated to aspirin. *J Thromb Haemost* 2006; 4: 2508-2509

9 Small DS, Farid NA, Payne CD, Weerakkody GJ, Li YG, Brandt JT, Salazar DE, Winters KJ. Effects of the proton pump inhibitor lansoprazole on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of prasugrel and clopidogrel. *J Clin Pharmacol* 2008; 48: 475-484

10 Fontana P, Senouf D, Mach F. Biological effect of increased maintenance dose of clopidogrel in cardiovascular outpatients and influence of the cytochrome P450 2C19*2 allele on clopidogrel responsiveness. *Thromb Res* 2008; 121: 463-468

11 Bockaert J, Fozard JR, Dumuis A, Clarke DE. The 5-HT4 receptor: a place in the sun. *Trends Pharmacol Sci* 1992; 13: 141-145

12 刘劲松, 侯晓华. 西沙比利胃粘膜保护机制的实验研究. 中华消化杂志 2004; 24: 51

13 孙沂, 樊宏伟, 王书奎, 何帮顺, 张振玉. 氯吡格雷对人胃粘膜上皮细胞株GES-1增殖作用的影响. 世界华人消化杂志 2010; 18: 329-334

14 Akimoto M, Hashimoto H, Shigemoto M, Yamashita K, Yokoyama I. Changes of nitric oxide and growth factors during gastric ulcer healing. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000; 36: S282-S285

15 Fujisawa M, Murata T, Hori M, Ozaki H. The 5-HT4 receptor agonist mosapride attenuates NSAID-induced gastric mucosal damage. *J Gastroenterol* 2010; 45: 179-186

16 Agarwal R, Mori Y, Cheng Y, Jin Z, Olaru AV, Hamilton JP, David S, Selaru FM, Yang J, Abraham JM, Montgomery E, Morin PJ, Meltzer SJ. Silencing of claudin-11 is associated with increased invasiveness of gastric cancer cells. *PLoS One* 2009; 4: e8002

17 Hayashi D, Tamura A, Tanaka H, Yamazaki Y, Watanabe S, Suzuki K, Suzuki K, Sentani K, Yasui W, Rakugi H, Isaka Y, Tsukita S. Deficiency of claudin-18 causes paracellular H+ leakage, up-regulation of interleukin-1β, and atrophic gastritis in mice. *Gastroenterology* 2012; 142: 292-304

18 Kinugasa T, Sakaguchi T, Gu X, Reinecker HC. Claudins regulate the intestinal barrier in response to immune mediators. *Gastroenterology* 2000; 118: 1001-1011

19 Oshima T, Koseki J, Chen X, Matsumoto T, Miwa H. Acid modulates the squamous epithelial barrier function by modulating the localization of claudins in the superficial layers. *Lab Invest* 2012; 92: 22-31

20 Tsukita S, Furuse M, Itoh M. Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2: 285-293

21 Matter K, Balda MS. Signalling to and from tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4: 225-236

22 Carrozzino F, Pugnale P, Féraille E, Montesano R. Inhibition of basal p38 or JNK activity enhances epithelial barrier function through differential modulation of claudin expression. *Am J Physiol Cell Physiol* 2009; 297: C775-C787

23 Oshima T, Sasaki M, Kataoka H, Miwa H, Takeuchi T, Joh T. Wip1 protects hydrogen peroxide-induced colonic epithelial barrier dysfunction. *Cell Mol Life Sci* 2007; 64: 3139-3147

24 Morazzani M, de Carvalho DD, Kovacic H, Smida-Rezgui S, Briand C, Penel C. Monolayer versus aggregate balance in survival process for EGF-induced apoptosis in A431 carcinoma cells: Implication of ROS-P38 MAPK-integrin alpha2beta1 pathway. *Int J Cancer* 2004; 110: 788-799
25 Chen L, Zhang SS, Barnstable CJ, Tombran-Tink J. PEDF induces apoptosis in human endothelial cells by activating p38 MAP kinase dependent cleavage of multiple caspases. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 348: 1288-1295
26 Porras A, Zuluaga S, Black E, Valladares A, Alvarez AM, Ambrosino C, Benito M, Nebreda AR. P38 alpha mitogen-activated protein kinase sensitizes cells to apoptosis induced by different stimuli. *Mol Biol Cell* 2004; 15: 922-933
27 Ding SZ, Smith MF, Goldberg JB. Helicobacter pylori and mitogen-activated protein kinases regulate the cell cycle, proliferation and apoptosis in gastric epithelial cells. *J Gastroenterol Hepatol* 2008; 23: e67-e78
28 Wang H, Sun Y, Liu S, Yu H, Li W, Zeng J, Chen C, Jia J. Upregulation of progranulin by Helicobacter pylori in human gastric epithelial cells via p38MAPK and MEK1/2 signaling pathway: role in epithelial cell proliferation and migration. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2011; 63: 82-92
29 Kobayashi N, Kataoka T, Ono A, Tsukimi Y, Okabe S. Role of p38 mitogen-activated protein kinase in the healing of gastric ulcers in rats. *J Physiol Pharmacol* 2001; 52: 195-210
30 Oshima T, Miwa H, Joh T. Aspirin induces gastric epithelial barrier dysfunction by activating p38 MAPK via claudin-7. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008; 295: C800-C806

■同行评价
该文设计合理, 实验方法较为经典, 数据可靠, 为莫沙比利对氯吡格雷相关的胃肠道损伤的防治提供了客观的理论依据.

编辑 翟欢欢 电编 鲁亚静

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

• 消息 •

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 2012-12-07, 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, 2011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1 998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 2013-01-01)

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2012年12月28日; 20(36): 3638-3643
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

基础研究 BASIC RESEARCH

糖基化终末产物及其受体在胃肠道中的分布

陈朋民, 赵静波, Hans Gregersen

■背景资料
AGE和RAGE与多种糖尿病合并症密切相关, 如: 糖尿病心脏病、糖尿病视网膜病、糖尿病肾病和糖尿病动脉粥样硬化等. 虽然有少量有关AGE和RAGE与糖尿病胃肠合并症的报道, 但是尚缺乏广泛和深入的研究.

陈朋民, 赵静波, Mech-Sense, Aalborg Hospital, 9000 Aalborg, Denmark
陈朋民, 中日友好医院临床医学研究所生化与分子生物学研究室 北京市 100029
Hans Gregersen, Sino-Danish Centre for Education and Research, 8000 Aarhus C, Denmark
陈朋民, 副研究员, 主要从事糖尿病胃肠合并症发病机制的研究.
作者贡献分布: 此课题由赵静波与Hans Gregersen设计; 研究过程、结果分析及论文写作由陈朋民与赵静波共同完成.
通讯作者: 赵静波, 副教授, Mech-Sense, Aalborg Hospital, 9000 Aalborg, Denmark. jz@rn.dk
电话: +45-28292688
收稿日期: 2012-10-15 修回日期: 2012-11-26
接受日期: 2012-12-20 在线出版日期: 2012-12-28

Distribution of advanced glycation end products and their receptor in the gastrointestinal tract

Peng-Min Chen, Jing-Bo Zhao, Hans Gregersen

Peng-Min Chen, Jing-Bo Zhao, Mech-Sense, Aalborg Hospital, 9000 Aalborg, Denmark
Peng-Min Chen, Department of Molecular Biology, Institute of Clinical Medicine, China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China
Hans Gregersen, Sino-Danish Centre for Education and Research, 8000 Aarhus C, Denmark
Correspondence to: Jing-Bo Zhao, Associate Professor, Mech-Sense, Aalborg Hospital, 9000 Aalborg, Denmark. jz@rn.dk
Received: 2012-10-15 Revised: 2012-11-26
Accepted: 2012-12-20 Published online: 2012-12-28

Abstract

AIM: To investigate the distribution of advanced glycation end products (AGEs) and their receptor (RAGE) in the gastrointestinal (GI) tract to provide a basis for further study of the association between AGE/RAGE and diabetic GI dysfunction.

METHODS: The distribution of AGEs [N epsilon-(carboxymethyl) lysine and N epsilon-(carboxyethyl) lysine] and RAGE were detected in the esophageal, gastric, duodenal, jejunal, ileal, colonic and rectal tissues of normal adult Wistar rats using immunohistochemistry.

RESULTS: In the esophagus, AGEs and RAGE were mainly distributed in striated muscle cells and squamous epithelial cells. In the stomach, AGEs were mainly distributed in parietal cells, and RAGE was strongly expressed in chief cells, mast cells and neurons in ganglia, moderately in parietal cells, and mildly in surface mucous cells. In the intestine, colon and rectum, AGEs and RAGE were distributed in mucosal epithelial cells, and RAGE was also distributed in neurons in the myenteric and submucosal plexuses.

CONCLUSION: AGEs and RAGE are widely distributed in epithelial cells of the GI tract as well as striated muscle cells in the esophagus. AGEs are also distributed in parietal cells in the stomach. RAGE is also distributed in chief cells, mast cells, parietal cells and surface mucous cells in the stomach and neurons in the whole GI tract.

Key Words: Diabetes mellitus; Gastrointestinal complications; N epsilon-(carboxymethyl)lysine; N epsilon-(carboxyethyl)lysine; Advanced glycation end products

Chen PM, Zhao JB, Hans Gregersen. Distribution of advanced glycation end products and their receptor in the gastrointestinal tract. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(36): 3638-3643

摘要

目的: 研究糖基化终末产物(advanced glycation end products, AGE)及其受体(receptor for advanced glycation end products, RAGE)在胃肠道中的分布, 为进一步探索其在慢性糖尿病胃肠功能紊乱中的作用奠定基础.

方法: 分别对成年Wistar大鼠食管、胃、十二指肠、空肠、回肠、结肠及直肠组织进行AGE及RAGE免疫组织化学染色.

结果: (1)食管: AGE及RAGE主要分布在横纹肌的肌细胞及黏膜的鳞状上皮细胞; (2)胃: AGE在壁细胞为强阳性. RAGE在主细胞、肥大细胞、神经细胞为强阳性, 在壁细胞为中等强度阳性, 在表面黏液细胞为弱阳性; (3)小肠: AGE及RAGE在绒毛及固有层上皮细胞为阳性或强阳性. RAGE在肠道的神经细胞亦为强阳性; (4)结肠及直肠: AGE及RAGE在黏膜上

■同行评议者
魏继福, 研究员, 江苏省人民医院; 洪天配, 教授, 北京大学第三医院内分泌科

皮细胞为弱阳性, RAGE在神经细胞为强阳性.

结论: AGE及RAGE广泛分布于肠道上皮细胞及食管的横纹肌细胞, AGE亦分布于胃的壁细胞, RAGE亦分布于胃的壁细胞、主细胞、表面黏液细胞、肥大细胞及胃肠道的神经细胞.

关键词: 糖尿病; 胃肠道合并症; 糖基化终末产物; 糖基化终末产物受体

陈朋民, 赵静波, Hans Gregersen. 糖基化终末产物及其受体在胃肠道中的分布. 世界华人消化杂志 2012; 20(36): 3638–3643
http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3638.asp

0 引言

胃肠道功能紊乱是慢性糖尿病常见的合并症之一. 很多研究已经揭示慢性糖尿病胃肠道的功能和结构(包括: 消化、吸收、运动、形态、生物力学特性等)发生了明显改变[1-3]. 然而胃肠道异常的病理发生是一个复杂的受多因素(如: 运动功能紊乱、自主神经异常及心理因素等)影响的过程, 目前公认高血糖启动和促进了合并症的发生发展, 但对其具体发生机制还不十分清楚.

糖基化终末产物(advanced glycation end products, AGE)是一个多分子的蛋白总称, 是通过一系列复杂的非酶催化的反应诱导糖基连接到不同蛋白质的氨基酸上[4], 高血糖能加速AGE在组织中的聚集. 糖基化终末产物受体(receptor for advanced glycation end products, RAGE)是免疫球蛋白超家族的一种跨膜受体[5,6]. 根据现有资料, 对AGE及RAGE在胃肠道中分布的研究还很少见. Ling等[7]采用免疫组织化学的方法检测了正常及1型糖尿病大鼠不同组织器官AGE的分布, 他们发现AGE在胃及小肠的上皮细胞有表达. 但迄今为止, 还未见系统而详细的对AGE及RAGE在胃肠道分布的研究报道.

本研究的目的是探讨AGE及其受体在整个胃肠道的分布, 从而为探讨AGE及RAGE在糖尿病胃肠道合并症中的作用奠定基础.

1 材料和方法

1.1 材料 抗AGE抗体(6D12)为小鼠抗Nε-羧甲基赖氨酸[N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine, CML, 一个主要的AGE]和Nε-羧乙基赖氨酸[N(epsilon)-(carboxyethyl)lysine, CEL]的单克隆抗体购自日本COSMO生物有限公司; 抗RAGE抗体为兔多克隆抗体购自美国细胞应用公司(Cell Applications, INC, USA); 第二抗体LSAB2 System-HRP、蛋白酶K、柠檬酸缓冲液(pH 6.0)、牛血清白蛋白(BSA)和苏木精购自丹麦Dako公司; 乙醇、甲醇、二甲苯为Sigma产品; 载玻片及盖玻片为德国Menzel-Glaser公司产品; 10只32周龄、体质量约330 g Wistar♂大鼠购自丹麦Taconic Europe A/S公司.

1.2 方法

1.2.1 取材: 大鼠用Hypnorm 0.5 mg/100 g体质量和Dormicum 0.25 mg/100 g体质量深度麻醉后, 分别取1 cm的食管、十二指肠、空肠、回肠、结肠、直肠及全胃, 胃肠内容物轻轻地用Krebs液清洗干净, 并固定于福尔马林中24 h, 之后通过注射过量麻醉剂处死大鼠. 食管取自下1/3末端, 十二指肠取自距幽门括约肌5 cm处, 空肠取自距Treitz韧带5 cm处, 回肠取自回盲瓣近端5 cm处, 结肠取自回盲瓣远端5 cm处, 直肠取自中段.

1.2.2 免疫组织化学染色: 将固定好的上述组织用系列乙醇脱水后石蜡包埋, 垂直于黏膜表面切片, 并固定于预先处理的免疫组织化学专用载玻片上. 室温下充分干燥后, 将切片置于37 ℃烤箱中过夜以增加组织对切片的黏附力. 二甲苯脱蜡2次, 每次15 min. 分别用1 000、950、900、800、700、600和500 mL/L乙醇逐级水化, 每个浓度2次, 每次3 s. 用水冲洗10 min后浸泡至0.01 mol/L PBS(pH 7.4)中3 min. (1)AGE免疫组织化学染色: 上述组织经蛋白酶K处理后(100 μg/mL, 37 ℃, 20 min)浸泡于3%双氧水-甲醇溶液中(常温下15 min)以抑制内源性过氧化物酶. 在5%BSA-PBS溶液中常温下孵育30 min以阻断非特异性染色. 与第一抗体6D12(1% BSA-PBS 1∶100稀释)或经过量CML和CEL处理过的正常小鼠IgG (250 μg/mL, 1% BSA-PBS 1∶250稀释, 阴性对照)在4 ℃下孵育过夜. 用PBS(0.01 mol/L)充分洗涤后, 与第二抗体的第一部分LINK(生物素化的抗小鼠和抗兔免疫球蛋白)在室温下孵育10 min. PBS充分洗涤后, 与第二抗体第二部分STREPTAVIDIN PEROXIDASE(辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素)室温下孵育10 min. (LINK及STREPTAVIDIN PEROXIDASE为丹麦Dako公司生产的第二抗体LSAB2 System-HRP的两部分). 经PBS充分洗涤后, 与含有过氧化氢及邻苯二氨的底物溶液常温下孵育5 min显色. 经水冲洗10 min后, 用苏木精复染1 min. 再次冲洗10 min后, 用盐酸-乙醇分化3 s. 经水充分冲洗后, 用800、900、950和1 000 mL/L的乙醇逐级脱水, 然后浸泡于二甲苯中2次, 每次15 min. 最后盖玻

■研发前沿
糖尿病胃肠合并症是目前国内外的研究热点之一, 而AGE和RAGE可能与其有密切关系. 为了探讨AGE和RAGE在糖尿病胃肠道合并症中的作用, 了解AGE和RAGE在正常胃肠道中的系统分布是亟待研究和解决的问题, 这正是本研究的重点所在.

■**创新盘点**
本文首次系统性地探讨了AGE及其受体在整个胃肠道的分布.

表 1 糖基化终末产物在胃肠道各段、各主要细胞免疫染色强度分布

	绒毛上皮细胞	陷窝上皮细胞	黏膜下层	平滑肌层	肌间神经细胞
十二指肠	+++	++	–	–	–
空肠	+++	++	–	–	–
回肠	+	–	–	–	–
结肠		肠腔面++, 其余部分–	–	–	–
直肠		++	–	–	–

片封片并在光镜下观察; (2)RAGE免疫组织化学染色: 抗RAGE抗体为兔源性多克隆抗体, 是经人RAGE肽链N末端免疫所得, 其序列与大鼠相应序列仅有两个氨基酸差异. 与AGE免疫组织化学染色相比, RAGE免疫组织化学染色省去蛋白酶K消化步骤, 取而代之的是将组织切片放入10 mmol/L柠檬酸缓冲液(pH 6.0)中煮沸18 min, 用以修复抗原. 除设立阴性对照外, 用正常大鼠肺组织切片做为阳性对照(RAGE在肺组织为高表达[8]). 第一抗体稀释度为1∶60. 其余步骤与AGE免疫组织化学染色相同. AGE及RAGE染色阳性区域均为棕黄色. 而在阴性对照中并未出现, 说明染色为特异性染色. 所做10只动物其着色部位及着色强度没有明显差异. 根据棕黄色在组织中的分布, 我们从组织和细胞水平描述其分布状态. 根据染色强度, 我们将其分为5级, 即: - 无明显染色; + 弱染色; ++ 中等强度染色; +++ 强染色; ++++ 极强染色.

2 结果

2.1 糖基化终末产物的分布

2.1.1 食管: AGE主要分布于食管横纹肌及黏膜层, 其分布为非均一性. 在黏膜层其染色强度从基底层到角化层逐渐减弱. 在细胞水平, AGE主要分布于横纹肌的肌细胞及鳞状上皮细胞, 肌细胞为不规则非均一性染色, 而鳞状上皮细胞为均一性染色. 黏膜下层未见明显着色(图1A).

2.1.2 胃: AGE主要分布在黏膜层, 尤其是在黏膜层的中部. 从细胞水平看, 壁细胞为强阳性, 胞膜胞浆均有染色, 但胞膜强于胞浆. 表面黏液细胞、主细胞及间质细胞为阴性. 黏膜下层、平滑肌层及神经节未见明显染色(图2A).

2.1.3 肠道: AGE主要分布在黏膜层(表1), 特别是在小肠的绒毛及腺窝上皮细胞(图3A, 除回肠腺窝上皮细胞外)及结肠黏膜表面上皮细胞分布广泛. 结肠黏膜非表面上皮细胞、黏膜下层、平滑肌层、神经丛未见明显染色. 在上皮细胞为非均一性分布, 绒毛上皮细胞的表面部分比基底部染色强, 腺窝上皮细胞与绒毛上皮正好相反, 其基底部染色更强. 同段相比, 绒毛上皮比腺窝上皮染色更强. 十二指肠和空肠黏膜上皮细胞染色强度相似, 两者比结肠黏膜染色更强, 与前三者相比, 回肠黏膜染色最弱. 在直肠, AGE主要分布在腺窝上皮细胞, 其染色强度与结肠相似.

2.2 糖基化终末产物受体的分布

2.2.1 食管: RAGE亦主要分布在横纹肌及黏膜层, 其在横纹肌层为不规则非均一性分布, 在黏膜层, 从基底部到黏膜表面染色强度逐渐降低. 从细胞水平看, RAGE主要分布在横纹肌的肌细胞及鳞状上皮细胞. 黏膜下层未见明显染色(图1B).

2.2.2 胃: RAGE主要分布在黏膜层, 其基底部较上半部染色更强. 从细胞水平看, 主细胞为强染色, 壁细胞中等染色, 表面黏液细胞弱染色, 间质细胞未见明显着色. 黏膜下层未见明显染色. 在平滑肌层, 肥大细胞及神经丛的神经细胞为强染色, 平滑肌细胞未见明显染色(图2B).

2.2.3 肠道: 在小肠RAGE主要分布在绒毛和腺窝上皮细胞以及神经丛的神经细胞, 其在细胞内为均匀性分布(表2), 但不同部位的细胞染色强度有明显差异, 绒毛上皮细胞染色强度明显强于腺窝上皮细胞; 十二指肠上皮细胞染色强度在三段小肠中最强(图3B), 回肠最弱, 空肠居中. 神经细胞在三段小肠中的染色强度无明显差异. 在结肠RAGE主要分布在神经节内的神经细胞, 其染色强度与小肠神经细胞类似(图3C), 另外RAGE在腺窝上皮细胞亦有少量分布, 与小肠相比其分布明显减少. 在直肠黏膜上皮细胞亦有RAGE分布(图3D).

3 讨论

Ling等[9]用抗不同种类的糖基化终末产物抗体研究了AGE在正常人不同组织器官的分布. 结果显示: AGE广泛分布于间质细胞、系膜细胞、

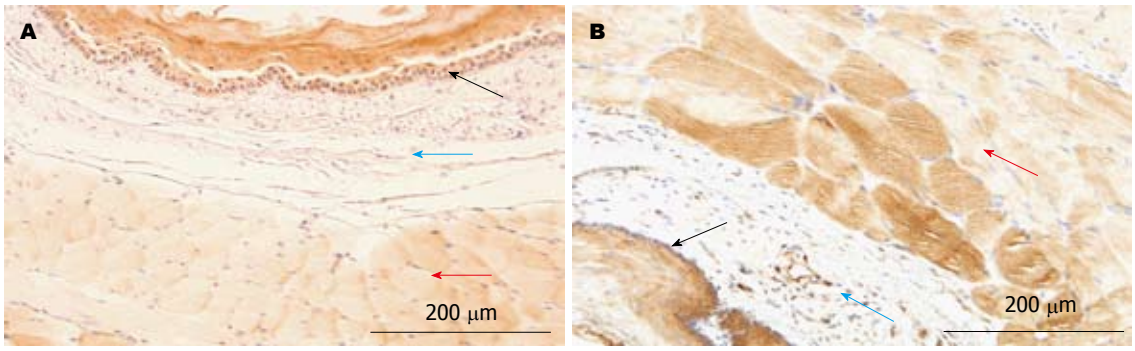


图 1 食道糖基化终末产物及其受体免疫组织化学染色(×20). A: 食道糖基化终末产物, 食道横纹肌层非均一染色(红色箭头); 食道黏膜下层无明显染色(蓝色箭头); 食道黏膜层染色较强且为非均一性(黑色箭头); B: 食道糖基化终末产物受体, 食道横纹肌层为不规则非均一性染色(红色箭头); 食道黏膜下层无明显染色(蓝色箭头); 食道黏膜层非均一性染色(黑色箭头).

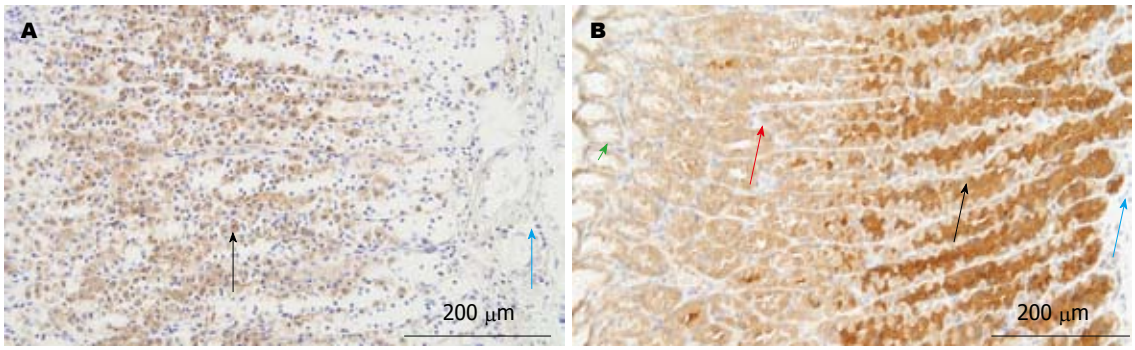


图 2 胃黏膜及黏膜下层糖基化终末产物及其受体免疫组织化学染色(×20). A: 胃黏膜及黏膜下层糖基化终末产物, 黏膜下层未见明显染色(蓝色箭头); 黏膜层免疫染色阳性者为壁细胞, 胞浆胞膜均有染色, 但胞膜较胞浆染色更强(黑色箭头); B: 胃黏膜及黏膜下层糖基化终末产物受体: 黏膜下层未见明显染色(蓝色箭头); 黏膜层主细胞均一性强染(黑色箭头); 黏膜层壁细胞均一性中等强度染色(红色箭头); 黏膜层表面黏液细胞均一性弱染(绿色箭头).

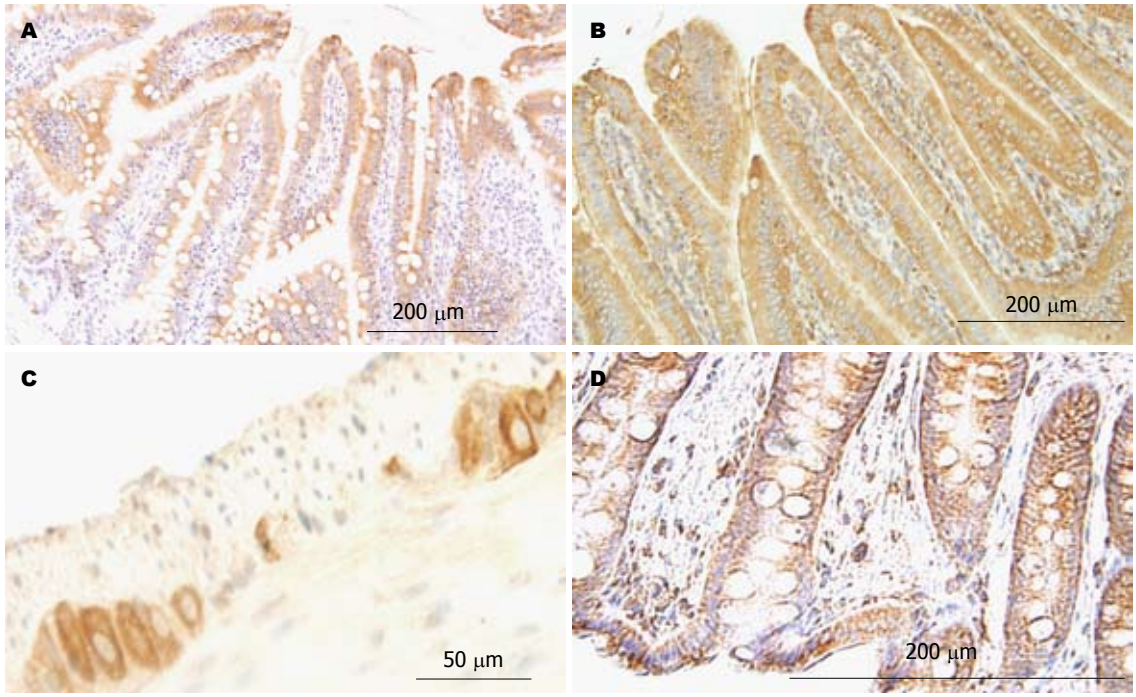


图 3 部分肠管组织糖基化终末产物及其受体免疫组化染色. A: 空肠绒毛糖基化终末产物(×20), 染色阳性者为绒毛上皮细胞, 为非均一性分布, 表面较基底部染色强; B: 十二指肠绒毛糖基化终末产物受体免疫组织化学染色图(×20), 染色阳性者为绒毛上皮细胞, 为均一性分布; C: 结肠肌间神经丛糖基化终末产物受体免疫组化染色图(×40), 染色阳性者为神经细胞, 为均一性分布; D: 直肠黏膜糖基化终末产物受体免疫组织化学染色图(×20), 染色阳性者为黏膜上皮细胞, 为均一性分布.

■应用要点

本研究为进一步探讨AGE及RAGE在糖尿病胃肠道合并症中的作用奠定了基础.

■名词解释
糖基化终末产物: 一类多分子蛋白的总称, 通过一系列复杂的非酶催化反应诱导糖基连接到不同蛋白质的氨基酸上.
糖基化终末产物受体: 免疫球蛋白超家族的一种跨膜受体, 其能与AGE结合从而引发一系列反应. AGE和RAGE与糖尿病合并症密切相关.

表 2 糖基化终末产物受体在胃肠道各段、各主要细胞免疫染色强度分布

	绒毛上皮细胞	陷窝上皮细胞	黏膜下层	平滑肌层	肌间神经细胞
十二指肠	++++	++	−	−	++++
空肠	+++	++	−	−	++++
回肠	++	+	−	−	++++
结肠		+	−	−	++++
直肠		++	−	−	

血细胞、细胞外基质以及心内膜、动静脉和毛细血管的内皮细胞. 细胞水平上, 细胞膜、细胞器、胞浆和胞核均有分布. 后来他们又检测了正常及1型糖尿病大鼠不同组织器官中4种AGE的分布, 在胃肠道, 他们研究了AGE在小肠和胃组织中的分布, 发现AGE主要分布于胃及小肠上皮细胞[7]. 对RAGE的研究多集中在病变组织与正常组织的比较上, 总体来说, RAGE在正常组织中的表达较低, 与其他组织相比, 其在肺组织中的表达最高[10]. 但迄今为止, 未见有关AGE及其受体在正常胃肠道组织中表达情况的系统研究报道. 本研究发现AGE主要分布在胃肠道的黏膜层及食管的横纹肌层, 平滑肌、神经丛及黏膜下层未见明显染色. RAGE主要分布在胃肠道的黏膜层、神经丛及食管的横纹肌层, 黏膜下层及平滑肌层未见明显染色. 本研究所采用的抗体是抗两种不同的AGE, 即CML和CEL, 为了更全面地阐明AGE在正常肠道中的分布, 在未来的研究中我们将采用多种不同的抗AGE特异性抗体. 同时, 我们将采用双染同时在胃肠道组织中定位AGE及其受体, 以进一步明确两者之间的表达关系.

多年的研究表明: AGE可在不同的组织器官中聚集, 其聚集的量随年龄的增长而增加[11], 过量聚集的AGE与多种疾病密切相关. AGE可通过受体非依赖型和依赖型两种通路影响慢性糖尿病合并症[7,8], 前者是通过非酶糖化和蛋白质交叉连接形成改变细胞外基质的结构, 后者是通过与细胞外特异性受体结合改变细胞功能促进合并症的形成. 现阶段的研究表明: AGE及其受体与不同类型糖尿病合并症的发病具有相关性[12], 如: 糖尿病心脏病[13]、糖尿病视网膜病[14]、糖尿病肾病[15]和糖尿病动脉粥样硬化[16]等; AGE与其受体结合, 可介导活性氧(ROS)-血管紧张素转化酶-血管紧张素-JAK2-TGF-beta-Smad级联反应, 从而诱导肾脏间质细胞增生、Ⅰ型胶原合成、肾小球系膜细胞肥厚、纤黏连蛋白合成、腹膜纤维化[17]等; 血浆AGE或亲和AGE的红细胞与血管内皮上的受体相互作用可通过裂隙的形成及肌动蛋白重组引起血管高渗透性炎性反应[18]; AGE和其受体结合还可刺激NADPH氧化酶和活性氧的产生, 活性氧与一氧化氮反应可抑制一氧化氮的扩血管作用[19]. 由于AGE及其受体在胃肠道分布广泛, 因此AGE及其受体在糖尿病胃肠功能紊乱中可能也起非常重要的作用. 然而, 迄今为止探讨AGE及其受体在慢性糖尿病胃肠功能紊乱中作用的报道甚少.

我们前期的研究工作已经表明: 在STZ诱导的糖尿病大鼠, AGE在小肠黏膜上皮细胞的表达明显增高; RAGE在小肠的上皮细胞及神经细胞表达明显增高[20]. 说明在糖尿病状态下, AGE及其受体在胃肠道有过度表达, 其可能与糖尿病性胃肠功能障碍有关. 众所周知, 小肠绒毛上皮细胞富含与消化和吸收有关的酶[21], AGE和RAGE如果在糖尿病状态下过度表达, 其可能影响小肠绒毛刷状缘的理化特性及功能, 从而影响糖尿病患者小肠的消化和吸收功能[22-24]. 另外, 大量研究表明, 糖尿病性自主神经病变与糖尿病胃肠动力障碍密切相关[25]. AGE和RAGE可能在糖尿病性自主神经病变中起到非常重要的作用[26-29]. 体外实验表明: AGE和内源性一氧化氮协同作用可导致神经元凋亡[30], 而Jeyabal等[31]研究表明: AGE抑制剂能抑制糖尿病肠道神经原一氧化氮合成酶的丢失, 提示在糖尿病中产生的AGE可能导致肠道一氧化氮合成酶表达的降低, 这个作用可能是胃肠道动力功能紊乱的原因之一. 因此, 糖尿病胃肠功能紊乱已成为国内外比较热门的研究课题之一. 本研究比较系统地描述了AGE及其受体在胃肠道中的分布, 为进一步探讨AGE及其受体在慢性糖尿病胃肠功能紊乱中的作用奠定了基础.

4 参考文献

1 Nair M. Diabetes mellitus, part 1: physiology and

complications. *Br J Nurs* 2007; 16: 184-188
2 Horowitz M, Samsom M. Gastrointestinal function in diabetes mellitus. First edition. UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2004: 1-339
3 Zhao J, Frøkjaer JB, Drewes AM, Ejskjaer N. Upper gastrointestinal sensory-motor dysfunction in diabetes mellitus. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 2846-2857
4 Singh R, Barden A, Mori T, Beilin L. Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia* 2001; 44: 129-146
5 Bierhaus A, Humpert PM, Morcos M, Wendt T, Chavakis T, Arnold B, Stern DM, Nawroth PP. Understanding RAGE, the receptor for advanced glycation end products. *J Mol Med* (Berl) 2005; 83: 876-886
6 Stern DM, Yan SD, Yan SF, Schmidt AM. Receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) and the complications of diabetes. *Ageing Res Rev* 2002; 1: 1-15
7 Ling X, Nagai R, Sakashita N, Takeya M, Horiuchi S, Takahashi K. Immunohistochemical distribution and quantitative biochemical detection of advanced glycation end products in fetal to adult rats and in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Lab Invest* 2001; 81: 845-861
8 Wada R, Yagihashi S. Role of advanced glycation end products and their receptors in development of diabetic neuropathy. *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1043: 598-604
9 Ling X, Sakashita N, Takeya M, Nagai R, Horiuchi S, Takahashi K. Immunohistochemical distribution and subcellular localization of three distinct specific molecular structures of advanced glycation end products in human tissues. *Lab Invest* 1998; 78: 1591-1606
10 Mukherjee TK, Mukhopadhyay S, Hoidal JR. Implication of receptor for advanced glycation end product (RAGE) in pulmonary health and pathophysiology. *Respir Physiol Neurobiol* 2008; 162: 210-215
11 Semba RD, Nicklett EJ, Ferrucci L. Does accumulation of advanced glycation end products contribute to the aging phenotype? *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2010; 65: 963-975
12 Goh SY, Cooper ME. Clinical review: The role of advanced glycation end products in progression and complications of diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93: 1143-1152
13 Kato T, Yamashita T, Sekiguchi A, Tsuneda T, Sagara K, Takamura M, Kaneko S, Aizawa T, Fu LT. AGEs-RAGE system mediates atrial structural remodeling in the diabetic rat. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2008; 19: 415-420
14 Sugiyama T, Okuno T, Fukuhara M, Oku H, Ikeda T, Obayashi H, Ohta M, Fukui M, Hasegawa G, Nakamura N. Angiotensin II receptor blocker inhibits abnormal accumulation of advanced glycation end products and retinal damage in a rat model of type 2 diabetes. *Exp Eye Res* 2007; 85: 406-412
15 Fukami K, Yamagishi S, Ueda S, Okuda S. Role of AGEs in diabetic nephropathy. *Curr Pharm Des* 2008; 14: 946-952
16 Tekabe Y, Luma J, Einstein AJ, Sedlar M, Li Q, Schmidt AM, Johnson LL. A novel monoclonal antibody for RAGE-directed imaging identifies accelerated atherosclerosis in diabetes. *J Nucl Med* 2010; 51: 92-97
17 Lee CI, Guh JY, Chen HC, Hung WC, Yang YL, Chuang LY. Advanced glycation end-product-induced mitogenesis and collagen production are dependent on angiotensin II and connective tissue growth factor in NRK-49F cells. *J Cell Biochem* 2005; 95: 281-292
18 Hirose A, Tanikawa T, Mori H, Okada Y, Tanaka Y. Advanced glycation end products increase endothelial permeability through the RAGE/Rho signaling pathway. *FEBS Lett* 2010; 584: 61-66
19 Grossin N, Wautier MP, Wautier JL. Red blood cell adhesion in diabetes mellitus is mediated by advanced glycation end product receptor and is modulated by nitric oxide. *Biorheology* 2009; 46: 63-72
20 Chen P, Zhao J, Gregersen H. Up-regulated expression of advanced glycation end-products and their receptor in the small intestine and colon of diabetic rats. *Dig Dis Sci* 2012; 57: 48-57
21 Guyton AC, Hall JE. Textbook of medical physiology. Tenth edition. USA: W.B. Saunders Company, 2000: 754-763
22 Bhor VM, Sivakami S. Regional variations in intestinal brush border membrane fluidity and function during diabetes and the role of oxidative stress and non-enzymatic glycation. *Mol Cell Biochem* 2003; 252: 125-132
23 Brasitus TA, Dudeja PK. Correction of abnormal lipid fluidity and composition of rat ileal microvillus membranes in chronic streptozotocin-induced diabetes by insulin therapy. *J Biol Chem* 1985; 260: 12405-12409
24 Keelan M, Walker K, Thomson AB. Intestinal brush border membrane marker enzymes, lipid composition and villus morphology: effect of fasting and diabetes mellitus in rats. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol* 1985; 82: 83-89
25 Phillips LK, Rayner CK, Jones KL, Horowitz M. An update on autonomic neuropathy affecting the gastrointestinal tract. *Curr Diab Rep* 2006; 6: 417-423
26 King RH. The role of glycation in the pathogenesis of diabetic polyneuropathy. *Mol Pathol* 2001; 54: 400-408
27 Sourris KC, Forbes JM. Interactions between advanced glycation end-products (AGE) and their receptors in the development and progression of diabetic nephropathy - are these receptors valid therapeutic targets. *Curr Drug Targets* 2009; 10: 42-50
28 Toth C, Martinez J, Zochodne DW. RAGE, diabetes, and the nervous system. *Curr Mol Med* 2007; 7: 766-776
29 Russo A, Fraser R, Adachi K, Horowitz M, Boeckxstaens G. Evidence that nitric oxide mechanisms regulate small intestinal motility in humans. *Gut* 1999; 44: 72-76
30 Cellek S, Qu W, Schmidt AM, Moncada S. Synergistic action of advanced glycation end products and endogenous nitric oxide leads to neuronal apoptosis in vitro: a new insight into selective nitrergic neuropathy in diabetes. *Diabetologia* 2004; 47: 331-339
31 Jeyabal PV, Kumar R, Gangula PR, Micci MA, Pasricha PJ. Inhibitors of advanced glycation end-products prevent loss of enteric neuronal nitric oxide synthase in diabetic rats. *Neurogastroenterol Motil* 2008; 20: 253-261

■同行评价
本文系统的研究了AGE及其受体(RAGE)在成年Wistar大鼠胃肠道各段组织中的分布. 研究创新性强, 研究结果可靠, 具有一定的科学价值.

编辑 田滢 电编 鲁亚静

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2012年12月28日; 20(36): 3644-3648
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

基础研究 BASIC RESEARCH

高频超声对正常SD大鼠肝脏血流动力学的检测

杨蕗璐, 马 琳, 陈克霏, 王 红, 卢 强, 凌文武, 全杰荣, 李加伍, 罗 燕

■背景资料
肝脏病变常常引起肝实质损害, 门静脉及肝动脉血流动力学的改变, 随着SD大鼠越来越广泛地用于模拟人类肝脏疾病的基础实验研究中, 获得正常大鼠肝脏声像图及多普勒血流参数对于肝脏疾病模型的观测和评估显得十分重要.

杨蕗璐, 马琳, 王红, 卢强, 凌文武, 全杰荣, 李加伍, 罗燕, 四川大学华西医院超声诊断科 四川省成都市 610041
陈克霏, 四川大学华西医院普外科 四川省成都市 610041
杨蕗璐, 在读硕士, 主要从事腹部超声诊断的研究.
国家自然科学基金资助项目, No. 81071163
作者贡献分布: 此课题由罗燕设计; 文献检索、实验操作及数据采集由杨蕗璐、马琳、陈克霏、王红、卢强、凌文武、全杰荣及李加伍共同完成; 数据分析及论文撰写由杨蕗璐与马琳完成; 实验指导及论文修改由罗燕完成.
通讯作者: 罗燕, 教授, 610041, 四川省成都市国学巷37号, 四川大学华西医院超声诊断科. luoyan77@vip.sina.com
电话: 028-85423192
收稿日期: 2012-11-08 修回日期: 2012-11-30
接受日期: 2012-12-20 在线出版日期: 2012-12-28

Assessment of hepatic hemodynamics using high-frequency ultrasound in normal rats

Lu-Lu Yang, Lin Ma, Ke-Fei Chen, Hong Wang, Qiang Lu, Wen-Wu Ling, Jie-Rong Quan, Jia-Wu Li, Yan Luo

Lu-Lu Yang, Lin Ma, Hong Wang, Qiang Lu, Wen-Wu Ling, Jie-Rong Quan, Jia-Wu Li, Yan Luo, Department of Ultrasound, West China Hospital of Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China
Ke-Fei Chen, Department of General Surgery, West China Hospital of Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 81071163
Correspondence to: Yan Luo, Professor, Department of Ultrasound, West China Hospital of Sichuan University, 37 Guoxue Lane, Chengdu 610041, Sichuan Province, China. luoyan77@vip.sina.com
Received: 2012-11-08 Revised: 2012-11-30
Accepted: 2012-12-20 Published online: 2012-12-28

Abstract

AIM: To detect hepatic hemodynamic parameters in normal rats to provide a basis for further monitoring and evaluation of liver diseases in rats.

METHODS: One hundred Sprague-Dawley (SD) rats were used. A 5-12 MHz high-frequency linear transducer was applied to obtain liver ultrasonograms and measure the diameter and maximum velocity of the portal vein, the peak systolic velocity, end diastolic velocity and resistance index of the proper hepatic artery.

RESULTS: The portal vein of rats was well demonstrated by high-frequency ultrasound. The test showed that the diameter of the portal vein of normal SD rats was around 0.18 cm ± 0.03 cm, the maximum velocity of the portal vein was around 16.21 cm/s ± 3.86 cm/s, and the peak systolic velocity, end diastolic velocity and resistance index of the proper hepatic artery were around 57.60 cm/s ± 15.41 cm/s, 26.46 cm/s ± 10.96 cm/s and 0.54 ± 0.13, respectively.

CONCLUSION: High-frequency Doppler ultrasonography allows obtaining clear portal vein ultrasonograms and the hemodynamic parameters of the portal vein and hepatic artery in rats, representing an effective method for monitoring hepatic hemodynamic changes in experimental rats.

Key Words: Rat liver; Hemodynamics; High-frequency ultrasound

Yang LL, Ma L, Chen KF, Wang H, Lu Q, Ling WW, Quan JR, Li JW, Luo Y. Assessment of hepatic hemodynamics using high-frequency ultrasound in normal rats. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(36): 3644-3648

摘要

目的: 了解正常SD大鼠的肝脏血流动力学参数, 为大鼠肝脏疾病模型的观测和评估提供参考.

方法: SD大鼠100只, 体质量200-400 g, 采用5.0-12.0 MHz高频探头观察肝脏多普勒声像图, 测量门静脉管径及最大血流速度, 肝固有动脉收缩期血流峰值速度(peak systolic velocity, PSV)、舒张末期血流速度(end diastolic velocity, EDV)及阻力指数(resistance index, RI).

结果: 高频超声能清晰显示大鼠门静脉; 正常SD大鼠门静脉管径为: 0.180 cm±0.028 cm; 门静脉最大血流速度为: 16.21 cm/s±3.86 cm/s; 肝固有动脉PSV、EDV、RI分别为: 57.60

■同行评议者
肖恩华, 教授, 中南大学湘雅二医院放射教研室

cm/s±15.41 cm/s、26.46 cm/s±10.96 cm/s、0.54±0.13.

结论: 高频多普勒超声能获得清晰的大鼠门静脉声像图, 并能测得门静脉和肝动脉的血流动力学参数, 在大鼠实验研究中, 可作为一种有效的监测血流动力学变化的手段.

关键词 : 大鼠肝脏; 血流动力学; 高频超声

杨蕗璐, 马琳, 陈克霏, 王红, 卢强, 凌文武, 全杰荣, 李加伍, 罗燕. 高频超声对正常SD大鼠肝脏血流动力学的检测. 世界华人消化杂志 2012; 20(36): 3644-3648
http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3644.asp

0 引言

作为医学基础实验研究的常用动物之一, SD大鼠已被广泛用于病毒性肝炎、肝纤维化、肝硬化及肝脏肿瘤动物模型的建立[1-5], 这些疾病常常引起肝实质损害、门静脉管径改变、门静脉及肝动脉血流重新分配[6-8]. 因此获得正常大鼠肝脏声像图和门静脉、肝固有动脉血流动力学参数十分重要. 超声作为一种安全、无创的检查手段, 能较准确地反映组织声学的变化并提供血流信息[9-13], 不仅可用于肝脏疾病模型建立的评估, 还可用于疾病发展的观测和预后评价[14-17]. 而目前, 国内外关于大鼠肝脏超声声像图表现的报道很少, 尚未见与肝脏血流动力学特点相关的报道[18-21]. 本研究测定了正常♂SD大鼠肝脏门静脉管径、门静脉及肝固有动脉的相关血流参数, 旨在为大鼠肝脏疾病模型的观测和评估提供参考依据.

1 材料和方法

1.1 *材料* 健康成年♂SD大鼠100只, 体质量200-400 g, 7-10周龄, 购自成都达硕生物科技有限公司, 于四川大学华西科技园动物实验中心按标准饲料统一喂养. Philips iU22超声诊断仪, 探头型号L12-5(频率5.0-12.0MHz).

1.2 *方法* 大鼠乙醚开放式吸入麻醉后取仰卧位, 用宠物电动推脱毛(脱毛范围为右上腹约5 cm×5 cm方形区域), 利用高频探头观察大鼠肝脏灰阶声像图特点, 在肝门部寻找门静脉, 用二维超声于门静脉主干入肝前约0.5 cm处测量门静脉前后径(portal vein diameter, PVD), 多普勒超声观察门静脉及肝固有动脉血流方向, 并检测门静脉最大血流速度(velocity of the portal vein, PVV)、肝固有动脉收缩期血流峰值速度(peak systolic velocity, PSV)、舒张末期血流速度(end diastolic velocity, EDV)及阻力指数(resistance index, RI). 测量血流速度时根据血管走行方向和内径调节取样容积为0.5 mm, 校正声束与血流之间夹角<60度. 上述检查均由同一经验丰富的医师完成, 每项指标结果取3次测量平均值.

统计学处理 采用SPSS16.0软件对各测值进行数据统计, 测量结果用mean±SD表示, 并给出95%置信区间(95%CI).

2 结果

2.1 *大鼠肝脏灰阶声像图表现* 正常大鼠肝脏被膜光滑, 呈明亮细线状回声, 实质呈弥漫性均匀分布的中低细密点状回声. 横断面上肝脏右侧圆顿, 左侧扁薄, 偶可见各叶的纤细分隔(图1A). 纵断面上, 肝脏略呈楔形, 内可见各级管道回声. 大鼠肝脏以肝门为中心逆时针方向依次分为乳头叶、左外叶、左内叶、中叶、右外叶以及三角叶, 其中肝中叶和左内叶因所占比例较大且解剖位置更靠近腹侧, 在高频探头下相对容易区分, 而三角叶因与右肾毗邻, 也较易辨认. 大鼠无胆囊, 各肝叶胆管汇集成胆总管开口于十二指肠.

2.2 *门静脉二维声像图及多普勒血流成像* 门静脉由肠系膜总静脉和脾静脉汇合而成, 二维超声声像图上所有大鼠门静脉均能清楚显示, 门静脉从尾端向头端走行清晰可见(图1B). 在彩色多普勒图像上门静脉表现为向肝血流; 血流频谱见图2A, 测得门静脉管径及最大血流速度见表1.

2.3 *肝固有动脉彩色多普勒血流成像* 大鼠肝固有动脉为肝总动脉主干的延续, 与门静脉伴行于第一肝门处入肝, 单独的二维超声检查常难以准确识别. 彩色多普勒声像图上所有大鼠的肝固有动脉均能显示, 正常肝固有动脉表现为单向入肝血流(图2B); 多普勒血流参数见表2.

3 讨论

国内外对大鼠肝脏解剖的相关研究[22-24]显示, 大鼠肝脏分6叶, 其中三角叶分膈、脏、背面, 呈狭长三棱锥形, 锥底紧贴下腔静脉, 并以脏面的凹陷切迹与右肾相毗邻, 除三角叶外, 其余5叶均为薄片状结构, 中央钝厚, 外缘薄锐, 分膈脏两面, 膈面稍凸, 脏面微凹. 虽在高频探头下偶可见各肝叶的纤细分隔, 但要准确区分各叶仍较困难[25]. 肝总动脉起自腹腔干, 向右头侧走行,

■研发前沿
由于受大鼠解剖变异, 操作者的经验以及仪器分辨力等诸多因素的影响, 大鼠肝动脉多普勒血流信息的采集相对困难, 而目前有关大鼠肝脏血流动力学特点的报道极少, 要制定更可靠全面的参考值范围还有待于进一步扩大样本量, 统一测量条件后完成.

■创新盘点
肝脏血流动力学参数是反映肝脏病变的重要指标，在大鼠肝脏疾病模型的观测和评估中具有重要意义，而目前国内尚无关于正常大鼠肝脏血流动力学特点的报道.

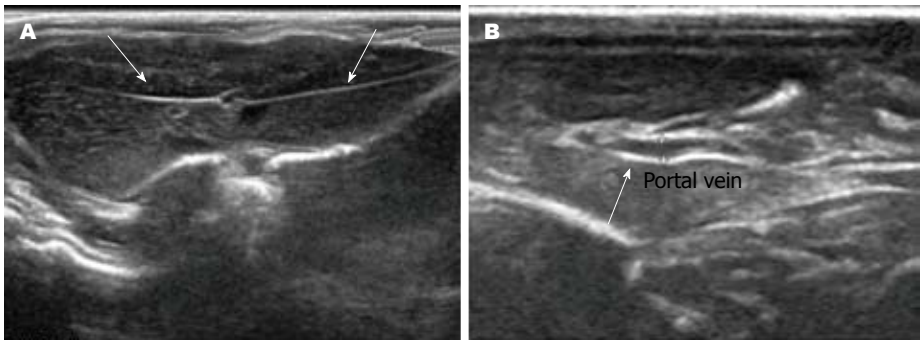


图 1 大鼠肝脏灰阶声像图. A: 肝脏横断面，箭头所示强光带为肝叶间的分隔; B: 肝门部，箭头所示为门静脉.

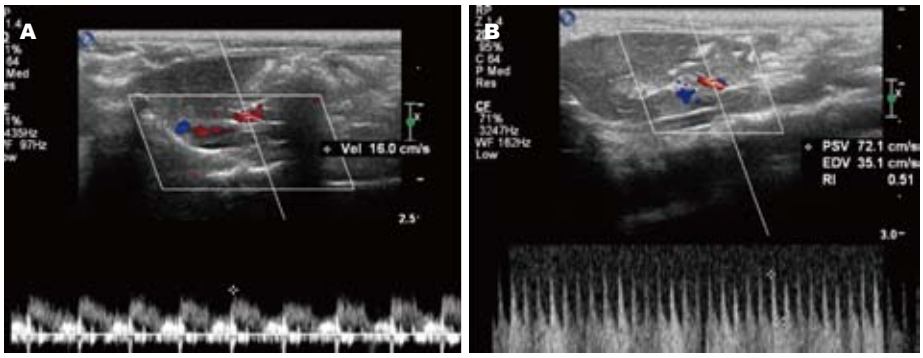


图 2 大鼠肝脏彩色多普勒血流成像. A: 门静脉血流频谱; B: 肝固有动脉血流频谱.

表 1 SD大鼠门静脉管径及最大血流速度 (mean ± SD)

测量项目	Min	Max	Mean ± SD	95% CI
PVD(cm)	0.12	0.24	0.180 ± 0.028	0.175–0.186
PVV(cm/s)	7.22	24.10	16.21 ± 3.86	15.45–16.98

表 2 SD大鼠肝固有动脉血流参数 (mean ± SD, cm/s)

测量项目	Min	Max	Mean ± SD	95% CI
PSV	31.30	90.10	57.60 ± 15.41	54.55–60.66
EDV	6.12	56.70	26.46 ± 10.96	24.28–28.64
RI	0.26	0.81	0.54 ± 0.13	0.52–0.57

继而转向腹侧，发出胰十二指肠动脉和胃右动脉后延续为肝固有动脉，直达肝门; 门静脉与肝固有动脉伴行于Glisson氏鞘内，在第一肝门处分左、右、头三支入肝实质. 其中左支入乳头叶，右支入右叶和三角叶，头支较粗，分三支分别入左外叶、左内叶和中叶[26]，各肝叶均有一独立的肝蒂，为Glisson系统和肝静脉系统出入肝脏的门户.

大鼠门静脉在二维灰阶扫查时容易辨认，采用高频探头在肝门部可较准确地测得门静脉管径. Dias等[21]曾用同样的方法测得150-200 g大鼠PVD值为0.16 cm±0.02 cm，较我们测得的200-400 g大鼠PVD均值小，这可能与两组大鼠的体质量不一致有关. 此外，我们用超声诊断仪测得的PVD为门静脉内径，较其他报道中外科游标卡尺测得的外径值略小[27]. 实验中，我们也发现PVD有随着大鼠体质量增加而增粗的趋势，这与刘保荣等[28]在用门静脉主干缩窄法制备大鼠门静脉高压模型时的发现一致. 但是，本实验样本量较小，未对不同体重大鼠PVD进行统计分析比较，体质量对PVD是否有确切影响还有待于进一步研究. 门静脉主干走行平直，管径较粗，使用高频超声探头采集血流信号相对容易. 李鹏超等[29]在做肝硬化动物模型时也曾测得20只240 g±20 g正常大鼠的PVV，报道的平均测量值较本实验结果偏小，这可能与该组大鼠体质量较小，样本量较小有一定关系.

大鼠肝固有动脉在二维超声检查时常难以识别，在彩色多普勒声像图上虽然都能显示，但因其内径细，走行迂曲，搏动快，个体解剖变异大，加上检查又受仪器分辨力及操作者经验的限制，使得肝固有动脉的辨认及流速测量相对困难. 检查时，对于不易识别的肝固有动脉，可从腹腔干发出肝总动脉起始部开始，沿其解剖走行向右头侧追溯. 通常探头在肝门部斜切时能使肝固有动脉处于最佳显示状态，彩色多普勒血流图上可表现为长约1 cm的向肝血流信号. 血流速度测量时设置取样容积至最小值0.5 mm，并尽可能减小声束与血流夹角，可获得相对准

确的血流信息[30]. 但是, 肝动脉血流速度极易受心率、呼吸运动、麻醉深度等测量当时状态的影响[31], 这可能是导致我们测得的血流动力学参数个体差异较大的原因之一. 目前尚无关于大鼠肝动脉血流动力学特点的报道, 我们所测得的肝动脉多普勒血流参数能否为肝脏疾病的基础研究提供参考还有待于进一步验证.

总之, 高频多普勒超声能测得正常SD大鼠的门静脉管径及血流速度、肝动脉的收缩期血流峰值速度、舒张末期血流速度及阻力指数, 有望用于监测及评估正常大鼠及大鼠肝脏疾病模型的肝脏血流动力学变化.

■**应用要点**
高频多普勒超声作为一种安全、无创的检查手段, 在基础实验研究中, 有望用于监测、评估正常大鼠及大鼠肝脏疾病模型的肝脏血流动力学变化.

4 参考文献

1 韩玉梅, 鄢丹, 胥秀英, 赵艳玲, 彭成. 肝脏疾病动物模型的分类与应用. 中药材 2010; 33: 644-647
2 Lee SW, Kim SH, Min SO, Kim KS. Ideal experimental rat models for liver diseases. *Korean J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2011; 15: 67-77
3 Lin J, Zhao J, Li T, Zhou J, Hu J, Hong Z. Hepatoprotection in a rat model of acute liver damage through inhibition of CY2E1 activity by total alkaloids extracted from Rubus alceifolius Poir. *Int J Toxicol* 2011; 30: 237-243
4 Lee GP, Jeong WI, Jeong DH, Do SH, Kim TH, Jeong KS. Diagnostic evaluation of carbon tetrachloride-induced rat hepatic cirrhosis model. *Anticancer Res* 2005; 25: 1029-1038
5 Leenders MW, Nijkamp MW, Borel Rinkes IH. Mouse models in liver cancer research: a review of current literature. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 6915-6923
6 朱为群, 张辉, 尹炽标, 冼建中, 李玉娥, 邝伟明, 张舒眉. 肝硬化门静脉高压症患者门静脉最大血流速度、平均血流速度和门静脉直径与自由门静脉压力相关性的研究. 中华普通外科杂志 2003; 18: 695-696
7 徐少玲, 李华峰. 肝硬化肝门静脉血流超声测定与肝纤维化指标的比较. 中国临床解剖学杂志 2006; 24: 472-474
8 Zipprich A, Steudel N, Behrmann C, Meiss F, Sziegoleit U, Fleig WE, Kleber G. Functional significance of hepatic arterial flow reserve in patients with cirrhosis. *Hepatology* 2003; 37: 385-392
9 Hoskins PR. Ultrasound techniques for measurement of blood flow and tissue motion. *Biorheology* 2002; 39: 451-459
10 Rocha HL, Diniz AL, Borges VF, Salomão FC. Assessment of portal venous index as a non-invasive method for diagnosing liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Arq Gastroenterol* 2012; 49: 14-18
11 Huang TL, Chen TY, Tsang LL, Ou HY, Yu CY, Wang CC, Wang SH, Lin CC, Liu YW, Yong CC, Chiu KW, Eng HL, Jawan B, Cheng YF, Chen CL. Hemodynamics of portal venous stenosis before and after treatment in pediatric liver transplantation: evaluation with Doppler ultrasound. *Transplant Proc* 2012; 44: 481-483
12 Lin SH, Ma JJ, Zhang H, Ding H, Yu Q, Zhu HG, Zeng WJ, Wang WP. [Real-time elastography for quantitative assessment of liver fibrosis in a rat model]. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2012; 20: 386-389
13 Chen ML, Wang Y, Yang YM, Qin QM, Cai YH, Zhou GH. [Diagnostic efficacy of an ultrasound quantitative method in a rat model of experimental liver fibrosis]. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2012; 20: 122-125
14 Nakanishi S, Shiraki K, Yamamoto K, Koyama M, Kimura N, Nakano T. Hemodynamics in the portal vein evaluated by pulse wave Doppler ultrasonography in patients with chronic hepatitis C treated with interferon. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 396-399
15 Demosthenes D. Cokkinos, Spyridon P. Dourakis. Ultrasonographic assessment of cirrhosis and portal hypertension. *Current Medical Imaging Reviews* 2009; 5: 62-70
16 Vezozzo DC, Farias AQ, Cerri GG, Da Silva LC, Carrilho FJ. Assessment of portal hemodynamics by Doppler ultrasound and of liver morphology in the hepatosplenic and hepatointestinal forms of schistosomiasis mansoni. *Dig Dis Sci* 2006; 51: 1413-1419
17 Lutz HH, Gassler N, Tischendorf FW, Trautwein C, Tischendorf JJ. Doppler ultrasound of hepatic blood flow for noninvasive evaluation of liver fibrosis compared with liver biopsy and transient elastography. *Dig Dis Sci* 2012; 57: 2222-2230
18 张超, 黄道中, 邓又斌, 张青萍. Wistar大鼠肝脏超声声像图表现及相关应用. 中国医学影像技术 2006; 22: 39-41
19 Miyata Y, Miyahara T, Moriyasu F. Decreased accumulation of ultrasound contrast in the liver of nonalcoholic steatohepatitis rat model. *World J Gastroenterol* 2011; 17: 4191-4198
20 Lessa AS, Paredes BD, Dias JV, Carvalho AB, Quintanilha LF, Takiya CM, Tura BR, Rezende GF, Campos de Carvalho AC, Resende CM, Goldenberg RC. Ultrasound imaging in an experimental model of fatty liver disease and cirrhosis in rats. *BMC Vet Res* 2010; 6: 6
21 Dias JV, Paredes BD, Mesquita LF, Carvalho AB, Kozlowski EO, Lessa AS, Takiya CM, Resende CM, Coelho HS, Campos-de-Carvalho AC, Rezende GF, Goldenberg RC. An ultrasound and histomorphological analysis of experimental liver cirrhosis in rats. *Braz J Med Biol Res* 2008; 41: 992-999
22 吕毅, 潘承恩, 孟令忠, 刘学民. SD大鼠肝脏及附属管道的应用解剖. 西安医科大学学报 1998; 19: 70-73
23 Madrahimov N, Dirsch O, Broelsch C, Dahmen U. Marginal hepatectomy in the rat: from anatomy to surgery. *Ann Surg* 2006; 244: 89-98
24 史冀华, 朱盛兴, 张水军. 大鼠肝部分切除术的应用解剖及实施. 世界华人消化杂志 2008; 16: 2516-2520
25 Chen JY, Chen HL, Wu SH, Tsai TC, Lin MF, Yen CC, Hsu WH, Chen W, Chen CM. Application of high-frequency ultrasound for the detection of surgical anatomy in the rodent abdomen. *Vet J* 2012; 191: 246-252
26 于春鹏, 单鸿, 姜在波, 钱结胜, 周斌, 吕文天, 王劲, 庞鹏飞. 大鼠门静脉系影像解剖学研究及穿刺入路的建立. 中国介入放射学 2008; 2: 72-74
27 吴凤东, 窦剑, 任贵军, 赵鑫, 邸恩昌. 一种可恢复性门静脉高压症大鼠模型. 中国现代普通外科进展 2006; 9: 30-32
28 刘保荣, 李宗芳, 周蕊, 蒋安, 张澍, 王波. 门静脉主干缩窄法制备SD大鼠门静脉高压症模型时最佳口径的探讨. 中华实验外科杂志 2008; 25: 1135-1137

■同行评价
本研究显示高频多普勒超声能获得清晰的大鼠门静脉声像图, 并能测得门静脉和肝动脉的血流动力学参数, 对科研工作有一定借鉴作用.

29 李鹏超, 鲁建国, 马庆久, 乔伟, 罗文. 大鼠肝硬化形成过程中门静脉压力及血流动力学变化. 第四军医大学学报 2007; 28: 404-406
30 Hadlock J, Beach KW, Strandness DE. Velocity variability in ultrasound Doppler examinations. *Ultrasound Med Biol* 2009; 35: 949–954
31 李志勇, 孙建宁, 张硕峰. 水合氯醛和戊巴比妥钠对SD大鼠麻醉效果的比较. 四川动物 2008; 27: 299-302

编辑 李军亮 电编 鲁亚静

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

• 消息 •

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)

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com
世界华人消化杂志 2012年12月28日; 20(36): 3649-3655
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

基础研究 BASIC RESEARCH

二苯乙烯苷对急性酒精性肝损伤小鼠炎症相关因子的影响

熊章鄂, 仝巧云, 郑世华, 李中艳, 王 婷

熊章鄂, 仝巧云, 郑世华, 李中艳, 三峡大学第一临床医学院, 宜昌市中心人民医院消化内科 湖北省宜昌市 443003
王婷, 三峡大学医学院药理教研室 湖北省宜昌市 443002
熊章鄂, 医学硕士, 主治医师, 主要从事消化系疾病的研究.
国家自然科学基金资助项目, No. 81100957
作者贡献分布: 本课题由熊章鄂、仝巧云及王婷设计; 研究过程由熊章鄂与郑世华完成; 研究所用的试剂及分析工具由王婷与李中艳提供; 数据分析由熊章鄂与王婷完成; 本论文由熊章鄂、仝巧云及王婷完成.
通讯作者: 王婷, 医学博士, 副教授, 443002, 湖北省宜昌市大学路8号, 三峡大学医学院药理教研室. tingting0301@126.com
收稿日期: 2012-11-07 修回日期: 2012-12-15
接受日期: 2012-12-20 在线出版日期: 2012-12-28

Tetrahydroxystilbene glucoside protects against ethanol-induced liver injury in mice by inhibition of expression of inflammation-related factors

Zhang-E Xiong, Qiao-Yun Tong, Shi-Hua Zheng, Zhong-Yan Li, Ting Wang

Zhang-E Xiong, Qiao-Yun Tong, Shi-Hua Zheng, Zhong-Yan Li, the First College of Clinical Medical Science, China Three Gorges University, Department of Gastroenterology, Yichang Central People's Hospital, Yichang 443003, Hubei Province, China
Ting Wang, Department of Pharmacology, Medical College of Three Gorges University, Yichang 443002, Hubei Province, China
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 81100957
Correspondence to: Ting Wang, MD, Associate Professor, Department of Pharmacology, Medical College of Three Gorges University, Yichang 443002, Hubei Province, China. tingting0301@126.com
Received: 2012-11-07 Revised: 2012-12-15
Accepted: 2012-12-20 Published online: 2012-12-28

Abstract

AIM: To investigate the protective effects of tetrahydroxystilbene glucoside (TSG) against acute ethanol-induced liver injury in mice and to explore the possible mechanisms involved.

METHODS: Kunming mice were randomly divided into five groups: normal control group, liver injury model group, low-(30 mg/kg) and high-dose (60 mg/kg) TSG groups, and Silibinin (50 mg/kg) group. Liver histopathology was measured by light microscopy. The contents of serum tumor necrosis factor-α (TNF-α), interleukin 1β (IL-1β), and IL-6 were assayed by ELSIA, and plasma endotoxin level was measured by LAL chromogenic endpoint assay. The mRNA expression of TNF-α and *iNOS* in liver tissue was detected by real-time PCR. The phospho-IκBα level and NF-κB nuclear translocation in hepatic tissue were measured by Western blot.

RESULTS: Compared to the control group, the model group showed significant hydropic degeneration and steatosis of hepatocytes, increased contents of serum TNF-α, IL-1β and IL-6 and plasma level of endotoxin (all $P < 0.01$), up-regulated mRNA expression of TNF-α and *iNOS* in liver tissue (TNF-α: 128.5 pg/mL ± 20.7 pg/mL *vs* 45.2 pg/mL ± 14.2 pg/mL; IL-1β: 71.8 pg/mL ± 9.1 pg/mL *vs* 33.1 pg/mL ± 9.5 pg/mL; IL-6: 59.8 pg/mL ± 13.1 pg/mL *vs* 23.7 pg/mL ± 5.9 pg/mL; endotoxin: 0.35 EU/mL ± 0.09 EU/mL *vs* 0.11 EU/mL ± 0.03 EU/mL. TNF-α mRNA: 1.33 ± 0.11 *vs* 0.63 ± 0.10; *iNOS* mRNA: 0.85 ± 0.09 *vs* 0.40 ± 0.07; phospho-IκB-α: 2.02 ± 0.14 *vs* 0.92 ± 0.19; NF-κB P65: 1.10 ± 0.14 *vs* 0.44 ± 0.13, $P < 0.05$, $P < 0.01$), and significantly increased phospho-IκBα level and NF-κB nuclear translocation in hepatic tissue (both $P < 0.01$). Compared to the model group, serum levels of TNF-α, IL-1β and IL-6 and plasma endotoxin level significantly decreased (all $P < 0.05$ or 0.01), the mRNA expression of TNF-α and iNOS was down-regulated, and phospho-IκBα level and NF-κB nuclear translocation in hepatic tissue were significantly inhibited in the TSG groups (TSG 60 mg/kg group: TNF-α: 65.9 pg/mL ± 13.9 pg/mL *vs* 128.5 pg/mL ± 20.7 pg/mL; IL-1β: 43.0 pg/mL ± 7.1 pg/mL *vs* 71.8 pg/mL ± 9.1 pg/mL; IL-6: 36.3 pg/mL ± 10.1 pg/mL *vs* 59.8 pg/mL ± 13.1 pg/mL; endotoxin: 0.20 EU/mL ± 0.05 EU/mL *vs* 0.35 EU/mL ± 0.09 EU/mL; TNF-α mRNA: 0.79 ± 0.09 *vs* 1.33 ± 0.11; *iNOS* mRNA: 0.53 ± 0.10 *vs* 0.85 ± 0.09; phospho-IκB-α: 1.35 ± 0.32 *vs* 2.02 ± 0.14; NF-κB P65: 0.62 ± 0.05 *vs* 1.10 ± 0.14, all $P < 0.05$ or 0.01).

CONCLUSION: TSG has a protective effect on acute alcoholic liver injury in mice possibly by decreasing endotoxin level and NF-κB nuclear translocation and attenuating the trigger of

■**背景资料**
随着我国嗜酒者逐年增多, 由酒精所致肝损伤的发病率呈逐渐上升的趋势. 大量研究证实由内毒素介导的炎症反应是酒精性肝病的重要发病机制.

■**同行评议者**
黎乐群, 教授, 广西医科大学附属肿瘤医院

■研发前沿
肠源性内毒素及其对Kupffer细胞激活介导的肝细胞损害在酒精性肝病的发病机理中发挥着关键性作用，针对这些环节找寻和开发治疗酒精性肝病的药物是科学界关注的热点.

inflammation-related cascade amplification.

Key Words: Tetrahydroxystilbene glucosidem; Ethanol-induced liver injury; Inflammatory factors; NF-κB

Xiong ZE, Tong QY, Zheng SH, Li ZY, Wang T. Tetrahydroxystilbene glucoside protects against ethanol-induced liver injury in mice by inhibition of expression of inflammation-related factors. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(36): 3649-3655

摘要

目的: 研究二苯乙烯苷(tetrahydroxystilbene glucoside, TSG)对急性酒精性肝损伤小鼠炎症相关因子的影响.

方法: 将昆明种小鼠随机分为正常对照组、模型组、TSG低剂量组(30 mg/kg)、TSG高剂量组(60 mg/kg)、水飞蓟宾组(50 mg/kg); 采用白酒灌胃的方式建立小鼠急性酒精性肝损伤模型. 光学显微镜观察小鼠肝脏病理变化, 采用ELISA法检测各组小鼠血清肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α, TNF-α)、白介素1β(interleukin 1β, IL-1β)、IL-6的含量, 鲎试剂终点显色法检测小鼠血浆内毒素水平, Real-time PCR法检测肝脏组织TNF-α和*iNOS*基因表达, Western blot法检测肝脏组织IκB-α磷酸化水平和NF-κB核移位程度.

结果: 与正常对照组比较, 模型组小鼠肝索排列紊乱, 肝脏出现明显的脂肪变性, 血清TNF-α、IL-1β、IL-6的含量和血浆内毒素水平均显著升高, TNF-α和*iNOS*基因表达上调, IκB-α磷酸化水平升高和NF-κB核移位增多, 差异具有统计学意义[TNF-α: 128.5 pg/mL±20.7 pg/mL *vs* 45.2 pg/mL±14.2 pg/mL; IL-1β: 71.8 pg/mL±9.1 pg/mL *vs* 33.1 pg/mL±9.5 pg/mL; IL-6: 59.8 pg/mL±13.1 pg/mL *vs* 23.7 pg/mL±5.9 pg/mL; endotoxin: 0.35 EU/mL±0.09 EU/mL *vs* 0.11 EU/mL±0.03 EU/mL. TNF-α mRNA: 1.33±0.11 *vs* 0.63±0.10; *iNOS* mRNA: 0.85±0.09 *vs* 0.40±0.07; phospho-IκB-α: 2.02±0.14 *vs* 0.92±0.19; NF-κB P65: 1.10±0.14 *vs* 0.44±0.13, $P<0.05$或$P<0.01$]; 给予TSG后, 小鼠肝脏组织脂肪变性减少, 各组小鼠血清TNF-α、IL-1β、IL-6的含量和血浆内毒素水平均明显降低; 肝脏组织TNF-α和*iNOS*基因表达下调, 同时IκB-α磷酸化水平和NF-κB核移位减少, 差异具有统计学意义[TSG 60 mg/kg group: TNF-α: 65.9 pg/mL±13.9 pg/mL *vs* 128.5 pg/mL±20.7 pg/mL; IL-1β: 43.0 pg/mL±7.1 pg/mL *vs* 71.8 pg/mL±9.1 pg/mL; IL-6: 36.3 pg/mL±10.1 pg/mL *vs* 59.8 pg/mL±13.1 pg/mL; endotoxin: 0.20 EU/mL±0.05 EU/mL *vs* 0.35 EU/mL±0.09 EU/mL; TNF-α mRNA: 0.79±0.09 *vs* 1.33±0.11; *iNOS* mRNA: 0.53±0.10 *vs* 0.85±0.09; phospho-IκB-α: 1.35±0.32 *vs* 2.02±0.14; NF-κB P65: 0.62±0.05 *vs* 1.10±0.14, $P<0.05$或$P<0.01$].

结论: TSG对小鼠急性酒精性肝损伤有良好的保护作用, 其机制可能是通过抑制内毒素引起的Kupffer细胞激活, 进而抑制下游核因子NF-κB的激活, 减少炎性反应级联放大的触发机制, 从而产生肝功能保护作用.

关键词: 二苯乙烯苷; 酒精性肝损伤; 炎症因子; NF-κB

熊章鄂, 仝巧云, 郑世华, 李中艳, 王婷. 二苯乙烯苷对急性酒精性肝损伤小鼠炎症相关因子的影响. 世界华人消化杂志 2012; 20(36): 3649-3655
http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3649.asp

0 引言

酒精性肝病(alcoholic liver disease, ALD)是由于长期大量饮用含乙醇的饮料导致肝脏的损害性病变, 其病理组织学变化主要表现为5种形式: 酒精性脂肪肝(alcoholic fatty liver, AFL)、酒精性肝炎(alcoholic hepatitis, AH)、酒精性肝纤维化(alcoholic hepatic fibrosis, AHF)、肝硬化(hepatic cirrhosis, HC)和肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC). 这几种病变往往可部分重叠, 可单独也可同时混存于病变的肝脏中[1,2]. 世界范围内, ALD是肝病及其相关疾病的主要死因之一[3-5]. 在我国嗜酒者逐年增多, 由酒精所致肝损伤的发病率呈逐渐上升的趋势[6,7], 酒精已成为继病毒性肝炎之后导致肝损害的第2大病因[8]. 许多实验研究证实, 由内毒素介导的炎症反应是ALD的重要发病机制之一[9]. 二苯乙烯苷(tetrahydroxystilbene glucoside, TSG)是从何首乌中提取分离得到的一种多酚结构的主要成分, 具有广泛的生物学活性. 现代药理研究显示, TSG具有抗氧化、清除自由基、抗炎、抗肿瘤、降血脂、抑制动脉粥样硬化、保护肝脏等多种药理作用[10,11]. 我们前期的研究表明, TSG对急性酒精性肝损伤小鼠的氧化应激及其脂质过氧化作用有很好的改善作用, 本研究进一步探讨TSG对急性酒精性肝损伤小鼠炎症相关因子的影响.

表 1 实时定量PCR引物序列

基因	上游引物(5'–3')	下游引物(5'–3')	产物长度(bp)
TNF–α	AGGCAACCTGACCACTCTCC	CACCACCATCAAGGACTCAA	292
iNOS	GACAGCACAGAATGTTCCAG	TGGCCAGATGTTCCTCTATT	305
GAPDH	CGGATTTGGTCGTATTGGG	CTCGCTCCTGGAAGATGG	100

■**相关报道**
二苯乙烯苷能降低肝中醋酸可的松所致的甘油三酯(TG)积累, 减轻四氯化碳(CCl_4)导致的肝损伤, 抑制CCl_4、醋酸可的松和硫代乙酰胺导致的小鼠肝脏微粒体中的脂质过氧化.

1 材料和方法

1.1 材料 SPF级♂昆明种小鼠, 体质量18-22 g, 由湖北省疾病预防实验动物中心提供, 动物合格证号: SCXK2011-0005. 动物饲养温度23 ℃±2 ℃, 相对湿度: 50%±5%, 自由进食和饮水. 二苯乙烯苷(TSG, C20H22O9, 分子量: 406, 纯度大于98%), 购自中国药品生物制品检定所; 北京红星二锅头为市售(北京红星股份有限公司); 肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α, TNF-α)、白介素-6(interleukin-6, IL-6)和IL-1β的ELISA检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所; 内毒素定量检测试剂盒购自上海伊华临床医学科技公司; RNA提取试剂盒购自Omega Bio-Tek公司(Omega Bio-tek.Inc., USA); RNA逆转录聚合酶链反应试剂盒和实时定量PCR(real-time PCR)试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司; TNF-α、iNOS和GAPDH引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成, 具体引物序列见下表1; NF-κB P65抗体和p-IκB-α抗体购自Cell Signaling Technology公司(Boston, MA, USA); β-actin购自Santa cruz公司(Santa Cruz, CA, USA); 其他试剂为市售分析纯.

1.2 方法

1.2.1 动物分组及模型制备: 适应性饲养1 wk后, 将小鼠随机分为正常对照组、模型组、TSG低剂量组(30 mg/kg)、TSG高剂量组(60 mg/kg)和水飞蓟宾组(50 mg/kg), 每组8只. TSG组和水飞蓟宾组分别灌胃给予相应剂量的药物, 正常对照组和模型组给予等容量的生理盐水, 1次/d, 给予3 d后, 模型组给予12 mL/kg的56度白酒灌胃, 给药组给予等剂量的白酒和相应剂量的药物灌胃, 1次/d, 连续3 d. 于第6天末次灌胃给药后, 动物禁食不禁水12 h, 各组动物经眼球后静脉丛取血, 分离血清和血浆备用; 取肝脏相同部位用滤纸吸净肝脏表面水分和血液后快速冷冻于液氮中备用.

1.2.2 小鼠肝脏HE染色, 镜下观察组织病理学变化: 取小鼠肝脏组织用10%福尔马林固定, 24 h后转移到75%的乙醇中, 常规脱水, 石蜡包埋, 切片, HE染色后进行病理学观察.

1.2.3 小鼠肝脏指数和肝功能的检测: 末次给药后, 动物禁食不禁水. 12 h后各组小鼠经眼球后静脉丛取血, 3 000 r/min离心10 min分离血清, 全自动生化分析仪测定各组血清中谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)和天冬氨酸转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)水平; 取肝脏, 用4 ℃生理盐水冲洗, 滤纸吸干, 称质量, 计算肝脏指数. 肝脏指数(%) = 肝脏质量(g)/体质量(g)×100%.

1.2.4 血浆内毒素水平的测定: 用肝素抗凝的无菌试管收集血液, 1 000 r/min离心5 min后收集血浆, 加入无热原生理盐水0.2 mL、Tris-HCl缓冲液0.2 mL混匀, 置于100 ℃水浴加热10 min去除潜在内毒素抑制剂, 然后3 000 r/min离心10 min, 取上清液检测. 具体操作参照试剂盒说明书进行, 于545 nm波长处测吸光度(A)值, 建立回归方程求标本中内毒素浓度.

1.2.5 ELISA法检测小鼠血清中TNF-α、IL-1β、IL-6的水平: 应用南京建成生物工程研究所提供的ELISA检测试剂盒检测血清TNF-α、IL-1β和IL-6的含量, 严格按照试剂盒说明书进行操作.

1.2.6 Real-time PCR检测肝脏组织TNF-α和*iNOS*基因的表达: 取50 mg肝脏组织, 加入1 mL的TRIzol冰上进行充分匀浆后按照试剂盒的说明书提取RNA. 紫外分光光度计测RNA浓度及纯度后, 按照反转录试剂盒说明书将提取的RNA反转录为cDNA后进行Real-time PCR反应, 引物序列见表1, 反应体系为: SYBR Premix Ex TaqTM Ⅱ (2×) 12.5 μL, PCR Forward Primer (10 μmol/L) 1 μL, PCR Reverse Primer (10 μmol/L) 1 μL, cDNA 2 μL, Rnase Free dH_2O 8.5 μL. 将样品放入实时定量PCR扩增仪中按95 ℃预变性10 s、95 ℃变性5 s、59 ℃退火30 s、72 ℃延伸15 s条件扩增40个循环. 根据各样品Ct值以及GAPDH为内对照, 按照公式$2^{-\triangle\triangle CT}$法分析TNF-α和*iNOS*基因的表达水平.

■**创新盘点**
以往的研究报道二苯乙烯苷具有良好的抗氧化和抗炎效应，但通过复制急性酒精性肝损伤模型，从炎症角度来探讨二苯乙烯苷的保护效应尚属首次.

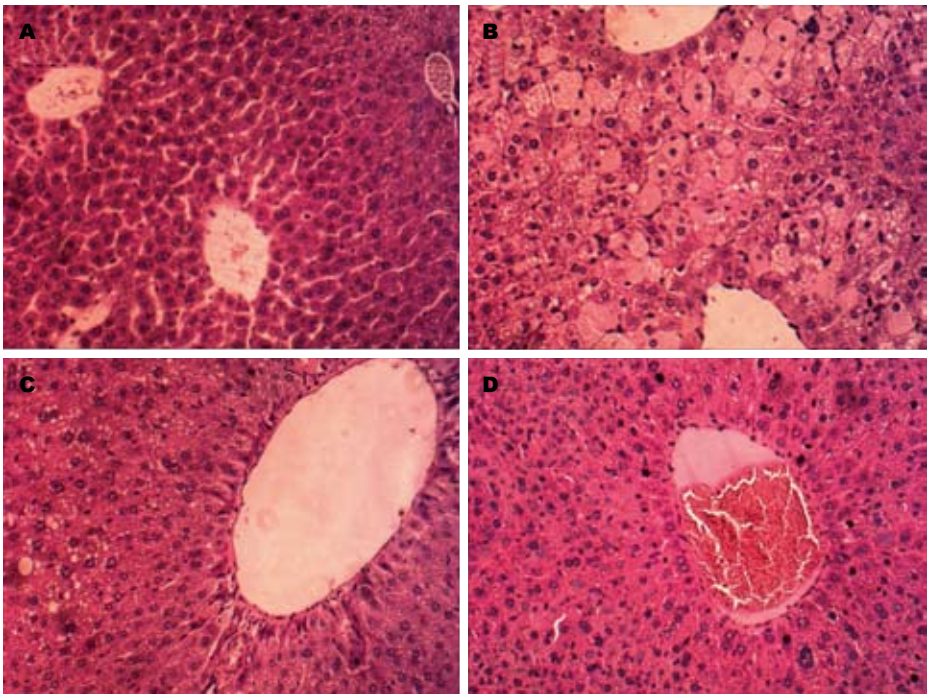


图 1 TSG对酒精性肝损伤小鼠肝组织病理变化的影响(HE × 200). A: 正常对照组; B: 模型组; C: TSG 60 mg/kg组; D: 水飞蓟宾50 mg/kg组. TSG: 二苯乙烯苷.

表 2 TSG对酒精性肝损伤小鼠肝脏指数及肝功能的影响 (mean ± SD, n = 8)

分组	剂量(mg/kg)	肝脏指数(%)	ALT(U/L)	AST(U/L)
正常对照组	–	4.31 ± 0.09	42.7 ± 9.1	109.8 ± 12.4
模型组	–	5.64 ± 0.08[b]	76.4 ± 12.3[b]	192.2 ± 22.9[b]
TSG低剂量组	30	5.01 ± 0.10[c]	64.2 ± 7.4[c]	159.1 ± 15.5[c]
TSG高剂量组	60	4.69 ± 0.07[d]	50.1 ± 9.5[d]	138.3 ± 11.4[d]
水飞蓟宾组	50	4.67 ± 0.09[d]	57.9 ± 8.9[d]	140.5 ± 9.1[d]

[b]P<0.01 *vs* 正常对照组; [c]P<0.05, [d]P<0.01 *vs* 模型组. ALT: 谷丙转氨酶; AST: 门冬氨酸氨基转移酶; TSG: 二苯乙烯苷.

1.2.7 Western Blot检测肝脏组织NF-κB P65和p-IκB-α表达: 取100 mg肝脏组织, 按照蛋白提取试剂盒说明书提取肝脏细胞核蛋白和总蛋白, 然后用BCA法定蛋白后制备组织蛋白用于后续的Western blot检测. 配制10%的分离胶, 每泳道加入50 μg的等量蛋白, 经SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后用湿转法将蛋白从胶转移至PVDF膜上. 取出NC膜后用封闭液(5%脱脂奶粉溶于TBST)封闭1 h. 根据抗体的效价要求, 稀释适当浓度的一抗(1%脱脂奶粉溶于TBST)于4 ℃孵育过夜. NF-κB P65和β-actin抗体效价均为1∶1 000, p-IκB-α效价为1∶500. 用TBST洗膜后加入HRP标记的羊抗鼠IgG二抗, 室温条件下孵育1 h. 再次洗膜后, 加ECL荧光剂, 压片显影, GTS凝胶图像处理系统软件扫描显影的密度.

统计学分析 数据经SPSS13.0软件处理, 所有的数据用均数±标准差表(mean±SD). 多组间显著性比较用单因素方差分析(ANOVA)结合Duncan's检验法. P<0.05有显著性差异.

2 结果

2.1 TSG对酒精性肝损伤小鼠肝脏组织病理变化的影响 如图1所示, 正常对照组小鼠肝索排列整齐, 肝细胞形态正常, 肝细胞无水肿及脂肪变性; 模型组肝索排列紊乱, 肝细胞出现严重水肿和脂肪变性; TSG高剂量组肝索排列较模型组有所恢复, 肝细胞水肿及脂肪变性显著减少; 水飞蓟宾组肝组织细胞脂肪变轻微, 主要以肝细胞水肿为主.

2.2 TSG对酒精性肝损伤小鼠肝脏指数及肝功能的影响 实验结果见表2, 与正常对照组相比, 模型组小鼠肝脏指数升高; 同时, 反应肝脏功能的指标ALT和AST的水平也明显升高, 分别升高到正常对照组的1.8倍和1.7倍, 提示小鼠经酒精暴

表 3 TSG对小鼠血清TNF-α、IL-1β、IL-6水平的影响 (mean ± SD, n = 8, pg/mL)

分组	剂量(mg/kg)	TNF-α	IL-1β	IL-6
正常对照组	–	45.2 ± 14.2	33.1 ± 9.5	23.7 ± 5.9
模型组	–	128.5 ± 20.7[b]	71.8 ± 9.1[b]	59.8 ± 13.1[b]
TSG低剂量组	30	88.1 ± 14.8[d]	52.8 ± 11.6[d]	43.1 ± 12.0[c]
TSG高剂量组	60	65.9 ± 13.9[d]	43.0 ± 7.1[d]	36.3 ± 10.1[d]
水飞蓟宾	50	62.1 ± 9.6[d]	45.2 ± 8.3[d]	38.5 ± 9.2[d]

[b]P<0.01 *vs* 正常对照组; [c]P<0.05, [d]P<0.01 *vs* 模型组. TNF: 肿瘤坏死因子; IL: 白介素; TSG: 二苯乙烯苷.

表 4 TSG对小鼠肝脏TNF-α和*iNOS*基因表达的影响 (mean ± SD, n = 4)

分组	剂量(mg/kg)	TNF-α/GAPDH mRNA表达	iNOS/GAPDH mRNA表达
正常对照组	–	0.63 ± 0.10	0.40 ± 0.07
模型组	–	1.33 ± 0.11[b]	0.85 ± 0.09[b]
TSG低剂量组	30	1.10 ± 0.09[c]	0.64 ± 0.07[c]
TSG高剂量组	60	0.79 ± 0.09[d]	0.53 ± 0.10[d]
水飞蓟宾	50	0.92 ± 0.12[d]	0.56 ± 0.08[d]

[b]P<0.01 *vs* 正常对照组; [c]P<0.05, [d]P<0.01 *vs* 模型组. TNF: 肿瘤坏死因子; TSG: 二苯乙烯苷.

■**应用要点**
二苯乙烯苷是从何首乌中提取分离的一种多酚类的有效成分, 本研究为开发和利用二苯乙烯苷类多酚化合物防治酒精性肝病提供了重要的实验室依据, 为开发祖国宝贵的中草药资源提供了方向.

露后肝细胞和肝脏功能受损. 灌胃给予TSG后, 各组小鼠肝脏指数明显下降, ALT和AST水平也显著降低, 与模型组比较差异具有统计学意义(P<0.05, P<0.01).

2.3 TSG对小鼠血清TNF-α、IL-1β、IL-6水平的影响 实验结果见表3, 正常对照组小鼠血清TNF-α、IL-1β和IL-6水平分别为45.2 pg/mL±14.2 pg/mL、33.1 pg/mL±9.5 pg/mL和23.7 pg/mL±5.9 pg/mL, 模型组小鼠血清TNF-α、IL-1β和IL-6水平较正常对照组显著升高, 分别为128.5 pg/mL±20.7 pg/mL、71.8 pg/mL±9.1 pg/mL和59.8 pg/mL±13.1 pg/mL. TSG低、高剂量可使小鼠血清TNF-α、IL-1β和IL-6水平呈剂量依赖性的显著降低, 与模型组相比具有显著性差异(P<0.05或P<0.01).

2.4 TSG对小鼠血浆内毒素水平的影响 实验结果见图2, 正常对照组小鼠血浆内毒素水平为0.11 EU/mL±0.03 EU/mL, 急性酒精暴露后模型组小鼠血浆内毒素水平显著升高为0.35 EU/mL±0.09 EU/mL, 差异具有统计学意义(P<0.01). 给予TSG后, 各组小鼠血浆内毒素水平与模型组相比明显下降(P<0.05或P<0.01).

2.5 TSG对小鼠肝脏TNF-α和*iNOS*基因表达的影响 实验结果见表4, 模型组小鼠肝脏组织TNF-α和*iNOS*基因表达较正常对照组显著升高, 分别升高到正常对照组的2.11倍和2.13倍, TSG低、高剂量组可使小鼠肝脏组织TNF-α和*iNOS*基因表达显著降低, 且具有剂量依赖性(P<0.05或P<0.01).

2.6 TSG对肝脏组织IκB-α磷酸化和胞核NF-κB P65表达的影响 实验结果见图3, 与正常对照组比较(p-IκB-α: 0.92±0.19; NF-κB P65: 0.44±0.13), 模型组大鼠肝脏组织IκB-α磷酸化水平和胞核中NF-κB P65表达显著升高, 其表达量p-IκB-α为2.02±0.14, 胞核NF-κB P65为1.10±0.14(P<0.01); TSG低、高剂量组明显降低肝脏组织IκB-α磷酸化水平和胞核中NF-κB p65的表达, 与模型组相比, 差异具有统计学意义(P<0.05或P<0.01).

3 讨论

ALD的发生是一个复杂的病理生理过程, 涉及多种细胞如Kupffer细胞、中性粒细胞、上皮细胞和许多有害因素如内毒素、氧化应激、细胞因子等[12,13]. 研究表明, 肠源性内毒素及其对Kupffer细胞的激活介导的肝细胞损害在急性酒精性肝损害的发病机理中发挥了关键性作用[14]. 正常生理情况下因为肠道的屏障作用

■同行评价
本文实验设计较严谨，数据可靠，有一定的创新性，为二苯乙烯苷治疗酒精性肝病提供了实验室依据.

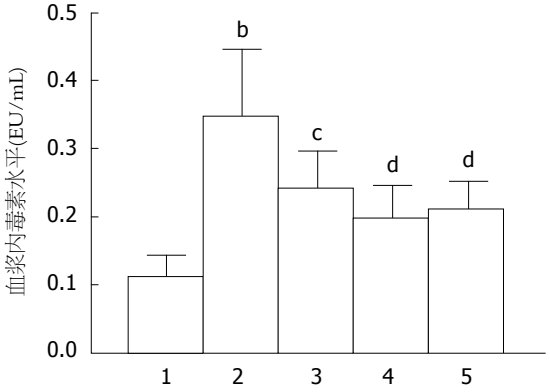


图 2 TSG对小鼠血浆内毒素水平的影响. $^{b}P<0.01$ *vs* 正常对照组; $^{c}P<0.05$, $^{d}P<0.01$ *vs* 模型组. 1: 正常对照组; 2: 模型组; 3: 二苯乙烯苷 30 mg/kg; 4: 二苯乙烯苷 60 mg/kg; 5: 水飞蓟宾 50 mg/kg; TSG: 二苯乙烯苷.

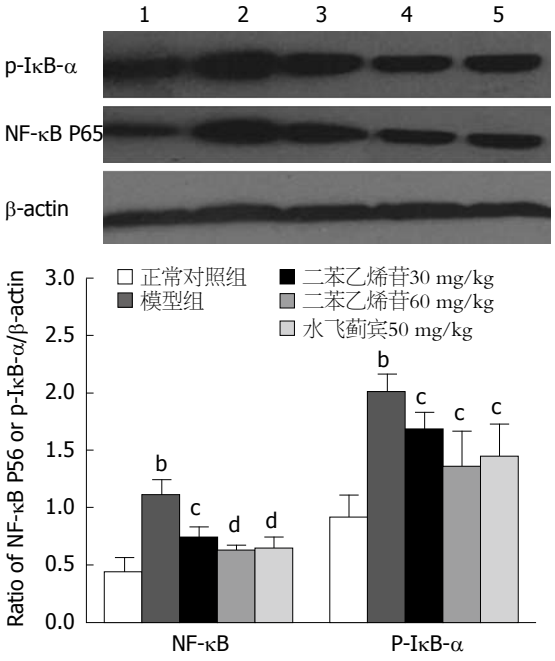


图 3 TSG对肝脏组织IκB-α磷酸化和胞核NF-κB P65表达的影响. 1: 正常对照组; 2: 模型组; 3: 二苯乙烯苷30 mg/kg组; 4: 二苯乙烯苷60 mg/kg组; 5: 水飞蓟宾50 mg/kg组; $^{b}P<0.01$ *vs* 正常对照组; $^{c}P<0.05$, $^{d}P<0.01$ *vs* 模型组, $n = 4$. TSG: 二苯乙烯苷.

以及Kupffer细胞对内毒素的清除作用, 脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)维持在很低的水平, 但在ALD患者及ALD动物模型中其内毒素水平均显著升高[15]. 内毒素是肠道革兰阴性杆菌细胞壁的LPS, 具有多种生物活性, 其核心致病成分是LPS, 当过多的LPS进入血液或组织时可引起发热、寒战、休克甚至肠源性内毒素血症或成人呼吸窘迫综合征. ALD时, 肠细菌会过度生长、肠黏膜通透性增加、肠细菌移位以及正常的免疫功能受抑制等, 导致肠源性内毒素血症[16,17]. 异常升高的LPS与Kupffer细胞表面的CD14和Toll样受体4共同结合后引起Kupffer细胞的活化, 从而激活NF-κB等相关炎症信号通路, 诱导TNF-α和IL-1β、IL-6等细胞因子和介质的产生[18], 这些细胞因子和介质被认为是早期肝脏损害的关键因素, 他们激发了肝脏的炎症过程和破坏了肝实质细胞的内环境稳态[9,19]. TNF-α一方面具有直接的细胞毒作用, 引起肝细胞坏死, 另一方面又可引起微循环障碍导致肝细胞坏死, 同时, 还与其他炎性因子如IL-6、IL-1β相互激发, 引起级联放大反应, 进一步加重肝损伤[20,21]. 本实验结果表明, 急性酒精暴露后, 小鼠血清TNF-α、IL-1β和IL-6水平均显著升高, 而给予TSG后可抑制炎性因子的水平, 提示TSG对肝损伤的保护作用与降低炎性因子水平有关.

NF-κB为核转录因子, 存在于多种细胞中, 是细胞内多种信号转导通路的汇聚点, 参与包括免疫反应、急性期反应蛋白、炎症反应等基因表达的调控, 通过影响炎性因子如TNF-α以及*iNOS*等基因表达在炎症反应和细胞凋亡等病理过程中起着关键作用[22,23]. 在TNF-α启动子上存在着NF-κB的结合位点, NF-κB被外源性因素如酒精刺激激活后即启动TNF-α的表达和分泌, 并促进其他炎性因子的调控, 参与肝损伤的发生发展. 静息状态下NF-κB与抑制蛋白IκB-α结合成复合物存在于细胞浆中, 当IκB-α磷酸化发生后, NF-κB和IκB-α解离, NF-κB游离后进入核内并与DNA上相应位点结合, 激活转录和翻译过程, 诱导iNOS以及炎性因子的合成、释放[24]. 本实验结果表明, 酒精性肝损伤时小鼠肝脏组织IκB-α磷酸化水平和胞核中NF-κB蛋白表达显著增强, 提示酒精刺激后NF-κB进入核内增多, 导致核内相关基因转录增强. 我们采用Real-time PCR检测了TNF-α和*iNOS*基因的表达. 实验结果表明, 酒精刺激后TNF-α和iNOS的表达也显著增强. 给予TSG后, 肝脏组织IκB-α磷酸化和NF-κB的蛋白表达水平与模型组相比显著降低. 同时, TNF-α和*iNOS*基因的表达也显著降低, 提示TSG可通过对NF-κB的调控, 从而抑制炎性相关因子的合成, 保护肝脏组织免遭炎性相关因子的侵害.

水飞蓟宾等一些中草药提取物对ALD有较好的治疗作用, 其机制是通过抗氧化及减少TNF-α的产生等途径发挥肝脏保护作用[25-27]. TSG是中药何首乌特有的生物活性成

分, 在许多研究中表明其通过激活沉默信息调节因子-1(SIRT1)从而抑制NF-κB的活化发挥抗炎作用[28,29]. 我们的研究结果表明在急性酒精性肝损伤模型中, TSG明显减少血内毒素水平, 减少TNF-α的表达, 可能是通过抑制Kupffer细胞的激活, 抑制NF-κB的活化而减少炎症介质的释放, 从而产生肝功能保护作用. 由于TSG具有多种药理学活性[30,31], 有可能比其他中药单体具有更好的药物保护作用, 深入研究其在ALD中的作用机理, 对于ALD的防治及开发祖国宝贵的中草药资源具有重要意义.

4 参考文献

1 Purohit V, Gao B, Song BJ. Molecular mechanisms of alcoholic fatty liver. *Alcohol Clin Exp Res* 2009; 33: 191-205

2 Diehl AM. Liver disease in alcohol abusers: clinical perspective. *Alcohol* 2002; 27: 7-11

3 Yu CH, Xu CF, Ye H, Li L, Li YM. Early mortality of alcoholic hepatitis: a review of data from placebo-controlled clinical trials. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 2435-2439

4 Grewal P, Viswanathen VA. Liver cancer and alcohol. *Clin Liver Dis* 2012; 16: 839-850

5 Bruha R, Dvorak K, Petrtyl J. Alcoholic liver disease. *World J Hepatol* 2012; 4: 81-90

6 厉有名, 陈卫星, 虞朝辉, 乐敏, 刘有恃, 徐根云, 季峰, 李舒丹. 浙江省酒精性肝病流行病学调查概况. 中华肝脏病杂志 2003; 11: 647-649

7 厉有名. 酒精性肝病的流行病学及自然史. 中华肝脏病杂志 2010; 18: 171-172

8 中华医学会肝病学分会脂肪肝和酒精性肝病学组. 酒精性肝病诊疗指南(2010年修订版). 中华肝脏病杂志 2010; 18: 167-170

9 Ambade A, Mandrekar P. Oxidative stress and inflammation: essential partners in alcoholic liver disease. *Int J Hepatol* 2012; 2012: 853175

10 谢岚. 何首乌及二苯乙烯苷的研究进展. 天津药学 2010; 22: 70-73

11 Ryu G, Ju JH, Park YJ, Ryu SY, Choi BW, Lee BH. The radical scavenging effects of stilbene glucosides from Polygonum multiflorum. *Arch Pharm Res* 2002; 25: 636-639

12 Bode C, Bode JC. Effect of alcohol consumption on the gut. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2003; 17: 575-592

13 Hartmann P, Chen WC, Schnabl B. The intestinal microbiome and the leaky gut as therapeutic targets in alcoholic liver disease. *Front Physiol* 2012; 3: 402

14 Massey VL, Arteel GE. Acute alcohol-induced liver injury. *Front Physiol* 2012; 3: 193

15 Rao RK, Seth A, Sheth P. Recent Advances in Alcoholic Liver Disease I. Role of intestinal permeability and endotoxemia in alcoholic liver disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 286: G881-G884

16 Szabo G, Bala S. Alcoholic liver disease and the gut-liver axis. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 1321-1329

17 Yan AW, Schnabl B. Bacterial translocation and changes in the intestinal microbiome associated with alcoholic liver disease. *World J Hepatol* 2012; 4: 110-118

18 Zimmermann HW, Trautwein C, Tacke F. Functional role of monocytes and macrophages for the inflammatory response in acute liver injury. *Front Physiol* 2012; 3: 56

19 Ajakaiye M, Jacob A, Wu R, Nicastro JM, Coppa GF, Wang P. Alcohol and hepatocyte-Kupffer cell interaction (review). *Mol Med Report* 2011; 4: 597-602

20 Wang HJ, Gao B, Zakhari S, Nagy LE. Inflammation in alcoholic liver disease. *Annu Rev Nutr* 2012; 32: 343-368

21 An L, Wang X, Cederbaum AI. Cytokines in alcoholic liver disease. *Arch Toxicol* 2012; 86: 1337-1348

22 Mandrekar P, Jeliazkova V, Catalano D, Szabo G. Acute alcohol exposure exerts anti-inflammatory effects by inhibiting IkappaB kinase activity and p65 phosphorylation in human monocytes. *J Immunol* 2007; 178: 7686-7693

23 Gasparini C, Feldmann M. NF-κB as a Target for Modulating Inflammatory Responses. *Curr Pharm Des* 2012; 18: 5735-5745

24 Novitskiy G, Ravi R, Potter JJ, Rennie-Tankersley L, Wang L, Mezey E. Effects of acetaldehyde and TNF alpha on the inhibitory kappa B-alpha protein and nuclear factor kappa B activation in hepatic stellate cells. *Alcohol Alcohol* 2005; 40: 96-101

25 Pradhan SC, Girish C. Hepatoprotective herbal drug, silymarin from experimental pharmacology to clinical medicine. *Indian J Med Res* 2006; 124: 491-504

26 Trappoliere M, Caligiuri A, Schmid M, Bertolani C, Failli P, Vizzutti F, Novo E, di Manzano C, Marra F, Loguercio C, Pinzani M. Silybin, a component of sylimarin, exerts anti-inflammatory and anti-fibrogenic effects on human hepatic stellate cells. *J Hepatol* 2009; 50: 1102-1111

27 Del Prete A, Scalera A, Iadevaia MD, Miranda A, Zulli C, Gaeta L, Tuccillo C, Federico A, Loguercio C. Herbal products: benefits, limits, and applications in chronic liver disease. *Evid Based Complement Alternat Med* 2012; 2012: 837939

28 Wang T, Gu J, Wu PF, Wang F, Xiong Z, Yang YJ, Wu WN, Dong LD, Chen JG. Protection by tetrahydroxystilbene glucoside against cerebral ischemia: involvement of JNK, SIRT1, and NF-kappaB pathways and inhibition of intracellular ROS/RNS generation. *Free Radic Biol Med* 2009; 47: 229-240

29 Shen Z, Ajmo JM, Rogers CQ, Liang X, Le L, Murr MM, Peng Y, You M. Role of SIRT1 in regulation of LPS- or two ethanol metabolites-induced TNF-alpha production in cultured macrophage cell lines. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009; 296: G1047-G1053

30 Zhang YZ, Shen JF, Xu JY, Xiao JH, Wang JL. Inhibitory effects of 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O-beta-D-glucoside on experimental inflammation and cyclooxygenase 2 activity. *J Asian Nat Prod Res 2007*; 9: 355-363

31 Tao L, Li X, Zhang L, Tian J, Li X, Sun X, Li X, Jiang L, Zhang X, Chen J. Protective effect of tetrahydroxystilbene glucoside on 6-OHDA-induced apoptosis in PC12 cells through the ROS-NO pathway. *PLoS One* 2011; 6: e26055

编辑 田滢 电编 鲁亚静

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2012年12月28日; 20(36): 3656-3662
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

基础研究 BASIC RESEARCH

糖原合成酶激酶-3β在D-GalN/LPS诱导的小鼠急性肝衰竭中的作用

杨丙章, 任 锋, 温 韬, 殷继明, 王欣欣, 朴正福, 陈德喜, 郑素军, 张 晶, 陈 煜, 段钟平, 师水生

■背景资料
在我国, 肝衰竭的发病原因主要是肝炎病毒, 其发病机制一是由病毒直接或间接所致原发性损伤(炎症反应), 二是以内毒素-细胞因子轴-肝细胞凋亡学说为核心的继发性损伤. 国内外研究相继发现糖原合成酶激酶(GSK-3β)在炎症反应和细胞凋亡中发挥着重要作用, 但GSK-3β在肝衰竭中的作用机制尚不清楚.

杨丙章, 师水生, 山西医科大学第二临床医学院 山西省太原市 030001
任锋, 温韬, 殷继明, 王欣欣, 朴正福, 陈德喜, 首都医科大学附属北京佑安医院肝病研究所 北京市 100069
郑素军, 张晶, 陈煜, 段钟平, 首都医科大学附属北京佑安医院人工肝中心 北京市 100069
杨丙章, 主要从事肝病相关的基础研究.
国家125科技重大专项基金资助项目, No. 2012ZX10002004-006, No. 2012ZX10004904-003-001
国家自然科学基金资助项目, No. 81270532
北京市优秀人才培养基金资助项目, D类, No. 2011D003034000022
2012年度留学回国人员择优基金资助项目
作者贡献分布: 此课题由杨丙章、任锋、段钟平及师水生设计; 研究过程由杨丙章、任锋、温韬、殷继明、王欣欣及朴正福完成; 数据分析由陈德喜、郑素军、张晶及陈煜完成; 本文由杨丙章与任锋写作完成; 师水生与段钟平审校.
通讯作者: 师水生, 主任医师, 030001, 山西省太原市五一路382号, 山西医科大学第二临床医学院. shshsheng@163.com
电话: 0351-3365000
收稿日期: 2012-10-16 修回日期: 2012-11-15
接受日期: 2012-12-17 在线出版日期: 2012-12-28

Role of glycogen synthase kinase 3β in the pathogenesis of D-GalN/LPS-induced acute liver injury in mice

Bing-Zhang Yang, Feng Ren, Tao Wen, Ji-Ming Yin, Xin-Xin Wang, Zheng-Fu Piao, De-Xi Chen, Su-Jun Zheng, Jin Zhang, Yu Chen, Zhong-Ping Duan, Shui-Sheng Shi

Bing-Zhang Yang, Shui-Sheng Shi, the Second Clinical Medical College, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China
Feng Ren, Tao Wen, Ji-Ming Yin, Xin-Xin Wang, Zheng-Fu Piao, De-Xi Chen, Institute of Liver Disease, Beijing Municipal, Beijing 100069, China
Su-Jun Zheng, Jing Zhang, Yu Chen, Zhong-Ping Duan, Beijing You'an Hospital, Capital Medical University, Capital Medical University, Beijing 100069, China
Supported by: the National Major Science and Technology Project during the "Twelfth Five-year Plan" Period, Nos. 2012ZX10002004-006 and 2012ZX10004904-003-001; National Natural Science Foundation of China, No. 81270532; the Beijing Talent Training Foundation (Class D), No. 2011D003034000022; and the 2012 Foundation for Excellent Returned Overseas Scholars
Correspondence to: Shui-Sheng Shi, Chief Physician, the Second Clinical Medical College, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China. shshsheng@163.com

Received: 2012-10-16 Revised: 2012-11-15
Accepted: 2012-12-17 Published online: 2012-12-28

Abstract

AIM: To study the role of glycogen synthase kinase-3β (GSK-3β) in the pathogenesis of acute liver failure (ALF) induced by injection of D-galactosamine/lipopolysaccharide (D-GalN/LPS) in mice.

METHODS: ALF was induced in C57BL/6 mice by intraperitoneal injection of D-GalN/LPS. Animal experimental groups included control group, ALF model group, SB216763 pretreatment group (SB216763 in DMSO, i.p, two hours before the induction of ALF) and SB216763 treatment group (SB216763 in DMSO, i.p, two hours after the induction of ALF). Phosphorylation level of GSK-3β was analyzed by Western blot. Serum levels of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) were measured to assess the liver function. HE staining was conducted to analyze histological injury. Inflammatory gene expression was detected by quantitative real-time PCR. The expression of apoptosis-related protein Caspase 3 was detected by Western blot. One-way ANOVA was used for pair-wise comparison of means of multiple samples (homogeneity of variance with LSD-*t* test, unequal variances with Games-Howell method).

RESULTS: The phosphorylation level of GSK-3β decreased initially and then increased in the progression of ALF. Inhibition of GSK-3β, either by pretreatment or treatment with SB216763, could improve liver function (serum ALT and AST levels decreased significantly, and there was obvious improvement in liver tissue injury), suppress inflammatory responses (inhibition of expression of pro-inflammatory cytokines, such as TNF-α, IL-6 and IL-1β, and promotion of expression of anti-inflammatory cytokine IL-10), and reduced the expression of apoptosis-related protein Caspase 3.

■同行评议者
唐世刚, 教授, 湖南省人民医院

CONCLUSION: GSK-3β is activated in D-GalN/LPS-induced ALF in mice, and inhibition of GSK-3β activity can improve liver injury by reducing inflammation and hepatocyte apoptosis, GSK-3β may be a new target for the treatment of ALF.

Key Words: D-Galactosamine; Lipopolysaccharide; Inflammation; Acute liver failure; Glycogen synthase kinase-3β

Yang BZ, Ren F, Wen T, Yin JM, Wang XX, Piao ZF, Chen DX, Zheng SJ, Zhang J, Chen Y, Duan ZP, Shi SS. Role of glycogen synthase kinase 3β in the pathogenesis of D-GalN/LPS-induced acute liver injury in mice. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(36): 3656-3662

摘要

目的: 研究细胞信号分子糖原合成酶激酶-3β(glycogen synthase kinase-3β, GSK-3β)在D-氨基半乳糖/脂多糖联合注射诱导小鼠重型肝炎肝衰竭中的作用.

方法: 以C57BL/6小鼠为研究对象, 腹腔注射D-氨基半乳糖/脂多糖建立小鼠重型肝炎肝衰竭模型. 动物实验分组: 对照组, 重型肝炎肝衰竭模型组, SB216763干预组(建模前2 h腹腔注射), SB216763治疗组(建模后2 h腹腔注射). Western blot检测肝脏组织GSK-3β磷酸化水平, 检测血清转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)、天门冬酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)评价肝脏功能, 观察肝脏组织病理变化评价肝脏损伤情况, 实时荧光定量PCR法检测肝脏细胞炎症因子基因表达, 并检测凋亡相关蛋白Caspase 3的活性表达. 多组样本均数的两两比较采用One-way ANOVA分析(方差齐者用LSD-*t*检验, 方差不齐者用Games-Howell法), $P<0.05$有统计学意义.

结果: Western blot结果显示, GSK-3β在急性肝衰竭过程中磷酸化水平先降低(活性升高)后再次升高; 抑制GSK-3β活性, 无论是干预还是治疗都改善肝脏功能(血清ALT、AST水平明显下降, 肝组织病理损伤明显改善), 并且抑制炎症反应[抑制促炎因子肿瘤坏死因子α(tumor necrosis factor-α, TNF-α)、白介素6(Interleukin-6, IL-6)、IL-1β表达, 促进抗炎因子IL-10高表达], 并可降低凋亡相关蛋白Caspase 3表达.

结论: 在D-氨基半乳糖/脂多糖诱导小鼠急性肝衰竭过程中GSK-3β被激活, 抑制GSK-3β活性通过降低炎症反应和肝细胞凋亡从而改善肝损伤. 因此, 对信号分子GSK-3β活性进行干预有可能为重型肝炎肝衰竭的治疗提供一个新的靶点.

关键词: D-氨基半乳糖; 脂多糖; 炎症; 急性肝衰竭; 糖原合成酶激酶-3β

杨丙章, 任锋, 温韬, 殷继明, 王欣欣, 朴正福, 陈德喜, 郑素军, 张晶, 陈煜, 段钟平, 师水生. 糖原合成酶激酶-3β在D-GalN/LPS诱导小鼠急性肝衰竭中的作用. 世界华人消化杂志 2012; 20(36): 3656-3662

http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3656.asp

■相关报道

任锋等报道, 缺血提高了GSK-3β的活性, 促进炎症反应的发生并导致肝脏组织的损伤. 特异性抑制GSK-3β后, 可通过降低炎症反应水平来减轻小鼠肝脏的缺血再灌注损伤.

0 引言

重型肝炎肝衰竭在临床上病情危重、发展迅速、病死率很高, 迄今在临床上还缺少特异有效的治疗药物和方法, 这主要是因为其确切发病机制并不清楚. 目前认为主要是免疫损伤、缺血缺氧性损伤和内毒素血症损伤等促进炎症反应及细胞凋亡, 最终导致肝衰竭[1-4]. 细胞内信号分子糖原合成酶激酶-3β(glycogen synthase kinase-3β, GSK-3β)在炎症反应以及细胞凋亡调节方面均发挥着重要作用[5-17]. 那么, GSK-3β在重型肝炎肝衰竭发病机制中作用如何? 最新的实验表明, 在D-氨基半乳糖/脂多糖联合注射诱导小鼠重型肝炎肝衰竭模型中, GSK-3β活性升高, 说明GSK-3β在重型肝炎肝衰竭致病机制中发挥一定调节作用, 因此我们分别利用GSK-3β特异性抑制剂SB216763, 分别探讨GSK-3β活性抑制对重型肝炎肝衰竭的干预和治疗作用.

1 材料和方法

1.1 材料 健康♂C57BL/6小鼠, 8-12周龄, 体质量18-25 g, 购自军事医学科学院, 在北京市肝病研究所饲养, 实验前12 h和实验期间禁食, 自由饮水; GSK-3β特异性抑制剂SB216763购自美国Sigma公司; p-GSK-3β、GSK-3β、Caspase 3、Cleaved caspase 3兔抗鼠单克隆抗体以及辣根过氧化酶(HPR)偶联的羊抗兔多克隆抗体均购自美国Cell Signaling公司; β-Actin抗体购自美国Santa Cruz公司; 增强化学发光试剂盒购自美国Thermo公司; 蛋白定量试剂盒购自美国Bio-Rad公司, SuperScript Ⅲ Platinum Two-step qRT-PCR试剂盒和TRIzol试剂均购自美国Invitrogen公司.

1.2 方法

1.2.1 模型的建立: C57BL/6小鼠腹腔注射D-氨基半乳糖(700 mg/kg)/脂多糖(10 μg/kg),

■**创新盘点**
本文首次试图以GSK-3β, 从炎症反应和细胞凋亡两方面入手, 研究重型肝炎肝衰竭可能的发病机制.

表 1 实时定量PCR检测炎症细胞因子基因引物

靶基因	正向引物	反向引物
HPRT	5–TCAACGGGGGACATAAAAGT–3	5–TGCATTGTTTTACCAGTGTCAA–3
IL–10	5–ACTGCACCCACTTCCCAGT–3	5–TGTCCAGCTGGTCCTTTGTT–3
IL–12p40	5–CAGCTTCTTCATCAGGGACAT–3	5–CTTGAGGGAGAAGTAGGAATGG–3
TNF–α	5–GCCTCTTCTCATTCCTGCTTGT–3	5–TTGAGATCCATGCCGTTG–3
IL–1β	5–TTGACGGACCCCAAAAGAT–3	5–GATGATCTGAGTGTGAGGGTCTG–3
IL–6	5–GCTACCAAACTGGATATAATCAGGA–3	5– CCAGGTAGCTATGGTACTCCAGAA –3

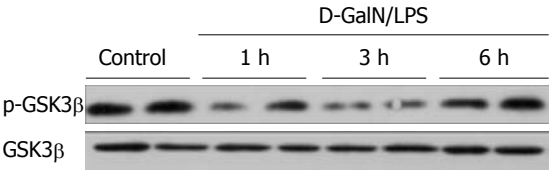


图 1 GSK–3β在重型肝炎肝衰竭进展中的活性变化.

SB216763在注射D-GalN/LPS之前或之后2 h注射, 浓度为50 mg/kg. 随后在不同的时间点处死小鼠收集肝脏组织及外周血.

1.2.2 实验分组: 为研究GSK-3β在重型肝炎肝衰竭过程中的表达, 将模型组分为0、1、3、6 h 4个亚组, 干预实验分建模前2 h和建模后2 h 2个亚组, 于建模后6 h处死小鼠.

1.2.3 肝组织蛋白提取、浓度测定及Western blot检测: 取小鼠肝组织约100 mg, 立即置于1 mL预冷的组织裂解液, 冰浴下充分匀浆, 然后于冰上静置30 min, 4 ℃下12 000 g离心5 min, 用Bio-Rad Dc蛋白分析微孔板法测定上清液中蛋白浓度, 具体操作按说明书进行; Western blotting操作如下: 取60 μg肝脏组织蛋白上样、蛋白样品的电泳(开始80 V, 当蛋白Marker电泳至分离胶后调为120 V至蛋白充分分离)、蛋白转膜(聚偏氟乙烯膜, 30 V、4 ℃过夜转膜)、一抗(1∶1 000稀释)4 ℃孵育过夜、二抗(1∶2 000稀释)室温孵育1 h、TBST漂洗3次, 取等量的增强化学发光试剂A液和B液混匀后孵育聚偏氟乙烯膜, 压片曝光.

1.2.4 生物化学分析仪检测 采用全自动生物化学分析仪测定血清转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)、天门冬酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)水平.

1.2.5 病理学检测: 常规石蜡包埋, 切片HE染色, 光学显微镜观察肝组织损伤情况.

1.2.6 炎症因子实时荧光定量PCR检测: 使用TRIzol试剂提取肝脏组织总RNA, 具体操作按照说明书进行; 测定总RNA浓度并配制等量总RNA的溶液; 使用SuperScript Ⅲ Platinum Two-step qRT-P CR试剂盒合成cDNA第一链, 随后进行实时荧光定量PCR检测, 具体操作按试剂盒说明书进行; 所测定细胞炎症因子及其引物见表1.

统计学处理 所有数据采用均数±标准差(mean±SD)表示, 用SPSS13.0进行数据处理, 多组样本均数的两两比较采用One-way ANOVA分析(方差齐者用LSD-*t*检验, 方差不齐者用Games-Howell法), $P<0.05$有统计学意义.

2 结果

2.1 GSK-3β活性在重型肝炎肝衰竭进展中的活性变化 Western blot结果显示(图1), 总GSK-3β水平在重型肝炎肝衰竭期间虽无明显变化, 但GSK-3β第9位丝氨酸位点磷酸化水平在建模后1、3 h降低(活性升高), 建模后6 h磷酸化水平又重新升高(活性降低), 结果说明GSK-3β活性在重型肝炎肝衰竭中的活性增高是暂时的, 随疾病的进展其活性再次降低.

2.2 抑制GSK-3β活性改善重型肝炎肝衰竭小鼠的肝脏功能 对于模型组, 在建模6 h后, 小鼠血清ALT、AST水平分别为2 195.3 IU/L±450.5 IU/L和3 705.3 IU/L±632.8 IU/L; 对于SB216763干预组, 血清ALT、AST水平分别为961.1 IU/L±356.0 IU/L和2 709.9 IU/L±423.9 IU/L, 与模型组相比, 差异具有显著的统计学意义. 对于SB216763治疗组, 血清ALT、AST水平分别为1 491.2 IU/L±622.9 IU/L和2 274.5 IU/L±651.0 IU/L, 与模型组相比, 差异也具有显著的统计学意义(图2). 因此, 无论是干预和治疗, 抑制GSK-3β活性都显著改善重型肝炎肝衰竭小鼠的肝脏功能.

2.3 抑制GSK-3β活性减轻重型肝炎肝衰竭的病理学损伤 正常小鼠肝脏体积正常, 呈鲜红色, 表面光滑, 边缘整齐, HE染色显示肝小叶形态

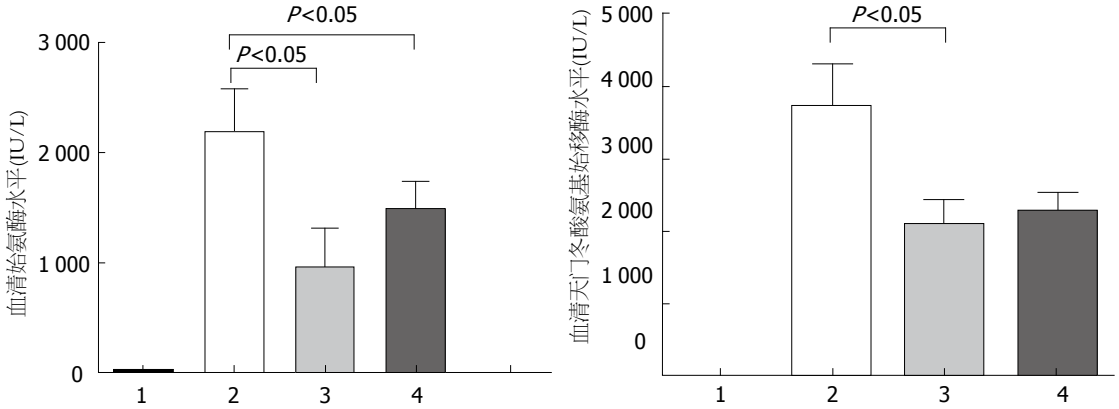


图 2 抑制GSK-3β活性改善重型肝炎肝衰竭小鼠的肝脏功能. 1: Control组; 2: DMSO+D-GalN/LPS组; 3: SB+D-GalN/LPS组; 4: D-GalN/LPS+SB组.

■应用要点

目前国内外对重型肝炎肝衰竭的治疗主要包括药物治疗、人工肝治疗及肝移植. 这些治疗虽然对减轻肝脏损伤, 挽救患者生命起一定的作用, 但尚缺乏特异、有效的干预手段, 整体疗效较差, 病死率居高不下. 而GSK-3β有可能为重型肝炎肝衰竭的治疗提供新的靶点.

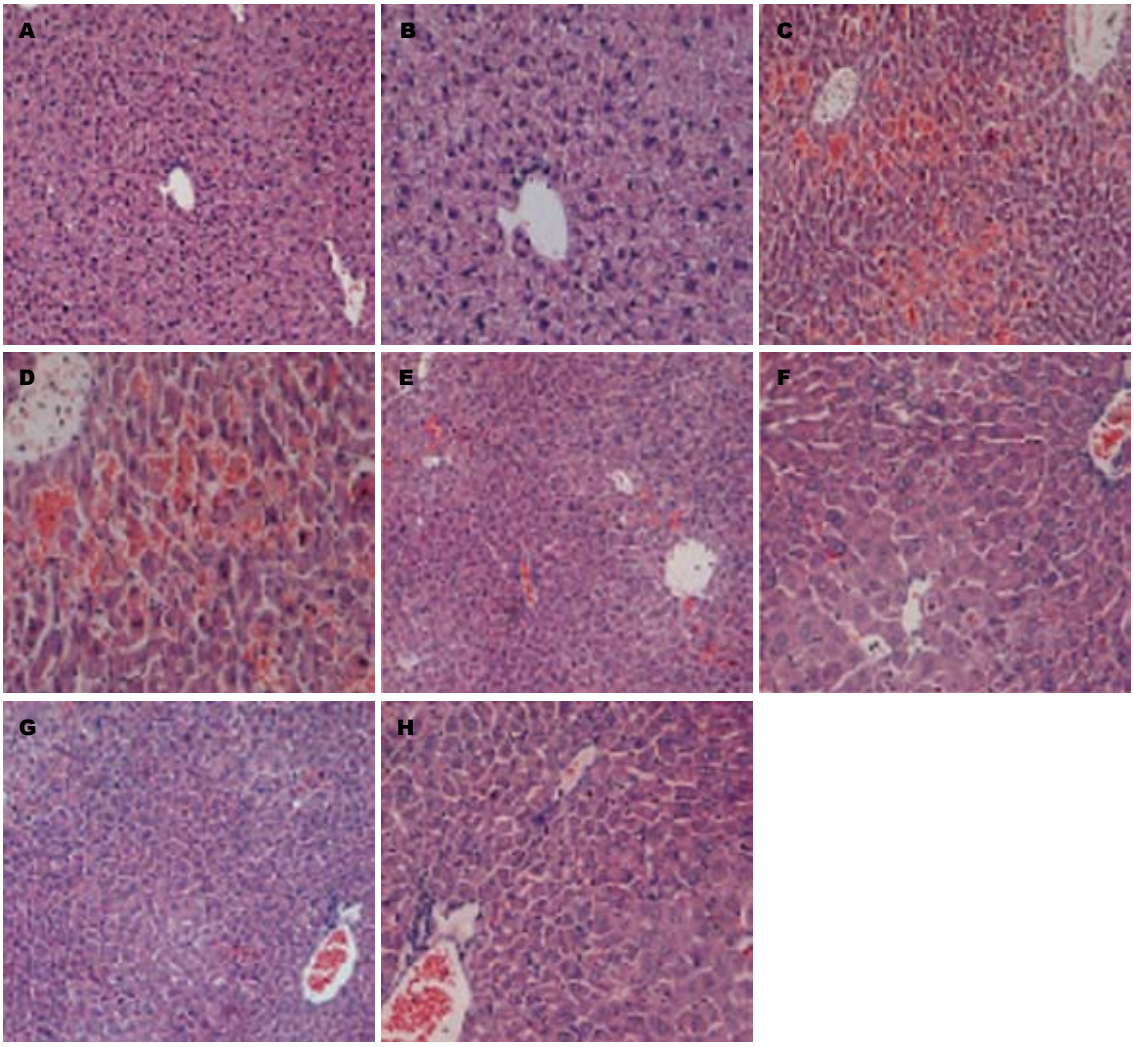


图 3 抑制GSK-3β活性减轻重型肝炎肝衰竭小鼠的病理学损伤. A, B: Control组; C, D: DMSO+D-GalN/LPS组; E, F: SB+D-GalN/LPS组; G, H: D-GalN/LPS+SB组.

结构完整, 未见变性、坏死及炎症细胞浸润等. D-GalN/LPS诱导重型肝炎肝衰竭6 h, 部分肝小叶出现结构紊乱、细胞肿胀变性、细胞凋亡及炎症细胞浸润, 可见大块坏死区. 给予SB216763干预或者治疗, 肝细胞变性、坏死明显减轻, 炎细胞浸润减少, 坏死区明显减少(图3). 结果提示GSK-3β抑制剂改善D-GalN/LPS所致小鼠重型肝炎肝衰竭的病理损伤.

■同行评价
本文以不同的实验方法验证同一问题，方法可靠，数据可信. 有较好的临床应用价值.

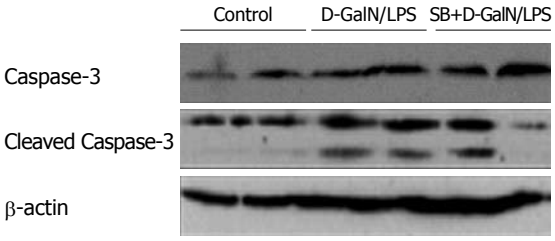


图 4 抑制GSK-3β活性降低Caspase-3活性片断Cleaved Caspase-3的表达.

2.4 抑制GSK-3β活性对肝脏炎症反应的影响 RT-PCR结果表明, D-GalN/LPS诱导的急性肝衰竭模型组肝脏组织中促炎因子肿瘤坏死因子α(tumor necrosis factor α, TNF-α)、白介素6(Interleukin-6, IL-6)、IL-1β基因表达升高, IL-10表达也升高; 而GSK-3β活性干预组肝脏组织中TNF-α、IL-6、IL-1b的表达明显降低, 同时促进抗炎因子IL-10的基因高表达, 并且差异均具有统计学意义(图4). 该研究表明抑制GSK-3β活性显著减轻D-GalN/LPS所致小鼠肝脏炎症反应.

2.5 抑制GSK-3β活性对肝细胞凋亡的影响 为了探明抑制GSK-3β活性对小鼠肝脏中肝细胞凋亡的影响, 我们分别检测了肝脏中Caspase-3及其活性片断的蛋白表达情况. 结果表明, D-GalN/LPS诱导的急性肝衰竭模型组6 h时间点的Caspase-3活性片断Cleaved Caspase-3的表达升高, 说明肝脏中肝细胞的大量凋亡存在; 而SB216763干预组较模型组相比, Cleaved Caspase 3表达降低, 说明干预组中肝脏组织肝细胞凋亡减少(图5). 因此研究结果提示GSK-3β活性抑制可抑制D-GalN/LPS诱导的肝细胞凋亡.

3 讨论

糖原合成酶激酶-3是一个丝氨酸/苏氨酸类激酶, 广泛存在于真核生物中, 哺乳动物体内发现有2种亚型: GSK-3α和GSK-3β, 在不同的组织中有不同的分布. 早期研究认为GSK-3β主要功能是磷酸化肝糖原合成酶(glycogen synthase, GS)并使之失活, 后来研究表明, GSK-3β在调节细胞活性、分化和生存方面具有广泛的生物学活性, 并且在静止细胞中持续表达. 后来研究表明, 该酶可磷酸化众多底物而发挥调节细胞增殖、凋亡, 调节炎症反应等重要功能[18,19], 在蛋白质合成、细胞增殖、细胞分化和炎症反应[2-5]等诸多方面扮演着相当重要的角色. 我们过去的实验已经证明GSK-3β活性调节在小鼠肝脏热缺血再灌注损伤中发挥重要作用[20,21]. 我们最新研究结果显示, GSK-3β在D-GalN/LPS诱导小鼠重型肝炎肝衰竭中也发挥重要的作用.

本研究的结果显示, 在D-GalN/LPS诱导小鼠重型肝炎肝衰竭过程中, GSK-3β磷酸化水平在建模后1、3 h明显降低而活性升高, 建模后6 h磷酸化水平又明显升高而活性降低, 这提示GSK-3β活性调节比较精细, 可能在重型肝炎肝衰竭中发挥着重要作用.

GSK-3β在细胞凋亡和炎症反应发挥着调节作用[5,22-29]. GSK-3β活性增强可通过调节外源性凋亡信号途径和内源性凋亡信号途径调节细胞凋亡. GSK-3β活性增强, 促进了一些促炎细胞因子的产生, 例如: IL-6、IL-1β和TNF-α; 另一方面, GSK-3β活性增强却减少了抗炎因子IL-10的产生; 而抑制GSK-3β的活性却大大减少了促炎因子IL-6、IL-1β和TNF-α的产生并且增加了抗炎因子IL-10的产生[5]. 由此可以推断, 抑制GSK-3β活性可能通过抑制炎症反应和细胞凋亡, 对D-GalN/LPS诱导小鼠重型肝炎肝衰竭起到一定的治疗作用.

我们的研究结果也表明, 抑制GSK-3β活性可以显著改善小鼠肝脏功能; 可以改善小鼠肝脏病理损伤; 可以抑制促炎因子TNF-α、IL-6、IL-1β的表达, 相反促进抗炎因子IL-10的表达, 而改善肝脏的炎症反应; 同时可以降低凋亡效应蛋白Cleaved Caspase 3表达. 我们可以做出推断, 抑制GSK-3β活性可以通过抑制炎症反应和细胞凋亡, 来改善肝脏功能、减轻肝脏损伤[30-32].

总之, GSK-3β活性在D-GalN/LPS诱导小鼠重型肝炎肝衰竭中发挥重要作用. 抑制GSK-3β活性对D-GalN/LPS诱导小鼠重型肝炎肝衰竭进行干预, 可减轻肝脏炎症反应和病理损伤, 抑制细胞凋亡, 改善肝脏功能. 因此, 干预GSK-3β活性可能为重型肝炎肝衰竭治疗提供新的靶点.

4 参考文献

1 Matsuda T, Yamaguchi Y, Matsumura F, Akizuki E, Okabe K, Liang J, Ohshiro H, Ichiguchi O, Yamada S, Mori K, Ogawa M. Immunosuppressants decrease neutrophil chemoattractant and attenuate ischemia/reperfusion injury of the liver in rats. *J Trauma* 1998; 44: 475-484

2 Zwacka RM, Zhang Y, Halldorson J, Schlossberg H, Dudus L, Engelhardt JF. CD4(+) T-lymphocytes mediate ischemia/reperfusion-induced inflammatory responses in mouse liver. *J Clin Invest* 1997; 100: 279-289

3 Clavien PA, Rüdiger HA, Selzner M. Mechanism of hepatocyte death after ischemia: apoptosis versus necrosis. *Hepatology* 2001; 33: 1555-1557

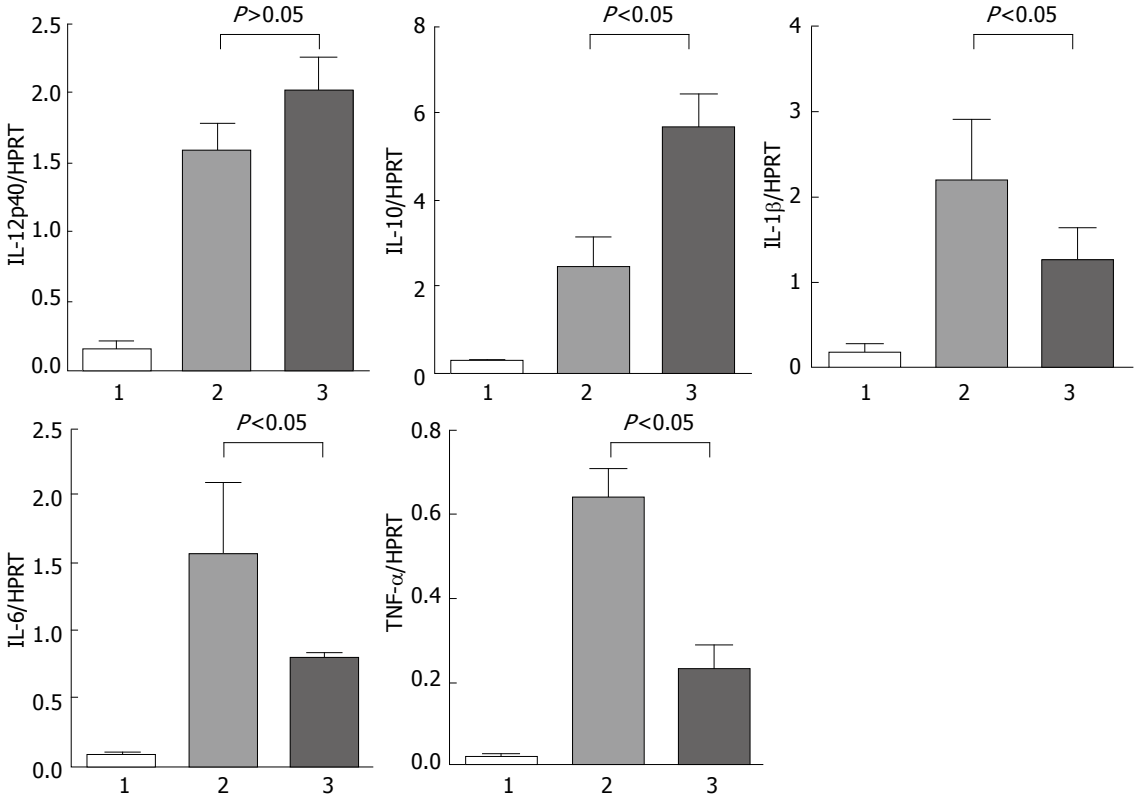


图 5 抑制GSK-3β活性对肝脏炎症因子表达的影响. 1: Control组; 2: DMSO+D-GalN/LPS组; 3: SB+D-GalN/LPS组.

4 刘沛. 肝衰竭发生机制研究现状. 中国实用内科杂志 2005; 21: 780-781

5 Martin M, Rehani K, Jope RS, Michalek SM. Toll-like receptor-mediated cytokine production is differentially regulated by glycogen synthase kinase 3. *Nat Immunol* 2005; 6: 777-784

6 Whittle BJ, Varga C, Pósa A, Molnár A, Collin M, Thiemermann C. Reduction of experimental colitis in the rat by inhibitors of glycogen synthase kinase-3beta. *Br J Pharmacol* 2006; 147: 575-582

7 Hoeflich KP, Luo J, Rubie EA, Tsao MS, Jin O, Woodgett JR. Requirement for glycogen synthase kinase-3beta in cell survival and NF-kappaB activation. *Nature* 2000; 406: 86-90

8 Schwabe RF, Brenner DA. Role of glycogen synthase kinase-3 in TNF-alpha-induced NF-kappaB activation and apoptosis in hepatocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 283: G204-G211

9 Racanelli V, Rehermann B. The liver as an immunological organ. *Hepatology* 2006; 43: S54-S62

10 Gao B, Jeong WI, Tian Z. Liver: An organ with predominant innate immunity. *Hepatology* 2008; 47: 729-736

11 Steinhorn DM, Cerra FB. Comparative effects of lipopolysaccharide on newborn versus adult rat hepatocyte and nonparenchymal cell cocultures. *Crit Care Med* 1997; 25: 121-127

12 Wanner GA, Müller PE, Ertel W, Bauer M, Menger MD, Messmer K. Differential effect of anti-TNF-alpha antibody on proinflammatory cytokine release by Kupffer cells following liver ischemia and reperfusion. *Shock* 1999; 11: 391-395

13 Colletti LM, Kunkel SL, Walz A, Burdick MD, Kunkel RG, Wilke CA, Strieter RM. The role of cytokine networks in the local liver injury following hepatic ischemia/reperfusion in the rat. *Hepatology* 1996; 23: 506-514

14 Suzuki S, Toledo-Pereyra LH, Rodriguez FJ, Cejalvo D. Neutrophil infiltration as an important factor in liver ischemia and reperfusion injury. Modulating effects of FK506 and cyclosporine. *Transplantation* 1993; 55: 1265-1272

15 Jaeschke H, Farhood A. Neutrophil and Kupffer cell-induced oxidant stress and ischemia-reperfusion injury in rat liver. *Am J Physiol* 1991; 260: G355-G362

16 Methe H, Zimmer E, Grimm C, Nabauer M, Koglin J. Evidence for a role of toll-like receptor 4 in development of chronic allograft rejection after cardiac transplantation. *Transplantation* 2004; 78: 1324-1331

17 Tailleux L, Schwartz O, Herrmann JL, Pivert E, Jackson M, Amara A, Legres L, Dreher D, Nicod LP, Gluckman JC, Lagrange PH, Gicquel B, Neyrolles O. DC-SIGN is the major Mycobacterium tuberculosis receptor on human dendritic cells. *J Exp Med* 2003; 197: 121-127

18 Jope RS, Johnson GV. The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *Trends Biochem Sci* 2004; 29: 95-102

19 Woodgett JR. Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/factor A. *EMBO J* 1990; 9: 2431-2438

20 Ren F, Duan Z, Cheng Q, Shen X, Gao F, Bai L, Liu J, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW, Zhai Y. Inhibition of glycogen synthase kinase 3 beta ameliorates liver ischemia reperfusion injury by way of an interleukin-10-mediated immune regulatory mechanism. *Hepatology* 2011; 54: 687-696

21 任锋, 张海燕, 朴正福, 郑素军, 陈煜, 武志明, 段钟平. 糖原合成酶激酶-3β在肝脏热缺血再灌注损伤中的作用及其干预. 中华肝脏病杂志 2011; 19: 547-551

22 Rust C, Gores GJ. Apoptosis and liver disease. *Am J Med* 2000; 108: 567-574
23 Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000; 407: 770-776
24 Kaplowitz N. Mechanisms of liver cell injury. *J Hepatol* 2000; 32: 39-47
25 Hancock WW, Gao W, Csizmadia V, Faia KL, Shemmeri N, Luster AD. Donor-derived IP-10 initiates development of acute allograft rejection. *J Exp Med* 2001; 193: 975-980
26 Hu X, Paik PK, Chen J, Yarilina A, Kockeritz L, Lu TT, Woodgett JR, Ivashkiv LB. IFN-gamma suppresses IL-10 production and synergizes with TLR2 by regulating GSK3 and CREB/AP-1 proteins. *Immunity* 2006; 24: 563-574
27 Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ* 2003; 10: 45-65
28 Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 1998; 281: 1305-1308
29 Geisler F, Algül H, Paxian S, Schmid RM. Genetic inactivation of RelA/p65 sensitizes adult mouse hepatocytes to TNF-induced apoptosis in vivo and in vitro. *Gastroenterology* 2007; 132: 2489-2503
30 Kim AJ, Shi Y, Austin RC, Werstuck GH. Valproate protects cells from ER stress-induced lipid accumulation and apoptosis by inhibiting glycogen synthase kinase-3. *J Cell Sci* 2005; 118: 89-99
31 Srinivasan S, Ohsugi M, Liu Z, Fatrai S, Bernal-Mizrachi E, Permutt MA. Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis is partly mediated by reduced insulin signaling through phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and increased glycogen synthase kinase-3beta in mouse insulinoma cells. *Diabetes* 2005; 54: 968-975
32 Wang H, Brown J, Gu Z, Garcia CA, Liang R, Alard P, Beurel E, Jope RS, Greenway T, Martin M. Convergence of the mammalian target of rapamycin complex 1- and glycogen synthase kinase 3-β-signaling pathways regulates the innate inflammatory response. *J Immunol* 2011; 186: 5217-5226

编辑 田滢 电编 鲁亚静

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

• 消息 •

2011年度《世界华人消化杂志》发文情况

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

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2012年12月28日; 20(36): 3663-3669
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

基础研究 BASIC RESEARCH

PI3K抑制剂对急性胰腺炎细胞因子和组织病理学评分的影响

陈 诚, 徐 萍, 王 静, 娄晓丽

陈诚, 徐萍, 王静, 南京医科大学附属上海松江中心医院消化内科 上海市 201600
娄晓丽, 南京医科大学附属上海松江中心医院中心实验室 上海市 201600
陈诚, 主要从事重症急性胰腺炎炎症信号通路方面的研究.
上海市松江区2011年医学领先合作基金资助项目
作者贡献分布: 此课题由徐萍与王静设计; 研究过程由陈诚与娄晓丽操作完成; 研究所用新试剂和分析工具由娄晓丽提供; 数据分析由陈诚与娄晓丽完成; 本论文写作由陈诚完成.
通讯作者: 徐萍, 201600, 上海市松江区中山中路748号, 南京医科大学附属上海松江中心医院消化内科. yfyxp@yahoo.com.cn
收稿日期: 2012-11-07 修回日期: 2012-12-19
接受日期: 2012-12-25 在线出版日期: 2012-12-28

Effect of PI3K inhibitor wortmannin on cytokine levels and pancreatic histopathological scores in rats with severe acute pancreatitis

Cheng Chen, Ping Xu, Jing Wang, Xiao-Li Lou

Cheng Chen, Ping Xu, Jing Wang, Department of Gastroenterology, Shanghai Songjiang Central Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Shanghai 201600, China
Xiao-Li Lou, Central Laboratory, Shanghai Songjiang Central Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Shanghai 201600, China
Correspondence to: Ping Xu, Department of Gastroenterology, Shanghai Songjiang Central Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Shanghai 201600, China. yfyxp@yahoo.com.cn
Received: 2012-11-07 Revised: 2012-12-19
Accepted: 2012-12-25 Published online: 2012-12-28

Abstract

AIM: To investigate the effect of the PI3K/Akt signaling transduction pathway inhibitor wortmannin on the levels of cytokines [tumor necrosis factor-α (TNF-α), interleukin-1β (IL-1β) and IL-6] and pancreatic histopathological changes in rats with severe acute pancreatitis (SAP).

METHODS: Sixty male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into five groups, including SAP group, sham operation group, normal saline group, DMSO control group, and wortmannin group. The modified Aho's method was used to reproduce the SAP model. The rats were sacrificed 3 and 6 h after treatment. The levels of inflammatory cytokines TNF-α, IL-1β and IL-6 in serum were determined by ELISA. Transcription levels of these inflammatory cytokines in pancreatic tissue were determined by real-time PCR. In addition, the amount of ascites, the activities of serum amylase and ascites amylase, and the pathological scores of pancreatic tissue were also measured.

RESULTS: At 3 and 6 h after treatment, all parameters tested, including the amount of ascites, the levels of serum and ascites amylase, the pathological scores of pancreatic tissue, serum levels of TNF-α, IL-1β and IL-6, and the transcription levels of TNF-α, IL-1β and IL-6 mRNAs in the pancreatic tissue, in the SAP group and DMSO group were significantly higher than those in the normal saline group and sham operation group (all $P < 0.05$). Compared to the SAP group and DMSO group, the above parameters decreased significantly in the wortmannin group (all $P < 0.05$).

CONCLUSION: Wortmannin exerts a protective effect against SAP possibly by down-regulating the levels of TNF-α, IL-1β and IL-6 and reducing pathological injury of pancreatic tissue in rats.

Key Words: Severe acute pancreatitis; Phosphatidylinositol 3-kinase/ser-ine threonine kinase; Wortmannin; Tumor necrosis factor-alpha; Interleukin-1β; Interleukin-6

Chen C, Xu P, Wang J, Lou XL. Effect of PI3K inhibitor wortmannin on cytokine levels and pancreatic histopathol ogical scores in rats with severe acute pancreatitis. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(36): 3663-3669

摘要

目的: 研究磷脂酰肌醇-3激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, P13K)/丝/苏氨酸激酶(ser-ine threonine kinase, Akt)信号通路抑制剂渥曼青霉素(wortmannin)对重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)大鼠细胞因子[肿瘤坏

■背景资料
由于发病机制尚不清楚, 临床上重症急性胰腺炎(SAP)的治疗仍然是一个棘手的问题. 近两年来, 如何在SAP发病早期抑制细胞因子等炎症介质的释放从而有效控制炎症反应成为研究SAP发病机制和治疗SAP的切入点. PI3K/Akt信号转导通路是机体的一条重要通路, 参与脓毒症、SAP并发肺损伤等疾病炎症反应的调控. SAP早期产生和释放的TNF-α, IL-1β, IL-6等促炎细胞因子是SAP发生和发展链上的始动环节. 因此通过抑制PI3K/Akt信号通路减少促炎细胞因子的释放为寻找有效控制SAP发病早期的炎症反应的方法提供了新的思路.

■同行评议者
崔云甫, 教授, 哈尔滨医科大学第二附属医院普外一科

■研发前沿
近年来大量研究表明SAP早期促炎细胞因子的产生及炎症的级联瀑布反应与PI3K/Akt、p38MAPK、NF-κB等细胞内信号转导通路有关. 但目前有关PI3K/Akt信号通路与SAP的研究主要是从SAP的发病机制的角度切入, 更多的是探讨PI3K/Akt信号通路对SAP并发症急性肺损伤的影响. 而PI3K特异性抑制剂wortmannin在急性胰腺炎发病早期通过抑制细胞因子胰腺组织内的转录和血清中的表达来减轻胰腺组织损伤的治疗作用至今未见报道.

死因子-α(tumor necrosis factor-α, TNF-α)、白介素-1β(interleukin-1β, IL-1β)、IL-6]转录和表达以及胰腺组织病理评分的影响, 探讨其对SAP大鼠的保护作用.

方法: 将60只SD大鼠随机分为重症急性胰腺炎组(S组)、假手术组(C组)、生理盐水组(NS组)、溶剂(DMSO)对照组(R组)、PI3K/Akt抑制剂wortmannin组(W组). 采用改良的Aho法制作SAP模型, 分别在造模3、6 h后抽血并处死大鼠, 收集胰腺组织. 采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血清细胞因子(TNF-α、IL-1β、IL-6)表达. Real-time PCR方法检测胰腺组织细胞因子(TNF-α、IL-1β、IL-6)mRNA转录水平变化, 并常规HE染色进行胰腺组织病理评分, 同时观察各组腹水量、血清及腹水淀粉酶的变化.

结果: S组和R组大鼠术后3、6 h的腹水量、血清及腹水淀粉酶水平、胰腺组织病理评分较C组和NS组差异有统计学意义(P<0.05); W组的腹水量、血清及腹水淀粉酶水平、胰腺组织病理评分较同时段的S组和R组有所降低, 差异有统计学意义(P<0.05). 与C组和NS组相比, S组和R组大鼠术后3、6 h的血清细胞因子TNF-α、IL-1β、IL-6表达水平和胰腺组织内TNF-α、IL-1β、IL-6 mRNA转录水平差异有统计学意义(P<0.05); W组的上述指标均低于S组和R组, 差异有统计学意义(P<0.05).

结论: PI3K抑制剂wortmanin通过抑制PI3K/Akt信号转导通路下调SAP大鼠细胞因子(TNF-α、IL-1β、IL-6)的转录和表达水平, 减轻胰腺组织的病理损伤, 对SAP大鼠具有保护作用.

关键词: 重症急性胰腺炎; 磷脂酰肌醇-3激酶/丝/苏氨酸激酶; 渥曼青霉素; 肿瘤坏死因子-α; 白介素-1β; 白介素-6

陈诚, 徐萍, 王静, 娄晓丽. PI3K抑制剂对急性胰腺炎细胞因子和组织病理学评分的影响. 世界华人消化杂志 2012; 20(36): 3663-3669
http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3663.asp

0 引言

重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)发病早期, 在各种损伤因子的刺激下单核/巨噬细胞等被激活. 释放出大量的促炎细胞因子. 多种促炎细胞因子[肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α, TNF-α)、白介素-1β(interleukin-1β, IL-1β)、IL-6等]在SAP的病情演变过程中起着至关重要的作用[1,2]. 近年来, 磷脂酰肌醇-3激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, P13K)/丝/苏氨酸激酶(ser-ine threonine kinase, Akt)信号转导通路在介导炎症、应激等细胞反应过程中发挥的重要调节作用引人注目[3,4]. wortmannin(渥曼青霉素)是一种常用的PI3K特异性抑制剂, 可以通过细胞膜与胞内PI3K的110 kD催化亚基相结合, 抑制其信号向下游传导而降低其下游Akt磷酸化水平, 从而阻断Akt下游的信号级联反应而发挥生物学效应[5,6]. 本研究旨在探讨wortmannin在重症急性胰腺炎大鼠发病早期对SAP大鼠细胞因子(TNF-α、IL-1β、IL-6)转录和表达的干预作用, 以及对重症急性胰腺炎大鼠的保护作用.

1 材料和方法

1.1 材料 健康♂SD大鼠, 清洁级, 鼠龄2-2.5 mo, 体质量160-200 g, 由上海交通大学附属第一人民医院动物实验中心提供; 牛磺胆酸钠、二甲基亚砜(DMSO)(上海生工生物工程技术服务有限公司); PI3K抑制剂wortmannin(Sigma, 美国); TRIzol(Invitrogen, 美国); 大鼠血清TNF-α、IL-1β、IL-6的ELISA检测试剂盒(欣博盛生物科技有限公司, 中国); TNF-α引物序列: 上游5'-AGGCTCCTCTCCGCCATCAAGA-3', 下游5'-TGGGCTCATACCAGGGCTT-3', 扩增片段148 bp; IL-1β引物序列: 上游5'-GATGGCTGCACTATTCCTAATGC-3', 下游5'-AGACTGCCCATTCTCGACAAG-3', 扩增片段207 bp; IL-6引物序列: 上游5'-TAGTCCTTCCTACCCCAACTTCC-3', 下游5'-TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC-3', 扩增片段165 bp; β-actin引物序列: 上游5'-CCTGGCACCCAGCACAAT-3', 下游5'-GGGCCGGACTCGTCATAC-3', 扩增片段105 bp; 第一链cDNA合成试剂盒(Fermentas, 美国); RNA提取试剂盒(TaKaRa, 大连宝生); PCR扩增仪(Bio-Rad, 美国); ABI 7500型定量PCR仪(Applied Biosystems); 倒置显微镜(Olympus, 日本).

1.2 方法

1.2.1 模型建立: 60只SD大鼠随机分为重症急性胰腺炎组(S组)、假手术组(C组)、生理盐水组(NS组)、溶剂(DMSO)对照组(R组)、PI3K/Akt抑制剂wortmannin组(W组), 分别于术后3 h、6 h 2个时间点处死并取材, 每组各6只. SAP模型采用改良的Aho法制作. 实验前12 h禁食, 自由饮水. S组: 术前15 min 0.2%戊巴比妥钠腹腔内

表 1 重症急性胰腺炎大鼠腹水量、血清淀粉酶、腹水淀粉酶、胰腺组织病理评分的变化 (mean ± SD)

分组	3 h				6 h			
	腹水量(mL)	AMS(IU/L)	腹水淀粉酶(IU/L)	胰腺病理评分	腹水量(mL)	AMS(IU/L)	腹水淀粉酶(IU/L)	胰腺病理评分
C组	0 ± 0	6675.00 ± 576.63	7200.00 ± 572.36	0.94 ± 1.52	0 ± 0	3205.00 ± 520.48	11100.00 ± 783.58	1.36 ± 0.95
NS组	0.87 ± 0.49	9916.60 ± 254.89	15900.00 ± 694.25	1.48 ± 1.73	0.88 ± 0.56	5488.30 ± 742.17	29800.00 ± 1087.43	2.77 ± 1.43
S组	6.67 ± 2.07[a]	23925.00 ± 590.90[a]	58624.00 ± 8423.86[a]	10.89 ± 2.43[a]	7.57 ± 1.84[a]	26087.50 ± 645.78[a]	65650.00 ± 5292.79[a]	12.00 ± 1.58[a]
R组	7.75 ± 1.05[a]	27425.00 ± 472.66[a]	104900.00 ± 2354.62[a]	11.26 ± 1.38[a]	8.28 ± 1.41[a]	34450.00 ± 384.78[a]	104250.00 ± 2273.86[a]	13.72 ± 1.25[a]
W组	4.67 ± 0.57[c]	12583.33 ± 770.39[c]	23640.00 ± 1079.25[c]	7.82 ± 2.06[c]	5.52 ± 1.25[c]	13116.60 ± 529.94[c]	54990.00 ± 2927.42[c]	6.42 ± 0.83[c]

[a]P<0.05 *vs* C组和NS组; [c]P<0.05 *vs* S组和R组. C组: 假手术组; NS组: 生理盐水组; S组: 重症急性胰腺炎组; R组: 对照组; W组: PI3K/Akt抑制剂wortmannin组; AMS: 淀粉酶.

■相关报道

目前的研究显示, 胰腺细胞内胰蛋白酶原的异位激活、钙离子的异常内流及核因子NF-κB的过度活化是SAP早期的特征性病理改变. 同时这些变化均与PI3K/Akt信号通路密切相关. 现已发现, 使用PI3K特异性抑制剂或者敲除PI3K基因可以抑制雨蛙肽诱导的和胰管内注射牛磺胆酸钠引起的SAP大鼠的胰蛋白酶原的激活, 降低NF-κB的活性水平, 而减轻SAP的严重性.

注射麻醉, 取上腹正中切口, 切开4 cm, 开腹后沿十二指肠内侧找到胆胰管开口, 以2枚血管夹分别夹住肝门部胆管和十二指肠乳头部位, 用5.5号穿刺针逆行刺入胰管, 以0.1 mL/min速度向胰管内匀速注射50 g/L牛磺胆酸钠(1 mL/kg), 注射后观察胰腺变化8-10 min, 松开血管夹, 确认腹腔无活动性出血后, 连续缝合关闭腹腔. C组: 开腹后不注射牛磺胆酸钠溶液, 只翻动胰腺并以钝器轻划胰腺3次. NS组: 开腹后注射等量的生理盐水(1 μL/g)代替牛磺胆酸钠. W组: 建模前30 min腹腔注射wortmannin(溶于DMSO) 1.0 mg/kg, 再复制SAP模型. R组: 建模前30min腹腔注射同等量的DMSO液, 再复制大鼠SAP模型. 各组大鼠术后自由饮水, 仍禁食.

1.2.2 *标本采集*: 分别于术后3 h、6 h 2个时段用七氟烷麻醉大鼠, 用10 mL注射器收集腹水标本, 记录腹水量, 同时送检腹水淀粉酶; 经心脏采血收集血标本, 4 ℃冰箱静置3 h后以3 000 r/min离心10 min取血清分为两部分, 血清一部分保存在-80 ℃冰箱中待行ELISA检测, 另一部分送检血清淀粉酶. 观察胰腺大体病理改变, 并取胰头部组织分为两部分: 第一部分用10%中性缓冲甲醛固定24 h, 石蜡包埋, 用于进行常规HE染色, 第二部分放入冻存管立即置于液氮罐内保存.

1.2.3 *指标检测*: (1)胰腺组织病理评分: 胰头部组织常规制作石蜡切片, HE染色, 在光镜下阅片观察胰腺组织损伤程度, 每片随机选取8-10个高倍视野, 采用Schimidt等[6]标准对胰腺组织的4个单项(水肿、炎症细胞浸润、出血、坏死程度)进行单独评分; (2)血清、腹水指标检测: 血清稀释40倍, 腹水稀释60-100倍, 经全自动干化学分析仪(Roche, 美国)检测血清和腹水中淀粉酶的含量; (3)采用双抗体夹心ELISA法检测血清细胞因子(TNF-α、IL-1β、IL-6)的表达水平, 严格按照说明书操作. (4)胰腺组织促炎因子(TNF-α、IL-1β、IL-6)mRNA转录水平变化的检测: 取冻存的胰腺组织100 μg, 采用TRIzol一步法提取总蛋白, 实验步骤严格按照试剂说明书进行, 紫外分光光度仪测总RNA在260 nm和280 nm波长下的吸光度(A)值, $A_{260/280}$稳定于1.8-2.0, 此时RNA的纯度较高. 按第一链cDNA合成试剂盒操作步骤将mRNA反转录成cDNA, 运用ABI7500型定量PCR仪采用两步法PCR反应程序检测胰腺组织中细胞因子(TNF-α、IL-1β、IL-6)mRNA的表达. 反应按以下条件循环: 95 ℃预变性30 s; 95 ℃变性5 s, 60 ℃退火并延伸34 s, 进行40个循环. 收集每个PCR延伸期的荧光. 实验重复3次取平均值, 计算mRNA相对β-action表达量的比值, 用$2^{-\Delta\Delta t}$值表示.

统计学处理 数据均以均数±标准差(mean ±SD)表示. 应用SPSS13.0统计分析软件采用单因素方差分析(LSD)和相关性分析处理数据, P<0.05为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 *腹水量、血清及腹水淀粉酶水平以及胰腺组织病理学观察* 重症急性胰腺炎组(S组)和溶剂对照组(R组)大鼠术后3、6 h的腹水量、血清及腹水淀粉酶水平较假手术组(C组)和生理盐水组(NS组)明显增高(P<0.05); 注射PI3K/Akt抑制剂

■创新盘点
本文的创新之处在于首次探讨PI3K特异性抑制剂wortmannin对SAP发病早期的细胞因子TNF-α、IL-1β、IL-6在胰腺组织中的转录水平和血清中表达水平的改变与胰腺组织病理学改变之间的关系, 从SAP治疗的角度显示了wortmannin对SAP大鼠, 尤其是大鼠胰腺组织的保护作用, 并且阐明了SAP大鼠细胞因子TNF-α、IL-1β、IL-6的转录和表达在发病早期的动态变化.

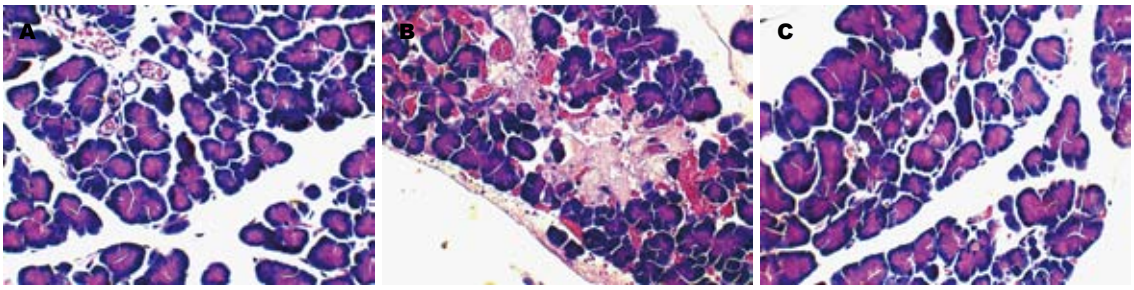


图 1 各组大鼠术后6 h胰腺组织病理改变(光学显微镜, ×400). A: 生理盐水组; B: 牛磺胆酸钠组; C: PI3K/Akt抑制剂wortmannin组.

表 2 SAP大鼠血清细胞因子的变化(mean ± SD, pg/mL)

分组	3 h			6 h		
	TNF-α	IL-1β	IL-6	TNF-α	IL-1β	IL-6
C组	6.54 ± 3.22	37.94 ± 1.79	1.25 ± 0.72	11.41 ± 5.06	29.67 ± 23.52	6.36 ± 4.56
NS组	7.36 ± 5.71	43.31 ± 13.59	7.25 ± 1.33	6.92 ± 4.74	47.79 ± 24.50	2.57 ± 3.43
S组	88.42 ± 4.05[a]	160.24 ± 38.18[a]	373.82 ± 28.73[a]	39.29 ± 11.23[ae]	301.40 ± 27.53[ae]	135.94 ± 36.10[ae]
R组	87.06 ± 12.56[a]	149.42 ± 16.18[a]	290.96 ± 17.14[a]	47.67 ± 4.43[ae]	278.57 ± 32.24[ae]	114.33 ± 20.90[ae]
W组	46.77 ± 10.45[c]	75.42 ± 15.08[c]	183.44 ± 11.23[c]	21.39 ± 3.56[ce]	160.67 ± 22.71[ce]	57.85 ± 31.61[ce]

[a]$P<0.05$ *vs* C组和NS组; [c]$P<0.05$ *vs* S组和R组; [e]$P<0.05$ *vs* 同组3 h组. SAP: 重症急性胰腺炎; TNF-α: 肿瘤坏死因子α; IL: 白介素. C组: 假手术组; NS组: 生理盐水组; S组: 重症急性胰腺炎组; R组: 对照组; W组: PI3K/Akt抑制剂wortmannin组.

wortmannin后的W组同时段的腹水量、血清及腹水淀粉酶水平较S组和R组明显降低($P<0.05$, 表1). S组和R组大鼠同时间段的病理评分明显高于C组和NS组($P<0.05$), 同时间段的W组大鼠胰腺组织病理损害程度较S组和R组明显减轻($P<0.05$). C组较同时段NS组、S组较同时段R组的腹水量、血清及腹水淀粉酶水平以及胰腺组织病理学评分差异无统计学意义($P>0.05$). 各组大鼠代表性胰腺组织病理形态学改变见图1. 生理盐水组(NS组)大鼠胰腺组织结构清晰, 大部分腺泡小叶完整, 偶见炎性细胞浸润, 未见间质充血、出血和腺泡细胞坏死(图1A). 牛磺胆酸钠组(S组)胰腺组织可见明显腺泡小叶结构破坏, 小叶间水肿, 片状出血, 炎性细胞浸润, 腺泡细胞变性坏死(图1B). PI3K/Akt抑制剂wortmannin组(W组)大鼠胰腺组织小叶结构存在, 部分间质水肿, 少量的炎性细胞浸润, 偶见点状出血, 未见腺泡细胞坏死(图1C). 各组胰腺组织病理评分比较见表1.

2.2 血清中细胞因子的表达变化 与C组和NS组相比, S组和R组大鼠术后3、6 h的血清细胞因子(TNF-α、IL-1β、IL-6)表达水平明显增高($P<0.05$), 注射PI3K/Akt抑制剂wortmannin后(W组)血清细胞因子(TNF-α、IL-1β、IL-6)表达水平显著低于S组和R组($P<0.05$). C组较同时段NS组、S组较同时段R组血清中的细胞因子(TNF-α、IL-1β、IL-6)的表达无统计学意义($P>0.05$). 与同组3 h相比, 6 h的S组、R组和W组TNF-α mRNA, IL-6 mRNA转录水平有所下降, 而IL-1β mRNA转录水平呈上升趋势, 差异存在统计学意义($P<0.05$). C组和NS组3h的血清细胞因子(TNF-α、IL-1β、IL-6)的表达与同组6 h相比, 差异无统计学意义($P>0.05$, 表2). 胰腺组织病理评分与血清中细胞因子(TNF-α、IL-1β、IL-6)的表达均呈正相关(r值分别为0.730、0.863和0.731, P值均<0.01).

2.3 胰腺组织细胞因子mRNA转录水平变化 与C组和NS组相比, S组和R组大鼠术后3、6 h的胰腺组织内TNF-α、IL-1β、IL-6 mRNA转录水平明显增高($P<0.05$); W组的上述指标低于S组和R组, 差异存在统计学意义$P<0.05$). C组较同时段NS组、S组较同时段R组的胰腺组织细胞因子(TNF-α、IL-1β、IL-6)mRNA转录水平差异无统计学意义($P>0.05$). 与同组3 h相比, 6 h的S组, R组和W组IL-1β mRNA转录水平有所上升, 而TNF-α mRNA转录水平呈下降趋势, 差异存在统计学意义($P<0.05$). IL-6 mRNA转录水平呈下降趋势, 差异无统计学意义($P>0.05$). C组和NS组3h

表 3 SAP大鼠胰腺组织细胞因子(TNF-α、IL-1β、IL-6)mRNA转录水平变化 (mean ± SD)

分组	3 h			6 h		
	TNF-α mRNA	IL-1β mRNA	IL-6 mRNA	TNF-α mRNA	IL-1β mRNA	IL-6 mRNA
C组	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
NS组	1.22 ± 0.25	1.51 ± 0.68	0.79 ± 0.36	1.46 ± 0.15	0.77 ± 0.53	0.84 ± 0.21
S组	757.97 ± 56.81[a]	18.06 ± 1.23[a]	51.02 ± 10.21[a]	117.78 ± 14.22[ae]	37.19 ± 3.65[ae]	42.14 ± 6.26[a]
R组	801.20 ± 54.47[a]	19.02 ± 1.12[a]	55.24 ± 12.30[a]	139.87 ± 12.36[ae]	31.15 ± 1.32[ae]	41.38 ± 8.36[a]
W组	458.39 ± 20.23[c]	10.61 ± 2.34[c]	14.41 ± 5.38[c]	57.52 ± 10.36[ce]	18.43 ± 2.36[ce]	7.67 ± 1.02[c]

[a]P<0.05 *vs* C组和NS组; [c]P<0.05 *vs* S组和R组; [e]P<0.05 *vs* 同组3 h. SAP: 重症急性胰腺炎; TNF-α: 肿瘤坏死因子α; IL: 白介素. C组: 假手术组; NS组: 生理盐水组; S组: 重症急性胰腺炎组; R组: 对照组; W组: PI3K/Akt抑制剂wortmannin组.

■应用要点
本研究用PI3K特异性抑制剂wortmannin对SAP大鼠进行干预治疗, 明显减轻SAP大鼠的炎症程度, 改善大鼠胰腺组织的病理损伤, 为PI3K特异性抑制剂用于临床治疗SAP提供了实验依据, 同时本研究也为临床应用药物如吡格列酮、白藜芦醇等治疗SAP的理论研究提供一些新的思路.

的胰腺组织细胞因子(TNF-α, IL-1β, IL-6)mRNA转录水平变化与同组6 h相比, 差异无统计学意义(P>0.05, 表3). 胰腺组织病理评分与胰腺组织细胞因子(TNF-α、IL-1β、IL-6)mRNA转录水平均呈正相关(r值分别为0.569、0.900和0.884, P值均<0.01).

3 讨论

SAP发病早期, 胰腺组织常出现明显的出血坏死及炎症细胞浸润. 过度激活的白细胞释放出大量的细胞因子, 形成复杂的炎症级联反应[7]. 研究表明, 胰腺组织和血液中的细胞因子在SAP发生和发展过程中呈现动态变化, 其中促炎细胞因子(TNF-α、IL-1β、IL-6等)的释放与SAP的严重程度呈正相关[8], 在SAP的发生、发展、和转归中发挥着重要的作用[9,10]. 在急性胰腺炎早期, TNF-α低浓度时能结合胰腺腺泡膜上的TNFR受体, 诱导腺泡凋亡, 高浓度时促使IL-1β, IL-6等细胞因子过表达, 进一步加重炎症反应[11]. IL-1β的作用主要是诱导和调控TNF-α、IL-6、iNOS、COX-2黏附分子的产生, 激活中性粒细胞, 与急性胰腺炎严重程度呈正相关. IL-6是由内皮细胞、单核巨噬细胞和成纤维细胞等产生的多功能因子, 同时作用于多种靶细胞, 引起全身炎症反应, 与炎性疾病的进展密切相关[12]. 血清中IL-6的水平在实验和临床上可作为衡量急性胰腺炎的严重程度和预后的较为敏感和特异度的指标之一[13,14]. 因此我们选择TNF-α、IL-1β、IL-6探讨SAP大鼠细胞因子的转录与表达. 我们的实验发现SAP大鼠的胰腺组织细胞因子(TNF-α、IL-1β、IL-6)mRNA和血清中细胞因子(TNF-α、IL-1β、IL-6)的表达明显增高, 在SAP大鼠发病早期, IL-1β的胰腺组织中mRNA和血清中的表达持续上升, 而TNF-α, IL-6呈现出先升后降趋势, 但是仍明显高于假手术组和生理盐水组. 用wortmanin预先干预的SAP大鼠在发病早期TNF-α、IL-1β、IL- 6 的转录和表达具有相同的时间依赖性, 但明显低于急性胰腺炎组.

P13K/Akt信号通路是胰岛素信号转导通路中一条经典的、具有广泛生物学效应的途径[15-17]. P13K家族是一类特异性催化磷脂酰肌醇3-位羟基磷酸化, 产生具有第二信使作用的肌醇脂物质的激酶[18]. Akt通路位于P13K的下游, 处于该通路的中心环节, 主要负责由PI3K始动的生物信息的传导. 细胞受到生长因子、细胞因子等刺激后会激活细胞内的PI3K, 活化的PI3K使其底物3,4-二磷酸磷脂酰肌醇(PIP_2)磷酸化成3,4,5-三磷酸磷脂酰肌醇(PIP_3)[19], 下游的Akt通过血小板-白细胞C激酶同源区与PI3K的磷酸化底物PIP_3结合, 并通过磷脂酰肌醇依赖性激酶-1(PDK-1)磷酸化Akt的第308位苏氨酸位点(Thr308)而被激活,在酰肌醇依赖性激酶-2(PDK-2)的存在下, Akt第473位上的丝氨酸位点(Ser473)也发生磷酸化, 使Akt处于充分活化状态[20], 激活的Akt进一步引起下游靶基因的变化[21].

近期研究发现, PI3K/Akt信号转导通路在炎症反应过程中发挥着重要的调节作用. PI3K/Akt信号通路的激活可以上调炎性介质基因的转录活性, 促使细胞产生大量细胞因子[22]. 研究者发现细菌内毒素、过敏毒素C5a等可以使PI3K/Akt通路活化, 进而激活了其他信号通路, 信号通路的异常活化可促进细胞因子TNF-α等的基因转录[23]. 由于PI3K/Akt信号通路反应迅速, 使细胞在致病因子的刺激下能及时反应, 因而此过程在机体炎症反应的过程中发挥了关键性的调节作用. 研究显示抑制P13K/Akt信号转导通

■名词解释
wortmannin(渥曼青霉素): 是一种常用的PI3K特异性抑制剂, 可以通过细胞膜与胞内PI3K的110 kD催化亚基相结合, 抑制其信号向下游传导而降低其下游Akt磷酸化水平, 从而阻断Akt下游的信号级联反应而发挥生物学效应.

路的激活可以明显降低急性胰腺炎的严重程度[24,25]. 我们的实验中亦发现用wortmanin预先干预的SAP大鼠腹水量、血清及腹水淀粉酶水平显著下降, 胰腺组织的病理损伤也得到明显的改善, wortmanin抑制PI3K/Akt信号通路有效地控制了SAP大鼠的早期炎症反应.

PI3K活性的特异性抑制剂wortmannin在重症急性胰腺炎发病早期显示出的独特抗炎作用近年来引起人们的广泛关注[26]. 研究显示PI3K信号转导通路抑制剂wortmannin可明显抑制SAP中性粒细胞内Akt的活性[27]并且对SAP大鼠肺损伤具有一定的保护作用[28,29]. 本实验的结果表明PI3K抑制剂wortmanin通过抑制PI3K/Akt信号转导通路可以减少SAP大鼠胰腺组织中细胞因子(TNF-α、 IL-1β、IL-6)mRNA表达, 同时降低了上述细胞因子在血清中的表达. SAP大鼠用wortmanin预先干预后, 细胞因子(TNF-α、IL-1β、IL-6)的胰腺组织mRNA转录水平和血清中的表达下调程度相近, 由此推测PI3K抑制剂wortmanin对细胞因子TNF-α、IL-1β、IL-6的转录与表达有着相似的抑制作用. 我们在实验中还发现, SAP大鼠的细胞因子(TNF-α、IL-1β、IL-6)的胰腺组织mRNA转录水平和血清中的表达与胰腺组织病理组织学改变均呈正相关性, 提示PI3K抑制剂wortmannin可通过抑制胰腺组织中细胞因子TNF-α、IL-1β、IL-6等的转录, 降低心清中细胞因子TNF-α、IL-1β、IL-6等的表达, 明显减轻SAP发病早期胰腺组织的病理损伤.

目前, 虽然SAP的治疗策略有指南不断更新, 但临床效果都不甚满意, SAP尚无明确的治疗方案[30,31]. 近两年来, 在SAP发病早期抑制细胞因子等炎症介质的释放从而有效控制炎症反应成为研究SAP发病机制和治疗SAP的切入点. 我们的实验显示PI3K/Akt信号传导通路抑制剂wortmannin通过抑制PI3K/Akt信号通路, 下调下游的细胞因子在胰腺组织中的转录水平, 引起心清中TNF-α、IL-1β、IL-6等细胞因子的表达下降, 从而减轻急性胰腺炎的严重程度, 对重症急性胰腺炎大鼠产生抗炎作用, 为SAP的治疗提供新的思路. 但wortmannin对SAP的具体抗炎机制以及PI3K/Akt信号通路与其他炎症信号通路的相互关系还需要我们今后的实验来进一步探讨.

4 参考文献

1 Zhang XP, Zhang J, Ma ML, Cai Y, Xu RJ, Xie Q, Jiang XG, Ye Q. Pathological changes at early stage of multiple organ injury in a rat model of severe acute pancreatitis. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2010; 9: 83-87

2 Xu P, Zhou XJ, Chen LQ, Chen J, Xie Y, Lv LH, Hou XH. Pioglitazone attenuates the severity of sodium taurocholate-induced severe acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 1983-1988

3 Rajaram MV, Ganesan LP, Parsa KV, Butchar JP, Gunn JS, Tridandapani S. Akt/Protein kinase B modulates macrophage inflammatory response to Francisella infection and confers a survival advantage in mice. *J Immunol* 2006; 177: 6317-6324

4 Zong Y, Sun L, Liu B, Deng YS, Zhan D, Chen YL, He Y, Liu J, Zhang ZJ, Sun J, Lu D. Resveratrol inhibits LPS-induced MAPKs activation via activation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway in murine RAW 264.7 macrophage cells. *PLoS One* 2012; 7: e44107

5 Zhang F, Zhang T, Jiang T, Zhang R, Teng ZH, Li C, Gu ZP, Mei Q. Wortmannin potentiates roscovitine-induced growth inhibition in human solid tumor cells by repressing PI3K/Akt pathway. *Cancer Lett* 2009; 286: 232-239

6 Schmidt J, Rattner DW, Lewandrowski K, Compton CC, Mandavilli U, Knoefel WT, Warshaw AL. A better model of acute pancreatitis for evaluating therapy. *Ann Surg* 1992; 215: 44-56

7 Dios ID. Inflammatory role of the acinar cells during acute pancreatitis. *World J Gastrointest Pharmacol Ther* 2010; 1: 15-20

8 Novovic S, Andersen AM, Ersbøll AK, Nielsen OH, Jorgensen LN, Hansen MB. Proinflammatory cytokines in alcohol or gallstone induced acute pancreatitis. A prospective study. *JOP* 2009; 10: 256-262

9 Bhatia M, Wong FL, Cao Y, Lau HY, Huang J, Puneet P, Chevali L. Pathophysiology of acute pancreatitis. *Pancreatology* 2005; 5: 132-144

10 Bhatia M. Acute pancreatitis as a model of SIRS. *Front Biosci* 2009; 14: 2042-2050

11 Xue DB, Zhang WH, Yun XG, Song C, Zheng B, Shi XY, Wang HY. Regulating effects of arsenic trioxide on cell death pathways and inflammatory reactions of pancreatic acinar cells in rats. *Chin Med J* (Engl) 2007; 120: 690-695

12 Aoun E, Chen J, Reighard D, Gleeson FC, Whitcomb DC, Papachristou GI. Diagnostic accuracy of interleukin-6 and interleukin-8 in predicting severe acute pancreatitis: a meta-analysis. *Pancreatology* 2009; 9: 777-785

13 Jun G, Zhi-jun T, Bao-liang Q, Fei L, Jia-bang S. Significance of trypsinogen activation peptides and interleukin-6 in experimental acute pancreatitis. *Zhongguo Yixuekexueyuan Xuebao* 2011; 33: 205-209

14 Sathyanarayan G, Garg PK, Prasad H, Tandon RK. Elevated level of interleukin-6 predicts organ failure and severe disease in patients with acute pancreatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22: 550-554

15 Lackner MR. Prospects for personalized medicine with inhibitors targeting the RAS and PI3K pathways. *Expert Rev Mol Diagn* 2010; 10: 75-87

16 Kuijk LM, Beekman JM, Koster J, Waterham HR, Frenkel J, Coffer PJ. HMG-CoA reductase inhibition induces IL-1beta release through Rac1/PI3K/PKB-dependent caspase-1 activation. *Blood* 2008; 112: 3563-3573

17 Steinbrunn T, Stühmer T, Sayehli C, Chatterjee M, Einsele H, Bargou RC. Combined targeting of MEK/MAPK and PI3K/Akt signalling in multiple myeloma. *Br J Haematol* 2012; 159: 430-440

18 Cantrell DA. Phosphoinositide 3-kinase signalling

pathways. *J Cell Sci* 2001; 114: 1439-1445
19 Pene F, Claessens YE, Muller O, Viguié F, Mayeux P, Dreyfus F, Lacombe C, Bouscary D. Role of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and mTOR/P70S6-kinase pathways in the proliferation and apoptosis in multiple myeloma. *Oncogene* 2002; 21: 6587-6597
20 Solit DB, Basso AD, Olshen AB, Scher HI, Rosen N. Inhibition of heat shock protein 90 function down-regulates Akt kinase and sensitizes tumors to Taxol. *Cancer Res* 2003; 63: 2139-2144
21 Madrid LV, Mayo MW, Reuther JY, Baldwin AS. Akt stimulates the transactivation potential of the RelA/p65 Subunit of NF-kappa B through utilization of the Ikappa B kinase and activation of the mitogen-activated protein kinase p38. *J Biol Chem* 2001; 276: 18934-18940
22 Luyendyk JP, Schabbauer GA, Tencati M, Holscher T, Pawlinski R, Mackman N. Genetic analysis of the role of the PI3K-Akt pathway in lipopolysaccharide-induced cytokine and tissue factor gene expression in monocytes/macrophages. *J Immunol* 2008; 180: 4218-4226
23 Konrad S, Ali SR, Wiege K, Syed SN, Engling L, Piekorz RP, Hirsch E, Nürnberg B, Schmidt RE, Gessner JE. Phosphoinositide 3-kinases gamma and delta, linkers of coordinate C5a receptor-Fcgamma receptor activation and immune complex-induced inflammation. *J Biol Chem* 2008; 283: 33296-33303
24 Wang K, Scheel-Toellner D, Wong SH, Craddock R, Caamano J, Akbar AN, Salmon M, Lord JM. Inhibition of neutrophil apoptosis by type 1 IFN depends on cross-talk between phosphoinositol 3-kinase, protein kinase C-delta, and NF-kappa B signaling pathways. *J Immunol* 2003; 171: 1035-1041
25 Singh VP, Saluja AK, Bhagat L, van Acker GJ, Song AM, Soltoff SP, Cantley LC, Steer ML. Phosphatidylinositol 3-kinase-dependent activation of trypsinogen modulates the severity of acute pancreatitis. *J Clin Invest* 2001; 108: 1387-1395
26 Yang SJ, Chen HM, Hsieh CH, Hsu JT, Yeh CN, Yeh TS, Hwang TL, Jan YY, Chen MF. Akt pathway is required for oestrogen-mediated attenuation of lung injury in a rodent model of cerulein-induced acute pancreatitis. *Injury* 2011; 42: 638-642
27 张成, 栾正刚, 葛春林, 郭仁宣. 磷脂酰肌醇3激酶/蛋白激酶B信号转导通路在重症急性胰腺炎中性粒细胞活化中的作用. 世界华人消化杂志 2006; 14: 1987-1991
28 蔡文科, 窦科峰, 赵青川, 王玉同, 党军强, 周红兵. wortmanin对重症急性胰腺炎大鼠肺损伤的保护作用. 第四军医大学学报 2007; 28: 1566-1569
29 Kang X, Wang LZ, Wang YG, Liu L, Fan ZW, Bai LZ, Lu XG. [Expression and significance of phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B signal transduction pathway in severe acute pancreatitis-associated lung injury]. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2010; 90: 732-737
30 Lankisch PG. Treatment of acute pancreatitis: an attempted historical review. *Pancreatology* 2010; 10: 134-141
31 Wu BU, Conwell DL. Update in acute pancreatitis. *Curr Gastroenterol Rep* 2010; 12: 83-90

■同行评议
本研究采用经典方法制备模型, 设计分组合理, 同时从细胞因子和组织病理学等多方面评估PI3K处理对SAP的效果, 方法部分充分. 研究采用2个早期时间点进行取材并比较, 探讨了实验性SAP大鼠发病早期细胞因子的动态变化. 文章有一定创新性.

编辑 田滢 电编 鲁亚静

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2012年12月28日; 20(36): 3670-3677
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

基础研究 BASIC RESEARCH

重症急性胰腺炎与中性粒细胞凋亡蛋白质的相关性

臧宪华, 吴彦彦, 许兰涛

■背景资料
蛋白组学是一种研究细胞内所有蛋白质及其动态变化的科学, 可通过对正常个体和病理个体的蛋白组分析, 寻找出一些疾病的特异性蛋白质分子,并可为研究疾病的发生、发展提供更多的理论基础. 本研究旨在探讨PMN凋亡延迟相关蛋白质, 为重症胰腺炎的治疗提供新的靶点.

臧宪华, 苏州大学医学部 江苏省苏州市 215006
吴彦彦, 许兰涛, 上海市奉贤区中心医院消化内科 上海市 201400
臧宪华, 硕士, 主要从事胰腺疾病的基础和临床研究.
作者贡献分布: 此课题许兰涛设计; 研究过程由臧宪华与吴彦彦操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由许兰涛提供; 数据分析由许兰涛、臧宪华及吴彦彦完成; 本论文写作由臧宪华与许兰涛完成.
通讯作者: 许兰涛, 主任医师, 201400, 上海市奉贤区南奉公路9588号, 上海市奉贤区中心医院消化内科. sccdlx@sohu.com
收稿日期: 2012-11-15 修回日期: 2012-12-01
接受日期: 2012-12-20 在线出版日期: 2012-12-28

Relationship between development and progression of severe acute pancreatitis and neutrophil apoptosis-related proteins in rats

Xian-Hua Zang, Yan-Yan Wu, Lan-Tao Xu

Xian-Hua Zang, Graduate Department, Soochow University, Suzhou 215006, Jiangsu Province, China
Yan-Yan Wu, Lan-Tao Xu, Department of Gastroenterology, Central Hospital of Fengxian, Shanghai 201400, China
Correspondence to: Lan-Tao Xu, Chief Physician, Department of Gastroenterology, Central Hospital of Fengxian, Shanghai 201400, China. sccdlx@sohu.com
Received: 2012-11-15 Revised: 2012-12-01
Accepted: 2012-12-20 Published online: 2012-12-28

Abstract

AIM: To investigate the relationship between the development and progression of severe acute pancreatitis (SAP) and apoptosis-related proteins in rats.

METHODS: Sixty SD rats were randomly divided into two groups: acute necrotizing pancreatitis (ANP) group and sham-operated (SO) group (n = 30 for each). At 3, 6, and 12 h after induction of ANP, the rats were sacrificed and blood samples were collected from the inferior vena cava. Density gradient centrifugation was conducted to separate polymorpho nuclear neutrophils (PMNs), and PMN apoptosis was determined by flow cytometry. PMNs collected at 12 h were lysed, and label-free technology was used to identify apoptosis-related proteins. Twenty-eight SAP patients treated at our hospital from June 2008 to June 2012 were randomly divided into a treatment group and a control group (n = 14 for each). The control group underwent conventional treatment, while the treatment group was treated with conventional treatment plus continuous infusion of somatostatin. The mean duration of abdominal pain, amylase recovery time, length of hospital stay, and the incidence of complications, rate of conversion to surgery, and mortality were compared between the two groups.

RESULTS: PMN apoptosis was significantly delayed in the ANP group compared to the SO group at all time points (all $P < 0.01$). Four PMN apoptosis-related proteins were identified: 78 KDa glucose-regulated protein, RhoGTPase, L-lactic acid dehydrogenase A chain, and hemoglobin α^2 chain (ANP/SO ratios: 1.953614, 3.526625, 1.766764, 0.609825; all $P < 0.05$). The mean duration of abdominal pain, amylase recovery time and length of stay were significantly shorter (P = 0.041, 0.001, 0.000), and the incidence of complications, rate of conversion to surgery, and mortality were significantly lower in the treatment group than in the control group (P = 0.022, 0.029, 0.029).

CONCLUSION: PMN apoptosis delay in ANP may be mediated by apoptosis-related proteins. Somatostatin therapy can significantly shorten the duration of patient's clinical symptoms and reduce complications and mortality.

Key Words: Severe pancreatitis; Somatostatin; Protein; Complications; Mortality

Zang XH, Wu YY, Xu LT. Relationship between development and progression of severe acute pancreatitis and neutrophil apoptosis-related proteins in rats. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(36): 3670-3677

摘要

目的: 探讨重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)的发生发展与中性粒细胞(polymorpho nuclear neutrophil, PMN)凋亡相关蛋白质是否相关.

■同行评议者
洪天配, 教授, 北京大学第三医院内分泌科

方法: SD大鼠60只, 随机分为2组, 每组30只, 建立急性坏死性胰腺炎(acute necrotizing pancreatitis, ANP)组和假手术(sham-operated, SO)组模型, 分别在制模后3、6、12 h分批处死大鼠, 抽取下腔静脉血密度梯度离心分离PMN, 用流式细胞仪测定PMN凋亡比率, 对胰腺组织进行病理评分. 并对大鼠制模后12 h的PMN裂解, 应用Label free技术对两组PMN进行蛋白定量差异分析, 进一步鉴定出与凋亡有关的差异蛋白质. 同时收集我院2008-06/2012-06收治的28例SAP患者, 随机分为治疗组(14例)和对照组(14例). 对照组采用常规综合治疗, 治疗组患者在常规综合治疗的基础上加用生长抑素(somatostatin, SST)持续静脉滴注. 比较两组患者的平均腹痛持续时间、淀粉酶恢复时间、平均住院天数以及并发症发生率、转手术率、死亡率. 分析凋亡相关蛋白质的抗凋亡机制及生长抑素在治疗SAP中的诱导凋亡作用, 推断SAP的发生发展是否与凋亡相关蛋白质有关.

结果: ANP组PMN凋亡延迟, 与SO组各个时间点比较差异有统计学意义(均$P<0.01$); 鉴定出与PMN凋亡有关的4种蛋白质: 78 kDa葡萄糖调节蛋白、RhoGTPases、*L*-乳酸脱氢酶A链和血红蛋白α2链(ANP组与SO组的比值分别为1.953614、3.526625、1.766764、0.609825), 两组差异有统计学意义($P<0.05$). 治疗组患者的平均腹痛持续时间、淀粉酶恢复时间及平均住院天数明显短于对照组患者, 两组比较差异有统计学意义(P值分别为0.041、0.001、0.000). 治疗组患者的并发症发生率、转手术率和死亡率明显低于对照组患者, 两组比较差异有统计学意义(P = 0.022, 0.029, 0.029).

结论: ANP时, PMN凋亡延迟, 与凋亡有关的差异蛋白质可能参与了ANP外周血PMN凋亡延迟; 应用生长抑素治疗SAP, 能明显缩短患者的临床症状缓解时间, 减少并发症, 降低患者的死亡率; SAP的发生发展可能与凋亡相关蛋白质有关.

关键词: 重症胰腺炎; 生长抑素; 蛋白质; 并发症; 死亡率

臧宪华, 吴彦彦, 许兰涛. 重症急性胰腺炎与中性粒细胞凋亡蛋白质的相关性. 世界华人消化杂志 2012; 20(36): 3670–3677
http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3670.asp

0 引言

重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)是一个多因素综合作用的结果, 其是以系统性炎性反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS)为特征, 并可进展为多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS), 最终可导致多器官功能衰竭, 例如急性呼吸窘迫综合症、肝衰竭、肾衰竭、全身毛细血管渗漏, 酸碱平衡失调等全身疾病, 这些是患者死亡率增加的主要原因[1]. 目前研究认为, 中性粒细胞(polymorphonuclear granulocytes, PMN)在凋亡中起着重要的作用, 但是中性粒细胞凋亡的具体机制尚不明确, 而PMN的蛋白组学改变与SAP的发生及SAP时PMN凋亡的关系具有重大的研究价值. 本研究运用非标记定量蛋白组学技术来分析SAP大鼠外周血PMN的蛋白组学的变化, 旨在寻找与SAP时外周血PMN凋亡延迟相关的特异性蛋白质, 并结合临床应用生长抑素治疗时SAP患者取得的满意效果, 探讨生长抑素的诱导凋亡作用机制, 进一步证实重症急性胰腺炎的发生发展与凋亡相关蛋白质相关.

■研发前沿
已有研究报道, GRP78通过上调抗凋亡蛋白Bcl-2的水平, 降低促凋亡蛋白BAD、BAX、BAK的表达而发挥抗细胞凋亡的作用; Rho通过降低Caspases3和Caspases9的活性从而延迟了细胞的凋亡.

1 材料和方法

1.1 材料 健康雄性SD大鼠20只, 清洁级, 体质量250-300 g, 由上海交通大学附属第六人民医院实验动物中心提供; 牛黄胆酸钠(美国sigma公司); 大鼠中性粒细胞分离液(LZS1091)(天津灏洋生物制品科技有限公司); 凋亡试剂盒(美国BD公司). 治疗组14例SAP患者中男7例, 女7例. 年龄30-90岁, 平均64.000岁±16.469岁. 对照组14例SAP患者中男6例, 女8例, 年龄47-89岁, 平均66.860岁±14.261岁. 全部病例诊断均符合《重症急性胰腺炎诊治指南》中的诊断及分级标准[2], 其中治疗组重症Ⅰ级6例, Ⅱ级8例; 对照组重症Ⅰ级4例, Ⅱ级10例. 临床表现为腹痛、呕吐, 伴有血、尿淀粉酶及血象增高、腹膜刺激征. CT检查: 均有胰腺肿大、坏死, 伴腹腔或胰周积液及血性腹水. 两组患者在年龄、性别、病情严重程度等方面比较差异无统计学意义.

1.2 方法

1.2.1 健康SD大鼠60只随机分为两组: 急性坏死性胰腺炎(ANP)组30只和假手术(sham-operated, SO)组30只, 每组在术后3、6、12 h时间点随机处死10只. ANP组模型的制作参照Banerjee[3]方法加以改进, SO组开腹, 仅翻动胰腺, 再关腹. 抽取下腔静脉血作中性粒细胞分离, percoll密度梯度离心法分离PMN, 流式细胞仪检测中性粒细

■创新盘点
本研究通过分析总结GRP78与RhoGTPases可能的抗凋亡机制, 并结合临床使用生长抑素可能的作用机制, 进一步证实重症急性胰腺炎与凋亡蛋白质有关.

表 1 各组大鼠PMN凋亡率的变化 (n = 10, mean ± SD, %)

分组	3 h	6 h	12 h
假手术组	6.56 ± 0.62	6.67 ± 0.76	6.37 ± 1.01
急性坏死性胰腺炎组	4.51 ± 0.69[a]	3.30 ± 0.59[ac]	2.15 ± 0.45[ace]

[a]P<0.05 *vs* 假手术组各时间点组; [c]P<0.05 *vs* 3 h; [e]P<0.05 *vs* 6 h.

表 2 各组胰腺组织病理学评分 (n = 10, mean ± SD)

分组	3 h	6 h	12 h
假手术组	0.10 ± 0.32	0.20 ± 0.42	0.10 ± 0.32
急性坏死性胰腺炎组	6.40 ± 1.35[a]	8.30 ± 1.34[ac]	10.70 ± 1.95[ace]

[a]P<0.05 *vs* 假手术组各时间点组; [c]P<0.05 *vs* 3 h; [e]P<0.05 *vs* 6 h.

胞凋亡指数, 切取胰腺标本组织, 病理切片HE染色, 由资深病理科医师盲法对胰腺病理切片进行观察并结合Schmids[4]法和Rongione[5]法对胰腺组织进行病理评分. 运用非标记定量蛋白组学技术对两组大鼠术后12 h的PMN进行蛋白组学的分析.

1.2.2 观察生长抑素治疗SAP患者的临床疗效: 患者入院后立即给予卧床休息、禁饮禁食, 持续胃肠减压, 补液, 纠正水电解质酸碱失衡等治疗, 用质子泵抑制剂奥美拉唑抑制胃酸分泌; 对有胸腹水或一般情况较差者, 予输新鲜血、血浆或蛋白质. 所有SAP患者均及早应用强有效的光谱抗生素; 对有胆总管结石者及时行内镜下乳头肌切开术(endoscopic sphincterotomy, EST)或手术治疗. 生长抑素应用: 对照组SAP患者不应用; 治疗组SAP患者入院即予以生长抑素6 mg加入输液中24 h维持. 待腹痛、腹胀改善, 血尿淀粉酶恢复正常, 可减量至3 mg, 24 h维持. 一般应用7-14 d. 分析凋亡相关蛋白质的抗凋亡机制及生长抑素在治疗SAP中的诱导凋亡作用, 进一步推断重症胰腺炎的发生发展是否与凋亡相关蛋白质有关.

1.2.3 观察指标: 检测中性粒细胞凋亡指数, 非标记定量蛋白质组学技术分析大鼠中性粒细胞蛋白质组学变化. 观察并记录患者的腹部症状体征, 尤其是腹痛情况. 患者在入院后3 d, 每天进行血常规、血尿淀粉酶和电解质的检查, 定期复查C反应蛋白、B超[6], 必要时可行腹部CT检查. 同时观察患者的急性呼吸窘迫综合症、腹痛持续时间、急性肾衰竭、弥散性血管内凝血、多器官功能衰竭、消化道出血、脓肿、胰腺囊肿等并发症的发生率和患者死亡率[7]. 光镜下胰腺组织病理学改变: 常规制作病理HE切片, 方法按临床病理学切片检查方法进行, 观察各组胰腺组织病变程度.

统计学处理 应用SPSS13.0软件进行统计学处理, 计数资料以率表示, 计量资料以mean ±SD表示, 组内和组间比较采用t检验和χ^2检验. P<0.05为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 各组大鼠不同时间外周血PMN凋亡率的变化 随着时间推移, ANP组大鼠的凋亡率逐渐降低, 至12 h达到最低(2.15%±0.45%), 与SO组各个时间段(3、6、12 h)两两比较差异有统计学意义(P<0.01, 表1, 图1).

2.2 胰腺组织变化 肉眼大体: SO组胰腺组织无明显变化, 腹腔内未见异常; ANP组不同时间点的大鼠, 腹腔内可见不同程度的血性腹水, 胰腺上有坏死灶, 腹腔脏器发生黏连, 肠系膜、大网膜上可见大量的皂化斑.

光镜下, SO组大鼠的胰腺组织无明显变化; ANP组不同时间点的大鼠, 胰腺组织可见不同程度的胰腺腺泡水肿、组织坏死, 中性粒细胞、淋巴细胞等炎症细胞浸润以及出血坏死病灶形成, 且随着时间的延长病变逐渐加重(图2). ANP组各时间点的胰腺组织病理学评分均较SO组高(P<0.05, 表2).

2.3 临床观察并记录所得的结果 治疗组患者的平均腹痛持续时间、淀粉酶恢复时间及平均住院天数明显短于对照组患者, 两组比较差异有统计学意义(P<0.05); 治疗组患者的并发症发生率、转手术率和死亡率明显低于对照组患者, 两组比较差异有统计学意义(P<0.05, 表3、表4).

2.4 应用非标记定量蛋白质组学技术对两组PMN进行蛋白定量差异分析 运用非标记定量蛋白质组学技术, 每组重复3次实验, ANP组、SO组样品的总离子流图谱及两组样品3次重复的质谱二维化图谱见图3-4, 我们得到513种含有定量信息的蛋白质. 采用随机配对t检验筛选出320种具有统计学意义(P<0.05)的差异蛋白质, 在ANP组大鼠PMN中表达上调的有219个, 下调的101个, 其中有4种蛋白质与PMN的凋亡关系密切, 包括78 kDa葡萄糖调节蛋白、RhoGT-

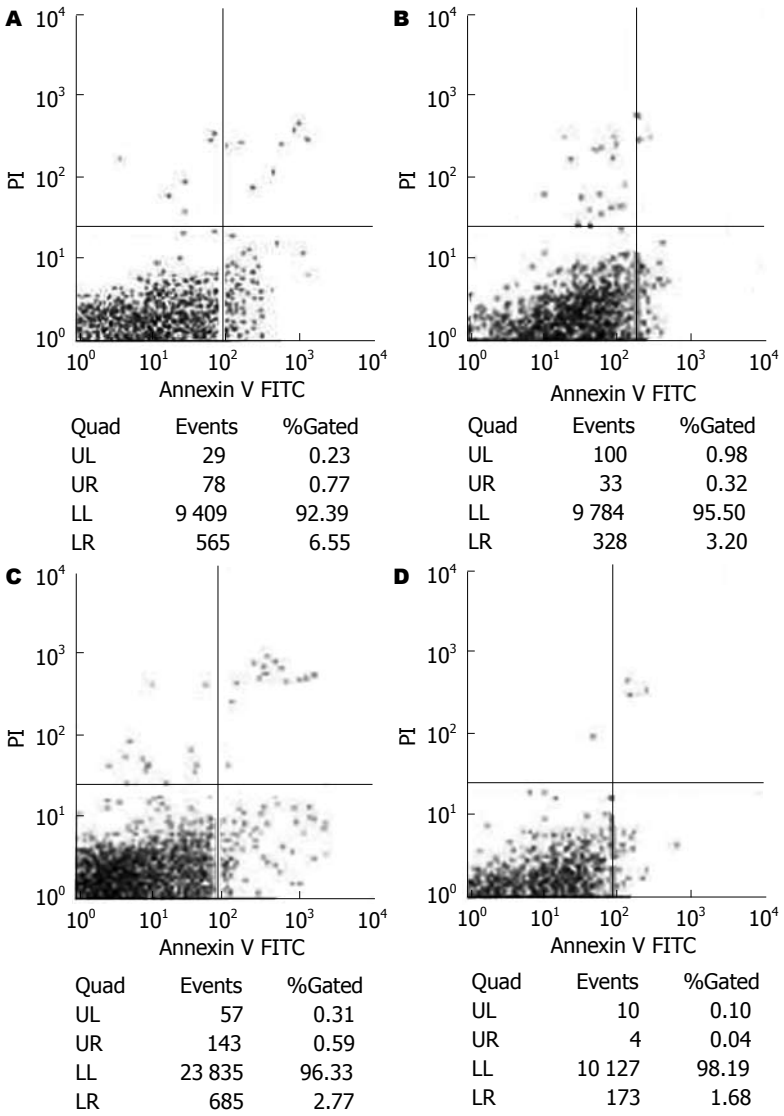


图 1 各组大鼠外周血中性粒细胞凋亡率的变化. A: 假手术组3 h; B–D: 急性坏死性胰腺炎组3, 6,12 h.

■名词解释

Label free技术: 非标记定量蛋白组学技术, 该方法适用于蛋白复杂程度不是特别高的样品的定量差异分析, 某些比较特殊的蛋白样品, 例如样品蛋白量少, 蛋白分子量较大或较小, 蛋白溶解性不良的样品, 不适宜用双向电泳技术进行分析,可以选用该方法, 常用该方法进行分析的样品包括,分离纯化的细胞器蛋白(如线粒体), 膜蛋白, 血清样品等.

Pases、L-乳酸脱氢酶A链和血红蛋白α2链, ANP组与SO组的比值分别为1.953614、3.526625、1.766764、0.609825.

3 讨论

SAP是一多因素累及多环节的疾病, 是临床上非常常见的一类急腹症, 他起病急且病情进展迅速, 而且有着复杂的临床病理变化, 在疾病的早期即可发生SIRS和MODS, 病死率高达20%-30%[8-13]. PMN凋亡异常引起功能及数量上的改变,是MODS发生发展的重要机制之一. 某些致炎细胞因子, 除了可以导致全身炎性反应外, 还可以通过抑制PMN的凋亡在SIRS、MODS中发挥着重要作用, 我们前期研究已经发现, IL-1细胞因子超家族成员IL-18可能参与了ANP大鼠外周血PMN的凋亡延迟作用[14].

本实验研究表明, ANP大鼠外周血中性粒细胞凋亡延迟, 这与李俊等[15]的研究相一致. 他们发现, 在ANP组大鼠循环中的PMN凋亡明显降低, 提示PMN的凋亡参与了急性胰腺炎的病理生理过程, 并且对急性胰腺炎的严重程度和转归有着很大的影响. 我们前期研究结果显示[8]: 生长抑素可以诱导PMN凋亡, 减轻胰腺炎的病理改变, 我们此次动物实验, 结合临床观察发现: 在常规治疗的基础上, 加用生长抑素, 患者的并发症发生率、转手术率和死亡率明显降低, 并且可以在一定程度上控制患者病情的发生、发展,明显减轻患者的临床症状. 生长抑素是否影响这些凋亡相关蛋白质的作用机制?

GRP78为内质网应激的标志蛋白[16]. 其在内质网中参与阻止内质网新生肽聚集、调节内质网钙稳态、抗内质网相关性细胞凋亡以及启动未折叠蛋白反应等细胞生命过程[17]. 目前研究认为, GRP78具有明显的抑制细胞凋亡的作用,认为其抗凋亡作用的发挥可能主要通过以下几点: (1)启动内质网应激相关性细胞凋亡; (2)抑制线

■同行评价
本文基础部分关于蛋白组学的研究有一定的新意, 通过分析总结GRP78与RhoGTPases可能的抗凋亡机制及生长抑素的可能作用机制, 将基础研究和临床研究两个部分之间连接, 文章逻辑性、条理性强.

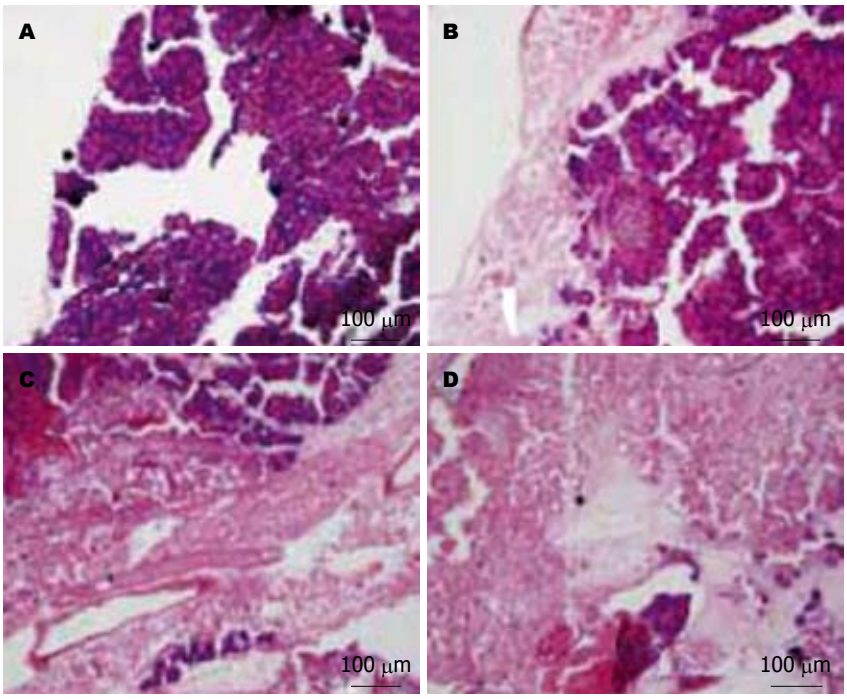


图 2 各时间点胰腺组织HE染色病理情况(×100). A: 假手术组3 h; B−D: 急性坏死性胰腺炎组3, 6,12 h.

表 3 两组患者腹痛持续时间、淀粉酶时间和平均住院天数比较 (d, mean ± SD)

分组	腹痛持续时间	淀粉酶恢复时间	平均住院天数
治疗组	4.43 ± 1.697	11.93 ± 5.771	18.43 ± 5.639
对照组	7.86 ± 2.179	19.57 ± 5.316	28.36 ± 5.638
*P*值	*P*<0.05	*P*<0.05	*P*<0.05

表 4 两组患者并发症发生率、转手术率和死亡率比较 *n* = 14 *n*(%)

分组	并发症	转手术	死亡
治疗组	3(21.4)	1(7.1)	1(7.1)
对照组	9(64.3)	6(42.9)	6(42.9)
*P*值	*P*<0.05	*P*<0.05	*P*<0.05

粒体通路介导的细胞凋亡. 随后Lin等[18]发现, 内质网应激时GRP78通过抑制内质网介导的线粒体释放的细胞色素C、凋亡诱导因子AIF来发挥抑制细胞凋亡的作用; (3)上调抗凋亡蛋白Bcl-2的水平, 降低促凋亡蛋白BAD、BAX、BAK的表达而发挥抗细胞凋亡的作用[19]. 内质网应激时, 导致GRP78的高表达, 升高的GRP78进一步缓解内质网应激,从而缓解细胞的凋亡[20].

RhoGTPases是一类小GTPases, 属于Ras超家族中的成员, 他是以无活性的结合GDP和有活性的结合GTP的方式发挥其重要的分子开关作用[21]. Barberan等[22]发现, Rho可以降低Caspases3和Caspases9的活性从而延迟了细胞的凋亡. 同时有的学者研究表明, Rac1能激活还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶使氧自由基产生增加,抑制细胞的凋亡[23], 他还可以通过磷脂酰肌醇3-激活酶/Akt途径来抑制细胞凋亡[24], 有研究表明ANP发生后, 肝细胞的凋亡与NF-κB的表达呈正相关[25], 外周血中性粒细胞细胞核的NF-κB的活化可能与ANP的凋亡延迟有关[26], 而Rho的效应物RTKN可以活化Rho/RTKN/NF-κB途径促进抗凋亡基因cIAP-2、BCL-XL、A1、和A20的表达从而抑制细胞的凋亡[27,28]. 总之, 根据近年来研究发现, RhoGTPases通过多种途径抑制了细胞的凋亡.

近年来有学者研究表明, 生长抑素治疗急性坏死性胰腺炎的机制之一可能是诱导损伤的胰腺细胞凋亡以减轻炎症反应, 细胞凋亡机制可能与生长抑素抑制Bcl-2的表达有关[29]; 生长抑素也可能是通过上调Caspase-3的表达来促进胰腺细胞凋亡, 减轻胰腺组织病理损伤[30]. 又有学者研究表明, 生长抑素通过改善中性粒细胞凋亡, 对重症胰腺炎有治疗作用[31]. 由此看出, 凋亡相关蛋白质可能参与了重症胰腺炎时的发生发展, 而生长抑素可能参与了抑制这些凋亡相关蛋白的抗凋亡作用, 从而促进细胞凋亡, 减轻重症胰腺炎对机体的损伤. 总之, 本次实验我们发现葡萄糖蛋白78与RhoGTPases等与凋亡相关的蛋白质, 为我们进一步研究明确SAP时中性粒细胞凋亡延迟的具体机制提供了方向, 并可以通

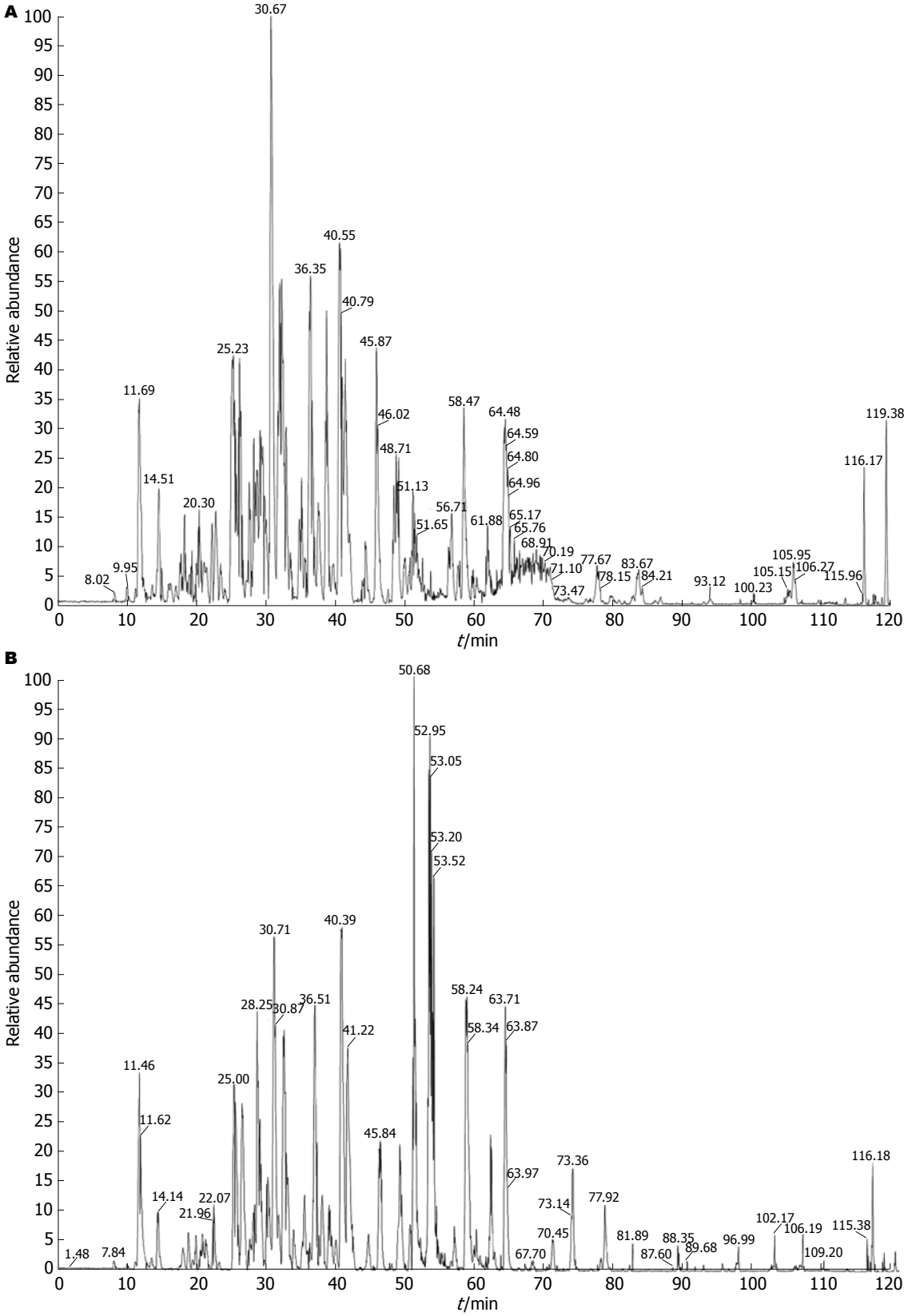


图 3 假手术组(A)和急性坏死性胰腺炎组(B)总离子流谱图.

过诱导或促进PMN的凋亡, 减轻中性粒细胞相关的组织损害及阻止病情的进展, 为治疗重症急性胰腺炎开辟新的思路.

虽然生长抑素治疗急性胰腺炎的机制比较复杂, 多种炎症因子都会因为生长抑素的给药而降低, 但是随着急性胰腺炎时胰腺细胞及中性粒

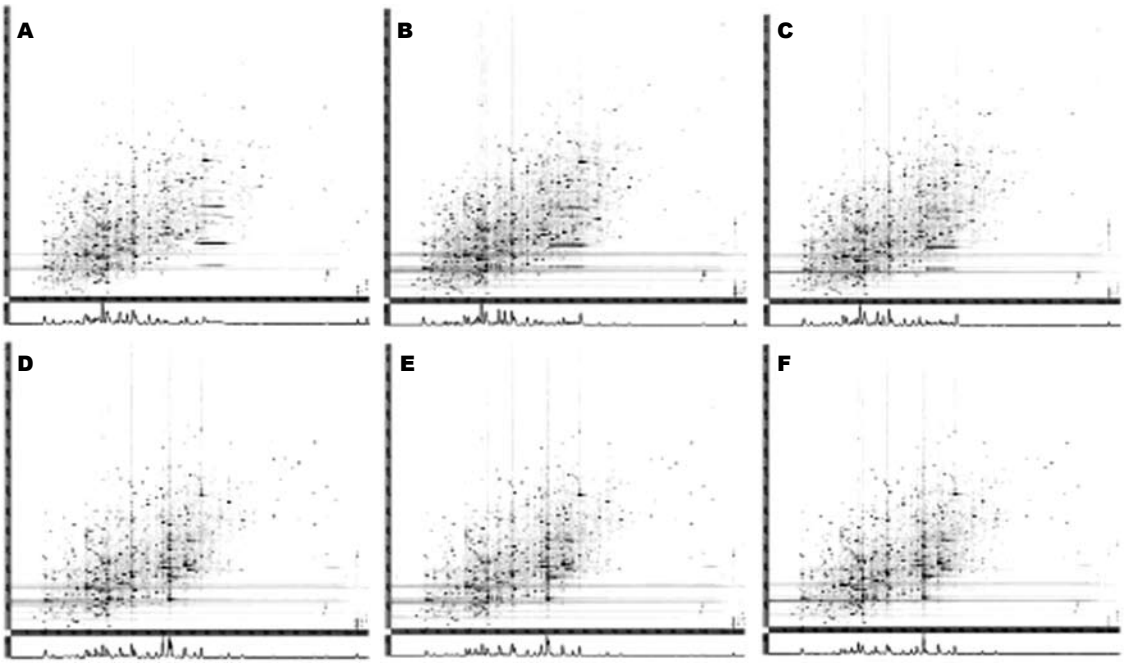


图 4 两组样品3次重复的质谱二维化图谱. A−C: 假手术组; D−F: 急性坏死性胰腺炎组.

细胞凋亡的深入研究, 将为生长抑素治疗急性胰腺炎的作用机制研究开辟一条新的途径, 从而为设计合成亲和力高、稳定性好、对胰腺有高选择性的新型生长抑素类似物提供有益帮助.

4 参考文献

1 Gravante G, Garcea G, Ong SL, Metcalfe MS, Berry DP, Lloyd DM, Dennison AR. Prediction of mortality in acute pancreatitis: a systematic review of the published evidence. *Pancreatology* 2009; 9: 601-614

2 中华医学会外科学胰腺外科学组. 重症急性胰腺炎诊治指南. 中华外科杂志 2007; 45: 727-729

3 Banerjee AK, Galloway SW, Kingsnorth AN. Experimental models of acute pancreatitis. *Br J Surg* 1994; 81: 1096-1103

4 Schmidt J, Rattner DW, Lewandrowski K, Compton CC, Mandavilli U, Knoefel WT, Warshaw AL. A better model of acute pancreatitis for evaluating therapy. *Ann Surg* 1992; 215: 44-56

5 Rongione AJ, Kusske AM, Kwan K, Ashley SW, Reber HA, McFadden DW. Interleukin 10 reduces the severity of acute pancreatitis in rats. *Gastroenterology* 1997; 112: 960-967

6 王平瑜, 常华, 姚立东, 白雪峰, 赵应灿. 重症急性胰腺炎的手术方法探讨. 中华现代中西医杂志 2004; 2: 105-108

7 周振华, 于喜法, 周林太. 重症急性胰腺炎早期包块的诊治(附26例报告). 中国医师杂志 2004; 6: 12-13

8 许兰涛, 唐承薇. 猕猴肠缺血再灌注后生长抑素含量与中性粒细胞寿命的相关性探讨. 中华医学杂志 2006; 12: 832-836

9 Sharif S, Broman M, Babcock T, Ong E, Jho D, Rudnicki M, Helton WS, Espat NJ. A priori dietary omega-3 lipid supplementation results in local pancreatic macrophage and pulmonary inflammatory response attenuation in a model of experimental acute edematous pancreatitis (AEP). *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2006; 30: 271-276

10 Chan YC, Leung PS. Acute pancreatitis: animal models and recent advances in basic research. *Pancreas* 2007; 34: 1-14

11 Sun B, Dong CG, Wang G, Jiang HC, Meng QH, Li J, Liu J, Wu LF. [Analysis of fatal risk factors for severe acute pancreatitis: a report of 141 cases]. *Zhonghua Waike Zazhi* 2007; 45: 1619-1622

12 Zhao YF, Zhai WL, Zhang SJ, Chen XP. Protection effect of triptolide to liver injury in rats with severe acute pancreatitis. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2005; 4: 604-608

13 Sekimoto M, Takada T, Kawarada Y, Hirata K, Mayumi T, Yoshida M, Hirota M, Kimura Y, Takeda K, Isaji S, Koizumi M, Otsuki M, Matsuno S. JPN Guidelines for the management of acute pancreatitis: epidemiology, etiology, natural history, and outcome predictors in acute pancreatitis. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2006; 13: 10-24

14 吴彦彦, 许兰涛. 白介素-18在急性胰腺炎大鼠中性粒细胞凋亡中的作用. 世界华人消化杂志 2012; 20: 140-144

15 李俊, 刘震, 李晓东, 陈玉祥, 张跃天, 黄卫. 外周血中性粒细胞凋亡与急性胰腺炎的关系探讨. 四川医学 2009; 30: 301-303

16 Lee AS. The ER chaperone and signaling regulator GRP78/BiP as a monitor of endoplasmic reticulum stress. *Methods* 2005; 35: 373-381

17 吴逸园, 杨业鹏, 李载全. 葡萄糖调节蛋白78的研究进展. 生理科学进展 2009; 2: 40-41

18 Lin JH, Li H, Yasumura D, Cohen HR, Zhang C, Panning B, Shokat KM, Lavail MM, Walter P. IRE1 signaling affects cell fate during the unfolded protein response. *Science* 2007; 318: 944-949

19 Misra UK, Pizzo SV. Ligation of cell surface GRP78 with antibody directed against the COOH-terminal domain of GRP78 suppresses Ras/MAPK and PI 3-kinase/AKT signaling while promoting caspase activation in human prostate cancer cells. *Cancer Biol Ther* 2010; 9: 142-152

20 Pan YX, Ren AJ, Zheng J, Rong WF, Chen H, Yan

XH, Wu C, Yuan WJ, Lin L. Delayed cytoprotection induced by hypoxic preconditioning in cultured neonatal rat cardiomyocytes: role of GRP78. *Life Sci* 2007; 81: 1042-1049
21 Lezoualc'h F, Métrich M, Hmitou I, Duquesnes N, Morel E. Small GTP-binding proteins and their regulators in cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* 2008; 44: 623-632
22 Barberan S, McNair K, Iqbal K, Smith NC, Prendergast GC, Stone TW, Cobb SR, Morris BJ. Altered apoptotic responses in neurons lacking RhoB GTPase. *Eur J Neurosci* 2011; 34: 1737-1746
23 郑红, 张学光. GTPase在肝癌细胞系中的表达和意义. 中国临床医学 2004; 11: 779-780
24 Castellano E, Downward J. Role of RAS in the regulation of PI 3-kinase. *Curr Top Microbiol Immunol* 2010; 346: 143-169
25 崔凝, 罗和生. 急性胰腺炎104例腹痛临床特点分析. 中国实用内科杂志 2011; 31: 130-132
26 吴彦彦, 许兰涛. 核因子-κB的活化在急性胰腺炎大鼠的中性粒细胞凋亡延迟中的作用. 中华试验外科杂志 2012; 29: 329-330
27 Liu CA, Wang MJ, Chi CW, Wu CW, Chen JY. Rho/Rhotekin-mediated NF-kappaB activation confers resistance to apoptosis. *Oncogene* 2004; 23: 8731-8742
28 Rajasekaran SA. Therapeutic potential of curcumin in gastrointestinal diseases. *World J Gastrointest Pathophysiol* 2011; 2: 1-14
29 钟荣德, 代伟, 周杰. 生长抑素对重症胰腺炎胰腺细胞凋亡的影响. 广东医学 2004; 25: 138-140
30 方中平, 何若冲. 生长抑素联合生长激素对重症急性胰腺炎胰腺细胞凋亡的影响. 中国医疗前沿 2010; 5: 22-23
31 方力争, 方强, 林玲, 王莹. 生长抑素及生长激素对重症急性胰腺炎外周血中性粒细胞凋亡的干预作用. 中华急诊医学杂志 2005; 14: 316-318

编辑 翟欢欢 电编 鲁亚静

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》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)

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2012年12月28日; 20(36): 3678-3682
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

基础研究 BASIC RESEARCH

红花注射液对溃疡性结肠炎大鼠IL-4和IL-1β表达的影响

原 皓, 赵雪曼, 原子英, 王鹤鸣, 赵文花

■背景资料
溃疡性结肠炎(UC)是一种慢性炎症性肠病，往往需终生服药治疗，传统治疗药物疗效好但不良反应大，因此寻找不良反应小的治疗药物是研究的热点之一. UC病变处除炎症外，还存在淤血，微循环破坏、障碍，红花注射液能改善微循环并有抗炎作用，推测对UC应有治疗作用.

■同行评议者
张志坚，教授，福州总医院消化内科

原皓, 潍坊医学院临床学院 山东省潍坊市 261000
赵雪曼, 王鹤鸣, 潍坊医学院附属医院消化内科 山东省潍坊市 261000
原子英, 青岛大学医学院 山东省青岛市 266021
赵文花, 德州市中医院内分泌科 山东省德州市 253000
原皓, 副教授, 主要从事消化系疾病的诊断治疗.
作者贡献分布: 此课题由原皓设计; 研究过程由赵雪曼、原子英、王鹤鸣及赵文花共同完成; 数据分析由赵雪曼完成; 本论文写作由原皓与赵雪曼完成.
通讯作者: 原皓, 副教授, 261042, 山东省潍坊市胜利东街288号, 潍坊医学院临床学院. 91chuhan@163.com
电话: 0536-8068912
收稿日期: 2012-09-24 修回日期: 2012-11-16
接受日期: 2012-12-17 在线出版日期: 2012-12-28

Treatment with Carthamus Tinctorius Injection up-regulates IL-4 expression and down-regulates IL-1β expression in ulcerative colitis in rats

Hao Yuan, Xue-Man Zhao, Zi-Ying Yuan, He-Ming Wang, Wen-Hua Zhao

Hao Yuan, Clinical College of Weifang Medical University, Weifang 261000, Shandong Province, China
Xue-Man Zhao, He-Ming Wang, Department of Internal Medicine, the Affiliated Hospital of Weifang Medical College, Weifang 261000, Shandong Province, China
Zi-Ying Yuan, Medical College of Qingdao University, Qingdao 266021, Shandong Province, China
Wen-Hua Zhao, Department of Endocrinology, Chinese Medicine Hospital of Dezhou, Dezhou 253000, Shandong Province, China
Correspondence to: Hao Yuan, Associate Professor, Clinical College of Weifang Medical University, 288 East Shengli Avenue, Weifang 261042, Shandong Province, China. 91chuhan@163.com
Received: 2012-09-24 Revised: 2012-11-16
Accepted: 2012-12-17 Published online: 2012-12-28

Abstract

AIM: To investigate the therapeutic effects of Carthamus Tinctorius Injection (CTI) against ulcerative colitis (UC) induced with 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) in rats and to explore the possible mechanisms involved.

METHODS: Thirty male Wistar rats were randomly divided into a treatment group, a model group, and a normal control group (n = 10 for each group). UC was induced with TNBS in rats in both the treatment group and model group. The treatment group was additionally treated with CTI. At the end of the treatment, colonic mucosal samples were taken to calculate disease activity index (DAI) and observe gross morphology of the colon and tissue injury. Colonic mucosal pathological changes were observed by HE staining. The expression of interleukin-4 (IL-4) and IL-1β mRNAs and proteins in colon tissue was detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and immunohistochemistry (IHC).

RESULTS: Compared to the model group, the DAI and gross morphology and pathological changes in colon tissue were significantly improved in the treatment group (all $P < 0.05$). The level of IL-4 in the treatment group was significantly higher than that in the model group ($P < 0.05$), but no differences was detected between the treatment group and control group. The level of IL-1β in treatment group and model group was significantly higher than that in control group ($P < 0.05$), but the level in treatment group was significantly lower than that in model group ($P < 0.05$).

CONCLUSION: CTI treatment relieved TNBS-induced colitis in rats possibly via mechanism associated with increasing IL-4 expression and decreasing IL-1β expression.

Key Words: Ulcerative colitis; Model; Therapeutic effects; Carthamus tinctorius injection; Interleukin-1β; Interleukin-4

Yuan H, Zhao XM, Yuan ZY, Wang HM, Zhao WH. Treatment with Carthamus Tinctorius Injection up-regulates IL-4 expression and down-regulates IL-1β expression in ulcerative colitis in rats. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(36): 3678-3682

摘要

目的: 观察红花注射液(injection of carthamus tinctorius, ICT)对2,4,6-三硝基苯磺酸(2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid, TNBS)所致大鼠溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)的治疗作用，并通过观察ICT对大鼠结肠黏膜白

细胞介素-4(interleukin-4, IL-4)和白细胞介素-1β(interleukin-1β, IL-1β)蛋白及mRNA表达的影响, 初步探讨其治疗UC的作用机制.

方法: 30只Wistar大鼠随机分为实验组、模型组和对照组3组, 每组各10只, 其中实验组和模型组大鼠分别用TNBS灌肠, 以复制UC模型, 同时实验组给予ICT干预治疗. 疗程结束后, 观察疾病活动指数(disease activity index, DAI), 剖取大鼠8 cm结肠, 进行结肠大体形态评分, 将标本进行HE染色, 并进行组织学损伤评分; 采用免疫组织化学染色及RT-PCR检测结肠IL-4和IL-1β蛋白及mRNA的表达.

结果: 实验组与模型组相比, UC大鼠的DAI、结肠黏膜的大体形态及组织学损伤明显改善(均P<0.05), 实验组IL-4蛋白及mRNA的表达与正常对照组相比无显著性差异(P>0.05), 与模型组相比显著升高(P<0.05); 模型组及实验组IL-1β蛋白及mRNA的表达较正常对照组显著升高(P<0.05), 而实验组较模型组显著降低(P<0.05).

结论: ICT对TNBS法诱导的大鼠UC有治疗作用, 其机制可能是通过上调抗炎因子IL-4的释放和抑制促炎细胞因子IL-1β的表达而起作用.

关键词: 溃疡性结肠炎; 模型; 疗效; 红花注射液; 白介素1β; 白介素4

原皓, 赵雪曼, 原子英, 王鹤鸣, 赵文花. 红花注射液对溃疡性结肠炎大鼠IL-4和IL-1β表达的影响. 世界华人消化杂志 2012; 20(36): 3678-3682

http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3678.asp

0 引言

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是一种结肠慢性非特异性炎症性疾病, 病程长, 常反复发作, 病变多局限于黏膜及黏膜下层, 目前其确切发病机制尚不清楚, 可能与免疫异常, 感染及遗传等因素有关[1], 而免疫异常导致的促炎因子与抗炎因子表达失衡在其发病机制中处于重要地位[2,3]. 除此之外, 微血栓形成也是其重要的病理机制之一[4,5]. 治疗UC的传统药物虽能在一定时间内改善大多数患者的症状, 但长期使用的不良反应较大[6,7]. 因此寻找不良反应小的药物意义重大. 红花注射液(injection of carthamus tinctorius, ICT)为红花有效成分提取物, 研究表明ICT不仅具有活血化瘀的作用, 多种成分还具有抗炎作用[8], 因此推测ICT理应对UC有一定的治疗作用. 本实验旨在观察ICT对大鼠UC的疗效, 并初步探讨其作用机制.

1 材料和方法

1.1 材料 健康Wistar大鼠, 体质量200 g±10 g(山东中医药大学动物中心). 主要试剂: 2,4,6-三硝基苯磺酸(2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid, TNBS)(美国Sigma公司); ICT(亚宝药业, 批号: Z14020783); RT-PCR检测试剂盒(大连宝生物工程有限公司); 兔抗大鼠IL-1β和IL-4多克隆抗体、PV-6001超敏性免疫试剂盒、浓缩型DAB试剂盒(ZLI-9032, 北京中杉金桥生物技术公司).

1.2 方法

1.2.1 分组与造模: 将30只健康Wistar大鼠适应性饲养1 wk, 体质量达到200 g左右后随即分为3组, 每组10只. 按照文献所述[9,10], 禁食不禁水24 h后, 根据大鼠的体质量, 以50 mg/kg为标准, 计算出治疗组和模型组大鼠灌肠所需混合药液的用量, TNBS与无水乙醇以1∶1比例混匀, 将导管经肛门缓慢插入约8 cm后, 将药液注入, 并倒提大鼠30 min, 对照组大鼠则灌注等量生理盐水, 常规饲养. 造模第1-10 d, 治疗组给予ICT, 以400 mg/(kg·d)为标准, 计算UC大鼠所需药量, 将其稀释至2 mL, 注入腹膜腔, 同时对照组和模型组给予生理盐水2 mL腹腔注射.

1.2.2 标本的制备: 造模第10天, 观察各组大鼠的一般情况后, 用10%水合氯醛处死动物, 剖取距肛门7-8 cm处结肠, 剪去一部分置冷生理盐水中冲洗干净, 先放入液氮罐中, 再转移至-80 ℃冰箱备用, 剩余部分沿纵轴剖开, 用冷生理盐水洗净后置于滤纸上吸干, 放入4%多聚甲醛中固定.

1.2.3 结肠炎症的评价标准: 采用疾病活动指数(disease activity index, DAI)、结肠大体形态及组织学损伤评分来评价结肠炎症. (1)DAI评分[11,12]: 造模10 d后, 综合大鼠体质量下降百分率 (体质量不变为0分, 1-5为1分, 6-10为2分, 11-15为3分, >15为4分)、大便黏稠度(正常为0, 松散大便为2分, 腹泻为4分)和大便带血情况(正常0分, 隐血阳性为2分, 显性出血为4分)来进行积分; (2)大体形态评分[13,14], 0分: 无损伤; 1分: 局部充血、水肿, 但未出现溃疡; 2分: 有溃疡, 但没有明显炎症; 3分: 有溃疡, 仅有一处出现炎症; 4分: 可见多处溃疡及炎症, 但溃疡均<1 cm; 5分: 可见多处溃疡及炎症, 且至少有一处溃疡>1 cm; (3)组织学损伤评分[15,16], 将甲醛固定的组织用石蜡包埋、切片(厚5 μm), 行HE染色, 镜下观察, 取10个视野(×100)的平均评分: 黏膜糜烂、溃疡伴显著炎性细胞浸润计4分, 固有层覆盖单层上

■研发前沿
UC的发生主要与遗传、免疫、环境、精神等因素有关, 其中免疫因素可导致UC发病这一观点已经得到人们广泛认可, 而促炎细胞因子与抗炎细胞因子作为免疫功能的重要组成部分, 逐渐成为人们研究的热点, 研究表明, 在正常组织中, 两者长期保持动态平衡, 而这种平衡一旦被打破, 即可导致肠黏膜免疫功能紊乱, 进而引发肠道炎症.

■相关报道
研究表明, UC患者多存在微循环障碍及免疫功能紊乱, 红花注射液(ICT)作为中药红花有效成分的提取物, 在临床上广泛应用于血栓栓塞性疾病, 近几年研究表明, 其不但具有活血化瘀、消肿止痛的作用, 其多种成分还具有抗炎作用, 且不良反应较小.

■**创新盘点**
ICT在临床上广泛应用于治疗心血管及血栓栓塞性疾病, UC除炎症外还存在病变处微循环破坏、障碍, 将活血化瘀的ICT用于UC的治疗并观察其对促炎因子IL-1β及抑炎因子IL- 4表达的影响从而初步探讨其治疗机制.

表 1 各组大鼠DAI、大体形态及组织学损伤评分的测定结果 (n = 10, mean ± SD)

分组	DAI评分	大体形态评分	组织学损伤评分
治疗组	4.58 ± 0.62[ac]	2.31 ± 0.36[ac]	3.28 ± 0.61[ac]
模型组	8.02 ± 0.73[a]	5.98 ± 0.53[a]	6.52 ± 0.83[a]
对照组	0.88 ± 0.27	0.28 ± 0.17	0.63 ± 0.12

[a]P<0.05 *vs* 正常对照组; [c]P<0.05 *vs* 模型组. DAI: 疾病活动指数.

表 2 各组大鼠肠组织IL- 1β和 IL- 4的表达 (n = 10, mean ± SD, %)

分组	IL- 1β	IL- 4
治疗组	25.74 ± 1.35[ac]	39.75 ± 0.66[c]
模型组	34.51 ± 2.91[a]	18.12 ± 0.97
对照组	16.84 ± 0.92	38.65 ± 0.62[c]

[a]P<0.05 *vs* 正常对照组; [c]P<0.05 *vs* 模型组. IL: 白介素.

表 3 各组大鼠结肠组织IL-1β mRNA和IL-4 mRNA的相对表达 (n = 10, mean ± SD)

分组	IL- 1β mRNA	IL- 4 mRNA
治疗组	3.21 ± 0.57[ac]	0.698 ± 0.48[c]
模型组	8.32 ± 0.76[a]	0.013 ± 0.008
对照组	1.22 ± 0.28	0.71 ± 0.69[c]

[a]P<0.05 *vs* 正常对照组; [c]P<0.05 *vs* 模型组. IL: 白介素.

皮伴轻度炎性细胞浸润计3分, 隐窝缺损2/3计2分, 隐窝缺损1/3计1分, 正常结肠黏膜组织计0分.

1.2.4 免疫组织化学法检测IL-4和IL-1β蛋白的表达: 按试剂盒说明书所述进行染色, 光镜下可见阳性细胞的胞质和/或胞膜呈棕黄色. 染色完成后, 每张切片随机选取5个高倍镜视野, 每个视野分别计数200个细胞, 共1 000个, 之后计算阳性细胞所占比率.

1.2.5 RT-PCR检测IL-4 mRNA、IL-1β mRNA的相对表达: 从-80 ℃冰箱中取出备用组织, 提取总RNA并检测其纯度和含量, 然后用其合成cDNA, 并检测RT-PCR产物. IL-1β基因的上游引物: 5'-GCCAACAAGTGGTATTCTC-CAT-3', 下游引物: 5'-TCTTTCATCACACAG-GACAGGT-3', 产物115 bp. IL-4基因上游引物: 5'-TCACCCTGTTCTGCTTTCTCAT-3', 下游引物: 5'-GAGTCCTTTTTCTGTGACCTG-3', 产物111 bp. 扩增反应条件为: 95 ℃预变性30 s, 95 ℃ 5 s, 60 ℃ 30 s, 共40个循环, 对扩增过程进行连续荧光检测并计算Ct值. Ct值可反映DNA的拷贝数, DNA拷贝数越高, 可检测到的荧光信号循环数就越少, 所得Ct值就越小. 本实验用$2^{-\triangle\triangle Ct}$表示样品中目的基因mRNA的相对表达量, 以比较各组大鼠结肠组织中IL-4 mRNA、IL-1β mRNA的表达情况.

统计学处理 实验数据用mean±SD表示, 采用SPSS16.0软件进行统计学分析, 并对数据进行单因素方差分析(one-way ANOVA)分析. 以P<0.05为差异有统计学意义.

■**应用要点**
经现代科学研究证实, ICT除具有抑制血小板聚集、改善脑血管及冠状血管供血、增加实验动物对缺氧耐受性等作用外, 其多种成分还具有抗炎作用, 本实验说明ICT可调节抗炎因子及抑炎因子之间的平衡, 抑制炎症反应, 且其不良反应小, 将其用于治疗UC值得进一步研究.

2 结果

2.1 大鼠一般情况 造模后的大鼠于1-2 d出现大便变稀的情况, 严重者便中可见脓血, 肛周污秽, 与正常组比较, 进食明显减少, 体质量减轻, 毛干涩, 喜卧扎堆. 红花组上述症状较模型组轻.

2.2 大鼠结肠大体形态、DAI及组织学损伤评分 肉眼见治疗组和模型组UC大鼠严重者肠腔内出现血性分泌物, 轻者见肠壁明显增厚、黏膜充血水肿、糜烂及溃疡形成, 镜下见结肠黏膜出现明显的炎症细胞浸润, 两者与正常组相比, 大体形态、DAI及组织学损伤评分均明显增高(P<0.05), 而治疗组与模型组相比, 其大体形态、DAI及组织损伤评分均明显降低(P<0.05, 表1, 图1).

2.3 结肠组织IL-1β和IL-4蛋白的表达 IL-1β和IL-4均以胞质和/或胞膜呈棕黄色为阳性, 实验中可见, 模型组IL-1β蛋白的表达较高, 而对照组IL-1β蛋白的表达较弱, 治疗组IL-1β蛋白的表达仍高于对照组, 但较模型组显著降低(P<0.05, 图2A-C), 说明ICT能抑制IL-1β的表达. 正常对照组和治疗组的IL-4蛋白的表达差异不显著, 而模型组IL-4蛋白的表达较对照组显著减低(P<0.05, 表2, 图2D-F), 提示ICT能促进IL-4的表达.

2.4 结肠组织IL-1β mRNA和IL-4 mRNA的相对表达 模型组及治疗组中IL-1β mRNA的相对表达较对照组显著升高(P<0.05), 而治疗组IL-1β mRNA的相对表达较模型组显著降低(P<0.05), 提示ICT能抑制IL-1β mRNA的表达. 模型组IL-4 mRNA的表达较对照组及治疗组显著减低(P<0.05, 表3), 而治疗组与正常对照组IL-4 mRNA的表达较差异无显著性, 说明ICT促进了IL-4 mRNA的表达.

3 讨论

UC是一种局限于黏膜及黏膜下层的慢性炎症性

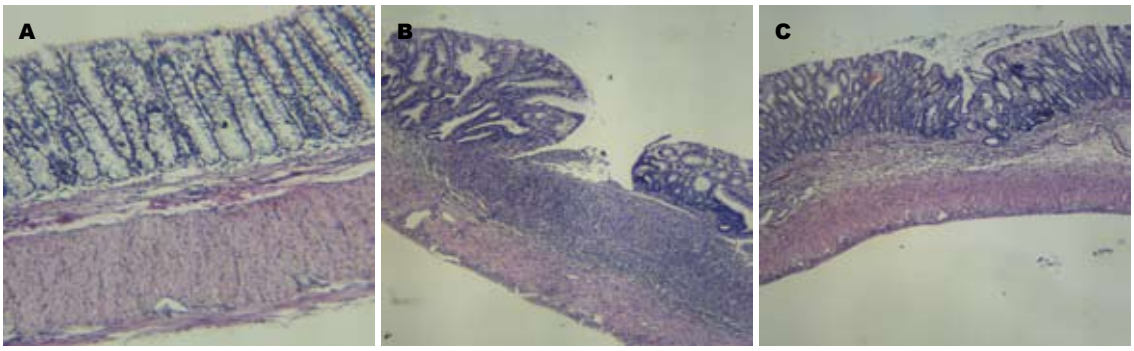


图 1 各组大鼠结肠病理组织(HE, ×40). A: 对照组; B: 模型组; C: 红花注射液治疗组.

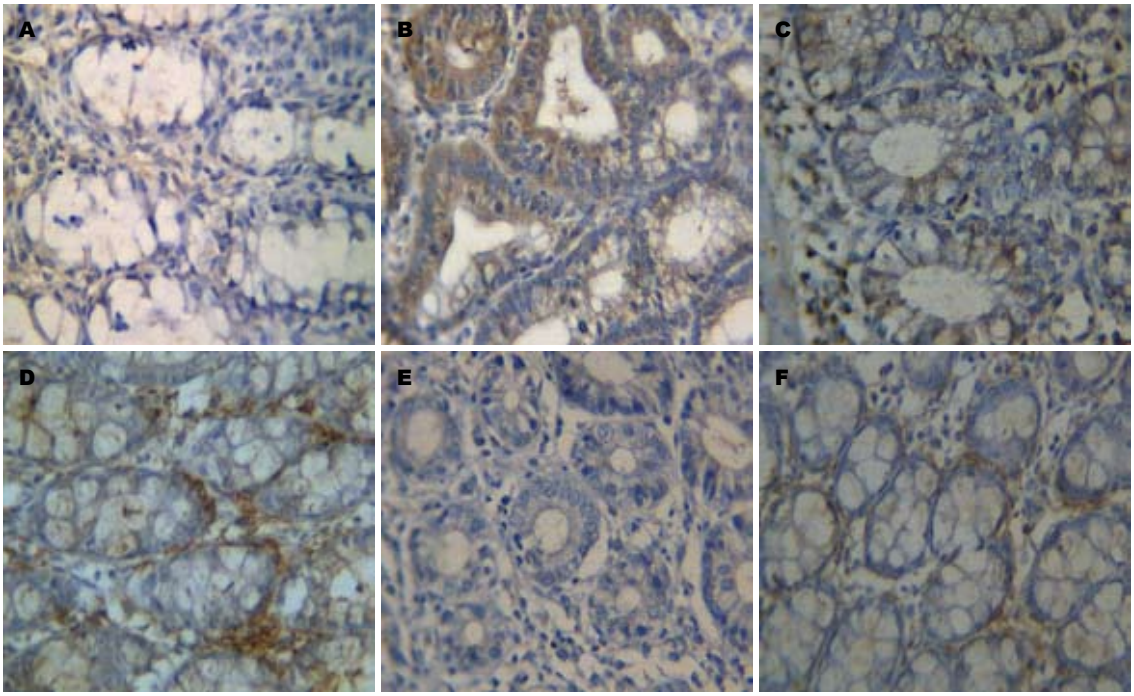


图 2 各组大鼠结肠黏膜IL-1β和IL-4的表达(PV, ×200). A−C: IL−1β; D−F: IL−4; A, D: 对照组; B, E: 模型组; C, F: 红花注射液治疗组. IL: 白介素.

■名词解释

白介素-1(IL-1): 包括IL-1α和IL-1β, 二者与相同的受体结合, 主要由单核细胞产生, 能促进免疫应答, 参与炎症反应, 促进伤口愈合, 刺激造血功能, 引起发热等. 白介素-4(IL-4): Ⅱ型辅助T细胞细胞分泌的细胞因子. IL-4的生物作用, 包括刺激活化B细胞和T细胞增殖、CD4+T细胞分化成Ⅱ型辅助T细胞, 他也在调节体液免疫和适应性免疫中起关键作用, 还是一种重要的抑炎因子.

疾病, 腹痛、腹泻、黏液脓血便是其最常见的症状, 其病因及发病机制尚不完全明确. 近几年, 促炎细胞因子与抗炎细胞因子之间的平衡失调可导致肠黏膜炎症反应这一观点已得到人们的广泛认可[17-19], 而IL-1β作为促炎细胞因子IL-1的主要活性形式备受关注. IL-1β主要由单核巨噬细胞, 中性粒细胞和内皮细胞分泌, 研究表明, IL-1β可以促进炎症细胞的活化与聚集[20,21], 并且可以通过刺激其他细胞因子、炎症介质产物的自分泌和旁分泌以上调炎症反应, 在UC黏膜炎症反应中具有极其重要的作用, 其在UC急性活动期表达明显增加[22-25], 而IL-4主要由活化的T淋巴细胞产生, 是一种重要的抑炎因子, 其在炎症性肠病患者体内分泌减少, 提示其与炎症性肠病的发生有密切关系[26], 他可以抑制单核巨噬细胞产生IL-1β和TNF-α等炎症因子[27-31], 还能下调单核巨噬细胞分泌氧自由基的能力. 炎症因子和抗炎因子的表达处于动态平衡的状态, 而这种平衡一旦被打破, 炎症反应便会随之发生.

ICT是中药红花有效成分的提取物, 因其具有活血化瘀, 消肿止痛, 改善循环的作用, 临床上广泛用于治疗心脑血管及血栓栓塞性疾病, 近些年的研究表明, 红花除具有以上作用外, 还能抑制炎症反应. 本实验中, 造模后的大鼠结肠黏膜的大体形态、DAI及组织学损伤在经ICT治疗后明显得到改善, 这表明ICT对UC确有治疗作用. 通过免疫组织化学和PCR技术发现, 模型组受累结肠组织IL-1β的表达显著升高, 而IL-4的表达较正常组显著降低, 说明病变局部促炎因子和抑炎因子失去了平衡, 这可能是结肠炎

■同行评价
本文设计基本合理, 采取的技术路线较为成熟, 研究结果可信, 结论基本客观, 能够为未来临床应用提供一定的理论依据.

症发生的原因之一, 而经过ICT治疗后, IL-4的表达明显升高, 而IL-1β的表达降低, 说明ICT能够调节炎症细胞因子与抗炎细胞因子之间的平衡从而控制炎症反应的发生, 促进炎症愈合, 这可能是ICT治疗UC的机制之一.

总之, ICT对UC有良好的治疗作用, 能够调节促炎因子IL-1β和抑炎因子IL-4的表达, 其对人类UC的疗效有待进一步研究.

4 参考文献

1 Hisamatsu T, Kanai T, Mikami Y, Yoneno K, Matsuoka K, Hibi T. Immune aspects of the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Pharmacol Ther* 2012 Oct 26. *[Epub ahead of print]*

2 Ogata H, Hibi T. Cytokine and anti-cytokine therapies for inflammatory bowel disease. *Curr Pharm Des* 2003; 9: 1107-1113

3 Kirsner JB. Historical origins of current IBD concepts. *World J Gastroenterol* 2001; 7: 175-184

4 贺国斌, 欧阳钦, 陈岱云, 李俸媛. 溃疡性结肠炎结肠组织微血栓形成的研究. 中国内镜杂志 2003; 9: 34-35, 38

5 Canero A, Parmeggiani D, Avenia N, Atelli PF, Goffredi L, Peltrini R, Madonna I, Ambrosino P, Apperti S, Apperti M. Thromboembolic tendency (TE) in IBD (Inflammatory bowel disease) patients. *Ann Ital Chir* 2012; 83: 313-317

6 夏冰, 程虹. 溃疡性结肠炎的生物治疗. 临床消化病杂志 2007; 19: 16-19

7 Martínez-Montiel MP, Muñoz-Yagüe MT. Biologic therapies for chronic inflammatory bowel disease. *Rev Esp Enferm Dig* 2006; 98: 265-291

8 王晓菲, 金鸣. 红花抗炎作用机制研究进展. 山西医药杂志 2007; 36: 51-53

9 Ha X, Yin Q, Hui L, Jia Q, Wang M, Zhang J, Xu Y, Chang Y, Yang X. Effect of oral hepatocyte growth factor gene mediated by attenuated salmonella on 2-, 4-, 6-trinitro-benzene-sulfonic-acid-induced ulcerative colitis in rat. *J Gastroenterol Hepatol* 2012; 27: 609-615

10 Dai SX, Zou Y, Feng YL, Liu HB, Zheng XB. Baicalin down-regulates the expression of macrophage migration inhibitory factor (MIF) effectively for rats with ulcerative colitis. *Phytother Res* 2012; 26: 498-504

11 Mao JW, Tang HY, Tan XY, Wang YD. Effect of Etiasa on the expression of matrix metalloproteinase-2 and tumor necrosis factor-α in a rat model of ulcerative colitis. *Mol Med Report* 2012; 6: 996-1000

12 Porter SN, Howarth GS, Butler RN. An orally administered growth factor extract derived from bovine whey suppresses breath ethane in colitic rats. *Scand J Gastroenterol* 1998; 33: 967-974

13 王炳芳, 王迎新, 王晓蕾, 姜文霞, 朱韶杰, 田培营. 己酮可可碱对大鼠溃疡性结肠炎治疗作用及其机制. 第四军医大学学报 2007; 28: 1196-1198

14 郑礼, 高振强, 王淑仙. 大鼠UC模型的实验研究. 中国药理学通报 1998; 14: 370-372

15 Dieleman LA, Palmen MJ, Akol H, Bloemena E, Peña AS, Meuwissen SG, Van Rees EP. Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS) is characterized by Th1 and Th2 cytokines. *Clin Exp Immunol* 1998; 114: 385-391

16 Tjandra K, Le T, Swain MG. Experimental colitis attenuates development of toxin-induced cholangitis in rats. *Dig Dis Sci* 2002; 47: 1216-1223

17 Matricon J. [Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease]. *Med Sci* (Paris) 2010; 26: 405-410

18 Lacruz-Guzmán D, Torres-Moreno D, Pedrero F, Romero-Cara P, García-Tercero I, Trujillo-Santos J, Conesa-Zamora P. Influence of polymorphisms and TNF and IL1β serum concentration on the infliximab response in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Eur J Clin Pharmacol* 2012 Sep 8. *[Epub ahead of print]*

19 Gologan S, Iacob R, Iancu D, Iacob S, Cotruta B, Vadan R, Catuneanu AM, Constantinescu I, Barbarii L, Gheorghe C, Diculescu M. Inflammatory gene expression profiles in Crohn's disease and ulcerative colitis: A comparative analysis using a reverse transcriptase multiplex ligation-dependent probe amplification protocol. *J Crohns Colitis* 2012 Sep 24. *[Epub ahead of print]*

20 康静静, 姚华伟, 梁宏德, 杨玉荣. 细胞因子在炎症性肠病中的作用. 细胞生物学学报 2011; 33: 204-209

21 Pope RM, Tschopp J. The role of interleukin-1 and the inflammasome in gout: implications for therapy. *Arthritis Rheum* 2007; 56: 3183-3188

22 万德惠, 徐萍. 溃疡性结肠炎患者血浆IL-1β、TGF-β1的检测及临床意义. 中国临床医药研究杂志 2005; 142: 15400-15401

23 Gotteland M, Lopez M, Muñoz C, Saez R, Altshiller H, Llorens P, Brunser O. Local and systemic liberation of pmlnflacnmatory cytokine in ulcerative colitis. *Dig Dis and Sci* 1999; 44: 830-835

24 Ashwood P, Harvey R, Verjee T, Wolstencroft R, Thompson RP, Powell JJ. Functional interactions between mucosal IL-1, IL-ra and TGF-beta 1 in ulcerative colitis. *Inflamm Res* 2004; 53: 53-59

25 黄国栋, 游宇, 黄强, 黄媛华, 何永恒, 黄道富, 肖美珍. 美珍颗粒剂配合结肠灌洗机治疗溃疡性结肠炎40例疗效观察. 中药材 2009; 32: 318

26 Nielsen OH, Køppen T, Rüdiger N, Horn T, Eriksen J, Kirman I. Involvement of interleukin-4 and -10 in inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 1996; 41: 1786-1793

27 Wang X, Jiang B, Li L, Yao H, Deng H. [Effects of total alkaloid of Sophora alopecuroides on serum IL-1beta and IL-4 expression in mice with acute ulcerative colitis]. *Zhongguo Zhongyao Zazhi* 2010; 35: 1177-1180

28 Linehan JD, Kolios G, Valatas V, Robertson DA, Westwick J. Immunomodulatory cytokines suppress epithelial nitric oxide production in inflammatory bowel disease by acting on mononuclear cells. *Free Radic Biol Med* 2005; 39: 1560-1569

29 Mora AL, Stephenson LM, Enerson B, Youn J, Keegan AD, Boothby M. New programming of IL-4 receptor signal transduction in activated T cells: Stat6 induction and Th2 differentiation mediated by IL-4Ralpha lacking cytoplasmic tyrosines. *J Immunol* 2003; 171: 1891-1900

30 Schreiber S, Heinig T, Panzer U, Reinking R, Bouchard A, Stahl PD, Raedler A. Impaired response of activated mononuclear phagocytes to interleukin 4 in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1995; 108: 21-33

31 杨幼林, 刘芳, 李宝杰, 徐洪雨, 马志斌. 白细胞介素-1β和干扰素-γ基因单核苷酸多态性与溃疡性结肠炎遗传易患性研究. 中国实用内科杂志2007; 27: 1193-1195

编辑 翟欢欢 电编 鲁亚静

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2012年12月28日; 20(36): 3683-3688
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

临床研究 CLINICAL RESEARCH

KLF6在胃癌和癌前病变中的表达及其意义

马歆花, 周英发, 郑鹏远, 于 洋, 张 庆, 张令巧

马歆花, 周英发, 郑鹏远, 于洋, 张庆, 张令巧, 郑州大学第二附属医院消化内科 河南省郑州市 450014
马歆花, 在读硕士, 主要从事消化系肿瘤的基础与临床研究.
河南省自然科学研究计划基金资助项目, No. 2011A320062
河南省医学科技攻关计划基金资助项目, No. 201203047
作者贡献分布: 此课题由周英发与马歆花设计; 标本收集由马歆花、于洋、张庆及张令巧完成; 研究过程由马歆花、于洋、张庆及张令巧操作完成; 研究所用试剂及分析工具由周英发提供; 数据分析由马歆花完成; 本论文写作由马歆花完成; 周英发与郑鹏远审阅.
通讯作者: 周英发, 副教授, 副主任医师, 450014, 河南省郑州市经八路2号, 河南省郑州大学第二附属医院消化内科.
yingfa.zhou@yahoo.com
电话: 0371-63939084
收稿日期: 2012-10-26 修回日期: 2012-12-08
接受日期: 2012-12-20 在线出版日期: 2012-12-28

Expression of KLF6 in gastric carcinoma and premalignant gastric lesions

Xin-Hua Ma, Ying-Fa Zhou, Peng-Yuan Zheng, Yang Yu, Qing Zhang, Ling-Qiao Zhang

Xin-Hua Ma, Ying-Fa Zhou, Peng-Yuan Zheng, Yang Yu, Qing Zhang, Ling-Qiao Zhang, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450014, Henan Province, China
Supported by: the Natural Sciences Research Project of Henan Province, No. 2011A320062; and the Scientific and Technological Project of Henan Province, No. 201203047
Correspondence to: Ying-Fa Zhou, Associate Professor, Associate Chief Physician, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Zhengzhou University, 2 Jingba Road, Zhengzhou 450014, Henan Province, China. yingfa.zhou@yahoo.com
Received: 2012-10-26 Revised: 2012-12-08
Accepted: 2012-12-20 Published online: 2012-12-28

Abstract

AIM: To detect the expression of the krüppel-like factor 6 (KLF6) in human gastric carcinoma and premalignant gastric lesions to investigate its role in the occurrence and development of gastric cancer.

METHODS: Fresh frozen gastric carcinoma tissues and matched tumor-adjacent normal gastric mucosa tissues were collected from 32 patients with gastric carcinoma. RT-PCR was used to analyze the expression level of KLF6 mRNA in these tissue samples. Meanwhile, the expression of KLF6 protein was detected by immunohistochemistry in 111 formalin-fixed paraffin-embedded samples, including 20 cases of normal gastric mucosa, 45 cases of intestinal metaplasia, 16 cases of dysplasia, and 30 cases of gastric carcinoma. The association of KLF6 expression with clinicopathological characteristics was analyzed.

RESULTS: The positive rate of KLF6 protein expression in normal gastric mucosa was significantly different from those in type Ⅲ intestinal metaplasia, dysplasia and gastric carcinoma (χ^2 = 6.033, 3.889, 11.092, P = 0.014, 0.049, 0.001). The positive rate of KLF6 expression in gastric carcinoma was associated with tumor differentiation and size (P = 0.009, 0.010). There was no significant difference in the expression of KLF6 mRNA between normal gastric mucosa and gastric carcinoma (P = 0.357).

CONCLUSION: Abnormal expression of KLF6 is closely related to type Ⅲ intestinal metaplasia, dysplasia, and gastric carcinoma. Detection of KLF6 expression may have certain value in the surveillance of premalignant lesions and the discovery of early gastric carcinoma.

Key Words: krüppel-like factor 6; Gastric carcinoma; Dysplasia; Intestinal metaplasia

Ma XH, Zhou YF, Zheng PY, Yu Y, Zhang Q, Zhang LQ. Expression of KLF6 in gastric carcinoma and premalignant gastric lesions. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(36): 3683-3688

摘要

目的: 探讨KLF6(krüppel-like factor 6)在胃癌和癌前病变中的表达及其意义.

方法: 收集郑州大学第二附属医院手术切除32例胃癌组织及其配对的正常胃黏膜组织新鲜标本, 采用RT-PCR检测组织中KLF6 mRNA的表达. 同期收集20例正常胃黏膜、45例肠上皮化生、16例异型增生及30例胃癌组织存档蜡块, 采用免疫组织化学SP法检测组织中KLF6蛋白的表达, 并结合临床资料进行分析.

结果: 正常胃黏膜与Ⅲ型肠上皮化生、异型

■背景资料
胃癌是消化系常见的恶性肿瘤之一. 近年来, 随着胃癌的发病率及死亡率呈上升趋势, 筛查具有持续癌变倾向的高危人群显得尤为重要. 因此探讨胃癌的发病机制, 寻找可以早期诊断的生物学指标, 是目前迫切需要解决的问题.

■同行评议者
陈光, 教授, 吉林大学第一医院消化器官外科

■研发前沿
胃癌的发生、发展受多个基因的调控，抑癌基因KLF6变异与人体多种肿瘤包括前列腺癌、肝癌的发生、发展有密切关系，在其发生过程中，常有KLF6基因的丢失、点突变、启动子甲基化等遗传学变异.

增生及胃癌组间KLF6蛋白的表达差异有统计学意义(均P<0.05); KLF6蛋白的表达与肿瘤分化程度、肿瘤大小相关，差异有统计学意义(均P<0.05). 正常胃黏膜与胃癌组织KLF6 mRNA表达差异无统计学意义(P = 0.357).

结论: KLF6蛋白的表达异常与Ⅲ型肠化、异型增生、胃癌的发生发展密切相关，其在监测癌前病变的进展及早期胃癌的发现中有一定价值.

关键词: KLF6; 胃癌; 异型增生; 肠上皮化生

马歆花, 周英发, 郑鹏远, 于洋, 张庆, 张令巧. KLF6在胃癌和癌前病变中的表达及其意义. 世界华人消化杂志 2012; 20(36): 3683–3688
http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3683.asp

0 引言

胃癌是消化系常见的恶性肿瘤，死亡率居第2位[1]，中晚期胃癌预后极差，5年生存率仅10%-20%[2]，而早期胃癌5年生存率可达90%以上[3]. 但是目前临床上首次就诊的胃癌患者中，80%左右为中晚期[4]. 造成这种状况的原因很多，其中缺乏特异、敏感的高危人群预警和早期诊断的生物学指标和方法是导致早期发现困难的关键所在. 因此，研究胃癌的变异特征，阐明胃癌多阶段演进的分子基础，为胃癌癌前高危人群预警、早期癌的诊断等提供重要分子标志有重要的意义[5,6]. *KLF*(krüppel-like factor)基因家族为哺乳类动物的转录调节因子，其正常表达与人类及动物细胞的正常分化、增殖及血管形成有着密切关系[7]. 新近研究发现，*KLF6*基因变异与人体多种肿瘤包括前列腺癌、乳腺癌、非小细胞肺癌、肝癌和结直肠癌的发生、发展有密切关系，在肿瘤的发生过程中，常常出现*KLF6*基因的丢失、点突变、启动子甲基化等遗传学变异[8-10]. 但*KLF6*基因与人胃癌癌前病变的发生、发展的关系不明确. 本课题以临床胃癌以及癌前病变患者作为研究对象，采用免疫组织化学SP法和RT-PCR检测KLF6在组织中的表达，以期分析其在肿瘤发生、发展中的作用及与肿瘤临床病理特征的相关性.

■相关报道
Reeves等研究发现*KLF6*基因位点的杂合性丢失(LOH)促进了结肠癌由黏膜内癌快速进展为浸润性癌.

1 材料和方法

1.1 材料 收集2011-10/2012-05郑州大学第二附属医院普外科和胸外科切除的胃癌手术标本64例，其中胃癌组织32例，与其对应的正常胃黏膜组织32例，取新鲜标本置于装有RNA保护液的EP管中，4 ℃过夜，而后冻存于-80 ℃超低温冰箱备用. 另同期收集郑州大学第二附属医院病理科存档蜡块111例，肠上皮化生45例，异型增生16例，胃癌30例，对照组选取正常胃黏膜组织20例，年龄在21-75岁之间，平均年龄58岁，所有标本均经病理学证实. 分期参照美国癌症联合委员会(AJCC)和国际抗癌联盟(UICC)第7版胃癌TNM分期[11].

1.2 方法

1.2.1 黏液组织化学: 蜡块4 μm切片，60 ℃烤箱烤片30 min，常规二甲苯脱蜡，梯度乙醇脱水; 蒸馏水洗片刻; 按说明书经HID-AB-PAS染色后[12]，常规梯度乙醇脱水，中性树胶封片.

1.2.2 免疫组织化学染色: 蜡块4 μm切片，60 ℃烤箱烤片30 min，常规二甲苯脱蜡，梯度乙醇脱水; 按说明书操作; 其中一抗为兔抗人KLF6多克隆抗体(美国Santa Cruz，稀释度1∶200); DAB (DAKO)显色剂显色后，镜下观察，当细胞内出现棕黄色颗粒后用蒸馏水冲洗中止反应; 自来水充分冲洗; 苏木素复染，1%盐酸乙醇分化，水洗，氨水返蓝，梯度乙醇脱水、透明、封片. 利用结肠阳性对照片作为阳性对照，以PBS代替一抗作阴性对照.

1.2.3 RT-PCR: 按照TRIzol(Invitrogen)说明书提取新鲜组织总mRNA，测定总mRNA的纯度，浓度及完整性，取2 μL总mRNA反转录为cDNA，并用于PCR(内参为β-actin)，KLF6正向引物: 5'-CGGACGCACACAGGAGAAAA-3'，反向引物: 5'-CGGTGTGCTTTCGGAAGTG-3'; β-actin正向引物: 5'-TGGCACCCAGCACAAT-GAA-3'，反向引物: 5'-CTAAGTCATAGTCC-GCCTAGAAGCA-3'. PCR反应体系为50 μL，反应条件: 95 ℃预变性5 min、95 ℃变性30 s，60 ℃退火45 s，72 ℃延伸1 min，共32个循环，最终72 ℃延伸10 min. 用2%琼脂糖凝胶进行电泳，电泳条件为120 mV，25 min，用目的基因条带和内参β-actin条带积分A的比值作为相对值进行统计学分析.

统计学处理 用SPSS17.0软件进行统计学分析. 免疫组织化学评分参考IRS评分法[13]. 统计KLF6在不同病变胃黏膜中的表达差异用四格表χ^2检验，胃癌组织阳性表达与临床参数间的差异用Fisher精确概率法，RT-PCR结果采用定量资料t检验，结果采用mean±SD表示. 当P<0.05时认为差异有统计学意义.

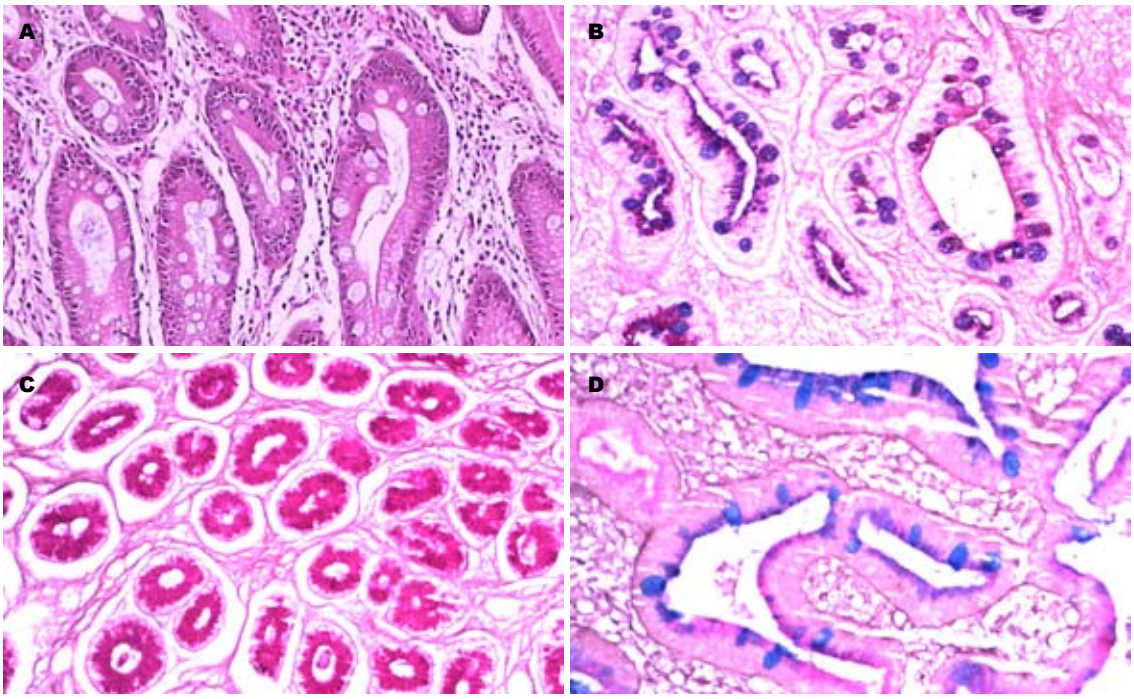


图 1 胃黏膜肠上皮化生HID-AB-PAS染色(×100). A: 肠上皮化生HE染色; B: III型肠上皮化生; C: II型肠上皮化柱状细胞; D: I型肠上皮化生.

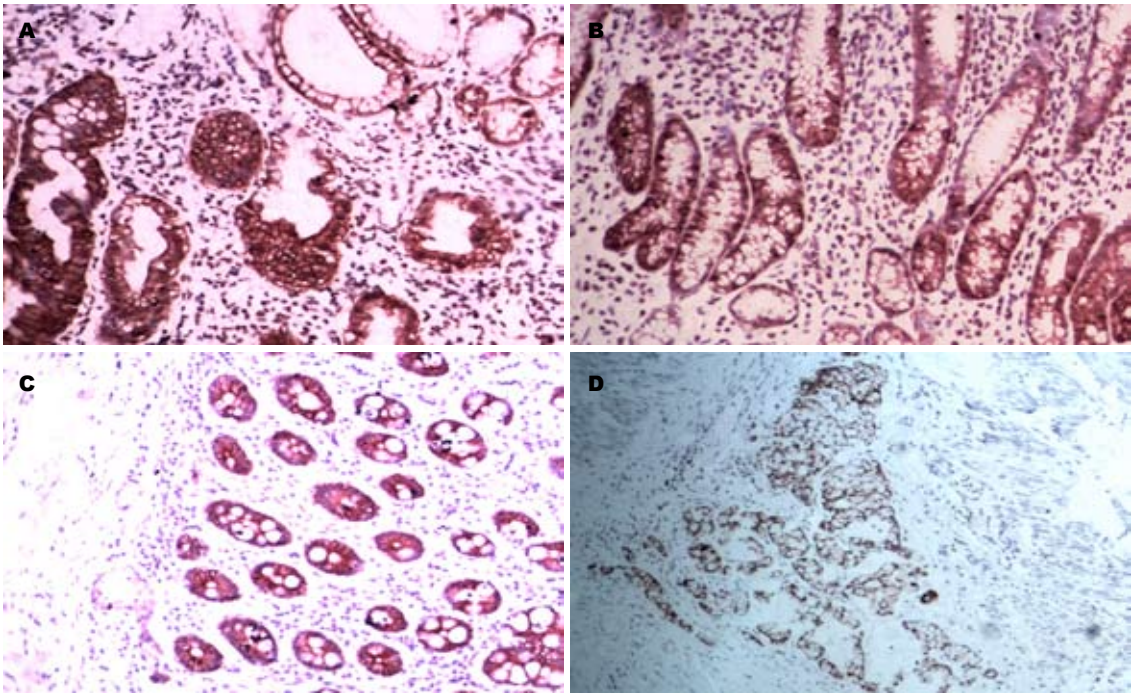


图 2 KLF6的表达(SP×100). A: 正常胃黏膜强阳性; B: 肠上皮化生阳性; C: 异型增生阳性; D: 胃癌阳性.

■**创新盘点**

本文应用免疫组织化学法与RT-PCR联合检测KLF6在胃癌及癌旁正常黏膜组织中的表达情况, 从而在蛋白水平及RNA水平上探讨其与胃癌各项临床病理参数之间的关系, 为KLF6成为预测胃癌生物学行为的重要参考指标提供理论依据.

2 结果

2.1 KLF6蛋白在正常胃黏膜、肠上皮化生及胃癌组织中的表达及其意义 肠上皮化生组织经HID-AB-PAS染色, 分为Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ型(图1). 其中Ⅲ型肠上皮化生柱状细胞分泌硫酸黏液(棕黑色); Ⅱ型肠上皮化生柱状细胞分泌中性黏液(红色); Ⅰ型肠上皮化生杯状细胞分泌唾液酸黏液(蓝色)[14]. KLF6蛋白阳性表达为细胞质和细胞膜着深棕色或棕色(图2), 其在正常胃黏膜与Ⅲ型肠上皮化生, 异型增生, 胃癌组织间表达差异有统计学意义(表1: χ^2 = 6.033, 3.889, 11.092, P = 0.014, 0.049, 0.001), 其中KLF6蛋白阳性表达与肿瘤分化程度、肿瘤大小相关, 差异有统计学意义(P = 0.009, 0.010), 而与性别、年龄、部

■应用要点
本文证实了KLF6在胃癌及癌前病变的表达变化可以为胃癌的早期诊断提供重要参考, 为胃癌早期发现、早期诊断提供重要依据.

表 1 KLF6蛋白在不同病变胃黏膜中的表达 (IHC)

组织类型	*n*	阳性数	阴性数	χ^2	*P*值
正常胃黏膜	20	18	2		
肠上皮化生					
I、II型肠化	30	22	8	2.803	0.149
III型肠化	15	8	7	6.033	0.014
异型增生	16	10	6	3.889	0.049
胃癌	30	13	17	11.092	0.001

表 2 KLF6蛋白表达与胃癌临床参数的关系 (*n* = 30)

临床参数	*n*	KLF6		*P*值
		阳性	阴性	
性别				
男	21	10	11	0.691
女	9	3	6	
年龄(岁)				
≥45	11	6	5	0.454
<45	19	7	12	
部位				
胃窦	15	6	9	1.000
胃底体	15	7	8	
浸润程度				
TI,T2	19	9	10	0.708
T3,T4	11	4	7	
分化程度				
高, 中	14	10	4	0.009
低	16	3	13	
组织学分型				
肠型	15	8	7	0.462
弥漫型	15	5	10	
区域淋巴结转移				
有	17	7	10	1.000
无	13	6	7	
肿瘤大小(cm)				
≥5	23	7	16	0.010
<5	7	6	1	

位、浸润程度、组织类型(胃癌组织学分型参照Lauren分型[15])、区域淋巴结转移无关(表2). 其幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)感染率因原始资料不全未行统计.

2.2 KLF6 mRNA在正常胃黏膜和胃癌组织中的表达及其意义 RT-PCR检测结果显示(图3), 在正常胃黏膜组织和胃癌中KLF6 mRNA表达水平分别为0.64±0.44和0.58±0.21, 其表达差异无统计学意义($P = 0.357$).

3 讨论

胃癌的发病有明显的地区差异和家族聚居现象,

图 3 KLF6 mRNA在正常组织和胃癌组织中的表达. n: 正常胃黏膜; t: 胃癌.

提示遗传和环境致癌因素在胃癌的发病中皆起着重要作用[16]. 胃癌的发生、发展是多因素、多阶段的综合发展过程[17,18]. 对于分化型胃癌, 其病理发生过程, 即萎缩性胃炎-肠化-异型增生-胃癌[19], 已为人们所公认, 但其详细病理过程及其分子机制仍不明确[20]. 例如对于肠化生, 究竟何种类型的肠化生更具癌变倾向, 目前仍存在争议. 以往研究提示不同类型肠化生与胃癌的关系不同, 发现柱状细胞分泌大量硫酸黏液的不完全型肠化生(III型肠上皮化生)与胃癌关系更密切[21]. 对于胃黏膜肠上皮化生、不典型增生与癌的关系, 长期胃镜活检及临床随访发现具有相同病理特点的癌前病变, 部分可持续加重至恶变, 部分却减轻或逆转为正常黏膜上皮. 很显然, 单纯从形态学上很难区别具有持续癌变倾向的高危人群. 然而, 这些形态学相似的癌前病变具有不同的分子变化, 这种分子差异是导致其不同临床转归的关键[22]. 因此, 阐明胃癌及癌前病变的分子特征, 尤其是甄别导致肠化和异型增生持续向癌方向发生、发展的关键基因和蛋白, 不仅有助于揭示胃癌多阶段演进的分子机制, 更在确定胃癌癌变高危人群、早期癌的诊断和疾病进展监测时具有重要临床应用价值.

*KLF*基因家族为哺乳类动物的锌指转录调节因子, 已发现人类的*KLF*基因至少有16个亚型[23]. *KLF*基因家族的正常表达与人类及动物细胞的分化、增殖及血管形成有着密切关系. KLF6, 又称锌指转录因子9 (zine finger factor 9, ZF9)或核心转录元件结合蛋白(core promoter-element binding protein, CPBP), 定位于人类染色体10p15, 全长约7 kb, 最初是从胎盘基因表达库中筛选出来的, 被认为是一种重要的核转录调控因子, 作用于缺乏TATA盒的核心启动元件, 通过参与细胞分化、发育、生长信号的转导、细胞增殖、凋亡和血管形成等过程参与正常组织的生长发育或肿瘤的发生发展[24]. 新近研究发现, KLF6在肝癌[25]、前列腺癌[26]和结肠癌[27,28]中均起着抑癌作用. 其中, *KLF6*基因位点的杂合性丢失(LOH)促进了结肠癌由黏膜内癌快速进展为浸润性癌[29].

本研究首次发现, 胃癌及癌前病变(肠上皮化生及异型增生)组织中存在KLF6表达的异常, 与正常胃黏膜组织相比, KLF6在III型肠上皮化生, 异型增生及胃癌组织呈低表达, 提示其异常表达与胃癌发生密切相关, 在低分化组织以及>5 cm的癌组织中表达差异显著, 提示其异常表达可能与肿瘤进展相关, 这一发现提示KLF6的监测可能在胃癌的早发现、早诊断以及癌前病变的随访中, 特别是III型肠上皮化生以及异型增生的随访中, 有重要临床应用价值.

近期的功能性研究发现KLF6主要通过非P53依赖途径上调P21WAF1/CIP1从而抑制细胞增殖, 以及抑制细胞周期素D1/细胞周期蛋白依赖性激酶复合物活性进而阻止细胞周期进程[30]. KLF6在癌组织中存在多种表达丢失机制, 如在前列腺癌、结直肠癌、神经胶质瘤、鼻咽癌以及肝癌中的LOH和体细胞突变机制, 在食管癌细胞系中的启动子甲基化, 在前列腺癌和卵巢癌中的选择性剪接[31,32]. 而其在胃癌发生、发展中的变异特征, 如*KLF*基因出现丢失的频率有多高、是否出现点突变和基因启动子的甲基化等, *KLF*基因在胃癌癌前病变(肠上皮化生和异型增生)、早期胃癌、进展期胃癌以及癌转移等不同疾病阶段的变异及表达规律如何, 是否可作为胃癌转移和复发的检测指标以及是否可作为化疗疗效判断的有效检测指标等, 都有待进行深入研究.

4 参考文献

1 Zhang J, Guo SB, Duan ZJ. Application of magnifying narrow-band imaging endoscopy for diagnosis of early gastric cancer and precancerous lesion. *BMC Gastroenterol* 2011; 11: 135

2 Paoletti X, Oba K, Burzykowski T, Michiels S, Ohashi Y, Pignon JP, Rougier P, Sakamoto J, Sargent D, Sasako M, Van Cutsem E, Buyse M. Benefit of adjuvant chemotherapy for resectable gastric cancer: a meta-analysis. *JAMA* 2010; 303: 1729-1737

3 Peddanna N, Holt S, Verma RS. Genetics of gastric cancer. *Anticancer Res* 1995; 15: 2055-2064

4 Layke JC, Lopez PP. Gastric cancer: diagnosis and treatment options. *Am Fam Physician* 2004; 69: 1133-1140

5 Roder DM. The epidemiology of gastric cancer. *Gastric Cancer* 2002; 5 Suppl 1: 5-11

6 Abbaszadegan MR, Moaven O, Sima HR, Ghafarzadegan K, A'rabi A, Forghani MN, Raziee HR, Mashhadinejad A, Jafarzadeh M, Esmaili-Shandiz E, Dadkhah E. p16 promoter hypermethylation: a useful serum marker for early detection of gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 2055-2060

7 Schuh R, Aicher W, Gaul U, Côté S, Preiss A, Maier D, Seifert E, Nauber U, Schröder C, Kemler R. A conserved family of nuclear proteins containing structural elements of the finger protein encoded by Krüppel, a Drosophila segmentation gene. *Cell* 1986; 47: 1025-1032

8 Ghaleb AM, Yang VW. The Pathobiology of Krüppel-like Factors in Colorectal Cancer. *Curr Colorectal Cancer Rep* 2008; 4: 59-64

9 Chen C, Hyytinen ER, Sun X, Helin HJ, Koivisto PA, Frierson HF, Vessella RL, Dong JT. Deletion, mutation, and loss of expression of KLF6 in human prostate cancer. *Am J Pathol* 2003; 162: 1349-1354

10 Ito G, Uchiyama M, Kondo M, Mori S, Usami N, Maeda O, Kawabe T, Hasegawa Y, Shimokata K, Sekido Y. Krüppel-like factor 6 is frequently down-regulated and induces apoptosis in non-small cell lung cancer cells. *Cancer Res* 2004; 64: 3838-3843

11 Washington K. 7th edition of the AJCC cancer staging manual: stomach. *Ann Surg Oncol* 2010; 17: 3077-3079

12 Shah M, Shrikhande SS. Mucin histochemistry of the upper gastrointestinal tract. *Indian J Gastroenterol* 1989; 8: 83-84

13 Kaemmerer D, Peter L, Lupp A, Schulz S, Sänger J, Baum RP, Prasad V, Hommann M. Comparing of IRS and Her2 as immunohistochemical scoring schemes in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Int J Clin Exp Pathol* 2012; 5: 187-194

14 Jass JR, Filipe MI. The mucin profiles of normal gastric mucosa, intestinal metaplasia and its variants and gastric carcinoma. *Histochem J* 1981; 13: 931-939

15 Lauren P. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. An attempt at a histo-clinical classification. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1965; 64: 31-49

16 Lin Y, Wolk A, Hakansson N, Lagergren J, Lu Y. Dietary intake of lignans and risk of esophageal and gastric adenocarcinoma: a cohort study in Sweden. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2012 Nov 28. *[Epub ahead of print]*

17 Xia HH, Wong BC, Lam SK. Chemoprevention of gastric cancer: current status. *Chin Med J* (Engl) 2003; 116: 5-10

18 Chiba T, Marusawa H, Matsumoto Y, Takai A. [Chronic inflammation and gastric cancer development]. *Nihon Rinsho* 2012; 70: 1694-1698

19 Rokkas T, Filipe MI, Sladen GE. Detection of an increased incidence of early gastric cancer in patients with intestinal metaplasia type III who are closely followed up. *Gut* 1991; 32: 1110-1113

20 Correa P. A human model of gastric carcinogenesis. *Cancer Res* 1988; 48: 3554-3560

21 Li ML, Zhang JC, Li SG, Wu WG, Rao LH, Dong P, Gu J, Lu JH, Zhang L, Ding QC, Wu XS, Mu JS, Yang JH, Zhang WJ, Chen L, Liu YB. Characteristic gene expression profiles in the progression from normal gastric epithelial cells to moderate gastric epithelial dysplasia and to gastric cancer. *Chin Med J* (Engl) 2012; 125: 1777-1783

22 Black AR, Black JD, Azizkhan-Clifford J. Sp1 and krüppel-like factor family of transcription factors in cell growth regulation and cancer. *J Cell Physiol* 2001; 188: 143-160

23 Dang DT, Pevsner J, Yang VW. The biology of the mammalian Krüppel-like family of transcription factors. *Int J Biochem Cell Biol* 2000; 32: 1103-1121

24 Kremer-Tal S, Reeves HL, Narla G, Thung SN, Schwartz M, Difeo A, Katz A, Bruix J, Bioulac-Sage P, Martignetti JA, Friedman SL. Frequent inactivation of the tumor suppressor Kruppel-like factor

■名词解释

癌前病变: 某些具有潜在癌变可能性的良性病变.

HID-AB-PAS染色法: 可区分羟基化酸性黏液、硫酸化黏液和中性黏液物质, 分别染成蓝色、棕黑色和红色, 可以将肠上皮化生分为Ⅰ型、Ⅱ型和Ⅲ型.

■同行评价
文章的科学性、创新性和可读性能较好地反映我国和国际胃肠病学临床和基础研究的先进水平.

6 (KLF6) in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2004; 40: 1047-1052
25 Narla G, Heath KE, Reeves HL, Li D, Giono LE, Kimmelman AC, Glucksman MJ, Narla J, Eng FJ, Chan AM, Ferrari AC, Martignetti JA, Friedman SL. KLF6, a candidate tumor suppressor gene mutated in prostate cancer. *Science* 2001; 294: 2563-2566
26 Reeves HL, Narla G, Ogunbiyi O, Haq AI, Katz A, Benzeno S, Hod E, Harpaz N, Goldberg S, Tal-Kremer S, Eng FJ, Arthur MJ, Martignetti JA, Friedman SL. Kruppel-like factor 6 (KLF6) is a tumor-suppressor gene frequently inactivated in colorectal cancer. *Gastroenterology* 2004; 126: 1090-1103
27 万晓娟, 宋锐锋, 陈玉龙, 徐珂, 徐峰. KLF6和WWOX蛋白在结直肠癌组织中的表达及意义. 世界华人消化杂志 2011; 19: 602-607
28 Wahab AH, Kassem AM, Matter S, El Deen AF, Helmy AS, Ismaeil MM, Zakaria MS. Role of KLF6 tumor suppressor gene mutations in the development of colorectal carcinoma in an Egyptian population. *Hepatogastroenterology* 2010; 57: 1405-1410
29 Benzeno S, Narla G, Allina J, Cheng GZ, Reeves HL, Banck MS, Odin JA, Diehl JA, Germain D, Friedman SL. Cyclin-dependent kinase inhibition by the KLF6 tumor suppressor protein through interaction with cyclin D1. *Cancer Res* 2004; 64: 3885-3891
30 Sangodkar J, Shi J, DiFeo A, Schwartz R, Bromberg R, Choudhri A, McClinch K, Hatami R, Scheer E, Kremer-Tal S, Martignetti JA, Hui A, Leung WK, Friedman SL, Narla G. Functional role of the KLF6 tumour suppressor gene in gastric cancer. *Eur J Cancer* 2009; 45: 666-676
31 Lièvre A, Landi B, Côté JF, Veyrie N, Zucman-Rossi J, Berger A, Laurent-Puig P. Absence of mutation in the putative tumor-suppressor gene KLF6 in colorectal cancers. *Oncogene* 2005; 24: 7253-7256

编辑 田滢 电编 鲁亚静

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》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)

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2012年12月28日; 20(36): 3689-3694
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

临床研究 CLINICAL RESEARCH

Th17与Foxp3$^+$Treg在胃癌患者外周血中的表达

叶 妮, 张光波, 高 楠, 黄语嫣, 钱夷婷, 李伏超, 朱一凡, 陈卫昌

叶妮, 苏州大学附属第一医院消化科 江苏省苏州市 215006
张光波, 苏州大学免疫研究所 江苏省苏州市 215006
高楠, 黄语嫣, 钱夷婷, 李伏超, 朱一凡, 陈卫昌, 苏州大学附属第一医院消化科 江苏省苏州市 215006
叶妮, 在读硕士, 主要从事胃癌免疫调节方面的研究.
国家自然科学基金资助项目, No. 81272737
江苏省医学重点实验室课题基金资助项目, No. XK201135
作者贡献分布: 此课题由叶妮、陈卫昌、高楠及张光波设计; 主要研究过程由叶妮、黄语嫣、钱夷婷、李伏超及朱一凡操作完成; 数据采集由叶妮与张光波完成; 数据分析由叶妮完成; 本论文写作由叶妮完成; 张光波与陈卫昌提出修改意见.
通讯作者: 陈卫昌, 教授, 215006, 江苏省苏州市沧浪区十梓街188号, 苏州大学附属第一医院消化科. weichangchen@126.com
收稿日期: 2012-11-01 修回日期: 2012-12-12
接受日期: 2012-12-20 在线出版日期: 2012-12-28

Clinical significance of number of Th17 and Foxp3$^+$Treg cells in peripheral blood of patients with gastric cancer

Ni Ye, Guang-Bo Zhang, Nan Gao, Yu-Yan Huang, Yi-Ting Qian, Fu-Chao Li, Yi-Fan Zhu, Wei-Chang Chen

Ni Ye, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215006, Jiangsu Province, China
Guang-Bo Zhang, Institute of Immunology, Soochow University, Suzhou 215000, Jiangsu Province, China
Nan Gao, Yu-Yan Huang, Yi-Ting Qian, Fu-Chao Li, Yi-Fan Zhu, Wei-Chang Chen, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215006, Jiangsu Province, China
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 81272737; the Fund of Medical Key Laboratory of Jiangsu Province, No. XK201135
Correspondence to: Wei-Chang Chen, Professor, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Soochow University, 188 Shizi Avenue, Suzhou 215006, Jiangsu Province, China. weichangchen@126.com
Received: 2012-11-01 Revised: 2012-12-12
Accepted: 2012-12-20 Published online: 2012-12-28

Abstract

AIM: To analyze the clinical significance of the number of Th17 and CD4$^+$CD25$^+$Foxp3$^+$Treg cells in peripheral blood of patients with gastric carcinoma.

METHODS: Peripheral blood samples were collected from patients with gastric cancer (n = 77) and healthy volunteers (n = 20) and used to separate PBMCs. The number of CD4$^+$CD25$^+$Foxp3$^+$Treg was determined by flow cytometry, and the number of CD4$^+$IL-17$^+$Th17 was determined after co-stimulation with PMA and ionomycin. The clinical significance of the number of Treg and Th17 cells in patients with gastric carcinoma was then analyzed.

RESULTS: The numbers of Th17 and Treg cells in peripheral blood of patients with gastric cancer were significantly higher than those in normal controls (both $P < 0.05$). The number of Treg cells, not Th17 cells, was closely related to degree of tumor infiltration, lymph node metastasis, and tumor clinical stage.

CONCLUSION: Although the numbers of both Th17 and Treg cells are significantly higher in patients with gastric cancer, only the latter is related to tumor infiltration.

Key Words: Gastric cancer; Treg; Th17; Tumor stage

Ye N, Zhang GB, Gao N, Huang YY, Qian YT, Li FC, Zhu YF, Chen WC. Clinical significance of number of Th17 and Foxp3$^+$Treg cells in peripheral blood of patients with gastric cancer. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(36): 3689-3694

摘要

目的: 研究胃癌患者外周血CD4$^+$CD25$^+$Foxp3$^+$调节性T细胞(Treg)及Th17细胞表达的临床意义.

方法: 收集胃癌患者(n = 77)与健康志愿者(n = 20)外周血并分离获取PBMC; 流式细胞术分析CD4$^+$CD25$^+$Foxp3$^+$Treg表达; PMA+Ionomycin 联合刺激后, 流式细胞术检测CD4$^+$IL-17$^+$Th17表达; 结合临床资料分析Treg及Th17表达的临床意义.

结果: 胃癌组患者外周血Th17和Treg表达均显著高于正常组(P<0.05). 进一步临床分析发现, 胃癌患者外周血中Treg细胞表达水平与胃癌临床分期、肿瘤浸润深度及淋巴结转移有关; 未见Th17与胃癌临床分期、浸润深度及淋巴结转移相关.

■背景资料
胃癌是最常见的恶性肿瘤之一, 其存在发病率逐年升高、早期症状隐匿、发现晚、预后差等特点. 因此, 胃癌的早期诊断及治疗成为近年研究的热点. 辅助性T细胞17(Th17)和调节性T细胞(Treg)调控关系的失衡在胃癌发生发展中发挥重要作用.

■同行评议者
郑鹏远, 教授, 主任医师, 副院长, 郑州大学第二附属医院消化科

■相关报道
Sasada发现肺癌、胃肠道肿瘤等多种肿瘤患者外周血$CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Treg细胞成分增加, 而另有相关研究显示Th17细胞与Treg细胞在分化与调节过程中密切相关. 然而目前对于Th17在肿瘤中的作用仍不十分明确, Wakita的一项研究表明在肿瘤微环境中, Th17似乎扮演着双重角色.

结论: 尽管两群Th细胞在胃癌患者体内显著升高, 但仅Treg与肿瘤进展相关, Th17的作用尚需进一步探讨.

关键词: 胃癌; 调节性T细胞; Th17; 肿瘤分期

叶妮, 张光波, 高楠, 黄语嫣, 钱夷婷, 李伏超, 朱一凡, 陈卫昌. Th17与$Foxp3^+$Treg在胃癌患者外周血中的表达. 世界华人消化杂志 2012; 20(36): 3689-3694
http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3689.asp

0 引言

胃癌是最常见的恶性肿瘤之一, 现有治疗方式如手术联合化疗或放化疗, 在进展期控制胃癌存在巨大困难[1,2]. 越来越多的文献报道肿瘤的发生发展与肿瘤宿主的免疫状态密切相关[3,4], 因而分析胃癌患者的免疫状态, 了解胃癌发生发展机制是寻求新的治疗策略的重要前提. 据报道, $CD4^+$辅助性T细胞可分为4种类型: Th1、Th2、Th17和调节性T细胞. 近年来, Th17及Treg成为研究者们竞相报道的热门对象, 目前已被证明, 在自身免疫性疾病、炎症性肠病及移植物抗宿主病中, 存在着Th17/Treg细胞失衡现象[5,6], 而其在肿瘤发生中的作用的相关报道有限. 本研究采用流式细胞仪分析我院77例胃癌患者及20例健康志愿者外周血Th17及Treg细胞水平, 探讨其与胃癌发生发展的关系.

1 材料和方法

1.1 材料 选取2011-10/2012-06苏州大学附属第一医院就诊胃癌患者77例(均经胃镜活检或手术病理证实), 其中男54例, 女23例, 年龄24-84岁, 平均年龄为62岁. 我院就诊的77胃癌患者中54例患者行手术治疗, 根据UICC/AJCC颁布的胃癌TNM分期标准(2010)将行手术治疗的54例胃癌患者按临床病理分期, 早期胃癌(ⅠA、ⅠB期)10例, 中晚期胃癌(ⅡA、ⅡB、ⅢA、ⅢB、Ⅳ期)44例. 健康志愿者20例, 取自健康体检者(均无心、肝、肺、肾等重要脏器疾病, 肝肾功能正常, 均无肿瘤家族史), 其中男10例, 女10例, 年龄58-79岁, 平均年龄65岁. FITC anti-human CD4、PE anti-human IL-17购自美国Biolegend公司; FITC anti-human CD4、APC anti-human CD25、PE anti-human Foxp3、PE Rat IgG2a、固定破膜剂和破膜缓冲剂购自美国eBioscience公司; FC500型流式细胞仪购自法国Beckman Coulter公司.

1.2 方法

1.2.1 淋巴细胞的提取: 所有受试对象于清晨抽取空腹外周血3 mL, EDTA抗凝, 用淋巴细胞分离液(Ficoll液)分离外周血PBMC.

1.2.2 Th17细胞检测: 配制1×10^6个/100 μL细胞悬液, 用FITC anti-human CD4/PE anti-human IL-17两色抗体对新鲜分离的单个核细胞进行标记检测. 加入PMA(1 μg/mL)0.5 μL, Ionomycin(1 μg/mL)0.5 μL, 置于37 ℃培养箱中刺激1 h, 加入BFA 2 μL, 置于37 ℃培养箱中刺激3 h, 用PBS洗涤弃上清, 加入FITC anti-human CD4抗体30 μL, 4 ℃避光孵育15 min后, 用PBS洗涤弃上清, 加入固定剂100 μL, 4 ℃避光孵育15 min, 加入破膜剂100 μL离心弃上清, 加入PE anti-human IL-17抗体5 μL, 混匀, 4 ℃避光孵育30 min, PBS洗涤弃上清后再加入PBS 300 μL, 充分混匀后用流式细胞仪检测.

1.2.3 $CD4^+CD25^+Foxp3^+$Treg细胞检测: 配制1×10^6个/100 μL细胞悬液, 用FITC anti-human CD4/APC anti-human CD25/PE anti-human Foxp3三色抗体对新鲜分离的单个核细胞进行标记检测. 加膜抗体FITC anti-human CD4、APC anti-human CD25各5 μL, 4 ℃避光孵育30 min后, 用PBS洗涤弃上清. 加入固定破膜剂1 mL, 混匀, 常温避光孵育45 min后, 加入破膜缓冲剂2 mL离心弃上清, 加入抗体PE anti-human Foxp3(同型对照PE Rat IgG2a)5 μL, 混匀, 4 ℃避光孵育45 min, 再用破膜缓冲剂2 mL, 离心弃上清, 各管加入PBS 300 μL, 充分混匀后流式细胞仪检测.

1.2.4 计算公式: Th17(%) = $(CD4^+IL17^+/CD4^+)\times100\%$; Treg(%) = $(CD4^+CD25^+Foxp3^+/CD4^+)\times100\%$.

统计学处理 测得数据采用SPSS16.0统计软件进行分析, 数据用mean±SD表示, 比较采用两独立样本t检验; 以$P<0.05$为差异具有统计学意义.

2 结果

2.1 Th17及Treg细胞在胃癌患者外周血中的表达分析 对77例胃癌患者及20例正常对照组外周血进行检测, 结果发现胃癌组外周血Th17(8.16%±3.13%)显著高于正常对照组(4.85%±1.85%)(图1); 同时, 本研究还发现, 胃癌组外周血$CD4^+CD25^+Foxp3^+$Treg细胞(4.72%±1.01%)显著高于正常对照组(1.57%±0.99%)(图2).

2.2 胃癌患者外周血Th17与Treg细胞表达的临

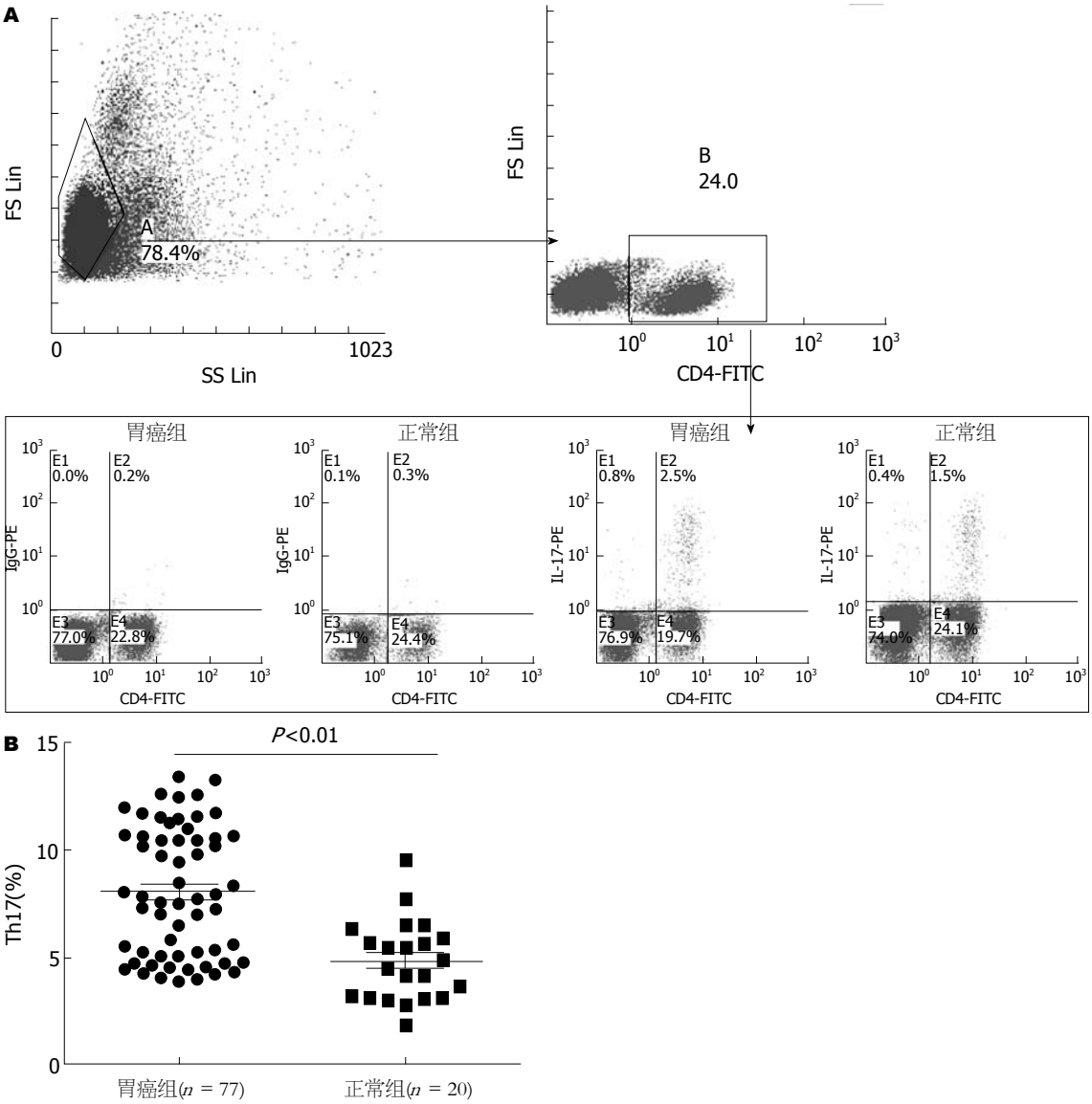


图 1 胃癌组及正常组外周血Th17表达. A: Th17细胞在胃癌组及正常组外周血中的分布图例; B: 胃癌组及正常组Th17统计分析.

■创新盘点

本实验对胃癌外周血中Foxp3+Treg及Th17表达进行研究, 尽管两群Th细胞在胃癌患者体内显著升高, 但仅Treg与肿瘤进展相关, Th17的作用尚需进一步探讨. 提示Treg细胞参与胃癌的发生发展过程, 期望为胃癌免疫治疗提供新思路.

床意义 本次实验所收77例胃癌患者中54例于我院行手术治疗(术后病理类型均为胃黏膜腺癌), 根据UICC/AJCC颁布的胃癌TNM分期标准(2010)将胃癌患者按临床病理分期, 其中早期胃癌(Ⅰa、Ⅰb期)10例, 中晚期胃癌(Ⅱ、Ⅲa、Ⅲb、Ⅳ期)44例, 发现胃癌患者外周血中$CD4^+CD25^+Foxp3^+$Treg细胞占$CD4^+$T细胞比例与胃癌临床分期、肿瘤浸润深度及淋巴结转移有关($P<0.05$), 未发现Th17与胃癌临床分期、浸润深度、淋巴结转移相关(表1).

3 讨论

肿瘤是严重威胁人类健康的常见疾病, 在我国每年恶性肿瘤患者超过160万人, 使之成为第1位致死病因. 因此, 越来越多的研究者将研究的重点放于肿瘤早期诊断与治疗中, 而免疫治疗目前已成为继手术、放化疗之后的另一种肿瘤治疗方法, 其目的是激发调动机体免疫系统, 增强肿瘤微环境抗肿瘤免疫力, 控制并杀伤肿瘤细胞. Th17及Treg细胞是当前广被研究的两种具有相反作用的淋巴细胞群, 二者之间存在复杂关系. 目前国内外陆续有相关文献报道肺癌、胃肠道肿瘤等多种肿瘤患者存在外周血$CD4^+CD25^+Foxp3^+$Treg细胞成分增加[7-9], 提示肿瘤患者可能存在天然免疫反应, 而Th17细胞与Treg细胞在分化与调节过程中密切相关. Kryczek等[10]在动物模型中发现Treg与Th17细胞比例随着肿瘤进展同步增高, 且在进展期肿瘤中达到最高水平. 既往研究表明, Th细胞亚群间具有可塑性, $Foxp3^+$调节性T细胞在IL-6及TGF-β作

■**应用要点**
本研究从疾病发生发展角度出发，对不同肿瘤分期患者外周血进行研究，发现Foxp3$^+$Treg细胞表达随着肿瘤进展而升高，从而发现Treg的消长与疾病进展有关.

表 1 胃癌患者体内Th17及Treg表达的临床意义 (mean ± SD, %)

临床特征	*n*	Th17	*P*值	CD4$^+$CD25$^+$Foxp3$^+$Treg	*P*值
肿瘤分期					
早期(Ⅰa、Ⅰb期)	10	9.32 ± 3.66	0.432	3.56 ± 0.42	0.043
中晚期(Ⅱ、Ⅲa、Ⅲb、Ⅳ期)	44	7.65 ± 2.86		5.71 ± 1.05	
肿瘤浸润深度					
T1+T2	13	10.05 ± 3.25	0.604	3.42 ± 0.21	0.042
T3+T4	41	7.20 ± 2.69		5.31 ± 0.84	
有无淋巴结转移					
无	8	10.12 ± 3.63	0.254	3.51 ± 0.28	0.048
有	46	7.33 ± 2.71		5.32 ± 0.85	

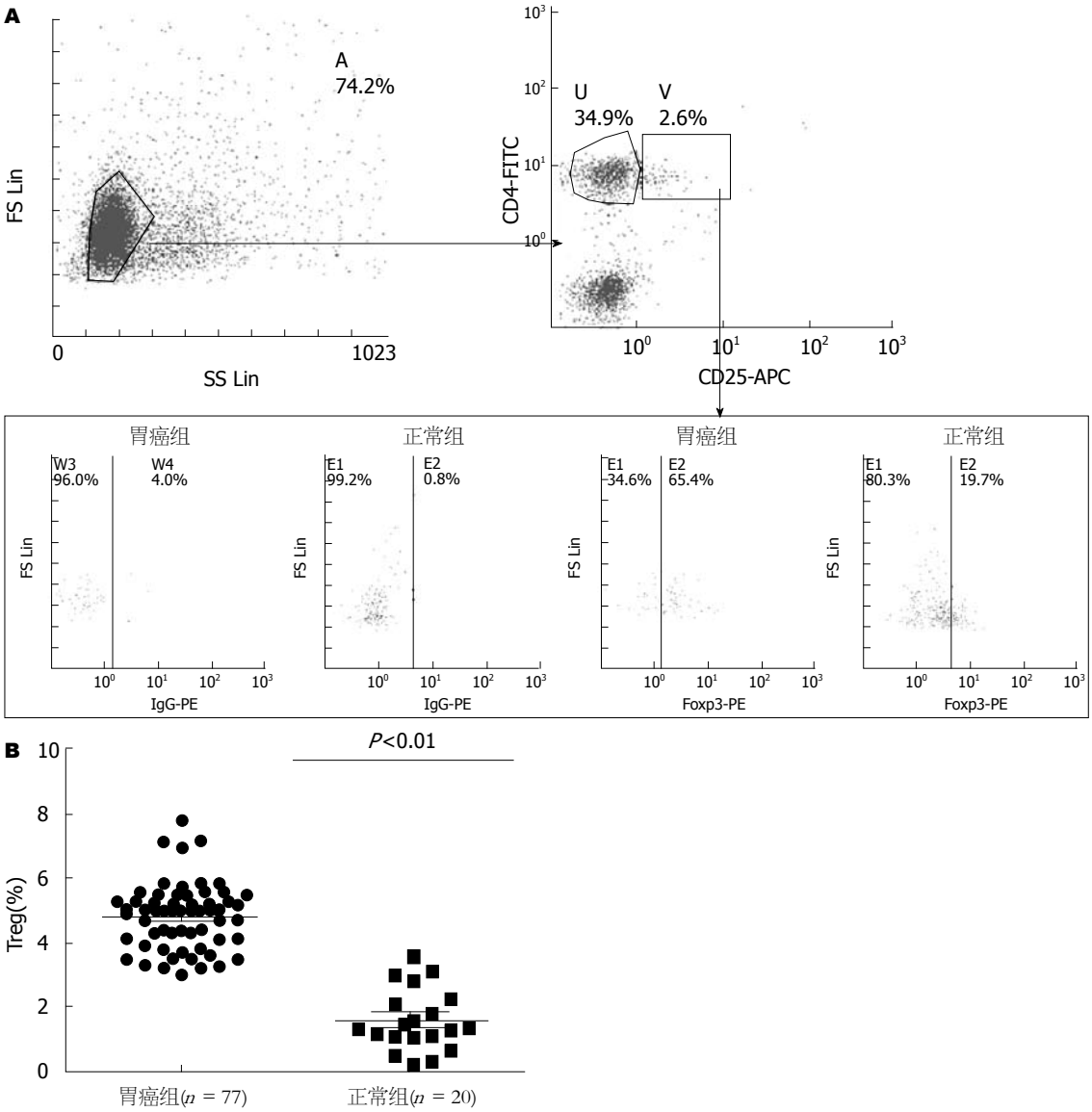


图 2 胃癌组及正常组外周血Treg细胞表达. A: Treg细胞在胃癌组及正常组外周血中的分布图例; B: 胃癌组及正常组Treg统计分析.

用下可重新编程分化为Th17样细胞，诱导初始CD4$^+$T细胞分化为Treg细胞[11-13]，Foxp3$^+$调节性T细胞亦可分化为Th17细胞[14]. 目前已证实在前列腺癌、非小细胞肺癌、卵巢癌、结肠癌、胃癌等多种恶性肿瘤患者体内中均存在Th17高水平表达[15-19].

本文研究结果显示, 胃癌患者外周血Th17及Treg细胞水平均较正常组升高, 且胃癌患者Treg/Th17比例显著高于正常对照组, 提示胃癌患者体内存在Th17/Treg细胞失衡(结果未示). 进一步分析发现, 仅胃癌患者外周血中$CD4^+CD25^+Foxp3^+$Treg细胞与胃癌临床分期、肿瘤浸润深度及淋巴结转移有关, 而Th17与胃癌临床分期、浸润深度、淋巴结转移无相关. 故我们认为相较于Th17, Treg细胞在肿瘤进展中发挥着更为重要的作用.

研究者们发现, 在肿瘤微环境中, 抗原特异性Treg细胞可诱导肿瘤特异性的局部免疫耐受, 促进肿瘤细胞的增长. 通过有效抑制效应细胞的激活或减少效应细胞到达肿瘤组织数量来抑制效应细胞活性. 研究表明, Treg细胞的抑制功能具有细胞接触依赖性[20]. 如小鼠Treg细胞被证实表达穿孔素及颗粒酶B, 一经活化可杀伤效应T细胞[21]或树突样细胞[22], 尤其是在肿瘤微环境中. Treg细胞可高水平表达CTLA-4, 为抗原提呈细胞CD80/86提供消极信号从而下调共刺激分子减少T细胞的活化[23]. 然而目前对于Th17在肿瘤中的作用仍不十分明确, TH17与肿瘤微环境中Th1细胞、$CD8^+$T细胞、NK细胞呈正相关, 而与Treg细胞负相关[24,25]. Su等[26]发现癌症患者中肿瘤浸润淋巴细胞中TH17数量明显高于非肿瘤组织TH17数量. Sfanos等[27]发现在前列腺癌中TH17水平与肿瘤进展呈负相关. 也许在Th17抗癌作用的研究中, IL-17所发挥的作用最让人困惑. Wakita等[28]的一项近期研究表明在肿瘤微环境中, IL-17似乎扮演着二重角色, 一方面其可促进肿瘤相关血管生成, 是肿瘤体内微血管数量和密度显著增加, 更有利于肿瘤生长、转移和浸润[29]; 另一方面, Th17细胞可促进抗肿瘤免疫应答, 抑制肿瘤的生长和转移[30].

调节性T细胞耗竭已成功在$Foxp3^+$转基因小鼠实验模型中试验. Treg细胞在小鼠模型中的损耗, 可诱导生成强力的抗肿瘤物质, 从而诱发肿瘤抑制反应. 然而, 在人体内, 允许选择性耗竭Treg细胞的表面抗原识别尚未实现. 同时科学家们将目光转向人类肿瘤微环境中的Th17细胞, Th17细胞的存在和功能都与减少肿瘤进展和改善病人的生存有关. 在已建立的小鼠模型中, 研究证明Th17具有强有力的抗肿瘤疗效, 而其作用可能因肿瘤不同类型、位置及肿瘤阶段而异. 故积极了解肿瘤微环境中Treg及Th17所发挥的作用, 有利于更好的了解肿瘤发生发展过程, 从而寻找治疗方案.

目前我们对于Th17/Treg细胞的产生、分化发育、病理机制及在肿瘤微环境中的相互关系的认识仍然十分有限, Th17/Treg在机体免疫组织、器官、免疫分子的复杂和功能的多样化等领域中仍有许多悬而未决的问题需要解决[31].

4 参考文献

1 Arkenau HT. Gastric cancer in the era of molecularly targeted agents: current drug development strategies. *J Cancer Res Clin Oncol* 2009; 135: 855-866

2 Wu K, Nie Y, Guo C, Chen Y, Ding J, Fan D. Molecular basis of therapeutic approaches to gastric cancer. *J Gastroenterol Hepatol* 2009; 24: 37-41

3 Lissoni P, Brivio F, Ferrante R, Vigore L, Vaghi M, Fumagalli E, Bucovec R, Malugani F, Fumagalli L. Circulating immature and mature dendritic cells in relation to lymphocyte subsets in patients with gastrointestinal tract cancer. *Int J Biol Markers* 2000; 15: 22-25

4 Decensi A, Costa A. Recent advances in cancer chemoprevention, with emphasis on breast and colorectal cancer. *Eur J Cancer* 2000; 36: 694-709

5 Afzali B, Lombardi G, Lechler RI, Lord GM. The role of T helper 17 (Th17) and regulatory T cells (Treg) in human organ transplantation and autoimmune disease. *Clin Exp Immunol* 2007; 148: 32-46

6 葛婷, 唐志鹏, 王亮, 张亚利. Th17/Treg失衡与炎症性肠病的关系. 世界华人消化杂志 2010; 18: 689-694

7 马海涛, 何靖康, 黄海涛, 陈少慕, 肺癌患者外周血CD4+CD25+调节性T细胞的检测及其临床意义. 江苏医药 2010; 36: 1252-1254

8 Li L, Chao QG, Ping LZ, Xue C, Xia ZY, Qian D, Shi-ang H. The prevalence of FOXP3+ regulatory T-cells in peripheral blood of patients with NSCLC. *Cancer Biother Radiopharm* 2009; 24: 357-367

9 Sasada T, Kimura M, Yoshida Y, Kanai M, Takabayashi A. CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with gastrointestinal malignancies: possible involvement of regulatory T cells in disease progression. *Cancer* 2003; 98: 1089-1099

10 Kryczek I, Wei S, Zou L, Altuwaijri S, Szeliga W, Kolls J, Chang A, Zou W. Cutting edge: Th17 and regulatory T cell dynamics and the regulation by IL-2 in the tumor microenvironment. *J Immunol* 2007; 178: 6730-6733

11 Yang XO, Nurieva R, Martinez GJ, Kang HS, Chung Y, Pappu BP, Shah B, Chang SH, Schluns KS, Watowich SS, Feng XH, Jetten AM, Dong C. Molecular antagonism and plasticity of regulatory and inflammatory T cell programs. *Immunity* 2008; 29: 44-56

12 Xu L, Kitani A, Fuss I, Strober W. Cutting edge: regulatory T cells induce CD4+CD25-Foxp3- T cells or are self-induced to become Th17 cells in the absence of exogenous TGF-beta. *J Immunol* 2007; 178: 6725-6729

13 Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, Weiner HL, Kuchroo VK. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 2006; 441: 235-238

14 Koenen HJ, Smeets RL, Vink PM, van Rijssen E, Boots AM, Joosten I. Human CD25highFoxp3pos regulatory T cells differentiate into IL-17-producing cells. *Blood* 2008; 112: 2340-2352

■名词解释

调节性T细胞: 调节性T细胞可分为天然产生的自然调节性T细胞(nTreg)和诱导产生的适应性调节性T细胞(aTreg或iTreg), 如Th3、Tr1, 另外亦有CD8 Treg、NKT细胞等, 与自身免疫性疾病的发生关系密切, 其异常表达可导致自身免疫性疾病.

Th17: 辅助性T细胞17是一种新发现的能够分泌白介素17的T细胞亚群, 在自身免疫性疾病和机体防御反应中具有重要的意义.

细胞毒T淋巴细胞相关抗原4: 又名CD152, 是一种白细胞分化抗原, 是T细胞上的一种跨膜受体, 与CD28共同享有B7分子配体, 而CTLA-4与B7分子结合后诱导T细胞无反应性, 参与免疫反应的负调节.

■同行评价
本文对研究胃癌的发生发展具有一定的理论意义.

15 Steiner GE, Newman ME, Paikl D, Stix U, Memaran-Dagda N, Lee C, Marberger MJ. Expression and function of pro-inflammatory interleukin IL-17 and IL-17 receptor in normal, benign hyperplastic, and malignant prostate. *Prostate* 2003; 56: 171-182

16 Numasaki M, Watanabe M, Suzuki T, Takahashi H, Nakamura A, McAllister F, Hishinuma T, Goto J, Lotze MT, Kolls JK, Sasaki H. IL-17 enhances the net angiogenic activity and in vivo growth of human non-small cell lung cancer in SCID mice through promoting CXCR-2-dependent angiogenesis. *J Immunol* 2005; 175: 6177-6189

17 Kato T, Furumoto H, Ogura T, Onishi Y, Irahara M, Yamano S, Kamada M, Aono T. Expression of IL-17 mRNA in ovarian cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 282: 735-738

18 Le Gouvello S, Bastuji-Garin S, Aloulou N, Mansour H, Chaumette MT, Berrehar F, Seikour A, Charachon A, Karoui M, Leroy K, Farcet JP, Sobhani I. High prevalence of Foxp3 and IL17 in MMR-proficient colorectal carcinomas. *Gut* 2008; 57: 772-779

19 Zhou Y, Toh ML, Zrioual S, Miossec P. IL-17A versus IL-17F induced intracellular signal transduction pathways and modulation by IL-17RA and IL-17RC RNA interference in AGS gastric adenocarcinoma cells. *Cytokine* 2007; 38: 157-164

20 Shevach EM. Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity* 2009; 30: 636-645

21 Ji Q, Gondek D, Hurwitz AA. Provision of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor converts an autoimmune response to a self-antigen into an antitumor response. *J Immunol* 2005; 175: 1456-1463

22 Boissonnas A, Scholer-Dahirel A, Simon-Blancal V, Pace L, Valet F, Kissenpfennig A, Sparwasser T, Malissen B, Fetler L, Amigorena S. Foxp3+ T cells induce perforin-dependent dendritic cell death in tumor-draining lymph nodes. *Immunity* 2010; 32: 266-278

23 Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T, Miyara M, Fehervari Z, Nomura T, Sakaguchi S. CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science* 2008; 322: 271-275

24 Kryczek I, Banerjee M, Cheng P, Vatan L, Szeliga W, Wei S, Huang E, Finlayson E, Simeone D, Welling TH, Chang A, Coukos G, Liu R, Zou W. Phenotype, distribution, generation, and functional and clinical relevance of Th17 cells in the human tumor environments. *Blood* 2009; 114: 1141-1149

25 Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, Evdemon-Hogan M, Conejo-Garcia JR, Zhang L, Burow M, Zhu Y, Wei S, Kryczek I, Daniel B, Gordon A, Myers L, Lackner A, Disis ML, Knutson KL, Chen L, Zou W. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* 2004; 10: 942-949

26 Su X, Ye J, Hsueh EC, Zhang Y, Hoft DF, Peng G. Tumor microenvironments direct the recruitment and expansion of human Th17 cells. *J Immunol* 2010; 184: 1630-1641

27 Sfanos KS, Bruno TC, Maris CH, Xu L, Thoburn CJ, DeMarzo AM, Meeker AK, Isaacs WB, Drake CG. Phenotypic analysis of prostate-infiltrating lymphocytes reveals TH17 and Treg skewing. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 3254-3261

28 Wakita D, Sumida K, Iwakura Y, Nishikawa H, Ohkuri T, Chamoto K, Kitamura H, Nishimura T. Tumor-infiltrating IL-17-producing gammadelta T cells support the progression of tumor by promoting angiogenesis. *Eur J Immunol* 2010; 40: 1927-1937

29 Tartour E, Fossiez F, Joyeux I, Galinha A, Gey A, Claret E, Sastre-Garau X, Couturier J, Mosseri V, Vives V, Banchereau J, Fridman WH, Wijdenes J, Lebecque S, Sautès-Fridman C. Interleukin 17, a T-cell-derived cytokine, promotes tumorigenicity of human cervical tumors in nude mice. *Cancer Res* 1999; 59: 3698-3704

30 Benchetrit F, Ciree A, Vives V, Warnier G, Gey A, Sautès-Fridman C, Fossiez F, Haicheur N, Fridman WH, Tartour E. Interleukin-17 inhibits tumor cell growth by means of a T-cell-dependent mechanism. *Blood* 2002; 99: 2114-2121

31 林三仁. 中国消化病学科发展30年回顾与展望. 中国实用内科杂志 2011; 31: 827

编辑 田滢 电编 鲁亚静

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com
世界华人消化杂志 2012年12月28日; 20(36): 3695-3700
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

临床研究 CLINICAL RESEARCH

临床隐匿性胃癌的FDG PET/CT征象

王 欣, 于丽娟, 陆佩欧, 田墨涵, 李迎辞, 王 洪

王欣, 于丽娟, 陆佩欧, 田墨涵, 李迎辞, 哈尔滨医科大学附属第三医院PET/CT中心 黑龙江省哈尔滨市 150081
王洪, 哈尔滨市呼兰区妇幼保健站 黑龙江省哈尔滨市 150500
王欣, 副主任医师, 主要从事肿瘤功能影像及分子影像的研究.
哈尔滨医科大学附属第三医院科研启动基金资助项目, No. JJ2009-13
作者贡献分布: 此课题由王欣设计; 研究过程由王欣、于丽娟、陆佩欧、田墨涵及李迎辞操作完成; 数据分析由王欣与王洪完成; 本论文写作由王欣完成.
通讯作者: 王欣, 副主任医师, 150081, 黑龙江省哈尔滨市哈平路150号, 哈尔滨医科大学附属第三医院PET/CT中心.
lxl20040130@163.com
收稿日期: 2012-10-10 修回日期: 2012-12-05
接受日期: 2012-12-20 在线出版日期: 2012-12-28

FDG PET/CT diagnosis of clinically occult gastric cancer

Xin Wang, Li-Juan Yu, Pei-Ou Lu, Mo-Han Tian, Ying-Ci Li, Hong Wang

Xin Wang, Li-Juan Yu, Pei-Ou Lu, Mo-Han Tian, Ying-Ci Li, PET-CT Center, the Third Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150081, Heilongjiang Province, China
Hong Wang, Hulan District Maternal and Child Health Station, Harbin 150500, Heilongjiang Province, China
Supported by: the Scientific Research Startup Foundation of Tumor Hospital of Harbin Medical University, No. JJ2009-13
Correspondence to: Xin Wang, Associate Chief Physician, PET-CT Center, the Third Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150081, Heilongjiang Province, China. lxl20040130@163.com
Received: 2012-10-10 Revised: 2012-12-05
Accepted: 2012-12-20 Published online: 2012-12-28

Abstract

AIM: To investigate the use of fluorodeoxyglucose (FDG) positron emission tomography (PET)/CT imaging in diagnosis of clinically occult gastric cancer.

METHODS: The imaging data for 26 patients with clinically occult gastric cancer who underwent FDG PET/CT imaging were reviewed retrospectively. They were hospitalized for metastatic tumors and therefore underwent FDG PET/CT for detecting carcinoma of unknown primary origin. They were finally diagnosed with gastric cancer by endoscopy (n = 24) or laparoscopy (n = 2). Based on imaging manifestations, the patients were divided into three groups: easily diagnosed, suspected, and hardly diagnosed.

RESULTS: PET imaging showed 57.7% (15/26) of intensively positive cases, 23.1% (6/26) of positive cases, and 19.2% (5/26) of negative cases. CT imaging showed 76.9% (20/26) of intensively positive cases, 11.5% (3/26) of positive cases, and 11.5% (3/26) of negative cases. The percentages of easily diagnosed, suspected, and hardly diagnosed patients were 53.8% (14/26), 34.6% (9/26) and 11.5% (3/26), respectively.

CONCLUSION: FDG PET/CT imaging can help diagnose clinically occult gastric cancer in about 88.4% of patients.

Key Words: Gastric cancer; Fluorodeoxyglucose; Positron emission tomography/computed tomography

Wang X, Yu LJ, Lu PO, Tian MH, Li YC, Wang H. FDG PET/CT diagnosis of clinically occult gastric cancer. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(36): 3695-3700

摘要

目的: 总结临床隐匿性胃癌的氟脱氧葡萄糖(fluorodeoxyglucose, FDG) PET/CT影像表现特点.

方法: 回顾分析26例临床隐匿性胃癌的临床及PET/CT影像资料. 男18例, 女8例, 年龄41-83岁, 平均年龄60.8岁, 皆以转移瘤症状为首发症状, 经胃镜活检证实24例, 经开腹手术证实2例. 以目测法分别分析FDG PET和CT影像, 依据其异常表现的强度分为强阳性、弱阳性和阴性; 再综合PET和CT表现, 根据诊断的难易程度分为3型: 易诊型、疑诊型和难诊型.

结果: PET表现为强阳性者57.7%(15/26), 弱阳性者23.1%(6/26), 阴性者19.2%(5/26). 同机CT表现强阳性者76.9%(20/26), 弱阳性者11.5%(3/26), 阴性者11.5%(3/26). 易诊型为53.8%(14/26), 疑诊型为34.6%(9/26), 难诊型为11.5%(3/26).

结论: 临床隐匿性胃癌大约88.4%的患者可通

■背景资料
正电子发射计算机断层成像/X线计算机断层成像(PET/CT), 将PET的功能成像和CT解剖成像整合为一体化成像仪, 他的全身成像模式, 代谢与形态双重影像能力, 为中晚期肿瘤患者提供了一种安全、便捷的诊断手段. ^{18}F-脱氧葡萄糖(FDG) PET/CT在不明来源转移瘤的原发病灶的查找上优于常规检查手段.

■同行评议者
肖恩华, 教授, 中南大学湘雅二医院放射教研室

■相关报道
国内外报道显示: FDG PET/CT在不明来源转移瘤的原发病灶的查找上优于常规检查手段, 骨转移瘤, 淋巴结转移瘤, 脑转移瘤的原发灶的检出率在58%-88%左右.

过FDG PET/CT检查发现或提示胃癌.

关键词: 胃癌; 氟脱氧葡萄糖; 正电子发射断层显像/计算机断层显像

王欣, 于丽娟, 陆佩欧, 田墨涵, 李迎辞, 王洪. 临床隐匿性胃癌的FDG PET/CT征象. 世界华人消化杂志 2012; 20(36): 3695–3700
http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3695.asp

0 引言

以转移灶为首发症状的胃癌, 被称为临床隐匿性胃癌, 在胃癌中约占4%的比重; 这些患者往往缺乏与胃部相关的临床症状和体征, 使原发病变的寻找变得复杂; 帮助这些患者尽快确定原发病变的部位, 有利于尽快开始正确的治疗, 减轻患者的痛苦[1,2]. 一体化的PET/CT氟脱氧葡萄糖显像, 在探查缺少临床症状的偶发瘤、常规检查隐匿的恶性肿瘤及转移灶方面, 有很大的优势[3-5]. 但作者未见有关临床隐匿性胃癌的氟脱氧葡萄糖(fluorodeoxyglucose, FDG)PET/CT显像的报道.

我们回顾分析了2007-2012在哈尔滨医科大学附属第三医院PET-CT中心, 以查找原发灶为目的, 最终证明为胃癌的患者的FDG PET/CT检查资料, 总结这部分疾病的PET/CT影像特点, 意在总结经验, 以期提高对这类胃癌的FDG PET/CT表现的认识.

1 材料和方法

1.1 *材料* 回顾分析2007-2012在哈尔滨医科大学附属第三医院PET-CT中心, 以查找原发灶为目的行FDG PET/CT检查, 最终证明为胃癌的患者的临床及FDG PET/CT的影像资料. 共26例, 男18例, 女8例, 年龄41-83岁, 平均年龄60.8岁; 皆以转移瘤症状为首发症状, 其中锁骨上淋巴结转移瘤3例、腹膜后淋巴结肿大6例、腹股沟淋巴结转移瘤1例、骨转移瘤4例、肝转移瘤8例、因腹水和或腹腔肿物疑卵巢癌行PET/CT检查4例. 经胃镜活检证实24例, 经开腹手术证实2例.

1.2 *方法*

1.2.1 PET/CT*检查方法*: 检查前禁食6 h以上, 静脉注射FDG 0.8-0.12 mCi/kg, 平静休息50-70 min后行PET/CT扫描, 扫描前口服500 mL纯净水, 以使胃腔膨胀. 第一次扫描结束后1 h行第二次扫描(延迟扫描), 扫描前再次饮水500 mL. PET/CT扫描仪为Discovery ST(GE corporation), PET采集2D模式, 2.5 min/床位, 迭代法重建; CT螺旋扫描120 kV, 120-200 mA, 0.75螺距, 3.75 mm层厚重建. 以CT数据为PET作衰减校正. 系统根据扫描前血糖水平、注射剂量及身高、体质量自动计算标准化摄取值(standard uptake value, SUV). FDG经mini-TRACE(GE Corporation)和FN自动化合成系统生产, 放化纯度>98 %.

1.2.2 *胃癌FDG PET/CT影像表现分析方法*: 由2位有5年以上CT及PET/CT工作经验医生共同在影像工作站观察PET/CT影像, 以二者的一致意见为准. PET判断胃癌以目测为主, 当胃区出现明显高于肝脏的局灶或弥漫异常放射性浓聚时, 且延迟显像放射性浓聚持续存在, 为PET强阳性(++); 当胃部出现较小的放射性浓聚灶, 或异常放射性浓聚不易与生理性摄取区分时, 为PET弱阳性(+); 当胃区呈现均匀的本底样放射性摄取时, 为PET阴性(-). 在同机CT图像上, 当胃壁呈现明显局限性或弥漫性不规则增厚, 胃壁厚度>1.0 cm, 为CT强阳性(++); 当在适度充盈胃壁呈现范围较小的局限增厚, 或胃壁弥漫轻度增厚、僵硬, 或胃壁局限密度略增高, 如有上述异常, 判断为CT弱阳性(+); 如CT无明确异常表现, 为CT阴性(-). 根据诊断的难易程度分为易诊型、疑诊型和难诊型. 当PET和CT影像均为强阳性表现时为易诊型, 即PET+CT = ++++; 当PET+CT = ++/+++为疑诊型; 当PET+CT = -/+时为难诊型.

2 结果

26例临床隐匿性胃癌的临床及FDG PET/CT表现资料见表1. PET表现为强阳性者57.7%(15/26), FDG摄取SUV_{max}介于6.2-13.0; 弱阳性者23.1%(6/26), FDG摄取SUV_{max}介于3.5-6.4; 阴性者19.2%(5/26). 同机CT表现强阳性者76.9%(20/26), 弱阳性者11.5%(3/26), 阴性者11.5%(3/26).

PET呈现明显异常放射性浓聚, 同机CT呈现明显异常胃壁增厚的双重强阳性者, 即易诊型为53.8%(14/26, 图1). 疑诊型为34.6%(9/26), 其中4例PET表现FDG摄取高于肝脏, 但无法与良性或生理性摄取区分, 但CT呈现明显胃壁增厚, 提示胃癌可能(图2A-C); 另外4例PET表现阴性而CT呈现明显强阳性(图2D-F); 1例PET表现强阳性, 而CT上局部胃壁增厚与良性的黏膜皱襞粗大不易区分.

难诊型为11.5%(3/26); 其中PET和CT均为

表 1 26例临床隐匿性胃癌的临床及FDG PET/CT表现

编号	性别	年龄	首发转移部位	胃癌发生部位	FDG PET表现	同机CT表现	组织学诊断
1	女	65	淋巴结	胃窦	++	++	腺癌
2	男	43	淋巴结	胃体和窦	++	++	低分化腺癌
3	男	71	淋巴结	胃体和窦	++	++	腺癌
4	男	84	肝	胃底贲门	++	++	腺癌
5	男	41	肝	胃体	++	++	腺癌
6	男	62	肝	胃体	++	++	腺癌
7	男	81	肝	胃体	++	++	腺癌
8	男	56	肝	胃窦	++	++	腺癌
9	男	63	肺肝	胃体和窦	++	++	腺癌
10	女	63	肺	胃底贲门	++	++	腺癌
11	男	61	骨	胃体	++	++	低分化腺癌
12	男	60	淋巴结	胃体	++	++	腺癌
13	男	60	淋巴结	胃底贲门	++	++	腺癌
14	男	57	淋巴结	胃窦	++	++	腺癌
15	女	72	骨转移	胃窦	++	+	腺癌
16	男	42	骨	胃底和体	+	++	低分化腺癌
17	女	62	淋巴结	胃底和体	+	++	腺癌
18	女	48	骨	胃体	–	++	低分化腺癌
19	女	59	腹水	胃体	–	++	印戒细胞癌
20	女	73	腹水	胃体	–	++	黏液腺癌
21	女	47	卵巢	胃体	–	++	印戒细胞癌
22	男	62	肝	胃窦	+	+	腺癌
23	男	63	肝	胃体	+	+	腺癌
24	男	69	淋巴结	胃底贲门	+	–	低分化腺癌
25	男	73	肝	贲门	+	–	低分化鳞癌
26	男	44	腹水	胃窦	–	–	低分化腺癌

++表示强阳性, +表示弱阳性, –表示阴性; FDG: ^{18}F–脱氧葡萄糖.

■**创新盘点**

本组病例显示临床隐匿性胃癌大约88.5%的患者可通过FDG PET/CT检查发现或提示胃癌. 其中半数以上病例在FDG PET/CT影像上同时呈现明显异常, 诊断很容易确立; 另外还有大约23.1%(6/26)的患者, PET和CT影像可互相补充, 提示胃部的恶性肿瘤存在的可能, 进一步通过针对胃部的活检也能很快明确诊断. 假阴性主要为“小病灶, 大转移”的胃癌, 需要特别注意贲门癌, 易于误诊为生理性摄取而漏诊.

阴性者1例(3.8%), 为胃窦低分化腺癌; 另外2例PET呈现弱阳性, 都是贲门癌(图3), PET上可见贲门区小灶放射性浓聚, 而CT无异常表现, 呈阴性, 内镜活检证实1例为贲门低分化腺癌, 另1例为低分化鳞癌, 最小病灶为直径1.5 cm的扁平状溃疡灶.

3 讨论

以转移灶症状为首发症状的癌症, 往往原发病表现不明显, 而患者心理压力大, 心情急切, 一些年老体弱的患者难以承受过多的侵入式检查; 一体化的FDG PET/CT检查, 具有代谢显像和解剖影像的双重能力, 无疑为这样的患者提供了一种安全、便捷的诊断手段. 国内外陆续发表的有关报道显示: FDG PET/CT在不明来源转移瘤的原发病灶的查找上优于常规检查手段, 骨转移瘤, 淋巴结转移瘤, 脑转移瘤的原发灶的检出率在58%-88%左右[6-10].

胃癌的FDG 显像的应用存在一些限制, 主要有两方面: 一方面胃本身为消化道的空腔脏器, 存在平滑肌蠕动、黏膜新陈代谢形成的FDG生理性摄取[11-13], 而胃黏膜的炎性病变, 如幽门螺旋杆菌感染所致浅表和糜烂性胃炎, 也会导致胃壁呈现弥漫的非特异性放射性浓聚[14], 这就给正常和异常的区分, 以及良性和恶性的区分带来困难; 另一方面, 研究显示, 胃癌的FDG摄取与葡萄糖转运蛋白(glucose transporter 1, Glut-1)的表达关系密切[15,16], 不同组织学类型的胃癌的Glut-1阳性表达率不同[17], 印戒细胞癌、黏液腺癌、非聚集生长类型的低分化腺癌以及一部分早期胃癌, 由于缺少Glut1的过度表达, 而无明显FDG摄取, 造成PET影像的假阴性[16,18]; 而低分化癌的FDG阳性率较低, 提示FDG的摄取程度与恶性度不相关[19,20]. 早期胃癌的FDG PET的阳性率较低, 文献报道0%-44%[21-23], 因而不建议用于胃癌的筛查; 进展期胃癌的FDG PET阳性率34%-94%[24-26]; 近些年来, 随着一体化PET/CT的临床应用, 与PET同机的CT解剖图像辅助作用,

■**应用要点**
PET/CT扫描前应嘱患者充分饮水，使胃壁舒张，有助于减少胃壁的生理性摄取和CT的诊断.

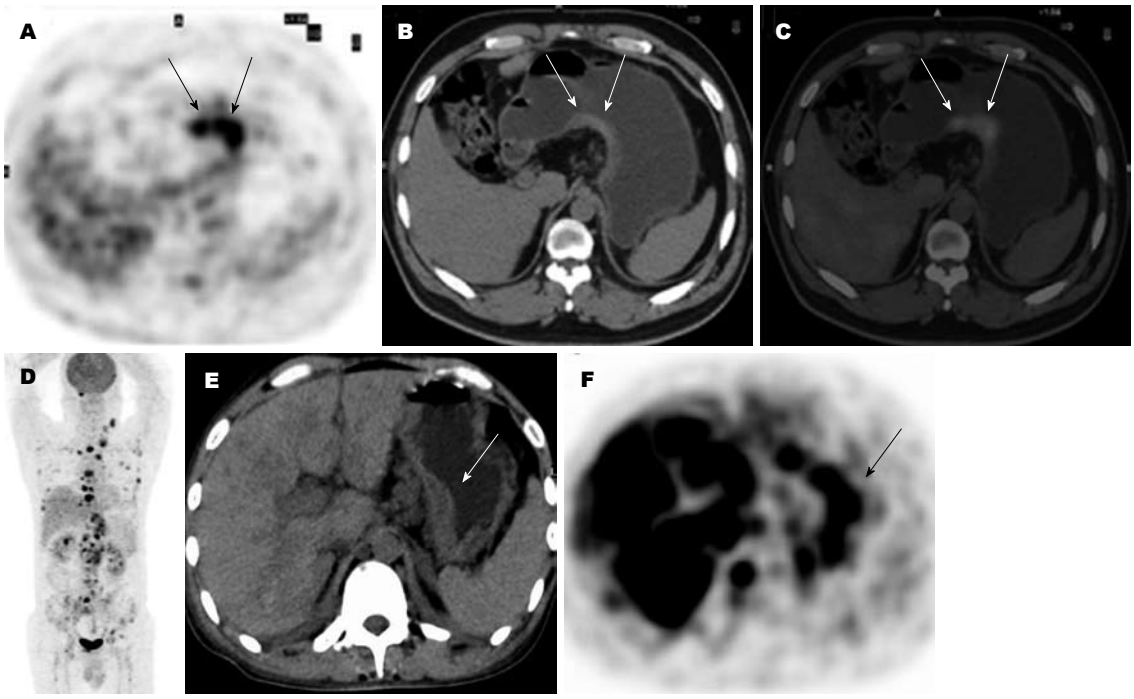


图 1 易诊型. A−D: 11号病例, 胃体低分化腺癌; 男, 61岁, FDG PET/CT显示胃体后壁局限增厚伴高度放射性浓聚(A: 黑箭头; B, C: 白箭头). 多发骨转移瘤呈多发放射性浓聚灶(D); E−F: 2号病例, 胃体和胃窦低分化腺癌; 男, 43岁, 以腹股沟淋巴结转移瘤为首发症状, FDG PET/CT显示胃壁不规则增厚伴高度放射性浓聚(黑白箭), 肝及腹膜后淋巴结多发转移瘤呈异常放射性浓聚.

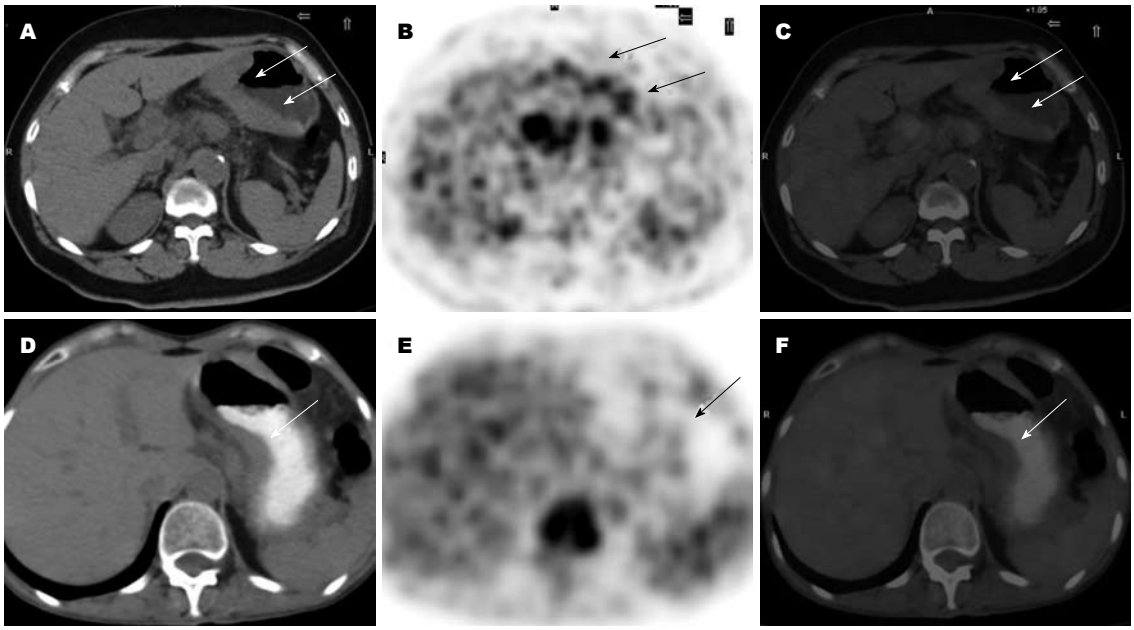


图 2 疑诊型. A−C: 17号病例, 胃底和体部腺癌; 女, 62岁, 以左侧锁骨上淋巴结转移瘤为首发症状; FDG PET/CT显示胃体小弯侧胃壁异常增厚(A, C: 白箭头), FDG摄取不均匀线状(B: 黑箭头); 肝门及胃左区淋巴结肿大呈异常放射性浓聚; D−F: 19号病例, 胃体部印戒细胞癌; 女, 59岁, 以腹胀、腹水为首发症状; FDG PET/CT显示胃体小弯侧壁弥漫异常增厚、僵硬(白箭), 无异常放射性摄取(黑箭).

使进展期胃癌的诊断率进一步得以提高[27,28].

临床隐匿性胃癌属于已经发生远处转移的晚期胃癌, 本组病例显示大约88.5%的患者可通过FDG PET/CT检查发现或提示胃癌. 其中半数以上病例在FDG PET/CT影像上同时呈现明显的放射性浓聚和CT形态异常, 诊断很容易确立; 另外还有大约23.1%(6/26)的患者虽然在FDG-PET影像上不明确, 但CT呈现明显的异常, 拟补了FDG影像的不足, 提示胃部的恶性肿瘤的存在可能, 进一步通过针对胃部的活检也能很快

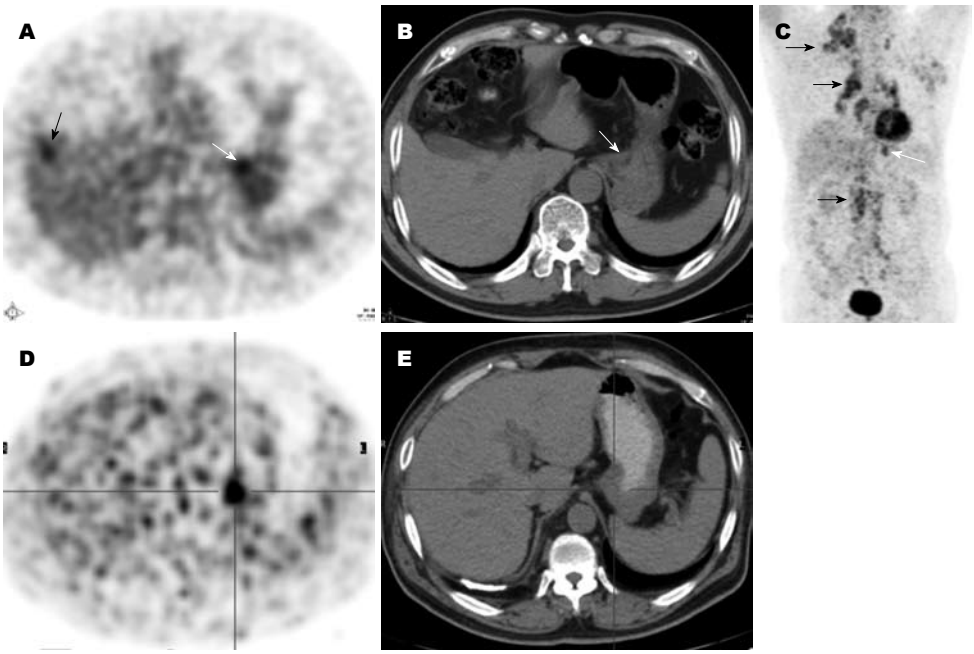


图 3 难诊型. A−B: 25号病例, 贲门低分化鳞癌; 男, 73岁, 以肝脏多分转移瘤为首发症状(A: 黑箭头); FDG PET/CT显示贲门小灶放射性浓聚(A: 白箭头), CT未见异常(B: 白箭头). C−E: 24号病例, 贲门低分化腺癌; 男, 69岁, 以右侧锁骨上淋巴结转移瘤为首发症状(C: 黑箭头); FDG PET/CT显示胃底贲门区局限放射性浓聚灶(C: 白箭头; D: 十字线), 相应部位胃壁形态自然, 无明显异常增厚(E: 十字线).

■名词解释
临床隐匿性胃癌: 以转移瘤症状为首发症状的胃癌, 在胃癌中约占4%.

明确诊断. 对于胃癌, 同样存在“小病灶, 大转移”现象, 这种现象对PET和CT都构成挑战; 本组病例中有3例表现出这种现象, 其中1例为胃体大弯的溃疡型胃癌, CT可见突向胃腔的“火山口样”腔内龛影, PET相应部位见局限放射性浓聚灶; 另外2例为贲门癌, 最小的癌灶在内镜下为直径1.5cm的扁平溃疡状病灶. 贲门部由于存在FDG的生理性摄取[14], 局限的小的放射性摄取灶易被误认为生理性摄取而漏诊, 小癌灶在CT图像上也可呈现阴性表现, 尤其是未使用低张药物和扩张胃腔的处理方法时, 因此贲门部的小癌大转移, 对PET/CT的诊断是个挑战, 需要额外加以注意.

本组病例中PET和CT都为阴性的纯阴性病例只有一例, 是胃窦的浸润生长的腺癌, 但在实际工作中该病例并没有被漏诊, 因为该患者自带的增强CT显示出胃壁的局限异常强化, 这提示我们FDG PET/CT与增强CT的结合会使其诊断能力进一步提升. 应用FDG PET/CT探查临床隐匿性胃癌时, 检查方法以及CT技术的应用很重要; 良好的胃部CT影像是诊断的重要组成部分, 所以检查前要充分的禁食, 可饮水或造影剂或牛奶以适度的充盈胃腔[29,30], 应用恰当的CT扫描剂量以便形成清晰的解剖图像. 通常认为胃癌的远处转移常见于肝脏、淋巴结及腹腔的种植转移, 骨转移相对较少; 本组病例中4例皆以骨转移瘤为首发症状, 并且3例是低分化腺癌, 大体类型是弥漫型, 其中2例患者年龄在40-50岁之间, 提示骨转移可与非肠型胃癌关系密切.

总之, 临床隐匿性胃癌大约88.5%的患者可通过FDG PET/CT检查发现或提示胃癌; 其中CT的加入使诊断的灵敏度大幅提升. 难诊型主要为易于误诊和漏诊的 “小病灶大转移”表现的胃癌, 需要特别注意的是贲门癌, 易于误诊为生理性摄取而漏诊.

4 参考文献

1 曲晶磊, 刘云鹏. 晚期胃癌分子靶向治疗的现状及其发展趋势. 世界华人消化杂志 2011; 19: 919-924
2 何若冰, 陈俊强. 胃癌新辅助化疗的研究进展. 世界华人消化杂志 2009; 17: 1207-1211
3 Choi JY, Lee KS, Kwon OJ, Shim YM, Baek CH, Park K, Lee KH, Kim BT. Improved detection of second primary cancer using integrated [18F] fluorodeoxyglucose positron emission tomography and computed tomography for initial tumor staging. *J Clin Oncol* 2005; 23: 7654-7659
4 Choi JY, Lee KS, Kim HJ, Shim YM, Kwon OJ, Park K, Baek CH, Chung JH, Lee KH, Kim BT. Focal thyroid lesions incidentally identified by integrated 18F-FDG PET/CT: clinical significance and improved characterization. *J Nucl Med* 2006; 47: 609-615
5 Israel O, Yefremov N, Bar-Shalom R, Kagana O, Frenkel A, Keidar Z, Fischer D. PET/CT detection of unexpected gastrointestinal foci of 18F-FDG uptake: incidence, localization patterns, and clinical

■同行评价

以转移灶症状为首发症状的临床隐匿的癌症，临床上寻找原发病有时很困难，本研究显示临床隐匿性胃癌大约88.4%的患者可通过FDG PET/CT检查发现或提示胃癌，对临床诊断有一定参考作用.

significance. *J Nucl Med* 2005; 46: 758-762

6 Wong WL, Sonoda LI, Gharpurhy A, Gollub F, Wellsted D, Goodchild K, Lemon C, Farrell R, Saunders M. 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography/computed tomography in the assessment of occult primary head and neck cancers--an audit and review of published studies. *Clin Oncol* (R Coll Radiol) 2012; 24: 190-195

7 Roh JL, Kim JS, Lee JH, Cho KJ, Choi SH, Nam SY, Kim SY. Utility of combined (18)F-fluorodeoxyglucose-positron emission tomography and computed tomography in patients with cervical metastases from unknown primary tumors. *Oral Oncol* 2009; 45: 218-224

8 梁颖, 吴宁, 李蒙, 郑容, 刘瑛, 张雯杰, 李静, 赵平. 18F-FDG PET/CT在查找骨转移瘤原发灶中的价值. 中国医学影像技术 2009; 25: 2275-2277

9 邱贵华. 18F-FDG PET/CT在原发灶不明的淋巴结转移癌中的应用. 第四军医大学学报 2007; 28: 1193-1195

10 王欣璐, 王全师, 吴湖炳, 王巧愚, 李洪生. 应用全身18F-FDG PET/PET-CT为脑转移瘤患者寻找原发灶. 实用放射学杂志 2006; 22: 1130-1133

11 Shammas A, Lim R, Charron M. Pediatric FDG PET/CT: physiologic uptake, normal variants, and benign conditions. *Radiographics* 2009; 29: 1467-1486

12 Kamimura K, Fujita S, Nishii R, Wakamatsu H, Nagamachi S, Yano T, Ogita M, Umemura Y, Fujimoto T, Nakajo M. An analysis of the physiological FDG uptake in the stomach with the water gastric distention method. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2007; 34: 1815-1818

13 Koga H, Sasaki M, Kuwabara Y, Hiraka K, Nakagawa M, Abe K, Kaneko K, Hayashi K, Honda H. An analysis of the physiological FDG uptake pattern in the stomach. *Ann Nucl Med* 2003; 17: 733-738

14 Takahashi H, Ukawa K, Ohkawa N, Kato K, Hayashi Y, Yoshimoto K, Ishiyama A, Ueki N, Kuraoka K, Tsuchida T, Yamamoto Y, Chino A, Uragami N, Fujisaki J, Igarashi M, Fujita R, Koyama M, Yamashita T. Significance of (18)F-2-deoxy-2-fluoro-glucose accumulation in the stomach on positron emission tomography. *Ann Nucl Med* 2009; 23: 391-397

15 Alakus H, Batur M, Schmidt M, Drebber U, Baldus SE, Vallböhmer D, Prenzel KL, Metzger R, Bollschweiler E, Hölscher AH, Mönig SP. Variable 18F-fluorodeoxyglucose uptake in gastric cancer is associated with different levels of GLUT-1 expression. *Nucl Med Commun* 2010; 31: 532-538

16 Yamada A, Oguchi K, Fukushima M, Imai Y, Kadoya M. Evaluation of 2-deoxy-2-[18F]fluoro-D-glucose positron emission tomography in gastric carcinoma: relation to histological subtypes, depth of tumor invasion, and glucose transporter-1 expression. *Ann Nucl Med* 2006; 20: 597-604

17 Kawamura T, Kusakabe T, Sugino T, Watanabe K, Fukuda T, Nashimoto A, Honma K, Suzuki T. Expression of glucose transporter-1 in human gastric carcinoma: association with tumor aggressiveness, metastasis, and patient survival. *Cancer* 2001; 92: 634-641

18 Stahl A, Ott K, Weber WA, Becker K, Link T, Siewert JR, Schwaiger M, Fink U. FDG PET imaging of locally advanced gastric carcinomas: correlation with endoscopic and histopathological findings. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2003; 30: 288-295

19 Esteves FP, Schuster DM, Halkar RK. Gastrointestinal tract malignancies and positron emission tomography: an overview. *Semin Nucl Med* 2006; 36: 169-181

20 Rosenbaum SJ, Stergar H, Antoch G, Veit P, Bockisch A, Kühl H. Staging and follow-up of gastrointestinal tumors with PET/CT. *Abdom Imaging* 2006; 31: 25-35

21 Sohn YJ, Jang JS, Choi SR, Kwon HC, Jung GJ, Kim MC, Jeong JS. Early detection of recurrence after endoscopic treatment for early gastric cancer. *Scand J Gastroenterol* 2009; 44: 1109-1114

22 Terauchi T, Murano T, Daisaki H, Kanou D, Shoda H, Kakinuma R, Hamashima C, Moriyama N, Kakizoe T. Evaluation of whole-body cancer screening using 18F-2-deoxy-2-fluoro-D-glucose positron emission tomography: a preliminary report. *Ann Nucl Med* 2008; 22: 379-385

23 Tsujimoto H, Sugasawa H, Ono S, Ichikura T, Yamamoto J, Hase K. Has the accuracy of preoperative diagnosis improved in cases of early-stage gastric cancer? *World J Surg* 2010; 34: 1840-1846

24 Chen J, Cheong JH, Yun MJ, Kim J, Lim JS, Hyung WJ, Noh SH. Improvement in preoperative staging of gastric adenocarcinoma with positron emission tomography. *Cancer* 2005; 103: 2383-2390

25 Kwee RM, Kwee TC. Imaging in assessing lymph node status in gastric cancer. *Gastric Cancer* 2009; 12: 6-22

26 Mukai K, Ishida Y, Okajima K, Isozaki H, Morimoto T, Nishiyama S. Usefulness of preoperative FDG PET for detection of gastric cancer. *Gastric Cancer* 2006; 9: 192-196

27 王欣, 于丽娟, 王大龙, 贾承晔, 田墨涵. 18F-FDG PET/CT对进展期胃癌治疗前评估的可行性. 世界华人消化杂志 2009; 17: 2159-2163

28 胡晓燕, 吴湖炳, 王全师, 周文兰, 李洪生, 王丽娟. 18F-FDG PET/CT显像对胃癌术前分期的临床价值. 中国临床医学影像杂志 2010; 21: 852-855

29 Tian J, Chen L, Wei B, Shao M, Ding Y, Yin D, Yao S. The value of vesicant 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography (18F-FDG PET) in gastric malignancies. *Nucl Med Commun* 2004; 25: 825-831

30 Zhu Z, Li F, Mao Y, Cheng W, Cheng X, Dang Y. Improving evaluation of primary gastric malignancies by distending the stomach with milk immediately before 18F-FDG PET scanning. *J Nucl Med Technol* 2008; 36: 25-29

编辑 翟欢欢 电编 鲁亚静

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com
世界华人消化杂志 2012年12月28日; 20(36): 3701-3706
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

临床研究 CLINICAL RESEARCH

Caspase-3在慢性病毒性乙、丙型肝炎及非酒精性肝炎中的表达及意义

杨海峰, 薛 玲, 郑彩娟, 幺作义, 张艳淑, 姚 林, 李 佳

杨海峰, 河北联合大学公共卫生学院, 河北省唐山市传染病医院 河北省唐山市 063000
郑彩娟, 幺作义, 河北省唐山市传染病医院 河北省唐山市 063000
薛玲, 张艳淑, 姚林, 李佳, 河北联合大学公共卫生学院 河北省唐山市 063000
杨海峰, 硕士研究生, 主治医师, 主要从事肝脏疾病的研究.
唐山市科学技术研究与发展指导计划基金资助项目, No. 111302091b
作者贡献分布: 此课题由杨海峰、姚林及张艳淑共同设计; 研究过程及论文写作由杨海峰操作完成; 数据分析由杨海峰与薛玲完成; 研究标本由幺作义、李佳及郑彩娟协助提供.
通讯作者: 姚林, 教授, 063000, 河北省唐山市建设南路57号, 河北联合大学公共卫生学院. yaolin766@sohu.com
电话: 0315-3725494
收稿日期: 2012-10-12 修回日期: 2012-11-22
接受日期: 2012-12-20 在线出版日期: 2012-12-28

Significance of expression of caspase-3 in chronic hepatitis B and C and nonalcoholic steatohepatitis

Hai-Feng Yang, Ling Xue, Cai-Juan Zheng, Zuo-Yi Yao, Yan-Shu Zhang, Lin Yao, Jia Li

Hai-Feng Yang, College of Public Health, Hebei United University; Tangshan Infectious Disease Hospital, Tangshan 063000, Hebei Province, China
Cai-Juan Zheng, Zuo-Yi Yao, Tangshan Infectious Disease Hospital , Tangshan 063000, Hebei Province, China
Ling Xue, Yan-Shu Zhang, Lin Yao, Jia Li, College of Public Health, Hebei United University, Tangshan 063000, Hebei Province, China
Supported by: the Science and Technology Research and Development Program of Tangshan, No. 111302091b
Correspondence to: Lin Yao, Professor, School of Public Health, Hebei United University, Jianshe South Road, Tangshan 063000, Hebei Province, China. yaolin766@sohu.com
Received: 2012-10-12 Revised: 2012-11-22
Accepted: 2012-12-20 Published online: 2012-12-28

Abstract

AIM: To determine the expression of caspase-3 in liver tissues of patients with chronic hepatitis B (CHB), chronic hepatitis C (CHC), or nonalcoholic steatohepatitis (NASH) and to analyze their clinical and pathological significance.

METHODS: Immunohistochemistry was used to determine the expression of caspase-3 in liver tissues from 70 patients with CHB, 50 patients with CHC, 50 patients with NASH, and 15 normal people.

RESULTS: The positive rates of caspase-3 expression in CHB, CHC and NASH were significantly higher than that in normal hepatic tissue (57.1%, 72.0%, 82.0% *vs* 18.8%; all $P < 0.05$). Caspase-3 expression was closely related with hepatic cell apoptosis ($r = 0.356$, $P < 0.001$). The positive rates of caspase-3 expression increased with the increase in the degree of pathological injury (all $P < 0.05$).

CONCLUSION: The expression of caspase-3 in CHB, CHC and NASH is closely related with liver cell apoptosis. Overexpression of caspase-3 may play an important role in the development of hepatitis.

Key Words: Caspase-3; Chronic hepatitis B; Chronic hepatitis C; Nonalcoholic steatohepatitis; Apoptosis

Yang HF, Xue L, Zheng CJ, Yao ZY, Zhang YS, Yao L, Li J. Significance of expression of caspase-3 in chronic hepatitis B and C and nonalcoholic steatohepatitis. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(36): 3701-3706

摘要

目的: 检测慢性乙型肝炎、慢性丙型肝炎和非酒精性脂肪性肝炎中Caspase-3的表达, 探讨其临床及病理学意义.

方法: 应用免疫组织化学方法检测Caspase-3在70例慢性乙型肝炎, 50例慢性丙型肝炎, 50例非酒精性脂肪性肝炎和15例正常肝组织的表达.

结果: (1)Caspase-3在慢性乙型肝炎、慢性丙型肝炎、非酒精性脂肪性肝炎中的表达(57.1%、72.0%、82.0%), 高于其在正常肝组织中表达(18.8%), 差异有统计学意义($P<0.05$); 并与肝细胞凋亡密切相关($r = 0.356$, $P<0.001$); (2)Caspase-3在慢性乙型肝炎、慢性丙型肝炎和非酒精性脂肪性肝炎随病理损伤程度加重其阳性表达率增高, 有统计学意义($P<0.05$).

■背景资料
慢性乙型肝炎、慢性丙型肝炎和非酒精性脂肪性肝炎常可引起肝硬化、肝癌, 严重危害人们的健康. 其发病机制目前尚不详. 目前, 对于细胞凋亡调控机制的研究成为肝炎发病机制研究的热点.

■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

■研发前沿
肝细胞凋亡是造成肝脏损伤和肝脏疾病最基本的中心环节, Caspase家族是肝细胞凋亡过程中重要的启动者和执行者之一. 而Caspase抑制剂的临床研究、应用可能成为下一步研究的前沿和热点.

结论: Caspase-3与慢性乙型肝炎、丙型肝炎和非酒精性脂肪性肝炎的肝细胞凋亡密切相关, 并参与肝炎的发病过程.

关键词: Caspase-3; 慢性乙型肝炎; 慢性丙型肝炎; 非酒精性脂肪肝; 细胞凋亡

杨海峰, 薛玲, 郑彩娟, 幺作义, 张艳淑, 姚林, 李佳. Caspase-3在慢性病毒性乙、丙型肝炎及非酒精性肝炎中的表达及意义. 世界华人消化杂志 2012; 20(36): 3701-3706
http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3701.asp

0 引言

慢性乙型肝炎、慢性丙型肝炎和非酒精性脂肪性肝炎常可引起肝硬化、肝癌[1-5], 严重危害人们的健康[6-8]. 其发病机制目前尚不详. 近年来, 细胞凋亡调控机制的研究成为研究肝炎发病机制的热点. 细胞凋亡(apoptosis)又称程序性细胞死亡(programmed cell death, PCD), 是机体在生理和病理性刺激下为保持内环境稳定, 由基因控制和酶促反应下的一种自主有序的死亡[9-12]. Caspase-3是导致细胞凋亡发生的关键步骤凋亡信号传导的共同通路[13,14]. 本研究应用免疫组织化学检测Caspase-3在慢性乙型肝炎、慢性丙型肝炎和非酒精性脂肪性肝炎中的表达, 探索其与肝细胞凋亡的关系, 与肝组织炎症活动度、肝纤维化程度的关系, 探讨其在肝炎的病理生理过程中的作用.

1 材料和方法

1.1 材料 收集2011-012/2012-05唐山市传染病医院就诊的慢性乙型病毒性肝炎患者70例, 慢性丙型肝炎50例(以上诊断标准符合2000年修订的病毒性肝炎防治方案[15]), 非酒精性脂肪肝肝炎50例(以上诊断标准符合2010年修订的非酒精性脂肪性肝病诊疗指南[16]), 研究对象总数170人, <30岁组38人, 30岁组114人, 45岁组18人. 另选用同期15例非肝脏疾病死亡的正常肝组织作对照. 所选病例行肝穿活检, 标本常规用40 g/L中性甲醛固定, 石蜡包埋. 兔抗人多克隆抗体Caspase-3试剂盒、凋亡检测试剂盒均购自北京中杉金桥生物技术有限公司.

1.2 方法

1.2.1 临床肝脏活检: 170例患者均进行1秒钟肝脏穿刺术, 所获取标本用40 g/L甲醛溶液固定, 常规石蜡切片, 行HE染色, 免疫组织化学检测丙肝病毒标志物, 依据2000年修订的病毒性肝炎防治方案及2010年修订的非酒精性脂肪性肝病诊疗指南进一步将肝脏损害程度分为轻度、中度、重度.

1.2.2 Caspase-3免疫组织化学检测: 采用免疫组织化学染色PV两步法检测肝组织中Caspase-3的表达. 按常规程序操作, 一抗工作液浓度: Caspase-3 1∶50, DAB显色. 设阳性和阴性对照. 阴性对照采用PBS代替一抗. Caspase-3的表达阳性为细胞浆和细胞核中有棕黄色颗粒. 每个切片随机选取不重叠5个高倍视野(400倍), 用Motic Med数码医学图像分析系统分别测定每个视野阳性染色部位的光密度, 取其平均值即得切片的平均光密度值. 用平均光密度代表Caspase-3在肝组织中的表达水平. 每例组织切片随机观察5个高倍视野, 阳性细胞数≤10%为阴性(-), >10%为阳性(+).

1.2.3 细胞凋亡的检测: 采用TdT介导的脱氧核甘酸切口末端标记法(TdT-mediated x-dUTP nicke-nd labeling, TUNEL)检测肝细胞凋亡.

统计学处理 采用SPSS16.0软件对数据进行χ^2检验, Fisher's test及Spearman等级相关分析, $P<0.05$有统计学意义.

2 结果

2.1 研究对象临床、病理资料 研究对象年龄构成见表1, 不同肝炎类型患者的年龄构成未见差异($\chi^2 = 3.928$, $P = 0.416$), 表明3组研究对象年龄组成结构基本相同, 具有可比性. 在慢性乙型肝炎、慢性丙型肝炎及非酒精性脂肪性肝炎3组肝炎肝组织病理分型比较差异无统计学意义($\chi^2 = 0.191$, $P = 0.996$, 图1, 表2). 表明3组研究对象病理组成结构基本相同, 具有可比性.

2.2 Caspase-3的表达与肝细胞凋亡 Caspase-3在慢性乙型肝炎、慢性丙型肝炎及非酒精性脂肪性肝炎肝组织中的表达(表3, 图2)与TUNEL检测的肝细胞凋亡的表达(图3)具有相关性($r = 0.356$, $P<0.001$). Caspase-3在慢性乙型肝炎、慢性丙型肝炎及非酒精性脂肪性肝炎中的表达明显高于正常肝组织, 差异有统计学意义($P<0.001$). Caspase-3在非酒精性脂肪性肝炎中表达明显高于慢性乙型肝炎, 差异有统计学意义($P<0.05$); Caspase-3在慢性乙型肝炎和慢性丙型肝炎中的表达未见异常, 无统计学意义($P>0.05$). 无论何种类型的肝炎, Caspase-3在各病理类型的表达存在差异($P<0.05$, 表4), 进一步分析Caspase-3在重型肝炎中的表达阳性率高, 轻型肝炎表达阳

表 1 不同肝炎类型研究对象年龄构成情况

年龄(岁)	慢性乙型肝炎		慢性丙型肝炎		非酒精性脂肪性肝炎	
	n	%	*n*	%	*n*	%
>30	13	18.6	10	20.0	15	30.0
30–	47	67.1	35	70.0	32	64.0
45–	10	14.3	5	10.0	3	6.0
合计	70	100.0	50	100.0	50	100.0

表 2 不同肝炎类型研究对象组织病理分型比较

病理分型	慢性乙型肝炎		慢性丙型肝炎		非酒精性脂肪性肝炎	
	n	%	*n*	%	*n*	%
轻度	30	42.0	21	42.0	20	40.0
中度	28	40.0	20	40.0	20	40.0
重度	12	17.1	9	18.0	10	20.0

表 3 Caspase-3在不同类型肝炎中的表达

肝炎类型	*n*	TUNEL阳性		Caspase-3阳性	
		n	%	*n*	%
慢性乙型肝炎	70	45	64.3	40	57.1
慢性丙型肝炎	50	40	80.0	36	72.0
非酒精性脂肪性肝炎	50	45	90.0	41	82.0
正常肝组织	15	4	26.7	3	20.0

性率最少, 差异有统计学意义.

3 讨论

随着细胞凋亡概念的引入, 人们开始从细胞凋亡的角度来审视肝炎的发生、发展. 目前认为, 肝细胞凋亡增加是肝炎发病的一个重要途径, 研究发现许多酶参与凋亡, 半胱天冬酶是其中重要的一种.

细胞凋亡是受细胞外微环境和细胞内基因调控的一种细胞主动性死亡方式[17,18]. 其中Caspase-3是最关键的蛋白酶, 不仅是凋亡的关键执行者, 也是细胞凋亡过程中的主要效应因子[19-21], 本组资料用TUNEL法检测细胞凋亡显示: 在肝细胞凋亡的细胞中多有Caspase-3表达, 且肝细胞凋亡随Caspase-3表达的增高而增加. 发生凋亡的细胞的染色质浓缩、边缘化, 核膜裂解、染色质分割成块状和凋亡小体等典型的凋亡形态. 本组资料显示: Caspase-3的表达与肝细胞凋亡分布区基本一致, 具有显著相关性, 说明Caspase-3参与肝细胞凋亡的信号传递过程.

肝细胞凋亡发生在肝细胞更新时, 凋亡小体(apoptotic bodies)很快被邻近的吞噬细胞所吞噬, 不引起炎症反应[22-24]. 但在慢性乙型肝炎、慢性丙型肝炎、等多种肝病时, 机体为维持自身生理状态, 细胞结构发生变化: 细胞质和染色体浓缩, DNA断裂成200 bp左右的片段, 大量凋亡小体形成, 可见大量点状坏死及碎屑样坏死的肝小叶, 即以细胞凋亡的形式停止细胞代谢, 阻止病毒的复制, 清除病毒感染的细胞, 同时肝脏功能受影响. 可见肝损伤实质主要是肝细胞

表 4 Caspase-3在不同肝炎不同病理分型肝组织中的表达

肝炎类型 病理分型	*n*	Caspase-3	
		阳性数(*n*)	阳性率(%)
慢性乙型肝炎	30	12	40.0
轻型	28	18	64.3
中型			
重型	12	10	83.3
χ^2		7.544	
P		0.023	
慢性丙型肝炎			
轻型	21	12	57.1
中型	20	15	75.0
重型	9	9	100.0
χ^2		Fisher's Exact Test	
P		0.049	
非酒精性脂肪性肝炎			
轻型	20	13	65.0
中型	20	18	90.0
重型	10	10	100.0
χ^2		Fisher's Exact Test	
P		0.034	

■相关报道

Ribeiro等通过实验发现NASH肝组织中凋亡越明显, 炎症程度越加重. 表明凋亡与炎症有着高度的相关性. Zender等报道, 急性肝功能衰竭常由肝炎病毒引起, 预后较差. 对于如何防治肝细胞的凋亡和维持肝脏的正常功能是当前的关注焦点.

■**创新盘点**
Caspases家族的研究多集中在肿瘤方面, 肝炎领域的相关研究较少, 且大多局限在动物实验阶段.

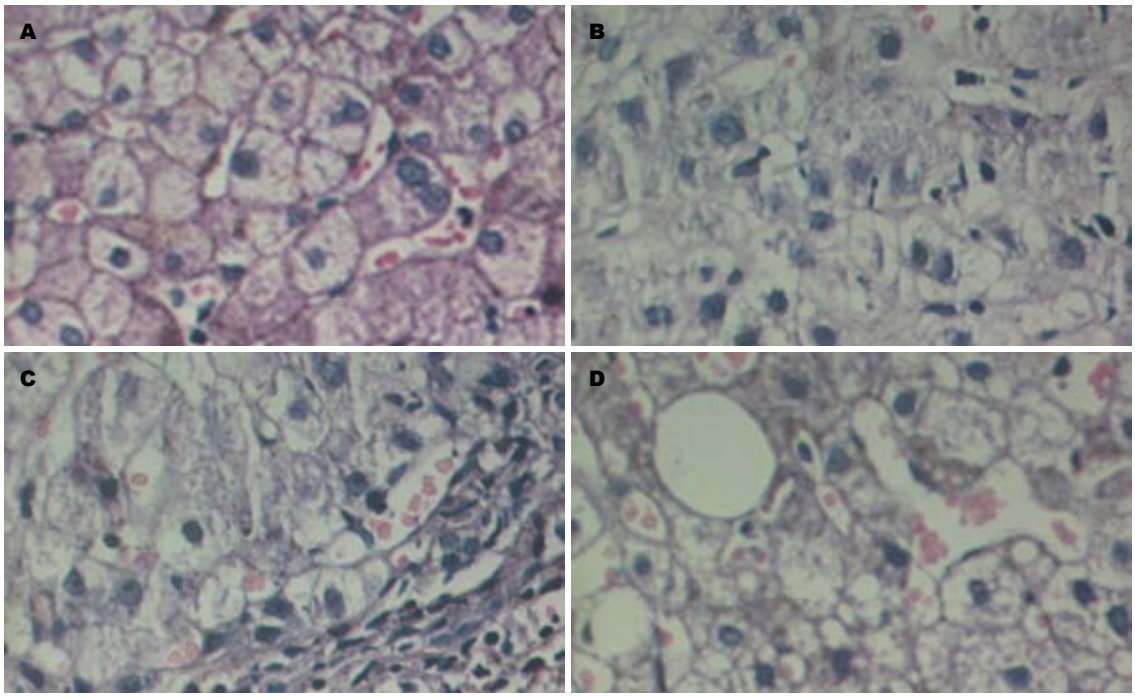


图 1 HE染色镜下观察结果(HE, ×400). 细胞核深蓝色, 胞浆及纤维组织呈深浅不等的红色. A: 正常组肝组织; B: 乙型肝炎肝组织; C: 丙型肝炎肝组织; D: 非酒精性脂肪性肝炎肝组织.

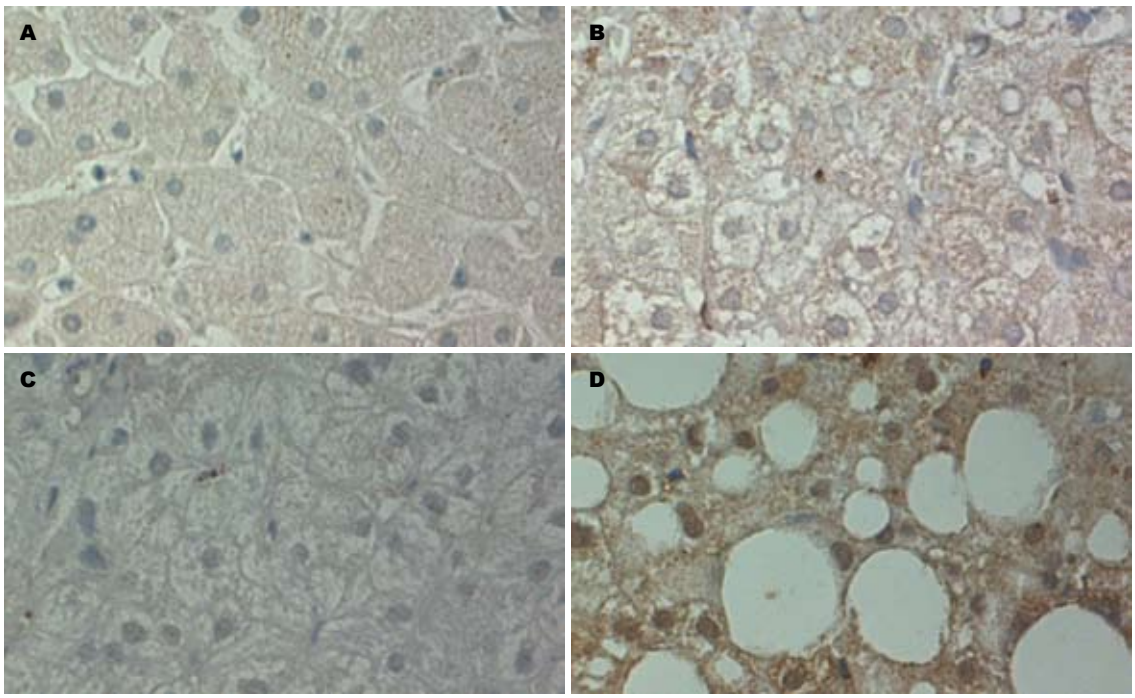


图 2 Caspase-3在肝组织中的表达(PV, ×400). Caspase-3定位于细胞浆和/或细胞核, 呈棕黄色. A: 正常组肝组织; B: 乙型肝炎肝组织; C: 丙型肝炎肝组织; D: 非酒精性脂肪性肝炎肝组织.

凋亡[25,26]. 因此, 慢性乙型肝炎和慢性丙型肝炎的发病机制均与细胞凋亡有关[27,28]. NASH起因很复杂, 但认为此病最初的损伤是由于继发于外周胰岛素抵抗而发生的脂解作用增加和高胰岛素血症所导致的肝细胞脂肪沉积. 进一步的损伤则是因为脂肪过氧化造成肝细胞脂肪变性时产生活性氧族(reactive oxygen species, ROS)而引起氧化应激. 这导致了细胞凋亡的Caspase家族级联反应的发生、并生成一些细胞因子引起炎症反应和出现肝星状细胞激活而引起纤维化[29,30]. 本组资料显示: 在慢性乙型肝炎、慢性丙型肝炎和非酒精性脂肪性肝炎中存在大量肝

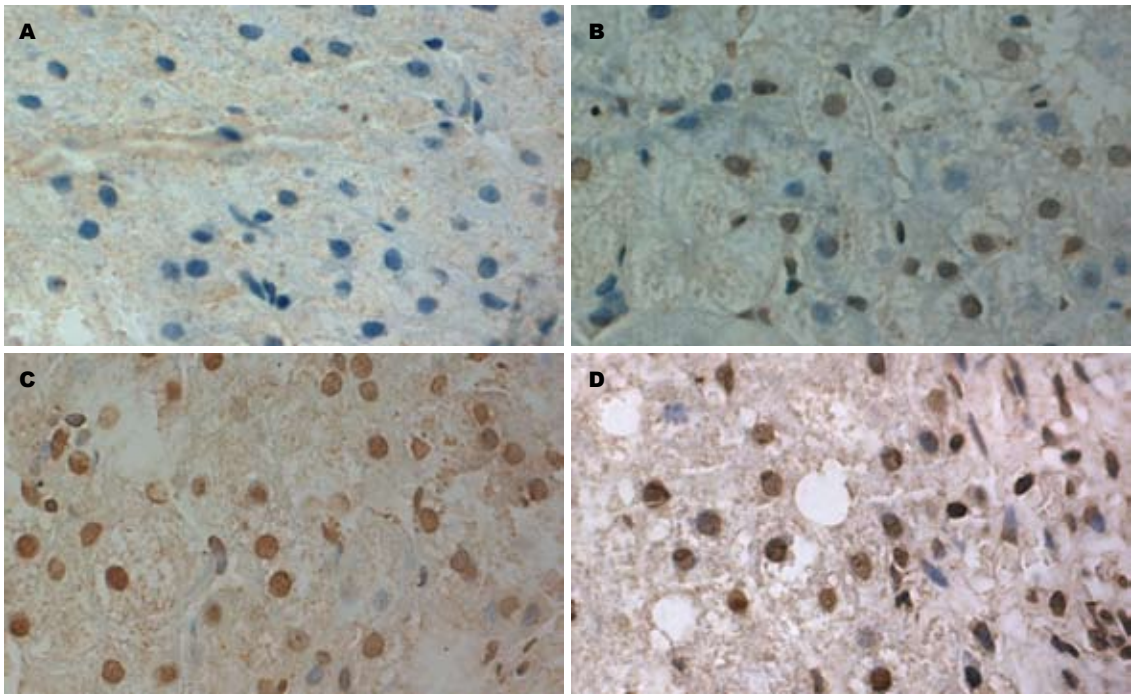


图 3 TUNEL检测的凋亡细胞(HE, ×400). 胞膜完整、核改变, 见核固缩及染色质边聚, 细胞核有棕黄色颗粒. A: 正常组肝组织; B: 乙型肝炎肝组织; C: 丙型肝炎肝组织; D: 非酒精性脂肪性肝炎肝组织.

■应用要点
基础研究证实, 细胞凋亡在炎症的发生和发展过程中起重要作用. 因此, 检测Caspase-3在肝炎中的表达, 结合临床生化指标为深入研究肝炎发病机制提供实验依据, 对肝炎的诊断、治疗、疗效、观察、预后监测具有重要的临床价值, 为Caspase抑制剂应用于肝炎治疗提供理论依据.

细胞凋亡, 说明肝细胞凋亡是慢性乙型肝炎、慢性丙型肝炎和非酒精性脂肪性肝炎的一种重要病理变化. 本组资料还显示: 在慢性肝炎的肝组织中, 凋亡细胞越多, 肝脏损伤程度越重. 提示如果凋亡细胞增多至能足够抗拒机体吞噬作用, 过剩凋亡的肝细胞可能激发肝脏损伤, 这与Leist等[31]研究结果一致.

本研究显示, 慢性乙型肝炎、慢性丙型肝炎、非酒精性脂肪性肝炎病理损伤程度与Caspase-3的表达呈正相关, 表明Caspase-3凋亡系统的激活, 可能促进了肝脏炎症反应. 本研究还显示, Caspase-3在非酒精性脂肪性肝炎中表达明显高于慢性乙型肝炎, 非酒精性脂肪性肝炎除直接或通过促进并存的其他肝病的进展,导致肝衰竭和肝细胞癌外, 还参与2型糖尿病和动脉硬化的发病, 多种因素可能是导致Caspase-3表达增高, 有待进一步研究, Caspase-3在慢性乙型肝炎和慢性丙型肝炎中的表达未见异常, Caspase-3在不同肝炎中的表达为Caspases抑制剂应用于肝炎治疗提供理论和实验依据.

4 参考文献

1 Billaud JN, Peterson D, Lee BO, Maruyama T, Chen A, Sallberg M, Garduño F, Goldstein P, Hughes J, Jones J, Milich D. Advantages to the use of rodent hepadnavirus core proteins as vaccine platforms. *Vaccine* 2007; 25: 1593-1606
2 Kwon JA, Rho HM. Transcriptional repression of the human p53 gene by hepatitis B viral core protein (HBc) in human liver cells. *Biol Chem* 2003; 384: 203-212
3 Kim JH, Kang S, Kim J, Ahn BY. Hepatitis B virus core protein stimulates the proteasome-mediated degradation of viral X protein. *J Virol* 2003; 77: 7166-7173
4 Feldstein AE, Canbay A, Guicciardi ME, Higuchi H, Bronk SF, Gores GJ. Diet associated hepatic steatosis sensitizes to Fas mediated liver injury in mice. *J Hepatol* 2003; 39: 978-983
5 张仁汉, 向小平, 宁心惠, 周喆, 刘宇, 王建辉. 北京市城区中老年居民代谢综合征的患病现况及危险因素分析. 中国全科医学 2009; 12: 2276-2278
6 Bellentani S, Saccoccio G, Masutti F, Crocè LS, Brandi G, Sasso F, Cristanini G, Tiribelli C. Prevalence of and risk factors for hepatic steatosis in Northern Italy. *Ann Intern Med* 2000; 132: 112-117
7 Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, Nuremberg P, Horton JD, Cohen JC, Grundy SM, Hobbs HH. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology* 2004; 40: 1387-1395
8 Fan JG, Zhu J, Li XJ, Chen L, Li L, Dai F, Li F, Chen SY. Prevalence of and risk factors for fatty liver in a general population of Shanghai, China. *J Hepatol* 2005; 43: 508-514
9 Ji Y, Lu G, Chen G, Huang B, Zhang X, Shen K, Wu S. Microcystin-LR Induces Apoptosis via NF-κB/iNOS Pathway in INS-1 Cells. *Int J Mol Sci* 2011; 12: 4722-4734
10 Shannan B, Seifert M, Leskov K, Willis J, Boothman D, Tilgen W, Reichrath J. Challenge and promise: roles for clusterin in pathogenesis, progression and therapy of cancer. *Cell Death Differ* 2006; 13: 12-19
11 Hossain MZ, Kleve MG. Nickel nanowires induced and reactive oxygen species mediated apoptosis in human pancreatic adenocarcinoma cells. *Int J Nano-*

■**同行评价**
本文通过对细胞凋亡关键酶Caspase-3的检测，来探讨慢性乙型肝炎、丙型肝炎及非酒精性脂肪性肝炎的发病机制，选材好，立题新颖，视角独特.

medicine 2011; 6: 1475-1485
12 Tamura R, Kanda T, Imazeki F, Wu S, Nakamoto S, Tanaka T, Arai M, Fujiwara K, Saito K, Roger T, Wakita T, Shirasawa H, Yokosuka O. Hepatitis C Virus nonstructural 5A protein inhibits lipopolysaccharide-mediated apoptosis of hepatocytes by decreasing expression of Toll-like receptor 4. *J Infect Dis* 2011; 204: 793-801
13 Marani M, Tenev T, Hancock D, Downward J, Lemoine NR. Identification of novel isoforms of the BH3 domain protein Bim which directly activate Bax to trigger apoptosis. *Mol Cell Biol* 2002; 22: 3577-3589
14 Woo M, Hakem A, Elia AJ, Hakem R, Duncan GS, Patterson BJ, Mak TW. In vivo evidence that caspase-3 is required for Fas-mediated apoptosis of hepatocytes. *J Immunol* 1999; 163: 4909-4916
15 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会. 病毒性肝炎防治方案. 中华肝脏病杂志 2000; 8: 324-329
16 中华医学会肝脏病学会脂肪肝和酒精性肝病学组. 非酒精性脂肪肝病诊疗指南. 中华肝脏病杂志 2006; 14: 161-163
17 Silva KL, Vasconcellos DV, Castro ED, Vasconcelos FC, Bigni R, Maia RC. Bisphosphonates induce apoptosis in CLL cells independently of MDR phenotype. *Cancer Chemother Pharmacol* 2008; 62: 165-171
18 Sun W, Wang W, Kim J, Keng P, Yang S, Zhang H, Liu C, Okunieff P, Zhang L. Anti-cancer effect of resveratrol is associated with induction of apoptosis via a mitochondrial pathway alignment. *Adv Exp Med Biol* 2008; 614: 179-186
19 Gao C, Tsuchida N. Activation of caspases in p53-induced transactivation-independent apoptosis. *Jpn J Cancer Res* 1999; 90: 180-187
20 王锴, 郁云龙, 刘阳阳, 李恩泽, 哈敏文, 朱志图. 蟾蜍毒素对人胃癌细胞凋亡的诱导机制. 世界华人消化杂志 2011; 19: 116-120
21 Fernandes-Alnemri T, Litwack G, Alnemri ES. CPP32, a novel human apoptotic protein with homology to Caenorhabditis elegans cell death protein Ced-3 and mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *J Biol Chem* 1994; 269: 30761-30764
22 李善妮, 瞿树林, 汤长发. 肝细胞凋亡与自身免疫的关系及影响因素. 中国免疫学杂志 2006; 22: 93-96
23 麦卫华, 韩蓉蓉, 胡学强, 刘汉伟, 寇丽, 周文英. 重症肌无力合并甲状腺功能亢进外周血T淋巴细胞Fas表达研究. 中国实用内科杂志 2012; 32: 360-363
24 孙凯, 刘志苏, 孙权. 线粒体在缺血预处理肝细胞凋亡中的作用. 陕西医学杂志 2003; 32: 967-969, F004
25 谢青, 李光明. 熊去氧胆酸抗肝细胞凋亡分子机制研究进展. 世界临床药物 2004; 25: 679-682
26 张定凤. 肝细胞凋亡和病毒性肝炎. 中华肝脏病杂志 1996; 4: 182-186
27 Ji C, Kaplowitz N. Betaine decreases hyperhomocysteinemia, endoplasmic reticulum stress, and liver injury in alcohol-fed mice. *Gastroenterology* 2003; 124: 1488-1499
28 Tardif KD, Mori K, Siddiqui A. Hepatitis C virus subgenomic replicons induce endoplasmic reticulum stress activating an intracellular signaling pathway. *J Virol* 2002; 76: 7453-7459
29 Leclercq IA, Farrell GC, Field J, Bell DR, Gonzalez FJ, Robertson GR. CYP2E1 and CYP4A as microsomal catalysts of lipid peroxides in murine nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Invest* 2000; 105: 1067-1075
30 Chitturi S, Farrell GC. Etiopathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Semin Liver Dis* 2001; 21: 27-41
31 Leist M, Gantner F, Bohlinger I, Tiegs G, Germann PG, Wendel A. Tumor necrosis factor-induced hepatocyte apoptosis precedes liver failure in experimental murine shock models. *Am J Pathol* 1995; 146: 1220-1234

编辑 翟欢欢 电编 鲁亚静

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2012年12月28日; 20(36): 3707-3712
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

文献综述 REVIEW

Barrett's食管微创治疗的研究进展

刘敬杨, 刘冰熔

刘敬杨, 刘冰熔, 哈尔滨医科大学第二附属医院消化内科 黑龙江省哈尔滨市150000
刘敬杨, 硕士, 主要从事Barrett's食管动物模型的构建及ESD治疗的研究工作.
作者贡献分布: 本篇综述由刘敬杨完成; 刘冰熔审校.
通讯作者: 刘冰熔, 主任医师, 150000, 黑龙江省哈尔滨市学府路246号, 哈尔滨医科大学第二附属医院.
liubingrong@medmail.com.cn
收稿日期: 2012-09-13 修回日期: 2012-09-19
接受日期: 2012-11-02 在线出版日期: 2012-12-28

Minimally invasive treatments for Barrett's esophagus

Jing-Yang Liu, Bing-Rong Liu

Jing-Yang Liu, Bing-Rong Liu, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Haerbin 150000, Heilongjiang Province, China
Correspondence to: Liu-Bing Rong, Chief Physician, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, 246 Xuefu Road, Harbin 150000, Heilongjiang Province, China. liubingrong@medmail.com.cn
Received: 2012-09-13 Revised: 2012-09-19
Accepted: 2012-11-02 Published online: 2012-12-28

Abstract
The incidence of esophageal adenocarcinoma has been rising in recent years. Barrett's esophagus (BE) is widely considered the precursor of invasive adenocarcinoma. High-grade dysplasia (HGD) in BE is the critical step before invasive esophageal adenocarcinoma. Currently, numerous minimally invasive treatments for BE with HGD are available; however, there have been no clear-cut guidelines for a large number of patients due to the individualization of therapy and the absence of long-term outcome evaluation. This review briefly summarizes currently available minimally invasive therapeutic modalities for BE and compares their therapeutic outcomes, with an aim to aid in the choice of the appropriate treatment.

Key Words: Barrett's esophagus; High-grade dysplasia; Endoscopic treatment

Liu JY, Liu BR. Minimally invasive treatments for Barrett's esophagus. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(36): 3707-3712

摘要
Barrett's食管(Barrett's esophagus, BE)是公认的癌前病变, 高度异型增生(high-grade dysplasia, HGD)的出现是进展为食管腺癌的关键. 在我国食管腺癌的发生率正呈快速上升趋势. 因此对BE中出现HGD患者的治疗引起了广泛重视. 随着医疗技术及医疗科技的发展, 各种微创治疗方法不断涌现, 但由于治疗方法的个体化, 及缺乏远期效果的评估, 对大部分患者来说治疗方法的选择还没有明确的指南. 本篇综述的目的是简单介绍各种内镜治疗方法, 比较这些方法的治疗效果, 分析影响治疗效果的相关因素, 以期为该病的治疗提供指导.

关键词: Barrett's食管; 高度异型增生; 内镜治疗

刘敬杨, 刘冰熔. Barrett's食管的微创治疗的研究进展. 世界华人消化杂志 2012; 20(36): 3707-3712
http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3707.asp

■背景资料
Barrett食管是公认的癌前病变, 是进展为食管腺癌的关键, 有着很高度癌变率. 外科手术曾一度被认为是唯一的治疗方法. 随着内镜微创治疗的进展, 各种微创治疗方法不断涌现. 但由于治疗方法的个体化, 及缺乏远期效果的评估, 对大部分患者来说治疗方法的选择还没有明确的指南.

0 引言
Barrett's食管(Barrett's esophagus, BE)是指食管下段复层鳞状上皮被化生的单层柱状上皮所代替的病理现象[1], 是慢性胃食管反流病(gastroesophageal reflux disease, GERD)作用的结果, 代表着该疾病的终末阶段. BE中出现有高度异型增生(high-grade dysplasia, HGD)则是进展为侵袭性食管腺癌前的关键步骤. BE患者发生食管腺癌的风险为普通人群的30-125倍, 而食管癌死亡率约占恶性肿瘤死亡的35.12%[2]. 传统的治疗方法是开胸、迷走神经切断加淋巴结清扫术[3]. 但这种治疗方法不但死亡率高[4], 并发症率高[5], 而且也大大降低了患者术后的生活质量[6]. 由此掀起了内镜下微创治疗研究的热潮. 内镜治疗方法大体分为两类: 热能技术[如射频消融(radiofrequency ablation, RFA)、氩离子凝固术、热探头、激光多极电凝]和非热能技术[如光动力治疗(photodynamic therapy, PDT)、内镜下黏膜切除术(endoscopic mucosal resection, EMR)、冷冻治疗法].

■同行评议者
关晓辉, 主任医师, 吉林北华大学附属医院

■研发前沿
由于食管腺癌死亡率很高，对身为其癌前病变的Barrett食管治疗成为了国内外医疗学者的研究热点. 早期外科手术术后并发症率高，且很大程度上降低了患者的生活质量. 而各种新兴的内镜微创治疗可以减少并发症，提高患者的生活质量.

1 热能技术

热能技术的治疗原理是通过特殊器械产生热能去除破坏病变食管黏膜. 这种特殊医疗器械大体可分为以下几种: 电凝器、氩离子凝固器(argon plasma coagulation, APC)、热探头、钕-钇铝石榴石(Nd: YAG)激光、磷酸钛氧钾($KTiOPO_4$, KTP)激光等. 其中用于BE患者中出现HGD的主要方法为APC法. 喷雾冷冻疗法是另外一种形式的热力学原理疗法, 也应用于HGD患者, 但这种疗法尚缺乏实践经验, 尚未有广泛应用于临床[7].

1.1 APC疗法 APC疗法是通过一种非接触型的凝固技术, 可将高频电能通过电离的氩气传送至病变组织表面, 使其发生凝固变性甚至坏死. 治疗功率一般设置为40-90 W. 有不同研究组就APC方法设定不同电功率对治疗效果的影响分别进行研究[8-10]. 结果显示中高(65-90 W)功率的短期(10.6-12 mo)治愈率较高(98.6%-100.0%). 术后并发症主要是狭窄. 发生率为4.3%-27.5%. 但均能通过内镜下食管扩张术矫正[8,10]. Boeckxstaens等[9]对27个BE患者进行了低电功率的APC治疗, 术后经过平均9 mo(6-18 mo)的随访发现有70%的患者完成了鳞状上皮的逆转, 有30%的患者在新生鳞状上皮下发现了肠化生细胞. 这样看来借助于这种APC治疗方法后经过9-12 mo的随访, 尽管缺乏对其长期有效性的评估, 但APC治疗效果显然与其能量设定直接相关. 需要指出的是APC治疗的相关并发症不仅与其使用的能量强度有关, 也与其与黏膜接触的压力大小及同一部位的治疗次数等相关[11].

1.2 激光疗法 激光疗法通过激光产生的热能效应作用于非正常食管黏膜, 造成深层组织的损伤. 各种激光包括Nd: YAG激光、KTP激光、KTP: YAG激光和氩激光等. 近期, Polese等[12]应用半导体激光治疗(diode laser treatment)对20例病理证实伴有肠上皮化生(intestinal metaplasia, IM)的BE患者进行内镜下治疗, 其中4例合并低度异型增生(low grade dysplasia, LGD), 随访2年, 每隔3 mo行1疗程治疗和每年1次活组织检查, 共进行161次激光疗程治疗(平均每个患者8次)无并发症发生, 所有患者中平均(83%±27%)化生组织在病理活检及内镜下全部消失, 4例LGD恢复鳞状上皮, 在平均随访6年2 mo中无肠化生、复发及疾病进展. 激光治疗对短段BE患者效果较好, 但需反复多次激光治疗, 其主要并发症是食管狭窄、出血等.

1.3 喷雾冷冻疗法 喷雾冷冻疗法主要为瞬间低温所致的组织细胞内外水分先后结晶, 再溶解. 溶解过程中造成了细胞内外渗透压的变化. 常用的低温剂包括液态二氧化碳和液态氮. 目前已经有用于治疗Barrett食管治疗的专用储存设备和传输导管以及管腔内减压装置. Falk等[13]对30例HGD的Barrett食管或黏膜内癌患者行冷冻治疗, 其中90%(27/30)的患者有病理分级下降. Xue等[14]将此方法运用于22名BE患者, 有2名患者随访丢失, 其他患者经平均2次的喷雾冷冻疗法治疗, 6 mo的随访检查示有3名患者出现了BE上皮的复发, 但所有患者都没有出现严重的术后并发症. 冷冻治疗对食管腺癌显示一定疗效, 一项研究中表明[14], 79例食管腺癌患者(T1期60例, T2期16例, T3、T4期3例)接受冷冻治疗后, 局部癌变消失率达61.2%[15]. 冷冻治疗具有较高的安全性, 其不良反应多为轻中度和一过性的胸痛和吞咽困难, 但无需特殊治疗均能缓解. 食管穿孔或狭窄发生率也很低. 与APC和多极电凝治疗相比, 冷冻治疗不需要精准接触病变部位, 因此对胃食管交界部位和食管裂孔疝造成食管扭曲的病变操作难度降低. 同时可实现对BE进行全阶段治疗[16].

2 非热能疗法

2.1 PDT PDT是通过静脉注射或口服某种光敏物质利用其特定的光敏物质在肿瘤或异常组织中高浓度集中, 结合内镜传递特定波长激光照射所产生的光化学能量及有毒的产物-单线态氧分子来破坏Barrett上皮. 5氨基乙酰丙酸是一种经口的光敏物质, 他能引起HGD上皮和癌性上皮组织的严重损伤, 在美国曾应用了一种通过静脉注射能导致深层次损伤的光敏剂-卟吩姆钠[17]. Overholt等[11]将特定波长的光通过一种柱状气囊, 对101个BE中有异型增生的患者进行治疗, 并进行了4年的随访, 通过对该方法的效果进行统计学分析得出, 54%的患者没有残留BE损伤, 成功去除低度、高度异型增生性黏膜及癌变黏膜的成功率分别为93%、78%和48%. 这就意味着HGD和食管腺癌对这种治疗方法存在较强的抵抗性. 术后食管狭窄的发生率为30%, 表示该方法造成了食管壁深层次的损伤. PDT治疗方法的主要限制因素是光敏剂过敏和食管狭窄率的高发[6]. 新一代光敏剂2-去乙烯基-2(1-己基氧乙基)鲍光过敏素(HPPH)由美国Roswell Park肿瘤研究所研发, 目前正在进行治疗食管癌的Ⅰ、Ⅱ期临床试验. HPPH被直径35 nm的

微粒包裹, 体外实验该微粒容易被UCI-107和HeLa(人子宫颈癌细胞)肿瘤细胞主动摄取, 胶囊表面0.5-1.0 nm微孔便于氧气通过而不致药物流失进入血管, 其光毒性明显降低, 以650 nm的激光进行照射就能大量杀死肿瘤细胞, 具有潜在的临床优势[18]. 经长期随访, 行食管癌切除术后的患者其生命质量修正年为11.82年, 行PDT治疗后患者的生命质量修正年为12.31年[19]. 应用卟吩姆钠的PDT对Barrett食管HGD患者具有去除甚至完全逆转肠化生上皮疗效, 能明显降低Barrett食管中HGD患者的癌变率, 这种效果具有长期效应[20]. 此外, 很多HGD患者甚至早期癌患者行PDT治疗后经过5-10年的随访, 经过对照生命时间分析显示患者的病变可以通过该方法得到控制[5].

2.2 RFA RFA是通过固定于内镜上的定向RFA应用装置所产生的高能量热能选择性作用于食管表面黏膜, 其产生的磁场是局部的带电离子快速震荡, 相互碰撞及摩擦产生热能, 使组织水分气化、蛋白质凝固、细胞凋亡, 彻底根除食管内异常细胞. RFA的特点是脱水凝固后的组织产生巨大阻抗, 阻断射频电流, 组织损伤深度得到有效控制[21]. 目前认为热力学疗法造成食管狭窄的原因主要是治疗过程中造成了病变以外组织的副损伤. 尽管RFA也会造成病变周围组织副损伤, 但因为其可以控制损伤深度, 所以并没有造成食管狭窄[22]. 在众多行之有效的内镜消融治疗中, RFA在治疗HGD和IM上取得了可喜的进展. 治疗过程中他可以控制损伤深度, 与光动力学疗法相比较少出现食管狭窄, 且病变复发率也很低. 在一项近期的调查研究中, 对25个超长段BE(≥8 cm)的患者进行RFA治疗. 其中有1例出现了术后出血, 2例出现了术后食管狭窄, 2例出现了术后恶心呕吐. 其中有15个患者进行了至少1次的术后复查并进行了术后病理活检, 1例根据病理检查结果进行了食管切除术, 其他患者都进行了2-3次的RFA治疗. 治疗的有效率为78.5%[23]. Shaheen等[24]的随机对照试验阐述了RFA术用于治疗BE合并HGD显而易见的优点. 另外, 其他改良的RFA技术也对BE治疗进行了有益的尝试, 如多步RFA气囊辅助RFA等. RFA是一种安全高效的治疗方法. 研究人员认为该方法较少引起食管狭窄, 也不易损伤黏膜下腺体. 与其他消融技术相比对BE和早期癌的治疗更加有效[25]. 但值得注意的是, 近期有食管穿孔、狭窄等相关并发症的报道, 故其长期疗效有待进一步验证.

2.3 EMR 自2000年EMR已经不再单纯作为一种活检技术, 而是作为一种治疗技术作用于BE中有HGD的患者, 并在欧美掀起了EMR治疗浪潮[26-33]. 该技术主要是在内镜下将病变黏膜剥离, 并用高频电流完整切除. 通常使用EMR技术包括“透明帽法”和“套扎器”法. 前者通过内镜前端安置的透明帽进行吸引和切除病变黏膜组织; 而后者是应用类似食管曲张静脉套扎装置进行圈套和结扎, 从而移除组织[34,35]. EMR在承德术后狭窄可以通过内镜下扩张治疗改善[36,37]. 若病灶较大亦有局部病灶残留及再发风险[30,38]. 美国芝加哥大学研究中心提出应将BE切除范围延展到内镜下观察到的Z线以上1.0 cm[39]. 这种方法最大的价值在于他能够检测出BE的残余部分的异时性病变, 可以提供精确地术前T分期[40]. EMR已经可以作为BE的治疗方法, 但在治疗较大病灶及癌灶时, 有局部病灶残留及再发的风险, 应加内镜治疗后定期随访复查, 必要时行再次治疗. EMR联合其他内镜治疗BE的方法有望完全去除整个病变. Sampliner[41]将光动力学疗法与EMR相结合应用于BE患者, 在去除病变组织的完整性方面达到了可喜的效果. Larghi等[42]推进了EMR技术, 他对26个BE中有HGD的患者进行了圆周型黏膜切除治疗. 通过对其中23个患者进行了平均28 mo的随访, 21个患者病变上皮彻底清除(87.5%), 1位患者术后3 mo在新生鳞状上皮下发现了Barrett上皮, 还有1位患者在经过12 mo的随访时发现有新生HGD病灶并进行了第二次内镜切除. 因其可以扩大治疗范围, 很多专家都很欣赏这种治疗方法. 但也提出为能够得到其确切的治疗效果评估, 仍需要行大规模的队列研究及长期内镜随访和复查. 他们也同样暗示新的器械可以帮助去除BE上皮及减少残余病变, 新的技术的发展需要新器械的辅助, 希望随着科技的发展能得到理想的结果[43,44].

2.4 内镜黏膜下剥离术(endoscopic submucosal dissection, ESD) ESD是在EMR基础上延伸出的新治疗技术, 适用于2.0 cm以上的黏膜和黏膜下层病变[45]. 该技术起初用于早期胃癌的治疗, 后期逐渐用于早期食管癌和癌前病变的治疗[46]. ESD是使用特殊切割设备(如陶瓷刀、三角形尖刀、伸缩刀、勾刀等)切开病变周围黏膜, 然后对该部分黏膜进行黏膜下剥离术. ESD与传统EMR相比具有很多优势, 他不但能对病变部位能进行大面积一次性切除及病理取样, 而且还

■**创新盘点**
本文通过大量的文献, 总结和概括了Barrett食管现阶段的微创治疗技术, 简单介绍了各种技术的治疗原理和方法. 其中有较常用的内镜射频消融、氩离子凝固术、光动力治疗、内镜下黏膜切除术, 还包括现阶段新兴的冷冻治疗法、内镜下黏膜剥离术, 但新兴方法中前者技术不成熟, 后者技术要求高, 目前相关报道较少.

■应用要点
本文的目的是简单介绍各种内镜治疗方法, 比较这些方法的治疗效果, 分析影响治疗效果的相关因素, 以指导临床上治疗方法的选择.

能降低病变残留率及复发率[47]. 出血和穿孔是其主要并发症, 而且就其操作而言所需时间长, 对内镜医师技术要求较高. 若胃食管反流病患者由于长期慢性反流引起了食管局部炎症和黏膜下纤维化, 就会增加黏膜下剥离的困难, 甚至增加穿孔的危险. 这些均制约了该技术在BE治疗中的应用. 目前为止就ESD方法治疗BE而言还没有相关统计学研究资料来评估其效果. 但随着现代治疗技术水平的提高, 新内镜的出现, 都为ESD治疗提供了更为广阔的空间. 由于EMR和ESD多进行局部病变的切除, 在此基础上衍生出不同食管黏膜环周切除方法, 旨在完全去除Barrett食管肠化生上皮, 但多在动物实验和临床尝试阶段[48], 其操作方法和临床价值仍需评估.

3 结论

现代医学领域无论是内外科专家之间还是不同内镜治疗专家之间对于HGD型BE患者治疗方法的选择上仍存在很多问题. 由于对BE组织恶变的自然发展过程还不是很清楚, 病理组织学诊断与其恶变可能性的关系又没有绝对相关性(这里提到的恶性程度是指其是否出现合并病及食管腺癌的后期发展情况). 若要选择最佳治疗方法, 病灶的多少、侵袭的范围、治疗前病变的分期、患者的意愿及其身体状况都是做出决定的参考因素. 治疗方法的选择是个体化的, 随着各种微创技术的发展及相关治疗效果的研究, 开胸全食管切除加淋巴结清扫伴已经不再是治疗HGD的金标准. 新近一些研究发现内镜治疗后在新生的鳞状上皮下仍有隐匿的Barrett上皮[49], 这些埋藏于新生组织下的肠化生上皮或癌组织可能造成病变复发、肿瘤进展的新的病因, 内镜治疗的长期疗效目前仍不清楚. 现阶段仍然要对各种微创方法进行随机对照试验, 将影响各种治疗技术治疗效果的相关因素规范化, 为更多的临床医师提供治疗技术上的相关指导. 从而为更多的BE患者创造福音[50].

4 参考文献

1 中华医学会消化病学分会. Barrett食管诊治共识. 胃肠病学 2011; 16: 485-486
2 黄山丽, 宋育林, 许建明. 122例早期食管癌的临床和病理分析. 安徽医药 2010; 14: 69-71
3 Collard JM. High-grade dysplasia in Barrett's esophagus. The case for esophagectomy. *Chest Surg Clin N Am* 2002; 12: 77-92
4 Swisher SG, Deford L, Merriman KW, Walsh GL, Smythe R, Vaporicyan A, Ajani JA, Brown T, Komaki R, Roth JA, Putnam JB. Effect of operative volume on morbidity, mortality, and hospital use after esophagectomy for cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2000; 119: 1126-1132
5 Begg CB, Cramer LD, Hoskins WJ, Brennan MF. Impact of hospital volume on operative mortality for major cancer surgery. *JAMA* 1998; 280: 1747-1751
6 Barr H. High-grade dysplasia in Barrett's oesophagus. The case against oesophageal resection. *Ann R Coll Surg Engl* 2007; 89: 586-588
7 Dumot JA, Vargo JJ, Falk GW, Frey L, Lopez R, Rice TW. An open-label, prospective trial of cryospray ablation for Barrett's esophagus high-grade dysplasia and early esophageal cancer in high-risk patients. *Gastrointest Endosc* 2009; 70: 635-644
8 Schulz H, Miehlke S, Antos D, Schentke KU, Vieth M, Stolte M, Bayerdörffer E. Ablation of Barrett's epithelium by endoscopic argon plasma coagulation in combination with high-dose omeprazole. *Gastrointest Endosc* 2000; 51: 659-663
9 Boeckxstaens GE, Hirsch DP, Fakhry N, Holloway RH, D'Amato M, Tytgat GN. Involvement of cholecystokininA receptors in transient lower esophageal sphincter relaxations triggered by gastric distension. *Am J Gastroenterol* 1998; 93: 1823-1828
10 Pereira-Lima JC, Busnello JV, Saul C, Toneloto EB, Lopes CV, Rynkowski CB, Blaya C. High power setting argon plasma coagulation for the eradication of Barrett's esophagus. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 1661-1668
11 Overholt BF, Panjehpour M, Halberg DL. Photodynamic therapy for Barrett's esophagus with dysplasia and/or early stage carcinoma: long-term results. *Gastrointest Endosc* 2003; 58: 183-188
12 Polese L, Angriman I, Scarpa M, Pagano D, Parente P, Erroi F, Frego M, D'Amico DF, Norberto L. Diode laser treatment of Barrett's esophagus: long-term results. *Lasers Med Sci* 2011; 26: 223-228
13 Falk GW, FREV L, Lopez R, Rice TW. An open-label,prospective trial of cryospray ablation for Barrett's esophagus high-grade dysplasia and early esophageal cancer in high-risk patients. *Gastrointest Endosc* 2009; 70: 635-644
14 Xue HB, Tan HH, Liu WZ, Chen XY, Feng N, Gao YJ, Song Y, Zhao YJ, Ge ZZ. A pilot study of endoscopic spray cryotherapy by pressurized carbon dioxide gas for Barrett's esophagus. *Endoscopy* 2011; 43: 379-385
15 Greenwald BD, Dumot JA, Abrams JA, Lightdale CJ, David DS, Nishioka NS, Yachimski P, Johnston MH, Shaheen NJ, Zfass AM, Smith JO, Gill KR, Burdick JS, Mallat D, Wolfsen HC. Endoscopic spray cryotherapy for esophageal cancer: safety and efficacy. *Gastrointest Endosc* 2010; 71: 686-693
16 杨云生. Barrett食管的内镜治疗. 中华消化内镜杂志 2011; 28: 489-491
17 Overholt BF, Lightdale CJ, Wang KK, Canto MI, Burdick S, Haggitt RC, Bronner MP, Taylor SL, Grace MG, Depot M. Photodynamic therapy with porfimer sodium for ablation of high-grade dysplasia in Barrett's esophagus: international, partially blinded, randomized phase III trial. *Gastrointest Endosc* 2005; 62: 488-498
18 Bellnier DA, Greco WR, Loewen GM, Nava H, Oseroff AR, Dougherty TJ. Clinical pharmacokinetics of the PDT photosensitizers porfimer sodium (Photofrin), 2-[1-hexyloxyethyl]-2-devinyl pyropheophorbide-a (Photochlor) and 5-ALA-induced protoporphyrin IX. *Lasers Surg Med* 2006; 38: 439-444

19 Vij R, Triadafilopoulos G, Owens DK, Kunz P, Sanders GD. Cost-effectiveness of photodynamic therapy for high-grade dysplasia in Barrett's esophagus. *Gastrointest Endosc* 2004; 60: 739-756
20 Overholt BF, Wang KK, Burdick JS, Lightdale CJ, Kimmey M, Nava HR, Sivak MV, Nishioka N, Barr H, Marcon N, Pedrosa M, Bronner MP, Grace M, Depot M. Five-year efficacy and safety of photodynamic therapy with Photofrin in Barrett's high-grade dysplasia. *Gastrointest Endosc* 2007; 66: 460-468
21 Wang KK, Sampliner RE. Updated guidelines 2008 for the diagnosis, surveillance and therapy of Barrett's esophagus. *Am J Gastroenterol* 2008; 103: 788-797
22 Eldaif SM, Lin E, Singh KA, Force SD, Miller DL. Radiofrequency ablation of Barrett's esophagus: short-term results. *Ann Thorac Surg* 2009; 87: 405-410; discussion 410-411
23 Vassiliou MC, von Renteln D, Wiener DC, Gordon SR, Rothstein RI. Treatment of ultralong-segment Barrett's using focal and balloon-based radiofrequency ablation. *Surg Endosc* 2010; 24: 786-791
24 Shaheen NJ, Sharma P, Overholt BF, Wolfsen HC, Sampliner RE, Wang KK, Galanko JA, Bronner MP, Goldblum JR, Bennett AE, Jobe BA, Eisen GM, Fennerty MB, Hunter JG, Fleischer DE, Sharma VK, Hawes RH, Hoffman BJ, Rothstein RI, Gordon SR, Mashimo H, Chang KJ, Muthusamy VR, Edmundowicz SA, Spechler SJ, Siddiqui AA, Souza RF, Infantolino A, Falk GW, Kimmey MB, Madanick RD, Chak A, Lightdale CJ. Radiofrequency ablation in Barrett's esophagus with dysplasia. *N Engl J Med* 2009; 360: 2277-2288
25 Sharma VK, Wang KK, Overholt BF, Lightdale CJ, Fennerty MB, Dean PJ, Pleskow DK, Chuttani R, Reymunde A, Santiago N, Chang KJ, Kimmey MB, Fleischer DE. Balloon-based, circumferential, endoscopic radiofrequency ablation of Barrett's esophagus: 1-year follow-up of 100 patients. *Gastrointest Endosc* 2007; 65: 185-195
26 May A, Gossner L, Behrens A, Kohnen R, Vieth M, Stolte M, Ell C. A prospective randomized trial of two different endoscopic resection techniques for early stage cancer of the esophagus. *Gastrointest Endosc* 2003; 58: 167-175
27 Nijhawan PK, Wang KK. Endoscopic mucosal resection for lesions with endoscopic features suggestive of malignancy and high-grade dysplasia within Barrett's esophagus. *Gastrointest Endosc* 2000; 52: 328-332
28 Waxman I, Saitoh Y. Clinical outcome of endoscopic mucosal resection for superficial GI lesions and the role of high-frequency US probe sonography in an American population. *Gastrointest Endosc* 2000; 52: 322-327
29 Buttar NS, Wang KK, Lutzke LS, Krishnadath KK, Anderson MA. Combined endoscopic mucosal resection and photodynamic therapy for esophageal neoplasia within Barrett's esophagus. *Gastrointest Endosc* 2001; 54: 682-688
30 May A, Gossner L, Pech O, Müller H, Vieth M, Stolte M, Ell C. Intraepithelial high-grade neoplasia and early adenocarcinoma in short-segment Barrett's esophagus (SSBE): curative treatment using local endoscopic treatment techniques. *Endoscopy* 2002; 34: 604-610
31 Pacifico RJ, Wang KK, Wongkeesong LM, Buttar NS, Lutzke LS. Combined endoscopic mucosal resection and photodynamic therapy versus esophagectomy for management of early adenocarcinoma in Barrett's esophagus. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2003; 1: 252-257
32 Mino-Kenudson M, Brugge WR, Puricelli WP, Nakatsuka LN, Nishioka NS, Zukerberg LR, Misdraji J, Lauwers GY. Management of superficial Barrett's epithelium-related neoplasms by endoscopic mucosal resection: clinicopathologic analysis of 27 cases. *Am J Surg Pathol* 2005; 29: 680-686
33 Ell C, May A, Pech O, Gossner L, Guenter E, Behrens A, Nachbar L, Huijsmans J, Vieth M, Stolte M. Curative endoscopic resection of early esophageal adenocarcinomas (Barrett's cancer). *Gastrointest Endosc* 2007; 65: 3-10
34 Soehendra N, Binmoeller KF, Bohnacker S, Seitz U, Brand B, Thonke F, Gurakuqi G. Endoscopic snare mucosectomy in the esophagus without any additional equipment: a simple technique for resection of flat early cancer. *Endoscopy* 1997; 29: 380-383
35 Van Vilsteren FG, Bergman JJ. Endoscopic therapy using radiofrequency ablation for esophageal dysplasia and carcinoma in Barrett's esophagus. *Gastrointest Endosc Clin N Am* 2010; 20: 55-74, vi
36 Qiu L, Chuttani R, Zhang S, Feng J, Itani S, Fang H, Pleskow D, Sawhney MS, Salahuddin S, Modell MD, Vitkin E, Hanlon EB, Itzkan I, Perelman LT. Diagnostic imaging of esophageal epithelium with clinical endoscopic polarized scanning spectroscopy instrument. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* 2009; 2009: 1997-2000
37 Zhu Y, Fearn T, Mackenzie G, Clark B, Dunn JM, Bigio IJ, Bown SG, Lovat LB. Elastic scattering spectroscopy for detection of cancer risk in Barrett's esophagus: experimental and clinical validation of error removal by orthogonal subtraction for increasing accuracy. *J Biomed Opt* 2009; 14: 044022
38 Sharma P. Endoscopic mucosal resection of early cancer and high-grade dysplasia in Barrett's esophagus. *Gastrointest Endosc* 2002; 55: 137-139
39 郭志芳, 李兆申. 内镜黏膜切除术的进展及临床应用进展. 中华消化内镜杂志 2006; 23: 478- 80
40 Badreddine RJ, Prasad GA, Lewis JT, Lutzke LS, Borkenhagen LS, Dunagan KT, Wang KK. Depth of submucosal invasion does not predict lymph node metastasis and survival of patients with esophageal carcinoma. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2010; 8: 248-253
41 Qiu L, Chuttani R, Zhang S, Feng J, Itani S, Fang H, Pleskow D, Sawhney MS, Salahuddin S, Modell MD, Vitkin E, Hanlon EB, Itzkan I, Perelman LT. Diagnostic imaging of esophageal epithelium with clinical endoscopic polarized scanning spectroscopy instrument. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* 2009; 2009: 1997-2000
42 Sampliner RE. Endoscopic ablative therapy for Barrett's esophagus: current status. *Gastrointest Endosc* 2004; 59: 66-69
43 Larghi A, Lightdale CJ, Memeo L, Bhagat G, Okpara N, Rotterdam H. EUS followed by EMR for staging of high-grade dysplasia and early cancer in Barrett's esophagus. *Gastrointest Endosc* 2005; 62: 16-23
44 Chennat J, Konda VJ, Ross AS, de Tejada AH, Noffsinger A, Hart J, Lin S, Ferguson MK, Posner MC, Waxman I. Complete Barrett's eradication en-

■名词解释

光动力学疗法(PDT): 通过静脉注射或口服某种光敏物质利用特定的光敏物质在肿瘤或异常组织中高浓度集中, 结合内镜传递特定波长激光照射所产生的光化学能量及有毒的产物-单线态氧分子来破坏Barrett上皮.

■同行评价
本文对Barrett食管的微创治疗进行了介绍和总结，指出各种方法的优缺点，内容真实，对临床不同患者选择治疗方法有一定指导意义.

doscopic mucosal resection: an effective treatment modality for high-grade dysplasia and intramucosal carcinoma--an American single-center experience. *Am J Gastroenterol* 2009; 104: 2684-2692
45 Namasivayam V, Wang KK, Prasad GA. Endoscopic mucosal resection in the management of esophageal neoplasia: current status and future directions. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2010; 8: 743-754; quiz e96
46 Moss A, Bourke MJ, Hourigan LF, Gupta S, Williams SJ, Tran K, Swan MP, Hopper AD, Kwan V, Bailey AA. Endoscopic resection for Barrett's high-grade dysplasia and early esophageal adenocarcinoma: an essential staging procedure with long-term therapeutic benefit. *Am J Gastroenterol* 2010; 105: 1276-1283
47 Saito Y, Uraoka T, Matsuda T, Emura F, Ikehara H, Mashimo Y, Kikuchi T, Fu KI, Sano Y, Saito D. Endoscopic treatment of large superficial colorectal tumors: a case series of 200 endoscopic submucosal dissections (with video). *Gastrointest Endosc* 2007; 66: 966-973
48 Willingham FF, Gee DW, Sylla P, Lauwers GY, Rattner DW, Brugge WR. En bloc esophageal mucosectomy for concentric circumferential mucosal resection (with video). *Gastrointest Endosc* 2009; 69: 147-151
49 Bronner MP, Overholt BF, Taylor SL, Haggitt RC, Wang KK, Burdick JS, Lightdale CJ, Kimmey M, Nava HR, Sivak MV, Nishioka N, Barr H, Canto MI, Marcon N, Pedrosa M, Grace M, Depot M. Squamous overgrowth is not a safety concern for photodynamic therapy for Barrett's esophagus with high-grade dysplasia. *Gastroenterology* 2009; 136: 56-64; quiz 351-352
50 Bennett C, Green S, Barr H, Bhandari P, Decaesteckker J, Ragunath K, Singh R, Tawil A, Jankowski J. Surgery versus radical endotherapies for early cancer and high grade dysplasia in Barrett's oesophagus. *Cochrane Database Syst Rev* 2010; (5): CD007334

编辑 翟欢欢 电编 鲁亚静

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》性质、刊登内容及目标

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

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

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

《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学领域的专家评论及临床实践和基础研究相结合具有实践意义的文章, 为内科学、外科学、感染病学、中医药学、肿瘤学、中西医结合学、影像学、内镜学、介入治疗学、病理学、基础研究等医生和研究人员提供转换平台, 更新知识, 为患者康复服务.

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2012年12月28日; 20(36): 3713-3718
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

文献综述 REVIEW

胃食管反流病的发病机制及其诊治的进展

史燕妹, 赵公芳, 黄 华

史燕妹, 赵公芳, 黄华, 昆明医科大学第二附属医院消化内科 云南省昆明市 650101
史燕妹, 在读硕士, 主要从事消化内科的相关研究.
作者贡献分布: 本文文献资料由赵公芳收集; 综述由史燕妹完成; 黄华负责审校.
通讯作者: 史燕妹, 在读硕士, 650101, 云南省昆明市西山区麻园1号, 昆明医科大学第二附属医院消化内科.
78227118@qq.com
收稿日期: 2012-11-13 修回日期: 2012-12-11
接受日期: 2012-12-20 在线出版日期: 2012-12-28

Recent progress in research of gastroesophageal reflux disease: Pathogenesis, diagnosis and treatment

Yan-Mei Shi, Gong-Fang Zhao, Hua Huang

Yan-Mei Shi, Gong-Fang Zhao, Hua Huang, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650101, Yunnan Province, China
Correspondence to: Yan-Mei Shi, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Kunming Medical University, 1 Mayuan Road, Xishan District, Kunming 650101, Yunnan Province, China. 78227118@qq.com
Received: 2012-11-13 Revised: 2012-12-11
Accepted: 2012-12-20 Published online: 2012-12-28

Abstract
The incidence of gastroesophageal reflux disease has been increasing annually in China. The emergence of new techniques in recent years has not only facilitated the diagnosis of this complex disease but also improved the understanding of the pathogenesis of this disease. Nowadays much attention is paid to adverse reactions of drugs such as proton pump inhibitors and prokinetic agents for gastroesophageal reflux disease, which has promoted the development of new treatments for gastroesophageal reflux disease. In this review, we will summarize recent progress in research of gastroesophageal reflux disease in terms of its pathogenesis, diagnosis and treatment.

Key Words: Gastroesophageal reflux disease; Pathogenesis; Diagnosis; Therapy

Shi YM, Zhao GF, Huang H. Recent progress in research of gastroesophageal reflux disease: Pathogenesis, diagnosis and treatment. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(36): 3713-3718

摘要
胃食管反流病患病率逐年升高, 临床表现复杂多样, 需要新型技术协助诊断, 这些新型诊断手段也促进胃食管反流病发病机制的深入研究. 近年质子泵抑制剂及胃肠动力药长期使用的不良反应备受关注, 推动胃食管反流病的治疗方法不断发展. 现就近年来胃食管反流病的发病机制与诊治手段的相关研究进展做一综述.

关键词: 胃食管反流病; 发病机制; 诊断手段; 治疗

史燕妹, 赵公芳, 黄华. 胃食管反流病的发病机制及其诊治的进展. 世界华人消化杂志 2012; 20(36): 3713-3718
http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3713.asp

0 引言
胃食管反流病是指胃或者十二指肠内容物反流入食管引起不适症状和/或并发症的一种疾病, 分生理性与病理性两种[1]. 典型症状是食管表现, 烧心与反流最具特征性, 还可出现胸痛、吞咽困难[2]. 此外还会有食管外表现, 如咽喉炎、慢性咳嗽和哮喘, 甚至咽部异物感、堵塞感等癔球症[3]. 亚洲地区以每周至少发作一次烧心或反流为诊断标准, 然后按照内镜下食管表现分为了反流性食管炎, 非糜烂性反流病和Barrett食管炎3个类型[4]. 近年相关文章的陆续发表可以看出胃食管反流病患病率逐年上升[5]. 胃食管反流病发病机制较复杂, 目前的治疗主要是应用质子泵抑制剂促进食管黏膜愈合及胃肠动力药提高食管下括约肌(lower esophageal sphincter, LES)压力[6]. 由于该病复发率为57%-90%, 患者必须长期服用质子泵抑制剂及促动力药缓解症状[7]. 近年来长期应用质子泵抑制剂及促动力药的一些不良反应受到关注: 质子泵抑制剂长期使用导致胃腺癌发生、老年人的骨质疏松、肠道内细菌过度生长等[8], 5-羟色胺-4受体激动剂

■背景资料
胃食管反流病患者群分布广泛而且患病率逐年升高, 症状严重的患者可影响生活质量; 胃食管反流病并发症Barrett食管是癌前病变, 经内镜治疗术后复发率较高; 胃食管反流病长期药物治疗的不良反应备受关注, 这也推动GERD发病机制的发展, 为诊治手段提供可靠的理论基础, 使新型诊治手段具有广泛的临床应用前景.

■同行评议者
许文燮, 教授, 上海交通大学基础医学院病理、生理与病理生理系

■**创新盘点**
本文总结了近年对胃食管反流病的发病机制及其诊治的新进展, 并客观评价了其研究的现实意义, 同时展望了其将来的研究前景.

替加色罗增加严重心血管系统不良反应已停止销售. 另一方面, 十二指肠胃食管反流病是具有独立危险因素的复杂反流病, 质子泵抑制剂对其治疗效果不佳[9]. 所以在减少胃食管反流病发病与药物使用方面, 危险因素的预防具有重要作用[10], 另外只有深入研究发病机制才能从根本上找到治疗靶点, 指导治疗.

近年胃食管反流病的发病机制在解剖结构作用如食管下括约肌、细胞分子学水平如食管上皮渗透性改变、唾液中表皮生长因子和蛋白酶激活受体-2, 甚至在基因水平研究都有新进展, 另外在幽门螺杆菌对胃食管反流病的影响方面也有了新的认识[11]. 胃食管反流病发病机制的发展推动诊治手段的进步, 出现了高分辨食管测压系统、24 h-pH监测及核素胃食管反流检查等新型诊断手段, 也出现了腹腔镜下胃食管反流病手术、食管下括约肌注射、食管下括约肌电刺激法及呼吸及训练法等新型治疗方法.

1 胃食管反流病的发病机制

胃食管反流病的发病机制根本上就是抗食管反流的防御屏障和反流物对食管黏膜攻击作用之间失去平衡[12].

1.1 *食管下括约肌* LES是胃食管反流的抵御屏障. 曾经认为LES压力>6 mmHg, 腹部LES长度>1 cm还有LES全长>2 cm是完整的LES的条件, 但是近年借助高分辨率食管测压系统研究表明LES压力积分>400 mmHg/(s•cm), LES全长>2 cm和腹部LES长度>1 cm才是LES维持有效抵御作用的重要因素[13]. 1999年, 邹磊等[14]用灌注式多导测压系统研究LES长度测定的临床意义, 提出了LES在胃食管反流患者无明显缩短或上提的观点, 与先前“酸刺激引起食管缩短, 上提而易伴食管裂孔疝”的提法有所不同. 随着高分辨率测压系统和动态阻抗pH监测的出现, 又将LES对酸暴露抵御作用的研究推向一个新阶段[15]. 2011年Hoshino等[16]研究表明: (1)LES长度<2 cm者的LES压力积分和食管蠕动推进速率均小于LES长度>2 cm者, 24h-pH检测结果提示LES长度与远端食管酸暴露及DeMeester评分无关; (2)腹部LES<1 cm者的LES压力积分及LES压力均明显小于腹部LES>1 cm者; (3)食管远端出现pH<4的时间≥总检测时间的4.2%称为pH监测阳性; 食管远端出现pH<4的时间占总监测时间的比例越高, 会获得相应更高的DeMeester评分, 说明具有更严重的远端食管酸暴露情况. pH监测阳性者LES压力积分[平均209 mmHg/(s•cm))远远小于pH检测阴性者LES压力积分(平均421 mmHg/(s•cm)], 腹部LES长度<1 cm者占pH监测阳性者60%以上; (4)LES压力积分是LES 10 s的压力总和, LES压力是某一个时间点上的压力, 在诊断食管反流上LES压力积分比LES压力要敏感得多; 60%胃食管反流患者LES压力>10 mmHg, LES压力积分却与远端食管酸反流严重程度存在正相关性; (5)按照LES压力积分大小将人群分为以下3类: 第1类: <400 mmHg/(s•cm); 第2类: = 400-800 mmHg/(s•cm); 第3类: >800 mmHg/(s•cm). LES压力积分<400 mmHg/(s•cm)的受试者中有70%是pH监测阳性者, 增加了DeMeester评分中诊断反流的得分; (6)几乎所有腹部LES长度<1 cm和LES压力积分<400 mmHg/(s•cm)同时存在的受试者腹部远端食管均有酸反流. 2012年Tsuboi等[17]研究也证实腹部LES长度及LES压力积分相互作用, 共同影响食管远端酸暴露.

1.2 *食管上皮渗透性改变* 一些人群虽然拥有完整的食管下括约肌[腹部食管下括约肌长度>1 cm, 食管下括约肌长度>2 cm, 食管下括约肌压力积分>400 mmHg/(s•cm)]但仍出现了24 h-pH监测阳性. 2011年Jovov等[18]利用电镜发现胃食管反流患者食管上皮细胞间隙增宽, 将胃食管反流病的病因研究深化到细胞与分子层面. 进一步考虑食管钙黏蛋白(E-cadberin)具有保持上皮细胞间连接, 加强上皮屏障的作用, 因此应用蛋白印迹(Western blot)检测发现, 钙黏蛋白有降解; 另外食管上皮电阻监测电阻降低及荧光素监测流量升高, 这些都支持钙黏蛋白降解导致食管上皮渗透性增加, 进而导致上皮功能障碍. 2012年Savarino等[19]也发现区别微观食管炎与功能性烧心患者比较可靠的证据是食管下段组织活检发现有细胞膨胀间隙, 这个组织学异常也是导致食管上皮渗透性改变, 发生炎症的原因之一.

1.3 *唾液的防御作用* 除了LES及食管上皮的机械屏障作用之外, 唾液的分泌也是食管防御机制的重要组成成分. 唾液下咽对食管有廓清作用, 可以中和及稀释进入食管中的反流物, 唾液中还含有促进食管表皮细胞生长的表皮生长因子[20]. 对照研究发现胃食管反流病患者的唾液PH、分泌量及表皮生长因子含量均明显低于正常人, 提示唾液腺功能不良[21]. 还有研究发现用5-羟色胺激动剂可以刺激唾液分泌, 并使食管碳酸氢盐流量和表皮生长因子均增加, 因此5-羟色

胺激动剂对唾液质与量的影响可能是其在促动力之外的另一个胃食管反流病治疗靶点[22].

1.4 蛋白酶激活受体-2 2004年Natio等[23]研究发现胃食管反流病患者白细胞介素-8的表达明显升高, 但一直未明确白细胞介素-8水平升高的通路. 2010年Kandulski等[24]研究发现严重的胃食管反流病患者反流物中出现十二指肠内容物, 特别是胰蛋白酶离开正常功能环境会引起明显的黏膜损伤, 他的直接破坏机制与蛋白酶激活受体-2(proteinase-activated receptors-2, PAR-2)有关, 蛋白酶激活后导致食管黏膜炎症因子白细胞介素-8表达增加, 参与食管黏膜炎症反应, 造成上皮损伤. PAR-2与白细胞介素-8通路阐释了胃食管反流病分子及炎症改变.

1.5 基因水平的易感因素 (1)Ⅲ型胶原蛋白a1链为胃食管反流病的敏感基因, 在家庭胃食管反流病的发生中占主导地位[25]; (2)氨基丁酸转氨酶也是胃食管反流病发生的敏感基因, 动物实验发现使用ABAT抑制剂可减少食管下括约肌一过性松弛和反流的发生[26]; (3)G蛋白B3亚单位调节G蛋白耦联过程, 高表达的患者食管黏膜对酸反流更敏感, 从而导致胸痛和反流性食管炎[27]; (4)微小RNA具有组织特异性及其时序性决定细胞功能的特异性, 有研究表明可直接调控Barrett食管进展为食管腺癌[28].

1.6 幽门螺杆菌感染 幽门螺杆菌对胃食管反流病的影响还存在争议, 根除幽门螺杆菌也要权衡利弊, 个体化治疗. 幽门螺杆菌感染引起胃体黏膜炎症, 使局部相关细胞因子增加, 胃酸分泌减少, 胃黏膜萎缩; 而根除幽门螺杆菌后会出现酸分泌反跳并不伴壁细胞数量增加, 尽管胃酸分泌恢复可能使原先无症状的反流转而出现症状, 但不根除幽门螺杆菌又有引发胃癌的风险, 故需因人而异. 幽门螺杆菌引起的胃窦炎症则引起胃泌素增加, 胃酸分泌增加, 因此根除幽门螺杆菌会减轻胃食管反流病症状[29].

2 胃食管反流病的诊断手段

胃食管反流病的诊断手段现应用于临床的有胃食管反流病诊断问卷[30], 其操作简单省时, 但是经过其他辅助检查的证实发现工具量表阳性诊断率偏低, 故其只能作为诊断的一个参考; 上消化道内镜的使用比较广泛[31], 但是胃食管反流病中的一种类型: 非糜烂性反流病在内镜下通常无黏膜损伤, 所以就体现了上消化道内镜的局限性, 需要另外的检查手段来补充他的不足之处. 近年来迅速发展的食管高分辨率测压和24 h-pH监测、核素胃食管反流检查可以鉴别病因, 指导治疗.

高分辨率测压系统是近年来发展的一种新型固态测压系统, 采用密集分布的压力传感器同步采集整个食管压力的数据, 通过计算机软件转变为三维空间图像, 更简单直观地分析结果[32]. 在食管测压中, 高分辨率测压系统能同步监测从咽部到腹部的压力变化. 高分辨率测压图比起传统的测压记录具有以下优点: (1)准确的描绘和显示了食管及其括约肌的功能运动; (2)很容易区分痉挛性收缩引起的管腔受压和食管功能失调食团受阻, 并可客观区分贲门失迟缓症, 食管远端痉挛, 功能性梗阻及亚型[33], 因为他的诊断优势, 所以被广泛应用于临床. 动态腔内pH监测24 h胃酸反流入食管, 了解食管下端酸暴露情况, 他比起传统pH监测研究扩大了信息面, 提高早期诊断胃食管反流检出率[34]. 曾经因为24 h-pH监测可以对胃食管反流进行定性和定量而被认为是诊断胃食管反流病的金标准[35], 但随着临床病例的总结发现一些患者存在十二指肠内容物反流, 24 h-pH监测结果为阴性, 所以胆盐检测技术迅速发展起来, 并动摇了24 h-pH监测诊断胃食管反流病金标准的地位[36]. 由于高分辨率食管测压及24 h-pH监测为侵入性检查且检查时间较长, 所以推动了核素胃食管反流检查的进步. 这个检查操作简单, 检查时间短暂, 只需要5 min左右, 将反流的程度与影像学结合起来, 能够反映静息状态和腹压增加时有无反流, 具有定量指标[37].

3 胃食管反流病的治疗进展

对于胃食管反流病的治疗, 多年以来主要以药物治疗为主[38], 强调改善生活方式和饮食习惯, 辅以抗反流手术及内镜下治疗胃食管反流病并发症如食管狭窄及Barrett食管[39]. 近年腹腔镜下胃食管反流病手术、LES注射、电刺激和呼吸肌训练法等新型治疗方法随着诊断手段的发展而兴起. 随着腹腔镜的飞速发展及在腹部手术的广泛应用, 腹腔镜下胃底折叠术[40]及食管裂孔疝反流患者的袖状胃切除术[41]已经成功开展. 2012年Granero Cendón等[42]对行腹腔镜下胃底折叠术及袖状胃切除术的胃食管反流病患者术后生活质量及症状缓解进行评估, 研究发现患者不但生活质量和反流症状得以改善, 而且营养状况明显好转.

■应用要点
胃食管反流病复发率高, 随着发病机制的深入研究, 必将为胃食管反流病的诊断和治疗提供潜在的理论基础, 并具有广泛的临床应用前景.

■名词解释
蛋白酶激活受体-2: 作为一中未被完全了解的丝氨酸蛋白酶受体, 广泛分布于整个消化系统. 其在食管黏膜上高表达与食管炎发生相关, 而在胃和肠黏膜上的高表达则保护黏膜, 促进胃肠蠕动, 另外与胰腺炎和消化系肿瘤的发生也密切相关.

2005年, Watson等[43]开始研究新型LES注射方法, 将Enteryx-一种生化相容性的非吸收性多聚物, 通过硬化治疗针注射到LES深部黏膜里, 他能迅速在原处凝固. 他的作用原理是增加胃食管连接处体积并降低LES顺应性, 从而减少反流. 这个技术的效果评价时间是24 mo, 以质子泵抑制剂使用量及食管下端酸暴露情况作为评价指标, 发现两个指标在注射治疗以后均明显降低. 这个技术被证实了主要适用于质子泵抑制剂依赖的胃食管反流病患者, 并且没有足够的证据证明远期的安全性和有效性, 所以还需大量临床样本的探索.

LES电刺激(electrical stimulation)可以提升LES压力, 减轻胃食管反流病症状. 电刺激分为两种, 一种是短暂型电刺激(short-term electrical stimulation)这个刺激维持30 min , 具有两种刺激器: 低能型和高能型. 低能型是刺激装置为频率20 Hz, 流量是5 mA到15 mA; 高能型是刺激装置为频率6 cpm, 流量为5 mA. 2012年, Rodríguez等[44]记录患者短暂电刺激前胃食管反流病症状并测量LES压力, 在给予短暂电刺激后7 d复测LES压力及了解患者症状改善情况, 研究表明短暂电刺激能增强LES收缩, 增加LES压力, 但不影响LES松弛. 另外一种是永久型电刺激, 在LES处植入一个20 Hz的电刺激装置, 他根据每个患者的胃食管反流情况裁定发出3 mA到8 mA电流的时间和数量. 2012年Lee等[45]在患者植入电刺激装之前进行胃食管反流病健康相关的生活质量评估和24 h-pH监测, 于植入后6 mo评估效果, 同样进行以上两样测试, 进行自身对照, 研究发现患者胃食管反流症状和酸反流减轻, 并且暂时还没有不良反应发生. 电刺激治疗法作为个体化治疗将减少质子泵抑制剂和促动力药的使用, 减少药物产生的不良反应.

呼吸肌训练法可以增加胸腔压力从而使胃食管反流病患者LES紧张[46]. 2012年Polisel等[47]通过食管测压和肺功能检测对经过2次/wk, 一共8 wk的呼吸肌训练的患者进行效果评价, 研究发现患者LES压力和呼气末压力均增加. 这个治疗方法简单无痛苦, 但是对症状缓解及生活质量改善还需要更多样本进行更长期的研究.

膈肌生物反馈治疗可以增加胃食管连接处功能, 减少酸暴露时间[48]. 还有能够减少LES松弛的药物如一氧化氮合成酶, 5-羟色胺拮抗剂, 辣椒素, 胆囊收缩素-A拮抗剂(如右旋氯谷胺)等成为治疗胃食管反流病的新靶点[49], 但是临床疗效尚待考证.

4 结论

胃食管反流病患病率连年增加, 临床表现复杂多样, 需要新型诊断手段包括高分辨率测压系统、24 h-pH监测、胆盐监测及核素食管反流检查等协助, 这些新型技术也使得胃食管反流病的发病机制深入化. 近年对质子泵抑制剂及胃肠动力药长期使用出现的不良反应的关注, 这推动了胃食管反流病治疗方法不断发展, 但是新型治疗方法包括LES注射法、LES电刺激疗法、物理呼吸疗法的安全性及有效性还有待临床大量样本的探索[42].

5 参考文献

1 Calvet X, Villoria A. [Esophageal diseases: gastroesophageal reflux disease and Barrett's esophagus]. *Gastroenterol Hepatol* 2012; 35 Suppl 1: 26-34

2 Vakil N, van Zanten SV, Kahrilas P, Dent J, Jones R. [The Montreal definition and classification of gastroesophageal reflux disease: a global, evidence-based consensus paper]. *Z Gastroenterol* 2007; 45: 1125-1140

3 Bozymski EM. Pathophysiology and diagnosis of gastroesophageal reflux disease. *Am J Hosp Pharm* 1993; 50: S4-S6

4 Liu X, Li M, Xu D, Hou Y, Wang Q, Tian Z, Sun Q, Zeng X. Prevalence and clinical importance of gastroesophageal reflux in Chinese patients with systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol* 2012; 30: S60-S66

5 Jung HK, Hong SJ, Jo YJ, Jeon SW, Cho YK, Lee KJ, Lee JS, Park HJ, Shin ES, Lee SH, Han SU. [Updated guidelines 2012 for gastroesophageal reflux disease]. *Korean J Gastroenterol* 2012; 60: 195-218

6 陈强, 邱忠明 药物是治疗胃食管反流慢性咳嗽的主要方法. 上海社区医师 2012; 28: 10

7 Seehusen DA, Escano J. Managing chronic gastroesophageal reflux disease. *Am Fam Physician* 2012; 86: 617-619

8 Ito T, Jensen RT. Association of long-term proton pump inhibitor therapy with bone fractures and effects on absorption of calcium, vitamin B12, iron, and magnesium. *Curr Gastroenterol Rep* 2010; 12: 448-457

9 Kunsch S, Neesse A, Linhart T, Nell C, Gress TM, Ellenrieder V. Prospective Evaluation of Duodenogastroesophageal Reflux in Gastroesophageal Reflux Disease Patients Refractory to Proton Pump Inhibitor Therapy. *Digestion* 2012; 86: 315-322 *[Epub ahead of print]*

10 Yamamichi N, Mochizuki S, Asada-Hirayama I, Mikami-Matsuda R, Shimamoto T, Konno-Shimizu M, Takahashi Y, Takeuchi C, Niimi K, Ono S, Kodashima S, Minatsuki C, Fujishiro M, Mitsushima T, Koike K. Lifestyle factors affecting gastroesophageal reflux disease symptoms: a cross-sectional study of healthy 19864 adults using FSSG scores. *BMC Med* 2012; 10: 45

11 Shapiro M, Simantov R, Yair M, Leitman M, Blatt A, Scapa E, Broide E. Comparison of central and intraesophageal factors between gastroesophageal reflux

disease (GERD) patients and those with GERD-related noncardiac chest pain. *Dis Esophagus* 2012; 25: 702-708
12 Szczesniak MM, Fuentealba SE, Cook IJ. Acid sensitization of esophageal mucosal afferents: implication for symptom perception in patients across the gastroesophageal reflux disease spectrum. *Clin J Pain* 2013; 29: 70-77
13 Kahrilas PJ. Esophageal motor disorders in terms of high-resolution esophageal pressure topography: what has changed? *Am J Gastroenterol* 2010; 105: 981-987
14 邹磊, 蒋绚, 赵景涛. 食管下括约肌长度测定的临床意义. 北京医科大学学报 1999; 31: 90-92
15 Bansal A, Kahrilas PJ. Has high-resolution manometry changed the approach to esophageal motility disorders? *Curr Opin Gastroenterol* 2010; 26: 344-351
16 Hoshino M, Sundaram A, Mittal SK. Role of the lower esophageal sphincter on acid exposure revisited with high-resolution manometry. *J Am Coll Surg* 2011; 213: 743-750
17 Tsuboi K, Hoshino M, Sundaram A, Yano F, Mittal SK. Role of the lower esophageal sphincter on esophageal acid exposure - a review of over 2000 patients. *Trop Gastroenterol* 2012; 33: 107-111
18 Jovov B, Que J, Tobey NA, Djukic Z, Hogan BL, Orlando RC. Role of E-cadherin in the pathogenesis of gastroesophageal reflux disease. *Am J Gastroenterol* 2011; 106: 1039-1047
19 Savarino E, Zentilin P, Mastracci L, Dulbecco P, Marabotto E, Gemignani L, Bruzzone L, de Bortoli N, Frigo AC, Fiocca R, Savarino V. Microscopic esophagitis distinguishes patients with non-erosive reflux disease from those with functional heartburn. *J Gastroenterol* 2012 Sep 25. *[Epub ahead of print]*
20 Eckley CA, Rios Lda S, Rizzo LV. Salivary egf concentration in adults with reflux chronic laryngitis before and after treatment: preliminary results. *Braz J Otorhinolaryngol* 2007; 73: 156-160
21 邹方明, 庄则豪. 胃食管反流病发病机制研究进展. 中华临床医师杂志(电子版) 2011; 5: 1674-0785
22 Yang L, Cai H, Tou J, Gu W, Shu X, Zhang T, Yang X, Shen Z, Jiang M. The role of the 5-hydroxytryptamine pathway in reflux-induced esophageal mucosal injury in rats. *World J Surg Oncol* 2012; 10: 219
23 Yoshida N, Uchiyama K, Kuroda M, Sakuma K, Kokura S, Ichikawa H, Naito Y, Takemura T, Yoshikawa T, Okanoue T. Interleukin-8 expression in the esophageal mucosa of patients with gastroesophageal reflux disease. *Scand J Gastroenterol* 2004; 39: 816-822
24 Kandulski A, Wex T, Mönkemüller K, Kuester D, Fry LC, Roessner A, Malfertheiner P. Proteinase-activated receptor-2 in the pathogenesis of gastroesophageal reflux disease. *Am J Gastroenterol* 2010; 105: 1934-1943
25 张玉琴, 亚斯古楞, 任建林. 胃食管反流病的危险因素以及相关疾病的研究概况. 胃肠病学 2012; 17: 307-310
26 de Vries DR, ter Linde JJ, van Boxel OS, van Herwaarden MA, Shephard P, Geng MM, Schwartz MP, Samsom M. In gastroesophageal reflux disease, differential gene expression in the duodenum points towards enhanced chylomicron production and secretion. *Dig Dis Sci* 2012; 57: 1475-1485
27 van Boxel OS, ter Linde JJ, Oors J, Otto B, Feinle-Bisset C, Smout AJ, Siersema PD. Duodenal lipid-induced symptom generation in gastroesophageal reflux disease: role of apolipoprotein A-IV and cholecystokinin. *Neurogastroenterol Motil* 2012; 24: 350-e168
28 Billeter AT, Barnett RE, Druen D, Polk HC, van Berkel VH. MicroRNA as a New Factor in Lung and Esophageal Cancer. *Semin Thorac Cardiovasc Surg* 2012; 24: 155-165
29 Pasechnikov VD, Chotchaeva AR, Pasechnikov DV. [Effect of HP eradication on the development of gastroesophageal reflux disease: results of the prospective study]. *Eksp Klin Gastroenterol* 2011; (3): 105-110
30 陈治, 周力, 张永宏, 朱健. 胃食管反流病量表在疾病诊断中的价值. 贵阳医学院学报 2012; 37: 426-427, 429
31 Shaheen NJ, Weinberg DS, Denberg TD, Chou R, Qaseem A, Shekelle P; for the Clinical Guidelines Committee of the American College of Physicians. Upper Endoscopy for Gastroesophageal Reflux Disease: Best Practice Advice From the Clinical Guidelines Committee of the American College of Physicians. *Ann Intern Med* 2012; 157: 808-816
32 Koch OO, Kaindlstorfer A, Antoniou SA, Spaun G, Pointner R, Swanstrom LL. Subjective and objective data on esophageal manometry and impedance pH monitoring 1 year after endoscopic full-thickness plication for the treatment of GERD by using multiple plication implants. *Gastrointest Endosc* 2013; 77: 7-14
33 Pandolfino JE, Roman S. High-resolution manometry: an atlas of esophageal motility disorders and findings of GERD using esophageal pressure topography. *Thorac Surg Clin* 2011; 21: 465-475
34 Karoui S, Ben Temime H, Serghini M, Zouiten L, Boubaker J, Filali A. [24-hour esophageal impedance-ph monitoring: technical aspects, indications and results]. *Tunis Med* 2012; 90: 351-356
35 Kleiman DA, Sporn MJ, Beninato T, Metz Y, Crawford C, Fahey TJ 3rd, Zarnegar R. Early referral for 24-h esophageal pH monitoring may prevent unnecessary treatment with acid-reducing medications. *Surg Endosc* 2012 Dec 12. *[Epub ahead of print]*
36 尹向前, 郭红. 胃食管反流病的诊断进展. 临床合理用药杂 2012; 5: 171-172
37 张勤生. 胆汁反流性胃炎的临床研究. 中外医疗 2012; 31: 80-81
38 Awad RA. Medical and surgical management of esophageal and gastric motor dysfunction. *Minerva Gastroenterol Dietol* 2012; 58: 227-238
39 Moretó M, Ojembarrena E, Barturen A, Casado I. Treatment of Achalasia by Injection of Sclerosant Substances: A Long-Term Report. *Dig Dis Sci* 2012 Nov 22. *[Epub ahead of print]*
40 Lee WJ, Chan CP, Wang BY. Recent advances in laparoscopic surgery. *Asian J Endosc Surg* 2012 Nov 6. *[Epub ahead of print]*
41 Pomp A. Comment on: Sleeve gastrectomy and crural repair in obese patients with gastroesophageal reflux disease and/or hiatal hernia. *Surg Obes Relat Dis* 2012 Aug 2. *[Epub ahead of print]*
42 Granero Cendón R, Ruiz Hierro C, Garrido Pérez JI, Vargas Cruz V, Lasso Betancor CE, Paredes Esteban RM. [Evaluation of quality of life in patients operated on for gastroesophageal reflux in the pediatric age]. *Cir Pediatr* 2012; 25: 82-86
43 Watson TJ, Peters JH. Lower esophageal sphincter injections for the treatment of gastroesophageal re-

■同行评价

本文条理清晰, 利用最新的文献综述了有关胃食管反流病发病机制、诊断和治疗的进展. 本文的内容有一定的新颖性, 具有一定的可读性, 对临床相关工作具有一定的指导意义.

flux disease. *Thorac Surg Clin* 2005; 15: 405-415
44 Rodríguez L, Rodríguez P, Neto MG, Ayala JC, Saba J, Berel D, Conklin J, Soffer E. Short-term electrical stimulation of the lower esophageal sphincter increases sphincter pressure in patients with gastroesophageal reflux disease. *Neurogastroenterol Motil* 2012; 24: 446-450, e213
45 Lee WJ, Chan CP, Wang BY. Electrical stimulation therapy of the lower esophageal sphincter is successful in treating GERD: final results of open-label prospective trial. Surg Endosc 2012 Nov 6. *[Epub ahead of print]*
46 Romdhane H, Ben Abdallah H, Abdelli MN. [Nocturnal gastroesophageal reflux and sleep apnea: what relationship?]. *Tunis Med* 2012; 90: 598-601
47 Carvalho de Miranda Chaves R, Suesada M, Polisel F, de Sá CC, Navarro-Rodriguez T. Respiratory physiotherapy can increase lower esophageal sphincter pressure in GERD patients. *Respir Med* 2012; 106: 1794-1799
48 Aziz AM, El-Khayat HR, Sadek A, Mattar SG, McNulty G, Kongkam P, Guda MF, Lehman GA. A prospective randomized trial of sham, single-dose Stretta, and double-dose Stretta for the treatment of gastroesophageal reflux disease. *Surg Endosc* 2010; 24: 818-825
49 杨建, 刘梅, 何键, 张兴明, 王汉斌. 胃食管反流病研究进展. 检验医学与临床 2012; 9: 1752-1754

编辑 翟欢欢 电编 鲁亚静

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》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出版权转让给本刊编辑部.

2 稿件修改

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

3 版权

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

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2012年12月28日; 20(36): 3719-3724
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

文献综述 REVIEW

肝细胞癌诊治的新起点

陈 鹏, 李 菲

陈鹏, 李菲, 天津市传染病医院慢性肝炎科 天津市 300192
陈鹏, 主要从事临床常见肝病的诊疗工作.
作者贡献分布: 本文综述由陈鹏完成; 李菲审校.
通讯作者: 李菲, 教授, 300192, 天津市南开区苏堤路75号, 天津市传染病医院慢性肝炎科. crbyya3@yahoo.cn
电话: 022-27468212
收稿日期: 2012-11-01 修回日期: 2012-12-08
接受日期: 2012-12-20 在线出版日期: 2012-12-28

Diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma: A new beginning

Peng Chen, Fei Li

Peng Chen, Fei Li, Department of Chronic Hepatitis, Tianjin Infectious Diseases Hospital, Tianjin 300192, China
Correspondence to: Fei Li, Professor, Department of Chronic Hepatitis, Tianjin Infectious Diseases Hospital, 75 Sudi Road, Nankai District, Tianjin 300192, China. crbyya3@yahoo.cn
Received: 2012-11-01 Revised: 2012-12-08
Accepted: 2012-12-20 Published online: 2012-12-28

Abstract
In endemic areas for hepatitis B virus (HBV) infection, hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the leading causes of cancer death, posing a serious threat to human health. Because of the high incidence and high mortality rate of HCC in the world, it has become a global health problem. Hepatitis B vaccination is an important means of preventing HBV infection, which can indirectly reduce the occurrence of HCC. Currently, although alpha-fetoprotein (AFP) and liver ultrasonography are still important for early diagnosis of HCC, they have some limitations. The emergence of new tumor markers and imaging technology will help improve the accuracy of early diagnosis of HCC. Molecularly targeted drugs are a hotspot of oncologic research in recent years, and multidisciplinary treatment gives us new hope for defeating HCC.

Key Words: Hepatocellular carcinoma; Early diagnosis; Molecularly targeted therapy

Chen P, Li F. Diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma: A new beginning. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(36): 3719-3724

摘要
在乙型肝炎高流行区, 肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是癌症死亡的主要原因之一, 严重威胁人类健康. 因肝细胞癌的高发生率和高致死率, 现已成为世界问题. 而随着分子生物学及肿瘤遗传学等研究的深入, 乙型肝炎疫苗接种成为预防乙型肝炎病毒感染的重要手段, 从而间接减少了HCC的发生. 在HCC早期诊断上, 甲胎蛋白(alpha-fetoprotein, AFP)和肝脏超声检查(ultrasound, US)仍然是HCC监测筛查的重要指标, 但仍有一定的局限性, 新型肿瘤标志物和影像学技术的出现更有助于提高HCC早期诊断的准确性. 分子靶向药物为近年肿瘤学研究的热点, 而多学科综合治疗模式才是人类战胜HCC的新希望.

关键词: 肝细胞癌; 早期诊断; 分子靶向治疗

陈鹏, 李菲. 肝细胞癌诊治的新起点. 世界华人消化杂志 2012; 20(36): 3719-3724
http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3719.asp

■背景资料
肝细胞癌(HCC)是一种复杂的多机制疾病, 随着分子生物学、细胞学等多学科研究的深入, 对HCC发病机制的认识也逐渐得到充实, 这也将为HCC的预防、早期诊断和治疗带来更多的途径和手段. 今后, 建立完善的控制HBV感染突破或对乙型肝炎病毒疫苗无反应战略, 推广预防HCC疫苗概念将成为人类战胜HCC的前提; AFP和US虽然是HCC的常规筛查监测指标, 但具有一定的局限性, 新一代HCC标志物的出现以及CT技术、超声造影等影像学技术的发展, 将为HCC的早期诊断带来希望.

0 引言
肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是世界范围内普遍存在的恶性肿瘤之一, 随着美国和欧洲发病率的增长, 他已经位于全球癌症相关性死因的第3位[1,2], 严重地威胁人类的身体健康和生命安全. 我国是全球HCC发病率最高的国家. 据统计, 目前我国HCC发病人数占全球的55%, 而死亡人数占全世界死亡人数的45%, 对国人的身体健康造成严重的威胁[3]. 近年来, 随着分子生物学的临床应用及肿瘤遗传学的发展, HCC的基础研究和诊疗方面也在不断进步. 众多学者已将目光转向HCC的预防和早期诊断, 而该病的高复发率也为更多业内人士针对HCC治疗有效性的对比研究创造了契机, 分子靶向治疗成为了研究的热点, 这可能将成为HCC诊治的新起点.

1 HCC发生的预防
1.1 HCC与乙型肝炎病毒感染的相关性 根据2010

■同行评议者
白浪, 副教授, 四川大学华西医院感染性疾病中心

■**创新盘点**
本文从HCC的预防, 早期诊断以及分子靶向治疗入手, 对HCC今年来诊治方面的热点和进展进行综述. 通过本文可以系统了解HCC的预防措施进展, 新近发现的一些重要的具有临床应用价值的肿瘤标志物, 影像学技术在HCC早期诊断的进展和HCC分子靶向治疗的进展.

年新版乙型肝炎指南, 我国乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染者约有9 300万, 1%-5%可进展为肝癌, 其中HCC占到90%以上. 有调查表明, HBV感染人群HCC发病率比对照人群高200倍以上[4,5]. 因此, HCC与HBV感染有紧密的关系. Xu等[6]的研究显示, HBV X蛋白通过抑制Notch1信号通路减缓细胞的衰老样生长停滞这一全新的功能, 可能是介导HBV相关性HCC形成的一个潜在分子机制, 这也说明了HBV感染对HCC的形成起到促进作用.

1.2 HCC的防治措施 HCC预防的最好策略在于对HBV的预防, 重点是广泛接种乙型肝炎疫苗以阻断HBV的母婴传播和人群间的水平传播. 截至2008年, 不少国家出现了免疫儿童和全人群乙型肝炎发病率、HBsAg感染率均有明显下降的趋势[7,8]. 然而, 从1990年开始分型报告以来, 乙型肝炎发病率从21.93/10万上升到2008年的88.52/10万; 成人仍然有约9 300万HBsAg携带者[9]. 因此, 在新生儿乙型肝炎疫苗计划免疫这一政策的基础上, 进一步研究成人乙型肝炎疫苗免疫策略, 探讨适用于成人的乙型肝炎基因疫苗的最佳免疫程序和剂量, 提高成人乙型肝炎疫苗的免疫接种率和免疫成功率, 进而加快控制乙型肝炎的进程, 是今后乙型肝炎防治研究的重点[10]. 但目前仍有1/3的HCC患者不能通过乙型肝炎疫苗免疫加以阻断, 失败的原因在于不完全乙型肝炎疫苗免疫和HBV感染突破. 后者定义为出生24 mo后HBV核心蛋白抗体阳性[11].

2 HCC的早期诊断

由于HCC的早期监测和诊断可显著提高患者的远期生存率[12]. 因此, 应重视对HCC的早期筛查和早期监测. 常规的早期筛查监测指标主要包括血清甲胎蛋白(alpha-fetoprotein, AFP)和肝脏超声检查(ultrasound, US). 随着影像学技术的发展, 对高危人群监测的加强、手术切除及肝移植的广泛开展, 越来越多的较小的占位性病变被发现, 其中主要是肝脏异型增生结节和早期HCC, 所以深入认识这类病变对于提高HCC或癌前病变的早期检出及预测患者预后均有重要意义, 新一代肿瘤标志物的出现和影像学技术的运用将可能成为早期HCC诊断的新方向.

2.1 分子生物学在HCC早期诊断中的作用 AFP是目前全世界应用最广泛的肝癌肿瘤标记物, 但有学者认为, AFP的诊断和筛查价值很差[13-15]. 尤其是早期HCC阳性率更低, 不足以早期发现HCC, 尽管有敏感的影像学支持, 他的诊断价值也在受到争议[16,17]. 因此, 目前仍缺乏理想的肝癌血清筛查指标, 特别是早期肝癌的血清标志物[18]. 磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3(Glypican-3, GPC3)是近来发现的具有潜在价值的肝癌血清标记物. Yasuda等[19]发现不同分化HCC组织中GPC3染色的增加, 这表明GPC3是由HCC肿瘤组织所产生. 有研究显示, 血清GPC3是AFP最重要的互补指标, GPC3相比较AFP有更高的灵敏度, 故与AFP联合检测可显著提高HCC诊断的灵敏度和特异性[20,21]. 新近发现的血管再生因子血管生成素-2(angiopoietin-2, Ang-2)及其受体(Tie2)系统, 在肿瘤血管新生过程中发挥着重要作用[22]. 血清Ang-2表达水平可作为一种新的具有临床应用价值的肿瘤标志物, 而Tie2表达的单核细胞则可作为与血管生成相关HCC的诊断标志物, 这有助于HCC的早期诊断、疗效评价、预后预测及高危对象的监测[23,24]. 血清高尔基蛋白73(golgi protein 73, GP73)是一种新发现的肝癌血清标志物. 郑昭敏等[25]的研究发现, 血清GP73在以乙型肝炎为基础的原发性HCC中的早期诊断价值优于AFP, 但在与肝硬化鉴别诊断中的价值有待于进一步探讨. 而Marrero等[26]对352例血清标本行免疫印迹技术分析, 发现HCC患者血清GP73水平显著高于肝硬化患者, 其早期发现HCC的敏感度显著高于AFP, 提示GP73可能成为一种有潜在价值的HCC标志物. 有报道指出, AFP与肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)、胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor, IGF)、白介素-6(interleukin-6, IL-6)、白介素8(interleukin-8, IL-8)、白细胞介素10(interleukin-10, IL-10)、转化生长因子-β1(ransforming growth factor-beta 1, TGF-β1)和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的联合检测系统优于传统单一AFP对早期HCC的诊断, 显示出他潜在的临床价值[27].

2.2 CT技术和超声造影在HCC早期诊断的价值 HCC的早诊断、早治疗对患者的预后尤为重要, 而肝脏实质性小占位病变(直径≤3 cm), 临床症状多不明显, 良恶性鉴别困难. 普通超声和CT检查有着一定的局限性. 近年来, 高端螺旋CT尤其是双源螺旋CT增强及超声造影技术在临床肝脏病变诊断上越来越得到广泛应用, 对于早期发现小肝癌有重要的诊断价值[28]. 房伟等[29]回顾性分析了73例确诊的肝实质性小病变的双源CT和超声造影的特点及诊断准确性, 进行分析总结,

结果提示双源CT与超声造影对肝实质性小病变有着很好的诊断一致性. CT灌注成像(CT perfusion imaging, CTPI)是通过对肝脏局部连续动态扫描获得病灶区和非病灶区的血流参数, 利用不同区域的参数差异来推断病灶性质, 成为对传统影像有参考价值的辅助诊断方法[30]. 尤其对AFP阴性的HCC患者, CTPI参数具有独立的诊断价值[31].

3 HCC的分子靶向治疗

HCC的发生、发展和转移与多种基因的突变、细胞信号传导通路和新生血管增生异常等密切相关, 其中存在着多个关键性环节, 证实进行分子靶向治疗的理论基础和重要的潜在靶点. 因此, 分子靶向治疗药物包括: (1)多靶点抑制剂, 如索拉非尼(sorafenib)和苏尼替尼(sunitinib)等; (2)抗表皮生长因子受体药物, 如厄罗替尼(erlotinib)和西妥昔单抗(cetuximab); (3)抗血管生成药物, 如贝伐单抗(bevacizumab)和brivanib等; (4)信号传导通路抑制剂, 如mTOR抑制剂依维莫司(everolimus RAD001). 尤其对多靶点多激酶抑制剂是近年来研究的亮点.

3.1 *分子靶向单药治疗* 索拉非尼是一种口服的多激酶抑制剂, 具有较强的抗血管生成作用. 最近在西方临太平洋地区和亚洲临太平洋地区进行了两个枢纽性3期随机安慰剂对照试验[32,33]. 其研究结果显示, 使用索拉非尼单药治疗的晚期恶性肿瘤患者获得了生存受益. 另一个多激酶小分子化合物苏尼替尼, 被美国FDA批准用于治疗晚期肾细胞癌[34], 一项苏尼替尼2期临床试验对45例晚期肝癌患者接受37.5 mg/d苏尼替尼治疗直至疾病进展或者不可耐受的不良反应. 结果显示, 37.5 mg/d苏尼替尼治疗是可行的, 并且适用于晚期肝癌和轻到中度肝功能障碍的患者[35]. 动物试验表明, 抗表皮生长因子受体药物厄罗替尼无论在体内还是体外对HCC都没有直接的抗肿瘤作用, 但与西妥昔单抗有协同作用, 联合用药值得进一步探索[36,37]. 抗血管生成药物贝伐单抗单药应用, 在HCC患者中具有积极的作用和很好的耐受性[38]. 而brivanib具有可控制的安全性, 他在先前接受索拉非尼治疗的进展期HCC患者中, 表现出有前景的抗肿瘤活性[39]. mTOR抑制剂依维莫司在终末期HCC的1/2期试验中, 10 mg/d依维莫司耐受性良好, 尽管试验并未进入到2期试验第2个阶段, 但依维莫司的抗肿瘤活性已经得到证实[40]. 肝细胞生长因子(hepatoeyte growth factor, HGF)是重要的肝再生介质之一, 其受体为c-Met, 为酪氨酸激酶受体. c-Met在包括HCC在内的多种肿瘤细胞内均有高表达或突变. HGF和c-Met结合后, 通过一系列信号转导通路, 与细胞生长、分化、血管生成等密切相关, 促进HCC细胞浸润和转移, 可能成为治疗HCC的有效靶点[41]. NK4是HGF截短的内源性片段, 可与c-Met受体结合, 但不能活化c-Met受体, 从而拮抗HGF与c-Met的相互作用, 抑制HCC细胞侵袭和转移. Heideman等[42]的研究显示, 以NK4干扰肿瘤生长、侵袭、转移和血管生成为基础的多效应HCC的基因治疗是一种很有前途的策略.

3.2 *分子靶向药物联合治疗* 在SHARP和ORIENTAL研究中, 索拉非尼都是单药使用, 在提倡多学科综合治疗的今天, 多种治疗手段联合无疑是今后发展的主旋律, 合理地综合应用各种治疗方法将有可能达到最佳的疗效. 虽然贝伐单抗与厄罗替尼的联合使用对于不能手术切除的HCC或者不适合局部治疗的转移性HCC患者, 未显示出明显的有效性, 并且不需要进一步研究, 然而, 这可以作为不能耐受索拉非尼治疗患者的一种替代性疗法[43]. Piguet等[44]的研究结果显示, 依维莫司增强了索拉非尼在原位HCC模型上的疗效, 依维莫司和索拉非尼联合抗肿瘤作用强于单药治疗. 需要注意的是, 苏尼替尼与索拉非尼治疗晚期HCC患者的3期SUN1170试验, 由于增加苏尼替尼治疗相关性严重不良事件和未必能达到额外疗效而被终止[45]. 因此, 分子靶向药物联合治疗仍需进一步探索.

3.3 *分子靶向药物与其他药物的联合使用* 化疗药物与分子靶向药物联合使用的报道是对综合治疗模式的进一步探索, 也进一步证实了靶向治疗在HCC综合治疗中的重要作用. 有文献表明联合其他化疗药物可增强索拉非尼作用. Abou-Alfa等[46]进行的2期随机试验结果显示, 联合使用索拉非尼和阿霉素治疗晚期肝癌获得良好效果. 索拉非尼和阿霉素间可能存在协同作用, 因为索拉非尼可能潜在地抑制了Raf/MAPK/ERK信号通路, 从而避免了多耐药性通路的激活. 西妥昔单抗、卡培他滨和奥沙利铂联合治疗方案, 尽管腹泻明显, 但是耐受性好, 联合治疗作用平缓, 但有很高的AFP反应率和影像学稳定率, 病情进展和总体生存时间比索拉非尼治疗组预期的要短[47]. 现阶段大规模3期随机试验正在筹备中, 以比较这个方案与单药索拉非尼

■**应用要点**
本文对HCC预防措施的进展进行了系统的综述, 以期为今后的研究提供新的方向.

■同行评价
文章引用了近5年有影响力的国外SCI文章, 对肝细胞癌诊治的新方法, 新策略进行了详细综述, 提供了大量信息, 内容新颖, 具有一定的临床使用价值.

治疗晚期肝癌患者的疗效. 索拉非尼与缺氧或肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体的联合应用具有协同杀伤HCC细胞色素酶的作用, 这种效果源于索拉非尼介导的抗凋亡蛋白的下调[48].

3.4 聚焦经肝动脉化疗栓塞治疗最新动态 经肝动脉化疗栓塞(transarterial chemoembolization, TACE)是使HCC患者受益的介入治疗手段, 常常被作为HCC患者原位肝移植(orthotopic liver transplant, OLT)的过渡性治疗. 一项中期START分析结果显示, 多激酶抑制剂索拉非尼与传统TACE联合治疗手段安全有效, 未出现意外性不良反应[49]. 而药物洗脱颗粒(drug eluting bead, DEB)的TACE是HCC的一种新型局部治疗手段, 结合了动脉的局部栓塞和邻近组织的化疗, 使用方法与传统的TACE相似[50]. DEB-TACE微粒由具有生物相容性的高分子材料作为化疗的黏合物. 他减少了肿瘤的血供, 阿霉素的缓慢释放也增强了局部抗肿瘤的效果, 减少了其他部位与化疗药物的接触. DEB-TACE的最新研究数据显示4年内50%的生存率[51], 而他作为一种颇有前景的新型局部治疗手段, 理论上与其他治疗手段联合, 综合治疗HCC疗效会更佳. Pawlik等[52]报道的关于索拉非尼联合阿霉素DEB-TACE治疗晚期HCC患者的Ⅱ期临床试验, 结果显示, 索拉非尼联合DEB-TACE治疗不能手术切除的HCC患者, 耐受性和安全性良好, 通过调整索拉非尼药物剂量, 药物的不良反应是可控的. 当然, TACE与其他分子靶向药物的综合治疗模式也在不断探索中, 我们期待更多患者能够从这些综合疗法中获益.

4 结论

HCC是一种复杂的多机制疾病, 随着分子生物学、细胞学等多学科的研究深入, 对HCC发病机制的研究也逐渐深入, 这也将为HCC的预防、早期诊断和治疗带来更多途径和手段[53]. 今后, 建立完善的控制HBV感染突破或对HBV疫苗无反应战略, 推广预防HCC疫苗概念将成为人类战胜HCC的前提; AFP和US虽然是HCC的常规筛查监测指标, 但具有一定的局限性, 新一代HCC标志物的出现以及CT技术、超声造影等影像学技术的发展, 将为HCC的早期诊断带来希望, 从而提高患者的远期生存率; 索拉非尼作为第一代分子靶向治疗药物, 在HCC治疗史上起到奠基作用, 而新一代分子靶向药物的出现, 也为HCC的治疗提供了更多途径, 随着对HCC靶向治疗研究的不断深入以及分子靶向药物与外科、射频、放疗、介入化疗及中医中药联合的不断完善, 综合治疗手段将为人类战胜HCC带来新希望.

5 参考文献

1 Altekruse SF, McGlynn KA, Reichman ME. Hepatocellular carcinoma incidence, mortality, and survival trends in the United States from 1975 to 2005. *J Clin Oncol* 2009; 27: 1485-1491

2 Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011; 61: 69-90

3 王季堃, 乔世峰. 反义IGF-I寡核苷酸转染抑制人肝癌细胞生长的实验观察. 中国肿瘤临床 2005; 32: 115-116

4 Park NH, Chung YH. [Molecular mechanisms of hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma]. *Korean J Hepatol* 2007; 13: 320-340

5 McPartland JL, Guzail MA, Kendall CH, Pringle JH. Apoptosis in chronic viral hepatitis parallels histological activity: an immunohistochemical investigation using anti-activated caspase-3 and M30 cytodeath antibody. *Int J Exp Pathol* 2005; 86: 19-24

6 Xu J, Yun X, Jiang J, Wei Y, Wu Y, Zhang W, Liu Y, Wang W, Wen Y, Gu J. Hepatitis B virus X protein blunts senescence-like growth arrest of human hepatocellular carcinoma by reducing Notch1 cleavage. *Hepatology* 2010; 52: 142-154

7 Zanetti AR. Update on hepatitis B vaccination in Italy 10 years after its implementation. *Vaccine* 2001; 19: 2380-2383

8 Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Hepatitis B vaccination coverage among adults--United States, 2004. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2006; 55: 509-511

9 李黎, 梁晓峰. 中国甲、乙型病毒性肝炎控制现状分析与对策. 疾病监测 2009; 24: 307-312

10 陈胤忠. 乙型肝炎免疫预防研究进展. 疾病控制杂志 2005; 9: 158-160

11 Chen HL, Lin LH, Hu FC, Lee JT, Lin WT, Yang YJ, Huang FC, Wu SF, Chen SC, Wen WH, Chu CH, Ni YH, Hsu HY, Tsai PL, Chiang CL, Shyu MK, Lee PI, Chang FY, Chang MH. Effects of maternal screening and universal immunization to prevent mother-to-infant transmission of HBV. *Gastroenterology* 2012; 142: 773-781. e2

12 Marrero JA, Feng Z, Wang Y, Nguyen MH, Befeler AS, Roberts LR, Reddy KR, Harnois D, Llovet JM, Normolle D, Dalhgren J, Chia D, Lok AS, Wagner PD, Srivastava S, Schwartz M. Alpha-fetoprotein, des-gamma carboxyprothrombin, and lectin-bound alpha-fetoprotein in early hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2009; 137: 110-118

13 Cedrone A, Covino M, Caturelli E, Pompili M, Lorenzelli G, Villani MR, Valle D, Sperandeo M, Rapaccini GL, Gasbarrini G. Utility of alpha-fetoprotein (AFP) in the screening of patients with virus-related chronic liver disease: does different viral etiology influence AFP levels in HCC? A study in 350 western patients. *Hepatogastroenterology* 2000; 47: 1654-1658

14 Durazo FA, Blatt LM, Corey WG, Lin JH, Han S, Saab S, Busuttil RW, Tong MJ. Des-gamma-carboxyprothrombin, alpha-fetoprotein and AFP-L3 in

patients with chronic hepatitis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2008; 23: 1541-1548
15 Sanai FM, Sobki S, Bzeizi KI, Shaikh SA, Alswat K, Al-Hamoudi W, Almadi M, Al Saif F, Abdo AA. Assessment of alpha-fetoprotein in the diagnosis of hepatocellular carcinoma in Middle Eastern patients. *Dig Dis Sci* 2010; 55: 3568-3575
16 Kudo M. The 2008 Okuda lecture: Management of hepatocellular carcinoma: from surveillance to molecular targeted therapy. *J Gastroenterol Hepatol* 2010; 25: 439-452
17 Abu El Makarem M. An overview of biomarkers for the diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Hepat Mon* 2012; 12: e6122
18 Stefaniuk P, Cianciara J, Wiercinska-Drapalo A. Present and future possibilities for early diagnosis of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 418-424
19 Yasuda E, Kumada T, Toyoda H, Kaneoka Y, Maeda A, Okuda S, Yoshimi N, Kozawa O. Evaluation for clinical utility of GPC3, measured by a commercially available ELISA kit with Glypican-3 (GPC3) antibody, as a serological and histological marker for hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res* 2010; 40: 477-485
20 Zynger DL, McCallum JC, Luan C, Chou PM, Yang XJ. Glypican 3 has a higher sensitivity than alpha-fetoprotein for testicular and ovarian yolk sac tumour: immunohistochemical investigation with analysis of histological growth patterns. *Histopathology* 2010; 56: 750-757
21 Liu H, Li P, Zhai Y, Qu CF, Zhang LJ, Tan YF, Li N, Ding HG. Diagnostic value of glypican-3 in serum and liver for primary hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 4410-4415
22 Kuboki S, Shimizu H, Mitsuhashi N, Kusashio K, Kimura F, Yoshidome H, Ohtsuka M, Kato A, Yoshitomi H, Miyazaki M. Angiopoietin-2 levels in the hepatic vein as a useful predictor of tumor invasiveness and prognosis in human hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2008; 23: e157-e164
23 陈宁, 苏平, 熊浩. 肝细胞癌患者血清血管生成素−2含量的检测及其临床意义. 中西医结合肝病杂志 2011; 21: 102-103
24 Matsubara T, Kanto T, Kuroda S, Yoshio S, Higashitani K, Kakita N, Miyazaki M, Sakakibara M, Hiramatsu N, Kasahara A, Tomimaru Y, Tomokuni A, Nagano H, Hayashi N, Takehara T. TIE2-expressing monocytes as a diagnostic marker for hepatocellular carcinoma correlated with angiogenesis. *Hepatology* 2012 Jul 19. *[Epub ahead of print]*
25 郑昭敏, 韩绍磊, 杜文军, 孔祥亘, 陈士俊. 血清高尔基体蛋白73在乙型肝炎相关性肝细胞癌早期诊断中的价值. 中华实验和临床感染病杂志(电子版) 2011; 5: 459-464
26 Marrero JA, Romano PR, Nikolaeva O, Steel L, Mehta A, Fimmel CJ, Comunale MA, D'Amelio A, Lok AS, Block TM. GP73, a resident Golgi glycoprotein, is a novel serum marker for hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2005; 43: 1007-1012
27 Gao DM, Sun L, Guo K, Li Y, Liu YK, Kang XN. [Applicability of the multiplex quantitative antibody array system for early diagnosis of hepatocellular carcinoma]. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2012; 20: 785-788
28 Jiang H, Chen J, Jiang JJ, Ye Z. [Diagnostic value of contrast-enhanced ultrasound for small hepatocellular carcinoma in cirrhotic patients: a meta-analysis]. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2012; 20: 828-832
29 房伟, 董海霞, 马智军. 双源CT和超声造影对肝实质性小病灶的早期诊断对比. 中国医疗前沿 2011; 6: 70, 11
30 吴嘉兴, 梅铭惠. CT灌注成像在肝癌诊断中的应用. 中华肝胆外科杂志 2010; 16: 634-637
31 Sahani DV, Holalkere NS, Mueller PR, Zhu AX. Advanced hepatocellular carcinoma: CT perfusion of liver and tumor tissue--initial experience. *Radiology* 2007; 243: 736-743
32 Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc JF, de Oliveira AC, Santoro A, Raoul JL, Forner A, Schwartz M, Porta C, Zeuzem S, Bolondi L, Greten TF, Galle PR, Seitz JF, Borbath I, Häussinger D, Giannaris T, Shan M, Moscovici M, Voliotis D, Bruix J. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2008; 359: 378-390
33 Cheng AL, Kang YK, Chen Z, Tsao CJ, Qin S, Kim JS, Luo R, Feng J, Ye S, Yang TS, Xu J, Sun Y, Liang H, Liu J, Wang J, Tak WY, Pan H, Burock K, Zou J, Voliotis D, Guan Z. Efficacy and safety of sorafenib in patients in the Asia-Pacific region with advanced hepatocellular carcinoma: a phase III randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Oncol* 2009; 10: 25-34
34 Motzer RJ, Hutson TE, Tomczak P, Michaelson MD, Bukowski RM, Rixe O, Oudard S, Negrier S, Szczylik C, Kim ST, Chen I, Bycott PW, Baum CM, Figlin RA. Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2007; 356: 115-124
35 Koeberle D, Montemurro M, Samaras P, Majno P, Simcock M, Limacher A, Lerch S, Kovàcs K, Inauen R, Hess V, Saletti P, Borner M, Roth A, Bodoky G. Continuous Sunitinib treatment in patients with advanced hepatocellular carcinoma: a Swiss Group for Clinical Cancer Research (SAKK) and Swiss Association for the Study of the Liver (SASL) multicenter phase II trial (SAKK 77/06). *Oncologist* 2010; 15: 285-292
36 Sieghart W, Pinter M, Dauser B, Rohr-Udilova N, Piguet AC, Prager G, Hayden H, Dienes HP, Dufour JF, Peck-Radosavljevic M. Erlotinib and sorafenib in an orthotopic rat model of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2012; 57: 592-599
37 Wei W, Guo RP, Li JQ, Xu L, Shi M, Zhang YQ. [Effects of cetuximab combined erlotinib on proliferation of human hepatocellular carcinoma cell lines HepG2 and Bel-7402]. *Ai Zheng* 2008; 27: 386-392
38 Boige V, Malka D, Bourredjem A, Dromain C, Baey C, Jacques N, Pignon JP, Vimond N, Bouvet-Forteau N, De Baere T, Ducreux M, Farace F. Efficacy, safety, and biomarkers of single-agent bevacizumab therapy in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Oncologist* 2012; 17: 1063-1072
39 Finn RS, Kang YK, Mulcahy M, Polite BN, Lim HY, Walters I, Baudelet C, Manekas D, Park JW. Phase II, open-label study of brivanib as second-line therapy in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2012; 18: 2090-2098
40 Zhu AX, Abrams TA, Miksad R, Blaszkowsky LS, Meyerhardt JA, Zheng H, Muzikansky A, Clark JW, Kwak EL, Schrag D, Jors KR, Fuchs CS, Iafrate AJ, Borger DR, Ryan DP. Phase 1/2 study of everolimus in advanced hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2011; 117: 5094-5102
41 Llovet JM, Bruix J. Molecular targeted therapies in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2008; 48:

1312-1327
42 Heideman DA, Overmeer RM, van Beusechem VW, Lamers WH, Hakvoort TB, Snijders PJ, Craanen ME, Offerhaus GJ, Meijer CJ, Gerritsen WR. Inhibition of angiogenesis and HGF-cMET-elicited malignant processes in human hepatocellular carcinoma cells using adenoviral vector-mediated NK4 gene therapy. *Cancer Gene Ther* 2005; 12: 954-962
43 Govindarajan R, Siegel E, Makhoul I, Williamson S. Bevacizumab and Erlotinib in Previously Untreated Inoperable and Metastatic Hepatocellular Carcinoma. *Am J Clin Oncol* 2012 May 24. *[Epub ahead of print]*
44 Piguet AC, Saar B, Hlushchuk R, St-Pierre MV, McSheehy PM, Radojevic V, Afthinos M, Terracciano L, Djonov V, Dufour JF. Everolimus augments the effects of sorafenib in a syngeneic orthotopic model of hepatocellular carcinoma. *Mol Cancer Ther* 2011; 10: 1007-1017
45 Pfizer discontinues phase 3 trial of Sutent in advanced hepatocellular carcinoma [press release] Business Wire Web site. 2010-10-13. Available from: URL: http: //www.businesswire.com/news/home/20100422006892/en/Pfizer-Discontinues-Phase-3-Trial-Sutent-Advanced
46 Abou-Alfa GK, Johnson P, Knox JJ, Capanu M, Davidenko I, Lacava J, Leung T, Gansukh B, Saltz LB. Doxorubicin plus sorafenib vs doxorubicin alone in patients with advanced hepatocellular carcinoma: a randomized trial. *JAMA* 2010; 304: 2154-2160
47 Sanoff HK, Bernard S, Goldberg RM, Morse MA, Garcia R, Woods L, Moore DT, O'Neil BH. Phase II Study of Capecitabine, Oxaliplatin, and Cetuximab for Advanced Hepatocellular Carcinoma. *Gastrointest Cancer Res* 2011; 4: 78-83
48 Nojiri K, Sugimoto K, Shiraki K, Tameda M, Inagaki Y, Ogura S, Kasai C, Kusagawa S, Yoneda M, Yamamoto N, Takei Y, Nobori T, Ito M. Sorafenib and TRAIL have synergistic effect on hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol* 2013; 42: 101-108
49 Chung YH, Han G, Yoon JH, Yang J, Wang J, Shao GL, Kim BI, Lee TY, Chao Y. Interim analysis of START: Study in asia of the combination of TACE (transcatheter arterial chemoembolization) with sorafenib in patients with hepatocellular carcinoma trial. *Int J Cancer* 2012 Nov 6. *[Epub ahead of print]*
50 Lewis AL, Taylor RR, Hall B, Gonzalez MV, Willis SL, Stratford PW. Pharmacokinetic and safety study of doxorubicin-eluting beads in a porcine model of hepatic arterial embolization. *J Vasc Interv Radiol* 2006; 17: 1335-1343
51 Burrel M, Reig M, Forner A, Barrufet M, de Lope CR, Tremosini S, Ayuso C, Llovet JM, Real MI, Bruix J. Survival of patients with hepatocellular carcinoma treated by transarterial chemoembolisation (TACE) using Drug Eluting Beads. Implications for clinical practice and trial design. *J Hepatol* 2012; 56: 1330-1335
52 Pawlik TM, Reyes DK, Cosgrove D, Kamel IR, Bhagat N, Geschwind JF. Phase II trial of sorafenib combined with concurrent transarterial chemoembolization with drug-eluting beads for hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol* 2011; 29: 3960-3967
53 林三仁. 中国消化病学科发展30年回顾与展望. 中国实用内科杂志 2011; 31: 827

编辑 田滢 电编 鲁亚静

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2012年12月28日; 20(36): 3725-3731
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

文献综述 REVIEW

抑瘤素M与肝脏再生、肝脏疾病关系的研究进展

彭菊聪, 苌新明

彭菊聪, 苌新明, 西安交通大学医学院第一附属医院消化内科 陕西省西安市 710061
彭菊聪, 在读硕士, 主要从事慢性肝脏疾病诊治方面的研究.
作者贡献分布: 本综述由彭菊聪完成; 修改审校由苌新明完成.
通讯作者: 苌新明, 教授, 主任医师, 710061, 陕西省西安市雁塔西路277号, 西安交通大学医学院第一附属医院消化内科. cxm218@163.com
电话: 029-85323924
收稿日期: 2012-10-11 修回日期: 2012-11-24
接受日期: 2012-12-20 在线出版日期: 2012-12-28

Advances in understanding the relationship between oncostatin M and liver regeneration and liver diseases

Ju-Cong Peng, Xin-Ming Chang

Ju-Cong Peng, Xin-Ming Chang, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Medical College of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, Shaanxi Province, China
Correspondence to: Xin-Ming Chang, Professor, Chief Physician, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Medical College of Xi'an Jiaotong University, 227 Yanta West Road, Xi'an 710061, Shaanxi Province, China. cxm218@163.com
Received: 2012-10-11 Revised: 2012-11-24
Accepted: 2012-12-20 Published online: 2012-12-28

Abstract
Oncostatin M (OSM) is a pleiotropic cytokine belonging to the interleukin (IL)-6 family of cytokines. It is closely related structurally and functionally to leukemia inhibitory factor (LIF). There are two types of functional OSM receptors (OSMR): I and II. The binding of OSM to its receptors activates the JAK-STAT and MAPK signal pathways. OSM not only inhibits the proliferation of tumor cells but also participates in several physiological and pathological processes in a variety of cell types and plays key roles in the pathogenesis of multiple diseases, including regulation of inflammatory responses, stimulation of hematopoiesis, regulation of cholesterol metabolism, and induction of neurotrophic peptides. Recent studies suggest that OSM participates in liver regeneration and is closely related to the occurrence and progression of viral hepatitis, non-alcoholic fatty liver disease, liver fibrosis, and liver cancer. This article reviews recent advances in understanding the relationship between OSM and liver generation and liver diseases.

Key Words: Oncostatin M; Liver regeneration; Liver diseases

Peng JC, Chang XM. Advances in understanding the relationship between oncostatin M and liver regeneration and liver diseases. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(36): 3725-3731

摘要
抑瘤素M(oncostatin M, OSM)是一种多功能细胞因子, 属白细胞介素6(interleukin-6, IL-6)家族成员, 在这些所有成员中, OSM与白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor, LIF)在结构和功能上最为接近. OSM有Ⅰ型和Ⅱ型两种类型受体(OSM receptor, OSMR), OSM通过与受体结合启动JAK-STAT及MAPK信号通路从而介导其生物学作用. OSM除具有抑制某些肿瘤细胞生长功效外, 还可作用于其他多种细胞, 参与众多的生理病理过程, 在多种疾病中发挥重要作用, 包括调节炎症反应、刺激造血、调节胆固醇代谢、保护神经系统等. 新近研究表明, 在肝脏疾病中, OSM参与肝脏再生, 并与病毒性肝炎、非酒精性脂肪性肝病、肝纤维化、肝细胞癌等的发生发展和转归密切相关. 此文就OSM与肝脏疾病关系的研究进展进行综述.

关键词: 抑瘤素M; 肝再生; 肝脏疾病

彭菊聪, 苌新明. 抑瘤素M与肝脏再生、肝脏疾病关系的研究进展. 世界华人消化杂志 2012; 20(36): 3725-3731
http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3725.asp

0 引言
抑瘤素M(oncostatin M, OSM)最初是Zarling等[1]于1986年从佛波醇12-肉豆蔻酸盐13-乙酸酯(phorbol-12-myristate-13-acetate, PMA)处理的人组织型淋巴瘤U937细胞系上清液分离纯化的一种糖蛋白, 因其对人A375黑色素瘤细胞系具有

■背景资料
抑瘤素M (OSM)是Zarling等于1986年从PMA处理的人组织型淋巴瘤U937细胞系上清液分离纯化的一种糖蛋白, 具有多种生理功能, 包括抑制肿瘤、调节炎症反应、刺激造血等. 近年来, OSM在肝脏疾病中的作用逐渐受到重视.

■同行评议者
傅志仁, 主任医师, 上海长征医院器官移植科

■研发前沿
目前有研究证实OSM能促进肝脏再生, 加速肝纤维化进展, 抑制肝炎病毒, 对肝细胞癌的作用尚有争议, 但OSM与肝脏疾病关系的研究还比较少且主要局限在细胞和动物水平, 今后需进一步研究.

生长抑制作用, 故得名. OSM属白细胞介素6(interleukin-6, IL-6)家族成员, 该家族还包括白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor, LIF)、心肌营养因子1(cardiotrophin-1, CT-1)、睫状神经营养因子(ciliary neurotrophic factor, CNTF)、IL-11及IL-31等细胞因子[2]. 由于他们共用同一个信号转导体gp130而表现出许多相似的生物学功能, 其中OSM与LIF在结构和功能上最为接近. OSM是一种多功能细胞因子, 除能抑制某些肿瘤细胞生长和诱导肿瘤细胞分化外, 还具有多种生物学活性, 包括调节炎症反应、刺激造血、促进组织修复、调节胆固醇代谢、保护神经系统等[3-8]作用. 随着研究的深入, OSM在肝脏再生及肝脏疾病中的作用受到重视, 本文将简要介绍OSM在肝脏中的作用及其与肝脏疾病的关系.

1 OSM的基因及蛋白质结构

1.1 *OSM*基因 *OSM*基因定位于22q12染色体上, 与*LIF*基因位于同一条染色体, *OSM*基因位于*LIF*基因的上游, 两基因仅相距10 kb, 因而认为OSM与LIF可能由一个共同的祖先基因复制而来, 共用同一个启动子元件[9]. 目前, 猿猴[10]、牛[11]和鼠[12]的*OSM*基因也已经被克隆, 小鼠的*OSM*基因位于11号染色体上, 编码263个氨基酸, 与*LIF*基因亦在同一条染色体上. *OSM*基因全长5 kb, 包括5'端非编码区25个核苷酸碱基、3个外显子、2个内含子和3'端非编码区1 055个核苷酸碱基, 3'端无polyA尾及AATAA多聚腺苷酸终止信号[13]. 外显子和内含子交界处有两个短的保守序列, 5'端为GT, 3'端为AG, 称为GT-AG法则.

1.2 OSM的蛋白质结构 OSM的cDNA编码含252个氨基酸残基的肽链, N-末端带有1段由25个疏水残基组成的信号肽, 其在分泌过程中被蛋白水解酶裂解, 形成含227个氨基酸残基的可溶性前体OSM(precursor OSM, Pro OSM), Pro OSM的C-末端的31个氨基酸残基再由胰蛋白酶裂解去除后, 最终生成仅含196个氨基酸残基的成熟OSM分子. 体外实验表明, 成熟OSM与Pro OSM竞争性结合受体的活性相当, 但前者的生长抑制活性却是后者的5-60倍, 因此, 推测Pro OSM的C-末端裂解过程可能在OSM活性调控中起重要作用[14].

成熟OSM多肽链中含有两个潜在的N-糖基化位点、一个O-糖基化位点及5个半胱氨酸(cysteine, Cys)残基, Cys残基分别位于C6、C49、C80、C127和C167位, 其中4个残基(C6-C127和C49-C167)形成两对分子内二硫键. 基因突变研究显示C49-C167二硫键对维持OSM生物学活性起重要作用, 而C6-C127二硫键则不是OSM活性所必需[15,16]. OSM二级结构主要由α-螺旋结构组成. Hoffman等[17]1995年用核磁共振方法研究OSM的结构, 发现OSM有4个α-螺旋结构(螺旋区段: 18-45、78-98、113-140和168-194), 分别形成4个螺旋束, 每个螺旋中介入3个螺旋区, 该结构与IL-6家族成员基本结构(4个螺旋束)一致.

OSM是一种耐酸碱、耐热的分泌型单链糖蛋白, pH值在2-11范围内稳定存在, 56 ℃加热1 h其活性保持不变[1]. OSM主要由单核-巨噬细胞、活化的T淋巴细胞、中性粒细胞、树突状细胞、肥大细胞、小胶质细胞、成骨细胞及卡波氏肉瘤(Kaposi's Sarcoma, KS)细胞等[18-22]分泌, 在肝脏组织, 主要产生于枯否氏细胞(kupffer cells, KC)[23]. OSM的分泌受多种因素的影响, 文献报道IL-3、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子、脂多糖、前列腺素E2及人绒毛膜促性腺激素等可促进OSM的表达和分泌[24].

2 OSM的受体

IL-6家族成员的一个基本特征是所有细胞因子共用同一个信号传导受体亚单位gp130, 细胞因子一般首先与其特异受体亚基结合后再与gp130结合, 但也有部分细胞因子直接与gp130结合. 这些细胞因子一方面因共用gp130而表现出相似的生物学活性; 另一方面又由于特异受体亚基的不同而有各自的特异性.

OSM有两种类型的受体[15], 分别称为Ⅰ型和Ⅱ型OSM受体(OSMR), Ⅰ型受体是由一个gp130分子和一个LIF受体β结合亚单位(LIFRβ)构成的异源二聚体(heterodimer), 该受体为OSM与LIF所共用, 这也就解释了为何OSM与LIF在生物学功能上有重叠. Ⅱ型受体由一个gp130分子和一个OSM特异性受体β亚单位(OSMRβ)构成, 为OSM特异性的受体, 但OSM并不直接与OSMRβ分子结合, 而是与gp130分子低亲和力结合, 这种结合导致OSMRβ与gp130分子形成高亲和力的受体复合物. OSM通过与Ⅱ型受体结合介导其独特的生物学活性, 如抑制黑色素瘤A375细胞增殖、刺激艾滋病相关的卡波氏肉瘤细胞、正常成纤维细胞及主动脉平滑肌细胞生长、上调肺上皮细胞α1-蛋白酶抑制剂的活性等[25-29], LIF及同家族的其他细胞因子则不具有

这些功能. 鼠OSMR于1998年被克隆出来, 同人的一样, 有两种类型, Ⅰ型(gp130/ LIFRβ)和Ⅱ型(gp130/OSMRβ)受体, 但是通过体外克隆OSMR的cDNA及重建受体功能研究显示鼠OSM只与特异性的Ⅱ型受体结合, 不与Ⅰ型受体结合, 或者只有在非常高的浓度下才能结合[30].

OSMR分布于机体的多种组织细胞, 在内皮源性细胞及多种肿瘤细胞系中高表达, 而在造血源性细胞中分布相对较少.

3 OSM的信号传导通路

OSM通过介导细胞内信号传导通路发挥其生物学作用, OSM与OSMR结合后主要激活两条信号传导通路: JAK-STAT和Ras-Raf-MAPK途径.

3.1 JAK-STAT信号通路 JAK是一种非受体型蛋白酪氨酸激酶, JAK既可催化与之相连的细胞因子受体发生酪氨酸磷酸化, 又能磷酸化多种含SH2结构域的信号分子. 信号传导及转录激活因子(signal transducer and activator of transcription, STAT)是细胞内潜在的转录因子, 具有信号传递和转录活化双重功能. STAT有几个独特的功能域, 包括SH2结构域、DNA结合功能域、转录激活域, SH2结构域可与特定的含磷酸化酪氨酸残基的受体结合, STAT被JAK激酶活化后发挥作用.

OSM与gp130受体亚单位低亲和力结合后, 诱导gp130和OSMRβ亚单位二聚体化, 二聚体化的受体亚单位相互磷酸化, 并激活结合于gp130胞内近膜端box1区的JAK激酶. 活化的JAK激酶又催化gp130胞浆区的酪氨酸残基发生磷酸化, 从而为STAT和含有SH2结构域的信号分子提供了锚定位点, STAT被募集至gp130上得以靠近JAK激酶从而被磷酸化. 活化的STAT(主要是SATA1和STAT3)形成同源或异源二聚体并移入核内, 与*OSM*基因启动子调节元件结合, 调节基因转录[15,31].

3.2 Ras-Raf-MAPK信号通路 Ras-Raf-MAPK途径是OSM介导的另一条重要的信号通路, 该通路将膜受体信号传导至细胞核内, 调节机体细胞的增殖、分化、生长及组织修复等.

Ras是*ras*基因编码的一种鸟苷酸结合蛋白(guanine nucleotide binding proteins, GNBPs), 具有GTP激酶的活性, 包括H-Ras、N-Ras和K-Ras 3种亚类. Ras与GTP结合时为活化状态, 而与GDP结合时则为失活态, 在信号转导过程中发挥“分子开关”作用[32]. Raf是Ras下游最关键的效应器, 属于丝氨酸/苏氨酸激酶家族, 包括3种亚型: A-Raf、B-Raf和Raf-1. 丝裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinase, MARK)是一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 能磷酸化靶蛋白底物的丝氨酸和苏氨酸残基.

OSM与gp130分子结合后, 激活JAK激酶, 活化的JAK磷酸化gp130胞浆区的酪氨酸. SHP2是一种非受体型蛋白酪氨酸磷酸酶, 被JAK1和JAK2激活并被募集至gp130上, SHP2为Grb2接头蛋白提供结合位点, Grb2与SHP2连接后随即又与SOS蛋白结合形成Grb2-SOS复合物并定位于质膜上. SOS通过促进Ras释放GDP, 结合GTP从而激活Ras. Ras-GTP直接与Raf结合, 从而启动了MAK级联反应, MEK、ERKs、MARPK相继被激活, 活化的MAPK入核, 启动特定转录子的转录[15,31-33].

4 肝再生

肝脏具有强大的再生能力, 肝部分切除或肝受损伤后, 处于G_0期的肝细胞重新进入细胞周期, 大量分裂增殖, 从而恢复肝脏的结构和功能. 多种生长因子和细胞因子参与了肝脏再生过程. 近年来研究发现, OSM在肝脏再生过程中亦起着非常重要的作用. Nakamura等[34]研究发现OSM和OSMR在正常小鼠肝脏低表达, 给予CCl_4诱导肝损伤, 1 h后OSM及OSMR的mRNA的表达即出现明显的升高, OSM主要表达于KC细胞, 而OSMR主要表达于肝细胞. Nakamura等[34]进一步用CCl_4诱导OSMR基因敲出($OSMR^{-/-}$)小鼠肝损伤模型进行研究, 与野生型相比, 发现$OSMR^{-/-}$小鼠肝脏再生能力严重受损, 并出现持续的肝实质细胞坏死, 增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)表达较低, 将$OSMR^{-/-}$小鼠大部分肝脏切除后, 肝脏再生能力也明显受到抑制, 细胞周期蛋白D1(Cyclin D1)、Cyclin D2、Cyclin D3、Cyclin E、Cyclin A2表达显著降低且时间延迟, STAT3磷酸化降低. 对其机制研究发现, 给予IL-6不能纠正$OSMR^{-/-}$肝损伤模型肝脏再生缺陷, 相反, 在$CC1_4$诱导的$IL\text{-}6^{-/-}$的小鼠肝损伤模型, 给予外源性OSM可以纠正肝再生不足, 并能诱导STAT3的磷酸化. 说明在肝脏再生过程中, OSM是IL-6下游的一个关键调节因子, OSM及信号通路起重要作用. 体外实验研究表明, OSM能抑制大鼠卵圆细胞的增殖并诱导其分化为肝细胞, 用小干扰RAN(siRNA)将卵圆细胞OSMR沉默后, OSM的诱导作用即消失[35].

■相关报道
Yamashita等研究发现, OSM可以诱导肝细胞癌干细胞的分化成熟, 并能增强5-氟尿嘧啶的抗肝脏肿瘤作用.

■**创新盘点**
本文首次较全面地综述了*OSM*基因、分子结构、信号通路及在肝脏疾病领域的最新研究进展.

此外, OSM还能促进胎肝细胞的分化和成熟[36].

有研究显示, 外源性的OSM干预能减轻动物肝损伤. Nakamura等[34]给CCl_4诱导的小鼠肝损伤模型皮下注射重组OSM, 发现OSM能抑制肝细胞坏死、减轻组织结构的破坏. Hamada等[37]用*OSM*基因治疗肝损伤大鼠进行研究, 给二甲基亚硝胺(dimethylnitrosamine, DMN)致肝损伤模型的大鼠脾脏注射含*OSM*基因的质粒, 对照组给予空质粒, 结果显示治疗组大鼠体质量、肝重、血清白蛋白水平升高, 肝脏损伤指标如胆红素、谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)、天门冬氨酸转氨酶(aspartate transaminase, AST)及肝纤维指标如透明质酸水平下降. 病理组织学显示治疗组肝小叶坏死及炎性细胞浸润减少, 再生肝细胞增多, 肝纤维化程度减轻. 此外, 造模前给予OSM预处理能拮抗DMN肝毒性, 促进受损肝细胞增殖. 这些研究提示OSM对实验性肝损伤具有治疗和预防作用, 是促肝细胞增殖和抗凋亡的一个关键调节因子, 推测OSM有可能成为治疗肝损伤的一种新的有效方法.

5 OSM与肝脏疾病

5.1 *病毒性肝炎* 近年来研究发现OSM具有抗肝炎病毒活性的新功能. Larrea等[38]分别用甲型肝炎病毒(hepatitis A virus, HAV)、丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)转染的肝细胞癌细胞株Huh7细胞进行研究, 发现OSM能诱导干扰素敏感区基因ISG20、GBP1的表达, 有效降低Huh7细胞的HAV、HCV病毒载量, 其抗病毒活性显著高于IL-6家族成员中其他细胞因子. OSM不仅本身具有抗HCV活性, 还与α干扰素(interferon-α, IFN-α)起协同作用, 是IFN-α的强效佐剂. 将HCV RNA高复制的Huh7细胞用IFN-α或IFN-α联合OSM培育, 在培育第4天, 联合组HCV核心蛋白表达即消失, 其抑制效果强于单独使用IFN-α. 众所周知, 核心蛋白是导致干扰素抵抗、病毒持续感染及肝细胞癌变的重要原因. 此外, OSM与IFN-α联合还能诱导参与天然免疫防御的重要细胞因子(MYD88、S100A9、 ULBP2、 IL-32 、IRF1)及趋化因子(CXCL1、 CXCL2、CXCL3)的产生, 上调参与抗原加工提呈的部分分子的基因(UBE2L6、PSMB8、SMB9、TAP1、TAP2、 HLA-B、HLA-C、B2M、TAPBP)表达, 激活效应性T细胞. 推测OSM抗HCV和HAV主要通过两方面起作用: 一方面激活固有免疫, 增强IFN-α的抗病毒活性; 另一方面, 促进抗原的吞噬、提呈, 提高肝脏上皮细胞免疫刺激活性, 参与抗嗜肝病毒的适应性免疫应答. Ikeda等[39]用OR6细胞研究发现OSM在很低浓度即显示出抗HCV活性, 半数有效浓度为0.71 ng/mL, 抗病毒活性维持到一次给药后96 h. OSM在低浓度(62 pg/mL)也能显著增强IFN-α的抗病毒效果, 病毒持续应答率达60%, 高于IFN-α与利巴韦林联合使用.

5.2 *非酒精性脂肪性肝病* 非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)是指除酒精和其他明确损肝因素所致的, 以弥漫性肝细胞大泡性脂肪变为主要特征的临床病理综合征. 病理分为单纯性非酒精性脂肪肝(non-alcoholic fatty liver, NAFL)及由其演变的非酒精性脂肪性肝炎(non-alcoholic steatohepatitis, NASH)、脂肪性肝纤维化、脂肪性肝硬化等4种类型. NAFLD发病机制以“二次打击”学说为代表, 胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)贯穿始终, 细胞因子在第二次打击中扮演重要角色, 与NAFLD的发生发展、转归密切相关[40]. 目前, 关于OSM与NAFLD发病关系的报道较少. 研究发现在高脂饮食诱导的小鼠NAFLD模型中, OSM mRNA的表达在NAFL即出现升高, NASH时显著升高, 是正常对照组的30倍. 因此, 推测OSM与NAFLD的发生发展有密切关系[23]. 其机制不清楚, 可能与OSM通过NF-κB信号通路途径促进NAFLD危险因子TNF-α产生[41]、抑制NAFLD的保护因素脂联素(adiponectin, ADP)的分泌[42]及通过抑制葡萄糖代谢关键酶Akt激酶和葡萄糖激酶介导IR[23]等有关.

5.3 *肝纤维化* 肝纤维化是长期反复的肝损伤过程中细胞外基质(extracellular matrix, ECM)过度沉积和胶降解减少的结果, 肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)是ECM最主要的来源, HSC的活化和增殖是肝纤维化形成的中心环节. 体外研究发现, OSM能刺激HSC的活化, 促进胶原蛋白的分泌, 与转化生长因子β的效果相当, 是一种强效的促肝纤维化细胞因子. 用OSM处理HSC后, 24 h胶原分泌量提高了1.9倍, 而Ⅰ型胶原α2 mRNA表达无变化[43]. 因此, 认为OSM对胶原分泌的影响主要在转录后阶段. OSM还能诱导由HSC转化来的肌成纤维细胞(myofibroblast like cells, MFB)定向迁移至肝脏损伤组织[44], 提高MFB金属蛋白酶组织抑制剂-1(TIMP-1)mRNA的表达及促进MFB分泌TIMP-1, 与对照组相比, 经OSM处理的MFB, 24 h TIMP-1的分泌量提

高1.53倍. 使用MEK抑制剂PD98059处理MFB后, 可拮抗OSM诱导的TIMP-1的分泌, 故研究者推想OSM对TIMP-1分泌的调节可能是通过激活MAPK信号通路[45]. Levy等[43]测定了OSM mRNA在正常肝组织和肝硬化组织的表达, 发现OSM在正常肝组织低表达, 肝硬化时表达升高. Znoyko等[46]也得出相同的结论, 此外还对OSM的受体进行测定, LIFRβ表达情况与OSM一致, 在正常肝组织低表达, 肝硬化组织表达显著升高, 而OSMβ则在正常肝组织低表达, 肝硬化组织基本检测不到. 因而认为OSM促肝纤维化的作用可能是通过Ⅰ型受体介导产生.

5.4 肝细胞癌 OSM最初是由于具有抑制人A375黑色素瘤细胞系生长的功能而得名, 随着对其研究的深入, 发现OSM与多种实体肿瘤如肺癌、乳腺癌、卵巢癌、神经胶质瘤、直肠癌、骨肉瘤、肝细胞癌等[47-52]有关系. 钱俊甫等[53]测定了30例肝细胞癌及癌旁组织、5例正常肝组织OSM和OSMR表达变化, 发现肝细胞癌组织OSM和OSMR显著低于癌旁组织及正常对照组, 肝细胞癌组织中临床Ⅲ期OSM表达低于临床Ⅰ期和Ⅱ期. 该研究提示OSM和OSMR与肝细胞癌的发生发展密切相关. 孔宁[54]用体外实验的方法研究了OSM对人肝细胞癌细胞株SMMC-7721的影响, 结果发现OSM能明显抑制SMMC-7721细胞的增殖, 诱导SMMC-7721细胞周期发生G_0/G_1期阻滞并促进细胞凋亡. 肝细胞癌干细胞一般对放化疗不敏感, 是治疗后复发的主要因素. Yamashita等[55]研究发现OSM可以通过激活STAT3从而抑制具有癌干细胞特性、上皮细胞黏附分子阳性(epithelial cell adhesion molecule, $EpCAM^+$)的Huh-1和Huh-7细胞EpCAM、甲胎蛋白、细胞角蛋白19的表达, 上调白蛋白的表达, 诱导肝细胞癌干细胞的分化成熟, 使$EpCAM^+$的癌干细胞转变为上皮细胞粘附分子阴性($EpCAM^-$)的非癌干细胞, 增强其对传统化疗药物5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)的敏感性. 将OSM与5-FU联合干预$EpCAM^-$非癌干细胞, 细胞增殖显著被抑制, 凋亡增多. Yamashita等[55]进一步用体内实验研究OSM对NOD小鼠肝细胞癌细胞皮下移植瘤的影响, 发现单用OSM或5-FU对移植瘤仅有轻微抑制作用, 与对照组相比无显著差异, 而OSM与5-FU联合能显著抑制瘤组织的生长, 肿瘤明显缩小. 结果提示OSM诱导休眠的$EpCAM^+$肝细胞癌干细胞分化是治疗肿瘤的一种有效方法. 因此, 猜想增强内源性OSM的活性和表达水平或给予外源性OSM有可能成为治疗肝细胞癌的潜在措施.

但也有研究结果显示OSM促进肝细胞癌的发展、转移. Cannito等[56]研究发现OSM在肝细胞癌细胞高表达, OSM通过诱导低氧诱导因子和丝氨酸蛋白抑制剂的表达, 从而刺激上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT), 增强肝细胞癌细胞的侵袭转移.

■应用要点
本文把OSM与肝脏再生及在多种肝脏疾病中的作用和机制作了详细的综述, 为OSM在肝脏发病中的作用及对肝脏疾病的治疗方面的研究提供了一定的方向.

6 结论

OSM是一种具有多种生物学活性的细胞因子, 其在肝脏疾病中的作用逐渐受到重视, OSM不仅能促进肝脏再生和具有抗HAV、HCV活性, 还在肝纤维化、NAFLD、肝细胞癌的形成过程中起着重要的作用. 但目前有关OSM与肝脏疾病关系的研究还比较少, 且主要停留在细胞及动物实验, OSM在肝脏疾病中的表达情况、作用、分子机制尚不完全明了且存在争议. 今后需深入研究OSM及两型受体在不同肝脏疾病、同种肝脏疾病不同阶段中的表达变化及分布、OSM的信号转导通路与肝脏疾病发生的关系. 作为外源性干预措施, OSM的有效性和安全性也需进一步研究. 有望通过增强或减弱OSM的活性及阻断或激活信号通路能成为将来治疗肝脏疾病尤其是病毒性肝炎、肝细胞癌的一个有效措施.

7 参考文献

1 Zarling JM, Shoyab M, Marquardt H, Hanson MB, Lioubin MN, Todaro GJ. Oncostatin M: a growth regulator produced by differentiated histiocytic lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; 83: 9739-9743

2 Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Müller-Newen G, Schaper F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J* 2003; 374: 1-20

3 Morikawa Y. Oncostatin M in the development of the nervous system. *Anat Sci Int* 2005; 80: 53-59

4 Wahl AF, Wallace PM. Oncostatin M in the anti-inflammatory response. *Ann Rheum Dis* 2001; 60 Suppl 3: iii75-iii80

5 Pelletier JP, Martel-Pelletier J. Oncostatin M: foe or friend? *Arthritis Rheum* 2003; 48: 3301-3303

6 Dumas A, Lagarde S, Laflamme C, Pouliot M. Oncostatin M decreases interleukin-1 β secretion by human synovial fibroblasts and attenuates an acute inflammatory reaction in vivo. *J Cell Mol Med* 2012; 16: 1274-1285

7 Minehata K, Takeuchi M, Hirabayashi Y, Inoue T, Donovan PJ, Tanaka M, Miyajima A. Oncostatin m maintains the hematopoietic microenvironment and retains hematopoietic progenitors in the bone marrow. *Int J Hematol* 2006; 84: 319-327

8 Kong W, Abidi P, Kraemer FB, Jiang JD, Liu J. In

■名词解释
抑瘤素M (OSM): 是一种多功能细胞因子, 属白细胞介素6家族成员, 有Ⅰ型和Ⅱ型两种受体类型, 通过JAK-STAT及MAPK信号通路介导生物学作用. OSM具有抑制肿瘤生长、调节炎症反应、刺激造血、调节胆固醇代谢、保护神经系统等作用.

vivo activities of cytokine oncostatin M in the regulation of plasma lipid levels. *J Lipid Res* 2005; 46: 1163-1171

9 Rose TM, Lagrou MJ, Fransson I, Werelius B, Delattre O, Thomas G, de Jong PJ, Todaro GJ, Dumanski JP. The genes for oncostatin M (OSM) and leukemia inhibitory factor (LIF) are tightly linked on human chromosome 22. *Genomics* 1993; 17: 136-140

10 Rose TM, Bruce AG. Oncostatin M is a member of a cytokine family that includes leukemia-inhibitory factor, granulocyte colony-stimulating factor, and interleukin 6. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 8641-8645

11 Malik N, Haugen HS, Modrell B, Shoyab M, Clegg CH. Developmental abnormalities in mice transgenic for bovine oncostatin M. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 2349-2358

12 Yoshimura A, Ichihara M, Kinjyo I, Moriyama M, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Hara T, Miyajima A. Mouse oncostatin M: an immediate early gene induced by multiple cytokines through the JAK-STAT5 pathway. *EMBO J* 1996; 15: 1055-1063

13 Malik N, Kallestad JC, Gunderson NL, Austin SD, Neubauer MG, Ochs V, Marquardt H, Zarling JM, Shoyab M, Wei CM. Molecular cloning, sequence analysis, and functional expression of a novel growth regulator, oncostatin M. *Mol Cell Biol* 1989; 9: 2847-2853

14 Linsley PS, Kallestad J, Ochs V, Neubauer M. Cleavage of a hydrophilic C-terminal domain increases growth-inhibitory activity of oncostatin M. *Mol Cell Biol* 1990; 10: 1882-1890

15 Tanaka M, Miyajima A. Oncostatin M, a multifunctional cytokine. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 2003; 149: 39-52

16 Kallestad JC, Shoyab M, Linsley PS. Disulfide bond assignment and identification of regions required for functional activity of oncostatin M. *J Biol Chem* 1991; 266: 8940-8945

17 Hoffman RC, Moy FJ, Price V, Richardson J, Kaubisch D, Frieden EA, Krakover JD, Castner BJ, King J, March CJ, Powers R. Resonance assignments for Oncostatin M, a 24-kDa alpha-helical protein. *J Biomol NMR* 1996; 7: 273-282

18 Kastl SP, Speidl WS, Kaun C, Katsaros KM, Rega G, Afonyushkin T, Bochkov VN, Valent P, Assadian A, Hagmueller GW, Hoeth M, de Martin R, Ma Y, Maurer G, Huber K, Wojta J. In human macrophages the complement component C5a induces the expression of oncostatin M via AP-1 activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28: 498-503

19 Repovic P, Benveniste EN. Prostaglandin E2 is a novel inducer of oncostatin-M expression in macrophages and microglia. *J Neurosci* 2002; 22: 5334-5343

20 Hong A, Zhang M, Leigh B, Stevens G. Induction of interleukin-6 and oncostatin M by radiation in Kaposi's sarcoma cell lines. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001; 50: 533-540

21 Suda T CK, Todate A, Ide K, Asada K, Nakamura Y, Suzuki K, Kuwata H, Nakamura H. Oncostatin M production by human dendritic cells in response to bacterial products. *Cytokine* 2002; 17: 335-340

22 Salamon P, Shoham NG, Puxeddu I, Paitan Y, Levi-Schaffer F, Mekori YA. Human mast cells release oncostatin M on contact with activated T cells: possible biologic relevance. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 121: 448-455. e5

23 Henkel J, Gärtner D, Dorn C, Hellerbrand C, Schanze N, Elz SR, Püschel GP. Oncostatin M produced in Kupffer cells in response to PGE2: possible contributor to hepatic insulin resistance and steatosis. *Lab Invest* 2011; 91: 1107-1117

24 Chen SH, Benveniste EN. Oncostatin M: a pleiotropic cytokine in the central nervous system. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004; 15: 379-391

25 Albasanz-Puig A, Murray J, Preusch M, Coan D, Namekata M, Patel Y, Dong ZM, Rosenfeld ME, Wijelath ES. Oncostatin M is expressed in atherosclerotic lesions: a role for Oncostatin M in the pathogenesis of atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2011; 216: 292-298

26 Gibbs P, Chen Q, Robinson WA. Effects of oncostatin M and tamoxifen on human melanoma cells. *Melanoma Res* 1998; 8: 221-226

27 Murakami-Mori K, Taga T, Kishimoto T, Nakamura S. AIDS-associated Kaposi's sarcoma (KS) cells express oncostatin M (OM)-specific receptor but not leukemia inhibitory factor/OM receptor or interleukin-6 receptor. Complete block of OM-induced KS cell growth and OM binding by anti-gp130 antibodies. *J Clin Invest* 1995; 96: 1319-1327

28 Scaffidi AK, Mutsaers SE, Moodley YP, McAnulty RJ, Laurent GJ, Thompson PJ, Knight DA. Oncostatin M stimulates proliferation, induces collagen production and inhibits apoptosis of human lung fibroblasts. *Br J Pharmacol* 2002; 136: 793-801

29 Sallenave JM, Tremblay GM, Gauldie J, Richards CD. Oncostatin M, but not interleukin-6 or leukemia inhibitory factor, stimulates expression of alpha1-proteinase inhibitor in A549 human alveolar epithelial cells. *J Interferon Cytokine Res* 1997; 17: 337-346

30 Tanaka M, Hara T, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Miyajima A. Reconstitution of the functional mouse oncostatin M (OSM) receptor: molecular cloning of the mouse OSM receptor beta subunit. *Blood* 1999; 93: 804-815

31 Böing I, Stross C, Radtke S, Lippok BE, Heinrich PC, Hermanns HM. Oncostatin M-induced activation of stress-activated MAP kinases depends on tyrosine 861 in the OSM receptor and requires Jak1 but not Src kinases. *Cell Signal* 2006; 18: 50-61

32 Molina JR, Adjei AA. The Ras/Raf/MAPK pathway. *J Thorac Oncol* 2006; 1: 7-9

33 Morrison DK. MAP kinase pathways. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2012; 4

34 Nakamura K, Nonaka H, Saito H, Tanaka M, Miyajima A. Hepatocyte proliferation and tissue remodeling is impaired after liver injury in oncostatin M receptor knockout mice. *Hepatology* 2004; 39: 635-644

35 Okaya A, Kitanaka J, Kitanaka N, Satake M, Kim Y, Terada K, Sugiyama T, Takemura M, Fujimoto J, Terada N, Miyajima A, Tsujimura T. Oncostatin M inhibits proliferation of rat oval cells, OC15-5, inducing differentiation into hepatocytes. *Am J Pathol* 2005; 166: 709-719

36 Ehashi T, Miyoshi H, Ohshima N. Oncostatin M stimulates proliferation and functions of mouse fetal liver cells in three-dimensional cultures. *J Cell Physiol* 2005; 202: 698-706

37 Hamada T, Sato A, Hirano T, Yamamoto T, Son G, Onodera M, Torii I, Nishigami T, Tanaka M, Miyajima A, Nishiguchi S, Fujimoto J, Tsujimura T.

Oncostatin M gene therapy attenuates liver damage induced by dimethylnitrosamine in rats. *Am J Pathol* 2007; 171: 872-881
38 Larrea E, Aldabe R, Gonzalez I, Segura V, Sarobe P, Echeverria I, Prieto J. Oncostatin M enhances the antiviral effects of type I interferon and activates immunostimulatory functions in liver epithelial cells. *J Virol* 2009; 83: 3298-3311
39 Ikeda M, Mori K, Ariumi Y, Dansako H, Kato N. Oncostatin M synergistically inhibits HCV RNA replication in combination with interferon-alpha. *FEBS Lett* 2009; 583: 1434-1438
40 Dowman JK,Tomlinson JW, Newsome PN. Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *Q J Med* 2010; 103: 71-83
41 Baker BJ, Park KW, Qin H, Ma X, Benveniste EN. IL-27 inhibits OSM-mediated TNF-alpha and iNOS gene expression in microglia. *Glia* 2010; 58: 1082-1093
42 Song HY, Kim MR, Lee MJ, Jeon ES, Bae YC, Jung JS, Kim JH. Oncostatin M decreases adiponectin expression and induces dedifferentiation of adipocytes by JAK3- and MEK-dependent pathways. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39: 439-449
43 Levy MT, Trojanowska M, Reuben A. Oncostatin M: a cytokine upregulated in human cirrhosis, increases collagen production by human hepatic stellate cells. *J Hepatol* 2000; 32: 218-226
44 Busletta C, Novo E, Paternostro C, Mareschi K, Cannito S. Oncostatin M stimulates chemotaxis of human hepatic profibrogenic cells. *Digestive and Liver Disease* 2011; 43: 78
45 Sohara N, Trojanowska M, Reuben A. Oncostatin M stimulates tissue inhibitor of metalloproteinase-1 via a MEK-sensitive mechanism in human myofibroblasts. *J Hepatol* 2002; 36: 191-199
46 Znoyko I, Sohara N, Spicer SS, Trojanowska M, Reuben A. Expression of oncostatin M and its receptors in normal and cirrhotic human liver. *J Hepatol* 2005; 43: 893-900
47 Ouyang L, Shen LY, Li T, Liu J. Inhibition effect of Oncostatin M on metastatic human lung cancer cells 95-D in vitro and on murine melanoma cells B16BL6 in vivo. *Biomed Res* 2006; 27: 197-202
48 Friedrich M, Höss N, Stögbauer F, Senner V, Paulus W, Ringelstein EB, Halfter H. Complete inhibition of in vivo glioma growth by oncostatin M. *J Neurochem* 2001; 76: 1589-1592
49 David E, Guihard P, Brounais B, Riet A, Charrier C, Battaglia S, Gouin F, Ponsolle S, Bot RL, Richards CD, Heymann D, Rédini F, Blanchard F. Direct anticancer effect of oncostatin M on chondrosarcoma. *Int J Cancer* 2011; 128: 1822-1835
50 许志伟, 李建生, 张金平. 人粪便中OSMR和TFPI2基因甲基化在结直肠癌诊断中的意义. 世界华人消化杂志 2011; 19: 1950-1953
51 West NR, Murphy LC, Watson PH. Oncostatin M suppresses oestrogen receptor-α expression and is associated with poor outcome in human breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 2012; 19: 181-195
52 Li Q, Zhu J, Sun F, Liu L, Liu X, Yue Y. Oncostatin M promotes proliferation of ovarian cancer cells through signal transducer and activator of transcription 3. *Int J Mol Med* 2011; 28: 101-108
53 钱俊甫, 孙君军, 刘伟峰, 解刚强, 金建光. OSM、OSMR在HCC及癌旁组织中的表达及意义. 肝胆外科杂志 2009; 17: 147-148
54 孔宁. 重组人OSM的制备及诱导肝细胞癌细胞分化的实验研究. 吉林大学, 2009
55 Yamashita T, Honda M, Nio K, Nakamoto Y, Yamashita T, Takamura H, Tani T, Zen Y, Kaneko S. Oncostatin m renders epithelial cell adhesion molecule-positive liver cancer stem cells sensitive to 5-Fluorouracil by inducing hepatocytic differentiation. *Cancer Res* 2010; 70: 4687-4697
56 Cannito S, Turato C, Paternostro C, Quarta S, Novo E, Busletta C. Oncostatin M, overexpressed in hepatocellular carcinoma, up-regulates SERPIN-B3 expression in hepatic cancer cells. *Dig Liver Dis* 2011; 43: 78

■**同行评价**
本文对抑瘤素M与肝脏再生、肝脏疾病的关系进行了综述, 选题较新, 论文结构合理, 层次清晰.

编辑 翟欢欢 电编 鲁亚静

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2012年12月28日; 20(36): 3732-3736
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

文献综述 REVIEW

法尼醇X受体对甘油三酯的代谢调节

何道同, 陈珺明, 王 兵

■背景资料
高甘油三脂血症作为代谢综合征(MS)的组分, 是非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)和心血管疾病的独立危险因素之一.

何道同, 陈珺明, 王兵, 上海交通大学附属上海市第六人民医院中医科 上海市 200233
何道同, 硕士, 主要从事中西医结合防治慢性肝病的研究.
上海市卫生局中医药科研基金资助项目, No. 2008L011A
上海市卫生局中医药科技基金资助项目, No. 2010L060A
上海市中西医结合学会科研基金资助项目, No. zxyk-1205
作者贡献分布: 本文综述由何道同完成; 王兵与陈珺明审校.
通讯作者: 王兵, 主任医师, 200233, 上海市徐汇区宜山路600号, 上海交通大学附属上海市第六人民医院中医科.
bingliver@163.com
电话: 021-584077667
收稿日期: 2012-09-28 修回日期: 2012-11-22
接受日期: 2012-12-20 在线出版日期: 2012-12-28

Regulation of triglyceride metabolism by the Farnesoid X receptor

Dao-Tong He, Jun-Ming Chen, Bing Wang

Dao-Tong He, Jun-Ming Chen, Bing Wang, School of Medicine, Shanghai Sixth People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200233, China
Supported by: the Traditional Chinese Medicine Science and Technology Fund of Shanghai Municipal Health Bureau, Nos. 2008L011A and 2010L060A; the Scientific Research Fund Project of Shanghai Institute of Integrated Traditional and Western Medicine, No. zxyk-1205
Correspondence to: Bing Wang, Chief Physician, Shanghai Sixth People's Hospital of Shanghai Affiliated to Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200233, China. bingliver@163.com
Received: 2012-09-28 Revised: 2012-11-22
Accepted: 2012-12-20 Published online: 2012-12-28

Abstract
Farnesoid x receptor (FXR) is a ligand-dependent nuclear transcription factor, belonging to the nuclear receptor superfamily. It is activated by bile acids (BAs) and is expressed in the liver, intestine, kidney, and adrenal gland. Upon activation by endogenous ligand (BAs), FXR can regulate triglyceride (TG) metabolism by modulating the activity of related enzymes, lipoprotein and receptors, and maintaining the balance between the contents of TG in the liver and circulation. This review aims to elucidate the regulation of triglyceride metabolism by FXR.

Key Words: Farnesoid X receptor; Triglyceride; Lipoprotein; Enzymes

■同行评议者
周南进, 研究员, 江西省医学科学研究所

He DT, Chen JM, Wang B. Regulation of triglyceride metabolism by the Farnesoid X receptor. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(36): 3732-3736

摘要
法尼醋X受体(farnesoid x receptor, FXR)属于配体依赖的核转录因子, FXR主要在肝脏、肠道、肾脏、肾上腺等表达, FXR因其可被内源性配体胆汁酸激活, 故又称胆汁酸受体, 他是孤儿核受体超家族中的一员. 被内源性配体胆汁酸激活后的FXR在甘油三酯(triglyceride, TG)代谢过程中起着重要作用, FXR可通过调控与TG代谢的关键酶、脂蛋白和相应受体, 从而使肝脏及循环血液中TG含量达到稳态平衡, 本文就FXR对TG的代谢调节作一综述.

关键词: 法尼醇X受体; 甘油三酯; 脂蛋白; 酶

何道同, 陈珺明, 王兵. 法尼醇X受体对甘油三酯的代谢调节. 世界华人消化杂志 2012; 20(36): 3732-3736
http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3732.asp

0 引言
高甘油三酯血症(hypertriglyeeridemia)是引起脂肪肝、代谢综合征(metabolic syndrome, MS)及冠心病(coronary heart disease, CHD)的独立危险因素之一[1-4]. 因此, 研究甘油三酯(triglyceride, TG)代谢机制对防治脂肪肝、MS和CHD有重要意义. 经研究证实[5,6], FXR在调控TG代谢中发挥重要作用. Sinal等[6]给予*FXR*基因敲除小鼠高脂饮食后发现TG含量明显高于对照组, 给予FXR激动剂后TG含量明显较对照组明显降低. FXR因其可被内源性配体胆汁酸激活, 故又称胆汁酸受体, 他是孤儿核受体超家族中的一员[7]. FXR主要在肝脏、肠道、肾脏、肾上腺、脂肪组织和心脏等表达[8]. 配体激活后的FXR对TG的代谢调节是通过调控TG代谢中的关键酶、脂蛋白和相应受体等来实现的.

1 FXR-SHP-SREBPlc-FAS-TG通路
FXR由胆汁酸激活后可激活小异二聚体伴侣分

子(small heterodimer partner, SHP)的表达, SHP是一种抑制性核受体[9,10]; 甾醇调节元件结合蛋(stero1 regulatory element binding proteins, SREBP-s)是一类分布于内质网和核膜上的膜连接蛋白, 有3种同工型: SREBP-la、 SREBP-lc和SREBP-2, 齶齿类动物和人类的肝脏中以SREBP-lc为主, SREBP-lc是一类调控TG和脂肪酸的合成、胆固醇的合成、低密度脂蛋白胆固醇(low-density lipoprotein, LDL)代谢相关基因表达的转录因子. 被FXR激活后的SHP通过抑制LXR的活性下调SREBP-lc的表达, 脂肪酸合酶(fatty acid synthesis, FAS)的活性间接的被抑制, 最终使血浆中TG含量减少[11,12].

2 FXR-PXR-PPARα-β氧化-TG通路

FXR可通过调控过氧化物酶体增殖物激活受体-α(peroxisome prolirerator-activated receptor α, PPAR-α)的活性, 使乙酰辅酶A合酶(acyl coasynthetase, ACS)、肉碱转移酶Ⅰ(carnitine palmitoyl transferase-Ⅰ, CPT-Ⅰ)及脂蛋白脂酶(lipoprotein lipase, LPL)的活性增强, 来调节胆汁酸的合成, 最终降低血浆TG的水平[13]. PPAR激动剂如非诺贝特通过促进脂肪酸在肝脏、肾脏及骨骼肌中的氧化, 降低血浆TG水平. PPAR-α是一种激素激活核受体, 其功能与脂肪酸氧化密切相关[14,15]. PPAR-α高表达于具有丰富线粒体和β氧化活性的骨骼肌组织中[16]. PPAR-α主要在肝脏表达, 被配体激活后, 可引起ACS、CPT-Ⅰ、LPL的转录增强. 其中CPT-Ⅰ是脂酸β氧化的限速酶, 其表达增加, 可增强脂肪酸的氧化代谢, 具有对抗肝脂肪变、延缓脂肪肝形成的作用[17]; LPL是清除血浆脂蛋白中所含TG的限速酶, 属于丝氨酸活性酶类, 在极低密度脂蛋白胆固醇(very low density lipoprotein cholesterol, VLDL-C)和乳糜微粒(chylomicron, CM)的代谢中有重要的作用, 在LPL作用下, CM和极低密度脂蛋白(very low density lipoprotein, VLDL)颗粒核心处的TG不断水解, 导致颗粒表面磷脂和未酯化胆固醇过剩并转移至高密度脂蛋白(high-density lipoprotein, HDL), 从而使CM和VLDL分别衍变成CM残体和中密度脂蛋白(intermediate-density lipoprotein, IDL), 促进CM和VLDL-C的代谢, 给予小鼠PPARα激动剂后肝脏LPL表达增加, ApoCⅢ的分泌降低, 且呈时间剂量依赖性地降低[18].

3 FXR-酶-TG通路

FXR下调FAS和肝脂酶(hepatic lipase, HL)的表达, 从而降低血浆中的胆固醇和TG含量[19]. FAS和HL是TG代谢中的关键酶, 其表达和活性变化与体内甘油三脂的含量密切相关[20]. FAS主要存在于肝、肾、脑、肺、乳腺及脂肪等组织, 是脂肪酸生物合成过程中将小分子碳单位聚合生成长链脂肪酸的关键酶, 可促进肝脏合成新的脂肪[21]. HL是一种糖蛋白, 由肝细胞合成和分泌, 具有磷脂酶A1和TG水解酶的活性. HL可催化残粒脂蛋白和HDL中甘油三脂和磷脂水解. 大量研究证实[22]HL在HDL代谢中发挥重要作用. 此外, HL还可以作为配体促进肝细胞摄取HDL中的胆固醇或LDL残粒、促进肝细胞摄取含apoB类脂蛋白[23,24]. 脂肪酸的合成在细胞质中进行, 合成反应过程中有数种酶参与, 其中FAS是最重要的酶. 正常情况下, FAS将乙酰CoA中的二碳合成脂肪酸, 再与甘油形成甘油三脂, 可促进肝脏合成新的脂肪. 此外, FAS是SREBP-lc所调控的下游基因. 抑制FAS及HL的活性, 最终使血浆中甘油三脂含量减少[22,25].

4 FXR-LPL-TG通络

FXR可通过调节LPL从而降解脂蛋白中的甘油三脂和磷[26]. FXR对LPL的调节依赖于LPL的2个辅活化因子: (Apo)CⅡ和(Apo)CⅢ. (Apo)是LPL的激活因子, (Apo)CⅢ是LPL的抑制因子[27-29]. FXR激活后活化(Apo)CⅡ, 同时降低(Apo)CⅢ的表达, 最终的叠加效应是进一步激活LPL, 增加VLDL和CM中的TG的水解[30].

5 FXR-PLTP-TG通路

FXR可上调磷脂转运蛋白(phos pholipid transfer-protein, PLTP)转录, 最终降低血浆TG. PLTP是一种分泌蛋白, 最初发现于线粒体和微粒体膜内, 主要存在于肝脏和小肠[31]. PLTP具有促进肝脏可溶性物质交换和运输的作用, 其后发现他对磷脂有较强的结合能力[31]. PTLP被FXR激活后可介导磷脂和胆固醇从富含甘油三脂的脂蛋白向HDL转运, 维持血浆中, HDL的水平, 促进血浆中脂质的降低[32]. PLTP在小鼠体内的过表达, 可加速肝脏对HDL中脂质的摄取和清除. 此外, PLTP在胞内则促进胆固醇的转化如生成胆汁酸、胆固醇酯、类固醇激素等[33].

6 FXR-VLDL-TG通路

FXR可诱导VLDL受体的表达, 增加肝脏及外周组织对胆固醇的吸收利用[34]. FXR激活后可降低游离脂肪酸FFA的合成和降低从肝脏分泌

■**研发前沿**
目前对甘油三酯代谢的研究涉及相关酶、脂蛋白和受体等多种途径, 但其机制尚未完全阐明.

■相关报道
经研究证实, FXR在调控TG代谢中发挥重要作用. Sinal等给予FXR基因敲除小鼠高脂饮食后发现TG含量明显高于对照组, 给予FXR激动剂后TG含量较对照组明显降低.

VLDL[9]. Schmedt和Dallinga-Thie等[35,36]的研究显示, VLDL受体基因缺陷小鼠的脂蛋白、血清总胆固醇、TG和游离脂肪酸水平与野生小鼠没有差别, 而当VLDLR转基因小鼠和VLDLR缺陷小鼠分别给予高脂饮食后, 转基因小鼠血清TG水平明显降低, 而缺陷小鼠甘油三脂水平明显升高. 当缺乏VLDLR时, VLDL不受影响, 但是循环血液中的TG明显升高.

7 FXR-SDC1-TG通路

FXR可诱导Syndecan1(SDC1)的转录, 降低血浆TG水平. SDC1是跨膜的硫酸乙酰肝素蛋白聚糖(heparin sulfate proteoglycan, HSPGs)的家族成员之一, 生理状态下主要表达于上皮细胞表面[37]; SDC1通过脂蛋白脂肪酶、apoE、肝脂酶等桥蛋白与脂蛋白相连, 在肝脏清除脂蛋白残粒中发挥作用[11].

糖尿病是全世界高发病率、高死亡率的疾病之一[38-41], 肝脏在葡萄糖糖代谢平衡中起着至关重要的作用, 是糖异生和糖原合成的重要器官. FXR的激活显示了对糖尿病以及胆汁酸代谢异常所致疾病和其他代谢疾病的治疗作用[42-44]. 有实验研究显示[45], FXR在禁食后的小鼠体内表达增加, 相应的受FXR调节的代谢基因如过氧化物酶体增殖物激活受体(PPARγ)、PPARγ共活剂-1a(PGC-1a), 肝细胞核因子(HNF-4α)等显著升高, 而HL的合成明显减少. 由此可见, FXR在糖脂代谢的调控中发挥重要作用. 小鼠肝细胞体内外的实验研究显示, PGC-1α、环磷酸腺苷的超表达能增加FXR的表达和活性. FXR通过激活SHP的活性, 通过SHP下调LRH-1, 最终抑制胆固醇7α-羟化酶活性, 胆汁酸的合成受到抑制, 因胆汁酸可抑制PGC-1α的活性, 因此FXR抑制BAs合成的同时间接激活了PGC-1α的活性, 而PGC-1α、CAMP均为体内代谢的启动和调节因子.

8 结论

由此可见, FXR对TG的调控机制涉及多基因、多靶点、多途径共同作用, 最终维持内外环境TG及相关脂质的动态平衡. 除此之外, FXR作为一种多靶点的核受体, 具有多种调节作用, 涉及脂肪、糖、胆汁酸及胆固醇等多种代谢相关的基因和信号转导的途径, 其表达异常与糖尿病、脂肪肝、胆结石(gallstone disease, GD)等疾病密切相关. 大量的实验研究显示[44-46], 激活的FXR对糖尿病、脂肪肝等多种代谢疾病有良好的治疗作用. 然而, FXR在其他组织, 例如脂肪组织、骨骼肌、胰腺和中枢神经系统的作用仍需进一步的深入研究. FXR作为全身能量代谢的一个调节器, 有望成为多种代谢疾病的一个治疗靶点.

9 参考文献

1 Vernon G, Baranova A, Younossi ZM. Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. *Aliment Pharmacol Ther* 2011; 34: 274-285

2 Dowman JK, Armstrong MJ, Tomlinson JW, Newsome PN. Current therapeutic strategies in non-alcoholic fatty liver disease. *Diabetes Obes Metab* 2011; 13: 692-702

3 Filippatos TD, Elisaf MS. Role of ezetimibe in non-alcoholic fatty liver disease. *World J Hepatol* 2011; 3: 265-267

4 Lebovics E, Rubin J. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): why you should care, when you should worry, what you should do. *Diabetes Metab Res Rev* 2011; 27: 419-424

5 Teodoro JS, Rolo AP, Palmeira CM. Hepatic FXR: key regulator of whole-body energy metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 2011; 22: 458-466

6 Sinal CJ, Tohkin M, Miyata M, Ward JM, Lambert G, Gonzalez FJ. Targeted disruption of the nuclear receptor FXR/BAR impairs bile acid and lipid homeostasis. *Cell* 2000; 102: 731-744

7 Cariou B. The farnesoid X receptor (FXR) as a new target in non-alcoholic steatohepatitis. *Diabetes Metab* 2008; 34: 685-691

8 López-Velázquez JA, Carrillo-Córdova LD, Chávez-Tapia NC, Uribe M, Méndez-Sánchez N. Nuclear receptors in nonalcoholic Fatty liver disease. *J Lipids* 2012; 2012: 139875

9 Watanabe M, Houten SM, Wang L, Moschetta A, Mangelsdorf DJ, Heyman RA, Moore DD, Auwerx J. Bile acids lower triglyceride levels via a pathway involving FXR, SHP, and SREBP-1c. *J Clin Invest* 2004; 113: 1408-1418

10 Volynets V, Spruss A, Kanuri G, Wagnerberger S, Bischoff SC, Bergheim I. Protective effect of bile acids on the onset of fructose-induced hepatic steatosis in mice. *J Lipid Res* 2010; 51: 3414-3424

11 Duran-Sandoval D, Cariou B, Fruchart JC, Staels B. Potential regulatory role of the farnesoid X receptor in the metabolic syndrome. *Biochimie* 2005; 87: 93-98

12 Hebanowska A. [Mechanisms of bile acid biosynthesis regulation--autoregulation by bile acids]. *Postepy Biochem* 2011; 57: 314-323

13 Wang B, Cheng LJ, Gao ZN, Zhang XY, Huo M, Zhang DJ, Wu J, Wei MF. [Activation of liver X receptor regulates fatty acid synthase expression in diabetic liver]. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2008; 88: 848-852

14 Slim A, Castillo-Rojas L, Hulten E, Slim JN, Pearce Moore D, Villines TC. Rosiglitazone and fenofibrate additive effects on lipids. *Cholesterol* 2011; 2011: 286875

15 Qin R, Zhang J, Li C, Zhang X, Xiong A, Huang F, Yin Z, Li K, Qin W, Chen M, Zhang S, Liang L, Zhang H, Nie H, Ye W. Protective effects of gypenosides against fatty liver disease induced by high fat and cholesterol diet and alcohol in rats. *Arch Pharm Res* 2012; 35: 1241-1250
16 Kimura T, Nakajima T, Kamijo Y, Tanaka N, Wang L, Hara A, Sugiyama E, Tanaka E, Gonzalez FJ, Aoyama T. Hepatic Cerebroside Sulfotransferase Is Induced by PPARα Activation in Mice. *PPAR Res* 2012; 2012: 174932
17 Zúñiga J, Cancino M, Medina F, Varela P, Vargas R, Tapia G, Videla LA, Fernández V. N-3 PUFA supplementation triggers PPAR-α activation and PPAR-α/NF-κB interaction: anti-inflammatory implications in liver ischemia-reperfusion injury. *PLoS One* 2011; 6: e28502
18 Li T, Chiang JY. Regulation of bile acid and cholesterol metabolism by PPARs. *PPAR Res* 2009; 2009: 501739
19 Shen LL, Liu H, Peng J, Gan L, Lu L, Zhang Q, Li L, He F, Jiang Y. Effects of farnesoid X receptor on the expression of the fatty acid synthetase and hepatic lipase. *Mol Biol Rep* 2011; 38: 553-559
20 Spijkerman E, Wacker A, Weithoff G, Leya T. Elemental and fatty acid composition of snow algae in Arctic habitats. *Front Microbiol* 2012; 3: 380
21 Guo X, Li H, Xu H, Halim V, Zhang W, Wang H, Ong KT, Woo SL, Walzem RL, Mashek DG, Dong H, Lu F, Wei L, Huo Y, Wu C. Palmitoleate induces hepatic steatosis but suppresses liver inflammatory response in mice. *PLoS One* 2012; 7: e39286
22 Wu F, Xu L, Liu J, Xu X. [Experimental studies on blood lipid regulating effects of shuanghua granules]. *Zhongguo Zhongyao Zazhi* 2011; 36: 1492-1498
23 Zhang Y, Edwards PA. FXR signaling in metabolic disease. *FEBS Lett* 2008; 582: 10-18
24 Ory DS. Nuclear receptor signaling in the control of cholesterol homeostasis: have the orphans found a home? *Circ Res* 2004; 95: 660-670
25 Bilz S, Samuel V, Morino K, Savage D, Choi CS, Shulman GI. Activation of the farnesoid X receptor improves lipid metabolism in combined hyperlipidemic hamsters. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006; 290: E716-E722
26 Xu G, Pan LX, Li H, Shang Q, Honda A, Shefer S, Bollineni J, Matsuzaki Y, Tint GS, Salen G. Dietary cholesterol stimulates CYP7A1 in rats because farnesoid X receptor is not activated. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 286: G730-G735
27 Daneshpour MS, Faam B, Mansournia MA, Hedayati M, Halalkhor S, Mesbah-Namin SA, Shojaei S, Zarkesh M, Azizi F. Haplotype analysis of Apo AI-CIII-AIV gene cluster and lipids level: Tehran Lipid and Glucose Study. *Endocrine* 2012; 41: 103-110
28 Wei J, Ouyang H, Wang Y, Pang D, Cong NX, Wang T, Leng B, Li D, Li X, Wu R, Ding Y, Gao F, Deng Y, Liu B, Li Z, Lai L, Feng H, Liu G, Deng X. Characterization of a hypertriglyceridemic transgenic miniature pig model expressing human apolipoprotein CIII. *FEBS J* 2012; 279: 91-99
29 Módulo CM, Machado Filho EB, Malki LT, Dias AC, de Souza JC, Oliveira HC, Jorge IC, Santos Gomes IB, Meyrelles SS, Rocha EM. The role of dyslipidemia on ocular surface, lacrimal and meibomian gland structure and function. *Curr Eye Res* 2012; 37: 300-308
30 Chennamsetty I, Claudel T, Kostner KM, Baghdasaryan A, Kratky D, Levak-Frank S, Frank S, Gonzalez FJ, Trauner M, Kostner GM. Farnesoid X receptor represses hepatic human APOA gene expression. *J Clin Invest* 2011; 121: 3724-3734
31 Jiang XC, Jin W, Hussain MM. The impact of phospholipid transfer protein (PLTP) on lipoprotein metabolism. *Nutr Metab* (Lond) 2012; 9: 75
32 Mak PA, Kast-Woelbern HR, Anisfeld AM, Edwards PA. Identification of PLTP as an LXR target gene and apoE as an FXR target gene reveals overlapping targets for the two nuclear receptors. *J Lipid Res* 2002; 43: 2037-2041
33 Smelt AH. Triglycerides and gallstone formation. *Clin Chim Acta* 2010; 411: 1625-1631
34 Sirvent A, Claudel T, Martin G, Brozek J, Kosykh V, Darteil R, Hum DW, Fruchart JC, Staels B. The farnesoid X receptor induces very low density lipoprotein receptor gene expression. *FEBS Lett* 2004; 566: 173-177
35 Schmedt A, Götte M, Heinig J, Kiesel L, Klockenbusch W, Steinhard J. Evaluation of placental syndecan-1 expression in early pregnancy as a predictive fetal factor for pregnancy outcome. *Prenat Diagn* 2012; 32: 131-137
36 Dallinga-Thie GM, Franssen R, Mooij HL, Visser ME, Hassing HC, Peelman F, Kastelein JJ, Péterfy M, Nieuwdorp M. The metabolism of triglyceride-rich lipoproteins revisited: new players, new insight. *Atherosclerosis* 2010; 211: 1-8
37 So CF, Choi KS, Wong TK, Chung JW. Recent advances in noninvasive glucose monitoring. *Med Devices* (Auckl) 2012; 5: 45-52
38 Wilkins JT, Ning H, Berry J, Zhao L, Dyer AR, Lloyd-Jones DM. Lifetime risk and years lived free of total cardiovascular disease. *JAMA* 2012; 308: 1795-1801
39 Melander O, Maisel AS, Almgren P, Manjer J, Belting M, Hedblad B, Engström G, Kilger U, Nilsson P, Bergmann A, Orho-Melander M. Plasma proneurotensin and incidence of diabetes, cardiovascular disease, breast cancer, and mortality. *JAMA* 2012; 308: 1469-1475
40 Zhang Y, Castellani LW, Sinal CJ, Gonzalez FJ, Edwards PA. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1alpha (PGC-1alpha) regulates triglyceride metabolism by activation of the nuclear receptor FXR. *Genes Dev* 2004; 18: 157-169
41 Hunsberger ML, Donatelle RJ, Lindsay K, Rosenberg KD. Physician care patterns and adherence to postpartum glucose testing after gestational diabetes mellitus in Oregon. *PLoS One* 2012; 7: e47052
42 Huang R, Xia M, Cho MH, Sakamuru S, Shinn P, Houck KA, Dix DJ, Judson RS, Witt KL, Kavlock RJ, Tice RR, Austin CP. Chemical genomics profiling of environmental chemical modulation of human nuclear receptors. *Environ Health Perspect* 2011; 119: 1142-1148
43 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 LXRalpha. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; 293: G817-G823
44 Malerød L, Sporstøl M, Juvet LK, Mousavi SA, Gjøen T, Berg T, Roos N, Eskild W. Bile acids reduce SR-BI expression in hepatocytes by a pathway

■创新盘点

FXR作为一种多靶点的核受体, 具有多种调节作用, 涉及脂肪、糖、胆汁酸及胆固醇等多种代谢相关的基因和信号转导途径, 其表达异常与糖尿病、脂肪肝、胆结石等疾病密切相关.

■同行评价
法尼醇X受体(FXR)广泛参与糖脂及胆汁酸等代谢, 逐渐成为相关代谢疾病研究的热点, 有关FXR调控脂代谢特别是甘油三酯代谢通路的研究, 对阐明NAFLD及MS的发病机制、寻找有效的治疗靶点具有重要的意义.

involving FXR/RXR, SHP, and LRH-1. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 336: 1096-1105
45 Yang ZX, Shen W, Sun H. Effects of nuclear receptor FXR on the regulation of liver lipid metabolism in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatol Int* 2010; 4: 741-748
46 Levi M. Nuclear receptors in renal disease. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1812: 1061-1067

编辑 翟欢欢 电编 鲁亚静

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》出版流程

本刊讯 《世界华人消化杂志》[ISSN 1009-3079 (print), ISSN 2219-2859 (online), CN 14-1260/R]是一份同行评议性和开放获取(open access, OA)的旬刊, 每月8、18、28号按时出版. 具体出版流程介绍如下:

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

第二步 审稿: 送审编辑对所有来稿进行课题查新, 并进行学术不端检测, 对不能通过预审的稿件直接退稿, 通过预审的稿件送交同行评议专家进行评议. 编辑部主任每周一组织定稿会, 评估审稿人意见, 对评审意见较高, 文章达到本刊发表要求的稿件送交总编辑签发拟接受, 对不能达到本刊发表要求的稿件退稿.

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

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

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

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

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

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

《世界华人消化杂志》从收稿到发行每一步都经过严格审查, 保证每篇文章高质量出版, 是消化病学专业人士发表学术论文首选的学术期刊之一. 为保证作者研究成果及时公布, 《世界华人消化杂志》保证每篇文章四月内完成. (编辑部主任: 李军亮 2010-01-18)

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2012年12月28日; 20(36): 3737-3741
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

文献综述 REVIEW

急性胰腺炎硬膜外治疗的研究进展

刘小龙, 陈国忠

刘小龙, 陈国忠, 中国人民解放军南京军区福州总医院麻醉科 福建省福州市 350025
刘小龙, 硕士, 主要从事急性胰腺炎硬膜外治疗的研究.
作者贡献分布: 本文综述由刘小龙完成; 陈国忠审校.
通讯作者: 陈国忠, 教授, 主任医师, 350025, 福建省福州市西二环北路156号, 中国人民解放军南京军区福州总医院麻醉科.
cgzssq2000@sina.com
电话: 0591-24937084
收稿日期: 2012-10-10 修回日期: 2012-11-23
接受日期: 2012-12-20 在线出版日期: 2012-12-28

Recent advances in the use of epidural anesthesia for acute pancreatitis

Xiao-Long Liu, Guo-Zhong Chen

Xiao-Long Liu, Guo-Zhong Chen, Department of Anaesthesiology, Fuzhong General Hospital of Nanjing Military Command of PLA, Fuzhou 350025, Fujian Province, China
Correspondence to: Guo-Zhong Chen, Professor, Chief Physician, Department of Anaesthesiology, Fuzhong General Hospital of Nanjing Military Command of PLA, Fuzhou 350025, Fujian Province, China. cgzssq2000@sina.com
Received: 2012-10-10 Revised: 2012-11-23
Accepted: 2012-12-20 Published online: 2012-12-28

Abstract
Acute pancreatitis (AP) is a common acute disease caused by a number of factors. It can cause a variety of systemic symptoms and multiple organ failure (MOF), having a high mortality rate. Currently, there is still a lack of effective treatment for AP because its pathogenesis has not been elucidated. The positive role of epidural anesthesia for AP was firs described by Browne in 1969. In recent years, it has been found that epidural anesthesia can prevent the progression of AP by inducing analgesia, inhibiting the release of inflammatory factors, promoting acinar cell apoptosis, and improving pancreatic microcirculation. In this paper, we will review recent progress in the use of epidural anesthesia for AP.

Key Words: Epidural anesthesia; Acute pancreatitis; MODS; Inflammatory cytokines

Liu XL, Chen GZ. Recent advances in the use of epidural anesthesia for acute pancreatitis. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(36): 3737-3741

摘要
急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)是一种由多因子引起的常见病、急性病, 且易并发多种全身症状, 继而引发多器官功能衰竭, 死亡率高. 由于其发病机制尚未阐明, 目前临床上尚缺乏行之有效的治疗方法. 自从1969年Browne第一次描述硬膜外阻滞对AP的积极作用以来, 许多学者对其进行了探讨. 近年来人们发现硬膜外阻滞能通过镇痛、抑制炎性因子释放、促进腺泡细胞凋亡及改善胰腺微循环等机制抑制AP的进展, 改善其转归. 本文对其治疗作用的研究进展作一综述.

关键词: 硬膜外阻滞; 急性胰腺炎; 多器官功能衰竭; 炎症因子

刘小龙, 陈国忠. 急性胰腺炎硬膜外治疗的研究进展. 世界华人消化杂志 2012; 20(36): 3737-3741
http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3737.asp

■背景资料
急性胰腺炎(AP)为临床上常见的急性病, 进展快, 死亡率高. 目前其发病机制尚未阐明, 临床上也缺乏行之有效的治疗方法. 近年发现硬膜外阻滞能在多方面抑制其进展, 改善转归.

0 引言
急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)病死率高, 其发病机制尚未完全明确. 近来有学者认为炎症介质和细胞因子的释放, 细胞凋亡的发生以及胰腺微循环障碍在AP的发生发展过程起重要作用[1], 干预上述机制治疗AP成为研究热点. 硬膜外输注局麻药或阿片类药物是临床上常用的麻醉方法之一, 其镇痛效果确切, 可抑制应激反应, 降低交感神经活性, 改善组织微循环, 增加组织灌注[2], 有望成为治疗AP的理想方法.

1 硬膜外阻滞与镇痛
腹痛为AP的主要表现和首发症状, 95%的AP患者均有不同程度的腹痛. 大部分患者疼痛多无明显诱因, 部位多在中、上腹部[3], 其中近半数放射至背部, 起病急, 30 min内疼痛达到高峰, 持续24 h以上且不能被一般解痉药缓解. 疼痛应激增加液体丢失, 促进深静脉血栓形成和胰液的

■同行评议者
谭晓冬, 教授, 中国医科大学附属盛京医院; 夏时海, 副教授, 副主任医师, 武警后勤学院附属医院肝胆胰脾科(中心)

■研发前沿
一直以来尽管人们对急性胰腺炎进行积极的治疗，但仍不能显著地降低其死亡率. 因此探索急性胰腺炎新的治疗方法十分重要.

分泌, 加重Oddi括约肌痉挛, 进一步升高胰胆管压力, 引起或加重休克并可能导致胰-心反射, 导致猝死, 因此AP急性期快速有效的镇痛十分重要. AP引起腹痛原因主要为: (1)胰腺炎症水肿刺激和牵拉被膜的神经末梢; (2)胰腺周围的炎性渗出物、胰液外溢或腹膜后出血侵及腹腔神经丛, 炎性渗出物进入腹腔致腹膜炎; (3)胰管梗阻, 膨胀或痉挛等. 感受胰腺疼痛的神经纤维为一对从腹腔神经丛传入到T5-11交感神经节的内脏大小神经纤维(内脏大神经T5-10, 内脏小神经T9-11)[4], 再由内脏神经传至中枢. 理论上, 阻断疼痛刺激传入大脑神经的传导通路就可以消除疼痛. 这一理论已在胰腺癌性疼痛的治疗中得到验证. 有报道[5,6]对晚期胰腺癌患者行胸交感神经节切断术治疗顽固性疼痛, 疼痛缓解率为100%, 且疼痛无复发. 对于不能耐受手术的胰腺癌患者则可用连续硬膜外阻滞镇痛. 有研究将40例急性水肿型胰腺炎患者随机分为治疗组(一般治疗+T11-12连续硬膜外阻滞)和对照组(一般治疗), 结果治疗组患者疼痛缓解所需时间和治疗天数明显少于对照组, 而对于重型胰腺炎患者, 硬膜外阻滞同样取得理想的镇痛效果, 由此认为连续硬膜外阻滞疗法可能通过阻滞了躯体和内脏的神经, 解除因疼痛导致的恶性循环同时抑制了胰腺的分泌[7,8]. 另外白志强等[9]将82例AP患者分成硬膜外自控镇痛(PCEA)组和静脉自控镇痛(PCIA)组, 结果PCEA组患者VAS评分低于PCIA组, 且镇痛药用量及PCA按压次数更少, 说明PCEA镇痛效果优于PCIA, 且药物用量更少, 其可能为阿片类和局麻药阻断痛觉在脊髓的上行传导通路以及脊神经根所致.

2 硬膜外阻滞与炎症因子

炎症因子在AP的发生和发展中起着不可替代的作用[10-12], 因其进人体循环, 易诱发全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS)和多系统器官功能衰竭(multiple organ failure, MOF), 影响胰腺炎病程及预后[13]. 硬膜外阻滞因其有效降低手术区域神经元的兴奋性, 抑制大脑皮质、边缘系统和下丘脑对大脑皮质的投射系统, 能有效减轻应激反应, 抑制炎症介质的释放[14]. 近年, 硬膜外阻滞作为治疗心绞痛的一种新手段被受到重视, 其抑制炎症因子和改善心肌灌注的作用已被广泛认同[15,16]. 另有研究表明: 硬膜外阻滞复合全麻较单纯全麻更有效地降低老年腹部手术患者应激反应[17]. Adolphs等[18]在一个实验性研究中表明胸段硬膜外阻滞可以防止缺血再灌注损伤引起的白细胞-内皮细胞的相互作用, 降低白细胞黏附反应, 抑制再灌注后的炎症反应. 栾静[19]将硬膜外阻滞用于治疗AP模型犬, 发现治疗组犬胰腺炎症状减轻, 且IL-6水平比对照组明显降低, IL-10活性明显升高(P<0.01). Bedirli等[20]将24只坏死型AP大鼠分成3组: 对照组(胰腺炎组)、硬膜外布比卡因组(胰腺炎+布比卡因)、硬膜外生理盐水组(胰腺炎+生理盐水), 24 h后抽血检测结果硬膜外布比卡因干预组肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF-α)、白介素(interleukin, IL-1β)浓度及血清淀粉酶浓度均明显降低, 提示硬膜外阻滞减弱AP诱导的全身炎症反应. Freise等[21]将胸段硬膜外阻滞(thoracic epidural anesthesia, TEA)用于治疗大鼠AP, 发现治疗组大鼠肠损伤和全身炎症反应均明显减轻、死亡率降低66%. 作者认为可能机制为TEA改善肠道微循环, 增加肠道组织氧供, 减少炎性因子释放而减轻或治愈胰腺炎.

■相关报道
Demirag等的研究显示硬膜外阻滞可能通过降低交感神经活性、改善胰腺微循环、缓解胰腺炎, 防止组织坏死.

3 硬膜外阻滞与腺泡细胞凋亡

凋亡是一种受基因调控的细胞主动性死亡, 其特点是不引起炎症反应、不破坏细胞生存的微环境[22], 而坏死则伴随剧烈的炎症反应. 新近的研究指出, 胰腺炎发生时最早的病理变化出现在胰腺腺泡细胞内[23], 腺泡细胞自身对损伤反应的强弱是“瀑布样效应”程度及病情轻重的决定性因素之一, 腺泡细胞的死亡方式与AP的病情有密切的关系, 已证实细胞凋亡与AP的严重程度呈负相关[24-26], 腺泡细胞凋亡在急性期是一种保护现象 .

已知与调控胰腺细胞凋亡密切相关信号分子有Caspase-3[27]、Bax、Bcl-2[28]、p53[29]、TNF-α [30]、FasL-Fas[31]. Caspase是凋亡发生过程中所需的重要的金属蛋白酶, 其中Caspase-3的激活是凋亡发生过程中蛋白级联反应的限速酶, 也是细胞凋亡的主要效应因子和执行者. 在AP中, Caspase-3通过多种途径(细胞膜、线粒体、内质网)参与腺泡细胞的凋亡, 减少腺泡细胞发生坏死. 这一保护性机制是通过Caspase降解受体作用蛋白实现的, 后者是细胞坏死的关键介导者[32]. 有学者[33]发现, 随着胆管梗阻时间的延长, Caspase-3活性逐渐降低, 大量腺泡细胞走向死亡; 而解除梗阻后, 残留的腺泡细胞再生, 并逐步恢复了胰腺腺泡细胞的功能, 其死亡方式也逐渐转为凋亡, Caspase-3的活性也逐渐增

加. 相反, 有研究者[34]认为促炎因子可以通过抑制细胞凋亡引起胰腺腺泡细胞大量坏死, 导致SIRS; 抑炎因子一方面促进腺泡细胞凋亡, 另一方面抑制促炎因子的释放, 均可以减轻胰腺炎症反应.

文献报道, 经布比卡因硬膜外阻滞治疗的AP犬的血液指标明显减轻, 且Bax、Bcl-2活性较AP组明显上升($P<0.05$)[19]. 由此认为硬膜外阻滞对于犬AP细胞凋亡的发生具有一定的积极作用, 但目前机制还不清楚, 可能是硬膜外阻滞的直接作用, 即诱导Caspase-3的活化或其他的凋亡相关信号分子, 还有可能是硬膜外阻滞打破了AP的促炎-抗炎网络, 使得原先处于弱势的IL-10等抗炎因子相对充足, 从而诱导胰腺细胞凋亡, 亦或还有其他的原因, 有待进一步研究.

4 硬膜外阻滞与微循环

胰腺微循环障碍被认为是胰腺损伤中的关键环节, 他既是AP发生的始动因子, 又为损伤持续和加剧的因素[35,36]. 胰腺缺血促使轻型胰腺炎向重型发展, 有效的容量治疗和活血药、抗凝药及输注右旋糖酐的应用, 均能改善胰腺微循环, 有助于缓解AP. TEA技术治疗冠心病已日臻成熟, 其机制为TEA阻滞交感神经、改善冠脉循环、降低血管阻力[37]、降低心肌耗氧量, 使心肌血流重新分布、氧供增加. 受此启发Demirag等[38]将TEA用于治疗胰腺炎, 将16只大鼠分为3组, 分别接受单纯TEA、单纯AP、AP+TEA 3种处理方法, 结果表明AP+TEA组开始时胰腺微循环血流降低和单纯AP组相似, 但施加TEA干预后, 血流在45 min内显著增加至基础值的52%, 且碱剩余明显降低, 胰腺水肿和坏死明显比AP组减轻, 提示TEA可部分恢复微循环, 防止水肿型胰腺炎发展成坏死性胰腺炎, 防止组织坏死. 可见, 硬膜外阻滞可能通过降低交感神经活性、改善胰腺微循环、缓解胰腺炎.

5 硬膜外阻滞与胰腺炎相关的并发症

在重症胰腺炎中, 61.7%的患者发生MOF, 26.6%发生单器官功能衰竭[39]. 在全身并发症中, 肺部并发症最多见, 且致死率也最高. Steinberg等[40]统计75%AP患者伴发肺部并发症, 包括从缺氧到急性呼吸窘迫综合症(acute respiratory distress syndrome, ARDS), 约有1/3伴发肺部并发症AP患者经历急性肺损伤(acute lung injury, ALI)或ARDS, 其中60%患者死于发病后第1周. Mehta等[41]将择期行非停跳的冠脉搭桥术的慢性阻塞性肺病患者分为两组, 一组单纯全麻、一组全麻复合高位硬膜外阻滞, 发现与单纯全麻相比, TEA的应用使得术后拔管时间和肺功能的恢复时间显著缩短, 且减少了心肺死亡率. AP期间, 炎症介质能导致大量炎症因子释放和各种活性物质进入血管, 之后随血液循环进入肺组织导致肺损伤和ICAM-1的表达. 有研究者将AP大鼠分为3组: 一组对照, 一组TEA+生理盐水, 另一组接受TEA+布比卡因治疗, 结果发现TEA治疗组肺组织细胞凋亡和ICAM-1表达均较对照组明显减少, 且TEA治疗组肺组织标本谷胱甘肽过氧化物酶、超氧化物歧化酶、过氧化氢酶浓度增加, 表明持续TEA减少SAP大鼠的肺损伤[20].

AP时易造成肠道缺血再灌注损伤, 并发肠屏障功能障碍, 导致肠道细菌移位, 内毒素进入循环, 诱发和加重SIRS[42,43]. 动物和临床试验均证实TEA增加肠黏膜的血流灌注, 改善肠血液循环[3,44-46], 减缓急性肠缺血的进展, 防止肠道细菌和内毒素的肠黏膜易位[47]. Freise等[21]把AP大鼠模型分为TEA治疗组和对照组, 结果显示TEA组大鼠的肠黏膜的毛细血管灌注增加, 动脉血流增加, 大鼠生存率大幅提高, 提示TEA能阻止SAP诱导的肠道并发症. 已知AP期间肝脏枯否细胞受损, 导致病原体清除率和全身免疫反应受损, 加重疾病的严重性. 且实验表明肝脏在AP 时与其他脏器尤其是肺脏的损伤关系密切[48]. Freise等[49]则通过动物实验进一步证实了TEA能减少AP期间的肝损伤, 保护全身炎症紊乱的肝脏功能, 且对平均动脉压的影响不明显, 可能与区域交感神经阻滞有关. 由此推测TEA可能是防治AP全身并发症的一种有效措施.

6 结论

硬膜外阻滞藉减轻AP患者的腹痛、抑制炎症因子的释放、改善胰腺微循环、促进胰腺细胞凋亡及防治AP相关并发症等方面改善AP的转归, 是其他单一疗法无法比拟的. 但迄今硬膜外阻滞治疗AP的研究多基于动物模型, 观察指标仅为临床效应指标, 极少深入机制探讨. 硬膜外阻滞存在一定并发症, 如神经损伤、局麻药毒性反应、硬膜外感染、阻滞范围过广引起的血压下降和SAP后期的凝血功能紊乱引起的硬膜外血肿等, 但此类并发症可经完善技术规避. 因此, 硬膜外

■创新盘点

本文首次从不同侧面阐述了硬膜外阻滞对AP的治疗作用, 包括减轻疼痛, 抑制炎症因子的释放、改善胰腺微循环、促进胰腺细胞凋亡及防治AP相关并发症.

■**应用要点**
本文对探讨和制定临床治疗AP的理想方案, 减少其并发症和死亡率有一定的现实意义, 今后若能广泛应用于临床, 将能对AP治疗有革新意义.

阻滞作为AP新的有效治疗途径, 值得深入研究.

7 参考文献

1 张延龄. 重新认识急性胰腺炎发病机制的意义. 中国实用外科杂志 2003; 23: 29-30
2 Unic-Stojanovic D, Babic S, Jovic M. Benefits, risks and complications of perioperative use of epidural anesthesia. *Med Arh* 2012; 66: 340-343
3 崔凝, 罗和生. 急性胰腺炎104例腹痛临床特点分析. 中国实用内科杂志 2011; 31: 130-132
4 Worsey J, Ferson PF, Keenan RJ, Julian TB, Landreneau RJ. Thoracoscopic pancreatic denervation for pain control in irresectable pancreatic cancer. *Br J Surg* 1993; 80: 1051-1052
5 金焰, 付德庄, 莫一我, 孙志为, 乔欧, 唐建中, 王欣, 湛斌, 王军. 腹腔镜经胸内脏交感神经切断术治疗晚期胰腺癌疼痛的临床应用研究(附12例报告). 中国内镜杂志 2000; 6: 73-75
6 李艳华, 宁杰, 陈韵, 唐天云, 李德亮. 体腔镜胸交感神经链切断术治疗晚期胰腺癌疼痛的疗效观察. 中国疼痛医学杂志 2000; 6: 130-132
7 李家书. 连续硬膜外阻滞疗法治疗急性水肿型胰腺炎. 中国疼痛医学杂志 1997; 3: 241
8 Bernhardt A, Kortgen A, Niesel HCh, Goertz A. [Using epidural anesthesia in patients with acute pancreatitis--prospective study of 121 patients]. *Anaesthesiol Reanim* 2002; 27: 16-22
9 白志强, 孙立萍. 急性胰腺炎患者静脉和硬膜外自控镇痛的效果观察. 北京医学 2007; 29: 755-756
10 Chao KC, Chao KF, Chuang CC, Liu SH. Blockade of interleukin 6 accelerates acinar cell apoptosis and attenuates experimental acute pancreatitis in vivo. *Br J Surg* 2006; 93: 332-338
11 Denham W, Fink G, Yang J, Ulrich P, Tracey K, Norman J. Small molecule inhibition of tumor necrosis factor gene processing during acute pancreatitis prevents cytokine cascade progression and attenuates pancreatitis severity. *Am Surg* 1997; 63: 1045-1049; discussion 1045-1049
12 李松财, 曹春宇, 刘祖炳. 血清肿瘤坏死因子-α和白细胞介素-8水平在急性胰腺炎患者中的变化及其意义. 现代实用医学 2011; 23: 543-544.
13 李昂, 胡伟明, 陆慧敏, 张肇达. 白细胞介素细胞因子在大鼠急性胰腺炎中的作用及其机制研究. 四川大学学报(医学版) 2011; 42: 358-363
14 傅爱丽. 两种麻醉方法对老年腹腔镜患者术后炎症反应的比较. 浙江创伤外科 2011; 19: 701-702
15 Suttner S, Lang K, Piper SN, Schultz H, Röhm KD, Boldt J. Continuous intra- and postoperative thoracic epidural analgesia attenuates brain natriuretic peptide release after major abdominal surgery. *Anesth Analg* 2005; 101: 896-903
16 陈国忠, 李中言, 窦元元, 王金华, 陈东生, 吴晓智. 顽固性心绞痛患者胸段硬膜外阻滞治疗后一氧化氮和循环内皮细胞变化. 中国动脉硬化杂志 2001; 9: 316-318
17 张燕辉. 全麻复合硬膜外麻醉对老年腹部手术患者应激反应的影响研究. 实用预防医学 2011; 18: 1307-1309
18 Adolphs J, Schmidt DK, Mousa SA, Kamin B, Korsukewitz I, Habazettl H, Schäfer M, Welte M. Thoracic epidural anesthesia attenuates hemorrhage-induced impairment of intestinal perfusion in rats. *Anesthesiology* 2003; 99: 685-692
19 栾静. 硬膜外阻滞治疗急性胰腺炎的实验研究. 吉林大学, 2011
20 Bedirli N, Akyürek N, Kösem B, Yaman M, Avunt ABÇ, Kurtipek Ö, Kavutçu M. Thoracic epidural anesthesia with bupivacaine attenuates systemic inflammatory response and lung impairment associated with cerulein-induced pancreatitis in rats. *Turk J Med Sci* 2012; 42: 217-227
21 Freise H, Lauer S, Anthonsen S, Hlouschek V, Minin E, Fischer LG, Lerch MM, Van Aken HK, Sielenkämper AW. Thoracic epidural analgesia augments ileal mucosal capillary perfusion and improves survival in severe acute pancreatitis in rats. *Anesthesiology* 2006; 105: 354-359
22 Bhatia M, Wallig MA, Hofbauer B, Lee HS, Frossard JL, Steer ML, Saluja AK. Induction of apoptosis in pancreatic acinar cells reduces the severity of acute pancreatitis. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 246: 476-483
23 黄莛庭. 急性胰腺炎细胞内早期事件的再认识. 中华肝胆外科杂志 2006; 12: 75-76
24 He ZJ, Podkletnova I, Alho H, Sand J, Nordback I. Apoptosis in acute pancreatitis. *Ann Chir Gynaecol* 2000; 89: 65-67
25 Kaiser AM, Saluja AK, Sengupta A, Saluja M, Steer ML. Relationship between severity, necrosis, and apoptosis in five models of experimental acute pancreatitis. *Am J Physiol* 1995; 269: C1295-C1304
26 Zhao M, Xue DB, Zheng B, Zhang WH, Pan SH, Sun B. Induction of apoptosis by artemisinin relieving the severity of inflammation in caerulein-induced acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 5612-5617
27 Yasuda H, Kataoka K, Ichimura H, Mitsuyoshi M, Iida T, Kita M, Imanishi J. Cytokine expression and induction of acinar cell apoptosis after pancreatic duct ligation in mice. *J Interferon Cytokine Res* 1999; 19: 637-644
28 周五一. 凋亡相关基因Bax、Bcl-2在大鼠急性胰腺炎中的表达. 空军总医院学报 2002; 18: 223-224, 226
29 Maacke H, Kessler A, Schmiegel W, Roeder C, Vogel I, Deppert W, Kalthoff H. Overexpression of p53 protein during pancreatitis. *Br J Cancer* 1997; 75: 1501-1504
30 Malleo G, Mazzon E, Genovese T, Di Paola R, Muià C, Centorrino T, Siriwardena AK, Cuzzocrea S. Etanercept attenuates the development of cerulein-induced acute pancreatitis in mice: a comparison with TNF-alpha genetic deletion. *Shock* 2007; 27: 542-551
31 李震东, 马清涌, 罗羽宏. Fas/FasL介导的caspase-3活化与急性胰腺炎腺泡细胞凋亡的关系. 中国病理生理杂志 2009; 25: 1197- 1201
32 Mareninova OA, Sung KF, Hong P, Lugea A, Pandol SJ, Gukovsky I, Gukovskaya AS. Cell death in pancreatitis: caspases protect from necrotizing pancreatitis. *J Biol Chem* 2006; 281: 3370-3381
33 范志宁, 刘训良, 熊观瀛, 文卫, 缪林 . 急性梗阻性胰腺炎大鼠胰腺腺泡细胞凋亡的变化. 世界华人消化杂志 2006; 14: 912-915
34 郎洁, 张培建. 细胞凋亡在急性胰腺炎发病机制中所起作用的研究进展. 中国普通外科杂志 2008; 17: 914-916
35 Panek J, Zasada J, Poźniczek M. [Microcirculatory disturbance in the course of acute pancreatitis]. *Przegl Lek* 2007; 64: 435-437
36 Zhou ZG, Chen YD, Sun W, Chen Z. Pancreatic microcirculatory impairment in experimental acute pancreatitis in rats. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 933-936

37 Nygård E, Kofoed KF, Freiberg J, Holm S, Aldershvile J, Eliasen K, Kelbaek H. Effects of high thoracic epidural analgesia on myocardial blood flow in patients with ischemic heart disease. *Circulation* 2005; 111: 2165-2170
38 Demirag A, Pastor CM, Morel P, Jean-Christophe C, Sielenkämper AW, Güvener N, Mai G, Berney T, Frossard JL, Bühler LH. Epidural anaesthesia restores pancreatic microcirculation and decreases the severity of acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 915-920
39 Bhatia M. Novel therapeutic targets for acute pancreatitis and associated multiple organ dysfunction syndrome. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2002; 1: 343-351
40 Steinberg W, Tenner S. Acute pancreatitis. *N Engl J Med* 1994; 330: 1198-1210
41 Mehta Y, Vats M, Sharma M, Arora R, Trehan N. Thoracic epidural analgesia for off-pump coronary artery bypass surgery in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Ann Card Anaesth* 2010; 13: 224-230
42 Liu H, Li W, Wang X, Li J, Yu W. Early gut mucosal dysfunction in patients with acute pancreatitis. *Pancreas* 2008; 36: 192-196
43 刘林, 于骅, 钦琦, 张军港, 刘洋, 邓世昌, 赵刚, 王春友. 肠道缺血再灌注在出血坏死性胰腺炎早期炎症反应中的作用. 中华消化外科杂志 2011; 10: 362-365
44 Sielenkämper AW, Eicker K, Van Aken H. Thoracic epidural anesthesia increases mucosal perfusion in ileum of rats. *Anesthesiology* 2000; 93: 844-851
45 Spackman DR, McLeod AD, Prineas SN, Leach RM, Reynolds F. Effect of epidural blockade on indicators of splanchnic perfusion and gut function in critically ill patients with peritonitis: a randomised comparison of epidural bupivacaine with systemic morphine. *Intensive Care Med* 2000; 26: 1638-1645
46 Brodner G, Van Aken H, Hertle L, Fobker M, Von Eckardstein A, Goeters C, Buerkle H, Harks A, Kehlet H. Multimodal perioperative management--combining thoracic epidural analgesia, forced mobilization, and oral nutrition--reduces hormonal and metabolic stress and improves convalescence after major urologic surgery. *Anesth Analg* 2001; 92: 1594-1600
47 Ai K, Kotake Y, Satoh T, Serita R, Takeda J, Morisaki H. Epidural anesthesia retards intestinal acidosis and reduces portal vein endotoxin concentrations during progressive hypoxia in rabbits. *Anesthesiology* 2001; 94: 263-269
48 Closa D, Bardají M, Hotter G, Prats N, Gelpí E, Fernández-Cruz L, Roselló-Catafau J. Hepatic involvement in pancreatitis-induced lung damage. *Am J Physiol* 1996; 270: G6-G13
49 Freise H, Lauer S, Konietzny E, Hinkelmann J, Minin E, Van Aken HK, Lerch MM, Sielenkaemper AW, Fischer LG. Hepatic effects of thoracic epidural analgesia in experimental severe acute pancreatitis. *Anesthesiology* 2009; 111: 1249-1256

■同行评价
本文立题新颖, 概括较为全面, 逻辑性强, 条理清晰, 具有一定的临床参考价值及学术意义.

编辑 翟欢欢 电编 鲁亚静

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

• 消息 •

WJG 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)

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2012年12月28日; 20(36): 3742-3747
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

文献综述 REVIEW

炎症性肠病治疗的新进展

高树娟, 施瑞华

■背景资料
近来炎症性肠病(IBD)在我国的发病率逐年上升, 严重影响了患者的生活质量, 但目前尚无有效方法治愈该病. 随着对IBD研究的深入及生物制药的进步, IBD的治疗有了新的进展.

高树娟, 施瑞华, 南京医科大学第一附属医院消化内科 江苏省南京市 210029
施瑞华, 教授, 主任医师, 主要从事上消化道肿瘤的基础与临床研究.
作者贡献分布: 本文综述由高树娟完成; 施瑞华审校.
通讯作者: 施瑞华, 教授, 主任医师, 210029, 江苏省南京市鼓楼区广州路300号, 南京医科大学第一附属医院消化内科. rui-huashi@126.com
电话: 025-68136035
收稿日期: 2012-11-16 修回日期: 2012-12-18
接受日期: 2012-12-20 在线出版日期: 2012-12-28

Recent progress in treatment of inflammatory bowel disease

Shu-Juan Gao, Rui-Hua Shi

Shu-Juan Gao, Rui-Hua Shi, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China
Correspondence to: Rui-Hua Shi, Professor, Chief Physician, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China. ruihuashi@126.com
Received: 2012-11-16 Revised: 2012-12-18
Accepted: 2012-12-20 Published online: 2012-12-28

Abstract
Inflammatory bowel disease (IBD) comprises two main types, namely, Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC). The etiology of IBD is not clear, and there is no effective cure so far. Currently available agents for IBD mainly consist of traditional drugs (including aminosalicylates, corticosteroids, and immunosuppressants) and new biological preparations (mainly TNF-α monoclonal antibody). The treatment of IBD evolves with the progress of clinical research and pharmaceutical techniques, such as new dosage forms, different routes of administration, and the application of new biological preparations. This article reviews recent progress in the treatment of IBD.

Key Words: Inflammatory bowel disease; Ulcerative colitis; Crohn's disease; Therapy

Gao SJ, Shi RH. Recent progress in treatment of inflammatory bowel disease. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(36): 3742-3747

■同行评议者
夏冰,教授, 武汉大学中南医院消化内科/消化系病研究中心

摘要
炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)主要包括溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)和克罗恩病(Crohn's disease, CD), 其病因尚不明确, 迄今也无有效的治愈方法. 目前临床上的药物治疗包括传统药物治疗及新型生物制剂. 传统药物主要有氨基水杨酸类、肾上腺糖皮质激素和免疫抑制剂; 用于临床的新型生物制剂主要为肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor-α, TNF-α)的单克隆抗体. 随着研究的深入及制药的进步, IBD的治疗有了新的进展, 如传统药物新剂型的出现及新的给药方式, 新型治疗药物的问世. 本文就IBD治疗新进展作一综述.

关键词: 炎症性肠病; 溃疡性结肠炎; 克罗恩病; 治疗

高树娟, 施瑞华. 炎症性肠病治疗的新进展. 世界华人消化杂志 2012; 20(36): 3742-3747
http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3742.asp

0 引言
炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)是一类病因尚不明确的慢性非特异性肠道炎症性疾病, 包括溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)和克罗恩病(Crohn's disease, CD). 近来该病在我国的发病率逐年上升, 严重影响了患者生活质量, 但迄今为止尚无有效方法治愈该病. 随着对IBD研究的深入及生物制药的进步, IBD的治疗有了新的进展, 包括如下方面: 传统药物新剂型的出现及新的使用方法, 新型的治疗药物问世及治疗的新理念.

1 氨基水杨酸类
口服氨基水杨酸制剂是IBD治疗的一线药物, 其有效成分5-aminosalicylic acid(5-ASA)在胃或小肠迅速吸收, 到达大肠的药物浓度不足以发挥抗炎作用. 为增加药物在末段回肠或结肠的分布浓度, 相继开发了多种5-ASA制剂[1]: 5-ASA前体药物及其包衣制剂. 柳氮磺吡啶是5-ASA

前体药物的代表, 这类药物除载体的不良反应外, 其在结肠定位释放特异性低, 临床应用受限. 5-ASA的包衣制剂通过包裹外衣使药物在小肠不吸收或很少吸收, 到达大肠时, 因pH环境变化或细菌分解作用, 使5-ASA释放出来, 无需载体协助, 避免了载体不良反应. 以下主要介绍代表药物美沙拉嗪(Mesalamine).

Mesalamine, 即5-ASA, 有口服和直肠栓剂两种剂型. 许多研究[2-4]发现Mesalamine口服或灌肠治疗轻中度UC均有较显著疗效; 在Marteau等[5]进行的随机双盲安慰剂对照试验中, 亦发现口服与灌肠联合治疗对左半结肠, 对更广泛结肠炎的疗效均优于各自的疗效. 欧洲克罗恩病和结肠炎组织(European crohn's disease and colitis organization, ECCO)对活动性轻中度UC(尤其左半结肠)患者的治疗提出“优先联合治疗”的建议也支持了这一结论[6]. Hussain等[7]发现每日顿服或分次服用同等剂量的Mesalamine, 其有效成分在患者的血清、尿液、粪便及直肠组织中的浓度是一样的. 据此, Kruis等[8]发现活动性UC患者3 g/d Mesalamine顿服的疗效与安全性等同于分3次服用、1 g/次 Mesalamine的效果; Dignass等[9]发现每日顿服Mesalamine治疗静止期UC的疗效优于同等剂量分次服用的效果; 同样地, 在对维持UC患者临床缓解治疗的研究中, Sandborn等[10]发现Mesalamine缓释片顿服1.6-2.4 g的疗效与相同剂量分两次服用的疗效相当. 另外, Sandborn等[11]在一项治疗中度活动性UC患者的研究中还发现, 顿服Mesalamine 4.8 g组中70%的患者诱导治疗有效, 顿服2.4 g组中66%诱导有效, 这两组的疗效相当, 这为Mesalamine治疗UC的剂量选择提供了指导, 也为5-ASA无效时选择激素或免疫抑制剂的时机提供了依据. 但目前对诱导缓解后, Mesalamine维持用药时间长短尚无定论. 一些学者[12,13]也评估了5-ASA对CD患者活动期及缓解期的治疗效果, 但目前除Reinisch等[14]在一项研究中发现Mesalamine对预防CD患者术后复发的治疗中有一定疗效外, 暂无资料表明Mesalamine对活动性CD诱导及维持缓解有效. ECCO也指出Mesalamine对CD的治疗效果有限[15].

2 糖皮质激素

自强的松龙用于治疗UC以来, 临床上使用糖皮质激素治疗IBD已有40年, 至今仍是治疗IBD的重要药物. 糖皮质激素对控制IBD急性发作特别有效, 尤其对中重度活动期病例. 目前用于治疗的激素种类主要有甲基强的松龙、强的松龙及氢化可的松; 对中重度IBD患者, 激素使用量为40-60 mg/d或者1 mg/(kg•d)强的松, 或等同剂量的其他种类激素, 但一般维持7-10 d, 不能作为维持缓解用药, 因而临床上应用受限[16]. 通过对激素的药代动力学及药效学研究, 发现药物血浆浓度的高低与治疗效果无明显相关, 局部浓度的高低才是发挥抗炎作用的关键, 为此国外研发了一些局部浓度高而全身反应小的新型制剂, 其中对布地奈德(Budesonide)的研究居多, 但所得的数据并不乐观. Seow等[17]发现Budesonide对CD患者的诱导缓解的疗效优于安慰剂及5-ASA, 稍劣于传统的糖皮质激素, 这种劣势可能在重度或肠道广泛性受累CD患者的治疗中较明显; Benchimol等[18]发现Budesonide对维持CD患者临床缓解的疗效较安慰剂差, 这虽然可能会延长患者复发的间隔时间, 但Budesonide的不良作用掩盖了上述优点. 2010年ECCO炎症性肠病指南[15]建议Budesonide可作为轻中度活动性回盲部CD病的首选治疗. 目前暂无将Budesonide推荐用于CD维持缓解及UC的诱导、维持缓解治疗.

3 免疫抑制剂

免疫抑制剂用于IBD的治疗已有20多年, 其不仅能有效诱导活动性CD和UC的缓解, 并能有效维持撤离激素后的缓解或减少激素用量, 也已有通过大样本长期随访的安全性报道[19]. 其中应用最多及研究较多较深的是硫唑嘌呤(azathioprine, AZA)和6-巯基嘌呤(6-mereapeopurine, 6-MP).

Cochrane数据发现AZA及6-MP可有效诱导并维持CD的缓解, 还可诱导并维持激素依赖的CD缓解, 有效协助激素撤离; 但AZA及6-MP对UC的疗效一直存有争议. Gisbert等[20]的荟萃分析发现AZA/6-MP对维持UC缓解较5-ASA组及安慰剂组有效; Bastida等[21]发现AZA/6-MP的抑制免疫及抗炎疗效与IBD的种类无关; Gisbert等[22]的另一项前瞻性研究发现AZA/6-MP可以降低IBD患者的住院率、缩短住院时间及降低手术风险. 故有学者[23]认为, AZA/6-MP对UC的疗效至少等同于其对CD的疗效. 另外, 虽然美国FDA将AZA/6-MP作为D级药物, 但目前有数据表明[24]AZA/6-MP对妊娠期或哺乳期的IBD患者也是安全有效的, 并有较好的耐受性. 但IBD患者对AZA的不耐受使超过30%的患者停止用

■**创新盘点**
本文重点从传统药物新剂型的出现及新的使用方法, 新型治疗药物的问世及治疗的新理念4方面入手综述了IBD的治疗进展, 临床应用性较强.

■应用要点
本文就临床面临的问题予以综述，临床应用性相对较强，可对临床工作起到一定的指导作用.

药, 特别是因不耐受消化道反应(如恶心呕吐、肝损害)而停药的患者占到10%-15%[25]. 研究发现若患者不耐受AZA, 可考虑用6-MP代替. Lees等[26]发现不耐受AZA的患者中, 超过50%可良好耐受6-MP; 这一点Hindorf的研究组[27]也证实. Bermejo等[28]也发现应用AZA治疗引起肝损的患者, 改为6-MP治疗后并未发现进一步肝损伤, 并对其有较好的耐受性.

临床上建议诱导缓解时AZA用量为2-3 mg/kg, 6-MP为1.0-1.5 mg/kg[16]; 维持缓解时AZA为2.00-2.50 mg/kg, 6-MP为0.75-1.50 mg/kg[29]. 由于免疫抑制剂潜在的不良反应, 2006年欧盟共识[30]中建议, 若患者用AZA维持缓解超过4年, 可考虑停药. 但Treton等[31]发现长期维持缓解的患者, 在停药后的第1、3、5年, 累积复发率分别为14%、53%、63%. Sewell等[32]的研究也认为中断AZA治疗是不明智的选择, 因为即使维持缓解多年后仍有较高的复发风险. 故2010年的欧盟共识中建议是否停药要根据个体的效益风险评估决定, 并未提何时停药[15].

4 新型的生物制剂

英夫利昔单抗(infliximab, IFX): 是基因重组的人鼠嵌合抗TNF-α的IgG单克隆抗体. 通过与TNF结合而激活细胞不良反应诱导炎症细胞溶解, 并促进活化T细胞的凋亡, 抑制炎症反应的发生[33]. 一项关于IFX治疗CD的研究[34]发现最初的诱导缓解率接近90%, 跟踪4.5年后维持临床缓解者超过60%. 因此, 有人提出IFX可作为治疗CD的一线药物. 许多研究也证实了IFX对中重度活动性UC(包括难治性和激素依赖)的治疗作用. 两项随机双盲安慰剂对照研究[35](ACT1、ACT2)均发现IFX对成人中重度UC的诱导和维持治疗效果显著高于安慰剂组.

瘘管形成是CD严重并发症之一, 目前缺乏有效的治疗. 早年对94例[36]伴有瘘管的CD患者静脉输注5 mg/kg或10 mg/kg英利昔3次后的有效率分别为68%与56%, 瘘管完全闭合率为55%与38%, 均显著高于对照组. 目前对英利昔的标准治疗方案尚无共识意见, Sands等[37]认为有瘘管形成的CD患者定期、多次静脉输注IFX的疗效要优于单剂量静脉输注, 而其耐受性和安全性并无差异. 研究者也探讨了IFX的应用剂量及使用方法. 一般治疗方案为在第0、2、6周给予5 mg/kg作为诱导缓解, 后每隔8 wk给予相同剂量维持缓解; 原来对治疗有反应随后又失去反应者可将给药间隔时间缩短或将剂量增加至10 mg/kg. 较之断次治疗, 常规维持治疗比较受青睐. 研究发现常规维持治疗不仅可以降低IBD患者的住院率及手术风险, 还可增加黏膜愈合率[37-39]. 另外, 断次治疗易产生抗IFX的自身抗体, 有数据[40]表明输注反应出现率越高, 治疗失败率越大. 一项来自比利时的大样本单中心队列研究观察到[34], 超过半数起初用断次治疗的患者, 由于产生自身抗体不得不中途改为常规维持治疗, 最终1/3的患者停止IFX治疗.

阿达木是重组人IgG1抗TNF-α单克隆抗体, 与TNF-α特异性结合后可阻断其与细胞表面受体的结合. 研究发现阿达木可诱导对传统治疗无应答的中重度CD患者的长期临床缓解, 对并发肛周直肠瘘的CD患者也有较好的治愈效果; 而且可用于无法耐受IFX或IFX治疗无效的CD患者[41]. 阿达木也可提高CD患者的生活质量、降低住院率及手术风险[42,43]. 其为皮下注射针剂, 不良反应相对较少, 但临床长期疗效安及全性仍有待进一步证实.

赛妥珠单抗(CDP870)是人源化抗人TNF-α单克隆抗体Fab片段的重组体, 该药本身连接聚乙二醇, 延长了药物的半衰期, 减少了给药次数. 初步实验[44]发现其可显著缓解CD患者的症状, 对CD的诱导及维持缓解有较好成效. 但目前对该药的临床研究相对较少.

5 联合治疗

传统治疗与生物制剂在IBD治疗中发挥了重要作用, 但各自也有不足. 一些研究者观察了将传统治疗与生物制剂联合治疗的效果, 初步得到了令人可喜的结果. 一项研究[44]评估了联合IFX与AZA治疗及单用AZA治疗激素依赖的活动性CD的疗效, 发现联合治疗效果优于单用AZA. 最近的一项SONIC试验[45]也证实这一结果. 研究还发现联合用药可以减轻单用生物制剂的副反应. 如间歇性单用IFX的免疫原性是38%; 接受间歇性IFX联合AZA者为16%; 单独规律静脉用IFX者为11%, 规律静脉用IFX者联合AZA者为7%[46]. 若将IFX换赛妥珠单抗, 上述4种发生免疫原性的百分比分别为24%、8%、12%、2%[47]. 暂时缺乏有关间歇性使用阿达木治疗产生自身抗体的数据.

联合治疗可能增加机会感染率, 但发生严重感染的机会并无明显增加. 一项研究[46]发现5.6%单用AZA的患者发生了严重感染, 4.9%单

用IFX者发生严重感染, 而联合治疗组为3.9%, 以上数据无统计学意义. 一项关于联合治疗的疗效及安全性评估的荟萃分析[48]亦发现联合治疗未增加感染尤其是重症感染发生的风险.

6 升阶与降阶治疗

传统“升阶”治疗方案的合理性近来受到质疑, 认为当病变已进展至严重的结构破坏, 甚至发生并发症时便难以逆转. 早期积极药物治疗可取得更好的临床疗效和更高的黏膜愈合率, 并且他可能有助于改变CD的自然病程. 一项对使用糖皮质激素治疗的初治儿童的随机对照研究[49]显示, 一开始即合用6-MP组, 2年随访撤离激素缓解率显著高于安慰剂组, 结果提示免疫抑制剂早期应用有可能提高疗效. 一项著名的“升阶”与“降阶”治疗的对比研究[50]将新诊断的活动性CD患者随机分为“降阶”组和“升阶”组, 前者开始即予IFX与AZA合用, 后者按传统方法从糖皮质激素治疗开始、无效加AZA、无效再加IFX. 随访2年, 发现停用激素的缓解率在第26周和第52周时两组为60.0%对35.9%(P = 0.006)和61.5%对42.2%(P = 0.0278); 随访2年后溃疡黏膜愈合率两组分别为73.1%和3.4%(P = 0.0028), 后一组有7例因肠道并发症需手术治疗而前一组则无.

早期药物治疗可取得更好的临床疗效, 并且可能有助于改变CD的自然病程, 这一事实似乎已逐渐得到认同. 但相当部分IBD患者, 尤其CD患者病情可维持长期的相对稳定, 而免疫抑制剂或生物制剂的使用存在效益风险比问题, 如何选择早期积极治疗的对象及时机成为关键问题. 有专家认为, 这一问题未解决之前, 对高危患者或传统治疗疗效不佳者及早予药物治疗是合理的[51].

7 结论

IBD严重影响患者的生活质量, 追求IBD患者临床长期缓解甚至达到黏膜愈合是我们的最终目标. 传统药物治疗是IBD治疗的基石, 新制剂的出现及新方法、新理念的提出也为IBD患者的治疗带来更多的选择, 但仍需不断地进行多中心、大样本、随机对照的临床试验研究, 为IBD的治疗选择提供更多依据.

8 参考文献

1 Campieri M. New steroids and new salicylates in inflammatory bowel disease: a critical appraisal. *Gut* 2002; 50 Suppl 3: III43-III46

2 Sutherland L, MacDonald JK. Oral 5-aminosalicylic acid for induction of remission in ulcerative colitis. *Cochrane Database Syst Rev* 2003; (3): CD000543

3 Feagan BG, Macdonald JK. Oral 5-aminosalicylic acid for maintenance of remission in ulcerative colitis. *Cochrane Database Syst Rev* 2012; (10): CD000544

4 Iacucci M, de Silva S, Ghosh S. Mesalazine in inflammatory bowel disease: a trendy topic once again? *Can J Gastroenterol* 2010; 24: 127-133

5 Marteau P, Probert CS, Lindgren S, Gassul M, Tan TG, Dignass A, Befrits R, Midhagen G, Rademaker J, Foldager M. Combined oral and enema treatment with Pentasa (mesalazine) is superior to oral therapy alone in patients with extensive mild/moderate active ulcerative colitis: a randomised, double blind, placebo controlled study. *Gut* 2005; 54: 960-965

6 Travis SP, Stange EF, Lémann M, Oresland T, Bemelman WA, Chowers Y, Colombel JF, D'Haens G, Ghosh S, Marteau P, Kruis W, Mortensen NJ, Penninckx F, Gassull M. European evidence-based Consensus on the management of ulcerative colitis: Current management. *J Crohns Colitis* 2008; 2: 24-62

7 Hussain FN, Ajjan RA, Kapur K, Moustafa M, Riley SA. Once versus divided daily dosing with delayed-release mesalazine: a study of tissue drug concentrations and standard pharmacokinetic parameters. *Aliment Pharmacol Ther* 2001; 15: 53-62

8 Kruis W, Kiudelis G, Rácz I, Gorelov IA, Pokrotnieks J, Horynski M, Batovsky M, Kykal J, Boehm S, Greinwald R, Mueller R. Once daily versus three times daily mesalazine granules in active ulcerative colitis: a double-blind, double-dummy, randomised, non-inferiority trial. *Gut* 2009; 58: 233-240

9 Dignass AU, Bokemeyer B, Adamek H, Mross M, Vinter-Jensen L, Börner N, Silvennoinen J, Tan G, Pool MO, Stijnen T, Dietel P, Klugmann T, Vermeire S, Bhatt A, Veerman H. Mesalamine once daily is more effective than twice daily in patients with quiescent ulcerative colitis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2009; 7: 762-769

10 Sandborn WJ, Korzenik J, Lashner B, Leighton JA, Mahadevan U, Marion JF, Safdi M, Sninsky CA, Patel RM, Friedenberg KA, Dunnmon P, Ramsey D, Kane S. Once-daily dosing of delayed-release oral mesalamine (400-mg tablet) is as effective as twice-daily dosing for maintenance of remission of ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2010; 138: 1286-1296, 1286-1296

11 Sandborn WJ, Regula J, Feagan BG, Belousova E, Jojic N, Lukas M, Yacyshyn B, Krzeski P, Yeh CH, Messer CA, Hanauer SB. Delayed-release oral mesalamine 4.8 g/day (800-mg tablet) is effective for patients with moderately active ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2009; 137: 1934-1943. e1-e3

12 Hanauer SB, Strömberg U. Oral Pentasa in the treatment of active Crohn's disease: A meta-analysis of double-blind, placebo-controlled trials. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2004; 2: 379-388

13 Akobeng AK, Gardener E. Oral 5-aminosalicylic acid for maintenance of medically-induced remission in Crohn's Disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2005; (1): CD003715

14 Reinisch W, Angelberger S, Petritsch W, Shonova O, Lukas M, Bar-Meir S, Teml A, Schaeffeler E, Schwab M, Dilger K, Greinwald R, Mueller R, Stange EF, Herrlinger KR. Azathioprine versus mesalazine for prevention of postoperative clinical

■同行评价

本文综述了炎症性肠病治疗药物的进展, 包括传统药物治疗及新型生物制剂. 主要亮点是传统药物新剂型的出现及新的给药方式, 生物制剂的联合应用等, 具有重要的临床价值.

recurrence in patients with Crohn's disease with endoscopic recurrence: efficacy and safety results of a randomised, double-blind, double-dummy, multicentre trial. *Gut* 2010; 59: 752-759

15 Dignass A, Van Assche G, Lindsay JO, Lémann M, Söderholm J, Colombel JF, Danese S, D'Hoore A, Gassull M, Gomollón F, Hommes DW, Michetti P, O'Morain C, Oresland T, Windsor A, Stange EF, Travis SP. The second European evidence-based Consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: Current management. *J Crohns Colitis* 2010; 4: 28-62

16 Engel MA, Neurath MF. New pathophysiological insights and modern treatment of IBD. *J Gastroenterol* 2010; 45: 571-583

17 Seow CH, Benchimol EI, Griffiths AM, Otley AR, Steinhart AH. Budesonide for induction of remission in Crohn's disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2008; (3): CD000296

18 Benchimol EI, Seow CH, Otley AR, Steinhart AH. Budesonide for maintenance of remission in Crohn's disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2009; (1): CD002913

19 Hindorf U, Lindqvist M, Hildebrand H, Fagerberg U, Almer S. Adverse events leading to modification of therapy in a large cohort of patients with inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 24: 331-342

20 Gisbert JP, Linares PM, McNicholl AG, Maté J, Gomollón F. Meta-analysis: the efficacy of azathioprine and mercaptopurine in ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2009; 30: 126-137

21 Bastida Paz G, Nos Mateu P, Aguas Peris M, Beltrán Niclós B, Rodríguez Soler M, Ponce García J. [Optimization of immunomodulatory treatment with azathioprine or 6-mercaptopurine in inflammatory bowel disease]. *Gastroenterol Hepatol* 2007; 30: 511-516

22 Gisbert JP, Niño P, Cara C, Rodrigo L. Comparative effectiveness of azathioprine in Crohn's disease and ulcerative colitis: prospective, long-term, follow-up study of 394 patients. *Aliment Pharmacol Ther* 2008; 28: 228-238

23 Gisbert JP, Chaparro M, Gomollón F. Common misconceptions about 5-aminosalicylates and thiopurines in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2011; 17: 3467-3478

24 Gisbert JP. Safety of immunomodulators and biologics for the treatment of inflammatory bowel disease during pregnancy and breast-feeding. *Inflamm Bowel Dis* 2010; 16: 881-895

25 Gisbert JP, Gomollón F, Maté J, Pajares JM. [Questions and answers on the role of azathioprine and 6-mercaptopurine in the treatment of inflammatory bowel disease]. *Gastroenterol Hepatol* 2002; 25: 401-415

26 Lees CW, Maan AK, Hansoti B, Satsangi J, Arnott ID. Tolerability and safety of mercaptopurine in azathioprine-intolerant patients with inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2008; 27: 220-227

27 Hindorf U, Johansson M, Eriksson A, Kvifors E, Almer SH. Mercaptopurine treatment should be considered in azathioprine intolerant patients with inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2009; 29: 654-661

28 Bermejo F, López-Sanromán A, Algaba A, Van-Domselaar M, Gisbert JP, García-Garzón S, Garrido E, Piqueras B, De La Poza G, Guerra I. Mercaptopurine rescue after azathioprine-induced liver injury in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2010; 31: 120-124

29 Mowat C, Cole A, Windsor A, Ahmad T, Arnott I, Driscoll R, Mitton S, Orchard T, Rutter M, Younge L, Lees C, Ho GT, Satsangi J, Bloom S. Guidelines for the management of inflammatory bowel disease in adults. *Gut* 2011; 60: 571-607

30 Travis SP, Stange EF, Lémann M, Oresland T, Chowers Y, Forbes A, D'Haens G, Kitis G, Cortot A, Prantera C, Marteau P, Colombel JF, Gionchetti P, Bouhnik Y, Tiret E, Kroesen J, Starlinger M, Mortensen NJ. European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: current management. *Gut* 2006; 55 Suppl 1: i16-i35

31 Treton X, Bouhnik Y, Mary JY, Colombel JF, Duclos B, Soule JC, Lerebours E, Cosnes J, Lemann M. Azathioprine withdrawal in patients with Crohn's disease maintained on prolonged remission: a high risk of relapse. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2009; 7: 80-85

32 Sewell JL, Mahadevan U. A new answer to an old question: azathioprine withdrawal in quiescent Crohn's disease. *Gastroenterology* 2009; 137: 379-381

33 ten Hove T, van Montfrans C, Peppelenbosch MP, van Deventer SJ. Infliximab treatment induces apoptosis of lamina propria T lymphocytes in Crohn's disease. *Gut* 2002; 50: 206-211

34 Schnitzler F, Fidder H, Ferrante M, Noman M, Arijs I, Van Assche G, Hoffman I, Van Steen K, Vermeire S, Rutgeerts P. Long-term outcome of treatment with infliximab in 614 patients with Crohn's disease: results from a single-centre cohort. *Gut* 2009; 58: 492-500

35 Rutgeerts P, Sandborn WJ, Feagan BG, Reinisch W, Olson A, Johanns J, Travers S, Rachmilewitz D, Hanauer SB, Lichtenstein GR, de Villiers WJ, Present D, Sands BE, Colombel JF. Infliximab for induction and maintenance therapy for ulcerative colitis. *N Engl J Med* 2005; 353: 2462-2476

36 Present DH, Rutgeerts P, Targan S, Hanauer SB, Mayer L, van Hogezand RA, Podolsky DK, Sands BE, Braakman T, DeWoody KL, Schaible TF, van Deventer SJ. Infliximab for the treatment of fistulas in patients with Crohn's disease. *N Engl J Med* 1999; 340: 1398-1405

37 Sands BE, Anderson FH, Bernstein CN, Chey WY, Feagan BG, Fedorak RN, Kamm MA, Korzenik JR, Lashner BA, Onken JE, Rachmilewitz D, Rutgeerts P, Wild G, Wolf DC, Marsters PA, Travers SB, Blank MA, van Deventer SJ. Infliximab maintenance therapy for fistulizing Crohn's disease. *N Engl J Med* 2004; 350: 876-885

38 Rutgeerts P, Feagan BG, Lichtenstein GR, Mayer LF, Schreiber S, Colombel JF, Rachmilewitz D, Wolf DC, Olson A, Bao W, Hanauer SB. Comparison of scheduled and episodic treatment strategies of infliximab in Crohn's disease. *Gastroenterology* 2004; 126: 402-413

39 Sandborn WJ, Rutgeerts P, Feagan BG, Reinisch W, Olson A, Johanns J, Lu J, Horgan K, Rachmilewitz D, Hanauer SB, Lichtenstein GR, de Villiers WJ, Present D, Sands BE, Colombel JF. Colectomy rate comparison after treatment of ulcerative colitis with

placebo or infliximab. *Gastroenterology* 2009; 137: 1250-1260; quiz 1520
40 Baert F, Noman M, Vermeire S, Van Assche G, D' Haens G, Carbonez A, Rutgeerts P. Influence of immunogenicity on the long-term efficacy of infliximab in Crohn's disease. *N Engl J Med* 2003; 348: 601-608
41 Colombel JF, Sandborn WJ, Rutgeerts P, Enns R, Hanauer SB, Panaccione R, Schreiber S, Byczkowski D, Li J, Kent JD, Pollack PF. Adalimumab for maintenance of clinical response and remission in patients with Crohn's disease: the CHARM trial. *Gastroenterology* 2007; 132: 52-65
42 Panaccione R, Colombel JF, Sandborn WJ, Rutgeerts P, D'Haens GR, Robinson AM, Chao J, Mulani PM, Pollack PF. Adalimumab sustains clinical remission and overall clinical benefit after 2 years of therapy for Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2010; 31: 1296-1309
43 Sandborn WJ, Feagan BG, Stoinov S, Honiball PJ, Rutgeerts P, Mason D, Bloomfield R, Schreiber S. Certolizumab pegol for the treatment of Crohn's disease. *N Engl J Med* 2007; 357: 228-238
44 Lémann M, Mary JY, Duclos B, Veyrac M, Dupas JL, Delchier JC, Laharie D, Moreau J, Cadiot G, Picon L, Bourreille A, Sobahni I, Colombel JF. Infliximab plus azathioprine for steroid-dependent Crohn's disease patients: a randomized placebo-controlled trial. *Gastroenterology* 2006; 130: 1054-1061
45 Colombel JF, Sandborn WJ, Reinisch W, Mantzaris GJ, Kornbluth A, Rachmilewitz D, Lichtiger S, D'Haens G, Diamond RH, Broussard DL, Tang KL, van der Woude CJ, Rutgeerts P. Infliximab, azathioprine, or combination therapy for Crohn's disease. *N Engl J Med* 2010; 362: 1383-1395
46 Hanauer SB, Wagner CL, Bala M, Mayer L, Travers S, Diamond RH, Olson A, Bao W, Rutgeerts P. Incidence and importance of antibody responses to infliximab after maintenance or episodic treatment in Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2004; 2: 542-553
47 Schreiber S, Khaliq-Kareemi M, Lawrance IC, Thomsen OØ, Hanauer SB, McColm J, Bloomfield R, Sandborn WJ. Maintenance therapy with certolizumab pegol for Crohn's disease. *N Engl J Med* 2007; 357: 239-250
48 Lin Z, Bai Y, Zheng P. Meta-analysis: efficacy and safety of combination therapy of infliximab and immunosuppressives for Crohn's disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2011; 23: 1100-1110
49 Markowitz J, Grancher K, Kohn N, Lesser M, Daum F. A multicenter trial of 6-mercaptopurine and prednisone in children with newly diagnosed Crohn's disease. *Gastroenterology* 2000; 119: 895-902
50 D'Haens G, Baert F, van Assche G, Caenepeel P, Vergauwe P, Tuynman H, De Vos M, van Deventer S, Stitt L, Donner A, Vermeire S, Van de Mierop FJ, Coche JC, van der Woude J, Ochsenkühn T, van Bodegraven AA, Van Hootegem PP, Lambrecht GL, Mana F, Rutgeerts P, Feagan BG, Hommes D. Early combined immunosuppression or conventional management in patients with newly diagnosed Crohn's disease: an open randomised trial. *Lancet* 2008; 371: 660-667
51 Panaccione R, Rutgeerts P, Sandborn WJ, Feagan B, Schreiber S, Ghosh S. Review article: treatment algorithms to maximize remission and minimize corticosteroid dependence in patients with inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2008; 28: 674-688

编辑 翟欢欢 电编 鲁亚静

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2012年12月28日; 20(36): 3748-3753
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

文献综述 REVIEW

结直肠肿瘤中医药治疗的研究进展

李宇飞, 李华山

■背景资料
结直肠肿瘤的发病率呈逐年上升趋势, 西医以手术切除及放化疗为主, 但均会产生极大的不良反应, 影响患者生活质量, 随着中医药学的发展, 在治疗结直肠肿瘤, 改善患者预后等方面显示出了独特的优势.

李宇飞, 李华山, 中国中医科学院广安门医院肛肠科 北京市 100053
李华山, 主任医师, 主要从事肛肠疾病的防治与研究工作.
作者贡献分布: 本文选题设计与审校由李华山完成; 文献资料搜集由李宇飞完成; 写作由李宇飞完成.
通讯作者: 李华山, 主任医师, 100053, 北京市西城区北线阁街5号, 中国中医科学院广安门医院肛肠科. lihuashan@263.net
电话: 010-88001025
收稿日期: 2012-10-11 修回日期: 2012-11-16
接受日期: 2012-12-03 在线出版日期: 2012-12-28

Advances in treatment of colorectal cancer by traditional Chinese medicine

Yu-Fei Li, Hua-Shan Li

Yu-Fei Li, Hua-Shan Li, Department of Proctology, Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100053, China
Correspondence to: Hua-Shan Li, Chief Physician, Department of Proctology, Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, 5 Beixiange, Xicheng District, Beijing 100053, China. lihuashan@263.net
Received: 2012-10-11 Revised: 2012-11-16
Accepted: 2012-12-03 Published online: 2012-12-28

Abstract
Colorectal cancer is a common malignant tumor in China. Currently, treatment of colorectal cancer by Western medicine mainly depends on surgical excision of early-stage tumors and radiotherapy/chemotherapy for middle or advanced disease. Chinese medicine shows a unique advantage in the treatment of colorectal cancer. Patients with colorectal cancer at various stages can benefit a lot from Chinese medicine, including significant improvement of the patient's living quality and prognosis, extension of survival time, reduction of adverse reactions caused by radio-chemotherapy, and prevention of recurrence and metastasis. The active ingredients of traditional Chinese medicine show excellent efficacies in inhibiting tumor development and inducing tumor cell differentiation and apoptosis. This article will, from a view of Chinese medicine, comprehensively summarize the etiology, pathogenesis, and treatment of colorectal cancer, aiming at providing better guidance to clinical treatment of this malignancy.

Key Words: Colorectal cancer; Traditional Chinese medicine; Treatment

Li YF, Li HS. Advances in treatment of colorectal cancer by traditional Chinese medicine. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(36): 3748-3753

摘要
结直肠癌是我国发病率较高的恶性肿瘤之一. 目前对结直肠癌的早期治疗西医以手术切除为主、中晚期以放化疗为主. 随着中医药学的不断发展, 在结直肠肿瘤的综合治疗中显示出独特的优势. 在各阶段配合其治疗, 可明显改善患者预后、延长患者的生存期、提高患者生活质量、减轻患者由于放化疗引起的不良反应并抑制肿瘤的复发和转移等. 并且, 随着中药有效成分研究的不断进展, 亦在抑制肿瘤发生发展及诱导肿瘤细胞分化和凋亡等方面显示出了极好的疗效. 合理的应用可极大地改善患者预后. 本文从中医角度全面综述了结直肠肿瘤的病因病机、发生发展及辨证治疗等内容, 旨在更好的指导临床治疗.

关键词: 结直肠肿瘤; 中医; 治疗

李宇飞, 李华山. 结直肠肿瘤中医药治疗的研究进展. 世界华人消化杂志 2012; 20(36): 3748-3753
http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3748.asp

0 引言
结直肠肿瘤是我国常见的消化道恶性肿瘤, 其发病率呈逐年升高趋势, 手术切除仍被认为是目前唯一能达到彻底治愈的有效方法, 然而适合手术切除的患者却仅占少数, 随着中医药学的发展, 近年来在治疗结直肠肿瘤方面显示出了独特的优势, 他可以很好的配合其他治疗手段延长患者的生存期, 提高患者生活质量, 减轻患者由于放化疗引起的不良反应等. 现将中医药在结直肠肿瘤治疗方面的现状综述如下.

1 中医对结直肠肿瘤病因病机的认识
在祖国医学的文献中并没有确切的记载结直肠癌的病名, 而古代医书中所载的如"肠溜"

■同行评议者
许剑民, 教授, 上海市复旦大学附属中山医院普外科

“肠蕈”“肠中积聚”“肠风”“脏毒”“肠澼”“腹痛伏梁”“锁肛痔”等病症, 与结直肠癌的症状体征相类似. 如: 《灵枢·水胀篇》: “帝曰: 肠蕈何如? 岐伯曰: 寒气客于肠外, 与卫气相搏, 气不得荣, 因有所系, 癖而内着, 恶气乃起, 息肉乃生, 其始生者, 大如鸡卵.”《灵枢·五变篇》: “黄帝曰: 人之善病肠中积聚者, 何以候之? 少俞答曰: 皮肤薄而不泽, 肉不坚而不泽, 如此肠胃恶, 恶则邪气留止, 积聚乃伤肠胃之间, 寒温不次, 邪气稍至, 蓄积留止, 大聚乃起.”《外科大成》: “锁肛痔, 肛门内外如竹节锁紧, 形如海蛇, 里急后重, 粪便细而带扁, 时留臭水.”《灵枢·水胀篇》: “肠蕈何如? 寒气客于肠外, 与卫气相搏, 气不得荣, 因有所系, 癖而内着, 恶气乃起, 息肉乃生, 其始生者, 大如鸡卵”, 说明大肠癌的病因系寒气客于肠外, 或误食不洁之品等, 内因包括忧思抑郁, 阴阳失调, 正气不足, 引起脾虚、气滞. 血瘀、痰凝、热毒、湿邪久聚, 从而相互交结而生肿瘤. 中医学对结直肠癌病因病机的认识主要包括饮食因素、起居不节、感受外邪、先天因素、情志因素等方面.《内经》曰: “饮食自倍, 肠胃乃伤”. 宋·严用和《济生方》: “过餐五味, 强食生冷果菜, 久则积结为徵瘕”. 张子和: “积之始成也, 伤酸苦甘辛咸之味, 或停温凉寒热之饮”.

刘伟胜教授在临证之中尤为重视内虚尤其是脾肾亏虚在肠癌发病中的重要作用, 他认为脾肾不足, 复因感邪, 致脾胃运化失司, 湿浊内生, 流注大肠, 气机阻滞, 瘀血内蓄, 湿瘀日久, 形成积块而发为肠癌, 湿、瘀为其基本病理因素, 而脾虚湿毒瘀阻是大肠癌最主要的发病机制, 湿热、瘀滞、癌毒是病之标; 脾虚、肾亏是病之本. 其病位在肠, 与脾、胃、肝、肾关系密切. 即大肠癌早期偏气滞、湿热、血瘀; 晚期多偏脾肾阳虚、肝肾阴虚、气血亏虚[1]. 丁金芳等[2]认为, 结直肠肿瘤的发生是因虚致积、因积致虚的病证. 贾小强等[3]认为瘀毒留滞大肠是大肠癌发生发展的重要机制. 王小宁等[4]认为, 脾虚气弱是大肠癌的发病基础, 瘀毒留滞是肿瘤发生、发展、转移的病理基础.

总之, 肠癌的产生是由于素体脾肾不足, 或饮食不节, 致脾胃虚弱之人, 因热毒蕴结, 火热湿毒下注肠道, 日久积结而成. 湿热、火毒、淤滞属病之标; 脾虚、肾亏、正气不足乃病之本, 二者互为因果. 因虚致积, 因积益虚, 终则阴阳离绝, 神离气脱.

2 辨证施治

2.1 结直肠肿瘤的辨证分型研究 许云等[5]根据临床调查和数理统计结论, 将根治术后大肠癌分为7大证型, 分别为: 肠燥津亏证、脾胃不足证、脾气亏虚证、肝阴亏虚, 湿热内蕴证、肝胃不和证、肾气亏虚证、阳虚湿停证. 郭勇教授通过长期临床实践, 将大肠癌辨证分型为: 脾虚湿阻证、气阴亏虚证、湿热蕴结证、阴虚内热证四型, 并提出湿热证是大肠癌的重要临床证型, 故清热化湿是大肠癌的重要治则, 其基础方为四君子汤合三根汤[6]. 王晓戎等[7]将大肠癌中医证候整理为14个证型, 其中出现频率较高的6个证型依次为: 湿热蕴结证、气血两虚证、脾肾阳虚证、肝肾阴虚证、瘀毒阻滞证、寒湿困脾证. 李斯文教授认为肠癌总属本虚标实之候, 早期多以湿热, 瘀毒偏盛, 治以祛邪为主, 晚期则脾肾阴阳气血俱虚, 治当扶正固本为主. 并通过长期临床实践, 将肠癌辨证分型为: 脾虚湿热、湿热瘀毒、脾肾寒湿、气血亏虚4型[8]. 吴继萍等[9]将结直肠癌患者辨证分型为: 脾虚湿毒、脾肾两虚、肝肾阴虚、气血亏虚及湿热瘀毒5型.

2.2 结直肠肿瘤的辨证论治研究

2.2.1 内治法: 结直肠癌临床上以大便性状改变为特征. 随着肿瘤的进展可出现肠道刺激症状, 便频, 腹痛, 腹泻便秘交替出现、不规则大便与黏液脓血便等. 在辨证时, 首先要分清寒、热、虚、实. 该病大多以本虚标实为特点. 本虚多为脾虚胃弱或脾肾两虚, 标实多属湿热、瘀毒为患. 故临证时应四诊合参, 全面分析.

齐元福教授临证针对肿瘤患者邪实与正虚并存的特点, 强调将扶正培本、健脾益气、活血化瘀3法与化疗有机地结合起来, 并提出晚期肿瘤患者尤要重视顾护胃气[10]. 周仲瑛教授将结直肠癌分为不同阶段, 认为病之初起或手术之前, 邪盛正不虚, 故抗癌解毒配合化痰软坚、逐瘀散结等治法为主; 中期或者手术、化疗之后, 兼有脏腑功能失调, 可适当伍入调理脏腑功能之品, 顺理气机; 晚期患者, 正虚明显, 出现不同的并发症, 此时则需补益气血、滋阴温阳, 兼顾抗癌散结、软坚化痰、散瘀消肿等辨证处理[11]. 杨宇飞等[12]结合古人经验及现代结直肠癌的防治特点, 认为结直肠癌的根本病因是络脉闭阻, 其形成的基本病机是局部阳气不达, 这也是肠癌术后复发转移的基本病机. 在该病因病机的基础之上, 提出“通阳”作为结直肠癌的主要治则, 并且根据通阳理论研制出祛邪胶囊, 得

■研发前沿
中医药联合手术及放化疗的综合治疗, 可明显延长患者生存期, 提高患者生活质量, 减轻患者由于放化疗引起的不良反应, 抑制肿瘤复发和转移等. 因此, 联合中医药的综合治疗方法, 将是以后临床的发展方向, 中医药在结直肠肿瘤患者中的应用应得到更多关注.

■相关报道
李猛等应用健脾消癥法治疗晚期大肠癌患者64例, 中医口服平消胶囊及参一胶囊并配合解毒得生煎直肠内滴注联合化疗组1年生存率为54.1%, 疗效明显优于单纯中药组(50%), 及单纯化疗组(40.9%).

到较好临床疗效. 戚晶等[13]提出结直肠癌术后, 术后无病与术后转移多有乏力、纳差、苔白、脉沉、腹胀等肝郁脾虚, 术后无病脾虚为主, 术后转移肝郁突出, 并多有咳嗽. 其中术后无病治宜健脾益气兼疏肝、调节情志为主; 术后转移治宜重在疏肝解郁、健脾益气、宣肺止咳为主. 郭勇教授认为治疗大肠癌当采用中医分阶段治疗的方法, 这与周仲瑛教授有相类似之处[6]. 他将大肠癌的中医治疗分为围手术期、辅助治疗期、随访观察期及晚期姑息治疗期4个阶段, 围手术期通过理气健脾中药调理, 可提高患者对手术的耐受性, 促进术后恢复, 调节免疫功能; 辅助治疗期主要有化疗、放疗、生物靶向、免疫、中医药等治疗方法, 在化疗期间通过理气、疏肝、和胃中药的调理, 可起到增敏减毒的作用; 随访观察期, 可通过扶正祛邪中药的调理, 减低肿瘤复发转移、延长无瘤生存期; 晚期姑息治疗期应以中药为主, 采用扶正祛邪并用, 积极控制症状, 提高生存质量, 延长生存期.

2.2.2 *其他疗法*: 早在明清时期, 就有关于大肠癌外治方法的阐述, 譬如: 外搽疗法、调敷疗法、熏洗疗法、针灸疗法等[14]. 陈志平等[15]应用“解毒得生煎”直肠内给药辅助治疗大肠癌也取得了不错效果, 研究显示其对改善患者临床症状, 提高患者生活质量有明显疗效, 总有效率达83.3%, 亦可使临床症状改善时间平均缩短3-5 d. 李斯文教授临床应用中药熏洗及灌肠方法取得较好疗效, 并创制消瘤Ⅰ号, 消瘤Ⅱ号, 灌肠Ⅰ号, 灌肠Ⅱ号方用于结直肠癌的治疗. 孙凤江[16]外用三脑止痛化积栓配合抗癌软坚清肠饮及三胶补元止血散内服, 治疗晚期直肠癌患者200例, 结果显示可明显延长患者生存期, 经随访平均可延长7年左右(2-10年)[8]. 中医的外治疗法, 如针灸治疗可明显改善患者术后肠道功能的恢复情况. 穆立新等[17]通过研究发现, 针灸在大肠癌术后具有很好的调节肠道功能的作用, 其针灸治疗组的总有效率达96.67%, 显效率为90.00%, 明显高于口服西药治疗的对照组(有效率为40.00%). 马云龙等[18]报道中医外治疗法可用于结直肠癌术后患者的并发症治疗, 他用清热止疡汤坐浴治疗低位直肠癌术后吻合口炎30例, 并与用肿节风注射液配液坐浴治疗的32例进行对照, 结果治疗组总有效率达96.67%, 对照组总有效率93.75%, 且治疗组复发率低于对照组.

3 中医药治疗结直肠肿瘤的疗效分析

中药在临床实践及体内外实验中已证实有明确抗大肠癌活性的作用, 现代药理学证实其可能的主要机制包括: 抑制细胞增殖、诱导细胞凋亡、抑制血管生成、逆转多药耐药、抑制粘附与侵袭转移、调节免疫功能等[19]. 近几年, 越来越多的临床实验已证实中医药在结直肠癌治疗中的优势所在, 其疗效显著. 作者认为, 中医药治疗结直肠癌的优势与特色主要表现在以下几个方面: (1)突出以人为本, 辨证施治, 强调带瘤生存的概念, 这正是中医学治病的核心所在; (2)改善临床症状和生存质量, 提高生存率; (3)对放化疗的增敏减毒作用; (4)术后调补, 促进机体康复, 提高机体免疫功能; (5)防治转移和复发, 阻断癌前病变.

3.1 *提高疗效及改善患者生活质量* 付莺等[20]采用静脉滴注复方苦参注射液15 mL加入生理盐水中, 联合奥沙利铂、亚叶酸钙和氟尿嘧啶化疗方案, 其临床总有效率及患者生活质量改善率分别为62.50%、66.67%, 明显高于单纯化疗组(41.67%、37.50%). 曾英等[21]采用扶正抗癌方结合FOLFOX化疗, 其有效率分别为57.14%、33.33%(P<0.05). 侯安继等[22]应用扶正抗癌iv号方治疗不适合放化疗的晚期结直肠癌患者, 在中医症状疗效与生存质量方面明显优于给予最佳方案治疗的对照组. 海艳洁等[23]采用槐耳颗粒联合FOLFOX4方案化疗, 患者在中医症状评分疗效, Karnofsky评分, 食欲及体重方面明显优于对照组, 证实槐耳颗粒联合化疗可改善晚期大肠癌患者的中医证候及体力状况, 提高患者生活质量.

3.2 *对放化疗的增敏减毒作用* 几乎所有抗癌药物均有不同程度的不良反应, 主要表现在骨髓造血功能的抑制, 消化道胃肠反应, 免疫功能低下等方面, 中医药在防治这些不良反应方面可以发挥较好的作用.

3.2.1 *减毒增效*: 韩慧娟等[24]应用康艾注射液联合化疗治疗60例大肠癌术后患者, 在生活质量改善率方面, 优于单纯化疗组; 同时, 化疗后治疗组在白细胞、恶心呕吐及腹泻不良反应发生率, 血小板及周围神经毒性不良反应发生率方面亦明显优于对照组. 束家和等[25]采用益气解毒汤联合CapeOX方案治疗晚期大肠癌患者, 可明显控制肿瘤进展, 提高患者临床获益率、延长生存期、改善临床症状和生活质量, 并能提

高免疫功能, 减轻化疗的不良反应, 其临床总有效率为44.44%, 白细胞下降、恶心呕吐等不良反应的发生情况也明显少于单纯化疗组. 方乃青等[26]认为参附注射液对预防化疗不良反应、改善患者生活质量、辅助化疗顺利完成有积极作用, 与单纯化疗组比, 其白细胞下降、恶心呕吐的发生率及KPS评分下降均小于对照组. 文洽先等[27]采用肠癌方联合OLF方案化疗, 其贫血及恶心呕吐等不良反应的发生率明显低于对照组. 陈永乐等[28]应用复方肠泰联合FOLFIRI方案化疗, 在改善患者体力状况、生活质量方面以及化疗所引发的白细胞、血红蛋白和血小板降低等部分不良反应发生率方面均低于单纯化疗组.

3.2.2 *治疗放化疗后不良反应*: 放化疗后引起血小板减少、反射性肠麻痹、肠道黏膜损伤等不良反应较为常见, 西药治疗效果不理想且昂贵, 中医药针对此方面的治疗有良好效果. 徐婵媛等[29]得出559例进展期大肠癌化疗后不良反应的发生率为88.6%, 进展期大肠癌患者重度不良反应的发生证候主要为脾肾阳虚型和气血两虚型, 因此治疗方法以扶正培元为主, 并充分考虑各系统各类型不良反应. 郑岚等[30]于化疗间歇期给予扶中升白方, 可明显延长患者因化疗所致白细胞减少的出现时间, 降低白细胞减少程度, 化疗后白细胞和血红蛋白恢复加快, 使粒细胞集落刺激因子使用剂量减少. 王振飞[31]用艾迪注射液配合化疗治疗大肠癌术后患者, 其生存质量明显改善, KPS评分明显提高, 改善率为55%, 效果明显优于单用化疗组. 对照组化疗后患者白细胞、血小板均有下降; 治疗组较稳定, 且恶心呕吐、腹泻及外周神经毒性发生率等也明显降低. 赵仁等[32]认为直肠癌放疗致肠道黏膜损伤的中医证候中, 热毒伤阴证最多占43.33%, 脾胃虚弱证占26.67%, 痰瘀互结占13.33%, 湿热内蕴证占10.00%, 而肾阴亏虚占6.67%. 其证候中阴虚与气虚相兼较多见, 即以热毒过盛, 伤津耗液为主, 伤阴证候为最多, 放疗不良反应证候群主要以热象为著, 属热(毒)邪耗气伤阴, 临床诊治中应用补益气阴中药, 疗效显著. 朱翔等[33]采用中医滋阴养血法与西医支持疗法结合治疗化疗后引起的血小板减少症患者, 其升血小板疗效明显, 32例中总有效率为87.5%.

3.3 *调整机体免疫功能* 中药治癌是通过增强或抑制免疫反应来调节肿瘤患者的免疫能力达到抑制肿瘤, 扶正祛邪的目的. 中医学认为, 免疫功能与机体正气呈正相关. 扶正就是提高或调整人体的免疫功能, 扶植和增强免疫防御系统, 抑制或杀灭癌细胞.

作者早期[34]证实中药肠癌康复汤联合5-氟尿嘧啶、丝裂霉素化疗方案可显著提高大肠癌手术患者的免疫功能, 在术后2 mo, CD3+、CD4+及NK细胞活性在中药组及中化组均恢复正常, 且较治疗前均有不同程度的提高, 但化疗组恢复较为缓慢, 在体液免疫方面亦取得了相类似的结果. 王文海等[35]应用辨证汤药配合化疗治疗肠癌术后患者, 治疗组CD4 T淋巴细胞的比例较治疗前及对照组均明显升高. 陆清昀[36]采用扶正抗癌方联合化疗能够改善大肠癌患者的细胞免疫及体液免疫功能, 有利于机体的康复,患者的生活质量明显得到改善. 尤建民等[37]证实中药微调三号方可改善中晚期大肠癌患者生活质量, 缓解临床症状, 稳定病灶, 提高疾病控制率, 有效提高机体免疫机能, 增强对肿瘤细胞的免疫监视及杀灭能力. 治疗组在治疗后CD3、CD4、CD4/CD8水平显著高于治疗前及单纯化疗组. 海艳洁等[38]证实艾迪注射液可调节大肠癌患者免疫功能, 联合化疗可改善晚期大肠癌患者体力状况, 提高患者生活质量. 在化疗前后机体免疫状态(CD3+、CD4+、CD8+、CD4+/CD8+)的变化方面, 治疗组较单纯化疗组CD8+明显下降, CD4+/CD8+比值显著上升. 侯冰宗等[39]报道应用艾迪注射液治疗可迅速提高大肠癌患者术后早期机体的细胞免疫和体液免疫功能. 使用艾迪治疗组患者的细胞免疫指标(CD3、CD4、CD4/CD8、NKC、IL-2R、T淋巴细胞转化率)及体液免疫指标(lL-2R、TNF-α)在术后1 wk开始迅速恢复且维持在高水平状态, 明显优于未用艾迪注射液组.

3.4 *防治复发和转移* 尽管手术切除是大肠癌治疗的最佳方案, 但仍会有部分患者术后出现复发, 且远处转移亦是肠癌患者常发生的情况, 肝脏是最主要的转移部位, 约占38%-60%. 而结直肠癌肝转移患者若不进行治疗的5年生存率接近于0. 近年来中医药在抗肿瘤复发转移及减少微小转移灶方面越来越受到大家的重视.

关家慧等[40]通过对222例Ⅱ-Ⅲ期结直肠癌根治术后患者进行研究, 在中西医结合治疗组中, 1、2、3、4、5年复发转移率分别为0(0/97), 2.06%(2/97)、12.37%(12/97)、13.40%(13/97)和14.94%(13/87), 明显优于未加中药组(5.00%、24.48%、31.63%、39.79%和44.82%). 蔡茂红[41]应用金龙胶囊联合化疗方案治疗结直肠癌肝

■**创新盘点**
本文所涉及的内容基本涵盖了目前国内中医治疗结直肠肿瘤的现状, 并且从中医角度针对结直肠恶性肿瘤的病因病机、发生发展及辨证治疗等方面做了全面综述, 对临床具有很好的指导意义.

■应用要点
中医学以人为本, 以调整脏腑阴阳、辨证施治为核心. 因此, 中医中药在结直肠肿瘤患者中的合理应用能有效地防治肿瘤的发生发展及复发转移, 极大的改善患者预后, 提高患者生活质量, 应用前景广阔.

转移患者, 其近期临床收益率、血CEA下降比率、体力状况、白细胞降低程度及免疫指标改变方面均明显好于对照组. 王飞等[42]应用康莱特注射液(KLT)联合环磷酰胺(CTX)进行裸鼠实验, 结果显示KLT联合CTX可以抑制模型裸鼠的脾脏接种瘤及肝脏转移瘤的生长, 与对照组相比, CTX+组的脾脏接种瘤和肝脏转移瘤重量减轻最明显, KLT组次之. 蒋益兰等[43]应用健脾消癌饮配合化疗治疗大肠癌术后患者62例, 结果其复发转移率为25.8%, 5年生存率为63.4%, 明显高于单用化疗治疗的60例患者的复发转移率和5年生存率(48.3%、35.5%).

4 中药成分抗结直肠肿瘤的现代研究

中医药学在晚期肿瘤患者的直接治疗中可发挥重要作用, 特别是可以从某些天然药物中寻找抗癌有效成分. 如应用组合得当, 可增强患者机体免疫功能, 诱导癌细胞分化和凋亡, 从而改善患者预后.

张喜林等[44]通过实验研究表明, 黄芪总提取物能够明显起到抑瘤作用, 随着黄芪剂量增长, 抑制率逐渐增加. 因此黄芪可作为一种有效的生物调节剂, 在肿瘤的防治中发挥巨大的潜力. 徐永中等[45]通过应用不同浓度的蟾酥灵处理结肠癌SW620细胞, 结果显示, 蟾酥灵对结肠癌细胞生长具有很强的抑制作用, 与诱导细胞凋亡有关. 崔旭琴等[46]指出, 毛兰素能显著诱导结肠癌SW480细胞凋亡, 并诱导细胞周期阻滞于G_2-M期, 毛兰素通过下调XIAP、Bcl-xL蛋白表达以及激活Caspase-9、Caspase-7、Caspase-3和PARP活性从而诱导SW480细胞凋亡, 抑制其增殖, 且随药物浓度与时间增加, 抑制率呈明显的剂量时间效应, 48 h半数抑制浓度IC_{50}为24.5 nmol/L. 陈立武等[47]通过实验研究得出, 复方中药针剂得力生可诱导直肠癌细胞凋亡, 术前尽早应用可提高疗效, 治疗组术前应用得力生静脉滴注及生理盐水稀释保留灌肠, 17例便血、肛门下坠感减轻, 7例不全性肠梗阻患者腹痛减轻, 术后电镜观察标本可发现凋亡的癌细胞, 疗效明显优于对照组. 崔澂等[48]通过比较三氧化二砷(As_2O_3)、川芎嗪、黄芪、氧化苦参碱、猪苓多糖、蒿甲醚等6种不同类型抗瘤中药制剂对结直肠癌NK、T细胞免疫功能抑制的影响, 得出不同类型抗瘤中药制剂下调结直肠癌免疫抑制的类别、程度、出现和维持的时间不尽相同, 然而下调肿瘤细胞产生的NK、T细胞免疫功能抑制是中药制剂抗瘤效应机制之一. 张惠等[49]报道, As_2O_3亦具有抑制肿瘤血管生成的作用, 能明显抑制血管内皮生长因子在人结肠癌细胞LoVo中的表达. 王毅等[50]通过移植瘤模型, 检测肿瘤组织微血管密度(microvessel dsnsity, MVD)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)及其受体(FLK21) 、内皮抑素(endostatin, ES)的积分光密度(IA), 计算VEGF/ES比值, 结果显示复方肠复康组可使移植瘤MVD、VEGF、FLK21及VEGF/ES比值显著降低, 同时使ES含量明显增高.

5 结论

中医药在治疗结直肠肿瘤的研究中取得了很大进展, 尤其是中医中药联合放化疗治疗中晚期癌症患者, 在提高生存率, 改善患者生活质量, 提高机体免疫功能, 提高患者对手术及放化疗的耐受性及敏感性, 改善放化疗后不良反应等方面, 均显示出了独特优势. 目前纯天然中药对某些实验肿瘤有一定的抑制作用, 可抑制恶性肿瘤细胞的生长增殖, 虽杀灭癌细胞能力远不及化学抗癌药物, 但是中医中药不良反应轻微, 根据辨证论治, 扶正祛邪相联合, 可以整体调节患者机体内环境, 增强机体的免疫作用, 从宏观上调整机体的抗癌能力. 因此, 中医中药联合手术及放化疗的综合治疗将是以后的发展方向, 中医药在结直肠肿瘤患者中的应用应得到更多关注.

6 参考文献

1 白建平, 邓宏, 张海波, 李柳宁. 刘伟胜教授治疗大肠癌经验简介. 新中医 2010; 42: 132-133
2 丁金芳, 黄云胜, 李明花, 施志明. 施志明治疗大肠癌经验举要. 上海中医药杂志 2007; 41: 43-44
3 贾小强, 邱辉忠, 黄乃健, 林国乐. 大肠癌辨证分型与肿瘤浸润转移相关性的前瞻性研究. 中华中医药杂志 2005; 20: 344-346
4 王小宁, 霍介格. 中医治疗大肠癌的思路与方法探讨. 中国中医基础医学杂志 2007; 13: 681-682
5 许云, 赵爱光, 谷晓红, 刘建平, 吴煜, 杨宇飞. 218例大肠癌根治术后中医辨证规律的临床研究. 世界科学技术−中医药现代化 2011; 13: 938-943
6 赵海燕, 郭勇. 中西医结合治疗大肠癌的经验. 中医中药 2010; 7: 138-139
7 王晓戎, 张宏, 袁孝兵, 郜峦, 李平. 基于现代文献的大肠癌中医证候及病机研究. 中国中医急症 2009; 18: 1859-1861
8 郭利华, 冯妮, 陈宝财, 李斯文. 李斯文教授辨证治疗结直肠癌的经验. 中医临床研究 2011; 3: 81-82
9 吴继萍, 冯妮, 李晓林, 李斯文. 中医辨证论治结直肠癌术后的临床研究. 光明中医 2011; 26: 1816-1818
10 郑祎. 齐元富教授运用中医药治疗大肠癌的经验. 中医学报 2010; 25: 323-324

11 何煜舟, 宋欣伟, 阮善明, 蒋旭宏. 周仲瑛教授治疗大肠癌的治法治则探讨. 中华中医药学刊 2010; 28: 696-697
12 杨宇飞, 王建彬. 通阳法防治结直肠癌的理论探析. 浙江中医药大学学报 2009; 33: 715-716
13 戚晶, 殷东风. 结直肠癌术后无病与术后转移证候特点及演变规律系统评价. 实用中医内科杂志 2012; 26: 41-42
14 张宏, 王晓戎. 明清时期“大肠癌”外治法浅析. 中医药临床杂志 2012; 24: 392-393
15 陈志平, 万胜, 万海栋. “解毒得生煎”直肠内给药辅助治疗大肠癌42例临床观察. 江苏中医药 2011; 43: 44
16 孙凤江. 中医药治疗晚期直肠癌的研究与体会. 中医杂志 2003; 44: 126
17 穆立新, 姜军作, 范杰华. 针灸治疗大肠癌术后30例疗效观察. 大连大学学报 2006; 27: 100-101, 106
18 马云龙, 张红英, 李永清, 施光其. 中药外用治疗低位直肠癌术后吻合口炎疗效观察. 辽宁中医杂志 2007; 34: 937-938
19 王舒雯, 许尤琪. 中药治疗大肠癌机理研究评述. 中医学报 2012; 27: 665-667
20 付莺, 戴泉. 复方苦参注射液联合化疗治疗中晚期大肠癌临床观察. 光明中医 2011; 26: 343
21 曾英, 李世杰. 扶正抗癌方结合FOLFOX化疗方案治疗大肠癌的临床观察. 西部中医药 2011; 24: 1-4
22 侯安继, 刘源, 胡艳, 周维, 张红卫, 黄燕莉, 沈晓燕, 周莉, 顾魏峰. 扶正消癌ⅳ号方治疗晚期结直肠癌疗效观察. 时针国医国药 2009; 20: 2908-2910
23 海艳洁, 郑宇, 庄亚严, 张高坤, 王敏, 卢林, 王志强, 赵秀峰, 崔虎军, 周宏博, 郝志英. 槐耳颗粒联合化疗对晚期大肠癌的初步临床研究. 药物流行病学杂志 2012; 21: 53-55
24 韩慧娟, 张来喜, 陈大志, 王勇. 康艾注射液配合化疗治疗大肠癌术后60例临床观察. 新中医 2010; 42: 42-43
25 束家和, 周荣耀, 钟意, 吴丽英. 益气解毒汤联合Cape-OX方案治疗晚期大肠癌45例. 上海中醫藥雜志 2011; 45: 33-35
26 方乃青, 肖寒, 申小苏. 参附注射液联合化疗治疗脾肾两虚型肠癌的疗效与安全性. 山东医药 2010; 50: 70-71
27 文洽先, 吕国强, 张振勇, 朱娅, 许彬. 肠癌方联合化疗治疗晚期大肠癌的临床观察. 实用医院临床杂志 2011; 8: 149-151
28 陈永乐, 姚远. 复方肠泰联合FOLFIRI方案化疗治疗晚期结直肠癌临床疗效观察. 当代医学 2012; 18: 36-37
29 徐婵媛, 李柳宁, 潘大铭, 温泽淮. 进展期大肠癌患者入院中医证候与化疗后不良反应相关性的回顾性分析. 辽宁中医药大学学报 2011; 13: 104-106
30 郑岚, 沈小珩, 周东亮. 扶中升白汤对大肠癌化疗所致白细胞减少的治疗作用. 现代中西医结合杂志 2011; 20: 1821-1822
31 王振飞. 大肠癌术后化疗配合艾迪注射液临床观察. 福建中医药 2007; 38: 9-10
32 赵仁, 李卫强, 朱西杰. 直肠癌放疗后肠道粘膜损伤的中医证候易感性初步研究. 江苏中医药 2010; 42: 25-26
33 朱翔, 方明智, 黄欣, 钱垠, 刘青, 杨兴华, 李敏. 滋阴养血治疗结直肠癌化疗后血小板减少临床观察. 辽宁中医药大学学报 2010; 12: 145-146
34 李华山, 李华宏, 唐宗江, 张森, 高枫, 李国栋, 王彩秀. 肠癌康复汤对大肠癌患者术后免疫功能的影响. 中国中西医结合杂志 2000; 20: 580-582
35 王文海, 龚航军, 周荣耀, 李佳, 宋花玲, 余根培, 张强. 中医辨证治疗140例中晚期大肠癌术后患者的临床分析. 上海中医药大学学报 2010; 24: 43-46
36 陆清昀. 扶正抗癌方对大肠癌肿瘤患者免疫功能的影响. 浙江中医药大学学报 2010; 34: 688-689
37 尤建民, 龚时夏, 周留勇. 中药微调三号方配合化疗治疗中晚期大肠癌30例. 南京中医药大学学报 2010; 26: 259-261
38 海艳洁, 鞠宝玲, 杜萍, 卢林, 王志强, 赵秀峰, 周宏博, 崔虎军, 郝志英. 艾迪联合化疗对晚期大肠癌患者免疫功能及生活质量的影响. 中国药师 2011; 14: 1634-1636
39 侯冰宗, 舒晓春, 周少朋, 房思炼, 李霄凌. 中药艾迪注射液对大肠癌术后机体免疫功能的影响. 第四军医大学学报 2008; 29: 933-935
40 关家慧, 杨宇飞, 吴煜, 许云, 吴显文, 刘端祺, 张侠, 宋飞翔, 耿振英. 中西医结合治疗减少Ⅱ－Ⅲ期结肠直肠癌根治术后复发转移222例队列研究的再随访. 癌症进展 2010; 8: 193-195
41 蔡茂红. 金龙胶囊联合化疗治疗结直肠癌肝转移的临床观察. 四川医学 2011; 32: 227-229
42 王飞, 王亚非, 李玉明, 王以浪, 张亮. 康莱特注射液对结肠癌肝转移裸鼠血浆骨桥蛋白的影响. 临床肿瘤学杂志 2011; 16: 682-684
43 蒋益兰, 潘敏求, 蔡美. 健脾消癌饮配合化疗拮抗大肠癌术后复发转移62例总结. 湖南中医杂志 2007; 23: 1-3
44 张喜林, 李文虎, 李路勇, 李书花. 黄芪总提取物抗肿瘤作用的实验研究. 中国现代药物应用 2010; 4: 29-31
45 徐永中, 范钰, 张尤历, 张宇川, 李华. 蟾蜍灵对结肠癌SW620细胞凋亡的影响. 江苏大学学报(医学版) 2007; 17: 515-517
46 崔旭琴, 苏鹏, 朱启彧, 安君霞, 王晶, 吴坚, 唐亚雄. 毛兰素诱导结肠癌SW480细胞凋亡的分子机制. 应用与环境生物学报 2011; 17: 512-516
47 陈立武, 杜建, 黄铭涵, 陈文列. 得力生诱导直肠癌细胞凋亡的临床观察. 现代肿瘤医学 2006; 14: 1413-1415
48 崔澂, 王润田, 支国成, 李金生, 王智华, 张征峥, 邓郁青. 不同类别抗瘤中药制剂下调结直肠癌免疫功能抑制的比较研究. 实用肿瘤杂志 2010; 25: 300-303
49 张惠, 陈卫昌, 岑建农. 三氧化二砷对人大肠癌LoVo细胞血管内皮生长因子表达的影响. 江苏医药 2007; 33: 153-155
50 王毅, 刘碧清, 胥方元, 王旺胜, 仝崇毅. 肠复康合剂对裸鼠移植性人结肠癌血管生成的抑制作用. 中国中西医结合消化杂志 2003; 11: 325-328

■**同行评价**
本文具有很好的临床意义和实用性.

编辑 翟欢欢 电编 鲁亚静

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2012年12月28日; 20(36): 3754-3760
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

文献综述 REVIEW

结直肠癌肝转移治疗的研究进展

李华山, 李宇飞

■背景资料
结直肠癌致死的重要原因是转移, 以肝脏转移最为常见. 虽然肝切除仍然作为根治结直肠癌肝转移的唯一手段, 但目前为止适合手术切除的患者仅占少数. 因此, 合理地选择治疗方案以期更好地改善患者预后, 多学科综合治疗方法便成为广大学者研究的焦点.

李华山, 李宇飞, 中国中医科学院广安门医院肛肠科 北京市 100053
李华山, 主任医师, 主要从事肛肠疾病的防治与研究工作.
作者贡献分布: 本文选题设计及审校由李华山完成; 文献资料搜集由李宇飞完成; 写作由李宇飞与李华山共同完成.
通讯作者: 李华山, 主任医师, 100053, 北京市西城区北线阁街5号, 中国中医科学院广安门医院肛肠科. lihuashan@263.net
电话: 010-88001025
收稿日期:2010-10-10 修回日期: 2012-11-17
接受日期: 2012-12-20 在线出版日期: 2012-12-28

Advances in treatment of liver metastases of colorectal cancer

Hua-Shan Li, Yu-Fei Li

Hua-Shan Li, Yu-Fei Li, Department of Proctology, Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100053, China
Correspondence to: Hua-Shan Li, Chief Physician, Department of Proctology, Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, 5 Beixiange Street, Xicheng District, Beijing 100053, China. lihuashan@263.net
Received: 2012-10-10 Revised: 2012-11-17
Accepted: 2012-12-20 Published online: 2012-12-28

Abstract
Liver metastasis of colorectal cancer has a high incidence and mortality and is the main factor affecting prognosis, which necessitates the development of more reasonable therapeutic strategy for this condition. Nowadays, surgical resection is the only probable curative method; however, surgical intervention is indicated in only a few patients. The development of medical technology and accumulation of clinical experience have led to the wide use of multimodal treatment for liver metastases of colorectal cancer. Multimodal treatment includes surgical resection, neoadjuvant chemotherapy, transcatheter hepatic arterial chemoembolization, radiation therapy, radiofrequency ablation, cryotherapy, percutaneous ethanol injection, and Chinese medicine treatment. The combined application of the above treatments can improve the survival rate and the quality of life of patients. This article summarizes the advances in comprehensive treatment for colorectal liver metastases.

Key Words: Colorectal cancer; Liver metastasis; Treatment

Li HS, Li YF. Advances in treatment of liver metastases of colorectal cancer. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(36): 3754-3760

摘要
结直肠癌肝转移的发生率和死亡率很高, 是影响结直肠癌预后的重要因素. 因此, 找到合理的治疗方案显得尤为重要. 目前手术切除仍被认为是唯一可能有效的治愈手段, 但能手术根治的患者仅占少数. 因此, 随着医疗技术的发展, 肝转移癌治疗经验的积累, 多学科综合治疗理念逐渐被广泛应用, 是确保结直肠癌肝转移患者获得最佳治疗策略的根本, 亦是今后结直肠癌肝转移治疗的发展方向. 多学科综合治疗方案包括手术切除、新辅助化疗、肝动脉化疗栓塞、放射疗法、射频消融术、冷冻疗法、无水乙醇注射术及中医药治疗等, 一种或多种方法联合应用可明显提高患者的生存率并改善生活质量, 本文对结直肠癌肝转移的综合治疗进展作一综述.

关键词: 结直肠癌; 肝转移; 治疗

李华山, 李宇飞. 结直肠癌肝转移治疗的研究进展. 世界华人消化杂志 2012; 20(36): 3754-3760
http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3754.asp

0 引言
结直肠癌是我国常见的恶性肿瘤且其发病率逐年上升, 结直肠癌致死的重要原因是转移. 在结直肠癌疾病的发展进程中, 约50%的患者被诊断为发生肝转移[1]. 大约20%-25%的结直肠癌患者伴同时性肝转移, 20%-25%的患者发生异时性肝转移[2]. 虽然肝切除仍然作为根治结直肠癌肝转移的唯一手段, 但目前为止结直肠癌肝转移患者中仅有10%-20%适合直接肝切除[3]. 因此, 随着外科技术的发展, 手术指征虽然在逐渐放宽, 但多学科综合治疗已成为现阶段治疗结直肠癌肝转移的一种全新理念, 合理地选择治

■同行评议者
郝立强, 副教授, 上海长海医院普外二科

疗方案可以更好地改善患者的预后, 延长生存期. 多学科综合治疗包括手术切除、新辅助化疗(neoadjuvant chemotherapy, NC)、肝动脉化疗栓塞术(transcatheter hepatic arterial chemoembolization, TACE)、射频消融术(radio-frequency ablation, RFA)、冷冻疗法、无水乙醇注射术(percutaneous ethanol injection, PEI)及中医药治疗等. 现将结直肠癌肝转移的治疗进展综述如下.

1 结直肠癌肝转移的手术治疗

结直肠癌肝转移的治疗方法有很多种, 手术切除仍被认为是目前唯一能部分达到彻底治愈的有效方法, 有研究报道其术后5年生存率可达34%-58%, 中位生存期为28-46 mo, 疗效明显优于其他非手术治疗方法[4].

既往一直认为若肝转移灶超过4个、病灶>4 cm、存在肝外病变和切除边缘少于1 cm是手术禁忌证[5]. 然而随着外科技术的不断发展, 手术的指征也在逐渐放宽, 现在越来越重视的是在保留足够正常肝储备功能的基础上能否获得阴性手术切缘, 当前认为若肝功能正常, 肝组织保留>25%-30%, 手术切除则是安全可行的. 近期Neumann等[6]通过研究指出, 结直肠癌肝转移的手术适应证包括: (1)排除非手术切除的肝外转移表现; (2)肝实质累计<75%; (3)肝静脉累及数不超过3个, 肝段累及数不超过7个; (4)无肝功能不全, Child B级或C级肝硬化等情况; (5)无严重并发症存在. 对于结直肠癌肝转移是同期切除或分期切除, 目前尚有争论, 有学者主张切除原发灶后2-3 mo再行肝转移灶切除[7], 也有倾向于同期切除原发灶和肝转移灶[8]. Martin等[9]报道了240例可切除直肠癌伴肝转移的患者资料, 其中134例行同期切除, 106例在原发灶切除后6 mo行肝转移灶切除, 结果两组总生存率、围手术期病死率相似, 但同期切除组的并发症明显较低, 因此认为同期切除是安全的. 周伟平等[10]认为, 以下情况可考虑同期切除原发灶和转移灶: (1)原发灶能根治性切除; (2)转移灶不超过4个, 肝切除量<50%; (3)位于升结肠、横结肠及降结肠的肿瘤, 能一个切口同时行肠切除及肝转移灶切除.

以前认为切除结直肠癌肝脏转移灶有3个基本原则: 尽可能切除全部转移病灶, 切缘距肿瘤>1 cm, 保留30%以上的正常肝组织. 然而目前不能将切缘距肿瘤>1 cm做为切除完全的标准. Pawlik等[11]通过观察557例结直肠癌肝转移肝切除术后生存情况, 45例切缘阳性、129例切缘在1-4 mm、85例切缘在5-9 mm和298例切缘≥1 cm, 患者的5年生存率分别为17.1%、62.3%、71. 1%和63.0%, 复发率分别为51%、39%、41%和39%. 因此只要切缘阴性, 即可认为手术彻底. 尽管肝切除术是结直肠癌肝转移治疗的最佳方案, 仍会有约60%-70%的患者术后出现复发, 常见的复发脏器为肝脏, 约占50%, 若复发灶小及数量少(<3个)仍可考虑行再次手术切除术. Pessaux等[12]观察268例手术切除结直肠癌肝转移灶患者中包括单次手术113例, 第1次复发后再次手术42例, 第2次复发后再次手术13例, 手术并发症发生率分别为9.5%、14.3%、18.2%, 5年生存率分别为33%、21%、36%. 因此局限于肝内的结直肠癌复发的治疗可考虑行多次肝切除.

Dexiang等[13]通过对1 613名患者的观察, 得出若肝转移数≥4, 最大肝转移灶≥5 cm, 血清癌胚抗原(crystalline egg albumen, CEA)≥5 ng/mL, CA199≥37 U/mL皆为预后不良因素. Inoue等[14]也强调术后血清CA199水平对患者预后起着至关重要的作用. Inoue等[14]通过观察108例患者结直肠癌肝转移肝切除术后的预后情况, 其1、2、3、5年生存率(OS)分别为90.5%、77.8%、63.2%和51.6%, 手术切缘以及手术的方式并不是患者的重要预后因素, 而术后血清CA199的水平及复发出现与否是OS的独立预后因素(P = 0.0458、0.0249), 结直肠肿瘤的深度及术后血清CA199的水平可作为影响无瘤生存率的重要因素(P = 0.0025、0.00138).

2 结直肠癌肝转移的非手术治疗

目前为止, 仅有10%-20%的结直肠癌肝转移患者适合应用手术疗法进行根治性切除, 然而大多数患者由于肿瘤大小, 剩余肝实质功能差, 患者整体情况差等多方面原因, 不能予以手术切除. 因此, 为了提高结直肠癌肝转移患者手术切除的可能性, 综合措施现已被广泛应用于临床.

2.1 新辅助化疗(neoadjuvant chemotherapy, NC)

NC是指在恶性肿瘤局部实施手术或放疗前应用的全身性化疗. 近年来显示出良好的应用前景, 已成为各种恶性肿瘤多学科综合治疗中的重要组成部分. NC被看作是肿瘤细胞减量治疗, 即通过术前化疗减小肿瘤负荷, 从而提高肿瘤的手术完全切除率, 延长患者生存期.

化疗药物的选择方面, 目前公认FOLFOX为

■**研发前沿**

针对结直肠癌肝转移患者, 如何合理有效地应用多学科综合治疗方法, 不同方法的适应证尚待临床中进一步研究和总结, 目前已成为临床治疗中的一大热点.

■相关报道
Lordan等报道了经多学科综合治疗的结直肠癌肝转移患者的3年和5年生存率分别为67.5%和54.1%, 明显高于未经多学科综合治疗讨论接受治疗的结直肠癌肝转移患者(49.9%和43.3%).

一线方案, 失败者可改用FOLFIRI方案. 而分子靶向治疗又使化疗效果大幅提高, 其中以血管内皮细胞生长因子受体拮抗剂贝伐单抗和表皮生长因子受体抑制剂西妥昔单抗为主.

随着大量临床实验的开展与深入, NC显示出独特的优势, 包括: (1)控制、缩小原发肿瘤, 降低肿瘤分期, 提高不可切除肿瘤的切除性, 提高治愈性手术切除率, 减少复发率; (2)控制术前存在的微小癌灶和亚临床灶, 减少术后复发; (3)防止术后肿瘤血供改变以致影响化疗效果; (4)降低手术时肿瘤细胞活力, 使之不易播散入血, 防止切除原发肿瘤引发的肿瘤刺激, 控制医源性转移; (5)了解肿瘤对化疗药物的敏感性, 合理选择敏感药物; (6)预防远处转移; (7)在减轻多种恶性肿瘤伴随症状的同时也减轻了患者的精神和心理上的不适反应.

Masi等[15]报道以奥沙利铂和/或伊立替康为主的NC, 可显著提高不可切除结直肠癌肝转移患者的可切除率(提高到38%). Wakai等[16]研究证实NC可减少术前存在的微转移灶, 在被研究的63名患者中, 21名术前予以NC, 结果表明在39名患者中共发现260个微转移灶(62%), 而术前予以NC的患者肝内微转移灶明显少于术前未进行NC的患者[5/21(24%) *vs* 34/42(81%), $P<0.001$]. 叶盛威等[17]应用CapeOX方案术前化疗使部分患者肿瘤缓解, 结合肝切除术, 明显延长患者生命. 针对仅局限于肝脏的不可切除性结直肠癌肝转移患者51例, 行术前CapeOX方案化疗, 缓解22例, 缓解率为43.1%(22/51), 其中15例行治愈性切除, 术后有5例出现并发症, 无手术死亡, 随访中位时间21 mo, 6例复发, 其中4例死亡, 其他均存活, 化疗无效的或化疗后肿瘤缓解但未能行肝切除的中位生存期为12 mo和19 mo. NC还可了解肿瘤对化疗药物的敏感性, 合理选择敏感药物, Folprecht等[3]指出若术前化疗有效(使不可切除肝转移转化为可切除), 那么这个化疗方案将会是术后化疗的首选.

虽然NC可以给不可手术切除的结直肠癌肝转移患者带来手术切除的希望, 但是化疗药物所引起的肝损伤也值得我们密切关注. 氟脲嘧啶的肝毒性较明确, 可导致肝实质的结节性增生、胆管纤维化和狭窄, 从而可能增加患者术后感染的机会[18]; 而伊立替康可引起脂肪肝炎, 可导致部分肝切除术后患者肝功能障碍和肝再生能力受损, 发生率高达50%; 奥沙利铂可引起肝窦阻塞综合征, 他可能增加术中出血风险和减少肝功能储备[19]. 因此, 我们在实施NC时一定要考虑具体给药方案以及化疗持续时间等一系列问题, 因人而异, 选择最佳方案行个体化治疗, 将NC的益处发挥到最大.

2.2 TACE TACE是指将导管选择性的插入到肿瘤供血靶动脉后, 以适当的速度注入适量的栓塞剂, 通过栓塞肝动脉减少肿瘤血供, 形成肿瘤局部缺血, 同时最大限度的将化疗药物直接传递到肿瘤部位. 他具有微创性, 可重复性强, 定位准确, 疗效高、见效快, 可提高肿瘤局部药物浓度等一系列优点. TACE适用于所有肝脏原发和继发肿瘤, 主要适用于肝癌和结直肠癌肝转移[20].

Martin等[21]对55例患者共99个转移灶应用伊立替康经肝动脉化疗栓塞, 其中位住院天数为23 h(23 h-10 d), 第1次治疗后, 中位无病生存期和总体生存天数分别为247 d和343 d, 其中6名(10%)患者从原始的肿瘤状态降级. 孙萍等[22]对48例结直肠癌行根治术后予肝动脉栓塞化疗及腹腔灌注化疗, 结果完全缓解5例(10.42%), 部分缓解23例(47.92%), 总有效率达58.34%. 全毅等[23]认为TACE可作为治疗一线化疗失败的结直肠癌肝转移有效的二线补救方案. 对45例采用FOLFOX6方案化疗后疗效评估为肿瘤进展的结直肠癌肝转移患者, 应用氟尿嘧啶、奥沙利铂及碘油经肝动脉灌注化疗栓塞, 其中完全缓解0例, 部分缓解14例, 稳定21例.

TACE亦可联合其他疗法同时应用, 可明显改善患者免疫功能, 提高临床疗效. 游建等[24]对55例难以手术切除的结肠癌肝转移患者, 30例行全身化疗, 25例行RFA联合TACE治疗, 联合组治疗后CD4+、CD4+/CD8+明显高于治疗前, CD8+显著低于治疗前, 且肿瘤坏死范围为(2.01 cm±0.26 cm)明显大于化疗组(0.25 cm±0.07 cm), 术后血清甲胎蛋白含量为(32.77 μg/L±4.66 μg/L)明显低于化疗组(256.33 μg/L±17.85 μg/L), 且平均生存时间明显长于化疗组.

虽然TACE可作为不可切除结直肠癌肝转移患者及化疗抵抗性患者的一种姑息性治疗, 其疗效显著, 但亦有一定副作用及局限性. Aliberti等[25]对82名患者的185个转移灶进行伊立替康经肝动脉化疗栓塞治疗, 1 mo后, 所有患者影像上的对比度增强影均有所减少. 但化疗栓塞后综合征亦很常见, 主要表现为右上腹疼痛(40%)发热(80%)恶心(27%)转氨酶升高(70%)等. 徐利兵等[26]对35例结直肠癌肝转移患者应用

肝动脉灌注草酸铂+氟尿嘧啶化疗+碘油乳剂栓塞肝动脉作为观察组, 对照组38例采用静滴草酸铂+氟尿嘧啶, 16 wk后两组客观疗效分别为68.6%及34.2%, 中位生存期为14.6 mo及10.3 mo, 但恶心、呕吐、腹痛、发热等副作用观察组显著增加(P<0.05). 屠世良等[27]指出, TACE反复多次应用后可能使癌细胞对化疗药物的敏感性降低, 导致肿瘤缩小的比例逐渐下降, 虽然肿瘤区血管逐渐被封堵, 血管内皮细胞变性闭塞, 但肿瘤周围逐渐形成侧支循环并参与肿瘤供血促使肿瘤增殖, 出现CEA在下降, 稳定一段时间后又回升的现象.

2.3 ^{125}I粒子永久性组织间植入内放射疗法 ^{125}I是一种人工合成同位素, 由124Xe吸收1个中子并以电子俘获方式变为^{125}I, 可释放X线和γ射线, γ射线能直接损伤大肠癌细胞的DNA, 破坏癌细胞DNA合成, 诱导癌细胞凋亡, 抑制某些与癌细胞代谢增殖等相关蛋白分子的合成; 同时^{125}I粒子释放的低线性能量传递射线电离癌细胞内的水分子, 产生自由基(H^+、H_2O_2、OH^-、O^{2-}), 可引起组织细胞损伤而致组织中的肿瘤细胞失去繁殖能力而凋亡[28]. 黄伟红等[29]通过取30例结直肠癌肝转移患者, 共35个病灶均予^{125}I粒子组织间植入治疗, 患者临床症状均明显改善, 无严重不良反应出现. 血清CEA和肝功能指标较术前有明显改善, ^{125}I粒子置入术前28例患者血清CEA升高, 术后2mo CEA转阴9例(32.1%), 下降17例(60.0%), 术后4 wk ALT、AST由异常降至正常分别为23例(76.7%)、20例(66.7%), 并且随访12 mo局部复发率为6.7%, 生存率为86.7%. Nag等[30]报道^{125}I粒子内放疗治疗不可手术切除的结直肠肝转移患者1年生存率和3年生存率分别是73%, 23%, 中位生存期20 mo, 最长生存时间7.5年. 单发的转移灶的5年肝内控制率(38%)高于多发的转移灶的5年肝内控制率(6%).

2.4 局部治疗

2.4.1 RFA: RFA是在影像设备(超声、CT、磁共振成像等)及腔镜引导下或术中直视下, 将可以传输射频电流的特制电极针直接导入肿瘤组织, 通过射频电流在电极针周围产生离子震荡导致发热, 靶区温度可高达70 ℃-100 ℃, 组织间水分子气化, 使电极针周围组织发生热凝固性坏死, 达到治疗肿瘤的目的.

RFA的发展可追溯到19世纪末期, 但直到1995年, 意大利科学家Rossi等才率先将此技术应用于肝脏肿瘤的治疗, 随后该项技术不断发展成熟[31,32]. 在结直肠癌肝转移治疗中, RFA得到了较广泛的应用且疗效确切, 有关RFA的研究和临床报道较多.

RFA的主要适应证为: 病灶直径≤4 cm, 数目不超过3个, 且无肝外转移. 符合上述条件者可以达到根治的效果, 但若病灶直径或数目超过上述标准或已有肝外转移, 可以酌情进行姑息性治疗[33,34]. 其主要优点是并发症发生率低以及除了可在开腹和腹腔镜手术下实行外, 还能在CT和超声引导下经皮穿刺后实行.

Veltri等[35]通过实验研究, 结果表明结直肠癌肝转移患者应用RFA后的预后及生存率与转移灶的大小有着密切的关系. 若转移灶的直径≤3.0 cm或2.5 cm, 且无肝外转移的患者, 应用RFA后的预后更好, 根据其对262位结直肠癌肝转移患者应用RFA后生存情况的分析观察, 认为转移灶直径≤3 cm的患者, 其中位生存期为41.0 mo, 转移灶直径>3 cm的患者, 中位生存期仅为21.7 mo, 最大转移灶直径≤2.5 cm时, 其中位生存期可延长至45.2 mo, 转移灶直径>3.5 cm的患者, 中位生存期降至18.5 mo, 而有肝外转移的患者比起无肝外转移的患者, 其RFA后中位生存期明显缩短(23.3 mo *vs* 32.6 mo). Van Tiborg等[36]也指出, RFA可作为不可切除的结直肠癌肝转移患者治疗上很好的选择, 其疗效主要取决于转移灶的大小, 数量以及位置, 其术后平均生存期为56 mo(95%: 45-67 mo), 1、3、5、8年的生存率分别为93%、77%、36%、24%. 崔彦等[37]应用PRFA治疗结直肠癌肝转移31例共55个病灶, 肿瘤直径1.5-8.5 cm, 应用RF2000射频仪和10电极LeVeen针, 病灶>2.5 cm者予分层多点叠合毁损, >5.0 cm或多发者配合TACE及PEI. 结果表明: 小肿瘤(<3.0 cm)完全坏死率达92.9%(26/28), 3.1-5.0 cm的肿瘤完全坏死率为73.3%(11/15), 病灶>5 cm者均未完全坏死; 1、2、3年生存率分别为87.1%、77.5%和54.8%. 顾仰葵等[38]通过分析CT导向下RFA的37例共52个术后可切除性结直肠癌肝转移灶患者的临床资料, 指出消融术后无1例治疗相关死亡, 中位生存期为39.8 mo, 3年生存率为42.6%, 认为CT导向下射频消融创伤小, 疗效肯定, 可作为术后可切除性结直肠癌肝转移首选治疗方法之一. Oshowo等[39]报道过应用射频消融与外科切除术治疗结直肠癌孤立性肝转移的一项回顾性研究的结果, 射频组的中位生存期为37 mo, 手术组的中位生存期为41 mo, 两者疗效相当. Abdalla等[40]报道对于不可切除的结直肠癌肝转移, RFA与单

■创新盘点

本文所涉及的内容基本涵盖了目前国内外治疗结直肠癌肝转移的常见方法, 多学科综合治疗已成为现阶段治疗结直肠癌肝转移的一种全新理念, 合理地选择治疗方案可以更好地改善患者的预后, 延长生存期, 对临床实践有一定的借鉴意义.

■应用要点
多学科综合治疗模式作为一种结直肠癌肝转移患者治疗的全新理念, 应用前景广阔, 然而不同方法的临床适应证有待在临床中进一步总结和创新.

纯化疗相比, 前者明显改善了患者的生存率, 4年生存率达到了22%.

由于其与手术切除相比, 有更高的切缘复发率(P = 0.004)以及较短的总生存期, RFA并不能作为结直肠癌肝转移患者的治疗首选, 主要用于不能实施手术切除的肝转移患者以及具有很大手术风险患者的一种选择[41].

2.4.2 *冷冻疗法*: 局部冷冻治疗是通过一个探针将液氮注入到病变位置, 同时在病灶形成冰球实施治疗. 一般冷冻时间持续20 min, 溶解时间10 min, 通常每个病灶进行2个冷冻一溶解周期. 这一方法安全性好, 可治疗单个或多个肝转移灶. 但是该方法不适于病灶>4 cm的转移肿瘤, 有时还须借助开腹手术或腹腔镜辅助, 因为过大的探针在经皮穿刺时, 可能造成较大创伤, 但此法可作为肿瘤不能手术切除者的替代治疗手段. Mala等[42]的前瞻性研究中, 19例结直肠癌肝转移患者接受24次冷冻治疗, 其中16次于磁共振成像引导下经皮完成, 2年无瘤存活率为48%. 徐克成等[43]于超声或CT引导下, 对326例不能手术切除的结直肠癌肝转移患者共行526次经皮冷冻治疗, 治疗后3 mo, 基线CEA水平升高者中77.6%降至正常范围. 280例接受CT随访者中, 冷冻病灶完全反应者14.6%, 部分反应41.1%, 稳定24.3%, 进展20.0%. 中位随访期为36 mo(7-62 mo), 复发率为41.7%. 全部病例中位存活期为29 mo(3-62 mo). 治疗后第1、2、3、4、5年存活率分别为78%、62%、41%、34%和23%.

2.4.3 PEI: 无水乙醇通过瘤内弥散进入肿瘤细胞, 使其产生凝固性坏死, 并不断向肿瘤四周扩散, 对于有胞膜的肿瘤效果明显, 并能显著提高患者免疫功能. 有文献报道[44]PEI对肝脏原发和继发的肿瘤有效, 甚至对于肝脏功能B级或者在肝实质中央, 紧靠重要管道结构的肿瘤均有效果.

何俊等[45]应用彩色多普勒超声引导经皮肝内肿瘤穿刺注射无水乙醇治疗耐药的结肠癌肝转移20例, 1-2次/wk , 4-6次为1疗程, 结果显示: 治疗后全身情况好转, 症状减轻或消失, 饮食明显增加, 生活质量提高, 无严重并发症发生, 其半年、1、2、3年生存率分别为100%(20/20)、70%(14/20)、40%(8/20)、10%(2/20), 中位总生存期17 mo, 与对照组有显著性差异(P<0.01).

2.5 *中医药治疗* 随着祖国医学的不断发展, 从中医药角度探讨结直肠癌肝转移的发生规律, 干预其转移的发生, 其中扶正抗癌药物尚可有效改善机体全身状况, 提高患者的生活质量并延长生存期, 亦可配合手术、放疗和化疗等治疗以减少不良反应, 提高疗效. 因此中医药治疗成为防治肝转移发生措施中不可忽视的重要组成部分.

李斯文教授[46]认为“脾虚邪实”是结直肠癌发生的最重要的病理基础, 正虚邪恋是导致术后复发转移的根源, “先安未受邪之地”消除转移基础为治疗之首要. 创立“强脾护肝”理论为指导, 采用内服中药及高位结直肠滴注疗法, 提高患者生活质量, 有效防治复发转移, 取得了良好效果, 在扶正祛邪抑癌原则指导下, 在益气健脾的基础之上, 他强调对脾胃功能的维护和重建, 对结直肠癌术后肝转移的患者, 辨证为脾虚肝郁证, 应用益气健脾, 解郁散结中药, 提高患者免疫力, 抗肿瘤复发转移, 明显提高了结直肠癌术后患者的存活率及生存质量. 蔡茂红[47]应用金龙胶囊联合化疗方案治疗结直肠癌肝转移患者, 其近期临床收益率、血CEA下降比率、体力状况、白细胞降低程度及免疫指标改变方面均明显好于对照组. 孟志强等[48]采用肝内介入治疗联合健脾理气为主中药治疗, 其有效率为30%, 且中位生存期为18.6 mo, 1、2、3年生存率70.2%、 40.3%、 13.0%, 均明显高于单纯介入组. 钱垠等[49]通过观察健脾中药加化疗和化疗两组延长结直肠癌肝转移患者生存期的作用, 结果显示加入健脾中药的化疗患者显示出了生存期延长的趋势.

虽然截止目前中医中药抗结直肠癌肝转移的临床报道相对较少, 然而动物实验也为我们提供了一些理论依据, 有待临床中进一步证实. 陈瑞新等[50]通过建立人结肠癌细胞株裸鼠肝转移模型, 研究复方参七汤对裸鼠肝转移模型的影响, 结果表明复方参七汤可显著降低肝转移裸鼠血中CK20 mRNA表达, 抑制裸鼠结肠癌肝转移的发生及发展, 实验组裸鼠肝转移血中CK20 mRNA表达为0.398±0.143, 明显低于对照组0.518±0.090. 王飞等[51]通过观察康莱特注射液对人结肠癌LoVo细胞裸鼠肝转移模型裸鼠血浆骨桥蛋白的影响, 结果表明康莱特联合环磷酰胺可以抑制模型裸鼠的中脾脏接种瘤及肝脏转移瘤的生长, 抑制其血浆骨桥蛋白的浓度. 刘敏等[52]亦通过动物实验得出, 苦参碱通过抗血管生成抑制结肠癌的肝转移, 与5-FU联合应用具有协同效应, 为安全有效的抗肿瘤策略.

3 结论

结直肠癌肝转移是结直肠癌致死的主要原因,

但经过积极有效的治疗, 仍能取得较高的5年生存率. 手术切除是唯一能达到治愈目标的方法, 然而并非所有患者都适合手术切除, 且多数患者肝切除术后仍可复发, 因此以外科手术为主的综合治疗越来越得到业内专家的重视. 用NC、TACE、放射疗法、RFA、冷冻疗法、PEI及中医药等治疗结直肠肝转移都有一定的缺陷及不足, 但对于不可手术切除的患者, 为延长其生存期、改善生存质量及创造最佳手术时机, 起着重要作用. 因此, 结合患者的具体情况, 病情特点, 选择合适的治疗方案, 个体化治疗, 多学科综合治疗, 取长补短, 以期提高结直肠癌肝转移的整体治疗效果.

4 参考文献

1 Scheele J, Stangl R, Altendorf-Hofmann A. Hepatic metastases from colorectal carcinoma: impact of surgical resection on the natural history. *Br J Surg* 1990; 77: 1241-1246

2 Zelek L, Bugat R, Cherqui D, Ganem G, Valleur P, Guimbaud R, Dupuis O, Aziza T, Fagniez PL, Auroux J, Kobeiter H, Tayar C, Braud AC, Haddad E, Piolot A, Buyse M, Piedbois P. Multimodal therapy with intravenous biweekly leucovorin, 5-fluorouracil and irinotecan combined with hepatic arterial infusion pirarubicin in non-resectable hepatic metastases from colorectal cancer (a European Association for Research in Oncology trial). *Ann Oncol* 2003; 14: 1537-1542

3 Folprecht G, Grothey A, Alberts S, Raab HR, Köhne CH. Neoadjuvant treatment of unresectable colorectal liver metastases: correlation between tumour response and resection rates. *Ann Oncol* 2005; 16: 1311-1319

4 Bentrem DJ, Dematteo RP, Blumgart LH. Surgical therapy for metastatic disease to the liver. *Annu Rev Med* 2005; 56: 139-156

5 Khatri VP, Petrelli NJ, Belghiti J. Extending the frontiers of surgical therapy for hepatic colorectal metastases: is there a limit? *J Clin Oncol* 2005; 23: 8490-8499

6 Neumann UP, Seehofer D, Neuhaus P. The surgical treatment of hepatic metastases in colorectal carcinoma. *Dtsch Arztebl Int* 2010; 107: 335-342

7 Bipat S, van Leeuwen MS, Ijzermans JN, Comans EF, Planting AS, Bossuyt PM, Greve JW, Stoker J. Evidence-base guideline on management of colorectal liver metastases in the Netherlands. *Neth J Med* 2007; 65: 5-14

8 王庆新, 徐斌, 晏建军, 周飞国, 严以群. 同时性结直肠癌肝转移患者治疗策略探讨. 癌症 2008; 27: 748-751

9 Martin R, Paty P, Fong Y, Grace A, Cohen A, DeMatteo R, Jarnagin W, Blumgart L. Simultaneous liver and colorectal resections are safe for synchronous colorectal liver metastasis. *J Am Coll Surg* 2003; 197: 233-241; discussion 241-242

10 周伟平, 吴孟超. 结直肠癌肝转移的治疗进展. 中华胃肠外科杂志 2005; 8: 9-l0

11 Pawlik TM, Scoggins CR, Zorzi D, Abdalla EK, Andres A, Eng C, Curley SA, Loyer EM, Muratore A, Mentha G, Capussotti L, Vauthey JN. Effect of surgical margin status on survival and site of recurrence after hepatic resection for colorectal metastases. *Ann Surg* 2005; 241: 715-724

12 Pessaux P, Lermite E, Brehant O, Tuech JJ, Lorimier G, Arnaud JP. Repeat hepatectomy for recurrent colorectal liver metastases. *J Surg Oncol* 2006; 93: 1-7

13 Dexiang Z, Li R, Ye W, Haifu W, Yunshi Z, Qinghai Y, Shenyong Z, Bo X, Li L, Xiangou P, Haohao L, Lechi Y, Tianshu L, Jia F, Xinyu Q, Jianmin X. Outcome of patients with colorectal liver metastasis: analysis of 1,613 consecutive cases. *Ann Surg Oncol* 2012; 19: 2860-2868

14 Inoue Y, Hayashi M, Komeda K, Masubuchi S, Yamamoto M, Yamana H, Kayano H, Shimizu T, Asakuma M, Hirokawa F, Miyamoto Y, Takeshita A, Shibayama Y, Uchiyama K. Resection margin with anatomic or nonanatomic hepatectomy for liver metastasis from colorectal cancer. *J Gastrointest Surg* 2012; 16: 1171-1180

15 Masi G, Loupakis F, Pollina L, Vasile E, Cupini S, Ricci S, Brunetti IM, Ferraldeschi R, Naso G, Filipponi F, Pietrabissa A, Goletti O, Baldi G, Fornaro L, Andreuccetti M, Falcone A. Long-term outcome of initially unresectable metastatic colorectal cancer patients treated with 5-fluorouracil/leucovorin, oxaliplatin, and irinotecan (FOLFOXIRI) followed by radical surgery of metastases. *Ann Surg* 2009; 249: 420-425

16 Wakai T, Shirai Y, Sakata J, Kameyama H, Nogami H, Iiai T, Ajioka Y, Hatakeyama K. Histologic evaluation of intrahepatic micrometastases in patients treated with or without neoadjuvant chemotherapy for colorectal carcinoma liver metastasis. *Int J Clin Exp Pathol* 2012; 5: 308-314

17 叶盛威, 李强. CapeOX方案结合手术治疗不可切除的结直肠癌肝转移. 中国肿瘤外科杂志 2009; 1: 122-123

18 Mandalà M, Mosconi S, Quadri A, Milesi L, Labianca R. Neoadjuvant chemotherapy for patients with liver metastases from colorectal cancer. *Expert Rev Anticancer Ther* 2007; 7: 887-897

19 Morris-Stiff G, Tan YM, Vauthey JN. Hepatic complications following preoperative chemotherapy with oxaliplatin or irinotecan for hepatic colorectal metastases. *Eur J Surg Oncol* 2008; 34: 609-614

20 Lubienski A, Simon M, Lubienski K, Gellissen J, Hoffmann RT, Jakobs TF, Helmberger T. [Update on chemoinfusion and chemoembolization treatments]. *Radiologe* 2007; 47: 1097-1096, 1108

21 Martin RC, Robbins K, Tomalty D, O'Hara R, Bosnjakovic P, Padr R, Rocek M, Slauf F, Scupchenko A, Tatum C. Transarterial chemoembolisation (TACE) using irinotecan-loaded beads for the treatment of unresectable metastases to the liver in patients with colorectal cancer: an interim report. *World J Surg Oncol* 2009; 7: 80

22 孙萍, 康国庆, 陈小兵, 罗素霞. 肝动脉插管栓塞化疗联合腹腔灌注化疗治疗结直肠癌肝转移48例疗效观察. 肿瘤基础与临床 2009; 22: 360-361

23 全毅, 何柱光, 李祥厦. TACE治疗化疗后进展期结直肠癌肝转移的临床研究. 重庆医学 2012; 41: 859-863

24 游建, 何鑫, 王平, 陈孝平. 射频消融联合肝动脉栓塞化疗治疗难以手术切除的结肠癌肝转移. 中华实验外科杂志 2009; 26: 1207-1209

25 Aliberti C, Fiorentini G, Muzzio PC, Pomerri F, Tilli M, Dallara S, Benea G. Trans-arterial chemoembolization of metastatic colorectal carcinoma to the

■名词解释

多学科综合治疗(MDT): 临床多学科工作团队, 通常是两个以上相关学科组成的固定工作组, 针对某一疾病进行定期定时的临床讨论会, 提出临床治疗方案, 结直肠癌肝转移中MDT的成员一般包括肝外科、肿瘤内科、影像科、介入科, 病理科及姑息治疗.

■同行评价
文章综述全面、思路清晰，总结结论明朗，有一定的参考价值.

liver adopting DC Bead®, drug-eluting bead loaded with irinotecan: results of a phase II clinical study. *Anticancer Res* 2011; 31: 4581-4587
26 徐利兵, 王秀明. 草酸铂加氟脲嘧啶方案联合肝动脉化疗栓塞术治疗结直肠癌肝转移的疗效分析. 河北联合大学学报(医学版) 2012; 14: 155-156
27 屠世良, 袁建华, 邓高里, 胡庭杨, 董全进. 选择性动脉灌注加栓塞化疗治疗结直肠癌肝转移的研究. 中国肿瘤临床 2007; 34: 845-848
28 Jakobs TF, Hoffmann RT, Tatsch K, Trumm C, Reiser MF. [Therapy response of liver tumors after selective internal radiation therapy]. *Radiologe* 2008; 48: 839-849
29 黄伟红, 冯关荣. 125I粒子瘤组织间植入治疗结直肠癌肝转移30例疗效观察. 山东医药 2009; 49: 81-82
30 Nag S, DeHaan M, Scruggs G, Mayr N, Martin EW. Long-term follow-up of patients of intrahepatic malignancies treated with iodine-125 brachytherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006; 64: 736-744
31 Rossi S, Di Stasi M, Buscarini E, Quaretti P, Garbagnati F, Squassante L, Paties CT, Silverman DE, Buscarini L. Percutaneous RF interstitial thermal ablation in the treatment of hepatic cancer. *AJR Am J Roentgenol* 1996; 167: 759-768
32 Meijerink MR, van den Tol P, van Tilborg AA, van Waesberghe JH, Meijer S, van Kuijk C. Radiofrequency ablation of large size liver tumours using novel plan-parallel expandable bipolar electrodes: initial clinical experience. *Eur J Radiol* 2011; 77: 167-171
33 Dupuy DE, Goldberg SN. Image-guided radiofrequency tumor ablation: challenges and opportunities--part II. *J Vasc Interv Radiol* 2001; 12: 1135-1148
34 Lau WY, Leung TW, Yu SC, Ho SK. Percutaneous local ablative therapy for hepatocellular carcinoma: a review and look into the future. *Ann Surg* 2003; 237: 171-179
35 Veltri A, Guarnieri T, Gazzera C, Busso M, Solitro F, Fora G, Racca P. Long-term outcome of radiofrequency thermal ablation (RFA) of liver metastases from colorectal cancer (CRC): size as the leading prognostic factor for survival. *Radiol Med* 2012; 117: 1139-1151
36 Van Tilborg AA, Meijerink MR, Sietses C, Van Waesberghe JH, Mackintosh MO, Meijer S, Van Kuijk C, Van Den Tol P. Long-term results of radiofrequency ablation for unresectable colorectal liver metastases: a potentially curative intervention. *Br J Radiol* 2011; 84: 556-565
37 崔彦, 王平, 董满库, 李晓鸥, 周立艳, 张宏文, 李成林. 经皮射频治疗结直肠癌肝转移31例. 中华普通外科杂志 2006; 21: 67-68
38 顾仰葵, 吴沛宏, 范卫君, 黄金华, 张亮, 高飞. CT导向下RFA在术后可切除性结直肠癌肝转移瘤治疗中的价值. 中华医学杂志 2008; 88: 2748-2750
39 Oshowo A, Gillams A, Harrison E, Lees WR, Taylor I. Comparison of resection and radiofrequency ablation for treatment of solitary colorectal liver metastases. *Br J Surg* 2003; 90: 1240-1243
40 Abdalla EK, Vauthey JN, Ellis LM, Ellis V, Pollock R, Broglio KR, Hess K, Curley SA. Recurrence and outcomes following hepatic resection, radiofrequency ablation, and combined resection/ablation for colorectal liver metastases. *Ann Surg* 2004; 239: 818-825; discussion 825-827
41 Lee KH, Kim HO, Yoo CH, Son BH, Park YL, Cho YK, Kim H, Han WK. Comparison of radiofrequency ablation and resection for hepatic metastasis from colorectal cancer. *Korean J Gastroenterol* 2012; 59: 218-223
42 Mala T, Edwin B, Mathisen Ø, Tillung T, Fosse E, Bergan A, SØreide O, Gladhaug I. Cryoablation of colorectal liver metastases: minimally invasive tumour control. *Scand J Gastroenterol* 2004; 39: 571-578
43 徐克成, 牛立志, 穆峰, 周亮, 胡以则, 杨大明, 左建生. 经皮冷冻治疗结直肠癌肝转移. 胃肠病学 2009; 14: 517-521
44 Becker G, Soezgen T, Olschewski M, Laubenberger J, Blum HE, Allgaier HP. Combined TACE and PEI for palliative treatment of unresectable hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 6104-6109
45 何俊, 雷开键, 贾钰铭, 王静. 无水酒精注射治疗耐药的结肠癌肝转移疗效观察. 四川医学 2009; 30: 1249-1250
46 张亮, 李斯文. 李斯文教授强脾护肝理论对结直肠癌肝转移治疗的探讨. 光明中医 2011; 26: 1104-1106
47 蔡茂红. 金龙胶囊联合化疗治疗结直肠癌肝转移的临床观察. 四川医学 2011; 32: 227-229
48 孟志强, 徐益语, 刘鲁明, 宋明志, 黄雯霞. 肝介入结合中药治疗大肠癌肝转移临床疗效观察. 中西医结合学报 2003; 1: 187-188
49 钱垠, 黄欣, 刘青. 健脾中药干预结直肠癌肝转移患者生存期的临床观察. 辽宁中医杂志 2009; 36: 401-402
50 陈瑞新, 徐青, 于秀, 陈玉泉, 沈洪薰. 复方参七汤对人结肠癌细胞株裸鼠肝转移影响. 郧阳医学院学报 2006; 25: 343-345
51 王飞, 王亚非, 李玉明, 王以浪, 张亮. 康莱特注射液对结肠癌肝转移裸鼠血浆骨桥蛋白的影响. 临床肿瘤学杂志 2011; 16: 682-685
52 刘敏, 朱玉森, 周国威, 岳宗柱, 敬长春. 苦参碱联合5-FU对人结肠癌裸鼠移植瘤肝转移的影响. 中国临床实用医学 2007; 1: 15-17

编辑 翟欢欢 电编 鲁亚静

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2012年12月28日; 20(36): 3761-3766
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

研究快报 RAPID COMMUNICATION

Fas/FasL、Bcl-2/Bax、Caspase-8在大鼠非酒精性脂肪性肝病中的作用机制

何双艳, 李珏宏, 李昌平, 李 鹏, 钟晓琳

何双艳, 李昌平, 李鹏, 钟晓琳, 泸州医学院附属医院 四川省泸州市 646000
李珏宏, 四川大学华西临床医学院 四川省成都市 610041
何双艳, 在读硕士, 主要从事消化系疾病的研究.
2011年泸州市科技局基金资助项目, No. 2011-I-S39(2/6)
作者贡献分布: 何双艳与李昌平对此文所作贡献均等; 此课题由何双艳、李珏宏、李昌平、李鹏及钟晓琳设计; 研究过程由何双艳、李珏宏、李昌平、李鹏及钟晓琳共同完成; 本论文写作由何双艳、李昌平及李珏宏共同完成.
通讯作者: 李昌平, 教授, 646000, 四川省泸州市太平街25号, 泸州医学院附属医院消化内科. lichangping1965@sina.com
电话: 0830-3161276
收稿日期: 2012-09-28 修回日期:2012-11-08
接受日期: 2012-11-23 在线出版日期: 2012-12-28

Role of Fas/FasL, Bcl-2/Bax and caspase-8 in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease in rats

Shuang-Yan He, Jue-Hong Li, Chang-Ping Li, Peng Li, Xiao-Lin Zhong

Shuang-Yan He, Chang-Ping Li, Peng Li, Xiao-Lin Zhong, Department of Gastroenterology, the Affliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000, Sichuan Province, China.
Jue-Hong Li, West China School of Medicine, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China
Supported by: the Foundation of Luzhou Science and Technology Bureau, No. 2011-I-S39(2/6)
Correspondence to: Chang-Ping Li, Professor, Department of Gastroenterology, the Affliated Hospital of Luzhou Medical College, 25 Taiping Street, Luzhou 646000, Sichan Province, China. lichangping1965@sina.com
Received: 2012-09-28 Revised: 2012-11-08
Accepted: 2012-11-23 Published online: 2012-12-28

Abstract

AIM: To investigate the role of hepatocyte apoptosis-related factors Fas, FasL, Bcl-2, Bax and caspase-8 in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) in rats.

METHODS: A rat model of experimental NAFLD was created by feeding a fat rich diet (NAFLD group). Control animals were fed a standard diet (control group). The percentage of apoptotic cells was detected by flow cytometry (FCM). The expression levels of Fas, Fas L, Bcl-2 and Bax proteins in the liver were determined by immunohistochemistry. The mRNA level of caspase-8 was measured by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction.

RESULTS: In the NAFLD group, steatosis was more obvious and fibrosis and inflammation activity scores were significantly higher than those in the control group. The percentage of apoptotic hepatocytes increased more significantly in the NAFLD group compared with the control group. With the increase in the severity of fat liver, Fas and FasL expression was enhanced in the model group and the number of positive cells increased. The expression of Bcl-2 and Bax proteins was weakly positive in the control group, while the number of positive cells in the model group gradually increased from week 4 to week 12. Bcl-2 and Bax proteins were more deeply stained in locations where fatty changes were more severe. With the progression of fatty liver, Bcl-2/Bax ratio progressively decreased in the NAFLD group. Caspase-8 mRNA expression in the NAFLD group was significantly higher than that in the control group. Caspase-8 mRNA expression progressively increased with the aggravation of steatosis and inflammation.

CONCLUSION: The degree of hepatocyte apoptosis is closely related to the degree of liver injury in rats with NAFLD. Pathological hepatocyte apoptosis promotes the progression of NAFLD. The activation of Fas, FasL, and caspase-8 is an important cause of steatosis, inflammation and fibrosis in NAFLD. Up-regulation of Bax and Bcl-2 and abnormal Bax/Bcl-2 ratio may be important factors responsible for hepatocyte apoptosis in NAFLD.

Key Words: Nonalcoholic fatty liver disease; Nonalcoholic steatohepatitis; Apoptosis; Fas/FasL; Bcl-2/Bax; Caspase-8

He SY, Li JH, Li CP, Li P, Zhong XL. Role of Fas/FasL, Bcl-2/Bax and caspase-8 in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease in rats. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(36): 3761-3766

■背景资料
非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)是21世纪全球重要的公共健康问题之一, 也是肝功能异常最常见的原因, 人群发病率高达25%, 脂肪肝可发展为肝细胞坏死, 肝纤维化和肝硬化, 其发病机制尚未阐明.

■同行评议者
任晓峰, 教授, 东北农业大学动物医学学院微生物室

■研发前沿
肝细胞凋亡及相关调节因素在NAFLD发病及其进展中的作用是目前NAFLD研究的热点之一，但关于其致病机制仍不清楚.

摘要

目的: 探讨肝细胞凋亡及其相关因素Fas/FasL、Bcl-2/Bax蛋白及Caspase-8 mRNA的表达在大鼠非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)中的作用.

方法: 采用改良高脂饮食建立大鼠NAFLD模型, 以正常饮食设立对照组. HE染色观察肝脏脂肪变、炎症活动和纤维化程度, 采用流式细胞仪法测肝细胞凋亡百分数; 免疫组织化学法检测Fas、FasL、Bcl-2及Bax在肝组织中表达情况; 实时荧光定量PCR法检测肝脏Caspase-8 mRNA的表达.

结果: NAFLD模型组脂肪变性明显, 纤维化和炎症活动度记分均显著高于正常对照组. 流式细胞仪检测显示, 与对照组比较, 实验组大鼠肝细胞凋亡百分数增加, 随造模时间延长凋亡率增加更明显(均P<0.01); 免疫组织化学染色显示随着肝脏脂肪变加重, Fas、FasL蛋白染色加深, 阳性细胞数增加; Bcl-2、Bax在对照组的表达均为散在弱阳性, 实验组4、8、12 wk阳性细胞数渐增加, 并在脂肪变明显的部位着色深且随着脂肪肝的进展, Bcl-2/Bax比率进行性下降. 实时荧光定量PCR法显示Caspase-8 mRNA 表达量在高脂组中显著高于对照组(均P<0.01), 且随肝脏脂肪变及炎症加重呈进行性上升.

结论: 在NAFLD发生过程中, 肝细胞凋亡促进NAFLD大鼠病情进展; Fas、FasL、Caspase-8 mRNA相关调控蛋白的活化是引起NAFLD脂肪变性、炎症及纤维化的重要因素. 细胞凋亡调节蛋白Bax、Bcl-2表达上调, 二者表达的相对比例发生异常, 这可能是NAFLD中肝细胞发生凋亡的重要原因之一.

关键词: **非酒精性脂肪性肝病; 非酒精性脂肪性肝炎; 细胞凋亡**; Fas/FasL; Bcl-2/Bax; Caspase-8

何双艳, 李珏宏, 李昌平, 李鹏, 钟晓琳. Fas/FasL、Bcl-2/Bax、Caspase-8在大鼠非酒精性脂肪性肝病中的作用机制. 世界华人消化杂志 2012; 20(36): 3761-3766
http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3761.asp

0 引言

非酒精性脂肪性肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)是指除酒精和其他明确的损肝因素所致的, 以弥漫性肝细胞大泡性脂肪变为主要特征的临床病理综合征[1,2]. 随着生活水平的提高、生活习惯的变化, 肥胖和糖尿病的发病率增加, NAFLD的发病率呈上升趋势, 在我国亦已成为仅次于病毒性肝炎的第2大肝病[3], 其可进展至肝硬化、肝功能衰竭、原发性肝细胞癌[4-6], 严重危害人民健康. 尽管NAFLD的发病机制仍不十分清楚, 但有证据显示肝细胞凋亡及其相关因素Fas/FasL、Bcl-2/Bax蛋白及Caspase-8在其发生发展中发挥着重要作用[7-9]. 本实验通过改良高脂饮食建立NAFLD大鼠模型, 检测Fas/Fasl, Bcl-2、Bax蛋白在肝组织的表达情况及检测肝脏Caspase-8 mRNA的表达, 从而进一步阐明和探讨他们在其发病机制中的作用及相互关系.

1 材料和方法

1.1 材料 健康成年SPF级♂SD大鼠40只, 体质量150-180 g, 购自重庆腾鑫生物技术有限公司. 兔抗大鼠Fas多克隆抗体、兔抗大鼠FasL多克隆抗体、兔抗大鼠Bcl-2多克隆抗体、兔抗大鼠Bax多克隆抗体、二抗羊抗兔IgG 、SP免疫组织化学染色试剂盒(北京中杉金桥公司); Annexin V/PI双染试剂盒(美国Beckman公司); Taq DNA PCR反应试剂盒(TaKaRa大连宝生); TRIzol购自美国Invitrogen; dNTP购自美国普洛麦格(Promega)公司; 引物合成及探针修饰(上海生物工程有限公司).

1.2 方法

1.2.1 分组及造模: 适应性喂养1 wk后, 40只大鼠按随机表法随机分为2组: 正常对照组20只(简称C组); NAFLD实验组20只(简称F组). 每组分为2、4、8、12 wk小组, 每小组各5只. 正常组以普通饲料喂养, 实验组以改良高脂饮食(即胆固醇2%+胆酸钠0.5%+丙硫氧嘧啶0.2%+蔗糖5%+猪油10%+基础饲料82.3%[10])喂养. 实验动物自由进食和饮水.

1.2.2 取材: 大鼠处死前1天禁食12 h, 自由饮水, 第2天称质量后以20 g/L戊巴妥钠溶液1 mL/kg腹腔内注射麻醉, 先进行心脏采血, 留取血清; 然后迅速取下肝脏测量肝湿质量, 以备计算肝指数(肝湿质量/体质量×100%); 在肝左叶中部切取1.0 cm×1.0 cm×1.0 cm大小肝组织, 浸泡于4%多聚甲醛中固定, 备做病理切片, 其余肝脏组织-80 ℃冰箱保存备用.

1.2.3 各组大鼠血脂及肝功能检测: 由全自动生化分析仪检测定血清甘油三酯(triglyceride, TG)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、天

门冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST).

1.2.4 肝组织病理观察: 将取出的新鲜肝组织用4%多聚甲醛固定、石蜡包埋、HE 染色, 在显微镜下观察肝组织的脂肪变、炎症活动以及纤维化情况.

1.2.5 流式细胞仪Annexin V/PI法测肝细胞凋亡百分数: 取实验大鼠新鲜肝脏组织约1 g, 置于预冷的PBS中, 立即剪碎, 数次PBS悬浮、洗涤, 400目滤网过滤, 获得悬浮肝细胞, 加入红细胞裂解液冰上裂解10 min, 1 000 r/min离心5 min, 弃上清; PBS重新悬浮肝细胞, 计数, Annexin-Ⅴ/PI 染色, 上机检测.

1.2.6 免疫组织化学检测Fas、FasL、Bcl-2、Bax蛋白在肝组织中的表达: 按照SP免疫组织化学染色试剂盒及DAB显色试剂盒说明书按步骤进行操作. 阳性判断标准为: 细胞膜或细胞浆出现棕褐色染色. 用Image plus 5.0软件进行图像分析, 作积分吸光度(IA)值半定量分析.

1.2.7 实时荧光定量PCR检测肝脏Caspase-8 mRNA的表达: 按TRIzol试剂说明书提取肝组织中的总RNA, 测定RNA 的浓度及纯度. 将提取的总mRNA逆转录为cDNA, 收集数据, 确定每个样品管中荧光强度增加到某一特定阈值时的扩增循环数(Ct值), 进行分析绘制每一反应管的扩增动力学曲线, 根据Ct值与标准模板初始拷贝的对数值作图, 得到该样品的标准曲线. GAPDH上游引物序列为: 5'-TGA CAT CAA GAA GGT GGT GA-3', 下游引物序列为: 5'-TCA TAC CAG GAA ATG AGC TT-3'. Caspase-8基因上游引物序列为: 5'-GAT GAG GCA GAC TTT CT G CT-3', 下游引物序列为: 5'-CAT AGT TCA CGC CAG TCA GGA T-3'. Caspase-8阳性结果为163 bp, Caspase-8的扩增条件为: 94 ℃ 2 min, 94 ℃ 20 s, 54 ℃ 20 s, 74 ℃ 20 s, 共45个循环.

统计学处理 数据使用SPSS13.0软件进行统计学分析. 计量资料用用mean±SD表示, C组与F组比较采用两样本均数比较的t检验; C组与F组间比较采用方差分析; 计数资料比较采用Fisher精确检验; 两者相关性分析采用直线相关分析. $P<0.05$为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 大鼠血脂、肝功能和肝组织学病理

2.1.1 大鼠血脂和肝功能: 随造模时间延长, F组血脂及肝功能各组指标呈进行性升高, 其中以ALT最为明显, 各时间点F组ALT值与C组比较及F组间比较均有明显差异(均$P<0.01$); TG水平F组在4 wk时显著升高, 相对C组及F组2 wk有差异($P<0.01$); 各时相点F组TC值与C组比较及F组间比较均有明显差异(均$P<0.05$); AST水平F组与C组间差异显著($P<0.01$), 而F组组间比较在4 wk相对F组2 wk有差异($P<0.01$), 其余4、8、12 wk F组间则无明显差异.

2.1.2 大鼠肝组织病理情况: HE染色结果显示, C组大鼠肝脏无异常发现, 各时相点F组肝组织炎症活动度评分均高于C组(均$P<0.05$); F组间比较: F组4 wk与2 wk差异显著($P<0.01$); F组12 wk与8 wk比较差异显著($P<0.05$, 图1)

2.2 实验各组大鼠肝细胞凋亡百分数情况 F组2 wk与C组比较略有增加但差异不显著; F组4 wk、 8 wk、12 wk与C组相同时相点比较肝细胞凋亡百分数明显著增加(均$P<0.01$). F组间比较肝细胞凋亡百分数增加显著($P<0.01$); 而C组各时相点之间差异无统计学意义(图2).

2.3 大鼠肝组织Fas、FasL、Bcl-2、Bax蛋白的表达

2.3.1 大鼠肝组织Fas、FasL蛋白表达: C组间比较差异不显著, F组Fas及FasL含量随造模时间延长逐步升高, 与C组比较差异明显($P<0.01$), 其中F组间比较以12 wk升高较明显, 8 wk、12 wk间差异较小(表1).

2.3.2 大鼠肝组织Bcl-2/Bax蛋白表达: F组Bcl-2、Bax蛋白的表达随着时间延长增高, 与C组比较, 差异具有统计学意义($P<0.01$); 随着脂肪肝的进展, F组Bcl-2/Bax 比率逐渐下降, 尤以F组8 wk及12 wk最为加明显(表1).

2.4 大鼠肝组织Caspase-8 mRNA相对表达量

Caspase-8 mRNA相对表达量在F组中随脂肪肝程度的加重呈进行性上升, F组各时相点Caspase-8 mRNA相对表达量均显著高于C组(均$P<0.01$), 且F组间比较也存在明显差异(均$P<0.01$, 表1).

3 讨论

肝细胞凋亡是多种肝脏疾病的共同病理表现, 近年来关于其在NAFLD发生发展中的作用取得较大进展, 揭示了肝细胞凋亡在NAFLD向非酒精性脂肪性肝炎(non-alcoholic steatohepatitis, NASH)及肝纤维化乃至肝硬化、肝癌进展中扮演的至关重要角色[11,12]. 本实验成功诱导NAFLD大鼠模型, 表现为血清ALT、AST、

■相关报道

赵和平和解燕茹在非酒精性脂肪性肝病动物实验研究中, 发现在NAFLD发生过程中, 细胞凋亡调节蛋白Bax表达上调, Bcl-2表达减少, 二者表达的相对比例发生异常.

■创新盘点

本实验应用改良高脂饮食建立NAFLD大鼠模型, 通过研究细胞凋亡调控蛋白Fas/FasL、Bcl-2/Bax及Caspase-8的表达与NAFLD进展的关系, 以期对其发病机制有新的认识, 从而揭示他们在NAFLD中的作用.

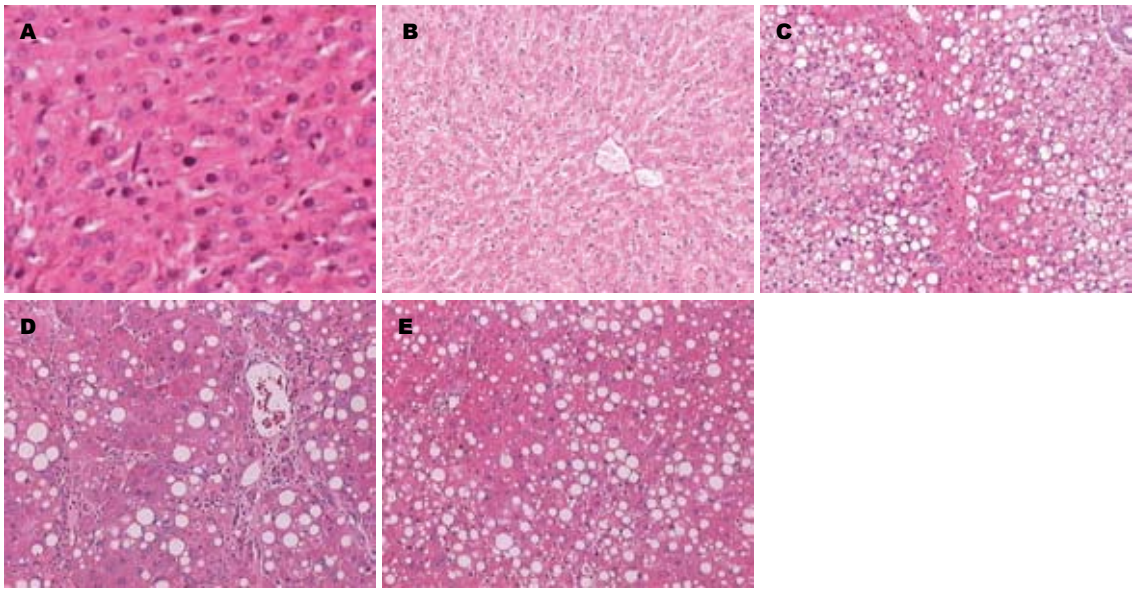


图 1 各组大鼠肝脏组织病理学改变(HE, ×400). A: C组; B−E: F组2 wk, 4 wk, 8 wk, 12 wk.

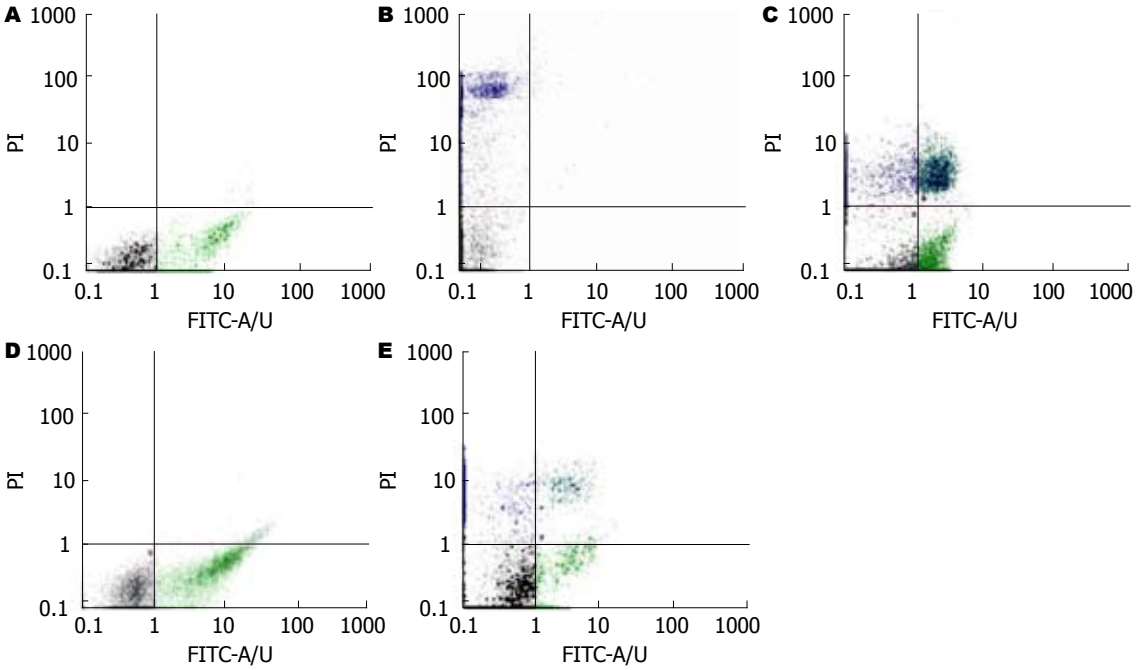


图 2 各组大鼠流式细胞术检测肝细胞凋亡情况. A: C组; B−E: F组2 wk, 4 wk, 8 wk, 12 wk.

TC、TG升高, 肝组织学上有肝细胞脂肪变、坏死、炎症细胞浸润或伴有肝纤维化, 且随着造模时间的延长肝细胞凋亡显著增加.

肝细胞是否发生凋亡主要受死亡受体信号转导通路、线粒体信号通路和内质网途径调控[13-15]. 死亡受体信号转导通路中的Fas是一种跨膜蛋白, 属于肿瘤坏死因子受体超家族成员, 在细胞凋亡中具有信号传导作用[16]. 他与FasL结合可以启动致死性凋亡信号的转导促进细胞凋亡, 细胞高表达的Fas蛋白与组织中可溶性FasL结合[17], 导致Fas相关死亡域蛋白(Fas-associated death domain protein, FADD)的募集, 形成死亡诱导信号复合体(death-inducing signaling complex, DISC), 激活proCaspase-8, 引起上游启始Caspase-8释[18,19], 既而活化Caspase-3、Caspase-6、Caspase-7等, 从而启动了Caspase家族酶链反应[20,21], 最终作用于细胞的结构蛋白, 导致细胞凋亡的发生[22]. Caspase-8是细胞凋亡上游关键酶, 是重要的凋亡启动因子, 其几乎能激活所有凋亡级联反应下游的Caspase而诱发凋[23,24]. 本实

表 1 Fas/FasL, Bcl-2/Bax, Caspase-8 mRNA蛋白在两组大鼠肝组织中的表达 ($\bar{x}\pm s$值, n = 5)

分组	Fas	FasL	Bcl-2	Bax	Bcl-2/Bax	Caspase-8 mRNA ($2^{-\triangle\triangle Ct}$)
C组						
2 wk	5.43 ± 0.97[b]	6.10 ± 0.48	3.87 ± 0.76	7.98 ± 0.34	0.48 ± 0.17	1.03 ± 0.24[b]
4 wk	4.68 ± 1.24[b]	6.35 ± 0.58[b]	4.13 ± 0.97[b]	8.70 ± 0.66[b]	0.46 ± 0.16	1.10 ± 0.36[b]
8 wk	6.70 ± 1.82[b]	8.25 ± 1.59[b]	5.63 ± 1.31[b]	8.70 ± 0.74[b]	0.63 ± 0.18	1.87 ± 0.56[b]
12 wk	4.51 ± 2.26[b]	9.43 ± 1.75[b]	6.42 ± 2.25	29.45 ± 1.45[b]	0.67 ± 0.21	1.92 ± 0.65[a]
F组						
2 wk	9.90 ± 3.93	8.87 ± 0.76[d]	4.74 ± 0.37	9.53 ± 1.51[d]	0.48 ± 0.24	2.54 ± 0.32[d]
4 wk	11.90 ± 5.49	17.00 ± 1.34[f]	6.18 ± 1.58	24.60 ± 2.81[f]	0.29 ± 0.14	5.46 ± 0.93[f]
8 wk	14.42 ± 6.31	30.10 ± 7.31	8.94 ± 1.56	37.90 ± 1.69[h]	0.21 ± 0.12	8.15 ± 1.48[h]
12 wk	18.43 ± 5.47	39.57 ± 6.43	9.16 ± 3.42	46.00 ± 3.22	0.18 ± 0.08	17.40 ± 1.97

[b]P<0.01 *vs* 各时间点F组; [d]P<0.01 *vs* 4 wk F组; [f]P<0.01 *vs* F组8 wk; [h]P<0.01 *vs* F组12 wk.

■应用要点

Fas、FasL、Caspase-8相关调控蛋白的活化是引起NAFLD脂肪变性、炎症及纤维化的重要因素. 细胞凋亡调节蛋白Bax、Bcl-2表达上调, 二者表达的相对比例发生异常, 这可能是NAFLD中肝细胞发生凋亡的重要原因之一.

验结果显示, F组Fas、FasL及Caspase-8 mRNA表达随着NAFLD的肝脂肪变程度加重, 其表达量都逐渐升高, 且与NAFLD的肝脂肪变程度和肝细胞凋亡百分数水平均呈正相关, 表明肝脏病变的发生、发展与Fas、FasL及Caspase-8的表达上调有关, 其可能的机制为: 高脂饮食造成肝脂肪变性, 脂肪分解产生游离脂肪酸(free fatty acids, FFA), FFA的脂毒性能诱导致肝细胞脂性凋亡, 诱发氧化应激, 产生大量的活性氧(reactive oxygen species, ROS), ROS的产生可激活Fas/FasL系统, 进一步导致Fas致死区结构蛋白募聚下游Caspase家族成员[25,26], 形成蛋白酶促级联反应, 导致肝细胞凋亡.

在线粒体调控细胞凋亡的体系中, Bcl-2及其家族成员共同构成一个非常复杂的相互作用的网络, 调控细胞凋亡[27]. 其中Bcl-2、Bax是最重要的代表. 在NAFLD形成过程中, 脂肪变性与氧应激使Bax合成增加并移至线粒体外膜, 改变构型形成同源二聚体后诱导线粒体PT孔开放、细胞色素C释放, 引起细胞凋亡; 而Bcl-2主要分布于线粒体外膜上, 他的同源二聚体抑制PT孔开放, 而且他与Bax结合后可以防止Bax构型改变从而起到抗凋亡的作用[28,29]. 因此Bcl-2抑制凋亡, Bax促进凋亡, Bcl-2蛋白与Bax蛋白的比值与细胞凋亡的发生有直接关系, 有学者甚至将Bcl-2和Bax的比值称作“凋亡开关”. Bax蛋白占优时细胞凋亡, Bcl-2蛋白占优时则细胞存活[30]. 本实验显示, Bcl-2蛋白、Bax蛋白在NAFLD肝细胞中的表达均较正常对照组增加, 二者均被诱导活化, 但在肝脏脂肪变及炎变发展的过程中, Bax蛋白的表达较Bcl-2蛋白增加明显, Bcl-2/Bax比值进行性降低, 而肝细胞的凋亡百分数则显著增加, 且Bcl-2/Bax相对比值与肝细胞凋亡百分数水平呈负相关. 由此可推测Bcl-2、Bax比例失调可能是肝细胞凋亡增加的重要原因之一.

总之, 本实验通过动态肝细胞凋亡百分数、肝脏Fas/FasL、Bcl-2/Bax、Caspase-8的表达, 细胞凋亡分子因素Fas/FasL、Bcl-2/Bax、Caspase-8与肝细胞凋亡亦紧密相连, 随着对NAFLD中肝细胞凋亡的深入研究, 能够进一步探明NAFLD的发病机制, 为细胞凋亡运用于NAFLD的诊治提供有力的理论依据, 给临床NAFLD的诊断、治疗、及预后判定开辟一条新的途径.

4 参考文献

1 Björnsson E, Angulo P. Non-alcoholic fatty liver disease. *Scand J Gastroenterol* 2007; 42: 1023-1030

2 Duvnjak M, Lerotić I, Barsić N, Tomasić V, Virović Jukić L, Velagić V. Pathogenesis and management issues for non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 4539-4550

3 Manco M, Bottazzo G, DeVito R, Marcellini M, Mingrone G, Nobili V. Nonalcoholic fatty liver disease in children. *J Am Coll Nutr* 2008; 27: 667-676

4 Browning JD, Horton JD. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J Clin Invest* 2004; 114: 147-152

5 Smith BW, Adams LA. Non-alcoholic fatty liver disease. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2011; 48: 97-113

6 Argo CK, Northup PG, Al-Osaimi AM, Caldwell SH. Systematic review of risk factors for fibrosis progression in non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* 2009; 51: 371-379

7 Feldstein AE, Canbay A, Angulo P, Taniai M, Burgart LJ, Lindor KD, Gores GJ. Hepatocyte apoptosis and fas expression are prominent features of human nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 2003; 125: 437-443

8 Nan YM, Wu WJ, Yao XX, Wang L. [The role of apoptosis and the related genes in non-alcoholic

■同行评价
本文对于研究非酒精性脂肪性肝病发病机制很有意义，具有一定的指导意义.

steatohepatitis]. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2007; 15: 41-46

9 解燕茹, 赵和平. 非酒精性脂肪性肝炎大鼠肝组织Bcl-2和Bax的表达及其意义. 实用肝脏病杂志 2009; 12: 411-413

10 王倩, 管小琴. 大鼠非酒精性脂肪肝造模方法的改进. 世界华人消化杂志 2007; 15: 1219-1224

11 Wieckowska A, Zein NN, Yerian LM, Lopez AR, McCullough AJ, Feldstein AE. In vivo assessment of liver cell apoptosis as a novel biomarker of disease severity in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2006; 44: 27-33

12 Canbay A, Friedman S, Gores GJ. Apoptosis: the nexus of liver injury and fibrosis. *Hepatology* 2004; 39: 273-278

13 Harper N, Hughes M, MacFarlane M, Cohen GM. Fas-associated death domain protein and caspase-8 are not recruited to the tumor necrosis factor receptor 1 signaling complex during tumor necrosis factor-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2003; 278: 25534-25541

14 Daniel PT. Dissecting the pathways to death. *Leukemia* 2000; 14: 2035-2044

15 李鹏, 李昌平. 细胞凋亡在非酒精性脂肪性肝病中的作用. 世界华人消化杂志 2008; 16: 2253-2258

16 Contassot E, Gaide O, French LE. Death receptors and apoptosis. *Dermatol Clin* 2007; 25: 487-501, vii

17 Iwase M, Kondo G, Watanabe H, Takaoka S, Uchida M, Ohashi M, Nagumo M. Regulation of Fas-mediated apoptosis in neutrophils after surgery-induced acute inflammation. *J Surg Res* 2006; 134: 114-123

18 Wong GH, Goeddel DV. Fas antigen and p55 TNF receptor signal apoptosis through distinct pathways. *J Immunol* 1994; 152: 1751-1755

19 Yin XM, Ding WX. Death receptor activation-induced hepatocyte apoptosis and liver injury. *Curr Mol Med* 2003; 3: 491-508

20 Chen M, Orozco A, Spencer DM, Wang J. Activation of initiator caspases through a stable dimeric intermediate. *J Biol Chem* 2002; 277: 50761-50767

21 Kim K, Fisher MJ, Xu SQ, el-Deiry WS. Molecular determinants of response to TRAIL in killing of normal and cancer cells. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 335-346

22 Fan TJ, Han LH, Cong RS, Liang J. Caspase family proteases and apoptosis. *Acta Biochim Biophys Sin* (Shanghai) 2005; 37: 719-727

23 贾庆华; 杨霄鹏; 惠玲; 哈小琴; 王晓辉. 醋酸铅对人肾小球系膜细胞凋亡及Caspase-3表达的影响. 解放军医学杂志 2012; 37: 628-631

24 Häcker G, Paschen SA. Therapeutic targets in the mitochondrial apoptotic pathway. *Expert Opin Ther Targets* 2007; 11: 515-526

25 南月敏, 乔梁, 于君, 吴文娟, 姚希贤. Fas及其配体诱导非酒精性脂肪性肝炎肝细胞凋亡. 中华消化杂志 2006; 26: 841-842

26 Begriche K, Igoudjil A, Pessayre D, Fromenty B. Mitochondrial dysfunction in NASH: causes, consequences and possible means to prevent it. *Mitochondrion* 2006; 6: 1-28

27 Akcali KC, Dalgic A, Ucar A, Haj KB, Guvenc D. Expression of bcl-2 gene family during resection induced liver regeneration: comparison between hepatectomized and sham groups. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 279-283

28 Pastorino JG, Shulga N, Hoek JB. TNF-alpha-induced cell death in ethanol-exposed cells depends on p38 MAPK signaling but is independent of Bid and caspase-8. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003; 285: G503-G516

29 Chen DF, Wang CH. [The relationship between the opening of mitochondrial permeability transition pores of cultured hepatocytes with their apoptoses in a non-alcoholic fatty liver disease model]. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2007; 15: 837-839

30 Panasiuk A, Dzieciol J, Panasiuk B, Prokopowicz D. Expression of p53, Bax and Bcl-2 proteins in hepatocytes in non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 6198-6202

编辑 翟欢欢 电编 鲁亚静

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2012年12月28日; 20(36): 3767-3772
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

研究快报 RAPID COMMUNICATION

利用荷H22腹水瘤小鼠恶性腹水模型比较培美曲塞腹腔用药与静脉用药的疗效

李永强, 潘琦津, 刘志辉, 胡晓桦, 廖小莉, 黄世庆

李永强, 潘琦津, 刘志辉, 胡晓桦, 廖小莉, 广西医科大学附属肿瘤医院化疗一科 广西壮族自治区南宁市 530021
黄世庆, 右江民族医学院附属医院肿瘤科 广西壮族自治区百色市 533000
李永强, 副主任医师, 主要从事肿瘤内科, 尤其是消化系肿瘤的临床诊治和研究工作.
广西卫生厅重点科研课题基金资助项目, No. 重200869
作者贡献分布: 此课题由李永强设计; 研究过程李永强、潘琦津、刘志辉、胡晓桦、 廖小莉及黄世庆操作完成; 研究所用试剂及分析工具由刘志辉提供; 数据分析由李永强、潘琦津及刘志辉完成; 本论文写作由李永强、潘琦津、刘志辉、胡晓桦及黄世庆完成.
通讯作者: 刘志辉, 副教授, 530021, 广西壮族自治区南宁市河堤路71号, 广西医科大学附属肿瘤医院化疗一科.
lzhh101@sina.com
电话: 0771-5333058
收稿日期: 2012-08-09 修回日期: 2012-11-15
接受日期: 2012-12-20 在线出版日期: 2012-12-28

Efficacy of intraperitoneal versus intravenous pemetrexed administration in management of malignant ascites in mice bearing ascitic hepatoma-22

Yong-Qiang Li, Qi-Jin Pan, Zhi-Hui Liu, Xiao-Hua Hu, Xiao-Li Liao, Shi-Qing Huang

Yong-Qiang Li, Qi-Jin Pan, Zhi-Hui Liu, Xiao-Hua Hu, Xiao-Li Liao, Department of Chemotherapy (Division I), Affiliated Tumor Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China
Shi-Qing Huang, Department of Oncology, Affiliated Hospital of Youjiang Medical College for Nationalities, Baise 533000, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China
Supported by: the Key Scientific Research Project of Health Department of Guangxi Zhuang Autonomous Region, No. 200869
Correspondence to: Zhi-Hui Liu, Associate Professor, Department of Chemotherapy (Division I), Affiliated Tumor Hospital of Guangxi Medical University, 71 Hedi Road, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. lzhh101@sina.com
Received: 2012-08-09 Revised: 2012-11-15
Accepted: 2012-12-20 Published online: 2012-12-28

Abstract

AIM: To compare the effectiveness of intraperitonea and intravenous administration of pemetrexed (PEM) in the management of malignant ascites in mice bearing hepatoma-22 (H22).

METHODS: A mouse model of ascites was established by intraperitoneal injection of 0.2 mL of H22 cell suspension (at a density of 1 × 10^7/mL cells). The mice were randomly divided into three groups at random on day 5 after induction of ascites (n = 18 per group): normal control group (normal saline), intraperitoneal pemetrexed group (PEM 300 mg/kg), and intravenous pemetrexed group (PEM 300 mg/kg). Pemetrexed was injected intraperitoneally or intravenously on days 5 and 8. The body weight, abdomen circumference and behavior of the mice were measured daily. Eight mice of each group were sacrificed on day 11 to measure the volume of ascites. The survival time of rest mice were recorded.

RESULTS: The mean volumes of ascites in the normal control group, intraperitoneal pemetrexed group and intravenous pemetrexed group were 15.74 mL ± 1.71 mL, 13.31 mL ± 2.45 mL and 8.58 mL ± 1.89 mL, respectively. In comparison to the normal control group, the two pemetrexed treatment group had significantly less production of ascites in (both $P < 0.05$). The mean volume of ascites in the intraperitoneal pemetrexed group was significantly lower than that in the intravenous administration group ($P < 0.01$). The mean survival times of mice in the intraperitoneal pemetrexed group, intravenous pemetrexed group, and normal control group were 15.10 d ± 0.46 d, 17.90 d ±0.71 d, and 14.20 d ± 0.44 d, respectively. The survival time was prolonged by 6.34% and 26.06% in the intraperitoneal pemetrexed group and intravenous pemetrexed group compared to the normal control group. There was no significant difference in the survival time between the intraperitoneal pemetrexed group and normal control group ($P > 0.05$), but the mean survival time was significantly longer in the intravenous pemetrexed group than in the normal control group and intraperitoneal pemetrexed group (both $P < 0.01$).

CONCLUSION: Intraperitoneal administration of pemetrexed is not superior to traditional intrave-

■背景资料
恶性肿瘤患者腹水的出现常作为预后不良的指标之一. 虽然目前治疗腹水的方法较多, 但至今仍缺乏特效的手段, 腹腔内化疗是局部治疗腹水的常用方法之一. 培美曲塞腹腔内用药仅处于药物代谢动力学研究阶段, 目前国内外尚无培美曲塞腹腔内用药的药效学研究报道. 本研究旨在比较培美曲塞腹腔用药与静脉用药两种途径对荷H22腹水瘤小鼠恶性腹水的抑制作用. 为进一步临床开展培美曲塞腹腔用药治疗恶性腹水提供理论基础.

■同行评议者
金瑞, 教授, 首都医科大学附属北京佑安医院消化科

■研发前沿
腔隙内给药可提高腔隙内药物浓度并可能降低血浆中药物浓度，进而可能获得相对静脉用药时更高的疗效及较低的全身不良反应. 培美曲塞对多种实体瘤的生长具有抑制作用. 在基础研究中，培美曲塞腔隙内用药的药物代谢动力学研究成为近年肿瘤研究领域的热点，旨在为进一步药效学实验研究及临床研究提供依据.

nous administration in the management of malignant ascites in mice bearing ascitic hepatoma-22.

Key Words: Pemetrexed; Ascites therapy; Intraperitoneal; Drug therapy; Animal model

Li YQ, Pan QJ, Liu ZH, Hu XH, Liao XL, Huang SQ. Efficacy of intraperitoneal versus intravenous pemetrexed administration in management of malignant ascites in mice bearing ascitic hepatoma-22. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(36): 3767-3772

摘要

目的: 比较培美曲塞腹腔用药与静脉用药两种途径对荷H22腹水瘤小鼠恶性腹水的抑制作用.

方法: ♂昆明小鼠腹腔内注射密度为1×10^7/mL H22瘤细胞悬液0.2 mL(含H22细胞数2×10^6)制备恶性腹水小鼠模型. 小鼠造模为第0天, 荷瘤小鼠出现腹水(第5天)后立即按体质量随机分成3组, 每组18只. 分别为: 空白对照组(等体积生理盐水, 腹腔用药)、培美曲塞腹腔用药组(培美曲塞300 mg/kg, 腹腔用药)、培美曲塞静脉用药组(培美曲塞300 mg/kg, 静脉用药), 用药时间均为d 5、d 8. 每天测量小鼠的体质量、腹围, 并观察其日常生活状态, 第11天处死各组8只小鼠测量腹水量. 其余剩下小鼠观察其生存时间, 计算生命延长率.

结果: 空白对照组、培美曲塞腹腔用药及静脉用药组小鼠腹水量分别为15.74 mL±1.71 mL、13.31 mL±2.45 mL、8.58 mL±1.89 mL. 与空白对照组比较, 培美曲塞用药两组小鼠腹水量均可减少($P<0.05$), 但培美曲塞静脉用药组小鼠腹水量明显较培美曲塞腹腔用药组减少($P<0.01$). 培美曲塞腹腔用药及静脉用药组小鼠平均生存时间分别为15.10 d±0.46 d、17.90 d±0.71 d, 较空白对照组14.20 d±0.44 d延长, 生命延长率分别为6.34%、26.06%. 培美曲塞腹腔用药组小鼠生存时间与空白对照组无差异($P>0.05$), 而培美曲塞静脉用药组与空白对照组及培美曲塞腹腔用药组比较, 均可明显延长小鼠生存时间($P<0.01$).

结论: 培美曲塞腹腔用药途径治疗荷H22腹水瘤小鼠疗效并不优于传统静脉用药.

关键词: 培美曲塞; 腹水/治疗; 腹腔内注射; 肿瘤/药物疗法; 动物模型

李永强, 潘琦津, 刘志辉, 胡晓桦, 廖小莉, 黄世庆. 利用荷H22腹水瘤小鼠恶性腹水模型比较培美曲塞腹腔用药与静脉用药的疗效. 世界华人消化杂志 2012; 20(36): 3767-3772
http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3767.asp

0 引言

培美曲塞(pemetrexed, PEM)为新型多靶点抗代谢类药物, 其在晚期恶性胸膜间皮瘤、晚期非小细胞肺癌化疗中得到广泛应用, 且在腹部肿瘤(如结肠癌、胰腺癌、胃癌、卵巢癌等)中亦显示出抗瘤作用[1]. 晚期腹部肿瘤常出现腹腔扩散, 而腹腔内化疗在腹部肿瘤中治疗中占有重要地位, 其与系统化疗相比, 具有腹腔药物高浓度及系统低浓度的优点而提高疗效及降低全身不良反应[2]. 然而, 并非所有化疗药物均适合腹腔内给药, 理想腹腔内使用药物应具备以下特点: 对腹膜刺激小、高分子量、低脂溶性、不需肝脏活化、能直接或通过肿瘤组织内代谢杀死肿瘤细胞[3]. 目前基础研究认为培美曲塞的药理学特点符合上述条件, 其可用于腹腔内用药[4]. 但培美曲塞腹腔用药的研究现仅处于药理学研究阶段, 目前国内外尚无培美曲塞腹腔用药与静脉用药的药效学比较研究报道. 本研究利用荷H22腹水瘤小鼠恶性腹水模型, 旨在比较培美曲塞腹腔用药与静脉用药两种途径对荷H22腹水瘤小鼠恶性腹水的抑制作用.

1 材料和方法

1.1 材料 培美曲塞二钠(江苏豪森), 台盼蓝(Sigma), 叶酸(Sigma). 净化工作台(苏州净化), 台式离心机(上海安亭), 倒置显微镜(南京江南). SPF级♂昆明(KM)小鼠54只, 4-5周龄, 体质量16-18 g, 由广西医科大学实验动物中心提供, 动物许可证号: SCXK桂2011-0003. 荷肝癌H22腹水瘤模型小鼠购自广西中医药研究所, 现由本实验室KM小鼠腹腔内接种保存. 实验小鼠饲养于室温24 ℃±2 ℃, 相对湿度40%-60%, 12 h光照、12 h黑暗的实验室中, 自由摄取食物和水. 动物适应性饲养3 d, 实验过程中喂食小鼠标准颗粒饲料(购自广西医科大学实验动物中心)并给予叶酸15 mg/(kg•d)灌胃.

1.2 方法

1.2.1 荷鼠肝癌H22腹水瘤小鼠模型的制作: 取传代第7天荷鼠肝癌H22腹水瘤模型小鼠1只, 颈椎脱臼法处死, 于超净台下无菌操作吸取小鼠腹腔乳白色瘤液3 mL, 移入离心管离心(1 000 r/min, 5 min), 收集H22细胞. 用生理盐水轻轻吹打后离心(1 000 r/min, 5 min), 弃上清, 生理盐水

调整瘤细胞悬液浓度为1×10^7/mL, 经0.4%台盼蓝染色镜检细胞存活率≥95%. 用75%乙醇消毒小鼠腹部, 小鼠腹腔注射瘤细胞悬液0.2 mL/只(相当于瘤细胞数2×10^6/只). 整个过程严格无菌操作, 接种于1 h内完成.

1.2.2 实验小鼠分组与用药: 荷瘤小鼠开始出现腹水(第5天)时, 利用EXCEl产生随机数字法按体质量随机分成3组, 每组18只, 分别为: 空白对照组(等剂量生理盐水)、培美曲塞腹腔用药组(培美曲塞300 mg/kg, 腹腔用药)、培美曲塞静脉用药组(培美曲塞300 mg/kg, 静脉用药). 小鼠腹腔内接种H22瘤细胞为第0天, 小鼠分组后立即给予用药, 第8天亦用药一次, 即用药时间为d 5、d 8[5].

1.2.3 观测指标: (1)一般观测指标: 用药期间观察各组小鼠毛色, 活动状况及精神状态等一般生活状况, 称量体质量、测量腹围, 连续观察其变化; (2)测量各组小鼠腹水量: 实验进行第11天时, 颈椎脱位法随机处死各组8只小鼠, 利用无菌注射器抽取腹水并测量腹水量; (3)各组小鼠生存期观察: 其余剩下各组实验小鼠记录死亡时间, 并计算生命延长率. 生命延长率ILS(%) = [(给药组平均生存天数/空白对照组平均生存天数)-1]×100%.

统计学处理 采用SPSS13.0 for windows统计软件进行统计学处理, 数据采取均数±标准差(mean±SD)表示, 组间比较采用完全随机设计的方差分析, 方差齐时用LSD法进行两两比较, 方差不齐时用Games-Howell法进行两两比较. 采用Kaplan-Meier曲线描述生存时间, 并使用Log-rank检验进行生存期分析. 以$\alpha = 0.05$为检验水准, $P<0.05$认为差异有统计学意义, $P<0.01$认为差异显著性.

2 结果

2.1 各组荷瘤体质量与腹围变化情况 荷H22腹水瘤小鼠生存时间短, 短期内因大量腹水生成而至体质量及腹围值变化大, 因此其体质量和腹围值可间接反映荷瘤小鼠腹水量. 空白对照组小鼠体质量及腹围值增长迅速, 曲线呈陡直直线. 培美曲塞腹腔用药组小鼠体质量及腹围值增长亦较迅速, 曲线亦呈陡直直线, 但斜率较空白对照组小. 而培美曲塞静脉用药组小鼠体质量、腹围增长缓慢, 曲线较另外两组低平. 第11天培美曲塞腹腔用药及静脉用药组小鼠体质量均显著低于空白对照组($P<0.01$), 而培美曲塞静脉用药组体质量低于培美曲塞腹腔用药组, 但差异未达统计学意义($P = 0.07$). 培美曲塞腹腔用药及静脉用药组小鼠腹围均显著低于空白对照组($P<0.01$), 而培美曲塞静脉用药组体质量低于培美曲塞腹腔用药组, 差异具有统计学意义($P<0.01$, 图1).

2.2 各组荷瘤小鼠腹水量 空白对照组、培美曲塞腹腔用药组及培美曲塞静脉用药组小鼠腹水量分别为15.74 mL±1.71 mL、13.31 mL±2.45 mL、8.58 mL±1.89 mL. 与空白对照组比较, 培美曲塞不同用药途径均可抑制荷瘤小鼠腹水的生成($P<0.05$), 但培美曲塞静脉用药组小鼠腹水量明显较培美曲塞腹腔用药组减少($P<0.01$, 图2).

2.3 各组荷瘤小鼠生存时间 培美曲塞腹腔用药组及静脉用药组小鼠平均生存时间分别为15.10 d±0.46 d、17.90 d±0.71 d, 不同程度上较空白对照组14.20 d±0.44 d延长, 生命延长率分别为6.34%、26.06%. 培美曲塞腹腔用药组小鼠生命延长无统计学差异($P>0.05$), 而培美曲塞静脉用药组与空白对照组及培美曲塞静脉用药比较, 生存时间差异均具有统计学意义($P<0.01$, 图3).

3 讨论

恶性腹水是恶性肿瘤引起腹膜腔内液体异常蓄积[6]. 常引起恶性腹水的肿瘤有卵巢癌(36.7%)、胰腺癌(21.0%)、胃癌(8.3%)、食管癌及结直肠癌(各4.0%)、乳腺癌(3.0%)等[7]. 恶性腹水患者预后差, 除乳腺癌及卵巢癌患者外, 其中位生存期为1-4 mo. 目前, 临床上治疗恶性腹水仍缺乏特效的手段, 而腹腔内化疗占有重要的地位. 腹腔内化疗本身亦具有其局限性, 如出现腹腔感染、肠黏连、肠穿孔、肠出血等不良反应的机率增加[8]. 因此腹腔内化疗必须衡量疗效与不良反应两方面, 其对药物的选择较为严格.

培美曲塞分子量为471.384, 为高分子量药物. 其具有脂溶性低的物理特点, 有报道动物静脉使用培美曲塞后中枢神经系统内药物浓度极低[9]. 培美曲塞不需肝脏代谢, 可直接通过还原型叶酸载体(reduced folate carrier, RFC)、叶酸盐受体(folate receptor, FR)、质子偶联叶酸转运体(proton-coupled folate transporter, PCFT)3种途径进入肿瘤细胞内, 在细胞内叶酰多聚谷氨酸合酶(folypolyglutamate synthetase, FPGS)的作用下, 转化为多聚谷氨酸盐, 后者和其单体共同抑制细胞体内和与嘌呤、胸腺合成有关的多种酶系, 进而干扰DNR及RNA合成而达到抑制肿瘤

■相关报道

在前临床试验中, 有报道动物使用培美曲塞于腹膜腔内、胸膜腔内、膀胱内、鞘内用药的药理学研究以及使用培美曲塞肝动脉/门静脉栓塞化疗治疗大鼠结肠癌肝转移的探索. Pestieau等使用正常大鼠比较培美曲塞腹腔用药与静脉用药的药物代谢动力学、机体组织药物浓度的差异. 提出培美曲塞腹腔用药可能存在临床前景.

■创新盘点

本研究利用鼠肝癌H22细胞株建立小鼠恶性腹水模型，然后比较培美曲塞腹腔用药与静脉用药对恶性腹水的抑制作用. 用药时间为小鼠出现腹水后，与临床上治疗恶性腹水模式相同，更能真实反映药物治疗恶性腹水的疗效.

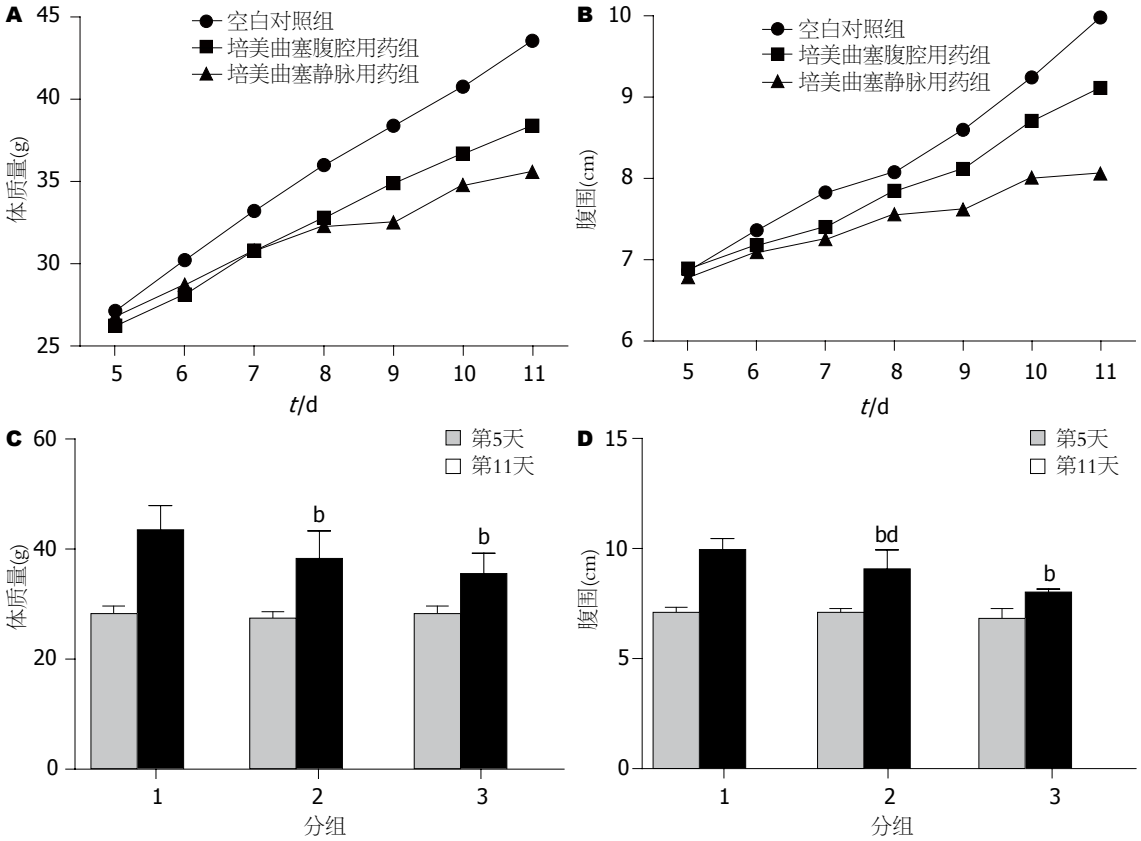


图 1 各组荷瘤体质量与腹围变化情况. A: 各组小鼠用药期间体质量变化趋势图; B: 各组小鼠用药期间腹围变化趋势图; C: 各组小鼠治疗前及治疗后体质量值变化图; D: 各组小鼠治疗前及治疗后腹围值变化图; 1: 空白对照组; 2: 培美曲塞腹腔用药组; 3: 培美曲塞静脉用药组. $^{b}P<0.01$ *vs* 空白对照组; $^{d}P<0.01$ *vs* 培美曲塞静脉用药组.

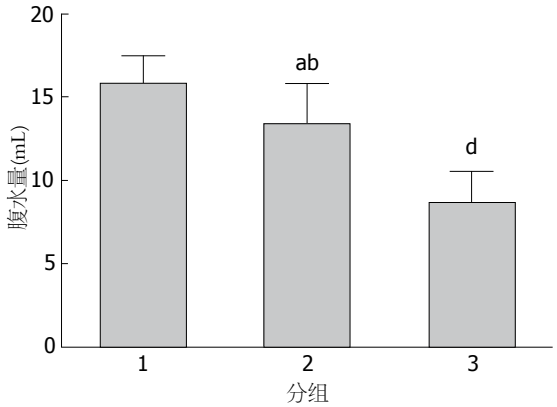


图 2 第11天各组小鼠腹水量(n = 8). 1: 空白对照组; 2: 培美曲塞腹腔用药组; 3: 培美曲塞静脉用药组. $^{b}P<0.01$ *vs* 空白对照组; $^{a}P<0.05$ *vs* 空白对照组; $^{d}P<0.01$ *vs* 培美曲塞静脉用药组.

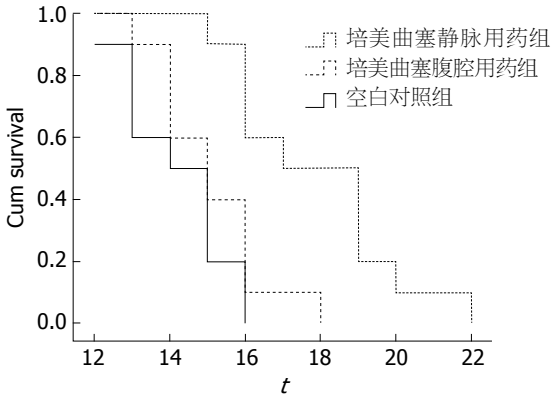


图 3 各组小鼠生存曲线图(n = 10).

生长的作用[10]. 因此，从培美曲塞药物学特征考虑其符合腹腔内使用药物的特点.

Pestieau等[4]使用正常大鼠比较培美曲塞腹腔用药与静脉用药的药物代谢动力学、机体组织药物浓度的差异. 结果表明培美曲塞腹腔用药与静脉用药相比，可以减少SD大鼠培美曲塞系统暴露的同时增加腹腔脏器表面暴露(约为静脉用药的24倍). 此外，对比培美曲塞两种不同用药途径给药3 h后，腹腔用药组大鼠肠系膜淋巴结和腹壁药物浓度亦较静脉用药组高，而肾脏药物浓度明显低于静脉用药组(约1/2). 从而提出培美曲塞腹腔用药可能存在临床前景.

目前临床使用培美曲塞是通过静脉滴注给药. 在前临床研究中，有报道动物使用培美曲塞于腹膜腔内[4]、胸膜腔内[11]、膀胱内[12]、鞘内用药[9]的药理学研究以及使用培美曲塞肝动脉

/门静脉栓塞化疗治疗大鼠结肠癌肝转移的探索[13]. 而培美曲塞腹腔用药现仅处于药理学研究阶段, 目前国内外尚无培美曲塞腹腔用药的药效学研究报道. 本研究利用荷H22腹水瘤小鼠恶性腹水模型, 比较培美曲塞腹腔用药与静脉用药两种途径对荷H22腹水瘤小鼠恶性腹水的抑制作用.

荷H22腹水瘤小鼠恶性腹水模型已广泛应用于肿瘤学的基础研究[14], 但在多数研究中, 动物腹腔接种H22细胞24 h后开始用药, 届时荷瘤小鼠尚无出现腹水, 与临床上治疗恶性腹水模式不同. 在本研究中, 小鼠腹腔接种瘤细胞后第5天开始给药, 此时荷瘤小鼠已开始出现腹水, 因此更能真实反映药物治疗恶性腹水的疗效. 在前期实验中我们发现腹腔使用培美曲塞10、50、90 mg/kg具有抑制H22腹水瘤小鼠腹水形成的作用, 但同时亦出现明显的不良反应(特别是血液学毒性)而致动物的死亡, 考虑可能与昆明小鼠体内叶酸贮存量及利用度小相关[15]. Backus等[16]认为在基础实验中细胞培养液及动物体内的叶酸水平应与人类血清浓度相近时才可真实反映抗代谢药物的抗肿瘤活性. 韩慧兰等[17]测定昆明小鼠食用普通饲料(叶酸含量约2 mg/kg)后血清叶酸浓度为28.38 nmol/L, 与人类叶酸值相近. 而国外报道裸鼠及Balb/c鼠食用叶酸含量为6 mg/kg的饲料后, 血清叶酸浓度分别约为700 nmol/L、250 nmol/L, 明显高于人类水平[18,19]. 因此, 本研究中动物选择为昆明小鼠较为真实反映培美曲塞的抗肿瘤活性. 但Worzalla等[20]使用CD 1 nu/nu和DBA/2小鼠分别给予标准饲料和低叶酸饲料(low folate diet, LFD)喂养. 经LFD喂养2 wk后, CD 1 nu/nu和DBA/2小鼠培美曲塞半数致死量(LD50)分别为1.6、10.0 mg/kg. 而使用标准饲料喂养时上述两系小鼠培美曲塞半数致死量分别是LFD组的250倍和60倍. 由此可见, 小鼠对培美曲塞最大耐受剂量跟小鼠品系及补充叶酸量有关. 在治疗皮下荷淋巴瘤DBA/2小鼠时, 添加叶酸仍可保留培美曲塞的抗瘤活性, 之后临床研究亦得到了证实[21].

本研究中培美曲塞通过腹腔及静脉途径给药均可抑制荷H22腹水瘤小鼠腹水的生成, 减缓了小鼠出现大量腹水而致活动受限、呼吸急促等症状出现的时间, 提高小鼠的生存质量. 但培美曲塞静脉用药在小鼠腹水量的减少及生命时间的延长上相比腹腔用药更具有优势, 提示培美曲塞腹腔用药治疗荷H22腹水瘤小鼠疗效并不优于传统的静脉用药. 临床上开展培美曲塞腹腔用药尚需进一步的研究以提供基础理论支持.

■**应用要点**
本研究提示培美曲塞腹腔用药治疗荷H22腹水瘤小鼠疗效并不优于传统的静脉用药. 临床上开展培美曲塞腹腔用药尚需进一步的实验研究.

4 参考文献

1 Hanauske AR, Chen V, Paoletti P, Niyikiza C. Pemetrexed disodium: a novel antifolate clinically active against multiple solid tumors. *Oncologist* 2001; 6: 363-373

2 Barni S, Cabiddu M, Ghilardi M, Petrelli F. A novel perspective for an orphan problem: old and new drugs for the medical management of malignant ascites. *Crit Rev Oncol Hematol* 2011; 79: 144-153

3 Markman M. Intraperitoneal antineoplastic drug delivery: rationale and results. *Lancet Oncol* 2003; 4: 277-283

4 Pestieau SR, Stuart OA, Sugarbaker PH. Multi-targeted antifolate (MTA): pharmacokinetics of intraperitoneal administration in a rat model. *Eur J Surg Oncol* 2000; 26: 696-700

5 Bertino P, Piccardi F, Porta C, Favoni R, Cilli M, Mutti L, Gaudino G. Imatinib mesylate enhances therapeutic effects of gemcitabine in human malignant mesothelioma xenografts. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 541-548

6 鲁伟, 崔光莹, 刁宏燕. 多项指标联合检测腹水临床意义研究. 中国实用内科杂志 2011; 31: 485

7 Ayantunde AA, Parsons SL. Pattern and prognostic factors in patients with malignant ascites: a retrospective study. *Ann Oncol* 2007; 18: 945-949

8 徐朝欢, 徐红, Xu Chao-Huan, Xu Hong. 卵巢癌腹腔化疗的进展. 中国癌症防治杂志 2009; 1: 188-190

9 Dai H, Chen Y, Elmquist WF. Distribution of the novel antifolate pemetrexed to the brain. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 315: 222-229

10 Nutt JE, Razak AR, O'Toole K, Black F, Quinn AE, Calvert AH, Plummer ER, Lunec J. The role of folate receptor alpha (FRalpha) in the response of malignant pleural mesothelioma to pemetrexed-containing chemotherapy. *Br J Cancer* 2010; 102: 553-560

11 Greillier L, Monjanel-Mouterde S, Fraticelli A, Devictor-Pierre B, Bouvenot J, Coltel N, Lamarche G, Astoul P. Intrapleural administration of pemetrexed: a pharmacokinetic study in an animal model. *J Thorac Oncol* 2009; 4: 404-408

12 Hendricksen K, Moonen PM, van der Heijden AG, Molkenboer-Kuenen J, Hulsbergen-van de Kaa CA, Witjes JA. Potential and toxicity of intravesical pemetrexed: a preclinical study in pigs. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 2597-2601

13 Rodenbach M, Eyol E, Seelig MH, Berger MR. Combination treatment of CC531-lac-Z rat liver metastases by chemoembolization with pemetrexed disodium and gemcitabine. *J Cancer Res Clin Oncol* 2005; 131: 289-299

14 李海燕, 方肇勤, 梁尚华. 小鼠移植性肝癌(H_(22))模型的研究及在中医药抗肿瘤中的应用. 中国中医基础医学杂志 2000; 6: 27-30

15 潘琦津, 李永强, 胡晓桦, 刘志辉, 廖小莉, 林燕. 培美曲塞腹腔用药对荷H22腹水瘤小鼠腹水抑制作用及其毒副反应的实验研究. 广西医学 2012; 34: 524-528

16 Backus HH, Pinedo HM, Wouters D, Padrón JM, Molders N, van Der Wilt CL, van Groeningen CJ, Jansen G, Peters GJ. Folate depletion increases sensitivity of solid tumor cell lines to 5-fluorouracil

■同行评价
本研究立题依据充分, 实验设计严谨, 实验动物和材料规范, 技术流程合理, 结果可信, 统计方法正确, 观点明确, 所引用的参考文献可以朔原, 对恶性肿瘤腹腔积液治疗的理论研究和临床治疗有一定参考价值.

and antifolates. *Int J Cancer* 2000; 87: 771-778
17 韩慧兰. 叶酸高分子复合物靶向抗肿瘤药效及机理的探讨. 复旦大学, 2004
18 Mathias CJ, Wang S, Lee RJ, Waters DJ, Low PS, Green MA. Tumor-selective radiopharmaceutical targeting via receptor-mediated endocytosis of gallium-67-deferoxamine-folate. *J Nucl Med* 1996; 37: 1003-1008
19 Leamon CP, Reddy JA, Dorton R, Bloomfield A, Emsweller K, Parker N, Westrick E. Impact of high and low folate diets on tissue folate receptor levels and antitumor responses toward folate-drug conjugates. *J Pharmacol Exp Ther* 2008; 327: 918-925
20 Worzalla JF, Shih C, Schultz RM. Role of folic acid in modulating the toxicity and efficacy of the multitargeted antifolate, LY231514. *Anticancer Res* 1998; 18: 3235-3239
21 Nakagawa K, Kudoh S, Matsui K, Negoro S, Yamamoto N, Latz JE, Adachi S, Fukuoka M. A phase I study of pemetrexed (LY231514) supplemented with folate and vitamin B12 in Japanese patients with solid tumours. *Br J Cancer* 2006; 95: 677-682

编辑 田滢 电编 鲁亚静

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》外文字符标准

本刊讯 本刊论文出现的外文字符应注意大小写、正斜体与上下角标. 静脉注射iv, 肌肉注射im, 腹腔注射ip, 皮下注射sc, 脑室注射icv, 动脉注射ia, 口服*po*, 灌胃ig. s(秒)不能写成S, kg不能写成Kg, mL不能写成ML, lcpm(应写为1/min)÷E%(仪器效率)÷60 = Bq, pH不能写PH或P^H, *H pylori*不能写成HP, T1/2不能写成tl/2或$T_{\frac{1}{2}}$, *V*max不能Vmax, μ不写为英文u. 需排斜体的外文字, 用斜体表示. 如生物学中拉丁学名的属名与种名, 包括亚属、亚种、变种. 如幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H.pylori*), *Ilex pubescens* Hook, *et* Arn.*var.glaber* Chang(命名者勿划横线); 常数*K*; 一些统计学符号(如样本数*n*, 均数mean, 标准差SD, *F*检验, *t*检验和概率*P*, 相关系数*r*); 化学名中标明取代位的元素、旋光性和构型符号(如*N*, *O*, *P*, *S*, *d*, *l*)如*n*-(normal, 正), *N*-(nitrogen, 氮), *o*-(ortho, 邻), *O*-(oxygen, 氧, 习惯不译), *d*-(dextro, 右旋), *p*-(para, 对), 例如*n*-butyl acetate(醋酸正丁酯), *N*-methylacetanilide(N-甲基乙酰苯胺), *o*-cresol(邻甲酚), 3-*O*-methyl-adrenaline(3-O-甲基肾上腺素), *d*-amphetamine(右旋苯丙胺), *l*-dopa(左旋多巴), *p*-aminosalicylic acid(对氨基水杨酸). 拉丁字及缩写*in vitro*, *in vivo*, *in situ*; Ibid, *et al*, *po*, *vs*; 用外文字母代表的物理量, 如*m*(质量), *V*(体积), *F*(力), *p*(压力), *W*(功), *v*(速度), *Q*(热量), *E*(电场强度), S(面积), *t*(时间), *z*(酶活性, kat), *t*(摄氏温度, ℃), *D*(吸收剂量, Gy), *A*(放射性活度, Bq), ρ(密度, 体积质量, g/L), *c*(浓度, mol/L), φ(体积分数, mL/L), *w*(质量分数, mg/g), *b*(质量摩尔浓度, mol/g), *l*(长度), *b*(宽度), *h*(高度), *d*(厚度), *R*(半径), *D*(直径), T_{max}, C_{max}, *V*d, $T_{1/2}$ *Cl*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.

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2012年12月28日; 20(36): 3773-3776
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

临床经验 CLINICAL PRACTICE

mir-21在食管鳞癌中的表达及其与临床病理行为的关系

赵俊刚, 任开明, 汤 隽, 张 磊

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、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@si-hospital.org
电话: 024-66601267
收稿日期: 2012-11-14 修回日期: 2012-12-07
接受日期: 2012-12-20 在线出版日期: 2012-12-28

Relationship between mir-21 expression and clinical and pathological features of 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 for Docotors of Liaoning Province, No. 20091108
Correspondence to: Jun-Gang Zhao, Associate Professor, Department of Thoracic Surgery, Shengjing Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. zhaoy3@si-hospital.org
Received: 2012-11-14 Revised: 2012-12-07
Accepted: 2012-12-20 Published online: 2012-12-28

Abstract

AIM: To investigate mir-21 expression in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) and to analyze its relationship with the clinical and pathological features of ESCC.

METHODS: Real-time RT-PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method were used to detect the expression of mir-21 in 96 cases of ESCC and tumor-adjacent tissue. The relationship between expression of mir-21 and clinical and pathological features of ESCC was analyzed.

RESULTS: Of 96 cases of ESCC specimens, mir-21 was highly expressed in 40 cases (41.6%). High mir-21 expression was closely related with the degree of tumor differentiation and TNM stage (both $P < 0.05$).

CONCLUSION: The high expression of mir-21 may play an important role in the occurrence and development of ESCC.

Key Words: Esophageal squamous cell carcinoma; Real-time RT-PCR; MicroRNA-21

Zhao JG, Ren KM, Tang J, Zhang L. Relationship between mir-21 expression and clinical and pathological features of esophageal squamous cell carcinoma. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(36): 3773-3776

摘要

目的: 探讨原发性食管鳞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)组织中mir-21的表达及其与ESCC临床病理行为的关系.

方法: 应用Real-time RT-PCR法及$2^{-\Delta\Delta CT}$分析法检测ESCC患者组织及相对应癌旁组织中mir-21的表达及其与ESCC临床病理行为的关系.

结果: 96例ESCC标本中, 40例(41.6%)mir-21存在高表达, mir-21高表达与患者分化程度、淋巴结转移及TNM分期密切相关(均$P<0.05$).

结论: 在原发性ESCC中, mir-21有较高的表达率, 与肿瘤的分化程度、淋巴结转移及TNM分期密切相关, 可能在ESCC的发生发展中有重要作用.

关键词: 食管鳞癌; Real-time RT-PCR; MicroRNA-21

赵俊刚, 任开明, 汤隽, 张磊. mir-21在食管鳞癌中的表达及其与临床病理行为的关系. 世界华人消化杂志 2012; 20(36): 3773-3776
http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3773.asp

0 引言

食管癌是世界范围内第6大导致死亡的恶性肿瘤, 在我国居第1位, 并且80%以上是食管鳞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC),

■背景资料
miRNAs在恶性肿瘤的发生发展中扮演重要角色. mir-21是miRNAs家族成员, 有研究表明mir-21与恶性肿瘤的发生发展关系密切, 但mir-21与ESCC的关系尚不明确.

■同行评议者
姜春萌, 教授, 主任, 大连医科大学附属第二医院消化科; 郭炜, 教授, 河北医科大学第四医院河北省肿瘤研究所病理研究室; 李瑗, 教授, 广西肿瘤研究所实验研究部

■研发前沿
本研究运用Real-time RT-PCR及$2^{-\Delta\Delta Ct}$分析法，检测96例ESCC组织及相对应癌旁组织中mir-21的表达变化，探讨原发性ESCC患者组织中mir-21的表达情况及其与ESCC临床病理行为的关系.

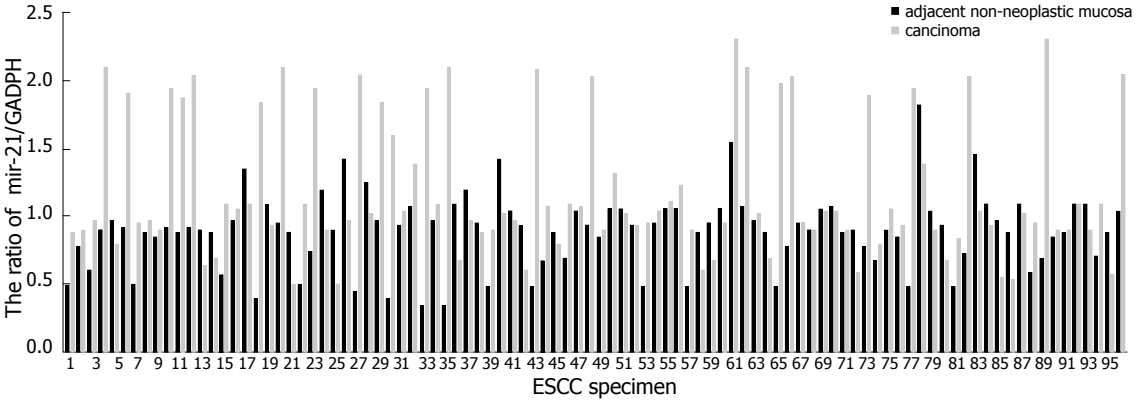


图 1 mir-21在食管鳞癌组织和相对应癌旁组织中的表达水平.

随着基础及临床研究的进展，ESCC的治疗有一定进步，但术后生存率仍不容乐观[1,2]. MicroRNAs(miRNAs)是最近发现的一组天然丰富的小RNA，长度为17-25个核苷酸[3]. 大量研究提示及证实miRNAs在恶性肿瘤的发生发展中扮演重要角色[4]. mir-21是miRNAs家族成员，有研究表明mir-21与恶性肿瘤的发生发展关系密切[5,6]，但mir-21与ESCC的关系尚不明确. 本研究运用Real-time RT-PCR及$2^{-\Delta\Delta Ct}$分析法，检测96例ESCC组织及相对应癌旁组织中mir-21的表达变化，探讨ESCC患者组织中mir-21的表达情况及其与ESCC临床病理行为的关系.

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胸外科食管癌手术切除标本96例. 癌旁组织取自距肿瘤边缘5 cm以上食管黏膜组织，并且经病理诊断证实为癌旁正常食管组织. 其中男69例，女27例，年龄42-79岁(中位年龄63.2岁). 按照国际抗癌联盟(UICC)2009年标准，高中分化71例，低分化25例. 病变位于食管上中段27例，下段69例. 伴有淋巴结转移53例，无淋巴结转移43例. TNM分期Ⅰ/Ⅱ期45例，Ⅲ/Ⅳ期51例. 全部肿瘤标本术后病理诊断为鳞状细胞癌，所有患者术前未接受放化疗. 上述组织切除后，用液氮冷冻并放置于-80 ℃冰箱中备用. RNA提取试剂盒购自QiQgen公司；反转录试剂盒购自Promega(美国)公司；RT-PCR试剂盒购自TakaRa(日本)公司，引物由南京金斯瑞公司提供.

1.2 方法 总RNA提取和Real-time RT-PCR检测mir-21的表达：总RNA采用TRIzol reagent提取，按照说明书的操作方法进行常规操作；然后使用RevertAid™ reverse transcriptase将这些RNA样品逆转录为cDNA. 然后进行PCR扩增，反应条件：50 ℃ 2 min, 95 ℃ 10 min, 95 ℃ 15 s, 50个循环, 60 ℃ 1 min. GAPDH作为内参，上游引物：5'-CAATGACCCCTTCATTGACC-3'，下游引物：5'-TGGAAGATGGTGATGGGATT-3'；mir-21上游引物：5'-TGACCACAGTCCATGCCATC-3'，下游引物：5'-CCACCCTGTTGCTGTAGCC-3'.

统计学处理 GAPDH mRNA作为内参来监控，通过$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算ESCC与癌旁组织胞之间目标miRNA表达水平的差异，mir-21的mRNA水平表示为$2^{-\Delta\Delta Ct}$，其中$\Delta Ct = Ct_{(mir\text{-}21)}-Ct_{(GAPDH)}$，$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{(肿瘤组织)}-\Delta Ct_{(正常组织)}$. 采用SPSS11.5统计学软件，使用Student's *t*-test进行数据统计. 以$P<0.05$判定有显著统计学意义.

2 结果

2.1 mir-21在ESCC组织中的表达 我们通过Real-time RT-PCR方法检测了96例ESCC标本组织及相对应癌旁组织中mir-21的表达情况，在96例ESCC标本中有40例(41.6%)出现了相对于癌旁组织的mir-21高表达($\Delta\Delta Ct<-1$). 14例(14.6%)出现了低表达($\Delta\Delta Ct>1$)，42例(43.7%)表达无明显差异($-1<\Delta\Delta Ct<1$)；mir-21在ESCC及相对应癌旁组织中的表达差异有统计学意义($P<0.05$, 图1).

2.2 mir-21的表达与ESCC临床病理行为的关系 经统计学分析发现，mir-21的高表达与患者分化程度、淋巴结转移及TNM分期密切相关，有淋巴结转移的ESCC标本中mir-21的表达明显高于无淋巴结转移组($\chi^2 = 5.913$, $P<0.05$)，低分化组ESCC标本中mir-21的表达明显高于高分化组($\chi^2 = 5.647$, $P<0.05$)，与患者的年龄、性别和肿瘤的位置无关(表1).

3 讨论

许多miRNA可作为原癌基因或抑癌基因，在

■相关报道
Wong等发现，在原发性胶质母细胞瘤组织中mir-21表达上调，证明mir-21不仅影响神经胶质瘤的形成，还能抑制神经胶质瘤对化疗药物的敏感性.

表 1 食管鳞癌患者组织中mir-21的表达与食管鳞癌临床病理行为的关系

临床资料	*n*	mean ± SD	*P*值
年龄(岁)			>0.05
≥60	63	0.9927 ± 0.1312	
<60	33	0.7275 ± 0.2039	
性别			>0.05
男	69	0.9735 ± 0.1513	
女	27	0.8279 ± 0.1987	
分化程度			0.039
低	25	1.5031 ± 0.5832	
中、高	71	0.7402 ± 0.0401	
肿瘤位置			>0.05
食管上中段	27	1.2135 ± 0.4423	
下段	69	1.0321 ± 0.2578	
淋巴转移			0.026
N0	43	0.8313 ± 0.0399	
N1/N2	53	1.6234 ± 0.7232	
TNM分期			0.017
Ⅰ/Ⅱ	45	1.3372 ± 0.4989	
Ⅲ/Ⅳ	51	1.5343 ± 0.5129	

肿瘤的发生发展中扮演着重要的角色[7,8], 其中mir-21最受人重视[9,10], 大量实验证明在多种肿瘤细胞中mir-21的表达均出现显著异常, 揭示mir-21作为一个致癌的miRNA[11], 在多种肿瘤的发生发展中起重要作用, mir-21可以抑制细胞凋亡而促进肿瘤增殖[12,13].

Wong等[14]发现, 在原发性胶质母细胞瘤组织中mir-21表达上调, 证明mir-21不仅影响神经胶质瘤的形成, 还能抑制神经胶质瘤对化疗药物的敏感性. Kurashige等[15]发现ESCC患者血清中mir-21表达下调, 化疗敏感者mir-21的水平明显下降, 提示血清mir-21的表达水平可能成为潜在的ESCC诊断生物标志物, 也可能作为化疗的反应标志物.

本研究采用Real-time RT-PCR法检测了96例ESCC患者组织中及相对应癌旁组织中mir-21的表达, 并用$2^{-\Delta\Delta Ct}$分析法分析96例ESCC患者组织及癌旁组织中mir-21的表达差异情况. 结果显示, 相对于癌旁组织, 96例ESCC标本中有40例(41.6%)出现mir-21的高表达, mir-21在ESCC及相对应癌旁组织中的表达差异有统计学意义. 研究结果表明, 在原发性ESCC中, mir-21有较高的表达率, 与肿瘤的分化程度、淋巴结转移及TNM分期密切相关, mir-21基因在ESCC发生发展中可能扮演着癌基因的角色.

mir-21与ESCC的关系的研究尚处于初步阶段, 对其深入研究有助于ESCC发生发展机制的探索, 将可能为ESCC的早期诊断、临床诊疗、提高化疗敏感性、提供更多理论依据[16-18].

■**创新盘点**
探讨原发性ESCC患者组织中mir-21的表达情况及其与ESCC临床病理行为的关系.

4 参考文献

1 Hao M, Chen X, Zhang T, Shen T, Xie Q, Xing X, Gu H, Lu F. Impaired nuclear export of tumor-derived c-terminal truncated cyclin D1 mutant in ESCC cancer. *Oncol Lett* 2011; 2: 1203-1211

2 Hasan R, Chauhan SS, Sharma R, Ralhan R. siRNA-mediated downregulation of TC21 sensitizes esophageal cancer cells to cisplatin. *World J Gastroenterol* 2012; 18: 4127-4135

3 Das N. MicroRNA Targets - How to predict? *Bioinformation* 2012; 8: 841-845

4 Wan SM, Lv F, Guan T. Identification of genes and microRNAs involved in ovarian carcinogenesis. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012; 13: 3997-4000

5 Kanaan Z, Rai SN, Eichenberger MR, Roberts H, Keskey B, Pan J, Galandiuk S. Plasma miR-21: a potential diagnostic marker of colorectal cancer. *Ann Surg* 2012; 256: 544-551

6 Han M, Wang Y, Liu M, Bi X, Bao J, Zeng N, Zhu Z, Mo Z, Wu C, Chen X. MiR-21 regulates epithelial-mesenchymal transition phenotype and hypoxia-inducible factor-1α expression in third-sphere forming breast cancer stem cell-like cells. *Cancer Sci* 2012; 103: 1058-1064

7 Jiao A, Slack FJ. MicroRNAs Micromanage Themselves. *Circ Res* 2012; 111: 1395-1397

8 Leonardo TR, Schultheisz HL, Loring JF, Laurent LC. The functions of microRNAs in pluripotency and reprogramming. *Nat Cell Biol* 2012; 14: 1114-1121

9 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

10 Bose D, Jayaraj G, Suryawanshi H, Agarwala P, Pore SK, Banerjee R, Maiti S. The tuberculosis drug streptomycin as a potential cancer therapeutic: inhibition of miR-21 function by directly targeting its precursor. *Angew Chem Int Ed Engl* 2012; 51: 1019-1023

11 Li Y, Li W, Ouyang Q, Hu S, Tang J. Detection of lung cancer with blood microRNA-21 expression levels in Chinese population. *Oncol Lett* 2011; 2: 991-994

12 Tavano F, di Mola FF, Piepoli A, Panza A, Copetti M, Burbaci FP, Latiano T, Pellegrini F, Maiello E, Andriulli A, di Sebastiano P. Changes in miR-143 and miR-21 expression and clinicopathological correlations in pancreatic cancers. *Pancreas* 2012; 41: 1280-1284

13 Han L, Yue X, Zhou X, Lan FM, You G, Zhang W, Zhang KL, Zhang CZ, Cheng JQ, Yu SZ, Pu PY, Jiang T, Kang CS. MicroRNA-21 expression is regulated by β-catenin/STAT3 pathway and promotes glioma cell invasion by direct targeting RECK. *CNS Neurosci Ther* 2012; 18: 573-583

14 Wong ST, Zhang XQ, Zhuang JT, Chan HL, Li CH, Leung GK. MicroRNA-21 inhibition enhances in vitro chemosensitivity of temozolomide-resistant glioblastoma cells. *Anticancer Res* 2012; 32: 2835-2841

15 Kurashige J, Kamohara H, Watanabe M, Tanaka Y, Kinoshita K, Saito S, Hiyoshi Y, Iwatsuki M, Baba Y, Baba H. Serum microRNA-21 is a novel biomarker in patients with esophageal squamous cell carci-

■**应用要点**
mir-21与ESCC的关系的研究尚处于初级阶段, 对其深入研究有助于ESCC发生发展机制的探索, 将可能为ESCC的早期诊断、临床诊疗、提高化疗敏感性、提供更多理论依据.

■同行评价
本文探讨食管鳞癌组织中mir-21的表达及其与ESCC临床病理行为的关系, 文章有一定的新颖性、科学性和可读性.

noma. *J Surg Oncol* 2012; 106: 188-192
16 Cai EH, Gao YX, Wei ZZ, Chen WY, Yu P, Li K. Serum miR-21 expression in human esophageal squamous cell carcinomas. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012; 13: 1563-1567
17 Zhu L, Yan W, Rodriguez-Canales J, Rosenberg AM, Hu N, Goldstein AM, Taylor PR, Erickson HS, Emmert-Buck MR, Tangrea MA. MicroRNA analysis of microdissected normal squamous esophageal epithelium and tumor cells. *Am J Cancer Res* 2011; 1: 574-584
18 朱炜. 术前新辅助放化疗与单纯手术对可切除食管癌疗效的Meta分析. 解放军医学杂志 2011; 36: 813-816

编辑 李军亮 电编 鲁亚静

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》正文要求

本刊讯 本刊正文标题层次为 0引言; 1 材料和方法, 1.1 材料, 1.2 方法; 2 结果; 3 讨论; 4 参考文献. 序号一律左顶格写, 后空1格写标题; 2级标题后空1格接正文. 以下逐条陈述: (1)引言 应包括该研究的目的和该研究与其他相关研究的关系. (2)材料和方法 应尽量简短, 但应让其他有经验的研究者能够重复该实验. 对新的方法应该详细描述, 以前发表过的方法引用参考文献即可, 有关文献中或试剂手册中的方法的改进仅描述改进之处即可. (3)结果 实验结果应合理采用图表和文字表示, 在结果中应避免讨论. (4)讨论 要简明, 应集中对所得的结果做出解释而不是重复叙述, 也不应是大量文献的回顾. 图表的数量要精选. 表应有表序和表题, 并有足够具有自明性的信息, 使读者不查阅正文即可理解该表的内容. 表内每一栏均应有表头, 表内非公知通用缩写应在表注中说明, 表格一律使用三线表(不用竖线), 在正文中该出现的地方应注出. 图应有图序、图题和图注, 以使其容易被读者理解, 所有的图应在正文中该出现的地方注出. 同一个主题内容的彩色图、黑白图、线条图, 统一用一个注解分别叙述. 如: 图1 萎缩性胃炎治疗前后病理变化. A: …; B: …; C: …; D: …; E: …; F: …; G: …. 曲线图可按●、○、■、□、▲、△顺序使用标准的符号. 统计学显著性用: $^{a}P<0.05$, $^{b}P<0.01$($P>0.05$不注). 如同一表中另有一套P值, 则$^{c}P<0.05$, $^{d}P<0.01$; 第3套为$^{e}P<0.05$, $^{f}P<0.01$. P值后注明何种检验及其具体数字, 如$P<0.01$, t = 4.56 *vs* 对照组等, 注在表的左下方. 表内采用阿拉伯数字, 共同的计量单位符号应注在表的右上方, 表内个位数、小数点、±、-应上下对齐. “空白”表示无此项或未测, “-”代表阴性未发现, 不能用同左、同上等. 表图勿与正文内容重复. 表图的标目尽量用t/min, c/(mol/L), p/kPa, V/mL, t/℃表达. 黑白图请附黑白照片, 并拷入光盘内; 彩色图请提供冲洗的彩色照片, 请不要提供计算机打印的照片. 彩色图片大小7.5 cm×4.5 cm, 必须使用双面胶条粘贴在正文内, 不能使用浆糊粘贴. (5)志谢 后加冒号, 排在讨论后及参考文献前, 左齐.

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2012年12月28日; 20(36): 3777-3781
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

临床经验 CLINICAL PRACTICE

1979–2008年青海地区经胃镜检出胃癌6 362例

荣光宏, 熊元治, 杨永耿, 刘芝兰, 赵 相, 逯艳艳

荣光宏, 熊元治, 杨永耿, 刘芝兰, 赵相, 逯艳艳, 青海省人民医院消化内科 青海省西宁市 810007
荣光宏, 硕士, 主要从事消化系肿瘤早期诊断及治疗的研究.
作者贡献分布: 此课题由荣光宏与熊元治设计; 研究过程由荣光宏、熊元治、杨永耿、刘芝兰、赵相及逯艳艳操作完成; 研究分析工具由荣光宏提供; 数据分析由荣光宏与杨永耿完成; 本论文写作由荣光宏与熊元治完成.
通讯作者: 熊元治, 主任医师, 810007, 青海省西宁市城东区共和路2号, 青海省人民医院消化内科. rongguanghong@163.com
电话: 0971-8066251
收稿日期: 2012-01-03 修回日期: 2012-07-22
接受日期: 2012-08-11 在线出版日期: 2012-12-28

Epidemiological features of gastric cancer detected by gastroscopy in Qinghai between 1979 and 2008

Guang-Hong Rong, Yuan-Zhi Xiong, Yong-Geng Yang, Zhi-Lan Liu, Xiang Zhao, Yan-Yan Lu

Guang-Hong Rong, Yuan-Zhi Xiong, Yong-Geng Yang, Zhi-Lan Liu, Xiang Zhao, Yan-Yan Lu, Department of Gastroenterology, Qinghai Provincial People's Hospital, Xining 810007, Qinghai Province, China
Correspondence to: Yuan-Zhi Xiong, Chief Physician, Department of Gastroenterology, Qinghai Provincial People's Hospital, 2 Gonghe Road, Chengdong District, Xining 810007, Qinghai Province, China. rongguanghong@163.com
Received: 2012-01-03 **Revised:** 2012-07-22
Accepted: 2012-08-11 **Published online:** 2012-12-28

Abstract

AIM: To investigate the prevalence of gastric cancer since the use of gastroscopy in Qinghai province, China.

METHODS: The clinical data for patients with gastric cancer detected by gastroscopy between 1979 and 2008 in Qinghai province was analyzed retrospectively. The detection rates of gastric cancer by gastroscopy were compared by ethnicity, gender, and time period, and the prevalence of gastric cancer in this region was calculated.

RESULTS: A total of 6 362 cases of gastric cancer were detected between 1979 and 2008, with an overall detection rate of 6.228%. The male to female ratio was 3.594∶1. The detection rates of gastric cancer by gastroscopy in Han, Hui, Tibetan, Salar, Tu, and Mongolian people were 5.959%, 8.519%, 6.128%, 6.868%, 6.492%, and 3.876%, respectively. The mean age of patients with gastric cancer was 55.40 years old (men, 56.19 years; women, 52.65 years). The predilection site of gastric cancer is the antrum. Although the overall detection rate of gastric cancer tended to decrease in recent years, an increase in the detection rate was note in Tu and Mongolian people. Age of onset of gastric cancer has gradually increased in recent years. There was an upward trend in the incidence of cardia cancer in recent years.

CONCLUSION: There are several features of gastric cancer detected in Qinghai between 1979 and 2008, including high detection rate, young average patient age, high proportion of male patients, and low degree of differentiation. Overall, the detection rate of gastric cancer decreased and average age of onset increased in recent years.

Key Words: Gastroscopy; Gastric cancer; Detection rate

Rong GH, Xiong YZ, Yang YG, Liu ZL, Zhao X, Lu YY. Epidemiological features of gastric cancer detected by gastroscopy in Qinghai between 1979 and 2008. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(36): 3777-3781

摘要

目的: 了解青海省自开展胃镜检查以来胃镜检出胃癌的变化趋势.

方法: 回顾性统计1979-2008年胃镜检出胃癌患者的一般临床资料及胃癌的一般生物学特征, 分析本地区不同民族、性别、时期胃癌的胃镜检出率, 分析本地区胃癌的变化趋势.

结果: 近30年共检出胃癌6 362例, 总检出率为6.228%; 检出胃癌患者男女比为3.594∶1; 汉、回、藏、撒拉、土、蒙古族胃镜胃癌检出率分别为: 5.959%、8.519%、6.128%、6.868%、6.492%、3.876%; 胃癌患者总平均年龄为55.40岁, 其中男为56.19岁, 女为52.65岁; 胃窦部为本地区胃癌好发部位; 近年来本地区胃镜胃癌检出率有降低趋势, 但在土族与蒙古族患者中有升高趋势; 近年来胃癌患者

■背景资料
我国是胃癌高发区, 但各地区胃镜检出率并不一致, 检出率1.95%-8.70%, 其中以李玉民等报道甘肃武威地区最高, 丁士刚等报道北京地区低.

■同行评议者
陈卫昌, 教授, 苏州大学附属第一医院消化内科

■研发前沿
胃癌在我国的青海、甘肃、宁夏及东北地区高发，胃镜仍是诊断胃癌的最有效手段，但对于胃癌的流行病学特点及趋势目前仍不清楚.

发病年龄逐渐增大，贲门癌发病有上升趋势.

结论：本地区胃镜胃癌检出率高，胃癌患者平均发病年龄低，男性患者比例高，分化程度低，但总体来看，近年来胃癌检出率有所降低，平均发病年龄增高.

关键词：胃镜；胃癌；检出率

荣光宏，熊元治，杨永耿，刘芝兰，赵相，逯艳艳. 1979–2008年青海地区经胃镜检出胃癌6 362例. 世界华人消化杂志 2012; 20(36): 3777–3781
http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3777.asp

0 引言

胃癌是常见的恶性肿瘤之一，位居原发肿瘤的第2位[1]，全世界约有35%的胃癌病例发生在我国[2,3]，胃癌也是我国常见的恶性肿瘤之一[4]. 在消化系恶性肿瘤的死亡病例中，有40%-50%死于胃癌，在消化系肿瘤中也占首位. 在我国的青海、甘肃、宁夏及东北地区高发，胃镜仍是诊断胃癌的最有效手段[5]，我们回顾性统计分析我院内镜中心1979-2008年经胃镜检出胃癌患者资料，旨在了解我省胃癌疾病变化趋势.

1 材料和方法

1.1 材料 选取1979-2008年在青海省消化内镜中心进行胃镜检查并经病理确诊的胃癌患者6 362例，对其临床一般资料、内镜下的表现及组织特点进行总结分析.

1.2 方法

1.2.1 内镜下胃癌诊断标准：根据1962年日本内镜学会的早期胃癌分型将早期胃癌分为3型即：Ⅰ型(隆起型)、Ⅱ型(浅表隆起型)、Ⅲ型(凹陷型)，其中Ⅱ型又分Ⅱa、Ⅱb、Ⅱc 3个亚型. 进展期胃癌根据Borrmann分型将其分为Ⅰ型(结节或息肉型)、Ⅱ型(局限溃疡型)、Ⅲ型(浸润溃疡型)、Ⅳ型(弥漫浸润型).

1.2.2 病理学诊断标准：以WHO分类将胃癌分为乳头状腺癌、管状腺癌、黏液性和印戒细胞癌，并根据其分化程度将其分为高分化型、中分化型、低分化型及未分型.

统计学处理 用SPSS13.0统计软件包进行统计学处理，以$P<0.05$为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 完成胃镜检查及胃癌检出情况 1979-2008年我院内镜中心共完成胃镜检查102 149例，共检出胃癌患者6 362例，总检出率为6.228%，其中检出早癌25例，早癌检出率为0.024%，早癌检出率较日本及北京地区极低[6,7]. 其中完成胃镜检查数男女之比为1.473∶1，胃癌检出之比为3.594∶1，男女总检出率分别为8.129%和3.414%，汉族、回、藏、撒拉、土、蒙古族患者胃镜胃癌检出率分别为为5.959%、8.519%、6.128%、6.868%、6.492%、3.876%；其中回族检出率最高，蒙古族最低(表1).

表 1 胃镜胃癌检出率

分组	胃镜数(*n*)	胃癌数(*n*)	检出率(%)
民族			
汉族	77 938	4 644	5.959
回族	10 706	912	8.519
藏族	9 970	611	6.128
撒拉族	1 223	82	6.868
土族	1 140	67	6.492
蒙古族	1 032	42	3.876
其他	140	4	2.857
性别			
男	60 845	4 946	8.129
女	41 304	1 416	3.414

2.2 胃癌患者性别与年龄分布 总检出男患者4 946例、女患者1 416例，检出率分别为8.129%和3.414%. 随着年龄段逐渐增大，男女发病比例逐渐增高，特别是超过50岁的患者中，男女比例>4∶1(表2). 胃癌患者总平均年龄为55.40岁，其中男为56.19岁，女52.65岁，其中男性以撒拉族与回族最高，藏族最低；女性中蒙古族最高，土族最小，经t检验分析，各民族各组之间平均年龄差异有显著意义($P<0.05$).

2.3 胃镜检出胃癌与部位关系 胃癌患者多集中在40-70岁，总检出5 060例，占79.5%. 胃窦部仍为本地区好发部位，占35.1%；贲门胃体癌在>60岁患者中所占比例较大，经χ^2检验分析，差异有极显著意义($P<0.01$)，趋势检验分析，随着年龄变大，贲门胃底癌检出率越高($P<0.01$)，目前具体原因不详，需要进一步展开此项研究. 胃体在不同年龄段之间所占比例不同，在40-60岁患者中比例最高，在>60岁患者组中最低，经χ^2检验分析，各组间差异有显著性；胃窦部癌在<40岁患者中发病比例高，经χ^2检验分析，与其他两组差异有极显著意义($P<0.01$)，趋势检验分析，随着年龄变大，胃窦部癌检出率越低($P<0.01$). 残胃癌在40岁以下患者中比例最低、在60岁以上患

表 2 不同年龄段性别比例表

	≤30岁	≤40岁	≤50岁	>50岁	≥60岁	≥70岁
男	122	535	1 520	3 426	2 122	675
女	79	300	585	831	493	133
男：女	1.54：1	1.78：1	2.59：1	4.12：1	4.30：1	5.08：1

表 3 各民族不同性别平均年龄比较(mean ± SD)

分组	年龄		
	男	女	总平均
汉族	56.110 ± 12.832	52.920 ± 12.561	55.400 ± 12.071
回族	57.500 ± 12.174	51.740 ± 13.456	56.170 ± 12.708
藏族	54.460 ± 11.814	51.920 ± 13.178	53.910 ± 12.156
撒拉族	57.880 ± 11.168	55.750 ± 12.819	57.460 ± 11.460
土族	57.340 ± 10.327	40.420 ± 13.741	54.220 ± 12.763
蒙古族	56.580 ± 12.613	56.870 ± 11.718	56.630 ± 12.402

表 4 各年龄组病变部位表n (%)

年龄组	贲门胃底	胃体	胃窦	残胃癌	多发癌	全胃癌	合计
n<40	108(16.0)	208(30.8)	322(47.6)	10(1.5)	7(1.0)	21(3.1)	676(100)
40≤n≤60	991(28.5)	1 109(31.9)	1 210(34.9)	63(1.8)	14(0.4)	87(2.5)	3 474(100)
n>60	781(35.3)	647(29.2)	702(31.7)	49(2.2)	10(0.5)	23(1.1)	2 212(100)
总计	1 880(29.5)	1 964(30.9)	2 234(35.1)	122(1.9)	31(0.5)	131(2.1)	6 362(100)

■同行评价
本文为胃镜检出胃癌地区的临床回顾性资料分析, 具有一定的研究价值和科研意义.

者中最高; 多发癌及全胃癌在40岁以下患者中比例最高; 趋势检验分析, 随着年龄变大, 全胃癌检出率越低(P<0.01, 表3, 4).

2.4 胃镜检出胃癌病理分析 其中记载乳头状腺癌、管状腺癌、黏液腺癌6 278例, 印戒细胞癌81例, 髓样癌、类癌及淋巴来源各1例. 其中高中分化1 165例、低分化5 197例, 以低分化为多, 占81.69%. 有4 483例进展期胃癌有Borrmann分型记载, 其中Ⅰ型33例、Ⅱ型475例、Ⅲ型3 158例、Ⅳ型662例, 以Ⅲ多见, 占70.4%.

2.5 胃镜检出胃癌与地域关系 有胃癌患者确切地理位置记载数为3 772例, 其中以西宁及周边海东地区多(9个地区), 为3 240例, 占有地理位置记载的85.9%, 其中又以湟中、西宁、乐都地区多. 有5 285例患者记载了明确的职业, 其中农牧民3 702例、干部850例、工人733例, 分别占有职业记载数的70.05%、16.08%和13.87%.

2.6 1979-2008年胃镜检出胃癌的变化趋势 本研究将30年以每10年划分为1个10年段来观察胃癌检出变化趋势.

2.6.1 总检出率、不同性别和不同民族检出率的变化趋势: 胃镜胃癌总检出率及不同性别检出率均逐渐降低, 但检出率仍然很高, 男性较女性检出率高. 不同民族检出率中以汉族、回族与撒拉族较高, 近年来汉族群众胃癌检出率逐渐降低, 回族、撒拉族及藏族检出率有波动但总体检出率降低, 而土族与蒙古族胃癌检出率近年来逐渐升高(图1-3).

2.6.2 胃癌患者年龄变化趋势: 青海地区无论男女, 胃癌患者平均年龄及总平均逐渐增大(图4, 5).

2.6.3 胃癌部位变化趋势: 贲门胃底癌所占比例逐渐增大, 趋势检验分析, 随着时间推移, 胃底贲门癌发生率的增高有显著性差异(P<0.01), 说明本地区胃癌有上升趋势, 胃体与胃窦部癌所占比例有所波动, 但近年来又有下降趋势(图5, 表5).

3 讨论

我国是胃癌高发区, 但各地区胃镜检出率并不一致, 检出率1.95%-8.70%, 其中以李玉民等[8]报道甘肃武威地区最高, 丁士刚等[9]报道北京地区低. 本研究分析我院1979-2008年胃镜检出胃癌情况, 了解本地区胃癌发病特点及变化趋势.

表 5 胃癌发生部位表

时间段	胃癌数(*n*)	贲门胃底		胃体		胃窦	
		n	(%)	*n*	(%)	*n*	(%)
1979–1988	1 198	295	24.6	399	33.3	428	35.7
1989–1998	1 806	486	26.9	647	35.8	975	53.9
1999–2008	3 358	1 099	32.7	918	27.3	1 211	35.7

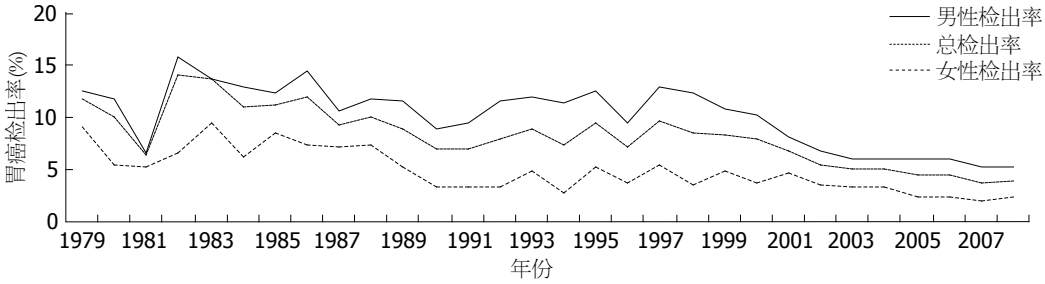


图 1 1979–2008年胃镜检出胃癌变化趋势.

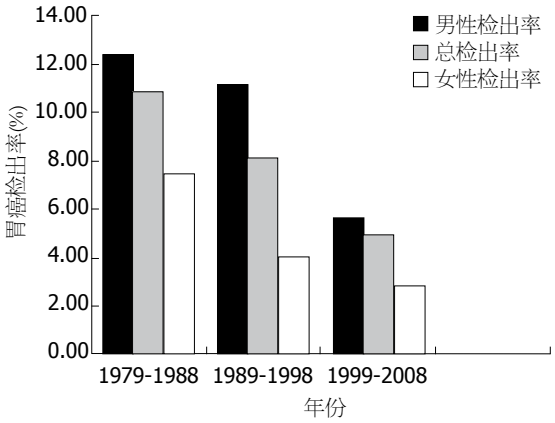


图 2 经胃镜检出胃癌变化趋势.

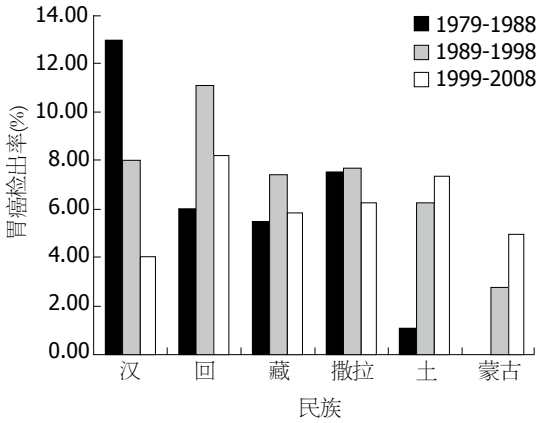


图 3 各民族经胃镜检出胃癌变化趋势.

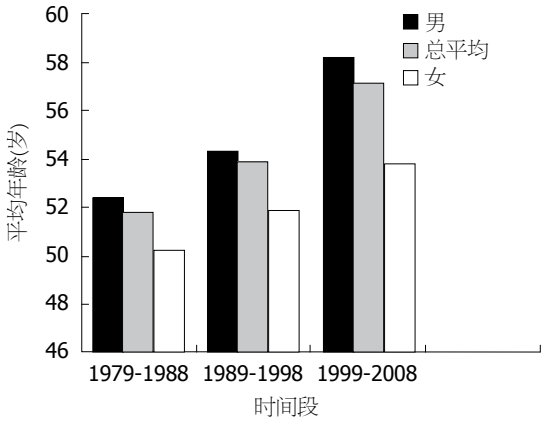


图 4 胃癌患者平均年龄变化趋势.

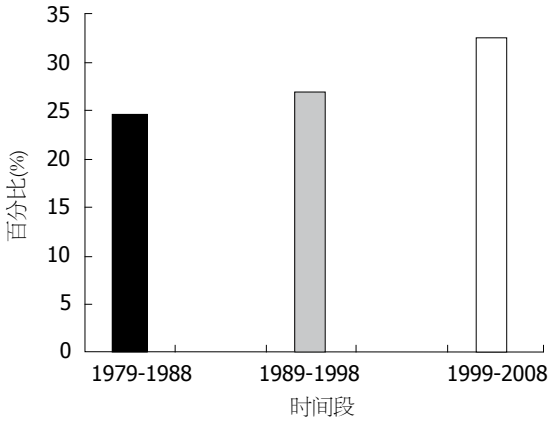


图 5 贲门胃底癌所占比例变化趋势.

从本研究结果可知, 本地区少数民族检出率比汉族高, 差异有极显著意义(P<0.01), 总检出率居全国前列. 不同民族中以回族和撒拉族检出率居高, 比陈明星等[10]报道高. 有报道称近年来胃癌在很多国家发病率开始降低[11,12], 我国部分地区近年来也出现了胃癌发病降低的现象[13],

近30年来本地区患者胃镜胃癌检出率逐渐降低. 不同民族检出率中, 以汉族检出率降低明显, 回族、撒拉族、藏族检出率有所波动, 但近年来有降低趋势; 土族与蒙古族患者检出率有所增高, 具体原因需进一步研究证实.

我们共检出男患者4 946例、女患者1 416例, 检出率分别为8.129%和3.414%, 男性检出率远高于女性, 说明本地区胃癌仍高发于男性中. 随着年龄段逐渐增大, 男女发病比例逐渐增高, 年龄超过50岁组中, 男女比例>4∶1, 说明胃癌发病可能与雌性激素分泌有关, 但需要进一步研究证实. 我们检出胃癌患者总平均年龄为55.40岁, 其中男性为56.19岁, 女性为52.65岁, 男性较女性提前3-4年发病. 近年来无论男女, 其胃癌平均年龄均逐渐增高. 马颖才等[14]报道在青海、西宁及周边地区胃癌发病率较高, 我们总结发现西宁及周边海东地区多有3 240例, 占有地理位置记载的85.9%, 其中又以湟中、西宁、乐都地区多. 在有职业记载的病理中, 农牧民占有70.05%, 远高于干部(16.08%)和工人(13.87%), 考虑与农牧民患者地处偏远、医疗卫生条件差、健康意识低及经济条件差等有关.

病理因素中, 病变部位以胃窦部最高, 胃体部次之, 贲门胃底癌最低, 说明本地区胃癌好发部位仍为胃窦部. 在不同年龄组中, 随着年龄逐渐增大, 贲门胃底癌所占比例逐渐增大, 趋势检验分析, 随着时间的推移, 胃底贲门癌发生率的增高有显著性差异(P<0.01), 说明本地区胃癌有上发趋势, 胃体与胃窦部癌所占比例有所波动, 但近年来又有所下降趋势. 病理类型中以腺癌占97.75%, 腺癌所占比例远较北京地区(45.3%)高[9,15]. Borrmann分型以Ⅲ的70.4%为主, 而分化程度以低分化腺癌为主, 低分化腺癌占81.69%, 这些与青海地区死亡率居全国这首相符[16].

总之, 本地区胃镜胃癌检出率高, 胃癌患者呈现平均发病年龄低、男性患者比例高、分化程度低等特点, 但总体来看, 近年来胃癌检出率有所降低, 平均发病年龄增高. 我们拟在我省大范围开展胃癌流行病学调查, 更详细了解本地区胃癌流行现状.

4 参考文献

1 Alberts SR, Cervantes A, van de Velde CJ. Gastric cancer: epidemiology, pathology and treatment. *Ann Oncol* 2003; 14 Suppl 2: ii31-ii36

2 Parkin DM. Global cancer statistics in the year 2000. *Lancet Oncol* 2001; 2: 533-543

3 Pisani P, Parkin DM, Bray F, Ferlay J. Erratum: Estimates of the worldwide mortality from 25 cancers in 1990. Int. J. Cancer, 83, 18-29 (1999). *Int J Cancer* 1999; 83: 870-873

4 李连弟, 鲁凤珠, 张思维, 牧人, 孙秀娣, 皇甫小梅, 孙杰, 周有尚, 欧阳宁慧, 饶克勤, 陈育德, 孙爱明, 薛志福, 夏毅. 中国恶性肿瘤死亡率20年变化趋势和近期预测分析. 中华肿瘤杂志 1997; 19: 3-9

5 林三仁, 王润田. 胃癌的早期诊断与胃癌普查. 中国肿瘤 1994; 3: 3-5

6 Kampschöer GH, Fujii A, Masuda Y. Gastric cancer detected by mass survey. Comparison between mass survey and outpatient detection. *Scand J Gastroenterol* 1989; 24: 813-817

7 丁士刚, 周丽雅, 陈龙凤, 安宝国, 林三仁. 25年来经胃镜检出胃癌的临床与病理特点. 中国微创外科杂志 2001; 1: 117-119

8 李玉民, 石斌, 柴琛, 李汛, 周文策, 刘虎, 米登海, 段国学, 王芳, 徐创贵, 张勇, 邓瑞, 郭进华, 张正坤, 傅汉中, 施耀仁, 梁聚民, 孙文勤, 薛群基, 刘维民. 甘肃省河西地区胃癌发病状况的调查. 中华普通外科杂志 2004; 19: 183-184

9 丁士刚, 陈龙凤, 安宝国, 林三仁, 周丽雅. 25年来经胃镜检出胃癌的变化趋势-1178例临床流行病学分析. 中国肿瘤临床与康复 2001; 8: 23-25

10 陈明星, 龚惠芸, 雷晴峰, 黄光海, 张芬芳, 石晓荣. 伊犁地区5种民族12年间的胃癌病例分析. 中国内镜杂志 2004; 10: 49-51

11 Roder DM. The epidemiology of gastric cancer. *Gastric Cancer* 2002; 5 Suppl 1: 5-11

12 Layke JC, Lopez PP. Gastric cancer: diagnosis and treatment options. *Am Fam Physician* 2004; 69: 1133-1140

13 金玉弟, 袁金仁, 许兴林, 吴云林, 吴巍, 吕婵. 15075例基层医院胃镜检查结果分析. 胃肠病病学和肝病学杂志 2008; 17: 876-879

14 马颖才, 熊元治, 杨卫红, 楮行琦, 杨桂英, 周翠萍, 杜娟. 青海西宁及周边海东6县胃癌高发区幽门螺杆菌感染状况与胃黏膜病理的关系研究. 临床荟萃 2004; 19: 181-183

15 张文辉, 吴本俨. 微小RNA与胃癌关系的研究进展. 解放军医学杂志 2010; 35: 1264-1266

16 孙秀娣, 牧人, 周有尚, 戴旭东, 张思维, 皇甫小梅, 孙杰, 李连弟, 鲁凤珠, 乔友林. 中国胃癌死亡率20年变化情况分析及其发展趋势预测. 中华肿瘤杂志 2004; 26: 4-9

编辑 李军亮 电编 鲁亚静

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2012年12月28日; 20(36): 3782-3786
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

临床经验 CLINICAL PRACTICE

百草枯中毒患者肝功能损害及血液净化治疗对预后的影响

孙国庆, 孙 昊, 吕清泉, 张劲松

■背景资料
百草枯是目前国内外广泛使用的一种快速灭生型触杀性除草剂. 急性中毒对全身多脏器均可产生毒性作用. 临床工作中发现, 百草枯对肝功能也可产生严重影响, 且越早出现严重肝功能损伤的患者, 其死亡率越高.

孙国庆, 江苏建康职业技术学院医学护理系 江苏省南京市 210005
孙昊, 吕清泉, 张劲松, 南京医科大学第一附属医院急诊科 江苏省南京市 210029
孙国庆, 副教授, 主要从事临床消化系疾病的相关研究.
作者贡献分布: 孙国庆、孙昊、吕清泉及张劲松对此文所作贡献均等; 此课题由孙国庆、孙昊及张劲松设计; 研究过程由孙国庆、孙昊及张劲松完成; 数据分析由孙昊与吕清泉完成; 本论文写作由孙国庆完成.
通讯作者: 张劲松, 主任医师, 副教授, 210029, 江苏省南京市广州路300号, 南京医科大学第一附属医院急诊科.
zhangjso@sina.com
电话: 025-83718836 传真: 025-86527613
收稿日期: 2012-10-29 修回日期: 2012-11-23
接受日期: 2012-12-20 在线出版日期: 2012-12-28

Relationship between hepatic dysfunction and prognosis in patients with paraquat poisoning: Clinical effects of hemopurification therapy

Guo-Qing Sun, Hao Sun, Qing-Quan Lv, Jin-Song Zhang

Guo-Qing Sun, Department of Nursing Science, Jiangsu Jiankang Vocational College, Nanjing 210005, Jiangsu Province, China
Hao Sun, Qing-Quan Lv, Jin-Song Zhang, Department of Emergency Medicine, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China
Correspondence to: Jin-Song Zhang, Chief Physician, Associate Professor, Department of Emergency Medicine, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, 300 Guangzhou Road, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China. zhangjso@sina.com
Received: 2012-10-29 Revised: 2012-11-23
Accepted: 2012-12-20 Published online: 2012-12-28

Abstract

AIM: To investigate the relationship between hepatic dysfunction and prognosis in patients with paraquat poisoning, and to assess the clinical effects of hemopurification therapy [hemoperfusion (HP), continuous venovenous hemodiafiltration (CVVHDF), plasma exchange (PE)] in these patients.

METHODS: The clinical data for 55 patients with paraquat poisoning who were treated at EICU in our hospital from January 2009 to October 2012 were analyzed retrospectively. The patients were divided into two groups, death group and survival group. ALT, AST, TBIL and DBIL were measured on the 1st, 4th, 7th and 14th day after poisoning. The patients were then divided into two groups according to the use of CVVHDF therapy or not to evaluate the effect of this treatment on hepatic function.

RESULTS: At each time point, the levels of all the hepatic function parameters in the death group were significantly higher than those in the survival group (all $P < 0.05$). HP was performed in all patients. Two patients who received PE treatment were dead. The mortality in the CVVHDF group was significantly higher than that in the non-CVVHDF group ($P < 0.01$), and there was no significant difference for all liver function parameters at each time point between the CVVHDF group and non-CVVHDF group.

CONCLUSION: Paraquat poisoning can cause hepatic dysfunction. The changes in liver function parameters, especially high bilirubin, might be reliable predictors of prognosis. Hemopurification therapy, especially CVVHDF, is useless in patients with paraquat poisoning in terms of improving liver function and decreasing mortality.

Key Words: Paraquat; Hepatic dysfunction; Hemopurification; Prognosis

Sun GQ, Sun H, Lv QQ, Zhang JS. Relationship between hepatic dysfunction and prognosis in patients with paraquat poisoning: Clinical effects of hemopurification therapy. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(36): 3782-3786

摘要

目的: 观察百草枯中毒患者出现肝功能损害的程度与预后的关系及血液净化: 血液灌流(hemoperfusio, HP)、连续性血液透析滤过(continuous venovenous hemodiafiltration, CVVHDF)、血浆置换(plasma exchange, PE)治疗方案对肝功能恢复及预后的影响.

方法: 对2009-01/2012-10本科室重症监护病

■同行评议者
周晓武, 副主任医师, 中国人民解放军空军总医院普外科; 陈钟, 教授, 南通大学附属医院普外科, 南通大学肝胆外科研究所

房收治的55例百草枯中毒患者进行回顾性分析, 根据预后分为存活组和死亡组, 分别于中毒后第1、4、7、14天行丙氨酸转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)、总胆红素(total bilirubin, TBIL)、直接胆红素(direct bilirubin, DBIL)检测, 并对两组患者行血液净化治疗的情况进行比较. 另外根据是否行CVVHDF治疗分组, 比较该方法对肝功能变化的影响.

结果: 存活组与死亡组相比, 肝功能各项指标在各时间点均有显著统计学差异(P<0.05); 所有患者均行HP治疗, 2例行PE治疗患者均死亡, 行CVVHDF治疗的患者中, 死亡率为66.7%(16/24), 明显高于未行CVVHDF治疗组(P<0.01); 比较有无行CVVHDF治疗的两组患者, 所有检测项目在两组间均无统计学差异.

结论: 百草枯中毒同样能够引起肝功能损害, 且损害程度与死亡率呈正比. 以胆红素升高为主要表现的肝功能损伤患者预后差. 血液净化治疗尤其是CVVHDF并不能改善既存的肝功能损害, 也不能明显降低死亡率.

关键词: 百草枯; 肝功能损害; 血液净化; 预后

孙国庆, 孙昊, 吕清泉, 张劲松. 百草枯中毒患者肝功能损害及血液净化治疗对预后的影响. 世界华人消化杂志 2012; 20(36): 3782-3786

http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3782.asp

0 引言

百草枯(paraquat, PQ)是目前世界范围内使用广泛的一种快速灭生型触杀性除草剂. 百草枯经肠道和黏膜吸收后, 极小剂量即可造成急性中毒, 对全身多脏器均可产生毒性作用[1]. 目前研究范围多集中在中毒后急性肺损伤、肺纤维化及急性肾功能损伤, 对其他脏器损害的报道尚少, 但在临床工作中逐渐发现, 百草枯对肝功能也可产生严重影响, 且越早出现严重肝功能损伤的患者, 其死亡率明显增加. 由于缺乏特效解毒剂, 临床上目前常规使用的药物治疗方案以及血液净化治疗策略仍存在很多不确定因素, 因此本研究选择探讨百草枯中毒患者的肝功能损害对预后的影响, 并对血液净化治疗进行临床观察, 现报告如下.

1 材料和方法

1.1 材料 入选2009-01/2012-10南京医科大学第一附属医院急诊重症监护病房(emergency intensive care unit, EICU)收治的急性百草枯中毒患者55例, 其中男18例, 平均年龄27.8岁±12.5岁; 女37例, 平均年龄31.4岁±10.5岁. 入选标准: 单一口服20%百草枯溶液(商品名不限), 既往无肝脏疾病史. 排除标准: 合并其他药物中毒, 既存重要脏器损害等影响测定值变化的疾病史. 以患者临床死亡作为观察终点.

1.2 方法

1.2.1 治疗方法: 入院后常规立即给予白陶土洗胃, 甘露醇、硫酸镁导泻, 大剂量激素(甲强龙500 mg qd×3 d, 后逐渐减量)、免疫抑制剂[环磷酰胺10 mg/(kg•d)×3 d]、大剂量维生素C(10 g qd)及保肝药物等综合治疗. 所有患者均行血液灌流(hemoperfusio, HP)治疗(7 d治疗方案), 有条件者同时行连续性血液透析滤过(continuous venovenous hemodiafiltration, CVVHDF)治疗, 两例患者行血浆置换(plasma exchange, PE)治疗.

1.2.2 检测方法: 分于入院第1天、第4天、第7天及第14天, 检测丙氨酸转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)、总胆红素(total bilirubin, TBIL)、直接胆红素(direct bilirubin, DBIL). 检测方法为: ALT和AST采用速率法, TBIL和DBIL采用比色法, 使用强生公司检测仪, 均由检验科医师完成. 观察百草枯致肝功能损害出现的时间、严重程度、持续时间以及观察血液净化治疗对肝功能及预后的影响.

统计学方法 采用SPSS16.0统计软件, 计数资料以mean±SD表示, 组间比较采用t检验. P<0.05为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 临床结果 根据预后分为死亡组23例(其中10例存活14 d以上死亡), 存活组32例, 在距离首次接受洗胃处理时间以及接受首次血液灌流时间点上, 两组比较均无统计学差异(P>0.05); 根据口服模拟实验估测口服百草枯溶液剂量, 存活组为15.7 mL±20.6 mL, 死亡组为50.3 mL±48.6 mL, 两组比较服毒量有统计学差异(P = 0.0033).

2.2 肝功能损害与预后关系 存活组与死亡组相比, 肝功能各项指标在各时间点均有显著统计学差异(P<0.05). 第7天与第14天部分患者死亡, 数据脱落(表1).

2.3 血液净化治疗与预后关系 所有患者均

■研发前沿
百草枯中毒缺乏特异性解毒剂, 目前常用的治疗策略有洗胃导泻、激素、免疫抑制剂、自由基清除剂及血液净化治疗等. 其中尤以血液净化治疗方案受到广泛使用和重视, 但近年来的临床实践及文献评价逐渐对其提出了质疑.

■相关报道
Hong等的临床研究分析指出ALT、AST高低与百草枯中毒患者死亡率相关. Koo等比较百草枯中毒HP和HP联合CVVH治疗效果, 结果显示HP-CVVH组死亡时间明显滞后于HP组, 但两组病死率差异无统计学意义.

■创新盘点
本研究显示百草枯中毒同样能够引起肝功能损害，以胆红素升高为主要表现的肝功能损伤患者预后差. 血液净化治疗尤其是CVVHDF不能改善既存的肝功能损害，也不能明显降低死亡率.

表 1 两组间各时间点肝功能指标比较 (mean ± SD)

分组	*n*	ALT(U/L)	AST(U/L)	TBIL(μmol/L)	DBIL(μmol/L)
存活组	32				
第1天	26	36.4 ± 28.0	32.9 ± 18.7	18.4 ± 9.7	4.7 ± 4.2
第4天	32	60.5 ± 77.0	45.6 ± 38.8	22.9 ± 9.7	6.3 ± 4.1
第7天	30	89.0 ± 64.3	53.7 ± 24.6	35.3 ± 46.4	15.0 ± 26.2
第14天	25	70.6 ± 31.0	40.1 ± 19.6	19.7 ± 11.6	6.3 ± 3.5
死亡组	23				
第1天	20	78.9 ± 13.4	86.1 ± 89.7	34.6 ± 29.5	17.7 ± 22.4
第4天	23	270.2 ± 21.0	221.3 ± 19.3	80.2 ± 49.4	50.0 ± 36.1
第7天	20	283.0 ± 23.2	126.8 ± 89.0	154.8 ± 78.8	113.9 ± 72.8
第14天	10	301.9 ± 31.9	112.5 ± 69.9	242.6 ± 26.1	181.4 ± 21.9

ALT: 丙氨酸转氨酶; AST: 天冬氨酸转氨酶; TBIL: 总胆红素; DBIL: 直接胆红素.

表 2 连续性血液透析滤过治疗对肝功能影响的比较 (mean ± SD)

分组	*n*	ALT(U/L)	AST(U/L)	TBIL(μmol/L)	DBIL(μmol/L)
治疗组	24				
第1天	20	66.6 ± 11.3	62.0 ± 52.6	30.9 ± 28.2	14.2 ± 21.4
第4天	24	177.1 ± 17.9	155.2 ± 16.3	64.1 ± 51.5	37.3 ± 39.0
第7天	22	183.6 ± 20.1	80.7 ± 67.4	76.6 ± 73.7	49.4 ± 60.1
第14天	20	188.6 ± 25.5	69.9 ± 51.8	115.0 ± 22.4	78.4 ± 17.1
非治疗组	31				
第1天	26	45.9 ± 69.2	51.5 ± 74.7	21.2 ± 15.1	7.5 ± 10.2
第4天	31	135.8 ± 19.6	99.8 ± 15.2	37.1 ± 34.2	17.5 ± 24.2
第7天	28	99.7 ± 75.5	67.1 ± 51.4	60.2 ± 84.7	35.5 ± 66.1
第14天	15	95.5 ± 84.0	60.4 ± 68.3	75.8 ± 12.6	55.3 ± 10.1

ALT: 丙氨酸转氨酶; AST: 天冬氨酸转氨酶; TBIL: 总胆红素; DBIL: 直接胆红素.

行HP治疗，2例行PE治疗患者均死亡；行CVVHDF治疗的患者中，死亡率为66.7%(16/24)，明显高于未行CVVHDF治疗组的死亡率为22.6%(7/31)(P<0.01). 综合3种治疗方案，行血液净化治疗的患者仍有很高的死亡率.

2.4 CVVHDF治疗对肝功能影响 根据是否行CVVHDF治疗，将患者分为2组，分别比较两组间在第1、4、7、14天各项肝功能指标，结果显示：治疗组对各项肝功能指标无明显影响，所有检测项目均在两组间无统计学差异(表2).

3 讨论

百草枯(paraquat, PQ)又名克芜踪、对草快，其化学结构为：1,1-二甲基-4,4-联吡啶二氯化物，属联吡啶杂环化合物，是一种易溶于水、中性和酸性介质中稳定、碱性条件氧化的非挥发性白色结晶体. 我国于1978年首次引进，是一种目前广泛使用的速效触灭型除草剂. 正常使用情况下对野生动物和环境少有危害，正确的使用对喷洒作业人员的健康影响也不大. 但百草枯经消化道和黏膜吸收时，对人畜有较强毒性，可造成急性中毒. 国内调查报告显示：PQ占国内中毒总数的1.8%，但病死率位居第一，不同地区、医疗机构存在较大差距，约在20%-80%左右[2,3]. 本次研究中死亡率为41.8%.

目前对百草枯致急性肺损伤、急性肾衰及早期肺纤维化的研究报道较多，对其他脏器损害的报道甚少. 但在临床工作中逐渐发现，百草枯对肝功能也可产生严重影响，且越早出现肝功能损伤的患者，其死亡率越高. 肝脏是人体最大的解毒器官，极易受各种有毒化学物质侵害，造成肝细胞坏死. 动物实验发现[4]，百草枯染毒大鼠模型血浆ALT、AST均明显升高，Hong等[5]的临床研究分析指出ALT、AST高低与百草枯

■应用要点
检测急性百草枯中毒患者的肝功能变化，可以作为判断其中毒程度及预后的指标之一. 血液净化治疗尤其是CVVHDF不能改善既存的肝功能损害，也不能明显降低死亡率. 故临床上需根据病情需要慎重施行.

中毒患者死亡率相关. 本研究显示, 死亡组的肝功能指标均明显高于存活组, 第4天两组比较统计学差异最明显, 且随着时间推迟, 死亡组各项指标均有不同程度的升高. 尤以胆红素的变化明显. 血清胆红素大部分由衰老红细胞在网状内皮系统中被破坏降解产生. 本研究中胆红素指标在早期即有提示意义, 且异常持续时间明显较ALT、AST长, 由此可以看出百草枯中毒致肝细胞严重损伤, 使肝细胞代谢功能受损, 胆红素代谢障碍, 因肝脏对毒物有巨大的调节代偿能力, 故百草枯患者若胆红素指标明显升高时, 提示预后严重不良.

百草枯对肝脏造成损害的机制较为复杂, 目前认为可能由于[6-8]: (1)PQ的直接损害: PQ可通过脂质过氧化机制直接损害组织细胞, 造成肝脏淤胆性损害, 这种淤胆以肝小叶间胆管的损伤为特征; (2)氧自由基等活性物质氧化损伤: PQ在体内的代谢过程中, 产生大量自由基, 可造成对肝细胞的氧化损伤, 细胞衰亡加快, 造成胆红素增多; (3)PQ生物转化过程的损害: 百草枯中毒还会有大量的炎性递质和细胞因子参与加重组织器官的损害, 如发生全身炎性反应综合征, 患者TNF-α、IL-10等在24 h内明显升高. 另外近年来, 基因表达的异常在PQ中毒机制研究中越来越受到关注和重视[9,10]: 百草枯中毒后机体可出现一些基因的异常表达, 可能是在损伤过程中起一定的作用. 但目前的研究多限于动物的肺组织[11], 非致死量百草枯中毒大鼠肺组织内TGF-β mRNA, α-spectrin mRNA, PLTP mRNA等均有不同程度的表达增加. 今后对于肝脏等其他重要脏器的影响将会是研究方向之一.

PQ中毒缺乏特异性解毒剂, 目前常用的治疗策略有洗胃导泻、激素、免疫抑制剂、自由基清除剂及血液净化治疗等. 其中尤以血液净化治疗方案受到广泛使用和重视, 但近年来的临床实践及文献评价逐渐提出了质疑的观点. Koo等[12]进行的针对PQ中毒HP和HP联合CVVH治疗效果, 结果显示: HP-CVVH组死亡时间明显滞后于HP组, 但两组病死率差异无统计学意义. 田甜[13]及王静等[14]进行的文献综述分析, 结论也支持HP等血液净化措施能延长患者生存时间, 但对超过致死剂量数倍的中毒, 血液净化治疗无效. 本研究结果支持以上文献结论, 血液灌流可有效清除体内部分毒物, 血液透析滤过治疗也可起到清除毒素和炎症介质的效果, 可以治疗毒物引起的急性肾功能不全, 从而延长患者生存时间为肝功能的恢复提供有利条件, 但并不能从根本上阻遏肝脏损伤的进程, 对于较大剂量的中毒患者, 无法逆转病情发展, 改善预后. 血浆置换本身对清除百草枯毒素无治疗效果, 但中毒患者后期出现严重肝损, 胆酶分离时, 具有一定的治疗价值[15], 本研究中2例患者虽经过PE治疗肝功能无进行性恶化, 但均因病情过重, 多脏器功能衰竭而最终死亡.

因此, 本研究显示百草枯中毒同样能够引起肝功能损害, 且损害程度与死亡率呈正比. 以胆红素升高为主要表现的肝功能损伤患者预后差. 检测急性百草枯中毒患者的肝功能变化, 可判断其中毒程度及预后. 血液净化治疗尤其是CVVHDF不能改善既存的肝功能损害, 也不能明显降低死亡率. 故临床上需根据病情需要慎重施行.

■**名词解释**
血液净化: 把患者血液引出体外并通过血液净化装置, 除去其中的致病物质(毒素), 达到净化血液, 治疗疾病的目的的过程. 包括血液透析、血液滤过、血液灌流、血浆置换、连续性血液净化等治疗方案. 不同模式有不同的适应症.

4 参考文献

1 Eddleston M, Adhikari S, Egodage S, Ranganath H, Mohamed F, Manuweera G, Azher S, Jayamanne S, Juzczak E, Sheriff MR, Dawson AH, Buckley NA. Effects of a provincial ban of two toxic organophosphorus insecticides on pesticide poisoning hospital admissions. *Clin Toxicol* (Phila) 2012; 50: 202-209

2 杨丽君, 何庆. 以循证医学方法为百草枯中毒制定治疗方案. 中国危重病急救医学 2011; 23: 581-584

3 黄培培, 陈旭锋, 张芹, 张劲松. 急性百草枯中毒23例临床分析. 南京医科大学学报(自然科学版) 2008; 28: 1208-1210

4 Novaes RD, Gonçalves RV, Marques DC, Cupertino Mdo C, Peluzio Mdo C, Leite JP, Maldonado IR. Effect of bark extract of Bathysa cuspidata on hepatic oxidative damage and blood glucose kinetics in rats exposed to paraquat. *Toxicol Pathol* 2012; 40: 62-70

5 Hong SY, Yang DH, Hwang KY. Associations between laboratory parameters and outcome of paraquat poisoning. *Toxicol Lett* 2000; 118: 53-59

6 Mohammadi-Bardbori A, Ghazi-Khansari M. Alternative electron acceptors: Proposed mechanism of paraquat mitochondrial toxicity. *Environ Toxicol Pharmacol* 2008; 26: 1-5

7 Shimada H, Hirai K, Simamura E, Hatta T, Iwakiri H, Mizuki K, Hatta T, Sawasaki T, Matsunaga S, Endo Y, Shimizu S. Paraquat toxicity induced by voltage-dependent anion channel 1 acts as an NADH-dependent oxidoreductase. *J Biol Chem* 2009; 284: 28642-28649

8 Minelli A, Grottelli S, Mierla A, Pinnen F, Cacciatore I, Bellezza I. Cyclo(His-Pro) exerts anti-inflammatory effects by modulating NF-κB and Nrf2 signalling. *Int J Biochem Cell Biol* 2012; 44: 525-535

9 Satomi Y, Tsuchiya W, Mihara K, Ota M, Kasahara Y, Akahori F. Gene expression analysis of the lung following paraquat administration in rats using DNA microarray. *J Toxicol Sci* 2004; 29: 91-100

10 Tomita M, Okuyama T, Katsuyama H, Miura Y, Nishimura Y, Hidaka K, Otsuki T, Ishikawa T. Mouse model of paraquat-poisoned lungs and its gene expression profile. *Toxicology* 2007; 231: 200-209

11 Satomi Y, Sakaguchi K, Kasahara Y, Akahori F.

■同行评价
文章从百草枯中毒后肝脏功能损伤的角度阐述相关的治疗措施及预后, 研究内容对百草枯中毒患者临床治疗方法的制定有一定意义, 具有一定的创新性.

Novel and extensive aspects of paraquat-induced pulmonary fibrogenesis: comparative and time-course microarray analyses in fibrogenic and non-fibrogenic rats. *J Toxicol Sci* 2007; 32: 529-553
12 Koo JR, Kim JC, Yoon JW, Kim GH, Jeon RW, Kim HJ, Chae DW, Noh JW. Failure of continuous veno-venous hemofiltration to prevent death in paraquat poisoning. *Am J Kidney Dis* 2002; 39: 55-59
13 田甜, 何庆. 血液净化治疗急性百草枯中毒的系统评价. 世界急危重病医学杂志 2007; 4: 2034-2035
14 王静, 刘京铭. 血液灌流在百草枯中毒中临床疗效的文献评价. 中国中西医结合肾病杂志 2009; 10: 1085-1086
15 魏屏, 张景辉, 刘薇, 朱祥珍. TRAIL在重型肝炎患者PBMC和血清中的表达及血浆置换治疗前后的变化. 世界华人消化杂志 2011; 19: 2063-2067

编辑 田滢 电编 鲁亚静

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》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)

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2012年12月28日; 20(36): 3787-3790
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

临床经验 CLINICAL PRACTICE

实时剪切波弹性成像检测肝脏硬度与血清肝纤维化指标及其与肝脏病理的相关性

王利慧, 徐 芸, 孙璐璐, 保 洁

王利慧, 徐芸, 保洁, 郑州大学第一附属医院消化内科 河南省郑州市 450001
孙璐璐, 郑州大学第一附属医院超声科 河南省郑州市 450001
王利慧, 在读硕士, 主要从事消化系疾病的研究.
作者贡献分布: 主要实验数据分析与文章起草由王利慧完成; 课题设计、文章修改及审阅由徐芸完成; 实验数据提供与实验操作由孙璐璐与保洁完成.
通讯作者: 徐芸, 主任医师, 450001, 河南省郑州市建设路1号, 郑州大学第一附属医院消化内科. xuyun@medmail.com.cn
电话: 0371-66862052
收稿日期: 2012-11-17 修回日期: 2012-12-18
接受日期: 2012-12-20 在线出版日期: 2012-12-28

Correlation between liver stiffness measured by supersonic shear imaging and serum fibrosis markers and liver pathology

Li-Hui Wang, Yun Xu, Lu-Lu Sun, Jie Bao

Li-Hui Wang, Yun Xu, Jie Bao, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, Henan Province, China
Lu-Lu Sun, Department of Ultrasound, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, Henan Province, China
Correspondence to: Yun Xu, Chief Physician, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, 1 Jianshe Road, Zhengzhou 450001, Henan Province, China. xuyun@medmail.com.cn
Received: 2012-11-17 Revised: 2012-12-18
Accepted: 2012-12-20 Published online: 2012-12-28

Abstract

AIM: To investigate the correlation between liver stiffness measured by supersonic shear imaging (SSI) and serum fibrosis markers and liver pathology.

METHODS: This study included 70 patients diagnosed with autoimmune liver disease at the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University from May 2011 to July 2012. All patients underwent measurement of serum fibrosis markers, liver biopsy and SSI. The correlation between liver stiffness and serum fibrosis markers and liver pathology was analyzed.

RESULTS: Liver stiffness was closely related to the grade and stage of fibrosis classified by liver pathology (45.45, 20.18, 21.21, 13.60 *vs* 15.18; 19.33, 37.29 *vs* 14.49; $r = 0.584, 0.541$; both $P < 0.05$). Liver stiffness was also closely related to PCIII, IV-C, LN and HA (12.02 ± 8.55 *vs* 6.96 ± 2.27; 97.96 ± 27.89 *vs* 78.67 ± 25.57; 306.78 ± 208.48 *vs* 46.14 ± 41.23; 257.42 ± 124.51 *vs* 88.05± 15.08; $r = 0.339, 0.365, 0.409, 0.450$; all $P < 0.05$). The grade of fibrosis classified by liver pathology is significantly correlated with the stage of fibrosis ($r = 0.616$, $P < 0.01$).

CONCLUSION: There is a good correlation between the liver stiffness measured by SSI and serum fibrosis markers and liver pathology. SSI can be used to dynamically monitor liver fibrosis and assess the degree of liver fibrosis.

Key Words: Supersonic shear imaging; Liver pathology; Autoimmune liver disease; Liver fibrosis; Correlation

Wang LH, Xu Y, Sun LL, Bao J. Correlation between liver stiffness measured by supersonic shear imaging and serum fibrosis markers and liver pathology. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(36): 3787-3790

摘要

目的: 探讨实时剪切波弹性成像(supersonic shear imaging, SSI)测得肝脏硬度与血清肝纤维化指标及肝脏病理的相关性.

方法: 选取郑州大学第一附属医院2011-05/2012-07诊断为“自身免疫性肝病”患者70例, 均进行血清肝纤维化指标检测, 肝脏活检和SSI检测. 分析肝脏硬度与血清肝纤维化指标及肝脏病理的相关性.

结果: (1)肝脏硬度与肝组织炎症分级及纤维化分期有显著相关性(45.45, 20.18, 21.21, 13.60 *vs* 15.18; 19.33, 37.29 *vs* 14.49; 均P<0.05), 相关系数为0.584和0.541; (2)肝脏硬度与Ⅲ型前胶原、Ⅳ型胶原、层粘蛋白、透明质酸均有显著相关性(12.02±8.55 *vs* 6.96±2.27; 97.96

■背景资料
肝纤维化是机体对慢性肝损伤的一种修复反应, 是慢性肝病的共有病理变化. 及时准确地判断肝纤维化程度, 对慢性肝病的防治及预后评价具有重要意义. 法国Supersonic Imagine公司推出了世界首台能检测组织弹性模量绝对值的弹性成像超声诊断仪AixPlorer型ShearWave™实时剪切波弹性成像超声诊断仪, 运用Supersonic剪切波弹性成像技术(SSI)可以测得兴趣区组织的硬度绝对值, 成为国内外研究的热点.

■同行评议者
程英升, 教授, 同济大学附属第十人民医院影像临床医学中心

■研发前沿
近年来，影像学诊断肝纤维化日趋成为研究热点. 在国内很多医院已使用Fibroscan判断肝纤维化程度，但Fibroscan有其自身局限性，且SSI具有实时肝脏弹性成像的优点，准确性高于Fibroscan.

±27.89 *vs* 78.67±25.57; 306.78±208.48 *vs* 46.14±41.23; 257.42±124.51 *vs* 88.05±15.08; $P<0.05$), 相关系数为0.339, 0.365, 0.409和0.450; (3)肝组织炎症分级与纤维化分期有显著相关性($r = 0.616$, $P<0.01$).

结论: SSI测得肝脏硬度与血清肝纤维化指标及肝脏病理有较好的相关性, SSI可动态监测肝纤维化进展, 评估肝纤维化程度.

关键词: 实时剪切波弹性成像; 肝脏病理; 自身免疫性肝病; 肝纤维化; 相关性

王利慧, 徐芸, 孙璐璐, 保洁. 实时剪切波弹性成像检测肝脏硬度与血清肝纤维化指标及其与肝脏病理的相关性. 世界华人消化杂志 2012; 20(36): 3787–3790
http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3787.asp

0 引言

肝纤维化是机体对慢性肝损伤的一种修复反应, 是慢性肝病的共有病理变化. 及时准确地判断肝纤维化程度, 对慢性肝病的防治及预后评价具有重要意义[1]. 肝脏活检目前仍然是诊断肝纤维化的金标准, 但因其创伤性操作, 取样误差, 不宜动态观察等缺点, 在临床应用中受到一定限制[2,3]. 因此, 寻找准确, 可靠, 非创伤性的诊断方法是国内外近年来的研究热点. AixPlorer型ShearWave™实时剪切波弹性成像超声诊断仪, 运用实时剪切波弹性成像技术(supersonic shear imaging, SSI)可以测得感兴趣区组织的硬度绝对值, 从而判断肝纤维化程度, 有关其研究国内尚少. 众所周知, 我国是乙型肝炎大国, 每年有众多患者死于肝硬化及其并发症, 国内关于肝纤维化诊断方法的研究绝大多数针对乙型肝炎患者, 但随着我们乙型肝炎防治工作的开展, 乙型肝炎的发病率较前明显下降, 其他类型的肝病发病率呈逐年上升趋势, 例如自身免疫性肝病[4]. 本文所选病例均为自身免疫性肝病, 旨在探讨SSI肝脏硬度值与血清肝纤维化指标及肝脏病理分级分期的相关性.

1 材料和方法

1.1 材料 选取2011-05/2012-07在郑州大学第一附属医院住院的自身免疫性肝病患者70例(包括自身免疫性肝炎、自身免疫性肝炎与原发性胆汁性肝硬化的重叠综合征), 自身免疫性肝炎诊断符合美国肝病协会(AASLD)制定的诊疗指南[5], 重叠综合征诊断符合欧洲肝病研究学会(EASL)指南[6], 已排除合并药物性、病毒性、遗传代谢性等肝损害的病例. 其中男10例, 女60例, 年龄16-70岁(平均51.87岁±10.46岁).

1.2 方法

1.2.1 肝脏活检: 超声引导下经皮使用16G活检针采集1.5-2.0 cm肝脏组织, 放置10%中性福尔马林溶液中固定, 用石蜡包埋, 连续切片后常规作HE染色, 网状纤维和MASSON染色. 参考2001年版《病毒性肝炎防治方案》[7]中慢性肝炎病理分级分期, 将肝脏炎症活动分为G0-G4级, 纤维化程度分为S0-S4期. 肝脏活检与肝脏硬度检测同时进行.

1.2.2 肝脏硬度测定: 使用法国Supersonic Imagine公司生产AixPlore全数字化彩色多普勒超声波诊断仪, 凸阵探头, 探头频率1-6 MHz. 首先探头置于受检者右锁骨中线第4-5肋间进行二维超声检查, 选择肝右叶进行弹性模量测量; 选择弹性成像模式(SWE)后, 嘱受检者吸气并屏住呼吸, 静置3 s, 图像稳定后定帧, 储存; 选取感兴趣区测量弹性值, 以kPa为单位. 测量时依据弹性图的显示效果调节弹性量程, 当蓝色显示较淡时, 需调小量程; 当图像偏红色时需调大量程, 以感兴趣区填充满均匀一致的蓝色时为准. 测量的结果包括最大值、最小值、平均值和标准差. 取5次测量的平均弹性值的平均值进行分析. 测量的弹性值为杨氏模量值, 杨氏模量值越大, 说明组织硬度越大[8].

1.2.3 血清肝纤维化指标测定: 采集患者晨起空腹静脉血3 mL, 采用放射免疫法检测Ⅲ型前胶原(procollagen type Ⅲ, PCⅢ), Ⅳ型胶原(type Ⅳ collagen, Ⅳ-C), 层黏蛋白(laminin, LN)和透明质酸(hyaluronic acid, HA).

统计学处理 用SPSS17.0统计学软件进行统计学分析. 正态分布数据以mean±SD表示, 非正态数据以中位数表示, 两变量间相关性用Spearman秩相关分析. $P<0.05$为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 临床特征 70例患者均进行血清肝纤维化指标、SSI测定及肝脏活检, 按照炎症分级(G1, G2, G3+G4)及纤维化分期(S0-S4)计算, 结果见表1, 2.

2.2 肝脏硬度与肝组织病理分级分期的相关性分析 SSI测得肝脏硬度值与肝组织炎症分级存在正相关关系: $r = 0.584$, $P<0.01$; 与纤维化分期存在正相关关系: $r = 0.541$, $P<0.01$.

2.3 肝脏硬度与血清肝纤维化指标的相关性分析

■相关报道
Ferraioli等及Bavu等在丙型肝炎患者中研究得出SSI诊断显著性肝纤维化(F≥2)下曲线下面积也均达90%以上.

表 1 各炎症分级的血清学指标及肝脏硬度值

项目	G1(n = 28)	G2(n = 28)	G3+G4(n = 14)
PC Ⅲ (ng/mL)	6.87 ± 2.68	6.66 ± 2.02	10.86 ± 5.30
Ⅳ–C(ng/mL)	75.83 ± 43.60	86.57 ± 40.73	117.03 ± 50.01
LN(ng/mL)	49.45 ± 40.61	48.33 ± 18.63	172.99 ± 161.97
HA(ng/mL)	105.91 ± 62.68	113.85 ± 37.64	238.70 ± 85.01
SSI(kPa)	14.49(6.55–29.35)	19.33(9.08–45.45)	37.29(17.03–67.27)

因G4例数少, 故与G3合并. PCIII: III型前胶原; Ⅳ–C: Ⅳ型胶原; LN: 层黏蛋白; HA: 透明质酸; SSI: Supersonic剪切波弹性成像技术.

表 2 各纤维化分期的血清学指标及肝脏硬度值

项目	S0(n = 11)	S1(n = 23)	S2(n = 22)	S3(n = 9)	S4(n = 5)
PC Ⅲ (ng/mL)	6.96 ± 2.27	6.70 ± 2.89	7.67 ± 2.71	7.96 ± 2.59	12.02 ± 8.55
Ⅳ–C(ng/mL)	78.67 ± 25.57	88.51 ± 53.96	81.36 ± 42.96	111.62 ± 55.58	97.96 ± 27.89
LN(ng/mL)	46.14 ± 41.23	53.32 ± 38.33	69.82 ± 44.85	39.52 ± 14.39	306.78 ± 208.48
HA(ng/mL)	88.05 ± 15.08	123.41 ± 72.38	137.61 ± 65.66	152.67 ± 78.88	257.42 ± 124.51
SSI(Kpa)	15.18(6.55–25.55)	13.60(8.90–36.63)	21.21(10.53–42.03)	20.18(11.83–53.07)	45.45(39.88–67.27)

PCIII: III型前胶原; Ⅳ–C: Ⅳ型胶原; LN: 层粘蛋白; HA: 透明质酸; SSI: Supersonic剪切波弹性成像技术..

表 3 70例患者肝组织病理分级与分期 (n)

病理分级	S0	S1	S2	S3	S4	合计
G1	9	12	6	1	0	28
G2	2	11	11	3	1	28
G3	0	0	5	4	3	12
G4	0	0	0	1	1	2
合计	11	23	22	9	5	70

r_s(spearman correlation) = 0.616, P<0.01.

SSI测得肝脏硬度值与PCⅢ、Ⅳ-C、LN、HA均有显著相关关系(P<0.05), 相关系数分别为: 0.339、0.365、0.409、0.450. 即肝脏硬度与血清肝纤维化指标呈正相关关系, 血清指标高时, 肝脏硬度值有增高的趋势.

2.4 肝组织炎症分级与纤维化分期的相关性分析 肝组织炎症活动与纤维化程度相关性有统计学意义(P<0.01), 相关系数为0.616, 二者呈正相关关系, 即随肝脏炎症活动的加重, 肝纤维化程度有加重的趋势(表3).

3 讨论

肝纤维化不是一个独立的疾病, 而是许多慢性肝病的共同病理过程. 在慢性肝病中, 肝组织炎症损伤的刺激是星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)的主要启动因素. 活化的HSC是肝纤维化形成的起始步骤, 是细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的主要来源, 可分泌Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ型胶原及HA等多种ECM成分. 肝纤维化时当胶原的合成与沉积大于降解和吸收, 导致ECM失衡, 在肝脏中过多积聚和沉积, 肝内胶原纤维增加进而逐渐形成肝纤维化, 尤其是后期的降解减少是形成肝纤维化的主要机制[9]. 所以, 肝组织炎症活动与肝组织纤维化程度有密切关系.

本研究所选病例均为自身免疫性肝病, 均进行肝纤维化4项测定, SSI测定, 研究其与肝组织病理相关性. 研究结果显示: 70例自身免疫性肝病患者肝组织炎症分级与纤维化分期有显著相关性. 因此, 随着肝脏炎症活动加重, 肝纤维化程度也加重, 这与以往研究结果一致[10].

影像学诊断肝纤维化日趋成为研究热点. 在国内很多医院已使用瞬时弹性超声诊断仪(Fibroscan)判断肝纤维化程度, 但Fibroscan有其自身局限性, 有腹腔积液, 肥胖及肋间隙狭窄的患者无法使用, 且难以扩展到二维成像, 无法避开肝内非目标结构[11], 且国外报道, SSI比Fibroscan能够更准确的评估显著性肝纤维化(F≥2), SSI具有实时肝脏弹性成像的优点[12]. 本研究结果示: SSI测得的肝脏硬度值与肝组织炎症分级及肝组织纤维化分期存在显著相关关系, 相关系

■创新盘点
本文所选病例均为自身免疫性肝病, 这有异于国内外研究. 所选病例均进行血清纤维化指标测定, SSI测定及肝脏活检. 通过比较SSI测得肝脏硬度与血清学指标及肝脏病理相关性, 体现其价值.

■应用要点
SSI作为诊断肝纤维化的一种无创的新方法, 操作简便, 可重复进行, 临床应用中患者易接受, SSI可动态监测肝纤维化进展, 评估肝纤维化程度.

■名词解释
剪切波弹性成像技术(SSI): 在组织内产生剪切波, 通过超高速成像系统采集剪切波, 根据$E = 3\rho c^2$(其中E为杨氏模量, c为剪切波传播速度, 组织密度), 系统自动计算出组织的杨氏模量值(即弹性模量值).

数分别为: 0.584和0.541. 曾婕等[13]研究得出SSI测得肝脏硬度值与肝组织纤维化分期具有显著相关性(r = 0.723, P<0.05)并以肝脏硬度值判断肝纤维化分期绘制ROC曲线, 曲线下面积均达90%以上; Ferraioli等[12]及Bavu等[14]在丙型肝炎患者中研究得出SSI诊断显著性肝纤维化(F≥2)曲线下面积也均达90%以上, 由此可见SSI对肝纤维化有较高诊断价值.

以往血清肝纤维化指标(PCⅢ、Ⅳ-C、LN、HA)与肝脏病理的相关性研究得出: PCⅢ、Ⅳ-C、LN、HA与肝纤维化有一定相关性, 对肝纤维化有较好的诊断价值, 但随着在临床上的应用发现常常与肝组织病理结果不一致, 灵敏度与特异度不稳定, 这可能与研究对象, 样本大小, 不同年龄分布等因素有关. 但血清学指标并非无意义, 其价值在于: 动态监测肝纤维化活动水平, 判断肝纤维化的发展趋势, 评价疗效及判断预后[15]. 因此, SSI作为诊断肝纤维化的新方法, 我们将其与传统血清纤维化指标进行相关性研究, 结果显示: SSI测得肝脏硬度值与血清肝纤维化指标(PCⅢ、Ⅳ-C、LN、HA)有显著相关关系, 由此可知, SSI与血清学指标在判断肝组织病理分级分期上存在一致性.

因此, SSI作为诊断肝纤维化的一种无创的新方法, 操作简便, 可重复进行, 临床应用中患者易接受, 值得我们更深一步探讨. 现国内尚属探索阶段, 本研究得出肝脏硬度与肝脏病理分级及分期有显著相关关系. 但不足之处在于: 所选病例均为自身免疫性肝病, 不同类型慢性肝病SSI测得弹性值是否存在差异需进一步探讨; SSI对不同类型慢性肝病肝纤维化的诊断价值是否存在差异有待进一步研究.

■同行评价
超声弹性成像检测可以有效诊断肝硬化的程度, 通过超声弹性成像检测和血清肝纤维化指标与穿刺病理对照可进一步明确超声弹性成像的准确性, 为临床诊断提供依据.

志谢: 感谢刁茂平和唐丽同志在实验及写作中给予的支持和帮助.

4 参考文献

1 Patel K. Noninvasive tools to assess liver disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2010; 26: 227-233
2 高人焘, 朱传龙. 肝纤维化无创性诊断的挑战-Fibroscan技术新进展. 实用肝脏病杂志 2009; 12: 467-469
3 滕光菊, 聂青和. 经皮肝脏活体穿刺活检技巧及研究进展. 世界华人消化杂志 2003; 11: 775-776
4 柯比努尔, 张跃新. 自身免疫性肝病的自身抗体的研究进展及临床意义. 临床肝胆病杂志 2008; 24: 463-465
5 Manns MP, Czaja AJ, Gorham JD, Krawitt EL, Mieli-Vergani G, Vergani D, Vierling JM. Diagnosis and management of autoimmune hepatitis. *Hepatology* 2010; 51: 2193-2213
6 European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: management of cholestatic liver diseases. *J Hepatol* 2009; 51: 237-267
7 中华医学会传染病与寄生虫病学分会, 肝病学分会. 病毒性肝炎防治方案. 中华传染病杂志 2001; 19: 56-62
8 安力春, 范春芝, 温朝阳, 徐建红, 罗渝昆, 唐杰. 呼吸时相及探测深度对肝弹性测量值的影响. 中国医学影像学杂志 2011; 19: 771-774
9 Pinzani M, Rombouts K, Colagrande S. Fibrosis in chronic liver diseases: diagnosis and management. *J Hepatol* 2005; 42 Suppl: S22-S36
10 Zheng M, Cai WM, Weng HL, Liu RH. ROC curves in evaluation of serum fibrosis indices for hepatic fibrosis. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 1073-1076
11 罗建文, 邵金华, 白净, 崔立刚, 王金锐. 瞬时弹性成像用于肝纤维化的无创评价. 中华肝脏病杂志 2006; 14: 395-397
12 Ferraioli G, Tinelli C, Dal Bello B, Zicchetti M, Filice G, Filice C; on behalf of the Liver Fibrosis Study Group. Accuracy of real-time shear wave elastography for assessing liver fibrosis in chronic hepatitis C: A pilot study. *Hepatology* 2012; 56: 2125-2133
13 曾婕, 吴莉莉, 郑荣琴, 吴涛, 黄泽萍, 苏中振. 实时剪切波弹性成像检测肝脏弹性模量与肝纤维化分期的相关性研究. 中华医学超声杂志(电子版) 2012; 9: 781-784
14 Bavu E, Gennisson JL, Couade M, Bercoff J, Mallet V, Fink M, Badel A, Vallet-Pichard A, Nalpas B, Tanter M, Pol S. Noninvasive in vivo liver fibrosis evaluation using supersonic shear imaging: a clinical study on 113 hepatitis C virus patients. *Ultrasound Med Biol* 2011; 37: 1361-1373
15 林利静, 徐列明. 肝纤维化四项血清标志物是否存在可信诊断价值. 肝脏 2012; 17: 433-435

编辑 翟欢欢 电编 鲁亚静

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2012年12月28日; 20(36): 3791-3794
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

临床经验 CLINICAL PRACTICE

血清肝纤维化HA、Ⅳ-C、PCⅢ和LN联合检测在布加综合征导致的肝纤维化诊断中的价值

王 磊, 魏 宁, 徐 浩, 祖茂衡, 肖晋昌, 张 静, 张 科, 傅宇飞

王磊, 蚌埠医学院 安徽省蚌埠市 233004
魏宁, 徐浩, 祖茂衡, 肖晋昌, 徐州医学院附属医院介入放射科 江苏省徐州市 221000
张静, 张科, 傅宇飞, 徐州医学院 江苏省徐州市 221000
王磊, 主要从事医学影像与核医学和介入放射学方面的研究.
国家"十一五"科技支撑计划协作基金资助项目, No. 2006038073024
作者贡献分布: 王磊与魏宁对此文所作贡献均等; 此课题由魏宁、王磊、徐浩及祖茂衡设计; 研究过程由肖晋昌、张科及傅宇飞操作完成; 数据分析由张静完成; 本论文写作由魏宁与王磊完成.
通讯作者: 魏宁, 副主任医师, 221000, 江苏省徐州市淮海西路99号, 徐州医学院附属医院介入放射科. weiningjieru2006@163.com
收稿日期: 2012-11-26 修回日期: 2012-12-11
接受日期: 2012-12-17 在线出版日期: 2012-12-28

Detection of serum levels of HA, Ⅳ-C, PCⅢ and LN in patients with Budd-Chiari syndrome

Lei Wang, Ning Wei, Hao Xu, Mao-Heng Zu, Jin-Chang Xiao, Jing Zhang, Ke Zhang, Yu-Fei Fu

Lei Wang, Bengbu Medical College, Bengbu 233004, Anhui Province, China
Ning Wei, Hao Xu, Mao-Heng Zu, Jin-Chang Xiao, Department of Interventional Radiology, the Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou 221000, Jiangsu Province, China
Jing Zhang, Ke Zhang, Yu-Fei Fu, Xuzhou Medical College, Xuzhou 221000, Jiangsu Province, China
Supported by: the Collaboration Fund of the National Key Technology R&D Program during the "Eleventh Five-year Plan" Period, No. 2006038073024
Corresponding to: Ning Wei, Associate Chief Physician, Department of Interventional Radiology, the Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, 99 Huaihai West Road, Xuzhou 221000, Jiangsu Province, China. weiningjieru2006@163.com
Received: 2012-11-26 Revised: 2012-12-11
Accepted: 2012-12-17 Published online: 2012-12-28

Abstract

AIM: To detect serum levels of hyaluronic acid (HA), type Ⅳ collagen (Ⅳ-C), type Ⅲ procollagen (PCⅢ) and laminin (LN) in patients with Budd-Chiari syndrome (BCS).

METHODS: Serum levels of HA, Ⅳ-C, PCⅢ and LN in 61 BCS patients (study group) and 60 healthy persons (control group) were measured by chemiluminescence and compared between the two groups. In addition, the patients were divided into the following subgroups for comparison of the above parameters: inferior vena cava type, hepatic vein type, and mixed type.

RESULTS: Serum levels of HA, Ⅳ-C, PCⅢ and LN were significantly higher in patients with BCS than in controls (t = 6.879, 7.071, 5.753, 6.330; all P < 0.05). However, there were no significant differences in serum levels of HA, Ⅳ-C, PCⅢ and LN between patients with different subtypes of BCS (all P > 0.05).

CONCLUSION: Serum levels of HA, Ⅳ-C, PCⅢ and LN were significantly higher in patients with BCS, and combined detection of these parameters may be helpful for the diagnosis of liver fibrosis caused by BCS.

Key Words: Budd-Chiari syndrome; Hepatic fibrosis; Hyaluronic acid; Type Ⅳ collagen; Type Ⅲ procollagen; Laminin; Chemiluminescence

Wang L, Wei N, Xu H, Zu MH, Xiao JC, Zhang J, Zhang K, Fu YF. Detection of serum levels of HA, Ⅳ-C, PCⅢand LN in patients with Budd-Chiari syndrome. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(36): 3791-3794

摘要

目的: 探讨血清透明质酸(hyaluronic acid, HA)、Ⅳ型胶原(type Ⅳ collagen, Ⅳ-C)、Ⅲ型前胶原肽(type Ⅲ procollagen, PCⅢ)、层黏连蛋白(laminin, LN)检测在布加综合征(budd-chiari syndrome, BCS)导致肝纤维化诊断的价值.

方法: 应用化学发光法分别检测我院介入科2004-03/2012-06收治的61例BCS患者(研究组)及60例健康者(对照组)血清HA、Ⅳ-C、PCⅢ、LN含量, 并进行统计学分析.

结果: BCS患者血清HA、Ⅳ-C、PCⅢ、LN含量均高于对照组, 差异具有统计学意义, 分别为t = 6.879, P<0.05; t = 7.071, P<0.05; t = 5.753,

■**背景资料**
布加综合征(BCS)作为肝后性门脉高压症已为人们所熟悉, 由于肝静脉回流受阻, 导致肝脏淤血, 而长期处于淤血状态的肝细胞发生变性坏死. 目前, 由布加综合征导致的肝硬化甚至是原发性肝癌已有较多报道. 肝纤维化是各种慢性肝病发展为肝硬化、原发性肝癌的共同病理基础.

■**同行评议者**
高泽立, 副教授, 周浦医院消化科, 上海交大医学院九院周浦分院

■研发前沿
BCS以开通血管为目的的介入治疗技术已很成熟，而关于由BCS导致的肝纤维化的早期诊断以及治疗却未引起重视. 血清HA、Ⅳ-C、PCⅢ和LN是监测肝脏纤维化的灵敏指标.

P<0.05; t = 6.330, P<0.05. 研究组进行组间比较, 血清HA、Ⅳ-C、PCⅢ、LN含量差异无统计学意义(P>0.05).

结论: 血清HA、Ⅳ-C、PCⅢ、LN作为检测肝纤维化灵敏指标, 联合检测对BCS导致肝纤维化的诊断和临床治疗具有重要意义.

关键词: 布加综合征; 肝纤维化; 透明质酸; Ⅳ型胶原; Ⅲ型前胶原肽; 层黏连蛋白; 化学发光法

王磊, 魏宁, 徐浩, 祖茂衡, 肖晋昌, 张静, 张科, 傅宇飞. 血清肝纤维化HA、Ⅳ-C、PCⅢ和LN联合检测在布加综合征导致的肝纤维化诊断中的价值. 世界华人消化杂志 2012; 20(36): 3791-3794
http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3791.asp

0 引言

布-加综合征(budd-chiari syndrome, BCS)为肝静脉和/或其开口以上的下腔静脉阻塞所导致的门静脉和/或下腔静脉高压临床症候群[1]. BCS患者由于肝静脉血液回流障碍, 肝脏长期处于淤血状态, 导致肝纤维化、肝硬化甚至原发性肝癌[2,3]. 肝纤维化是肝硬化、肝癌的早期阶段, 因其尚处于可逆阶段, 故对其进行早期诊断, 对于了解BCS患者肝脏损伤情况有重要意义. 目前国内外学者对于肝炎、肝硬化的无创性诊断肝纤维化进程进行了大量研究, 血清生化学指标如透明质酸(hyaluronic acid, HA)、Ⅳ型胶原(type Ⅳ collagen, Ⅳ-C)、Ⅲ型前胶原肽(type Ⅲ procollagen, PCⅢ)、层黏连蛋白(laminin, LN)为早期监测肝脏纤维化的灵敏指标[4], 但尚未有文献报道将其用于BCS导致的肝纤维化的诊断.

本研究通过对我院介入科2004-03/2012-06收治的61例BCS患者, 进行血清HA、Ⅳ-C、PCⅢ、LN检测, 以探求其对BCS导致肝纤维化诊断的临床价值.

■相关报道
慢性肝病的肝纤维化进程越来越受到临床的重视, 怎样为临床提供更为有效的肝纤维化指标是人们关注的焦点. 血清HA、Ⅳ-C、PCⅢ和LN是肝纤维化早期诊断和判断严重程度的敏感指标, 为临床早发现、早诊断、早治疗肝纤维化有极为重要的意义.

1 材料和方法

1.1 材料 研究组为我院介入科自2004-03/2012-06门诊及住院收治的BCS患者61例. 其中男31例, 女30例, 年龄14-68岁, 平均44岁. 全部病例术前均行彩色超声或MRI检查, 介入术中均予以下腔静脉、肝静脉造影确诊. 按照目前国内公认分型[1]方法进行临床分型, 其中下腔静脉型40例, 肝静脉型13例, 混合型8例. 正常对照组60例, 男47例, 女13例, 年龄17-80岁, 平均42岁, 选自健康体检者, 均无肝、肾疾病、糖尿病史及疑似或确诊肿瘤史.

1.2 方法 患者清晨空腹采血, 离心取血清-20 ℃保存待测HA、Ⅳ-C、PCⅢ、LN. 仪器为北京源德JETLIA-962加液型化学发光免疫分析仪, 化学发光免疫试剂盒为北京源德生物医学工程有限公司提供, 操作严格按照仪器和试剂盒说明书进行检测.

统计学处理 采用SPSS16.0统计软件分析. 各项指标的测定结果均以mean±SD表示, BCS组与正常对照组比较采用t检验分析, 多组之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

研究组BCS患者血清HA、Ⅳ-C、PCⅢ、LN水平均高于对照组, 差异有统计学意义, 分别为t = 6.879, P<0.05; t = 7.071, P<0.05; t = 5.753, P<0.05; t = 6.330, P<0.05. 3种亚型之间比较, 差异无统计学意义(P>0.05, 表1).

3 讨论

3.1 布-加综合征导致肝纤维化的诊断现状 BCS患者病变主要累及肝静脉和/或肝段下腔静脉, 是导致患者发生肝硬化甚至原发性肝癌的主要因素. 由于肝静脉回流受阻导致肝脏淤血, 长期淤血状态下的肝脏可出现一系列病理变化, BCS患者肝脏可出现不同程度的肝纤维化, 其原因可能是早期肝小叶中央静脉及其周围肝血窦扩张淤血, 周围肝细胞因肝扩张的肝血窦的压迫和缺氧, 发生变性坏死[5]. 肝细胞损伤后, 细胞因子的合成与分泌发生变化, 细胞因子促进肝星形细胞(hepatic stellate cells, HSC)合成胶原纤维及刺激HSC增殖转化为成纤维细胞, 同时大量合成胶原等细胞外基质(extracellular matrixc, ECM), ECM过度沉积, 其合成和降解失衡, 最终导致肝脏发生纤维化[6]. 韩新巍等[7]对28例BCS患者进行了经皮肝穿刺切割活检, 发现肝血窦轻度扩张者12例, 重度者16例; 纤维组织轻度增生8例, 中度11例, 重度9例.

据Shrestha[8]统计, BCS患者中肝硬化发生率71%-100%, 原发性肝癌发生率4.6%-47.0%. 因为肝纤维化是慢性肝病发展至肝硬化甚至原发性肝癌的必然, 是肝硬化的病理特征, 所以肝纤维化可以作为BCS患者发展成肝硬化的前期表现. 由于肝纤维化在肝硬化前尚可逆转, 因此对

表 1 BCS病例及各类型与对照组血清HA、Ⅳ-C、PCⅢ、LN检测结果比较(mean SD, μg/L)

分组	*n*	HA	Ⅳ-C	LN	PCⅢ
正常对照组	60	70.95 ± 31.17	57.35 ± 31.28	54.95 ± 29.65	2.40 ± 1.97
全部BCS组	61	325.74 ± 287.56[a]	262.30 ± 224.17[a]	166.72 ± 134.63[a]	20.32 ± 24.24[a]
下腔静脉型组	40	347.43 ± 277.69[c]	234.33 ± 199.79[c]	170.90 ± 132.97[c]	19.97 ± 26.44[c]
肝静脉型组	13	308.62 ± 315.01[c]	314.15 ± 251.64[c]	161.38 ± 144.29[c]	20.38 ± 23.33[c]
混合型组	8	276.38 ± 297.79[c]	317.88 ± 294.60[c]	154.50 ± 144.37[c]	21.93 ± 14.36[c]

[a]$P<0.05$ *vs* 正常对照组; [c]$P<0.05$ *vs* 正常对照组.

■**创新盘点**
本文首次提出要重视对由BCS导致的肝纤维化早期的诊断, 将血管开通和肝纤维化治疗视为整体, 提出对BCS的整体治疗.

BCS患者进行有关肝纤维化方面的早期诊断并对其进行治疗, 对于阻止其转变成肝硬化至关重要.

目前, 对于BCS患者诊断的措施主要集中于对下腔静脉和肝静脉血管形态的影像学检查如彩超、MRI和DSA等, 而针对其并存的肝纤维化的诊断则鲜有关注. 肝脏穿刺活检被推荐作为必要的检查方法[1], 但由于其为创伤性检查, 因此在临床应用上具有一定的局限性. 同时, 肝纤维化是临床影像诊断的难题之一, 当影像学检查上能看到异常图像时患者往往已至纤维化晚期, 尽管在应用MR扩散加权成像诊断肝纤维化和肝硬化方面做了很多探索[9], 但仍有其局限性, 难以对肝纤维化做出明确诊断, 更难以准确判断肝纤维化的严重程度. 目前, 针对BCS患者肝纤维化的诊断不论从认识上还是技术上都尚存不足, 故此寻找非创伤、便捷、准确的诊断方法对明确BCS患者肝纤维化有重要意义.

3.2 血清HA、Ⅳ-C、PCⅢ、LN与肝纤维化 HA是一种简单的糖胺二糖肽分子聚合体, 由体内间质细胞合成, 分布在各种结缔组织中, 经淋巴循环入血. 肝脏内皮细胞是降解血液中HA的主要场所, 肝脏受损时, 肝间质细胞增生或肝血流受阻, 合成HA增加, 而内皮细胞受损害使血液中HA的摄取和降解减少, 因而导致HA平增高, 增高程度与肝损害程度平行[10]. 在肝纤维化活动期, 血清中含量最多的是HA. HA可加速胶原蛋白聚合成前胶原纤维的横纹周期, 并可能影响到前胶原的粗细, 促进胶原蛋白分子的聚合过程. HA对HSC有激活作用, 表现为HSC骨架蛋白增加和胶原合成增加. 血清中HA升高可以估计肝纤维化时肝窦毛细血管化的形成和肝窦功能的改变. 因此, HA可以反映肝脏的损伤程度和纤维化的发展变化. HA是反映肝纤维化形成和肝损害的定量标志, 持续升高, 则预后不良.

Ⅳ-C是基底膜中所特有的胶原蛋白, 由分子交联形成的一种网状结构, 是构成基底膜的主要胶原成分. 在肝纤维化过程中, Ⅳ-C大量合成并在窦周Disse间隙内连续性沉积, 形成基底膜, 导致肝纤维化特征性的肝窦毛细血管化, 造成肝细胞血供及营养供给障碍, 进一步加重肝细胞损害. 由于肝窦毛细血管化出现在肝纤维化早期, Ⅳ-C与肝窦毛细血管化的发生存在密切联系. 因此, 在肝纤维化早期, 肝内Ⅳ-C即明显增加, 血清中Ⅳ-C浓度在肝纤维化早期即升高. 因此,检测血清Ⅳ-C含量可以判断早期肝纤维化的发生及其严重程度[11].

PCⅢ是完整的Ⅲ型前胶原分子, 是ECM的主要胶原成分, 能直接反映Ⅲ型胶原的代谢状况. 肝纤维化早期PCⅢ合成比较旺盛, 但纤维化晚期PCⅢ合成速度放缓, PCⅢ水平下降. 因此, PCⅢ是活动性肝纤维化的敏感指标[12].

LN是一种非胶原性黏蛋白, 分布在各基底膜的透明层中, 与Ⅳ-C一起构成内皮细胞之间的基底膜. 正常肝脏内LN含量很少, 肝窦壁正常时不存在LN, 肝脏发生慢性损坏时, LN含量增加. LN与Ⅳ-C是反应基底膜更效率的指标, 两者可反映肝纤维化的进展及严重程度[13].

3.3 血清HA、Ⅳ-C、PCⅢ、LN检测在BSC诊治中的临床价值 研究认为, 生化学评估肝纤维化时, 2项及以上指标有异常即具有诊断提示意义[4], 故本研究通过对61例BCS患者和60例健康人血清HA、Ⅳ-C、PCⅢ、LN进行联合检查. 我们发现, 所有BCS患者血清HA、Ⅳ-C、PCⅢ、LN较正常对照组明显升高($P<0.05$), 说明BCS患者由于肝脏长期淤血已出现肝纤维化. 当按亚型分组后, 下腔静脉型、肝静脉型、混合型组别分别与正常对照组比较, 3个亚型患者血清HA、Ⅳ-C、PCⅢ、LN均明显高于正常对照组($P<0.05$), 说明3个亚型均导致肝纤维化即肝

■**应用要点**
血清HA、Ⅳ-C、PCⅢ和LN是检测肝纤维的简单易行的方法. 目前, BCS患者肝纤维化血清学检测尚未普及. 开展对BCS患者血清肝纤维化指标的检测对治疗临床治疗有重要意义.

■名词解释
布-加综合征: 肝静脉和/或其开口以上的下腔静脉阻塞所导致的门静脉和/或下腔静脉高压临床症候群.

纤维化与BCS分型无关. 3个亚型患者血清HA、Ⅳ-C、PCⅢ、LN组间比较发现, 差异无统计学意义(P>0.05), 说明BCS各亚型之间并不因病变发生的部位不同而有明显差异. 因此, 这也进一步证明了肝静脉或下腔静脉阻塞均可导致肝脏淤血发生纤维化.

血清HA、Ⅳ-C、PCⅢ、LN作为肝纤维化早期诊断和判断严重程度的敏感指标, 以往临床上主要用于对慢性肝炎[14,15]和自身免疫性[16]肝病导致的肝纤维化的诊断, 尚未有文献报道用于BCS导致的肝纤维化的诊断. 目前, 临床治疗BCS主要以介入开通血管为主, 而鲜有针对肝纤维化的治疗, 这也许是肝纤维化诊断被忽视的原因. 笔者认为对BCS导致的肝纤维化的治疗是介入治疗整体的组成部分, 加强对肝纤维化的治疗可以进一步延缓甚至逆转患者肝脏的损伤, 减少肝硬化甚至原发性肝癌的发生.

综上, 对BCS患者进行血清HA、Ⅳ-C、PCⅢ和LN的联合检测, 可以对其导致的肝纤维化进行早期诊断, 可以延缓甚至逆转患者肝脏损伤. 将血管开通及肝纤维化治疗的作为整体, 对减少BCS导致的原发性肝癌的发生具有重要意义.

■同行评价
本研究紧密联系临床, 研究提示对布加综合征患者导致肝纤维化及肝硬化有血清HA、Ⅳ-C、PCⅢ和LN升高. 对布加综合征患者进行血清肝纤维化指标检测对临床有重要意义.

4 参考文献

1 中华医学会放射学分会介入学组. 布加综合征介入诊疗规范的专家共识. 中华放射学杂志 2010; 44: 345-349
2 张庆桥, 祖茂衡, 徐浩, 顾玉明, 魏宁, 许伟, 刘洪涛, 崔艳峰, 王文亮. 布加综合征合并肝细胞癌的介入治疗. 中华放射学杂志 2010; 44: 852-855
3 Gwon D, Ko GY, Yoon HK, Sung KB, Kim JH, Lee SS, Lee JM, Ohm JY, Shin JH, Song HY. Hepatocellular carcinoma associated with membranous obstruction of the inferior vena cava: incidence, characteristics, and risk factors and clinical efficacy of TACE. *Radiology* 2010; 254: 617-626
4 中华肝脏病学会肝纤维化学组. 肝纤维化诊断及疗效评估共识. 中华肝脏病杂志 2002; 10: 327-328
5 党晓卫, 李鹏, 乔师师, 杨志强, 徐大千, 王兆阳, 许培钦. 布加综合征和肝内型门静脉高压症肝脏病理学改变的对比研究. 中华普通外科杂志 2012; 27: 384-387
6 沈文, 尹建忠, 张龙江, 王鹏辉, 祁吉. 肝纤维化和肝硬化的MR扩散成像及与病理对照、CT灌注参数的相关性研究. 临床放射学杂志 2007; 26: 1000-1004
7 韩新巍, 马波, 吴刚, 高雪梅, 马南, 王艳丽, 丁鹏绪. Budd-Chiari综合征: 肝脏病理学改变. 介入放射学杂志 2006; 15: 527-529
8 Shrestha SM. Liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma in hepatic vena cava disease, a liver disease caused by obstruction of inferior vena cava. *Hepatol Int* 2009; 3: 392-402
9 程悦, 沈文, 祁吉. MR扩散加权成像和CT灌注成像对纤维化诊断价值的比较. 中国医学影像技术 2010; 26: 297-300
10 由悦, 张文华, 夏稻子. 超声背向散射积分对甲亢性肝病及脂肪肝所致肝功能损害的诊断价值. 中国实用内科杂志 2010; 30: 18-19
11 黄培新, 程晓芸. 血清Ⅳ型胶原在肝纤维诊断中的价值. 同济大学学报(医学版) 2001; 22: 47-48
12 王爱莉. 血清肝纤维化标志物联合检测的临床评价. 国际检验医学杂志 2011; 32: 430
13 许春海, 孟冬梅, 吕淑兰, 康鹏. 肝纤维化指标的检测及临床意义. 中华实验和临床病毒学杂志 2010; 24: 50-52
14 魏雪菲, 徐佩, 李菡, 陈载融, 郭万华. 血清肝纤维化指标和肝功能指标联合检测在慢性乙型肝炎肝纤维化诊断中的价值. 国际检验医学杂志 2012; 33: 2278-2280
15 王茸, 张淼. 乙型肝炎肝硬化及肝癌血清中炎性因子检测的临床意义. 中国实用内科杂志 2011; 31: 452
16 李巍, 曹文艳, 孟存仁, 包建玲, 朱有森. 自身免疫性肝病患者肝纤维化血清标志物检测的意义. 国际检验医学杂志 2012; 33: 2062-2064

编辑 田滢 电编 鲁亚静

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com
世界华人消化杂志 2012年12月28日; 20(36): 3795-3800
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

结直肠子宫内膜异位症术前活检病理误诊分析6例

余 俊, 李 燕, 潘华雄, 贺 骏, 聂 秀

余俊, 李燕, 潘华雄, 贺骏, 聂秀, 华中科技大学附属协和医院病理科 湖北省武汉市 420020
余俊, 主治医师, 主要从事心血管及女性生殖系统疾病的研究.
作者贡献分布: 余俊完成文章的撰写、数据整理及病例收集; 李燕与潘华雄完成图片采集与数据分析; 免疫组织化学实验由贺骏完成; 文章审阅与病例收集由聂秀完成.
通讯作者: 聂秀, 副主任医师, 420020, 湖北省武汉市汉口解放大道1277号, 华中科技大学附属协和医院病理科.
niexiuyishi@126.com
收稿日期: 2012-11-02 修回日期: 2012-12-12
接受日期: 2012-12-17 在线出版日期: 2012-12-28

Rectosigmoid endometriosis: Practical approaches to improve the possibility of obtaining a definite preoperative biopsy diagnosis

Jun Yu, Yan Li, Hua-Xiong Pan, Jun He, Xiu Nie

Jun Yu, Yan Li, Hua-Xiong Pan, Jun He, Xiu Nie, Department of Pathology, Union Hospital, Huazhong Science and Technology University, Wuhan 420020, Hubei Province, China
Correspondence to: Xiu Nie, Associate Chief Physician, Department of Pathology, Union Hospital, Huazhong Science and Technology University, 1277 Hankou Jiefang Dadao, Wuhan 420020, Hubei Province, China. niexiuyishi@126.com
Received: 2012-11-02 Revised: 2012-12-12
Accepted: 2012-12-17 Published online: 2012-12-28

Abstract

AIM: To discuss the methods for improving the accuracy of preoperative diagnosis of rectosigmoid endometriosis.

METHODS: From December 2002 up to now, six patients with intestinal endometriosis were treated at our hospital. The clinical manifestations, enteroscopic findings, and histopathological manifestations of preoperative biopsy specimens and postoperative specimens removed by laparotomy or laparoscope resection were analyzed. A review of the literature was also performed.

RESULTS: Four (66.7%) cases of the rectosigmoid endometriosis were misdiagnosed clinically, including 1 case misdiagnosed as glandular dysplasia and 3 cases as chronic inflammation (including 1 case as ulcers). Immunohistochemical staining for ER, PR, CK7, K20 and CD10 were performed. Normal colorectal epithelia were negative for CK7, ER, and PR, whereas rectosigmoid endometriosis was positive for CK7, ER, and PR and showed endometrial stromal expression of CD10.

CONCLUSION: Combination of clinical manifestations, colonoscopic findings, and immunohistochemistry can improve the accuracy of preoperative diagnosis of endometriosis.

Key Words: Rectosigmoid; Endometriosis; Biopsy; Misdiagnosis

Yu J, Li Y, Pan HX, He J, Nie X. Rectosigmoid endometriosis: Practical approaches to improve the possibility of obtaining a definite preoperative biopsy diagnosis. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(36): 3795-3800

摘要

目的: 探讨有效提高结直肠子宫内膜异位症术前活检诊断准确率的方法及思路.

方法: 回顾性分析我院2002年至今收治的6例结直肠子宫内膜异位症患者的临床表现、肠镜结果, 对比术前活检和术后手术标本的组织病理学表现, 分析误诊的原因, 同时行ER、PR、CK7、CK20和CD10的免疫组织化学检测.

结果: 结直肠子宫内膜异位和结直肠癌临床表现、肠镜结果、B超和CT检查结果在一定程度上相似; 本组6例结直肠子宫内膜异位症肠镜活检诊断中, 3例误诊为慢性炎症, 其中1例认为伴有中度异型增生; 1例误诊为溃疡, 误诊率达67%(4/6). 异位子宫内膜的免疫组织化学表型为腺体Ck7阳性, 腺体及内膜间质ER、PR阳性以及间质细胞CD10阳性, 而正常结直肠黏膜免疫组织化学表型为: 腺上皮Ck7阴性, 上皮及黏膜固有层间质ER、PR及CD10阴性. CK20在异位子宫内膜腺体及肠黏黏膜腺上皮内表达均为阴性. 本组6例手术后大标本免疫组织化学检测结果与术前肠镜活检标

■背景资料
子宫内膜异位症是指子宫内膜组织存在于子宫腔以外的部位, 是育龄妇女的一种常见疾病. 结直肠子宫内膜异位症相对少见, 可引起严重的胃肠道和盆腔炎的症状, 容易误诊为结直肠恶性疾病. 由于肠镜和影像学结果类似, 结直肠子宫内膜异位症和结直肠癌的鉴别诊断困难. 对于结直肠子宫内膜异位的诊断, 目前尚没有可靠的放射或内镜学的诊断方法, 即使是内镜活检有时也不具有诊断作用. 因此, 结直肠子宫内膜异位症的术前诊断通常较困难.

■同行评议者
陈云昭, 副教授, 新疆石河子大学医学院/一附院病理科

■应用要点
通过形态学观察, 并且综合特征性的临床病史、结合免疫组织化学检测ER、PR及CK7可以有效提高结直肠子宫内膜异位症术前活检诊断的准确率.

本免疫表型均显示一致.

结论: 本研究表明仅根据临床症状, 影像学和内镜检查结果, 临床医生很难将其与恶性肿瘤区分; 而通过形态学观察, 并且综合特征性的临床病史、结合免疫组织化学检测ER、PR及CK7可以有效提高结直肠子宫内膜异位症术前活检诊断的准确率.

关键词: 结直肠; 子宫内膜异位症; 活检; 误诊

余俊, 李燕, 潘华雄, 贺骏, 聂秀. 结直肠子宫内膜异位症术前活检病理误诊分析6例. 世界华人消化杂志 2012; 20(36): 3795–3800
http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3795.asp

0 引言

子宫内膜异位症是指子宫内膜组织存在于子宫腔以外的部位, 是育龄妇女的一种常见疾病. 结直肠子宫内膜异位症相对少见, 可引起严重的胃肠道和盆腔炎的症状, 容易误诊为结直肠恶性疾病. 由于肠镜和影像学结果类似, 结直肠子宫内膜异位症和结直肠癌的鉴别诊断困难. 对于结直肠子宫内膜异位的诊断, 目前尚没有可靠的放射或内镜学的诊断方法, 即使是内镜活检有时也不具有诊断作用. 因此, 结直肠子宫内膜异位症的术前诊断通常较困难. 本研究收集6例结直肠子宫内膜异位症的病例, 这些患者术前临床和病理曾诊断为结直肠癌、溃疡或炎症, 本研究我们将分析结直肠子宫内膜异位症术前活检容易误诊的原因以及探讨解决的方法.

1 材料和方法

1.1 *材料* 收集武汉协和医院自2002-12至今诊治的结直肠子宫内膜异位症患者共6例, 6例均被临床作为结直肠癌行根治性手术, 术后病理诊断均证实为结直肠子宫内膜异位症.

1.2 *方法* 标本经10%中性甲醛固定, 常规脱水透明, 石蜡包埋制片, HE染色. 免疫组织化学检测采用石蜡切片Envision法, 所用试剂购自Dako公司. 我们回顾了病史、肠镜表现, 复查了病例的术前肠镜活检标本和剖腹手术或腹腔镜切除术的术后标本的病理切片, 对术前活检标本和术后大标本组织块进行ER、PR、CK7、CK20和CD10的免疫组织化学检测. 同时进行了相关文献复习.

2 结果

2.1 *临床病史* 6例患者的平均年龄为44.8年(38-49岁). 3例有腹痛症状. 3例患者有大便变化, 2例主诉便血, 2例有肠梗阻. 1名患者的症状与月经周期相关. 其中有3例患者有左侧卵巢受累及的情形; 1例患者有阴道和子宫受累的情况. 其中1例表现为直肠上段左侧壁类圆形软组织密度结节影, 向腔内外生长, 边缘光滑, 横断面直径2.27 cm, 前缘紧贴子宫二者界限不清. 子宫稍大. 子宫左上方类圆形囊实性包块2.9 cm×3.6 cm; 1例表现为直肠前壁与阴道残端黏连, 左卵巢1.5 cm囊肿; 还有1例在阴道后穹隆可见3 cm×2 cm×2 cm囊性包块.

2.2 *B超和CT* 1例行电子肠镜及超声, 结果显示: 黏膜下层和肌层消失, 肠壁明显增厚. 该患者同时进行了CT检查, 结果显示在降结肠左侧壁上发现软组织密度的圆形结节, 突向肠腔生长, 子宫左上方可见圆形光滑的实性及囊性肿块.

2.3 *结肠镜检查结果* 5例患者进行了结肠镜检查. 1例患者显示为溃疡, 1例显示为黏膜突起、1例为管腔狭窄、3例为息肉样肿块. 例1: 直肠新生物; 例2: 直肠一扁平隆起病灶, 表面粗糙; 例4: 距肛门6-12 cm直肠新生物, 表面菜花状, 伴糜烂, 占肠腔周径约1/3; 例5: 直肠乙状结肠交界处距肛门约12 cm菜花样肿物, 1.0-1.6 cm ,表面溃烂, 质硬脆, 易出血; 例6: 克隆氏病, 肠结核, 直乙狭窄.

2.4 *结肠镜活检* 6例结肠镜活检的本院病理诊断分别是: 3例诊断为慢性炎症, 其中1例认为伴有中度异型增生; 1例诊断为溃疡; 2例考虑诊断为子宫内膜异位症, 其中1病例(No. 3)在外院会诊, 分别诊断为: (1)炎症伴腺体轻度异型增生; (2)腺体重度异型增生, 腺癌不能排除(图1).

2.5 *手术切除标本巨检* 6例病例与邻近脏器关系可分别表现为: 直肠前壁与阴道残端黏连, 阴道后壁与直肠前壁紧密融合成整体; 盆腔受累情况可包括: 左卵巢囊肿, 阴道后穹隆囊性包块; 病变的大体可为表现: (1)直肠左后壁位于黏膜下肿块; (2)直肠壁增厚僵硬, 狭窄明显; (3)直肠前壁菜花状新生物, 表面溃烂, 质硬脆, 易出血; (4)肠管内多处糜烂及溃疡, 水肿增厚明显, 局部肠管狭窄明显, 部分肠管严重扩张(图2).

2.6 *活检及术后大标本病理诊断* 2例考虑诊断为子宫内膜异位症的活检组织HE切片上于肠黏膜内可见子宫内膜样腺体及间质. 与周边具有细杆状核的肠杯状细胞相比, 异位的内膜腺体呈低柱状, 可有纤毛, 胞质透明, 黏液减少, 核圆形或椭圆形, 异位的子宫内膜腺体周围可见子宫

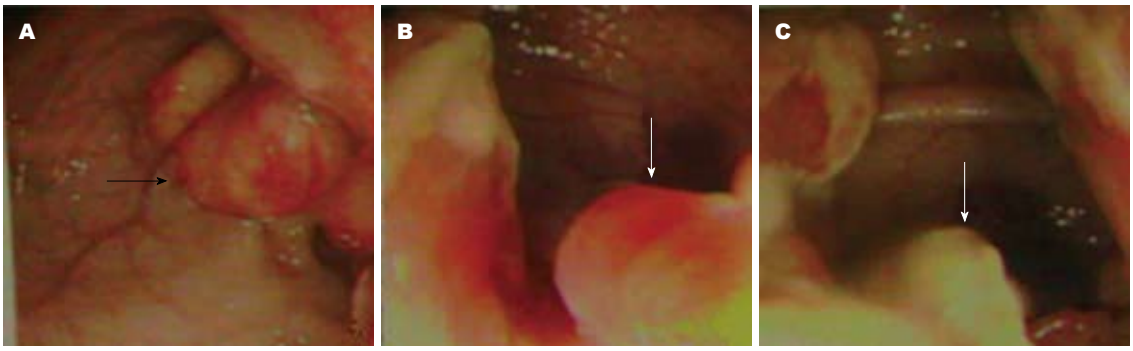


图 1 结肠镜检. A: 直肠距肛门6 cm处见分叶状有蒂新生物, 表面充血, 局部肠腔稍窄; B, C: 距肛门12 cm见不规则新生物, 基底显狭窄示不清, 表面溃烂, 管腔狭窄.

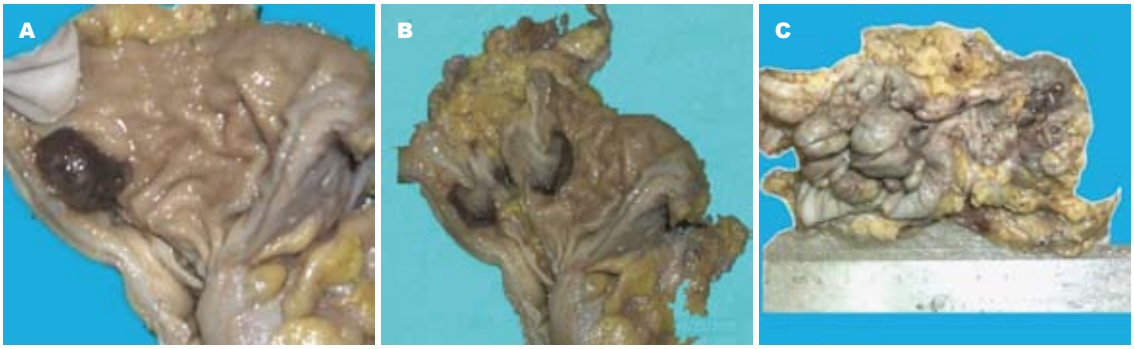


图 2 标本大体观. A, B: 乙状结肠直肠交界处, 距肛门约12 cm, 可见多个菜花状肿块, 大小1.0−1.6 cm, 表面溃疡, 质硬而脆, 易出血; C: 距肛门11 cm可见直肠狭窄, 肠腔内可见菜花型肿块; 距肛门6 cm肠腔内还可见的菜花样叶状肿块; 横结肠, 乙状结肠严重扩张, 直径达10 cm.

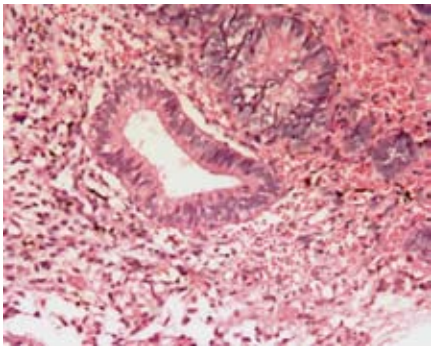


图 3 直肠小活检标本中异位子宫内膜样腺体的形态特征(x100).

内膜间质细胞紧密环绕, 与肠固有层内疏松结缔组织纤维间质细胞相比, 异位子宫内膜间质排列明显密集. 3例考虑诊断为慢性炎症或溃疡的活检标本HE切片上可见主为肠黏膜组织, 但其中似杂少量子宫内膜样腺体, 其上皮胞质内黏液减少、核圆. 诊断为溃疡的1例活检镜下主为溃疡面坏死炎性渗出物以及肉芽组织, 于肉芽组织内也可见个别子宫内膜样腺体, 子宫内膜间质不明显(图3).

6例术后标本HE切片上均检出肠壁内存在明确的异位子宫内膜腺体及间质, 异位内膜腺体呈管状或向腔内形成乳头状, 主要沿肠壁肌束间隙膨胀性生长, 其成长长径基本与疏松结缔组织分布方向基本一致, 表现为在黏膜下层呈平行腔面生长, 在固有肌层的肌束间则呈垂直腔面生长(图4). 个别病例可见异位子宫内膜自浆膜层全层穿透肠壁至黏膜面, 形成息肉.

2.7 免疫组织化学结果 4例肠镜活检诊断为慢性炎症或溃疡的病例及2例考虑为子宫内膜异位症的病例免疫组织化学表型均符合子宫内膜异位症. 异位子宫内膜的免疫组织化学表型为腺体CK7阳性, 腺体及内膜间质ER和PR阳性以及间质细胞CD10阳性, 而正常结直肠黏膜免疫组织化学表型为: 腺上皮CK7阴性, 上皮及黏膜固有层间质ER、PR及CD10阴性, CK20在异位子宫内膜腺体及肠黏膜腺上皮内表达均为阴性. 6例手术后大标本免疫组织化学检测结果与术前肠镜活检标本免疫表型均显示一致(图5).

3 讨论

本组结直肠子宫内膜异位症患者为育龄妇女, 通常有生育史. 1例患者的症状与月经周期相关.

■同行评价

本文立题较为新颖, 结合实际病例对于结直肠癌及结直肠子宫内膜异位症的误诊原因回顾及分析, 对少见部位子宫内膜异位症的误诊起到警醒的作用, 提供了包括临床病史、临床检查结果、大体所见、镜下观察及免疫组织化学分析, 提供素材较为具体和清晰.

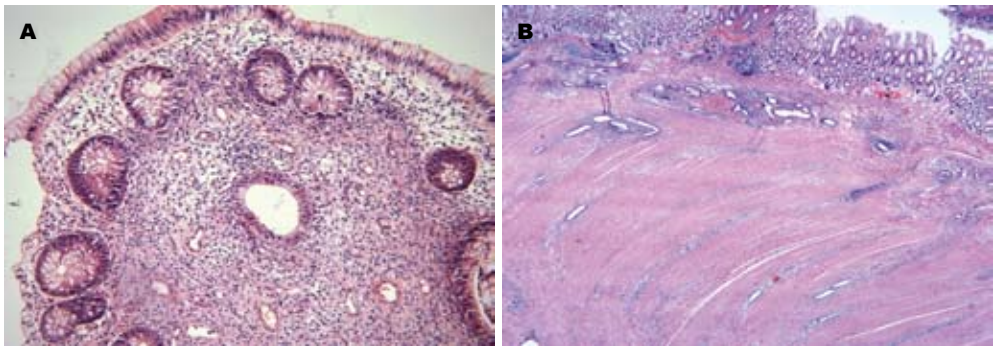


图 4 肠道子宫内膜异位症的HE的形态学特点. A: 活检标本, 可见小的溃疡面、坏死和炎性渗出物, 黏膜息肉样增生, 间质细胞丰富, 核呈椭圆形, 细胞质半透明, 一些子宫内膜腺体间仍然可见少数色素沉着(×40); B: 术后标本, 显示典型的子宫内膜异位症的生长模式(×20).

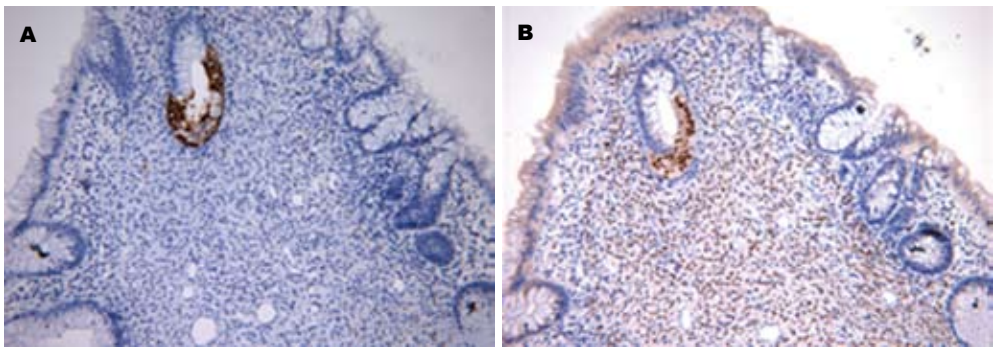


图 5 子宫内膜异位症的活检标本的CK7及ER免疫组织化学染色结果(×40). A: 显示子宫内膜腺体CK7染色阳性, 而肠道腺体CK7染色阴性; B: 显示子宫内膜腺体及间质细胞ER染色阳性, 而肠道腺体及间质ER染色阴性.

其中有3例患者有左侧卵巢受累及的情形; 1例患者有阴道和子宫受累的情况. 卵巢子宫内膜异位囊肿合并盆腔局部黏连者, 早期囊肿与周围组织(包括子宫后壁、阔韧带后叶、侧盆壁以及结肠、直肠等)膜状或片状黏连, 晚期则为致密黏连. 侵犯结直肠者, 可伴有受侵肠道壁僵硬结节; 侵犯阴道穹窿可看到及触及阴道穹窿的触痛结节. 子宫直肠窝部分或完全封闭常常提示更深处病变的存在, 也提示可能有直肠黏连包裹于其中[1-5].

患者常有腹痛、大便形状改变、出血和肠梗阻等症状, 导致临床容易诊断为结直肠癌. 本组病例中有1例表现为周期性的与月经期相关的出血和腹部疼痛的症状. B超和CT检查表现为肠黏膜肿块, 肠壁增厚, 肌层消失, 这些影像学特点与结直肠癌相似. 在结肠镜下, 结直肠子宫内膜异位和结直肠癌表现也相似, 本组病例显示可形成溃疡、息肉样隆起性占位及肠腔狭窄等. 因此, 仅根据临床症状、影像学结果和内镜检查做出判断时, 临床医生很难将其与恶性肿瘤区分[6-13]在本组病例中, 即使结肠镜活检提示为炎症或溃疡的病例, 临床医生依然选择了行根治术手术的治疗方案, 提示结直肠子宫内膜异位症在临床容易被误诊为结直肠癌. 临床医生应提高对结直肠子宫内膜异位症的认识, 对于育龄期妇女询问出血和腹部疼痛的症状是否与月经周期相关, 是区别肠道子宫内膜异位症与结直肠癌最具价值的临床症状. B超和CT检查对两者之间的鉴别作用有限[14-18].

本组病例手术大标本巨检分别表现为溃疡、息肉样隆起性占位或肠腔狭窄等, 与结直肠癌相似. 我们发现, 结直肠癌发现时通常临床分期较晚, 溃疡一般较深, 或表现为息肉状时, 息肉表面粗糙、菜花状. 而肠道子宫内膜异位症通常溃疡浅表, 当表现为息肉状隆起时, 息肉表面常较光滑, 可呈分叶状, 出血明显时, 呈褐色外观[14-16].

结直肠子宫内膜异位症手术大标本的病理特征明显, 可见小的溃疡面、坏死和炎性渗出物, 黏膜息肉样增生, 间质细胞丰富, 核呈椭圆形, 细胞质半透明, 一些子宫内膜腺体间仍然可见少数色素沉着; 异位子宫内膜沿肠壁肌束间

隙生长. 有经验的病理医师通常不易误诊, 而肠镜活检标本即使在高年资病理医生, 其误诊率也高, 本组病例活检误诊率达67%[19-24]. 分析本组误诊的原因, 包括: (1)活检样本取材浅表, 镜下钳取的大部分为肠黏膜组织, 异位的子宫内膜组织与肠固有腺体混杂, 在炎症的背景下难以观察; (2)由于病变出血及黏膜溃疡, 继发引起黏膜腺上皮修复性增生, 表现出一定程度的肠上皮异型, 容易被病理医师注意到, 而忽略了主要病变; (3)因肠道子宫内膜异位症少见, 病理医师的诊断意识不强, 从而忽略了真正的病变, 或将异位的子宫内膜视为异型增生的肠腺体. 对于同一病例的同一张HE切片, 3家医院给出了3种不同的诊断, 包括子宫内膜异位症、腺体中度不典型以及癌不能排除.

结直肠子宫内膜异位症通常主要累及肠壁外层部分, 黏膜部分的内镜检查往往正常或只显示有轻微的病变, 因此需要建立更为敏感的病理诊断方法, 避免漏诊. 我们分析肠黏膜和子宫内膜腺体及间质的不同免疫表型, 重点筛选ER、PR、CK7、CK20和CD10作为观察指标, 发现ER、PR、CK7及CD10均可以区分结直肠黏膜和异位的子宫内膜, CK20不具鉴别价值(图5)[25-27]. 我们术前肠镜活检误诊的4例患者用免疫组织化学标记均清楚地显示出了位于肠黏膜内的异位子宫内膜腺体或间质. 因固有层内中性粒细胞也表达CD10, 在黏膜重度急性炎症的情况下, CD10表达模式的观察受到干扰. 而ER、PR及CK7特异性高, 是最具有价值的免疫组织化学检测指标.

结合形态学及免疫表型特点, 肠镜活检诊断结直肠子宫内膜异位症可以更加明确, 避免误诊漏诊的发生. 对于拟诊病例, 可进一步询问患者是否具有痛经等症状或是否因子宫内膜异位症已行子宫或卵巢切除. 对于育龄妇女, 病理医师应提高结直肠子宫内膜异位症的诊断意识.

当肠镜活检诊断为结直肠子宫内膜异位症时, 可选择腔内超声检查以了解病变的形状、大小、位置、侵犯肠壁深度或与周围组织关系, 帮助临床选择治疗方案. 结直肠子宫内膜异位症的治疗是整个子宫内膜异位症治疗的一个组成部分. 药物治疗的目的是缓解症状及促进生育功能, 也可用于术前准备, 但不能达到根治目的. 当恶性肿瘤的诊断不能完全被排除或者患者出现持续顽固性的症状时, 可考虑手术根治治疗[28-30].

4 参考文献

1 Gambone JC, DeCherney AH. Surgical treatment of minimal endometriosis. *N Engl J Med* 1997; 337: 269-270

2 Nisolle M, Alvarez ML, Colombo M, Foidart JM. [Pathogenesis of endometriosis]. *Gynecol Obstet Fertil* 2007; 35: 898-903

3 Hunter T, Hart R. Endoscopic surgery for female infertility: a review of current management. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 2009; 49: 588-593

4 Seoud AA, Saleh MM, Yassin AH. Endometriosis: a possible cause of right shoulder pain. *Clin Exp Obstet Gynecol* 2010; 37: 19-20

5 Giudice LC. Clinical practice. Endometriosis. *N Engl J Med* 2010; 362: 2389-2398

6 Kwok RM, Moawad FJ, Laczek JT, Horwhat JD. Intestinal endometriosis: an uncommon cause of rectal bleeding. *Endoscopy* 2010; 42 Suppl 2: E112-E113

7 González-Pezzat I, Soto-Pérez-de-Celis E, García-Lascurain JL. Bowel endometriosis as an unusual cause of rectal bleeding. *Am Surg* 2011; 77: 239-241

8 Pickron TB, Cooper J. Laparoscopic hysterectomy and ileocecal resection for treatment of endometriosis. *JSLS* 2009; 13: 224-225

9 Podgaec S, Gonçalves MO, Klajner S, Abrão MS. Epigastric pain relating to menses can be a symptom of bowel endometriosis. *Sao Paulo Med J* 2008; 126: 242-244

10 Maytham GD, Dowson HM, Levy B, Kent A, Rockall TA. Laparoscopic excision of rectovaginal endometriosis: report of a prospective study and review of the literature. *Colorectal Dis* 2010; 12: 1105-1112

11 Kondo W, Bourdel N, Jardon K, Tamburro S, Cavoli D, Matsuzaki S, Botchorishvili R, Rabischong B, Pouly JL, Mage G, Canis M. Comparison between standard and reverse laparoscopic techniques for rectovaginal endometriosis. *Surg Endosc* 2011; 25: 2711-2717

12 Vercellini P, Barbara G, Buggio L, Frattaruolo MP, Somigliana E, Fedele L. Effect of patient selection on estimate of reproductive success after surgery for rectovaginal endometriosis: literature review. *Reprod Biomed Online* 2012; 24: 389-395

13 Ruffo G, Stepniewska A, Crippa S, Serboli G, Zardini C, Steinkasserer M, Ceccaroni M, Minelli L, Falconi M. Laparoscopic ileocecal resection for bowel endometriosis. *Surg Endosc* 2011; 25: 1257-1262

14 Daraï E, Lesieur B, Dubernard G, Rouzier R, Bazot M, Ballester M. Fertility after colorectal resection for endometriosis: results of a prospective study comparing laparoscopy with open surgery. *Fertil Steril* 2011; 95: 1903-1908

15 Stepniewska A, Pomini P, Guerriero M, Scioscia M, Ruffo G, Minelli L. Colorectal endometriosis: benefits of long-term follow-up in patients who underwent laparoscopic surgery. *Fertil Steril* 2010; 93: 2444-2446

16 de Ziegler D, Borghese B, Chapron C. Endometriosis and infertility: pathophysiology and management. *Lancet* 2010; 376: 730-738

17 Pereira RM, Zanatta A, Serafini PC, Redwine D. The feasibility of laparoscopic bowel resection performed by a gynaecologist to treat endometriosis. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2010; 22: 344-353

18 Jelenc F, Ribič-Pucelj M, Juvan R, Kobal B, Sinkovec J, Salamun V. Laparoscopic rectal resection of deep infiltrating endometriosis. *J Laparoendosc Adv Surg*

Tech A 2012; 22: 66-69
19 Gupta RK, Agrawal CS, Yadav RP, Uprety D, Sah PL. Rectosigmoid endometriosis causing an acute large bowel obstruction: a report of a case and a review of the literature. *JNMA J Nepal Med Assoc* 2011; 51: 83-86
20 Uchiyama S, Haruyama Y, Asada T, Nagaike K, Hotokezaka M, Yorita K, Chijiiwa K. Rectal endometriosis masquerading as dissemination in a patient with rectal cancer: report of a case. *Surg Today* 2010; 40: 672-675
21 Kim JS, Hur H, Min BS, Kim H, Sohn SK, Cho CH, Kim NK. Intestinal endometriosis mimicking carcinoma of rectum and sigmoid colon: a report of five cases. *Yonsei Med J* 2009; 50: 732-735
22 Lin PY, Cheng CJ, Lou HY, Tiong C, Fang SU, Cheng YC, Chang CC. Deep infiltrating cervical endometriosis mimicking rectosigmoid cancer. *Am J Med Sci* 2011; 342: 239
23 Ret Dávalos ML, De Cicco C, D'Hoore A, De Decker B, Koninckx PR. Outcome after rectum or sigmoid resection: a review for gynecologists. *J Minim Invasive Gynecol* 2007; 14: 33-38
24 Sassi S, Bouassida M, Touinsi H, Mongi Mighri M, Baccari S, Chebbi F, Bouzeidi K, Sassi S. Exceptional cause of bowel obstruction: rectal endometriosis mimicking carcinoma of rectum--a case report. *Pan Afr Med J* 2011; 10: 33
25 De Cicco C, Corona R, Schonman R, Mailova K, Ussia A, Koninckx P. Bowel resection for deep endometriosis: a systematic review. *BJOG* 2011; 118: 285-291
26 Gajjar KB, Mahendru AA, Khaled MA. Caesarean scar endometriosis presenting as an acute abdomen: a case report and review of literature. *Arch Gynecol Obstet* 2008; 277: 167-169
27 Cinardi N, Franco S, Centonze D, Giannone G. Perineal scar endometriosis ten years after Miles' procedure for rectal cancer: Case report and review of the literature. *Int J Surg Case Rep* 2011; 2: 150-153
28 Streuli I, de Ziegler D, Borghese B, Santulli P, Batteux F, Chapron C. New treatment strategies and emerging drugs in endometriosis. *Expert Opin Emerg Drugs* 2012 Mar 23. *[Epub ahead of print]*
29 Chen N, Zhu L, Lang J, Liu Z, Sun D, Leng J, Fan Q, Zhang H, Cui Q. The clinical features and management of perineal endometriosis with anal sphincter involvement: a clinical analysis of 31 cases. *Hum Reprod* 2012; 27: 1624-1627
30 Zhu L, Lang J, Wang H, Liu Z, Sun D, Leng J, Zhou H, Cui Q, Wong F. Presentation and management of perineal endometriosis. *Int J Gynaecol Obstet* 2009; 105: 230-232

编辑 田滢 电编 鲁亚静

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》参考文献要求

本刊讯 本刊采用“顺序编码制”的著录方法, 即以文中出现顺序用阿拉伯数字编号排序. 提倡对国内同行近年已发表的相关研究论文给予充分的反映, 并在文内引用处右上角加方括号注明角码. 文中如列作者姓名, 则需在“Pang等”的右上角注角码号; 若正文中仅引用某文献中的论述, 则在该论述的句末右上角注码号. 如马连生[1]报告……, 潘伯荣等[2-5]认为……; PCR方法敏感性高[6-7]. 文献序号作正文叙述时, 用与正文同号的数字并排, 如本实验方法见文献[8]. 所引参考文献必须以近2-3年SCIE, PubMed,《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊为准, 通常应只引用与其观点或数据密切相关的国内外期刊中的最新文献, 包括世界华人消化杂志(http://www.wjgnet.com/1009-3079/index.jsp)和*World Journal of Gastroenterology*(http://www.wjgnet.com/1007-9327/index.jsp). 期刊: 序号, 作者(列出全体作者). 文题, 刊名, 年, 卷, 起页-止页, PMID编号 ; 书籍: 序号, 作者(列出全部),书名, 卷次, 版次, 出版地, 出版社, 年, 起页-止页.

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com
世界华人消化杂志 2012年12月28日; 20(36): 3801-3803
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

CD40在溃疡性结肠炎组织中的表达及意义

赵 毅, 陆志平, 曹建凡, 陈卫昌

赵毅, 陈卫昌, 苏州大学附属第一医院消化科 江苏省苏州市 215006
赵毅, 陆志平, 曹建凡, 常熟市第二人民医院消化科 江苏省常熟市 215500
赵毅, 副主任医师, 硕士, 主要从事消化内科临床及内镜研究.
作者贡献分布: 本课题由赵毅、陆志平及陈卫昌设计; 研究过程由赵毅、陆志平及曹建凡完成; 数据分析及论文写作由赵毅与陆志平完成.
通讯作者: 陈卫昌, 主任医师, 215006, 江苏省苏州市十梓街188号, 苏州大学附属第一医院消化科. zy26074@126.com
收稿日期: 2012-11-11 修回日期: 2012-12-06
接受日期: 2012-12-14 在线出版日期: 2012-12-28

Significance of expression of CD40 in ulcerative colitis

Yi Zhao, Zhi-Ping Lu, Jian-Fan Cao, Wei-Chang Chen

Yi Zhao, Wei-Chang Chen, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215006, Jiangsu Province, China
Yi Zhao, Zhi-Ping Lu, Jian-Fan Cao, Department of Gastroenterology, Changshu No.2 People's Hospital, Changshu 215500, Jiangsu Province, China
Correspondence to: Wei-Chang Chen, Chief Physician, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215006, Jiangsu Province, China. zy26074@126.com
Received: 2012-11-11 Revised: 2012-12-06
Accepted: 2012-12-14 Published online: 2012-12-28

Abstract

AIM: To investigate the expression of CD40 in ulcerative colitis.

METHODS: The expression of CD40 protein was detected by immunohistochemistry in 56 cases of human ulcerative colitis and 10 case of normal colon tissue.

RESULTS: The positive rate of CD40 expression in active ulcerative colitis was significantly higher than that in normal colon tissue (62.50% vs 20.00%, χ^2 = 6.2217, P < 0.05). The positive rate of CD40 expression was significantly higher in moderately than in mildly active ulcerative colitis (P < 0.05).

CONCLUSION: CD40 is abnormally expressed in colon tissue of patients with ulcerative colitis.

Key Words: CD40; Ulcerative colitis

Zhao Y, Lu ZP, Cao JF, Chen WC. Significance of expression of CD40 in ulcerative colitis. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(36): 3801-3803

摘要

目的: 研究CD40分子在溃疡性结肠炎组织中的表达及其与溃疡性结肠炎严重度之间的相关性.

方法: 收集2008-01/2011-10本院收治的溃疡性结肠炎患者56例, 同时收集同期健康体检者10例. 应用免疫组织化学技术检测溃疡性结肠炎组织和正常结肠组织中CD40分子的表达.

结果: CD40分子在溃疡性结肠炎组织中的阳性表达率明显高于对照组(62.50% *vs* 20.00%, χ^2 = 6.2217, P<0.05). 与轻度溃疡性结肠炎相比, CD40阳性表达率在中度溃疡性结肠炎中明显升高(90.00% *vs* 39.28%, P<0.05).

结论: CD40在溃疡性结肠炎组织中存在异常表达.

关键词: CD40; 溃疡性结肠炎

赵毅, 陆志平, 曹建凡, 陈卫昌. CD40在溃疡性结肠炎组织中的表达及意义. 世界华人消化杂志 2012; 20(36): 3801-3803
http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3801.asp

0 引言

溃疡性结肠炎是肠道的慢性炎症性疾病, 其病因并不完全明确, 其中免疫因素致病是目前一重要学说. CD40分子具有促进B细胞活化增殖、信号传导等重要功能, 是免疫应答中重要的共刺激分子[1]. 基于CD40在介导免疫反应中所发挥的重要作用, 本试验分析CD40在溃疡性结肠炎组织和正常结肠组织中的表达, 探讨CD40在溃疡性结肠炎发病机制中的作用.

1 材料和方法

1.1 材料 收集2008-01/2011-10本院收治的溃疡性结肠炎患者56例, 其中男31例, 女25例, 年龄

■背景资料
溃疡性结肠炎是肠道的慢性炎症性疾病, 其病因并不完全明确, 其中免疫因素致病是目前一重要学说. CD40分子具有促进B细胞活化增殖、信号传导等重要功能, 是免疫应答中重要的共刺激分子.

■同行评议者
张志坚, 教授, 福州总医院消化内科

■相关报道
薛丽英等报道CD-40在食管鳞状细胞癌组织中的表达阳性率为54.43%, 明显高于正常食管鳞状上皮(P<0.05), 食管鳞状细胞癌组织CD40蛋白表达与淋巴结转移密切相关(P<0.05). 王赫等也报道结肠组织中CD40阳性细胞百分数较对照组高(P<0.05).

表 1 CD40分子在溃疡性结肠炎组织及健康体检者肠道组织中的表达

分组	n	CD40表达强度			
		−	+	++	+++
患者组	56	21	12[a]	17[a]	6[a]
健康体检组	10	8	2	0	0

[a]P<0.05 *vs* 健康体检组.

17-62岁, 平均(40.50±11.26)岁. 溃疡性结肠炎患者诊断符合中华医学会消化病学分会炎症性肠病学科组制定的诊断指南. 另外, 收集健康体检者10例, 其中男6例, 女4例, 年龄28-59岁, 平均(41.70±10.54)岁. 所有患者及健康体检者均于肠镜操作中留取组织标本. 2组患者年龄、性别均无统计学差异, 具有可比性(P>0.05). 所有受试者均签署知情同意书. 鼠抗人CD40单克隆抗体购自BD Pharmingen公司, DAB显色试剂为福建迈新生物科技有限公司产品.

1.2 方法

1.2.1 检测溃疡性结肠炎组织中CD40的表达: 采用SP免疫组织化学法, 用PBS取代一抗做阴性对照, 阳性对照采用何杰金氏淋巴瘤标本.

1.2.2 判断标准: CD40染色阳性表达呈棕黄色或棕褐色, 主要位于细胞膜, 胞浆同时着色亦为阳性. 计分标准参照Barnes等[2]提出的基于3个参数的半定量计数方法, 即染色强度(A), 阳性细胞数(B)和两者计分的乘积. 免疫组织化学染色计分标准参照文献[3].

1.2.3 指标观察: 根据患者的腹泻、便血、内镜下黏膜表现计算southerland评分.

统计学处理 以SPSS10.0软件进行统计, 计数资料采用卡方检验分析各组间差异, 计量资料符合参数检验的采用t检验, 不符合参数检验的采用秩和检验, P<0.05为差异有显著性.

2 结果

2.1 CD40分子在溃疡性结肠炎患者及健康体检者肠道组织中的表达 CD40分子在溃疡性结肠炎组织中有不同程度的表达, 其表达率为62.5%, 较健康体检者(20%)明显升高, 且差异有统计意义(χ^2 = 6.2217, P<0.05, 表1).

2.2 CD40分子表达与溃疡性结肠炎病变严重度(southerland评分)的相关性 56例溃疡性结肠炎患者中southerland评分为3-5分者28例、6-10分者21例、11-12分者7例, 其阳性率轻度组为39.28%, 中度组为90.00%, 重度组为71.42%; CD40分子表达率在轻度组与中度组之间比较, 差异有统计学意义(χ^2 = 5.4532, P<0.05); 轻、中度组与重度组相比, 均无统计学意义(P>0.05).

3 讨论

研究认为, CD40参与多种疾病的致病过程, 如自身免疫性疾病、感染性疾病、宿主抗移植物排斥反应、移植物抗宿主疾病等. 黄建安等[3]采用免疫组织化学法检测肺恶性肿瘤组织中CD40分子的表达, 并分析CD40表达水平高低与临床分期和病理分级的相关性; 结果显示CD40在肺癌组织中的阳性表达率为76.5%, 明显高于正常肺组织(P<0.01), CD40在肺癌发病过程中可能起重要的作用, 其阳性表达可作为肺癌预后判断及淋巴结转移监测的有价值指标之一. 田文妍等[4]检测128例胃腺癌及其相应癌旁组织中的CD40蛋白表达, 结果显示胃腺癌组织中CD40蛋白阳性表达率为64.8%, 而相应癌旁组织中阳性表达率为7.0%, CD40表达与胃腺癌远处转移和TNM分期相关. 张志超等[5]报道40例原发性肝细胞癌组织中CD40的表达, 并选择25例癌旁正常组织(距癌组织≥2 cm)作为对照, 结果显示40例肝癌组织中CD40表达的阳性率为47.5%(19/40), 明显高于癌旁正常组织, 具有显著性差异(P<0.01). 薛丽英等[6]报道CD40在食管鳞状细胞癌组织中的表达阳性率为54.43%, 明显高于正常食管鳞状上皮(P<0.05), 食管鳞状细胞癌组织CD40蛋白表达与淋巴结转移密切相关(P<0.05). 王赫等[7]也报道结肠组织中CD40阳性细胞百分数较对照组高(P<0.05).

目前, 国内外相关的研究认为在溃疡性结肠炎发病过程中树突状细胞呈激活状态, 激活的树突状细胞是导致溃疡性结肠炎发生、发展的关键启动子. CD40可以促进血管内皮细胞表面的粘附分子血管细胞黏附分子-1和E-选择素的表达, 反过来可以促进炎症部位淋巴细胞的聚集. CD40可与APC(包括树突状细胞和巨噬细胞)表面的CD40结合, 从而对细胞免疫不同时相的免疫应答起控制作用[8-10].

本研究表明, 在溃疡性结肠炎患者黏膜表面可见CD40的表达明显升高, 且与健康体检者相比有统计学差异(P<0.05). 有研究表明, 在活化的炎症性肠病组织中可见黏膜和黏膜下的单核细胞、内皮细胞及肠间质细胞的CD40的广泛分布[11-15]; 其次, 溃疡性结肠炎严重度与CD40的

表达有一定的相关度. 本研究表明, 随着溃疡性结肠炎southerland评分的升高, 中、重度溃疡性结肠炎患者结肠组织中CD40分子的表达较轻度组明显升高, 表明CD40的表达水平部分反应了溃疡性结肠炎症的轻重, 但与重度组中CD40分子表达率相比, 无论轻、中度均无统计学意义(P>0.05). 其原因可能在于CD40-CD40L的传导过程涉及到众多炎症因子、细胞因子及黏附分子. 而溃疡性结肠炎除炎症外还有免疫机制等多方面因素作用, 其次, 可能与纳入研究的病例数较少有关.

本研究表明, CD40在溃疡性结肠炎黏膜组织中的存在表达异常, 提示其在溃疡性结肠炎发生发展中发挥了一定作用. 通过调控CD40分子的表达, 将为溃疡性结肠炎的生物治疗提供新的治疗思路.

4 参考文献

1 Koutroubakis IE, Theodoropoulou A, Xidakis C, Sfiridaki A, Notas G, Kolios G, Kouroumalis EA. Association between enhanced soluble CD40 ligand and prothrombotic state in inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004; 16: 1147-1152

2 Barnes DM, Meyer JS, Gonzalez JG, Gullick WJ, Millis RR. Relationship between c-erbB-2 immunoreactivity and thymidine labelling index in breast carcinoma in situ. *Breast Cancer Res Treat* 1991; 18: 11-17

3 黄建安, 顾冬梅, 庄羽美, 康苏娅, 张学光. CD40分子在肺癌中的表达及其临床意义. 江苏医药 2003; 29: 645-647

4 田文妍, 陈卫昌, 李锐, 刘雷. CD40、PI3K、p-Akt、VEGF在人胃腺癌中的表达和意义. 胃肠病学 2011; 16: 404-408

5 张志超, 贾明库. CD40与ICAM-1在肝癌组织中的表达及临床意义. 吉林大学, 2006

6 薛丽英, 张祥宏, 李学民, 李月红, 丁涛, 米建民, 王俊灵, 严霞, 温实, 邢欣, 崔晋峰. 食管鳞状细胞癌CD40、COX-2表达及其与血管生成关系的研究. 中华医学会病理学分会2009年学术年会论文汇编, 2009: 89

7 王赫, 周毅, 梁磊, 陈艳. CD40在大鼠炎症性肠病外周血和结肠组织中的表达. 天津医药 2007; 35: 518-519

8 Schönbeck U, Libby P. The CD40/CD154 receptor/ligand dyad. *Cell Mol Life Sci* 2001; 58: 4-43

9 万国仕, 赵振中, 钱一龙, 谢中华, 王珠美, 朱建俊. 血清SOCS-3、IL-6、TNF-α在溃疡性结肠炎患者中的变化及其相互关系. 世界华人消化杂志 2011; 19: 3370-3373

10 宋璐, 夏冰. 溃疡性结肠炎发病机制及其诊断. 中国实用内科杂志 2010; 35: 1056-1058

11 Mineva ND, Rothstein TL, Meyers JA, Lerner A, Sonenshein GE. CD40 ligand-mediated activation of the de novo RelB NF-kappaB synthesis pathway in transformed B cells promotes rescue from apoptosis. *J Biol Chem* 2007; 282: 17475-17485

12 吴昊, 曹曙光, 徐昌隆, 裴继华, 郑波. 亚甲基四氢叶酸还原酶G1793A基因多态性与溃疡性结肠炎的关系. 解放军医学杂志 2011; 36: 1214-1216

13 Kono K, Sobue I. [Histamine and ergotamine loading tests]. *Nihon Rinsho* 1979; Suppl: 1847-1848

14 Toubi E, Shoenfeld Y. The role of CD40-CD154 interactions in autoimmunity and the benefit of disrupting this pathway. *Autoimmunity* 2004; 37: 457-464

15 陈晓晴, 许华, 罗小平. 促红细胞生成素对坏死性小肠结肠炎TLR4、NF-κB及IL-6变化的影响. 解放军医学杂志 2011; 36: 918-922

■同行评价

本研究目的明确, 有一定的临床意义, 但是指标单一, 希望进一步深入研究.

编辑 李军亮 电编 鲁亚静

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2012年12月28日; 20(36): 3804-3810
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

临床经验 CLINICAL PRACTICE

达芬奇机器人手术系统与腹腔镜手术在直肠癌TME中疗效的Meta分析

袁殿宝, 文西年, 许新才, 李 涛

■背景资料
2001年达芬奇机器人手术系统被应用于结直肠外科的微创治疗. 自2002年以来, 相继有机器人结直肠外科手术成功的报道.

袁殿宝, 文西年, 许新才, 李涛, 新疆医科大学第一附属医院胃肠外科 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830054
袁殿宝, 主要从事胃肠肿瘤外科方面的研究.
作者贡献分布: 袁殿宝与李涛对此文所作贡献均等; 此课题由袁殿宝与李涛设计; 研究过程由袁殿宝、文西年、许新才及李涛操作完成; 数据分析由袁殿宝与文西年完成; 本论文写作由袁殿宝、文西年及李涛完成.
通讯作者: 李涛, 主任医师, 830054, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市鲤鱼山南路137号, 新疆医科大学第一附属医院胃肠外科. lit@medmail.com.cn
收稿日期: 2012-11-06 修回日期: 2012-12-03
接受日期: 2012-12-20 在线出版日期: 2012-12-28

Robotic versus laparoscopic total mesorectal excision for rectal cancer: A Meta-analysis

Dian-Bao Yuan, Xi-Nian Wen, Xin-Cai Xu, Tao Li

Dian-Bao Yuan, Xi-Nian Wen, Xin-Cai Xu, Tao Li, Department of Gastrointestinal Surgery, the First Affiliated Hospital of Xinjiang University, Urumqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China
Correspondence to: Tao Li, Chief Physician, Department of Gastrointestinal Surgery, the First Affiliated Hospital of Xinjiang University, 137 Liyushan South Road, Urumqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China. lit@medmail.com.cn
Received: 2012-11-06 Revised: 2012-12-03
Accepted: 2012-12-20 Published online: 2012-12-28

Abstract

AIM: To compare the efficacy of robotic versus laparoscopic total mesorectal excision for rectal cancer.

METHODS: Controlled trials comparing the efficacy of robotic versus laparoscopic total mesorectal excision for rectal cancer were electronically searched from MEDLINE (PubMed), EMBASE, OVID, CNKI, and WANFANG databases. Relevant published and unpublished data and their references were also searched manually. The data were extracted and the methodological quality of the incorporated research was evaluated by two reviewers independently, and the RevMan 5.1 software was used for Meta-analysis.

RESULTS: Six studies including 414 patients were included in the analysis. A meta-analysis showed that there were no significant differences in operative time [MD = 23.77, 95% CI (-1.80, 49.34), P = 0.07], length of hospital stay [MD = -0.59, 95% CI (-1.62, 0.43), P = 0.26], number of cleared lymph nodes [MD = 0.97, 95% CI (-0.69, 2.64), P = 0.25], overall complications [RR = 0.82, 95% CI (0.49, 1.36), P = 0.44] and individual complications between the study group and control group.

CONCLUSION: Current evidence demonstrates that robotic and laparoscopic techniques have similar curative effect in total mesorectal excision for rectal cancer. The above conclusion is still validated by carrying out more multi-center randomized controlled trials.

Key Words: Da Vinci surgical system; Laparoscopic surgery; Minimally invasive; Rectal cancer; Meta-analysis

Yuan DB, Wen XN, Xu XC, Li T. Robotic versus laparoscopic total mesorectal excision for rectal cancer: A Meta-analysis. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(36): 3804-3810

摘要

目的: 比较机器人辅助腹腔镜(robot-assisted, RAP)与传统腹腔镜(laparoscopic, LAP)在直肠癌全系膜切除术(total mesorectal excision, TME)中的疗效.

方法: 计算机检索MedLine(PubMed)、EMBASE、OVID、全文数据库(CNKI)、万方数据库, 并手工检索发表的资料和会议论文并追索纳入文献的参考文献, 查找国内外比较机器人辅助腹腔镜与传统腹腔镜治疗直肠癌的相关病例-对照试验. 对纳入研究进行方法学质量评价之后, 采用RevMan 5.1软件进行Meta分析.

结果: 共纳入6个相关病例-对照研究, 合计414例患者. Meta分析结果表明: 机器人辅助腹腔镜(RAP)组与传统腹腔镜(LAP)组相比, 两组在

■同行评议者
许剑民, 教授, 上海市复旦大学附属中山医院普外科

手术时间[MD = 23.77, 95%CI(-1.80, 49.34), P = 0.07]、住院时间[MD = -0.59, 95%CI(-1.62, 0.43), P = 0.26]、淋巴结清扫数目[MD = 0.97, 95%CI(-0.69, 2.64), P = 0.25]、总并发症[RR = 0.82, 95%CI(0.49, 1.36), P = 0.44]及相关单并发症方面没有显著统计学差异.

结论: RAP与LAP在直肠癌TME手术中的疗效及并发症发生率方面效果相似. 由于纳入研究数量少, 上述结论尚需开展更多设计合理的多中心大样本的随机对照试验加以验证.

关键词: 达芬奇机器人手术系统; 腹腔镜手术; 微创; 直肠癌; Meta分析

袁殿宝, 文西年, 许新才, 李涛. 达芬奇机器人手术系统与腹腔镜手术在直肠癌TME中疗效的Meta分析. 世界华人消化杂志 2012; 20(36): 3804-3810
http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3804.asp

0 引言

2001年达芬奇机器人手术系统被应用于结直肠外科的微创治疗. 自2002年以来, 相继有机器人结直肠外科手术成功的报道[1,2]. 直肠癌全系膜切除术(total mesorectal excision, TME)已经成为低位直肠癌的标准术式, Ng等[3]的研究认为机器人联合腹腔镜行低位直肠癌TME手术有一定的优势, 其操作简便, 同时发挥机器人操作臂在狭小空间操作灵活、三维立体、视野清晰的优势. 本研究采用Cochrane系统评价方法, 通过搜集国内外关于机器人辅助腹腔镜(robot-assisted, RAP)与传统腹腔镜(laparoscopic, LAP)手术治疗低位直肠癌的资料, 比较分析其两种手术方式的疗效, 进一步指导临床工作.

1 材料和方法

1.1 材料 所有病例明确组织学诊断为直肠癌; 均行手术治疗者. 试验组采用RAP手术治疗, 对照组患者采用LAP手术治疗.

1.2 方法

1.2.1 排除标准: 无法建立气腹的患者; 既往有结肠手术病史的患者; 非直肠癌TME研究.

1.2.2 观察指标: 包括手术时间、住院时间、淋巴结清扫数目、手术并发症、环周切缘到肿瘤的距离.

1.2.3 计算机检索: 检索MedLine(PubMed)、EMBASE、OVID、全文数据库(CNKI)、万方数据库, 并手工检索发表的资料和会议论文并追索纳入文献的参考文献, 查找国内外关于比较RAP与LAP在治疗直肠癌中的疗效及并发症的相关文献资料. 检索时间(1979-2012). 中文检索词包括: 达芬奇机器人手术系统、腹腔镜、直肠癌、TME. 英文检索词: Da Vinci surgical system、Laparoscopic surgery、Rectal cancer、TME.

1.2.4 资料提取与文献质量评价: 由2位评价者独立检索文献、提取资料并再次核对, 如有分歧则通过征求第3方意见进行解决. 纳入研究的方法学质量评价采用Cochrane Reviewer'Handbook 5.1的RCT质量标准[4]和吴泰相等[5]对隐蔽分组和盲法的描述, 具体评价标准包括随机方法、隐蔽分组、医生和患者的盲法、数据统计者的盲法、不完整资料偏倚、选择性报告结果和其他潜在影响真实性的因素7项. 如7项指标均符合则说明该研究的质量较高, 否则有产生相应偏倚的可能性.

统计学处理 采用Cochrane协作网提供的RevMan 5.1软件进行Meta分析. 计数资料用相对危险度(RR)及95%可信区间(CI)表示, 对度量衡单位相同的计量资料采用加权均数差值(WMD), 单位不同者采用标化均数差值(SMD). 数据合并之前先对各研究的数据进行异质性检验, 若各研究间无异质性存在, 采用固定效应模型进行分析; 若各研究结果间存在异质性, 首先分析异质性来源, 如无明显临床异质性, 可采用随机效应模型分析. 对无法定量合成者, 则通过描述予以定性评价.

2 结果

2.1 纳入研究的特征及偏倚风险评价 按照预先制定的检索策略, 通过电子和手工检索本研究最终纳入中文文献0篇, 英文文献6篇[6-11]共414例患者, 试验组采用机器人辅助腹腔镜(RAP)手术治疗186例, 对照组患者采用传统LAP手术治疗228例. 所纳入研究的特征(表1), 纳入研究的偏倚风险评价(图1), 结果显示未见明显发表偏倚.

2.2 Meta分析

2.2.1 手术时间比较: 纳入的6个研究均比较了RAP与LAP的手术时间, 异质性检验结果显示各研究间无统计学异质性(P = 0.00003, I^2 = 79%), 故采用随机效应模型进行Meta分析, 结果显示两组差异有统计学意义[MD = 23.77, 95%CI(-1.80, 49.34), P = 0.07](图2).

2.2.2 住院时间比较: 纳入的6个研究均比较了

■**研发前沿**
机器人联合腹腔镜行低位直肠癌TME手术有一定的优势, 其操作简便, 同时发挥机器人操作臂在狭小空间操作灵活、三维立体、视野清晰的优势.

■相关报道
Zimmern等认为机器人辅助腹腔镜手术方便选择手术入路, 可以在狭小的空间内操作灵活, 能够更彻底的切除全直肠系膜, 同时Jayaraman等认为达芬奇机器人系统, 解剖结构更加明显, 创伤小、出血量少, 应用前景广泛.

表 1 6篇纳入文献基本特征

作者	发表时间(年)	国家	例数(n)	RAP组(n)	LAP组(n)	资料可比性
Pigazzi等[6]	2006	加利福尼亚	12	6	6	abcde
Park等[7]	2010	韩国	123	41	82	abcde
Bianchi等[8]	2010	意大利	50	25	25	abcde
Baik等[9]	2008	韩国	36	18	18	abcde
Baik等[10]	2009	韩国	113	56	57	abcde
Park等[11]	2012	韩国	80	40	40	abcde

RAP: 机器人辅助腹腔镜; LAP: 传统腹腔镜; a为年龄, b为性别, c为肿瘤位置, d为肿瘤分期, e为体质量指数.

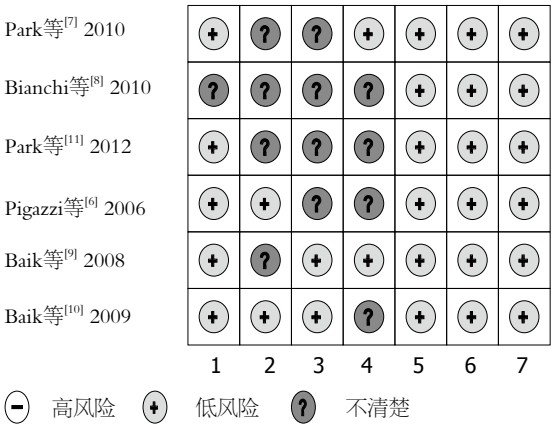


图 1 纳入研究的偏倚风险评价. 1: Random sequence generation (selection bias); 2: Allocation concealment (selection bias); 3: Blinding of participants and personnel (performance bias); 4: Blinding of outcome assessment (detection bias); 5: Incomplete outcome data (attrition bias); 6: Selective reporting (reporting bias); 7: Other bias.

RAP与LAP的住院时间, 异质性检验结果显示各研究间无统计学异质性(P = 0.002, I^2 = 74%), 故采用随机效应模型进行Meta分析, 结果显示两组差异有统计学意义[MD = -0.59, 95%CI(-1.62, 0.43), P = 0.26](图3).

2.2.3 淋巴结清扫数目比较: 纳入的6个研究均比较了RAP与LAP的淋巴结清扫数目, 异质性检验结果显示各研究间无统计学异质性(P = 0.51, I^2 = 0%), 故采用固定效应模型进行Meta分析, 结果显示两组差异有统计学意义[MD = 0.97, 95%CI(-0.69, 2.64), P = 0.25](图4).

2.2.4 手术并发症比较: 纳入的研究有2篇[1,4]比较了术后肺不张[RR = 1.47, 95%CI(0.30, 7.32), P = 0.64]; 3篇[1,2,4]比较了术后吻合口瘘[RR = 0.74, 95%CI(0.30, 1.83), P = 0.51]; 2篇[1,2]比较了术后伤口感染[RR = 0.55, 95%CI(0.08, 3.62), P = 0.54]; 3篇[1,4,5]比较了术后肠梗阻[RR = 0.93, 95%CI(0.24, 3.54), P = 0.91]; 3篇[1,2,5]比较了术后腹腔脓肿[RR = 1.17, 95%CI(0.32, 4.20), P = 0.81]; 3篇[1,2,4]比较了术后尿潴留[RR = 0.37, 95%CI(0.04, 3.29), P = 0.37]; 2篇[1,2]比较了术后贫血[RR = 0.76, 95%CI(0.18, 3.17), P = 0.71], 各并发症组异质性检验结果显示各研究间均无统计学异质性(I^2均<50%), 故均采用固定效应模型进行Meta分析, 7组并发症结果显示两组差异均无统计学意义, 总并发症[RR = 0.82, 95%CI(0.49, 1.36), P = 0.44](图5).

3 讨论

TME已经成为低位直肠癌的标准术式, 由于低位直肠癌解剖学特点, 传统开腹手术操作相对局限, 因此需要寻求更完善的手术方式, 而手术方式的选择要把握以下因素[12-14]: (1)掌握低位直肠的病理生理; (2)多学科综合应用; (3)不断完善的手术技巧和手术设备.

随着外科微创观念的不断深入, 腹腔镜手术和机器人辅助腹腔镜手术逐渐应用到直肠癌TME中. 汪迎等[15]研究结果显示腹腔镜手术疗效明显优于开腹手术. 由于缺少证据支持, NCCN直肠癌指南对腹腔镜直肠癌手术推荐“仅限于临床试验”, 时至今日, 由于腹腔镜与开放直肠癌手术远期疗效的对比研究结果尚未出炉, 故2012年指南对腹腔镜直肠癌手术推荐仍未改变, 但外科学者一直对手术方式、手术入路和手术质量进行不断的探索和完善. 机器人辅助腹腔镜手术于2001年才被应用到结直肠外科, 应用时间较短, 但机器人联合腹腔镜行低位直肠癌TME手术操作简便, 直肠癌机器人手术也遵循全直肠系膜切除的手术原则[16], 与传统开腹手术及腹腔镜手术相比: (1)机器人辅助腹腔镜手术方便选择手术入路, 可以在狭小的空

■**创新盘点**

本研究采用Cochrane系统评价方法, 通过搜集国内外关于机器人辅助腹腔镜RAP与传统腹腔镜LAP手术治疗低位直肠癌的资料, 比较分析其两种手术方式的疗效, 进一步指导临床工作.

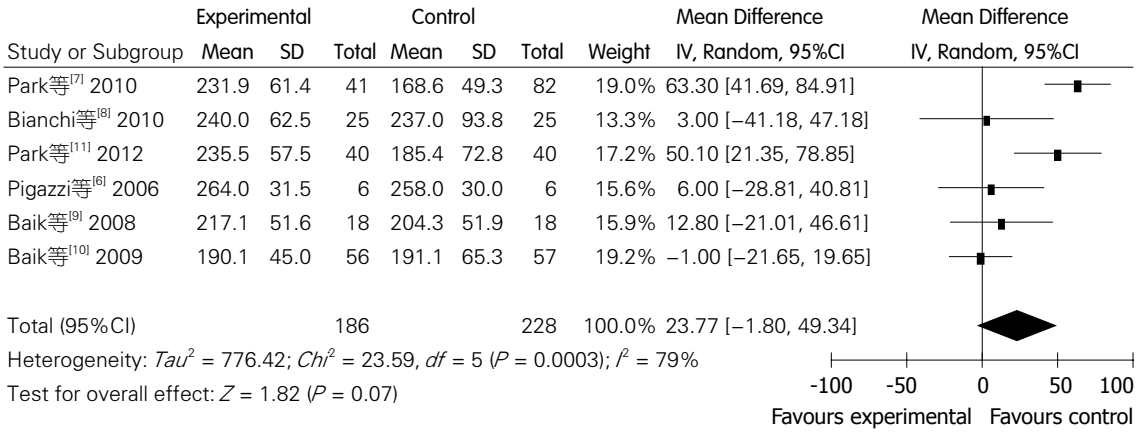


图 2 机器人辅助腹腔镜与传统腹腔镜的手术时间比较的Meta分析.

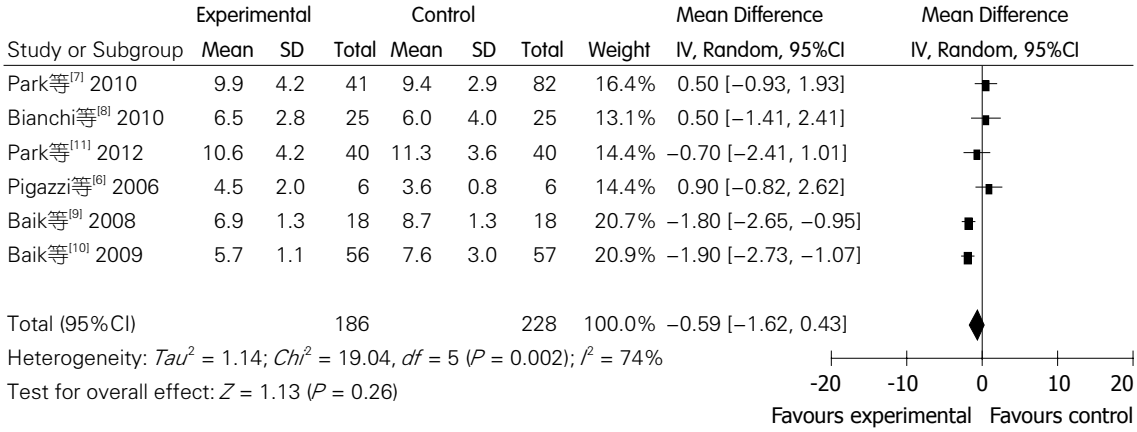


图 3 机器人辅助腹腔镜与传统腹腔镜的住院时间比较的Meta分析.

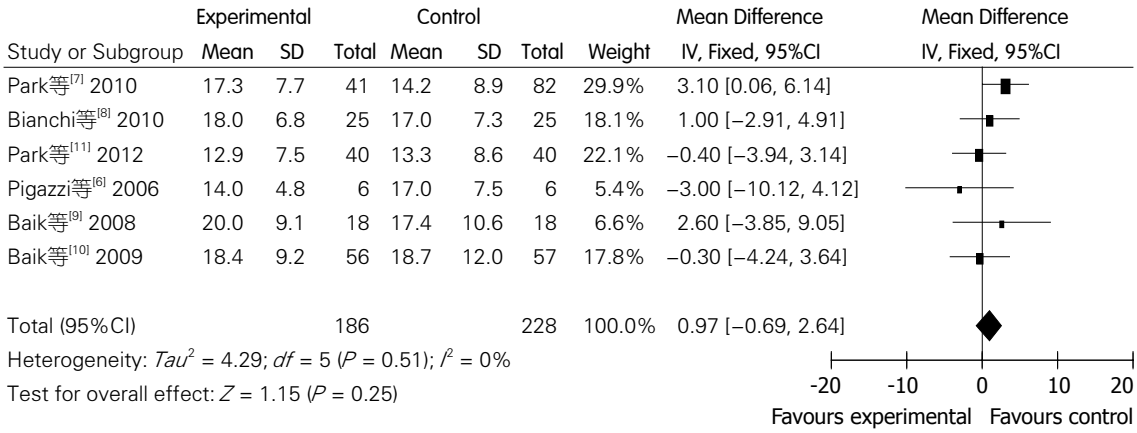


图 4 机器人辅助腹腔镜与传统腹腔镜的淋巴结清扫数目比较的Meta分析.

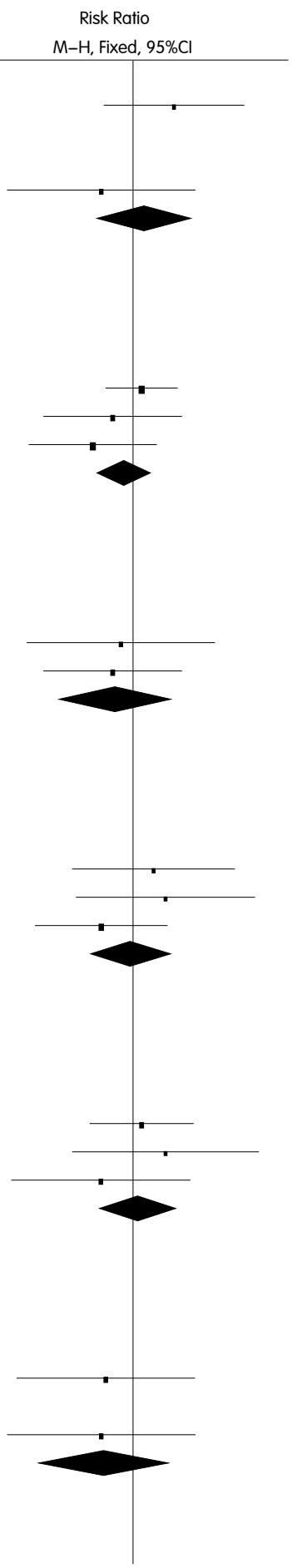
间内操作灵活, 能够更彻底的切除全直肠系膜[17]; (2)盆腔视野充分暴露, 有效保护盆腔植物神经, 进一步避免了患者的性功能和排尿功能的损害; (3)达芬奇机器人系统, 解剖结构更加明显, 创伤小、出血量少, 应用前景广泛[18].

纳入研究显示: 国内外临床上机器人辅助腹腔镜与腹腔镜治疗低位直肠癌的随机对照研究数量较少, 按照Cochrane Reviewer'Handbook 5.1的RCT质量标准和吴泰相等的质量评价, 6篇文献[6-11]质量偏低, 目前相关文献存在如下不足, 随机和盲法的实施存在不足, 6篇文献[6-11]中均未提到随机分组的具体方法、采用具体分配隐藏方案及盲法的实施, 故无法避免人为因素对结果产生的影响及实施和结果测量偏倚的

■**应用要点**

与传统腹腔镜治疗低位直肠癌比较，机器人辅助腹腔镜手术在治疗低位直肠癌方面同样可以取得较满意的结果，期望随着机器人辅助腹腔镜技术的不断成熟，在低位直肠癌外科领域取得进步和突破.

Study or Subgroup	Experimental Events	Experimental Total	Control Events	Control Total	Weight	Risk Ratio M-H, Fixed, 95%CI
4.1.1 肺不张						
Park等[7] 2010	2	41	1	82	2.2%	4.00 [0.37, 42.83]
Bianchi等[8] 2010	0	0	0	0		Not estimable
Pigazzi等[6] 2006	0	0	0	0		Not estimable
Baik等[10] 2009	0	56	1	57	4.9%	0.34 [0.01, 8.15]
Subtotal (95% CI)		97		139	7.0%	1.47 [0.30, 7.32]
Total events	2		2			
Heterogeneity: Chi^2 = 1.50; df = 1 (P = 0.22); I^2 = 33%						
Test for overall effect: Z = 0.47 (P = 0.64)						
4.1.2 吻合口瘘						
Park等[7] 2010	4	41	6	82	13.1%	1.33 [0.40, 4.46]
Bianchi等[8] 2010	1	25	2	25	6.5%	0.50 [0.05, 5.17]
Baik等[10] 2009	1	56	4	57	13.0%	0.25 [0.03, 2.21]
Subtotal (95% CI)		122		164	32.6%	0.74 [0.30, 1.83]
Total events	6		12			
Heterogeneity: Chi^2 = 1.96; df = 2 (P = 0.37); I^2 = 0%						
Test for overall effect: Z = 0.66 (P = 0.51)						
4.1.3 伤口感染						
Park等[7] 2010	0	41	1	82	3.3%	0.66 [0.03, 15.82]
Bianchi等[8] 2010	1	25	2	25	6.5%	0.50 [0.05, 5.17]
Subtotal (95% CI)		66		107	9.8%	0.55 [0.08, 3.62]
Total events	1		3			
Heterogeneity: Chi^2 = 0.02; df = 1 (P = 0.89); I^2 = 0%						
Test for overall effect: Z = 0.62 (P = 0.54)						
4.1.4 肠梗阻						
Park等[8] 2010	1	41	1	82	2.2%	2.00 [0.13, 31.17]
Pigazzi等[6] 2006	1	6	0	6	1.6%	3.00 [0.15, 61.74]
Baik等[10] 2009	1	56	3	57	9.7%	0.34 [0.04, 3.16]
Subtotal (95% CI)		103		145	13.5%	0.93 [0.24, 3.54]
Total events	3		4			
Heterogeneity: Chi^2 = 1.66; df = 2 (P = 0.44); I^2 = 0%						
Test for overall effect: Z = 0.11 (P = 0.91)						
4.1.5 腹腔脓肿						
Park等[7] 2010	2	41	3	82	6.5%	1.33 [0.23, 7.67]
Bianchi等[8] 2010	1	25	0	25	1.6%	3.00 [0.13, 70.30]
Pigazzi等[6] 2006	0	6	1	6	4.9%	0.33 [0.02, 6.86]
Subtotal (95% CI)		72		113	13.1%	1.17 [0.32, 4.20]
Total events	3		4			
Heterogeneity: Chi^2 = 1.03; df = 2 (P = 0.60); I^2 = 0%						
Test for overall effect: Z = 0.24 (P = 0.81)						
4.1.6 尿潴留						
Park等[7] 2010	0	41	2	82	5.5%	0.40 [0.02, 8.05]
Bianchi等[8] 2010	0	25	0	25		Not estimable
Baik等[10] 2009	0	56	1	57	4.9%	0.34 [0.01, 8.15]
Subtotal (95% CI)		122		164	10.3%	0.37 [0.04, 3.29]
Total events	0		3			
Heterogeneity: Chi^2 = 0.00; df = 1 (P = 0.95); I^2 = 0%						
Test for overall effect: Z = 0.89 (P = 0.37)						



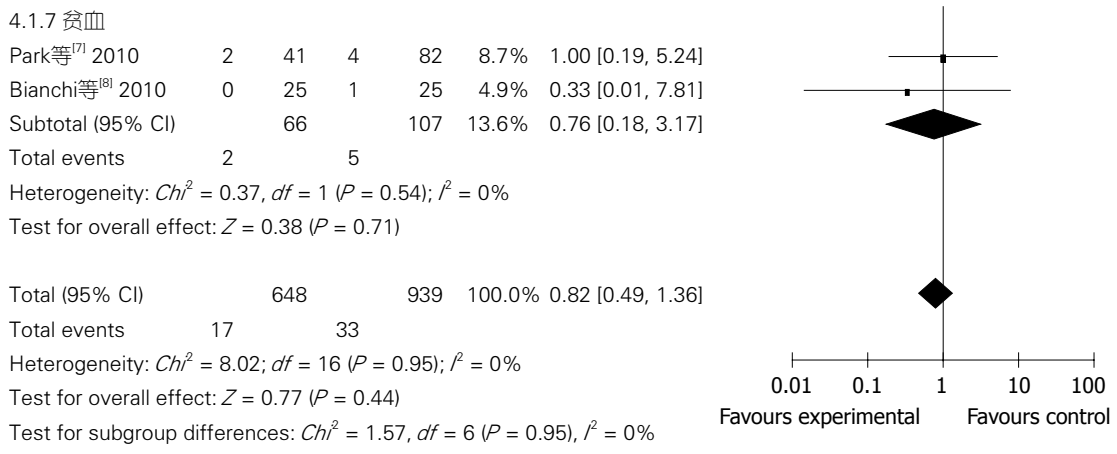


图 5 机器人辅助腹腔镜与传统腹腔镜并发症比较的Meta分析.

■名词解释

机器人辅助腹腔镜手术: 医生通过机器手臂实现对内窥镜手术器械的远程控制. 该系统的三维可视化功能可提供深度感知, 提高了外科医生的灵活度和运动范围. 该系统还通过减少手的抖动和把外科医生的动作经系统处理之后按比例提供给机械手臂来加强(对手术精度的)控制.

产生, 从而影响结果的论证强度, 6项研究[6-11]报告结果数据均完整且均报告所有预先指定的主要结局指标, 不存在报告偏倚和随访偏倚. 6项研究分别来自美国[6]、意大利[8]、韩国[7,9,10,11], 其来源可能会影响到结果的普遍性, 纳入研究样本量偏少, 有可能存在选择性偏倚. 综上所述, 本研究使结论的论证强度和可信度受到一定程度的限制.

系统评价结果显示: 与传统腹腔镜治疗低位直肠癌比较, 机器人辅助腹腔镜手术在低位直肠癌方面同样可以取得较满意的结果, 其治疗效果与腹腔镜组相似. 鉴于纳入研究质量低, 使论证强度受到一定限制, 有必要进一步开展前瞻性临床随机试验和远期疗效观察的循证医学进行验证, 例如: 采取多中心随机分组并进行隐蔽分组, 扩大样本量, 采用盲法, 随访期足够长, 进行高质量的随机对照试验来进一步提升结论的论证强度和可信度.

4 参考文献

1 Weber PA, Merola S, Wasielewski A, Ballantyne GH. Telerobotic-assisted laparoscopic right and sigmoid colectomies for benign disease. *Dis Colon Rectum* 2002; 45: 1689-1694; discussion 1689-1694

2 Delaney CP, Lynch AC, Senagore AJ, Fazio VW. Comparison of robotically performed and traditional laparoscopic colorectal surgery. *Dis Colon Rectum* 2003; 46: 1633-1639

3 Ng KH, Lim YK, Ho KS, Ooi BS, Eu KW. Robotic-assisted surgery for low rectal dissection: from better views to better outcome. *Singapore Med J* 2009; 50: 763-767

4 Higgins JPT, Green S. Chapter 8: Assessing risk of bias in included studies. In: Higgins JPT, Green S (editors). Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions Version 5.1.0 [updated March 2011]. The Cochrane Collaboration, 2011

5 吴泰相, 刘关键. 隐蔽分组(分配隐藏)和盲法的概念实施与报告. 中国循证医学杂志 2007 7: 203-207

6 Pigazzi A, Ellenhorn JD, Ballantyne GH, Paz IB. Robotic-assisted laparoscopic low anterior resection with total mesorectal excision for rectal cancer. *Surg Endosc* 2006; 20: 1521-1525

7 Park JS, Choi GS, Lim KH, Jang YS, Jun SH. Robotic-assisted versus laparoscopic surgery for low rectal cancer: case-matched analysis of short-term outcomes. *Ann Surg Oncol* 2010; 17: 3195-3202

8 Bianchi PP, Ceriani C, Locatelli A, Spinoglio G, Zampino MG, Sonzogni A, Crosta C, Andreoni B. Robotic versus laparoscopic total mesorectal excision for rectal cancer: a comparative analysis of oncological safety and short-term outcomes. *Surg Endosc* 2010; 24: 2888-2894

9 Baik SH, Ko YT, Kang CM, Lee WJ, Kim NK, Sohn SK, Chi HS, Cho CH. Robotic tumor-specific mesorectal excision of rectal cancer: short-term outcome of a pilot randomized trial. *Surg Endosc* 2008; 22: 1601-1608

10 Baik SH, Kwon HY, Kim JS, Hur H, Sohn SK, Cho CH, Kim H. Robotic versus laparoscopic low anterior resection of rectal cancer: short-term outcome of a prospective comparative study. *Ann Surg Oncol* 2009; 16: 1480-1487

11 Park SY, Choi GS, Park JS, Kim HJ, Ryuk JP. Short-term clinical outcome of robot-assisted intersphincteric resection for low rectal cancer: a retrospective comparison with conventional laparoscopy. *Surg Endosc* 2013; 27: 48-55

12 Ueno H, Mochizuki H, Hashiguchi Y, Ishikawa K, Fujimoto H, Shinto E, Hase K. Preoperative parameters expanding the indication of sphincter preserving surgery in patients with advanced low rectal cancer. *Ann Surg* 2004; 239: 34-42

13 Rullier E, Laurent C, Bretagnol F, Rullier A, Vendrely V, Zerbib F. Sphincter-saving resection for all rectal carcinomas: the end of the 2-cm distal rule. *Ann Surg* 2005; 241: 465-469

14 Hohenberger W, Merkel S, Matzel K, Bittorf B, Papadopoulos T, Göhl J. The influence of abdominoperanal (intersphincteric) resection of lower third rectal carcinoma on the rates of sphincter preservation and locoregional recurrence. *Colorectal Dis* 2006; 8: 23-33

15 汪迎, 潘凯, 夏利刚, 钟克力, 陈杰. 腹腔镜与开腹直肠癌根治术对局部与全身免疫反应影响的对比研究. 中国微创外科杂志 2010; 10: 602-605

■**同行评价**
本文机器人辅助腹腔镜与传统腹腔镜治疗在直肠癌治疗中的结果, 有一定的创新性和临床意义.

16 郑民华, 马君俊. 腹腔镜直肠全系膜切除术在中低位直肠癌手术中的应用现状与展望. 中华胃肠外科杂志 2006; 9: 99-101
17 Zimmern A, Prasad L, Desouza A, Marecik S, Park J, Abcarian H. Robotic colon and rectal surgery: a series of 131 cases. *World J Surg* 2010; 34: 1954-1958
18 Jayaraman S, Davies W, Schlachta CM. Getting started with robotics in general surgery with cholecystectomy: the Canadian experience. *Can J Surg* 2009; 52: 374-378

编辑 田滢 电编 鲁亚静

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

• 消息 •

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)

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2012年12月28日; 20(36): 3811-3815
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

临床经验 CLINICAL PRACTICE

结直肠癌线粒体基因组的微卫星不稳定性

崔海宏, 黄 平, 赵 婷, 张振华, 徐 伟, 王小鹏, 韩 英

崔海宏, 黄平, 赵婷, 张振华, 徐伟, 王小鹏, 中国人民解放军第305医院消化内科 北京市 100017
韩英, 中国人民解放军北京军区总医院消化科 北京市100700
崔海宏, 主治医师, 主要从事结肠炎症与肿瘤方面的研究.
作者贡献分布: 此课题由崔海宏、黄平及韩英设计; 研究过程由崔海宏、黄平、赵婷、张振华、徐伟及王小鹏操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由韩英提供; 数据分析由崔海宏与赵婷完成; 本论文写作由崔海宏、黄平及韩英完成.
通讯作者: 韩英, 主任医师, 100700, 北京市东城区东四十条, 中国人民解放军北京军区总医院消化科. yingh721003@sina.com
接受日期: 2012-10-29 修回日期: 2012-11-11
接受日期: 2012-12-20 在线出版日期: 2012-12-28

Mitochondrial DNA microsatellite instability in colorectal cancer

Hai-Hong Cui, Ping Huang, Ting Zhao, Zhen-Hua Zhang, Wei Xu, Xiao-Peng Wang, Ying Han

Hai-Hong Cui, Ping Huang, Ting Zhao, Zhen-Hua Zhang, Wei Xu, Xiao-Peng Wang, Department of Gastroenterology, the 305th Hospital of PLA, Beijing 100017, China
Ying Han, Department of Gastroenterology, General Hospital of Bejing Military Command, Dongsishitiao, Dongcheng District, Beijing 100700, China
Correspondence to: Ying Han, Chief Physician, Department of Gastroenterology, General Hospital of Bejing Military Command, Dongsishitiao, Dongcheng District, Beijing 100700, China. yingh721003@sina.com
Received: 2012-10-29 Revised: 2012-11-11
Accepted: 2012-12-20 Published online: 2012-12-28

Abstract

AIM: To investigate microsatellite instability in the non-coding region and coding regions of mitochondrial DNA in colorectal cancer.

METHODS: Mitochondrial DNA was extracted from 50 cases of fresh CRC samples and matched tumor-adjacent noncancerous tissue. Fluorescence polymerase chain reaction and short tandem repeat locus scanning were conducted to analyze microsatellite instability.

RESULTS: Mitochondrial DNA microsatellite instability was detected in 19 of 50 (38%) patients with CRC. The microsatellite instability in the non-coding region and coding region of mitochondrial DNA had a significant correlation ($\chi^2 = 4.929$, $P = 0.026$).

CONCLUSION: There is a high frequency of microsatellite instability in mitochondrial DNA of CRC patients, and mitochondrial DNA microsatellite instability may play a role in the occurrence of colorectal cancer.

Key Words: Colorectal cancer; Mitochondrial DNA; Microsatellite instability

Cui HH, Huang P, Zhao T, Zhang ZH, Xu W, Wang XP, Han Y. Mitochondrial DNA microsatellite instability in colorectal cancer. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(36): 3811-3815

摘要

目的: 探讨结直肠癌(colorectal cancer, CRC)线粒体DNA(mitochondrial DNA, mtDNA)非编码区及编码区的微卫星不稳定.

方法: 选取50例新鲜CRC及相应癌旁组织标本, 提取基因组DNA. 利用荧光标记聚合酶链反应及短重复序列位点扫描的方法, 对线粒体DNA编码区及非编码区微卫星不稳定进行比较分析.

结果: 共检出19例线粒体微卫星不稳定(mitochondrial microsatellite instability, mtMSI), 发生率为38%(19/50), 线粒体非编码区微卫星与编码区微卫星不稳定有显著相关性(P<0.05).

结论: 结直肠癌患者肠黏膜细胞mtDNA中存在较高频率的微卫星不稳定, 在一些结直肠癌的发生中可能起一定作用.

关键词: 结直肠癌; 线粒体DNA; 微卫星不稳定

崔海宏, 黄平, 赵婷, 张振华, 徐伟, 王小鹏, 韩英. 结直肠癌线粒体基因组的微卫星不稳定性. 世界华人消化杂志 2012; 20(36): 3811-3815
http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3811.asp

0 引言

微卫星不稳定(microsatellite instability, MSI)是指由于复制错误(replication error, RER)引起的简单重复序列增加或丢失. 在肿瘤组织中, 也就

■背景资料
微卫星不稳定性与肿瘤之间的关系是近年来肿瘤学研究的热点之一, 结肠癌细胞中线粒体基因组微卫星不稳定的情况, 也值得进行深入研究.

■同行评议者
赵春玲, 副教授, 潍坊医学院细胞生物学教研室

■研发前沿
线粒体微卫星不稳定以较高比例存在于结直肠癌中，在一些结直肠癌的发生中可能起一定作用. 在今后的研究中，我们将对肿瘤细胞线粒体的功能异常做进一步探讨，证实基因的突变对其细胞器功能的影响.

表 1 微卫星位点引物序列

位置	引物	重复序列	退火温度(℃)	片段长度(bp)
ND1F-FAM	CCGACCTTAGCTCTCACCAT	(C)6	55	85
ND1R	AATAGGAGGCCTAGGTTGAG			
ND2F-TET	CCTGAGTAGGCCTAGAAATAAA	(A)7	55	90
ND2R	ACTTGATGGCAGCTTCTGTG			
COIIIF-FAM	CCAAAAAGGCCTTCGATACG	(T)7	57	96
COIIIR	GCTAGGCTGGAGTGGTAAAA			
ND_5-1F-ROX	CACCCTGACCCTGACTTCC	(C)6and(A)8	57	106
ND_5-1R	GGTGGATGCGACAATGGATT			
ND_5-2F-FAM	GCCCTTCTAAACGCTAATCC	(CCT)3&(AGC)3	58	93
ND_5-2R	TCAGGGGTGGAGACCTAATT			
D303F-FAM	GCACAGCCACTTTCCACA	(C)7	55	106
D303R	TTTTGGGGTTTGGCAGAG			
D514F-FAM	TCCCATACTACTAATCTCA	(CA)8	55	102
D514R	TGTCTTTGGGGTTTGGTT			
D16184F-FAM	AAAACCCAATCCACATCA	(C)9	55	105
D16184R	GGTGAGGGGTGGCTTTGG			

是肿瘤与其相应非肿瘤组织相比，其结构性等位基因的大小发生改变. 其发生主要是由于参与错误修复的基因功能缺陷，而产生一种缺陷蛋白质，其不能正常的校正复制错误，从而引起微卫星DNA的改变，使其不能正常地发挥调控作用，导致细胞增殖及分化异常，促发恶性肿瘤形成. 早期报道在遗传性非息肉性结直肠癌(hereditary nonpolyposis colorectal cancer, HNPCC)连锁的D2S123位点上，发现微卫星不稳定性[1]，表现为发生(CA)n双核苷酸电泳迁移率的改变，出现与正常基因组长度不同的等位基因条带以后，在许多散发性肿瘤中均出现频率不等的MSI，如结肠癌、胰腺癌、膀胱癌等. MSI包括细胞核MSI和线粒体MSI. 线粒体微卫星不稳定性(mitochondrial microsatellite instability, mtMSI)即线粒体基因组内短的碱基重复序列长度的改变. 有关线粒体基因组微卫星不稳定在结直肠癌发生中的作用，尚未深入研究. 本研究采用荧光标记聚合酶链反应(PCR)及STR(short tandem repeat)位点扫描的方法，对结直肠癌组织线粒体微卫星不稳定进行了分析.

■相关报道
多项研究证明，各种实体瘤中，均存在线粒体DNA的微卫星不稳定的现象，其被认为在这些恶性肿瘤的癌变过程中起重要作用.

1 材料和方法

1.1 材料 收集本院2008-01/2008-06手术切除的50例大肠癌组织，其中男27例，女23例，年龄27-85岁，平均年龄59.8岁±11.7岁. 手术前均未接受放疗或化疗. 取材后部分标本用10%甲醛固定，其余立即放置于-80 ℃超低温冰箱保存备用. 将固定的大肠癌及距肿瘤1 cm以上正常黏膜连续冰冻切片20张(5 μm)，HE染色，显微镜下观察，证实大肠癌组织中肿瘤细胞占70%以上. 全部患者术前均未接受放射治疗和化学治疗. 大肠癌及正常基因组DNA的提取采取酚/氯仿异戊醇提取法.

1.2 方法

1.2.1 mtMSI的检测：选择微卫星位点引物序列见表1[2,3]，由上海英俊公司合成. 荧光PCR反应体积10 μL，包括10×缓冲液，1.5 mmol/L $MgCl_2$，200 μmol/L dNTP，上下游引物各0.5 μmol/L，0.75 UTaq DNA多聚酶(宝生物公司)和100 ng基因组DNA. PCR反应条件为起始变性温度94 ℃，5 min，以下过程94 ℃ 30 s，58 ℃ 45 s，72 ℃ 30 s，35个循环，最后72 ℃延伸30 min. 变性后产物经ABIPRISM 3730(Applied Biosystems)毛细管电泳45 min. Datacollection软件自动进行数据收集和处理，并生成原始的样品数据文件. GeneMarker分析软件对配对产物数据自动分析检测mtMSI阳性率.

1.2.2 数据处理：荧光扫描结果用GeneMarker V1.7(Applied Biosystems, Inc.)软件进行基因型判读. 肿瘤组织与正常组织相对照，出现条带的迁移、缺失或电泳图的形状改变判为MSI.

统计学处理 实验数据分析采用χ^2 Pearson检验，单向有序等级资料的非参数检验，使用SPSS16.0统计学分析软件进行处理，$P<0.05$时认为有显著性差异.

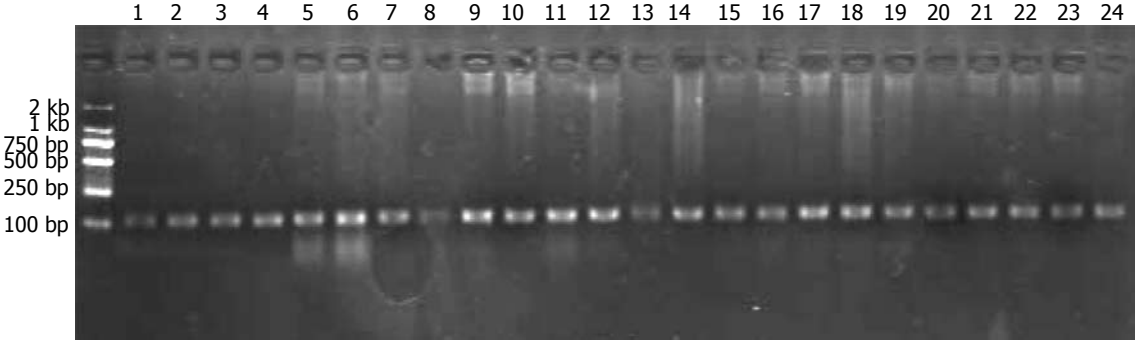


图 1 mtMSI荧光PCR产物. 1−6: ND2; 7−12: COIII; 13−18: ND_5−1; 19−24: ND_5−2.

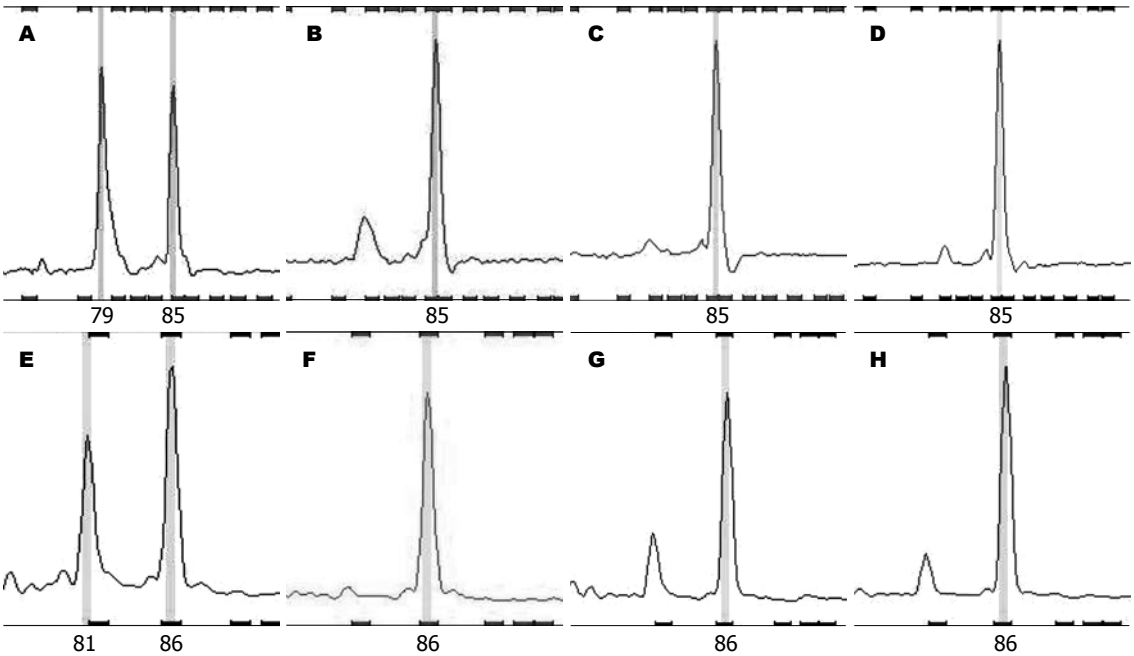


图 2 微卫星扫描图. A−D: ND1; E−H: ND2; A, B, E, F: 肿瘤患者癌组织及癌旁组织, 表现为微卫星不稳定; C, D, G, H: 肿瘤患者癌组织及癌旁组织, 表现为微卫星稳定.

■创新盘点

本研究采用荧光标记聚合酶链反应及短重复序列位点扫描的方法, 对线粒体DNA编码区及非编码区微卫星不稳定进行比较分析, 从而发现结肠癌细胞中线粒体基因不稳定的情况, 为结肠癌的研究提供理论依据.

2 结果

对3个线粒体非编码区及5个线粒体编码区微卫星位点检测结果显示(图1, 2): 共检出mtMSI 19例, 发生率为38%(19/50), 1例升结肠癌患者全部位点均阳性, 11例患者D303阳性, 2例患者D514阳性, 2例患者D16184位点阳性, 6例患者ND1阳性, 2例患者ND2阳性, 1例患者COIII阳性, 2例患者ND_5-1阳性, 8例患者ND_5-2阳性. 根据卡方检验, 线粒体非编码区微卫星与编码区微卫星不稳定有显著相关性$\chi^2 = 4.929$, $P = 0.026$(表2).

3 讨论

微卫星DNA可能参与基因表达调控、基因重排与变异、维持基因组稳定等重要生命活动. 他具有以下特点: (1)微卫星重复单位数目的改变可以引起高度多态性, 微卫星位点在不同个体间有明显的差异; (2)微卫星具有较高程度的不稳定性, 且在遗传上高度保守, 在家系中可以稳定地传递, 是一种很好的遗传标志; (3)微卫星有较高突变率, 容易引发线粒体病和癌症. 微卫星异常是基因组不稳定的重要分子标志. 主要表现为: 微卫星不稳定性; 杂合性丢失(loss of heterozygosity, LOH). 微卫星不稳定性(microsatellite instability, MSI)与肿瘤之间的关系是近年来肿瘤学研究的热点之一, 产生微卫星不稳定性的机制及其与肿瘤发生发展关系得到深入研究[4,5]. 微卫星的不稳定产生的主要原因: (1)DNA损伤, 包括点突变、缺失、串联重复、碱基替代和移码突变等变异; (2)滑链错配(slipped- strand mispairing), 即复制时1条DNA链发生滑动错误

■**应用要点**
本研究发现结肠癌细胞线粒体DNA的非编码区及编码区均存在微卫星不稳定,为揭示结肠癌的发病机制奠定基础.

表 2 微卫星阳性位点统计

编号	线粒体微卫星位点							
	ND1	ND2	COIII	ND_5–1	ND_5–2	D310	D514	D16184
1	+					+		
2	+	+	+	+	+	+	+	+
4					+	+		
9						+		
13						+		
14	+					+		
17	+					+		
18						+		
20		+						
24					+			
25	+					+	+	
30					+			
32					+			
37					+			
40						+		
41				+				
43					+			
45	+					+		+
49					+			
合计	6	2	1	2	8	11	2	2

(slippage), 导致重复序列中1个或多个碱基的错误配对, 使微卫星结构区域发生改变; (3)错配修复基因(mis-match repair, MMR)功能缺陷. 不能正常地发挥修复作用, 导致基因组不稳定; (4)不等价交换(unequal crossing-over)使重复拷贝数目发生变化, 表现为微卫星简单重复序列的增加或丢失. 目前发现的参与错配修复功能的基因有6个: hMSH2、hMSH6(GTBP)、hMSH3、hMLH1、hPMS1、hPMS2[6]. 有学者认为, MSI是错配修复缺陷的标志, 而错配修复缺陷可能使癌基因、抑癌基因及一些对细胞生长起调控作用的基因的复制错误得不到修复, 从而使细胞生长失控, 最终发生肿瘤. 在胃肠道肿瘤, 高频率微卫星不稳定肿瘤几乎均表现为BAT-26改变, 故BAT25、BAT26为研究结直肠癌MSI的首选位点[7].

MSI包括细胞核MSI和线粒体MSI. 人类基因组中以双核苷酸重复, 即(CA)n和(GT)n最多. 总共有5×10^4-5×10^5个, 平均每5-50 kb DNA就存在1个(CA)n. 微卫星多位于基因非编码区, 即基因内含子或非翻译区, 但在编码序列及外显子也可找到. 其高度多态性主要来源于重复数目的不同. 在微卫星区域出现的突变率远高于非重复DNA序列. 大量研究表明: 在许多肿瘤中核MSI和肿瘤的临床特征有密切的联系. 一些研究证明: 核MSI与肿瘤细胞的生存优势有显著的相关性, 而与肿瘤的转移能力呈负相关[8]. 线粒体是细胞核外唯一的遗传物质, 他只有37个基因, 核基因组编码线粒体的大约900个基因产物, 随即送到细胞浆中. 线粒体也存在微卫星位点, 所以可能受控于核基因组的调控[9]. mtMSI被定义为线粒体基因组内短的碱基重复序列长度的变化. 线粒体基因组中含有多个单和双核苷酸重复序列(mono-and dinucleotide repeats), 即微卫星位点. 线粒体微卫星位点重复次数较核基因组少的多, 一般为7-9次. 用来检测线粒体基因组非编码区不稳定性最常用的位点为: D303、D514和D16184位. 但在编码区也存在微卫星位点. Santos等的研究表明mtDNA D-环区的突变与编码区的突变有关, 从而影响线粒体的功能[10]. 在MMR缺陷细胞中, MSI发生在非编码区通常被认为是与生物学无关, 属于中性突变, 但近期很多学者认为非编码区调控编码区的转录和转录和翻译, 也有重要作用. 所以微卫星序列在非编码区及编码区域中发生插入或缺失几个核酸碱基均被认为是肿瘤形成的重要分子机制[11]. 通过核酸碱基的插入或缺失促使大量的包括控制细胞增殖和存活的基因移码突变, 在负性选择的压力下, 可使细胞向恶性转变.

mtMSI在肿瘤的发生发展过程中可能也起一定作用. Habano等[12]最近报道, 在一些胃癌中, 核MSI与线粒体DNA(PolyC)n重复区的微卫星不稳定有关. 同时还发现, 线粒体微卫星不稳定与线粒体基因突变有相关性. 到目前为止, 在前列腺癌、胃癌、乳腺癌、肝癌中, mtMSI被发现是一个非常普遍的现象, 被认为在这些恶性肿瘤的癌变过程中起重要作用[13-16]. 然而, 有关线粒体基因组微卫星不稳定在结直肠癌的发生率, 以及用多重荧光PCR方法检测编码区及非编码区MSI未见文献报道. 在本研究中, 我们分析了50例结直肠癌样本及对照的正常组织, 共检出mtMSI 19例(占总数的38%), mtMSI发生率低于乳腺癌中的42.5%[17]而高于肝癌中的21.2%[16]、胃癌中的16%[12]. 线粒体微卫星不稳定检出率高于以往我们研究的核基因组中的发生率[18]. mtMSI编码区MSI高发于ND1及ND_5-2位点. 可能表明mtMSI显型的结直肠癌患者中有线粒体基因组(ND1及ND_5)不稳定的倾向. ND1及ND_5是线粒体呼吸链中重要分子, 不稳定的编码基因表达异常, 可直接或间接地为线粒体的复制或细

胞的增殖提供选择性的生长优势. 我们研究发现编码区mtMSI与非编码区mtMSI有相关性, 可能是机体内存在错配修复基因产生的缺陷蛋白, 可同时引起非编码区及编码区的基因发生微卫星不稳定. 因非编码区调控编码区基因的转录和翻译, 可能对线粒体的功能产生影响. 研究认为线粒体基因组的不稳定或突变影响了线粒体的呼吸功能, 释放高水平的氧化物而致细胞核肿瘤相关基因的损伤或突变, 另一途径影响线粒体对细胞凋亡的调控功能而致细胞恶变. 上述结果说明, 线粒体微卫星不稳定也以较高比例存在于结直肠癌中, 在一些结直肠癌的发生中可能起一定作用. 在今后的研究中, 我们将对肿瘤细胞线粒体的功能异常做进一步探讨, 证实基因的突变对其细胞器功能的影响.

4 参考文献

1 Aaltonen LA, Peltomäki P, Leach FS, Sistonen P, Pylkkänen L, Mecklin JP, Järvinen H, Powell SM, Jen J, Hamilton SR. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science* 1993; 260: 812-816

2 Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, Meltzer SJ, Rodriguez-Bigas MA, Fodde R, Ranzani GN, Srivastava S. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998; 58: 5248-5257

3 Habano W, Nakamura S, Sugai T. Microsatellite instability in the mitochondrial DNA of colorectal carcinomas: evidence for mismatch repair systems in mitochondrial genome. *Oncogene* 1998; 17: 1931-1937

4 Iacopetta B, Grieu F, Amanuel B. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Asia Pac J Clin Oncol* 2010; 6: 260-269

5 Boland CR, Goel A. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology* 2010; 138: 2073-2087.e3

6 Worthley DL, Leggett BA. Colorectal cancer: molecular features and clinical opportunities. *Clin Biochem Rev* 2010; 31: 31-38

7 Deschoolmeester V, Baay M, Wuyts W, Van Marck E, Van Damme N, Vermeulen P, Lukaszuk K, Lardon F, Vermorken JB. Detection of microsatellite instability in colorectal cancer using an alternative multiplex assay of quasi-monomorphic mononucleotide markers. *J Mol Diagn* 2008; 10: 154-159

8 Corso G, Pedrazzani C, Marrelli D, Pascale V, Pinto E, Roviello F. Correlation of microsatellite instability at multiple loci with long-term survival in advanced gastric carcinoma. *Arch Surg* 2009; 144: 722-727

9 Gryfe R, Kim H, Hsieh ET, Aronson MD, Holowaty EJ, Bull SB, Redston M, Gallinger S. Tumor microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancer. *N Engl J Med* 2000; 342: 69-77

10 Santos C, Montiel R, Arruda A, Alvarez L, Aluja MP, Lima M. Mutation patterns of mtDNA: empirical inferences for the coding region. *BMC Evol Biol* 2008; 8: 167

11 Gologan A, Krasinskas A, Hunt J, Thull DL, Farkas L, Sepulveda AR. Performance of the revised Bethesda guidelines for identification of colorectal carcinomas with a high level of microsatellite instability. *Arch Pathol Lab Med* 2005; 129: 1390-1397

12 Habano W, Sugai T, Nakamura SI, Uesugi N, Yoshida T, Sasou S. Microsatellite instability and mutation of mitochondrial and nuclear DNA in gastric carcinoma. *Gastroenterology* 2000; 118: 835-841

13 Jerónimo C, Nomoto S, Caballero OL, Usadel H, Henrique R, Varzim G, Oliveira J, Lopes C, Fliss MS, Sidransky D. Mitochondrial mutations in early stage prostate cancer and bodily fluids. *Oncogene* 2001; 20: 5195-5198

14 Jeong CW, Lee JH, Sohn SS, Ryu SW, Kim DK. Mitochondrial microsatellite instability in gastric cancer and gastric epithelial dysplasia as a precancerous lesion. *Cancer Epidemiol* 2010; 34: 323-327

15 Alazzouzi H, Farriol M, Espín E, Armengol M, Pena M, Zeh K, Schwartz S, Schwartz S. Molecular patterns of nuclear and mitochondrial microsatellite alterations in breast tumors. *Oncol Rep* 2003; 10: 1561-1567

16 吴凯, 房殿春, 罗元辉. 肝癌微卫星不稳定性及其相关基因突变. 中华肝脏病杂志 2000; 8: 54

17 Richard SM, Bailliet G, Páez GL, Bianchi MS, Peltomäki P, Bianchi NO. Nuclear and mitochondrial genome instability in human breast cancer. *Cancer Res* 2000; 60: 4231-4237

18 崔海宏, 韩英, 王继恒, 曹建彪, 李恕军, 杨欣艳, 范如英. 细胞核和线粒体微卫星不稳在大肠癌发生中的作用及两者的关系. 世界华人消化杂志 2009; 17: 433-436

■同行评价

微卫星不稳定性与肿瘤的发生发展关系密切, 该研究符合伦理学要求, 比较新颖, 有一定的意义.

编辑 田滢 电编 鲁亚静

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com
世界华人消化杂志 2012年12月28日; 20(36): 3816-3821
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

临床经验 CLINICAL PRACTICE

Ⅱa期结肠癌的预后因素

王 林, 顾 晋, 彭亦凡

■背景资料
目前各种诊疗指南对Ⅱ期结肠癌患者是否需要接受辅助治疗尚存在争议, 部分学者更为主张对Ⅱb期具有高危因素的结肠癌患者进行辅助治疗. Ⅱa期的结肠癌患者通常被认为预后较好、不需接受辅助治疗; 但临床发现: 约有20%-25%的Ⅱa期结肠癌患者会在术后3年内发生复发和转移. 因此, 甄别Ⅱa期结肠癌的高危因素就成为一个亟待解决的临床问题.

■同行评议者
周晓武, 副主任医师, 中国人民解放军空军总医院普外科; 陈钟, 教授, 南通大学附属医院普外科, 南通大学肝胆外科研究所

王林, 顾晋, 彭亦凡, 北京大学肿瘤医院结直肠肿瘤外科 北京市 100142
王林, 博士, 主治医师, 主要从事结直肠癌的临床和基础研究.
作者贡献分布: 王林与彭亦凡对此文所作贡献均等; 此课题由王林与顾晋共同设计; 试验过程和结果判定由王林与彭亦凡完成; 数据统计分析由王林完成; 本论文写作由王林与彭亦凡完成; 顾晋审阅.
通讯作者: 彭亦凡, 博士, 副主任医师, 副教授, 100142, 北京市海淀区阜成路52号, 北京大学肿瘤医院暨北京市肿瘤防治研究所, 结直肠肿瘤外科, 恶性肿瘤发病机制及转化研究教育部重点实验室. pengyf_1972@yahoo.com.cn
电话: 010-88196085
收稿日期: 2012-10-23 修回日期: 2012-11-20
接受日期: 2012-12-17 在线出版日期: 2012-12-28

Prognostic factors of stage Ⅱa colon cancer

Lin Wang, Jin Gu, Yi-Fan Peng

Lin Wang, Jin Gu, Yi-Fan Peng, Department of Colorectal Surgery, Beijing Cancer Hospital, Beijing 100142, China
Correspondence to: Yi-Fan Peng, Associate Chief Physician & Associate Professor, Key Laboratory of Carcinogenesis and Translational Research (Ministry of Education); Department of Colorectal Surgery, Peking University Cancer Hospital & Institute, 52 Fucheng Road, Haidian Distract, Beijing 100142, China. pengyf_1972@yahoo.com.cn
Received: 2012-10-23 Revised: 2012-11-20
Accepted: 2012-12-17 Published online: 2012-12-28

Abstract
AIM: To investigate the prognostic factors of stage Ⅱa (pT3N0M0) colon cancer.

METHODS: The demographic, clinical and laboratory data for 161 patients with stage Ⅱa colon cancer treated with curative surgery alone at Peking University Cancer Hospital from January 2004 to June 2008 were reviewed retrospectively. Eighty-four valid cases were selected in this study based on inclusive and exclusive criteria. The 3-year disease-free survival (DFS) was tested by univariate and multivariate analyses to identify prognostic factors.

RESULTS: The overall 3-year DFS for the selected 84 cases was 88.1%. The 3-year DFS for patients with elevated CEA levels was significantly lower than those with normal CEA levels (76.5% *vs* 95.8%, P = 0.007). Multivariate analysis demonstrated that CEA level (OR = 8.013, 95% CI 1.573-40.817, P = 0.012), expression of Ki67 (OR = 3.298, 95% CI 0.799-13.610, P = 0.099), male gender (OR = 7.212, 95% CI 1.293-40.237, P = 0.024) and anemia (OR = 6.461, 95% CI 1.537-27.151, P = 0.011) were independent prognostic factors for the 3-year DFS. Stratified analysis revealed that elevated level of CEA combined with high expression of Ki67 was associated with a poorer prognosis (3-year DFS = 70%).

CONCLUSION: Elevated preoperative serum level of CEA and high expression of Ki67 in cancer tissue are predictors of poor prognosis for stage Ⅱa colon cancer. More intensive adjuvant treatment should be considered in patients with such high risk factors.

Key Words: Colorectal Cancer; Histopathology; Immunohistochemistry; Prognosis.

Wang L, Gu J, Peng YF. Prognostic factors of stage Ⅱa colon cancer. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(36): 3816-3821

摘要
目的: 探讨Ⅱa期(pT3N0M0)结肠癌的预后因素.

方法: 收集2004-01/2008-06北京大学肿瘤医院外科手术治疗且未接受辅助化疗的Ⅱ期结肠癌患者共161例, 选取符合标准的84例Ⅱa期患者纳入研究. 回顾性分析这些患者的临床病理资料、血清学肿瘤标志物指标、免疫组织化学结果以及3年无病生存率(3 years disease free survival, 3yrDFS), 通过单因素及多因素生存分析, 探讨Ⅱa期结肠癌的预后因素.

结果: 84例入组患者的3yrDFS为88.1%. 术前血清癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA)水平升高患者的3yrDFS为77.1%, 而CEA水平正常患者的3yrDFS为95.9%, 二组间差异显著(P = 0.007). 多因素生存分析显示: 男(P = 0.024, OR = 7.212, 1.293-40.237)、术前CEA水平升高(P = 0.012, OR = 8.013,

1.573-40.817)、术前贫血(P = 0.011, OR = 6.461, 1.537-27.151)以及Ki67高表达(P = 0.099, OR = 3.298, 0.799-13.610)是提示Ⅱa期结肠癌患者预后不良的独立风险因素, 而术前血清CEA水平升高合并Ki67高表达者预后较差(3yrDFS 70%).

结论: 术前血清CEA水平联合肿瘤组织Ki67表达可以作为预测Ⅱa期结肠癌患者预后的重要指标. 对于术前血清CEA水平升高并且Ki67高表达的Ⅱa期结肠癌患者可能应采取更积极的辅助治疗.

关键词: 结直肠肿瘤; 组织病理; 免疫组织化学; 预后

王林, 顾晋, 彭亦凡. Ⅱa期结肠癌的预后因素. 世界华人消化杂志 2012; 20(36): 3816–3821
http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3816.asp

0 引言

结肠癌已成为我国最常见的消化系肿瘤之一, 且其发病率呈上升趋势. 临床上, 约有30%-40%的结肠癌在根治性切除后被确定为Ⅱ期(即pT3/4N0M0)[2,3]. 目前各种诊疗指南对Ⅱ期结肠癌患者是否需要接受辅助治疗尚存在争议[4-7], 仅主张对Ⅱb期具有高危因素的结肠癌患者进行辅助治疗[8,9]. Ⅱa期的结肠癌患者通常被认为预后较好、不需接受辅助治疗; 但临床发现: 约有20%-25%的Ⅱa期结肠癌患者会在术后3年内发生复发和转移[10]. 因此, 甄别Ⅱa期结肠癌的高危因素就成为一个亟待解决的临床问题[11]. 本研究采用单因素和多因素生存分析方法, 对北京大学肿瘤医院结直肠外科收治的Ⅱa期结肠癌患者的临床病理资料、血清学肿瘤标志物指标、免疫组织化学结果以及3年无病生存率(3 years disease free survival, 3yrDFS)等进行回顾性分析, 以探索Ⅱa期结肠癌的预后因素.

1 材料和方法

1.1 材料 选取2004-01/2008-06所经治的161例Ⅱ期结肠癌中随机选取84例Ⅱa期结肠癌患者进行研究. 其中男50例, 女34例. 病变部位: 升结肠癌36例, 横结肠癌7例, 降结肠癌19例, 乙状结肠癌22例. 术后病理淋巴结检出数: 4-48(平均14.5)枚; 其中检出>12枚者59例(70.2%). 镜下见肿瘤分化不良者18例, 伴有脉管癌栓者2例. (1)入选标准: 接受了开放的结肠癌根治性切除术, 手术符合目前所提倡的全结肠系膜切除标准[12]; 术后病理分期为pT3N0M0; 有完整的临床、病理和随访资料, 且免疫组织化学检查项目均一性较好; 患者术后未进行辅助放化疗; (2)排除标准: 罹患其他恶性肿瘤的病史; 遗传性结肠癌; 根据临床分期和术中所见存在合并同时性转移的结肠癌; 合并炎症性肠病的结肠癌. 鼠抗人Ki67单克隆抗体、鼠抗人P53单克隆抗体购自德国Dako公司; SP免疫组织化学试剂盒和DAB显色试剂盒均购自北京中杉生物技术有限公司.

1.2 方法

1.2.1 血清学CEA检测: 入选患者均在手术前1 wk内采外周静脉血, 送检进行血清CEA水平的定量测试. 所有样本均在北京大学肿瘤医院检验科进行检验, CEA滴度的判定使用Elecsys CEA reagent kit for Modular Analytics E170/cobas e 601/cobas e 602试剂盒(Roche, Germany), 以5 ng/mL作为临界值判断CEA是否升高.

1.2.2 免疫组织化学: 北京肿瘤医院病理科对于结肠癌手术切除标本行免疫组织化学检测, 检测包括Ki67和P53等指标, 实验按产品说明书操作. 切片常规脱蜡至水, Ki67、P53采用高压热修复. 30 mL/L H_2O_2孵育10 min, 蒸馏水冲洗, PBS浸泡5 min, 滴加正常兔血清工作液, 孵育10 min后倾去, 不洗; 滴加一抗37 ℃孵育2 h, PBS冲洗3 min×3次. 滴加二抗, 孵育15 min, PBS冲洗3 min×3次. 滴加三抗, 孵育15 min, PBS冲洗3 min×3次, DAB显色, 苏木素复染, 脱水, 透明, 封片. PBS代替一抗作阴性对照, 正常大肠黏膜上皮表达情况作阳性对照. Ki67及P53蛋白均定位于细胞核内, 呈现棕黄色或者棕褐色颗粒, 每张组织切片随机选取10个高倍视野, 计数1 000个肿瘤细胞, Ki67蛋白按阳性细胞数占细胞总数比例分为0%-20%, >20%-40%, >40%-60%, >60%-80%, 和>80% 5组, 其中阳性细胞数>40%是定义高细胞增殖指数组, 而阳性细胞数≤40%是低细胞增殖指数组[13]. P53蛋白阳性细胞数占细胞总数比例≥10%定义为P53蛋白表达异常升高, 阳性细胞数<10%是定义为表达正常[13].

1.2.3 随访: 所有患者术后均按照NCCN结肠癌治疗指南进行随访, 患者术后2年内每3 mo随访, 3-5年每6 mo随访. 检查项目包括体检、血清CEA检查、血常规及生化、胸片、腹盆腔CT或超声. 对于肿瘤局部复发或远隔转移的判断, 以影像学诊断为主.

统计学处理 采用SPSS13.0统计软件进行分析. 分类变量中率的比较采用χ^2检验, 显著性水

■创新盘点

本研究紧贴临床, 采用单因素和多因素生存分析方法, 对所收治的Ⅱa期结肠癌患者的临床病理资料、血清学肿瘤标志物指标、免疫组织化学结果以及3年无病生存率(3yrDFS)等进行回顾性分析, 研究发现: 血清CEA水平升高、肿瘤组织Ki67高表达是3yrDFS显著减低的风险因素, 合并这2种风险因素的患者, 其预后显著低于Ⅱa期结肠癌的整体预后.

■**应用要点**
本研究发现血清CEA水平升高、肿瘤组织Ki67高表达是3yrDFS显著减低的风险因素，合并这2种风险因素的患者，其预后显著低于Ⅱa期结肠癌的整体预后. 这有助于为临床判定Ⅱa期结肠癌的预后和指导化疗提供一个客观的参考指标.

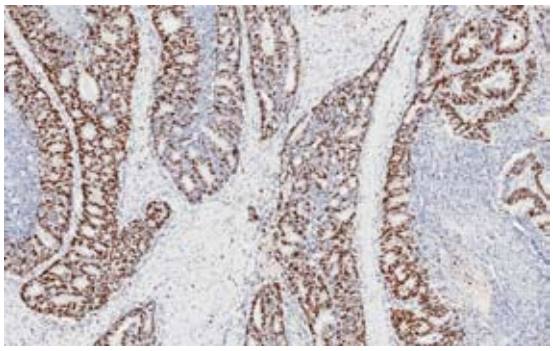


图 1 Ki67阳性表达(SP × 200).

表 1 入组病例的临床病理资料

临床病理因素	*n*	3yrDFS(%)	*P*值
性别			
男	50	84.0	0.144
女	34	94.1	
年龄(岁)			
<65	42	95.2	0.054
≥65	42	81.0	
血清CEA (ng/mL)			
≤5	49	95.9	0.007
>5	35	77.1	
血清CA199 (ng/mL)			
≤27	70	90.0	0.252
>27	14	78.6	
血红蛋白(g/L)			
<110	32	81.2	0.108
≥110	52	92.3	
肿瘤部位			
右半结肠	43	86.0	0.521
左半结肠	41	90.2	
肿瘤长径(cm)			
<5	38	89.5	0.702
≥5	46	87.0	
淋巴结数			
<12	25	88.0	0.917
≥12	59	88.1	
肿瘤分化			
高中分化	66	86.4	0.335
低分化、黏液	18	94.4	
脉管癌栓			
无	82	87.8	N/A
有	2	100.0	
Ki67表达			
低	46	93.5	0.104
高	38	81.6	
P53表达			
阴性	13	76.9	0.189
阳性	71	90.1	

3yrDFS: 3年无病生存率.

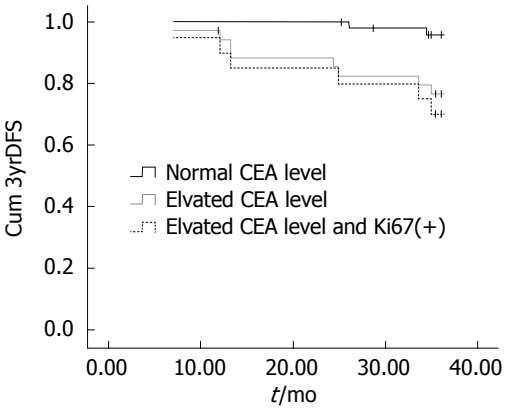


图 2 入组病例的生存分析. 3yrDFS: 3年无病生存率; CEA: 血清癌胚抗原.

准$P = 0.05$. 单因素生存分析采用Kaplan-Meier曲线法(Log-rank检验), 显著性水准品$P = 0.05$. 多因素生存分析采用COX回归模型, 显著性水准$P = 0.1$.

2 结果

2.1 无病生存率 本组失访10例, 随访74例. 随访时间: 2-77 mo(中位时间45 mo). 随访病例的3yrDFS为88.1%; 其中8例发生异时性肝转移, 2例发生异时性肺转移, 未见局部复发病例.

2.2 单因素预后分析 术前血清CEA水平升高者的3yrDFS为77.1%, 而CEA水平正常者的3yrDFS为95.9%, 差异显著($P = 0.007$).

而高龄(年龄≥65岁)($P = 0.054$)、术前贫血($P = 0.108$)、肿瘤组织Ki67高表达($P = 0.104$)虽无统计学差异(图1), 但显示出了影响3yrDFS的趋势(表1).

2.3 多因素预后生存分析 COX回归分析显示: 降低3yrDFS的独立风险因素有血清CEA水平升高($P = 0.012$, $OR = 8.013$, 1.573-40.817), 男性($P = 0.024$, $OR = 7.212$, 1.293-40.237), 术前贫血($P = 0.011$, $OR = 6.461$, 1.537-27.151)以及肿瘤组织Ki67高表达($P = 0.099$, $OR = 3.298$, 0.799-13.610). 亚组分析显示: 血清CEA升高伴Ki67高表达患者的3yrDFS(95.9%)显著低于血清CEA水平正常者(70%, $P = 0.002$)(图2).

3 讨论

临床上Ⅱ期病例约占全部结肠癌病例的40%[14,15]. 目前认为Ⅱ期结肠癌的高危因素有[8,16-18]: 血清CEA>5 ng/mL, 合并穿孔、梗阻, 急诊手术, 淋巴结<12枚, 脉管癌栓和神经侵犯等. 此外, 肿瘤浸润前缘存在肿瘤细胞出芽(tumor

budding)、VEGF高表达等也与不良预后有关[19-23]. 目前普遍认为Ⅱb/c期(T4a/b, N0M0)预后较差[8,24], 因此诊疗指南普遍建议对T4期结肠癌进行辅助治疗. 但研究显示[8,14,15]: Ⅱ期结肠癌患者辅助化疗的绝对生存获益仅为2%-4%. 对于Ⅱa期结肠癌患者的风险评价仍然存在争议. 因此, 如何进一步甄别高危Ⅱ期结肠癌患者是目前研究的热点问题.

因检测手段非常成熟且性价比较高, CEA已成为结肠癌诊疗中最重要的肿瘤标志物[25]. 术前常规检测血清CEA水平被美国病理医师协会作为Ⅰ类推荐[18,26], 而美国临床肿瘤学会则建议术后应随访检测CEA水平3年以上[27]. 但术前CEA水平升高的II期结肠癌是否需要更积极的辅助治疗尚存在争议[14,15,28-30]. 多数文献[31-38]中, 术前CEA升高是结肠癌的预后不良因素, 尤其是Ⅰ-Ⅱ期的肿瘤[34,35]. 尽管90%以上的结肠癌细胞都表达CEA, 但外周血清CEA升高者仅有30%-40%, 这提示结肠癌的浸润程度和外分泌能力存在个体差异, 而这些差异也导致患者预后不同[39].

Ki67的表达水平则反映了肿瘤的原位增殖能力[13], 虽有学者[40,41]认为Ki67或P53等免疫组织化学指标与患者预后相关, 但作为预后单一因素的提示意义有限. 有学者将CEA与Ki67或P53免疫组织化学指标联合评价, 以期提高判断结肠癌预后的准确性[42,43], 但其仅测量肿瘤组织的CEA表达水平, 而忽略了血清CEA水平所提示的肿瘤浸润能力.

本研究发现: 血清CEA水平升高、肿瘤组织Ki67高表达是3yrDFS显著减低的风险因素, 合并这2种风险因素的患者, 其无病生存率(70%)显著低于Ⅱa期结肠癌的整体无病生存率(88.1%), 也差于既往文献报道的Ⅱa期结肠癌无病生存率(87.5%)[1]. 此类患者能否从更积极的辅助治疗中获益? 这还需随机对照研究提供更多证据. 本研究的多因素分析中还发现: 其他因素如男性(P = 0.024, OR = 7.212, 1.293-40.237), 术前贫血(P = 0.011, OR = 6.461, 1.537-27.151)也影响Ⅱa期结肠癌的预后, 这提示Ⅱa期结肠癌预后评价的复杂性.

4 参考文献

1 顾国利, 杜长征, 薛卫成, 顾晋, 赵军. 结直肠癌P27表达与Ki-67、P170、MLH1、MSH2、MSH6的关系及意义. 世界华人消化杂志 2012; 20: 2157-2161

2 Wang W, Wang GQ, Sun XW, Chen G, Li YF, Zhang LY, Qiu HB, Huang CY, Zhan YQ, Zhou ZW. Prognostic values of chromosome 18q microsatellite alterations in stage II colonic carcinoma. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 6026-6034

3 Mroczkowski P, Schmidt U, Sahm M, Gastinger I, Lippert H, Kube R. Prognostic factors assessed for 15,096 patients with colon cancer in stages I and II. *World J Surg* 2012; 36: 1693-1698

4 Kosmider S, Lipton L. Adjuvant therapies for colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 3799-3805

5 Tournigand C, André T, Bonnetain F, Chibaudel B, Lledo G, Hickish T, Tabernero J, Boni C, Bachet JB, Teixeira L, de Gramont A. Adjuvant therapy with fluorouracil and oxaliplatin in stage II and elderly patients (between ages 70 and 75 years) with colon cancer: subgroup analyses of the Multicenter International Study of Oxaliplatin, Fluorouracil, and Leucovorin in the Adjuvant Treatment of Colon Cancer trial. *J Clin Oncol* 2012; 30: 3353-3360

6 Giráldez MD, Lozano JJ, Cuatrecasas M, Alonso-Espinaco V, Maurel J, Mármol M, Hörndler C, Ortego J, Alonso V, Escudero P, Ramírez G, Petry C, Lasalvia L, Bohmann K, Wirtz R, Mira A, Castells A. Gene-expression signature of tumor recurrence in patients with stage II and III colon cancer treated with 5'fluoruracil-based adjuvant chemotherapy. *Int J Cancer* 2012 Jul 26. *[Epub ahead of print]*

7 Ishiguro M, Mochizuki H, Tomita N, Shimada Y, Takahashi K, Kotake K, Watanabe M, Kanemitsu Y, Ueno H, Ishikawa T, Uetake H, Matsui S, Teramukai S, Sugihara K. Study protocol of the SACURA trial: a randomized phase III trial of efficacy and safety of UFT as adjuvant chemotherapy for stage II colon cancer. *BMC Cancer* 2012; 12: 281

8 Jee SH, Moon SM, Shin US, Yang HM, Hwang DY. Effectiveness of Adjuvant Chemotherapy with 5-FU/Leucovorin and Prognosis in Stage II Colon Cancer. *J Korean Soc Coloproctol* 2011; 27: 322-328

9 O'Connor ES, Greenblatt DY, LoConte NK, Gangnon RE, Liou JI, Heise CP, Smith MA. Adjuvant chemotherapy for stage II colon cancer with poor prognostic features. *J Clin Oncol* 2011; 29: 3381-3388

10 Ding PR, An X, Zhang RX, Fang YJ, Li LR, Chen G, Wu XJ, Lu ZH, Lin JZ, Kong LH, Wan DS, Pan ZZ. Elevated preoperative neutrophil to lymphocyte ratio predicts risk of recurrence following curative resection for stage IIA colon cancer. *Int J Colorectal Dis* 2010; 25: 1427-1433

11 Tsikitis VL, Malireddy K, Green EA, Christensen B, Whelan R, Hyder J, Marcello P, Larach S, Lauter D, Sargent DJ, Nelson H. Postoperative surveillance recommendations for early stage colon cancer based on results from the clinical outcomes of surgical therapy trial. *J Clin Oncol* 2009; 27: 3671-3676

12 Engel A. Complete mesocolic excision is the new kid on the block. *Colorectal Dis* 2011; 13: 1083-1084

13 Jakob C, Liersch T, Meyer W, Becker H, Baretton GB, Aust DE. Predictive value of Ki67 and p53 in locally advanced rectal cancer: correlation with thymidylate synthase and histopathological tumor regression after neoadjuvant 5-FU-based chemoradiotherapy. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 1060-1066

14 Brändstedt J, Wangefjord S, Nodin B, Gaber A, Manjer J, Jirström K. Gender, anthropometric factors and risk of colorectal cancer with particular reference to tumour location and TNM stage: a cohort

■**名词解释**

3年无病生存率: 是指某种疾病患者经3年随访, 到随访结束时未复发转移、仍存活的病例数占观察病例的比例. 常用于评价疾病治疗的远期疗效.

■同行评价
本研究具有一定临床意义.

study. *Biol Sex Differ* 2012; 3: 23

15 Kjaer-Frifeldt S, Hansen TF, Nielsen BS, Joergensen S, Lindebjerg J, Soerensen FB, dePont Christensen R, Jakobsen A. The prognostic importance of miR-21 in stage II colon cancer: a population-based study. *Br J Cancer* 2012; 107: 1169-1174

16 Ogata Y, Murakami H, Sasatomi T, Ishibashi N, Mori S, Ushijima M, Akagi Y, Shirouzu K. Elevated preoperative serum carcinoembrionic antigen level may be an effective indicator for needing adjuvant chemotherapy after potentially curative resection of stage II colon cancer. *J Surg Oncol* 2009; 99: 65-70

17 Sharif S, O'Connell MJ. Gene Signatures in Stage II Colon Cancer: A Clinical Review. *Curr Colorectal Cancer Rep* 2012; 8: 225-231

18 Zhang NH, Li J, Li Y, Zhang XT, Liao WT, Zhang JY, Li R, Luo RC. Co-expression of CXCR4 and CD133 proteins is associated with poor prognosis in stage II-III colon cancer patients. *Exp Ther Med* 2012; 3: 973-982

19 魏学明, 顾国利, 任力, 熊梅, 王石林, 李德昌. 大肠癌EGFR、HER-2、VEGF表达特点及其对分子靶向治疗的指导意义. 世界华人消化杂志 2009; 17: 1836-1841

20 Chang DT, Pai RK, Rybicki LA, Dimaio MA, Limaye M, Jayachandran P, Koong AC, Kunz PA, Fisher GA, Ford JM, Welton M, Shelton A, Ma L, Arber DA, Pai RK. Clinicopathologic and molecular features of sporadic early-onset colorectal adenocarcinoma: an adenocarcinoma with frequent signet ring cell differentiation, rectal and sigmoid involvement, and adverse morphologic features. *Mod Pathol* 2012; 25: 1128-1139

21 Chen TH, Huang CC, Yeh KT, Chang SH, Chang SW, Sung WW, Cheng YW, Lee H. Human papilloma virus 16 E6 oncoprotein associated with p53 inactivation in colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2012; 18: 4051-4058

22 Abdel-Rahman WM, Ruosaari S, Knuutila S, Peltomäki P. Differential roles of EPS8 in carcinogenesis: loss of protein expression in a subset of colorectal carcinoma and adenoma. *World J Gastroenterol* 2012; 18: 3896-3903

23 Law PC, Auyeung KK, Chan LY, Ko JK. Astragalus saponins downregulate vascular endothelial growth factor under cobalt chloride-stimulated hypoxia in colon cancer cells. *BMC Complement Altern Med* 2012; 12: 160

24 McKenzie S, Nelson R, Mailey B, Lee W, Chung V, Shibata S, Garcia-Aguilar J, Kim J. Adjuvant chemotherapy improves survival in patients with American Joint Committee on Cancer stage II colon cancer. *Cancer* 2011; 117: 5493-5499

25 顾国利, 任力, 黄蓉蓉, 魏学明, 李德昌, 戴大江, 王石林. 大肠癌免疫组化表达与临床病理的关系. 世界华人消化杂志 2006; 14: 2765-2770

26 Lan YT, Yang SH, Chang SC, Liang WY, Li AF, Wang HS, Jiang JK, Chen WS, Lin TC, Lin JK. Analysis of the seventh edition of American Joint Committee on colon cancer staging. *Int J Colorectal Dis* 2012; 27: 657-663

27 Locker GY, Hamilton S, Harris J, Jessup JM, Kemeny N, Macdonald JS, Somerfield MR, Hayes DF, Bast RC. ASCO 2006 update of recommendations for the use of tumor markers in gastrointestinal cancer. *J Clin Oncol* 2006; 24: 5313-5327

28 Gulley JL, Madan RA, Tsang KY, Arlen PM, Camphausen K, Mohebtash M, Kamrava M, Schlom J, Citrin D. A pilot safety trial investigating a vector-based vaccine targeting carcinoembryonic antigen in combination with radiotherapy in patients with gastrointestinal malignancies metastatic to the liver. *Expert Opin Biol Ther* 2011; 11: 1409-1418

29 Thirunavukarasu P, Sukumar S, Sathaiah M, Mahan M, Pragatheeshwar KD, Pingpank JF, Zeh H, Bartels CJ, Lee KK, Bartlett DL. C-stage in colon cancer: implications of carcinoembryonic antigen biomarker in staging, prognosis, and management. *J Natl Cancer Inst* 2011; 103: 689-697

30 Bacolod MD, Barany F. Molecular profiling of colon tumors: the search for clinically relevant biomarkers of progression, prognosis, therapeutics, and predisposition. *Ann Surg Oncol* 2011; 18: 3694-3700

31 Lesterhuis WJ, de Vries IJ, Aarntzen EA, de Boer A, Scharenborg NM, van de Rakt M, van Spronsen DJ, Preijers FW, Figdor CG, Adema GJ, Punt CJ. A pilot study on the immunogenicity of dendritic cell vaccination during adjuvant oxaliplatin/capecitabine chemotherapy in colon cancer patients. *Br J Cancer* 2010; 103: 1415-1421

32 Machado NO, Chopra PJ, Al Hamdani A. Pancreatic metastasis from colon carcinoma nine years after a hemicolectomy managed by distal pancreatectomy. A review of the literature regarding the role and outcome of pancreatic resection for colorectal metastasis. *JOP* 2010; 11: 377-381

33 Aldulaymi B, Christensen IJ, Sölétormos G, Jess P, Nielsen SE, Brünner N, Nielsen HJ. Changes in soluble CEA and TIMP-1 levels during adjuvant chemotherapy for stage III colon cancer. *Anticancer Res* 2010; 30: 233-237

34 Uen YH, Lin SR, Wu DC, Su YC, Wu JY, Cheng TL, Chi CW, Wang JY. Prognostic significance of multiple molecular markers for patients with stage II colorectal cancer undergoing curative resection. *Ann Surg* 2007; 246: 1040-1046

35 Huh JW, Oh BR, Kim HR, Kim YJ. Preoperative carcinoembryonic antigen level as an independent prognostic factor in potentially curative colon cancer. *J Surg Oncol* 2010; 101: 396-400

36 Sun LC, Chu KS, Cheng SC, Lu CY, Kuo CH, Hsieh JS, Shih YL, Chang SJ, Wang JY. Preoperative serum carcinoembryonic antigen, albumin and age are supplementary to UICC staging systems in predicting survival for colorectal cancer patients undergoing surgical treatment. *BMC Cancer* 2009; 9: 288

37 Tausch C, Konstantiniuk P, Kugler F, Reitsamer R, Roka S, Pöstlberger S, Haid A. Sentinel lymph node biopsy after preoperative chemotherapy for breast cancer: findings from the Austrian Sentinel Node Study Group. *Ann Surg Oncol* 2008; 15: 3378-3383

38 Nakatani H, Kumon T, Kumon M, Hamada S, Okanoue T, Kawamura A, Nakatani K, Hiroi M, Hanazaki K. High serum levels of both carcinoembryonic antigen and carbohydrate antigen 19-9 in a patient with sigmoid colon cancer without metastasis. *J Med Invest* 2012; 59: 280-283

39 Mourtzikou A, Stamouli M, Kroupis C, Christodoulou S, Skondra M, Kastania A, Pectasides D, Athanasas G, Dimas C. Evaluation of carcinoembryonic antigen (CEA), epidermal growth factor receptor (EGFR), epithelial cell adhesion molecule EpCAM (GA733-2), and carbohydrate antigen 19-9 (CA 19-9) levels in colorectal cancer patients and correlation with clinicopathological characteristics. *Clin Lab*

2012; 58: 441-448
40 Kim GP, Colangelo LH, Wieand HS, Paik S, Kirsch IR, Wolmark N, Allegra CJ. Prognostic and predictive roles of high-degree microsatellite instability in colon cancer: a National Cancer Institute-National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Collaborative Study. *J Clin Oncol* 2007; 25: 767-772
41 Li DD, Sun T, Wu XQ, Chen SP, Deng R, Jiang S, Feng GK, Pan JX, Zhang XS, Zeng YX, Zhu XF. The inhibition of autophagy sensitises colon cancer cells with wild-type p53 but not mutant p53 to topotecan treatment. *PLoS One* 2012; 7: e45058
42 Fichtner I, Slisow W, Gill J, Becker M, Elbe B, Hillebrand T, Bibby M. Anticancer drug response and expression of molecular markers in early-passage xenotransplanted colon carcinomas. *Eur J Cancer* 2004; 40: 298-307
43 王永鹏, 马思平, 宋纯, 刘云鹏, 郑美珍. 晚期结肠癌综合治疗及毒副反应处理. 中国实用内科杂志 2012; 32: 179-181

编辑 田滢 电编 鲁亚静

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》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.

世界华人消化杂志 2012年12月28日; 20(36): 3824-3828
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

《世界华人消化杂志》投稿须知

《世界华人消化杂志》为保证期刊的学术质量, 对所有来稿均进行同行评议, 是一份被中国科技论文统计源核心期刊, 中文核心期刊要目总览收录的学术类期刊.

1 投稿总则

1.1 性质 《世界华人消化杂志》[ISSN 1009-3079 (print), ISSN 2219-2859 (online), CN 14-1260/R]是一份同行评议性和开放获取(open access, OA)的旬刊. OA最大的优点是面向全国本领域专家及公众开放无需注册, 免费获取PDF等格式的全文, 切实破除了传统性期刊阻碍科学研究成果快速传播的障碍. OA是一项真正意义上的公益性科学传播工具, 编委、作者和读者利益的最大化的目标, 努力推进本学科的繁荣和发展.

《世界华人消化杂志》定价68.00元, 全年2448.00元, 邮发代号82-262, 由世界华人消化杂志编辑部出版. 《世界华人消化杂志》主要报道胃肠病学、肝胆病学、胰腺病学、内镜介入与消化外科等多学科的评论及基础研究和临床实践等各类文章, 具体内容涉及: 食管疾病, 如反流性食管炎、Barret's食管、食管静脉曲张和食管癌等; 胃部疾病, 胃食管反流性疾病、胃炎、胃动力障碍、胃出血、胃癌和幽门螺杆菌感染等; 肠道疾病, 如肠道出血、肠穿孔、肠梗阻、肠道炎症(如IBD/CD等)、肠道感染、大肠癌和大肠腺瘤等; 肝胆部疾病如病毒性肝炎、肝硬化、脂肪肝、肝纤维化、肝衰竭、胆石病、胆汁郁积、梗阻性黄疸、肝癌、胆囊癌、胆管癌和门静脉高压等; 胰腺疾病, 如胰腺炎和胰腺癌等; 全身性疾病涉及消化系统, 如自身免疫性及瘀胆性疾病、腹腔疾病、消化不良和代谢性疾病等; 以及与以上疾病相关的基因及基因组学、微生物及分子生物学、病因学、流行病学、免疫学、临床内外科诊断与治疗(如影像、化疗、移植、营养等); 除以上外, 本刊也报道诊断与筛选、内窥镜检查法、影像及先进技术.

《世界华人消化杂志》被国际检索系统美国《化学文摘》(Chemical Abstracts, CA)、荷兰《医学文摘库/医学文摘(EMBase/Excerpta Medica, EM)》和俄罗斯《文摘杂志(Abstract Journal, AJ)》收录. 国内为中国科技论文统计与分析期刊(科技部列选为中国科技论文统计源期刊)、《中文核心期刊要目总览》(2011年版)内科学类的核心期刊、《中国学术期刊评价研究报告-RCCS权威、核心期刊排行榜与指南》和中国知识资源总库收录. 《中国科技期刊引证报告(核心版)》统计显示, 2010年《世界华人消化杂志》总被引频次3 458次, 影响因子0.694, 综合评价总分60.6分, 分别位居内科学类49种期刊的第5位、第7位、第6位, 分别位居1 998种中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)的第79位、第320位、第190位; 其他指标: 他引率0.83, 被引半衰期4.9, 来源文献量712, 文献选出率0.90, 参考文献量17 963, 平均引文数25.23, 平均作者数4.35, 地区分布数29, 机构分布数349, 基金论文比0.45, 海外论文比0.01.

1.2 栏目 述评, 基础研究, 临床研究, 焦点论坛, 文献综述, 研究快报, 临床经验, 病例报告, 会议纪要. 文稿应具科学性、先进性、可读性及实用性, 重点突出, 文字简练, 数据可靠, 写作规范, 表达准确.

2 撰稿要求

2.1 总体标准 文稿撰写应遵照国家标准GB7713科学技术报告、学位论文和学术论文的编写格式, GB6447文摘编写规则, GB7714文后参考文献著录规则, GB/T 3179科学技术期刊编排格式等要求; 同时遵照国际医学期刊编辑委员会(International Committee of Medical Journal Editors)制定的《生物医学期刊投稿的统一要求(第5版)》(Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals). 见: *Ann Intern Med* 1997; 126: 36-47.

2.2 名词术语 应标准化, 前后统一, 如原词过长且多次出现者, 可于首次出现时写出全称加括号内注简称, 以后直接用简称. 医学名词以全国自然科学名词审定委员会公布的《生理学名词》、《生物化学名词与生物物理学名词》、《化学名词》、《植物学名词》、《人体解剖学名词》、《细胞生物学名词》及《医学名词》系列为准, 药名以《中华人民共和国药典》和卫生部药典委员会编的《药名词汇》为准, 国家食品药品监督管理局批准的新药, 采用批准的药名; 创新性新药, 请参照我国药典委员会的“命名原则”, 新译名词应附外文. 公认习用缩略语可直接应用(建议第一次也写出全称), 如ALT, AST, mAb, WBC, RBC, Hb, T, P, R, BP,

PU, GU, DU, ACTH, DNA, LD50, HBsAg, HCV RNA, AFP, CEA, ECG, IgG, IgA, IgM, TCM, RIA, ELISA, PCR, CT, MRI等. 为减少排印错误, 外文、阿拉伯数字、标点符号必须正确打印在A4纸上. 中医药名词英译要遵循以下原则: (1)有对等词者, 直接采用原有英语词, 如中风stroke, 发热fever; (2)有对应词者应根据上下文合理选用原英语词, 如八法eight principal methods; (3)英语中没有对等词或相应词者, 宜用汉语拼音, 如阴yin, 阳yang, 阴阳学说yinyangology, 人中renzhong, 气功qigong; 汉语拼音要以词为单位分写, 如weixibao nizhuanwan(胃细胞逆转丸), guizhitang(桂枝汤). 通常应小写.

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

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 ℃±1.2 ℃, 45.6岁±24岁, 56.4 d±0.5 d. 3.56±0.27 pg/ml应为3.56 ng/L±0.27 ng/L. BP用kPa(mmHg), RBC数用1×10^{12}/L, WBC数用1×10^{9}/L, WBC构成比用0.00表示, Hb用g/L. M_r明确的体内物质以nmol/L或mmol/L表示, 不明确者用g/L表示. 1 M硫酸, 改为1 mol/L硫酸, 1 N硫酸, 改为0.5 mol/L硫酸. 长10 cm, 宽6 cm, 高4 cm, 应写成10 cm×6 cm×4 cm. 生化指标一律采用法定计量单位表示, 例如, 血液中的总蛋白、清蛋白、球蛋白、脂蛋白、血红蛋白、总脂用g/L, 免疫球蛋白用mg/L; 葡萄糖、钾、尿素、尿素氮、CO_2结合力、乳酸、磷酸、胆固醇、胆固醇酯、三酰甘油、钠、钙、镁、非蛋白氮、氯化物; 胆红素、蛋白结合碘、肌酸、肌酐、铁、铅、抗坏血酸、尿胆元、氨、维生素A、维生素E、维生素B1、维生素B2、维生素B6、尿酸; 氢化可的松(皮质醇)、肾上腺素、汞、孕酮、甲状腺素、睾酮、叶酸用nmol/L; 胰岛素、雌二醇、促肾上腺皮质激素、维生素B12用pmol/L. 年龄的单位有日龄、周龄、月龄和岁. 例如, 1秒, 1 s; 2分钟, 2 min; 3小时, 3 h; 4天, 4 d; 5周, 5 wk; 6月, 6 mo; 雌性♀, 雄性♂, 酶活性国际单位IU = 16.67 nkat, 对数log, 紫外uv, 百分比%, 升L, 尽量把1×10^{-3} g与5×10^{-7} g之类改成1 mg与0.5 mg, hr改成h, 重量γ改成mg, 长度m改成mm. 国际代号不用于无数字的文句中, 例如每天不写每d, 但每天8 mg可写8 mg/d. 在一个组合单位符号内不得有1条以上的斜线, 例如不能写成mg/kg/d, 而应写成mg/(kg•d), 且在整篇文章内应统一. 单位符号没有单、复数的区分, 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% CO_2, 50 mL/L CO_2; 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: wcjd@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υ; (6)样本数用英文小写*n*; (7)概率用英文斜体大写*P*. 在统计学处理中在文字叙述时平均数±标准差表示为mean±SD, 平均数±标准误为mean±SE. 统计学显著性用$^aP<0.05$, $^bP<0.01$($P>0.05$不注). 如同一表中另有一套*P*值, 则$^cP<0.05$, $^dP<0.01$; 第三套为$^eP<0.05$, $^fP<0.01$等.

2.6 数字用法 遵照国家标准GB/T 15835-1995出版物上数字用法的规定, 作为汉语词素者采用汉字数字, 如二氧化碳、十二指肠、三倍体、四联球菌、五四运动、星期六等. 统计学数字采用阿拉伯数字, 如1 000-1 500 kg, 3.5 mmol/L±0.5 mmol/L等. 测量的数据不能超过其测量仪器的精密度, 例如6 347意指6 000分之一的精密度. 任何一个数字, 只允许最后一位有误差, 前面的位数不应有误差. 在一组数字中的mean±SD应考虑到个体的变差, 一般以SD的1/3来定位数, 例如3 614.5 g±420.8 g, SD的1/3达一百多g, 平均数波动在百位数, 故应写成3.6 kg±0.4 kg, 过多的位数并无意义. 又如8.4 cm±0.27 cm, 其SD/3 = 0.09 cm, 达小数点后第2位, 故平均数也应补到小数点后第2位. 有效位数以后的数字是无效的, 应该舍. 末尾数字, 小于5则舍, 大于5则进, 如恰等于5, 则前一位数逢奇则进, 逢偶(包括“0”)且5之后全为0则舍. 末尾时只可1次完成, 不得多次完成. 例如23.48, 若不要小数点, 则应成23, 而不应该23.48→23.5→24. 年月日采用全数字表达法, 请按国家标准GB/T 7408-94书写. 如1985年4月12日, 可写作1985-04-12; 1985年4月, 写作1985-04; 从1985年4月12日23时20分50秒起至1985年6月25日10时30分止, 写作1985-04-12 T23:20:50/1985-06-25 T10:30:00; 从1985年4月12日起至1985年6月15日止, 写作1985-04-12/06-16, 上午8时写作08:00, 下午4时半写作16:30. 百分数的有效位数根据分母来定: 分母≤100, 百分数到个位; 101≤分母≤1 000, 百分数到小数点后1位; 余类推. 小数点前后的阿拉伯数字, 每3位间空1/4阿拉伯数字距离, 如1 486 800.475 65. 完整的阿拉伯数字不移行!

2.7 标点符号 遵照国家标准GB/T 15834-1995标点符号用法的要求, 本刊论文中的句号都采用黑圆点; 数字间的起止号采用“-”字线, 并列的汉语词间用顿号分开, 而并列的外文词、阿拉伯数字、外文缩略词及汉语拼音字母拼写词间改用逗号分开, 参考文献中作者间一律用逗号分开; 表示终了的标点符号, 如句号、逗号、顿号、分号、括号及书名号的后一半, 通常不用于一行之首; 而表示开头的标点符号, 如括号及书名号的前一半, 不宜用于一行之末. 标点符号通常占一格, 如顿号、逗号、分号、句号等; 破折号应占两格; 英文连字符只占一个英文字符的宽度, 不宜过长, 如5-FU. 外文字符下划一横线表示用斜体, 两横线表示用小写, 三横线表示用大写, 波纹线表示用黑体.

3 稿件格式

3.1 题名 简明确切地反映论文的特定内容, 鲜明而有特色, 阿拉伯数字不宜开头, 不用副题名, 一般20个字. 避免用“的研究”或“的观察”等非特定词.

3.2 作者 论文作者的署名，按照国际医学杂志编辑委员会(ICMJE, International Committee of Medical Journal Editors)作者资格标准执行. 作者标准为: (1)对研究的理念和设计、数据的获得、分析和解读做出重大贡献; (2)起草文章, 并对文章的重要的知识内容进行批评性修改; (3)接受对准备发表文章的最后一稿. 作者应符合条件1, 2, 3, 对研究工作有贡献的其他人可放入志谢中. 作者署名的次序按贡献大小排列, 多作者时姓名间用逗号, 如是单名, 则在姓与名之间空1格(正文和参考文献中不空格). 《世界华人消化杂志》要求所有署名人写清楚自己对文章的贡献. 世界华人消化杂志不设置共同第一作者和共同通信作者.

3.3 单位 作者后写单位的全称空1格后再写省市及邮政编码. 格式如: 张旭晨, 梅立新, 承德医学院病理教研室 河北省承德市 067000

3.4 第一作者简介 格式如: 张旭晨, 1994年北京中医药大学硕士, 讲师. 主要从事消化系统疾病的病理研究.

3.5 作者贡献分布 格式如: 陈湘川与庞丽娟对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*/(mol/L), *p*/kPa, *V*/mL, *t*/℃表达.

志谢 后加冒号, 排在讨论后及参考文献前, 左齐.

4 参考文献 本刊采用"顺序编码制"的著录方法, 即以文中出现顺序用阿拉伯数字编号排序. 提倡对国内同行近年已发表的相关研究论文给予充分的反映, 并在文内引用处右上角加方括号注明角码. 文中如列作者姓名, 则需在"Pang等"的右上角注角码号; 若正文中仅引用某文献中的论述, 则在该论述的句末右上角注码号. 如马连生[1]报告……, 潘伯荣等[2-5]认为……; PCR方法敏感性高[6-7]. 文献序号作正

《世界华人消化杂志》自2006-01-01起改为旬刊发行, 每月8、18、28日出版. 北京报刊发行局发行, 邮发代号: 82-262.

《世界华人消化杂志》坚持开放获取(open access, OA)的出版模式, 编辑出版高质量文章, 努力实现编委、作者和读者利益的最大化, 努力推进本学科的繁荣和发展, 向专业化、特色化和品牌化方向迈进.

文叙述时, 用与正文同号的数字并排, 如本实验方法见文献[8]. 所引参考文献必须以近2-3年SCIE, PubMed,《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊为准, 通常应只引用与其观点或数据密切相关的国内外期刊中的最新文献. 期刊: 序号, 作者(列出全体作者). 文题, 刊名, 年, 卷, 起页-止页, PMID和DOI编号; 书籍: 序号, 作者(列出全部),书名, 卷次, 版次, 出版地, 出版社, 年, 起页-止页.

5 网络版的发表前链接 本刊即将开始实行网络版的每篇文章上都有该文发表前纪录的链接, 包括首次提交的稿件, 同行评议人报告, 作者给审稿人回信和作者修回稿, 以PDF格式上传. 读者可以针对论文、审稿意见和作者的修改情况发表意见, 指出问题与不足; 作者也可以随时修改完善自己发表的论文, 使文章的发表成为一个编者、同行评议者、读者、作者互动的动态过程.

4 写作格式实例

4.1 述评写作格式实例

http://www.wjgnet.com/1009-3079/sp.asp

4.2 研究原著写作格式实例

http://www.wjgnet.com/1009-3079/yjyz.asp

4.3 焦点论坛写作格式实例

http://www.wjgnet.com/1009-3079/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/lcjy.asp

4.7 病例报告写作格式实例

http://www.wjgnet.com/1009-3079/blbg.asp

5 投稿方式

接受在线投稿, 不接受其他方式的投稿, 如E-mail、打印稿. 在线投稿网址: http://www.baishideng.com/wcjd/ch/index.aspx. 无法在线提交的通过submission@wjgnet.com, 电话: 010-8538-1892, 传真: 010-8538-1893寻求帮助. 投稿须知下载网址http://www.wjgnet.com/1009-3079/tgxz.pdf. 审稿过程平均时间需要14-28 d. 所有的来稿均经2-3位同行专家严格评审, 2位或以上通过为录用, 否则将退稿或修改后再审. 接受后的稿件作者需缴纳稿件发表费, 文章发表后可获得1本样刊及10套单行本(稿酬).

6 修回稿须知

6.1 修回稿信件 来稿包括所有作者签名的作者投稿函. 内容包括: (1)保证无重复发表或一稿多投; (2)是否有经济利益或其他关系造成的利益冲突; (3)所有作者均审读过该文并同意发表, 所有作者均符合作者条件, 所有作者均同意该文代表其真实研究成果, 保证文责自负; (4)列出通讯作者的姓名、职称、地址、电话、传真和电子邮件; 通讯作者应负责与其他作者联系, 修改并最终审核复核稿; (5)列出作者贡献分布; (6)来稿应附有作者工作单位的推荐信, 保证无泄密, 如果是几个单位合作的论文, 则需要提供所有参与单位的推荐信; (7)愿将印刷版和电子版出版权转让给本刊编辑部.

6.2 稿件修改 来稿经同行专家审查后, 认为内容需要修改、补充或删节时, 本刊编辑部将把原稿连同审稿意见、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

世界华人消化杂志 2012年12月28日; 20(36): 3829
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

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: lijiuyi@cma.org.cn

2012-09-01/30
第十五届全国中西医结合大肠肛门病学术交流会
会议地点: 济南市
联系方式: doclf@163.com

2012-09-06/09
第七届中国肿瘤学术大会暨第十一届海峡两岸肿瘤学术会议
会议地点: 北京市
联系方式: shengwangyan@163.com

2012-09-14/16
中华医学会第十二次全国超声医学学术会议
会议地点: 青岛市
联系方式: lilyjia@163.com

2012-09-20/23
2012中国消化病学大会
会议地点: 上海市
联系方式: abstract@ccdd2012.org

2012-09-21/30
2012中华影像技术第20次全国学术大会暨国际影像技术论坛
会议地点: 长春市
联系方式: ting@dxyer.com

2012-09-28/10-02
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: lckyhy@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: lijiuyi@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•

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!

戴朝六 教授
中国医科大学第二临床学院(盛京医院)肝胆外科

党双锁 教授
西安交通大学医学院第二附属医院感染科

段义农 教授
南通大学医学院病原生物学系

方今女 教授
延边大学医学院预防医学教研部

高国全 教授
中山大学中山医学院生物化学教研室

高英堂 研究员
天津市第三中心医院

顾国利 副主任医师
中国人民解放军空军总医院普通外科

官泳松 教授
四川大学华西医院放射科

郭炜 教授
河北医科大学第四医院河北省肿瘤研究所病理研究室

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

洪天配 教授
北京大学第三医院内分泌科

黄培林 教授
东南大学肿瘤学

江学良 教授
中国人民解放军济南军区总医院消化科

金山 主任医师
内蒙古医学院附属医院普通外科

李勇 副教授
上海中医药大学附属市中医医院消化科

刘颖斌 主任医师
上海交通大学医学院附属新华医院

倪才方 教授
苏州大学附属第一医院介入科

秦成勇 教授
山东省立医院消化内科

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

任建林 教授
厦门大学附属中山医院消化内科

孙学英 教授
哈尔滨医科大学第一附属医院

汪思应 教授
安徽医科大学

王健生 教授
西安交通大学医学院第一附属医院肿瘤外科

王蔚虹 教授
北京大学第一医院消化内科

王志刚 副主任医师
上海市第六人民医院普外科

魏睦新 教授
南京医科大学第一附属医院

徐泱 副主任医师
上海复旦大学附属中山医院

杨柏霖 副主任医师
南京中医药大学附属医院

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

禹正杨 副教授
南华大学附属第一医院