

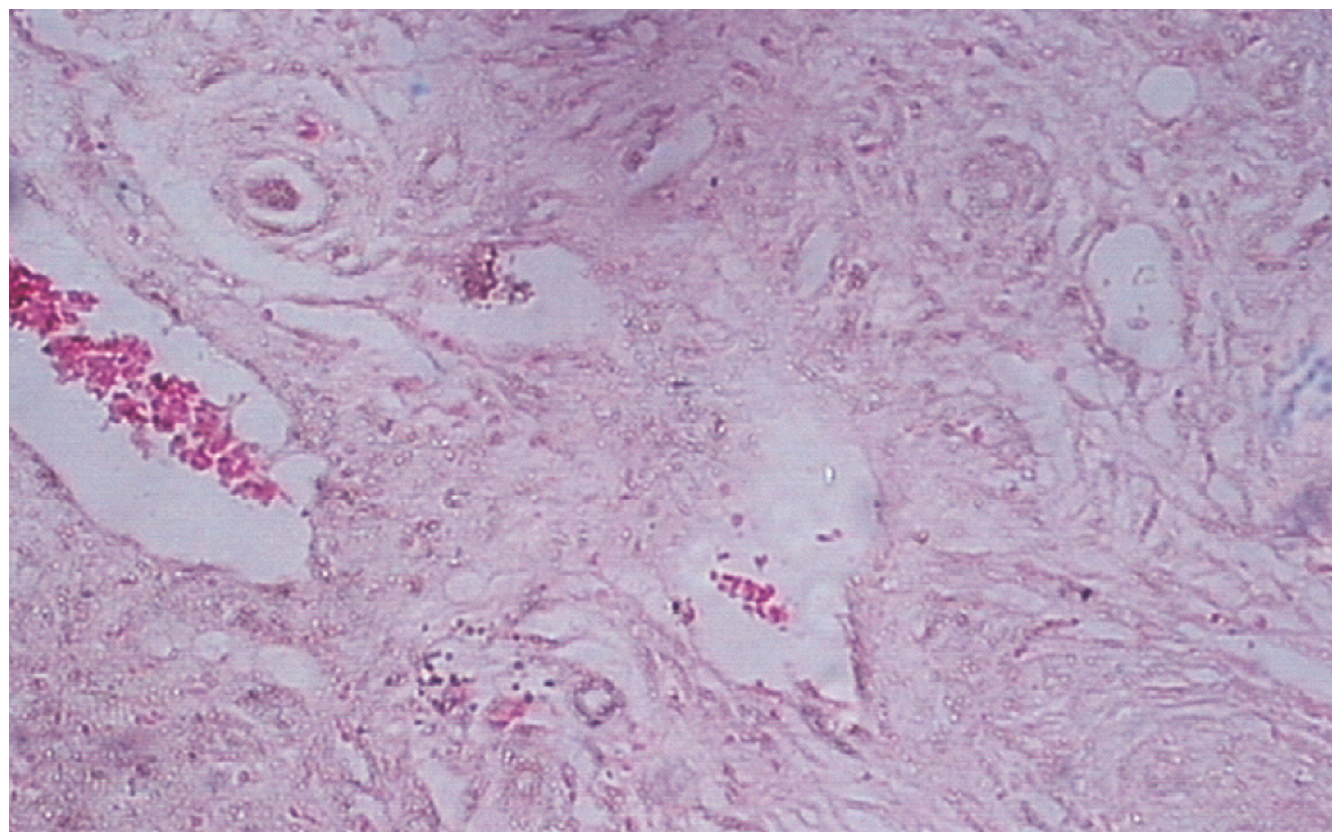
ISSN 1009-3079 (print)
ISSN 2219-2859 (online)
CN 14-1260/R

世界华人消化杂志®

WORLD CHINESE JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2011 年 10 月 18 日 第 19 卷 第 29 期 (Volume 19 Number 29)



29 / 2011

ISSN 1009-3079



名誉总编辑

潘伯荣

总编辑

马连生

《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

2009-01-01/2011-12-31

wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

总顾问

陈可冀教授
黄象谦教授
黄志强教授
王宝恩教授
危北海研究员
吴孟超教授
杨春波教授
周殿元教授

名誉总编辑

潘伯荣教授

社长/总编辑

马连生教授

副总编辑

纪小龙教授
姜洪池教授
王苑本教授
吴云林教授
徐克成教授
杨思凤教授
姚希贤教授
岳茂兴教授
张万岱教授
周学文教授

常务编委

程英升教授
范学工教授
高毅主任医师
江学良主任医师
李岩教授
刘连新教授
吕宾教授
罗和生教授
聂青和教授
王小众教授

编委

消化内科学

白爱平副教授
苒新明教授
陈国忠副主任医师
陈洪刚教授
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

邓长生教授
丁士刚教授
董蕾教授
杜雅菊主任医师
杜奕奇副教授
樊晓明主任医师
房静远教授
冯志杰主任医师
傅春彬主任医师
高峰副教授
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
何松教授
洪天配教授
侯晓华教授
胡伏莲教授
胡和平主任医师
黄培林教授
黄晓东主任医师
黄颖秋教授
黄缘教授
霍丽娟教授
季国忠教授
江米足主任医师
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
李定国教授
李淑德教授
李瑜元教授
李玉民教授
李玉明教授
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
刘铁夫教授
刘莹副主任医师
刘占举教授
陆伦根教授
吕志武教授
马红主任医师
马欣主任医师
毛高平教授

孟庆华教授
倪润洲教授
欧希龙副教授
潘秀珍教授
朴云峰教授
秦成勇教授
任粉玉副教授
任建林教授
邵先玉教授
沈琳主任医师
沈守荣教授
沈薇教授
施瑞华教授
宋军副教授
宋于刚教授
唐世刚教授
田宇彬教授
宛新建副教授
王邦茂教授
王炳元教授
王承党教授
王江滨教授
王俊平教授
王晓艳副教授
闻勤生教授
夏冰教授
夏时海副教授
徐可树教授
许乐主任医师
杨建民教授
姚树坤教授
叶红军主任医师
张春清教授
张国梁主任医师
张军教授
张小晋主任医师
张晓岚教授
张筱茵副教授
张志坚教授
郑培永副教授
郑鹏远教授
郑素军副主任医师
周国雄主任医师
周晓东副教授
周宇教授
朱春兰主任医师
邹晓平主任医师
诸琦教授
于珮主任医师

消化外科学

白雪巍副主任医师

蔡开琳副教授
蔡三军主任医师
曹杰主任医师
陈光教授
陈海龙教授
陈积圣教授
陈进宏副主任医师
陈力教授
陈立波教授
陈凇教授
陈强谱教授
陈汝福教授
陈亚军主任医师
陈钟教授
程爱国教授
程爱群主任医师
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
董明教授
杜成友教授
杜顺达副主任医师
房林副教授
傅红副教授
傅华群教授
傅志仁主任医师
高成新教授
葛海燕教授
巩鹏副教授
谷俊朝主任医师
顾国利副主任医师
顾岩教授
韩天权教授
郝纯毅主任医师
郝立强副教授
何超教授
何晓顺教授
何裕隆教授
黄志勇教授
季加孚教授
姜卫东教授
姜波健教授
蒋龙元副教授
金山副教授
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

李杰教授
李奇林教授
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
李永翔主任医师
李志霞教授
李宗芳教授
梁力建教授
刘宝林教授
刘超副教授
刘建教授
刘颖斌主任医师
卢实春教授
陆才德教授
陆云飞教授
禄韶英副主任医师
吕明德教授
吕云福教授
彭吉润主任医师
彭心宇教授
齐清会教授
秦春宏副主任医师
秦华东教授
秦环龙教授
秦建民副主任医师
邱宝安主任医师
邱双健副教授
邱伟华副主任医师
仇毓东副教授
裘正军教授
单云峰副主任医师
沈柏用副教授
沈世强教授
施宝民教授
施诚仁教授
施晓雷副主任医师
石毓君副研究员
宋振顺教授
孙诚谊教授
孙学英教授
孙延平副主任医师
邵升副教授
谭晓冬教授
汤朝晖副主任医师
汤恢焕教授
汤绍涛教授
唐南洪教授
田晓峰教授
汪波副主任医师

世界华人消化杂志®

编辑委员会

汪根树副教授
王春友教授
王德盛副主任医师
王凤山教授
王广义教授
王健生教授
王鲁副教授
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
王正康教授
王志刚副主任医师
王忠裕教授
吴河水教授
吴健雄教授
吴金术教授
吴泰璜教授
吴志勇教授
伍晓汀教授
谢敏主任医师
谢晓华副教授
邢光明教授
徐大华主任医师
徐迅迪教授
徐洪副教授
许戈良教授
许剑民教授
薛东波教授
严律南教授
杨柏霖副主任医师
杨桦教授
杨家和主任医师
杨维良教授
杨银学教授
杨尹默教授
伊力亚尔·夏合丁教授
殷正丰教授
于聪慧教授
于则利教授
禹正杨副教授
郁宝铭教授
元云飞教授
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
张群华教授
张水军教授
张宗明教授
赵刚副教授

智绪亭教授
周伟平教授
邹小明教授

消化感染病学

陈国凤主任医师
陈红松研究员
陈建杰教授
陈仕珠主任医师
陈志辉副主任医师
党双锁教授
丁惠国教授
范建高教授
范小玲主任医师
高润平教授
高泽立副教授
高志良主任医师
龚国忠教授
管世鹤副教授
郝春秋副教授
何生松教授
胡国信副主任医师
靳雪源副主任医师
林菊生教授
刘正稳教授
宁琴教授
牛俊奇教授
钱林学主任医师
孙殿兴主任医师
谭德明教授
汤华研究员
唐霓副研究员
唐晓鹏教授
王凯教授
王怡主任医师
魏来教授
吴建国教授
吴君主任医师
宣世英教授
杨江华副教授
杨林副研究员
姚鹏副教授
张继明教授
张明辉副主任医师
张占卿主任医师
赵桂鸣主任医师
赵连三教授
赵秀英副教授
周霞秋教授
朱传武教授
庄林主任医师

消化中医药学

蔡淦教授

陈治水主任医师
杜群副研究员
黄恒青主任医师
李军祥教授
李康副教授
李晓波教授
李勇副教授
李振华教授
刘成海研究员
刘平教授
刘绍能主任医师
龙致贤教授
南极星教授
牛英才研究员
沈洪教授
司富春教授
唐志鹏研究员
王富春教授
王新月教授
邢建峰副教授
徐列明教授
许玲副教授
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
陈公琰主任医师
陈克能教授
代智副研究员
华海清教授
李瑗教授
刘宝瑞教授
刘彬彬副研究员
刘云鹏教授
秦叔逵教授
沈克平主任医师
王阁教授
向德兵副教授
肖文华主任医师
谢丹教授
熊斌教授
张凤春教授

消化影像学

白彬主任医师
陈克敏教授
官泳松教授
韩新巍教授
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
施海彬教授
魏经国教授
肖恩华教授
徐爱民副教授
徐辉雄教授
徐克教授
严惟力副教授
杨业发教授
杨建勇教授
赵卫主任医师

消化内镜及介入治疗学

丁佑铭教授
郝俊鸣副主任医师
茅爱武教授
潘林娜教授
孙明军教授
万军教授
吴硕东教授
袁友红副教授

消化中西医结合学

唐文富副教授
王学美研究员
魏睦新教授
杨钦河教授
张春虎副教授

消化基础研究

曹洁副教授
曹鹏副研究员
曹师承教授
陈敬贤教授
陈秋生教授
陈志龙教授
崔莲花副教授
樊红教授
高春芳研究员
高国全教授
高英堂研究员
管冬元副教授
何敏教授
黄昆教授
黄文林教授
黄园教授
李东辉教授
李刚教授
李杰副教授
李君文研究员
李永哲副研究员
李增山副教授
刘克辛教授
刘森副教授

梅林教授
钱其军研究员
钱睿哲教授
任超世研究员
任浩副教授
任晓峰副教授
台桂香教授
谭学瑞教授
田文静副教授
田颖刚副研究员
汪思应教授
王钦红教授
魏继福副研究员
吴道澄教授
吴军研究员
吴俊华副教授
徐宁志研究员
许文燮教授
姚登福教授
阴赅宏研究员
郁卫东副研究员
喻荣彬教授
张青云研究员
张学教授
赵平副教授
周南进研究员
周士胜教授
周素芳教授
周晓东研究员
周晓武副主任医师
朱进霞教授

消化病理学

杜祥教授
李菊玲副教授
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
吕宁主任医师
马大烈教授
门秀丽教授
潘兴华副主任医师
孙伟副研究员
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
赵景民教授
朱亮副教授

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ● 2011 年 10 月 18 日 第 19 卷 第 29 期 (总第361期)

述 评

3009 IGF- II /IGF- I R相关信号通路与肝细胞癌靶向治疗

姚登福, 姚敏, 蔚丹丹

基 础 研 究

3015 NO在大鼠胰十二指肠移植中的作用

苏艳军, 刘其雨, 刁畅, 张建明, 李立, 段体德, 程若川

3023 EGCG对LoVo和SW480结肠癌细胞株的作用及对Notch1与Notch2基因表达的影响

张春霞, 王水明, 何勇山, 周阿成, 金黑鹰

3028 艾灸对脾虚大鼠小肠上皮线粒体超微结构及呼吸链酶含量的影响

易受乡, 彭艳, 彭芬, 常小荣, 龙奕文, 林亚平

临 床 研 究

3035 PEMT基因G175A和rs12325817位点多态性与非酒精性脂肪肝的关系

唐华, 王旭霞, 赵曙光, 王景杰, 张超, 卢王, 李慧艳, 闻勤生

文 献 综 述

3040 EBV感染与胃癌关系的研究进展

陈江, 朱冠保

3046 丙型肝炎的研究进展

袁征, 邵铭, 何晶

3053 miR-200家族在消化系肿瘤中的研究进展

杜平, 张庆瑜

3058 幽门螺杆菌*iceA1*基因地域分布特征

黄敬敬, 战淑慧, 董全江, 董开芯

研 究 快 报

3064 光敏剂-磁性纳米粒子螯合剂对磁性纳米粒子在VX2肝转移癌细胞内靶向性分布的影响

葛海燕, 常卓林, 李淑萍, 刘豫昊, 龚健

临 床 经 验

3070 去唾液酸糖蛋白受体抗体阳性的 I 型自身免疫性肝炎生物学性状及其意义

吴虹杰, 徐芸

3075 JNK信号通路在慢性乙型肝炎患者外周血单个核细胞中的活化

侯炳旭, 冯丽英

3081 胆囊息肉样病变的临床流行病学特点及其易感性因素

张毅, 刘薇, 周静, 王伟, 王仁萍, 马先福, 王燕

3088 结直肠癌肝转移的预后因素

王科伟, 范海银, 孔凡民, 董明

3094 Peutz-Jeghers综合征: 恶性肿瘤高风险人群

袁柏思, 路又可, 金鑫鑫, 万海军, 周淑萍, 汪芳裕

3100 序贯疗法和标准三联疗法根除幽门螺杆菌的疗效比较

吴改玲, 蓝宇, 张小晋

附 录	3104 《世界华人消化杂志》投稿须知 3109 2011年国内国际会议预告
志 谢	3110 志谢世界华人消化杂志编委
消 息	3014 《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》 3022 中国科技信息研究所发布《世界华人消化杂志》影响因子0.625 3034 《世界华人消化杂志》性质、刊登内容及目标 3045 《世界华人消化杂志》入选北京大学图书馆2008年版《中文核心期刊要目总览》 3052 《世界华人消化杂志》修回稿须知 3057 WJG成功通过评审被PMC收录 3069 《世界华人消化杂志》参考文献要求 3080 WJG总被引频次排名位于第174名 3087 《世界华人消化杂志》外文字符标准 3093 《世界华人消化杂志》2011年开始不再收取审稿费 3103 《世界华人消化杂志》栏目设置
封面故事	葛海燕, 常卓林, 李淑萍, 刘豫昊, 龚健. 光敏剂-磁性纳米粒子螯合剂对磁性纳米粒子在VX2肝转移癌细胞内靶向性分布的影响. 世界华人消化杂志 2011; 19(29): 3064-3069 http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/3064.asp
本期责任人	编务 周媛; 送审编辑 李军亮; 组版编辑 闫晋利; 英文编辑 王天奇; 责任编辑 李军亮; 审核编辑 李军亮; 形式规范 马连生

<p>世界华人消化杂志</p> <p>Shijie Huaren Xiaohua Zazhi</p> <p>吴阶平 题写封面刊名 陈可冀 题写版权刊名 (旬刊)</p> <p>创 刊 1993-01-15 改 刊 1998-01-25 出 版 2011-10-18 原刊名 新消化病学杂志</p> <p>名誉总编辑 潘伯荣 总 编 辑 马连生 编辑部主任 李军亮 期 刊 名 称 世界华人消化杂志 主 管 单 位 山西省科学技术厅 主 办 单 位 太原消化病研治中心</p>	<p>编辑 世界华人消化杂志编辑委员会 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com</p> <p>出版 世界华人消化杂志编辑部 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com</p> <p>印刷 北京科信印刷厂</p> <p>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)</p> <p>订购 全国各地邮电局</p> <p>邮购 世界华人消化杂志编辑部 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com</p>	<p>世界华人消化杂志是一份同行评议性的旬刊, 是一份被《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊.《世界华人消化杂志》的英文摘要被美国《化学文摘》, 荷兰《医学文摘库/医学文摘》和俄罗斯《文摘杂志》收录.</p> <p>世界华人消化杂志正式开通了在线办公系统(http://www.baishideng.com/wcjd/ch/index.aspx), 所有办公流程一律可以在线进行, 包括投稿、审稿、编辑、审读, 以及作者、读者、编者之间的信息反馈交流.</p> <p>特别声明 本刊刊出的所有文章不代表本刊编辑部和本刊编委会的观点, 除非特别声明. 本刊如有印装质量问题, 请向本刊编辑部调换.</p> <p>2011年版权归世界华人消化杂志所有</p>
---	---	---

World Chinese Journal of Digestology

October 2011 Contents in Brief Volume 19 Number 29

EDITORIAL	<p>3009 Insulin-like growth factor (IGF)-II/IGF-I R related signaling pathway and molecular targeted therapy for hepatocellular carcinoma <i>Yao DF, Yao M, Yu DD</i></p>
BASIC RESEARCH	<p>3015 Role of nitric oxide in pancreas-duodenal transplantation in rats <i>Su YJ, Liu QY, Diao C, Zhang JM, Li L, Duan TD, Cheng RC</i></p> <p>3023 Effect of epigallocatechin-3-gallate on Notch1 and Notch2 expression in human colorectal cancer cell lines SW480 and LoVo <i>Zhang CX, Wang SM, He YS, Zhou AC, Jin HY</i></p> <p>3028 Effect of moxibustion on mitochondrial ultrastructure and contents of mitochondrial enzymes in the intestinal epithelium of spleen-deficiency rats <i>Yi SX, Peng Y, Peng F, Chang XR, Long YW, Lin YP</i></p>
CLINICAL RESEARCH	<p>3035 Association between the G175A and rs12325817 polymorphisms in the phosphatidylethanolamine N-methyltransferase gene and susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease <i>Tang H, Wang XX, Zhao SG, Wang JJ, Zhang C, Lu W, Li HY, Wen QS</i></p>
REVIEW	<p>3040 Advances in understanding the relationship between Epstein-Barr virus infection and gastric carcinoma <i>Chen J, Zhu GB</i></p> <p>3046 Progress in hepatitis C research <i>Yuan Z, Shao M, He J</i></p> <p>3053 miR-200 family and gastrointestinal tumors <i>Du P, Zhang QY</i></p> <p>3058 Characteristics of geographical distribution of the <i>Helicobacter pylori</i> <i>iceA1</i> gene <i>Huang JJ, Zhan SH, Dong QJ, Dong KX</i></p>
RAPID COMMUNICATION	<p>3064 Targeted distribution of photosensitizer-manoparticle conjugates in transplanted VX-2 liver tumors in rabbits <i>Ge HY, Chang ZL, Li SP, Liu YH, Gong J</i></p>
CLINICAL PRACTICE	<p>3070 Biological significance of autoantibodies to asialoglycoprotein receptor in patients with type I autoimmune hepatitis <i>Wu HJ, Xu Y</i></p> <p>3075 Role of the JNK signal pathway in activation-induced cell death in PBMC from patients with chronic hepatitis B <i>Hou BX, Feng LY</i></p> <p>3081 Clinical epidemiological characteristics and correlative factors of polypoid lesions of the gallbladder <i>Zhang Y, Liu W, Zhou J, Wang W, Wang RP, Ma XF, Wang Y</i></p> <p>3088 Analysis of prognostic factors for colorectal liver metastases <i>Wang KW, Fan HY, Kong FM, Dong M</i></p> <p>3094 High risk of cancer in Peutz-Jeghers syndrome <i>Yuan BS, Lu YK, Jin XX, Wan HJ, Zhou SP, Wang FY</i></p>

	3100 Sequential therapy versus standard triple therapy for <i>Helicobacter pylori</i> eradication <i>Wu GL, Lan Y, Zhang XJ</i>
APPENDIX	3104 Instructions to authors of World Chinese Journal of Digestology 3109 Meeting events calendar in 2011
ACKNOWLEDGMENT	3110 Acknowledgments to reviewers of World Chinese Journal of Digestology
COVER	<i>Ge HY, Chang ZL, Li SP, Liu YH, Gong J.</i> Targeted distribution of photosensitizer-manoparticle conjugates in transplanted VX-2 liver tumors in rabbits. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2011; 19(29): 3064-3069 http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/3064.asp
RESPONSIBLE EDITORS FOR THIS ISSUE	Assistant Editor: <i>Yuan Zhou</i> Review Editor: <i>Jun-Liang Li</i> Electronic Page Editor: <i>Jin-Li Yan</i> English Language Editor: <i>Tian-Qi Wang</i> Editor-in-Charge: <i>Jun-Liang Li</i> Proof Editor: <i>Jun-Liang Li</i> Layout Editor: <i>Lian-Sheng Ma</i>

Indexed/Abstracted by Chemical Abstracts, EMBASE/ Excerpta Medica and Abstract Journals

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

Founded on January 15, 1993
Renamed on January 25, 1998
Publication date October 18, 2011

NAME OF JOURNAL

World Chinese Journal of Digestology

RESPONSIBLE INSTITUTION

Department of Science and Technology
of Shanxi Province

SPONSOR

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

EDITING

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

PRINTING

Beijing Kexin Printing House

PUBLISHING

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

OVERSEAS DISTRIBUTOR

Beijing Bureau for Distribution of Newspapers and Journals (Code No. 82-261)
China International Book Trading Corporation PO Box 399, Beijing, China (Code No. M4481)

HONORARY EDITOR-IN-CHIEF

Bo-Rong Pan

EDITOR-IN-CHIEF

Lian-Sheng Ma

SCIENCE EDITORS

Director: Jun-Liang Li

SUBSCRIPTION

RMB 56 Yuan for each issue
RMB 2016 Yuan for one year

CSSN

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

COPYRIGHT

© 2011 Published by *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 © 2011 by Editorial Department of *World Chinese Journal of Digestology*

IGF- II /IGF- I R相关信号通路与肝细胞癌靶向治疗

姚登福, 姚 敏, 蔚丹丹

姚登福, 姚敏, 蔚丹丹, 南通大学附属医院临床医学研究中心 江苏省南通市 226001

江苏省自然科学基金资助项目, No. BK2008187

姚登福, 教授, 主要从事恶性肿瘤早期诊断和分子机制研究.

作者贡献分布: 本论文由姚登福、姚敏及蔚丹丹完成.

通讯作者: 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. yaodf@ahnmc.com

电话: 0513-85052297

收稿日期: 2011-06-01 修回日期: 2011-08-10

接受日期: 2011-10-04 在线出版日期: 2011-10-18

Insulin-like growth factor (IGF)- II /IGF- I R related signaling pathway and molecular targeted therapy for hepatocellular carcinoma

Deng-Fu Yao, Min Yao, Dan-Dan Yu

Deng-Fu Yao, Min Yao, Dan-Dan Yu, Research Center of Clinical Medicine, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China

Supported by: the Natural Science Foundation of Jiangsu Province, No. BK2008187

Correspondence to: Deng-Fu Yao, Professor, Research Center of Clinical Medicine, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China. yaodf@ahnmc.com

Received: 2011-06-01 Revised: 2011-08-10

Accepted: 2011-10-04 Published online: 2011-10-18

Abstract

The insulin-like growth factor (IGF)- II /IGF- I receptor (IGF- I R) related signaling pathway is associated with the development and progression of hepatocellular carcinoma (HCC). Hepatic IGF-II activation can deliver a mitogenic signal to IGF- I R to increase the tumorigenic potential of liver cells. Recently, a considerable amount of evidence suggests that targeted inhibition of IGF-II and IGF- I R could inhibit the proliferation of hepatoma cells. In this review, we summarize the interaction of IGF-II and IGF- I R in hepatocarcinogenesis and evaluate their potential use in molecular targeted therapy for hepatocellular carcinoma.

Key Words: Insulin-like growth factor- II; Insulin-like growth factor- I receptor; Targeted therapy; Hepatocellular carcinoma

Yao DF, Yao M, Yu DD. Insulin-like growth factor (IGF)- II /IGF- I R related signaling pathway and molecular targeted therapy for hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(29): 3009-3014

摘要

胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor, IGF)- II /IGF II - I R相关信号通路与肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)发生发展密切相关. IGF- II 活化可经IGF- I R传递促有丝分裂信号, 增加HCC变可能. 近来研究显示靶向IGF- II 或IGF- I R可明显抑制HCC细胞增殖. 本文就IGF- II 和IGF- I R信号通路在肝细胞癌变、转化过程中的作用及作为HCC基因治疗靶目标的研究进展进行了评述.

关键词: 胰岛素样生长因子- II; 胰岛素样生长因子- I 受体; 分子靶向; 肝细胞癌

姚登福, 姚敏, 蔚丹丹. IGF- II /IGF- I R相关信号通路与肝细胞癌分子靶向治疗. *世界华人消化杂志* 2011; 19(29): 3009-3014

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/3009.asp>

0 引言

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是由肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV或hepatitis C virus, HCV)感染、化学致癌物等多病因作用, 诱发癌基因或癌相关基因激活、抗癌基因失活或胚胎期某些癌基因重新复活和HCC发生相关信号通路等异常, 致肝细胞恶性转化、增殖失控^[1], 经过启动、促进和演变多阶段发病的复杂过程^[2,3], 已证明有数百基因表达异常, 调控HCC进展^[4,5]. 随着基因(DNA)组学、转录(mRNA)组学和蛋白质组学技术进步, HCC诊治研究有所进展. HCC手术切除仍是最好治疗手段, 但因癌细胞对化疗、放疗不敏感, 其预后极差. 胰岛素样生长因子轴(insulin-like growth factor axis, IGFs)及所介导的信号通路与HCC关系密切, 尤其是该通路的重要成员: IGF- II 和IGF- I 受体(insulin-like growth factor- I receptor, IGF- I R)至关重要^[6-8]. 本文述

■背景资料

肝细胞癌的防治是全世界的医学难题. 肝细胞癌发展与胰岛素样生长因子轴(insulin-like growth factors, IGFs)及所介导的信号通路与肝细胞癌关系密切, 尤其是该通路的重要成员: IGF- II 和IGF- I 受体(IGF- I R)至关重要, 可成为基因治疗新靶点.

■同行评议者

田晓峰, 教授, 大连医科大学附属第二医院普通外科; 丁惠国, 主任医师, 首都医科大学附属北京佑安医院肝病消化科; 高润平, 教授, 吉林大学第一医院肝病科

■ 研发前沿

IGF-Ⅱ具有刺激DNA和蛋白质合成,促进细胞有丝分裂,调节糖原代谢的作用。肝组织中IGF-Ⅰ RmRNA与IGF-Ⅱ mRNA表达正相关,可能通过高亲和力受体IGF-Ⅰ R结合,以自分泌和旁分泌方式发挥效应。

表 1 IGFs成员的分子特征和基因编码

	相对分子质量 (kDa)	氨基酸	基因定位	基因 (kbp)	外显子
IGF-Ⅰ	7.7	70	12q22-12q24	100	6
IGF-Ⅱ	7.5	67	11p15	30	9
IGF-Ⅰ R	225	α : 706; β : 626	15q25-15q26	100	21
IGF-Ⅱ R	270	2450	6q25-6q27	140	未知
IGFBP-1	25.3	234	7p12-7p14	5.2	4
IGFBP-2	31.4	289	2q31-2q34	32	4
IGFBP-3	28.7	264	7p12-7p14	8.9	5
IGFBP-4	26.0	237	17q12-17q21	12	4
IGFBP-5	28.6	252	2q31-2q24	33	4
IGFBP-6	22.8	216	12q13	4.7	4

评IGF-Ⅱ和IGF-Ⅰ R表达及作为HCC基因治疗靶目标的研究进展。

1 IGF-Ⅱ及IGF-Ⅰ R的分子构成

IGFs有2种相关多肽即IGF-Ⅰ和IGF-Ⅱ,通过与特异受体IGF-Ⅰ R和IGF-Ⅱ R在细胞膜相互作用来发挥活性,由特异的IGF结合蛋白(insulin-like growth factor binding protein 1-6, IGFBP1-6)和IGFBP水解酶调节,在细胞生长、增殖、分化、凋亡以及转化方面起着重要作用(表1)^[8]。IGF-Ⅱ具有刺激DNA和蛋白质合成,促进细胞有丝分裂,调节糖原代谢的作用。肝组织中IGF-Ⅰ RmRNA与IGF-Ⅱ mRNA表达正相关,可能通过高亲和力受体IGF-Ⅰ R结合,以自分泌和旁分泌方式发挥效应^[9,10]。

IGF-Ⅰ R是细胞表面酪氨酸蛋白激酶受体,是由2个 α 亚基(MW为13.5 kDa)及2个 β 亚基(MW为9 kDa)包含跨膜区、ATP结合位点及酪氨酸激酶区,以二硫键连接成四聚体。 α 亚基含有与IGF-Ⅰ或胰岛素结合的位点,是细胞生长分化的调节因子,介导丝裂信号、防御凋亡损伤、诱导血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)表达。IGF-Ⅱ是由67个氨基酸残基组成(相对分子质量为7.5 kDa)的单链多肽,人类IGF-Ⅱ基因位于第11号染色体短臂11p15,其完整的核苷酸序列至少含有9个外显子(E₁-E₉)及4种启动子(P₁-P₄)。IGF-Ⅱ是调节胚胎生长发育所必需的生长因子之一,主要由肝脏合成,在体外具有刺激DNA和蛋白质合成,促进细胞有丝分裂,调节糖原代谢的功能^[11,12]。

IGF-Ⅱ通过其高亲和力受体IGF-Ⅰ R和IGF-Ⅱ R以自分泌和旁分泌的方式来发挥效应。IGF-Ⅱ生物学作用主要由IGF-Ⅰ R介导,肝细胞IGF-

Ⅱ过表达,IGF-Ⅱ与IGF-Ⅰ R结合后,解除了 α 亚基对 β 亚基上酪氨酸激酶的抑制,酪氨酸激酶被激活,自身磷酸化,导致胰岛素受体底物(IRS)1-4和Shc多位点磷酸化,启动两条信号级联反应:RAS-RAF-MAPK和PI-3K/AKT/mTOR,促有丝分裂,诱导细胞增生、转化和抗凋亡;IGF-Ⅰ R与胰岛素受体(IRS)84%同源,活化受控于IGF-Ⅱ表达和IGFBP生物活性。结合PI3-K的调节亚单位P₈₅和生长因子受体结合蛋白2(growth factor receptor binding protein-2, GRB2),启动两条信号转导通路:PI3K/Akt通路和MAPK通路,促进细胞有丝分裂,诱导细胞增生、转化和抑制凋亡。IGF-Ⅱ和IGF-Ⅰ R表达增多可促进细胞有丝分裂、细胞转化及抗凋亡作用。IGF-Ⅱ R与转运溶酶体酶结合,降解IGF-Ⅱ。IGFs的生物活性并不仅仅依赖于他们和IGF受体相互作用,同时在局部的细胞环境也受IGF结合蛋白的影响^[13]。

2 IGF-Ⅱ/IGF-Ⅰ R表达与肝细胞恶性转化

IGFs失衡与肝细胞恶性转化关系密切^[14]。IGF-Ⅰ R和IGF-Ⅱ在胚胎期肝内含量较高,成人阶段维持低水平^[15]。IGF-Ⅰ R是细胞生长分化的重要调节因子,可介导丝裂信号、防御凋亡损伤、诱导血管内皮生长因子,并是一些细胞类型转化所必需^[16]。HCC变过程中IGF-Ⅱ/IGF-Ⅰ R重新激活,表达增加与分化程度相关。活化的IGF-Ⅱ/IGF-Ⅰ R,具有促进癌细胞播散和侵袭的作用。以2-乙酰氨基苄制作HCC模型,观察IGF-Ⅱ和IGF-Ⅰ R表达与胞内定位,IGF-Ⅰ RmRNA与IGF-Ⅱ mRNA动态变化。经病理学证实,早期肝细胞胞质出现颗粒样变性,偶见异型胞核;中期核染色质增粗,核浆比增大;后期组织结构消失,细胞排列成巢状、粗条索状,细胞核中等大,核

染色质增粗, 核浆比例增大, 均为高分化HCC, 此过程中IGF- II 和IGF- I R在蛋白和转录水平上呈进行性增加, 伴大量核酸合成, 癌前病变时肝总RNA显著升高, IGF- II 为重要的细胞生长调节因子, 经IGF- I R酪氨酸激酶途径活化, 在肝细胞异常增殖和分化阶段, IGF- II 产生胚胎表型逆转, 提示两者的活化、转录与HCC形成有关^[17]。

胚胎肝内IGF- II /IGF- I R过表达, 出生后逐步降至较低水平; HCC变时, 肝IGF- II /IGF- I R重新表达, 伴明显的异质性^[18,19]。HCCIGF- II /IGF- I R基因所编译的肽链与胎肝IGF- II /IGF- I R一致。HCC形成多伴有肝炎和/或肝硬化, 且多数伴有HBV感染; 从慢性肝炎到肝硬化到HCC发展过程中, IGF- II /IGF- I R表达水平, 癌组织高于肝硬化和/或慢性肝炎的癌周组织(多数伴不典型增生)。HCC形成过程中IGF- II /IGF- I R变化与肝病理学平行。HCC及HCC细胞株中IGF- I R mRNA和/或蛋白呈过表达, IGF- I R破坏可阻止SV40T抗原或V-ras癌基因诱导转化, 其数量减少则引起转化表型逆转。相反, IGF- I R过表达导致细胞转化或肿瘤形成, 表皮生长因子受体需经IGF- I R才能对细胞发挥有丝分裂作用及转化潜能, 而IGF- I R过表达直接可引起细胞转化, 对HCC细胞恶性表型建立和维持不可缺少。在HBV-x阳性HCC细胞株SNU368中, IGF- I R表达显著高于HBV-x阴性HCC细胞株SNU387, 提示HBV-x可通过激活IGF- I R表达参与HCC形成^[20]。

3 肝癌与IGF- II 及IGF- I R过表达机制

IGF- II 及IGF- I R过度表达是HCC形成过程中的重要特征, IGF- I R介导信号传至细胞内, 其异常活化与表达可能是HCC变的早期事件, 机制复杂, 涉及肝炎病毒如HBV和HCV慢性感染与复制、毒素(如酒精或黄曲霉毒素)及代谢产物所致肝损伤与肝硬化, 以及癌基因活化、抑癌基因突变等等。HBV基因编码的HBx蛋白, 可通过蛋白激酶C及p44/p42MAPK信号通路使Sp1磷酸化, 增加其与DNA结合力, 激活IGF- II 启动子P₄, 导致IGF- II 过表达。HCV核心蛋白也可通过PKC信号通路激活启动子P₄, 上调IGF- II 表达。IGF- II /IGF- I R信号途径激活和过表达, 启动下游两条信号级联反应, 促使具有高增殖活性的癌前肝细胞转化、抗凋亡、诱导VEGF表达与新血管生成等^[21-24]。HCC组织IGF- I R和IGF- I

R-mRNA阳性率分别为80.0%, 76.7%; 非癌组中的表达阳性率分别为43.3%, 33.3%, HCC组阳性率明显高于非癌组, 与HCC动物模型的所测结果相吻合。

培养HCC细胞株(HepG2、Huh-6、Huh-7和PLC), 加入黄曲霉素B1(Aflatoxin B1, AFB1), 发现IGF- II 和IGF- I R表达与AFB1剂量相关, 提示AFB1经IGF- I R介导信号通路, 促进HCC细胞增殖, 另以含240 mL/L乙醇的流质喂饲野生型小鼠8 wk后, 同样见IGF- I R表达上调。P₅₃可经转录PTEN和IGF-BP3减少IGF- I R/AKT信号途径活化^[25]。突变型P₅₃蛋白丧失了抑癌功能, 密码子249突变的P₅₃蛋白激活相关信号转导通路, 经激活IGF- II 胚胎型启动子P₃和P₄, 上调IGF- II 表达。HCC组织磷脂酰肌醇蛋白聚糖3过表达, 与IGF- II 或IGF- I R结合, 促其HCC变。另与IGF- II 基因低甲基化有关, IGF- II 基因或启动子中含多个CCGG位点, 正常肝IGF- II 基因呈高甲基化状态, 而癌组织IGF- II 呈广泛低甲基化, IGF- II 基因去甲基化, 使基因重新活化, 肝IGF- II 过表达引起血IGF- II 升高^[26-28]。

4 IGF- II 与HCC靶向治疗

HCC治疗以手术为主, 因HCC细胞对放疗、化疗不敏感, 重组DNA技术使HCC基因治疗成为可能, 已成为探讨的热点^[29-31]。非编码RNA(miRNA)是体内的RNA干扰触发器, 可通过在经典的RNA干扰途径降解靶基因mRNA、也可直接抑制靶基因的蛋白翻译、还可经快速脱腺苷化降解mRNA, 被看作体内固有的基因调控子中最大家族。以真核表达载体构建了IGF- II 表达干扰载体, 模拟天然miRNA构建表达miRNA质粒, 以调控相关基因IGF- II 表达, 以人IGF- II 序列设计并合成miRNA, 将miRNA插入质粒构建pcDNA™6.2-GW/EmGFP miR干扰载体; 经筛选、转染HepG2细胞, 以荧光定量PCR分析靶向HCCIGF- II 基因表达的干扰效果; 测序证实成功构建真核IGF- II 干扰质粒MR-IGF- II, 将干扰质粒转染至HepG2细胞, 镜下显示50%转染效率; 经荧光定量PCR扩增, 沉默IGF- II 基因表达效率达43%, 将其转染至HepG2细胞, 在转录和蛋白水平上对IGF- II 具有较高干扰效率^[32]。

以调控目标基因的miRNA表达质粒的构建和有效质粒筛选, 确定针对IGF- II 基因的miRNA的有效作用位点, 选用最有效的并确定了2 035-2 055为IGF- II 有效位点; 将有效质粒瞬

■相关报道

以人IGF- II 序列设计并合成miRNA, 将miRNA插入质粒构建干扰载体; 经筛选、转染HepG2细胞, 将其转染至HepG2细胞, 在转录和蛋白水平上对IGF- II 具有较高干扰效率。

■创新盘点

人miRNA干扰质粒能有效抑制HepG2细胞IGF-II表达。针对IGF-II表达的相关信号通路的基因治疗或改变IGF-II启动子P3甲基化状态,与IGF-IR联合干扰效果更佳,可抑制癌细胞生长,促进凋亡。

时转染HepG2细胞后,观察到miRNA使HCC细胞中IGF-II表达在转录水平和蛋白水平上都明显下调;并使HCC细胞增殖受抑制,表现为细胞周期改变,癌细胞增殖受阻于G₀-G₁期,癌细胞凋亡增加,证实了IGF-II表达与HCC发生的密切关系。人miRNA干扰质粒能有效抑制HepG2细胞IGF-II的表达。针对IGF-II表达的相关信号通路的基因治疗或改变IGF-II基因启动子P₃的甲基化状态,纠正IGF-II基因异常,可成为基因治疗新靶点^[33,34]。

5 IGF-IR与HCC靶向治疗

HCCIGF-IR过表达^[35],针对IGF-IR分子靶向治疗,现有多种靶向IGF-IR方法,如寡核苷酸、单克隆抗体、小分子抑制剂和RNAi等^[36-38]。以靶向IGF-IR的寡核苷酸治疗HCC,可抑制癌细胞生长、下调IGF-IR mRNA,注入裸鼠模型,肿瘤生长受抑,呈浓度依赖性;靶向IGF-IR反义寡核苷酸,能防止HCC复发及HCC肺转移、降低裸鼠血AFP浓度。可阻止激酶域或底物结合位点抑制酪氨酸激酶激活,靶向IGF-IR的小分子酪氨酸激酶抑制剂颇多,如酪氨酸磷酸化抑制剂AG538、选择性激酶抑制剂—环木脂体家族的PPP、PQIP、NVP-AEW541和表没食子儿茶素没食子酸酯(epigallocatechin gallate, EGCG)等PQIP为一种新颖有效、选择性的IGF-IR小分子酪氨酸激酶抑制剂,能有效抑制癌细胞增殖,与IGF-IR亲和力高于IR的14倍,因特异性强不影响糖原代谢;EGCG是从绿茶中提取多酚化合物,可抑制酪氨酸激酶受体(phosphoreceptor tyrosine kinase, RTK)和下游信号通路;提高IGF-IR磷酸化水平,可诱导癌细胞凋亡、降低IGF-II mRNA及蛋白表达,与阿霉素联用,可用于预防或治疗HCC^[39,41]。

以序列特异性小干扰RNA(siRNA)转染HCC细胞,使靶mRNA断裂,经核酸酶作用降解,目的基因沉默;靶向IGF-IR mRNA序列siRNA,脂质体瞬时转染HCC细胞Huh7,增殖抑制、促进凋亡及使Huh7对阿霉素敏感性增加。联合应用靶向IGF-IR mRNA及靶向EGFR mRNA的siRNA,使HepG2和Huh7对阿霉素敏感性增加、下调AKT和ERK磷酸化水平。RNAi可沉默靶基因,比基因敲除术简单,与单抗和小分子酪氨酸激酶抑制剂相比不影响IR。尽管RNAi有巨大治疗潜能,靶点选择、siRNA导入、沉默基因序列设计、siRNA半衰期延长等尚需更多的研究^[42,43]。

以IGF-IR单克隆抗体中和IGF-IR,可阻断IGF-II信号转导,抑制HCC细胞增殖。A12是一种人类单克隆IgG1抗体,与IGF-IR高度特异,可促进IGF-IR降解,阻止与IGF-II结合;在体外可降低IGF-IR和下游信号,注射人HCC细胞异体移植鼠模型体内,可延缓肿瘤生长、延长生存期、减少增殖率和诱导凋亡;单抗分子相对较大,肽类为抗体小分子片段,易进入细胞有望成为替代物;靶向IGF-IR寡肽单抗,可阻断受体激活及下游信号通路,可抑制癌细胞增殖。将人抗受体抗体嵌入可下调IGF-IR表达,而显著抑制受体信号传导^[44-46]。以IGF-IR为靶点的体内试验,可直接通过诱发凋亡和抑制细胞生长来抑制肿瘤细胞转化和/或使肿瘤消退。索拉非尼有利于提高晚期HCC患者生存,但可诱导IGF-IR表达或活化、上调IGF-II/IGF-IR途径下游元件(MEK等)发生磷酸化。靶向IGF-IR在HCC治疗中可具有放、化疗增敏作用和联合靶向价值。

6 结论

HCC发生机制复杂且为多基因疾病,与肝炎病毒的慢性感染、癌基因及癌相关基因激活及抑癌基因的失活等,引起肝细胞持续增殖导致癌变^[47,48]。HCC发生发展过程中IGF-II/IGF-IR信号通路异常激活,被认为是细胞恶性转化过程的关键^[49,50]。以IGF-II特异性反义寡核苷酸治疗或对其启动子进行甲基化处理,均能抑制肿瘤的生长,延长动物的存活期。人源化抗受体抗体的嵌入,可下调IGF-IR表达,而显著抑制受体信号传导。许多体内外肿瘤模型中,小分子IGF-IR酪氨酸激酶抑制剂对IGF-IR的活性和肿瘤细胞的生长也有明显抑制作用。而IGF轴与HCC关系复杂,其确切调控机制有待探讨。

7 参考文献

- 1 Kew MC. Hepatitis B virus x protein in the pathogenesis of hepatitis B virus-induced hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2011; 26 Suppl 1: 144-152
- 2 Song JY, Lee JH, Joe CO, Lim DS, Chung JH. Retrotransposon-specific DNA hypomethylation and two-step loss-of-imprinting during WW45 haploinsufficiency-induced hepatocarcinogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 2011; 404: 728-734
- 3 Morisawa T, Marusawa H, Ueda Y, Iwai A, Okazaki IM, Honjo T, Chiba T. Organ-specific profiles of genetic changes in cancers caused by activation-induced cytidine deaminase expression. *Int J Cancer* 2008; 123: 2735-2740
- 4 Ibrahim AE, Arends MJ, Silva AL, Wyllie AH, Gre-

- ger L, Ito Y, Vowler SL, Huang TH, Tavaré S, Murrell A, Brenton JD. Sequential DNA methylation changes are associated with DNMT3B overexpression in colorectal neoplastic progression. *Gut* 2011; 60: 499-508
- 5 Findeis-Hosey JJ, Xu H. The use of insulin like-growth factor II messenger RNA binding protein-3 in diagnostic pathology. *Hum Pathol* 2011; 42: 303-314
- 6 Qian J, Yao D, Dong Z, Wu W, Qiu L, Yao N, Li S, Bian Y, Wang Z, Shi G. Characteristics of hepatic igf-II expression and monitored levels of circulating igf-II mRNA in metastasis of hepatocellular carcinoma. *Am J Clin Pathol* 2010; 134: 799-806
- 7 Matsuyama M, Sugiura S, Kakita A, Sato Y, Kuroda M. Hepatocellular carcinoma arising from ectopic liver tissue in the spleen producing insulin-like growth factor II. *Pathol Res Pract* 2011; 207: 124-126
- 8 陆园园, 姚登福. 胰岛素样生长因子(IGF)家族成员与肝细胞癌变关系. *交通医学* 2008; 22: 31-34
- 9 Newman J, Cohen EH, Cosgrove L, Kopacz K, Dransfield DT, Adams TE, Peat TS. Crystallization and preliminary X-ray analysis of the complexes between a Fab and two forms of human insulin-like growth factor II. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 2009; 65: 945-948
- 10 姚登福, 顾文静, 李月明. 肝细胞癌变过程中相关生长因子的表达与动态变化. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 2570-2575
- 11 Coppola D, Ouban A, Gilbert-Barness E. Expression of the insulin-like growth factor receptor 1 during human embryogenesis. *Fetal Pediatr Pathol* 2009; 28: 47-54
- 12 Belfiore A, Frasca F, Pandini G, Sciacca L, Vigneri R. Insulin receptor isoforms and insulin receptor/insulin-like growth factor receptor hybrids in physiology and disease. *Endocr Rev* 2009; 30: 586-623
- 13 Schlegel W, Halbauer D, Raimann A, Albrecht C, Scharmer D, Sagmeister S, Helmreich M, Häusler G, Egerbacher M. IGF expression patterns and regulation in growth plate chondrocytes. *Mol Cell Endocrinol* 2010; 327: 65-71
- 14 Jia HL, Ye QH, Qin LX, Budhu A, Forgues M, Chen Y, Liu YK, Sun HC, Wang L, Lu HZ, Shen F, Tang ZY, Wang XW. Gene expression profiling reveals potential biomarkers of human hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 1133-1139
- 15 Qiu LW, Yao DF, Zong L, Lu YY, Huang H, Wu W, Wu XH. Abnormal expression of insulin-like growth factor-II and its dynamic quantitative analysis at different stages of hepatocellular carcinoma development. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2008; 7: 406-411
- 16 李敏, 姚登福, 董志珍, 钱静, 李姗姗, 卞银珠, 赛文莉. IGF-II 异常活化及Bcl-2过表达与肝细胞恶性转化关系的研究. *胃肠病学和肝病杂志* 2009; 18: 1091-1094
- 17 宗蕾, 姚登福, 邱历伟, 吴信华, 吴玮. 肝细胞癌变过程中IGF-II 动态表达及IGFBP-3蛋白水平变化相关分析. *江苏医药* 2009; 34: 87-89
- 18 Barra WF, Castro G, Hoff AO, Siqueira SA, Hoff PM. Symptomatic hypoglycemia related to inappropriately high igf-II serum levels in a patient with desmoplastic small round cell tumor. *Case Report Med* 2010; 2010: 684045
- 19 Liu JG, Zhao HJ, Liu YJ, Wang XL. Effect of selenium-enriched malt on VEGF and several relevant angiogenic cytokines in diethylnitrosamine-induced hepatocarcinoma rats. *J Trace Elem Med Biol* 2010; 24: 52-57
- 20 董志珍, 姚登福, 沈预程, 张崇国, 顾文静. 肝细胞肝癌组织TGF-B1和IGF-II 异常表达与HBV复制. *江苏医药* 2008; 34: 649-651
- 21 Weng CJ, Hsieh YH, Tsai CM, Chu YH, Ueng KC, Liu YF, Yeh YH, Su SC, Chen YC, Chen MK, Yang SF. Relationship of insulin-like growth factors system gene polymorphisms with the susceptibility and pathological development of hepatocellular carcinoma. *Ann Surg Oncol* 2010; 17: 1808-1815
- 22 Ubagai T, Kikuchi T, Fukusato T, Ono Y. Aflatoxin B1 modulates the insulin-like growth factor-2 dependent signaling axis. *Toxicol In Vitro* 2010; 24: 783-789
- 23 Couvert P, Carrié A, Pariès J, Vaysse J, Miroglio A, Kerjean A, Nahon P, Chelly J, Trinchet JC, Beaugrand M, Ganne-Carrié N. Liver insulin-like growth factor 2 methylation in hepatitis C virus cirrhosis and further occurrence of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 5419-5427
- 24 姚敏, 姚登福. 肝细胞恶性转化与肝癌诊断的特异标志物. *中华肝脏病杂志* 2011; 19: 244-246
- 25 Chen YW, Boyartchuk V, Lewis BC. Differential roles of insulin-like growth factor receptor- and insulin receptor-mediated signaling in the phenotypes of hepatocellular carcinoma cells. *Neoplasia* 2009; 11: 835-845
- 26 Cheng W, Tseng CJ, Lin TT, Cheng I, Pan HW, Hsu HC, Lee YM. Glypican-3-mediated oncogenesis involves the Insulin-like growth factor-signaling pathway. *Carcinogenesis* 2008; 29: 1319-1326
- 27 沈预程, 姚登福, 邱历伟, 赛文莉, 吴玮, 吴信华. IGF-II 基因启动子低甲基化状态与肝细胞癌变关系的研究. *交通医学* 2009; 23: 1-4
- 28 钱静, 沈预程, 邱历伟, 姚宁华, 姚登福. 肝癌组织IGF-II 启动子甲基化状态及病理学特征分析. *交通医学* 2010; 24: 112-115
- 29 王以浪, 姚登福. RNAi抑制肝癌分子通路及靶向治疗. *中华肝脏病杂志* 2009; 17: 157-160
- 30 van Rooij E. The art of microRNA research. *Circ Res* 2011; 108: 219-234
- 31 Huang S, He X. The role of microRNAs in liver cancer progression. *Br J Cancer* 2011; 104: 235-240
- 32 姚宁华, 姚登福, 钱静, 董志珍, 邱历伟, 蔚丹丹. miRNA干扰质粒构建及对肝癌HepG2细胞IGF-II 表达的抑制作用. *世界华人消化杂志* 2011; 19: 1015-1021
- 33 Shah AA, Meese E, Blin N. Profiling of regulatory microRNA transcriptomes in various biological processes: a review. *J Appl Genet* 2010; 51: 501-507
- 34 Kota J, Chivukula RR, O'Donnell KA, Wentzel EA, Montgomery CL, Hwang HW, Chang TC, Vivekanandan P, Torbenson M, Clark KR, Mendell JR, Mendell JT. Therapeutic microRNA delivery suppresses tumorigenesis in a murine liver cancer model. *Cell* 2009; 137: 1005-1017
- 35 陆园园, 姚登福, 吴信华, 黄华, 邱历伟, 吴玮. 肝癌及癌旁组织IGF- I R表达及其临床病理学特征分析. *南通大学学报(医学版)* 2008; 28: 169-170
- 36 Charette N, De Saeger C, Lannoy V, Horsmans Y, Leclercq I, Stärkel P. Salirasib inhibits the growth of hepatocarcinoma cell lines in vitro and tumor growth in vivo through ras and mTOR inhibition. *Mol Cancer* 2010; 9: 256
- 37 Tovar V, Alsinet C, Villanueva A, Hoshida Y, Chiang DY, Solé M, Thung S, Moyano S, Toffanin S, Mínguez B, Cabellos L, Peix J, Schwartz M, Mazzaferro V, Bruix J, Llovet JM. IGF activation in a

应用要点

RNAi可沉默靶基因, 比基因敲除术简单, 与单抗和小分子酪氨酸激酶抑制剂相比不影响I R. 尽管RNAi有巨大治疗潜能, 靶点选择、siRNA导入、沉默基因序列设计、siRNA半衰期延长等, 尚需更多的研究。

■同行评价

本文详细论述了IGF-II与IGF-IR相关信号通路与HCC发生发展的作用及机制,就国内外以靶向IGF-II或IGF-IR基因治疗在动物体内外抑制HCC现状进行了描述。题目新颖,文章层次清楚,引文全面,基本反映了本领域最新研究动态。

- 38 Prakash J, Beljaars L, Harapanahalli AK, Zeinstra-Smith M, de Jager-Krikkken A, Hessing M, Steen H, Poelstra K. Tumor-targeted intracellular delivery of anticancer drugs through the mannose-6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor. *Int J Cancer* 2010; 126: 1966-1981
- 39 Huynh H, Ngo VC, Koong HN, Poon D, Choo SP, Toh HC, Thng CH, Chow P, Ong HS, Chung A, Goh BC, Smith PD, Soo KC. AZD6244 enhances the anti-tumor activity of sorafenib in ectopic and orthotopic models of human hepatocellular carcinoma (HCC). *J Hepatol* 2010; 52: 79-87
- 40 Eichenmüller M, von Schweinitz D, Kappler R. Betulinic acid treatment promotes apoptosis in hepatoblastoma cells. *Int J Oncol* 2009; 35: 873-879
- 41 McLarty J, Bigelow RL, Smith M, Elmajian D, Ankem M, Cardelli JA. Tea polyphenols decrease serum levels of prostate-specific antigen, hepatocyte growth factor, and vascular endothelial growth factor in prostate cancer patients and inhibit production of hepatocyte growth factor and vascular endothelial growth factor in vitro. *Cancer Prev Res (Phila)* 2009; 2: 673-682
- 42 Metalli D, Lovat F, Tripodi F, Genua M, Xu SQ, Spinelli M, Alberghina L, Vanoni M, Baffa R, Gomella LG, Iozzo RV, Morrione A. The insulin-like growth factor receptor I promotes motility and invasion of bladder cancer cells through Akt- and mitogen-activated protein kinase-dependent activation of paxillin. *Am J Pathol* 2010; 176: 2997-3006
- 43 Cuevas EP, Escribano O, Monserrat J, Martínez-Botas J, Sánchez MG, Chiloeches A, Hernández-Breijo B, Sánchez-Alonso V, Román ID, Fernández-Moreno MD, Guijarro LG. RNAi-mediated silencing of insulin receptor substrate-4 enhances actinomycin D- and tumor necrosis factor-alpha-induced cell death in hepatocarcinoma cancer cell lines. *J Cell Biochem* 2009; 108: 1292-1301
- 44 Dong J, Demarest SJ, Sereno A, Tamraz S, Langley E, Doern A, Snipas T, Perron K, Joseph I, Glaser SM, Ho SN, Reff ME, Hariharan K. Combination of two insulin-like growth factor-I receptor inhibitory antibodies targeting distinct epitopes leads to an enhanced anti-tumor response. *Mol Cancer Ther* 2010; 9: 2593-2604
- 45 Dransfield DT, Cohen EH, Chang Q, Sparrow LG, Bentley JD, Dolezal O, Xiao X, Peat TS, Newman J, Pilling PA, Phan T, Priebe I, Brierley GV, Kastrapeli N, Kopacz K, Martik D, Wassaf D, Rank D, Conley G, Huang Y, Adams TE, Cosgrove L. A human monoclonal antibody against insulin-like growth factor-II blocks the growth of human hepatocellular carcinoma cell lines in vitro and in vivo. *Mol Cancer Ther* 2010; 9: 1809-1819
- 46 沈俊俊, 姚登福. 单克隆抗体介导的肝癌靶向治疗. 国际内科学杂志 2009; 36: 49-53
- 47 Vu TH, Nguyen AH, Hoffman AR. Loss of IGF2 imprinting is associated with abrogation of long-range intrachromosomal interactions in human cancer cells. *Hum Mol Genet* 2010; 19: 901-919
- 48 Longato L, de la Monte S, Kuzushita N, Horimoto M, Rogers AB, Slagle BL, Wands JR. Overexpression of insulin receptor substrate-1 and hepatitis Bx genes causes premalignant alterations in the liver. *Hepatology* 2009; 49: 1935-1943
- 49 Lawson EA, Zhang X, Crocker JT, Wang WL, Klibanski A. Hypoglycemia from IGF2 overexpression associated with activation of fetal promoters and loss of imprinting in a metastatic hemangiopericytoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94: 2226-2231
- 50 Honda S, Arai Y, Haruta M, Sasaki F, Ohira M, Yamaoka H, Horie H, Nakagawara A, Hiyama E, Todo S, Kaneko Y. Loss of imprinting of IGF2 correlates with hypermethylation of the H19 differentially methylated region in hepatoblastoma. *Br J Cancer* 2008; 99: 1891-1899

编辑 李军亮 电编 闫晋利

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011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)

NO在大鼠胰十二指肠移植中的作用

苏艳军, 刘其雨, 刁畅, 张建明, 李立, 段体德, 程若川

苏艳军, 刁畅, 张建明, 段体德, 程若川, 昆明医学院第一附属医院胃肠与甲状腺外科 云南省昆明市 650032
刘其雨, 李立, 昆明市第一人民医院暨昆明医学院附属甘美医院器官移植中心 云南省昆明市 650011
苏艳军, 在读博士研究生, 主要从事肝脏与胰腺相关疾病的研究。
作者贡献分布: 段体德与程若川对此文所作贡献均等; 此课题由段体德与程若川设计; 研究过程由苏艳军、刘其雨、刁畅及张建明操作完成; 数据分析由苏艳军与刘其雨完成; 本论文写作由程若川完成。

通讯作者: 程若川, 教授, 主任医师, 650032, 云南省昆明市西昌路295号, 昆明医学院第一附属医院胃肠与甲状腺外科。
cruochuan@yahoo.com.cn

收稿日期: 2011-08-18 修回日期: 2011-10-08

接受日期: 2011-10-13 在线出版日期: 2011-10-18

Role of nitric oxide in pancreas-duodenal transplantation in rats

Yan-Jun Su, Qi-Yu Liu, Chang Diao, Jian-Ming Zhang, Li Li, Ti-De Duan, Ruo-Chuan Cheng

Yan-Jun Su, Chang Diao, Jian-Ming Zhang, Ti-De Duan, Ruo-Chuan Cheng, Department of Gastrointestinal and Thyroid Surgery, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650032, Yunnan Province, China

Qi-Yu Liu, Li Li, Department of Organ Transplantation, the First People's Hospital of Kunming and the Affiliated Ganmei Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650011, Yunnan Province, China

Correspondence to: Ruo-Chuan Cheng, Professor, Department of Gastrointestinal and Thyroid Surgery, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650032, Yunnan Province, China. cruochuan@yahoo.com.cn

Received: 2011-08-18 Revised: 2011-10-08

Accepted: 2011-10-13 Published online: 2011-10-18

Abstract

AIM: To investigate the role of nitric oxide in ischemia-reperfusion injury and cell apoptosis following pancreas-duodenal transplantation in rats.

METHODS: A total of 168 SD rats were used in the study. Seventy-two female rats with diabetes induced by intraperitoneal injection of alloxan were used as donors, and 96 male rats were used as recipients. A rat model of pancreas-duodenal transplantation was developed using dual cannula technique. The 96 male rats were randomly divided into sham group, control group, *L*-Arg group, and *L*-NAME group, with 24 rats in each group. Rats of each group were randomly

killed at 1 h, 3 h and 6 h. Serum nitric oxide and amylase levels were examined, and pancreatic injury was evaluated. The expression of iNOS in pancreatic tissue was detected by immunohistochemistry, and pancreatic cell apoptosis was evaluated by flow cytometry.

RESULTS: Serum nitric oxide and amylase, pancreas injury scores were significantly higher in the control group (1 h, 3 h, 6 h) than in the sham group (all $P < 0.01$). Serum nitric oxide was significantly higher and serum amylase and pancreas injury scores were significantly lower in the *L*-Arg group than in the control group (1 h, 3 h, 6 h) (all $P < 0.01$). Serum nitric oxide was significantly lower and serum amylase and pancreas injury scores were significantly higher in the *L*-NAME group than in the control group (all $P < 0.01$). The percentage of viable cells was significantly lower and apoptosis rate was significantly higher in the control group than in the sham group (all $P < 0.01$). The percentage of viable cells was significantly lower and apoptosis rate was significantly higher in the *L*-Arg and *L*-NAME groups than in the control group (all $P < 0.01$). The number of necrotic cells in the *L*-Arg group was lower than that in the control group but higher than that in the *L*-NAME group (all $P < 0.01$).

CONCLUSION: Nitric oxide plays a dual role in ischemia-reperfusion injury and cell apoptosis following pancreas-duodenal transplantation in rats.

Key Words: Pancreas-duodenal transplantation; Nitric oxide; Ischemia-reperfusion injury; Apoptosis

Su YJ, Liu QY, Diao C, Zhang JM, Li L, Duan TD, Cheng RC. Role of nitric oxide in pancreas-duodenal transplantation in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(29): 3015-3022

摘要

目的: 探讨一氧化氮(NO)在大鼠胰十二指肠移植中缺血再灌注损伤和细胞凋亡中的作用。

方法: 168只大鼠, 72只雄性作为供体, 96只雌性通过腹腔注射四氧嘧啶诱导糖尿病作为受

■背景资料

缺血再灌注损伤(I/R)是胰腺移植中不可避免的问题,也是引起移植胰腺炎和移植失败的主要原因。目前研究发现胰腺移植的各个环节都有细胞凋亡的参与,研究认为细胞凋亡是胰腺移植I/R的早期事件。NO在胰腺移植I/R中所起的作用认识尚未统一,有的学者认为NO在胰腺I/R中具有加重损害的作用,有的认为有保护作用。

■同行评议者

朱亮, 副教授, 大连医科大学生理教研室

■ 研发前沿

一氧化氮(NO)广泛分布于生物体内各组织中, NO是以L-精氨酸(L-arginine, L-Arg)为底物, 由多种形式的NOS催化生成, 是一种新型生物信使分子, 在体内可转化成具有强烈的细胞毒性作用的自由基, 他在胰腺移植中的作用非常复杂, 一方面NO可以改善胰腺炎的微循环, 减轻组织水肿和炎症细胞浸润, 同时NO通过调节BaX、bcl-2等凋亡相关基因, 调控胰腺细胞的凋亡, 另一方面, 大量的NO又加重胰腺的缺血再灌注损伤和细胞凋亡。可见, NO在胰腺移植缺血/再灌注损伤中的作用复杂, 认识尚未统一。因此如何有效利用NO的生物学作用已成为NO研究的热点。

体, 采用双套管法建立糖尿病大鼠胰十二指肠移植动物模型, 随机分为假手术组($n = 24$)、对照组(对照组 $n = 24$)、L-Arg组($n = 24$)和L-NAME组($n = 24$), 再分为1 h、3 h、6 h亚组($n = 8$), 检测血清NO和淀粉酶、胰腺组织病理损害评分和胰腺组织中iNOS表达检测、胰腺细胞凋亡。

结果:再灌注后1 h、3 h、6 h各时间点血清淀粉酶和NO、胰腺病理损害评分逐渐升高各时间点均显著高于假手术组($P < 0.01$); L-Arg组1 h、3 h、6 h各时间点血清NO均高于对照组($P < 0.01$), L-Arg组1 h、3 h血清淀粉酶和胰腺病理损害评分都低于对照组($P < 0.01$), 而6 h则血清淀粉酶高于对照组($P < 0.01$); L-NAME组1 h、3 h、6 h各时间点血清NO均低于对照组($P < 0.01$), 而血清淀粉酶和胰腺病理损害评分均显著高于对照组($P < 0.01$)。再灌注后1 h、3 h、6 h各时间点胰腺活细胞均低于假手术组($P < 0.01$), 早期凋亡细胞高于假手术组($P < 0.01$), L-Arg组1 h、3 h、6 h各时间点活细胞高于对照组($P < 0.01$), 而L-NAME组则低于对照组($P < 0.01$); 早期凋亡细胞L-Arg组6 h、L-NAME组1 h、3 h高于对照组($P < 0.01$)。L-Arg组1 h、3 h、6 h各时间点坏死细胞显著低于对照组($P < 0.01$), 而L-NAME组各时间点均高于对照组($P < 0.01$)。

结论:NO参与了大鼠胰十二指肠移植中的缺血再灌注损伤和胰腺细胞凋亡, 扮演着保护与损伤的双重角色。

关键词:胰十二指肠移植; 一氧化氮; 缺血再灌注损伤; 凋亡

苏艳军, 刘其雨, 刁畅, 张建明, 李立, 段体德, 程若川. NO在大鼠胰十二指肠移植中的作用. 世界华人消化杂志 2011; 19(29): 3015-3022

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/3015.asp>

0 引言

细胞凋亡存在于肾^[1]、心^[2]、肝^[3]、肺^[4]等重要脏器的移植中, 也发生于胰腺移植的各环节中, 并可能是缺血再灌注损伤(ischemia-reperfusion injury, I/R)和移植排斥反应的主要机制^[5]。一氧化氮(Nitric Oxide, NO)是一种反应性极强的自由基, NO是以L-精氨酸(L-arginine, L-Arg)为底物, 由多种形式的NOS催化生成, NOS是NO合成过程中的重要限速因素。NOS共有三种亚型: 神经元型NOS(neuronal NOS, nNOS)、内皮型NOS(endothelial NOS, eNOS)和诱导型

NOS(inducible NOS, iNOS), eNOS和nNOS正常情况下呈Ca²⁺依赖性, 其活性受Ca²⁺浓度和钙调蛋白(calmodulin, CaM)浓度的调节, 而iNOS是Ca²⁺非依赖性。本研究的目的在于探讨内源性NO和iNOS在大鼠胰十二指肠移植缺血再灌注损伤和细胞凋亡中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料 健康封闭群SD(Sprague-Dawley)大鼠168只(280-350 g), 由昆明医学院实验动物中心提供, 其中96只♂大鼠通过腹腔注射四氧嘧啶制作糖尿病大鼠模型, 作为受体, 72只♀行胰十二指肠切除作为供体。

1.2 方法

1.2.1 移植模型的建立:采用双套管法建立糖尿病大鼠胰十二指肠移植动物模型^[6]。不阻断体循环, 采用双套管将供胰所带腹主动脉和门静脉分别与受体大鼠的左肾动脉和左肾静脉进行套管吻合完成血管重建; 同时将供体的十二指肠远端与受体的Treitz韧带下2 cm空肠作端侧吻合完成外分泌引流。

1.2.2 分组:根据处理因素不同, 完全随机分为4组: (1)假手术组($n = 24$): 为糖尿病大鼠, 麻醉下行左肾切除后即关腹; (2)对照组($n = 24$): 常规行胰十二指肠移植, 不作药物干预; (3)L-Arg处理组($n = 24$): 在移植的基础上, 受体在开放肾动脉前5 min静脉注射L-Arg(100 mg/kg); (4)L-硝基精氨酸甲酯(L-NAME)处理组($n = 24$): 在移植的基础上, 受体在开放肾动脉前5 min静脉注射L-NAME(10 mg/kg)。以上各组大鼠随机分为1 h、3 h、6 h三个亚组, 各时间点8只。

1.2.3 血清指标:处死动物时腹主动脉采血7 mL, 分为2 mL、5 mL二管, 分别用于血清NO和淀粉酶测定。血清淀粉酶于全自动生化分析仪上进行; 血清NO采用硝酸还原酶法测定血清NO₂-/NO₃-含量, 间接反映NO的生成量, 按南京建成生物工程研究所血清NO测定试剂盒说明书操作。

1.2.4 胰腺病理损害评分和iNOS表达检测:采血完毕, 立即取胰腺组织, 40 g/L甲醛固定, 石蜡包埋, 连续5 μm切片, HE染色和SABC法iNOS免疫组化染色(兔抗大鼠iNOS多克隆抗体购自美国LabVision公司), 由固定病理医师观察组织病理学改变和iNOS表达情况。参照Schmidt等^[7]的评分标准进行病理学评分。

1.2.5 细胞凋亡检测:取黄豆大小胰腺组织采用研磨法制成单细胞悬液, 按Annexin V/PI凋亡

表 1 血清NO和淀粉的水平 (mean ± SD)

分组	NO(μmol/L)			血清淀粉酶(U/L)		
	1 h	3 h	6 h	1 h	3 h	6 h
假手术组	31.6 ± 5.2 ^b	31.7 ± 4.8 ^b	31.1 ± 5.0 ^b	253.6 ± 37.5 ^b	248.3 ± 28.7 ^b	254.3 ± 27.1 ^b
对照组	40.8 ± 4.1 ^d	49.7 ± 5.3	60.2 ± 6.7 ^d	948.9 ± 82.7 ^d	1769.5 ± 178.0	2431.4 ± 239.0 ^d
L-Arg组	52.3 ± 5.1 ^{bd}	61.9 ± 4.9 ^b	81.1 ± 7.2 ^{bd}	517.4 ± 72.9 ^{bd}	1241.8 ± 150.6 ^b	3158.3 ± 234.9 ^{bd}
L-NAME组	21.52 ± 1.8 ^{bd}	32.4 ± 2.3 ^b	46.0 ± 8.2 ^{bd}	1341.9 ± 189.5 ^{bd}	2494.6 ± 220.1 ^b	3464.4 ± 188.4 ^{bd}

^bP<0.01 vs 对照组; ^dP<0.01 vs 同组3 h.

■ 相关报道

李柏峰等利用诱导型NO合酶选择性抑制剂氨基胍在大鼠胰腺移植进行试验干预,发现对移植的胰腺起到保护作用.可能是氨基胍抑制NO的过量产生,减轻其作为自由基的细胞毒性有关.

表 2 胰腺组织病理损害评分 (mean ± SD)

分组	1 h	3 h	6 h
假手术组	0	0	0
对照组	3.00 ± 0.38 ^a	3.69 ± 0.46	5.00 ± 0.65 ^a
L-Arg组	2.44 ± 0.42 ^{ba}	3.00 ± 0.46 ^b	5.12 ± 1.12 ^a
L-NAME组	4.19 ± 0.65 ^{ba}	5.69 ± 0.37 ^b	6.7 ± 0.059 ^{ba}

^aP<0.05 vs 同组3 h; ^bP<0.01 vs 对照组.

试剂盒说明书(ACT Gene 公司产品)操作,通过FACSCalibur流式细胞仪(美国Becton Dickinson公司),收集10 000个细胞,FL1通道检测Annexin V-FITC荧光信号,FL2通道检测PI荧光信号.结果判定:Annexin V(+)/PI(+)细胞落在右上象限,为晚期凋亡和坏死细胞;Annexin V(-)/PI(-)细胞落在左下象限,为活细胞;Annexin V(+)/PI(-)细胞落在右下象限,为早期凋亡细胞.

统计学处理 采用SPSS统计软件分析.计量资料以mean ± SD表示两组均数的比较,经方差齐性检验,采用成组t检验;多组均数比较,采用单因素方差分析,P<0.05认为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 血清NO和淀粉酶的变化

血清NO和淀粉酶的变化见表1.

2.2 病理学结果 假手术组各时间点胰腺组织结构均正常,无水肿及炎症细胞浸润、出血等.对照组1 h胰腺组织结构改变轻微,腺泡轮廓基本清晰,局部有胰腺小叶间隙增宽,间质少量炎性细胞浸润,随再灌注时间延长,小叶腺泡细胞间水肿加重,炎症细胞渗出增多,并可见少量腺泡细胞破坏及出血灶. L-Arg处理后,与对照组比较可看到1 h、3 h的间质炎症细胞浸润明显减少,腺泡细胞的破坏也显著减少,但6 h则炎症细胞浸润及小叶结构破坏等病理损害均明显加重; L-NAME处理后,与对照组比较可见各时间点胰

腺的水肿、炎症细胞浸润及小叶结构破坏、出血等病理损害均显著加重.胰腺病理损害评分见表2.

2.3 胰腺组织中iNOS的表达 胞浆内棕黄色颗粒为阳性,无着色为阴性.胰腺组织iNOS免疫组织化学染色发现,假手术组各时间点的胰腺均无iNOS阳性染色.对照组再灌注1 h有阳性染色,主要见于胰岛细胞,随时间延长逐渐表达于血管平滑肌细胞和胰腺腺泡细胞; L-Arg组1 h除表达于胰岛细胞外,部分胰腺腺泡细胞、血管平滑肌细胞也有表达,3 h、6 h表达逐渐增强; L-NAME处理后,1 h无iNOS阳性染色,3 h始见血管平滑肌细胞表达;6 h则可见部分胰岛细胞也有表达,但可见显著炎症细胞浸润和胰腺小叶结构的破坏(图1).

2.4 细胞凋亡检测结果

细胞凋亡检测结果见表3和图2.

3 讨论

I/RI是胰腺移植中不可回避的问题^[8-10].胰腺移植后早期胰腺炎的发生率为17%-35%^[11],而I/RI则是引起移植胰腺炎的主要原因.胰腺的I/RI可进一步导致局部和全身并发症,严重者引起移植植物功能丧失甚至受体死亡.本研究在大鼠胰十二指肠移植模型中观察到,再灌注1 h就有血清淀粉酶升高和胰腺病理损害的证据,并且再灌注3 h、6 h胰腺损害逐渐加重,表明该模型中

■创新盘点

有关NO在胰腺移植中的作用国内临床和基础研究均有报道,但同时从提供NO合酶底物L-Arg和NO合酶抑制剂L-NAME研究的文献很少,体现了文章的创新性。

表 3 胰腺细胞凋亡率(% , mean \pm SD)

组别	再灌注时间	活细胞	早期凋亡	晚期凋亡细胞
假手术组	1 h	94.6 \pm 1.0 ^{bd}	1.9 \pm 0.3 ^{bd}	3.5 \pm 0.9 ^{bd}
	3 h	94.3 \pm 1.2 ^{bd}	1.8 \pm 0.3 ^{bd}	4.1 \pm 0.9 ^{bd}
	6 h	94.3 \pm 0.9 ^{bd}	2.0 \pm 0.2 ^{bd}	3.7 \pm 0.8 ^{bd}
L-Arg组	1 h	81.0 \pm 1.5 ^{de}	10.8 \pm 1.0 ^a	8.3 \pm 2.3 ^d
	3 h	76.7 \pm 1.2 ^d	14.1 \pm 1.7	9.4 \pm 2.0 ^d
	6 h	61.6 \pm 1.9 ^{de}	15.7 \pm 1.9 ^d	22.7 \pm 2.4 ^{de}
对照组	1 h	75.4 \pm 3.2 ^e	11.0 \pm 1.6 ^e	12.4 \pm 4.8
	3 h	70.2 \pm 1.7	16.6 \pm 2.8	13.2 \pm 3.7
	6 h	72.3 \pm 2.2	10.5 \pm 1.5 ^e	16.3 \pm 3.1
L-NAME组	1 h	58.4 \pm 2.4 ^{de}	22.6 \pm 2.8 ^{de}	17.9 \pm 4.3 ^{de}
	3 h	52.8 \pm 2.7 ^d	20.5 \pm 2.1 ^d	26.8 \pm 2.9 ^d
	6 h	44.3 \pm 4.0 ^{de}	11.3 \pm 1.8 ^e	44.1 \pm 4.5 ^{de}

^b $P < 0.01$ vs L-Arg组、L-NAME组同时间点; ^a $P < 0.01$ vs 对照组同时间点; ^e $P < 0.05$ vs 同组3 h。

胰十二指肠的缺血再灌注同样可导致再灌注性胰腺炎的发生,移植模型的建立是成功的。

NO在胰腺移植I/RI中所起的作用认识尚未统一,有的学者认为NO在胰腺I/RI中具有加重损害的作用^[12-14],有的认为有保护作用^[15-17]。我们在该移植模型中观察到胰腺移植后,血清淀粉酶、胰腺病理损害和血清NO均随再灌注时间延长逐渐增高,并且各时间点间差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。早期我们的研究认为NO通过氧自由基对移植的胰腺具有损害作用^[18]。由于没有对血清NO水平进行干预,不能说是NO原发性升高介导胰腺的损害,还是胰腺损害后继发性NO升高发挥对胰腺的保护作用。因此,本研究在胰腺再灌注前静脉注射小剂量L-Arg升高血清NO水平,发现再灌注1 h、3 h血清淀粉酶水平、胰腺炎症细胞浸润、病理损害评分均显著低于或轻于对照组,而6 h则血清淀粉酶水平、胰腺炎症细胞浸润及病理损害评分均显著增高,高于对照组($P < 0.05$)。提示胰腺移植缺血再灌注早期(1 h、3 h)产生的内源性NO有减轻I/RI的作用,这与原春辉等^[19]的研究是一致的。本实验同时采用NOS抑制剂L-NAME进行干预,各时间点的血清NO水平下降后,血清淀粉酶及胰腺的病理损害显著加重,这也从反面说明NO对I/RI的保护作用。

NO是以L-Arg为底物,由多种形式的NOS催化生成。NOS共有三种亚型:神经元型NOS(neuronal NOS, nNOS)、内皮型NOS(endothelial NOS, eNOS)和诱导型NOS(inducible NOS, iNOS), eNOS和nNOS正常情况下呈Ca²⁺依赖性,

其活性受Ca²⁺浓度和钙调蛋白的调节。李柏峰等^[14]对大鼠胰腺移植中的胰腺组织NOS亚型的活性检测发现, cNOS在各实验组(空白对照组、移植组和处理组)中无显著性差异,而移植组iNOS显著高于对照组,并且发现iNOS表达于胰腺组织的血管内皮细胞、平滑肌细胞和胰岛细胞,可见胰腺移植中的NO主要来源于iNOS。而移植再灌注早期产生的内源性NO可能来自于cNOS合成的,可以改善微循环,减轻组织水肿和炎症细胞浸润,适当补充可发挥NO的保护作用^[19]。实验性胰腺炎动物模型研究中发现胰腺和肺组织中均有iNOS过度表达,由此引起的NO过量产生介导了胰腺和肺组织的氧化损伤^[20,21]。本研究通过免疫组化检测胰腺iNOS的表达,发现胰腺组织的血管内皮细胞、平滑肌细胞和胰岛细胞都有iNOS表达,且随时间延长表达逐渐增强。由iNOS生成的NO适当补充cNOS介导的NO生成的不足可发挥一定的保护作用;但在6 h可看到胰腺腺泡细胞也广泛表达iNOS,此时大量NO生成而表现出胰腺的损害作用。本实验同时也发现,对照组和L-Arg处理组6 h的NO大量生成对胰腺的缺血再灌注有显著的损害作用,而应用L-NAME抑制NO生成后,6 h的血清淀粉酶和病理损害仍较对照组和L-Arg处理组6 h重,可能为1 h、3 h时NO作为保护因素被抑制,其他损伤因素占优势而导致严重的胰腺损伤,而在6 h作为损害因素的NO水平下降并不能显著地改善1 h、3 h所导致的损伤。

目前研究发现胰腺移植的各个环节都有细胞凋亡的参与^[5]。不同器官再灌注后发生细胞凋

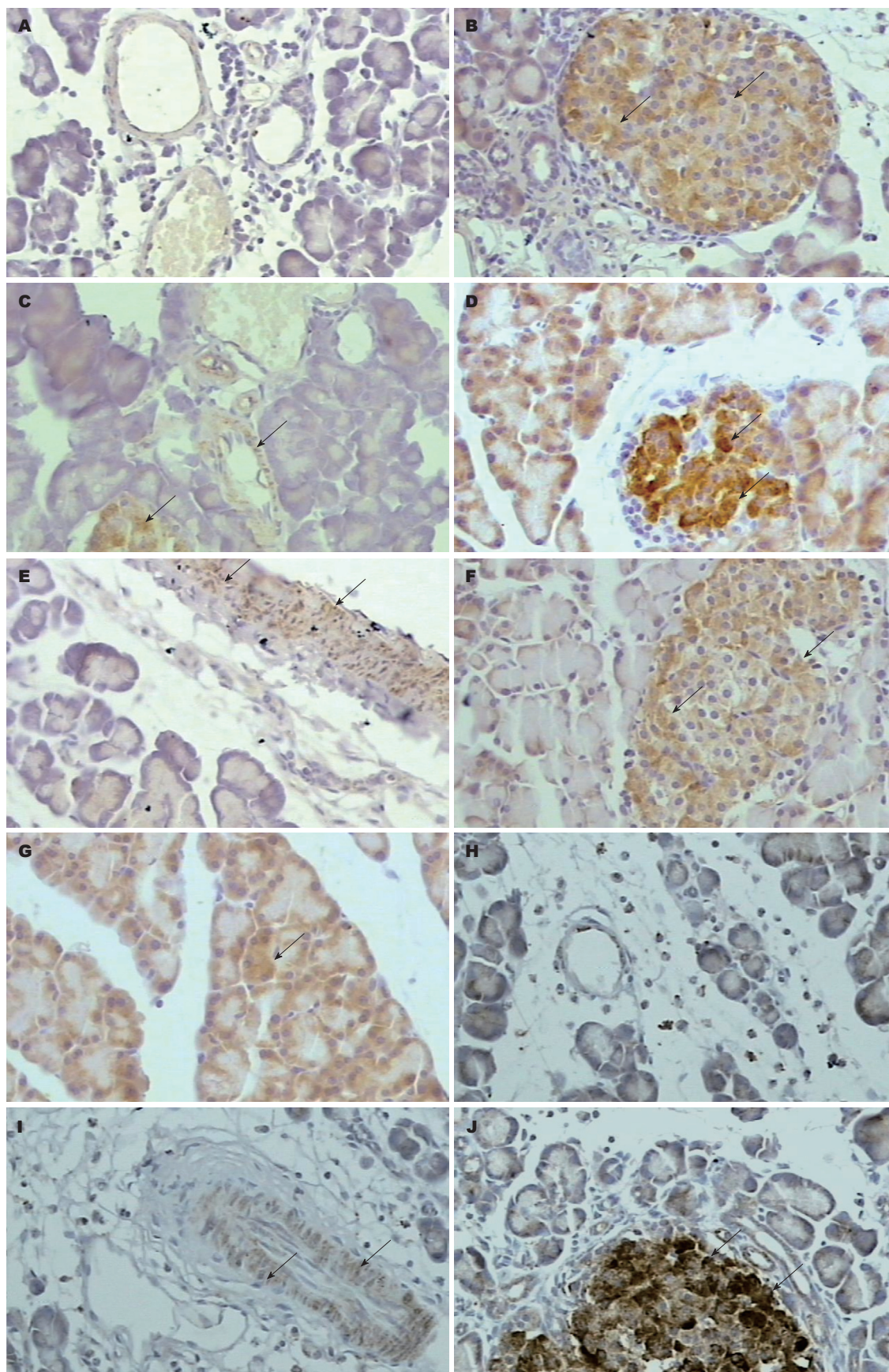


图1 胰腺组织iNOS免疫组织化学染色. A: 假手术组6 h; B: 对照组1 h; C: 对照组3 h; D: 对照组6 h; E: *L*-Arg组1 h; F: *L*-Arg组3 h; G: *L*-Arg组6 h; H: *L*-NAME组1 h; I: *L*-NAME组3 h; J: *L*-NAME组6 h. A: iNOS $\times 100$; B-J: iNOS $\times 200$.

■应用要点

本研究结果表明大鼠胰十二指肠移植中存在I/RI和细胞凋亡, 再灌注早期产生的NO对I/RI和细胞凋亡有双重的调节作用, 但NO的确切的分子机制仍有待于进一步的深入研究, 如何有效地在恰当的时间进行干预以最大的发挥NO的保护作用而避免损害作用, 也将成为进一步的内容。

亡的高峰期不尽相同, 研究认为细胞凋亡是胰腺移植I/RI的早期事件^[22]. 李涛等^[23]研究发现细

同行评价

本研究选题新颖,设计科学,结果可靠,具有较好的学术价值。

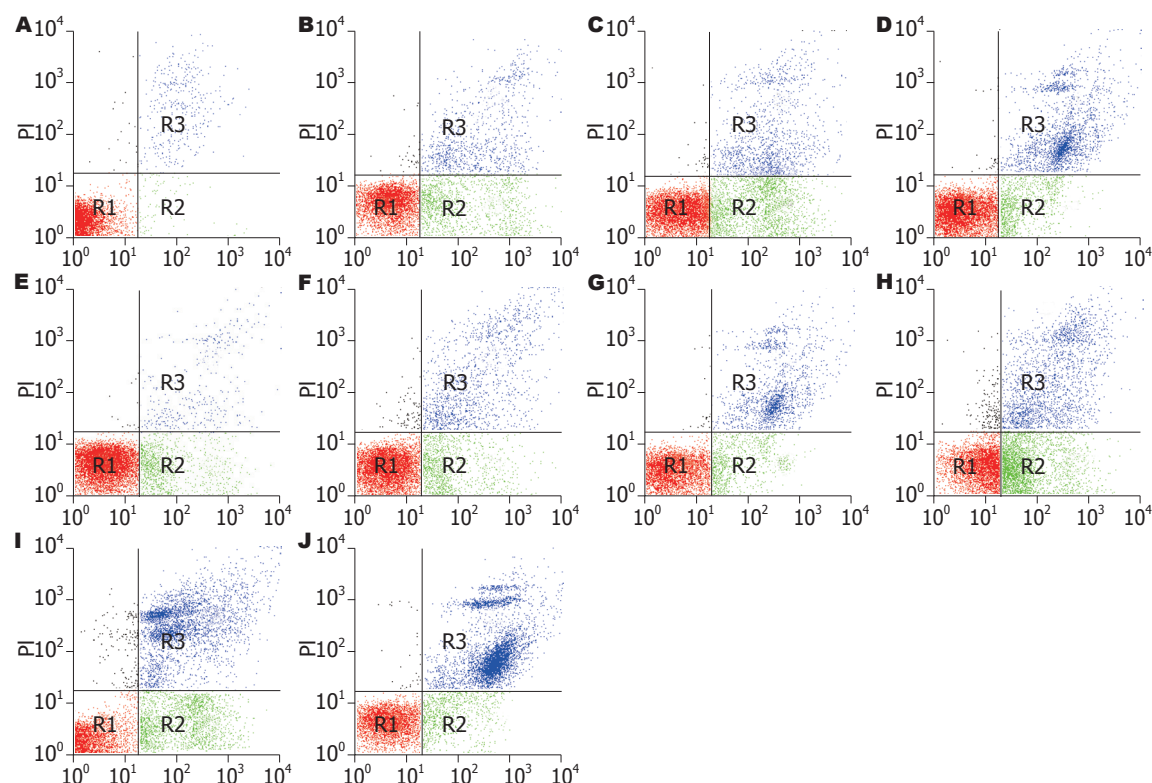


图2 胰腺腺细胞凋亡图。 A: 假手术组6 h; B: 对照组1 h; C: 对照组3 h; D: 对照组6 h; E: *L*-Arg组1 h; F: *L*-Arg组3 h; G: *L*-Arg组6 h; H: *L*-NAME组1 h; I: *L*-NAME组3 h; J: *L*-NAME组6 h。R1区: Annexin V-FITC和PI染色同时阴性-活细胞; R2区: Annexin V-FITC染色阳性和PI染色阴性-早期凋亡细胞; R3区: Annexin V-FITC和PI染色同时阳性-晚期凋亡细胞及继发性坏死细胞。

细胞凋亡与移植胰腺急性排斥反应的严重程度呈正相关,细胞凋亡指数可作为判断移植物损伤程度的指标。既往国内外相关文献中报道的检测细胞凋亡最为常用的方法为TUNEL法标记DNA断裂^[24],该法检测到的是凋亡晚期甚至已发生坏死的细胞。Drognitz等^[25]发现胰腺移植时的细胞凋亡主要发生在再灌注期,胰腺再灌注1-2 h就有细胞凋亡,且均显著高于切取保存同等时间而未移植的胰腺。张召辉等^[21]对大鼠冷缺血2 h的胰腺分别于再灌注1、3、6、9、12 h行细胞凋亡TUNEL检测,发现再灌注1 h就有细胞凋亡,3 h达凋亡高峰,随后逐渐下降,所以认为细胞凋亡是缺血再灌注损伤的早期事件。本实验通过特异性结合细胞膜的磷脂酰丝氨酸结合蛋白(Annexin V, AV)作为探针检测早期凋亡细胞,同时利用碘化丙啶(PI)不能透过完整细胞膜的特点,将两者结合,应用AV/PI双染法检测早期凋亡细胞、晚期凋亡细胞和活细胞,发现胰腺冷缺血保存90 min后,再灌注1 h细胞凋亡就显著增加,随再灌注时间延长,早期凋亡细胞在3 h达高峰,为 $16.6\% \pm 1.5\%$,而晚期凋亡和坏死细胞则随再灌注时间延长逐渐增加,6 h最高达 $16.3\% \pm 3.1\%$ 。

本研究也观察到NO对胰腺细胞凋亡的双向调节作用。Xiaoguang等^[26]和Tanaka等^[27]发现NO介导的细胞凋亡在异基因大鼠胰腺移植急性排斥反应中发挥重要的作用。他们对发现同基因移植胰腺的腺泡细胞轻度表达iNOS,并且移植前后无显著性变化,而异基因移植后的胰腺iNOS表达显著增加,明显高于同基因移植组和经氨基胍处理的异基因移植胰腺。另外发现移植后细胞凋亡指数与iNOS表达具有显著相关性。由此认为,NO介导的细胞凋亡在胰腺移植急性排斥反应中具有重要作用,iNOS抑制剂氨基胍通过减少内源性NO生成而减轻异基因移植的胰腺损伤。而同基因大鼠胰腺移植中是否也有类似的调节作用,目前未见报道。本研究采用SD大鼠进行同基因胰十二指肠移植,发现移植大鼠血清NO随再灌注时间延长逐渐增加,而早期凋亡细胞于3 h达高峰,晚期凋亡细胞于6 h达高峰,似乎是NO介导了细胞凋亡的发生;然而我们在再灌注早期使用小剂量的内源性NO供体*L*-Arg,使受体血清中NO水平增高,可显著减少移植物1 h、3 h晚期凋亡细胞数,显著提高了其活细胞比例,而显著增加了6 h的早期凋亡和晚期凋亡细胞比例,从而使活细胞显著下降。

另一方面, 我们在再灌注早期使用NOS抑制剂(L-NAME)抑制NO生成, 显著增加了1 h、3 h、6 h各时间的早期和晚期凋亡细胞数, 从而显著减少了有功能的活细胞数。胰腺移植再灌注早期NO不是原发性升高发挥促凋亡作用的, 而是再灌注损伤后继发性升高发挥抗损伤和抗凋亡作用的, 而在6 h异常升高的NO则有促凋亡作用。可见, NO对胰腺细胞的凋亡也有双向调节作用。参与胰腺细胞凋亡是因素较多, 目前对胰腺细胞凋亡研究较多的是Fas/FasL系统^[28,29]和Bax/Bcl-2系统^[30], 他们最终激活caspase家族酶链反应, 导致细胞凋亡的发生, 而NO在胰腺细胞凋亡中的作用目前仍然不清楚。

本研究结果表明大鼠胰十二指肠移植中存在I/R和细胞凋亡, 再灌注早期产生的NO对I/R和细胞凋亡有双重的调节作用, 但NO的确切的分子机制仍有待于进一步的深入研究。

4 参考文献

- Porter CJ, Ronan JE, Cassidy MJ. fas-fas-ligand antigen expression and its relationship to increased apoptosis in acute renal transplant rejection. *Transplantation* 2000; 69: 1091-1094
- Takahashi W, Suzuki JI, Izawa A, Takayama K, Yamazaki S, Isobe M. Inducible nitric oxide-mediated myocardial apoptosis contributes to graft failure during acute cardiac allograft rejection in mice. *Jpn Heart J* 2000; 41: 493-506
- Song E, Su F, Chen J, Ou Q, Wang M, Exton MS. Blocking CTL-based cytotoxic pathways reduces apoptosis of transplanted hepatocytes. *J Surg Res* 2001; 99: 61-69
- Ng SC, Wan S, Yim A P. Pulmonary Ischemia-Reperfusion Injury: role of apoptosis. *Eur Respir J* 2005; 25: 356-363
- 程若川, 段体德. 胰腺移植中细胞凋亡的研究进展. *国际外科学杂志* 2006; 33: 410-414
- 刘其雨, 程若川, 苏艳军, 张建国, 刁畅. 双套管法制作大鼠胰十二指肠移植模型. *中国普外基础与临床杂志* 2007; 14: 420-422
- Schmidt J, Rattner DW, Lewandowski K, Compton CC, Mandavilli U, Knoefel WT, Warshaw AL. A better model of acute pancreatitis for evaluating therapy. *Ann Surg* 1992; 215: 44-56
- Oehmann C, Benz S, Drognitz O, Pisarski P, Hopt UT, Obermaier R. Remote preconditioning reduces microcirculatory disorders in pancreatic ischemia/reperfusion injury. *Pancreas* 2007; 35: e45-e50
- Woeste G, Wullstein C, Meyer S, Usadel KH, Hopt UT, Bechstein WO, von Dobschuetz E. Octreotide attenuates impaired microcirculation in postischemic pancreatitis when administered before induction of ischemia. *Transplantation* 2008; 86: 961-967
- Obermaier R, Drognitz O, Benz S, Hopt UT, Pisarski P. Pancreatic ischemia/reperfusion injury: impact of different preservation temperatures. *Pancreas* 2008; 37: 328-332
- Drognitz O, Michel P, Koczan D, Neeff H, Mikami Y, Obermaier R, Thiesen HJ, Hopt UT, Loebler M. Characterization of ischemia/reperfusion-induced gene expression in experimental pancreas transplantation. *Transplantation* 2006; 81: 1428-1434
- Ayub K, Serracino-Inglott F, Williamson RC, Mathie RT. Expression of inducible nitric oxide synthase contributes to the development of pancreatitis following pancreatic ischaemia and reperfusion. *Br J Surg* 2001; 88: 1189-1193
- 李柏峰, 刘永锋, 程颖, 成东华, 王晓东, 李铁民. 一氧化氮在大鼠胰腺缺血/再灌注中的变化及作用. *中国医科大学学报* 2005; 34: 507-508
- 李柏峰, 张克忠, 刘永锋, 程颖, 成东华, 李铁民. 氨基胍对大鼠胰腺移植保护作用的实验研究. *中国普通外科杂志* 2008; 17: 237-241
- Benz S, Schnabel R, Weber H, Pfeffer F, Wiesner R, von Breitenbuch P, Nizze H, Schareck W, Hopt UT. The nitric oxide donor sodium nitroprusside is protective in ischemia/reperfusion injury of the pancreas. *Transplantation* 1998; 66: 994-999
- Benz S, Obermaier R, Wiessner R, Breitenbuch PV, Burska D, Weber H, Schnabel R, Mayer J, Pfeffer F, Nizze H, Hopt UT. Effect of nitric oxide in ischemia/reperfusion of the pancreas. *J Surg Res* 2002; 106: 46-53
- Obermaier R, von Dobschuetz E, Muhs O, Keck T, Drognitz O, Jonas L, Schareck W, Hopt UT, Benz S. Influence of nitric oxide on microcirculation in pancreatic ischemia/reperfusion injury: an intravital microscopic study. *Transpl Int* 2004; 17: 208-214
- 程若川, 刁畅, 魏晓岗, 钱军, 罗华友, 冯曜宇. 奥曲肽对大鼠胰腺移植缺血再灌注损伤的保护机制. *中华实验外科杂志* 2004; 21: 909-911
- Yuan CH, Liu YF, Cheng Y, Zhao N, Li GC, Liang J, He SG. Protective effects of L-arginine on reperfusion injury after pancreaticoduodenal transplantation in rats. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2004; 3: 349-354
- Leindler L, Morschl E, László F, Mándi Y, Takács T, Jármay K, Farkas G. Importance of cytokines, nitric oxide, and apoptosis in the pathological process of necrotizing pancreatitis in rats. *Pancreas* 2004; 29: 157-161
- Viola G, al-Mufti RA, Sohail M, Williamson RC, Mathie RT. Nitric oxide induction in a rat model of selective pancreatic ischemia and reperfusion. *Hepato-gastroenterology* 2000; 47: 1250-1255
- 张召辉, 李玺, 路远阳. 大鼠移植胰腺缺血再灌注后细胞凋亡的变化. *消化外科* 2004; 3: 278-281
- 李涛, 罗军, 温浩. 细胞凋亡在大鼠胰腺移植急性排斥反应中的作用. *中国普外基础与临床杂志* 2007; 14: 59-62
- Obermaier R, von Dobschuetz E, Drognitz O, Hopt UT, Benz S. Ischemic preconditioning attenuates capillary no-reflow and leukocyte adherence in postischemic pancreatitis. *Langenbecks Arch Surg* 2004; 389: 511-516
- Drognitz O, Von Dobschuetz E, Kissler H, Liu X, Obermaier R, Neeff H, Hopt UT, Benz S. Organ procurement in experimental pancreas transplantation with minimal microcirculatory impairment. *Eur Surg Res* 2004; 36: 185-191
- Xiaoguang N, Zhong L, Hailong C, Ping Z, Xiaofeng B, Fenglin G. The relation between apoptosis of acinar cells and nitric oxide during acute rejection of pancreas transplantation in rats. *Transpl Immunol* 2003; 11: 15-21
- Tanaka S, Kamiike W, Ito T, Uchikoshi F, Matsuda

- H, Nozawa M, Kumura E, Shiga T, Kosaka H. Generation of nitric oxide as a rejection marker in rat pancreas transplantation. *Transplantation* 1995; 60: 713-717
- 28 Kornmann M, Ishiwata T, Maruyama H, Beger HG, Korc M. Coexpression of FAS and FAS-ligand in chronic pancreatitis: correlation with apoptosis. *Pancreas* 2000; 20: 123-128
- 29 Hsu PN, Lin HH, Tu CF, Chen NJ, Wu KM, Tsai HF, Hsieh SL. Expression of human Fas ligand on mouse beta islet cells does not induce insulinitis but is insufficient to confer immune privilege for islet grafts. *J Biomed Sci* 2001; 8: 262-269
- 30 Fiorina P, Torriani G, Gremizzi C, Davalli AM, Orsenigo E, Bruno Ventre M, Dell'Antonio G, Carlo VD, Rossini S, Secchi A. Selective intra-graft apoptosis and down-regulation of lymphocyte bcl-2, iNOs and CD95L expression in kidney-pancreas transplanted patients after anti-Thymoglobulin induction. *Transpl Int* 2004; 17: 603-608

编辑 李军亮 电编 闫晋利

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011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 0.625

本刊讯 一年一度的中国科技论文统计结果11月26日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, 2009年《世界华人消化杂志》总被引频次3 009次, 影响因子0.625, 综合评价总分49.4分, 分别位居内科学类48种期刊的第6位、第9位、第6位, 分别位居1 946种中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)的第87位、第378位、第351位; 其他指标: 即年指标0.112, 他引率0.79, 引用刊数473种, 扩散因子15.72, 权威因子1 170.03, 被引半衰期4.0, 来源文献量752, 文献选出率0.93, 地区分布数30, 机构分布数30, 基金论文比0.39, 海外论文比0.01。

经过多项学术指标综合评定及同行专家评议推荐, 《世界华人消化杂志》再度被收录为“中国科技论文统计源期刊”(中国科技核心期刊)。(编辑部主任: 李军亮 2010-11-28)

EGCG对LoVo和SW480结肠癌细胞株的作用及对Notch1与Notch2基因表达的影响

张春霞, 王水明, 何勇山, 周阿成, 金黑鹰

张春霞, 何勇山, 周阿成, 南京中医药大学研究生院 江苏省南京市 210029

王水明, 金黑鹰, 全国肛肠医疗中心 南京中医药大学第三附属医院 江苏省南京市 210001

张春霞, 硕士研究生, 主要从事中医外科肛肠的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30572447; No. 30973837

江苏省自然科学基金资助项目, No. BK2007009

作者贡献分布: 此课题由张春霞、王水明及金黑鹰设计; 研究过程由张春霞、王水明、何勇山及金黑鹰操作完成; 数据分析由张春霞、周阿成及金黑鹰完成; 本论文写作由张春霞与金黑鹰完成。

通讯作者: 金黑鹰, 副教授, 硕士生导师, 210001, 江苏省南京市, 全国肛肠医疗中心, 南京中医药大学第三附属医院。

jinheiyang@yahoo.com.cn

收稿日期: 2011-06-19 修回日期: 2011-10-08

接受日期: 2011-10-10 在线出版日期: 2011-10-18

Effect of epigallocatechin-3-gallate on Notch1 and Notch2 expression in human colorectal cancer cell lines SW480 and LoVo

Chun-Xia Zhang, Shui-Ming Wang, Yong-Shan He, A-Cheng Zhou, Hei-Ying Jin

Chun-Xia Zhang, Yong-Shan He, A-Cheng Zhou, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

Shui-Ming Wang, Hei-Ying Jin, National Center for Colorectal Surgery, the Third Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210001, Jiangsu Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30572447 and 30973837; and the Natural Science Foundation of Jiangsu Province, No. BK2007009

Correspondence to: Hei-Ying Jin, Associate Professor, National Center for Colorectal Surgery, the Third Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210001, Jiangsu Province, China. jinheiyang@yahoo.com.cn

Received: 2011-06-19 Revised: 2011-10-08

Accepted: 2011-10-10 Published online: 2011-10-18

Abstract

AIM: To investigate the inhibitory effect of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) on the proliferation of human colorectal cancer cell lines LoVo and SW480 and to explore the possible mechanisms involved.

METHODS: Cultured LoVo and SW480 cells

were used to examine the impact of different concentrations of EGCG (10, 20 and 35 mg/L) on cell proliferation by MTT assay and on cell apoptosis and cell cycle progression by flow cytometry. The expressing of Notch1 and Notch2 in cultured LoVo and SW480 cells was detected by real-time PCR.

RESULTS: EGCG inhibited the proliferation of LoVo cells and SW480 cells in a dose-dependent, time-independent manner. EGCG enhanced the apoptosis of LoVo cells and SW480 cells and blocked the cell cycle at G₀/G₁ phase. Moreover, EGCG down-regulated Notch2 gene expression but had no significant impact on Notch1 gene expression in LoVo cells and SW480 cells.

CONCLUSION: EGCG can significantly inhibit the proliferation of SW480 and LoVo cells by altering cell cycle and inducing cell apoptosis via mechanisms associated with down-regulating Notch2 gene expression.

Key Words: Epigallocatechin-3-gallate; SW480 cells; LoVo cells; Notch1; Notch2

Zhang CX, Wang SM, He YS, Zhou AC, Jin HY. Effect of epigallocatechin-3-gallate on Notch1 and Notch2 expression in human colorectal cancer cell lines SW480 and LoVo. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(29): 3023-3027

摘要

目的: 探讨绿茶提取物表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)对结肠癌细胞株LoVo细胞和SW480细胞增殖的抑制作用, 研究其对Notch1与Notch2的基因表达的影响。

方法: 体外培养LoVo细胞和SW480细胞, 采用不同浓度的EGCG(10、20、35 mg/L)对其进行干预, MTT法检测EGCG对LoVo细胞和SW480细胞增殖的抑制作用; 用流式细胞仪检测EGCG对LoVo细胞和SW480细胞细胞凋亡和细胞周期的影响。实时荧光定量PCR检测EGCG干预后的LoVo细胞和SW480细胞的

■背景资料

表没食子儿茶素没食子酸酯(epigallocatechin-3-gallate, EGCG)是绿茶提取物, 是茶多酚中含量最高、活性最强的单体。本课题组的前期研究表明茶多酚对结肠癌有明显抑制作用。

■同行评议者

李刚, 教授, 北京大学医学部生物化学与分子生物学系; 陈光, 教授, 吉林大学第一医院消化器官外科

■研究前沿

前期研究表明茶多酚对结直肠癌有明显抑制作用, EGCG对结肠癌皮下原位荧光动物模型结肠肿瘤的生长有明显的抑制作用, 目前对于EGCG对Notch信号转导途径的靶向基因Notch1与Notch2的报道较少。

Notch1与Notch2基因的表达情况。

结果: MTT法检测EGCG对LoVo细胞和SW480细胞增殖均具有抑制作用, 且呈浓度依赖性, 不具有时间依赖性。流式细胞仪检测EGCG能增强LoVo细胞和SW480细胞的凋亡率, 且剂量与凋亡率呈正相关。EGCG能将SW480细胞和LoVo细胞周期阻滞在G₀/G₁期, 阻碍其向S期转换, 抑制其细胞增殖。实时荧光定量PCR检测EGCG能下调两株细胞Notch2的基因表达, 而SW480细胞的Notch1基因表达有下调的趋势, LoVo细胞的Notch1基因表达有上调的趋势, 但差异均无显著意义。

结论: EGCG对体外培养的LoVo细胞和SW480细胞的增殖有明显抑制作用, 且能诱导细胞凋亡和影响细胞周期, 其作用机制可能与下调Notch2的基因表达及激活Notch信号转导途径有关, 但是EGCG对Notch1基因表达的影响尚需要做进一步探讨。

关键词: 表没食子儿茶素没食子酸酯; LoVo细胞; SW480细胞; Notch2; Notch1

张春霞, 王水明, 何勇山, 周阿成, 金黑鹰. EGCG对LoVo和SW480结肠癌细胞株的作用及对Notch1与Notch2基因表达的影响. 世界华人消化杂志 2011; 19(29): 3023-3027

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/3023.asp>

0 引言

表没食子儿茶素没食子酸酯(epigallocatechin-3-gallate, EGCG)是绿茶提取物, 是茶多酚中含量最高、活性最强的单体^[1]。我们的前期研究表明茶多酚对结直肠癌有明显抑制作用^[2], EGCG对结肠癌皮下原位荧光动物模型结肠肿瘤的生长有明显的抑制作用^[3]。目前对于EGCG对Notch信号转导途径的靶向基因Notch1与Notch2的报道较少, 本研究旨在探讨EGCG对结直肠癌细胞株LoVo细胞和SW480细胞增殖的抑制作用及对Notch1与Notch2基因的影响, 研究其对结直肠癌的抑癌机制。

1 材料和方法

1.1 材料 LoVo细胞、SW480细胞和EGCG购自中科院细胞所。MTT试剂盒购自日本dojindo公司; 胎牛血清购于美国Invitrogen公司; Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒购于碧云天公司; 碘化丙啶(PI)购于碧云天公司, 以PBS配成1 mg/mL浓度, 4 °C保存; Notch1与Notch2基因引物购于上海生工生物工程技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 MTT法检测EGCG对LoVo细胞和SW480细胞增殖的抑制作用: 将LoVo细胞、SW480细胞分别以 5×10^3 的数目分别接种于96板中, 每种细胞种12个孔, 分别将孔中的培养基添加至200 μ L分别含终浓度为0 mg/L(对照组), 10、20、35 mg/L EGCG(实验组)的完全培养基, 放置于37 °C、50 mL/L CO₂细胞培养箱, 孵育24、72 h。细胞孵育到达24、72 h时, 按照100 μ L加入10 μ L MTT溶液的比例, 在孔中加入MTT反应液。在37 °C培养箱中放置1 h后, 利用酶标仪读取450 nm波长处的吸光度(A值)。抑制率 = $[1 - (\text{实验组} - \text{空白对照的MTTA值}) / (\text{对照组} - \text{空白对照的MTTA值})] \times 100\%$ 。

1.2.2 流式细胞仪检测EGCG对LoVo细胞和SW480细胞凋亡和细胞周期的影响: (1)流式细胞仪检测细胞凋亡。把细胞培养液吸出至适当的15 mL离心管内, PBS洗涤贴壁细胞一次, 加入消化后细胞, 稍混匀, 转移到离心管内, 1 000 g离心5 min, 弃上清, 收集细胞, 用PBS轻轻重悬细胞并计数。取 0.5×10^6 重悬的细胞, 1 000 g离心5 min, 弃上清, 加入195 μ L Annexin V-FITC结合液轻轻重悬细胞。加入5 μ L Annexin V-FITC, 轻轻混匀。室温避光孵育10 min。1 000 g离心5 min, 弃上清, 加入190 μ L Annexin V-FITC结合液轻轻重悬细胞。加入10 μ L碘化丙啶(PI)染色液, 轻轻混匀, 冰浴避光放置72 h。随即进行流式细胞仪检测, Annexin V-FITC为绿色荧光, PI为红色荧光。(2)流式细胞仪分析细胞周期。收集细胞, 4 °C、1 000 r/min离心5 min。用预冷PBS缓冲液洗两遍。充分悬浮细胞, 4 °C、1 000 r/min离心5 min后弃上清。细胞沉淀加入1 mL预冷700 mL/L乙醇, 吹打均匀, 4 °C固定过夜。PBS洗涤去乙醇, 1 000 r/min离心5 min, 洗两遍。0.5 mL PBS含50 mg/L PI, 100 mg/L RNase A重悬细胞, 37 °C避光孵育30 min。以标准程序用流式细胞仪检测, 结果用细胞周期拟和软件ModFit分析。

1.2.3 实时荧光定量PCR检测EGCG对LoVo细胞和SW480细胞的Notch1与Notch2的基因表达: (1)PCR扩增引物: Notch1上游引物: 5'-CAATGTGGATGCCGCAGTTGTG-3', 下游引物: 5'-CAGCACCTTGCGGTCTCGTA-3'; Notch2上游引物: 5'-AAAAATGGGGCCAACCGAGAC-3', 下游引物: 5'-TTCATCCAGAAGGCGCACAA-3'。(2)培养细胞总RNA的提取及cDNA的制备: 按照Qiagen试剂盒说明书进行所有样本总RNA的

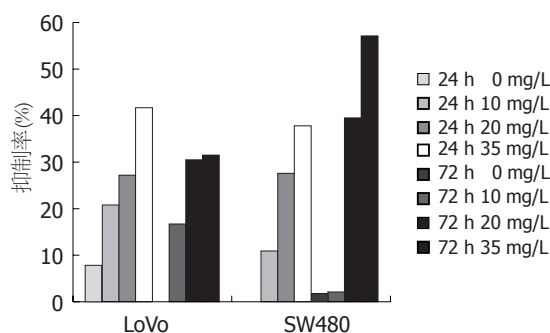


图1 EGCG对肠癌细胞增殖的抑制作用.

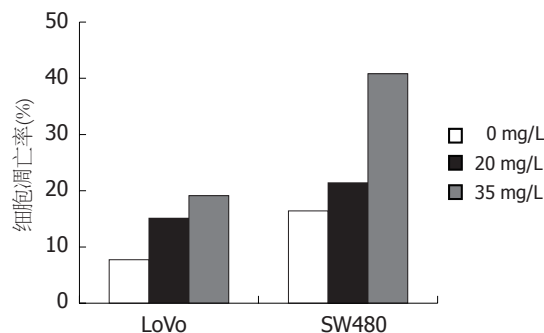
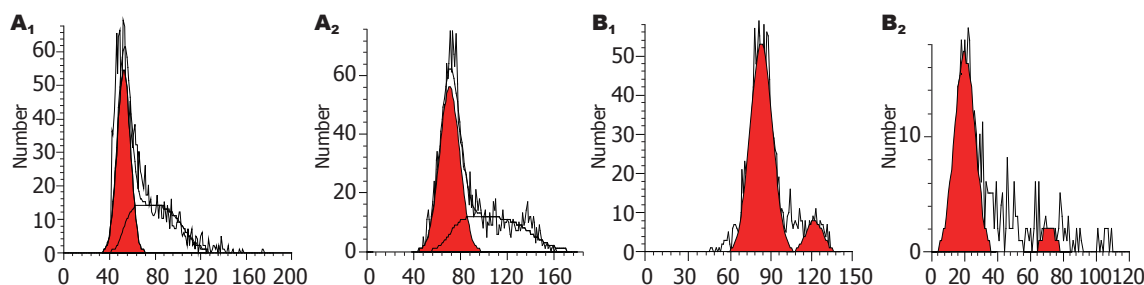


图2 EGCG对肠癌细胞凋亡的影响.

■ 相关报道

Chen等研究发现下调Notch2与Notch1均可抑制成胶质细胞瘤的生长,但Notch2发挥了更大的作用. Notch信号转导途径对结直肠肿瘤细胞的生长调控起关键作用.

图3 EGCG对肠癌细胞周期的影响. A₁: SW480细胞(0 mg/L); A₂: SW480细胞(35 mg/L); B₁: LoVo细胞(0 mg/L); B₂: LoVo细胞(35 mg/L).

抽提. 用260 nm波长分光测定RNA浓度, 根据 A_{260}/A_{280} 的比值计算RNA的纯度. 将RNA反转录为cDNA, Total RNA 2 μ g, 20 μ m Oligo(dT)₁₅ Primer 1 μ L, 补DEPC H₂O至15 μ L, 70 $^{\circ}$ C加热5 min, 冰上放置2 min, 补充5 \times M-MLV Reaction Buffer 5 μ L, 10 mmol/L dNTP 1.25 μ L, RNasin RNase Inhibitor 25 U, M-MLV RT Rnase H- 200 U, 补DEPC H₂O至25 μ L. 轻轻混匀上述反应液, 放置于42 $^{\circ}$ C反应60 min后, 于-20 $^{\circ}$ C保存. (3)实时荧光定量RT-PCR: 反应体系包括: 2 \times SYBR Premix Ex Taq, 1 μ mol/L上游引物0.5 μ L, 1 μ mol/L下游引物0.5 μ L, ROX0.4 μ L, cDNA样本2 μ L, 补ddH₂O至20 μ L. 反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 30s, 然后95 $^{\circ}$ C 5 s, 共40个循环. 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 95 $^{\circ}$ C 30 s, 60 $^{\circ}$ C 15 s 绘制溶解曲线. 反应均在ABI prism 7300 PCR仪上进行. 仪器荧光检测通道选择SYBR GREEN. (4)数据处理: 以PCR反应的前15个循环的荧光信号作为荧光本底信号, 以6-15个循环的荧光信号的标准差的10倍为荧光阈值, 每个扩增管内的荧光信号达到设定的荧光阈值所经历的循环数, 就是循环阈值Ct. 完成荧光阈值的设定及标准曲线的建立, 获得相对原始浓度, 比较Notch1与Notch2的基因表达情况.

统计学处理 应用SPSS17.0统计软件处理数据, 结果用实验数据以mean \pm SD表示, 采用独立

样本 t 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 MTT法检测不同浓度的EGCG对LoVo细胞、SW480细胞细胞增殖的抑制作用 随着EGCG浓度的增加, 24 h与72 h时LoVo细胞、SW480细胞的增殖抑制率均逐渐升高, 均在EGCG浓度为35 mg/L时抑制率达到最高. 但随着时间的延长, LoVo细胞、SW480细胞的增殖抑制率却无明显规律性. 说明EGCG对两株细胞增殖的抑制作用均具有浓度依赖性, 却不具有时间依赖性(图1).

2.2 流式细胞仪检测结直肠癌细胞株的凋亡 浓度为20 mg/L和35 mg/L的EGCG对LoVo细胞、SW480细胞的凋亡均有明显增强, 且剂量与凋亡率呈正相关. 说明EGCG能增强LoVo细胞、SW480细胞的凋亡率, 随着EGCG剂量的增加, 凋亡率升高(图2).

2.3 流式细胞仪分析细胞周期 EGCG能将SW480细胞和LoVo细胞细胞周期阻滞在G₀/G₁期, 阻碍其向S期转换, 抑制其细胞增殖(图3).

2.4 实时荧光定量PCR检测EGCG对Notch1与Notch2基因表达的影响 EGCG能下调SW480细胞和LoVo细胞Notch2的基因表达($P=0.039$, 0.001), 而SW480细胞的Notch1基因表达有下调的趋势, LoVo细胞的Notch1基因表达有上调的趋势, 但差异均无显著意义($P>0.05$, 图4).

■ 创新盘点

本研究发现EGCG对体外培养的LoVo细胞和SW480细胞的增殖有明显抑制作用,且能诱导细胞凋亡和影响细胞周期。其作用机制可能与下调Notch2的基因表达及激活Notch信号转导途径有关。

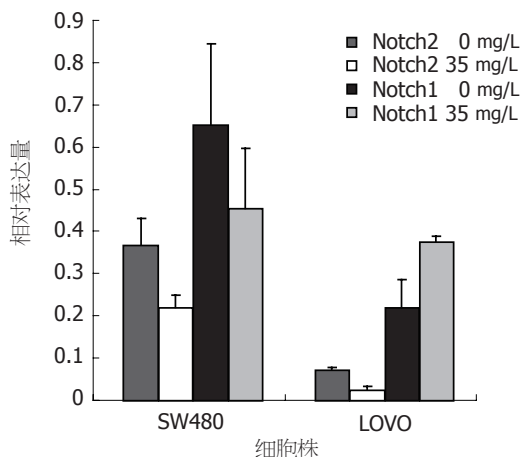


图4 EGCG对肠癌细胞株Notch1与Notch2基因相对表达的影响。

3 讨论

EGCG的抗癌作用目前报道很多,但其作用机制尚不明确^[4-6]。本实验通过研究细胞Notch信号转导途径相关基因来分析探索其作用机制。LoVo细胞是错配修复基因缺失的微卫星不稳定结肠癌细胞,对CEA高表达^[7],而SW480细胞是错配修复基因表达正常的结肠癌细胞。MTT实验结果显示EGCG对LoVo细胞和SW480细胞增殖均具有抑制作用,且呈浓度依赖性,不具有时间依赖性。流式细胞仪检测EGCG能诱导LoVo细胞和SW480细胞的凋亡,其剂量与凋亡率呈正相关;且能改变细胞周期,将两株细胞均阻滞在G₁期,阻滞其DNA复制。

本课题组在前期研究中发现,茶多酚处理后的细胞株可以导致HES1和JAG1基因下调,而这些基因是Notch信号转导途径的靶基因,提示茶多酚中的成分是否具有调节Notch信号转导途径的作用^[2,8-10]。EGCG是茶多酚中含量最高、活性最强的单体,研究表明其作用机制与诱导肿瘤细胞凋亡和阻滞细胞周期及影响相关蛋白、基因的表达有关^[11-15]。正常Notch信号转导系统与细胞正常增殖和分化、器官和组织的更新有重要的关系,当Notch信号发生异常时,细胞增殖增加,可以进一步转化为癌。哺乳动物的细胞Notch系统具有4个Notch蛋白(Notch1-4)和5个相应的配体(DLL1、DLL3、DLL4、JAG1和JAG2),Notch信号可以被2个细胞之间的配体结合激活,导致蛋白裂解而使细胞质内的Notch蛋白部分(Notch-IC)被释放,Notch-IC直接进入细胞核结合到转录因子CSL,从而导致转录被抑制^[16]。结肠是一个反复更新的器官,因此在结肠壁内隐窝存在着前体细胞和干细胞、移行增大(transit

amplifying, TA)细胞和最终分化的细胞,结肠干细胞存在于隐窝基底部,增殖形成TA细胞,TA细胞逐渐上移增殖形成各种结肠细胞并停止增殖^[17]。干细胞在适合的微环境下可以调节细胞的增殖、分化和凋亡,但是在各种外来因素的干扰下,这种微环境就会发生改变,导致Notch信号表达增加,从而导致肿瘤发生^[18]。

Notch1与Notch2基因是Notch信号转导途径的两个靶基因^[19],本组研究了EGCG处理后的LoVo和SW480细胞株的Notch1与Notch2基因的基因表达的变化。结果显示,EGCG能下调结直肠癌细胞SW480细胞和LoVo细胞Notch2的基因表达,两细胞之间具有明显差异,能下调SW480细胞的Notch1基因表达,上调LoVo细胞的Notch1基因表达,但差异无显著意义。表明EGCG可能通过下调Notch2基因的表达,影响细胞周期的移行,诱导细胞的凋亡。

近年来的研究表明^[20-22],Notch信号途径和多种肿瘤的发生有关,其主要的原因是影响了肿瘤干细胞的分化,从而导致肿瘤发生。在结直肠癌的研究中发现,Notch信号途径的基因呈现高表达状态,提示在结直肠癌的发生中,Notch信号途径作为抑癌基因来发挥作用^[19]。Reedijk等^[23]在一个队列研究中发现Notch信号转导途径的基因NOTCH1,LFNG和HES1在肿瘤中出现高表达。Tanaka等^[24]研究发现可通过Notch2基因的过度表达及Notch1基因的下调抑制骨肉瘤的体外生长。Chen等^[25]研究发现下调Notch2与Notch1均可抑制成胶质细胞瘤的生长,但Notch2发挥了更大的作用。Notch信号转导途径对结直肠癌肿瘤细胞的生长调控起关键作用^[23]。但Notch信号转导途径的基因到底发挥致癌基因的作用还是抑癌基因的作用,目前仍有争议^[26,27]。有研究表明Notch1,Notch2可作为抑癌基因抑制肿瘤生长,可能通过阻滞细胞周期来抑制细胞分化^[16,25]。

本研究发现EGCG对体外培养的LoVo细胞和SW480细胞的增殖有明显抑制作用,且能诱导细胞凋亡和影响细胞周期。其作用机制可能与下调Notch2的基因表达及激活Notch信号转导途径有关,但是EGCG对Notch1基因表达的影响尚需要做进一步探讨。

4 参考文献

- Ahmad N, Feyes DK, Nieminen AL, Agarwal R, Mukhtar H. Green tea constituent epigallocatechin-3-gallate and induction of apoptosis and cell cycle arrest in human carcinoma cells. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89: 1881-1886

- 2 Jin H, Tan X, Liu X, Ding Y. The study of effect of tea polyphenols on microsatellite instability colorectal cancer and its molecular mechanism. *Int J Colorectal Dis* 2010; 25: 1407-1415
- 3 王水明, 金黑鹰, 张春霞, 孙宇, 杨志坚, 丁义江. 表没食子儿茶素没食子酸酯对结肠癌皮下易位的原位荧光动物模型肿瘤生长和转移的作用. *世界华人消化杂志* 2010; 18: 3016-3019
- 4 Sadava D, Whitlock E, Kane SE. The green tea polyphenol, epigallocatechin-3-gallate inhibits telomerase and induces apoptosis in drug-resistant lung cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 360: 233-237
- 5 Ju J, Hong J, Zhou JN, Pan Z, Bose M, Liao J, Yang GY, Liu YY, Hou Z, Lin Y, Ma J, Shih WJ, Carothers AM, Yang CS. Inhibition of intestinal tumorigenesis in Apcmin/+ mice by (-)-epigallocatechin-3-gallate, the major catechin in green tea. *Cancer Res* 2005; 65: 10623-10631
- 6 Shimizu M, Deguchi A, Lim JT, Moriwaki H, Kopelovich L, Weinstein IB. (-)-Epigallocatechin gallate and polyphenon E inhibit growth and activation of the epidermal growth factor receptor and human epidermal growth factor receptor-2 signaling pathways in human colon cancer cells. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 2735-2746
- 7 黎成金, 王羊, 王烈, 涂小煌, 王瑜, 张宝明. 组织特异性胞嘧啶脱氨酶和5-氟胞嘧啶热化疗对裸鼠结肠癌肝脏转移的影响. *中华消化外科* 2009; 8: 213-216
- 8 戴功建, 金黑鹰, 丁义江, 夏建国, 刘秀芳, 刘飞, 谈瑄忠, 耿建祥. 茶多酚对微卫星不稳定结肠癌裸小鼠的抗肿瘤作用及其作用机制. *中西医结合学报* 2008; 12: 1263-1266
- 9 刘秀芳, 金黑鹰, 丁义江, 丁曙晴, 刘飞, 倪敏, 王静. 抗突变中药对错配修复基因缺失结肠癌细胞的抑制作用. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 2201-2204
- 10 Xu YY, Jin HY, Tan XZ, Liu XF, Ding YJ. [Tea polyphenol inhibits colorectal cancer with microsatellite instability by regulating the expressions of HES1, JAG1, MT2A and MAFA]. *Zhongxiyi Jiehe Xuebao* 2010; 8: 870-876
- 11 Sukhthankar M, Alberti S, Baek SJ. (-)-Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) post-transcriptionally and post-translationally suppresses the cell proliferative protein TROP2 in human colorectal cancer cells. *Anticancer Res* 2010; 30: 2497-2503
- 12 Adachi S, Shimizu M, Shirakami Y, Yamauchi J, Natsume H, Matsushima-Nishiwaki R, To S, Weinstein IB, Moriwaki H, Kozawa O. (-)-Epigallocatechin gallate downregulates EGF receptor via phosphorylation at Ser1046/1047 by p38 MAPK in colon cancer cells. *Carcinogenesis* 2009; 30: 1544-1552
- 13 Adachi S, Nagao T, To S, Joe AK, Shimizu M, Matsushima-Nishiwaki R, Kozawa O, Moriwaki H, Maxfield FR, Weinstein IB. (-)-Epigallocatechin gallate causes internalization of the epidermal growth factor receptor in human colon cancer cells. *Carcinogenesis* 2008; 29: 1986-1993
- 14 Qin J, Xie LP, Zheng XY, Wang YB, Bai Y, Shen HF, Li LC, Dahiya R. A component of green tea, (-)-epigallocatechin-3-gallate, promotes apoptosis in T24 human bladder cancer cells via modulation of the PI3K/Akt pathway and Bcl-2 family proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 354: 852-857
- 15 Shimizu M, Shirakami Y, Sakai H, Yasuda Y, Kubota M, Adachi S, Tsurumi H, Hara Y, Moriwaki H. (-)-Epigallocatechin gallate inhibits growth and activation of the VEGF/VEGFR axis in human colorectal cancer cells. *Chem Biol Interact* 2010; 185: 247-252
- 16 Radtke F, Raj K. The role of Notch in tumorigenesis: oncogene or tumour suppressor? *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 756-767
- 17 Bolo's V, Grego-Bessa J, de la Pompa JL. Notch Signaling in Development and Cancer. *Endocr Rev* 2007; 28: 339-363
- 18 Li L, Neaves WB. Normal stem cells and cancer stem cells: the niche matters. *Cancer Res* 2006; 66: 4553-4557
- 19 Sitnik K, Cichy J. [Role of Cre-loxP-mediated conditional gene targeting in understanding the function of Notch receptors]. *Postepy Biochem* 2006; 52: 49-55
- 20 de Antonellis P, Medaglia C, Cusanelli E, Andolfo I, Liguori L, De Vita G, Carotenuto M, Bello A, Formiggini F, Galeone A, De Rosa G, Virgilio A, Scognamiglio I, Sciro M, Basso G, Schulte JH, Cinalli G, Iolascon A, Zollo M. MiR-34a Targeting of Notch Ligand Delta-Like 1 Impairs CD15/CD133 Tumor-Propagating Cells and Supports Neural Differentiation in Medulloblastoma. *PLoS One* 2011; 6: e24584
- 21 Pandya K, Meeke K, Clementz AG, Rogowski A, Roberts J, Miele L, Albain KS, Osipo C. Targeting both Notch and ErbB-2 signalling pathways is required for prevention of ErbB-2-positive breast tumour recurrence. *Br J Cancer* 2011; 105: 796-806
- 22 Allen TD, Rodriguez EM, Jones KD, Bishop JM. Activated Notch1 induces lung adenomas in mice and cooperates with Myc in the generation of lung adenocarcinoma. *Cancer Res* 2011; 71: 6010-6018
- 23 Reedijk M, Odorcic S, Zhang H, Chetty R, Tennert C, Dickson BC, Lockwood G, Gallinger S, Egan SE. Activation of Notch signaling in human colon adenocarcinoma. *Int J Oncol* 2008; 33: 1223-1229
- 24 Tanaka M, Setoguchi T, Hirotsu M, Gao H, Sasaki H, Matsunoshita Y, Komiya S. Inhibition of Notch pathway prevents osteosarcoma growth by cell cycle regulation. *Br J Cancer* 2009; 100: 1957-1965
- 25 Chen J, Kesari S, Rooney C, Strack PR, Chen J, Shen H, Wu L, Griffin JD. Inhibition of notch signaling blocks growth of glioblastoma cell lines and tumor neurospheres. *Genes Cancer* 2010; 1: 822-835
- 26 Maillard I, Pear WS. Notch and cancer: best to avoid the ups and downs. *Cancer Cell* 2003; 3: 203-205
- 27 Yang CS, Lambert JD, Sang S. Antioxidative and anti-carcinogenic activities of tea polyphenols. *Arch Toxicol* 2009; 83: 11-21

■同行评价

本研究从细胞学角度证明EGCG的抗肿瘤作用, 并借助Notch信号转导途径相关基因探索其作用机制, 有一定科研价值。

编辑 李军亮 电编 闫晋利

艾灸对脾虚大鼠小肠上皮线粒体超微结构及呼吸链酶含量的影响

易受乡, 彭艳, 彭芬, 常小荣, 龙奕文, 林亚平

■背景资料

艾灸疗法具有温通和温补作用, 其温补作用在治疗脾胃病方面尤为突出。现代研究发现艾灸治疗脾虚证具有良好疗效, 并发现其作用与改善胃肠运动及吸收功能, 调节消化酶活性等有关。

易受乡, 彭艳, 彭芬, 常小荣, 龙奕文, 林亚平, 湖南中医药大学针灸推拿学院 经穴与脏腑相关重点实验室 国家中医药管理局三级实验室 湖南省长沙市 410007

易受乡, 教授, 主要从事经脉脏腑相关的研究。

国家重大基础研究(973)基金资助项目, No. 2009CB522904

湖南省教育厅基金资助项目, No. 11C0965

作者贡献分布: 此课题由易受乡设计; 研究过程由彭艳、彭芬及龙奕文操作完成; 研究所用工具由易受乡、常小荣及林亚平提供; 数据分析由彭艳与彭芬完成; 本论文写作由彭艳完成。

通讯作者: 易受乡, 教授, 410007, 湖南省长沙市韶山中路113号, 湖南中医药大学东塘校区. yishouxiang@yahoo.com.cn

收稿日期: 2011-08-15 修回日期: 2011-10-05

接受日期: 2011-10-12 在线出版日期: 2011-10-18

Effect of moxibustion on mitochondrial ultrastructure and contents of mitochondrial enzymes in the intestinal epithelium of spleen-deficiency rats

Shou-Xiang Yi, Yan Peng, Fen Peng, Xiao-Rong Chang, Yi-Wen Long, Ya-Ping Lin

Shou-Xiang Yi, Yan Peng, Fen Peng, Xiao-Rong Chang, Yi-Wen Long, Ya-Ping Lin, Key Laboratory of Meridians and Viscera, Tertiary Laboratory of State Administration of Traditional Chinese Medicine, Institute of Acupuncture, Moxibustion and Massage, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410007, Hunan Province, China

Supported by: the Major State Basic Research Development Program of China (973 Program), No. 2009CB522904; and the Foundation of Hunan Education Department, No. 11C0965

Correspondence to: Shou-Xiang Yi, Professor, Institute of Acupuncture and Massage, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, 113 Shaoshan Middle Road, Changsha 410007, Hunan Province, China. yishouxiang@yahoo.com.cn
Received: 2011-08-15 Revised: 2011-10-05

Accepted: 2011-10-12 Published online: 2011-10-18

Abstract

AIM: To observe the effect of moxibustion on symptom scores, mitochondrial ultrastructure, contents of succinodehydrogenase (SDH) and cytochrome oxidase (CCO), expression of COX I in the jejunal epithelium of spleen-deficiency rats and to explore the mechanism by which moxibustion reinforces the spleen-stomach.

METHODS: Forty healthy Sprague-Dawley

rats were randomly assigned into four groups: A (blank group; normal rats), B (model group; spleen-deficiency rats), C (moxibustion group; spleen-deficiency rats intragastrically given Sijunzi Decoction) and D (herbs group; spleen-deficiency rats receiving moxibustion at Zusanli, Zhongwan, Guanyuan, Pishu and Weishu points). An animal model of spleen-deficiency was established by intragastric administration of Chinese Rhubarb Infusion. Common symptoms were recorded. Mitochondrial ultrastructure of the jejunal epithelium was observed by electron microscopy. Enzyme-linked immunosorbent assay was used to detect the contents of SDH and CCO. The expression of COX I was detected by Western blot.

RESULTS: Compared to group A, symptom score increased significantly ($P < 0.01$), the contents of SDH and CCO and expression of COX I decreased significantly ($P < 0.05$ or 0.01), and the mitochondrial ultrastructure of the jejunal epithelium was terribly destroyed in group B. Compared to group B, the mitochondrial ultrastructure of the jejunal epithelium was only mildly destroyed, and the contents of SDH and CCO and expression of COX I increased significantly (0.387 ± 0.076 , 0.343 ± 0.053 vs 0.277 ± 0.037 ; 0.246 ± 0.058 , 0.231 ± 0.038 vs 0.167 ± 0.021 ; 0.941 ± 0.204 , 1.040 ± 0.214 vs 0.481 ± 0.131 , $P < 0.05$ or 0.01) in groups C and D. There were no significant differences in the above parameters between groups C and D.

CONCLUSION: Moxibustion could warm and reinforce the spleen-stomach and relieve symptoms of spleen-deficiency possibly by promoting the recovery of mitochondrial ultrastructure of the intestinal epithelium and increasing the contents of respiratory chain enzymes.

Key words: Moxibustion; Zusanli; Spleen-deficiency; Mitochondria; Sijunzi decoction

Yi SX, Peng Y, Peng F, Chang XR, Long YW, Lin YP. Effect of moxibustion on mitochondrial ultrastructure and contents of mitochondrial enzymes in the intestinal

■同行评议者

沈克平, 主任医师, 上海龙华医院肿瘤五科

epithelium of spleen-deficiency rats. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2011; 19(29): 3028-3034

摘要

目的: 观察艾灸足三里等穴对脾虚大鼠一般症状积分、空肠组织线粒体结构、琥珀酸脱氢酶(SDH)、细胞色素氧化酶(CCO)含量及其亚基蛋白COX I表达的影响, 探讨艾灸温补脾胃改善脾虚证的作用机制。

方法: 40只SD大鼠随机分为4组: A空白对照组, B脾虚模型组, C艾灸穴位组(脾虚+艾条温和灸组), D中药对照组(脾虚+四君子汤组), 每组10只。200%大黄水浸剂灌胃造成脾虚大鼠模型, 艾灸足三里、中脘、关元、脾俞、胃俞等穴, 观察大鼠一般症状, 透射电镜观察大鼠空肠组织线粒体结构, 酶联免疫法(ELISA)测定空肠上皮SDH和CCO含量, 免疫印记(Western blot)方法测定空肠上皮细胞内细胞色素氧化酶亚基 I (Cytochrome oxidase I, COX I)蛋白表达。

结果: 与A组比较, B组脾虚模型大鼠脾虚症状积分显著增加($P<0.01$), 空肠上皮细胞线粒体超微结构严重破坏, 空肠上皮细胞SDH和CCO含量及COX I表达较A组显著降低($P<0.05$ 或 0.01)。经艾灸足三里等穴或四君子药液灌胃治疗的C、D组空肠上皮细胞线粒体超微结构轻微损伤, 空肠上皮细胞SDH、CCO含量及COX I表达量均显著高于B组(0.387 ± 0.076 , 0.343 ± 0.053 vs 0.277 ± 0.037 ; 0.246 ± 0.058 , 0.231 ± 0.038 vs 0.167 ± 0.021 ; 0.941 ± 0.204 , 1.040 ± 0.214 vs 0.481 ± 0.131 , $P<0.05$ 或 0.01), C、D两组比较无显著性差异。

结论: 艾灸足三里等穴可温补脾胃, 改善大鼠脾虚症状, 其机制与促进脾虚大鼠小肠上皮细胞线粒体结构恢复, 增加呼吸链酶含量及其亚基蛋白的表达有关, 提示艾灸可通过促进线粒体结构和功能的恢复, 改善能量代谢。

关键词: 艾灸; 足三里; 脾虚; 线粒体; 四君子汤

易受乡, 彭艳, 彭芬, 常小荣, 龙奕文, 林亚平. 艾灸对脾虚大鼠小肠上皮线粒体超微结构及呼吸链酶含量的影响. 世界华人消化杂志 2011; 19(29): 3028-3034
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/3028.asp>

0 引言

中医学理论认为^[1], 脾的主要生理功能为主运化、主升举和主统血, 其中以运化为核心。艾灸具有温补脾胃的效应, 可改善“脾主运化”功

能。有学者认为, 中医脾主运化的细胞生物学基础与线粒体功能关系密切^[2]。线粒体的功能特点与脾的生理功能有着多方面的共通之处, 其氧化磷酸化产能过程与脾主运化功能相吻合。线粒体含有进行食物氧化所需的酶, 将食物的潜能转化成供细胞所用的能量。因此, 本研究采用苦寒泻下法建立大鼠脾虚模型, 观察艾灸足三里、中脘、关元、脾俞、胃俞穴对脾虚大鼠症状、空肠上皮细胞线粒体结构、线粒体酶含量及亚基蛋白表达的影响, 分析艾灸改善脾虚证与线粒体能量代谢的关系, 从能量代谢角度探讨艾灸温补脾胃的分子生物学机制。

1 材料和方法

1.1 材料 健康SD大鼠, SPF级, 雌雄各半, 体重180-220 g, 共40只, 由湖南中医药大学实验动物中心提供。艾条(南阳市卧龙汉医艾绒厂); SDH含量测定试剂盒, CCO含量测定试剂盒(北京博奥森生物技术有限公司); 2.5%的戊二醛, 2%的钨酸(由中南大学湘雅医学院配制提供); BCA蛋白定量试剂盒(Wellbio); Tris, APS, SDS, Tween-20, 丙烯酰胺, 甘氨酸, 甲叉双丙烯酰胺, 丽春红(Sigma公司); 山羊抗小鼠IgG(goat anti-mouse IgG), 山羊抗兔IgG(goat anti-rabbit IgG)(Proteintech公司); RIPA裂解液(北京普利莱公司); SuperECL Plus超敏发光液(Thermo pierce公司); 显影液, 定影液(WellBiology公司)。四君子汤: 市购人参、白术、茯苓、炙甘草, 按照9:9:9:6比例依照中药传统水煮方法煎煮, 100℃恒温水浴加热浓缩, 得到含生药1 mL的四君子汤药液^[3]。

1.2 方法

1.2.1 分组及造模: (1)分组。40只大鼠随机分为4组, 每组10只。A空白对照组, B脾虚模型组, C艾灸穴位组(脾虚+艾条温和灸)D组: 中药对照组(脾虚+四君子汤组); (2)动物造模及评价方法。脾虚动物模型: 采用苦寒泻下法, 200%的大黄水浸剂浓缩液4℃灌胃, 每只1 mL/100 g, 每天2次, 连续14 d。观察体质量、体温、饮食、大便、精神状态、行为变化等。200%的大黄水煎剂浓缩液制备方法: 市售生大黄(安徽沪淮中药饮片厂, 10 g/包), 加入100℃蒸馏水煮沸5 min, 四层纱布过滤3-4次, 100℃水浴浓缩至200%(相当于生药2 mg/mL), 4℃保存备用; 脾虚动物模型评价标准: 泄泻, 严重时甚至脱肛; 食少纳呆; 消瘦, 体质量减轻; 神态萎靡, 四肢不收,

■研究前沿

目前研究已表明, 中医“脾”的生理功能与线粒体的功能特点有着多方面的共通之处, 其氧化磷酸化产能过程与脾主运化功能相吻合。艾灸温补脾胃效应与线粒体结构和功能之间的有何联系, 中医“脾主运化”的生理功能与能量代谢之间的关系, 有待深入探讨。

■相关报道

现阶段研究表明,脾虚患者和动物主要表现为胃肠道运动和吸收功能障碍,胃肠细胞线粒体结构改变,线粒体酶含量或活性降低,能量代谢障碍。中药四君子汤对脾虚动物胃肠细胞线粒体能量代谢有一定调节作用。

表 1 脾虚动物模型症状量化积分表

症状	无症状 (0分)	轻度 (1分)	中度 (2分)	重度 (3分)
大便稀溏	无,成形	半成形,稍稀,拉尾排便反应阳性	稀便,拉尾排便反应阳性	溏便,肛周污浊,拉尾排便反应强阳性
食少	无	食欲较差,食量减少10%–20%	食欲不佳,食量减少20%–40%	终日不欲进食
体质量增长率	≥10%	7%–10%(含7%)	4%–7%(含4%)	<4%
倦怠	无倦怠,反应灵敏,拉尾抵抗持续时间>1 min	肢体稍倦,反应较灵活,拉尾抵抗持续时间30–60 s	少动,乏力,拉尾抵抗力持续5–30 s	无力,扎堆,拉尾抵抗持续时间<5 s
皮毛	皮毛光泽	稍荣,少光泽	蓬松不荣	枯槁无光泽

具有前两项症状,且总积分≥4分,认为脾虚模型造模成功;≤5分为轻度,6–10分为中度,>10分为重度;尾排便试验:拉尾排便率(观察1 min内,牵拉大鼠尾巴时,是否出现排便现象);悬空拉尾抵抗力测试:观察方法,手捉大鼠尾巴,呈悬空状,大鼠开始摇晃挣扎,开始计时,直至大鼠无力旋转挣扎时为止,统计时间,可以反映大鼠的乏力程度。

毛色枯槁;卷缩聚堆;易疲劳。第1,2项为主症,第3–6项为兼症。具备2项主症和2项兼症时,即可以认为脾虚证造模成功。

1.2.2 治疗方法: (1)穴位定位。穴位定位参考林文注主编《实验针灸学》常用动物穴位定位法及拟人对照法定位,以胸锁联合和耻骨联合连线下1/4与上3/4交点为肚脐。足三里:膝关节后外侧,腓骨小头下约5 mm处;脾俞:第十二胸椎下两旁肋间;胃俞:第十三胸椎下两旁肋间;中脘:脐与胸骨剑突连线中点,约脐上20 mm处;关元:脐与耻骨联合上缘连线上3/5与下2/5交点,约脐下25 mm处; (2)艾灸方法。取大鼠中脘穴、关元穴、单侧足三里穴,单侧脾俞穴,单侧胃俞穴。单日大鼠仰卧位固定,灸中脘、关元及一侧足三里穴(隔日左右交替);双日大鼠俯卧位固定,灸单侧脾俞胃俞(隔日左右交替)。大鼠束缚于鼠板上,定穴后局部剪毛,用隔热纸包裹局部,隔热纸上剪一5 mm×5 mm的小孔并对准穴位,将艾条固定于自制艾条支架上,

使艾条点燃部位垂直距离大鼠穴位约3 cm,点燃施灸,每天每穴艾灸30 min,连续艾灸14 d; (3)实验步骤。所有大鼠分组处理,A组蒸馏水灌胃,每只1 mL/100 g,每天2次,连续14 d。B、C、D组200%的大黄水煎剂浓缩液4 ℃灌胃,每只1 mL/100 g,每天2次,连续14 d。同时,从实验第1天开始,A、B组捆绑30 min不艾灸;C组艾灸穴位30 min,D组四君子颗粒药液1.2 mL/只,连续处理14 d。于实验第14天处理后,4组大鼠禁食不禁水24 h,第15天处死全部大鼠取材。

1.2.3 观察指标: (1)一般症状积分。分别于实验第0天(造模前1 d),第14天(造模最后1 d)观察大便、精神状态、行为变化等,并记录体质量,食

量,拉尾抵抗时间,按表1计分; (2)空肠组织线粒体结构观察。取近端空肠黏膜组织,2.5%的戊二醛固定24 h以上,2%的锇酸后固定2 h,梯度脱水,环氧树脂混合液浸泡24 h,包埋,超薄切片,电子染色,透射电镜观察、照片; (3)空肠组织SDH、CCO含量。取大鼠空肠新鲜组织200 mg,加入适量生理盐水捣碎,3 000 r/min离心10 min取上清。采用ELISA法检测上清液中SDH和CCO的含量(具体操作方法参照北京博奥申生物技术有限公司ELISA检测试剂盒使用说明书); (4)空肠上皮细胞COX I蛋白含量测定。采用蛋白免疫印记(Western blot)检测空肠上皮细胞COX I蛋白含量。将曝光后的底片扫描,用Imager Quant 400成像系统软件对Western blot条带进行灰度扫描,将灰度值数字化,以目的蛋白的灰度值除以内参β-actin的灰度值以校正误差,测定其I4值。

统计学处理 数据用mean±SD表示,所有资料进行正态性检验;多组计量资料采用单因素方差分析(One-way ANOVA),方差齐者用LSD和SNK法,方差不齐者用Tamhane's T2或Dunnett's T3法,前后比较采用配对t检验,所有数据使用SPSS17 for Windows软件进行处理。

2 结果

2.1 艾灸对大鼠脾虚症状的影响 大黄水浸剂灌胃14 d后,模型大鼠体质量增长缓慢,食量下降,活动减少,喜蜷聚,大便溏泄,毛色不泽,食量下降。造模后B组大鼠脾虚症状积分与造模前相比显著增高,亦显著高于A组($P<0.01$),提示造模成功。经艾灸或四君子汤药液同步治疗的C组和D组大鼠脾虚症状不明显,脾虚症状积分显著低于B组($P<0.01$),造模前后无显著性差异,与A组

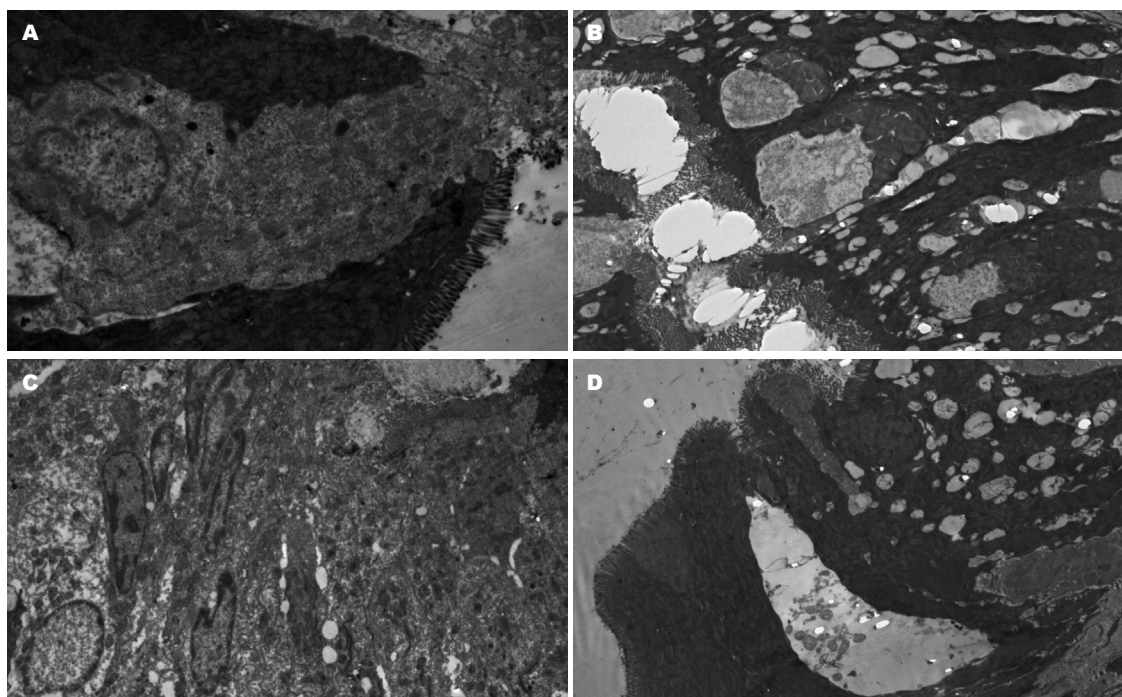


图1 艾灸对脾虚大鼠空肠上皮线粒体结构的影响($\times 5000$)。A: A组; B: B组; C: C组; D: D组。

■应用要点

本文从脾虚证入手, 分析“脾主运化”与能量代谢的关系, 探讨“脾”与线粒体相关性。在国内率先开展了艾灸改善脾虚证与线粒体结构与功能之间关系的研究, 具有一定的创新性。

比较无显著差异。C组症状总积分略优于D组, C、D两组比较无显著性差异。结果提示艾灸足三里等穴或以四君子汤药液灌胃均可改善大黄水浸剂灌胃所致的大鼠脾虚症状, 艾灸效果略优于四君子汤(表2)。

2.2 艾灸对脾虚大鼠空肠上皮线粒体结构的影响 A组空白对照组: 空肠上皮细胞微绒毛排列整齐, 线粒体结构正常, 嵴清晰(图1A); B组脾虚模型组: 上皮细胞之间间隙扩大, 连接变短、水肿, 上皮细胞胞浆水肿, 线粒体空泡化(图1B); C组艾灸穴位组: 腺上皮结构正常, 仅少数线粒体水肿(图1C); D组中药对照组: 肠上皮胞浆水肿, 可见一小空泡, 但线粒体正常(图1D)。

2.3 艾灸对脾虚大鼠空肠组织SDH、CCO含量的影响 与A组比较, B组模型大鼠空肠上皮细胞SDH和CCO含量显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 表明脾虚模型建立后, 空肠上皮细胞呼吸链酶含量降低; 与B组比较, C组和D组大鼠空肠上皮细胞SDH和CCO含量显著增高($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 表明艾灸或四君子汤药液可增加空肠上皮细胞SDH和CCO含量; C组空肠上皮细胞SDH和CCO含量略高于D组($P>0.05$), 表明艾灸效果略优于四君子汤, 但未出现显著性差异(表3)。

2.4 艾灸对脾虚大鼠空肠上皮细胞COX I蛋白表达的影响 与A组比较, B组模型大鼠空肠上皮细胞COX I表达量显著降低(0.481 ± 0.131 vs 0.827 ± 0.207 , $P<0.05$), 表明脾虚模型建立后, 大

表2 各组大鼠脾虚症状积分比较 (mean \pm SD, $n=10$)

分组	造模前 (造模第0天)	造模后 (造模第14天)	差值
A组	0.90 ± 0.57	1.10 ± 0.74	0.20 ± 0.25
B组	1.10 ± 0.57	6.20 ± 0.79^b	5.10 ± 0.35^d
C组	1.00 ± 0.47	2.00 ± 0.47	1.00 ± 0.21^f
D组	0.90 ± 0.32	1.80 ± 0.42	0.90 ± 0.18^f

^b $P<0.01$ vs 造模前; ^d $P<0.01$ vs A组; ^f $P<0.01$ vs B组。

表3 各组大鼠空肠组织SDH和CCO含量比较 (mean \pm SD, $n=10$)

分组	SDH(μ mol/g)	CCO(k/mg)
A组	0.343 ± 0.039	0.231 ± 0.024
B组	0.277 ± 0.037^a	0.167 ± 0.021^b
C组	0.387 ± 0.076^d	0.246 ± 0.058^c
D组	0.343 ± 0.053^c	0.231 ± 0.038^c

^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ vs A组; ^c $P<0.05$, ^d $P<0.01$ vs B组。

鼠空肠上皮细胞COX I表达量下降; 与B组比较, C组和D组大鼠空肠上皮细胞COX I表达量显著增强(0.941 ± 0.204 , 1.040 ± 0.214 vs 0.481 ± 0.131 , $P<0.01$), 表明艾灸或四君子汤药液可使空肠上皮细胞COX I表达增强; D组空肠上皮细胞COX I表达量略高于C组($P>0.05$), 表明四君子汤药液效果略优于艾灸, 但无显著性差异(图2)。

■同行评价

本研究设计合理, 结果可靠, 结论可信, 对艾灸温补脾胃效应的机制研究有一定的参考价值。

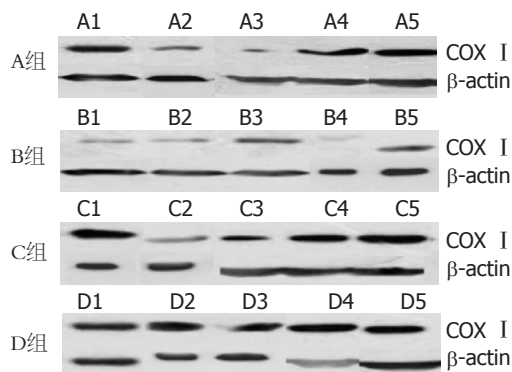


图2 各组大鼠空肠上皮细胞COX I表达凝胶电泳图。A: A组; B: B组; C: C组; D: D组。

3 讨论

中医学理论认为, 脾的主要功能是运化水谷精微, 化生气血, 荣养五脏六腑、四肢百骸。五脏六腑依赖脾脏所化生气血的滋养, 才能发挥其各自的生理功能。脾虚失运, 则出现食欲不振、腹胀、便溏、消化不良, 以至倦怠, 消瘦等气血生化不足的病变, 即脾虚证。治疗应以健脾益气、升发脾阳、运化水谷为主要治疗原则, 以达到脾运恢复的目的^[4]。临床治疗脾虚证, 常用健脾益气方药, 四君子汤是益气健脾方剂的基础方和代表方。亦可采用针灸治疗^[5-7]。灸法具有温经散寒、温阳化湿、消瘀散结、行气止痛之功, 通过合理配穴, 可助脾胃恢复其升降之机。升降和, 湿滞消, 则诸症自除^[8]。本研究采用艾灸足三里等穴对脾虚大鼠进行治疗, 大鼠体质量、食量及体力等均得到改善, 表明艾灸可温补脾胃, 改善脾虚症状, 其疗效与四君子汤药液无明显差异。

脾主运化, 为后天之本, 脾从饮食水谷中摄取精微以营养五脏六腑、四肢百骸。从现代医学角度来看, 食物中的营养物质, 经小肠吸收后, 由血液输送到全身的组织细胞之中, 然后主要在细胞内的线粒体进行生物氧化, 产生能量以维持机体的生理活动。组织器官代谢相关酶的活性以及线粒体结构和功能的变化都是脾虚证发生的病理机制^[9]。近年来, 有关脾主运化的研究已深入到亚细胞分子水平。有学者认为, 中医脾主运化的细胞生物学基础与线粒体功能关系密切, 并提出了“脾—线粒体相关”理论^[2]。线粒体是细胞内进行呼吸和能量转换的场所, 是细胞的“动力工厂”^[10]。线粒体形态结构主要是封闭的双层膜结构, 内膜上分布有电子传递复合物和其他与线粒体代谢相关的酶蛋白分子,

因此内膜在能量转换功能中起着主要作用。线粒体的这种结构与能量合成功能密切相关^[11,12]。嵴膜破坏可引起线粒体功能下降, 线粒体肿胀(基质空间增大)同样会引起线粒体电子传递受阻, 氧化磷酸化解偶联以及ATP合成量减少。脾虚时, 线粒体结构和含量会发生相应改变。临床观察发现^[13], 脾胃气虚胃脘痛患者壁细胞线粒体数目明显减少; 壁细胞及浆细胞均可见线粒体肿胀, 膜缺损, 嵴断裂、基质变淡等变化, 与对照组相比有明显差异。在对长期脾虚模型大鼠的研究中也发现^[14], 心肌细胞、肝细胞、骨骼肌细胞、胃壁细胞、胃主细胞线粒体结构均出现了改变, 线粒体形状异常, 结构紊乱, 基质改变或成空泡样变。这些病理性改变的出现, 必然引起细胞的能量代谢障碍, 导致相应细胞的功能低下, 如: 胃壁细胞泌酸、主细胞分泌胃蛋白酶减少; 小肠吸收细胞对营养物质的吸收, 结肠柱状细胞对水分的吸收障碍, 使整个消化道处于一种低下状态, 出现中医脾虚失运的症候, 如纳差、食后腹胀、便溏、腹泻等。因此, 胃肠线粒体的改变是脾虚证候发生的一个重要超微病理基础。本研究中显示, 脾虚大鼠空肠组织线粒体空泡化, 水肿。从现代医学分析, 线粒体肿胀, 内质网扩张, 可能是由于线粒体功能受损, 能量不足, Na^+/K^+ 泵运转障碍, 过多的水停积于细胞器内所引起。这与中医脾运化水湿无力密切相关。经艾灸处理的脾虚大鼠, 仅观察到少数线粒体水肿, 提示艾灸足三里等穴可促进线粒体损伤恢复, 改善能量代谢。

中医脾主运化, 不仅仅是指食物在胃肠的消化吸收, 更重要的是线粒体的生物氧化产能过程。线粒体的功能特点与脾的生理功能有着多方面的共通之处, 其氧化磷酸化产能过程与脾主运化功能相吻合^[15]。线粒体含有进行食物氧化所需的酶, 因而线粒体可以把各种食物的潜能转化成能为细胞用来实现它的各种功能活动的能量。脾虚时, “脾主运化”功能受损, 胃肠功能减弱, 蛋白质的消化吸收障碍, 生产各种酶的原料缺乏。而脾虚导致其他脏器组织细胞受到损伤, 也会导致酶的生成减少。呼吸链是位于线粒体内膜的一个酶体系, 由四个酶复合体(complex I, II, III, IV)和连通复合物I, II和III的辅酶Q(CoQ)以及连通复合物I和IV的细胞色素c(Cyt. c)组成。这一酶系催化生物底物的氧化并和催化ATP合成的ATP酶相偶联共同组成生物能量转化的分子机构^[16]。琥珀酸脱氢酶(SDH)

作为参与三羧酸循环的关键酶, 是反映线粒体功能的标志酶之一, 其活性一般可作为评价三羧酸循环运行程度的指标. SDH活性下降时, 细胞物质转运、能量代谢功能低下, 影响离子运送, 影响消化酶合成分泌和细胞正常生理功能活动, 以致消化吸收障碍^[17]. 目前在脾虚动物的胃肠组织^[18]、脑组织^[19]、心肌^[20]和骨骼肌^[21]中, 均观察到SDH活性降低. 而细胞色素氧化酶(COX)即呼吸链复合体IV, 是呼吸链上的关键酶, 是线粒体中唯一能被直接氧分子氧化的细胞色素, 其活性直接影响线粒体生物氧化、产生能量的过程. 研究发现, 脾虚大鼠肝脏线粒体SDH、COX活性均显著降低, 说明脾虚大鼠肝脏线粒体受损, 能量代谢障碍, 导致细胞氧化磷酸化功能障碍, 合成ATP的能力降低^[22]. COX与线粒体功能及细胞能量的产生密切相关, 其编码基因的改变、表达及酶活性的发挥对细胞在生理和病理情况下的机能、代谢和形态结构有直接影响. COX多个亚基的复合物镶嵌在线粒体内膜上, 其中I、II、III三个大亚基由线粒体基因编码并定位合成. 其中任何一个亚基受损均可导致电子传递障碍, 直接影响线粒体功能^[23]. 刘友章等^[24]发现, 长期耗气破气加上饥饱失调制作的脾虚模型大鼠, 无论是肝、心肌、胃还是骨骼肌细胞线粒体细胞色素a、b、c、c1均降低, 细胞色素氧化酶的量低于正常大鼠, mtDNA编码COX I a、COX II、COXIII存在突变现象, 表明长期处于脾虚状态可导致各器官线粒体DNA损害, 细胞色素氧化酶减少, 机体能量代谢减少. 本研究结果显示, 脾虚模型大鼠小肠上皮细胞胞浆水肿, 线粒体空泡化, SDH和CCO含量降低, COX I 蛋白表达减少, 提示线粒体结构和功能被破坏, 能量生成障碍. 经艾灸或四君子汤治疗后, 大鼠小肠上皮细胞线粒体结构仅轻微损伤, SDH和CCO含量增高, COX I 蛋白表达增强, 甚至略高于空白对照组. 推测可能由于组织细胞线粒体在恢复过程中, 为了满足体能恢复及体重增加所需的能量, 能量代谢加快所致.

总之, 脾虚证是以消化系统为中心的多系统、多器官功能障碍综合征候群, 即以消化、运动和吸收功能障碍为主要症候. “脾主运化”的生理功能与能量代谢关系密切. 食物中的各种营养物质, 经小肠吸收后, 由血液输送到全身的组织细胞之中, 然后主要在细胞内的线粒体进行生物氧化, 产生能量以维持机体的生理活动. 小肠是食物消化和吸收的重要部位, 小

肠吸收细胞对一些物质(糖、氨基酸、钠)等的吸收是一个主动的耗能过程, 需不断地消耗ATP来实现. 若某种因素影响到线粒体的能量代谢, 并超过了本身的代偿能力, 就必然会影响到小肠吸收细胞的吸收功能, 导致营养物质的吸收障碍, 出现吸收不良症状. 艾叶药性偏温, 加之艾火产生的热力, 使得艾灸疗法具有独特的温补脾胃之功效. 现代研究亦发现, 艾灸时的红外辐射可为机体细胞的代谢活动提供所必需的能量, 也能给缺乏能量的病态细胞提供活化能^[25]. 本研究成果显示, 脾虚模型大鼠空肠上皮细胞线粒体超微结构损伤, 呼吸链酶含量降低, 能量代谢障碍. 而艾灸可促进线粒体结构恢复, 增加呼吸链酶含量, 促进生物氧化, 改善能量代谢, 从而达到温补脾胃, 改善“脾主运化”功能的效应. 因此, 促进线粒体结构和功能恢复是艾灸温补脾胃改善脾虚证的重要环节.

4 参考文献

- 1 孙广仁. 中医基础理论. 第1版. 北京: 中国中医药出版社, 2004: 83
- 2 Liu Yz. Exploration of the nature of PI "spleen" in Traditional Chinese Medicine on a subcellular level: A study on the gastric mucosal ultrastructure of 51 cases of diarrhea due to weakness of function of "PI". *Traditional Chinese Medicine Digest* 1987; 11: 3-20
- 3 彭成, 雷载权. 四君子汤对消化、运动、吸收作用的实验研究. *中药药理与临床* 1995; 11: 6-8
- 4 江玉, 王明杰. 脾虚证的研究进展. *泸州医学院学报* 2006; 29: 269-270
- 5 王贵华. 温针灸治疗脾虚湿困型慢性结肠炎80例. *中国针灸* 2006; 26: 351
- 6 何邦广, 吴海标, 钱火辉. 温针灸治疗脾虚型溃疡性结肠炎临床观察. *吉林中医药* 2009; 29: 410-411
- 7 余华, 王文莉. 麦粒灸治疗脾虚泄泻证的临床研究. *中国针灸* 2001; 21: 131-134
- 8 曹锐, 黄芳. 灸法在常见脾胃病治疗中的应用. *中国实用乡村医生杂志* 2007; 14: 23-24
- 9 王乐. 脾虚证实验研究概况. *辽宁中医杂志* 2007; 34: 246-247
- 10 Huang ML, Becker EM, Whitnall M, Suryo Rahmanto Y, Ponka P, Richardson DR. Elucidation of the mechanism of mitochondrial iron loading in Friedreich's ataxia by analysis of a mouse mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 16381-16386
- 11 翟中和, 王喜中, 丁明孝. *细胞生物学*. 第1版, 北京: 高等教育出版社, 2001: 208
- 12 McBride HM, Neuspiel M, Wasiak S. Mitochondria: more than just a powerhouse. *Curr Biol* 2006; 16: R551-R560
- 13 刘友章, 宋雅芳, 劳绍贤, 邓铁涛, 王建华. 胃脘痛患者胃黏膜超微结构研究及中医“脾-线粒体相关”理论探讨. *中华中医药学刊* 2007; 25: 2439-2442
- 14 刘友章, 王昌俊, 周俊亮, 刘静, 刘兆周, 欧志穗, 金友. 长期脾虚模型大鼠细胞线粒体的研究. *中华中医药学刊* 2006; 24: 391-394
- 15 郑敏麟, 阮诗玮. 中医藏象实质细胞生物学假说之一——“脾”与线粒体. *中国中医基础医学杂志* 2002; 8: 10-12

- 16 Jongpipitvanich S, Sueblinvong T, Norapucsunton T. Mitochondrial respiratory chain dysfunction in various neuromuscular diseases. *J Clin Neurosci* 2005; 12: 426-428
- 17 Armstrong C, Staples JF. The role of succinate dehydrogenase and oxaloacetate in metabolic suppression during hibernation and arousal. *J Comp Physiol B* 2010; 180: 775-783
- 18 刘旺根, 王红霞, 王雪萍. 黄芪建中汤对大鼠脾虚证胃粘膜酶组织化学的影响. *浙江中医杂志* 2004; 39: 355-356
- 19 王艳杰, 柳春, 王德山. 实验性脾气虚证大鼠脑组织酶含量变化的实验研究. *辽宁中医药大学学报* 2008; 10: 736-738
- 20 任周新. 补中益气丸对脾虚大鼠血压的影响及其机理初探. *河南中医学院学报* 2004; 19: 16-17
- 21 孙恩亨, 谢锦玉. 脾气虚大鼠骨骼肌中某些元素、酶及能荷的变化. *中国中西医结合杂志* 1993; 13: 736-738
- 22 宋雅芳, 王汝俊, 刘友章, 刘静, 黄秋凌. 健脾益气中药对脾虚大鼠肝组织线粒体功能的影响. *中药新药与临床药理* 2009; 20: 423-426
- 23 Pecina P, Houstkova H, Hansikova H, Zeman J, Houstek J. Genetic Defects of Cytochrome C Oxidase Assembly. *Physiol Res* 2004; 53(Suppl 1): S213-S223
- 24 刘友章, 王昌俊, 周俊亮, 刘静, 刘兆周, 欧志穗, 金友. 四君子汤修复脾虚大鼠线粒体细胞色素氧化酶的作用及机制. *中国临床康复* 2006; 10: 118-122
- 25 王丽君. 艾灸疗法结合脾胃调理治疗前期糖尿病20例. *中国医药导报* 2010; 7: 108-109

编辑 曹丽鸥 电编 闫晋利

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011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496位胃肠病学和肝病专家支持的开放存取的同行评议的旬刊杂志, 旨在推广国内各地的胃肠病学和肝病领域临床实践和基础研究相结合的最具有临床意义的原创性及各类评论性的文章, 使其成为一种公众资源, 同时科学家、医生、患者和学生可以通过这样一个不受限制的平台来免费获取全文, 了解其领域的所有的关键的进展, 更重要的是这些进展会为本领域的医务工作者和研究者服务, 为他们的患者及基础研究提供进一步的帮助。

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

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

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

PEMT基因G175A和rs12325817位点多态性与非酒精性脂肪肝的关系

唐 华, 王旭霞, 赵曙光, 王景杰, 张 超, 卢 王, 李慧艳, 闻勤生

唐华, 王旭霞, 赵曙光, 王景杰, 张超, 卢王, 李慧艳, 闻勤生, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院消化内科 陕西省西安市 710038

唐华, 主治医师, 主要从事非酒精性脂肪肝的发生机制研究。

作者贡献分布: 此课题由唐华、王旭霞、赵曙光、王景杰、张超、卢王、李慧艳及闻勤生设计; 研究过程由唐华、王旭霞、赵曙光、王景杰、张超、卢王及李慧艳完成; 标本收集由王景杰、张超、卢王、李慧艳及闻勤生完成; 论文的撰写和校正由唐华、王旭霞及闻勤生共同完成。

通讯作者: 闻勤生, 主任医师, 710038, 陕西省西安市, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院消化内科。

wengqss@yahoo.com.cn

收稿日期: 2011-08-12 修回日期: 2011-10-10

接受日期: 2011-10-13 在线出版日期: 2011-10-18

Association between the G175A and rs12325817 polymorphisms in the phosphatidylethanolamine N-methyltransferase gene and susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease

Hua Tang, Xu-Xia Wang, Shu-Guang Zhao, Jing-Jie Wang, Chao Zhang, Wang Lu, Hui-Yan Li, Qin-Sheng Wen

Hua Tang, Xu-Xia Wang, Shu-Guang Zhao, Jing-Jie Wang, Chao Zhang, Wang Lu, Hui-Yan Li, Qin-Sheng Wen, Department of Gastroenterology, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University of Chinese PLA, Xi'an 710038, Shaanxi Province, China

Correspondence to: Qin-Sheng Wen, Professor, Department of Gastroenterology, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University of Chinese PLA, Xi'an 710038, Shaanxi Province, China. wengqss@yahoo.com.cn

Received: 2011-08-12 Revised: 2011-10-10

Accepted: 2011-10-13 Published online: 2011-10-18

Abstract

AIM: To investigate whether there is an association between the G175A and rs12325817 single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the phosphatidylethanolamine N-methyltransferase (PEMT) gene and susceptibility to non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD).

METHODS: The G175A and rs12325817 SNPs were genotyped using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism

in 156 patients with NAFLD and 188 healthy controls. Clinical parameters were compared between NAFLD patients and controls.

RESULTS: The genotype and allele frequency of G175A and rs12325817 were significantly different between NAFLD patients and controls (G175A: $P = 0.03$; rs12325817: $P = 0.00075$). The frequency of A allele in the G175A locus and C allele in the rs12325817 locus were significantly higher in the NAFLD group (G175A: $P = 0.002$; rs12325817: $P = 0.00025$) than in the control group, which indicates that these alleles are risk factors for NAFLD.

CONCLUSION: The G175A and rs12325817 polymorphisms in the PEMT gene are associated with susceptibility to NAFLD

Key Words: Nonalcoholic fatty liver disease; Phosphatidylethanolamine N-methyltransferase gene; Gene polymorphisms

Tang H, Wang XX, Zhao SG, Wang JJ, Zhang C, Lu W, Li HY, Wen QS. Association between the G175A and rs12325817 polymorphisms in the phosphatidylethanolamine N-methyltransferase gene and susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(29): 3035-3039

摘要

目的: 研究磷脂酰乙醇胺N甲基转移酶基因(PEMT)G175A和rs12325817位点多态性与非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)的关系。

方法: 运用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性检测156例NAFLD患者和188名健康对照PEMT基因G175A和rs464396基因型, 等位基因频率分布, 分析NAFLD患者与对照组临床各项指标的变化。

结果: G175A和rs12325817位点基因型及等位基因频率分布在NAFLD组及对照组之间均存在显著性差异(G175A: $P = 0.03$; rs12325817: $P = 0.00075$), 其中, G175A位点A等位基因

■背景资料

非酒精性脂肪肝(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)是肝功能异常的最常见原因, 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

刘宝瑞, 教授, 南京大学医学院附属鼓楼医院肿瘤中心

■相关报道

PEMT基因缺失的纯合子小鼠肝脏不能表达任何PEMT活性,即使通过饮食补充胆碱,也不能获得正常体内需要的胆碱代谢产物,最终发展至脂肪肝。

表 1 候选多态性位点的引物, 退火温度, PCR产物长度及酶切片段

位点	引物	退火条件	产物(bp)	酶	酶切片段(bp)
G175A	F: 5'TGGTGGCCCTCACCTACATAGTGGCTCTCCTATA3' R: 5'TATGTAGGTGAGGGCCACCAGCACCAGTCAG3'	58 °C 30 s	207	Sma I	G: 93+114 A: 207
rs12325817	F: 5'ACTTCCTGGGTTGAAGCGATTCTC3' R: 5'TTTATTCTCTGGCCGTGCCAG3'	60 °C 30 s	224	BsmB I	A: 224 G: 92+132

和rs12325817位点C等位基因频率分布在NAFLD组显著高于对照组(G175A: $P = 0.002$; rs12325817: $P = 0.00025$), 提示A和C等位基因为NAFLD发病的危险因子。

结论: PEMT 基因G175A和rs12325817位点多态性均与NAFLD的易感性相关, 且rs12325817与NAFLD的相关性尤以女性更为显著。

关键词: 非酒精性脂肪肝; 磷脂酰乙醇胺N甲基转移酶基因; 基因多态性

唐华, 王旭霞, 赵曙光, 王景杰, 张超, 卢王, 李慧艳, 闻勤生. PEMT基因G175A和rs12325817位点多态性与非酒精性脂肪肝的关系. 世界华人消化杂志 2011; 19(29): 3035-3039
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/3035.asp>

0 引言

非酒精性脂肪肝(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)是肝功能异常的最常见原因, 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^[1], 其发病机制尚未阐明。肥胖, 糖尿病和高甘油三酯血症被认为是预测性危险因素。磷脂酰乙醇胺N甲基转移酶(phosphatidylethanolamine N-methyltransferase gene, PEMT)催化合成磷脂, 有研究表明PEMT与NAFLD的发生与发展相关^[2]。关于NAFLD与PEMT基因多态性的研究目前开展较少, 本研究通过用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)法检测NAFLD患者与正常人群PEMT基因G175A和rs464396的多态性分布, 分析其与NAFLD发病的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 NAFLD组, 2007-12/2010-07经我院临床、腹部B超及实验室检查诊断为NAFLD的患者, 诊断标准参照按中华医学会肝病学分会NAFLD标准^[3]。剔除有饮酒史(折合乙醇量每周>40 g, 持续1年以上)、病毒性肝炎、药物性

肝病等患者。入选NAFLD组156例, 其中男80例, 女76例, 平均年龄(57.85±12.75)岁。健康对照组188例, 男性92例, 女性96例, 平均年龄(57.67±12.50)岁, 排除一级亲属中有II型糖尿病、高血压、高脂血症及其他代谢性疾病者。NAFLD组与对照组在性别、年龄等方面均具可比性。

1.2 方法

1.2.1 指标检测: 所有研究对象于清晨采空腹静脉血10 mL, 用于血糖(FPG)、肝功能、血脂指标检测, 肝功能等生化指标。用酶联免疫吸附法检测空腹胰岛素(FINS)、胰岛素抵抗采用稳态模式评估法的胰岛素抵抗指数(homeostatic metabolic assessment, HOMA-IR)指标(即空腹血胰岛素水平($\mu\text{U/mL}$) \times 空腹血糖水平(mmol/L) $\div 22.5$, 当患者HOMA-IR>2, 定义为IR)。并进行人体测量, 包括身高、体质量、腰围(经肋缘和髂连线中点)和臀围(耻骨联合上缘, 两侧经大转子, 后经臀部最突出部位), 计算身高体质量指数(BMI) = 体质量(kg)/[身高(m)]²和腰臀比(WHR) = 腰围(cm)/臀围(cm), 用体脂仪检测体内脂肪分布, 用B超检测肝脏回声, 间接了解肝脏的脂肪分布情况。另取5 mL血, 经EDTA抗凝, 离心分离血浆和血细胞, 分装后置于-84 °C冰箱以备检测PEMT基因型。

1.2.2 DNA标本提取: 按基因组DNA纯化试剂盒(Promega)说明书从外周血单核细胞中提取基因组DNA, 紫外仪(Beckman Coulter)定量后冻存于-20 °C备用。

1.2.3 聚合酶链反应: 采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)法, G175A检测引物按参考文献[4,5]合成, rs12325817检测引物参照文献[6]合成。所有位点的引物, 产物长度, PCR反应退火温度, 酶切片段(表1)。PCR扩增采用12 μL 反应体系, 含50-200 ng基因组DNA, 2 \times PCR缓冲液, 15 mmol/L MgCl_2 , dNTPs(2 mmol/L), 5 $\mu\text{mol/L}$ 引物, 0.5 U Tag酶(北京天根)。PCR反应条件如下: 95 °C预变性5 min; 95 °C变性30 s, 一定的退火温度30 s, 72 °C延伸40 s, 共30个循环; 72 °C延伸5 min, 最后4 °C保存。

表 2 NAFLD与对照组一般资料及多项人体测量指标和生化指标的比较

	对照组	NAFLD组	P值
年龄	57.67 ± 12.50	57.85 ± 12.75	0.8953
BMI(kg/m ²)	22.24 ± 2.65	26.11 ± 2.78	0.0072
SBP(mmHg)	137.81 ± 19.28	140.53 ± 19.66	0.1984
DBP(mmHg)	81.07 ± 9.37	81.90 ± 9.85	0.4269
腰围	83.28 ± 10.71	86.98 ± 8.31	0.0005
腰臀比(WHR)	0.85 ± 0.08	0.95 ± 0.07	<0.001
TC(mmol/L)	4.91 ± 0.75	5.05 ± 0.85	0.1098
TG(mmol/L)	1.17 ± 0.04	2.33 ± 0.19	<0.001
ALT(u/L)	28.68 ± 2.99	29.23 ± 2.69	0.0765
AST(u/L)	32.90 ± 2.12	33.40 ± 2.65	0.0527
LDL-C(mmol/L)	3.24 ± 0.65	3.64 ± 0.58	<0.001
HDL-C(mmol/L)	1.82 ± 0.78	1.94 ± 0.84	0.1740
FPG	5.15 ± 0.79	5.67 ± 1.53	<0.001
FINS	8.35 ± 4.14	10.74 ± 6.44	<0.001
HOMA-IR	1.97 ± 1.17	2.80 ± 1.96	<0.001

BMI: 体质指数; SBP: 收缩压; DBP: 舒张压; WHR: 腰臀比; TC: 血清总胆固醇; TG: 血清三酰甘油; ALT: 谷丙转氨酶; AST: 谷草转氨酶; HDL-C: 高密度脂蛋白胆固醇; LDL-C: 低密度脂蛋白胆固醇; FPG: 空腹血糖; FINS: 空腹胰岛素; HOMA-IR: 胰岛素抵抗指数。

1.2.4 限制性酶切检测: 取5 μ L PCR产物, 建立总体积为20 μ L的酶切反应体系, 加入相应的限制性酶(NEB, 北京), 37 $^{\circ}$ C温育过夜, 4 $^{\circ}$ C水浴15 min终止反应。酶切产物用2.5%琼脂糖凝胶(含溴化乙锭)电泳分离, 经凝胶成像仪系统(BIO-RAD, 美国)处理后进行基因型判读, 记录并保存结果。

统计学处理 Modified Powerstats软件(promerge)检验样本基因型分布是否符合Hardy-Weinberg平衡定律, 以确认样本是否具有代表性。基因型及等位基因频率采用直接计数法, 两组间差异用 χ^2 检验, 计量资料组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义, 以上检测均采用SPSS13.0统计软件。

2 结果

2.1 正常对照组与NAFLD组在一般资料, 人体测量及生化指标的比较 NAFLD组在年龄、性别构成与对照组相似, 具有可比性; 但BMI、腰围、腰臀比、TG、LDL-C、FPG、FINS、HOMA-IR高于对照组($P < 0.05$, 表2)。

2.2 PEMT基因G175A和rs12325817位点多态性的分布 NAFLD患者和正常对照G175A和rs12325817位点基因型及等位基因分布见表3、图1及图2。这两个位点不论在NAFLD组及对照组, 其基因型频率分布均符合Hardy-Weinberg平衡定律($P > 0.05$)。G175A和rs12325817位点基因型频率分布在NAFLD组及对照组之间均存

■创新盘点

本研究发现rs123-25817与NAFLD得易感性相关, 且存在性别差异。此结果提示性别差异可能与女性雌激素水平较男性高, 而该位点位于含有雌激素反应元件的PEMT启动子区有关。

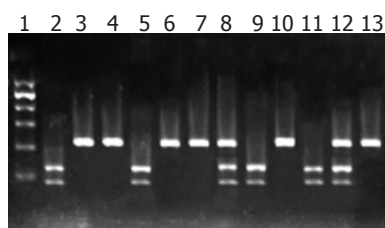


图 1 PEMT基因G175A位点琼脂糖分型。1: Marker I; 2, 5, 9, 11: GG基因型; 3, 4, 6, 7, 10, 13: AA基因型; 8, 12: GA基因型。

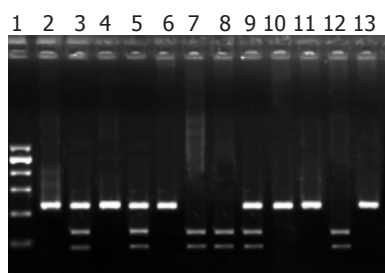


图 2 PEMT基因rs12325817位点琼脂糖分型。1: Marker I; 2, 4, 6, 10, 11, 13: AA基因型; 7, 8, 12: GG基因型; 3, 5, 9: GA基因型。

在显著性差异(G175A: $P = 0.03$; rs12325817: $P = 0.00075$), 其中, G175A位点A等位基因频率分布在NAFLD组显著高于对照组($P = 0.002$)。rs12325817位点C等位基因频率分布在NAFLD组显著高于对照组($P = 0.00025$)。将所有样本按照性别分组, G175A位点基因型及等位基因频率分布在不同性别NAFLD组及对照组没有显著性差异, 而rs12325817位点女性样本中基因型频率

■同行评价

本研究从PEMT基因位点多态性角度探索非酒精性脂肪肝的发病机制,得到一些可靠的实验结论,有一定的科学意义。

表 3 PEMT基因G175A和rs12325817位点基因型及等位基因频率分布

		NAFLD组 <i>n</i> (%)	对照组 <i>n</i> (%)
G175A基因型	AA	3(1.9)	2(1.1%)
	AG	61(39.1)	43(22.9%)
	GG	92(59.0)	143(76.1%)
		$\chi^2 = 11.506, P = 0.003$	
G175A等位基因	A	67(21.50)	47(12.50%)
	G	245(78.50)	329(87.50%)
		$\chi^2 = 9.934, P = 0.002, OR = 1.914, 95\%CI = 1.273-2.879$	
rs12325817基因型	GG	43(27.6)	97(51.1%)
	CG	85(54.5)	79(42.0%)
	CC	28(17.9)	13(6.9%)
		$\chi^2 = 23.139, P = 0.00075$	
rs12325817等位基因	G	171(54.8)	271(72.1%)
	C	141(45.2)	105(27.9%)
		$\chi^2 = 22.131, P = 0.00025, OR = 2.128, 95\%CI = 1.550-2.922$	

表 4 PEMT基因rs12325817位点在男女性样本中基因型及等位基因频率分布

			NAFLD组 <i>n</i> (%)	对照组 <i>n</i> (%)
男性	rs12325817基因型	GG	29(36.3)	46(50.0)
		CG	38(47.5)	35(38.0)
		CC	13(16.3)	11(12.0)
			$\chi^2 = 3.322, P = 0.190$	
	rs12325817等位基因	G	96(60.0)	127(69.0)
		C	64(40.0)	57(31.0)
		$\chi^2 = 3.055, P = 0.080, OR=1.485, 95\%CI=0.952-2.317$		
女性	rs12325817基因型	GG	20(26.3)	44(45.8)
		CG	45(59.2)	43(44.8)
		CC	11(14.5)	9(9.4)
			$\chi^2 = 7.015, P = 0.030$	
	rs12325817等位基因	G	85(55.9)	131(68.2)
		C	67(44.1)	61(31.8)
		$\chi^2 = 5.501, P = 0.019, OR=1.693, 95\%CI=1.089-2.632$		

分布在NAFLD组与对照组存在显著性差异(表4, $P = 0.030$), C等位基因频率在NAFLD组显著高于对照组($P = 0.019$), 而在男性样本中则基因型及等位基因频率分布均没有显著性差异(基因型: $P = 0.190$; 等位基因: $P = 0.080$).

3 讨论

大量流行病学资料显示, NAFLD与肥胖、II型糖尿病、血脂异常以及高血压等代谢综合征有密切相关^[7], 而我们的研究也证实了这一点, BMI指数NAFLD显著高于对照组, 多项血脂指标在NAFLD组及对照组间均存在显著性差异。

磷脂中磷脂酰胆碱(phosphatidylcholine, PC)是构成肝细胞膜的主要成分, PC合成途径除了

其他组织具有的CDP胆碱通路以外, 还具有一条独特的通路, 即磷脂酰乙醇胺N-甲基转移酶(phosphatidylethanolamine N-methyltransferase, PEMT)催化磷脂酰乙醇胺(phosphatidylethanolamine, PE)甲基化生成PC的通路^[8]. 当饮食中胆碱摄入不足的时候, PEMT活性呈显著的正调节表达. 实验动物给以低蛋氨酸和低胆碱饮食可引起脂肪性肝炎并伴有纤维化, 同时有PEMT显著地呈正调节表达. 肝脏病变时PEMT活性降低, 肝脏磷脂酰胆碱合成不足, 结果必然形成脂肪肝^[9,10]. 对PEMT基因敲除动物模型的研究发现, PEMT基因缺失的纯合子小鼠肝脏不能表达任何PEMT活性, 即使通过饮食补充胆碱, 也不能获得正常体内需要的胆碱代谢产物, 最终发展

至脂肪肝^[11,12]。由于PC与胆碱缺乏与NAFLD发病密切相关, 而PEMT对于PC和胆碱的合成有重要的影响, 因此研究认为PEMT参与了NAFLD发病的重要环节。

PEMT基因主要在肝脏组织中表达, 激活后可调控与葡萄糖的产生、转运、利用及脂肪代谢的调节相关的基因的表达。Song等^[4]的研究首次报道PEMT基因175位点外显子8存在G/A转换(G175A, 5465G→A, 即Val-Met, NCBI编号为rs7926)导致氨基酸置换, 由于氨基酸的改变致该酶功能丧失30%而增加患非酒精性脂肪肝的风险^[4,13], 但是没有研究证实该多态性位点与胆碱缺乏有关^[14], 这种基因多态性在NAFLD患者发生率相当于正常人的1.7倍, Dong等^[13]对日本人群中PEMT基因G175A突变与非酒精性脂肪性肝炎(NASH)的关系进行研究发现, G175A位点突变型等位基因A携带者比野生型等位基因G携带者发生NASH的危险性增加。之后也有研究证实在高加索人群脂肪肝患者中G175A位点非常常见^[15]。我们的研究显示, 该位点A等位基因及A等位基因携带者基因型频率在NAFLD组显著高于对照组, 这与我国黄红丽^[5]的研究结果相一致, 提示A等位基因可能增加了NAFLD疾病的易感性。

rs12325817(-744 G/C), 位于PEMT基因启动子上游744bp处, 由da Costa等^[14]首次发现, 当采用低胆碱饮食时78%的C等位基因携带者发展为器官功能障碍, 考虑到该效果存在性别差异, 该研究小组推测由于该位点位于PEMT启动子上, 该启动子区含雌激素反应元件, 由于G被C的替换, 改变启动子对雌激素的反应性, 引起酶活性减弱, 减少PC合成。我们的研究结果同样发现rs12325817与NAFLD的易感性相关, 且存在性别差异。此结果提示性别差异可能与女性雌激素水平较男性高, 而该位点位于含有雌激素反应元件的PEMT启动子区有关。该位点与NAFLD的相关性研究尚需要在其他民族和群体进一步证明。

总之, NAFLD的病因机制复杂, 目前主要以代谢综合征及遗传因素为研究热点。在NAFLD的发病机制及发展进程中, PEMT所起的作用需要更进一步的研究探讨。

4 参考文献

- Browning JD, Horton JD. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J Clin Invest* 2004; 114: 147-152
- Zhou YJ, Li YY, Nie YQ, Yang H, Zhan Q, Huang J, Shi SL, Lai XB, Huang HL. Influence of polygenetic polymorphisms on the susceptibility to non-alcoholic fatty liver disease of Chinese people. *J Gastroenterol Hepatol* 2010; 25: 772-777
- 中华医学会肝脏病学分会脂肪肝和酒精性肝病学组. 非酒精性脂肪肝病诊断标准. *中华肝脏病杂志* 2003; 11: 71
- Song J, da Costa KA, Fischer LM, Kohlmeier M, Kwock L, Wang S, Zeisel SH. Polymorphism of the PEMT gene and susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). *FASEB J* 2005; 19: 1266-1271
- 黄红丽, 李瑜元, 聂玉强, 周永健, 沙卫红, 杜艳蕾, 王红. 磷脂酰乙醇胺N甲基转移酶基因G175A多态性与非酒精性脂肪肝的关系. *广东医学* 2008; 29: 1092-1094
- Xu X, Gammon MD, Zeisel SH, Lee YL, Wetmur JG, Teitelbaum SL, Bradshaw PT, Neugut AI, Santella RM, Chen J. Choline metabolism and risk of breast cancer in a population-based study. *FASEB J* 2008; 22: 2045-2052
- Koek GH. [Treatment of non-alcoholic fatty liver disease]. *Ned Tijdschr Geneesk* 2011; 155: A3181
- Oe K, Ochi T, Hayase Y, Saibara T. [Nonalcoholic steatohepatitis (NASH) and nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD)]. *Nihon Rinsho* 2011; 69 Suppl 1: 406-409
- Dowman JK, Armstrong MJ, Tomlinson JW, Newsome PN. Current therapeutic strategies in non-alcoholic fatty liver disease. *Diabetes Obes Metab* 2011; 13: 692-702
- Saibara T, Ono M. Phosphatidylcholine could have a key role in the pathogenesis of steatohepatitis - Reply. *J Hepatol* 2007; 47: 869-870
- Zhu X, Song J, Mar MH, Edwards LJ, Zeisel SH. Phosphatidylethanolamine N-methyltransferase (PEMT) knockout mice have hepatic steatosis and abnormal hepatic choline metabolite concentrations despite ingesting a recommended dietary intake of choline. *Biochem J* 2003; 370: 987-993
- Tarquini R, Lazzeri C, Boddi M, Marra F, Abbate R, Gensini GF. [Non-alcoholic fatty liver disease: a new challenge for cardiologists]. *G Ital Cardiol (Rome)* 2010; 11: 660-669
- Dong H, Wang J, Li C, Hirose A, Nozaki Y, Takahashi M, Ono M, Akisawa N, Iwasaki S, Saibara T, Onishi S. The phosphatidylethanolamine N-methyltransferase gene V175M single nucleotide polymorphism confers the susceptibility to NASH in Japanese population. *J Hepatol* 2007; 46: 915-920
- da Costa KA, Kozyreva OG, Song J, Galanko JA, Fischer LM, Zeisel SH. Common genetic polymorphisms affect the human requirement for the nutrient choline. *FASEB J* 2006; 20: 1336-1344
- Zeisel SH. People with fatty liver are more likely to have the PEMT rs7946 SNP, yet populations with the mutant allele do not have fatty liver. *The FASEB Journal* 2006; 20: 2181-2182

编辑 李军亮 电编 闫晋利

EBV感染与胃癌关系的研究进展

陈江, 朱冠保

■背景资料

胃癌的病因研究一直为国内外学者所重视,但其致病机制至今尚未完全明了,认为可能与遗传、饮食、环境及生物等多种因素有关。其中,EBV感染与胃癌发生的关系在近年来已逐渐成为研究热点。

陈江, 朱冠保, 温州医学院附属第一医院胃肠外科 浙江省温州市 325000

浙江省自然科学基金资助项目, No. Y2100660

作者贡献分布: 本文综述由陈江完成, 朱冠保审核。

通讯作者: 朱冠保, 教授, 主任医师, 325000, 浙江省温州市, 温州医学院附属第一医院胃肠外科. zgbwmc@yahoo.com.cn

收稿日期: 2011-08-30 修回日期: 2011-10-02

接受日期: 2011-10-13 在线出版日期: 2011-10-18

Advances in understanding the relationship between Epstein-Barr virus infection and gastric carcinoma

Jiang Chen, Guan-Bao Zhu

Jiang Chen, Guan-Bao Zhu, Department of Gastrointestinal Surgery, the First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325000, Zhejiang Province, China
Supported by: the Natural Science Foundation of Zhejiang Province, No. Y2100660

Correspondence to: Guan-Bao Zhu, Professor, Department of Gastrointestinal Surgery, the First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325000, Zhejiang Province, China. zgbwmc@yahoo.com.cn

Received: 2011-08-30 Revised: 2011-10-02

Accepted: 2011-10-13 Published online: 2011-10-18

Abstract

Epstein-Barr virus (EBV) plays an important role in gastric carcinogenesis and EBV infection is closely related to the development and progression of gastric cancer. Advances in molecular biology techniques have deepened our understanding of the characteristics of EBV-associated gastric cancer (EBVaGC). It has been found that latent EBV infection and EBV-induced malignant transformation are an important basis for the pathogenesis of EBVaGC. Understanding the pathogenesis of EBVaGC provides a theoretical basis for the diagnosis, treatment and prevention of this disease.

Key Words: Epstein-Barr virus; Gastric carcinoma; EBV-associated gastric carcinoma

■同行评议者

刘冰熔, 教授, 黑龙江省哈尔滨医科大学附属第二临床医院消化内科

Chen J, Zhu GB. Advances in understanding the relationship between Epstein-Barr virus infection and gastric carcinoma research. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2011; 19(29): 3040-3045

摘要

EB病毒(Epstein-Barr virus, EBV)是引起胃癌的重要生物学因素之一,其感染与胃癌的发生和发展密切相关。随着分子生物学技术的发展和运用,研究者对与EBV感染相关胃癌(EBVaGC)的特征和发生机制进行了深入研究,发现EBV潜伏感染和细胞恶性转化是EBV致EBVaGC的重要基础,为EBVaGC的诊断、治疗和预防提供了理论基础。

关键词: EB病毒; 胃癌; EBV相关胃癌

陈江, 朱冠保. EBV感染与胃癌关系的研究进展. 世界华人消化杂志 2011; 19(29): 3040-3045

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/3040.asp>

0 引言

胃癌是我国最常见的消化系统恶性肿瘤,也是世界范围内占第2位的恶性肿瘤。目前我国新发胃癌患者呈现年轻化趋势^[1]。胃癌的病因研究一直为国内外学者所重视,但其致病机制至今尚未完全明了,认为可能与遗传、饮食、环境及生物等多种因素有关。其中,EBV感染与胃癌发生的关系在近年来已逐渐成为研究热点。自1990年首次报道^[2]1例EBV阳性胃癌以来,越来越多的证据表明,EBV感染不但与多种人类恶性肿瘤如伯基特淋巴瘤(Burkitt lymphoma, BL)、鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)、传染性单核细胞增多症、霍奇金病(hodgkin's disease, HD)、淋巴瘤等密切相关,而且与部分胃癌,尤其是胃腺癌的发生有关。Tokunaga等^[3]将“经EBER-ISH证实胃癌细胞EBER阳性者”定义为EB病毒(Epstein-Barr virus, EBV)相关胃癌。各国学者对EBV的结构、功能、生物学特性、致癌机理等进行了大量的研究,从分子和基因水平对EBV感染与胃癌之间的关系进行了深入的研究,目前广泛认为EBV潜伏感染和细胞恶性转化可能是其致癌的重要基础。本文就近年来EBV感染与胃癌之间的致癌机制、预后及防治等方面的研究进展综述如下。

1 EBV结构特征

EBV属疱疹病毒科的 γ 亚科, 是淋巴细胞病毒属的双链DNA病毒. EBV的形态与其他疱疹病毒相似, 由核心、蛋白衣壳及包膜三部分组成. 核心主要含双股线性DNA, 其长度随不同毒株而异, 平均为 17.5×10^4 bp, 病毒衣壳为20面体立体对称, 由162个壳微粒组成. 包膜是EBV成熟释放时, 披载感染细胞的核膜组成, 其上有病毒基因编码的糖蛋白, 有识别淋巴细胞上的EBV受体的位点, 及可介导细胞融合等功能. EBV主要感染B淋巴细胞和上皮细胞并可处于潜伏状态而形成潜伏感染, 但在某些因素的诱导下, 可发生增殖感染, 或恶性转化而形成肿瘤细胞. 被病毒感染的细胞可在EBV的基因组的指导下产生各种EBV相关抗原, 包括: (1)EBV增殖感染相关抗原: EBV早期抗原(EBV early antigen, EA), EBV衣壳抗原(EB Viral capsid antigen, VCA), EBV膜抗原(EB Membrane antigen, MA); (2)EBV潜伏感染相关抗原: EBV核抗原(Epstein-Barr virus nuclear antigen, EBNA), 包括EBNA1、EBNA2、EBNA3A、EBNA3B、EBNA3C和主导蛋白, EBV潜伏膜蛋白(EB Latent membrane protein, LMP), 包括LMP1、LMP2A、LMP2B; (3)其他: EBV编码的早期核糖核酸(EB - encoded RNAs, EBERs), 包括EBER1、EBER2; 终末蛋白(TP), 包括TP1和TP2^[4].

2 EBV感染与胃癌的关系

EBV在人群中有很高的感染率. 人类通常在婴幼儿时期就已感染了EBV, 约98%的成人终身携带EBV^[5]. 自从报道第一例EBV相关胃癌以来, 越来越多的学者研究发现EBV感染与胃癌的发生有关. zur Hausen等^[6]报道, 全球近10%的胃癌与EBV感染相关. 但各国家或地区之间又有明显的差异性: 北美为16%^[7]; 俄罗斯学者^[8]研究了俄罗斯四个地区胃癌病人EBV感染率为7.3%-15%; 在日本约7%^[9]; 福建地区为10.3%^[10]; 浙江温州地区为17.5%^[11]. EBV在胃癌标本的检出率的这种差异性虽然可能与种族、地区不同有关, 但也可能与不同学者的研究方法不同, 特别是选择的胃癌病理类型和组织学特征不同有密切关系. 有研究表明, 间质中有明显淋巴细胞浸润的胃癌(包括淋巴上皮瘤样癌)的EBV感染阳性率远高于其他类型病例^[12]. EBV相关性胃癌多见于男性和有显著淋巴细胞浸润的病例^[13]. 最近关于EBV相关残胃癌(EBVaGRC)的研究进一步证实了手

术后残胃促发作用^[14]. 采用PCR、DNA原位杂交和EBERs原位杂交技术等, 相继在多种类型的胃癌组织中均可检测到EBV, 但以胃腺癌为多见. 因此, EBV与胃癌的相关性得以证实.

3 EBV感染途径和方式

EBV感染途径至今尚未完全阐明, 有研究表明, EBV主要感染淋巴细胞, 也可感染上皮细胞和成纤维细胞等. EBV在体外优先感染B淋巴细胞^[15], 其细胞表面表达丰富的CD21分子(EBV的受体), 能与EBV表面的包膜糖蛋白gp350/220结合, 并通过受体介导的细胞内吞噬作用进入B淋巴细胞. 随后病毒的外膜与细胞质小泡发生融合, 将病毒衣壳释放到细胞质内, 后被输送至细胞核, 随着病毒基因组的环化而形成游离体, 因而EBV感染与多种淋巴细胞系统恶性肿瘤的发生密切相关. EBV血清抗体阳性或鼻咽部感染EBV者, 咽喉部位脱落的细胞常有大量病毒排出, 所以推测在与EBV携带者的密切接触或自身咽部受EBV感染者, EBV可通过唾液或饮食下行到胃^[16]. 一方面, 胃黏膜损伤部位易聚集淋巴细胞或有淋巴细胞经过, EBV通过感染淋巴细胞, 进入淋巴系统^[17], 这可能是EBV进一步感染、传播及致胃癌形成的重要步骤; 另一方面, EBV可直接感染某些胃黏膜上皮细胞, 具体机制较为复杂, 可能有以下几种方式^[18]: (1)受体间结合, 即EBV通过CD21依赖性方式感染CD21分子阳性的上皮细胞; (2)细胞间融合, 即上皮细胞与EBV阳性的B淋巴细胞紧密接触引起上皮细胞感染; (3)VCA/IgA抗体介导EBV感染上皮细胞; (4)EBV包膜糖蛋白复合体参与EBV对上皮细胞的感染.

4 EBV感染致胃癌机制

现今大部分观点认为EBV潜伏感染和细胞恶性转化是EBV致癌的重要基础. 其中EBV核抗原(Epstein-Barr virus nuclear antigen, EBNA)^[19]和EBV潜伏膜蛋白(EB Latent membrane protein, LMP)^[20]基因为公认的EBV转化基因. 研究发现, 几乎所有EBV感染和转化的细胞核内都可检出EBV核抗原, 包括EBNA1, EBNA2, EBNA3A, EBNA3B, EBNA3C和EBNA4.

EBNA1与EBV基因组复制和稳定性有关, 他含有多个甘氨酸-丙氨酸重复序列, 该重复序列为转化所必须, 可通过顺式作用方式抑制抗原递呈细胞对自身的加工处理, 使CTL不能识别

■相关报道

越来越多的证据表明, EBV感染不但与多种人类恶性肿瘤如伯基特淋巴瘤(BL)、鼻咽癌(NPC)、传染性单核细胞增多症、霍奇金病(HD)、淋巴瘤等密切相关, 而且与部分胃癌, 尤其是胃腺癌的发生有关.

■同行评价

本文主要就近年来EBV感染与胃癌之间的致癌机制、预后及防治等方面的研究进展进行了综述,内容较丰富,结构合理,有一定参考价值。

自身的免疫表位从而逃避免疫应答, EBNA1在EBV的潜伏感染中表达, 推测在EBV相关肿瘤的发病中可能起相同的作用。一般认为EBNA2是B细胞转化的必需蛋白, 他可反式调控LMP1和cmyc, 并刺激CD23、CD21等产生。EBNA3包括EBNA3A、3B、3C。EBNA3A也与B细胞转化有关, EBNA3C可诱导CD21表达, 可能参与EBV感染细胞的转化过程; 而EBNA3B则不是细胞转化所必需的。EBNA4又称主导蛋白(leader protein, LP), 已发现LP能激发B细胞永生, 并能与EBNA2协同诱导周期素D2和推动细胞周期进程。通过与EBNA2酸性反式激活结构域相作用, LP可大大增加EBNA2反式激活LMP1表达的作用。

EBV潜伏膜蛋白(EB Latent membrane protein, LMP)是病毒潜伏感染增殖转化B细胞时出现的膜抗原, 包括LMP1, LMP2A, LMP2B。LMP1具有多种生物学活性, 是诱导B细胞转化的主要因子, 是目前已经证实的EBV恶性转化基因, 除转化B细胞外, 还能调控某些基因的表达, 如上调表皮生长因子受体(EGFR)、干扰素调节因子2和7、CD23、CD40、CD54等; 下调CD10等表达, 激活细胞黏附分子LFA1等的表达; LMP2A则可以显著增强LMP1对NF- κ B途径的激活作用, 提示LMP2A与LMP1两种膜蛋白相互配合, 共同促进上皮细胞转化^[21]。LMP2A另一个更为重要的作用是通过直接抑制BCR下游信号的传导或间接改变基因的转录调节PTK, 阻止EBV进入病毒的增殖期, 从而维持病毒的潜伏状态^[22]。

除EBNA和LMP外, 另一个被认为是EBV相关性胃癌的癌基因是BARF1(BamHI A rightward open reading frame1)^[23]。BARF1基因属于EBV裂解期中的早期基因, 普遍存在于EBV阳性的胃癌中, 约90%病毒相关胃癌组织中可检测到BARF1蛋白^[24], zur Hausen等^[6]对132例胃癌病人进行研究, 结果发现通过原位杂交方法检测出的10例EBV阳性胃癌中有9例存在BARF1基因转录本。最近的研究表明, BARF1在EBV潜伏感染状态亦可表达^[25]。BARF1能够诱导原代猴肾上皮细胞的永生^[26], 抑制紫杉醇诱导的人胃癌细胞的凋亡^[27], 增强NPC细胞的肿瘤原性^[28], 诱导小鼠成纤维细胞^[29]和EBV阴性的人B细胞系^[30]的恶性转化, 其编码的蛋白(p31)具有很强的促有丝分裂原活性^[31], BARF1基因能够全面增强胃癌细胞的肿瘤原性, 可能在EBV相

关胃癌发生与演化的整个过程中起重要作用^[32]。这些研究表明, BARF1属于EBV致癌基因, 且在不同种类细胞中的作用可能有所差异。通过基因芯片分析表明^[29], BARF1表达使胃癌细胞一些与细胞增殖、凋亡、周期、黏附等相关基因的表达量有明显上调, 说明BARF1基因对细胞状态的影响是全面的。最新研究表明, BARF1蛋白可能通过上调胃上皮细胞c-met和Bcl-2基因表达促进胃上皮细胞的增殖和抑制其凋亡, 从而促进细胞的恶性转化^[33]。研究者提出胃癌对BARF1的表达可能是EBV介导胃癌形成的一个途径, 并且BARF1将会成为治疗EBV相关胃癌的一个新靶子。

近年来, 又有研究表明EBVaGC中FasL蛋白表达的上调及TIL(tumor infiltrating lymphocytes)凋亡的降低有利于肿瘤细胞逃避机体免疫监视, 为肿瘤的发生发展创造条件^[34]。TIDC(tumor-induced cell death)及TIL-T可能在EBVaGC肿瘤免疫反应中起着重要的作用, TIDC可能对于TIL-T具有趋化作用^[35]。

5 EBV相关胃癌的筛查及检测方法

日本学者^[36]曾报道了用内镜超声(EUS)技术来鉴别EBV与早期胃癌的关系, 发现EBV相关性早期胃癌表现为一个低回声的黏膜下小结, 其特征是最大厚度与宽度的比值较EBV阴性的早期胃癌显著大, 在浸润至黏膜下的早期胃癌中这种情况更明显($P<0.05$), 并且在66.7%的EBV相关性早期胃癌中, 凹陷的病损均有隆起的正常黏膜包围($P<0.05$), 这项技术对EBV相关性胃癌的早期识别有较大的临床价值。

目前, EBV检测方法包括直接检测EBV基因组或其表达产物和EBV血清学检查两大类。前者常用的方法有Southern印迹(Southern Blot)、多聚酶链反应(PCR)和原位杂交(ISH)技术。虽然常规PCR法灵敏度高, 但是由于需要抽提组织中的EBV DNA, 可存在DNA的机械性破坏、DNA酶水解、沉淀后回收不全等众多因素的影响, 以及不能对EBV基因在细胞和分子水平上定位等限制, 其应用价值有限; 而核酸原位杂交技术(ISH)检测早期胃癌活检标本的EBV虽然灵敏度较低, 操作相对复杂, 不能检测拷贝数较低的病毒核酸, 但是由于EBER-1是转录时产生最多的RNA, 其致癌作用也已得到公认, 且结构稳定, 不宜被核酸酶降解, 因此认为, EBER-ISH是诊断EBV相关胃癌最可靠的指标。

血清学通常检测EBV抗体, 如抗壳抗原抗体(antiEBVCA, 抗VCA)、抗早期抗原抗体(antiEBEA, 抗EBEA)、抗核心抗原抗体(antiEBNA, 抗EB2NA)和抗膜抗原抗体(antiEBMA, 抗MA)等. 可用ELISA、间接免疫荧光法(indirect IF)测定抗VCA、EA、MA和EBNA的抗体^[37]. 间接IF法比ELISA法更敏感, 故目前普遍使用间接IF法. 但测定MA抗体时结果不稳定, 而且抗EBNA抗体含量少, 用常规方法常为阴性, 需用更敏感的抗补体免疫荧光法测定^[38]. 免疫酶技术较免疫荧光法敏感性稍高, 操作方便. Shinkura等^[39]认为EBV衣壳抗原IgA(VCA/IgA)可能是EBV相关性胃癌患者机体对EBV免疫应答反应的一个特殊标记物, 他们用荧光免疫法检测了64例EBV阳性和59例EBV阴性的胃癌患者血清中的抗体, 并用73例健康患者的血清标本作对照, 发现VCA/IgA是唯一的一个在EBV相关胃癌的血清中普遍存在, 并且其血清滴度显著升高的抗体, 而在EBV阴性胃癌和73例健康患者中却无此现象. 这一新发现具有重要的临床意义, 在临床上可以通过用ELISA法检测VCA/IgA对早期EBV阳性胃癌进行快速鉴别, 并可用来监测胃癌的发展、预后和疗效.

6 EBV相关胃癌的预后、防治及EBV疫苗的研究现状

EBV阳性胃癌具有分化程度低、恶性程度高、富于淋巴细胞浸润等病理特征^[40]. 实验表明, EBV阳性胃癌标本的淋巴结转移率明显低于EBV阴性胃癌标本, 而且EBV阳性胃癌有大量淋巴细胞浸润, 淋巴滤泡反应性增生, 说明EBV的感染可能增加了肿瘤细胞的免疫原性, 激活了免疫系统. 这使其在临床应用如手术方案选择及预后方面有一定的实用价值, 并对研究EBV在生物治疗方面提供了很好的启示. EBV相关胃癌的预防目前尚无有效方法, 国内关于EBV的疫苗研究虽有许多报道, 但至今尚缺乏一个有效的动物模型来检测疫苗的保护性作用. 因为即便EBV在肿瘤细胞中被消灭, 但这种病毒的DNA仍有可能带有致癌基因, 故欲用完整的病毒粒子制备疫苗显然不明智.

目前, 报道用基因工程方法构建的同时表达EBV gp320和HBsAg的痘苗疫苗^[41], 并对其表达稳定性和体液免疫效果进行了研究. 另外, 以CHO细胞为代表的哺乳动物表达系统是生产基因工程疫苗的重要系统, 他能进行正确的糖基

化和其他转录后加工, 表达产物的高级结构、理化性质和抗原性最为接近天然分子, 外源基因整合到染色体中, 比较容易获得稳定表达的细胞系, 所以在CHO细胞中表达gp350/220被认为是最安全有效的方式.

EBV的LMP2A基因无致癌性, 在癌组织中能持续表达, 序列相对保守, 而且可与信号分子结合, 干扰B细胞受体(B-cell receptor, BCR)信号转导, 阻止EBV进入病毒增殖期, 维持潜伏感染状态^[42]. 因此, LMP2A是EBV相关肿瘤治疗理想的靶抗原, 并有望成为胃癌基因治疗的新策略之一. 目前正在研究的与LMP2A相关的疫苗有: DNA疫苗^[43], 以EBV潜伏膜蛋白2(latent membrane protein 2, LMP2)为靶基因, 构建EBV-LMP2的候选DNA疫苗; 以腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)为载体构建包含EBV-LMP2基因的重组腺病毒疫苗, 可在体内外有效地引发CTL应答^[44]; 以腺病毒(Ad5)为载体构建Ad5F35-LMP2重组腺病毒, 在动物体内诱导LMP2特异性细胞和体液反应, 且Ad5F35-LMP2重组腺病毒修饰的DC疫苗在体内以及体外可活化LMP2特异性的CTL, 并杀伤肿瘤细胞^[45]. 单独及联合使用表达EBV潜伏膜蛋白抗原2(epstein-barr virus latent membrane protein 2, EBV-LMP2)的DNA疫苗、腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)疫苗、非复制5型腺病毒疫苗(Ad5), 分别免疫小鼠后, 检测EBV-LMP2特异性细胞免疫应答水平, 发现疫苗诱导的特异性细胞应答水平与疫苗的免疫策略有关. 其中, 使用3种载体疫苗联合免疫的效果最好, 其次则是先使用DNA疫苗免疫2次, 再用腺病毒疫苗加强免疫1次的联合免疫方法, DNA疫苗和AAV疫苗单独免疫能够诱导出特异性的CTL, 但与联合免疫相比诱导的应答水平很低. 结果表明, 使用DNA, AAV和腺病毒载体疫苗联合免疫, 能够更好地诱导机体产生特异性细胞免疫应答^[46], 为EBV相关肿瘤的防治提供了良好的疫苗策略.

目前, EBV疫苗研究中所遇到的问题: 部分疫苗的免疫原性较弱, 不足以引起机体的抗肿瘤反应; 细胞疫苗的制备过程复杂, 成本较高, 难以规模化生产和使用; 基因疫苗的整合具有潜在危险, 安全性有待观察; 各种载体疫苗都有可能诱导机体产生针对载体的抗体, 导致该疫苗的应用受限; 疫苗的免疫效应期限较短, 且应用于临床的时间不长, 不利于一些小概率的不良反应的观察; 对于疫苗的接种对象, 接种时间

间隔以及最适剂量, 免疫途径等问题还需要更多的临床研究, 接种后如何进行后续的检测也是需要研究的问题之一; 单独筛选某些型别的EBV疫苗比较困难。

7 结论

EBV和胃癌的发生、发展, 治疗和预防都有着密不可分的关系, 对于EBV的深入研究将有利于我们加深对于胃癌的认识, 并最终为采用疫苗预防和治疗胃癌提供理论依据。

8 参考文献

- 秦敬柱, 袁长海, 张加胜, 刘保锋. 我国胃癌患者年轻化趋势的原因分析. *中国初级卫生保健* 2009; 23: 10-11
- Burke AP, Yen TS, Shekitka KM, Sobin LH. Lymphoepithelial carcinoma of the stomach with Epstein-Barr virus demonstrated by polymerase chain reaction. *Mod Pathol* 1990; 3: 377-380
- Tokunaga M, Uemura Y, Tokudome T, Ishidate T, Masuda H, Okazaki E, Kaneko K, Naoe S, Ito M, Okamura A. Epstein-Barr virus related gastric cancer in Japan: a molecular patho-epidemiological study. *Acta Pathol Jpn* 1993; 43: 574-581
- Thompson MP, Kurzrock R. Epstein-Barr virus and cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 803-821
- Münz C, Moormann A. Immune escape by Epstein-Barr virus associated malignancies. *Semin Cancer Biol* 2008; 18: 381-387
- zur Hausen A, Brink AA, Craanen ME, Middeldorp JM, Meijer CJ, van den Brule AJ. Unique transcription pattern of Epstein-Barr virus (EBV) in EBV-carrying gastric adenocarcinomas: expression of the transforming BARF1 gene. *Cancer Res* 2000; 60: 2745-2748
- Shibata D, Tokunaga M, Uemura Y, Sato E, Tanaka S, Weiss LM. Association of Epstein-Barr virus with undifferentiated gastric carcinomas with intense lymphoid infiltration. Lymphoepithelioma-like carcinoma. *Am J Pathol* 1991; 139: 469-474
- Gurtsevich VE, Novikova EV, Borisova Elu, Stepina VN, Iakovleva LS, Davydov MI, Klimenkov AA, Nered SN, Frank GA, Kozlovskii OM, Britvina VA, Petel'nikova ES, Petrovichev NN, Ruzabakiev RM, Tokunaga M, Zaridze DG. [Molecular biological and clinical-morphological studies of gastric tumors associated with Epstein-Barr virus]. *Vestn Ross Akad Med Nauk* 2000; (3): 27-31
- Sairenji T. Epstein-Barr virus (EBV) infection and gastric carcinoma: the approach through EBV infected epithelial cell lines. *Jpn J Infect Dis* 1999; 52: 110-112
- 万榕, 高美钦, 高凌云, 陈碧芬, 蔡乾坤. 胃癌组织中EBV编码的RNA原位杂交检测. *福建医科大学学报* 1998; 32: 148-150
- 朱冠保, 成骏, 张丽芳, 陈韶. 胃癌和EB病毒感染相关性研究. *中华胃肠外科杂志* 2001; 4: 215-216
- Matsunou H, Konishi F, Hori H, Ikeda T, Sasaki K, Hirose Y, Yamamichi N. Characteristics of Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma with lymphoid stroma in Japan. *Cancer* 1996; 77: 1998-2004
- 殷智榕, 高冬玲, 徐晓丽, 郝志芳, 宋一民. 胃癌组织中EB病毒的检测. *广西医科大学学报* 2001; 18: 803-805
- Kaizaki Y, Hosokawa O, Sakurai S, Fukayama M. Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma in the remnant stomach: de novo and metachronous gastric remnant carcinoma. *J Gastroenterol* 2005; 40: 570-577
- Martin DR, Marlowe RL, Ahearn JM. Determination of the role for CD21 during Epstein-Barr virus infection of B-lymphoblastoid cells. *J Virol* 1994; 68: 4716-4726
- 姚庆云, Rickinson AB, Epstein MA. 健康人口腔中EB病毒排出情况的研究. *病毒学报* 1985; 1: 1-6
- Fingerroth JD, Weis JJ, Tedder TF, Strominger JL, Biro PA, Fearon DT. Epstein-Barr virus receptor of human B lymphocytes is the C3d receptor CR2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984; 81: 4510-4514
- 甄永占, 周天戟. EB病毒致胃癌形成的分子学机制研究进展. *国外医学(微生物学分册)* 2004; 27: 11-13
- 李淑英, 高金兰, 夏庆安, 周天戟. EB病毒相关胃癌潜伏感染膜蛋白-1表达的研究. *华北煤炭医学院学报* 2006; 8: 435-436
- 唐运莲, 冬毕华, 高天舒, 刘芳, 刘小敏, 甘润良. 胃癌、胃淋巴瘤与EB病毒感染的相关性研究. *南华大学学报·医学版* 2009; 37: 658-661
- Dawson CW, George JH, Blake SM, Longnecker R, Young LS. The Epstein-Barr virus encoded latent membrane protein 2A augments signaling from latent membrane protein 1. *Virology* 2001; 289: 192-207
- Pang MF, Lin KW, Peh SC. The signaling pathways of Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 2A (LMP2A) in latency and cancer. *Cell Mol Biol Lett* 2009; 14: 222-247
- Wiech T, Nikolopoulos E, Lassman S, Heidt T, Schöpflin A, Sarbia M, Werner M, Shimizu Y, Sakka E, Ooka T, zur Hausen A. Cyclin D1 expression is induced by viral BARF1 and is overexpressed in EBV-associated gastric cancer. *Virchows Arch* 2008; 452: 621-627
- Seto E, Yang L, Middeldorp J, Sheen TS, Chen JY, Fukayama M, Eizuru Y, Ooka T, Takada K. Epstein-Barr virus (EBV)-encoded BARF1 gene is expressed in nasopharyngeal carcinoma and EBV-associated gastric carcinoma tissues in the absence of lytic gene expression. *J Med Virol* 2005; 76: 82-88
- Fiorini S, Ooka T. Secretion of Epstein-Barr virus-encoded BARF1 oncoprotein from latently infected B cells. *Virol J* 2008; 5: 70
- 郭秀婵, 盛望, 张永利, 黄燕萍, TOoka, 曾毅. Epstein-Barr病毒BARF1基因协同TPA诱发猴肾上皮细胞恶性转化的研究. *中华实验和临床病毒学杂志* 2001; 15: 321-323
- Wang Q, Tsao SW, Ooka T, Nicholls JM, Cheung HW, Fu S, Wong YC, Wang X. Anti-apoptotic role of BARF1 in gastric cancer cells. *Cancer Lett* 2006; 238: 90-103
- Seto E, Ooka T, Middeldorp J, Takada K. Reconstitution of nasopharyngeal carcinoma-type EBV infection induces tumorigenicity. *Cancer Res* 2008; 68: 1030-1036
- Wei MX, Ooka T. A transforming function of the BARF1 gene encoded by Epstein-Barr virus. *EMBO J* 1989; 8: 2897-2903
- Sall A, Caserta S, Jolicœur P, Franqueville L, de Turenne-Tessier M, Ooka T. Mitogenic activity of Epstein-Barr virus-encoded BARF1 protein. *Oncogene* 2004; 23: 4938-4944
- Houali K, Wang X, Shimizu Y, Djennaoui D, Nich-

- olls J, Fiorini S, Bouguermouh A, Ooka T. A new diagnostic marker for secreted Epstein-Barr virus encoded LMP1 and BARF1 oncoproteins in the serum and saliva of patients with nasopharyngeal carcinoma. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 4993-5000
- 32 李友琼, 张雪怡, 曾健, 陈巧林, 李良菊, 成静, 訾瑞峰, 周天戟. EB病毒BARF1基因表达对胃癌细胞株SGC7910生物学行为的影响. *江苏大学学报(医学版)* 2009; 19: 214-219
- 33 曾健, 李友琼, 王文红, 杨莉, 訾瑞峰, 张雪怡, 周天戟. EB病毒BARF1蛋白诱导胃癌细胞 c-met和Bcl-2基因过表达. *江苏医药* 2010; 36: 913-917
- 34 何丹, 肖琳, 陈建宁, 梁琼, 邵春奎. EBV相关胃癌中Fas/FasL的表达及其与凋亡的关系. *癌症* 2010; 29: 304-309
- 35 肖琳, 何丹, 丁运刚, 冯智英, 邵春奎. 肿瘤浸润树突状细胞和T淋巴细胞在EBV相关胃癌中的肿瘤免疫作用. *中山大学学报(医学科学版)* 2010; 31: 253-257
- 36 Nishikawa J, Yanai H, Mizugaki Y, Takada K, Tada M, Okita K. Case report: hypoechoic submucosal nodules: a sign of Epstein-Barr virus-associated early gastric cancer. *J Gastroenterol Hepatol* 1998; 13: 585-590
- 37 Ishihara S, Okada S, Wakiguchi H, Kurashige T, Hirai K, Kawa-Ha K. Clonal lymphoproliferation following chronic active Epstein-Barr virus infection and hypersensitivity to mosquito bites. *Am J Hematol* 1997; 54: 276-281
- 38 Andersson A, Vetter V, Kreutzer L, Bauer G. Avidities of IgG directed against viral capsid antigen or early antigen: useful markers for significant Epstein-Barr virus serology. *J Med Virol* 1994; 43: 238-244
- 39 Shinkura R, Yamamoto N, Koriyama C, Shinmura Y, Eizuru Y, Tokunaga M. Epstein-Barr virus-specific antibodies in Epstein-Barr virus-positive and -negative gastric carcinoma cases in Japan. *J Med Virol* 2000; 60: 411-416
- 40 唐运莲, 冬毕华, 甘润良, 曾庆彪, 蒋日成. 人胃癌及胃间质细胞肿瘤Epstein-Barr病毒的检测. *南华大学学报·医学版* 2002; 30: 11-18
- 41 魏滨, 谷淑燕, 李燕, 郭斐, 阮力. 表达EBV病毒主要膜蛋白gp350/220的非复制型重组痘苗病毒的构建. *病毒学报* 2001; 17: 29-33
- 42 高玉, 纪静, 朱伟, 王云, 罗兵. EB病毒潜伏期膜蛋白I LMP2A对胃癌细胞增殖的影响. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 108-113
- 43 朱伟严, 周玲, 王琦, 姚家伟, 曾毅. EB病毒潜伏膜蛋白2 DNA疫苗的构建及其初步免疫效果观察. *中华微生物学和免疫学杂志* 2002; 22: 185-190
- 44 左建民, 周玲, 王琦, 曾毅. 含EBV-LMP2基因重组腺病毒疫苗的构建及其诱导CTL应答的初步探讨. *中华微生物学和免疫学杂志* 2003; 23: 446-449
- 45 莫武宁. 鼻咽癌患者细胞免疫功能及Ad5F35-LMP2重组腺病毒疫苗的研究. *广西医科大学* 2007
- 46 杨松梅, 王湛, 周玲, 杜海军, 莫武宁, 曾毅. 携带EBV-LMP2基因的DNA疫苗、腺相关病毒疫苗和腺病毒疫苗免疫小鼠的特异性细胞免疫应答. *中国科学C辑: 生命科学* 2009; 39: 342-345

编辑 曹丽鸥 电编 闫晋利

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》入选北京大学图书馆 2008年版《中文核心期刊要目总览》

本刊讯 《中文核心期刊要目总览》(2008年版)采用了被索量、被摘量、被引量、他引量、被摘率、影响因子、获国家奖或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80余种, 统计文献量达32 400余万篇次(2003-2005年), 涉及期刊12 400余种. 本版还加大了专家评审力度, 5 500多位学科专家参加了核心期刊评审工作. 经过定量评价和定性评审, 从我国正在出版的中文期刊中评选出1 980余种核心期刊, 分属七大编73个学科类目. 《世界华人消化杂志》入选本版核心期刊库(见R5内科学类核心期刊表, 第66页). (编辑部主任: 李军亮 2010-01-08)

丙型肝炎的研究进展

袁征, 邵铭, 何晶

■背景资料

丙型肝炎是一种主要经血液传播的疾病, 丙型肝炎病毒感染可导致肝脏慢性炎症坏死和纤维化, 部分患者可发展为肝硬化甚至肝细胞癌, 对患者的健康和生命危害极大, 已成为严重的社会和公共卫生问题。目前聚乙二醇干扰素 α 与利巴韦林的联合治疗仍是世界多国广为接受的标准治疗方案。

袁征, 邵铭, 何晶, 江苏省中医院感染科 江苏省南京市 210029

江苏省“六大人才高峰”基金资助项目, No. 5

作者贡献分布: 本综述由袁征完成; 邵铭与何晶审校。

通讯作者: 邵铭, 副教授, 主任医师, 210029, 江苏省南京市汉中

路155号, 江苏省中医院感染科. jszygr@163.com

收稿日期: 2011-08-13 修回日期: 2011-10-10

接受日期: 2011-10-13 在线出版日期: 2011-10-18

Progress in hepatitis C research

Zheng Yuan, Ming Shao, Jing He

Zheng Yuan, Ming Shao, Jing He, Department of Infectious Diseases, Jiangsu Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

Supported by: the Fifth Batch “six large trades talent peak” of Jiangsu Province, No. 5

Correspondence to: Ming Shao, Associate Professor, Department of Infectious Diseases, Jiangsu Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China. jszygr@163.com

Received: 2011-08-13 Revised: 2011-10-10

Accepted: 2011-10-13 Published online: 2011-10-18

Abstract

Hepatitis C is caused by the hepatitis C virus (HCV), which primarily has six genotypes. Hepatitis C is mainly transmitted via contact with blood contaminated by HCV. HCV infection is distributed worldwide, and China is a medium- to high-risk endemic area for HCV. Hepatitis C easily becomes chronic and even develops into liver cirrhosis and hepatoma. As a consequence, it places a major demand on early diagnosis and treatment of this disease. Currently, the diagnosis of hepatitis C mainly relies on the detection of HCV-RNA and viral genotypes. Combined therapy with polyethylene glycol interferon α (PEG-INF- α) and ribavirin (RBV) is the standard antiviral therapy regimen for HCV (SOC). What's more, the latest research has been focused on the responsible guide treat (RGT) based on the SOC. The application of newly developed small molecule drugs alone or in combination with SOC also represents a hot topic. This paper will provide a brief overview of progress in hepatitis C research.

Key words: Hepatitis C; HCV-RNA; Genotype; Treatment

Yuan Z, Shao M, He J. Progress in hepatitis C research. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(29): 3046-3052

摘要

丙型肝炎由丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)感染引起, 主要经血液传播, 有6种主要的基因型。感染者呈全球分布, 我国属中、高流行区。丙型肝炎易慢性化发展为肝硬化、肝癌。HCV-RNA及基因型的检测对于丙型肝炎的诊断及治疗有着重要作用。目前聚乙二醇干扰素 α (polyethylene glycol interferon α , PEG-INF- α)与利巴韦林(Ribavirin, RBV)的联合治疗为抗HCV治疗的标准治疗(SOC)方案, 研究热点为基于SOC方案上的应答指导治疗(responsible guide treat, RGT)、新研发的小分子药物的单独应用及其与SOC的联合应用。本文就这些问题作简要综述。

关键词: 丙型肝炎; HCV-RNA; 基因型; 治疗

袁征, 邵铭, 何晶. 丙型肝炎的研究进展. 世界华人消化杂志 2011; 19(29): 3046-3052

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/3046.asp>

0 引言

丙型肝炎是一种由丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)引起、主要经血液传播的肝脏急、慢性炎症的传染性疾病。自1989年美国Chiron公司发现HCV以来^[1], HCV感染逐渐成为一个世界性公共卫生问题。本文就丙型肝炎目前国内外研究进展作一综述。

1 流行病学

1.1 流行情况 全球约1.7-2.1亿人口为丙型肝炎病毒的慢性感染者, 其感染率在世界各地分布差异较大^[2]。按地理位置划分, 欧美等国家为低流行地区, 非洲则属高流行区^[3]。在西欧国家感染率达0.4%-3%, 东欧和中东地区较高^[4], 而在埃

■同行评议者

陈志辉, 副教授, 中国人民解放军第二军医大学附属长海医院感染科

及可达9%, 其感染率最高, 甚至在某些乡村地区这一数字可达50%^[5]. 我国属中、高流行区, 普通人群中抗-HCV阳性率平均为3.2%^[6], 以长江为界, 北方(3.6%)高于南方(2.9%)^[7].

1.2 传播途径 HCV主要经血液传播, 包括输血、静脉吸毒、手术(包括外科手术、牙科治疗、内镜诊疗及纹身纹眉等)、性接触和母婴垂直传播等. 20世纪90年代之前传播途径主要为输血及输血液相关制品, 自从将抗-HCV检测引入献血员的筛查, 经输血传播丙型肝炎病毒已得到显著控制. 近年来新发感染HCV主要与静脉药瘾有关, 陈益等^[8]对湛江市某戒毒所的静脉吸毒者与非静脉吸毒者作对比, 发现静脉吸毒组HCV感染率为40.36%, 是非静脉吸毒组的4.16倍; 肝功能异常率为23.46%, 是非静脉吸毒组的3倍. 静脉吸毒组感染HCV和肝功能损害的危险性明显高于非静脉吸毒组. 另外, 经血液透析感染亦逐渐增多, 我国血液透析HCV感染的荟萃分析, 我国血液透析患者中的HCV感染率约为41.1%. 有报道^[9], 男性同性恋之间尤其是感染人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)者, 感染HCV的危险性更高.

1.3 基因型分布 根据目前统一的命名系统-Simmonds系统^[10,11], 以阿拉伯数字表示HCV基因型, 以小写的英文字母表示基因的亚型(如1a、2b、3c等), HCV有6种主要的基因型和更多的亚型共11型. 基因型1(亚型1a和1b)在全球分布最广, 占所有HCV感染的70%以上, 欧美国家以1型为主(欧洲为1b, 美国以1a为多), 基因2型在欧洲和亚洲均有广泛分布, 3型主要分布在印度、巴基斯坦、泰国和新加坡等国家, 4a型主要分布在中东、埃及和中非地区. 基因型5、6较少见, 6a型仅在越南、马来西亚等东南亚国家发现. 我国最主要的基因型为1b(66%), 其次为2a(14%), 在香港、澳门等地区可见6型分布.

1.4 自然史 急性HCV感染者中50%-90%无症状, 感染后自然阴转率低, 治疗效果差, 极易慢性化, 约75%-80%急性丙肝患者转为慢性感染, 其中至少20%患者经过10-20年发展为肝硬化, 而在肝硬化患者中每年有1%-4%可发展为肝细胞癌(HCC)^[12]. HCV感染者中发生HCC的几率是非HCV感染者的17倍^[13]. 肝硬化和HCC是慢性丙型肝炎的主要死亡原因, 其中, 失代偿性肝硬化是最主要的原因, 肝硬化失代偿的5年存活率约为50%, 10年的存活率仅为25%^[14]. 而一旦发展为HCC, 一年内病死率高达33%^[15,16]. 加速HCV

感染者肝病进展的外界因素包括酗酒, 糖尿病, 老龄, 非酒精性脂肪肝, 合并HIV或其他肝炎病毒的感染. 陈建^[17]等研究显示, 嗜酒的HCV感染者酒精摄入量与HCV-RNA水平有相关性, 提示嗜酒可促进HCV-RNA复制, 加快肝病进展. 有研究显示, 有糖尿病的慢性丙型肝炎患者发生肝癌的危险性比无糖尿病者高5.7倍^[18].

2 实验室检测

2.1 HCV-RNA的检测 HCV-RNA在感染1 wk内即可被检测到, 比抗体出现早数周时间, 直观地反映病毒的存在, 尤其在移植、HIV感染以及血液透析人群中, RNA检测常常作为HCV感染的主要确诊手段, 而且其检测对于指导临床抗病毒治疗尤为重要. 近年来HCV-RNA最主要的检测手段为基于核酸扩增检测技术(NAT)的聚合酶链反应法(PCR), 从最早的逆转录PCR(RT-PCR), 然后是套式PCR, 现在临床上多采用实时荧光定量PCR(RTQ-PCR), 检测灵敏度及特异性不断提高, 且实现了全自动定量检测, 大大提高检测水平^[19]. 目前竞争性逆转录PCR方法(competitive reverse transcription PCR, CTR-PCR)的敏感性可达到100拷贝/mL, 但该方法操作复杂, 技术难度要求较高.

2.2 HCV基因型的检测 HCV基因型的检测有分子学方法和血清学方法. 分子学方法有直接测序、特异性引物PCR法、特异性探针杂交法(LIPA)、限制性片段长度多态性分析(RFLP)法、荧光共振能量转移探针的解离曲线分析法、引物特异的延伸分析(PSEM)法、异源分子迁移率分析(HMA)法等; 血清学方法包括重组免疫印迹试验(RIBA)和酶免疫试验(EIA)^[20]. 每种方法都有各自的优点和不足, 所有这些方法都能正确辨别主要的基因组别, 但只有核苷酸的直接测序在区分亚型中是有效的. 在HCV分型中应采用何种方法, 主要取决于实验室的现有条件以及分型的目的. 对临床而言, 能准确确定主要组型就已足够, 但对于流行病学研究而言, 亚型的检测是必需的.

2.3 肝纤维化的评估 肝纤维化的轻重对慢性HCV感染患者的治疗选择及预后判断尤为重要^[21]. 目前肝活检仍是评价肝脏炎症及纤维化分级分期的最主要检查方法^[22], 最常见的用于肝组织学诊断的计分系统有IASL、Batts-Ludwig、Metavir和Ishak等4种.

无创检测方法有血清学相关标志物的检测

■ 研发前沿

近年来研究较多的肝细胞材料为猪肝细胞和肿瘤源性肝细胞株(C3A、HepG2等), 但动物肝细胞存在发生免疫反应及传播动物源性病毒的危险, 肿瘤源性肝细胞株分化程度低、生物学功能低下, 且在临床应用中存在细胞逃逸进入患者体内引起肿瘤的危险, 限制了临床的广泛应用.

■相关报道

有PROVE3的研究结果提示加用Telaprevir可明显提高既往抗病毒失败患者的SVR率。

及瞬时弹性技术。血清学有常用的透明质酸、层黏蛋白、III型前胶原氨基末端肽及IV型胶原等检测,近年来在新的血清标志物研究上亦取得一定的进展,如基质金属蛋白酶(MMP)和基质金属蛋白酶组织抑制因子(TIMP)^[23],人体微纤维关联性蛋白4(MFAP4)^[24],细胞角蛋白(CK)^[25]等血清中纤维化标志物的研究对诊断纤维化程度有一定意义,肝脏穿刺前初步筛查可以减少肝脏穿刺的数量,但是不能取代肝脏穿刺的价值^[26]。瞬时弹性检测FibroScan是建立在超声诊断基础上的快速、非侵袭性测量肝脏硬度的新技术^[27],其操作简单,可重复性强,国外多项研究^[28-30]表明其可在一定程度上反应HCV感染患者肝纤维化程度。Sporea^[31]将199例丙型肝炎的FibroScan与肝穿刺病理作对照研究,发现FibroScan与肝穿刺病理的纤维化诊断的敏感性为59.6%,特异性为93.3%,诊断准确率在77.3%。但FibroScan检测也存在其局限性,国外报道近5%的FibroScan受检者即使进行30次测量后也不能获得有效的测量值,提示FibroScan检测可能受到某些受检者特征及操作者主观因素的影响。国内有研究称,体质量指数是影响检测成功率的最主要因素^[32]。

以上这些方法在综合评估肝病病情上起到一定作用,但至今还没有1项能完全取代肝组织学检查。

3 抗病毒治疗

3.1 发展方向 聚乙二醇干扰素 α (Polyethylene glycol interferon α , PEG-IFN- α)与利巴韦林(Ribavirin, RBV)的联合治疗仍是目前世界多国广为接受的标准治疗(SOC)方案^[21,33-36],近年来抗病毒的研究热点为基于SOC方案上的应答指导治疗(RGT)^[37]、新研发的小分子药物的单独应用及其与SOC的联合应用^[38]。发展方向为制定出高效、短疗程、便于操作、更好的耐受性及依从性的治疗方案。

3.2 目的和终点 2011年欧洲丙肝防治指南^[39]指出,丙型肝炎的治疗目的是清除病毒、防止HCV相关肝病的发生(包括肝纤维化、肝硬化和HCC)。治疗的终点为获得持续病毒学应答(SVR),即抗病毒治疗结束24 wk时HCV-RNA仍低于检测下限。

3.3 疗效预测因素

3.3.1 基因型: 基因型对于治疗应答预测及确定抗病毒治疗疗程有重要作用。基因1型和4型尤

其是1b型对治疗的反应较差,基因2型和3型对治疗应答较好。北美的许多临床研究资料显示HCV基因1型的感染者经SOC初治48 wk取得SVR率可达40%以上,在西欧这一数字可达50%以上。而基因2型和3型经SOC初治24 wk可获得70%以上SVR率^[40]。而且目前的RGT个体化治疗也因基因型的不同而有不同策略。

3.3.2 宿主IL-28B的基因多态性: IL-28B IFN- λ 3是一类属于IFN- λ 家族的新型白介素编码基因,位于19号染色体上^[41]。2009年,有3个研究小组^[42-44]采用全基因组相关性研究(genome-wide association studies, GWAS)方法,在IL-28B基因上定位了2个与HCV疗效相关性最强的基因多态性(single nucleotide polymorphisms, SNPs): rs12979860-IL-28B上游3 kb处和rs8099917-IL-28B上游8 kb处,认为携带该2处SNPs的患者抗HCV治疗效果较好。Ge等^[42]调查发现,携带SNP-rs12979860的纯合子基因型患者对SOC的SVR率是未携带该基因患者的2倍。同时,他们还发现不同人种携带该保护性等位基因的概率是不一样的:东亚人最高,欧洲人次之,非洲裔美国人最低。Thomas等^[43]的研究也显示IL28-B基因的多态性也和种族分布有关,其中东亚人具有保护性基因的概率最高。IL28-B基因多态性研究是抗HCV治疗上的一个新突破,根据其基因型可以预测患者的自愈率以及对PEG-IFN- α 和RBV联合治疗的SVR率。在决定治疗方案前,可测定患者的rs12979860或rs8099917的基因型,对于携带该基因的患者,可以制定24或48 wk的SOC方案;不携带该基因的患者,如果其病情发展缓慢,可以推迟治疗,等到新的靶向药物的上市,如果其病情进展较快,必要时早期做肝移植手术^[45]。

3.3.3 治疗前基线病毒载量: 根据治疗前低基线病毒载量水平(<400000-800000 IU/mL),2011年欧洲丙肝防治指南^[39]对于获得RVR(即治疗4 wk时HCV-RNA低于检测下限)的患者建议可将疗程缩短:基因1型或4型缩短为24 wk,基因2型或3型缩短为12-16 wk。而有研究显示,对于基因1型和4型,基线病毒载量高(>800 000 IU/mL)的患者即使获得RVR也可能治疗失败。

3.3.4 应答时间: 根据患者对治疗应答的不同模式(包括快速病毒学应答RVR、早期病毒学应答EVR及延迟病毒学应答DVR)来预测长期疗效、决定疗程、调整治疗方案,可以使疗效最大化,疗程合理化,复发最低化,此为RGT的原理及意义所在。故2011年欧洲丙型肝炎防治指南^[39]作出

如下调整: (1)对于基因1型和4型: 如果患者治疗前基线病毒载量低, 经治疗获得RVR, 可将疗程缩短为24 wk; 如果病毒清除延迟(HCV-RNA在12 wk-24 wk转为阴性), 即获得DVR, 应考虑将治疗时间延长到72 wk以减少复发率; (2)对于基因2型和3型: 如果患者治疗前基线病毒载量低, 经治疗获得RVR, 可将疗程缩短为12-16 wk; 对于未获得EVR或仅获DVR或合并影响因素(如肥胖、胰岛素抵抗等)者, 只要在24 wk时病毒低于检测下限, 可将疗程延长至48 wk或72 wk; (3)不论基因型如何, 若治疗12 wk时病毒载量减少 $<2\log$ IU/mL, 并且在24 wk时病毒仍可测得, 均应考虑停止治疗。

3.3.5 肝硬化: 目前干扰素(interferon, IFN)是治疗HCV感染唯一的有效治疗药物, 但HCV相关的肝硬化患者, 尤其是失代偿期肝硬化, 应用标准剂量的IFN会产生严重的不良反应和后果, 甚至危及患者的生命。因此, 探索小剂量维持治疗的方案是必要的。因为相当比例的患者对于小剂量的IFN仍然具有一定水平的应答。

我国有研究用小剂量IFN α -2b联合利巴韦林治疗HCV相关肝硬化失代偿期患者12 mo, 结果显示, 抗病毒治疗组HCV RNA转阴率为93.1%, 对照组为0, 抗病毒治疗后随着HCV RNA的转阴ALT均下降到40 U/L以下, 而对照组ALT水平经降酶治疗后可暂时降至正常, 停药后又会出现升高。抗病毒治疗组中无1例患者出现严重不良反应, 对照组中有2例(3.3%)因严重并发症而导致死亡^[46]。小剂量IFN α -2b开始逐渐加量联合利巴韦林方案可用于治疗失代偿期丙型肝炎肝硬化患者, 但治疗的远期疗效还有待进一步观察^[47]。而HALT-C研究^[48]发现, 对于HCV相关肝硬化患者, 小剂量长疗程的聚乙二醇干扰素治疗, 无论获得SVR与否, 并不能显著降低肝癌的发生率。

3.3.6 其他不良预测因素: 其他一些可能预测不良SVR的因素还包括: 如高体重指数、高龄 >40 岁、胰岛素抵抗、代谢综合征、肝细胞脂肪变性或纤维化等。对于具备这些因素的患者, 可能需要延长疗程或加大剂量。

4 药物研究进展

由于PEG-IFN联合RBV的标准治疗仍有部分患者难以获得SVR, 选择合理的药物靶点、研发高效抗HCV药物成为亟待解决的问题。目前, 直接针对HCV生活周期的小分子抑制剂-统称为

“特异性靶向HCV抗病毒治疗”(STAT-Cs)成为国际上HCV研究领域关注的一个热点。研究和发展中的药物分为以下几类: (1)干扰素的新型制剂: 白蛋白干扰素, 缓控型干扰素(如Locteron), 干扰素脂质体, 复合干扰素; (2)蛋白酶抑制剂: 针对NS3/4A丝氨酸蛋白酶, 包括Telaprevir、Boceprevir、SCH446211、TMC435350、Vaniprevir(MK-7009)、Narlaprevir(SCH 900518)等; (3)聚合酶抑制剂: 针对NS5B聚合酶, 主要分为核苷类和非核苷聚合酶抑制剂两类; (4)非结构基因5A抑制剂, 如BMS-790052。

4.1 干扰素新剂型 为克服干扰素的半衰期短、给药频率高、不能持久抑制病毒等缺点, 近年来开发出了很多类型的长效干扰素^[49]。目前已广泛应用的PEG-IFN α -2a和PEG-IFN α -2b半衰期分别为77-90 h和36-40 h, 将无生物活性的PEG与干扰素连接, 改变药物代谢动力学特性, 减缓排泄速度, 延长半衰期, 同时缩小了体内血药峰谷浓度差; 人血清白蛋白融合干扰素(Albinterferon)是运用生物工程技术, 通过构建编码人血清白蛋白和IFN α -2b的融合基因, 并在载体中高效表达而获得, 借助人白蛋白半衰期较长的特点将干扰素给药时间间隔延长至2-4 wk。在一项对932例基因2/3型感染者的研究中, 使用白蛋白干扰素 α -2b每2 wk 900和1200 μ g患者的SVR率均与接受PEG-IFN α -2a相近^[50]。但Albinterferon在不良反应方面却并没有表现出很强的优势, 和PEG-IFN α -2a类似; Locteron是一类缓控型IFN α -2b, 每2周注射一次, 前期试验对比于PEG-IFN α -2b, Locteron明显减少流感样症状的发生, 表明患者对Locteron具有更好的耐受性^[51]。此外, 其他处于研发中的干扰素修饰物有干扰素脂质体、复合干扰素, 以期开发出长效、高效的干扰素。

4.2 蛋白酶抑制剂 HCV基因的NS3蛋白酶有N端色氨酸蛋白酶和C端RNA解旋酶的双功能蛋白, 色氨酸蛋白酶异质二聚体结合辅助因子NS4A显著增强蛋白水解过程, 发挥酶的活性, 催化多种蛋白前体的成熟, 在HCV的复制过程中发挥重要的作用。因此NS3/4A蛋白酶的抑制剂可抑制病毒复制。

4.2.1 Telaprevir: Telaprevir是目前研究最广泛的STAT-Cs药物之一, 已经进入临床III期研究阶段。Telaprevir应用于基因1型感染者已有3个疗效和安全性临床研究, 分别针对美国初治患者(PROVE1 250例)、欧洲初治患者(PROVE2 334

■创新盘点

本文从各个疗效预测因素方面探讨抗病毒治疗方法的选择及调整, 并对抗病毒新药的研发进行了概述。

■同行评价

本文对丙型肝炎目前的流行病学及诊断治疗进行了全面细致的总结,对临床工作有较好的参考作用。

例)和既往治疗失败者(PROVE3 453例)^[52,53]。其中PROVE1方案中三药联合应用12 wk再继续应用PEG-IFN α -2a+RBV 36 wk比标准方案PEG-IFN α -2a+RBV 48 wk的SVR率高出26%。而在PROVE3方案中对于既往治疗失败者的研究中,三药联合应用24 wk再继续应用PEG-IFN α -2a+RBV 24 wk比标准方案PEG-IFN α -2a+RBV 48 wk的SVR率高出38%。加用Telaprevir后的不良反应主要有瘙痒、皮疹和贫血。然而, Telaprevir治疗短期内即可导致病毒耐药株的出现,从而限制了该药的长期应用,目前已发现的体内突变株为V36A/M, T54A, R155K/T, A156S/T/V。

4.2.2 Boceprevir: Boceprevir是另一种蛋白酶抑制剂。在针对基因1型感染者的SPRINT-1的研究中,先以PEG-IFN α -2b+RBV治疗4 wk作导入期,继而Boceprevir+PEG-IFN α -2b+RBV治疗44 wk,所获得的SVR率达75%,较对照组标准方案治疗48 wk 38%的SVR率高出37%。该研究还显示,降低RBV剂量(400-1 000 mg/d)将降低治疗的SVR率^[54]。报道的Boceprevir相关的不良反应包括头疼、恶心、乏力、贫血等。长期使用该药同样可导致病毒的耐药突变,已发现的变异株有V36M, T54S和R155K等。

5 结论

丙型肝炎由于其患者基数大、分布广、难治性等特点已成为世界性公共卫生问题。由于人类对该疾病的不断深入认识,近20年来已取得了极大进展,同时亦存在挑战。首先,自20世纪90年代各国开展献血员的HCV抗体筛查以来,该病毒的传播已得到明显控制,然而由于反复输血、血透及静脉吸毒人群的增多, HCV传播仍在蔓延,今后是否将HCV-RNA引入献血员的筛查用于更灵敏的检测HCV,牵涉到更多的经济卫生政策问题,以及对吸毒人群的控制及管理需政府作出更多的工作。关于HCV预防性疫苗问题,目前已有DNA疫苗获准进入临床试验,是否能将其用于普通人群的接种保护机体免于感染,令人拭目以待。其次,在丙型肝炎的治疗方面,从开始的干扰素 α 应用到丙型肝炎的抗病毒治疗中,到INF联合RBV治疗,继而迎来PEG-IFN联合RBV确立标准抗病毒方案,近年来又发展出应答指导的个体化治疗阶段,丙型肝炎的抗病毒治疗方案在不断优化。今后的小分子化合物的发展及其与标准方案联合应用必将在提高应答率、减低复发率上发挥更大优势。但

是, HCV感染的抗病毒治疗仍面临诸多挑战,如HCV感染早期宿主的免疫反应如何清除病毒及相关基因多态性对抗病毒治疗疗效的影响,为何不同HCV基因型对治疗效果反应差别大,对于难治性及复发患者的治疗及如何减少及控制小分子化合物应用过程中出现的耐药问题等。对于这些问题,仍需进一步研究与探讨。

6 参考文献

- 1 Choo QL, Richman KH, Han JH, Berger K, Lee C, Dong C, Gallegos C, Coit D, Medina-Selby R, Barr PJ. Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 2451-2455
- 2 Shepard CW, Ortega-Sanchez IR, Scott RD, Rosenstein NE. Cost-effectiveness of conjugate meningococcal vaccination strategies in the United States. *Pediatrics* 2005; 115: 1220-1232
- 3 Lavanchy D. The global burden of hepatitis C. *Liver Int* 2009; 29 Suppl 1: 74-81
- 4 Esteban JI, Sauleda S, Quer J. The changing epidemiology of hepatitis C virus infection in Europe. *J Hepatol* 2008; 48: 148-162
- 5 Kamal SM, Nasser IA. Hepatitis C genotype 4: What we know and what we don't yet know. *Hepatology* 2008; 47: 1371-1383
- 6 刘姐姐, 王全楚. 输血后丙型肝炎患者的临床特点及自然病程. *实用肝脏病杂志* 2008; 11: 410-411
- 7 刘丽君, 魏来. 丙型肝炎病毒的流行病学. *传染病信息* 2007; 20: 261-264
- 8 陈益, 连文, 陈嘉林. 湛江市静脉内毒瘾者感染HCV和肝功能分析. *实用预防医学* 2004; 11: 483-484
- 9 van de Laar TJ, Matthews GV, Prins M, Danta M. Acute hepatitis C in HIV-infected men who have sex with men: an emerging sexually transmitted infection. *AIDS* 2010; 24: 1799-1812
- 10 Simmonds P, Bukh J, Combet C, Deléage G, Enomoto N, Feinstone S, Halfon P, Inchauspé G, Kuiken C, Maertens G, Mizokami M, Murphy DG, Okamoto H, Pawlotsky JM, Penin F, Sablon E, Shin-I T, Stuyver LJ, Thiel HJ, Viazov S, Weiner AJ, Widell A. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* 2005; 42: 962-973
- 11 Major ME, Feinstone SM. The molecular virology of hepatitis C. *Hepatology* 1997; 25: 1527-1538
- 12 庄辉. 重视丙型肝炎的研究. *中华肝脏病杂志* 2004; 12: 65-66
- 13 Zein NN. The epidemiology and natural history of hepatitis C virus infection. *Cleve Clin J Med* 2003; 70 Suppl 4: S2-S6
- 14 魏来. 丙型肝炎病毒感染后的自然史. *中华肝脏病杂志* 2004; 12: 102
- 15 Yang JD, Roberts LR. Hepatocellular carcinoma: A global view. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2010; 7: 448-458
- 16 Bartosch B, Thimme R, Blum HE, Zoulim F. Hepatitis C virus-induced hepatocarcinogenesis. *J Hepatol* 2009; 51: 810-820
- 17 陈建, 王敏, 李延青. 酒精对慢性丙型肝炎患者的影响. *中华肝脏病杂志* 2003; 11: 624-625
- 18 刘红春. 糖尿病可能与慢性丙型肝炎患者发生肝癌有

- 关. 国外医学消化系疾病分册 2002; 22: 189-190
- 19 冯国钢. 丙型肝炎病毒临床检验技术研究进展. 齐齐哈尔医学院学报 2010; 31: 2782
- 20 解莹, 谢晨. 丙型肝炎病毒基因分型的研究进展. 大连医科大学学报 2010; 32: 470-474
- 21 Ghany MG, Strader DB, Thomas DL, Seeff LB. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: an update. *Hepatology* 2009; 49: 1335-1374
- 22 Ishak K, Baptista A, Bianchi L, Callea F, De Groote J, Gudat F, Denk H, Desmet V, Korb G, MacSween RN. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol* 1995; 22: 696-699
- 23 戴颖, 朱莹. 基质金属蛋白酶抑制剂-1与肝纤维化. 中国全科医学 2008; 11: 906-908
- 24 Mölleken C, Sitek B, Henkel C, Poschmann G, Sipos B, Wiese S, Warscheid B, Broelsch C, Reiser M, Friedman SL, Tornøe I, Schlosser A, Klöppel G, Schmiegel W, Meyer HE, Holmskov U, Stühler K. Detection of novel biomarkers of liver cirrhosis by proteomic analysis. *Hepatology* 2009; 49: 1257-1266
- 25 Cummings J, Ranson M, Butt F, Moore D, Dive C. Qualification of M30 and M65 ELISAs as surrogate biomarkers of cell death: long term antigen stability in cancer patient plasma. *Cancer Chemother Pharmacol* 2007; 60: 921-924
- 26 Sebastiani G, Alberti A. Non invasive fibrosis biomarkers reduce but not substitute the need for liver biopsy. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 3682-3694
- 27 Sandrin L, Fourquet B, Hasquenoph JM, Yon S, Fournier C, Mal F, Christidis C, Ziol M, Poulet B, Kazemi F, Beaugrand M, Palau R. Transient elastography: a new noninvasive method for assessment of hepatic fibrosis. *Ultrasound Med Biol* 2003; 29: 1705-1713
- 28 Bacon B R. All hepatitis C patients should be offered liver biopsy and treatment. *AGA Perspectives* 2005; 4: 4
- 29 Ziol M, Handra-Luca A, Kettaneh A, Christidis C, Mal F, Kazemi F, de Lédinghen V, Marcellin P, Dhumeaux D, Trinchet JC, Beaugrand M. Noninvasive assessment of liver fibrosis by measurement of stiffness in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2005; 41: 48-54
- 30 de Lédinghen V, Douvin C, Kettaneh A, Ziol M, Roulot D, Marcellin P, Dhumeaux D, Beaugrand M. Diagnosis of hepatic fibrosis and cirrhosis by transient elastography in HIV/hepatitis C virus-coinfected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2006; 41: 175-179
- 31 Sporea I, Sirli R, Deleanu A, Tudora A, Curescu M, Cornianu M, Lazar D. Comparison of the liver stiffness measurement by transient elastography with the liver biopsy. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 6513-6517
- 32 李林芳, 戴琳, 张琪. 瞬时弹性记录仪检测肝纤维化影响因素及稳定性分析. 南方医科大学学报 2008; 28: 595
- 33 McCaughan GW, Omata M, Amarapurkar D, Bowden S, Chow WC, Chutaputti A, Dore G, Gane E, Guan R, Hamid SS, Hardikar W, Hui CK, Jafri W, Jia JD, Lai MY, Wei L, Leung N, Piratvisuth T, Sarin S, Sollano J, Tateishi R. Asian Pacific Association for the Study of the Liver consensus statements on the diagnosis, management and treatment of hepatitis C virus infection. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22: 615-633
- 34 de Bruijne J, Buster EH, Gelderblom HC, Brouwer JT, de Knecht RJ, van Erpecum KJ, Schalm SW, Bakker CM, Zaaijer HL, Janssen HL, Reesink HW. Treatment of chronic hepatitis C virus infection - Dutch national guidelines. *Neth J Med* 2008; 66: 311-322
- 35 Practice guidelines for the treatment of hepatitis C: recommendations from an AISF/SIMIT/SIMAST Expert Opinion Meeting. *Dig Liver Dis* 2010; 42: 81-91
- 36 Sarrazin C, Berg T, Ross RS, Schirmacher P, Wedemeyer H, Neumann U, Schmidt HH, Spengler U, Wirth S, Kessler HH, Peck-Radosavljevic M, Ferenci P, Vogel W, Moradpour D, Heim M, Cornberg M, Protzer U, Manns MP, Fleig WE, Dollinger MM, Zeuzem S. [Prophylaxis, diagnosis and therapy of hepatitis C virus (HCV) infection: the German guidelines on the management of HCV infection]. *Z Gastroenterol* 2010; 48: 289-351
- 37 Pai SA, Kini D, Shetty K, Rao UV. Psammomatous carcinoid of the rectum. *J Clin Pathol* 2003; 56: 978
- 38 魏来. 丙型肝炎研究进展. 中国继续医学教育 2010; 2: 9-17, 83
- 39 EASL Clinical Practice Guidelines: management of hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 2011; 55: 245-264
- 40 Feld JJ, Hoofnagle JH. Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C. *Nature* 2005; 436: 967-972
- 41 许刚, 任浩. IL-28B基因多态性在丙型肝炎患者治疗中的作用. 世界华人消化杂志 2011; 19: 661-666
- 42 Ge D, Fellay J, Thompson AJ, Simon JS, Shianna KV, Urban TJ, Heinzen EL, Qiu P, Bertelsen AH, Muir AJ, Sulkowski M, McHutchison JG, Goldstein DB. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature* 2009; 461: 399-401
- 43 Thomas DL, Thio CL, Martin MP, Qi Y, Ge D, O'Huigin C, Kidd J, Kidd K, Khakoo SI, Alexander G, Goedert JJ, Kirk GD, Donfield SM, Rosen HR, Tobler LH, Busch MP, McHutchison JG, Goldstein DB, Carrington M. Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature* 2009; 461: 798-801
- 44 Suppiah V, Moldovan M, Ahlenstiel G, Berg T, Weltman M, Abate ML, Bassendine M, Spengler U, Dore GJ, Powell E, Riordan S, Sheridan D, Smedile A, Fragomeli V, Müller T, Bahlo M, Stewart GJ, Booth DR, George J. IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon-alpha and ribavirin therapy. *Nat Genet* 2009; 41: 1100-1104
- 45 Ahlenstiel G, Booth DR, George J. IL28B in hepatitis C virus infection: translating pharmacogenomics into clinical practice. *J Gastroenterol* 2010; 45: 903-910
- 46 陈立艳, 周莉, 马英骥, 颜炳柱, 毕蔓茹, 杨宝山, 王威. 小剂量干扰素联合利巴韦林对丙型肝炎失代偿期肝硬化的治疗. 世界华人消化杂志 2010; 18: 2925-2928
- 47 阮连国, 朱清静, 蔡艳萍, 周星, 李霞, 万十千. 小剂量干扰素 α -2b递增方案联合利巴韦林治疗失代偿期丙型肝炎肝硬化的疗效观察. 中西医结合肝病杂志 2010; 2: 207
- 48 Di Bisceglie AM, Shiffman ML, Everson GT, Lindsay KL, Everhart JE, Wright EC, Lee WM, Lok AS, Bonkovsky HL, Morgan TR, Ghany MG, Morishima C, Snow KK, Dienstag JL. Prolonged therapy of advanced chronic hepatitis C with low-dose peginterferon. *N Engl J Med* 2008; 359: 2429-2441
- 49 徐丙发, 范清林, 魏伟. 干扰素 2α 及长效干扰素抗肝炎

- 病毒作用机制的研究进展. 中国药理学通报 2008; 10: 1276-1279
- 50 Nelson D, Benhamou Y, Chuang WL. Efficacy and safety results of albinterferon alfa-2b in combination with ribavirin in interferon alfa treatment-naïve patients with genotype 2 or 3 chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2009; 50(Suppl 1): s378
- 51 Kronenberger B, Zeuzem S. Current and future treatment options for HCV. *Ann Hepatol* 2009; 8: 103-112
- 52 IM, Sulkowski M, Kauffman R, McNair L, Alam J, Muir AJ. Telaprevir with peginterferon and ribavirin for chronic HCV genotype 1 infection. *N Engl J Med* 2009; 360: 1827-1838
- 53 Hézode C, Forestier N, Dusheiko G, Ferenci P, Pol S, Gooser T, Bronowicki JP, Bourlière M, Gharakhani S, Bengtsson L, McNair L, George S, Kieffer T, Kwong A, Kauffman RS, Alam J, Pawlotsky JM, Zeuzem S. Telaprevir and peginterferon with or without ribavirin for chronic HCV infection. *N Engl J Med* 2009; 360: 1839-1850
- 54 Kwo P, Lawitz E, McCone J. HCV SPRINT-1 final results: SVR 24 from a phase 2 study of boceprevir plus PegIntron (peginterferon alfa-2b)/ribavirin in treatment-naïve subjects with genotype 1 chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2009; 50(Suppl 1): s4

编辑 曹丽鸥 电编 闫晋利

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011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、补充或删除时, 本刊编辑部将把原稿连同审稿意见、编辑意见寄回给作者修改, 而作者必须于15 d内将单位介绍信、作者符合要点承诺书、版权转让信等书面材料寄回编辑部, 同时将修改后的电子稿件上传至在线办公系统; 逾期寄回的, 作重新投稿处理.

3 版权

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

幽门螺杆菌*iceA1*基因地域分布特征

黄敬敬, 战淑慧, 董全江, 董开芯

■背景资料

幽门螺杆菌(*H. pylori*)感染与胃癌的发生密切相关, 其毒力相关基因 *cagA*、*vacA* 的致病机制已被分子生物学、组织学和流行病学证实。近年研究发现 *H. pylori iceA* 基因也是一种潜在的毒力相关因素, 但其确切的致病机制仍未明, 有待进一步解决。

黄敬敬, 战淑慧, 董全江, 董开芯, 青岛大学医学院附属青岛市立医院消化内科及中心实验室 山东省青岛市 266071

作者贡献分布: 本文综述写作和资料分析由黄敬敬完成; 资料查阅由董开芯完成; 战淑慧与董全江完成审校工作。

通讯作者: 董全江, 教授, 主任医师, 266071, 山东省青岛市, 青岛市立医院消化内科及中心实验室. jiangacer@126.com

收稿日期: 2011-08-20 修回日期: 2011-10-08

接受日期: 2011-10-12 在线出版日期: 2011-10-18

Characteristics of geographical distribution of the *Helicobacter pylori iceA1* gene

Jing-Jing Huang, Shu-Hui Zhan, Quan-Jiang Dong, Kai-Xin Dong

Jing-Jing Huang, Shu-Hui Zhan, Quan-Jiang Dong, Kai-Xin Dong, Department of Gastroenterology & Department of Central Laboratory, Qingdao Municipal Hospital, Medical College of Qingdao University, Qingdao 266071, Shandong Province, China

Correspondence to: Quan-Jiang Dong, Professor, Department of Gastroenterology & Department of Central Laboratory, Qingdao Municipal Hospital, Medical College of Qingdao University, Qingdao 266071, Shandong Province, China. jiangacer@126.com

Received: 2011-08-20 Revised: 2011-10-08

Accepted: 2011-10-12 Published online: 2011-10-18

Abstract

The *iceA* gene has been recently identified as a virulence-related gene of *Helicobacter pylori* (*H. pylori*). The expression of *iceA1* is up-regulated in *H. pylori* contacted with epithelial cells. The *iceA1* gene shows a significant homology to the *nlaIII* gene of *Neisseria lactamica*, which encodes a NlaIII-like restriction endonuclease. *iceA1*-positive *H. pylori* strains enhance the expression of inflammatory factors in epithelial cells and are closely associated with the severity of gastric mucosal inflammation. In some strains, the *iceA1* gene may be inactivated due to frame shift, or replaced by *iceA2*. The strains from Asia and Africa mainly express the *iceA1*, while *iceA2* is predominant in American strains. *H. pylori* strains from Europe show genetic affinity towards both Asia and Europe strains. This pattern of geographical distribution of the *H. pylori iceA1* gene possibly reflects different disease profiles of different geographical regions.

■同行评议者

白爱平, 副教授, 南昌大学第一附属医院消化内科

Key Words: *Helicobacter pylori*; *iceA*; Virulence

Huang JJ, Zhan SH, Dong QJ, Dong KX. Characteristics of geographical distribution of the *Helicobacter pylori iceA1* gene. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(29): 3058-3063

摘要

iceA 基因是近年来发现的一种幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*, *H. pylori*) 毒力相关基因。 *H. pylori* 与胃黏膜上皮接触后可引起 *iceA1* 基因表达上调, 该基因与 *nlaIII* 基因 (位于乳糖奈瑟氏菌) 具有相似性, 其编码的蛋白质产物具有 NlaIII 样限制性核酸内切酶活性。研究表明, *iceA1* 阳性菌株能引起上皮细胞炎症因子表达水平增高, 与胃黏膜炎症程度的发生关系密切。在某些 *H. pylori* 菌株中 *iceA1* 基因可因存在框移突变而失活或者被 *iceA2* 基因取代。在亚洲和非洲的菌株主要表达 *iceA1* 基因, 美洲大陆则以 *iceA2* 多见, 而欧洲的 *iceA* 基因与亚洲和美洲菌株均具有相似性。 *H. pylori iceA1* 基因的地域分布特征很可能反映出不同地区的疾病转归差异性。

关键词: 幽门螺杆菌; *iceA*; 毒力

黄敬敬, 战淑慧, 董全江, 董开芯. 幽门螺杆菌 *iceA1* 基因地域分布特征. 世界华人消化杂志 2011; 19(29): 3058-3063
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/3058.asp>

0 引言

幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*, *H. pylori*) 是一种微需氧、螺旋状的革兰氏阴性杆菌, 定居于胃内, 可引起消化系统炎症及溃疡病的发生, 最终发展为胃癌^[1-4]。世界卫生组织已于1994年将 *H. pylori* 列为一类致癌原^[5]。全世界约有一半以上人口感染 *H. pylori*, 并终身携带。大部分感染者终身无消化系统症状产生, 但少数人最终发展为消化性溃疡病或胃癌^[6,7]。这与 *H. pylori* 基因组的高度多样性和异质性密切相关。第一个被检测出的 *H. pylori* 毒力相关基因 *cagA* (cytotoxin-associated gene) 位于 *cag* 致病岛, 其编码产物 *cagA*

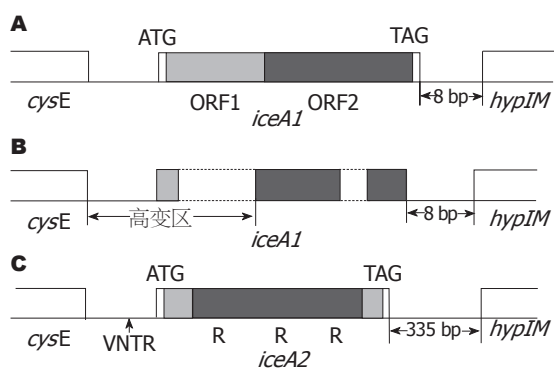


图1 *iceA1*和*iceA2*基因结构模式图。A: 阴影部分表示完整的*iceA1*基因, 由ORF1和ORF2两部分组成, 该基因与*nlaIIIR*有相似性。转录起始点为ATG密码子, 终止密码子为TAG, 与下游基因之间有保守的8 bp相连; B: 阴影区代表不完整的*iceA1*基因, 虚线部分表示该区域碱基发生框移突变, 不能表达出有功能的产物蛋白质, 属于假基因; C: 阴影部分代表全长为439 bp的*iceA2*基因, 中间区含有3个重复片段R, 基因两端的序列较为保守, 起始密码子位于上游VNTR序列的末端, 终止密码子为TAG, 与下游基因之间有约335 bp相对保守区。

能促进黏膜炎症反应, 感染*cagA*阳性*H.pylori*的个体更易发生消化性溃疡病^[8-12]。与*cagA*不同, *vacA* (vacuolating cytotoxin gene) 毒力基因存在于所有的*H.pylori*中。该基因含有s区、i区和m区^[13-16], 各区又可分为2个亚型。*vacA*基因编码的毒素能特异性作用于宿主细胞并产生空泡活性, 含有*vacA* s1/i1/m1基因型的*H.pylori*毒力最强^[17-20]。近年研究发现, *H.pylori*基因组中存在的高度变异的*iceA*基因也是一种潜在的毒力相关因素。当*H.pylori*与宿主上皮细胞接触后可诱导*iceA1*表达上调。*iceA1*与乳糖奈瑟氏菌*nlaIIIR*基因有同源性, 其表达具有*NlaIIIR*样限制性核酸内切酶活性。表达该产物的*H.pylori*与临床疾病发生的严重程度关系密切^[21-23], 但各家报道并不完全一致^[24-27]。本文就*iceA*基因研究最新进展作一综述。

1 *iceA*基因结构特征

当*H.pylori*与黏膜上皮细胞接触后可诱导菌株的一个基因表达上调, 转录产物mRNA增多, 称该基因为*iceA* (induced by contact with epithelium)。该基因位于*H.pylori*基因链上保守的*cysE*和*hpyIM*基因之间, 根据基因结构和编码产物的不同, 将*iceA*基因分为2大类, 即*iceA1*和*iceA2*, 二者的序列结构相差极大(图1)。

完整的*iceA1*基因(图1A)全长约为684 bp, 与奈瑟菌属的*nlaIIIR*基因有相似性(约60%)^[22,23], *nlaIIIR*编码的蛋白质*NlaIIIR*由230个氨基酸组成, 是一种限制性核酸内切酶, 能特异性作用

于DNA链上的CATG序列^[28]。完整的*iceA1*基因编码的产物由228个氨基酸组成。研究表明该蛋白质亦有*NlaIIIR*样的CATG剪切活性^[29,30]。构成*iceA1*的核苷酸序列可分为高度多变的ORF1区和相对保守的ORF2区两部分, 通过序列分析及蛋白质表达研究发现^[30-33], 该基因转录起始位点为ORF1区起始处的ATG密码子, 终止密码子为基因末端的TAG序列。由于*iceA*基因的碱基序列高度多变, 并且将近80%菌株在该基因上存在框移突变(主要发生在ORF1区), 导致转录提前终止, 因此不能表达出有功能的蛋白质产物, 属于假基因(图1B), 只有完整的*iceA1*序列才能表达出具有*NlaIIIR*样限制性核酸内切酶活性的蛋白质。*iceA2*基因序列与*iceA1*约有40%相似性^[22,23], 但基因结构完全不同(图1C)。位于*iceA2*基因两端编码14个氨基酸和10个氨基酸的碱基序列较为保守, 中间区序列高度多变, 含有0-3个重复片段, 该片段由105 bp构成, 因此*iceA2*基因长度可分为4种(124 bp, 229 bp, 334 bp, 439 bp)^[31]。该基因上游区域中含有一段可变数量的串联重复序列(VNTR序列), 转录起始密码子ATG位于VNTR序列末端的保守区域内。由于*iceA2*基因主要由无意义的重复片段构成, 不能编码有功能蛋白质, 因此该基因亦属于无功能基因。

2 *iceA*与下游*hpyIM*基因及上游*cysE*基因的毗邻关系

*iceA1*基因末端与下游的*hpyIM*基因起始端之间有8 bp组成的高度保守区相连, *H.pylori hpyIM*基因长约990 bp, 有2个转录起始位点, 其转录水平受*iceA1*基因的调控^[34]。*hpyIM*基因产物蛋白为腺嘌呤甲基化酶, 能特异性识别CATG序列, 有效防止自身DNA链被限制性核酸内切酶降解。该蛋白与完整的*iceA1*基因产物可能形成II型限制-修饰系统, 这一系统已在多种细菌中发现^[35-38]。由于绝大多数*iceA1*基因编码的蛋白产物不具有*NlaIIIR*样的核酸内切酶活性, 故*H.pylori iceA1-hpyIM*基因形成的限制-修饰系统是无功能的^[39]。*iceA1*基因的ORF1区域含有大量框移突变, 因此在ORF2转录起始区与上游的*cysE*基因末端之间存在一段由315-394 bp组成的高变区。*cysE*基因编码产物为丝氨酸乙酰转移酶同系物, 该基因含有516 bp, 其中G+C含量约50%, 远远高于*iceA1*与*hpyIM*基因的G+C含量(约36%)^[32]。*iceA2*基因末端与下游*hpyIM*基因起始端之间含有约335 bp的相对保守区, 其中将近77%核苷酸序列一致^[31]。

■ 研发前沿

目前已通过分子生物学技术阐明*iceA*基因的结构特征, 但对其具体致病机制的研究仍处于初级阶段, 主要通过流行病学统计方法分析该毒力因素与消化系统疾病发生的相关性。

■相关报道

近年来许多学者都对*iceA*基因的结构特征、发病机制进行了研究,认为该毒力因素与临床疾病发生的严重程度密切相关,但各家报道对该结论仍存在争议。

*iceA2*菌株的*hpyIM*基因只有一个转录起始点,该基因的转录水平较*iceA1*链*hpyIM*基因低^[34]。*iceA2*转录起始位点与*cysE*基因末端之间的碱基数量不等(224-338 bp),其中含有高度保守的VNTR序列(可变数量的串联重复序列),该序列由1-15个8 bp重复片段组成,*iceA2*基因的转录起始密码子位于VNTR序列下游的90 bp中^[32]。

3 *iceA*毒力菌株与临床疾病的相关性

*iceA*阳性*H.pylori*导致宿主临床疾病的发生是多因素共同作用的结果。人们对*iceA*基因编码产物所引发临床疾病的具体致病机制的研究还处于初级阶段。研究显示,当*H.pylori*与宿主胃黏膜上皮接触后*iceA1*基因表达上调,完整的*iceA1*转录产物有NlaIIIR蛋白样的限制性核酸内切酶活性,能特异性剪切DNA片段上的CATG序列,其下游的*hpyIM*基因产物能有效识别并防止自身DNA序列被降解,但该种*iceA1*基因产物不能被分泌到细胞外,因此可能不直接参与细胞损伤的病理过程。*iceA1*阳性菌株最终可引起胃黏膜上皮内中性粒细胞浸润,产生的IL-8浓度增高,导致黏膜炎症程度加重及消化性溃疡病的发生,其具体致病机制仍需做进一步研究^[22,23,31,33,40,41]。*iceA2*阳性菌株与临床疾病的发生无相关性。在Caner等^[42]的研究中发现,从患有消化性溃疡病的患者胃黏膜中分离出的*H.pylori*菌株,大多数(68.8%)含有*iceA1*基因,统计学分析后表明,*iceA1*菌株的感染与消化性溃疡病的发生有显著相关性,这与之之前Peek等^[22]的观点一致,但东亚国家^[24,25,43-45]的此类研究并未发现*iceA1*菌株的感染与临床病变的严重程度相关,认为*iceA1*基因不能作为预测*H.pylori*导致临床疾病发生的标志。目前的研究大多是通过统计学方法来分析*iceA1*毒力菌株的感染与消化性疾病发生的相关性,在该毒力因素引发临床疾病发生的具体分子生物学机制方面仍需进行深入的探索。细菌的毒力因素包括蛋白介质的形成和入侵,细菌的持续感染及对宿主的长期损害^[46]。因此,*iceA1*阳性菌株感染导致临床疾病的发生,除了与菌株自身基因型的多样性和异质性有关外,与*H.pylori*持续感染时间(宿主年龄因素)以及不同地区不同种族宿主对外界刺激的反应及防御能力也具有相关性。

4 *iceA*基因的地域分布规律

世界七大板块中,除南极洲无常驻人口外,其

他各大洲均有人类定居几百年甚至上千年,而*H.pylori*定植人体也有数百至上千年历史。*H.pylori*的基因组具有高度多样性和异质性,这是与宿主长期共同演变进化的结果。不同地区流行的*H.pylori*基因组结构明显不同,而基因组多样性则影响细菌毒力因子的功能及抗原形成,即在细菌进化过程中,毒力因素也存在生物-地理变异^[47]。例如,在西方欧美国家,有将近60%的*H.pylori*菌株含有*cagA*基因,并且有证据表明,该毒力因素与消化性溃疡病及胃癌的发生关系密切;而在东亚国家,*cagA*基因几乎存在于所有的*H.pylori*中^[48,49],但绝大多数携带者并没有产生临床症状。*vacA*基因也是如此,如*vacAs1a*常见于美国、欧洲北部等国家,*vacAs1b*多见于拉丁美洲、葡萄牙及西班牙人口中,而*vacAs1c*则几乎只在东亚人群中发现^[50-53]。

*iceA*基因在各大洲也存在地域性分布差异。在亚洲(中国、韩国、日本、泰国、印度、马来西亚、新加坡),*iceA1*基因占主导地位,各地区的统计学调查显示,在东亚、南亚绝大多数国家,*iceA1*菌株与临床疾病的发生无相关性^[24,25,43,44,54-59]。但在亚洲西部(土耳其、沙特阿拉伯)国家的研究表明,*iceA1*阳性菌株能导致临床病理结局的发生,并且该地区*iceA2*基因的表达率也显著高于东南亚地区^[42,60]。在美洲(美国、哥伦比亚、巴西)则以*iceA2*基因为主^[22,24,61],并且不同地区的*iceA2*基因序列构成不同,在北美洲(美国)*iceA2*主要由229 bp构成,而南美洲(哥伦比亚)的基因多含有334 bp。在美国进行的一项研究指出,*iceA1*阳性菌株能够导致宿主黏膜上皮细胞发生炎症反应,加重中性粒细胞的浸润程度,引起严重临床疾病发生^[22]。但在其他地区的调查尚不支持此观点^[24,61]。欧洲大陆东北部与亚洲相连,西部则靠近美洲大陆,欧洲的*H.pylori*菌株与亚洲和美洲印第安人菌株均表现出亲缘性^[47,62]。欧洲东北部各国(荷兰、保加利亚、英国)大部分地区以*iceA1*基因为主导^[23,47,63],这与亚洲大陆表现较为一致,在荷兰有学者认为*iceA1*毒力菌株的感染与消化性溃疡病的发生有相关性^[23]。欧洲西南部地区(葡萄牙、西班牙)则以*iceA2*基因为主^[64,65],在葡萄牙进行的研究中发现*iceA1*毒力因素的表达与临床疾病的发生之间有统计学意义,这与北美洲研究结果一致。与亚洲大陆相比,欧洲东北部虽以*iceA1*基因为主导,但*iceA1*的表达率明显低于亚洲,而*iceA2*阳性菌株相对较多;同时与美洲大陆相比,欧洲

西南部国家基因型虽以*iceA2*为主, 但阳性率远低于美洲地区, 而*iceA1*表达较高. 这一现象表明, 欧洲流行的*H.pylori*菌株与亚洲及美洲菌株均表现出相似性, 其表达的*iceA*基因序列介于亚洲和欧洲之间. 非洲中北部地区(尼日利亚、突尼斯)以*iceA1*为主导^[66,67], *iceA1*表达率显著高于*iceA2*基因, 对分离的*H.pylori*菌株进行统计学分析得出结论, 该地区*iceA1*菌株感染与临床疾病的发生无相关性, 且*iceA1*基因与亚洲菌株有流行病学相似之处. 但在南非地区*iceA1*、*iceA2*基因型的表达率均很高^[68], 以*iceA2*为主, 同时有较高水平的*iceA1*、*iceA2*基因混合感染.

总体来说, *iceA*基因的分布存在地域性差异, 在亚洲、非洲主要表达为*iceA1*基因, 在美洲大陆则以*iceA2*为主导, 而欧洲大陆的*iceA*基因则表现出与亚洲、美洲菌株的相似性. 在大多数地区的研究中未发现*iceA1*毒力菌株感染与临床疾病发生的因果联系, 但在美国、荷兰、南非等少数研究中指出, *iceA1*是*H.pylori*致病的毒力因素之一, 认为*iceA1*菌株能加重胃壁黏膜细胞的炎症程度, 与消化性溃疡病的发生关系密切.

5 结论

人类发现*H.pylori*已有二十多年历史, 对其毒力基因(如*cagA*、*vacA*)的致病机制已进行了较为系统全面的研究和阐述, 但对新的毒力因素*iceA1*的研究还处于初级阶段, 该毒力菌株与临床疾病的相关性仍存在争议. 因此, 对其致病机理进行更为深入的研究能更好地解释*iceA1*菌株感染与临床疾病发生的因果联系. 目前, 还没有获得完整的*iceA*基因地域差异性分布资料, 如大洋洲、亚洲及北美洲以北广大地区*iceA*基因分布及该毒力因素与当地人口临床疾病发生的相关性还未知, 有待做进一步调查研究以阐明地域分布差异的原因. 随着这些问题的解决, 我们将更全面深刻的认识*H.pylori*对人类的致病作用, 为研究微生物的地域分布、进化起源问题提供参考.

6 参考文献

- 1 Covacci A, Telford JL, Del Giudice G, Parsonnet J, Rappuoli R. Helicobacter pylori virulence and genetic geography. *Science* 1999; 284: 1328-1333
- 2 Graham DY, Yamaoka Y. H.pylori and cagA: relationships with gastric cancer, duodenal ulcer, and reflux esophagitis and its complications. *Helicobacter* 1998; 3: 145-151

- 3 Wen S, Moss SF. Helicobacter pylori virulence factors in gastric carcinogenesis. *Cancer Lett* 2009; 282: 1-8
- 4 Parkin DM. The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int J Cancer* 2006; 118: 3030-3044
- 5 Venkateshwari A, Krishnaveni D, Venugopal S, Shashikumar P, Vidyasagar A, Jyothy A. Helicobacter pylori infection in relation to gastric cancer progression. *Indian J Cancer* 2011; 48: 94-98
- 6 Sachs G, Wen Y, Scott DR. Gastric infection by Helicobacter pylori. *Curr Gastroenterol Rep* 2009; 11: 455-461
- 7 Hatakeyama M. Helicobacter pylori and gastric carcinogenesis. *J Gastroenterol* 2009; 44: 239-248
- 8 Blaser MJ, Perez-Perez GI, Kleanthous H, Cover TL, Peek RM, Chyou PH, Stemmermann GN, Nomura A. Infection with Helicobacter pylori strains possessing cagA is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Res* 1995; 55: 2111-2115
- 9 Gerhard M, Lehn N, Neumayer N, Borén T, Rad R, Schepp W, Miehke S, Classen M, Prinz C. Clinical relevance of the Helicobacter pylori gene for blood-group antigen-binding adhesin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 12778-12783
- 10 Parsonnet J, Friedman GD, Orentreich N, Vogelmann H. Risk for gastric cancer in people with CagA positive or CagA negative Helicobacter pylori infection. *Gut* 1997; 40: 297-301
- 11 Hamlet A, Thoreson AC, Nilsson O, Svennerholm AM, Olbe L. Duodenal Helicobacter pylori infection differs in cagA genotype between asymptomatic subjects and patients with duodenal ulcers. *Gastroenterology* 1999; 116: 259-268
- 12 Hatakeyama M. SagA of CagA in Helicobacter pylori pathogenesis. *Curr Opin Microbiol* 2008; 11: 30-37
- 13 Rhead JL, Letley DP, Mohammadi M, Hussein N, Mohagheghi MA, Eshagh Hosseini M, Atherton JC. A new Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin determinant, the intermediate region, is associated with gastric cancer. *Gastroenterology* 2007; 133: 926-936
- 14 Ogiwara H, Graham DY, Yamaoka Y. vacA i-region subtyping. *Gastroenterology* 2008; 134: 1267; author reply 1268
- 15 Jang S, Jones KR, Olsen CH, Joo YM, Yoo YJ, Chung IS, Cha JH, Merrell DS. Epidemiological link between gastric disease and polymorphisms in VacA and CagA. *J Clin Microbiol* 2010; 48: 559-567
- 16 Jones KR, Whitmire JM, Merrell DS. A Tale of Two Toxins: Helicobacter Pylori CagA and VacA Modulate Host Pathways that Impact Disease. *Front Microbiol* 2010; 1: 115
- 17 Atherton JC, Cao P, Peek RM, Tummuru MK, Blaser MJ, Cover TL. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of Helicobacter pylori. Association of specific vacA types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J Biol Chem* 1995; 270: 17771-17777
- 18 Atherton JC, Peek RM, Tham KT, Cover TL, Blaser MJ. Clinical and pathological importance of heterogeneity in vacA, the vacuolating cytotoxin gene of Helicobacter pylori. *Gastroenterology* 1997; 112: 92-99
- 19 Basso D, Zambon CF, Letley DP, Stranges A, Marchet A, Rhead JL, Schiavon S, Guariso G, Ceroti M, Nitti D, Rugge M, Plebani M, Atherton JC. Clinical relevance of Helicobacter pylori cagA and vacA gene polymorphisms. *Gastroenterology* 2008; 135:

■创新盘点

本文全面地阐述了*H.pylori iceA*基因的结构特征, 对*iceA*毒力菌株与临床疾病的相关性特别是该基因的地域分布规律进行了描述.

■应用要点

- iceA* 阳性 *H. pylori* 与消化性疾病的发生有相关性。对 *iceA* 基因具体致病机制及地域分布规律进行进一步研究对胃癌的预防及治疗提供思路。
- 20 Miehlik S, Kirsch C, Agha-Amiri K, Günther T, Lehn N, Malfertheiner P, Stolte M, Ehninger G, Bayerdörffer E. The *Helicobacter pylori* vacA s1, m1 genotype and cagA is associated with gastric carcinoma in Germany. *Int J Cancer* 2000; 87: 322-327
 - 21 Sheu SM, Sheu BS, Yang HB, Li C, Chu TC, Wu JJ. Presence of iceA1 but not cagA, cagC, cagE, cagF, cagN, cagT, or orf13 genes of *Helicobacter pylori* is associated with more severe gastric inflammation in Taiwanese. *J Formos Med Assoc* 2002; 101: 18-23
 - 22 Peek RM, Thompson SA, Donahue JP, Tham KT, Atherton JC, Blaser MJ, Miller GG. Adherence to gastric epithelial cells induces expression of a *Helicobacter pylori* gene, iceA, that is associated with clinical outcome. *Proc Assoc Am Physicians* 1998; 110: 531-544
 - 23 van Doorn LJ, Figueiredo C, Sanna R, Plaisier A, Schneeberger P, de Boer W, Quint W. Clinical relevance of the cagA, vacA, and iceA status of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 1998; 115: 58-66
 - 24 Yamaoka Y, Kodama T, Gutierrez O, Kim JG, Kashima K, Graham DY. Relationship between *Helicobacter pylori* iceA, cagA, and vacA status and clinical outcome: studies in four different countries. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 2274-2279
 - 25 Ito Y, Azuma T, Ito S, Suto H, Miyaji H, Yamazaki Y, Kato T, Kohli Y, Keida Y, Kuriyama M. Sequence analysis and clinical significance of the iceA gene from *Helicobacter pylori* strains in Japan. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 483-488
 - 26 Amjad N, Osman HA, Razak NA, Kassian J, Din J, bin Abdullah N. Clinical significance of *Helicobacter pylori* cagA and iceA genotype status. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 4443-4447
 - 27 Ciftci IH, Uslan I, Dilek FH, Aşık G, Özgür MA, Dilek ON. [Investigation of *Helicobacter pylori* iceA1 and iceA2 genes in patients with chronic gastritis and gastric cancer]. *Mikrobiyol Bul* 2011; 45: 228-233
 - 28 Morgan RD, Camp RR, Wilson GG, Xu SY. Molecular cloning and expression of NlaIII restriction-modification system in *E. coli*. *Gene* 1996; 183: 215-218
 - 29 Xu Q, Peek RM, Miller GG, Blaser MJ. The *Helicobacter pylori* genome is modified at CATG by the product of *hpyIM*. *J Bacteriol* 1997; 179: 6807-6815
 - 30 Xu Q, Morgan RD, Roberts RJ, Xu SY, van Doorn LJ, Donahue JP, Miller GG, Blaser MJ. Functional analysis of iceA1, a CATG-recognizing restriction endonuclease gene in *Helicobacter pylori*. *Nucleic Acids Res* 2002; 30: 3839-3847
 - 31 Figueiredo C, Quint WG, Sanna R, Sablon E, Donahue JP, Xu Q, Miller GG, Peek RM, Blaser MJ, van Doorn LJ. Genetic organization and heterogeneity of the iceA locus of *Helicobacter pylori*. *Gene* 2000; 246: 59-68
 - 32 Donahue JP, Peek RM, Van Doorn LJ, Thompson SA, Xu Q, Blaser MJ, Miller GG. Analysis of iceA1 transcription in *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 2000; 5: 1-12
 - 33 Peek RM, van Doorn LJ, Donahue JP, Tham KT, Figueiredo C, Blaser MJ, Miller GG. Quantitative detection of *Helicobacter pylori* gene expression in vivo and relationship to gastric pathology. *Infect Immun* 2000; 68: 5488-5495
 - 34 Xu Q, Blaser MJ. Promoters of the CATG-specific methyltransferase gene *hpyIM* differ between iceA1 and iceA2 *Helicobacter pylori* strains. *J Bacteriol* 2001; 183: 3875-3884
 - 35 Saunders NJ, Jeffries AC, Peden JF, Hood DW, Tettelin H, Rappuoli R, Moxon ER. Repeat-associated phase variable genes in the complete genome sequence of *Neisseria meningitidis* strain MC58. *Mol Microbiol* 2000; 37: 207-215
 - 36 Dybvig K, Sitaraman R, French CT. A family of phase-variable restriction enzymes with differing specificities generated by high-frequency gene rearrangements. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 13923-13928
 - 37 Wilson GG. Organization of restriction-modification systems. *Nucleic Acids Res* 1991; 19: 2539-2566
 - 38 Hood DW, Deadman ME, Jennings MP, Bisceric M, Fleischmann RD, Venter JC, Moxon ER. DNA repeats identify novel virulence genes in *Haemophilus influenzae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 11121-11125
 - 39 Xu Q, Morgan RD, Roberts RJ, Blaser MJ. Identification of type II restriction and modification systems in *Helicobacter pylori* reveals their substantial diversity among strains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 9671-9676
 - 40 Ramis IB, Fonseca TL, de Moraes EP, Fernandes MS, Mendoza-Sassi R, Rodrigues O, Juliano CR, Scaini CJ, da Silva PE. Molecular Basis of pathogenicity in *Helicobacter pylori* clinical isolates. *J Clin Microbiol* 2010; 48: 3776-3778
 - 41 Ma YJ, Duan GC, Zhang RG, Fan QT, Zhang WD. Mutation of iceA in *Helicobacter pylori* compromised IL-8 induction from human gastric epithelial cells. *J Basic Microbiol* 2010; 50 Suppl 1: S83-S88
 - 42 Caner V, Yilmaz M, Yoneti N, Zencir S, Karagenc N, Kaleli I, Bagci H. H pylori iceA alleles are disease-specific virulence factors. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 2581-2585
 - 43 Han YH, Liu WZ, Zhu HY, Xiao SD. Clinical relevance of iceA and babA2 genotypes of *Helicobacter pylori* in a Shanghai population. *Chin J Dig Dis* 2004; 5: 181-185
 - 44 Wong BC, Yin Y, Berg DE, Xia HH, Zhang JZ, Wang WH, Wong WM, Huang XR, Tang VS, Lam SK. Distribution of distinct vacA, cagA and iceA alleles in *Helicobacter pylori* in Hong Kong. *Helicobacter* 2001; 6: 317-324
 - 45 Zheng PY, Hua J, Yeoh KG, Ho B. Association of peptic ulcer with increased expression of Lewis antigens but not cagA, iceA, and vacA in *Helicobacter pylori* isolates in an Asian population. *Gut* 2000; 47: 18-22
 - 46 Merrell DS, Falkow S. Frontal and stealth attack strategies in microbial pathogenesis. *Nature* 2004; 430: 250-256
 - 47 Kauser F, Hussain MA, Ahmed I, Srinivas S, Devi SM, Majeed AA, Rao KR, Khan AA, Sechi LA, Ahmed N. Comparative genomics of *Helicobacter pylori* isolates recovered from ulcer disease patients in England. *BMC Microbiol* 2005; 5: 32
 - 48 Mizushima T, Sugiyama T, Komatsu Y, Ishizuka J, Kato M, Asaka M. Clinical relevance of the babA2 genotype of *Helicobacter pylori* in Japanese clinical isolates. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 2463-2465
 - 49 Yamaoka Y. Mechanisms of disease: *Helicobacter pylori* virulence factors. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2010; 7: 629-641
 - 50 van Doorn LJ, Figueiredo C, Sanna R, Pena S, Mi-

- dolo P, Ng EK, Atherton JC, Blaser MJ, Quint WG. Expanding allelic diversity of *Helicobacter pylori* vacA. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 2597-2603
- 51 Yamaoka Y. *Helicobacter pylori* typing as a tool for tracking human migration. *Clin Microbiol Infect* 2009; 15: 829-834
- 52 Yamaoka Y, Orito E, Mizokami M, Gutierrez O, Saitou N, Kodama T, Osato MS, Kim JG, Ramirez FC, Mahachai V, Graham DY. *Helicobacter pylori* in North and South America before Columbus. *FEBS Lett* 2002; 517: 180-184
- 53 Sugimoto M, Yamaoka Y. The association of vacA genotype and *Helicobacter pylori*-related disease in Latin American and African populations. *Clin Microbiol Infect* 2009; 15: 835-842
- 54 Perng CL, Lin HJ, Sun IC, Tseng GY. *Helicobacter pylori* cagA, iceA and vacA status in Taiwanese patients with peptic ulcer and gastritis. *J Gastroenterol Hepatol* 2003; 18: 1244-1249
- 55 Nishiya D, Shimoyama T, Fukuda S, Yoshimura T, Tanaka M, Munakata A. Evaluation of the clinical relevance of the iceA1 gene in patients with *Helicobacter pylori* infection in Japan. *Scand J Gastroenterol* 2000; 35: 36-39
- 56 Chomvarin C, Namwat W, Chaicumpar K, Mairiang P, Sangchan A, Sripan B, Tor-Udom S, Vilaichone RK. Prevalence of *Helicobacter pylori* vacA, cagA, cagE, iceA and babA2 genotypes in Thai dyspeptic patients. *Int J Infect Dis* 2008; 12: 30-36
- 57 Mukhopadhyay AK, Kersulyte D, Jeong JY, Datta S, Ito Y, Chowdhury A, Chowdhury S, Santra A, Bhattacharya SK, Azuma T, Nair GB, Berg DE. Distinctiveness of genotypes of *Helicobacter pylori* in Calcutta, India. *J Bacteriol* 2000; 182: 3219-3227
- 58 Wu CC, Chou PY, Hu CT, Liu ZC, Lin CY, Tseng YH, Lin NT. Clinical Relevance of the vacA, iceA, cagA, and flaA genes of *Helicobacter pylori* strains isolated in Eastern Taiwan. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 2913-2915
- 59 Kim SY, Woo CW, Lee YM, Son BR, Kim JW, Chae HB, Youn SJ, Park SM. Genotyping CagA, VacA subtype, IceA1, and BabA of *Helicobacter pylori* isolates from Korean patients, and their association with gastroduodenal diseases. *J Korean Med Sci* 2001; 16: 579-584
- 60 Momenah AM, Tayeb MT. *Helicobacter pylori* cagA and iceA genotypes status and risk of peptic ulcer in Saudi patients. *Saudi Med J* 2007; 28: 382-385
- 61 Ashour AA, Collares GB, Mendes EN, de Gusmão VR, Queiroz DM, Magalhães PP, de Carvalho AS, de Oliveira CA, Nogueira AM, Rocha GA, Rocha AM. iceA genotypes of *Helicobacter pylori* strains isolated from Brazilian children and adults. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 1746-1750
- 62 Ghose C, Perez-Perez GI, Dominguez-Bello MG, Pride DT, Bravi CM, Blaser MJ. East Asian genotypes of *Helicobacter pylori* strains in Amerindians provide evidence for its ancient human carriage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 15107-15111
- 63 Boyanova L, Yordanov D, Gergova G, Markovska R, Mitov I. Association of iceA and babA genotypes in *Helicobacter pylori* strains with patient and strain characteristics. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2010; 98: 343-350
- 64 Nogueira C, Figueiredo C, Carneiro F, Gomes AT, Barreira R, Figueira P, Salgado C, Belo L, Peixoto A, Bravo JC, Bravo LE, Realpe JL, Plaisier AP, Quint WG, Ruiz B, Correa P, van Doorn LJ. *Helicobacter pylori* genotypes may determine gastric histopathology. *Am J Pathol* 2001; 158: 647-654
- 65 Araya JC, Anabalón L, Roá I, Bravo M, Villaseca MA, Guzmán P, Roa JC. [Association between *Helicobacter pylori* genotype and the severity of gastritis in infected adults]. *Rev Med Chil* 2004; 132: 1345-1354
- 66 Smith SI, Kirsch C, Oyediji KS, Arigbabu AO, Coker AO, Bayerdörfer E, Miehle S. Prevalence of *Helicobacter pylori* vacA, cagA and iceA genotypes in Nigerian patients with duodenal ulcer disease. *J Med Microbiol* 2002; 51: 851-854
- 67 Ben Mansour K, Fendri C, Zribi M, Masmoudi A, Labbene M, Fillali A, Ben Mami N, Najjar T, Meherzi A, Sfar T, Buruoa C. Prevalence of *Helicobacter pylori* vacA, cagA, iceA and oipA genotypes in Tunisian patients. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2010; 9: 10
- 68 Kidd M, Peek RM, Lastovica AJ, Israel DA, Kummer AF, Louw JA. Analysis of iceA genotypes in South African *Helicobacter pylori* strains and relationship to clinically significant disease. *Gut* 2001; 49: 629-635

■同行评价

本综述内容较为新颖, 全面阐述了 *H.pylori iceA* 基因的研究现状和最新进展, 具有较好的参考价值。

编辑 曹丽鸥 电编 闫晋利

miR-200家族在消化系统肿瘤中的研究进展

杜平, 张庆瑜

杜平, 张庆瑜, 天津医科大学总医院消化内科 天津市 300052
国家自然科学基金资助项目, No. 81172356
天津市自然科学基金资助项目, No. 10JCZDJC18500
作者贡献分布: 本文由杜平综述, 张庆瑜审校.
通讯作者: 张庆瑜, 主任医师, 教授, 博士生导师, 300052, 天津市和平区鞍山道154号, 天津医科大学总医院消化内科.
zhangqy@tjmu.edu.cn
电话: 022-60362207
收稿日期: 2011-07-21 修回日期: 2011-10-11
接受日期: 2011-10-14 在线出版日期: 2011-10-18

miR-200 family and gastrointestinal tumors

Ping Du, Qing-Yu Zhang

Ping Du, Qing-Yu Zhang, Department of Gastroenterology, Tianjin Medical University General Hospital, Tianjin 300052, China
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 81172356; and the Natural Science Foundation of Tianjin City, No. 10JCZDJC18500
Correspondence to: Qing-Yu Zhang, Professor, Department of Gastroenterology, Tianjin Medical University General Hospital, No. 154 Anshan Road, Heping District, Tianjin 300052, China. zhangqy@tjmu.edu.cn
Received: 2011-07-21 Revised: 2011-10-11
Accepted: 2011-10-14 Published online: 2011-10-18

Abstract

The miR-200 family (including miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141, and miR-429) play important roles in proliferation, invasion and metastasis of tumors of epithelial origin. Gastrointestinal tumors belong to a group of tumors of epithelial origin. This article reviews the latest advances in understanding the relationship between the miR-200 family and gastrointestinal tumors.

Key Words: miR-200 family; Gastrointestinal tumors; Epithelial-mesenchymal transition

Du P, Zhang QY. miR-200 family and gastrointestinal tumors. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(29): 3053-3057

摘要

miR-200家族(miR-200a、miR-200b、miR-200c、miR-141、miR-429)是众多已被发现的

microRNA中的一员, 其在上皮来源肿瘤的增殖、侵袭、转移中的作用成为近年来的研究热点之一, 本文对miR-200家族在同为上皮来源的消化系统肿瘤中的研究进展进行了综述.

关键词: miR-200家族; 消化系统肿瘤; 上皮-间质转化

杜平, 张庆瑜. miR-200家族在消化系统肿瘤中的研究进展. 世界华人消化杂志 2011; 19(29): 3053-3057
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/3053.asp>

0 引言

microRNA是一类长度约22个核苷酸左右的小分子非编码RNA, 以转录后调节的方式改变靶基因的表达水平. miRNA通常由RNA聚合酶II转录生成双链pri-miRNA, 后者经Drosha酶在核中切割形成70个核苷酸左右的双链pre-miRNA^[1,2]. 并在exportin-5等分子的作用下转运出核, 在细胞质中由Dicer酶等加工为成熟的miRNA^[3,4], 最后成熟的单链miRNA分子与Argonaute蛋白等形成RNA诱导的沉默复合体(RNA-induced silencing complex, RISC), 并作用于特异mRNA的3'UTR(非编码区)从而抑制翻译过程的进行或直接降解mRNA^[5,6]. miRNA对靶基因的作用方式分为2种, 一种是通过与靶基因的完全互补配对而直接导致mRNA的降解; 一种是通过与靶基因的不完全互补结合, 抑制翻译过程. miRNA通过调节靶基因的表达, 在多种细胞进程(如细胞的分化、增殖、生长、迁移、存活等)中具有重要作用, 进而调节机体内多种病理和生理过程^[7].

1 miR-200家族

miR-200家族包括miR-200a、miR-200b、miR-200c、miR-141和miR-429五个成员. 根据不同的功能及“种子区”序列(第2-7位核酸)的差异, miR-200家族可分为2个亚家族: 分别为miR-200a/miR-141和miR-200b/miR-200c/miR-429; 而根据不同的基因组定位, miR-200家族又可分为2个簇: miR-200a/miR-200b/miR-429基因簇定位

■背景资料

microRNA是一类长约22个核苷酸左右、进化保守的内源性非编码小分子RNA. 自1993年在线虫中发现第一种microRNA(命名为lin-4)以来, 研究者对microRNA的生物合成、功能及作用机制进行了大量研究. 多项研究表明, microRNA以转录后调节的方式调节目的基因的表达, 在个体发育、细胞增殖和分化、细胞凋亡以及肿瘤的发生发展过程中都有一定的调控作用.

■同行评议者

朴云峰, 教授, 吉林大学第一医院临床医院消化科

■ 研发前沿

miR-200家族在上皮来源肿瘤(如消化系统肿瘤、乳腺癌、子宫内膜癌、卵巢癌、前列腺癌等)中的作用成为近年来的研究热点。如研究其在肿瘤的发生发展、侵袭转移、化疗耐药等方面的作用靶点与调控机制。目前亟待研究miR-200家族内各成员在不同肿瘤,以及同一类肿瘤不同阶段中的表达水平变化和作用,同时还要寻找更多具有应用价值的靶点。

于1号染色体,而miR-200c/miR-141基因簇定位于12号染色体^[8]。miR-200家族成员在多种上皮来源肿瘤中的表达及功能成为目前研究热点,在不同的肿瘤细胞系及组织中,miR-200家族成员的表达并不完全相同。

2 miR-200家族与上皮间质转化

2.1 上皮间质转化 上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)是上皮细胞失去其极性和细胞间连结,重组其细胞骨架,表达间质细胞标志物,并显示出侵袭特性的横向分化过程^[9]。EMT在胚胎发育,创伤修复与组织再生,上皮来源肿瘤的转移与侵袭过程中均发挥着重要作用^[8-11]。多种因子可诱导肿瘤细胞发生EMT,如转化生长因子 β (TGF- β)^[12], Met(一种酪氨酸激酶受体), BCL9-2^[10]等。发生EMT的肿瘤细胞,除了形态学上的变化,功能上也发生相应变化,如更强的侵袭性和迁移能力,对失巢凋亡的抵抗^[13]等。在分子水平上,通常作为发生EMT标志的有表达降低的上皮钙粘素(E-cadherin),含量升高的波形蛋白(vimentin)和神经钙黏素(N-cadherin), β -连环素(β -catenin)的细胞核定位,同时还有促进EMT发生的转录因子如Snail1(Snail), Snail2(Slug), Twist, EF1/ZEB1, SIP1/ZEB2表达升高等^[10]。Park等^[8]通过对60种不同肿瘤细胞系的研究,认为miR-200家族成员是肿瘤细胞中EMT过程的关键调控因子,与维持细胞的上皮特性密切相关,miR-200低表达可引起EMT发生^[8,14]。Chen等^[15]也报道了在卵巢癌中,过度表达的miR-429可以逆转EMT过程而诱导间质上皮转化(mesenchymal-epithelial transition, MET)。

2.2 上皮钙粘蛋白(E-cadherin) E-cadherin(CDH1)是依赖钙离子的跨膜糖蛋白,与上皮细胞间的黏附相关,同时还可与 α -catenin, β -catenin等相互作用,是上皮细胞的分子标志物之一。E-cadherin表达降低是EMT的重要标志之一^[10]。多种促进EMT发生的转录因子如ZEB1, Snail等通过结合到其启动子区的E-box来抑制其转录^[16,17]。Matsumura等^[18]证实肝癌、胃癌等多种肿瘤中E-cadherin表达减弱与侵袭转移相关。miR-200家族表达升高可使多种肿瘤细胞系E-cadherin表达升高并降低其侵袭性^[8,14,19]。

2.3 ZEB1与ZEB2 ZEB1和ZEB2(SIP1)同为含有锌指结构,能结合到靶基因启动子区E-box的转录因子。二者通过与E-cadherin基因启动子区结合,抑制其转录,从而降低E-cadherin蛋白表达,

促进EMT的发生^[16,20]。Bindels等^[21]报道ZEB2可激活vimentin的启动子,引起vimentin的过表达。miR-200家族主要通过结合二者mRNA的3'非编码区(3'UTR)来抑制ZEB1和ZEB2的表达,进而提高E-cadherin水平,从而逆转EMT过程,降低瘤细胞的侵袭和迁移能力^[8]。Hurteau等^[22]以及Christoffersen等^[23]分别报道,miR-200家族主要促使ZEB1和ZEB2 mRNA降解来抑制二者表达。Bracken等^[20]在犬肾MDCK细胞系和人类乳腺癌细胞系中报道了ZEB1-SIP1可抑制miR-200a、miR-200b和miR-429的表达。Burk等^[24]也在乳腺癌,直肠癌,胰腺癌细胞系中证实了ZEB1可抑制miR-141, miR-200c的转录。以上研究表明,miR-200家族与ZEB1/SIP1间存在着一个双向负反馈调节的环路。

2.4 其他 Burk等^[24]报道在乳腺癌、结肠癌、胰腺癌细胞系中miR-141可以在mRNA和蛋白水平上抑制TGF- β 2的表达,从而抑制EMT的发生。Ahmad等^[25]在乳腺癌细胞系中发现,磷酸葡萄糖异构酶(PGI)过表达可增加核因子- κ B(NF- κ B)的DNA结合活性,促进ZEB1/ZEB2的转录,诱导EMT的发生,且瘤细胞中的miR-200家族含量减少。Cochrane等^[26]证实了在乳腺癌,子宫内膜癌,卵巢癌中,miR-200c可显著降低EMT标志物之一-纤维连接蛋白-1(fibronectin 1, FN-1)的含量。

3 miR-200家族与Wnt/ β -catenin信号通路

Wnt/ β -catenin通路与包括直肠癌在内的多种肿瘤的发生发展密切相关^[27],正常情况下由GSK3 β , APC, Axin, CK1组成的复合物使 β -catenin的氨基末端磷酸化,从而促使 β -catenin在胞浆中的泛素化蛋白酶体降解^[28]。当Wnt配体存在时,并在其受体卷曲蛋白(Fzd)及低密度脂蛋白受体相关蛋白5/6(LRP5/6)的共同作用下,或者降解复合物的组分发生基因突变或失活时,非磷酸化的 β -catenin在胞浆聚集并进入细胞核,与TCF/LEF家族成员形成复合物,在其他共激活因子的协同下,激活下游基因的转录^[29],如c-Myc^[30],细胞周期蛋白D1(cyclin D1)基因^[31]等。这些基因的产物与细胞增殖,肿瘤发生密切相关^[30,31]。Saydam等^[32]报道,在人脑脊膜瘤细胞中,miR-200a的下调导致 β -catenin和cyclin D1表达的升高,同时 β -catenin的mRNA是miR-200a的直接靶点,miR-200a可抑制其翻译,进而抑制Wnt通路激活,抑制细胞增殖。他们还认为,升高的

E-cadherin与 β -catenin在细胞膜上结合, 参与细胞间黏附, 减少了 β -catenin在胞浆内的聚集及其核转移, 进而抑制Wnt/ β -catenin通路的活性。

4 miR-200家族在消化系统肿瘤中的表达变化

4.1 食管癌 众所周知, Barrett's食管为食管癌的癌前病变。Smith等^[33]报道, Barrett's食管上皮细胞中的miR-200家族成员表达低于正常的胃黏膜或十二指肠黏膜上皮, 同时miR-200家族的异常表达与食管上皮异型增生以及腺癌的发生密切相关。

4.2 胃癌 Du等^[34]证实在胃癌组织和胃癌细胞系中miR-141表达下降, 并且过表达的miR-141可明显抑制胃癌细胞系MGC-803的生长。Shinozaki等^[35]最近报道在手术切除的胃癌组织中, miR-200a和miR-200b表达水平下调, 同时证实了EB病毒相关胃癌组织中miR-200a和miR-200b含量下降。王驰等^[36]也报道miR-200b对胃癌细胞系MGC-803的生长有调节作用, 提高miR-200b含量可抑制其生长, 他们还认为这种抑制作用可能与Bcl-2蛋白表达减少有关。

4.3 胰腺癌 Li等^[37]报道, 在大部分胰腺癌细胞系中, 检测到了miR-200a和miR-200b基因甲基化减少以及二者的过度表达, SIP1基因启动子甲基化导致的表达下调, 同时伴随有E-cadherin的表达下调。

4.4 肝胆管癌 Meng等^[38]报道, 在胆管癌细胞系中, miR-21、miR-200b、miR-141过度表达, 并发现抑制miR-200b、miR-21可提高癌细胞对化疗药吉西他滨的敏感性。而降低miR-141的表达可抑制肿瘤细胞的增殖。经吉西他滨处理的肿瘤细胞, miR-200b、miR-21在体内外试验中均有明显升高, 然而在裸鼠移植瘤模型上, miR-141表达减少。

4.5 直肠结肠癌 Bandrés等^[39]证实miR-200a、miR-200b、miR-200c在结直肠癌细胞系中表达上升, Rossi等^[40]报道在结直肠癌细胞系中, 5-氟尿嘧啶(5-Fu)处理后可使miR-200b含量下调, 而miR-141表达上升, 同时miR-200b可使c-Abl, Src和Ras等癌基因失活。

5 miR-200家族与临床的联系

5.1 肿瘤的侵袭与转移 多个实验室的体内外试验均证实, miR-200家族的高表达可降低多种肿瘤初期的增殖, 侵袭和转移能力^[15,16,19,26]。然而Dykxhoorn等^[41]也报道了在裸鼠移植瘤模型中,

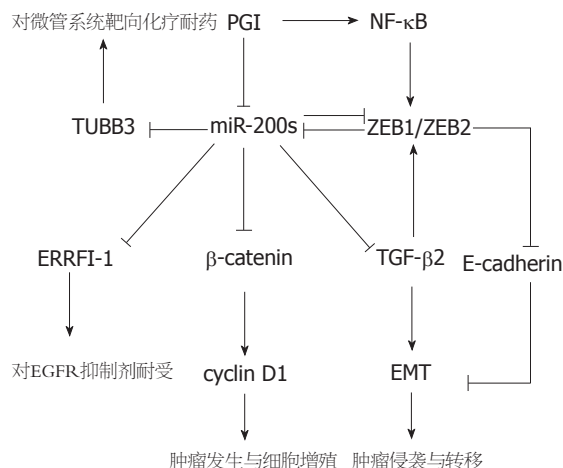


图1 miR-200家族在肿瘤中的部分作用。

高表达miR-200家族成员的鼠乳腺癌细胞, 拥有更强的肺转移和成瘤能力, 同时此类细胞中E-cadherin高表达, 说明至少在某些类型的肿瘤细胞中, miR-200家族可能促进其远端转移。

5.2 肿瘤的诊断 Li等^[37]报道, 与健康人相比, 胰腺癌患者血清中的miR-200a和miR-200b含量显著升高, 提示了miR-200家族在某些肿瘤诊断中的潜在价值, 为其早期诊断提供了线索。

5.3 肿瘤的治疗 Cochrane等^[26]报道, 在低分化子宫内膜癌, 卵巢癌, 乳腺癌细胞系中, miR-200c可通过抑制 β -微管蛋白III(class III beta-tubulin TUBB3)基因的表达提高作用于细胞微管系统化疗药的敏感性, 如紫杉醇, 长春新碱等。陈勇等^[42]证实了miR-200c可逆转胃癌细胞系对顺铂的耐药性。Adam等^[19]也报道在膀胱癌细胞系中, miR-200家族成员可通过抑制ERRFI-1/Mig-6基因表达提高瘤细胞对以表皮生长因子受体(EGFR)为靶点的治疗的敏感性。以上研究均揭示了miR-200家族成员在肿瘤治疗中的应用价值(图1)。

6 结论

miR-200家族对上皮来源肿瘤, 尤其是对消化系统肿瘤的细胞表型、增殖、侵袭、转移有着重要的调节作用, 同时对其诊断与治疗也有着重要价值。然而, miR-200家族成员在不同组织中的表达水平和作用有所不同, 未来除了进一步研究各成员在不同癌组织和肿瘤不同阶段中的作用外, 还要继续寻找其潜在靶点, 为消化系统肿瘤的联合治疗、基因治疗、靶向治疗提供更多的依据和指导。

7 参考文献

- 1 Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, Kim VN. MicroRNA genes are transcribed by RNA

■相关报道

Korpal等报道miR-200家族在乳腺癌动物模型中可促进其肺部转移瘤的形成, 并进一步发现这与miR-200家族直接靶点Sec23a表达降低有关, Sec23a蛋白可促进细胞分泌Igfbp4和Tnag11蛋白, 这2种蛋白均有抑制肿瘤远端转移的作用。以上研究表明miR-200家族在肿瘤发生发展的不同阶段中的作用是不同的。

■创新盘点

本文回顾了近年来miR-200家族在多种消化系统肿瘤中基础与临床方面的最新研究进展, 并对其临床应用前景进行了展望。临床成果与基础研究相结合, 有利于读者对miR-200家族的作用有更加全面深刻的理解。

■应用要点

随着越来越多miR-200家族成员的靶点被发现,其在上皮来源肿瘤特别是在消化系统肿瘤中的作用将被进一步阐释.对miR-200家族的深入研究将为消化系统肿瘤的早期诊断、预后评估,与其他药物联合治疗,基因靶向治疗等提供更多的指导和依据.

- 2 polymerase II. *EMBO J* 2004; 23: 4051-4060
- 2 Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Rådmark O, Kim S, Kim VN. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 2003; 425: 415-419
- 3 Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev* 2003; 17: 3011-3016
- 4 Lund E, Güttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U. Nuclear export of microRNA precursors. *Science* 2004; 303: 95-98
- 5 Gregory RI, Chendrimada TP, Cooch N, Shiekhattar R. Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell* 2005; 123: 631-640
- 6 Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004; 116: 281-297
- 7 Mongroo PS, Rustgi AK. The role of the miR-200 family in epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Biol Ther* 2010; 10: 219-222
- 8 Park SM, Gaur AB, Lengyel E, Peter ME. The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2. *Genes Dev* 2008; 22: 894-907
- 9 Castilla MÁ, Moreno-Bueno G, Romero-Pérez L, Van De Vijver K, Biscuola M, López-García MÁ, Prat J, Matías-Guiu X, Cano A, Oliva E, Palacios J. Micro-RNA signature of the epithelial-mesenchymal transition in endometrial carcinosarcoma. *J Pathol* 2011; 223: 72-80
- 10 Acloque H, Adams MS, Fishwick K, Bronner-Fraser M, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease. *J Clin Invest* 2009; 119: 1438-1449
- 11 Lee JM, Dedhar S, Kalluri R, Thompson EW. The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *J Cell Biol* 2006; 172: 973-981
- 12 Zavadil J, Böttinger EP. TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene* 2005; 24: 5764-5774
- 13 Micalizzi DS, Farabaugh SM, Ford HL. Epithelial-mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2010; 15: 117-134
- 14 Gregory PA, Bert AG, Paterson EL, Barry SC, Tsykin A, Farshid G, Vadas MA, Khew-Goodall Y, Goodall GJ. The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nat Cell Biol* 2008; 10: 593-601
- 15 Chen J, Wang L, Matyunina LV, Hill CG, McDonald JF. Overexpression of miR-429 induces mesenchymal-to-epithelial transition (MET) in metastatic ovarian cancer cells. *Gynecol Oncol* 2011; 121: 200-205
- 16 Aigner K, Dampier B, Descovich L, Mikula M, Sultan A, Schreiber M, Mikulits W, Brabletz T, Strand D, Obrist P, Sommergruber W, Schweifer N, Wernitznig A, Beug H, Foisner R, Eger A. The transcription factor ZEB1 (deltaEF1) promotes tumour cell dedifferentiation by repressing master regulators of epithelial polarity. *Oncogene* 2007; 26: 6979-6988
- 17 Nieto MA. The snail superfamily of zinc-finger transcription factors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3: 155-166
- 18 Matsumura T, Makino R, Mitamura K. Frequent down-regulation of E-cadherin by genetic and epigenetic changes in the malignant progression of hepatocellular carcinomas. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 594-599
- 19 Adam L, Zhong M, Choi W, Qi W, Nicoloso M, Arora A, Calin G, Wang H, Siefker-Radtke A, McConkey D, Bar-Eli M, Dinney C. miR-200 expression regulates epithelial-to-mesenchymal transition in bladder cancer cells and reverses resistance to epidermal growth factor receptor therapy. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 5060-5072
- 20 Bracken CP, Gregory PA, Kolesnikoff N, Bert AG, Wang J, Shannon MF, Goodall GJ. A double-negative feedback loop between ZEB1-SIP1 and the microRNA-200 family regulates epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res* 2008; 68: 7846-7854
- 21 Bindels S, Mestdagt M, Vandewalle C, Jacobs N, Volders L, Noël A, van Roy F, Berx G, Foidart JM, Gilles C. Regulation of vimentin by SIP1 in human epithelial breast tumor cells. *Oncogene* 2006; 25: 4975-4985
- 22 Hurteau GJ, Spivack SD, Brock GJ. Potential mRNA degradation targets of hsa-miR-200c, identified using informatics and qRT-PCR. *Cell Cycle* 2006; 5: 1951-1956
- 23 Christoffersen NR, Silahatoglu A, Orom UA, Kauppinen S, Lund AH. miR-200b mediates post-transcriptional repression of ZFH1B. *RNA* 2007; 13: 1172-1178
- 24 Burk U, Schubert J, Wellner U, Schmalhofer O, Vincan E, Spaderna S, Brabletz T. A reciprocal repression between ZEB1 and members of the miR-200 family promotes EMT and invasion in cancer cells. *EMBO Rep* 2008; 9: 582-589
- 25 Ahmad A, Aboukameel A, Kong D, Wang Z, Sethi S, Chen W, Sarkar FH, Raz A. Phosphoglucose isomerase/autocrine motility factor mediates epithelial-mesenchymal transition regulated by miR-200 in breast cancer cells. *Cancer Res* 2011; 71: 3400-3409
- 26 Cochrane DR, Spoelstra NS, Howe EN, Nordeen SK, Richer JK. MicroRNA-200c mitigates invasiveness and restores sensitivity to microtubule-targeting chemotherapeutic agents. *Mol Cancer Ther* 2009; 8: 1055-1066
- 27 Polakis P. Wnt signaling and cancer. *Genes Dev* 2000; 14: 1837-1851
- 28 MacDonald BT, Tamai K, He X. Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell* 2009; 17: 9-26
- 29 Barker N, Clevers H. Mining the Wnt pathway for cancer therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 2006; 5: 997-1014
- 30 He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* 1998; 281: 1509-1512
- 31 Tetsu O, McCormick F. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 1999; 398: 422-426
- 32 Saydam O, Shen Y, Würdinger T, Senol O, Boke E, James MF, Tannous BA, Stemmer-Rachamimov AO, Yi M, Stephens RM, Fraefel C, Gusella JF, Krichevsky AM, Breakefield XO. Downregulated microRNA-200a in meningiomas promotes tumor growth by reducing E-cadherin and activating the Wnt/beta-catenin signaling pathway. *Mol Cell Biol* 2009; 29: 5923-5940
- 33 Smith CM, Watson DI, Leong MP, Mayne GC, Michael MZ, Wijnhoven BP, Hussey DJ. miR-200 family expression is downregulated upon neoplastic progression of Barrett's esophagus. *World J Gastro*

- enterol 2011; 17: 1036-1044
- 34 Du Y, Xu Y, Ding L, Yao H, Yu H, Zhou T, Si J. Down-regulation of miR-141 in gastric cancer and its involvement in cell growth. *J Gastroenterol* 2009; 44: 556-561
- 35 Shinozaki A, Sakatani T, Ushiku T, Hino R, Isogai M, Ishikawa S, Uozaki H, Takada K, Fukayama M. Downregulation of microRNA-200 in EBV-associated gastric carcinoma. *Cancer Res* 2010; 70: 4719-4727
- 36 王驰, 钟鹰, 栗滔, 黄靓, 毛振江, 肖祥. miR-200b对胃癌MGC-803细胞增殖的影响以及对Bcl-2表达的调节. *世界华人消化杂志* 2010 18: 2077-2083
- 37 Li A, Omura N, Hong SM, Vincent A, Walter K, Griffith M, Borges M, Goggins M. Pancreatic cancers epigenetically silence SIP1 and hypomethylate and overexpress miR-200a/200b in association with elevated circulating miR-200a and miR-200b levels. *Cancer Res* 2010; 70: 5226-5237
- 38 Meng F, Henson R, Lang M, Wehbe H, Maheshwari S, Mendell JT, Jiang J, Schmittgen TD, Patel T. Involvement of human micro-RNA in growth and response to chemotherapy in human cholangiocarcinoma cell lines. *Gastroenterology* 2006; 130: 2113-2129
- 39 Bandrés E, Cubedo E, Agirre X, Malumbres R, Zárate R, Ramirez N, Abajo A, Navarro A, Moreno I, Monzó M, García-Foncillas J. Identification by Real-time PCR of 13 mature microRNAs differentially expressed in colorectal cancer and non-tumoral tissues. *Mol Cancer* 2006; 5: 29
- 40 Rossi L, Bonmassar E, Faraoni I. Modification of miR gene expression pattern in human colon cancer cells following exposure to 5-fluorouracil in vitro. *Pharmacol Res* 2007; 56: 248-253
- 41 Dykxhoorn DM, Wu Y, Xie H, Yu F, Lal A, Petrocca F, Martinvalet D, Song E, Lim B, Lieberman J. miR-200 enhances mouse breast cancer cell colonization to form distant metastases. *PLoS One* 2009; 4: e7181
- 42 陈勇, 左静, 刘颖, 高鸿, 刘巍. miRNA-200c逆转胃癌SGC7901/DDP细胞对顺铂的耐药性及其相关机制. *肿瘤* 2010; 30: 646-650

■同行评价

miR-200家族在上皮来源肿瘤,尤其是对消化系统肿瘤的细胞表型,增殖、侵袭、转移有着重要的调节的作用,同时对其诊断与治疗也有着重要价值.该文综述了近年miR-200与肿瘤发生机制的研究进展,为治疗提供了新的靶点.

编辑 李军亮 电编 闫晋利

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011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)

光敏剂-磁性纳米粒子螯合剂对磁性纳米粒子在VX2肝转移癌细胞内靶向性分布的影响

葛海燕, 常卓林, 李淑萍, 刘豫昊, 龚健

■背景资料

研究表明, 纳米技术在磁共振成像、细胞内高温热疗等方面都具有独特的优势。但是, 由于纳米粒子本身没有与肿瘤细胞特异性结合的靶向性特点, 单纯的纳米粒子难以在肿瘤细胞内集聚, 因而在肿瘤组织内就难以发挥纳米粒子的生物学作用。

葛海燕, 常卓林, 同济大学附属东方医院胃肠外科 上海市 200120

李淑萍, 同济大学附属东方医院科研科 上海市 200120

刘豫昊, 同济大学附属第十人民医院SICU 上海市 200072

龚健, 同济大学附属第十人民医院肝胆外科 上海市 200072

教育部“高等学校博士学科点专项科研基金”资助项目, No. 20070247057

上海市科委“科技攻关计划课题基金”资助项目, No. 054119555

作者贡献分布: 本文的试验设计, 课题申请由葛海燕完成; 研究过程由常卓林、李淑萍、刘豫昊及龚健操作完成; 实验仪器管理与质量控制由李淑萍完成; 论文写作由葛海燕、刘豫昊及龚健完成。

通讯作者: 葛海燕, 主任医师, 教授, 博士生导师, 200120, 上海市, 同济大学附属东方医院胃肠外科. gesurgery@163.com

收稿日期: 2011-04-21 修回日期: 2011-09-25

接受日期: 2011-10-08 在线出版日期: 2011-10-18

Targeted distribution of photosensitizer-manoparticle conjugates in transplanted VX-2 liver tumors in rabbits

Hai-Yan Ge, Zhuo-Lin Chang, Shu-Ping Li, Yu-Hao Liu, Jian Gong

Hai-Yan Ge, Zhuo-Lin Chang, Department of Gastrointestinal Surgery, Shanghai East Hospital of Tongji University, Shanghai 200120, China

Shu-Ping Li, Department of Science Research, Shanghai East Hospital of Tongji University, Shanghai 200120, China

Yu-Hao Liu, Department of SICU, Shanghai East Hospital of Tongji University, Shanghai 200120, China

Jian Gong, Department of Gastrointestinal Surgery, Shanghai East Hospital of Tongji University, Shanghai 200120, China

Supported by: the Doctoral Research Fund of the Ministry of Education of China, No. 20070247057; and the Science and Technological Research Fund of Shanghai Municipal Science and Technological Commission, No. 054119555

Correspondence to: Hai-Yan Ge, Professor, Department of Gastrointestinal Surgery, Shanghai East Hospital of Tongji University, Shanghai 200120, China. gesurgery@163.com

Received: 2011-04-21 Revised: 2011-09-25

Accepted: 2011-10-08 Published online: 2011-10-18

Abstract

AIM: To investigate the targeted distribution of photosensitizer-manoparticle conjugates in transplanted VX-2 liver tumors in rabbits.

METHODS: Forty healthy New Zealand rabbits were randomly divided into four groups:

normal control group, photosensitizer group, nanoparticle group, and conjugate group. A rabbit model of transplanted VX-2 liver tumor was created. On days 16, 18 and 20 after model creation, the animals in each group were injected with saline, photosensitizer, nanoparticles and conjugate solution via the ear vein, respectively. On day 22, animals were sacrificed to observe the growth of tumors and examine pathological changes in liver tissue by Prussian blue staining, transmission electron microscopy and atomic absorption spectroscopy.

RESULTS: Prussian blue staining showed that there were plenty of iron particles stained blue inside cancer cells in the conjugate group, which were much more than those in other groups. There were few iron particles inside normal liver cells. Transmission electron microscopy revealed that there were large quantity of black small particles inside the lysosomes, endoplasmic reticulum, mitochondria and nucleus of cancer cells in the conjugate group, which were much more than those in other groups. There were only few black small particles inside normal liver cells.

CONCLUSION: Photosensitizer-nanoparticle conjugates have cancer-targeted effect and could help nanoparticles enter into transplanted VX-2 liver tumor cells.

Key Words: Nanoparticles; Photosensitizer; Transplanted VX-2 liver tumor; Conjugate

Ge HY, Chang ZL, Li SP, Liu YH, Gong J. Targeted distribution of photosensitizer-manoparticle conjugates in transplanted VX-2 liver tumors in rabbits. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(29): 3064-3069

摘要

目的: 研究光敏剂-磁性纳米粒子螯合物促进磁性纳米粒子在VX2肝转移癌细胞内的靶向性分布。

方法: 取健康新西兰大白兔40只, 体质量

■同行评议者

黄培林, 教授, 东南大学

2.5-3.0 kg. 建立VX2肝转移瘤模型, 随机分成空白对照组、光敏剂组、磁性纳米粒子组和光敏剂-磁性纳米粒子螯合物组, 在成瘤后的第16、18和20 d, 经兔耳缘静脉分别注射生理盐水、光敏剂、磁性纳米粒子和螯合物. 于第22 d处死试验兔, 剖腹观察肿瘤生长情况, 取正常肝组织和癌结节, 作普鲁氏蓝铁染色、透射电镜检查和原子光谱吸收半定量检测.

结果: (1)普鲁氏蓝染色后, 在螯合剂组癌结节内见到大量蓝染铁颗粒, 明显多于其他各组, 而肝细胞内少见蓝染铁颗粒; (2)电镜检查, 螯合剂组癌细胞内有大量散在的黑色细小颗粒, 主要分布在溶酶体、内质网、线粒体和细胞核内; 而肝细胞内只有少量黑色细小颗粒; (3)原子光谱吸收半定量检测显示, 在癌结节内, 螯合剂组铁含量(9.09 mg/L)明显高于空白对照组、光敏剂组和磁性纳米粒子组($P<0.01$), 癌组织内铁含量也明显高于正常肝组织的铁含量($P<0.01$).

结论: 光敏剂-磁性纳米粒子螯合剂能够促进磁性纳米粒子在肝转移瘤结节内的聚集.

关键词: 磁性纳米粒子; 光敏剂; VX2肝转移瘤; 螯合剂

葛海燕, 常卓林, 李淑萍, 刘豫昊, 龚健. 光敏剂-磁性纳米粒子螯合剂对磁性纳米粒子在VX2肝转移瘤细胞内靶向性分布的影响. 世界华人消化杂志 2011; 19(29): 3064-3069
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/3064.asp>

0 引言

肝转移瘤是影响结直肠癌手术预后的主要因素之一, 大约50%-70%的患者在根治性手术后会发生异时性肝转移, 死亡患者中有70%-90%存在肝转移瘤. 由于肝转移瘤具有多发性、弥漫性分布的特点, 使得对肝转移瘤的早期诊断和治疗都缺乏有效的方法^[1]. 近年来纳米技术的深入发展使人们看到了诊断、治疗肝转移瘤的希望^[2]. 一些研究表明, 纳米技术在磁共振成像、细胞内高温热疗等方面都具有独特的优势^[3,4]. 但是, 由于纳米粒子本身没有与肿瘤细胞特异性结合的靶向性特点, 单纯的纳米粒子难以在肿瘤细胞内集聚, 因而在肿瘤组织内就难以发挥纳米粒子的生物学作用. 我们先期的研究表明, 光敏剂可以与磁性纳米粒子结合形成螯合剂, 并且这种光敏剂-磁性纳米粒子螯合剂可以进入培养的结肠癌细胞中. 因此, 本研究通过兔VX-2肝移植瘤模型, 观察光敏剂-磁性纳米粒子螯合剂是否能够促进磁性纳米粒子在肝移植瘤细胞内的聚集.

1 材料和方法

1.1 材料 健康清洁级新西兰大白兔, 雌雄各半, 40只, 体质量2.0-2.5 kg, 同济大学实验动物中心以及同济大学附属同济医院动物实验中心提供并饲养, 许可证号: SYXK(沪)2007-0031, 实验动物生产许可证号: SCXK(沪)2004-0007. VX2鳞癌细胞新西兰大白兔: 由上海中医药大学附属普陀区中心医院放射科李铭、李森医师惠赠. 光敏剂: 主要成分为血卟啉单甲醚(HMME)(10 g/L), 避光, -20 °C保存, 由上海第二军医大学红绿光研究所提供. 磁性纳米粒子: 主要成分为葡聚糖4万色包被 Fe_3O_4 粒子, 铁离子含量为1.32 mol/L, 水合粒径50 nm, 多分散系数PDI = 0.197, 型号061010磁粒, 由上海交通大学纳米材料研究所古晨宏教授惠赠. 显微镜及成像系统: LEICA DM IRB显微镜, 徕卡仪器有限公司产品. 透射电镜: CM120 Philips 公司产品. 原子吸收光谱仪: 安捷伦科技上海有限公司产品.

1.2 方法

1.2.1 光敏剂-纳米磁性螯合剂溶液的制备: 取光敏剂10 μL , 纳米磁性粒子150 μL , 0.9%NaCl溶液10 mL. 等比值取光敏剂溶液、纳米磁性粒子溶液、0.9%NaCl溶液, 避光的条件下混匀, 并在37 °C下水浴30 min, 分装为10 mL一管. 避光, 4 °C保存.

1.2.2 兔VX2肝转移瘤模型的建立: 取新西兰大白兔, 体质量2.0-2.5 kg. 取3%戊巴比妥钠溶液1.0 mL/kg, 沿耳缘静脉缓慢推注, 麻醉完全后取仰卧位, 以剑突为中心备皮, 直径约10 cm. 常规消毒. 在剑突下行纵行切口, 长约3 cm, 进腹后显露肝左中央叶, 用组织钳从膈面斜型穿刺肝组织, 长约1 cm左右, 注意切忌穿透肝脏组织脏面. 将预先从荷瘤种兔取下的新鲜瘤组织块(1 mm \times 1 mm \times 1 mm)2-3块塞入窦道中, 用纱布压迫窦道口处3-5 min, 再用明胶海绵覆盖表面, 防止种植的肿瘤组织块脱落, 逐层关腹. 待实验兔苏醒后送返动物房, 禁食12 h. 术后于后肢肌注1 mL硫酸庆大霉素, 每天1次, 连用3 d.

1.2.3 实验分组及处理: 取40只VX2荷瘤兔, 雌雄各半, 随机分为4组: 空白对照组、光敏剂组、磁性纳米粒子组(粒子组)和光敏剂-磁性纳米粒子螯合剂组(螯合剂组). 成瘤后每天观察体温、心率等生命体征变化及体质量等一般情况, 于第16、18、20 d经耳缘静脉分别注射生理盐水(1 mL/kg), 光敏剂[1 $\mu\text{L}/(\text{mL}\cdot\text{kg})$]、磁性纳米粒子[15 $\mu\text{L}/(\text{mL}\cdot\text{kg})$]和螯合剂[2 $\mu\text{L}/(\text{mL}\cdot\text{kg})$], 于第

■ 研发前沿

光敏剂可以与磁性纳米粒子结合形成螯合剂, 并且这种光敏剂-磁性纳米粒子螯合剂可以进入培养的结肠癌细胞中.

■ 相关报道

光燕翔等以纳米沉淀法制备光敏感纳米微球,将负载52盐酸乙酰氨基丙酸(52ALA)的光敏感纳米微球对膀胱癌进行光动力学治疗,结果显示光敏感纳米微球可以显著提高光动力学杀伤效应。

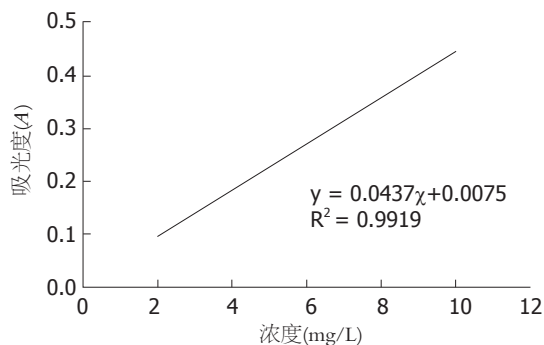


图1 原子吸收光谱测定铁离子含量的标准曲线

22 d处死荷瘤兔,剖腹观察肿瘤生长情况,并取每组的癌结节和正常肝组织,分别作普鲁氏铁染色、透射电镜观察以及原子光谱吸收仪检测。

统计学处理 采用SPSS13.0统计学软件对所得结果进行统计学分析,实验数据用mean±SD表示, $P>0.05$ 被认为差异无统计学意义, $P<0.05$ 被认为差异有统计学意义, $P<0.01$ 被认为差异有显著统计学意义。

2 结果

2.1 应用原子吸收光谱分析样本中铁离子含量 为了客观地验证在不同组别的肝转移癌结节内铁离子的多寡,实验中采用原子吸收光谱分析技术分析样本中铁离子的含量。根据对标准浓度的测定结果绘制工作曲线,并计算出相应的函数关系公式(图1)。在铁离子浓度(mg/L)为2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0时,对应的吸光度(A)分别为0.121, 0.180, 0.269, 0.339, 0.460。

整合剂组的铁离子相对含量最高,达到9.09 mg/L,明显高于纳米粒子组、光敏剂组和空白对照组,均有非常显著的统计学意义($P<0.01$)。纳米粒子组也高于光敏剂组和空白组($P<0.05$)。光敏剂组和空白组比较,无统计学意义(表1)。

上述结果表明,通过将磁性纳米粒子与光敏剂整合的方式,能够促进磁性纳米粒子进入肿瘤细胞。单纯的磁性纳米粒子只有极少量能够进入肿瘤细胞内,但是明显少于整合剂组,这也从另一个侧面验证了整合剂携带铁的能力。光敏剂因为本身不含铁离子,所以和空白组对比没有统计学意义。正常肝组织由于血供丰富,肝窦内富含枯否氏细胞,对纳米粒子等颗粒物质具有非特异性吞噬功能,并且肝细胞和肝窦内的红细胞本身也含有微量的铁离子,因而在各个组别的正常肝组织内也能测出铁离子含量,但是没有显著性差异($P>0.05$)。

表1 各组标本铁相对浓度的比较 ($n=40$, mg/L, mean±SD)

分组	肿瘤	肝脏
整合剂组	9.09 ± 2.31	4.43 ± 1.10
纳米粒子组	4.97 ± 1.53	4.53 ± 1.11
光敏剂组	3.45 ± 0.61	4.82 ± 1.94
空白对照组	3.30 ± 0.26	4.10 ± 0.70

2.2 HE染色,光镜下观察癌结节形态 癌组织表现为细胞排列紊乱,失去正常的排列结构、层次或极向,大量的癌细胞成团状或巢状,细胞较正常大,细胞核增大、深染,有病理性核分裂象。证实实验中肝组织中增生的结节为癌组织。

2.3 普鲁士蓝染色,光镜下观察标本中含铁离子的分布 在普鲁士蓝染色切片中,空白对照组:无论是肿瘤组织还是正常肝组织,在其切片中均未发现蓝染颗粒;整合剂组可见到在中性红染色的背景下,大量散在或片状分布的蓝色颗粒(图2A);光敏剂组的肿瘤组织中几乎未见到蓝染颗粒(图2B);纳米粒子组的肿瘤组织内偶见到少许的蓝色颗粒(图2C)。从这些图片对比可以看出,整合剂组的肿瘤组织内铁离子的含量最多,纳米粒子组与光敏剂组的肿瘤组织内铁离子的含量极少,提示整合剂可以促进更多的磁性纳米粒子进入肿瘤细胞内。

2.4 电镜下观察纳米粒子在癌细胞内的分布 在透射电镜下,癌细胞的大小和形态很不一致,尤其是癌细胞核的体积增大,核浆比例较正常的增大,核的大小、形状和染色不一,核染色质深,呈粗颗粒状,分布不均,常堆积在核膜下,使核膜显得增厚,常有病理性核分裂象。

整合剂组的电镜图像显示,核内可以清晰地看到大量散在的黑色细小点状颗粒,为高电子密度影,在胞核周围也可见到散在的黑色颗粒,部分颗粒为溶酶体所吞噬。而在组织间隙内未见到类似颗粒(图3A)。

光敏剂组可见到胞核较大,形状变异。在胞质内见到溶酶体、内质网、核糖体等细胞器,未见到黑色细小点状颗粒(图3B)。纳米粒子组在肿瘤细胞核内可见极少量的铁颗粒(图3C)。空白对照组除见到成片的肿瘤细胞,胞核大小各异,在胞核与胞质内均未见到黑色点状颗粒。

3 讨论

近年来,纳米技术在肿瘤研究领域的应用越来越引起关注^[2-4]。其中磁性纳米材料(Fe_3O_4 、

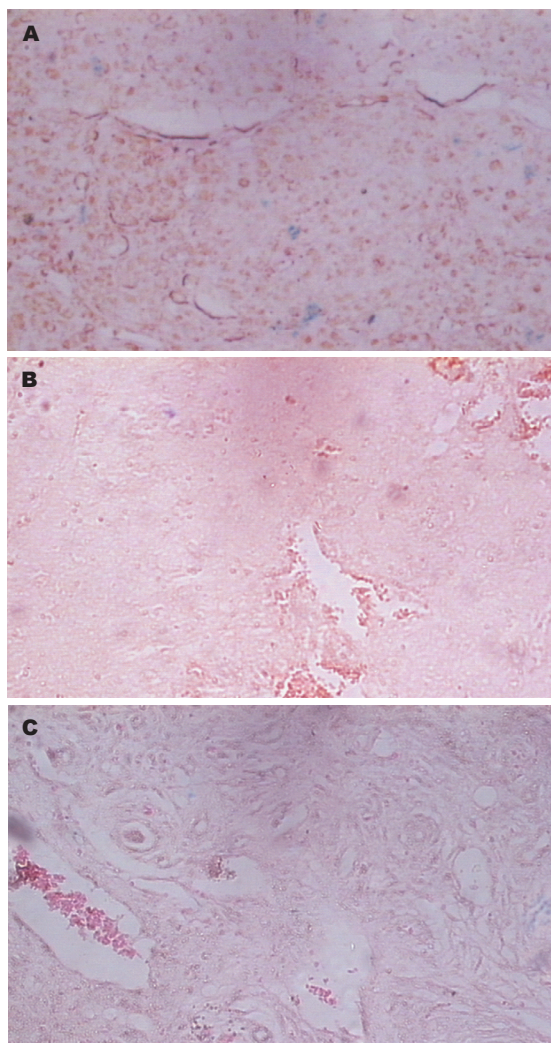


图 2 光镜下观察标本中含铁离子的分布(普鲁士蓝染色). A: 整合剂组光镜照片, 在肿瘤组织中可见大量蓝染颗粒; B: 光敏剂组光镜照片, 极少见到蓝染颗粒; C: 纳米粒子组光镜照片, 极少见到蓝染颗粒.

$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 作为一类新材料, 由于其独特的理化性质, 如量子尺寸效应、小尺寸效应、表面与界面效应和宏观量子隧道效应等, 使其在肿瘤诊断、治疗的研究中受到广泛重视. 别彩群等^[5]成功制备了抗肝癌单链抗体二聚体高分子免疫纳米颗粒, 初步研究证明对肝癌细胞增殖具有抑制作用. 纳米级 Fe_3O_4 粒子作为磁共振造影剂在临床上已经得到应用. 但是, 存在的难题是磁性纳米粒子缺乏靶向性, 它不能特异性地在肿瘤细胞或肿瘤组织内形成浓聚区, 因而影响了其生物学效能的发挥.

光动力疗法(Photodynamic therapy, PDT)是近年来正在快速发展中的肿瘤治疗新方法, 已广泛应用于皮肤表面、口咽部、食管、膀胱等体表或脏腔表面的各种癌前病变、早期肿瘤、癌性梗阻的治疗, 并且都具有较肯定的疗效.

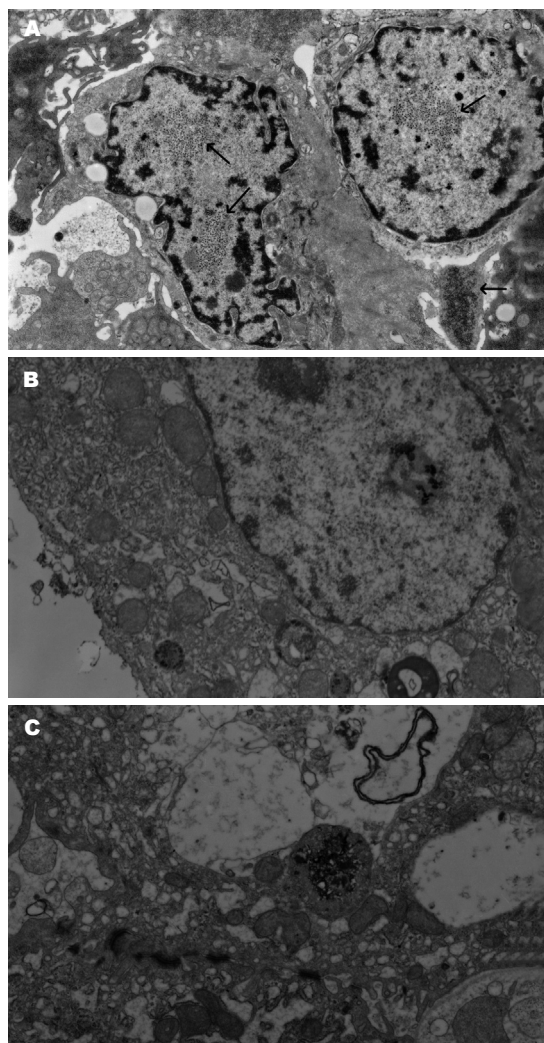


图 3 电镜下观察纳米粒子在癌细胞内的分布. A: 整合剂组电镜照片($\times 6500$), 箭头所指处为肿瘤细胞内的细小点状颗粒物质; B: 光敏剂组电镜照片, 未见黑色细小点状颗粒聚集; C: 磁性纳米粒子组电镜照片, 未见黑色细小点状颗粒聚集.

PDT的重要特性之一是光敏剂能够选择性地与肿瘤细胞结合, 肿瘤细胞内光敏剂的浓度明显高于周围正常组织, 并且只有被相同波长的激光照射后才能产生光化学反应, 从而进行光动力诊断和光动力治疗^[6,7].

近年来以纳米粒子作为载体, 与光敏剂或其他药物相结合的技术逐渐引起研究者的关注. 燕翔等^[8]以纳米沉淀法制备光敏感纳米微球, 将负载52盐酸乙酰氨基丙酸(52aminolevulinic acid, 52ALA)的光敏感纳米微球对膀胱癌进行光动力学治疗, 结果显示光敏感纳米微球可以显著提高光动力学杀伤效应. Ma^[9]等报道, 利用褐藻酸钠纳米微球吸附磁性三氧化二铁制成纳米药物SPIO2藻酸盐, 高达90%的SPIO2藻酸盐能迅速到达肝脏及脾脏. Zhang等^[10]通过合成“己内酯2聚乙二醇2丙交酯聚合物(PCLLA2PEG2P-

■创新盘点

本研究通过普鲁士铁染色、透射电镜和原子吸收光谱仪分析, 从三个不同角度都证明光敏剂-磁性纳米粒子整合剂具有促进磁性纳米粒子进入肿瘤细胞的能力.

■同行评价

本研究从不同角度均证明光敏剂-磁性纳米粒子螯合剂具有促进磁性纳米粒子向肿瘤细胞转移的能力, 具有较强创新性和实用性。

CLLA)”, 并且包埋羟基喜素碱成纳米微球, 通过动物实验显示具有较好的靶向性抗肿瘤效果。这些研究从不同侧面阐明了纳米修饰技术在光动力学治疗中的美好前景。我们在本实验中通过对肝转移癌组织的普鲁士蓝铁染色和原子吸收光谱分析技术, 进一步观察了光敏剂-磁性纳米粒子螯合剂在肝转移癌内的实际分布和含量, 为光敏剂-磁性纳米粒子螯合剂在肿瘤组织内的靶向性研究提供实验依据。

普鲁士蓝中性红复染是广泛用来检测组织中铁颗粒的一项技术, 丁军等^[11]应用普鲁氏蓝染色结果证实小鼠尾静脉注射葡聚糖超顺磁性氧化铁纳米颗粒(MSPiO)后, 在小鼠肝脏、脾脏、肾脏等多个脏器的网状内皮系统内均有MSPiO分布。郑爱萍等^[12]应用普鲁士蓝染色法观察皮肤创缘组织中的含铁血黄素巨噬细胞数量变化, 认为这是一种简便易行、经济实用的推断损伤时间的病理形态学方法。本实验结果显示, 在肝转移癌结节内, 单纯磁性纳米粒子组可见到少量的蓝染颗粒, 空白组和光敏剂组则极少见到蓝染颗粒, 两组之间没有显著差异, 这是因为空白组和光敏剂组的试剂本身不含铁粒子, 所以在相应的组织内不显示蓝染颗粒。而单纯磁性纳米粒子组的癌结节内少见蓝染颗粒, 提示该组的肿瘤组织内也极少含铁粒子, 其原因可能与磁性纳米粒子缺乏肿瘤细胞的靶向性导入, 因而难以有更多的磁性纳米粒子进入癌组织。螯合剂组的癌结节内蓝染颗粒明显多于光敏剂组、纳米粒子组和空白对照组, 说明螯合剂组的癌结节内比其他各组有更多的含铁粒子。结合其他几组的资料, 可以认为这一结果是由于磁性纳米粒子与光敏剂形成螯合剂而获得的, 证明光敏剂-磁性纳米粒子螯合剂具有促进磁性纳米粒子进入肿瘤细胞的能力。

透射电镜观察的资料显示, 螯合剂组的癌细胞内含有大量的细小黑色铁颗粒, 为高电子密度影, 主要分布在细胞核、溶酶体、内质网以及线粒体。而在光敏剂组、纳米粒子组和空白对照组的电镜照片中, 都很少见到类似高电子密度影的细小黑色颗粒物质。透射电镜的检查结果从另外一个侧面验证了螯合剂组的癌细胞内铁颗粒的存在。

原子吸收光谱法(AAS)是利用气态原子可以吸收一定波长的光辐射, 使原子中外层的电子从基态跃迁到激发态的现象而建立的。由于原子吸收光谱法具有检出限低、准确度高、选

择性好、分析速度快等优点, 目前已成为无机元素定量分析应用最广泛的一种分析方法, 适用于样品中微量及痕量组分的分析^[13,14]。丁军等^[11]采用原子吸收分光光度法检测小鼠尾静脉注射超顺磁性氧化铁纳米颗粒(MSPiO)后铁在小鼠体内各脏器中分布的时间量化关系。张宏征等^[15]以原子吸收光谱分析法检测小鼠肾脏内顺铂含量, 病理切片普鲁士蓝铁染色和扫描电镜检查显示含氧化铁的纳米粒分布于肾脏毛细血管腔、内皮细胞等部位, 验证了具有超顺磁性的CDDP-MNP在体外磁场作用下能实现体内靶向性分布。本实验中采用的技术方法与上述文献报道基本一致, 通过对不同组别样本原子吸收光谱的测定, 进一步验证了通过普鲁士蓝中性红复染技术观察到的癌结节内的蓝染颗粒和透射电镜显示的细小黑色颗粒为铁粒子, 并且提示螯合剂组的癌结节内铁粒子含量明显高于其他各组以及正常肝组织。

本研究通过普鲁士铁染色、透射电镜和原子吸收光谱仪分析, 从三个不同角度都验证了光敏剂-磁性纳米粒子螯合剂组肝转移癌结节内的铁粒子含量明显高于光敏剂组、磁性纳米粒子组, 而且也高于正常肝细胞内的铁粒子含量, 证明光敏剂-磁性纳米粒子螯合剂具有促进磁性纳米粒子进入肿瘤细胞的能力。这一研究成果将为应用光纳米技术诊断或治疗肝转移癌打下重要的实验基础。

志谢 本研究中所用磁性纳米粒子由上海交通大学微米/纳米加工技术国家重点实验室, 薄膜与微细技术教育部重点实验室古宏晨教授惠赠, Vx2鳞癌细胞新西兰大白兔由上海中医药大学附属普陀区中心医院放射科李铭、李森医师惠赠。特此表示诚挚谢意!

4 参考文献

- 1 Van Cutsem E. A glimpse of the future. new directions in the treatment of colorectal cancer. *Eur J Cancer* 1996; 32A Suppl 5: S23-S27
- 2 Service RF. Materials and biology. Nanotechnology takes aim at cancer. *Science* 2005; 310: 1132-1134
- 3 Huh YM, Jun YW, Song HT, Kim S, Choi JS, Lee JH, Yoon S, Kim KS, Shin JS, Suh JS, Cheon J. In vivo magnetic resonance detection of cancer by using multifunctional magnetic nanocrystals. *J Am Chem Soc* 2005; 127: 12387-12391
- 4 Sonvico F, Mornet S, Vasseur S, Dubernet C, Jaillard D, Degrouard J, Hoebeke J, Duguet E, Colombo P, Couvreur P. Folate-conjugated iron oxide nanoparticles for solid tumor targeting as potential specific magnetic hyperthermia media-

- tors: synthesis, physicochemical characterization, and in vitro experiments. *Bioconjug Chem* 2005; 16: 1181-1188
- 5 别彩群, 韩利民, 王启章, 范红梅, 朱浩峰, 梁旭竞, 杨冬华. 抗肝癌免疫纳米颗粒的制备及其对肝癌细胞增殖的影响. *世界华人消化杂志* 2010; 18: 1326-1330
- 6 Gahlen J, Stern J, Laubach HH, Pietschmann M, Herfarth C. Improving diagnostic staging laparoscopy using intraperitoneal lavage of delta-aminolevulinic acid (ALA) for laparoscopic fluorescence diagnosis. *Surgery* 1999; 126: 469-473
- 7 葛海燕. 光动力治疗消化系统肿瘤的进展与展望. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 457-462
- 8 燕翔, 黄海锋, 朱震舒, 郭宏骞. 负载52ALA纳米微球对膀胱癌光动力学作用的初步研究. *临床肿瘤学杂志* 2010; 15: 132-135
- 9 Ma HL, Xu YF, Qi XR, Maitani Y, Nagai T. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles stabilized by alginate: pharmacokinetics, tissue distribution, and applications in detecting liver cancers. *Int J Pharm* 2008; 354: 217-226
- 10 Zhang L, Yang M, Wang Q, Li Y, Guo R, Jiang X, Yang C, Liu B. 10-Hydroxycamptothecin loaded nanoparticles: preparation and antitumor activity in mice. *J Control Release* 2007; 119: 153-162
- 11 丁军, 赵继红, 李神, 杨海山. MSPIO可用作临床MRI阴性对比剂的影像学病理毒理学分析. *中国实验诊断学* 2007; 11: 380-384
- 12 郑爱萍, 胡金花, 郑剑, 李艳红, 许小明. 含铁血黄素巨噬细胞与损伤时间的相关性研究. *南昌大学学报(医学版)* 2010; 50: 12-14, 37
- 13 万正杨. 原子吸收光谱法测定鼠肾组织中Cu、Fe、Zn、Ca、Mg. *中国卫生检验杂志* 2007; 17: 1228
- 14 任曦. 原子吸收法测定1000例婴幼儿微量元素的含量. *微量元素与健康研究* 2010; 27: 14-15
- 15 Zhang HZ, Xie MQ, Kang Z, Shen H, Wang L. [Targeted distribution of cis-platin magnetic nanoparticles in mice]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 2008; 28: 1756-1759

编辑 李军亮 电编 闫晋利

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》参考文献要求

本刊讯 本刊采用“顺序编码制”的著录方法,即以文中出现顺序用阿拉伯数字编号排序.提倡对国内同行近年已发表的相关研究论文给予充分的反映,并在文内引用处右上角加方括号注明角码.文中如列作者姓名,则需在“Pang等”的右上角注角码号;若正文中仅引用某文献中的论述,则在该论述的句末右上角注角码号.如马连生^[1]报告……,潘伯荣等^[2-5]认为……;PCR方法敏感性高^[6-7].文献序号作正文叙述时,用与正文同号的数字并排,如本实验方法见文献[8].所引参考文献必须以近2-3年SCIE, PubMed,《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊为准,通常应只引用与其观点或数据密切相关的国内外期刊中的最新文献,包括世界华人消化杂志(<http://www.wjgnet.com/1009-3079/index.jsp>)和World Journal of Gastroenterology(<http://www.wjgnet.com/1007-9327/index.jsp>).期刊:序号,作者(列出全体作者).文题,刊名,年,卷,起页-止页, PMID编号;书籍:序号,作者(列出全部),书名,卷次,版次,出版地,出版社,年,起页-止页.

去唾液酸糖蛋白受体抗体阳性的 I 型自身免疫性肝炎生物学性状及其意义

吴虹杰, 徐芸

■背景资料

去唾液酸糖蛋白受体是仅存在于肝细胞肝窦面细胞膜上一类跨膜蛋白, 具有肝组织特异性, 是AIH自身免疫应答中重要的靶抗原, 与自身免疫性肝炎的发生、活动、严重程度及进展密切相关。

吴虹杰, 徐芸, 郑州大学第一附属医院消化内科 河南省郑州市 450052

作者贡献分布: 吴虹杰与徐芸对此文所作贡献均等; 此课题由徐芸设计, 研究过程由吴虹杰、徐芸及汪群英操作完成; 研究所用分析工具由徐芸与汪群英提供; 数据分析由吴虹杰完成; 本论文写作由吴虹杰完成。

通讯作者: 徐芸, 教授, 450052, 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

收稿日期: 2011-08-21 修回日期: 2011-09-25

接受日期: 2011-10-06 在线出版日期: 2011-10-18

Biological significance of autoantibodies to asialoglycoprotein receptor in patients with type I autoimmune hepatitis

Hong-Jie Wu, Yun Xu

Hong-Jie Wu, Yun Xu, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China

Correspondence to: Yun Xu, Professor, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, 1 Jianshe Road, Zhengzhou 450052, Henan Province, China. xuyun@medmail.com.cn

Received: 2011-08-21 Revised: 2011-09-25

Accepted: 2011-10-06 Published online: 2011-10-18

Abstract

AIM: To investigate the differences in clinical, biochemical, immunoserologic, genetic, histological features and response to treatment between patients with type 1 autoimmune hepatitis (AIH-I) who were positive for autoantibodies to asialoglycoprotein receptor (ASGPR) and those negative for anti-ASGPR.

METHODS: A total of 79 patients with AIH-I were screened for the presence of anti-ASGPR by ELISA and were divided into anti-ASGPR-positive group and anti-ASGPR-negative group.

RESULTS: There were 59 patients in the anti-ASGPR-positive group and 20 patients in the anti-ASGPR-negative group. No significant differences were found between anti-ASGPR-positive and-negative patients in age, gender,

alanine transaminase (ALT) activity, aspartate aminotransferase (AST) activity, alkaline phosphatase (ALP) activity, gamma glutamyl transpeptidase (γ -GT) activity, antinuclear autoantibodies (ANA), smooth muscle autoantibodies (SMA), DR3, and DR4. The levels of immunoglobulin G, C3, histological inflammatory activity and fibrosis, and response to treatment differed significantly between the two groups.

CONCLUSION: The presence of anti-ASGPR is correlated, to a certain extent, with inflammatory activity, pathological changes, and response to treatment in patients with AIH-I.

Key Words: Type 1 autoimmune hepatitis; Autoantibodies to asialoglycoprotein receptor; Clinicopathological features

Wu HJ, Xu Y. Biological significance of autoantibodies to asialoglycoprotein receptor in patients with type 1 autoimmune hepatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(29): 3070-3074

摘要

目的: 探讨去唾液酸糖蛋白受体抗体(Autoantibodies to asialoglycoprotein receptor, anti-ASGPR)阳性和阴性 I 型自身免疫性肝炎(type I autoimmune hepatitis AIH-I)在临床、生化、免疫学、遗传学、组织学特点及其治疗应答反应的差异。

方法: 应用酶联免疫分析法(ELISA)检测79例确诊的AIH-I患者血清中anti-ASGPR, 将其分为anti-ASGPR阳性组及阴性组。

结果: 患者中anti-ASGPR阳性的百分比为75%, 阳性患者($n = 59$)中, 男性($n = 7$), 女性($n = 52$), 平均年龄(49.1 ± 8.6)岁; 阴性患者($n = 20$)中, 男性($n = 2$), 女性($n = 18$), 平均年龄(47.1 ± 7.9)岁, 阳性患者与阴性患者在年龄、性别、ALT、AST、ALP、GGT、ANA、SMA、DR3、DR4比较差异无统计学意义,

■同行评议者

郑素军, 副主任
医师, 首都医科
大学附属北京佑
安医院

而在IgG、补体C3水平, 组织学炎症活动及纤维化程度、治疗应答方面有统计学意义($P<0.05$).

结论: anti-ASGPR与AIH- I 患者炎症活动及病理改变存在一致性, 且其对治疗应答有一定的提示.

关键词: I 型自身免疫性肝炎; 抗去唾液酸糖蛋白受体抗体; 临床病理特点

吴虹杰, 徐芸. 去唾液酸糖蛋白受体抗体阳性的 I 型自身免疫性肝炎生物学性状及其意义. 世界华人消化杂志 2011; 19(29): 3070-3074

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/3070.asp>

0 引言

自身免疫性肝炎(autoimmune hepatitis, AIH)是一种与自身免疫有关的肝脏疾病, 但目前对其病因和发病机制尚不十分清楚. 基于自身抗体谱特点, 可将其分为 I 型和 II 型两种亚型, 其中 I 型最为常见, 但其自身抗体多不具有特异性. 近年来研究发现, 去唾液酸糖蛋白受体抗体具有特异性, 而有关该抗体阳性的 I 型自身免疫性肝炎的生物学特点报道甚少. 本研究对去唾液酸糖蛋白受体抗体阳性及阴性的 I 型自身免疫性肝炎患者的临床、生化、免疫、病理特点及治疗应答进行了系列分析, 以对其诊治提高认识.

1 材料和方法

1.1 材料 2010-07/2011-08郑州大学一附院住院及门诊确诊的AIH- I 患者($n = 79$), 女性($n = 70$, 89%), 平均年龄(48 ± 9)岁; 男性($n = 9$, 12%), 平均年龄(49 ± 6)岁. 收集其资料. 所有患者均排除病毒性肝炎、药物性肝炎、遗传代谢性肝病、酒精性及非酒精性脂肪性肝病. AIH的诊断参照2002年美国肝病学会(AASLD)制定的AIH诊疗指南^[1], 总分在治疗前 >15 分为确诊, 10-15分可能诊断, 治疗后 >17 分为确诊, 12-17分可能诊断.

1.2 方法

1.2.1 ELISA检测anti-ASGPR: 采用ELISA法检查患者的血清去唾液酸糖蛋白受体抗体, 试剂盒由CUSABIO公司生产, 操作步骤严格按试剂盒说明书.

1.2.2 肝脏组织学检查: B超引导下经皮肝穿取1.5-2 cm肝组织, 置40 g/L甲醛溶液固定, 石蜡包埋, 制成厚度约为3-4 μm 的切片, 常规HE染色, 用于组织定位. 免疫组化染色所有的单克隆抗

体CD138、CD38由中杉金桥公司生产, 依照试剂盒说明按 Envision 二步法进行. 显微镜下观察免疫组化染色后阳性细胞分布, 每张切片取10个汇管区及肝小叶, 于400倍视野下计算平均阳性细胞数.

1.2.3 治疗: 参照2002年美国肝病学会(AASLD)制定的AIH诊疗指南^[1].

1.2.4 治疗应答评估方法: 参考国际自身免疫性肝炎小组(IAIHG)推荐的治疗应答标准进行评估.

统计学处理 计量资料用mean \pm SD表示, 计数资料以例数或百分率进行描述, 应用SPSS17.0对计量资料进行 t 检验, 计数资料进行 χ^2 检验、Yates校正 χ^2 检验、Fisher确切概率法、秩和检验、率等统计处理.

2 结果

2.1 临床特征 AIH- I 以中年女性患者为主, anti-ASGPR阳性与阴性组在年龄、性别、临床症状及体征比较方面无明显差异($P<0.05$, 表1).

2.2 生化、免疫及遗传学 anti-ASGPR阳性及阴性组患者均有不同程度的肝功能损伤, 但肝功损伤程度无明显差异, anti-ASGPR阳性AIH- I 患者具有显著异常的球蛋白IgG、补体C3, 与anti-ASGPR阴性组有明显差异($P<0.05$); 两组间在ANA、SMA阳性率及DR3、DR4检出率方面无明显差异($P>0.05$, 表2).

2.3 病理 anti-ASGPR阳性组中, 有81%的患者出现界面性肝炎(图1A), 20%出现玫瑰花结样改变(图1B), 27%肝硬化; anti-ASGPR阴性组中, 有45%的患者出现界面性肝炎, 10%出现玫瑰花结样改变, 20%肝硬化; anti-ASGPR阳性组较阴性组有高频率的界面性肝炎及更明显的CD138浆细胞和CD38细胞(图1C, D)浸润($P<0.05$). 两组炎症活动分级情况有统计学差异($P<0.05$), anti-ASGPR阳性组炎症重度明显高于anti-ASGPR阴性(54% vs 10%). 纤维化情况两组比较无差异($P>0.05$), 但anti-ASGPR阳性组早期肝硬化及重度纤维化比率明显高于阴性组(48% vs 25%, 表3).

2.4 治疗应答 anti-ASGPR阳性组55例患者接受治疗, 第1年随访观察期间, 缓解27例(49%), anti-ASGPR阴性组18例接受治疗, 缓解14例(78%), anti-ASGPR阳性组较阴性组缓解率低($P<0.05$).

3 讨论

AIH以高球蛋白血症, 自身抗体阳性, 组织学存

■ 相关报道

去唾液酸糖蛋白受体抗体与AIH- I 患者炎症活动及病理改变存在一致性, 且其对治疗应答有一定的提示, 有助于提高对AIH- I 患者的临床诊治认识.

■应用要点

本文对我国AIH-I患者进行了去唾液酸糖蛋白受体抗体检测,并研究了其临床意义,对于判断AIH-I患者炎症活动有一定作用.

表 1 AIH-I 临床特征

	Anti-ASGPRAb(+) (n = 59)(%)	Anti-ASGPRAb(-) (n = 20)(%)	t/ χ^2 值	P值
年龄	49.1 ± 8.6	47.1 ± 7.9	0.899	0.371
性别(男/女)	8/51	1/19	0.402	0.526
症状				
疲劳	50(85)	16(80)	0.021	0.884
食欲减退	48(68)	13(65)	2.271	0.132
腹部不适	40(68)	10(50)	2.036	0.154
低热	21(36)	6(30)	0.208	0.649
体征				
肝掌、蜘蛛痣	36(61)	8(40)	2.674	0.102
脾大	28(48)	7(35)	0.939	0.332
黄疸	6(10)	1(5)	0.061	0.804
腹水	12(20)	3(15)	0.039	0.844
无症状	8(14)	4(20)	0.111	0.739

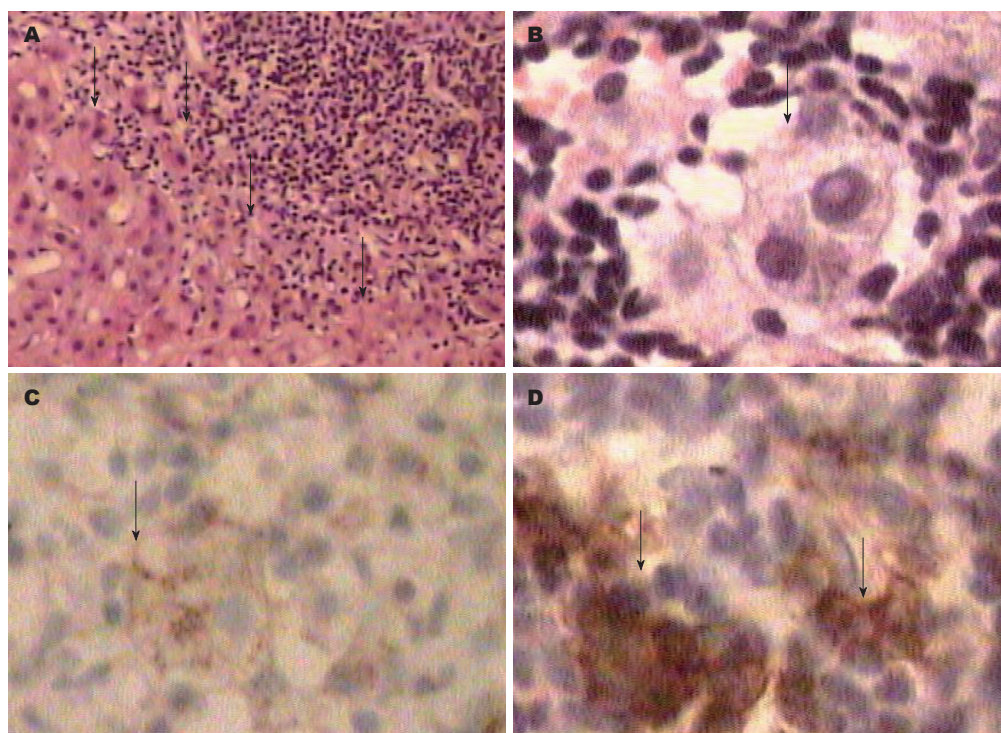
表 2 AIH-I 生化、遗传及遗传学特性

	Anti-ASGPRAb(+) (n = 59)(%)	Anti-ASGPRAb(-) (n = 20)(%)	t/ χ^2 值	P值
生化				
ALT(U/L)	326.3 ± 153.0	308.8 ± 139.7	0.451	0.653
AST(U/L)	324.1 ± 150.8	298.1 ± 151.9	0.660	0.514
ALP(U/L)	213.8 ± 106.0	182.5 ± 93.8	1.172	0.245
r-GT(U/L)	211.7 ± 108.9	179.3 ± 97.3	1.179	0.242
白蛋白(g/L)	37.2 ± 6.0	41.6 ± 5.9	-2.773	0.070
免疫学				
r-球蛋白(g/L)	35.0 ± 7.8	26.5 ± 4.5	4.622	0.000
IgG(mg/L)	33.7 ± 7.0	25.7 ± 5.3	4.675	0.000
C3(mg/L)	0.4 ± 0.3	0.6 ± 0.2	-2.305	0.002
ANA 阳性	54(92)	17(85)	0.166	0.684
SMA 阳性	13(22)	2(10)	0.733	0.392
遗传学				
DR3	3(5)	1(5)	0.000	1.000
DR4	21(36)	11(55)	1.599	0.206

在界面炎和汇管区浆细胞浸润,以及免疫抑制剂治疗有效为主要特点.根据血清自身抗体类型的不同可将其分为2型^[2].其中,I型抗核抗体(ANA)和(或)抗平滑肌抗体(SMA)阳性;II型抗肝肾微粒体抗体1阳性(LKM-1),但这些抗体本身的测定无法监测该疾病的活动规律,也不具备预测治疗应答的能力^[3].因此,寻找具有预测意义的血清标志物对监测疾病活动、预测疗效、建立个体化治疗方案以及指导撤药时机都具有重要意义.ASGPR是仅存在于肝细胞肝窦面细胞膜上的一类跨膜蛋白,可参与含半乳糖末端的唾液酸糖蛋白的结合和内化,具

有肝组织特异性^[4],显然该抗原是AIH自身免疫应答中重要的靶抗原.目前认为唾液酸糖蛋白受体是I型AIH主要的候选自身抗原^[5],与自身免疫性肝炎的发生、活动、严重程度及进展密切相关^[6-8].

本研究中的AIH-I患者多为女性,高发年龄为40-60岁;而在白种人群中,I型发病率的年龄呈现两个高峰,分别为10-25岁,45-70岁.本研究年龄分布特点与邱德凯等研究一致,推测这种差别可能与种族间不同遗传背景有关^[9].性别及年龄在anti-ASGPR阳性组及阴性组患者中无明显差别,临床上两组患者均可出现乏力、食



■同行评价

本研究主要探讨了ASGPR阴性的I型自身免疫性肝炎的生物学性状,有助于该病的诊断和治疗。

图1 胰肝脏组织学病理变化. A: 界面性肝炎($\times 100$); B: 玫瑰花结($\times 400$); C: CD138浆细胞($\times 400$); D: 汇管区成簇的CD38细胞($\times 200$).

表3 AIH-I 病理学

	Anti-ASGPRAb(+)	Anti-ASGPRAb(-)	t/χ^2 值	P值
	($n = 59$)(%)	($n = 20$)(%)		
界面性肝炎	48(81)	9(45)	9.826	0.020
玫瑰花结	12(20)	2(10)	0.501	0.479
肝硬化	16(27)	3(15)	0.629	0.428
CD138/HP	9.3 ± 4.4	5.6 ± 3.3	3.365	0.001
CD38/HP	23.2 ± 6.6	18.1 ± 5.8	3.076	0.003
炎症活动分级			9.848	0.015
G ₁ -G ₂ (轻度)	27(46)	18(90)		
G ₃ (中度)	27(46)	2(10)		
G ₄ (重度)	5(8)	0(0)		
纤维化活动分期			2.952	0.450
S ₁	10(17)	8(40)		
S ₂	15(25)	7(35)		
S ₃	18(31)	2(10)		
S ₄	16(27)	3(15)		

欲减退、腹部不适、低热、肝掌、蜘蛛痣、脾大、腹水等多样化特征,与一般慢性肝病如慢性乙型肝炎无明显差别,且两组之间也无明显差异。

anti-ASGPR阳性组与阴性组相比,血清中存在更高的 γ -球蛋白、IgG,补体C3水平较低,而血清ANA、SMA无明显差别。本研究中ANA检测的阳性率高于anti-ASGPR的阳性率,与国外报道不同^[10],原因不明。组织学检查中,两

组均可出现界面性肝炎、玫瑰花结及淋巴细胞及浆细胞浸润,且anti-ASGPR阳性组出现了界面性肝炎、玫瑰花结、CD38细胞、CD138浆细胞浸润情况明显高于anti-ASGPR阴性组($P < 0.05$),且炎症活动情况也较阴性组重,阳性组中炎症活动中重度比例明显高于阴性组(54% vs 10%)。分析原因可能如下: (1)ASGPR在肝小叶1带中的细胞高表达,血清中anti-ASGPR与门脉周围的肝损伤有明显关系,导致界

面性肝损伤^[11]。(2)Guy等^[12]研究表明,肝细胞可通过ASGPR识别介导细胞毒性反应而杀死周围病变细胞,以达到在肝内免疫调节及局限炎症反应的功能,并且在体外实验中此作用对CD4淋巴细胞亦有效。由此可推断,当血液中出现大量anti-ASGPR时,会减弱上述肝细胞功能,由此引起更严重的炎症反应,以致anti-ASGPR阳性组中界面性肝炎、玫瑰花结及淋巴细胞及浆细胞浸润明显高于阴性组,炎症活动分级也说明了这一点。(3)在anti-ASGPR阳性组中CD138细胞(CD138为浆细胞最特异性的标志^[13])、 γ -球蛋白、IgG明显高于阴性组($P<0.05$),表明anti-ASGPR阳性组中浆细胞浸润情况及循环抗体产生较阴性组重,导致更严重的体液免疫反应活动,加重了肝组织内自身免疫炎症。CD38(除浆细胞外,还可表达于成熟的淋巴、单核和粒细胞)细胞浸润数目,anti-ASGPR阳性组较阴性组多,这也从一些方面说明了阳性组炎症活动较阴性组重。(4)显著的炎症活动导致肝细胞变性坏死,大量纤维组织增生,以致肝纤维化。遗憾的是本研究未测定anti-ASGPR的滴度,无法明确其滴度高低与肝组织损伤严重程度的相关性。

在第1年随访观察治疗中,anti-ASGPR阳性组缓解率低于阴性组($P<0.05$),说明anti-ASGPR的存在使AIH-I型患者不易产生缓解,Czaja等^[10]研究表明,anti-ASGPR阳性组中缓解情况较阴性组无差异,我们推测,这可能与Czaja等进行治疗观察均达到治疗终点而本研究只进行1年观察有关。我们将进行进一步的观察至治疗终点,并观察患者复发及持续缓解情况。

总之,Anti-ASGPR与AIH-I患者炎症活动及肝组织活检情况存在相关性,并对治疗应答有一定的提示,可提高我们对其临床诊治的认识。

4 参考文献

- 1 Czaja AJ, Freese DK. Diagnosis and treatment of autoimmune hepatitis. *Hepatology* 2002; 36: 479-497
- 2 Makol A, Watt KD, Chowdhary VR. Autoimmune hepatitis: a review of current diagnosis and treatment. *Hepat Res Treat* 2011; 2011: 390916
- 3 Lüth S, Herkel J, Kanzler S, Frenzel C, Galle PR, Dienes HP, Schramm C, Lohse AW. Serologic markers compared with liver biopsy for monitoring disease activity in autoimmune hepatitis. *J Clin Gastroenterol* 2008; 42: 926-930
- 4 Treichel U, McFarlane BM, Seki T, Krawitt EL, Alessi N, Stickel F, McFarlane IG, Kiyosawa K, Furuta S, Freni MA. Demographics of anti-asialoglycoprotein receptor autoantibodies in autoimmune hepatitis. *Gastroenterology* 1994; 107: 799-804
- 5 巫协宁, 邱德凯. 临床肝胆系病学. 上海: 上海科学技术文献出版社, 2002: 269-273
- 6 Hausdorf G, Roggenbuck D, Feist E, Büttner T, Jungblut PR, Conrad K, Berg C, Klein R. Autoantibodies to asialoglycoprotein receptor (ASGPR) measured by a novel ELISA--revival of a disease-activity marker in autoimmune hepatitis. *Clin Chim Acta* 2009; 408: 19-24
- 7 Hajoui O, Debray D, Martin S, Alvarez F. Autoantibodies to the asialoglycoprotein receptor in sera of children with auto-immune hepatitis. *Eur J Pediatr* 2000; 159: 310-313
- 8 Czaja AJ. Autoantibodies as prognostic markers in autoimmune liver disease. *Dig Dis Sci* 2010; 55: 2144-2161
- 9 邱德凯, 马雄. I型自身免疫性肝炎患者的临床病理分析. *中华消化杂志* 2002; 22: 275-278
- 10 Czaja AJ, Pfeifer KD, Decker RH, Vallari AS. Frequency and significance of antibodies to asialoglycoprotein receptor in type 1 autoimmune hepatitis. *Dig Dis Sci* 1996; 41: 1733-1740
- 11 McFarlane BM, Sipos J, Gove CD, McFarlane IG, Williams R. Antibodies against the hepatic asialoglycoprotein receptor perfused in situ preferentially attach to periportal liver cells in the rat. *Hepatology* 1990; 11: 408-415
- 12 Guy CS, Rankin SL, Michalak TI. Hepatocyte cytotoxicity is facilitated by asialoglycoprotein receptor. *Hepatology* 2011 Jun 7. [Epub ahead of print]
- 13 Chilosi M, Adami F, Lestani M, Montagna L, Cimmarosto L, Semenzato G, Pizzolo G, Menestrina F. CD138/syndecan-1: a useful immunohistochemical marker of normal and neoplastic plasma cells on routine trephine bone marrow biopsies. *Mod Pathol* 1999; 12: 1101-1106

编辑 李军亮 电编 闫晋利

JNK信号通路在慢性乙型肝炎患者外周血单个核细胞中的活化

侯炳旭, 冯丽英

侯炳旭, 冯丽英, 河北医科大学第二医院消化科 河北省消化病重点实验室 河北省消化病研究所 河北省石家庄市 050000

作者贡献分布: 本文的主要试验、数据分析和文章起草由侯炳旭完成; 文章修改和审阅由冯丽英完成。

通讯作者: 冯丽英, 教授, 050000, 河北省石家庄市和平西路215号, 河北医科大学第二医院消化科, 河北省消化病重点实验室, 河北省消化病研究所. hysfly888@163.com

收稿日期: 2011-08-21 修回日期: 2011-10-12

接受日期: 2011-10-14 在线出版日期: 2011-10-18

Role of the JNK signal pathway in activation-induced cell death in PBMC from patients with chronic hepatitis B

Bing-Xu Hou, Li-Ying Feng

Bing-Xu Hou, Li-Ying Feng, Department of Gastroenterology, the Second Hospital of Hebei Medical University; Hebei Key Laboratory of Gastroenterology; Hebei Institute of Gastroenterology, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China

Correspondence to: Li-Ying Feng, professor, Department of Gastroenterology, The Second Hospital of Hebei Medical University; Hebei Key Laboratory of Gastroenterology; Hebei Institute of Gastroenterology, 215 Heping West Road, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China. hysfly888@163.com

Received: 2011-08-21 Revised: 2011-10-12

Accepted: 2011-10-14 Published online: 2011-10-18

Abstract

AIM: To study the role of the JNK signal pathway in activation-induced cell death (AICD) in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patients with chronic hepatitis B (CHB).

METHODS: Forty CHB patients were randomly and equally divided into two groups: CHB group and CHB+inhibitor group. The normal control group was composed of twenty healthy blood donors. PBMC were isolated, cultured *in vitro*, and used to stimulate AICD. The CHB+inhibitor group was pretreated with the JNK specific inhibitor SP600125 (20 $\mu\text{mol/L}$) for 2 h before re-stimulation of apoptosis. The expression of p-JNK, total JNK, p-c-Jun and Bim proteins was detected by Western blot, and the apoptosis of PBMC was

measured by flow cytometry.

RESULTS: The apoptosis rate of PBMC was significantly higher in the CHB+inhibitor group than in the healthy control group, and in the CHB group than in the healthy control group and CHB+inhibitor group (all $P < 0.05$). The expression of p-JNK, p-c-Jun and Bim was significantly higher in the CHB group than in the healthy control group and in the CHB+inhibitor group (all $P < 0.01$). No significant differences were observed in the expression of total JNK among the three groups. The apoptosis rate of PBMC had positive correlation with the expression of p-JNK in CHB patients ($r = 0.823$, $P < 0.01$).

CONCLUSION: The JNK signal pathway is involved in mediating AICD in PBMC from CHB patients.

Key Words: Chronic hepatitis B; Peripheral blood mononuclear cells; Activation-induced cell death; c-Jun N-terminal kinase; c-Jun; Bim

Hou BX, Feng LY. Role of the JNK signal pathway in activation-induced cell death in PBMC from patients with chronic hepatitis B. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(29): 3075-3080

摘要

目的: 研究c-Jun氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)信号通路在慢性乙型肝炎患者外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMC)激活诱导细胞死亡(activation induced cell death, AICD)过程中的作用。

方法: 选取慢性乙型肝炎患者40例, 采用完全随机化方法随机分为2组, 慢性乙肝组($n = 20$), 慢性乙肝+抑制剂组($n = 20$), 选取健康对照组($n = 20$)。体外分离培养PBMC, 模拟细胞在体内的AICD过程, 其中慢性乙肝+抑制剂组在重新刺激凋亡前用JNK特异性抑制剂SP600125 20 $\mu\text{mol/L}$ 预处理2 h。应用Western blot检测各组中磷酸化JNK(p-JNK)、总JNK、磷酸化

■背景资料

JNK信号通路能介导多种胞外刺激诱导的细胞凋亡, 参与了许多细胞凋亡的发生。近年来研究证明JNK信号通路参与介导了多种疾病(流感、人类黑色素瘤等)淋巴细胞的AICD过程, 但是关于JNK信号通路是否也参与介导了慢性乙型肝炎患者淋巴细胞的AICD过程还未见报道。

■同行评议者

崔莲花, 副教授, 青岛大学医学院公共卫生系; 魏继福, 副研究员, 江苏省人民医院中心实验室

■研究前沿

慢性乙肝患者淋巴细胞的AICD过多现象是多年来研究的重点。如何通过调节AICD来减少淋巴细胞凋亡,改善慢性乙肝患者的细胞免疫功能是近年研究的热点。

c-jun(p-c-jun)、Bim(bcl-2 interacting mediator of cell death)的表达,流式细胞术检测PBMC凋亡。

结果:慢性乙肝组PBMC凋亡率高于健康对照组,也高于慢性乙肝+抑制剂组,差异有统计学意义($P<0.05$)。慢性乙肝+抑制剂组PBMC凋亡率高于健康对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。慢性乙肝组p-JNK的表达高于健康对照组($t = 5.885, P<0.01$),也高于慢性乙肝+抑制剂组($t = 11.502, P<0.01$)。总JNK在三个组的表达无统计学差异。慢性乙肝组p-c-jun的表达高于健康对照组($t = 5.477, P<0.01$),也高于慢性乙肝+抑制剂组($t = 12.899, P<0.01$)。慢性乙肝组Bim的表达高于健康对照组($t = 9.133, P<0.01$),也高于慢性乙肝+抑制剂组($t = 10.086, P<0.01$)。慢性乙肝组PBMC凋亡率与p-JNK蛋白的表达成正相关($r = 0.823, P<0.01$)。

结论:JNK信号通路参与介导了慢性乙型肝炎患者PBMC的AICD过程,是其凋亡增多的机制之一。

关键词:慢性乙型肝炎;外周血单个核细胞;激活诱导细胞死亡;c-Jun氨基末端激酶;c-jun;Bim

侯炳旭,冯丽英. JNK信号通路在慢性乙型肝炎患者外周血单个核细胞中的活化. 世界华人消化杂志 2011; 19(29): 3075-3080

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/3075.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)易致慢性化感染,但其慢性化机制尚不完全清楚。近年来有研究发现慢性乙型肝炎(chronic viral hepatitis B, CHB)患者存在淋巴细胞的激活诱导细胞死亡(activation induced cell death, AICD)过多的现象^[1-3],并认为可能是导致HBV持续慢性感染的一个重要因素^[3]。因此如何通过调节AICD来减少淋巴细胞凋亡,改善CHB患者的细胞免疫功能,将是打破免疫耐受状态、清除体内HBV的可能途径。但是目前关于CHB患者淋巴细胞发生AICD的机制尚未完全阐明。c-Jun氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)信号通路能介导多种胞外刺激诱导的细胞凋亡,参与了许多细胞凋亡的发生^[4]。近年来研究证明JNK信号通路参与介导了多种疾病(流感、人类黑色素瘤等)淋巴细胞的AICD过程^[5,6]。但是关于JNK信号通路是否也参与介导了CHB患者淋巴细胞的AICD

过程还未见报道。为此我们以CHB患者外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMC)为研究对象,体外模拟AICD过程^[7],观察应用JNK特异性抑制剂SP600125前后PBMC中磷酸化JNK(p-JNK)、总JNK及其下游转录因子磷酸化c-jun(p-c-jun)和下游蛋白Bim(bcl-2 interacting mediator of cell death)的表达及PBMC凋亡率的变化,研究JNK信号通路在CHB患者外周血单个核细胞AICD过程中的作用,进一步探讨AICD发生的机制,为CHB的治疗提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料 选取河北医科大学第二医院住院及门诊慢性乙型肝炎患者共40例,其中男性22例,女性18例,年龄在18-60岁,平均年龄35岁。采用完全随机化方法随机分为2组,慢性乙肝组20例,慢性乙肝+抑制剂组20例。所有病例诊断标准均符合2005年中华医学会制定的“慢性乙型肝炎防治指南”,乙型肝炎标志物HBsAg阳性、HBeAg或抗-HBe阳性和抗-HBc阳性, 1×10^3 copies/mL < HBV DNA < 1×10^7 copies/mL, ALT 2倍以上升高。排除HAV、HCV、HDV、HEV和HIV感染,排除近3 mo应用糖皮质激素、干扰素等影响免疫功能药物的患者,除外有近期急性感染患者。健康对照组20例,男12例,女8例,年龄在18-45岁,平均年龄30岁,取自健康献血员,签署知情同意书。植物血凝素PHA(石家庄华瑞公司); 1640培养液(北京索莱宝科技有限公司); 淋巴细胞分离液(北京鼎国公司); 注射用白介素-2(北京双鹭药业公司); 抗人的CD3抗体(美国Biolegend公司); 胎牛血清(杭州四季青生物制品公司); 兔抗p-JNK单克隆抗体、兔抗Bim多克隆抗体(美国Bioworld公司); 兔抗JNK多克隆抗体、兔抗p-c-jun多克隆抗体、兔抗GAPDH多克隆抗体、抗兔IgG(二抗)、SP600125(美国Santa Cruz公司); WB细胞裂解液(石家庄华瑞公司); 碘化丙啶PI(美国Sigma公司)。

1.2 方法

1.2.1 PBMC的制备:采用密度梯度离心法进行PBMC提取,无菌条件下抽取肝素抗凝静脉血4 mL,用4 mL生理盐水使血液等体积稀释。离心管中加入淋巴细胞分离液4 mL,将离心管倾斜45 °C,将稀释血液在距淋巴细胞分离液界面上1 cm处沿试管壁加至分离液面上,保持将离心管放置于水平式离心机内,在18 °C-20 °C,以2 000 r/min离心20 min,混合液分为4层。离心

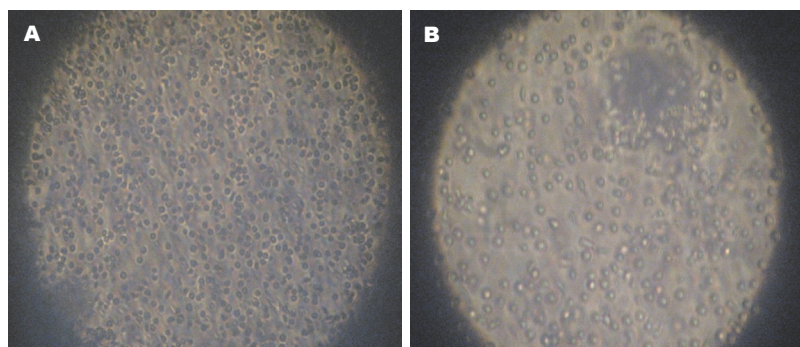


图1 培养7 d的外周血单个核细胞形态. A: 低倍镜下观察; B: 高倍镜下观察.

■相关报道

Chhabra等研究发现人类黑色素瘤表位特异性原始CTL发生的AICD是由JNK所介导的, 伴随着凋亡诱导因子AIF的释放和大规模的DNA碎片裂, 应用JNK特异性抑制剂SP600125能够阻碍凋亡诱导因子AIF的线粒体-核转位, 并阻止CTL发生AICD.

后用毛细吸管插入灰白色层液面析出层内细胞混合物, 移入另一离心管中. 用5倍体积的生理盐水洗涤2次, 每次2 000 r/min, 10 min. 用RPMI-1640培养液定容细胞, 计数细胞后再调整细胞至 1×10^6 个/mL单个核细胞. 用台盼蓝染液检查所分离的细胞活性, 取2滴细胞悬液加1滴2%台盼蓝, 3-5 min后取样作湿片高倍镜检, 活细胞不着色, 死细胞染成蓝色. 计数200个细胞, 计算活细胞百分率, 活性在95%以上.

1.2.2 PBMC的培养: 将分离获得的PBMC, 加入25 cm²培养瓶中, 静置2 h, 除去贴壁细胞, 用含100 mL/L胎牛血清的RPMI 1640培养基进行培养, PBMC浓度为 1×10^6 个细胞/mL. 培养液中加入PHA, PHA终浓度为100 μg/mL, 置37 °C, 50 mL/L CO₂培养箱培养, 16-18 h后, 用生理盐水清洗3遍, 洗净培养液中的PHA, 加入外源性IL-2 1000 kU/L进行培养, 每3 d更换培养基, 培养至少7 d. 用500 mg/L CD3抗体重新刺激PBMC 48 h后, 收集细胞. 其中慢性乙肝+抑制剂组在加抗CD3抗体前用JNK特异性抑制剂SP600125 20 μmol/L 预处理2 h.

1.2.3 流式细胞术检测细胞凋亡: 700 mL/L预冷的乙醇固定细胞, 4 °C过夜. 离心2 000 r/min, 5 min, 去掉固定液, 并用冷PBS洗2次, 加入Rnase A 100 μL, 37 °C 30 min后加入PI染液900 μL, 4 °C避光静置30 min后上流式细胞仪检测细胞周期, 以G1峰左侧出现亚二倍体细胞群的峰形者为凋亡细胞群. 每次计数 10^5 个细胞, 计算细胞凋亡率.

1.2.4 Western blot检测PBMC中p-JNK、总JNK、p-c-jun、Bim蛋白的表达: 提取总蛋白, 测蛋白含量, 按每孔100 μg计算样品蛋白上样量. 行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)凝胶电泳, 用PVDF膜进行冰浴转膜, 取出膜用5%脱脂奶粉4 °C封闭过夜. 在4 °C一抗(1:500)反应过夜, 二抗(1:5 000)室温封闭2 h. 暗室中滴加

ECL试剂行曝光、显影和定影. 采用美国Image JA软件对Western blot结果进行定量分析, 灰度值以累积吸光度(IA)表示, 结果以目的蛋白与GAPDH的IA值的比值表示.

统计学处理 用SPSS17.0软件进行统计分析. 计量资料数据均以mean±SD表示, 2组间均数差异性比较采用t检验, 3组间均数差异性比较采用SNK-q检验. 两指标之间的相关性采用pearson法进行直线相关分析. $P < 0.05$ 即认为有统计学意义.

2 结果

2.1 PBMC培养的结果 分离的PBMC, 用台盼蓝染液检查细胞活性: 计数200个细胞, 活细胞百分率在95%以上. 镜下可见花团状的细胞团说明细胞激活增殖(图1).

2.2 用流式细胞仪分析PBMC凋亡的结果 慢性乙肝组患者PBMC凋亡率($28.27\% \pm 4.61\%$)高于健康对照组($19.36\% \pm 5.90\%$), 差异有统计学意义($P < 0.05$), 也高于慢性乙肝+抑制剂组($23.37\% \pm 5.52\%$), 差异有统计学意义($P < 0.05$). 慢性乙肝+抑制剂组PBMC凋亡率($23.37\% \pm 5.52\%$)高于健康对照组($19.36\% \pm 5.90\%$), 差异有统计学意义($P < 0.05$, 图2).

2.3 Western blot检测p-JNK、总JNK、p-c-jun、Bim蛋白表达的结果 Western blot显示在大约54 kDa位置出现p-JNK特异性条带, 54 kDa位置出现总JNK特异性条带, 43 kDa位置出现p-c-jun特异性条带, 27 kDa位置出现Bim特异性条带, 在37 kDa位置出现GAPDH条带, 经Image JA软件灰度扫描并与内参比较分析显示: 慢性乙肝组p-JNK蛋白的表达量高于健康对照组(1.09 ± 0.16 vs 0.83 ± 0.12 , $t = 5.885$, $P < 0.01$), 也高于慢性乙肝+抑制剂组(1.09 ± 0.16 vs 0.53 ± 0.15 , $t = 11.502$, $P < 0.01$), 差异有统计学意义. 总JNK蛋白在3个组的表达差异无统计学意义. 慢性乙肝组p-c-jun蛋白的表达量高于健康对照组(1.21

■创新盘点

本实验以慢性乙肝患者PBMC为研究对象, 体外模拟AICD过程, 研究JNK信号通路在CHB患者外周血单个核细胞AICD过程中的作用, 进一步探讨AICD发生的机制, 为慢性乙型肝炎的治疗提供理论依据.

■应用要点

本研究发现JNK信号通路参与介导了慢性乙型肝炎患者PBMC的AICD过程,是CHB患者PBMC凋亡增多的机制之一。

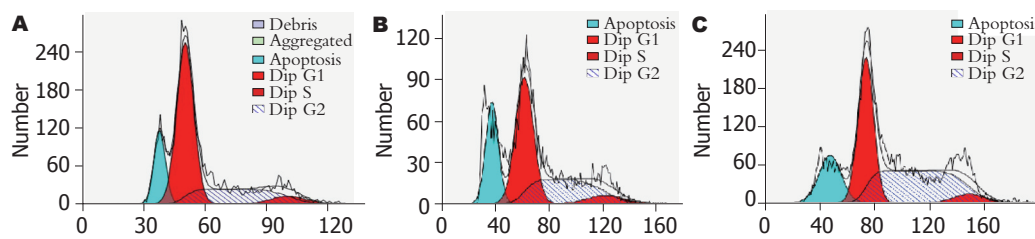


图2 流式细胞凋亡图. A: 正常人; B: 慢性乙肝患者; C: 慢性乙肝+抑制剂的成员。



图3 蛋白质印迹方法检测各组p-JNK、总-JNK、p-c-jun和Bim蛋白表达。

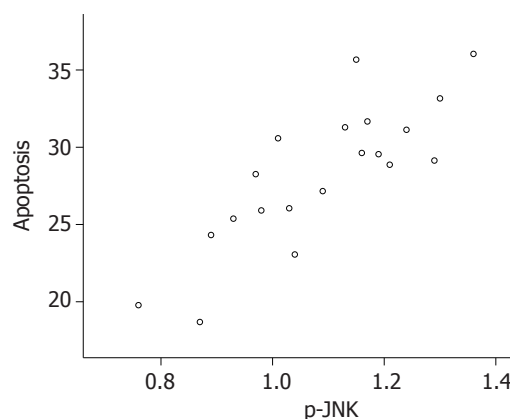


图4 慢性乙肝组PBMC凋亡率与PBMC中p-JNK蛋白的表达成正相关($r = 0.823, P < 0.01$)。

表1 各组p-JNK、总-JNK、p-c-jun和Bim蛋白表达的比较 (mean \pm SD, $n = 20$)

分组	p-JNK	总-JNK	p-c-jun	Bim
对照组	0.83 \pm 0.12	1.08 \pm 0.14	0.96 \pm 0.13	0.58 \pm 0.12
慢性乙肝组	1.09 \pm 0.16 ^d	1.13 \pm 0.15	1.21 \pm 0.15 ^d	0.96 \pm 0.14 ^d
慢性乙肝+抑制剂的组	0.53 \pm 0.15 ^b	1.06 \pm 0.12	0.62 \pm 0.14 ^b	0.52 \pm 0.13 ^b

^b $P < 0.01$ vs 慢性乙肝组; ^d $P < 0.01$ vs 对照组。

± 0.15 vs 0.96 ± 0.13 , $t = 5.477$, $P < 0.01$), 也高于慢性乙肝+抑制剂的组(1.21 ± 0.15 vs 0.62 ± 0.14 , $t = 12.899$, $P < 0.01$), 差异有统计学意义。慢性乙肝组Bim蛋白的表达量高于健康对照组(0.96 ± 0.14 vs 0.58 ± 0.12 , $t = 9.133$, $P < 0.01$), 也高于慢性乙肝+抑制剂的组(0.96 ± 0.14 vs 0.52 ± 0.13 , $t = 10.086$, $P < 0.01$), 差异有统计学意义(图3和表1)。

2.4 用Pearson法分析p-JNK蛋白的表达与凋亡率的相关性结果在AICD过程中慢性乙肝组PBMC凋亡率与PBMC中p-JNK蛋白的表达成正相关($r = 0.823$, $P < 0.01$, 图4)。

3 讨论

AICD是指已活化的成熟淋巴细胞(T或B细胞)再次受到激活信号(特别是TCR/CD3复合体)激活后所发生的细胞凋亡, 它既是维持机体免疫稳

定的一种生理机制, 也是形成外周免疫耐受的重要原因^[8]。本实验在体外培养PBMC, 模拟细胞在体内的AICD过程, 结果发现慢性乙肝组的PBMC凋亡率明显高于健康对照组, 这与短期内激活PBMC的凋亡情况相一致^[3], 这表明慢性乙肝患者的PBMC存在AICD过多的现象。CHB患者的PBMC可能在HBV特异性抗原刺激下被激活, 再发生自身凋亡(即AICD), 这可能导致CHB患者淋巴细胞数量减少、功能下降和免疫细胞比例失衡, 从而减弱了机体的细胞免疫功能和有效的针对HBV的特异性细胞免疫应答, 使机体对HBV的清除作用减弱, 最终造成对HBV的免疫耐受, 这可能是导致HBV持续慢性感染的一个重要原因^[9]。

JNK家族是一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 是丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated pro-

tein kinase, MAPK)家族的一员^[10]. JNK信号通路介导了许多细胞凋亡的发生, 在多种疾病的发生发展中起重要作用^[11]. p-JNK是JNK的活性形式, 通过检测p-JNK的表达可以反映JNK信号通路的活化情况. c-Jun和Bim都是JNK介导的细胞凋亡信号通路中的重要下游分子^[12]. c-Jun是一种核内转录因子, 是JNK重要的核内底物, 活化的JNK转位到细胞核后能够使c-Jun磷酸化而激活, 从而提高其转录活性, 促进下游凋亡相关靶基因的转录而分别启动死亡受体途径及线粒体途径的细胞凋亡^[13,14]. p-c-Jun的激活同样也反映了JNK信号通路的活化情况. Bim蛋白是JNK重要的胞浆底物, 是Bcl-2家族中一种重要的凋亡调节蛋白^[15]. 活化的JNK能够通过激活转录因子c-Jun等而上调Bim的表达, 也可以在胞质内直接使Bim蛋白磷酸化而诱发线粒体途径的细胞凋亡^[12]. 本研究发现慢性乙肝组PBMC中p-JNK及其下游转录因子p-c-jun和下游蛋白Bim的表达量均较健康对照组高, 而总JNK蛋白的表达量无显著性差异, 表明p-JNK蛋白表达的增加是JNK活化所致, 慢性乙型肝炎患者PBMC中存在JNK信号通路的过度激活, 但是其激活的原因尚未阐明, 我们推测与HBV的持续慢性感染有关. Wang等^[16]研究表明HBV X蛋白(HBx)能够持续激活JNK和P38信号通路而介导肝细胞的凋亡, 在CHB患者的PBMC中也可以检出HBx mRNA^[17], 那么在CHB患者的PBMC中HBx能否激活JNK信号通路而介导凋亡, HBx是否是JNK信号通路过度激活的原因还需要进一步研究.

研究证实JNK信号通路参与介导了多种疾病淋巴细胞的AICD过程, 但是关于JNK信号通路是否也参与介导了CHB患者PBMC的AICD过程还未见报道. 本研究通过在体外培养PBMC, 模拟细胞在体内的AICD过程, 发现慢性乙肝组PBMC的凋亡率与p-JNK蛋白的表达呈正相关. 应用JNK特异性抑制剂SP600125^[18,19]预处理细胞后, 可以明显抑制p-JNK及其下游转录因子p-c-jun和下游蛋白Bim的表达, PBMC凋亡率也明显降低, 表明JNK信号通路参与介导了慢性乙型肝炎患者PBMC的AICD过程. 由于抑制JNK并不能使CHB患者PBMC的凋亡率完全降至正常, 因此JNK信号通路只是介导CHB患者PBMC凋亡增多的机制之一, 关于PBMC发生AICD的其他机制还有待于进一步的研究.

免疫治疗是目前慢性乙型肝炎治疗的研究

热点, 如何通过恢复自身的免疫力来彻底清除病毒达到治愈乙肝的目标是我们目前面临的主要问题. 本研究发现JNK信号通路参与介导了慢性乙型肝炎患者PBMC的AICD过程, 是CHB患者PBMC凋亡增多的机制之一, 应用SP600125抑制JNK后, 可以降低慢性乙肝患者PBMC凋亡率. 这给我们治疗慢性乙型肝炎带来了新的思路, 我们可以探索从不同水平干预JNK或其下游底物的表达, 通过抑制JNK通路来减少淋巴细胞凋亡, 改善CHB患者的细胞免疫功能, 提高机体清除HBV的能力.

4 参考文献

- 1 Nakamura K, Yuh K, Sugyo S, Shijo H, Kimura N, Okumura M. Apoptosis observed in peripheral T lymphocytes from patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 1996; 111: 156-164
- 2 Lohman BL, Welsh RM. Apoptotic regulation of T cells and absence of immune deficiency in virus-infected gamma interferon receptor knockout mice. *J Virol* 1998; 72: 7815-7821
- 3 李玲, 顾长海, 李欣. 激活诱导细胞死亡在乙型肝炎发病机制中的意义. *中华医学杂志* 2003; 83: 1146-1149
- 4 Martindale JL, Holbrook NJ. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J Cell Physiol* 2002; 192: 1-15
- 5 Chhabra A, Mehrotra S, Chakraborty NG, Dorsky DI, Mukherji B. Activation-induced cell death of human melanoma specific cytotoxic T lymphocytes is mediated by apoptosis-inducing factor. *Eur J Immunol* 2006; 36: 3167-3174
- 6 Mehrotra S, Chhabra A, Hegde U, Chakraborty NG, Mukherji B. Inhibition of c-Jun N-terminal kinase rescues influenza epitope-specific human cytolytic T lymphocytes from activation-induced cell death. *J Leukoc Biol* 2007; 81: 539-547
- 7 Strasser A, Pellegrini M. T-lymphocyte death during shutdown of an immune response. *Trends Immunol* 2004; 25: 610-615
- 8 Green DR, Droin N, Pinkoski M. Activation-induced cell death in T cells. *Immunol Rev* 2003; 193: 70-81
- 9 袁文声, 吴晓蔓. 激活诱导细胞凋亡(AICD)在乙型肝炎慢性化机制中的意义. *临床肝胆病杂志* 2006; 22: 29-30
- 10 Keshet Y, Seger R. The MAP kinase signaling cascades: a system of hundreds of components regulates a diverse array of physiological functions. *Methods Mol Biol* 2010; 661: 3-38
- 11 Johnson GL, Nakamura K. The c-jun kinase/stress-activated pathway: regulation, function and role in human disease. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1773: 1341-1348
- 12 Bogoyevitch MA, Kobe B. Uses for JNK: the many and varied substrates of the c-Jun N-terminal kinases. *Microbiol Mol Biol Rev* 2006; 70: 1061-1095
- 13 Carboni S, Antonsson B, Gaillard P, Gotteland JP, Gillon JY, Vitte PA. Control of death receptor and mitochondrial-dependent apoptosis by c-Jun N-terminal kinase in hippocampal CA1 neurones following global transient ischaemia. *J Neurochem* 2005; 92: 1054-1060

■名词解释

AICD: 指已活化的成熟淋巴细胞(T或B细胞)再次受到激活信号(特别是TCR/CD3复合体)激活后所发生的细胞凋亡, 它既是维持机体免疫稳定的一种生理机制, 也是形成外周免疫耐受的重要原因.

■同行评价

本文主要研究了JNK信号通路在CHB患者外周血单个核细胞AICD过程中的作用,并初步探讨了AICD发生的机制,有一定科研意义。

- 14 Dunn C, Wiltshire C, MacLaren A, Gillespie DA. Molecular mechanism and biological functions of c-Jun N-terminal kinase signalling via the c-Jun transcription factor. *Cell Signal* 2002; 14: 585-593
- 15 叶艳, 张林杰. 凋亡调节蛋白BIM的研究进展. 国外医学. 生理、病理科学与临床分册 2004; 24: 548-550
- 16 Wang WH, Grégori G, Hullinger RL, Andrisani OM. Sustained activation of p38 mitogen-activated protein kinase and c-Jun N-terminal kinase pathways by hepatitis B virus X protein mediates apoptosis via induction of Fas/FasL and tumor necrosis factor (TNF) receptor 1/TNF-alpha expression. *Mol Cell Biol* 2004; 24: 10352-10365
- 17 Nakamoto Y, Kaneko S. Mechanisms of viral hepatitis induced liver injury. *Curr Mol Med* 2003; 3: 537-544
- 18 Bennett BL, Sasaki DT, Murray BW, O'Leary EC, Sakata ST, Xu W, Leisten JC, Motiwala A, Pierce S, Satoh Y, Bhagwat SS, Manning AM, Anderson DW. SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 13681-13686
- 19 Shin M, Yan C, Boyd D. An inhibitor of c-jun aminoterminal kinase (SP600125) represses c-Jun activation, DNA-binding and PMA-inducible 92-kDa type IV collagenase expression. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1589: 311-316

编辑 曹丽鸥 电编 闫晋利

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011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)

胆囊息肉样病变的临床流行病学特点及其易感性因素

张毅, 刘薇, 周静, 王伟, 王仁萍, 马先福, 王燕

张毅, 刘薇, 周静, 王伟, 王仁萍, 马先福, 王燕, 青岛大学医学院附属医院健康体检中心 山东省青岛市 266003

作者贡献分布: 本课题立题设计由张毅、王燕及马先福完成; 研究过程及数据分析由张毅、刘薇、周静、王伟、王仁萍、马先福及王燕完成; 论文撰写与修改均由张毅完成。

通讯作者: 张毅, 副主任医师, 266003, 山东省青岛市市南区江苏路16号, 青岛大学医学院附属医院健康体检中心。

zhang.yi2000@163.com

电话: 0532-82911096

收稿日期: 2011-07-25 修回日期: 2011-10-10

接受日期: 2011-10-12 在线出版日期: 2011-10-18

Clinical epidemiological characteristics and correlative factors of polypoid lesions of the gallbladder

Yi Zhang, Wei Liu, Jing Zhou, Wei Wang,
Ren-Ping Wang, Xian-Fu Ma, Yan Wang

Yi Zhang, Wei Liu, Jing Zhou, Wei Wang, Ren-Ping Wang, Xian-Fu Ma, Yan Wang, Health Examination Center, the Affiliated Hospital of Medical College of Qingdao University, Qingdao 266003, Shandong Province, China

Correspondence to: Yi Zhang, Health Examination Center, the Affiliated Hospital of Medical College of Qingdao University, 16 Jiangsu Road, Qingdao 266003, Shandong Province, China. zhang.yi2000@163.com

Received: 2011-07-25 Revised: 2011-10-10

Accepted: 2011-10-12 Published online: 2011-10-18

Abstract

AIM: To investigate the clinical epidemiological characteristics and correlative factors of polypoid lesions of the gallbladder (PLG) in Qingdao, China.

METHODS: A total of 27 400 people who underwent health examination from January 2009 to December 2009 at our hospital were included in the study. Stratified random sampling was adopted to select 1 678 patients who were diagnosed with PLG by ultrasound to conduct an epidemiological survey, and 1 700 people without PLG were used as controls. Multifactor unconditional Logistic regression analyses were performed to investigate the relationship of life styles, behavior factors, blood sugar (FPG), triglycerides (TG), total cholesterol (CHO), fatty liver, cholecystitis and gallbladder stone with PLG. The clinical pathological characteristics

and rationality of cholecystectomy were analyzed in 219 patients who had PLG with a diameter of >10 mm and underwent cholecystectomy.

RESULTS: Of 2 7400 people, 27 301 (99.64%) had complete data. The prevalence of PLG was 6.15% (1 678/27 301). The male to female ratio was 1.5 : 1. The majority (64.96%) of patients ranged in age between 30 and 59 years. Solitary PLG and multiple PLG accounted for 37.72% and 62.28%, respectively. The majority (86.95%) of PLG were smaller than 10 mm in diameter. Cholesterol polyps (CPs), benign non-CPs and malignant gallbladder diseases accounted for 79.14%, 17.76% and 3.10%, respectively. Multi-factor unconditional Logistic regression analyses revealed that life styles, behavior factors, TG, FPG, and gallbladder stone had no significant association with PLG (all $P > 0.05$), while age, sex, CHO, fatty liver, and cholecystitis were significantly correlated with PLG (all $P < 0.05$). Of 219 (13.05%) patients who had PLG with a diameter of >10 mm and underwent cholecystectomy, 76.26% had benign PLG and 23.74% had malignant disease.

CONCLUSION: The incidence of PLG was 6.15% in Qingdao. Abnormal CHO metabolism, fatty liver and cholecystitis were correlative factors for PLG. Cholecystectomy should be cautiously selected in patients who had PLG with a diameter ≤ 10 mm.

Key Words: Gallbladder; Polypoid lesions; Ultrasound examination; Epidemiological characteristics; Pathology; Correlative factors

Zhang Y, Liu W, Zhou J, Wang W, Wang RP, Ma XF, Wang Y. Clinical epidemiological characteristics and correlative factors of polypoid lesions of the gallbladder. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(29): 3081-3087

摘要

目的: 探讨青岛地区胆囊息肉样病变(polypoid lesion of gallbladder, PLG)的临床流行病学特点及其易感性因素。

方法: 选择2009/01-2009/12在本院健康体检

■背景资料

由于地域性差异、生活方式和行为因素的不同,国内外有关胆囊息肉样病变(polypoid lesion of gallbladder, PLG)的临床流行病学调查结果也不尽相同,且有较大差异。但多数文献报道PLG发病率在5%以下。随着超声诊断技术的普及与提高,无临床症状的PLG检出率亦在日益增加。

■同行评议者

李国威, 教授, 西安交通大学医学院第二附属医院普通外科; 梁力建, 教授, 中山大学附属第一医院肝胆外科

■研究前沿

随着超声诊断技术的普及与提高,无症状性PLG的检出率亦在日益增加.但有关区域性PLG发病情况及其易感性因素的大样本研究报道甚少.

中心体检的27 400人作为调查对象,采用分层随机整群抽样法,对1 678例超声诊断PLG患者进行临床流行病学调查,并抽取1 700人非PLG者作为对照组.采用多因素非条件Logistic回归分析生活方式、行为因素、空腹血糖(FPG)、三酰甘油(TG)、胆固醇(CHO)和体质指数(BMI)、脂肪肝、胆囊炎、胆囊结石和胆囊癌等,以OR值为PLG易感性因素.分析PLG直径 >10 mm行胆囊切除术219例患者的超声病理学特点以及手术治疗良性非肿瘤性PLG合理性.

结果: 27 400人健康体检中,资料完整27 301人,应答率为99.64%.经超声诊断PLG者1 678例,发病率6.15%,其中男性59.95%(1 006/1 678),女性40.05%(672/1 678),男女比例1.5:1;30-59岁占64.96%(1 090/1 678).PLG单发37.72%(633/1 678),多发62.28%(1 045/1 678);直径 ≤ 10 mm占86.95%(1 459/1 678).胆固醇性息肉(cholesterol polyps, CPs)占79.14%(1 328/1 678);良性非CPs占17.76%(298/1 678);恶性PLG占3.10%(52/1 678).多因素非条件Logistic回归分析:PLG组与对照组在生活方式、行为因素、BMI、TG、FPG、胆囊结石中比较无明显差异($\chi^2 = 4.346-5.264, P > 0.05$),经OR值分析在年龄、性别、CHO、脂肪肝和胆囊炎中,PLG组明显高于对照组($\chi^2 = 7.163-9.865, P < 0.05$).219例PLG直径 >10 mm行切除胆囊术,占同期超声诊断的13.05%;临床病理学诊断良性PLG 167例,占同期手术的76.26%,恶性PLG 52例(胆囊癌34例,腺瘤癌变8例,腺瘤样增生癌变8例,腺肌瘤癌变2例)占23.74%,均为单发,基底宽,57.69%(30/52)CED显示血流信号.

结论: 青岛地区PLG发病率为6.15%,70%以上为CPs,男性多于女性,30-59岁为高发年龄段.CHO代谢异常、脂肪肝和胆囊炎是PLG的易感性因素.对直径 ≤ 10 mm的PLG应慎重施行胆囊切除,可超声随访观察.

关键词: 胆囊;息肉样病变;超声检查;流行病学;病理学;易感因素

张毅,刘薇,周静,王伟,王仁萍,马先福,王燕.胆囊息肉样病变的临床流行病学特点及其易感性因素.世界华人消化杂志 2011; 19(29): 3081-3087
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/3081.asp>

0 引言

1931年Kirklin首先报告胆囊乳头状瘤的放射学诊断,1957年Jones将胆囊壁乳头状隆起性病变

命名为胆囊息肉样病变(polypoid lesion of gall-bladder, PLG),嗣后有关PLG的发病率情况的报道逐渐增多^[1].但由于地域性差异、生活方式不同和行为因素的关系,PLG的发病率具有较大的差异,国外文献报道为2.7%-28.6%不等^[2],国内文献报道则低于国外文献,为1.35%-12.4%^[3,4],但目前国内外多数学者报道PLG的发病率在5%以下^[5].随着超声诊断技术的普及与提高,无症状性PLG的检出率亦在日益增加.但有关区域性PLG发病情况及易感性因素的大样本研究报道甚少.超声诊断PLG包含20余种不同临床病理学类型,许多患者担心PLG可能发生癌变,而预防性切除了功能正常的胆囊.为此,我们通过对居住在青岛地区的居民进行健康体检,旨在调查研究青岛地区PLG的临床流行病学特点及其易感性因素,分析PLG >10 mm的超声与临床病理学特点,对胆囊切除治疗良性非肿瘤性PLG的合理性进行再探讨.

1 材料和方法

1.1 材料 选择青岛市内七区于2009-01/12在青岛大学医学院附属医院健康体检中心进行健康体检者27 400人,采用分层随机整群抽样方法,抽取20-86岁(平均 47.41 ± 4.24 岁)居住青岛地区离退休人员、机关和企事业单位的干部、职工及市民经超声诊断为PLG的1 678例进行临床流行病学调查及其易感性因素分析,并随机抽取非PLG者1 700人作为对照组. PLG组中男1 006例,女672例;年龄20-86岁(平均 47.61 ± 4.25 岁).219例PLG直径 >10 mm施行胆囊切除术,占同期超声诊断的13.05%.对照组中男976人,女724人;年龄21-83岁(平均 47.12 ± 4.23 岁).

1.2 方法

1.2.1 调查内容: 将超声、体质指数(BMI)=[体质量/身高²(kg/m²), BMI ≤ 24 kg/m²为正常, ≥ 25 - ≤ 29 kg/m²为超重, ≥ 30 kg/m²为肥胖]、空腹血糖(FPG)、三酰甘油(TG)、胆固醇(CHO)等检查结果纳入本次调查的主要内容.同时详细记录被调查对象的性别、年龄、职业、文化程度、婚姻状况、家庭状况、经济收入、饮食结构、吸烟(>1 支/天,持续1年以上)及饮酒(乙醇量 >30 mL/天,并持续或累积6 mo)、睡眠状况、户外运动、家族史、疾病史(包括脂肪肝、胆囊炎、胆囊结石、高血脂、糖尿病)等.

1.2.2 调查: 本组经腹部超声检查者共计27 400人,获得满意胆囊声像图及资料完整者27 301

人, 图像及资料不完整者99人(包括胆囊切除术后和胆囊显示欠清或不满意者)予以删除, 应答率为99.64%。总体研究对象为3 378人, 其中男1 982人, 女1 396人, 男女比例为1.42:1。采用统一编制的表格式调查问卷, 由副主任医师以上职称的专业医师与被调查者面对面地进行详细询问, 并逐项填写《PLG流行病学调查表》。超声及各项生化检查由副主任医师以上的专业人员操作。整个研究过程严格执行质量控制标准, 统一调查方法。采用多因素非条件Logistic回归分析PLG与行为因素和生化指标、脂肪肝、胆囊炎、胆囊结石等疾病的相关性。

1.2.3 超声检查: 采用PHILIPS非凡型和TOSHIBA SSA-6600型彩色多普勒超声诊断仪, 探头频率为3.5 MHz。受检者在空腹12 h后的状态下进行腹部超声检查。以清晰显示胆囊壁局限性、隆起性、固定性乳头状或息肉样回声为PLG的超声诊断标准。仔细观察PLG的形态、结构、数目并测量大小, 基底部与胆囊壁的关系; 用彩色能量多普勒(CED)观察PLG内有无血流信号。根据PLG超声图像特点作出疾病倾向性诊断, 如胆囊胆固醇性息肉、结晶、腺瘤、腺肌瘤或癌等。以肝脏增大, 近场回声增强, 远场回声衰减, 血管回声稀疏程度等作为判断脂肪肝的程度和标准。以胆囊壁厚度>3 mm毛糙作为胆囊炎的判断标准。以胆囊内见可移动性强回声团后伴声影作为胆囊结石的判断标准。

1.2.4 生化检测: 采用日本日立牌9600全自动生化分析仪进行各项指标测定, 试剂采用北京中生生物工程公司生产的检测试剂。取被检查者的空腹血5 mL进行FPG、TG和CHO检测, 以TG>1.7 mmol/L为判断血脂异常的标准, 以CHO>5.7 mmol/L为判断胆固醇升高的标准, 以FPG>6.1 mmol/L为判断血糖水平升高的标准。

统计学分析 采用SPSS13.0统计分析软件, 将资料录入编号建立数据库, 并对数据进行核对及逻辑检查, 确保数据真确无误, 对数据缺失予以删除处理。比较采用 χ^2 检验; 正态分布计数用均数±标准差表示; 组间比较采用 t 检验; 非正态的计量资料用中位数(M)和四分位数间距(QR)来表示, 组间比较采用秩和检验, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义; 采用多因素非条件Logistic回归分析, 以OR值分析与PLG之间的相关性。

2 结果

2.1 PLG组与对照组年龄与性别构成比 本次调

查研究PLG总发病率6.15%(1 678/27 301), 男性59.95%(1 006/1 678), 女性40.05%(672/1 678), 男女比例1.50:1; 年龄20-86岁, 平均年龄47.61±4.25岁, QR为14。对照组1 700人中男性57.41%(976/1 700), 女性42.59%(724/1 700), 男女比例1.35:1。年龄21-83岁, 平均年龄47.12±4.23岁, QR为13。将调查人群按每10岁为一个年龄段分为20-岁、30-岁、40-岁、50-岁、60-岁和>70岁共6个组, 30-59岁男性占67.40%(678/1 006), 女性占61.31%(412/672)是PLG发病的峰值年龄段, 经两个独立样本非参数检验, PLG组与对照组年龄有明显差异($Z=8.610$, 双侧 $P<0.05$)。经两个独立样本非参数检验, PLG组与对照组比较男性多于女性, 有显著性差异($Z=8.612$, 双侧 $P<0.05$)。

2.2 超声诊断PLG直径与胆囊疾病的关系 本组超声诊断为PLG共1 678例, 其中单发为37.72%(633/1 678), 多发占62.28%(1045/1 678); PLG直径≤10 mm占86.95%(1459/1 678), >10 mm占13.05%(219/1 678); 良性PLG占96.90%(1 626/1 678)胆固醇性息肉(cholesterol polyps, CPs)占79.14%(1 328/1 678), 包括胆固醇息肉和胆固醇结晶; 良性非CPs占17.76%(298/1 678), 恶性PLG占3.10%(52/1 678, 表1)。

2.3 219例PLG>10 mm的超声与临床病理学特点 本组有219例PLG施行切除胆囊术, 直径均>10 mm, 占同期超声诊断的13.05%, PLG超声病理学诊断为良性167例, 占同期手术的76.26%; 恶性52例占23.74%, 其中胆囊癌34例, 腺瘤癌变8例, 腺瘤样增生癌变8例, 腺肌瘤癌变2例, 直径>20 mm占61.54%(32/52), 基底宽占96.15%(50/52), CED显示血流信号者占57.69%(30/52, 表2)。

2.4 PLG组与对照组BMI、FPG、TG和CHO检测结果 在BMI、FPG和TG的检测中, 两组比较无明显差异($\chi^2=5.264-5.372$, $P>0.05$), 而在CHO的检测中, 两组比较有显著性差异($\chi^2=7.463$, $P<0.05$), 表明CHO代谢异常是PLG易感性因素(表3)。

2.5 PLG组与对照组脂肪肝及胆囊炎和结石的关系 两组在合并脂肪肝、胆囊炎和胆囊结石等疾病所占的比例分别为36.83% vs 24.47%、31.05% vs 20.82%和14.90% vs 14.29%。由此可见脂肪肝和胆囊炎在PLG组所占的比例明显高于对照组, 具有显著性差异($\chi^2=7.263-7.562$,

■相关报道

Myers等报道PLG发病率为5.0%, 男女比例无明显差异。Okamoto等[8]对194 767例日本健康人应用超声进行普查, 查出PLG患者10 926例, 检出率为5.6%, 其中男性发病率为5.9%, 女性为4.5%; 年龄男性多为30-40岁; 而女性多见于40-50岁。

■创新盘点

采用超声诊断技术和生物化学检测指标以及问卷调查等手段对青岛地区PLG进行调查分析,揭示青岛地区PLG的发病率、年龄和性别分布的临床流行病学特点。

表 1 1678例超声诊断PLG直径与胆囊疾病的关系 n (%)

超声诊断	n	单发	多发	直径 ≤ 5 mm	6–10 mm	>10 mm
胆固醇性息肉	1204(71.75)	273(22.67)	931(77.33)	985(81.81)	219(18.19)	–
胆固醇结晶	124(7.39)	48(38.71)	76(61.29)	89(71.77)	35(28.23)	–
腺瘤性息肉	96(5.72)	84(87.50)	12(14.29)	–	31(32.29)	65(67.71)
炎性息肉	84(5.01)	79(94.05)	5(5.95)	2(2.38)	43(51.19)	39(46.43)
腺瘤样增生	79(4.71)	75(94.94)	4(5.06)	–	31(39.24)	48(60.76)
胆囊癌	34(2.03)	34(100.00)	–	–	–	34(100.00)
腺肌瘤	29(1.73)	29(100.00)	–	–	3(10.34)	26(89.66)
壁内结石	18(1.07)	1(5.56)	17(94.44)	11(61.11)	7(38.89)	–
胆泥团	6(0.36)	6(100.0)	–	–	2(33.33)	4(66.67)
炎性肉芽肿	4(0.24)	4(100.00)	–	–	1(25.00)	3(75.00)
合计	1678(100.00)	633(37.72)	1045(62.28)	1087(64.78)	372(22.17)	219(13.05)

表 2 219例PLG >10 mm的超声与临床病理学特点 n (%)

病理诊断	n	单发	基宽	直径10–20 mm	>20 mm	CED
腺瘤性息肉	57(26.03)	47(82.46)	48(84.21)	51(89.47)	6(10.53)	12(21.05)
炎性息肉	39(17.81)	35(89.74)	28(71.79)	32(82.05)	7(17.95)	–
腺瘤样增生	40(18.26)	37(92.50)	29(72.50)	34(85.00)	6(15.00)	14(35.00)
腺肌瘤	24(10.96)	21(87.50)	24(100.00)	4(16.67)	20(83.33)	9(37.50)
胆囊癌	34(15.53)	34(100.00)	32(94.12)	12(35.29)	22(64.71)	24(70.59)
腺瘤癌变	8(3.65)	8(100.00)	8(100.00)	4(50.00)	4(50.00)	2(50.00)
腺瘤样增生癌变	8(3.65)	8(100.00)	8(100.00)	4(50.00)	4(50.00)	2(50.00)
腺肌瘤癌变	2(0.91)	2(100.00)	2(100.00)	–	2(100.00)	1(50.00)
胆泥团	4(1.83)	3(75.00)	3(75.00)	4(100.00)	–	–
炎性肉芽肿	3(1.37)	3(100.00)	3(100.00)	3(100.00)	–	–
合计	219(100.00)	198(90.41)	185(84.47)	148(67.58)	71(32.42)	64(29.22)

表 3 PLG组与对照组BMI、FPG、TG和CHO检测结果 (mean \pm SD)

分组	n	BMI(kg/m ²)	FPG(mmol/L)	TG(mmol/L)	CHO(mmol/L)
PLG组	1678	24.78 \pm 0.32	4.98 \pm 0.76	1.55 \pm 0.12	5.21 \pm 0.82
对照组	1700	24.62 \pm 0.24	4.84 \pm 0.64	1.25 \pm 0.11	4.57 \pm 0.71
χ^2 值		5.361	5.264	5.372	7.463
P 值		>0.05	>0.05	>0.05	<0.05

$P<0.05$),说明脂肪肝和胆囊炎是PLG易感性因素(表4)。

2.6多因素非条件Logistic回归分析 以PLG为应变量,以性别、年龄、婚姻状况、家庭情况、职业、文化程度、经济状况、吸烟、饮酒、海产品、睡眠状态、户外运动、家族疾病史、BMI、FPG、TG、CHO、脂肪肝、胆囊炎、胆囊结石等20项指标为协变量,采用多因素非条件Logistic回归分析结果显示:性别、年龄、CHO、脂肪肝和胆囊炎等指标与PLG密切相关,OR值2.674–3.930,两组差异有显著($\chi^2 = 7.162$ – 9.856 ,

$P<0.05$)。但在婚姻状况、家庭情况、职业、文化程度、经济状况、睡眠状态、户外运动、吸烟、饮酒、海产品、家族疾病史、BMI、TG、FPG、胆囊结石等15项指标两组比较差异无显著性($\chi^2 = 4.346$ – 5.264 , $P>0.05$,表5)。

3 讨论

PLG是以胆囊壁局限性隆起并突向胆囊腔内形成息肉样病变为医学影像学特征的一类胆囊疾病总称,其中90%以上为良性非肿瘤性病变,CPs占70%以上^[6]。随着超声诊断技术的不断提高以

表 4 PLG组与对照组脂肪肝及胆囊炎和结石的关系 n (%)

分组	n	脂肪肝	胆囊炎	胆囊结石
PLG组	1678	618(36.83)	521(31.05)	250(14.90)
对照组	1700	416(24.47)	354(20.82)	243(14.29)
χ^2 值		7.562	7.263	4.172
P 值		<0.05	<0.05	>0.05

■同行评价

本文为临床进一步研究PLG易感性与发病机制, 采取有效预防措施提供了较有价值的信息和依据。

表 5 多因素非条件Logistic回归分析 (自由度 = 1)

变量	B值	SE	χ^2 值	P 值	OR值
性别	2.301	0.220	9.865	0.000	3.672
年龄	2.607	0.236	9.390	0.000	3.930
家庭情况	0.693	0.216	4.532	0.058	1.310
婚姻状况	0.684	0.206	4.501	0.059	1.278
职业	0.657	0.203	4.504	0.071	1.280
文化程度	0.681	0.204	4.510	0.061	1.280
经济状况	0.669	0.219	4.563	0.056	1.293
睡眠状态	0.651	0.213	4.504	0.064	1.280
户外运动	0.657	0.237	4.346	0.051	1.137
家族疾病史	0.869	0.249	4.361	0.055	1.387
海产品	0.769	0.212	4.653	0.056	1.291
吸烟	0.862	0.266	7.392	0.023	1.963
饮酒	0.476	0.228	4.456	0.058	1.279
BMI	0.869	0.249	4.361	0.055	1.387
FPG	0.831	0.231	5.264	0.057	1.317
TG	0.967	0.239	5.372	0.053	1.435
CHO	0.785	0.254	7.463	0.028	2.848
脂肪肝	2.219	0.267	7.162	0.024	2.674
胆囊炎	2.347	0.289	7.563	0.031	2.850
胆囊结石	1.094	0.278	4.572	0.054	1.945

B值: 回归系数值; SE: 标准误; OR: 数比数。

及在健康体检人群中的广泛应用, PLG的检出率亦随之升高, 其中无症状性PLG占有相当大的比例, 已成为临床最常见的胆囊疾病之一。由于地域性差异, 生活方式以及行为因素的不同, 国内外有关PLG的临床流行病学调查结果也不尽相同。Myers等^[7]报道PLG发病率为5.0%, 男女比例无明显差异。Okamoto等^[8]对194 767例日本健康人应用超声进行普查, 查出PLG患者10 926例, 检出率为5.6%, 其中男性发病率为5.9%, 女性为4.5%; 年龄男性多为30-40岁; 而女性多见于40-50岁。Hattori等^[9]报道PLG发病率为5.8%, 男性多于女性, 年龄在30-50岁居多。国内报道PLG发病率为1.35%-12.40%之间, 平均在5.0%以下, 男女比例为1.5:1.0-5.5:1.0, 其发病率有逐年增长趋势^[3,4]。本次对青岛市内七区27 301名健康体检者应用超声检查, 查出PLG患者1678例, 发病

率为6.15%, 男女比例为1.5:1.0, 按照3个年龄段分层分析: 20-、60-和>70岁PLG的发病率相对较低, 组间比较无显著性差异; 而在30-、40-和50-岁PLG的发病率相对比较集中, 30-59岁男性占67.40%, 女性为61.31%, 与20-、60-和>70岁比较差异较大。虽然青岛地区是胆结石的高发区, 但本次调查结果显示PLG并非是本地区的高发病, 说明PLG的发病并非完全是地域性因素占主导, 揭示了青岛地区PLG的发病率仍高于国内平均水平(5.0% vs 6.15%), 男性多于女性和30-59岁为高峰年龄段分布的临床流行病学特点。

由于90%以上的PLG为良性病变, 且70%以上CPs, 多数学者围绕此结果展开临床和基础研究。Lee等^[10]研究发现PLG的发生及发展与TG代谢和慢性炎症密切相关, 并认为是全身脂质代谢紊乱和胆囊局部慢性炎症反应的结

果. Sugiyama等^[11]研究认为CPs的实质是肝脏对TG、CHO代谢发生障碍, 由于不饱和脂肪酸和胆碱的缺失, 使磷脂和胆汁酸合成减少, 导致胆汁中胆盐、磷脂和CHO比例失衡, 导致胆囊内CHO含量过度饱和, 粘蛋白浓度降低, 胆汁高度浓缩, 大量CHO析出并沉积于炎性胆囊壁黏膜上皮, 大量吞噬CHO结晶的泡沫细胞聚集固有层内, 逐渐形成向黏膜表面突出的黄色小结节, 从而导致CPs和炎性息肉的发生. Bar等^[12]研究发现CPs、炎性息肉几乎均合并慢性胆囊炎. 戴红蕾等^[5]研究认为脂肪肝和CHO代谢异常等因素与PLG有关. 李承龙等^[13]研究表明CPs与CHO代谢异常有关, 且与胆囊结石密切相关. 严格来讲CPs并非是临床病理意义上的真性息肉, 而是由于CHO代谢失调, 大量吞噬脂质的组织细胞堆积在胆囊壁固有层, 上覆以正常的黏膜上皮形成局限性隆起, 迄今为止, 尚未发现CPs癌变的报道. 由于CPs多数带有细蒂, 故有时因胆囊收缩为可能发生脱落, 且可能为形成结石的核心. 欧健苹等^[4]报道男性脂肪肝及PLG发病率高于女性. Segawa^[14]调查发现男性PLG与肥胖指数呈正相关, 其发病率与肥胖指数的曲线一致, 但女性则无此相关性. 本次调查研究结果表明PLG的发病与婚姻、职业、经济状况、吸烟、饮酒、海产品、运动、BMI、GLU、TG、胆囊结石等诸多因素无明显关联. 经多因素非条件Logistic回归分析表明PLG与性别、年龄、CHO代谢异常、脂肪肝和胆囊炎密切相关, 说明除年龄和性别因素以外, CHO代谢异常、脂肪肝和胆囊炎是PLG的主要易感性因素, 其中胆囊炎是PLG形成的重要临床病理学基础, 而CHO和脂肪肝则是PLG形成的促发因素. 提示PLG的易感性因素与胆囊结石并非完全相同. 因此, 控制或祛除PLG的易感性因素, 对降低PLG的发病率, 提高健康水平具有重要的意义.

超声诊断的PLG中包含着20余种不同临床病理学类型, 对于PLG直径>10 mm者可能包含早期胆囊癌和癌前病变(如胆囊腺瘤, 胆囊腺肌瘤病等)的潜在危险. 因此, 许多患者由于担心PLG发生癌变, 而选择了预防性胆囊切除术. 由于胆囊切除后可引起胆道和肠道的生理功能紊乱及胆道流体力学的改变, 引发胆结石的几率增加; 高浓度的毒性胆汁(石胆酸和去氧胆酸)直接排入肠腔, 结肠癌的发病率较常人增加3-4倍; 20%以上的患者引起胆汁反流性胃炎和胆囊切除后综合征等一系列病理学改变. 大量临床研究表明:

超声诊断多发性PLG, 其最大直径<10 mm者, 几乎全部为良性病变, 一般不会发生癌变, 也不会产生症状与出现并发症^[15,16]. 但位于胆囊颈部或胆囊管出口处的息肉或合并胆囊结石者, 由于息肉或结石堵塞胆囊管而造成胆汁排流障碍, 引起胆囊炎则可能发生右上腹绞痛等症状, 对此, 无论息肉大小均应积极采取治疗措施, 必要时手术治疗. Csendes等^[17]对111例直径<10 mm的PLG进行随访, 84例未手术者中50%PLG大小不变, 26.5%PLG数目和大小有所增加, 而23.5%缩小或消失. 本组良性PLG>95%, CPs>75%; 良性非CPs占17.76%, 恶性PLG仅占3.10%. 219例PLG中直径>10 mm者恶性病变占23.74%, 高于Chattopadhyay等^[18]报道PLG直径>10 mm恶性病变和癌变率为15%. 尽管胆囊腺瘤并非恶性, 但却被公认为癌前病变. 王秋生^[9]认为胆囊腺瘤和胆囊癌的发生与结石及慢性炎症对胆囊黏膜的长期刺激和损伤, 导致上皮细胞发生局部异型增生, 胆酸等致癌物质促使增生的黏膜发生息肉或乳头状腺瘤, 继而发生癌变. 本组直径>10 mm的腺瘤和腺瘤样增生113例中有16例发生癌变, 占14.16%. 因此, 当超声显示单发的PLG, 直径>10 mm, 无蒂, 基底宽, CED显示血流信号或合并胆囊结石者高度提示恶性PLG, 特别是位于胆囊床侧的恶性病变易发生肝脏浸润性转移, 应及早采取手术治疗, 对预防和发现早期胆囊癌的具有重要意义^[20]. 但对多发性PLG直径<10 mm, 有蒂或基底窄者, 可继续超声随访观察.

4 参考文献

- 1 Irie H, Kamochi N, Nojiri J, Egashira Y, Sasaguri K, Kudo S. High b-value diffusion-weighted MRI in differentiation between benign and malignant polypoid gallbladder lesions. *Acta Radiol* 2011; 52: 236-240
- 2 张宗明. 胆道外科疾病的诊治现状与进展. *世界华人消化志* 2008; 16: 1200-1204
- 3 刘勇. 胆囊息肉样病变的诊治进展. *武警医学院学报* 2009; 18: 371-373
- 4 欧健苹, 苏凤璋. 超声检查脂肪肝与胆囊息肉的关系分析. *新医学* 2010; 41: 90-99
- 5 戴红蕾, 陈周闻, 方力争. 1095例胆囊息肉样病变易感因素分析. *全科医学临床与教育* 2006; 4: 458-492
- 6 张毅, 张积华, 袁梅, 郑淑芳, 王正滨. 胆囊小隆起性病变的临床病理学特点与超声诊断的对比. *世界华人消化杂志* 2010; 18: 2707-2711
- 7 Myers RP, Shaffer EA, Beck PL. Gallbladder polyps: epidemiology, natural history and management. *Can J Gastroenterol* 2002; 16: 187-194
- 8 Okamoto M, Okamoto H, Kitahara F, Kobayashi K, Karikome K, Miura K, Matsumoto Y, Fujino MA. Ultrasonographic evidence of association of polyps and stones with gallbladder cancer. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 446-450
- 9 Hattori M, Inui K, Yoshino J, Miyoshi H, Okushima

- K, Nakamura Y, Naito T, Imaeda Y, Horibe Y, Hattori T, Nakazawa S. [Usefulness of contrast-enhanced ultrasonography in the differential diagnosis of polypoid gallbladder lesions]. *Nihon Shokakibyo Gakkai Zasshi* 2007; 104: 790-798
- 10 Lee J, Choi HS. [Reverse cholesterol transport in cultured gallbladder epithelial cells]. *Korean J Gastroenterol* 2004; 43: 145-152
- 11 Sugiyama M, Atomi Y, Kuroda A, Muto T, Wada N. Large cholesterol polyps of the gallbladder: diagnosis by means of US and endoscopic US. *Radiology* 1995; 196: 493-497
- 12 Bar Dayan Y, Vilkin A, Niv Y. Gallbladder mucin plays a role in gallstone formation. *Eur J Intern Med* 2004; 15: 411-414
- 13 李承龙, 冯贤松. 胆囊胆固醇息肉成因的研究进展. 国际外科学杂志 2006; 33: 94-97
- 14 Segawa K, Arisawa T, Niwa Y, Suzuki T, Tsukamoto Y, Goto H, Hamajima E, Shimodaira M, Ohmiya N. Prevalence of gallbladder polyps among apparently healthy Japanese: ultrasonographic study. *Am J Gastroenterol* 1992; 87: 630-633
- 15 Fang X, Gupta N, Shen SS, Tamboli P, Charnsan-gavej C, Rashid A, Wang H. Intraluminal polypoid metastasis of renal cell carcinoma in gallbladder mimicking gallbladder polyp. *Arch Pathol Lab Med* 2010; 134: 1003-1009
- 16 Numata K, Oka H, Morimoto M, Sugimori K, Kunisaki R, Nihonmatsu H, Matsuo K, Nagano Y, Nozawa A, Tanaka K. Differential diagnosis of gallbladder diseases with contrast-enhanced harmonic gray scale ultrasonography. *J Ultrasound Med* 2007; 26: 763-774
- 17 Csendes A, Burgos AM, Csendes P, Smok G, Rojas J. Late follow-up of polypoid lesions of the gallbladder smaller than 10 mm. *Ann Surg* 2001; 234: 657-660
- 18 Chattopadhyay D, Lochan R, Balupuri S, Gopinath BR, Wynne KS. Outcome of gall bladder polypoid lesions detected by transabdominal ultrasound scanning: a nine year experience. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 2171-2173
- 19 王秋生. 胆囊息肉样病变的诊治策略. 外科理论与实践 2005; 10: 312-314
- 20 吴舟锋, 吴瀛涛, 蒋天业. 胆囊息肉样病变267例临床分析. 中华肝胆外科杂志 2010; 16: 764-766

编辑 李军亮 电编 闫晋利

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》外文字符标准

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

结直肠癌肝转移的预后因素

王科伟, 范海银, 孔凡民, 董明

■背景资料

结直肠癌是消化系统的常见恶性肿瘤之一, 肝转移是结直肠癌主要的死亡原因之一, 了解其预后因素, 以及不同治疗方案对预后的影响, 会对临床治疗起到明显的指导作用。

王科伟, 范海银, 孔凡民, 董明, 中国医科大学附属第一医院辽宁省沈阳市 110001

作者贡献分布: 此课题由孔凡民设计; 资料统计及论文撰写由王科伟完成; 数据分析整理由范海银完成; 论文校审由董明完成。

通讯作者: 孔凡民, 教授, 主任医师, 110001, 辽宁省沈阳市和平区南京北街155号, 中国医科大学附属第一医院普通外科教研室. kong_fanmin@yahoo.com.cn

收稿日期: 2011-08-12 修回日期: 2011-10-10

接受日期: 2011-10-14 在线出版日期: 2011-10-18

Analysis of prognostic factors for colorectal liver metastases

Ke-Wei Wang, Hai-Yin Fan, Fan-Min Kong, Ming Dong

Ke-Wei Wang, Hai-Yin Fan, Fan-Min Kong, Ming Dong, Department of Gastrointestinal Surgery, the First Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Correspondence to: Fan-Min Kong, Professor, the First Hospital of China Medical University, Nanjing North Street, Heping District, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. kong_fanmin@yahoo.com.cn

Received: 2011-08-12 Revised: 2011-10-10

Accepted: 2011-10-14 Published online: 2011-10-18

Abstract

AIM: To evaluate the clinical prognostic factors for colorectal liver metastases and to analyze the impact of different treatments on prognosis.

METHODS: The clinical and prognostic data for 71 patients with colorectal liver metastases were analyzed. Univariate analysis was performed using the Kaplan-Meier method and Log-rank test to find significant prognostic factors, while multivariate analysis was performed using the Cox regression model.

RESULTS: Univariate analysis showed that the maximum diameter of liver metastases, presence or absence of regional lymph node metastasis and highest ALP level were significant prognostic factors. Cox multivariate regression analysis revealed that presence or absence of regional lymph node metastasis and highest ALP level were independent prognostic factors for colorectal liver metastases. The prognosis differed significantly between patients undergoing surgical resection and those undergoing chemotherapy

($P = 0.049$), but showed no significant difference between patients undergoing local treatment and those undergoing surgical resection as well as between patients undergoing local treatment and those undergoing chemotherapy.

CONCLUSION: The maximum diameter of liver metastases, presence or absence of regional lymph node metastasis, and highest ALP level are significant prognostic factors for colorectal liver metastases. Curative surgical resection combined with chemotherapy is the preferred treatment option for colorectal liver metastases since it was associated with better long-term survival.

Key Words: Colorectal cancer; Liver metastasis; Prognosis; Surgical resection

Wang KW, Fan HY, Kong FM, Dong M. Prognostic factors for colorectal liver metastasis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(29): 3088-3093

摘要

目的: 评价结直肠癌肝转移的临床预后因素及治疗方案对预后的影响。

方法: 收集71例结直肠癌肝转移患者的临床资料及预后情况, 用Kaplan-Meier生存分析及Log-rank检验进行单因素分析, 将有统计学意义的预后因素纳入Cox回归模型进行多因素分析。

结果: Kaplan-Meier单因素分析及Log-rank检验显示, 肝转移灶最大直径、有无区域淋巴结转移及诊断肝转移时碱性磷酸酶(ALP)最高值3个因素对其预后影响有显著意义; 将这3个预后因素纳入Cox回归多因素分析显示, 有无区域淋巴结转移、诊断肝转移时ALP最高值是结直肠癌肝转移的独立预后因素。全组3种治疗方式比较差别无统计学意义, 但对手术切除组和化疗组两组进行比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 而局部治疗组和手术组之间, 局部治疗组和化疗组之间差别无统计学意义。

结论: 肝转移灶最大直径、原发病灶有无区域淋巴结转移、诊断肝转移时最高ALP值是

■同行评议者

汤朝晖, 副主任医师, 上海交大医学院附属新华医院普外科; 王忠裕, 教授, 大连医科大学附属第一医院普通外科二科

结直肠癌肝转移患者的预后因素; 肝转移灶最大直径越小、无区域淋巴结转移、诊断肝转移时最高ALP值正常的患者预后越好; 手术切除联合化疗目前是结直肠癌肝转移的首选治疗方案, 可获得较好的远期生存。

关键词: 结直肠癌; 肝转移; 预后; 手术治疗

王科伟, 范海银, 孔凡民, 董明. 结直肠癌肝转移的预后因素. 世界华人消化杂志 2011; 19(29): 3088-3093
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/3088.asp>

0 引言

结直肠癌是消化系统的常见恶性肿瘤之一, 我国结直肠癌发病率约为206/10万, 近年每年以2%的速度增加, 占肿瘤死亡的第4位^[1]. 肝转移是结直肠癌主要的死亡原因之一, 约20%-25%的患者在初诊时发现伴有肝转移, 有60%以上的结直肠癌最终发生肝转移^[2]. 肝转移无法切除患者的中位生存时间仅6-9 mo, 5年生存率几乎为零, 而肝转移灶能根治性切除患者的5年生存率可达30%-40%. 近年多学科干预治疗结直肠癌肝转移, 使结直肠癌肝转移患者的预后得到了一定的改善. 现对我院收治的71例结直肠癌肝转移(colorectal liver metastases, CRLM)病例的临床特点, 治疗过程及预后进行回顾性分析, 了解其预后因素, 不同治疗方案对预后的影响, 为临床治疗提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料 2005-01/2010-06我院收治的CRLM患者中, 将仍然存活但随访时间少于1年之病例予以剔除, 共收集到符合入组标准的患者71例. 全组男41例, 女30例, 男女比例为1.37:1, 年龄39-82岁, 中位年龄59岁. 同时肝转移53例, 异时肝转移18例, 均有影像学或病理学检查支持, 平均出现肝转移的时间29.75 mo(最长术后16年出现肝转移). 结直肠癌原发部位: 直肠33例(46.5%)、乙状结肠18例(25.3%)、脾曲和降结肠3例(4.2%)、盲肠、升结肠和肝曲18例(25.3%), 横结肠1例(1.4%). 肿瘤分化程度: 高分化腺癌15例(21.1%), 中分化50(70.4%), 低分化及黏液腺癌6例(8.5%). 原发肿瘤有区域淋巴结转移51例(71.8%), 无区域淋巴结转移20例(28.2%). 转移灶累及肝右叶的24例(33.8%), 肝左叶的13例(18.3%), 双叶均累及34(47.9%). 单发肝转移灶者35例(49.3%), 多发转移灶者36例(50.7%). 肝

转移灶最大直径 ≥ 5 cm 28例(39.4%), < 5 cm 43例(60.6%). 全组诊断结直肠癌肝转移时CEA ≥ 200 ng/L 6例(8.5%), < 200 ng/L 65例(91.5%); 全组诊断结直肠癌肝转移时ALP最高值 ≥ 130 U/L 16(22.5%)例, < 130 U/L 55例(77.5%).

1.2 方法

1.2.1 患者入组标准: (1)肿瘤原发于结直肠; (2)原发病灶有明确的病理诊断; (3)经超声、增强CT, PET/CT检查和(或)术后病理学检查证实为肝转移; (4)首发转移为肝转移; (5)排除合并其他原发肿瘤和其他转移; (6)原发肿瘤均手术切除; (7)除外患有肝硬化、肝炎、梗阻性黄疸等其他肝脏疾病的患者; (8)ALP值为诊断肝转移时最高值(正常值范围38-128 U/L); (9)有完整的临床及随访资料。

1.2.2 治疗方案: (1)肝转移灶手术切除组29例(40.8%): 包括直接接受手术治疗和非手术治疗后获得二期手术治疗的, 该组患者术后接受辅助FOLFOX4方案(奥沙利铂、四氢叶酸钙、氟尿嘧啶)或IFL方案(依立替康, 四氢叶酸钙, 氟尿嘧啶)化疗; (2)化疗组34例(47.9%): 包括全身化疗和局部肝动脉化疗栓塞术(TACE), 全身化疗是用FOLFOX方案、FOLFOX4方案或IFL方案; 肝动脉化疗栓塞术是采用经肝动脉的碘油栓塞加化疗药物灌注(表阿霉素、丝裂霉素、替加氟); (3)局部治疗组8例(11.3%): 包括射频消融(RFA)、无水酒精注射(PEI)等。

1.2.3 随访: 随访截止日期2011-01-31, 存活29例, 死亡42例. 随访时间6-60 mo, 中位随访时间22 mo. 均通过电话方式或病案检索随访。

统计学处理 生存时间指患者自确诊肝转移至死亡或截止的时间. 结果应用SPSS13.0进行统计分析. 以生存时间为因变量对结直肠癌肝转移患者的预后因素分析, 单因素分析采用Kaplan-Meier法和Log rank检验, 多因素分析采用Cox回归模型, 显著性水平 $P < 0.05$.

2 结果

2.1 生存情况 71例结直肠癌肝转移患者的中位生存时间为27.0 mo \pm 1.6 mo, 1年生存率81.2%, 3年生存率26.7%, 5年生存率12.7%(图1). 同时肝转移中平均生存时间27.0 mo \pm 1.6 mo, 1年生存率77.2%, 3年生存率60.8%. 异时肝转移平均生存时间27.0 mo \pm 4.0 mo, 1年生存率87.2%, 3年生存率44.4%, 差异无统计学意义。

2.2 不同治疗方案对预后的影响 手术切除组中

■ 相关报道

Artigas等研究表明: 肝转移灶最大直径 < 4 cm, 肝转移灶数目 < 4 个的患者术后有较好的生存率。

应用要点

收集结直肠癌肝转移患者的临床资料及预后情况,用Kaplan-Meier生存分析及Log-rank检验进行单因素分析,将有统计学意义的预后因素纳入Cox回归模型进行多因素分析,从而得出结直肠癌肝转移的临床预后因素及治疗方案对预后的影响。

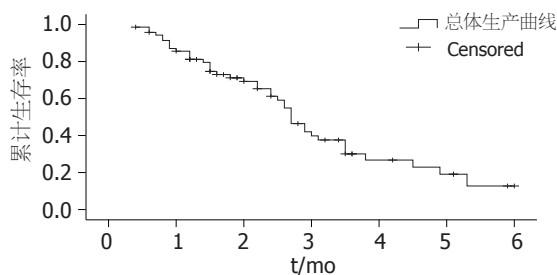


图1 71例肝转移患者的总体生存曲线。

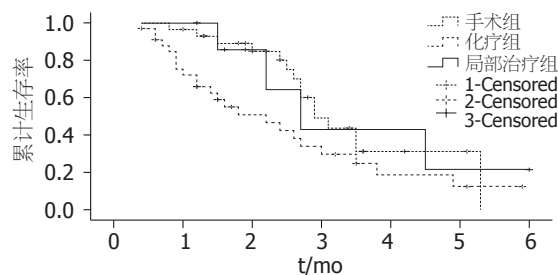


图2 不同治疗方式的生存曲线。

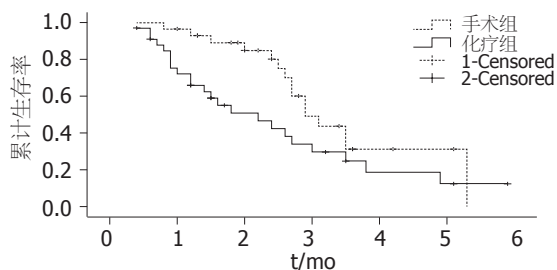


图3 手术组与化疗组生存曲线比较。

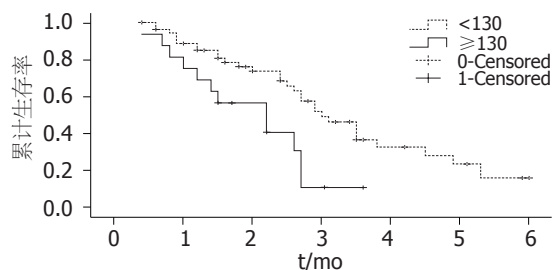


图4 不同ALP值的生存曲线。

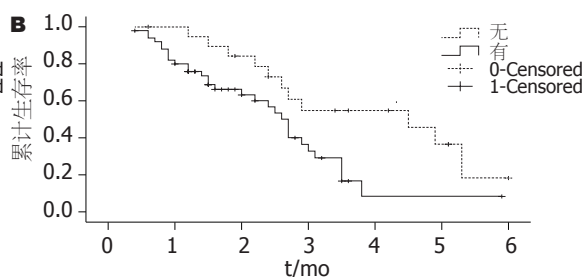
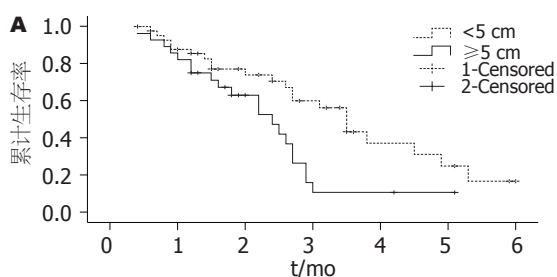


图5 不同肝转移灶最大直径和有无区域淋巴结的生存曲线。A: 不同肝转移灶最大直径; B: 有无区域淋巴结。

位生存时间为29.0 mo \pm 2.7 mo, 1年生存率93.0%, 3年生存率31.2%; 化疗组中位生存时间22.0 mo \pm 5.9 mo, 1年生存率65.9%, 3年生存率24.7%; 局部治疗组中位生存时间为27.0 \pm 1.6 mo, 1年生存率100%, 3年生存率42.9%, 全组3种治疗方式比较差别无统计学意义(图2)。但对手术切除组和化疗组患者进行比较发现, 差异有统计学意义($P = 0.049$, 图3), 而局部治疗组和手术组之间, 局部治疗组和化疗组之间差别无统计学意义。

2.3 不同ALP值水平的预后 ALP值<130 U/L者组中位生存时间30 mo, 1年生存率为84.9%, 3年生存率为32%; ≥ 130 U/L者组中位生存时间22 mo, 1年生存率68.8%, 3年生存率为10.0%(图4), 差异有统计学意义。

2.4 结直肠癌肝转移患者的预后因素分析

2.4.1 单因素分析: 用Kaplan-Meier单因素分析和Log rank检验对患者的年龄、性别、肝转移灶的数目、肝转移灶最大直径、针对肝转移灶治

疗方式、有无区域淋巴结转移、肝转移时间、肿瘤分化程度、CEA值、ALP值等因素进行了分析, 结果显示肝转移灶最大直径、有无区域淋巴结转移, ALP值3个因素对其预后影响有显著意义(表1)。

2.4.2 多因素分析: 将单因素分析有统计学意义的预后因素引入Cox回归模型进行多因素分析, 结果显示: 有无区域淋巴结转移和不同肝转移灶是肝转移患者的独立预后因素(图5, 表2)。

3 讨论

肝脏是结直肠癌转移的主要部位, 这是由于结直肠门静脉血回流的解剖学特点所决定的。结直肠癌脱落的癌细胞首先转移到肝脏, 在肝脏形成转移灶后再通过血流转移到肺、骨等其他脏器。结直肠癌死亡病例尸检发现肝转移率达80%, 肝转移是结直肠癌患者的主要死亡原因, 结直肠癌肝转移能获得手术切除的患者仅占10%-20%, 而不经治疗的肝转移中位生存期为

表 1 结直肠癌肝转移的单因素分析结果

预后因素	n	中位生存 时间(mo)	3年生 存率%	P值
年龄(岁)				
≥ 60	34	29.0	30.7	0.86
< 60	37	25.0	27.9	
性别				
男	41	27.0	22.9	0.55
女	30	27.0	27.4	
原发肿瘤位置				
直肠	33	27.0	21.9	0.24
结肠	38	27.0	19.7	
转移灶最大直径				
≥ 5 cm	28	24.0	10.5	0.01
< 5 cm	43	35.0	37.1	
肝转移灶个数				
单发	35	29.0	33.7	0.14
多发	36	25.0	26.9	
区域淋巴结转移				
无	20	45.0	45.6	0.02
有	51	27.0	16.6	
肝转移时间				
同时	53	27.0	25.6	0.40
异时	18	27.0	33.3	
治疗方式				
手术组	29	29.0	31.2	0.09
化疗组	34	22.0	24.7	
局部治疗组	8	27.0	42.9	
肿瘤分化程度				
高分化	15	26.0	11.4	0.53
中分化	50	27.0	26.9	
低分化	6	35.0	25.0	
CEA值				
≥ 200 ng/mL	6	27.0	16.5	0.06
< 200 ng/mL	65	22.0	30.0	
ALP值				
≥ 130 U/L	16	22.0	10.0	0.01
< 130 U/L	55	30.0	32.0	

5-9 mo^[3]。因此, 探讨结直肠癌肝转移的临床特征及采取什么样的治疗方案对患者的预后影响有重要意义。

结直肠癌肝转移有许多临床预后危险因素, 许多学者进行了相关的研究。国外有学者用Meta分析的方法对结直肠癌肝转移的预后因素进行了总结, 主要因素有肝转移灶的大小、肝转移灶的个数、肝转移时间、无瘤间期的长短、原发灶分期、术前CEA值、肝转移灶治疗方式等。Fong等^[4]对肝转移临床预后因素进行了临床危险评分研究, 把发现肝转移的时间、原发灶

有无区域淋巴结转移、肝转移灶的数目、术前CEA值、最大转移灶直径这5个预后因素作为结直肠癌肝转移的临床危险因素评分的因素, 其研究发现无区域淋巴结转移的5年生存率41%、有区域淋巴结转移者为32%; 肝转移时间>12 mo者5年生存率41%、<12 mo为30%; 单发肝转移灶患者5年生存率44%、多发肝转移灶患者为28%; 术前CEA值>200 ng/mL的患者5年生存率为24%、≤200 ng/mL的患者为38%; 肝转移灶最大直径>5 cm的患者5年生存率为31%、<5 cm的患者为40%。Artigas等^[5]研究表明: 肝转移灶最大直径<4 cm, 肝转移灶数目<4个的患者术后有较好的生存率。但是也有研究表明^[6]: 肝转移时间、原发灶的Dukes分期、肝转移的数目与预后无明显相关性。Tanai等^[7]对同时异时肝转移的预后研究表明: 同时肝转移和异时肝转移术后生存时间差别无统计学意义。本研究表明: 肝转移灶的最大直径≥5 cm、有区域淋巴结转移患者预后较差, 肝转移灶最大直径≥5 cm者中位生存时间24 mo, 3年生存率为10.5%; <5 cm者中位生存时间为35 mo, 3年生存率为37.1%, 差别有统计学意义。

无区域淋巴结转移者中位生存时间45 mo, 3年生存率45.6%; 有区域淋巴结转移者中位生存时间为27 mo, 3年生存率为16.6%, 差别有统计学意义。而肝转移的预后与原发灶的部位、肝转移灶的个数、诊断肝转移时CEA值及肝转移时间无明显相关性, 差别无统计学意义。

一般我们认为原发肿瘤的分化程度是结直肠癌患者的预后因素, Yokoyama等^[8]对212例高分化和71例中分化患者进行了分析, 研究表明: 中分化腺癌的区域淋巴结转移、淋巴浸润、静脉浸润、肝转移、腹腔转移与高分化腺癌相比, 差异有统计学意义, 生存分析显示中分化腺癌预后较差。同样Kanemitsu等^[9]对2 678例结肠癌根治术后患者的病理类型进行了预后分析, 其中97例患者为黏液腺癌患者, 对患者的年龄、性别、肿瘤位置、肿瘤病理类型、肿瘤分期等因素进行预后分析表明, 黏液腺癌预后较差。但是本研究表明: 结直肠癌肝转移预后与病理类型无明显相关性, 可能与研究样本量较小, 随访时间较短有关。

ALP是广泛分布于人体肝脏、骨骼、肠、肾和胎盘等组织经肝脏向胆外排出的一种酶。碱性磷酸酶主要用于阻塞性黄疸、原发性肝癌、继发性肝癌、胆汁淤积性肝炎等的检查。ALP异常升高临床上主要见于: (1)生理性增高:

■同行评价

本文为回顾性临床分析, 文中应用了多种统计学方法对可能影响结直肠癌肝转移预后的多个因素进行了分析, 得出肝转移灶大小、有无淋巴结转移以及ALP值与患者预后有关。阅后感觉文章不错, 对本病的治疗具有一定的指导意义。

表 2 结直肠癌肝转移患者预后因素的Cox多因素回归分析结果

影响因素	B	SE	Wald	df	P值	RR值	95%CI	
							Lower	Upper
肝转移灶最大直径	0.658	0.342	3.708	1	0.054	1.932	0.988	3.776
区域淋巴结转移	0.851	0.373	5.211	1	0.022	2.342	1.128	4.865
ALP值	0.810	0.376	4.624	1	0.032	2.247	1.074	4.699

儿童在生理性的骨骼发育期,碱性磷酸酶活力可比正常人高1-2倍;(2)病理性升高:阻塞性黄疸、肝硬化、肝坏死,碱性磷酸酶明显升高;原发性和继发性肝癌时碱性磷酸酶亦明显升高,与癌组织中或癌肿周围肝细胞合成碱性磷酸酶增加有关。其他肿瘤如乳腺癌、肺癌、卵巢癌、骨肉瘤、骨肉瘤等,碱性磷酸酶增高时,提示可能有肝脏转移;变形性骨炎、成骨细胞瘤、佝偻病、骨软化、甲状腺及甲状旁腺功能亢进、肾小管性酸中毒、遗传性磷酸酶过多症。我们可见许多结直肠癌患者出现肝转移时ALP值增高。Saif等^[10]对105例结直肠癌肝转移患者的术前ALP值进行研究(正常值范围39-117 U/L),把ALP值分为3组>120 U/L, 20-120 U/L, <20 U/L,结果表明ALP水平增高和原发肿瘤的T分期有明显相关性($P = 0.0003$); ALP>120组患者与正常ALP组相比预后较差(RR = 4.4, 95%CI, 1.0-19.1); CEA值和ALP值有明显的相关性($P = 0.002$)。同样在临床工作中我们可见患者许多结直肠癌患者出现肝转移时ALP值增高。本研究表明: ALP ≥ 130 U/L的患者中位生存时间为22 mo, 3年生存率为10%;而ALP<130 U/L的患者中位生存时间为30 mo, 3年生存率32%($P = 0.01$), Cox多因素分析显示 $P = 0.032$ 、RR值 = 2.247(95%CI, 1.074-4.699),表明ALP是结直肠癌肝转移的独立预后因素。

结直肠癌肝转移手术切除治疗是唯一可能获得治愈的治疗方式。Kavlakoglu等^[11]对42例结直肠癌肝转移手术切除的患者进行了回顾性研究,研究表明中位生存时间为56 mo, 3年生存率为71.3%,单因素分析显示肝转移灶的个数<4个、肝转移灶最大直径<4 cm、切除方式、阴性手术切缘是结直肠癌肝转移的预后因素。多因素分析显示肝转移灶个数>4个、肝转移灶最大直径>4 cm是结直肠癌肝转移患者的独立预后因素(RR值分别为2.18和5.89)。新兴技术如射频消融技术(RFA)^[12]、冷冻技术等的发展,为结直肠癌肝转移患者提供了多种治疗方案。

另有文献报道^[13]抗体治疗可以明显提高结直肠癌肝转移患者的生存率,但该项技术尚未在我院开展,因此可作为未来的研究方向。目前结直肠癌肝转移患者是手术治疗还是RFA治疗存在一些争议,许多国外的结直肠癌肝转移治疗指南把RFA治疗也列为结直肠癌肝转移治疗方案的一种。许多学者对手术治疗和RFA治疗的预后进行了回顾性分析。Abdalla等^[14]对418例结直肠癌肝转移患者进行回顾性研究,研究表明手术切除患者的4年生存率为65%,而RFA治疗组为22%,差异有统计学意义。而Berber和Siperstein等^[15]对158例肝转移灶RFA和90例单发肝转移灶手术切除的患者的预后进行了回顾性研究,研究表明: RFA治疗组5年生存率为30%,手术组为50%,差异无统计学意义。本研究表明:手术切除组29例,中位生存时间为29.0 mo \pm 2.7 mo, 1年生存率93.0%, 3年生存率31.2%;化疗组34例中位生存时间22.0 mo \pm 5.9 mo, 1年生存率65.9%, 3年生存率24.7%,局部治疗组(RFA组)8例,中位生存时间为27.0 mo \pm 1.6 mo, 1年生存率100%, 3年生存率42.9%,全组3种治疗方式差别无统计学意义,但对手术切除组和化疗组患者进行了比较发现差异有统计学意义($P = 0.049$),而局部治疗组和化疗组,手术切除和局部治疗组之间差异无显著意义,这可能与局部治疗组样本量较小有关。所以本研究认为手术切除联合化疗是结直肠癌肝转移患者首选治疗方式,可获得较好的远期生存。

4 参考文献

- 1 Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 1999; 49: 33-64, 1
- 2 Steele G, Ravikumar TS. Resection of hepatic metastases from colorectal cancer. Biologic perspective. *Ann Surg* 1989; 210: 127-138
- 3 Pawlik TM, Choti MA. Surgical therapy for colorectal metastases to the liver. *J Gastrointest Surg* 2007; 11: 1057-1077
- 4 Fong Y, Fortner J, Sun RL, Brennan MF, Blumgart LH. Clinical score for predicting recurrence after hepatic resection for metastatic colorectal cancer: analysis of 1001 consecutive cases. *Ann Surg* 1999; 230: 309-318; discussion 318-321

- 5 Artigas V, Marín-Hargreaves G, Marcuello E, Pey A, González JA, Rodríguez M, Moral A, Monill JM, Sancho J, Pericay C, Trias M. [Surgical resection of liver metastases from colorectal carcinoma. Experience in Sant Pau Hospital]. *Cir Esp* 2007; 81: 339-344
- 6 Umekita N, Maeshiro T, Miyamoto S, Suzuki T, Inoue S, Awane Y. [Preoperative CEA level predicts outcomes of hepatic resection for liver metastases from colorectal cancer]. *Gan To Kagaku Ryoho* 1998; 25: 1426-1428
- 7 Taniai N, Yoshida H, Mamada Y, Matsumoto S, Mizuguchi Y, Suzuki H, Furukawa K, Akimaru K, Tajiri T. Outcome of surgical treatment of synchronous liver metastases from colorectal cancer. *J Nihon Med Sch* 2006; 73: 82-88
- 8 Yokoyama S, Takifuji K, Hotta T, Matsuda K, Tomimaga T, Oku Y, Nasu T, Tamura K, Ieda J, Yamaue H. Moderately differentiated colorectal adenocarcinoma as a lymph node metastatic phenotype: comparison with well differentiated counterparts. *BMC Surg* 2010; 10: 8
- 9 Kanemitsu Y, Kato T, Hirai T, Yasui K, Morimoto T, Shimizu Y, Kodera Y, Yamamura Y. Survival after curative resection for mucinous adenocarcinoma of the colorectum. *Dis Colon Rectum* 2003; 46: 160-167
- 10 Saif MW, Alexander D, Wicox CM. Serum Alkaline Phosphatase Level as a Prognostic Tool in Colorectal Cancer: A Study of 105 patients. *J Appl Res* 2005; 5: 88-95
- 11 Kavlakoglu B, Ustun I, Oksuz O, Pekcici R, Ergocen S, Oral S. Surgical treatment of liver metastases from colorectal cancer: experience of a single institution. *Arch Iran Med* 2011; 14: 120-125
- 12 Gwak JH, Oh BY, Lee RA, Chung SS, Kim KH. Clinical applications of radio-frequency ablation in liver metastasis of colorectal cancer. *J Korean Soc Coloproctol* 2011; 27: 202-210
- 13 Davies JM, Goldberg RM. Treatment of metastatic colorectal cancer. *Semin Oncol* 2011; 38: 552-560
- 14 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
- 15 Berber E, Tsinberg M, Tellioglu G, Simpfendorfer CH, Siperstein AE. Resection versus laparoscopic radiofrequency thermal ablation of solitary colorectal liver metastasis. *J Gastrointest Surg* 2008; 12: 1967-1972

编辑 曹丽鸥 电编 闫晋利

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011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)

Peutz-Jeghers综合征: 恶性肿瘤高风险人群

袁柏思, 路又可, 金鑫鑫, 万海军, 周淑萍, 汪芳裕

■背景资料

Peutz-Jeghers综合征是一种常染色体显性遗传病, 典型的临床特征为皮肤、黏膜特定部位色素斑和胃肠道多发错构瘤性息肉, *STK11/LKB1*基因因其主要突变基因, 本征并发恶性肿瘤的风险明显高于普通人群。

袁柏思, 路又可, 金鑫鑫, 万海军, 周淑萍, 汪芳裕, 中国人民解放军南京军区南京总医院消化内科 江苏省南京市 210002
作者贡献分布: 此论文由袁柏思与汪芳裕设计; 文献检索、资料统计以及图表制作由袁柏思、路又可、金鑫鑫、万海军及周淑萍完成; 本论文写作由袁柏思完成。

通讯作者: 汪芳裕, 教授, 210002, 江苏省南京市中山东路305号, 中国人民解放军南京军区南京总医院消化内科。
cat409@126.com

收稿日期: 2011-08-15 修回日期: 2011-10-07

接受日期: 2011-10-12 在线出版日期: 2011-10-18

High risk of cancer in Peutz-Jeghers syndrome

Bo-Si Yuan, You-Ke Lu, Xin-Xin Jin, Hai-Jun Wan, Shu-Ping Zhou, Fang-Yu Wang

Bo-Si Yuan, You-Ke Lu, Xin-Xin Jin, Hai-Jun Wan, Shu-Ping Zhou, Fang-Yu Wang, Department of Gastroenterology, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command of Chinese PLA, Nanjing 210002, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Fang-Yu Wang, Professor, Department of Gastroenterology, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command of Chinese PLA, Nanjing 210002, Jiangsu Province, China. cat409@126.com

Received: 2011-08-15 Revised: 2011-10-07

Accepted: 2011-10-12 Published online: 2011-10-18

Abstract

AIM: To assess cancer risk in patients with Peutz-Jeghers syndrome (PJS) and to develop a surveillance recommendation.

METHODS: A systematic PubMed search was performed to analyze related data of cancer in patients with PJS described in 20 cohort studies.

RESULTS: The cohort studies included 3 302 patients in total, and 573 (17.35%) of them developed 619 cases of cancer, including 368 (60.23%) cases of gastrointestinal and 243 (39.77%) cases of non-gastrointestinal cancers. The most common malignancy was colorectal cancer, followed by small bowel, breast, gastroesophageal, gynecological, pancreatic, and lung cancers. The age range of the high incidence rate of cancer was 11-70 years old, and seemed younger among Chinese patients than that in other countries. The lifetime relative risks for any cancer ranged from 9.9 to 18, for gastrointestinal cancer was 13 to 50.5, breast

cancer 13.9 to 20.3, and gynecological cancer was 20.3 compared with the general population. Obviously, the age-related cumulative risks are increasing. The *STK11/LKB1* mutation did not significantly influence cancer risk ($P > 0.05$).

CONCLUSION: Patients with PJS have markedly increased relative and absolute risk for gastrointestinal and non-gastrointestinal cancers. In order to improve the outcome for PJS patients, it is very important to strengthen cancer surveillance and closer follow-up in an early phase.

Key Words: Peutz-Jeghers syndrome; Cancer; Polyps; Gastrointestinal tract

Yuan BS, Lu YK, Jin XX, Wan HJ, Zhou SP, Wang FY. High risk of cancer in Peutz-Jeghers syndrome. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(29): 3094-3099

摘要

目的: 评估Peutz-Jeghers综合征(Peutz-Jeghers syndrome, PJS)患者并发恶性肿瘤的风险, 提出监测建议。

方法: 通过Pubmed检索PJS并发恶性肿瘤的群组研究文献, 并摘录符合条件的20篇文献中的相关资料进行分析。

结果: 共纳入3 302例PJS患者, 其中573人(17.35%)并发619例恶性肿瘤, 包括消化系统肿瘤368例(60.23%), 非消化系统肿瘤243例(39.77%)。并发的常见恶性肿瘤中, 依次为结直肠癌、小肠癌、乳腺癌、胃食管癌、妇科癌、胰腺癌、肺癌, 且国内外发病频率具有一致性; PJS患者恶性肿瘤高发年龄段为11-70岁, 国内患者有较年轻化的趋势。PJS并发任意癌的相对风险为9.0-18, 并发消化系统肿瘤的相对风险为13-50.5, 并发乳腺癌的相对风险为13.9-20.3, 并发妇科癌的相对风险为20.3, 各年龄段癌症累积风险明显增高。有无*STK11/LKB1*基因突变对PJS并发恶性肿瘤风险无明显影响($P > 0.05$)。

结论: PJS患者为恶性肿瘤的高风险人群, 其

■同行评议者

何松, 教授, 重庆医科大学附属第二医院消化内科; 万军, 主任医师, 中国人民解放军总医院南楼老年消化科

并发消化系肿瘤及消化系外癌的风险明显增高, 应加强随诊筛查恶性肿瘤。

关键词: Peutz-Jeghers综合征; 癌; 息肉; 胃肠道

袁柏思, 路又可, 金鑫鑫, 万海军, 周淑萍, 汪芳裕. Peutz-Jeghers综合征: 恶性肿瘤高风险人群. 世界华人消化杂志 2011; 19(29): 3094-3099
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/3094.asp>

0 引言

Peutz-Jeghers综合征(Peutz-Jeghers syndrome, PJS) 又称黑斑息肉综合征, 由荷兰医生Peutz和美国医生Jeghers分别于1921年和1949年首先报道, 因而命名为PJS, 本征是一种常染色体显性遗传病, 特征性的表现为皮肤、黏膜特定部位色素斑和胃肠道多发性息肉。1998年发现肿瘤抑制基因 $STK11/LKB1$ 为PJS的相关致病基因^[1,2]。虽然本征的发病机制仍未阐明, 但目前的文献报道^[3-8]多认为PJS并发恶性肿瘤的风险有所增加。许多研究中心根据已掌握的资料去评估恶性肿瘤风险, 但因受限于较少的病例资料而使恶性肿瘤风险变化较大, 据此, 我们通过检索国内外的群组研究资料, 以期对PJS的恶性肿瘤风险进行更好的评估, 从而指导治疗和恶性肿瘤监测。

1 材料和方法

1.1 材料 检索Pubmed数据库, 时间为1947-01-01/2010-12-31, 检索方法为: (Peutz OR Jeghers) AND(cancer OR carcinoma OR tumor)。文献入选标准: (1)诊断符合PJS; (2)并发恶性肿瘤; (3)群组研究资料。根据入选标准, 共检出1 183篇英文文献, 剔除不符合条件的文献1 164篇, 最终列入统计范围的英文文献共19篇, 加上1篇国内文献荟萃分析资料, 共计20篇文献^[4-23]。

1.2 方法 根据参考文献追溯符合条件的文章, 剔除综述类文献、个案报道、资料不全的文献及社论文章。摘录纳入文献的有效信息: 病例数、性别、年龄、报道地区、并发恶性肿瘤类型及病例数、恶性肿瘤累积风险、相对风险。对所获取资料进行汇总, 采用Excel 2007、Origin 8、SPSS18.0等软件进行统计分析及图表制作, 率的比较用 χ^2 检验, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

在检索时间范围内, 共纳入3 302例PJS患者, 能够确定性别的病例中男1 304例, 女1 342例, 男

女比例约为1:1。其中573人并发恶性肿瘤, 发病率为17.35%, 其中国外为20.36%(366/1 798), 国内为13.76%(207/1 504); 并发恶性肿瘤病例共619例(有40人合并两种或两种以上的癌), 其中消化系肿瘤(包括食管癌、胃癌、小肠癌、结直肠癌、胰腺癌和胆道癌)共368例, 占60.23%, 非消化系肿瘤共243例, 占39.77%, 两者之比约为1.5:1, 从病例资料的分布看各大洲均有报道, 以欧美报道的文献较多, 但无明显的地区特异性(表1)。

对可明确肿瘤类型的资料进行统计分析发现, PJS合并的恶性肿瘤中以胃食管癌、小肠癌、结直肠癌、胰腺癌、妇科癌(子宫癌、卵巢癌、输卵管癌和卵巢环状小管性索肿瘤)、乳腺癌和肺癌多见, 亦可合并其他较少见的癌(甲状腺癌、前列腺癌、多发性骨髓瘤、肝癌、鼻咽癌、肾癌、睾丸癌、wilm's瘤、急性粒细胞白血病及不确定组织类型的癌等), 统计的各种恶性肿瘤例数详见图1, 由此可见国内外报道的PJS并发恶性肿瘤的分布趋势具有一致性。

对可得到具体年龄资料患者的年龄作一统计分析发现, PJS并发恶性肿瘤的年龄段分布主要在11-70之间, 累积频率为98.3%, 在21-50岁间国内外报道的例数基本一致, 而在11-20岁间国内报道明显多于国外(15/2), 在51-70岁间国内报道明显少于国外(6/28), 可见国内PJS患者并发恶性肿瘤有较年轻化的趋势(图2)。

PJS并发恶性肿瘤较普通人群的相对风险明显增高, 我们检索到6篇对此进行评价的文献^[3,12,14,16,18,21], 年份介于1987-2003。数据显示PJS并发任意癌的相对风险为9.0-18, 并发消化系肿瘤的相对风险为13-50.5, 并发乳腺癌的相对风险为13.9-20.3, 并发妇科癌的相对风险为20.3^[21](图3)。

对涉及PJS并发常见恶性肿瘤, 如消化系肿瘤(胃食管癌、小肠癌、结直肠癌、胰腺癌)、妇科癌、乳腺癌和肺癌年龄相关的癌症累积风险的文献^[4,6,7]发现, 随着年龄的增长PJS并发各种恶性肿瘤的累积风险明显增加(图4)。

进一步评价 $STK11/LKB1$ 基因突变对PJS并发恶性肿瘤风险的影响, 我们对能够明确基因突变及相应肿瘤类型的文献资料^[5,7,8,19-21]进行比较, 发现两组间的差别并无统计学意义($P>0.05$, 表2), 因此, $STK11/LKB1$ 基因突变对肿瘤风险的影响无统计学意义。

参照国外相关文献, 对先前提出的随诊建

■研究前沿

Peutz-Jeghers综合征并发恶性肿瘤的原因及相关的致病危险因素仍未阐明, 有效的治疗药物缺乏, 需要大样本多中心的临床研究及流行病学调查对本征进一步研究。

■相关报道

Peutz-Jeghers综合征并发恶性肿瘤风险高,而且容易出现肠梗阻、肠套叠及消化系出血等并发症,目前尚缺乏有效的治疗药物去预防及控制,潜在的有望控制本征息肉的药物有COX-2抑制剂塞来昔布及新型大环内酯类抗真菌药,并可作为免疫抑制剂的雷帕霉素(Rapamycin),但仍处于临床试验阶段,确切的疗效有待进一步证实。

表 1 Peutz-Jeghers综合征并发恶性肿瘤一览表 (n)

作者	发表年份	地区	n	男/女	患者数	恶性肿瘤数	消化系肿瘤	非消化系肿瘤
Utsunomiya等 ^[9]	1975	日本	202	—	28	28	27	1
Linos等 ^[10]	1981	美国	48	28/20	11	12	2	10
Burdick等 ^[11]	1982	美国	10	3/7	3	4	0	4
Giardiello等 ^[12]	1987	美国	31	—	15	16	8	8
Foley等 ^[13]	1988	美国	12	7/5	3	3	2	1
Spigelman等 ^[14]	1989	英国	72	33/39	16	17	10	7
Hizawa等 ^[15]	1993	日本	8	4/4	4	4	3	1
Boardman等 ^[16]	1998	美国	34	18/16	18	26	10	16
Westerman等 ^[17]	1999	荷兰	22	13/9	7	7	5	2
Choi等 ^[18]	2000	韩国	30	14/16	5	7	6	1
Olschwang等 ^[19]	2001	法国	63	—	19	19	11	8
Scott等 ^[20]	2002	澳大利亚	36	—	9	9	4	5
Lim等 ^[21]	2003	英国	71	—	15	15	7	8
Amos等 ^[22]	2004	美国	93	—	8	8	—	—
Lim等 ^[4]	2004	欧美多中心	240	109/131	47	54	26	28
Schumacher等 ^[5]	2005	德国	88	—	19	21	9	12
Mehenni等 ^[6]	2006	瑞士	149	76/73	29	32	22	10
Hearle等 ^[7]	2006	欧美多中心	419	193/226	85	96	44	52
Mehenni等 ^[8]	2007	欧美多中心	170	73/97	25	27	17	10
Yuan等 ^[23]	2009	中国	1504	770/734	207	214	155	59
合计			3302	1304/1342	573	619	368	243

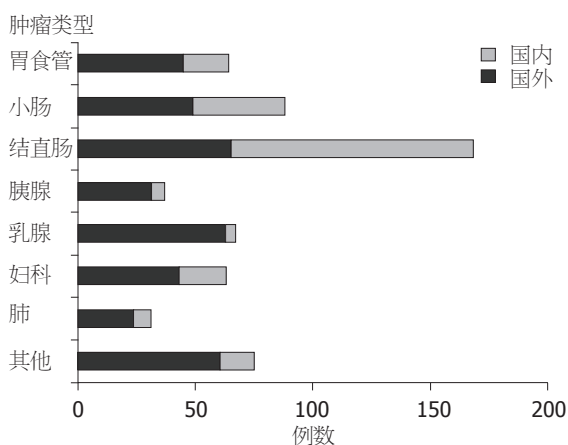


图 1 Peutz-Jeghers综合征并发恶性肿瘤各年龄段分布及累积频率。

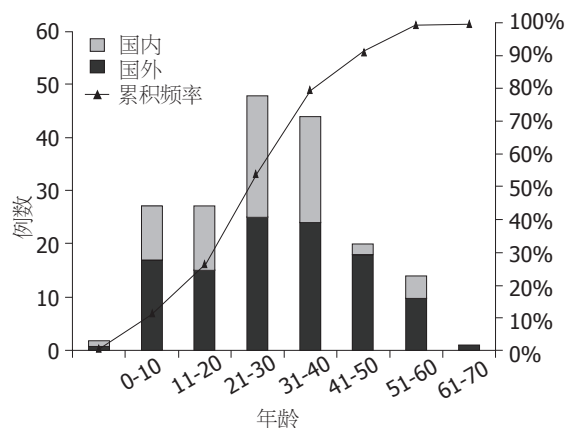


图 2 Peutz-Jeghers综合征并发恶性肿瘤相对风险及其95%CI。

议^[23]加以补充及修改,总结PJS患者常见恶性肿瘤的随诊建议见表3。

3 讨论

我们的研究结果和先前的报道^[3-8]均证实PJS并发恶性肿瘤的风险明显增高。在本研究涉及的20个群组病例研究的3 302例PJS患者中,有573例PJS患者合并恶性肿瘤,发生率为17.35%,明显高于普通人群的发病率^[24]。对比国内外报道的数据发现,国外略高于国内(20.36%/13.76%),这

可能是由于纳入研究的人群不同所致,合并的恶性肿瘤中,以消化系肿瘤最常见,其次为女性相关肿瘤(乳腺癌和妇科癌)和肺癌,这些并发的常见肿瘤类型,国内外报道的频率趋势基本一致。对PJS并发恶性肿瘤的风险统计发现,相对普通人群,PJS并发恶性肿瘤的相对风险为9-18倍,其中以并发消化系肿瘤(13-50.5倍)、乳腺癌(13.9-20.3倍)和妇科癌(20.3倍)为高,据此,我们认为PJS是恶性肿瘤的高发人群。

目前,对PJS患者合并恶性肿瘤的危险因素

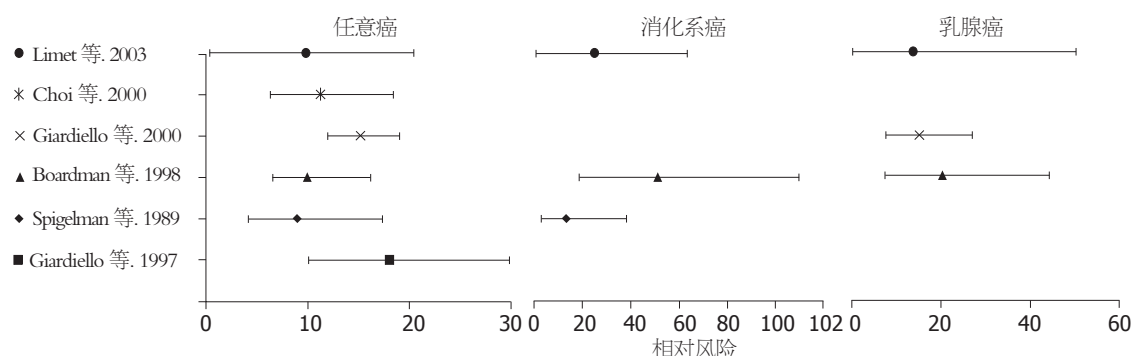


图3 Peutz-Jeghers综合征并发恶性肿瘤相对风险及其95%CI.

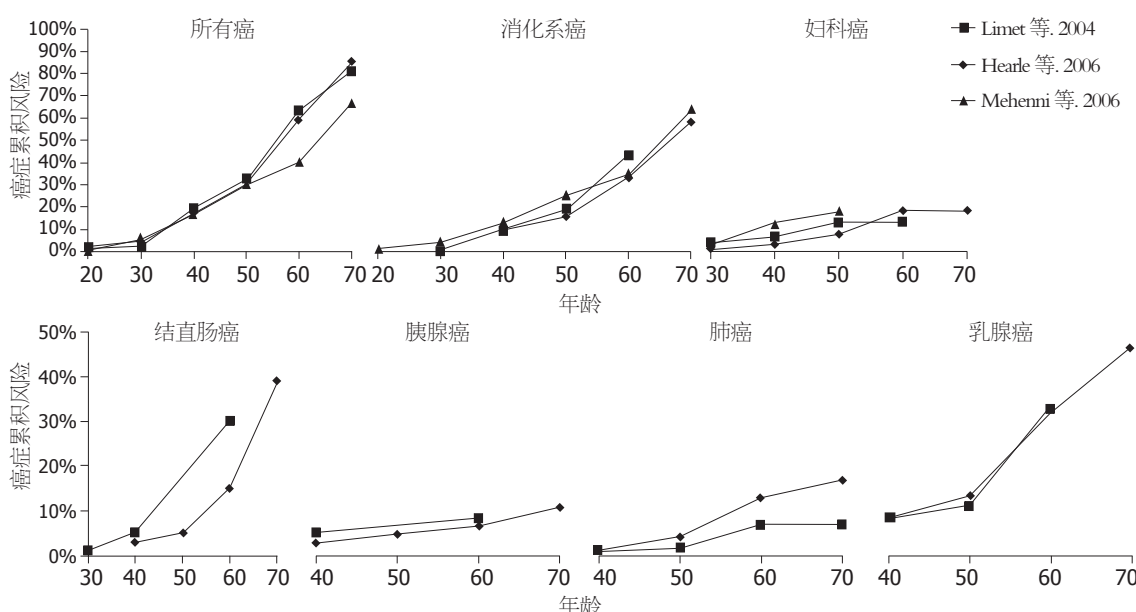


图4 Peutz-Jeghers综合征常见恶性肿瘤各年龄段累积风险.

尚未阐明, 我们的研究结果提示年龄是一个重要危险因素, 从并发的恶性肿瘤中可见, 以11-70岁为年龄的多发时间段, 但国内外报道的情况略有差异, 国内报道的病例有相对年轻化的趋势, 而且随着年龄增加, PJS并发各种恶性肿瘤的累积频率和累积风险亦明显增加; PJS全世界均有报道, 但未见它们的发病率及并发恶性肿瘤和地域有明显关系; PJS患者63%-70%^[7,8]有家族史, 对于有无家族史患者并发恶性肿瘤的比较, 因数据缺乏而无法进行, 但国外早期一篇荟萃分析^[3]的结果提示具有家族性病史的PJS患者合并恶性肿瘤的发病率为30.14%(66/210), 明显高于我们统计的结果, 可见有家族史者发生恶性肿瘤的危险性明显增高; 在性别方面, 女性患者并发乳腺癌和妇科癌的相对风险及频率明显增高, 其他部位肿瘤与性别的关系无法进行比较, 但国外荟萃分析的文献报道^[3]并无明显关系; 尚不能确定与胃肠道息肉的部位、数量、大小的

关系. 关于PJS息肉的癌变问题, 应该严格区分是错构瘤性息肉恶变还是合并与息肉无关的胃肠道原发性癌症. 已有研究报道^[14,25-28]PJS息肉存在错构瘤-腺瘤-腺癌的演变, 但所涉及的病例数较少, 也有认为癌变很可能是由腺瘤演变而来, 不一定来自本征的息肉, 此外, 本征息肉的癌变, 其恶性程度与原发的胃肠道癌症的比较也未见报道; 作为PJS典型表现的皮肤黏膜黑斑, 出现于大多数PJS患者, 但其与肿瘤的关系未见报道, 上述问题都需要多中心、大样本的研究去进一步证实.

1998年Hemminki和Jenne同时发现 $STK11/LKB1$ 基因为PJS的相关致病基因^[1,2], 该基因在人体几乎所有组织中表达, 是一种肿瘤抑制基因, 编码一种新的丝氨酸/苏氨酸激酶, 通过磷酸化作用来调控细胞分化. PJS患者 $STK11/LKB1$ 基因突变可导致氨基酸改变和终止信号提前出现, 翻译和转录发生异常, 使激酶失活, 导致疾病的发

■创新盘点

本文以大量详实的文献数据为基础, 从肿瘤类型、发病年龄、风险比较、基因突变与癌变的关系以及国内外数据的比较等方面来分析PJS并发恶性肿瘤的情况, 并在此基础上提出随访及监测建议.

■应用要点

本文在总结国内外文献报道中Peutz-Jeghers综合征并发恶性肿瘤的各种相关危险因素,对进一步指导临床治疗和恶性肿瘤监测具有重要的指导价值。

表 2 有无*STK11/LKB1*突变的Peutz-Jeghers综合征并发恶性肿瘤风险比较

	并发癌(n)	无癌(n)	合计(n)	并发癌率(%)	统计学分析
有基因突变	113	417	530	21.32	$\chi^2 = 0.145$
无基因突变	53	210	263	20.15	$P = 0.703$
合计	166	627	793	20.93	

表 3 PJS患者及其一级亲属随诊建议

肿瘤监测部位	开始监测年龄(岁)	随诊区间(年)	检查方法
胃、十二指肠	10	1-3(根据检查结果 ^a)	胃镜 ^b ; 消化道钡餐
空回肠	10	1-3(根据检查结果 ^a)	胶囊内镜 ^b ; 消化道钡餐
结直肠	25	1-3(根据检查结果 ^a)	结肠镜 ^b ; 钡灌肠
胰腺	30	1-2	(CT ^b ; 超声胃镜; 腹部B超)+CA199 ^b
肺	25	1	胸片 ^b ; C
乳腺	20	1-2	自查/月 ^b ; χ 线/年; 乳腺B超/年
子宫	20	1	(宫颈刮片 ^b ; 经阴道B超)+CA125 ^b
卵巢	20	1	妇科B超

^a未发现息肉, 间隔3年复查, >50岁每年复查; 发现散发小息肉, 切除后每1-2年复查; 较多息肉, 每年均需复查并行息肉切除; ^b首选检查方法。

生、发展。目前对PJS患者*STK11/LKB1*基因突变的研究逐渐增多, 文献报道^[1,8,19-21]50%-90%的PJS患者有*STK11/LKB1*基因的突变, 对*STK11/LKB1*基因突变能否导致PJS并发恶性肿瘤的风险增加, 国外报道的结论并不完全一致^[7,21], 我们对有无*STK11/LKB1*基因突变的PJS进行比较发现, 突变与否与并发恶性肿瘤的风险无明显关系, 而且国外较大样本资料的研究^[4,7]表明, *STK11/LKB1*基因突变位点及突变类型亦与并发恶性肿瘤的风险无明显关系, 这可能是由于基因型和表现型的不同所致, 因此, 需要对PJS并发癌的机制进行更深入的研究。

本研究尚有以下不足, 首先是文献选择偏倚, 文献的选择均为群组研究资料, PJS并发恶性肿瘤的病例被报道的可能性将更大, 反之则较小, 而且较少病例资料的报道未被纳入, 因此有可能使得出的肿瘤风险与实际有所差别; 其次是文献中部分数据的缺失(如部分文献中未提供具体的年龄、肿瘤的类型及例数), 使我们的统计结果与实际产生偏倚。但我们选择的文献较多, 范围广, 进行统计的病例数较大, 每项结果的统计均有较大样本(>100例)为基础的多篇文献数据, 因此, 本研究的结果应能够较接近地反映PJS并发恶性肿瘤的实际情况。

由于本征是恶性肿瘤高风险人群, 而目前对并发的恶性肿瘤尚无好的治疗办法, 因此监测

和随访PJS患者, 采取有效的治疗方法以减少恶性肿瘤的发生很重要。此外, PJS患者具有一定遗传性, 而且文献报道^[21]中PJS一级亲属中虽无PJS的典型表现, 但亦可见到发生恶性肿瘤的风险有所增加, 因此我们建议对PJS患者一级亲属亦需加强随诊, 以期能早发现、早治疗合并的恶性肿瘤, 从而降低死亡率。居于我们的诊疗实践、对本病的进一步认识以及诊疗技术的进步, 我们参照国外相关文献, 对先前提出的随诊建议^[23]加以补充及修改, 总结PJS患者常见恶性肿瘤的随诊建议。

总之, 本研究的结果表明PJS患者为恶性肿瘤的高风险人群, 其并发消化系肿瘤及消化系外癌的风险明显增高, 应积极治疗胃肠道息肉及筛查全身肿瘤。

4 参考文献

- Hemminki A, Markie D, Tomlinson I, Avizienyte E, Roth S, Loukola A, Bignell G, Warren W, Aminoff M, Höglund P, Järvinen H, Kristo P, Pelin K, Ridanpää M, Salovaara R, Toro T, Bodmer W, Olschwang S, Olsen AS, Stratton MR, de la Chapelle A, Aaltonen LA. A serine/threonine kinase gene defective in Peutz-Jeghers syndrome. *Nature* 1998; 391: 184-187
- Jenne DE, Reimann H, Nezu J, Friedel W, Löff S, Jeschke R, Müller O, Back W, Zimmer M. Peutz-Jeghers syndrome is caused by mutations in a novel serine threonine kinase. *Nat Genet* 1998; 18: 38-43
- Giardiello FM, Brensinger JD, Tersmette AC, Goodman SN, Petersen GM, Booker SV, Cruz-Correa M,

- Offerhaus JA. Very high risk of cancer in familial Peutz-Jeghers syndrome. *Gastroenterology* 2000; 119: 1447-1453
- 4 Lim W, Olschwang S, Keller JJ, Westerman AM, Menko FH, Boardman LA, Scott RJ, Trimbath J, Giardiello FM, Gruber SB, Gille JJ, Offerhaus GJ, de Rooij FW, Wilson JH, Spigelman AD, Phillips RK, Houlston RS. Relative frequency and morphology of cancers in STK11 mutation carriers. *Gastroenterology* 2004; 126: 1788-1794
- 5 Schumacher V, Vogel T, Leube B, Driemel C, Goecke T, Möslein G, Royer-Pokora B. STK11 genotyping and cancer risk in Peutz-Jeghers syndrome. *J Med Genet* 2005; 42: 428-435
- 6 Mehenni H, Resta N, Park JG, Miyaki M, Guanti G, Costanza MC. Cancer risks in LKB1 germline mutation carriers. *Gut* 2006; 55: 984-990
- 7 Hearle N, Schumacher V, Menko FH, Olschwang S, Boardman LA, Gille JJ, Keller JJ, Westerman AM, Scott RJ, Lim W, Trimbath JD, Giardiello FM, Gruber SB, Offerhaus GJ, de Rooij FW, Wilson JH, Hansmann A, Möslein G, Royer-Pokora B, Vogel T, Phillips RK, Spigelman AD, Houlston RS. Frequency and spectrum of cancers in the Peutz-Jeghers syndrome. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 3209-3215
- 8 Mehenni H, Resta N, Guanti G, Mota-Vieira L, Lerner A, Peyman M, Chong KA, Aissa L, Ince A, Cosme A, Costanza MC, Rossier C, Radhakrishna U, Burt RW, Picard D. Molecular and clinical characteristics in 46 families affected with Peutz-Jeghers syndrome. *Dig Dis Sci* 2007; 52: 1924-1933
- 9 Utsunomiya J, Gocho H, Miyana T, Hamaguchi E, Kashimura A. Peutz-Jeghers syndrome: its natural course and management. *Johns Hopkins Med J* 1975; 136: 71-82
- 10 Linos DA, Dozois RR, Dahlin DC, Bartholomew LG. Does Peutz-Jeghers syndrome predispose to gastrointestinal malignancy? A later look. *Arch Surg* 1981; 116: 1182-1184
- 11 Burdick D, Prior JT. Peutz-Jeghers syndrome. A clinicopathologic study of a large family with a 27-year follow-up. *Cancer* 1982; 50: 2139-2146
- 12 Giardiello FM, Welsh SB, Hamilton SR, Offerhaus GJ, Gittelsohn AM, Booker SV, Krush AJ, Yardley JH, Luk GD. Increased risk of cancer in the Peutz-Jeghers syndrome. *N Engl J Med* 1987; 316: 1511-1514
- 13 Foley TR, McGarrity TJ, Abt AB. Peutz-Jeghers syndrome: a clinicopathologic survey of the "Harrisburg family" with a 49-year follow-up. *Gastroenterology* 1988; 95: 1535-1540
- 14 Spigelman AD, Murday V, Phillips RK. Cancer and the Peutz-Jeghers syndrome. *Gut* 1989; 30: 1588-1590
- 15 Hizawa K, Iida M, Matsumoto T, Kohrogi N, Kinoshita H, Yao T, Fujishima M. Cancer in Peutz-Jeghers syndrome. *Cancer* 1993; 72: 2777-2781
- 16 Boardman LA, Thibodeau SN, Schaid DJ, Lindor NM, McDonnell SK, Burgart LJ, Ahlquist DA, Po-dratz KC, Pittelkow M, Hartmann LC. Increased risk for cancer in patients with the Peutz-Jeghers syndrome. *Ann Intern Med* 1998; 128: 896-899
- 17 Westerman AM, Entius MM, de Baar E, Boor PP, Koole R, van Velthuysen ML, Offerhaus GJ, Lindhout D, de Rooij FW, Wilson JH. Peutz-Jeghers syndrome: 78-year follow-up of the original family. *Lancet* 1999; 353: 1211-1215
- 18 Choi HS, Park YJ, Youk EG, Yoon KA, Ku JL, Kim NK, Kim SM, Kim YJ, Moon DJ, Min JS, Park CJ, Bae OS, Yang DH, Jun SH, Chung ES, Jung PM, Whang Y, Park JG. Clinical characteristics of Peutz-Jeghers syndrome in Korean polyposis patients. *Int J Colorectal Dis* 2000; 15: 35-38
- 19 Olschwang S, Boisson C, Thomas G. Peutz-Jeghers families unlinked to STK11/LKB1 gene mutations are highly predisposed to primitive biliary adenocarcinoma. *J Med Genet* 2001; 38: 356-360
- 20 Scott RJ, Crooks R, Meldrum CJ, Thomas L, Smith CJ, Mowat D, McPhillips M, Spigelman AD. Mutation analysis of the STK11/LKB1 gene and clinical characteristics of an Australian series of Peutz-Jeghers syndrome patients. *Clin Genet* 2002; 62: 282-287
- 21 Lim W, Hearle N, Shah B, Murday V, Hodgson SV, Lucassen A, Eccles D, Talbot I, Neale K, Lim AG, O'Donohue J, Donaldson A, Macdonald RC, Young ID, Robinson MH, Lee PW, Stoodley BJ, Tomlinson I, Alderson D, Holbrook AG, Vyas S, Swarbrick ET, Lewis AA, Phillips RK, Houlston RS. Further observations on LKB1/STK11 status and cancer risk in Peutz-Jeghers syndrome. *Br J Cancer* 2003; 89: 308-313
- 22 Amos CI, Keitheri-Cheteri MB, Sabripour M, Wei C, McGarrity TJ, Seldin MF, Nations L, Lynch PM, Fidler HH, Friedman E, Frazier ML. Genotype-phenotype correlations in Peutz-Jeghers syndrome. *J Med Genet* 2004; 41: 327-333
- 23 袁柏思, 朱人敏, 汪芳裕. 我国Peutz-Jeghers综合征患者合并恶性肿瘤的临床分析. *胃肠病学* 2009; 14: 351-354
- 24 Siegel R, Ward E, Brawley O, Jemal A. Cancer statistics, 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths. *CA Cancer J Clin* 2011; 61: 212-236
- 25 Perzin KH, Bridge MF. Adenomatous and carcinomatous changes in hamartomatous polyps of the small intestine (Peutz-Jeghers syndrome): report of a case and review of the literature. *Cancer* 1982; 49: 971-983
- 26 Hizawa K, Iida M, Matsumoto T, Kohrogi N, Yao T, Fujishima M. Neoplastic transformation arising in Peutz-Jeghers polyposis. *Dis Colon Rectum* 1993; 36: 953-957
- 27 Wang ZJ, Ellis I, Zauber P, Iwama T, Marchese C, Talbot I, Xue WH, Yan ZY, Tomlinson I. Allelic imbalance at the LKB1 (STK11) locus in tumours from patients with Peutz-Jeghers' syndrome provides evidence for a hamartoma-(adenoma)-carcinoma sequence. *J Pathol* 1999; 188: 9-13
- 28 Nakamura T, Suzuki S, Yokoi Y, Kashiwabara H, Maruyama K, Baba S, Nakagawa H, Nakamura S. Duodenal cancer in a patient with Peutz-Jeghers syndrome: molecular analysis. *J Gastroenterol* 2002; 37: 376-380

同行评价

本研究有积极的临床意义, 使临床医师对Peutz-Jeghers综合征这种相对少见的疾病有了一个更深入的认识, 有利于临床上更加重视这种疾病。

编辑 曹丽鸥 电编 闫晋利

序贯疗法和标准三联疗法根除幽门螺杆菌的疗效比较

吴改玲, 蓝宇, 张小晋

■背景资料

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H.pylori*)根除率随着耐药率的增加在下降, 多数研究提示10 d序贯疗法优于7 d或10 d标准三联疗法, 但其与14 d标准三联疗法的疗效比较研究较少。

吴改玲, 蓝宇, 张小晋, 北京积水潭医院消化内科 北京市 100035

作者贡献分布: 此课题由吴改玲设计; 研究过程由吴改玲、蓝宇及张小晋完成; 数据分析及论文书写由吴改玲完成; 文章的指导和审阅由蓝宇完成。

通讯作者: 吴改玲, 100035, 北京市, 北京积水潭医院消化内科。wgailin@sina.com.cn

收稿日期: 2011-07-13 修回日期: 2011-10-10

接受日期: 2011-10-13 在线出版日期: 2011-10-18

Sequential therapy versus standard triple therapy for *Helicobacter pylori* eradication

Gai-Ling Wu, Yu Lan, Xiao-Jin Zhang

Gai-Ling Wu, Yu Lan, Xiao-Jin Zhang, Department of Gastroenterology, Jishuitan Hospital, Beijing 100035, China
Correspondence to: Gai-Ling Wu, Department of Gastroenterology, Jishuitan Hospital, Beijing 100035, China. wgailin@sina.com.cn

Received: 2011-07-13 Revised: 2011-10-10

Accepted: 2011-10-13 Published online: 2011-10-18

Abstract

AIM: To assess the efficacy and safety of a new sequential treatment regimen versus standard triple therapy for *Helicobacter pylori* (*H.pylori*) infection.

METHODS: One hundred and two *H.pylori*-infected patients with chronic gastritis or peptic ulcer were randomized to receive a 10-day sequential therapy [esomeprazole (20 mg, twice daily) plus amoxicillin (1000 mg, twice daily) for the first 5 d, followed by esomeprazole (20 mg), clarithromycin (500 mg) and tinidazole (500 mg) twice daily for the remaining 5 d] or a 14-day standard triple therapy [esomeprazole (20mg), clarithromycin (500 mg) and amoxicillin 1000 mg, twice daily]. *H.pylori* status was evaluated by ¹³C-urea breath test or endoscopy four weeks after completion of treatment.

RESULTS: There were no significant differences in the eradication rate of *H.pylori* infection (90.4% vs 90.2%, $P = 1.000$) and the incidence of side effects (23.5 % vs 35.3%, $P = 0.172$) between the 10-day sequential regimen group and 14-day standard regimen group. The treatment cost

was significantly lower for the 10-day sequential therapy than for the 14-day standard triple therapy (380.6 yuan vs 677.88 yuan, $P < 0.05$).

CONCLUSION: The 10-day sequential treatment regimen has similar eradication rate of *H.pylori* infection and incidence of side effects but higher cost-efficiency compared to the 14-day standard triple therapy.

Key Words: Sequential therapy; Standard triple therapy; *Helicobacter pylori*; Eradication rate

Wu GL, Lan Y, Zhang XJ. Sequential therapy versus standard triple therapy for *Helicobacter pylori* eradication. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(29): 3100-3103

摘要

目的: 观察10 d序贯疗法治疗幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H.pylori*)的疗效及不良反应, 与14 d三联标准疗法比较*H.pylori*根除情况及经济学上是否有优越性。

方法: 将103例经胃镜检查确诊为慢性胃炎或消化性溃疡且*H.pylori*阳性的患者随机分为两组, 治疗组(10 d序贯疗法)52例, 前5 d埃索美拉唑、阿莫西林, 后5 d埃索美拉唑、克拉霉素、替硝唑。对照组(14 d标准三联疗法)51例, 埃索美拉唑、阿莫西林、克拉霉素14 d。所有患者停药4 wk后复查¹³C呼气试验或胃镜检查, 判断*H.pylori*根除情况。

结果: 治疗组*H.pylori*根除率为90.4%, 与对照组(90.2%)比较无统计学差异($P = 1.000$); 两组不良反应发生率分别为12/52(23.1%)、18/51(35.3%), 两组比较无统计学差异($P = 0.172$); 治疗组费用为380.6元, 较对照组(677.88元)明显减低。

结论: 10 d序贯疗法的*H.pylori*根除率不低于标准14 d三联疗法, 2组不良反应发生率相似, 但10 d序贯疗法根除*H.pylori*的效价比更高。

关键词: 序贯疗法; 标准三联疗法; 幽门螺杆菌; 根除率

■同行评议者

李振华, 教授, 中国中医科学院西苑医院消化科

吴改玲, 蓝宇, 张小晋. 序贯疗法和标准三联疗法根除幽门螺杆菌的疗效比较. 世界华人消化杂志 2011; 19(29): 3100-3103
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/3100.asp>

0 引言

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H.pylori*)感染是胃炎和消化性溃疡等疾病的主要病因^[1]. 由于抗生素耐药的流行, 7 d和10 d的标准三联疗法对*H.pylori*根除率下降^[2,3]. 为了提高*H.pylori*根除率, 建议延长标准三联疗法的疗程(14 d)或改用四联疗法. 国外提出序贯疗法, 荟萃分析提示10 d序贯疗法优于7 d或10 d标准三联疗法^[4], 但10 d序贯疗法与14 d标准三联疗法的疗效比较研究较少. 本研究的目的是比较10 d序贯疗法与14 d标准三联疗法根除*H.pylori*的疗效, 以便更好的指导临床根除*H.pylori*治疗.

1 材料和方法

1.1 材料 103例有消化不良症状经胃镜诊断的活动性慢性胃炎或消化性溃疡且*H.pylori*感染的患者, 其中男性44例, 女性59例, 年龄18-80岁, 平均年龄 49.68 ± 16.30 岁. 纳入标准: (1)4 wk内未使用质子泵抑制剂(PPI)、 H_2 受体拮抗剂、铋剂及抗生素; (2)所有患者均为第1次根除*H.pylori*治疗, 既往*H.pylori*感染根除失败者除外; (3)无消化系大出血和幽门梗阻、穿孔等并发症; (4)无消化系手术史; (5)无严重心、肺、肝、肾功能不全; (6)非哺乳期妇女及孕妇; (7)排除癌性溃疡及其他肿瘤病史; (8)无相关药物过敏史.

1.2 方法

1.2.1 确定*H.pylori*感染: 胃镜下快速尿素酶试验、组织Giemsa染色法或 ^{13}C 呼气试验3项中至少一项阳性即判定为*H.pylori*感染. 快速尿素酶试验采用福建三强生物化工有限公司所生产的胃幽门螺杆菌诊断试剂盒, ^{13}C 呼气试验使用原子高科股份有限公司生产的尿素 ^{13}C 胶囊和北京中科科仪有限公司生产的 ^{13}C 质谱仪. 所有患者均按照随机数字表随机分为治疗组(10 d序贯疗法组)和对照组(14 d标准三联疗法组). 治疗组52例, 快速尿素酶试验与组织Giemsa染色法均阳性33例, 均阴性者4例, 快速尿素酶试验阳性而组织Giemsa染色法阴性9例, 快速尿素酶试验阴性而组织Giemsa染色法阳性6例, ^{13}C 呼气试验阳性4例(快速尿素酶试验和组织Giemsa染色法均阴性者), 其中男性20例, 女性32例, 平均年龄 49.85 ± 17.15 岁, 慢性胃炎32例, 溃疡病20例. 对

照组51例, 快速尿素酶试验与组织Giemsa染色法均阳性者31例, 均阴性者3例, 快速尿素酶试验阳性而组织Giemsa染色法阴性11例, 快速尿素酶试验阴性而组织Giemsa染色法阳性6例, ^{13}C 呼气试验阳性3例, 其中男性24例, 女性27例, 平均年龄 48.53 ± 15.55 岁, 慢性胃炎26例, 溃疡病25例. 两组性别、年龄、疾病构成比无明显差异($P > 0.05$).

1.2.2 治疗组用药: 前5 d: 埃索美拉唑肠溶片20 mg bid+阿莫西林胶囊1 000 mg bid, 后5 d: 埃索美拉唑肠溶片20 mg bid、克拉霉素片0.5 bid+替硝唑片0.5 bid. 对照组用药: 埃索美拉唑肠溶片20 mg bid+阿莫西林胶囊1 000 mg bid+克拉霉素片0.5 bid 14天. 埃索美拉唑肠溶片由无锡阿斯利康公司生产, 阿莫西林胶囊由联邦制药有限公司生产, 克拉霉素片、替硝唑片由丽珠制药有限公司生产. 根除治疗结束至少1 mo后应用 ^{13}C 呼气试验或快速尿素酶试验或组织Giemsa染色法复查*H.pylori*根除情况; 复查前至少1 mo内停用一切抗生素、铋剂、 H_2 受体拮抗剂及质子泵抑制剂. 观察两组的*H.pylori*根除率、不良反应发生情况; 比较两组的效价比.

统计学处理 所有数据采用SPSS16.0统计软件分析处理, 计量资料比较采用 t 检验, 计数资料比较用卡方检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义.

2 结果

2.1 *H.pylori*根除率的比较 治疗组52例, 47例*H.pylori*成功根除, 根除率90.4%; 对照组51例, 46例根除, 根除率90.2%, 2组*H.pylori*根除率无统计学差异($P = 1.000$).

2.2 药物不良反应 治疗组有12例出现不良反应, 对照组有18例出现不良反应, 两组的不良反应发生率分别为23.1%和35.3%, 两组比较无统计学差异($P = 0.172$). 不良反应主要以口苦、口腔异味、大便次数增加为主, 恶心及呕吐较少见, 且不良反应均较轻微, 未影响治疗(表1).

2.3 治疗方案费用比较 治疗组的费用为380.6元, 对照组费用为677.88元, 治疗组的费用明显低于对照组.

3 讨论

*H.pylori*感染是胃炎和消化性溃疡的主要病因^[1], 1994年世界卫生组织正式将其列为第1类致癌因子^[5], 并明确为胃癌的危险因素^[6,7]. 2003年桐城会议^[8]及2007年庐山会议^[9]明确指出消化性

■研究前沿

本研究观察10 d序贯疗法根除*H.pylori*与14 d三联标准疗法比较是否效价比更高, 以便更好的指导临床根除*H.pylori*治疗.

■相关报道

荟萃分析显示10 d序贯疗法较7 d标准三联疗法*H.pylori*根除率提高了17.6%; 10 d序贯疗法同样也优于10 d标准三联疗法.

■创新盘点

本研究比较了10 d序贯疗法与14 d三联标准疗法根除幽门螺杆菌的疗效,既往多数文章是将10 d序贯疗法与7或10 d三联标准疗法比较,本研究提示10 d序贯疗法优于14 d三联标准疗法。

■应用要点

10 d序贯疗法的根除*H.pylori*效价比高于14 d标准三联疗法,对于我国*H.pylori*感染率较高的状况,10 d序贯疗法根除*H.pylori*有更多的益处。

表 1 两组患者不良反应发生情况 (n)

	n	口苦、口腔异味	大便次数增加	恶心、呕吐	合计
治疗组	52	9	6	2	12
对照组	51	8	10	3	18

溃疡和慢性胃炎伴胃黏膜萎缩、糜烂必须根除*H.pylori*, 2007年庐山会议^[9]指出慢性胃炎伴消化不良症状患者亦支持根除*H.pylori*. 因此*H.pylori*感染的治疗一直是大家所关注的热点, 包括质子泵抑制剂、阿莫西林、咪唑类药物和克拉霉素的7 d标准三联疗法曾被推荐为根除*H.pylori*的一线方案, 特别是质子泵抑制剂加阿莫西林和克拉霉素方案, 在一段时间内因其*H.pylori*根除率高、不良反应少、依从性好等特点而作为首选方案. 但近年来随着*H.pylori*耐药的不断产生, 质子泵抑制剂加克拉霉素和阿莫西林治疗方案对*H.pylori*的根除率明显下降, 甚至降到了80%^[2,3]. 究其原因主要是因为抗生素耐药、依从性差、疗程偏短、药物相关性副作用、胃内细菌负荷量、*cagA*基因以及吸烟史等因素^[10]. 研究还发现*H.pylori*的根除率在复治者比初治者明显下降, 同样的治疗方案, 随着时间推移, *H.pylori*根除率逐步降低, 所以对*H.pylori*的根除治疗应力争在第1次治疗取得成功^[11]. 因此筛选根除率高的治疗方案, 避免耐药菌株已引起国内外学者的广泛关注. 欧洲指南建议当克拉霉素耐药流行超过15%-20%时, 应用14 d疗程的三联方案或者10-14 d四联方案^[12]. 意大利学者Vaira等^[13]对300例患者的随机双盲研究显示, 10 d序贯疗法*H.pylori*根除率(89%)明显高于传统三联疗法(77%). Zullo等^[14-16]研究亦表明10 d序贯疗法能够获得比7 d或10 d三联疗法更高的*H.pylori*根除率. 意大利根除*H.pylori*的指南把10 d序贯疗法给予了与标准7-14 d三联疗法同等地位, 作为了一线治疗方案. 国内童锦禄等^[4]对中外10 d序贯疗法与标准三联疗法(7 d或10 d)治疗*H.pylori*感染的资料进行了荟萃分析, 结果表明10 d序贯疗法较7 d标准三联疗法*H.pylori*根除率提高了17.6%; 10 d序贯疗法同样也优于10 d标准三联疗法. 无论是溃疡性消化不良还是非溃疡性消化不良, 10 d序贯疗法皆获得了更高的*H.pylori*根除率. 两者之间的副作用发生率也相似. 而且从经济学方面考虑, 10 d序贯疗法费用也明显低于10 d标准三联疗法. 我国第三次全国幽门螺杆菌共识会推荐序贯疗法为根除*H.pylori*

的B级或C级的新疗法^[17].

与7 d或10 d标准三联疗法相比, 将疗程延长至14 d可获得更高的*H.pylori*根除率. 但是经济负荷随之增加. 若10 d序贯疗法能取得与14 d标准三联疗法相同的根除率, 无论从疗程上还是从经济负荷上都将显示其优势. 但10 d序贯疗法与标准14 d三联疗法疗效的比较报道不多. 本研究中10 d序贯疗法*H.pylori*根除率为90.4%, 与国内文献报道的10 d序贯疗法的*H.pylori*根除率相近, 且其*H.pylori*根除率能达到14 d标准三联疗法的疗效, 而且治疗费用比后者少近一半, 可减轻患者的经济负担, 未出现严重的不良反应, 效价比更高. 庞淑珍等^[18]对消化性溃疡*H.pylori*阳性的患者进行10 d序贯疗法(含奥美拉唑、阿莫西林、克拉霉素和替硝唑)与14 d标准三联疗法(含奥美拉唑、阿莫西林、克拉霉素)根除*H.pylori*疗效比较, 两组疗效相当, 与本研究结果相似, 提示10 d序贯疗法可能为目前抗*H.pylori*治疗的一种较为安全、经济、有效的方案.

10 d序贯疗法高疗效的机制不甚明了, 单用阿莫西林能够获得50%的*H.pylori*根除率, 并能减少患者胃内细菌的负荷量. 胃内细菌的负荷量减少在某种程度上提高了细菌对后续药物的敏感性^[19]. 另一方面, 阿莫西林能够破坏细菌细胞壁, 增加大环内酯类药物的进入, 从而增加药物的疗效. 因此, 前半疗程的阿莫西林能够预防随后应用克拉霉素的耐药. 另外高的*H.pylori*根除率亦可能与应用替硝唑有关, 替硝唑的作用机制尚未完全阐明, 其硝基可被还原成一种细胞毒, 从而作用于细菌的DNA代谢过程, 促使细菌死亡. 替硝唑作用比甲硝唑强2-4倍, 且具有更长的作用时间; *H.pylori*对替硝唑的耐药率明显低于对甲硝唑的耐药率^[20].

10 d序贯疗法与14 d标准三联疗法不良反应发生率相似, 均偏高, 但两组不良反应均主要以口苦、口腔异味、大便次数增加为主, 恶心及呕吐较少见, 不良反应均较轻微, 未影响患者的治疗, 提示两组方案均较安全.

10 d序贯疗法的*H.pylori*根除率同14 d标准三联疗法, 两组的不良反应发生率相似, 但序贯

疗法效价比更高, 从经济学角度来讲节省药费4成以上, 对于我国*H.pylori*感染率较高的状况, 10 d序贯疗法根除*H.pylori*是有更多的益处。

4 参考文献

- 1 Shallcross TM, Rathbone BJ, Wyatt JL, Heatley RV. Helicobacter pylori associated chronic gastritis and peptic ulceration in patients taking non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Aliment Pharmacol Ther* 1990; 4: 515-522
- 2 潘秀珍, 彭孝伟, 彭如洁. 幽门螺杆菌对抗生素耐药研究进展. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 806-813
- 3 Ford A, Moayyedi P. How can the current strategies for Helicobacter pylori eradication therapy be improved? *Can J Gastroenterol* 2003; 17 Suppl B: 36B-40B
- 4 童锦禄, 冉志华, 沈骏, 黄美兰, 陈翔, 萧树东. 10天序贯疗法与标准三联疗法治疗幽门螺杆菌感染荟萃分析. *胃肠病学和肝病杂志* 2008; 17: 106-109
- 5 International Agency for Research on Cancer. Schistosomes, live flukes and Helicobacter pylori. LARC monographs on the evaluation on carcinogenic risks to humans. Vol 61. Lyon: LARC, 1994: 177-220
- 6 Jankowski J. Helicobacter pylori infection and gastric cancer. *BMJ* 1991; 302: 1534
- 7 Dixon MF. Pathophysiology of Helicobacter pylori infection. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1994; 201: 7-10
- 8 张万岱, 萧树东, 胡伏莲, 林三仁, 胡品津, 刘文忠, 王继德, 徐智民. 幽门螺杆菌共识意见. *中华消化杂志* 2004; 24: 126-127
- 9 中华医学会消化病学分会幽门螺杆菌学组. 第三次全国幽门螺杆菌感染若干问题共识报告. *中华内科杂志* 2008; 47: 346-349
- 10 Vilaichone RK, Mahachai V, Graham DY. Helicobacter pylori diagnosis and management. *Gastroenterol Clin North Am* 2006; 35: 229-247
- 11 田雨, 王蔚虹, 胡伏莲. 中国幽门螺杆菌感染治疗共识意见. *中国医药导刊* 2007; 9: 104-105
- 12 Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain C, Bazzoli F, El-Omar E, Graham D, Hunt R, Rokkas T, Vakil N, Kuipers EJ. Current concepts in the management of Helicobacter pylori infection: the Maastricht III Consensus Report. *Gut* 2007; 56: 772-781
- 13 Vaira D, Zullo A, Vakil N, Gatta L, Ricci C, Perna F, Hassan C, Bernabucci V, Tampieri A, Morini S. Sequential therapy versus standard triple-drug therapy for Helicobacter pylori eradication: a randomized trial. *Ann Intern Med* 2007; 146: 556-563
- 14 Zullo A, Gatta L, De Francesco V, Hassan C, Ricci C, Bernabucci V, Cavina M, Ierardi E, Morini S, Vaira D. High rate of Helicobacter pylori eradication with sequential therapy in elderly patients with peptic ulcer: a prospective controlled study. *Aliment Pharmacol Ther* 2005; 21: 1419-1424
- 15 Zullo A, Vaira D, Vakil N, Hassan C, Gatta L, Ricci C, De Francesco V, Menegatti M, Tampieri A, Perna F, Rinaldi V, Perri F, Papadia C, Fornari F, Pilati S, Mete LS, Merla A, Poti R, Marinone G, Savioli A, Campo SM, Faleo D, Ierardi E, Miglioli M, Morini S. High eradication rates of Helicobacter pylori with a new sequential treatment. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 17: 719-726
- 16 De Francesco V, Zullo A, Hassan C, Della Valle N, Pietrini L, Minenna MF, Winn S, Monno R, Stoppino V, Morini S, Panella C, Ierardi E. The prolongation of triple therapy for Helicobacter pylori does not allow reaching therapeutic outcome of sequential scheme: a prospective, randomised study. *Dig Liver Dis* 2004; 36: 322-326
- 17 成虹, 胡伏莲. 第三次全国幽门螺杆菌共识会在江西庐山召开—Hp共识会议纪要. *中国医药导刊* 2007; 9: 440-441
- 18 庞淑珍, 赵文星, 任莹. 10天序贯疗法与14天标准三联疗法根除幽门螺杆菌疗效比较. *实用医学杂志* 2009; 25: 3058-3060
- 19 Murakami K, Fujioka T, Okimoto T, Sato R, Kodama M, Nasu M. Drug combinations with amoxycillin reduce selection of clarithromycin resistance during Helicobacter pylori eradication therapy. *Int J Antimicrob Agents* 2002; 19: 67-70
- 20 谢国艳, 高志生, 周建华, 黄敏, 胡嘉波. 上海市崇明地区幽门螺杆菌耐药性分析及cagA基因检测. *中国感染与化疗杂志* 2008; 8: 463-465

■同行评价

本研究采用序贯疗法与14 d标准三联疗法对*H.pylori*感染的治疗进行对照, 并证实了其有效性和价格低廉的卫生经济学优越性, 具有一定的临床价值。

编辑 曹丽鸥 电编 闫晋利

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011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, 文字精练, 数据可靠, 写作规范, 表达准确。

《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56.00元, 全年2016.00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》(2008年版)内科学类的核心期刊、《中国学术期刊评价研究报告-RCES权威、核心期刊排行榜与指南》和

中国知识资源总库收录。2009年《世界华人消化杂志》总被引频次3 009次, 影响因子0.625, 综合评价总分49.4分, 分别位居内科学类48种期刊的第6位、第9位、第6位, 分别位居1 946种中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)的第87位、第378位、第351位; 其他指标: 即年指标0.112, 他引率0.79, 引用刊数473种, 扩散因子15.72, 权威因子1 170.03, 被引半衰期4.0, 来源文献量752, 文献选出率0.93, 地区分布数30, 机构分布数30, 基金论文比0.39, 海外论文比0.01。

1.2 栏目 述评, 基础研究, 临床研究, 焦点论坛, 文献综述, 研究快报, 临床经验, 病例报告, 会议纪要。文稿应具科学性、先进性、可读性及实用性, 重点突出, 文字简练, 数据可靠, 写作规范, 表达准确。

2 撰稿要求

2.1 总体标准 文稿撰写应遵照国家标准GB7713科学技术报告、学位论文和学术论文的编写格式, GB6447文摘编写规则, GB7714文后参考文献著录规则, GB/T 3179科学技术期刊编排格式等要求; 同时遵照国际医学期刊编辑委员会(International Committee of Medical Journal Editors)制定的《生物医学期刊投稿的统一要求(第5版)》(Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals)。见: *Ann Intern Med* 1997; 126: 36-47。

2.2 名词术语 应标准化, 前后统一, 如原词过长且多次出现者, 可于首次出现时写出全称加括号内注简称, 以后直接用简称。医学名词以全国自然科学名词审定委员会公布的《生理学名词》、《生物化学名词与生物物理学名词》、《化学名词》、《植物学名词》、《人体解剖学名词》、《细胞生物学名词》及《医学名词》系列为准, 药名以《中华人民共和国药典》和卫生部药典委员会编的《药名词汇》为准, 国家食品药品监督管理局批准的新药, 采用批准的药名; 创新性新药, 请参照我国药典委员会的“命名原则”, 新译名词应附外文。公认习用缩略语可直接应用(建议第一次也写出全称), 如ALT, AST, mAb, WBC, RBC, Hb, T, P, R, BP, PU, GU, DU, ACTH, DNA, LD50, HBsAg, HCV

RNA, AFP, CEA, ECG, IgG, IgA, IgM, TCM, RIA, ELISA, PCR, CT, MRI等. 为减少排印错误, 外文、阿拉伯数字、标点符号必须正确打印在A4纸上. 中医药名词英译要遵循以下原则: (1)有对等词者, 直接采用原有英语词, 如中风stroke, 发热fever; (2)有对应词者应根据上下文合理选用原英语词, 如八法eight principal methods; (3)英语中没有对等词或相应词者, 宜用汉语拼音, 如阴yin, 阳yang, 阴阳学说yinyangology, 人中renzhong, 气功qigong; 汉语拼音要以词为单位分写, 如weixibao nizhuanwan(胃细胞逆转丸), guizhitang(桂枝汤). 通常应小写.

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

2.4 计量单位 采用国际单位制并遵照有关国家

标准, GB3100-3102-93量和单位. 原来的“分子量”应改为物质的相对分子质量. 如30 kD改为 M_r 30 000或30 kDa(M大写斜体, r小写正体, 下角标); “原子量”应改为相对原子质量, 即 A_r (A大写斜体, r小写正体, 下角标); 也可采用原子质量, 其单位是u(小写正体). 计量单位在+、-及-后列出. 在±前后均要列出, 如37.6 °C ± 1.2 °C, 45.6岁 ± 24岁, 56.4 d ± 0.5 d. 3.56 ± 0.27 pg/ml应为3.56 ng/L ± 0.27 ng/L. BP用kPa(mmHg), RBC数用 $1 \times 10^{12}/L$, WBC数用 $1 \times 10^9/L$, WBC构成比用0.00表示, Hb用g/L. M_r 明确的体内物质以nmol/L或mmol/L表示, 不明确者用g/L表示. 1 M硫酸, 改为1 mol/L硫酸, 1 N硫酸, 改为0.5 mol/L硫酸. 长10 cm, 宽6 cm, 高4 cm, 应写成10 cm × 6 cm × 4 cm. 生化指标一律采用法定计量单位表示, 例如, 血液中的总蛋白、清蛋白、球蛋白、脂蛋白、血红蛋白、总脂用g/L, 免疫球蛋白用mg/L; 葡萄糖、钾、尿素、尿素氮、CO₂结合力、乳酸、磷酸、胆固醇、胆固醇酯、三酰甘油、钠、钙、镁、非蛋白氮、氯化物; 胆红素、蛋白结合碘、肌酸、肌酐、铁、铅、抗坏血酸、尿胆元、氨、维生素A、维生素E、维生素B1、维生素B2、维生素B6、尿酸; 氢化可的松(皮质醇)、肾上腺素、汞、孕酮、甲状腺素、睾酮、叶酸用nmol/L; 胰岛素、雌二醇、促肾上腺皮质激素、维生素B12用pmol/L. 年龄的单位有日龄、周龄、月龄和岁. 例如, 1秒, 1 s; 2分钟, 2 min; 3小时, 3 h; 4天, 4 d; 5周, 5 wk; 6月, 6 mo; 雌性♀, 雄性♂, 酶活性国际单位IU = 16.67 nkat, 对数log, 紫外uv, 百分比%, 升L, 尽量把 1×10^{-3} g与 5×10^{-7} g之类改成1 mg与0.5 mg, hr改成h, 重量γ改成mg, 长度m改成mm. 国际代号不用于无数字的文句中, 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% CO₂, 50 mL/L CO₂; 1 : 1 000肾上腺素, 1 g/L肾上腺素; 胃黏膜含促胃液素36.8 pg/mg, 改为胃黏膜蛋白含促胃液素36.8 ng/g; 10%葡萄糖改为560 mmol/L或100 g/L葡萄糖; 45 ppm = 45×10^{-6} ; 离心的旋转频率(原称转速)用r/min, 超速者用g; 药物剂量若按体质量计算, 一律以“/kg”表示.

《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, 2008年版)收录的学术期刊.

《世界华人消化杂志》编辑部, 100025, 北京市朝阳区, 东四环中路62号, 远洋国际中心D座903室, 电话: 010-5908-0035, 传真: 010-8538-1893, Email: wjcd@wjgnet.com; http://www.wjgnet.com

2.5 统计学符号 (1) t 检验用小写 t ; (2) F 检验用英文大写 F ; (3)卡方检验用希腊文小写 χ^2 ; (4)样本的相关系数用英文小写 r ; (5)自由度用希腊文小写 ν ; (6)样本数用英文小写 n ; (7)概率用英文斜体大写 P . 在统计学处理中在文字叙述时平均数 \pm 标准差表示为 $\text{mean} \pm \text{SD}$, 平均数 \pm 标准误为 $\text{mean} \pm \text{SE}$. 统计学显著性用 $^aP < 0.05$, $^bP < 0.01$ ($P > 0.05$ 不注). 如同一表中另有一套 P 值, 则 $^cP < 0.05$, $^dP < 0.01$; 第三套为 $^eP < 0.05$, $^fP < 0.01$ 等.

2.6 数字用法 遵照国家标准GB/T 15835-1995出版物上数字用法的规定, 作为汉语词素者采用汉字数字, 如二氧化碳、十二指肠、三倍体、四联球菌、五四运动、星期六等. 统计学数字采用阿拉伯数字, 如1000-1500 kg, 3.5 mmol/L \pm 0.5 mmol/L等. 测量的数据不能超过其测量仪器的精密度, 例如6347意指6000分之一的精密度. 任何一个数字, 只允许最后一位有误差, 前面的位数不应有误差. 在一组数字中的 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 应考虑到个体的变差, 一般以SD的1/3来定位数, 例如3614.5 g \pm 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 \pm 0.4 kg, 过多的位数并无意义. 又如8.4 cm \pm 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 \rightarrow 23.5 \rightarrow 24. 年月日采用全数字表达法, 请按国家标准GB/T 7408-94书写. 如1985年4月12日, 可写作1985-04-12; 1985年4月, 写作1985-04; 从1985年4月12日23时20分50秒起至1985年6月25日10时30分止, 写作1985-04-12 T23:20:50/1985-06-25 T10:30:00; 从1985年4月12日起至1985年6月15日止, 写作1985-04-12/06-16, 上午8时写作08:00, 下午4时半写作16:30. 百分数的有效位数根据分母来定: 分母 ≤ 100 , 百分数到个位; $101 \leq \text{分母} \leq 1000$, 百分数到小数点后1位; 余类推. 小数点前后的阿拉伯数字, 每3位间空1/4阿拉伯数字距离, 如1486800.475 65. 完整的阿拉伯数字不移行!

2.7 标点符号 遵照国家标准GB/T 15834-1995标点符号用法的要求, 本刊论文中的句号都采用黑圆点; 数字间的起止号采用“-”字线, 并列的汉语词间用顿号分开, 而并列的外文词、阿拉伯数字、外文缩略词及汉语拼音字母拼写词间改用逗号分开, 参考文献中作者间一律用逗号

分开; 表示终了的标点符号, 如句号、逗号、顿号、分号、括号及书名号的后一半, 通常不用于一行之首; 而表示开头的标点符号, 如括号及书名号的前一半, 不宜用于一行之末. 标点符号通常占一格, 如顿号、逗号、分号、句号等; 破折号应占两格; 英文连字符只占一个英文字符的宽度, 不宜过长, 如5-FU. 外文字符下划一横线表示用斜体, 两横线表示用小写, 三横线表示用大写, 波纹线表示用黑体.

3 稿件格式

3.1 题名 简明确切地反映论文的特定内容, 鲜明而有特色, 阿拉伯数字不宜开头, 不用副题名, 一般20个字. 避免用“的研究”或“的观察”等非特定词.

3.2 作者 论文作者的署名, 按照国际医学杂志编辑委员会(ICMJE, International Committee of Medical Journal Editors)作者资格标准执行. 作者标准为: (1)对研究的理念和设计、数据的获得、分析和解读做出重大贡献; (2)起草文章, 并对文章的重要的知识内容进行批评性修改; (3)接受对准备发表文章的最后一稿. 作者应符合条件1, 2, 3, 对研究工作有贡献的其他人可放入致谢中. 作者署名的次序按贡献大小排列, 多作者时姓名间用逗号, 如是单名, 则在姓与名之间空1格(正文和参考文献中不空格). 《世界华人消化杂志》要求所有署名人写清楚自己对文章的贡献. 世界华人消化杂志不设置共同第一作者和共同通信作者.

3.3 单位 作者后写单位的全称空1格后再写省市及邮政编码. 格式如: 张旭晨, 梅立新, 承德医学院病理教研室 河北省承德市 067000

3.4 第一作者简介 格式如: 张旭晨, 1994年北京中医药大学硕士, 讲师. 主要从事消化系统疾病的病理研究.

3.5 作者贡献分布 格式如: 陈湘川与庞丽娟对此文所作贡献两均等; 此课题由陈湘川、庞丽娟、陈玲、杨兰、张金芳、齐妍及李洪安设计; 研究过程由陈玲、杨兰、张金芳、蒋金芳、杨磊、李锋及曹秀峰操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由曹秀峰提供; 数据分析由陈湘川、杨兰及庞丽娟完成; 本论文写作由陈湘川、庞丽娟及李洪安完成.

3.6 同行评议者 为了确保刊出文章的质量, 本刊即将开始实行接受稿件的同行评议公开策略, 将同行评议者姓名, 职称, 机构的名称与文章一同在脚注出版. 格式如: 房静远, 教授, 上海交通

大学医学院附属医院仁济医院,上海市消化疾病研究所.

3.7 基金资助项目 格式如: 国家自然科学基金资助项目, No. 30224801

3.8 通讯作者 格式如: 通讯作者: 黄缘, 教授, 330006, 江西省南昌市民德路1号, 南昌大学第二附属医院消化内科, 江西省分子医学重点实验室. huang9815@yahoo.com

电话: 0351-4078656 传真: 0351-4086337

收稿日期: 修回日期:

3.9 英文摘要

题名 文章的题名应言简意赅, 方便检索, 英文题名以不超过10个实词为宜, 应与中文题名一致.

作者 作者姓名汉语拼音拼写法规定为: 先名, 后姓; 首字母大写, 双名之间用半字线“-”分开, 多作者时姓名间加逗号. 格式如: “潘伯荣”的汉语拼写法为“Bo-Rong Pan”.

单位 先写作者, 后写单位的全称及省市邮政编码. 例如: Xu-Chen Zhang, Li-Xin Mei, Department of Pathology, Chengde Medical College, Chengde 067000, Hebei Province, China

基金资助项目 格式如: Supported by National Natural Science Foundation of China, No.30224801

通讯作者 格式如: Correspondence to: Dr. Lian-Sheng Ma, Taiyuan Research and Treatment Center for Digestive Diseases, 77 Shuangta Xijie, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China. wcjd@wjgnet.com

收稿及修回日期 格式如: Received: Revised:

摘要 包括目的、方法、结果、结论, 书写要求与中文摘要一致.

3.10 中文摘要 必须在300字左右, 内容应包括目的(应阐明研究的背景和设想、目的), 方法(必须包括材料或对象. 应描述课题的基本设计, 双盲、单盲还是开放性, 使用什么方法, 如何进行分组和对照, 数据的精确程度. 研究对象选择条件与标准是否遵循随机化、齐同化的原则, 对照组匹配的特征. 如研究对象是患者, 应阐明其临床表现, 诊断标准. 如何筛选分组, 有多少例进行过随访, 有多少例因出现不良反应而中途停止研究), 结果(应列出主要结果, 包括主要数据, 有什么新发现, 说明其价值和局限, 叙述要真实、准确、具体, 所列数据经用何种统计学方法处理; 应给出结果的置信区间和统计学显著性检验的确切值; 概率写 P , 后应写出相应显著性检验值), 结论(全文总结, 准确无误的观点及价值).

3.11 正文标题层次 0 引言; 1 材料和方法, 1.1 材

料, 1.2 方法; 2 结果; 3 讨论; 4 参考文献. 序号一律左顶格写, 后空1格写标题; 2级标题后空1格接正文. 正文内序号连排用(1), (2), (3). 以下逐条陈述.

0 引言 应包括该研究的目的和该研究与其他相关研究的关系.

1 材料和方法 应尽量简短, 但应让其他有经验的研究者能够重复该实验. 对新的方法应该详细描述, 以前发表过的方法引用参考文献即可, 有关文献中或试剂手册中的方法的改进仅描述改进之处即可.

2 结果 实验结果应合理采用图表和文字表示, 在结果中应避免讨论.

3 讨论 要简明, 应集中对所得的结果做出解释而不是重复叙述, 也不应是大量文献的回顾.

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

志谢 后加冒号, 排在讨论后及参考文献前, 左齐.

4 参考文献 本刊采用“顺序编码制”的著录方法, 即以文中出现顺序用阿拉伯数字编号排序. 提倡对国内同行近年已发表的相关研究论文给予充分的反映, 并在文内引用处右上角加方括号注明角码. 文中如列作者姓名, 则需在“Pang等”的右上角注角码号; 若正文中仅引用某文献中的论述, 则在该论述的句末右上角注码号. 如马连生^[1]报告……, 潘伯荣等^[2-5]认

《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.

2010年,《世界华人消化杂志》将坚持开放获取(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。

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

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

6.3 版权 本论文发表后作者享有非专有权, 文责由作者自负. 作者可在本单位或本人著作集中汇编出版以及用于宣讲和交流, 但应注明发表于《世界华人消化杂志》××年; 卷(期): 起止页码. 如有国内外其他单位和个人复制、翻译出版等商业活动, 须征得《世界华人消化杂志》编辑部书面同意, 其编辑版权属本刊所有.

《世界华人消化杂志》编辑部

北京百世登生物医学科技有限公司
100025, 北京市朝阳区东四环中路62号
远洋国际中心D座903室
电话: 010-5908-0035
传真: 010-8538-1893
E-mail: wcjd@wjgnet.com
<http://www.wjgnet.com>

2011年国内国际会议预告

2011-08-20/22

第十五次全国中西医结合儿科学术会议

会议地点: 兰州市

联系方式: zxyek@sina.com

2011-08-26/27

第四届福瑞肝纤维化论坛

会议地点: 上海市

联系方式: bstract@cosoman.com

2011-08-31/09-02

腹腔间室综合征的护理进展

会议地点: 延吉市

联系方式: qiyan68@126.com

2011-09

中华医学会超声医学分会第十一次全国超声医学学术会议

会议地点: 青岛市

联系方式: <http://www.nccsum.org/>

2011-09-14/17

第六届全国疑难及重症肝病大会

会议地点: 兰州市

联系方式: office@cnsld.org

2011-09-14/18

第十四届全国临床肿瘤学大会暨2011年CSCO学术年会

会议地点: 福州市

联系方式: 010-67726451

2011-09-16/18

第七届全国消化系统中晚期恶性肿瘤学术年会

会议地点: 济南市

联系方式: xiaohuahuiyi@126.com

2011-09-24

2011中国消化病学大会

会议地点: 北京市

联系方式: 010-51292005-105

2011-09-25/26

2011北京消化内镜节

会议地点: 北京市

联系方式: 010-51292005-105

2011-10-07/09

第八届亚太肝病学会主题会议

会议地点: 北京市

联系方式: info@apaslstc.org

2011-10-13/16

2011年亚太地区国际肿瘤生物学和医学学术会议

会议地点: 上海市

联系方式: clinimmunchina@yahoo.com

2011-10-14/16

中华医学会第五次全国艾滋病、病毒性丙型肝炎暨全国

热带病学术会议

会议地点: 重庆市

联系方式: www.nccsid.org

2011-10-21/23

中华医学会病理学分会第十七次学术会议

会议地点: 杭州市

联系方式: leighdai@cma.org.cn

2011-10-22/26

第19届欧洲肠胃病学联合组织(UEG)会议周

会议地点: 斯德哥尔摩

联系方式: uegw2011@cpo-hanser.de

2011-10-28/11-02

2011美国胃肠病学会年度科学会议

会议地点: 华盛顿

联系方式: annualmeeting@acg.gi.org

2011-11-04/08

第62届美国肝病研究学会(AASLD)年会

会议地点: 旧金山

联系方式: medical_conference@263.net

2011-11-18/23

第十一届全国消化道恶性病变介入诊疗研讨会暨2011全

国内镜/介入/放疗新技术国际论坛

会议地点: 北京市

联系方式: doctor302@163.com

2011-11-25/27

2011年全国消化道静脉曲张及其伴发消化疾病内镜诊治研讨会

会议地点: 西安市

联系方式: 2011varices@sina.com

2011-12-08/11

第11次全国消化系疾病学术会议

会议地点: 杭州市

联系方式: csgdabstract@126.com

2011-12-09/11

江苏省第四次胃肠外科学术会议

会议地点: 南京市

联系方式: jswwk@yahoo.com.cn

志谢世界华人消化杂志编委

本期文章审稿中(包括退稿), 我刊编委付出了宝贵的时间和大量的精力, 提高了《世界华人消化杂志》的学术质量, 在此表示衷心感谢!

陈治水 主任医师
中国人民解放军第二一医院中医科

曹秀峰 教授
南京医科大学附属南京第一医院肿瘤中心

陈国忠 副主任医师
广西中医学院第一附属医院消化内科

崔莲花 副教授
青岛大学医学院公共卫生系

代智 副研究员
复旦大学附属中山医院肝癌研究所

丁惠国 主任医师
首都医科大学附属北京佑安医院肝病消化科

葛海燕 教授
同济大学附属东方医院普通外科

巩鹏 教授
大连医科大学附属第一医院普外二科

胡国信 副教授
南昌大学第一附属医院感染内科

姜卫东 教授
安徽省立医院肝胆外科

江米足 教授
浙江大学医学院附属儿童医院儿科

蓝宇 教授
北京积水潭医院消化科

靳雪源 副主任医师
中国人民解放军第302医院消化内科

李军祥 教授
北京中医药大学附属东方医院消化内科

李瑜元 教授
广州市第一人民医院内科

梁力建 教授
中山大学附属第一医院肝胆外科

欧希龙 副教授
东南大学中大医院消化科

孙诚谊 教授
贵阳医学院附属医院

孙殿兴 主任医师
白求恩国际和平医院肝病科

谭晓冬 副教授
中国医科大学盛京医院胰腺甲状腺外科

唐世刚 教授
湖南省人民医院

唐文富 副教授
四川大学华西医院中西医结合科

王小众 教授
福建医科大学附属协和医院消化内科

王志刚 副主任医师
上海市第六人民医院普外科

肖恩华 教授
中南大学湘雅二医院放射教研室

徐宁志 研究员
中国医学科学院肿瘤医院研究所细胞生物与分子生物学实验室

颜宏利 教授
中国人民解放军第二军医大学遗传学教研室

姚树坤 教授
中日友好医院消化内科

张春虎 副教授
中南大学湘雅医院中西医结合研究所

周南进 研究员
江西省医学科学研究所