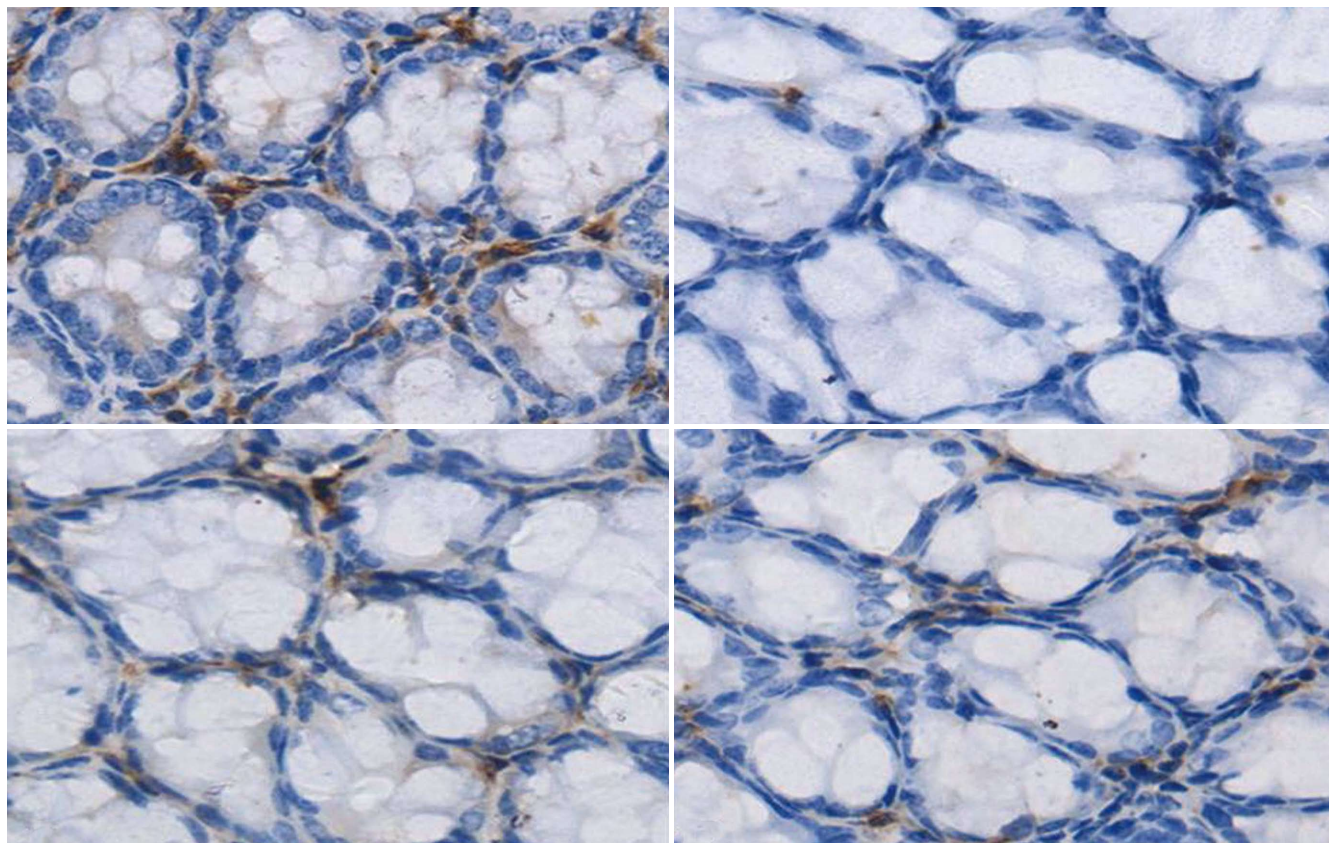


世界华人消化杂志®

**WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY**

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2010 年 8 月 18 日 第 18 卷 第 23 期 (Volume 18 Number 23)



23 / 2010

ISSN 1009-3079



9 771009 307056

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
杨思风教授
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
聂新明教授
陈洪副教授

陈其奎教授
陈卫昌教授
陈贻胜教授
程斌教授
迟宝荣教授
崔立红副教授
邓长生教授
丁士刚主任医师
董蕾教授
杜雅菊主任医师
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
郭晓钟教授
郝建宇教授
何松教授
洪天配教授
胡伏莲教授
胡和平主任医师
黄晓东主任医师
黄颖秋教授
黄缘教授
季国忠教授
江米足主任医师
姜春萌教授
姜慧卿教授
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
李祖国副教授
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
刘占举教授
陆伦根教授

马红主任医师
马欣主任医师
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
王邦茂教授
王炳元教授
王承尧教授
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
朱春兰主任医师
邹晓平主任医师

消化外科学
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
仇毓东副教授
崔云甫教授
戴朝六教授
戴冬秋教授
单云峰副主任医师
丁义涛教授
董明教授
房林副教授
傅红副教授
傅华群教授
傅志仁主任医师
葛海燕教授
巩鹏副教授
谷俊朝主任医师
顾岩教授
韩天权教授
郝纯毅主任医师
何超教授
何裕隆教授
黄志勇教授
季加孚教授
莫卫东教授
蒋龙元副教授
李国威教授
李华副教授
李华山主任医师
李奇林教授
李胜研究员
李涛副主任医师

李文岗教授
李旭副教授
李永翔主任医师
梁力建教授
刘超副教授
刘建教授
卢实春教授
陆才德教授
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
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
裘正军教授
沈柏用副教授
沈世强教授
施诚仁教授
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
汤恢焕教授
田晓峰教授
汪波副主任医师
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
王要军教授
王悦华副主任医师

世界华人消化杂志®

编辑委员会

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
谢敏主任医师
谢晓华副教授
邢光明教授
徐大华主任医师
徐迅迪副主任医师
徐泱副主任医师
许戈良教授
严律南教授
杨柏霖副主任医师
杨家和主任医师
杨秋蒙副主任医师
杨维良教授
伊力亚尔·夏合丁教授
殷正丰教授
于聪慧教授
于则利教授
郁宝铭教授
元云飞教授
张佳林教授
张进祥副教授
张俊副研究员
张群华教授
张水军教授
张宗明教授
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
龚国忠教授
管世鹤副教授
何生松教授
胡国信副主任医师
林菊生教授
刘正稳教授
貌盼勇研究员
宁琴教授
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
杨江华副主任医师
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
周霞秋教授
朱传武主任医师
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
李勇副教授
李振华教授
刘成海研究员
刘孟安教授
刘平教授
刘绍能主任医师

沈洪教授
唐志鹏研究员
王富春教授
王新月教授
谢鸣教授
徐列明教授
许玲副教授
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
李璠教授
刘宝瑞教授
刘彬彬副研究员
刘云鹏教授
沈克平主任医师
肖文华主任医师
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
李健丁教授
龙学颖副主任医师
倪才方教授
魏经国教授
肖恩华教授
徐爱民副教授
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
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
张春虎副教授

消化基础研究

曹洁副教授
曹鹏副研究员
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
胡旭初副教授
黄园教授
黄文林教授
李刚教授
李杰副教授
李永哲副研究员
李增山副教授
刘克辛教授
梅林教授
钱睿哲教授
任超世研究员
任浩副教授
台桂香教授
谭学瑞教授
田文静副教授
田颖刚副研究员
王钦红教授
汪思应教授
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
喻荣彬副教授
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

消化病理学

杜祥教授
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
马大烈教授
潘兴华副主任医师
王鲁平主任医师
王娅兰教授
魏蕾教授
颜宏利副教授
于颖彦教授
余宏宇教授
张锦生教授
赵景民教授
朱亮副教授

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ● 2010年8月18日 第18卷 第23期 (总第319期)

述 评

- 2401 超声在肠道疾病诊断中的应用价值
黄争, 范一宏, 吕宾, 黄斌

基 础 研 究

- 2405 复方氯胺酮口服液对胃肠动力的影响
韩盛, 张锦, 汤隽
- 2410 黄芪汤对二甲基亚硝胺诱导大鼠肝纤维化模型作用的机制
闫晓风, 刘平, 孙明瑜, 王晓玲
- 2416 TGF- β 1诱导的上皮间质转化对肝癌细胞系中边缘群细胞的调控
王波, 夏羽佳, 晏维, 夏丽敏, 刘梅, 田德安

临 床 研 究

- 2422 FAF1 mRNA在胃癌组织中的表达及其与幽门螺杆菌感染的相关性
刘爱群, 葛莲英, 罗小玲, 罗元, 林思彤
- 2427 HDGF在肝癌组织和肝癌细胞HepG2中的表达及其意义
周南翔, 周艳艳, 霍继荣

文 献 综 述

- 2434 microRNA在食管癌中的特征
程蕾, 凌志强, 毛伟敏
- 2442 GH-SOCS2-IGF-1轴对溃疡性结肠炎肠黏膜屏障的影响
张榕, 施茵, 关鑫
- 2448 内皮素B受体基因甲基化与肿瘤关系的研究进展
吴川清, 陶凯雄
- 2453 手术治疗肥胖症和2型糖尿病的现状分析及前景展望
付峻林, 朱惠明

研 究 快 报

- 2460 DNA聚合酶 β 在食管癌组织中的修复功能
赵四敏, 陈旭东, 张成娟, 赵国强, 董子明
- 2464 消食和胃冲剂对小鼠胃肠动力的影响
迟鹏, 李岩, 陈苏宁
- 2469 曲古菌素A对人胃癌细胞SGC-7901中组蛋白H3乙酰化水平及细胞凋亡的影响
杨桐树, 李云龙, 赵婷

临 床 经 验

- 2472 血清低相对分子质量差异蛋白质组在食管癌诊断和分期中的作用
任兴军, 谭小林, 杨成虎, 李小琼, 冯峰, 胡琼英, 丁银环, 戴天阳, 王开正
- 2478 P27蛋白和PCNA在肝门部胆管癌中的表达及临床意义
李铸, 周宁新, 张德林, 吕雅莉
- 2483 chemerin在克罗恩病患者血清中的水平及其临床意义
顾颀, 庞智, 皇甫照, 华江, 周春立, 沈必武
- 2487 术中内镜检查小肠淋巴管扩张症6例
姜国俊, 林香春, 蔺武, 沈文彬, 耿万德, 昌红, 齐然
- 2491 几种常见根治术式治疗先天性巨结肠术后远期排便功能的评价
高明太, 刘登瑞, 陈健, 赵成基, 孙学强, 李乐, 靳曙光, 强锦辉, 雷军强, 周永宁, 赵玉元
- 2496 序贯疗法治疗幽门螺杆菌根除失败患者的疗效
杨佳丽, 赵清喜

病例报告	2500 原发性大网膜恶性间皮瘤1例 何书平, 孙培莉, 张智弘, 金淑贤, 陈涛, 华一兵, 黄茂
附录	2504 《世界华人消化杂志》投稿须知 2509 2010年国内国际会议预告
志 谢	2510 志谢世界华人消化杂志编委
消 息	2404 <i>WJC, WJGE, WJGO, WJGS, WJH, WJR</i> 6本期刊被PMC收录 2409 《世界华人消化杂志》出版流程 2415 汤姆森-路透公布2009年 <i>WJG</i> 影响因子2.092 2421 《世界华人消化杂志》名词术语标准 2426 《世界华人消化杂志》被收录情况 2441 《世界华人消化杂志》修回稿须知 2459 <i>WJG</i> 成功通过评审被PMC收录 2468 《2009年版中国科技期刊引证报告》(核心版)发布《世界华人消化杂志》2008年影响因子0.547 2477 2009年《世界华人消化杂志》编委审稿总结 2482 《世界华人消化杂志》按时完成2009年度出版任务 2486 《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》 2490 《世界华人消化杂志》性质、刊登内容及目标 2495 2008年内科学类期刊总被引频次和影响因子排序 2499 《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》
封面故事	Fu JL, Wang ZH, Li GZ, Wang YR, Liu P. Decreased IgA+ plasma cells and IgA expression in acute liver necrosis mice. <i>World J Gastroenterol</i> 2010; 16(30): 3827-3833 http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v16/i30/3827.htm
本期责任人	编务 刘晓芳; 送审编辑 李军亮; 组版编辑 吴鹏联; 英文编辑 王天奇; 责任编辑 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 2010-08-18 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</p> <p>期 刊 名 称 世界华人消化杂志 主 管 单 位 山西省科学技术厅 主 办 单 位 太原消化病研治中心</p>	<p>编辑 世界华人消化杂志编辑委员会 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com</p> <p>出版 世界华人消化杂志编辑部 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com</p> <p>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>2010年版权归世界华人消化杂志所有</p>
中国标准连续出版物号 ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R	邮发代号 82-262 国外代号 M 4481	国内定价 每册56.00元 全年2016.00元 广告经营许可证 1401004000050

World Chinese Journal of Digestology

August 2010 Contents in Brief Volume 18 Number 23

EDITORIAL	2401 Diagnostic value of ultrasonography for detection of intestinal diseases <i>Huang Z, Fan YH, Lv B, Huang B</i>
BASIC RESEARCH	2405 Effects of Compound Ketamine Oral Solution on gastrointestinal motility in rats <i>Han S, Zhang J, Tang J</i> 2410 Mechanisms underlying the therapeutic effect of Huangqi Decoction against dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis in rats <i>Yan XF, Liu P, Sun MY, Wang XL</i> 2416 Regulation of side population cells by TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma cell lines SMMC-7721 and HepG2 <i>Wang B, Xia YJ, Yan W, Xia LM, Liu M, Tian DA</i>
CLINICAL RESEARCH	2422 Relationship between FAF1 mRNA expression and <i>Helicobacter pylori</i> infection in gastric cancer <i>Liu AQ, Ge LY, Luo XL, Luo Y, Lin ST</i> 2427 Significance of HDGF expression in hepatocellular carcinoma tissue and HepG2 cells <i>Zhou NX, Zhou YY, Huo JR</i>
REVIEW	2434 MicroRNAs and esophageal cancer <i>Cheng L, Ling ZQ, Mao WM</i> 2442 Regulatory role of the GH-SOCS2-IGF-1 axis in the pathogenesis of intestinal mucosal barrier dysfunction in ulcerative colitis <i>Zhang R, Shi Y, Guan X</i> 2448 Advances in understanding the relationship between aberrant methylation of EDNRB and tumors <i>Wu CQ, Tao KX</i> 2453 Surgical treatment of morbid obesity and type 2 diabetes mellitus: current situation and future prospects <i>Fu SL, Zhu HM</i>
RAPID COMMUNICATION	2460 DNA repair function of DNA polymerase β in human esophageal cancer <i>Zhao SM, Chen XD, Zhang CJ, Zhao GQ, Dong ZM</i> 2464 Effects of Xiaoshihewei Granule on gastrointestinal motility in Kunming mice <i>Chi P, Li Y, Chen SN</i> 2469 Trichostatin A increases histone H3 acetylation and promotes apoptosis in gastric cancer cell line SGC-7901 <i>Yang TS, Li YL, Zhao T</i>
CLINICAL PRACTICE	2472 Detection of differentially expressed low molecular weight serum proteins for diagnosis and staging of esophageal cancer <i>Ren XJ, Tan XL, Yang CH, Li XQ, Feng F, Hu QY, Ding YH, Dai TY, Wang KZ</i> 2478 Clinical significance of P27 and PCNA expression in hilar cholangiocarcinoma <i>Li Z, Zhou NX, Zhang DL, Lv YL</i>

	<p>2483 Clinical significance of serum chemerin levels in patients with Crohn's disease <i>Gu W, Pang Z, Huangfu Z, Hua J, Zhou CL, Shen BW</i></p> <p>2487 Diagnostic value of intraoperative endoscopic examination in patients with intestinal lymphangiectasia: an analysis of 6 cases <i>Jiang GJ, Lin XC, Lin W, Shen WB, Geng WD, Chang H, Qi R</i></p> <p>2491 Evaluation of long-term bowel function in patients with Hirschsprung's disease after different radical operations <i>Gao MT, Liu DR, Chen J, Zhao CJ, Sun XQ, Li L, Jin SG, Qiang JH, Lei JQ, Zhou YN, Zhao YY</i></p> <p>2496 Efficacy of sequential therapy in patients who failed <i>Helicobacter pylori</i> eradication treatment <i>Yang JL, Zhao QX</i></p>
CASE REPORT	<p>2500 Primary malignant mesothelioma of the greater omentum: a case report and literature review <i>He SP, Sun PL, Zhang ZH, Jin SX, Chen T, Hua YB, Huang M</i></p>
APPENDIX	<p>2504 Instructions to authors of World Chinese Journal of Digestology</p> <p>2509 Meeting events calendar in 2010</p>
ACKNOWLEDGMENT	<p>2510 Acknowledgments to reviewers of World Chinese Journal of Digestology</p>
COVER	<p>Fu JL, Wang ZH, Li GZ, Wang YR, Liu P. Decreased IgA+ plasma cells and IgA expression in acute liver necrosis mice. <i>World J Gastroenterol</i> 2010; 16(30): 3827-3833 http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v16/i30/3827.htm</p>
RESPONSIBLE EDITORS FOR THIS ISSUE	<p>Assistant Editor: <i>Xiao-Fang Liu</i> Review Editor: <i>Jun-Liang Li</i> Electronic Page Editor: <i>Peng-Zhen Wu</i> English Language Editor: <i>Tian-Qi Wang</i> Editor-in-Charge: <i>Jun-Liang Li</i> Layout Editor: <i>Lian-Sheng Ma</i></p>

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 August 18, 2010

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 CN 14-1260/R

COPYRIGHT

© 2010 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 © 2010 by Editorial Department of *World Chinese Journal of Digestology*

超声在肠道疾病诊断中的应用价值

黄争, 范一宏, 吕宾, 黄斌

黄争, 范一宏, 吕宾, 黄斌, 浙江省中医院消化科 浙江省杭州市 310006

吕宾, 教授, 主要从事消化系统疾病方面的研究。

作者贡献分布: 本文综述由黄争完成; 范一宏、吕宾及黄斌审校。

通讯作者: 范一宏, 副教授, 副主任医师, 310006, 浙江省杭州市, 浙江省中医院消化科. yhfansjr@yahoo.com.cn

收稿日期: 2010-04-28 修回日期: 2010-07-10

接受日期: 2010-07-21 在线出版日期: 2010-08-18

Diagnostic value of ultrasonography for detection of intestinal diseases

Zheng Huang, Yi-Hong Fan, Bin Lv, Bin Huang

Zheng Huang, Yi-Hong Fan, Bin Lv, Bin Huang, Department of Gastroenterology, Zhejiang Traditional Chinese Medicine Hospital, Hangzhou 310006, Zhejiang Province, China

Correspondence to: Associate Professor Yi-Hong Fan, Department of Gastroenterology, Zhejiang Traditional Chinese Medicine Hospital, Hangzhou 310006, Zhejiang Province, China. yhfansjr@yahoo.com.cn

Received: 2010-04-28 Revised: 2010-07-10

Accepted: 2010-07-21 Published online: 2010-08-18

Abstract

When ultrasonography was initially introduced into clinical practice, its use for detection of intestinal diseases was greatly restricted due to the problem that ultrasound imaging is greatly affected by gas. However, with the development of ultrasound technology, ultrasonography has been applied widely to the detection of intestinal diseases in recent years. In this article, we will review the application value of different ultrasound methods in the diagnosis of intestinal eminence diseases, mesenteric ischemic diseases, intestinal acute abdomen, and intestinal motility disorders. Furthermore, we will discuss the disadvantages of ultrasonography in diagnosis of intestinal diseases to provide a reference for clinicians.

Key Words: Ultrasonography; Intestine; Auxiliary examination

Huang Z, Fan YH, Lv B, Huang B. Diagnostic value of ultrasonography for detection of intestinal diseases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(23): 2401-2404

摘要

超声检查问世之初, 由于超声成像易受气体的影响, 使其在肠道疾病检查中的应用受到了极大的限制。但是随着超声检查技术的进步, 各种超声检查在肠道疾病诊断中的应用越来越广泛。本文主要介绍近年来不同超声检查技术在肠道隆起性病变、肠壁病变、肠系膜缺血性病变、肠道急腹症及肠道动力异常中的应用价值, 同时客观评价超声在肠道疾病诊治中存在的不足, 为超声检查的临床应用提供参考。

关键词: 超声检查技术; 肠道; 辅助检查

黄争, 范一宏, 吕宾, 黄斌. 超声在肠道疾病诊断中的应用价值. *世界华人消化杂志* 2010; 18(23): 2401-2404

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2401.asp>

0 引言

目前对肠道病变检测多采用肠镜、X线钡餐、放射性核素、选择性血管造影、CT等方式。然而, 这些检测方法都不同程度地受到价格和安全性的影响而使大部分患者难以接受。寻找一种简便、安全的检测方法非常重要。20世纪70年代诊断用超声检查问世之初, 主要用于肝、胆、胰、脾、肾等实质性脏器的检查。超声显像易受气体干扰, 肠道属空腔器官, 内有气体, 从而使其在肠道病变检查中的应用受到了限制。但是, 随着消泡剂、超声造影剂、超声成像技术和探头设计的进步, 超声检查在肠道病变诊断中的应用也越来越广泛, 并且体现了巨大的价值。本文对目前超声检查在肠道疾病诊断、治疗中的应用及其存在的不足作一概述。

1 超声在检测肠道隆起性病变中的应用

肠道隆起性病变的发病率居高不下, 包括上皮病变、上皮内病变及腔外压迫。胃、肠镜检查能发现消化道隆起性病变, 但仅能对部分隆起性病变作出明确诊断, 对于上皮内和胃肠道腔外压迫所引起的隆起性病变诊断困难。寻找简便、经济的检查方法对患者很重要。Fukumoto等^[1]以胶囊内镜或双气囊小肠镜为对照, 研究

■背景资料

目前, 超声检查技术在肠道疾病的诊治中尚未得到合理应用, 国外多项研究成果显示超声检查技术在肠道疾病的诊治中有巨大的应用价值, 值得学习。

■同行评议者

周国雄, 主任医师, 南通大学附属医院消化内科

■相关报道

Pascu等通过研究发现利用超声检测判断炎症性肠病活动性的准确率达89%,通过核磁共振检查的准确率为73%。

经腹超声检测小肠肿瘤的准确性。结果发现,经腹超声检测小肠肿瘤特异性可达到98.6%,对>2 cm的肿瘤的检出率达9.5%。自1980年应用以来,超声内镜(endoscopic ultrasonography, EUS)为内镜下诊治开辟了一个全新的领域。EUS不仅能清楚显示胃肠道隆起病变的起源层次和回声特点,而且还能显示肿物的边界、大小、包膜、有无浸润征象,对了解病变的起源、性质、分期,鉴别良恶性,正确区分胃肠道腔内病变和胃肠道腔外压迫性隆起都有重要临床价值。Uradomo等^[12]研究证实EUS可对阑尾部位的病变性质进行正确鉴别,包括黏液囊肿、异位阑尾、胃肠道间质瘤、脂肪瘤等。对于肠道肿瘤EUS可进行术前分期诊断,为治疗方案的抉择和预后的判断提供有价值的信息。EUS还可鉴别肠道其他良性疾病、预测病情发展程度、评价治疗效果、监测术后复发,在其引导下可对原发肿瘤或肿大淋巴结进行活检。Lok等^[13]通过EUS下小肠肿瘤的大小、形态、是否囊性变、回声是否均匀判断肿瘤潜在的危险性,并对47位小肠肿瘤小于3 cm的、形态规则、回声均匀的患者进行平均约17.3 mo的随访,发现仅3例有肿瘤增大。提示超声可为肠道肿瘤良恶性的判断提供可靠的线索。对于胃肠道息肉特别是宽蒂息肉, EUS可以显示息肉根部或蒂部有无较粗的管状无回声结构(息肉滋养血管),从而正确评估内镜手术风险,设计更详细合理的手术方式。彩色多普勒超声可显示肿瘤的血供情况。二维超声联合彩超检查对评价肿瘤的良恶性、是否需要手术、何时手术有很高的参考价值。国内陈丽萍等^[14]报道腹部二维超声联合彩色多普勒超声对小肠平滑肌瘤的诊断率可达94.1%。

2 超声在检测肠壁病变中的应用

多种肠道疾病如炎症性肠病、结核、感染等均可引起肠壁的病变。超声检查对肠壁病变的病因学诊断有一定参考价值,且为非侵入性、操作方便,其在肠壁病变相关疾病诊断中的应用也越来越广泛,尤其是在炎症性肠病的诊断中,与X线钡餐相比显示了巨大的应用前景^[5]。Bremner等^[6]通过研究认为超声在诊断小肠克罗恩病上与X线钡剂灌肠相比可得到88%的阳性预计值。Pascu等^[7]通过研究发现利用超声检测判断炎症性肠病活动性的准确率达89%,通过核磁共振检查的准确率为73%。提示我们对于不愿接受肠镜检查的患者,腹部超声监测辅助诊

断炎症性肠病可作为首选的检查方法。Barreiros等^[8]通过腹部超声对7例肠结核患者的研究发现,存在以下不同程度的病变:肠系膜不对称增厚(100%)、肠内脓肿(86%)、瘘管(43%)、肠系膜淋巴结增大、回声不均及局限的低回声点(86%)、腹水(29%)、脾肿大(14%)。提示回盲部肠系膜增厚伴壁内脓肿或淋巴结增多高度提示肠结核。超声不但可发现肠道的形态改变和生理功能的异常,体外高频超声还可检测典型的病理组织改变。Nylund等^[9]将手术切除的克罗恩病患者的肠道组织改变与其相应的超声变化检测结果进行了比较,发现黏膜下层轻中度纤维化体外高频超声表现为高回声区伴散在的低回声点,黏膜下层重度纤维化表现为高回声区伴片状的低回声区,肌层的轻中度纤维化表现为低回声层伴散在的高回声点,肌层的重度纤维化表现为低回声层伴片状的高回声区域。可见超声检查可为肠壁病变的诊断提供重要的参考价值。

3 超声在肠系膜缺血性病变中的应用

随着人口老龄化及心血管患者的增加,急性肠系膜缺血的发病率也在增加。其目前诊断的金标准为动脉造影,但造影剂存在潜在的肾毒性。彩色多普勒超声检查肠系膜缺血特异性强,可以作为疑似患者的首选检查,并且图像表现可为是否需要手术治疗提供参考。有研究结果显示,在肠系膜动脉急性缺血,彩超下出现肠道蠕动停止、肠壁变薄、肠祥积液时常需要手术,一旦出现肠壁层次不清、肠壁蠕动停止,无论是肠系膜动脉还是静脉缺血均需手术^[10]。彩超可显示肠壁血管密度,研究认为彩超检查肠壁血管密度增加通常提示肠壁存在炎症反应^[11]。对于肠旋转不良患者,通过彩色多普勒超声检查是否存在肠管和肠系膜的血供异常,可作为患者是否需要手术的有效筛查方法。无肠管和肠系膜的血供异常可不行手术处理^[12]。

4 肠道急腹症的超声检查价值

肠道急腹症是一类以急性腹痛为突出表现,需要早期诊断和及时处理的腹部疾病。其特点是发病急、进展快、变化多、病情重,一旦诊断延误,治疗方针不当,将会给患者带来严重危害甚至死亡。以往临床诊断很困难,现在B超和彩超的普及为大多数急腹症,尤其是肠套叠、阑尾炎等常见肠道急腹症的诊断和鉴别诊断提供了可

■创新盘点

国内对超声技术在胃肠疾病中的应用价值尚无系统综述报道,而本文结合国内外最新研究成果,系统阐述超声技术在肠道疾病诊治中的应用价值,为超声检查技术的进一步应用提供参考。

靠的依据. 国外研究认为: 与X线、CT、核磁共振相比, 超声诊断肠套叠为较好的检查方法^[13]. 国内亦报道高频彩色多普勒超声显像对小儿肠套叠的诊断率可达97.9%^[14]. 阑尾炎超声图像下特点为: 单纯性阑尾炎主要是阑尾肿大, 直径>7 mm, 阑尾壁肿胀、增厚, 阑尾壁厚>2.5 mm、化脓性阑尾炎阑尾肿大更明显, 黏膜毛糙, 阑尾腔内有较多液性暗区、坏疽性阑尾炎, 阑尾轮廓不清, 阑尾轻度肿大, 壁层次不清, 阑尾腔内有液性暗区^[15]. Je等^[16]对160例疑似阑尾炎的儿童进行阑尾超声检查, 指标包括: 最大的阑尾直径(maximal-outer-diameter, MOD)和最大的阑尾壁厚度(maximal-mural-thickness, MMT). 并根据最终的治疗方法将其分为手术与非手术组. 结果发现两组的MOD、MMT中位值之间其存在显著差异, 认为最合适的诊断阑尾炎的MOD和MTT值为: MOD>0.57 cm与MTT>0.22 cm.

5 肠道动力异常的超声检查价值

超声检查不干扰肠道的正常动力状态, 并且能在生理状态下评价肠动力, 近年来已被用于研究胃肠道的动力异常. 有研究通过超声观察肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)患者乙状结肠分节运动的频率和推进运动的幅度, 结果发现便秘型IBS分节运动频率减小, 腹泻型IBS推进运动幅度增大, 为IBS的发病机制研究提供线索^[17]. Arslan等^[18]使用高频超声检测十二指肠, 以研究在过敏性刺激时, 肠壁的结构和动力. 发现部分患者中, 在刺激之后, 可观察到黏膜增厚、肠壁层次数量的改变和十二指肠持续的收缩. 他推测黏膜增厚可能为刺激所导致的黏膜水肿所致, 肠壁层次数量增加可能是过敏反应使黏膜肌层增厚, 形成一个新的产生回声的界面之故. 这为过敏所致肠道功能异常的机制研究提供了线索. 对儿童便秘患者, 通过超声检查估算结直肠的直径长度, 从而间接反映肠道的传导功能, 作为便秘严重程度的参考标准, 并可进行病因学分析^[19,20]. 估计肠内粪便量与判断便秘的严重程度、指导治疗密切相关. 有学者通过研究发现, 临床触诊所估计粪便量与超声检测到的粪便量比较有显著意义, 与超声相比, 临床触诊判断低估了31%患者体内的粪便量^[21].

6 结论

超声检查无创伤和辐射, 可实时观察, 作为肠道病变的辅助检查, 不但可以减少一些不需要的损伤性检查, 减轻对患者身体的损伤, 还可以减

少我们有限的医疗资源的利用. 但是, 我们也要清楚地认识到, 目前超声检查还存一定的不足. 一方面, 消化道超声造影法虽然有口服脱水剂法、灌注法、消化道复合声学影法等, 但显像效果仍然欠理想, 且检查前患者需要做肠道清洁、检查时需要一次性饮入大量液体、检查时间长, 给患者带来了不便; 另一方面, 超声检查结果受操作者主观影响很大, 对操作者技术要求高, 且目前超声对肠道病变的检查结果尚缺少统一的检查参数可循. 如何提高超声肠道显像的质量、建立统一的检测参数, 将超声检查广泛应用于肠道病变的检查中, 为患者谋福利, 需要医务人员的继续努力.

7 参考文献

- 1 Fukumoto A, Tanaka S, Imagawa H, Shishido T, Oka S, Yoshida S, Yamada H, Chayama K. Usefulness and limitations of transabdominal ultrasonography for detecting small-bowel tumors. *Scand J Gastroenterol* 2009; 44: 332-338
- 2 Uradomo LT, Darwin PE. Evaluation of subepithelial abnormalities of the appendix by endoscopic ultrasound. *Diagn Ther Endosc* 2009; 2009: 295379
- 3 Lok KH, Lai L, Yiu HL, Szeto ML, Leung SK. Endosonographic surveillance of small gastrointestinal tumors originating from muscularis propria. *J Gastrointest Liver Dis* 2009; 18: 177-180
- 4 陈丽萍, 姚运明, 王小丛, 迟宝荣. 超声对小肠平滑肌肉瘤的诊断价值. *中国全科医学* 2007; 10: 578-579
- 5 Parente F, Maconi G, Bollani S, Anderloni A, Sampietro G, Cristaldi M, Franceschelli N, Bianco R, Taschieri AM, Bianchi Porro G. Bowel ultrasound in assessment of Crohn's disease and detection of related small bowel strictures: a prospective comparative study versus x ray and intraoperative findings. *Gut* 2002; 50: 490-495
- 6 Bremner AR, Pridgeon J, Fairhurst J, Beattie RM. Ultrasound scanning may reduce the need for barium radiology in the assessment of small-bowel Crohn's disease. *Acta Paediatr* 2004; 93: 479-481
- 7 Pascu M, Roznowski AB, Müller HP, Adler A, Wiedenmann B, Dignass AU. Clinical relevance of transabdominal ultrasonography and magnetic resonance imaging in patients with inflammatory bowel disease of the terminal ileum and large bowel. *Inflamm Bowel Dis* 2004; 10: 373-382
- 8 Barreiros AP, Braden B, Schieferstein-Knauer C, Ignee A, Dietrich CF. Characteristics of intestinal tuberculosis in ultrasonographic techniques. *Scand J Gastroenterol* 2008; 43: 1224-1231
- 9 Nylund K, Leh S, Immervoll H, Matre K, Skarstein A, Hausken T, Gilja OH, Birger Nesje L, Ødegaard S. Crohn's disease: Comparison of in vitro ultrasonographic images and histology. *Scand J Gastroenterol* 2008; 43: 719-726
- 10 Danse EM, Kartheuser A, Paterson HM, Laterre PF. Color Doppler sonography of small bowel wall changes in 21 consecutive cases of acute mesenteric ischemia. *JBR-BTR* 2009; 92: 202-206
- 11 Spalinger J, Patriquin H, Miron MC, Marx G, Herzog D, Dubois J, Dubinsky M, Seidman EG. Doppler US in patients with crohn disease: vessel

■应用要点

超声检查技术无创伤、辐射、可实时观察, 作为肠道病变的辅助检查, 可减少一些不需要的损伤性检查, 还可节约有限的医疗资源, 相信随着超声检查技术的进一步改进, 其在肠道疾病诊治中的应用会越来越广泛.

■同行评价

本文内容丰富, 实用性较强, 有较好的临床参考价值.

- density in the diseased bowel reflects disease activity. *Radiology* 2000; 217: 787-791
- 12 Orzech N, Navarro OM, Langer JC. Is ultrasonography a good screening test for intestinal malrotation? *J Pediatr Surg* 2006; 41: 1005-1009
- 13 Cerro P, Magrini L, Porcari P, De Angelis O. Sonographic diagnosis of intussusceptions in adults. *Abdom Imaging* 2000; 25: 45-47
- 14 袁惠, 牛锦东. 高频彩色多普勒超声显像对小儿肠套叠的诊断价值. *云南医药* 2009; 30: 67
- 15 何钊群, 赵亚平, 江湛. 超声显像在小儿急腹症诊断中的应用. *中华医学杂志* 2005; 29: 26
- 16 Je BK, Kim SB, Lee SH, Lee KY, Cha SH. Diagnostic value of maximal-outer-diameter and maximal-mural-thickness in use of ultrasound for acute appendicitis in children. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 2900-2903
- 17 Kusunoki H, Kamada T, Sato M, Haruma K, Hata J. [Ultrasonographic assessment of sigmoid colon in patients with irritable bowel syndrome] *Nippon Rinsho* 2006; 64: 1461-1466
- 18 Arslan G, Ødegaard S, Elsayed S, Florvaag E, Berstad A. Food allergy and intolerance: response to intestinal provocation monitored by endosonography. *Eur J Ultrasound* 2002; 15: 29-36
- 19 Klijn AJ, Asselman M, Vijverberg MA, Dik P, de Jong TP. The diameter of the rectum on ultrasonography as a diagnostic tool for constipation in children with dysfunctional voiding. *J Urol* 2004; 172: 1986-1988
- 20 Singh SJ, Gibbons NJ, Vincent MV, Sithole J, Nwokoma NJ, Alagarswami KV. Use of pelvic ultrasound in the diagnosis of megarectum in children with constipation. *J Pediatr Surg* 2005; 40: 1941-1944
- 21 Lakshminarayanan B, Kufeji D, Clayden G. A new ultrasound scoring system for assessing the severity of constipation in children. *Pediatr Surg Int* 2008; 24: 1379-1384

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

WJC, WJGE, WJGO, WJGS, WJH, WJR 6本期刊被 PMC 收录

本刊讯 我们于2010-08-17收到PubMed Central的通知, 经过美国国立医学图书馆机构咨询委员会The Literature Selection Technical Review Committee评定, 决定*WJC, WJGE, WJGO, WJGS, WJH, WJR* 6本期刊被PubMed Central(PMC)收录. PMC是一个提供生命科学期刊文献的全文数据库, 他是由隶属美国国立医学图书馆(National Library of Medicine)的国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information)所创建与管理的. (常务副总编辑: 张海宁2010-08-17)

复方氯胺酮口服液对胃肠动力的影响

韩盛, 张锦, 汤隽

韩盛, 张锦, 中国医科大学附属盛京医院麻醉科 辽宁省沈阳市 110004

汤隽, 中国医科大学附属盛京医院外科 辽宁省沈阳市 110004
韩盛, 主治医师, 主要从事小儿术前用药的临床和基础研究.

辽宁省自然科学基金资助项目, No. 20062085

辽宁省教委基金资助项目, No. 05L461

作者贡献分布: 此论文由韩盛与张锦共同设计; 研究过程由韩盛操作完成; 数据处理由韩盛与汤隽共同完成; 论文撰写由韩盛完成; 审核和修改由张锦与汤隽完成.

通讯作者: 张锦, 教授, 博士生导师, 110004, 辽宁省沈阳市和平区三好街36号, 中国医科大学附属盛京医院麻醉科.

jinzhang_cmu2h@yahoo.com.cn

电话: 024-96615-68722

收稿日期: 2010-02-19 修回日期: 2010-06-09

接受日期: 2010-06-22 在线出版日期: 2010-08-18

Effects of Compound Ketamine Oral Solution on gastrointestinal motility in rats

Sheng Han, Jin Zhang, Jun Tang

Sheng Han, Jin Zhang, Department of Anesthesiology, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China

Jun Tang, Department of General Surgery, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China

Supported by: the Natural Science Foundation of Liaoning Province, No.20062085; and the Foundation of Liaoning Provincial Education Committee, No. 05L461

Correspondence to: Professor Jin Zhang, Department of Anesthesiology, Shengjing Hospital of China Medical University, 36 Sanhao Avenue, Heping District, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. jinzhang_cmu2h@yahoo.com.cn

Received: 2010-02-19 Revised: 2010-06-09

Accepted: 2010-06-22 Published online: 2010-08-18

Abstract

AIM: To investigate the effects of Compound Ketamine Oral Solution (CKOS) on gastric emptying rate, intestinal transit rate, and plasma motilin levels in rats and to evaluate the safety of application of CKOS to clinical practice.

METHODS: One hundred and twenty-five Wistar rats were randomly divided into five groups (25 rats each): control group (intragastrically given 1 mL distilled water), sauce group (intragastrically given 1 mL sauce solution), midazolam (MID) group (intragastrically given 1 mL MID solution, 10 mg/kg), ketamine (KET) group (intragastrically given 1 mL KET solution, 100

mg/kg), and CKOS group (intragastrically given 1 mL CKOS). These groups were further divided into five subgroups (five rats each) for testing at different time points. After gastric administration, each rat was intragastrically given 1 mL of 0.2% phenolphthalein. Blood samples were taken at 0, 30, 60, 120 and 360 min to measure plasma motilin levels. The stomach and small intestine of the rats in the 30-min subgroup were removed to measure the rates of gastric emptying and intestinal transit, respectively.

RESULTS: In the control group, the motilin levels at 30 and 60 min were significantly higher than that at baseline ($219.6 \text{ ng/L} \pm 13.05 \text{ ng/L}$ and $235.4 \text{ ng/L} \pm 22.43 \text{ ng/L}$ vs $178.3 \text{ ng/L} \pm 15.32 \text{ ng/L}$, both $P < 0.01$). In the sauce group, the motilin levels at 30 and 60 min were significantly higher than that at baseline and those at corresponding time points in the control group (all $P < 0.01$). The motilin levels at 30 and 60 min in the KET, MID and CKOS groups were lower than those in the control group at corresponding time points (all $P < 0.01$ or 0.05). There were no differences in the motilin levels among the KET, MID and CKOS groups. The rates of gastric emptying and intestinal transit were significantly higher in the sauce group than in the control group (both $P < 0.01$). The rates of gastric emptying at 30 min in the KET, MID and CKOS groups were significantly lower than that in the control group (all $P < 0.01$ or 0.05). The rate of intestinal transit in the KET group was lower than that in the control group ($P < 0.01$).

CONCLUSION: CKOS can slow down gastric emptying in rats. KET and MID can inhibit excretion of motilin.

Key Words: Child; Premedication; Compound Ketamine Oral Solution; Motilin; Gastric emptying; Intestinal transit

Han S, Zhang J, Tang J. Effects of Compound Ketamine Oral Solution on gastrointestinal motility in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(23): 2405-2409

摘要

目的: 观察复方氯胺酮口服液(CKOS)对大鼠

■背景资料

目前小儿麻醉前用药一直没有成熟的剂型, 而且口服用药溶液量较大. 复方氯胺酮口服液具有用药容量少, 口味易被患儿接受, 镇静效果满意等特点. 在临床应用上也有较高的安全性.

■同行评议者

李勇, 副教授, 上海中医药大学附属市中医院消化科

■ 研发前沿

许多研究表明:小儿麻醉前用药采用口服的方式较易被患儿及其家属接受,也能达到理想的镇静效果.但其是否增加反流误吸的危险目前还不清楚.这个问题限制了这种方式在临床上的广泛应用.术前口服药对胃肠动力的影响需要进行深入研究.

胃排空、肠转运速度、胃动素水平的影响,进一步评价其临床应用的安全性.

方法:选Wister大鼠125只,随机分成5组,每组25只,每组又分成5个时点,每个时点5只.对照组(C组):蒸馏水1 mL灌胃;调味剂组:调味剂溶液(含清甜素、巧克力香精、除苦剂)1 mL灌胃;咪达唑仑组(MID组):咪达唑仑溶液1 mL灌胃,剂量为10 mg/kg;氯胺酮组(KET组):氯胺酮溶液1 mL灌胃,剂量为100 mg/kg;CKOS组:CKOS溶液(含氯胺酮剂量为100 mg/kg、咪达唑仑剂量为10 mg/kg加调味剂等)1 mL灌胃.立刻用0.2%酚红1 mL灌胃.分别于0、30、60、120、360 min 5个时点断头取血2 mL,检测血浆胃动素.将30 min时点对应的大鼠取出胃肠,观察色素在小肠移行速度,用分光光度计检测胃内色素残留率.

结果:C组30、60 min胃动素水平分别为219.6 ng/L \pm 13.05 ng/L、235.4 ng/L \pm 22.43 ng/L较0点水平178.3 ng/L \pm 15.32 ng/L有显著的升高(均 $P<0.01$),T组30、60 min胃动素较0点也有明显升高(均 $P<0.01$),且与C组对应时点相比,也有显著差异(均 $P<0.01$),表明调味剂能促进胃动素的分泌.KET组、MID组、CKOS组30、60 min胃动素水平都低于C组对应时点(均 $P<0.05$ 或 0.01).T组30 min胃残留率为30.29% \pm 7.42%比C组30 min残留率(46.07% \pm 6.01%)显著减少($P<0.01$),T组小肠推进比显著大于C组($P<0.01$).KET组、MID组和CKOS组的30 min胃残留率显著大于C组($P<0.05$ 或 0.01).KET组小肠推进比显著小于C组($P<0.01$).

结论:CKOS口服减慢大鼠胃液体排空速度;CKOS对胃动素分泌有一定的抑制作用.

关键词:小儿;麻醉前用药;复方氯胺酮口服液;胃动素;胃排空;小肠转运

韩盛, 张锦, 汤隽. 复方氯胺酮口服液对胃肠动力的影响. 世界华人消化杂志 2010; 18(23): 2405-2409
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2405.asp>

0 引言

目前临床常用的麻醉前给药方法是经直肠、经鼻、肌注途径给药,不仅小儿不易接受,且造成术前恐惧,影响术后小儿的身心健康.口服给药是一个比较方便易行、小儿较易接受的用药途径^[1,2].复方氯胺酮口服液(Compound Ketamine Oral Solution, CKOS)是我们与药科大学合作共

同研制的麻醉前口服药剂型.在前期临床应用中发现其镇静效果满意率可达到90%以上^[3].虽尚未发现反流误吸的病例,但该药是否增加反流误吸的危险还不清楚.任何降低食管下端括约肌张力,减慢胃排空和肠转运速度,增加胃酸分泌的因素都会增加反流误吸的危险.研究表明胃动素(motilin, MTL)可以增强胃动力^[4].CKOS对MTL的影响还不清楚.本研究通过动物实验观察CKOS对大鼠胃排空、肠转运速度、MTL水平的影响,探讨其对胃肠动力的影响.

1 材料和方法

1.1 材料 Wister大鼠125只,♂,体质量200 g \pm 25 g,中国医学院大学实验动物中提供,实验前大鼠禁食12 h,禁水2 h.酚红、NaOH(沈阳化学制剂公司购置)、复方氯胺酮口服液(沈阳药科大学配制)、752型分光光度计(上海光谱仪器有限公司生产)、MTL放免试剂盒(解放军总医院东亚放免研究所)、氯胺酮(华北制药,批号:20040217)、咪达唑仑(徐州恩华药业公司,批号:B1153).

1.2 方法

1.2.1 分组:Wister大鼠125只,随机分成5组,每组25只,每组又分成5个时点,每个时点5只(各组各时点大鼠体质量无统计学差异).C(Control,对照)组:蒸馏水1 mL灌胃;T组(调味剂组):调味剂溶液1 mL灌胃,含清甜素,巧克力香精,除苦剂;MID(Midazolam,咪达唑仑)组:MID溶液1 mL灌胃,剂量为10 mg/kg;KET(Ketamine,氯胺酮)组:KET溶液1 mL灌胃,剂量为100 mg/kg;CKOS组:CKOS溶液(含KET剂量为100 mg/kg、MID剂量为10 mg/kg加调味剂等)1 mL灌胃.

1.2.2 步骤:每只1 mL溶液灌胃后,立刻用0.2%酚红1 mL灌胃.分别于0、30、60、120、360 min 5个时点断头取血2 mL,置于含30 μ L 10% EDTA和30 μ L抑肽酶塑料管中混匀,3 500 r/min,4 $^{\circ}$ C离心15 min,取血浆-20 $^{\circ}$ C保存.迅速将30 min时点对应的大鼠开腹取全胃肠,自幽门括约肌处取胃,沿大弯侧剪开,将胃内色素残留物充分洗于5 mL 0.1% NaOH中,3 500 r/min离心15 min,取上清滤液,以752型分光光度计,波长560 nm测吸光度.另测定1 mL 0.2%酚红加1 mL蒸馏水和5 mL 0.1% NaOH的吸光度为基础光密度.按公式(样品吸光度/基础吸光度 \times 100%)计算胃液体残留率,同时量取幽门括约肌至色素最前端及至盲肠的距离,以二者之比作为小肠推进比.血浆MTL

表 1 各组大鼠各时点胃动素的变化 (mean \pm SD, ng/L)

分组	0 min	30 min	60 min	120 min	360 min
C组	178.3 \pm 15.32	219.6 \pm 13.05 ^b	235.4 \pm 22.43 ^b	183.8 \pm 22.87	182.2 \pm 8.58
T组	179.2 \pm 17.48	252.6 \pm 21.45 ^{bd}	273.6 \pm 18.35 ^{bd}	193.4 \pm 23.25 ^a	180.6 \pm 16.01
KET组	184.8 \pm 18.27	192.2 \pm 14.20 ^d	195.8 \pm 17.63 ^d	171.8 \pm 12.83	162.8 \pm 20.25 ^{ac}
MID组	175.8 \pm 14.67	199.4 \pm 11.17 ^{ac}	211.0 \pm 17.51 ^{bc}	180.0 \pm 11.73	159.8 \pm 10.96 ^{ac}
CKOS组	180.8 \pm 9.63	185.0 \pm 10.42 ^d	190.4 \pm 12.10 ^d	177.0 \pm 11.47	168.0 \pm 13.45

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 同组0时点; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs 同时点C组.

表 2 各组大鼠30 min胃残留率、小肠推进比 (mean \pm SD, %)

分组	胃残留率	小肠推进比
C组	46.07 \pm 6.01	50.36 \pm 9.25
T组	30.29 \pm 7.42 ^b	70.31 \pm 7.52 ^b
KET组	57.40 \pm 4.68 ^b	37.82 \pm 3.83 ^b
MID组	55.37 \pm 6.14 ^a	45.31 \pm 4.93
CKOS组	58.96 \pm 4.63 ^b	42.20 \pm 6.06

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs C组.

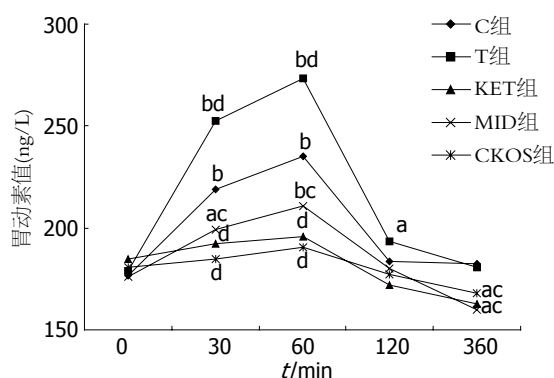


图 1 各组大鼠各时间点胃动素的变化. ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 同组0时点; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs 同时点C组.

测定采用放免法, 参照试剂盒说明进行.

统计学处理 应用SPSS10.0版本统计分析软件, 所得参数以mean \pm SD表示, 以方差分析进行统计学处理.

2 结果

2.1 各组不同时间血浆MTL水平 各组大鼠0 min MTL无统计学差异($P > 0.05$). C组和T组灌胃后MTL水平上升, 60 min后达到最高. C组30 min、60 min MTL较0 min有显著的升高($P < 0.01$), T组30、60 min MTL较0 min也有明显升高($P < 0.01$), 且与C组相同时点相比, 也有显著差异($P < 0.01$), 表明调味剂能促进MTL的分泌. KET组、CKOS组30、60 min MTL水平与0 min相比无统计学

■ 相关报道

Takefumi等给小鼠静脉注入催眠剂量的MID和生理盐水后, 发现MID能够以剂量相关的方式抑制胃排空和肠转运速度.

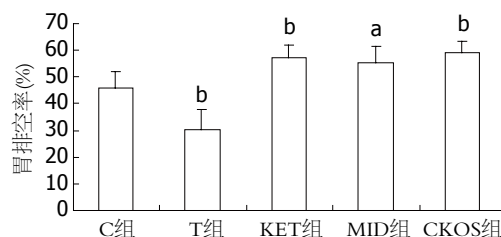


图 2 各组大鼠30 min胃残留率. ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs C组.

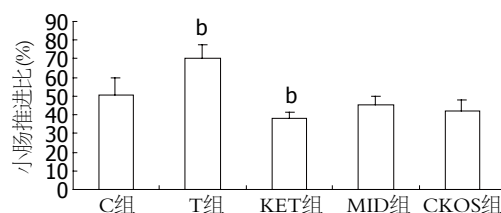


图 3 各组大鼠小肠推进比. ^b $P < 0.01$ vs C组.

差异($P > 0.05$), MID组30、60 min MTL水平高于0 min($P < 0.05$ 或 < 0.01), KET组、MID组、CKOS组30、60 min MTL水平都低于C组相同时点($P < 0.01$ 或 < 0.05), 并显著低于T组相同时点($P < 0.01$), KET组、MID组、CKOS组3组之间无统计学差异($P > 0.05$). 360 min KET组和MID组的MTL水平低于组内0 min, 也低于C组($P < 0.05$, 表1, 图1).

2.2 胃内色素残留率和小肠推进比 T组30 min胃残留率比C组显著减少($P < 0.01$), T组小肠推进比显著大于C组($P < 0.01$). KET组、MID组和CKOS组的30 min胃残留率显著大于C组($P < 0.01$ 或 < 0.05). KET组小肠推进比显著小于C组($P < 0.01$), MID组和CKOS组小肠推进比也小于C组, 但没有统计学差异($P > 0.05$, 表2, 图2, 3).

3 讨论

小儿术前哭闹不合作一直是临床尚未解决的一大难题. 在前期研究中通过动物实验和临床研究已经证实了CKOS口服用药起效快、镇静

■创新盘点

本研究观察了口服CKOS对大鼠胃肠动力的影响,发现KET、MID单独或联合口服会减慢胃液体排空和肠转运速度。

效果确切,患儿及其家属易于接受^[3],并通过动物实验证明对大鼠重要脏器有保护作用^[5,6],对胃黏膜无明显刺激性^[7]。CKOS使小儿术前合作程度增加、哭闹大大减少,但其术后恶心、呕吐,反流、窒息发生率如何尚不清楚,本研究目的是为了进一步证实该剂型对胃肠动力的影响。本研究发现KET组的30 min胃残留率、小肠推进比与C组相比,有明显的统计学差异,表明KET都能够减慢大鼠胃对液体的排空和小肠推进速度。MID组和CKOS组的30 min胃残留率与C组相比,也有明显的统计学差异,表明MID和CKOS都能够减慢大鼠胃液体的排空速度。

为了使小儿更容易接受CKOS,我们在口服液中加了赋形剂,调味剂由清甜素、巧克力香精、除苦剂和蒸馏水组成,其热卡密度和渗透压大于蒸馏水。研究结果证实调味剂组的排空速度和小肠推进速度要快于对照组。CKOS的成分由KET、MID和调味剂构成。KET、MID都能够减慢大鼠胃液体的排空速度,CKOS组与KET和MID组相比没有统计学差异,表明CKOS对胃肠动力的抑制没有随联合用药而进一步加强,这可能是KET和MID与调味剂综合作用的结果。Inada等^[8]给小鼠静脉注入催眠剂量的MID和生理盐水后,用含有荧光物质的液体灌胃,30 min后观察胃排空和肠转运情况,发现MID能够以剂量相关的方式抑制胃排空和肠转运速度。本研究的结果显示MID能够抑制胃排空,这与Inada的研究结果一致。MID组的小肠推进比为45.31%±4.93%,与C组的小肠推进比(50.36%±9.25%)相比没有统计学差异($P = 0.059$)。这一点与Inada的研究结果不一致,可能与用药剂量不同有关。

本研究结果显示KET口服能够减慢胃液体排空和肠转运速度。胃排空受年龄、容量、热卡密度和渗透压等因素影响。300 mL盐水的排空速度要大于150 mL盐水的排空速度。Grant等^[9]研究了止痛剂量的KET对成人胃动力的影响,比较KET 0.5 mg/kg肌注与生理盐水肌注后对乙酰胺基酚的吸收情况,发现两者没有差异。吸入麻醉药对胃肠动力有抑制作用。Freye等^[10]比较KET和MID联合静脉输入剂量分别为5 mg/(kg·h)、0.5 mg/(kg·h)与吸入1.5%的安氟醚对胃肠动力的影响,发现两者没有统计学差异。在前期研究中,我们发现CKOS中的KET能够抑制大鼠的脑星形细胞和胃的兴奋性受体N-甲基D-门冬氨酸受体1(N-methyl-D-aspartate receptor 1, NMDAR1)的表达,而MID能够加强抑制性受体 γ -氨基丁

酸A受体(gamma-aminobutyric acid A receptor, GABAAR)的表达^[11,12]。KET 5 mg/(kg·h)和MID 0.5 mg/(kg·h)静脉输入对胃动力抑制作用可能是分别通过抑制胃平滑肌上的NMDAR1和能够兴奋胃腺体中的GABAAR来实现的。

MTL是启动胃肠收缩活动的兴奋性脑肠肽,是增加胃肠动力的重要激素,MTL不足导致胃肠平滑肌松弛、胃张力及蠕动减弱、胃排空时间延长、胃液潴留增加^[13]。本研究结果显示KET组、MID组、CKOS组在30 min和60 min的MTL水平都低于C组和T组,由此可以推断KET、MID、CKOS对灌胃后MTL分泌增加反应的抑制,是他们减慢胃排空和肠转运速度的原因之一。

麻醉用药异丙酚具有显著的镇吐作用。有文章报道异丙酚降低血浆MTL水平,异丙酚的镇吐作用可能与降低血浆MTL水平有关^[14]。CKOS组的MTL水平没有大幅度上升,不会导致因MTL水平过高而引起的恶心和呕吐。在许多临床研究中,经常采用KET和MID单独或联合混以较大容量的甜饮料术前口服。本研究表明KET、MID单独或联合口服会减慢胃液体排空和肠转运速度,如术前口服液体量较大,会增加胃储留,增加反流误吸的危险。CKOS口服减慢大鼠胃液体排空速度。但在临床应用时,30 kg以下的小儿口服容量小于7.5 mL,由于容量较小,降低了反流误吸的危险。CKOS临床应用是安全可行的。

4 参考文献

- 1 苏岚. 小儿口服麻醉前用药. 国外医学·麻醉学与复苏分册 2001; 22: 207-208
- 2 张莉, 张锦, 任素杰, 欧阳茹莉, 张红. 手术前后小儿及家长心理调查分析及麻醉前用药途径的选择. 中国医科大学学报 2003; 32: 62-64
- 3 张锦, 韩盛, 丁平田, 崔健君, 张秉钧. 复方氯胺酮口服液用于小儿术前的药效观察. 中华麻醉学杂志 2003; 23: 412-415
- 4 Tack J, Georges Brohee Prize 1994. Motilin and the enteric nervous system in the control of interdigestive and postprandial gastric motility. *Acta Gastroenterol Belg* 1995; 58: 21-30
- 5 韩盛, 张锦, 崔健君, 张秉钧, 丁平田. 口服术前药对大鼠神经行为的影响. 中华麻醉学杂志 2002; 22: 686-687
- 6 张锦, 李妍, 张福会, 丁平田, 张勇, 崔健君, 张秉钧. 不同剂量复方氯胺酮口服液对鼠重要脏器超微结构的影响. 中国医科大学学报 2003; 32: 390-393
- 7 张锦, 崔健君, 韩盛, 丁平田, 张秉钧. 小儿术前药新剂型—微量口服液对大鼠胃粘膜刺激性的研究. 中华麻醉学杂志 2002; 22: 172-175
- 8 Inada T, Asai T, Yamada M, Shingu K. Propofol and midazolam inhibit gastric emptying and gastrointestinal transit in mice. *Anesth Analg* 2004; 99:

- 1102-1106, table of contents
- 9 Grant IS, Nimmo WS, Clements JA. Lack of effect of ketamine analgesia on gastric emptying in man. *Br J Anaesth* 1981; 53: 1321-1323
- 10 Freye E, Sundermann S, Wilder-Smith OH. No inhibition of gastro-intestinal propulsion after propofol- or propofol/ketamine-N₂O/O₂ anaesthesia. A comparison of gastro-caecal transit after isoflurane anaesthesia. *Acta Anaesthesiol Scand* 1998; 42: 664-669
- 11 张锦, 韩盛, 王英. 咪达唑仑和氯胺酮口服液对鼠前脑NMDAR1和GABAAR的影响. *中国小儿急救医学* 2010; 17: 225-227
- 12 韩盛, 张锦, 汤隽. 复方氯胺酮口服液对大鼠胃NMDAR₁、GABA_AAR表达的影响. *实用药物与临床* 2010; 13: 8-11
- 13 王志刚, 刘凤林, 秦新裕. 综述胃动素受体的研究进展. *国外医学·药学分册* 2001; 28: 344-347
- 14 熊源长, 刘涛, 王英伟, 邓小明. 芬太尼和曲马多术后镇痛对血浆胃动素水平的影响. *中华麻醉学杂志* 2004; 24: 236-237

■同行评价

本研究思路较清晰, 实验设计尚合理, 统计学处理方法恰当, 具有一定的临床现实意义。

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》出版流程

本刊讯 《世界华人消化杂志》(ISSN 1009-3079, CN 14-1260/R)是一份同行评议性和开放获取(open access, OA)的旬刊, 每月8、18、28号按时出版. 具体出版流程介绍如下:

第一步 作者提交稿件: 作者在线提交稿件(<http://www.baishideng.com/wcjd/ch/index.aspx>), 提交稿件中出现问题可以发送E-mail至submission@wjgnet.com咨询, 编务将在1个工作日内回复.

第二步 审稿: 送审编辑对所有来稿进行课题查新, 并进行学术不端检测, 对不能通过预审的稿件直接退稿, 通过预审的稿件送交同行评议专家进行评议. 编辑部主任每周一组织定稿会, 评估审稿人意见, 对评审意见较高, 文章达到本刊发表要求的稿件送交总编辑签发拟接受, 对不能达到本刊发表要求的稿件退稿.

第三步 编辑、修改稿件: 科学编辑严格根据编辑规范要求编辑文章, 包括全文格式、题目、摘要、图表科学性和参考文献; 同时给出退修意见送作者修改. 作者修改稿件中遇到问题可以发送E-mail至责任科学编辑, 责任科学编辑在1个工作日内回复. 为保证文章审稿意见公平公正, 本刊对每一篇文章均增加该篇文章的同行评议者和同行评论, 同时配有背景资料、研发前沿、相关报道、创新盘点、应用要点和名词解释, 供非专业人士阅读了解该领域的最新科研成果.

第四步 录用稿件: 作者将稿件修回后, 编辑部主任组织第2次定稿会, 评估作者修回稿件质量. 对修改不合格的稿件通知作者重修或退稿, 对修改合格的稿件送总编辑终审, 合格后发正式录用通知. 稿件正式录用后, 编务通知作者缴纳出版费, 出版费缴纳后编辑部安排生产, 并挂号将缴费发票寄出.

第五步 排版制作: 电子编辑对稿件基本情况进行检查, 核对无误后, 进行稿件排版及校对、图片制作及参考文献核对. 彩色图片保证放大400%依然清晰; 中文参考文献查找全文, 核对作者、题目、期刊名、卷期及页码, 英文参考文献根据本杂志社自主研发的“参考文献检测系统”进行检测, 确保作者、题目、期刊名、卷期及页码准确无误. 排版完成后, 电子编辑进行黑马校对, 消灭错别字及语句错误.

第六步 组版: 本期责任电子编辑负责组版, 对每篇稿件图片校对及进行质量控制, 校对封面、目次、正文页码和书眉, 修改作者的意见, 电子编辑进行三校. 责任科学编辑制作整期中英文摘要, 并将英文摘要送交英文编辑进一步润色. 责任电子编辑再将整期进行二次黑马校对. 责任科学编辑审读本期的内容包括封面、目次、正文、表格和图片, 并负责核对作者、语言编辑和语言审校编辑的清样, 负责本期科学新闻稿的编辑.

第七步 印刷、发行: 编辑部主任和主编审核清样, 责任电子编辑通知胶片厂制作胶片, 责任科学编辑、电子编辑核对胶片无误送交印刷厂进行印刷. 责任电子编辑制作ASP、PDF、XML等文件. 编务配合档案管理员邮寄杂志.

第八步 入库: 责任电子编辑入库, 责任科学编辑审核, 包括原创文章、原始清样、制作文件等.

《世界华人消化杂志》从收稿到发行每一步都经过严格审查, 保证每篇文章高质量出版, 是消化病学专业人士发表学术论文首选的学术期刊之一. 为保证作者研究成果及时公布, 《世界华人消化杂志》保证每篇文章从投稿到刊出4 mo内完成. (编辑部主任: 李军亮 2010-01-18)

黄芪汤对二甲基亚硝胺诱导大鼠肝纤维化模型作用的机制

闫晓风, 刘平, 孙明瑜, 王晓玲

■背景资料

肝纤维化是各种慢性肝病发展的共同途径,也是进一步向肝硬化发展的必经之路,在一定情况下可被逆转,但若病因持续存在,肝纤维化逐渐加重,肝小叶及血管等逐渐被改建,最终发展为不可逆转的肝硬化。如何逆转肝纤维化成为当今肝病学界的热点问题。

闫晓风, 王晓玲, 上海中医药大学基础医学院生物教研室 上海市 201203

刘平, 上海中医药大学附属曙光医院肝病研究所 上海高校中医内科学E-研究院 上海市 201203

孙明瑜, 上海中医药大学附属曙光医院肝病研究所 上海市 201203

闫晓风, 医学硕士, 主要从事细胞和分子生物学研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 90409020

国家科技部973计划基金资助项目, No. 2006CB504801

上海市科委启明星计划基金资助项目, No. 08QA1406200

作者贡献分布: 此课题由闫晓风、王晓玲、孙明瑜及刘平设计; 研究过程由闫晓风完成; 研究所用试剂及分析工具由刘平提供; 数据分析由闫晓风完成; 本论文写作由闫晓风与王晓玲完成。

通讯作者: 王晓玲, 教授, 201203, 上海市浦东新区张江蔡伦路1200号, 上海中医药大学基础医学院生物教研室。

wxlzxx@sohu.com

电话: 021-51322585

收稿日期: 2010-01-07 修回日期: 2010-06-29

接受日期: 2010-07-12 在线出版日期: 2010-08-18

Mechanisms underlying the therapeutic effect of Huangqi Decoction against dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis in rats

Xiao-Feng Yan, Ping Liu, Ming-Yu Sun, Xiao-Ling Wang

Xiao-Feng Yan, Xiao-Ling Wang, Department of Biology, College of Basic Medical Sciences, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

Ping Liu, Institute for Liver Diseases, Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine; E-institute of Traditional Chinese Internal Medicine, Shanghai Municipal Education Commission, Shanghai 201203, China

Ming-Yu Sun, Institute for Liver Diseases, Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 90409020; the Major State Basic Research Development Program of China (973 Program), No. 2006CB504801; and the Shanghai Rising-Star Program, No. 08QA1406200

Correspondence to: Professor Xiao-Ling Wang, Department of Biology, College of Basic Medical Sciences, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, 1200 Cailun Road, Pudongxin District, Shanghai 201203, China. wxlzxx@sohu.com

Received: 2010-01-07 Revised: 2010-06-29

Accepted: 2010-07-12 Published online: 2010-08-18

Abstract

AIM: To investigate the mechanisms underlying the therapeutic effect of Huangqi Decoction

against dimethylnitrosamine (DMN)-induced liver fibrosis in rats.

METHODS: Liver fibrosis was induced in rats by intraperitoneal injection of DMN for 4 wk. Rats were randomly divided into two groups: normal group and model group. Fibrotic rats in the model group were further randomly divided into two subgroups: model control subgroup and Huangqi Decoction subgroup. The Huangqi Decoction subgroup was intragastrically administered Huangqi Decoction for 2 wk, while the model control subgroup was administered equal volume of saline. At the end of 2, 4 and 6 wk, hepatic tissue samples were collected to detect the protein expression of Fas, caspase-8, caspase-3, matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1) and TIMP-2 by Western blot, mRNA expression of α -SMA by real time-PCR, and MMP-2 and MMP-9 activity by gelatin enzymography.

RESULTS: Compared with the normal group, the expression levels of Fas, caspase-8, caspase-3, TIMP-1 and TIMP-2 proteins and α -SMA mRNA as well as MMP-2 and MMP-9 activity in liver tissue increased gradually in the model group and peaked at 4 wk. Compared with the model control subgroup, the expression levels of Fas, caspase-8, caspase-3, TIMP-1 and TIMP-2 proteins and α -SMA mRNA as well as MMP-2 activity at 6 wk were significantly reduced (1.05 ± 0.02 vs 1.17 ± 0.04 , 1.41 ± 0.04 vs 1.98 ± 0.06 , 0.86 ± 0.01 vs 1.19 ± 0.04 , 1.03 ± 0.03 vs 1.58 ± 0.06 , 1.16 ± 0.04 vs 1.53 ± 0.01 , 3.12 ± 0.47 vs 8.48 ± 0.45 and 2.15 ± 0.03 vs 2.33 ± 0.05 , respectively; all $P < 0.05$ or 0.01), and MMP-9 protein expression and activity were significantly increased (1.21 ± 0.00 vs 1.12 ± 0.01 and 1.25 ± 0.07 vs 1.10 ± 0.04 , respectively; both $P < 0.05$ or 0.01) in liver tissue in the Huangqi Decoction subgroup.

CONCLUSION: Huangqi Decoction exerts significant anti-fibrotic effects perhaps by inhibiting hepatic cell apoptosis and hepatic stellate cell (HSC) activation, modulating the MMPs/TIMPs system, and promoting extracellular matrix (ECM) degradation.

■同行评议者

朱传武, 主任医师, 江苏省苏州市第五人民医院传染科; 姚登福, 教授, 南通大学附属医院分子医学中心

Key Words: Huangqi Decoction; Liver fibrosis; Apoptosis, Hepatic stellate cell activation; Tissue inhibitor of metalloproteinases

Yan XF, Liu P, Sun MY, Wang XL. Mechanisms underlying the therapeutic effect of Huangqi Decoction against dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(23): 2410-2415

摘要

目的: 探讨黄芪汤逆转二甲基亚硝胺(dimethylnitrosamine, DMN)诱导的大鼠肝纤维化的作用机制。

方法: 采用DMN诱导大鼠肝纤维化, 造模4 wk, 随机分为正常组, 2 wk模型组, 4 wk模型组。造模结束后, 将模型组随机分为模型对照组, 黄芪汤组。黄芪汤组于第5周起灌胃, 模型对照组以同体积生理盐水灌胃。2 wk、4 wk、6 wk末分别收集大鼠肝组织, 免疫印迹法检测Fas、caspase-8、caspase-3、MMP-9、TIMP-1、TIMP-2蛋白表达; 实时定量PCR法检测 α -SMA mRNA表达; 明胶酶图法检测肝组织MMP-2和MMP-9的活性。

结果: 与正常组相比, 模型组Fas、caspase-8、caspase-3、MMP-9、TIMP-1、TIMP-2蛋白表达量、 α -SMA mRNA表达量、MMP-2活性和MMP-9活性均于造模后逐渐升高, 4 wk时达到高峰。与6 wk模型对照组相比, 黄芪汤组Fas、caspase-8、caspase-3、TIMP-1、TIMP-2蛋白表达量、 α -SMA mRNA表达量、MMP-2活性明显降低(1.05 ± 0.02 vs 1.17 ± 0.04 , 1.41 ± 0.04 vs 1.98 ± 0.06 , 0.86 ± 0.01 vs 1.19 ± 0.04 , 1.03 ± 0.03 vs 1.58 ± 0.06 , 1.16 ± 0.04 vs 1.53 ± 0.01 , 3.12 ± 0.47 vs 8.48 ± 0.45 , 2.15 ± 0.03 vs 2.33 ± 0.05 , 均 $P < 0.05$ 或 0.01)。MMP-9蛋白表达及活性均显著升高(1.21 ± 0.00 vs 1.12 ± 0.01 , 1.25 ± 0.07 vs 1.10 ± 0.04 , 均 $P < 0.05$ 或 0.01)。

结论: 黄芪汤显示了良好的抗肝纤维化作用, 作用机制与其抑制肝细胞凋亡, 抑制HSC活化, 调控MMPs/TIMPs系统, 促进ECM降解有关。

关键词: 黄芪汤; 肝纤维化; 细胞凋亡; 肝星状细胞活化; 基质金属蛋白酶组织抑制剂

闫晓风, 刘平, 孙明瑜, 王晓玲. 黄芪汤对二甲基亚硝胺诱导大鼠肝纤维化模型作用的机制. *世界华人消化杂志* 2010; 18(23): 2410-2415
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2410.asp>

0 引言

肝纤维化是继发于各种原因引起的肝脏的一种损伤修复反应过程^[1], 是肝硬化的早期和必经阶段, 在一定情况下可被逆转^[2-5]。目前认为肝脏损伤-肝实质炎症、坏死-肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)激活-大量肝脏内细胞外基质(extracellular matrix, ECM)沉积, 是肝纤维化发生机制的核心环节。其中肝细胞凋亡是肝纤维化进展的重要促动因素, HSC激活, ECM降解减少是肝纤维化发生的重要环节。本实验在前期实验的基础上进一步探讨黄芪汤对二甲基亚硝胺(dimethylnitrosamine, DMN)诱导的大鼠肝纤维化的作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料 Wistar大鼠, ♂, 54只, 清洁级, 体质量150-180 g, 购自中国科学院上海实验动物中心, 上海中医药大学实验动物中心饲养, 造模和观察, 正常饮食饮水。黄芪汤由黄芪、炙甘草组成, 制成粗粉末。水煎, 浓缩煎出液制成流浸膏, 真空干燥后冷藏保存。DMN购自日本东京化成株式会社。小鼠抗Fas单克隆抗体(BD Bioscience公司); 兔抗caspase-8单克隆抗体(CHEMICON公司); 兔抗caspase-3单克隆抗体(Cell Signaling Technology公司); 小鼠抗MMP-9单克隆抗体(Calbiochem公司); 小鼠抗TIMP-1单克隆抗体(Lab Vision公司); 小鼠TIMP-2单克隆抗体(Lab Vision公司)。逆转录试剂盒(Revert Aid™ First Strand cDNA Synthesis Kit, Ferments Life Sciences(购于晶美生物工程有限公司)); 荧光定量PCR检测试剂盒, SYBR Green Ex Taq™(perfect Real Time), TaKaRa Biotechnology(Dalian)Co.Ltd, (购自上海皓嘉科技发展有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 造模及分组: 采用Ala-Kokko方法^[6]复制肝纤维化模型。模型组40只大鼠以2 mL/kg剂量于每周前3 d连续腹腔注射0.5%的DMN溶液(以生理盐水稀释), 共4 wk。正常组大鼠腹腔注射等量生理盐水。在造模的2、4 wk分别处死正常组大鼠3只/模型组大鼠4只, 正常组大鼠3只/模型组大鼠6只, 作为用药前动态观察。造模结束后, 将模型组大鼠随机分为模型对照组(15只), 黄芪汤组(15只), 另外还剩下正常组(8只)。黄芪汤组于第5周起, 按65 kg体质量成人临床用量的8倍量用蒸馏水10 mL稀释灌胃, 每日1次, 共2 wk。正常组与模型对照组以同体积生理盐水灌胃。实

■ 研究前沿

黄芪汤重用黄芪为君, 少以甘草为臣佐, 共同达到补气祛湿之功用。药效学结果显示可有效逆转肝纤维化, 但其抗肝纤维化的机制还有待进一步研究。

■相关报道

有研究证实,二甲基亚硝胺(DMN)诱导细胞凋亡,与死亡受体信号结合,诱导肝细胞凋亡,通过细胞外信号释放趋化性/炎症性因子加重肝损伤并激活HSC;HSC可以吞噬肝细胞凋亡小体,增强促纤维形成基因及死亡配体的表达。

表 1 各组肝组织中Fas、caspase-8、caspase-3蛋白表达量 (mean ± SD, $n = 4$)

分组	Fas	caspase-8	caspase-3
正常组	1.00 ± 0.02	1.00 ± 2.60E-03	1.00 ± 0.01
2 wk模型组	1.28 ± 0.05 ^b	37.00 ± 1.00 ^b	1.34 ± 0.01 ^b
4 wk模型组	1.66 ± 0.07 ^b	254.00 ± 10.00 ^b	2.03 ± 0.10 ^b
6 wk模型组	1.17 ± 0.04 ^b	1.98 ± 0.06 ^b	1.19 ± 0.04 ^b
黄芪汤组	1.05 ± 0.02 ^d	1.41 ± 0.04 ^d	0.86 ± 0.01 ^d

^b $P < 0.01$ vs 正常组; ^d $P < 0.01$ vs 6 wk模型组。

表 2 各组肝组织中MMP-9、TIMP-1、TIMP-2蛋白表达量 (mean ± SD, $n = 4$)

分组	MMP-9	TIMP-1	TIMP-2
正常组	1.00 ± 0.01	1.00 ± 0.06	1.00 ± 0.03
2 wk模型组	1.32 ± 0.02 ^a	4.00 ± 0.03 ^a	1.17 ± 0.03 ^a
4 wk模型组	1.48 ± 0.02 ^a	6.00 ± 0.11 ^a	2.16 ± 0.00 ^a
6 wk模型组	1.12 ± 0.01 ^a	1.58 ± 0.06 ^a	1.53 ± 0.01 ^a
黄芪汤组	1.21 ± 0.00 ^c	1.03 ± 0.03 ^c	1.16 ± 0.04 ^c

^a $P < 0.05$ vs 正常组; ^c $P < 0.05$ vs 6 wk模型组。

验结束时戊巴比妥钠麻醉, 打开腹腔, 取肝, 称质量后, 以Eppendorf管分装后液氮速冻, -80 °C保存备用。

1.2.2 免疫印迹法检测肝组织Fas、caspase-8、caspase-3、MMP-9、TIMP-1、TIMP-2蛋白表达: 提取肝组织蛋白, 定量, 与SDS上样缓冲液混合, 95 °C-100 °C变性5 min; 制胶, 上样, 电泳, 切胶, 半干转膜器恒流300 mA转PVDF膜70 min; 1 × TTBS洗膜5 min × 3次, 以5%脱脂奶粉TTBS封闭, 室温震荡1 h; 置于经封闭液稀释的一抗(Fas: 1 : 5 000; caspase-8: 1 : 100; caspase-3: 1 : 1 000; MMP-9: 1 : 100; TIMP-1: 1 : 200; TIMP-2: 1 : 4 000)中, 4 °C轻摇过夜; 1 × TTBS洗膜5 min × 3次, 置于经1 × TTBS稀释的二抗中, 室温震荡1 h, TTBS洗5 min × 3次, 除去未结合的二抗。暗室中发光, 压片, 显影, 定影; 应用复日FR-200生物电泳图像分析系统分析底片中的目的条带, 计算机自动读取并记录每条带的光密度值。目的条带与内参(GAPDH)条带光密度的比值为目的蛋白的相对表达量, 正常组蛋白的相对表达量计为1。

1.2.3 实时定量PCR法检测 α -SMA mRNA表达量: 提取肝组织总RNA, 反转录后进行PCR扩增。18S为内参。引物如下: α -SMA Forward: 5'-CGA GAGGACGTTGTTAGCATAGAG-3', Reverse: 5'-GGGCATCCACGAAACCA-3'; 18S Forward: 5'-GTAACCCGTTGAACCCCAT-3', Reverse: 5'-CCATCCAATCGGTAGTAGCG-3'。PCR反应条件: 95 °C预变性10 s; 95 °C变性5 s, 退火延伸并作一步, 温度58 °C, 20 s, 共40个循环。

1.2.4 明胶酶图法检测肝组织MMP-2、MMP-9活性: 提取肝组织蛋白, 定量, 制备SDS聚丙烯酰胺凝胶, 含0.1%明胶的8%分离胶, 5%堆积胶, 取含50 μ g总蛋白的匀浆液与4倍样品缓冲液混和后上样, 进行还原但非变性电泳。电泳条件:

4 °C, 60 V, 时间约2.5 h。电泳结束后, 凝胶置于洗脱液中洗脱45 min × 2, 然后以漂洗液漂洗30 min × 2。其后, 将凝胶置于孵育液中, 37 °C孵育18 h。孵育结束后经考马斯亮蓝染色液染色4 h, 可显示出MMP-2和MMP-9位于蓝色背景上的透亮带。应用复日FR-200生物电泳图像分析系统在灰阶模式下扫描电泳凝胶, 并分析MMPs活性条带灰度密度值, 正常组MMPs活性计为1。

统计学处理 计量资料以mean ± SD表示, 采用SPSS11.5中的ANOVA程序进行单因素方差分析, 组间比较采用 q 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 凋亡相关蛋白免疫印迹检测结果 各时间点模型组大鼠肝组织Fas、caspase-8、caspase-3相对表达量显著高于正常组($P < 0.01$), 4 wk模型组大鼠肝组织Fas、caspase-8、caspase-3表达最高, 6 wk有所下降。与6 wk模型组相比, 黄芪汤组大鼠肝组织Fas($P < 0.01$), caspase-8($P < 0.01$), caspase-3($P < 0.01$)蛋白表达显著降低(图1, 表1)。

2.2 α -SMA实时定量PCR检测结果 各时间点模型组及黄芪汤组大鼠肝组织 α -SMA mRNA表达显著高于正常组($P < 0.01$), 4 wk模型组大鼠肝组织表达最高; 6 wk有所下降, 与6 wk模型组相比, 黄芪汤组大鼠肝组织 α -SMA mRNA表达显著降低($P < 0.01$)。

2.3 MMPs/TIMPs免疫印迹、明胶酶图结果 各时间点模型组大鼠肝组织MMP-9、TIMP-1、TIMP-2蛋白表达, MMP-2、MMP-9活性显著高于正常组, 4 wk模型组最高, 6 wk有所下降; 与6 wk模型组相比, 黄芪汤组大鼠肝组织TIMP-1、TIMP-2蛋白表达($P < 0.05$), MMP-2活性显著降低(均 $P < 0.05$), MMP-9蛋白表达($P < 0.05$)及MMP-9活性明显升高($P < 0.01$, 图2, 3, 表2, 3)。

表 3 各组肝组织中 MMP-2、MMP-9 活性变化 ($n = 4$)

分组	MMP-2 活性	MMP-9 活性
正常组	1.00 ± 0.03	1.00 ± 0.01
2 wk 模型组	3.00 ± 0.08 ^a	1.30 ± 0.01 ^a
4 wk 模型组	3.62 ± 0.16 ^a	1.38 ± 0.01 ^a
6 wk 模型组	2.33 ± 0.05 ^a	1.10 ± 0.04 ^a
黄芪汤组	2.15 ± 0.03 ^c	1.25 ± 0.07 ^d

^a $P < 0.05$ vs 正常组; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs 6 wk 模型组。

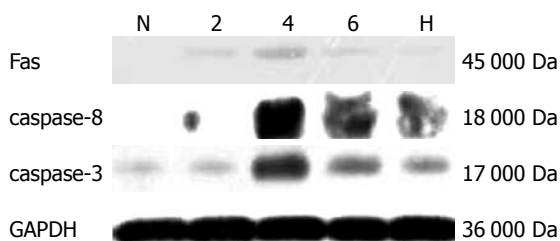


图 1 各组肝组织中 Fas、caspase-8、caspase-3 蛋白表达变化。N: 正常组; 2: 2 wk 模型组; 4: 4 wk 模型组; 6: 6 wk 模型组; H: 黄芪汤组。

3 讨论

肝纤维化是由肝细胞损伤引起炎症反应、肝纤维组织增生和肝细胞结节状再生 3 种改变反复交错进行的过程, 是一个缓慢而动态的过程, 涉及细胞、细胞因子、ECM 之间一系列复杂的变化^[7-9]。肝细胞凋亡是肝细胞增生不良、肝纤维化进展的重要促动因素。

细胞凋亡在人体组织细胞中普遍存在, 他由基因编程控制, 许多基因参与此过程的调节, 细胞凋亡是有核细胞通过启动自身内部的遗传机制激活内源性 DNA 内切酶而发生的一种主动细胞死亡的过程。正常肝组织中肝细胞凋亡少见, 随着肝纤维化发生、发展, 肝细胞凋亡出现显著的变化。细胞凋亡可能是不同类型肝病细胞死亡的共同通路^[10], 严重慢性病毒性肝炎患者肝细胞凋亡明显增加^[11], 原发性胆汁性肝硬化患者肝中肝细胞和胆管上皮细胞凋亡率增加^[12]。

课题组前期研究证实^[13,14], 黄芪汤能显著改善大鼠肝组织病理变化, 降低羟脯氨酸(Hyp)含量, 降低血 ALT、AST、ALP、GGT 活性, 进而有效逆转肝纤维化。本研究基于前期良好的药效学基础, 进一步探讨黄芪汤抗肝纤维化的作用机制。结果显示, 2、4、6 wk 模型组大鼠肝组织凋亡相关蛋白 Fas、caspase-8、caspase-3 表达量明显高于正常组, 黄芪汤明显减少模型大鼠 Fas、caspase-8、caspase-3 蛋白表达量, 与

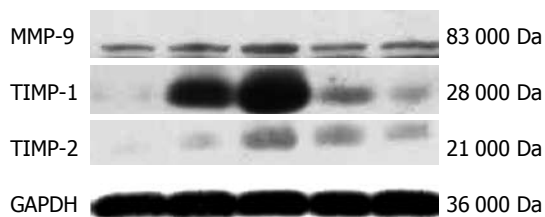


图 2 各组肝组织中 MMP-9、TIMP-1、TIMP-2 蛋白表达变化。

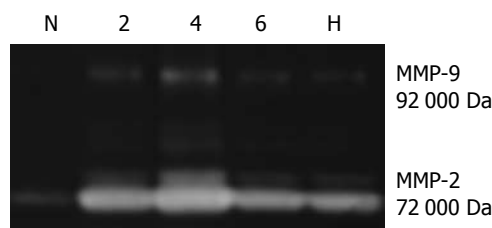


图 3 大鼠肝组织 MMP-2、9 活性的变化。N: 正常组; 2: 2 wk 模型组; 4: 4 wk 模型组; 6: 6 wk 模型组; H: 黄芪汤组。

α -SMA mRNA 表达量趋势一致。提示肝细胞凋亡、HSC 激活之间存在密切的因果关系, 黄芪汤可有效抑制肝细胞凋亡及 HSC 激活。

细胞凋亡的途径主要有 3 条, 他们是: 线粒体通路、死亡受体通路、内质网通路。Fas、caspase-8、caspase-3 是死亡受体通路的主要蛋白。研究发现^[15-19], 在肝脏疾病中, 肝细胞凋亡主要是通过 Fas/FasL 途径介导所致。有研究证实^[21], DMN 诱导细胞凋亡, 与死亡受体信号结合, 诱导肝细胞凋亡, 通过细胞外信号释放趋化性/炎症性因子加重肝损伤并激活 HSC; HSC 可以吞噬肝细胞凋亡小体, 增强促纤维形成基因及死亡配体的表达。黄以群等^[22]研究表明, 苦参素可显著降低慢性乙型肝炎患者血清中 FasL、Fas、TNF- α 、IL-6 水平。严茂祥等^[17]研究认为中药复方肝力克可调节肝纤维化大鼠肝细胞的凋亡水平, 抑制肝纤维化大鼠肝细胞 Fas/FasL、Bcl-2/Bax 的表达。黄芪汤抑制肝细胞凋亡, 可能通过死亡受体途径发挥主要作用。

HSC 的过度激活是肝纤维化的中心环节, 并最终导致大量 ECM 的合成, 而 α -SMA 蛋白的过度表达是 HSC 活化的标志。 α -SMA 蛋白表达的增强提示大量成纤维细胞的侵入和活化, 进一步合成胶原。本实验结果显示, 大鼠肝组织 α -SMA mRNA 表达随模型进展明显持续升高, 黄芪汤能够明显减少模型大鼠 α -SMA mRNA 表达量, 说明在外界因素的刺激下, HSC 激活并增殖, 导致 ECM 合成分泌增多, 从而发生肝纤维化, 且肝纤维化程度随刺激因素的持续而进行性加

■ 创新盘点

本研究以中医经典方剂黄芪汤为研究对象, 从分子生物学角度探讨其抗肝纤维化的作用机制。

■应用要点

本研究显示, 黄芪汤可抑制肝细胞凋亡, 抑制HSC活化、调控MMPs/TIMPs系统, 促进ECM降解, 进一步提示其具有抗肝纤维化的作用, 为本方的临床应用奠定了良好的基础。

重, 而黄芪汤可通过抑制HSC激活与增殖达到抗肝纤维化的作用。

目前认为肝纤维化是各种原因导致的肝损伤持续存在, 组织发生修复反应时因ECM合成和代谢失衡, 导致ECM产生多于降解, ECM在肝内异常沉积而引起的病理过程, 是一个涉及复杂的细胞及分子机制的动态过程^[23]。影响ECM合成和降解平衡的因素很多, 其中调控ECM代谢的细胞因子失衡是最重要原因^[24]。

肝组织中, 基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)及其抑制因子基质金属蛋白酶组织抑制因子(tissue inhibitor of metal protease, TIMPs)在纤维形成和纤维降解中发挥重要作用^[25], MMPs促进ECM降解, 而TIMPs通过抑制MMPs阻止ECM降解^[26,27]。正常情况下, MMPs/TIMPs处于动态平衡, 调节肝内ECM的合成和降解, 维持其质和量的稳定。病理状态下MMPs/TIMPs失衡与肝炎、肝纤维化、肝硬化的发生发展有密切关系^[28]。

MMP-2是相对分子质量72 000 Da的明胶酶, 以无活性的前体形式产生, 激活后可以分解基底膜的主要成分IV型胶原, 后者是维持HSC于生理性静息状态的必要物质, 而活化的HSC不仅能产生大量的ECM, 也是肝内MMP-2的主要来源, MMP-2通过降解正常的内皮下基质, 破坏肝HSC等多种细胞生存的内环境, 有利于HSC的激活, 因而MMP-2与HSC活化两者互为因果, 在肝纤维化早期尤为突出, 并使纤维化进程不断推进^[29]。Murawaki等^[30]检测了肝组织内MMP-2酶原含量, 其升高程度与肝组织胶原含量呈正相关。Takahara等^[31]证实MMP-2参与了肝纤维化过程中肝组织的重塑, 活动性评分呈正相关。本实验结果与上述研究非常一致, DMN大鼠肝组织MMP-2活性随着模型的加重逐渐升高, 4 wk时达到高峰。与6 wk模型组相比, 黄芪汤组MMP-2活性明显降低, 表明黄芪汤可下调MMP-2的表达来改善HSC等多种细胞生存的内环境, 使HSC活化减少, 从而使肝纤维化程度减轻。由此提示, 下调MMP-2表达, 从而改善HSC等多种细胞生存的内环境, 使HSC活化较少, 是黄芪汤有效治疗实验性大鼠肝纤维化的机制之一。

MMP-9是相对分子质量92 000 Da的明胶酶, 主要来源于库弗细胞^[32], 以酶原形式分泌, 被激活后形成IV型胶原酶, 降解破坏ECM和基底膜^[33]。关于MMP-9在肝纤维化中的作用目前尚有争议^[34]。黄芪汤组大鼠肝组织蛋

白表达MMP-9显著升高, TIMP-1, 2明显降低, MMP-9活性明显增强。提示黄芪汤可以显著提高MMP-9活性, 促进MMP-9而抑制TIMP-1, 2表达, 降解过度沉积的ECM, 维持MMPs/TIMPs调控的动态平衡。

前期研究^[13]根据中医以方测证理论认为DMN大鼠肝硬化的病机既有气虚又有湿阻, 两者并重。但单纯补气有助湿之弊, 单纯祛湿有伤正之虞。黄芪汤重用黄芪为君, 补中气助气化, 气足则湿邪得化, 湿去则正气得复, 再少以甘草为臣佐, 补中益气, 助黄芪补中气, 共同达到补气祛湿之功用。切中DMN大鼠纤维化的病机特点。以上研究结果结合现代研究^[35-37], 提示黄芪汤具有明显的抗肝纤维化的作用, 其作用机制与抑制肝细胞凋亡, 抑制HSC活化、调控MMPs/TIMPs系统, 促进ECM降解有关。

4 参考文献

- 1 唐有为. 细胞外基质降解系统与肝纤维化. 医学综述 2000; 6: 209-210
- 2 Friedman SL. Hepatic fibrosis -- overview. *Toxicology* 2008; 254: 120-129
- 3 Tsukada S, Parsons CJ, Rippe RA. Mechanisms of liver fibrosis. *Clin Chim Acta* 2006; 364: 33-60
- 4 Rovida E, Navari N, Caligiuri A, Dello Sbarba P, Marra F. ERK5 differentially regulates PDGF-induced proliferation and migration of hepatic stellate cells. *J Hepatol* 2008; 48: 107-115
- 5 Bennett RG, Dalton SR, Mahan KJ, Gentry-Nielsen MJ, Hamel FG, Tuma DJ. Relaxin receptors in hepatic stellate cells and cirrhotic liver. *Biochem Pharmacol* 2007; 73: 1033-1040
- 6 Ala-Kokko L, Pihlajaniemi T, Myers JC, Kivirikko KI, Savolainen ER. Gene expression of type I, III and IV collagens in hepatic fibrosis induced by dimethylnitrosamine in the rat. *Biochem J* 1987; 244: 75-79
- 7 李甘地, 来茂德. 病理学. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 256-261
- 8 Lamireau T, Desmoulière A, Bioulac-Sage P, Rosenbaum J. [Mechanisms of hepatic fibrogenesis] *Arch Pediatr* 2002; 9: 392-405
- 9 Mattioli B, Straface E, Quaranta MG, Giordani L, Viora M. Leptin promotes differentiation and survival of human dendritic cells and licenses them for Th1 priming. *J Immunol* 2005; 174: 6820-6828
- 10 Jiang Z, Liu Y, Savas L, Smith L, Bonkovsky H, Baker S, Banner B. Frequency and distribution of DNA fragmentation as a marker of cell death in chronic liver diseases. *Virchows Arch* 1997; 431: 189-194
- 11 Fausto N. Liver regeneration. *J Hepatol* 2000; 32: 19-31
- 12 Reynaert H, Chavez M, Geerts A. Vascular endothelial growth factor and liver regeneration. *J Hepatol* 2001; 34: 759-761
- 13 王磊, 刘平, 慕永平, 李风华, 龙爱华, 顾宏图, 陈高峰. 二甲基亚硝胺大鼠肝纤维化中医方证研究. 中医杂志 2006; 47: 929-932
- 14 王磊, 刘平, 慕永平, 刘成. 清热利湿与益气古典方剂

- 逆转二甲基亚硝胺大鼠肝硬化的细胞生物学基础研究. 自然科学进展 2007; 17: 1026-1035
- 15 Jodo S, Kung JT, Xiao S, Chan DV, Kobayashi S, Tateno M, Lafyatis R, Ju ST. Anti-CD95-induced lethality requires radioresistant FcγRII+ cells. A novel mechanism for fulminant hepatic failure. *J Biol Chem* 2003; 278: 7553-7557
 - 16 Xia M, Xu C, Ji S, Xue S. Shedding of Fas ectodomain that affects apoptosis of hepatocytes occurring in regenerative liver. *J Gastroenterol* 2002; 37: 1042-1047
 - 17 Bajt ML, Vonderfecht SL, Jaeschke H. Differential protection with inhibitors of caspase-8 and caspase-3 in murine models of tumor necrosis factor and Fas receptor-mediated hepatocellular apoptosis. *Toxicol Appl Pharmacol* 2001; 175: 243-252
 - 18 Matsui H, Hikichi Y, Tsuji I, Yamada T, Shintani Y. LIGHT, a member of the tumor necrosis factor ligand superfamily, prevents tumor necrosis factor-α-mediated human primary hepatocyte apoptosis, but not Fas-mediated apoptosis. *J Biol Chem* 2002; 277: 50054-50061
 - 19 Nakae H, Zheng YJ, Wada H, Tajimi K, Endo S. Involvement of IL-18 and soluble fas in patients with postoperative hepatic failure. *Eur Surg Res* 2003; 35: 61-66
 - 20 柏淑禹, 吴建成, 王爱珍. DMN所致小鼠肝损伤模型中血清IL-18和肝脏Fas mRNA的表达. 天津医药 2003; 31: 786-788
 - 21 黄以群, 林珍辉, 纪树梅, 王崇国. 苦参素对慢性乙型肝炎患者血清Fas、FasL、肿瘤坏死因子-α、白介素-6的影响. 中华传染病杂志 2005; 23: 130-131
 - 22 严茂祥, 陈芝芸, 宋建华, 项柏康, 曲宝戈. 补肾益气化痰解毒法对肝纤维化大鼠肝细胞凋亡及凋亡相关基因的影响. 医学研究杂志 2008; 37: 29-32
 - 23 谢玉梅, 聂青和. 肝纤维化治疗的新热点-TIMPs. 世界华人消化杂志 2003; 11: 601-605
 - 24 刘芳, 刘金星. 转化生长因子β1在肝纤维化中的作用. 世界华人消化杂志 2000; 8: 86-88
 - 25 Hemmann S, Graf J, Roderfeld M, Roeb E. Expression of MMPs and TIMPs in liver fibrosis - a systematic review with special emphasis on anti-fibrotic strategies. *J Hepatol* 2007; 46: 955-975
 - 26 Olaso E, Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrogenesis. *J Hepatol* 1998; 29: 836-847
 - 27 Arthur MJ. Collagenases and liver fibrosis. *J Hepatol* 1995; 22: 43-48
 - 28 Iredale JP. Tissue inhibitors of metalloproteinases in liver fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol* 1997; 29: 43-54
 - 29 Nagase H. Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol Chem* 1997; 378: 151-160
 - 30 Murawaki Y, Yamada S, Ikuta Y, Kawasaki H. Clinical usefulness of serum matrix metalloproteinase-2 concentration in patients with chronic viral liver disease. *J Hepatol* 1999; 30: 1090-1098
 - 31 Takahara T, Furui K, Yata Y, Jin B, Zhang LP, Nambu S, Sato H, Seiki M, Watanabe A. Dual expression of matrix metalloproteinase-2 and membrane-type 1-matrix metalloproteinase in fibrotic human livers. *Hepatology* 1997; 26: 1521-1529
 - 32 Feldstein AE, Canbay A, Angulo P, Taniai M, Burgart LJ, Lindor KD, Gores GJ. Hepatocyte apoptosis and fas expression are prominent features of human nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 2003; 125: 437-443
 - 33 周建华, 王文祥, 文继舫, 曹慧秋, 沈明. MMP-2、MMP-9、TIMP-1、TIMP-2在非小细胞肺癌中的表达及临床病理学意义. 实用预防医学 2006; 12: 23-26
 - 34 Reif S, Somech R, Brazovski E, Reich R, Belson A, Konikoff FM, Kessler A. Matrix metalloproteinases 2 and 9 are markers of inflammation but not of the degree of fibrosis in chronic hepatitis C. *Digestion* 2005; 71: 124-130
 - 35 马红, 王宝恩, 陈笠阳, 马雪梅. 黄芪对肝纤维化治疗作用的实验研究. 中华肝脏病杂志 1997; 5: 32-33
 - 36 宋少刚, 杨雁, 陈敏珠. 黄芪总提取物对大鼠肝星状细胞增殖及产生胶原的影响. 中国临床药理学与治疗学 2001; 6: 111-113
 - 37 宋少刚, 杨雁, 路景涛, 周爱武, 陈敏珠. 黄芪总甙抗肝纤维化作用及其机制. 第七届中国抗炎免疫药理学学术会议论文摘要集 2000; 17: 9

■同行评价

本文选题尚可, 设计合理, 结论具有一定的临床参考价值.

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

汤姆森 - 路透公布 2009 年 WJG 影响因子 2.092

本刊讯 根据2010-06-18发布的2009年度期刊引证报告, *World Journal of Gastroenterology*(WJG)(中文刊名《世界胃肠病学杂志》)影响因子为2.092, 论文总被引次数12 740次, 特征因子0.05832, 分别位于65种国际胃肠肝病学期刊的第33位, 8位和5位.

与2008年的影响因子(2.081), 总被引次数(10 822次), 特征因子(0.05006)相比, WJG在2009年国际胃肠肝病学期刊中的排名分别增加了7个百分点, 4个百分点和3个百分点. (WJG编辑部主任: 程剑侠 2010-06-18)

TGF- β 1诱导的上皮间质转化对肝癌细胞系中边缘群细胞的调控

王波, 夏羽佳, 晏维, 夏丽敏, 刘梅, 田德安

■背景资料

肿瘤干细胞学说认为, 肿瘤组织中并非所有的肿瘤细胞都具有恶性特征, 只有肿瘤干细胞具有自我更新和分化潜能, 成为肿瘤增殖、抗药和复发的根源。上皮间质转化学说最早被发育生物学家用来描述胚胎发育过程中某些特定部位的上皮细胞所发生的形态学改变, 发生间质转化的上皮细胞在经历了短暂的结构改变后, 细胞的迁徙和运动能力增强, 从而成为肿瘤侵袭和转移的重要机制之一。

王波, 夏羽佳, 晏维, 夏丽敏, 刘梅, 田德安, 华中科技大学同济医学院附属同济医院消化内科 湖北省武汉市 430030
国家自然科学基金资助项目, No. 30873038; No. 30800968
王波, 主治医师, 主要从事消化系统疾病方面的研究。

作者贡献分布: 此课题由王波、夏羽佳及晏维设计; 研究过程由夏羽佳、晏维、夏丽敏及刘梅完成; 数据分析由王波与夏羽佳完成; 论文书写由王波与田德安完成。

通讯作者: 田德安, 主任医师, 430030, 湖北省武汉市解放大道1095号, 华中科技大学同济医学院附属同济医院消化内科。

tiandeanwh@medmail.com.cn

电话: 027-83663611

收稿日期: 2010-05-01 修回日期: 2010-07-05

接受日期: 2010-07-12 在线出版日期: 2010-08-18

Regulation of side population cells by TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma cell lines SMMC-7721 and HepG2

Bo Wang, Yu-Jia Xia, Wei Yan, Li-Min Xia, Mei Liu, De-An Tian

Bo Wang, Yu-Jia Xia, Wei Yan, Li-Min Xia, Mei Liu, De-An Tian, Department of Gastroenterology, Tongji Hospital, Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China
Supported by: National Natural Science Foundation of China, Nos. 30873038 and 30800968

Correspondence to: De-An Tian, Department of Gastroenterology, Tongji Hospital, Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, 1095 Jiefang Avenue, Wuhan 430030, Hubei Province, China. tiandeanwh@medmail.com.cn

Received: 2010-05-01 Revised: 2010-07-05

Accepted: 2010-07-12 Published online: 2010-08-18

Abstract

AIM: To evaluate the influence of transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1)-induced epithelial-mesenchymal transition (EMT) on side population cells in SMMC-7721.

METHODS: The percentages of SP cells in SMMC-7721 and HepG2 cells were analyzed by flow cytometry. TGF- β 1 was added to the cultured SMMC7721 and HepG2 cells to induce EMT *in vitro*. Seventy-two hours later, cell morphological changes were observed, the pro-

tein expression of E-cadherin was detected by Western blot and immunofluorescence, and the changes in the percentages of SP cells were analyzed by flow cytometry.

RESULTS: An experimental system for the selection of SP cells from hepatocellular carcinoma cells was successfully established. There were 4.3% of SP cells in SMMC-7721 cells, and the expression of ABCG2 (ATP-binding cassette superfamily G member 2) was up-regulated in these SP cells. No SP cells were detected in HepG2 cells. After exposure to TGF- β 1 for 72 h, SMMC-7721 cells showed significant morphological changes and reduced E-cadherin expression and SP cell percentage.

CONCLUSION: TGF- β 1 is able to induce EMT and reduce the percentage of side population cells in hepatocellular carcinoma cell lines, suggesting that EMT may promote the invasion and metastasis of carcinoma cells by suppressing the proliferation of cancer stem cells.

Key Words: Side population cell; Transforming growth factor- β 1; Epithelial-mesenchymal transition; Cancer stem cell; Hepatocellular carcinoma

Wang B, Xia YJ, Yan W, Xia LM, Liu M, Tian DA. Regulation of side population cells by TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma cell lines SMMC-7721 and HepG2. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(23): 2416-2421

摘要

目的: 观察转化生长因子 β 1(TGF- β 1)诱导的上皮间质转化(EMT)对SMMC-7721中SP细胞的影响。

方法: 常规培养人肝癌细胞系SMMC-7721和HepG2, 利用流式细胞术分析肝癌细胞系中SP细胞的含量并分选出SP细胞, Western blot检测ABCG2蛋白的表达。TGF- β 1诱导肝癌细胞SMMC-7721, 动态观察细胞形态学变化, Western blot和免疫荧光检测EMT相关指标钙

■同行评议者

倪润洲, 教授, 南通大学附属医院消化内科

粘蛋白(E-cadherin)的表达, 通过流式细胞仪分析TGF- β 1诱导前后SP细胞含量的变化。

结果: 利用流式细胞术成功建立了肝癌SP细胞分选体系。检测发现, SMMC-7721中SP细胞含量为4.3%, Western blot显示该SP细胞ABC G2蛋白表达明显上调。而HepG2中未能检测出SP细胞。TGF- β 1诱导72 h后SMMC-7721细胞发生上皮间质转化, Western blot和免疫荧光检测发现E-cadherin蛋白的表达下调, 同时SP细胞含量也明显降低。

结论: 不同肝癌细胞系中SP细胞含量的差别可能与细胞系的遗传背景和性质不同有关。EMT可能抑制了肿瘤干细胞的增殖, 促进肿瘤细胞向侵袭和转移的方向发展。

关键词: 边缘群细胞; 转化生长因子 β 1; 上皮间质转化; 肿瘤干细胞; 肝癌

王波, 夏羽佳, 晏维, 夏丽敏, 刘梅, 田德安. TGF- β 1诱导的上皮间质转化对肝癌细胞系中边缘群细胞的调控. 世界华人消化杂志 2010; 18(23): 2416-2421
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2416.asp>

0 引言

恶性肿瘤的基本特性是细胞异常增殖、浸润转移和复发, 其发病机制仍有待进一步阐明。新近研究发现, 肿瘤组织中并非所有的肿瘤细胞都具有恶性特征, 只有肿瘤干细胞具有自我更新和分化潜能, 成为肿瘤增殖生长、转移和复发的根源^[1-3]。边缘群(side population, SP)细胞最初是造血干细胞经流式细胞仪分选发现的一类具有很强的自我更新和增殖分化能力的细胞^[4,5]。随后, 人们在肿瘤细胞系中也发现少量具有这样特性的SP细胞^[6,7]。目前认为肿瘤组织SP细胞代表的是一族肿瘤干细胞, 这些细胞对化疗药物有内在的高抵抗性, 即使大部分肿瘤细胞被常规化疗杀死, 只要残存SP细胞, 都可能引起肿瘤复发和转移^[8-10]。上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)最早被发育生物学家用来描述胚胎发育过程中某些特定部位的上皮细胞所发生的形态学改变, 发生EMT的上皮细胞在经历了短暂的结构改变后, 细胞的迁徙和运动能力增强。转化生长因子 β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)是一种具有多种功能的细胞因子, 已有研究发现其在诱发EMT中起着关键的作用^[11,12]。目前认为和肿瘤干细胞一样, EMT亦是一种重要的肿瘤侵袭和转移机制^[13-15]。

原发性肝癌是我国最常见的消化系统恶性肿瘤之一, 临床上病情常迅速进展, 预后极差。因此针对肝癌的侵袭转移一直是该领域的研究热点。已有文献报道在肝癌组织和细胞系中发现肿瘤干细胞^[16,17]。但关于肝癌组织中EMT和SP细胞之间的关系, 国内外尚无相关报道。本论文以TGF- β 1诱导肝癌细胞系发生EMT, 观察其对SP细胞的影响, 试图为今后进一步研究肝癌复发转移提供新的理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料 人肝癌细胞系SMMC-7721和HepG2由华中科技大学附属同济医院肝病研究所保存。DMEM培养基购自Gibco公司; 胎牛血清购自Clark公司; Hoechst 33342、碘化丙啶(Propidium Iodide, PI)和维拉帕米均购自Sigma公司; 人TGF- β 1购自英国Protech公司; 三磷酸腺苷结合盒转运体成员2(ATP-binding cassette superfamily G member 2, ABCG2)及钙粘蛋白(E-cadherin)兔抗人多克隆抗体购自Santa Cruz公司。FACS Aria流式细胞仪及其分析软件为美国BD公司产品。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: SMMC-7721和HepG2细胞用含青链霉素及100 mL/L胎牛血清的DMEM培养液在37 °C、50 mL/L CO₂饱和湿度条件下培养, 0.25%胰蛋白酶液消化传代, 取对数生长期细胞用于实验。

1.2.2 SP细胞分析及分选: 调整细胞密度为10⁶/mL, 设实验组和对照组。实验组加入Hoechst 33342至终浓度为10 mg/L。对照组先加入终浓度为50 mmol/L的维拉帕米在37 °C水浴10 min。然后, 两组细胞均于37 °C恒温避光水浴90 min, 每15 min摇匀1次。最后500 g于4 °C离心5 min弃上清, 以4 °C预冷的HBSS重悬细胞。在反应体系中加入PI使其终浓度为0.5 mg/L时上流式细胞仪检测。仪器参数如下, 355 UV激发光源, 610 nm双色短通反射滤镜, 450 nm和675 nm边缘长通滤片分别散射蓝光和红光部分。测量前向散射和侧向散射二维参数图, 检测细胞均一性, 将低蓝光低红光且维拉帕米组缺失区域设定为SP细胞的门(gate), 分析并分选出SP和非SP细胞。

1.2.3 TGF- β 1诱导SMMC-7721后SP细胞分析: SMMC-7721细胞培养方法同前, 设实验组和对照组。实验组加入TGF- β 1至其终浓度为10 μ g/L, 置37 °C、50 mL/L CO₂饱和湿度条件下培养72 h后, Olympus倒置显微镜观察细胞形态,

■ 研发前沿

肿瘤干细胞学说和细胞上皮间质转化学说是肿瘤学领域新近研究的重点和热点。由于肿瘤干细胞缺乏特异性的细胞表面标志, 而大量的研究证实干细胞及某些前体细胞具有SP表型, 因此推测SP细胞可作为一种肿瘤干细胞筛选和分离纯化的标志。深入探讨SP细胞与肿瘤干细胞之间的联系及调控的机制将是此领域亟待研究的重要问题之一。

■相关报道

最初的研究表明:来源于骨髓的SP细胞具有很强的造血干细胞活性,能重建致死放射量照射小鼠的髓系和淋巴系血细胞;随后人们相继在多种正常组织、肿瘤组织和细胞系中分离出功能类似的SP细胞。

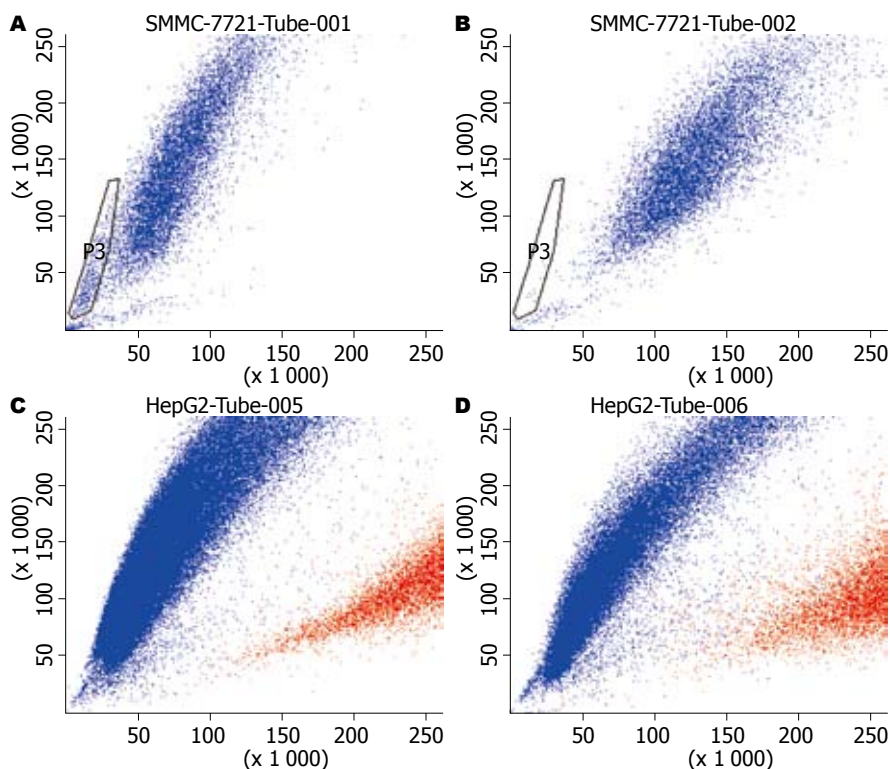


图1 肝癌细胞系中SP细胞分析. A: SMMC-7721细胞实验组; B: SMMC-7721细胞对照组; C: HepG2细胞实验组; D: HepG2细胞对照组.

Western blot分析E-cadherin蛋白的表达. 流式细胞仪分析SMMC-7721细胞发生EMT时SP细胞的含量变化.

1.2.4 Western blot检测目的蛋白表达: ABCG2及E-cadherin蛋白的表达采用Western blot检测. RIPA裂解液提取总蛋白, Bradford法检测其浓度. 取50 μ g总蛋白进行电泳. 10% SDS-PAGE中电泳完毕后将凝胶中的蛋白转移至硝酸纤维素膜上, 5%的封闭液封闭2 h, 加入一抗(兔抗人多克隆抗体, 1:100), 4 $^{\circ}$ C过夜; 洗膜, 再加入二抗(羊抗兔IgG-HRP, 1:10 000)孵育1 h, 洗膜后进行ECL显色. 利用相关图像分析软件扫描分析条带的灰度值. 目的蛋白表达的相对强度 = 目的条带的灰度值/ β -actin条带的灰度值.

1.2.5 免疫荧光法检测细胞E-cadherin蛋白的表达: 待上述各组SMMC-7721细胞在盖玻片上生长融合到90%-95%时, 取出以4%的甲醛室温固定30 min; 0.2% Triton X-100透化5 min; 5%的封闭液室温封闭30 min; 加入一抗4 $^{\circ}$ C过夜后, 加入二抗避光孵育30 min, 激光共聚焦显微镜观察蛋白定位表达情况.

统计学处理 应用SPSS11.0软件进行统计分析, 实验数据以mean \pm SD表示, 各组间比较均采用t检验, $P < 0.05$ 差异有统计学意义.

2 结果

2.1 肿瘤细胞系中SP细胞的分析 SMMC-7721和

HepG2细胞经Hoechst 33342及PI双标记后经流式细胞仪分析, SP细胞位于左下角两种荧光均阴性或很弱的区域, SMMC-7721细胞实验组SP细胞含量为4.3%, 由于维拉帕米可以阻断SP细胞排出Hoechst 33342, 经维拉帕米处理后SP细胞含量减少为0.1%. HepG2细胞实验组和对照组之间无明显区别(图1). 前向散射和侧向散射二维参数图分析SMMC-7721中SP和非SP细胞形态、大小、胞质均匀性无明显区别. ABCG2表达于SP细胞表面, 是造成细胞SP表型的关键分子之一. 与非SP细胞相比, SMMC-7721中SP细胞ABCG2表达明显上调(图2).

2.2 TGF- β 1诱导SMMC-7721发生EMT 研究显示, TGF- β 1在诱发细胞EMT中起着关键作用, 而上皮性标志物E-cadherin是EMT过程中表达下调的主要因子之一. SMMC-7721细胞在TGF- β 1刺激下逐渐由原来的多角形生长变化为长梭形, 排列松散, Western blot和免疫荧光均提示E-cadherin的表达下调, 提示细胞间黏附减弱(图3, 4).

2.3 TGF- β 1诱导SMMC-7721EMT后SP细胞含量分析 TGF- β 1诱导SMMC-7721发生EMT后, 其SP细胞含量明显下降. 未加入维拉帕米组SP细胞含量为0.1%, 经维拉帕米处理后SP细胞含量减少为0.0%(图5).

3 讨论

1996年, Goodell等采用流式细胞术研究造血干

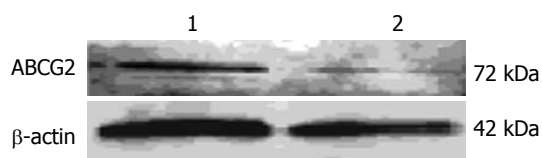


图 2 SMMC-7721细胞中ABCG2蛋白的表达. 1: SP细胞; 2: 非SP细胞.

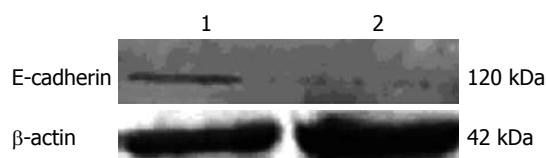


图 3 SMMC-7721细胞中E-cadherin蛋白的表达. 1: 对照组; 2: 实验组.

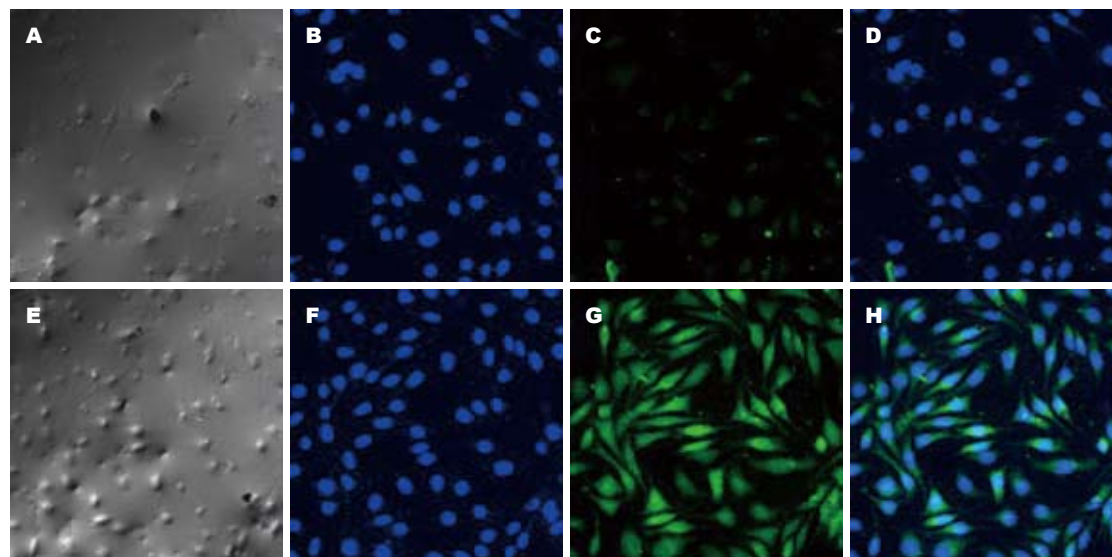


图 4 免疫荧光法示SMMC-7721细胞中E-cadherin蛋白的表达(免疫荧光法). A-D: 实验组; E-H: 对照组; 绿色荧光: E-cadherin的表达; 蓝色荧光: Hoechst 33258核染色.

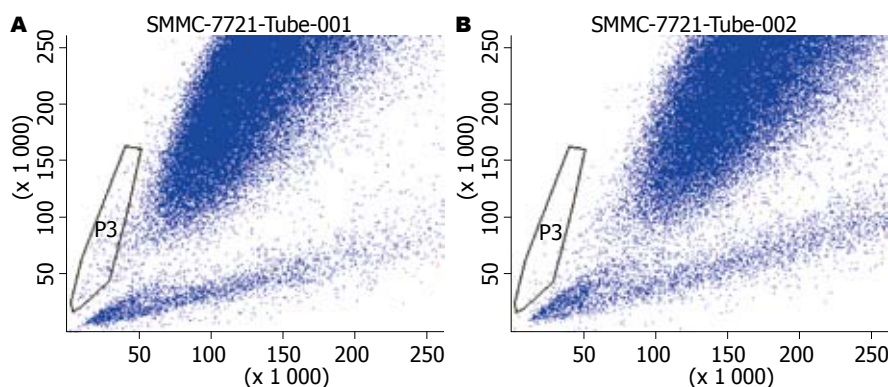


图 5 SMMC-7721细胞经TGF- β 1诱导发生EMT后SP细胞分析. A: 无维拉帕米组; B: 维拉帕米组.

细胞在体内的增殖情况时发现有一小群细胞呈彗星状分布在细胞主群的一侧, 他们将这群细胞称为SP细胞. 最初的研究表明: 来源于骨髓的SP细胞具有很强的造血干细胞活性, 能重建致死放射量照射小鼠的髓系和淋巴系血细胞; 随后人们相继在多种正常组织(骨髓、骨骼肌、肺、肝、心脏、睾丸、肾、皮肤、脑和乳腺等)、肿瘤组织和细胞系中分离出功能类似的SP细胞^[18-21]. 由于SP细胞符合肿瘤干细胞学说的特点, 对肿瘤组织中SP细胞的研究随即成为新的热点^[22,23].

SP细胞能特异性的将荧光染料Hoechst

33342排出到胞外, 从而具有Hoechst 33342拒染或淡染性, 钙离子拮抗剂能够阻止这个过程, 这是流式细胞仪进行检测分选的基本原理. 膜转运蛋白ABCG2是决定不同组织来源SP细胞排出Hoechst 33342的决定性基因之一. ABCG2是从MCF-7乳腺癌耐药细胞株克隆出来的ATP结合盒转运子家族的一个新成员, 是一种多药耐药基因, 推测其与SP细胞对化疗药物的内在高抵抗性有关^[24-26]. 维拉帕米和利血平能够抑制SP细胞上膜转运蛋白的功能, 常使SP细胞数量显著下降, 因此常被用来辅助鉴定SP细胞. 目前认为维拉帕米主要阻断ABC转运蛋白家族中

■创新盘点

国内外学者已在多种人肿瘤细胞系中发现SP细胞; 上皮间质转化机制在肿瘤侵袭转移过程中的作用也有所报道. 本论文在此基础上首先检测了SP细胞在两种常用肝癌细胞系中的分布情况, 并深入探讨转化生长因子诱导的肝癌细胞系发生上皮间质转化对SP细胞含量的影响. 结合肿瘤学领域新理论, 旨在为将来组织水平研究肝癌转移、抗药及复发机制提供理论基础, 此研究思路和技术路线国内外报道较少.

■应用要点

本文研究了肝癌细胞系中SP细胞的调控机制,有助于从不同的侧面了解肿瘤干细胞在肝癌中的分布和作用,从而为后续治疗肝癌转移、抗药及复发提供理论基础。

多药耐药蛋白1(multidrug resistance protein 1, MDR1),但其阻断没有特异性;利血平主要阻断P-糖蛋白和ABCG2蛋白^[27]。不同细胞群中这些膜蛋白的表达情况存在差异,例如有些胃肠肿瘤细胞中ABCG2并未参与SP细胞表型的形成,细胞培养前后SP和非SP细胞中ABCG2是一致的。因此,不同的膜运载体在外排Hoechst 33342中可能起着不同的作用^[28],从而间接影响了维拉帕米等药物的阻断作用。

我们的研究显示, SMMC-7721中Hoechst 33342阴性/弱阳性细胞含量为4.3%, HepG2中未能检测出此类细胞,不同肝癌细胞系中此细胞含量的不同可能与细胞系的遗传背景和性质不同有关。经维拉帕米处理后SMMC-7721中这些细胞的含量下降为0.1%,采用Western blot检测发现该细胞群ABCG2蛋白的表达明显上调,可确认此Hoechst 33342阴性/弱阳性细胞为SP细胞。我们成功的采用流式细胞术建立肿瘤细胞株中SP细胞分离纯化体系,从而满足后续研究的需要。

EMT是指上皮细胞在特定的生理和病理情况下向间质细胞转化的现象。正常上皮细胞富于细胞间黏附从而形成稳定的细胞间接触。EMT时上皮组织基本结构消失,失去细胞极性和紧密连接,细胞内骨架成分重排并获得移行能力等间质细胞的特性。EMT与胚胎发育过程和特定类型的伤口愈合中细胞及组织的重塑有关。肝癌组织的中央细胞往往是上皮表型,当经历EMT后肿瘤细胞摆脱细胞之间的连接,从而获得突破基底膜、侵袭周围组织的能力^[29]。E-cadherin是上皮组织中的一种依赖Ca²⁺的细胞间跨膜粘连糖蛋白分子,主要参与细胞间的连接。E-cadherin同时也是EMT的关键分子。TGF- β 是诱发EMT最强的因素之一^[30]。我们的研究结果显示,加入TGF- β 1后, SMMC-7721细胞的形态发生改变。免疫荧光提示定位于胞质的表达阳性细胞明显减少, Western blot提示其蛋白表达明显下调,说明TGF- β 1能够诱导肿瘤细胞系发生EMT,从而在肝癌转移过程中起到重要的作用。

既然SP细胞和EMT都与肝癌的发生及转移有关,两者之间的关系如何呢?我们的研究发现, TGF- β 1诱导SMMC-7721细胞发生EMT后, SP细胞比例分别从未诱导前的4.3%降低到诱导后的0.1%。分析其可能的机制,我们推测EMT状态的诱导和维持在一定程度上抑制了肿瘤干细胞的

增殖,促进了肿瘤细胞向侵袭和转移方向发展。另外, TGF- β 1本身的作用机制也相当复杂,对于SMMC-7721细胞而言可能发挥了肿瘤生长抑制因子的作用^[31]。

总之,我们的研究建立了肝癌肿瘤干细胞分选体系,初步探讨了SP细胞和EMT之间的关系,为将来进一步研究肿瘤干细胞在肝癌发生中的作用和调控机制提供了新的思路 and 依据。

4 参考文献

- 1 Mueller MT, Hermann PC, Heeschen C. Cancer stem cells as new therapeutic target to prevent tumour progression and metastasis. *Front Biosci (Elite Ed)* 2010; 2: 602-613
- 2 Sottoriva A, Verhoeff JJ, Borovski T, McWeeney SK, Naumov L, Medema JP, Sloot PM, Vermeulen L. Cancer stem cell tumor model reveals invasive morphology and increased phenotypical heterogeneity. *Cancer Res* 2010; 70: 46-56
- 3 Frank NY, Schatton T, Frank MH. The therapeutic promise of the cancer stem cell concept. *J Clin Invest* 2010; 120: 41-50
- 4 Chan RK, Garfein E, Gigante PR, Liu P, Agha RA, Mulligan R, Orgill DP. Side population hematopoietic stem cells promote wound healing in diabetic mice. *Plast Reconstr Surg* 2007; 120: 407-411; discussion 412-413
- 5 王榕, 蒋敬庭, 杨伊林, 吴昌平. 肿瘤干细胞的分离与纯化研究进展. 中国组织工程研究与临床康复 2009; 13: 161-164
- 6 Wang J, Guo LP, Chen LZ, Zeng YX, Lu SH. Identification of cancer stem cell-like side population cells in human nasopharyngeal carcinoma cell line. *Cancer Res* 2007; 67: 3716-3724
- 7 张鹏, 秦环龙. 大肠癌干细胞分选与鉴定的研究进展. 世界华人消化杂志 2008; 16: 4031-4035
- 8 Wu C, Wei Q, Utomo V, Nadesan P, Whetstone H, Kandel R, Wunder JS, Alman BA. Side population cells isolated from mesenchymal neoplasms have tumor initiating potential. *Cancer Res* 2007; 67: 8216-8222
- 9 Sabiz M, Skladanowski A. Cancer stem cells and escape from drug-induced premature senescence in human lung tumor cells: implications for drug resistance and in vitro drug screening models. *Cell Cycle* 2009; 8: 3208-3217
- 10 Gupta PB, Chaffer CL, Weinberg RA. Cancer stem cells: mirage or reality? *Nat Med* 2009; 15: 1010-1012
- 11 韩磊, 郭克建, 周文平, 陈希涛. Genistein对TGF- β 1诱导人胰腺癌细胞上皮-间质转化的作用. 世界华人消化杂志 2008; 16: 2359-2363
- 12 张红燕, 孙洋, 李珊珊, 杨建萍, 阎爱华, 王新华, 王小军. TGF- β 1引发的上皮间质转化与食管鳞癌浸润转移的关系. 世界华人消化杂志 2008; 16: 3162-3166
- 13 杨文君, 陈丽荣. 上皮间质转化在肿瘤侵袭转移中的作用. 实用肿瘤杂志 2008; 23: 86-90
- 14 Iwatsuki M, Mimori K, Yokobori T, Ishi H, Beppu T, Nakamori S, Baba H, Mori M. Epithelial-mesenchymal transition in cancer development and its clinical significance. *Cancer Sci* 2010; 101: 293-299
- 15 Sarkar FH, Li Y, Wang Z, Kong D. Pancreatic cancer stem cells and EMT in drug resistance and metastasis. *Minerva Chir* 2009; 64: 489-500
- 16 宋凯, 杨硕菲, 吴俊华, 江春平. 肝癌干细胞的研究进

- 展. 世界华人消化杂志 2009; 17: 3704-3710
- 17 丁景弦, 白小明, 张海, 汪亦品, 彭韬, 冷静. Huh7细胞中边缘群细胞分选及其增殖分裂能力的研究. 南京医科大学学报(自然科学版) 2010; 30: 139-143
- 18 Kayo H, Yamazaki H, Nishida H, Dang NH, Morimoto C. Stem cell properties and the side population cells as a target for interferon-alpha in adult T-cell leukemia/lymphoma. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 364: 808-814
- 19 Komuro H, Saihara R, Shinya M, Takita J, Kaneko S, Kaneko M, Hayashi Y. Identification of side population cells (stem-like cell population) in pediatric solid tumor cell lines. *J Pediatr Surg* 2007; 42: 2040-2045
- 20 Wu C, Alman BA. Side population cells in human cancers. *Cancer Lett* 2008; 268: 1-9
- 21 Hermann PC, Bhaskar S, Cioffi M, Heeschen C. Cancer stem cells in solid tumors. *Semin Cancer Biol* 2010; 20: 77-84
- 22 Saikawa Y, Fukuda K, Takahashi T, Nakamura R, Takeuchi H, Kitagawa Y. Gastric carcinogenesis and the cancer stem cell hypothesis. *Gastric Cancer* 2010; 13: 11-24
- 23 Maenhaut C, Dumont JE, Roger PP, van Staveren WC. Cancer stem cells: a reality, a myth, a fuzzy concept or a misnomer? An analysis. *Carcinogenesis* 2010; 31: 149-158
- 24 Ding XW, Wu JH, Jiang CP. ABCG2: a potential marker of stem cells and novel target in stem cell and cancer therapy. *Life Sci* 2010; 86: 631-637
- 25 Smith PJ, Furon E, Wiltshire M, Campbell L, Feeney GP, Snyder RD, Errington RJ. ABCG2-associated resistance to Hoechst 33342 and topotecan in a murine cell model with constitutive expression of side population characteristics. *Cytometry A* 2009; 75: 924-933
- 26 奚忠, 江春平, 丁义涛. ABCG2在肝细胞性肝癌组织和肝癌细胞株中的表达及意义. 世界华人消化杂志 2009; 17: 247-252
- 27 曹宝山, 贾军, 任军, 马博, 鲁智豪, 邸立军, 宋国红, 方健, 马力文. 维拉帕米和利血平对A549和H460肺癌侧群细胞的阻断差异机制及意义. 现代肿瘤医学 2009; 17: 8-12
- 28 窦骏. 肿瘤干细胞研究面临的挑战与对策. 生物技术通讯 2009; 20: 561-563
- 29 Yilmaz M, Christofori G. EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer Metastasis Rev* 2009; 28: 15-33
- 30 Gavert N, Ben-Ze'ev A. Epithelial-mesenchymal transition and the invasive potential of tumors. *Trends Mol Med* 2008; 14: 199-209
- 31 Kabashima A, Higuchi H, Takaishi H, Matsuzaki Y, Suzuki S, Izumiya M, Iizuka H, Sakai G, Hozawa S, Azuma T, Hibi T. Side population of pancreatic cancer cells predominates in TGF-beta-mediated epithelial to mesenchymal transition and invasion. *Int J Cancer* 2009; 124: 2771-2779

■同行评价

本研究选题新颖, 为肿瘤干细胞在肝癌发生中的作用和调控机制提供新的依据。

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》名词术语标准

本刊讯 本刊名词术语一律标准化, 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.

FAF1 mRNA在胃癌组织中的表达及其与幽门螺杆菌感染的相关性

刘爱群, 葛莲英, 罗小玲, 罗元, 林思彤

■背景资料

胃癌的发生是多阶段、多基因调控的进展性过程。*H.pylori*感染不仅能够诱导胃黏膜上皮细胞的增殖,同时诱导其凋亡,凋亡的增加进一步引起胃上皮细胞代偿性过度增殖,当细胞增殖速率超过凋亡时,细胞凋亡被抑制,使异常细胞被清除的能力降低,而且处于过度增殖状态的细胞更易受到致癌物质的损伤,从而增加了DNA畸变的危险,最终可能导致胃癌的发生。

刘爱群, 葛莲英, 广西医科大学附属肿瘤医院内镜室 广西壮族自治区南宁市 530021

罗小玲, 广西医科大学科技处 广西壮族自治区南宁市 530021

罗元, 林思彤, 广西医科大学附属肿瘤医院病理科 广西壮族自治区南宁市 530021

刘爱群, 2008级广西医科大学肿瘤学在读博士, 主要从事消化系统肿瘤的基础和临床研究。

广西自然科学基金资助项目, No. 0728203

作者贡献分布: 此课题由刘爱群、葛莲英及罗小玲设计, 研究过程由刘爱群、罗元及林思彤操作完成; 数据分析及本论文写作由刘爱群与葛莲英完成。

通讯作者: 葛莲英, 主任医师, 530021, 广西壮族自治区南宁市河堤路71号, 广西医科大学附属肿瘤医院内镜室。

gelianying2008@163.com

电话: 0771-5310521

收稿日期: 2010-05-08 修回日期: 2010-07-05

接受日期: 2010-07-12 在线出版日期: 2010-08-18

Relationship between FAF1 mRNA expression and *Helicobacter pylori* infection in gastric cancer

Ai-Qun Liu, Lian-Ying Ge, Xiao-Ling Luo, Yuan Luo, Si-Tong Lin

Ai-Qun Liu, Lian-ying Ge, Department of Endoscopy, the Affiliated Tumor Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Xiao-Ling Luo, Science and Technology Agency, Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Yuan Luo, Si-Tong Lin, Department of Pathology, the Affiliated Tumor Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Supported by: the Natural Science Foundation of Guangxi, No. 0728203

Correspondence to: Lian-Ying Ge, Department of Endoscopy, the Affiliated Tumor Hospital of Guangxi Medical University, 71 Hedi Road, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. gelianying2008@163.com

Received: 2010-05-08 Revised: 2010-07-05

Accepted: 2010-07-12 Published online: 2010-08-18

Abstract

AIM: To investigate the expression of Fas-associated factor 1 (FAF1) mRNA and to analyze its relationship with *Helicobacter pylori* (*H.pylori*) infection in gastric cancer.

METHODS: Real-time fluorescent quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to detect the expression of FAF1 mRNA in 40 gastric cancer specimens and matched normal gastric mucosa tissue specimens. The β -actin gene was used as a reference for normalization of FAF1 expression level. *H.pylori* infection was detected by HE Staining, toluidine blue staining and Warthin-Starry silver staining.

RESULTS: The expression level of FAF1 mRNA was significantly lower in gastric cancer than in corresponding normal gastric mucosa tissue (0.27 ± 0.12 vs 0.48 ± 0.08 , $P < 0.05$). The expression level of FAF1 mRNA in well-differentiated cancer tissue was higher than that in poorly differentiated cancer tissue (0.39 ± 0.06 vs 0.19 ± 0.06 , $t = 9.966$, $P < 0.01$). The expression level of FAF1 mRNA was significantly lower in gastric cancer with distant metastasis than in that without distant metastasis (0.25 ± 0.11 vs 0.34 ± 0.14 , $t = 2.753$, $P < 0.01$). The expression of FAF1 mRNA showed no obvious relationship with tumor size, infiltration degree, stage, and lymph node metastasis in gastric cancer. The expression level of FAF1 in *H.pylori*-positive patients was lower than that in *H.pylori*-negative patients (0.18 ± 0.06 vs 0.29 ± 0.12 , $P < 0.05$), whereas FAF1 expression had no significant correlation with *H.pylori* infection in normal gastric mucosa tissue (0.49 ± 0.08 vs 0.47 ± 0.11 , $t = 0.6515$, $P > 0.05$).

CONCLUSION: Abnormal expression of the FAF1 gene may be related to the carcinogenesis and development of gastric cancer, and the expression level of FAF1 gene can be down-regulated by *H.pylori* infection during gastric carcinogenesis.

Key Words: Gastric cancer; Fas-associated factor 1 mRNA; Real-time fluorescent quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction; *Helicobacter pylori*

Liu AQ, Ge LY, Luo XL, Luo Y, Lin ST. Relationship between FAF1 mRNA expression and *Helicobacter pylori*

■同行评议者

关玉盘, 教授, 首都医科大学附属北京朝阳医院消化科

infection in gastric cancer. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2010; 18(23): 2422-2426

摘要

目的: 探讨FAF1 mRNA在胃癌组织中的表达水平及其临床意义以及与幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H.pylori*)感染的相关性。

方法: 应用实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)技术对40例胃癌患者及相应正常胃黏膜组织中的FAF1 mRNA进行定量检测, 以 β -actin为内参照。 *H.pylori*采用HE染色、甲苯胺蓝染色和Warthin-Starry银染法进行检测。

结果: 胃癌组织中FAF1 mRNA的表达明显低于相应正常胃黏膜组织(0.27 ± 0.12 vs 0.48 ± 0.08 , $P < 0.05$)。高、中分化的胃癌组织FAF1 mRNA表达值明显高于低、未分化的胃癌组织(0.39 ± 0.06 vs 0.19 ± 0.06 , $t = 9.966$, $P < 0.01$)。有远处转移的胃癌组织FAF1 mRNA表达值低于无远处转移的胃癌组织(0.25 ± 0.11 vs 0.34 ± 0.14 , $t = -2.753$, $P < 0.01$)。而FAF1 mRNA表达水平在浸润深度、有无淋巴结转移、肿瘤大小及临床分期不同的胃癌组织中无显著性差异。FAF1 mRNA表达量在*H.pylori*阳性胃癌组织中明显低于*H.pylori*阴性(0.18 ± 0.06 vs 0.29 ± 0.12 , $P < 0.05$)。FAF1表达量在*H.pylori*阳性正常胃黏膜组织中与*H.pylori*阴性比较无显著差异(0.49 ± 0.08 vs 0.47 ± 0.11 , $t = 0.6515$, $P > 0.05$)。

结论: FAF1基因的表达异常可能与胃癌的发生发展有关, *H.pylori*感染可能通过下调FAF1基因的表达而发挥致癌作用。

关键词: 胃癌; Fas相关因子1 mRNA; 实时荧光定量逆转录聚合酶链反应; 幽门螺杆菌

刘爱群, 葛莲英, 罗小玲, 罗元, 林思彤. FAF1 mRNA在胃癌组织中的表达与幽门螺旋杆菌感染的相关性. 世界华人消化杂志 2010; 18(23): 2422-2426
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2422.asp>

0 引言

近来研究表明, 肿瘤不仅是增殖和分化异常的疾病, 也是细胞凋亡异常的疾病, 细胞凋亡状态及其调控基因的异常, 参与肿瘤的发生、发展^[1]。Fas相关因子1(Fas-associated factor 1, FAF1)是新近发现的一种能够增强Fas诱导凋亡作用的蛋白, 且在胃癌组织中有特异性低表达^[2]。幽门螺

杆菌(*Helicobacter pylori*, *H.pylori*)感染与胃癌的发生关系密切, 被WHO确认为第I类致癌因子。然而, 其致癌的确切机制至今还不是很清楚。关于FAF1在*H.pylori*感染所致胃癌变过程中的表达改变及机制, 国内外尚未见相关报道。本研究采用实时荧光定量RT-PCR技术检测在胃癌组织及相对正常胃黏膜组织中FAF1 mRNA表达水平, 探讨FAF1基因与胃癌发生、发展的关系, 并同时进行*H.pylori*感染检测, 进一步了解胃癌发生发展的分子机制。

1 材料和方法

1.1 材料 收集2005-06/2006-04广西医科大学附属肿瘤医院及广西壮族自治区人民医院胃癌根治性手术切除并有完整检查资料的胃癌标本40例。其中男29例, 女11例, 年龄34-78(中位年龄55)岁, 所有病例术前均未进行放疗和化疗或免疫治疗。胃癌组织取自原发灶中央非坏死部分, 正常胃黏膜组织取自距离肿瘤原发灶 ≥ 5 cm处, 所有病例均经病理检查证实。胃癌组织标本经液氮浸泡5 min, 后放入-80℃冰箱低温保存。后经10%中性甲醛溶液固定, 石蜡包埋, 然后制备4 μ m厚连续切片。*H.pylori*感染分别用HE染色、美蓝染色、Warthin-Starry(W-S)银染3种方法检测, 其中3种方法中两种及以上者为*H.pylori*阳性, 标本取胃窦区正常黏膜, 若胃窦为肿瘤组织, 则取周围经病理检查证实的正常胃黏膜检测。引物采用Primer 5软件设计, FAF1上游引物: 5'-cttgctgaatcagggtctc-3', FAF1下游引物: 5'-tccaccccaattctgt agc-3', 扩增片段长度为164 bp, 内参 β -actin上游引物: 5'-accgagcgcggtacagc-3', β -actin下游引物: 5'-ctcattgccaatggtgat-3', 扩增长度为180 bp, 所有引物均由上海生工生物技术有限公司合成。定量PCR试剂盒为美国QIAGEN公司产品。

1.2 方法 取0.05-0.1 g胃组织采用TRIzol法提取总RNA。将上述提取的完整的总RNA按试剂说明书操作逆转录合成cDNA。取上述逆转录反应产物cDNA 2 μ L, 加2 \times Quanti Tect SYBR Green PCR buffer 12.5 μ L, 10 μ mol/L上下游引物各0.75 μ L, RNase-free Water 9 μ L(25 μ L反应总体积)进行定量PCR。反应条件: 94℃ 5 min预变性, 94℃ 45 s, 55℃ 45 s, 72℃ 60 s, 35个循环, 72℃ 10 min末延伸。55℃采集光源, β -actin作为内参照, 每份样本均根据 β -actin的拷贝数进行校正。结果的计算: $\Delta\Delta Ct = (\text{样品} Ct \text{均值} - \text{内参照} Ct \text{均值}) - (\text{对照样品} Ct \text{均值} - \text{对照内参照} Ct \text{均值})$, 然后取 $2^{-\Delta\Delta Ct}$

■创新盘点

国内外尚未见有关FAF1在*H.pylori*感染所致胃癌变过程中的表达及机制的报道, 而本研究采用比较敏感的荧光实时定量PCR法检测了40例患者胃癌和正常胃黏膜组织中FAF1 mRNA的水平, 并进一步分析他们的表达与临床指标的关系。

■ 相关报道

Björing-Poulsen 等在对各种不同组织来源的肿瘤用Western blot检测中发现, FAF1只在胃癌组织中特异低表达, 尤其是在含印戒细胞的胃癌组织中.

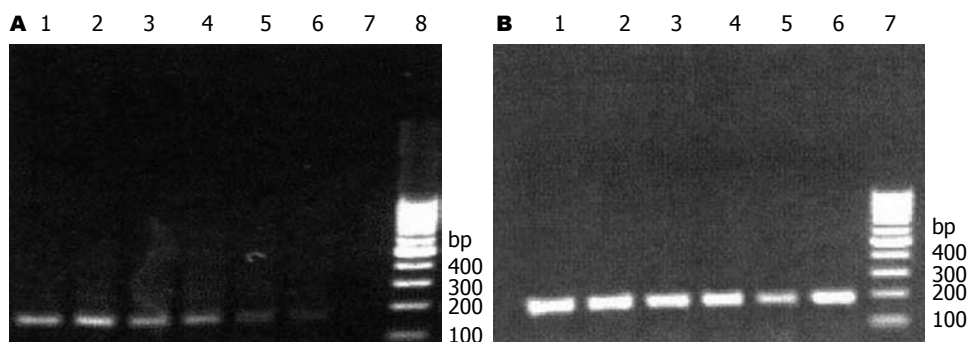


图1 FAF1 mRNA和 β -actin mRNA RT-PCR产物电泳图. A: FAF1 mRNA; 1-2: 正常组织; 3-6: 癌组织; 7: 阴性对照; 8: 相对分子质量参照物(DNA Marker); B: 内参照 β -actin mRNA; 1-6: β -actin; 7: 相对分子质量参照物(DNA Marker).

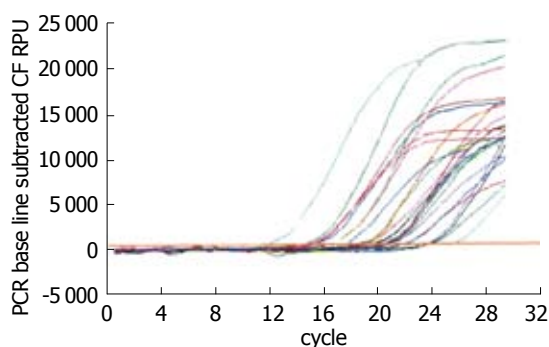


图2 FAF1 mRNA的荧光定量RT-PCR扩增曲线.

即代表被检样品初始FAF1 mRNA的含量.

统计学处理 采用SPSS15.0软件进行统计学分析. FAF1 mRNA的相对含量以mean \pm SD表示. 统计学方法采用单因素方差分析及 t 检验, 方差不齐用 t' 检验, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 胃癌组织及正常胃黏膜组织中FAF1 mRNA水平 胃癌组织和相对正常胃黏膜组织中均检测到FAF1及 β -actin基因的表达(图1, 2). 胃癌组织及正常胃黏膜组织中FAF1 mRNA的含量分别为 0.27 ± 0.12 、 0.48 ± 0.08 , 两组间相比差异有显著性($P<0.05$).

2.2 不同临床参数胃癌组织中FAF1 mRNA水平的关系 高中分化的胃癌组织、低未分化的胃癌组织中FAF1 mRNA含量分别为 0.39 ± 0.06 、 0.19 ± 0.06 , 两组间相比差异有显著性($t = 9.966$, $P<0.01$); 有远处转移的胃癌组织、无远处转移的胃癌组织中FAF1 mRNA含量分别为 0.19 ± 0.07 、 0.29 ± 0.12 , 两组间相比差异有显著性($t = -2.753$, $P<0.01$), 而FAF1 mRNA表达水平在浸润深度、有无淋巴结转移、肿瘤大小及临床分期不同的胃癌组织中无显著性差异(表1).

2.3 胃癌和相对正常胃黏膜组织中FAF1 mRNA

表1 不同临床参数胃癌组织中FAF1 mRNA含量 (mean \pm SD)

临床参数	<i>n</i>	FAF1 mRNA	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
浸润深度			1.090	0.283
浆膜内	7	0.30 ± 0.12		
浆膜及浆膜外	33	0.25 ± 0.11		
临床分期			1.568	0.125
I、II	8	0.32 ± 0.12		
III、IV	32	0.25 ± 0.11		
肿瘤直径(cm)			0.100	0.921
≥ 5	18	0.26 ± 0.11		
< 5	22	0.26 ± 0.12		
淋巴结转移			1.266	0.213
有	3	0.34 ± 0.14		
无	37	0.25 ± 0.11		
远处转移			-2.753	0.009
有	12	0.19 ± 0.07		
无	28	0.29 ± 0.12		
分化程度			9.966	0.000
高、中分化	14	0.39 ± 0.06		
低、未分化	26	0.19 ± 0.06		

含量与 $H.pylori$ 感染的关系 40例患者中 $H.pylori$ 感染率为(21/40, 52.50%). $H.pylori$ 常位于胃黏膜腺体隐窝处, 聚集存在, 镜下呈淡蓝色、棕黑色、淡紫色短棒状(图3). 在 $H.pylori$ 阳性和 $H.pylori$ 阴性胃癌中, FAF1 mRNA含量分别为 0.18 ± 0.06 和 0.29 ± 0.12 , $H.pylori$ 阳性者明显低于 $H.pylori$ 阴性, 二者之间有显著性差异($t = 3.6084$, $P<0.05$). 在 $H.pylori$ 阳性和 $H.pylori$ 阴性正常胃黏膜组织中, FAF1含量分别为 0.49 ± 0.08 和 0.47 ± 0.11 , 二者之间无显著差异($t = 0.6515$, $P>0.05$).

3 讨论

FAF1是新近发现的Fas死亡信号结合体的成员之一, 其N-末端区域能与Fas特异性的结合, 他是

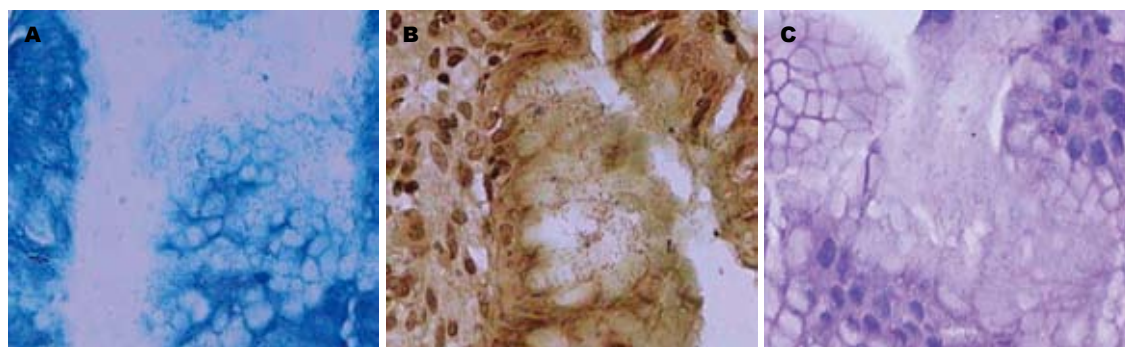


图 3 *H. pylori*在胃黏膜表面的聚焦($\times 400$). A: 美蓝染色呈蓝色; B: W-S银染呈棕黑色; C: HE染色呈淡紫色.

同行评价

本文选题新颖, 设计可靠, 结论明确, 具有一定的科学性、可读性和临床科研价值.

能够增强Fas介导细胞凋亡的蛋白分子^[3-6], 他编码的一种蛋白牵涉肿瘤细胞的存活和人类一些肿瘤的发病^[7]. 甚至在缺乏任何外来死亡信号的情况下, FAF1过表达也会启动细胞凋亡^[8]. 除了与Fas相互作用之外, FAF1也是蛋白激酶CK2的调节亚单位的成员之一^[2], 二者相互结合成复合物, 当受到DNA损伤刺激时其诱导凋亡作用显著增加^[9]. 目前对FAF1与癌症的关系的研究还很少. 更令人感兴趣的是, Bjorling-Poulsen等^[2]在对各种不同组织来源的肿瘤用Western blot检测中发现, FAF1只在胃癌组织中特异低表达尤其是在含印戒细胞的胃癌组织中. 这提示FAF1可作为胃癌比较特异的诊断指标. 因此研究胃癌组织中的FAF1的表达水平的改变可望为胃癌的基因治疗提供一个新的靶基因. 本研究采用比较敏感的荧光实时定量PCR法检测了40例患者胃癌和正常胃黏膜组织中FAF1 mRNA的水平, 并进一步分析他们的表达与临床指标的关系. 结果表明, FAF1 mRNA在癌组织中的表达水平明显低于正常组织, 并与肿瘤的分化程度、有无远处转移等临床病程特征有着明显的关联: 高中分化胃癌患者的FAF1 mRNA表达值显著高于低、未分化患者; 无远处转移的高于有远处转移, 这说明FAF1与胃癌细胞的分化及生存预后具有重要的关系, 他可能作为一个抑癌基因参与胃癌的发生发展过程.

*H. pylori*是人类胃癌的 I 类致癌原, 在胃癌的发生发展中起重要致病作用, 但其致病的确切机制不清. *H. pylori*在胃内的寄居部位与胃癌的好发部位一致, 这些结论也显示了两者的相关性. 临床流行病学资料显示: 在*H. pylori*感染的高风险人群中进行根治性治疗能明显降低胃癌的危险率^[10,11]. 一般认为*H. pylori*感染是胃癌发生发展进程中的首要推动因子. *H. pylori*感染后, 增加了胃黏膜的损伤程度和敏感性, 使细胞

具备了向恶性方向转化的条件. 一些学者应用cDNA array分析了*H. pylori*诱导的胃上皮细胞基因表达谱的变化, 表明在*H. pylori*的刺激下, 胃癌细胞株有21个基因上调和17个基因下调. 对基因表达变化的进一步研究, 将有助于了解宿主细胞的抵抗策略和适应性变化的根本机制, 从而为干预有关环节, 减轻宿主细胞对*H. pylori*的易感性提供新的思路^[12]. 胃癌的发生是多阶段、多基因调控的进展性过程. *H. pylori*感染不仅能够诱导胃黏膜上皮细胞的增殖, 同时诱导其凋亡, 凋亡的增加进一步引起胃上皮细胞代偿性过度增殖, 当细胞增殖速率超过凋亡时, 细胞凋亡被抑制, 使异常细胞被清除的能力降低, 而且处于过度增殖状态的细胞更易受到致癌物质的损伤, 从而增加了DNA畸变的危险, 最终可能导致胃癌的发生^[13,14]. 本研究实验结果为40例胃癌标本中, *H. pylori*感染率达到52.50%, 比国内外一些文献报道低^[15,16], 可能与本研究样本例数较少有关. 本研究在检测过程中发现*H. pylori*感染存在于胃黏膜表面黏液中、细胞表面、胃小凹、腺腔以及癌旁组织中, 而癌组织内少见*H. pylori*, 其可能原因是胃癌组织中的微环境不适合*H. pylori*生长, 或者是胃癌组织释放了某种破坏因子使局部*H. pylori*破坏崩解所致, 这与文献报道较为一致^[17]. *H. pylori*感染导致胃癌的途径有很多种^[18-20], 尚有待我们的进一步研究, 而对*H. pylori*感染与胃癌中特异性低表达基因的研究将具有重要的意义.

在40例胃癌标本中*H. pylori*感染阳性组与阴性组相比, 前者FAF1阳性表达率明显低于后者($P<0.05$), 而在相应的正常胃黏膜组织中表达无明显差异. 表明*H. pylori*感染通过调控FAF1基因的表达使其明显下调, 从而使癌细胞凋亡减少, 细胞生存期延长, 细胞数量增加并进一步促进细胞增殖, 从而影响细胞凋亡与增殖的平衡, 使

胃癌细胞获得恶性转化的潜能与特征,促进了胃癌的发生发展,在一定程度上两者呈负相关。同时在本研究中我们发现了这样一个可能,即FAF1在胃癌中的减少表达或许是逃避凋亡的另外一种途径。随着分子生物学的发展,应用一些基因的敲除或敲入技术,沉默癌基因和*H.pylori*或激活抑癌基因,相信会成为治疗胃癌的一个有效手段。

4 参考文献

- Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995; 267: 1456-1462
- Bjørling-Poulsen M, Seitz G, Guerra B, Issinger OG. The pro-apoptotic FAS-associated factor 1 is specifically reduced in human gastric carcinomas. *Int J Oncol* 2003; 23: 1015-1023
- Chu K, Niu X, Williams LT. A Fas-associated protein factor, FAF1, potentiates Fas-mediated apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 11894-11898
- Ryu SW, Lee SJ, Park MY, Jun JI, Jung YK, Kim E. Fas-associated factor 1, FAF1, is a member of Fas death-inducing signaling complex. *J Biol Chem* 2003; 278: 24003-24010
- De Zio D, Ferraro E, D'Amelio M, Simoni V, Bordini M, Soroldoni D, Berghella L, Meyer BI, Cecconi F. Faf1 is expressed during neurodevelopment and is involved in Apaf1-dependent caspase-3 activation in proneural cells. *Cell Mol Life Sci* 2008; 65: 1780-1790
- Adham IM, Khulan J, Held T, Schmidt B, Meyer BI, Meinhardt A, Engel W. Fas-associated factor (FAF1) is required for the early cleavage-stages of mouse embryo. *Mol Hum Reprod* 2008; 14: 207-213
- Altomare DA, Menges CW, Pei J, Zhang L, Skele-Stump KL, Carbone M, Kane AB, Testa JR. Activated TNF-alpha/NF-kappaB signaling via down-regulation of Fas-associated factor 1 in asbestos-induced mesotheliomas from Arf knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 3420-3425
- Park MY, Ryu SW, Kim KD, Lim JS, Lee ZW, Kim E. Fas-associated factor-1 mediates chemotherapeutic-induced apoptosis via death effector filament formation. *Int J Cancer* 2005; 115: 412-418
- Guerra B, Boldyreff B, Issinger OG. FAS-associated factor 1 interacts with protein kinase CK2 in vivo upon apoptosis induction. *Int J Oncol* 2001; 19: 1117-1126
- Cheung TK, Xia HH, Wong BC. Helicobacter pylori eradication for gastric cancer prevention. *J Gastroenterol* 2007; 42 Suppl 17: 10-15
- Fukase K, Kato M, Kikuchi S, Inoue K, Uemura N, Okamoto S, Terao S, Amagai K, Hayashi S, Asaka M. Effect of eradication of Helicobacter pylori on incidence of metachronous gastric carcinoma after endoscopic resection of early gastric cancer: an open-label, randomised controlled trial. *Lancet* 2008; 372: 392-397
- 刘文忠. 幽门螺旋杆菌研究进展. 第1版. 上海: 上海科学技术文献出版社, 2001: 41-42
- Peter S, Beglinger C. Helicobacter pylori and gastric cancer: the causal relationship. *Digestion* 2007; 75: 25-35
- Li WQ, Zhang L, Ma JL, Zhang Y, Li JY, Pan KF, You WC. Association between genetic polymorphisms of DNA base excision repair genes and evolution of precancerous gastric lesions in a Chinese population. *Carcinogenesis* 2009; 30: 500-505
- 高洪臣, 杨丹, 谭岩. 不同胃黏膜病变中幽门螺旋杆菌感染分析. *吉林医学* 2007; 28: 918-919
- Motta CR, Cunha MP, Queiroz DM, Cruz FW, Guerra EJ, Mota RM, Braga LL. Gastric precancerous lesions and Helicobacter pylori infection in relatives of gastric cancer patients from Northeastern Brazil. *Digestion* 2008; 78: 3-8
- 于秀文, 董楠楠, 宫月华, 徐倩, 袁媛. 幽门螺杆菌在胃癌及其癌前疾病中的原位检测及意义. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 3740-3745
- Ladeira MS, Bueno RC, Dos Santos BF, Pinto CL, Prado RP, Silveira MG, Rodrigues MA, Bartchewsky W Jr, Pedrazzoli J Jr, Ribeiro ML, Salvadori DM. Relationship among oxidative DNA damage, gastric mucosal density and the relevance of cagA, vacA and iceA genotypes of Helicobacter pylori. *Dig Dis Sci* 2008; 53: 248-255
- Kobayashi M, Lee H, Nakayama J, Fukuda M. Roles of gastric mucin-type O-glycans in the pathogenesis of Helicobacter pylori infection. *Glycobiology* 2009; 19: 453-461
- Forman D, Pisani P. Gastric cancer in Japan--honing treatment, seeking causes. *N Engl J Med* 2008; 359: 448-451

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》被收录情况

本刊讯 《世界华人消化杂志》被国际权威检索系统美国《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(科技部遴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、中国学术期刊文摘、中国生物医学文献光盘数据库、中文科技资料目录医药卫生、解放军医学图书馆CMCC系统、中国医学文摘外科学分册(英文版)、中国医学文摘内科学分册(英文版)收录。(编辑部主任: 李军亮 2010-01-08)

HDGF在肝癌组织和肝癌细胞HepG2中的表达及其意义

周南翔, 周艳艳, 霍继荣

周南翔, 周艳艳, 霍继荣, 中南大学湘雅二医院消化内科 湖南省长沙市 410011

周南翔, 中南大学湘雅二医院消化内科在读博士, 主要从事消化系统肿瘤的研究。

作者贡献分布: 此课题由周南翔、周艳艳及霍继荣设计; 研究过程由周南翔操作完成; 数据分析由周艳艳完成; 本论文写作由周南翔与周艳艳完成。

通讯作者: 霍继荣, 教授, 410011, 湖南省长沙市人民路139号, 中南大学湘雅二院消化内科。hjr198@hotmail.com

电话: 0731-85295035 传真: 0731-85533525

收稿日期: 2010-05-11 修回日期: 2010-06-08

接受日期: 2010-06-22 在线出版日期: 2010-08-18

Significance of HDGF expression in hepatocellular carcinoma tissue and HepG2 cells

Nan-Xiang Zhou, Yan-Yan Zhou, Ji-Rong Huo

Nan-Xiang Zhou, Yan-Yan Zhou, Ji-Rong Huo, Department of Gastroenterology, the Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410011, Hunan Province, China

Correspondence to: Professor Ji-Rong Huo, Department of Gastroenterology, the Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410011, Hunan Province, China. hjr198@hotmail.com

Received: 2010-05-11 Revised: 2010-06-08

Accepted: 2010-06-22 Published online: 2010-08-18

Abstract

AIM: To investigate the expression of hepatoma-derived growth factor (HDGF) in hepatocellular carcinoma (HCC) tissue and HepG2 cells and to analyze its significance.

METHODS: Ten HCC tissue samples and matched noncancerous tissue samples were collected. The mRNA expression of HDGF in these HCC samples, noncancerous tissue samples and HepG2 cells was detected by real-time RT-PCR. The protein expression of HDGF in 137 HCC tissue samples and 49 normal liver tissue samples was examined by immunohistochemistry. The relationship between HDGF expression and clinicopathological parameters in HCC was then analyzed.

RESULTS: The expression levels of HDGF mRNA were 21.11 and 11.39 times higher in

HCC tissue and HepG2 cells than in noncancerous tissue, respectively. The positive rate of HDGF expression in HCC tissue was significantly higher than that in normal liver tissue (77.4% vs 51.5%, $P = 0.011$). High expression of HDGF protein was positively correlated with T classification, N classification and clinical stage (all $P < 0.05$) in HCC patients. Univariate Cox analysis showed that HDGF expression, N classification and clinical stage had significant correlation with survival prognosis of HCC patients ($P = 0.028, 0.041$ and 0.000 ; HR = 1.557, 1.526 and 2.316, respectively). Multivariate analysis showed that HDGF expression might be an independent prognostic indicator ($P = 0.000$, HR = 0.358) for the development and progression of HCC. Patients with higher HDGF expression showed a significantly shorter overall survival time than those with low HDGF expression.

CONCLUSION: HDGF is highly expressed in HCC tissue and HepG2 cells. High HDGF expression is an independent prognostic factor in HCC patients. High HDGF expression is associated with poor overall survival in patients with HCC.

Key Words: Hepatocellular carcinoma; HepG2 cell; Hepatoma-derived growth factor; RT-PCR; Immunohistochemistry; Multivariate analysis

Zhou NX, Zhou YY, Huo JR. Significance of HDGF expression in hepatocellular carcinoma tissue and HepG2 cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(23): 2427-2433

摘要

目的: 探讨肝癌组织中及肝癌细胞HepG2中HDGF的表达及其意义。

方法: 收集10对配对的新鲜肝癌及其癌旁组织, 提取总RNA, 并用同样的方法提取HepG2细胞的总RNA。随后利用M-MLV逆转录酶逆转录成cDNA, RT-PCR检测HDGF在肝癌组织、癌旁组织及HepG2细胞中的表达情况。收集137例肝癌和49例正常对照组织石蜡切片, 免疫组织化学检测HDGF在肝癌与非癌组织之间的差异表达, 并分析该基因表达与肝癌患

■背景资料

HDGF是HDGF家族的第一位成员, 是一种肝素结合蛋白, 它具有高度保守的N端氨基酸序列, 称其为“hath”区。HDGF通过核定位信号序列转位于细胞核中, 并在诱导细胞生长活性中必不可少。HDGF是在肝脏再生的DNA合成前的一种重要的自分泌因子, 能够促进肝组织的再生。HDGF在多种肿瘤细胞中高表达, 并与肿瘤的不良预后密切相关。

■同行评议者

秦成勇, 教授, 山东省立医院消化内科

■研究前沿

研究表明HDGF是在肝脏的再生的DNA合成前的一种重要的自分泌因子,能够促进肝组织的再生.HDGF在多种肿瘤细胞中高表达,并与肿瘤的不良预后密切相关.

者临床病理参数之间的关系.

结果:成功提取肝癌及其癌旁组织和HepG2细胞的总RNA. RT-PCR检测显示在肝癌组织及HepG2细胞中HDGF mRNA表达量都明显高于癌旁临近的非癌组织,最高分别为癌旁组织的21.11倍和11.39倍. 免疫组织化学分析显示HDGF在肝癌组织中高表达占77.4%,明显高于正常组织(51.5%, $P = 0.011$),且高表达的HDGF与肝癌的临床分期、N分类和T分类呈明显相关(均 $P < 0.05$). Cox模型单变量分析显示, N分类、临床分期、HDGF表达水平与患者的生存预后明显相关($P = 0.028, 0.041, 0.000$; HR = 1.557, 1.526, 2.316). 多变量分析, HDGF表达水平可以作为独立的预后因素影响疾病的发生及发展($P = 0.000$, HR = 0.358). Kaplan-Meier生存分析, 过表达的HDGF可明显缩短患者的生存时间.

结论:在肝癌组织和HepG2细胞中HDGF高表达. HDGF是肝癌患者一个独立的预后预测因子.

关键词:肝癌; 肝癌细胞HepG2; 肝癌细胞衍生生长因子; 逆转录聚合酶链式反应; 免疫组织化学; 多因素分析

周南翔, 周艳艳, 霍继荣. HDGF在肝癌组织和肝癌细胞HepG2中的表达及其意义. 世界华人消化杂志 2010; 18(23): 2427-2433
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2427.asp>

0 引言

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)的致死率及发病率分别占世界的第3位和第5位,每年约有600 000患者死于肝癌,每年新增病例约100万^[1]. 我国地属B型肝炎病毒慢性感染率和饮食结构中黄曲霉素暴露率较高的东亚地区,是肝癌的高发国家,在世界每年肝癌死亡病例和新增病例中,我国占全世界的45%和40%以上^[2]. 目前引起肝癌发病的因素有多种,包括病毒性肝炎、黄曲霉素、遗传因素等,他们导致癌基因的过度表达,抑癌基因丢失表达,最终引起肝癌的发生. 肝癌细胞衍生生长因子(hepatoma-derived growth factor, HDGF)是一个肝癌获得性的生长因子,于1986年由Klagsbrun等^[3]首先从肝癌细胞培养上清液中分离,1994年该基因由Nakamura等克隆^[4]. HDGF具有促进细胞增殖、血管生成及营养神经活性,与包括肝癌在内的多种肿瘤的发生和进展相关^[5]. 本研究先通过RT-PCR分析新鲜的肝癌与癌旁组织配对标本和

肝癌细胞HepG2中HDGF mRNA的表达情况,再通过免疫组织化学在蛋白水平分析肝癌和正常组织中该因子的表达情况,并分析其与肝癌患者临床病理参数之间的关系,旨在探讨HDGF的临床病理意义.

1 材料和方法

1.1 材料 收集2008-05/2009-06中南大学湘雅二医院经病理诊断为HCC的新鲜肝癌和对应的临近癌旁组织共10对,液氮冻存后转入-70℃冰箱保存. HepG2细胞由中南大学肿瘤研究所保存,该细胞在RPMI 1640+100 mL/L FBS的生长培养基中,37℃、50 mL/L CO₂饱和湿度条件下培养生长. 收集2008-12/2009-12中南大学湘雅二医院肝癌137例和对照正常组织石蜡切片49例,其中肝癌患者患病年龄17-79(中位患病年龄48)岁. 入选者的病史资料齐全. 依照国际抗癌联盟于2002年提出的最新恶性消化系肿瘤的TMN6分期标准^[6],将入选患者的肝癌进行分期. DEPC, TRIzol, 荧光定量PCR试剂盒, Taq酶和DNA marker(大连宝生物公司); TIANScript cDNA第一链合成试剂盒(Tiagen公司); PCR试剂盒, DNA Marker, DEPC(TaKaRa公司); HDGF、内参GAPDH基因PCR引物(上海英骏生物公司); HDGF兔抗人多克隆抗体(武汉三鹰公司); Beta-actin(Santa Cruz公司); SP超敏试剂盒, 内源性生物素阻断试剂盒, DAB显色液(福州迈新生物技术公司).

1.2 方法

1.2.1 提取肝癌组织及其配对癌旁组织, 肝癌细胞HepG2的总RNA:取组织100 mg研磨至粉末,加入TRIzol 1 mL混匀,转入1.5 mL EP管. 取对数生长期肝癌细胞HepG2,预冷的PBS洗2次,加入TRIzol 1 mL,冰上静置10 min后吹打,将悬液转移到1.5 mL EP管中. 每升TRIzol加氯仿0.2 L,紧闭离心管,剧烈摇荡15 s,室温放置2 min,4℃,12 000 g,30 min. 取上层水相转入新的离心管,等比例加入异丙醇,上下颠倒10次后,4℃,12 000 g,30 min. 弃上清液,加入1 mL的750 mL/L乙醇,混匀,4℃,12 000 g,10 min. 弃上清,超净台内室温干燥10 min. 将RNA溶于30 μL DEPC水中,4℃过夜,分装保存于-80℃. 1%琼脂糖凝胶电泳观察RNA质量,并用紫外分光光度计测定抽提RNA浓度、纯度.

1.2.2 逆转录合成cDNA和实时qPCR反应:取3 μg总RNA按照逆转录第一链合成试剂盒说明书进行cDNA的合成. RT-PCR法按照试剂盒说明书进行操作,95℃预变性,95℃变性,上荧

光定量仪反应, 检测各模板的Ct值. 采用相对定量法来比较mRNA表达的差异: 以临近癌旁组织GAPDH为内参, 计算肝癌组织的 $\Delta\Delta Ct$ 值, $\Delta\Delta Ct = (\text{样品目的基因的Ct值} - \text{对照目的基因的Ct值}) - (\text{样品看家基因的Ct值} - \text{对照看家基因的Ct值})$. 通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法确定各肝癌细胞株中HDGF表达特性, 用单因素方差分析肝细胞、肝癌细胞株之间HDGF的表达差异. PCR引物由上海英骏生物公司合成: GAPDH sense: 5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3'; Antisense: 5'-TGGTGAAGACGCCAGTGGA-3'; HDGF sense: 5'-GAGGGTGACGGTGATAAGAA-3'; Antisense: 5'-GAAACATTGGTGGCTACAGG-3'.

1.2.3 免疫组织化学检测: 石蜡切片常规脱蜡, 入水, 高温高压修复抗原; 滴加内源性过氧化物酶阻断剂, 37 °C 10 min, PBS冲洗3次×5 min; 滴加非免疫性动物血清, 37 °C 10 min; 弃去非免疫性动物血清; 滴加一抗HDGF多克隆抗体(稀释比例为1:50), 4 °C过夜, PBS洗3次×5 min; 滴加二抗生物素标记的羊抗鼠/兔IgG(SP试剂盒C液), 37 °C孵育30 min, PBS洗3次×5 min; 滴加链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶溶液, 37 °C孵育30 min, PBS洗3次×5 min; 滴加新鲜配制的DAB溶液, 显色5-10 min; 自来水冲洗, 苏木素复染, 酒精脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片. PBS替代一抗作为空白对照, 细胞膜及细胞质中呈现棕黄色颗粒为阳性. HDGF主要以核内表达为主, 该基因也同样在内皮细胞中表达较高. 因此我们评估HDGF表达强度的评价的方法为: 在检测的5个视野中, 每个视野平均有90%以上的细胞为表达阳性, 同时表达水平应相当或高于内皮细胞核表达为HDGF表达指数水平 II (expression index, EI levels II)即高表达(high expression), 反之为表达指数水平 I (expression index, EI levels I)即低表达(low expression).

统计学处理 采用SPSS17.0统计软件包进行统计学处理. 荧光定量PCR法检测肝癌细胞株HDGF表达特性, 结果比较采用单因素方差分析, 多重比较采用SNK检验. χ^2 检测HDGF蛋白表达与临床病理参数之间的相关性. Kaplan-Meier和Log-rank test方法分别绘制和比较生存曲线. Cox风险比例模型分析影响肝癌患者预后的因素.

2 结果

2.1 RNA质量 提取的肝癌和其对应的癌旁临近

表 1 肝癌细胞HDGF mRNA的表达(mean ± SD)

标本样品	ΔCt	$2^{-\Delta\Delta Ct}(\text{folds})$
N1	7.13 ± 0.86	1.49
T1	4.53 ± 0.32	9.06
N2	6.95 ± 0.76	1.69
T2	4.60 ± 0.37	8.63
N3	6.78 ± 0.37	1.90
T3	4.35 ± 0.87	10.27
N4	6.28 ± 1.171	2.69
T4	4.65 ± 0.58	8.34
N5	7.71 ± 1.82	1.00
T5	5.40 ± 1.31	4.96
N6	6.29 ± 0.51	2.67
T6	4.77 ± 0.51	7.67
N7	6.13 ± 1.24	2.99
T7	4.54 ± 1.08	9.00
N8	6.85 ± 1.19	1.82
T8	4.79 ± 0.85	7.57
N9	6.81 ± 1.01	1.87
T9	3.31 ± 0.81	21.11
N10	6.58 ± 0.36	2.19
T10	3.77 ± 0.71	15.35
HepG2	4.20 ± 0.35	11.39

组织, 以及HepG2细胞RNA用1%琼脂糖凝胶电泳检测其完整性. 电泳检测有3条清晰的rRNA带: 28S、18S、5S, 说明RNA无降解, 质量较好(图1).

2.2 荧光定量PCR分析检测mRNA表达情况 通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法确定肝癌组织及HepG2细胞HDGF mRNA的表达差异. 我们以HDGF表达最小的癌旁组织N5作为对照, 计算各自组织细胞中HDGF的表达量(表1). 与非癌肝组织相比, 所有的肿瘤组织及HepG2细胞都展示了HDGF高表达, 其中T9样品表达量最高, 为21.11倍. 而HepG2细胞第3高表达为11.39倍.

2.3 免疫组织化学检测蛋白表达 137例肝癌组织和49例正常肝组织中HDGF的表达结果显示, HDGF主要在细胞核中表达, 且肝癌组织HDGF的表达明显比正常组织中高($P = 0.011$, 表2).

2.4 HDGF在HCC患者中的表达与临床病理参数之间的关系 HDGF在细胞核中过表达与年龄、性别、是否吸烟、饮酒以及HBV感染、有无远处转移无关, 但与疾病的临床分期、T分类和N分类明显相关(表3).

2.5 Cox模型分析影响肝癌患者预后的因素 单变量分析显示, N分类、临床分期、HDGF表达水平与患者的生存预后明显相关($P = 0.028, 0.041$,

■ 相关报道

Ren等的研究表明, HDGF在肺癌中过表达, 与其侵袭性生物学行为和不良临床预后相关, 并证实HDGF的多克隆抗体对于肺癌细胞A549的异种移植瘤模型具有抗肿瘤活性.

■创新盘点

目前关于HDGF在中国肝癌患者中的表达研究报道不多,在本研究中,首先利用实时荧光定量PCR技术比较了10对配对的肝癌与其临近的非癌肝组织,以及HepG2细胞中HDGF表达水平。

表 2 HDGF在肝癌与正常组织中的表达 (n,%)

标本分组	n	HDGF		P值
		高表达	低表达	
肝癌组织	137	73(77.4)	64(26.6)	0.011
正常肝组织	49	16(51.5)	33(48.5)	

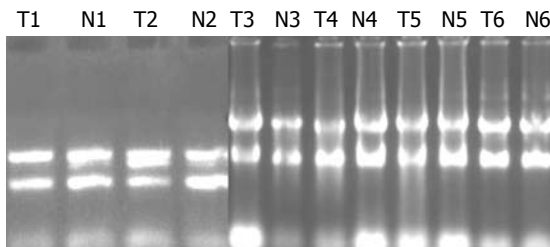


图 1 部分肝癌和其对应的癌旁临近组织总RNA的电泳结果. T: 肝癌组织; N: 对应的癌旁组织.

0.000; HR = 1.557, 1.526, 2.316). 高表达的HDGF, N₂, N₃和临床分期为III、IV期使肝癌的不良预后的风险增加, 并且是影响其预后的独立因素. 多变量分析, HDGF表达水平可以作为独立的预后因素影响疾病的发生及发展($P = 0.000$, HR = 0.358). Kaplan-Meier生存分析, HDGF高表达的HCC患者其最长生存时间为72 mo, 且仅为患者总数的17%, 而HDGF低表达的患者最长生存时间为96 mo, 占总数的38%. 说明高表达的HDGF可明显缩短患者的生存时间(图2, 表4).

3 讨论

肝癌与其他肿瘤一样, 是一个多因素参与、多阶段发展的复杂过程. HDGF是HDGF家族的第一位成员, 是一种肝素结合蛋白, 它具有高度保守的N端氨基酸序列, 称其为“hath(homologous to amino terminus of HDGF)”区^[6,7]. HDGF通过核定位信号序列转位于细胞核中, 并在诱导细胞生长活性中必不可少, 对某些HCC细胞及成纤维细胞, 内皮细胞, 血管平滑肌细胞, 胚胎肝细胞具有促有丝分裂的作用^[4,8-10], 研究表明HDGF是在肝脏的再生的DNA合成前的一种重要的自分泌因子, 能够促进肝组织的再生^[11]. HDGF在多种肿瘤细胞中高表达, 并与肿瘤的不良预后密切相关. Ren等^[12]的研究表明, HDGF在肺癌中过表达, 与其侵袭性生物学行为和不良临床预后相关, 并证实HDGF的多克隆抗体对于肺癌细胞A549的异种移植瘤模型具有抗肿瘤活性. Yamamoto等^[13]对于食管癌的研究也表明, HDGF的表达情况是评价早期食管癌(1-2期)预

表 3 HDGF在肝癌中的表达与临床病理参数相关性 (n,%)

临床病理参数	n	HDGF		P值
		高表达	低表达	
标本分组				
肝癌组织	137	73(77.4)	64(26.6)	0.011
正常肝组织	49	16(51.5)	33(48.5)	
性别				
男	87	51(81.0)	36(19.0)	0.112
女	50	22(43.6)	28(56.4)	
年龄(岁)				
≥50	69	36(75.3)	33(24.7)	0.865
<50	68	37(47.7)	31(52.3)	
吸烟				
是	47	24(79.5)	23(20.5)	0.722
否	90	49(76.8)	41(23.2)	
饮酒				
是	48	28(0.0)	20(0.0)	0.473
否	89	45(0.0)	44(0.0)	
HBV感染				
是	103	54(0.0)	49(0.0)	0.843
否	34	19(0.0)	15(0.0)	
T分类				
T ₁ -T ₂	98	42(73.3)	56(26.7)	0.000
T ₃ -T ₄	39	31(87.5)	8(12.5)	
N分类				
N ₀ -N ₁	64	22(66.2)	42(33.8)	0.000
N ₂ -N ₃	73	51(86.7)	22(13.3)	
远处转移				
有	33	22(87.5)	11(12.5)	0.109
无	104	51(76.9)	53(23.1)	
临床分期				
I-II	56	11(54.5)	45(45.5)	0.000
III-IV	81	62(89.0)	19(11.0)	

后的独立因素, 但不能作为评价进展期食管癌(3-4期)的独立因素. Mao等^[14]的研究表明HDGF的高表达将通过Erk1/2的活化和促进细胞锚定非依赖性生长而促使胃上皮肿瘤化, 且与胃癌的低分化和淋巴转移倾向相关. 廖斐等^[15]通过siRNA抑制HDGF mRNA和蛋白质的表达, 发现其可能通过下调PCNA的表达和抑制p-ERK1/2蛋白活化而抑制大肠癌LoVo细胞的增殖. Tsang等^[16,17]研究证实, 敲低HDGF表达的HepG2细胞, 促凋亡蛋白Bad的表达上调并且有ERK和Akt的激活, 导致细胞固有性凋亡途径被激活, 同时还通过NF-κB信号通路激活Fas而诱导非固有凋亡途径, HDGF可能是肿瘤细胞的生存因子并将成为肿瘤治疗的靶点之一. Yamamoto等^[18]最近的研究证实VitK2正是通过抑制HDGF的mRNA和蛋白的表达对肝癌细胞HepG2具有剂量依赖性

表 4 单变量和多变量综合生存Cox回归模型总结

临床参数	单变量分析			多变量分析 <i>n</i> (%)		
	<i>P</i> 值	HR	95%CI	<i>P</i> 值	HR	95%CI
年龄(岁)						
≥50 vs <50	0.321	1.219	0.825–1.801			
性别						
男 vs 女	0.310	1.229	0.826–1.829			
吸烟						
是 vs 否	0.784	1.059	0.701–1.601			
饮酒						
是 vs 否	0.468	0.861	0.574–1.291			
HBV感染						
是 vs 否	0.866	1.040	0.661–1.634			
T分类						
T ₃ –T ₄ vs T ₁ –T ₂	0.390	1.202	0.790–1.828			
N分类						
N ₂ –N ₃ vs N ₀ –N ₁	0.028	1.557	1.048–2.314	0.267	0.722	0.406–1.283
M分类						
M ₀ vs M ₁	0.170	0.731	0.468–1.143			
临床分期						
Ⅲ–Ⅳ vs Ⅰ–Ⅱ	0.041	1.526	1.017–2.290	0.335	1.443	0.684–3.044
HDGF表达指数(EI)						
Ⅱ vs Ⅰ	0.000	2.316	1.548–3.464	0.000	0.358	0.210–0.610

HR: 各变量风险比(hazard ratio)的估计值.

应用要点

HDGF参与了中国人肝癌的发生和进展, 其表达水平与临床病理指标和预后有一定关系, 可作为肝癌患者预后的指标之一.

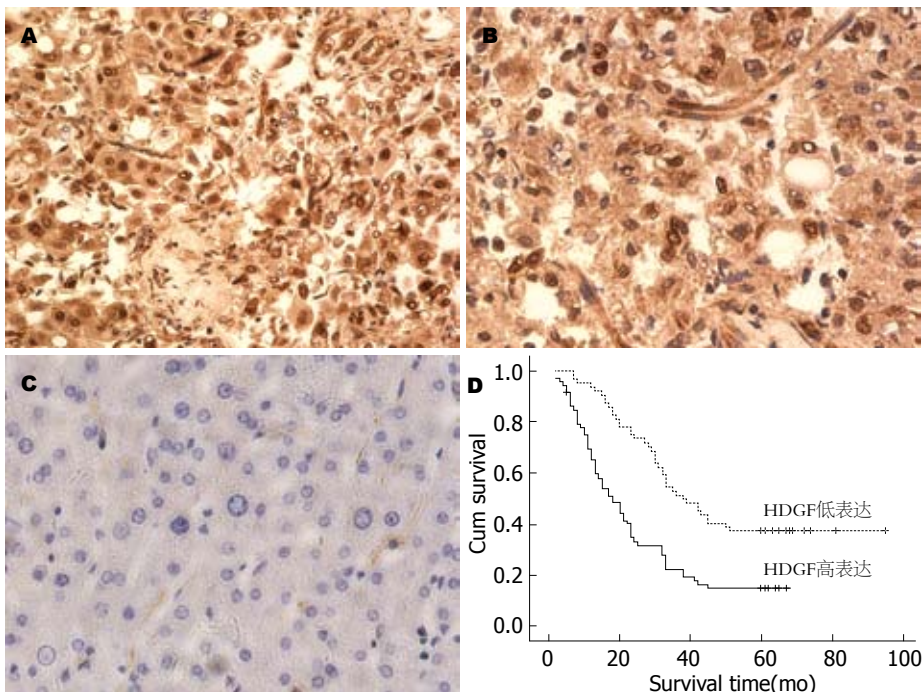


图 2 检测HDGF在肝癌组织中的表达和肝癌患者生存曲线. A: 高表达; B: 低表达; C: 未见表达; D: 生存曲线.

抑制增殖作用.

目前关于HDGF在中国肝癌患者中的表达研究报道不多, 在本研究中, 首先利用实时荧光

定量PCR技术比较了10对配对的肝癌与其临近的非癌肝组织, 以及HepG2细胞中HDGF表达水平. 结果显示, 与非癌肝组织相比, 所有的肿

■同行评价

本文设计合理, 方法先进, 具有一定的临床参考价值.

瘤组织及HepG2细胞都显示HDGF明显高表达(较非癌肝组织高), 其中T9样品表达量最高, 为21.11倍. 而HepG2细胞第3高表达为11.39倍. 对于137个HCC患者和49个非癌正常肝组织标本的免疫组织化学结果显示, HDGF主要在核中表达, 胞质也部分表达. 统计分析显示, HDGF蛋白表达也和mRNA表达水平类似, 明显在癌组织中高表达($P = 0.011$). Enomoto等^[19]发现HDGF的过表达能够部分抑制小鼠肝细胞的成熟分化. Okuda等将HDGF基因导入NIH3T3细胞中^[20], 稳定高表达HDGF蛋白虽然不能对细胞在软琼脂分析中产生重要的锚定非依赖生长, 但该细胞却在裸鼠中产生了肉瘤样肿瘤, CD31免疫组织化学分析该组织发现产生了许多的新生血管. 瞬时转染发现, HDGF能促进VEGF基因的表达明显增高. Chang等^[21]免疫组织化学分析52例大肠基质肿瘤HDGF表达. 核高表达的HDGF正向相关于肿瘤有丝分裂细胞计数、肿瘤大小、PCNA和Ki-67表达、细胞多形性现象和NIH风险水平. 此外, 核和胞质HDGF高表达的患者无病生存期明显减少. 日本Yoshida等^[22]通过HDGF抗体研究发现HDGF在肝癌细胞的胞核与胞质中的表达远高于癌周正常肝细胞, 在肿瘤中的表达也大大高于临近脂肪肝或脂肪肝. 在肝癌FLS小鼠模型建立中也发现, HDGF的表达在肿瘤形成的早期就已经增高, 它能够加强DNA合成及细胞中脂滴微粒的形成从而激活巨噬细胞集落. 说明HDGF是在FLS小鼠中可能是通过旁分泌的方式而从受到刺激的肝细胞中释放或分泌, 并通过自分泌的方式刺激肝肿瘤细胞的生长. 以上研究报道都证实HDGF在肿瘤的发生、发展中起到了重要作用, 本阶段试验的结果也提示, HDGF的高表达可能与中国人肝癌发生有密切关系.

目前, 在以HepG2为研究对象对HDGF促使肿瘤发生的作用机制研究中发现, 过表达的HDGF不但能加快细胞的增殖, 还能促进细胞的恶性转化. 在抑制HDGF表达后能抑制肿瘤细胞生长, 并促使细胞发生凋亡. Hu等^[23]利用反义寡核苷酸抑制敲低HDGF表达不但可以抑制HepG2细胞的生长, 而且还能抑制HDGF表达同时诱导HepG2细胞和其他肿瘤细胞发生凋亡. 进一步研究机制发现, 抑制HDGF表达可以促进细胞中促凋亡蛋白Bad表达, 也使ERK和Akt失活, 这种方式又反过来促使Bad蛋白上的Ser-112核Ser-136发生去磷酸化, 然后激活内在

的凋亡信号通路, 如线粒体膜去极化、线粒体细胞色素C(Cyt C)释放以及激活caspase-9和3, 加快促凋亡的过程. Abouzied等^[24]还在HepG2细胞中敲低HDGF表达后, 通过NF- κ B信号通路触发Fas介导的外部凋亡信号转导通路. 降低的HDGF表达能增加Fas启动子活性和Fas的表达. 抑制Fas表达能减轻抑制HDGF表达后细胞凋亡的诱导和生长抑制. 通过BAY11-7082抑制NF- κ B表达, 能减少HDGF敲低表达后对于Fas启动子活性的影响, 增加Fas的表达、凋亡的诱导和生长的抑制. 结合本试验研究结果, 可以推测HDGF在中国人肝癌的发展过程中起到了重要的作用. 即肝癌组织和HepG2细胞中HDGF的高表达, 既可能是肝癌的诱发和促进因素之一, 也有可能是肝癌发生和进展的结果表现, 这与肝细胞在DNA复制前能够自分泌HDGF的特点相符合^[11].

国内外多种肿瘤研究中表明HDGF是一个独立的预后预测因子, 其中也包括了肝癌. Yoshida等^[25]对于100位接受了手术治疗的HCC患者的肝癌标本进行免疫组织化学分析HDGF表达, 并对其中10例进行RT-PCR检测mRNA表达情况. 生存分析和多因素分析显示, HDGF指数阳性(>90%的肝癌细胞中核及胞质中均有阳性染色)的患者无瘤生存和总生存率明显低于HDGF指数阴性(除前者以外)的患者, 提示HDGF是评价HCC预后的较好指标. Hu等^[26]对105例HCC标本应用免疫染色检验HDGF表明, 其在肝癌细胞核中的表达与患者的临床分期相关, 并可以作为HCC患者术后评估无病和总生存率的新的预后指标之一. 本研究发现, 过表达的HDGF与肝癌的临床分期、N分类和T分类(均 $P = 0.000$)明显相关. 生存曲线分析发现, HDGF的表达与患者的预后明显相关. HDGF表达越高, 患者的生存时间愈短. Cox回归模型分析显示, 过表达的HDGF可作为中国肝癌患者独立的预后因子.

总之, HDGF参与了中国人肝癌的发生和进展, 其表达水平与临床病理指标和预后有一定关系, 可作为肝癌患者预后的指标之一.

4 参考文献

- 1 Schütte K, Bornschein J, Malfertheiner P. Hepatocellular carcinoma—epidemiological trends and risk factors. *Dig Dis* 2009; 27: 80-92
- 2 韩泽广. 肝癌基因组学研究进展. 中国科学C辑: 生命科学 2008; 38: 907-912
- 3 Klagsbrun M, Sasse J, Sullivan R, Smith JA. Human

- tumor cells synthesize an endothelial cell growth factor that is structurally related to basic fibroblast growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; 83: 2448-2452
- 4 Nakamura H, Izumoto Y, Kambe H, Kuroda T, Mori T, Kawamura K, Yamamoto H, Kishimoto T. Molecular cloning of complementary DNA for a novel human hepatoma-derived growth factor. Its homology with high mobility group-1 protein. *J Biol Chem* 1994; 269: 25143-25149
- 5 Abouzied MM, El-Tahir HM, Prenner L, Häberlein H, Gieselmann V, Franken S. Hepatoma-derived growth factor. Significance of amino acid residues 81-100 in cell surface interaction and proliferative activity. *J Biol Chem* 2005; 280: 10945-10954
- 6 International Union Against Cancer (UICC). Sobin LH, Wittekind C, editors. TNM classification of malignant tumors. 6th ed. New York: Wiley-Liss, 2002: 81-83
- 7 Izumoto Y, Kuroda T, Harada H, Kishimoto T, Nakamura H. Hepatoma-derived growth factor belongs to a gene family in mice showing significant homology in the amino terminus. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 238: 26-32
- 8 Kishima Y, Yamamoto H, Izumoto Y, Yoshida K, Enomoto H, Yamamoto M, Kuroda T, Ito H, Yoshizaki K, Nakamura H. Hepatoma-derived growth factor stimulates cell growth after translocation to the nucleus by nuclear localization signals. *J Biol Chem* 2002; 277: 10315-10322
- 9 Everett AD, Stoops T, McNamara CA. Nuclear targeting is required for hepatoma-derived growth factor-stimulated mitogenesis in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 2001; 276: 37564-37568
- 10 Enomoto H, Yoshida K, Kishima Y, Kinoshita T, Yamamoto M, Everett AD, Miyajima A, Nakamura H. Hepatoma-derived growth factor is highly expressed in developing liver and promotes fetal hepatocyte proliferation. *Hepatology* 2002; 36: 1519-1527
- 11 Enomoto H, Nakamura H, Liu W, Yoshida K, Okuda Y, Imanishi H, Saito M, Shimomura S, Hada T, Nishiguchi S. Hepatoma-derived growth factor is induced in liver regeneration. *Hepatol Res* 2009; 39: 988-997
- 12 Ren H, Chu Z, Mao L. Antibodies targeting hepatoma-derived growth factor as a novel strategy in treating lung cancer. *Mol Cancer Ther* 2009; May 12. [Epub ahead of print]
- 13 Yamamoto S, Tomita Y, Hoshida Y, Morii E, Yasuda T, Doki Y, Aozasa K, Uyama H, Nakamura H, Monden M. Expression level of hepatoma-derived growth factor correlates with tumor recurrence of esophageal carcinoma. *Ann Surg Oncol* 2007; 14: 2141-2149
- 14 Mao J, Xu Z, Fang Y, Wang H, Xu J, Ye J, Zheng S, Zhu Y. Hepatoma-derived growth factor involved in the carcinogenesis of gastric epithelial cells through promotion of cell proliferation by Erk1/2 activation. *Cancer Sci* 2008; 99: 2120-2127
- 15 廖斐, 董卫国, 罗和生, 刘蒙. 沉默肝癌衍生生长因子对大肠癌细胞增殖的抑制. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 1286-1291
- 16 Tsang TY, Tang WY, Tsang WP, Co NN, Kong SK, Kwok TT. Downregulation of hepatoma-derived growth factor activates the Bad-mediated apoptotic pathway in human cancer cells. *Apoptosis* 2008; 13: 1135-1147
- 17 Tsang TY, Tang WY, Tsang WP, Co NN, Kong SK, Kwok TT. Mechanistic study on growth suppression and apoptosis induction by targeting hepatoma-derived growth factor in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. *Cell Physiol Biochem* 2009; 24: 253-262
- 18 Yamamoto T, Nakamura H, Liu W, Cao K, Yoshikawa S, Enomoto H, Iwata Y, Koh N, Saito M, Imanishi H, Shimomura S, Iijima H, Hada T, Nishiguchi S. Involvement of hepatoma-derived growth factor in the growth inhibition of hepatocellular carcinoma cells by vitamin K(2). *J Gastroenterol* 2009; 44: 228-235
- 19 Clermont F, Gonzalez NS, Communi D, Franken S, Dumont JE, Robaye B. HDGF is dephosphorylated during the early steps of endothelial cell apoptosis in a caspase-dependent way. *J Cell Biochem* 2008; 104: 1161-1171
- 20 Enomoto H, Nakamura H, Komatsu-Kanatani N, Liu Y, Yoshida K, Okuda Y, Yamamoto T, Liu WD, Nishiguchi S. Partial blockage of hepatocyte maturation in hepatoma-derived growth factor transgenic mice. *World J Hepatol* 2009; 1: 98-102
- 21 Chang KC, Tai MH, Lin JW, Wang CC, Huang CC, Hung CH, Chen CH, Lu SN, Lee CM, Changchien CS, Hu TH. Hepatoma-derived growth factor is a novel prognostic factor for gastrointestinal stromal tumors. *Int J Cancer* 2007; 121: 1059-1065
- 22 Yoshida K, Nakamura H, Okuda Y, Enomoto H, Kishima Y, Uyama H, Ito H, Hirasawa T, Inagaki S, Kawase I. Expression of hepatoma-derived growth factor in hepatocarcinogenesis. *J Gastroenterol Hepatol* 2003; 18: 1293-1301
- 23 Hu TH, Lin JW, Chen HH, Liu LF, Chuah SK, Tai MH. The expression and prognostic role of hepatoma-derived growth factor in colorectal stromal tumors. *Dis Colon Rectum* 2009; 52: 319-326
- 24 Abouzied MM, El-Tahir HM, Prenner L, Häberlein H, Gieselmann V, Franken S. Hepatoma-derived growth factor. Significance of amino acid residues 81-100 in cell surface interaction and proliferative activity. *J Biol Chem* 2005; 280: 10945-10954
- 25 Yoshida K, Tomita Y, Okuda Y, Yamamoto S, Enomoto H, Uyama H, Ito H, Hoshida Y, Aozasa K, Nagano H, Sakon M, Kawase I, Monden M, Nakamura H. Hepatoma-derived growth factor is a novel prognostic factor for hepatocellular carcinoma. *Ann Surg Oncol* 2006; 13: 159-167
- 26 Hu TH, Huang CC, Liu LF, Lin PR, Liu SY, Chang HW, Changchien CS, Lee CM, Chuang JH, Tai MH. Expression of hepatoma-derived growth factor in hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2003; 98: 1444-1456

编辑 曹丽鸥 电编 吴鹏朕

microRNA在食管癌中的特征

程 蕾, 凌志强, 毛伟敏

■背景资料

人类恶性肿瘤发生、发展的分子基础是基因的改变。近年来在研究肿瘤相关基因, 如癌基因、抑癌基因、肿瘤转移及耐药相关基因等方面已取得了不少成果, 但因肿瘤发生发展的确切机制仍未完全了解, 而且临床上许多肿瘤缺少早期特异性的诊断指标及特效的治疗方法, microRNA的发现为肿瘤的诊断与治疗提供了新的思路与方法。

程蕾, 浙江中医药大学附属浙江省肿瘤医院 浙江省杭州市 310053
程蕾, 凌志强, 毛伟敏, 浙江省肿瘤医院 浙江省肿瘤医院研究所 浙江省杭州市 310022
浙江省自然科学基金资助项目, No. Y2080749; No. Y2091110
人事部留学人员科技活动项目择优基金资助项目, No. 2008004
浙江省科技计划基金资助项目, No. 2009C33143
作者贡献分布: 本文综述由程蕾完成, 凌志强与毛伟敏负责审校。
通讯作者: 凌志强, 副研究员, 医学博士, 310022, 浙江省杭州市半山桥广济路38号, 浙江省肿瘤医院, 浙江省肿瘤医院研究所。
lingzq@hotmail.com
电话: 0571-88122423 传真: 0571-88122413
收稿日期: 2010-04-27 修回日期: 2010-07-06
接受日期: 2010-07-12 在线出版日期: 2010-08-18

MicroRNAs and esophageal cancer

Lei Cheng, Zhi-Qiang Ling, Wei-Min Mao

Lei Cheng, Zhejiang Cancer Hospital, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, Zhejiang Province, China

Lei Cheng, Zhi-Qiang Ling, Wei-Min Mao, Zhejiang Cancer Research Institute, Zhejiang Cancer Hospital, Hangzhou 310022, Zhejiang Province, China

Supported by: the Natural Science Foundation of Zhejiang Province, Nos. Y2080749, Y2091110; the Science and Technology Foundation for Selected Overseas Chinese Scholars, Ministry of Personnel of China, No. 2008004; and the Science and Technology Program of Zhejiang Province, No. 2009C33143

Corresponding to: Zhi-Qiang Ling, Zhejiang Cancer Research Institute, Zhejiang Cancer Hospital, 38 Guangji Road, Banshanqiao District, Hangzhou 310022, Zhejiang Province, China. lingzq@hotmail.com

Received: 2010-04-27 Revised: 2010-07-06

Accepted: 2010-07-12 Published online: 2010-08-18

Abstract

MicroRNAs (miRNAs) are a class of non-coding RNAs of 19-22 nucleotides that regulate gene expression at the post-transcriptional level. MiRNAs have been demonstrated to be involved in almost all basic signaling pathways. Recent studies indicate that miRNAs are closely associated with tumor genesis, differentiation, metastasis and relapse. The research of miRNA alterations in the pathogenesis of esophageal cancer has been attracting more and more attention, providing a new technique for early diagnosis, treatment and prognosis of the

disease. MiRNAs might act as new biomarkers for tumor diagnosis and new targets for tumor gene therapy. This article focuses on the biosynthesis, mechanisms of action, and detection of miRNAs, their relationship with tumors, as well as their potential use in the diagnosis, classification and biological treatment of esophageal cancer.

Key Words: MicroRNA; Oncogene; Tumor suppressor gene; Esophageal cancer

Cheng L, Ling ZQ, Mao WM. MicroRNAs and esophageal cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(23): 2434-2441

摘要

microRNAs(miRNA)是一类长19-22个核苷酸的內源性非编码的小分子RNA, 通过对靶基因转录后水平的负调控, 几乎参与了体内所有的基本信号传导途径。最近发现microRNA与肿瘤的发生、分化、转移及复发等密切相关。食管癌发生过程中microRNA的改变已成为目前的研究热点, 为食管癌的早期诊断、治疗和预后提供了新的手段。microRNA有望成为肿瘤诊断新的生物学标志和肿瘤基因治疗的新靶点。本文着重介绍microRNA的产生、作用机制、与肿瘤的关系、检测方法及其在食管癌的诊断、分期和生物治疗方面的潜在作用。

关键词: microRNA; 癌基因; 抑癌基因; 食管癌

程蕾, 凌志强, 毛伟敏. microRNA在食管癌中的特征. 世界华人消化杂志 2010; 18(23): 2434-2441

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2434.asp>

0 引言

microRNA(miRNA)是一类长度为19-22个核苷酸(nt)的非编码单链小RNA分子, 广泛存在于动物、植物以及病毒中, 通常, 如果miRNA与其靶基因mRNA的3'-uTR(非翻译区)片段完全互补, 则通过启动mRNA的3'端Poly(A)尾和5'端脱帽子结构, 介导mRNA的降解^[1]。大量研究表明, miRNA参与了包括细胞分裂增殖、分化与发

■同行评议者

樊红, 教授, 东南大学医学院发育与疾病相关基因教育部重点实验室

育以及代谢等许多重要的生物学过程. miRNA本身并不编码蛋白质,而是通过与特异的靶mRNA结合使之降解或者抑制其翻译,从而降低相关靶基因蛋白质的表达^[2]. 迄今为止,在人类估计约有1 000多种miRNAs,目前已被证实的miRNAs就达500多个^[3]. 肿瘤发生发展过程中所出现的特异性miRNA的异常表达,不仅可以区分不同肿瘤的起源,同时也可以反映肿瘤发展的不同阶段^[4]. 食管癌是世界上最常见的6大恶性肿瘤之一,其中我国的年新发病例约占世界食管癌新发病例的50%以上,严重危害我国人民的健康. 由于食管癌的早期症状不明显,大多数就诊患者已处于中晚期,预后效果很差,5年生存率只有10%左右. 然而,早期食管癌(包括上皮内癌和黏膜内癌)的5年生存率可达90%-100%. 因此,提高癌前病变如Barrett's食管或癌症的早诊率并加以治疗,对降低食管癌的发生率和死亡率具有重大意义.

1 miRNA的生物合成

miRNA位于1个基因的内含子中,其初始转录子(pri-miRNA)在核中进行转录. 在细胞核中Pri-miRNA被Drosha(一种RNase III核酸内切酶)切成70 nt左右茎环状的pre-miRNA. pre-miRNA由核质/细胞质转运蛋白Exportin-5运输到胞质中,这一过程需要G蛋白因子Ran参与. 在胞质中pre-miRNA被Dicer剪切成22 nt的双链miRNA,这段序列定位于pre-miRNA的3'或5'端. 成熟的miRNA与其互补序列形成的双螺旋结构解旋后,一条链被降解,另一条成熟的miRNA进入RNA诱导的基因沉默复合物(RNA-induced silencing complex, RISC)中,形成非对称RISC复合物(asymmetric RISC assembly). 该复合物会结合到靶mRNA的3'非翻译区(untranslated region, UTR),阻断靶基因的翻译,在大多数情况下成熟miRNA和靶mRNA序列不完全互补^[5,6]. 转录产物最初的茎-环结构提供了寻找潜在的miRNA基因的结构线索. miRNA与他的目的mRNA互补的碱基配对决定了这个过程的特异性^[7]. 每个miRNA可以有多个靶基因,而几个miRNA可以调节同一个基因. miRNA可以与不完全互补的目的mRNA 3' UTR配对来抑制蛋白质的翻译,也可以与UTR完全互补来使目的mRNA降解. 显然,miRNA与直接参与蛋白表达的mRNA、tRNA及rRNA不同,他们和蛋白合成并没有直接关系,而是通过与mRNA分子发生相互作用来抑

制蛋白合成,从而控制基因的表达,提示miRNA的重要性在于调控基因表达,而非蛋白的编码合成.

2 miRNA在肿瘤中的研究进展

2.1 oncomirs 研究表明,miRNA可以作为抑癌基因或者癌基因,这类miRNA被称为致癌miRNA(oncogenic miRNA, oncomirs). oncomirs的负调控和染色体的缺失、增加及易位有关^[8]. miRNA的表达可通过作用于癌基因或抑癌基因的表达来影响肿瘤的发展,如miR-17-92可以直接影响癌基因. miRNA还通过介入细胞周期、凋亡、血管生成和转移来影响肿瘤的发生发展等过程^[9-11]. miRNA的表达谱比编码蛋白的基因表达谱更能准确区分肿瘤类型. miRNA在肿瘤的发生、发展、诊断及预后都有其特征性的表达谱,因此可通过检测miRNA的表达谱来指导临床诊治工作.

2.2 miRNA的检测方法 目前,基因芯片技术、Northern blot、qRT-PCR等方法已被用于检测miRNA的表达水平及功能评价. 基因芯片采用大规模微阵列技术,一张芯片上包含成千上万个探针,大大提高了筛选的速度和通量. 其中miRCURYTMLNA芯片应用最为多见. 该芯片是一种建立在“核酸锁”(locked nucleic acid, LNA)修饰探针基础上的miRNA表达谱检测技术平台. DNA探针和miRNA之间的键是不稳定的,因为DNA单体可在N构象和S构象之间来回移动. LNA是一种经特殊化学修饰的新型核苷酸衍生物,是DNA类似物,其亚甲基桥用于锁定糖环,让单体保持在N位置. 在高温下,LNA/RNA双链比DNA/RNA双链稳定. 这增加了在微阵列筛选中的灵敏性和特异性,并减小了杂交误差. 在核苷酸链合成时掺入LNA所制备的探针,特别适合短序列miRNA的高通量检测,赋予LNA芯片较高的灵敏度与特异性. 另外,通过调整LNA修饰的核苷酸在探针中的比例可以自由设计Tm值,实现探针与miRNA杂交Tm值的均一化. 再者,LNA修饰探针敏感性高,样品用量少、标记最低仅需要1-2 μg总RNA,无需富集提纯^[12]. 筛选肿瘤组织中的miRNA表达谱可以对肿瘤进行分类,并指导临床肿瘤的个体化治疗,也可以用miRNA表达谱作为一种生物标志物去监测肿瘤治疗的效果^[13]. 目前大部分的实验都取材于冰冻标本或者石蜡包埋的标本,因取材不便等多种原因,不适合用于早期诊断,因

■研发前沿

目前关于miRNA的研究已成为备受瞩目的热点,重点在于确定各个肿瘤特异性的microRNA及与其相应的靶mRNA、简便快速的检测方法,及其在肿瘤治疗领域的运用,如RNAi等先进的技术.

■相关报道

Ho等在被新确诊为胰腺癌患者的血浆里提取miRNA, 将其转化为cDNA, 利用qRT-PCR方法, 以人工合成的miR-54为正常对照组, 得出结论, 在胰腺癌患者的血浆中检测出miR-210, 提出存在于血浆中的miR-210可作为胰腺癌临床诊断和预后评估的分子标志物。

此寻找出敏感的生物标志物迫切需要一种非侵入性且易于操作的检测方法。最理想的是以体液如血清、血浆、尿液等作为实验标本进行肿瘤的诊断。血清中miRNA能用于肿瘤的诊断有以下几方面原因: (1)miRNA在肿瘤中呈负调控表达^[14]; (2)瘤中的miRNA的表达谱有着组织特异性^[15]; (3)miRNA在甲醛液固定的组织中有很高的稳定性, 可以推测miRNA在血浆或血清中也具有相同的稳定性^[16,17]。目前一系列的研究已证实游离的DNA、mRNA及miRNA存在于血清中, 也存在于其他的体液中, 都有望成为潜在的生物标志物^[18-23]。Ho等^[24]在被新确诊为胰腺癌患者的血浆里提取miRNA, 将其转化为cDNA, 利用qRT-PCR方法, 以人工合成的miR-54为正常对照组, 得出结论, 在胰腺癌患者的血浆中检测出miR-210, 提出存在于血浆中的miR-210可作为胰腺癌临床诊断和预后评估的分子标志物。血清microRNA有望成为新兴的肿瘤诊断和预后的分子标志物。

2.3 miRNA在恶性肿瘤诊断中的研究 已知, miRNA是通过特异性基因沉默导致靶mRNA降解, 抑制蛋白质的合成或在细胞分化、增殖和凋亡等关键时期调控转录后的基因表达水平, 即作为癌基因参与恶性肿瘤的发生和发育, 又作为抑癌基因参与控制恶性肿瘤的形成。因此, 对miRNA作用机制的研究有助于加深对肿瘤发生机制的理解。一直以来, 肿瘤的早期诊断仍是困扰科学家们的一大难题, 为此科学家们不断寻找快速简便的检测方法。Gilad等^[25]研究了血清中的miRNA得出以下结论: 1 mL的人血清中就有足够的miRNA产生探测信号可被基因芯片所探测到, 用Heat-Map和量集群分析法可以得出血清中的miRNA在很大程度上能区分肿瘤患者与健康献血者, miRNA在怀孕的妇女的血清中较未孕妇女升高; 文章中尚未得出性别、年龄和肿瘤治疗手段包括放、化疗对血清中miRNA的表达是否存在影响。Rosenfeld等^[26]在对miRNA的表达分析后认为肿瘤的多样性也决定了其与正常组织不同的miRNA表达谱的不同, 且miRNA具有高度的组织特异性, 可用于确认转移灶的起源。Xiao等^[27]选取了55例胃癌及17例正常组织标本, 采用qRT-PCR技术研究了miR-106a与胃癌的相关性, 结果发现miR-106a在肿瘤组织中表达高于正常组织, 且与肿瘤分期、瘤组织大小、分化、淋巴结及远处侵犯转

移有关, 存在显著性差异($P<0.01$)。Xiao等^[27]认为miR-106a可用于胃癌的诊断。Wickramasinghe等^[28]运用qRT-PCR及Western blot技术发现miRNA的表达在乳腺癌中与雌激素受体 α (estrogen receptor α , ER α)的表达有关, 在ER α 阳性的肿瘤中miR-21表达要高于ER α 阴性的肿瘤, 雌二醇(E2)在MCF-7人乳腺癌细胞中抑制miR-21表达, 这种抑制又被羟基他莫昔芬(4-OHT)、法洛德西(ICI 182 780)、siRNA ER α 所阻止。E2也能在MCF-7中负调控miR-21靶基因PDCD4、PTEN、BCL2的蛋白表达。同时发现, ER β 也是肿瘤抑制基因。Uziel等^[29]在成神经管细胞瘤(medulloblastomas, MBs)中发现26种miRNA表达升高, 24种miRNA表达下降, 且与基因型无关。在这26种miRNA中有9种已被证实是由癌基因的miRNA17-92所编码, 其中3种miR-17-92(miR-92、miR-19a、miR-20)在人MBs中过表达。结果认为, miRNA-17-92联合SHH信号旁路促进了机体中MBs的形成与发展。Laios等^[30]为了验证miRNA在卵巢肿瘤复发的作用, 应用Real-time TaqMan PCR等技术对复发的卵巢肿瘤进行了miRNA表达谱分析, 结果显示miR-9与miR-223在表达谱中表现最明显, 分别处于下调最高峰与上调最高峰, 认为miR-9与miR-223可作为检测卵巢肿瘤复发的潜在生物指标。同时研究者推测Dicer与Drosha可能没在肿瘤复发中起明显作用。

2.4 miRNA与恶性肿瘤的治疗 miRNA不仅仅具有肿瘤诊断作用, 由于miRNA在肿瘤发生发展过程中起到癌基因或抑癌基因的作用, 因此可以通过调控miRNA的表达来达到治疗肿瘤的目的。miRNA参与肿瘤基因治疗主要有两种方式, 一种是那些具有抑癌作用的miRNA过表达, 利用脂质体转染模拟内源性miRNA的人工合成的双链miRNA, 或利用miRNA的表达载体在体内表达大量miRNA, 常用的表达载体为病毒类载体(包括腺病毒载体、腺病毒伴随病毒载体、慢病毒载体等)。另外, 还可以通过导入人工合成的、与具有癌基因性的成熟miRNA序列互补的反义寡聚核苷酸(anti-miRNA oligonucleotides, AMOs)的方法来灭活肿瘤细胞中的miRNA。AMOs是一种被用于调控失控基因过度表达的手段。由于miRNA仅长约19-24个碱基, 用AMOs抑制miRNA活性被认为可能是目前最好而且最实际的方法。Fei等^[31]以miR-16、miR-21、

miR-214、miR-181a为靶点, 设计、合成相对应的AMOs, 并将其转染入肺癌A649细胞株中, 利用流式细胞仪检测A549细胞流式细胞术检测细胞凋亡率和细胞周期分布, 并利用RT-PCR技术检测miR-21在细胞株中的表达情况. 结果显示: AMO-miR-21、AMO-miR-16、AMO-miR-181a通过诱导凋亡抑制了A549细胞株的生长, 这些抑制作用与剂量及作用时间成正比, AMO-miR-21在A549细胞株中下调了miR-21的表达. 得出结论: miR-21、miR-16、miR-181a可作为肺癌治疗的靶点, AMOs为肿瘤的治疗开辟了新途径.

3 miRNA在食管癌中的研究进展

食管癌是世界上八大常见肿瘤之一, 而我国是食管癌发病率和死亡率最高的国家, 其发病率居恶性肿瘤的第4位. 食管癌的形成是多因素作用、多基因变化和多阶段发展的过程, 其发生、发展与癌基因组、表观基因组及组织环境等诸多因素有关. 从正常食管黏膜→癌前病变→食管癌各发展演变过程皆存在特征性的生物标志物, 对此筛选不仅有助于食管癌早期诊断, 而且为其临床治疗提供新的药靶. 目前, 业已证实, 食管癌miRNA的研究不仅有利于食管癌的早诊、预估转移和预后, 而且对开展食管癌个性化治疗具有重要的意义.

通过基因芯片技术对肿瘤组织与正常组织miRNA的表达谱进行检测已有报道, 如mRNA表达谱Barrett's食管(Barrett's esophagus, BE)与食管腺癌(esophageal adenocarcinoma, EAC)的鉴别诊断. 与mRNA相比, 食管癌组织中的miRNA的表达谱为区别肿瘤组织与正常组织及肿瘤类型提供了更好的方法. 例如, 为区分肺癌和正常组织, 肺腺癌与鳞癌以及前列腺、甲状腺良恶性肿瘤都利用了不同的miRNA表达谱. 此外, miRNA在鉴别分化不良的肿瘤的来源中也扮演了重要的角色. 因此, Feber等^[32]提出了两点假设: (1)在食管恶性肿瘤中存在着肿瘤特异性miRNA表达谱. (2)miRNA的表达谱与BE进展到腺癌的进程有关. 为此研究人员选取了1999-2005年做过食管(部分)切除术的患者, 共制作了35份食管冰冻组织标本, 其中10例腺癌(AC)、10例鳞状细胞癌(squamous-cell carcinoma, SCC)、9例正常鳞状上皮组织(normal squamous epithelium, NSE)、5例BE和1例高度异型性(high gradedysplasia, HGD).

应用基因芯片技术得出以下实验结果: 13种miRNA在食管的AC、SCC、NSE中的表达明显不同, 如miR-194、miR-192、miR-200c在AC中高表达, 但在SCC中低表达. miR-42在SCC中的表达谱和在AC中差别甚远, miR-21、miR-205、miR-203、miR-93在肿瘤与正常组织中的表达谱也有很大的差别, 但在两种不同的肿瘤组织中差异不明显. NSE与SCC的表达谱相似, 但与AC不同, BE的表达谱处于AC与NSE之间, HCG的基因表达谱与AC相似. 得出的结论: 应用miRNA表达序列区分了正常食管、BE高度异型性与两种不同的肿瘤类型. 为了更好地区分在4组的特定的miRNA表达谱, 还利用了miRNA数据库. 这种分析方法在确认5个BE患者miRNA表达亚型上起了重大的作用. 研究者认为BE与AC不同的miRNA表达能确认肿瘤进展的特殊标志物. 目前, BE的分子遗传学与其发展为EAC的进展已经受到了研究者的重视, 但从BE到EAC发展过程的分子机制仍不清楚. Kan等^[33]在文章中研究了miR-106b-25多顺反子与BE与EAC的关系. 实验材料: 食管培养细胞(HEEpiC、QhTTRT、ChTTRT、GihTTRT、OE-33)、22例正常的上皮组织、24例BE、22例EAC. 通过基因芯片技术、qRT-PCR技术研究miRNA不同的表达谱, qPCR技术检测miR-106b-25拷贝数的改变以及在定位于染色体7q22.1的MCM7基因. 在试管中进行细胞增殖、细胞周期循环、凋亡, 在活体内进行肿瘤发生试验, 从而去验证miR-106b-25的生物作用. 为了证实miR-106b-25直接作用的靶细胞, 实验中还运用了免疫印迹法与荧光素酶分析法. 得出以下结论: miR-106b-25在试管内或活体内能影响增殖、凋亡、促进细胞循环以及促进肿瘤生成. miR-93和-106b靶向抑制p21, 促使p21 mRNA降解, miR-25亦靶向抑制Bim蛋白翻译. 得出的结论为: miR-106b-25通过抑制靶基因p21与Bim促进了食管癌的发生发展. Maru等^[34]也研究了miR-196a在食管癌中的应用, 他们得出的结论是: miR-196a在EA、BE、良恶性交界位置、高度恶性组织中表达增加. 认为miR-196a可以作为BE筛检的生物标志物, 并认为角蛋白5(keratin 5, KRT5)、富含脯氨酸的小分子蛋白2C(small proline-rich protein 2C, SPRR2C)及S100钙粒蛋白A9(calcium-binding protein A9, S100A9)是miRNA-196a的靶基因. Hiyoshi等^[35]研究了miR-21在食管鳞癌中的作用: 选

■创新盘点

此篇文章全面系统地阐明了microRNA的合成及其检测方法, 在肿瘤诊断及治疗中的运用. 目前, 关于食管癌中microRNA的文献不多, 本文对此做了详细地阐述, 让读者对microRNA的食管癌表达谱有了深入的了解.

■应用要点

该文章重点阐述了microRNA的检测及治疗,对肿瘤尤其是食管癌的早期诊断及治疗开拓了思路,为进一步深入研究奠定了基础。

取了20例配对的食管鳞癌标本及7组食管鳞癌的细胞株(TE6、TE8、TE10、TE11、TE12、TE14、KYSE30),运用TagMan qRT-PCR和原位杂交技术进行检测。通过对转染反义miR-21细胞增殖及侵袭能力的分析,来判断miR-21在食管鳞癌的发展中所扮演的角色,并进一步探讨了miR-21靶向调控程序性细胞死亡4(programmed cell death 4, PDCD4)的机制。PDCD4是近年来新发现的抑癌基因,不仅对细胞的程序性死亡进行重要调节,而且通过抑制蛋白转录和翻译过程抑制肿瘤细胞的生长。实验结果如下: 20对配对样本中, 18例肿瘤组织中miR-21的表达明显高于对照的正常组织,其中有淋巴结或者血道转移的患者样本中的miR-21表达显著提高,对miR-21原位杂交(in situ hybridization, ISH)的实验结果显示: 石蜡包埋的食管鳞癌组织强阳性染色。7组细胞株的miR-21也表现为高表达,转染反义miR-21的细胞的增殖及侵袭能力显著降低,食管鳞癌PDCD4蛋白水平与miR-21表达呈负相关。在转染反义miR-21的细胞中,在PDCD4 mRNA水平未改变的前提下,不仅增加了PDCD4蛋白的表达,而且还增加了含有PDCD4-3'非编码区结构的荧光素酶报告基因的活性。研究者得出以下结论: 在食管鳞癌中,miRNA-21在转录后水平负调控靶细胞PDCD4及细胞增殖与侵袭能力,该结论为食管鳞癌的靶向治疗提供了依据。Guo等^[36]也在其文章中研究了miR-103/107与食管癌的关系,进行了以下的实验: 选取了1999-2001期间31对食管鳞癌的标本及癌旁正常组织作为实验组,这些组织在手术中液态氮下切割并保存在-80℃。选取了一组包含了24例配对样本,该组标本保存时间均<6 mo。所有的样本的相关信息比如年龄、性别、病理、分化、TNM分期、肿瘤分期、术后的生存时间都可以获得。这些食管癌标本首先用石蜡包埋法及进行HE染色。按照以下实验步骤进行检测: (1)标记目标RNAs: 用TRIzol法提取RNA,并运用聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)溶解析出法先分离低相对分子质量RNA,其次对分离后得到的低相对分子质量RNA进行荧光素标记、沉淀、乙醇清洗并干燥,最后将低相对分子质量RNA悬浮于含有3×SSC、0.2% SDS、15%甲酰胺的杂交缓冲液中。(2)玻片杂交: 在BioMixer II芯片杂交仪上进行杂交,该种方法的优点早已在全基因组mRNA表达谱的文章中被报道^[37]。杂交结束后,

分别在42℃及室温条件下用含有0.2% SDS、SSC溶液和0.2% SCC液连续冲洗芯片各5 min,然后用LuxScan 10K-A laser confocal scanner扫描芯片运用LuxScan 3.0 software软件分析所得到的图像。(3)计算分析: 建立模型,并利用拔靴法估计实验组31对标本的每个预测模型准确度,利用计算公式计算准确度。可利用最公开有效的方法预测miRNA靶基因,如: miRBase^[38]、miRANDA^[14]、TARGETSCAN^[8]、PICTAR^[39]软件。利用生存分析Kaplan-Meier方法绘制患者的生存曲线, Cox proportional hazard回归模型检查协变量的共同效果。(4)定量RT-PCR: 为了验证miRNA的表达谱,研究者利用带有miRNA特殊引物的qRT-PCR法检测mRNA,设置U6为内参基因,反应的条件为: 95℃ 10 min、40个循环: 95℃ 15 s、60℃ 35 s、72℃ 3 s。最后用LightCycler软件分析得出的结果,利用溶解曲线分析法分析qRT-PCR扩增产物,并运用琼脂糖凝胶电泳证实。研究者在对31对食管癌样本和与之相对应的、距离至少有5 cm范围的相邻的正常组织标本的miRNA表达谱的进行分析,得出以下结论: 从冰冻组织中提取的RNA总量大幅度下降,而从新鲜组织中提取的RNA无明显下降,但是新鲜组织中和储备组织中的miRNA的表达谱相近,说明短的miRNA片段在冰冻组织中相对稳定,这样就大大扩大了从组织中研究miRNA的范围。同时,通过对在7组不同的因素如年龄、性别、病理类型、分化等级、T、N、TMN中的miRNA表达谱比较,发现有5种miRNA(miR-335、miR-181d、miR-25、miR-7、miR-495)与病理类型有关(对蕈伞型与髓样型进行比较)。miR-25和miR-130b与分化等级有关(通过对高、中、低等级进行比较)。吸烟量和饮酒量被认为是鳞癌的高危因素,然后试验中发现miRNA表达谱的变化与这些因素无关,甚至与年龄无相关性。通过对肿瘤与正常组织的miRNA表达谱分析得出: miR-25、miR-424、miR-151在肿瘤组织中高表达,miR-100、miR-99a、miR-29c、miR-140呈低表达。并且得出结论: miR-103/107低表达与总体生存率增高有关,miR-103/107高表达、TNM与预后成反比,所以这两种miRNA可被用于食管癌的早期诊断以及作为基因治疗的靶点。Sugito等^[40]报道核糖核酸酶(ribonuclease, RNASE)在食管鳞癌中的比例增高与高RNASE表达与食管鳞癌的不良预后有关。一

部分miRNA表达谱的改变不是偶然的,能提示miRNA与肿瘤相关基因的mRNA的转录的改变.这些偶然的miRNA的靶基因可能是肿瘤抑制基因或者其他和肿瘤相关的基因,如:生长因子、生长因子受体、信号传感器、转录因子、凋亡调节物、细胞分裂调控基因、DNA修复基因.目前有许多文章已经提出了许多用于识别miRNA(44-47)靶基因的方法.在这些假设的靶基因中,YWHAM是肿瘤抑制基因,他能调节细胞周期,TGFBR3参与了 β 转化生长因子的信号传导通路,AXIN2参与了Wnt信号传导通路,TAF5被认为是转录因子,CAPZA2参与了细胞运动,一些靶基因可能通过不同的机制参与了食管癌进展过程.如YWHAH基因与肿瘤抑制相关,能调节细胞周期.相关的报道也提出miR-107在消化系统肿瘤(结肠癌、胰腺癌、胃癌^[41,42])中高表达,食管癌也属于消化系统,以上的结论也证明了miR-103/miR-107在食管癌中的高表达与预后差有关.通过单变量及多变量分析表明,miR-103/107在食管癌患者的低、高表达水平均与无病生存率的存在相关性.这些结论为研究食管癌发生发展的分子机制奠定了基础,同时,也为食管癌的诊断提供了简便且经济的方法,如qRT-PCR技术.Matsushima等^[43]通过miRNA基因芯片技术对从食管鳞癌细胞株(OE21、TE10)、食管鳞状细胞株Het1及食管鳞癌患者活检组织标本中所提取的miRNA表达谱进行分析,发现:与在Het1细胞株中相比,miR-203、miR-429、miR-205、miR-200c、miR-141在食管鳞癌细胞株OE21、TE10中表达增高.同样与Het1细胞株中相比,miR-153、miR-100、miR-125b、miR-10a、miR-99a、miR-376a、miR-379、miR-651、miR-146b在OE21、TE10细胞株中表达降低.通过qRT-PCR技术在多种恶性肿瘤细胞株及非恶性细胞株进行验证,其中包括5组食管鳞癌细胞株(TE5、TE8、TE10、TE11、OE21).发现:在所有的食管鳞癌细胞株中,只有miR-205表达一致增高与miR-10表达一致降低.通过转染反义-miR-205入细胞株中,发现细胞的增殖、分化、凋亡均未见明显改变.敲除miR-205后,受侵细胞的数量明显增加,表明miR-205可以改变食管鳞癌中细胞的转移及侵袭性.得出结论:在食管鳞癌中,miR-205与miR-10表达改变显著,在食管鳞癌发生、发展过程中,miR-250可能通过抑制E-钙黏蛋白(E-cadherin, E-CD)转录,影响上皮-间质转

变(epithelial-mesenchymal transition, EMT),从而调控了细胞的侵袭与转移.为研究食管鳞癌的发病机制提供了新的思路.

4 结论

miRNA在食管癌发生发展中的功能研究越来越受到人们的关注.因此,分析miRNA的表达水平为食管癌患者早期的筛查和提高临床治疗效果提供了很大的帮助.同时,一些与肿瘤异常反应相关的miRNA可被应用于化疗试剂的研制.同时,专家们可利用miRNA的表达谱分析为肿瘤患者提供个体化的治疗方案.但是,基于miRNA的治疗方法,从研究到实践的过程仍需要不断地摸索与完善.作为一种潜在治疗新手段,miRNA治疗的效果仍然需要时间来验证.对miRNA的深入研究,为食管癌的早期和精确的诊断提供一个新的治疗靶标,为创新发展食管癌的治疗策略开拓了美好的前景.

5 参考文献

- 1 Pillai RS, Bhattacharyya SN, Artus CG, Zoller T, Cougot N, Basyuk E, Bertrand E, Filipowicz W. Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells. *Science* 2005; 309: 1573-1576
- 2 Engels BM, Hutvagner G. Principles and effects of microRNA-mediated post-transcriptional gene regulation. *Oncogene* 2006; 25: 6163-6169
- 3 Bentwich I, Avniel A, Karov Y, Aharonov R, Gilad S, Barad O, Barzilai A, Einat P, Einav U, Meiri E, Sharon E, Spector Y, Bentwich Z. Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs. *Nat Genet* 2005; 37: 766-770
- 4 Kumar MS, Lu J, Mercer KL, Golub TR, Jacks T. Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis. *Nat Genet* 2007; 39: 673-677
- 5 Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, Ketting RF, Hannon GJ. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* 2004; 432: 231-235
- 6 Gregory RI, Yan KP, Amuthan G, Chendrimada T, Doratotaj B, Cooch N, Shiekhattar R. The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* 2004; 432: 235-240
- 7 Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature* 2004; 431: 350-355
- 8 Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer* 2006; 6: 857-866
- 9 Nelson KM, Weiss GJ. MicroRNAs and cancer: past, present, and potential future. *Mol Cancer Ther* 2008; 7: 3655-3660
- 10 Lee YS, Dutta A. MicroRNAs in cancer. *Annu Rev Pathol* 2009; 4: 199-227
- 11 Latronico MV, Catalucci D, Condorelli G. MicroRNA and cardiac pathologies. *Physiol Genomics* 2008; 34: 239-242
- 12 Griffiths-Jones S. miRBase: the microRNA sequence database. *Methods Mol Biol* 2006; 342: 129-138
- 13 Santarpia L, Nicoloso M, Calin GA. MicroRNAs: a complex regulatory network drives the acquisition

■同行评价

本文选题新颖,对食管癌的诊断、分期和生物治疗具有一定的参考价值,可读性较强.

- of malignant cell phenotype. *Endocr Relat Cancer* 2010; 17: F51-F75
- 14 Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006; 6: 259-269
 - 15 Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert BL, Mak RH, Ferrando AA, Downing JR, Jacks T, Horvitz HR, Golub TR. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 2005; 435: 834-838
 - 16 Xi Y, Nakajima G, Gavin E, Morris CG, Kudo K, Hayashi K, Ju J. Systematic analysis of microRNA expression of RNA extracted from fresh frozen and formalin-fixed paraffin-embedded samples. *RNA* 2007; 13: 1668-1674
 - 17 Li J, Smyth P, Flavin R, Cahill S, Denning K, Aherne S, Guenther SM, O'Leary JJ, Sheils O. Comparison of miRNA expression patterns using total RNA extracted from matched samples of formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) cells and snap frozen cells. *BMC Biotechnol* 2007; 7: 36
 - 18 Kopreski MS, Benko FA, Gocke CD. Circulating RNA as a tumor marker: detection of 5T4 mRNA in breast and lung cancer patient serum. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 945: 172-178
 - 19 Lo YM, Tsui NB, Chiu RW, Lau TK, Leung TN, Heung MM, Gerovassili A, Jin Y, Nicolaides KH, Cantor CR, Ding C. Plasma placental RNA allelic ratio permits noninvasive prenatal chromosomal aneuploidy detection. *Nat Med* 2007; 13: 218-223
 - 20 Swarup V, Rajeswari MR. Circulating (cell-free) nucleic acids--a promising, non-invasive tool for early detection of several human diseases. *FEBS Lett* 2007; 581: 795-799
 - 21 Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogossova-Agadjanyan EL, Peterson A, Noteboom J, O'Briant KC, Allen A, Lin DW, Urban N, Drescher CW, Knudsen BS, Stirewalt DL, Gentleman R, Vessella RL, Nelson PS, Martin DB, Tewari M. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 10513-10518
 - 22 Resnick KE, Alder H, Hagan JP, Richardson DL, Croce CM, Cohn DE. The detection of differentially expressed microRNAs from the serum of ovarian cancer patients using a novel real-time PCR platform. *Gynecol Oncol* 2009; 112: 55-59
 - 23 Taylor DD, Gercel-Taylor C. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2008; 110: 13-21
 - 24 Ho AS, Huang X, Cao H, Christman-Skieller C, Bennewith K, Le QT, Koong AC. Circulating miR-210 as a Novel Hypoxia Marker in Pancreatic Cancer. *Transl Oncol* 2010; 3: 109-113
 - 25 Gilad S, Meiri E, Yogev Y, Benjamin S, Lebanony D, Yerushalmi N, Benjamin H, Kushnir M, Cholakh H, Melamed N, Bentwich Z, Hod M, Goren Y, Chajut A. Serum microRNAs are promising novel biomarkers. *PLoS One* 2008; 3: e3148
 - 26 Rosenfeld N, Aharonov R, Meiri E, Rosenwald S, Spector Y, Zepeniuk M, Benjamin H, Shabes N, Tabak S, Levy A, Lebanony D, Goren Y, Silberschein E, Targan N, Ben-Ari A, Gilad S, Sion-Vardy N, Tobar A, Feinmesser M, Kharenko O, Nativ O, Nass D, Perelman M, Yosepovich A, Shalmon B, Polak-Charcon S, Fridman E, Avniel A, Bentwich I, Bentwich Z, Cohen D, Chajut A, Barshack I. MicroRNAs accurately identify cancer tissue origin. *Nat Biotechnol* 2008; 26: 462-469
 - 27 Xiao B, Guo J, Miao Y, Jiang Z, Huan R, Zhang Y, Li D, Zhong J. Detection of miR-106a in gastric carcinoma and its clinical significance. *Clin Chim Acta* 2009; 400: 97-102
 - 28 Wickramasinghe NS, Manavalan TT, Dougherty SM, Riggs KA, Li Y, Klinge CM. Estradiol downregulates miR-21 expression and increases miR-21 target gene expression in MCF-7 breast cancer cells. *Nucleic Acids Res* 2009; 37: 2584-2595
 - 29 Uziel T, Karginov FV, Xie S, Parker JS, Wang YD, Gajjar A, He L, Ellison D, Gilbertson RJ, Hannon G, Roussel MF. The miR-17~92 cluster collaborates with the Sonic Hedgehog pathway in medulloblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 2812-2817
 - 30 Laios A, O'Toole S, Flavin R, Martin C, Kelly L, Ring M, Finn SP, Barrett C, Loda M, Gleeson N, D'Arcy T, McGuinness E, Sheils O, Sheppard B, O'Leary J. Potential role of miR-9 and miR-223 in recurrent ovarian cancer. *Mol Cancer* 2008; 7: 35
 - 31 Fei J, Lan F, Guo M, Li Y, Liu Y. Inhibitory effects of anti-miRNA oligonucleotides (AMOs) on A549 cell growth. *J Drug Target* 2008; 16: 688-693
 - 32 Feber A, Xi L, Luketich JD, Pennathur A, Landreneau RJ, Wu M, Swanson SJ, Godfrey TE, Little VR. MicroRNA expression profiles of esophageal cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2008; 135: 255-260; discussion 260
 - 33 Kan T, Sato F, Ito T, Matsumura N, David S, Cheng Y, Agarwal R, Paun BC, Jin Z, Olaru AV, Selaru FM, Hamilton JP, Yang J, Abraham JM, Mori Y, Meltzer SJ. The miR-106b-25 polycistron, activated by genomic amplification, functions as an oncogene by suppressing p21 and Bim. *Gastroenterology* 2009; 136: 1689-1700
 - 34 Maru DM, Singh RR, Hannah C, Albarracin CT, Li YX, Abraham R, Romans AM, Yao H, Luthra MG, Anandasabapathy S, Swisher SG, Hofstetter WL, Rashid A, Luthra R. MicroRNA-196a is a potential marker of progression during Barrett's metaplasia-dysplasia-invasive adenocarcinoma sequence in esophagus. *Am J Pathol* 2009; 174: 1940-1948
 - 35 Hiyoshi Y, Kamohara H, Karashima R, Sato N, Imamura Y, Nagai Y, Yoshida N, Toyama E, Hayashi N, Watanabe M, Baba H. MicroRNA-21 regulates the proliferation and invasion in esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 1915-1922
 - 36 Guo Y, Chen Z, Zhang L, Zhou F, Shi S, Feng X, Li B, Meng X, Ma X, Luo M, Shao K, Li N, Qiu B, Mitchelson K, Cheng J, He J. Distinctive microRNA profiles relating to patient survival in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2008; 68: 26-33
 - 37 Patterson TA, Lobenhofer EK, Fulmer-Smentek SB, Collins PJ, Chu TM, Bao W, Fang H, Kawasaki ES, Hager J, Tikhonova IR, Walker SJ, Zhang L, Hurban P, de Longueville F, Fuscoe JC, Tong W, Shi L, Wolfinger RD. Performance comparison of one-color and two-color platforms within the MicroArray Quality Control (MAQC) project. *Nat Biotechnol* 2006; 24: 1140-1150
 - 38 Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004; 116: 281-297
 - 39 Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K, Rassenti L, Kipps T, Negrini M, Bullrich F, Croce CM. Frequent deletions and down-regulation of

- micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 15524-15529
- 40 Sugito N, Ishiguro H, Kuwabara Y, Kimura M, Mitsui A, Kurehara H, Ando T, Mori R, Takashima N, Ogawa R, Fujii Y. RNA SEN regulates cell proliferation and affects survival in esophageal cancer patients. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 7322-7328
- 41 Roldo C, Missiaglia E, Hagan JP, Falconi M, Capelli P, Bersani S, Calin GA, Volinia S, Liu CG, Scarpa A, Croce CM. MicroRNA expression abnormalities in pancreatic endocrine and acinar tumors are associated with distinctive pathologic features and clinical behavior. *J Clin Oncol* 2006; 24: 4677-4684
- 42 Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, Visone R, Iorio M, Roldo C, Ferracin M, Prueitt RL, Yanaihara N, Lanza G, Scarpa A, Vecchione A, Negrini M, Harris CC, Croce CM. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 2257-2261
- 43 Matsushima K, Isomoto H, Kohno S, Nakao K. MicroRNAs and esophageal squamous cell carcinoma. *Digestion* 2010; 82: 138-144

编辑 李军亮 电编 吴鹏联

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2010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.

GH-SOCS2-IGF-1轴对溃疡性结肠炎肠黏膜屏障的影响

张榕, 施茵, 关鑫

■背景资料

溃疡性结肠炎(UC)又称慢性非特异性溃疡性结肠炎, 是一种反复发作的原因不明的肠道慢性非特异性炎症性肠病。目前, 本病确切的发病机制尚未明确, 可能与感染、遗传、免疫、饮食、环境以及精神心理等多方面因素有关。大量研究表明, 肠黏膜屏障的损伤与溃疡性结肠炎的发生、发展密切相关。

张榕, 施茵, 关鑫, 上海市针灸经络研究所 上海市 200030
国家重点基础研究发展计划(973计划)基金资助项目, No. 2009CB522900
国家中医药管理局基金资助项目, No. 06-07JP17
上海市重点学科基金资助项目, No. S30304
作者贡献分布: 本文综述由张榕完成; 施茵与关鑫审校。
通讯作者: 施茵, 200030, 上海市宛平南路650号, 上海市针灸经络研究所。flysy0636@hotmail.com
电话: 021-64383910 传真: 021-64644238
收稿日期: 2010-05-25 修回日期: 2010-07-08
接受日期: 2010-07-12 在线出版日期: 2010-08-18

Regulatory role of the GH-SOCS2-IGF-1 axis in the pathogenesis of intestinal mucosal barrier dysfunction in ulcerative colitis

Rong Zhang, Yin Shi, Xin Guan

Rong Zhang, Yin Shi, Xin Guan, Shanghai Institute of Acupuncture-Moxibustion and Meridian, Shanghai 200030, China

Supported by: the Major State Basic Research Development Program of China (973 Program), No. 2009CB522901; the Foundation of State Administration of Traditional Chinese Medicine, No. 06-07JP17; and the Leading Academic Discipline Project of Shanghai Municipal Education Commission, No. S30304

Correspondence to: Yin Shi, Shanghai Institute of Acupuncture-Moxibustion and Meridian, 630 Wanping South Road, Shanghai 200030, China. flysy0636@hotmail.com
Received: 2010-05-25 Revised: 2010-07-08
Accepted: 2010-07-12 Published online: 2010-08-18

Abstract

Ulcerative colitis (UC) is a chronic, nonspecific inflammatory bowel disease usually associated with recurrent attacks. Intestinal bacterial translocation induced by intestinal mucosal barrier dysfunction may mediate abnormal immune response and chronic intestinal inflammation and therefore play an important role in the development and progression of UC. The GH-SOCS2-IGF1 axis, consisting of growth hormone (GH), suppressors of cytokine signaling 2 (SOCS2), and insulin-like growth factor-1 (IGF-1), is involved in the injury and repair of intestinal mucosal barrier. The research on the abnormal regulation of the GH-SOCS2-IGF1 axis in the pathogenesis of intestinal mucosal barrier dysfunction in UC

has attracted increasing attention. This paper will briefly summarize the respective role of GH, SOCS2, and IGF-1, and discuss the regulatory role of the GH-SOCS2-IGF1 axis in the pathogenesis of intestinal mucosal barrier dysfunction in UC.

Key Words: GH-SOCS2-IGF-1 axis; Ulcerative colitis; Intestinal mucosal barrier

Zhang R, Shi Y, Guan X. Regulatory role of the GH-SOCS2-IGF-1 axis in the pathogenesis of intestinal mucosal barrier dysfunction in ulcerative colitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(23): 2442-2447

摘要

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是一种反复发作的原因不明的肠道慢性非特异性炎症性肠病。由肠黏膜屏障功能异常或损伤而形成的“肠道细菌易位”可介导异常免疫反应和慢性肠道炎症在UC的发生与发展中起着重要作用。近年来研究显示, 生长激素(growth hormone, GH)、细胞因子信号抑制蛋白-2(suppressors of cytokine signaling proteins 2, SOCS2)和胰岛素样生长因子-I(insulin like growth factor-1, IGF-1)相互作用形成GH-SOCS2-IGF1轴, 参与肠黏膜屏障的损伤与修复过程, 而对GH-SOCS2-IGF1轴的调控异常进而导致的肠黏膜屏障功能损伤在UC中的影响作用已日益受到关注。本文旨从GH、SOCS2、IGF-1各自的生物学效应以及GH-SOCS2-IGF-1轴对UC肠黏膜屏障的调节作用等方面作一简要概述。

关键词: GH-SOCS2-IGF-1轴; 溃疡性结肠炎; 肠黏膜屏障

张榕, 施茵, 关鑫. GH-SOCS2-IGF-1轴对溃疡性结肠炎肠黏膜屏障的影响. *世界华人消化杂志* 2010; 18(23): 2442-2447
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2442.asp>

0 引言

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)又称慢性非特异性溃疡性结肠炎, 是一种反复发作的原

■同行评议者

王富春, 教授, 长春中医药大学针灸推拿学院

因不明的肠道慢性非特异性炎症性肠病。本病主要累及结肠黏膜及黏膜下层, 初起多见为黏膜浅层的弥漫性炎症改变和广泛性充血, 继而出现黏膜水肿、糜烂和溃疡, 若久病失治或误治则可出现肠壁变厚、变窄或肠管变短等症状^[1,2]。目前, 本病确切的发病机制尚未明确, 可能与感染、遗传、免疫、饮食、环境以及精神心理等多方面因素有关。大量研究表明, 肠黏膜屏障的损伤与UC的发生、发展密切相关^[3,4]。近年来, 随着对其研究的不断深入, 人们发现在肠黏膜屏障损伤和修复的过程中生长激素(growth hormone, GH)-细胞因子信号抑制蛋白-2(suppressors of cytokine signaling proteins 2, SOCS2)-胰岛素样生长因子-1(insulin like growth factor-1, IGF-1)轴发挥重要作用, 已日渐受到人们的关注。我们查阅了近年来国内外的相关文献, 旨从GH-SOCS2-IGF-1轴对UC肠黏膜屏障的调节作用这一角度进行概述。

1 GH、SOCS2和IGF-1的生物学效应

1.1 GH GH是由脑垂体前叶嗜酸性细胞分泌的一种含191个氨基酸, 相对分子质量为22 000 kDa的单一肽链的蛋白质激素。GH因种群不同其结构及组成有所不同, 人类GH是由191个氨基酸组成, 相对分子质量为21 500 Da, 含有两个二硫键的单肽链。GH的合成和分泌主要受下丘脑生长激素释放激素(growth hormone releasing hormone, GHRH)和生长激素释放抑制激素(growth hormone release inhibiting hormone, GHIH)的双重控制。GHRH促进GH分泌及合成; GHIH抑制GHRH的合成产生, 两者均能与垂体前叶的特异性受体结合。此外, 应激、低血糖、运动以及内分泌激素如雌激素、睾酮等也可促进GH的分泌; 而高血糖、游离脂肪酸则可抑制GH的分泌。

GH一方面通过直接与靶器官表面特异性受体(GH receptor, GHR)结合, 刺激靶细胞从而发挥生物学作用; 另一方面则通过刺激肝细胞、肠及其他部位产生的胰岛素样生长因子(insulin like growth factors, IGFs)^[5]而间接发挥其生物学效应。GHR广泛表达于机体各个组织器官, 特别是胃、小肠、大肠等胃肠道各个部分中。研究证实, 在胃肠道上皮细胞、黏膜固有层、黏膜肌层、黏膜下层以及肌层固有层中存在大量GHR^[6]。这些部位的GHR与生长激素结合, 能够促进肠黏膜细胞对谷氨酰胺的摄取和利用^[7,8], 加速细胞核内DNA和RNA的合成和/或提高已合成的RNA的

活性, 增加肠道内蛋白及其他营养物质的合成, 营养肠道。目前研究表明, 生长激素能够影响肠黏膜细胞有丝分裂的速度^[9], 并可能通过酪氨酸激酶促进人类肠道细胞的离子转运、增殖和分化^[10], 对肠质量、长度、黏膜质量、绒毛高度和腺窝深度有明显的促进作用^[11]。此外, 大量的动物研究表明^[12,13], GH能有效减少肠源性细菌和内毒素移位, 对包括肝细胞^[14]、肠道免疫细胞^[15]在内的多种细胞的凋亡进行调节, 从而起到对胃肠道的保护作用。

1.2 IGF-1 胰岛素样生长因子(insulin like growth factors, IGFs)是一种因其空间结构与胰岛素相似, 能与胰岛素竞争胰岛素受体结合部位, 产生胰岛素样作用而得名的蛋白多肽。IGFs有两个亚型即IGF-1和IGF-2, 是体内重要的生长因子之一。其中IGF-1又名生长介素, 是由第12号染色体短臂的基因编码的含有70个氨基酸, 相对分子质量7 649 Da的单链碱性多肽。

IGF-1可在机体大多数组织中表达, 其在血浆中多以结合蛋白的形式存在, 仅1%以游离形式存在。研究发现, 肝、脂肪等组织都能合成分泌IGF-1, 肝脏是合成与分泌IGF-1的主要场所, 循环中的IGF-1多来源于GH与肝细胞膜上的GHR结合而促使肝脏产生; 其他组织包括软骨组织、脂肪组织等也能通过旁分泌或自分泌的形式在局部分泌IGF-1。

根据分泌部位的不同, IGF-1的调控方式和功效不尽相同。IGF-1主要通过与细胞膜上的IGF-1受体(IGF-1 receptor, IGF-1R)结合发挥生物学作用, 其IGF-1R几乎存在于动物的所有组织及细胞中, 包括整个胃肠道、肝脏、中枢神经系统等^[16], 其中绝大部分免疫细胞均表达IGF-1R。IGF-1发挥作用的形式多样化, 主要通过内分泌、自分泌和旁分泌3种机制来发挥其作用。此外, IGF-1的生物学作用以及IGF-1与IGF-1R结合的有效性要受胰岛素样生长因子结合蛋白(insulin-like growth factor binding protein, IGFBPs)的调节。现已证实, IGFBP-3可在一定程度上调节IGF-1对组织的活性^[17], IGFBP-3含量越低, 游离IGF-1增多, IGF-1对组织的作用就越强; 而IGFBP-3含量高, 游离IGF-1减少, 其对组织的作用相对较弱。

Ohneda等^[18]通过转基因小鼠实验发现, IGF-1过表达对肠道黏膜的长度和重量等的影响与以前观察发现的生长激素过表达的表现相似, 两者均能促进小肠的生长。IGF-1可通过作用于

■研究前沿

SOCS2的调节作用是基于何种机制上发生, 以及其不同部位、不同表达水平对调节作用是否有差异等诸多问题尚待明确。因此, 如何通过GH-SOCS2-IGF-1轴调控以适度表达GH、IGF-1, 使其在UC的肠黏膜屏障损伤的修复方面发挥作用可能将成为今后研究的一个方向。

■相关报道

Isomäki等通过对类风湿性关节炎(RA)患者不同部位SOCS2 mRNA表达的观察发现, SOCS2 mRNA在RA患者滑液巨噬细胞中的表达呈上升趋势, 在外周血中则相反。

小肠隐窝上皮细胞的IGF-1R, 促进上皮细胞的增殖、分化以及DNA、RNA合成^[19], 其促隐窝细胞增殖作用强于生长激素, 但刺激肠上皮细胞分化的效果不如生长激素。因IGF-1不能分辨正常细胞与癌细胞, IGF-1的过度表达可能会引起新生物及某些组织增生, 导致组织纤维化以及肿瘤等的发生^[20]。此外, IGF-1还可抑制肠黏膜细胞等多种细胞的凋亡^[14,21], 促进细胞合成胶原和细胞外基质。动物实验证实, IGF-1能降低小鼠肠黏膜的通透性, 增强肠上皮细胞屏障的功能^[22]。

1.3 SOCS-2 SOCS-2家族, 是一类可被多种细胞因子诱导产生、且对细胞因子信号通路具有负反馈调节作用的蛋白分子。该家族主要由SOCS1-7及CIS这8个成员组成, 拥有共同的结构特点^[23,24], 即中间包含一个SH2结构域, 通过这一结构可以与信号传导蛋白和转录激活物(signal transducers and activators of transcription, STAT)竞争结合细胞因子受体上磷酸化的酪氨酸残基; C末端有一段由40个氨基酸构成, 为全家族共有, 在进化中高度保守的序列, 称为“SOCS盒”, 与蛋白酪氨酸激酶(Janus kinase, JAK)家族的酪氨酸磷酸化位点(如JAK2的KEYY)非常相似; N末端为一段可变序列。迄今为止, 人们对SOCS家族中的SOCS1、SOCS2、SOCS3及CIS的研究较多, 而且发现其中SOCS2在肠道方面发挥着极为重要的作用。

SOCS2由198个氨基酸组成, 其N末端相对较短, 长度为50-75个氨基酸。通常编码SOCS2的mRNA在未受刺激的骨髓、脾和外周血细胞等组织和细胞内呈低水平表达。但当受到细胞因子或其他刺激物诱导时, SOCS mRNA表达则会即刻上调, 其表达水平很大程度上受到刺激因子类型和所在组织不同的影响。此外, 细胞所处环境和/或细胞分化程度也会影响SOCS mRNA的表达。Isomäki等^[25]通过对类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)患者不同部位SOCS2 mRNA表达的观察发现, SOCS2 mRNA在RA患者滑液巨噬细胞中的表达呈上升趋势, 在外周血中则相反。

通常情况下, SOCS2能被包括GH、IGF-1在内的多种细胞因子或激素所诱导, 其发生主要依赖于JAK/STAT信号传导通路的激活。反过来, SOCS2又通过对细胞因子所介导的信号转导过程进行抑制从而发挥相应的作用。Tannahill等^[26]发现SOCS2能增强STAT5的磷酸化作用, 但对细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated

kinase, ERK)的磷酸化作用影响较小。由此推测, SOCS2对信号转导的抑制作用可能是通过JAK/STAT信号传导途径来发挥的。

SOCS2在机体的生长发育中起重要调节作用。Metcalf等^[27]通过对SOCS2(-/-)型小鼠的研究发现: 当小鼠体内缺乏SOCS2时, 其生长速度大大超过同等条件下的正常小鼠, 主要表现为长骨长度的增加以及机体大多数器官成比例的扩大。

Greenhalgh等^[28]则发现SOCS2在低水平表达时能抑制催乳素分泌信号的传导, 影响妊娠的发生, 而当其达到一定浓度时又恢复了对催乳素的应答性, 起促进作用。这一研究发现提示SOCS2可能有双向调节作用。越来越多的研究表明: SOCS2与SOCS1、SOCS3之间存在相互作用。SOCS2能抑制SOCS1或SOCS3的表达^[29]。如SOCS2能通过加快SOCS3降解促进IL-2和IL-3信号, 从而影响T淋巴细胞的增生, 参与到辅助性T淋巴细胞平衡中^[26]。

2 GH-SOCS2-IGF-1轴之间的相互影响作用

人们很早就认识到GH与IGF-1之间的交互作用。大量的研究表明, 在体内GH与IGF-1通过形成GH/IGF-1轴而发挥作用。一方面GH与靶细胞上的GHR相结合, 刺激肝脏及肠道IGF-1的生成^[30], IGF-1则直接作用于靶细胞, 介导GH的生物学效应, 此时IGF-1随着GH的上升而增高; 另一方面当IGF-1达到一定水平时, 他又可以在垂体前叶或丘脑下部水平负反馈调控GH的分泌。

Isshiki等^[31]通过对糖尿病大鼠的肾小球RNA进行DNA微阵列分析发现, 大鼠系膜细胞中过度表达的SOCS2能够通过防止p66Shc衔接蛋白上的酪氨酸317磷酸化作用, 进一步抑制了IGF-1诱导的ERK的激活, 从而起到对IGF-1R介导的生物学作用的抑制作用。此外, 通过SOCS2缺陷小鼠等一系列实验, 人们发现当小鼠体内缺乏SOCS2时, 小鼠会出现一系列GH和IGF-1失调的特征性表现^[27], 可见大量尿蛋白的降低, 局部组织如心脏、肺脏及脾脏IGF-1的增多以及皮肤胶原蛋白的累积。种种研究表明, SOCS2可能对GH-IGF-1通路起着负性调节作用。但SOCS2并非仅仅抑制GH及IGF-1的信号传导, 而对GH信号转导可能有双重作用。有研究发现, SOCS2过表达的小鼠并未出现生长缺陷, 反而体积明显大于野生型小鼠, 推测SOCS2在低浓度时可抑制GH的作用, 而高浓度时则可增强其信号转导^[32]。

目前为止, 人们已经初步认识到GH、SOCS2和IGF-1之间的影响作用, 但对这一影响作用产生的机制并不明确. 目前大部分研究表明, GH-SOCS2-IGF-1轴可能主要通过JAK2/STAT5信号传导途径来发挥相互影响作用的. GH与靶组织细胞膜表面GHR结合, 导致受体二聚化, 再以其结构域在胞内膜近侧区的富含脯氨酸的短链基序-box1作为结合位点与JAK2相互靠近并磷酸化^[33], 而活化的JAK使GHR胞内端以及一些信号蛋白的某些关键位点的酪氨酸残基磷酸化^[34], 从而活化包括JAK2/信号传导及STAT5通路在内的多种信号通路. 活化的GHR为STAT5提供了锚定位点, STAT5与受体胞内端结合之后, 在JAK2的催化下发生酪氨酸磷酸化而被活化, 活化的STAT5与受体分离, 并发生同或异二聚化, STAT5二聚体转位进入核内, 与靶基因启动子上的STAT反应元件相结合, 从而启动包括SOCS2在内的靶基因转录, 合成的SOCS2又通过SH2区与活化的细胞因子受体的磷酸化酪氨酸残基结合, 竞争性抑制STAT的结合或隐藏受体上的STAT结合位点, 从而抑制STAT的进一步活化, 使得JAK/STAT信号调节通路受抑制, 从而抑制了IGF-1和GH的功能, 发挥负反馈调节作用.

3 GH-SOCS2-IGF-1轴对UC肠黏膜屏障功能的调节作用

近年来, 在对UC的发病机制研究中发现, 由肠上皮细胞凋亡异常^[35-37]、炎症细胞因子等炎症介质诱导的紧密连结蛋白表达异常^[38]以及黏蛋白表达减少^[39,40]等所致的肠黏膜屏障功能异常在UC的发生与发展中起着重要作用. 而GH-SOCS2-IGF-1轴参与肠黏膜屏障功能的调控, 对GH-SOCS2-IGF-1轴的调控异常进而导致的肠黏膜屏障功能损伤在UC中的影响作用已日益受到人们的关注.

3.1 对肠上皮细胞的调节作用 肠上皮细胞为单层柱状上皮细胞, 他与肠黏膜表面的黏液层、基底膜、黏膜下固有层共同构成了肠黏膜机械屏障. 生理状态下, 肠上皮细胞沿着隐窝绒毛轴进行增殖-分化-凋亡, 正常的结肠细胞凋亡主要发生在肠腔表面的上皮层. 在病理状态下, 上皮细胞这一正常增殖-分化-凋亡顺序可能遭到破坏. Iwamoto等^[41]通过对活动期UC肠上皮细胞的变化观察发现, 活动期UC除肠腔上皮细胞外, 病变处及邻近的非病变处隐窝上皮细胞凋亡也增

加. 同时, 在炎症活动区域, 上皮细胞生存时间大为缩短, 只有正常细胞的一半^[42], 使上皮细胞凋亡速率明显增加. 肠上皮细胞凋亡的异常使得由其构成的肠黏膜机械屏障被破坏, 从而导致结肠黏膜的损伤.

通常进行上皮细胞连续性重建是损伤后黏膜修复最重要的步骤. GH-SOCS2-IGF-1轴一方面可以通过GH、IGF-1的营养作用, 促进肠上皮细胞的分化与增殖^[43]; 另一方面则通过IGF-1缓解细胞凋亡的发生, 使肠上皮细胞凋亡减少^[21]. 结肠上皮细胞凋亡和增殖重新达到平衡时, 正常细胞稳态开始恢复, 受损黏膜也逐步修复.

3.2 对成纤维细胞的调节作用 UC的特征性表现在于结肠上皮表浅而广泛的缺失和固有层的炎症改变. 当肠道受损时, 固有层上皮肌样成纤维细胞在GH、IGF-1的作用下分化和增殖^[44], 从而促进胶原的大量分泌以促进伤口愈合. 但当GH/IGF-1表达过度时, 则会促使细胞增殖分化功能过强, 而使肠道肌层和间质细胞过度生长, 胶原组织过度沉积, 从而导致肠道肿瘤和/或纤维化, 最终出现肠壁变厚、变窄, 肠管变短等^[45,46]. 此时, SOCS2发挥其负反馈调节作用, 通过对GH/IGF-1信号通路传导的抑制, 下调GH/IGF-1的表达水平, 使之恢复正常水平, 从而减少对UC肠黏膜的损害^[47].

3.3 对UC肠黏膜屏障功能的调节作用 大量研究证实, 由肠上皮细胞为主构成的肠黏膜机械屏障是肠道防御机制的重要环节, 构成了肠道防御肠腔内致病性抗原(细菌、有毒物质、食物抗原物质、致癌物质等)侵入的第一道防线. 当肠黏膜机械屏障结构和功能保持完整时, 能有效地防止肠腔内致病性抗原侵入, 维持肠道内环境的相对稳定, 防止相关疾病的发生. 反之, 当肠黏膜机械屏障受损时, 大量的致病抗原侵入黏膜及黏膜下层, 引发一系列免疫炎症反应, 进一步加重肠黏膜屏障的损伤程度.

研究发现, 肠黏膜屏障通透性的改变是UC发病的主要因素之一, 而肠黏膜屏障通透性的增加又与肠上皮细胞的凋亡异常以及肠上皮细胞间紧密连接(tight junction, TJ)受损^[48]有关. GH-SOCS2-IGF-1轴通过对肠上皮细胞的凋亡与增殖进行调节, 使得肠上皮细胞凋亡/增殖比恢复正常, 肠黏膜通透性降低, 从而减少致病性抗原侵入以及继发性炎症损伤的发生, 由此缓解肠黏膜屏障的进一步损害. 另一方面, GH-SOCS2-IGF-1轴通过GH、IGF-1对肠道的营养

■同行评价

本文表达流畅, 条理清楚, 论据充分, 具有一定的学术价值.

作用^[6,49],促进肠黏膜细胞的生长,使得肠黏膜高度增加,肠绒毛增多,对受损肠黏膜有修复和保护作用.此外,GH-SOCS2-IGF-1轴还可刺激胶原沉积^[50]、细胞分裂,使得平滑肌体积增大,肠长度增长,促进受损肠黏膜的愈合.

4 结论

近年来,人们已经认识到GH-SOCS2-IGF-1轴在治疗溃疡性结肠炎过程中的重要性,GH-SOCS2-IGF-1轴可通过降低肠黏膜通透性,促进肠黏膜细胞的分化、增殖和刺激胶原沉积等多种方式,参与肠黏膜屏障的修复过程.但就现有的临床资料来看,通过增加GH、IGF-1在体内的表达来治疗疾病,已取得了一定的疗效.然而,GH、IGF-1的过度表达会导致患肠道癌症和/或肠纤维化的风险加大,造成肠黏膜的进一步损伤.此外,虽有大量动物实验证实SOCS2对GH、IGF-1存在负反馈调节作用,但SOCS2的调节作用是基于何种机制上发生,以及其不同部位、不同表达水平对调节作用是否有差异等诸多问题尚待明确.因此,如何通过GH-SOCS2-IGF-1轴调控以适度表达GH、IGF-1,使其在UC的肠黏膜屏障损伤的修复方面发挥作用可能将成为今后研究的一个方向.目前,针对GH-SOCS2-IGF-1轴对UC肠黏膜屏障功能的调节作用知之甚少,且确切机制尚不清楚.随着这方面研究的不断深入,必将对肠黏膜屏障功能的调节认识以及UC的治疗有着重要的指导作用.

5 参考文献

- 1 中华消化病学分会炎症性肠病协作组. 对我国炎症性肠病诊断治疗规范的共识意见. 第七次全国消化学术会议论文汇编(上册) 2007: 3
- 2 吴焕淦, 季光, 施征, 施茵. 溃疡性结肠炎中医诊断与治疗. 第1版. 上海: 上海科学技术出版社. 2009: 76-77
- 3 姚汝冰, 邱明义, 胡兵, 郭郡浩, 蔡辉. 乌梅丸对溃疡性结肠炎大鼠结肠粘膜形态学的影响. 广州中医药大学学报 2003; 20: 59-62
- 4 刘惠萍, 张秀兰, 赵东. 结肠炎颗粒对模型大鼠溃疡性结肠炎的作用. 中华实验外科杂志 2005; 22: 831
- 5 Le Roith D, Scavo L, Butler A. What is the role of circulating IGF-I? *Trends Endocrinol Metab* 2001; 12: 48-52
- 6 Wheeler EE, Challacombe DN. The trophic action of growth hormone, insulin-like growth factor-I, and insulin on human duodenal mucosa cultured in vitro. *Gut* 1997; 40: 57-60
- 7 Ray EC, Avissar NE, Salloum R, Sax HC. Growth hormone and epidermal growth factor upregulate specific sodium-dependent glutamine uptake systems in human intestinal C2BBel cells. *J Nutr* 2005; 135: 14-18
- 8 Balteskard L, Unneberg K, Mjaaland M, Jenssen TG, Revhaug A. Growth hormone and insulinlike growth factor 1 promote intestinal uptake and hepatic release of glutamine in sepsis. *Ann Surg* 1998; 228: 131-139
- 9 Leblond CP, Carriere R. The effect of growth hormone and thyroxine on the mitotic rate of the intestinal mucosa of the rat. *Endocrinology* 1955; 56: 261-266
- 10 Canani RB, Bisceglia M, Bruzzese E, Mallardo G, Guarino A. Growth hormone stimulates, through tyrosine kinase, ion transport and proliferation in human intestinal cells. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1999; 28: 315-320
- 11 Byrne TA, Wilmore DW, Iyer K, Dibaise J, Clancy K, Robinson MK, Chang P, Gertner JM, Lautz D. Growth hormone, glutamine, and an optimal diet reduces parenteral nutrition in patients with short bowel syndrome: a prospective, randomized, placebo-controlled, double-blind clinical trial. *Ann Surg* 2005; 242: 655-661
- 12 Yang ZW, Li JG, Mao XG, Sun B, Tong ZS, Sun HY, Li XR, Cong YP. Effects of recombinant human growth hormone on intestinal translocation of bacteria and endotoxin in rats with obstructive jaundice. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2005; 4: 445-449
- 13 Wang X, Wang B, Wu J, Wang G. Beneficial effects of growth hormone on bacterial translocation during the course of acute necrotizing pancreatitis in rats. *Pancreas* 2001; 23: 148-156
- 14 Sheen-Chen SM, Ho HT, Chia-Pei L, Hung KS, Eng HL. The effect of insulin-like growth factor-I on hepatocyte apoptosis after bile duct ligation in rat. *Dig Dis Sci* 2006; 51: 2220-2224
- 15 孙少川, 郑春宁, 刘国勤, 谭伟, 姜永胜. 重组人生长激素对大鼠肠道缺血再灌注后肠壁组织T淋巴细胞亚群和浆细胞凋亡的影响. 中华实验外科杂志 2006; 23: 605-606
- 16 Kooijman R, Willems M, De Haas CJ, Rijkers GT, Schuurmans AL, Van Buul-Offers SC, Heijnen CJ, Zegers BJ. Expression of type I insulin-like growth factor receptors on human peripheral blood mononuclear cells. *Endocrinology* 1992; 131: 2244-2250
- 17 Chicharro JL, López-Calderon A, Hoyos J, Martín-Velasco AI, Villa G, Villanúa MA, Lucía A. Effects of an endurance cycling competition on resting serum insulin-like growth factor I (IGF-I) and its binding proteins IGFBP-1 and IGFBP-3. *Br J Sports Med* 2001; 35: 303-307
- 18 Ohneda K, Ulshen MH, Fuller CR, D'Ercole AJ, Lund PK. Enhanced growth of small bowel in transgenic mice expressing human insulin-like growth factor I. *Gastroenterology* 1997; 112: 444-454
- 19 Kooijman R, Rijkers GT, Zegers BJ. IGF-I potentiates interleukin-2 production in human peripheral T cells. *J Endocrinol* 1996; 149: 351-356
- 20 Krein PM, Winston BW. Roles for insulin-like growth factor I and transforming growth factor-beta in fibrotic lung disease. *Chest* 2002; 122: 289S-293S
- 21 王映珍, 王世文, 李培杰, 党登峰, 孙志江, 王先坤, 徐庆杰. 胰岛素样生长因子-I对重症急性胰腺炎大鼠小肠黏膜上皮细胞bax和bcl-2 mRNA表达的影响. 世界华人消化杂志 2008; 16: 1396-1401
- 22 Lorenzo-Zúñiga V, Rodríguez-Ortígon CM, Bartolí R, Martínez-Chantar ML, Martínez-Peralta L, Pardo A, Ojanguren I, Quiroga J, Planas R, Prieto J. Insulin-like growth factor I improves intestinal barrier function in cirrhotic rats. *Gut* 2006; 55:

- 1306-1312
- 23 Takagi M, Kamiya N, Takahashi T, Ito S, Hasegawa M, Suzuki N, Nakanishi K. Effects of bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor beta1 on gene expression of transcription factors, AJ18 and Runx2 in cultured osteoblastic cells. *J Mol Histol* 2004; 35: 81-90
- 24 Hilton DJ, Richardson RT, Alexander WS, Viney EM, Willson TA, Sprigg NS, Starr R, Nicholson SE, Metcalf D, Nicola NA. Twenty proteins containing a C-terminal SOCS box form five structural classes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 114-119
- 25 Isomäki P, Alanrää T, Isohanni P, Lagerstedt A, Korpela M, Moilanen T, Visakorpi T, Silvennoinen O. The expression of SOCS is altered in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2007; 46: 1538-1546
- 26 Tannahill GM, Elliott J, Barry AC, Hibbert L, Cacalano NA, Johnston JA. SOCS2 can enhance interleukin-2 (IL-2) and IL-3 signaling by accelerating SOCS3 degradation. *Mol Cell Biol* 2005; 25: 9115-9126
- 27 Metcalf D, Greenhalgh CJ, Viney E, Willson TA, Starr R, Nicola NA, Hilton DJ, Alexander WS. Gigantism in mice lacking suppressor of cytokine signalling-2. *Nature* 2000; 405: 1069-1073
- 28 Greenhalgh CJ, Rico-Bautista E, Lorentzon M, Thaus AL, Morgan PO, Willson TA, Zervoudakis P, Metcalf D, Street I, Nicola NA, Nash AD, Fabri LJ, Norstedt G, Ohlsson C, Flores-Morales A, Alexander WS, Hilton DJ. SOCS2 negatively regulates growth hormone action in vitro and in vivo. *J Clin Invest* 2005; 115: 397-406
- 29 邢长英, 归绥琪, 王海燕. 人早孕母胎界面SOCS1、SOCS2、SOCS3表达. *中国免疫学杂志* 2006; 22: 538-544
- 30 Ersoy B, Ozbilgin K, Kasirga E, Inan S, Coskun S, Tuglu I. Effect of growth hormone on small intestinal homeostasis relation to cellular mediators IGF-I and IGFBP-3. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 5418-5424
- 31 Isshiki K, He Z, Maeno Y, Ma RC, Yasuda Y, Kuroki T, White GS, Patti ME, Weir GC, King GL. Insulin regulates SOCS2 expression and the mitogenic effect of IGF-1 in mesangial cells. *Kidney Int* 2008; 74: 1434-1443
- 32 Greenhalgh CJ, Metcalf D, Thaus AL, Corbin JE, Uren R, Morgan PO, Fabri LJ, Zhang JG, Martin HM, Willson TA, Billestrup N, Nicola NA, Baca M, Alexander WS, Hilton DJ. Biological evidence that SOCS-2 can act either as an enhancer or suppressor of growth hormone signaling. *J Biol Chem* 2002; 277: 40181-40184
- 33 Argetsinger LS, Campbell GS, Yang X, Witthuhn BA, Silvennoinen O, Ihle JN, Carter-Su C. Identification of JAK2 as a growth hormone receptor-associated tyrosine kinase. *Cell* 1993; 74: 237-244
- 34 Uyttendaele I, Lemmens I, Verhee A, De Smet AS, Vandekerckhove J, Lavens D, Peelman F, Tavernier J. Mammalian protein-protein interaction trap (MAPPIT) analysis of STAT5, CIS, and SOCS2 interactions with the growth hormone receptor. *Mol Endocrinol* 2007; 21: 2821-2831
- 35 吴焕淦, 黄臻, 刘慧荣, 张卫, 施茵, 朱毅, 崔云华, 刘世敏. 针灸对大鼠溃疡性结肠炎结肠上皮细胞凋亡影响的实验研究. *中国针灸* 2005; 25: 119-122
- 36 Deplancke B, Gaskins HR. Hydrogen sulfide induces serum-independent cell cycle entry in nontransformed rat intestinal epithelial cells. *FASEB J* 2003; 17: 1310-1312
- 37 Hagiwara C, Tanaka M, Kudo H. Increase in colorectal epithelial apoptotic cells in patients with ulcerative colitis ultimately requiring surgery. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17: 758-764
- 38 Utech M, Ivanov AI, Samarin SN, Bruewer M, Turner JR, Mrsny RJ, Parkos CA, Nusrat A. Mechanism of IFN-gamma-induced endocytosis of tight junction proteins: myosin II-dependent vacuolarization of the apical plasma membrane. *Mol Biol Cell* 2005; 16: 5040-5052
- 39 Heazlewood CK, Cook MC, Eri R, Price GR, Tauro SB, Taupin D, Thornton DJ, Png CW, Crockford TL, Cornall RJ, Adams R, Kato M, Nelms KA, Hong NA, Florin TH, Goodnow CC, McGuckin MA. Aberrant mucin assembly in mice causes endoplasmic reticulum stress and spontaneous inflammation resembling ulcerative colitis. *PLoS Med* 2008; 5: e54
- 40 Van Klinken BJ, Van der Wal JW, Einerhand AW, Büller HA, Dekker J. Sulphation and secretion of the predominant secretory human colonic mucin MUC2 in ulcerative colitis. *Gut* 1999; 44: 387-393
- 41 Iwamoto M, Koji T, Makiyama K, Kobayashi N, Nakane PK. Apoptosis of crypt epithelial cells in ulcerative colitis. *J Pathol* 1996; 180: 152-159
- 42 Allan A, Bristol JB, Williamson RC. Crypt cell production rate in ulcerative proctocolitis: differential increments in remission and relapse. *Gut* 1985; 26: 999-1003
- 43 Gillingham MB, Dahly EM, Murali SG, Ney DM. IGF-I treatment facilitates transition from parenteral to enteral nutrition in rats with short bowel syndrome. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003; 284: R363-R371
- 44 Lee SW, Kim SH, Kim JY, Lee Y. The effect of growth hormone on fibroblast proliferation and keratinocyte migration. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2010; 63: e364-e369
- 45 Simmons JG, Pucilowska JB, Lund PK. Autocrine and paracrine actions of intestinal fibroblast-derived insulin-like growth factors. *Am J Physiol* 1999; 276: G817-G827
- 46 Simmons JG, Pucilowska JB, Keku TO, Lund PK. IGF-I and TGF-beta1 have distinct effects on phenotype and proliferation of intestinal fibroblasts. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 283: G809-G818
- 47 Fruchtman S, Simmons JG, Michaylira CZ, Miller ME, Greenhalgh CJ, Ney DM, Lund PK. Suppressor of cytokine signaling-2 modulates the fibrogenic actions of GH and IGF-I in intestinal mesenchymal cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 289: G342-G350
- 48 Gassler N, Rohr C, Schneider A, Kartenbeck J, Bach A, Obermüller N, Otto HF, Autschbach F. Inflammatory bowel disease is associated with changes of enterocytic junctions. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 281: G216-G228
- 49 钱锋, 余佩武, 李前伟. 生长激素对肠粘膜屏障保护作用的临床研究. *第三军医大学学报* 2002; 24: 865-867
- 50 Theiss AL, Simmons JG, Jobin C, Lund PK. Tumor necrosis factor (TNF) alpha increases collagen accumulation and proliferation in intestinal myofibroblasts via TNF receptor 2. *J Biol Chem* 2005; 280: 36099-36109

内皮素B受体基因甲基化与肿瘤关系的研究进展

吴川清, 陶凯雄

■背景资料

EDNRB基因是一种内皮素受体基因, 作为一种抑癌抑制基因, 其启动子高甲基化在多种肿瘤的发生发展中有着重要作用。随着检测方法的不断更新, EDNRB基因可能成为某些肿瘤的标志物, 而且甲基化改变不像基因突变和缺失等改变, 具有可逆性。DNA甲基化的可逆性特征为临床抗肿瘤治疗提供了一种新途径, 应用DNA甲基转移酶抑制剂可以使一些重要基因发生去甲基化, 恢复正常功能。

吴川清, 陶凯雄, 华中科技大学同济医学院附属协和医院腔镜外科 湖北省武汉市430022

国家自然科学基金资助项目, No. 30872473

作者贡献分布: 本综述由吴川清完成, 陶凯雄审校。

通讯作者: 陶凯雄, 主任医师, 医学博士, 博士生导师, 430022, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院附属协和医院腔镜外科. kaixgtao@public.wh.hb.cn

电话: 027-85351619

收稿日期: 2010-05-31 修回日期: 2010-07-07

接受日期: 2010-07-12 在线出版日期: 2010-08-18

Advances in understanding the relationship between aberrant methylation of EDNRB and tumors

Chuan-Qing Wu, Kai-Xiong Tao

Chuan-Qing Wu, Kai-Xiong Tao, Department of Laparoscopic Surgery, Wuhan Union Hospital, Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30872473

Correspondence to: Kai-Xiong Tao, Department of Laparoscopic Surgery, Wuhan Union Hospital, Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China. kaixgtao@public.wh.hb.cn

Received: 2010-05-31 Revised: 2010-07-07

Accepted: 2010-07-12 Published online: 2010-08-18

Abstract

DNA methylation is a major epigenetic mechanism and plays an important role in the pathogenesis of tumors. The endothelin receptor B (EDNRB) gene is an important candidate tumor suppressor gene. EDNRB promoter hypermethylation has been detected in several types of tumors and may therefore be used as a useful molecular marker for tumor diagnosis. In addition, EDNRB gene methylation may also be used as a new target for tumor treatment due to the reversibility of DNA methylation.

Key Words: Endothelin receptor B; Gene; Hypermethylation; Tumor

Wu CQ, Tao KX. Advances in understanding the relationship between aberrant methylation of EDNRB and tumors. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(23): 2448-2452

摘要

遗传学修饰的DNA甲基化在肿瘤的发生发展中起重要作用。内皮素受体B(endothelin receptor B, EDNRB)基因是候选的抑癌基因之一。甲基化引起EDNRB基因失活与某些肿瘤发生的关系日益受到人们的关注, 可能成为某些肿瘤早期诊断的分子标志物, 同时由于DNA甲基化具有可逆性, 也可作为某些肿瘤提供新的治疗靶点。

关键词: 内皮素受体B; 基因; 高甲基化; 肿瘤

吴川清, 陶凯雄. 内皮素B受体基因甲基化与肿瘤关系的研究进展. *世界华人消化杂志* 2010; 18(23): 2448-2452

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2448.asp>

0 引言

抑癌基因启动子高度甲基化被认为是除突变和缺失以外的抑癌基因功能失活的关键机制, 在肿瘤的发生和发展中起重要作用^[1]。候选抑癌基因-内皮素受体B(endothelin receptor B, EDNRB)基因, 已成为目前肿瘤表遗传学研究的热点之一。

1 DNA甲基化与癌症的关系

随着表遗传学的发展, 人们认识到肿瘤不仅是遗传性疾病, 同时也是由DNA甲基化异常引起的基因调控失常的表遗传性疾病^[2]。人类基因组DNA存在广泛的甲基化修饰。在早期发育阶段, 甲基化和去甲基化的交替进行是细胞得以生长和分化的关键程序, 且在细胞正常发育以及保持基因组稳定性中起着至关重要的作用。正常细胞内, 启动子区的胞嘧啶-磷酸-鸟嘌呤(CpG)岛呈非甲基化状态, 而大部分散在分布的CpG岛二核苷酸多发生甲基化^[3]。肿瘤中常伴随基因组整体甲基化水平降低和某些基因CpG岛区域甲基化水平异常升高(如抑癌基因), 并且这两种变化可在一种肿瘤中同时发生。基因组整体甲基化水平降低可导致原癌基因活化等, 这些因素促进了肿瘤的发生; 基因启动子区的CpG岛发生异常高甲基化可导致基因转录沉默, 使重要基因如抑癌基因等表达极度降低或不表达, 进而

■同行评议者

李淑德, 主任医师, 中国人民解放军第二军医大学长海医院消化内科

也促进了肿瘤细胞的形成^[4]。

2 EDNRB基因的结构与生物学活性

EDNRB基因位于13号染色体q22, GenBank ID 1910, 长度大约为24 kb, 含7个外显子和6个内含子, 其启动子部位包含一个CpG岛^[5], 而在CpG岛的过甲基化作用时基因转录灭活。其编码产物EDNRB属于G蛋白偶联受体超家族, 与配体内皮素(endothelin, ET)结合传递细胞外的信号, 在胚胎发育过程中, EDNRB/ET-3在神经嵴细胞迁移发育分化成神经节细胞时候扮演着重要角色^[6], 与巨结肠病相关联^[7]。目前研究表明: ET-1及其受体(ETAR和ETBR), 通常被称为ET轴(ET-axis), 已经表明与多种人肿瘤的增殖、血管生成和转移有关。在多种肿瘤中, ET-1表达常增多, 而相应的受体却因肿瘤细胞类型不同而不同^[8]。EDNRB基因启动子的高甲基化与多种肿瘤相关联, 伴随有EDNRB基因表达的沉默^[9-18]。

3 EDNRB基因甲基化在某些人类肿瘤中的发现

3.1 前列腺癌 Pao等^[9]发现, 与相应的正常邻近组织相比, 前列腺癌组织中EDNRB基因启动子5'端CpG岛甲基化程度的高低与EDNRB基因表达呈现密切的负相关, 甲基化程度越高则表达越低。用5-氮杂-2'-脱氧胞苷处理前列腺癌细胞后, EDNRB基因表达被重新激活。Bastian等^[10]研究发现前列腺癌中高甲基化率为14%, 而良性前列腺增生则无甲基化, 其CpG岛高甲基化对前列腺癌有预后价值。

3.2 肝癌 Hsu等^[11]以EDNRB和p16两个候选肿瘤抑制基因研究34例肝细胞癌的表遗传学变化发现, EDNRB与p16基因高甲基化的分别为29.4%(10/34)和32.3%(11/34), mRNA转录子的降低与EDNRB与p16基因高甲基化具有明显的相关性。同时发现EDNRB基因启动子异常甲基化与患者的年龄、性别、临床分期或者是否为病毒感染所致无关。

3.3 肺癌 Chen等^[12]在对79例肺癌的研究中发现, 其中26例(32.9%)有EDNRB基因存在异常甲基化。EDNRB基因启动子高甲基化有组织类型差异, 与临床病理特征无关。mRNA转录子降低与异常甲基化相关。5-氮杂-2'-脱氧胞苷处理后, H1355人肺癌细胞株的甲基化状态得到逆转, 而且EDNRB基因再次表达。

3.4 食管癌 Zhao等^[13]在对21例食管原发鳞状细胞癌和匹配邻近正常组织的研究中发现, 其中5

例(23.8%)EDNRB基因5'CpG岛高甲基化, 另外16例(76.2%)肿瘤组织中有相对于低或中等水平的异常甲基化, 肿瘤组织的异常甲基化水平明显高于匹配的邻近正常组织。通过实时定量PCR分析, 相对于匹配的邻近正常组织, EDNRB基因mRNA的表达在启动子高甲基化的肿瘤组织中明显减少。在食管鳞状细胞癌株中加入5-氮杂-2'-脱氧胞苷处理后, EDNRB基因表达恢复。这些说明EDNRB基因启动子高甲基化, 可能在食管鳞状细胞癌的发生中起重要作用。

3.5 白血病 Hsiao等^[14]在26例白血病患者和8例随机正常志愿者的研究中, 检测p16和EDNRB基因启动子的高甲基化情况发现: p16在急性淋巴细胞白血病为85%, 在急性粒细胞白血病中为83%, 而慢性粒细胞白血病没有检测到甲基化; EDNRB在急性淋巴细胞白血病中为92%, 在急性粒细胞白血病中为75%, 慢性粒细胞白血病中为100%。8例随机正常供血者中p16和EDNRB基因启动子没有检测到异常甲基化。

3.6 恶性黑色素瘤 Kumasaka等^[15]通过转基因小鼠建立黑色素瘤模型的4种阶段: 非肿瘤、良性、癌前病变及恶性。通过检测EDNRB基因的表达发现, 随着恶性度的增加, EDNRB基因的表达逐渐减少。在EDNRB基因为杂合子的转基因模型小鼠(Ednrb+/-; RET mice)中, >80%的模型小鼠的原发肿瘤为恶性, 肿瘤的发生之前没有良性病变部位, 这和人类原发恶性黑色素瘤的形成类似, 也说明了EDNRB基因的表达减少可能促使人恶性黑色素瘤的发生。

3.7 鼻咽癌 Zhou等^[16]在对鼻咽癌EDNRB基因的表遗传学的研究中, 通过半定量RT-PCR和实时荧光定量PCR对49例鼻咽癌患者和12例慢性鼻咽炎活检组织的EDNRB的mRNA表达进行检测; 采用甲基化特异性PCR(methylation specific PCR, MSP)方法, 测定EDNRB基因的甲基化状态; 4种鼻咽癌细胞株经过5-氮杂-2'-脱氧胞苷处理后检测mRNA表达情况发现: 在鼻咽癌组织和鼻咽癌细胞株中, EDNRB基因表达下调; 而EDNRB甲基化状态, 相对于慢性鼻咽炎组织的42%, 鼻咽癌活检组织高达84%。5-氮杂-2'-脱氧胞苷的处理均激活了鼻咽癌细胞株EDNRB基因的表达。从而认为高甲基化影响了EDNRB基因的表达, 可能在鼻咽癌的形成中发挥作用。

3.8 膀胱癌 Yates等^[17]取90例恶性膀胱癌和30例正常尿道上皮的样本, 通过定量甲基化特异性PCR对这些样本的17个基因的启动子进行检测

■研究前沿

甲基化引起EDNRB基因失活与肿瘤发生的关系日益受到人们的关注。在目前报道的基础上, 是否有更多肿瘤的发生与EDNRB基因的甲基化有关, EDNRB基因是否会成为肿瘤筛查的一个广谱分子标志物, 受到了研究者的关注。

■相关报道

Phé等研究发现通过多种抑癌基因甲基化的检测对前列腺癌的诊断要比单基因的诊断准确。

表 1 EDNRB基因启动子高甲基化情况 (%)

肿瘤	甲基化频率		参考文献
	肿瘤组	对照组	
前列腺癌	14.0	0.0	[10]
肝癌	29.4	0.0	[11]
肺癌	32.9	0.0	[12]
食管癌	23.8	0.0	[13]
鼻咽癌	84.0	42.0	[16]
膀胱癌	66-100		[17]
子宫内膜癌	31.4	0.0	[18]
肾癌	73.0	49.0	[21]

发现: EDNRB, RASSF1a, E-cadherin TNFSR25及APC这5种基因与膀胱癌的进展相关. 多变量分析提示: 相对于肿瘤的分级, 这些基因的甲基化程度与肿瘤的进展甚至死亡率更有相关性, 其中EDNRB基因启动子高甲基化对膀胱癌预后敏感度达66%-100%.

3.9 子宫内膜癌 Zhu等^[18]进行了子宫内膜癌组织中EDNRB基因启动子区域CpG岛甲基化状态的研究, 取35例子宫内膜癌组织标本和20例正常子宫内膜组织标本作对照. 35例子宫内膜癌组织中, 甲基化率为31.4%(11/35), 13例癌旁组织中的甲基化率为53.9%(7/13), 22例外周血白细胞DNA中的甲基化率为40.9%(9/22), 不同的组织中EDNRB基因启动子的甲基化率比较差异无统计学意义. 但与正常对照组的子宫内膜组织中未检测到该基因启动子的甲基化相比, 差异有统计学意义.

4 EDNRB基因可能成为癌症早期诊断的分子标志物

Zhu等^[19]在子宫内膜癌的研究中发现有13例患者仅在癌旁组织或外周血中出现EDNRB基因甲基化, 而癌组织中未出现EDNRB基因的甲基化. 可能是在癌前病变向癌的演进过程中, 继发有其他的分子水平的改变, 如点突变和(或)杂合性缺失, 故能在癌旁组织或白细胞中检出该基因的甲基化. 因此, 甲基化是抑癌基因失活的“二次打击”中其中的“一次打击”^[20], 这说明EDNRB基因异常甲基化是癌变过程中的一个早期、频发事件. EDNRB基因启动子异常高甲基化与多种肿瘤的发生相关. EDNRB基因启动子区甲基化状况可能会成为一种非常有前途的分子标志物. 然而EDNRB基因并没有在所有上述肿瘤组织中完全甲基化, 如表1. 这说明肿瘤组

织往往存在多基因多位点的甲基化, Phé等^[22]研究发现通过多种抑癌基因甲基化的检测对前列腺癌的诊断要比单基因的诊断准确. Chen等^[12]在肺癌甲基化与非甲基化的病例中, 5年的生存率无明显差异, 认为EDNRB基因异常甲基化可能不是肺癌唯一的预后因素. 因此发展和采用高通量的基因甲基化检测方法, 鉴定肿瘤特异的基因甲基化图谱将成为这个领域的研究趋势, 而EDNRB基因甲基化的研究必将是甲基化图谱绘制中的重要部分.

5 EDNRB基因CpG岛甲基化主要的检测方法

5.1 MSP MSP是目前DNA甲基化研究领域最常使用的技术^[23]. 其原理: 设计的引物中包含多个CpG位点, 一对引物是针对发生甲基化的CpG位点, 另一对引物是针对未发生甲基化的CpG位点. 检测MSP扩增产物, 若用针对处理后甲基化DNA链的引物能扩增出片段, 则说明该检测的位点存在甲基化; 若用针对处理后非甲基化DNA链的引物扩增出片段, 则说明被检测的位点不存在甲基化. MSP是一种分析给定DNA序列是否存在甲基化的快速定性方法, 但由于甲基化特异引物所包含的CpG位点有限, 会丢失一些甲基化信息.

5.2 亚硫酸盐-基因组测序法 Frommer等^[24]利用亚硫酸氢盐对DNA进行化学修饰的方法为DNA甲基化研究开辟了一条全新的思路, 其原理: 单链DNA中未发生甲基化的胞嘧啶可被亚硫酸氢盐脱氨基而转变为尿嘧啶, 而甲基化的胞嘧啶保持不变. 然后, 利用PCR技术对需要的那段序列进行扩增, 将尿嘧啶全部转化成胸腺嘧啶, 对PCR产物进行测序并与未经修饰的序列比较, 便可判断该CpG位点是否发生甲基化. 在该技术的推动下, 有关特定基因控制区CpG岛异常甲基化与肿瘤发生相关的报道大量出现, 但是此方法需要大量的克隆测序, 较为繁琐、昂贵.

5.3 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱 Sequenom's EpiTYPER是近年来问世的一种新型高通量检测甲基化仪器, 这种检测方法是基于碱基特异性裂解结合质谱测定分析建立的新型检测技术, 其原理: 基因组DNA经亚硫酸氢盐处理后使非甲基化的胞嘧啶转化成尿嘧啶(C-U)而甲基化的胞嘧啶保持不变, 然后使用T7-启动子区标记PCR对其进行扩增, 接着使用RNA酶A对产生的单链RNA分子进行碱基特异性裂解. 由于C/T的转变导致反转录链C/A的转变, 结果使含有甲

甲基化CpG位点的片段与含有非甲基化CpG位点的片段的每个CpG位点之间相差16 Da, 这个质量差通过基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption/ionisation, time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS)来分析^[25-27], 进而得知基因的甲基化状况. 这种方法适用于大样本基因启动子区CpG位点的甲基化定量检测, 但是相关耗材价格昂贵.

6 肿瘤治疗的新途径

DNA甲基化是靠DNA甲基转移酶(DNA methyltransferase, DNMT)来维持的, 在CpG甲基化异常机制参与的肿瘤细胞中常表现为过度表达^[28]. 而甲基化改变不像基因突变和缺失等改变, 具有可逆性^[29]. DNA甲基化的可逆性特征为临床抗肿瘤治疗提供了一种新途径: 应用DNMT抑制剂可以使一些重要基因发生去甲基化, 恢复正常功能. 从广义上讲, DNMT抑制剂可分为3大类: 核苷类DNMT抑制剂, 如5-旦胞苷及其脱氧核糖类似物; 非核苷类DNMT抑制剂, 如胍屈嗪; 自行设计的抑制剂, 如RG108^[30]. 5-氮杂-2'-脱氧胞苷是第一个被美国FDA批准上市治疗恶性肿瘤的去甲基化药物, 最初被认为是细胞毒性物质, 后经临床试验研究表明, 它能与DNMT共价结合, 降低酶的生物活性而得以抵制甲基化, 低甲基化后的基因再次活化^[31-33]. 有研究显示, 在前列腺癌、鼻咽癌、肺癌和食管癌细胞株中经5-氮杂-2'-脱氧胞苷处理后EDNRB基因重新表达^[9,12,13,16]. 目前, 5-氮杂-2'-脱氧胞苷已成功应用于临床的一些实例, 如在急性粒细胞白血病中的应用^[34]. 小分子干扰RNA是一种新发现的分子通过与mRNA结合导致其降解和基因沉默. 通过干扰DNMT mRNA, 使DNMT的表达下降, 从而使得DNA去甲基化^[35]. 反义寡聚核苷酸是为杂交选择mRNA区域而合成的核苷酸. 如MG98就是一种反义寡聚脱氧胸苷酸, 能够特异地抑制DNMT1 mRNA翻译的过程. 有药物动力学的研究证明, 它的药效与药物剂量无关^[36]. DNMT的反义寡聚核苷酸在不改变DNA甲基化模式的基础上增加抑癌基因的表达, 提示有可能DNMT调节基因表达是一个不依赖甲基化的过程^[37].

7 结论

表遗传学改变已经成为肿瘤研究领域中的热点, EDNRB基因甲基化的异常与上述肿瘤的发生具有一致性, 但因果关系尚不明确. 还有很多问题需要去探索: 导致EDNRB基因异常甲基化的原

因是什么? 是否有更多类型的肿瘤发生EDNRB基因异常甲基化? 是否有一种更为特异、简便与价廉的检测方法用以检测EDNRB基因是否在肿瘤性疾病中发生异常甲基化? 有无不良反应更少的药物或其他方法来防止EDNRB基因发生异常甲基化或逆转甲基化? 总之, EDNRB基因与肿瘤关系的研究尚处于初步探索阶段. 相信随着上述问题的逐一解决, 人类对肿瘤的诊断与治疗会迈出一大步.

8 参考文献

- 1 Feinberg AP, Ohlsson R, Henikoff S. The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nat Rev Genet* 2006; 7: 21-33
- 2 Ludvíková M, Pesta M, Holubec L Jr, Kalfert D. [New aspects of tumor pathobiology] *Cesk Patol* 2009; 45: 94-99
- 3 Banerjee HN, Verma M. Epigenetic mechanisms in cancer. *Biomark Med* 2009; 3: 397-410
- 4 Qureshi SA, Bashir MU, Yaqinuddin A. Utility of DNA methylation markers for diagnosing cancer. *Int J Surg* 2010; 8: 194-198
- 5 Hyndman KA, Miyamoto MM, Evans DH. Phylogeny, taxonomy, and evolution of the endothelin receptor gene family. *Mol Phylogenet Evol* 2009; 52: 677-687
- 6 Saldana-Caboverde A, Kos L. Roles of endothelin signaling in melanocyte development and melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* 2010; 23: 160-170
- 7 Sánchez-Mejías A, Fernández RM, López-Alonso M, Antiñolo G, Borrego S. New roles of EDNRB and EDN3 in the pathogenesis of Hirschsprung disease. *Genet Med* 2010; 12: 39-43
- 8 Binder C, Hagemann T, Sperling S, Schulz M, Pukrop T, Grimshaw MJ, Ehrenreich H. Stromal endothelin B receptor-deficiency inhibits breast cancer growth and metastasis. *Mol Cancer Ther* 2009; 8: 2452-2460
- 9 Pao MM, Tsutsumi M, Liang G, Uzvolgyi E, Gonzales FA, Jones PA. The endothelin receptor B (EDNRB) promoter displays heterogeneous, site specific methylation patterns in normal and tumor cells. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 903-910
- 10 Bastian PJ, Ellinger J, Heukamp LC, Kahl P, Müller SC, von Rücker A. Prognostic value of CpG island hypermethylation at PTGS2, RAR-beta, EDNRB, and other gene loci in patients undergoing radical prostatectomy. *Eur Urol* 2007; 51: 665-674; discussion 674
- 11 Hsu LS, Lee HC, Chau GY, Yin PH, Chi CW, Lui WY. Aberrant methylation of EDNRB and p16 genes in hepatocellular carcinoma (HCC) in Taiwan. *Oncol Rep* 2006; 15: 507-511
- 12 Chen SC, Lin CY, Chen YH, Fang HY, Cheng CY, Chang CW, Chen RA, Tai HL, Lee CH, Chou MC, Lin TS, Hsu LS. Aberrant promoter methylation of EDNRB in lung cancer in Taiwan. *Oncol Rep* 2006; 15: 167-172
- 13 Zhao BJ, Sun DG, Zhang M, Tan SN, Ma X. Identification of aberrant promoter methylation of EDNRB gene in esophageal squamous cell carcinoma. *Dis Esophagus* 2009; 22: 55-61
- 14 Hsiao PC, Liu MC, Chen LM, Tsai CY, Wang YT,

■创新盘点

本文首次总结了EDNRB基因启动子高甲基化与多种肿瘤发生的关系.

同行评价

本文行文流畅、规范,参考文献较新,对阐明肿瘤发生的分子机制和肿瘤的分子靶向治疗的研究,具有重要的理论指导意义。

- Chen J, Hsu LS. Promoter methylation of p16 and EDNRB gene in leukemia patients in Taiwan. *Chin J Physiol* 2008; 51: 27-31
- 15 Kumasaka MY, Yajima I, Hossain K, Iida M, Tsuzuki T, Ohno T, Takahashi M, Yanagisawa M, Kato M. A novel mouse model for de novo Melanoma. *Cancer Res* 2010; 70: 24-29
- 16 Zhou L, Feng X, Shan W, Zhou W, Liu W, Wang L, Zhu B, Yi H, Yao K, Ren C. Epigenetic and genetic alterations of the EDNRB gene in nasopharyngeal carcinoma. *Oncology* 2007; 72: 357-363
- 17 Yates DR, Rehman I, Abbod MF, Meuth M, Cross SS, Linkens DA, Hamdy FC, Catto JW. Promoter hypermethylation identifies progression risk in bladder cancer. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 2046-2053
- 18 Zhu JZ, Wang B, Hong FZ, Li HM, Liew CT. [Hypermethylation of the 5'CpG island of EDNRB gene in endometrial carcinoma] *Zhonghua Binglixue Zazhi* 2006; 35: 489-490
- 19 Knudson AG. Hereditary cancer: two hits revisited. *J Cancer Res Clin Oncol* 1996; 122: 135-140
- 20 Phé V, Cussenot O, Rouprêt M. Methylated genes as potential biomarkers in prostate cancer. *BJU Int* 2010; 105: 1364-1370
- 21 Pflug BR, Zheng H, Udan MS, D'Antonio JM, Marshall FF, Brooks JD, Nelson JB. Endothelin-1 promotes cell survival in renal cell carcinoma through the ET(A) receptor. *Cancer Lett* 2007; 246: 139-148
- 22 Licchesi JD, Herman JG. Methylation-specific PCR. *Methods Mol Biol* 2009; 507: 305-323
- 23 Frommer M, McDonald LE, Millar DS, Collis CM, Watt F, Grigg GW, Molloy PL, Paul CL. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89: 1827-1831
- 24 Tessema M, Belinsky SA. Mining the epigenome for methylated genes in lung cancer. *Proc Am Thorac Soc* 2008; 5: 806-810
- 25 Radpour R, Haghighi MM, Fan AX, Torbati PM, Hahn S, Holzgreve W, Zhong XY. High-throughput hacking of the methylation patterns in breast cancer by in vitro transcription and thymidine-specific cleavage mass array on MALDI-TOF silico-chip. *Mol Cancer Res* 2008; 6: 1702-1709
- 26 Coolen MW, Statham AL, Gardiner-Garden M, Clark SJ. Genomic profiling of CpG methylation and allelic specificity using quantitative high-throughput mass spectrometry: critical evaluation and improvements. *Nucleic Acids Res* 2007; 35: e119
- 27 Ragoussis J, Elvidge GP, Kaur K, Colella S. Matrix-assisted laser desorption/ionisation, time-of-flight mass spectrometry in genomics research. *PLoS Genet* 2006; 2: e100
- 28 Luczak MW, Jagodziński PP. The role of DNA methylation in cancer development. *Folia Histochem Cytobiol* 2006; 44: 143-154
- 29 De Schutter H, Nuyts S. Radiosensitizing potential of epigenetic anticancer drugs. *Anticancer Agents Med Chem* 2009; 9: 99-108
- 30 Kristensen LS, Nielsen HM, Hansen LL. Epigenetics and cancer treatment. *Eur J Pharmacol* 2009; 625: 131-142
- 31 Kantarjian H, Oki Y, Garcia-Manero G, Huang X, O'Brien S, Cortes J, Faderl S, Bueso-Ramos C, Ravandi F, Estrov Z, Ferrajoli A, Wierda W, Shan J, Davis J, Giles F, Saba HI, Issa JP. Results of a randomized study of 3 schedules of low-dose decitabine in higher-risk myelodysplastic syndrome and chronic myelomonocytic leukemia. *Blood* 2007; 109: 52-57
- 32 Yang AS, Doshi KD, Choi SW, Mason JB, Mannari RK, Gharybian V, Luna R, Rashid A, Shen L, Estecio MR, Kantarjian HM, Garcia-Manero G, Issa JP. DNA methylation changes after 5-aza-2'-deoxycytidine therapy in patients with leukemia. *Cancer Res* 2006; 66: 5495-5503
- 33 Mund C, Brueckner B, Lyko F. Reactivation of epigenetically silenced genes by DNA methyltransferase inhibitors: basic concepts and clinical applications. *Epigenetics* 2006; 1: 7-13
- 34 Polakova K, Bandzuchova E, Sabty FA, Mistrik M, Demitrovcova L, Russ G. Activation of HLA-G expression by 5-aza-2'-deoxycytidine in malignant hematopoietic cells isolated from leukemia patients. *Neoplasma* 2009; 56: 514-520
- 35 Lu Q, Qiu X, Hu N, Wen H, Su Y, Richardson BC. Epigenetics, disease, and therapeutic interventions. *Ageing Res Rev* 2006; 5: 449-467
- 36 Stewart DJ, Donehower RC, Eisenhower EA, Wainman N, Shah AK, Bonfils C, MacLeod AR, Besterman JM, Reid GK. A phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of the DNA methyltransferase 1 inhibitor MG98 administered twice weekly. *Ann Oncol* 2003; 14: 766-774
- 37 Bacon AL, Fox S, Turley H, Harris AL. Selective silencing of the hypoxia-inducible factor 1 target gene BNIP3 by histone deacetylation and methylation in colorectal cancer. *Oncogene* 2007; 26: 132-141

编辑 曹丽鸥 电编 吴鹏朕

DNA聚合酶 β 在食管癌组织中的修复功能

赵四敏, 陈旭东, 张成娟, 赵国强, 董子明

■背景资料

DNA聚合酶 β 主要功能被认为是参与DNA修复,他是目前已知碱基切除修复(BER)中最重要的聚合酶之一。研究结果显示,在多种肿瘤组织中发现pol β 基因的突变和表达异常,然而对于突变和表达异常的pol β 基因其修复功能有无改变,目前相关资料较少。

赵四敏, 漯河医学高等专科学校病理生理学教研室 河南省漯河市 462002

陈旭东, 漯河医学高等专科学校组织学与胚胎学教研室 河南省漯河市 462002

张成娟, 河南省肿瘤医院病理科 河南省郑州市 450001

赵国强, 郑州大学基础医学院微生物学与免疫学教研室 河南省郑州市 450001

董子明, 郑州大学基础医学院病理生理学教研室 河南省郑州市 450001

国家自然科学基金资助项目, No. 30471952

作者贡献分布: 此课题由董子明、赵国强及赵四敏设计; 研究过程由赵四敏、张成娟及赵国强操作完成; 数据分析由董子明与赵国强完成; 本论文写作由赵四敏与陈旭东完成。

通讯作者: 董子明, 教授, 450001, 河南省郑州市科学大道100号, 郑州大学基础医学院病理生理学教研室。

dongziming@zzu.edu.cn

电话: 0395-2112101

收稿日期: 2010-03-18 修回日期: 2010-06-14

接受日期: 2010-06-28 在线出版日期: 2010-08-18

DNA repair function of DNA polymerase β in human esophageal cancer

Si-Min Zhao, Xu-Dong Chen, Cheng-Juan Zhang, Guo-Qiang Zhao, Zi-Ming Dong

Si-Min Zhao, Department of Pathophysiology, Luohe Medical College, Luohe 462002, Henan Province, China

Xu-Dong Chen, Department of Histology and Embryology, Luohe Medical College, Luohe 462002, Henan Province, China

Cheng-Juan Zhang, Department of Pathology, Henan Cancer Hospital, Henan 450001, Henan Province, China

Guo-Qiang Zhao, Department of Microbiology and Immunology, College of Basic Medical Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, Henan Province, China

Zi-Ming Dong, Department of Pathophysiology, College of Basic Medical Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, Henan Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30471952

Correspondence to: Professor Zi-Ming Dong, Department of Pathophysiology, College of Basic Medical Sciences, Zhengzhou University, 100 Science Avenue, Zhengzhou 450001, Henan Province, China. dongziming@zzu.edu.cn

Received: 2010-03-18 Revised: 2010-06-14

Accepted: 2010-06-28 Published online: 2010-08-18

Abstract

AIM: To observe the variation in base excision repair (BER) function of mutant DNA polymerase β (pol β).

METHODS: The plasmids pcDNA4-C-pol β 1 and

pcDNA4-C-pol β 2 were transfected into pol β -knockout EC9706 cells by lipotransfection. The stable transfectants were screened in the medium containing G418. The recombinant proteins were purified by nickel column chromatography. DNA substrate that contains a single-base deletion was synthesized to test the BER function of the purified recombinant proteins.

RESULTS: Cell strains stably transfected with pcDNA4-C-pol β 1 and pcDNA4-C-pol β 2 were successfully obtained. Purified proteins pol β 1 and pol β 2 were incubated with synthesized DNA substrate that contains a single-base deletion to test their BER function. Wild-type pol β could completely excise the DNA substrate while the mutant pol β could only partly excise the DNA substrate.

CONCLUSION: Wide-type pol β has stronger activity than mutant pol β in repairing DNA substrate that contains a single-base deletion.

Key Words: DNA polymerase β ; Nickel affinity chromatography; Base excision repair

Zhao SM, Chen XD, Zhang CJ, Zhao GQ, Dong ZM. DNA repair function of DNA polymerase β in human esophageal cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(23): 2460-2463

摘要

目的: 观察突变型DNA聚合酶 β (DNA polymerase β , pol β)的碱基切除修复(base excision repair, BER)功能的改变。

方法: 将pol β 真核表达载体pcDNA4-C-pol β 1, pcDNA4-C-pol β 2以脂质体介导方式转染pol β 基因敲除的EC9706细胞, G418筛选得到稳定转染pcDNA4-C-pol β 1, pcDNA4-C-pol β 2的细胞克隆; 通过镍柱亲和层析法纯化蛋白; 退火合成含有单碱基缺失的DNA底物, 与纯化的野生型和突变型pol β 蛋白进行BER修复实验。

结果: G418筛选得到稳定转染pcDNA4-C-pol β 1, pcDNA4-C-pol β 2的EC9706细胞; 提取

■同行评议者

石毓君, 副教授, 四川大学华西医院

并纯化出pol β 1、pol β 2蛋白与退火合成单碱基缺口的DNA底物进行BER实验。在BER实验中,野生型pol β 能够在DNA底物的酶切位点处将其完全切开,而突变型pol β 仅将其部分切开。

结论:野生型的pol β 能够修复单碱基缺失的DNA底物,而突变型的pol β 碱基切除修复功能明显减弱。

关键词: DNA聚合酶 β ; 镍柱亲和层析; 碱基切除修复

赵四敏, 陈旭东, 张成娟, 赵国强, 董子明. DNA聚合酶 β 在食管癌组织中的修复功能. 世界华人消化杂志 2010; 18(23): 2460-2463
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2460.asp>

0 引言

DNA聚合酶 β (DNA polymerase β , pol β)是DNA聚合酶家族中的一员,为一看家基因。其主要功能被认为是参与DNA修复,在碱基切除修复(base excision repair, BER)过程中填补单核苷酸缺口^[1],包括短补丁(单一核苷酸)BER途径和/或长补丁(几个核苷酸合并)BER途径^[2],是目前已知BER中最重要的聚合酶之一^[3]。迄今为止,已在直肠癌、前列腺癌、食管癌、胃癌、鼻咽癌等多种人类肿瘤组织中发现pol β 基因的突变和表达异常^[4-8]。近年来许多学者对pol β 在肿瘤组织及细胞系中的突变,表达状态进行了系统研究,然而肿瘤组织中突变pol β 的功能改变鲜见报道。本课题组曾在世界上首次发现在食管癌高发区及非高发区食管癌患者中有pol β 基因的突变存在^[9],人食管癌组织pol β 基因突变突变率达36%,且其突变形式与已报道的在其他肿瘤中pol β 基因的突变形式不尽相同有以A/G转换和G/T颠换为热点等的多种突变形式^[10]。作为该课题的后继研究,本实验选择利用先前所构建的野生型和食管癌突变型pol β 基因真核表达载体(pcDNA4-C-pol β 1和pcDNA4-C-pol β 2),转染入pol β 基因敲除的EC9706细胞(本实验室前期构建并冻存),纯化得到39 000 Da的pol β 蛋白,检测其对单碱基缺失DNA底物的修复能力,为探讨pol β 基因突变在肿瘤发生发展中的作用积累实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料 野生型和食管癌突变型pol β 基因真

核表达载体(pcDNA4-C-pol β 1和pcDNA4-C-pol β 2)均由本实验室构建保存; HislinkTM蛋白纯化试剂盒、限制性内切酶HindIII购自Promega公司; G418购自Gibco公司; 脂质体(LipofectamineTM2000)购自Invitrogen公司; DMEM、胎牛血清购自杭州四季青生物工程研究所。

1.2 方法

1.2.1 细胞转染及蛋白纯化: 将本实验室先前构建的质粒pcDNA4-C-pol β 1和pcDNA4-C-pol β 2分别以脂质体包裹的方式转染入pol β 基因敲除的EC9706细胞,转染6 h后换为含100 mL/L BSA的DMEM完全培养基继续培养,继续培养24 h后G418筛选2 wk, G418筛选浓度为700 g/L,得到稳定表达pcDNA4-C-pol β 1, pcDNA4-C-pol β 2的细胞克隆,收集稳定转染的细胞使用HislinkTM蛋白纯化试剂盒纯化蛋白; 纯化的蛋白通过紫外分光光度法测定蛋白含量,将得到的野生型和突变型pol β 蛋白均稀释为400 μ g/L。

1.2.2 聚丙烯酰胺凝胶电泳: 浓缩胶浓度为5%,分离胶浓度为15%。分别取pcDNA4-C-pol β 1, pcDNA4-C-pol β 2稳定转染后超声破碎细胞的上清液以及HislinkTM蛋白纯化试剂盒纯化的蛋白,加入相应体积的5 \times Loading Buffer, 95 $^{\circ}$ C煮5 min后SDS-PAGE电泳,考马斯亮蓝R-250染色30 min,甲醇-冰醋酸脱色并观察。采用凝胶分析系统扫描,分析SDS-PAGE后凝胶上的染色条带。

1.2.3 BER修复实验DNA底物的制备: 合成带有HindIII酶切位点的单碱基缺失DNA底物的3条单链P1、P2、P3分别为P1: 5'TACCGCGGCCG AACTCCATCTGGATAA3'; P2: 5'CTTAGAACG CTCGGTTGCTATTGGGTAC3'; P3: 5'GTACCC AATAGCAACCGAGCGTT CTAAGCTTATCC AGATGGAGTTCGGCCGCGGTA3'; 由上海生工公司合成。退火反应体系50 μ L, 其中P1 11.25 μ L, P2 11.25 μ L, P3 22.5 μ L, 10 \times Buffer 5 μ L。退火条件为: 95 $^{\circ}$ C煮沸3 min, 自然降温至70 $^{\circ}$ C维持10 min, 再自然降温至37 $^{\circ}$ C, 1.5%琼脂糖凝胶电泳并凝胶成像分析,退火产物大小56 bp。

1.2.4 BER修复及酶切鉴定: 设计的DNA底物碱基缺口处含有HindIII酶切位点,如果缺口能被pol β 蛋白修复,则完整的DNA底物能被HindIII切开,分别成为27和28 bp的两个片段,如果pol β 蛋白修复功能丧失或不足,则缺失不能或只能部分被修复, DNA底物不能或部分被HindIII切开。但如果存在蛋白浓度过高可以将底物全部

■ 研发前沿

pol β 是一重要的DNA修复酶, pol β 是BER过程的重要组成部分, pol β 异常的细胞表现为BER的缺乏和对损伤碱基物质敏感性的增加,也会增加抑癌基因,原癌基因以及其他控制生长的重要基因的突变频率,从而增加肿瘤的发生几率。因此进一步研究pol β 及其在DNA修复中作用的规律和机制,及其在人类肿瘤中的表达特征已经成为肿瘤分子机制深入研究中的一个新领域。

■创新盘点

有调查显示:分析90种肿瘤有超过35%的肿瘤存在polβ基因的突变.但关于突变polβ基因的功能改变少有报道.本实验分析食管癌突变型polβ基因的碱基切除修复功能改变,并且本实验选用的细胞株是polβ基因敲除的EC9706细胞,确保发挥作用的是转染细胞的polβ基因,排除了本底干扰的问题.

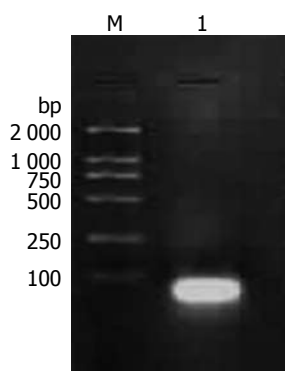


图1 DNA底物退火电泳结果. M: DNA Marker DL2000; 1: DNA底物, 长度56 bp.

修复或蛋白浓度过低底物全不能修复这类情况, 则不能观察到野生型和突变型polβ的功能差别. 因此按1:4, 1:8和1:16分别稀释400 μg/L polβ1和polβ2蛋白. BER修复反应体系6 μL, 10×Buffer 0.6 μL, 修复实验DNA底物3 μL, 4×dNTP 0.6 μL, 稀释后polβ1(或polβ2)蛋白0.6 μL, MilliQ-H₂O 1.2 μL, 37℃水浴30 min, 后70℃灭活10 min. 酶切体系为10 μL, 其中Buffer 1 μL, HindIII 1 μL, BER修复产物5 μL, MilliQ-H₂O 3 μL, 37℃酶切2 h, 2%琼脂糖凝胶电泳, 凝胶分析系统扫描分析结果.

2 结果

2.1 BER实验DNA底物的制备 3条单链P1、P2、P3退火后形成含有单碱基缺失的56 bp的DNA底物, 琼脂糖凝胶电泳后凝胶成像分析, 条带单一位置正确, 说明退火产物与预期结果相符(图1).

2.2 细胞转染后蛋白纯化结果 表达产物经SDS-PAGE分析, 结果显示, 在相对分子质量约为39 000 Da的蛋白条带处, 转染重组质粒组明显亮于转染空质粒组, 与预期的融合蛋白大小相符(图2); Hislink™蛋白纯化试剂盒纯化的蛋白仅在39 000 Da位置有一条带, 说明蛋白表达及纯化成功(图3).

2.3 BER实验结果 当含有碱基缺失的DNA底物得到BER修复, 可被HindIII切开成为27和28 bp的两个短片段. 1:4稀释polβ1蛋白的BER产物, 经HindIII酶切, 56 bp的DNA底物带完全消失, 说明彻底修复DNA底物上的碱基缺失; 而对应的1:4稀释polβ2蛋白的BER产物, HindIII酶切后仍然存在明显的56 bp DNA底物带, 说明突变型polβ蛋白仅能部分修复DNA底物上的碱基缺失. polβ蛋白进一步稀释, 1:8稀释时polβ1的BER作用也显著高于polβ2; 1:16稀释时, polβ1还能修复部分DNA底物上的碱基缺失, 而对应polβ2已完全没有修复活性, 电泳结果仅有1条未修复

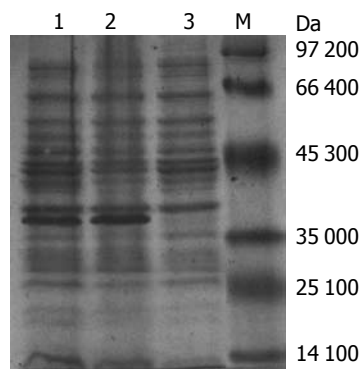


图2 诱导表达SDS-PAGE结果. M: 蛋白Marker; 1: pcDNA4-C-polβ1; 2: pcDNA4-C-polβ2; 3: 空质粒.

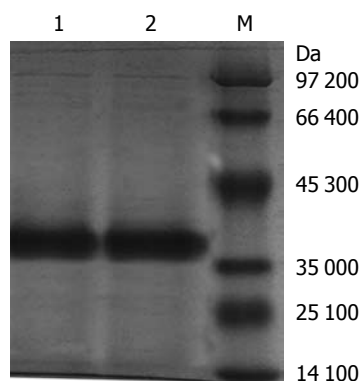


图3 纯化后蛋白SDS-PAGE结果. M: 蛋白Marker; 1: 野生型polβ1; 2: 突变型polβ2.

的56 bp DNA底物带(图4).

3 讨论

肿瘤的发生是多个基因突变累积的结果. 这些突变包括参与DNA复制和修复以及维持基因稳定性和完整性的基因, 其中polβ基因和肿瘤的关系受到越来越多的关注. polβ是一重要的DNA修复酶, 该酶在哺乳类动物细胞的同源性以及在结构进化中的高度保守性说明他在生命活动中起着重要作用^[11]. 自从重组全DNA技术克隆出了DNA聚合酶β的cDNA以后, 他的生物学功能越来越受到人们的重视. 有人称其为生物进化过程的“看家酶”. 其突变的存在与一些肿瘤的发生有关^[12].

野生型polβ最为重要的功能是在DNA切除修复中填补由碱基切除所产生的单个核苷酸缺口, 一般而言, 他并不参与其他DNA聚合酶的催化反应. 但在应对外来损伤因素时, 高表达的polβ则有可能参与DNA跨损伤合成或者其他的DNA修复途径等, 引起DNA合成和修复中的突变机会的增加^[13]. polβ是BER过程的重要组成部分, 而BER又是异常基因修复的重要途径, 对于细胞的正常生长具有至关重要的作用. polβ异常的细胞会显示BER的缺乏以及增加对损伤碱基的物质的敏感性, 也会增加抑癌基因, 原癌基因以及其他控制生长的重要基因的突变频率, 从

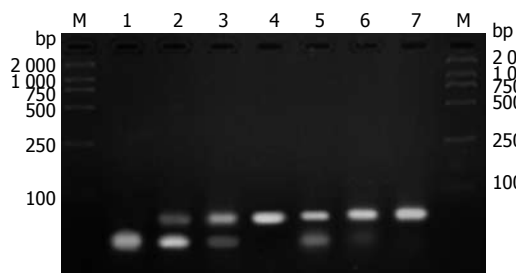


图 4 BER产物Hind III 酶切电泳结果. M: DNA Marker DL2000; 1-3: 分别为1:4、1:8、1:16稀释pol β 1蛋白; 4: 未进行BER的DNA; 5-7: 分别为1:4、1:8、1:16稀释pol β 2蛋白.

而增加肿瘤的发生几率.

本研究结果显示: 野生型pol β 能够修复单碱基缺失的56 bp的DNA底物, HindIII发挥作用, 得到27和28 bp的两个片段, 提示野生型pol β BER功能正常; 食管癌组织中突变的pol β 不能或只能部分修复单碱基缺失的56 bp的DNA底物, 提示突变的pol β BER功能丧失或减弱. pol β 突变是一种负性显性突变, 可能引起碱基切除修复功能缺陷, 从而可能参与了肿瘤的发生^[14]. 在体外突变的pol β 可以抑制野生型pol β 的BER活性^[15]. 缺陷的pol β 失去了正常的BER功能, 同时还可能抑制细胞本身野生型pol β 的BER功能, 不能修复细胞自发的或内源性的DNA损伤, 引起基因突变的积累, 也增加了原癌基因和抑癌基因突变的积累, 导致增变基因表型.

pol β 基因和肿瘤之间的关系正逐渐受到关注, 很多的研究证明他参与了肿瘤的发生和发展, 进一步研究pol β 及其在DNA修复中作用的规律和机制, 及其在人类肿瘤中的表达特征已经成为深入研究肿瘤分子机制中一个新的领域, 他将有助于了解肿瘤的发病机制, 对于肿瘤的基因治疗和抗药性以及化疗药物选择方面也会给以有益的提示.

4 参考文献

1 Beard WA, Wilson SH. Structure and mechanism of

- 2 DNA polymerase Beta. *Chem Rev* 2006; 106: 361-382
- 3 Sobol RW, Prasad R, Evenski A, Baker A, Yang XP, Horton JK, Wilson SH. The lyase activity of the DNA repair protein beta-polymerase protects from DNA-damage-induced cytotoxicity. *Nature* 2000; 405: 807-810
- 4 Matsuda T, Vande Berg BJ, Bebenek K, Osheroff WP, Wilson SH, Kunkel TA. The base substitution fidelity of DNA polymerase beta-dependent single nucleotide base excision repair. *J Biol Chem* 2003; 278: 25947-25951
- 5 Bhattacharyya N, Chen HC, Wang L, Banerjee S. Heterogeneity in expression of DNA polymerase beta and DNA repair activity in human tumor cell lines. *Gene Expr* 2002; 10: 115-123
- 6 王蕾, 董子明, 赵国强. siRNA沉默DNA聚合酶 β 基因对胃癌BGC-823细胞增殖的影响. *肿瘤* 2008; 28: 651-655
- 7 Starcevic D, Dalal S, Sweasy JB. Is there a link between DNA polymerase beta and cancer? *Cell Cycle* 2004; 3: 998-1001
- 8 Podlutzky AJ, Dianova II, Wilson SH, Bohr VA, Dianov GL. DNA synthesis and dRPase activities of polymerase beta are both essential for single-nucleotide patch base excision repair in mammalian cell extracts. *Biochemistry* 2001; 40: 809-813
- 9 Lang T, Maitra M, Starcevic D, Li SX, Sweasy JB. A DNA polymerase beta mutant from colon cancer cells induces mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 6074-6079
- 10 刘栋, 董子明, 赵国强. 食管癌DNA聚合酶 β 的突变. *河南职工医学院学报* 2002; 14: 289-291
- 11 赵国强, 郑乃刚, 赵勤, 杨洪艳, 刘栋, 赵继敏, 金戈, 高丽, 董子明. 人食管癌组织中DNA聚合酶 β 基因突变特点分析. *郑州大学学报(医学版)* 2003; 38: 499-500
- 12 Nowak R, Woszczynski M, Siedlecki JA. Changes in the DNA polymerase beta gene expression during development of lung, brain, and testis suggest an involvement of the enzyme in DNA recombination. *Exp Cell Res* 1990; 191: 51-56
- 13 郑红, 赵国强, 董子明, 李明善. DNA聚合酶 β 基因在鼻咽癌中的突变. *基础医学与临床* 2005; 25: 160-162
- 14 金戈, 杨洪艳, 赵继敏, 黄幼田, 郑智敏, 赵国强, 赵勤, 吴景兰, 董子明. 稳定表达野生型和突变型DNA聚合酶 β 的NIH3 T3细胞系的建立及其生长特性. *郑州大学学报(医学版)* 2005; 40: 819-822
- 15 Wang L, Patel U, Ghosh L, Banerjee S. DNA polymerase beta mutations in human colorectal cancer. *Cancer Res* 1992; 52: 4824-4827
- 16 Iwanaga A, Ouchida M, Miyazaki K, Hori K, Mukai T. Functional mutation of DNA polymerase beta found in human gastric cancer--inability of the base excision repair in vitro. *Mutat Res* 1999; 435: 121-128

同行评价

本文创新性一般, 实验方法较合理, 结果可靠, 有一定的科学价值.

编辑 曹丽鸥 电编 吴鹏朕

手术治疗肥胖症和2型糖尿病的现状分析及前景展望

付峻林, 朱惠明

付峻林, 朱惠明, 深圳市人民医院消化科 广东省深圳市 518020
作者贡献分布: 付峻林完成综述; 朱惠明审校.
通讯作者: 付峻林, 副主任医师, 518020, 广东省深圳市东门北路1017号, 深圳市人民医院消化科. fusuolin@163.com
收稿日期: 2010-05-23 修回日期: 2010-06-29
接受日期: 2010-07-12 在线出版日期: 2010-08-18

Surgical treatment of morbid obesity and type 2 diabetes mellitus: current situation and future prospects

Suo-Lin Fu, Hui-Ming Zhu

Suo-Lin Fu, Hui-Ming Zhu, Department of Gastroenterology, Shenzhen People's Hospital, Shenzhen 518020, Guangdong Province, China
Correspondence to: Suo-Lin Fu, Department of Gastroenterology, Shenzhen People's Hospital, 1017 Dongmen North Road, Shenzhen 518020, Guangdong Province, China. fusuolin@163.com
Received: 2010-05-23 Revised: 2010-06-29
Accepted: 2010-07-12 Published online: 2010-08-18

Abstract

Along with social progress and life style transformation, morbid obesity, type 2 diabetes mellitus, and metabolic syndrome are increasingly becoming a great threat to human health. Because conventional conservative treatment has little effect on these diseases, they were considered incurable before. However, surgery shows good results in the treatment of these diseases and has therefore revolutionized their treatment. This review aims to elucidate the therapeutic mechanisms of surgery for morbid obesity and 2 diabetes mellitus and to discuss the current situation and future prospects of surgical treatment of these diseases.

Key Words: Surgical treatment; Morbid obesity; Type 2 diabetes mellitus; Mechanism

Fu SL, Zhu HM. Surgical treatment of morbid obesity and type 2 diabetes mellitus: current situation and future prospects. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(23): 2453-2459

摘要

随着社会发展和生活方式的转变, 肥胖症和2

型糖尿病以及由此发展而来的代谢综合征, 成为一类威胁人类健康的重要疾病. 因传统的非手术治疗收效甚微, 既往此类疾病被认为无法治愈. 但是现在手术治疗效果显著, 形成了标准的治疗方式, 使此类疾病的治疗方式发生革命性的转变. 本文就手术治疗肥胖症和2型糖尿病的现状和机制进行综述, 并对从开放手术、腹腔镜手术到内镜手术的发展过程进行回顾和展望.

关键词: 手术治疗; 肥胖症; 2型糖尿病; 机制

付峻林, 朱惠明. 手术治疗肥胖症和2型糖尿病的现状分析及前景展望. *世界华人消化杂志* 2010; 18(23): 2453-2459
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2453.asp>

0 引言

当人体质量增加到一定程度, 容易并发糖尿病、高血压、高脂血症、冠心病等一系列疾病, 称为肥胖症(obesity)或病态肥胖(morbid obesity). 判断肥胖程度的常用指标是体质量指数(body mass index, BMI). 因为人种、文化和环境等的差异, 世界各地诊断肥胖症的标准不尽一致^[1,2], 但出现并发症被视为核心要素. 国人的BMI ≥ 28 时, 检出高血压、糖尿病、冠心病的危险因素的特异度就高达90%以上^[3,4]. 现代社会肥胖症正在成为全球流行的疾病. 我国肥胖症发病率也在逐年上升, 2005年的研究显示我国超重和肥胖者共2.8亿人, 肥胖者6 844万人^[5]. 肥胖症给患者造成的危害显而易见, 除了引发失业、离婚、自卑, 甚至自杀等许多社会和心理问题外, 其本身并发的糖尿病、高血压、脂肪肝、胆石症、脑梗、心血管疾病、阻塞性睡眠呼吸暂停综合征等一系列疾病, 常常给患者造成致命危害. 世界卫生组织已将肥胖列为影响健康的第5大危险因素. 有研究显示, 与肥胖症相关的疾病负担占到总体医疗费用的3%-6%^[6], 肥胖引起的后果比吸烟和酗酒更严重^[7], 而重度肥胖症患者的实际寿命可能比预期寿命少20年^[8]. 肥胖症和糖尿病密切相关, 是2型糖尿病(type 2 diabetes

■背景资料

现代社会肥胖症患者越来越多, 肥胖症容易引发2型糖尿病和代谢综合征, 此类慢性代谢疾病对人类健康危害极大, 传统治疗收效甚微, 而手术治疗效果显著, 使此类疾病有可能获得治愈.

■同行评议者

范建高, 教授, 上海交通大学医学院附属新华医院消化内科

■ 研发前沿

国外十分普及及手术治疗代谢疾病。但因手术方式多种多样,各种术式的详细机制还未阐明,对其正在深入研究。此外手术方式也在向微创化方向快速发展。而国内开展得较慢,有必要加强研究。

mellitus, T2DM)患者中最常见的危险因素^[9]。约90%的T2DM是肥胖症或体质量超重者,研究显示肥胖症患者比正常体质量者发展为糖尿病的风险增加10倍^[10]。T2DM发病的核心机制是胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)。2004年Wild等^[11]研究提示,全球有糖尿病患者约1.7亿人,到2030年预计将达到3.66亿,其中85%-90%为T2DM。糖尿病正日益成为威胁人类健康的重大疾病。长期血糖控制不佳者,可伴发各种器官,尤其是眼、心、血管、肾、神经等损害,病情严重或应激时可发生酮症酸中毒和高渗性昏迷等急性并发症,导致残废或者早亡。而肥胖症和T2DM发展到一定阶段便可出现代谢综合征(metabolic syndrome, MS)^[10]。MS是指在个体中多种代谢异常情况集结存在的现象^[9],是一组代谢紊乱性疾病的总称,以中心性肥胖、IR、高血压、高三酰甘油血症、高密度脂蛋白胆固醇降低、糖耐量下降或T2DM为主要表现的症候群。其中肥胖症和T2DM可能是MS的始动和中心环节,而IR是MS各种代谢异常集结出现的共同发病机制。MS患者常具有多重心血管危险因素,是心血管疾病的高危人群^[12,13]。MS患病率像肥胖症和糖尿病一样逐年上升,美国的资料显示MS已累及24%的成人^[14,15]。而中国成人(35-74岁)男性MS发病率为9.8%,女性为17.8%^[16]。可以认为肥胖症-T2DM-MS-心脑血管疾病是目前和未来除恶性肿瘤外最危害人类健康的问题,世界许多学者和机构都呼吁予以重视,及早预防和干预。

1 手术治疗肥胖症和T2DM的现状

1.1 传统治疗 肥胖症和T2DM传统的治疗方法包括饮食控制、体力锻炼、药物治疗,如药物减肥、口服降糖药或注射胰岛素等,由于难以坚持,或造成生活质量下降,如节食引起饥饿感等,效果不佳,极易反弹,或血糖无法完全控制正常,都不可避免进一步加重或发展成MS。特别是T2DM在以往由于要终身治疗,被认为是一种不可治愈的疾病。

1.2 手术治疗

1.2.1 历史: 手术治疗肥胖症和T2DM开始于20世纪50-60年代, Kremen等^[17]1954年首先报道了空回肠旁路手术,迄今已有半个多世纪。减肥手术(bariatric surgery)发展至今已开发出数十种术式,根据作用机制可分成3大类: 限制摄入型、减少吸收型和联合型手术。限制摄入型作用机制为缩减胃容积,减少进食量,主要有胃垂直绑

扎成形术(vertical banded gastroplasty, VBG)^[18]、可调节胃束带术(adjustable gastric banding, AGB)^[19]和胃袖状切除术(sleeve gastrotomy, SG)^[20]等。减少吸收型作用机制为将胃流出道改道缩短,减少十二指肠和上段空肠的吸收面积,主要有可控空回肠旁路术(controlled jejunoileal bypass)^[21]、胆胰转流术(biliopancreatic diversion, BPD)^[22]和改良的胆胰转流十二指肠转位术(biliopancreatic diversion with duodenal switch, BPD-DS)^[23]等。联合型即联合进行胃减容和转流的术式,主要有胃旁路术(gastric bypass, GP)^[24]和改良的Roux-en-Y胃旁路术(Roux-en-Y gastric bypass, RYGB)^[25]等。BPD-DS一般都联合了SG,也可归为联合型手术。许多术式因为减质量效果较差或不良反应严重,逐渐被淘汰。最早减肥手术都是开腹手术,自从腹腔镜外科发展起来后,大部分减肥手术都转为腹腔镜操作,实现了微创化的转变。如Wittgrove等^[26]1994年就开展了腹腔镜RYGB。

1.2.2 疗效: 虽然各种术式效果不一,综合多数研究报道,均显示减肥手术可显著减轻患者的超重体质量。如van Gemer等^[27]报道21例VBG患者多余体质量可减少50%-60%,显著改善生活质量,并可延长寿命,而且费用较低。Fielding等^[28]认为AGB减质量效果较慢,但腹腔镜可调节胃束带术(laparoscopic adjustable gastric banding, LAGB)安全易行,可取除回复,并报道一组41例青少年LAGB患者随访发现减质量达到70%并保持了5年^[29]。Arias等^[30]报道腹腔镜胃袖状切除术(laparoscopic sleeve gastrotomy, LSG)术后两年平均减质量达67.9%。SG常作为联合BPD-DS和RYGB治疗极度肥胖患者的一期手术^[20],但研究显示SG单独应用减质量效果也很明显^[31]。BPD的效果似乎更好,Scopinaro等^[22]报道1976年以来1 968例BPD患者随访18年,减质量持续到达70%以上。Marceau等^[23]发现联合SG的BPD-DS的效果还要优于远端胃切除的BPD,且手术风险及并发症均较老式BPD少。此类术式虽然效果明显,但创伤大,操作复杂,死亡率高,术后并发症多见,且腹腔镜下操作难度更大,因而较少应用。GB因为反流、吻合口溃疡等并发症基本上被RYGB取代。Higa等^[32]则报道腹腔镜RYGB术后两年可减质量69%,3年仍达62%。Weinel等^[33]认为RYGB的减质量效果与Roux臂的长短有关。最近的一项研究比较了腹腔镜RYGB(laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass, LRYGB)和腹腔镜BPD-

DS(laparoscopic biliopancreatic diversion with duodenal switch, LDS)两种方法, 结果LRYGB手术时间为91 min而LDS是206 min($P<0.001$), 1例LDS转成开放手术; 早期并发症LRYGB 4例, LDS为7例($P=0.327$); 住院天数LRYGB为2 d而LDS是4 d($P<0.001$); 远期并发症分别是4例和9例($P=0.121$); 但术后1年的减质量效果则是LDS优于LRYGB(74.8% vs 54.4%, $P<0.001$)^[34].

1.2.3 减肥手术治疗T2DM和MS: 很早人们就发现了减肥手术除减质量外在代谢方面的作用^[21]. 后来许多研究显示减肥手术治疗T2DM的惊人效果. 1992年Pories等^[35]首次报道515例行RYGB的肥胖患者中, 发现288例伴T2DM或糖耐量损害(impaired glucose tolerance, IGT)术后仅30例(5.8%)仍有糖尿病, 后来又报道RYGB术后146例伴T2DM和152例IGT受损患者分别有121例(82.9%)和150例(98.7%)血糖、糖化血红蛋白和胰岛素水平都保持在正常范围, 并得到完全控制; 353例伴发高血压者86%血压恢复到正常水平, 其他MS相关表现均到达不同程度改善^[36]. 有专门研究显示GB可改善患者的大动脉弹性和左室功能^[37]. Papadia等^[38]报道了一组平均年龄16.8岁的青少年肥胖患者接受BPD治疗, 平均随访11年发现, 除了减质量外, 伴发的高血压、高血糖和血脂紊乱等均大大改善. 一般认为联合术式比单纯限制型手术效果更好, 但创伤和并发症也相当较多. 但Vidal等^[39]比较分析SG(39例)和RYGB(52例)治疗肥胖症伴T2DM和MS的结果, 显示术后1年两者减质量效果相似(63.00% vs 66.06%, $P=0.413$); 而T2DM治愈率相同, 均为84.6%($P=0.618$), MS的治愈率也相当(62.2% vs 67.3%, $P=0.392$). 研究还显示减质量与T2DM治愈无关, 而与MS治愈有关, 并认为手术可以控制MS患者各种心血管危险因素. 另有报道显示AGB对肥胖症并T2DM、IGT和MS都有益处, 可以阻止IGT发展为T2DM^[40], 可见限制型手术也有相当疗效. 2004年Buchwald等^[41]荟萃分析了136篇共22 094例患者行AGB、GP、胃成形术、BPD或DS减肥手术的资料, 76.8%的糖尿病完全治愈, 86.0%得到改善, 高脂血症70%以上得到改善, 高血压61.7%治愈, 78.5%有改善, 85.7%的呼吸睡眠暂停消失. 认为减肥手术可使大多数糖尿病、高脂血症、高血压和呼吸睡眠暂停获得治愈或好转. 近年来研究发现相关手术对非肥胖症的T2DM也有优异疗效. DePaula等^[42,43]用腹腔镜SG联合节段回肠插入近端空肠手术治疗

BMI<35和BMI为21-29的T2DM均取得显著疗效, 绝大部分患者血糖恢复正常, 不再需要胰岛素治疗, 甚至高血脂、高血压和微蛋白尿都得到有效控制. 而相关动物实验也证实了手术对非肥胖糖尿病的效果^[44]. 可以推测及早行手术治疗有可能阻止T2DM向MS发展的趋势.

1.2.4 手术治疗的优缺点: 相比传统治疗, 手术治疗肥胖症、T2DM和MS的疗效非常显著, 使人们对此类疾病的认识正在发生深刻变化. 肥胖者可能获得长期减质量, 而T2DM和MS及相关并发症均可得到长期的改善. 特别是T2DM有可能从以往认为的需要终身用药不可治愈的慢性内科疾病变成一种通过一次手术可以彻底治愈的外科疾病. 这是减质量手术的最大优点. 但手术治疗毕竟也增加了手术相关的许多风险和并发症. 手术涉及麻醉、身体的创伤、器官的毁损、生理结构的破坏以及一定的死亡率, 术后还要较多的并发症. Buchwald等^[41]统计显示手术死亡率单纯限制型手术为0.1%, GB是0.5%, 而BPD或DS达到1.1%. 而且除了AGB外, 其他术式可调控性和可恢复性都很差. 德国一篇报道SG术后两年总并发症达14.1%, 手术并发症为9.4%, 术后死亡率1.4%^[45]. Kellogg等^[46]分析了RYGB患者短期再入院和再手术率, 分别为7.01%和2.57%, 常见的原因有恶心、呕吐、脱水、腹痛、切开疼痛等, 而开放手术高于腹腔镜手术. REGB最常见的远期并发症是胃肠吻合口溃疡, Hata等^[47]报道一组患者RYGB术后10.4%怀疑溃疡而行治疗, 其中115例行胃镜82例证实溃疡, 15例再次手术治疗. 减肥手术还有减质量不足、反弹, 以及腹泻、倾倒综合征、营养不良、维生素和微量元素缺乏、慢性腹痛、肠粘连、肠梗阻, 甚至胆石症、结肠癌^[48,49]等并发症. 毁损性、创伤大、破坏性强、可控可复性差和一系列的并发症, 这些都是手术治疗的缺点.

1.2.5 国内外现状: 手术治疗肥胖症和T2DM在欧美国家已被普遍接受并广泛开展. 仅在美国每年接受此类手术的患者就超过10万例. 各机构纷纷制订相关诊治标准和共识指南, 美国的医保政策也将其纳入补偿范围. 减肥手术的概念在逐渐向代谢手术(metabolic surgery)过渡. 手术方式也逐渐集中到几种经典术式, 其中RYGB经过数十年的实践和完善, 一直是欧美的主流术式, 并成为治疗T2DM和MS的标准术式, 有学者认为其在治疗效果、手术风险和术后生活质量三者之间达到了较好的平衡^[50]. 而国内开展较晚, 21世纪开

■ 相关报道

Chiellini等评价了9例经口胃成形术(TOGA)患者胰岛素敏感性的变化, 发现3 mo后在体质量减轻的同时胰岛素敏感性显著改善, 显示仅用内镜完成的效果, 而创伤大大减轻.

■应用要点

本文重点分析了各种减肥手术方式的可能机制,特别是其影响胃肠激素及肠-胰岛轴调节胰岛内分泌从而降低血糖的机制,有助于今后开展此类研究进行试验设计。

始郑成竹等学者陆续开展了相关临床和基层研究工作^[51,52],并在2007年制订了国内首部相关指南^[53]。由于国人接受度较低,国内开展得还很不充分,与国外差距较大。

2 手术治疗T2DM和MS的作用机制

目前对手术治疗T2DM和MS研究还不够深入,确切机制尚不清楚。起初认为胃缩容后进食减少可能与血糖下降有关^[54],但后来的许多研究发现AGB等单纯限制摄入手术效果不明显^[55],而RYGB降血糖作用独立于进食减少和体质量减轻^[56]。另外多项研究显示,RYGB术后血糖可很快降至正常,而此时体质量还未有明显下降,提示其降血糖作用与体质量减轻无关^[57,58],而主要与胃流出道改变有关。目前的研究多集中在改道手术影响肠-胰岛轴上,认为手术改变了食物的流向,影响胃肠激素分泌,通过肠-胰岛轴调节胰岛内分泌功能^[59]。相关的调节机制目前有两种假说。

2.1 十二指肠空肠(前肠)假说 十二指肠空肠旷置后,食物成分减少或停止了对近端小肠的刺激,K细胞释放抑胃肽(gastric inhibitory polypeptide, GIP)减少,从而解除了IR,使T2DM得到长期治愈。研究显示,十二指肠空肠旁路术的大鼠糖耐量显著改善,而胃空肠吻合术则无此作用,认为近端小肠被绕过是关键^[56],后来又发现RYGB仅降低糖尿病患者的GIP,而不降低无糖尿病者的GIP^[57],这一结果得到了动物实验的证实^[44],对非T2DM的G-K大鼠行BPD或GBP后,近端空肠释放的GIP明显减少。

2.2 远端回肠(后肠)假说 RYGB或BPD术后,食物更快达到远端小肠,刺激远端小肠的L细胞分泌胰高血糖素样肽-1(glucagon-like peptide-1, GLP-1),GLP-1可增加胰岛素分泌,还可促进胰岛细胞增殖和再生,减少凋亡,进一步导致胰岛素分泌增加,从而使血糖降低^[60]。多项研究观察到BPD术后GLP-1分泌大量增加^[61-63]。

2.3 其他胃肠激素 还有许多胃肠激素参与控制T2DM的机制也在研究中。饥饿素(ghrelin)是目前已知唯一可在外周刺激食欲的胃肠激素,通过增强下丘脑神经肽Y的分泌表达来发挥作用,促进摄食、减少脂肪利用和能量消耗,从而增加体质量^[64]。有多项研究提示GBP术后饥饿素水平下降^[65,66],从而减少了对食欲的刺激,并抑制生长抑素释放,升高胰岛素水平,降低血糖。多肽YY3-36(peptide YY3-36)是一种主要由回肠L

细胞在餐后释放的后肠激素,作用于下丘脑弓状核抑制神经肽Y的释放,产生饱胀感,抑制胃的排空及胃肠蠕动,从而抑制食欲^[67]。有研究观察到GBP术后对照节食治疗多肽YY3-36显著升高^[68]。另外,改道手术后瘦素(leptin)水平升高和脂连素(adiponectin)水平升高可能参与增高胰岛素敏感性并维持血糖长期正常^[69]。动物实验也显示,十二指肠空肠旷置术后血清瘦素水平明显下降后,糖代谢恢复正常^[70]。总之,参与手术治疗T2DM作用的胃肠激素很多,推测手术改变了原有胃肠道结构甚至功能,导致原代谢内分泌状态被破坏,从而恢复了正常的糖代谢,但各种术式的详细机制还有待进一步深入研究。

3 结论

随着腹腔镜减肥手术的广泛开展和逐渐成熟,内镜手术治疗代谢疾病也开始进入各国学者的视野。已在临床使用的有内镜胃内放置水囊及十二指肠套管减肥法。而经自然腔道内镜手术(natural orifice transluminal endoscopic surgery, NOTES)问世和初步应用^[71],使参照外科原理采用内镜治疗肥胖症成为可能。Ellsmere等^[72]综述了仅有的36篇涉及内镜应用于减肥手术的初步研究文献,认为内镜治疗相关疾病将大有可为。而基于内镜技术的经口胃成形术(transoral gastropasty, TOGA)已经开始在临床应用^[73,74]。随着技术的发展和器械的改进,内镜治疗代谢病,将可以达到外科手术相似的原理和效果,并且更安全微创,可控可复性更好。随着经济发展和老龄化社会的到来,肥胖及代谢相关疾病越来越流行,严重危害人类健康。而此类疾病内科治疗困难,减肥手术或代谢外科的创立和发展为其提供了一种有效手段,使其得到普遍治愈成为可能。而随着代谢手术作用机制的深入研究,胃肠激素参与肠-胰岛轴调节糖代谢的机制逐渐阐明,一种基于激素水平调节机制的药物治疗有可能诞生,使代谢病从有创的手术治疗又回到无创的药物治疗。

4 参考文献

- 1 Sauerland S, Angrisani L, Belachew M, Chevallier JM, Favretti F, Finer N, Fingerhut A, Garcia Caballero M, Guisado Macias JA, Mittermair R, Morino M, Msika S, Rubino F, Tacchino R, Weiner R, Neugebauer EA. Obesity surgery: evidence-based guidelines of the European Association for Endoscopic Surgery (EAES). *Surg Endosc* 2005; 19: 200-221
- 2 Misra A, Chowbey P, Makkar BM, Vikram NK,

- Wasir JS, Chadha D, Joshi SR, Sadikot S, Gupta R, Gulati S, Munjal YP. Consensus statement for diagnosis of obesity, abdominal obesity and the metabolic syndrome for Asian Indians and recommendations for physical activity, medical and surgical management. *J Assoc Physicians India* 2009; 57: 163-170
- 3 国际生命科学学会中国办事处中国肥胖问题工作组联合数据汇总分析协作组. 中国成人体质指数分类的推荐意见简介. *中华预防医学杂志* 2001; 35: 349-350
 - 4 中国肥胖问题工作组数据汇总分析协作组. 我国成人人体质量指数和腰围对相关疾病危险因素异常的预测价值: 适宜体质量指数和腰围切点的研究. *中华流行病学杂志* 2002; 23: 5-10
 - 5 武阳丰, 马冠生, 胡永华, 李艳平, 李贤, 崔朝辉, 陈春明, 孔灵芝. 中国居民的超重和肥胖流行现状. *中华预防医学杂志* 2005; 9: 316-320
 - 6 Must A, Spadano J, Coakley EH, Field AE, Colditz G, Dietz WH. The disease burden associated with overweight and obesity. *JAMA* 1999; 282: 1523-1529
 - 7 Fontaine KR, Redden DT, Wang C, Westfall AO, Allison DB. Years of life lost due to obesity. *JAMA* 2003; 289: 187-193
 - 8 Sturm R. The effects of obesity, smoking, and drinking on medical problems and costs. *Health Aff (Millwood)* 2002; 21: 245-253
 - 9 卫生部疾病控制司, 中华医学会糖尿病学分会. 《中国糖尿病防治指南》(试行本)(节选). *中国慢性病预防与控制* 2004; 12: 283-285
 - 10 Koopman RJ, Swofford SJ, Beard MN, Meadows SE. Obesity and metabolic disease. *Prim Care* 2009; 36: 257-270
 - 11 Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 2004; 27: 1047-1053
 - 12 Gupta S, Gupta BM. Metabolic syndrome: diabetes and cardiovascular disease. *Indian Heart J* 2006; 58: 149-152
 - 13 Guize L, Pannier B, Thomas F, Bean K, Jégo B, Benetos A. Recent advances in metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Arch Cardiovasc Dis* 2008; 101: 577-583
 - 14 Grundy SM. Obesity, metabolic syndrome, and cardiovascular disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 2595-2600
 - 15 Mensah GA, Mokdad AH, Ford E, Narayan KM, Giles WH, Vinicor F, Deedwania PC. Obesity, metabolic syndrome, and type 2 diabetes: emerging epidemics and their cardiovascular implications. *Cardiol Clin* 2004; 22: 485-504
 - 16 Gu D, Reynolds K, Wu X, Chen J, Duan X, Reynolds RF, Whelton PK, He J. Prevalence of the metabolic syndrome and overweight among adults in China. *Lancet* 2005; 365: 1398-1405
 - 17 Kremen AJ, Linner JH, Nelson CH. An experimental evaluation of the nutritional importance of proximal and distal small intestine. *Ann Surg* 1954; 140: 439-448
 - 18 Mason EE. Vertical banded gastroplasty for obesity. *Arch Surg* 1982; 117: 701-706
 - 19 Kuzmak LI, Thelmo W, Abramson DL, Kral JG. Reversible adjustable gastric banding. Surgical technique. *Eur J Surg* 1994; 160: 569-571
 - 20 Gumbs AA, Gagner M, Dakin G, Pomp A. Sleeve gastrectomy for morbid obesity. *Obes Surg* 2007; 17: 962-969
 - 21 Shibata HR, MacKenzie JR, Long RC. Metabolic effects of controlled jejunoileal bypass. *Arch Surg* 1967; 95: 413-428
 - 22 Scopinaro N, Gianetta E, Adami GF, Friedman D, Traverso E, Marinari GM, Cuneo S, Vitale B, Ballari F, Colombini M, Baschieri G, Bachi V. Biliopancreatic diversion for obesity at eighteen years. *Surgery* 1996; 119: 261-268
 - 23 Marceau P, Hould FS, Simard S, Lebel S, Bourque RA, Potvin M, Biron S. Biliopancreatic diversion with duodenal switch. *World J Surg* 1998; 22: 947-954
 - 24 Mason EE, Ito C. Gastric bypass in obesity. *Surg Clin North Am* 1967; 47: 1345-1351
 - 25 Alden JF. Gastric and jejunoileal bypass. A comparison in the treatment of morbid obesity. *Arch Surg* 1977; 112: 799-806
 - 26 Wittgrove AC, Clark GW, Tremblay LJ. Laparoscopic Gastric Bypass, Roux-en-Y: Preliminary Report of Five Cases. *Obes Surg* 1994; 4: 353-357
 - 27 van Gemert WG, Adang EM, Kop M, Vos G, Greve JW, Soeters PB. A prospective cost-effectiveness analysis of vertical banded gastroplasty for the treatment of morbid obesity. *Obes Surg* 1999; 9: 484-491
 - 28 Fielding GA, Ren CJ. Laparoscopic adjustable gastric band. *Surg Clin North Am* 2005; 85: 129-140, x
 - 29 Fielding GA, Duncombe JE. Laparoscopic adjustable gastric banding in severely obese adolescents. *Surg Obes Relat Dis* 2005; 1: 399-405; discussion 405-407
 - 30 Arias E, Martínez PR, Ka Ming Li V, Szomstein S, Rosenthal RJ. Mid-term follow-up after sleeve gastrectomy as a final approach for morbid obesity. *Obes Surg* 2009; 19: 544-548
 - 31 Bernante P, Foletto M, Busetto L, Pomerri F, Pesenti FF, Pelizzo MR, Nitti D. Feasibility of laparoscopic sleeve gastrectomy as a revision procedure for prior laparoscopic gastric banding. *Obes Surg* 2006; 16: 1327-1330
 - 32 Higa KD, Ho T, Boone KB. Laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass: technique and 3-year follow-up. *J Laparoendosc Adv Surg Tech A* 2001; 11: 377-382
 - 33 Weinel RJ, Neuhaus C, Stapp J, Klotter HJ, Trautmann ME, Joseph K, Arnold R, Rothmund M. Preoperative localization of gastrointestinal endocrine tumors using somatostatin-receptor scintigraphy. *Ann Surg* 1993; 218: 640-645
 - 34 Søvik TT, Taha O, Aasheim ET, Engström M, Kristinsson J, Björkman S, Schou CF, Lönroth H, Mala T, Olbers T. Randomized clinical trial of laparoscopic gastric bypass versus laparoscopic duodenal switch for superobesity. *Br J Surg* 2010; 97: 160-166
 - 35 Pories WJ, MacDonald KG Jr, Flickinger EG, Dohm GL, Sinha MK, Barakat HA, May HJ, Khazanie P, Swanson MS, Morgan E. Is type II diabetes mellitus (NIDDM) a surgical disease? *Ann Surg* 1992; 215: 633-642; discussion 643
 - 36 Pories WJ, Swanson MS, MacDonald KG, Long SB, Morris PG, Brown BM, Barakat HA, deRamon RA, Israel G, Dolezal JM. Who would have thought it? An operation proves to be the most effective therapy for adult-onset diabetes mellitus. *Ann Surg* 1995; 222: 339-350; discussion 350-352
 - 37 Ikonomidis I, Mazarakis A, Papadopoulos C, Patsouras N, Kalfarentzos F, Lekakis J, Kremastinos DT, Alexopoulos D. Weight loss after bariatric surgery improves aortic elastic properties and left ventricular function in individuals with morbid

■名词解释

经自然腔道内镜手术(NOTES): 是指通过胃、肠、子宫等自然腔道用普通内镜进入腹腔进行手术的新技术, 目前已能完成胆囊摘除术、阑尾切除术等多种术式, 将来有可能完成各种经典的减肥术式。

同行评价

本文行文简洁,文献引用合理,能较好地反映目前该领域的研究现状,可读性好。

- obesity: a 3-year follow-up study. *J Hypertens* 2007; 25: 439-447
- 38 Papadia FS, Adami GF, Marinari GM, Camerini G, Scopinaro N. Bariatric surgery in adolescents: a long-term follow-up study. *Surg Obes Relat Dis* 2007; 3: 465-468
- 39 Vidal J, Ibarzabal A, Romero F, Delgado S, Momblán D, Flores L, Lacy A. Type 2 diabetes mellitus and the metabolic syndrome following sleeve gastrectomy in severely obese subjects. *Obes Surg* 2008; 18: 1077-1082
- 40 Brancatisano A, Wahlroos S, Matthews S, Brancatisano R. Gastric banding for the treatment of type 2 diabetes mellitus in morbidly obese. *Surg Obes Relat Dis* 2008; 4: 423-429
- 41 Buchwald H, Avidor Y, Braunwald E, Jensen MD, Pories W, Fahrbach K, Schoelles K. Bariatric surgery: a systematic review and meta-analysis. *JAMA* 2004; 292: 1724-1737
- 42 DePaula AL, Macedo AL, Rassi N, Machado CA, Schraibman V, Silva LQ, Halpern A. Laparoscopic treatment of type 2 diabetes mellitus for patients with a body mass index less than 35. *Surg Endosc* 2008; 22: 706-716
- 43 DePaula AL, Macedo AL, Mota BR, Schraibman V. Laparoscopic ileal interposition associated to a diverted sleeve gastrectomy is an effective operation for the treatment of type 2 diabetes mellitus patients with BMI 21-29. *Surg Endosc* 2009; 23: 1313-1320
- 44 Patrìti A, Facchiano E, Donini A. Effect of duodenal-jejunal exclusion in a non-obese animal model of type 2 diabetes: a new perspective for an old disease. *Ann Surg* 2004; 240: 388-389; author reply 389-391
- 45 Stroh C, Birk D, Flade-Kuthe R, Frenken M, Herbig B, Höhne S, Köhler H, Lange V, Ludwig K, Matkowitz R, Meyer G, Pick P, Horbach T, Krause S, Schäfer L, Schlensak M, Shang E, Sonnenberg T, Susewind M, Voigt H, Weiner R, Wolff S, Wolf AM, Schmidt U, Lippert H, Manger T. Results of sleeve gastrectomy-data from a nationwide survey on bariatric surgery in Germany. *Obes Surg* 2009; 19: 632-640
- 46 Kellogg TA, Swan T, Leslie DA, Buchwald H, Ikramuddin S. Patterns of readmission and reoperation within 90 days after Roux-en-Y gastric bypass. *Surg Obes Relat Dis* 2009; 5: 416-423
- 47 Hata JA, DeMaria EJ, Portenier DD, Grant J, Pryor AD. PL-52: Marginal ulcer after 1,792 laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass (LRYGB) procedures: Incidence, medical and surgical treatment and complications. *Surg Obes Relat Dis* 2008; 4: 308-309
- 48 Adami GF, Papadia FS, Scopinaro N. Colorectal cancer after biliopancreatic diversion for obesity. *Int J Obes (Lond)* 2007; 31: 1864
- 49 Sainsbury A, Goodlad RA, Perry SL, Pollard SG, Robins GG, Hull MA. Increased colorectal epithelial cell proliferation and crypt fission associated with obesity and roux-en-Y gastric bypass. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008; 17: 1401-1410
- 50 Rotellar F, Pastor C, Baixauli J, Gil A, Valetí V, Poveda I, Martí-Cruchaga P. [Laparoscopic bariatric surgery: proximal gastric bypass] *An Sist Sanit Navar* 2005; 28 Suppl 3: 33-40
- 51 郑成竹, 柯重伟, 印慨, 李际辉, 吴月凤, 胡明根, 葛小莉, 邹大进. 腹腔镜垂直捆绑胃成形术治疗病态肥胖(附25例报告). *中国实用外科杂志* 2002; 22: 591-592
- 52 郑成竹, 胡明根, 柯重伟, 印慨, 李际辉, 胡兵, 吴月凤, 邹大进. 腹腔镜可调节捆扎带胃减容术治疗单纯重度肥胖症的临床应用. *中华胃肠外科杂志* 2004; 7: 368-371
- 53 中华医学会外科学分会内分泌外科学组, 中华医学会外科学分会腹腔镜与内镜外科学组, 中华医学会外科学分会胃肠外科学组, 中华医学会外科学分会外科手术学组. 中国肥胖病外科治疗指南(2007). *中国实用外科杂志* 2007; 27: 759-762
- 54 Greenway SE, Greenway FL 3rd, Klein S. Effects of obesity surgery on non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Arch Surg* 2002; 137: 1109-1117
- 55 Meneghini LF. Impact of bariatric surgery on type 2 diabetes. *Cell Biochem Biophys* 2007; 48: 97-102
- 56 Rubino F, Forgione A, Cummings DE, Vix M, Gnuli D, Mingrone G, Castagneto M, Marescaux J. The mechanism of diabetes control after gastrointestinal bypass surgery reveals a role of the proximal small intestine in the pathophysiology of type 2 diabetes. *Ann Surg* 2006; 244: 741-749
- 57 Rubino F, Gagner M, Gentileschi P, Kini S, Fukuyama S, Feng J, Diamond E. The early effect of the Roux-en-Y gastric bypass on hormones involved in body weight regulation and glucose metabolism. *Ann Surg* 2004; 240: 236-242
- 58 Schauer PR, Burguera B, Ikramuddin S, Cottam D, Gourash W, Hamad G, Eid GM, Mattar S, Ramanathan R, Barinas-Mitchel E, Rao RH, Kuller L, Kelley D. Effect of laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass on type 2 diabetes mellitus. *Ann Surg* 2003; 238: 467-484; discussion 484-485
- 59 Patrìti A, Facchiano E, Sanna A, Gullà N, Donini A. The enteroinsular axis and the recovery from type 2 diabetes after bariatric surgery. *Obes Surg* 2004; 14: 840-848
- 60 Cummings DE, Overduin J, Foster-Schubert KE. Gastric bypass for obesity: mechanisms of weight loss and diabetes resolution. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 2608-2615
- 61 Valverde I, Puente J, Martín-Duce A, Molina L, Lozano O, Sancho V, Malaisse WJ, Villanueva-Peñacarrillo ML. Changes in glucagon-like peptide-1 (GLP-1) secretion after biliopancreatic diversion or vertical banded gastroplasty in obese subjects. *Obes Surg* 2005; 15: 387-397
- 62 Borg CM, le Roux CW, Ghatti MA, Bloom SR, Patel AG. Biliopancreatic diversion in rats is associated with intestinal hypertrophy and with increased GLP-1, GLP-2 and PYY levels. *Obes Surg* 2007; 17: 1193-1198
- 63 Patrìti A, Aisa MC, Annetti C, Sidoni A, Galli F, Ferri I, Gullà N, Donini A. How the hindgut can cure type 2 diabetes. Ileal transposition improves glucose metabolism and beta-cell function in Goto-kakizaki rats through an enhanced Proglucagon gene expression and L-cell number. *Surgery* 2007; 142: 74-85
- 64 Nakazato M, Murakami N, Date Y, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K, Matsukura S. A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature* 2001; 409: 194-198
- 65 Tritos NA, Mun E, Bertkau A, Grayson R, Maratos-Flier E, Goldfine A. Serum ghrelin levels in response to glucose load in obese subjects post-gastric bypass surgery. *Obes Res* 2003; 11: 919-924
- 66 Cummings DE, Weigle DS, Frayo RS, Breen PA, Ma MK, Dellinger EP, Purnell JQ. Plasma ghrelin levels after diet-induced weight loss or gastric bypass surgery. *N Engl J Med* 2002; 346: 1623-1630
- 67 Batterham RL, Cohen MA, Ellis SM, Le Roux CW, Withers DJ, Frost GS, Ghatti MA, Bloom

- SR. Inhibition of food intake in obese subjects by peptide YY3-36. *N Engl J Med* 2003; 349: 941-948
- 68 Oliván B, Teixeira J, Bose M, Bawa B, Chang T, Summe H, Lee H, Laferrère B. Effect of weight loss by diet or gastric bypass surgery on peptide YY3-36 levels. *Ann Surg* 2009; 249: 948-953
- 69 Vendrell J, Broch M, Vilarrasa N, Molina A, Gómez JM, Gutiérrez C, Simón I, Soler J, Richart C. Resistin, adiponectin, ghrelin, leptin, and proinflammatory cytokines: relationships in obesity. *Obes Res* 2004; 12: 962-971
- 70 Pacheco D, de Luis DA, Romero A, González Sagrado M, Conde R, Izaola O, Aller R, Delgado A. The effects of duodenal-jejunal exclusion on hormonal regulation of glucose metabolism in Goto-Kakizaki rats. *Am J Surg* 2007; 194: 221-224
- 71 朱惠明, 师瑞月, 王娜, 黄勋, 王立生, 王琴, 罗伟香, 李银鹏. 经胃腹腔内镜检查对原因不明腹水的诊断价值. *中华消化内镜杂志* 2010; 27: 5-8
- 72 Ellsmere JC, Thompson CC, Brugge WR, Chuttani R, J Desilets D, Rattner DW, E Tarnoff M, Kaplan LM. Endoscopic interventions for weight loss surgery. *Obesity (Silver Spring)* 2009; 17: 929-933
- 73 Moreno C, Closset J, Dugardeyn S, Baréa M, Mehdi A, Collignon L, Zalcman M, Baurain M, Le Moine O, Devière J. Transoral gastroplasty is safe, feasible, and induces significant weight loss in morbidly obese patients: results of the second human pilot study. *Endoscopy* 2008; 40: 406-413
- 74 Chiellini C, Iaconelli A, Familiari P, Riccioni ME, Castagneto M, Nanni G, Costamagna G, Mingrone G. Study of the effects of transoral gastroplasty on insulin sensitivity and secretion in obese subjects. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2010; 20: 202-207

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2010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)

消食和胃冲剂对小鼠胃肠动力的影响

迟鹏, 李岩, 陈苏宁

■背景资料

功能性消化不良是临床常见的消化系统疾病, 其中24%-78%患者存在胃肠动力障碍。许多研究表明, 中药有促胃肠动力的作用。

迟鹏, 鞍山市中心医院消化内科 辽宁省鞍山市 114000
李岩, 中国医科大学附属盛京医院消化内科 辽宁省沈阳市 110004
陈苏宁, 中国医科大学附属盛京医院中医科 辽宁省沈阳市 110004
通讯作者: 李岩, 110004, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学附属盛京医院消化内科. yanli0227@126.com
收稿日期: 2010-04-20 修回日期: 2010-06-18
接受日期: 2010-06-22 在线出版日期: 2010-08-18

Effects of Xiaoshihewei Granule on gastrointestinal motility in Kunming mice

Peng Chi, Yan Li, Su-Ning Chen

Peng Chi, Department of Gastroenterology, Anshan Central Hospital, Anshan 114000, Liaoning Province, China
Yan Li, Department of Gastroenterology, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China
Su-Ning Chen, Department of Chinese Medicine, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China
Correspondence to: Yan Li, Department of Gastroenterology, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. yanli0227@126.com
Received: 2010-04-20 Revised: 2010-06-18
Accepted: 2010-06-22 Published online: 2010-08-18

Abstract

AIM: To evaluate the effects of Xiaoshihewei Granule and its each herbal component on gastric emptying and small intestinal propulsion in healthy mice.

METHODS: An orthogonal design was used to evaluate the effects of Xiaoshihewei Granule and its each herbal component on gastric emptying and small intestinal propulsion in Kunming mice. The effects of each herbal component on gastrointestinal motility were then compared.

RESULTS: Orthogonal analysis showed that Sharen, Shanzha and Shenqu herbs in Xiaoshihewei Granule had significant impact on gastric emptying, and Sharen, Shanzha and Laifuzi herbs had significant impact on small intestinal propulsion in healthy mice. Signifi-

cant synergistic effects were observed among the various herbal components of Xiaoshihewei Granule.

CONCLUSION: Sharen, Shanzha and Shenqu herbs in Xiaoshihewei Granule have significant impact on gastric emptying, while Sharen, Shanzha and Laifuzi herbs have significant impact on small intestinal on in healthy mice. There are significant synergistic effects among the various herbal components of Xiaoshihewei Granule.

Key Words: Xiaoshihewei Granule; Orthogonal design; Gastric emptying; Small intestinal propulsion

Chi P, Li Y, Chen SN. Effects of Xiaoshihewei Granule on gastrointestinal motility in Kunming mice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(23): 2464-2468

摘要

目的: 研究消食和胃冲剂及其方中各组成药物对小鼠胃肠动力的影响。

方法: 将消食和胃冲剂及其各组成药味以正交设计法分组, 以昆明小鼠为对象, 观察各组用药后营养性半固体食物于胃内残留率和小肠推进比, 并依正交设计的方法探讨方剂中各药味对小鼠胃肠动力的主次作用和交互作用。

结果: 消食和胃冲剂中部分组成药物有促进胃排空和小肠推进的作用。各单味药增加胃排空效应的大小为: 砂仁>山楂>神曲>枳实, 莱菔子作用不明显, 茯苓、甘草则作用相反, 可见砂仁、山楂、神曲对促进胃排空起主要作用; 各单味药增加小肠推进效应的大小为: 砂仁>山楂>莱菔子>枳实, 茯苓、神曲作用不明显, 甘草则作用相反。可见砂仁、山楂、莱菔子对促进小肠推进起主要作用。各组成药物之间存在着广泛的协同作用。

结论: 消食和胃冲剂中砂仁、山楂、神曲对胃排空有明显的促进作用, 砂仁、山楂、莱菔子对小肠推进有明显的促进作用, 各味药物之间存在着广泛的协同作用。

■同行评议者

魏睦新, 教授, 南京医科大学第一附属医院中医内科

关键词: 消食和胃冲剂; 正交设计; 胃排空; 小肠推进

迟鹏, 李岩, 陈苏宁. 消食和胃冲剂对小鼠胃肠动力的影响. 世界华人消化杂志 2010; 18(23): 2464-2468

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2464.asp>

0 引言

功能性消化不良是临床常见的消化系疾病, 其中24%-78%患者存在胃肠动力障碍. 许多研究表明, 中药有促胃肠动力的作用. 本研究中消食和胃冲剂是在经典方剂保和丸的基础上加减而得, 并已在前期的动物实验中证实对正常小鼠及胃肠运动障碍小鼠的胃排空和小肠推进起到明显的促进作用, 本文采用正交设计方法, 在动物实验中通过计算营养性半固体食物的胃排空率和小肠推进比, 研究该冲剂中各组成药物对胃肠动力的影响, 探讨各药味在该方剂中的作用大小及其交互作用, 进而开发出一种新的促胃肠动力药物.

1 材料和方法

1.1 材料 健康6周龄、♂, 昆明系小白鼠160只, 体重19-21 g, 由中国医科大学附属盛京医院医学动物实验中心提供. 取焦山楂、神曲、茯苓、炒莱菔子、砂仁、炒枳实、炙甘草(购于沈阳市药材采购供应站), 将其混合即消食和胃冲剂组方, 每味药均制成生药浓度为50%的水煎剂. 制备营养性半固体糊^[1]: 10 g羧甲基纤维素钠溶于250 mL蒸馏水中, 分别加入16 g奶粉, 8 g糖, 8 g淀粉搅拌均匀后加入4 mL碳素墨水, 配成300 mL约300 g的半固体糊状物, 冰箱冷藏保存, 用前2 h取出, 恢复至室温.

1.2 方法

1.2.1 分组: 按正交设计方法, 每味药为1个因子, 共7个因子, 均取“不给药”和“给全药量”两个水平, 随机确定各药的代号, 但水平号未随机化, 水平1为不含药物的溶液, 水平2为含7种药物的全方剂(山楂15 g、神曲10 g、茯苓10 g、枳实10 g、砂仁15 g、莱菔子10 g、甘草10 g). 采用主效应不与交互作用混杂的正交表L16(2¹⁵)设计, 即进行16组实验, 2个水平, 15个因子(7个主效应列, 7个两两混杂交互作用列, 1个空白列). 根据正交表中主效应列的水平配成16种不同组合的配方. 不管各组用药的成分有何不同, 某一成分的用量固定不变, 而投药的容量也固定不变.

1.2.2 给药及取材方法: 按正交设计表L16(2¹⁵)

表 1 消食和胃冲剂对胃排空作用方差分析

列号	因子	SS	V	MS	F
1	A	936.360	1	936.360	139.589 ^b
11	E	198.810	1	198.810	29.638 ^b
6	B×C, E×F, D×G	171.610	1	171.610	25.583 ^b
3	A×B, D×E, F×G	151.290	1	151.290	22.554 ^b
2	B	129.960	1	129.960	19.374 ^b
4	C	88.360	1	88.360	13.172 ^a
5	A×C, D×F, E×G	39.690	1	39.690	5.917
14	G	39.690	1	39.690	5.917
9	A×D, B×E, C×F	38.440	1	38.440	5.730
15	C×F, B×F, A×G	27.040	1	27.040	4.031
7	空列	16.000			
10	B×D, A×E, C×G	6.760			
8	D	5.290	5		2.385
12	C×D, A×F, B×G	3.240			
13	F	2.250			

A: 山楂; B: 神曲; C: 茯苓; D: 枳实; E: 砂仁; F: 莱菔子; G: 甘草.
×表示前后两者产生交互作用.^a $P<0.05$; ^b $P<0.01$, $F_{0.05}(1,5) = 6.61$, $F_{0.01}(1,5) = 16.3$.

的安排, 将小鼠随机分16次进行实验, 每组10只, 每日给予相应药物0.4 mL/只, 均喂养7 d. 实验前小鼠禁食不禁水18 h, 第8天各组动物分别灌喂相应药物0.4 mL/只, 1 h后灌喂营养性半固体糊0.5 mL/只, 15 min后脱颈椎处死, 立即剖开腹腔, 结扎胃贲门和幽门, 迅速从贲门处至回肠末端分离胃肠. 取幽门至回肠末端肠管, 将其自然拉直铺平, 分别测量从幽门括约肌至半固体糊前端及至回盲部的小肠长度, 计算幽门括约肌至半固体糊前端的距离占幽门括约肌至回盲部距离百分比为小肠推进比. 取胃, 用滤纸拭干后称胃全质量, 沿胃大弯剪开胃体, 洗去胃内容物后拭干, 称胃净质量. 以胃全质量和胃净质量的差值为胃内残留物质量, 计算胃内残留物占所灌半固体糊(0.5 g)的质量百分比为胃内残留率.

统计学处理 正交设计采用直观分析和方差分析法, $P<0.05$ 差异有统计学意义.

2 结果

2.1 各单味药物对小鼠胃排空功能的影响 各单

■相关报道

实验研究表明, 砂仁水提液可明显增加小鼠的胃排空和小肠运动功能.

■创新盘点

本文采用正交设计方法,在动物实验中通过计算营养性半固体食物的胃排空率和小肠推进比,研究该冲剂中各组成药物对胃肠动力的影响,探讨各药味在该方剂中的作用大小及其交互作用,进而开发出一种新的促胃肠动力药物。

表 2 正交设计和效应计算表

实验号	1 A	2 B	3 A×B D×E F×G	4 C	5 A×C D×F E×G	6 B×C E×F D×G	7	8 D
1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	1	1	1	1	1	1	1	2
3	1	1	1	2	2	2	2	1
4	1	1	1	2	2	2	2	2
5	1	2	2	1	1	2	2	1
6	1	2	2	1	1	2	2	2
7	1	2	2	2	2	1	1	1
8	1	2	2	2	2	1	1	2
9	2	1	2	1	2	1	2	1
10	2	1	2	1	2	1	2	2
11	2	1	2	2	1	2	1	1
12	2	1	2	2	1	2	1	2
13	2	2	1	1	2	2	1	1
14	2	2	1	1	2	2	1	2
15	2	2	1	2	1	1	2	1
16	2	2	1	2	1	1	2	2
I _胃	41.575	36.775	37.200	31.575	35.700	37.400	32.925	34.500
II _胃	26.475	31.275	30.850	36.475	32.350	30.650	35.125	33.550
8R	-15.100	-5.500	-6.350	4.900	-3.350	-6.750	2.200	-0.950
I _肠	62.674	71.050	67.844	72.606	69.252	68.584	71.740	68.697
II _肠	78.941	70.565	73.771	69.009	72.362	73.031	69.875	72.917
8R	16.267	0.485	5.927	-3.597	3.110	4.447	-1.865	4.220

I_胃和II_胃分别表示1水平下和2水平下实验数据之和。R_胃为极差,其值表示各因子效应的大小。如本实验 $R = (II - I) / 8$,用8R_胃表示给药与不给药的效应差别。负值大,表示给药使胃排空增加的效应大,正值大则相反;I_肠和II_肠分别表示1水平下和2水平下实验数据之和。R_肠为极差,其值表示各因子效应的大小。如本实验 $R = (II - I) / 8$,用8R_肠表示给药与不给药的效应差别,正值大,表示给药使小肠推进增加的效应大,负值大则相反。A: 山楂; B: 神曲; C: 茯苓; D: 枳实; E: 砂仁; F: 莱菔子; G: 甘草。×表示前后两者产生交互作用。

味药增加胃排空效应的大小为: 砂仁>山楂>神曲>枳实, 莱菔子作用不明显, 茯苓、甘草则作用相反。正交表交互作用有7列, 每一列有3个交互作用。其中第3、6列交互作用较大, 分别为-6.35和-6.75, 其他列的交互作用与第3、6列相差较大, 认为其交互作用较小, 进一步作方差分析。在正交表中安排1个空白列, 其偏差平方和为16.000, 将偏差平方和小于空白列的另4列与空白列一起合并为误差估计, 用来计算各因子的F比值。按F比值查表判断其显著性, 结果可见, 砂仁、山楂、神曲对胃排空有促进作用, 莱菔子、甘草作用不明显, 茯苓则对胃排空有抑制作用。交互作用列中, 第6、3列作用显著($P<0.01$), 同直观分析一致(表1-3)。

2.2 各单味药物对小鼠小肠推进功能的影响 各单味药增加小肠推进效应的大小为: 砂仁>山楂>莱菔子>枳实, 茯苓、神曲作用不明显, 甘草

则作用相反。正交表交互作用有7列, 每一列有3个交互作用。其中第3、6列交互作用较大, 分别为5.927和4.447, 其他列的交互作用与第3、6列相差较大, 认为其交互作用较小, 进一步作方差分析。在正交表中安排1个空白列, 其偏差平方和为13.913, 将偏差平方和小于空白列的另2列与空白列一起合并为误差估计, 用来计算各因子的F比值。按F比值查表判断其显著性, 结果可见, 砂仁、山楂、莱菔子对小肠推进有促进作用, 茯苓、神曲作用不明显, 甘草则对小肠推进有抑制作用。交互作用列中, 第3、6列作用显著($P<0.01$), 同直观分析一致(表2-4)。

3 讨论

保和丸出自经典方剂《丹溪心法》, 由山楂、神曲、半夏、茯苓、陈皮、连翘、莱菔子组成, 其功效可消食和胃, 治疗饮食不节, 伤及脾

表 3 正交设计和效应计算表及其胃残留率和小肠推进比

实验号	水平							胃残留率(%)	小肠推进比(%)
	9	10	11	12	13	14	15		
	A×D	B×D		C×D			C×E		
	B×E	A×E		A×F			B×F		
	C×F	C×G	E	B×G	F	G	A×G		
1	1	1	1	1	1	1	1	53.80	50.04
2	2	2	2	2	2	2	2	44.20	67.77
3	1	1	1	2	2	2	2	51.20	58.44
4	2	2	2	1	1	1	1	40.80	63.56
5	1	2	2	1	1	2	2	32.20	62.38
6	2	1	1	2	2	1	1	33.00	71.48
7	1	2	2	2	2	1	1	37.60	65.76
8	2	1	1	1	1	2	2	39.80	61.96
9	2	1	2	1	2	1	2	19.20	92.65
10	1	2	1	2	1	2	1	33.60	72.04
11	2	1	2	2	1	2	1	22.60	79.57
12	1	2	1	1	2	1	2	28.80	84.33
13	2	2	1	1	2	2	1	25.20	75.83
14	1	1	2	2	1	1	2	11.40	88.66
15	2	2	1	2	1	1	2	34.20	64.91
16	1	1	2	1	2	2	1	36.80	73.54
I 胃	35.675	33.475	37.450	34.575	33.550	32.350	35.425		
II 胃	32.375	34.575	30.600	33.475	34.500	35.700	32.625		
8R	-3.300	1.100	-6.850	-1.100	0.950	3.350	-2.800		
I 肠	69.399	72.042	67.379	70.536	67.890	72.674	68.977		
II 肠	72.216	69.572	74.236	71.079	73.725	68.941	72.638		
8R	2.817	-2.470	6.857	0.543	5.835	-3.733	3.661		

I_胃和II_胃分别表示1水平下和2水平下实验数据之和。R_胃为极差, 其值表示各因子效应的大小。如本实验 $R = (II - I)/8$, 用8R_胃表示给药与不给药的效应差别。负值大, 表示给药使胃排空增加的效应大, 正值大则相反; I_肠和II_肠分别表示1水平下和2水平下实验数据之和。R_肠为极差, 其值表示各因子效应的大小。如本实验 $R = (II - I)/8$, 用8R_肠表示给药与不给药的效应差别, 正值大, 表示给药使小肠推进增加的效应大, 负值大则相反。A: 山楂; B: 神曲; C: 茯苓; D: 枳实; E: 砂仁; F: 莱菔子; G: 甘草。×表示前后两者产生交互作用。

胃及肝气不舒, 横逆犯脾所致脘腹痞满胀痛, 噎腐吞酸, 恶心呕吐等。本研究中消食和胃冲剂由保和丸加砂仁、炒枳实、炙甘草, 减半夏、陈皮、连翘而成。实验研究表明, 砂仁水提液可明显增加小鼠的胃排空和小肠运动功能^[2]。山楂含有脂肪酶, 能促进脂肪消化, 并能增加胃消化酶的分泌, 促进消化。对胃肠功能具有一定调节作用, 对活动亢进的兔十二指肠平滑肌呈抑制作用, 而对松弛的大鼠胃平滑肌有轻度的增强收缩作用^[3]。莱菔子有促进肠推进作用, 而对胃排空有抑制作用^[4], 对离体家兔的胃、十二指肠平滑肌有显著收缩效应^[5]。神曲为酵母制剂, 含有维生素B复合体、酶类等, 可通过氧化供能, 促进人体对蛋白质的消化^[6]。枳实可增强狗在体小肠的肌电活动, 并被阿托品阻滞, 提示与

M受体有关^[7]。研究表明枳实煎剂可促进胃排空及小肠推进功能, 可能与血浆胃动素水平升高有关^[8,9]。

本实验采用营养性半固体糊灌喂法观察消食和胃冲剂中各组成成分对胃肠动力的影响, 通过正交分析表明, 在该方剂中, 对于促进胃排空和小肠推进, 7味药物的作用有主有次, 强弱不等。砂仁、山楂、神曲对促进胃排空起主要作用, 砂仁、山楂、莱菔子对促进小肠推进起主要作用。各单味药之间存在较广泛的一级交互作用, 神曲与砂仁, 山楂与莱菔子, 山楂与枳实对促进胃排空及小肠推进有显著的协同作用。

本研究提示, 消食和胃冲剂中部分组成药物有显著促进小鼠胃排空及小肠推进功能的

■应用要点

消食和胃冲剂中砂仁、山楂、神曲对胃排空有明显的促进作用, 砂仁、山楂、莱菔子对小肠推进有明显的促进作用, 各味药物之间存在着广泛的协同作用。

■同行评价

本文选题适当, 设计合理, 有一定的临床参考价值。

表 4 消食和胃冲剂对小肠推进作用方差分析

列号	因子	SS	V	MS	F
1	A	1 058.526	1	1 058.526	198.090 ^b
11	E	188.101	1	188.101	35.201 ^b
3	A×B, D×E, F×G	140.541	1	140.541	26.300 ^a
13	F	136.189	1	136.189	25.486 ^a
6	B×C, E×F, D×G	79.121	1	79.121	14.806 ^a
8	D	71.234	1	71.234	13.331 ^a
14	G	55.726	1	55.726	10.428 ^a
15	C×F, B×F, A×G	53.582	1	53.582	10.027
4	C	51.768	1	51.768	9.688
5	A×C, D×F, E×G	38.688	1	38.688	7.240
9	A×D, B×E, C×F	31.753	1	31.753	5.942
10	B×D, A×E, C×G	24.404	1	24.404	4.567
7	空列	13.913			
12	C×D, A×F, B×G	1.177	3		2.604
2	B	0.941			

A: 山楂; B: 神曲; C: 茯苓; D: 枳实; E: 砂仁; F: 莱菔子; G: 甘草。
×表示前后两者产生交互作用。^a $P<0.05$; ^b $P<0.01$, $F_{0.05}(1,3) = 10.1$, $F_{0.01}(1,3) = 34.1$ 。

作用, 证实了该冲剂组方合理, 方中焦山楂、神

曲、砂仁消食理气为君药; 炒莱菔子、炒枳实理气和胃为臣药; 食积内郁, 易于生湿化热, 故以茯苓渗湿健脾为佐药; 炙甘草调和诸药为使药, 诸药合用共奏消食和胃之功。全方补泻兼施, 使升降出入有序, 脾胃运化如常, 进而胃肠动力得以恢复, 临床诸症得以消除。如进一步加以研究, 可能对一些胃肠道运动功能障碍性疾病的治疗有一定的意义, 进而开发出新的促进胃肠动力药物。

4 参考文献

- 1 吴春福, 陈多. 小鼠胃排空模型的探讨. 中国药理学通报 1997; 13: 271-272
- 2 李岩, 孙思予, 周卓. 消食行气中药对小鼠胃肠动力的影响. 新消化病学杂志 1997; 5: 153
- 3 薛洁, 夏昌隆. 山楂药理研究进展. 新疆中医药 2002; 20: 69-71
- 4 李文惠, 黄维良, 朱训富, 胡昌江, 刘龙成, 谭世德, 叶功伟, 魏宏. 莱菔子不同炮制品对动物胃和小肠运动的影响. 成都中医药大学学报 1985; 28: 47
- 5 李玲, 谈斐. 莱菔子、蒲公英、白术对家兔离体胃、十二指肠肌的动力作用. 中国中西医结合脾胃杂志 1998; 6: 107
- 6 吴勇. 软坚散结话神曲. 云南中医杂志 1986; 7: 44
- 7 黄子荷, 杨德治, 魏义全, 应崇智, 毕庆和. 阿托品对枳实增强犬小肠电活动效应的影响. 中国中西医结合杂志 1996; 6: 292-294
- 8 李岩, 陈苏宁, 李宇权, 徐葆, 田代真一. 芍药甘草汤、四逆散对胃排空及小肠推进功能影响的拆方研究. 中华消化杂志 1996; 16: 18-21
- 9 李岩, 陈苏宁, 陈少夫, 周卓, 徐堡壘, 李宇权. 柴胡、枳实合剂对健康人胃排空及小肠推进功能及血中胃动素、胃泌素水平的影响. 中国中西医结合杂志 1996; 16: 622

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《2009年版中国科技期刊引证报告》(核心版)发布 《世界华人消化杂志》2008年影响因子 0.547

本刊讯 中国科学技术信息研究所发布2008年《世界华人消化杂志》的总被引频次为2 480, 位居1 868种中国科技论文统计源期刊的第100位, 41种内科学类期刊的第6位。2008年《世界华人消化杂志》的影响因子为0.547, 41种内科学类期刊的第17位。大家最为关注的是《2009年版中国科技期刊引证报告》(核心版)中新增一个综合评价指标, 即综合评价总分, 该指标根据科学计量学原理, 系统性地综合考虑被评价期刊的各影响力指标(总被引频次、影响因子、他引率、基金论文比、引文率等)在其所在学科中的相对位置, 并按照一定的权重系数将这些指标进行综合集成, 对期刊进行综合评价。《世界华人消化杂志》总分为49.5, 在41种内科学类期刊中排名第8位, 在1 868种中国科技期刊排名第341位。(编辑部主任: 李军亮 2010-01-08)

曲古菌素A对人胃癌细胞SGC-7901中组蛋白H3乙酰化水平及细胞凋亡的影响

杨桐树, 李云龙, 赵婷

杨桐树, 赵婷, 哈尔滨医科大学附属肿瘤医院检验科 黑龙江省哈尔滨市 150081

李云龙, 哈尔滨医科大学第二临床医学院普外科 黑龙江省哈尔滨市 150086

哈尔滨医科大学第二临床医学院博士科研基金资助项目, No. BS2008-05

作者贡献分布: 此课题由李云龙与杨桐树设计; 研究过程由杨桐树与赵婷操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由李云龙提供; 数据分析由杨桐树与赵婷完成; 本论文写作由杨桐树、李云龙及赵婷完成。

通讯作者: 李云龙, 副教授, 150086, 黑龙江省哈尔滨市南岗区学府路246号, 哈尔滨医科大学第二临床医学院. hydeyll@live.cn
电话: 0451-86605354

收稿日期: 2010-06-30 修回日期: 2010-07-28

接受日期: 2010-08-03 在线出版日期: 2010-08-18

Trichostatin A increases histone H3 acetylation and promotes apoptosis in gastric cancer cell line SGC-7901

Tong-Shu Yang, Yun-Long Li, Ting Zhao

Tong-Shu Yang, Ting Zhao, Department of Clinical Laboratory, the Affiliated Tumor Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150081, Heilongjiang Province, China

Yun-Long Li, Department of General Surgery, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China

Correspondence to: Associate Professor Yun-Long Li, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, 246 Xuefu Road, Nangang District, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China. hydeyll@live.cn

Received: 2010-06-30 Revised: 2010-07-28

Accepted: 2010-08-03 Published online: 2010-08-18

Abstract

AIM: To investigate the effects of trichostatin A (TSA), a histone deacetylase inhibitor, on apoptosis in human gastric cancer cell line SGC-7901.

METHODS: After SGC-7901 cells were incubated with 75 $\mu\text{g/L}$ TSA for 48 h, cell apoptosis was measured by flow cytometry, and the expression of acetylated histone H3 was detected by immunohistochemistry.

RESULTS: TSA could significantly inhibit proliferation and induce apoptosis of SGC-7901

cells. The expression level of acetylated histone H3 was higher in SGC-7901 cells treated with TSA (75 $\mu\text{g/L}$ for 48 h) than in control cells (35.43 ± 6.05 vs 1.12 ± 1.06). The apoptosis rate was significantly different between SGC-7901 cells treated with TSA (75 $\mu\text{g/L}$ for 48 h) and control cells ($P < 0.05$).

CONCLUSION: TSA can induce SGC-7901 cell apoptosis possibly by up-regulating the expression of acetylated histone H3.

Key Words: Gastric neoplasm; Trichostatin A; Apoptosis; Acetylated histone H3; SGC-7901

Yang TS, Li YL, Zhao T. Trichostatin A increases histone H3 acetylation and promotes apoptosis in gastric cancer cell line SGC-7901. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(23): 2469-2471

摘要

目的: 探讨组蛋白去乙酰化酶(HDAC)抑制剂曲古菌素A(TSA)对胃癌细胞系SGC-7901中组蛋白H3乙酰化水平及细胞凋亡的影响。

方法: 流式细胞仪检测细胞凋亡率, 免疫细胞化学法检测75 $\mu\text{g/L}$ TSA干预前胃癌细胞系SGC-7901中乙酰化组蛋白H3的表达。

结果: TSA干预后胃癌细胞系SGC-7901中乙酰化组蛋白H3的表达水平明显升高, 乙酰化组蛋白H3阳性细胞数从 1.12 ± 1.06 上升至 35.43 ± 6.05 , 与未干预相比两者表达有显著性差异($P < 0.01$), 流式细胞仪分析显示细胞凋亡率增加到 $22.13\% \pm 3.49\%$ 。

结论: TSA可诱导细胞凋亡, 促进胃癌细胞系SGC-7901中乙酰化组蛋白H3的表达。

关键词: 胃肿瘤; 曲古菌素A; 细胞凋亡; 乙酰化组蛋白H3; SGC-7901

杨桐树, 李云龙, 赵婷. 曲古菌素A对人胃癌细胞SGC-7901中组蛋白H3乙酰化水平及细胞凋亡的影响. 世界华人消化杂志

■背景资料

组蛋白乙酰化酶(HAT)和组蛋白去乙酰化酶(HDAC)二者之间的动态平衡控制着染色质的结构和基因的表达。曲古菌素A(TSA)是一种异羟肟酸类HDAC抑制剂, 能抑制组蛋白去乙酰化酶的活性。

■同行评议者

谢敏, 主任医师, 南京大学医学院附属鼓楼医院普外科

■研究前沿

体外培养已经证实, TSA能促进多种肿瘤的凋亡, 但对TSA在胃癌中的凋亡作用和TSA可以促进胃癌细胞系SGC-7901中乙酰化组蛋白H3表达的研究不多。

2010; 18(23): 2469-2471

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2469.asp>

0 引言

组蛋白乙酰化酶(histone acetylase, HAT)和组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylase, HDAC)是调节组蛋白乙酰化状态的一对功能相互拮抗的蛋白酶, 二者之间的动态平衡控制着染色质的结构和基因的表达。曲古菌素A(trichostatin A, TSA)是一种异羟肟酸类组蛋白去乙酰化酶抑制剂(histone deacetylase inhibitors, HDACi), 能抑制HDAC的活性, 影响细胞增殖^[1,2]。本研究以TSA作用胃癌细胞系SGC-7901, 观察SGC-7901细胞中组蛋白H3乙酰化的变化及其对该细胞凋亡的影响, 初步探讨其在胃癌细胞系SGC-7901中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料 胃癌细胞株SGC-7901由黑龙江省肿瘤防治研究所惠赠。100 mL/L胎牛血清、100 g/L链霉素、含100 kU/L青霉素的RPMI 1640(Gibco公司)培养液。兔抗人乙酰化组蛋白H3多克隆抗体购自美国Upstate公司, 其工作浓度为1:100。增强型SABC免疫组织化学检测试剂盒购自北京中山公司。TSA购于Sigma公司, 批号T8552/028k4153。

1.2 方法

1.2.1 分组: 实验设空白对照组和75 μ g/L TSA组^[3]。

1.2.2 细胞培养: SGC-7901细胞常规培养于胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司)、100 kU/L青霉素和100 mg/L链霉素的RPMI 1640培养液中, 在37 $^{\circ}$ C, 50 mL/L CO₂培养箱中贴壁培养。每1-2 d传代1次, 取对数生长期细胞进行实验。

1.2.3 流式细胞术: 收集培养48 h对照组和处理组细胞, 离心, PBS洗2次, 用Annexin V缓冲液重悬细胞, 取 5×10^6 细胞加入5 μ L Annexin V-FITC(Pharmingen)混匀, 室温避光孵育10 min。离心, 弃上清, 用190 μ L Annexin V-FITC缓冲液重悬细胞, 加入20 mg/L PI 10 μ L, 用流式细胞仪检测凋亡细胞。

1.2.4 免疫组织化学检测: 采用SABC法。各组按说明书进行操作。染色结果以细胞核内出现明确的棕黄色或棕褐色判定为阳性表达。采用图像分析软件UTHSCSA Image Tool 3.0版, 随机选取10个高倍视野($\times 200$)计数阳性细胞数, 计算平均数。

统计学处理 采用SPSS17.0统计分析软件。

数据用mean \pm SD表示, 组间差异采用F检验, $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 75 μ g/L TSA对SGC-7901细胞凋亡的影响 流式细胞术检测, 75 μ g/L TSA处理SGC-7901细胞48 h和对照组细胞相比, SGC-7901细胞凋亡率达到22.13% \pm 3.49%(图1)。

2.2 免疫组织化学观察 各组免疫细胞化学采用图像分析软件处理(图2), 对照组蛋白H3阳性细胞数为1.12 \pm 1.06, 而TSA组则为35.43 \pm 6.05, TSA组较对照组阳性细胞数显著增高($P < 0.01$)。

3 讨论

组蛋白乙酰化/去乙酰化修饰是基因转录调控的关键机制之一。乙酰化是最早被发现的与转录有关的组蛋白修饰方式, 主要发生在组蛋白H3和H4的尾部比较保守的赖氨酸残基。组蛋白乙酰化水平受一对互相拮抗的蛋白酶-HAT和HDAC调控, HAT/HDAC活性紊乱会使基因表达失控, 导致癌症的发生^[4]。HDACi可以通过抑制HDAC活性, 诱导组蛋白高乙酰化, 调节基因表达, 从而发挥抗癌效应。

TSA是第一个来源于天然产物的HDACi, 是HDACi的代表药物之一, 属异羟肟酸类化合物, 可通过其异羟肟酸配基与HDAC管状结构底部的锌离子结合抑制HDACs的活性^[5]。本实验采用流式细胞仪检测75 μ g/L TSA处理胃癌SGC-7901细胞的凋亡率, 48 h后出现明显的凋亡, 凋亡率达到22.13% \pm 3.49%, TSA在SGC-7901细胞中所诱导的细胞凋亡效应与TSA在其他恶性肿瘤细胞中的作用相符^[6-9]。

本实验采用免疫细胞化学方法检测TSA(75 μ g/L)干预前后, 胃癌细胞系SGC-7901乙酰化组蛋白H3表达水平, 正常培养的SGC-7901细胞乙酰化组蛋白H3呈低水平表达, TSA干预后, SGC-7901细胞乙酰化组蛋白H3表达水平明显增加($P < 0.01$)。这种生物学效应表明, TSA通过抑制HDAC^[6], 打破了SGC-7901细胞原有的组蛋白乙酰化调控状态, 使得SGC-7901细胞中乙酰化组蛋白H3表达增多。

去乙酰化转移酶抑制剂抗肿瘤主要通过调控与肿瘤相关的基因来实现的, 具体的机制因肿瘤和去乙酰化转移酶抑制剂的种类不同而有所不同^[10-13], 其对肿瘤细胞的效应主要通过以下几个途径来实现: (1)阻滞细胞周期、诱导细

■相关报道

国内外有关报道提示TSA对多种肿瘤细胞有显著抑制作用, 抑制肿瘤细胞凋亡。

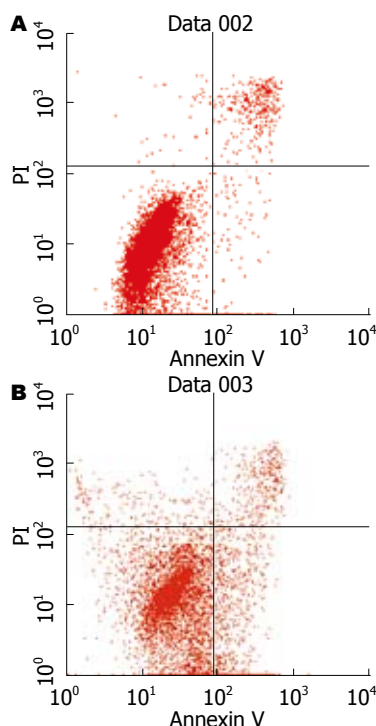


图 1 流式细胞仪检测SGC-7901细胞凋亡. A: 对照组; B: 实验组.

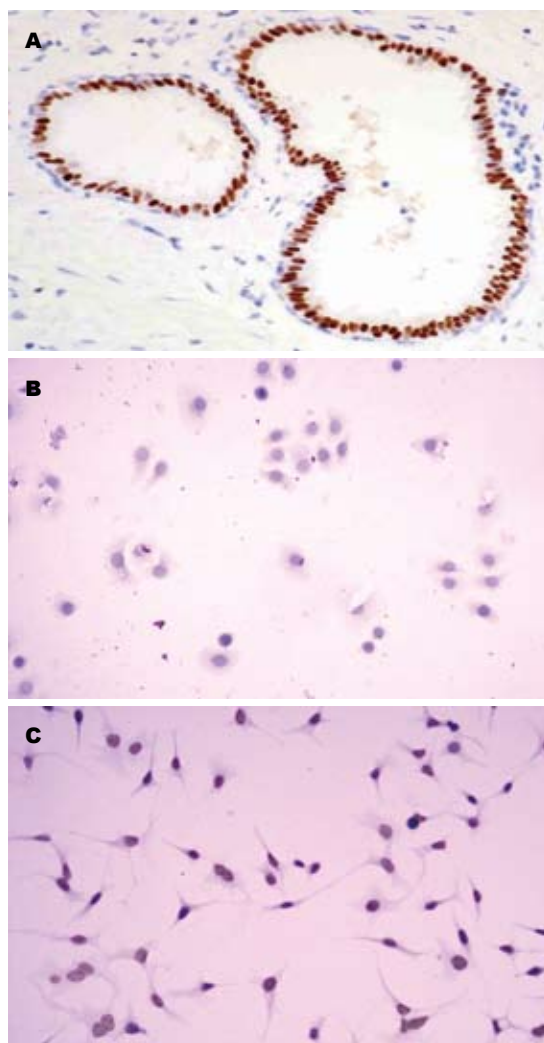


图 2 乙酰化组蛋白H3染色结果($\times 200$). A: 阳性对照; B: 对照组; C: TSA组.

胞分化; (2)诱导细胞凋亡; (3)抑制血管生成; (4)增加肿瘤细胞对化疗和放疗的敏感性. TSA等HDACi作为HDAC抑制剂, 可诱导组蛋白的高乙酰化状态, 而组蛋白高乙酰化很可能是TSA等HDACi作用的始动环节, 因此, 我们推测TSA等HDACi有可能通过诱导组蛋白高乙酰化激活或抑制相关基因转录, 直接或间接诱导肿瘤细胞凋亡.

我们的研究初步表明, TSA可以促进胃癌细胞系SGC-7901中乙酰化组蛋白H3的表达, 诱导SGC-7901细胞凋亡, 这极有可能发展为一种新的治疗胃癌的方法, 但TSA的具体作用机制有待进一步研究.

4 参考文献

- 1 马俊芬, 江亚南, 赵继敏, 黄幼田, 赵明耀, 董子明. 曲古菌素A对食管癌EC1细胞增殖和细胞周期的影响及其分子机制. 世界华人消化杂志 2009; 17: 3534-3537
- 2 张波, 陈剑英, 王国斌, 陈道达. 组蛋白去乙酰酶抑制剂对结肠癌细胞增殖和ID4基因表达的影响. 世界华人消化杂志 2007; 15: 2021-2025
- 3 Zou XM, Li YL, Wang H, Cui W, Li XL, Fu SB, Jiang HC. Gastric cancer cell lines induced by trichostatin A. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 4810-4815
- 4 Dhordain P, Lin RJ, Quief S, Lantoin D, Kerckaert JP, Evans RM, Albagli O. The LAZ3(BCL-6) oncoprotein recruits a SMRT/mSIN3A/histone deacetylase containing complex to mediate transcriptional repression. *Nucleic Acids Res* 1998; 26: 4645-4651
- 5 Marks PA, Richon VM, Breslow R, Rifkind RA.

Histone deacetylase inhibitors as new cancer drugs. *Curr Opin Oncol* 2001; 13: 477-483

- 6 周玉美, 王林, 钱俊杰, 孙志贤. 组蛋白乙酰化酶构效关系研究进展. 解放军药学报 2006; 22: 206-209
- 7 Duan H, Heckman CA, Boxer LM. Histone deacetylase inhibitors down-regulate bcl-2 expression and induce apoptosis in t(14;18) lymphomas. *Mol Cell Biol* 2005; 25: 1608-1619
- 8 陈维凯, 陈燕, 谷俊侠, 崔国惠. 曲古菌素A对HL-60细胞组蛋白乙酰化水平和凋亡的作用. 中国实验血液学杂志 2004; 12: 324-328
- 9 洪振亚, 易莉莎, 苗新宇, 卢运萍, 周剑锋, 刘文励. 应用基因芯片分析曲古菌素A促人白血病细胞株Molt-4凋亡的机制. 癌症 2006; 25: 946-953
- 10 张波, 刘科, 陈道达. 曲古菌素A对结肠癌Lovo细胞增殖抑制的研究. 中国普通外科杂志 2007; 16: 574-576
- 11 陈紫恒, 房静远. P21WAF1的调节—乙酰化和甲基化. 国外医学·肿瘤学分册 2002; 29: 263-266
- 12 徐周敏, 梅琪, 陈坚. 曲古菌素A抑制肿瘤细胞增殖及提高p21基因表达. 军事医学科学院院刊 2007; 31: 420-422
- 13 王立明, 曲巍. 肿瘤抗异常转录治疗研究进展. 国外医学·肿瘤学分册 2005; 32: 420-423

■创新盘点

国内外大多以研究胃癌细胞系的增殖为目标, 对于细胞凋亡的研究大多使用流式细胞仪检测细胞周期, 而本研究是将凋亡与免疫组织化学结合起来, 探讨H3的表达及细胞凋亡.

■同行评价

本文选题较好, 数据可靠, 对胃癌的治疗有一定的参考价值.

编辑 曹丽鸥 电编 吴鹏朕

血清低相对分子质量差异蛋白质组在食管癌诊断和分期中的作用

任兴军, 谭小林, 杨成虎, 李小琼, 冯峰, 胡琼英, 丁银环, 戴天阳, 王开正

■背景资料

食管癌早期诊断和分期诊断对食管癌的研究具有重要价值, 目前急需寻找能够诊断早期食管癌的方法, 以提高食管癌患者的生存率; 急需寻找可以在术前明确分期的方法, 利于手术方式的选择和术前的治疗。SELDI蛋白质芯片技术在这方面研究上有着显著的优势。

任兴军, 杨成虎, 冯峰, 四川省射洪县人民医院 四川省遂宁市 629200

谭小林, 李小琼, 胡琼英, 丁银环, 王开正, 泸州医学院附属医院检验科 四川省泸州市 646000

戴天阳, 泸州医学院附属医院胸心外科 四川省泸州市 646000
作者贡献分布: 任兴军与谭小林对本文所作贡献均等; 此课题由谭小林、任兴军及王开正设计; 研究过程由谭小林、任兴军、杨成虎、李小琼、冯峰、胡琼英、丁银环、戴天阳及王开正操作完成; 研究所用试剂及分析工具由王开正提供; 病例资料主要由任兴军、杨成虎、冯峰及戴天阳提供; 数据分析由谭小林、任兴军、李小琼及王开正完成; 本论文写作由谭小林、任兴军及王开正完成。

通讯作者: 王开正, 教授, 646000, 四川省泸州市, 泸州医学院附属医院检验科. kaizhengw@yahoo.com.cn

电话: 0830-3165730

收稿日期: 2010-04-27 修回日期: 2010-07-08

接受日期: 2010-07-21 在线出版日期: 2010-08-18

Detection of differentially expressed low molecular weight serum proteins for diagnosis and staging of esophageal cancer

Xing-Jun Ren, Xiao-Lin Tan, Cheng-Hu Yang,
Xiao-Qiong Li, Feng Feng, Qiong-Ying Hu,
Yin-Huan Ding, Tian-Yang Dai, Kai-Zheng Wang

Xing-Jun Ren, Cheng-Hu Yang, Feng Feng, People's Hospital of Shenhong County, Suining 629200, Sichuan Province, China

Xiao-Lin Tan, Xiao-Qiong Li, Qiong-Ying Hu, Yin-Huan Ding, Kai-Zheng Wang, Department of Laboratory Medicine, Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000, Sichuan Province, China

Tian-Yang Dai, Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000, Sichuan Province, China

Correspondence to: Professor Kai-Zheng Wang, Department of Laboratory Medicine, Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000, Sichuan Province, China. kaizhengw@yahoo.com.cn

Received: 2010-04-27 Revised: 2010-07-08

Accepted: 2010-07-21 Published online: 2010-08-18

Abstract

AIM: To find biomarkers for early diagnosis of esophageal cancer (EC) by detecting differentially expressed low molecular weight serum proteins using mass spectrometry.

METHODS: The serum proteomic patterns of EC

patients and healthy controls were detected using the surface-enhanced laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry (SELDI-TOF-MS). Differential protein peaks between EC patients and controls were analyzed using the Biomarker Pattern Software, and a model for early diagnosis of EC was developed and validated using an artificial neural network (ANN). Differential protein peaks between early and advanced EC patients were analyzed to establish a model for staging of EC.

RESULTS: Five differential serum proteins were identified between EC patients and controls, and three differential serum proteins were found between early and advanced EC. The diagnostic model established based on the five differential serum proteins between EC patients and controls had a sensitivity of 87.88%, a specificity of 91.43%, and an accuracy of 89.71%. The blind test generated a sensitivity of 95.83%, a specificity of 89.13%, and an accuracy of 91.43%. The staging model established based on the three differential serum proteins between early and advanced EC had a sensitivity of 75.76%, a specificity of 79.17%, and an accuracy of 77.19%.

CONCLUSION: SELDI-TOF-MS in combination with ANN is simple and feasible for the diagnosis and staging of EC.

Key Words: Esophageal cancer; Proteomics; Staging; Diagnostic model; Surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry

Ren XJ, Tan XL, Yang CH, Li XQ, Feng F, Hu QY, Ding YH, Dai TY, Wang KZ. Detection of differentially expressed low molecular weight serum proteins for diagnosis and staging of esophageal cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(23): 2472-2477

摘要

目的: 研究食管癌癌变过程中血清低相对分子质量蛋白的细微变化, 探索食管癌发生的机制, 寻找食管癌早期诊断的生物标志物和方法。

■同行评议者

吕宾, 教授, 浙江中医学附属医院 (浙江省中医院、浙江省东方医院) 消化科

方法:应用表面激光解析电离飞行时间质谱技术对食管癌患者血清和健康对照血清进行蛋白质谱指纹图谱检测,通过Biomarker Wizard软件筛选差异蛋白,使用人工神经网络软件建立食管癌早期诊断模型并用盲法验证其诊断效果;将食管癌早期和中晚期食管癌患者血清质谱图进行比对分析,寻找各期差异蛋白,并建立分期诊断模型。

结果:发现食管癌和正常人差异蛋白5种,早期食管癌和中晚期食管癌差异蛋白3种。通过早期食管癌组和健康对照组建立早期诊断模型的灵敏度87.88%,特异度91.43%,准确度89.71%,经过盲法验证结果为灵敏度95.83%,特异度89.13%,准确度91.43%。早期食管癌和中晚期筛选的差异蛋白建立的分期诊断模型灵敏度75.76%,特异度79.17%,准确度77.19%。

结论:表面增强激光解析离子化飞行时间质谱联合人工神经网络技术操作较为简便,在食管癌的诊断和分期上具有可行性。

关键词:食管癌;蛋白质组学;分期;诊断模型;表面增强激光解析离子化飞行时间质谱

任兴军, 谭小林, 杨成虎, 李小琼, 冯峰, 胡琼英, 丁银环, 戴天阳, 王开正. 血清低相对分子质量差异蛋白质组在食管癌诊断和分期中的作用. 世界华人消化杂志 2010; 18(23): 2472-2477
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2472.asp>

0 引言

食管癌位居我国恶性肿瘤的前列,其发病机制和早期诊断技术一直是国内外学者研究的热点。因早期癌变是否能够发现已成为目前食管癌预后的决定因素,故本研究采用能够检测1 fmol级别的微量蛋白的表面激光解析电离飞行时间质谱(surface-enhanced laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry, SELDI-TOF-MS)技术,检测食管癌的各期(从0期到IV期)的血清中的蛋白组学变化,寻找相关差异蛋白,旨在提高食管癌的早期诊断率,阐明食管癌的相关发病机制并探索低相对分子质量差异蛋白组在食管癌诊断和分期中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料 试验对象分为3组:早期食管癌组、中晚期食管癌组和健康对照组。食管癌患者来自2008-07/2009-12泸州医学院附属医院收治的食管癌患者。根据术后病理诊断,以国际抗癌联盟(UICC)食管癌TNM分期标准(2002),所有食管癌

均经过病理证实为食管鳞癌。早期诊断模型建模组和验证组食管癌病例构成:男36例,女21例,平均年龄59.6(31-83)岁。其中早期诊断模型食管癌建模组33例:其中0期1例,I期1例,IIA期31例;早期诊断模型验证组食管癌24例:0期2例,I期3例,IIA期19例。中晚期食管癌组24例:男16例,女8例,平均年龄60.7(33-87)岁,其中IIB期3例,IIIA期20例,IV期1例。健康对照组82例:男51例,女31例,平均年龄54.5(27-79)岁,所有健康对照组标本均源于泸州医学院附属医院的2008-07/2009-12健康体检者。所有癌症患者均于术前1 d空腹无菌采取静脉血,均于术后病理学确证且在采血之前未经任何放化疗治疗。健康对照组,每例标本均做常规生化检测,肝肾功能,血脂、血糖均处于正常范围,并排除了肝炎、糖尿病、结缔组织病等易使血清中产生干扰蛋白的疾病。所有试验样本无溶血。早期食管癌,中晚期食管癌和正常人在年龄和性别上无统计学差异。蛋白指纹图谱分析仪(PBS II/C)CIPHERGEN Biosystem Inc. 美国),水(HPLC级),三氟乙酸(trifluoro-acetic acid, TFA)(Sigma USA),芥子酸(sinapic acid, SPA Sigma USA),能量吸收分子,乙腈(acetonitrile, HPLC grade),PBS(磷酸盐缓冲液,10×),均购自美国Sigma公司。96孔蛋白质芯片工作平台(CIPHERGEN Biosystem Inc.美国),Au蛋白芯片。

1.2 方法

1.2.1 标本的采集和处理:抽取清晨空腹前臂静脉全血3 mL于洁净试管(不抗凝),避免溶血,置4℃冰箱中1-2 h,然后4℃ 3 000 r/min离心10 min;取上清加入eppendorf管。再次3 000 r/min离心5 min,0.5 mL eppendorf管分装,30-100 μL每管,放入-80℃保存,每个样本至少3管以上。

1.2.2 芯片预处理和血清样本准备:将芯片装入96孔芯片处理器中进行预处理,在处理血清样本的同时活化芯片。先在每孔中依次加入丙酮,盐酸(0.01 mmol/L),盐酸甲醇(1:1混合),甲醇,每次加入后振荡5 min,拍干,卸下芯片,室温干燥后点样。与此同时,预先将血清从-80℃冰箱取出,在冰上缓慢融化(30-60 min),放入低温离心机4℃离心2 min。取200 μL离心管编号,于每管中分别加入5 μL PBS,5 μL待检血清,充分混匀。在活化芯片至第3步时,即芯片处理器开始振荡时加入盐酸甲醇,立即向血清样本中加入10 μL半饱和SPA,同时充分混匀后点样于芯池中,再次点样加能量吸收分子,干燥上机检测。

1.2.3 数据采集与处理:用ProteinChip Software

■ 研发前沿

随着SELDI技术的研究深入,其在肿瘤方面的应用前景亦有越来越广阔。如何设计更好的实验用于肿瘤的诊断、治疗、疗效判断和预后估计,并使之能够早日用于临床已是当前研究者面临的主要问题之一。食管癌作为危害我国人民健康的主要肿瘤之一,已成为目前SELDI-TOF-MS研究的焦点。

■相关报道

国内外许多学者对使用SELDI技术诊断食管癌进行了广泛的研究, 差异蛋白筛选结合蛋白质组学数据库初步鉴定后, 再经过其他技术(2-DE等)验证鉴定后建立诊断模型, 这可能是进一步探讨食管癌发病机制和提高诊断食管癌诊断率的关键。

表 1 早期、中晚期食管癌和正常人差异蛋白 (mean ± SD)

差异蛋白 (m/z)	峰强度			方差分析	
	晚期食管癌	早期食管癌	正常对照	F值	P值
4 473	11.48 ±	7.70 ±	4.29 ±	11.45	<0.001
	8.59	4.98	3.34		
4 633	9.70 ±	7.52 ±	4.82 ±	12.43	<0.001
	4.55	3.80	3.05		
5 006	9.92 ±	7.81 ±	2.54 ±	40.25	<0.001
	3.68	3.85	2.36		
5 343	32.97 ±	23.67 ±	13.12 ±	18.28	<0.001
	16.07	12.72	9.17		
5 926	48.11 ±	40.61 ±	19.89 ±	26.34	<0.001
	19.84	15.63	12.54		

3.2软件收集质谱信号, 设置激光强度为190, 检测灵敏度9, 检测上限100 000 m/z, 优化收集数据2 000-20 000 m/z, 信号收集位置20-80, 每个样本取140个点所收集信号的平均值。所有样本均使用相同的参数设置。使用Biomarker Wizard 软件去除噪音, 初始的噪音过滤值为5, 第2次的噪音过滤值为2, 以10%为最小阈值进行聚类, 相对分子质量偏差设为0.3%后, 结合早期食管癌, 中晚期食管癌以及正常人质谱图筛选差异蛋白。

1.2.4 建立模型和盲法验证: 使用筛选出的差异蛋白, 结合人工神经网络(artificial neural network, ANN)软件-人工神经网络Office插件2.01(Youngfan开发)版本。早期食管癌和健康对照组建的早期诊断模型采用早期食管癌33例, 健康对照组35例建立模型, 剩下未参与建模(24例早期食管癌和46例健康对照)的样本作为验证组。分期诊断模型使用早期食管癌33例和中晚期食管癌24例建立模型。早期诊断模型输入层、隐含层、输出层的节点分别设置5、3、1, 以筛选的差异蛋白峰强度作为输入节点, 设定训练组食管癌患者的目标输出值为1, 正常对照的目标输出值为0, 训练次数为1 000, 学习率为0.02(此时网络误差基本恒定且最小), 采用反向传播(back-propagation)算法, 建立并存储人工神经网络诊断模型。盲法验证: 利用双盲方法, 将验证组中食管癌和健康对照血清蛋白标志物质谱数据输入模型进行模拟仿真计算。根据建模时尤登指数最好时设定cut-off值, 通过模拟计算的结果, 对模型的预测诊断效能进行评价。分期诊断模型输入层、隐含层、输出层的节点分别设置3、3、1, 以筛选的差异蛋白峰强度作为输入节点, 设定训练组中晚期食管癌患者的目标输出值为1, 早期食管癌的目标输出值为0, 训练

表 2 早期食管癌、中晚期食管癌差异蛋白 (mean ± SD)

差异蛋白 (m/z)	峰强度		t/检验	
	早期食管癌	中晚期食管癌	t值	P值
4473	7.7 ± 4.98	11.57 ± 8.50	2.158	0.035
5334	23.86 ± 12.64	33.40 ± 15.55	2.554	0.013
5890	10.28 ± 8.11	17.18 ± 14.70	2.260	0.028

次数为1 000, 学习率为0.02, 建立并存储ANN诊断模型。并将建模组数据回纳入所建模型, 根据仿真计算值计算模型的诊断效能。

1.2.5 差异蛋白统计学处理和诊断模型诊断效能评估: 使用SPSS11.5软件对早期、中晚期食管癌和健康对照所筛选差异蛋白强度分别进行方差分析; 对早期和晚期食管癌差异蛋白单独进行t检验, 分析其差异有无显著性。两个诊断模型中各个差异蛋白的独立诊断价值使用SPSS进行分析, 以尤登指数最高时确定诊断阈值, 并计算此时的灵敏度和特异度。对两个模型的ANN预测值与各个差异蛋白强度同时输入SPSS软件绘制ROC曲线图, 计算并比较曲线下面积大小。最后对ANN软件联合各个差异蛋白后的预测诊断效能和各个差异蛋白单独诊断食管癌的价值进行分析。

2 结果

2.1 差异蛋白的检出 早期食管癌例, 中晚期食管癌和正常人, 在相对分子质量2 000-20 000 Da共检测到有统计学差异的56个($P < 0.05$)。筛选出5个差异蛋白分别是4 473、4 633、5 006、5 343、5 926(表1), 3组中各个差异蛋白表达。其变化均是在食管癌中增高, 中晚期食管癌较早期食管癌更高(图1)。

单独分析早期食管癌和中晚期食管癌质谱图发现了3个显著差异($P < 0.001$)差异蛋白, 分别是4 473、5 334、5 890。3个差异蛋白强度情况。均是中晚期食管癌患者明显增高(表2), 这3个蛋白建立的分期诊断模型能够很好地区分早期和中晚期食管癌患者。

2.2 各差异蛋白在各组中的诊断价值及其ROC曲线图 早期和分期诊断模型中各个差异蛋白的诊断价值如下(表3, 表4), 早期诊断模型中ANN预测值和质荷比为5 006、5 926、5 343、4 633、4 473的ROC曲线(图2A)下面积分别为0.958、0.88、0.848、0.758、0.725、0.716。分期诊断模型中ANN预测值和质荷比为5 334、

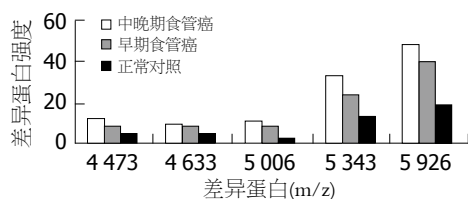


图 1 3组中各个差异蛋白表达情况。

表 3 早期诊断模型中各个差异蛋白的诊断价值

差异蛋白m/z	诊断阈值	灵敏度(%)	特异度(%)
4 473	6.45	64.71	80.00
4 633	5.43	73.53	77.14
5 006	4.86	82.35	91.43
5 343	22.70	61.76	91.43
5 926	30.99	79.41	82.86

表 4 分期诊断模型中各个差异蛋白的诊断价值

差异蛋白m/z	诊断阈值	灵敏度(%)	特异度(%)
4 473	10.04	81.82	54.17
5 334	33.12	81.82	54.17
5 890	11.65	72.73	66.67

5 890、4 473的ROC曲线(图2B)面积分别为0.774、0.678、0.670、0.657。

2.3 诊断模型 使用5个差异蛋白建立早期食管癌和正常人的诊断模型。该模型的灵敏度87.88%，特异度91.43%，准确度89.71%，使用未参与建模的病例盲法验证结果为灵敏度95.83%，特异度89.13%，准确度91.43%。使用3个在早期和中晚期食管癌的差异蛋白建立的区别食管癌病理分期模型的诊断效率是：灵敏度75.76%，特异度79.17%，准确度77.19%。

3 讨论

食管癌已成为我国危害人们健康的常见肿瘤，目前临床就诊的手术患者中多数为Ⅱ、Ⅲ期患者，占90%以上，但目前Ⅱ、Ⅲ食管癌5年生存率在20%-36%^[1]。目前张合林等^[2]发现淋巴结转移已成为食管癌预后的重要因素，王永岗^[3]研究发现淋巴结转移者的5年生存率为16.4%，明显低于无淋巴结转移者的51.9%，且ⅡB期患者的5年生存率和Ⅲ期患者相近。故本研究据淋巴结转移的与否将食管癌分为早期食管癌(0、Ⅰ、ⅡA期)、中晚期食管癌(ⅡB、Ⅲ、Ⅳ期)，以便于更好地分析食管癌癌变过程中蛋白变化情况，

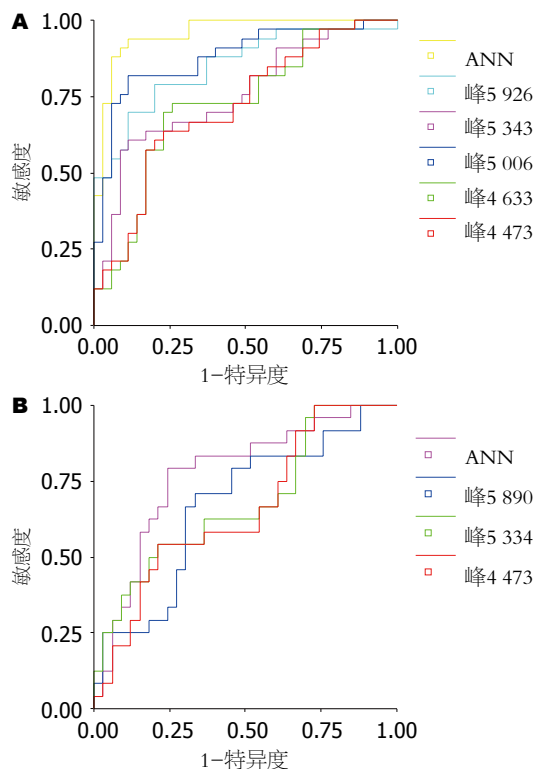


图 2 各个差异蛋白强度以及ANN预测值的ROC曲线。A: 早期诊断模型; B: 分期诊断模型。

探索食管癌癌变机制。

本项研究筛选出食管癌低相对分子质量差异蛋白质共计56个($P<0.05$), 其中表达明显差异($P<0.001$)的有5个, 他们对于食管癌的诊断价值大小依次为: 5 006 Da>5 926 Da>5 343 Da>4 633 Da>4 473 Da, 其灵敏度在64.71%-82.35%, 特异性为77.17%-91.43%。而在分期诊断模型中, 3个差异蛋白的诊断价值大小分别为5 334 Da>5 890 Da>4 473 Da, 其灵敏度为72.73%-81.82%, 特异度在54.17%-66.67%。陈建平等^[4]研究食管癌患者和正常人血清发现, 差异蛋白强度在正常人中均高于食管癌, 而本研究与王英等^[5], 王立东等^[6], 刘茶珍等^[7], 施民新等^[8], Xu等^[9], 亦不全相同。各个研究所筛选差异蛋白和建立模型的诊断效果不同, 这可能与多种因素有关。(1)病例选择: 如王士杰等^[10]只选择了高发区病例; 有的学者只选用食管鳞癌或腺癌^[11], 有的两者兼有。(2)芯片种类: WCX2芯片主要和蛋白质表面的正电荷基团相互作用(如赖氨酸, 精氨酸, 组氨酸)而捕获蛋白质; IMAC3芯片可以螯合金属离子(Cu^{2+} , Ni^{2+} , Ca^{2+})等, 通过色氨酸, 半胱氨酸及磷酸化氨基酸等与血清中蛋白质相结合以检查磷酸化蛋白质或生物标志分子; 而本研究所用金芯片是在将样品经过适当处理后直接点样干燥

■创新盘点

本研究建立了一种对食管癌进行早期诊断和分期诊断的模型, 并具有较高的诊断效能, 可以在大样本验证后用于临床辅助诊断。

■应用要点

差异蛋白筛选结合蛋白组学数据库鉴定为探索食管癌的发病机制提出新的方法;建立诊断模型为SELDI技术用于食管癌的临床诊断提供参考数据。

后检测。(3)数据挖掘软件. ANN是一种大规模并行非线性处理系统,具有良好的抗干扰能力,适应性、自学习能力,在数据挖掘方面较决策树和支持向量机有其独特的优势. ANN联合分析差异蛋白质组,建立的早期诊断模型和分期诊断模型明显提高了诊断效率,ROC曲线下面积为0.958和0.774,较单个差异蛋白的诊断价值明显增高,提示ANN具有综合能力及提高多项试验联合诊断的潜力. ANN联合SELDI技术筛选差异蛋白诊断疾病模型有其显著的优势,余捷凯等^[12]用于卵巢癌,姜伟等^[13]用于精神分裂症都取得了很好的诊断效果。

食管癌患者明显表达增高的5个差异蛋白质组与疾病发展阶段呈现正相关的现象,在肿瘤晚期其表达强度增高明显. 因所选差异蛋白均带一个电荷,所以其质核比就代表了其相对分子质量. 经Swiss-Prot蛋白质数据库初步检索,4 633 Da的蛋白质可能为一种等电点PI: 9.05,相对分子质量为4 632的蛋白质-单链DNA结合蛋白(single-stranded DNA-binding protein MSSP-1). 其可能作用于原癌基因的上游区局部,与DNA复制相关. 相对分子质量为5334的蛋白可能为 β -防御素134(beta-defensin 134),相对分子质量5 324 Da, PI: 6.73. 防御素是一类相对分子质量在4 000 Da左右的阳离子抗菌肽,普遍分布于哺乳动物、昆虫及植物体内,而人防御素属于抗菌肽家族防御素类,是人体免疫系统的重要组成部分,为4 000-6 000 Da的阳离子短肽,是人体内源性免疫系统的重要组成部分. β -防御素(HBD3)在成年人心脏,骨骼肌,胸腺,食管、口腔黏膜等中均有表达^[14]. 然而迄今为止 β -防御素家族的基因发现的不多,功能也不很清楚,故其在食管癌的发生和进展中是否有作用以及作用如何尚需进一步研究. 其他几个相对分子质量没有在此数据库中发现相关蛋白。

在分期诊断模型中各个差异蛋白在食管癌中晚期的表达强度较早期食管癌高,且差异有显著性. 差异蛋白之一5 890查阅数据库鉴定为纤维蛋白原 α 链(fibrinogen alpha chain frag). 目前发现血浆中纤维蛋白原增高与多种肿瘤的发生、发展、转移和预后相关^[15,16]. 而纤维蛋白原 α 链表达强度增高是否与血浆中纤维蛋白原含量相关目前还有待进一步研究. 差异蛋白4 473鉴定为抗凝血酶III(antithrombin-III). 抗凝血酶III是一种球蛋白,在肝脏内合成,Allard等^[17]发现其与脑卒中关系密切. 目前大多文献报道

在肿瘤患者血中抗凝血酶III浓度较健康正常人低,可能是由于癌肿中有凝血活酶物质释放到血流中促进凝血过程,从而使其浓度下降. 本研究筛选出差异蛋白虽然较健康对照高,但是其强度仍较大多数差异蛋白低. 本研究其他几个差异蛋白未在蛋白组学数据库中找到人类相对应的蛋白,可能是未被人们发现的新蛋白. 分期诊断模型在经过大样本验证可行后,就可以在食管癌患者术前就可以明确其是否属于中晚期食管癌,对手术方式的选择和术前治疗药物的选择方面有重大的意义. 在蛋白组学技术结合实验数据库的应用方面,蔡建等^[18]利用<http://www.dbmi.pitt.edu/EPO-KB/Query.jsp>软件鉴定了结直肠癌标志物血小板因子4,并通过ELISA验证. 因此通过SELDI技术筛选差异蛋白并经数据库鉴定具有较好的准确性和较大的可行性. 本研究采用高通量高灵敏度的SELDI检测技术,从食管癌在发生发展过程中蛋白质代谢的细微变化探索疾病过程的内在联系,建立早期和分期诊断模型,进而寻找一种能够在食管癌早期就能够较好诊断和在食管癌术前就能够明确进行分期诊断的新方法. 这可能为肿瘤的诊断和防治以及发病机制的探索找到一种新的方法. 鉴于淋巴结转移将显著影响患者的预后,而如果能够在患者手术治疗前发现患者存在淋巴结转移,则可预先进行淋巴结清扫等处理提高患者的术后生存率. 因此我们下一步将扩大样本量,多中心,更长时间的重复验证早期和分期诊断模型的诊断效果,并将结合最新食管癌分期UICC(2009年)进一步分析差异蛋白是否随转移的淋巴结数目增多而变化并且鉴定其相关蛋白. 更大样本的双盲验证和完善的诊断模型,促使其早日用于临床。

4 参考文献

- 1 Lowy AM, Firdaus I, Roychowdhury D, Redmond K, Howington JA, Sussman JJ, Safa M, Ahmad SA, Reed MF, Rose P, James L, Jazieh AR. A phase II study of sequential neoadjuvant gemcitabine and paclitaxel, radiation therapy with cisplatin and 5-fluorouracil and surgery in locally advanced esophageal carcinoma. *Am J Clin Oncol* 2006; 29: 555-561
- 2 张合林, 平育敏, 杜喜群, 白世祥, 何清波. 应用COX模型分析影响食管癌切除术后预后因素. *中华肿瘤杂志* 1999; 21: 32-34
- 3 王永岗, 汪良骏, 张庆斌, 刘向阳, 张汝刚, 张大为. 影响食管癌手术治疗患者预后的病理因素分析. *实用癌症杂志* 2001; 16: 516-520
- 4 陈建平, 高春芳, 王秀丽, 李东晖. 应用SELDI-TOF-MS技术分析食管鳞癌手术前后血清蛋白的差异. *安*

- 徽医药 2008; 12: 510-511
- 5 王英, 张自森, 刘芳, 毛友生, 张金生, 张德超, 邓碧萍, 马龙华, 许洋, 赵晓航. 食管鳞癌血清WCX2蛋白芯片诊断模型的研究. 中华检验医学杂志 2004; 27: 634-637
- 6 王立东, 王道存, 郑树, 范宗民, 李吉林, 冯常伟, 张延瑞, 刘宾, 高珊珊, 何欣, 冯笑山. 河南林州食管癌高发区食管癌和癌前病变患者血清蛋白质谱. 癌症 2006; 25: 549-554
- 7 刘茶珍, 朱佩云, 施民新, 刘继斌, 廖萍, 项翠琴, 张一心, 王文静. 应用IMAC3蛋白芯片分析食管鳞癌血清蛋白质谱的变化. 癌症 2008; 27: 272-278
- 8 施民新, 刘茶珍, 刘继斌, 强福林, 朱佩云, 廖萍, 王文静, 张一心, 杨磊. 应用SELDI-TOF-MS技术分析南通地区食管癌血清差异表达蛋白. 现代肿瘤医学 2006; 14: 1360-1361
- 9 Xu SY, Liu Z, Ma WJ, Sheyhidin I, Zheng ST, Lu XM. New potential biomarkers in the diagnosis of esophageal squamous cell carcinoma. *Biomarkers* 2009; 14: 340-346
- 10 王士杰, 张立玮, 于卫芳, 余捷凯, 郑树, 李英赛, 尔丽绵, 温登瑰, 高金宏, 徐志彬. 高发区筛查人群食管鳞癌血清蛋白指纹图谱诊断模型的建立及临床价值. 中华肿瘤杂志 2007; 29: 441-443
- 11 Hammoud ZT, Dobrolecki L, Kesler KA, Rahmani E, Rieger K, Malkas LH, Hickey RJ. Diagnosis of esophageal adenocarcinoma by serum proteomic pattern. *Ann Thorac Surg* 2007; 84: 384-392; discussion 392
- 12 余捷凯, 郑树, 唐勇, 李力, 胡跃, 刘建. 血清蛋白质谱与人工神经网络模型诊断卵巢癌的应用性研究. 中华检验医学杂志 2005; 28: 480-482
- 13 姜伟, 王开正, 白克镇, 邓剑, 蔡美珠. 精神分裂症患者血清蛋白标志物的临床应用研究. 中国神经精神疾病杂志 2008; 34: 27-30
- 14 Jia HP, Schutte BC, Schudy A, Linzmeier R, Guthmiller JM, Johnson GK, Tack BF, Mitros JP, Rosenthal A, Ganz T, McCray PB Jr. Discovery of new human beta-defensins using a genomics-based approach. *Gene* 2001; 263: 211-218
- 15 Yamashita H, Kitayama J, Nagawa H. Hyperfibrinogenemia is a useful predictor for lymphatic metastasis in human gastric cancer. *Jpn J Clin Oncol* 2005; 35: 595-600
- 16 Takeuchi H, Ikeuchi S, Kitagawa Y, Shimada A, Oishi T, Isobe Y, Kubochi K, Kitajima M, Matsumoto S. Pretreatment plasma fibrinogen level correlates with tumor progression and metastasis in patients with squamous cell carcinoma of the esophagus. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22: 2222-2227
- 17 Allard L, Lescuyer P, Burgess J, Leung KY, Ward M, Walter N, Burkhard PR, Corthals G, Hochstrasser DF, Sanchez JC. ApoC-I and ApoC-III as potential plasmatic markers to distinguish between ischemic and hemorrhagic stroke. *Proteomics* 2004; 4: 2242-2251
- 18 蔡建, 高春芳, 范乃军, 盛新华, 赵光, 王秀丽. SELDI-TOF-MS联合蛋白质组学实验数据库对结直肠癌血清标志物的鉴定. 世界华人消化杂志 2009; 17: 2854-2858

■同行评价

本文整体设计尚合理, 结果可靠, 为食管癌发病机制的研究奠定基础, 具有一定的临床参考价值。

编辑 曹丽鸥 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

2009年《世界华人消化杂志》编委审稿总结

本刊讯 《世界华人消化杂志》(*World Chinese Journal of Digestology*, *WCJD*)编辑委员会共计400人, 全部为副教授及副主任医师以上。WCJD编委会审稿费结算工作于每年01-05开始。本次统计为2008-01-01/2009-12-31编委审稿费用, 共计40 850, 数据以稿件审回日期为准。WCJD共计审稿1 418篇, 其中送审专家377位, 共计送审次数2 094次, 成功审回次数1 634, 成功率78.03%。其中审稿次数排前三位的为: 西安交通大学医学院第二附属医院感染科党双锁教授和福建医科大学附属协和医院消化内科王小众教授并列第一位, 各17篇; 南京医科大学附属南京第一医院肿瘤中心曹秀峰教授第二位, 16篇; 中国医科大学附属第一医院消化内科王炳元教授和苏州大学附属第一医院消化科陈卫昌教授并列第三位, 各15篇。

WCJD编辑部感谢各位编委2009年对WCJD工作的支持, 同时希望各位编委更加积极主动的配合我们今后的工作。审稿费已经通过邮局汇款, 如有审稿费未收到或者审稿稿件有误差, 请各位编委与编辑部联系, 联系电话: 010-85381892, 联系人: 李军亮。(编辑部主任: 李军亮 2010-04-20)

P27蛋白和PCNA在肝门部胆管癌中的表达及临床意义

李铸, 周宁新, 张德林, 吕雅莉

■背景资料

肝门部胆管癌是肝外胆管癌的主要类型, 占肝外胆管癌的58%-75%, 由于所处位置隐秘, 以往多在尸检中发现。近年来随着影像诊断学技术的发展, 其发病率似有上升的趋势。

李铸, 贵阳医学院附属医院肝胆外科 贵州省贵阳市 550004
周宁新, 中国人民解放军第二炮兵总医院肝胆胃肠病研究所 北京市 100088

张德林, 贵州省人民医院肝胆外科 贵州省贵阳市 550002

吕雅莉, 中国人民解放军总医院病理科 北京市 100853

作者贡献分布: 李铸为本课题的设计者和完成者; 周宁新指导该课题的设计和论文完成; 张德林协助实验操作; 吕雅莉提供标本收集。

通讯作者: 李铸, 主治医师, 550004, 贵州省贵阳市, 贵阳医学院附属医院肝胆外科。wind-xiaozhu@163.com

电话: 0851-6773015

收稿日期: 2010-05-13 修回日期: 2010-07-06

接受日期: 2010-07-12 在线出版日期: 2010-08-18

Clinical significance of P27 and PCNA expression in hilar cholangiocarcinoma

Zhu Li, Ning-Xin Zhou, De-Lin Zhang, Ya-Li Lv

Zhu Li, Department of Hepatobiliary Surgery, the Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou Province, China

Ning-Xin Zhou, Institute of Hepatobiliary and Gastrointestinal Surgery, General Hospital of the Second Artillery Corps of Chinese PLA, Beijing 100088, China

De-Lin Zhang, Department of Hepatobiliary Surgery, Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang 550002, Guizhou Province, China

Ya-Li Lv, Department of Pathology, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China

Correspondence to: Zhu Li, Department of Hepatobiliary Surgery, the Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou Province, China. wind-xiaozhu@163.com

Received: 2010-05-13 Revised: 2010-07-06

Accepted: 2010-07-12 Published online: 2010-08-18

Abstract

AIM: To analyze the clinical significance of P27 and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression in hilar cholangiocarcinoma.

METHODS: The expression of P27 and PCNA was detected by immunohistochemistry in 44 hilar cholangiocarcinoma specimens and 8 normal bile duct tissue specimens.

RESULTS: The positive rates of P27 and PCNA expression in hilar cholangiocarcinoma were 77.2% and 100%, respectively. P27 expression had a significant correlation with histological grade, lymph node metastasis and perineural

invasion. PCNA expression was associated with histological grade, lymph node metastasis and vascular invasion. The survival of patients with low or absent P27 expression was significantly lower than that of patients with high P27 expression. PCNA expression in grade III and IV cancer was associated with poor survival when compared with that in grade II cancer.

CONCLUSION: P27 and PCNA expression is associated with the development and progression of hilar cholangiocarcinoma and can be used as prognostic markers for the disease.

Key Words: Hilar cholangiocarcinoma; P27; Proliferating cell nuclear antigen; Immunohistochemistry

Li Z, Zhou NX, Zhang DL, Lv YL. Clinical significance of P27 and PCNA expression in hilar cholangiocarcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(23): 2478-2482

摘要

目的: 探讨P27蛋白和增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)在肝门部胆管癌的表达及临床意义。

方法: 免疫组织化学方法测定44例肝门部胆管癌中P27蛋白与PCNA的表达情况, 并与8例正常胆管组织进行对照分析。

结果: 肝门部胆管癌P27表达的阳性率为77.2%(34/44), PCNA为100%(44/44)。P27的表达与肿瘤的分化、淋巴转移及神经浸润显著相关($P<0.05$), 与年龄、性别、肿瘤浸润深度、肿瘤分型、血管转移、临床分期等无显著相关。而PCNA的阳性表达与肿瘤的分化、淋巴转移及血管转移显著相关, 与年龄、性别、肿瘤浸润深度、肿瘤类型、神经浸润及临床分期等无显著相关。P27蛋白与PCNA之间呈负相关关系。P27低表达组与缺失组的生存曲线明显低于高表达组生存曲线。而PCNA II级患者预后较其他预后要好, IV级预后最差。

结论: 肝门部胆管癌中P27联合PCNA的检测对判断肿瘤的恶性程度、预测转移趋势及示预后均有重要意义。

■同行评议者

陈进宏, 副主任医师, 复旦大学附属华山医院外科

关键词: 肝门部胆管癌; P27蛋白; 增殖细胞核抗原; 免疫组织化学

李铸, 周宁新, 张德林, 吕雅莉. P27蛋白和PCNA在肝门部胆管癌中的表达及临床意义. 世界华人消化杂志 2010; 18(23): 2478-2482
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2478.asp>

0 引言

肝门部胆管癌是肝外胆管癌的主要类型, 占肝外胆管癌的58%-75%, 由于所处位置隐秘, 以往多在尸检发现. 近年来随着影像诊断学技术的发展, 其发病率似有增多的趋势^[1]. 本试验通过对44例肝门部胆管癌中P27蛋白与增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)的表达研究, 探讨其生物学意义和临床意义. 现报道如下.

1 材料和方法

1.1 材料 选取中国人民解放军总医院1996-2000年经手术切除、术前未行放化疗、有明确病理结果及详细随访资料的肝门部胆管癌标本44例, 用中性甲醛固定, 常规石蜡包埋. 其中男29例, 女15例, 年龄17-73(平均53)岁. 按临床分期, I-II期15例, III期0例, IV期29例, 其中IVa期27例, IVb期2例. 病理分级(39例): 高分化腺癌13例, 中分化腺癌17例, 低分化腺癌9例. 肿瘤分型: I型3例; II型19例; IIIa型9例; IIIb型6例; IV型4例; Va型0例; Vb型3例^[2]. 对照组标本选取行根治性切除的胆管癌标本的远端边缘的正常胆管组织. 鼠抗人P27蛋白单克隆抗体和鼠抗PCNA单克隆抗体均购于北京中杉金桥生物技术有限公司, 抗兔/鼠通用型免疫组织化学检测试剂盒购于上海基因有限公司.

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学染色: 采用两步法(做高温高压抗原修复), 一抗工作浓度P27为1:20, PCNA为1:125. 用正常扁桃体组织(由北京中杉金桥生物技术有限公司提供)作为阳性对照, 用PBS代替一抗做阴性对照.

1.2.2 结果判断标准: P27蛋白结果判断标准^[3]: 以细胞核或胞核伴胞质内出现棕黄色颗粒为阳性结果, 每张切片选5个高倍视野进行细胞计数, 按阳性细胞数占同类细胞的百分比. P27的表达分为高表达组: 阳性细胞 $\geq 50\%$; 低表达组: 阳性细胞 $< 50\%$; 及阴性表达组: 无阳性细胞染色. PCNA结果判断标准: 选择细胞染色最明显高

倍视野处, 计算PCNA标记指数(PCNA labelling index, PCNA LI) = 阳性细胞/总计算的细胞数 $\times 100\%$. 一般计算200个胆管上皮细胞, 只要细胞核呈棕黄色, 不论染色强弱, 即计算为PCNA阳性细胞. 分为5级: 0级: 未见阳性细胞, I级: 阳性细胞 $\leq 25\%$; II级: 阳性细胞26%-50%; III级: 阳性细胞51%-75%; IV级: 阳性细胞 $\geq 76\%$.

统计学处理 采用四格表 χ^2 检验. 生存分析采用Kaplan-Meier法, 生存率的比较采用Log-rank检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有显著性. Kaplan-Meier曲线由Stata自动生成.

2 结果

2.1 P27蛋白与PCNA在肝门部胆管癌中的表达 P27蛋白与PCNA染色阳性细胞均为细胞核着色. P27蛋白阳性率为77.3%(34/44), 其中高表达14例(31.8%), 低表达20例(45.5%), 阴性表达10例(22.7%), 而对照组中, P27蛋白阳性率为100%(8/8), 以高表达为主; PCNA在所有的肿瘤细胞中染色均为阳性. 其中I级1例, II级12例, III级24例, IV级7例. 而对照组中PCNA阳性率为87.5%(7/8), 以低表达为主, 6例阳性表达 $< 25\%$. 对照组与肝门部胆管癌组织中的P27蛋白阳性率比较没有显著性差异, 但对照组与肝门部胆管癌组织中的PCNA阳性率差异显著.

2.2 P27蛋白和PCNA的表达与肝门部胆管癌临床病理的关系

2.2.1 P27蛋白与肝门部胆管癌临床病理的关系: P27阳性表达与肿瘤分化、神经及淋巴的转移呈显著相关($P < 0.05$). P27在高、中分化组、无神经浸润组和无淋巴转移组阳性表达率明显高于低分化组、已经发生神经浸润组及已经发生淋巴转移组. 与患者性别、年龄、肿瘤浸润深度、肿瘤分型、血管转移、临床分期等在统计学上差异无显著(表1).

2.2.2 PCNA的表达与肝门部胆管癌临床病理的关系: PCNA的阳性表达与肿瘤的分化、淋巴转移及血管转移显著相关($P < 0.01$); PCNA在中、低分化组, 淋巴结及血管转移组中的强阳性表达率明显高于高分化组, 淋巴结未转移组和血管未转移组. PCNA阳性表达与患者年龄、性别、肿瘤浸润深度、肿瘤类型、神经浸润和临床分期等在统计学上差异无显著(表1).

2.3 P27蛋白和PCNA之间的相互关系 P27蛋白和PCNA之间呈负相关关系, 相关系数为-0.5614. 二者之间呈线性关系($P = 0.0006$, 图1).

■ 相关报道

Jarnagin等发现P27的表达随胆树近端向远端延伸而呈进行性下降, 其推论P27等细胞周期蛋白的表达取决于肿瘤位置和形态.

■应用要点

PCNA是反映细胞增殖活性的指标, P27蛋白与其联合应用将有助于判断肝门部胆管癌的恶性程度及预后.

表 1 P27蛋白与PCNA和各病理参数的关系 (*n*)

临床病理参数	<i>n</i>	P27阳性			PCNA阳性				
		高	低	阴性	0级	I级	II级	III级	IV级
性别									
男	29	10	12	7	0	1	8	13	7
女	15	4	8	3	0	0	4	11	0
年龄(岁)									
<50	31	12	10	9	0	1	8	18	4
>50	13	2	10	1	0	0	4	6	3
肿瘤浸润深度									
T1+T2	17	6	9	2	0	0	6	9	2
T3	27	8	11	8	0	1	6	15	5
肿瘤分类									
I型	3	0	3	0	0	0	0	3	0
II型	19	6	9	4	0	1	6	8	4
III a型	9	6	1	2	0	0	4	5	0
III b型	6	3	1	2	0	0	1	3	2
IV型	4	0	3	1	0	0	0	3	1
V a型	0	0	0	0	0	0	0	0	0
V b型	3	1	1	1	0	0	2	1	0
肿瘤分化									
高分化	13	11	2	0 ^b	0	1	12	0	0 ^b
中分化	17	1	13	3	0	0	0	16	1
低分化	9	0	2	7	0	0	0	4	5
血管转移									
有	4	1	1	2	0	1	0	1	2 ^b
无	40	13	19	8	0	0	12	23	5
神经侵犯									
有	12	3	3	6 ^a	0	1	2	6	3
无	32	11	17	4	0	0	10	18	4
淋巴转移									
有	7	2	1	4 ^a	0	0	1	1	5 ^b
无	37	12	19	6	0	1	11	23	2
临床分期									
I-II期	15	5	8	2	0	0	5	8	2
III-IV期	29	9	12	8	0	1	7	15	6

^a*P*<0.05, ^b*P*<0.01.

2.4 P27蛋白和PCNA与生存随访的关系 P27蛋白高、低及阴性表达组的平均生存时间为84、72与65 mo. P27高、低表达及缺失表达组各组生存率经Logrank检验, 在统计学上差异不显著, 但在Kaplan-Meier曲线上, P27的高表达组生存曲线明显高于低表达组与缺失组的生存曲线(图2A). PCNA平均生存时间分别为缺失、79、74与56 mo(I级患者由于病例数少, 中位生存时间表现为缺失), 各级别患者的生存时间经Logrank检验, 在统计学上存在显著性差异(*P*<0.05), 其中II级患者预后较其他级别患者预后要好, IV级最差(图2B).

3 讨论

在肿瘤发生、发展过程中, 细胞周期调节失控是一个重要的分子事件. 作为细胞周期负性调节因子的P27, 其异常表达活性的改变会影响细胞周期进程^[4]. 进而影响细胞增殖, 其与肿瘤发生、发展密切相关. P27Kip1是由Polyak等^[5]于1994年首先克隆出来的, 他是CDKI家族成员之一, 主要作用于G₁期, 抑制cyclin/CDK复合物的活性, 阻止pRb磷酸化, 使细胞周期停滞于G₁期, 抑制细胞增殖. 近年发现, 在多种消化系肿瘤中^[4,6,7], P27Kip1蛋白的异常表达与肿瘤的进展和不良预后密切相关.

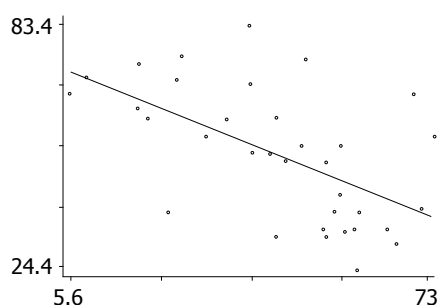


图 1 P27蛋白与PCNA之间的相互关系。

本组肝门部胆管癌病例中P27蛋白的阳性表达率为77.2%, 不同于国内刘岳兰等^[8]关于胆管癌的P27的阳性表达率为40.82%的报道. 考虑原因可能和肿瘤位置有关. Jarnagin等^[9]发现P27的表达随胆树近端向远端延伸而呈进行性下降, 其推论P27等细胞周期蛋白的表达取决于肿瘤位置和形态.

本研究发现, P27蛋白在肝门部胆管癌组织中以低表达为主. Motagnolia等^[10]认为, 一旦受到恶性增殖信号的刺激, P27的蛋白表达水平下降, 一方面由于合成降低, 更主要的是由于细胞蛋白翻译后泛素蛋白酶体降解途径的速度提高. P27蛋白水平功能的下降减低了它对CDK或cyclin/CDK复合物活性的抑制效应, 导致CDK的活化效应递增, 使细胞能够完成细胞周期G₁-S期的重要转换, 驱动细胞周期的运行, 而使细胞增殖、分裂过快、过多直至肿瘤形成. 我们推测P27蛋白在肝门部胆管癌中的低表达有可能缘于相同的机制.

本试验中, P27阳性表达与肿瘤分化、神经及淋巴的转移呈显著相关($P<0.05$). P27在高、中分化组的阳性表达率明显高于低分化组($P<0.01$). 这说明其可作为一个预示恶性程度的指标. 在肝门部胆管癌中, 神经浸润是一种特殊的重要的转移方式. 肝门处由于在解剖上神经、血管、淋巴管的紧密关系, 肿瘤可能首先浸润小血管、淋巴管, 在神经纤维周围形成“卫星”灶, 继而浸润神经周围间隙^[11]. 本试验结果显示P27蛋白在无神经浸润组和无淋巴结转移组的阳性表达率显著高于神经浸润组和淋巴结转移组($P<0.01$), 这说明P27蛋白的低表达或丢失可促进细胞外基质的降解和改变细胞间的黏附力, 促进肿瘤转移. P27各组生存率经Logrank检验, 虽然在统计学上差异无显著, 但在卡-迈二氏曲线上, P27高表达组生存曲线明显高于低表达组与缺失组的生存曲线, 且高表达组

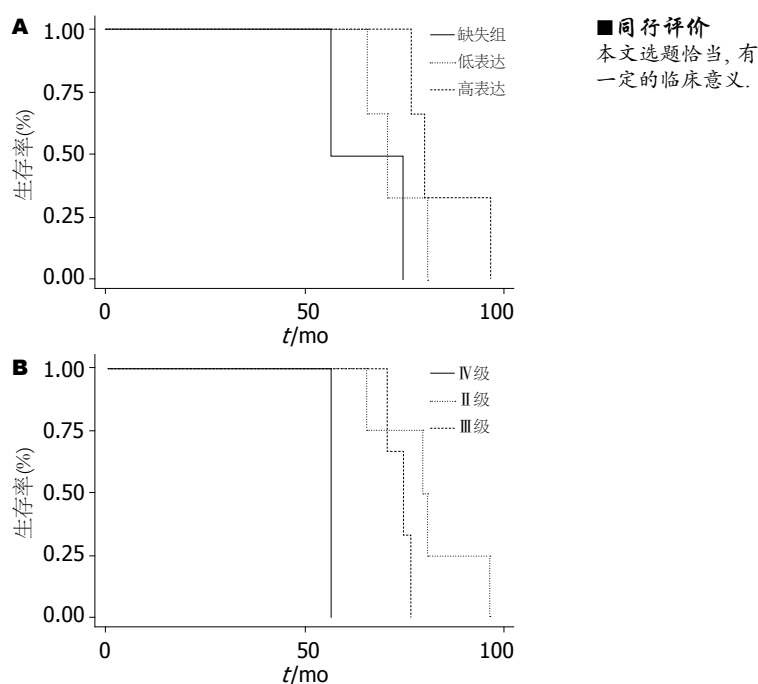


图 2 生存曲线. A: P27蛋白表达组; B: PCNA表达组.

的中位生存时间(84 mo)明显长于低表达组(72 mo)及缺失组(65 mo). 可当增加样本量时可能得到各组生存率存在差异性的结论. 这说明P27高表达组的预后要好于低表达组及缺失组. 综述以上表明肝门部胆管癌的分化程度越低, 肿瘤浸润范围越广, P27蛋白的表达就越低或缺失越高, 提示肝门部胆管癌病程演变与P27蛋白缺失有关. 这和国外报道相似^[12]. 这充分说明P27是一种抑癌基因蛋白, 在肝门部胆管癌的发生发展中起着重要作用.

PCNA是一种仅在增殖细胞中合成或表达的核内多肽, 其合成、表达与细胞周期有关. PCNA从细胞增殖周期G₁期开始在细胞核内出现, S期最为明显. 因此, 免疫组织化学方法显示PCNA表达阳性细胞是处于DNA合成期细胞, 即分裂增殖状态的细胞. PCNA在肿瘤的良恶性的划分、恶性程度的确定等方面有广泛的应用^[13]. 在本试验中PCNA在中、低分化组, 淋巴结及血管转移组中的强阳性表达率明显高于高分化组, 淋巴结未转移组和血管未转移组. 这说明PCNA表达率越高, 增殖活性愈高, 分化愈差, 发生血管浸润与淋巴转移几率就越高, 提示PCNA可客观的反映肝门部胆管癌的分化程度及恶性程度. PCNA各级别患者生存时间经Logrank检验, 在统计学上存在显著性差异($P<0.05$), 其中II级患者预后较其他级别患者预后要好, IV级最差. 这说明PCNA阳性表达越强, 恶性程度越高, 预后

越差,这和国外报道相似^[14]。

P27与PCNA的表达呈负相关关系。推断P27是抑制细胞增殖的,当其表达减弱,导致细胞周期失控,其抑制功能减弱,引起细胞恶性增殖,导致PCNA表达升高。这说明P27与PCNA在肝门部胆管癌的发生、发展过程中可能具有拮抗作用。

总之,肝门部胆管癌的发生是多因素、多阶段、进行性的过程,存在着细胞周期调控的异常与蛋白水平的变化,P27作为细胞周期抑制剂,具有多种生物学功能。P27蛋白是通过翻译和泛素蛋白酶体降解来进行调节的。P27蛋白通过影响cyclin CDK复合物活性来阻滞细胞停滞于G₁期,从而抑制细胞增殖,诱导细胞分化,促进细胞凋亡。PCNA是反映细胞增殖活性的指标。P27蛋白与其联合应用将有助于判断肝门部胆管癌的恶性程度及预后。

4 参考文献

- 1 黄志强. 黄志强胆道外科. 第1版. 济南: 山东科学技术出版社, 2000: 795-816
- 2 周宁新, 黄志强, 冯玉泉, 顾万清, 蔡守旺, 张文智, 黄晓强, 段云鹏, 王敬, 纪文斌. 肝门部胆管癌103外科治疗远期疗效的评析. 中华外科杂志 1997; 35: 649-651
- 3 Fiorentino M, Altimari A, D'Errico A, Gabusi E, Chieco P, Masetti M, Grigioni WF. Low P27 Expression is an independent predictor of survival for patients with either hilar or peripheral intrahepatic cholangiocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 3994-3999
- 4 Xuan YH, Choi YL, Shin YK, Kook MC, Chae SW, Park SM, Chae HB, Kim SH. An immunohistochemical study of the expression of cell-cycle-regulated proteins p53, cyclin D1, RB, p27, Ki67 and MSH2 in gallbladder carcinoma and its precursor lesions. *Histol Histopathol* 2005; 20: 59-66
- 5 Polyak K, Lee MH, Erdjument-Bromage H, Koff A, Roberts JM, Tempst P, Massagué J. Cloning of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell* 1994; 78: 59-66
- 6 张广建, 寇有为, 王强. 胃癌组织中P27表达与cyclin D1、cyclin E表达的相关性. 世界华人消化杂志 2007; 15: 3809-3814
- 7 Hu YX, Watanabe H, Li P, Wang Y, Ohtsubo K, Yamaguchi Y, Sawabu N. An immunohistochemical analysis of p27 expression in human pancreatic carcinomas. *Pancreas* 2000; 21: 226-230
- 8 刘岳兰, 朱卫东. P27kip1蛋白在胆管癌中的表达及其与浸润转移的关系. 中国医师杂志 2004; 6: 1693-1694
- 9 Jarnagin WR, Klimstra DS, Hezel M, Gonen M, Fong Y, Roggin K, Cymes K, DeMatteo RP, D'Angelica M, Blumgart LH, Singh B. Differential cell cycle-regulatory protein expression in biliary tract adenocarcinoma: correlation with anatomic site, pathologic variables, and clinical outcome. *J Clin Oncol* 2006; 24: 1152-1160
- 10 Montagnoli A, Fiore F, Eytan E, Carrano AC, Draetta GF, Herskho A, Pagano M. Ubiquitination of p27 is regulated by Cdk-dependent phosphorylation and trimeric complex formation. *Genes Dev* 1999; 13: 1181-1189
- 11 钩又三子. 神经束的脉管外通液路与淋巴管癌瘤的神经浸润に注目して. 脉と臓 1991; 12: 121-127
- 12 Nitti D, Belluco C, Mammano E, Marchet A, Ambrosi A, Mencarelli R, Segato P, Lise M. Low level of p27(Kip1) protein expression in gastric adenocarcinoma is associated with disease progression and poor outcome. *J Surg Oncol* 2002; 81: 167-175; discussion 175-176
- 13 沈翀, 劳山, 陈罡. 肿瘤细胞增殖标志物蛋白功能及意义的研究进展. 微创医学 2009; 4: 273-275
- 14 Russo G, Zamparelli A, Howard CM, Minimo C, Bellan C, Carillo G, Califano L, Leoncini L, Giordano A, Claudio PP. Expression of cell cycle-regulated proteins pRB2/p130, p107, E2F4, p27, and pCNA in salivary gland tumors: prognostic and diagnostic implications. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 3265-3273

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》按时完成2009年度出版任务

本刊讯 2009-12-28,《世界华人消化杂志》按时完成2009年1-36期的出版任务,出版各类文章774篇,全部经过同行专家评议。其中评论性文章158篇(20.41%),原创性文章237篇(30.62%),研究快报91篇(11.76%),临床经验253篇(32.69%),病例报告13篇(1.68%),会议纪要2篇(0.26%)。

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。

chemerin在克罗恩病患者血清中的水平及其临床意义

顾 颖, 庞 智, 皇甫照, 华 江, 周春立, 沈必武

顾颖, 庞智, 周春立, 沈必武, 江苏省苏州市立医院北区消化内科 江苏省苏州市 215008

庞智, 皇甫照, 华江, 苏州市消化系疾病与营养研究中心 江苏省苏州市 215008

作者贡献分布: 此课题由顾颖与庞智设计; 病例收集由庞智、顾颖、周春立及沈必武完成; 研究所用试剂与分析工具由顾颖、华江及皇甫照提供; 研究过程由庞智与皇甫照操作完成; 本论文写作由庞智与顾颖完成。

通讯作者: 庞智, 医学博士, 主任医师, 硕士生导师, 215008, 江苏省苏州市广济路242号, 江苏省苏州市立医院北区消化内科。pangzhi0273@sina.com

电话: 0512-62363008 传真: 0512-65332028

收稿日期: 2010-05-10 修回日期: 2010-06-29

接受日期: 2010-07-05 在线出版日期: 2010-08-18

Clinical significance of serum chemerin levels in patients with Crohn's disease

Wei Gu, Zhi Pang, Zhao Huangfu, Jiang Hua, Chun-Li Zhou, Bi-Wu Shen

Wei Gu, Zhi Pang, Chun-Li Zhou, Bi-Wu Shen, Department of Gastroenterology, Suzhou Municipal Hospital (North Area), Suzhou 215008, Jiangsu Province, China
Zhi Pang, Zhao Huangfu, Jiang Hua, Digestive Disease & Nutrition Research Center of Suzhou, Suzhou 215008, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Zhi Pang, Department of Gastroenterology, Suzhou Municipal Hospital (North Area), 242 Guangji Road, Jinchang District, Suzhou 215008, Jiangsu Province, China. pangzhi0273@sina.com

Received: 2010-05-10 Revised: 2010-06-29

Accepted: 2010-07-05 Published online: 2010-08-18

Abstract

AIM: To analyze the clinical significance of serum chemerin levels in patients with Crohn's disease (CD) by evaluating the correlation of serum chemerin with gender, age and CD activity index (CAI).

METHODS: Serum samples were collected from 50 CD patients and 50 healthy controls to determine chemerin levels by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The *t*-test was used to compare the statistic difference in serum chemerin levels between the two groups. The correlation of serum chemerin with gender, age and CAI were analyzed by the *t* test, one-way analysis of variance, and Pearson's correlation.

RESULTS: Serum chemerin level was significantly higher in CD patients than in healthy controls ($124.18 \mu\text{g/L} \pm 21.32 \mu\text{g/L}$ vs $95.38 \mu\text{g/L} \pm 11.22 \mu\text{g/L}$, $P < 0.01$). There was a significant positive correlation between serum chemerin level and CAI ($r = 0.438$, $P < 0.05$) though no correlation was noted between serum chemerin level and gender or age in CD patients (both $P > 0.05$).

CONCLUSION: These findings indicate that the potential regulatory function of chemerin in intestinal inflammation may be associated with the immunopathogenesis of CD.

Key Words: Chemerin; Crohn's disease; Enzyme-linked immunosorbent assay

Gu W, Pang Z, Huangfu Z, Hua J, Zhou CL, Shen BW. Clinical significance of serum chemerin levels in patients with Crohn's disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(23): 2483-2486

摘要

目的: 分析克罗恩病(Crohn's disease, CD)患者血清chemerin的浓度与性别、年龄和疾病活动指数的关系, 探讨chemerin在CD中的临床意义。

方法: 选取CD患者50例与健康对照者50名作为研究对象, 应用ELISA法检测两组对象血清chemerin的浓度, 采用*t*检验比较两组间统计学差异。应用*t*检验、单因素方差分析及直线相关分析比较CD患者外周血中chemerin的浓度与性别、年龄和疾病活动指数的关系。

结果: 50例CD患者外周血中chemerin的浓度与50名健康对照者血清chemerin的浓度具有明显统计学差异, CD患者外周血中chemerin的浓度显著高于健康对照者($124.18 \mu\text{g/L} \pm 21.32 \mu\text{g/L}$ vs $95.38 \mu\text{g/L} \pm 11.22 \mu\text{g/L}$, $P < 0.01$)。CD患者血清chemerin浓度与疾病活动指数间存在显著的正相关($r = 0.438$, $P < 0.05$), 而与性别和年龄间均不存在显著的相关关系($P > 0.05$)。

■背景资料

chemerin是孤独G蛋白偶联受体chemerin R的内源性配体, 在组织中分布广泛, 具有调节先天性及获得性免疫反应, 调节骨骼的发育和代谢, 维持皮肤正常生理功能等多种生物学效应。最近的研究表明chemerin是一种脂肪因子, 其表达水平与肥胖相关, 并有调节脂肪细胞的分化、脂解, 促进脂肪细胞内胰岛素信号传导途径等生物学效应。因此chemerin是一种重要的生理调节肽。

■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

■ 研发前沿

chemerin是一种新发现的脂肪因子,作为chemerin R的天然配体,具有多种生物学效应。克罗恩病是一种慢性非特异性肠道炎症状态,由脂肪细胞分泌的chemerin是否可以导致肠黏膜局部和全身的炎症反应增强,加重肠黏膜的功能障碍并对其他组织造成影响等问题尚未明确。深入研究chemerin和chemerin R系统的生物学功能,为寻找预防和治疗克罗恩病提供新的分子生物学靶点。

结论: CD患者chemerin水平明显升高,与疾病活动指数间存在显著的正相关。

关键词: Chemerin; 克罗恩病; 酶联免疫吸附试验

顾颖, 庞智, 皇甫照, 华江, 周春立, 沈必武. chemerin在克罗恩病患者血清中的水平及其临床意义. 世界华人消化杂志 2010; 18(23): 2483-2486

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2483.asp>

0 引言

炎症性肠病主要包括克罗恩病(Crohn's disease, CD)和溃疡性结肠炎,是一种慢性非特异性的胃肠道炎症性疾病^[1,2]。CD患者腹腔内脂肪积聚,肠系膜脂肪组织肥大和黏膜下脂肪沉积是该病的特征^[3,4]。chemerin可由脂肪组织释放^[5,6],但至今尚未在CD患者中进行分析。血液中chemerin的活化形式含有134个氨基酸,其前体在结构上属于杀菌肽/半胱氨酸蛋白酶抑制剂家族。chemerin通过碳末端的处理后,具有趋化白细胞的功能,其受体ChemR23(chemokine like receptor 1, CMKLR1)属于G蛋白偶联受体,主要分布在单核细胞衍生的树突状细胞和巨噬细胞膜上^[7-9]。机体在正常状态下,除周血白细胞,其他组织产生的chemerin是以其前体形式分泌到细胞外的,chemerin前体活性很低,在蛋白水解酶的作用下去除碳末端的6个氨基酸转化为chemerin,即为ChemR23的强激动剂。chemerin-ChemR23通路在炎症反应、脂肪代谢等方面都具有重要作用。ChemR23的表达由促炎症性细胞因子,TLR配体和转化生长因子- β (transforming growth factor-beta, TGF- β)进行调节,而这些因子在IBD致病机制中起着重要作用^[10-13]。

本研究通过检测CD患者和健康者血清chemerin的水平,并对chemerin与临床指标进行统计学分析,从而探讨chemerin与CD之间的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 收集2007-2010年在苏州市立医院北区消化科门诊就诊或住院的临床诊断资料完整、彼此无血缘关系的CD患者50例(诊断标准依据中华医学会消化病学分会炎症性肠病协作组制定的《中国炎症性肠病诊断治疗规范的共识意见》)^[14],其中男22例,女28例,平均年龄34.63岁 \pm 12.54岁;患者的疾病活动指数(CD activity index, CDAI)为179.25分 \pm 62.45分;平均病史7.24年 \pm 3.68年;疾病分类(维也纳分类)^[15]: A1为39例,

A2为11例, L1、L2、L3和L4分别为8、12、26和4例, B1、B2和B3分别为28、16和6例;所有患者近1 mo未使用皮质激素治疗,近3 mo未使用过免疫抑制剂,近期无明确感染病史,无严重心、肺和神经、精神疾病,并除外糖尿病及其他内分泌疾病患者,肝、肾功能损害者,服用避孕药的女性育龄患者以及创伤者等。健康对照组50例,均为门诊体检健康者,其中男24例,女26例,平均年龄35.19岁 \pm 11.61岁;CD组和健康对照组的性别构成比、年龄差异无统计学意义(均 $P>0.05$)。

1.2 方法

1.2.1 试剂与材料: 采用的人chemerin酶联免疫分析试剂盒由美国R&D Systems公司生产,chemerin抗体为小鼠抗人chemerin单克隆抗体,与人chemerin有完全交叉反应,与血浆胰岛素、瘦素、脂联素、抵抗素等肽类激素无交叉反应。

1.2.2 血清制备: 按常规采血并收集血清装于EP管中, -20°C 冻存,待测。

1.2.3 操作步骤: 严格按照试剂盒说明书进行操作应在加终止液后15 min内。以450 nm波长依次测定各孔的吸光度(A值)。用标准品的浓度与A值计算出标准曲线的直线回归方程式,将标本的A值代入方程式,计算出样品浓度,再乘以稀释倍数,即为样品的实际浓度(单位为 $\mu\text{g/L}$)。

统计学处理 采用统计软件分析(SPSS15.0 for Windows, Chicago, IL)。计量数据用mean \pm SD表示;采用 t 检验比较两组间统计学差异。应用 t 检验、单因素方差分析和直线相关分析比较CD患者外周血中chemerin的浓度与性别、年龄和疾病活动指数的关系。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组血清chemerin水平的比较 先将CD组和健康对照组的血清chemerin值经自然对数转换以符合正态分布。CD组血清chemerin水平显著地高于健康对照组($P<0.01$)。在健康对照组,女性比男性有较高的血清chemerin水平($P<0.05$);而在CD组,性别之间血清chemerin水平的差异无统计学意义($P>0.05$,表1)。

2.2 血清chemerin和临床资料间的相关性 先将血清chemerin经自然对数转换以符合正态分布。在所有观察对象中作简单直线相关分析,血浆chemerin与CDAI间存在显著的正相关关系($r=0.438, P<0.05$),而与性别和年龄间均不存在显著的相关关系($P>0.05$)。

表 1 CD组和健康对照组的血清chemerin的比较

分组	n	chemerin($\mu\text{g/L}$)	P值
CD组	50	124.18 \pm 21.32 ^b	<0.01
男	22	120.86 \pm 23.11 ^a	>0.05
女	28	126.79 \pm 20.69	
健康对照组	50	95.38 \pm 11.22	
男	24	92.27 \pm 12.34 ^c	<0.05
女	26	98.25 \pm 10.06	

^a $P>0.05$ vs CD组女; ^b $P<0.01$ vs 健康对照组; ^c $P<0.05$ vs 健康对照组女.

3 讨论

2003年, Wittamer等^[7]在卵巢癌患者腹腔积液中分离、鉴定出G蛋白偶联受体ChemR23的配体,发现该配体是一种趋化蛋白,遂将其命名为chemerin,并同时将其ChemR23称作chemerin受体(chemerin receptor, chemerin R). 在炎症早期, chemerin能够趋化携有chemerin R的未成熟树突状细胞和巨噬细胞,起着联络天然性免疫与适应性免疫的作用^[8,9]. Prochemerin(相对分子质量约为18 000 Da)是chemerin(相对分子质量约为16 000 Da)的直接前体,其生物活性较chemerin显著降低. 凝血、纤溶、炎症反应中的丝氨酸蛋白酶(因子XII a、纤溶蛋白酶、弹性蛋白酶、组织蛋白酶G等)能去除prochemerin羧基端的数个氨基酸残基而使其激活,成为具有生物活性的chemerin. 研究^[16]表明chemerin在炎症部位的血管内皮细胞高表达,从而通过chemerin与ChemR23的特异性结合使ChemR23阳性的不成熟的浆细胞样树突状细胞(plasmacytoid dendritic cells, pDC)跨过单层的血管内皮到达炎症部位,然后不成熟的pDC和巨噬细胞与微生物产物TLR或炎症因子相互作用,从而使pDC成熟^[17]. 在成熟过程中, pDC失去了吞噬能力,却获得了抗原递呈能力,将抗原递呈给T淋巴细胞^[18]. T淋巴细胞到达炎症部位杀死病原体. 在以上这一过程中chemerin的活化是限速步骤^[19]. 最近有研究^[19,20]表明在炎症中一些天然杀伤细胞也表达ChemR23,且与树突状细胞同时存在. 提示在炎症过程中, chemerin同时趋化了自然杀伤细胞到达炎症部位,自然杀伤细胞通过单独分泌细胞因子或与树突状细胞相互作用来参与免疫反应. 最近研究^[21]发现除趋化作用外,脂肪细胞可以通过自分泌作用合成并分泌chemerin到胞外,作用于脂肪细胞及其周围细胞上的

ChemR23受体,在调节脂肪细胞分化和脂肪代谢中发挥重要作用.

chemerin是一种新发现的脂肪因子,作为chemerin R的天然配体,具有多种生物学效应. 然而, chemerin的确切生理作用目前并不十分清楚. CD患者腹腔内脂肪积聚,肠系膜脂肪组织肥大和黏膜下脂肪沉积是该病的特征^[3,4], chemerin可由脂肪组织释放^[5,6],参与机体的免疫应答过程,而促炎症性因子和多种免疫细胞在CD致病机制中起着重要作用^[10-13]. 为探讨chemerin在CD发生发展中的可能作用,本研究通过酶联免疫吸附试验检测了CD患者及健康者血清chemerin水平,并与健康对照者进行了比较,同时分析了血清chemerin与其他临床指标的关系. 结果表明CD患者血清chemerin水平显著高于健康者,提示血清chemerin水平变化与患者免疫功能紊乱的发生和发展有一定的关系,患者肠黏膜组织局部的慢性炎症反应加速了中性粒细胞产生各种蛋白酶进而活化prochemerin的过程,从而使局部chemerin浓度增加,继而导致入血的chemerin增加; CD患者血清chemerin水平与CDAI间存在显著的正相关关系,似可佐证这种推测. 外周血中chemerin浓度与年龄和性别之间未发现统计学意义,可能与试验的样本量不足有关. 本试验也显示了chemerin可能具有作为CD的诊断指标的潜力. 本研究选择CD患者作为研究对象,并且严格限制存在感染、应激状态的患者入组,目的是尽可能排除引起体内chemerin水平变化的其他因素,特别是排除感染性炎症对体内活性chemerin水平的干扰,这样使得chemerin测定值能更好的反映体内的真实情况和疾病的本质特征.

总之,外周血chemerin水平的明显升高,提示其与CD有明确相关性,可能这种因子在CD的发生、发展、及转归的病理生理机制中发挥重要作用,对于chemerin的深入研究,有望为阐明和治疗该疾病提供全新的途径.

4 参考文献

- 1 Cho JH. The genetics and immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol* 2008; 8: 458-466
- 2 Comalada M, Peppelenbosch MP. Impaired innate immunity in Crohn's disease. *Trends Mol Med* 2006; 12: 397-399
- 3 Schäffler A, Schölmerich J, Büchler C. Mechanisms of disease: adipocytokines and visceral adipose tissue--emerging role in intestinal and mesenteric diseases. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2005; 2:

■相关报道

2003年, Wittamer等在卵巢癌患者腹腔积液中分离、鉴定出G蛋白偶联受体ChemR23的配体,发现该配体是一种趋化蛋白,遂将其命名为chemerin,并同时将其ChemR23称作chemerin受体.

■同行评价

本文选题准确、设计合理、数据详实、结论可靠,为相关临床研究提供了可靠的实验资料。

- 103-111
- 4 Ahualli J. The double duct sign. *Radiology* 2007; 244: 314-315
- 5 Roh SG, Song SH, Choi KC, Katoh K, Wittamer V, Parmentier M, Sasaki S. Chemerin—a new adipokine that modulates adipogenesis via its own receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 362: 1013-1018
- 6 Bozaoglu K, Bolton K, McMillan J, Zimmet P, Jowett J, Collier G, Walder K, Segal D. Chemerin is a novel adipokine associated with obesity and metabolic syndrome. *Endocrinology* 2007; 148: 4687-4694
- 7 Wittamer V, Franssen JD, Vulcano M, Mirjolet JF, Le Poul E, Migeotte I, Brézillon S, Tyldesley R, Blanpain C, Detheux M, Mantovani A, Sozzani S, Vassart G, Parmentier M, Communi D. Specific recruitment of antigen-presenting cells by chemerin, a novel processed ligand from human inflammatory fluids. *J Exp Med* 2003; 198: 977-985
- 8 Wittamer V, Bondue B, Guillaubert A, Vassart G, Parmentier M, Communi D. Neutrophil-mediated maturation of chemerin: a link between innate and adaptive immunity. *J Immunol* 2005; 175: 487-493
- 9 Zabel BA, Allen SJ, Kulig P, Allen JA, Cichy J, Handel TM, Butcher EC. Chemerin activation by serine proteases of the coagulation, fibrinolytic, and inflammatory cascades. *J Biol Chem* 2005; 280: 34661-34666
- 10 Monteleone G, Boirivant M, Pallone F, MacDonald TT. TGF-beta1 and Smad7 in the regulation of IBD. *Mucosal Immunol* 2008; 1 Suppl 1: S50-S53
- 11 Bleich A, Janus LM, Smoczek A, Westendorf AM, Strauch U, Mähler M, Hedrich HJ, Fichtner-Feigl S, Schölmerich J, Falk W, Hofmann C, Obermeier F. CpG motifs of bacterial DNA exert protective effects in mouse models of IBD by antigen-independent tolerance induction. *Gastroenterology* 2009; 136: 278-287
- 12 Zabel BA, Ohyama T, Zuniga L, Kim JY, Johnston B, Allen SJ, Guido DG, Handel TM, Butcher EC. Chemokine-like receptor 1 expression by macrophages in vivo: regulation by TGF-beta and TLR ligands. *Exp Hematol* 2006; 34: 1106-1114
- 13 Brown SJ, Mayer L. The immune response in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2007; 102: 2058-2069
- 14 中华医学会消化病学分会炎症性肠病协作组. 中国炎症性肠病诊断治疗规范的共识意见. *中华内科杂志* 2008; 47: 73-79
- 15 Gasche C, Scholmerich J, Brynskov J, D'Haens G, Hanauer SB, Irvine EJ, Jewell DP, Rachmilewitz D, Sachar DB, Sandborn WJ, Sutherland LR. A simple classification of Crohn's disease: report of the Working Party for the World Congresses of Gastroenterology, Vienna 1998. *Inflamm Bowel Dis* 2000; 6: 8-15
- 16 Colonna M, Trinchieri G, Liu YJ. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat Immunol* 2004; 5: 1219-1226
- 17 Vermi W, Riboldi E, Wittamer V, Gentili F, Luini W, Marrelli S, Vecchi A, Franssen JD, Communi D, Massardi L, Sironi M, Mantovani A, Parmentier M, Facchetti F, Sozzani S. Role of ChemR23 in directing the migration of myeloid and plasmacytoid dendritic cells to lymphoid organs and inflamed skin. *J Exp Med* 2005; 201: 509-515
- 18 Gilliet M, Liu YJ. Generation of human CD8 T regulatory cells by CD40 ligand-activated plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* 2002; 195: 695-704
- 19 Moretta A, Marcenaro E, Parolini S, Ferlazzo G, Moretta L. NK cells at the interface between innate and adaptive immunity. *Cell Death Differ* 2008; 15: 226-233
- 20 Goralski KB, McCarthy TC, Hanniman EA, Zabel BA, Butcher EC, Parlee SD, Muruganandan S, Sinal CJ. Chemerin, a novel adipokine that regulates adipogenesis and adipocyte metabolism. *J Biol Chem* 2007; 282: 28175-28188
- 21 Mårtensson UE, Fenyö EM, Olde B, Owman C. Characterization of the human chemerin receptor-ChemR23/CMKLR1—as co-receptor for human and simian immunodeficiency virus infection, and identification of virus-binding receptor domains. *Virology* 2006; 355: 6-17

编辑 曹丽鸥 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2010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)

术中内镜检查小肠淋巴管扩张症6例

姜国俊, 林香春, 蔺武, 沈文彬, 耿万德, 昌红, 齐然

姜国俊, 林香春, 蔺武, 北京世纪坛医院消化内科 北京市 100038

沈文彬, 耿万德, 北京世纪坛医院淋巴外科 北京市 100038
昌红, 齐然, 北京世纪坛医院病理科 北京市 100038

作者贡献分布: 姜国俊与林香春对此文所作贡献均等; 此课题由姜国俊与林香春设计; 术中内镜检查由姜国俊、林香春及蔺武操作, 由沈文彬与耿万德协助完成; 病理检查由昌红与齐然完成; 数据分析由姜国俊与林香春完成; 本论文写作由姜国俊、林香春、沈文彬及耿万德完成。

通讯作者: 姜国俊, 副主任医师, 100038, 北京市海淀区铁医路10号, 北京世纪坛医院消化内科. jiangguojun@yahoo.com.cn
电话: 010-63926370

收稿日期: 2010-04-25 修回日期: 2010-07-25

接受日期: 2010-08-03 在线出版日期: 2010-08-18

Diagnostic value of intraoperative endoscopic examination in patients with intestinal lymphangiectasia: an analysis of 6 cases

Guo-Jun Jiang, Xiang-Chun Lin, Wu Lin, Wen-Bin Shen, Wan-De Geng, Hong Chang, Ran Qi

Guo-Jun Jiang, Xiang-Chun Lin, Wu Lin, Department of Gastroenterology, Beijing Shijitan Hospital, Beijing 100038, China

Wen-Bin Shen, Wan-De Geng, Department of Lymphatic Surgery, Beijing Shijitan Hospital, Beijing 100038, China

Hong Chang, Ran Qi, Department of Pathology, Beijing Shijitan Hospital, Beijing 100038, China

Correspondence to: Guo-Jun Jiang, Department of Gastroenterology, Beijing Shijitan Hospital, 10 Tieyi Road, Haidian District, Beijing 100038, China. jiangguojun@yahoo.com.cn
Received: 2010-04-25 Revised: 2010-07-25

Accepted: 2010-08-03 Published online: 2010-08-18

Abstract

AIM: To assess the diagnostic value of intraoperative endoscopic examination in patients with intestinal lymphangiectasia (IL).

METHODS: Six patients with IL and protein-losing enteropathy underwent intraoperative endoscopic examination during the study. Intraoperative endoscopic examination was performed via an intestinal incision to locate the site of lymph fluid leakage.

RESULTS: Endoscopic findings included white fluid in the intestinal lumen, multiple scattered white spots, and white and swollen villi in all

the 6 patients, polyps in 3 patients, and mucosal erosion in 2 patients. After subserosal injection of methylene blue, the sites of lymph fluid leakage were successfully located in 5 patients (83.3%).

CONCLUSION: Endoscopic examination is a very important diagnostic test for patients with IL, especially for locating the site of lymph fluid leakage.

Key Words: Intestinal lymphangiectasia; Protein-losing enteropathy; Intraoperative endoscopy

Jiang GJ, Lin XC, Lin W, Shen WB, Geng WD, Chang H, Qi R. Diagnostic value of intraoperative endoscopic examination in patients with intestinal lymphangiectasia: an analysis of 6 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(23): 2487-2490

摘要

目的: 探讨术中内镜检查对小肠淋巴管扩张症(intestinal lymphangiectasia, IL)的诊断价值。

方法: 6例IL并蛋白丢失性肠病患者, 男3例, 女3例, 年龄15-55(平均33.5)岁, 术中经小肠切口行内镜检查以确定肠道淋巴液漏出的部位。

结果: 内镜下均可见肠腔内大量乳白色液体, 黏膜见散在的、多发的白色斑点及弥漫性绒毛肿胀、发白。伴息肉样改变3例, 伴黏膜糜烂2例。于浆膜下注射亚甲蓝后, 5例发现淋巴液漏出病灶。

结论: 内镜对IL的诊断, 尤其对确定淋巴漏出的部位有重要价值。

关键词: 小肠淋巴管扩张症; 蛋白丢失性肠病; 术中内镜

姜国俊, 林香春, 蔺武, 沈文彬, 耿万德, 昌红, 齐然. 术中内镜检查小肠淋巴管扩张症6例. *世界华人消化杂志* 2010; 18(23): 2487-2490

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2487.asp>

0 引言

小肠淋巴管扩张症(intestinal lymphangiectasia,

■背景资料

小肠淋巴管扩张症(IL)是由于各种原因引起的淋巴回流受阻, 致小肠淋巴管扩张、破裂, 淋巴液漏入肠腔或腹腔, 形成乳糜性腹泻、脂肪泻及乳糜样腹水, 从而引起低蛋白血症。IL为一罕见病, 内镜为其重要的检查与诊断方法。近年来, 随着胶囊内镜检查技术的发展, IL检出率有所提高, 但研究报告仍以零星个案报道为主。

■同行评议者

张志坚, 教授, 福州总医院消化内科

■研发前沿

目前胶囊内镜检查是研究的热点,但其费用高及不能取活检成为亟待解决的难点与重点。

IL)是引起蛋白丢失性肠病的重要原因。由于发病率低,国内外文献多为个案报道,有关的内镜学研究至今仍然稀少。本病分为原发性和继发性,两者病因有别,但在肠道的改变相同。本文探讨术中内镜检查对IL的诊断价值。

1 材料和方法

1.1 材料 对北京世纪坛医院2007-07/2009-10因IL并蛋白丢失性肠病拟行手术治疗的6例患者术中经小肠切口进行内镜检查以确定病变范围及手术方案。其中男3例,女3例。年龄15-55(平均33.5)岁。术前均综合临床、内镜、病理、淋巴管造影、核素显影等资料而确诊。

1.2 方法 术前禁食、禁水6 h。术中经小肠切口进镜,向两侧检查小肠及十二指肠,观察黏膜形态变化。其间为防止内镜造成污染,将内镜镜身置于一个由聚乙烯薄膜制成的医用无菌保护套中,由外科医生持内镜镜身进镜,由消化科医生持内镜操作部操作,共同完成内镜检查。对可疑部位位于浆膜下多点注射0.5 g/L的亚甲蓝,每点0.2-0.5 mL,观察肠黏膜面蓝色淋巴液漏出情况,以确定淋巴漏出部位。

2 结果

2.1 术中内镜 6例患者均可见肠腔内较多乳白色液体存留(图1A);黏膜见散在的、多发的白色斑点(图1B),绒毛呈弥漫性肿胀、发白(图1A, C);伴息肉样改变3例、伴有黏膜糜烂2例;于浆膜下注射亚甲蓝后,5例肠液被染为蓝色并成功发现淋巴液漏出病灶(图1A)。黏膜散在的、多发的白色斑点,直径0.2-0.4 cm,略高出黏膜面,呈粟粒状或囊泡状;弥漫性肿胀、发白的绒毛呈密集的颗粒状或珊瑚样改变。

2.2 肠道受累部位 6例均累及空肠,同时累及十二指肠(降部及其以下)4例,累及回肠2例。

2.3 术前胃镜检查 共5例术前行胃镜检查。其中4例于十二指肠降部发现本病改变,3例获活检病理证实;1例胃镜下未发现本病改变,未取活检。

2.4 病理检查 4例患者明确淋巴液漏出灶后,行小肠或十二指肠部分切除并行病理检查;1例术中发现淋巴液漏出局限,仅作局部缝扎,未再做病理学检查;1例术前、术中内镜检查及术前活检病理检查均符合本病,但术中浆膜下注射亚甲蓝后未能发现淋巴液漏出病灶,故未切除肠管,仅取切口附近肠壁组织活检。4例手术切除的肠管标本行组织学检查,结果均符合本病;1

例于小肠切口附近取肠壁组织活检,组织学检查未见本病改变。组织学表现为固有层或黏膜下淋巴管高度扩张,伴黏膜下淋巴细胞、浆细胞、嗜酸细胞浸润(图2),与内镜下表现多发的白色斑点及绒毛发白相对应。1例可见浆膜下泡沫细胞,1例合并增生性息肉。

3 讨论

IL是由于各种原因引起的淋巴回流受阻,致小肠淋巴管扩张、破裂、淋巴液漏出。因淋巴液漏入肠腔,丢失蛋白,引起不同程度的蛋白丢失性肠病。IL的发病率及各受累肠段所占比例目前尚没有统计学资料报道。本病发病不多,但危害不小,值得深入研究。IL的检查方法主要有淋巴管造影、核素显影、粪便 $\alpha 1$ 抗胰蛋白酶测定、粪便同位素标记蛋白测定及内镜检查。前5种方法因准确度、技术难度、放射性污染及费用高等因素而受限。内镜检查相对廉价、易于开展,但也有不足,对其诊断价值还须更深入、更客观的认识。

本组资料中,受累肠道主要是空肠,其次是十二指肠(降部或以下),再次是回肠。病变的这一分布特点正是内镜检查的困难所在。IL的内镜检查主要有胃镜、小肠镜、胶囊内镜和结肠镜等。胃镜达不到空肠与回肠;小肠镜无论经口还是经肛途径都难以在1次检查中完成对整个十二指肠及全部小肠的检查;胶囊胃镜虽能检查自口至肛门的整个消化道,但不能取活检;结肠镜只能达到末段回肠。我们的内镜检查在手术中进行,在外科医生协助下可以对任何肠管进行彻底的检查,结合浆膜下注射亚甲蓝,6例中有5例成功发现了淋巴漏出的部位,为外科手术提供指导。因此本方法对IL的诊断,尤其对肠道的淋巴漏出部位的确定有重要意义。

IL可有以下内镜下改变:一是散在的、多发的白色或黄白色斑点,可突起呈结节状、粟粒状及囊泡状,表面似有白膜但用水不能冲掉^[1-3];二是弥漫性绒毛肿胀、发白,可呈颗粒状、沙粒样、珊瑚样^[1,4,5];三是伴发的息肉与黏膜糜烂^[1,3];四是局灶性的白色或黄白色斑片、结节、团块或线条^[4-6]。本组资料除第四类没有出现,其他类型均有发生。本组与文献不同之处有以下两点:一是浆膜下注射亚甲蓝可发现淋巴漏出严重的部位;二是肠内均见乳白色液体。IL患者弥漫性肠绒毛肿胀、发白的组织学特征是黏膜下层与固有层淋巴管扩张及淋巴液滞留。

■相关报道

Kim等将IL在十二指肠的改变归纳为3点:一是多发的、散在的针尖状白点;二是弥漫性的绒毛增粗,顶端发白;三是局限性白色斑片与结节。他们对常规胃镜检查进行回顾性及前瞻性研究,结果表明有上述胃镜下改变,黏膜活检证实有淋巴管扩张者并不十分罕见,但多没有吸收不良的临床表现。

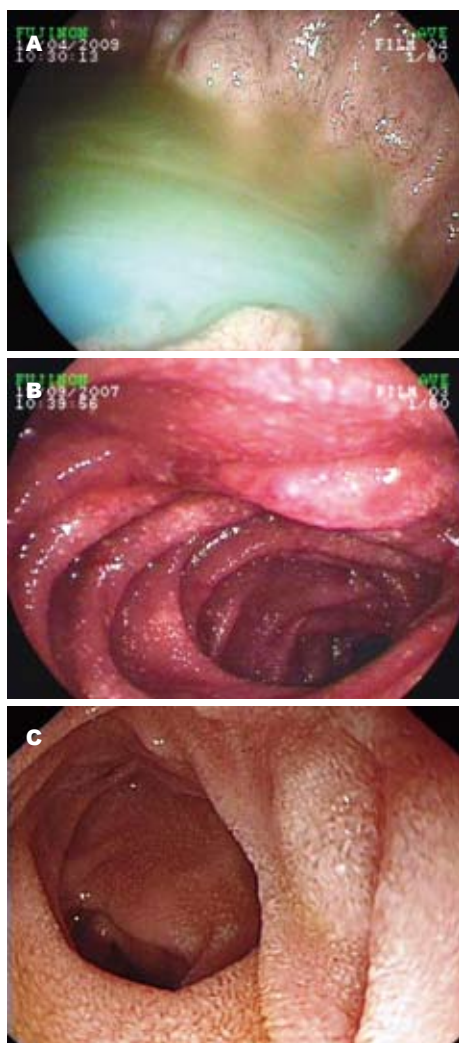


图 1 术中内镜示IL的改变: A: 黏膜绒毛肿胀、发白, 肠腔内见黄绿色肠液与乳白色淋巴漏出液, 二者混合不均, 左下方呈蓝色, 为浆膜下注射亚甲蓝后亚甲蓝随淋巴液漏入肠腔所致; B: 黏膜见散在的多发的白色斑点, 略高出黏膜面, 部分呈粟粒状或囊泡状; C: 绒毛肿胀、发白, 呈颗粒状。

散在的、多发的白色或黄白色斑点用放大内镜观察, 就是肿胀、增粗、发白的绒毛^[7]。两者组织学改变并无实质区别。有人认为白色斑点与扩张的淋巴管较为集中有关^[8]。

在文献报道的内镜资料中“散在的、多发的白色斑点”出现频率最高, 但他不是IL特有, 淋巴瘤、非特异性十二指肠炎、贾第鞭虫病等也可出现^[9]。这种改变在某些IL患者可能也是可逆的。有报道原发性IL患者在进脂肪餐后才出现这种改变^[10,11]。白色斑点在常规胃镜和小肠镜检查中可有1.9%-10.0%的检出率, 活检病理也可见黏膜下层及固有层淋巴管扩张, 但患者没有IL的临床表现, 因而缺乏实际意义^[8,12]。

肠腔内出现乳白色液体, 原因有以下两点: 一是食物的影响, 二是淋巴漏出^[13]。浆膜下注射

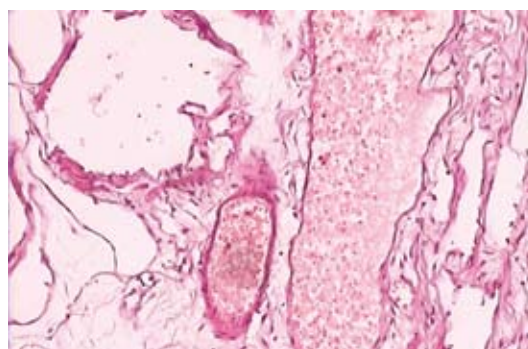


图 2 IL小肠黏膜的组织学改变: 黏膜下淋巴管高度扩张。

亚甲蓝后见亚甲蓝漏入肠腔, 是淋巴漏出的证据, 但并不见于所有IL患者。本组有1例临床有明显蛋白丢失性肠病改变, 术前及术中内镜检查、术前活检病理均符合IL, 术中肠腔内可见乳白色液体, 但浆膜下注射亚甲蓝后并没有发现亚甲蓝漏入肠腔。对这类患者浆膜下注射亚甲蓝并不能有效发现淋巴漏出的确切位置。推测其肠道淋巴漏出可能是弥漫的、多部位的、小量的、缓慢的和非显性的, 虽然每个病灶漏出不明显, 但由于病灶多, 其总量仍然可观。

息肉样改变的意义有待进一步探讨, 本组中3例有息肉样改变, 仅1例做病理检查, 结果为增生性息肉。黏膜糜烂可能与黏膜下淋巴管严重扩张、破溃有关^[3]。息肉样改变与糜烂均缺乏特异性, 因而不能作为IL的诊断依据。

病理检查对IL的诊断固然重要, 但内镜活检可能因取材部位、标本处理过程中淋巴液丢失等因素影响诊断^[8,12]。本组有1例术前胃镜活检未发现本病, 可能与此有关。本组另有1例术前临床资料、胃镜及活检都符合IL, 但手术中于切口附近所取肠组织活检却未查出淋巴管扩张。其原因可能有以下两点: 一是活检部位并不是病变最重之处; 二是标本处理过程中也可能因淋巴液丢失而影响诊断。这表明手术中活检也可能漏诊。

总之, 内镜下改变对IL的诊断有重要价值, 但必须结合病理与临床表现才有意义。术中内镜对确定淋巴漏出的确切部位并进一步确定手术范围有重要价值。

4 参考文献

- 1 杨爱明, 蔡华聪, 陆星华, 钱家鸣, 麦灿荣, 柯美云, 孙钢, 刘晓红, 方秀才. 小肠淋巴管扩张症的诊断与治疗. 临床消化病杂志 2007; 19: 80-82
- 2 戴彦成, 唐志鹏, 张亚利. 原发性小肠淋巴管扩张症1例. 现代消化及介入诊疗 2009; 14: 135-136
- 3 林香春, 吴静, 高炳霞, 沈文斌. 小肠淋巴管扩张症

■创新盘点

本研究与文献不同之处有以下3点: 一是内镜检查在手术中经小肠切口进行; 二是浆膜下注射亚甲蓝可发现淋巴漏出严重的部位; 三是肠内均见乳白色液体。

■同行评价

本文可读性较强, 有一定的科学性和创新性, 具有较强的临床意义.

- 合并病毒性肝炎2例. 世界华人消化杂志 2008; 16: 2195-2197
- 4 Chamouard P, Nehme-Schuster H, Simler JM, Finck G, Baumann R, Pasquali JL. Videocapsule endoscopy is useful for the diagnosis of intestinal lymphangiectasia. *Dig Liver Dis* 2006; 38: 699-703
- 5 Fang YH, Zhang BL, Wu JG, Chen CX. A primary intestinal lymphangiectasia patient diagnosed by capsule endoscopy and confirmed at surgery: a case report. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 2263-2265
- 6 Chen CP, Chao Y, Li CP, Lo WC, Wu CW, Tsay SH, Lee RC, Chang FY. Surgical resection of duodenal lymphangiectasia: a case report. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 2880-2882
- 7 Gonen C, Sarioglu S, Akpınar H, Simsek I. From white points to yellow plaques: magnifying endoscopic features of duodenal lymphangiectasia. *Endoscopy* 2009; 41: 655-656; author reply 657
- 8 Bellutti M, Mönkemüller K, Fry LC, Dombrowski F, Malfertheiner P. Characterization of yellow plaques found in the small bowel during double-balloon enteroscopy. *Endoscopy* 2007; 39: 1059-1063
- 9 Biyikoğlu I, Babalı A, Cakal B, Köklü S, Filik L, Astarci MH, Ustün H, Ustündağ Y, Akbal E. Do scattered white spots in the duodenum mark a specific gastrointestinal pathology? *J Dig Dis* 2009; 10: 300-304
- 10 Lee J, Kong MS. Primary intestinal lymphangiectasia diagnosed by endoscopy following the intake of a high-fat meal. *Eur J Pediatr* 2008; 167: 237-239
- 11 Veldhuyzen van Zanten SJ, Bartelsman JF, Tytgat GN. Endoscopic diagnosis of primary intestinal lymphangiectasia using a high-fat meal. *Endoscopy* 1986; 18: 108-110
- 12 Kim JH, Bak YT, Kim JS, Seol SY, Shin BK, Kim HK. Clinical significance of duodenal lymphangiectasia incidentally found during routine upper gastrointestinal endoscopy. *Endoscopy* 2009; 41: 510-515
- 13 Hauser B, Moreels T, Urbain D, Van Marck V, Pletincx M, Devreker T, Vandenplas Y. Intestinal lymphangiectasia. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2009; 48: 125

编辑 曹丽鸥 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2010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, 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位胃肠病学和肝病学专家支持的开放存取的同行评议的旬刊杂志, 旨在推广国内各地的胃肠病学和肝病领域临床实践和基础研究相结合的最具有临床意义的原创性及各类评论性的文章, 使其成为一种公众资源, 同时科学家、医生、患者和学生可以通过这样一个不受限制的平台来免费获取全文, 了解其领域的所有的关键的进展, 更重要的是这些进展会为本领域的医务工作者和研究者服务, 为他们的患者及基础研究提供进一步的帮助.

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

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

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

几种常见根治术式治疗先天性巨结肠术后远期排便功能的评价

高明太, 刘登瑞, 陈健, 赵成基, 孙学强, 李乐, 靳曙光, 强锦辉, 雷军强, 周永宁, 赵玉元

高明太, 刘登瑞, 陈健, 赵成基, 孙学强, 李乐, 靳曙光, 赵玉元, 兰州大学第一医院小儿外科 甘肃省兰州市 730000
强锦辉, 甘肃省定西市人民医院普外科 甘肃省定西市 743000

雷军强, 兰州大学第一医院放射科 甘肃省兰州市 730000

周永宁, 兰州大学第一医院消化科 甘肃省兰州市 730000

甘肃省技术与开发专项计划基金资助项目, No. 0805TCYA023

作者贡献分布: 此课题由高明太设计; 研究过程由高明太及刘登瑞操作完成; 研究所用分析工具由陈健、赵成基、孙学强、李乐、靳曙光、强锦辉、雷军强、周永宁及赵玉元提供; 数据分析由刘登瑞与高明太完成; 本论文写作由刘登瑞与高明太完成。

通讯作者: 高明太, 主任医师, 硕士生导师, 730000, 甘肃省兰州市, 兰州大学第一医院小儿外科. gaomingtai@hotmail.com

电话: 0931-8625200-6865

收稿日期: 2010-04-29 修回日期: 2010-07-10

接受日期: 2010-07-21 在线出版日期: 2010-08-18

Evaluation of long-term bowel function in patients with Hirschsprung's disease after different radical operations

Ming-Tai Gao, Deng-Rui Liu, Jian Chen, Cheng-Ji Zhao, Xue-Qiang Sun, Le Li, Shu-Guang Jin, Jin-Hui Qiang, Jun-Qiang Lei, Yong-Ning Zhou, Yu-Yuan Zhao

Ming-Tai Gao, Deng-Rui Liu, Jian Chen, Cheng-Ji Zhao, Xue-Qiang Sun, Le Li, Shu-Guang Jin, Yu-Yuan Zhao, Department of Pediatric Surgery, the First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu Province, China
Jin-Hui Qiang, Department of General Surgery, People's Hospital of Dingxi, Dingxi 743000, Gansu Province, China.
Jun-Qiang Lei, Department of Radiology, the First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu Province, China

Yong-Ning Zhou, Department of Gastroenterology, the First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu Province, China

Supported by: the Specialized Technical Research and Development Foundation of Gansu Province, No. 0805TCYA023

Correspondence to: Ming-Tai Gao, Department of Pediatric Surgery, the First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu Province, China. gaomingtai@hotmail.com

Received: 2010-04-29 Revised: 2010-07-10

Accepted: 2010-07-21 Published online: 2010-08-18

Abstract

AIM: To assess the long-term bowel function in patients with Hirschsprung's disease after different radical operations by analyzing postoperative subjective and objective indicators.

METHODS: A total of 220 children with Hirschsprung's disease who underwent modified Soave operation, improved Swenson operation or modified Duhamel operation at the First Hospital of Lanzhou University from June 1992 to April 2008 were included in this study. The bowel function in these patients at 3, 6 and 24 mo after operation was evaluated.

RESULTS: The overall incidence of long-term bowel dysfunction was lower and its appearance was earlier in children undergoing improved Soave operation than in those undergoing improved Swenson operation or modified Duhamel operation (23.8% vs 46.7%, 40.8%, all $P < 0.05$) though no significant difference was noted in the overall incidence of long-term bowel dysfunction between the latter two groups. When the resection length was less than 35 cm, the overall incidence of long-term bowel dysfunction was significantly lower in children undergoing modified Soave operation than in the other two groups of patients (both $P < 0.05$). However, when the resection length was more than 35 cm, no significant differences were noted in the overall incidence of long-term bowel dysfunction among the three groups of patients. Surgical procedure showed no correlation with anorectal manometric pressure and anal canal length measured during barium enema examination at 2 years after surgery. However, the anorectal angle at 2 years after surgery was narrower in patients undergoing modified Soave operation than in the other two groups of patients (both $P < 0.05$).

CONCLUSION: Improved Soave operation is superior to improved Swenson operation and modified Duhamel operation in improving long-term bowel function in patients with Hirschsprung's disease. The longer the length of bowel resected, the higher the incidence of bowel dysfunction.

Key Words: Hirschsprung's disease; Surgery; Long-term bowel function

■背景资料

随着医学生物模式的转变, 排便功能障碍影响着HD患儿术后远期生活质量的提高, 人们对不同术式术后远期排便功能的评价, 已日益引起临床的重视。虽然目前国内外先天性巨结肠根治术式众多, 但均不同程度的遇到便秘、污粪及术后肠炎等远期问题。

■同行评议者

施诚仁, 教授, 上海交通大学医学院附属新华医院小儿外科

■ 研发前沿

目前多以单一术式远期报道为主,不同手术方式远期排便功能的比较报道甚少,本课题对不同手术方式治疗先天性巨结肠术后远期排便功能进行随访,并进行综合评价。

Gao MT, Liu DR, Chen J, Zhao CJ, Sun XQ, Li L, Jin SG, Qiang JH, Lei JQ, Zhou YN, Zhao YY. Evaluation of long-term bowel function in patients with Hirschsprung's disease after different radical operations. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(23): 2491-2495

摘要

目的: 评估经肛门改良Soave术、改良Swenson术及改良Duhamel术治疗先天性巨结肠术后远期排便功能的有效性及其预后。

方法: 对1992-06/2008-04兰州大学第一医院经肛门改良Soave术、改良Swenson术及改良Duhamel术治疗的220例先天性巨结肠患儿术后3 mo、6 mo、2年的排便功能进行随访。对不同随访时间排便功能障碍的发生率、手术切除长度及肛门直肠测压、钡灌肠进行比较。

结果: 经肛门改良Soave术远期排便功能障碍的总发生率均低于后两者(23.8% vs 46.7%, 40.8%, 均 $P<0.05$),且发生时间均早于后两者(均 $P<0.05$),而后两者之间排便功能障碍的发生率无统计学意义;切除长度 ≤ 35 cm时经肛门改良Soave术治疗的患儿术后排便功能障碍的发生率低于后两者,差异有统计学意义(均 $P<0.05$),而后两者之间无统计学意义,切除长度 >35 cm时三者之间无统计学意义;手术方式与直肠测压结果、钡灌肠肛管长度在术后2年无相关性,但改良Soave术后2年直肠肛管角小于后两者(均 $P<0.05$)。

结论: 经肛门改良Soave术后远期排便功能的有效性高于其他两组;手术切除肠段长度越长,排便功能异常的发生率越高;耻骨直肠肌或肛门括约肌在远期排便功能控制能力方面发挥更大作用。

关键词: 先天性巨结肠病; 外科手术; 远期排便功能

高明太, 刘登瑞, 陈健, 赵成基, 孙学强, 李乐, 靳曙光, 强锦辉, 雷军强, 周永宁, 赵玉元. 几种常见根治术式治疗先天性巨结肠术后远期排便功能的评价. *世界华人消化杂志* 2010; 18(23): 2491-2495

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2491.asp>

0 引言

先天性巨结肠病(Hirschsprung's disease, HD)是以病变肠管神经节细胞缺失为特征的小儿常见胃肠道畸形之一。1948年Swenson和Bill开创了用手术治疗先天性巨结肠,之后又出现许多术式,其中被广泛采用的有4种:Swenson、Duhamel、Soave、Rehbein,随着医学生物模式

的转变,人们对不同术式术后远期排便功能的评价,已日益引起临床的重视,排便功能障碍影响着HD患儿术后远期生活质量的提高。我们随访了1992-06/2008-04兰州大学第一医院经肛门改良Soave术(84例)、改良Swenson术(60例)、改良Duhamel术(76例)的220例患儿,现报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料 入院时所有患儿均有反复便秘、腹胀等低位肠梗阻症状,体征与X线检查均表现为低位肠梗阻征,经钡剂灌肠确诊为HD。术中所见和病理结果亦均证实HD的诊断,均为常见型、短段型和长段型。220例HD患儿中,经肛门改良Soave术组84例,男72例,女12例,手术平均年龄1.5(40 d-5)岁,其中常见型64例,短段型13例,长段型7例;改良Duhamel术组76例,男65例,女11例;手术平均年龄1.9(60 d-15)岁,其中常见型57例、短段型10例、长段型9例;改良Swenson术组60例,男51例,女9例,手术平均年龄1.7(14 d-14)岁,其中常见型48例、短段型7例、长段型5例,3组患儿的年龄、临床分型比较,差异无统计学意义。

1.2 方法

1.2.1 改良Soave术: 于齿状线上约0.5-1 cm切开直肠黏膜1周,在黏膜和肌层间向上分离出直肠肌鞘,切开肌鞘,分离结扎直肠、结肠系膜血管,直到超过扩张段,在正常肠管段切断,纵行劈开直肠肌鞘后正中,将近端肠管通过直肠肌鞘拉下,在齿状线水平与切口下端用可吸收线缝合1周;改良Duhamel术: 开腹后探查结肠病变范围,切除狭窄段和巨大病变的结肠。沿直肠后壁钝性分离一隧道,达肛门内括约肌。近端结肠放入特制套筒内,将套筒插入直肠后隧道。转至会阴部手术。于肛门两侧缝线牵引,在齿状线上约1.5 cm处切开直肠后壁,将套筒顶出切口外,拖出的近端结肠后壁与肛门后壁切口远端边缘分两层缝合。沿直结肠腔内放入卵圆钳,将直肠盲端夹住并套叠翻出。将环钳后片放入拖出的肠腔内,将翻出之直肠套入环钳并沿直肠前壁将环钳前片放入,使钳环超过套叠根部上缘,以便前后片合拢时只夹住直肠前壁返折和拖出的结肠前壁。旋紧螺丝,将多余肠壁切除。转回腹部手术,缝合盆底及两侧腹膜,关闭腹腔;改良Swenson术: 病变结肠在腹腔充分分离后,经肛门翻转拖出后切除,减少腹腔污染机会;保留部分直肠前壁,使吻合口呈前高后低的椭圆形,增大吻合口直径,减少对直肠前壁的游离,以保留直肠的部分感觉功能和减少术后尿潴留和吻合口狭窄等并发症。

表 1 不同手术方式与随访时间排便功能障碍的发生率 $n(\%)$

分组	n	总发生	术后3 mo	术后6 mo	术后2年
改良Soave术组	84	20(23.8) ^a	15(17.9) ^a	6(7.14) ^a	4(4.76) ^a
改良Swenson术组	60	28(46.7)	25(41.7)	13(21.7)	11(18.3)
改良Duhamel术组	76	31(40.8)	28(36.8)	14(18.4)	10(13.2)

^a $P<0.05$ vs 改良Swenson术组和改良Duhamel术组。

表 2 不同手术方式与手术切除长度排便功能障碍的发生率

分组	≤ 35 cm			>35 cm			合计
	n	发生数	发生率(%)	n	发生数	发生率(%)	
改良Soave术组	75	14	18.7 ^a	9	6	66.7	84
改良Swenson术组	43	17	39.5	17	11	64.7	60
改良Duhamel术组	61	21	34.4	15	10	66.7	76

^a $P<0.05$ vs 改良Swenson术组和改良Duhamel术组。

1.2.2 术后随访: 在术后3 mo、6 mo、2年对所有患儿进行电话随访、信件随访和部分门诊随访。记录术后不同时间排便次数, 粪便性状, 有无便意、便秘、失禁及污粪, 是否肠炎、排便控制, 是否使用缓泻剂。复诊常规进行肛诊及钡灌肠检查, 同时进行肛门直肠测压, 记录直肠肛管抑制反射(rectoanal inhibitory reflex, RAIR)、肛管高压区长度、直肠静息压、肛管静息压等。比较3种手术方式与发育状况、在不同时间的排便情况及不同切除长度之间的关系; 同时对直肠肛管测压、钡灌肠检查结果进行比较。

根据结果将患儿分成排便正常组、失禁组、污粪组、便秘组和肠炎组。(1)失禁标准: 每周不能自我控制的排便次数 >3 次;(2)污粪标准: 无意识地排出少量粪便并污染内裤;(3)便秘标准: 每周排便次数 <3 次或排使用力时间 $>25\%$ 的排便时间^[1]。选肛管高压区长度和直肠肛管静息压差作为反映肛门内括约肌功能指标; 选直肠肛管角和肛管长度作为反映耻骨直肠肌功能指标。

本肛肠测压采用瑞典Medtronic公司生产胃肠道动力仪, 应用标准气压袖带灌注(presscuff)系统, 直肠刺激气囊采用标准气囊, 标准4通道递进式导管, MMS计算机处理分析系统。测量肛管静息压、肛门高压区长度和RAIR。

统计学处理 所有数据的统计学处理均由SPSS软件进行数据分析, 计量资料用 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示, 采用方差分析; 计数资料采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 不同手术方式与随访时间的排便功能障碍的发生率 经肛门改良Soave术式远期排便功能障碍的总发生率均低于后两者(均 $P<0.05$), 且发生时间均早于后者(均 $P<0.05$), 而后两者之间排便功能障碍发生率的差异无统计学意义(表1)。

2.2 手术方式与切除长度 切除长度 ≤ 35 cm时经肛门改良Soave术治疗的患儿术后排便功能障碍的发生率低于后两者, 差异有统计学意义($P<0.05$), 而后两者之间无统计学意义($P>0.05$), >35 cm时三者之间均无统计学意义(表2)。

2.3 手术方式与直肠肛管测压、钡灌肠 手术方式与直肠测压结果、钡灌肠肛管长度在术后2年无相关性, 改良Soave术后2年直肠肛管角小于其他两组($P<0.05$, 表3)。

3 讨论

HD自Ruys(1691年)及Hirschsprung(1886年)发现描述之后, 随后的100多年里, 人们对HD进行了深入的研究。历经了各种手术方法的探索, 包括: Swenson、Duhamel、Rehbein、Soave等, 但各家的报道结果相差甚远。因此对HD手术后远期功能的评价日益重要。目前多采用临床主观评定与客观检查即主客观相结合的方法评价其远期功能。我们采用主客观相结合的方法对兰州大学第一医院开展的改良Swenson手术、改良Duhamel手术和改良Soave手术远期排便效果进行了观察, 评价不同根治术后HD远期的排便功能。

■创新盘点

国内对先天性巨结肠手术治疗积累了大量经验并各有特点, 但对不同术式术后远期的排便功能未进行系统的随访及探索。本研究对不同手术方式治疗先天性巨结肠术后远期排便功能随访, 综合分析将直肠肛管测压技术和钡灌肠用于排便功能测定, 进行综合评价, 能更为客观地反映直肠肛管及排便控制肌群的解剖形态与功能。

■应用要点

本课题对目前常用的3种手术方式治疗先天性巨结肠术后随访,进行排便功能的综合评价,探索影响疾病术后恢复的因素,加深对术式的理解,合理选择手术方式,预防术后并发症的发生,提高远期排便功能,指导临床实践工作,都具有重要作用。

表 3 手术方式与直肠肛管测压、钡灌肠之间的关系 (mean ± SD)

分组	n	引出RAIR (n)	肛门高压区 长度(cm)	肛管静息压 (mmHg)	钡灌肠肛管 长度(cm)	直肠肛管角 (度)
改良Soave术组	84	20	2.1 ± 0.2	65.4 ± 18.0	2.3 ± 0.1	92.6 ± 10.5 ^a
改良Swenson术组	60	15	2.0 ± 0.2	52.3 ± 13.4	2.0 ± 0.2	110.2 ± 11.8
改良Duhamel术组	76	17	1.8 ± 0.4	48.9 ± 14.8	1.9 ± 0.2	106.3 ± 12.2

^aP<0.05 vs 改良Swenson术组和改良Duhamel术组。

HD根治术后肛门功能从外科解剖重建到术后功能重建需要相当长的时间。术后长期规律随访和功能重建是现代医学模式的重要内容之一。随访中我们发现,不同术式排便功能障碍术后随访时间延长而减少,且这种变化在术后6 mo以后恢复速度转为平缓,且术后2年内经肛门改良Soave术不同时期排便功能障碍的发生率均较改良Duhamel和改良Swenson术低。这可能是经肛门改良Soave术吸收以往术式的优点,摒弃其缺点,并在此基础上加以改进的结果。随访发现,经肛门手术拖出困难,部分长段型巨结肠因肠管切除不够,而强行拖出吻合造成术后并发症的发生率仍较高。因此要根据患儿的不同条件选择适宜的手术方式,对于没有腹腔镜条件的长段型、全结肠型巨结肠就不能单纯行经肛手术,可行改良Duhamel、改良Swenson术或充分游离结肠后再经肛手术可能更为适宜。

同时研究发现,不同术式在切除长度≤35 cm时,改良Soave术可能避免了开腹的并发症。盆腔的整个手术在直肠肌层部或肌层下进行,对肛门内外括约肌损伤较小等因素,使排便功能障碍的发生率明显低于改良Duhamel术和改良Swenson术,但随肠管长度增加,三者排便功能无明显差别,这与肠管切除后结肠缩短有关。因为术后重建的直肠乙状结肠的代偿时间越长,术后排便功能恢复越慢;另一方面由于拖出结肠与肛管残端吻合后导致结肠迂曲减少,结肠拉直甚至保持一定的张力,无法储存粪便;同时由于结肠牵拉致直肠肛管角开大并固定,不能随着不同的排便状态发生改变,易发生排便功能障碍。因此,切除肠管越多,排便功能障碍发生率越高。

切除内括约肌部分是改进HD手术的重要措施^[2-4]。内括约肌的处理不当与排便功能障碍有密切的关系,如果切除过多,可能产生污粪甚至失禁;切除过少,又可导致便秘复发。我们通过测量RAIR、肛管高压区、肛门静息压、钡灌肠肛管

长度、直肠肛管角来反映内括约肌的功能状态。随访结果表明手术方式与直肠测压结果在术后2年无相关性,我们发现部分排便功能障碍的患儿与客观检测结果并不完全一致,说明肛门内括约肌功能不是产生排便功能障碍唯一因素,也有报道^[5]认为结肠传输功能缓慢也可能是发生便秘的原因之一。改良Soave术肛管后壁齿状线上0.5 cm环形切开,切开黏膜及部分环肌层,以达到部分内括约肌切除,既避免了传统Soave和改良Swensen术式保留括约肌过多,引起便秘复发;又避免了改良Duhamel等术式破坏过多的括约肌,导致术后失禁。

直肠肛管角为直肠下端与肛管两者轴线向前形成的夹角,以直肠肛管角作为反映对排便控制具有重要意义。肛管长度也在某种程度上反映耻骨直肠肌环对直肠的钳闭作用,夹角越小,耻骨直肠肌环功能越好。直肠肛管角是维护肛门正常节制功能的重要生理形态,排便时此角变大,使肛管直肠拉直,以利于粪便排出。改良Soave术后2年此角明显小于其他两组,是由于手术在直肠肌层与黏膜下进行,紧贴直肠后壁操作,对耻骨直肠肌损伤小,对耻骨直肠肌环功能的影响小所致。改良Duhamel、改良Swenson术在探通直肠后隧道时可能造成致骶前神经丛的损伤,特别是耻骨直肠肌部分损伤所致。

不同根治术后治疗效果不尽相同,可能与多种因素有关,除手术方式、随访时间、病变肠段范围外,便秘、污粪的标准及术者对术式的理解,操作熟练程度等因素也影响着术后排便功能的评价。

4 参考文献

- 1 Drossman DA, Sandler RS, McKee DC, Lovitz AJ. Bowel patterns among subjects not seeking health care. Use of a questionnaire to identify a population with bowel dysfunction. *Gastroenterology* 1982; 83: 529-534
- 2 Nasr A, Langer JC. Evolution of the technique in the transanal pull-through for Hirschsprung's disease: effect on outcome. *J Pediatr Surg* 2007; 42:

- 36-39; discussion 39-40
- 3 Li AW, Zhang WT, Li FH, Cui XH, Duan XS. A new modification of transanal Soave pull-through procedure for Hirschsprung's disease. *Chin Med J (Engl)* 2006; 119: 37-42
- 4 刘朝阳, 周小渔, 肖雅玲. 经肛门 I 期根治手术治疗儿童先天性巨结肠临床疗效分析. 医学临床研究 2009; 26: 2051-2053
- 5 Baillie CT, Kenny SE, Rintala RJ, Booth JM, Lloyd DA. Long-term outcome and colonic motility after the Duhamel procedure for Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg* 1999; 34: 325-329

■同行评价
本文新颖性一般, 有一定的临床参考价值.

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

•消息•

2008 年内科学类期刊总被引频次和影响因子排序

代码	期刊名称	总被引频次			影响因子		
		数值	学科排名	离均差率	数值	学科排名	离均差率
1170	JOURNAL OF GERIATRIC CARDIOLOGY	7	41	-0.99	0.043	41	-0.92
G275	WORLD JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY	5432	1	3.71	0.792	6	0.52
G803	肝脏	586	25	-0.49	0.594	11	0.14
G938	国际呼吸杂志	645	22	-0.44	0.294	34	-0.43
G415	国际内分泌代谢杂志	663	20	-0.43	0.379	28	-0.27
G501	临床肝胆病杂志	582	27	-0.50	0.441	22	-0.15
G658	临床荟萃	1709	8	0.48	0.356	32	-0.32
G257	临床内科杂志	875	16	-0.24	0.412	24	-0.21
G855	临床消化病杂志	314	32	-0.73	0.294	34	-0.43
G261	临床心血管病杂志	836	17	-0.28	0.371	29	-0.29
G293	临床血液学杂志	408	31	-0.65	0.329	33	-0.37
G491	岭南心血管病杂志	161	39	-0.86	0.158	40	-0.70
G662	内科急危重症杂志	308	34	-0.73	0.279	36	-0.46
G523	内科理论与实践	34	40	-0.97	0.171	39	-0.67
G746	实用肝脏病杂志	312	33	-0.73	0.562	14	0.08
G190	世界华人消化杂志	2480	6	1.15	0.547	17	0.05
G800	胃肠病学	619	23	-0.46	0.621	10	0.19
G326	胃肠病学和肝病杂志	580	28	-0.50	0.415	23	-0.20
G083	心肺血管病杂志	246	37	-0.79	0.361	31	-0.31
G419	心血管病学进展	585	26	-0.49	0.410	25	-0.21
G260	心脏杂志	553	29	-0.52	0.406	26	-0.22
G610	胰腺病学	268	35	-0.77	0.366	30	-0.30
G234	中国动脉硬化杂志	934	15	-0.19	0.557	16	0.07
G267	中国实用内科杂志	2309	7	1.00	0.487	20	-0.06
G211	中国糖尿病杂志	1567	11	0.36	0.570	13	0.10
G380	中国心血管杂志	256	36	-0.78	0.225	37	-0.57
G203	中国心脏起搏与心电生理杂志	657	21	-0.43	0.562	14	0.08
G633	中国血液净化	680	19	-0.41	0.546	18	0.05
G119	中国循环杂志	694	18	-0.40	0.406	26	-0.22
G231	中华肝脏病杂志	3283	4	1.84	1.119	2	1.15
G235	中华高血压杂志	1168	14	0.01	0.730	8	0.40
G639	中华老年多器官疾病杂志	166	38	-0.86	0.207	38	-0.60
G876	中华老年心脑血管病杂志	588	24	-0.49	0.442	21	-0.15
G155	中华内分泌代谢杂志	1612	10	0.40	0.897	5	0.73
G156	中华内科杂志	3484	3	2.02	0.788	7	0.52
G161	中华肾脏病杂志	1643	9	0.42	1.068	3	1.05
G285	中华消化内镜杂志	1314	13	0.14	0.578	12	0.11
G168	中华消化杂志	2571	5	1.23	1.025	4	0.97
G892	中华心率失常学杂志	494	30	-0.57	0.657	9	0.26
G170	中华心血管病杂志	4186	2	2.63	1.375	1	1.64
G172	中华血液学杂志	1501	12	0.30	0.489	19	-0.06
	平均值	1154			0.520		

以上数据摘自2009年版《中国科技期刊引证报告》(核心版). 科学技术文献出版社, 177-178.

序贯疗法治疗幽门螺杆菌根除失败患者的疗效

杨佳丽, 赵清喜

■背景资料

彻底根除 *H.pylori* 感染可促进消化系溃疡愈合, 预防溃疡复发, 逆转 MALT 淋巴瘤病程, 对症状顽固的 *H.pylori* 相关性胃炎也有效。随着根除 *H.pylori* 治疗在临床上的广泛应用, 发现治疗失败的病例也越来越多, *H.pylori* 的耐药率逐年上升。

杨佳丽, 赵清喜, 青岛大学医学院附属医院消化内科 山东省青岛市 266003

作者贡献分布: 杨佳丽与赵清喜对此文所作贡献均等; 此课题有杨佳丽与赵清喜设计; 研究过程、数据分析由赵清喜与杨佳丽完成。论文写作由杨佳丽完成。

通讯作者: 杨佳丽, 主治医师, 266003, 山东省青岛市江苏路16号, 青岛大学医学院附属医院消化内科。

yangjiali7890523@126.com

电话: 0532-82911304

收稿日期: 2010-06-18 修回日期: 2010-07-31

接受日期: 2010-08-10 在线出版日期: 2010-08-18

Efficacy of sequential therapy in patients who failed *Helicobacter pylori* eradication treatment

Jia-Li Yang, Qing-Xi Zhao

Jia-Li Yang, Qing-Xi Zhao, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Medical College of Qingdao University, Qingdao 266003, Shandong Province, China

Correspondence to: Jia-Li Yang, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Medical College of Qingdao University, 16 Jiangsu Road, Qingdao 266003, Shandong Province, China. yangjiali7890523@126.com

Received: 2010-06-18 Revised: 2010-07-31

Accepted: 2010-08-10 Published online: 2010-08-18

Abstract

AIM: To investigate the efficacy of sequential therapy in patients who failed first-line *Helicobacter pylori* (*H.pylori*) eradication therapy.

METHODS: Patients who were diagnosed with *H.pylori* infection by rapid urease test and pathological examination and failed first-line eradication therapy were enrolled. Failure of the initial treatment is defined if the patient is positive for the ¹⁴C-urea breath test within 4 wk after the treatment. These patients were randomly divided into two groups: trial group (*n* = 30) and control group (*n* = 32). The trial group received sequential regimen, omeprazole 20 mg plus amoxicillin 1 g, twice daily for the first 5 d, followed by omeprazole 20 mg, clarithromycin 500 mg and tinidazole 500 mg, twice daily for the last 5 d; while the control group (*n* = 32) received quadruple regimen, omeprazole 20 mg plus bismuth citrate 220 mg and amoxicillin 1

g, twice daily, and levofloxacin 0.4 g once daily, for 7 d. Within 4 wk after the therapy, the ¹⁴C-urea breath test was performed to detect *H.pylori* infection status.

RESULTS: The eradication rates achieved in the trial group and control group were 82.14% versus 80.00% in the per-protocol analysis, and 76.67% versus 75.00% in the intent-to-treat analysis, respectively, with significant differences between the two groups (both *P* > 0.05).

CONCLUSION: Sequential therapy is an effective rescue regimen in patients who failed first-line *H.pylori* eradication treatment.

Key Words: Sequential therapy; *Helicobacter pylori*; Rescue therapy

Yang JL, Zhao QX. Efficacy of sequential therapy in patients who failed *Helicobacter pylori* eradication treatment. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(23): 2496-2499

摘要

目的: 探讨序贯疗法作为幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*, *H.pylori*) 补救治疗方案是否有更高的 *H.pylori* 根除率。

方法: 经胃镜检查确诊为 *H.pylori* 阳性的慢性胃炎和消化性溃疡患者, 用标准一线治疗方案进行 *H.pylori* 根除治疗, 停药 4 wk 后 ¹⁴C 尿素呼气试验仍为阳性或复查胃镜组织学检查 *H.pylori* 为阳性的患者判定为根除失败。对于初次根除失败患者随机分为两组: 治疗组 (30 例) 方案为前 5 d 给予奥美拉唑+阿莫西林, 后 5 d 给予奥美拉唑+替硝唑+克拉霉素; 对照组 (32 例) 给予奥美拉唑+枸橼酸铋钾+阿莫西林+左氧氟沙星, 连续 7 d, 比较治疗后两组患者的 *H.pylori* 根除率。

结果: 治疗组和对照组 *H.pylori* PP 根除率分别为 82.14% 和 80.00%, ITT 根除率分别为 76.67% 和 75.00%, 不具有统计学意义。

结论: 序贯疗法可作为 *H.pylori* 一线治疗根除

■同行评议者

程斌, 教授, 华中科技大学同济医学院附属同济医院消化内科

失败患者的安全、有效的补救治疗方案。

关键词: 序贯疗法; 幽门螺杆菌; 补救治疗

杨佳丽, 赵清喜. 序贯疗法治疗幽门螺杆菌根除失败患者的疗效. 世界华人消化杂志 2010; 18(23): 2496-2499
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2496.asp>

0 引言

目前已确认幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H.pylori*)感染是慢性胃炎的主要病因, 是消化性溃疡和胃黏膜相关淋巴组织(mucosa-associated lymphoid tissue, MALT)淋巴瘤的重要病因。近年来还发现*H.pylori*感染与某些胃肠道外疾病亦相关^[1]。彻底根除*H.pylori*感染可促进消化系溃疡愈合, 预防溃疡复发, 逆转MALT淋巴瘤病程, 对症状顽固的*H.pylori*相关性胃炎也有效。目前根除*H.pylori*的方案分为两类: 一类以铋剂为基础; 另一类是以质子泵抑制剂奥美拉唑为基础加两种抗生素的三联短程方案。随着根除*H.pylori*治疗在临床上的广泛应用, 发现治疗失败的病例也越来越多, *H.pylori*的耐药率逐年上升。2006年经流行病学调查表明我国*H.pylori*对抗生素的耐药率为: 甲硝唑50%-100%(平均75.6%), 克拉霉素0%-40%(平均27.6%), 阿莫西林0%-2.7%^[3]。因此根除治疗失败的病例如何进行补救治疗就成为消化科医生目前经常遇到的问题。本课题通过序贯疗法补救治疗常规根除*H.pylori*失败病例与含铋剂四联一周疗法根除*H.pylori*失败病例相对比, 观察其*H.pylori*根治率及不良反应发生率, 探讨序贯疗法是否有更高的根治率及优越性。

1 材料和方法

1.1 材料 采用随机、单盲、平行对照研究方法。选取*H.pylori*根除失败患者62例, 随机分为2组, 其中治疗组30例, 男18例, 女12例, 年龄19-69(平均43)岁, 慢性胃炎15例, 十二指肠溃疡9, 胃溃疡6例; 对照组32例, 男21例, 女11例, 年龄18-70(平均44)岁, 慢性胃炎17例, 十二指肠溃疡10例, 胃溃疡5例。治疗组失访2例, 对照组失访2例, 最后有效病例58例。患者的年龄、性别、症状及内镜下检查结果无显著性差异($P>0.05$)。

1.2 方法

1.2.1 入选标准: (1)入选患者均接受过胃镜和病理检查, 诊断为消化性溃疡或慢性浅表、萎缩性胃炎; (2)经病理组织银染色法和快速尿素酶试验

检测证实*H.pylori*感染; (3)入选患者*H.pylori*初次治疗方案均为国际标准一线方案: 质子泵抑制剂/枸橼酸铋雷尼替丁(标准剂量)+阿莫西林(1 g)/甲硝唑(0.4 g)+克拉霉素(0.5 g), bid×7 d; (4)初次治疗失败依据: 初次治疗结束4 wk后行胃镜下银染色法复查或¹⁴C尿素呼气试验为*H.pylori*阳性。

1.2.2 排除标准: (1)年龄在18岁以下或者70岁以上者; (2)孕妇及哺育期妇女; (3)对药物过敏者; (4)食道胃底静脉曲张者; (5)癌性溃疡的患者; (6)有特殊的球部溃疡, 如胃泌素瘤、肝性溃疡, 复合性溃疡, 并发食管或幽门梗阻者; (7)心、肝、肾功能不全者; (8)吻合口溃疡的患者; (9)酗酒, 有药瘾者。

1.2.3 治疗方案: 治疗组给予奥美拉唑20 mg+阿莫西林(山东鲁抗医药股份有限公司)1 g每日2次, 连续5 d, 然后奥美拉唑20 mg+替硝唑(湖北广济药业股份有限公司)500 mg+克拉霉素(江苏恒瑞医药股份有限公司)500 mg每日2次, 连续5 d。对照组给予奥美拉唑20 mg+枸橼酸铋钾220 mg+阿莫西林1 g每日2次+左旋氧氟沙星400 mg每日1次, 连续7 d。

1.2.4 症状改善指标: 上腹痛、腹胀、反酸、嗝气、纳差、恶心和呕吐7项症状的严重程度评分标准: 0分: 无症状; 1分: 偶有症状或症状较轻; 2分: 经常发生, 部分影响日常工作及生活, 药物能缓解; 3分: 症状严重, 影响日常工作及生活, 药物难以缓解。根据积分变化率进行三级疗效评估, 其标准: 显效: 临床症状消失或基本消失; 有效: 临床症状有所改善或明显减轻, 积分减少50%以上; 无效: 临床症状无改善或加重, 积分减少不足50%; 总有效率=显效率+有效率。

1.2.5 *H.pylori*检测方法和根除判断标准: 补救治疗结束4 wk后胃溃疡行胃镜检查, 球部溃疡及慢性胃炎者行¹⁴C-尿素呼气试验, 阴性者, 确定为*H.pylori*根除成功, 阳性者为补救治疗失败, 通过根除率评判该方案的疗效。

统计学处理 各组的*H.pylori*根除率用按意愿治疗(ITT)分析和按方案治疗(PP)分析进行评价, 用 χ^2 检验及查四格表的统计意义检验便查表法, 以 $P<0.05$ (双侧)认为差异有统计学意义。症状积分改变用 t 检验分析。所有统计分析用SPSS软件包进行。

2 结果

2.1 *H.pylori*根除率 治疗组和对照组*H.pylori* PP根除率分别为82.14%和80.00%, ITT根除率分别

■ 研发前沿

从发现和分离*H.pylori*至今, 已有28年的历史。*H.pylori*感染依然是一种在全世界流行的慢性感染。中国是*H.pylori*感染率较高的国家, 因此*H.pylori*感染的临床治疗是我国*H.pylori*研究领域的重点, 也是我国临床医师对*H.pylori*研究最关注的问题。

■创新盘点

本课题通过序贯疗法补救治疗常规根除*H.pylori*失败病例与含铋剂四联一周疗法根除*H.pylori*失败病例相对比, 观察其*H.pylori*根治率及不良反应发生率, 探讨序贯疗法是否有更高的根治率及优越性。

表 1 患者*H.pylori*根除率的比较

分组	根除 (<i>n</i>)	未根除 (<i>n</i>)	失访 (<i>n</i>)	合计 (<i>n</i>)	根除率(%)	
					PP	ITT
治疗组	23	5	2	30	82.14	76.67
对照组	24	6	2	32	80.00	75.00
合计	47	11	4	62	81.03	75.80

表 2 停药4 wk后两组临床症状缓解率比较 *n*(%)

分组	<i>n</i>	显效	有效	无效	总有效率
治疗组	28	23(82.14)	3(10.71)	2(7.14)	26(92.86)
对照组	30	22(73.33)	5(16.67)	3(10.0)	27(90.00)

为76.67%和75.00%, 无统计学意义($P>0.05$, 表1)。

2.2 症状积分改善状况 用 χ^2 检验比较两组停药4 wk后主要临床症状缓解率, 其显效率及有效率均无统计学差异(表2)。

2.3 不良反应 治疗组出现1例恶心, 1例口腔金属味, 1例轻微腹泻, 不良反应发生率10.7%; 对照组出现2例乏力, 1例纳差、恶心, 1例皮疹, 1例头晕, 不良反应发生率13.3%。两组不良反应均为轻中度不适, 不影响治疗, 无需停药及特殊处理, 服药期间或疗程结束停药后自行消失。患者用药前后血、尿、大便常规及肝肾功能均无异常。两组比较差异无显著性($P>0.05$)。

3 讨论

从发现和分离*H.pylori*至今, 已有28年的历史。*H.pylori*感染依然是一种在全世界流行的慢性感染。中国是*H.pylori*感染率较高的国家, 因此*H.pylori*感染的临床治疗是我国*H.pylori*研究领域中的重点, 也是我国临床医师对*H.pylori*研究最关注的问题。

我国已先后3次发布了关于*H.pylori*感染处理若干问题的共识意见, 即1999年的《海南共识》、2003年的《桐城共识》以及2007年的《庐山共识》。其中质子泵抑制剂(proton pump inhibitors, PPI)加两种抗生素的“三联疗法”仍然是当前国内外*H.pylori*共识意见推荐的一线治疗方案^[4], 临床最常用的抗生素包括甲硝唑、克拉霉素和阿莫西林。随着根除*H.pylori*治疗的普遍开展, 一些有效的治疗方案随着时间的推移根除率在下降。即使应用推荐的根除方案, 也有10%-30%的患者持续有*H.pylori*感染, 从而有必要进行补救治疗。桐城共识方案中建议对于第

一次根治失败的患者, 有条件的单位应该进行药物敏感性试验, 根据药物敏感性试验的结果选取抗生素治疗。但有条件行药物敏感试验的单位有限, 且此项检查无形中增加了患者的经济负担, 故存在二线方案以供选择。

当第一线治疗失败时则进入第二线治疗, 即补救治疗。补救的治疗方案普遍采用四联方案即: 铋剂, PPI, 联合两种一线抗生素。研究发现四联方案的治疗效果, 通常都有满意的疗效。2003年桐城共识中推荐以下根除方案为二线方案: PPI(标准剂量)+B(标准剂量)+M(0.4 g tid)+T(0.75 g或1.00 g), bid×(7-14) d。国内研究也表明包括标准剂量PPI、铋剂、左旋氧氟沙星和阿莫西林的三联补救方案是安全有效的, 根除率达83.87%^[5]。故本研究用此种方案作为对照组。

作为治疗组的序贯疗法由意大利学者首先提出, 所用的*H.pylori*根除药物很普遍, 但给药方法不同。提出者De Francesco等发现14 d二联药物治疗和随后的7 d三联药物治疗的*H.pylori*根除率显著高于给药顺序相反的方案, 这提示给予抗生素的顺序影响了*H.pylori*的根除率。基于这一研究结果, De Francesco等进一步简化了方案, 提出了10 d序贯疗法, 在5 d的诱导期中应用PPI常规剂量bid, 联合阿莫西林1 000 mg bid, 在接下来的5 d中, 应用了PPI常规剂量bid, 替硝唑500 mg bid, 和克拉霉素500 mg bid的三联治疗。初步研究提示, 前5 d诱导期采用的阿莫西林不仅本身能够杀灭*H.pylori*, 而且还能减少患者的细菌负荷量, 从而增加细菌对克拉霉素的敏感性^[6]。因此, 有学者推测阿莫西林可以破坏细菌的细胞壁, 从而防止形成克拉霉素泵出通道^[7]。克拉霉素是一种新型的大环内酯类抗生素, 作用机制是通过阻止DNA依赖蛋白质合成而达到杀菌目的, 而且对酸较稳定, 能达到较高的血药浓度和较长的半衰期。另外较高的*H.pylori*根除率也有可能是应用了替硝唑, 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. 替硝唑抗菌作用比甲硝唑强2-4倍, 具有更长的作用时间^[8]. 另外, 疗程延长对于疗效增加是否起作用也有争议.

序贯疗法的具体作用机制还有待进一步研究. 研究表明序贯疗法疗效理想, 不受吸烟、*H.pylori* CagA阳性等因素影响^[9], 且对非溃疡性消化不良和溃疡患者也能达到相似的根除率. 方案中的克拉霉素耐药可降低序贯疗法的根除率, 但降幅远不及三联疗法. 此外, 序贯疗法的不良反应轻且少见, 与三联疗法相比无明显差异, 有学者提出可考虑作为补救方案^[10], 而四联疗法的不良反应发生率高且依从性低, 患者依从性较差. 大多学者认为为避免二线治疗失败, 一线治疗失败方案中的抗生素, 应假设为已耐药, 在补救方案中避免再次使用^[11]. 本研究表明序贯疗法作为补救治疗方案较四联疗法相比有相似根除率, 不良反应相对较少. 有研究表明序贯疗法并不适用于克拉霉素和甲硝唑双重耐药的地区^[12], 可能为本实验中根除失败原因. 本研究临床病例数相对较少, 是否可作为二线根除方案予以推广, 尚待多中心、大样本的临床研究来进一步证实其临床疗效和安全性.

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 胡品津. 规范幽门螺杆菌感染的诊断和治疗. 中华内科杂志 2004; 43: 243
- 3 胡伏莲. 关注我国幽门螺杆菌耐药现状. D03版. 中国医学论坛报 2008-07-31
- 4 中华医学会消化病分会, 幽门螺杆菌学组/幽门螺杆菌科研协作组. 第三次全国幽门螺杆菌感染若干问题共识报告(2007年8月庐山). 胃肠病学 2008; 13: 42-46
- 5 王震华, 熊光苏, 吴叔明. 含左氧氟沙星的四联方案补救治疗幽门螺杆菌的临床研究. 胃肠病学和肝病学杂志 2006; 15: 38-39
- 6 Murakami K, Fujioka T, Okimoto T, Sato R, Kodama M, Nasu M. Drug combinations with amoxicillin reduce selection of clarithromycin resistance during *Helicobacter pylori* eradication therapy. *Int J Antimicrob Agents* 2002; 19: 67-70
- 7 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
- 8 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
- 9 仇晓华, 萧树东. 根除幽门螺杆菌10 d序贯疗法的临床实践. 胃肠病学 2009; 14: 58-59
- 10 元刚, 陈湖. 幽门螺杆菌根除失败的补救措施. 临床消化病杂志 2006; 18: 70-71
- 11 罗雁, 刘会领, 金玉坤, 陆伟. 幽门螺杆菌根除失败原因及防治对策探讨. 国际消化病杂志 2008; 28: 211-212
- 12 陆红, 萧树东. 幽门螺杆菌的治疗有望改善一序贯疗法. 胃肠病学 2009; 14: 125-126

■同行评价

本文课题设计实用性较强, 有一定的临床意义.

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2010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)

原发性大网膜恶性间皮瘤1例

何书平, 孙培莉, 张智弘, 金淑贤, 陈涛, 华一兵, 黄茂

■背景资料

大网膜间皮瘤是来源于大网膜间皮细胞的肿瘤, 多为高度恶性肿瘤。由于其临床表现、影像学表现和实验室检查缺乏特异性, 诊断存在很大难度, 使得患者不能得到及时诊断而延误治疗, 因而在临床工作中要予以重视。

何书平, 孙培莉, 张智弘, 金淑贤, 黄茂, 南京医科大学第一附属医院呼吸内科 江苏省南京市 210029

何书平, 江苏省宿迁市中医院呼吸科 江苏省宿迁市 223800
张智弘, 南京医科大学第一附属医院病理科 江苏省南京市 210029

陈涛, 华一兵, 南京医科大学第一附属医院普外科 江苏省南京市 210029

作者贡献分布: 何书平负责文稿的书写; 孙培莉负责疾病诊断、资料收集及文稿审理修改; 金淑贤与黄茂负责不同诊疗阶段疾病诊断; 陈涛与华一兵负责腹腔镜检查; 张智弘负责病理诊断与病理学部分的审理修改。

通讯作者: 孙培莉, 副教授, 210029, 江苏省南京市, 南京医科大学一附院呼吸内科, plisun@yahoo.cn

电话: 025-68136254 传真: 025-83672308

收稿日期: 2010-05-01 修回日期: 2010-07-08

接受日期: 2010-07-12 在线出版日期: 2010-08-18

Primary malignant mesothelioma of the greater omentum: a case report and literature review

Shu-Ping He, Pei-Li Sun, Zhi-Hong Zhang,
Shu-Xian Jin, Tao Chen, Yi-Bing Hua, Mao Huang

Shu-Ping He, Pei-Li Sun, Shu-Xian Jin, Mao Huang, Department of Pulmonary Medicine, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

Shu-Ping He, Department of Pulmonary Medicine, Suqian Hospital of Traditional Chinese Medicine, Suqian 223800, Jiangsu Province, China

Zhi-Hong Zhang, Department of Pathology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

Tao Chen, Yi-Bing Hua, Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Associate Professor Pei-Li Sun, Department of Pulmonary Medicine, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China. plisun@yahoo.cn

Received: 2010-05-01 Revised: 2010-07-08

Accepted: 2010-07-12 Published online: 2010-08-18

Abstract

Primary malignant mesothelioma of the greater omentum is extremely rare. Here, we report a case of primary malignant papillary mesothelioma of the greater omentum that manifested as signs of pleural effusion (chest tightness) instead of common abdominal discomfort. A definitive diagnosis was established by laparoscopic biopsy in combination with positron emission tomography/computed tomography (PET/CT).

Due to the lack of usual clinical or radiological manifestations, primary malignant mesothelioma of the greater omentum is easily misdiagnosed. Preoperative PET/CT can help locate the optimal site for endoscopic biopsy and improve the diagnosis of this rare disease.

Key Words: Greater omentum; Mesothelioma; Pleural effusion; Diagnosis

He SP, Sun PL, Zhang ZH, Jin SX, Chen T, Hua YB, Huang M. Primary malignant mesothelioma of the greater omentum: a case report and literature review. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(23): 2500-2503

摘要

大网膜恶性间皮瘤临床极为罕见。本文报道的大网膜腺管乳头型恶性间皮瘤, 以胸腔积液常见的胸闷为首发症状, 经PET/CT检查后, 腹腔镜手术探查得以确诊。本例无常见的消化系统症状及影像学表现, 易被误诊、漏诊。故对于不明原因胸腹水, 应行常规胸腔镜或腹腔镜检查, 有助于早期诊断。术前PET/CT检查有利于病灶定位, 提高诊断率。

关键词: 大网膜; 间皮瘤; 胸腔积液; 诊断

何书平, 孙培莉, 张智弘, 金淑贤, 陈涛, 华一兵, 黄茂. 原发性大网膜恶性间皮瘤1例. *世界华人消化杂志* 2010; 18(23): 2500-2503

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2500.asp>

0 引言

大网膜间皮瘤是来源于大网膜间皮细胞的肿瘤, 多为高度恶性肿瘤。由于其临床表现、影像学表现和实验室检查缺乏特异性, 诊断存在很大难度, 使得患者不能得到及时诊断而延误治疗, 因而在临床工作中要予以重视。南京医科大学第一附属医院成功诊断了1例以咳嗽、胸闷为首发症状的大网膜恶性间皮瘤患者, 现报道如下。

1 病例报告

男, 42岁, 供电工人。因“干咳伴胸闷气喘二十余天。”于2009-06-22入院。患者二十余天前不

■同行评议者

陈洪, 主任医师, 副教授, 东南大学附属中大医院消化科

明原因出现咳嗽伴胸闷气喘;无发热盗汗,无咳痰咯血,无胸腹痛,无消瘦,食纳及睡眠好,二便正常。入院查体: T 37.3℃, R 22次/分, P 88次/分, BP 135/90 mmHg, 体质量指数为29.36(78 kg、163 cm), 神志清, 精神欠佳, 全身皮肤黏膜无黄染及出血点, 浅表淋巴结未触及肿大。巩膜无黄染, 口唇无紫绀, 胸廓两侧对称, 两下肺呼吸运动减弱, 呼吸音低, 未闻及干湿性罗音。HR 88次/分, 心律齐, 各瓣膜区未及杂音。腹部饱满、软, 无压痛、反跳痛, 肝脾肋下未及, 移动性浊音(+), 双下肢无浮肿。入院后进一步检查, 胸部增强CT显示双侧中等量胸腔积液伴下肺膨胀不全, 左下肺舌叶条片状密度增高影; ESR 100 mm/h、C反应蛋白(C reactive protein, CRP)112 mg/L、铁蛋白(serum ferritin, SF)1 020 μg/L、CA125 398 kU/L, 余检查如血尿粪常规、肝肾功能、凝血5项、抗核抗体、免疫5项、肿瘤标志物(AFP、CEA、CA50、CA724、CA199、NSE、CYFRA21-1)、β2-微球蛋白均正常;腹部B超: 脂肪肝, 肝稍大, 腹腔积液, 脾大, 胆胰未见明显异常; PPD 1:2 000皮试(-)。入院后胸腔穿刺多次抽胸水检查示: 外观淡褐色, 浑浊; 胸水常规示细胞计数为 $(1\ 800-7\ 600) \times 10^6/L$, 单核占70%-90%; 李凡他试验(+); 胸水乳糜试验(+); 胸水肿瘤标志物CYFRA21-1、CA125增高(33.07 μg/L, 1 039 kU/L), AFP、CEA、CA50、CA724、CA199、NSE均在正常范围; 胸水生化: 乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)126 U/L(血清LDH 163 U/L), 总蛋白(TP)55.2 g/L, 腺苷脱氨酶(adenosine deaminase, ADA)6 U/L; 胸水GLU 9.2 mmol/L(血GLU 9.6 mmol/L); 胸水三酰甘油 3.02 mmol/L; IFN-γ 0.1 ng/L; 胸水结核杆菌DNA定量(-); 胸水膜式液基细胞学检查两次未见肿瘤细胞; 淋巴管造影未见异常。全身PET/CT检查示: 右前下纵隔、腹膜后、肠系膜区多发小淋巴结, 部分氟代脱氧葡萄糖(fluorodeoxyglucose, FDG)代谢轻度增高, 两侧胸腔内积液, 右中腹升结肠外侧(图1A)、横结肠系膜处(图1B)见多处斑片状FDG摄取轻度增高影, SUV最大值5.8。

根据PET/CT检查结果, 考虑腹腔镜检查的成功率及安全性远高于胸腔镜检查, 遂采取腹腔镜手术探查。术中见大网膜挛缩, 僵硬, 遍布肿瘤结节, 质地硬(图2); 肿瘤结节手术切除中见乳糜样液体溢出, 见中等量乳糜性腹水。腹膜、肠系膜未见转移病灶。胃、肝脏、脾脏等脏器未见异常。

大网膜组织病理: (右侧大网膜)脂肪结缔组织中可见小乳头状或腺管状结构, 表面被覆非典型性上皮样细胞。肿瘤细胞大小较一致, 胞质嗜酸, 核大呈空泡状, 染色质细腻, 部分细胞内可见红染的核仁, 核分裂像难以找到(图3), 考虑为恶性肿瘤(恶性间皮瘤\低分化腺癌)。免疫组织化学示上皮样细胞钙结合素calretinin(++)(图4A)、广谱细胞角蛋白CKpan(++), 细胞角蛋白CK5/6(+), 波形蛋白vimentin(+)(图4B)、上皮膜抗原EMA(+); 结合HE切片本例符合恶性间皮瘤腺管乳头型。术中去除大网膜主要病灶, 术后予鸦胆子油治疗, 胸腹水逐渐减少, 后转入肿瘤科化疗。现患者病情控制, 一般状况良好, 还在随访中。

2 讨论

大网膜是连于胃大弯和横结肠之间的四层腹膜, 呈“围裙”状悬挂于横结肠和小肠之前。大网膜内含脂肪、血管、淋巴管等, 活动度大, 有限制炎症蔓延的作用。1908年Miller等首先报道了间皮瘤, 1960年Wagner等首次提出间皮瘤的发生与接触石棉粉尘有关^[1]。间皮瘤是一种起源于间皮的肿瘤, 可发生于任何被间皮覆盖的体腔, 以胸膜最常见。发生于腹膜的间皮瘤则比较罕见^[1,2], 约占所有间皮瘤病例的20%-33%, 可发生于2-92(平均年龄为54)岁, 其中约63%的病例年龄为45-64岁, 儿童罕见; 其恶性多于良性, 男性多于女性。而原发于大网膜的间皮瘤则极为罕见^[3-5]。间皮瘤病因不明, 除了与长期接触石棉以外, 也认为可能与猿猴病毒(SV40)感染及人类染色体13q和14q的缺失有关^[1,2]; 其他病因有慢性炎症刺激、放射性物质及亚硝胺等。

病理诊断是确诊间皮瘤的可靠依据^[2]。根据肿瘤内所含主要成分的不同, 将间皮瘤分为上皮型、纤维型和混合型3种。按形态分为局限型和弥漫型, 后者多见。局限型者多为纤维型, 恶性程度较低; 弥漫型者多为上皮型, 恶性程度高^[4]。组织类型分为腺管乳头型、肉瘤样型、未分化型及混合型。恶性间皮瘤在大网膜肿瘤的发生率为8.2%, 呈细颗粒状或小结节状, 也可呈弥漫性葡萄样, 内含浆液, 少数呈弥漫性胼胝样增厚, 易侵犯周围脏器; 瘤细胞分化不同, 呈异型性, 可见瘤巨细胞, 核分裂明显。恶性间皮瘤常表达的阳性标志物有: calretinin、高分子角蛋白CK5/6、vimentin、间皮细胞抗原等。本例为弥漫型, 免疫组织化学结果显示: 上皮样细胞示

■研究前沿

不明原因乳糜性胸腔积液是临床常见的棘手问题, 难以诊断。在PET/CT指导下内镜检查, 有助于对不明原因胸腔积液的病因诊断。

■创新盘点

原发于大网膜的恶性间皮瘤在PubMed上仅见2篇病例报道,国内也只见2例报道,都表现为消化系统症状,而本病例诊断为大网膜恶性间皮瘤,但临床症状以呼吸系统症状为首表现,无明显消化系统症状。

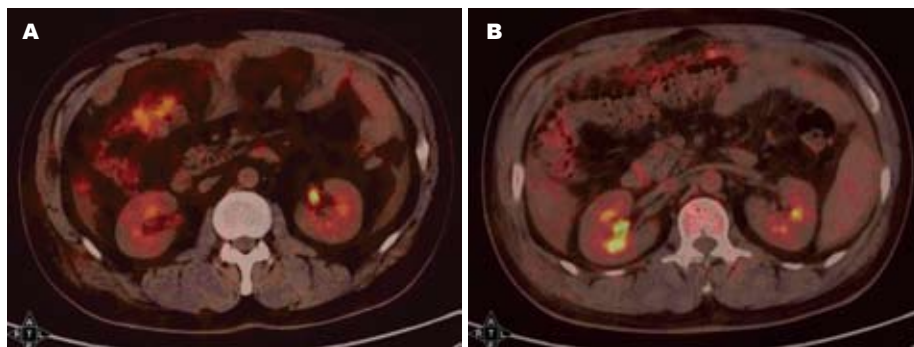


图 1 全身PET/CT检查结果. A: 右中腹升结肠外侧; B: 横结肠系膜.



图 2 腹腔镜下检查结果.

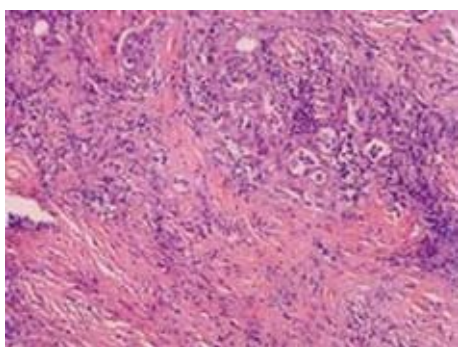


图 3 大网膜组织病理(HE染色×400).

calretinin(++), 高分子细胞角蛋白CK5/6(+), vimentin(+), 组织学上属于典型的腺管乳头型. 本例经腹腔镜活检病理确诊为原发于大网膜的恶性间皮瘤, 肉眼观察为弥漫结节样改变, 并融合广泛粘连, 切除肿瘤结节时可见乳糜样液体溢出, 与上述病理描述一致. 去除患者大网膜主要病灶后, 胸腹水逐渐减少. 胸水乳糜液常见于不同原因导致胸导管破裂或阻塞, 使乳糜液溢出至胸腔; 但该患者淋巴管造影未见异常, 而术中发现腹水外观与胸水一致, 当挤压肿瘤结节时可见乳糜样液体溢出, 加之去除大网膜主要病灶后, 胸腹水逐渐减少. 推测原因之一是: 大网膜间皮瘤肿瘤组织本身分泌乳糜液致乳糜性腹腔积液, 腹液通过食道横膈孔流入胸腔至胸腔积液; 原因之二可能与间皮瘤转移至胸膜, 从而致咳嗽、胸

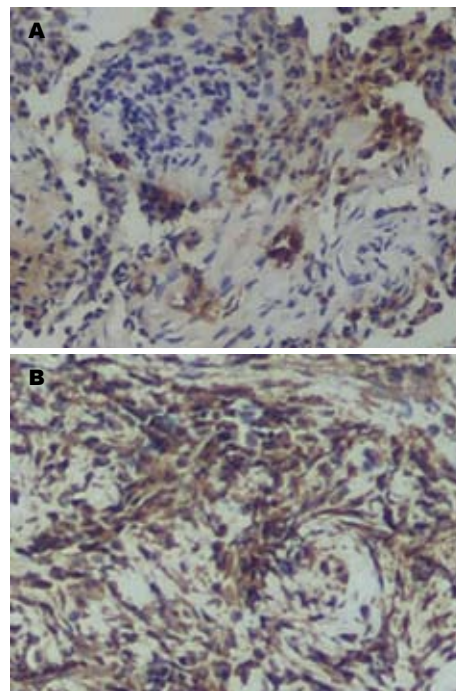


图 4 免疫组织化学检查. A: calretinin(++); B: vimentin(+).

闷、气喘等症状. 大网膜恶性间皮瘤与腹膜间皮瘤一样, 发病隐匿, 早期多无症状, 临床表现无特征性, 多数表现为消化系统症状与体征^[3-6], 如腹痛及腹部包块; 腹水发生率高, 常因腹水就诊. 肿块巨大时可压迫胃肠道, 产生食欲减退、饱胀不适等症状, 可伴有恶心、呕吐, 可伴乏力、发热、消瘦、贫血、低血糖等; 合并其他部位间皮瘤、转移至其他脏器及合并症的相应表现. 弥漫型腹膜间皮瘤随着疾病进展, 可于1年内死于肠梗阻或体质消瘦^[2]. 我们报道的病例为42岁男性患者, 否认有石棉接触史, 无任何消化系统症状, 胃纳可, 无消瘦, 却主要表现为咳嗽、胸闷、气喘等呼吸道症状, 伴有双侧胸腔积液, 与以往报道的腹膜或大网膜间皮瘤临床表现完全不一致, 也因此就诊住院于呼吸科病房.

影像学检查是诊断与鉴别诊断腹膜或大网膜间皮瘤的必要检查手段, 也是间皮瘤临床分

期的主要依据. 腹部CT可见腹膜有薄片状增厚及腹水^[2], 但缺乏特征性表现, 而累及大网膜的病变CT影像不易发现. 头颅MRI、胸部CT检查对间皮瘤的分期具有价值. 腹水脱落细胞学检查常是阴性, 必需通过病灶活检, 常需要腹腔镜或者剖腹探查, 行组织病理学检查方可确诊. PET/CT检查间皮瘤患者可见SUV值增高(本例SUV值最高5.8), 因此PET/CT检查对良恶性胸腹膜疾病具有鉴别诊断价值, 其对间皮瘤的诊断的敏感性和特异性分别为96.8%和88.5%^[4]. 随着腹腔镜检查技术的发展, 以及病理学、免疫组织化学诊断水平的进步, 提高了该疾病的诊断率. 腹膜和大网膜间皮瘤症状不典型, 常误诊为结核性腹膜炎、腹腔内原发或转移性肿瘤, 需腹腔镜和剖腹探查活检, 加以病理诊断方可明确. 我们报道的病例就是依赖于腹腔镜手术探查, 依靠组织病理才确诊. 腹腔镜下腹膜和大网膜间皮瘤的表现^[7]为腹膜表面黄白或灰白色大小不一结节, 大网膜增厚、挛缩, 表面呈结节状, 该结节样病灶可融合为巨大实质性包块; 腹水多呈黄色浑浊或血性浑浊液体. 我们报道的病例术中见中等量乳白色腹水, 大网膜挛缩、僵硬, 遍布黄白色肿瘤结节, 质地硬. 腹膜、肠系膜未见转移病灶. 胃、肝脏、脾脏等脏器未见异常. 与以往的报道描述一致.

腹膜恶性间皮瘤属中胚叶源性恶性肿瘤, 能分泌大量透明质酸黏液, 因此腹水呈渗出液, 李凡他试验阳性, 细胞数 $>500 \times 10^6/L$, 血清白蛋白梯度 $<11\text{ g/L}$; 83.3%为黄色浑浊腹水, 16.7%为血性腹水. 腹水脱落细胞学检查对腹膜恶性间皮瘤的诊断仍较困难, 若腹水中查见大量间皮细胞($\geq 5\%$)及典型的恶性间皮细胞则可明确诊断, 但阳性率极低, 且需与反应性细胞增生和转移性癌细胞鉴别. 本例大网膜恶性间皮瘤患者, 胸腹腔见乳糜样积液, 胸水检查显示为单核细胞为主的渗出液, 且乳糜试验阳性. 这与以往间皮瘤的报道不一致. 腹水生化检查本例患者IFN- γ 0.1 ng/L, ADA 6 U/L在正常范围, 而肿瘤标志物CYFRA21-1 33.07 $\mu\text{g/L}$ 、CA125 1 039 kU/L增高, 后者尤为显著. CA125增高在以往间皮瘤的文献均有报道. 腹膜间皮瘤患者中约25%的患者CA125升高, Duan等认为, 部分间皮细胞来源的肿瘤具有分泌CA125

的能力, 如果患者同时有腹膜间皮瘤肝内转移, 慢性肝病致肝脏对CA125的清除能力下降, 则血CA125水平可明显增高. 然而, 由于CA125增高多见于卵巢癌, 也可见于胰腺癌、胃癌、结肠癌及乳腺癌, 因此血CA125对腹膜间皮瘤的诊断不具特异性. 据Simsek报道7例恶性腹膜间皮瘤患者血清CA125水平全部升高, 平均为308 kU/L(8-1 300 kU/L). 在3例患者的随诊中发现对化疗敏感的2例患者CA125降至正常, 1例化疗无效患者CA125继续升高. 因此CA125可作为监测间皮瘤治疗反应的一项指标. 恶性间皮瘤患者红细胞沉降率(erythrocyte sedimentation rate, ESR)一般较快, 最高为157 mm/h, 白细胞总数可轻度偏高或正常, CRP合成会增加, CRP最高可达300 mg/L, 出现在肿瘤发生转移或并发细菌感染时. SF是一种含铁的蛋白质, 主要在肝脏合成, 血液中含有量很微; 由于恶性肿瘤细胞合成SF含量增加, 所以SF也是恶性肿瘤的标志物之一. 本病例外周血检测发现ESR增快、CRP增高, SF和CA125均明显增高, 与以往文献恶性间皮瘤实验室指标特点相符^[3].

本病例诊断为大网膜恶性间皮瘤, 但临床症状以呼吸系统症状为首发表现, 无明显消化系统症状, 因此对于病因不明的双侧胸腔积液患者, 胸水IFN- γ 、ADA正常, 而血清CA125增高, 胸水CA125双倍增高患者, 应需要警惕间皮瘤的可能; 通过PET/CT全身检查有利于尽早定位诊断, 并选择内镜检查获取病理, 有助于尽早明确诊断.

3 参考文献

- 1 Bridda A, Padoan I, Mencarelli R, Frego M. Peritoneal mesothelioma: a review. *MedGenMed* 2007; 9: 32
- 2 Moore AJ, Parker RJ, Wiggins J. Malignant mesothelioma. *Orphanet J Rare Dis* 2008; 3: 34
- 3 Shin MK, Lee OJ, Ha CY, Min HJ, Kim TH. Malignant mesothelioma of the greater omentum mimicking omental infarction: a case report. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 4856-4859
- 4 Liu YC, Kuo YL, Yu CP, Wu HS, Yu JC, Chen CJ, Chan DC, Yu CY, Hsieh CB, Chen TW. Primary malignant mesothelioma of the greater omentum: report of a case. *Surg Today* 2004; 34: 780-783
- 5 尚丽明, 黎乐群, 肖开银. 大网膜巨大恶性间皮瘤一例. *中华普通外科杂志* 2004; 19: 519
- 6 孙林, 关咏梅, 康志海, 付红, 杜伯涛. 双侧卵巢、输卵管及大网膜恶性间皮瘤误诊为卵巢癌1例分析. *中国误诊学杂志* 2006; 6: 3573-3575
- 7 翁国爱, 邢红卫. 腹膜恶性间皮瘤的临床诊断及其在腹腔镜下的特征分析. *临床医学* 2007; 27: 29-30

■同行评价

本文可读性较强, 有一定的临床参考价值.

编辑 曹丽鸥 电编 吴鹏朕