

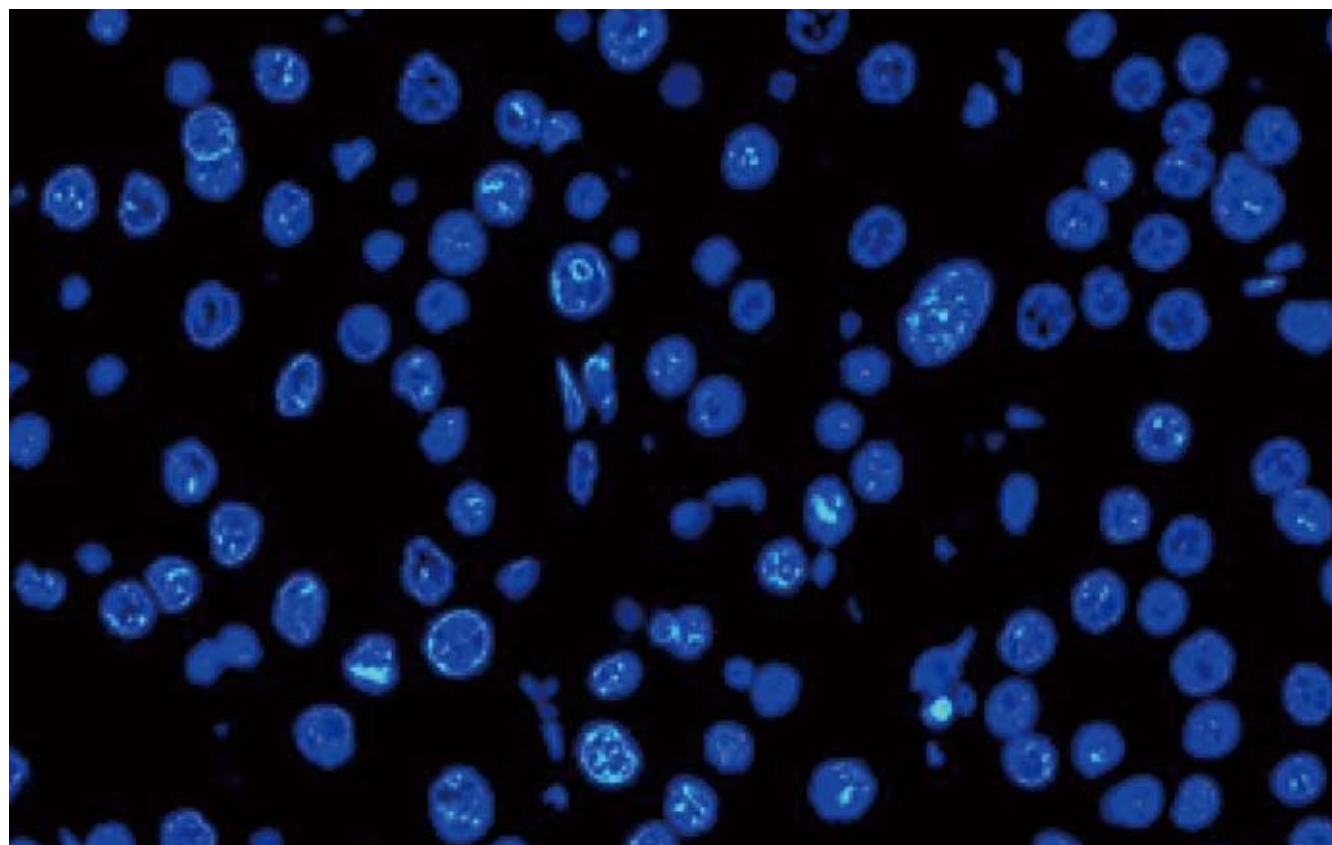
ISSN 1009-3079 (print)
ISSN 2219-2859 (online)
CN 14-1260/R

世界华人消化杂志®

**WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY**

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2011 年 8 月 18 日 第 19 卷 第 23 期 (Volume 19 Number 23)



23 / 2011

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
杨思凤教授
姚希贤教授
岳茂兴教授
张万岱教授
周学文教授

常务编委

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

编委

消化内科学

白爱平副教授
苒新明教授
陈国忠副主任医师
陈洪刚教授
陈其奎教授
陈卫昌教授
陈贻胜教授
程斌教授
迟宝荣教授
崔立红教授

邓长生教授
丁士刚教授
董蕾教授
杜雅菊主任医师
杜奕奇副教授
樊晓明主任医师
房静远教授
冯志杰主任医师
傅春彬主任医师
高峰副教授
戈之铮教授
关玉盘教授
关晓辉主任医师
郭晓钟教授
郝建宇教授
何松教授
洪天配教授
侯晓华教授
胡伏莲教授
胡和平主任医师
黄培林教授
黄晓东主任医师
黄颖秋教授
黄缘教授
霍丽娟教授
季国忠教授
江米足主任医师
姜春萌教授
姜慧卿教授
姜相君主任医师
金瑞教授
蓝宇教授
李定国教授
李淑德教授
李瑜元教授
李玉民教授
李玉明教授
廖家智副主任医师
林志辉教授
刘冰熔教授
刘凤斌教授
刘改芳主任医师
刘海峰主任医师
刘海林主任医师
刘铁夫教授
刘莹副主任医师
刘占举教授
陆伦根教授
吕志武教授
马红主任医师
马欣主任医师
毛高平教授

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

消化外科学

白雪巍副主任医师

蔡开琳副教授
蔡三军主任医师
曹杰主任医师
陈光教授
陈海龙教授
陈积圣教授
陈进宏副主任医师
陈力教授
陈立波教授
陈凇教授
陈强谱教授
陈汝福教授
陈亚军主任医师
陈钟教授
程爱国教授
程爱群主任医师
程树群副教授
崔云甫教授
戴朝六教授
戴冬秋教授
丁义涛教授
董明教授
杜成友教授
杜顺达副主任医师
房林副教授
傅红副教授
傅华群教授
傅志仁主任医师
高成新教授
葛海燕教授
巩鹏副教授
谷俊朝主任医师
顾国利副主任医师
顾岩教授
韩天权教授
郝纯毅主任医师
郝立强副教授
何超教授
何晓顺教授
何裕隆教授
黄志勇教授
季加孚教授
姜卫东教授
姜波健教授
蒋龙元副教授
金山副教授
黎乐群教授
李革副教授
李国威教授
李华副教授
李华山主任医师

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

汪根树副教授
王春友教授
王德盛副主任医师
王凤山教授
王广义教授
王健生教授
王鲁副教授
王蒙副教授
王石林主任医师
王文跃主任医师
王悦华副主任医师
王振宁教授
王正康教授
王志刚副主任医师
王忠裕教授
吴河水教授
吴健雄教授
吴金术教授
吴泰璜教授
吴志勇教授
伍晓汀教授
谢敏主任医师
谢晓华副教授
邢光明教授
徐大华主任医师
徐迅迪教授
徐洪副教授
徐戈良教授
许剑民教授
薛东波教授
严律南教授
杨柏霖副主任医师
杨桦教授
杨家和主任医师
杨维良教授
杨银学教授
杨尹默教授
伊力亚尔·夏合丁教授
殷正丰教授
于聪慧教授
于则利教授
禹正杨副教授
郁宝铭教授
元云飞教授
张必翔主任医师
张宏伟教授
张佳林教授
张进祥副教授
张俊副研究员
张力为副教授
张群华教授
张水军教授
张宗明教授
赵刚副教授

智绪亭教授
周伟平教授
邹小明教授

消化感染病学

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

消化中医药学

蔡淦教授

陈治水主任医师
杜群副研究员
黄恒青主任医师
李军祥教授
李康副教授
李晓波教授
李勇副教授
李振华教授
刘成海研究员
刘平教授
刘绍能主任医师
龙致贤教授
南极星教授
牛英才研究员
沈洪教授
司富春教授
唐志鹏研究员
王富春教授
王新月教授
邢建峰副教授
徐列明教授
许玲副教授
徐庆教授
袁红霞研究员
张声生教授

消化肿瘤学

曹秀峰教授
曹志成院士
陈公琰主任医师
陈克能教授
代智副研究员
华海清教授
李瑗教授
刘宝瑞教授
刘彬彬副研究员
刘云鹏教授
秦叔逵教授
沈克平主任医师
王阁教授
向德兵副教授
肖文华主任医师
谢丹教授
熊斌教授
张凤春教授

消化影像学

白彬主任医师
陈克敏教授
官泳松教授
韩新巍教授
胡红杰主任医师
李健丁教授
龙学颖副主任医师

倪才方教授
施海彬教授
魏经国教授
肖恩华教授
徐爱民副教授
徐辉雄教授
徐克教授
严惟力副教授
杨业发教授
杨建勇教授
赵卫主任医师

消化内镜及介入治疗学

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

消化中西医结合学

唐文富副教授
王学美研究员
魏睦新教授
杨钦河教授
张春虎副教授

消化基础研究

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

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

消化病理学

杜祥教授
李菊玲副教授
李淳副教授
李晟磊副主任医师
刘丽江教授
刘勇钢副主任医师
吕宁主任医师
马大烈教授
门秀丽教授
潘兴华副主任医师
孙伟副研究员
王鲁平主任医师
王娅兰教授
颜宏利副教授
于颖彦教授
余宏宇教授
张锦生教授
赵春玲副教授
赵景民教授
朱亮副教授

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ● 2011年8月18日 第19卷 第23期 (总第355期)

述 评

2421 重症急性胰腺炎发病机制研究现状

卢世云, 潘秀珍

基 础 研 究

2426 醋酸铅诱导人肝细胞系L-02细胞凋亡与caspase-3表达关系的影响

邢伟, 李胜联, 陈兆夷

2432 糜酶对实验性大鼠肝纤维化的影响

张立华, 王昌源, 杜磊, 谭炳芹

2437 siRNA沉默NHE1基因对MHCC97-H肝癌细胞侵袭迁移的影响

孙伟, 王德盛, 杨薛康, 周亮, 张勇, 苟泽鹏, 祝普利, 张福琴, 窦科峰

2443 野生型p53对肝癌细胞POLDI基因表达及细胞恶性表型的影响

韦长元, 刘起理, 廖柳凤, 徐恒, 谭晓虹

临 床 研 究

2450 mTOR和p-p70S6K在食管鳞癌组织中蛋白表达的相关性及其临床意义

尹玉慧, 张艳, 李晟磊, 刘红涛, 侯桂琴

2455 肝细胞癌中一种高通量二维细胞识别技术方法的建立

朱玉珍, 符达, 刘黎黎, 马雨水, 沈锡中, 陈锡美

2461 Brg1及VEGF信号通路相关蛋白在Peutz-Jeghers综合征中的表达及意义

刘金霞, 周平, 胡志民, 毛高平

文 献 综 述

2467 蒙古沙土鼠不同幽门螺杆菌菌株感染相关性胃病的研究进展

柳云恩, 袁媛

2473 类胰岛素生长因子与肝癌

孙芳, 付汉江, 铁轶, 郑晓飞

2480 注射疗法治疗直肠脱垂的研究现状

李华山, 崔国策, 王晓锋

研 究 快 报

2486 5-HT及电刺激对胃节律紊乱模型新西兰白兔胃电活动的影响

黄伟锋, 张慧, 欧阳守, 卢春敬

临 床 经 验

2492 肠道异位静脉曲张37例

姜国俊, 岳振东, 吴静, 刘福全, 林香春, 王振彪, 宫轲

2496 英夫利西治疗重度溃疡性结肠炎2例

赵丽珍, 王思平, 李红

2501 二氧化碳注入在结肠镜检查中的Meta分析

苗志国, 齐鲁楠, 黎乐群

病 例 报 告

2506 经内镜置支架治疗全内脏转位的十二指肠乳头癌1例

侯森林, 乔娜, 韩锦胜, 乔占英

附 录	2508 《世界华人消化杂志》投稿须知 2513 2011年国内国际会议预告
志 谢	2514 志谢世界华人消化杂志编委
消 息	2436 《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》 2460 中国科技信息研究所发布《世界华人消化杂志》影响因子0.625 2466 《世界华人消化杂志》出版流程 2472 《世界华人消化杂志》参考文献要求 2479 WJG成功通过评审被PMC收录 2485 《世界华人消化杂志》正文要求 2491 《世界华人消化杂志》2011年开始不再收取审稿费 2495 《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》 2500 《世界华人消化杂志》性质、刊登内容及目标
封面故事	朱玉珍, 符达, 刘黎黎, 马雨水, 沈锡中, 陈锡美. 肝细胞癌中一种高通量二维细胞识别技术方法的建立. 世界华人消化杂志 2011; 19(23): 2455-2460 http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2455.asp
本期责任人	编务 周媛; 送审编辑 李军亮; 组版编辑 何基才; 英文编辑 王天奇; 责任编辑 李军亮; 审核编辑 李军亮; 形式规范 马连生

<p>世界华人消化杂志</p> <p>Shijie Huaren Xiaohua Zazhi</p> <p>吴阶平 题写封面刊名 陈可冀 题写版权刊名 (旬刊)</p> <p>创 刊 1993-01-15 改 刊 1998-01-25 出 版 2011-08-18 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>2011年版权归世界华人消化杂志所有</p>
<p>中国标准连续出版物号 ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) 邮发代号 国外代号 国内定价 广告经营许可证 CN 14-1260/R 82-262 M 4481 每期56.00元 全年2016.00元 1401004000050</p> <p>www.wjgnet.com</p>		

World Chinese Journal of Digestology

August 2011 Contents in Brief Volume 19 Number 23

EDITORIAL	2421 Recent progress in understanding the pathogenesis of severe acute pancreatitis <i>Lu SY, Pan XZ</i>
BASIC RESEARCH	<p>2426 Lead acetate induces cell apoptosis and promotes caspase-3 expression in human liver cell line L-02 <i>Xing W, Li SL, Chen ZY</i></p> <p>2432 Role of chymase in the pathogenesis of experimental liver fibrosis in rats <i>Zhang LH, Wang CY, Du L, Tan BQ</i></p> <p>2437 SiRNA-mediated silencing of the NHE1 gene inhibits cell invasion and migration in human hepatocellular carcinoma cell line MHCC97-H <i>Sun W, Wang DS, Yang XK, Zhou L, Zhang Y, Gou ZP, Zhu PL, Zhang FQ, Dou KF</i></p> <p>2443 Effect of overexpression of wild-type p53 on POLD1 expression and malignant cell behavior in human hepatocellular carcinoma cell line SMMC-7721 <i>Wei CY, Liu QL, Liao LF, Xu H, Tan XH</i></p>
CLINICAL RESEARCH	<p>2450 Clinical significance of expression of mTOR and p-p70S6K in esophageal squamous cell carcinoma <i>Yin YH, Zhang Y, Li SL, Liu HT, Hou GQ</i></p> <p>2455 A high-throughput two-dimensional screening technique for cellular recognition and localization in hepatocellular carcinoma <i>Zhu YZ, Fu D, Liu LL, Ma YS, Shen XZ, Chen XM</i></p> <p>2461 Expression of Brg1, VEGF and COX-2 in Peutz-Jeghers syndrome <i>Liu JX, Zhou P, Hu ZM, Mao GP</i></p>
REVIEW	<p>2467 Gastric diseases in Mongolian gerbils infected with different strains of <i>Helicobacter pylori</i> <i>Liu YE, Yuan Y</i></p> <p>2473 Insulin-like growth factors and hepatocellular carcinoma <i>Sun F, Fu HJ, Tie Y, Zheng XF</i></p> <p>2480 Injection treatment of rectal prolapsed: current research status <i>Li HS, Cui GC, Wang XF</i></p>
RAPID COMMUNICATION	2486 Effect of 5-HT and electrical stimulating on gastric electric activity in rabbits with gastric dysrhythmia <i>Huang WF, Zhang H, Ouyang S, Lu CJ</i>
CLINICAL PRACTICE	<p>2492 Ectopic varices in the gastrointestinal tract: an analysis of 37 cases <i>Jiang GJ, Yue ZD, Wu J, Liu FQ, Lin XC, Wang ZB, Gong K</i></p> <p>2496 Treatment of ulcerative colitis with infliximab: an analysis of 2 cases <i>Zhao LZ, Wang SP, Li H</i></p> <p>2501 Carbon dioxide insufflation during colonoscopy: a meta-analysis <i>Miao ZG, Qi LN, Li LQ</i></p>
CASE REPORT	2506 ERCP-assisted metal stent placement for complete transposition of the viscera in a patient with papillary carcinoma of the duodenum <i>Hou SL, Qiao N, Han JS, Qiao ZY</i>

APPENDIX	2508 Instructions to authors of World Chinese Journal of Digestology 2513 Meeting events calendar in 2011
ACKNOWLEDGMENT	2514 Acknowledgments to reviewers of World Chinese Journal of Digestology
COVER	<i>Zhu YZ, Fu D, Liu LL, Ma YS, Shen XZ, Chen XM.</i> A high-throughput two-dimensional screening technique for cellular recognition and localization in hepatocellular carcinoma. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2011; 19(23): 2455-2460 http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2455.asp
RESPONSIBLE EDITORS FOR THIS ISSUE	Assistant Editor: <i>Yuan Zhou</i> Review Editor: <i>Jun-Liang Li</i> Electronic Page Editor: <i>Ji-Cai He</i> English Language Editor: <i>Tian-Qi Wang</i> Editor-in-Charge: <i>Jun-Liang Li</i> Proof Editor: <i>Jun-Liang Li</i> Layout Editor: <i>Lian-Sheng Ma</i>

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

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

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

NAME OF JOURNAL

World Chinese Journal of Digestology

RESPONSIBLE INSTITUTION

Department of Science and Technology
of Shanxi Province

SPONSOR

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

EDITING

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

PRINTING

Beijing Kexin Printing House

PUBLISHING

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

OVERSEAS DISTRIBUTOR

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

HONORARY EDITOR-IN-CHIEF

Bo-Rong Pan

EDITOR-IN-CHIEF

Lian-Sheng Ma

SCIENCE EDITORS

Director: Jun-Liang Li

SUBSCRIPTION

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

CSSN

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

COPYRIGHT

© 2011 Published by *WCJD*. All rights reserved; no part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise without the prior permission of *WCJD*. Authors are required to grant *WCJD* an exclusive licence to publish.

SPECIAL STATEMENT

All articles published in this journal represent the viewpoints of the authors except where indicated otherwise.

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

Full instructions are available online at www.wjgnet.com/1009-3079/tgxz.asp. If you do not have web access please contact the editorial office.

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

重症急性胰腺炎发病机制研究现状

卢世云, 潘秀珍

卢世云, 潘秀珍, 福建医科大学省立临床学院 福建省立医院
消化内科 福建省胃肠病研究所 福建省福州市 350001
潘秀珍, 主任医师, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事幽门螺杆菌感染、胃肠动力疾病、消化系统肿瘤及胰腺疾病的基础与临床研究。

作者贡献分布: 查找文献、述评由卢世云完成; 审校由潘秀珍完成; 找文献、述评由卢世云完成; 审校由潘秀珍完成。

通讯作者: 潘秀珍, 主任医师, 教授, 硕士生导师, 350001, 福建省福州市东街134号, 福建省立医院消化内科, 福建省胃肠病研究所, panxiuz@yahoo.com

电话: 0591-87557768-9088

收稿日期: 2011-04-13 修回日期: 2011-07-02

接受日期: 2011-07-11 在线出版日期: 2011-08-18

Recent progress in understanding the pathogenesis of severe acute pancreatitis

Shi-Yun Lu, Xiu-Zhen Pan

Shi-Yun Lu, Xiu-Zhen Pan, Provincial Clinical College of Fujian Medical University; Department of Gastroenterology, Fujian Provincial Hospital; Gastroenterology Institute of Fujian Province, Fuzhou 350001, Fujian Province, China
Correspondence to: Professor Xiu-Zhen Pan, Department of Gastroenterology, Fujian Provincial Hospital; Gastroenterology Institute of Fujian Province, Fuzhou 350001, Fujian Province, China. xzpan@pub5.fz.fj.cn

Received: 2011-04-13 Revised: 2011-07-02

Accepted: 2011-07-11 Published online: 2011-08-18

Abstract

Severe acute pancreatitis (SAP) is an acute abdominal disease that is characterized by sudden onset, quick progression, many complications and high mortality. Multiple organ dysfunction syndrome (MODS) is still regarded as the main cause of death in SAP patients. Nowadays, the mortality rate for patients with SAP in developed countries is 22.7%. In the early 21st century, the mortality reached 15.60%-23.77% in mainland China. However, the etiology, pathogenesis and pathophysiology of SAP remains unclear, resulting in puzzle or perplexity in choosing and developing treatment strategies for SAP. This paper reviews recent progress in understanding the pathogenesis of SAP.

Key Words: Acute pancreatitis; SAP; Pathogenesis

Lu SY, Pan XZ. Recent progress in understanding the pathogenesis of severe acute pancreatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(23): 2421-2425

摘要

重症急性胰腺炎是一种起病急、进展快、并发症多、病死率高的急腹症。常常由于并发多器官功能障碍综合征而造成患者死亡,病死率国外近期报道仍高达22.7%,我国报道21世纪初期的病死率也达15.60%-23.77%。究其原因,主要是其发病机制尚未完全阐明,导致治疗观点和治疗方案摇摆不定。本文阐述其发病机制研究进展,旨在探讨重症急性胰腺炎发病机制的复杂性,提高治疗效果。

关键词: 急性胰腺炎; 重症; 发病机制

卢世云, 潘秀珍. 重症急性胰腺炎发病机制研究现状. *世界华人消化杂志* 2011; 19(23): 2421-2425

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2421.asp>

0 引言

重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)是一种发病机制复杂、病情凶险、并发症多、死亡率高的急腹症^[1-3]。SAP之所以病死率居高不下,其主要原因就是其发病机制尚不完全清楚,导致治疗观点和治疗方案不规范。因此,有关其发病机制的探索一直是研究的热点。SAP的基本发病机制是各种原因导致胰管梗阻,有或无十二指肠液、胆汁反流、血液循环障碍,胰腺防御机制受到破坏,胰蛋白酶原被激活,后者又激活其他酶反应,导致胰腺及其邻近组织炎症、出血、坏死等改变,消化液和坏死组织液经血循环、淋巴管途径输送到全身则可导致全身多脏器损害。随着众多学者对SAP发病机制的深入研究,发现除了传统的胰酶自身消化学说外,还有炎性介质学说、微循环障碍、细菌感染等在SAP的发生发展中也起着重要作用。SAP是一种胰腺局部病变诱发全身性炎症介质和细胞因子释放的瀑布式级联反应的全身性疾病,疾病早期常伴有急性生理紊乱和器官功能损

■背景资料

重症急性胰腺炎 SAP是一种发病机制复杂、病情凶险、并发症多、死亡率高的急腹症。SAP之所以病死率居高不下,其主要原因就是其发病机制尚不完全清楚,导致治疗观点和治疗方案不规范。因此,有关其发病机制的探索一直是研究的热点。

■同行评议者

张筱茵, 副教授, 中国人民解放军第四军医大学西京医院消化疾病研究所

■ 研发前沿

目前SAP的发病机制还没有完全阐述清楚,各种致病因素导致胰酶原过度激活、胰酶入血是其启动因素;坏死物质激活免疫系统,释放大量CK及炎性介质,是SAP病情失控的关键环节;全身血循环障碍,组织的缺血坏死,诱发SIRS及MOF是SAP的主要表现。

害。近年来,对该病的研究主要集中在胰酶自身消化、白细胞过度激活、微循环障碍、高脂血症、细菌感染等方面。

1 胰酶自身消化学说

胰管梗阻与胆汁反流以及乙醇对胰腺腺泡和Oddi括约肌的作用是主要诱因^[4]。胆石嵌顿于胆总管下端或胆总管共同通道引起胆汁反流,激活了胰蛋白酶引起胰腺腺泡损伤是长期以来传统的观点,但不能圆满解释一些原因不明的急性胰腺炎和胆管、胰管分别开口于十二指肠者。有报道这类患者约91%有一过性小结石的嵌顿,而动物实验在分别结扎胆管和胰管也可引起急性胰腺炎,然并无胆汁反流,这说明胰管梗阻同样是一重要的致病因素^[5]。有研究认为妊娠性胰腺炎也是由于妊娠生理过程的改变导致胆道梗阻进而诱发胰腺炎^[6]。酒精引起的胰腺炎是由于神经受体的功能异常使胰腺、十二指肠Oddi括约肌对乙酰胆碱反应增强,胰液分泌增加,肠-胰反流出现,而引起了胰腺炎的发生^[7,8]。另外他可改变胰液蛋白质成分从而形成蛋白栓子阻塞胰小管,还可增加溶酶体酶及改变体内及胰腺的脂质代谢,改变细胞膜的流动性和完整性。近年国外学者^[9,10]发现作为蛋白质正常合成、分泌调节物质的蛋白伴侣物与胰酶分泌密切相关,其中两个重要亚基伴侣因子(chaperonin, Cpn)及热休克蛋白(heat shock proteins, HSP)的作用最受关注。高温诱导HSP高表达后,可预防蛋白酶原的胞内活化,阻止雨蛙肽(caerulein)诱导的急性胰腺炎的发生,这种保护作用可被预先使用HSP表达的抑制剂所抵消。吴浩等^[11]研究发现生长抑素对SAP大鼠病情并无明显改善作用,却能明显抑制后期抗炎细胞因子(cytokine, CK)IL-10、TGF- β 的释放,说明胰腺炎发展至重症阶段CK所起的作用已经超过酶的自身消化作用。

2 白细胞过度激活学说

目前研究发现CK和炎性介质在SAP的发生、发展中起重要作用。SAP发生时,白细胞过度激活导致大量促炎CK及炎性介质释放入血,发生呼吸爆发,产生氧自由基,形成致炎因子激活的级联及复杂的网络状互相影响,是导致微循环障碍,进一步加重胰腺损伤,并引发全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS)及多器官功能衰竭(multiple organ failure, MOF)的重要基础^[12-15]。其中影

响较大的有肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白介素(interleukin, IL)、血小板活化因子(platelet activating factor, PAF)以及核因子(nuclear factor- κ B, NF- κ B)和磷脂酶A2(phospholipase A2, PLA2)等。

2.1 TNF- α TNF- α 主要来源于活化的巨噬细胞,具有多种生物学活性,与胰腺炎症程度密切相关。急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)发生1 h后即可检测到血清TNF- α 水平升高,6 h后达到高峰,阻断其升高可减轻SAP的病情严重程度^[16]。低浓度的TNF- α 能诱导细胞凋亡,促进炎症愈合;而高浓度的TNF- α 则导致胰腺腺泡细胞坏死。大量的TNF- α 进一步激发一系列级联反应,诱导IL-1、IL-6、IL-8等的表达,使细胞因子过度激活引起胰腺细胞坏死,最终导致胰腺及胰腺外组织的损伤^[17,18]。TNF- α 还可下调内皮细胞血栓调节蛋白表达,促进血栓形成及上调黏附分子功能。总之, TNF- α 过度刺激的结果是作用于各种炎症细胞、激活细胞和亚细胞水平的级联反应,造成组织严重损伤。

2.2 IL IL-1主要来自巨噬细胞,是重要的前炎症因子。IL-1在AP早期即升高,并与TNF- α 协同作用,不但可以刺激自身的释放,还可促进彼此的释放^[19,20]。IL-1在AP中除有与TNF- α 相似的病理生理作用外,还可直接刺激胰酶的合成、储存和(或)释放,加速腺泡空泡的变性坏死。他对粒细胞具有趋化和激活作用,还可通过自分泌或旁分泌刺激其他炎性介质如IL-6和IL-8等炎症细胞因子的产生。

IL-6主要由单核巨噬细胞产生,有广泛的促炎作用,主要刺激肝脏细胞合成C反应蛋白(C-reactive protein, CRP)等急性期蛋白,还可促进B细胞和T细胞分化增生,增加免疫球蛋白合成,促进急性期反应,导致组织损伤。他的浓度与胰腺炎预后密切相关^[21],在反映AP严重程度方面,IL-6的敏感性更高,而CRP的特异性较高。IL-8是中性粒细胞强有力的诱导物和活化因子,他由单核/巨噬细胞、内皮细胞产生,具有激活诱导T、B细胞分化,增强NK细胞杀伤靶细胞,促进吞噬等功能,在中性粒细胞介导的组织损伤中起重要作用^[22]。目前认为TNF- α 、IL-1、IL-6诱发的炎症反应很大程度上是通过诱导以IL-8为代表的趋化因子的产生而实现的^[23]。IL-8升高引起的弹力蛋白酶的升高与病情呈正相关,而后者被认为是中性粒细胞激活的标志。

2.3 PAF PAF是一种低分子磷脂,可与多种细胞

表面的PAF受体结合而产生一系列促炎反应。PAF是内源性炎症启动与放大过程的重要介质, 可以与G蛋白耦联的跨膜受体结合, 通过胞内的信号传导使胞内的PLA2和磷脂酶C激活, 介导内皮细胞损伤和中性粒细胞浸润。他是迄今发现的最强的血小板聚集剂及血管活性脂类递质, 可导致毛细血管扩张及通透性升高, 并可促进血栓形成, 引起微循环障碍, 加重胰腺炎症的严重程度, 在重症胰腺炎的发生和发展中起着重要作用^[24-26]。

2.4 NF- κ B NF- κ B最初从B淋巴细胞核中提取而出, 是一类主要参与炎症分子表达调控的转录因子, 能与多种基因启动因子或增强子的 κ B位点特异性结合的转录因子。在AP早期起着重要作用。活化的NF- κ B进入细胞核, 与特异的DNA位点结合, 启动IL-6、TNF- α 等许多炎症因子、黏附分子和急性反应蛋白的基因表达, 控制他们的转录^[27]。近年来, NF- κ B在AP的发病机制中的作用成为一个新的研究热点。有动物实验研究表明, AP时应用NF- κ B抑制剂能抑制炎症因子的表达和释放, 可以使胰腺细胞凋亡增加, 坏死细胞减少, 减轻动物SAP模型的病情及降低实验组动物死亡率^[28]。裴红红等发现^[29]水肿型胰腺炎较坏死性胰腺炎NF- κ B表达强度明显减弱, 认为可能是由于水肿型胰腺炎时存在着细胞凋亡的保护机制所引起。可能NF- κ B有一定的抗凋亡作用, SAP炎症介质的产生始发于NF- κ B的活化, 因此抑制NF- κ B的激活可能阻止SAP病情的恶化^[30-32]。

2.5 PLA2 研究表明PLA2是合成PAF的重要限速酶, AP时血中PLA2浓度升高, 活性增强^[33], 将PAF注入胰十二指肠上动脉可导致胰腺水肿、腺泡细胞空泡变性、坏死及高淀粉酶血症等。PLA2在胰腺炎引发SIRS及进展至SAP中起着重要作用。人体分泌的PLA2可分为I B、II A、II E、II F等不同, 其中GIB- PLA2被称为“胰腺的PLA2”, 因为GIB-PLA2在胰腺腺泡中广泛表达。GIB-PLA2可以有效地催化卵磷脂水解, 使血浆中类花生四烯酸的水平增高, 如前列腺素(PGI2)和血栓素(TXA2)。PGI2和TXA2的作用相反, 两者平衡控制正常止血机制, 如PGI2相对过多, 就导致出血倾向; 反之就导致血栓形成。在AP时两者之间的平衡被打破, 导致病情恶化^[34], 而高浓度的PLA2也SAP急性肺损伤的重要原因^[35]。

3 微循环障碍

近年来, 胰腺微循环障碍在AP发病机制中的作用越来越受到重视^[36,37], 他是SAP的启动因子和持续损伤因子。SAP早期即发生微循环障碍, 这不仅包括胰腺局部的缺血坏死, 还涉及到外周循环及其他器官的缺血与功能失常。实验证实胰腺小叶内动脉括约肌损伤是AP局部微循环紊乱的始动环节^[38], 而微动脉痉挛收缩导致血流瘀滞、血栓形成等血液流变学改变, 进而产生组织缺血、坏死。SAP时释放大量的炎症因子, 包括PAF、内皮素(endothelin, ET)、TXA2和PGI2、氧化亚氮(nitricoxide, NO)及氧自由基(OH)等, PAF导致毛细血管扩张及通透性升高, 并可激活PLA2、磷脂酶C而发挥作用, 其拮抗剂已开始试用于临床并取得了较好的治疗效果^[39]。TXA2为强烈的微血管收缩物质和血小板收缩促进剂, 可诱导组织缺血及引发出、凝血障碍, 活化白细胞, 释放OH, 导致血管内皮损伤。PGI2为其极强的拮抗剂, PGE1与PGI2有类似作用。ET可致胰血管持续痉挛, 促进钙离子内流, 损伤胰腺组织, 减少心输出量, 导致缺血、OH产生, 缺血缺氧与OH又正反馈促进内皮细胞产生ET, 造成恶性循环。NO在ET诱导下产生增加负反馈调节ET的作用, SAP时, PGI2, PGE1和NO合成相对不足, 造成TXA2/PGI2, ET/NO的比值升高, 与病情严重程度相平行^[40]。

4 高脂血症

已有的研究显示, 高三酰甘油血症(hypertriglyceridemia, HTG)约占所有胰腺炎病因中的1%-13%^[41-44], 约占非酒精性和非胆源性胰腺炎病因的20%^[45], 而妊娠期胰腺炎病因主要以高脂血症最为常见^[46]。张俊晶等^[47]认为AP患者中12%-38%出现显著的TG升高, 通常可达11.29-22.58 mmol/L, 甚至高达112.9 mmol/L。而高胆固醇血症的AP患者较少见。HTG导致的AP的确切机制仍不清楚, 可能由于大量TG在胰酶的作用下生成游离脂肪酸, 游离脂肪酸对胰腺腺泡有直接损伤作用, 并可通过加强TNF等细胞因子毒性引起生物膜损伤, 导致线粒体肿胀、变形、膜通透性增加, 加重胰腺的缺血坏死。另外HTG使血液黏稠度增加, 致胰腺微循环障碍, 胰腺缺氧, 血清脂质颗粒阻塞胰腺血管, 导致血流动力学改变而发生胰腺缺血。而部分患者的脂蛋白脂肪酶或载脂蛋白C-II活性降低, 脂代谢

■相关报道

吴浩等研究发现生长抑素对SAP大鼠病情并无明显改善作用, 却能明显抑制后期炎症细胞因子(CK) IL-10、TGF- β 的释放, 说明胰腺炎发展至重症阶段CK所起的作用已经超过酶的自身消化作用。

■同行评价

本文详细总结了重症胰腺炎发病机制的研究状况,从最古老的胰酶自身消化说到较新的“二次打击学说”,较为全面地分析阐述了SAP的发病机制,具有较好的学术价值。

过程异常也能导致高脂胰腺炎的发生^[48]。但并不是所有的HTG(甚至TG水平极高时)均可引起AP,表明高脂胰腺炎的发生是多基因、多因素参与的。

5 细菌感染

胰腺炎早期主要表现为化学性炎症,细菌感染往往是组织缺血坏死后的继发性改变。感染是AP发生、发展及转归中一个重要的中心环节,可由轻症发展至重症,甚至导致多器官系统功能不全,病程分为急性反应期、全身感染期和残余感染期^[49]。AP肠道组织缺血坏死后,黏膜面细菌向浆膜面巨噬细胞胞质内移位引起胰腺感染。当产生内毒素血症后,内毒素激活外周单核白细胞中的NF- κ B,启动TNF- α 等靶CK、炎症介质基因的表达,形成第二次CK活化的级联,使机体遭受再次打击,病情进一步恶化。内毒素的主要成分是脂多糖(lipopolysaccharide, LPS),他可以诱导实验性SAP的发生,他的代谢产物可激活巨噬细胞产生过多的NO扩张血管,减少胰腺血液灌注,导致胰腺损伤^[50]。而脂多糖结合蛋白(lipopolysaccharide-binding protein, LBP)通过结合LPS对SAP起保护作用。LPS还可活化内皮细胞,使其表达炎症反应相关基因、凋亡相关基因及蛋白合成、胞内信号传导和能量代谢相关基因。这些基因的表达必然导致炎症反应加剧,内皮细胞凋亡坏死,细胞间连接及细胞内能量代谢的紊乱。

6 结论

目前SAP的发病机制还没有完全阐述清楚,各种致病因素导致胰酶原过度激活、胰酶入血是其启动因素;坏死物质激活免疫系统,释放大量的CK及炎症介质,是SAP病情失控的关键环节;全身血循环障碍,组织的缺血坏死,诱发SIRS及MOF是SAP的主要表现。另外,细胞凋亡学说、胰腺腺泡内钙超载学说也在SAP发病过程中受到重视。因此,在SAP的治疗上,除了有效抑制胰酶分泌外,准确判断症状的发生机制,早期及时控制免疫系统功能失调,预防炎症介质活化,调节微循环障碍,才是控制临床病情,避免继发感染、病情恶化的重要措施。总之,SAP的发病机制复杂,往往是多种因素相互促进而形成的一条恶性循环链。故深入探讨并完善其基础病理理论,有利于切断此链并指导临床治疗。

7 参考文献

- 1 Chiang DT, Anozie A, Fleming WR, Kiroff GK. Comparative study on acute pancreatitis manage-

- ment. *ANZ J Surg* 2004; 74: 218-221
- 2 李良平,唐承薇,黄丽斌,谢咏梅,蒋永威,岳浩平,赵聪,史维,奚维东,黄茂涛.成都地区不同阶段重症急性胰腺炎病死率的比较研究. *胰腺病学* 2003; 3: 154-161
- 3 急性胰腺炎协作组.中国6223例急性胰腺炎病因及病死率分析. *胰腺病学* 2006; 6: 321-322
- 4 吴璟奕,费健,毛恩强,汤耀卿,张圣道.急性胰腺炎994例病因与治疗分析. *中华胰腺病杂志* 2010; 10: 231-234
- 5 Siech M, Weber H, Letko G, Dummmler W, Schoenberg MH, Beger HG. Similar morphological and intracellular biochemical changes in alcoholic acute pancreatitis and ischemic acute pancreatitis in rats. *Pancreas* 1997; 14: 32-38
- 6 Lowenfels AB, Maisonneuve P, Sullivan T. The changing character of acute pancreatitis: epidemiology, etiology, and prognosis. *Curr Gastroenterol Rep* 2009; 11: 97-103
- 7 McCutcheon AD. Neurological damage and duodenopancreatic reflux in the pathogenesis of alcoholic pancreatitis. *Arch Surg* 2000; 135: 278-285
- 8 Wang GJ, Gao CF, Wei D, Wang C, Ding SQ. Acute pancreatitis: etiology and common pathogenesis. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 1427-1430
- 9 Frossard JL, Bhagat L, Lee HS, Hietaranta AJ, Singh VP, Song AM, Steer ML, Saluja AK. Both thermal and non-thermal stress protect against caerulein induced pancreatitis and prevent trypsinogen activation in the pancreas. *Gut* 2002; 50: 78-83
- 10 Lee HS, Bhagat L, Frossard JL, Hietaranta A, Singh VP, Steer ML, Saluja AK. Water immersion stress induces heat shock protein 60 expression and protects against pancreatitis in rats. *Gastroenterology* 2000; 119: 220-229
- 11 吴浩,陈晓理,邓一芸,黄兴兰,张正.生长抑素对急性胰腺炎大鼠血中IL-10和TGF- β 1的影响及意义. *四川大学学报(医学版)* 2003; 34: 315-316
- 12 张刚,张肇达,刘续宝,田伯乐,胡伟明,蒋俊明.急性胰腺炎大鼠肺内TNF- α 基因表达与肺损伤的关系. *世界华人消化杂志* 2000; 8: 142
- 13 Sathyanarayan G, Garg PK, Prasad H, Tandon RK. Elevated level of interleukin-6 predicts organ failure and severe disease in patients with acute pancreatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22: 550-554
- 14 Song JM, Liu HX, Li Y, Zeng YJ, Zhou ZG, Liu HY, Xu B, Wang L, Zhou B, Wang R. Extracellular heat-shock protein 70 aggravates cerulein-induced pancreatitis through toll-like receptor-4 in mice. *Chin Med J (Engl)* 2008; 121: 1420-1425
- 15 Mofidi R, Duff MD, Wigmore SJ, Madhavan KK, Garden OJ, Parks RW. Association between early systemic inflammatory response, severity of multi-organ dysfunction and death in acute pancreatitis. *Br J Surg* 2006; 93: 738-744
- 16 Gulcubuk A, Altunatmaz K, Sonmez K, Haktanir-Yatkin D, Uzun H, Gurel A, Aydin S. Effects of curcumin on tumour necrosis factor-alpha and interleukin-6 in the late phase of experimental acute pancreatitis. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 2006; 53: 49-54
- 17 Pereda J, Sabater L, Cassinello N, Gómez-Cambrotero L, Closa D, Folch-Puy E, Aparisi L, Calvete J, Cerdá M, Lledó S, Viña J, Sastre J. Effect of simultaneous inhibition of TNF-alpha production and xanthine oxidase in experimental acute pancreatitis: the role of mitogen activated protein kinases. *Ann*

- Surg* 2004; 240: 108-116
- 18 Ramudo L, Manso MA, Sevillano S, de Dios I. Kinetic study of TNF-alpha production and its regulatory mechanisms in acinar cells during acute pancreatitis induced by bile-pancreatic duct obstruction. *J Pathol* 2005; 206: 9-16
- 19 Granger J, Remick D. Acute pancreatitis: models, markers, and mediators. *Shock* 2005; 24 Suppl 1: 45-51
- 20 Xiping Z, Yan P, Xinmei H, Guanghua F, Meili M, Jie N, Fangjie Z. Effects of dexamethasone and *Salvia miltiorrhiza* on the small intestine and immune organs of rats with severe acute pancreatitis. *Inflammation* 2010; 33: 259-266
- 21 Stimac D, Fisić E, Milić S, Bilić-Zulle L, Perić R. Prognostic values of IL-6, IL-8, and IL-10 in acute pancreatitis. *J Clin Gastroenterol* 2006; 40: 209-212
- 22 王斌, 湛先保, 李兆申. 炎症因子在重症急性胰腺炎启动全身炎性反应综合征中的作用. *中华胰腺病杂志* 2010; 10: 142-144
- 23 Chooklin S. Pathogenic aspects of pulmonary complications in acute pancreatitis patients. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2009; 8: 186-192
- 24 Chen C, Xia SH, Chen H, Li XH. Therapy for acute pancreatitis with platelet-activating factor receptor antagonists. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 4735-4738
- 25 Mann O, Tiefenbacher WJ, Kaifi J, Schneider C, Kluth D, Bloechle C, Yekebas E, Izicki JR, Strate T. Effect of platelet-activating factor antagonist WEB 2086 on microcirculatory disorders in acute experimental pancreatitis of graded severity. *Pancreas* 2009; 38: 58-64
- 26 Xia SH, Hu CX, Zhao ZL, Xia GD, Di Y. Significance of platelet activating factor receptor expression in pancreatic tissues of rats with severe acute pancreatitis and effects of BN52021. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 2992-2998
- 27 Algül H, Tando Y, Schneider G, Weidenbach H, Adler G, Schmid RM. Acute experimental pancreatitis and NF-kappaB/Rel activation. *Pancreatol* 2002; 2: 503-509
- 28 白雪巍, 孙备. 重症急性胰腺炎与核转录因子. *哈尔滨医科大学学报* 2004; 38: 488-489
- 29 裴红红, 杨正安, 秦兆寅, 封英群. 大鼠急性坏死性胰腺炎时核因子κB表达的意义. *中华普通外科杂志* 2002; 17: 752
- 30 Yubero S, Ramudo L, Manso MA, De Dios I. The role of redox status on chemokine expression in acute pancreatitis. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1792: 148-154
- 31 Schneider L, Hartwig W, Flemming T, Hackert T, Fortunato F, Heck M, Gebhard MM, Nawroth PP, Bierhaus A, Buchler MW, Werner J. Protective effects and anti-inflammatory pathways of exogenous calcitonin gene-related peptide in severe necrotizing pancreatitis. *Pancreatol* 2009; 9: 662-669
- 32 Giakoustidis A, Mudan SS, Giakoustidis D. Dissecting the stress activating signaling pathways in acute pancreatitis. *Hepatogastroenterology* 2010; 57: 653-656
- 33 Papachristou GI, Whitcomb DC. Inflammatory markers of disease severity in acute pancreatitis. *Clin Lab Med* 2005; 25: 17-37
- 34 Nevalainen TJ, Graham GG, Scott KF. Antibacterial actions of secreted phospholipases A2. Review. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1781: 1-9
- 35 Zhang XM, Chen HL, Wang ZH. [Expression of secretory type II phospholipase A2 in acute lung injury following acute pancreatitis and interventional effect of Qingyi decoction on it]. *Zhongguo Wei zhongbing Jijiu Yixue* 2010; 22: 518-521
- 36 Cuthbertson CM, Christophi C. Disturbances of the microcirculation in acute pancreatitis. *Br J Surg* 2006; 93: 518-530
- 37 Barkay O, Niv E, Santo E, Bruck R, Hallak A, Konikoff FM. Low-dose heparin for the prevention of post-ERCP pancreatitis: a randomized placebo-controlled trial. *Surg Endosc* 2008; 22: 1971-1976
- 38 Ceranowicz P, Dembinski A, Warzecha Z, Dembinski M, Cieszkowski J, Rembisz K, Konturek SJ, Kusnierz-Cabala B, Tomaszewska R, Pawlik WW. Protective and therapeutic effect of heparin in acute pancreatitis. *J Physiol Pharmacol* 2008; 59 Suppl 4: 103-125
- 39 卢义展, 王湘英. 微循环障碍在重症急性胰腺炎发病机制中的地位. *中华胰腺病杂志* 2010; 10: 144-146
- 40 赵晓晏, 夏时海. 血小板活化因子与急性胰腺炎的发生和治疗. *世界华人消化杂志* 2001; 9: 958-960
- 41 钱钺, 刘明东, 邹小平. 高脂血症性急性胰腺炎的临床特征. *中华胰腺病杂志* 2009; 9: 89-91
- 42 Baranyai T, Terzin V, Vajda A, Wittmann T, Czakó L. [Acute pancreatitis caused by hypertriglyceridemia]. *Oro Hetil* 2010; 151: 1869-1874
- 43 Kyriakidis AV, Raitsiou B, Sakagianni A, Harisopoulou V, Pyrgioti M, Panagopoulou A, Vasilakis N, Lambropoulos S. Management of acute severe hyperlipidemic pancreatitis. *Digestion* 2006; 73: 259-264
- 44 Chang MC, Su CH, Sun MS, Huang SC, Chiu CT, Chen MC, Lee KT, Lin CC, Lin JT. Etiology of acute pancreatitis--a multi-center study in Taiwan. *Hepatogastroenterology* 2003; 50: 1655-1657
- 45 Gan SI, Edwards AL, Symonds CJ, Beck PL. Hypertriglyceridemia-induced pancreatitis: A case-based review. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 7197-7202
- 46 Sun L, Li W, Geng Y, Shen B, Li J. Acute pancreatitis in pregnancy. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2011; 90: 671-676
- 47 张俊晶, 孟兴凯, 李得溪. 高脂血症性胰腺炎研究现状. *中华胰腺病杂志* 2010; 10: 458-460
- 48 Jiménez Forero SJ, Roa Saavedra DX, Villalba MC. [Acute pancreatitis secondary to hypertriglyceridemia - a report of two cases]. *Rev Esp Enferm Dig* 2008; 100: 367-371
- 49 李云, 杜艳, 段丽平. 急性重症胰腺炎并发感染的诊断新进展. *医学综述* 2010; 16: 2959-2961
- 50 Hu XD, Yang Y, Zhong XG, Zhang XH, Zhang YN, Zheng ZP, Zhou Y, Tang W, Yang YF, Hu LH, Zuo JP. Anti-inflammatory effects of Z23 on LPS-induced inflammatory responses in RAW264.7 macrophages. *J Ethnopharmacol* 2008; 120: 447-451

编辑 李军亮 电编 何基才

醋酸铅诱导人肝细胞系L-02细胞凋亡与caspase-3表达关系的影响

邢伟, 李胜联, 陈兆夷

■背景资料

铅是一种广泛存在于自然界的人体非必需元素, 可对多个系统造成损伤。肝脏作为体内新陈代谢的中心站和重要的解毒器官, 是许多药物、外源性化学物质和氧化性毒物的重要靶点。慢性铅暴露已成为一个全球性的公共卫生问题。

邢伟, 陈兆夷, 桂林医学院附属医院消化内科 广西壮族自治区桂林市 541004

李胜联, 桂林医学院公共卫生学院 广西壮族自治区桂林市 541004

邢伟, 桂林医学院在读硕士, 主要从事化学性肝病的研究。

广西自然科学基金资助项目, No. 桂科自0640184

作者贡献分布: 实验由邢伟完成并撰写论文; 李胜联审修; 课题由邢伟设计; 李胜联指导; 陈兆夷提供实验指导。

通讯作者: 李胜联, 教授, 硕士生导师, 541004, 广西壮族自治区桂林市, 桂林医学院公共卫生学院. lishenglian@glmc.edu.cn

收稿日期: 2011-06-07 修回日期: 2011-08-16

接受日期: 2011-08-17 在线出版日期: 2011-08-18

Lead acetate induces cell apoptosis and promotes caspase-3 expression in human liver cell line L-02

Wei Xing, Sheng-Lian Li, Zhao-Yi Chen

Wei Xing, Zhao-Yi Chen, Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Guilin Medical University, Guilin 541004, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China
Sheng-Lian Li, School of Public Health, Guilin Medical University, Guilin 541004, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Supported by: the Natural Science Foundation of Guangxi, No. 0640184

Correspondence to: Professor Sheng-Lian Li, School of Public Health, Guilin Medical University, Guilin 541004, Guangxi Autonomous Region, China. lishenglian@glmc.edu.cn

Received: 2011-06-07 Revised: 2011-08-16

Accepted: 2011-08-17 Published online: 2011-08-18

Abstract

AIM: To investigate the impact of lead acetate on cell apoptosis and caspase-3 expression in human liver cell line L-02.

METHODS: After L-02 cells were treated with different concentrations (0, 2.5, 40, 100, 200, 400 $\mu\text{mol/L}$) of lead acetate for 24 or 48 h, the proliferation of L-02 cells was assayed by MTT assay; cell morphological changes were observed after Hoechst33258 staining; and the expression of caspase-3 mRNA and protein was determined by RT-PCR and Western blot.

RESULTS: Compared to the normal control

group, the proliferation of L-02 cells was significantly inhibited after treatment with different concentrations of lead acetate for 24 or 48 h (24 h: 0.4678 ± 0.0438 , 0.4686 ± 0.0733 , 0.4500 ± 0.0712 , 0.4244 ± 0.0407 , 0.3998 ± 0.0499 vs 0.5234 ± 0.0589 ; 48 h: 0.4290 ± 0.0607 , 0.4184 ± 0.0296 , 0.4032 ± 0.0499 , 0.3856 ± 0.0386 , 0.3750 ± 0.0149 vs 0.5300 ± 0.0397 , all $P < 0.05$ or 0.01). Significant morphological changes were noted in cells treated with lead acetate for 48 h. Compared to the normal control group, the levels of caspase-3 mRNA increased significantly in a dose-dependent manner in L-02 cells treated with lead acetate (1.0912 ± 0.0769 , 1.2874 ± 0.144 , 1.4536 ± 0.1046 , 1.6986 ± 0.1371 , 1.9882 ± 0.0925 vs 0.8438 ± 0.0933 , all $P < 0.01$). Additionally, the expression levels of caspase-3 protein also significantly increased after treatment with lead acetate.

CONCLUSION: Lead acetate inhibits proliferation and induces apoptosis of L-02 cells possibly via a mechanism associated with the activation of caspase-3.

Key Words: Lead acetate; L-02 cells; Cell apoptosis; Caspase-3

Xing W, Li SL, Chen ZY. Lead acetate induces cell apoptosis and promotes caspase-3 expression in human liver cell line L-02. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(23): 2426-2431

摘要

目的: 探讨醋酸铅对人肝细胞系L-02细胞凋亡与caspase-3表达的关系。

方法: 不同浓度(0、2.5、40、100、200、400 $\mu\text{mol/L}$)的醋酸铅处理的L-02细胞24 h及(或)48 h后, MTT法观察L-02细胞生长的影响, Hoechst33258染色法观察细胞凋亡形态学变化, RT-PCR和Western blot法观察caspase-3的表达。

结果: 24 h及48 h后与对照组比较, 醋酸铅能明显抑制细胞的增殖(24 h: 0.4678 ± 0.0438 ,

■同行评议者

张志坚, 教授, 福州总医院消化内科; 吴君, 主任医师, 贵州省贵阳市贵阳医学院附属医院感染科

0.4686±0.0733, 0.4500±0.0712, 0.4244±0.0407, 0.3998±0.0499 vs 0.5234±0.0589; 48 h: 0.4290±0.0607, 0.4184±0.0296, 0.4032±0.0499, 0.3856±0.0386, 0.3750±0.0149 vs 0.5300±0.0397, $P<0.05$ 或 0.01). 48 h后各实验组Hoechst33258染色, 细胞呈凋亡形态学改变; 与对照组比较, caspase-3 mRNA的表达明显升高, 呈明显的剂量-效应关系(1.0912±0.0769, 1.2874±0.144, 1.4536±0.1046, 1.6986±0.1371, 1.9882±0.0925 vs 0.8438±0.0933, $P<0.01$), caspase-3蛋白质水平表达升高.

结论: 醋酸铅能有效抑制L-02细胞的增殖, 并诱导其凋亡, 其机制可能与caspase-3活化有关.

关键词: 醋酸铅; L-02细胞; 细胞凋亡; 天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-3

邢伟, 李胜联, 陈兆夷. 醋酸铅诱导人肝细胞系L-02细胞凋亡与caspase-3表达关系的影响. 世界华人消化杂志 2011; 19(23): 2426-2431

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2426.asp>

0 引言

随着现代工业的发展, 铅的使用越来越广泛, 对环境和人群健康的危害也越来越大, 慢性铅暴露已成为一个全球性的公共卫生问题^[1]. 流行病学调查显示, 在职业人群中慢性铅中毒居职业中毒的首位. 凋亡(apoptosis)是指细胞在基因控制和酶促反应下的一种程序性死亡, 是机体维持自身稳定的一种基本生理机制^[2-5]. caspase-3是细胞凋亡的蛋白酶级联反应的必经之路^[6]. 研究表明, 铅可通过活化caspase-3诱导肾小管上皮细胞凋亡^[7]. 而铅所诱导的肝细胞凋亡与caspase-3表达的关系, 未见报道. 为此, 我们进行了研究, 现将结果报道如下.

1 材料和方法

1.1 材料 醋酸铅(天津凯通); 正常人肝细胞系(L-02)(南方医科大学细胞库); 胎牛血清(杭州四季青); DMEM高糖培养基(美国Gibco); 胰蛋白酶、噻唑蓝(美国Sigma); 二甲基亚砜(DMSO)(杭州双林); Hoechst33258染色试剂盒(德国Merck); TRIzol试剂(美国Gibco); 达辉RT-PCR反应体系(广州达辉); 达安基因实验伴侣(广州达安); 低熔点琼脂糖(西班牙); caspase-3及硝酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)引物序列及目的基因长度(上海英骏); Rabbit Anti-caspase-3(P11, 武汉博士德); 二抗(北京中杉); 蛋白酶抑制剂(美国

Amresco); Western blot发光剂(武汉博士德); 硝酸纤维素膜(上海闪晶); 其余试剂均为市售分析纯. 倒置相差光学显微镜、倒置荧光显微镜(日本Olympus); 低温高速离心机(德国Eppendorf); 电泳仪(北京六一); 捷达801凝胶成像分析系统(广州达辉); ABI9700扩增仪(美国).

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及形态学观察: L-02细胞用含15 mL/L胎牛血清的DMEM高糖培养基在37℃、50 mL/L CO₂的湿化培养箱中培养, 每2 d换液1次, 每3 d传代1次. 实验所用细胞均处于对数生长期. 细胞传代过夜后, 进行醋酸铅干预, 参照醋酸铅研究文献[7], 使其终浓度(0、2.5、40、100、200、400 μmol/L), 对照组加入相应体积的PBS. 处理24 h及48 h后, 倒置相差显微镜下观察细胞生长情况.

1.2.2 MTT比色试验法: 取对数生长期细胞, 胰酶消化后收集细胞悬液, 按 4×10^3 /孔接种于两块96孔的培养板中, 补足培养基至200 μL/孔. 在37℃、50 mL/L CO₂条件下过夜后, 醋酸铅干预后使其终浓度为(2.5、40、100、200、400 μmol/L), 对照组加入相应体积的磷酸盐缓冲液(PBS), 每组设5个复孔. 染毒后两块板分别继续培养24及48 h后, 每孔加入20 μL MTT(5 g/L)后继续培养4 h, 弃去培养基, 每孔加入150 μL DMSO溶剂, 在酶标仪于490 nm处读取吸光度(A)值. 计算抑制率(%) = (对照组A值-醋酸铅组A值)/对照组A值×100%.

1.2.3 Hoechst33258荧光染色法: 收集细胞按 1×10^6 /mL浓度接种于6孔板中, 每孔3 mL, 待细胞基本铺满孔底后, 分别加入醋酸铅, 使其终浓度为(2.5、40、100、200、400 μmol/L), 对照组加入相应体积的PBS. 干预48 h后, 弃培养液, 加入1 mL多聚甲醛固定30 min, 用PBS洗3遍, 取5 μL染色浓缩液和0.5 mL的染色稀释液混合后加入染色, 37℃避光15 min, 荧光显微镜下观察、照相.

1.2.4 RT-PCR检测caspase-3 mRNA的表达: 醋酸铅干预48 h后, 弃去培养基, 每瓶细胞加入1 mL TRIzol冰上孵育10 min, 将消化液转移至灭菌的1.5 mL的EP管中, 再加入200 μL的氯仿, 混匀冰上孵育10 min, 4℃ 12 000 r/min离心10 min, 取上清液转移至新的EP管中, 加入等体积的异丙醇, 颠倒混匀冰上孵育10 min, 4℃ 12 000 r/min离心5 min, 弃上清, 加入1 mL 750 mL/L乙醇洗涤RNA沉淀, 4℃ 8 500 r/min离心5 min, 弃上清, 待沉淀干燥后溶于40 μL焦碳酸二乙酯(DEPC)

■ 研发前沿

从细胞凋亡角度探讨外来化合物的毒性作用机制是目前分子毒理学研究中的一个热点. 研究表明醋酸铅可诱导星形胶质细胞、成骨细胞、肾小管上皮细胞凋亡. 如能深入研究醋酸铅诱导人肝细胞凋亡及其机制, 将会为治疗提供新的途径和方法.

■相关报道

国内外有关报道提示醋酸铅对多种细胞具有显著的毒性作用. 国内已有的研究证明, 铅可通过活化caspase-3, 诱导PC12细胞凋亡.

表 1 不同时间各个浓度的A值 (mean \pm SD, $n = 5$)

分组	24 h		48 h	
	A值	抑制率(%)	A值	抑制率(%)
对照组	0.5234 \pm 0.0589	0.00	0.5300 \pm 0.0397	0.00
2.5 μ mol/L组	0.4678 \pm 0.0438	9.97	0.4290 \pm 0.0607 ^a	11.81
40 μ mol/L组	0.4686 \pm 0.0733	10.47	0.4184 \pm 0.0296 ^b	21.06
100 μ mol/L组	0.4500 \pm 0.0712	14.02	0.4032 \pm 0.0499 ^b	23.92
200 μ mol/L组	0.4244 \pm 0.0407 ^a	18.91	0.3856 \pm 0.0386 ^b	27.25
400 μ mol/L组	0.3998 \pm 0.0499 ^b	23.61	0.3750 \pm 0.0149 ^b	29.24

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 对照组.

水中. 按以下比例配制逆转录体系: 5 \times 逆转录Buffer 4 μ L, dNTP(10 mmol/ μ L)0.2 μ L, 逆转录酶(200 U/ μ L)1 μ L, F(10 pm/ μ L) 0.4 μ L, R(10 pm/ μ L)0.4 μ L, DEPC水9 μ L, RNA模板5 μ L, 总体积20 μ L, 37 $^{\circ}$ C恒温1 h, 然后95 $^{\circ}$ C, 3 min灭活, 将逆转录产物放-20 $^{\circ}$ C冰箱备用. caspase-3的cDNA序列设计特异性引物上游为5'-ACATCTCCCG-GCGGCGGGCCCCGGA-3', 下游为5'-TCCGCG-GCCCCGCCGCGGGAGATGT-3', 产物大小为437 bp. 内参GAPDH引物序列上游为5'-AACGT-GTCAGTGGTGGACCT-3', 下游为5'-AGGGGA-GATTCAGTGTGGTG-3', 产物大小为400 bp. PCR扩增按以下比例配制PCR反应体系: 5 \times 定性Buffer 10 μ L, dNTP(10 mmol/ μ L)1 μ L, Taq酶(5 U/ μ L)1 μ L, F(10 pm/ μ L)1 μ L, R(10 pm/ μ L)1 μ L, 纯水31 μ L, 模板5 μ L, 总体积50 μ L, 94 $^{\circ}$ C 4 min预变性, 然后95 $^{\circ}$ C 30 s, 54 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s运行35个循环, 最后72 $^{\circ}$ C延伸8 min, 4 $^{\circ}$ C保存. 用2%琼脂糖凝胶100 V \times 30 min电泳, 扫描存盘. 用捷达801凝胶成像分析系统中进行灰度扫描, 目的基因mRNA表达量 = 每例标本目的基因的平均灰度值/同一标本GAPDH的平均灰度值.

1.2.5 Western blot检测caspase-3蛋白质的表达: 醋酸铅干预48 h后收集细胞, 用冷PBS洗涤2次后, 加入细胞裂解液, 冰上裂解45 min, 4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min离心20 min, 取上清于新的EP管中, 用考马斯亮蓝染色法测定蛋白浓度. 每孔蛋白定量为50 μ g, 加入2 \times SDS凝胶加样缓冲液混合均匀, 沸水水浴5 min, 配置12%的SDS-聚丙烯酰胺(PAGE)分离胶和5%的浓缩胶, 样品加入上样孔底, 60 V, 电泳30 min, 至样品进入分离胶后, 120 V, 电泳1 h后转移至磷酸纤维素膜上, 丽春红染色观察转移效果. 置膜于5%脱脂奶粉的TBST[10 mmol/L Tris(pH7.4), 150 mmol/L NaCl,

0.1% Tween 20]封闭缓冲液1 h, 室温缓慢摇动. 按1:500加入一抗, 室温孵育1 h, 缓慢摇动, TBST洗膜3次, 按1:2 000加入辣根过氧化物酶标记的二抗, 室温孵育1 h, 缓慢摇动, TBST洗膜3次, 在暗室中与化学发光剂ECL反应, X线胶片曝光显影.

统计学处理 运用SPSS17.0统计软件进行统计学分析, 多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA), 组间比较采用 q 检验.

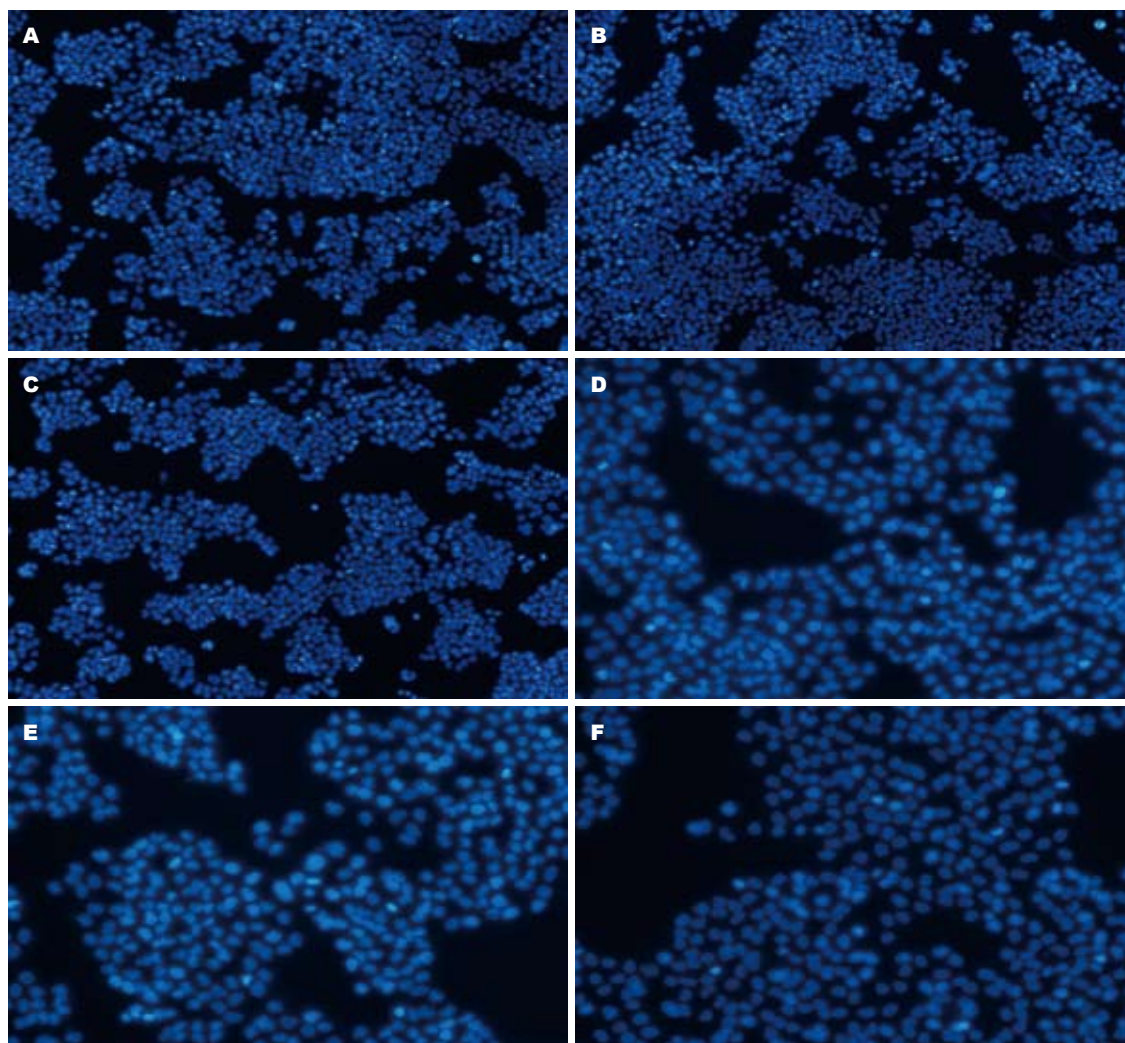
2 结果

2.1 细胞生长形态学观察 对照组细胞, 24及48 h后形态上均无明显变化, 呈贴壁生长, 细胞呈梭形或多边形; 实验组细胞, 24 h后黄染、突起、皱缩、变圆, 细胞轮廓不清, 少数细胞漂浮于培养基中, 48 h后, 较多细胞漂浮, 并已开始崩解.

2.2 MTT比色试验 各组细胞A值及抑制率见表1. 24及48 h后, 各实验组间A值均有统计学差异, 并呈现明显的剂量-效应关系.

2.3 Hoechst33258荧光染色法 对照组细胞核完整、染色均匀一致. 48 h后, 2.5、40 μ mol/L组部分细胞核染色加深呈高亮蓝色、模糊、核明显固缩, 100、200、400 μ mol/L组细胞有大量细胞核浓染、固缩、核碎裂(图1).

2.4 caspase-3 mRNA的表达 RT-PCR结果显示不同浓度的实验组caspase-3 mRNA的转录水平较对照组明显升高, 且呈剂量-效应关系(图2). 灰度扫描结果表明, caspase-3 mRNA的相对表达量增加, 差异有统计学意义($F = 69.687$, $P < 0.01$). caspase-3 mRNA与GAPDH mRNA灰度比值: 2.5 μ mol/L: 1.0912 \pm 0.0769; 40 μ mol/L: 1.2874 \pm 0.144; 100 μ mol/L: 1.4536 \pm 0.1046; 200 μ mol/L: 1.6986 \pm 0.1371; 400 μ mol/L: 1.9882 \pm 0.0925; 对照组: 0.8438 \pm 0.0933, $n = 5$. 与对照组比较, 各实



■创新盘点

本研究表明, 醋酸铅可能通过诱导人肝细胞凋亡, 导致肝损害. 通过caspase-3途径诱导凋亡可能为其凋亡机制之一.

图 1 不同浓度醋酸铅作用L-02细胞48 h后Hoechst33258荧光染色结果(A-C × 200; D-F × 400). A: 对照组; B: 2.5 μmol/L组; C: 40 μmol/L组; D: 100 μmol/L组; E: 200 μmol/L组; F: 400 μmol/L组.

验组明显增高($P < 0.01$).

2.5 caspase-3蛋白质的表达 蛋白免疫印迹胶片扫描图(图3), 从图中可以看到不同浓度醋酸铅作用L-02细胞48 h后caspase-3及内参GAPDH表达的改变. 结果显示实验组caspase-3蛋白水平较对照组明显升高.

3 讨论

铅是一种广泛存在于自然界的人体非必需元素, 可对多个系统造成损伤, 主要累及神经、造血、心血管、消化、泌尿和免疫系统^[8]. 王涤新等^[9]报道了职业性接触铅烟尘, 可导致铅中毒. 临床上职业性铅中毒多为慢性中毒, 肝脏作为铅的主要蓄积部位, 是铅毒性的主要靶器官之一.

细胞凋亡^[10,11]作为细胞死亡的方式之一, 是通过一系列死亡信号分子活化而导致的主动性死亡过程. 其发生机制与细胞内信号转导系统

所引起的基因调控有关. 细胞凋亡的机制尚不完全清楚, 认为细胞内所发生的与凋亡有关的一系列有序的级联反应, 关键是激活了一组被称为caspase的蛋白酶^[12]. caspase是一组天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶, 目前已发现14个成员, 在细胞凋亡过程中根据caspase的作用不同, 研究者将caspase分为始动caspase和执行caspase, 前者包括caspase-8、caspase-9、caspase-10, 后者包括caspase-3、caspase-6、caspase-7. 其中caspase-3是最关键的蛋白酶, 不仅是凋亡的关键执行者^[13], 也是细胞凋亡过程中的主要效应因子, 其表达量的上调可能与铅诱导凋亡有关. 在正常情况下, caspase-3以无活性的caspase-3酶原形式存在, 只有当细胞发生凋亡时才变成有活性的caspase-3. 而活化的caspase-3能裂解大量底物, 是凋亡机制的核心成分^[14]. 因此许多学者将活化的caspase-3的出现作为细胞凋亡的标志^[15].

■应用要点

本文研究了醋酸铅诱导人肝细胞凋亡的有效浓度和剂量关系,探讨了其毒性作用的分子机制,为醋酸铅诱导肝细胞凋亡提供了实验基础,同时为临床上寻找治疗途径提供理论依据。

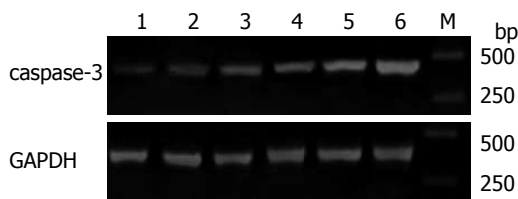


图2 不同浓度醋酸铅作用L-02细胞48 h后caspase-3 mRNA的表达水平. 1: 对照组; 2: 2.5 $\mu\text{mol/L}$ 组; 3: 40 $\mu\text{mol/L}$ 组; 4: 100 $\mu\text{mol/L}$ 组; 5: 200 $\mu\text{mol/L}$ 组; 6: 400 $\mu\text{mol/L}$ 组; M: Marker.

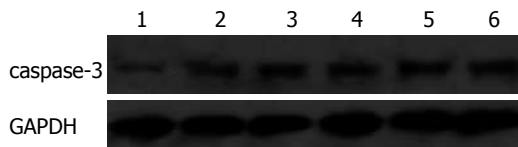


图3 不同浓度醋酸铅作用L-02细胞48 h后caspase-3 mRNA及内参GAPDH的表达. 1: 对照组; 2: 2.5 $\mu\text{mol/L}$ 组; 3: 40 $\mu\text{mol/L}$ 组; 4: 100 $\mu\text{mol/L}$ 组; 5: 200 $\mu\text{mol/L}$ 组; 6: 400 $\mu\text{mol/L}$ 组.

大多数凋亡途径均需要通过caspase-3介导, 所有caspase-3又被称为死亡蛋白^[16].

近年来, 在铅毒性的研究过程中发现, 细胞凋亡可能起着十分重要的作用. 研究表明, 铅可引起大鼠肾小管上皮细胞凋亡, 机制可能与氧化应激有关^[17], 也有学者认为可能与NF- κ B、p53基因的激活及bcl-2基因的抑制有关^[18], 还有学者认为可能主要通过激活p53而引起DNA损伤, 同时与Bax/Bcl-2表达的不平衡而导致线粒体功能障碍有关, 最终引起caspase-3的活化, 导致细胞凋亡^[19]. 铅可诱导星形胶质细胞^[20]、海马细胞^[21]、大鼠脑细胞^[22]凋亡, 其机制可能与Bax/Bcl-2比例增高和caspase-3蛋白的表达有关. 有研究表明铅暴露可诱导原代成骨细胞^[23]凋亡, 机制可能是通过增加细胞内的钙离子的浓度导致凋亡的发生. 有报道称醋酸铅可引起间质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)^[24]和大鼠肝脏干细胞^[16]的凋亡, 认为与caspase的级联反应和细胞外信号调节蛋白激酶的磷酸化直接相关. 铅也可诱导生殖细胞凋亡^[25], 机制可能与激活Fas/FasL、Bcl-2水平升高有关. 综上所述, 目前铅可以通过以下5种途径诱导细胞凋亡: (1)氧化应激^[26]; (2)Bcl-2/Bax值的改变^[27]; (3)依赖P53介导^[28]; (4)依赖Fas/FasL途径^[25]; (5)经caspase-3蛋白介导^[29].

本实验研究发现: 24及48 h后, 与对照组比较, 醋酸铅能明显抑制细胞的增殖($P<0.05$ 或 0.01). 细胞凋亡时细胞核染色质浓缩, 细胞膜包裹细胞

质和核碎片, 形成大小不一的凋亡小体^[30]. 我们应用Hoechst33258染色, 48 h后各实验组细胞形态学呈凋亡改变. PT-PCR结果显示: 实验组caspase-3 mRNA的表达较对照组明显升高, 呈明显的剂量-效应关系(1.0912 ± 0.0769 , 1.2874 ± 0.144 , 1.4536 ± 0.1046 , 1.6986 ± 0.1371 , 1.9882 ± 0.0925 vs 0.8438 ± 0.0933 , $P<0.01$). 为验证醋酸铅诱导L-02细胞凋亡机制, 我们检测caspase-3蛋白表达, 结果显示实验组caspase-3蛋白水平明显升高. 因此, 我们推测醋酸铅通过激活caspase-3诱导L-02细胞凋亡.

caspase-3抑制剂可以抑制caspase-3活性, 并抑制铅诱导HK-2细胞凋亡^[31]. 铅通过影响caspase-3的活性诱导神经母细胞的凋亡, 而17- β -雌二醇可有效阻断caspase-3活性, 对神经有保护作用^[32]. 硫胺素和抗坏血酸能拮抗醋酸铅引起小鼠睾丸的凋亡作用^[33], 主要是通过拮抗TGFP和caspase-3表达的提高, 最终引起睾丸细胞凋亡率明显降低. 氧化应激被认为是导致铅的神经毒性的可能机制之一. 铅暴露后, 为防止细胞损伤的有效方法之一是使用抗氧化剂^[34]. 有研究发现铅可能通过竞争性结合巯基和钙来影响其改变. 通过组合一种抗氧化剂(如卡托普利)和巯基螯合剂可以为治疗提供新思路^[35]. 因此, 临床上可以通过使用caspase-3抑制剂, 拮抗醋酸铅对肝细胞的凋亡作用, 达到治疗铅中毒的目的. 本实验有待于深入研究具体凋亡信号通路, 用于指导临床治疗.

总之, 铅可诱导L-02细胞凋亡, 从而导致肝损伤. 本实验为进一步研究铅引起的肝细胞凋亡作用机制及其对凋亡相关蛋白的影响提供了实验基础, 同时为临床上治疗铅引起的慢性肝损害, 提供了理论依据.

4 参考文献

- 1 van Wijngaarden E, Dosemeci M. Brain cancer mortality and potential occupational exposure to lead: findings from the National Longitudinal Mortality Study, 1979-1989. *Int J Cancer* 2006; 119: 1136-1144
- 2 Ji Y, Lu G, Chen G, Huang B, Zhang X, Shen K, Wu S. Microcystin-LR Induces Apoptosis via NF- κ B/iNOS Pathway in INS-1 Cells. *Int J Mol Sci* 2011; 12: 4722-4734
- 3 Shannan B, Seifert M, Leskov K, Willis J, Boothman D, Tilgen W, Reichrath J. Challenge and promise: roles for clusterin in pathogenesis, progression and therapy of cancer. *Cell Death Differ* 2006; 13: 12-19
- 4 Hossain MZ, Kleve MG. Nickel nanowires induced and reactive oxygen species mediated apoptosis in human pancreatic adenocarcinoma cells. *Int J Nanomedicine* 2011; 6: 1475-1485

- 5 Tamura R, Kanda T, Imazeki F, Wu S, Nakamoto S, Tanaka T, Arai M, Fujiwara K, Saito K, Roger T, Wakita T, Shirasawa H, Yokosuka O. Hepatitis C Virus Nonstructural 5A Protein Inhibits Lipopolysaccharide-Mediated Apoptosis of Hepatocytes by Decreasing Expression of Toll-Like Receptor 4. *J Infect Dis* 2011; 204: 793-801
- 6 姜子瑜, 华海清, 杨爱珍, 秦叔逵. 复方苦参、奥沙利铂及重组人血管内皮抑素联合对人肝癌细胞株 SMMC-7721 凋亡的影响. *世界华人消化杂志* 2010; 18: 3396-3401
- 7 徐进, 季林丹, 徐立红. 铅诱导的PC12细胞凋亡及caspase-3的激活. *环境科学学报* 2006; 26: 1172-1174
- 8 姜培荣, 杨富杰, 杨璐. 铅接触对神经和免疫系统的影响. *职业与健康* 2010; 26: 1904-1905
- 9 王涤新, 张薇. 铅中毒致视神经损害二例. *中华劳动卫生职业病杂志* 2006; 24: 621-622
- 10 Silva KL, Vasconcellos DV, Castro ED, Vasconcellos FC, Bigni R, Maia RC. Bisphosphonates induce apoptosis in CLL cells independently of MDR phenotype. *Cancer Chemother Pharmacol* 2008; 62: 165-171
- 11 Sun W, Wang W, Kim J, Keng P, Yang S, Zhang H, Liu C, Okunieff P, Zhang L. Anti-cancer effect of resveratrol is associated with induction of apoptosis via a mitochondrial pathway alignment. *Adv Exp Med Biol* 2008; 614: 179-186
- 12 Gao C, Tsuchida N. Activation of caspases in p53-induced transactivation-independent apoptosis. *Jpn J Cancer Res* 1999; 90: 180-187
- 13 王锴, 郁云龙, 刘阳阳, 李恩泽, 哈敏文, 朱志图. 蟾蜍毒素对人胃癌细胞凋亡的诱导机制. *世界华人消化杂志* 2011; 19: 116-120
- 14 张红英, 李锦毅, 张建永. Fas、FasL及Caspase-3在维甲酸诱导胃癌细胞凋亡中的作用. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 3255-3260
- 15 陈海鸥, 傅爱. 急性肝衰竭TNF- α 、Caspase-3及TGF- β 1 mRNA的表达及罗格列酮的干预. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 1185-1189
- 16 Agarwal S, Roy S, Ray A, Mazumder S, Bhattacharya S. Arsenic trioxide and lead acetate induce apoptosis in adult rat hepatic stem cells. *Cell Biol Toxicol* 2009; 25: 403-413
- 17 Wang L, Wang H, Hu M, Cao J, Chen D, Liu Z. Oxidative stress and apoptotic changes in primary cultures of rat proximal tubular cells exposed to lead. *Arch Toxicol* 2009; 83: 417-427
- 18 Rong J, Chang W, Lv L, Chen J. [Study on the roles of nuclear factor-kappaB, p53 and Bcl-2 gene in lead acetate induced apoptosis in PC12 cells]. *Weisheng Yanjiu* 2008; 37: 262-23, 268
- 19 Xu J, Ji LD, Xu LH. Lead-induced apoptosis in PC12 cells: involvement of p53, Bcl-2 family and caspase-3. *Toxicol Lett* 2006; 166: 160-167
- 20 Rai A, Maurya SK, Khare P, Srivastava A, Bandyopadhyay S. Characterization of developmental neurotoxicity of As, Cd, and Pb mixture: synergistic action of metal mixture in glial and neuronal functions. *Toxicol Sci* 2010; 118: 586-601
- 21 Sharifi AM, Mousavi SH, Jorjani M. Effect of chronic lead exposure on pro-apoptotic Bax and anti-apoptotic Bcl-2 protein expression in rat hippocampus in vivo. *Cell Mol Neurobiol* 2010; 30: 769-774
- 22 Kiran Kumar B, Prabhakara Rao Y, Noble T, Weddington K, McDowell VP, Rajanna S, Bettaiya R. Lead-induced alteration of apoptotic proteins in different regions of adult rat brain. *Toxicol Lett* 2009; 184: 56-60
- 23 Ma Y, Fu D, Liu Z. Effect of lead on apoptosis in cultured rat primary osteoblasts. *Toxicol Ind Health* 2011 Jun 28. [Epub ahead of print]
- 24 Sharifi AM, Ghazanfari R, Tekiyehmaroof N, Sharifi MA. Investigating the effect of lead acetate on rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells toxicity: role of apoptosis. *Toxicol Mech Methods* 2011; 21: 225-230
- 25 Shan G, Tang T, Zhang X. The protective effect of ascorbic acid and thiamine supplementation against damage caused by lead in the testes of mice. *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci* 2009; 29: 68-72
- 26 Du H, Zhu X, Fan C, Xu S, Wang Y, Zhou Y. Oxidative damage and OGG1 expression induced by a combined effect of titanium dioxide nanoparticles and lead acetate in human hepatocytes. *Environ Toxicol* 2011 Jan 20. [Epub ahead of print]
- 27 Sharifi AM, Mousavi SH. Studying the effects of lead on DNA fragmentation and proapoptotic bax and antiapoptotic bcl-2 protein expression in PC12 cells. *Toxicol Mech Methods* 2008; 18: 75-79
- 28 Tousson E, Rafat BM, Hessien M, El Barbary AA, Sami A. P53 and Bcl2 apoptosis proteins in meso-2,3-dimercaptosuccinic acid treated lead-intoxicated rabbits. *Toxicol Ind Health* 2011; 27: 271-278
- 29 Liu J, Han D, Li Y, Zheng L, Gu C, Piao Z, Au WW, Xu X, Huo X. Lead affects apoptosis and related gene XIAP and Smac expression in the hippocampus of developing rats. *Neurochem Res* 2010; 35: 473-479
- 30 秦成勇, 刘慧. 鹅脱氧胆酸衍生物HS-1200诱导人肝癌细胞株凋亡的作用及机制. *世界华人消化杂志* 2010; 18: 641-645
- 31 金文达, 雷义, 朱茂祥, 陈锋, 曾燃元. 醋酸铅诱导HK-2细胞凋亡及其机制研究. *毒理学杂志* 2009; 10: 364-367
- 32 Chetty CS, Vemuri MC, Reddy GR, Suresh C. Protective effect of 17-beta-estradiol in human neurocellular models of lead exposure. *Neurotoxicology* 2007; 28: 396-401
- 33 Zhang Y, Wang CH, Liang JC, Zhang C, Wang CQ. [Impacts of combined supplementation with ascorbic acid and thiamine on certain biochemical and morphologic indexes of testes in mice treated by lead]. *Weisheng Yanjiu* 2006; 35: 731-734
- 34 Chen T, Li YY, Zhang JL, Xu B, Lin Y, Wang CX, Guan WC, Wang YJ, Xu SQ. Protective effect of C(60)-methionine derivate on lead-exposed human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *J Appl Toxicol* 2011; 31: 255-261
- 35 Pachauri V, Saxena G, Mehta A, Mishra D, Flora SJ. Combinational chelation therapy abrogates lead-induced neurodegeneration in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 2009; 240: 255-264

■同行评价

本文选题有一定的新颖性, 实验数据可靠, 结果客观, 有一定的学术和实际应用价值。

编辑 何基才 电编 何基才

糜酶对实验性大鼠肝纤维化的影响

张立华, 王昌源, 杜磊, 谭炳芹

■背景资料

肝纤维化的病理过程是以胶原为主的细胞外基质(ECM)过量增生与异常沉积。其发病机制复杂, 已证实肥大细胞与肝纤维化密切相关。而存在于肥大细胞中的糜酶也被证明参与了多种脏器如心脏、肾脏等的纤维化, 但其与肝纤维化的关系尚不明确, 如能证实, 则有助于完善肝纤维化发病机制, 寻找新的抗肝纤维化靶点, 发展新的抗肝纤维化药物。

张立华, 济南市传染病医院 山东省济南市 250021
王昌源, 济南市传染病医院 山东省济南市 250021
杜磊, 济南市传染病医院 山东省济南市 250021
谭炳芹, 潍坊市人民医院 山东省潍坊市 261000
张立华, 主治医师, 主要从事肝病如病毒性肝炎、肝硬化的研究。
作者贡献分布: 本研究由王昌源与张立华设计; 研究过程由张立华、杜磊与谭炳芹操作完成; 数据分析和论文写作由张立华完成。
通讯作者: 王昌源, 教授, 250021, 山东省济南市, 山东大学医学院 济南市传染病医院。wangcy5440@163.com
电话: 0531-87935971-8017
收稿日期: 2011-05-26 修回日期: 2011-08-05
接受日期: 2011-08-12 在线出版日期: 2011-08-18

Role of chymase in the pathogenesis of experimental liver fibrosis in rats

Li-Hua Zhang, Chang-Yuan Wang, Lei Du,
Bing-Qin Tan

Li-Hua Zhang, Jinan Infectious Disease Hospital, Jinan 250021, Shandong Province, China
Chang-Yuan Wang, Medical College of Shandong University, Jinan Infectious Disease Hospital, Jinan 250021, Shandong Province, China
Lei Du, Jinan Infectious Disease Hospital, Jinan 250021, Shandong Province, China
Bing-Qin Tan, People's Hospital of Weifang, Weifang 261000, Shandong Province, China
Correspondence to: Professor Chang-Yuan Wang, Medical College of Shandong University, Jinan Infectious Disease Hospital, Jinan 250021, Shandong Province, China. wangcy5440@163.com
Received: 2011-05-26 Revised: 2011-08-05
Accepted: 2011-08-12 Published online: 2011-08-18

Abstract

AIM: To investigate the role of chymase in the pathogenesis of dimethylnitrosamine (DMN)-induced liver fibrosis in rats.

METHODS: Thirty male Wistar rats were randomly divided into three groups. The model group was administered with 10% DMN. The interventional group was given soybean trypsin inhibitor (SBTI) after induction of liver fibrosis with DMN. The normal group was given normal sodium. Liver histological and ultramicroscopic changes were observed, and serum indices for liver fibrosis, serum transforming growth factor

$\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) and hepatic chymase-like activity were measured at the end of the experiment.

RESULTS: Compared to the model group, the interventional group had narrower fiber separation and showed no typical pseudo-lobule. Transmission electron microscopy demonstrated that hepatic cell damage in the interventional group was lessened significantly as compared to that in the model group, and only scattered collagen fiber was observed in the sinus hepaticus. Serum levels of HA, LN, PC III, C IV, TGF- $\beta 1$ and hepatic chymase-like activity in the interventional group were significantly lower than those in the model group (all $P < 0.05$).

CONCLUSION: Chymase participates in the development of liver fibrosis possibly by direct or indirect induction of TGF- $\beta 1$ and may be a promising therapy target for hepatic fibrosis.

Key words: Chymase; Chymase inhibitor; Liver fibrosis; TGF- $\beta 1$; Wistar rats

Zhang LH, Wang CY, Du L, Tan BQ. Role of chymase in the pathogenesis of experimental liver fibrosis in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(23): 2432-2436

摘要

目的: 探讨糜酶在肝纤维化形成中的作用, 为研发新型抗纤维化药物奠定基础。

方法: 30只♂Wistar大鼠随机均分为3组。模型组以DMN制作肝纤维化模型; 干预组除应用DMN外, 同时给予糜酶抑制剂; 正常组以生理盐水作对照。实验结束时进行组织学检查、电镜观察、血清肝纤维化指标、转化生长因子- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)和糜酶样活性检测。

结果: 与模型组相比干预组肝内纤维间隔纤细, 无明显假小叶。电镜显示干预组肝细胞损伤明显减轻, 肝窦内胶原纤维较少。干预组血清透明质酸(HA)、层粘连蛋白(LN)、Ⅲ型前胶原(PCⅢ)、Ⅳ型胶原(CⅣ)、TGF- $\beta 1$ 和肝内糜酶样活性均明显低于模型组(均 $P < 0.05$)。

■同行评议者

刘绍能, 主任医师, 中国中医科学院广安门医院消化科

结论: 糜酶通过直接或间接诱导TGF- β 1的产生在肝纤维化形成中发挥重要作用, 糜酶将成为未来新型抗肝纤维化药物的作用靶点.

关键词: 糜酶; 糜酶抑制剂; 肝纤维化; 转化生长因子- β 1; Wistar大鼠

张立华, 王昌源, 杜磊, 谭炳芹. 糜酶对实验性大鼠肝纤维化的影响. 世界华人消化杂志 2011; 19(23): 2432-2436

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2432.asp>

0 引言

临床诸多的抗肝纤维化药物疗效均不理想^[1], 进一步研究肝纤维化的形成机制, 寻找新的治疗靶点对药物研发具有重要意义. 一些研究提示肥大细胞参与多种组织纤维化的发生, 如慢性胰腺炎^[2,3]、肝纤维化^[4-7]和肝硬化^[8]、肾纤维化^[9-12]及肺纤维化^[13,14]等. 肥大细胞通过何种途径参与组织纤维化的形成引起不少学者的关注, 一些研究显示主要存在于肥大细胞中的糜酶与心肌、肺间质的纤维化密切相关^[15-17]. 但是, 糜酶与肝纤维化的关系目前仍不清楚. 本研究通过DMN大鼠模型, 探讨了糜酶在肝纤维化形成中的作用, 为研发新型抗纤维化药物奠定了基础.

1 材料和方法

1.1 材料 δ Wistar大鼠, 购自山东大学医学院实验动物中心. 大豆胰蛋白酶抑制剂(SBTI)、血管紧张素 I (Ang I)、牛胰蛋白酶抑制剂(Aprotinine)均为美国Amresco公司产品, 赖诺普利(Lisinopril)为Merck公司产品, Ang I 放免分析测定盒购自北京北方生物技术研究所, LN、HA、PCIII及CIV酶联免疫分析测定盒均购自上海海研医学生物技术中心, TGF- β 1试剂盒购自浙江大学生物基因工程有限公司, DMN购自天津化学试剂研究所.

1.2 方法

1.2.1 实验动物处理: 采用DMN腹腔注射法制作肝纤维化大鼠模型^[18]. 8 wk龄雄性Wistar大鼠30只, 体质量150-200 g, 随机均分为3组: 干预组、模型组及正常组. 其中干预组及模型组大鼠每周连续3 d, 腹腔内注射1% DMN 10 mg/kg, 共4 wk. 干预组同时给予SBTI 10 mg/kg灌胃, 1次/d, 共4 wk, 模型组及正常组以等体积的生理盐水作对照. 4 wk末, 用3%戊巴比妥钠8 mL腹腔注射麻醉大鼠, 收取肝组织, 取心脏血, 15 000 g离

心3 min, 取上清-20 $^{\circ}$ C保存, 部分肝组织常规切片, 部分制作电镜标本, 其余-70 $^{\circ}$ C保存备用. 实验结束时, 干预组和模型组分别有1只和2只大鼠死亡.

1.2.2 组织与超微结构学观察: 肝组织切片以常规HE及Masson染色方法进行, 并按照2000年修订病毒性肝炎防治方案进行肝组织纤维化程度分期. 透射电镜标本按常规方法制作.

1.2.3 血清肝纤维化指标检测: HA、LN、PCIII及CIV浓度按酶联免疫吸附试剂盒说明进行.

1.2.4 血清肝脏转化生长因子- β 1(TGF- β 1)检测: 按酶联免疫吸附试剂盒说明进行.

1.2.5 肝内糜酶样活性测定: 由于目前还未发现糜酶特异的抑制剂, 组织糜酶活性难以测定. 本实验参考王醒等^[19]的方法进行间接糜酶样活性测定. 利用不能抑制糜酶活性的蛋白酶抑制剂抑制样品中其他能水解Ang I 的蛋白酶活性, 剩余活性被认为是糜酶样活性, 主要包括糜酶活性, 还含有少量与糜酶特性类似的其他一些蛋白酶活性. 肝组织称重后剪碎放入预冷的20 mmol/L Tris-HCl、pH7.4缓冲液中, Polytron匀浆, 15 000 g, 离心30 min, 分别收集上清及沉淀物. 糜酶主要存在于上清中, 而血管紧张素转化酶(ACE)主要存在于沉淀中. 沉淀物以同样缓冲液再悬浮, 微匀浆使之均匀待测. 以Lowry法测定各待测物中蛋白浓度.

酶活性检测反应体系分为4组, 每组均设空白对照. 各组均以20 mmol/L Tris-HCl、pH7.4缓冲液调整反应体积至500 μ L. 其中, 1组: 含酶底物Ang I 6 ng、待测物(上清或沉渣); 2组: 同一组另加Lisinopril至50 μ mol/L; 3组: 同一组另加Aprotinine至20 μ mol/L; 4组: 同一组并另加EDTA至20 mmol/L; 不含待测物的上述体系分别为各组的对照. 各组均最后加入待测物启动反应, 37 $^{\circ}$ C水浴15 min, 以2.5倍体积预冷乙醇终止反应, 10 000 g, 离心30 min, 取上清液冰冻干燥后加入400 μ L缓冲液(由试剂盒提供)溶解, 利用血浆肾素活性放射免疫分析测定盒测定各样品中Ang I 剩余量. 根据反应前后Ang I 的减少量计算酶活性. 不加任何抑制剂的反应体系值为Ang I 降解总活性. 被Lisinopril抑制的Ang I 降解活力为样品中ACE活力, 糜酶样活性等于总活性减去被Lisinopril、Aprotinine和EDTA抑制的活性. 每分钟降解1 ng Ang I 所需酶量定义为1酶活性单位(U).

■ 研发前沿

研究证实, 肝纤维化为一动态的过程, 是可逆的, 这大大增强了人们对于肝纤维化防治的信心. 目前肝纤维化的发病机制日臻完善, 相关研究已深入到分子生物学领域.

■相关报道

局部Ang II与组织纤维化和/或重构过程有关,肝星状细胞可表达Ang II受体,故血管紧张素II与肝纤维化的形成关系密切。血管紧张素II通过促进肝星状细胞发生,影响TGF- β 、基质金属蛋白酶及其组织抑制物的合成、活化,参与肝纤维化形成。

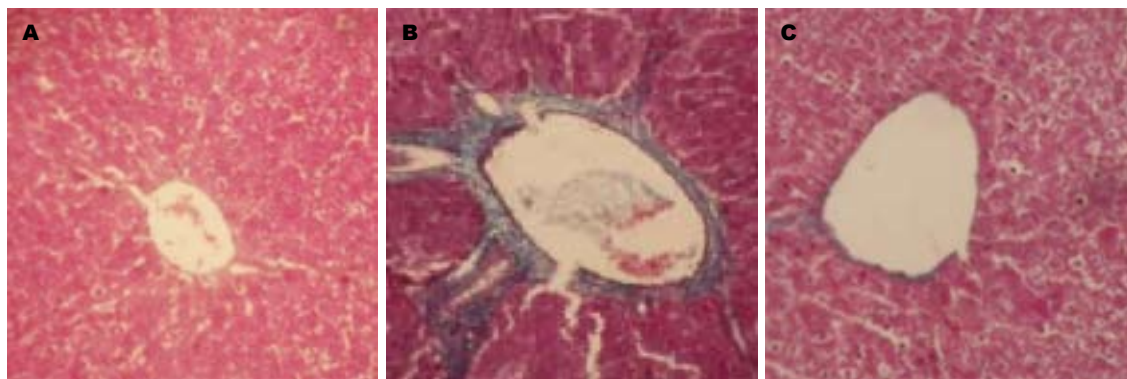


图1 肝组织Masson染色。A: 正常组; B: 模型组; C: 干预组。

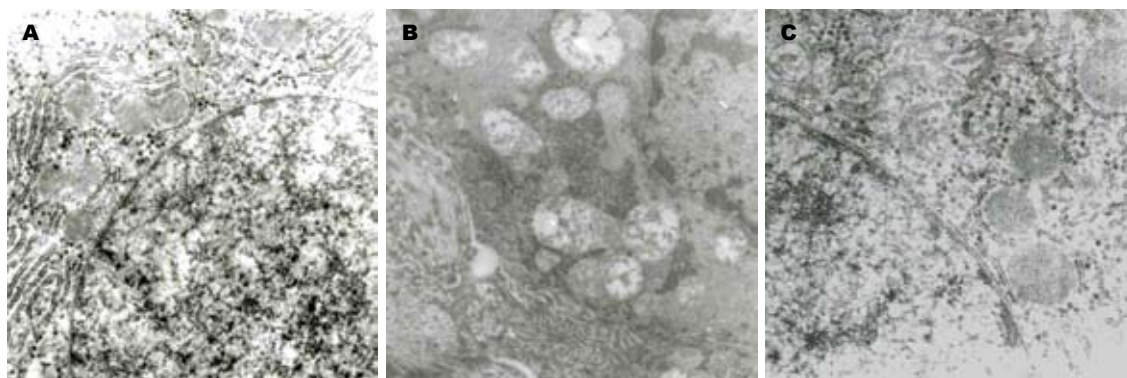


图2 大鼠肝细胞电镜照片。A: 正常组; B: 模型组; C: 干预组。

表1 HE、Masson染色肝组织纤维化程度分期

分组	n	纤维化分期					秩和
		0	I	II	III	IV	
正常组	10	10	—	—	—	—	55
模型组	8	—	—	1	2	5	179.5 ^a
干预组	9	—	1	5	3	—	143.5 ^{ac}

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

2 结果

2.1 组织与超微结构学观察 HE染色显示模型组肝小叶结构破坏,纤维结缔组织明显增生并向小叶内延伸。Masson染色示肝内完全性纤维间隔,假小叶形成。干预组胶原纤维间隔纤细,着色减少,无明显假小叶形成(图1)。电镜显示模型组肝细胞变性明显,表现为内质网溶解,核糖体消失,线粒体肿胀,结构模糊,肝细胞核固缩、变形,核膜模糊不清,肝窦内胶原纤维大量增生。干预组肝细胞线粒体无明显肿胀,膜性结构可见,内质网存在,但不如正常组规律,肝窦内胶原纤维明显少于模型组(图2)。3组大鼠肝组织纤维化程度分期差异均具有显著性(均 $P < 0.05$,表1)。

2.2 肝纤维化指标及TGF- β 1含量测定 模型组、干预组和正常组大鼠血清HA、LN、PCIII、CIV及TGF- β 1检测结果(表2)。

2.3 肝组织内ACE及糜酶样活性测定 干预组、模型组和正常组大鼠肝内糜酶样活性和ACE活性(表3)。

3 讨论

人糜酶是一种相对分子质量为29 000 Da的糖蛋白,与已知的丝氨酸蛋白酶具有高度同源性。他在肥大细胞、内皮细胞以及间叶细胞分泌颗粒中合成并贮存,其中以肥大细胞为主。糜酶属强碱性酶,作用的最适pH值为8-9,作用底物主要为Ang I和神经紧张素,其活性可被糜酶抑素、大豆胰蛋白酶抑制剂和苯甲基磺酰氟等丝氨酸蛋白酶抑制剂所抑制。已经证实,糜酶与心肌、肺间质等的纤维化密切相关。但其与肝纤维化的关系目前尚不清楚。

尹明实等^[20]发现:慢性肝炎纤维化分期重(S3和S4)的患者,其肝组织中糜酶浓度明显高于纤维化轻(S1和S2)的患者;免疫组化染色显示糜酶标记的肥大细胞主要分布于纤维化旺盛的汇

表 2 各组大鼠血清肝纤维化指标及TGF-β1的含量测定

分组	n	HA(μg/L)	LN(μg/L)	PC III (μg/L)	C(μg/L)	TGF-β1(ng/L)
正常组	10	102.5 ± 14.1	97.2 ± 13.5	90.6 ± 16.3	38.4 ± 5.7	3.46 ± 0.25
模型组	8	198.6 ± 16.3 ^a	116.9 ± 13.4 ^a	201.6 ± 12.7 ^a	84.3 ± 6.9 ^a	11.99 ± 1.93 ^a
干预组	9	165.6 ± 14.8 ^{ac}	102.4 ± 11.4 ^c	172.8 ± 13.8 ^{ac}	69.6 ± 7.3 ^{ac}	5.60 ± 0.91 ^c

^aP<0.05 vs 正常组; ^cP<0.05 vs 模型组。

表 3 各组大鼠肝组织内ACE及糜酶样活性测定

分组	样本	相对活性(U/mg 蛋白)	
		ACE	Chymase-like
正常组	上清液	0.116 ± 0.009	0.213 ± 0.013
	沉渣	0.207 ± 0.033	0.116 ± 0.009
	合计	0.162 ± 0.052	0.165 ± 0.051
模型组	上清液	0.117 ± 0.010	0.371 ± 0.028 ^a
	沉渣	0.222 ± 0.023	0.204 ± 0.019 ^a
	合计	0.170 ± 0.057	0.288 ± 0.089 ^a
干预组	上清液	0.120 ± 0.010	0.229 ± 0.011 ^c
	沉渣	0.214 ± 0.016	0.204 ± 0.014 ^a
	合计	0.167 ± 0.050	0.216 ± 0.018 ^{ac}

^aP<0.05 vs 正常组; ^cP<0.05 vs 模型组。

管区与类洞壁,其分布与纤维化部位相一致,且肝组织中糜酶浓度高的患者,其肝组织内糜酶标记的肥大细胞分布增多,提示肝组织中糜酶浓度可能与慢性肝炎肝纤维化关系密切。本实验应用糜酶抑制剂干预大鼠肝纤维化过程,结果发现不论从组织与超微结构学还是血清学指标上,干预组大鼠肝纤维化程度均较模型组明显减轻,从而证明糜酶在肝纤维化的形成中具有非常重要的作用,同时还提示抑制糜酶能够明显地减轻肝脏纤维化。

本研究同时检测了3组大鼠肝内糜酶样活性、ACE活性及血清TGF-β1水平,结果显示干预组大鼠肝内糜酶样活性和血清TGF-β1水平较模型组明显降低($P<0.05$),而ACE活性无改变。多项研究证实TGF-β1在肝纤维化的形成中发挥重要作用^[21-23],他是目前已知的最重要的促HSC活化因子之一^[24],在HSC活化早期刺激ECM的合成与沉积,主要包括I型胶原、III型胶原和IV型胶原^[25,26]。Lindsted等^[27]的研究证实糜酶可直接激活TGF-β1的前体。同时,糜酶作为目前已知的最强有力的局部组织Ang I转化酶,能将局部组织中的Ang I底物转化为Ang II^[28],而Ang II在心肌、肾组织中都可诱导TGF-β1的生成^[29,30]。以上

再次证实糜酶参与了肝纤维化的形成,直接或间接诱导TGF-β1的生成为其机制之一。

总之,本研究通过组织与结构学观察、血清学指标和肝组织内糜酶样活性检测等证实,糜酶确实参与了肝纤维化的发生,直接或间接诱导TGF-β1的生成为其机制之一。肝纤维化机制复杂,目前尚未完全清楚,临床抗纤维化治疗疗效也不满意,本研究首次阐述了肝纤维化形成的糜酶途径,丰富了肝纤维化理论,也为临床抗纤维化治疗找到了新的靶点。糜酶抑制剂有可能发展为一类新的抗肝纤维化药物。

4 参考文献

- 梁兵, 欧阳钦. 肝纤维化的治疗进展. 昆明医学院学报 2007; 28: 126-132
- Esposito I, Friess H, Kappeler A, Shrikhande S, Kleeff J, Ramesh H, Zimmermann A, Büchler MW. Mast cell distribution and activation in chronic pancreatitis. *Hum Pathol* 2001; 32: 1174-1183
- 李波静, 王兴鹏, 吴凯. 肥大细胞在大鼠胰腺组织纤维化形成中的作用及其机制. 中华消化杂志 2006; 3: 171-175
- Terada T, Matsunaga Y. Increased mast cells in hepatocellular carcinoma and intrahepatic cholangiocarcinoma. *J Hepatol* 2000; 33: 961-966
- Matsunaga Y, Terada T. Mast cell subpopulations in chronic inflammatory hepatobiliary diseases. *Liver* 2000; 20: 152-156
- 阿依甫汗, 温浩. 肥大细胞与肝纤维化. 消化外科 2004; 3: 374-377
- Jeong WI, Jeong DH, Do SH, Kim YK, Park HY, Kwon OD, Kim TH, Jeong KS. Mild hepatic fibrosis in cholesterol and sodium cholate diet-fed rats. *J Vet Med Sci* 2005; 67: 235-242
- 张晓晨, 康健, 禄云山, 曹建平, 刘亚革. 肝硬化患者肝脾组织中肥大细胞的分布特点. 沈阳部队医药 2001; 14: 575-575
- Tóth T, Tóth-Jakatics R, Jimi S, Ihara M, Urata H, Takebayashi S. Mast cells in rapidly progressive glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10: 1498-1505
- Tóth T, Tóth-Jakatics R, Jimi S, Takebayashi S. Increased density of interstitial mast cells in amyloid A renal amyloidosis. *Mod Pathol* 2000; 13: 1020-1028
- Yamada M, Ueda M, Naruko T, Tanabe S, Han YS, Ikura Y, Ogami M, Takai S, Miyazaki M. Mast cell chymase expression and mast cell phenotypes in human rejected kidneys. *Kidney Int* 2001; 59: 1374-1381

■创新盘点

已经证明,糜酶与心肌、肾脏的纤维化密切相关,但与肝纤维化的关系尚不明确。本研究首次应用糜酶抑制剂干预肝纤维化的发生,并通过病理学、肝纤维化指标、糜酶样活性及TGF-β1等多项指标,证实了糜酶抑制剂对肝纤维化的抑制作用,有力地证明了糜酶的促肝纤维化发生作用。

■同行评价

本研究首次阐述了肝纤维化形成的糜酶途径,丰富了肝纤维化理论,也为临床抗纤维化治疗找到了新的靶点。糜酶抑制剂有可能发展为一类新的抗肝纤维化药物。

- 12 Goto E, Honjo S, Yamashita H, Shomori K, Adachi H, Ito H. Mast cells in human allografted kidney: correlation with interstitial fibrosis. *Clin Transplant* 2002; 16 Suppl 8: 7-11
- 13 Cairns JA, Walls AF. Mast cell tryptase stimulates the synthesis of type I collagen in human lung fibroblasts. *J Clin Invest* 1997; 99: 1313-1321
- 14 Akers IA, Parsons M, Hill MR, Hollenberg MD, Sanjar S, Laurent GJ, McNulty RJ. Mast cell tryptase stimulates human lung fibroblast proliferation via protease-activated receptor-2. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000; 278: L193-L201
- 15 Takai S, Jin D, Sakaguchi M, Katayama S, Muramatsu M, Sakaguchi M, Matsumura E, Kim S, Miyazaki M. A novel chymase inhibitor, 4-[1-([bis-(4-methylphenyl)-methyl]-carbamoyl)3-(2-ethoxy-benzyl)-4-oxo-azetidine-2-yl]oxy]-benzoic acid (BCEAB), suppressed cardiac fibrosis in cardiomyopathic hamsters. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 305: 17-23
- 16 王先梅, 赵连友, 郑强荪, 武利军, 陈永清, 牛晓琳, 黄志刚. 糜酶抑制剂对自发性高血压大鼠心肌纤维化的影响. *心脏杂志* 2006; 1: 31-34
- 17 郑金旭, 顾燕兰, 万兵. 糜酶抑制剂对肺纤维化的干预作用及其机制研究. *山东大学学报(医学版)* 2008; 12: 1132-1135
- 18 Tada S, Nakamuta M, Enjoji M, Sugimoto R, Iwamoto H, Kato M, Nakashima Y, Nawata H. Pirfenidone inhibits dimethylnitrosamine-induced hepatic fibrosis in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2001; 28: 522-527
- 19 王醒, 李鹏, 陈兰英. 放免法同时测定糜酶转基因小鼠心脏中血管紧张素转化酶及糜酶活性. *基础医学与临床* 2000; 20: 90-92
- 20 尹明实, 朴红心, 周振霞, 韩学吉, 太永日. 肝组织中糜酶浓度在慢性肝炎肝纤维化中的意义. *中国免疫学杂志* 2006; 22: 876-877
- 21 Lin WC, Kuo SC, Lin WL, Fang HL, Wang BC. Filtrate of fermented mycelia from *Antrodia camphorata* reduces liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in rats. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 2369-2374
- 22 孙丽娟, 曹慧玲, 王玉梅, 高小平, 胡宏, 李良军. 肝病患者血清TGF- β 检测的临床意义. *放射免疫学杂志* 2006; 19: 3
- 23 Fang HL, Lai JJ, Lin WL, Lin WC. A fermented substance from *Aspergillus phoenicis* reduces liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 2007; 71: 1154-1161
- 24 Gressner AM, Weiskirchen R, Breitkopf K, Dooley S. Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. *Front Biosci* 2002; 7: d793-d807
- 25 Kharbanda KK, Rogers DD, Wyatt TA, Sorrell MF, Tuma DJ. Transforming growth factor-beta induces contraction of activated hepatic stellate cells. *J Hepatol* 2004; 41: 60-66
- 26 Chen YW, Li DG, Wu JX, Chen YW, Lu HM. Tetradrine inhibits activation of rat hepatic stellate cells stimulated by transforming growth factor-beta in vitro via up-regulation of Smad 7. *J Ethnopharmacol* 2005; 100: 299-305
- 27 Lindstedt KA, Wang Y, Shiota N, Saarinen J, Hyytiäinen M, Kokkonen JO, Keski-Oja J, Kovanen PT. Activation of paracrine TGF-beta1 signaling upon stimulation and degranulation of rat serosal mast cells: a novel function for chymase. *FASEB J* 2001; 15: 1377-1388
- 28 赵晓燕, 苏金林, 张兴凯. 糜酶与心血管疾病间关系的研究进展. *宁夏医学杂志* 2010; 32: 91-92
- 29 陈爱兰, 陈敏生. TGF- β 1、Ang II与心肌肥大关系的研究进展. *热带医学杂志* 2005; 5: 411-413
- 30 Ruiz-Ortega M, Egido J. Angiotensin II modulates cell growth-related events and synthesis of matrix proteins in renal interstitial fibroblasts. *Kidney Int* 1997; 52: 1497-1510

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

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

• 消息 •

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

本刊讯 《中文核心期刊要目总览》(2008年版)采用了被索量、被摘量、被引量、他引量、被摘率、影响因子、获国家奖或被国内外重要检索工具收录、基金论文比、Web下载量等9个评价指标, 选作评价指标统计源的数据库及文摘刊物达80余种, 统计文献量达32400余万篇次(2003-2005年), 涉及期刊12400余种。本版还加大了专家评审力度, 5500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1980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(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)

siRNA沉默NHE1基因对MHCC97-H肝癌细胞侵袭迁移的影响

孙伟, 王德盛, 杨薛康, 周亮, 张勇, 苟泽鹏, 祝普利, 张福琴, 窦科峰

孙伟, 王德盛, 周亮, 张勇, 苟泽鹏, 祝普利, 张福琴, 窦科峰, 中国人民解放军第四军医大学西京医院肝胆胰脾外科 陕西省西安市 710032

杨薛康, 中国人民解放军第四军医大学西京医院烧伤与皮肤外科 陕西省西安市 710032

孙伟, 在读硕士, 主要从事肝癌的复发与转移的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30872480

陕西省科技研究发展计划基金资助项目, No. 2008K09-05

西京医院学科助推计划基金资助项目, No. XJZT07M013

作者贡献分布: 此课题由王德盛, 杨薛康立题设计; 研究过程由孙伟, 周亮, 张勇, 苟泽鹏, 祝普利操作完成; 数据分析由孙伟, 周亮, 张勇完成; 本论文写作由孙伟完成; 王德盛, 窦科峰, 张福琴审校。

通讯作者: 王德盛, 副教授, 副主任医师, 710032, 陕西省西安市, 中国人民解放军第四军医大学西京医院肝胆胰脾外科。
wangds@fmmu.edu.cn

电话: 029-84775259 传真: 029-84775255

收稿日期: 2011-06-03 修回日期: 2011-08-08

接受日期: 2011-08-12 在线出版日期: 2011-08-18

SiRNA-mediated silencing of the NHE1 gene inhibits cell invasion and migration in human hepatocellular carcinoma cell line MHCC97-H

Wei Sun, De-Sheng Wang, Xue-Kang Yang, Liang Zhou, Yong Zhang, Ze-Peng Gou, Pu-Li Zhu, Fu-Qin Zhang, Ke-Feng Dou

Wei Sun, De-Sheng Wang, Liang Zhou, Yong Zhang, Ze-Peng Gou, Pu-Li Zhu, Fu-Qin Zhang, Ke-Feng Dou, Department of Hepatobiliary Surgery, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University of Chinese PLA, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China

Xue-Kang Yang, Department of Burns and Cutaneous Surgery, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University of Chinese PLA, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30872480; the Natural Science Foundation of Shaanxi Province, No. 2008K09-05; and the Science Promotion Program Foundation of Xijing Hospital, No. XJZT07M013

Correspondence to: Associate Professor De-Sheng Wang, Department of Hepatobiliary Surgery, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University of Chinese PLA, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China. wangds@fmmu.edu.cn

Received: 2011-06-03 Revised: 2011-08-08

Accepted: 2011-08-12 Published online: 2011-08-18

Abstract

AIM: To investigate the effect of small interfering

RNA (siRNA)-mediated silencing of the Na⁺/H⁺ exchanger 1 (NHE1) gene on cell invasion and migration in human hepatocellular carcinoma cell line MHCC97-H.

METHODS: After MHCC97-H cells were transfected with NHE1-specific siRNA, the levels of NHE1 mRNA and protein were detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot, respectively. Cell proliferation was detected by MTT assay. The impact of NHE1 knockdown on cell invasion and migration was determined by Transwell chamber assay. The changes in morphology cytoskeleton and pseudopodia were observed by immunofluorescence.

RESULTS: Compared to negative control and mock control cells, the levels of NHE1 mRNA and protein in MHCC97-H cells transfected with NHE1-specific siRNA decreased significantly ($P < 0.05$). NHE1 knockdown significantly suppressed the invasion and migration of MHCC97-H cells compared to negative control and mock control cells (34.1 ± 5.2 vs 56.9 ± 6.1 , 57.2 ± 6.1 ; 120.2 ± 12.8 vs 235.2 ± 16.8 , 231.9 ± 14.7 ; all $P < 0.05$). However, there were no significant differences in cell migration and invasion between the two control groups. Cell proliferation showed no significant differences among the three groups 48 or 72 h after transfection. Compared to the two control groups, deletion of NHE1 decreased the number of membrane pseudopodia and disrupted the cross-linked actin network in MHCC97-H cells.

CONCLUSION: Deletion of NHE1 inhibits cell invasion and migration by influencing cytoskeleton rearrangement and pseudopodia formation in human hepatocellular carcinoma cell line MHCC97-H.

Key Words: Liver cancer; Na⁺/H⁺ exchanger 1; RNA interference; Cytoskeleton

Sun W, Wang DS, Yang XK, Zhou L, Zhang Y, Gou ZP,

■背景资料

钠氢交换蛋白1广泛存在于细胞膜表面, 可通过排出细胞内H⁺, 形成细胞外酸性微环境, 也可通过与肌动蛋白结合蛋白(ezrin, radixin and moesin, ERM)的联系, 参与细胞形态的维持及伪足的形成。近年来研究表明, 钠氢交换蛋白1在多种肿瘤细胞中表达增加, 并和肿瘤细胞的侵袭转移密切相关。

■同行评议者

范学工, 教授, 中南大学湘雅医院感染病科; 莫卫东, 教授, 安徽省立医院肝胆外科

■研究前沿

研究表明, NHE1在侵袭性伪足处聚集维持酸性微环境, 通过介导溶酶体向细胞外周转运和胞吐作用, 释放多种蛋白酶以降解细胞外基质, 利于肿瘤侵袭转移, 但其具体机制有待进一步研究。

Zhu PL, Zhang FQ, Dou KF. SiRNA-mediated silencing of the NHE1 gene inhibits cell invasion and migration in human hepatocellular carcinoma cell line MHCC97-H. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(23): 2437-2442

摘要

目的: 探讨RNA干扰沉默NHE1基因后对人肝癌细胞株MHCC97-H细胞侵袭迁移的影响。

方法: 应用NHE1基因小干扰RNA(small interfering RNA, siRNA)转染人肝癌细胞株MHCC97-H细胞, 同时设立空白对照组和无关对照组。转染成功后采用RT-PCR和Western blot分别从基因和蛋白水平检测RNA干扰沉默NHE1基因的效果。MTT法测定转染后三组细胞的增殖状况, Transwell小室检测沉默NHE1基因对MHCC97-H细胞侵袭、转移能力的影响, 进一步采用免疫荧光观察其对MHCC97-H细胞骨架和伪足的影响。

结果: 与两对照组比较, 转染NHE1-siRNA组NHE1 mRNA和蛋白表达水平均明显降低($P<0.05$); 细胞侵袭、迁移实验结果显示, NHE1-siRNA组穿透人工基底膜的细胞数(34.1 ± 5.2 , 120.2 ± 12.8)较空白对照组(56.9 ± 6.1 , 235.2 ± 16.8)和转染无关对照组(57.2 ± 6.1 , 231.9 ± 14.7)均明显减少, 差异均有统计学意义($P<0.05$), 而空白对照组与无关对照组比较差异无统计学意义; MTT结果显示, 转染后48 h和72 h三组细胞间增殖活性差异无统计学意义; NHE1基因沉默后与两对照组相比, MHCC97-H细胞膜伪足形成减少, 细胞内肌动蛋白网排列紊乱。

结论: siRNA沉默NHE1基因后可能通过影响MHCC97-H细胞骨架的重组和伪足的形成, 从而抑制MHCC97-H细胞的侵袭和迁移能力。

关键词: 肝癌; 钠氢交换蛋白1; RNA干扰; 细胞骨架

孙伟, 王德盛, 杨薛康, 周亮, 张勇, 苟泽鹏, 祝普利, 张福琴, 窦科峰. siRNA沉默NHE1基因对MHCC97-H肝癌细胞侵袭迁移的影响. *世界华人消化杂志* 2011; 19(23): 2437-2442

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2437.asp>

0 引言

钠氢交换蛋白1(Na⁺/H⁺exchanger1, NHE1)是存在于所有真核细胞的一种跨膜蛋白, 其功能是通过Na⁺、H⁺交换将细胞内过多的H⁺排出, 在维持细胞内pH值、稳定细胞容量、参与离子转运、调节肿瘤细胞行为如侵袭和转移等方

面具有重要的作用^[1-3]。另有研究表明, NHE1可与肌动蛋白结合蛋白(ezrin, radixin and moesin, ERM)之间发生结构联系, 参与细胞形态的维持以及调节细胞的运动能力^[4-6]。肝癌是我国最常见的恶性肿瘤之一, 其中90%的患者死于肝癌转移, 严重威胁着人类的健康^[7,8]。我们前期研究证明, NHE1 mRNA和蛋白在肝癌组织中的表达程度显著高于正常肝组织和癌旁组织, 提示NHE1可能与肝癌的恶性程度和侵袭转移有密切的关系^[9-11]。本研究以人肝癌细胞株MHCC97-H细胞为研究对象, 采用脂质体转染小干扰RNA沉默NHE1基因, 观察转染后MHCC97-H细胞侵袭、迁移能力的变化, 观察转染后细胞骨架肌动蛋白和细胞伪足的变化, 以期找出抑制肝癌侵袭转移的治疗靶点。

1 材料和方法

1.1 材料 肝癌细胞株MHCC97-H购自上海复旦大学肝癌研究所, DMEM培养基购自Gibco公司。TRIzol、脂质体转染试剂LipofectamineTM2000购自Invitrogen公司。逆转录试剂盒购自Fermentas公司。NHE1基因siRNA购自上海吉玛生物有限公司(NHE1-siRNA 序列1、正义链: 5'-GCCCUGUUAUAUCAUCCGUTT-3', 反义链: 5'-ACGGAAUGAUUAACAGGGCTT-3'; 序列2、正义链: 5'-GACAAGCUCAACCGGUUUATT-3', 反义链: 5'-UAAACCGGUUGAGCUUGUUCTT-3'; 序列3、正义链: 5'-GUGAGCAGAUACAACAATT-3', 反义链: 5'-AUGUUGUUGAUCUGCUCACTT-3'; 无关对照siRNA正义链: 5'-UUCUCCGAACGUGU-CACGUTT-3', 反义链: 5'-ACGUGACACGUUC-GGAGAATT-3')。本实验应用抑制效率最高的序列1作为研究序列。NHE1和GAPDH引物由北京奥科鼎盛生物科技有限公司合成。鼠抗人NHE1抗体购自Millipore公司。鼠抗人 β -actin抗体购自Santa Cruz公司。异硫氰酸荧光素(FITC)标记的鬼笔环肽(Phalloidin)购自sigma公司。Transwell小室购自Millipore公司。Matrigel购自美国BD公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: 肝癌细胞株MHCC97-H在含100 mL/L胎牛血清的DMEM培养液(含青霉素100 kU/L, 链霉素100 μ g/mL), 37 $^{\circ}$ C、50 mL/L CO₂、饱和湿度环境的条件下连续培养。待对数生长期时, 收取细胞, 进行实验。

1.2.2 NHE1-siRNA转染及细胞分组: 转染前24 h, 取对数生长期的细胞胰酶消化、计数, 调整细胞数为 2.0×10^5 /孔, 接种于6孔板, 孵箱培养, 使细胞密度达到60%。转染时用Opti-MEM培养基2 mL换去完全培养基。分别用250 μ L的Opti-MEM稀释200 pmol siRNA和5 μ L LipofectamineTM2000, 混匀, 室温孵育5 min后, 将250 μ L LipofectamineTM2000混合物加入siRNA混合物中, 总体积为500 μ L, 混匀, 室温孵育20 min, 将500 μ L siRNA/LipofectamineTM2000混合物分别加入6孔板中, 混匀, 培养4-6 h后更换完全培养基, 37 $^{\circ}$ C继续培养48-72 h用于实验。细胞分组: (1)空白对照组: 转染时加入Opti-MEM培养基; (2)无关对照组: 转染时加入非特异性siRNA/LipofectamineTM2000复合物; (3)NHE1-siRNA组: 转染时加入NHE1特异性siRNA/LipofectamineTM2000复合物。

1.2.3 RT-PCR: 细胞转染48 h后收集细胞, 按TRIzol说明书操作提取细胞总RNA, 按逆转录试剂盒说明书进行逆转录反应, RNA量为1 μ g, 引物为Oligo(dT)₁₈, 反应条件为70 $^{\circ}$ C 5 min、0 $^{\circ}$ C 5 min、37 $^{\circ}$ C 5 min、42 $^{\circ}$ C 60 min、70 $^{\circ}$ C 10 min、-20 $^{\circ}$ C保存。用于扩增人NHE1 cDNA的引物序列为: 上游引物序列: 5'-CACAC-CACCATCAAATACTTCC-3', 下游引物序列: 5'-GAACTTGTTGATGAACCAGGTC-3'; 以人GAPDH为内参照, 上游引物序列为: 5'-ACCA-CAGTCCATGCCATCAC-3', 下游引物序列为: 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'。PCR反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 5 min预变性, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 59 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 共30个循环, 72 $^{\circ}$ C延伸10 min。取PCR扩增产物15 μ L, 经2.5%琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色后, 用UVP凝胶成像系统进行检测, 并用Gelpro软件对阳性条带的密度进行测定, 以相对光密度率(以NHE1的阳性条带光密度与GAPDH相比)作为NHE1 mRNA的相对表达量。实验重复3次。

1.2.4 Western blot检测NHE1蛋白的表达: 转染后72 h, 用RIPA和PMSF提取细胞总蛋白。BCA法检测蛋白浓度。取50 μ g蛋白质样品, 与5 \times 上样缓冲液混合, 沸水煮5 min变性, 经SDS-PAGE, 蛋白从凝胶中转移到PVDF膜上, 含5%脱脂奶粉的TBST封闭2 h。加入鼠抗人NHE1单克隆抗体(1:500稀释)和鼠抗人 β -actin单克隆抗体(1:500稀释), 4 $^{\circ}$ C孵育过夜, TBST漂洗3次, 每次5 min, 加入HRP标

记的羊抗鼠二抗(1:5000稀释)室温孵育2 h, ECL显影, 并进行密度分析。实验重复3次。

1.2.5 MTT分析: 取对数生长期的细胞胰酶消化、计数, 调整细胞数为 5.0×10^3 /孔, 接种于96孔板, 37 $^{\circ}$ C孵箱培养24 h, 常规分组转染细胞, 分别于转染后24 h、48 h和72 h, 各孔加入MTT溶液(5 g/L)20 μ L, 37 $^{\circ}$ C孵育4 h, 吸弃孔内培养液, 加入DMSO 150 μ L, 充分溶解结晶物, 读取各孔光吸收值(490 nm波长)。每组每个时间点设3个平行样本, 取各组值的均数表示细胞的增殖情况, 实验重复3次。

1.2.6 细胞侵袭实验: 将Matrigel胶(50 μ L/孔)均匀地铺在Transwell小室膜上, 收集转染48 h后的各组细胞 5×10^4 个, 用200 μ L无血清DMEM培养液稀释后接种到上室中, 将小室置于加有600 μ L含200 mL/L胎牛血清DMEM培养液的24孔板内, 37 $^{\circ}$ C、50 mL/L CO₂, 孵育24 h后取出小室, 小心擦掉上室细胞, PBS洗3次, 950 mL/L乙醇固定, 结晶紫染色, 200倍显微镜下计数5个视野穿过微孔的细胞数, 取其均值, 每组3个小室, 实验重复3次。

1.2.7 细胞迁移实验: 迁移实验不铺Matrigel胶, 孵育24 h后取出小室, 其余步骤同侵袭实验。

1.2.8 免疫荧光标记细胞骨架: 转染后48 h细胞爬片, 常规培养24 h后, 吸净培养基, PBS冲洗3遍, 40 g/L多聚甲醛室温下固定20 min, PBS再冲洗3遍, 0.5% Triton X-100透膜10 min, 用FITC-鬼笔环肽室温下孵育30 min标记细胞骨架肌动蛋白, PBS冲洗3遍, 50%甘油封片。荧光显微镜观察细胞骨架和细胞膜伪足($\times 400$), 并拍照。

统计学处理 采用SPSS13.0统计软件分析, 计量资料以mean \pm SD表示, 组间比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 转染NHE1-siRNA对MHCC97-H细胞NHE1 mRNA和蛋白表达的影响 转染48 h后, siRNA组细胞NHE1基因 mRNA水平明显下调, 与空白对照组和无关对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$), 而空白对照组和无关对照组NHE1 mRNA表达差异无统计学意义(图1); Western blot结果显示, NHE1-siRNA转染组NHE1蛋白表达水平较空白对照组和无关对照组明显降低, 差异具有统计学意义($P < 0.05$), 空白对照组和无关对照组间差异无统计学意义(图2), 表明NHE1基因被成功抑制。

■ 相关报道

在乳腺癌细胞中发现, 定位于侵袭性伪足的NHE1可在其周围形成酸性微环境, 利于细胞外基质降解, 进而促进肿瘤侵袭, 为证明NHE1在肿瘤侵袭中的作用提供了结构基础。

■创新盘点

既往研究多集中于NHE1通过调节细胞内外的酸碱环境,进而调节细胞的多种行为,本文从NHE1与细胞结构关系方面对NHE1在肿瘤侵袭转移中的作用进行了初步研究。

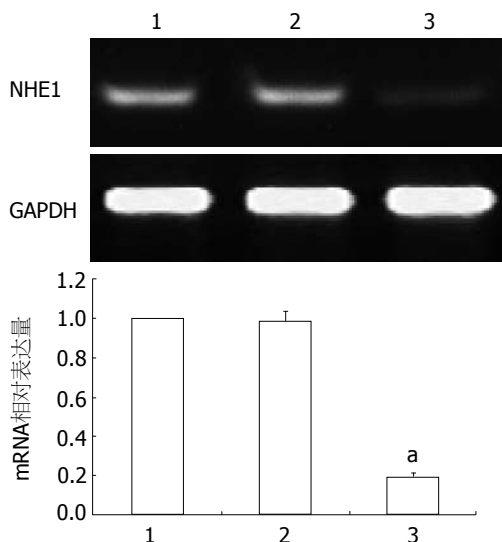


图1 RT-PCR检测各组MHCC97-H细胞mRNA的表达。1:空白对照组; 2: 无关对照组; 3: NHE1-siRNA组。* $P < 0.05$ vs 空白对照组。

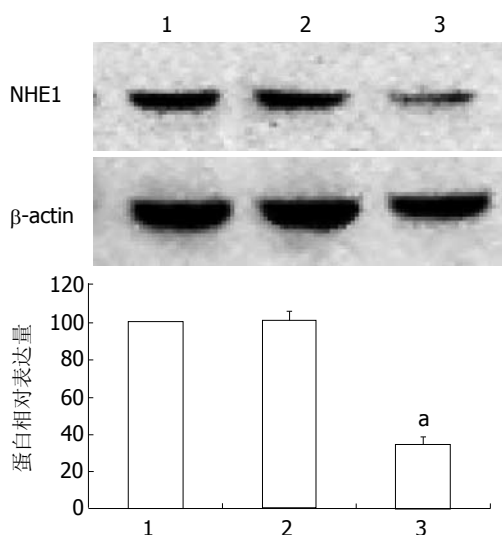


图2 Western blot检测各组MHCC97-H细胞蛋白的表达。1:空白对照组; 2: 无关对照组; 3: NHE1-siRNA组。* $P < 0.05$ vs 空白对照组。

2.2 抑制NHE1基因抑制MHCC97-H细胞迁移 空白对照组迁移细胞数目为 235.2 ± 16.8 个, 转染无关对照组为 231.9 ± 14.7 个, 而NHE1-siRNA转染组为 120.2 ± 12.8 个, 与空白对照组和无关对照组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$, 图3)。

2.3 抑制NHE1基因抑制MHCC97-H细胞侵袭 空白对照组穿透人工基底膜细胞数目为 56.9 ± 6.1 个, 无关对照组为 57.2 ± 6.1 个, 两者差异无统计学意义, NHE1-siRNA组为 34.1 ± 5.2 个, 与空白对照组和无关对照组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$, 图4)。

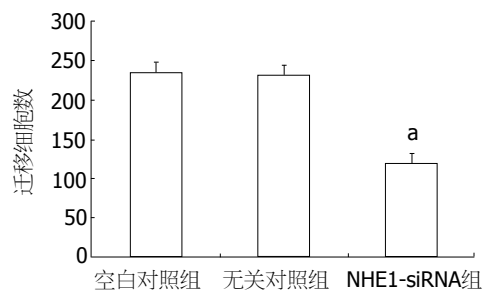


图3 转染siRNA后各组迁移细胞数。* $P < 0.05$ vs 空白对照组。

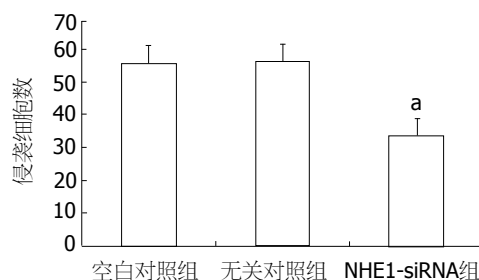


图4 转染siRNA后各组侵袭细胞数。* $P < 0.05$ vs 空白对照组。

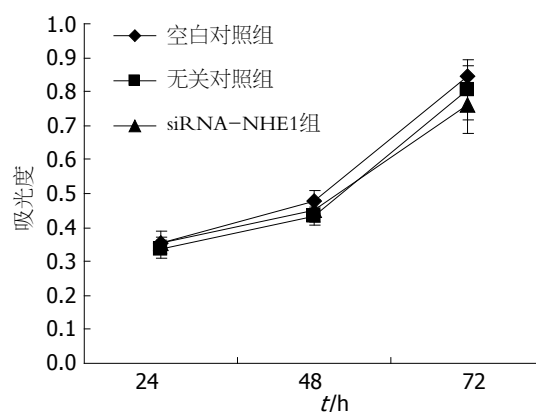


图5 转染siRNA后各组细胞的增殖活性。

2.4 NHE1-siRNA转染后对MHCC97-H细胞增殖活性的影响 MTT方法检测结果显示, 转染后空白对照组、无关对照组和NHE1-siRNA组间光吸收值无明显差异(48 h: 0.476 ± 0.035 , 0.433 ± 0.025 vs 0.450 ± 0.034 ; 72 h: 0.846 ± 0.032 , 0.806 ± 0.087 vs 0.761 ± 0.082), 即转染后48 h和72 h 3组细胞间增殖差异无统计学意义(图5)。

2.5 NHE1抑制后MHCC97-H细胞骨架和细胞膜伪足的变化 空白对照组和无关对照组MHCC97-H细胞内肌动蛋白网和细胞膜伪足形成正常, 细胞转染NHE1-siRNA后, 与两对照组相比, 细胞内肌动蛋白网排列紊乱, 形成减

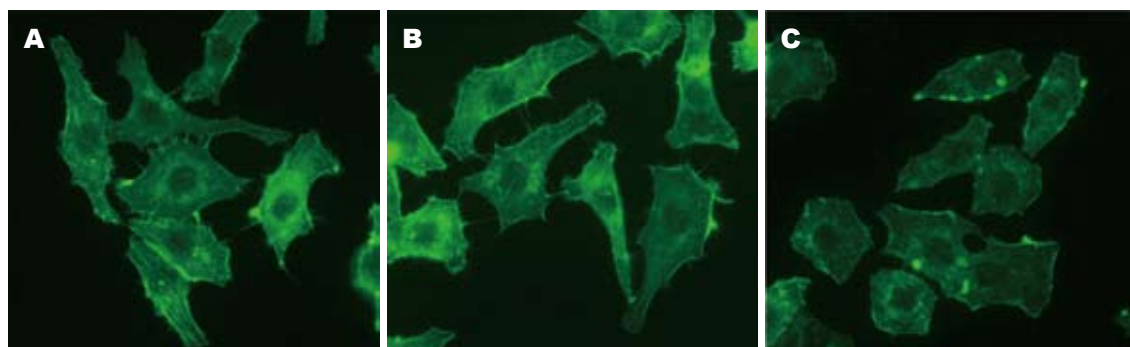


图6 NHE1基因沉默后对MHCC97-H细胞骨架和伪足的影响. A: 空白对照组; B: 无关对照组; C: NHE1-siRNA组.

■应用要点

细胞骨架重组和细胞伪足的形成在肿瘤细胞侵袭转移中发挥着重要作用, 研究表明NHE1参与了细胞骨架重组和伪足形成, 故可通过抑制NHE1抑制伪足或伪足形成的中间环节, 进而达到抑制肿瘤侵袭转移的目的.

少, 细胞膜伪足回缩、形成减少或消失(图6).

3 讨论

肝癌是恶性程度极高、预后极差的恶性肿瘤, 侵袭和转移是其作为恶性肿瘤重要的生物学特性, 同时也是肝癌治疗失败和患者致死的主要原因^[12], 肝癌的侵袭转移涉及许多方面, 其具体机制尚不明确, 研究肝癌侵袭转移调控的机制对于预防和阻止肝癌侵袭转移至关重要.

NHE1是存在于细胞膜表面的离子转运蛋白, 调控细胞内pH的动态平衡^[13,14]. 在肿瘤细胞中, NHE1表达增加及活性增强^[15], 形成肿瘤细胞胞内碱性、胞外酸性的特殊微环境. 除此之外, 研究发现, NHE1可以通过与ERM之间发生结构联系锚定肌动蛋白丝, 控制细胞骨架的完整, 从而参与细胞形态的维持及细胞运动的调节^[4,16,17]. 在表达突变NHE1的成纤维细胞中, 不影响NHE1的离子交换功能, 但可以阻断NHE1与ERM的结合, 发现这种突变会降低细胞黏附力, 影响细胞的极性和细胞的定向运动^[4]. 本研究中, 采用siRNA干扰沉默NHE1基因后, MHCC97-H细胞NHE1 mRNA和蛋白含量明显降低, 说明NHE1基因已被成功沉默. 研究发现, NHE1-siRNA转染MHCC97-H细胞后, 与空白对照组和无关对照组相比, 穿透人工基底膜的MHCC97-H细胞明显减少. 提示NHE1可能参与了MHCC97-H细胞移动的调节.

Transwell侵袭小室是体外检测肿瘤细胞侵袭力筛选高转移细胞的经典方法, 其结果反映了细胞对细胞外基质的穿透能力和细胞的侵袭能力. 本研究中发现, 转染NHE1-siRNA的MHCC97-H细胞其侵袭力较空白对照组和无关对照组明显下降, 表明NHE1可能促进了MHCC97-H细胞的侵袭能力.

在肿瘤的侵袭转移过程中, 细胞骨架的重

组发挥了重要作用. 而许多侵袭性肿瘤细胞有与侵袭性密切相关的伪足^[18-20]. 有研究显示NHE1定位于极性细胞的前端, 对伪足形成和细胞趋化有重要作用^[21,22]. 应用NHE1抑制剂可以阻断这种侵袭结构的形成以及减弱细胞的侵袭能力^[23]. 在乳腺癌细胞研究中发现, NHE1在侵袭性伪足聚集表达, 并在此区域产生酸性环境, 促进细胞外基质降解, 利于肿瘤侵袭转移^[24,25]. 在仓鼠肺成纤维细胞的研究中发现, 抑制NHE1可抑制由RhoA介导的应力纤维的聚合及细胞骨架的调节, 推测NHE1可能作为RhoA的下游分子影响细胞形态的调节^[26,27]. Paradiso等^[28]研究发现, 血清剥夺可以通过NHE1和RhoA交互作用, 诱导NHE1依赖的细胞形态学和骨架改变, 导致肿瘤细胞趋化和侵袭. 提示RhoA可能通过对NHE1的调节, 引起细胞骨架改变, 从而影响肿瘤细胞侵袭. 另有研究发现, NHE1的活性与细胞伪足的形成有关, 而伪足对肿瘤细胞的运动、黏附至关重要, 用5-(N-ethyl-N-isopropyl)amiloride (EIPA, NHE1抑制剂)抑制转染了鼠肉瘤病毒(MSV)的上皮细胞MSV-MDCK的NHE1活性可以引起该细胞的细胞骨架结构的显著改变. 表现为肌动蛋白纤维松弛, 伪足中肌动蛋白变少, 伪足变浅、消失, 细胞变圆, 细胞从支持物上脱落. 去EIPA后, 伪足又重新形成. 推测NHE1可能与细胞伪足的形成及细胞运动密切相关^[29]. 在成纤维细胞研究中发现, 其伪足中存在NHE1、F肌动蛋白和Talin的共区域化, NHE1可以通过其胞质区与肌动蛋白的联系参与灶性黏附作用(focal adhesion), 表明NHE1可能直接参与肿瘤细胞伪足形成、运动和黏附过程^[30]. 本研究中, 采用siRNA干扰沉默NHE1基因后, 肝癌细胞内的肌动蛋白网排列紊乱, 同时细胞伪足形成减少. 而空白对照组和无关对照组, 无此改变, 提示NHE1与细胞骨架重组及细胞伪足形

同行评价

本文设计尚合理,内容较新颖,有一定创新性,学术价值较好,为进一步探讨肝癌转移机制提供了有价值的实验结果。

成相关,进而影响细胞的侵袭。

总之, NHE1可能通过改变细胞骨架和伪足形成参与了肿瘤的侵袭和转移,这在肝细胞癌治疗过程中,采用针对NHE1基因治疗提供了理论依据。但NHE1调控细胞骨架和伪足形成的具体分子机制尚待进一步研究。

参考文献

- Harguindeguy S, Orive G, Luis Pedraz J, Paradiso A, Reshkin SJ. The role of pH dynamics and the Na⁺/H⁺ antiporter in the etiopathogenesis and treatment of cancer. Two faces of the same coin--one single nature. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1756: 1-24
- Malo ME, Fliegel L. Physiological role and regulation of the Na⁺/H⁺ exchanger. *Can J Physiol Pharmacol* 2006; 84: 1081-1095
- Cardone RA, Casavola V, Reshkin SJ. The role of disturbed pH dynamics and the Na⁺/H⁺ exchanger in metastasis. *Nat Rev Cancer* 2005; 5: 786-795
- Denker SP, Huang DC, Orlowski J, Furthmayr H, Barber DL. Direct binding of the Na⁺-H exchanger NHE1 to ERM proteins regulates the cortical cytoskeleton and cell shape independently of H(+) translocation. *Mol Cell* 2000; 6: 1425-1436
- Putney LK, Denker SP, Barber DL. The changing face of the Na⁺/H⁺ exchanger, NHE1: structure, regulation, and cellular actions. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2002; 42: 527-552
- Schneider L, Stock CM, Dieterich P, Jensen BH, Pedersen LB, Satir P, Schwab A, Christensen ST, Pedersen SF. The Na⁺/H⁺ exchanger NHE1 is required for directional migration stimulated via PDGFR-α in the primary cilium. *J Cell Biol* 2009; 185: 163-176
- El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology* 2007; 132: 2557-2576
- Bruix J, Llovet JM. Prognostic prediction and treatment strategy in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2002; 35: 519-524
- Yang X, Wang D, Dong W, Song Z, Dou K. Overexpression of Na⁺/H⁺ exchanger 1 and its clinicopathologic significance in hepatocellular carcinoma. *Med Oncol* 2010; 27: 1109-1113
- 李杰, 窦科峰, 张洪涛, 张超, 李韧, 张福琴, 王德盛. NHE1 mRNA在肝癌组织的表达及意义. *胃肠病学和肝病杂志* 2009; 18: 121-122
- 李杰, 窦科峰, 刘艳雷, 张洪涛, 刘卫辉, 李韧, 王德盛. 肝癌组织中NHE1蛋白的表达及其临床意义. *中国肿瘤临床* 2009; 36: 986-988
- Thomas MB, Zhu AX. Hepatocellular carcinoma: the need for progress. *J Clin Oncol* 2005; 23: 2892-2899
- Slepkov ER, Rainey JK, Sykes BD, Fliegel L. Structural and functional analysis of the Na⁺/H⁺ exchanger. *Biochem J* 2007; 401: 623-633
- Slepkov E, Fliegel L. Structure and function of the NHE1 isoform of the Na⁺/H⁺ exchanger. *Biochem Cell Biol* 2002; 80: 499-508
- 滕小春, 刘海峰, 刘永生, 段丽, 王国安, 何俊堂. NHE1蛋白在胃癌和胃癌前病变中的表达及临床意义. *第三军医大学学报* 2004; 26: 402-404
- Meima ME, Mackley JR, Barber DL. Beyond ion translocation: structural functions of the sodium-

hydrogen exchanger isoform-1. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2007; 16: 365-372

- Denker SP, Barber DL. Ion transport proteins anchor and regulate the cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol* 2002; 14: 214-220
- Sahai E, Marshall CJ. Differing modes of tumour cell invasion have distinct requirements for Rho/ROCK signalling and extracellular proteolysis. *Nat Cell Biol* 2003; 5: 711-719
- Buccione R, Orth JD, McNiven MA. Foot and mouth: podosomes, invadopodia and circular dorsal ruffles. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004; 5: 647-657
- Buccione R, Caldieri G, Ayala I. Invadopodia: specialized tumor cell structures for the focal degradation of the extracellular matrix. *Cancer Metastasis Rev* 2009; 28: 137-149
- Denker SP, Barber DL. Cell migration requires both ion translocation and cytoskeletal anchoring by the Na-H exchanger NHE1. *J Cell Biol* 2002; 159: 1087-1096
- Jia Z, Barbier L, Stuart H, Amraei M, Pelech S, Dennis JW, Metalnikov P, O'Donnell P, Nabi IR. Tumor cell pseudopodial protrusions. Localized signaling domains coordinating cytoskeleton remodeling, cell adhesion, glycolysis, RNA translocation, and protein translation. *J Biol Chem* 2005; 280: 30564-30573
- Bourguignon LY, Singleton PA, Diedrich F, Stern R, Gilad E. CD44 interaction with Na⁺-H⁺ exchanger (NHE1) creates acidic microenvironments leading to hyaluronidase-2 and cathepsin B activation and breast tumor cell invasion. *J Biol Chem* 2004; 279: 26991-27007
- Busco G, Cardone RA, Greco MR, Bellizzi A, Colella M, Antelmi E, Mancini MT, Dell'Aquila ME, Casavola V, Paradiso A, Reshkin SJ. NHE1 promotes invadopodial ECM proteolysis through acidification of the peri-invadopodial space. *FASEB J* 2010; 24: 3903-3915
- Frantz C, Karydis A, Nalbant P, Hahn KM, Barber DL. Positive feedback between Cdc42 activity and H⁺ efflux by the Na-H exchanger NHE1 for polarity of migrating cells. *J Cell Biol* 2007; 179: 403-410
- Tominaga T, Barber DL. Na-H exchange acts downstream of RhoA to regulate integrin-induced cell adhesion and spreading. *Mol Biol Cell* 1998; 9: 2287-2303
- Vexler ZS, Symons M, Barber DL. Activation of Na⁺-H⁺ exchange is necessary for RhoA-induced stress fiber formation. *J Biol Chem* 1996; 271: 22281-22284
- Paradiso A, Cardone RA, Bellizzi A, Bagorda A, Guerra L, Tommasino M, Casavola V, Reshkin SJ. The Na⁺-H⁺ exchanger-1 induces cytoskeletal changes involving reciprocal RhoA and Rac1 signaling, resulting in motility and invasion in MDA-MB-435 cells. *Breast Cancer Res* 2004; 6: 616-628
- Lagana A, Vadrnais J, Le PU, Nguyen TN, Laprade R, Nabi IR, Noël J. Regulation of the formation of tumor cell pseudopodia by the Na(+)/H(+) exchanger NHE1. *J Cell Sci* 2000; 113: 3649-3662
- Wu KL, Khan S, Lakhe-Reddy S, Jarad G, Mukherjee A, Obejero-Paz CA, Konieczkowski M, Sedor JR, Schelling JR. The NHE1 Na⁺/H⁺ exchanger recruits ezrin/radixin/moesin proteins to regulate Akt-dependent cell survival. *J Biol Chem* 2004; 279: 26280-26286

野生型p53对肝癌细胞POLD1基因表达及细胞恶性表型的影响

韦长元, 刘起理, 廖柳凤, 徐恒, 谭晓虹

韦长元, 刘起理, 廖柳凤, 谭晓虹, 广西医科大学附属肿瘤医院 广西壮族自治区南宁市 530021
徐恒, 广西医科大学医学实验中心 广西壮族自治区南宁市 530021

韦长元, 博士研究生, 教授, 主要从事肝癌的基础与临床和乳腺癌的生物学特性与临床治疗对策研究.

国家自然科学基金资助项目, No. 303296

作者贡献分布: 韦长元负责实验操作指导、数据分析和论文起草修改; 刘起理与廖柳凤主要进行实验操作、数据分析和论文起草; 徐恒负责实验设计、论文修改和审阅; 谭晓虹主要进行实验操作、数据分析.

通讯作者: 徐恒, 教授, 530021, 广西壮族自治区南宁市, 广西医科大学医学实验中心. heng6888@yahoo.com

收稿日期: 2011-06-03 修回日期: 2011-07-23

接受日期: 2011-08-05 在线出版日期: 2011-08-18

Effect of overexpression of wild-type p53 on POLD1 expression and malignant cell behavior in human hepatocellular carcinoma cell line SMMC-7721

Chang-Yuan Wei, Qi-Li Liu, Liu-Feng Liao, Heng Xu, Xiao-Hong Tan

Chang-Yuan Wei, Qi-Li Liu, Liu-Feng Liao, Xiao-Hong Tan, Cancer Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China
Heng Xu, Experimental Center of Medical Sciences, Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 303296

Correspondence to: Professor Heng Xu, Medical Experimental Research Center, Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. heng6888@yahoo.com

Received: 2011-06-03 Revised: 2011-07-23

Accepted: 2011-08-05 Published online: 2011-08-18

Abstract

AIM: To investigate the impact of overexpression of wild-type p53 on cell proliferation and malignant phenotype in human hepatocellular carcinoma cell line SMMC-7721 and to explore possible mechanism involved.

METHODS: Enhanced green fluorescence protein gene-containing eukaryotic expression

plasmids expressing p53-specific small interfering RNA (shRNA) (p53-siRNA) or wild-type p53 (pEGFP-p53) were constructed and introduced into SMMC-7721 cells by Lipofection-2000-mediated transfection. Meanwhile, the pEGFP-C1 empty vector was also transfected into SMMC-7721 cells. Cell lines stably expressing p53-siRNA, pEGFP-p53 or pEGFP-C1 were screened in medium containing G418. After transfection, the expression of p53 and POLD1 mRNAs was detected by RT-PCR. The changes in malignant cell behavior were determined by cell growth curve determination and colony formation assay.

RESULTS: Compared to control SMMC-7721 cells, p53 mRNA expression was increased and POLD1 gene expression was decreased in SMMC-7721 cells transfected with the plasmid carrying wild-type p53 gene, while p53 mRNA expression was reduced and POLD1 mRNA expression was increased in SMMC-7721 cells transfected with the plasmid carrying p53-siRNA. MTT results showed that cell growth rate was faster in SMMC-7721 cells transfected with the plasmid carrying p53-siRNA than in control SMMC-7721 cells, but was slower in SMMC-7721 cells transfected with the plasmid carrying wild-type p53 gene than in control cells. Colony formation assay showed that colony formation rate was lower in SMMC-7721 cells transfected with the plasmid carrying wild-type p53 gene than in control cells (38.1% vs 52.6%, $P < 0.05$), but was higher in cells transfected with the plasmid carrying p53-siRNA than in control cells (72.6% vs 52.6%, $P < 0.05$). High expression of wild-type p53 inhibited POLD1 transcription and cell proliferation, while low expression of wild-type p53 promoted POLD1 transcription and cell proliferation.

CONCLUSION: Wild-type p53 controls liver cancer cell proliferation and malignant phenotype possibly by regulating POLD1 expression.

Key Words: SMMC-7721; POLD1; p53; RNA inter-

■背景资料

DNA复制是细胞正常分裂、增殖的关键一步, DNA聚合酶 δ 是真核生物DNA复制的最主要复制酶, DNA聚合酶 δ 催化亚基基因1(POLD1)基因编码DNA聚合酶 δ 催化P125. 本文选择对POLD1有调节作用之一的抑癌基因p53, 探讨两者在癌的恶性增殖与DNA的复制之间的相互关系.

■同行评议者

葛海燕, 教授, 同济大学附属第十人民医院普通外科; 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

■相关报道

研究表明, 在MCF-7细胞中高表达的p53可以抑制POLD1启动子的活性, 并且这种抑制作用具有剂量依赖效应, 但目前仍不清楚, 在肝癌细胞中高表达p53对POLD1的调控作用及改变p53表达水平后, POLD1的相应变化和细胞功能变化。

ference

Wei CY, Liu QL, Liao LF, Xu H, Tan XH. Effect of overexpression of wild-type p53 on POLD1 expression and malignant cell behavior in human hepatocellular carcinoma cell line SMMC-7721. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(23): 2443-2449

摘要

目的: 探讨野生型p53对人肝癌细胞SMMC-7721细胞增殖和细胞恶性表型影响的一种可能机制。

方法: 设计并构建p53特异性小干扰shRNA绿色荧光真核表达质粒(p53-siRNA)和表达EGFP-p53融合蛋白的p53绿色荧光真核增强表达质粒(pEGFP-p53), 通过脂质体Lipofection-2000介导转染, 将表达pEGFP-p53重组质粒、p53-siRNA及空载体pEGFP-C1转染入SMMC-7721细胞; 经G418筛选, 获得稳定细胞系7721-p53、7721-C1; 7721-p53RNAi、7721-NC。通过RT-PCR检测转染后p53、POLD1 mRNA表达水平。通过生长曲线测定, 克隆形成实验, 了解SMMC-7721细胞在p53表达水平改变后细胞癌性的变化。

结果: 与人肝癌细胞SMMC-7721比较, 转染质粒pEGFP-p53的野生型p53高表达组, p53 mRNA表达量增高, POLD1基因的表达量降低; 而转染pGPU6/GFP/neo-p53i-769的p53低表达组, p53 mRNA表达量降低, POLD1 mRNA表达量增高, 其他组较空白对照无明显变化。对高表达野生型p53的人肝癌细胞系SMMC-7721-pEGFP-C1-p53, 低表达野生型p53的人肝癌细胞系SMMC-7721-pGPU6/GFP/neo-p53i-769, 和普通入肝癌细胞SMMC-7721分别进行MTT和平板克隆形成实验。MTT结果发现: SMMC-7721-pGPU6/GFP/neo-p53i-769的细胞其生长速度比普通肝癌细胞的要快, 而SMMC-7721-pEGFP-p53的细胞较普通肝癌细胞生长速度较慢。克隆形成实验结果显示: pEGFP-C1-p53、pGPU6/GFP/neo-p53i-769组克隆形成率分别为38.1%和72.6%, 与普通肝癌细胞SMMC-7721的克隆形成率52.6%相比, 均有统计学差异($P < 0.05$)。结果显示: 在人肝癌细胞SMMC-7721中, 野生型p53高表达组能够抑制POLD1的基因转录, 并抑制细胞增殖活性; 而低表达组能够促进POLD1的基因转录, 促进细胞增殖。

结论: p53对POLD1的调控作用可能是p53对肝癌细胞增殖和细胞恶性表型影响的一种新

的机制。

关键词: SMMC-7721; POLD1; p53; RNA干扰

韦长元, 刘起理, 廖柳凤, 徐恒, 谭晓虹. 野生型p53对肝癌细胞POLD1基因表达及细胞恶性表型的影响. *世界华人消化杂志* 2011; 19(23): 2443-2449

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2443.asp>

0 引言

DNA聚合酶 δ (DNA polymerase δ , pol δ)是真核生物DNA复制的最主要复制酶, 参与到DNA复制、修复、细胞周期调控等过程, 对保持真核生物基因组的结构完整性和遗传稳定性具有重要作用^[1,2]。pol δ 由四个亚基组成, 其催化亚基P125由POLD1基因编码^[3]。POLD1基因定位于染色体19q13.3-q13.4, 含有27个外显子和26个内含子^[4,5]。对保持真核生物基因组的结构完整性和遗传稳定性具有重要作用^[6-8]。DNA聚合酶 δ 的聚合酶和外切酶二者活性位于其催化亚基P125。只有通过P125上的PIP-box和KA-box 2个PCNA相互作用位点, P125与PCNA相互作用才能发挥其功能活性^[9,10]。有研究表明, POLD1基因的表达受到细胞周期的调控, 在POLD1基因启动子中首次鉴定CDE/CHR元件, 并证明此元件与POLD1基因细胞周期调控密切相关^[11,12]。

野生型p53作为人体内重要的抑癌基因, 存在于几乎所有肿瘤细胞中, p53在DNA复制、修复、重组及细胞周期调控中都起到重要作用。其对正常细胞生长的维持及肿瘤细胞的抑制作用一直是医学界重要的研究方向^[13]。以往研究^[14]发现: 转录因子p53能够与受其调控的基因的启动子或内含子中的保守序列结合, 从而调控受控基因的表达。另外, POLD1基因的启动子区上可能存在p53及转录因子Sp1的结合位点, p53可能通过与Sp1竞争结合位点从而抑制POLD1启动子活性^[15]。在受p53调控的基因中, 有些基因可能与细胞中POLD1基因的表达调控有关。如细胞周期抑制因子p21的表达就受p53的正向调控^[16,17]。细胞周期抑制因子p21基因启动子区域具有p53结合位点, 野生型p53能与p21结合激活p21基因转录, 而p21又可以通过自身或PCNA、Gadd45、E2F、Myc、Rb等细胞因子的相互作用抑制POLD1启动子的活性, 所以野生型p53通过p21间接抑制了POLD1的活性。但是, 目前仍不清楚在肝癌细胞中p53对POLD1的调控作

用. 本研究通过构建p53的绿色荧光真核增强表达质粒, 以及p53低表达的RNA干扰表达质粒, 并分别导入人肝癌细胞SMMC-7721中, 从正反两方面验证在人肝癌细胞SMMC-7721中p53对POLD1基因表达产生的调控作用. 同时对筛选出来的稳定细胞系进行生长速率检测、平板集落形成率等实验, 检测p53对POLD1基因表达产生调控之后, 对肝癌细胞增殖及细胞恶性表型的影响.

1 材料和方法

1.1 材料 人肝癌细胞SMMC-7721购于中科院上海细胞库; 脂质体Lipofectamine2000和TRIzol试剂购于美国Invitrogen公司; pEGFP-C1空载体由北京师范大学柳惠图教授惠赠; 表达EGFP-p53融合蛋白的pEGFP-p53重组质粒由中国科学院上海生命科学学院吴家睿研究员惠赠; RNA干扰所用的siRNA序列, 及pGPU6/GFP/neo重组真核表达质粒(含有增强型绿色荧光蛋白阅读框, 正确插入目的基因cDNA后, 能够将目的蛋白融合在EGFP的C端)由吉玛公司构建.

1.2 方法

1.2.1 siRNA的筛选及p53-siRNA绿色荧光真核表达质粒的构建: 具有互补序列、能够编码短发卡结构RNA(shRNA)的双链寡核苷酸模板DNA转录产物所形成的siRNA的作用靶点为人p53mRNA(GeneBank No, NM_00546.4)第198-1379 bp位核苷酸. 为防止siRNA的off-target, 本研究设计了3对siRNA Oligo, 以下3对siRNA与p53序列无同源性, 亦不与任何人类基因序列同源. 同时以双链寡核苷酸转录产物所形成的siRNA作为阴性对照. 将人肝癌细胞SMMC-7721培养于含有100 mL/L胎牛血清的RPMI1640(Hyclone)培养基中, 并置于37 °C含50 mL/L CO₂的温箱培养. 实验分6组: A: p53i-769组, 转染试剂中加入p53i-769 siRNA Oligo; B: p53i-574组, 转染试剂中加入p53i-574 siRNA Oligo; C: p53i-73组, 转染试剂中加入p53i-73 siRNA Oligo; D: 空白对照组, 即未转染组; E: 脂质体组, 即转染中仅含脂质体, 无siRNA; F: 阴性对照组, 即转染试剂中加入阴性对照siRNA; 以上实验组分别用脂质体Lipofectamine2000介导转染人肝癌细胞SMMC-7721. 分别收集24 h, 48 h, 72 h的未干扰和siRNA干扰的细胞, 用TRIzol法提取细胞总RNA. 用RT-PCR方法检测SMMC-7721细胞中p53 mRNA的表达. PCR反应条件为: 94 °C预

表 1 siRNA筛选所用序列

siRNA Oligo	序列
p53i-769	5'-GGAAGACUCCAGUGGUAUUTT-3' 5'-AUUACCACUGGAGUCUCCAG-3'
p53i-574	5'-GCAUCUUAUCCGAGUGGAATT-3' 5'-UUCCACUCGGAUAAGAUGCTG-3'
P53i-73	5'-CUACUCCUGAAAACAACGTT-3' 5'-CGUUGUUUCAGGAAGUAGTT-3'
阴性对照	5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3' 5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3'

变性4 min, 然后扩增30个循环, 每个循环94 °C变性45 s、55 °C退火45 s、72 °C延伸1 min, 最后72 °C延伸10 min. p53基因扩增产物为186 bp, 上游引物为5'-GGCCCACTTCACCGTACTAA-3', 下游引物为5'-GTGGTTTCAAGGCCAGATGT-3'. β-actin的扩增产物为661 bp, 上游引物为5'-TGACGGGGTCACCCACACTGTGCCCATCTA-3', 下游引物为5'-CTAGAAGCATTTGCGGTGGACGATGGAGGG-3'. 以p53与β-actin的条带的灰度比值表示p53 mRNA的相对含量. 经半定量RT-PCR鉴定得到的对p53表达有明显干扰作用的siRNA Oligo送上海吉玛公司构建真核表达载体pGPU6/GFP/neo-p53i-769. 同时由公司用阴性对照siRNA构建阴性对照真核表达pGPU6/GFP/neo-shNC(表1).

1.2.2 细胞的培养、转染及稳定细胞株的筛选: 将人肝癌细胞SMMC-7721培养于含有100 mL/L胎牛血清的RPMI 1640培养基中, 并置于37 °C含50 mL/L CO₂的温箱培养. 用脂质体Lipofectamine2000分别介导质粒pEGFP-p53、pEGFP-C1、pGPU6/GFP/neo-p53i-769、pGPU6/GFP/neo-shNC转染SMMC-7721细胞, 48 h后, 用荧光显微镜观察绿色荧光蛋白的表达情况. 再用G418(600 mg/L)筛选细胞, 挑取克隆, 16 d后, 各组陆续出现较大的细胞群落, 挑出单克隆扩大培养, 扩大培养后分别得到pEGFP-p53、pEGFP-C1、pGPU6/GFP/neo-p53i-769、pGPU6/GFP/neo-shNC的稳定细胞系. 同时培养SMMC-7721细胞作空白对照组. 转染步骤参照转染剂的操作说明书进行, 筛选方法见参考文献[18].

1.2.3 稳定细胞系的鉴定(RT-PCR方法检测p53 mRNA表达): 收集各组稳定细胞系的细胞, 用TRIzol法提取细胞总RNA, 反转录成cDNA, 以基因特异性引物进行PCR扩增. p53的扩增条件同前; 以GAPDH为内

■创新盘点

本文探讨在肝癌细胞SMMC-7721中, 不同p53基因表达水平下, POLD1基因的相应变化, 及由此而引起的细胞功能变化.

■应用要点

对p53和其他已知或未知的细胞周期(增殖)调控因子协同调控POLDI基因表达的机制进行深入的研究,以确定POLDI基因表达在癌细胞中的异常调控模式。通过研究癌细胞中对POLDI基因癌性表达,寻找癌细胞增殖阻断的靶点,为发展有效的新的抗癌或抗细胞增殖性疾病药物提供基础。

参对照. GAPDH基因扩增产物为210 bp, 上游引物为5'-AACGGATTGTCGATTG-3', 下游引物为5'-CTGGAAGATGGTGTATGGG-3'。所有扩增产物经1.5%的琼脂糖凝胶电泳分离后用溴化乙锭染色观察。

1.2.4 RT-PCR分析p53表达变化对POLDI mRNA表达水平的影响: p53和GAPDH的扩增条件同前; POLDI上游引物为5'-ACCTACTGAGCAACCGCATCG-3', 下游引物为5'-CGGTACTGGCAGAACTCACAC-3'。扩增条件为: 94 °C预变性4 min, 然后扩增30个循环; 每个循环94 °C变性45 s、62 °C退火45 s、72 °C延伸1 min, 最后再72 °C延伸10 min。POLDI基因扩增产物为487 bp, GAPDH作为内参对照, 序列同前。所有扩增产物经1.5%的琼脂糖凝胶电泳分离后用溴化乙锭染色观察。

1.2.5 不同细胞系生长速率的比较: 分别取7721、7721-p53、7721-p53i、7721-C1、7721-NC等细胞系处于对数生长期的细胞, 按 1×10^4 个细胞/mL的量接种于含100 mL/L胎牛血清及抗生素(青霉素100 kU/L, 链霉素100 mg/L)的RPMI1640培养基中, 置于37 °C、50 mL/L CO₂的细胞培养箱培养。24 h后, 将检测孔的培养基吸尽, 加入100 μ L的新培养基和10 μ L MTT(5 g/L溶于PBS), 于37 °C孵育4 h; 再加入150 μ L的裂解液DMSO, 震荡10 min后测A₄₉₀。以后每个细胞系每隔24 h从孔板中吸取3个孔进行检测, 持续七天。并绘制曲线图。

1.2.6 不同细胞系平板集落形成率的比较: 用细胞计数板在显微镜下计数, 以1 000个细胞/孔的量分别吸取SMMC-7721, pGPU6/GFP/neo-shNC、pEGFP-C1-p53、pGPU6/GFP/neo-p53i-769 4组细胞系的细胞, 接种于含有RPMI1640培养基(含100 mL/L胎牛血清、100 kU/L青霉素、100 mg/L链霉素)的6孔板中, 每组细胞系做3个平行孔, 置于37 °C、50 mL/L CO₂的细胞培养箱中培养。静置培养10 d后, 观察集落的形态, 并用Giemsa染色法在显微镜下统计50个细胞以上的集落。计算不同细胞集落形成率。用SPOT II采集图像。

统计学处理 以上实验数据经SPSS17.0统计处理后, 数据以mean \pm SD表示。数据比较采用方差分析, 当 $P < 0.05$ 时则认为差异有显著。

2 结果

2.1 p53i-769, p53i-574, p53i-73转染SMMC-7721

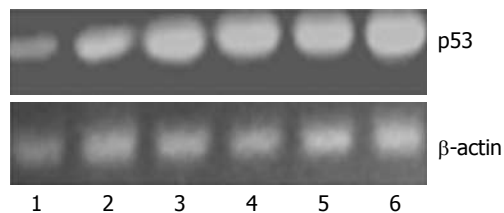


图1 半定量分析不同siRNA质粒转染细胞后对p53 mRNA的表达影响(48 h)。1: p53i-769组, 转染试剂中加入p53i-769 siRNA; 2: p53i-574组, 转染试剂中加入p53i-574 siRNA; 3: p53i-73组, 转染试剂中加入p53i-73 siRNA; 4: 空白对照组, 未转染组; 5: 脂质体组, 转染中仅含有脂质体, 无siRNA; 6: 阴性对照组, 转染试剂中加入阴性对照片段shNC siRNA。

细胞后对p53 mRNA的表达影响 转染p53i-769、p53i-574、p53i-73组的SMMC-7721细胞p53 mRNA表达水平都有所下降(图1)。根据各实验组跑胶结果中p53电泳条带灰度比值比较, 发现相对于空白对照组, p53i-769组的24 h、48 h、72 h的p53表达量分别下调45.64%、60.81%、72.67%; p53i-574组分别下调38.24%、57.34%、64.93%; p53i-73组分别下调32.11%、46.59%、49.31%。上述实验组抑制作用随处理时间的延长而呈增长趋势, 其余各对照组p53 mRNA表达差异无明显变化。

根据上述结果, 筛选出干扰效果最明显的A组: p53i-769后送上海吉玛生物工程公司分别将p53i-769和阴性对照shNC重组于pGPU6/GFP/neo上, 构建得到绿色荧光真核表达载体: pGPU6/GFP/neo-p53i-769、pGPU6/GFP/neo-shNC。

2.2 质粒转染SMMC-7721后绿色荧光蛋白的表达 分别将pEGFP-p53, pEGFP-C1, pGPU6/GFP/neo-p53i-769, pGPU6/GFP/neo-shNC转染SMMC-7721细胞。48 h后, 将培养的细胞置于荧光显微镜下观察, 镜检发现各组均有一定量的绿色荧光产生, 表明质粒已经成功转染细胞, 并能在细胞内表达。

2.3 稳定细胞系的鉴定 各组细胞经G418筛选后, 得到稳定的细胞系, 用半定量RT-PCR的方法检测p53 mRNA在不同细胞系中的表达。结果发现, 与阴性对照组相比, 转染pEGFP-p53的p53高表达组, p53 mRNA表达量增高; 而转染pGPU6/GFP/neo-p53i-769的p53低表达组, p53 mRNA表达量降低(图2)。表明稳定转染的质粒对p53 mRNA表达水平起到了相应的调节作用。

2.4 RT-PCR分析p53表达变化对POLDI mRNA表达水平的影响 与空白组相比, 转染pEGFP-p53

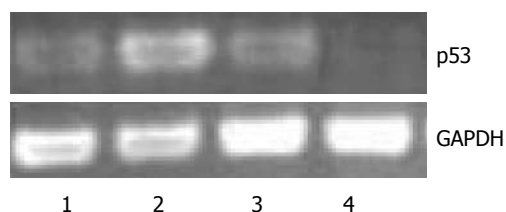


图 2 半定量PCR检测各组细胞转染后p53表达变化. 1: pEGFP-C1; 2: pEGFP-C1-p53; 3: pGPU6/GFP/neo-shNC; 4: pGPU6/GFP/neo-p53i-769.

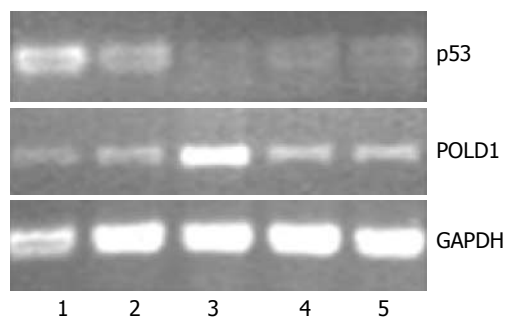


图 3 半定量分析p53对POLDI1基因表达量的影响. 1: pEGFP-C1-p53; 2: 空白对照; 3: pGPU6/GFP/neo-p53i-769; 4: 脂质体组; 5: 阴性对照组.

的p53高表达组, 随着p53 mRNA表达量增高, POLDI1基因的表达量降低; 而转染pGPU6/GFP/neo-p53i-769的p53低表达组, 随着p53 mRNA表达量降低, POLDI1 mRNA表达量增高; 其他组较空白对照无明显变化(图3). 表明p53对POLDI1起着负性调节的作用.

3种细胞系的活细胞数目(起始)均随着时间的延长而不断增加, 但从第6天转染pEGFP-p53和转染pGPU6/GFP/neo-p53i-769的细胞系其活细胞数处于高峰, 第7天两者的活细胞数都开始下降. 转染pGPU6/GFP/neo-p53i-769的细胞其生长速度比空白对照组的要快, 而转染pEGFP-p53的细胞较之于空白对照组细胞其生长速度较慢(图4).

2.6 p53对SMMC-7721细胞的单细胞锚定依赖性克隆能力的影响 以SMMC-7721, pGPU6/GFP/neo-shNC细胞为对照, 接种pEGFP-C1-p53、pGPU6/GFP/neo-p53i-769于6孔板中, 每个细胞系做3个平行孔. 经培养后, 发现各个细胞系的克隆集落形成数由少到多排列顺序为: pEGFP-C1-p53<SMMC-7721<pGPU6/GFP/neo-shNC<pGPU6/GFP/neo-p53i-769. 统计分析发现, pEGFP-C1-p53、pGPU6/GFP/neo-p53i-769组克隆形成率分别为38.1%和72.6%, 与对照组SMMC-7721和pGPU6/GFP/neo-shNC的克隆形

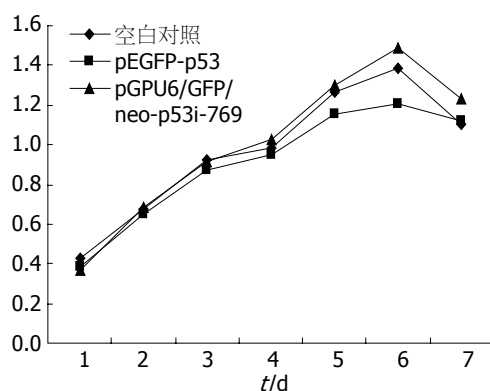


图 4 p53对细胞生长速率的影响.

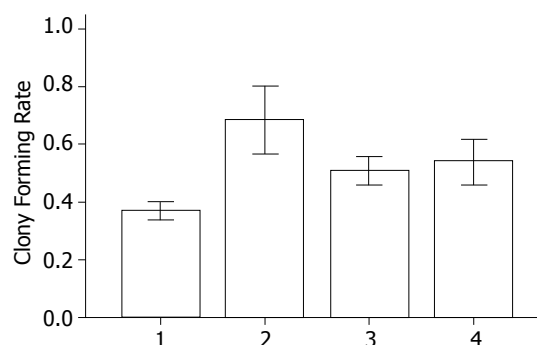


图 5 各组平板克隆集落形成率比较分析. 1: SMMC-7721-pEGFP-C1-p53组; 2: SMMC-7721-GFP/neo-p53i-769组; 3: SMMC-7721-pEGFP-C1-p53组; 4: SMMC-7721-pGPU6/GFP/neo-shNC组.

成率52.6%和49.3%相比, 有统计学差异($P<0.05$). 而两个对照组SMMC-7721和pGPU6/GFP/neo-shNC之间的克隆形成率无统计学差异(图5).

3 讨论

肝癌是我国常见的恶性肿瘤之一, 其发病率在我国仍逐年上升. 在我国位列居民癌症死因的第2位^[19], 手术切除和肝移植虽已被认为是根治肝癌的最好手段^[20], 但转移和复发是影响肝癌术后生存的最大障碍. 探讨肝癌发生发展和转移复发的分子机制, 寻找早期诊断肝癌、预测转移的生物标志和干预治疗的靶点已成为当今肝癌研究的热点^[21].

癌细胞的恶性增殖与DNA的复制是密不可分的. 因此, 认识DNA复制调控的机理对了解肝癌细胞恶性增殖至关重要. 癌细胞在大量增殖的过程中需要大量的DNA合成, 作为DNA复制中关键的基因, POLDI1基因表达异常调控可能与癌细胞的恶性增殖有关. 已有报道, 在肝癌组织中, POLDI1基因和其编码蛋白p125的表达水平平均显著高于癌旁组织, 证实了癌的恶性增殖

■名词解释

POLD1: 即DNA聚合酶 δ 催化亚基基因1, DNA聚合酶 δ 是真核生物DNA复制的最主要复制酶, DNA聚合酶 δ 催化亚基基因1(POLD1)基因编码DNA聚合酶 δ 催化亚基P125.

■同行评价

本文探讨野生型p53对肝癌细胞POLDI基因表达及细胞恶性表型的影响,对探讨肝癌的分子发病机制及进一步指导治疗,有重要临床意义。

可能与POLDI的表达有关^[22]。而POLDI启动子的结合蛋白又是调控其表达的制约因素。比如细胞周期素依赖性蛋白激酶(cyclin dependent kinases, CDKs)、细胞分裂周期蛋白(cell division cycle proteins, CDCs)和细胞周期素(Cyclins)、细胞周期抑制因子(cyclin dependent kinases inhibitor, CDKI)如p53、p21、增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)及E2F、Myc、Rb等多种细胞周期调控因子和促进细胞增殖的生长因子参与了此进程的调控^[14,23]。这些调控蛋白和某些未知的上游调控蛋白相互作用形成一个特异的DNA复制调控系统^[24-27]。一旦某个调控环节失常,会造成DNA复制异常而导致细胞癌变或病变^[28,29]。所以,认识已知或未知的调控因子,对POLDI基因异常表达的调控机理,和细胞恶性增殖的相关性有着至关重要的作用。

Li等^[15]研究发现, p53可能通过与转录因子Sp1竞争POLDI基因的启动子区上的结合位点,从而抑制POLDI启动子活性。国内专家通过利用染色体免疫共沉淀(ChIP, Chromatin Immunoprecipitation)和荧光素酶报告基因实验证实高表达条件下p53在细胞内(*in vivo*)能与POLDI启动子直接结合并抑制POLDI启动子活性,并且这种抑制作用是不依赖于细胞周期的^[30]。除影响p21表达外,研究还发现, p53可以对Gadd45基因表达进行调控,而Gadd45表达出的蛋白能够与PCNA, p21及一些细胞周期因子结合而影响DNA复制及细胞周期调控^[31,32]。由此,我们认为, p53可能通过多条途径直接或间接的影响着POLDI基因的表达,进而影响DNA的复制,最终起到抑制肿瘤细胞恶性增殖的作用。

本研究通过构建真核表达载体,经导入肝癌细胞SMMC-7721后得到可在体内高表达野生型p53的稳定细胞系SMMC-7721-pEGFP-C1-p53。半定量RT-PCR检测结果发现:肝癌细胞中p53高表达,可对POLDI的mRNA表达水平产生明显的抑制作用。与此同时,我们还通过RNA干扰技术沉默SMMC-7721肝癌细胞中p53的表达,结果发现肝癌细胞中p53的低表达后, POLDI基因的mRNA的表达量明显增高。通过以上正反两方面的对比,我们认为p53确实具有对POLDI表达的调控作用。我们通过生长速率检测、平板集落形成率等实验,发现肝癌细胞中p53表达上调确实能够抑制SMMC-7721细胞的增殖能力和锚定依赖性。而p53低表达后SMMC-7721细胞的生长速率有所增加,单细胞锚定依赖性克隆

能力增强。这意味着p53对POLDI的调控作用可能是p53对细胞增殖和细胞恶性表型影响的一种新的分子通路。通过从细胞水平和分子水平两个层面,我们进一步验证了p53对POLDI的抑制作用,同时也证明了用RNA干扰方法沉默p53可促进POLDI基因的表达。POLDI基因的表达水平与p53呈负相关,这意味着p53可能参与了POLDI基因的调控,并且这种作用有可能是p53对细胞增殖抑制及细胞恶性表型变化的调控途径之一。这也意味着POLDI基因的异常调控和p125功能活性癌性表现与肝癌的发生和发展有着密切的联系。

总之,野生型p53高表达能够抑制POLDI的基因转录细胞增殖活性,而低表达能够促进POLDI的基因转录细胞增殖活性。这对在肝癌细胞中p53影响POLDI基因表达的研究提供了实验依据。我们将在现有的实验研究基础上,对p53和其他已知或未知的细胞周期(增殖)调控因子协同调控POLDI基因表达的机理进行深入的研究,以确定POLDI基因表达在肝癌细胞中的异常调控模式。通过研究肝癌细胞中对POLDI基因癌性表达和p125功能活性癌性表现的抑制,寻找肝癌细胞增殖阻断的靶点,为发展有效的新的抗肝癌或抗肝癌细胞增殖性疾病药物提供基础。

4 参考文献

- 1 Goldsby RE, Hays LE, Chen X, Olmsted EA, Slayton WB, Spangrude GJ, Preston BD. High incidence of epithelial cancers in mice deficient for DNA polymerase delta proofreading. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 15560-15565
- 2 Hazane F, Valenti K, Sauvaigo S, Peinnequin A, Mouret C, Favier A, Beani JC. Ageing effects on the expression of cell defence genes after UVA irradiation in human male cutaneous fibroblasts using cDNA arrays. *J Photochem Photobiol B* 2005; 79: 171-190
- 3 Chang LS, Zhao L, Zhu L, Chen ML, Lee MY. Structure of the gene for the catalytic subunit of human DNA polymerase delta (POLDI). *Genomics* 1995; 28: 411-419
- 4 Chung DW, Zhang JA, Tan CK, Davie EW, So AG, Downey KM. Primary structure of the catalytic subunit of human DNA polymerase delta and chromosomal location of the gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 11197-11201
- 5 Kemper RR, Ahn ER, Zhang P, Lee MY, Rabin M. Human DNA polymerase delta gene maps to region 19q13.3-q13.4 by in situ hybridization. *Genomics* 1992; 14: 205-206
- 6 Venkatesan RN, Treuting PM, Fuller ED, Goldsby RE, Norwood TH, Gooley TA, Ladiges WC, Preston BD, Loeb LA. Mutation at the polymerase active site of mouse DNA polymerase delta increases genomic

- instability and accelerates tumorigenesis. *Mol Cell Biol* 2007; 27: 7669-7682
- 7 Meng X, Zhou Y, Zhang S, Lee EY, Frick DN, Lee MY. DNA damage alters DNA polymerase delta to a form that exhibits increased discrimination against modified template bases and mismatched primers. *Nucleic Acids Res* 2009; 37: 647-657
- 8 Yabuta T, Shinmura K, Yamane A, Yamaguchi S, Takenoshita S, Yokota J. Effect of exogenous MSH6 and POLD1 expression on the mutation rate of the HPRT locus in a human colon cancer cell line with mutator phenotype, DLD-1. *Int J Oncol* 2004; 24: 697-702
- 9 Xu H, Zhang P, Liu L, Lee MY. A novel PCNA-binding motif identified by the panning of a random peptide display library. *Biochemistry* 2001; 40: 4512-4520
- 10 Naryzhny SN. Proliferating cell nuclear antigen: a proteomics view. *Cell Mol Life Sci* 2008; 65: 3789-3808
- 11 Zeng XR, Hao H, Jiang Y, Lee MY. Regulation of human DNA polymerase delta during the cell cycle. *J Biol Chem* 1994; 269: 24027-24033
- 12 宋楠萌, 朱晓宇, 石磊, 安婧, 武彦威, 桑建利. POLD1基因启动子中CDE/CHR元件的鉴定及功能分析. *中国科学: C辑* 2009; 39: 449-459
- 13 Boehme KA, Blattner C. Regulation of p53--insights into a complex process. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2009; 44: 367-392
- 14 Tokino T, Nakamura Y. The role of p53-target genes in human cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 2000; 33: 1-6
- 15 Li B, Lee MY. Transcriptional regulation of the human DNA polymerase delta catalytic subunit gene POLD1 by p53 tumor suppressor and Sp1. *J Biol Chem* 2001; 276: 29729-29739
- 16 Gartel AL, Tyner AL. Transcriptional regulation of the p21((WAF1/CIP1)) gene. *Exp Cell Res* 1999; 246: 280-289
- 17 Liu G, Lozano G. p21 stability: linking chaperones to a cell cycle checkpoint. *Cancer Cell* 2005; 7: 113-114
- 18 Spector DL, Goldman RD, Leinwand LA, 黄培堂, 周江, 张映辉. 细胞实验指南(下册). 第1版. 北京: 科学出版社, 2001: 783-784
- 19 Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2002; 55: 74-108
- 20 Llovet JM, Burroughs A, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet* 2003; 362: 1907-1917
- 21 杨国欢, 代智, 周俭. 肝细胞癌的蛋白质组学研究进展. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 2487-2492
- 22 欧贤红, 廖柳凤, 刘华钢, 徐恒. POLD1基因在原发性肝癌中的表达及其意义. *世界华人消化杂志* 2011; 19: 151-155
- 23 Hallstrom TC, Nevins JR. Balancing the decision of cell proliferation and cell fate. *Cell Cycle* 2009; 8: 532-535
- 24 Sclafani RA, Holzen TM. Cell cycle regulation of DNA replication. *Annu Rev Genet* 2007; 41: 237-280
- 25 Nishitani H, Lygerou Z. Control of DNA replication licensing in a cell cycle. *Genes Cells* 2002; 7: 523-534
- 26 Stillman B. DNA polymerases at the replication fork in eukaryotes. *Mol Cell* 2008; 30: 259-260
- 27 Budzowska M, Kanaar R. Mechanisms of dealing with DNA damage-induced replication problems. *Cell Biochem Biophys* 2009; 53: 17-31
- 28 Bandura JL, Calvi BR. Duplication of the genome in normal and cancer cell cycles. *Cancer Biol Ther* 2002; 1: 8-13
- 29 Blow JJ, Gillespie PJ. Replication licensing and cancer-a fatal entanglement? *Nat Rev Cancer* 2008; 8: 799-806
- 30 朱晓宇, 徐恒, 李莉, 张海江, 宋楠萌, 孙建华, 石磊, 桑建利. p53亚细胞定位变化对POLD1基因启动子活性的影响. *自然科学进展* 2006; 16: 555-562
- 31 Kearsley JM, Coates PJ, Prescott AR, Warbrick E, Hall PA. Gadd45 is a nuclear cell cycle regulated protein which interacts with p21Cip1. *Oncogene* 1995; 11: 1675-1683
- 32 Hall PA, Kearsley JM, Coates PJ, Norman DG, Warbrick E, Cox LS. Characterisation of the interaction between PCNA and Gadd45. *Oncogene* 1995; 10: 2427-2433

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

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

• 消息 •

WJG 总被引频次排名位于第 174 名

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

mTOR和p-p70S6K在食管鳞癌组织中蛋白表达的相关性及其临床意义

尹玉慧, 张艳, 李晟磊, 刘红涛, 侯桂琴

■背景资料

雷帕霉素靶蛋白 (TOR) 可以控制与肿瘤发生密切相关的多项细胞功能, 如: 细胞生长增殖、细胞周期调控及细胞迁移等。mTOR 下游的一个重要的靶分子是核糖体 p70S6K, p70S6K 可调控细胞生长, 是 mTOR 的一个直接靶点。

尹玉慧, 李晟磊, 郑州大学第一附属医院病理科 河南省郑州市 450052

张艳, 侯桂琴, 郑州大学药学院临床药理学系 河南省郑州市 450001

刘红涛, 郑州大学生物工程系细胞生物学研究室 河南省郑州市 450001

尹玉慧, 主管技师, 研究方向肿瘤病理。

国家自然科学基金资助项目, No. 30901778

作者贡献分布: 此课题侯桂琴设计; 研究过程由尹玉慧、张艳、李晟磊及刘红涛操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由侯桂琴提供; 数据分析由李晟磊完成; 本论文写作由尹玉慧、张艳、李晟磊、刘红涛及侯桂琴完成。

通讯作者: 侯桂琴, 450001, 河南省郑州市, 郑州大学药学院临床药理学系, hougqluo@126.com

收稿日期: 2011-04-08 修回日期: 2011-08-04

接受日期: 2011-08-12 在线出版日期: 2011-08-18

Clinical significance of expression of mTOR and p-p70S6K in esophageal squamous cell carcinoma

Yu-Hui Yin, Yan Zhang, Sheng-Lei Li, Hong-Tao Liu, Gui-Qin Hou

Yu-Hui Yin, Sheng-Lei Li, Department of Pathology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China

Yan Zhang, Gui-Qin Hou, Department of Clinical Pharmacy, School of Pharmaceutical Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, Henan Province, China

Hong-Tao Liu, Laboratory of Cell Biology, Department of Bioengineering, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, Henan Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30901778

Correspondence to: Gui-Qin Hou, Department of Clinical Pharmacy, School of Pharmaceutical Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, Henan Province, China. hougqluo@126.com

Received: 2011-04-08 Revised: 2011-08-04

Accepted: 2011-08-12 Published online: 2011-08-18

Abstract

AIM: To explore the relationship of expression of mammalian target of rapamycin (mTOR) and its downstream effector ribosomal S6 kinase (p70S6K) with the development, progression, invasion and metastasis of esophageal squamous cell carcinoma (ESCC).

■同行评议者

李淳, 副教授, 汕头大学医学院病理教研室

METHODS: Immunohistochemistry was used to detect the protein expression of mTOR and phosphorylated p70S6K (p-p70S6K) in 35 ESCC specimens, 15 tumor-adjacent atypical hyperplastic epithelial specimens, and 15 normal esophageal epithelial specimens.

RESULTS: The expression of mTOR protein was closely correlated with tumor TNM grade in ESCC ($\chi^2 = 9.121$, $P < 0.01$). The positive rates of mTOR protein expression in normal esophageal epithelium, tumor-adjacent atypical hyperplastic epithelium and carcinoma were 20% (3/15), 46.7% (7/15) and 62.9% (22/35), respectively, with a significant difference among the three groups ($\chi^2 = 7.767$, $P < 0.05$). The expression levels of p-p70S6K protein were closely correlated with lymph node metastasis and TNM grade in ESCC ($\chi^2 = 5.846$, 4.523, both $P < 0.05$). The positive rates of p-p70S6K protein expression in normal esophageal epithelium, tumor-adjacent atypical hyperplastic epithelium and carcinoma were 33.3% (5/15), 73.3% (11/15) and 74.3% (26/35), respectively, with a significant difference among the three groups ($\chi^2 = 8.350$, $P < 0.05$). There is a positive correlation between the protein expression levels of mTOR and p-p70S6K ($\gamma_p = 0.346$, $P = 0.006$).

CONCLUSION: High expression of mTOR and p-p70S6K was detected in ESCC. mTOR and p-p70S6K play an important role in the carcinogenesis, invasion and metastasis of ESCC. The expression of mTOR and p-p70S6K may be used as molecular parameters for early diagnosis and prognostic evaluation of ESCC.

Key Words: Mammalian target of rapamycin; p-p70S6K; Esophageal squamous cell carcinoma; Immunohistochemistry

Yin YH, Zhang Y, Li SL, Liu HT, Hou GQ. Clinical significance of expression of mTOR and p-p70S6K in esophageal squamous cell carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(23): 2450-2454

摘要

目的: 探讨哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)及其下游关键因子p-p70S6K的表达与食管鳞癌发生、发展及浸润、转移的关系。

方法: 35例食管癌手术切除标本取自河南省安阳市肿瘤医院。应用免疫组织化学SP法检测35例食管鳞癌组织, 15例癌旁不典型增生组织及15例正常食管黏膜组织中mTOR及p-p70S6K蛋白的表达。

结果: 食管鳞癌组织中mTOR蛋白表达与肿瘤TNM分期密切相关 ($\chi^2 = 9.121, P < 0.05$); 在食管鳞癌癌变过程中, mTOR蛋白在正常黏膜组织、癌旁不典型增生组织及癌组织中的表达率依次增高, 分别为20%(3/15)、46.7%(7/15)、62.9%(22/35), 组间比较有明显差异($\chi^2 = 7.767, P < 0.05$)。p-p70S6K蛋白表达与肿瘤的淋巴结转移及TNM分期密切相关($\chi^2 = 5.846, 4.523$; 均 $P < 0.05$), 其在正常黏膜组织、癌旁不典型增生组织及癌组织中的表达率依次增高, 分别为33.3%(5/15)、73.3%(11/15)、74.3%(26/35), 组间比较有明显差异($\chi^2 = 8.350, P < 0.05$), mTOR及p-p70S6K的表达呈正相关关系($r_p = 0.359, P = 0.034$)。

结论: mTOR及p-p70S6K蛋白在食管鳞癌组织中表达显著升高, 且二者与食管鳞癌的生物学行为关系密切。提示二者高表达与食管鳞癌的发生、发展有关, 可作为食管鳞癌早期诊断和判断预后的辅助指标。

关键词: 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白; p-p70S6K; 食管鳞癌; 免疫组织化学

尹玉慧, 张艳, 李磊, 刘红涛, 侯桂琴. mTOR和p-p70S6K在食管鳞癌组织中蛋白表达的相关性及其临床意义. 世界华人消化杂志 2011; 19(23): 2450-2454
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2450.asp>

0 引言

哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)是近年来发现的一种进化上保守的蛋白激酶, 也是一种重要的信号转导分子, 参与多种病理和生理过程, 不仅在正常的细胞生长增殖中起主要作用, 而且与细胞分化以及癌细胞的生长、增殖密切相关, 是细胞生长的中心调控因子^[1-4]。核糖体S6激酶(p70S6K)是其下游重要的分子靶点。激活的mTOR能促使p70S6K磷酸化, 从而促进翻译的进行, 最终加

快细胞的生长和增殖^[5-7]。研究证明, 许多肿瘤中存在mTOR/p70S6K信号通路的异常激活^[8,13]。由于食管鳞癌在我国尤其是河南省林州市(林县)发生率和死亡率均很高, 故本研究应用免疫组织化学技术对35例食管癌组织、15例食管癌正常组织和20例癌旁组织进行检测, 观察mTOR及p-p70S6K在食管鳞癌中的表达情况及其与食管癌发生发展的关系, 以期对食管鳞癌的早期诊断和判断预后寻找分子指标。

1 材料和方法

1.1 材料 35例食管癌手术切除标本于2008-05-23/06-16取自食管癌高发区河南省安阳市肿瘤医院, 所有病例术前均无化疗, 放疗及免疫治疗史。其中男16例, 女19例, 年龄33-77(平均61.3±9.1)岁。全部病理组织学证实均为鳞状细胞癌。其中组织学分级 I 级9例, II 级14例, III级12例; 伴淋巴结转移者16例, 无淋巴结转移者19例。浸润深度分3组, 浸达黏膜者7例, 浸达肌层15例, 浸达纤维膜13例。TNM分期 I - II 者13例, III-IV 者22例。选取全部35例病例中癌旁3 cm以内经HE切片证实有中-重度不典型增生或原位癌组织做癌旁对照; 另选取15例>3 cm的远端正常食管黏膜组织做正常对照。兔抗人p-p70S6K多克隆抗体购自美国Santa Cruz公司, 兔抗人mTOR单克隆抗体购自武汉博士德生物技术有限公司, 二抗及免疫组织化学SP试剂盒和二甲基联苯胺(DAB)购自北京中杉金桥生物技术有限公司, 封闭血清、3%双氧水、磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)、乙二胺四乙酸(ethylenediamine tetraacetic acid, EDTA)及苏木素等均由河南省肿瘤病理重点实验室提供。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学: 全部样本经40 g/L多聚甲醛液固定, 常规脱水, 石蜡包埋, 连续切片, 切片厚度4-6 μm , 分别用于HE和免疫组织化学染色。采用SP法, mTOR及p-p70S6K抗体稀释倍数分别为1:100及1:300。具体步骤如下: 组织切片用60 $^{\circ}\text{C}$ 烤60 min后用二甲苯、乙醇脱蜡至水, 3%双氧水浸泡20 min以封闭内源性过氧化物酶活性; 高压锅枸橼酸盐抗原修复, 降至室温后用PBS洗3次, 每次5 min; 滴加10%血清以阻断非特异性结合, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育10 min。加一抗4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, PBS洗3次每次5 min; 滴加生物素标记二抗, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育10 min, PBS洗3次每次5 min, 滴加辣根过氧化物酶标记的链霉素卵白素工作液37 $^{\circ}\text{C}$

■ 研发前沿

mTOR/p70S6K信号通路在肿瘤的演进过程中发挥着极其重要的作用, 明确mTOR/p70S6K信号通路在食管鳞癌中的作用是目前研究的重点。

■相关报道

国内外已有报道表明,许多肿瘤中存在mTOR/p70S6K信号通路的异常激活。

表1 mTOR及p-p70S6K蛋白在食管鳞癌组织、非典型增生及正常黏膜组织中的表达

	<i>n</i>	mTOR			χ^2 值	<i>P</i> 值	p-p70S6K			χ^2 值	<i>P</i> 值
		-	+	阳性率(%)			-	+	阳性率(%)		
正常黏膜上皮组织	15	12	3	20.0	7.767	0.021	10	5	33.3	8.350	0.015
非典型增生组织	15	8	7	46.7			4	11	73.3		
鳞癌组织	35	13	22	62.9			9	26	74.3		

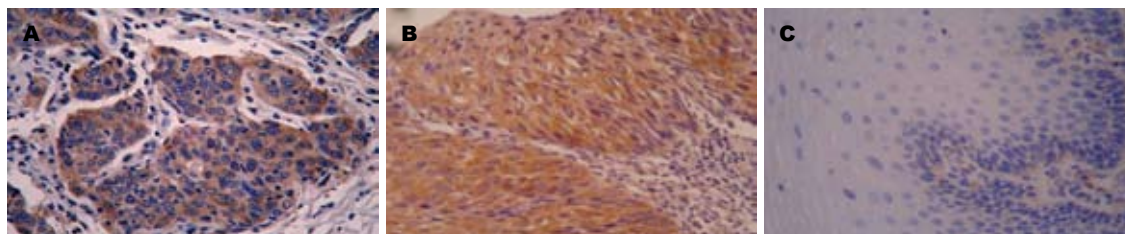


图1 mTOR在食管鳞癌组织中的表达(SP × 200). A: 强阳性; B: 中度阳性; C: 阴性.

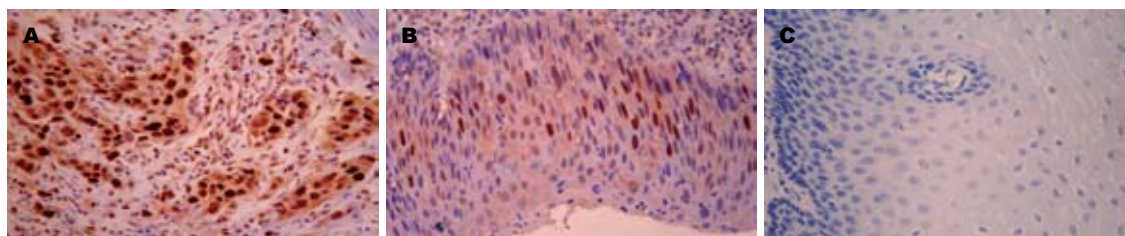


图2 p-p70S6K在食管鳞癌组织中的表达(SP × 200). A: 强阳性; B: 弱阳性; C: 阴性.

孵育10 min, DAB显色, 苏木素复染, 脱水、干燥并用中性树脂封片. 以PBS液代替一抗作为阴性对照.

1.2.2 结果判定: p-p70S6K蛋白定位在细胞核内, 阳性信号呈棕黄色颗粒样物质, mTOR蛋白定位于细胞质内, 阳性信号呈棕黄色颗粒样物质. 高倍镜下随机选取5个视野(每个视野观察细胞数不少于200个), 按阳性细胞所占百分比及着色深浅进行结果判定^[14,15]: (1)按阳性细胞数占同类细胞数的百分比, <30%为1分, 30%-70%为2分; >70%为3分; (2)按切片中细胞着色深浅评分: 0分, 细胞无显色; 1分, 浅黄色; 2分, 棕黄色; 3分, 棕褐色. 取(1)(2)两项评分的乘积作为总积分, 0-1分为阴性(-), >1分为阳性(+).

统计学处理 应用SPSS13.0统计学软件分别对p-p70S6K在食管癌与正常食管组织中的表达情况, p-p70S6K与食管癌的病理分级、临床分期及有无淋巴结转移的关系进行统计分析, 采用 χ^2 检验, 检验水准 $\alpha = 0.05$.

2 结果

2.1 mTOR蛋白在食管鳞癌组织中的表达及其与

临床生物学行为的关系 mTOR蛋白阳性表达主要位于肿瘤细胞的胞质中, 呈浅黄色至深黄色颗粒(图1). 在食管鳞癌癌变过程中mTOR蛋白表达在正常黏膜组织、癌旁不典型增生组织及癌组织中的表达率依次增高, 分别为20%(3/15)、46.7%(7/15)、62.9%(22/35), 组间比较有明显差异($\chi^2 = 7.767$, $P < 0.05$, 表1). mTOR蛋白表达与食管鳞癌组织学分级、浸润深度、淋巴结转移无关, 组间差别无统计学意义($\chi^2 = 0.173$, 2.353, 1.861, 均 $P > 0.05$), mTOR蛋白阳性表达率与TNM分期密切相关($\chi^2 = 9.121$, 均 $P < 0.01$, 表2).

2.2 p-p70S6K蛋白在食管鳞癌组织中的表达及其与临床生物学行为的关系 p-p70S6K蛋白阳性着色定位于细胞核, 呈棕黄色或深黄色颗粒(图2). 在食管鳞癌癌变过程中p-p70S6K蛋白在正常黏膜组织、癌旁不典型增生组织及癌组织中的表达率依次升高, 分别为33.3%(5/15)、73.3%(11/15)、74.3%(26/35), 组间比较有明显差异($\chi^2 = 8.350$, $P < 0.05$, 表1). p-p70S6K蛋白表达与食管鳞癌组织的组织学分级及浸润深度无关, 组间比较差异无统计学意义($\chi^2 = 0.120$,

表 2 mTOR及p-p70S6K蛋白表达与食管鳞癌临床生物学行为的关系

病理特征	n	mTOR			p-p70S6K		
		阳性表达n(%)	χ^2 值	P值	阳性表达n(%)	χ^2 值	P值
组织学分级							
I	9	6(66.7)	0.173	0.917	7(77.8)	0.120	0.942
II	14	9(64.3)			10(71.4)		
III	12	7(58.3)			9(75.0)		
浸润深度							
黏膜层	7	3(42.9)	2.353	0.308	4(57.1)	1.810	0.404
肌层	15	9(60.0)			11(73.3)		
纤维膜	13	10(76.9)			11(84.6)		
淋巴结转移							
无	19	10(52.6)	1.861	0.172	11(57.9)	5.846	0.016
有	16	12(75.0)			15(93.8)		
TNM分期							
I、II	13	4(30.8)	9.121	0.003	7(53.8)	4.523	0.033
III、IV	22	18(81.8)			19(86.4)		

■创新盘点

本文首次采用免疫组织化学技术检测食管癌高发区安阳肿瘤医院食管癌标本中mTOR及p-p70S6K蛋白表达,并探讨其可能的分子作用机制。

表 3 mTOR及p-p70S6K在食管鳞癌组织中表达的相关性

p-p70S6K	n	mTOR		γ_p 值	P值
		+	-		
+	26	19	7	0.359	0.034
-	9	3	6		

1.810, 均 $P>0.05$), p-p70S6K蛋白阳性表达率与癌组织的淋巴结转移及TNM分期密切相关($\chi^2 = 5.846$ 及 4.523 ; 均 $P<0.05$, 表2)。

2.3 p-p70S6K及mTOR在食管鳞癌组织中表达的相关性 在35例食管鳞癌组织中, mTOR阳性表达22例中, 其p-p70S6K蛋白表达阳性占19例, 而mTOR表达阴性的13病例中, 其p-p70S6K蛋白表达阴性的占6例。mTOR及p-p70S6K蛋白在食管鳞癌组织中的表达呈正相关关系($\gamma_p = 0.359$, $P = 0.034$, 表3)。

3 讨论

TOR是1994年筛选啤酒酵母免疫抑制剂雷帕霉素抗性株时被发现并克隆^[16,17]。随后, 在哺乳动物也发现了结构和功能保守的TOR蛋白, 称为mTOR, 又称FRAP、RAFT、RAPT。与肿瘤发生密切相关的多项细胞功能如: 细胞生长增殖、细胞周期调控及细胞迁移等受控于mTOR^[18]。mTOR下游的一个重要的靶分子是核糖体p70S6K, p70S6K可调控细胞生长, 是mTOR的一个直接靶点。许多证据表明, p70S6K通过增强mRNA翻译来控制细胞生长^[19,20]。通常认为, 激

活的p70S6K促进了5'TOP(terminal oligopyrimidine tract) mRNA的翻译, 此种mRNA包含一个短的多聚嘧啶(4-14个核苷酸), 与5'帽结构紧密相邻^[20,21], 主要编码翻译机制中涉及的成员, 包括所有核糖体蛋白、延长因子和polyA结合蛋白(PABP)。研究表明, p70S6K是5'TOP mRNA翻译所必需的^[22,23]。活化的mTOR/p70S6K信号通路通过调控下游基因的表达, 从而促进肿瘤的发生和发展, 其已成为肿瘤研究中的热点^[24,25]。目前, 国内外对mTOR/p70S6K信号通路的研究多集中在乳腺癌^[2]、宫颈癌^[12]、肝癌^[26]、肺癌等^[27], 而在食管鳞癌中的研究报道不多, 由于食管鳞癌是河南省高发的肿瘤, 其侵袭性强, 对临床化疗药不敏感, 且易复发, 因此, 本研究以食管鳞癌为研究对象, 检测mTOR及p-p70S6K在食管鳞癌中的表达情况并分析其临床意义, 以期对食管鳞癌寻找新的分子治疗靶点。

本研究结果显示, mTOR及p-p70S6K在食管鳞癌组织中的表达远高于其在相对应的癌旁不典型增生组织及正常食管黏膜内, 并且二者具有正相关, 进一步证实了mTOR可以促使p70S6K发生磷酸化。mTOR与食管鳞癌的TNM分期密切相关, p-p70S6K与TNM分期及有无淋巴结转移密切相关, 提示mTOR及p-p70S6K高表达的食管鳞癌具有更强的侵袭能力, 二者可能共同参与了食管鳞癌浸润转移的过程。联合检测食管鳞癌中mTOR及p-p70S6K蛋白的表达有利于我们进一步地了解食管癌的生物行为, 为食管鳞癌的早期诊断和治疗提供一个新的分

■同行评价

本研究应用临床标本验证mTOR及p-p70S6K与食管癌的关系,具有一定的意义。

子靶点。

4 参考文献

- Peterson RT, Beal PA, Comb MJ, Schreiber SL. FKBP12-rapamycin-associated protein (FRAP) autophosphorylates at serine 2481 under translationally repressive conditions. *J Biol Chem* 2000; 275: 7416-7423
- 郑杰. mTOR信号途径与肿瘤. *生命科学* 2006; 18: 261-265
- Gingras AC, Raught B, Sonenberg N. Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR. *Genes Dev* 2001; 15: 807-826
- Fingar DC, Blenis J. Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression. *Oncogene* 2004; 23: 3151-3171
- Takahashi T, Hara K, Inoue H, Kawa Y, Tokunaga C, Hidayat S, Yoshino K, Kuroda Y, Yonezawa K. Carboxyl-terminal region conserved among phosphoinositide-kinase-related kinases is indispensable for mTOR function in vivo and in vitro. *Genes Cells* 2000; 5: 765-775
- Liu L, Li F, Cardelli JA, Martin KA, Blenis J, Huang S. Rapamycin inhibits cell motility by suppression of mTOR-mediated S6K1 and 4E-BP1 pathways. *Oncogene* 2006; 25: 7029-7040
- Easley CA, Ben-Yehudah A, Redinger CJ, Oliver SL, Varum ST, Eisinger VM, Carlisle DL, Donovan PJ, Schatten GP. mTOR-mediated activation of p70 S6K induces differentiation of pluripotent human embryonic stem cells. *Cell Reprogram* 2010; 12: 263-273
- Bjornsti MA, Houghton PJ. The TOR pathway: a target for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2004; 4: 335-348
- Zhang YJ, Dai Q, Sun DF, Xiong H, Tian XQ, Gao FH, Xu MH, Chen GQ, Han ZG, Fang JY. mTOR signaling pathway is a target for the treatment of colorectal cancer. *Ann Surg Oncol* 2009; 16: 2617-2628
- Pene F, Claessens YE, Muller O, Viguié F, Mayeux P, Dreyfus F, Lacombe C, Bouscary D. Role of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and mTOR/P70S6-kinase pathways in the proliferation and apoptosis in multiple myeloma. *Oncogene* 2002; 21: 6587-6597
- Panwalkar A, Verstovsek S, Giles FJ. Mammalian target of rapamycin inhibition as therapy for hematologic malignancies. *Cancer* 2004; 100: 657-666
- Albert JM, Kim KW, Cao C, Lu B. Targeting the Akt/mammalian target of rapamycin pathway for radiosensitization of breast cancer. *Mol Cancer Ther* 2006; 5: 1183-1189
- Morgensztern D, McLeod HL. PI3K/Akt/mTOR pathway as a target for cancer therapy. *Anticancer Drugs* 2005; 16: 797-803
- 高冬玲, 李晟磊, 陈奎生, 赵志华, 赵秋民, 刘宗文, 张云汉. 金属蛋白酶抑制基因RECK在食管鳞癌中的表达及生物学意义. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 1634-1638
- 李晟磊, 赵秋民, 刘宗文, 赵志华, 高冬玲, 郑湘予, 陈奎生, 张云汉. 食管鳞癌中RECK和MMP-9蛋白表达的相关性及临床病理意义. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 1082-1086
- Chen J, Zheng XF, Brown EJ, Schreiber SL. Identification of an 11-kDa FKBP12-rapamycin-binding domain within the 289-kDa FKBP12-rapamycin-associated protein and characterization of a critical serine residue. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 4947-4951
- Choi J, Chen J, Schreiber SL, Clardy J. Structure of the FKBP12-rapamycin complex interacting with the binding domain of human FRAP. *Science* 1996; 273: 239-242
- Hansel DE, Platt E, Orloff M, Harwalker J, Sethu S, Hicks JL, De Marzo A, Steinle RE, Hsi ED, Theodorescu D, Ching CB, Eng C. Mammalian target of rapamycin (mTOR) regulates cellular proliferation and tumor growth in urothelial carcinoma. *Am J Pathol* 2010; 176: 3062-3072
- Fenton TR, Gwaller J, Cramer R, Gout IT. S6K1 is acetylated at lysine 516 in response to growth factor stimulation. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 398: 400-405
- Meng Q, Xia C, Fang J, Rojanasakul Y, Jiang BH. Role of PI3K and AKT specific isoforms in ovarian cancer cell migration, invasion and proliferation through the p70S6K1 pathway. *Cell Signal* 2006; 18: 2262-2271
- Stolovich M, Lerer T, Bolker Y, Cohen H, Meyuhav O. Lithium can relieve translational repression of TOP mRNAs elicited by various blocks along the cell cycle in a glycogen synthase kinase-3- and S6-kinase-independent manner. *J Biol Chem* 2005; 280: 5336-5342
- Jefferies HB, Fumagalli S, Dennis PB, Reinhard C, Pearson RB, Thomas G. Rapamycin suppresses 5'TOP mRNA translation through inhibition of p70s6k. *EMBO J* 1997; 16: 3693-3704
- Schwab MS, Kim SH, Terada N, Edfjäll C, Kozma SC, Thomas G, Maller JL. p70(S6K) controls selective mRNA translation during oocyte maturation and early embryogenesis in *Xenopus laevis*. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 2485-2494
- Li W, Tan D, Zhang Z, Liang JJ, Brown RE. Activation of Akt-mTOR-p70S6K pathway in angiogenesis in hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep* 2008; 20: 713-719
- Gibbons JJ, Abraham RT, Yu K. Mammalian target of rapamycin: discovery of rapamycin reveals a signaling pathway important for normal and cancer cell growth. *Semin Oncol* 2009; 36 Suppl 3: S3-S17
- 冀静, 顾婷婷, 郑鹏生. mTOR/P70S6K信号通路在宫颈癌组织中的表达及其临床意义. *西安交通大学学报(医学版)* 2010; 31: 10-13
- Tarhini A, Kotsakis A, Gooding W, Shuai Y, Petro D, Friedland D, Belani CP, Dacic S, Argiris A. Phase II study of everolimus (RAD001) in previously treated small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2010; 16: 5900-5907

编辑 李薇 电编 何基才

肝细胞癌中一种高通量二维细胞识别技术方法的建立

朱玉珍, 符达, 刘黎黎, 马雨水, 沈锡中, 陈锡美

朱玉珍, 陈锡美, 上海市同济大学附属同济医院消化内科 上海市 200065

符达, 刘黎黎, 马雨水, 沈锡中, 复旦大学附属中山医院消化科 上海市 200032

朱玉珍, 硕士生, 主要研究肝癌发生的分子机制.

中国博士后基金面上项目, No. 20100480542

作者贡献分布: 朱玉珍与符达对此文所作贡献均等; 本文研究课题由沈锡中和陈锡美构思, 符达设计; 免疫荧光实验由刘黎黎完成; 细胞识别技术方法由刘黎黎与朱玉珍共同完成; 论文撰写由朱玉珍和马雨水完成, 修改由符达和沈锡中完成.

通讯作者: 陈锡美, 教授, 200065, 上海市新村路389号, 同济大学附属同济医院消化内科. chenxm021@126.com

电话: 021-56051080

收稿日期: 2011-05-30 修回日期: 2011-08-10

接受日期: 2011-08-17 在线出版日期: 2011-08-18

A high-throughput two-dimensional screening technique for cellular recognition and localization in hepatocellular carcinoma

Yu-Zhen Zhu, Da Fu, Li-Li Liu, Yu-Shui Ma, Xi-Zhong Shen, Xi-Mei Chen

Yu-Zhen Zhu, Xi-Mei Chen, Department of Gastroenterology, Tongji Hospital, Tongji University, Shanghai 200065, China

Da Fu, Li-Li Liu, Yu-Shui Ma, Xi-Zhong Shen, Department of Gastroenterology, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China

Supported by: the China Postdoctoral Science Foundation, No. 20100480542

Correspondence to: Professor Chen Xi-Mei, Department of Gastroenterology, Tongji Hospital, Tongji University, 389 Xincun Road, Shanghai 200065, China. chenxm021@126.com

Received: 2011-05-30 Revised: 2011-08-10

Accepted: 2011-08-17 Published online: 2011-08-18

Abstract

AIM: To establish a novel high-throughput two-dimensional screening technique for cellular recognition and localization in hepatocellular carcinoma (HCC).

METHODS: HCC specimen was collected from a patient who underwent radical resection. The paraffin-embedded specimen was serially sectioned at a thickness of 1 μ m. Five serial sections were used for staining: one for H&E staining and the other four for immunofluores-

cence staining for detecting eight reported liver cancer stem cell (LCSC) markers. Fluorescein isothiocyanate (FITC) and tetramethyl rhodamine isothiocyanate (rhodamine) were used for fluorescent imaging for double staining. The sections were counterstained with Hoechst33342 to demonstrate the nuclei for cellular localization. Fluorescence microscopy was used to detect the fluorescence intensity and localization.

RESULTS: We identified the valid number of cells in a visual field (1×100) of microscopy and delineated the merged cell map. The results showed that 8 LCSCs biomarkers could be detected in 2 772 valid cells. The expression levels of biomarkers were different in these cells and a single valid cell could express 0-8 biomarkers. No biomarkers could be detected in 2 453 cells (88.5%).

CONCLUSION: A high-throughput two-dimensional screening technique for cellular recognition and localization has been successfully developed and can be used to detect the expression of two or more LCSC markers in one liver cancer cell.

Key Words: Liver cancer stem Cells; High-throughput screening; Two-dimension; Cellular recognition; Cellular localization

Zhu YZ, Fu D, Liu LL, Ma YS, Shen XZ, Chen XM. A high-throughput two-dimensional screening technique for cellular recognition and localization in hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(23): 2455-2460

摘要

目的: 建立一种新颖的高通量二维细胞识别、定位技术, 为肝癌干细胞的鉴定、异质性分化细胞分类等提供技术平台.

方法: 收集原发性肝细胞癌患者手术标本1例, 每个标本分别石蜡包埋, 以1 μ m的厚度连续切5片. 每张切片取第一片做常规HE染色, 病理诊断. 其余4张切片分别以肝癌组织中目前已报道的8个可能的肝癌干细胞标志物进行了

■背景资料

肿瘤干细胞的发现是最近肿瘤研究中的一个重要方向. 肿瘤干细胞方面的深入研究, 对于理解肿瘤的发展、转移、预后和治疗等有重要的意义.

■同行评议者

代智, 副研究员, 复旦大学附属中山医院肝癌研究所

■研究前沿

已有文献报道肝癌干细胞的分离和鉴定,但目前还没有公认而统一的肝癌干细胞标志物。不同肝癌干细胞亚群之间的差异特征和相关分子机制尚未见报道。

免疫荧光标记,利用试剂Hoechst33342(蓝色)标记细胞核定位,异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC),四甲基异硫氰酸罗丹明(tetramethyl rhodamine isothiocyanate rhodamine)双荧光标记待测抗体,荧光显微镜检测荧光位置及强度。

结果:以4个切片中均能识别的细胞核做定位,确定每个切片1个 1×100 显微镜视野中有效细胞的个数,作出4个切片合并的细胞图谱,建立了一种新颖的二维细胞识别技术。检测得到有效细胞为2 772个。检测的8个抗体均在肝癌细胞中表达,并且不同肝癌细胞中肝癌干细胞标志物的表达情况不同,同一肝癌细胞可同时表达多个肝癌干细胞的分子标志,且可见8个抗体均阳性的肝癌细胞。其中2 772个有效细胞中有2 453个细胞为阴性,所占比例为884.9%。

结论:完成了高通量二维细胞识别、定位技术方法的建立,该方法可在一个肝癌干细胞上检测两种以上的肝癌干细胞分子标志的表达情况。

关键词:肝癌干细胞;高通量;二维技术;细胞识别;细胞定位

朱玉珍, 符达, 刘黎黎, 马雨水, 沈锡中, 陈锡美. 肝细胞癌中一种高通量二维细胞识别技术方法的建立. 世界华人消化杂志 2011; 19(23): 2455-2460
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2455.asp>

0 引言

随着对肿瘤干细胞研究的深入,肿瘤干细胞理论已经逐渐受到广泛认可。肿瘤干细胞分子标志物在乳腺癌、前列腺癌、结肠癌、神经胶质瘤、白血病、肺癌等肿瘤中已确立^[1-6],但是就肝癌干细胞的分子标志物而言,目前的研究证据尚不能完全证实肝癌干细胞(liver cancer stem cell, LCSC)的存在。肝癌中已证实有一小群具有干细胞样潜能的肿瘤细胞的存在,并发现了一些人肝癌干细胞可能相关的生物标记,包括侧群细胞^[7-9]、CD133^[10-14]、CD133⁺/CD44⁺^[15]、CD133⁺/CD45⁺^[16]、CD90^[17]、CD90⁺/CD44⁺^[18]、OV6^[19]、AFP⁺/EpCAM⁺^[20-23]、ALDH^[24],但尚无一致结论。上述肝癌干细胞可能的标志物及相关标志物组合有8个,但不同实验室的结果不能相互印证,免疫组织化学、免疫荧光技术一次做多能标识两个抗体于同一细胞,在同一细胞标记8个相关抗体目前技术仍无法达到。因此,

我们利用组织免疫荧光、荧光显微镜检测技术建立一种新的高通量的二维细胞识别技术。

1 材料和方法

1.1 材料 Hoechst33342染料(Sigma公司,工作浓度1:1 000),异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC),四甲基异硫氰酸罗丹明(tetramethyl rhodamine isothiocyanate rhodamine),80i正置荧光显微镜荧光显微镜(Nikon公司),抗体ABCG2, AFP, CD133, c-Kit, CD34, CD44(PTG公司)。

1.2 方法

1.2.1 肝癌组织固定,包埋与切片:收集上海复旦大学附属中山医院原发性肝细胞癌患者手术标本1例,每个标本经40 g/L的中性甲醛固定,分别石蜡包埋,以1 μm 的厚度连续切5片。每张切片取第一片做常规HE染色,病理诊断。其余4张切片分别以肝癌组织中目前已报道的8个可能的肝癌干细胞标志物进行了免疫荧光双标记。

1.2.2 标本脱蜡及水化:将组织切片于恒温烘箱孵育半小时,在二甲苯中浸3次,每次10 min。脱蜡后切片依次浸入1 000 mL/L、950 mL/L、700 mL/L梯度乙醇中脱二甲苯,每次2 min。至蒸馏水中浸5 min,0.01 mol/L的PBS洗3次,每次5 min。

1.2.3 抗原修复及封闭:取出切片,放置于3%过氧化氢溶液中,室温孵育15 min,0.01 mol/L的PBS振洗2次,每次5 min。取出标本,放入95 $^{\circ}\text{C}$ 预热的抗原修复液(柠檬酸抗原修复液, pH6.0),中低火煮沸15 min,冷却至室温,0.01 mol/L的PBS振洗3次,每次3 min。取出切片,擦干切片组织周围的液体,放置于湿盒中,每份标本加入10%正常山羊血清,每张片子约50 μL ,室温孵育30 min。**1.2.4 加入抗体及封片:**将切片的液体甩干,滴加对应的一抗于组织上。切片加入一抗后,置于湿盒内,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。取出后37 $^{\circ}\text{C}$ 复温60 min,0.01 mol/L的PBS振洗3次,每次5 min;Hoechst 33342(1:100)染核。将切片的液体甩干,滴加对应的二抗于组织上,二抗为1:1混合FITC标记的羊抗兔IgG和罗丹明标记羊抗小鼠IgG,37 $^{\circ}\text{C}$,40 min。0.01 mol/L的PBS振洗3次,每次5 min,10%缓冲甘油封片。设空白对照(无一抗,加PBS)和抗体特异性对照(只加一抗不加二抗或只加二抗不加一抗),所有切片同时染色。抗体名称及组合如下: EPCAM/AFP, CD90/CD44, ABCG2/CD133, c-Kit/CD34。

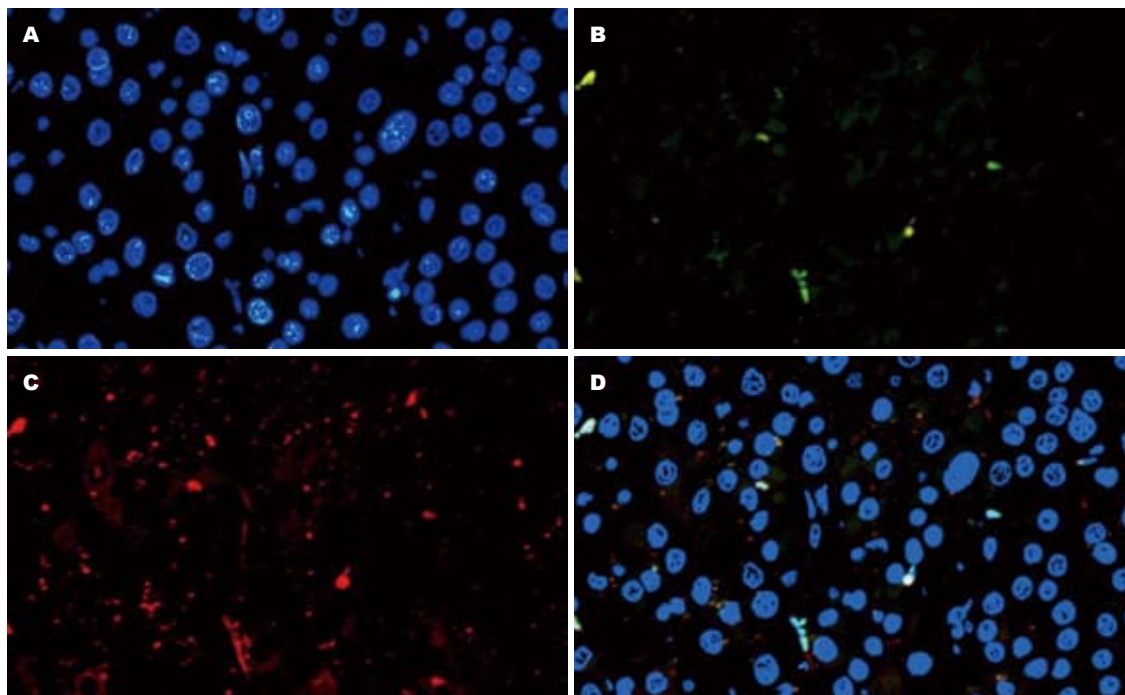


图 1 EpCAM和AFP检测肝癌组织切片(×100). A: Hoechst 33342; B: FITC; C: Rhodamine; D: 合成图.

■ 相关报道

Yang等分离鉴定了CD90⁺肝癌干细胞,证实CD90⁺CD44⁺的肝癌细胞具有较强的侵袭和转移能力,差异基因组学筛选出一系列与侵袭转移相关的差异基因.

1.2.5 荧光显微镜检测荧光位置及强度: 细胞定位及计数: 以4个连续切片中均能识别的细胞核做定位, 记为有效细胞, 确定每个切片1个1×100显微镜视野中有效细胞的个数. 于中山医院中心实验室Nikon 80i正置荧光显微镜下4张连续切片分别观察, 于1个1×100的显微镜视野中每张切片均选择相同的视野, 拍照、保存. 用A3纸打印出图片, 4张纸都用3 mm的长度或宽度分别列出坐标, 横向为: X1, X2, X3...X99; 竖向为Y1, Y2, Y3...Y140(A3纸长宽分别为297 mm和420 mm), 4张切片中的相同坐标部位均有细胞的存在才能记为一个有效细胞. 在原图片进行荧光半定量计数, 按荧光强弱分为+++, ++, +, 阴性.

2 结果

2.1 荧光显微镜检测荧光位置及强度 肝癌组织经组织免疫荧光后, 于×400的荧光显微镜下观察拍照. 图1为肝癌组织切片的EpCAM和AFP检测示意图. 肝癌组织切片利用试剂Hoechst33342(蓝色)标记细胞核定位, FITC(绿色)和Rhodamine(红色)分别标记EpCAM和AFP二抗, 荧光显微镜检测蓝, 绿, 红的成像再利用Nikon 80i正置荧光显微镜自带软件做出相关合成图.

2.2 8个标志物在肝癌组织中的表达 4张切片中的相同坐标部位均有细胞的存在才能记为一个有效细胞, 共计算有效细胞为2 772个. 检测的8

表 1 表达不同数目肝癌干细胞标志物的细胞个数

HCSCs标志物数目	阳性细胞数目	所占比例(%)
8	11	3.9
7	2	0.7
6	28	10.1
5	6	2.2
4	45	16.2
3	23	8.3
2	146	52.7
1	58	20.9
0	2 453	884.9

个抗体均在肝癌细胞中表达, 并且不同肝癌细胞中肝癌干细胞标志物的表达情况不同, 同一肝癌细胞可同时表达多个肝癌干细胞的分子标志(表1), 且可见8个抗体均阳性的肝癌细胞(图2). 其中, 2 772个有效细胞中有2 453个细胞为阴性, 所占比例为884.9%.

3 讨论

肝癌干细胞是指肝癌组织中一小群具有自我更新与分化潜能的肝癌细胞, 因其可能与肝癌发生和转移直接相关而备受关注. Ma等^[14]的研究表明, CD133⁺ HCC细胞具有干细胞/祖细胞的特点. 也有一些实验显示C133⁺细胞CD133⁺细胞具有相同的致癌能力^[4]. Yamashita等^[20]发现EpCAM⁺AFP⁺细胞亚群具有肝癌干细胞特征, 且

■创新盘点

利用建立的一种新颖的高通量二维细胞识别技术,可以对8个分子标记进行肝癌干细胞的筛选或免疫双标。

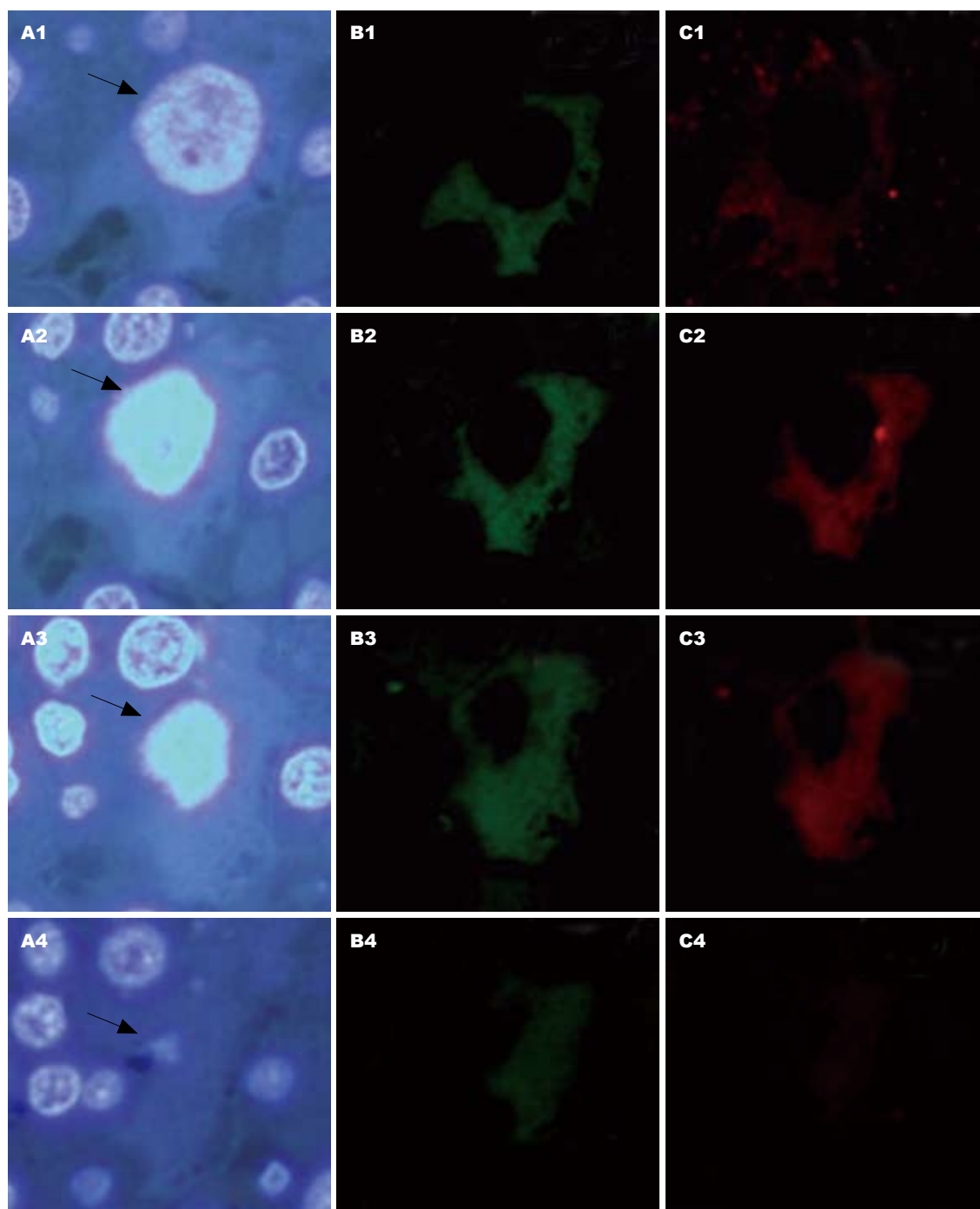


图 2 8个肝癌干细胞标志物有效细胞荧光检测结果($\times 400$). A: Hoechst 33342; B: FITC; C: Rhodamine; 通过细胞定位显示4个连续切片中的同一个肝癌细胞(图中箭头所指).

在不同的细胞系中,肝癌干细胞的标志物也有差别. AFP^+ 的细胞系HuH1、HuH7、Hep3B同时也表达EpCAM、CD133,但没有CD90阳性表达细胞; AFP^+ 的细胞系SK-Hep-1、HLE、HLF有CD90 $^+$ 的细胞亚群,但没有EpCAM $^+$ 和或CD133 $^+$ 的亚群. 卵圆细胞标记OV6 $^+$ 的肝癌细胞具有更高的体内成瘤能力和化疗耐受性^[19]. Zhu等^[15]在对肝癌细胞系HepG2、Hep3B、Huh7、SMMC-7721、MHCC-LM3、MHCC-97L的研究中发现从

CD133 $^+$ 细胞群中分离出的CD133 $^+$ CD44 $^+$ 细胞具有干细胞的特性. Yang等^[18]从肝癌细胞株和HCC患者肝癌组织中研究发现CD90 $^+$ CD44 $^+$ 细胞具有肿瘤干细胞特性,且较CD90 $^+$ CD44 $^-$ 具有较强的侵袭能力与转移能力. 上述各个实验结果都证明各自的具有特殊分子标记的细胞具有LCSC的特征,但是对于不同细胞系的研究分子标记有差异,且相关的分子组合也只有2个.

在既往文献对肿瘤干细胞分子标记的报道

中,多采用流式^[25-28]或磁珠分选^[29-33]对癌细胞系中的具有癌干细胞分子标记的细胞进行分选,此分选价格较昂贵且对1个细胞1次最多也只能分选具有2个的分子标记;采用免疫组织化学或免疫荧光法对人肿瘤组织检测CSCs的存在时,双抗也只能检测出1个细胞同时存在的两种分子标记^[34,35]。目前,与LCSC相关的标志物有8种,采用流式或磁珠分选、免疫组化技术只能用于两个相关的分子标记相互关系的研究。本实验用8个已报道的肝癌干细胞标志物对肝癌患者肿瘤组织进行了检测、立体定位和分类,结果发现在同一肝癌组织中,多种肝癌干细胞标志物可在一个肝癌细胞上同时表达,少数肝癌细胞可同时表达8个肝癌干细胞标记,各个肝癌干细胞分子标记存在交叉表达的情况。

总之,高通量二维细胞识别技术方法的建立,可同时对目前8个肝癌干细胞相关的分子标记之间的相关性进行研究;可用于推测肝癌干细胞在肝癌细胞中的比例与复发的相关性;用于比较肝癌干细胞标志物在肝癌及癌旁组织的表达差异,根据其与其预后的关联,探讨最佳的肝癌干细胞标志物组合及验证其在复发中的作用,并检验肿瘤干细胞的特性,为肝癌干细胞的分离和临床应用提供理论依据和实践基础。

4 参考文献

- Visvader JE, Lindeman GJ. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer* 2008; 8: 755-768
- Xu Y, He K, Goldkorn A. Telomerase targeted therapy in cancer and cancer stem cells. *Clin Adv Hematol Oncol* 2011; 9: 442-455
- Medema JP, Vermeulen L. Microenvironmental regulation of stem cells in intestinal homeostasis and cancer. *Nature* 2011; 474: 318-326
- Lu X, Kang Y. Cell fusion hypothesis of the cancer stem cell. *Adv Exp Med Biol* 2011; 714: 129-140
- Davies EJ, Marsh V, Clarke AR. Origin and maintenance of the intestinal cancer stem cell. *Mol Carcinog* 2011; 50: 254-263
- 许蜜蝶, 李维卿, 余宏宇. 干细胞与肝癌相关性的研究进展. *世界华人消化杂志* 2010; 18: 3881-3885
- Chiba T, Kita K, Zheng YW, Yokosuka O, Saisho H, Iwama A, Nakauchi H, Taniguchi H. Side population purified from hepatocellular carcinoma cells harbors cancer stem cell-like properties. *Hepatology* 2006; 44: 240-251
- Shi GM, Xu Y, Fan J, Zhou J, Yang XR, Qiu SJ, Liao Y, Wu WZ, Ji Y, Ke AW, Ding ZB, He YZ, Wu B, Yang GH, Qin WZ, Zhang W, Zhu J, Min ZH, Wu ZQ. Identification of side population cells in human hepatocellular carcinoma cell lines with stepwise metastatic potentials. *J Cancer Res Clin Oncol* 2008; 134: 1155-1163
- Zen Y, Fujii T, Yoshikawa S, Takamura H, Tani T, Ohta T, Nakanuma Y. Histological and culture studies with respect to ABCG2 expression support the existence of a cancer cell hierarchy in human hepatocellular carcinoma. *Am J Pathol* 2007; 170: 1750-1762
- Ma S, Chan KW, Hu L, Lee TK, Wo JY, Ng IO, Zheng BJ, Guan XY. Identification and characterization of tumorigenic liver cancer stem/progenitor cells. *Gastroenterology* 2007; 132: 2542-2556
- Yin S, Li J, Hu C, Chen X, Yao M, Yan M, Jiang G, Ge C, Xie H, Wan D, Yang S, Zheng S, Gu J. CD133 positive hepatocellular carcinoma cells possess high capacity for tumorigenicity. *Int J Cancer* 2007; 120: 1444-1450
- Suetsugu A, Nagaki M, Aoki H, Motohashi T, Kunisada T, Moriwaki H. Characterization of CD133+ hepatocellular carcinoma cells as cancer stem/progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 351: 820-824
- Rountree CB, Senadheera S, Mato JM, Crooks GM, Lu SC. Expansion of liver cancer stem cells during aging in methionine adenosyltransferase 1A-deficient mice. *Hepatology* 2008; 47: 1288-1297
- Ma S, Lee TK, Zheng BJ, Chan KW, Guan XY. CD133+ HCC cancer stem cells confer chemoresistance by preferential expression of the Akt/PKB survival pathway. *Oncogene* 2008; 27: 1749-1758
- Zhu Z, Hao X, Yan M, Yao M, Ge C, Gu J, Li J. Cancer stem/progenitor cells are highly enriched in CD133+CD44+ population in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 2010; 126: 2067-2078
- Rountree CB, Ding W, He L, Stiles B. Expansion of CD133-expressing liver cancer stem cells in liver-specific phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10-deleted mice. *Stem Cells* 2009; 27: 290-299
- Yang ZF, Ngai P, Ho DW, Yu WC, Ng MN, Lau CK, Li ML, Tam KH, Lam CT, Poon RT, Fan ST. Identification of local and circulating cancer stem cells in human liver cancer. *Hepatology* 2008; 47: 919-928
- Yang ZF, Ho DW, Ng MN, Lau CK, Yu WC, Ngai P, Chu PW, Lam CT, Poon RT, Fan ST. Significance of CD90+ cancer stem cells in human liver cancer. *Cancer Cell* 2008; 13: 153-166
- Yang W, Yan HX, Chen L, Liu Q, He YQ, Yu LX, Zhang SH, Huang DD, Tang L, Kong XN, Chen C, Liu SQ, Wu MC, Wang HY. Wnt/beta-catenin signaling contributes to activation of normal and tumorigenic liver progenitor cells. *Cancer Res* 2008; 68: 4287-4295
- Yamashita T, Ji J, Budhu A, Forgues M, Yang W, Wang HY, Jia H, Ye Q, Qin LX, Wauthier E, Reid LM, Minato H, Honda M, Kaneko S, Tang ZY, Wang XW. EpCAM-positive hepatocellular carcinoma cells are tumor-initiating cells with stem/progenitor cell features. *Gastroenterology* 2009; 136: 1012-1024
- Yamashita T, Forgues M, Wang W, Kim JW, Ye Q, Jia H, Budhu A, Zanetti KA, Chen Y, Qin LX, Tang ZY, Wang XW. EpCAM and alpha-fetoprotein expression defines novel prognostic subtypes of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2008; 68: 1451-1461
- Ji J, Yamashita T, Budhu A, Forgues M, Jia HL, Li C, Deng C, Wauthier E, Reid LM, Ye QH, Qin LX, Yang W, Wang HY, Tang ZY, Croce CM, Wang XW. Identification of microRNA-181 by genome-wide screening as a critical player in EpCAM-positive he-

■应用要点

高通量二维细胞识别技术方法的建立,可用于推测肝癌干细胞在肝癌细胞中的比例与复发的相关性,将为肝癌干细胞的分离和临床应用提供理论依据和实践基础。

■同行评价

本文有一定的创新性, 研究结果具有很好的临床价值.

- 23 patic cancer stem cells. *Hepatology* 2009; 50: 472-480
邱谢武, 于聪慧. 肝癌干细胞与肝癌复发转移的研究进展. *世界华人消化杂志* 2011; 19: 1802-1807
- 24 Ma S, Chan KW, Lee TK, Tang KH, Wo JY, Zheng BJ, Guan XY. Aldehyde dehydrogenase discriminates the CD133 liver cancer stem cell populations. *Mol Cancer Res* 2008; 6: 1146-1153
- 25 Shmelkov SV, Butler JM, Hooper AT, Hormigo A, Kushner J, Milde T, St Clair R, Baljevic M, White I, Jin DK, Chadburn A, Murphy AJ, Valenzuela DM, Gale NW, Thurston G, Yancopoulos GD, D'Angelica M, Kemeny N, Lyden D, Rafii S. CD133 expression is not restricted to stem cells, and both CD133+ and CD133- metastatic colon cancer cells initiate tumors. *J Clin Invest* 2008; 118: 2111-2120
- 26 Dotto GP. Calcineurin signaling as a negative determinant of keratinocyte cancer stem cell potential and carcinogenesis. *Cancer Res* 2011; 71: 2029-2033
- 27 Dou J, Wen P, Hu W, Li Y, Wu Y, Liu C, Zhao F, Hu K, Wang J, Jiang C, He X, Gu N. Identifying tumor stem-like cells in mouse melanoma cell lines by analyzing the characteristics of side population cells. *Cell Biol Int* 2009; 33: 807-815
- 28 Lu YR, Yuan Y, Wang XJ, Wei LL, Chen YN, Cong C, Li SF, Long D, Tan WD, Mao YQ, Zhang J, Li YP, Cheng JQ. The growth inhibitory effect of mesenchymal stem cells on tumor cells in vitro and in vivo. *Cancer Biol Ther* 2008; 7: 245-251
- 29 Fan H, Guo H, Zhang IY, Liu B, Luan L, Xu S, Hou X, Liu W, Zhang R, Wang X, Pang Q. The different HMGA1 expression of total population of glioblastoma cell line U251 and glioma stem cells isolated from U251. *Brain Res* 2011; 1384: 9-14
- 30 Zhong Y, Guan K, Guo S, Zhou C, Wang D, Ma W, Zhang Y, Li C, Zhang S. Spheres derived from the human SK-RC-42 renal cell carcinoma cell line are enriched in cancer stem cells. *Cancer Lett* 2010; 299: 150-160
- 31 Joo KM, Nam DH. Prospective identification of cancer stem cells with the surface antigen CD133. *Methods Mol Biol* 2009; 568: 57-71
- 32 Shervington A, Lu C, Patel R, Shervington L. Telomerase downregulation in cancer brain stem cell. *Mol Cell Biochem* 2009; 331: 153-159
- 33 Cammareri P, Lombardo Y, Francipane MG, Bonventre S, Todaro M, Stassi G. Isolation and culture of colon cancer stem cells. *Methods Cell Biol* 2008; 86: 311-324
- 34 van der Horst G, van den Hoogen C, Buijs JT, Cheung H, Bloys H, Pelger RC, Lorenzon G, Heckmann B, Feyen J, Pujuguet P, Blanque R, Clément-Lacroix P, van der Pluijm G. Targeting of $\alpha(v)$ -integrins in stem/progenitor cells and supportive microenvironment impairs bone metastasis in human prostate cancer. *Neoplasia* 2011; 13: 516-525
- 35 Kleist B, Xu L, Li G, Kersten C. Expression of the adult intestinal stem cell marker Lgr5 in the metastatic cascade of colorectal cancer. *Int J Clin Exp Pathol* 2011; 4: 327-335

编辑 何基才 电编 何基才

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

● 消息 ●

中国科技信息研究所发布《世界华人消化杂志》 影响因子 0.625

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

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

Brg1及VEGF信号通路相关蛋白在Peutz-Jeghers综合征中的表达及意义

刘金霞, 周平, 胡志民, 毛高平

刘金霞, 周平, 中国人民解放军空军总医院肿瘤放疗科 北京市 100142

胡志民, 郑州大学第二附属医院神经外科 河南省郑州市 450014

毛高平, 中国人民解放军空军总医院消化内科 北京市 100142

刘金霞, 硕士研究生, 主要从事消化系统肿瘤的病理学研究.

作者贡献分布: 本课题由周平, 毛高平设计; 由周平指导完成, 实验过程及论文撰写由刘金霞完成, 数据分析由胡志民和刘金霞共同完成.

通讯作者: 周平, 副教授, 副主任医师, 硕士生导师, 100142, 北京市阜成路30号, 中国人民解放军空军总医院肿瘤放疗科. zhouping4946@yahoo.com.cn

收稿日期: 2011-05-04 修回日期: 2011-08-05

接受日期: 2011-08-12 在线出版日期: 2011-08-18

Expression of Brg1, VEGF and COX-2 in Peutz-Jeghers syndrome

Jin-Xia Liu, Ping Zhou, Zhi-Min Hu, Gao-Ping Mao

Jin-Xia Liu, Ping Zhou, Department of Radiation Oncology, The General Hospital of Air Force of Chinese PLA, Beijing 100142, China

Zhi-Min Hu, The Second Affiliated Hospital Of Zhengzhou University, Zhengzhou 450014, Henan Province, China

Gao-Ping Mao, Department of Digestive Disease, The General Hospital of Air Force of Chinese PLA, Beijing 100142, China

Correspondence to: Associate Professor Ping Zhou, Department of Radiation Oncology, General Hospital of Chinese PLA Air Force, Beijing 100142, China. zhouping4946@yahoo.com.cn

Received: 2011-05-04 Revised: 2011-08-05

Accepted: 2011-08-12 Published online: 2011-08-18

Abstract:

AIM: To detect the expression of brahma-related gene 1 (Brg1), vascular endothelial growth factor (VEGF) and cyclooxygenase 2 (COX-2) proteins in Peutz-Jeghers syndrome (PJS) and to analyze their clinical significance.

METHODS: Immunohistochemistry was used to detect the expression of Brg1, VEGF and COX-2 proteins in 72 PJS samples, 12 normal small intestinal mucosal tissue samples and 30 cancer tissue samples.

RESULTS: The positive rates of Brg1, VEGF

and COX-2 expression were significantly higher in PJS than in normal mucosal tissue (54.17% vs 16.67%, 58.33% vs 8.33%, 62.50% vs 25.00%, all $P < 0.01$) and in cancer tissue than in PJS (76.67% vs 54.17%, 80.00% vs 58.33%, 83.33% vs 62.50% all $P < 0.01$). In PJS, positive correlations were found between Brg1 and VEGF expression and between Brg1 and COX-2 expression.

CONCLUSION: Brg1, VEGF and COX-2 may play a role in the occurrence of PJS.

Key Words: Peutz-Jeghers syndrome; Brahma-related gene 1; Vascular endothelial growth factor; Immunohistochemistry

Liu JX, Zhou P, Hu ZM, Mao GP. Expression of Brg1, VEGF and COX-2 in Peutz-Jeghers syndrome. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2011; 19(23): 2461-2466

摘要

目的: 检测染色质重构复合物核心催化亚基(Brg1)及VEGF信号通路相关蛋白在Peutz-Jeghers综合征(PJS)中的表达, 探讨其与PJS息肉发生发展的关系.

方法: 应用免疫组织化学染色技术分析72枚PJS息肉、12例正常小肠黏膜及30例小肠癌中Brg1、VEGF、COX-2蛋白的表达和分布, 比较其在三种组织表达程度的差异.

结果: Brg1、VEGF、COX-2在小肠腺癌组织中的阳性表达率明显高于PJS息肉组织和正常小肠黏膜组织(Brg1: 76.67% vs 54.17%, 16.67%; VEGF: 80.00% vs 58.33%, 8.33%; COX-2: 83.33% vs 62.50%, 25.00%, 均 $P < 0.01$). PJS息肉组织中Brg1与VEGF蛋白表达率呈显著正相关($\chi^2 = 15.734$, $r = 0.467$), 与COX-2蛋白表达率呈正相关($\chi^2 = 7.552$, $r = 0.324$).

结论: 在PJS息肉中Brg1及VEGF信号通路可能参与了PJS的发生, 并且是其癌变的重要因素之一.

■背景资料

Peutz-Jeghers综合征患者息肉多发生于小肠, 以往因为诊断困难, 报道较少. 近几年随着双气囊小肠镜的临床应用, 解决了小肠疾病诊断和治疗的盲区, 该病报道亦不断增加, 虽然在诊断和治疗上取得了积极的进展, 但PJS的具体发病机制仍未完全明确, 有待进一步研究探索.

■同行评议者

颜宏利, 教授, 中国人民解放军第二军医大学遗传学教研室

■研究前沿

目前PJS的治疗以发现息肉并摘除为主,但息肉易复发,所以研究探索抑制息肉再生长的治疗方法是本文研究的新动向。

关键词: Peutz-Jeghers综合征; 染色质重构复合物核心催化亚基; 血管内皮生长因子; 免疫组织化学

刘金霞, 周平, 胡志民, 毛高平. Brg1及VEGF信号通路相关蛋白在Peutz-Jeghers综合征中的表达及意义. 世界华人消化杂志 2011; 19(23): 2461-2466
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2461.asp>

0 引言

Peutz-Jeghers综合征(Peutz-Jeghers syndrome, PJS)是一种常染色体显性遗传疾病,以多发性胃肠道错构瘤性息肉和皮肤黏膜黑色素沉着为特征,因此又称黑斑息肉综合征和色素沉着综合征^[1]. PJS患者息肉多发生于小肠,病理特征常以错构瘤为主合并其他病理类型,是发生肠道和肠道外肿瘤的危险因素,可合并多种恶性肿瘤^[2]. PJS患者息肉多发、频发是困扰临床医生的主要问题,同时为患者和家属带来了沉重的精神和经济负担,所以PJS的致病因素成为我们研究的热点. 多数研究认为PJS的发生是由STK11基因突变所致,其在PJS家系患者中的突变率为70%,散发病例中为30%-67%^[3]. 近年来,关于PJS发病机制的研究中,染色质重构复合物核心催化亚基(brahma-related gene 1, Brg1)有可能参与了PJS的发生发展^[4], Brg1作为染色质重构复合物的重要成员之一,他在基因调控、细胞因子应答、肿瘤发生、发育和分化过程中起重要作用^[5],但与PJS的关系尚不明确;而血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)信号通路可能是PJS发展过程中的关键通路之一;因此,我们用免疫组织化学方法研究Brg1, VEGF和环氧合酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)在正常小肠黏膜组织、PJS息肉组织和小肠癌组织中的表达情况,阐明其与PJS发生发展及其癌变的关系,为PJS的治疗和预防提供一定的参考依据.

1 材料和方法

1.1 材料 收集中国人民解放军空军总医院60例PJS患者2005-02/2010-09归档的病理蜡块标本72枚,所有切片标本均经组织病理学证实. 男35例,女25例,年龄10-49(平均 24.1 ± 7.9)岁. 同时选取小肠腺癌组织30例和正常小肠黏膜组织12例作为实验对照组. 试剂采用兔抗人Brg1多克隆抗体(工作浓度1:100)购自北京博奥森生物公司,兔抗人VEGF、COX-2多克隆抗体购自福州迈新生物公司为工作液. 免疫组织化学试剂盒为北

京中杉生物试剂有限公司.

1.2 方法 所有标本均经40 g/L甲醛固定,常规脱水、透明、渗蜡、包埋,4 μ m厚连续切片. 常规脱蜡、水化,采用免疫组织化学染色法(SP法),DAB显色,苏木素复染,吹干,具体实验步骤按试剂盒说明书进行. 阴性对照采用生理盐水磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗,以博奥森公司提供的大鼠心肌细胞阳性片作阳性对照. 操作严格按照产品说明书进行. 评判标准: (1)Brg1: 染色阳性细胞为细胞核呈棕黄色至深褐色,部分细胞质同时为淡黄色和/或黄色,若只有细胞质着色,可视为阴性; (2)VEGF: 染色阳性细胞为细胞质或细胞核着色呈黄色或棕黄色; (3)COX-2染色阳性细胞为细胞质着色呈棕黄色或褐色. 其中Brg1阳性细胞<25%为阴性; 25%-50%为弱阳性(+), 51%-75%为中等阳性(++), >75%为强阳性(+++); COX-2、VEGF以阳性细胞数超过10%作为阳性表达诊断标准,再根据阳性反应强度分为弱阳性(+), 中度阳性(++)和强阳性(+++); 每个指标均有两位以上病理医师进行双盲阅片.

统计学处理 应用SPSS17.0软件进行统计分析,组间差别采用四格表 χ^2 检验. $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 Brg1、VEGF、COX-2在不同组织中的表达 (图1-3) Brg1在正常小肠黏膜组织、PJS息肉组织和小肠腺癌组织中阳性表达率分别为16.67%, 54.17%和76.67%, 3组间两两比较,差异均有统计学意义($P < 0.01$); VEGF在正常小肠黏膜组织、PJS息肉组织和小肠癌组织中阳性表达率分别为80.00%, 58.33%和8.33%, 3组间两两比较,差异均有统计学意义($P < 0.01$); COX-2在正常小肠黏膜组织、PJS息肉组织和小肠癌组织中阳性表达率分别为83.33%, 62.50%和25.00%, 3组间两两比较,差异均有统计学意义($P < 0.01$).

2.2 Brg1和VEGF、COX-2在PJS组织中表达的相关性 在PJS息肉组织中Brg1、VEGF、COX-2蛋白的阳性表达率分别为54.17%, 58.33%, 62.50%, 经相关性分析, Brg1的表达与VEGF表达呈显著正相关($\chi^2 = 15.734$, $p = 0.467$); 与COX-2的表达亦呈正相关($\chi^2 = 7.552$, $p = 0.324$).

3 讨论

PJS患者在临床上常以腹痛、腹胀和消化道出血为主要表现,主要因肠道息肉多发导致肠套叠所

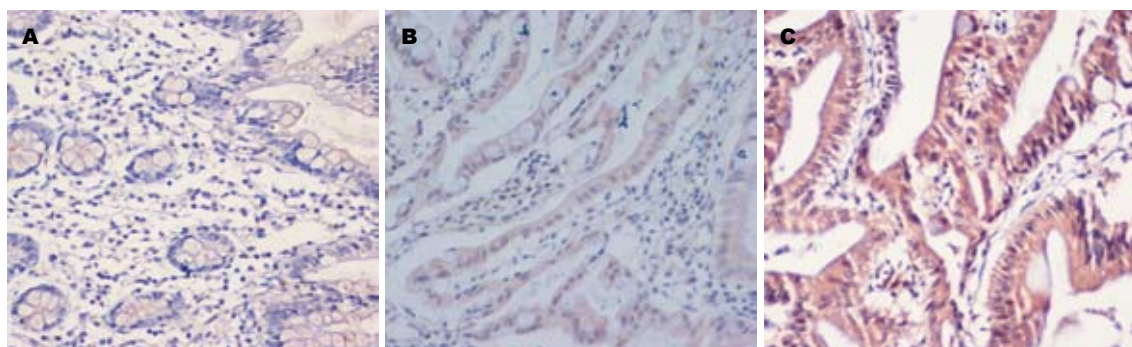


图 1 Brg1在不同组织中的表达(SP × 200). A: 正常小肠黏膜组织; B: PJS息肉组织; C: 小肠癌组织

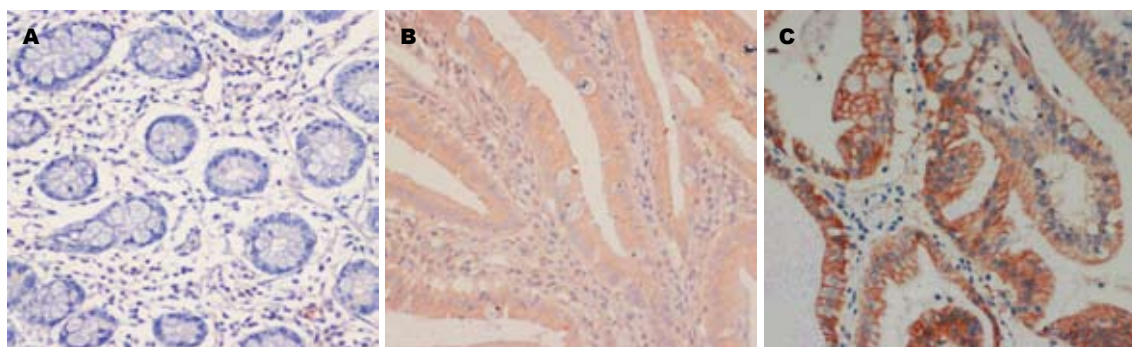


图 2 VEGF在不同组织中的表达(SP × 200). A: 正常小肠黏膜组织; B: PJS息肉组织; C: 小肠癌组织

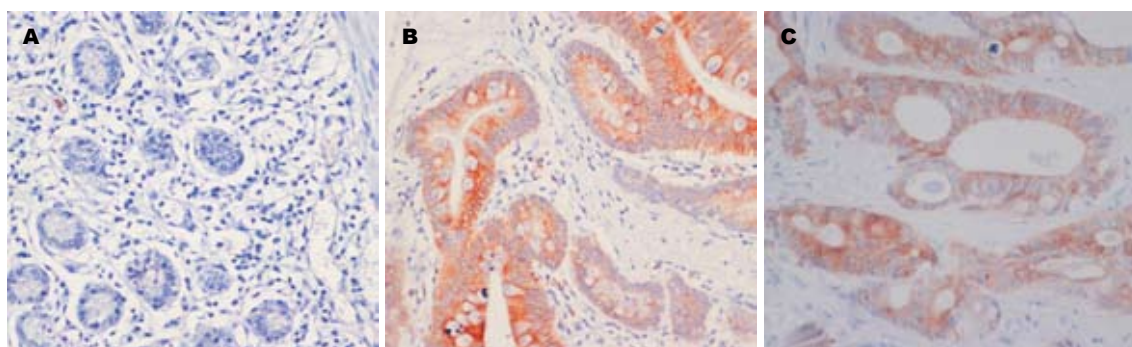


图 3 COX-2在不同组织中的表达(SP × 200). A: 正常小肠黏膜组织; B: PJS息肉组织; C: 小肠癌组织

致, 本综合征是胃肠道、前列腺、乳腺、子宫和其他器官恶性肿瘤发生的高危因素^[6]. 因此, PJS的发病机制和发病原因成为我们研究的热点之一.

目前研究认为PJS主要致病基因为STK11/LKB1基因, 位于19p13.3, 由Jenne等^[7]和Hemminki等^[8]于1998年分别报道. 随后国内外学者对其致病基因进行不断的探索, 赵喜荣等^[9]研究发现FHIT基因突变和丢失可能在PJS的发生和癌变中起到一定的作用. Hearle等^[10]对一PJS女婴小肠息肉提取DNA并分析, 发现了 $t(11; 19)(q13; q13.4)$ 染色体易位. Mehenni等^[11]通过对6个家系进行多基因位点连锁分析发现,

其中1个家系的19q13.4区带可能存在PJS致病基因; Marneros等^[12]的研究亦在1个PJS家系中检测到定位于19q13.4区带的PJS致病基因, 但具体基因还有待进一步研究明确. 夏欧东等^[13]发现随着肿瘤恶性程度的增高Axin蛋白表达逐渐降低, 与组织病理改变呈负相关. 说明Axin表达降低可能是PJS息肉发生的原因, 并可能参与了PJS息肉演变为腺瘤以及进一步癌变的过程. 马娅梅等^[14]发现IFITM1有可能成为判断PJS恶变风险的良好标记物. 戴益琛等^[15]采用基因芯片技术筛选PJS特异的差异表达基因谱, 发现EPHB4、EPHB3、EPHB1、EFNB2、EFNA1、COL4A1、COL4A2、COL6A3和COL6A2基

■ 相关报道

赵喜荣等研究发现FHIT基因突变和丢失可能在PJS的发生和癌变中起到一定的作用. Hearle等对一PJS女婴小肠息肉提取DNA并分析, 发现了 $t(11; 19)(q13; q13.4)$ 染色体易位.

■同行评价

作者利用免疫组织化学检测Peutz-Jeghers综合征Brg1和VEGF等蛋白的表达,探讨该病的发病机制,有一定的研究意义。

因可能是PJS特异性相关基因. 蒋建国等^[16]对STK13基因进行突变分析发现STK13基因并不是我国PJS患者新的致病基因. 基于上述研究有关PJS的具体发病基因尚不是很明确.

随着研究更进一步的深入,我们得知在正常机体内Brg1和VEGF信号通路可控制染色体的复制速度和血管的迅速生成,抑制上皮细胞过度生长,其信号通路又参与促进血管生成,促进生成核转移的恶性机制^[17]. 而在PJS的息肉发生发展中LKB1和Brg1有关^[18], Brg1是20世纪90年代初在酿酒酵母中被发现的一种抑癌基因,是SWI/SNF家族的重要组成成分,定位于人类染色体19p13上^[19],其mRNA长约5 247 bp,基因编码的蛋白质相对分子质量为 2.05×10^5 Da. Brg1具有ATP依赖的解螺旋酶活性,在SWI-SNF2的核染色质改造功能中发挥着重要作用,同时也是许多基因复制所必需的蛋白之一^[20],在肺癌的发生中位于19p上的抑癌基因Brg1和LKB1基因起着同样的作用^[21]. 国内外研究还发现Brg1基因在前列腺癌、宫颈癌及胃癌组织中存在高表达,而在肺癌组织、喉鳞状细胞癌及多种肿瘤细胞系中表达下调或缺失^[22-28]. 证明Brg1在肿瘤的发生发展过程中起着非常重要的作用,本实验通过对不同组织中蛋白表达的检测发现Brg1随着肿瘤恶性程度的高低呈逐渐下降趋势,即表明Brg1在PJS息肉组织中存在高表达,且可能是PJS息肉发生发展及恶变的关键蛋白.

VEGF是1989年从牛垂体滤泡星状细胞培养液首先纯化出来^[29],并发现具有促进血管内皮细胞有丝分裂的活性,被认为是最强的血管形成诱导因子. 对于实体肿瘤的研究证实,瘤体需要有新生血管供血及营养支持才能继续生长^[30],而肿瘤细胞却能够产生高水平的VEGF,与内皮细胞膜受体结合,激活内皮细胞受体酪氨酸激酶,促进内皮细胞的增生和转移,形成新生血管,肿瘤细胞的无限制生长、繁殖和转移依赖于新生血管的不断支持. PJS息肉的无限制生长与肿瘤细胞的血液供应有关,其血管新生是肿瘤生长的关键环节.

COX-2是前列腺素合成过程中的一个关键限速酶,其过度表达可导致前列腺素产物增加,而前列腺素是许多肿瘤形成的早期共同特点. 此外,前列腺素合成过程中产生的毒性物质如自由基、活性氧等,也可使肿瘤细胞的遗传产生不稳定性,进一步促使其恶变的转化. COX-2

在肠道肿瘤、胃癌、乳腺癌、头颈部癌等多种肿瘤组织中高表达,其通过合成致癌物质、促进肿瘤血管新生、抑制肿瘤细胞凋亡、促进肿瘤黏附和转移等促进肿瘤的发生、发展^[31]. McGarrity等^[32]的研究证实COX-2在PJS患者错构瘤性息肉中过表达. Rossi等^[33]亦发现COX-2在PJS裸鼠模型和PJS患者错构瘤性息肉中的表达增高,而我们的研究与其报道相符. 亦有报道显示长期大量服用非甾体类消炎药,其结肠发病率到50%-60%^[34],但尚未在PJS患者中进行评估. 由此可见,COX-2可能成为PJS息肉的治疗靶点,COX-2抑制剂可能成为减小肿瘤体积以及降低PJS患者手术率的有效方法,但有待于临床进一步证实. 我们的研究结果显示,COX-2主要表达在新生的血管内皮细胞和形成血管的细胞中,并且COX-2和VEGF表达基本一致,其增高幅度与肿瘤恶性程度相关. 同时表明COX-2通过影响VEGF参与了肿瘤新生血管的形成.

在我们的研究组PJS息肉组织中Brg1与VEGF、COX-2蛋白阳性表达率分别成正相关($\chi^2 = 15.734$, $p = 0.467$ 和 $\chi^2 = 7.552$, $p = 0.324$),研究证实了Brg1蛋白表达率升高,VEGF信号通路的相关蛋白表达率也相应升高,信号传递破坏上皮细胞的正常生长,出现黏膜过度生长,息肉形成,提示在PJS息肉形成中,间质-上皮相互作用能够维持上皮细胞生长.

Brg1作为一种抑癌基因,其蛋白或mRNA却在小肠癌组织和PJS息肉组织中高表达,且表达强度以肿瘤恶性程度增加而增强,分析其原因,可能与其启动子异常甲基化、基因突变及其转录激活功能异常等因素有关. 此时,异常表达的基因产物可能已经失去了原有抑癌基因的生物学特性,即抑癌基因功能丢失或者产生了转录激活的作用.

在本实验中VEGF、COX-2的高表达很可能会促进Brg1蛋白表达的上调,促进抑癌基因的非正常表达,使其在PJS息肉组织和小肠癌组织中发生了功能丢失或转录激活作用,从而失去了原本的抑癌作用,进而在PJS息肉的发生发展及息肉癌变的过程中起着一定的作用,为我们判断PJS息肉癌变提供了一个参考;并且3种因子很可能是PJS息肉发生发展及息肉恶变的关键蛋白,需进一步实验证实(有关Brg1基因在PJS患者中的突变情况我们将另有文献报道),同时王石林等对COX-2抑制剂和雷帕霉素预防PJS作为以后研究的新动向对我们亦有一定的启发^[35].

4 参考文献

- 1 Kopacova M, Tachei I, Rejchrt S, Bures J. Peutz-Jeghers syndrome: diagnostic and therapeutic approach. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 5397-5408
- 2 Clements A, Robison K, Granai C, Steinhoff MM, Scalia-Wilbur J, Moore RG. A case of Peutz-Jeghers syndrome with breast cancer, bilateral sex cord tumor with annular tubules, and adenoma malignum caused by STK11 gene mutation. *Int J Gynecol Cancer* 2009; 19: 1591-1594
- 3 Kopáková M, Bures J, Ferko A, Tachecí I, Rejchrt S. Comparison of intraoperative enteroscopy and double-balloon enteroscopy for the diagnosis and treatment of Peutz-Jeghers syndrome. *Surg Endosc* 2010; 24: 1904-1910
- 4 Alhopuro P, Katajisto P, Lehtonen R, Ylisaukko-Oja SK, Näätsaari L, Karhu A, Westerman AM, Wilson JH, de Rooij FW, Vogel T, Moeslein G, Tomlinson IP, Aaltonen LA, Mäkelä TP, Launonen V. Mutation analysis of three genes encoding novel LKB1-interacting proteins, BRG1, STRADalpha, and MO25alpha, in Peutz-Jeghers syndrome. *Br J Cancer* 2005; 92: 1126-1129
- 5 Bourgo RJ, Siddiqui H, Fox S, Solomon D, Sansam CG, Yaniv M, Muchardt C, Metzger D, Chambon P, Roberts CW, Knudsen ES. SWI/SNF deficiency results in aberrant chromatin organization, mitotic failure, and diminished proliferative capacity. *Mol Biol Cell* 2009; 20: 3192-3199
- 6 Leggett BA, Young JP, Barker M. Peutz-Jeghers syndrome: genetic screening. *Expert Rev Anticancer Ther* 2003; 3: 518-524
- 7 Jenne DE, Reimann H, Nezu J, Friedel W, Loff S, Jeschke R, Müller O, Back W, Zimmer M. Peutz-Jeghers syndrome is caused by mutations in a novel serine threonine kinase. *Nat Genet* 1998; 18: 38-43
- 8 Hemminki A, Markie D, Tomlinson I, Avizienyte E, Roth S, Loukola A, Bignell G, Warren W, Aminoff M, Höglund P, Järvinen H, Kristo P, Pelin K, Ridanpää M, Salovaara R, Toro T, Bodmer W, Olschwang S, Olsen AS, Stratton MR, de la Chapelle A, Aaltonen LA. A serine/threonine kinase gene defective in Peutz-Jeghers syndrome. *Nature* 1998; 391: 184-187
- 9 赵喜荣, 康连春, 周永双, 贾义星, 陈竹, 康素海, 李文梅, 赵敏, 崔建涛, 孙安乐, 吕有勇. Peutz-Jeghers综合征脆性组氨酸三连体基因突变与癌变的关系. *癌症* 2003; 22: 50-54
- 10 Hearle N, Lucassen A, Wang R, Lim W, Ross F, Wheeler N, Moore I, Shipley J, Houlston R. Mapping of a translocation breakpoint in a Peutz-Jeghers hamartoma to the putative PJS locus at 19q13.4 and mutation analysis of candidate genes in polyp and STK11-negative PJS cases. *Genes Chromosomes Cancer* 2004; 41: 163-169
- 11 Mehenni H, Blouin JL, Radhakrishna U, Bhardwaj SS, Bhardwaj K, Dixit VB, Richards KF, Bermejo-Fenoll A, Leal AS, Raval RC, Antonarakis SE. Peutz-Jeghers syndrome: confirmation of linkage to chromosome 19p13.3 and identification of a potential second locus, on 19q13.4. *Am J Hum Genet* 1997; 61: 1327-1334
- 12 Marneros AG, Mehenni H, Reichenberger E, Antonarakis SE, Krieg T, Olsen BR. Gene for the human transmembrane-type protein tyrosine phosphatase H (PTPRH): genomic structure, fine-mapping and its exclusion as a candidate for Peutz-Jeghers syndrome. *Cytogenet Cell Genet* 2001; 92: 213-216
- 13 夏欧东, 马娅梅, 吴保平. 黑斑息肉综合征中Axin表达研究. *解放军医学杂志* 2008; 33: 692-694
- 14 马娅梅, 吴保平, 夏欧东. 干扰素诱导的跨膜蛋白1在Peutz-Jeghers综合征的表达及意义. *南方医科大学学报* 2009; 29: 541-543, 547
- 15 戴益琛, 宋于刚, 谢军培, 曾伟. 采用基因芯片技术筛选黑斑息肉综合征相关基因. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 2191-2194
- 16 蒋建国, 李宜雄, 夏昆, 吕新生, 夏家辉. Peutz-Jeghers综合征STK13基因突变分析. *中华消化杂志* 2004; 24: 583-585
- 17 Derynck R, Akhurst RJ, Balmain A. TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nat Genet* 2001; 29: 117-129
- 18 Marignani PA, Kanai F, Carpenter CL. LKB1 associates with Brg1 and is necessary for Brg1-induced growth arrest. *J Biol Chem* 2001; 276: 32415-32418
- 19 Wong AK, Shanahan F, Chen Y, Lian L, Ha P, Hendricks K, Ghaffari S, Iliev D, Penn B, Woodland AM, Smith R, Salada G, Carillo A, Laity K, Gupte J, Swedlund B, Tavtigian SV, Teng DH, Lees E. BRG1, a component of the SWI-SNF complex, is mutated in multiple human tumor cell lines. *Cancer Res* 2000; 60: 6171-6177
- 20 Baas AF, Smit L, Clevers H. LKB1 tumor suppressor protein: PArTaker in cell polarity. *Trends Cell Biol* 2004; 14: 312-319
- 21 Rodriguez-Nieto S, Sanchez-Cespedes M. BRG1 and LKB1: tales of two tumor suppressor genes on chromosome 19p and lung cancer. *Carcinogenesis* 2009; 30: 547-554
- 22 王秀明, 何莲芝. Brg1基因在宫颈癌中的表达. *安徽医学杂志* 2010; 31: 446-448
- 23 李青, 周晓军, 谢海龙, 苏宁, 邓红, 易龙. 胃癌组织中Brg1基因突变及蛋白表达的研究. *医学研究生学报* 2005; 18: 875-878
- 24 关勇军, 蔡秀梅, 李友军, 何春梅, 陈主初. 肺癌组织和肿瘤细胞系中Brg1的表达分析. *生命科学研究* 2007; 11: 84-89
- 25 李燕, 石群立, 金行藻, 孟奎, 周晓军, 孙丽萍. 组织芯片检测前列腺癌中Brg1表达的研究. *中华男科杂志* 2006; 12: 629-632
- 26 崔香艳, 汪欣, 陈玮伦, 于红, 黄可新, 祝威. Brg1在喉鳞状细胞癌组织中的表达及意义. *吉林大学学报(医学版)* 2010; 36: 546-549
- 27 Sentani K, Oue N, Kondo H, Kuraoka K, Motoshita J, Ito R, Yokozaki H, Yasui W. Increased expression but not genetic alteration of BRG1, a component of the SWI/SNF complex, is associated with the advanced stage of human gastric carcinomas. *Pathobiology* 2001; 69: 315-320
- 28 Reisman DN, Sciarrotta J, Wang W, Funkhouser WK, Weissman BE. Loss of BRG1/BRM in human lung cancer cell lines and primary lung cancers: correlation with poor prognosis. *Cancer Res* 2003; 63: 560-566
- 29 顾健健, 纪钧. VEGF及其在肺癌抗血管生成中的研究进展. *实用肿瘤杂志* 2009; 24: 614-616
- 30 顾阳春, 马力文. VEGF/VEGFR与胃癌. *癌症进展* 2010; 8: 70-74
- 31 Cao Y, Prescott SM. Many actions of cyclooxygenase-2 in cellular dynamics and in cancer. *J Cell Physiol* 2002; 190: 279-286
- 32 McGarrity TJ, Peiffer LP, Amos CI, Frazier ML, Ward MG, Howett MK. Overexpression of cyclooxygenase 2 in hamartomatous polyps of Peutz-Jeghers syndrome. *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 213-216

- 671-678
- 33 Rossi DJ, Ylikorkala A, Korsisaari N, Salovaara R, Luukko K, Launonen V, Henkemeyer M, Ristimäki A, Aaltonen LA, Makela TP. Induction of cyclooxygenase-2 in a mouse model of Peutz-Jeghers polypsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 12327-12332
- 34 熊枝繁, 李盛安. 胃癌组织中COX-2、VEGF和MMP-9的表达及临床意义. *中国现代医学杂志* 2008; 18: 3202-3206
- 35 王石林, 顾国利. Peutz-Jeghers综合征临床诊断治疗的现状和问题. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 2385-2389

编辑 李薇 电编 何基才

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》出版流程

本刊讯 《世界华人消化杂志》[ISSN 1009-3079 (print), ISSN 2219-2859 (online), CN 14-1260/R]是一份同行评议性和开放获取(open access, OA)的旬刊, 每月8、18、28号按时出版. 具体出版流程介绍如下:

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

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

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

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

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

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

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

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

《世界华人消化杂志》从收稿到发行每一步都经过严格审查, 保证每篇文章高质量出版, 是消化病学专业人士发表学术论文首选的学术期刊之一. 为保证作者研究成果及时公布, 《世界华人消化杂志》保证每篇文章16 wk内完成. (编辑部主任: 李军亮 2010-01-18)

蒙古沙土鼠不同幽门螺杆菌菌株感染相关性胃病的研究进展

柳云恩, 袁媛

柳云恩, 袁媛, 中国医科大学附属第一医院肿瘤研究所暨普通外科研究所肿瘤病因与筛查研究室 辽宁省高校肿瘤病因与预防重点实验室 辽宁省沈阳市 110001

作者贡献分布: 本文综述由柳云恩完成; 袁媛教授审校。

通讯作者: 袁媛, 教授, 博士生导师, 110001, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学附属第一医院肿瘤研究所暨普通外科研究所肿瘤病因与筛查研究室, yyuan@mail.cmu.edu.cn

电话: 024-83282292

收稿日期: 2011-07-06 修回日期: 2011-08-11

接受日期: 2011-08-12 在线出版日期: 2011-08-18

Gastric diseases in Mongolian gerbils infected with different strains of *Helicobacter pylori*

Yun-En Liu, Yuan Yuan

Yun-En Liu, Yuan Yuan, Department of Tumor Etiology and Screening, Institute of Cancer and General Surgery, Key Laboratory of Cancer Control in Liaoning Province, the First Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Correspondence to: Yuan Yuan, Professor, Department of Tumor Etiology and Screening, Institute of Cancer and General Surgery, the First Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. yyuan3@hotmail.com

Received: 2011-07-06 Revised: 2011-08-11

Accepted: 2011-08-12 Published online: 2011-08-18

Abstract

Helicobacter pylori (*H.pylori*) is a bacterium responsible for one of the most widespread infections found in humans. It colonizes the gastric mucosa and can result in chronic gastritis and gastric cancer. The incidence of spontaneous gastric gastritis is low in Mongolian gerbils, and spontaneous *H.pylori* infection can not be detected in this animal. Since *H.pylori*-related gastric diseases in Mongolian gerbils are very similar to those in humans, they have been considered as ideal animals to establish *H.pylori* infection models. However, different strains of *H.pylori* may induce different types of pathologic changes in Mongolian gerbils. Clarification of the pathogenic mechanisms of different strains of *H.pylori* may provide a theoretical basis for screening appropriate *H.pylori* strains and directing individualized treatment in patients with *H.pylori*-related gastric diseases. In this paper, we review the recent progress in research of gastric diseases in Mongolian gerbils infected with different strains of *H.pylori*.

alized treatment in patients with *H.pylori*-related gastric diseases. In this paper, we review the recent progress in research of gastric diseases in Mongolian gerbils infected with different strains of *H.pylori*.

Key Words: Mongolian gerbil; *Helicobacter pylori*; Pathogenic mechanism; Gastric diseases; Individualized treatment

Liu YE, Yuan Y. Gastric diseases in Mongolian gerbils infected with different strains of *Helicobacter pylori*. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(23): 2467-2472

摘要

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H.pylori*)感染在世界范围内高发, 他定植于人胃黏膜, 导致慢性胃炎及胃癌的发生。蒙古沙鼠(mongolian gerbil, MG)很少患自发性胃炎, 且不是*H.pylori*的自然宿主。人工接种*H.pylori*后, 蒙古沙鼠患*H.pylori*相关性胃病与胃病患者最相似, 是一个公认的人类胃病的动物模型。采用不同*H.pylori*菌株感染蒙古沙鼠, 经常会导致不同的*H.pylori*相关性胃病的发生, 其原因可能与*H.pylori*致病菌株密切相关。因此, 明确*H.pylori*的致病菌株及其机制, 可以为筛选*H.pylori*致病菌株提供理论参考, 并有利于对*H.pylori*相关性胃病患者进行个体化治疗。本文对蒙古沙土鼠不同*H.pylori*菌株感染相关性胃疾病研究进展进行综述。

关键词: 蒙古沙鼠; 幽门螺杆菌; 致病机制; 胃病; 个体化治疗

柳云恩, 袁媛. 蒙古沙土鼠不同幽门螺杆菌菌株感染相关性胃病的研究进展. 世界华人消化杂志 2011; 19(23): 2467-2472
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2467.asp>

0 引言

约50%人群感染幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H.pylori*), 其与慢性胃炎、消化性溃疡及胃癌的发生密切相关^[1-4]。绝大多数人群感染*H.pylori*后

■背景资料

蒙古沙鼠(MG)很少患自发性胃炎, 且不是*H.pylori*的自然宿主。人工接种*H.pylori*后, 蒙古沙鼠患*H.pylori*相关性胃病与胃病患者最相似, 是一个公认的人类胃病的动物模型。

■同行评议者

王江滨, 教授, 吉林大学中日联谊医院消化内科; 王振宇, 教授, 中国医科大学附属第一医院肿瘤外科

■研究前沿

深入研究不同 *H.pylori* 菌株特有的致病基因和毒素蛋白, 同时深入研究MG的宿主因素, 并探讨两者之间的交互作用。

无任何症状^[5], 少数人患 *H.pylori* 相关性胃炎及溃疡, 极少数发展为 *H.pylori* 相关性胃癌。为了探究不同的临床结局是否与 *H.pylori* 的致病菌株相关, 亟待建立一个与人类胃病类似的动物模型。Yokota等^[6]首次报道了蒙古沙鼠(Mongolian gerbil, MG)感染 *H.pylori* 后, 胃黏膜发生轻微的炎症细胞浸润。MG患自发性胃炎机率很低, 且不是 *H.pylori* 自然宿主。人工接种 *H.pylori* 后, MG发生 *H.pylori* 相关性胃病与人类胃病最类似。研究发现将 *H.pylori* 接种到MG体内, 胃黏膜发生萎缩或肠化生等病变^[7,8]。而Cao等^[9]用 *H.pylori* 诱导MG黏膜发生了神经内分泌起源的类癌。此外, Kuo等^[10]在MG体内诱发了胃癌。相反, Toyoda等^[11]采用相同 *H.pylori* 菌株感染MG, 并未观察到任何胃部肿瘤发生。因此, 不同 *H.pylori* 菌株感染MG, 经常会产生截然不同的临床结局, 其原因可能与菌株自身致病性密切相关。因此, 明确 *H.pylori* 致病菌株及其机制, 可以为筛选 *H.pylori* 致病菌株提供理论参考, 并有利于对 *H.pylori* 相关性胃病患者进行个体化治疗。本文对蒙古沙鼠不同 *H.pylori* 菌株感染相关性胃疾病进行综述。

1 *H.pylori* 相关性胃炎

Ikeno等^[12]用ATCC43504菌株接种MG, 2 wk后, 镜下未见任何组织学改变; 4 wk后, 胃黏膜明显变薄, 移行带壁细胞和主细胞消失, 幽门出现轻-中度炎症细胞浸润; 26 wk后, 出现溃疡, 肠化生和增生性息肉等病变。Honda等^[13]用相同菌株感染MG, 6 wk后, 幽门部即发生溃疡, 并持续到18 wk, 溃疡穿透黏膜下层和肌层, 部分浸润到肝脏和胰腺, 6 mo后, 胃小弯发生萎缩性胃炎和肠化生, 12-18 mo, 肠化生演变为发育异常。使用相同菌株感染同一品系MG, 病变的严重程度和出现的时间却大相径庭, 其原因可能与菌株毒力大小有关, 众所周知, 任何菌株原代培养时致病性最强, 随着不停的传代培养, 菌株毒力明显下降^[14], 因而, 在这种情况下可能导致同一菌株致病性显著不同。研究发现ATCC43504菌株是一个高致病性菌株^[15], 其为研究 *H.pylori* 致病基因及毒力大小提供了实验模型, 并为评价其他菌株的毒力提供了标准。

Yan等^[16]用 2×10^9 CFU/mL NCTC11637菌株接种MG, 6 wk后, MG胃黏膜发现轻度的炎症细胞浸润。Takahashi等^[17]用相同菌株接种MG, 20 wk后, MG发生了出血性胃炎和溃疡等病变。结果提示, 与ATCC43504菌株相比, NCTC11637

菌株的毒力明显降低, 两种菌株的致病性存在较大差别, 两种菌株属于同一家族, 且均表达 $cagA^+vacA^{+18,19}$, 因此, 除公认的致病基因 ($cagA^+vacA^+$) 外, ATCC43504菌株可能存在独特的致病基因, 使其具备较强的致病能力。

Watanabe等^[20]用TN2GF4菌株(胃溃疡分离株)接种MG, 26 wk后, MG发生了重度活动性胃炎、溃疡和肠化生等病变。Ohkusa等^[21]用TN2GF4和ATCC43504菌株分别接种MG, 12 wk后, MG发生了胃炎和溃疡, 然而, 感染TN2GF4菌株的MG发生十二指肠炎症和肠化生的风险更高。肠化生是慢性胃炎常见表现形式, 且肠化生与肠型胃癌发生密切相关^[22,23], 此外, TN2GF4菌株单独诱导MG发生高分化腺癌的几率高。结果提示TN2GF4菌株可能较ATCC43504具有更强的致病能力。

不同菌株致病性存在较大差别, 即使同一家族来源的菌株致病性也千差万别, 其原因何在? Ohnita等^[24]发现携带 $cagPAI^+$ 菌株诱导MG发生溃疡、萎缩、肠化生和增生性息肉, 而 $cagPAI^-$ 菌株仅见黏膜糜烂和轻度炎症细胞浸润, 但 $cagPAI^-$ 并未影响菌株的定植能力。 *H.pylori* 菌株感染周期和定植密度可以促进细胞增殖, 从而发挥致癌作用^[25]。此外, $cagPAI^+$ 能激活转录因子NF- κ B, NF- κ B通过刺激IL-8的产生而促进胃黏膜细胞的增殖, 从而导致MG发生 *H.pylori* 相关性胃炎^[26,27]。IL-1 β 是急性炎症最特征的细胞因子之一, MG感染 *H.pylori* 后, IL-1 β 表达水平升高, 4 wk时, 达到高峰, 然后迅速降低。IL-4, IL-6和IL-10是慢性炎症最具特征的细胞因子, 这些细胞因子在 *H.pylori* 感染8-24 wk达到高峰, 他们与胃癌的发生密切相关^[28]。因此, 当对 *H.pylori* 感染患者进行筛选时, 可以通过检测细胞因子的表达水平, 即可大致判断菌株的感染时间, 从而为临床治疗 *H.pylori* 相关性胃炎提供重要参考。

2 *H.pylori* 相关性胃癌

Honda等^[13]用ATCC43504菌株感染MG, 18 mo后, 2/5(40%)动物发展为高分化胃癌, 其中1例来源于肠化生部位, 另外1例也与肠化生密切相关, 未见低分化腺癌。而Hirayama等^[29]用ATCC43504菌株接种MG, 24 mo后, 18/56只MG发生了类癌, 1/56发展为低分化腺癌。Zheng等^[30]用ATCC43504和161菌株(中国胃癌患者分离株)感染MG, 84 wk后, 18%(3/17)感染了ATCC43504菌株的MG发生了高分化癌, 而感染161菌株的MG

发生了1例胃癌。结果提示, 使用相同菌株感染MG, 可以导致胃癌发生率明显不同, 其原因何在? 首先, *H.pylori*感染时间明显不同, 而*H.pylori*感染时间是胃癌形成的必要条件, 长期*H.pylori*感染可以刺激黏膜细胞增生^[31]; 其次, MG饲养条件及来源不同, 实验动物对条件要求较为苛刻, 不同条件下动物自发突变发生率明显不同; 再次, 菌株的传代次数, 不同实验使用的菌株传代次数不可能完全一致, 有的可能是原代培养, 有的菌株可能传过若干代, 菌株毒力无法保证, 因而导致结果不同。

Sugiyama等^[32]用致癌物MNU和ATCC43504菌株共同感染MG, 20 wk后, 36.8%(7/19)的动物发生了腺癌和印戒细胞癌, 其中高、低分化腺癌各1例, 印戒细胞癌5例。Cao等^[33]分别在*H.pylori*菌株感染的早、中和晚期给予MG致癌物MNU, 52 wk后, 3个阶段胃癌的发生率分别为60%(12/20), 18.4%(2/11)和10%(2/20), 结果提示在菌株感染早期给予致癌物容易导致胃癌的发生。Tokieda等^[34]用相同菌株和致癌物MNNG接种MG, 52 wk后, 单用*H.pylori*感染的MG未发生腺癌, 而单用MNNG致癌物则诱发17.6%动物发生了腺癌, 致癌物和*H.pylori*联合作用在24 wk即有1例发生高分化腺癌, 52 wk后, 66.7%(4/6)的动物发生了高分化腺癌。Shimizu等^[35]用相同菌株和不同剂量的致癌物MNNG分别接种MG, 50 wk后, MNNG(300 mg)和*H.pylori*联合导致12(44.4%)的动物发生高分化腺癌, 而MNNG(60 mg)和*H.pylori*联合作用, 导致6(24.0%)动物发生印戒细胞癌。结果提示, 不同浓度致癌物与*H.pylori*联合使用, 导致MG发生的胃癌类型和发生率与单用*H.pylori*均存在显著差别, 单独*H.pylori*感染只能诱导出高分化腺癌, 而未见其他类型癌产生。因此, 有研究认为*H.pylori*可能在胃癌发生过程中只是起到促进作用, 而并非启动作用^[36]。

Watanabe等^[20]用TN2GF4菌株(胃溃疡患者分离株)接种MG, 26 wk后, MG出现重度活动性胃炎、溃疡和肠化生, 62 wk后, 37%(10/27)的动物发生了高分化腺癌。Ogura等^[37]用分别用TN2(WT)和TN2 Δ vacA菌株接种MG, 该菌株与TN2GF4菌株属于同一家族, 23 wk后, TN2(WT)菌株分别诱导25%(1/4)和25%(1/4)动物发生了高分化腺癌和类癌, 而TN2 Δ vacA菌株在接种28周后, 分别有25%(1/4)和17.86%(5/28)的动物发生了高分化腺癌和类癌。结果提示, 同一家族中

不同菌株致病能力差别显著, 同一菌株野生型和突变株致癌性也千差万别, TN2GF4家族菌株可能是一个高致癌性菌株家族。

此外, Romero-Gallo等^[38]用7.13(溃疡患者分离株)菌株接种MG, 14 wk后, 33%MG发生了高分化腺癌, 18 wk后, 50%的MG发生高分化腺癌, 该菌株不仅能迅速诱发胃癌, 还随接种时间的延长, 胃癌发生率显著增加。Franco等^[39]则将7.13菌株及oipA⁻突变株接种MG, 24 wk后, 7.13(WT)菌株诱发44%的MG发展为高分化腺癌, 而oipA⁻菌株仅能导致27%动物发展为腺癌。结果提示oipA⁻突变明显降低了7.13菌株致病能力, 从而降低了胃癌的发生率和减轻了病变的严重程度, 同时oipA⁻基因缺失也极大的降低了胞质或核内B-catenin易位能力, 影响了核内细胞信号传导途径^[40], 从而降低了胃癌发生率。此外, oipA⁻能导致重度*H.pylori*感染, 同时引起IL-6和IL-11表达水平升高, 最终能增加*H.pylori*相关性胃病的发病风险^[41]。然而, 他的子代菌株B128仅能导致MG发生轻度溃疡和胰腺炎^[42]。研究发现7.13菌株和B128菌株的主要区别在于OioA⁻基因位于7.13菌株编码框架内部, 而由于在5'端富含CT区域插入2个bp, OioA⁻基因位于B128菌株编码框架外部, 从而导致其转录过早终止^[43]。此外, 7.13菌株感染MG后, 不同炎症因子表达各不相同, 6-12 mo, TNF- α mRNA表达水平达到顶峰, IL-17 mRNA表达水平则在感染12 mo后达到顶峰, 结果提示7.13菌株处于慢性感染阶段, 同时发现, IL-17, IL-18和TNF- α mRNA等细胞因子在7.13菌株野生株中的表达水平显著高于oipA⁻突变株^[44,45], 说明oipA⁻基因可能决定胃黏膜炎症细胞因子的表达, 从而对胃癌的发生起决定作用。结果表明同一家族不同菌株致病基因可能存在较大差别, 这种差别可能会导致菌株的致病能力存在显著差异^[46], 从而可能严重影响同一家族菌株的致癌性。

3 结论

不同*H.pylori*菌株感染MG均能成功建立与人类*H.pylori*相关性胃病类似的动物模型^[47-49], 然而, 不同菌株感染MG通常会导致不同的病理变化(表1), 即便是来源于同一家族的菌株或同一菌株的突变株, 感染MG结局也大不相同。因此, 为了更清楚的研究*H.pylori*致病机制, 我们有必要深入研究不同*H.pylori*菌株特有的致病基因和毒素蛋白, 同时深入研究MG的宿主因素, 并探讨

■创新盘点

本文对蒙古沙土鼠不同*H.pylori*感染相关性胃病进行综述, 并剖析了不同菌株的致病特点及其机制。

■应用要点

本文可以为临床筛选*H. pylori*致病菌株提供理论参考,对*H. pylori*相关性胃病患者进行个体化治疗有一定的参考价值。

表 1 不同*H. pylori*菌株感染MG胃癌类型

年代	菌株	沙鼠周龄(wk)	致癌物	试验周期: 胃癌发生率n(%)	胃癌类型(n)	研究者
1998	ATCC-43504	5	无	18 mo: 2/5(40)	高分化腺癌	Honda等 ^[13]
1998	ATCC-43504	7	MNU	20 wk: 7/19(36.8)	高分化腺癌(1); 低分化腺癌(1); 印戒细胞癌(5)	Sugiyama等 ^[32]
1999	ATCC-43504	不明	无	24 mo: 19/112(19.96)	类癌(18/56); 高分化腺癌(1/56)	Hirayama等 ^[29]
1999	ATCC-43504	5	MNNG	24 wk: 1/2(50); 52 wk: 4/6(66.7)	高分化腺癌(5)	Tokieda等 ^[34]
1999	ATCC-43504	7	MNNG	50 wk: MNNG(300 mg) 12(44.4); 50 wk: MNNG(60 mg) 6 (24)	高分化腺癌(8); 低分化癌(4)印戒细胞癌(6)	Shimizu等 ^[35]
2000	TN2 (WT)	5	无	23 wk: 2 /8(25.00)	类癌(1/4); 高分化腺癌(1/4)	Ogura等 ^[37]
2000	TN2ΔvacA	5	无	28 wk: 6/22(27.27)	类癌(5/18); 高分化腺癌(1/4)	Ogura等 ^[37]
2000	TN2GF4(溃疡分离株)	不明	无	62 wk: 10/27(37)	高分化腺癌(10)	Watanabe等 ^[20]
2004	ATCC-43504	不明	无	84 wk: 2/11(18.18)	高分化腺癌(2)	Zheng等 ^[30]
2004	161(胃癌分离株)	不明	无	84 wk: 1/6(16.67)	高分化腺癌(1)	Zheng等 ^[30]
2008	7.13oipA ⁻	4	无	24 wk: 27	高分化腺癌	Franco等 ^[39]
2008	7.13(WT)	4	无	24 wk: 44	高分化腺癌	Franco等 ^[39]
2008	7.13(溃疡分离株)	4-8	无	14 wk: 33; 18 wk: 50	高分化腺癌	Romero-Gallo等 ^[38]

两者之间的交互作用^[50],从而为更深入研究不同*H. pylori*相关性胃病的致病机制提供理论基础。

4 参考文献

- Plummer M, van Doorn LJ, Franceschi S, Kleter B, Canzian F, Vivas J, Lopez G, Colin D, Muñoz N, Kato I. Helicobacter pylori cytotoxin-associated genotype and gastric precancerous lesions. *J Natl Cancer Inst* 2007; 99: 1328-1334
- 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
- Batista SA, Rocha GA, Rocha AM, Saraiva IE, Cabral MM, Oliveira RC, Queiroz DM. Higher number of Helicobacter pylori CagA EPIYA C phosphorylation sites increases the risk of gastric cancer, but not duodenal ulcer. *BMC Microbiol* 2011; 11: 61
- Kato M, Asaka M. Recent knowledge of the relationship between Helicobacter pylori and gastric cancer and recent progress of gastroendoscopic diagnosis and treatment for gastric cancer. *Jpn J Clin Oncol* 2010; 40: 828-837
- Taddesse G, Habteselassie A, Desta K, Esayas S, Bane A. Association of dyspepsia symptoms and Helicobacter pylori infections in private higher clinic, Addis Ababa, Ethiopia. *Ethiop Med J* 2011; 49: 109-116
- Yokota K, Kurebayashi Y, Takayama Y, Hayashi S, Isogai H, Isogai E, Imai K, Yabana T, Yachi A, Oguma K. Colonization of Helicobacter pylori in the gastric mucosa of Mongolian gerbils. *Microbiol Immunol* 1991; 35: 475-480
- Hagiwara T, Mukaisho K, Nakayama T, Sugihara H, Hattori T. Long-term proton pump inhibitor administration worsens atrophic corpus gastritis and promotes adenocarcinoma development in Mongolian gerbils infected with Helicobacter pylori. *Gut* 2011; 60: 624-630
- Wiedemann T, Loell E, Mueller S, Stoeckelhuber M, Stolte M, Haas R, Rieder G. Helicobacter pylori cag-Pathogenicity island-dependent early immunological response triggers later precancerous gastric changes in Mongolian gerbils. *PLoS One* 2009; 4: e4754
- Cao L, Mizoshita T, Tsukamoto T, Takenaka Y, Toyoda T, Cao X, Ban H, Nozaki K, Tatematsu M. Development of carcinoid tumors of the glandular stomach and effects of eradication in Helicobacter pylori-infected Mongolian gerbils. *Asian Pac J Cancer Prev* 2008; 9: 25-30
- Kuo CH, Hu HM, Tsai PY, Wu IC, Yang SF, Chang LL, Wang JY, Jan CM, Wang WM, Wu DC. Short-term celecoxib intervention is a safe and effective chemopreventive for gastric carcinogenesis based on a Mongolian gerbil model. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 4907-4914
- Toyoda T, Tsukamoto T, Takasu S, Shi L, Hirano N, Ban H, Kumagai T, Tatematsu M. Anti-inflammatory effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE), a nuclear factor-kappaB inhibitor, on Helicobacter pylori-induced gastritis in Mongolian gerbils. *Int J Cancer* 2009; 125: 1786-1795
- Ikeno T, Ota H, Sugiyama A, Ishida K, Katsuyama T, Genta RM, Kawasaki S. Helicobacter pylori-induced chronic active gastritis, intestinal metaplasia, and gastric ulcer in Mongolian gerbils. *Am J Pathol* 1999; 154: 951-960
- Honda S, Fujioka T, Tokieda M, Gotoh T, Nishizono

- A, Nasu M. Gastric ulcer, atrophic gastritis, and intestinal metaplasia caused by *Helicobacter pylori* infection in Mongolian gerbils. *Scand J Gastroenterol* 1998; 33: 454-460
- 14 Radin JN, González-Rivera C, Ivie SE, McClain MS, Cover TL. *Helicobacter pylori* VacA induces programmed necrosis in gastric epithelial cells. *Infect Immun* 2011; 79: 2535-2543
- 15 Chang CC, Chen SH, Lien GS, Lee YJ, Lou HY, Hsieh CR, Fang CL, Pan S. Anti-*Helicobacter pylori* therapy significantly reduces *Helicobacter pylori*-induced gastric mucosal damage in Mongolian gerbils. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 982-985
- 16 Yan J, Luo YH, Mao YF. Establishment of *Helicobacter pylori* infection model in Mongolian gerbils. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 852-855
- 17 Takahashi S, Fujita T, Yamamoto A. Role of cyclooxygenase-2 in *Helicobacter pylori*-induced gastritis in Mongolian gerbils. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 279: G791-G798
- 18 Baek HY, Lim JW, Kim H. Interaction between the *Helicobacter pylori* CagA and alpha-Pix in gastric epithelial AGS cells. *Ann N Y Acad Sci* 2007; 1096: 18-23
- 19 Chen Y, Wang Y, Xu W, Zhang Z. Analysis on the mechanism of *Helicobacter pylori*-induced apoptosis in gastric cancer cell line BGC-823. *Int J Mol Med* 2005; 16: 741-745
- 20 Watanabe T, Tada M, Nagai H, Sasaki S, Nakao M. *Helicobacter pylori* infection induces gastric cancer in mongolian gerbils. *Gastroenterology* 1998; 115: 642-648
- 21 Ohkusa T, Okayasu I, Miwa H, Ohtaka K, Endo S, Sato N. *Helicobacter pylori* infection induces duodenitis and superficial duodenal ulcer in Mongolian gerbils. *Gut* 2003; 52: 797-803
- 22 Tsukanov VV, Butorin NN, Maady AS, Shtygashcheva OV, Amelchugova OS, Tonkikh JL, Fassan M, Rugge M. *Helicobacter pylori* Infection, Intestinal Metaplasia, and Gastric Cancer Risk in Eastern Siberia. *Helicobacter* 2011; 16: 107-112
- 23 Das KM. Lack of clinical usefulness of Das-1 monoclonal antibody and mucin expression as risk markers of gastric carcinoma in patients with gastric intestinal metaplasia. *Am J Clin Pathol* 2010; 133: 980
- 24 Ohnita K, Isomoto H, Honda S, Wada A, Wen CY, Nishi Y, Mizuta Y, Hirayama T, Kohno S. *Helicobacter pylori* strain-specific modulation of gastric inflammation in Mongolian gerbils. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 1549-1553
- 25 Cao X, Tsukamoto T, Nozaki K, Tanaka H, Cao L, Toyoda T, Takasu S, Ban H, Kumagai T, Tatematsu M. Severity of gastritis determines glandular stomach carcinogenesis in *Helicobacter pylori*-infected Mongolian gerbils. *Cancer Sci* 2007; 98: 478-483
- 26 Yanai A, Maeda S, Shibata W, Hikiba Y, Sakamoto K, Nakagawa H, Ohmae T, Hirata Y, Ogura K, Muto S, Itai A, Omata M. Activation of IkappaB kinase and NF-kappaB is essential for *Helicobacter pylori*-induced chronic gastritis in Mongolian gerbils. *Infect Immun* 2008; 76: 781-787
- 27 Yang C, Ling H, Zhang M, Yang Z, Wang X, Zeng F, Wang C, Feng J. Oxidative stress mediates chemical hypoxia-induced injury and inflammation by activating NF-kb-COX-2 pathway in HaCaT cells. *Mol Cells* 2011; 31: 531-538
- 28 Yamaoka Y, Yamauchi K, Ota H, Sugiyama A, Ishizone S, Graham DY, Maruta F, Murakami M, Katsuyama T. Natural history of gastric mucosal cytokine expression in *Helicobacter pylori* gastritis in Mongolian gerbils. *Infect Immun* 2005; 73: 2205-2212
- 29 Hirayama F, Takagi S, Iwao E, Yokoyama Y, Haga K, Hanada S. Development of poorly differentiated adenocarcinoma and carcinoid due to long-term *Helicobacter pylori* colonization in Mongolian gerbils. *J Gastroenterol* 1999; 34: 450-454
- 30 Zheng Q, Chen XY, Shi Y, Xiao SD. Development of gastric adenocarcinoma in Mongolian gerbils after long-term infection with *Helicobacter pylori*. *J Gastroenterol Hepatol* 2004; 19: 1192-1198
- 31 Gonzalez-Obeso E, Fujita H, Deshpande V, Ogawa F, Lisovsky M, Genevay M, Grzyb K, Brugge W, Lennerz JK, Shimizu M, Srivastava A, Lauwers GY. Gastric hyperplastic polyps: a heterogeneous clinicopathologic group including a distinct subset best categorized as mucosal prolapse polyp. *Am J Surg Pathol* 2011; 35: 670-677
- 32 Sugiyama A, Maruta F, Ikeno T, Ishida K, Kawasaki S, Katsuyama T, Shimizu N, Tatematsu M. *Helicobacter pylori* infection enhances N-methyl-N-nitrosourea-induced stomach carcinogenesis in the Mongolian gerbil. *Cancer Res* 1998; 58: 2067-2069
- 33 Cao X, Tsukamoto T, Nozaki K, Tanaka H, Shimizu N, Kaminishi M, Kumagai T, Tatematsu M. Earlier *Helicobacter pylori* infection increases the risk for the N-methyl-N-nitrosourea-induced stomach carcinogenesis in Mongolian gerbils. *Jpn J Cancer Res* 2002; 93: 1293-1298
- 34 Tokieda M, Honda S, Fujioka T, Nasu M. Effect of *Helicobacter pylori* infection on the N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced gastric carcinogenesis in mongolian gerbils. *Carcinogenesis* 1999; 20: 1261-1266
- 35 Shimizu N, Inada K, Nakanishi H, Tsukamoto T, Ikehara Y, Kaminishi M, Kuramoto S, Sugiyama A, Katsuyama T, Tatematsu M. *Helicobacter pylori* infection enhances glandular stomach carcinogenesis in Mongolian gerbils treated with chemical carcinogens. *Carcinogenesis* 1999; 20: 669-676
- 36 Tatematsu M, Tsukamoto T, Mizoshita T. Role of *Helicobacter pylori* in gastric carcinogenesis: the origin of gastric cancers and heterotopic proliferative glands in Mongolian gerbils. *Helicobacter* 2005; 10: 97-106
- 37 Ogura K, Maeda S, Nakao M, Watanabe T, Tada M, Kyutoku T, Yoshida H, Shiratori Y, Omata M. Virulence factors of *Helicobacter pylori* responsible for gastric diseases in Mongolian gerbil. *J Exp Med* 2000; 192: 1601-1610
- 38 Romero-Gallo J, Harris EJ, Krishna U, Washington MK, Perez-Perez GI, Peek RM. Effect of *Helicobacter pylori* eradication on gastric carcinogenesis. *Lab Invest* 2008; 88: 328-336
- 39 Franco AT, Johnston E, Krishna U, Yamaoka Y, Israel DA, Nagy TA, Wroblewski LE, Piazuelo MB, Correa P, Peek RM. Regulation of gastric carcinogenesis by *Helicobacter pylori* virulence factors. *Cancer Res* 2008; 68: 379-387
- 40 Yamaoka Y. Mechanisms of disease: *Helicobacter pylori* virulence factors. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2010; 7: 629-641
- 41 Sugimoto M, Ohno T, Graham DY, Yamaoka Y. *Helicobacter pylori* outer membrane proteins on gastric mucosal interleukin 6 and 11 expression in

同行评价

本文对蒙古沙鼠幽门螺杆菌相关性胃病的研究进展进行了综述,有一定的参考价值 and 意义。

- Mongolian gerbils. *J Gastroenterol Hepatol* 2011 Jun 16 [Epub ahead of print]
- 42 Rieder G, Karnholz A, Stoeckelhuber M, Merchant JL, Haas R. H pylori infection causes chronic pancreatitis in Mongolian gerbils. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 3939-3947
- 43 Farnbacher M, Jahns T, Willrodt D, Daniel R, Haas R, Goesmann A, Kurtz S, Rieder G. Sequencing, annotation, and comparative genome analysis of the gerbil-adapted *Helicobacter pylori* strain B8. *BMC Genomics* 2010; 11: 335
- 44 Sugimoto M, Ohno T, Graham DY, Yamaoka Y. Gastric mucosal interleukin-17 and -18 mRNA expression in *Helicobacter pylori*-induced Mongolian gerbils. *Cancer Sci* 2009; 100: 2152-2159
- 45 Futagami S, Hiratsuka T, Suzuki K, Kusunoki M, Wada K, Miyake K, Ohashi K, Shimizu M, Takahashi H, Gudis K, Kato S, Tsukui T, Sakamoto C. gammadelta T cells increase with gastric mucosal interleukin (IL)-7, IL-1beta, and *Helicobacter pylori* urease specific immunoglobulin levels via CCR2 upregulation in *Helicobacter pylori* gastritis. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21: 32-40
- 46 Kawai M, Furuta Y, Yahara K, Tsuru T, Oshima K, Handa N, Takahashi N, Yoshida M, Azuma T, Hattori M, Uchiyama I, Kobayashi I. Evolution in an oncogenic bacterial species with extreme genome plasticity: *Helicobacter pylori* East Asian genomes. *BMC Microbiol* 2011; 11: 104
- 47 Senkovich OA, Yin J, Ekshyyan V, Conant C, Traylor J, Adegboyega P, McGee DJ, Rhoads RE, Slepnev S, Testerman TL. *Helicobacter pylori* AlpA and AlpB Bind Host Laminin and Influence Gastric Inflammation in Gerbils. *Infect Immun* 2011; 79: 3106-3116
- 48 Fox JG, Kuipers EJ. Long-term proton pump inhibitor administration, H pylori and gastric cancer: lessons from the gerbil. *Gut* 2011; 60: 567-568
- 49 Ohno T, Vallström A, Rugge M, Ota H, Graham DY, Arnqvist A, Yamaoka Y. Effects of blood group antigen-binding adhesin expression during *Helicobacter pylori* infection of Mongolian gerbils. *J Infect Dis* 2011; 203: 726-735
- 50 Shin CM, Kim N, Lee HS, Lee DH, Kim JS, Jung HC, Song IS. Intrafamilial aggregation of gastric cancer: a comprehensive approach including environmental factors, *Helicobacter pylori* virulence, and genetic susceptibility. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2011; 23: 411-417

编辑 李薇 电编 何基才

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》参考文献要求

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

类胰岛素生长因子与肝癌

孙芳, 付汉江, 铁铁, 郑晓飞

孙芳, 白求恩医学院生物化学教研室 河北省石家庄市 050081.

付汉江, 铁铁, 郑晓飞, 中国人民解放军军事医学科学院放射与辐射医学研究所 北京市 100850

作者贡献分布: 本文综述由孙芳、付汉江及铁铁完成; 郑晓飞审校.

通讯作者: 孙芳, 讲师, 博士, 050081, 河北省石家庄市, 白求恩医学院生物化学教研室. sunlyna@163.com

电话: 0311-87977346

收稿日期: 2011-06-15 修回日期: 2011-07-19

接受日期: 2011-08-10 在线出版日期: 2011-08-18

Insulin-like growth factors and hepatocellular carcinoma

Fang Sun, Han-Jiang Fu, Yi Tie, Xiao-Fei Zheng

Fang Sun, Department of Biochemistry, Bethune Military Medical College of the Chinese People's Liberation Army, Shijiazhuang 050081, Hebei Province, China
Han-Jiang Fu, Yi Tie, Xiao-Fei Zheng, Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China

Correspondence to: Fang Sun, Department of Biochemistry, Bethune Military Medical College of the Chinese People's Liberation Army, Shijiazhuang 050081, Hebei Province, China. sunlyna@163.com

Received: 2011-06-15 Revised: 2011-07-19

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

Abstract

Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the most malignant types of cancer. It has a rapid course and carries a poor prognosis. Hepatocarcinogenesis is a complex multi-step and multifactorial process. Recent studies have discovered the association between the dysregulation of insulin-like growth factor (IGF)-related signaling pathways and pathogenesis of liver cancer. IGFs are multifunctional cell proliferation regulatory factors and play an important role in fetal development, central nervous system development and cancer cell proliferation. The biological activity of IGFs is regulated by a complex regulatory network which consists of different types of receptors, IGF-binding proteins and IGF binding-related proteins. This review focuses on the changes in the IGF axis and IGF-related signaling pathways in liver tumorigenesis and their application in targeted therapy for liver cancer.

Key Words: Insulin-like growth factors; Insulin-like growth factor-I receptor; Hepatocellular carcinoma

Sun F, Fu HJ, Tie Y, Zheng XF. Insulin-like growth factors and hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(23): 2473-2479

摘要

肝癌是常见的恶性肿瘤之一, 其病程快且预后很差. 其发生是一个多因素多步骤协同的复杂过程. 近来的研究报道, 肝癌发生分子机制与类胰岛素生长因子体系信号通路异常相关. 类胰岛素生长因子是一种多功能细胞增殖调控因子, 他在胚胎发育、中枢神经系统发育及肿瘤细胞增殖等方面具有重要的生物学功能. 类胰岛素生长因子的生物学活性受到包括类胰岛素生长因子不同类型的受体、类胰岛素结合蛋白及类胰岛素结合相关蛋白等多因素参与的复杂的调控网络调控. 本文主要介绍了类胰岛素生长因子体系在肝癌中的异常改变、类胰岛素生长因子相关信号通路及其作用机制以及在肝癌靶向治疗中的应用.

关键词: 类胰岛素生长因子; 类胰岛素生长因子受体-I; 肝癌

孙芳, 付汉江, 铁铁, 郑晓飞. 类胰岛素生长因子与肝癌. 世界华人消化杂志 2011; 19(23): 2473-2479

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2473.asp>

0 引言

肝癌是世界第五大恶性肿瘤, 在中国是第二大恶性肿瘤, 其发病率几乎等同于致死率^[1,2]. 肝癌的发病机制是多因素、多步骤的复杂过程, 其分子生物学机制还没有完全阐明. 病因学分析表明, 有80%以上的肝癌发生与HBV和HCV病毒感染、黄曲霉毒素B1中毒、酗酒所致慢性酒精中毒及某些遗传性疾病等密切相关^[3]. 类胰岛素生长因子(insulin-like growth factors, IGFs)是一种多功能细胞增殖调控因子, 他在胎儿发育、中枢神经系统发育及肿瘤细胞增殖等方面具有重要的生物学功能. 研究表明, IGFs在多种

■背景资料

肝癌是常见的恶性肿瘤之一, 其病程快且预后很差. 其发生是一个多因素多步骤协同的复杂过程.

■同行评议者

王钦红, 副教授, 美国杜克大学医学院肿瘤生物系; 魏继福, 副研究员, 江苏省人民医院中心实验室; 周素芳, 教授, 广西医科大学科技处

■ 研发前沿

肝癌的发病机制是多因素、多步骤的复杂过程,其分子生物学机制还没有完全阐明。

肿瘤的发生发展过程中起关键作用^[4]。IGFs的生物学活性受到包括类胰岛素生长因子不同类型的受体、IGFs结合蛋白及类胰岛素结合相关蛋白等复杂的调控网络调控,这些信号因子在肿瘤细胞内环境的中心调控位置,为肿瘤的靶向治疗提供了靶点。本文主要论述了肝癌发生发展过程中IGFs体系相关分子的异常改变,肝癌中IGFs信号通路的异常改变及靶向治疗策略。

1 正常肝细胞中IGFs体系各因子的表达及特性

IGFs家族包括IGF- I、IGF- II、膜相关IGF- I受体(IGF- I R)、甘露醇-6-磷酸/IGF- II受体(IGF- II/M6PR, IGF- II R)、6种IGFs结合蛋白(IGF binding proteins, IGFBPs)。他们共同在机体的生长、代谢和发育过程中起重要的调节作用。肝脏是合成分泌IGFs的主要器官,是内分泌途径中IGFs因子的主要来源,而机体的其他组织绝大部分也都可以自身分泌IGFs因子,由此形成自分泌或旁分泌的循环途径^[5]。

1.1 IGF- I IGF- I基因定位在染色体12,全长100 kb,有两个启动子,6个外显子,编码70氨基酸的单链蛋白多肽。IGF- I基因表达主要受生长激素水平调节,主要负责调控成体的生长。雌激素、促肾上腺皮质激素、促甲状腺激素等,还有一些生长因子,血小板生长因子、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)等均影响IGF- I的表达。IGF- I不但促进细胞增殖,还激活PI3K-MAPK通路使肿瘤细胞逃避凋亡^[6]。

1.2 IGF- II IGF- II基因位于染色体11,在胰岛素基因下游1.4 kb区域,全长30 kb,9个外显子,编码67个氨基酸的蛋白质。IGF- I和IGF- II的氨基酸序列有62%同源,结构上两者与胰岛素原的结构相似。IGF- II基因的表达在转录水平受到复杂的调控,他有4种不同的启动子(P1、P2、P3、P4),编码生成多种不同的转录本^[7]。人类IGF- II在胚胎发育过程中几乎所有组织中均有表达,且表达水平较高,此时主要是活性较高的P2、P3和P4启动子转录表达IGF- II。出生后P2、P3、P4的活性降低,在成人肝组织中主要由组织特异性的启动子P1转录表达IGF- II。IGF- II另一个表达特性是基因印迹,即只有来源于亲本的一个等位基因是表达的^[8]。此外,等位基因的差异表达还受DNA甲基化,组氨酸乙酰化等的调控。IGF- II主要在胚胎和胎儿期发挥功能,出生后主要IGF- I发挥作用。IGF- II血液中的浓

度约400-600 $\mu\text{g/L}$,而IGF- I在血液中的浓度约100-200 $\mu\text{g/L}$,即使IGF- II浓度更高,但在出生后受生长激素的调节IGF- I的功能显得更为重要,而生长激素对IGF- II的影响较小。

1.3 IGFs受体 IGFs通过与细胞表面特异性的受体结合发挥生物学效应。IGFs有两种类型的受体:IGF- I型受体(IGF- I R)和IGF- II型受体(IGF- II R)。IGF- I R和IGF- II R都是跨膜糖蛋白,但是两者的结构和功能完全不同。IGF- I R是一个异四聚体跨膜蛋白,含有两个 α 亚基和两个 β 亚基,结构上与胰岛素受体有60%的同源性。IGF- I、IGF- II和胰岛素均可以与IGF- I R结合,IGF- I R与IGF- I的亲和力比IGF- II高2倍甚至15倍之多。IGF- I R是酪氨酸激酶蛋白,可激活下游一系列细胞增殖和抗凋亡信号通路,如激活Ras蛋白, Raf蛋白信号通路, MAPK蛋白和其他PI3激酶相关通路^[9]。IGF- I R的表达受类固醇类激素和生长因子的调节。血清IGFs浓度过高可以抑制IGF- I R受体的表达,说明IGFs可以负反馈调节IGF- I R信号通路。与IGFs功能相反,其他的生长因子包括成纤维生长因子、血小板内皮生长因子、表皮生长因子可刺激IGF- I R表达。

IGF- II R是一个单体蛋白,具有酪氨酸激酶活性,受体的胞外有3个结合区域,一个为IGF- II的结合位点,不与IGF- I结合,另外两个为甘露糖-6-磷酸的(M6P)的结合位点,还可与肾素、多育曲菌素、甲状腺球蛋白、潜在的转化生长因子(transforming growth factor- β , TGF- β)结合。当IGF- II R与潜在的转化生长因子结合可以激活TGF- β 下游的信号通路。IGF- II结合IGF- II R主要作用是降解细胞外IGF- II分子,调节循环系统中IGF- II的分子浓度^[10]。IGF- II结合IGF- II R后,IGF- II被降解,IGF- II生物活性降低。也正因为如此,IGF- II R在一直被认为是潜在的肿瘤抑制分子。

1.4 IGFBPs IGFs的生物活性受其6种特异性的结合蛋白的调节,他们不但调节着血清中IGFs因子的活性,而且还参与调控IGFs因子和其受体作用的过程^[11]。IGFBPs通过与IGFs的竞争性结合阻止IGFs与IGF- I的结合,从而相应的减少了与受体结合的IGFs因子^[12]。就结合能力而言IGFBPs(kd-10-10M)与IGFs的亲和力高于IGF- I R(kd-10-8M)与IGFs的亲和能力。因此,IGFBPs与IGFs结合后阻止了IGFs与IGF- I R的结合进而抑制了IGFs的功能。然而,IGFBPs与IGFs的

结合同时也保护了IGFs免于受到蛋白酶的降解,这种保护能够增强IGFs在局部组织的生物活性.在实际情况下,IGFBPs对IGFs的影响主要是IGFBPs的转录后磷酸化修饰和蛋白水解.在6个高亲和性的类胰岛素结合蛋白IGFBP1-6中,IGFBP3在血清中的浓度最高^[13].IGFBP3基因转录受组织特异性的调控.许多激素和生长因子均可调控IGFBP3的表达,如雌激素类、糖皮质激素类、甲状腺类激素、成纤维生长因子、TGF- β 、血小板生长因子等.一些特异性的细胞因子,如白介素1(IL-1)和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)可刺激IGFBP3的表达.除了依赖于IGFs的功能,IGFBP3还有独立于IGFs的功能,这些功能主是由IGFBP3的细胞膜受体介导的.除了与IGFs结合能力较高的IGFBPs之外,还存在一些结合能力较低的蛋白称IGFBP相关蛋白(IGFBP-rP)^[14].IGFBP-rP富含半胱氨酸,且与IGFBPs的N端有部分结构相似性,与IGFs的结合能力较IGFBPs弱百倍.

2 肝癌发生过程中IGFs体系各因子的异常表达

在恶性细胞的增殖分化过程中包括了生长因子的自分泌和旁分泌过程.研究表明,IGFs体系在肝的病理学病变特别是肝癌形成、恶性增殖过程中有很重要的作用^[15-18].

2.1 IGFs的异常表达及机制 IGFs表达水平和敏感性的改变在细胞由良性向恶性的转化过程中发挥重要作用.在肝癌组织中,IGF- I mRNA的表达较临近的正常肝组织低,这可能是由于在肝癌组织中生长激素受体表达过低所致的生长激素分泌不足所致的.但是IGF- I在肝癌病人血清中浓度减少似乎与肝损伤无明显相关^[19].IGF- II在肝脏肿瘤、不同成瘤动物模型中病灶形成部位及人类肝细胞癌中均呈现过量表达.在肝硬化患者的肝组织、肝癌组织及肝癌细胞系中均发现IGF- II表达高于正常肝组织40-100倍之多^[20].在感染了慢性HBV和HCV病毒的肝硬化和肝癌组织中,IGF- II的表达也有明显增加^[21].

多种肿瘤中均发现IGF- II和IGF- I R共表达,IGF- II一般是通过与IGF- I R结合经旁分泌途径介导肝细胞的增殖,而在恶性转化的肿瘤细胞中可自身分泌IGF- II,并受到复杂的转录调节^[22].其一,肝癌组织中IGF- II过量表达主要与其P1启动子活性丢失,而胚胎性启动子生成的转录本的表达增多相关;其二,肝炎病毒介导IGF- II过量表达.有证据表明,HBV阳性的肝癌

患者体内,HBV病毒编码的HBx蛋白可上调IGF- II基因的P3和P4启动子生成的转录本.同时,HBx蛋白可阳性调节Sp1介导的IGF- II P4转录本的激活表达^[23].如HBV阳性的肝癌病人中,黄曲霉素B1诱导的p53在249位密码子位置基因突变(p53mt249)可促进IGF- II P4转录本的过量表达;其三,IGF- II基因印迹异常在肝癌中已得到证实.一般认为,IGF- II基因印迹异常是发生了印迹丢失或通过母源H19基因的沉默而导致双等位基因表达从而诱发肿瘤.

另一方面,研究发现IGF- II在肝癌肿瘤组织新生血管形成中起重要作用^[24].在人肝细胞癌中IGF- II以时间依赖的方式上调VEGF mRNA和蛋白的表达^[25-26].在肝癌中IGF- II可能是缺氧诱导的血管生成因子,肿瘤组织缺氧可增强IGF- II诱导的VEGF的表达并加速肝癌细胞的恶性生长和侵袭转移.肝癌组织中IGF- II mRNA的表达几乎是100%,癌旁组织中阳性率约50%.肝癌患者血清IGF- II表达水平显著高于慢性肝炎和肝硬化患者.与正常人和非肝肿瘤患者血清比较,IGF- II在肝癌患者血清表达阳性率约34%,而其他的肝组织病变过程没有IGF- II的过量表达.此外,血清IGF- II mRNA的表达与肝癌的病程相关,在侵袭转移的肝癌组织中IGF- II的表达几乎是100%的,而甲胎蛋白阴性的肝癌组织中IGF- II表达率只有35%.

2.2 IGFs受体异常表达 IGF- I和IGF- II主要的促有丝分裂功能都是由IGF- I R介导的,IGF- I R在促进细胞增殖逃避细胞凋亡等方面发挥重要作用.大量的事实证明,机体在生理条件下IGF- I R受生长负调控因子或抑癌基因的抑制表达活性降低^[27].在人类肝硬化组织、肝癌组织中,IGF- I R基因表达较正常肝组织增加^[28].胰岛素受体亚基1(insulin receptor substrate-1, IRS-1)是参与IGF- I R信号通路的中间效应因子,IRS-1的表达在肝癌中也较癌旁组织高.动物模型,IRS-1的过量表达可激活其下游Raf/MEK/ERK-1/ERK-2和PI-3激酶信号通路,促进DNA的合成^[29].IGFs体系另一种受体是IGF- II R,其基因的杂合丢失或突变是肝癌发生过程中较早的变异现象^[30].IGF- II R很重要的生物学功能之一是降解IGF- II.在肝癌中IGF- II R基因的杂合丢失或突变增加了可结合受体的IGF- II分子浓度,减少了细胞凋亡并激活了下游细胞增殖信号通路.

2.3 IGFBPs异常表达 IGFs因子有6种结合蛋白,

■相关报道
已有研究表明,IGFs体系相关因子在多种肿瘤的发生发展过程中起关键作用.

■创新盘点

本文主要论述了肝癌发生发展过程中IGFs体系相关分子的异常改变, 肝癌中IGFs信号通路的异常改变及靶向治疗策略。

肝癌组织中IGFBP-1、-3和-4均有明显下调, 特别是IGFBP-3在肝癌组织标本中表达水平很低甚至检测不到^[31]。IGFs结合蛋白的表达下调, 使得有更多的游离的IGFs因子通过结合其受体促进肿瘤细胞的增殖。最近的研究表明, TIA-1通过与IGFBP3基因3'UTR区域富含AT的序列元件结合, 介导IGFBP3的表达抑制^[32]。用IGFBP3重组蛋白和IGF-I处理HepG2细胞, 发现IGFBP3能减少IGF-I的促有丝分裂活性, 同时发现用IGFBP3预处理HepG2细胞后能显著减少IGF-I诱导的磷酸化级联反应。可溶性的IGFBP3可与血清中的IGF-I结合进而阻止IGF-I与其相应受体结合, 抑制了IGF-I的生物学功能。

3 IGFs相关信号通路的改变

IGF-I R受体促进细胞增殖、抗凋亡主要是通过PI3K/Akt和MAPK-ERK级联反应^[33]。肝癌细胞有很强的血管生成能力, 其中过度激活的IGF-I /IGF-I R信号通路的可通过诱导HIF-1 α 上调VEGF的表达, 同时伴随Akt, STAT3和Erk磷酸化水平增加。研究表明, 在肝细胞和肝癌细胞增殖过程中PI3K激酶信号通路发挥重要的调控作用, 该信号通路的过度激活有助于形成组织癌变前的损伤^[34]。在肝细胞癌和肝细胞瘤中, 一些基因的变异相应的又会增强PI3K激酶的本底活性。有报道, 10%的肝细胞癌中发生PTEN突变失活或者等位基因杂合丢失, 从而激活PI3K激酶信号通路的组成性表达^[35]。糖原合成激酶-3 β (glycogen synthase kinase-3 β , GSK-3 β)是PI3K激酶信号通路下游的靶基因之一, 他调控着 β -连环蛋白磷酸化过程和Wnt/ β -连环蛋白信号通路, 后者可引起异常蛋白在细胞核处聚集并激活LEF/TCF等转录因子的表达。另一方面, IGF-I R-PI3K/Akt激活下游的核转录因子NF- κ B介导细胞抗凋亡^[36]。NF- κ B不但可促进血管生成还可抑制细胞凋亡。在肝癌细胞中NF- κ B自发激活表达并诱导环氧合酶2(cyclooxygenase-2, COX-2)和可诱导氮氧化物合成酶的表达, 使得肿瘤细胞逃避凋亡反应。HER-3是EGFR家族的一个特殊成员, 虽然他没有酪氨酸激酶活性但也能与PI3K结合激活下游的Akt信号通路。HER-3通过与EGFR或HER-2结合形成异源二聚体, 募集PI3K的调节亚基p85而发挥转磷酸化作用。已有文献表明, HER-3是肿瘤细胞对EGFR激酶抑制剂(EGFR TKIs)敏感性的关键调控效应因子^[37]。

除了ERK和PI3K/Akt信号通路之外, mTOR

信号通路和IGF-I/Akt信号通路在细胞生长、存活和能量代谢过程中起着重要的调控作用, 两者相互作用协调细胞在生长、分化以及营养支持等方面的平衡^[38]。IGF-I与IGF-I R结合后, 后者募集并磷酸化细胞膜上的PI3激酶生成PIP3, PIP3分别磷酸化PDK1上的苏氨酸位点308和mTORC2(PDK2)上的丝氨酸位点473, 进而激活了Akt的表达^[39]。磷酸化的Akt激活下游的转录因子包括FOXO、BAD、MDM2、GSK3 α/β 等的表达^[40-42]。在肝癌细胞中PI3K、Akt和Rheb的突变或高表达可刺激mTOR信号通路和IGF-I /Akt信号通路的异常激活。此外, 肿瘤抑制基因LKB1、PTEN、TSC1和TSC2的突变也可激活mTOR和IGF-I /Akt的异常表达。值得注意的是, 抑癌基因p53也参与IGF-I /Akt/mTOR通路的调控, 压力诱导下的p53可激活IGF-I /Akt/mTOR通路的负调节因子包括IGFBP3、PTEN、TSC2、AMPK β 1、Sestrins 1和REDD1等, 从而监测恶性细胞的过度生长和分化^[43-46]。此外, IGF-I R受体还可激活下游JAK/STAT信号通路, 诱导其下游细胞因子抑制子信号通路(suppressors of cytokine signaling, SOCS)相关蛋白的表达, 而后者又是IGF-I诱导的JAK/STAT信号通路的负反馈调控因子^[47]。

还有研究表明, 在肝癌细胞中IGFs信号通路与肿瘤细胞侵袭转移相关的EMT信号通路共同调控着肝癌细胞增殖^[48]。已有的研究表明, 对上皮型肝癌细胞系HepG2和Hep3B联合使用IGF-I R和EGFR抑制剂型化疗药物, 可对抗肝癌细胞中由于过度激活的IGF-II/IGF-I R信号通路导致的吉非替尼耐药性^[49,50]。研究同时表明, 肝癌细胞中的EMT信号通路决定着其对EGFR抑制剂型化疗药的敏感性。由于在间质型肝癌细胞中的高表达整联蛋白相关激酶(integrin-linked kinase, ILK), ILK抑制E-cadherin的转录表达并激活EMT信号通路, 增加Akt磷酸化水平促进细胞增殖, 从而使得间质型肝细胞癌对EGFR抑制剂型抗肿瘤药物的敏感性降低。

IGF-II的受体IGF-II R, 还可以结合TGF- β 抑制细胞生长, IGF-II R是TGF- β 潜在的激活因子。在肝细胞中TGF- β 可抑制细胞生长并诱导细胞凋亡。TGF- β 信号通路主要通过I型或II型丝/苏氨酸激酶受体异源复合跨膜蛋白结合发挥调控作用。激活的TGF- β I型受体可以磷酸化调节其下游靶蛋白Smads。在10%的肝癌中, TGF- β 信号通路的异常主要是由Smad2和Smad4基因

突变引起的。此外,在肝癌中TGF- β I R II受体自身的基因突变可能也会导致TGF- β 信号通路的失调^[51]。

4 结论

IGF- I R信号通路在肝癌发生过程中发挥重要作用,过度激活的IGF- I R信号通路使得癌细胞对化疗药物、激素疗法、生物疗法及放疗等的敏感性降低。因此,在不改变生理条件下的肝功能的同时抑制该通路中的相关分子,不失为治疗肝癌的可行的策略^[52]。研究表明,特异性的抑制IGF- I R的活性可提高放化疗药物对肿瘤细胞的杀伤力^[53]。过表达负显性IGF- I R突变体或转染IGF- I R特异性的反义寡核苷酸,在体内外实验中均得到良好的抑制IGFs/IGF- I R通路的效果。此外,已经有许多特异性的针对肝癌IGF-II/IGF- I R信号通路的治疗策略,包括IGF- I R单克隆抗体、小分子酪氨酸激酶受体抑制剂等。CP-751, 871是人IGF- I R全长IgG2单克隆抗体,已经在肿瘤 I 期临床试验上大量使用。肿瘤动物模型研究表明,他通过阻断IGFs因子介导的磷酸化受体及下游Akt,以剂量依赖的方式下调IGF- I R的活性同时增强放化疗药物的敏感性^[54]。还有研究表明,IGF- I R的小分子激酶抑制剂GSK1904529A通过阻断PI3K/Akt和MAPK信号通路诱导肿瘤细胞周期G1期阻滞^[55]。索拉菲尼作为一个多种激酶的抑制剂是至今唯一的批准上市的肝癌治疗药物,使肝癌患者的平均生存期由7.9 mo延长至10.4 mo^[56]。此外,IGF-II/M6PR在肿瘤靶向药物研究中也受到关注。用M6P修饰人血清白蛋白(human serum albumin, HSA)可作为抗肿瘤靶向药物载体^[57]。放射性免疫共沉淀实验表明,M6P-HSA特异表达于黑素瘤细胞中并与M6P/IGF-II R结合,靶向药物阿霉素-M6P-HAS显著抑制肿瘤生长,并极大的减弱了药物对肝脏功能的损伤。总之,IGFs信号通路在肝癌中的重要功能为肝癌治疗提供了越来越多的靶点。通过对IGFs体系的体内外研究及随之进行的临床 I 期实验,都证实联合肿瘤放化疗,内分泌疗法和生物疗法等,靶向IGFs信号通路中的关键性因子为将来实现肿瘤患者的个性化治疗方案带来更大的希望。

5 参考文献

- 1 El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology* 2007; 132: 2557-2576

- 2 Peto J. Cancer epidemiology in the last century and the next decade. *Nature* 2001; 411: 390-395
- 3 Villanueva A, Newell P, Chiang DY, Friedman SL, Llovet JM. Genomics and signaling pathways in hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis* 2007; 27: 55-76
- 4 Maki RG. Small is beautiful: insulin-like growth factors and their role in growth, development, and cancer. *J Clin Oncol* 2010; 28: 4985-4995
- 5 Alexia C, Fallot G, Lasfer M, Schweizer-Groyer G, Groyer A. An evaluation of the role of insulin-like growth factors (IGF) and of type-I IGF receptor signalling in hepatocarcinogenesis and in the resistance of hepatocarcinoma cells against drug-induced apoptosis. *Biochem Pharmacol* 2004; 68: 1003-1015
- 6 Halevy O, Cantley LC. Differential regulation of the phosphoinositide 3-kinase and MAP kinase pathways by hepatocyte growth factor vs. insulin-like growth factor-I in myogenic cells. *Exp Cell Res* 2004; 297: 224-234
- 7 Nielsen FC, Christiansen J. Posttranscriptional regulation of insulin-like growth factor II mRNA. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 1995; 220: 37-46
- 8 Honda S, Arai Y, Haruta M, Sasaki F, Ohira M, Yamaoka H, Horie H, Nakagawara A, Hiyama E, Todo S, Kaneko Y. Loss of imprinting of IGF2 correlates with hypermethylation of the H19 differentially methylated region in hepatoblastoma. *Br J Cancer* 2008; 99: 1891-1899
- 9 Baserga R, Peruzzi F, Reiss K. The IGF-1 receptor in cancer biology. *Int J Cancer* 2003; 107: 873-877
- 10 Brown J, Jones EY, Forbes BE. Interactions of IGF-II with the IGF2R/cation-independent mannose-6-phosphate receptor mechanism and biological outcomes. *Vitam Horm* 2009; 80: 699-719
- 11 Clemmons DR. Insulin-like growth factor binding proteins and their role in controlling IGF actions. *Cytokine Growth Factor Rev* 1997; 8: 45-62
- 12 Grimberg A, Cohen P. Role of insulin-like growth factors and their binding proteins in growth control and carcinogenesis. *J Cell Physiol* 2000; 183: 1-9
- 13 Arany E, Afford S, Strain AJ, Winwood PJ, Arthur MJ, Hill DJ. Differential cellular synthesis of insulin-like growth factor binding protein-1 (IGFBP-1) and IGFBP-3 within human liver. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 79: 1871-1876
- 14 von Horn H, Hwa V, Rosenfeld RG, Hall K, Teh BT, Tally M, Ekström TJ, Gray SG. Altered expression of low affinity insulin-like growth factor binding protein related proteins in hepatoblastoma. *Int J Mol Med* 2002; 9: 645-649
- 15 Scharf JG, Schmidt-Sandte W, Pahernik SA, Ramadori G, Bräulke T, Hartmann H. Characterization of the insulin-like growth factor axis in a human hepatoma cell line (PLC). *Carcinogenesis* 1998; 19: 2121-2128
- 16 Gray SG, Eriksson T, Ekström C, Holm S, von Schweinitz D, Kogner P, Sandstedt B, Pietsch T, Ekström TJ. Altered expression of members of the IGF-axis in hepatoblastomas. *Br J Cancer* 2000; 82: 1561-1567
- 17 Khandwala HM, McCutcheon IE, Flyvbjerg A, Friend KE. The effects of insulin-like growth factors on tumorigenesis and neoplastic growth. *Endocr Rev* 2000; 21: 215-244

■应用要点

IGFs信号通路在肝癌中的重要功能为肝癌治疗提供了越来越多的靶点。

■名词解释

类胰岛素生长因子: 是一种多功能细胞增殖调控因子, 他在胎儿发育, 中枢神经系统发育及肿瘤细胞增殖等方面具有重要的生物学功能。

- 18 Breuhahn K, Schirmacher P. Reactivation of the insulin-like growth factor-II signaling pathway in human hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 1690-1698
- 19 Stuver SO, Kuper H, Tzonou A, Lagiou P, Spanos E, Hsieh CC, Mantzoros C, Trichopoulos D. Insulin-like growth factor 1 in hepatocellular carcinoma and metastatic liver cancer in men. *Int J Cancer* 2000; 87: 118-121
- 20 Cariani E, Lasserre C, Seurin D, Hamelin B, Kemeny F, Franco D, Czech MP, Ullrich A, Brechot C. Differential expression of insulin-like growth factor II mRNA in human primary liver cancers, benign liver tumors, and liver cirrhosis. *Cancer Res* 1988; 48: 6844-6849
- 21 Sedlaczek N, Hasilik A, Neuhaus P, Schuppan D, Herbst H. Focal overexpression of insulin-like growth factor 2 by hepatocytes and cholangiocytes in viral liver cirrhosis. *Br J Cancer* 2003; 88: 733-739
- 22 Breuhahn K. [Molecular mechanisms of progression in human hepatocarcinogenesis]. *Pathologie* 2010; 31 Suppl 2: 170-176
- 23 Tovar V, Alsinet C, Villanueva A, Hoshida Y, Chiang DY, Solé M, Thung S, Moyano S, Toffanin S, Mínguez B, Cabellos L, Peix J, Schwartz M, Mazzaferro V, Bruix J, Llovet JM. IGF activation in a molecular subclass of hepatocellular carcinoma and pre-clinical efficacy of IGF-1R blockage. *J Hepatol* 2010; 52: 550-559
- 24 Chao W, D'Amore PA. IGF2: epigenetic regulation and role in development and disease. *Cytokine Growth Factor Rev* 2008; 19: 111-120
- 25 Cantarini MC, de la Monte SM, Pang M, Tong M, D'Errico A, Trevisani F, Wands JR. Aspartyl-asparagyl beta hydroxylase over-expression in human hepatoma is linked to activation of insulin-like growth factor and notch signaling mechanisms. *Hepatology* 2006; 44: 446-457
- 26 Wang Z, Ruan YB, Guan Y, Liu SH. Expression of IGF-II in early experimental hepatocellular carcinomas and its significance in early diagnosis. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 267-270
- 27 Baserga R. The IGF-I receptor in cancer research. *Exp Cell Res* 1999; 253: 1-6
- 28 Scharf JG, Braulke T. The role of the IGF axis in hepatocarcinogenesis. *Horm Metab Res* 2003; 35: 685-693
- 29 Metz HE, Houghton AM. Insulin receptor substrate regulation of phosphoinositide 3-kinase. *Clin Cancer Res* 2011; 17: 206-211
- 30 Jang HS, Kang KM, Choi BO, Chai GY, Hong SC, Ha WS, Jirtle RL. Clinical significance of loss of heterozygosity for M6P/IGF2R in patients with primary hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 1394-1398
- 31 Luo SM, Tan WM, Deng WX, Zhuang SM, Luo JW. Expression of albumin, IGF-1, IGFBP-3 in tumor tissues and adjacent non-tumor tissues of hepatocellular carcinoma patients with cirrhosis. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4272-4276
- 32 Subramaniam K, Ooi LL, Hui KM. Transcriptional down-regulation of IGFBP-3 in human hepatocellular carcinoma cells is mediated by the binding of TIA-1 to its AT-rich element in the 3'-untranslated region. *Cancer Lett* 2010; 297: 259-268
- 33 Elevated insulin-like growth factor 1 receptor signaling induces antiestrogen resistance through the MAPK/ERK and PI3K/Akt signaling routes. *Breast Cancer Res* 2011; 13: R52
- 34 Coutant A, Rescan C, Gilot D, Loyer P, Guguen-Guillouzo C, Baffet G. PI3K-FRAP/mTOR pathway is critical for hepatocyte proliferation whereas MEK/ERK supports both proliferation and survival. *Hepatology* 2002; 36: 1079-1088
- 35 Stambolic V, Suzuki A, de la Pompa JL, Brothers GM, Mirtsos C, Sasaki T, Ruland J, Penninger JM, Siderovski DP, Mak TW. Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell* 1998; 95: 29-39
- 36 Salminen A, Kaarniranta K. Insulin/IGF-1 paradox of aging: regulation via AKT/IKK/NF-kappaB signaling. *Cell Signal* 2010; 22: 573-577
- 37 Desbois-Mouthon C, Baron A, Blivet-Van Eggel-poël MJ, Fartoux L, Venot C, Bladt F, Housset C, Rosmorduc O. Insulin-like growth factor-1 receptor inhibition induces a resistance mechanism via the epidermal growth factor receptor/HER3/AKT signaling pathway: rational basis for cotargeting insulin-like growth factor-1 receptor and epidermal growth factor receptor in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 5445-5456
- 38 Feng Z, Levine AJ. The regulation of energy metabolism and the IGF-1/mTOR pathways by the p53 protein. *Trends Cell Biol* 2010; 20: 427-434
- 39 Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 2005; 307: 1098-1101
- 40 Zhou BP, Liao Y, Xia W, Zou Y, Spohn B, Hung MC. HER-2/neu induces p53 ubiquitination via Akt-mediated MDM2 phosphorylation. *Nat Cell Biol* 2001; 3: 973-982
- 41 Bader AG, Kang S, Zhao L, Vogt PK. Oncogenic PI3K deregulates transcription and translation. *Nat Rev Cancer* 2005; 5: 921-929
- 42 Shaw RJ, Cantley LC. Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth. *Nature* 2006; 441: 424-430
- 43 Feng Z, Zhang H, Levine AJ, Jin S. The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 8204-8209
- 44 Feng Z, Hu W, de Stanchina E, Teresky AK, Jin S, Lowe S, Levine AJ. The regulation of AMPK beta1, TSC2, and PTEN expression by p53: stress, cell and tissue specificity, and the role of these gene products in modulating the IGF-1-AKT-mTOR pathways. *Cancer Res* 2007; 67: 3043-3053
- 45 Budanov AV, Karin M. p53 target genes sestrin1 and sestrin2 connect genotoxic stress and mTOR signaling. *Cell* 2008; 134: 451-460
- 46 Levine AJ, Feng Z, Mak TW, You H, Jin S. Coordination and communication between the p53 and IGF-1-AKT-TOR signal transduction pathways. *Genes Dev* 2006; 20: 267-275
- 47 Himpe E, Kooijman R. Insulin-like growth factor-I receptor signal transduction and the Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription (JAK-STAT) pathway. *Biofactors* 2009; 35: 76-81
- 48 Fuchs BC, Fujii T, Dorfman JD, Goodwin JM, Zhu AX, Lanuti M, Tanabe KK. Epithelial-to-mesenchymal transition and integrin-linked kinase mediate sensitivity to epidermal growth factor receptor inhibition in human hepatoma cells. *Cancer Res* 2008; 68: 2391-2399
- 49 Desbois-Mouthon C, Cacheux W, Blivet-Van Eggel-

- poël MJ, Barbu V, Fartoux L, Poupon R, Housset C, Rosmorduc O. Impact of IGF-1R/EGFR cross-talks on hepatoma cell sensitivity to gefitinib. *Int J Cancer* 2006; 119: 2557-2566
- 50 Höpfner M, Huether A, Sutter AP, Baradari V, Schuppan D, Scherübl H. Blockade of IGF-1 receptor tyrosine kinase has antineoplastic effects in hepatocellular carcinoma cells. *Biochem Pharmacol* 2006; 71: 1435-1448
- 51 Kawate S, Takenoshita S, Ohwada S, Mogi A, Fukusato T, Makita F, Kuwano H, Morishita Y. Mutation analysis of transforming growth factor beta type II receptor, Smad2, and Smad4 in hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol* 1999; 14: 127-131
- 52 Zender L, Villanueva A, Tovar V, Sia D, Chiang DY, Llovet JM. Cancer gene discovery in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2010; 52: 921-929
- 53 Ryan PD, Goss PE. The emerging role of the insulin-like growth factor pathway as a therapeutic target in cancer. *Oncologist* 2008; 13: 16-24
- 54 Cohen BD, Baker DA, Soderstrom C, Tkalcevic G, Rossi AM, Miller PE, Tengowski MW, Wang F, Gualberto A, Beebe JS, Moyer JD. Combination therapy enhances the inhibition of tumor growth with the fully human anti-type 1 insulin-like growth factor receptor monoclonal antibody CP-751,871. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 2063-2073
- 55 Sabbatini P, Rowand JL, Groy A, Korenchuk S, Liu Q, Atkins C, Dumble M, Yang J, Anderson K, Wilson BJ, Emmitte KA, Rabindran SK, Kumar R. Antitumor activity of GSK1904529A, a small-molecule inhibitor of the insulin-like growth factor-I receptor tyrosine kinase. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 3058-3067
- 56 Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc JF, de Oliveira AC, Santoro A, Raoul JL, Forner A, Schwartz M, Porta C, Zeuzem S, Bolondi L, Greten TF, Galle PR, Seitz JF, Borbath I, Häussinger D, Giannaris T, Shan M, Moscovici M, Voliotis D, Bruix J. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2008; 359: 378-390
- 57 Prakash J, Beljaars L, Harapanahalli AK, Zeinstra-Smith M, de Jager-Krikken A, Hessing M, Steen H, Poelstra K. Tumor-targeted intracellular delivery of anticancer drugs through the mannose-6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor. *Int J Cancer* 2010; 126: 1966-1981

■同行评价

本文系统的描述了IGF在肝癌发生发展中的作用及分子机制,对更好的理解复杂的肝癌分子发生机制有一定的指导作用。

编辑 李薇 电编 何基才

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

• 消息 •

WJG 成功通过评审被 PMC 收录

本刊讯 PubMed Central(PMC)是由美国国家医学图书馆(NLM)下属国家生物技术信息中心(NCBI)创立的开放存取(Open Access)的生物医学和生命科学全文数据库。此数据库只收录采取国际同行评审制度评议的期刊,并对收录期刊有较高的科学、编辑及数据文件质量要求。

截至目前,我国只有两本期刊被PMC收录。《浙江大学学报B》(英文版)(*Journal of Zhejiang University Science B*)是我国第一本通过PMC评审并于2006-03-15被收录的期刊。《世界胃肠病学杂志》(英文版)(*World Journal of Gastroenterology, WJG*)第二本通过PMC评审并于2009-03-26被收录,全文免费向公众开放,见: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/tocrender.fcgi?journal=818&action=archive> (WJG编辑部主任:程剑侠 2009-03-26)

注射疗法治疗直肠脱垂的研究现状

李华山, 崔国策, 王晓锋

■背景资料

直肠脱垂是肛肠科比较棘手的病症, 长期的完全性直肠脱垂将会导致阴部神经损伤而产生肛门失禁、溃疡、出血、狭窄及坏死的危险, 所以有关直肠脱垂的研究一直是肛肠科较为热点的问题。

李华山, 崔国策, 王晓锋, 中国中医科学院广安门医院肛肠科 北京市 100053

国家自然科学基金资助项目, No. 30973757

作者贡献分布: 本文选题及审校由李华山完成; 文献资料搜集由崔国策与王晓锋共同完成; 写作由李华山与崔国策共同完成。

通讯作者: 李华山, 主任医师, 100053, 北京市宣武区北线阁5号, 中国中医科学院广安门医院肛肠科. lihuashan@263.net
电话: 010-88001025 传真: 010-63014195

收稿日期: 2011-06-14 修回日期: 2011-07-19

接受日期: 2011-08-12 在线出版日期: 2011-08-18

Injection treatment of rectal prolapsed: current research status

Hua-Shan Li, Guo-Ce Cui, Xiao-Feng Wang

Hua-Shan Li, Guo-Ce Cui, Xiao-Feng Wang, Department of Proctology, Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100053, China
supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30973757

Correspondence to: Professor Hua-Shan Li, Department of Proctology, Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, 5 Beixiang, Xuanwu District, Beijing 100053, China. lihuashan@263.net

Received: 2011-06-14 Revised: 2011-07-19

Accepted: 2011-08-12 Published online: 2011-08-18

Abstract

Injection therapy is currently an important treatment choice for rectal prolapse. Frequently used drugs include alcohol, 50% glucose, phenol-almond oil, 5% sodium morrhuate, alum injection, peony-gallnut injection, and Xiaozhiling injection. Injection methods include rectal submucosal injection, perirectal injection, double-layer four-step injection, punctiform injection, columnar injection, and sector injection. Foreign scholars usually treat infants and patients with incomplete rectal prolapse by injection therapy, while domestic scholars often use this method to treat various kinds of rectal prolapse. Xiaozhiling injection is the most commonly used drug for rectal prolapse in China and is associated with a satisfactory short-term curative effect despite a low level of recurrence. Injection therapy has many advantages such as minimal invasiveness, low cost, good safety and efficacy, and simpleness, and is therefore a preferred treat-

ment for rectal prolapse.

Key Words: Rectal prolapse; Injection therapy; Xiaozhiling injection

Li HS, Cui GC, Wang XF. Injection treatment of rectal prolapsed: current research status. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(23): 2480-2485

摘要

注射疗法是目前治疗直肠脱垂的一项重要方法。常用的注射药物有酒精、50%葡萄糖、石碳酸杏仁油、5%鱼肝油酸钠、明矾注射液、芍倍注射液、消痔灵注射液等。注射方法有直肠黏膜下层注射法、直肠周围注射法、双层四步注射法, 以及点状注射法、柱状注射法与扇形注射法等多种。注射疗法国外多用于婴幼儿及不完全性直肠脱垂, 国内运用于各种直肠脱垂。分析近10年来文献, 国内以消痔灵注射液治疗直肠脱垂的文献最多, 近期疗效肯定, 远期仍存在着一定的复发率。注射疗法特别是消痔灵注射法具有创伤小、并发症少、疗效肯定、安全经济、易于操作的诸多优点, 可作为直肠脱垂的首选治疗方法。

关键词: 直肠脱垂; 注射疗法; 消痔灵注射液

李华山, 崔国策, 王晓锋. 注射疗法治疗直肠脱垂的研究现状. 世界华人消化杂志 2011; 19(23): 2480-2485

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2480.asp>

0 引言

直肠脱垂是直肠、肛管、甚至部分乙状结肠移位下降和外脱的一种疾病。多见于年轻人和老人, 常引起诸如大便失禁等痛苦的症状。其最初病因仍旧不是很清楚, 争论也很多, 但有两种学说比较流行, 即滑动疝学说和肠套叠学说。手术仍是治疗直肠脱垂的主要手段, 有经腹与经会阴两种途径, 方法超过二百种, 但“没有一种是令人满意的”^[1]。注射疗法因其较高的复发率曾遭到人们的“唾弃”; 但是, 因其不破坏直肠、结肠的解剖结构和生理功能, 没有开腹或经会

■同行评议者

刘宝林, 教授, 中国医科大学附属盛京医院普通外科; 郝立强, 副教授, 上海长海医院普外二科

阴手术所引起的一系列并发症, 而日益受到人们的重视. 现将注射疗法治疗直肠脱垂的进展概述如下.

1 注射疗法的药物选择

常用的注射药物有酒精、50%葡萄糖、盐水、牛奶、石碳酸杏仁油、5%鱼肝油酸钠、不同浓度的明矾注射液、芍倍注射液、消痔灵注射液等, 每一种药物的治愈率和并发症都不相同. 一些药物治愈率高但是并发症较多, 如酒精、石碳酸杏仁油等; 一些药物并发症少但是治愈率低, 如盐水、50%葡萄糖注射液; 一些药物很有效且并发症少但注射技术要求较高, 如明矾注射液、消痔灵注射液. 丘禹洪等^[2]采用950 mL/L乙醇、Bahador等^[3]采用960 mL/L酒精治疗小儿直肠脱垂, 徐东生^[4]采用50%葡萄糖治疗肛管直肠脱垂, 王长江和朱文强^[5]应用5%鱼肝油酸钠注射液、Zganjer等^[6]采用牛奶治疗婴幼儿直肠脱垂, Sasaki等^[7]采用石碳酸杏仁油、Shah等^[8]采用高渗盐水治疗儿童直肠脱垂, 任贵全和王铭^[9]采用芍倍注射液治疗老年直肠脱垂, 于铎^[10]采用8%复方明矾注射液(明矾6 g, 黄连2 g, 枸橼酸钠1.5 g, 盐酸普鲁卡因1 g, 共制成100 mL溶液), 李华山等^[11,12]、韩宝等^[13]采用消痔灵注射液治疗成人完全性直肠脱垂等. 总之, 随着注射疗法的发展, 注射药物亦由原来的西药制剂为主逐步拓展到纯中药制剂如芍倍注射液, 以及中西药综合剂型如各种明矾制剂、消痔灵注射液等. 但是, 由于国家药物要求的日益规范, 一些传统制剂如各种复方明矾注射液, 因达不到上市新药标准而被禁止注射于人体, 有些药物已逐渐被淘汰, 目前应用最广的药物就是消痔灵注射液.

2 注射疗法的方法选择

常用的注射方法有直肠黏膜下层注射法, 直肠周围注射法, 肛门周围注射法, 点状注射法, 柱状注射法, 扇形注射法, 双向注射法, 高低位注射法等. 如丘禹洪等^[2]采用直肠周围注射, 徐东生^[4]采用50%葡萄糖环形点状黏膜下层注射; 王长江和朱文强^[5]进行肛门周围注射, 于铎^[10]采用直肠黏膜下层及肛门直肠周围间隙注射治疗直肠脱垂, 李日增^[14]采用直肠黏膜下注射和骨盆直肠间隙注射, 闫曙华^[15]采用柱状注射法, 张志涛^[16]采用直肠黏膜下点状注射、直肠四周高低位注射, 李华山等^[11,12]采用消痔灵双层四步注射, 韩宝等^[13]对 I 度脱垂采用单纯直肠内注射、II 度

及III度采用直肠内加直肠外注射.

3 注射疗法的适应证

国外学者多以注射疗法治疗婴幼儿及不完全性直肠脱垂; 国内学者将注射疗法运用于各种直肠脱垂. 如Zganjer等^[6]采用牛奶治疗婴幼儿直肠脱垂, Sasaki等^[7]采用石碳酸杏仁油注射治疗小儿直肠脱垂, Bahador等^[3]采用96%酒精注射治疗婴幼儿原发性直肠脱垂, Hachiro等^[17]采用硫酸铝钾鞣酸注射治疗直肠脱垂, 李华山等^[11,12]采用消痔灵双层四步注射治疗成人完全性直肠脱垂, 韩宝等^[13]用消痔灵注射治疗直肠脱垂, 包括 I 度、II 度及III度直肠脱垂.

4 注射疗法的疗效与安全性

文献报道注射疗法均取得了较好疗效, 而且并发症较少, 具有相当的安全性. 如丘禹洪等^[2]采用95%乙醇行直肠周围注射治疗小儿直肠脱垂32例, 25例症状消失, 7例经二次注射后痊愈. 2例患儿术后出现一过性大便失禁, 1例出现尿潴留. 徐东生^[4]采用50%葡萄糖环形点状注射黏膜下层治疗肛管直肠脱垂11例, 治愈率64%(7例), 总有效率91%(10例). 王长江和朱文强^[5]应用5%鱼肝油酸钠注射液进行肛门周围注射38例, 其中2例注射后饮食不当引起急性肠炎, 导致第1次注射失败, 2次注射痊愈, 3例患者出现排尿困难. Zganjer等^[6]采用牛奶治疗婴幼儿直肠脱垂86例, 结果显示治愈率达到95.3%(82例), 余4例行手术治疗. Sasaki等^[7]采用石碳酸杏仁油注射治疗小儿直肠脱垂9例, 结果9例患者全部治愈, 并且无任何并发症发生. Shah等^[8]采用高渗盐水黏膜下注射治疗儿童直肠脱垂患者17例, 治愈率83%(14/17), 3例因食物中的牛乳蛋白过敏而致注射治疗失败, 并认为高渗盐水注射对早期特发的儿童直肠脱垂效果明显. Abeş等^[18]认为高渗盐水造成肠黏膜细胞损伤, 证实15%的生理盐水注射因操作简便, 安全性高, 并发症少而是可取的, 一次治愈率达到93.7%. Bahador等^[3]采用96%酒精注射治疗165例婴幼儿原发性直肠脱垂取得满意疗效. Fahmy等^[19]比较了运用980 mL/L酒精、5%苯酚杏仁油和聚糖酐玻尿酸的共聚物(dextranomer/hyaluronic acid copoly-mer, Deflux)治疗儿童直肠脱垂的效果, 结果显示Deflux注射具有最低的并发症发生率, 长期随访无复发. 5%苯酚杏仁油因其较高的并发症发生率而不宜作为治疗首选. 980 mL/L酒精因取材便宜, 可作为

■研发前沿

直肠脱垂的治疗主要以手术为主, 经腹手术方法百余种, 腹腔镜手术显示了其最新的进展; 经会阴手术亦有数十种, 注射疗法占据着重要地位, 每一种术式都有其优缺点, 选择性地应用各种术式较单一使用一种术式能大大地改善结果, 个体化诊疗方案可能是今后研究的重要方向.

■相关报道

韩宝等用消痔灵注射治疗直肠脱垂266例,单纯直肠内注射158例(43.9%),直肠内外注射108例(56.1%),结果治愈263例(98.9%),好转3例(1.1%)。谢长明等对126例小儿直肠脱垂患者经明矾制剂治疗后的疗效进行长期随访观察,发现3年复发率为2.4%(3例),相对复发率较低。

Deflux注射治疗的替代品。Hachiro等^[17]采用硫酸铝钾鞣酸注射治疗14例直肠脱垂,全部治愈,无术中或术后并发症。1例患者需要1-2 mo后重复注射治愈。任贵全和王铭^[9]以芍倍注射液治疗老年直肠脱垂20例,痊愈19例,好转1例,总有效率98%。于铎^[10]采用8%复方明矾注射液(明矾6 g、黄连2 g、枸橼酸钠1.5 g、盐酸普鲁卡因1 g,共制成100 mL溶液)注射直肠黏膜层及肛门直肠周围间隙治疗直肠脱垂63例,有效率达100%,远期疗效3年内无1例患者复发。李新等^[20]亦用自制复方明矾液治疗直肠脱垂102例,以直肠黏膜脱垂行黏膜下注射,完全脱垂行直肠周围间隙注射,结果全组总治愈率98%,无出血、感染、严重疼痛等不良反应和并发症。其他类型的明矾制剂还包括复方明矾注射液^[21]、5%明矾注射液^[22]、自拟脱肛液(6%明矾注射液)^[23]、12%枯矾溶液^[24]等,经多次注射术后总体治愈率达到100%,均无严重并发症发生。但是,笔者临床中曾经诊治过以7%明矾注射液,采取直肠周围注射后发生直肠全层坏死的病例,最后不得不行乙状结肠永久性造口。可见,如果所选择的药物及用量不当,或注射方法不当,也可能发生严重的并发症。

5 消痔灵注射疗法

自从80年代中国中医科学院广安门医院发明了消痔灵注射液以后,不仅在痔的治疗上取得了突破性进展,在直肠脱垂的治疗上亦取得了长足进步。分析近10年来文献,以消痔灵注射液治疗直肠脱垂的文献最多,普遍取得了较好疗效。李华山等^[11,12]采用消痔灵双层四步注射治疗完全性直肠脱垂36例,对消痔灵注射的药物浓度进行了研究。方法是36例患者随机分为A、B两组,A组20例为高浓度组,B组16例为低浓度组。结果A组临床控制19例,有效1例;B组临床控制16例。两组近期疗效未见显著差异。经3-36 mo随访,复发7例。复发病例中有4例经再次行高浓度注射而达到临床控制,1例行开腹作肠管切除术,1例行开腹直肠悬吊固定术,1例行经吻合器的直肠黏膜环形切除术(PPH手术)达到临床控制。虽然本研究中未见药物浓度对两组患者近期疗效及远期疗效的显著性影响,但长期临床工作中发现疗效与药物浓度呈正相关关系,即浓度越高,疗效越好。韩宝等^[13]用消痔灵注射液治疗直肠脱垂266例,对注射方法的注射部位进行评价。单纯直肠内注射158例(43.9%),直肠内外注射108例(56.1%)。结果治愈263例(98.9%),好转3

例(1.1%)。均无直肠狭窄、大出血、肠梗阻、感染等并发症发生。李日增^[14]以消痔灵治疗直肠脱垂46例,I度脱垂者只行直肠黏膜注射,II-III度脱垂者行直肠黏膜注射和骨盆直肠间隙注射。结果一次痊愈42例,好转2例,无效0例,好转2例经2次注射治疗后痊愈,亦无严重并发症发生。张志涛^[16]采用1:1消痔灵注射液直肠黏膜下点状注射、直肠四周高低位注射法治疗成人完全性直肠脱垂,高位注射的目的是将药液注于两侧直肠骨盆间隙、骶前间隙;低位注射的目的是将药液注射于直肠脱垂返折沟的下部周围。以截石位3、6、9点距肛门1.5 cm处为注射进针点。结果25例1次治愈,治愈率100%,随访3年,未见复发。可见,注射方法如注射的部位与用药量会对疗效有重要影响。针对重度脱垂患者(II度、III度)加用直肠外注射,不但减少了感染几率,而且加强了直肠与周围组织的粘连固定,明显提高手术后疗效。由上可见,只有对不同程度的直肠脱垂采用不同浓度、不同部位的消痔灵注射方法,才能取得较好的治疗效果。

对于儿童直肠脱垂,国外文献运用注射疗法治疗有较多报道,但尚无以消痔灵注射液治疗的报道,可能是因为消痔灵注射液尚不能进入国际市场之故。国内对于儿童直肠脱垂常采用直肠黏膜下点状注射法,必要时加用直肠周围间隙注射。席艳君等^[25]以消痔灵注射液行直肠黏膜下点状注射配合直肠间隙注射治疗小儿直肠脱垂32例;结果32例小儿患者均为一次性治愈,全部病例随访1-2年未见复发,无后遗症。叶平^[26]治疗小儿直肠脱垂20例,以消痔灵(1:1)注射液行黏膜下点状注射配合直肠间隙注射治疗;结果20例均一次性治愈,术后随访1年,无复发。

6 其他注射疗法

唐学刚等^[27]采用ZT医用黏涂胶注射于骨盆直肠间隙及直肠后间隙,治疗II度直肠脱垂13例。通过医用胶注入人体后产生强大的黏合力而将组织固定,达到治疗目的。术后无明显并发症,除2例需二次注射外,余11例均1次治愈,随访2年无复发。吕氏^[28]以补中益气注射液肛周注射加离子导入治疗脱肛134例,分别在距肛门2 cm的2、4、8、10点上,注射药液在耻骨直肠肌、肛提肌、耻骨尾骨肌之中,各注本品8-10 mL,小儿酌减,隔5 d注射1次,自第1次药物注射之日起,每日用离子导入仪治疗1次,每次25 min,治疗15-20 d,结果痊愈119例,有效12例,无效3例,总

有效率97.7%。

7 注射合并其他疗法

对于重度直肠脱垂,或有合并症的直肠脱垂,单纯注射有时难以取得最好的效果,同时配合一些简单治疗往往结果会更好,国内文献对此均有不少报道。闫曙华^[15]将消痔灵注射液和0.5%利多卡因按1:1配制,于3、6、9、12点行柱状注射,每针注药量5-10 mL,配合直肠远端肛直交界处3、7、11点分别结扎松弛的黏膜,并在结扎点之间的黏膜下注射药液,以收缩肛管治疗完全性直肠脱垂(Ⅱ、Ⅲ度)患者76例,结果治疗后14 d复查,76例均治愈。2 mo后复发2例,再次进行单纯注射治疗,7 d后症状消失。随访1年无复发。曾辉等^[29]对Ⅱ度或Ⅲ度直肠脱垂患者23例行1:1消痔灵稀释液点状注射及间隙注射加直肠黏膜多点结扎法治疗,结果23例出院时均痊愈,平均住院8.9 d。跟踪随访1-2年,均未见直肠肛门狭窄、结肠功能紊乱、排便障碍、性功能减退等后遗症,其中,痊愈22例,好转1例。23例中肛门括约功能亦均较治疗前有不同程度的改善。彭文等^[30]采用消痔灵稀释液(消痔灵与生理盐水按1:1配制)20 mL注射双侧骨盆直肠间隙结合吻合器直肠黏膜环切术(PPH术)治疗完全性直肠脱垂(Ⅰ、Ⅱ度)13例,结果13例患者术后排便顺畅,无肿物脱出,基本无痛苦,或仅有轻度坠胀感。结果全部达到治愈,无并发症及后遗症,随访1-6年无复发。侯超峰等^[31]采用1:1消痔灵注射液直肠周围三间隙注射,每个间隙注药10-15 mL,加PPH术治疗完全性直肠脱垂患者,结果28例患者术后首次排便即无脱出,完全回缩。术后随访半年,痊愈率96.43%,总有效率100%。全组无肛门失禁、大出血、肛周感染及肛管狭窄等。姚健等^[32]采用连接式黏膜下注射、直肠周围间隙注射、肛门紧缩术综合治疗三度直肠脱垂,所谓连接式注射,即以1:1消痔灵注射直肠乙状结肠交界处,然后沿直肠上段到下段直至脱出肛外,以加强直肠上段黏膜下层的粘连注射,复位后再注射直肠下端黏膜下层及直肠周围间隙。结果15例全部临床治愈,随访11例,10例2-8年无复发,1例半年后轻度复发,失访4例。罗虎^[33]采用黏膜下注射加肛门环缩术治疗完全性直肠脱垂38例,结果治愈率为95%,明显高于采用单纯黏膜下注射治疗或单纯肛门环缩术的79%治愈率。孙芳华^[34]采用消痔灵直肠黏膜下网格状注射、肛周间隙柱状注射加外括约肌

折叠术的方法治疗Ⅱ-Ⅲ度老年性直肠脱垂35例,结果经治疗后34例治愈,1例糖尿病患者因切口感染,拆除缝线充分引流后治愈,术后部分患者有不同程度的下坠感,但均于1 wk左右消失,术后所有病例均无出血,无脱出,无直肠黏膜坏死,无肛门狭窄。经随访1-6年,治愈33例,2例于术后半年内出现黏膜不全脱垂,经再次注射消痔灵后治愈。邵风等^[35]采用三联术(直肠黏膜柱状结扎术+缩肛术+消痔灵注射术)治疗直肠脱垂32例,结果全部患者均近期治愈,平均疗程17 d,随访0.5-2.0年均无复发,亦未见术后并发症和后遗症。陈萌等^[36]采用改进的三联术(直肠黏膜排列结扎术+肛门环缩术+消痔灵周围注射术)治疗完全性直肠脱垂患者25例,结果25例患者全部治愈,无1例复发,效果满意。注射疗法的合并治疗还包括中药方剂内服与药物熏洗^[37,38]、或配合针灸治疗等多种中西医结合方法治疗,术后治愈率为84.6%-100.0%,总体有效率达到100%。

由于直肠脱垂发病机制较为复杂,致使治疗方法的多样化,从不同方面解决了直肠脱垂的问题。如直肠黏膜多点结扎既可以有效紧缩和固定松弛脱垂的黏膜,同时又在侧壁脱垂的黏膜下层形成多处点状瘢痕带,具有瘢痕固定、对抗肠套叠的作用。PPH术直接切除了多余松弛的直肠黏膜,缩窄了直肠腔,同时钛钉的刺激也会使黏膜与肌层紧密粘连,强化直肠全层。肛门紧缩术适用于肛门收缩无力或肛门已松弛的直肠脱垂患者,尤其是老年体弱不适合较大手术者,肛门缩紧后不但使松弛的肛门紧缩,而且加强了括约肌的张力,同时环缩线还对直肠起着支撑的作用。外括约肌折叠术的方法是针对老年人直肠黏膜松弛、肠腔扩大伴有肛门松弛、收缩乏力甚至肛门失禁的患者而设计的,肛门外括约肌折叠术的优点是不埋置异物,避免了异物反应和无菌性炎症瘢痕造成的周围组织弹性的丧失,有效防止了术后肛门狭窄的发生,可最大限度地保护肛管的正常生理功能,还可以增强括约肌的张力,能使肛门位置适度前移,肛直角变钝,从而增强盆底对直肠的承托作用。总之,单纯注射疗法,由于注射浓度,剂量等掌握不好,术后效果可能不佳,或产生严重并发症,若配合PPH术、结扎疗法、肛门环缩术、外括约肌折叠术等可减少手术并发症,并能提高手术疗效。

■创新盘点

本文所涉及的内容基本涵盖了注射治疗直肠脱垂的研究现状,系统研究注射疗法,全面客观评价各注射疗法的优劣、疗效及其存在问题,对临床实践有一定的指导意义。

■应用要点

注射疗法治疗直肠脱垂的可选药物较多,注射方法亦多种多样,但以消痔灵注射疗法认可度最高,近期疗效肯定,其缺点是仍存在着一定的复发率,可根据患者的不同情况,选择相应的注射方法,制定出个性化的诊疗方案以提高疗效、降低复发率。

8 存在的问题

从文献报道来看,我们认为注射疗法尚存在以下问题有待解决。一是缺少完美的注射药物,目前国内能够使用且效果较好的就只有消痔灵注射液,更好的药物则有待开发;二是注射方法尚不完善,目前的注射方法主要包括两大部分,即黏膜下层注射与直肠周围间隙注射,有些作者注射部位或仅限于黏膜下,或仅限于直肠周围间隙的两侧与后侧,对于直肠前方的注射男性因有前列腺与精囊腺,女性因有直肠阴道隔,怕误伤这些组织而不敢注射;三是现有的直肠脱垂分类与分度标准,对指导直肠脱垂的治疗针对性不强;因为直肠脱垂往往合并其他盆底功能障碍性疾病,如子宫阴道脱垂、膀胱脱垂、便秘与大便失禁等;四是现有的临床研究样本量偏少,随访时间偏短,尚缺少大样本、前瞻性、长期的随机对照或队列研究;五是注射疗法治疗直肠脱垂的作用机制尚未搞清,致使医师对注射方法、注射部位、药物浓度与用量及其与疗效的关系把握不准,从而影响了临床疗效,甚至会出现一些并发症;六是复发,这是注射疗法存在的主要问题,据报道注射疗法的整体复发率16%^[39],据我们观察远高于此概率,尤其是对于女性合并子宫脱垂的患者;七是注射后的后遗症问题,如大便失禁,肛门直肠坠胀与疼痛,便秘等。如何解决上述问题,有待肛肠医务工作者继续努力。

9 结论

注射疗法治疗直肠脱垂具有创伤小,经济,安全,疗效肯定,而且易于操作的特点,适合在各级医院开展,患者易于接受,便于临床推广。特别是消痔灵注射疗法,即使大剂量注射亦未出现严重并发症,可作为直肠脱垂的首选治疗方法。注射疗法近期疗效肯定,如果能够解决复发的问題,也就解决了直肠脱垂治疗的根本问题。各种合并疗法从不同层面固定脱垂的直肠,避免了单一术式的局限性和片面性,所以,根据患者的不同情况,选择不同的治疗方法,制定出个性化的诊疗方案,可能是今后相当长时间内直肠脱垂研究的一个重要方向。

10 参考文献

- Marchal F, Bresler L, Ayav A, Zarnegar R, Brunaud L, Duchamp C, Boissel P. Long-term results of Delorme's procedure and Orr-Loygue rectopexy to treat complete rectal prolapse. *Dis Colon Rectum*

- 2005; 48: 1785-1790
- 丘禹洪, 吴文华. 乙醇直肠周围注射治疗小儿直肠脱垂32例. *广东医学院学报* 1997; 15: 149-150
- Bahador A, Foroutan HR, Hosseini SM, Davani SZ. Effect of submucosal alcohol injection on prolonged rectal prolapse in infants and children. *J Indian Assoc Pediatr Surg* 2008; 13: 11-13
- 徐东升. 50%葡萄糖点状注射治疗肛管直肠脱垂11例. *苏州大学学报(医学版)* 2003; 23: 463-467
- 王长江, 朱文强. 鱼肝油酸钠注射治疗直肠脱垂38例. *中国中西医结合外科杂志* 1998; 4: 356-357
- Zganjer M, Cizmic A, Cigit I, Zupancic B, Bumci I, Popovic L, Kljenak A. Treatment of rectal prolapse in children with cow milk injection sclerotherapy: 30-year experience. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 737-740
- Sasaki Y, Iwai N, Kimura O, Hibi M. The treatment of rectal prolapse in children with phenol in almond oil injection. *Eur J Pediatr Surg* 2004; 14: 414-417
- Shah A, Parikh D, Jawaheer G, Gornall P. Persistent rectal prolapse in children: sclerotherapy and surgical management. *Pediatr Surg Int* 2005; 21: 270-273
- 任贵全, 王铭. 芍倍注射液治疗老年直肠脱垂的临床体会. *中国老年保健医学* 2005; 3: 42-44
- 于铎. 复方明矾注射液治疗直肠脱垂63例. *中医药信息* 1999; 35-36
- 李华山, 李国栋. 消痔灵双层四步注射治疗成人完全性直肠脱垂117例. *大肠肛门病外科杂志* 2003; 9: 183-184
- 李华山, 李国栋, 李东冰, 王春晓, 王晓锋, 景建中, 寇玉明, 张建华, 胡占岭. 消痔灵双层四步注射治疗完全性直肠脱垂临床疗效评价. *首都医科大学学报* 2006; 27: 789-791
- 韩宝, 聂广军. 消痔灵注射治疗直肠脱垂266例. *人民军医* 2008; 51: 165
- 李日增. 注射法治疗直肠脱垂46例临床观察. *医学信息* 2010; 5: 497-498
- 闫曙华. 直肠黏膜下层柱状注射术加肛门结扎瘢痕固定治疗直肠脱垂体会. *现代中西医结合杂志* 2008; 17: 5274
- 张志涛. 直肠高低位注射治疗直肠脱垂25例疗效观察. *中国社区医师(医学专业)* 2010; 12: 97
- Hachiro Y, Kunitomo M, Abe T, Kitada M, Ebisawa Y. Aluminum potassium sulfate and tannic acid injection in the treatment of total rectal prolapse: early outcomes. *Dis Colon Rectum* 2007; 50: 1996-2000
- Abeş M, Sarihan H. Injection sclerotherapy of rectal prolapse in children with 15 percent saline solution. *Eur J Pediatr Surg* 2004; 14: 100-102
- Fahmy MA, Ezzelrab S. Outcome of submucosal injection of different sclerosing materials for rectal prolapse in children. *Pediatr Surg Int* 2004; 20: 353-356
- 李新, 李益人. 复方明矾液治疗直肠脱垂. *深圳中西医结合杂志* 1998; 8: 36
- 杨伟. 复方明矾注射液治疗小儿直肠脱垂123例. *广西中医药* 1999; 22: 30-31
- 吴丹妮. 硬化剂注射治疗小儿直肠脱垂60例. *云南中医中药杂志* 2001; 22: 11
- 沈红. 自拟脱肛液局部注射治疗小儿直肠脱垂290例报告. *山东医药* 2005; 45: 78
- 罗亨卿. 30例婴幼儿直肠脱垂枯矾注射治疗的分析. *湖北医科大学学报* 1996; 12: 289-290
- 席艳君, 党红民, 陈波, 吴学刚. 消痔灵注射治疗小儿直肠脱垂症32例. *陕西中医* 2009; 30: 812-813
- 叶平. 消痔灵注射治疗小儿直肠脱垂20例. *实用中西医结合临床* 2007; 7: 6

- 27 唐学刚, 王加记. 医用胶治疗直肠脱垂13例体会. 临床外科杂志 1999; 7: 172
- 28 吕明忠, 黄雪玉, 李岚岚. 补中益气注射液肛周注射加离子导入治疗脱肛134例. 北京中医 1994; (4): 12
- 29 曾辉, 李柳生, 张璇. 注射加结扎治疗Ⅱ-Ⅲ度直肠脱垂的临床观察. 中国医药导报 2008; 5: 60-61
- 30 彭文, 刘宗荣, 魏荣辉, 龚颖生, 刘恒良. 直肠周围间隙硬化剂注射结合PPH手术治疗直肠脱垂13例. 中医药导报 2010; 16: 65
- 31 侯超峰, 陈红跃, 张大. 吻合器痔上黏膜环切术(PPH)加直肠周围硬化剂注射治疗直肠脱垂28例观察. 河南外科学杂志 2010; 16: 7-8
- 32 姚健, 宋天豹, 钟开伦, 穆云, 王顺和. 黏膜下层连接式注射及直肠外注射加肛门缩窄术治疗Ⅲ度直肠脱垂的临床体会. 西部医学 2008; 20: 781-782
- 33 罗虎. 黏膜下注射加肛门环缩术治疗直肠脱垂38例. 实用医技杂志 2008; 15: 3574-3575
- 34 孙芳华. 消痔灵注射加外括约肌折叠术治疗老年性直肠脱垂的疗效分析. 实用心脑血管病杂志 2009; 17: 857-858
- 35 邵凤, 于冬青. 三联术治疗直肠脱垂32例. 中国民间疗法 2005; 13: 61-62
- 36 陈萌, 于永铎. 改进的成人直肠脱垂经肛三联术的临床研究. 结直肠肛门外科 2009; 15: 255-256
- 37 孙真理, 杨刚. 内外治、注射疗法治疗直肠脱垂26例临床观察. 中国现代医生 2008; 46: 81-82
- 38 刘国军. 中西医结合治疗直肠脱垂50例临床观察. 国医论坛 2007; 22: 35-36
- 39 徐洋. 刘希家教授治疗成人直肠脱垂的临床经验. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2009: 1-23

■同行评价

本文论述全面, 条理清晰, 对临床医师有较好的借鉴和学习价值.

编辑 李薇 电编 何基才

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

● 消息 ●

《世界华人消化杂志》正文要求

本刊讯 本刊正文标题层次为 0 引言; 1 材料和方法, 1.1 材料, 1.2 方法; 2 结果; 3 讨论; 4 参考文献. 序号一律左顶格写, 后空1格写标题; 2级标题后空1格接正文. 以下逐条陈述: (1)引言 应包括该研究的目的和该研究与其他相关研究的关系. (2)材料和方法 应尽量简短, 但应让其他有经验的研究者能够重复该实验. 对新的方法应该详细描述, 以前发表过的方法引用参考文献即可, 有关文献中或试剂手册中的方法的改进仅描述改进之处即可. (3)结果 实验结果应合理采用图表和文字表示, 在结果中应避免讨论. (4)讨论 要简明, 应集中对所得的结果做出解释而不是重复叙述, 也不应是大量文献的回顾. 图表的数量要精选. 表应有表序和表题, 并有足够具有自明性的信息, 使读者不查阅正文即可理解该表的内容. 表内每一栏均应有表头, 表内非公知通用缩写应在表注中说明, 表格一律使用三线表(不用竖线), 在正文中该出现的地方应注出. 图应有图序、图题和图注, 以使其容易被读者理解, 所有的图应在正文中该出现的地方注出. 同一个主题内容的彩色图、黑白图、线条图, 统一用一个注解分别叙述. 如: 图1 萎缩性胃炎治疗前后病理变化. A: …; B: …; C: …; D: …; E: …; F: …; G: … 曲线图可按●、○、■、□、▲、△顺序使用标准的符号. 统计学显著性用: ^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ ($P>0.05$ 不注). 如同一表中另有一套 P 值, 则¹ $P<0.05$, ² $P<0.01$; 第3套为³ $P<0.05$, ⁴ $P<0.01$. P 值后注明何种检验及其具体数字, 如 $P<0.01$, $t=4.56$ vs 对照组等, 注在表的左下方. 表内采用阿拉伯数字, 共同的计量单位符号应注在表的右上方, 表内个数、小数点、±、-应上下对齐. “空白”表示无此项或未测, “-”代表阴性未发现, 不能用同左、同上等. 表图勿与正文内容重复. 表图的标目尽量用 t/min , $c/(\text{mol/L})$, p/kPa , V/mL , $t/^\circ\text{C}$ 表达. 黑白图请附黑白照片, 并拷入光盘内; 彩色图请提供冲洗的彩色照片, 请不要提供计算机打印的照片. 彩色图片大小 $7.5\text{ cm}\times 4.5\text{ cm}$, 必须使用双面胶条粘贴在正文内, 不能使用浆糊粘贴. (5)致谢 后加冒号, 排在讨论后及参考文献前, 左齐.

5-HT及电刺激对胃节律紊乱模型新西兰白兔胃电活动的影响

黄伟锋, 张慧, 欧阳守, 卢春敬

■背景资料

胃节律紊乱综合征(GDS)是胃运动功能(动力)性疾病中最主要的征候群,有明显胃病症状,但纤维胃镜、X线等检查均不能发现病变,但EGG检查却表明有基本电节律(BER)的改变,主要为各种节律失常及波幅变化无常。初步证实胃电图对功能(动力)性胃病的检查、诊断和治疗具有重要价值。

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

卢春敬, 厦门市妇幼保健院输血科 福建省厦门市 361003

福建省科技厅重点基金资助项目, No. 2009D026

福建省卫生厅青年科研课题基金资助项目, No. 2009-2-89, No. 2010-2-112

作者贡献分布: 黄伟锋与张慧对此文所作贡献均等; 此课题由黄伟锋、张慧、欧阳守设计; 研究过程由张慧、黄伟锋、卢春敬操作完成; 研究相关分析工具由黄伟锋、张慧提供; 数据分析由黄伟锋、张慧、卢春敬完成; 本论文写作主要由黄伟锋完成; 欧阳守指导课题研究完成。

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

电话: 0592-5957214 传真: 0592-5957214

收稿日期: 2011-06-01 修回日期: 2011-08-16

接受日期: 2011-08-17 在线出版日期: 2011-08-18

Effect of 5-HT and electrical stimulating on gastric electric activity in rabbits with gastric dysrhythmia

Wei-Feng Huang, Hui Zhang, Shou Ouyang,
Chun-Jing Lu

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

Chun-Jing Lu, Xiamen Maternity and Child Health Care Hospital, Xiamen 361003, Fujian Province, China

Supported by: the Key Project of Department of Science and Technology of Fujian Province, China, No. 2009D026, and the Youth Foundation of Health Department of Fujian Province, Nos.2009-2-89 and 2010-2-112

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

Received: 2011-06-01 Revised: 2011-08-16

Accepted: 2011-08-17 Published online: 2011-08-18

Abstract

AIM: To evaluate the effect of 5-hydroxytryptamine (5-HT) and electrical stimulation on gastric electric activity (GEA) in rabbits with gastric dysrhythmia (GD).

METHODS: GD was induced in rabbits by peripheral injection of glucagon. Peripheral injection of 5-HT, gastric pacemaking, and electrical stimulation of the paraventricular nucleus (PVN) and raphe magnus (RM, P7) were performed in GD rabbits. Four pairs of bipolar Ag-AgCl elec-

trodes implanted on the serosa along the gastric greater curve were used for recording GEA. The stimulation of PVN and RM was carried out using brain stereotaxis apparatus (SN-2). The analyzed parameters included frequency (F), phase difference (PD), ratio of negative PD (RNPD) and corresponding rate of waves (CRW).

RESULTS: The F of GEA in the gastric corpus 2 increased (from 4.29 ± 0.60 to 4.56 ± 0.59 , $P = 0.05$) and that in the gastric antrum decreased (from 4.54 ± 0.51 to 4.27 ± 0.44 , $P = 0.013$) in GD rabbits. Injection of 500 μ g 5-HT accelerated the F of GEA in the gastric corpus 1 (from 4.06 ± 0.45 to 4.25 ± 0.37 , $P = 0.031$), corpus 3 (from 4.32 ± 0.51 to 4.58 ± 0.36 , $P = 0.041$) and gastric antrum (from 4.54 ± 0.47 to 4.73 ± 0.44 , $P = 0.017$) and improved the CRW in the gastric corpus 3 (from 0.78 ± 0.13 to 0.83 ± 0.10 , $P = 0.030$) in GD rabbits. The F of GEA in the gastric corpus 3 was (from 4.27 ± 0.53 to 4.52 ± 0.47 , $P = 0.022$) increased by gastric pacing. Electrical stimulation of PVN decreased the F of GEA in the gastric corpus 3 (from 4.47 ± 0.44 to 4.14 ± 0.46 , $P = 0.046$) and gastric antrum (from 4.05 ± 0.54 to 3.69 ± 0.55 , $n = 12$, $P = 0.039$), increased the RNPD in the gastric antrum (from 0.32 ± 0.19 to 0.40 ± 0.19 , $P = 0.046$), and greatly inhibited GEA in GD rabbits. Electrical stimulation of P7 slowed the F of GEA in the gastric antrum (from 4.31 ± 0.44 to 3.86 ± 0.47 , $P = 0.012$) in GD rabbits.

CONCLUSION: A rabbit model of GD has been successfully developed by injection of glucagon. Peripheral injection of 500 μ g 5-HT and gastric pacemaking prominently improved the waves of GEA. Electrical stimulation of the PVN and RM decreased the F of GEA in GD rabbits, which demonstrate that there exists a "descending inhibition system" in the centre nervous system.

Key Words: Gastric dysrhythmia; 5-HT; Electrical stimulation; Gastric electric activity; Rabbit

Huang WF, Zhang H, Ouyang S, Lu CJ. Effect of 5-HT and electrical stimulating on gastric electric activity in rabbits with gastric dysrhythmia. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(23): 2486-2491

■同行评议者

任超世, 研究员, 中国医学科学院生物医学工程研究所; 曹鹏, 副研究员, 江苏省中医药研究院细胞与分子生物学实验室

摘要

目的: 观察5-HT及电刺激对胃节律紊乱模型新西兰白兔胃电活动的影响。

方法: 对以胰高血糖素造模的新西兰白兔胃节律紊乱模型采用外周注射5-HT、胃起步点起搏, 电刺激室旁核和中缝大核(P7)的方法, 四导胃浆膜电信号同步记录, 分析胃体、及胃窦部胃电信号的平均频率, 相位差, 负相位比率, 波形对应率, 幅度等指标, 考察5-HT及电刺激对胃节律紊乱模型新西兰白兔胃电活动的影响。

结果: (1)胰高血糖素外周注射, 胃体2频率加快($4.29 \pm 0.60 \rightarrow 4.56 \pm 0.59$, $P = 0.05$), 胃窦频率减慢($4.54 \pm 0.51 \rightarrow 4.27 \pm 0.44$, $P = 0.013$), 胃节律紊乱模型建立成功; (2)胃节律紊乱模型外周注射500 μg 5-HT后频率均加快(胃体1: $4.06 \pm 0.45 \rightarrow 4.25 \pm 0.37$, $P = 0.031$; 胃体3: $4.32 \pm 0.51 \rightarrow 4.58 \pm 0.36$, $P = 0.041$; 胃窦: $4.54 \pm 0.47 \rightarrow 4.73 \pm 0.44$, $P = 0.017$), 波形对应率变好(胃体3: $0.78 \pm 0.13 \rightarrow 0.83 \pm 0.10$, $P = 0.030$); (3)胃节律紊乱模型胃起搏后频率均加快, 胃体3($4.27 \pm 0.53 \rightarrow 4.52 \pm 0.47$, $P = 0.022$); (4)胃节律紊乱模型室旁核电刺激能进一步减慢频率, 胃体3($4.47 \pm 0.44 \rightarrow 4.14 \pm 0.46$, $P = 0.046$)、胃窦($4.05 \pm 0.54 \rightarrow 3.69 \pm 0.55$, $P = 0.039$)差异显著, 胃窦负相位比率升高($0.32 \pm 0.19 \rightarrow 0.40 \pm 0.19$, $P = 0.046$)。单纯室旁核电刺激抑制胃电, 进一步证实中枢存在“下行性抑制系统”; (5)胃节律紊乱模型P7电刺激后胃窦频率减慢($4.31 \pm 0.44 \rightarrow 3.86 \pm 0.47$, $P = 0.012$)。

结论: 外周注射胰高血糖素后, 胃节律紊乱模型建立成功。外周注射5-HT 500 μg 或胃起步点起搏后节律趋向正常, 浆膜胃电波形转好; 室旁核和P7电刺激则进一步减慢胃电频率, 可能是下行性抑制系统在发挥作用。

关键词: 胃节律紊乱; 5-羟色胺; 电刺激; 浆膜胃电活动; 新西兰白兔

黄伟锋, 张慧, 欧阳守, 卢春敬. 5-HT及电刺激对胃节律紊乱模型新西兰白兔胃电活动的影响. 世界华人消化杂志 2011; 19(23): 2486-2491
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2486.asp>

0 引言

胃电图(electrogastrogram, EGG)是以电极置于腹部体表胃体投影位置记录的胃电活动信号。胃节律紊乱综合征(gastric dysrhythmia symptom,

GDS)是胃运动功能(动力)性疾病中最主要的征候群, 临床十分常见^[1], 有明显胃病症状, 但纤维胃镜、X线等检查均不能发现病变, 但EGG检查却表明有基本电节律(basic electrical rhythm, BER)的改变, 主要为各种节律失常及波幅变化无常^[2]。初步证实胃电图对功能(动力)性胃病的检查、诊断和治疗具有重要价值^[3]。5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)是参与调节胃肠道运动和分泌功能的重要神经递质, 5-HT信号系统异常与胃肠道功能性疾病密切相关^[4]。中枢神经系统对胃肠运动的调控起重要作用。当体内环境变化时, 中枢调节能够使胃肠的运动与人体各个器官系统之间的活动保持动态平衡, 胃肠各段的运动、消化液的分泌、吸收、排泄等功能, 在空间和时间上能保持协调一致。20世纪80年代前后曾经有过一些有关中枢对消化系统运动调控的研究, 但目前研究较少, 以日本学者居多, 国内仅3-4家单位。本实验以胰高血糖素造模胃节律紊乱的新西兰白兔为对象, 采用外周注射5-HT、胃起步点起搏, 电刺激室旁核和中缝大核(P7)的方法, 考察5-HT及电刺激对胃节律紊乱模型新西兰白兔胃电活动的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 健康新西兰白兔25只, 雌雄不限, 体重 $2.0 \text{ kg} \pm 0.2 \text{ kg}$, 中国生旺实验动物养殖有限公司, 生产许可证号: SCXK(沪)2002-0011, 分笼饲养。5-HT、胰高血糖素购自Sigma公司, 氯醛糖、乌拉坦等其他试剂为国产分析纯。实验主要仪器有MP100WSW十六导生理工作站, 四导EGG放大器(美国Biopac公司), WD-5型双路数显胃肠生物电治疗仪(自行研制), 八通道数码触摸式液晶显示刺激器(美国MPI公司DS8000), SN-2型脑部立体定位仪(日本成茂)。

1.2 方法

1.2.1 手术: 健康新西兰白兔, 术前禁食18 h以上, 自由饮水。兔耳缘静脉注射40 mg/kg氯醛糖与0.5 g/kg乌拉坦混合液。兔腹部剪毛后, 从剑突下2 cm沿腹白线作1个约10 cm的纵行切口, 尽量避开血管, 钝性分离, 暴露大部分胃。胃浆膜下植入双极电极, 共埋五对。第一对为刺激电极, 白金丝自制成针形, 埋于胃起步点上方, 负极在尾端, 正极在头端。另外四对为记录电极, 为Ag-AgCl针形电极, 直径1 mm, 分别埋在胃起步点下方(胃体1)、胃大弯处(胃体2)、胃大弯与胃窦之间(胃体3)和胃窦(胃体4)。每对电极的双极间

■研究前沿

目前, 对PVN在应激性胃溃疡和应激高血压发病中的作用、外周5-HT对胃肠道的作用等方面做了较深入研究, 故本文以浆膜胃电各指标(包括独创的相位差指标)为研究对象, 就外周注射5-HT及胃起搏、电刺激中枢核团对胃电的影响进行相关研究。

■ 相关报道

Deponti等研究发现5-HT可促进胃肠道运动,使移行性复合运动波(MMC)出现次数增多,并可导致内脏痛觉敏感。本课题组及其他同行前期研究发现胃肠起搏可以改善紊乱的胃肠电多个指标和功能性胃肠道疾病的临床症状。而关于中枢与胃肠运动的关系研究主要集中在上世纪80、90年代。

表 1 正常胃电 ($n = 20$)

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

表 2 造模前后胃电 ($n = 21$)

	频率		相位差		负相位比率		波形对应率	
	前	后	前	后	前	后	前	后
胃体1	4.24 ± 0.13	4.17 ± 0.12	—	—	—	—	0.87 ± 0.03	0.87 ± 0.03
胃体2	4.29 ± 0.13	4.56 ± 0.13	1.67 ± 0.55	2.27 ± 0.49	0.37 ± 0.47	0.31 ± 0.41	0.79 ± 0.02	0.81 ± 0.02
胃体3	4.45 ± 0.11	4.43 ± 0.12	1.43 ± 0.53	1.14 ± 0.42	0.39 ± 0.49	0.40 ± 0.04	0.83 ± 0.03	0.81 ± 0.03
胃窦	4.54 ± 0.11	4.27 ± 0.10^a	1.78 ± 0.38	1.63 ± 0.43	0.34 ± 0.04	0.37 ± 0.05	0.81 ± 0.02	0.79 ± 0.03

^a $P < 0.05$ vs 对照组。

距离大约3-5 mm, 沿着胃环形肌方向与纵形肌相垂直, 用缝线作2点固定。连接4对浆膜胃电电极到MP100WSW 16导生物信号采集分析系统, 动物术后恢复2-3 h。整个实验过程耳缘静脉缓慢滴注生理盐水输液。

1.2.2 脑定位: 将兔头部固定于脑立体定位仪上, 剪去颅顶毛。按脑立体定位图谱定位室旁核PVN(坐标: AP 0.0 mm, L(R) ± 0.5 mm, H 13.5 mm)和P7。用微型电钻在颅顶延人字缝, 分别在PVN和Rm(P7)钻出2个小洞(尽量不要弄破脑膜, 使脑部少出血)以备刺激电极的插入。部分动物采用开颅、吸小脑、直接暴露第IV脑室的方法, 直观直接定位。颅顶钻孔的动物, 实验结束时, 开颅吸除小脑, 以观察证实脑电极的真实定位。

1.2.3 实验记录: (1)动物恢复一段时间后, 记录一段浆膜胃电, 作为对照; (2)耳缘静脉注射胰高血糖素建立新西兰白兔胃节律紊乱模型, 记录浆膜胃电变化; (3)耳缘静脉注射500 μ g 5-HT记录浆膜胃电前后变化; (4)待5-HT作用消失后行胃起步点电刺激记录浆膜胃电前后变化, 刺激频率比实验动物正常胃电频率大0.3-0.5(cycle per min, cpm); (5)室旁核电刺激记录浆膜胃电前后变化; (6)中缝大核P7电刺激记录浆膜胃电前后变化。

1.2.4 观察参数: (1)相位差: 四导同时记录胃起步点(胃体1)、胃体2、胃体3、胃窦部胃电, 以同一波形在该导出现时相对于起步点出现时的时

间差计算, 如果远端波形落后于起步点者为正相位差, 先于起步点者为负相位差, 单位: s; (2)波形对应率: 各导记录的波形与起步点记录的波形, 互相对应的波数占整体出现波数的比值; (3)负相位比率: 在每个记录中, 负相位差出现的次数占该记录中相位差总个数的比率; (4)平均频率: 稳定记录15 min内平均每分钟出现波形的个数; (5)幅度(峰-峰, P-P)值。

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

2 结果

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

2.2 建立胃节律紊乱模型 耳缘静脉注射胰高血糖素后胃体2频率加快($4.29 \pm 0.60 \rightarrow 4.56 \pm 0.59$, $P = 0.05$), 胃窦频率减慢($4.54 \pm 0.51 \rightarrow 4.27 \pm 0.44$, $P = 0.013$), 胃节律紊乱模型建立成功(表2)。

2.3 外周注射5-HT 胃节律紊乱后, 外周注射500 μ g 5-HT频率均加快(胃体1: $4.06 \pm 0.45 \rightarrow 4.25 \pm 0.37$, $P = 0.031$; 胃体3: $4.32 \pm 0.51 \rightarrow 4.58 \pm 0.36$, $P = 0.041$; 胃窦: $4.54 \pm 0.47 \rightarrow 4.73 \pm 0.44$, $P = 0.017$), 波形对应率变好(胃体3: $0.78 \pm 0.13 \rightarrow 0.83 \pm 0.10$, $P = 0.030$, 表3)。

2.4 胃起搏 胃节律紊乱模型胃起搏后频率均加快, 胃体3($4.27 \pm 0.53 \rightarrow 4.52 \pm 0.47$, $P = 0.022$)差

■创新盘点

以胃浆膜电为研究对象, 观察5-HT及胃起搏、中枢电刺激对胃节律紊乱模型新西兰白兔胃电的影响, 进一步证实本实验室所提出的中枢同时存在“下行性抑制”和“下行性兴奋”两个系统共同调控消化道功能的概念以及胃肠起搏治疗功能性胃肠道疾病有良好的疗效。

表 3 外周注射5-HT对模型的影响 ($n = 16$)

	频率		相位差		负相位比率		波形对应率	
	前	后	前	后	前	后	前	后
胃体1	4.06 ± 0.11	4.25 ± 0.09 ^a	—	—	—	—	0.86 ± 0.03	0.96 ± 0.02
胃体2	4.16 ± 0.12	4.35 ± 0.14	1.61 ± 0.50	1.03 ± 0.48	1.31 ± 0.42	1.60 ± 0.36	0.75 ± 0.03	0.78 ± 0.03
胃体3	4.32 ± 0.13	4.58 ± 0.36 ^a	1.07 ± 0.37	1.18 ± 0.45	0.36 ± 0.03	0.43 ± 0.03	0.78 ± 0.03	0.83 ± 0.02 ^a
胃窦	4.54 ± 0.12	4.73 ± 0.11 ^a	0.31 ± 0.42	1.60 ± 0.36	0.37 ± 0.05	0.37 ± 0.30	0.79 ± 0.02	0.82 ± 0.02

^a $P < 0.05$ vs 注射5-HT前。

表 4 胃起搏对模型的影响 ($n = 14$)

	频率		相位差		负相位比率		波形对应率	
	前	后	前	后	前	后	前	后
胃体1	4.31 ± 0.20	4.26 ± 0.08	—	—	—	—	0.90 ± 0.03	0.91 ± 0.02
胃体2	4.27 ± 0.17	4.37 ± 0.06	1.64 ± 0.33	0.43 ± 0.65	0.35 ± 0.03	0.39 ± 0.11	0.79 ± 0.02	0.91 ± 0.02 ^b
胃体3	4.27 ± 0.14	4.52 ± 0.13 ^a	1.33 ± 0.43	0.39 ± 0.27	0.35 ± 0.04	0.43 ± 0.05	0.80 ± 0.02	0.89 ± 0.02 ^a
胃窦	4.31 ± 0.16	4.38 ± 0.15	1.37 ± 0.42	1.70 ± 0.59	0.35 ± 0.04	0.38 ± 0.06	0.80 ± 0.03	0.86 ± 0.02

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 胃起搏前。

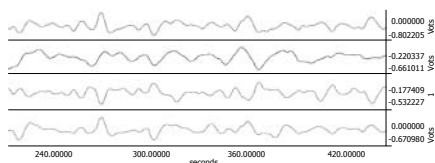


图 1 正常胃电。

异显著, 波形对应率改善(胃体2: $0.79 \pm 0.02 \rightarrow 0.91 \pm 0.02$, $P = 0.002$; 胃体3: $0.80 \pm 0.02 \rightarrow 0.89 \pm 0.02$, $P = 0.023$, 表4)。

2.5 室旁核电刺激 胃节律紊乱模型室旁核电刺激能进一步减慢频率, 胃体3($4.47 \pm 0.44 \rightarrow 4.14 \pm 0.46$, $P = 0.046$)、胃窦($4.05 \pm 0.54 \rightarrow 3.69 \pm 0.55$, $P = 0.039$)差异显著, 胃窦负相位比率升高($0.32 \pm 0.19 \rightarrow 0.40 \pm 0.19$, $P = 0.046$, 表5)。

2.6 P7电刺激 胃节律紊乱模型P7电刺激后胃窦频率减慢($4.31 \pm 0.44 \rightarrow 3.86 \pm 0.47$, $P = 0.012$, 表6)。

3 讨论

实验中兔正常胃电频率为3.48-3.77 cpm, 与以往实验结果相同, 说明在胃体埋植双极电极记录新西兰白兔胃电的方法是可靠的。相位差可能是表示胃电传导(扩布)的一个较好的指标。4导同时记录胃体起步点(胃体1)、胃体2、胃体3及胃窦部胃电, 如果远端波形先于起步点者即为负相位差, 说明胃电传导(扩布)异常, 相位差若

由负转正则说明胃电传导转向正常。欧阳守等有关胃肠起步点和胃肠起搏的研究证实, 胃肠各部都存在自主的、但接受中枢与肠神经系统(脑肠-轴)调控的起步点活动及其相位差^[5,6]。王礼建等^[7]在“延髓最后区(area postrema, AP)”的研究中证实, AP调控周期性发放的消化间期复合肌电锋电位的移行, 其作用途径是通过胃动素等实现的。许多实验都表明胃电传导(扩布)接受中枢胆碱能、肾上腺能或肽能神经元下行性抑制或下行性兴奋的调控^[8]。欧阳守等有关胃肠平滑肌细胞离子通道的实验证明, 钙、钾通道胃肠动力有着不可忽视的作用^[9,10], 以Cajal细胞(interstitial cells of Cajal, ICC)为原动力的肠肌丛在胃电传导(扩布)中起决定性的作用^[11]。可以肯定脑-肠轴共同对胃肠电的起源、传导(扩布)的精细调节, 是胃肠道正常功能活动的保障。

正常人体胃的基本胃节律来自胃大弯上部的起步点(pacemaker), 呈整齐而规则的慢波经胃体、胃窦纵环肌向幽门方向传播, 频率约为3 cpm。BER是恒定不变和始终存在的^[12]。有明显胃病临床症状的患者, 具有胃功能性和(或)器质性疾病以及其他能够导致胃节律紊乱的全身性疾病, EGG检查有各种胃节律异常, 即可诊断为GDS。可以使基本电节律(BER)的产生与传播发生节律紊乱的原因很多^[12,13]。(1)神经体液调节

■应用要点

以中枢为靶点,可以作为治疗胃肠道疾病的一个途径,胃肠起搏可以作为治疗功能性胃肠道疾病的新途径。

表 5 室旁核电刺激对模型的影响 ($n = 12$)

	频率		相位差		负相位比率		波形对应率	
	前	后	前	后	前	后	前	后
胃体1	3.70 ± 0.08	3.71 ± 0.09	—	—	—	—	0.82 ± 0.03	0.74 ± 0.03
胃体2	4.31 ± 0.18	4.34 ± 0.14	1.60 ± 0.43	1.19 ± 0.42	0.36 ± 0.04	0.42 ± 0.05	0.77 ± 0.03	0.80 ± 0.04
胃体3	4.47 ± 0.13	4.14 ± 0.13 ^a	1.65 ± 0.52	1.74 ± 0.40	0.36 ± 0.05	0.33 ± 0.03	0.78 ± 0.03	0.78 ± 0.02
胃窦	4.05 ± 0.16	3.69 ± 0.16 ^a	2.38 ± 0.53	1.41 ± 0.61	0.32 ± 0.05	0.40 ± 0.06 ^a	0.75 ± 0.03	0.74 ± 0.03

^a $P < 0.05$ vs 室旁核电刺激前。

表 6 P7电刺激对模型的影响 ($n = 14$)

	频率		相位差		负相位比率		波形对应率	
	前	后	前	后	前	后	前	后
胃体1	3.64 ± 0.10	3.76 ± 0.14	—	—	—	—	0.77 ± 0.03	0.83 ± 0.03
胃体2	4.68 ± 0.21	4.36 ± 0.25	1.01 ± 0.44	0.71 ± 0.58	0.42 ± 0.04	0.46 ± 0.05	0.74 ± 0.03	0.78 ± 0.02
胃体3	4.45 ± 0.10	4.26 ± 0.13	0.74 ± 0.33	1.26 ± 0.41	0.48 ± 0.04	0.42 ± 0.04	0.75 ± 0.03	0.77 ± 0.02
胃窦	4.31 ± 0.12	3.86 ± 0.13 ^a	2.10 ± 0.47	1.03 ± 0.45	0.39 ± 0.06	0.44 ± 0.04	0.74 ± 0.03	0.74 ± 0.03

^a $P < 0.05$ vs P7 电刺激前。

障碍:最主要的是胃兴奋性和抑制性神经传递介质比例失调。其他体液因素失常,还包括5-羟色胺、胰高血糖素、胰岛素等;(2)组织病理改变;(3)临床常见的疾病^[14,15]:胃功能性疾病;胃器质性疾病;全身性疾病;(4)药物影响:胰高血糖素、胰岛素等。本实验采用外周注射胰高血糖素建立新西兰白兔胃节律紊乱模型,造模后节律紊乱,胃体2频率加快,胃体1、3、胃窦减慢。

5-HT又称为血清素,是重要的神经递质,人体内95%的5-HT在胃肠道的肠嗜铬细胞及肠神经元中合成。5-HT通过与其受体相互作用,在胃肠动力、感觉和分泌中发挥重要作用。5-HT与肠道动力学和肠道敏感性的改变也有一定的关系。De Ponti等^[16]研究发现5-HT可促进胃肠道运动,使移行性复合运动波(migrating motor complex, MMC)出现次数增多,并可导致内脏痛觉敏感。故深入开展5-HT及其相关药物的研究,对临床上寻求更安全有效的药物具有重要临床意义。

本实验在胃节律紊乱模型新西兰白兔的耳缘静脉注射500 μ g 5-HT后频率均加快,波形对应率变好。胃起步点电刺激后频率均加快,波形对应率变好。提示,外周注射500 μ g 5-HT及胃起步点电刺激可使胃节律紊乱模型恢复正常。室旁核(PVN)在视上核的后上方第三脑室两侧,其细胞功能复杂,具有神经和体液双重调控功能,

是调节内脏活动的较高级中枢,他对生理及应激状态下的胃酸分泌、胃电和胃运动及各种原因所致的胃黏膜损伤具有广泛的调节作用^[17,18]。已有资料表明PVN是下丘脑功能最复杂的核团之一,与内脏活动关系密切。

中缝大核(nucleus raphe magnus, RM)是延脑后部中缝处的一个重要核团。在细胞组成方面, RM中存在有分别含5-羟色胺(5-HT)、P物质、脑啡肽及乙酰胆碱的细胞。许多含5-HT的细胞中还共存有P物质或脑啡肽,或5-HT和脑啡肽共存、5-HT和促甲状腺素释放激素(thyrotropin-releasing hormone, TRH)共存等。近年来的研究表明,中缝大核与内源性镇痛、血压、呼吸等功能调节有关,也有对胃肠功能调节的报道^[19,20]。

Rm对胃电活动的调节是通过下行性抑制途径而实现的,损毁Rm后猫的胃运动和胃电增强^[21]。此外,刺激Rm中线左右0.5 mm部位时,可引起胃电活动的兴奋效应,这表明延髓水平还存在一个“下行性兴奋系统”与下行性抑制系统相互配合,共同调节胃电活动及其他功能。张经济等^[22]在刺激尾核时也发现对狗的胃电快波和胃运动功能呈双相性影响。说明刺激延髓内侧网状结构可通过下行性抑制和下行性兴奋两条途径调节胃功能活动。

本实验在胃节律紊乱模型室基础上,室旁核

或中缝大核(P7)电刺激能进一步减慢频率, 相位差变小, 负相位比率升高. 以往的实验中, 单纯室旁核电刺激抑制胃电^[23], 本实验进一步证实中枢存在“下行性抑制系统”.

总之, 外周注射胰高血糖素后, 胃节律紊乱模型建立成功. 外周注射5-HT 500 μ g或胃起搏点起搏后节律趋向正常, 胃电波形转好. 室旁核和P7电刺激则进一步减慢频率, 可能是下行性抑制系统在发挥作用.

4 参考文献

- 1 李胜利, 郭宏春, 张梅. 治疗胃节律紊乱综合征临床探讨. 安徽中医临床杂志 1995; 7: 1-2
- 2 王万铁, 毛朝鸣. 胃节律紊乱综合征132例胃电分析. 临床医学 1997; 17: 16-17
- 3 王德山, 柴纪严, 闫醒予, 张立德, 张彦, 吕盈莹. 胃节律紊乱综合征性胃电图的临床研究. 锦州医学院学报 1997; 4: 23-24
- 4 丁健华, 傅传刚, 赵荣华. 五羟色胺在胃肠道功能性疾病中的研究现状. 世界华人消化杂志 2005; 13: 2405-2408
- 5 欧阳守. 胃肠起搏点. 科学(中文版) 1998; 12: 56-59
- 6 Shou Ouyang, You-Ping Zhang, Yue-Bin Lin, Jia-Jun Lin, Shi-Ying Li. Analysis of Phase Difference of Electrogastro-graphy. Program of Eighth International Workshop on Electrogastrography. San Diego, USA. May 2000: 41
- 7 王礼建, 周吕, 张春玥. 延髓最后区(AREA POSTREMA)对狗胃肠电活动的调节作用. 基础医学与临床 2001; 21: 85
- 8 王东岩, 刘志敏, 陈宝忠, 牛淑东. 中枢P物质参与电针对家兔胃运动、胃电的抑制效应. 针灸临床杂志 2000; 16: 53-55
- 9 李世英, 欧阳守. 豚鼠结肠平滑肌细胞L-型钙通道特性研究. 基础医学与临床 2003; 23: 109
- 10 黄伟锋, 欧阳守, 张慧. 豚鼠结肠平滑肌细胞大电导钙激活钾通道特性及氧化修饰的影响. 生理学报 2009; 61: 285-291
- 11 胡玉莲, 黄志华. Cajal间质细胞与胃肠起搏. 国际消化病杂志 2006; 26: 330-333
- 12 连志城, 欧阳守, 许冠荪, 陈国志. 胃肠电及胃肠动力研究在中国. 第1版. 广州: 华南理工大学出版社, 1997: 1-2, 355-365, 539-542, 751-731
- 13 齐惠滨, 罗金燕, 戴信刚, 王学勤. 糖尿病性胃轻瘫的动力学研究. 世界华人消化杂志 1997; 5: 661-662
- 14 Cucchiara S, Salvia G, Borrelli O, Ciccimarra E, Az-Zeqeh N, Rapagiolo S, Minella R, Campanozzi A, Riezzo G. Gastric electrical dysrhythmias and delayed gastric emptying in gastroesophageal reflux disease. *Am J Gastroenterol* 1997; 92: 1103-1108
- 15 Ko CW, Chang CS, Lien HC, Wu MJ, Chen GH. Gastric dysrhythmia in uremic patients on maintenance hemodialysis. *Scand J Gastroenterol* 1998; 33: 1047-1051
- 16 De Ponti F, Tonini M. Irritable bowel syndrome: new agents targeting serotonin receptor subtypes. *Drugs* 2001; 61: 317-332
- 17 Spiller R, Garsed K. Postinfectious irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2009; 136: 1979-1988
- 18 Michel K, Zeller F, Langer R, Nekarda H, Kruger D, Dover TJ, Brady CA, Barnes NM, Schemann M. Serotonin excites neurons in the human submucous plexus via 5-HT3 receptors. *Gastroenterology* 2005; 128: 1317-1326
- 19 陈香梅, 柳滨, 刘志敏. 中缝大核微量注射5-HT等药物对电针抑制胃运动、胃电的影响. 针灸临床杂志 2004; 4: 47-49
- 20 陈香梅, 柳滨, 刘志敏. 中缝大核内微量注射5-羟色胺、P物质等对家兔胃运动胃电的影响. 白求恩医学院学报 2004; 1: 5-7
- 21 欧阳守, 孙东, 许冠荪. 电针及刺激延脑中缝大核对猫胃电的影响. 生理学报 1983; 1: 34-41
- 22 张经济, 石守谦, 李碧春. 刺激尾核对狗胃电的影响. 生理学报 1981; 1: 88-91
- 23 张慧, 欧阳守, 黄伟锋. 5-HT及其阻断剂脑内微注射和微电刺激对家兔胃电活动的影响. 世界华人消化杂志 2009; 17: 3189-3196

■同行评价

本文行文流畅, 层次清晰, 以胃节律紊乱模型新西兰白兔为研究对象, 观察5-HT及电刺激对胃电活动的影响, 其结果对研究中枢神经系统与胃肠运动的调控作用有一定的参考价值, 学术价值较好.

编辑 何基才 电编 何基才

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》2011年开始不再收取审稿费

本刊讯 为了方便作者来稿, 保证稿件尽快公平、公正的处理, 《世界华人消化杂志》编辑部研究决定, 从2011年开始对所有来稿不再收取审稿费. 审稿周期及发表周期不变. (编辑部主任: 李军亮 2011-01-01)

肠道异位静脉曲张37例

姜国俊, 岳振东, 吴静, 刘福全, 林香春, 王振彪, 宫轲

■背景资料

肠道异位静脉曲张是各种门静脉高压的严重并发症, 但与食管胃底静脉曲张有许多不同, 其破裂出血占所有静脉曲张出血的1%-5%, 而且可能是致命的。

姜国俊, 吴静, 林香春, 首都医科大学附属北京世纪坛医院消化科 北京市 100038

岳振东, 刘福全, 首都医科大学附属北京世纪坛医院介入治疗科 北京市 100038

王振彪, 首都医科大学附属北京世纪坛医院肛肠科 北京市 100038

宫轲, 首都医科大学附属北京世纪坛医院基本外科 北京市 100038

作者贡献分布: 姜国俊、岳振东及吴静对此文所作贡献均等; 此课题由姜国俊、吴静、王振彪及宫轲设计; 内镜检查由姜国俊、吴静及林香春完成; 经颈静脉肝内门体系统支架分流术由岳振东与刘福全完成; 经皮肝穿肠系膜血管造影由岳振东、刘福全及宫轲全完成; 数据分析由姜国俊、岳振东、吴静及王振彪完成; 本论文写作由姜国俊、岳振东、吴静、刘福全、林香春、王振彪及宫轲完成。

通讯作者: 吴静, 主任医师, 教授, 100038, 北京市海淀区铁医路10号, 首都医科大学附属北京世纪坛医院消化科。

wujing36@163.com

电话: 010-63926372

收稿日期: 2011-07-08 修回日期: 2011-08-11

接受日期: 2011-08-16 在线出版日期: 2011-08-18

Ectopic varices in the gastrointestinal tract: an analysis of 37 cases

Guo-Jun Jiang, Zhen-Dong Yue, Jing Wu, Fu-Quan Liu, Xiang-Chun Lin, Zhen-Biao Wang, Ke Gong

Guo-Jun Jiang, Jing Wu, Xiang-Chun Lin, Department of Gastroenterology, Beijing Shijitan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100038, China

Zhen-Dong Yue, Fu-Quan Liu, Department of interventional therapy, Beijing Shijitan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100038, China

Zhen-Biao Wang, Department of Chinese Anus & Intestine, Beijing Shijitan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100038, China

Ke Gong, Department of General Surgery, Beijing Shijitan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100038, China

Correspondence to: Professor Jing Wu, Department of Gastroenterology, Beijing Shijitan Hospital, Capital Medical University, 10 Tieyi Road, Haidian District, Beijing 100038, China. wujing36@y163.com

Received: 2011-07-08 Revised: 2011-08-11

Accepted: 2011-08-16 Published online: 2011-08-18

Abstract

AIM: To investigate the incidence and causes of ectopic varices (EV) in the gastrointestinal tract and to analyze the relationship between EV and portal hypertension (PH).

METHODS: The clinical data for 37 patients

with EV in the gastrointestinal tract were retrospectively analyzed. Of these patients, 26 were diagnosed by endoscopic examination, 10 during transjugular intrahepatic portosystemic stent shunt (TIPSS) procedures, and one by percutaneous transhepatic inferior mesenteric venography. The diagnosis of PH was based upon the finding of portal vein dilatation in patients with hepatic cirrhosis (HC) and extrahepatic portal vein obstruction (EPVO) in patients without cirrhosis. Portal pressure was measured directly in patients who underwent TIPSS.

RESULTS: Patients with EV in the gastrointestinal tract were infrequently seen, representing 0.09% (26/28 967) of all patients undergoing endoscopic examination. Of all 37 cases of EV in the gastrointestinal tract, 6 occurred in the duodenum, 11 in the small intestine, 4 in the colon, and 16 in the anorectal region. In patients undergoing TIPSS, portal pressure ranged between 3.18 and 6.13 kPa, with a mean value of $4.07 \text{ kPa} \pm 0.92 \text{ kPa}$. The etiology of PH was HC in 26 cases and EPVO in 4 cases. In the remaining 7 cases, a specific cause had not been determined.

CONCLUSION: EV in the gastrointestinal tract is a rare condition, occurring most commonly in the duodenum, colon, and anorectal region. PH is the primary cause of EV, often resulting from HC and EPVO. Both EV and PH may be easily overlooked, and EV may occur in patients lacking the classic signs of PH.

Key Words: Ectopic varices; Gastrointestinal tract; Portal hypertension; Endoscope; Transjugular intrahepatic portosystemic stent shunt

Jiang GJ, Yue ZD, Wu J, Liu FQ, Lin XC, Wang ZB, Gong K. Ectopic varices in the gastrointestinal tract: an analysis of 37 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(23): 2492-2495

摘要

目的: 探讨肠道异位静脉曲张(EV)的发病、病因及其与门脉高压(PH)的关系。

方法: 回顾性分析肠道EV 37例。其诊断方法:

■同行评议者

张宗明, 教授, 清华大学第一附属医院消化医学中心; 魏经国, 教授, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院放射科; 程爱国, 教授, 华北煤炭医学院临床医学系

内镜26例, 经颈静脉肝内门体系统支架分流术(TIPSS)中行门脉造影10例, 经皮肝穿刺肠系膜血管造影1例. PH的判断: 肝硬化(HC)须有门脉增宽, 非HC须有肝外门脉梗阻(EPVO)影像证据. TIPSS术中于门脉主干测压.

结果: 2003-05/2010-12 28 967例次内镜检查中查出肠EV 26例(检出率为0.09%), 282例TIPSS术中行门脉造影检出肠EV 10例(检出率为3.5%). EV分布: 十二指肠6例(球部2例、降部4例), 小肠11例(空肠6例、回肠5例), 结肠4例, 肛直肠16例. TIPSS术中测门脉压力为3.18-6.13 kPa(4.07 kPa \pm 0.92 kPa). PH的病因: HC并PH26例(肝炎后19例, 酒精性5例, 胆汁性2例; 3例伴有门脉血栓形成, 9例食管曲张静脉曲张硬化剂治疗史); EPVO4例(结肠癌术后2例, 胰腺癌晚期1例, 肠系膜血管瘤手术后1例); 病因不明7例, 均无HC、EPVO及PH的表现(其中2例作超声与CT检查, 其余5例未作进一步检查).

结论: 肠道EV少见, 以十二指肠、结肠及肛直肠等处好发; PH是EV的根本原因, 为HC和EPVO所致; EV与PH都易漏诊, EV发生时PH表现可能不明显.

关键词: 异位静脉曲张; 肠道; 门静脉高压; 内镜; 经颈静脉肝内门体系统支架分流术

姜国俊, 岳振东, 吴静, 刘福全, 林香春, 王振彪, 宫轲. 肠道异位静脉曲张37例. 世界华人消化杂志 2011; 19(23): 2492-2495
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2492.asp>

0 引言

异位静脉曲张(ectopic varices, EV)是指发生于食管与胃底以外的腹部静脉曲张, 可出现在肠道、脐、腹膜、肠造瘘口、肝镰状韧带周围、膈、卵巢、膀胱以及胃体或胃窦(IGV2型)等处^[1]. EV是门静脉高压(portal hypertension, PH)的严重并发症, 其破裂出血占有静脉曲张出血的1%-5%^[1]. 本文总结37例发生在肠道的EV, 初步分析其发病、病灶分布、病因及EV与PH的关系.

1 材料和方法

1.1 材料 2003-05/2010-12间首都医科大学附属北京世纪坛医院确诊肠道EV37例. 其中男28例, 女9例. 年龄35-79(平均56)岁. 28例有呕血或黑便史. 26例肝硬化(hepatic cirrhosis, HC)中, 3例伴有门脉血栓形成, 9例有食管曲张静脉曲张硬化剂治疗史. HC患者Child分级: A级3例、B级19例、

C级4例.

1.2 方法 EV诊断方法有: 内镜、经颈静脉肝内门体系统支架分流术(transjugular intrahepatic portosystemic stent shunt, TIPSS)中行门脉造影、经皮肝穿刺肠系膜血管造影. 门脉压的测定和PH的判断: TIPSS术中将导管插入门脉主干, 直接测其压力. 门脉压超过1.47 kPa(14 cmH₂O)即为PH. HC并PH患者须行超声或CT证实门脉增宽, 非HC患者须经超声或CT确定有肝外门脉梗阻(extrahepatic portal venous obstruction, EPVO).

2 结果

2.1 肠道EV的诊断 8年间行胃镜和结肠镜诊治共28 967例次, 确诊肠道EV26例(0.09%); 行TIPSS术282例, 术中经门脉造影确诊肠道EV 10例(3.5%). 另1例因乙型肝炎后HC并呕血、黑便住院, 先后行内镜、肠系膜动脉造影及剖腹探查均未发现出血灶, 最后经皮肝穿刺肠系膜血管造影发现空场上段有一粗大扭曲的EV伴造影剂漏入肠腔.

2.2 病灶分布 十二指肠6例(球部2例、降部4例)、空肠6例、回肠5例、结肠4例、肛直肠16例. 十二指肠、结肠与肛直肠等部位占70.3%.

2.3 PH的检查 10例TIPSS术中测得门脉压力为3.18-6.13 kPa(32.4-62.5 cmH₂O), 平均4.07 kPa \pm 0.92 kPa(41.5 cmH₂O \pm 9.43 cmH₂O).

2.4 PH病因 HC并PH 26例, 其中肝炎后19例, 酒精性5例, 胆汁性2例; EPVO4例, 其中结肠癌术后2例, 胰腺癌晚期1例, 肠系膜血管瘤手术后1例; 病因不明7例, 其EV病灶均位于肛直肠, 临床无HC及PH的表现, 其中2例作超声与CT检查未发现HC、PH及EPVO, 其余5例未作进一步检查.

3 讨论

肠道EV可发生在整个肠道, 包括肛直肠. 过去曾长期将肛直肠EV与痔混淆, 现已明确二者的病因、发病机理、组织学改变、临床表现都不相同^[2,3]. 若将肛直肠EV误作痔而手术, 后果严重^[4]. 肠道EV与胃食管静脉曲张有许多不同, 总结其特点具有重要意义.

目前文献报道的EV发病数存在很大差别, 而且缺乏可比性, 患病率或检出率为0.03%-75.00%^[5-9]. 本组28 967例内镜诊治中诊断EV 26例, 总检出率为0.09%. 其中十二指肠6例, 检出率为0.02%, 与解放军总医院资料相近, 但远低

■研发前沿

此文章研究领域中的研究热点、重点有: 肛直肠静脉曲张与痔的区别、胶囊内镜对肠异位静脉曲张的诊断价值、肠异位静脉曲张的内镜下治疗与介入治疗. 亟待研究的问题是: 为异位静脉曲张制定一个切实可行的诊疗规范与流程.

■创新盘点

本研究提示大多数肠异位静脉曲张可以通过胃镜及结肠镜来诊断, 肠异位静脉曲张发生时门脉高压表现可能并不明显.

■应用要点

本研究表明肠异位静脉曲张与门脉高压都容易漏诊、误诊,需提高认识,适时选择敏感和准确的检查方法;内镜是肠异位静脉曲张的主要诊断方法,这些对临床实际工作具有重要的指导意义。

于国外报道的水平^[1,5,9]。本组在282例TIPSS术中发现EV 10例,检出率为3.5%,与英国的资料(3.7%)相近^[6]。

各研究报道的发病数的差别较大,可能原因有:(1)病例选择不同,造成彼此间的差异及不可比性,这可能是最主要的原因;(2)检查方法与过程的差别,如普通内镜不如超声内镜敏感^[10],内镜检查过程中向肠内注气过多时可使EV暂时“消失”,钡剂灌肠可将EV误认为息肉^[11],血管造影可将EV误认为血管瘤^[12];(3)检查时机不同,如刚发生过消化道出血的患者PH得到缓解,EV也可能暂时塌陷,活动性出血时可因肠内积血而影响内镜观察,血管造影显现病灶的几率在活动性出血与非活动性出血时不同;(4)部分患者EV破裂后因出血凶猛未来得及作进一步检查便死亡,死亡后又没行尸体解剖,造成漏诊。

目前肠道EV的好发部位还不十分清楚。在一些涉及整个肠道的研究中,十二指肠、结肠与肛直肠所占的比例是最高的,日本为80.9%,英国为57.1%^[5,6]。本组资料与之相近,为70.3%(26/37)。这提示十二指肠、结肠与肛直肠等可能是肠道EV好发部位,而这些部位正是胃镜与结肠镜所能检查之处,因而进一步提示大多数EV可通过胃镜与结肠镜来诊断。尽管如此,我们还要强调不可忽视小肠EV。小肠EV因缺乏简便而有效的检查方法,非常容易漏诊,必须高度重视。本组小肠EV占29.7%(11/37),在TIPSS术前及经皮肝穿刺肠系膜血管造影前全部漏诊。因此,凡遇可疑小肠EV,都应考虑作小肠镜、胶囊内镜、肠系膜血管造影甚至经皮肝穿刺肠系膜血管造影等检查以免漏诊。

肠道EV的根本原因是PH。PH包括HC和EPVO。后者包括各种原因造成的门脉梗阻与血液回流障碍,如门脉血栓形成,肿瘤、胰腺假性囊肿压迫门脉及其属支,腹部手术后影响门脉回流等。PH引起EV的机理是门脉和体静脉间形成较粗的交通支,实现门脉血流到体静脉的分流。EPVO可于门脉梗阻附近形成较大的门脉—门脉吻合而形成EV,手术后可出现跨越吻合口静脉曲张^[13]。正常情况下,门静脉压为0.67-1.33 kPa,超过1.33-1.59 kPa,即称PH。如果门静脉压高达3.92 kPa(40 cmH₂O)则可出现静脉曲张或破裂出血^[3]。本组37例中26例有HC及PH的临床表现,超声或CT示门脉增宽,符合HC并PH。其中10例于TIPSS术中测门脉压力为3.18-6.13 kPa(32.4-62.5 cmH₂O),平均4.07 kPa±

0.92 kPa(41.50 cmH₂O±9.43 cmH₂O),明显高于PH诊断标准。本组有4例非HC患者,有EPVO的证据,符合EPVO所致EV。

本组还有7例肛直肠EV患者,临床无HC及PH的表现(其中2例作超声与CT检查,其余5例未作进一步检查)。对于这些病例,门脉压改变有两种可能:(1)最大的可能是的确存在PH,但临床表现不明显,因检查方法不敏感而漏诊。PH的检查方法很多,最直接、最准确的是门静脉直接测压,其次是肝静脉楔压。但这些方法都属有创,且技术难度大,难以普及。其他方法如超声、CT、肠系膜血管造影、磁共振等都有不足,易漏诊(尤其对肠系膜下静脉区域EV)。有报道EV患者临床、肝活检、肠系膜血管造影均无明显HC与PH改变,测肝静脉楔压方查出PH^[14,15]。实际工作中PH多是综合临床表现、肝脾形态改变、并结合门脉宽度与流速而诊断,这种方法容易漏诊。因此,对EV患者视具体情况认真分析,选择合适的检查,以免漏诊PH;(2)不存在PH。对于无PH的EV通常叫做“特发性EV”。特发性EV非常罕见,但陆续有报道^[11,12,16]。一些所谓“特发性EV”最后查出了真正的原因^[17],也有真正的“特发性EV”被误诊为其他病^[11,12]。特发性EV病因不清,可能与先天性血管异常有关^[11,17]。Hosking等^[18]曾报道1例直肠EV患者作肝穿刺、门脉造影、肝静脉楔压均未发现有PH或HC的证据,推测其EV可能与下腔静脉梗阻有关。Sugiyama等^[19]曾报道1例回结肠静脉缺如致未段回肠至升结肠EV。

特发性EV的存在,表明PH不是EV唯一的原因。本组7例无HC及PH临床表现的肛直肠EV患者,因缺乏可靠的检查资料,不能除外PH,不能诊断为特发性EV,但这7例提示肠道EV可发生于无明显HC及PH临床表现的患者。

4 参考文献

- 1 Helmy A, Al Kahtani K, Al Fadda M. Updates in the pathogenesis, diagnosis and management of ectopic varices. *Hepatol Int* 2008; 2: 322-334
- 2 中华医学会外科学分会结直肠肛门外科学组, 中华中医药学会肛肠病专业委员会, 中国中西医结合学会结直肠肛门病专业委员会. 痔临床诊治指南(2006版). *中华胃肠外科杂志* 2006; 9: 461-463
- 3 张东铭. 痔与门脉高压. *大肠肛门病外科杂志* 2004; 10: 75-80
- 4 彭友, 罗定存, 林乐岷. 门脉高压症并发肛直肠静脉曲张破裂出血1例. *实用医学杂志* 2009; 25: 816
- 5 Watanabe N, Toyonaga A, Kojima S, Takashimizu S, Oho K, Kokubu S, Nakamura K, Hasumi A, Murashima N, Tajiri T. Current status of ectopic

- varices in Japan: Results of a survey by the Japan Society for Portal Hypertension. *Hepatol Res* 2010; 40: 763-776
- 6 Kochar N, Tripathi D, McAvoy NC, Ireland H, Redhead DN, Hayes PC. Bleeding ectopic varices in cirrhosis: the role of transjugular intrahepatic porto-systemic stent shunts. *Aliment Pharmacol Ther* 2008; 28: 294-303
 - 7 Diaz-Sanchez A, Nuñez-Martinez O, Gonzalez-Asanza C, Matilla A, Merino B, Rincon D, Beceiro I, Catalina MV, Salcedo M, Bañares R, Clemente G. Portal hypertensive colopathy is associated with portal hypertension severity in cirrhotic patients. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 4781-4787
 - 8 Dhiman RK, Saraswat VA, Choudhuri G, Sharma BC, Pandey R, Naik SR. Endosonographic, endoscopic, and histologic evaluation of alterations in the rectal venous system in patients with portal hypertension. *Gastrointest Endosc* 1999; 49: 218-227
 - 9 令狐恩强, 冯佳. LDRf分型方法在十二指肠静脉曲张中的应用. *中国消化内镜杂志* 2008; 2: 9-10
 - 10 Wiechowska-Kozłowska A, Bialek A, Milkiewicz P. Prevalence of 'deep' rectal varices in patients with cirrhosis: an EUS-based study. *Liver Int* 2009; 29: 1202-1205
 - 11 Zaman L, Bebb JR, Dunlop SP, Jobling JC, Teahon K. Familial colonic varices-a cause of "polyposis" on barium enema. *Br J Radiol* 2008; 81: e17-e19
 - 12 Han JH, Jeon WJ, Chae HB, Park SM, Youn SJ, Kim SH, Bae IH, Lee SJ. A case of idiopathic colonic varices: a rare cause of hematochezia misconceived as tumor. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 2629-2632
 - 13 Mitchell AW, Jackson JE. Trans-anastomotic porto-portal varices in patients with gastrointestinal haemorrhage. *Clin Radiol* 2000; 55: 207-211
 - 14 Azar C, Khalifeh M, Al-Kutoubi MA, Sharara AI. Recurrent massive haemorrhage from an endoscopically inevident isolated rectal varix. *Dig Liver Dis* 2006; 38: 851-853
 - 15 Francois F, Tadros C, Diehl D. Pan-colonic varices and idiopathic portal hypertension. *J Gastrointest Liver Dis* 2007; 16: 325-328
 - 16 Krishna RP, Singh RK, Ghoshal UC. Recurrent lower gastrointestinal bleeding from idiopathic ileocolonic varices: a case report. *J Med Case Reports* 2010; 4: 257
 - 17 Defreyne L, Meersschaut V, van Damme S, Berrevoet F, Robberecht E, Praet M. Colonic arterio-venous malformation in a child misinterpreted as an idiopathic colonic varicosis on angiography: remarks on current classification of childhood intestinal vascular malformations. *Eur Radiol* 2003; 13 Suppl 4: L138-L141
 - 18 Hosking SW, Johnson AG. Bleeding anorectal varices-a misunderstood condition. *Surgery* 1988; 104: 70-73
 - 19 Sugiyama S, Yashiro K, Nagasako K, Sato S, Watanabe K, Igarashi T, Hanyu F, Obata H. Extensive varices of ileocecum. Report of a case. *Dis Colon Rectum* 1992; 35: 1089-1091

■同行评价

本文科学性和可读性较好,有一定的学术意义,对临床具有一定的参考意义。

编辑 李薇 电编 何基才

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》入选《中国学术期刊评价研究报告—RCCSE 权威、核心期刊排行榜与指南》

本刊讯 《中国学术期刊评价研究报告-RCCSE权威、核心期刊排行榜与指南》由中国科学评价研究中心、武汉大学图书馆和信息管理学院联合研发,采用定量评价和定性分析相结合的方法,对我国万种期刊大致浏览、反复比较和分析研究,得出了65个学术期刊排行榜,其中《世界华人消化杂志》位居396种临床医学类期刊第45位。(编辑部主任:李军亮 2010-01-08)

英夫利西治疗重度溃疡性结肠炎2例

赵丽珍, 王思平, 李红

■背景资料

国外研究表明, 英夫利西 (IFX) 对于中重度且传统治疗不能充分缓解的 UC 患者有诱导和维持缓解的良好疗效且临床安全性好, 国内在此方面的研究尚处于起步阶段。

赵丽珍, 王思平, 李红, 中国人民解放军总医院健康医学中心 北京市 100853

作者贡献分布: 此课题由李红设计; 研究过程由李红、王思平及赵丽珍协作完成; 本论文写作由赵丽珍完成, 李红及王思平指导写作。

通讯作者: 李红, 副主任医师, 100853, 北京市复兴路28号, 中国人民解放军总医院健康医学中心。lihongam@hotmail.com

电话: 010-68295592 传真: 010-68295653

收稿日期: 2011-04-18 修回日期: 2011-06-23

接受日期: 2011-06-28 在线出版日期: 2011-08-18

Treatment of ulcerative colitis with infliximab: an analysis of 2 cases

Li-Zhen Zhao, Si-Ping Wang, Hong Li

Li-Zhen Zhao, Si-Ping Wang, Hong Li, Health Science Center, The Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China

Correspondence to: Hong Li, Health Science Center, The Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China. lihongam@hotmail.com

Received: 2011-04-18 Revised: 2011-06-23

Accepted: 2011-06-28 Published online: 2011-08-18

Abstract

AIM: To assess the feasibility, safety, and efficacy of infliximab in patients with severe ulcerative colitis (UC).

METHODS: Two patients with severe UC were treated with infliximab. The safety and efficacy of infliximab were evaluated, and relevant literature was reviewed.

RESULTS: The first patient underwent induction therapy with infliximab 5 mg/kg at weeks 0, 2 and 6 and maintenance therapy with infliximab every 8 weeks. Complete bowel healing was achieved after five infliximab infusions. The second patient, who initially did not respond to infusions with infliximab 5 mg/kg, was subsequently treated with a higher dose (10 mg/kg) of infliximab. Mucosal healing was achieved after five times of infliximab treatment. No infliximab-associated adverse events occurred in both patients. It has been reported in recent years that infliximab is effective for the induction and

maintenance of clinical remission in patients with moderate to severe UC. If attenuation of the response to 5 mg/kg dose occurs, increasing the dose of infliximab can get re-achievement of response. However, serious side effects of infliximab including opportunistic infections were reported, necessitating careful monitoring of therapy.

CONCLUSION: Infliximab is safe and effective in patients with severe UC and represents a new useful alternative modality for the treatment of severe UC.

Key Words: Infliximab; Ulcerative colitis; Therapy

Zhao LZ, Wang SP, Li H. Treatment of ulcerative colitis with infliximab: an analysis of 2 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(23): 2496-2500

摘要

目的: 探讨英夫利西治疗重度溃疡性结肠炎 (UC) 的安全性和有效性。

方法: 报道2例重度UC治疗中英夫利西的用法、疗效及安全性, 并复习近年国内外相关文献。

结果: 1例患者在接受3次英夫利西5 mg/kg诱导缓解后并以相同剂量每8 wk 1次维持治疗, 输注5次后达到黏膜愈合。另1例患者应用英夫利西5 mg/kg效果欠佳, 加量至10 mg/kg后效果明显好转, 输注5次后达到黏膜愈合。2例患者均未发生英夫利西相关的副反应。文献复习显示英夫利西可诱导中重度UC的临床缓解, 治疗效果衰减的患者增加剂量可重新建立疗效反应。英夫利西有诱发机会性感染等多种副反应的风险, 治疗期间应严密监测、积极预防。

结论: 英夫利西治疗重度UC是安全和可行的, 可作为治疗重度UC的选择方案之一。

关键词: 英夫利西; 溃疡性结肠炎; 治疗

赵丽珍, 王思平, 李红. 英夫利西治疗重度溃疡性结肠炎2例. 世

■同行评议者

刘莹, 副主任医师, 首都医科大学附属北京友谊医院消化科

界华人消化杂志 2011; 19(23): 2496-2500
http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2496.asp

0 引言

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是一种慢性非特异性结肠炎症,病变主要累及结肠黏膜和黏膜下层。本病在西方国家常见,发病率每年为(79-268)/10万^[1]。随着我国人民营养状况、生活环境和生活方式的改变,近20年UC的发病率也明显升高^[2-4],据推测中国UC的患病率为11.6/10万^[5]。我院近16年来UC的患病率也呈现增高趋势^[6]。重度UC是指慢性复发型活动期以及暴发型病例出现重型腹泻、脓血便伴腹痛、脱水、贫血等症状;因其症状重,疗效差,成为临床治疗的难点之一^[7]。国外研究表明,英夫利西(infliximab, IFX)对于中重度且传统治疗不能充分缓解的UC患者有诱导和维持缓解的良好疗效且临床安全性好^[8,9],国内在此方面的研究尚处于起步阶段。我们近期应用英夫利西治疗2例重度UC患者,疗效满意,现结合经治病例,并综合复习相关文献,探索适合我国重度UC的英夫利西治疗方案。

1 材料和方法

1.1 材料 收集中国解放军总医院特需消化内科2009-2010年应用英夫利西治疗重度溃疡性结肠炎患者2例。2例患者一般情况:男1女1;年龄33岁和55岁;病程分别为7年和8年。临床表现为反复腹痛、腹泻,伴黏液血便,经多次应用5-氨基水杨酸制剂、糖皮质激素及免疫抑制剂治疗,症状反复发作并逐渐加重,2例患者均合并中度贫血及营养不良, Sutherland疾病活动指数(DAI)总分为11-12分。其中1例既往有陈旧性肺结核及慢性乙型肝炎病史。

1.2 方法

1.2.1 治疗方法: 2例患者均在5-氨基水杨酸制剂(美沙拉嗪4.0 g/d)、皮质类固醇激素(甲泼尼龙48 mg/d)及免疫抑制剂(硫唑嘌呤2 mg/kg)用量维持不变基础上,检查抗核抗体谱除外自身抗体异常,检查肺CT、PPD试验及结核相关化验除外活动性肺结核后,开始使用英夫利西5 mg/kg输注,以0、2、6 wk输注3次,以后每8 wk输注1次维持治疗,取得临床完全缓解后将激素逐步减量至停用。输注5次后病变部位达到黏膜愈合,硫唑嘌呤及美沙拉嗪亦缓慢减量,以硫唑嘌呤1.5 mg/kg及美沙拉嗪2 g/d维持治疗。

1.2.2 Sutherland疾病活动指数(DAI): 总分之和<2分为症状缓解; 3-5分为轻度活动; 6-10分为中度活动; 11-12分为重度活动。

1.2.3 临床症状评估: (1)完全缓解: 治疗后排便每日0-2次,无肉眼血便和镜下红细胞; (2)部分缓解: 治疗后排便每日3-4次,无肉眼血便,镜下红细胞<10个/高倍镜; (3)无变化: 治疗后每日排便5次以上,肉眼可见血便。

1.2.4 总疗效评价: 参照中华医学会消化病学分会炎症性肠病协作组标准^[7]。(1)完全缓解: 临床症状消失,结肠镜检查黏膜大致正常; (2)有效: 临床症状基本消失,结肠镜复查黏膜轻度炎症反应或假息肉形成; (3)无效: 经治疗后临床症状、内镜及病理检查无改善。

1.2.5 不良事件: 试验期间应如实填写不良事件记录表,记录不良事件的发生时间、严重程度、持续时间、采取的措施和转归。

2 结果

2例患者均使用英夫利西5次(0、2、6、8、16、22 wk),均在2 wk内腹痛、腹泻消失,大便1-2次/d,为黄色成形便,达到临床完全缓解,此后甲泼尼龙片即逐渐减量直至停药。其中1例以5 mg/kg输注1次(0 wk),症状未见明显缓解。于第2次输注时加量至10 mg/kg(2 wk),输注当日患者即自觉症状明显缓解,此后以10 mg/kg维持治疗。

治疗后8 wk及24 wk复查肠镜,2例患者均在24 wk达到黏膜愈合(图1, 2), DAI由治疗前11-12分降为1-2分,总疗效评价为完全缓解,贫血及低蛋白血症等逐渐改善,硫唑嘌呤及美沙拉嗪缓慢减量,以硫唑嘌呤1.5 mg/kg及美沙拉嗪2 g/d维持治疗。病例分别随访30 wk和1年,症状无复发。

治疗及随访期间,定期监测肺CT及抗核抗体谱均正常。其中1例因慢性乙型肝炎,治疗期间坚持服用口服恩替卡韦片0.5 mg/d,监测HBV DNA定量正常。2例患者均无不良事件发生。

3 讨论

UC为原因不明的慢性非特异性肠道炎症。目前,UC已成为我国的主要肠道疾病和慢性腹泻的主要原因。由于治疗缺乏特异性,导致病程迁延,反复发作,局部(癌变、大出血、肠穿孔等)和全身(多器官累及)并发症增多。重度UC死亡率较高,严重危害患者的健康。UC的传统治疗药物有3大类: 氨基水杨酸类药物、肾上腺皮质激素和

■研究前沿

UC为原因不明的慢性非特异性肠道炎症。目前,UC已成为我国的主要肠道疾病和慢性腹泻的主要原因。由于治疗缺乏特异性,导致病程迁延,反复发作,局部(癌变、大出血、肠穿孔等)和全身(多器官累及)并发症增多。

■相关报道

有研究表明, 诱导治疗中5 mg/kg为最佳剂量-疗效关系, 更大的剂量并不能获得更好的疗效。

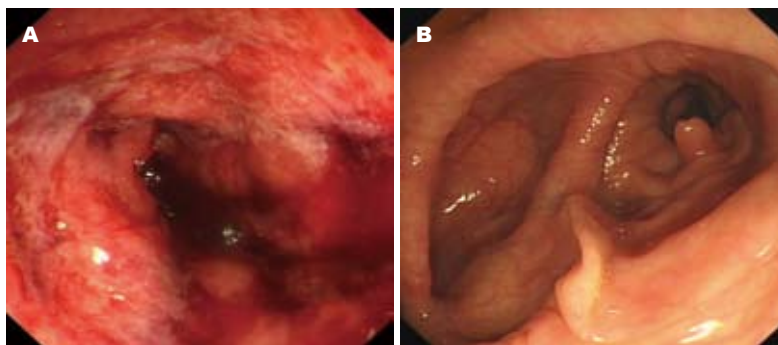


图 1 55岁男性英夫利西治疗前后肠镜下表现. A: 英夫利西治疗前; B: 英夫利西治疗24 wk后.

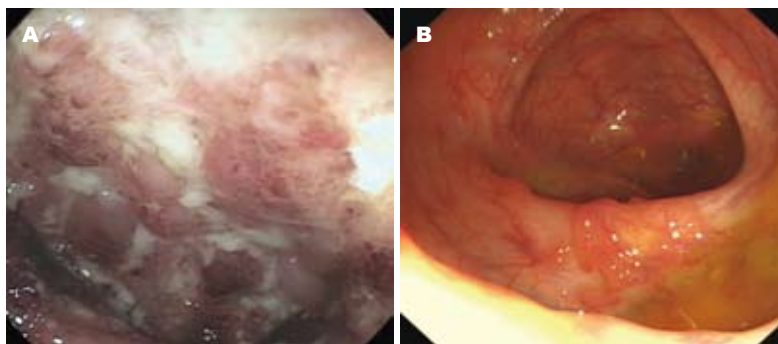


图 2 33岁女性英夫利西治疗前后肠镜下表现. A: 英夫利西治疗前; B: 英夫利西治疗24 wk后.

免疫抑制剂. 氨基水杨酸类药物的非特异性抗炎, 只能暂时控制和缓解症状, 不能从根本上治愈该病, 长期应用不良反应增多, 停药后容易复发(1年复发率>50%). 皮质类固醇或免疫抑制等治疗会导致继发性的健康问题, 部分激素耐药或抵抗的难治性患者效果更不理想.

重度UC治疗的基本原则为激素冲击疗法, 但激素依赖或抵抗型溃疡性结肠炎的治疗效果不理想, 并发症多, 需要寻找更为特异的治疗方法. 英夫利西为肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)单抗, 通过与多种免疫反应细胞中的促炎因子TNF- α 的结合, 封闭其促炎效应、并促进炎细胞凋亡, 发挥抗炎作用^[10]. 2005年2个大规模的随机、安慰剂对照试验ACT I和ACT II发现英夫利西对于激素抵抗或依赖的UC患者治疗有效, 美国食品药品监督管理局随即批准其用于中重度活动UC的治疗^[11]. 英夫利西应用的一般反应率达70%, 缓解率近50%, 较对照组高出30%左右; 可使患者激素减量, 降低住院率与手术率, 提高生活质量^[8,9].

2007年英夫利西被批准在国内上市, 主要用于克罗恩病(crohn disease, CD)的诱导缓解和维持治疗. 应用英夫利西治疗UC的经验和报道较少. 江学良等^[12]应用英夫利西治疗13例皮质激素抵抗型UC患者, 大部分患者1 wk内症状缓解, 排便次数明显减少, 2 wk内排便次数基本正常. 治疗后8 wk, 13例患者中7例达到肠镜下完全缓解,

5例部分缓解. 李世荣等^[13]应用英夫利西治疗7例CD和7例UC患者, 对比观察治疗效果, 证实英夫利西治疗难治性CD和UC具有相同的疗效. 我们应用英夫利西治疗重度UC也取得了满意的效果.

有研究表明, 诱导治疗中5 mg/kg为最佳剂量-疗效关系, 更大的剂量并不能获得更好的疗效^[14]. 但在治疗过程当中, 一些复发的患者可产生耐药性, 增加剂量可使治疗效果衰减的患者重新建立起疗效反应. 在Accent II研究中, 一些治疗失败的患者, 增加英夫利西治疗剂量可使61%的患者重新起效^[15]. 在一项英夫利西治疗不定型结肠炎的回溯性研究中, 70%(14/20)的患者对5 mg/kg英夫利西治疗有反应, 14例患者中有4例由于治疗效果衰减, 增大剂量至10 mg/kg可重新达到良好的治疗效果^[16]. 本文1例在增加剂量后疗效明显增加. 因此, 根据患者的个体情况, 适当灵活的控制治疗剂量可能会有更好的收益. 黏膜愈合是取得UC远期治疗效果的关键因素^[17], 李世荣等^[13]认为应用英夫利西至少4次以上方能达到黏膜愈合的目标. 我们2例患者均为应用5次后复查肠镜, 达到黏膜愈合. 国外研究表明^[8,9], 应用英夫利西可促进激素尽快减量, 并减少UC患者手术治疗率. 而且诱导缓解后以每8周1次的系统维持治疗效果好于阶段性疗法, 更能降低住院率及手术率^[18]. 但囿于经济原因, 目前国内患者很难达到系统维持治疗. 因此, 我们在英夫利西治疗病情完全缓解后以免

疫抑制剂及美沙拉嗪维持治疗, 随访期间未再复发(最长1年). 此种以英夫利西为过渡的序贯治疗方案可能更适合目前我国国情, 但尚需临床大样本研究及长期随访证实.

英夫利西治疗自身免疫性疾病时, 也干扰了机体的免疫功能, 因此应密切关注其应用过程中的安全性问题. 主要的不良事件有严重感染、恶性肿瘤可能、视神经炎、脱髓鞘病变、抗核抗体生成等. 因此用药前需严格评估病情、排除潜在与活动性结核及各种感染, 用药过程中应注意各种不良反应特别是药物过敏、心功能衰竭和神经系统障碍等.

英夫利西有激活隐匿性结核病的危险. 美国胸科学会建议, 所有拟行英夫利西治疗的患者在治疗前均应行胸部X线(或肺CT)和PPD试验^[9]. 我国是结核病的高发国家之一, 故在使用此类药物前更需高度关注结核感染的筛查, 以及治疗过程中的定期监测.

英夫利西的免疫抑制作用, 可能使病毒性肝炎患者用药后进入活动期^[20], 但这一观点尚存争议. 因此建议在使用英夫利西前评估肝功能, HBV DNA $\geq 10^6$ 拷贝/L者, 先予抗病毒治疗至转氨酶恢复正常, HBV DNA降至 $<10^6$ 拷贝/L才开始英夫利西治疗, 治疗期间继续用抗病毒治疗, 并定期监测肝功能. 本文中第1例病例患者既往曾患肺结核, 且合并慢性乙型肝炎. 在英夫利西治疗前严密筛查, 治疗中和治疗后密切监测, 未引发结核和慢性乙型肝炎复发. 因此, 应用英夫利西过程中提高警惕, 动态监测可能出现的各种特异性或非特异性感染, 是顺利治疗的前提和保证.

我们的初步经验证实, 使用英夫利西能缓解激素抵抗型重度UC患者的症状, 促进黏膜愈合. 因此, 对激素抵抗型重度UC患者, 如条件允许, 应尽早应用英夫利西可有望更快诱导缓解病情, 从而缩短治疗时间、减少住院率及手术率.

4 参考文献

- Farrokhvar F, Swarbrick ET, Irvine EJ. A critical review of epidemiological studies in inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 2001; 36: 2-15
- Jiang XL, Cui HF. An analysis of 10218 ulcerative colitis cases in China. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 158-161
- Wang YF, Ouyang Q, Hu RW. Progression of inflammatory bowel disease in China. *J Dig Dis* 2010; 11: 76-82
- Chow DK, Leong RW, Tsoi KK, Ng SS, Leung WK, Wu JC, Wong VW, Chan FK, Sung JJ. Long-term follow-up of ulcerative colitis in the Chinese popu-

- lation. *Am J Gastroenterol* 2009; 104: 647-654
- Ooi CJ, Fock KM, Makharia GK, Goh KL, Ling KL, Hilmi I, Lim WC, Kelvin T, Gibson PR, Gearry RB, Ouyang Q, Sollano J, Manatsathit S, Rerknimitr R, Wei SC, Leung WK, de Silva HJ, Leong RW. The Asia-Pacific consensus on ulcerative colitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2010; 25: 453-468
- 石卉, 万军, 肖琰, 常青, 宫媛, 王昌正. 溃疡性结肠炎住院患者525例临床特征分析. *中华内科杂志* 2011; 50: 40-43
- 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
- Rutgeerts P, Sandborn WJ, Feagan BG, Reinisch W, Olson A, Johanns J, Travers S, Rachmilewitz D, Hanauer SB, Lichtenstein GR, de Villiers WJ, Present D, Sands BE, Colombel JF. Infliximab for induction and maintenance therapy for ulcerative colitis. *N Engl J Med* 2005; 353: 2462-2476
- Järnerot G, Hertervig E, Friis-Liby I, Blomquist L, Karlén P, Grännö C, Vilien M, Ström M, Danielsson A, Verbaan H, Hellström PM, Magnuson A, Curman B. Infliximab as rescue therapy in severe to moderately severe ulcerative colitis: a randomized, placebo-controlled study. *Gastroenterology* 2005; 128: 1805-1811
- Rutgeerts P, Vermeire S, Van Assche G. Biological therapies for inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 2009; 136: 1182-1197
- Wilhelm SM, McKenney KA, Rivait KN, Kale-Pradhan PB. A review of infliximab use in ulcerative colitis. *Clin Ther* 2008; 30: 223-230
- 江学良. 英夫利西治疗激素抵抗型溃疡性结肠炎临床观察. *中华消化杂志* 2010; 30: 564-565
- 李世荣, 陆晓娟, 盛剑秋, 范如英, 李恕军, 赵晓军. 溃疡性结肠炎和克罗恩病的英夫利西(类克)治疗效果比较. *胃肠病学和肝病学杂志* 2010; 19: 644-646
- D'haens G, Van Deventer S, Van Hogezaand R, Chalmers D, Kothe C, Baert F, Braakman T, Schaible T, Geboes K, Rutgeerts P. Endoscopic and histological healing with infliximab anti-tumor necrosis factor antibodies in Crohn's disease: A European multicenter trial. *Gastroenterology* 1999; 116: 1029-1034
- Sands BE, Anderson FH, Bernstein CN, Chey WY, Feagan BG, Fedorak RN, Kamm MA, Korzenik JR, Lashner BA, Onken JE, Rachmilewitz D, Rutgeerts P, Wild G, Wolf DC, Marsters PA, Travers SB, Blank MA, van Deventer SJ. Infliximab maintenance therapy for fistulizing Crohn's disease. *N Engl J Med* 2004; 350: 876-885
- Papadakis KA, Treyzon L, Abreu MT, Fleshner PR, Targan SR, Vasiliasukas EA. Infliximab in the treatment of medically refractory indeterminate colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 18: 741-747
- Frøslie KF, Jahnsen J, Moum BA, Vatn MH. Mucosal healing in inflammatory bowel disease: results from a Norwegian population-based cohort. *Gastroenterology* 2007; 133: 412-422
- Sandborn WJ, Rutgeerts P, Feagan BG, Reinisch W, Olson A, Johanns J, Lu J, Horgan K, Rachmilewitz D, Hanauer SB, Lichtenstein GR, de Villiers WJ, Present D, Sands BE, Colombel JF. Colectomy rate comparison after treatment of ulcerative colitis with placebo or infliximab. *Gastroenterology* 2009; 137: 1250-1260; quiz 1520
- Mow WS, Abreu-Martin MT, Papadakis KA, Pitchon HE, Targan SR, Vasiliasukas EA. High incidence of anergy in inflammatory bowel disease pa-

■同行评价

本文立题较好, 有重要的临床借鉴价值.

- tients limits the usefulness of PPD screening before infliximab therapy. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2004; 2: 309-313
- 20 Esteve M, Saro C, González-Huix F, Suarez F, Forné

M, Viver JM. Chronic hepatitis B reactivation following infliximab therapy in Crohn's disease patients: need for primary prophylaxis. *Gut* 2004; 53: 1363-1365

编辑 李薇 电编 何基才

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》性质、刊登内容及目标

本刊讯 《世界华人消化杂志》[国际标准刊号ISSN 1009-3079 (print), ISSN 2219-2859 (online), 国内统一刊号CN 14-1260/R, Shijie Huaren Xiaohua Zazhi/*World Chinese Journal of Digestology*], 是一本由来自国内23个省、市、自治区、特别行政区的496位胃肠病学和肝病专家支持的开放存取的同行评议的旬刊杂志, 旨在推广国内各地的胃肠病学和肝病领域临床实践和基础研究相结合的最具有临床意义的原创性及各类评论性的文章, 使其成为一种公众资源, 同时科学家、医生、患者和学生可以通过这样一个不受限制的平台来免费获取全文, 了解其领域的所有的关键的进展, 更重要的是这些进展会为本领域的医务工作者和研究者服务, 为他们的患者及基础研究提供进一步的帮助。

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

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

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

二氧化碳注入在结肠镜检查中的Meta分析

苗志国, 齐鲁楠, 黎乐群

苗志国, 齐鲁楠, 黎乐群, 广西医科大学附属肿瘤医院肝胆外科 广西壮族自治区南宁市 530021

作者贡献分布: 本课题由苗志国与黎乐群共同设计; 研究过程由苗志国、齐鲁楠及黎乐群完成; 论文写作由苗志国完成。

通讯作者: 黎乐群, 教授, 博士生导师, 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肝胆外科。miaoziaa@163.com

电话 0771-5310045

收稿日期: 2011-07-04 修回日期: 2011-08-11

接受日期: 2011-08-12 在线出版日期: 2011-08-18

Carbon dioxide insufflation during colonoscopy: a meta-analysis

Zhi-Guo Miao, Lu-Nan Qi, Le-Qun Li

Zhi-Guo Miao, Lu-Nan Qi, Le-Qun Li, Department of Hepatobiliary Surgery, Affiliated Tumor Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Correspondence to: Professor Le-Qun Li, Department of Hepatobiliary Surgery, Affiliated Tumor Hospital of Guangxi Medical University, 71 Hedi Road, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. miaoziaa@163.com

Received: 2011-07-04 Revised: 2011-08-11

Accepted: 2011-08-12 Published online: 2011-08-18

Abstract

AIM: To assess the safety and efficacy of carbon dioxide insufflation during colonoscopy.

METHODS: We searched the Cochrane Central Library, MEDLINE, EMBASE, VIP until June 2011. No language restrictions were replied. All the RCTs comparing carbon dioxide insufflation versus air insufflation during colonoscopy were included. The quality of included studies was evaluated and a meta-analysis was performed using RevMan5.1.0 software.

RESULTS: Nine randomized controlled trials (RCTs) encompassing a total of 2 065 patients were included. The result of meta-analysis showed that carbon dioxide insufflation was superior to air insufflation in reducing the discomfort after colonoscopy. The participants without any discomfort 1 h after the examination from three RCTs (RR, 1.57; 95% CI, 1.35 to 1.82;

$P < 0.05$) and 6 h after the examination from four RCTs (RR, 1.30; 95% CI, 1.17 to 1.45; $P < 0.05$) differed significantly between the two groups. There were no statistical differences in the pooled mean difference (MD) of cecal intubation time from five RCTs (MD, -0.73; 95% CI, -1.73 to 0.27; $P = 0.15$) and in ET CO₂ from one study between two groups.

CONCLUSION: Carbon dioxide insufflation can reduce discomfort after colonoscopy examination. Cecal intubation time was not statistically different between the carbon dioxide insufflation group and air insufflations group. Use of carbon dioxide did not add risk of side-effects caused by the increase of ET CO₂.

Key Words: Carbon dioxide; Colonoscopy; Meta-analysis

Miao ZG, Qi LN, Li LQ. Carbon dioxide insufflation during colonoscopy: a meta-analysis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(23): 2501-2505

摘要

目的: 评价应用二氧化碳进行结肠镜检查的安全性及有效性。

方法: 检索Cochrane图书馆; PubMed数据库; EMBASE数据库; 重庆维普中文科技期刊数据库截止日期为2011-06, 没有语言限制。所有关于结肠镜检查中应用二氧化碳注入对比空气注入的临床随机对照实验被纳入, 对纳入研究的方法学进行评价, 并运用统计学分析软件RevMan5.10进行Meta分析。

结果: 检索出9篇随机对照试验, 共计2065个参与者。Meta分析结果显示: (1)检查1 h后无疼痛人数: 共3个试验被纳入, 显示二氧化碳组优于空气组, 相对危险度RR = 1.57; 95%CI: 1.35-1.82($P < 0.05$); (2)检查6 h后无疼痛人数: 共4个试验被纳入, 显示二氧化碳组优于空气组, 相对危险度RR = 1.30, 95%CI: 1.17-1.45 ($P < 0.05$); (3)插管至回盲部时间: 共5个试验纳入, 显示两组无统计学差异, 均数差MD为

■背景资料

结肠镜在大肠疾病的诊治中起着非常重要的作用。当今世界的常规方法是应用空气注入进行结肠镜检查。但是这也是导致患者术中术后出现腹痛及腹部不适的原因。二氧化碳注入在1974年被报道开始应用于结肠镜检查, 他能减轻患者结肠镜检查中和检查后的疼痛。本研究运用Meta分析的方法, 对二氧化碳注入应用结肠镜检查的安全性和有效性进行评估。

■同行评议者

李华, 副教授, 中山大学附属第三医院肝脏外科; 徐迅迪, 教授, 中南大学湘雅二医院肝胆胰外科; 崔云甫, 教授, 哈尔滨医科大学第二附属医院普外科

■研究前沿

目前没有Meta分析评估结肠镜检查用CO₂注入替代空气注入。

-0.73, 95%CI: -1.73-0.27($P = 0.15$); (4)呼气末二氧化碳分压: 仅一个试验被纳入, 两组无统计学差异。

结论: 结肠镜检查中二氧化碳注入对比空气注入能减轻检查后疼痛, 检查时间无统计学差异; 未发现二氧化碳注入增加呼气末二氧化碳分压增加副作用的发生率, 进一步的高质量研究需要被开展。

关键词: 结肠镜; 二氧化碳; Meta分析

苗志国, 齐鲁楠, 黎乐群. 二氧化碳注入在结肠镜检查中的Meta分析. 世界华人消化杂志 2011; 19(23): 2501-2505
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2501.asp>

0 引言

结肠镜在大肠疾病的诊治中起着非常重要的作用。当今世界的常规方法是应用空气注入进行结肠镜检查。但是这也是导致患者术中术后出现腹痛及腹部不适的原因。据报道, 结肠镜检查后疼痛发生率为50%, 12%的人在24 h后仍感到剧烈的疼痛^[1], 4%的人甚至无法在第2天参加工作^[2]。因此寻找一种方法来减轻患者的不适很有必要。二氧化碳注入在1974年被报道开始应用于结肠镜检查, 他能减轻患者结肠镜检查中和检查后的疼痛^[3,4]。近来有很多随机对照研究比较了CO₂注入对比空气注入, 但是缺乏相关评价其安全性和有效性的Meta分析, 本研究的目的是评估结肠镜检查中CO₂作为注气媒介的安全性和有效性。

1 材料和方法

1.1 材料 检索Cochrane图书馆, PubMed数据库, EMBASE数据库, 重庆维普中文科技期刊数据库(VIP)截止日期为2011-06。英文检索词包括carbon dioxide, colonoscopy, sigmoidoscopy, randomized controlled trial, random。中文检索词包括二氧化碳、结肠镜、随机对照实验、随机。没有语种的限制。

1.2 方法

1.2.1 纳入标准: (1)设计类型: 结肠镜检查中CO₂注入对比空气注入的随机对照试验符合纳入标准, 不受语种限制; (2)研究对象: 准备接受结肠镜检查的参与者, 患有基础肺部疾病的参与者被排除; (3)干预措施: CO₂注入与空气注入的比较; (4)疗效判定指标: 检查1 h后无疼痛人数, 检查6 h后无疼痛人数, 插管至回盲部所需时间, 呼

气末CO₂分压P(ET CO₂)。

1.2.2 方法学质量评价与资料提取: 对检索到的文献, 两名评价者独立地进行资料提取和方法学质量评价, 如果遇到分歧通过讨论或由第3名研究人员参加讨论解决分歧。文献的方法学质量评价通过以下几个方面来进行评价: (1)随机序列的产生: 若由随机数字表或计算机软件产生则认为采用了合理的随机方法, 若按入院顺序、出生日期等则认为没有采用合理的随机方法; (2)分配隐藏: 包括分配序列由谁产生, 产生分配序列的人是否参与纳入病例, 分配表格怎么保管; (3)是否使用盲法; (4)不完整数据的报告; (5)选择性报告; (6)其他偏倚(基线是否可比、是否提前终止试验、是否有基金支持)。评价的标准分为3个等级分别是: 1: 低风险; 2: 高风险; 3: 不清楚。资料提取包括实验的设计类型, 参与者的情况, 干预措施, 随访时间, 观察结果。

统计学处理 统计分析使用Cochrane协作网提供的Revman5.10软件。对于二分类变量应用相对危险度RR来分析, 连续性变量应用均数差MD来分析, 两类变量都计算其95%可信区间(95%CI)。假设检验采用U检验, 当 $P < 0.05$ 时表示两组差异存在统计学意义, 区间估计和假设检验结果在森林图中列出。临床试验结果的异质性检验通过Q检验, 检验水准取 $\alpha = 0.10$ 。即 $P < 0.1$ 时研究结果间存在异质性。 I^2 用来量化异质性。一般我们认为 $I^2 > 50\%$, 说明研究之间存在异质性。若各个研究之间无统计学异质性, Meta分析采用固定效应模型, 如果存在较大异质性, 是用敏感性分析或亚组分析等方法处理异质性, 若经处理后仍存在异质性, 则采用随机效应模型计算其合并效应量。纳入的研究数目 > 10 的时候, 进行漏斗图分析是否存在发表偏倚。

2 结果

2.1 临床试验的特点和质量 初检得到相关文献49篇, 阅读题目及摘要后, 排除非随机试验, 然后通过全文阅读排除不符合纳入标准的试验和正在进行中的会议记录文章和没有报告目标指标的研究。最后共9个试验^[5-13]共计2 065个参与者符合纳入标准, 被本研究纳入Meta分析。各研究的实验组跟对照组患者的基线资料可比。各研究的基本资料见(表1), 各研究的质量评估详见(表2)。

2.2 Meta分析结果

2.2.1 检查1 h后无疼痛人数: 共有3个试验^[10-12]

表 1 纳入研究的基本资料

研究ID	研究设计类型	性别比例(男:女)		平均年龄		干预措施		基线是否可比
		CO ₂ 组	空气组	CO ₂ 组	空气组	CO ₂ 组	空气组	
周先勇 ^[5]	随机对照试验	122 : 138	118 : 142	38.2	40.2	CO ₂ 注入	空气注入	可比
刘雄祥等 ^[6]	随机对照试验	100 : 74	101 : 74	48.5 ± 16.8	48.1 ± 13.2	CO ₂ 注入	空气注入	可比
Church等 ^[7]	随机对照试验	54 : 69	73 : 51	未提	未提	CO ₂ 注入	空气注入	可比
Yamano等 ^[8]	随机对照试验	41 : 25	37 : 17	63.2 ± 8.5	61.7 ± 9.3	CO ₂ 注入	空气注入	可比
Riss等 ^[9]	随机对照试验	未提	未提	未提	未提	CO ₂ 注入	空气注入	可比
Breththauer等 ^[10]	随机对照试验	未提	未提	未提	未提	CO ₂ 注入	空气注入	可比
Breththauer等 ^[11]	随机对照试验	未提	未提	55.7	55.2	CO ₂ 注入	空气注入	可比
Sumana等 ^[12]	随机对照试验	未提	未提	55.9 ± 1.9	53.1 ± 1.5	CO ₂ 注入	空气注入	可比
Uraoka等 ^[13]	随机对照试验	29 : 39	29 : 38	65	62	CO ₂ 注入	空气注入	可比

■创新盘点

本文检索了CO₂注入对比空气注入在结肠镜过程中应用的相关文章,并运用Meta分析的方法。目前国内尚无相似研究。

表 2 纳入研究的质量情况

研究ID	随机分配方法	分配隐藏	盲法	结果数据的完整性	选择性报告研究结果	其他偏倚来源
Church等 ^[7]	随机,具体方法不详 风险不清楚	不清楚	患者单盲	不清楚	不清楚	低风险
Yamano等 ^[8]	随机,具体方法不详 风险不清楚	不清楚	低风险	不清楚	不清楚	低风险
Riss等 ^[9]	计算机随机	不清楚	患者单盲	不清楚	不清楚	低风险
Breththauer等 ^[10]	随机,具体方法不详 风险不清楚	低风险	低风险	不清楚	低风险	低风险
Breththauer等 ^[11]	电脑随机	低风险	低风险	低风险	低风险	低风险
Sumana等 ^[12]	随机,具体方法不详 风险不清楚	不清楚	低风险	低风险	低风险	低风险
Uraoka等 ^[13]	随机数字表	低风险	低风险	低风险	低风险	低风险
周先勇 ^[5]	随机,具体方法不详 风险不清楚	不清楚	不清楚	不清楚	不清楚	低风险
刘雄祥等 ^[6]	随机,具体方法不详 风险不清楚	不清楚	不清楚	不清楚	不清楚	低风险

被纳入,采用固定效应模型进行Meta分析结果显示RR值为1.57可信区间为1.35到1.82。异质性检验 $P = 0.007$, $I^2 = 80\%$ (图1)。通过敏感性分析剔除异质性大的研究M. Breththauer 2005重新进行Meta分析得到RR = 1.40, 95%CI: 1.21-1.61。异质性检验 $P = 0.22$, $I^2 = 34\%$ (图2)。

2.2.2 检查6 h后无疼痛人数: 共有4个试验^[9-12]被纳入,采用固定效应模型进行Meta分析结果显示RR = 1.30, 95%CI: 1.17-1.45。异质性检验 $P = 0.56$, $I^2 = 0\%$ (图3)。

2.2.3 插管至回盲部时间: 共有5个试验^[5-8,14]被纳入,采用固定效应模型进行Meta分析结果显示MD = -0.73, 95%CI: -1.73-0.27。异质性检验为 $P = 0.23$, $I^2 = 29\%$ (图4)。

2.2.4 呼气末CO₂分压P(ET CO₂): 仅有刘雄祥等^[6]一个研究报告了呼气末CO₂分压,结果示二氧化

碳组跟空气组无统计学差异。

3 讨论

由于空气获得成本低,暴露肠壁充分,所以结肠镜检查中空气注入是目前世界上的标准方法,但是检查后持续的肠管扩张会导致接受检查者腹痛不适,导致患者恐惧接受结肠镜检查。CO₂极易溶于血液及其他体液,既可快速从肠腔吸收,同时又容易通过肺呼吸排出体外。

本研究的结果表明检查结束后1 h跟6 h无疼痛人数,CO₂注入组优于空气注入组。而插管时间无统计学差异,呼气末CO₂分压亦无统计学意义。

Amato等^[14]在2011年在十七国消化疾病大会上发表的会议记录同样示CO₂注入能够减轻患者结肠镜检查后的疼痛。Singh等^[15]同样显示CO₂注入能减轻患者检查后的疼痛,而且能使插

■应用要点

本研究表明, 结肠镜检查中二氧化碳注入对比空气注入能减轻患者检查术后的疼痛, 高质量大样本的随机对照研究需要被开展。

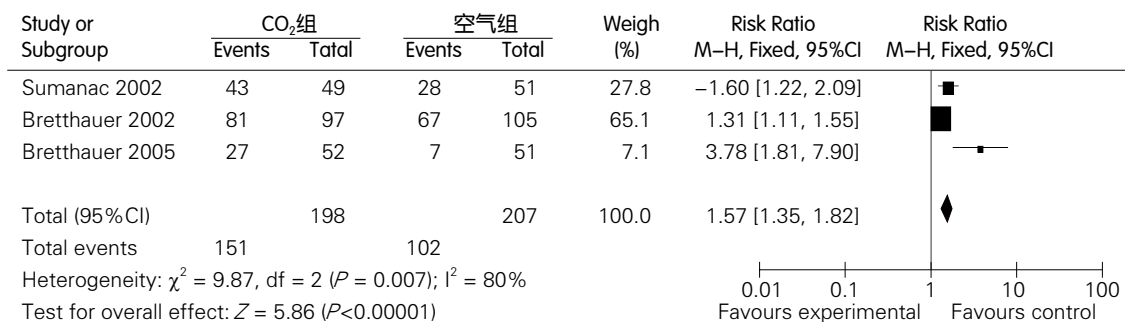


图 1 检查1 h后无疼痛人数Meta分析森林图。

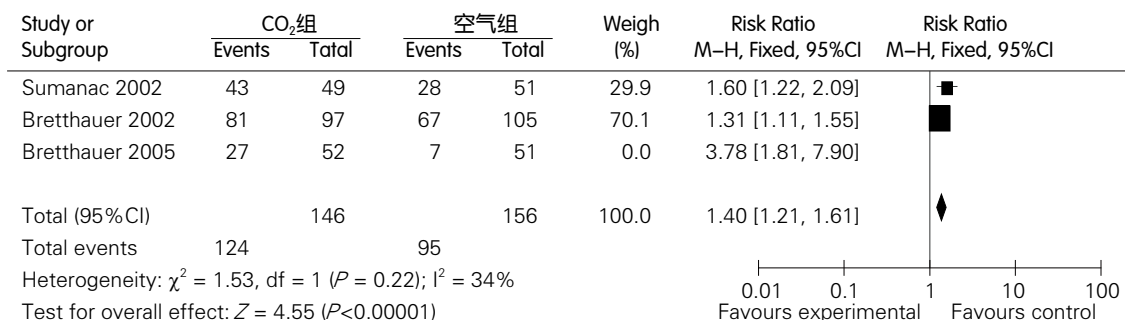


图 2 检查1 h后无疼痛人数剔除异质性来源的研究后Meta分析森林图。

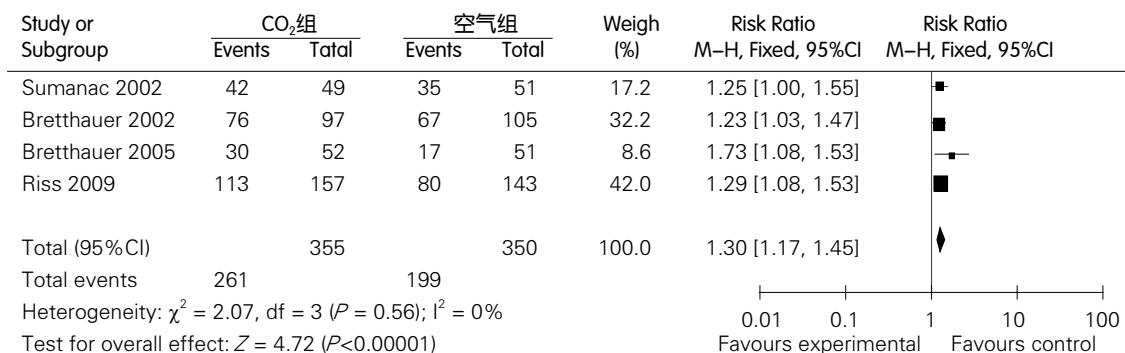


图 3 检查6 h后无疼痛人数Meta分析森林图。

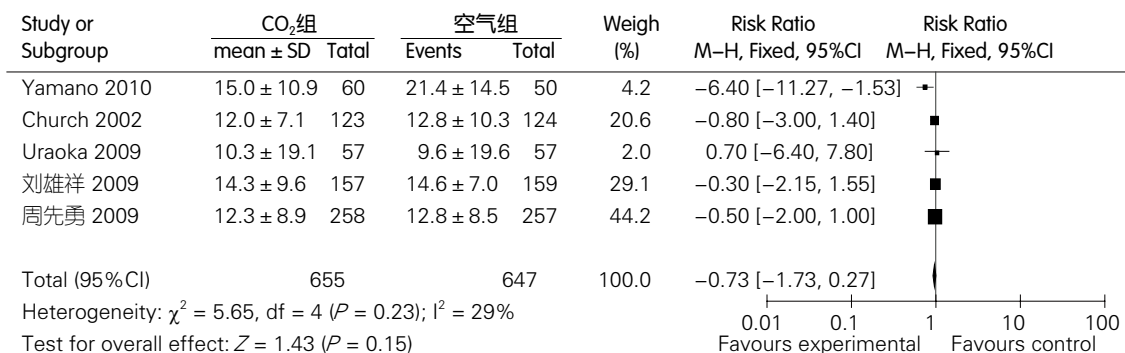


图 4 插管至回盲部时间Meta分析森林图。

管更加容易。Takahashi等^[16]在插管困难的患者中CO₂注入能减轻患者检查后疼痛。上述会议记录和摘要研究的结果跟我们Meta分析的结果相吻

合^[16]。目前为止国内外未有Meta分析和系统评价来评估CO₂注入应用于结肠镜检查的安全性和有效性。

本研究纳入试验存在的问题: 2个研究^[11,13]报道了随机方法和分配隐藏, 其他研究可能存在选择性偏倚, 有4个研究^[5-7,9]没有采用盲法或者仅仅单对患者采用盲法, 可能存在实施偏倚和测量偏倚. 5个研究^[5-9]的未完成检查的原因未记录, 未进行意向性分析, 可能存在报告性偏倚.

本研究的局限性主要有以下几点: (1)有些文献的质量不高; (2)在研的研究和摘要研究因为无法获知研究方法学质量未纳入Meta分析, 待研究全文发表后将更新我们的研究; (3)本研究不适用于有基础呼吸系统疾病的患者; (4)缺乏报告呼气末二氧化碳分压的研究来评估CO₂注入的安全性.

对于未来开展的研究有以下几点建议: (1)严格遵循随机对照试验的设计原则, 尽量避免偏倚的产生, 对试验人员进行培训, 如正确产生随机序列和分配序列, 隐蔽分组, 盲法的实施; (2)对未纳入数据统计的患者注明原因, 并进行意向性分析(ITT); (3)结局指标的报告按照统一的标准; (4)准确详细记录实验组跟对照组患者的基线资料.

总之, 该Meta分析显示CO₂注入能减轻无肺部疾病患者检查后的疼痛, 但是安全性有待进一步的验证, 大样本的高质量RCT和研究存在基础呼吸系统疾病的患者的RCT需要被开展.

4 参考文献

- 1 Stevenson GW, Wilson JA, Wilkinson J, Norman G, Goodacre RL. Pain following colonoscopy: elimination with carbon dioxide. *Gastrointest Endosc* 1992; 38: 564-567
- 2 Newcomer MK, Shaw MJ, Williams DM, Jowell PS. Unplanned work absence following outpatient colonoscopy. *J Clin Gastroenterol* 1999; 29: 76-78
- 3 Rogers BH. Carbon dioxide for colonoscopy. *Gastroenterology* 1980; 78: 1659-1660
- 4 Rogers BH. The safety of carbon dioxide insufflation during colonoscopic electrosurgical polypectomy. *Gastrointest Endosc* 1974; 20: 115-117
- 5 周先勇. 二氧化碳在电子结肠镜检中的应用价值. *医学临床研究* 2009; 26: 2140-2141
- 6 刘雄祥, 刘德良, 李杰. 应用二氧化碳进行结肠镜镜检查的安全性与其有效性评价. *中南大学学报* 2009; 34: 825-830
- 7 Church J, Delaney C. Randomized, controlled trial of carbon dioxide insufflation during colonoscopy. *Dis Colon Rectum* 2003; 46: 322-326
- 8 Yamano HO, Yoshikawa K, Kimura T, Yamamoto E, Harada E, Kudou T, Katou R, Hayashi Y, Satou K. Carbon dioxide insufflation for colonoscopy: evaluation of gas volume, abdominal pain, examination time and transcutaneous partial CO₂ pressure. *J Gastroenterol* 2010; 45: 1235-1240
- 9 Riss S, Akan B, Mikola B, Rieder E, Karner-Hanusch J, Dirlea D, Mittlböck M, Weiser FA. CO₂ insufflation during colonoscopy decreases post-interventional pain in deeply sedated patients: a randomized controlled trial. *Wien Klin Wochenschr* 2009; 121: 464-468
- 10 Bretthauer M, Lynge AB, Thiis-Evensen E, Hoff G, Fausa O, Aabakken L. Carbon dioxide insufflation in colonoscopy: safe and effective in sedated patients. *Endoscopy* 2005; 37: 706-709
- 11 Bretthauer M, Hoff GS, Thiis-Evensen E, Huppertz-Hauss G, Skovlund E. Air and carbon dioxide volumes insufflated during colonoscopy. *Gastrointest Endosc* 2003; 58: 203-206
- 12 Sumanac K, Zealley I, Fox BM, Rawlinson J, Salena B, Marshall JK, Stevenson GW, Hunt RH. Minimizing postcolonoscopy abdominal pain by using CO(2) insufflation: a prospective, randomized, double blind, controlled trial evaluating a new commercially available CO(2) delivery system. *Gastrointest Endosc* 2002; 56: 190-194
- 13 Uraoka T, Kato J, Kuriyama M, Hori K, Ishikawa S, Harada K, Takemoto K, Hiraoka S, Fujita H, Horii J, Saito Y, Yamamoto K. CO(2) insufflation for potentially difficult colonoscopies: efficacy when used by less experienced colonoscopists. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 5186-5192
- 14 Amato A, Radaelli F, Paggi S, Spinzi G, Terruzzi V. Oc.02.7: carbon dioxide insufflation and warm water infusion versus standard air insufflation: a randomized controlled trial in unsedated colonoscopy. *Dig Liver Dis* 2011; 43: S122-S123
- 15 Singh R, Neo EN, Ashby A, Drumond D, Nind G, Murphy EMA, Luck A, Tucker G, Tam W. The impact of carbon dioxide insufflation on efficacy, patient tolerance and safety during colonoscopy: a prospective double blind randomised controlled study. *J Gastroenterol Hepatol* 2009; 24: A236
- 16 Takahashi M, Katayama Y, Kuwayama H. Carbon dioxide-insufflation's impact on patient-based comfort of colonoscopy in difficult-to-insert cases; a randomized controlled trial. *Gastrointest Endosc* 2009; 69: AB365-AB365

编辑 李薇 电编 何基才

经内镜置支架治疗全内脏转位的十二指肠乳头癌1例

侯森林, 乔娜, 韩锦胜, 乔占英

■背景资料

经内镜置入胆道支架是解除恶性阻塞性黄疸的有效手段,可解除和预防胆道内压异常升高,有效地改善肝功能及控制胆管炎,对延长患者生命、提高生活质量有重要的作用,应用已日渐广泛。

侯森林, 乔娜, 韩锦胜, 乔占英, 河北医科大学第二医院微创外科 河北省石家庄市 050000

作者贡献分布: 此课题由侯森林设计、操作并完成论文书写; 乔娜协助完成手术操作; 韩锦胜完成数据分析并帮助论文书写; 乔占英对手术过程、论文撰写进行了指导。

通讯作者: 侯森林, 教授, 050000, 河北省石家庄市, 河北医科大学第二医院微创外科. housenlin2006@126.com

电话: 0311-66002386

收稿日期: 2011-05-22 修回日期: 2011-07-13

接受日期: 2011-07-18 在线出版日期: 2011-08-18

ERCP-assisted metal stent placement for complete transposition of the viscera in a patient with papillary carcinoma of the duodenum

Sen-Lin Hou, Na Qiao, Jin-Sheng Han, Zhan-Ying Qiao

Sen-Lin Hou, Na Qiao, Jin-Sheng Han, Zhan-Ying Qiao, Department of Microsurgery, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China

Correspondence to: Professor Sen-Lin Hou, Department of Microsurgery, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China. housenlin2006@126.com.

Received: 2011-05-22 Revised: 2011-07-13

Accepted: 2011-07-18 Published online: 2011-08-18

Abstract

Endoscopic retrograde cholangiopancreatography (ERCP) was used to treat complete transposition of the viscera in a patient with papillary carcinoma of the duodenum. The impact of two different body positions (left and right prone positions) on the difficulty level of the surgery was compared. In addition, we summarize key points of the surgical procedure.

Key Words: Endoscope; Stent placement; Complete transposition of the viscera; Papillary carcinoma of the duodenum

Hou SL, Qiao N, Han JS, Qiao ZY. ERCP-assisted metal stent placement for complete transposition of the viscera in a patient with papillary carcinoma of the duodenum. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(23): 2506-2507

■同行评议者

蓝宇, 教授, 北京积水潭医院消化科

摘要

采用内镜下十二指肠途径(ERCP)置支架治疗, 比较左俯卧位与右俯卧位在全内脏转位患者的手术操作的难易程度及关键技术点, 分享经内镜支架治疗全内脏转位的十二指肠乳头癌患者1例的心得体会。

关键词: 内镜; 支架治疗; 全内脏转位; 十二指肠乳头癌

侯森林, 乔娜, 韩锦胜, 乔占英. 经内镜置支架治疗全内脏转位的十二指肠乳头癌1例. *世界华人消化杂志* 2011; 19(23): 2506-2507

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2506.asp>

0 引言

全内脏转位(total situs versus, TSI)是一种罕见的解剖异常, 有这种遗传倾向的新生儿发生率为1/1 000-100 000^[1], 一般表现右位心, 腹部异常为正常解剖的反位, 无发育、生长异常, 也不影响其功能, 一般无任何症状. 其发生原因可能与胚胎发育异常或者双亲染色体异常有关. 对全内脏转位患者经内镜下治疗操作未见有报道. 本病例报告为经内镜置支架治疗全内脏转位的十二指肠乳头癌患者1例, 在内镜的操作过程的心得体会及关键技术点与大家分享。

1 病例报告

女, 76岁, 主因发现皮肤、巩膜黄染3 d入院. 患者于3 d前发现皮肤巩膜黄染, 呈渐进性, 伴有周身瘙痒, 无腹痛、腹胀, 无恶心、呕吐, 不伴有寒战、发热, 尿色呈浓茶样, 大便为陶土样大便. 患者于5 mo前曾行经皮经肝穿刺置支架治疗, 术中取病理活检结果回报为十二指肠乳头腺癌. 查体: 全身皮肤巩膜明显黄染, 心肺查体未见异常, 腹平坦, 未见胃肠型及蠕动波, 未见腹壁静脉曲张, 全腹软, 肝脾未触及, 剑突下轻度压痛, 无反跳痛及肌紧张, 移动性浊音阴性, 肠鸣音5次/min. 肝功能示: TBIL 233 $\mu\text{mol/L}$, DBIL 101 $\mu\text{mol/L}$, IBIL 132 $\mu\text{mol/L}$, ALT 259 U/L, AST

234 U/L, ALP 1 730 U/L, GGT 1 172 U/L. 腹部B超提示: 胆总管内留置管、胆总管近端最宽处约2.8 cm肝内胆管明显扩张最宽处约1.6 cm提示肝内外胆管、主胰管最宽处约0.85 cm明显扩张. 胸片提示: 镜面右位心, 胃泡位于右膈下. 诊断: 十二指肠乳头腺癌、全内脏转位. 考虑患者支架已堵塞, 拟行经内镜置支架治疗.

常规术前准备下, 首先取常规的左俯卧位, 插镜进入胃腔后见胃的走行与正常进镜相反, 胃部标记不明显, 勉强进镜到达十二指肠后, 需要推镜身使十二指肠镜弯曲才能看到乳头, 乳头距镜身较远, 不易调整、固定乳头位置, 插管方向不能与胆管走行同轴, 诊断和治疗极其困难. 退出内镜后使患者体位改为右俯卧位重新进镜, 术者改为右手持镜, 方向与正常进镜呈180度旋转, 到达胃体部, 远处为胃角侧面像, 镜头向上反转, 则见胃角正面像, 上方为胃体部, 下方为胃窦部, 到达十二指肠球部, 再稍进镜, 并将镜身逆时针旋转约60度后, 再进镜看到乳头后拉直镜身, 先行选择性胆管插管, 待导丝越过梗阻段先抽出墨绿色胆汁约40 mL后注入适量30%泛影葡胺造影, 见胆总管下段梗阻, 梗阻段以上肝内外胆管扩张, 考虑肿瘤长入金属支架内造成胆管梗阻, 再循导丝用推送器置入一8 mm×80 mm胆道金属支架, 支架下端位于乳头下方1.0 cm处, 见有大量墨绿色感染胆汁引出. 顺利完成内镜操作.

术后患者未出现出血、胆管炎、胰腺炎等并发症, 术后第5天复查肝功能结果: TBIL 104.1 $\mu\text{mol/L}$, DBIL 60.7 $\mu\text{mol/L}$, IBIL 43.4 $\mu\text{mol/L}$, ALT 71 U/L, AST 41 U/L, ALP 1 164 U/L, GGT 639 U/L. 术后恢复顺利, 术后3 wk肝功能各项指标均降至正常.

2 讨论

全内脏转位(total situs inversus, TSI)是一种罕见的常染色体隐性遗传解剖畸形, 其特征是心脏及腹内脏器与正常解剖位置呈镜像分布^[2]. 内脏转位分为部分转位及完全转位两种, 统计表明内脏转位中全内脏转位占93.76%±2.2%, 部分内脏转位占6.3%±2.2%, 以胸腹腔脏器完全转位较多见. 可能有以下两个原因: (1)胎儿胚胎发育时旋转障碍所致. 转位原因尚不清楚, 可能与

胚胎发生及胎儿初期发育异常有关; (2)另一原因可能来自双亲染色体及其运载的基因. 与家族遗传、染色体结构和数量的改变有关. TSI并不被认为是恶性肿瘤的危险因素. TSI合并十二指肠乳头腺癌罕见, 2006年意大利的Tsunoda等^[3]报道了第1例全内脏转位并胆管癌行胰十二指肠切除术个例, 国内尚未见相关手术报道. Sato等^[4]报道了内脏转位并肝胆管结石病例. 本病例患者直系亲属中未见有全内脏转位者. 对于伴有全内脏转位患者行经内镜逆行胰胆管造影术(endoscopic retrograde cholangiopancreatography, ERCP), 尚无文献报道.

术者尝试了左俯卧位与右俯卧位对于患者行ERCP的区别, 应用常规的左俯卧位, 有以下几个困难: (1)十二指肠镜在刚进入胃腔后, 由于胃体不易进入, 内镜容易在胃底部结袢; (2)由于胃角等胃部标记不明显, 进入胃窦和发现幽门困难; (3)由于角度相反, 通过幽门后内镜进入十二指肠降部困难; (4)乳头位置不好摆在内镜视野的中央, 由于乳头距镜身较远而且不易调整、固定乳头位置, 插管方向与胆管走行不在同一轴线, 插管造影等操作不易成功. 采取右俯卧位时, 困难在于术者在进镜的过程中是右手持镜, 打钮不方便, 特别困难时可以让助手帮助进镜. 但由于方向的纠正使得进镜、拉直镜身非常顺利, 乳头的位置和正常一样, 操作变得非常顺利. 笔者建议术前应对患者进行评估, 如果发现完全内脏转位, 应采用右俯卧位, 内镜主机的位置完全相反的情况下完成. 设备的放置、术者助手的站位, 皆与正常情况的方向相反, 给手术操作带来不便, 但只要仔细、谨慎操作且不拘泥于常规, 可顺利完成手术.

3 参考文献

- 1 Cronen PW, Moss JP, Simpson T, Rao M, Cowles L. Tenckhoff catheter placement: surgical aspects. *Am Surg* 1985; 51: 627-629
- 2 Sano T, Kamiya J, Nagino M, Kanai M, Uesaka K, Nimura Y. Hepatectomy for proximal bile duct carcinoma in a patient with situs inversus; a case report. *Hepatogastroenterology* 2003; 50: 1266-1268
- 3 Tsunoda S, Miyashita T, Murata M. Pancreaticoduodenectomy for common bile duct cancer in a patient with situs inversus totalis: a case report. *Int Surg* 2006; 91: 24-27
- 4 Sato M, Watanabe Y, Iseki S, Akehi S, Tachibana M, Sato N, Kimura S. Hepatolithiasis with situs inversus: first case report. *Surgery* 1996; 119: 598-600

■同行评价

本文病例罕见, 具有一定的临床借鉴价值.

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

《世界华人消化杂志》投稿须知

《世界华人消化杂志》为保证期刊的学术质量, 对所有来稿均进行同行评议, 是一份被中国科技论文统计源核心期刊、中文核心期刊要目总览收录的学术类期刊。

1 投稿总则

1.1 性质 《世界华人消化杂志》[ISSN 1009-3079 (print), ISSN 2219-2859 (online), CN 14-1260/R]是一份同行评议性和开放获取(open access, OA)的旬刊。OA最大的优点是面向全国本领域专家及公众开放无需注册, 免费获取PDF等格式的全文, 切实破除了传统性期刊阻碍科学研究成果快速传播的障碍。OA是一项真正意义上的公益性科学传播工具, 编委、作者和读者利益的最大化的目标, 努力推进本学科的繁荣和发展。

《世界华人消化杂志》定价56.00元, 全年2016.00元, 邮发代号82-262, 由世界华人消化杂志编辑部出版。《世界华人消化杂志》主要报道胃肠病学、肝胆病学、胰腺病学、内镜介入与消化外科等多学科的评论及基础研究和临床实践等各类文章, 具体内容涉及: 食管疾病, 如反流性食管炎、Barret's食管、食管静脉曲张和食管癌等; 胃部疾病, 胃食管反流性疾病、胃炎、胃动力障碍、胃出血、胃癌和幽门螺杆菌感染等; 肠道疾病, 如肠道出血、肠穿孔、肠梗阻、肠道炎症(如IBD/CD等)、肠道感染、大肠癌和大肠腺瘤等; 肝胆部疾病如病毒性肝炎、肝硬化、脂肪肝、肝纤维化、肝衰竭、胆石病、胆汁郁积、梗阻性黄疸、肝癌、胆囊癌、胆管癌和门静脉高压等; 胰腺疾病, 如胰腺炎和胰腺癌等; 全身性疾病涉及消化系统, 如自身免疫性及瘀胆性疾病、腹腔疾病、消化不良和代谢性疾病等; 以及与以上疾病相关的基因及基因组学、微生物及分子生物学、病因学、流行病学、免疫学、临床内外科诊断与治疗(如影像、化疗、移植、营养等); 除以上外, 本刊也报道诊断与筛选、内窥镜检查法、影像及先进技术。

《世界华人消化杂志》被国际检索系统美国《化学文摘》(Chemical Abstracts, CA)、荷兰《医学文摘库/医学文摘(EMBASE/Excerpta Medica, EM)》和俄罗斯《文摘杂志(Abstract Journal, AJ)》收录。国内为中国科技论文统计与分析期刊(科技部选为中国科技论文统计源期刊)、《中文核心期刊要目总览》(2008年版)内科学类的核心期刊、《中国学术期刊评价研究报告-RCES权威、核心期刊排行榜与指南》和

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

1.2 栏目 述评, 基础研究, 临床研究, 焦点论坛, 文献综述, 研究快报, 临床经验, 病例报告, 会议纪要。文稿应具科学性、先进性、可读性及实用性, 重点突出, 文字简练, 数据可靠, 写作规范, 表达准确。

2 撰稿要求

2.1 总体标准 文稿撰写应遵照国家标准GB7713科学技术报告、学位论文和学术论文的编写格式, GB6447文摘编写规则, GB7714文后参考文献著录规则, GB/T 3179科学技术期刊编排格式等要求; 同时遵照国际医学期刊编辑委员会(International Committee of Medical Journal Editors)制定的《生物医学期刊投稿的统一要求(第5版)》(Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals)。见: *Ann Intern Med* 1997; 126: 36-47。

2.2 名词术语 应标准化, 前后统一, 如原词过长且多次出现者, 可于首次出现时写出全称加括号内注简称, 以后直接用简称。医学名词以全国自然科学名词审定委员会公布的《生理学名词》、《生物化学名词与生物物理学名词》、《化学名词》、《植物学名词》、《人体解剖学名词》、《细胞生物学名词》及《医学名词》系列为准, 药名以《中华人民共和国药典》和卫生部药典委员会编的《药名词汇》为准, 国家食品药品监督管理局批准的新药, 采用批准的药名; 创新性新药, 请参照我国药典委员会的“命名原则”, 新译名词应附外文。公认习用缩略语可直接应用(建议第一次也写出全称), 如ALT, AST, mAb, WBC, RBC, Hb, T, P, R, BP, PU, GU, DU, ACTH, DNA, LD50, HBsAg, HCV

RNA, AFP, CEA, ECG, IgG, IgA, IgM, TCM, RIA, ELISA, PCR, CT, MRI等. 为减少排印错误, 外文、阿拉伯数字、标点符号必须正确打印在A4纸上. 中医药名词英译要遵循以下原则: (1)有对等词者, 直接采用原有英语词, 如中风stroke, 发热fever; (2)有对应词者应根据上下文合理选用原英语词, 如八法eight principal methods; (3)英语中没有对等词或相应词者, 宜用汉语拼音, 如阴yin, 阳yang, 阴阳学说yinyangology, 人中renzhong, 气功qigong; 汉语拼音要以词为单位分写, 如weixibao nizhuanwan(胃细胞逆转丸), guizhitang(桂枝汤). 通常应小写.

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

2.4 计量单位 采用国际单位制并遵照有关国家

标准, GB3100-3102-93量和单位. 原来的“分子量”应改为物质的相对分子质量. 如30 kD改为 M_r 30 000或30 kDa(M大写斜体, r小写正体, 下角标); “原子量”应改为相对原子质量, 即 A_r (A大写斜体, r小写正体, 下角标); 也可采用原子质量, 其单位是u(小写正体). 计量单位在+、-及-后列出. 在±前后均要列出, 如37.6 °C ± 1.2 °C, 45.6岁 ± 24岁, 56.4 d ± 0.5 d. 3.56 ± 0.27 pg/ml应为3.56 ng/L ± 0.27 ng/L. BP用kPa(mmHg), RBC数用 $1 \times 10^{12}/L$, WBC数用 $1 \times 10^9/L$, WBC构成比用0.00表示, Hb用g/L. M_r 明确的体内物质以nmol/L或mmol/L表示, 不明确者用g/L表示. 1 M硫酸, 改为1 mol/L硫酸, 1 N硫酸, 改为0.5 mol/L硫酸. 长10 cm, 宽6 cm, 高4 cm, 应写成10 cm × 6 cm × 4 cm. 生化指标一律采用法定计量单位表示, 例如, 血液中的总蛋白、清蛋白、球蛋白、脂蛋白、血红蛋白、总脂用g/L, 免疫球蛋白用mg/L; 葡萄糖、钾、尿素、尿素氮、CO₂结合力、乳酸、磷酸、胆固醇、胆固醇酯、三酰甘油、钠、钙、镁、非蛋白氮、氯化物; 胆红素、蛋白结合碘、肌酸、肌酐、铁、铅、抗坏血酸、尿胆元、氨、维生素A、维生素E、维生素B1、维生素B2、维生素B6、尿酸; 氢化可的松(皮质醇)、肾上腺素、汞、孕酮、甲状腺素、睾酮、叶酸用nmol/L; 胰岛素、雌二醇、促肾上腺皮质激素、维生素B12用pmol/L. 年龄的单位有日龄、周龄、月龄和岁. 例如, 1秒, 1 s; 2分钟, 2 min; 3小时, 3 h; 4天, 4 d; 5周, 5 wk; 6月, 6 mo; 雌性♀, 雄性♂, 酶活性国际单位IU = 16.67 nkat, 对数log, 紫外uv, 百分比%, 升L, 尽量把 1×10^{-3} g与 5×10^{-7} g之类改成1 mg与0.5 mg, hr改成h, 重量γ改成mg, 长度m改成mm. 国际代号不用于无数字的文句中, 例如每天不写每d, 但每天8 mg可写8 mg/d. 在一个组合单位符号内不得有1条以上的斜线, 例如不能写成mg/kg/d, 而应写成mg/(kg·d), 且在整篇文章内应统一. 单位符号没有单、复数的区分, 例如, 2 min不是2 mins, 3 h不是3 hs, 4 d不是4 ds, 8 mg不是8 mgs. 半个月, 15 d; 15克, 15 g; 10%福尔马林, 40 g/L甲醛; 95%酒精, 950 mL/L乙醇; 5% CO₂, 50 mL/L CO₂; 1 : 1 000肾上腺素, 1 g/L肾上腺素; 胃黏膜含促胃液素36.8 pg/mg, 改为胃黏膜蛋白含促胃液素36.8 ng/g; 10%葡萄糖改为560 mmol/L或100 g/L葡萄糖; 45 ppm = 45×10^{-6} ; 离心的旋转频率(原称转速)用r/min, 超速者用g; 药物剂量若按体质量计算, 一律以“/kg”表示.

《世界华人消化杂志》为中国科技论文统计源核心期刊(2010年)和中文核心期刊要目总览(北京大学图书馆, 2008年版)收录的学术期刊.

《世界华人消化杂志》编辑部, 100025, 北京市朝阳区, 东四环中路62号, 远洋国际中心D座903室, 电话: 010-5908-0035, 传真: 010-8538-1893, Email: wjcd@wjgnet.com; http://www.wjgnet.com

2.5 统计学符号 (1) t 检验用小写 t ; (2) F 检验用英文大写 F ; (3)卡方检验用希文小写 χ^2 ; (4)样本的相关系数用英文小写 r ; (5)自由度用希文小写 ν ; (6)样本数用英文小写 n ; (7)概率用英文斜体大写 P . 在统计学处理中在文字叙述时平均数 \pm 标准差表示为 $\text{mean} \pm \text{SD}$, 平均数 \pm 标准误为 $\text{mean} \pm \text{SE}$. 统计学显著性用 $^aP < 0.05$, $^bP < 0.01$ ($P > 0.05$ 不注). 如同一表中另有一套 P 值, 则 $^cP < 0.05$, $^dP < 0.01$; 第三套为 $^eP < 0.05$, $^fP < 0.01$ 等.

2.6 数字用法 遵照国家标准GB/T 15835-1995出版物上数字用法的规定, 作为汉语词素者采用汉字数字, 如二氧化碳、十二指肠、三倍体、四联球菌、五四运动、星期六等. 统计学数字采用阿拉伯数字, 如1000-1500 kg, 3.5 mmol/L \pm 0.5 mmol/L等. 测量的数据不能超过其测量仪器的精密度, 例如6347意指6000分之一的精密度. 任何一个数字, 只允许最后一位有误差, 前面的位数不应有误差. 在一组数字中的 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 应考虑到个体的变差, 一般以SD的1/3来定位数, 例如3614.5 g \pm 420.8 g, SD的1/3达一百多g, 平均数波动在百位数, 故应写成3.6 kg \pm 0.4 kg, 过多的位数并无意义. 又如8.4 cm \pm 0.27 cm, 其SD/3 = 0.09 cm, 达小数点后第2位, 故平均数也应补到小数点后第2位. 有效位数以后的数字是无效的, 应该舍. 末尾数字, 小于5则舍, 大于5则进, 如恰等于5, 则前一位数逢奇则进, 逢偶(包括“0”)且5之后全为0则舍. 末尾时只可1次完成, 不得多次完成. 例如23.48, 若不要小数点, 则应成23, 而不应该23.48 \rightarrow 23.5 \rightarrow 24. 年月日采用全数字表达法, 请按国家标准GB/T 7408-94书写. 如1985年4月12日, 可写作1985-04-12; 1985年4月, 写作1985-04; 从1985年4月12日23时20分50秒起至1985年6月25日10时30分止, 写作1985-04-12 T23:20:50/1985-06-25 T10:30:00; 从1985年4月12日起至1985年6月15日止, 写作1985-04-12/06-16, 上午8时写作08:00, 下午4时半写作16:30. 百分数的有效位数根据分母来定: 分母 ≤ 100 , 百分数到个位; $101 \leq \text{分母} \leq 1000$, 百分数到小数点后1位; 余类推. 小数点前后的阿拉伯数字, 每3位间空1/4阿拉伯数字距离, 如1486800.475 65. 完整的阿拉伯数字不移行!

2.7 标点符号 遵照国家标准GB/T 15834-1995标点符号用法的要求, 本刊论文中的句号都采用黑圆点; 数字间的起止号采用“-”字线, 并列的汉语词间用顿号分开, 而并列的外文词、阿拉伯数字、外文缩略词及汉语拼音字母拼写词间改用逗号分开, 参考文献中作者间一律用逗号

分开; 表示终了的标点符号, 如句号、逗号、顿号、分号、括号及书名号的后一半, 通常不用于一行之首; 而表示开头的标点符号, 如括号及书名号的前一半, 不宜用于一行之末. 标点符号通常占一格, 如顿号、逗号、分号、句号等; 破折号应占两格; 英文连字符只占一个英文字符的宽度, 不宜过长, 如5-FU. 外文字符下划一横线表示用斜体, 两横线表示用小写, 三横线表示用大写, 波纹线表示用黑体.

3 稿件格式

3.1 题名 简明确切地反映论文的特定内容, 鲜明而有特色, 阿拉伯数字不宜开头, 不用副题名, 一般20个字. 避免用“的研究”或“的观察”等非特定词.

3.2 作者 论文作者的署名, 按照国际医学杂志编辑委员会(ICMJE, International Committee of Medical Journal Editors)作者资格标准执行. 作者标准为: (1)对研究的理念和设计、数据的获得、分析和解读做出重大贡献; (2)起草文章, 并对文章的重要的知识内容进行批评性修改; (3)接受对准备发表文章的最后一稿. 作者应符合条件1, 2, 3, 对研究工作有贡献的其他人可放入志谢中. 作者署名的次序按贡献大小排列, 多作者时姓名间用逗号, 如是单名, 则在姓与名之间空1格(正文和参考文献中不空格). 《世界华人消化杂志》要求所有署名人写清楚自己对文章的贡献. 世界华人消化杂志不设置共同第一作者和共同通信作者.

3.3 单位 作者后写单位的全称空1格后再写省市及邮政编码. 格式如: 张旭晨, 梅立新, 承德医学院病理教研室 河北省承德市 067000

3.4 第一作者简介 格式如: 张旭晨, 1994年北京中医药大学硕士, 讲师. 主要从事消化系统疾病的病理研究.

3.5 作者贡献分布 格式如: 陈湘川与庞丽娟对此文所作贡献两均等; 此课题由陈湘川、庞丽娟、陈玲、杨兰、张金芳、齐妍及李洪安设计; 研究过程由陈玲、杨兰、张金芳、蒋金芳、杨磊、李锋及曹秀峰操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由曹秀峰提供; 数据分析由陈湘川、杨兰及庞丽娟完成; 本论文写作由陈湘川、庞丽娟及李洪安完成.

3.6 同行评议者 为了确保刊出文章的质量, 本刊即将开始实行接受稿件的同行评议公开策略, 将同行评议者姓名, 职称, 机构的名称与文章一同在脚注出版. 格式如: 房静远, 教授, 上海交通

大学医学院附属医院仁济医院,上海市消化疾病研究所.

3.7 基金资助项目 格式如: 国家自然科学基金资助项目, No. 30224801

3.8 通讯作者 格式如: 通讯作者: 黄缘, 教授, 330006, 江西省南昌市民德路1号, 南昌大学第二附属医院消化内科, 江西省分子医学重点实验室. huang9815@yahoo.com

电话: 0351-4078656 传真: 0351-4086337

收稿日期: 修回日期:

3.9 英文摘要

题名 文章的题名应言简意赅, 方便检索, 英文题名以不超过10个实词为宜, 应与中文题名一致.

作者 作者姓名汉语拼音拼写法规定为: 先名, 后姓; 首字母大写, 双名之间用半字线“-”分开, 多作者时姓名间加逗号. 格式如: “潘伯荣”的汉语拼写法为“Bo-Rong Pan”.

单位 先写作者, 后写单位的全称及省市邮政编码. 例如: Xu-Chen Zhang, Li-Xin Mei, Department of Pathology, Chengde Medical College, Chengde 067000, Hebei Province, China

基金资助项目 格式如: Supported by National Natural Science Foundation of China, No.30224801

通讯作者 格式如: Correspondence to: Dr. Lian-Sheng Ma, Taiyuan Research and Treatment Center for Digestive Diseases, 77 Shuangta Xijie, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China. wcjd@wjgnet.com

收稿及修回日期 格式如: Received: Revised:

摘要 包括目的、方法、结果、结论, 书写要求与中文摘要一致.

3.10 中文摘要 必须在300字左右, 内容应包括目的(应阐明研究的背景和设想、目的), 方法(必须包括材料或对象. 应描述课题的基本设计, 双盲、单盲还是开放性, 使用什么方法, 如何进行分组和对照, 数据的精确程度. 研究对象选择条件与标准是否遵循随机化、齐同化的原则, 对照组匹配的特征. 如研究对象是患者, 应阐明其临床表现, 诊断标准. 如何筛选分组, 有多少例进行过随访, 有多少例因出现不良反应而中途停止研究), 结果(应列出主要结果, 包括主要数据, 有什么新发现, 说明其价值和局限, 叙述要真实、准确、具体, 所列数据经用何种统计学方法处理; 应给出结果的置信区间和统计学显著性检验的确切值; 概率写 P , 后应写出相应显著性检验值), 结论(全文总结, 准确无误的观点及价值).

3.11 正文标题层次 0 引言; 1 材料和方法, 1.1 材

料, 1.2 方法; 2 结果; 3 讨论; 4 参考文献. 序号一律左顶格写, 后空1格写标题; 2级标题后空1格接正文. 正文内序号连排用(1), (2), (3). 以下逐条陈述.

0 引言 应包括该研究的目的和该研究与其他相关研究的关系.

1 材料和方法 应尽量简短, 但应让其他有经验的研究者能够重复该实验. 对新的方法应该详细描述, 以前发表过的方法引用参考文献即可, 有关文献中或试剂手册中的方法的改进仅描述改进之处即可.

2 结果 实验结果应合理采用图表和文字表示, 在结果中应避免讨论.

3 讨论 要简明, 应集中对所得的结果做出解释而不是重复叙述, 也不应是大量文献的回顾.

图表的数量要精选. 表应有表序和表题, 并有足够具有自明性的信息, 使读者不查阅正文即可理解该表的内容. 表内每一栏均应有表头, 表内非公知通用缩写应在表注中说明, 表格一律使用三线表(不用竖线), 在正文中该出现的地方应注出. 图应有图序、图题和图注, 以使其容易被读者理解, 所有的图应在正文中该出现的地方注出. 同一个主题内容的彩色图、黑白图、线条图, 统一用一个注解分别叙述. 如: 图1 萎缩性胃炎治疗前后病理变化. A: ...; B: ...; C: ...; D: ...; E: ...; F: ...; G: ... 曲线图可按●、○、■、□、▲、△顺序使用标准的符号. 统计学显著性用: $^aP<0.05$, $^bP<0.01$ ($P>0.05$ 不注). 如同一表中另有一套 P 值, 则 $^cP<0.05$, $^dP<0.01$; 第3套为 $^eP<0.05$, $^fP<0.01$. P 值后注明何种检验及其具体数字, 如 $P<0.01$, $t = 4.56$ vs 对照组等, 注在表的左下方. 表内采用阿拉伯数字, 共同的计量单位符号应注在表的右上方, 表内个位数、小数点、±、-应上下对齐. “空白”表示无此项或未测, “-”代表阴性未发现, 不能用同左、同上等. 表图勿与正文内容重复. 表图的标目尽量用 t/min , $c/(\text{mol/L})$, p/kPa , V/mL , $t/^\circ\text{C}$ 表达.

志谢 后加冒号, 排在讨论后及参考文献前, 左齐.

4 参考文献 本刊采用“顺序编码制”的著录方法, 即以文中出现顺序用阿拉伯数字编号排序. 提倡对国内同行近年已发表的相关研究论文给予充分的反映, 并在文内引用处右上角加方括号注明角码. 文中如列作者姓名, 则需在“Pang等”的右上角注角码号; 若正文中仅引用某文献中的论述, 则在该论述的句末右上角注码号. 如马连生^[1]报告……, 潘伯荣等^[2-5]认

《世界华人消化杂志》自2006-01-01起改为旬刊发行, 每月8、18、28日出版. 北京报刊发行局发行, 邮发代号: 82-262.

2010年,《世界华人消化杂志》将坚持开放获取(open access, OA)的出版模式,编辑出版高质量文章,努力实现编委、作者和读者利益的最大化,努力推进本学科的繁荣和发展,向专业化、特色化和品牌化方向迈进。

为……; PCR方法敏感性高^[6-7]。文献序号作正文叙述时,用与正文同号的数字并排,如本实验方法见文献[8]。所引参考文献必须以近2-3年SCIE, PubMed,《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊为准,通常应只引用与其观点或数据密切相关的国内外期刊中的最新文献。期刊: 序号, 作者(列出全体作者), 文题, 刊名, 年, 卷, 起页-止页, PMID和DOI编号; 书籍: 序号, 作者(列出全部), 书名, 卷次, 版次, 出版地, 出版社, 年, 起页-止页。

5 网络版的发表前链接 本刊即将开始实行网络版的每篇文章上都有该文发表前纪录的链接, 包括首次提交的稿件, 同行评议人报告, 作者给审稿人回信和作者修回稿, 以PDF格式上传。读者可以针对论文、审稿意见和作者的修改情况发表意见, 指出问题与不足; 作者也可以随时修改完善自己发表的论文, 使文章的发表成为一个编者、同行评议者、读者、作者互动的动态过程。

4 写作格式实例

4.1 述评写作格式实例

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

4.2 研究原著写作格式实例

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

4.3 焦点论坛写作格式实例

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

4.4 文献综述写作格式实例

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

4.5 研究快报写作格式实例

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

4.6 临床经验写作格式实例

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

4.7 病例报告写作格式实例

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

5 投稿方式

接受在线投稿, 不接受其他方式的投稿, 如E-mail、打印稿。在线投稿网址: <http://www.baishideng.com/wcjd/ch/index.aspx>。无法在线提交的通过submission@wjgnet.com, 电话: 010-8538-1892, 传真: 010-8538-1893寻求帮助。投稿须知下载网址<http://www.wjgnet.com/1009-3079/tgxz.pdf>。审稿过程平均时间需要14-28 d。所有的来

稿均经2-3位同行专家严格评审, 2位或以上通过为录用, 否则将退稿或修改后再审。接受后的稿件作者需缴纳稿件发表费, 文章发表后可获得1本样刊及10套单行本(稿酬)。

6 修回稿须知

6.1 修回稿信件 来稿包括所有作者签名的作者投稿函。内容包括: (1)保证无重复发表或一稿多投; (2)是否有经济利益或其他关系造成的利益冲突; (3)所有作者均审读过该文并同意发表, 所有作者均符合作者条件, 所有作者均同意该文代表其真实研究成果, 保证文责自负; (4)列出通讯作者的姓名、职称、地址、电话、传真和电子邮件; 通讯作者应负责与其他作者联系, 修改并最终审核复核稿; (5)列出作者贡献分布; (6)来稿应附有作者工作单位的推荐信, 保证无泄密, 如果是几个单位合作的论文, 则需要提供所有参与单位的推荐信; (7)愿将印刷版和电子版出版权转让给本刊编辑部。

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

6.3 版权 本论文发表后作者享有非专有权, 文责由作者自负。作者可在本单位或本人著作集中汇编出版以及用于宣讲和交流, 但应注明发表于《世界华人消化杂志》××年; 卷(期): 起止页码。如有国内外其他单位和个人复制、翻译出版等商业活动, 须征得《世界华人消化杂志》编辑部书面同意, 其编辑版权属本刊所有。

《世界华人消化杂志》编辑部

北京百世登生物医学科技有限公司
100025, 北京市朝阳区东四环中路62号
远洋国际中心D座903室
电话: 010-5908-0035
传真: 010-8538-1893
E-mail: wcjd@wjgnet.com
<http://www.wjgnet.com>

2011年国内国际会议预告

2011-08-20/22

第十五次全国中西医结合儿科学术会议

会议地点: 兰州市

联系方式: zxyek@sina.com

2011-08-26/27

第四届福瑞肝纤维化论坛

会议地点: 上海市

联系方式: bstract@cosoman.com

2011-08-31/09-02

腹腔间室综合征的护理进展

会议地点: 延吉市

联系方式: qiyan68@126.com

2011-09

中华医学会超声医学分会第十一次全国超声医学学术会议

会议地点: 青岛市

联系方式: <http://www.nccsum.org/>

2011-09-14/17

第六届全国疑难及重症肝病大会

会议地点: 兰州市

联系方式: office@cnsld.org

2011-09-14/18

第十四届全国临床肿瘤学大会暨2011年CSCO学术年会

会议地点: 福州市

联系方式: 010-67726451

2011-09-16/18

第七届全国消化系统中晚期恶性肿瘤学术年会

会议地点: 济南市

联系方式: xiaohuahuiyi@126.com

2011-09-24

2011中国消化病学大会

会议地点: 北京市

联系方式: 010-51292005-105

2011-09-25/26

2011北京消化内镜节

会议地点: 北京市

联系方式: 010-51292005-105

2011-10-07/09

第八届亚太肝病学会主题会议

会议地点: 北京市

联系方式: info@apaslstc.org

2011-10-13/16

2011年亚太地区国际肿瘤生物学和医学学术会议

会议地点: 上海市

联系方式: clinimmunchina@yahoo.com

2011-10-14/16

中华医学会第五次全国艾滋病、病毒性丙型肝炎暨全国

热带病学术会议

会议地点: 重庆市

联系方式: www.nccsid.org

2011-10-21/23

中华医学会病理学分会第十七次学术会议

会议地点: 杭州市

联系方式: leighdai@cma.org.cn

2011-10-22/26

第19届欧洲肠胃病学联合组织(UEG)会议周

会议地点: 斯德哥尔摩

联系方式: uegw2011@cpo-hanser.de

2011-10-28/11-02

2011美国胃肠病学会年度科学会议

会议地点: 华盛顿

联系方式: annualmeeting@acg.gi.org

2011-11-04/08

第62届美国肝病研究学会(AASLD)年会

会议地点: 旧金山

联系方式: medical_conference@263.net

2011-11-18/23

第十一届全国消化道恶性病变介入诊疗研讨会暨2011全

国内镜/介入/放疗新技术国际论坛

会议地点: 北京市

联系方式: doctor302@163.com

2011-11-25/27

2011年全国消化道静脉曲张及其伴发消化疾病内镜诊治研讨会

会议地点: 西安市

联系方式: 2011varices@sina.com

2011-12-08/11

第11次全国消化系疾病学术会议

会议地点: 杭州市

联系方式: csgdabstract@126.com

2011-12-09/11

江苏省第四次胃肠外科学术会议

会议地点: 南京市

联系方式: jswcwk@yahoo.com.cn

志谢世界华人消化杂志编委

本期文章审稿中(包括退稿), 我刊编委付出了宝贵的时间和大量的精力, 提高了《世界华人消化杂志》的学术质量, 在此表示衷心感谢!

白爱平 副教授
南昌大学第一附属医院消化内科

陈贻胜 教授
福建省立医院消化内科

党双锁 教授
西安交通大学第二医院感染科

高润平 教授
吉林大学第一医院肝病科

高泽立 主任医师
上海交通大学医学院附属第九人民医院周浦分院消化科

戈之铮 教授
上海交通大学医学院附属仁济医院消化科

何松 教授
重庆医科大学附属第二医院消化内科

江米足 教授
浙江大学医学院附属儿童医院儿科

姜慧卿 教授
河北医科大学第二医院消化科

李华 副教授
中山大学附属第三医院肝脏外科

李晟磊 副主任医师
郑州大学第一附属医院病理科

梁力建 教授
中山大学附属第一医院肝胆外科

廖家智 主治医师
华中科技大学同济医学院附属同济医院消化内科

刘超 副教授
中山大学孙逸仙纪念医院肝胆胰外科

禄韶英 副主任医师
西安交通大学医学院第一附属医院普外科11病区

倪润洲 教授
南通大学附属医院消化内科

欧希龙 副教授
东南大学中大医院消化科

齐清会 教授
北京协和医院肝外科

施诚仁 教授
上海交通大学医学院附属新华医院小儿外科

唐世刚 教授
大连大学附属中山医院内科

田文静 副教授
哈尔滨医科大学公卫学院

王富春 教授
长春中医药大学针灸推拿学院

王江滨 教授
吉林大学中日联谊医院消化内科

谢敏 主任医师
南京大学医学院附属鼓楼医院普外科

薛东波 教授
哈尔滨医科大学附属第一医院微创胆道外科

殷正丰 教授
中国人民解放军第二军医大学东方肝胆外科医院

孙殿兴 主任医师
白求恩国际和平医院肝病科

张佳林 教授
中国医科大学附属第一医院肝胆外科暨器官移植科

郑素军 副主任医师
首都医科大学附属北京佑安医院

朱亮 副教授
大连医科大学生理教研室