

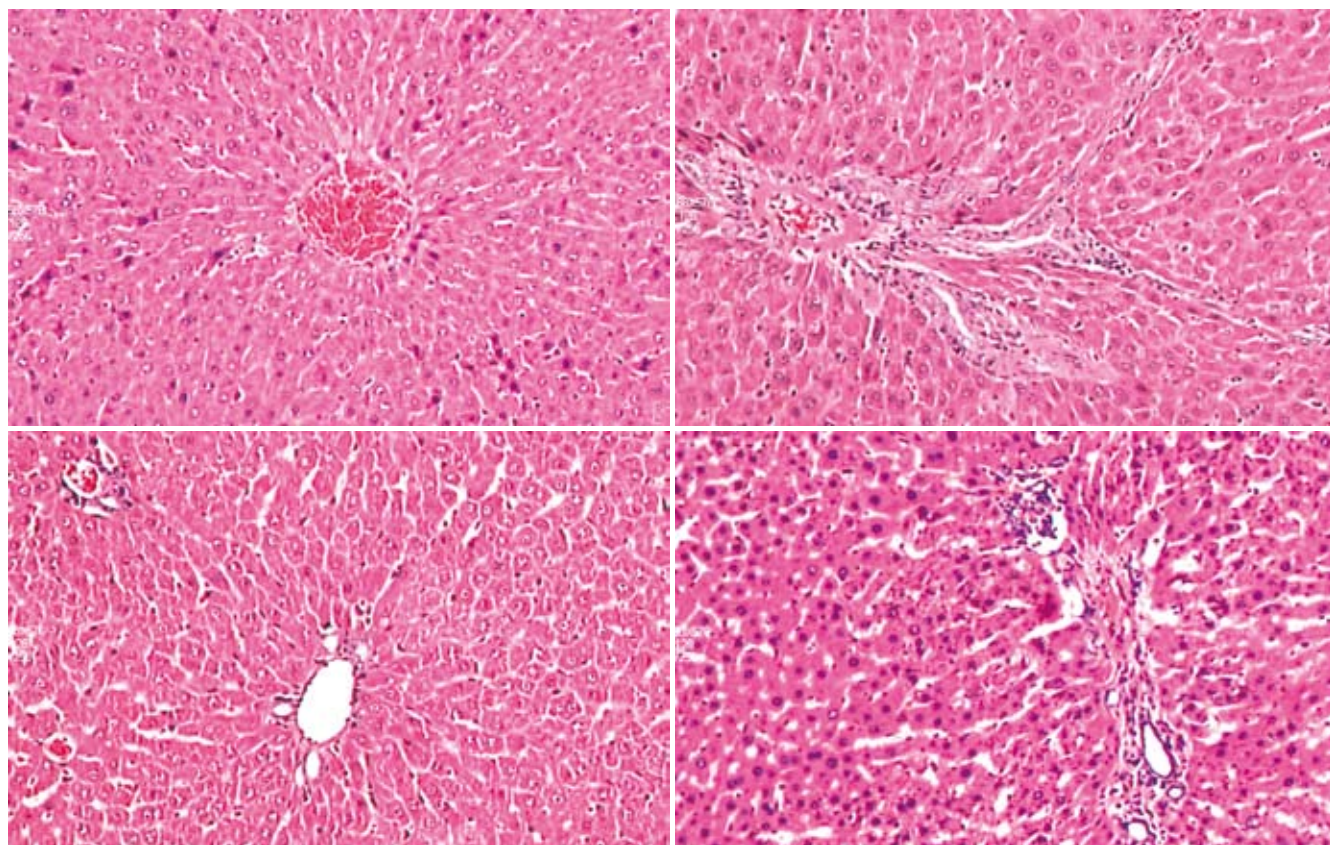
ISSN 1009-3079 (print)  
ISSN 2219-2859 (online)  
CN 14-1260/R

# 世界华人消化杂志®

## WORLD CHINESE JOURNAL OF DIGESTOLOGY

### Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2010 年 12 月 28 日 第 18 卷 第 36 期 (Volume 18 Number 36)



## 36/2010

ISSN 1009-3079



9 771009 307056

名誉总编辑

潘伯荣

总编辑

马连生

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

# 世界华人消化杂志®

## 编辑委员会

2009-01-01/2011-12-31

wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

### 总顾问

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

### 名誉总编辑

潘伯荣教授

### 社长/总编辑

马连生教授

### 副总编辑

纪小龙教授  
姜洪池教授  
王苑本教授  
吴云林教授  
徐克成教授  
杨思凤教授  
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  
栾新明教授  
陈国忠副主任医师  
陈洪副教授  
陈其奎教授  
陈卫昌教授  
陈贻胜教授  
程斌教授  
迟宝荣教授

崔立红副教授  
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  
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  
王邦茂教授  
王炳元教授  
王承党教授  
王江滨教授  
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

#### 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  
陈凜教授  
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  
王要军教授  
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  
徐迅迪副主任医师  
徐泱副主任医师  
许戈良教授  
许剑民教授  
薛东波教授  
严律南教授  
杨柏霖副主任医师  
杨桦教授  
杨家和主任医师  
杨维良教授  
杨银学教授  
杨尹默教授  
伊力亚尔·夏合丁教授  
殷正丰教授  
于聪慧教授  
于则利教授  
禹正杨副教授  
郁宝铭教授  
元云飞教授  
张必翔主任医师  
张宏伟教授  
张佳林教授  
张进祥副教授  
张俊副研究员  
张力为副教授  
张群华教授  
张水军教授

张宗明教授  
赵刚副教授  
智绪亭教授  
周伟平教授  
邹小明教授

### 消化感染病学

陈国凤主任医师  
陈红松研究员  
陈建杰教授  
陈仕珠主任医师  
陈志辉副主任医师  
党双锁教授  
丁惠国教授  
范建高教授  
范小玲主任医师  
高润平教授  
高泽立副教授  
高志良主任医师  
龚国忠教授  
管世鹤副教授  
郝春秋副教授  
何生松教授  
胡国信副主任医师  
靳雪源副主任医师

林菊生教授  
刘正稳教授  
宁琴教授  
牛俊奇教授  
钱林学主任医师  
孙殿兴主任医师  
谭德明教授  
汤华研究员  
唐霓副研究员  
唐晓鹏教授  
王凯教授  
王怡主任医师  
魏来教授  
吴建国教授  
吴君主任医师  
宣世英教授  
杨华副主任医师  
杨林副研究员  
姚鹏副教授  
张继明教授  
张明辉副主任医师  
张占卿主任医师  
赵桂鸣主任医师  
赵连三教授  
赵秀英副教授  
周霞秋教授  
朱传武主任医师

庄林主任医师

### 消化中医学

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  
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  
李璦教授  
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  
李健丁教授  
龙学颖副主任医师  
倪才方教授  
魏经国教授  
肖恩华教授  
徐爱民副教授  
徐辉雄教授  
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  
陈志龙教授  
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  
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  
阴赧宏研究员  
郁卫东副研究员  
喻荣彬副教授  
张青云研究员  
张学教授  
赵平副教授  
周南进研究员  
周士胜教授  
周素芳教授  
周晓东研究员  
周晓武副主任医师  
朱进霞教授

### 消化病理学

杜祥教授  
季菊玲副教授  
李淳副教授  
李晟磊副主任医师  
刘丽江教授  
刘勇钢副主任医师  
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 ● 2010年12月28日 第18卷 第36期 (总第332期)

## 述 评

3831 EGFR单抗治疗晚期结直肠癌的疗效预测标志物的研究进展

施敏, 张俊, 朱正纲

## 基础 研究

3838 人参皂甙Rh2对食管癌Eca-109细胞caspase3、caspase8基因的影响

彭林涛, 许欣

3843 5-氮杂-2'-脱氧胞苷对人胃癌SGC-7901细胞株生长及EDNRB基因启动子异常甲基化的影响

吴川清, 韩高雄, 帅晓明, 陶凯雄

3848 PPAR $\gamma$ 、NF- $\kappa$ B的表达与砷暴露致大鼠肝纤维化的相关性

刘洋, 吴君, 闫超, 刘芙蓉

3857 APC/ $\beta$ -catenin/TCF通路在奥曲肽调控结肠癌SW480中的分子机制

王松, 包铮, 龙建武, 肖忠盛, 李峰, 梁庆模

3863 针刺对结肠吻合术后Cajal间质细胞修复与再生的影响

邓晶晶

## 临 床 研 究

3869 Tiam1和Rac1在食管鳞癌组织中蛋白表达的相关性及临床病理意义

刘帅, 曲蕴慧, 郝文海

## 文 献 综 述

3874 高场磁共振在脂肪肝诊断和脂肪分级中的研究进展

昌倩, 肖恩华

3881 干细胞与肝癌相关性的研究进展

许蜜蝶, 李维卿, 余宏宇

3886 隐匿性胰液-胆道系统逆流的研究进展

杨慧慧, 何雨, 金文香, 金颖, 李会兵, 金春香

3891 益生菌在炎症性肠病中的应用

刘揆亮, 吕愈敏, 顾芳

## 研 究 快 报

3896 脑室内注射瘦素对大鼠胃肠运动的影响

赵艳军, 吴瑞芹, 乔跃兵, 刘凤芹, 李学良, 林琳, 李炳庆

3900 丙型肝炎病毒E2结合蛋白基因在人胰腺细胞cDNA文库中的筛选

张婷, 任娜, 田梅梅, 李贵, 张锦前, 成军

3905 侧群细胞对NOD/SCID小鼠NK细胞杀伤的抵抗作用

邱爽, 张会英

## 临 床 经 验

3910 超声内镜在光滑型食管隆起性病变中的诊断价值

刘景华, 王进, 程鹏, 杨丽敏, 刘丽, 李山林, 刘利敏, 周永静

3914 电子胃镜联合腹部超声对肝硬化食管静脉曲张破裂出血的预测

郭世斌, 段志军

3918 奥曲肽治疗肠梗阻35例

孙昌泉, 石海, 许建明

3922 Gardner和Turcot综合征的临床特点93例

曹海龙, 王邦茂, 曹晓沧

3926 腹腔镜全/次结肠切除术的临床应用24例

李栋, 张奇兵, 王权, 王超, 孙东辉, 所剑

病例报告	3930 成人回肠末端Burkitt样淋巴瘤1例 张宪祥, 孙传东, 宋樱, 张炳远, 卢云, 赵伟, 胡继霖
附录	3934 《世界华人消化杂志》投稿须知 3939 2011年国内国际会议预告
志 谢	3940 志谢世界华人消化杂志编委
消 息	3837 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 3856 《世界华人消化杂志》性质、刊登内容及目标 3880 《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》 3890 《世界华人消化杂志》栏目设置 3895 《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》 3899 WJC, WJGE, WJGO, WJGS, WJH, WJR 6本期刊被PMC收录 3904 《世界华人消化杂志》正文要求 3925 汤姆森-路透公布2009年WJG影响因子2.092 3933 WJG成功通过评审被PMC收录
封面故事	刘洋, 吴君, 闫超, 刘芙蓉. PPAR $\gamma$ 、NF- $\kappa$ B的表达与神暴露致大鼠肝纤维化的相关性. 世界华人消化杂志 2010; 18(36): 3848-3856 <a href="http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/3848.asp">http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/3848.asp</a>
本期责任人	编务 刘晓芳; 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 李薇; 审核编辑 李军亮; 形式规范 马连生

<p><b>世界华人消化杂志</b></p> <p><b>Shijie Huaren Xiaohua Zazhi</b></p> <p>吴阶平 题写封面刊名 陈可冀 题写版权刊名 (旬刊)</p> <p>创 刊 1993-01-15 改 刊 1998-01-25 出 版 2010-12-28 原刊名 新消化病学杂志</p> <p>名誉总编辑 潘伯荣 总 编 辑 马连生 编辑部主任 李军亮 期 刊 名 称 世界华人消化杂志 主 管 单 位 山西省科学技术厅 主 办 单 位 太原消化病研治中心</p>	<p><b>编辑</b> 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 <a href="http://www.wjgnet.com">http://www.wjgnet.com</a></p> <p><b>出版</b> 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 <a href="http://www.wjgnet.com">http://www.wjgnet.com</a></p> <p><b>印刷</b> 北京科信印刷厂</p> <p><b>发行</b> 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><b>订购</b> 全国各地邮电局</p> <p><b>邮购</b> 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 <a href="http://www.wjgnet.com">http://www.wjgnet.com</a></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(<a href="http://www.baishideng.com/wcjd/ch/index.aspx">http://www.baishideng.com/wcjd/ch/index.aspx</a>), 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><b>特别声明</b> 本刊刊出的所有文章不代表本刊编辑部和本刊编委会的观点, 除非特别声明. 本刊如有印装质量问题, 请向本刊编辑部调换.</p> <p>2010年版权归世界华人消化杂志所有</p>
<p>中国标准连续出版物号 <b>ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)</b> 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><a href="http://www.wjgnet.com">www.wjgnet.com</a></p>		

# World Chinese Journal of Digestology

## December 2010 Contents in Brief Volume 18 Number 36

<b>EDITORIAL</b>	<p>3831 Biomarkers predicting clinical response to EGFR-targeted monoclonal antibody therapy in patients with metastatic colorectal cancer <i>Shi M, Zhang J, Zhu ZG</i></p>
<b>BASIC RESEARCH</b>	<p>3838 Ginsenoside Rh2 up-regulates caspase 3 and caspase 8 expression in human esophageal cancer cell line Eca-109 <i>Peng LT, Xu X</i></p> <p>3843 Treatment with 5-Aza-2'-deoxycytidine induces promoter demethylation of the EDNRB gene and inhibits cell proliferation in human gastric carcinoma cell line SGC-7901 <i>Wu CQ, Han GX, Shuai XM, Tao KX</i></p> <p>3848 Correlation of PPAR<math>\gamma</math> and NF-<math>\kappa</math>B expression with arsenic-induced hepatic fibrosis in rats <i>Liu Y, Wu J, Yan C, Liu FR</i></p> <p>3857 Involvement of the APC/<math>\beta</math>-catenin/TCF signaling pathway in the regulatory effects of octreotide on SW480 colon cancer cells <i>Wang S, Bao Z, Long JW, Xiao ZS, Li F, Liang QM</i></p> <p>3863 Acupuncture improves the repair and regeneration of interstitial cells of Cajal in rats after enteroenterostomy <i>Deng JJ</i></p>
<b>CLINICAL RESEARCH</b>	<p>3869 Clinicopathological significance of Tiam1 and Rac1 protein expression in esophageal squamous cell carcinoma <i>Liu S, Qu YH, Yan WH</i></p>
<b>REVIEW</b>	<p>3874 High-field MRI for diagnosis of fatty liver and fat grading: recent research progress <i>Chang Q, Xiao EH</i></p> <p>3881 Stem cells and hepatocellular carcinoma <i>Xu MD, Li WQ, Yu HY</i></p> <p>3886 Progress in research of occult pancreatobiliary reflux <i>Yang HH, He Y, Jin WX, Jin Y, Li HB, Jin CX</i></p> <p>3891 Role of probiotics in the management of inflammatory bowel disease <i>Liu KL, Lv YM, Gu F</i></p>
<b>RAPID COMMUNICATION</b>	<p>3896 Intracerebroventricular injection of leptin inhibits gastric emptying but has no effect on intestinal transit in rats <i>Zhao YJ, Wu RQ, Qiao YB, Liu FQ, Li XL, Lin L, Li BQ</i></p> <p>3900 Screening of proteins binding to hepatitis C virus E2 protein from a human pancreas cDNA library <i>Zhang T, Ren N, Tian MM, Li B, Zhang JQ, Cheng J</i></p> <p>3905 Side population cells isolated from hepatic carcinoma cell lines escape being killed by NK cells from NOD/SCID mice <i>Qiu S, Zhang HY</i></p>
<b>CLINICAL PRACTICE</b>	<p>3910 Role of endoscopic ultrasonography in the diagnosis and treatment of smooth esophageal protuberant lesions <i>Liu JH, Wang J, Cheng P, Yang LM, Liu L, Li SL, Liu LM, Zhou YJ</i></p> <p>3914 Prediction of variceal bleeding in patients with liver cirrhosis by combined endoscopy and ultrasound</p>

	<p><i>Guo SB, Duan ZJ</i></p> <p>3918 Efficacy of octreotide in the management of intestinal obstruction: an analysis of 35 cases <i>Sun CQ, Shi H, Xu JM</i></p> <p>3922 Clinical features of Gardner syndrome and Turcot syndrome in Chinese population: an analysis of 93 cases <i>Cao HL, Wang BM, Cao XC</i></p> <p>3926 Laparoscopic total/subtotal colectomy for colorectal diseases: an analysis of 24 cases <i>Li D, Zhang QB, Wang Q, Wang C, Sun DH, Suo J</i></p>
<b>CASE REPORT</b>	<p>3930 Adult Burkitt-like lymphoma of the ileum: a case report and review of the literature <i>Zhang XX, Sun CD, Song Y, Zhang BY, Lu Y, Zhao W, Hu JL</i></p>
<b>APPENDIX</b>	<p>3934 Instructions to authors of World Chinese Journal of Digestology</p> <p>3939 Meeting events calendar in 2011</p>
<b>ACKNOWLEDGMENT</b>	<p>3940 Acknowledgments to reviewers of World Chinese Journal of Digestology</p>
<b>COVER</b>	<p><i>Liu Y, Wu J, Yan C, Liu FR.</i> Correlation of PPAR<math>\gamma</math> and NF-<math>\kappa</math>B expression with arsenic-induced hepatic fibrosis in rats. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2010; 18(36): 3848-3856 <a href="http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/3848.asp">http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/3848.asp</a></p>
<b>RESPONSIBLE EDITORS FOR THIS ISSUE</b>	<p>Assistant Editor: <i>Xiao-Fang Liu</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>Wei Li</i> Proof Editor: <i>Jun-Liang Li</i> Layout Editor: <i>Lian-Sheng Ma</i></p>

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

## Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

**Founded** on January 15, 1993  
**Renamed** on January 25, 1998  
**Publication date** December 28, 2010

**NAME OF JOURNAL**  
*World Chinese Journal of Digestology*

**RESPONSIBLE INSTITUTION**  
Department of Science and Technology  
of Shanxi Province

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

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

© 2010 Published by *WCJD*. All rights reserved; no part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise without the prior permission of *WCJD*. Authors are required to grant *WCJD* an exclusive licence to publish.

## SPECIAL STATEMENT

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

## INSTRUCTIONS TO AUTHORS

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

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

# EGFR单抗治疗晚期结直肠癌的疗效预测标志物的研究进展

施敏, 张俊, 朱正纲

施敏, 张俊, 朱正纲, 上海交通大学医学院附属瑞金医院外科 上海消化外科研究所 上海市 200025

张俊, 副教授, 主要从事胃肠肿瘤方面的研究.

国家自然科学基金资助项目, No. 30801371

作者贡献分布: 本文综述由施敏完成; 张俊与朱正纲审校.

通讯作者: 张俊, 副教授, 200025, 上海市, 上海交通大学医学院附属瑞金医院外科, 上海消化外科研究所.

jun\_zj10977@yahoo.com.cn

电话: 021-64670644

收稿日期: 2010-09-03 修回日期: 2010-10-18

接受日期: 2010-10-26 在线出版日期: 2010-12-28

## Biomarkers predicting clinical response to EGFR-targeted monoclonal antibody therapy in patients with metastatic colorectal cancer

Min Shi, Jun Zhang, Zheng-Gang Zhu

Min Shi, Jun Zhang, Zheng-Gang Zhu, Department of Surgery, Ruijin Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University; Shanghai Institute of Digestive Surgery, Shanghai 200025, China

Supported by; National Natural Science Foundation of China, No. 30801371

Correspondence to: Associate Professor Jun Zhang, Department of Surgery, Ruijin Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University; Shanghai Institute of Digestive Surgery, Shanghai 200025, China. jun\_zj10977@yahoo.com.cn

Received: 2010-09-03 Revised: 2010-10-18

Accepted: 2010-10-26 Published online: 2010-12-28

## Abstract

The emergence of monoclonal antibodies targeting the epidermal growth factor receptor (EGFR), such as panitumumab and cetuximab, has expanded the range of treatment options for metastatic colorectal cancer. The realization that detection of positive EGFR expression by immunostaining does not reliably predict clinical outcome of EGFR-targeted treatment has led to an intense search for alternative predictive biomarkers. Oncogenic activation of signaling pathways downstream of the EGFR, such as K-ras, BRAF or PIK3CA mutations, or inactivation of the PTEN tumor suppressor gene is central to the progression of colorectal cancer. Tumor K-ras mutations, which may be present in 35%-45% of patients with colorectal cancer,

have emerged as an important predictive marker of resistance to panitumumab or cetuximab treatment. In addition, among colorectal tumors carrying wild-type K-ras, mutation of BRAF or PIK3CA or loss of PTEN expression may be associated with resistance to EGFR-targeted monoclonal antibody treatment, although these additional biomarkers require further validation before incorporation into clinical practice. Additional knowledge of the molecular basis for sensitivity or resistance to EGFR-targeted monoclonal antibodies will allow the development of new treatment algorithms to identify patients who are most likely to respond to treatment and could also provide rationale for combining therapies to overcome primary resistance. The use of K-ras mutations as a selection biomarker for anti-EGFR monoclonal antibody (eg, panitumumab or cetuximab) treatment is the first major step toward individualized treatment for patients with metastatic colorectal cancer.

**Key Words:** Anti-EGFR monoclonal antibody; K-ras mutation; Predictive marker; Metastatic colorectal cancer

Shi M, Zhang J, Zhu ZG. Biomarkers predicting clinical response to EGFR-targeted monoclonal antibody therapy in patients with metastatic colorectal cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(36): 3831-3837

## 摘要

靶向EGFR的单克隆抗体西妥昔单抗和帕尼单抗的问世大大拓宽了转移性结直肠肿瘤疗效, 而当人们意识到使用免疫组织化学技术检测EGFR蛋白表达阳性与应用EGFR单抗治疗的疗效并没有相关性, 便致力于可能的疗效预测标志物的研究. EGFR信号转导系统下游的例如K-ras、BRAF、PIK3CA的基因突变, 以及肿瘤抑制基因PTEN的失活都成了研究的热点. 在结直肠癌中, K-ras基因突变率为35%-45%, 已成为EGFR单克隆抗体治疗转移性结直肠癌的主要疗效预测标志物. 另外, 在K-ras野生型基因的患者中, BRAF、PIK3CA基因突变以及PTEN的缺失表达, 都可能与EGFR单克隆抗体的耐药有关, 但在这些可能的疗效预测标志物被运用到临床实践中前, 还

## ■背景资料

我国结直肠癌(CRC)发病率不断上升, 尽管对其病因学研究和以手术切除、放射治疗和化学药物治疗为主的多学科综合治疗取得一定进展, 但进一步的疗效提高仍面临巨大挑战. 最近, 个体差异与药物治疗疗效的关系日益受到重视.

## ■同行评议者

房林, 副教授, 同济大学附属上海市第十人民医院普外科



## ■研发前沿

随着循证医学和转化型研究地不断发展,个体化治疗日益成为结直肠癌临床治疗及基础研究的重点,其中尤以基于肿瘤发生发展机制的分子靶向治疗发展最快。EGFR信号转导系统下游,如K-ras、BRAF、PIK3CA的基因突变,以及肿瘤抑制基因PTEN的失活都成了研究的热点。

需进一步地研究以明确他们的价值,以期在选择适合接受EGFR单克隆抗体的患者中起到更大的作用。而K-ras基因突变被作为治疗前的疗效预测标志物,则是开创了转移性结直肠癌个体化治疗的第一步。

**关键词:** 表皮生长因子受体单克隆抗体; K-ras基因突变; 疗效预测标志物; 转移性结直肠癌

施敏, 张俊, 朱正纲. EGFR单抗治疗晚期结直肠癌的疗效预测标志物的研究进展. 世界华人消化杂志 2010; 18(36): 3831-3837  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/3831.asp>

## 0 引言

我国结直肠癌(colorectal cancer, CRC)发病率不断上升, 尽管对其病因学研究和以手术切除、放射治疗和化学药物治疗为主的多学科综合治疗取得一定进展, 但进一步的疗效提高仍面临巨大挑战。最近, 个体差异与药物治疗疗效的关系日益受到重视。随着循证医学和转化型研究地不断发展, 个体化治疗日益成为CRC临床治疗及基础研究的重点, 其中尤以基于肿瘤发生发展机制的分子靶向治疗发展最快。

表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)是实体瘤分子靶向治疗的重要靶点之一。EGFR是具有配体依赖性的酪氨酸激酶活性的跨膜糖蛋白家族, 存在于除造血干细胞外的大多数细胞中, 在CRC、乳腺癌、胰腺癌、前列腺癌和非小细胞肺癌等多种肿瘤中均呈过度表达。EGFR过度激活可促使恶性肿瘤细胞增殖、抑制凋亡、促进肿瘤血管生成和转移。

目前, 已有西妥昔单抗和帕尼单抗2种EGFR单抗获准用于CRC的临床治疗。前者为人鼠嵌合性IgG1型抗体, 较天然配体亲和力高100倍以上, 通过与受体胞外区结合, 导致受体内化、降解、抑制EGFR信号转导, 并通过抗体依赖的细胞毒(antibody dependent cytotoxicity, ADCC)效应杀伤肿瘤细胞。在早期开展的EGFR单抗多项临床研究中, 均将肿瘤组织EGFR免疫组织化学染色阳性作为入组标准。最近发现, EGFR蛋白表达与EGFR单抗疗效间并无相关性<sup>[1]</sup>。这一发现促使人们致力于研究可能的疗效预测分子, 以便确定哪类患者能从EGFR单抗治疗中获益。本文就EGFR单抗治疗晚期CRC的疗效预测标志物的研究进展综述如下。

## 1 EGFR单抗的疗效预测标志物: 皮疹与K-ras

目前使用较多的分子标志物大致可分为疗效预

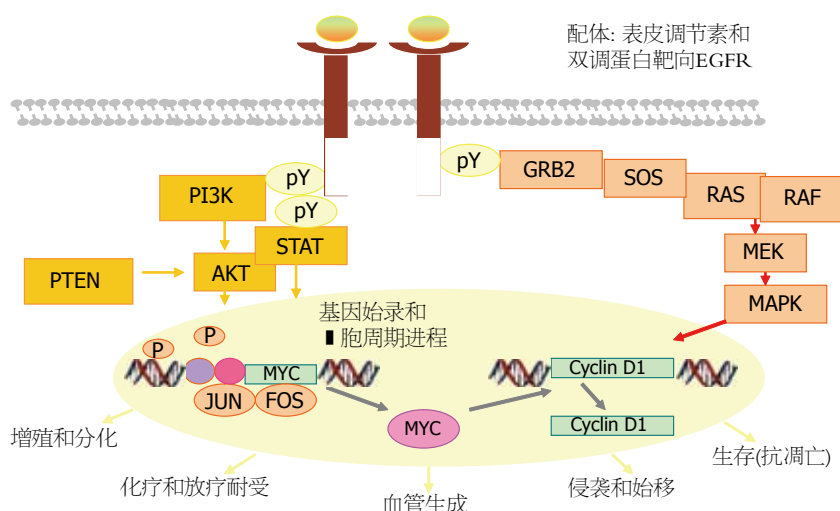
测标志物(predictive marker)和预后判断标志物(prognostic marker)2种。前者是预测某一个特定治疗药物疗效的标志物, 为临床选用何种药物及何种组合治疗提供信息; 而预后判断标志物则是判断患者预后的指标, 有助于指导临床是否需要及何时开始治疗。就EGFR单抗治疗领域而言, 目前公认的疗效预测标志物为皮疹和K-ras基因突变状态。

**1.1 “痤疮样”皮疹** 西妥昔单抗的注册研究-BOND-1研究比较了含伊立替康方案一线化疗失败的转移性结直肠癌肿瘤患者, 二线使用伊立替康或伊立替康联合西妥昔单抗的疗效。结果发现, 皮疹严重程度与临床疗效明显相关; 皮疹越多, 疗效越好<sup>[2]</sup>, 嗣后的多个研究均重复了这一现象。为进一步验证皮疹程度与疗效的关系, 发起了EVEREST研究<sup>[3]</sup>, 共计入组166例伊立替康治疗失败的患者, 先接受标准剂量的西妥昔单抗联合伊立替康治疗, 其中89例0-1度皮疹者在第22天时随机再分为西妥昔单抗标准剂量组和剂量递增组, 后者逐步增加西妥昔单抗剂量, 直至患者耐受性良好且皮疹程度升至2级, 最大剂量为500 mg/m<sup>2</sup>。结果显示, 剂量递增组3-4级皮肤毒性发生率明显升高, 有效率亦明显高于标准剂量组(30% vs 13%,  $P < 0.05$ )。

特征性的“痤疮样”皮疹是一个较理想的临床疗效预测指标。但鉴于皮疹的发生只有在用药后方能观察到, 与其说这是疗效预测指标, 倒不如说是提示药物有效性的临床征兆更为恰当。

**1.2 K-ras基因突变** K-ras基因是实体瘤中突变频率较高的癌基因, 属ras癌基因家族, 10%-20%的肿瘤发生与K-ras异常有关。有丝分裂活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, RAS-RAF-MARK)和磷脂酰肌醇3激酶(phosphatidylinositol 3 kinase, PI3K)信号通路所传递的细胞信号经不同接头蛋白磷酸化后, 通过转录因子调控细胞生长、分化和凋亡, 并在肿瘤发生及发展中起重要作用(图1)<sup>[4]</sup>。

Andreyev等<sup>[5,6]</sup>开展RASCAL和RASCAL II研究, 旨在评价K-ras突变状态作为CRC预后判断标志物的意义。结果显示, CRC中K-ras突变率为37.3%, 其中80.8%发生在12密码子。K-ras突变者治疗失败(复发或死亡)的风险升高25%(HR = 1.25;  $P < 0.001$ ), 死亡风险升高22%(HR = 1.22;  $P = 0.004$ )。K-ras基因不同密码子突变的预后意义亦各有不同, 如密码子12甘氨酸突变为缬氨酸的突变率为8.6%, 是独立不良预后因素。突变者

图 1 EGFR信号转导通路<sup>[4]</sup>

## ■ 相关报道

Santini等检测了99例结肠直肠癌原发灶和转移灶中的K-ras突变情况,发现仅有4例(4%)表达不一致。

表 1 CRYSTAL/OPUS研究结果(2009年更新)<sup>[10,11]</sup>

	CRYSTAL K-ras wt		OPUS K-ras wt	
	FOLFIRI( <i>n</i> = 350)	Cetuximab+FOLFIRI( <i>n</i> = 316)	FOLFOX4( <i>n</i> = 97)	Cetuximab+FOLFOX4( <i>n</i> = 82)
ORR(%)	39.7	57.3	34.0	57.3
<i>P</i> 值		<0.0001		0.0027
mPFS(mo)	8.4	9.9	7.2	8.3
HR		0.696		0.567
<i>P</i> 值		0.0012		0.0064
OS(mo)	20.0	23.5	18.5	22.8
HR		0.796		0.855
<i>P</i> 值		0.0094		0.3854

Wt: wild type, 野生型; HR: 相对危险度; ORR: 总体反应率; mPFS: 中位无进展生存时间; OS: 总生存时间。

的治疗失败风险升高30%(HR = 1.3,  $P = 0.004$ ), 死亡风险升高23%(HR = 1.23,  $P = 0.008$ )。缬氨酸突变只是Duke's C期患者的不良预后因素, 而对Duke's B无影响。治疗失败风险升高50%(HR = 1.5,  $P = 0.0076$ ), 死亡风险升高45%(HR = 1.45,  $P = 0.02$ )。

K-ras基因突变后, 可自主激活EGFR信号转导途径的下游通路, 而无需胞外EGF信号刺激。故一旦K-ras基因突变, 即可导致肿瘤对EGFR单抗耐药。其他可能的相关机制还包括: K-ras基因突变可上调VEGF表达、激活肿瘤干细胞、上调DNA甲基化、抑制抑癌基因及促凋亡基因表达, 上调DNA修复基因等<sup>[7-9]</sup>。

CRYSTAL研究是一项纳入1 000余例患者的3期临床研究, 证实了西妥昔单抗联合FOLFIRI方案一线治疗转移性结直肠癌(metastatic colorectal cancer, mCRC)疗效明显优于FOLFIRI方案。分层分析显示, K-ras野生型者可从西妥昔单抗中获益显著, 而突变者则否<sup>[10]</sup>(表1)。无独有

偶, 另一项联合FOLFOX方案一线治疗mCRC的2期临床研究(OPUS)亦获类似结果; 甚者, K-ras突变者在化疗基础上加用西妥昔单抗非但不能获益, 反而降低疗效<sup>[11]</sup>。包括帕尼单抗在内的其他抗EGFR单抗3期临床研究中, 均观察到疗效与K-ras突变状态的相关性<sup>[12,13]</sup>。

EVERSET研究发现, 在伊立替康耐药的mCRC患者中, K-ras野生型者可从西妥昔单抗治疗中显著获益; 对突变型患者, 即使西妥昔单抗剂量增加, 也不能提高客观缓解率<sup>[6]</sup>。

总之, 无论是单药应用还是联合化疗, K-ras均是预测EGFR单抗疗效的独立分子标志物。就检测技术而言, 基于DNA水平的基因突变分析, 较基于蛋白质水平的免疫组织化学检测更为合理<sup>[1]</sup>。原因包括: (1)与蛋白质在标本处理过程中受固定剂、脱水剂、包埋试剂和储存条件等诸多因素影响不同, DNA在石蜡包埋组织中的结构相对保持稳定; (2)基因突变检测只有野生型和突变型2种结果, 清晰明了, 而免疫组织化学

## ■应用要点

BRAF基因状态有望成为EGFR单抗的另一疗效预测标志物。PTEN失表达、PI3K突变、EGFR扩增、EGFR配体过表达等其他指标,都是潜在的疗效预测标志物,基于各种相关标志物检测的个体化治疗,有望成为将来的发展方向。

表 2 CRYSTAL研究评估BRAF作为西妥昔单抗疗效预测标志物的数据<sup>[18]</sup>

	K-ras wt/BRAF wt( <i>n</i> = 566)		K-ras wt/BRAF mt( <i>n</i> = 59)	
	FOLFIRI( <i>n</i> = 289)	Cetuximab+FOLFIRI( <i>n</i> = 277)	FOLFOX4( <i>n</i> = 33)	Cetuximab+FOLFOX4( <i>n</i> = 26)
ORR(%)	42.6	61.0	15.2	19.2
<i>P</i> 值		<0.0001		0.9136
mPFS(mo)	8.8	10.9	5.6	8.0
HR		0.679		0.934
<i>P</i> 值		0.0016		0.8656
OS(mo)	21.6	25.1	10.3	14.1
HR		0.830		0.908
<i>P</i> 值		0.0549		0.7440

Wt: wild type, 野生型; HR: 相对危险度; ORR: 总体反应率; mPFS: 中位无进展生存时间; OS: 总生存时间。

染色强度和染色比例的评判结果则受较多人为因素的影响; (3) 鉴于约40%的结肠直肠癌患者可发生K-ras基因突变, 且为结肠直肠癌发生、发展过程中出现较早期的事件, 故在原発灶和转移灶中均可检测到基因突变<sup>[3,14]</sup>, 标本选择余地较大。Santini等<sup>[15]</sup>检测了99例结肠直肠癌原発灶和转移灶中的K-ras突变情况, 发现仅有4例(4%)表达不一致; (4) 绝大多数的K-ras基因突变位点仅限于12、13、61这3个密码子, 用PCR技术即可检出, 无需进行繁杂的多个外显子测序, 从技术操作上也较为简便。

## 2 其他潜在的EGFR单抗疗效预测标志物

K-ras突变现已公认为EGFR单抗的疗效预测标志物。但即便是K-ras野生型者, 其总体反应率亦不足70%。因此, 如何找到K-ras野生型患者的耐药标志物, 成为下一步的主要研究任务。

**2.1 BRAF基因突变** Di Nicolantonio等<sup>[16]</sup>回顾性分析了113例接受帕尼单抗或西妥昔单抗作为二线或三线治疗的mCRC患者资料, 并检测了其中79例的BRAF V600E突变情况。发现BRAF V600E突变型者(*n* = 11), 无一对帕尼单抗或西妥昔单抗治疗有效。而BRAF V600E野生型者(*n* = 68), 其对帕尼单抗或西妥昔单抗治疗的总体反应率为32%(*P* = 0.029)。且BRAF V600E突变性者的无进展生存时间(progression free survival, PFS)与总生存时间(overall survival, OS)均劣于BRAF野生型者(*P* < 0.001)<sup>[16]</sup>。Loupakis等<sup>[17]</sup>报道了87例K-ras野生型mCRC患者接受西妥昔单抗联合伊立替康治疗, 回顾性分析BRAF基因状态与疗效之间的关系, 其中13例为BRAF V600E突变型者, 结果发现无1例有效, 与此相对的是, 74例BRAF V600E野生型者中, 有24例对治疗有效

(*P* = 0.016)。

同样, 2009年ASCO会议报道了对CRYSTAL研究入组患者BRAF基因状态的回顾性研究<sup>[18]</sup>, 共检测了625例患者的BRAF基因突变状态, 其中59例(9%)为突变型, 未发现K-ras与BRAF双突变者。回顾性分析显示, 在K-ras/BRAF均为野生型的患者中, 西妥昔单抗联合FOLFIRI组与单用FOLFIRI组相比, 前者PFS、客观反应率(objective response rate, ORR)均有显著提高, OS有延长趋势。而在BRAF为突变型的患者中, 两组的疗效(OS、PFS、ORR)均差于BRAF野生型患者(表2)。因此, 2010年NCCN结直肠癌临床实践指南也做出了修改, 认为尽管目前的研究数据还不一致, 但存在BRAF V600E突变的患者似乎不太可能从抗EGFR单抗中获益。

**2.2 PTEN和PI3K** 10号染色体同源丢失性磷酸酶与张力蛋白(phosphatase and tensin homology deleted on chromosome ten, PTEN)基因是被发现的人类第一个有磷酸酶活性的抑癌基因, 可使PI3K信号途径中的主要信号分子磷脂酰肌醇3, 4, 5-三磷酸(phosphatidylinositol 3, 4, 5-triphosphate, PIP3)等磷脂酰肌醇去磷酸化, 是负向调节肿瘤的关键分子。对PI3K家族全部16个成员的激酶结构域外显子编码区域进行序列分析显示, PIK3CA是唯一可发生体细胞突变而致癌的基因, 在CRC中突变率高达32%<sup>[19]</sup>。

体外研究发现, 呈PIK3CA基因突变或PTEN失表达状态的结直肠癌肿瘤细胞系对西妥昔单抗耐药<sup>[20]</sup>。在临床观察中, 也发现PIK3CA突变伴PTEN失表达(*P* = 0.02)或仅为PTEN失表达(*P* < 0.001)者, 接受西妥昔单抗治疗疗效较差<sup>[21,22]</sup>。Frattini等<sup>[22]</sup>报道了11例PTEN失表达的mCRC患者中, 无一对西妥昔单抗治疗有反应。

相反, 在16例完整表达PTEN者中, 西妥昔单抗反应率高达63%(10/16)。Sartore-Bianchi等<sup>[23]</sup>观察了110例接受EGFR单抗治疗的mCRC患者, 发现无论PTEN是否表达, PIK3CA突变均与PFS呈负相关( $P = 0.035$ ), PIK3CA基因突变伴PTEN失表达者OS显著缩短( $P = 0.005$ )。该研究还提示, K-ras基因突变, 同时合并PIK3CA基因突变或PTEN失表达, 对EGFR靶向治疗无反应者高达70%<sup>[23]</sup>。因此PIK3CA基因突变或PTEN失表达或许可成为潜在的EGFR单抗疗效预测标志物, 需通过大样本临床研究验证。

**2.3 EGFR基因扩增** 部分结直肠肿瘤表现为EGFR基因扩增, 由此导致EGFR蛋白高表达, 通过荧光原位杂交(fluorescence *in situ* hybridization, FISH)或显色原位杂交(chromogenic *in situ* hybridization)技术, 可检测EGFR基因拷贝数<sup>[24]</sup>。Moroni等<sup>[25]</sup>用FISH技术检测31例mCRC组织, 发现在抗EGFR单抗治疗有反应的9例中, 8例呈EGFR拷贝数增加; 而在治疗无效的21例患者中, 仅1例为EGFR高度扩增。

但EGFR扩增状态作为疗效预测标志物的价值尚未获得共识。Italiano等<sup>[26]</sup>检测了39例接受西妥昔单抗治疗的mCRC组织, 发现EGFR基因拷贝数与临床有效率、PFS及OS均无明显相关。Lenz等<sup>[27]</sup>用RT-PCR法检测346例mCRC组织的结果也显示, EGFR基因拷贝数与临床有效率及PFS无关, 但与OS相关( $P = 0.03$ )。基于FISH检测结果, 每个细胞核中<3个EGFR基因拷贝的患者, 对EGFR单抗治疗疗效不佳。一项3期临床研究分析显示, 平均每个细胞核中<2.47个基因拷贝的患者, 帕尼单抗治疗无一有效; 而20例>2.47个基因拷贝数者中, 有效率则高达30%(6/20)。平均每个细胞核中<2.5个基因拷贝者, PFS和OS均明显缩短( $P = 0.039, 0.015$ ), 提示该指标作为预后判断标志物的价值<sup>[28]</sup>。

就EGFR基因拷贝数检测技术而言, 有必要统一EGFR基因扩增的检测方法, 并开展大样本研究, 以进一步验证该指标作为EGFR单抗治疗疗效预测标志物的价值。

**2.4 EGFR配体过表达** 表皮调节素(epiregulin)和双调蛋白(amphiregulin)是天然的EGFR配体, 通过自分泌形式促进肿瘤生长。表皮调节素或双调蛋白mRNA高表达与西妥昔单抗疗效相关<sup>[29]</sup>。接受EGFR单抗治疗后, 表皮调节素高表达组与低表达组的中位PFS分别为103.5和57 d( $P < 0.001$ ), 双调蛋白高表达组和低表达组的中位PFS分别

为115.5和57 d( $P < 0.001$ )<sup>[29]</sup>。在接受西妥昔单抗治疗的K-ras野生型患者中, 表皮调节素或双调蛋白高表达者的疾病控制率明显高于突变型者( $P = 0.0003$ )<sup>[29]</sup>。Khambata-Ford等<sup>[29]</sup>认为表皮调节素和双调蛋白的表达水平, 有望成为继K-ras突变状态后, 另一个有价值的疗效预测标志物。

**2.5 其他** 有关抗EGFR单抗的疗效预测标志物的研究, 除前所提及者外, 尚包括在肿瘤血管生成和细胞周期调控途径所涉及的诸多受体、信号分子、接头蛋白、转录因子等。如临床前研究发现EGFR信号通路有促血管生成作用, 在体外实验和临床标本检测中也发现VEGF-A或其受体表达与EGFR靶向治疗耐药相关<sup>[30]</sup>。COX-2、CD1和IL-8的表达及其基因多态性亦然<sup>[31]</sup>。如COX-2 765G>C和COX-2+8473T>C基因型的患者, 接受西妥昔单抗治疗的PFS显著长于其他基因型者<sup>[31]</sup>。

### 3 结论

K-ras基因突变已是公认的EGFR单抗疗效预测标志物, NCCN和欧洲成人用药委员会(committee for medicinal products for human use of the European medicines agency, CHMP)指南均建议, 在确诊mCRC时就应该检测K-ras基因状态, 并据此选择相应的靶向治疗方案。BRAF基因状态有望成为EGFR单抗的另一疗效预测标志物。PTEN失表达、PI3K突变、EGFR扩增、EGFR配体过表达等其他指标, 都是潜在的疗效预测标志物, 应予深入研究。以治疗目的为出发点的优化治疗方案选择除基于大样本的循证医学证据外, 基于各种相关标志物(包括疗效预测标志物与预后判断标志物)检测的个体化治疗, 有望成为将来的发展方向。

### 4 参考文献

- 1 Messersmith WA, Ahnen DJ. Targeting EGFR in colorectal cancer. *N Engl J Med* 2008; 359: 1834-1836
- 2 Cunningham D, Humblet Y, Siena S, Khayat D, Bleiberg H, Santoro A, Bets D, Mueser M, Harstrick A, Verslype C, Chau I, Van Cutsem E. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004; 351: 337-345
- 3 Van Cutsem E, Humblet Y, Gelderblom H, Vermorken JB, Viret F, Glimelius B, Ciardiello F, Gallarani E, Amellal N, Peeters M. Cetuximab dose-escalation in patients with metastatic colorectal cancer with no or slight skin reactions on cetuximab standard dose treatment(EVEREST): Pharmacokinetic and efficacy data of a randomized study. 2007 Gastrointestinal Cancers Symposium, Abstract 237
- 4 Meyerhardt JA, Mayer RJ. Systemic therapy for

### ■同行评价

本文新颖性较好, 对了解EGFR单抗治疗方面的临床及基础研究有一定的参考价值。



- colorectal cancer. *N Engl J Med* 2005; 352: 476-487
- 5 Andreyev HJ, Norman AR, Cunningham D, Oates JR, Clarke PA. Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the multicenter "RASCAL" study. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90: 675-684
- 6 Andreyev HJ, Norman AR, Cunningham D, Oates J, Dix BR, Iacopetta BJ, Young J, Walsh T, Ward R, Hawkins N, Beranek M, Jandik P, Benamouzig R, Jullian E, Laurent-Puig P, Olschwang S, Muller O, Hoffmann I, Rabes HM, Zietz C, Troungos C, Valavanis C, Yuen ST, Ho JW, Croke CT, O'Donoghue DP, Giaretti W, Rapallo A, Russo A, Bazan V, Tanaka M, Omura K, Azuma T, Ohkusa T, Fujimori T, Ono Y, Pauly M, Faber C, Glaesener R, de Goeij AF, Arends JW, Andersen SN, Lövig T, Breivik J, Gaudernack G, Clausen OP, De Angelis PD, Meling GI, Rognum TO, Smith R, Goh HS, Font A, Rosell R, Sun XF, Zhang H, Benhattar J, Losi L, Lee JQ, Wang ST, Clarke PA, Bell S, Quirke P, Bubb VJ, Piris J, Cruickshank NR, Morton D, Fox JC, Al-Mulla F, Lees N, Hall CN, Snary D, Wilkinson K, Dillon D, Costa J, Pricolo VE, Finkelstein SD, Thebo JS, Senagore AJ, Halter SA, Wadler S, Malik S, Krtolica K, Urosevic N. Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the 'RASCAL II' study. *Br J Cancer* 2001; 85: 692-696
- 7 Zachary I, Gliki G. Signaling transduction mechanisms mediating biological actions of the vascular endothelial growth factor family. *Cardiovasc Res* 2001; 49: 568-581
- 8 Haigis KM, Kendall KR, Wang Y, Cheung A, Haigis MC, Glickman JN, Niwa-Kawakita M, Sweet-Cordero A, Sebolt-Leopold J, Shannon KM, Settleman J, Giovannini M, Jacks T. Differential effects of oncogenic K-Ras and N-Ras on proliferation, differentiation and tumor progression in the colon. *Nat Genet* 2008; 40: 600-608
- 9 Patra SK. Ras regulation of DNA-methylation and cancer. *Exp Cell Res* 2008; 314: 1193-1201
- 10 Van Cutsem E, Köhne CH, Hitre E, Zaluski J, Chang Chien CR, Makhson A, D'Haens G, Pintér T, Lim R, Bodoky G, Roh JK, Folprecht G, Ruff P, Stroh C, Tejpar S, Schlichting M, Nippgen J, Rougier P. Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2009; 360: 1408-1417
- 11 Bokemeyer C, Bondarenko I, Makhson A, Hartmann JT, Aparicio J, de Braud F, Donea S, Ludwig H, Schuch G, Stroh C, Loos AH, Zube A, Koralewski P. Fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin with and without cetuximab in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2009; 27: 663-671
- 12 Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Tu D, Tebbutt NC, Simes RJ, Chalmers H, Shapiro JD, Robitaille S, Price TJ, Shepherd L, Au HJ, Langer C, Moore MJ, Zalberg JR. K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *N Engl J Med* 2008; 359: 1757-1765
- 13 Amado RG, Wolf M, Peeters M, Van Cutsem E, Siena S, Freeman DJ, Juan T, Sikorski R, Suggs S, Radinsky R, Patterson SD, Chang DD. Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008; 26: 1626-1634
- 14 Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61: 759-767
- 15 Santini D, Loupakis F, Vincenzi B, Floriani I, Stasi I, Canestrari E, Rulli E, Maltese PE, Andreoni F, Masi G, Graziano F, Baldi GG, Salvatore L, Russo A, Perrone G, Tommasino MR, Magnani M, Falcone A, Tonini G, Ruzzo A. High concordance of KRAS status between primary colorectal tumors and related metastatic sites: implications for clinical practice. *Oncologist* 2008; 13: 1270-1275
- 16 Di Nicolantonio F, Martini M, Molinari F, Sartore-Bianchi A, Arena S, Saletti P, De Dosso S, Mazzucchelli L, Frattini M, Siena S, Bardelli A. Wild-type BRAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008; 26: 5705-5712
- 17 Loupakis F, Ruzzo A, Cremolini C, Vincenzi B, Salvatore L, Santini D, Masi G, Stasi I, Canestrari E, Rulli E, Floriani I, Bencardino K, Galluccio N, Catalano V, Tonini G, Magnani M, Fontanini G, Basolo F, Falcone A, Graziano F. KRAS codon 61, 146 and BRAF mutations predict resistance to cetuximab plus irinotecan in KRAS codon 12 and 13 wild-type metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer* 2009; 101: 715-721
- 18 Van Cutsem E, Lang I, Folprecht G, Nowacki M, Cascinu S, Shchepotin I, Maurel J, Cunningham D, Celik I, Kohne C. Cetuximab plus FOLFIRI in the treatment of metastatic colorectal cancer(mCRC): The influence of KRAS and BRAF biomarkers on outcome: Updated data from the CRYSTAL trial. ASCO Gastrointestinal Cancer Symposium, 2010: abstract 281
- 19 Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, Silliman N, Ptak J, Szabo S, Yan H, Gazdar A, Powell SM, Riggins GJ, Willson JK, Markowitz S, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE. High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science* 2004; 304: 554
- 20 Jhawer M, Goel S, Wilson AJ, Montagna C, Ling YH, Byun DS, Nasser S, Arango D, Shin J, Klampfer L, Augenlicht LH, Perez-Soler R, Mariadason JM. PIK3CA mutation/PTEN expression status predicts response of colon cancer cells to the epidermal growth factor receptor inhibitor cetuximab. *Cancer Res* 2008; 68: 1953-1961
- 21 Perrone F, Lampis A, Orsenigo M, Di Bartolomeo M, Gevorgyan A, Losa M, Frattini M, Riva C, Andreola S, Bajetta E, Bertario L, Leo E, Pierotti MA, Pilotti S. PI3KCA/PTEN deregulation contributes to impaired responses to cetuximab in metastatic colorectal cancer patients. *Ann Oncol* 2009; 20: 84-90
- 22 Frattini M, Saletti P, Romagnani E, Martin V, Molinari F, Ghisletta M, Camponovo A, Etienne LL, Cavalli F, Mazzucchelli L. PTEN loss of expression predicts cetuximab efficacy in metastatic colorectal cancer patients. *Br J Cancer* 2007; 97: 1139-1145
- 23 Sartore-Bianchi A, Martini M, Molinari F, Veronese S, Nichelatti M, Artale S, Di Nicolantonio F, Saletti P, De Dosso S, Mazzucchelli L, Frattini M, Siena S, Bardelli A. PIK3CA mutations in colorectal cancer are associated with clinical resistance to EGFR-targeted monoclonal antibodies. *Cancer Res* 2009; 69: 1851-1857
- 24 Ooi A, Takehana T, Li X, Suzuki S, Kunitomo K, Iino H, Fujii H, Takeda Y, Dobashi Y. Protein overexpression and gene amplification of HER-2 and EGFR in colorectal cancers: an immunohistochemical and fluorescent in situ hybridization study. *Mod Pathol* 2004; 17: 895-904
- 25 Moroni M, Veronese S, Benvenuti S, Marrapese G,

- Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, Gambacorta M, Siena S, Bardelli A. Gene copy number for epidermal growth factor receptor (EGFR) and clinical response to antiEGFR treatment in colorectal cancer: a cohort study. *Lancet Oncol* 2005; 6: 279-286
- 26 Italiano A, Follana P, Caroli FX, Badetti JL, Benchi-mol D, Garnier G, Gugenheim J, Haudebourg J, Keslair F, Lesbats G, Lledo G, Roussel JF, Pedeutour F, François E. Cetuximab shows activity in colorectal cancer patients with tumors for which FISH analysis does not detect an increase in EGFR gene copy number. *Ann Surg Oncol* 2008; 15: 649-654
- 27 Lenz HJ, Van Cutsem E, Khambata-Ford S, Mayer RJ, Gold P, Stella P, Mirtsching B, Cohn AL, Pippas AW, Azarnia N, Tsuchihashi Z, Mauro DJ, Rowinsky EK. Multicenter phase II and translational study of cetuximab in metastatic colorectal carcinoma refractory to irinotecan, oxaliplatin, and fluoropyrimidines. *J Clin Oncol* 2006; 24: 4914-4921
- 28 Sartore-Bianchi A, Moroni M, Veronese S, Carnaghi C, Bajetta E, Luppi G, Sobrero A, Barone C, Cascinu S, Colucci G, Cortesi E, Nichelatti M, Gambacorta M, Siena S. Epidermal growth factor receptor gene copy number and clinical outcome of metastatic colorectal cancer treated with panitumumab. *J Clin Oncol* 2007; 25: 3238-3245
- 29 Khambata-Ford S, Garrett CR, Meropol NJ, Basik M, Harbison CT, Wu S, Wong TW, Huang X, Takimoto CH, Godwin AK, Tan BR, Krishnamurthi SS, Burris HA 3rd, Poplin EA, Hidalgo M, Baselga J, Clark EA, Mauro DJ. Expression of epiregulin and amphiregulin and K-ras mutation status predict disease control in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab. *J Clin Oncol* 2007; 25: 3230-3237
- 30 Bianco R, Rosa R, Damiano V, Daniele G, Gelardi T, Garofalo S, Tarallo V, De Falco S, Melisi D, Benelli R, Albini A, Ryan A, Ciardiello F, Tortora G. Vascular endothelial growth factor receptor-1 contributes to resistance to anti-epidermal growth factor receptor drugs in human cancer cells. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 5069-5080
- 31 Lurje G, Nagashima F, Zhang W, Yang D, Chang HM, Gordon MA, El-Khoueiry A, Husain H, Wilson PM, Ladner RD, Mauro DJ, Langer C, Rowinsky EK, Lenz HJ. Polymorphisms in cyclooxygenase-2 and epidermal growth factor receptor are associated with progression-free survival independent of K-ras in metastatic colorectal cancer patients treated with single-agent cetuximab. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 7884-7895

编辑 李薇 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2010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)

# 人参皂甙Rh2对食管癌Eca-109细胞caspase3、caspase8基因的影响

彭林涛, 许欣

## ■背景资料

人参皂甙单体Rh2可直接作用于癌细胞, 通过诱导其凋亡, 抑制肿瘤的生长, 包括对胃癌、肺癌、前列腺癌、卵巢癌等多种肿瘤细胞, 其中对食管癌细胞的作用研究报道在国内外尚少见。

彭林涛, 邢台人民医院外科 河北省邢台市 054031  
许欣, 邢台人民医院病理科 河北省邢台市 054031  
彭林涛, 副主任医师, 主要从事肿瘤临床治疗方面的研究。  
作者贡献分布: 彭林涛与许欣对此文所作贡献均等; 此课题由彭林涛与许欣设计; 研究过程由彭林涛与许欣操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由彭林涛提供; 数据分析由许欣完成; 本论文写作由彭林涛与许欣完成。  
通讯作者: 许欣, 副主任医师, 054031, 河北省邢台市, 邢台人民医院病理科. xx7766@sina.com  
收稿日期: 2010-09-20 修回日期: 2010-11-05  
接受日期: 2010-11-17 在线出版日期: 2010-12-28

## Ginsenoside Rh2 up-regulates caspase 3 and caspase 8 expression in human esophageal cancer cell line Eca-109

Lin-Tao Peng, Xin Xu

Lin-Tao Peng, Department of Surgery, Xingtai People's Hospital, Xingtai 054031, Hebei Province, China  
Xin Xu, Department of Pathology, Xingtai People's Hospital, Xingtai 054031, Hebei Province, China  
Correspondence to: Xin Xu, Department of Pathology, Xingtai People's Hospital, Xingtai 054031, Hebei Province, China. xx7766@sina.com  
Received: 2010-09-20 Revised: 2010-11-05  
Accepted: 2010-11-17 Published online: 2010-12-28

## Abstract

**AIM:** To investigate the effect of ginsenoside Rh2 on the expression of caspase 3 and caspase 8 in human esophageal cancer cell line Eca-109 to explore possible mechanisms underlying the apoptosis-inducing activity of ginsenoside Rh2.

**METHODS:** After Eca-109 cells were treated with ginsenoside Rh2, cell growth was detected by MTT assay; cell apoptosis was determined by flow cytometry; and the expression of apoptosis-associated proteins caspase 3 and caspase 8 was measured by immunocytochemistry and Western blot.

**RESULTS:** Ginsenoside-Rh2 inhibited the growth of Eca-109 cells in a dose- and time-dependent manner. Apoptotic cells were observed

on a DNA histogram as a subdiploid or pre-G1 peak. Treatment with ginsenoside Rh2 significantly altered cell cycle distribution, and the apoptosis rate of cells treated with ginsenoside Rh2 was significantly higher than that of control cells ( $19.10\% \pm 2.12\%$  vs  $2.10\% \pm 0.87\%$ ,  $P < 0.01$ ). Compared with control cells, the expression of caspase 3 and caspase 8 proteins was up-regulated significantly in Eca-109 cells treated with 20 mg/L ginsenoside Rh2 for 72 h ( $0.35 \pm 0.04$  vs  $0.10 \pm 0.02$ ,  $0.84 \pm 0.06$  vs  $0.31 \pm 0.11$ , both  $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** Ginsenoside Rh2 induces the apoptosis of Eca-109 cells possibly by up-regulating the expression of caspase 3 and caspase 8.

**Key Words:** Ginsenoside Rh2; Eca-109 cells; Apoptosis; Caspase 3; Caspase 8

Peng LT, Xu X. Ginsenoside Rh2 up-regulates caspase 3 and caspase 8 expression in human esophageal cancer cell line Eca-109. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(36): 3838-3842

## 摘要

**目的:** 探讨人参皂甙Rh2诱导人食管癌Eca-109细胞凋亡过程中caspase3、caspase8凋亡调节基因的相互关系及可能的作用机制。

**方法:** 应用MTT法测定其对细胞的生长抑制作用, 流式细胞术分析人参皂甙Rh2作用后细胞凋亡及增殖的变化, 应用免疫细胞化学及Western blot技术检测用药前后凋亡相关基因caspase3、caspase8蛋白表达的变化。

**结果:** 人参皂甙Rh2对人食管癌Eca-109细胞有生长抑制作用, 并呈时效和量效依赖关系。流式细胞仪分析结果发现, 食管癌Eca-109细胞在DNA组图上出现典型的亚二倍体峰即凋亡峰, 在细胞周期中的分布也发生了明显的变化, 其48 h凋亡率明显高于对照组( $19.10\% \pm 2.12\%$  vs  $2.10\% \pm 0.87\%$ ,  $P < 0.01$ )。免疫细胞化学及Western blot技术结果显示, 20 mg/L人参皂甙Rh2作用72 h后食管癌Eca-109细胞

## ■同行评议者

李晟磊, 副主任医师, 郑州大学第一附属医院病理科、河南省肿瘤病理重点实验室、郑州大学医学院病理教研室

caspase3、caspase8蛋白表达明显升高( $0.35 \pm 0.04$  vs  $0.10 \pm 0.02$ ,  $0.84 \pm 0.06$  vs  $0.31 \pm 0.11$ , 均 $P < 0.05$ ).

**结论:** 人参皂甙Rh2具有诱导食管癌Eca-109细胞凋亡和抑制细胞分化的作用, 其分子机制可能是上调caspase3、caspase8蛋白表达.

**关键词:** 人参皂甙Rh2; 食管癌Eca-109细胞; 凋亡; caspase3; caspase8

彭林涛, 许欣. 人参皂甙Rh2对食管癌Eca-109细胞caspase3、caspase8基因的影响. 世界华人消化杂志 2010; 18(36): 3838-3842  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/3838.asp>

## 0 引言

人参是我国传统的名贵药材, 人参中含有多种类型的化学成分<sup>[1]</sup>, 人参皂甙具有抗肿瘤、抗衰老、抗辐射等多种生物学活性, 其中人参皂甙单体Rh2(ginsenoside-Rh2, GS-Rh2)是从人参中分离出的原人参二醇型低糖链皂甙单体, 多项研究证实, GS-Rh2、Rg3抑制癌细胞的能力最强<sup>[2-6]</sup>, 并且对正常细胞的毒性甚低. GS-Rh2可以通过诱导细胞凋亡或分化, 有效地抑制多种肿瘤细胞的增殖活性<sup>[7-10]</sup>, 对食管癌细胞的作用研究报道在国内外尚少见. 本研究通过体外培养食管癌Eca-109细胞, 研究GS-Rh2作用后细胞凋亡及其调控基因表达的变化, 探讨GS-Rh2在食管癌细胞中的作用机制, 为食管癌的化学预防提供实验依据.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 人食管癌细胞株Eca-109, 由中国人民解放军第四军医大学实验中心提供. GS-Rh2吉林大学基础医学院有机化学教研室, RPMI 1640购自美国Gibco公司, 二甲亚砜(DMSO)购自美国Sigma公司, 胎牛血清购自天津灏洋生物公司, 考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所, 聚偏二氟乙烯膜(PVDF)购自美国Milipore公司, caspase3兔抗人多克隆抗体购自北京中杉金桥生物技术有限公司进口分装, caspase8鼠抗人单克隆抗体购自美国Abcam公司, SP试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司. Epics-XL-II型流式细胞仪, 美国Beckman Coulter公司, LDZ5-2型离心机, 北京医用离心机厂, CO<sub>2</sub>培养箱, 日本SANYO公司, DG5031型酶联免疫检测仪, 华东电子集团医疗装备公司.

## 1.2 方法

**1.2.1 细胞实验及分组:** 食管癌细胞株Eca-109用含100 mL/L胎牛血清(FBS)的RPMI 1640培养基常规培养. 正常传代, 随机分为不加药的对照组及用5、10、20、40 mg/L的人参皂甙Rh2处理24、48、72 h组, 分别收获细胞进行相关实验.

**1.2.2 细胞的生长抑制:** 取对数生长期的人食管癌Eca-109细胞, 用0.25%胰蛋白酶+0.02% EDTA消化, 细胞计数, 接种于96孔培养板中, 每孔滴加单细胞悬液200  $\mu$ L, 培养细胞完全贴壁生长后, 加药GS-Rh2(0、5、10、20、40 mg/L), 培养24、48和72 h. 同时设不含药物的阴性对照组和等体积DMSO的溶剂对照组, 每浓度每时间点设6组, 每孔滴加MTT溶液(5 g/L)20  $\mu$ L, 继续孵育4 h, 吸弃上清液. 每孔滴加DMSO 200  $\mu$ L, 酶联免疫检测仪测定, 绘制细胞生长曲线.

**1.2.3 FCM检测细胞凋亡和周期变化:** 用5、10、20、40 mg/L的GS-Rh2处理细胞24、48、72 h后终止培养, 分别收获细胞. 采用碘化丙啶(propidium iodide, PI)一步插入性DNA荧光染色方法. DNA染液中含PI 50 mg/L、RNA酶10 mg/L及1% Triton-X 100. 先用0.01 mol/L PBS离心洗涤2次, 去除样品中的70%乙醇. 每份样品中加入DNA染液1 mL, 在4  $^{\circ}$ C冰箱中染色30 min. 上机检测前以500目筛网过滤, 应用流式细胞仪进行检测. 根据亚G<sub>1</sub>峰的分布组方图计算细胞凋亡率. 应用DNA细胞周期分析软件, 计算出DNA组方图各时相分布的百分比.

**1.2.4 免疫细胞化学检测:** 将细胞接种到预先放置了消毒盖玻片的6孔板, 置CO<sub>2</sub>培养箱孵育, 进行细胞培养. 20 mg/L的GS-Rh2处理细胞分别培养24、48、72 h后终止培养, 每组6孔细胞, 取出盖玻片, 浸入0.01 mol/L PBS洗涤3次, 每次3 min. 加冷丙酮于室温固定10 min, 分别对caspase3、caspase8的表达进行检测. 按SP试剂盒操作说明进行. DAB显色后每张切片取10个高倍视野, 每个视野大约20个细胞, 采用图像分析软件Image-pro Plus 5.0分析积分吸光度值(IA), 以平均值作为最终结果.

**1.2.5 Western blot检测细胞凋亡基因蛋白的表达:** 收集细胞, PBS洗涤2次, 加入200 mL蛋白裂解液, 冰浴1 h, 4  $^{\circ}$ C 10 000 $\times g$ 离心20 min, 吸取上清液, 考马斯亮蓝试剂盒测定蛋白浓度. -70  $^{\circ}$ C保存. 每份取30  $\mu$ g细胞总蛋白进行10%变性蛋白的SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳, 电泳后, 转至PVDF膜, 37  $^{\circ}$ C用5%脱脂奶粉封闭2

## ■研发前沿

自从发现人参抗肿瘤的活性成分主要是人参皂甙Rh2, 各国学者先后通过多种体内外实验证实, Rh2通过诱导分化或凋亡, 抑制多种肿瘤细胞的增殖与生长, 对多种癌细胞作用机制的探讨成为研究重点.

## ■相关报道

李殿友等2000年发表的文章首次报道了Rh2对C6胶质瘤细胞的增殖影响, 在该实验中发现, Rh2作用72 h后, 浓度为4  $\mu$ mol/L的Rh2对C6胶质瘤细胞诱导凋亡作用最为明显.



### ■创新盘点

细胞凋亡的不足是肿瘤发生的重要原因,而通过多种途径诱导肿瘤细胞凋亡是人参皂甙抗肿瘤的重要机制之一,其中对食管癌细胞的作用研究报道尚少见.本研究阐明GS-Rh2对食管癌的作用机制,证实caspase8-caspase3通路在细胞凋亡中的重要作用.

表 1 20 mg/L GS-Rh2作用Eca-109细胞48 h后细胞周期和细胞凋亡分析 (mean  $\pm$  SD,  $n = 3$ , %)

分组	细胞周期			凋亡率
	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M	
对照组	45.69 $\pm$ 0.72	27.92 $\pm$ 0.60	26.39 $\pm$ 0.65	2.10 $\pm$ 0.87
48 h	50.26 $\pm$ 0.69 <sup>b</sup>	24.53 $\pm$ 0.65	25.21 $\pm$ 1.10 <sup>a</sup>	19.10 $\pm$ 2.12 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 对照组.

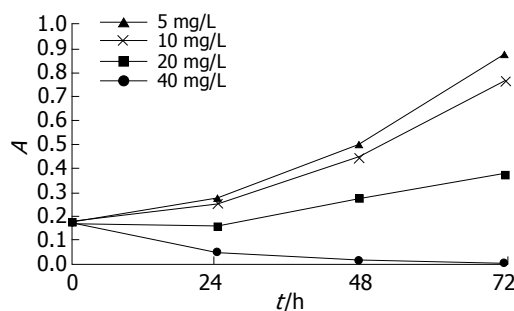


图 1 不同浓度GS-Rh2对Eca-109细胞的生长抑制作用.

h, 加入一抗caspase8、caspase3(1:200稀释),  $\beta$ -actin(1:200稀释), 加辣根过氧化物酶标记的羊抗兔或小鼠IgG(1:5000稀释), 37°C孵育2 h, 洗膜后加入ECL发光试剂, 在X线胶片上曝光, 显影, 定影. Western blot图片应用凝胶成像系统(美国UVP公司)测定光密度值, 目的基因与 $\beta$ -actin光密度值的比值作为其基因的相对含量.

**统计学处理** 实验数据均用mean  $\pm$  SD表示, 采用SPSS11.5统计软件进行统计分析, 两组间均数比较采用 $t$ 检验, 检验水准 $\alpha = 0.05$ .

## 2 结果

**2.1 MTT法测定细胞生长抑制** 结果显示GS-Rh2对Eca-109细胞有生长抑制作用, 其抑制作用随药物浓度增加、作用时间延长而增强, 呈现时效和量效关系, GS-Rh2对细胞生长的半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)为20 mg/L(图1).

**2.2 流式细胞仪分析细胞凋亡和细胞周期** GS-Rh2能诱导Eca-109细胞发生凋亡, 凋亡率随浓度的增高及时间的延长而明显升高, 与对照组相比, 差异有显著性( $P < 0.05$ ). GS-Rh2将Eca-109细胞阻滞于G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期, 随着浓度的增高及作用时间的延长, G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期细胞数逐渐增加, S和G<sub>2</sub>/M期细胞数逐渐减少. 与对照组比较, 差异具有统计学意义( $P < 0.01$ 或 $0.05$ ), 有明显的量效及时效关系(表1).

**2.3 免疫细胞化学检测 caspase3、caspase8蛋白** 阳性物质主要位于细胞质. 采用图像分析软件

表 2 免疫组织化学检测20 mg/L GS-Rh2作用Eca-109细胞后caspase3、caspase8蛋白的表达 (mean  $\pm$  SD,  $n = 9$ )

分组	caspase3	caspase8
对照组	0.17 $\pm$ 0.02	0.12 $\pm$ 0.01
GS-Rh2		
24 h	0.47 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.17 $\pm$ 0.04
48 h	0.37 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	0.24 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>
72 h	0.96 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>	0.36 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 对照组.

表 3 Western blot检测20 mg/L GS-Rh2作用Eca-109细胞后caspase3、caspase8蛋白的表达 (mean  $\pm$  SD,  $n = 3$ )

分组	caspase3	caspase8
对照组	0.31 $\pm$ 0.11	0.10 $\pm$ 0.02
GS-Rh2		
24 h	0.76 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	0.18 $\pm$ 0.04
48 h	0.71 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.26 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>
72 h	0.84 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	0.35 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 对照组.

Image-pro Plus 5.0分析阳性区域IA值, 对照组中, caspase3和caspase8蛋白在细胞中表达于20 mg/L GS-Rh2处理后表达水平明显降低, 差异具有统计学意义( $P < 0.05$ , 图2, 3, 表2).

**2.4 Western blot检测细胞凋亡基因蛋白的表达** 与不加药的对照组进行比较, 药物作用24 h后蛋白表达开始发生明显变化, caspase8、caspase3蛋白表达水平增高( $P < 0.01$ 或 $P < 0.05$ ). 而且随着药物作用时间的延长, 有明显的时效关系(图4, 表3).

## 3 讨论

大量的研究表明, 虽然大多数化疗药物都具有诱导肿瘤细胞凋亡的作用, 但化疗药物的不良反应限制了其临床应用, 而植物抗癌成分越来越受到人们关注, 人参具有抗肿瘤、抗衰老、

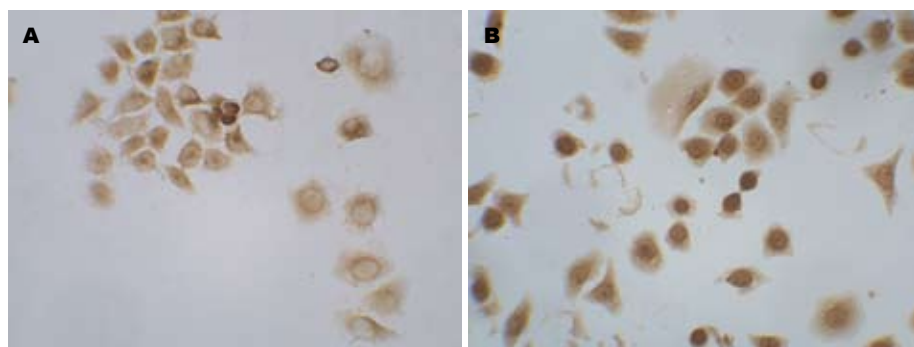


图 2 各组食管癌细胞caspase3的表达(ICC × 400). A: 对照组; B: 20 mg/L GS-Rh2组.

#### ■应用要点

本文研究证明, GS-Rh2可通过诱导食管癌细胞凋亡而抑制肿瘤的生长. 为临床指导应用GS-Rh2治疗食管癌及其他恶性肿瘤提供实验依据.

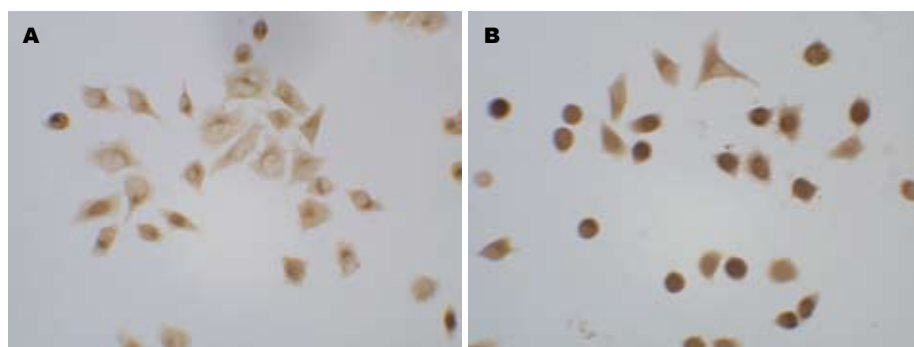


图 3 各组食管癌细胞caspase8的表达(ICC × 400). A: 对照组; B: 20 mg/L GS-Rh2组.

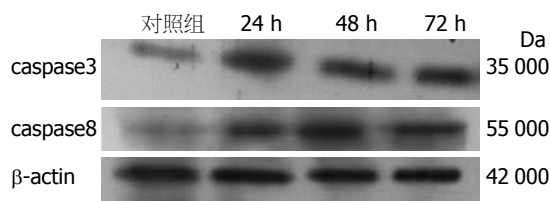


图 4 Western blot示20 mg/L GS-Rh2作用Eca-109细胞后caspase3、caspase8蛋白的表达.

抗辐射等多种生物活性作用<sup>[11-14]</sup>. 人参抗肿瘤的活性成分主要是人参皂甙, GS-Rh2是由人参中提取的天然活性成分, 属于二醇组皂甙. 可直接作用于癌细胞, 通过诱导其凋亡抑制肿瘤的生长. 自从Odashima等<sup>[15]</sup>报道了从红参中提取的有效成分Rh2在体外对鼠黑色素瘤B16细胞具有分化诱导作用后, 各国学者先后通过多种体内外实验证实<sup>[16]</sup>, Rh2可以通过诱导分化或凋亡, 抑制多种肿瘤细胞的增殖与生长, 并证明对正常细胞的毒性甚低. Fei等<sup>[17]</sup>研究发现人参皂甙Rh2诱导黑色素瘤细胞A375-S2凋亡的机制部分依赖于caspase-8和caspase-3通路. 李殿友等<sup>[18]</sup>2000年发表文章首次报道了Rh2对C6胶质瘤细胞的增殖影响, 在该实验中发现: Rh2作用72 h后, 浓度为4  $\mu\text{mol/L}$ 的Rh2对C6胶质瘤细胞诱导凋亡作用最为明显. 日本学者研究发现Rh2在体外浓度为10-60  $\mu\text{mol/L}$ 间能够以剂量依赖方式抑制各种已知的人类卵巢癌细胞株的增殖, 并且在IC<sub>50</sub>浓度左右导致细胞凋亡<sup>[19]</sup>. Kim等<sup>[20]</sup>研究发现GS-

Rh2诱导人神经母细胞瘤SK-N-BE(2)细胞凋亡过程中, 需要caspase1和caspase3的激活和Bax的表达增加. 本研究通过体外培养食管癌Eca-109细胞, 观察GS-Rh2对其细胞凋亡的影响, 以及细胞凋亡相关调控因子caspase8和caspase3基因表达的变化, 以探讨其抗癌作用的机制. 结果表明GS-Rh2能够抑制Eca-109细胞的增殖, 并且呈现出明显的时效和量效关系, 结果与GS-Rh2在其他肿瘤中的作用类似<sup>[21-29]</sup>, 是GS-Rh2抗肿瘤机制的理论基础之一.

近年来研究发现许多肿瘤药物作用于肿瘤细胞的G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期, 本实验用流式细胞仪分析细胞凋亡和细胞周期, 结果显示GS-Rh2能诱导Eca-109细胞发生凋亡, 凋亡率随浓度的增高及时间的延长而明显升高. 随着浓度的增高及作用时间的延长, G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期细胞数逐渐增加, S和G<sub>2</sub>/M期细胞数逐渐减少. 提示GS-Rh2将Eca-109细胞阻滞于G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期, 从而抑制其DNA合成. 我们的实验结果与其他报道相一致<sup>[30-33]</sup>.

本研究观察并检测了GS-Rh2作用前后Eca-109细胞中细胞凋亡调控因子caspase8和caspase3蛋白的表达, 结果显示20 mg/L GS-Rh2处理细胞后caspase8和caspase3基因表达水平增高, 而且有较明显的时效关系, 这与在其他肿瘤细胞系中的研究结果类似, 可能通过启动细胞凋亡信号传导系统, 凋亡信号通过细胞质信号蛋白传递至细胞凋亡的执行人caspase, 再由激活的

# 同行评价

本文实验设计合理,具有一定的科学意义及临床应用价值。

caspase对其特异性底物进行降解,最终caspase3的活化导致细胞DNA的裂解造成细胞凋亡<sup>[34,35]</sup>。进一步证实了caspase8-caspase3通路在细胞凋亡中的重要作用。

总之,本研究为阐明GS-Rh2的抗癌机制,指导临床应用GS-Rh2治疗食管癌及其他恶性肿瘤提供实验依据。

## 参考文献

- 黎阳, 张铁军, 刘素香, 陈常青. 人参化学成分和药理研究进展. 中草药 2009; 40: 164, 附2
- 王庭富, 陈拯民. 人参皂甙Rg3对免疫功能的影响. 中国药科大学学报 1999; 30: 133-135
- 陈声武, 王岩, 王毅, 王丽娟, 何忠梅, 王本祥. 人参皂苷Rg1和Rh1抗肿瘤作用的研究. 吉林大学学报医学版 2003; 29: 25-28
- 何芳. 人参皂甙Rg3抗肿瘤作用的实验研究进展. 河南科技大学学报(医学版) 2005; 23: 155-156
- 竇德强, 靳玲, 陈英杰. 人参的化学成分及药理活性的研究进展与展望. 沈阳药科大学学报 1999; 16: 151-156
- 简捷, 刘利珍, 李小燕, 胡志方, 王韬, 黄缘. 人参皂甙Rg3对人肝癌细胞Pim-3及Bad/凋亡蛋白表达的影响. 世界华人消化杂志 2008; 16: 2229-2233
- Popovich DG, Kitts DD. Ginsenosides 20(S)-protopanaxadiol and Rh2 reduce cell proliferation and increase sub-G1 cells in two cultured intestinal cell lines, Int-407 and Caco-2. *Can J Physiol Pharmacol* 2004; 82: 183-190
- Oh JI, Chun KH, Joo SH, Oh YT, Lee SK. Caspase-3-dependent protein kinase C delta activity is required for the progression of Ginsenoside-Rh2-induced apoptosis in SK-HEP-1 cells. *Cancer Lett* 2005; 230: 228-238
- Cheng CC, Yang SM, Huang CY, Chen JC, Chang WM, Hsu SL. Molecular mechanisms of ginsenoside Rh2-mediated G1 growth arrest and apoptosis in human lung adenocarcinoma A549 cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 2005; 55: 531-540
- 韩冬, 张铁军, 唐铖, 田成旺. 人参皂甙的药动学研究进展. 中草药 2009; 40: 附1-附3
- 张均田. 人参研究的回顾和展望. 药学学报 1995; 30: 321
- 李欣, 万红贵, 卢定强, 韦萍. 人参皂甙的抗肿瘤研究进展. 生物加工过程 2003; 1: 13-17
- 陶丽华, 高峰, 刘红岩, 付招娣, 雷小虹, 徐少峰, 韩锐. 20(R)--人参皂甙Rh2抗癌细胞转移实验研究. 人参研究 2002; 14: 17-18
- Park E. 人参皂甙Rh2的抗过敏活性. 国外医学·中医中药分册 2005; 27: 35-36
- Odashima S, Ohta T, Kohno H, Matsuda T, Kitagawa I, Abe H, Arichi S. Control of phenotypic expression of cultured B16 melanoma cells by plant glycosides. *Cancer Res* 1985; 45: 2781-2784
- 杨金祥, 章建芳, 郑波, 张江峰. 人参皂甙Rh2抗肿瘤作用研究进展. 中国药师 2007; 10: 236-238
- Fei XF, Wang BX, Tashiro S, Li TJ, Ma JS, Ikejima T. Apoptotic effects of ginsenoside Rh2 on human malignant melanoma A375-S2 cells. *Acta Pharmacol Sin* 2002; 23: 315-322
- 李殿友, 杨红, 罗毅男. 人参单体皂甙RH2对C6胶质瘤细胞的增殖抑制和诱导凋亡作用. 白求恩医科大学学报 2000; 26: 342-344
- Nakata H, Kikuchi Y, Tode T, Hirata J, Kita T, Ishii K, Kudoh K, Nagata I, Shinomiya N. Inhibitory effects of ginsenoside Rh2 on tumor growth in nude mice bearing human ovarian cancer cells. *Jpn J Cancer Res* 1998; 89: 733-740
- Kim YS, Jin SH. Ginsenoside Rh2 induces apoptosis via activation of caspase-1 and -3 and up-regulation of Bax in human neuroblastoma. *Arch Pharm Res* 2004; 27: 834-839
- 周东波, 胡成平, 苏小丽, 杨红忠. 人参单体Rh-2诱导人肺腺癌A549/DDP细胞凋亡的体外研究. 中国肺癌杂志 2005; 8: 257-260
- 赵文杰, 陈迪, 倪劲松, 王心蕊, 高静, 李平亚. 20(S)-人参皂甙Rg3对前列腺癌PC-3M细胞的诱导凋亡作用. 中国药理学通报 2009; 25: 235-238
- 吴歌, 李红, 杨世杰. 人参皂甙单体Rh<sub>2</sub>抑制小鼠前胃癌系细胞增殖及其机制. 中国药理学通报 2008; 24: 101-105
- 陶丽华, 刘红岩, 韩锐. 20(R)-人参皂甙Rh<sub>2</sub>抗B<sub>16</sub>(16)-BL6黑色素瘤转移的作用. 辽宁中医杂志 2006; 33: 1505-1506
- 周桂华, 孟艳, 李扬, 赵雪俭, 陈燕萍, 马兴元. 人参单体皂甙Rh2对体外培养的前列腺癌细胞株PC-3M抑制效应的研究. 白求恩医科大学报 2001; 27: 595-597
- 于广久, 康建, 郭凤. 人参单体皂甙RH2对人喉癌细胞株HEP-2抗增殖作用的研究. 锦州医学院学报 2003; 24: 34-37
- 方希敏, 李原, 钱江潮, 周海霞, 王菊香. 人参总皂甙对HL-60细胞凋亡相关基因bax、bcl-x1表达的影响. 中国实验血液学杂志 2008; 16: 781-784
- 杨展, 王旭光, 吴英健, 何慧娟, 杨勤, 吴平. 人参总皂甙对K562细胞凋亡相关基因XIAP和Survivin表达的影响. 中国现代医药杂志 2009; 11: 13-15
- 吴歌, 杨世杰. 人参皂甙单体Rh2诱导小鼠前胃癌细胞系凋亡的分子机制. 世界华人消化杂志 2007; 15: 2972-2976
- Lee KY, Park JA, Chung E, Lee YH, Kim SI, Lee SK. Ginsenoside-Rh2 blocks the cell cycle of SK-HEP-1 cells at the G1/S boundary by selectively inducing the protein expression of p27kip1. *Cancer Lett* 1996; 110: 193-200
- Ota T, Kohno H, Maeda M, Tanino M, Odashima S. Involvement of peanut agglutinin-binding sugar chains in experimental metastasis of B16 melanoma cells. *Oncol Res* 1993; 5: 235-243
- Ota T, Maeda M, Odashima S, Ninomiya-Tsuji J, Tatsuka M. G1 phase-specific suppression of the Cdk2 activity by ginsenoside Rh2 in cultured murine cells. *Life Sci* 1997; 60: PL39-PL44
- 程慧, 宋新波, 张丽娟. 人参皂甙Rg3与Rh2的研究进展. 药物评价研究 2010; 33: 307-311
- 黄文芳, 杨永长, 刘华, 陈江, 周定安. 辛伐他汀诱导k562细胞凋亡过程中Caspase3、Caspase9活性变化. 肿瘤防治研究 2007; 34: 39-41
- 王燕燕, 宋兴福, 崔向军, 黄骥. 青蒿琥酯对人肺腺癌A549细胞中Caspase9及Caspase3活性的影响. 肿瘤防治研究 2007; 34: 652-653

编辑 李薇 电编 何基才

# 5-氮杂-2'-脱氧胞苷对人胃癌SGC-7901细胞株生长及EDNRB基因启动子异常甲基化的影响

吴川清, 韩高雄, 帅晓明, 陶凯雄

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

吴川清, 在读硕士, 主要从事胃肠道肿瘤和先天性疾病方面的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30872473

作者贡献分布: 此课题由陶凯雄设计; 研究过程由吴川清与韩高雄操作完成; 研究所用试剂及分析工具由陶凯雄提供; 数据分析由吴川清与帅晓明完成; 本论文写作由吴川清与陶凯雄完成。

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

kaixgtao@public.wh.hb.cn

电话: 027-85351619

收稿日期: 2010-09-27 修回日期: 2010-11-19

接受日期: 2010-11-23 在线出版日期: 2010-12-28

## Treatment with 5-Aza-2'-deoxycytidine induces promoter demethylation of the EDNRB gene and inhibits cell proliferation in human gastric carcinoma cell line SGC-7901

Chuan-Qing Wu, Gao-Xiong Han, Xiao-Ming Shuai, Kai-Xiong Tao

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

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

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

Received: 2010-09-27 Revised: 2010-11-19

Accepted: 2010-11-23 Published online: 2010-12-28

## Abstract

**AIM:** To investigate the effects of 5-Aza-2'-deoxycytidine on promoter hypermethylation of the EDNRB gene and cell proliferation in human gastric carcinoma cell line SGC-7901.

**METHODS:** After SGC-7901 cells were treated with different concentrations (1, 2, 5, 10  $\mu\text{mol/L}$ ) of 5-Aza-2'-deoxycytidine, the promoter methylation status of the EDNRB gene in SGC-7901 cells was analyzed using methylation-specific

polymerase chain reaction (MSP); the expression of EDNRB gene in SGC-7901 cells was detected by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR); cell proliferation was measured by MTT assay; and cell cycle distribution and apoptosis were analyzed by flow cytometry.

**RESULTS:** Before treatment with 5-Aza-2'-deoxycytidine, promoter hypermethylation of the EDNRB gene was detected in SGC-7901 cells. Accordingly, the expression of EDNRB mRNA was not detected in SGC-7901 cells. After treatment of cells with 5-Aza-2'-deoxycytidine for four days, promoter demethylation of the EDNRB gene was induced and EDNRB mRNA expression was detected. Treatment with 5-Aza-2'-deoxycytidine restrained the proliferation of SGC-7901 cells in a time- and dose-dependent manner. Treatment with 5-Aza-CdR induced cell cycle arrest in S phase. The apoptosis rate was significantly higher in SGC-7901 cells treated with 5 or 10  $\mu\text{mol/L}$  5-Aza-CdR than in control cells ( $7.13\% \pm 0.87\%$ ,  $13.34\% \pm 1.12\%$  vs  $3.69\% \pm 0.52\%$ , both  $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** 5-Aza-2'-deoxycytidine can effectively induce promoter demethylation of the EDNRB gene, activate EDNRB gene expression, and inhibit cell growth in human gastric carcinoma cell line SGC-7901.

**Key Words:** 5-Aza-2'-deoxycytidine; Gastric carcinoma; Cell line; Endothelin receptor B; Gene; Methylation

Wu CQ, Han GX, Shuai XM, Tao KX. Treatment with 5-Aza-2'-deoxycytidine induces promoter demethylation of the EDNRB gene and inhibits cell proliferation in human gastric carcinoma cell line SGC-7901. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(36): 3843-3847

## 摘要

**目的:** 探讨去甲基化药物5-氮杂-2'-脱氧胞苷(5-Aza-CdR)对人胃癌细胞系SGC-7901细胞株的生长及EDNRB基因启动子异常甲基化的影响。

## ■背景资料

胃癌在我国各种恶性肿瘤中居首位, 目前资料表明胃癌的癌变是一个多因素、多步骤、多阶段发展过程, 涉及癌基因、抑癌基因等的改变。EDNRB基因作为一种抑癌基因, 其启动子高甲基化可能在胃癌的发生发展过程中有着重要作用。DNA甲基化的可逆性特征可能为临床治疗胃癌提供了一种新途径, 应用DNA甲基转移酶抑制剂可以使EDNRB基因发生去甲基化, 恢复正常功能。

## ■同行评议者

郑鹏远, 教授, 郑州大学第二附属医院消化科



## ■创新盘点

本文首次报道了5-Aza-CdR能有效逆转人胃癌SGC-7901细胞EDNRB基因的异常甲基化,从而激活因高甲基化导致EDNRB基因沉默的再转录,诱导该基因的表达,抑制该细胞的生长。

**方法:** 使用1、2、5、10  $\mu\text{mol/L}$  5-Aza-CdR干预胃癌SGC-7901细胞,甲基化特异性PCR(MSP)和逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)分别检测药物干预前后EDNRB基因的甲基化状态和EDNRB mRNA的表达,MTT法检测细胞增殖活性,流式细胞术分析细胞周期及细胞凋亡的改变。

**结果:** 未经5-Aza-CdR处理的SGC-7901细胞中EDNRB基因启动子区域CpG岛高甲基化,且EDNRB mRNA不表达,经1、2、5、10  $\mu\text{mol/L}$  5-Aza-CdR处理4 d后,EDNRB基因启动子区域高甲基化状态得到逆转,细胞中EDNRB mRNA表达恢复。4种浓度5-Aza-CdR处理的SGC-7901细胞后,细胞增殖受到抑制,且呈时间和剂量依赖性;并抑制SGC-7901细胞生长周期,其细胞周期阻滞于S期,5、10  $\mu\text{mol/L}$  5-Aza-CdR实验组细胞凋亡率显著高于对照组,且差异有统计学意义( $7.13\% \pm 0.87\%$ ,  $13.34\% \pm 1.12\%$  vs  $3.69\% \pm 0.52\%$ ,  $P = 0.032$ ,  $P < 0.001$ )。

**结论:** 5-Aza-CdR能有效逆转人胃癌SGC-7901细胞EDNRB基因的异常甲基化,从而激活因高甲基化导致EDNRB基因沉默的再转录,诱导该基因的表达,抑制该细胞的生长。

**关键词:** 5-氮杂-2'-脱氧胞苷; 胃癌; 细胞株; 内皮素B受体; 基因; 甲基化

吴川清, 韩高雄, 帅晓明, 陶凯雄. 5-氮杂-2'-脱氧胞苷对人胃癌SGC-7901细胞株生长及EDNRB基因启动子异常甲基化的影响. 世界华人消化杂志 2010; 18(36): 3843-3847  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/3843.asp>

## 0 引言

随着表遗传学的发展,人们认识到肿瘤不仅是遗传性疾病,同时也是由DNA甲基化异常引起的基因调控失常的表遗传性疾病。内皮素受体B(endothelin receptor B, EDNRB)基因是候选的抑癌基因之一,其启动子异常高甲基化与多种肿瘤的发生发展相关<sup>[1]</sup>,但在胃癌组织中对该基因的研究,目前尚未有报道。5-氮杂-2'-脱氧胞苷(5-aza-2'-deoxycytidine, 5-Aza-CdR)是一种DNA甲基转移酶(DNA methyltransferase, DNMT)抑制剂,通过抑制甲基化转移酶,可使多种启动子区域高甲基化的抑癌基因重新表达或表达增高<sup>[2,3]</sup>。为研究胃癌中EDNRB基因的甲基化状态及CpG岛去甲基化后其转录活性的表达,我们应用5-Aza-CdR对SGC-7901细胞进行处理,观察EDNRB基因的启

动子甲基化状态、转录表达情况及细胞生物学特性的改变,从而了解EDNRB基因启动子异常高甲基化与胃癌的关系,并为胃癌的临床治疗提供新的靶点。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 人胃癌细胞株SGC-7901由华中科技大学同济医学院附属协和医院腔镜外科腔镜实验室培养; RPMI 1640(Hyclone公司), 内含100 mL/L的胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司); 琼脂糖(Invitrogen公司); 5-Aza-CdR(Sigma公司), 用PBS充分溶解后配制成1 mol/L的母液, -20  $^{\circ}\text{C}$  保存; DNA提取试剂盒(QIAGEN公司); EZ DNA Methylation-Gold Kit(TIANGEN公司); AMV第1链cDNA试剂盒及PCR扩增试剂盒(上海生工生物工程有限公司); TRIzol试剂(Invitrogen公司); 引物合成(Invitrogen公司); MTT及PI(BD公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养和干预:** 将SGC-7901细胞用含有100 mL/L的胎牛血清的RPMI 1640培养液中, 在50 mL/L  $\text{CO}_2$ 、37  $^{\circ}\text{C}$  的培养箱中培养。另配制含1, 2, 5, 10  $\mu\text{mol/L}$  5-Aza-CdR的完全培养液。取传代后24 h的细胞, 分别加入1、2、5、10  $\mu\text{mol/L}$  5-Aza-CdR浓度的完全培养液, 上述完全培养液每24 h更换1次, 培养4 d后回收细胞。对照组则使用不含5-Aza-CdR的普通完全培养液。

**1.2.2 MSP法检测5-Aza-CdR处理前后SGC-7901细胞中EDNRB基因甲基化状态:** 取对照组和药物处理4 d后SGC-7901细胞, 用DNA提取试剂盒抽提细胞基因组DNA, 紫外分光光度计检测DNA纯度及含量。每份标本取1  $\mu\text{g}$  DNA, 参照EZ DNA Methylation-Gold Kit说明书对基因组DNA进行亚硫酸氢盐修饰。以亚硫酸氢盐处理后的DNA为模板, 使用甲基化扩增试剂盒分别用甲基化引物和非甲基化引物进行PCR扩增, 所有PCR扩增均使用25  $\mu\text{L}$  反应体系。引物参考文献[4], 扩增片段为121 bp, PCR反应条件: 95  $^{\circ}\text{C}$  预变性10 min; 95  $^{\circ}\text{C}$  变性30 s, 58  $^{\circ}\text{C}$  退火30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸30 s, 35个循环后; 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸10 min。PCR产物用2%琼脂糖凝胶电泳, 成像观察甲基化与非甲基化产物条带。

**1.2.3 RT-PCR检测5-Aza-CdR处理前后SGC-7901细胞中EDNRB基因的表达:** 取对照组和药物处理4 d后的SGC-7901细胞, 按RNA提取试剂盒说明书中步骤提取RNA后制备cDNA模板, 反应体系包括: 2.5  $\mu\text{g}$  RNA, 1  $\mu\text{L}$  dNTP, 2  $\mu\text{L}$  二硫苏糖

醇, 5×逆转录缓冲液4 μL, 1 μL寡聚脱氧胸苷酸(Oligo dT), 1 μL核糖核酸酶抑制剂(RNaseOUT), 1 μL莫洛尼鼠白血病病毒(moloney murine leukemia virus, MMLV)逆转录酶. 反应条件: 65 °C 5 min, 冰上冷却5 min; 37 °C 50 min, 70 °C 15 min. RT-PCR扩增: 反应体系中包含cDNA模板1 μL(100 ng). 预变性95 °C 10 min, 55 °C退火30 s, 循环40次, 72 °C延伸10 min. 引物序列参考文献[5], 产物长度为720 bp. 产物用2%琼脂糖凝胶电泳, 成像观察到目的条带则定义为EDNRB基因mRNA的阳性表达.

**1.2.4 MTT法检测5-Aza-CdR作用于SGC-7901细胞后对细胞增殖的影响:** 取对数生长期后成规消化, 按每孔 $3 \times 10^3$ 个/L种入96孔板, 100 μL/孔, 实验组5-Aza-CdR的终浓度分别为1, 2, 5, 10 μmol/L, 每组设3个复孔, 对照组加等量PBS, 共接种5板, 每日取出1板加入5 g/L MTT液10 μL, 37 °C孵育4 h后弃去上清液, PBS洗涤2次, 每孔加入二甲亚砜(DMSO)100 μL, 置摇床振荡10 min后, 酶标仪上测定各孔 $A_{490}$ 孔值, 计算细胞增殖抑制率(CPTR),  $CPIR = (\text{对照组}A_{490} - \text{实验组}A_{490}) / \text{对照组}A_{490} \times 100\%$ ; 并以 $A_{490}$ 值为纵坐标, 时间(d)为横坐标绘制细胞生长曲线.

**1.2.5 流式细胞仪检测SGC-7901细胞周期与凋亡的影响:** 取对照组和5-Aza-CdR干预4 d后SGC-7901细胞, PBS洗涤2次, 将细胞密度调整为 $1 \times 10^6$ /L, 700 mL/L预冷的乙醇-20 °C固定24 h以上, 加入RNase A至终浓度为0.1 g/L, 37 °C温育30 min, 加PI至终浓度为50 mg/L, 室温避光染色30 min后, 用FACS流式细胞仪测定. 数据采用Modifit软件分析. 每组实验设定5个复孔, 重复3次.

**统计学处理** SPSS17.0统计软件包处理数据, 实验数据以mean±SD表示, 多个样本均数间的两两分析采用LSD-*t*检验, 两组均数比较采用*t*检验,  $P < 0.05$ 差异有统计学意义,  $P < 0.01$ 差异有显著统计学意义.

## 2 结果

**2.1 SGC-7901细胞EDNRB基因启动子区甲基化状态分析** 用EDNRB基因甲基化特异性引物扩增出现预期条带, 扩增产物大小为121 bp, 而未甲基化引物未扩增出相应条带(图1).

**2.2 经5-Aza-CdR处理SGC-7901细胞后EDNRB基因甲基化状态的改变** 经4种浓度5-Aza-CdR分别处理后, 出现了杂合状态, 甲基化和非甲基化

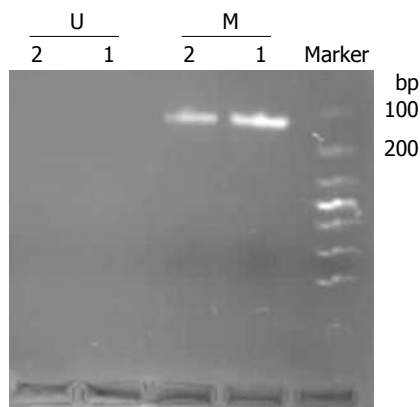


图1 SGC-7901细胞EDNRB基因启动子区甲基化状态分析. Marker: DL 1 000™ DNA Marker; M: 甲基化; U: 非甲基化; 2: 1的重复组.

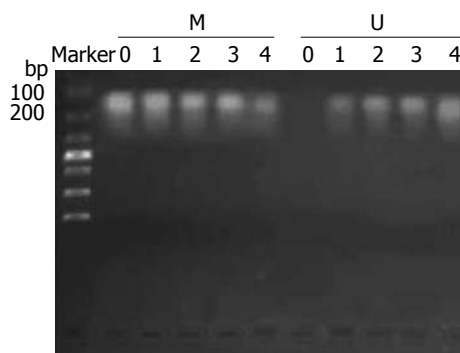


图2 经5-Aza-CdR处理SGC-7901细胞后EDNRB基因甲基化状态的改变. Marker: DL 1 000™ DNA Marker; M: 甲基化; U: 非甲基化; 0: 对照组(未用药处理); 1-4: 1, 2, 5, 10 μmol/L 5-Aza-CdR.

引物均扩增出产物, 说明甲基化和非甲基化的DNA序列均存在, 表明EDNRB基因启动子区域高甲基化发生了逆转(图2).

**2.3 5-Aza-CdR对SGC-7901细胞中EDNRB基因mRNA表达的影响** 未经5-Aza-CdR处理的SGC-7901细胞中未检测出EDNRB mRNA的表达, 4种不同5-Aza-CdR处理组中均检测出EDNRB mRNA表达, 并随着浓度的增高其表达增强(图3).

**2.4 5-Aza-CdR对SGC-7901细胞增殖活性的影响** 经4种不同浓度5-Aza-CdR作用后, SGC-7901细胞的生长增殖活性均有明显抑制, 与对照组比较, 细胞增殖速度出现不同程度减慢(图4). 在一定范围内5-Aza-CdR浓度越高, 对SGC-7901细胞的抑制作用越明显. 与对照组相比, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ).

**2.5 5-Aza-CdR对SGC-7901细胞周期和凋亡率的影响** 经4种不同浓度5-Aza-CdR作用4 d后, 流式细胞仪分析细胞周期结果显示: 5、10 μmol/L

### ■应用要点

EDNRB基因可能成为胃癌早期诊断的分子标志物, 同时由于DNA甲基化具有可逆性, 也可胃癌提供新的治疗靶点.

### ■同行评价

本文设计合理,具有一定的理论意义和潜在的实用价值。

表 1 5-Aza-CdR作用SGC-7901细胞4d后细胞周期与凋亡率的变化(%,  $n = 4$ , mean  $\pm$  SD)

5-Aza-CdR浓度 ( $\mu\text{mol/L}$ )	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> 期	S期	G <sub>0</sub> /M期	凋亡率
0	53.12 $\pm$ 1.69	39.43 $\pm$ 2.14	9.45 $\pm$ 0.96	3.69 $\pm$ 0.52
1	51.25 $\pm$ 2.64	39.67 $\pm$ 2.04	9.12 $\pm$ 0.83	4.52 $\pm$ 0.92
2	49.78 $\pm$ 2.77	41.74 $\pm$ 1.96	8.89 $\pm$ 1.06	4.88 $\pm$ 1.21
5	46.70 $\pm$ 1.37 <sup>a</sup>	44.77 $\pm$ 2.40 <sup>a</sup>	8.12 $\pm$ 0.98	7.13 $\pm$ 0.87 <sup>a</sup>
10	46.14 $\pm$ 1.82 <sup>a</sup>	45.67 $\pm$ 2.17 <sup>a</sup>	8.02 $\pm$ 0.73	13.34 $\pm$ 1.12 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 对照组(0  $\mu\text{mol/L}$  5-Aza-CdR)。

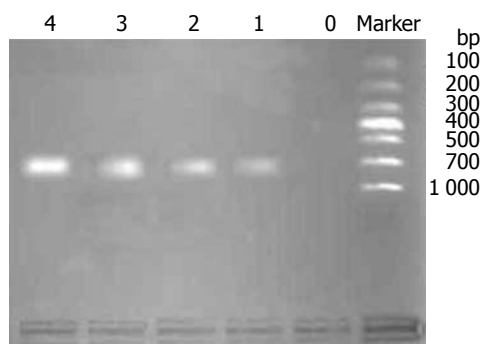


图 3 经5-Aza-CdR处理SGC-7901细胞后EDNRB基因mRNA表达变化。Marker: DL 1 000™ DNA Marker; M: 甲基化; U: 非甲基化; 0: 对照组(未用药处理); 1-4: 1, 2, 5, 10  $\mu\text{mol/L}$  5-Aza-CdR。

5-Aza-CdR实验组S期细胞数目增多, G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期细胞减少, 细胞凋亡率显著增高(表1), 说明细胞周期阻滞于S期。

### 3 讨论

EDNRB基因位于13号染色体q22, 长度大约为24 kb, 含7个外显子和6个内含子, 其编码产物EDNRB属于G蛋白偶联受体超家族, 与配体内皮素(endothelin, ET)结合传递细胞外的信号, 在胚胎发育过程中, EDNRB/ET-3在神经嵴细胞迁移发育分化成神经节细胞时候扮演着重要角色<sup>[6-10]</sup>, 与巨结肠病相关联<sup>[11-14]</sup>。有研究<sup>[15-25]</sup>显示, 在前列腺癌、肺癌、肝癌、食管癌、鼻咽癌、白血病、卵巢癌、恶性黑色素瘤、膀胱癌、子宫内膜癌及肾癌中均有存在EDNRB基因启动子异常高甲基化, 其中前列腺癌、鼻咽癌、肺癌、卵巢癌和食管癌细胞株中经5-Aza-CdR处理后EDNRB基因重新表达。

甲基化改变不像基因突变和缺失等改变, 具有可逆性<sup>[26,27]</sup>。DNA甲基化的可逆性特征为临床抗肿瘤治疗提供了一种新途径: 应用DNMT抑制剂可以使一些重要基因发生去甲基化, 恢复正常功能。5-Aza-CdR是第1个被美国FDA批

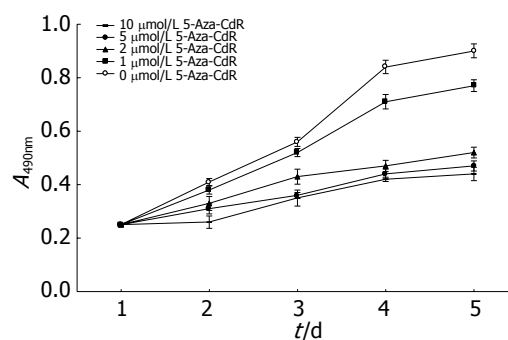


图 4 经不同浓度5-Aza-CdR处理SGC-7901细胞的生长曲线。

准上市治疗恶性肿瘤的去甲基化药物<sup>[2,3]</sup>。目前, 5-Aza-CdR已成功应用于临床的一些实例, 如在急性粒细胞白血病中的应用<sup>[28]</sup>。

我们的研究结果表明, 未经5-Aza-CdR处理的SGC-7901细胞中EDNRB基因启动子区域显示为高甲基化状态, 同时SGC-7901细胞中EDNRB基因mRNA不表达; 经5-Aza-CdR处理后, EDNRB基因的启动子区域高甲基化状态得到逆转, 并可检出EDNRB基因mRNA重新表达, 并且EDNRB基因mRNA的表达水平与药物作用浓度存在一定的正相关。5-Aza-CdR干预SGC-7901细胞后, 细胞增殖速度减慢, 在一定范围内其抑制SGC-7901细胞增殖的作用呈量效关系, 并使细胞生长停滞在S期, 凋亡率显著升高。由此可见, EDNRB mRNA表达失活与其基因启动子区域CpG岛高甲基化高度相关, 由于EDNRB基因启动子区域高甲基化而导致其表达失活, EDNRB基因的表达可通过5-Aza-CdR的去甲基化作用而被重新激活, 使其转录活性得到恢复, 从而使EDNRB基因再次发挥肿瘤抑制作用; 另外也说明5-Aza-CdR对SGC-7901细胞有显著的抑制增殖和诱导凋亡的作用, 并在一定程度上呈浓度依赖性, 究其原因, 5-Aza-CdR的去甲基化功能能诱发因高甲基化而封闭的基因重获表达, 通

过逆转包括EDNRB基因在内的具有生长调控作用的基因启动子区域的高甲基化的状态, 使这些基因重新获得表达, 从而发挥抑制胃癌细胞生长及促进胃癌细胞凋亡的作用。

我们认为EDNRB基因在胃癌细胞中表达失活与该基因启动子区域CpG岛高甲基化高度相关, 而5-Aza-CdR能够逆转其启动子区域高甲基化状态并恢复EDNRB基因的表达, 使其再次发挥抑癌基因作用, 为胃癌的早期诊断和临床治疗提供了一种新的依据。对该领域的进一步探讨有利于阐明胃癌发生发展的分子机制, 可能成为胃癌治疗新靶点。

#### 4 参考文献

- 1 吴川清, 陶凯雄. 内皮素B受体基因甲基化与肿瘤关系的研究进展. 世界华人消化杂志 2010; 18: 2448-2452
- 2 Yang AS, Doshi KD, Choi SW, Mason JB, Mannari RK, Gharybian V, Luna R, Rashid A, Shen L, Esteccio MR, Kantarjian HM, Garcia-Manero G, Issa JP. DNA methylation changes after 5-aza-2'-deoxycytidine therapy in patients with leukemia. *Cancer Res* 2006; 66: 5495-5503
- 3 Mossman D, Kim KT, Scott RJ. Demethylation by 5-aza-2'-deoxycytidine in colorectal cancer cells targets genomic DNA whilst promoter CpG island methylation persists. *BMC Cancer* 2010; 10: 366
- 4 Lo KW, Tsang YS, Kwong J, To KF, Teo PM, Huang DP. Promoter hypermethylation of the EDNRB gene in nasopharyngeal carcinoma. *Int J Cancer* 2002; 98: 651-655
- 5 Pao MM, Tsutsumi M, Liang G, Uzvolgyi E, Gonzales FA, Jones PA. The endothelin receptor B (EDNRB) promoter displays heterogeneous, site specific methylation patterns in normal and tumor cells. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 903-910
- 6 Saldana-Caboverde A, Kos L. Roles of endothelin signaling in melanocyte development and melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* 2010; 23: 160-170
- 7 Roberts RR, Bornstein JC, Bergner AJ, Young HM. Disturbances of colonic motility in mouse models of Hirschsprung's disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008; 294: G996-G1008
- 8 Druckenbrod NR, Powers PA, Bartley CR, Walker JW, Epstein ML. Targeting of endothelin receptor-B to the neural crest. *Genesis* 2008; 46: 396-400
- 9 Nagy N, Goldstein AM. Endothelin-3 regulates neural crest cell proliferation and differentiation in the hindgut enteric nervous system. *Dev Biol* 2006; 293: 203-217
- 10 Barlow A, de Graaff E, Pachnis V. Enteric nervous system progenitors are coordinately controlled by the G protein-coupled receptor EDNRB and the receptor tyrosine kinase RET. *Neuron* 2003; 40: 905-916
- 11 Sánchez-Mejías A, Fernández RM, López-Alonso M, Antiñolo G, Borrego S. New roles of EDNRB and EDN3 in the pathogenesis of Hirschsprung disease. *Genet Med* 2010; 12: 39-43
- 12 Duan XL, Zhang XS, Li GW. Clinical relationship between EDN-3 gene, EDNRB gene and Hirschsprung's disease. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 2839-2842
- 13 Lin YC, Lai HS, Hsu WM, Lee PI, Chen HL, Chang MH. Mutation analysis of endothelin-B receptor gene in patients with Hirschsprung disease in Taiwan. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2008; 46: 36-40
- 14 Sangkhathat S, Chiengkriwate P, Kusafuka T, Patrapinyokul S, Fukuzawa M. Novel mutation of Endothelin-B receptor gene in Waardenburg-Hirschsprung disease. *Pediatr Surg Int* 2005; 21: 960-963
- 15 Jerónimo C, Henrique R, Campos PF, Oliveira J, Caballero OL, Lopes C, Sidransky D. Endothelin B receptor gene hypermethylation in prostate adenocarcinoma. *J Clin Pathol* 2003; 56: 52-55
- 16 Chen SC, Lin CY, Chen YH, Fang HY, Cheng CY, Chang CW, Chen RA, Tai HL, Lee CH, Chou MC, Lin TS, Hsu LS. Aberrant promoter methylation of EDNRB in lung cancer in Taiwan. *Oncol Rep* 2006; 15: 167-172
- 17 Hsu LS, Lee HC, Chau GY, Yin PH, Chi CW, Lui WY. Aberrant methylation of EDNRB and p16 genes in hepatocellular carcinoma (HCC) in Taiwan. *Oncol Rep* 2006; 15: 507-511
- 18 Zhao BJ, Sun DG, Zhang M, Tan SN, Ma X. Identification of aberrant promoter methylation of EDNRB gene in esophageal squamous cell carcinoma. *Dis Esophagus* 2009; 22: 55-61
- 19 Zhou L, Feng X, Shan W, Zhou W, Liu W, Wang L, Zhu B, Yi H, Yao K, Ren C. Epigenetic and genetic alterations of the EDNRB gene in nasopharyngeal carcinoma. *Oncology* 2007; 72: 357-363
- 20 Hsiao PC, Liu MC, Chen LM, Tsai CY, Wang YT, Chen J, Hsu LS. Promoter methylation of p16 and EDNRB gene in leukemia patients in Taiwan. *Chin J Physiol* 2008; 51: 27-31
- 21 洪凡真, 王波, 李晓明. 卵巢上皮性肿瘤EDNRB基因甲基化状态的研究. 中华妇产科杂志 2006; 41: 630-632
- 22 Kumasaka MY, Yajima I, Hossain K, Iida M, Tsuzuki T, Ohno T, Takahashi M, Yanagisawa M, Kato M. A novel mouse model for de novo Melanoma. *Cancer Res* 2010; 70: 24-29
- 23 Yates DR, Rehman I, Abbod MF, Meuth M, Cross SS, Linkens DA, Hamdy FC, Catto JW. Promoter hypermethylation identifies progression risk in bladder cancer. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 2046-2053
- 24 朱介之, 王波, 洪凡真, 李晓明, 刘宗石. 子宫内膜癌组织中内皮素受体B基因启动子区域CpG岛的甲基化状况的研究. 中华病理学杂志 2006; 35: 489-490
- 25 Pflug BR, Zheng H, Udan MS, D'Antonio JM, Marshall FF, Brooks JD, Nelson JB. Endothelin-1 promotes cell survival in renal cell carcinoma through the ET(A) receptor. *Cancer Lett* 2007; 246: 139-148
- 26 Luczak MW, Jagodziński PP. The role of DNA methylation in cancer development. *Folia Histochem Cytobiol* 2006; 44: 143-154
- 27 Kulis M, Esteller M. DNA methylation and cancer. *Adv Genet* 2010; 70: 27-56
- 28 Polakova K, Bandzuchova E, Sabty FA, Mistrik M, Demitrovicova L, Russ G. Activation of HLA-G expression by 5-aza-2'-deoxycytidine in malignant hematopoietic cells isolated from leukemia patients. *Neoplasma* 2009; 56: 514-520

编辑 李薇 电编 何基才



# PPAR $\gamma$ 、NF- $\kappa$ B的表达与砷暴露致大鼠肝纤维化的相关性

刘洋, 吴君, 闫超, 刘芙蓉

## ■背景资料

砷是一种已知的毒物和人类致癌物, 近年来动物实验和人群流行病学调查均表明砷进入机体后, 主要分布于肝脏。饮用高砷水导致的慢性砷中毒会使肝脏出现脂肪变性、炎症、坏死和纤维化等病理变化, 引起严重的肝脏损害, 如慢性肝炎、肝纤维化、肝硬化, 甚至肝癌。

刘洋, 吴君, 闫超, 刘芙蓉, 贵阳医学院附属医院感染科 贵州省贵阳市 550004

刘洋, 在读硕士, 主要从事肝脏疾病的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30471592

中国肝炎防治基金会“王宝恩肝纤维化研究基金”资助项目, No. 20070013

作者贡献分布: 此课题的总设计与指导由吴君提供; 课题实施及论文写作由刘洋完成; 闫超与刘芙蓉参与课题实施。

通讯作者: 吴君, 教授, 550004, 贵州省贵阳市, 贵阳医学院附属医院感染科, wuwuj@21cn.com

收稿日期: 2010-10-11 修回日期: 2010-11-14

接受日期: 2010-11-23 在线出版日期: 2010-12-28

## Correlation of PPAR $\gamma$ and NF- $\kappa$ B expression with arsenic-induced hepatic fibrosis in rats

Yang Liu, Jun Wu, Chao Yan, Fu-Rong Liu

Yang Liu, Jun Wu, Chao Yan, Fu-Rong Liu, Department of Infectious Diseases, the Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30471592; and the Wang Baoen Foundation for Liver Fibrosis Research, No. 20070013

Correspondence to: Professor Jun Wu, Department of Infectious Diseases, the Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou Province, China. wuwuj@21.cn.com

Received: 2010-10-11 Revised: 2010-11-14

Accepted: 2010-11-23 Published online: 2010-12-28

## Abstract

**AIM:** To investigate the significance of peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) and nuclear transcription factor kappa B (NF- $\kappa$ B) expression in arsenic-induced hepatic fibrosis in rats.

**METHODS:** One hundred and ten Sprague-Dawley rats were randomly divided into control group (tap water), model group (100 mg/L NaAsO<sub>2</sub>) and spontaneous recovery group (100 mg/L NaAsO<sub>2</sub> + tap water). Ten rats of each group were sacrificed on days 30, 60, 90 and 120. Hepatic histological changes and liver fibrosis were evaluated by hematoxylin and eosin staining and Masson staining. The mRNA and protein expression of PPAR $\gamma$  and NF- $\kappa$ B was detected by real-time PCR and Western blot, respectively.

**RESULTS:** (1) Pathology: With the prolongation of arsenic exposure, hepatic injury became more serious. Compared with the model group, liver injury was significantly relieved on day 30 after one-month arsenic-exposure in the spontaneous recovery, but showed no significant changes on day 30 after two- or three-month arsenic-exposure; (2) mRNA: Compared with the control group, the expression levels of PPAR $\gamma$  mRNA were significantly reduced at different time points in the model group (174.99  $\pm$  41.48 *vs* 218.40  $\pm$  47.85, 114.55  $\pm$  21.30 *vs* 218.40  $\pm$  47.85, 64.67  $\pm$  9.83 *vs* 218.40  $\pm$  47.85, 19.20  $\pm$  16.10 *vs* 218.40  $\pm$  47.85, all *P* < 0.05). The expression level of PPAR $\gamma$  mRNA on day 30 after one-month arsenic-exposure in the spontaneous recovery group was significantly higher than that in the corresponding model group (215.97  $\pm$  45.96 *vs* 174.99  $\pm$  41.48, *P* < 0.05). Compared with the control group, the levels of NF- $\kappa$ B mRNA were significantly elevated at different time points in the model group (65.58  $\pm$  13.17 *vs* 30.84  $\pm$  15.24, 90.23  $\pm$  15.68 *vs* 30.84  $\pm$  15.24, 117.95  $\pm$  18.19 *vs* 30.84  $\pm$  15.24, 172.86  $\pm$  32.92 *vs* 30.84  $\pm$  15.24, all *P* < 0.05). The expression of NF- $\kappa$ B mRNA on day 30 after one-month arsenic-exposure in the spontaneous recovery group was significantly higher than that in the corresponding model group (40.45  $\pm$  19.56 *vs* 65.58  $\pm$  13.17, *P* < 0.05); (3) Protein: Compared with the control group, the level of PPAR $\gamma$  protein was reduced in the model group. Compared with the control group, the level of NF- $\kappa$ B protein was elevated in the model group; (4) Correlation: There is a negative correlation between PPAR $\gamma$  and NF- $\kappa$ B mRNA expression (*r* = 0.847, *P* < 0.05) as well as between PPAR $\gamma$  and NF- $\kappa$ B protein expression (*r* = 0.529, *P* < 0.05).

**CONCLUSION:** Liver tissue injury is aggravated gradually with the prolongation of arsenic exposure. Earlier avoidance of arsenic exposure is associated with a quicker recovery from liver injury. In arsenic-induced hepatic fibrosis, PPAR $\gamma$  mRNA and protein expression is reduced, while that of NF- $\kappa$ B is elevated. There is a negative correlation between PPAR $\gamma$  and NF- $\kappa$ B expression in arsenic-induced hepatic fibrosis.

## ■同行评议者

党双锁, 教授, 西安交通大学第二医院感染科

**Key Words:** Arsenic exposure; Hepatic fibrosis; Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ ; Nuclear transcription factor kappa B

Liu Y, Wu J, Yan C, Liu FR. Correlation of PPAR $\gamma$  and NF- $\kappa$ B expression with arsenic-induced hepatic fibrosis in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(36): 3848-3856

## 摘要

**目的:** 初步探讨过氧化物酶体增殖物激活受体 $\gamma$ (PPAR $\gamma$ )、核转录因子B(NF- $\kappa$ B)的表达与水砷暴露致大鼠肝纤维化的相关性。

**方法:** 110只SD大鼠随机分成对照组(自来水)、模型组(浓度100 mg/L亚砷酸钠溶液)、自然恢复组(浓度100 mg/L亚砷酸钠溶液+自来水)。对照组和模型组分别于第1、2、3、4月末各处死10只,自然恢复组先给予砷溶液,分别在第1、2、3月末取出10只改给予1 mo自来水饮用后处死。肝组织病理学检查以观察肝纤维化的动态变化,实时荧光定量RT-PCR法和Western blot法检测PPAR $\gamma$ 、NF- $\kappa$ B的mRNA及蛋白表达水平。

**结果:** (1)病理结果: HE染和Masson染色可见,随砷暴露时间的延长,肝细胞变性、坏死增多,汇管区炎症细胞浸润加重,纤维组织增生增多,肝纤维化趋势明显。砷暴露1 mo脱离自然恢复1 mo后较同月模型组肝细胞变性、坏死及炎细胞浸润程度明显减轻,胶原生成减少。砷暴露2、3 mo脱离自然恢复1 mo后较同月模型组病理结果差异不明显; (2)mRNA水平: 模型组PPAR $\gamma$  mRNA含量逐渐降低,与对照组比较差异均有统计学意义( $174.99 \pm 41.48$ ,  $114.55 \pm 21.30$ ,  $64.67 \pm 9.83$ ,  $19.20 \pm 16.10$  vs  $218.40 \pm 47.85$ ,  $P < 0.05$ ), 砷暴露1、2、3 mo后分别自然恢复1 mo大鼠肝组织中PPAR $\gamma$  mRNA表达均低于同月造模组,仅砷暴露1 mo自然恢复组1 mo组PPAR $\gamma$  mRNA降低有统计学意义( $174.99 \pm 41.48$  vs  $215.97 \pm 45.96$ ,  $P < 0.05$ ); 模型组NF- $\kappa$ B mRNA含量逐渐升高,与对照组比较差异均有统计学意义( $65.58 \pm 13.17$ ,  $90.23 \pm 15.68$ ,  $117.95 \pm 18.19$ ,  $172.86 \pm 32.92$  vs  $30.84 \pm 15.24$ ,  $P < 0.05$ ), 砷暴露1、2、3 mo后分别自然恢复1 mo大鼠肝组织中NF- $\kappa$ B mRNA表达均高于同月造模组,仅砷暴露1 mo自然恢复组1 mo组NF- $\kappa$ B mRNA升高有统计学意义( $65.58 \pm 13.17$  vs  $40.45 \pm 19.56$ ,  $P < 0.05$ ); (3)蛋白水平: 模型组大鼠肝组织中PPAR $\gamma$ 的蛋白含量表达均低于对照组,造模3、4 mo组与造模1 mo组比较差异有统计学意义( $0.63 \pm 0.06$ ,  $0.55 \pm 0.11$  vs  $0.85 \pm 0.08$ ,  $P < 0.05$ ); 模型组大鼠肝组织中NF- $\kappa$ B的蛋白

含量均高于对照组,造模3、4 mo组与造模1 mo组比较差异有统计学意义( $3.25 \pm 0.89$ ,  $4.27 \pm 1.26$  vs  $1.6 \pm 0.57$ ,  $P < 0.05$ ); (4)PPAR $\gamma$ 和NF- $\kappa$ B的相关性: 两者mRNA的表达呈负相关( $r = 0.847$ ,  $P < 0.01$ ), 两者蛋白表达也呈负相关( $r = 0.529$ ,  $P < 0.05$ )。

**结论:** 肝纤维化程度随砷暴露时间延长而加重,越早脱离砷环境,肝损伤自然恢复越快;砷暴露时间越长,PPAR $\gamma$  mRNA及蛋白表达越低, NF- $\kappa$ B mRNA及蛋白表达越高,二者存在一反馈抑制通路; PPAR $\gamma$ -NF- $\kappa$ B信号传导通路参与砷暴露致肝纤维化形成机制。

**关键词:** 砷暴露; 肝纤维化; 过氧化物酶体增殖物激活受体 $\gamma$ ; 核转录因子 $\kappa$ B

刘洋, 吴君, 闫超, 刘芙蓉. PPAR $\gamma$ 、NF- $\kappa$ B的表达与砷暴露致大鼠肝纤维化的相关性. *世界华人消化杂志* 2010; 18(36): 3848-3856

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/3848.asp>

## 0 引言

砷是一种已知的毒物和人类致癌物,饮用高砷水导致的慢性砷中毒会使肝脏出现变性、炎症、坏死和纤维化等病理变化,引起严重的肝脏损害,如慢性肝炎、肝纤维化、肝硬化,甚至肝癌<sup>[1-4]</sup>。肝纤维化成因是肝细胞发生坏死及炎症刺激时,肝脏中胶原蛋白等细胞外基质的增生与降解失去平衡,进而导致肝脏内纤维结缔组织异常沉积的病理过程<sup>[5]</sup>。过氧化物酶体增殖物激活受体 $\gamma$ (peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ , PPAR $\gamma$ )是一类依赖配体调节的转录因子,在转录水平上调控多种细胞的增殖、侵袭、分化和凋亡,对多种促炎介质基因转录的抑制是其抗炎特性的分子基础,在各种炎症损伤进程中具有重要作用<sup>[6,7]</sup>。细胞核转录因子 $\kappa$ B(nuclear factor-kappa B, NF- $\kappa$ B)是调控机体免疫和炎症反应因子表达的重要转录因子,可促进多种促炎细胞因子的转录及表达<sup>[8]</sup>。研究表明,PPAR $\gamma$ -NF- $\kappa$ B途径参与炎症反应平衡过程<sup>[9]</sup>。NF- $\kappa$ B的激活可能是大量炎症反应基因表达的控制点,在炎症反应中活化后的PPAR $\gamma$ 可以通过多种机制抑制NF- $\kappa$ B的表达,因此,PPAR $\gamma$ -NF- $\kappa$ B途径是控制炎症反应的一个重要的靶点,针对抑制NF- $\kappa$ B活性可能是治疗炎症的一个有效方案<sup>[10-12]</sup>。本文拟在建立较稳定的砷致肝损伤、肝纤维化动物模型基础上,观察在砷暴露致肝纤维化模型中PPAR $\gamma$ 、NF- $\kappa$ B的mRNA和蛋白

## ■ 相关报道

有研究表明 PPAR $\gamma$ 和NF- $\kappa$ B之间关系密切,二者存在一反馈抑制通路,且这一通路与组织炎症的发生密切相关。

## ■创新盘点

PPAR $\gamma$ -NF- $\kappa$ B途径是控制炎症反应的一个重要的靶点, 针对抑制NF- $\kappa$ B活性可能是治疗炎症的一个有效方案.

的表达差异, 并初步探讨两者表达水平的相关性, 结合肝组织病理学表现来探索砷导致大鼠肝纤维化形成的分子机制, 为砷中毒致肝纤维化的防治提供理论依据.

## 1 材料和方法

1.1 材料 健康清洁级SD大鼠110只, 雌雄各半, 体质量180-200 g, 购自贵阳医学院实验动物中心, 在清洁级动物饲养室进行饲养. 荧光PCR扩增仪(广东中山, DA7600), 核酸蛋白定量仪(Thermo SCIENTIFIC), 高速低温离心机(美国, Sigma 3K15), PH仪(美国, METTLER TOLEDO Five Easy), 凝胶成像系统(美国, BIO-RAD Gel Doc XR), 电泳仪(北京, 六一仪器厂DYCZ-24DN), 扩增仪(美国, PE Applied Biosystems PE9700). 亚砷酸钠( $\text{NaAsO}_2$ , 美国Sigma chemical公司), 批号76H0240. PPAR $\gamma$ 、NF- $\kappa$ B、 $\beta$ -actin引物委托上海捷达生物工程有限公司合成, RNA纯化试剂盒[北京, 天根生化科技(北京)有限公司], TRIzol Reagent(invitrogen Cat. No. 15596-026), RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit(Fermentas, Cat. No. K1622), SYBR Green(天根生化, FP202), 兔NF- $\kappa$ B多克隆抗体(Santa Cruz, Cat. No. sc-33022); 鼠PPAR $\gamma$ 单克隆抗体(Santa Cruz, Cat. No. sc-7273); 小鼠 $\beta$ -actin单克隆抗体(Sigma, Cat. No. sc-A5441); HRP标记山羊抗兔抗体(Santa Cruz, Cat. No. sc-2030); HRP标记山羊抗鼠抗体(Santa Cruz, Cat. No. sc-2302), BCA Protein Assay Kit(Thermo SCIENTIFIC, Cat. No. 23227).

### 1.2 方法

1.2.1 分组及造模: 将110只SD大鼠随机分成3组: 对照组、模型组、自然恢复组, 各组均给予普通饲料. 对照组40只, 给予自来水自由饮用; 模型组40只, 给予100 mg/L<sup>[13]</sup>的亚砷酸钠溶液自由饮用. 对照组和模型组分别予第1、2、3、4月末各处死10只. 自然恢复组30只, 给予普通饲料. 第1月给予砷溶液(100 mg/L), 月末随机取出10只改为自来水, 其余仍给予砷溶液. 第2月末处死上月分出的10只, 并再次取出10只改为自来水, 1 mo后处死, 以此类推, 第4月末将最后10只停用砷溶液的大鼠处死. 股动脉放血后脱颈处死大鼠, 剖取相同部位肝脏, 分别浸泡于40 g/L甲醛溶液中固定, 送病理科作苏木素-伊红(HE)染色及Masson染色, 光镜下观察肝脏病理变化及胶原表达情况. 另取肝组织100 mg, 迅速加入

1 mL TRIzol试剂中, 立即提取肝组织总RNA. 其余肝组织置于EP管中, -80 °C低温保存备用.

1.2.2 实时荧光定量PCR法检测PPAR $\gamma$ 、NF- $\kappa$ B的mRNA: PPAR: 按参考文献设计并在GenBank进行核对, 委托上海捷达合成, 上游引物为: 5'-GCTCAAGTATGGTGTCCATGAG-3', 下游引物为5'-TGAGATGAGGACTCCATCTT-TATTCA-3'; NF- $\kappa$ B: 按参考文献设计并在GenBank进行核对, 委托上海捷达合成. 上游引物为: 5'-CGGGCTGGTGAGGAAATTAG-3', 下游引物为5'-CCCCAAAGTACGTCGCATCTT-3';  $\beta$ -actin: 按参考文献设计并在GenBank进行核对, 委托上海捷达合成, 上游引物为5'-ACCAC-CATGTACCCAGGCAT-3', 下游引物为5'-CCG-GACTCATCGTACTCCTG-3'. 采用标准TRIzol-酚-氯仿一步法提取总RNA, 采用紫外分光光度法测定RNA在波长为260 nm和280 nm时的吸光度值( $A_{260}$ 、 $A_{280}$ ), 以 $A_{260}/A_{280}$ 的比值鉴定RNA的纯度(1.6-1.8), 将浓度稀释为50  $\mu$ g/L, 经MMLv催化合成cDNA第一链, 以此为模板进行实时荧光定量PCR扩增, 得出各样本末的初始拷贝数. 实验过程中严格设立内参 $\beta$ -actin, 以作为逆转录酶和荧光RT-PCR的质控措施. 逆转录反应体系(20  $\mu$ L): 50  $\mu$ g/L RNA 10  $\mu$ L, 5 $\times$ reaction Buffer 4.0  $\mu$ L, 10 mmol/L dNTPmix 2.0  $\mu$ L, 100  $\mu$ mol/L Oligo(dT)<sub>18</sub> 1.0  $\mu$ L, 200 U/ $\mu$ L M-MLV 1.0  $\mu$ L, 20 U/ $\mu$ L RNase Inhibitor 1.0  $\mu$ L, RNase-free H<sub>2</sub>O 1.0  $\mu$ L. 逆转录参数设置: 42 °C, 60 min; 70 °C, 5 min; 反应结束后取出cDNA -20 °C保存备用. PCR反应体系(20  $\mu$ L)包括: 逆转录产物2  $\mu$ L, 10  $\mu$ mol/L上游引物0.5  $\mu$ L, 10  $\mu$ mol/L下游引物0.5  $\mu$ L, 2 $\times$ SYBR Green 10  $\mu$ L, RNase-free H<sub>2</sub>O 7  $\mu$ L. PCR扩增参数设置: 50 °C, 2 min; 95 °C, 预变性10 min后进入循环, 95 °C, 15 s; 60 °C, 1 min, 40个循环. 反应结束后, 由广东中山DA7600荧光PCR扩增仪软件自动记录荧光曲线并分析计算出Ct值, 建立 $\beta$ -actin作为内对照, 检测被测样品RNA的完整性和可靠性. 结果判断:  $\Delta$ 循环阈值(cycle threshold, Ct) = 样品Ct均值-内参照Ct均值, 然后取 $2^{-\Delta\text{Ct}}$ 代表被检样品PPAR $\gamma$ 、NF- $\kappa$ B mRNA的相对表达量.

1.2.3 Western blot法检测肝组织中PPAR $\gamma$ 、NF- $\kappa$ B的蛋白: 取肝组织100 mg, 按试剂盒操作提取组织总蛋白, BCA法测定蛋白浓度. 60  $\mu$ g蛋白/泳道混合等体积上样缓冲液处理, 蛋白变性, 恒流100 mA电泳, 恒压100 V转膜45 min, 封闭

2 h. 洗膜后加兔NF- $\kappa$ B抗体(1:1 000稀释)或鼠PPAR $\gamma$ 抗体(1:1 000稀释)4℃过夜; 对应兔或鼠二抗(1:5 000稀释), 37℃孵育, 曝光、显影、定影. 抗体去除液洗膜后加入抗 $\beta$ -actin抗体(1:10 000)步骤同上, 检测 $\beta$ -actin并以其表达水平作为内参照. 结果采用BIO-RAD凝胶成像系统照相, 扫描条带灰度值, 数据采用归一法处理后即代表蛋白表达含量.

**统计学处理** 所有数据均用SPSS11.5统计软件分析, 计量资料以mean $\pm$ SD表示, 多组间比较采用单因素方差分析(ANOVA), 方差具有齐性时用SNK及LSD检验. 方差不齐用Tamhane's T2检验进行各组间比较.  $P<0.05$ 为差异有统计学意义. PPAR $\gamma$ 、NF- $\kappa$ B的相关性分析采用Pearson相关分析,  $P<0.05$ 为差异有统计学意义.

## 2 结果

**2.1 一般情况** 正常对照组大鼠状态良好, 毛发光泽; 模型组随砷暴露时间延长大鼠毛发粗糙、精神萎靡, 动作迟钝, 易激惹, 进食、进水量明显减少.

### 2.2 肝组织病理检查结果

**2.2.1 HE染色光镜下观察:** 对照组大鼠小叶结构完整, 肝细胞索在中央静脉四周呈放射状排列, 肝细胞索间空隙为肝血窦, 胞质丰富, 无肝细胞变性、坏死及炎症细胞浸润(图1A), 模型组可见明显肝脏损伤, 大量坏死肝细胞及炎性细胞浸润, 纤维增生加重, 肝小叶结构破坏(图1B); 砷暴露1 mo自然恢复1 mo组较同月模型组比较可见轻度水样变、脂肪变性, 未见脂肪变性、及气球样变性, 汇管区及肝小叶内见少量炎细胞浸润, 肝细胞坏死少, 肝小叶结构尚完整(图1C, D); 砷暴露2 mo自然恢复1 mo组较同月模型组比较可见肝细胞水样变性, 汇管区及肝小叶内可见脂肪变性、及气球样变性程度减轻, 汇管区及肝小叶内可见炎细胞浸润, 肝细胞坏死减少, 肝小叶结构不完整(图1E, F). 砷暴露3、4 mo后自然恢复1 mo与同月模型组比较病理改变的变化不明显.

**2.2.2 Masson染色光镜下观察:** 对照组大鼠肝组织肝小叶结构完整, 未见有染成绿色的胶原纤维(图2A), 模型组可见明显的肝细胞坏死并被纤维增生修复, 增生的纤维形成细丝状或汇集成粗条索甚至片状, 包绕汇管区并向肝小叶间及叶内、肝小叶中心延伸(图2B). 砷暴露1 mo自然恢复1 mo组较同月模型组比较汇管区、小叶中

央静脉周围胶原纤维增生减少(图2C, D), 肝小叶结构完整. 砷暴露2 mo自然恢复1 mo组较同月模型组比较中央静脉及门静脉有少量纤维束放散延伸, 尚无间隔形成(图2E, F). 砷暴露3、4 mo后自然恢复1 mo与同月模型组比较病理改变的变化不明显.

**2.3 对照组和模型组、自然恢复组大鼠肝组织中PPAR $\gamma$ 、NF- $\kappa$ B的mRNA的表达情况** 各组肝组织中PPAR $\gamma$ 、NF- $\kappa$ B mRNA的荧光定量扩增曲线均呈现典型的S型(图3), 溶解曲线分析可见单峰值, 排除了非特异性扩增(图4). 模型组大鼠肝组织中PPAR $\gamma$ 的mRNA的含量表达均低于对照组, 与同月对照组相比, 造模1、2、3、4 mo的PPAR $\gamma$ 的mRNA均有统计学意义( $P<0.05$ ). 造模1、2、3 mo后分别自然恢复1 mo大鼠肝组织中mRNA表达均高于同月模型组, 仅造模1 mo自然恢复1 mo组PPAR $\gamma$  mRNA升高有统计学意义( $P<0.05$ ); 模型组大鼠肝组织中NF- $\kappa$ B的mRNA的含量表达均高于对照组, 与同月对照组相比, 造模1、2、3、4 mo的NF- $\kappa$ B的mRNA均有统计学意义( $P<0.05$ ). 造模1、2、3 mo后分别自然恢复1 mo大鼠肝组织中mRNA表达均低于同月造模组, 仅造模1 mo自然恢复1 mo组NF- $\kappa$ B的mRNA降低有统计学意义( $P<0.05$ , 表1).

**2.4 对照组和模型组、自然恢复组大鼠肝组织中PPAR $\gamma$ 、NF- $\kappa$ B蛋白表达情况** 模型组大鼠肝组织中PPAR $\gamma$ 的蛋白含量表达均低于正常对照组, 与造模1 mo组比较, 造模3、4 mo的PPAR $\gamma$ 的蛋白均有统计学意义( $P<0.05$ ), 造模1、2、3 mo后分别自然恢复1 mo大鼠肝组织中蛋白含量均低于同月造模组, 但无统计学意义( $P>0.05$ ); 模型组大鼠肝组织中NF- $\kappa$ B的蛋白含量均高于正常对照组, 与造模1 mo组比较, 造模3、4 mo的NF- $\kappa$ B的mRNA均有统计学意义( $P<0.05$ ). 造模1、2、3 mo后分别自然恢复1 mo大鼠肝组织中mRNA表达均低于同月造模组, 但均无统计学意义( $P>0.05$ , 表2, 图5).

**2.5 PPAR $\gamma$ 和NF- $\kappa$ B mRNA及蛋白表达的相关性** 各组PPAR $\gamma$ 和NF- $\kappa$ B mRNA的表达呈负相关( $r = 0.847$ ,  $P<0.01$ ), PPAR $\gamma$ 和NF- $\kappa$ B蛋白表达呈负相关( $r = 0.529$ ,  $P<0.05$ ).

## 3 讨论

肝脏是毒物代谢的靶器官, 近年来动物实验和人群流行病学调查均表明砷进入机体后, 主要分布于肝脏<sup>[14,15]</sup>. 动物研究表明, 肝脏是砷的蓄积

### ■应用要点

本文拟在建立较稳定的砷致肝损伤、肝纤维化动物模型的基础上, 观察在砷暴露致肝纤维化模型中PPAR $\gamma$ 、NF- $\kappa$ B的mRNA和蛋白的表达差异, 并初步探讨两者表达水平的相关性, 结合肝组织病理学表现, 来探索砷导致小鼠肝纤维化形成的分子机制, 为砷中毒致肝纤维化的防治提供理论依据.



### 同行评价

本文科学性较好, 对于了解砷暴露致毒损伤机制有一定参考价值.

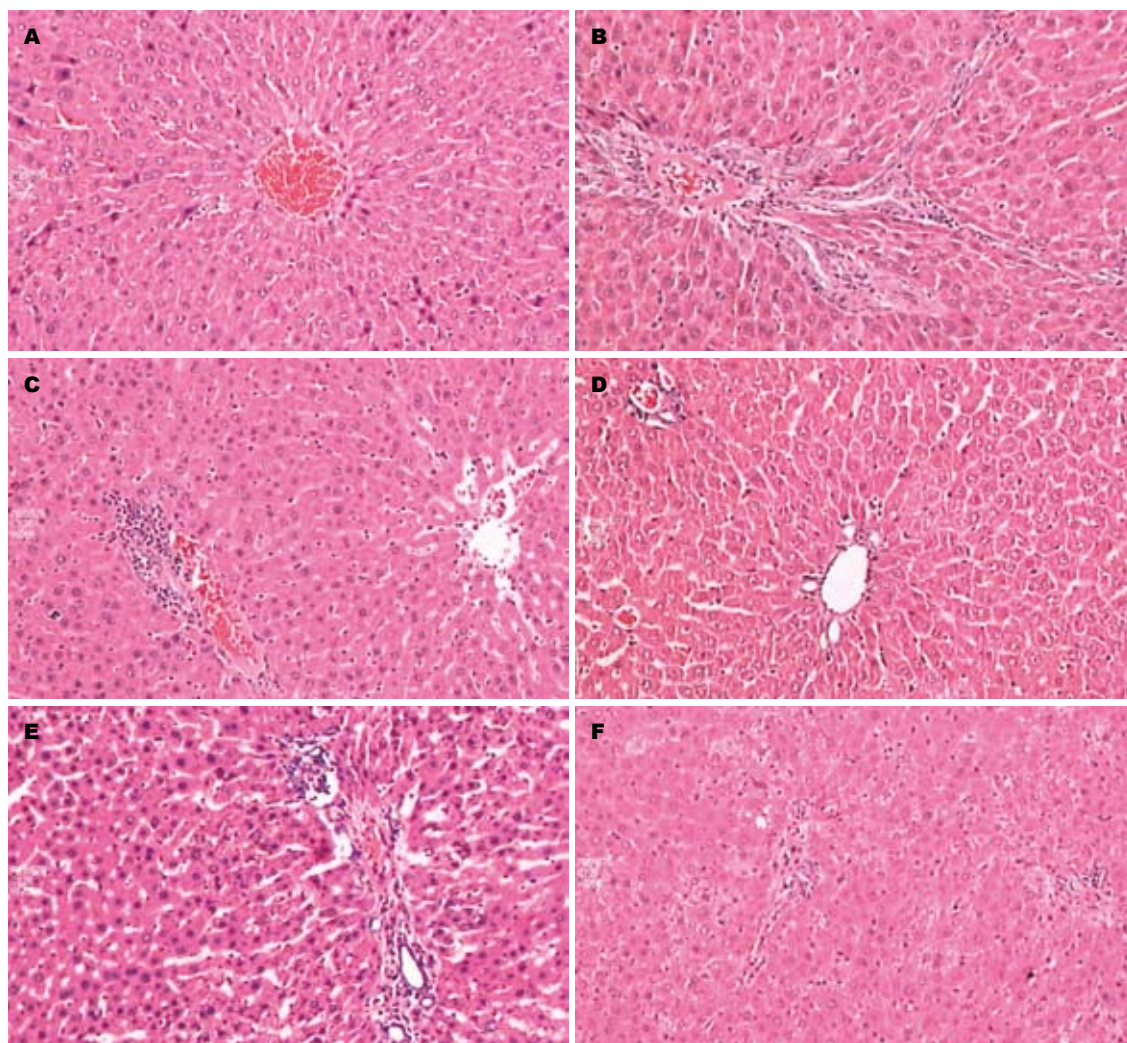


图 1 HE示大鼠肝细胞( $\times 400$ ). A: 对照4 mo组; B: 造模4 mo组; C: 造模1 mo组; D: 砷暴露1 mo+自然恢复1 mo组; E: 造模2 mo组; F: 砷暴露2 mo+自然恢复1 mo组.

器官, 慢性砷暴露大鼠肝组织的砷含量及砷致肝脏损伤程度与砷浓度、及暴露时间呈正相关, 且高浓度砷组肝组织显微镜下观察显示有肝细胞变性、炎症及点状坏死, 呈量效关系<sup>[13,16,17]</sup>. 实验结果表明, 随砷暴露时间的延长, 大鼠肝脏肝组织炎症细胞浸润和肝细胞变性、坏死逐渐加重, 并伴有纤维组织增生进行性增多, 形成纤维间隔, 最终破坏肝小叶结构. 越早脱离砷暴露环境, 肝脏损伤甚至肝纤维化越容易修复和逆转, 而在砷暴露后期, 肝脏严重受损、肝纤维化组织大量增生, 脱离砷环境后自然恢复的意义不大, 这与以往研究结果一致<sup>[13,18]</sup>. 这一结论说明砷可引起明显肝组织损伤、肝纤维化, 且随者砷暴露时间的延长, 其纤维化趋势越明显, 对砷中毒的防治重点应在于砷污染的控制以及尽早脱离砷环境.

肝纤维化是继发于肝脏炎症或损伤后组织修复的代偿反应, 现代细胞和分子生物学研究

表 1 实时荧光定量检测各组大鼠肝组织中PPAR $\gamma$ 、NF- $\kappa$ B mRNA含量的表达 (mean  $\pm$  SD)

分组	PPAR $\gamma$	NF- $\kappa$ B
对照组	218.40 $\pm$ 47.85	30.84 $\pm$ 15.24
模型组		
1 mo	174.99 $\pm$ 41.48 <sup>a</sup>	65.58 $\pm$ 13.17 <sup>a</sup>
2 mo	114.55 $\pm$ 21.30 <sup>a</sup>	90.23 $\pm$ 15.68 <sup>a</sup>
3 mo	64.67 $\pm$ 9.83 <sup>a</sup>	117.95 $\pm$ 18.19 <sup>a</sup>
4 mo	19.20 $\pm$ 16.10 <sup>a</sup>	172.86 $\pm$ 32.92 <sup>a</sup>
恢复组		
1 mo	215.97 $\pm$ 45.96 <sup>c</sup>	40.45 $\pm$ 19.56 <sup>c</sup>
2 mo	139.06 $\pm$ 21.46	77.25 $\pm$ 14.05
3 mo	105.44 $\pm$ 35.81	96.85 $\pm$ 16.97

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 对照组; <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs 模型组.

表明, 器官纤维化形成的分子病理学基础就是细胞-细胞因子-基质间的相互作用, 其特征为成纤维细胞的增殖活化及细胞外基质(extracel-



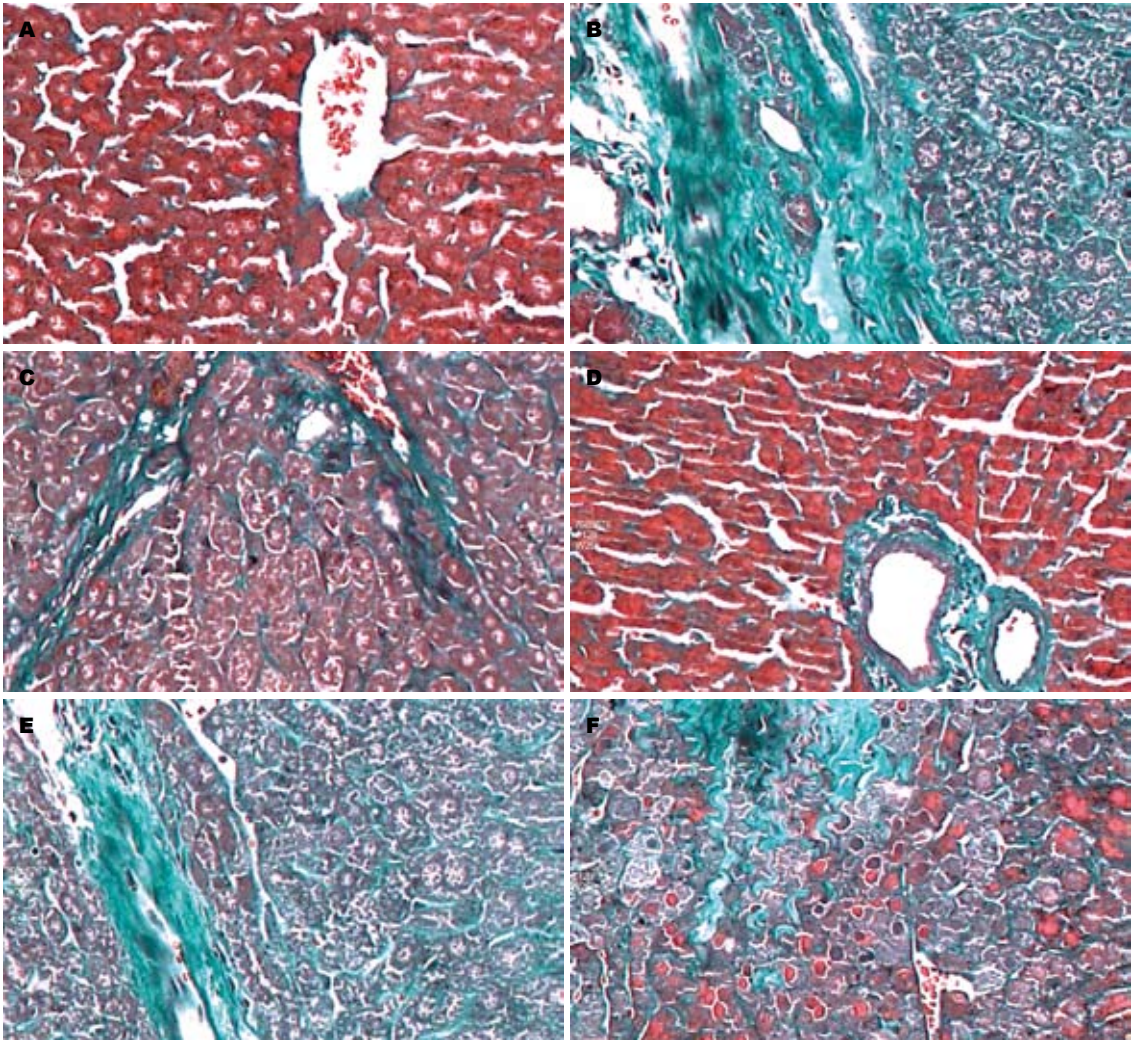


图 2 Masson示大鼠肝细胞( $\times 400$ ). A: 对照4 mo组; B: 造模4 mo组; C: 造模1 mo组; D: 砷暴露1 mo+自然恢复1 mo组; E: 造模2 mo组; F: 砷暴露2 mo+自然恢复1 mo组.

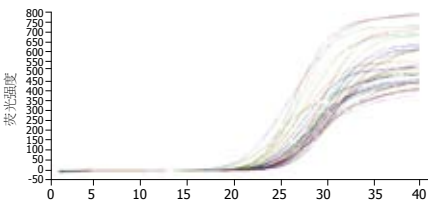


图 3 部分标本PPAR $\gamma$ 、NF- $\kappa$ B的mRNA荧光定量扩增曲线.

lular matrix, ECM)的合成与降解的失衡, 导致胶原的异常沉积过度, 形成纤维间隔, 肝脏原有结构被破坏, 形成纤维化<sup>[19,20]</sup>. 肝纤维化成因尚未完全清楚, 典型的发病机制认为, 多因素造成的肝损伤启动了肝纤维化, 包括肝细胞坏死、凋亡、炎细胞浸润和ECM改变<sup>[21]</sup>. 在肝纤维化中起决定性作用的是肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSCs), 他不仅是炎症靶细胞, 也是肝脏炎症反应中的重要效应细胞, 他的激活是整个肝纤维化发生的开端. 各种损肝因子引起肝细胞

表 2 Western blot检测各组肝组织中PPAR $\gamma$ 、NF- $\kappa$ B含量 (mean $\pm$ SD)		
分组	PPAR $\gamma$	NF- $\kappa$ B
模型组		
1 mo	0.85 $\pm$ 0.08	1.60 $\pm$ 0.57
2 mo	0.82 $\pm$ 0.10	2.63 $\pm$ 0.10
3 mo	0.63 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	3.25 $\pm$ 0.89 <sup>a</sup>
4 mo	0.55 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>	4.27 $\pm$ 1.26 <sup>a</sup>
恢复组		
1 mo	1.15 $\pm$ 0.09	1.61 $\pm$ 0.41
2 mo	0.72 $\pm$ 0.24	2.97 $\pm$ 0.51
3 mo	0.46 $\pm$ 0.09	3.41 $\pm$ 0.98

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 模型组.

损伤、坏死、凋亡及肝组织炎症反应, 激活库普弗细胞分泌多种细胞因子, 随同肝细胞、血小板和窦内皮细胞等分泌的细胞因子、脂质过氧化产物等化学递质共同作用于HSCs, 激活

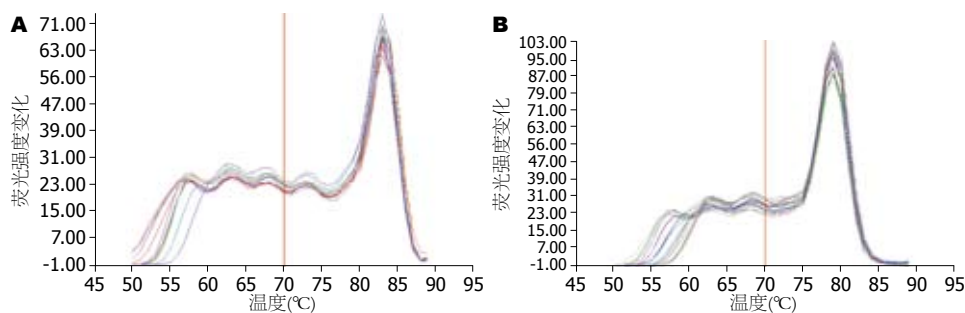


图 4 部分标本PPAR $\gamma$ 、NF- $\kappa$ B的mRNA熔解度曲线。A: PPAR $\gamma$ ; B: NF- $\kappa$ B。

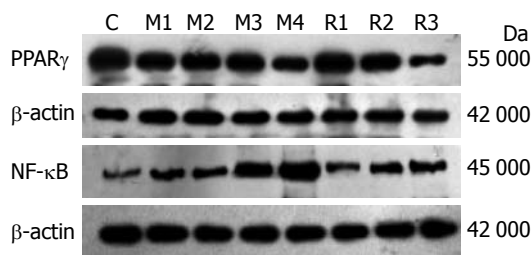


图 5 不同组大鼠肝组织中PPAR $\gamma$ 、NF- $\kappa$ B蛋白表达。C: 对照组; M1: 砷暴露1 mo组; M2: 砷暴露2 mo组; M3: 砷暴露3 mo组; M4: 砷暴露4 mo组; R1: 砷暴露1 mo+自然恢复1 mo组; R2: 砷暴露2 mo+自然恢复1 mo组; R3: 砷暴露3 mo+自然恢复1 mo组。

一系列细胞内信号传递结构和分子, 如促分裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)、Smad家族, 磷脂酰肌醇3-激酶(phosphatidylinositol3-kinase, PI3-K)等, 导致基因表达的变化, 最终合成分泌大量ECM, 形成纤维化<sup>[22,23]</sup>。

研究表明, 各种促炎因子可不同程度的诱导HSCs的活化, 释放足以造成肝脏损伤的肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor  $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、NF- $\kappa$ B等炎症介质, 进而促进炎症的发生<sup>[24]</sup>。NF- $\kappa$ B在激活的HSCs内表达增多, 可进一步激活其下游基因环氧化酶2(cyclooxygenase 2, COX-2)、细胞间黏附分子1(intercellular adhesion molecule 1, ICAM-1)、白介素-1(interleukin 1, IL-1)、IL-6、IL-8、内皮素-1(endothelin1, ET-1)等转录表达相应的产物, 触发或加剧肝脏炎症, 并通过自由基、TNF- $\alpha$ 、转化生长因子 $\beta$ (transforming growth factor, TGF- $\beta$ )、基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMP)等炎性介质进一步激活NF- $\kappa$ B, 维持HSCs活化, 从而放大炎症反应活性, 最终促成肝脏纤维化<sup>[25-27]</sup>。

过氧化物酶体增殖物激活受体( Peroxisome proliferator-activated receptors, PPARs)是配体活化的核转录因子, 属II型核受体超家族成员之一, 有PPAR $\alpha$ 、PPAR $\beta$ 、PPAR $\gamma$  3种亚型, 三者在组织中的分布和表达不尽相同, PPAR $\gamma$ 表达于脂肪细胞、核细胞和巨噬细胞、肺泡及气道

皮细胞和血管内皮细胞等。PPAR $\gamma$ 具有多种生物学效应, 在脂质代谢、抑制炎症反应、细胞分化、抑制细胞增殖和诱导细胞凋亡等方面发挥重要作用<sup>[6]</sup>。PPAR $\gamma$ 可从不同水平调控细胞内多条炎症信号转导途径, 对多种促炎介质基因转录的抑制使其抗炎特性的分子基础<sup>[28,29]</sup>。PPAR $\gamma$ 先和DNA结合伴侣维甲酸X受体(retinoid X receptor, RXR)结合形成二聚体, 同时募集转录共激活子PPARs结合蛋白, 在辅激活因子的协同作用下, 识别靶基因启动子区的过氧化物酶体增殖子反应元件(peroxisome proliferator-activated receptor response elements, PPARE), 调控基因的表达, 进而调节体内糖、脂肪代谢, 参与炎症反应<sup>[30]</sup>。PPAR $\gamma$ 还可通过抑制转录因子活性来发挥负向的间接转录调控, 包括NF- $\kappa$ B、激活子蛋白-1等<sup>[31]</sup>。因此, 活化后PPAR $\gamma$ 在抗纤维增生性疾病的有效作用成为新的研究热点。

NF- $\kappa$ B是一种能够与B细胞免疫球蛋白 $\kappa$ 轻链基因的增强子 $\kappa$ B序列特异结合的核蛋白因子, 与许多靶基因的转录启动有关, 在细胞和生物体生长、分泌、细胞系定向等过程中起非常重要的作用。通常情况下, NF- $\kappa$ B二聚体与其抑制蛋白I $\kappa$ B结合位于细胞质中, 处于静止状态。当有刺激信号时, 细胞内外多种刺激因素可通过一定的转导通路激活I $\kappa$ B激酶(IKK), 活化了的IKK能磷酸化I $\kappa$ B, 使NF- $\kappa$ B得以释放, 使其能从胞质转移到胞核, 与靶基因的 $\kappa$ B位点结合激活相关基因的转录<sup>[32,33]</sup>。

研究发现, PPAR $\gamma$ -NF- $\kappa$ B信号通路参与介导了调解炎症反应平衡过程<sup>[34]</sup>。PPAR $\gamma$ 对各种炎症因子的抑制作用主要是通过抑制NF- $\kappa$ B的活化来完成的。PPAR $\gamma$ 通过与其配体结合而成激活状态, 使NF- $\kappa$ B活性下降或抑制其活化, 从而减少细胞因子的基因表达, 最终缓解炎症反应<sup>[35]</sup>。PPAR $\gamma$ 抑制NF- $\kappa$ B炎症的途径, 其作用机制可能有: (1)PPAR $\gamma$ 可直接与NF- $\kappa$ B的亚基p65/p50结合, 发生蛋白质-蛋白质相互作用, 形成转录抑制



复合物,降低NF- $\kappa$ B与DNA的结合活性,进而抑制NF- $\kappa$ B的表达;(2)PPAR $\gamma$ 可作用于I $\kappa$ B $\alpha$ 的基因调控区,通过抑制I $\kappa$ B $\alpha$ 的表达来抑制NF- $\kappa$ B的激活;(3)PPAR $\gamma$ 还可以通过竞争结合协同活化因子CBP及p300,抑制NF- $\kappa$ B的转录,从而诱导巨噬(泡沫)细胞的凋亡<sup>[36]</sup>。

实验结果表明,PPAR $\gamma$  mRNA和蛋白水平在正常组织均表达较高,随砷暴露致肝损伤、肝纤维化时间越长,其表达水平越低,越早脱离砷暴露环境,肝损伤、肝纤维化自然恢复得越好,随着肝损伤的修复,PPAR $\gamma$  mRNA及蛋白的表达水平随之回升;NF- $\kappa$ B表达则刚好相反,正常组织中其mRNA和蛋白水平较低,随肝脏炎症程度的加重,其表达水平逐渐增高,而随着脱离砷暴露的自然恢复时间延长,其表达水平又逐渐下降,提示PPAR $\gamma$ 、NF- $\kappa$ B均参与了砷暴露致肝损伤、肝纤维化发生发展过程。与此同时,PPAR $\gamma$ 和NF- $\kappa$ B mRNA和蛋白的表达之间有一定相关性,均呈负相关,提示二者之间存在一反馈抑制通路,并且这一通路与砷中毒致肝纤维化密切相关,与以往研究结果一致<sup>[37]</sup>。而上调PPAR $\gamma$ 表达是否对砷暴露肝损伤、肝纤维化具有拮抗作用,还有待进一步研究探讨。

#### 4 参考文献

- Santra A, Maiti A, Das S, Lahiri S, Charkaborty SK, Mazumder DN. Hepatic damage caused by chronic arsenic toxicity in experimental animals. *J Toxicol Clin Toxicol* 2000; 38: 395-405
- Liu J, Liu Y, Goyer RA, Achanzar W, Waalkes MP. Metallothionein-I/II null mice are more sensitive than wild-type mice to the hepatotoxic and nephrotoxic effects of chronic oral or injected inorganic arsenicals. *Toxicol Sci* 2000; 55: 460-467
- Waalkes MP, Keefer LK, Diwan BA. Induction of proliferative lesions of the uterus, testes, and liver in swiss mice given repeated injections of sodium arsenate: possible estrogenic mode of action. *Toxicol Appl Pharmacol* 2000; 166: 24-35
- Brown KG, Ross GL. Arsenic, drinking water, and health: a position paper of the American Council on Science and Health. *Regul Toxicol Pharmacol* 2002; 36: 162-174
- 程明亮, 杨长青. 肝纤维化的基础研究与临床. 第2版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 1-2
- Zingarelli B, Cook JA. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a new therapeutic target in sepsis and inflammation. *Shock* 2005; 23: 393-399
- Moraes LA, Piqueras L, Bishop-Bailey D. Peroxisome proliferator-activated receptors and inflammation. *Pharmacol Ther* 2006; 110: 371-385
- Atreya I, Atreya R, Neurath MF. NF-kappaB in inflammatory bowel disease. *J Intern Med* 2008; 263: 591-596
- Kaplan J, Cook JA, O'Connor M, Zingarelli B. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is required for the inhibitory effect of ciglitazone but not 15-deoxy-Delta 12,14-prostaglandin J2 on the NFkappaB pathway in human endothelial cells. *Shock* 2007; 28: 722-726
- Andresen L, Jørgensen VL, Perner A, Hansen A, Eugen-Olsen J, Rask-Madsen J. Activation of nuclear factor kappaB in colonic mucosa from patients with collagenous and ulcerative colitis. *Gut* 2005; 54: 503-509
- Kaltschmidt C, Kaltschmidt B, Neumann H, Wekerle H, Baeuerle PA. Constitutive NF-kappa B activity in neurons. *Mol Cell Biol* 1994; 14: 3981-3992
- Schreiber S, Nikolaus S, Hampe J. Activation of nuclear factor kappa B inflammatory bowel disease. *Gut* 1998; 42: 477-484
- 闫超, 吴君, 刘芙蓉, 张莉莎. 水砷暴露大鼠肝损伤和肝纤维化模型的建立. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 862-866
- Ng JC, Wang J, Shraim A. A global health problem caused by arsenic from natural sources. *Chemosphere* 2003; 52: 1353-1359
- 吴君. 砷对肝脏毒性的研究进展. *中国药物与临床* 2005; 5: 645-647
- Xie Y, Trouba KJ, Liu J, Waalkes MP, Germolec DR. Biokinetics and subchronic toxic effects of oral arsenite, arsenate, monomethylarsonic acid, and dimethylarsinic acid in v-Ha-ras transgenic (Tg.AC) mice. *Environ Health Perspect* 2004; 112: 1255-1263
- 杨瑞瑛, 王生玲, 张玲, 林勤, 张智勇, 马品江, 朱殿志, 王连方. 砷中毒大鼠肝脏亚细胞组分中砷的分布. *中国地方病学杂志* 2003; 22: 387-388
- 刘芙蓉, 吴君, 闫超, 张莉莎. 砷暴露与大鼠肝脏损伤及激活素A, 转化生长因子- $\beta$ 1的相关性. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 747-752
- Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 2005; 115: 209-218
- Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem* 2000; 275: 2247-2250
- Guo J, Friedman SL. Hepatic fibrogenesis. *Semin Liver Dis* 2007; 27: 413-426
- 黄光存, 张锦生. 肝星状细胞激活的细胞内信号转导. *世界华人消化杂志* 2001; 9: 1056-1060
- 姜慧卿, 张晓岚. 肝纤维化的发生机制. *世界华人消化杂志* 2000; 8: 687-689
- Li Z, Yang S, Lin H, Huang J, Watkins PA, Moser AB, Desimone C, Song XY, Diehl AM. Probiotics and antibodies to TNF inhibit inflammatory activity and improve nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2003; 37: 343-350
- Elsharkawy AM, Mann DA. Nuclear factor-kappaB and the hepatic inflammation-fibrosis-cancer axis. *Hepatology* 2007; 46: 590-597
- Son G, Iimuro Y, Seki E, Hirano T, Kaneda Y, Fujimoto J. Selective inactivation of NF-kappaB in the liver using NF-kappaB decoy suppresses CCl4-induced liver injury and fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; 293: G631-G639
- Blackwell TS, Christman JW. The role of nuclear factor-kappa B in cytokine gene regulation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997; 17: 3-9
- Blanquart C, Barbier O, Fruchart JC, Staels B, Glinneur C. Peroxisome proliferator-activated receptors: regulation of transcriptional activities and roles in inflammation. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2003; 85: 267-273
- 路一平, 邱健. 过氧化物酶体增殖物激活受体 $\gamma$ 与动脉粥样硬化. *医学研究生学报* 2006; 19: 565-568
- Kielian T, Drew PD. Effects of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists on central

- nervous system inflammation. *J Neurosci Res* 2003; 71: 315-325
- 31 王昱, 沅峰, 朱宇熹, 卢仲毅. PPAR $\gamma$ 与肺纤维化. 重庆医学 2009; 38: 987-989
- 32 Sen R, Baltimore D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* 1986. 46: 705-716. *J Immunol* 2006; 177: 7485-7496
- 33 Chong LW, Hsu YC, Chiu YT, Yang KC, Huang YT. Anti-fibrotic effects of thalidomide on hepatic stellate cells and dimethylnitrosamine-intoxicated rats. *J Biomed Sci* 2006; 13: 403-418
- 34 Shimada T, Kojima K, Yoshiura K, Hiraishi H, Terano A. Characteristics of the peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ) ligand induced apoptosis in colon cancer cells. *Gut* 2002; 50: 658-664
- 35 Bassaganya-Riera J, Reynolds K, Martino-Catt S, Cui Y, Hennighausen L, Gonzalez F, Rohrer J, Benninghoff AU, Hontecillas R. Activation of PPAR gamma and delta by conjugated linoleic acid mediates protection from experimental inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2004; 127: 777-791
- 36 Straus DS, Pascual G, Li M, Welch JS, Ricote M, Hsiang CH, Sengchanthalangsy LL, Ghosh G, Glass CK. 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 inhibits multiple steps in the NF-kappa B signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 4844-4849
- 37 苗新普, 欧阳钦, 韦红. COX-2、PPAR $\gamma$ 和NF- $\kappa$ B p65在溃疡性结肠炎组织中的表达及意义. 世界华人消化杂志 2010; 18: 2660-2665

编辑 李薇 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

## • 消息 •

### 《世界华人消化杂志》性质、刊登内容及目标

**本刊讯** 《世界华人消化杂志》[国际标准刊号ISSN 1009-3079 (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、中医中药学、肿瘤学、中西医结合学、影像学、内镜学、介入治疗学、病理学、基础研究等医生和研究人员提供转换平台, 更新知识, 为患者康复服务。

# APC/ $\beta$ -catenin/TCF通路在奥曲肽调控结肠癌SW480中的分子机制

王松, 包铮, 龙建武, 肖忠盛, 李峰, 梁庆模

王松, 包铮, 龙建武, 李峰, 梁庆模, 南华大学附属南华医院  
肿瘤外科 湖南省衡阳市 421002

肖忠盛, 南华大学附属第一医院普通外科 湖南省衡阳市  
421001

王松, 硕士, 主要从事普外肿瘤防治临床与基础研究.

湖南省自然科学基金资助项目, No. 07JJ6158

湖南省教育厅基金资助项目, No. 07C631

作者贡献分布: 此课题由梁庆模与王松设计; 研究过程由王松、  
包铮、龙建武及肖忠盛完成; 数据分析由王松与李峰完成; 论文  
书写由王松与梁庆模完成.

通讯作者: 梁庆模, 教授, 主任医师, 421002, 湖南省衡阳市珠晖  
区东风南路336号, 南华大学附属南华医院肿瘤外科.

hylqm@vip.sina.com

电话: 0734-8193128

收稿日期: 2010-09-14 修回日期: 2010-10-22

接受日期: 2010-11-02 在线出版日期: 2010-12-28

## Involvement of the APC/ $\beta$ -catenin/TCF signaling pathway in the regulatory effects of octreotide on SW480 colon cancer cells

Song Wang, Zheng Bao, Jian-Wu Long,  
Zhong-Sheng Xiao, Feng Li, Qing-Mo Liang

Song Wang, Zheng Bao, Jian-Wu Long, Feng Li, Qing-Mo Liang, Department of Surgical Oncology, the Affiliated Nanhua Hospital of South China University, Hengyang 421002, Hunan Province, China

Zhong-Sheng Xiao, Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of South China University, Hengyang 421001, Hunan Province, China

Supported by: the Natural Science Foundation of Hunan Province, No. 07JJ6158; and the Foundation of Hunan Provincial Education Department, No. 07C631

Correspondence to: Professor Qing-Mo Liang, Department of Surgical Oncology, the Affiliated Nanhua Hospital of South China University, 336 South Dongfeng Road, Zhuhui District, Hengyang 421002, Hunan Province, China. hylqm@vip.sina.com

Received: 2010-09-14 Revised: 2010-10-22

Accepted: 2010-11-02 Published online: 2010-12-28

## Abstract

**AIM:** To investigate whether the APC/ $\beta$ -catenin/TCF signaling pathway is involved in the regulatory effects of octreotide (OCT) on SW480 colon cancer cells.

**METHODS:** (1) mRNA testing: SW480 cells were cultured *in vitro* and divided into control group

and OCT group (treated with  $10^{-10}$  mol/L OCT). Total RNA was prepared from the two groups of cells and used to detect the mRNA expression of APC2, AXIN, CK1 $\alpha$ , cyclin D1 and FZD7 by RT-PCR. (2) Protein testing: SW480 cells were cultured *in vitro* and divided into control group and OCT group (treated with /L OCT at a concentration of  $10^{-14}$ ,  $10^{-12}$  or  $10^{-10}$  mol/L). Total protein was prepared from the two groups of cells and used to detect the protein expression of APC2, CK1 $\alpha$  and CyclinD1 by Western blot.

**RESULTS:** (1) mRNA testing: Treatment with OCT increased the mRNA levels of APC2 and CK1 $\alpha$  (both  $P < 0.05$ ), decreased that of cyclin D1 ( $P < 0.05$ ), but had no significant impact on those of FZD7 and axin (both  $P > 0.05$ ) in SW480 cells; (2) Protein testing: Treatment with different concentrations of OCT increased the protein levels of APC2 and CK1 $\alpha$  and decreased that of cyclin D1 in SW480 cells in a dose-dependent manner (all  $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** OCT can negatively regulate APC/ $\beta$ -catenin/TCF signaling by up-regulating APC2 and CK1 $\alpha$  expression and down-regulating cyclin D1 expression.

**Key Words:** Octreotide; SW480 cells; APC/ $\beta$ -catenin/TCF signaling pathway; APC2; CK1 $\alpha$ ; CyclinD1

Wang S, Bao Z, Long JW, Xiao ZS, Li F, Liang QM. Involvement of the APC/ $\beta$ -catenin/TCF signaling pathway in the regulatory effects of octreotide on SW480 colon cancer cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(36): 3857-3862

## 摘要

**目的:** 研究奥曲肽(Octreotide, OCT)对结肠癌SW480细胞中APC/ $\beta$ -catenin/TCF通路各热点分子在mRNA水平和蛋白水平表达量的影响, 初步探讨OCT调控SW480细胞APC/ $\beta$ -catenin/TCF通路的分子靶点.

**方法:** (1)mRNA检测: 体外培养人结肠癌SW480细胞, 分为对照组和OCT组( $10^{-10}$  mol/L), 分别提取两组细胞的总RNA, 以RT-PCR法检

## ■背景资料

APC/ $\beta$ -catenin/TCF通路异常是结肠癌发生的重要早期事件, 以其关键成分为靶标的药物将成为防治结肠癌的重要手段. 目前已有NASID、选择性COX-2抑制剂通过抑制该通路治疗结肠癌的临床干预试验, 但缺少奥曲肽抑制APC/ $\beta$ -catenin/TCF通路治疗结肠癌的相关研究.

## ■同行评议者

李永翔, 主任医师, 安徽医科大学第一附属医院普外科



## ■相关报道

本课题组的前期工作提示奥曲肽可以通过调控APC/ $\beta$ -catenin/TCF通路中30个基因抑制结肠癌SW480细胞增殖,其中APC2、CK1 $\alpha$ 和AXIN显著上调,而Cyclin D1、FZD7显著下调。

测APC2、AXIN、CK1 $\alpha$ 、Cyclin D1、FZD7的mRNA,筛选出两组细胞5个基因mRNA的表达差异;(2)蛋白检测:体外培养人结肠癌SW480细胞,分为对照组和OCT 1、2、3组( $10^{-14}$ 、 $10^{-12}$ 、 $10^{-10}$  mol/L),分别提取4组细胞的总蛋白,以Western blot法检测APC2、CK1 $\alpha$ 、Cyclin D1的蛋白质,鉴定4组细胞中3个基因在蛋白水平的表达差异。

**结果:** (1)mRNA检测: OCT组( $10^{-10}$  mol/L)中APC2、CK1 $\alpha$ 的mRNA表达上调(均 $P < 0.05$ ), Cyclin D1的mRNA表达下调( $P < 0.05$ ), AXIN和FZD7的mRNA改变无统计学意义( $P > 0.05$ ); (2)蛋白检测: OCT 1、2、3组中APC2、CK1 $\alpha$ 蛋白表达上调( $P < 0.05$ ), Cyclin D1蛋白表达下调( $P < 0.05$ ), 且呈浓度依赖性。

**结论:** OCT通过强化APC2、CK1 $\alpha$ “负反馈”调节作用,下调靶基因Cyclin D1,负性调控结肠癌SW480中APC/ $\beta$ -catenin/TCF通路。

**关键词:** 奥曲肽; SW480细胞; APC/ $\beta$ -catenin/TCF信号通路; APC2; CK1 $\alpha$ ; Cyclin D1

王松, 包铮, 龙建武, 肖忠盛, 李峰, 梁庆模. APC/ $\beta$ -catenin/TCF通路在奥曲肽调控结肠癌SW480中的分子机制. 世界华人消化杂志 2010; 18(36): 3857-3862

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/3857.asp>

## 0 引言

结肠癌的发病率为恶性肿瘤的第4位,而且近年来有逐渐增加的趋势.结肠癌发生、发展机制较为复杂,目前的分子模型提示其多阶段的发展过程中,涉及到许多癌基因、抑癌基因和信号通路的改变.其中约80%-90%的结肠癌中存在APC突变,而非APC突变结肠癌中50%为 $\beta$ -catenin突变,两者均为APC/ $\beta$ -catenin/TCF通路关键分子,因此APC/ $\beta$ -catenin/TCF通路是控制结肠癌发生、发展的主要通路,亦是结肠癌治疗的主要靶点之一.近年来,大量的研究发现奥曲肽对多种实体肿瘤的生长具有良好的抑制作用,而其不良反应小,患者耐受性好,具有广阔的应用前景.我们的前期工作也已证实奥曲肽可抑制结肠癌SW480增殖,下调 $\beta$ -catenin蛋白<sup>[1]</sup>,并通过基因芯片初步了解到奥曲肽使结肠癌SW480细胞APC/ $\beta$ -catenin/TCF通路30个基因发生差异性改变,其中13个基因显著上调,主要涉及APC2、AXIN家族、CK1家族,17个基因显著下调<sup>[2]</sup>,但是奥曲肽调控APC/ $\beta$ -catenin/TCF通路的机制尚未阐明.因此本文参考基因芯片结果对

热点基因进行研究,以期证实奥曲肽调控结肠癌SW480中APC/ $\beta$ -catenin/TCF通路的分子机制,为奥曲肽治疗结肠癌提供理论基础。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 人结肠腺癌细胞株SW480,系人结肠低分化黏液腺癌,购于中南大学湘雅医学院.醋酸奥曲肽注射液(批号: S0065,北京诺华制药有限公司); RPMI 1640培养基(美国Gibco公司); 新生牛血清(杭州四季青公司); 胰蛋白酶(美国Amresco公司); DAB显色试剂为福州迈新公司; RT-PCR试剂盒、溴化乙锭(EB)、Taq酶等(美国Promega公司); 1, 4二硫苏糖醇、逆转录试剂盒(美国Amersham Biosciences公司); Tripure RNA提取试剂盒、甲叉丙烯酰胺(美国Roche公司); APC2、AXIN、CK1 $\alpha$ 、FZD7和Cyclin D1引物由上海生工生物技术公司合成. CK1 $\alpha$ (F158)兔抗人多克隆抗体、APC2(N32)兔抗人多克隆抗体和Cyclin D1(L283)兔抗人多克隆抗体(美国Abzoom公司);  $\beta$ -actin单克隆抗体、辣根酶标记羊抗兔IgG、辣根酶标记羊抗兔IgG(北京中杉金桥公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养:** SW480细胞培养于含10%小牛血清,  $1 \times 10^5$  U/L青霉素及 $1 \times 10^5$  U/L链霉素RPMI 1640完全培养基中,在37℃, 50 mL/L CO<sub>2</sub>及饱和湿度条件下培养,细胞呈单层生长,铺满培养瓶约2-3 d传代1次.取对数生长期细胞用于实验。

**1.2.2 RT-PCR法检测基因mRNA表达:** 依照前期实验结果<sup>[1,2]</sup>,取奥曲肽抑制SW480最佳抑制浓度为实验组,即OCT组( $10^{-10}$  mol/L); 对照组为SW480加入培养基、生理盐水.以上均培养24 h.分别提取2组细胞的总RNA,逆转录合成cDNA,PCR扩增APC2、CSNK1A1L、Cyclin D1、AXIN、FZD7(表1),RT-PCR产物鉴定及半定量分析,最后凝胶图像分析APC2、CSNK1A1L、Cyclin D1、AXIN、FZD7表达强度。

**1.2.3 Western blot法检测基因蛋白表达:** 取奥曲肽1、2、3组( $10^{-14}$ 、 $10^{-12}$ 、 $10^{-10}$  mol/L)为实验组; 对照组为SW480加入培养基、生理盐水.以上均培养24 h.分别提取4组细胞的总蛋白,制备SDS-PAGE凝胶,将蛋白质样品上样至SDS-PAGE凝胶加样孔内,每条泳道上样40  $\mu$ g进行SDS-PAGE凝胶电泳,转移至PVDF膜上,5%脱脂奶粉封闭室温下2 h.4℃孵育一抗(1:200

表 1 5个热点基因及 $\beta$ -actin内参引物序列

热点基因	序列(5'-3')	扩增片段长度(bp)
APC2	A: GGA TGG AGA AGG CGA AAG TGA G S: TTG CCA AAG GGT AGG GAA ATG	352
AXIN1	A: CAG TCA AAC TCG TCG CTC AC S: CTC CCA CCT CTT CAT CCA A	444
Cyclin D1	A: CCT CCC ACG AAA CGC TAC T S: CGA TGC CAA CCT CCT CAA	404
CK1 $\alpha$	A: TCC TCC ACT ACC TCC ACC S: AGG CTA CAC CTT TGA CTA TGC	255
FZD7	A: CCT TTA GCG AAG TCA GAA CCT S: GCC AAG GAG ACG TGG AGT A	363
$\beta$ -actin	A: GTGGG GCGCC CCAGG CACCA S: CTTCC TTAAT GTCAC GCACG ATTTC	505

## ■创新盘点

化合物拮抗结肠癌机制研究大多集中在APC/ $\beta$ -catenin/TCF通路的 $\beta$ -catenin分子上,而本课题以前期基因芯片热点基因的改变为研究对象,对APC/ $\beta$ -catenin/TCF通路多个分子进行联合研究,有利于充分阐明奥曲肽抑制结肠癌细胞增殖的关键机制。

$\beta$ -actin, 1 : 500 APC2, 1 : 500 CK1 $\alpha$ , 1 : 500 Cyclin D1)过夜, TBST洗膜后孵育二抗(1 : 4 000)孵育1 h, TBST再次洗膜, 发光剂显色, X片曝光、显影、定影、水洗, 进行图像分析。

**统计学处理** 各组实验数据均用mean $\pm$ SD表示, 采用SPSS13.0统计分析软件包处理。实验结果采用One-way ANOVA方式行方差分析, 两两比较采用Student's *t*检验, 进行统计学分析,  $P < 0.05$ 认为差别有显著性意义。实验重复3遍以上。

## 2 结果

**2.1 RT-PCR检测奥曲肽对结肠癌SW480细胞APC2、CK1 $\alpha$ 、Cyclin D1、AXIN和FZD7 mRNA表达的影响** 经电泳后RNA中28S、18S和5S 3条带清晰可见(图1), 说明细胞总RNA提取的质量可靠, 可以用于RT-PCR实验。RT-PCR法检测奥曲肽组( $10^{-10}$  mol/L)和对照组细胞中APC2、CK1 $\alpha$ 、Cyclin D1、AXIN和FZD7各mRNA的表达(图2)。结果显示: 与对照组相比较, OCT组中SW480细胞APC2、CK1 $\alpha$  mRNA表达增加, 且Cyclin D1 mRNA表达减少( $P < 0.05$ , 图3); 但是AXIN和FZD7 mRNA改变无统计学意义( $P > 0.05$ )。

**2.2 Western blot检测奥曲肽对结肠癌SW480细胞APC2、CK1 $\alpha$ 、Cyclin D1蛋白表达的影响**

**2.2.1 奥曲肽对SW480细胞中APC2蛋白表达的影响:** 不同浓度OCT( $0$ 、 $10^{-14}$ 、 $10^{-12}$ 、 $10^{-10}$  mol/L)孵育SW480细胞24 h后, 提取总细胞蛋白, 用Western blot法检测各组细胞APC2蛋白(图4)。结果显示: 随着奥曲肽浓度的增大, 细胞中APC2蛋白逐渐增加, 呈剂量依赖性, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

**2.2.2 奥曲肽对SW480细胞中CK1 $\alpha$ 蛋白表达的影响:** 不同浓度奥曲肽( $0$ 、 $10^{-14}$ 、 $10^{-12}$ 、 $10^{-10}$

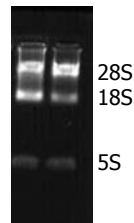


图 1 SW480细胞总RNA电泳检测结果。

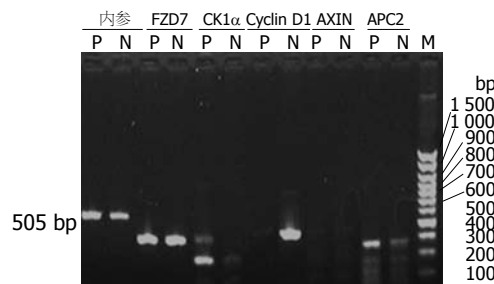


图 2 奥曲肽作用前后SW480细胞中各个基因mRNA的表达差异。P: 奥曲肽组; N: 对照组; M: DNA Marker。

mol/L组)孵育SW480细胞24 h后, 提取总细胞蛋白, 用Western blot法检测各组细胞CK1 $\alpha$ 蛋白(图5)。结果显示: 随着奥曲肽浓度的增大, 细胞中CK1 $\alpha$ 蛋白逐渐增加, 呈剂量依赖性, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

**2.2.3 奥曲肽对SW480细胞中Cyclin D1蛋白表达的影响:** 不同浓度奥曲肽( $0$ 、 $10^{-14}$ 、 $10^{-12}$ 、 $10^{-10}$  mol/L)孵育SW480细胞24 h后, 提取总细胞蛋白, 用Western blot法检测各组细胞Cyclin D1蛋白(图6)。结果显示: 随着奥曲肽浓度的增大, 细胞中Cyclin D1蛋白逐渐下降, 呈剂量依赖性, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

## 3 讨论

奥曲肽(SMS 201-995, Octreotide)是一种人工合

### ■应用要点

奥曲肽具有半衰期长、生物活性强、体内代谢稳定、受体选择性较强及分子小易吸收等优势,已广泛应用于消化系统疾病和多种内分泌肿瘤的临床治疗,对其抑制结肠癌细胞APC/ $\beta$ -catenin/TCF通路的机制研究,将为奥曲肽治疗结肠癌的策略提供理论依据。

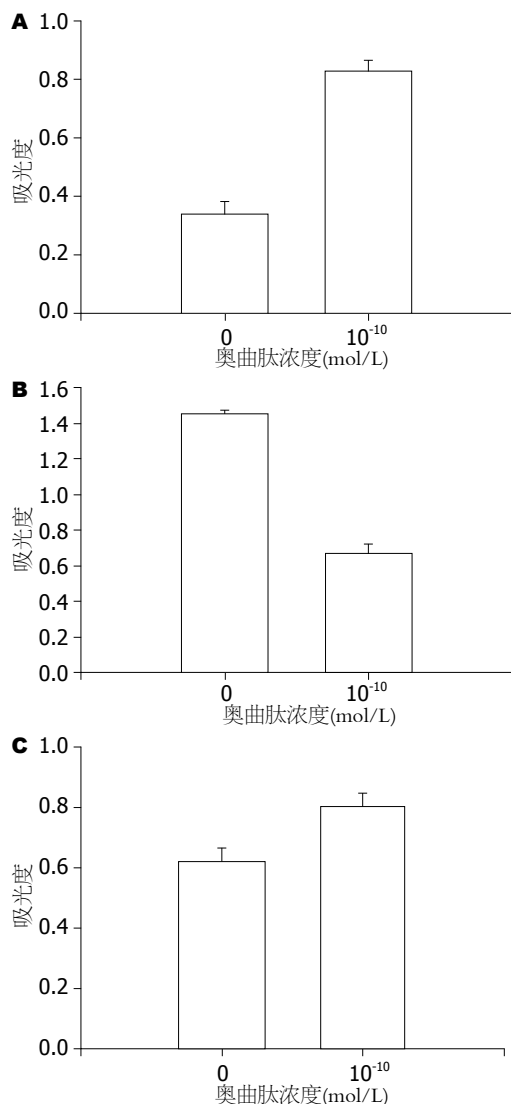


图3 奥曲肽作用后SW480细胞CK1 $\alpha$ 、Cyclin D1及APC2 mRNA的表达变化。A: CK1 $\alpha$  mRNA; B: Cyclin D1 mRNA; C: APC2 mRNA。

成的八肽生长抑素类似物,与天然生长抑素比较,其具有半衰期长(约90 min)、生物活性强、体内代谢稳定、受体选择性较强及分子小易吸收等特点,已广泛应用于消化系统疾病和多种内分泌肿瘤的临床治疗。近期基础研究显示奥曲肽能有效控制消化系肿瘤,如奥曲肽可以通过上调Fas/FasL表达而抑制肝癌细胞增殖<sup>[3]</sup>,通过上调Fas/FasL表达且下调突变型p53表达诱导SGC-7901胃癌细胞凋亡<sup>[4]</sup>。同时,我们的前期工作亦提示奥曲肽可以通过调控APC/ $\beta$ -catenin/TCF通路中30个基因抑制结肠癌SW480细胞增殖,其中APC2、CK1 $\alpha$ 和AXIN显著上调( $10^{-10}$  mol/L奥曲肽组/对照组>2倍),他们主要参与“ $\beta$ -Catenin破坏复合体”的形成;而Cyclin D1、FZD7显著下调( $10^{-10}$  mol/L奥曲肽组/对照

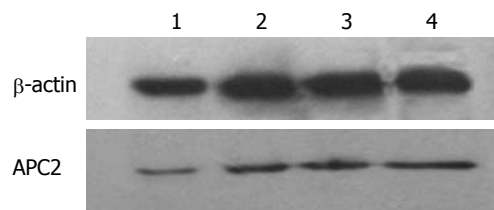


图4 不同浓度奥曲肽作用后SW480细胞中APC2蛋白的表达差异。1: 对照组; 2: 奥曲肽 $10^{-14}$  mol/L组; 3: 奥曲肽 $10^{-12}$  mol/L组; 4: 奥曲肽 $10^{-10}$  mol/L组。

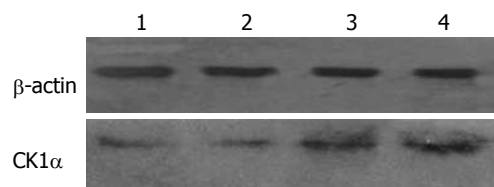


图5 不同浓度奥曲肽作用后SW480细胞中CK1 $\alpha$ 蛋白的表达差异。1: 对照组; 2: 奥曲肽 $10^{-14}$  mol/L组; 3: 奥曲肽 $10^{-12}$  mol/L组; 4: 奥曲肽 $10^{-10}$  mol/L组。

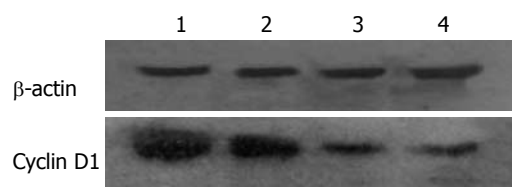


图6 不同浓度奥曲肽作用后SW480细胞中Cyclin D1蛋白的表达差异。1: 对照组; 2: 奥曲肽 $10^{-14}$  mol/L组; 3: 奥曲肽 $10^{-12}$  mol/L组; 4: 奥曲肽 $10^{-10}$  mol/L组。

组<0.5), 其中Cyclin D1为下游靶基因<sup>[2]</sup>。但是上述调控机制尚不清楚,为此本课题就基因芯片中的热点基因进行了研究。

APC/ $\beta$ -catenin/TCF通路在结肠癌中控制着细胞的命运,是结肠癌发生的重要早期事件,控制着结肠癌细胞的增殖、侵袭和转移,并起到癌细胞微环境调节器的作用<sup>[5]</sup>。该通路多个组成成员APC、 $\beta$ -catenin、c-Myc、Cyclin D1等的突变,在结肠癌的发生发展过程中起着决定性的作用<sup>[6]</sup>。

APC突变为80%-90%的结肠癌的主要诱癌因素(如本实验对象SW480)。APC突变聚集区(mutation cluster region, MCR)正好为 $\beta$ -catenin的结合区域,导致细胞质内 $\beta$ -catenin异常积聚, $\beta$ -catenin转导入细胞核内与TCF/LEF蛋白结合形成三聚体,竞争性抑制TCF/LEF与APC/ $\beta$ -catenin/TCF通路下游靶基因结合,开启靶基因的异常高表达而至癌。

APC2又称为APCL,为APC的同源物,位于染色体19p13.3,由2 303个氨基酸组成。APC2缺

失了保守的羧基端、缺乏3个15-aa重复基序、5个20-aa重复基序和两个SAMP重复基序,但是仍与APC有76%的同源性,基本保持了APC的主要功能: (1)Yang等<sup>[7]</sup>研究显示,磷酸化位点同时包括了Ser-45位点(CK1作用)和Ser-33/Ser-37/Thr-41位点(GSK3- $\beta$ 作用),而C-端截短APC蛋白并未影响GSK3- $\beta$ 和CK1对 $\beta$ -catenin的磷酸化功能;研究还显示, SAMP重复基序与磷酸化 $\beta$ -catenin的降解有关,与全长APC比较, APC2中的SAMP重复基序的减少使得 $\beta$ -catenin磷酸化降解下降, phosph- $\beta$ -catenin增加; (2)Fagman等<sup>[8]</sup>研究认为C-端截短APC蛋白除包含了未被截去NES1APC 63-83及NES2APC的外,其犹狒类结构区域可能还含有一个NLSX功能区,他独立于NLS1APC及NLS2APC以外; (3)Neufeld等<sup>[9]</sup>和Henderson等<sup>[10]</sup>亦认为APC2和APC一样,均具有细胞核穿梭功能,调控 $\beta$ -catenin由细胞核转移至细胞质内。以上研究表明APC2具有APC相似的功能,可抑制APC突变激活的异常APC/ $\beta$ -catenin/TCF通路。

本实验采用RT-PCR和Western blot均证实了奥曲肽可以上调APC2 mRNA和蛋白,并且呈浓度依赖性。奥曲肽通过上调SW480细胞中APC2,使得APC2与 $\beta$ -catenin、Axin等相结合,重装“破坏复合体”,有利于GSK-3 $\beta$ 、CK1 $\alpha$ 磷酸化 $\beta$ -catenin,促进 $\beta$ -catenin从细胞核内向细胞质、细胞膜转位。以上提示奥曲肽上调的APC2弥补了SW480细胞中突变APC的功能缺失,从而抑制异常激活的APC/ $\beta$ -catenin/TCF通路。

CK1也是APC/ $\beta$ -catenin/TCF通路的重要组成部分,他是一组广泛分布于各类真核生物的蛋白激酶超家族。该家族中包括了“负性调控子”CK1 $\alpha$ 以及“正性调控子”CK1 $\gamma$ 、CK1 $\epsilon$ 等。CK1 $\alpha$ 下降和CK1 $\gamma$ 、CK1 $\epsilon$ 上升,两种调控子的比例失调可抑制“破坏复合体”的形成,异常激活APC/ $\beta$ -catenin/TCF通路。

CK1 $\alpha$ 与 $\beta$ -catenin、APC、Axin、GSK-3 $\beta$ 共同形成破坏复合体,该复合体中的CK1 $\alpha$ 可使 $\beta$ -catenin的丝氨酸(Ser)45残基磷酸化,后者有助于GSK-3 $\beta$ 对 $\beta$ -catenin的Ser33/37、苏氨酸(Thr)41残基磷酸化,磷酸化后的 $\beta$ -catenin被泛素蛋白酶体泛素化和降解,从而下调异常的APC/ $\beta$ -catenin/TCF通路<sup>[11]</sup>。此外,有研究认为CK1 $\alpha$ 可以通过TCF家族之一NF-AT4蛋白,掩盖其NLS区域,减少其转移至细胞核内,减少基因的异常表达,从而下调异常的APC/ $\beta$ -catenin/TCF通路<sup>[12]</sup>。

CK1 $\gamma$ 、CK1 $\epsilon$ 作用正好相反。(1)数项研究表明CK1 $\epsilon$ 通过磷酸化散乱蛋白干扰GSK-3 $\beta$ 与AXIN结合,增强TCF3与 $\beta$ -catenin的亲合力,及减少异源三聚体参与了“破坏复合体”的形成,解离“破坏复合体”,从而上调APC/ $\beta$ -catenin/TCF通路<sup>[13-15]</sup>; (2) CK1 $\gamma$ 通过磷酸化促转录受体LRP5/6,使得AXIN结合不稳定,从而上调APC/ $\beta$ -catenin/TCF通路<sup>[16]</sup>; (3)CK1 $\gamma$ 、 $\epsilon$ 通过磷酸化E-cadherin,使E-cadherin丧失定位于细胞间稳定细胞黏附的作用,且磷酸化后的E-cadherin与 $\beta$ -catenin作用减弱,从而上调APC/ $\beta$ -catenin/TCF通路<sup>[17]</sup>。

我们的前期工作显示, CK1家族中CK1 $\alpha$ ( $10^{-10}$  mol/L奥曲肽组/对照组 = 6.41)的上调大于CK1 $\gamma$ ( $10^{-10}$  mol/L奥曲肽组/对照组 = 5)及CK1 $\epsilon$ ( $10^{-10}$  mol/L奥曲肽组/对照组 = 0)<sup>[2]</sup>。本实验RT-PCR和Western blot均证实,奥曲肽可以上调CK1 $\alpha$ 的mRNA和蛋白,呈浓度依赖性。以上均提示奥曲肽可以选择性增加此“负性调控子”CK1 $\alpha$ ,平衡两种调控子的比例,重装“破坏复合体”,促进 $\beta$ -catenin的磷酸化,从而抑制异常激活的APC/ $\beta$ -catenin/TCF通路。

Cyclin D1基因是一种细胞周期调控因子,在结肠癌组织中通常是过表达,而该基因直接发生突变的情况很少,但他可被异常的APC/ $\beta$ -catenin/TCF信号通路直接激活。我们的实验结果显示,奥曲肽不但可上调APC2、CK1 $\alpha$ 的mRNA和蛋白,还可以下调Cyclin D1的mRNA和蛋白,且呈浓度依赖性。

目前,研究显示多种化合物抗结肠癌的作用与APC/ $\beta$ -catenin/TCF通路有关,如非甾体类抗炎药物可促进 $\beta$ -catenin蛋白的降解和核转出,如阿司匹林<sup>[18]</sup>、舒林酸<sup>[19]</sup>;酪氨酸激酶抑制剂可调控 $\beta$ -catenin的酪氨酸残基磷酸化,促使 $\beta$ -catenin与E-cadherin结合增加,如格列卫<sup>[20]</sup>、绿茶酚<sup>[21]</sup>等;姜黄素<sup>[22]</sup>、槲皮素<sup>[23]</sup>等天然化合成成分可减少细胞核内的 $\beta$ -catenin和TCF-4蛋白及其相互结合等。

本研究认为奥曲肽调控结肠癌SW480中APC/ $\beta$ -catenin/TCF通路的分子机制为:奥曲肽通过上调APC2、CK1 $\alpha$ ,重装“破坏复合体”,利于 $\beta$ -catenin蛋白分解,减少 $\beta$ -catenin与TCF/LEF蛋白的结合,从而抑制下游靶基因Cyclin D1,强化“负反馈机制”,最终抑制APC/ $\beta$ -catenin/TCF通路。这可能是奥曲肽抑制结肠癌细胞增殖的关键机制,将为奥曲肽治疗结肠癌的策略提供理论依据。

#### 同行评价

本文可读性较好,具有一定的科学性和创新性。

## 4 参考文献

- 1 陈劲松, 梁庆模. 奥曲肽与氟尿嘧啶联合对人结肠癌细胞SW480增殖抑制作用的研究. *中国药房* 2008; 22: 1699
- 2 Chen JS, Liang QM, Li HS, Yang J, Wang S, Long JW. Octreotide inhibits growth of colonic cancer SW480 cells by modulating the Wnt/P-catenin pathway. *Pharmazie* 2009; 64: 126-131
- 3 Ma Q, Meng LQ, Liu JC, Hu JP, Ge J, Wan YL, Jiang S. [Octreotide induces apoptosis of human hepatoma cells by the mechanism of facilitating the Fas/FasL gene expression therein]. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2008; 88: 716-718
- 4 唐卓斌, 杜楠, 房殿春. 奥曲肽对SGC-7901胃癌细胞中Fas, FasL及P53表达的影响. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 694-698
- 5 Huang D, Du X. Crosstalk between tumor cells and microenvironment via Wnt pathway in colorectal cancer dissemination. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 1823-1827
- 6 Bodmer WF. Cancer genetics: colorectal cancer as a model. *J Hum Genet* 2006; 51: 391-396
- 7 Yang J, Zhang W, Evans PM, Chen X, He X, Liu C. Adenomatous polyposis coli (APC) differentially regulates beta-catenin phosphorylation and ubiquitination in colon cancer cells. *J Biol Chem* 2006; 281: 17751-17757
- 8 Fagman H, Larsson F, Arvidsson Y, Meuller J, Nordling M, Martinsson T, Helmbrecht K, Brabant G, Nilsson M. Nuclear accumulation of full-length and truncated adenomatous polyposis coli protein in tumor cells depends on proliferation. *Oncogene* 2003; 22: 6013-6022
- 9 Neufeld KL, Nix DA, Bogerd H, Kang Y, Beckerle MC, Cullen BR, White RL. Adenomatous polyposis coli protein contains two nuclear export signals and shuttles between the nucleus and cytoplasm. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 12085-12090
- 10 Henderson BR. Nuclear-cytoplasmic shuttling of APC regulates beta-catenin subcellular localization and turnover. *Nat Cell Biol* 2000; 2: 653-660
- 11 Liu C, Li Y, Semenov M, Han C, Baeg GH, Tan Y, Zhang Z, Lin X, He X. Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell* 2002; 108: 837-847
- 12 Zhu J, Shibasaki F, Price R, Guillemot JC, Yano T, Dötsch V, Wagner G, Ferrara P, McKeon F. Intramolecular masking of nuclear import signal on NF-AT4 by casein kinase I and MEKK1. *Cell* 1998; 93: 851-861
- 13 Hino S, Michiue T, Asashima M, Kikuchi A. Casein kinase I epsilon enhances the binding of Dvl-1 to Frat-1 and is essential for Wnt-3a-induced accumulation of beta-catenin. *J Biol Chem* 2003; 278: 14066-14073
- 14 Lee E, Salic A, Kirschner MW. Physiological regulation of [beta]-catenin stability by Tcf3 and CK1epsilon. *J Cell Biol* 2001; 154: 983-993
- 15 Gao ZH, Seeling JM, Hill V, Yochum A, Virshup DM. Casein kinase I phosphorylates and destabilizes the beta-catenin degradation complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 1182-1187
- 16 Davidson G, Wu W, Shen J, Bilic J, Fenger U, Stanek P, Glinka A, Niehrs C. Casein kinase 1 gamma couples Wnt receptor activation to cytoplasmic signal transduction. *Nature* 2005; 438: 867-872
- 17 Dupre-Crochet S, Figueroa A, Hogan C, Ferber EC, Bialucha CU, Adams J, Richardson EC, Fujita Y. Casein kinase 1 is a novel negative regulator of E-cadherin-based cell-cell contacts. *Mol Cell Biol* 2007; 27: 3804-3816
- 18 Dihlmann S, Klein S, Doeberitz Mv MK. Reduction of beta-catenin/T-cell transcription factor signaling by aspirin and indomethacin is caused by an increased stabilization of phosphorylated beta-catenin. *Mol Cancer Ther* 2003; 2: 509-516
- 19 Boon EM, Keller JJ, Wormhoudt TA, Giardiello FM, Offerhaus GJ, van der Neut R, Pals ST. Sulindac targets nuclear beta-catenin accumulation and Wnt signalling in adenomas of patients with familial adenomatous polyposis and in human colorectal cancer cell lines. *Br J Cancer* 2004; 90: 224-229
- 20 Zhou L, An N, Haydon RC, Zhou Q, Cheng H, Peng Y, Jiang W, Luu HH, Vanichakarn P, Szatkowski JP, Park JY, Breyer B, He TC. Tyrosine kinase inhibitor STI-571/Gleevec down-regulates the beta-catenin signaling activity. *Cancer Lett* 2003; 193: 161-170
- 21 Ju J, Hong J, Zhou JN, Pan Z, Bose M, Liao J, Yang GY, Liu YY, Hou Z, Lin Y, Ma J, Shih WJ, Carothers AM, Yang CS. Inhibition of intestinal tumorigenesis in Apcmin/+ mice by (-)-epigallocatechin-3-gallate, the major catechin in green tea. *Cancer Res* 2005; 65: 10623-10631
- 22 Park CH, Hahm ER, Park S, Kim HK, Yang CH. The inhibitory mechanism of curcumin and its derivative against beta-catenin/Tcf signaling. *FEBS Lett* 2005; 579: 2965-2971
- 23 Park CH, Chang JY, Hahm ER, Park S, Kim HK, Yang CH. Quercetin, a potent inhibitor against beta-catenin/Tcf signaling in SW480 colon cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 328: 227-234

编辑 曹丽鸥 电编 何基才



# 针刺对结肠吻合术后Cajal间质细胞修复与再生的影响

邓晶晶

邓晶晶, 广州市第八人民医院中西医结合科 广东省广州市 510060

邓晶晶, 医师, 主要从事针刺调整胃肠动力的研究.

通讯作者: 邓晶晶, 510060, 广东省广州市, 广州市第八人民医院中西医结合科. djistar33@hotmail.com

收稿日期: 2010-10-04 修回日期: 2010-11-28

接受日期: 2010-12-01 在线出版日期: 2010-12-28

## Acupuncture improves the repair and regeneration of interstitial cells of Cajal in rats after enteroenterostomy

Jing-Jing Deng

Jing-Jing Deng, Department of Integrated Chinese & Western Medicine, Guangzhou Eighth People's Hospital, Guangzhou 510060, Guangdong Province, China

Correspondence to: Jing-Jing Deng, Department of Integrated Chinese & Western Medicine, Guangzhou Eighth People's Hospital, Guangzhou 510060, Guangdong Province, China. djistar33@hotmail.com

Received: 2010-10-04 Revised: 2010-11-28

Accepted: 2010-12-01 Published online: 2010-12-28

### Abstract

**AIM:** To explore the mechanism by which acupuncture promotes intestinal motility.

**METHODS:** Thirty Sprague-Dawley rats were randomly divided into blank group, model group (receiving colocolic anastomosis) and acupuncture group. The acupuncture group underwent acupuncture at Zusanli, Sanyinjiao and Taichong daily for three continuous days. After acupuncture treatment, defecation was observed and intestinal propulsive rate was measured. Tissue samples of the colon which was 2 cm below the caecum were taken to observe the ultrastructure of interstitial cells of Cajal (ICC) and the Ache-ICC-SMC network.

**RESULTS:** In the acupuncture group, the time to first postoperative passage of feces was shortened and intestinal propulsive rate was improved compared with the model group [(2.00 ± 0.47) d vs (2.50 ± 0.53) d, (66.30 ± 4.21)% vs (46.33 ± 5.56)%], both  $P < 0.05$ . Compared with the blank group, the damage of ICC ultrastructure

in the model group was more significant while that in the acupuncture group was milder. In the model group, the ENS-ICC-SMC structure was disorganized, and the number of ICC and their fluorescence intensity were greatly decreased compared with the blank group [(18.67 ± 6.11) vs (32.33 ± 5.51), (35.00 ± 9.54) vs (58.67 ± 10.21), both  $P < 0.05$ ]. In contrast, in the acupuncture group, the damage of the network structure was milder, and the number of ICC and their fluorescence intensity were increased compared with the model group [(30.33 ± 3.21) vs (18.67 ± 6.11), (56.67 ± 9.45) vs (35.00 ± 9.54), both  $P < 0.05$ ]. Similar results were also obtained for the number of VACHT-positive nerve fibres [(18.67 ± 3.79) vs (20.67 ± 3.21), (20.33 ± 5.13) vs (34.67 ± 6.81), (23.00 ± 4.58) vs (18.67 ± 3.79), (36.00 ± 8.19) vs (20.33 ± 5.13), all  $P < 0.05$ ].

**CONCLUSION:** Acupuncture can improve intestinal motility in rats after abdominal operation perhaps by improving the repair and regeneration of ICC.

**Key Words:** Enteroenterostomy; Acupuncture; Interstitial cells of Cajal; Repair; Regeneration

Deng JJ. Acupuncture improves the repair and regeneration of interstitial cells of Cajal in rats after enteroenterostomy. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(36): 3863-3868

### 摘要

**目的:** 探讨针刺促进术后肠道动力恢复的机制.

**方法:** 30只SD大鼠随机分为空白组、模型组(行结肠吻合术)、针刺组. 针刺组予每日针刺双侧足三针(足三里、三阴交、太冲), 连续3 d. 观察大鼠排便情况, 测量小肠推进率, 观察结肠组织Cajal间质细胞(interstitial cells of Cajal, ICC)超微结构和胆碱能神经-ICC-平滑肌细胞网络结构.

**结果:** 针刺组术后首次排便时间较模型组提前, 小肠推进率提高(2.00 d ± 0.47 d vs 2.50 d ± 0.53 d, 66.30% ± 4.21% vs 46.33% ± 5.56%,  $P < 0.05$ ). 与空白组比较, 模型组ICC超微结

### 背景资料

ICC是胃肠慢波活动的起搏器和传导者, 其超微结构和功能的改变可能是众多胃肠动力障碍疾病的病理生理学基础. 研究表明, 肠道术后存在ICC数量减少, 结构萎缩和功能下降. 而针刺对结肠吻合术后ICC的修复与再生有何影响, 该影响是否与其调整肠道动力的作用相关, 尚未见报道.

### 同行评议者

张春虎, 副教授, 中南大学湘雅医院中西医结合研究所

## ■研究前沿

ICC是胃肠起搏机制和胃肠动力障碍性疾病研究的热点。近年生理学和形态学研究表明, ICC参与了一系列胃肠动力性疾病的发生, 但其数量、结构或功能的改变是原发还是继发, 与其他影响因素(如药物、针刺等)之间的关系如何等的详细机制仍需深入研究。

构损伤明显, 胆碱能神经-ICC-平滑肌细胞网络结构紊乱, ICC和小泡乙酰胆碱转移体(VAChT)阳性神经纤维数量明显减少( $18.67 \pm 6.11$  vs  $32.33 \pm 5.51$ ,  $18.67 \pm 3.79$  vs  $20.67 \pm 3.21$ ,  $P < 0.05$ ) 荧光强度减弱( $35.00 \pm 9.54$  vs  $58.67 \pm 10.21$ ,  $20.33 \pm 5.13$  vs  $34.67 \pm 6.81$ ,  $P < 0.05$ )。而针刺组ICC超微结构损伤较模型组轻, 网络样结构维持, ICC和VAChT阳性神经纤维的数量较模型组增多( $30.33 \pm 3.21$  vs  $18.67 \pm 6.11$ ,  $23.00 \pm 4.58$  vs  $18.67 \pm 3.79$ ,  $P < 0.05$ ), 荧光强度增强( $56.67 \pm 9.45$  vs  $35.00 \pm 9.54$ ,  $36.00 \pm 8.19$  vs  $20.33 \pm 5.13$ ,  $P < 0.05$ )。

**结论:** 针刺能促进结肠吻合术后肠动力的恢复, 这可能与具有修复ICC超微结构, 促进ICC细胞及其网络结构再生的功能有关。

**关键词:** 结肠吻合术; 针刺; Cajal间质细胞; 修复; 再生

邓晶晶. 针刺对结肠吻合术后Cajal间质细胞修复与再生的影响. 世界华人消化杂志 2010; 18(36): 3863-3868  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/3863.asp>

## 0 引言

术后肠麻痹是外科常见的并发症之一。相关研究表明<sup>[1]</sup>, 肠道术后, 胃肠起搏细胞Cajal间质细胞(interstitial cells of Cajal, ICC)数量明显减少, 结构萎缩, 信号转导功能下降。本研究在此基础上, 以结肠吻合术大鼠为对象, 探讨针刺对术后ICC结构和数量改变的影响, 分析此影响与针刺调整肠道动力的关系。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 小泡乙酰胆碱转移体(vesicular acetylcholine transporter, VAChT)兔抗人、大小鼠多克隆抗体(H-160, Santa Cruz, Biotech, USA, No. sc-15315), c-Kit羊抗人、大小鼠多克隆抗体(M-14, Santa Cruz, Biotech, USA, No. sc-1494), 四甲基异硫氰酸罗丹明(tetramethyl rhodamine isothiocyanate, TRITC)-牛抗兔IgG抗体(Santa Cruz, Biotech, USA, No. sc-2367), 异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)-驴抗羊IgG抗体(北京博奥森生物技术有限公司, No. bsF-0294D), 抗荧光衰减封片剂(北京普利莱基因技术有限公司, No. 01210); JEM-1200EX型透射电镜(日本JEOL公司), UCT型超薄切片机(德国LEICA公司), HM550型冷切片机(德国Microm公司), LSM 700激光扫描共聚焦显微镜(德国Zeiss

公司), 图像分析软件(Image pro plus), -80 °C冰箱(日本SANYO公司), 恒温箱(上海跃进医疗仪器厂), 光学显微镜(日本Olympus公司)。

## 1.2 方法

**1.2.1 分组及造模:** SPF级健康SD大鼠30只, 由广州中医药大学动物实验中心提供, 合格证号: 0055935, 雌雄各半, 体质量250-300 g。将大鼠分为雌雄两组, 每组内再以体质量作为分层因素进行区组随机化, 分为针刺组、模型组、空白组。结肠吻合模型的制备: 术前禁食禁饮12 h, 10%水合氯醛过滤器(孔径170 μm)过滤后行腹腔注射麻醉(剂量330 mg/kg)。大鼠仰卧位固定, 常规备皮、消毒、铺无菌巾, 下腹部正中切口, 长约2 cm, 开腹后寻找到大鼠盲肠下2 cm处结肠, 切断并原位单层缝合, 连续缝合腹膜及肌层, 间断缝合皮肤。手术当天禁食禁水, 术后第1、2天流质饮食, 第3天按16-20 g/(只·d)的1/3量供给标准鼠料。所有动物第4天处死检测指标。

**1.2.2 穴位定位与针刺方法:** 取双侧足三针(后三里、三阴交、太冲), 定位参考《实验针灸学》。针刺组动物术后清醒即予针刺, 用0.18 mm×10 mm的美容针直刺入穴位, 每5 min缓慢提插捻转2-3次, 针刺15 min/(次·d), 连续3 d。模型组、空白组每天同一时间放于固定器中15 min。

**1.2.3 排便观察:** 观察并记录大鼠术后首次排便时间。

**1.2.4 小肠推进率测量:** 予碳素墨水灌胃, 每只1 mL, 30 min后处死, 用米尺测量小肠全长(幽门至回盲部)以及标志物在小肠从幽门向前推进的距离(从幽门至炭末前沿的长度)。计算标志物推进的距离占小肠全长的百分比。

**1.2.5 电镜标本制作:** 迅速用冷刀片取出盲肠下2 cm处结肠组织, 切成0.2 cm×0.5 cm小块。用多聚甲醛和戊二醛配成的前固定液进行前固定, 漂洗, 锇酸行后固定, 漂洗, 乙醇和丙酮阶梯脱水, 环氧树脂渗透和包埋, 半薄切片, 2%甲苯胺蓝染色, 光镜定位, 修块, 超薄切片, 铀-铅双染色, 透射电镜观察及拍照。

**1.2.6 激光共聚焦显微镜检测:** 取盲肠下2 cm处结肠组织, Zamboni液中固定, 4 °C 6 h, 行冰冻切片, 将切好的冰冻组织切片(厚5 μm)放入冷丙酮固定, PBS冲洗; 用5% BSA(溶于含0.3% TritonX-100的PBST中)封闭1 h; 加入一抗(兔抗VAChT 1:100, 羊抗c-Kit 1:100), 37 °C孵育1.5 h, 4 °C过夜, PBS冲洗; 加入二抗(FITC-驴抗羊IgG 1:200, TRITC-牛抗兔IgG 1:200), 37 °C

表 1 小肠推进率 (mean  $\pm$  SD,  $n = 10$ )

分组	推进长度(cm)	小肠全长(cm)	推进率(%)
针刺组	79.38 $\pm$ 4.58 <sup>a</sup>	121.13 $\pm$ 5.73	66.30 $\pm$ 4.21 <sup>a</sup>
模型组	55.59 $\pm$ 6.22 <sup>b</sup>	119.12 $\pm$ 8.24	46.33 $\pm$ 5.56 <sup>b</sup>
空白组	95.12 $\pm$ 4.57	114.51 $\pm$ 6.35	83.75 $\pm$ 7.01

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 模型组; <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 空白组。

避光孵育1 h, PBS冲洗; 抗荧光衰减封片剂封片, 镜检观察. 以适于FITC(490 nm)和RBITC(550 nm)的激发波长观测标本, c-Kit阳性荧光为绿色, VAcHT阳性荧光为红色. 采用双通道同步扫描, 扫描分辨率1 024 dpi, 每一标本随机选取3个高倍视野, 用图像分析软件进行图像的三维重建和荧光值定量分析.

**统计学处理** 用SPSS16.0软件进行数据处理.

## 2 结果

**2.1 排便观察** 针刺组术后首次排便时间为2.00 d  $\pm$  0.47 d, 模型组为2.50 d  $\pm$  0.53 d, 采用秩和检验比较,  $P < 0.05$ . 可见针刺能缩短结肠吻合术后首次排便时间.

**2.2 小肠推进率** 模型组小肠推进率较空白组下降, 采用 $t$ 检验比较, 两者有显著性差异( $P < 0.05$ ). 针刺组与模型组比较有显著差异( $P < 0.05$ ), 而针刺组与空白组比较差异不显著( $P > 0.05$ , 表1), 表明针刺治疗能提高小肠推进率.

**2.3 电镜观察ICC及其网络的超微结构变化** 空白组ICC多为梭形或椭圆形, 核大, 不规则或椭圆, 可见核仁、核孔, 常染色质均匀分布于细胞核中央, 异染色质主要分散位于核的周边, 核膜完整; 核周胞质少, 胞质和突起内含丰富的线粒体、核糖体, 发达的内质网和高尔基体; 有较多成束的中间丝和微丝分布在核周和细胞突起, 未见粗肌丝; 胞内可见电致密胞质; 有细胞膜内陷空泡; 基底膜完整. ICC多与神经末梢和神经束伴随存在, 胞体靠近神经纤维, 与神经纤维末梢形成突触样连接(synaptic-like contacts)<sup>[2,3]</sup>. ICC相互之间、ICC与平滑肌细胞(smooth muscle cell, SMC)间可见缝隙连接(gap junctions)<sup>[4,5]</sup>. SMC形态及其相互间的缝隙连接正常. 神经纤维末梢与SMC未见紧密连接. 神经-ICC-SMC网络完整(图1A).

模型组ICC核皱缩, 常染色质变少, 分布不均匀, 异染色质趋边, 呈斑块状; 突起明显减少或消失, 许多末梢突起破裂, 失去胞质内容物;

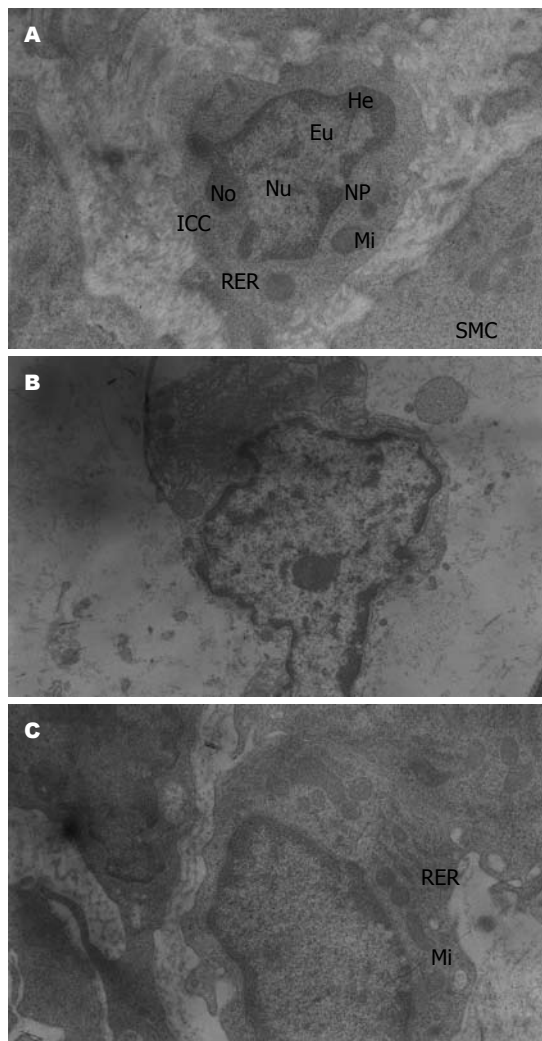


图 1 各组结肠ICC的超微结构. A: 空白组. ICC在SMC间隙中间, 与SMC形成缝隙连接, 核(Nu)大, 可见核仁(No), 常染色质(Eu)均匀分布于细胞核中央, 异染色质(He)趋边, 有核孔(Np), 核膜完整, 细胞质内含线粒体(Mi, 内可见线粒体脊)和粗面内质网(RER); B: 模型组. ICC细胞核萎缩, 常染色质变少, 分布不均匀, 胞质溶解丢失, 不完整; C: 针刺组. ICC细胞基本正常, 内含条状粗面内质网(RER), 线粒体(Mi).

胞质空泡形成, 胞膜泡状化; 胞质内细胞器异常: 线粒体数量减少, 出现肿胀、嵴断裂、溶解、甚至破裂; 内质网扩张, 粗面内质网脱颗粒; 次级溶酶体增多; 许多中间丝排空; 出现大的脂滴和空的膜结合泡; 基底膜缺乏或不完整. 部分细胞胞质内微细结构辨认不清. ICC与神经纤维间的突触样连接缺失, 间距增加, 其内存在大量板层体(lamellar bodies). 神经纤维末梢肿胀, 伴神经递质小泡减少或消失. SMC粗面内质网扩张, 高尔基体肿胀, 出现大量细胞膜内陷空泡. ICC相互间、ICC与SMC间及SMC相互间缝隙连接明显减少或缺如, 尚存的细胞间连接也显示不清. 组织间隙内存在大量液性物质和无序的胶原(图1B).

### ■ 相关报道

Kobayashi等研究表明, 肠道括约肌ICC-IM的丢失将导致该区域肠运动神经传递衰减. 王广勇等发现神经元损伤与ICC数量减少直接相关, 其恢复亦伴随ICC的增殖.



# ■创新盘点

本研究从三维立体以及超微结构方面观测ICC和胆碱能神经-ICC-平滑肌细胞网络结构的结肠吻合术后改变及针刺治疗对其影响,并配合排便和小肠推进率的观察,以探讨其与胃肠动力的关系和针刺调整术后胃肠动力的机制。

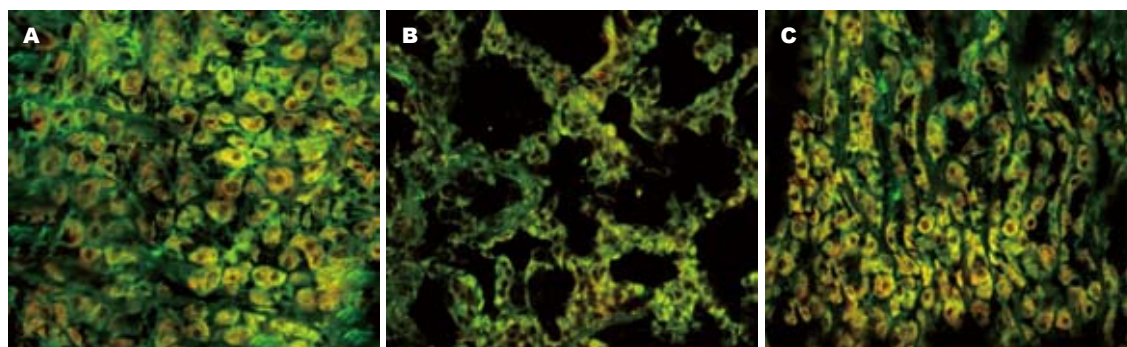


图2 各组ENS-ICC-SMA网络. A: 空白组; B: 模型组; C: 针刺组.

表2 FITC和RBITC的荧光强度值及其标记的细胞数量 (mean  $\pm$  SD,  $n = 10$ )

分组	FITC		RBITC	
	荧光强度(a.u.)	细胞数(个)	荧光强度(a.u.)	细胞数(个)
针刺组	56.67 $\pm$ 9.45 <sup>a</sup>	30.33 $\pm$ 3.21 <sup>a</sup>	36.00 $\pm$ 8.19 <sup>a</sup>	23.00 $\pm$ 4.58 <sup>a</sup>
模型组	35.00 $\pm$ 9.54 <sup>c</sup>	18.67 $\pm$ 6.11 <sup>c</sup>	20.33 $\pm$ 5.13 <sup>c</sup>	18.67 $\pm$ 3.79 <sup>c</sup>
空白组	58.67 $\pm$ 10.21	32.33 $\pm$ 5.51	34.67 $\pm$ 6.81	20.67 $\pm$ 3.21

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 模型组; <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs 空白组.

针刺组ICC核基本保持正常形态,细胞突起减少但损伤不明显,异染色质部分趋边;胞质内细胞器形态结构尚清晰可见,线粒体、核糖体、内质网和高尔基体数量较多,少量线粒体肿胀、内质网扩张;部分微丝从胞质中央向外周漂移;基底膜维持完整.少量神经纤维末梢肿胀,神经递质小泡无明显减少.SMC损伤不明显,有少量细胞膜内陷空泡. ICC与神经纤维间保持突触样连接; ICC相互间、ICC与SMC间及SMC相互间存在缝隙连接,无明显间隙;可见少量板层状体;组织间隙内存在少量液性物质(图1C).

2.4 激光共聚焦显微镜观察胆碱能神经-ICC网络结构的变化 空白组ICC呈梭形,有数个突触, ICC间通过突触彼此相互连接形成密集的网络样结构.胆碱能神经纤维也相接成网,网内的神经节含大量VACHT阳性神经纤维. ICC长的突触与神经纤维平行走行,短的突触彼此相连并与平滑肌和神经纤维紧密连接, ICC网络包绕着胆碱能神经网络,胆碱能神经-ICC-SMC网络结构完整(表2, 图2A).

模型组ICC数量较空白组明显减少,荧光强度减弱( $P < 0.05$ ). ICC细胞突起不明显,完整的网络样结构消失,网络出现大片空缺, ICC之间以及其与平滑肌和神经纤维之间的紧密样连接缺损.胆碱能神经网络结构严重残缺,呈片状分布,

神经纤维间的连接大大减少, VACHT阳性神经纤维较空白组减少明显,荧光强度减弱( $P < 0.05$ ). ICC与胆碱能神经纤维分布不均匀,胆碱能神经-ICC-SMC网络结构紊乱(图2B).

针刺组ICC分布较为连续,保持网络状结构,细胞突起可见, ICC间及其与平滑肌和神经纤维之间连接较紧密,无明显的间隙,细胞的数量以及荧光强度比模型组有所增强( $P < 0.05$ ). VACHT阳性神经纤维较模型组明显增多,维持神经网络样结构,胆碱能神经节之间的连接较为紧密,荧光强度有所增强( $P < 0.05$ ). ICC与胆碱能神经纤维间的长突起较模型组也有所增多,相互间的连接结构较为完整,胆碱能神经-ICC-SMC网络结构基本得以维持(图2C).

## 3 讨论

近年来, ICC已成为胃肠起搏机制和一些胃肠动力障碍性疾病研究的热点<sup>[6-8]</sup>. ICC是胃肠慢波活动的起搏器和传导者,在胃肠动力的发生与调控中起着重要作用<sup>[9-13]</sup>. 研究表明,胃肠内的ICC可根据其分布位置分为ICC-MY(位于环形肌和纵行肌之间)、ICC-IM(位于肌束间)、ICC-DMP(位于环形肌深层内的ICC-IM)和ICC-SM(位于黏膜下层)4类. 其中ICC-MY是主要的起搏细胞,具有自动产生节律性去极化的功能,

其产生的自发性内向电流为起搏电流,进而产生慢波<sup>[14,15]</sup>。ICC-IM也能产生持续放电活动,形成单位电位(unitary potentials),并凭借此电位将ICC-MY的起搏信号传递给予自身形成紧密连接的平滑肌<sup>[16]</sup>,从而完成自发性收缩过程。

ICC的功能实现是以其超微结构和网络结构为基础的。大量内质网、高尔基体、游离核糖体均参与蛋白质合成,代谢功能活跃;丰富的线粒体又保证了其作为胃肠道慢波起搏细胞所需的能量供应<sup>[17]</sup>; ICC之间、ICC与SMC之间、ICC与神经细胞之间形成的缝隙连接和触突样连接,使其作为慢波导体和神经系统控制胃肠平滑肌运动的信息整合中转站的功能得以实现。肠神经系统运动末梢、肌间从ICC、SMC三者相互连接成网络,形成伸展感受器共同感受肠腔内压力的变化,在膨胀诱发的电位活动及其引发的潜在肠蠕动中起重要作用,被认为是构成胃肠动力的基本功能单位 (basic functional unit of gastrointestinal motility, BFUGM)<sup>[18-22]</sup>。

作为肠神经作用的首要靶细胞, ICC参与着肠神经系统信号向SMC的传送<sup>[23-27]</sup>。相关研究表明<sup>[28]</sup>, 肠道括约肌ICC-IM的丢失将导致该区域肠运动神经传递衰减。而另一方面, 肠神经系统的信号在肠神经末梢与ICC间的传导又有赖于神经递质担当信使。乙酰胆碱(acetylcholine, Ach)是肠壁内最主要的兴奋性神经递质,他在胆碱能神经元末梢的胞质中由胆碱和乙酰辅酶A在乙酰胆碱转移酶(choline acetyltransferase, CHAT)的催化下合成,然后由VACHT负责转运并包装成突触囊泡,在囊泡中储存直至释放<sup>[29]</sup>。Ach被释放后,与ICC结合产生兴奋性连接电位,使SMC去极化而产生收缩。故Ach的含量及能否被顺利转运直接影响着胃肠平滑肌的收缩运动。由于VACHT特异性较强,能够清楚地显示胆碱能神经元终末突触小泡的膜上及周围轴浆中的Ach,反映运动终板功能状态,因此被认为是目前最可靠的Ach存在及其量多少的标志物<sup>[30]</sup>。

本研究采用Ach的特异性标志物VACHT抗体和ICC的特异性标志物c-Kit抗体对大鼠结肠组织进行免疫荧光双标记,运用激光扫描共聚焦显微镜结合透射电镜,从三维立体以及超微结构方面观测ICC和胆碱能神经-ICC-SMC网络结构的结肠吻合术后改变及针刺治疗对其的影响,并配合排便和小肠推进率的观察,以探讨其与胃肠动力的关系和针刺调整术后胃肠动力的机制。

研究结果表明,结肠吻合术后,吻合口附近ICC的超微结构出现明显损伤,尤其线粒体的大量破裂溶解,造成细胞色素C释放,引起细胞凋亡坏死<sup>[31]</sup>。ICC数量减少,兴奋性神经递质Ach含量下降,网络结构破坏,细胞间信号传导受阻,使慢波电活动的产生和扩布均受到严重影响,故术后肠道动力减弱,小肠推进率变小,排便延迟。有研究发现<sup>[32]</sup>,神经元损伤与ICC数量减少直接相关,其恢复亦伴随ICC增殖。在本研究中,ICC和胆碱能神经的损伤与恢复也表现出一致变化的趋势。针刺组大鼠结肠组织的ICC超微结构损伤和胆碱能神经-ICC-SMC网络结构破坏均较模型组轻,小肠推进率增加,首次排便时间提前,表明针刺能改善ICC的超微结构,减轻线粒体损伤,促进ICC和胆碱能神经再生,网络结构的恢复,这可能是针刺促进术后肠动力恢复的机制之一。至于针刺促进ICC修复和再生的作用是否与其促进受损神经恢复的作用有关,仍有待深入研究。

中医认为,脾主肌肉,司运化,胃肠动力与脾有着密切的关系。本研究取足阳明胃经足三里穴、足太阴脾经三阴交穴以调脾胃,佐以足厥阴肝经太冲穴,取肝之疏泄助脾升胃降而行气机,故能取得较好疗效。鉴于ICC在整个消化道均有分布,且结肠为消化道中血供最差,吻合术后并发症最严重的部位,由此推测,针刺对其他消化道如胃、小肠等手术术后的ICC修复和再生以及胃肠运动功能早期恢复亦有良好的疗效,至于其具体疗效及相关机制尚需进一步探讨。

**志谢:** 感谢袁青教授、唐纯志教授和刘晓嵘医师在本实验中给予的指导和帮助。

## 4 参考文献

- 1 Mei F, Yu B, Ma H, Zhang HJ, Zhou DS. Interstitial cells of Cajal could regenerate and restore their normal distribution after disrupted by intestinal transection and anastomosis in the adult guinea pigs. *Virchows Arch* 2006; 449: 348-357
- 2 Belzer V, Kobil T, Rich A, Hanani M. Intercellular coupling among interstitial cells of Cajal in the guinea pig small intestine. *Cell Tissue Res* 2002; 307: 15-21
- 3 Chen H, Ordög T, Chen J, Young DL, Bardsley MR, Redelman D, Ward SM, Sanders KM. Differential gene expression in functional classes of interstitial cells of Cajal in murine small intestine. *Physiol Genomics* 2007; 31: 492-509
- 4 Daniel EE, Thomas J, Ramnarain M, Bowes TJ, Jury J. Do gap junctions couple interstitial cells of Cajal pacing and neurotransmission to gastrointestinal smooth muscle? *Neurogastroenterol Motil* 2001; 13:

## ■应用要点

针刺促进结肠吻合术后肠动力的恢复可能与其具有修复ICC超微结构,促进ICC细胞及其网络结构再生的功能有关。这为临床运用针刺调整术后肠麻痹提供了实验证据,也为其他具有ICC改变的胃肠动力障碍疾病的治疗提供了一个值得探索的方向。



## ■同行评价

本文学术性较好,对临床有一定的参考价值.

- 297-307
- 5 Iino S, Horiguchi K, Nojyo Y. W(sh)/W(sh) c-Kit mutant mice possess interstitial cells of Cajal in the deep muscular plexus layer of the small intestine. *Neurosci Lett* 2009; 459: 123-126
- 6 张丹, 夏志伟, 韩亚京. 长期慢性束缚水浸应激对大鼠胃窦Cajal间质细胞数量的影响. *世界华人消化杂志* 2010; 18: 920-925
- 7 包呈梅, 胡森, 陆江阳, 武彦. 卡巴胆碱对缺血/再灌注损伤肠道Cajal间质细胞的影响. *中国病理生理杂志* 2009; 25: 1845-1847
- 8 李凡, 黄颖, 童卫东, 刘宝华. 雌激素诱导小鼠肠道Cajal间质细胞内ERK快速活化的研究. *重庆医学* 2009; 38: 1354-1356
- 9 Camborová P, Hubka P, Sulková I, Hulín I. The pacemaker activity of interstitial cells of Cajal and gastric electrical activity. *Physiol Res* 2003; 52: 275-284
- 10 Dickens EJ, Edwards FR, Hirst GD. Selective knockout of intramuscular interstitial cells reveals their role in the generation of slow waves in mouse stomach. *J Physiol* 2001; 531: 827-833
- 11 Ward SM, Sanders KM, Hirst GD. Role of interstitial cells of Cajal in neural control of gastrointestinal smooth muscles. *Neurogastroenterol Motil* 2004; 16 Suppl 1: 112-117
- 12 Daniel EE. Communication between interstitial cells of Cajal and gastrointestinal muscle. *Neurogastroenterol Motil* 2004; 16 Suppl 1: 118-122
- 13 Takeuchi T, Fujinami K, Fujita A, Okishio Y, Takewaki T, Hata F. Essential role of the interstitial cells of Cajal in nitric oxide-mediated relaxation of longitudinal muscle of the mouse ileum. *J Pharmacol Sci* 2004; 95: 71-80
- 14 Dickens EJ, Hirst GD, Tomita T. Identification of rhythmically active cells in guinea-pig stomach. *J Physiol* 1999; 514 (Pt 2): 515-531
- 15 Ordög T, Ward SM, Sanders KM. Interstitial cells of cajal generate electrical slow waves in the murine stomach. *J Physiol* 1999; 518 (Pt 1): 257-269
- 16 Sanders KM, Ordög T, Koh SD, Torihashi S, Ward SM. Development and plasticity of interstitial cells of Cajal. *Neurogastroenterol Motil* 1999; 11: 311-338
- 17 Ward SM, Ordög T, Koh SD, Baker SA, Jun JY, Amberg G, Monaghan K, Sanders KM. Pacemaking in interstitial cells of Cajal depends upon calcium handling by endoplasmic reticulum and mitochondria. *J Physiol* 2000; 525 Pt 2: 355-361
- 18 Wang XY, Vannucchi MG, Nieuwmeyer F, Ye J, Fausone-Pellegrini MS, Huizinga JD. Changes in interstitial cells of Cajal at the deep muscular plexus are associated with loss of distention-induced burst-type muscle activity in mice infected by *Trichinella spiralis*. *Am J Pathol* 2005; 167: 437-453
- 19 Wang XY, Paterson C, Huizinga JD. Cholinergic and nitrergic innervation of ICC-DMP and ICC-IM in the human small intestine. *Neurogastroenterol Motil* 2003; 15: 531-543
- 20 Mitsui R, Komuro T. Direct and indirect innervation of smooth muscle cells of rat stomach, with special reference to the interstitial cells of Cajal. *Cell Tissue Res* 2002; 309: 219-227
- 21 Schultz T, Daniel V, Daniel EE. Does ICC pacing require functional gap junctions between ICC and smooth muscle in mouse intestine? *Neurogastroenterol Motil* 2003; 15: 129-138
- 22 Altdorfer K, Bagaméri G, Donáth T, Fehér E. Nitric oxide synthase immunoreactivity of interstitial cells of Cajal in experimental colitis. *Inflamm Res* 2002; 51: 569-571
- 23 Seki K, Komuro T. Immunocytochemical demonstration of the gap junction proteins connexin 43 and connexin 45 in the musculature of the rat small intestine. *Cell Tissue Res* 2001; 306: 417-422
- 24 Horiguchi K, Sanders KM, Ward SM. Enteric motor neurons form synaptic-like junctions with interstitial cells of Cajal in the canine gastric antrum. *Cell Tissue Res* 2003; 311: 299-313
- 25 Iino S, Ward SM, Sanders KM. Interstitial cells of Cajal are functionally innervated by excitatory motor neurones in the murine intestine. *J Physiol* 2004; 556: 521-530
- 26 Wang XY, Sanders KM, Ward SM. Relationship between interstitial cells of Cajal and enteric motor neurons in the murine proximal colon. *Cell Tissue Res* 2000; 302: 331-342
- 27 Hanani M, Freund HR. Interstitial cells of Cajal—their role in pacing and signal transmission in the digestive system. *Acta Physiol Scand* 2000; 170: 177-190
- 28 Kobayashi KS, Chamailard M, Ogura Y, Henegariu O, Inohara N, Nuñez G, Flavell RA. Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science* 2005; 307: 731-734
- 29 Prado MA, Reis RA, Prado VF, de Mello MC, Gomez MV, de Mello FG. Regulation of acetylcholine synthesis and storage. *Neurochem Int* 2002; 41: 291-299
- 30 Sang Q, Young HM. The identification and chemical coding of cholinergic neurons in the small and large intestine of the mouse. *Anat Rec* 1998; 251: 185-199
- 31 Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 1996; 86: 147-157
- 32 王广勇, 李兆申, 高峻, 邹多武. Cajal间质细胞和肠神经元在急性坏死性胰腺炎豚鼠小肠组织中的改变. *胰腺病学* 2007; 7: 394-397

编辑 李薇 电编 何基才

# Tiam1和Rac1在食管鳞癌组织中蛋白表达的相关性及临床病理意义

刘 帅, 曲蕴慧, 鄢文海

刘帅, 曲蕴慧, 郑州大学第一附属医院检验科 河南省郑州市 450052

刘帅, 鄢文海, 郑州大学基础医学院病理生理教研室 河南省郑州市 450052

刘帅, 主管技师, 主要从事消化系统肿瘤方面的研究。

作者贡献分布: 此课题由鄢文海设计; 研究过程由刘帅与曲蕴慧共同操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由鄢文海提供; 数据分析由曲蕴慧完成; 本论文写作由刘帅、曲蕴慧及鄢文海共同完成。

通讯作者: 鄢文海, 教授, 450052, 河南省郑州市大学路40号, 郑州大学基础医学院病理生理教研室. yanwenhaizd@126.com

收稿日期: 2010-10-06 修回日期: 2010-11-09

接受日期: 2010-11-17 在线出版日期: 2010-12-28

## Clinicopathological significance of Tiam1 and Rac1 protein expression in esophageal squamous cell carcinoma

Shuai Liu, Yun-Hui Qu, Wen-Hai Yan

Shuai Liu, Yun-Hui Qu, Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China

Shuai Liu, Wen-Hai Yan, Department of Pathophysiology, Basic Medical College, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China

Correspondence to: Professor Wen-Hai Yan, Department of Pathophysiology, Basic Medical College, Zhengzhou University, 40 Daxue Road, Zhengzhou 450052, Henan Province, China. yanwenhaizd@126.com

Received: 2010-10-06 Revised: 2010-11-09

Accepted: 2010-11-17 Published online: 2010-12-28

## Abstract

**AIM:** To detect the expression of T-cell lymphoma invasion and metastasis factor 1 (Tiam1) and Rac GTPase activating protein 1 (Rac1) proteins in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) and to analyze their correlation with the development, progression, invasion and metastasis of ESCC.

**METHODS:** The expression of TIAM1 and Rac1 proteins was detected by immunohistochemistry in 62 ESCC specimens, 20 tumor-adjacent atypical hyperplastic epithelial specimens, and 20 normal esophageal epithelial specimens.

**RESULTS:** The expression of Tiam1 protein was

closely correlated with tumor grade, infiltration, lymph node metastasis, and TNM grade in ESCC ( $\chi^2 = 8.779, 7.680, 4.502$  and  $4.987$ , all  $P < 0.05$ ). There is a significant difference in the positive rate of Tiam1 protein expression among normal esophageal epithelium, tumor-adjacent atypical hyperplastic epithelium and carcinoma [15.0% (3/20), 55.0% (11/20) and 72.6% (45/62), respectively;  $\chi^2 = 20.643$ ,  $P < 0.05$ ]. The expression of Rac1 protein was closely correlated with tumor grade, infiltration, lymph node metastasis, and TNM grade in ESCC ( $\chi^2 = 8.652, 6.884, 8.276$  and  $6.371$ , all  $P < 0.05$ ). There is a significant difference in the positive rate of Rac1 protein expression among normal esophageal epithelium, adjacent atypical hyperplastic epithelium and carcinoma [25.0% (5/20), 70.0% (14/20) and 70.0% (44/62), respectively;  $\chi^2 = 57.621$ ,  $P < 0.01$ ]. There is a positive correlation between the expression of Tiam1 and Rac1 proteins ( $\gamma_p = 0.642$ ,  $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** Combined detection of Tiam1 and Rac1 expression can be used for early diagnosis and prognostic evaluation of ESCC.

**Key Words:** T-cell lymphoma invasion and metastasis factor 1; Rac GTPase activating protein 1; Esophageal squamous cell carcinoma; Immunohistochemistry; Invasion and metastasis

Liu S, Qu YH, Yan WH. Clinicopathological significance of Tiam1 and Rac1 protein expression in esophageal squamous cell carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(36): 3869-3873

## 摘要

**目的:** 探讨T淋巴瘤侵袭转移诱导因子1(Tiam1)及Rac GTP酶激活蛋白1(Rac1)的表达与食管鳞癌发生发展、浸润转移的关系。

**方法:** 62例食管癌手术切除标本于2006-02-26/03-16取自食管癌高发区河南省安阳市肿瘤医院。应用免疫组织化学SP法检测62例食管鳞癌组织、20例癌旁不典型增生组织及20例正常食管黏膜组织中Tiam1及Rac1蛋白表达。

## ■背景资料

Tiam1可以调节细胞骨架结构重组, 影响细胞的形变极化过程, 促进细胞运动和迁移, 参与基因表达调控、细胞增殖与凋亡等生物学功能。

## ■同行评议者

张青云, 研究员, 北京大学临床肿瘤学院北京肿瘤医院检验科

## ■ 研究前沿

关于Tiam1及Rac1在食管鳞癌发生发展中的作用国内外尚未见报道。关于Tiam1及Rac1与恶性肿瘤关系的研究已成为热点。

**结果:** 食管鳞癌组织中Tiam1蛋白表达与癌的组织学分级、浸润深度、淋巴结转移及TNM分期均密切相关( $\chi^2 = 8.779, 7.680, 4.502, 4.987$ ; 均 $P < 0.05$ ); 在食管鳞癌癌变过程中Tiam1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5.0%(3/20)、55.0%(11/20)、72.6%(45/62), 组间比较有明显差异( $\chi^2 = 20.643, P < 0.05$ ); Rac1蛋白表达也与癌的组织学分级、浸润深度、淋巴结转移及TNM分期均密切相关( $\chi^2 = 8.652, 6.884, 8.276, 6.371$ ; 均 $P < 0.05$ ); Rac1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25.0%(5/20)、70.0%(14/20)、70.0%(44/62), 组间比较有明显差异( $\chi^2 = 14.245, P < 0.05$ )。Tiam1及Rac1的表达呈正相关关系( $\gamma_p = 0.642, P < 0.05$ )。

**结论:** Tiam1及Rac1可作为食管鳞癌早期诊断和判断预后的辅助指标。

**关键词:** T淋巴瘤侵袭转移诱导因子1; Rac GTP酶激活蛋白1; 食管鳞状细胞癌; 免疫组织化学; 浸润转移

刘帅, 曲蕴慧, 郗文海. Tiam1和Rac1在食管鳞癌组织中蛋白表达的相关性及临床病理意义. 世界华人消化杂志 2010; 18(36): 3869-3873

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/3869.asp>

## 0 引言

T淋巴瘤侵袭转移诱导因子1(T lymphoma invasion and metastasis factor 1, Tiam1)是新近发现的一种原癌基因, 由BW5147小鼠T淋巴瘤细胞高侵袭变异株中分离鉴定, 故命名为Tiam1基因<sup>[1]</sup>。可以调节细胞骨架结构重组, 影响细胞的形体极化过程, 促进细胞运动和迁移, 参与基因表达调控、细胞增殖与凋亡等生物学功能<sup>[2-4]</sup>。Rho家族(Ras homologue family)是与肿瘤侵袭、转移密切相关的小G蛋白, Rac GTP酶激活蛋白1(Rac GTPase activating protein 1, Rac1)则是其重要成员之一<sup>[5,6]</sup>。有关Tiam1与Rac1与食管癌浸润转移的关系及二者表达相关性的研究, 迄今国内外均未见报道。我们采用了免疫组织化学SP法系统地检测了Tiam1与Rac1基因在62例食管鳞癌组织、20例癌旁不典型增生组织及20例正常食管黏膜组织的表达情况, 探讨Tiam1与Rac1在食管癌演变过程中的作用, 以期寻找食管癌早期诊断和判断预后的分子指标。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 62例食管癌手术切除标本于2006-02-26/03-16取自食管癌高发区河南省安阳市肿瘤医院(所有62例食管癌患者均知情并同意且经医院伦理委员会批准), 所有病例术前均无化疗、放疗及免疫治疗史。其中男36例, 女26例, 年龄38-75(平均 $60.6 \pm 9.5$ )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15例, II级25例, III级22例; 伴淋巴结转移者20例, 无淋巴结转移者42例。浸润深度分2组, 浸达浅层者(包括黏膜层、黏膜下层及浅肌层)7例, 浸达深者(包括深肌层及纤维膜)。全部样本分别在癌灶、癌旁3 cm以内及远端正常黏膜组织3处取材, 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  $\mu\text{m}$ , 分别用于HE和免疫组织化学染色。兔抗人多克隆Tiam1抗体及鼠抗人Rac1单克隆抗体均购自美国Santa Cruz公司, SP免疫组织化学试剂盒购自北京中杉金桥生物技术开发公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 免疫组织化学染色:** 采用SP法, Tiam1与Rac1单抗稀释, 稀释倍数分别为1:100和1:120, DAB显色, 苏木素复染。染色步骤严格按说明书进行, 以PBS液代替一抗体作为阴性对照。

**1.2.2 结果判定方法:** Tiam1与Rac1蛋白阳性信号均呈棕黄色颗粒样物质, 主要位于细胞质内。高倍镜下随机选取5个视野(每个视野观察细胞数 $\geq 200$ 个), 按阳性细胞所占百分比及着色深浅进行结果判定<sup>[7,8]</sup>。(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, 应用 $\chi^2$ 检验。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

## 2 结果

**2.1 Tiam1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** Tiam1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Tiam1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15.0%(3/20)、55.0%(11/20)、72.6%(45/62), 组间比较有明显差异( $\chi^2 = 20.643, P < 0.05$ , 表1)。Tiam1蛋白表达与食

表 1 Tiam1及Rac1在食管鳞癌组织、非典型增生及正常黏膜组织中的表达

	Tiam1				$\chi^2$ 值	P值	Rac1			$\chi^2$ 值	P值
	n	-(n)	+(n)	阳性率n(%)			-(n)	+(n)	阳性率n(%)		
正常黏膜上皮组织	20	17	3	15.0	20.643	0.000	15	5	25.0	14.245	0.001
非典型增生组织	20	9	11	55.0			6	14	70.0		
鳞癌组织	62	17	45	72.6			18	44	71.0		

## ■创新盘点

本文首次采用免疫组织化学法检测了食管癌高发区河南安阳的食管癌患者手术切除的癌组织Tiam1及Rac1蛋白的表达情况。

表 2 Tiam1及Rac1蛋白表达与食管鳞癌临床生物学行为的关系

病理特征	n	Tiam1			Rac1		
		阳性表达n(%)	$\chi^2$ 值	P值	阳性表达n(%)	$\chi^2$ 值	P值
组织学分级							
I	15	7(46.7)	8.779	0.012	7(73.3)	8.652	0.013
II	25	18(68.0)			17(68.0)		
III	22	20(86.4)			20(72.7)		
浸润深度							
浅层	7	2(28.6)	7.680	0.006	2(28.6)	6.884	0.009
深层	55	43(78.2)			42(76.4)		
淋巴结转移							
无	42	27(64.3)	4.502	0.034	25(54.2)	8.276	0.004
有	20	18(90.0)			19(85.7)		
TNM分期							
I、II	26	15(57.7)	4.987	0.026	14(53.8)	6.371	0.012
III、IV	36	30(83.3)			30(83.3)		

管鳞癌组织学分级、浸润深度、淋巴结转移及TNM分期均有关( $\chi^2 = 8.779, 7.680, 4.502, 4.987$ , 均 $P < 0.05$ , 表2)。

**2.2 Rac1蛋白在食管鳞癌中的表达及其与临床生物学行为的关系** Rac1蛋白阳性着色定位于细胞质内, 呈棕黄色或深黄色颗粒(图2)。在食管鳞癌癌变过程中Rac1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25.0%(5/20)、70.0%(14/20)、71.0%(44/62), 组间比较有明显差异( $\chi^2 = 14.245, P < 0.01$ , 表1)。Rac1蛋白阳性表达率与食管鳞癌组织学分级、浸润深度、淋巴结转移及TNM分期均密切相关( $\chi^2 = 8.652, 6.884, 8.276, 6.371$ ; 均 $P < 0.05$ , 表2)。

**2.3 Tiam1及Rac1在食管鳞癌组织中表达的相关性分析** 在62例食管鳞癌组织中, Tiam1阳性表达45例中, 其Rac1蛋白表达阳性占40例, 而Tiam1表达阴性的17病例中, 其Rac1蛋白表达阴性的占13例。Tiam1及Rac1蛋白在食管鳞癌组织中的表达呈正相关关系( $\gamma_p = 0.642, P < 0.05$ , 表3)。

### 3 讨论

恶性肿瘤的侵袭和转移是肿瘤细胞与宿主细胞

表 3 Tiam1及Rac1在食管鳞癌组织中表达的相关性

Tiam1	n	Rac1		$\gamma_p$ 值	P值
		+(n)	-(n)		
+(n)	45	40	5	0.642	0.000
-(n)	17	4	13		

和间质之间的一个多步骤、多基因参与的非常复杂的过程, 主要是因为癌基因的功能增强、突变和抑癌基因的功能的缺失、突变所导致的。人类Tiam1基因位于21q22.1带, 含有2个7.3 kb外显子, 被一个14 kb内含子分隔。该基因含5 521个碱基, 其编码产物的相对分子质量为 $177 \times 10^3$ , 由1 591个氨基酸残基组成的蛋白质, 属于Dbl家族成员(diffuse B2 cell lymphoma oncogene family)<sup>[9,10]</sup>。Tiam1在鼠的脑和睾丸组织中呈高表达, 在其他组织如心、肺、肝、脾、肾、胸腺、淋巴结、唾液腺中低度表达或不表达, 在人的肝细胞、肾小管上皮细胞、支气管上皮细胞、心肌细胞中低度表达, 在平滑肌细胞中呈中度表达, 在其他正常组织中不表达<sup>[11]</sup>。近年研究显示Tiam1在肝癌<sup>[9]</sup>、鼻咽癌<sup>[12]</sup>、胃癌<sup>[13]</sup>、前列腺



# 应用要点

联合检测Tiam1及Rac1蛋白表达可望成为食管鳞癌早期诊断、判断预后的分子指标之一。

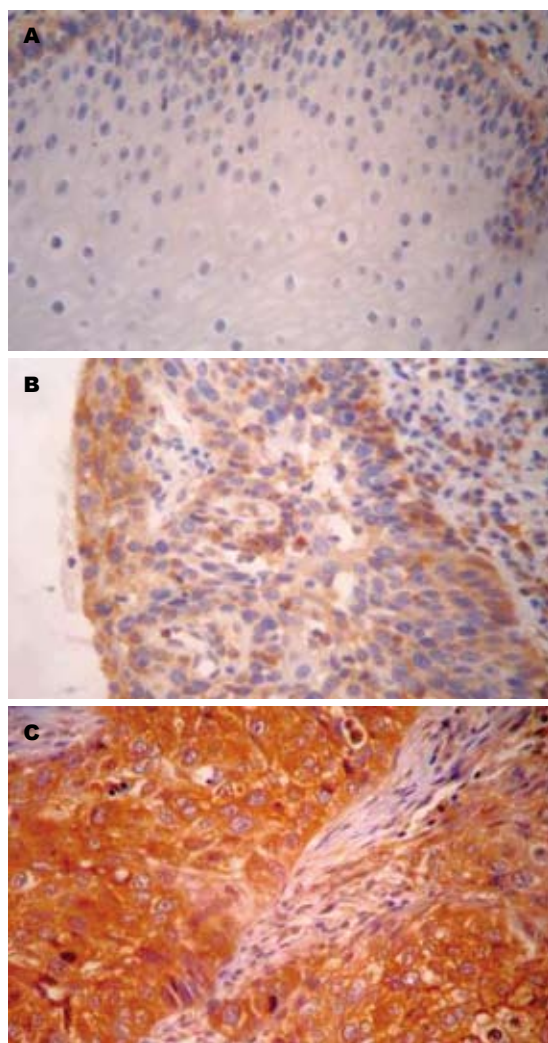


图 1 SP示Tiam1的表达( $\times 400$ ). A: 正常黏膜; B: 癌旁组织; C: 癌组织.

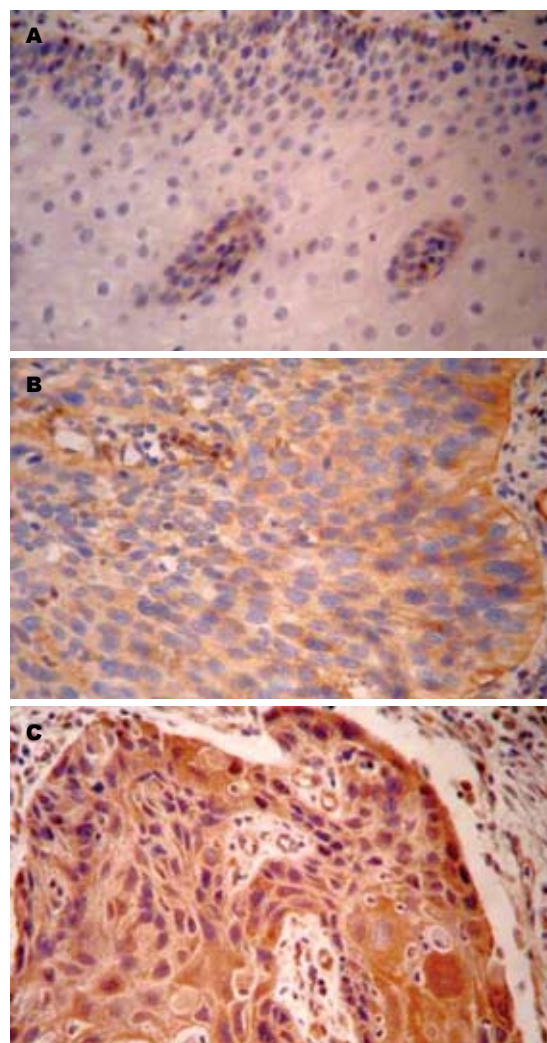


图 2 SP示Rac1的表达( $\times 400$ ). A: 正常黏膜; B: 癌旁组织; C: 癌组织.

癌<sup>[14]</sup>等多种恶性肿瘤组织中呈阳性表达并与其分化程度、侵袭转移密切相关.

Rho家族是与肿瘤侵袭、转移密切相关的小G蛋白, Rac1是其家族中的重要成员之一<sup>[5,6]</sup>. Rac1蛋白存在Rac1-GDP(失活状态)和Rac1-GTP(激活状态)两种形式<sup>[15]</sup>. Rac1的生物功能发挥依赖于此两种活性形式间的转换, 且具有调节细胞骨架重组, 影响细胞形体极化, 促进细胞运动与迁移, 抑制细胞凋亡的作用<sup>[16]</sup>. Rac1可通过激活IV型胶原酶MMP-2, 并上调I型胶原酶的表达, 促进细胞外基质降解, 从而增强肿瘤细胞侵袭穿透能力; 也可以通过调节NF- $\kappa$ B活性并增加细胞内超氧化物阴离子浓度进而抑制肿瘤细胞凋亡的发生<sup>[17,18]</sup>.

Tiam1基因能够调节E钙黏附素介导的细胞黏附, 并与Rho一起参与黏附复合物的组装, 诱导T淋巴瘤的侵袭. Tiam1基因表达产物还能促

进整合素介导的异型细胞之间、细胞与基质之间的相互作用. Tiam1定位于细胞间的黏附处, 共同定位的还有E-cadherin等黏附复合物; 在细胞作用底物为胶原蛋白I时, 细胞表现为运动性增强, Tiam1定位于膜皱褶和胞质. 因此, 底物通过影响Tiam1的定位, 直接或间接的调节着Rac1的活性, 决定着细胞黏附或是运动. 而肿瘤细胞的黏附和迁移运动活性的交替变换对肿瘤的侵袭转移是至关重要的<sup>[13]</sup>.

本研究结果显示, Tiam1及Rac1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, 说明Tiam1及Rac1高表达的食管鳞癌具有更强的侵袭能力. 本试验还发现, 随食管鳞癌组织的分化程度的降低、浸润深度的增加、TNM分期的增加及伴有淋巴结转移的发生, Tiam1蛋白染色阳性率呈逐渐增强趋势, 组间比较差异具有统计学意

义( $P<0.05$ ). 我们推测Tiam1是Rac1的特异性鸟昔酸转换因子, 能够促进GDP的释放以及GTP的结合, 进而激活Rac1, 再经激酶等信号分子转导, 激活下游分子, 实现调节细胞骨架结构重组, 影响细胞的形体极化过程, 促进细胞运动和迁移, 诱导肿瘤细胞的侵袭转移, 参与基因表达调控、细胞增殖与凋亡等. Tiam1及Rac1蛋白表达呈正相关关系提示了二者在食管鳞癌发生发展过程中可能起到了协同作用. 联合检测Tiam1及Rac1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途径.

#### 4 参考文献

- 1 Habets GG, Scholtes EH, Zuydgeest D, van der Kammen RA, Stam JC, Berns A, Collard JG. Identification of an invasion-inducing gene, Tiam-1, that encodes a protein with homology to GDP-GTP exchangers for Rho-like proteins. *Cell* 1994; 77: 537-549
- 2 Woodcock SA, Rushton HJ, Castañeda-Saucedo E, Myant K, White GR, Blyth K, Sansom OJ, Malliri A. Tiam1-Rac signaling counteracts Eg5 during bipolar spindle assembly to facilitate chromosome congression. *Curr Biol* 2010; 20: 669-675
- 3 Masuda M, Maruyama T, Ohta T, Ito A, Hayashi T, Tsukasaki K, Kamihira S, Yamaoka S, Hoshino H, Yoshida T, Watanabe T, Stanbridge EJ, Murakami Y. CADM1 interacts with Tiam1 and promotes invasive phenotype of human T-cell leukemia virus type I-transformed cells and adult T-cell leukemia cells. *J Biol Chem* 2010; 285: 15511-15522
- 4 Rajagopal S, Ji Y, Xu K, Li Y, Wicks K, Liu J, Wong KW, Herman IM, Isberg RR, Buchsbaum RJ. Scaffold proteins IRSp53 and spinophilin regulate localized Rac activation by T-lymphocyte invasion and metastasis protein 1 (TIAM1). *J Biol Chem* 2010; 285: 18060-18071
- 5 Lee CS, Choi CK, Shin EY, Schwartz MA, Kim EG. Myosin II directly binds and inhibits Dbl family guanine nucleotide exchange factors: a possible link to Rho family GTPases. *J Cell Biol* 2010; 190: 663-674
- 6 Wang J, Lu W, Wen T. Silencing of Rho-GDIgamma by RNAi promotes the differentiation of neural stem cells. *Methods Mol Biol* 2010; 650: 111-120
- 7 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
- 8 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
- 9 Choi Y, Kim H, Chung H, Hwang JS, Shin JA, Han IO, Oh ES. Syndecan-2 regulates cell migration in colon cancer cells through Tiam1-mediated Rac activation. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 391: 921-925
- 10 Xing J, Birukova AA. ANP attenuates inflammatory signaling and Rho pathway of lung endothelial permeability induced by LPS and TNFalpha. *Microvasc Res* 2010; 79: 56-62
- 11 Woodcock SA, Jones RC, Edmondson RD, Malliri A. A modified tandem affinity purification technique identifies that 14-3-3 proteins interact with Tiam1, an interaction which controls Tiam1 stability. *J Proteome Res* 2009; 8: 5629-5641
- 12 Qi Y, Huang B, Yu L, Wang Q, Lan G, Zhang Q. Prognostic value of Tiam1 and Rac1 overexpression in nasopharyngeal carcinoma. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 2009; 71: 163-171
- 13 Walch A, Seidl S, Hermannstädter C, Rauser S, Deplazes J, Langer R, von Weyhern CH, Sarbia M, Busch R, Feith M, Gillen S, Höfler H, Luber B. Combined analysis of Rac1, IQGAP1, Tiam1 and E-cadherin expression in gastric cancer. *Mod Pathol* 2008; 21: 544-552
- 14 Engers R, Mueller M, Walter A, Collard JG, Willers R, Gabbert HE. Prognostic relevance of Tiam1 protein expression in prostate carcinomas. *Br J Cancer* 2006; 95: 1081-1086
- 15 Miroshnychenko DO, Teleheiev HD, Maliuta SS. [Analysis of GEF activity of Bcr protein DH domain]. *Ukr Biokhim Zh* 2007; 79: 116-121
- 16 Ho HH, Chang CS, Ho WC, Liao SY, Wu CH, Wang CJ. Anti-metastasis effects of gallic acid on gastric cancer cells involves inhibition of NF-kappaB activity and downregulation of PI3K/AKT/small GTPase signals. *Food Chem Toxicol* 2010; 48: 2508-2516
- 17 Hwang YP, Yun HJ, Kim HG, Han EH, Lee GW, Jeong HG. Suppression of PMA-induced tumor cell invasion by dihydroartemisinin via inhibition of PKCalpha/Raf/MAPKs and NF-kappaB/AP-1-dependent mechanisms. *Biochem Pharmacol* 2010; 79: 1714-1726
- 18 Yang SF, Chen MK, Hsieh YS, Yang JS, Zavras AI, Hsieh YH, Su SC, Kao TY, Chen PN, Chu SC. Anti-metastatic effects of Terminalia catappa L. on oral cancer via a down-regulation of metastasis-associated proteases. *Food Chem Toxicol* 2010; 48: 1052-1058

#### ■同行评价

本文实验设计较合理, 对食管鳞癌的诊断及预后有一定的参考意义.

编辑 李薇 电编 何基才

# 高场磁共振在脂肪肝诊断和脂肪分级中的研究进展

昌倩, 肖恩华

## ■背景资料

MRI无电离辐射, 具有极高的软组织分辨率, 并可多方位成像, 随着磁共振成像技术的发展, MRI在脂肪肝的定性和定量诊断上都具有可观的发展前景, 为临床的诊断、治疗以及随访提供了新手段。

昌倩, 肖恩华, 中南大学湘雅二医院放射科 湖南省长沙市 410011

国家自然科学基金资助项目, No. 30070235

湖南省自然科学基金资助项目, No. 06JJ20081

作者贡献分布: 本文综述由昌倩完成; 肖恩华审校。

通讯作者: 肖恩华, 教授, 主任医师, 410011, 湖南省长沙市, 中南大学湘雅二医院放射科. cjr.xiaoenhua@vip.163.com  
电话: 86-731-85292116

收稿日期: 2010-08-13 修回日期: 2010-11-07

接受日期: 2010-11-17 在线出版日期: 2010-12-28

## High-field MRI for diagnosis of fatty liver and fat grading: recent research progress

Qian Chang, En-Hua Xiao

Qian Chang, En-Hua Xiao, Department of Radiology, the Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011, Hunan Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30070235; and the Natural Science Foundation of Hunan Province, No. 06JJ20081

Correspondence to: Professor En-Hua Xiao, Department of Radiology, the Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011, Hunan Province, China. cjr.xiaoenhua@vip.163.com

Received: 2010-08-13 Revised: 2010-11-07

Accepted: 2010-11-17 Published online: 2010-12-28

## Abstract

The incidence of fatty liver has been increasing gradually. The development of magnetic resonance imaging (MRI) has increased the sensitivity and specificity for diagnosis of fatty liver. Currently, multiple MRI methods, including fat-suppression sequence, chemical shift, contrast-enhanced MRI and magnetic resonance spectroscopy (MRS), are available for detection and quantification of fatty liver. MR fat-suppression sequence, especially opposed-phase and in-phase chemical shift gradient-echo sequence, is particularly important for detection of fatty liver. MRS is used to quantify liver fat content at the molecular level. In this article, we review the recent progress in research of high-field MRI for diagnosis of fatty liver and fat grading.

Key Words: Fatty liver; Magnetic resonance imaging; Quantification

Chang Q, Xiao EH. High-field MRI for diagnosis of fatty liver and fat grading: recent research progress. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2010; 18(36): 3874-3880

## 摘要

脂肪肝的发病率愈来愈高, 而磁共振成像 (magnetic resonance imaging, MRI) 技术的发展提高了脂肪肝诊断的灵敏度和特异性。目前定性定量诊断脂肪肝的MRI检查方法有: MRI脂肪抑制技术的成像序列、化学位移、肝脏特异性对比剂成像及磁共振波谱 (magnetic resonance spectroscopy, MRS)。MRI脂肪抑制序列尤其是梯度回波中的同相位反相位序列对脂肪肝定性具有重要价值, 而MRS可从分子水平定量来分析脂肪肝脂肪含量。本文对脂肪肝临床, MRI的定性定量诊断, 研究进展进行了综述。

关键词: 脂肪肝; 磁共振成像; 定量

昌倩, 肖恩华. 高场磁共振在脂肪肝诊断和脂肪分级中的研究进展. 世界华人消化杂志 2010; 18(36): 3874-3880

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/3874.asp>

## 0 引言

脂肪肝是一种常见的早期可逆转的良性肝脏疾病。如果不及时治疗可导致多种不良后果, 如肝功能不全、肝硬化等。目前, 临床上评价脂肪肝较多的是依靠B超和CT等影像学诊断手段。而准确测定肝脏脂肪含量, 明确脂肪肝的程度仍需要肝活体组织学检查, 但因其为创伤性检查, 不被患者普遍接受; 另外肝穿刺活检只能穿刺肝脏某一部位, 而对于脂肪不均匀浸润病例尚不能反映不同部位的脂肪浸润情况。虽然B超、CT试图对脂肪肝进行定量半定量的研究, 但都集中在通过间接的声像图和CT值来反映脂肪肝的严重程度, 而没有从细胞分子水平微观地定量评价脂肪肝脂肪变性的程度。随着磁共振成像 (magnetic resonance imaging, MRI) 技术的发展, MRI在脂肪肝的定性和定量诊断上都具有可观的发展前景, 为临床的诊断、治疗以及随访提供

## ■同行评议者

龙学颖, 副主任医师, 中南大学湘雅医院放射科



了新手段<sup>[1]</sup>.

磁共振无电离辐射, 具有极高的软组织分辨力, 并可多方位成像, 磁共振脂肪抑制序列(fat-suppression sequence, FSIR)尤其是梯度回波中的同相位反相位序列对脂肪肝定性具有重要价值, 而且磁共振波谱(magnetic resonance spectroscopy, MRS)可从分子水平定量来分析脂肪肝脂肪含量. 随着各种软件的开发和应用, MRS已从过去的将肝脏摘除离体研究, 发展到活体动物实验及临床研究, 对脂肪肝定量具有重要意义. MRI检查方法简单、无创, 即使是非酒精性脂肪肝(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)患者, 对轻度的脂肪变性或进展的肝纤维化, 具有良好的肝脏脂肪含量定量能力, 可无需特殊设备很容易进行<sup>[2]</sup>. 我们就脂肪肝临床, MR检查方法, 临床应用现状、研究进展作一综述.

## 1 脂肪肝的基本概念、分类及发病机制

脂肪肝是一种病理学概念, 系指肝内脂肪含量超过肝湿质量的5%, 或肝活检30%以上肝细胞有脂肪变且弥漫分布于全肝. 根据肝脏脂质含量占肝湿质量的比率或肝活检组织病理切片脂肪染色镜检, 可将脂肪肝分为轻度(含脂肪5%-10%或每单位面积见1/3-2/3的肝细胞脂变)、中度(含脂肪10%-25%或2/3以上肝细胞脂变)和重度(含脂肪25%-50%或以上, 或几乎所有肝细胞均发生脂肪变)3型. 根据肝组织病理学变化, 可将脂肪肝分为3个时期, I期为不伴炎症反应的单纯性脂肪肝, II期为伴有汇管区炎症和纤维化的脂肪性肝炎, III期为脂肪肝伴肝小叶内纤维组织增生乃至完全纤维化假小叶形成即脂肪性肝硬化<sup>[3]</sup>.

脂肪性肝病(fatty liver disease)则是一种临床概念, 系病变主体在肝小叶, 以弥漫性肝细胞大泡性脂肪变为病理特征的综合征. 临床上根据患者有无过量饮酒史, 分酒精性脂肪性肝病, 简称酒精性肝病(alcoholic fatty liver disease, AFLD)和NAFLD. 尽管丙型肝炎、自身免疫性肝病、Wilson病亦可导致肝脂肪变, 但因其病变主体在汇管区, 且有特定命名, 故不属于普通脂肪性肝病的范畴<sup>[4]</sup>.

脂肪肝发病机制: 遗传易感性与多元代谢紊乱相互作用, 参与了NAFLD的发病<sup>[5]</sup>. 脂肪肝时肝内异常增加的脂质(特别是过氧化脂质), 游离脂肪酸(free fatty acid, FFA)以及可能并存的铁负荷过重和高瘦素血症, 均可通过增强脂质过

氧化反应和/或刺激Kupffer<sup>[6]</sup>细胞释放炎症介质, 促进肝星状细胞激活、转化和合成细胞外基质, 从而诱发进展性肝纤维化<sup>[7]</sup>.

目前, 定性定量诊断脂肪肝的MRI检查方法有: MRI脂肪抑制技术的成像序列、化学位移、肝脏特异性对比剂成像及MRS<sup>[8]</sup>.

## 2 MRI脂肪抑制技术的成像序列对脂肪肝的研究

MRI脂肪抑制技术的成像序列主要包括频率饱和和反转恢复序列(spectral saturation inversion recovery, SPIR), 短T1反转恢复序列(short T1 inversion recovery, STIR)和Dixon法.

2.1 SPIR序列 频率选择性饱和脂肪抑制技术, 采用SPIR序列的优点是扫描时间短, 主要用于T<sub>2</sub>WI的脂肪抑制, 理论上比化学位移成像在短T2\*的环境下进行脂肪检测更加准确, 因为后者由相位干扰所产生的信号消减可能会与短T2\*所引起的信号衰减相混淆, 干扰脂肪的检测. 但其对主磁场的均匀度要求较高, 在场强不均匀的区域, 如含气软组织的界面或接近金属硬件的区域, 脂肪信号可能不会被有效地抑制, 而水信号却有可能无意间被抑制. 匀场法虽然有利于减少场强的不均一性, 但是会增加检查的时间.

2.2 STIR序列 选择性脂肪抑制技术, 是一种可以在重组的图像上消除脂肪信号的反转恢复序列. 由于人体组织中脂肪的T<sub>1</sub>值最短, 所以180度脉冲后其纵向磁矢量从反向的最大值恢复到零点所需的时间很短. 若选择短的反转时间(inversion time, TI)进行成像即可有效抑制脂肪信号. STIR技术对主磁场均匀度要求不是很高, 主要用于T<sub>1</sub>WI图像的脂肪抑制, 在化学脂肪饱和和相对无效的条件下, 他是一种获得脂肪衰减图像的有效方法, 特别是在低场强的条件下. 但缺点是扫描时间长, 对脂肪的定量也不可靠. 采用STIR可100%抑制脂肪, 脂肪肝的脂肪信号明显抑制表现为低信号并较同层肌肉信号低, 在定性评价脂肪肝方面具有一定价值, 但特异性和敏感性不高, 因为无明显客观对比参考指标, 信号减低的程度与病变的严重程度有关, 很难定性诊断轻度脂肪肝<sup>[9]</sup>.

邹强等<sup>[10]</sup>对兔脂肪肝模型的MRI SE序列双梯度回波T<sub>2</sub>WI及病理对照研究表明, 脂肪肝组的T<sub>2</sub>值与VP值存在具有显著性意义的线性正向相关关系. 李文政等<sup>[11]</sup>对脂肪肝动物模型的CT、MRI SE序列T<sub>1</sub>WI及病理对照研究表明, 脂

### ■研究前沿

如何解决MRI定量脂肪肝含量时明显依靠水脂肪分解方法的选择, 是亟待研究的问题.



## ■ 创新盘点

从分子影像的水平上研究MRI定量定性脂肪肝,使早期脂肪肝的诊断及脂肪肝的分级成为可能。

脂肪抑制前后肝脏信号强度衰减率与Vv值之间存在有意义的中度线性正相关关系,但该指标对轻中度脂肪肝不敏感,实际应用价值不大。Qa-yyum等<sup>[12]</sup>初步研究结果显示,对肝脏脂肪含量的测量,脂肪抑制成像比梯度回波成像更准确,尤其是对于有肝硬变背景的患者。所以, Rinella等<sup>[13]</sup>发现脂肪肝病理活检脂肪含量为15%左右时,梯度回波化学位移成像无法测得,他们提出应结合脂肪饱和法提高MRI诊断的准确性。

**2.3 Dixon法 相位敏感法** 由于水和脂肪质子有不同的去相位比值,一个自旋回波脉冲序列产生两幅不同相位的敏感图像:分别是IP图像与水和脂肪质子相位差180度的图像,两幅图像减影,可得到只有水或脂肪的图像。改进后Dixon(three-point Dixon)法克服了原来成像时间长、对磁场非均匀性敏感、易受呼吸运动伪影的影响等缺陷,且可用于低场强开放式磁共振系统,对关节软骨损伤的诊断非常有效。

### 3 化学位移同相位反相位序列对脂肪肝的研究

**3.1 化学位移双梯度回波** 使用正相和反相位成像快速评估在NAFLD中肝脏脂肪含量,他能客观快速和可靠地区别正常肝脏脂肪含量和增加的肝脏脂肪含量<sup>[14]</sup>。梯度回波化学位移MRI利用Dixon<sup>[15]</sup>的相位位移脂肪抑制的原理,同时运用梯度回波快速成像技术,达到水和脂肪质子信号相互叠加和抵消,从而获得水和脂肪的同相位和反相位图像。同相位图像的效果是水和脂肪信号之和,而反相位图像的效果则是二者信号之差,二者对比时,反相位序列显示有脂肪的组织信号强度减低。在反相位梯度回波成像条件下化学位移选择(chemical shift selective, CHESS)脂肪抑制脉冲准确提高脂肪肝信号强度,有助于抑制反相位中的一方,减少水和脂肪的干扰,脂肪肝反相的信号增加依靠脂肪含量和脂肪次亚基和水的纵向弛豫时间<sup>[16]</sup>。与脂肪饱和成像技术比较,梯度回波化学位移MRI技术更明显地显示了混有脂肪和水组织信号强度的减低,对脂肪肝内的脂肪含量检测非常敏感<sup>[17]</sup>。

化学位移MRI对于NAFLD患者的脂肪浸润提供客观数据而没有提供肝纤维化的信息<sup>[18]</sup>。反相位能准确定量脂肪肝含量<sup>[19]</sup>。化学位移和单回波T2\*加权成像能定量明显的肝脏脂肪变性(等级大于或等于)<sup>[20]</sup>。Rinella等<sup>[13]</sup>采用双梯度回波、化学位移梯度回波成像定量测定捐献者肝脏的脂肪含量及其脂肪变程度并与活检病理结果对照,发现MRI脂肪变指标与病理脂肪变分级

呈正相关;对脂肪含量>20%者,采用MRI可作出明确诊断;而对于脂肪含量<15%者, MRI则无法作出有效诊断。

**3.2 化学位移成像数字减影** 郭兴华等<sup>[21]</sup>对34例脂肪肝MRI资料,用化学位移成像的同相位图与反相位图进行减影,在减影图上测量并计算肝脾对比信号比(CNR),以此推断肝脏脂肪浸润,并将脂肪肝CT分度结果与这种减影法的CNR做Spearman相关分析,以观察CNR数值变化与脂肪肝严重程度的相关趋势,用化学位移成像数字减影图诊断脂肪肝敏感度、特异度较高,客观易行,且具有定量诊断的潜在能力。

**3.3 三维扰相双梯度回波** Fischer等<sup>[22]</sup>评估三维扰相双梯度回波的MRI序列,进行肝脏脂肪含量定性和定量分析。使用Pearson相关分析和t检验,评估脂肪信号分数和肝脏脂肪含量之间的关系,用病理学作为参考。比较病理总的肝脏脂肪含量,三维扰相双梯度回波MRI的脂肪信号分数主要反映了脂肪空泡,而区分健康的肝脏与脂肪肝,提高了肝脏脂肪变性分级。

**3.4 多回波梯度回波** 肝脏脂质的多回波和分光镜之间有明显相关性。在体外,水的T<sub>2</sub>弛豫时间比脂肪更长,多回波能定量脂肪和水的比率,脂肪和水的T<sub>2</sub>值。多回波成像是能同时定量脂肪和T<sub>2</sub>值的一种方法<sup>[23]</sup>。Yokoo等<sup>[24]</sup>低翻转角多回波梯度回波序列磁共振成像技术中的松弛校正及干扰校正脂肪定量为NAFLD提供了高的诊断率和脂肪分级精确度。

尽管任何一对的同相和反相回波都可以用来比较测定脂肪的含量,但一般使用第一对连续的反相和同相回波,因为这样可以减小T<sub>2</sub>信号衰减和相位误差的影响,提高检测的准确性。而且,若采用重T<sub>1</sub>WI(短重复时间或高脉冲角)序列,可以扩大相关脂肪信号,增强对少量脂肪检测的敏感性,如肾脏髓性脂肪瘤等<sup>[25]</sup>,但是对于包含在脂肪组织的小肿瘤,这种序列却很难检测出来。

目前临床多应用双回波化学位移成像技术,在1次重复时间(repetition time, TR)内采集数据,可同层显示IP和OP图像,缩短扫描时间,消除呼吸伪影,提高图像质量,有利于含脂小病灶的检出,另外,很多的临床研究也证实了梯度回波化学位移MRI对检测脂肪肝具有很高的敏感性,OP像上信号强度较IP像明显下降。

此外, Guiu等<sup>[26]</sup>提出以质子MRS作为标准,在活体内采用三回波化学位移梯度回波成像进

肝脂肪量, 在发现他和质子MRS具有很好的相关性和一致性的基础上, 认为三回波序列在纵向研究中可以替代质子MRS. 虽然其样本例数少, 也没有和组织学的发现相比较, 但是作为一种多回波化学位移量化脂肪的技术, 值得我们进一步探讨.

#### 4 肝脏特异性对比剂成像对脂肪肝的研究

将锰对称螯合而成, Mn与配体DPDP螯合后, 能减少毒性, 增强组织弛豫时间, 因而吸收Mn-DPDP的组织器官在T<sub>1</sub>WI上呈高信号. Mn-DPDP注入体内后, 其分布以腺体器官居多(如肝、胰)等. 脂肪肝Mn-DPDP研究方面: 范明霞等<sup>[27]</sup>对CCl<sub>4</sub>脂肪肝纤维化模型的FMPSPGR和SET<sub>1</sub>WI序列病理对照研究表明, 大鼠脂肪肝注射Mn-DPDP后采用FMPSPGR序列和SET<sub>1</sub>WI序列进行不同时间点MRI检查, 可以反映肝脏功能变化信息, 但对脂肪肝程度分期尚有一定难度.

超顺磁性氧化铁(supparamagnetic iron oxides, SPIO)粒子的磁矩和磁化率均远大于人体组织及顺磁性螯合物, 因此称之为磁化率对比剂, 他使磁场不均匀, 加速质子去相位过程, 从而缩短了组织的T<sub>1</sub>和T<sub>2</sub>值, 对T<sub>2</sub>值的缩短更为明显, 主要产生T<sub>2</sub>弛豫增强, 因此又称T<sub>2</sub>负向强化. 正常肝、淋巴结等内和某些良性病变含吞噬细胞(Kupffer细胞)和/或内皮细胞, 这些细胞吞噬SPIO后, 使局部磁场不均匀, 产生T<sub>2</sub>弛豫增强. 不含吞噬细胞或吞噬细胞功能不良的病变组织, 不受SPIO的影响, 维持原有的信号, 这样在T<sub>2</sub>WI上增强了病灶与背景组织的对比. 局灶性脂肪肝SPIO研究表明: 脂肪肝病变组织摄取SPIO明显高于正常肝组织. SPIO增强后, 脂肪肝病变组织不同程度摄取SPIO, 表现为SPIO增强后T<sub>2</sub>WI序列肝信号强度减低, 减低的程度明显高于正常肝实质. Tomita等<sup>[28]</sup>使用SPIO增强MRI, 无创性评估NAFLD, 使用梯度回波平面成像, 以及%T<sub>2</sub>值, 计算T值, 时间常数作为指数值, 使用T<sub>2</sub>加权快速自旋回波成像, 计算SPIO标记的T<sub>2</sub>弛豫值. NAFLD的活动分数和T值之间有显著统计正相关. T<sub>2</sub>值与脂肪肝活动分数有显著负相关, 结论: NAFLD患者怀疑有非酒精性脂肪肝炎, 无创性的超顺磁性氧化铁增强MRI可能有用.

Gd-EOB-DTPA(gadolinium-ethoxybenzyl-diethylenetriamine pentaacetic acid)增强MRI是一种有用的方法, 在Gd-EOB-DTPA增强MRI中通过增加信号强度时间, 尤其有助于对非酒精性

脂肪肝炎的肝纤维化的分级<sup>[29]</sup>.

#### 6 脂肪肝MRS的定性定量研究

目前, 随着磁共振软、硬件的不断成熟, 磁共振技术的发展已经进入到磁共振分子影像的阶段. 磁共振分子影像是利用磁共振成像的方法研究活体条件下生物细胞内在正常或病理状态下的分子过程的无创技术, MRS作为一种新的磁共振分子影像技术, 近年来正逐步应用于肝脏疾病的研究, 如定量分析脂肪肝的脂肪含量及其脂质组成. MRS是一种定性定量脂肪肝的方法<sup>[30,31]</sup>.

6.1 MRS研究脂肪肝的原理 具有核磁共振现象的原子核, 当接受一个90度射频脉冲时, 使他们从Z轴自旋到X轴上, 停止射频脉冲后, 自旋核便以运动方式回到他们原来的Z轴位置, 称为弛豫, 接受线圈在弛豫时间内能接受到一种随时间变化而呈指数衰减的信号. 自由感应衰减信号(free induction decay, FID)经过傅里叶转换产生了按频率分布的函数图, 即MRS. 在MRS上, 不同共振峰面积的比值可代表各类核的相对数目, 他既与产生波峰的物质浓度成正比, 也与化合物的结构有关, 这是利用原子核的MRS对相应化合物做结构推断和定量分析的基础; 由化学位移造成的共振峰数目和位置的不同, 体现了化合物中同种原子核所处的化学环境不同及化合物结构上的差别, 据此可检测化合物的结构, 对不同的化合物进行区分<sup>[32]</sup>. 目前可以用在医学领域MRS研究的原子核有<sup>31</sup>P、<sup>1</sup>H、<sup>23</sup>Na、<sup>13</sup>C、<sup>19</sup>F、<sup>7</sup>Li等, 由于氢质子较其他原子在有机物结构中具有高自然丰度和核磁感性, 故氢质子最多应用于MRS研究中. 目前, 用于脂肪肝定性及定量的主要为<sup>1</sup>H-MRS<sup>[33]</sup>.

<sup>1</sup>H-MRS可用来检测脂质(lipid, lip)、胆碱(choline, Cho)、谷氨酰胺及谷氨酸复合物(glutamate/glutamine, Glx)等多种含氢化合物的代谢变化, 可以在分子水平上对肝脏的脂质代谢变化进行定量分析, 因此常用于脂肪肝的研究. 脂肪肝<sup>1</sup>H-MRS成像, 主要采集的是水峰、脂质峰以及其他少量化合物杂峰, 通过软件校正和图像函数滤过, 在特定化学位移点上得到水峰和脂质峰, 因为水峰相对稳定, 测得水峰和脂质峰下面积的相对比值, 即可得到脂质含量的量化值. 国内外研究均表明<sup>1</sup>H-MRS可以定量分析肝内脂质含量, 脂肪肝的<sup>1</sup>H-MRS主要表现为三酰甘油含量的增加, 且不同程度脂肪变性的肝脏<sup>1</sup>H-MRS表现与组织病理学分级高度相关, 这表

#### ■应用要点

随着MRI/MRS装置改进、软件开发及临床研究的深入, 其在脂肪肝中的应用将发挥越来越重要的作用.

## ■名词解释

磁共振分子影像: 是利用磁共振成像的方法研究活体条件下生物细胞内在正常或病理状态下的分子过程的无创技术。

明<sup>1</sup>H-MRS还可以对肝脂肪变性的严重程度进行量化分级<sup>[34]</sup>。

白亮彩等<sup>[35]</sup>初步提示MRS是很好的脂肪肝分级方法, 但若应用于临床实践, 还需进行大量病例的MRS和病理组织脂肪含量的对照研究。孙希杰等<sup>[36]</sup>在利用磁共振弥散成像所获得的表面弥散系数(apparent diffusion coefficient, ADC)值对127例肝脏病变进行量化研究过程中, 得到脂肪肝ADC值的均值是 $(1\ 137 \pm 132) \times 10^3 \text{ mm}^2/\text{s}$ , 经统计学分析肝硬化等肝脏疾病与脂肪肝ADC值之间存在显著性差异( $P < 0.05$ ), 由此, 为MRI对肝脏疾病的诊断和鉴别诊断, 尤其在不典型脂肪肝和/或合并肝脏肿瘤方面, 能够得出更准确的结论开辟了新思路。

在脂肪性肝病中非侵入性的早期定性脂肪性肝炎MRS有潜在的重要价值<sup>[37]</sup>。MRS是一种检测肝硬化的新方法, 但不能检测NAFLD, 在脂肪变性和纤维化方面仍然处于进一步研究当中<sup>[38]</sup>。

**6.2 MRS的研究进展** 随着MRS技术的发展, 运用MRS来研究肝脏病变的代谢变化也有了一定进展。Szczepaniak等<sup>[39]</sup>发现人体脂肪肝细胞内TG亚甲基化学位移为1.4 ppm, 肌肉筋膜间隙脂肪组织内TG亚甲基化学位移为1.6 ppm, 就可以利用TG亚甲基不同化学位移的特点来区别TG蓄积的不同细胞来源。<sup>31</sup>P-MRS, 他能测定各种磷酸盐代谢物如磷酸单脂、无机磷、磷酸二脂、磷酸肌酸、三磷酸腺苷, 从而反映肝脏病变的能量和磷酸盐代谢。多数学者的研究都认为活体<sup>31</sup>P-MRS检测到弥漫性肝脏病变的代谢物浓度变化与细胞磷脂代谢异常和细胞内质网减少是一致的。

## 7 几种MRI检查方法的优缺点

**7.1 化学位移成像** 使用化学位移成像进行脂肪变的检测和量化。多项研究已证实双回波化学位移成像所测得的肝脏脂肪成分同组织学所测得的结果之间高度相关。然而这项技术的准确性会受肝脏铁质的影响( $T_2$ 的效应显著)<sup>[8]</sup>, 所以在肝铁含量升高的患者中检测和量化时有必要校正 $T_2$ 的效应, 或结合脂肪抑制成像使用。

**7.2 脂肪抑制成像** 频率选择脂肪抑制成像在以脂肪为主的病灶中进行检测会更加有效(如肾血管肌脂瘤和脂肪瘤)。但有时抑制不完全, 特别是在小的病灶中。加之脂肪饱和与非脂肪饱和的图像并没有常规的在相同的成像参数下获得,

故不推荐这项技术在水脂分离中使用。但是在短 $T_2$ 的环境下, SPIR序列理论上比化学位移成像合适。

**7.3 MRS成像** MRS目前尚不宜用于常规的肝脏脂肪的检测。因为匀场可能增加相当多的检查时间。在大多数情形下, 化学位移成像已能提供很好的检测。尽管有文献称MRS检测的准确性高, 但由于技术还很不成熟, 故暂不推荐这项技术作为常规的脂肪量化方法。假如使用MRS, 笔者推荐使用一个相对长的重复时间(如 $\geq 3 \text{ s}$ ), 使 $T_1$ 效应最小化; 并用多回波的方法检测和校正 $T_2$ 效应的衰减。MRS使用回波不对称反复分解和最小二乘估计正确定量肝脏脂肪含量, 更适合定量小器官的脂肪含量, 如胰腺<sup>[40]</sup>。

我们的研究证明MRI测量脂肪肝分数明显依靠水脂肪分解方法的选择, 这种变异性限制了MRI方法的临床应用, 特别是早期脂肪肝。因此, 脂肪含量需要建立特别的标准。

## 8 结论

3种方法各有一定的优势和局限性, 可根据临床实际情况选用合适的成像方法, 使用这3种方法测量肝内脂肪和评估脂肪变性, 最终依靠的是预期的使用和可获得的资源<sup>[41]</sup>。虽然目前尚未制定明确的磁共振脂肪肝严重度量化标准, MRS也没有化学位移成像和脂肪抑制成像应用广泛, 但随着磁共振软硬件设备的不断发展, 尤其是肝脏MRS研究的日益深入, 其临床应用价值必将进一步提高。但目前仍有不少问题有待解决, 如易受呼吸运动伪影干扰, 数据后处理较为复杂, 随着MRI/MRS装置改进、软件开发及临床研究的深入, 检测和处理时间将会缩短。我们相信随着脂肪肝动物实验及大宗临床病例MRS的深入研究, MRI将在脂肪肝人群筛查、预后和疗效评价、肝移植供肝质量评价等方面发挥重要的临床应用价值。

## 9 参考文献

- 1 Van Beers B. [Magnetic resonance imaging for quantifying hepatic steatosis and hepatic fibrosis] *Bull Mem Acad R Med Belg* 2009; 164: 44-50; discussion 51-52
- 2 Hatta T, Fujinaga Y, Kadoya M, Ueda H, Murayama H, Kurozumi M, Ueda K, Komatsu M, Nagaya T, Joshita S, Kodama R, Tanaka E, Uehara T, Sano K, Tanaka N. Accurate and simple method for quantification of hepatic fat content using magnetic resonance imaging: a prospective study in biopsy-proven nonalcoholic fatty liver disease. *J Gastroen-*

- terol 2010; 45: 1263-1271
- 3 徐小平, 龙建新, 陶学伟, 熊江琴, 刘雄飞, 魏竣. 脂肪肝的影像学研究现状及进展. 实用中西医结合临床 2006; 6: 90-92
- 4 刘于宝, 梁长虹. MRI定性定量研究脂肪肝的进展. 临床放射学杂志 2006; 25: 975-978
- 5 Stefan N, Kantartzis K, Machann J, Schick F, Thamer C, Rittig K, Balletshofer B, Machicao F, Fritsche A, Häring HU. Identification and characterization of metabolically benign obesity in humans. *Arch Intern Med* 2008; 168: 1609-1616
- 6 Asanuma T, Ono M, Kubota K, Hirose A, Hayashi Y, Saibara T, Inanami O, Ogawa Y, Enzan H, Onishi S, Kuwabara M, Oben JA. Super paramagnetic iron oxide MRI shows defective Kupffer cell uptake function in non-alcoholic fatty liver disease. *Gut* 2010; 59: 258-266
- 7 丁晓颖, 彭永德. 脂肪细胞因子和非酒精性脂肪性肝病. 国际内科学杂志 2008; 35: 96-99
- 8 Cassidy FH, Yokoo T, Aganovic L, Hanna RF, Bydder M, Middleton MS, Hamilton G, Chavez AD, Schwimmer JB, Sirlin CB. Fatty liver disease: MR imaging techniques for the detection and quantification of liver steatosis. *Radiographics* 2009; 29: 231-260
- 9 幸东, 崔幸力, 李政良. MRI诊断脂肪肝20例. 第四军医大学学报 2005; 26: 1329
- 10 邹强, 孙西河, 王滨, 谢海柱. 脂肪肝MR定量诊断的实验研究. 中国临床医学影像杂志 2001; 12: 180-183
- 11 李文政, 彭光春, 汤恢煊, 刘凡, 雷光武, 周建华, 付春燕. 脂肪肝CT、MRI定量诊断的对照实验研究. 医学影像学杂志 2005; 15: 294-297
- 12 Qayyum A, Goh JS, Kakar S, Yeh BM, Merriman RB, Coakley FV. Accuracy of liver fat quantification at MR imaging: comparison of out-of-phase gradient-echo and fat-saturated fast spin-echo techniques--initial experience. *Radiology* 2005; 237: 507-511
- 13 Rinella ME, McCarthy R, Thakrar K, Finn JP, Rao SM, Koffron AJ, Abecassis M, Blei AT. Dual-echo, chemical shift gradient-echo magnetic resonance imaging to quantify hepatic steatosis: Implications for living liver donation. *Liver Transpl* 2003; 9: 851-856
- 14 Borra RJ, Salo S, Dean K, Lautamäki R, Nuutila P, Komu M, Parkkola R. Nonalcoholic fatty liver disease: rapid evaluation of liver fat content with in-phase and out-of-phase MR imaging. *Radiology* 2009; 250: 130-136
- 15 Dixon WT. Simple proton spectroscopic imaging. *Radiology* 1984; 153: 189-194
- 16 Mulkern RV, Salsberg SL, Krauel MR, Ludwig DS, Voss S. A paradoxical signal intensity increase in fatty livers using opposed-phase gradient echo imaging with fat-suppression pulses. *Pediatr Radiol* 2008; 38: 1099-1104
- 17 杨春敏, 黄之杰, 黄海东, 顾明, 胡朝芬. 梯度回波化学位移MRI诊断脂肪肝的价值. 西南国防医药 2007; 17: 59-61
- 18 Kalra N, Duseja A, Das A, Dhiman RK, Virmani V, Chawla Y, Singh P, Khandelwal N. Chemical shift magnetic resonance imaging is helpful in detecting hepatic steatosis but not fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Ann Hepatol* 2009; 8: 21-25
- 19 Lee SS, Park SH, Kim HJ, Kim SY, Kim MY, Kim DY, Suh DJ, Kim KM, Bae MH, Lee JY, Lee SG, Yu ES. Non-invasive assessment of hepatic steatosis: prospective comparison of the accuracy of imaging examinations. *J Hepatol* 2010; 52: 579-585
- 20 Lim RP, Tuvia K, Hajdu CH, Losada M, Gupta R, Parikh T, Babb JS, Taouli B. Quantification of hepatic iron deposition in patients with liver disease: comparison of chemical shift imaging with single-echo T2\*-weighted imaging. *AJR Am J Roentgenol* 2010; 194: 1288-1295
- 21 郭兴华, 刘启旺, 王娟萍, 张崇杰, 郑国芳, 樊瑞强, 朱素梅. 化学位移成像数字减影图诊断肝脂肪变性的价值. 中华放射学杂志 2006; 40: 1178-1180
- 22 Fischer MA, Nanz D, Reiner CS, Montani M, Breitenstein S, Leschka S, Alkadhi H, Stolzmann P, Marincek B, Scheffell H. Diagnostic performance and accuracy of 3-D spoiled gradient-dual-echo MRI with water- and fat-signal separation in liver-fat quantification: comparison to liver biopsy. *Invest Radiol* 2010; 45: 465-470
- 23 O'Regan DP, Callaghan MF, Wylezinska-Arridge M, Fitzpatrick J, Naoumova RP, Hajnal JV, Schmitz SA. Liver fat content and T2\*: simultaneous measurement by using breath-hold multiecho MR imaging at 3.0 T--feasibility. *Radiology* 2008; 247: 550-557
- 24 Yokoo T, Bydder M, Hamilton G, Middleton MS, Gamst AC, Wolfson T, Hassanein T, Patton HM, Lavine JE, Schwimmer JB, Sirlin CB. Nonalcoholic fatty liver disease: diagnostic and fat-grading accuracy of low-flip-angle multiecho gradient-recalled-echo MR imaging at 1.5 T. *Radiology* 2009; 251: 67-76
- 25 Guiu B, Loffroy R, Cercueil JP, Krause D. Multiecho MR imaging and proton MR spectroscopy for liver fat quantification. *Radiology* 2008; 249: 1081
- 26 Guiu B, Petit JM, Loffroy R, Ben Salem D, Aho S, Masson D, Hillon P, Krause D, Cercueil JP. Quantification of liver fat content: comparison of triple-echo chemical shift gradient-echo imaging and in vivo proton MR spectroscopy. *Radiology* 2009; 250: 95-102
- 27 范明霞, 周康荣, 沈继章, 陈材忠. 大鼠CCL4模型诱发的脂肪肝Mn-DPDP磁共振研究. 放射学实践 2004; 19: 860-863
- 28 Tomita K, Tanimoto A, Irie R, Kikuchi M, Yokoyama H, Teratani T, Suzuki T, Taguchi T, Noguchi M, Ohkura T, Hibi T. Evaluating the severity of non-alcoholic steatohepatitis with superparamagnetic iron oxide-enhanced magnetic resonance imaging. *J Magn Reson Imaging* 2008; 28: 1444-1450
- 29 Tsuda N, Okada M, Murakami T. New proposal for the staging of nonalcoholic steatohepatitis: evaluation of liver fibrosis on Gd-EOB-DTPA-enhanced MRI. *Eur J Radiol* 2010; 73: 137-142
- 30 Friedrich-Rust M, Müller C, Winckler A, Kriener S, Herrmann E, Holtmeier J, Poynard T, Vogl TJ, Zeuzem S, Hammerstingl R, Sarrazin C. Assessment of liver fibrosis and steatosis in PBC with FibroScan, MRI, MR-spectroscopy, and serum markers. *J Clin Gastroenterol* 2010; 44: 58-65
- 31 Cowin GJ, Jonsson JR, Bauer JD, Ash S, Ali A, Osland EJ, Purdie DM, Clouston AD, Powell EE, Galloway GJ. Magnetic resonance imaging and spectroscopy for monitoring liver steatosis. *J Magn Reson Imaging* 2008; 28: 937-945
- 32 秦慧娟, 赵卫东. 磁共振波谱分析在肝脏疾病中的应用进展. 山西医药杂志•上半月 2008; 37: 632-634
- 33 Zhong L, Chen JJ, Chen J, Li L, Lin ZQ, Wang WJ, Xu JR. Nonalcoholic fatty liver disease: quantitative assessment of liver fat content by computed tomography, magnetic resonance imaging and proton

# 同行评价

本文可读性较好, 具有一定的学术价值.



- magnetic resonance spectroscopy. *J Dig Dis* 2009; 10: 315-320
- 34 王艳芝, 宋震亚. 肝脏疾病磁共振波谱研究进展. 国际消化病杂志 2009; 29: 42-44
- 35 白亮彩, 郭顺林, 周怀琪, 雷军强, 寥郁, 张毅. <sup>1</sup>H MRS 在定量分析脂肪肝中的初步研究. 中国医学影像技术 2006; 22: 529-531
- 36 孙希杰, 全显跃, 梁文, 温志波, 曾盛, 黄凡恒, 唐明. 肝脏病变的磁共振扩散成像的量化研究初探. 实用放射学杂志 2003; 19: 596-598
- 37 Ehman RL. Science to practice: can MR elastography be used to detect early steatohepatitis in fatty liver disease? *Radiology* 2009; 253: 1-3
- 38 Roldan-Valadez E, Favila R, Martínez-López M, Uribe M, Méndez-Sánchez N. Imaging techniques for assessing hepatic fat content in nonalcoholic fatty liver disease. *Ann Hepatol* 2008; 7: 212-220
- 39 Szczepaniak LS, Babcock EE, Schick F, Dobbins RL, Garg A, Burns DK, McGarry JD, Stein DT. Measurement of intracellular triglyceride stores by <sup>1</sup>H spectroscopy: validation in vivo. *Am J Physiol* 1999; 276: E977-E989
- 40 Kim H, Taksali SE, Dufour S, Befroy D, Goodman TR, Petersen KF, Shulman GI, Caprio S, Constable RT. Comparative MR study of hepatic fat quantification using single-voxel proton spectroscopy, two-point dixon and three-point IDEAL. *Magn Reson Med* 2008; 59: 521-527
- 41 Fabbrini E, Conte C, Magkos F. Methods for assessing intrahepatic fat content and steatosis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2009; 12: 474-481

编辑 李军亮 电编 李薇

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

## • 消息 •

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

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

# 干细胞与肝癌相关性的研究进展

许蜜蝶, 李维卿, 余宏宇

许蜜蝶, 李维卿, 余宏宇, 中国人民解放军第二军医大学长征医院病理科 上海市 200003  
国家自然科学基金资助项目, No. 30570836  
作者贡献分布: 本文文献查阅由许蜜蝶与李维卿完成; 写作由许蜜蝶完成; 论文审校由余宏宇完成.  
通讯作者: 余宏宇, 教授, 主任医师, 200003, 上海市黄浦区凤阳路415号, 中国人民解放军第二军医大学附属长征医院病理科. yuhongyu795@gmail.com  
电话: 021-81886122  
收稿日期: 2010-10-10 修回日期: 2010-11-10  
接受日期: 2010-11-17 在线出版日期: 2010-12-28

## Stem cells and hepatocellular carcinoma

Mi-Die Xu, Wei-Qing Li, Hong-Yu Yu

Mi-Die Xu, Wei-Qing Li, Hong-Yu Yu, Department of Pathology, Shanghai Changzheng Hospital, the Second Military Medical University, Shanghai 200003, China  
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30570836  
Correspondence to: Professor Hong-Yu Yu, Department of Pathology, Shanghai Changzheng Hospital, the Second Military Medical University, 415 Fengyang Road, Huangpu District, Shanghai 200003, China. yuhongyu795@gmail.com  
Received: 2010-10-10 Revised: 2010-11-10  
Accepted: 2010-11-17 Published online: 2010-12-28

## Abstract

Stem cells are a class of special embryonic or adult cells that are able to self-renew and undergo multi-directional differentiation. Studies have shown that stem cells have selective tropism toward tumor tissue. Previous studies have shown that hepatic stem cells play an important role in hepatocarcinogenesis by participating in regulation of cell growth and differentiation. However, some other studies demonstrated that stem cells could inhibit cell growth in hepatocellular carcinoma. Elucidation of relationship between stem cells and hepatocellular carcinoma could provide new clues to the pathogenesis of hepatocellular carcinoma and help develop new therapeutic strategies for the disease.

**Key Words:** Stem cell; Hepatocellular carcinoma; Tumor tropism; Promotion; Inhibition

Xu MD, Li WQ, Yu HY. Stem cells and hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(36):

3881-3885

## 摘要

干细胞是存在于胚胎和成体中的一类具有自我更新能力和多向分化潜能的特殊细胞. 有研究显示, 干细胞对肿瘤组织具有较为特异的趋向性. 干细胞与肝癌之间关系错综复杂, 直接影响着肝癌发生及转归. 既往研究表明, 干细胞可参与肝癌细胞生长分化调控, 是原发性肝癌发生的关键因素. 近年来, 亦有研究证实干细胞可能对肝癌细胞的生长具有抑制作用. 阐明干细胞在肝癌发生转归中的具体作用, 可为揭示肝癌的发病机制及制定新型治疗策略提供新线索.

**关键词:** 干细胞; 肝癌; 肿瘤趋向性; 促进; 抑制

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(36): 3881-3885  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/3881.asp>

## 0 引言

干细胞具有自我更新、多向分化、无限增殖潜能三大特征. 存在于或可定向迁移至肝脏内发挥作用的干细胞有: 卵圆细胞、小肝细胞等内源性肝干细胞和间充质干细胞等骨髓源性干细胞和胰腺上皮细胞等外源性肝干细胞. 大部分肝干细胞具有向肝细胞和胆管细胞双向分化的能力. 干细胞对肝癌原发及转移灶具有靶向性, 一些干细胞经基因修饰可在肿瘤局部稳定表达治疗因子而保持自身干细胞特性不变, 利用此特性可将其作为细胞载体参与肿瘤生物靶向治疗; 同时, 一些干细胞到达肝癌后, 作为该环境组分还参与肝癌组织的构建和调控新生血管的形成, 从而对肝癌生长产生促进或抑制效应. 本文就相关研究作一综述.

## 1 干细胞的肿瘤趋向性

将绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, EGFP)标记的可持续表达c-Kit抗体的肝卵圆样细胞WB-F344通过尾静脉注射入患有CBRH7919大

## ■背景资料

干细胞与肝癌之间的关系错综复杂, 他既是肝癌发生的关键因素又可对肝癌产生抑制作用, 其对肝癌发生转归的影响可能是多因素的.

## ■同行评议者

单云峰, 副主任医师, 温州医学院附属第一医院肝胆外科

## ■ 研发前沿

干细胞因其不可替代的多种优势而被认为是最具肿瘤治疗潜力的细胞。而干细胞对肝癌的促瘤之外尚存抑瘤作用。这一发现成为肝癌治疗又一新突破点。但其作用机制尚不完全清楚,需深入研究和探讨。

鼠肝癌细胞原位种植肝癌的Wistar大鼠体内,在不同的时间点取大鼠肝、肾、脾和肺组织荧光显微镜下观察其在大鼠体内的分布情况。与对照组和其他脏器相比发现,干预4 d后即可观察到大量这种c-Kit<sup>+</sup>WB-EGFP细胞位于正常肝组织与肿瘤的交界位置,而在肿瘤内部只有少许WB-EGFP细胞。8 d后,在肿瘤中心地带观察到大量这种WB-EGFP细胞侵袭<sup>[1]</sup>。这说明肝卵圆细胞对可向肝内特异性定向迁移、靶向性地集中在肿瘤病灶周围,具追踪肿瘤细胞特性。但肝干细胞的这种肿瘤趋向性并不代表其本身具有自然的恶变倾向,作为唯一有机会获得致癌过程必须的基因突变的一种自我更新群体,肝干细胞可经过一系列包括HBV/HCV的感染等特定病理因素或环境刺激下,经多种癌变途径,成为肿瘤组织中占支配地位的细胞群体<sup>[2]</sup>。这种定向迁移能力是一种癌变还是聚集后介导免疫反应等发挥抑瘤作用尚待证实。

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSC)是存在于骨髓微环境中的具有多分化潜能的干细胞,正常情况下的MSC可向体内多种组织器官定向移动,但主要存在于骨髓内。生长中的肿瘤可分泌多种细胞因子,如表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)、IL-8、IL-6、肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)、基质金属蛋白酶-1(matrix metalloproteinase-1, MMP-1)等, MSC可通过表面相应受体与这些细胞因子作用向肿瘤靶向性迁移而不影响自身干细胞特性<sup>[3,4]</sup>。不过MSC在对肿瘤原发和继发灶靶向迁移的同时,亦可向脾、肺、肾等无瘤荷器官迁移。

## 2 干细胞在肝癌中角色

肝癌的发生发展及侵袭转移是建立在肝癌细胞与周围微环境及机体内环境之间的相互作用之上的复杂过程。干细胞微环境改变与肿瘤发生机制、肿瘤分期及肿瘤预后密切相关。针对干细胞与肝癌的发生发展及预后的具体相关性研究有助于阐明干细胞在肝癌中所扮演的具体角色。

**2.1 肝干细胞的致癌作用** 既往对肝脏组织不典型增生结节癌变机制的研究表明肝癌起源于成熟肝细胞的去分化<sup>[5]</sup>。然而近年来,随着对卵圆细胞等肝干细胞的研究的深入及肝癌干细胞这一概念的提出,有学者开始倾向于认为肝癌细胞是肝干细胞成熟终止的产物,随后实验证实,

肝癌是一种干细胞疾病,肝癌可由多种不同阶段的肝干细胞分化而来<sup>[6]</sup>。

卵圆细胞在肝内可转化为肝癌细胞<sup>[7-10]</sup>,且为原发性肝癌发生的关键因素:(1)向卵圆细胞转染致癌基因或将细胞内抑癌基因敲除可导致肝癌的发生<sup>[11,12]</sup>;(2)卵圆细胞瘤变过程中可检测到c-myc原癌基因的过表达,而Myc蛋白失活的卵圆细胞则可分化成为肝细胞或胆管细胞<sup>[13,14]</sup>。参与细胞生长分化调控的Wnt、SHH、Notch等信号传导途径亦参与肿瘤细胞的生长调控,这些调节机制异常可能是肿瘤发生的重要原因<sup>[15]</sup>。

由于在肝卵圆细胞中表达的c-Kit、CD34和Thy-1等分子标记亦可在骨髓干细胞中表达<sup>[16-21]</sup>,故有学者提出卵圆细胞由骨髓干细胞分化而来,且当成熟干细胞的增殖受阻时这种分化作用更趋明显<sup>[22-26]</sup>,持续、严重的肝损伤释放某种信号分子,诱使骨髓干细胞移行至肝脏,肝内局部微环境刺激其向卵圆细胞方向分化,进而分化为肝细胞或胆管上皮细胞,以修复损伤肝脏,参与组织构建<sup>[27]</sup>。由此可否推断肝癌可由骨髓干细胞转分化而来?有研究表明MSC癌变为肝癌的可能性很小<sup>[28]</sup>,Wu等<sup>[29]</sup>则提出低分化肝癌起源于骨髓干细胞和卵圆细胞,而分化良好肝癌源于成熟的肝细胞。

但目前尚未成功分离任何肝癌干细胞,也无明确的肝癌干细胞分子标志物提出,因此,肝癌的细胞起源仍需要更为深入的研究。

肝切除治疗后肝癌复发患者体内包括CK-19、ABCG2、CD133、Nestin、CD44、VEGF和PD-ECGF等在内的许多肝干细胞或肿瘤血管发生相关分子标志物过表达,并且对患者的生存率和存活率有统计学相关意义,其中肝癌组织中VEGF和MVD高表达的患者的生存率和无复发率明显要低于低表达患者。说明肝干细胞分子标志物的高表达与肝癌血管发生和肝癌的预后不良显著相关<sup>[30]</sup>,利用这一现象可有利于将肝癌患者按切除术后复发风险进行分类,进而帮助临床选择治疗方案。

**2.2 肝干细胞的抑瘤作用** 将CBRH-7919大鼠肝癌细胞与WB-F344肝卵圆样干细胞按照不同比例共培养,随着培养基中WB-F344肝卵圆样干细胞的增多,CBRH-7919大鼠肝癌细胞凋亡率明显升高。同时在肝癌细胞内可检测到TGF- $\beta$ /Smad信号通路及其通路成员Smad4和TGF- $\beta$  II上调,提示肝卵圆细胞可通过上调肝癌细胞内TGF- $\beta$ /Smad信号通路从而促进肝癌细胞的凋亡<sup>[31]</sup>。

Qiao等<sup>[32]</sup>应用胎儿真皮来源的Z3 MSC和胎儿骨髓来源的BMMS-03 MSC的条件培养液分别作用于肝癌H7402/HepG2细胞, 结果显示肝癌细胞的增殖受到明显抑制. Wnt信号转导途径是调节细胞自我更新和分化并可决定细胞的分化发展命运的重要通路, 对肿瘤细胞在MSC条件培养液作用后Wnt/ $\beta$ -catenin信号转导途径进行观察发现, 在应用MSC条件培养液作用后H7402和HepG2细胞中 $\beta$ -catenin和其下游靶蛋白如c-myc、survivin、PCNA和Bcl-2的表达水平发生明显下调; H7402细胞胞质和胞核内 $\beta$ -catenin的含量明显减少, 说明MSC可能通过抑制肿瘤细胞Wnt/ $\beta$ -catenin信号转导途径从而抑制肿瘤细胞恶性表型, 削弱其增殖能力. NF- $\kappa$ B是重要的转录调控因子, 他与肿瘤的发生发展、浸润转移以及耐药性有密切的关系. 其异常表达可影响肿瘤细胞的增殖、分化、细胞周期和凋亡. 对于干预后H7402肝癌细胞进行基因芯片检测发现, 肝癌细胞中NF- $\kappa$ B的表达受到明显抑制<sup>[33]</sup>.

值得一提的是MSC亦可通过抑制Wnt通路对乳腺癌细胞发挥抑瘤作用<sup>[34]</sup>, 相对的也有实验表明MSC可促进一些肿瘤的增殖<sup>[35]</sup>. 此外, 应用共培养系统将具高肺转移潜能的MHCC97-H肝癌细胞与MSC共培养并建立荷瘤小鼠进行体外观察, 其结果显示MSC可促进肝癌细胞的增殖, 同时也可抑制癌灶的侵袭和转移, 该作用可能与MSC TGF- $\beta$ 1表达下调具一定联系<sup>[36]</sup>. 干细胞对肿瘤细胞的作用可能与干细胞数量及所处肿瘤微环境相关, 两种显著差异的原因有待于进一步探查. 目前对于MSC抑瘤效率尚无量化标准, 其可能导致的不良反应也无明确评价.

上述研究表明干细胞具有抑制肝癌细胞增殖的作用, 且此作用为一个多基因多因子参与的过程. 虽然在各研究中使用的细胞起源不同, 干细胞和肿瘤细胞调节自我更新、分化和凋亡的信号通路却相似, 如Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路参与调节干细胞和祖细胞的扩增<sup>[15,37-39]</sup>, 诱导哺乳动物祖细胞转化<sup>[40,41]</sup>, Notch BMP信号通路在干细胞自我更新和分化中扮演重要角色<sup>[15,37,42]</sup>; 以及TGF- $\kappa$ /Smad通路参与胚胎肝细胞扩增和肿瘤细胞形成<sup>[43-45]</sup>. 这些通路可能决定了肿瘤细胞的分化能力和发展方向, 也随之决定肿瘤细胞的恶性程度, 但相对于不同细胞的调控机制尚待进一步研究.

### 3 干细胞应用于肝癌治疗前景

目前治疗肝癌最有效的方法是肿瘤切除和原位

肝移植, 但术后高复发率和肝源的缺乏严重制约了患者的治愈率. 近年来对肝干细胞的研究提供了诸如利用干细胞的体内定向分化增殖能力在癌灶切除术前或术后向患者体内注射干细胞以提高远期存活率<sup>[46]</sup>等新型的治疗方式.

因MSC不表达MHC-II类抗原等, 免疫原性低, 而肝干细胞不仅可以通过患者自体血液收集, 且不具有抗原性, 不会引起免疫抑制, 因此有学者设想将MSC和肝干细胞作为理想的载体携带治疗基因靶向治疗肝癌. 这一途径可以解决基因治疗中目的基因的高效转移、表达高度组织特异性和精确表达调控等问题, 有望达到“载体携带足够的效应剂到达肿瘤部位并持续发挥作用而对正常组织无不良反应”的理想治疗目标<sup>[47]</sup>. 例如, HGF为多种组织细胞内分裂素, 若使用肝干细胞为载体靶向导入受损肝脏, HGF可望在损伤的肝脏中大量聚集, 从而修复受损组织细胞. 向二甲基亚硝胺诱导的肝硬化大鼠模型骨骼肌转染HGF, 将构建载有HGF的肝干细胞对病肝进行干预, 结果表明硬变的肝脏中很多病理标志物的明显减少<sup>[48,49]</sup>, 绝大多数肝癌由硬变肝中肝癌再生发展而来, 临床肝硬变缓解率的提高有助于降低肝癌发病率. Chen等<sup>[50]</sup>将编码IL-12的腺病毒或逆转录病毒载体MSC后予小鼠行腹腔注射, 1 wk后皮下注射肝癌细胞, 结果肿瘤细胞的生长明显受抑, 这证实IL-12-MSC可有效作用于临床前期肿瘤, 抑制肿瘤再发和复发.

如前文所述, 干细胞不仅可以靶向性地集中在肿瘤病灶的周围, 对肿瘤细胞进行直接杀伤; 而且可能在分子(基因)水平上恢复致癌基因与抑癌基因的平衡状态, 有效地防止肿瘤的侵袭和转移. 此外, 有研究表明MSC还可通过旁分泌VEGF、HGF及IGF-1等细胞因子并上调Bcl-2蛋白表达修复肿瘤术后放化疗对正常组织造成的损伤, 重建造血的功能, 恢复机体的免疫监视和抗肿瘤能力<sup>[51]</sup>. 但干细胞增殖过程中也容易受外来因素的影响, 引起肿瘤的发生. 若将干细胞在肝癌微环境中发挥促瘤作用还是抑瘤作用的先决条件阐明并善加利用, 干细胞治疗将不仅仅是针对肝脏慢性疾病的治疗方法<sup>[52]</sup>, 更将发展作为临床治疗肝癌的重要途径.

### 4 结论

干细胞的肿瘤趋向性及促瘤抑瘤双向性的发现为肝癌发病机制和治疗策略的调整提供了新思

#### ■ 相关报道

Li等应用共培养系统将具高肺转移潜能的MHCC97-H肝癌细胞与MSC共培养, 并建立荷瘤小鼠进行体外观察, 发现MSC可促进肝癌细胞的增殖, 同时也可抑制癌灶的侵袭和转移, 为干细胞并可能应用于临床HCC治疗提供理论基础.

#### ■ 创新盘点

近年来, 干细胞在肝癌中的研究日益增多, 但大多致力于癌变机制探讨或移植治疗效果观察和评价, 本文则首次对干细胞促瘤之外抑瘤作用的可能机制作了较全面的归纳和系统的阐述.



## ■应用要点

本文为从事干细胞治疗肝癌的研究者提供了借鉴和指导。如能深入研究并阐明具体的作用机制,并针对性的采取一些措施来提高干细胞治疗肝癌的有效性和安全性,将为肝癌治疗提供新视角。

路。深入研究干细胞、肝癌细胞特征和关系可望开展针对肝癌的靶向治疗策略,解决肿瘤多药耐药、肿瘤复发转移等诸多棘手问题。但怎样分离、特异性鉴定及筛选高纯度的干细胞这些问题成为限制肝干细胞应用的瓶颈。而干细胞与对肝癌组织抑制具体机制的阐明,更是有待研究的重点问题,可为认识和治疗肝癌提供新的治疗靶点,开发新的治疗措施。上述问题的圆满解决将为干细胞在肝癌治疗中应用提供切实的理论基础。

## 5 参考文献

- Zhong XG, He S, Yin W, Deng JY, Cheng B. Selective tropism of liver stem cells to hepatocellular carcinoma in vivo. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 3886-3891
- Alison MR, Islam S, Lim S. Stem cells in liver regeneration, fibrosis and cancer: the good, the bad and the ugly. *J Pathol* 2009; 217: 282-298
- Honczarenko M, Le Y, Swierkowski M, Ghiran I, Glodek AM, Silberstein LE. Human bone marrow stromal cells express a distinct set of biologically functional chemokine receptors. *Stem Cells* 2006; 24: 1030-1041
- Ho IA, Chan KY, Ng WH, Guo CM, Hui KM, Cheang P, Lam PY. Matrix metalloproteinase 1 is necessary for the migration of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells toward human glioma. *Stem Cells* 2009; 27: 1366-1375
- Sell S. Stem cell origin of cancer and differentiation therapy. *Crit Rev Oncol Hematol* 2004; 51: 1-28
- 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
- Lee ES, Han EM, Kim YS, Shin BK, Kim CH, Kim HK, Won NH, Yeom BW, Kim I, Leong AS. Occurrence of c-kit<sup>+</sup> tumor cells in hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma. *Am J Clin Pathol* 2005; 124: 31-36
- Fang CH, Gong JQ, Zhang W. Function of oval cells in hepatocellular carcinoma in rats. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2482-2487
- 方驰华, 陈铁军, 刘胜军. 利用特异性Y染色体研究肝脏卵圆细胞在原发性肝癌发生中的作用. *中华外科杂志* 2006; 44: 1501-1504
- 陈琼荣, 向景, 刘清波, 赵国强, 车丽洪. 卵圆细胞的生物学特征及其与肝癌发生的关系. *肿瘤防治研究* 2008; 35: 390-393
- Dumble ML, Croager EJ, Yeoh GC, Quail EA. Generation and characterization of p53 null transformed hepatic progenitor cells: oval cells give rise to hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis* 2002; 23: 435-445
- Iidaka T, Tsukamoto T, Totsuka Y, Hirata A, Sakai H, Shirai N, Yamamoto M, Wakabayashi K, Yanai T, Masegi T, Donehower LA, Tatematsu M. Lack of elevated liver carcinogenicity of aminophenyl-norharman in p53-deficient mice. *Cancer Lett* 2005; 217: 149-159
- Yaswen P, Goyette M, Shank PR, Fausto N. Expression of c-Ki-ras, c-Ha-ras, and c-myc in specific cell types during hepatocarcinogenesis. *Mol Cell Biol* 1985; 5: 780-786
- Lemmer ER, de la Motte Hall P, Omori N, Omori M, Shephard EG, Gelderblom WC, Cruse JP, Barnard RA, Marasas WF, Kirsch RE, Thorgerirsson SS. Histopathology and gene expression changes in rat liver during feeding of fumonisin B1, a carcinogenic mycotoxin produced by *Fusarium moniliforme*. *Carcinogenesis* 1999; 20: 817-824
- Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001; 414: 105-111
- Theise ND, Badve S, Saxena R, Henegariu O, Sell S, Crawford JM, Krause DS. Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation. *Hepatology* 2000; 31: 235-240
- Krause DS, Theise ND, Collector MI, Henegariu O, Hwang S, Gardner R, Neutzel S, Sharkis SJ. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 2001; 105: 369-377
- Petersen BE, Goff JP, Greenberger JS, Michalopoulos GK. Hepatic oval cells express the hematopoietic stem cell marker Thy-1 in the rat. *Hepatology* 1998; 27: 433-445
- Baumann U, Crosby HA, Ramani P, Kelly DA, Strain AJ. Expression of the stem cell factor receptor c-kit in normal and diseased pediatric liver: identification of a human hepatic progenitor cell? *Hepatology* 1999; 30: 112-117
- Lemmer ER, Shepard EG, Blakolmer K, Kirsch RE, Robson SC. Isolation from human fetal liver of cells co-expressing CD34 haematopoietic stem cell and CAM 5.2 pancytokeratin markers. *J Hepatol* 1998; 29: 450-454
- Petersen BE, Grossbard B, Hatch H, Pi L, Deng J, Scott EW. Mouse A6-positive hepatic oval cells also express several hematopoietic stem cell markers. *Hepatology* 2003; 37: 632-640
- Fukuda K, Sugihara A, Nakasho K, Tsujimura T, Yamada N, Okaya A, Sakagami M, Terada N. The origin of biliary ductular cells that appear in the spleen after transplantation of hepatocytes. *Cell Transplant* 2004; 13: 27-33
- Minguet S, Cortegano I, Gonzalo P, Martínez-Marín JA, de Andrés B, Salas C, Melero D, Gaspar ML, Marcos MA. A population of c-Kit(low)(CD45/TER119)- hepatic cell progenitors of 11-day post-coitus mouse embryo liver reconstitutes cell-depleted liver organoids. *J Clin Invest* 2003; 112: 1152-1163
- Wu X, Zhao L, Xu Q, Zhang Y, Tang H. [Differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into hepatocytes in hepatotomized mouse]. *Shengwu Yixue Gongchengxue Zazhi* 2005; 22: 1234-1237
- Jang YY, Collector MI, Baylin SB, Diehl AM, Sharkis SJ. Hematopoietic stem cells convert into liver cells within days without fusion. *Nat Cell Biol* 2004; 6: 532-539
- Yamazaki S, Miki K, Takayama T, Hasegawa K, Sata M, Midorikawa Y, Aburatani H, Makuuchi M. Hepatic gene induction in murine bone marrow after hepatectomy. *J Hepatol* 2006; 44: 325-333
- Chen JZ, Hong H, Xiang J, Xue L, Zhao GQ. A selective tropism of transfused oval cells for liver. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 544-546
- 吴昌雄, 郑进方, 梁力建. 骨髓基质细胞在小鼠肝脏内分化及癌变的潜能. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 2984-2989
- Wu XZ, Chen D. Origin of hepatocellular carcinoma: role of stem cells. *J Gastroenterol Hepatol* 2006;

- 21: 1093-1098
- 30 Yang XR, Xu Y, Yu B, Zhou J, Qiu SJ, Shi GM, Zhang BH, Wu WZ, Shi YH, Wu B, Yang GH, Ji Y, Fan J. High expression levels of putative hepatic stem/progenitor cell biomarkers related to tumour angiogenesis and poor prognosis of hepatocellular carcinoma. *Gut* 2010; 59: 953-962
  - 31 Li WQ, Li YM, Guo J, Liu YM, Yang XQ, Ge HJ, Xu Y, Liu HM, He J, Yu HY. Hepatocytic precursor (stem-like) WB-F344 cells reduce tumorigenicity of hepatoma CBRH-7919 cells via TGF-beta/Smad pathway. *Oncol Rep* 2010; 23: 1601-1607
  - 32 Qiao L, Xu Z, Zhao T, Zhao Z, Shi M, Zhao RC, Ye L, Zhang X. Suppression of tumorigenesis by human mesenchymal stem cells in a hepatoma model. *Cell Res* 2008; 18: 500-507
  - 33 Qiao L, Zhao TJ, Wang FZ, Shan CL, Ye LH, Zhang XD. NF-kappaB downregulation may be involved in the depression of tumor cell proliferation mediated by human mesenchymal stem cells. *Acta Pharmacol Sin* 2008; 29: 333-340
  - 34 Qiao L, Xu ZL, Zhao TJ, Ye LH, Zhang XD. Dkk-1 secreted by mesenchymal stem cells inhibits growth of breast cancer cells via depression of Wnt signaling. *Cancer Lett* 2008; 269: 67-77
  - 35 Studeny M, Marini FC, Dembinski JL, Zompetta C, Cabreira-Hansen M, Bekele BN, Champlin RE, Andreeff M. Mesenchymal stem cells: potential precursors for tumor stroma and targeted-delivery vehicles for anticancer agents. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96: 1593-1603
  - 36 Li GC, Ye QH, Xue YH, Sun HJ, Zhou HJ, Ren N, Jia HL, Shi J, Wu JC, Dai C, Dong QZ, Qin LX. Human mesenchymal stem cells inhibit metastasis of a hepatocellular carcinoma model using the MHCC97-H cell line. *Cancer Sci* 2010; 101: 2546-2553
  - 37 Tsai RY. A molecular view of stem cell and cancer cell self-renewal. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36: 684-694
  - 38 Reya T, Clevers H. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* 2005; 434: 843-850
  - 39 Menon LG, Picinich S, Koneru R, Gao H, Lin SY, Koneru M, Mayer-Kuckuk P, Glod J, Banerjee D. Differential gene expression associated with migration of mesenchymal stem cells to conditioned medium from tumor cells or bone marrow cells. *Stem Cells* 2007; 25: 520-528
  - 40 Shimizu H, Julius MA, Giarré M, Zheng Z, Brown AM, Kitajewski J. Transformation by Wnt family proteins correlates with regulation of beta-catenin. *Cell Growth Differ* 1997; 8: 1349-1358
  - 41 Hatsell S, Rowlands T, Hiremath M, Cowin P. Beta-catenin and Tcfs in mammary development and cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2003; 8: 145-158
  - 42 Pardal R, Clarke MF, Morrison SJ. Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 895-902
  - 43 Weinstein M, Yang X, Deng C. Functions of mammalian Smad genes as revealed by targeted gene disruption in mice. *Cytokine Growth Factor Rev* 2000; 11: 49-58
  - 44 Chang H, Brown CW, Matzuk MM. Genetic analysis of the mammalian transforming growth factor-beta superfamily. *Endocr Rev* 2002; 23: 787-823
  - 45 Massagué J, Blain SW, Lo RS. TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell* 2000; 103: 295-309
  - 46 智建生, 赵秀娟. 原发性肝癌局部根治性切除术结合骨髓间充质干细胞输注疗效观察. *临床和实验医学杂志* 2007; 6: 17-18
  - 47 Mishra L, Banker T, Murray J, Byers S, Thenappan A, He AR, Shetty K, Johnson L, Reddy EP. Liver stem cells and hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2009; 49: 318-329
  - 48 Ueki T, Kaneda Y, Tsutsui H, Nakanishi K, Sawa Y, Morishita R, Matsumoto K, Nakamura T, Takahashi H, Okamoto E, Fujimoto J. Hepatocyte growth factor gene therapy of liver cirrhosis in rats. *Nat Med* 1999; 5: 226-230
  - 49 Horiguchi K, Hirano T, Ueki T, Hirakawa K, Fujimoto J. Treating liver cirrhosis in dogs with hepatocyte growth factor gene therapy via the hepatic artery. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2009; 16: 171-177
  - 50 Chen XC, Wang R, Zhao X, Wei YQ, Hu M, Wang YS, Zhang XW, Zhang R, Zhang L, Yao B, Wang L, Jia YQ, Zeng TT, Yang JL, Tian L, Kan B, Lin XJ, Lei S, Deng HX, Wen YJ, Mao YQ, Li J. Prophylaxis against carcinogenesis in three kinds of unestablished tumor models via IL12-gene-engineered MSCs. *Carcinogenesis* 2006; 27: 2434-2441
  - 51 Fu X, He Y, Xie C, Liu W. Bone marrow mesenchymal stem cell transplantation improves ovarian function and structure in rats with chemotherapy-induced ovarian damage. *Cytotherapy* 2008; 10: 353-363
  - 52 Kakinuma S, Nakauchi H, Watanabe M. Hepatic stem/progenitor cells and stem-cell transplantation for the treatment of liver disease. *J Gastroenterol* 2009; 44: 167-172

# 同行评价

本文选题新颖, 具有一定的学术价值。

编辑 曹丽鸥 电编 李薇

# 隐匿性胰液-胆道系统逆流的研究进展

杨慧慧, 何雨, 金文香, 金颖, 李会兵, 金春香

## ■背景资料

随着人们对胰胆管合流异常研究的深入, 发现胰液-胆道系统逆流不仅只发生于胰胆管合流异常的患者, 而且发生在胰胆管合流正常的人群, 即隐匿性胰液-胆道系统逆流。国外研究认为, 隐匿性胰液-胆道系统逆流是胆道系统恶性病变的高危因素, 并且认为其可能是某些胆系良性疾病的致病因子。国内目前尚未见相关文献报道, 应该引起国内研究者的关注。

杨慧慧, 何雨, 金春香, 吉林大学第一医院联合超声室 吉林省长春市 130021

金颖, 吉林大学白求恩医学院 吉林省长春市 130021

李会兵, 天津医科大学总医院神经外科 天津市 300052

金文香, 吉林省长春市朝阳区医院神经内科 吉林省长春市 130021

作者贡献分布: 论文撰写由杨慧慧完成; 文献检索、资料分析由杨慧慧、金颖及李会兵完成; 审校由何雨与金文香完成; 选题由金春香完成。

通讯作者: 金春香, 130021, 吉林省长春市新民大街71号, 吉林省长春市吉林大学第一医院VIP门诊。jincx\_jp@yahoo.com

电话: 0431-88782133

收稿日期: 2010-08-09 修回日期: 2010-11-14

接受日期: 2010-11-23 在线出版日期: 2010-12-28

## Progress in research of occult pancreatobiliary reflux

Hui-Hui Yang, Yu He, Wen-Xiang Jin, Ying Jin,  
Hui-Bing Li, Chun-Xiang Jin

Hui-Hui Yang, Yu He, Chun-Xiang Jin, Department of Ultrasound, the First Hospital of Jilin University, Changchun 130021, Jilin Province, China

Ying Jin, Normal Bethune College of Medicine, Jilin University, Changchun 130021, Jilin Province, China

Hui-Bing Li, Department of Neurosurgery, Tianjin Medical University General Hospital, Tianjin 300052, China

Wen-Xiang Jin, Department of Neurology, Chaoyang Hospital, Changchun 130021, Jilin Province, China

Correspondence to: Chun-Xiang Jin, Department of VIP Clinic, the First Hospital of Jilin University, 71 Xinmin Avenue, Changchun 130021, Jilin Province, China. jincx\_jp@yahoo.com

Received: 2010-08-09 Revised: 2010-11-14

Accepted: 2010-11-23 Published online: 2010-12-28

## Abstract

Increasing knowledge regarding pancreaticobiliary maljunction (PBM) has led researchers to find that pancreatobiliary reflux (flow of pancreatic juice into the biliary tract) occurs not only in PBM patients but also in individuals with a normal pancreaticobiliary junction (occult pancreatobiliary reflux, OPR). The functional disorders of the sphincter of Oddi have been proposed as a possible cause for OPR. Some studies have found that OPR is a high risk factor for gallbladder cancer. The incidence of choledochal stones is higher in patients with OPR than in those without OPR. In this article, we review the progress in research of OPR.

**Key Words:** Occult pancreatobiliary reflux; Related disease; Biliary amylase

Yang HH, He Y, Jin WX, Jin Y, Li HB, Jin CX. Progress in research of occult pancreatobiliary reflux. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(36): 3886-3890

## 摘要

随着人们对胰胆管合流异常研究的深入, 发现胰液-胆道系统逆流不仅只发生于胰胆管合流异常的患者, 而且发生在胰胆管合流正常的人群, 即隐匿性胰液-胆道系统逆流(OPR)。大多数研究者认为导致OPR的主要原因是Oddi括约肌的功能失调, 并认为OPR是胆囊癌发生的高危因子, 且OPR患者中胆总管结石的发病率较高。本文就目前对OPR的研究进展作一综述。

**关键词:** 隐匿性胰液-胆道系统逆流; 相关疾病; 胆汁中的淀粉酶

杨慧慧, 何雨, 金文香, 金颖, 李会兵, 金春香. 隐匿性胰液-胆道系统逆流的研究进展. *世界华人消化杂志* 2010; 18(36): 3886-3890

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/3886.asp>

## 0 引言

随着对胰胆管合流异常的研究增多及认识的加深, 研究者们<sup>[1-4]</sup>发现胰液-胆道系统逆流不仅只发生于胰胆管合流异常的患者, 而且发生于胰胆管合流正常的患者, 即隐匿性胰液-胆道系统逆流(occult pancreatobiliary reflux, OPR)。但关于OPR的机制研究及其与胆道系统疾病的关系甚少, 此方面的研究主要以国外为主, 且研究的侧重点在于分析胆汁中的淀粉酶与胆道系统疾病之间的相关性<sup>[5-8]</sup>, 国内目前尚未见相关文献报道, 现结合文献对OPR目前的研究成果及研究进展综述如下。

## 1 OPR的定义和诊断

OPR是指胆总管与主胰管合流正常的前提下胰液逆流入胆道系统<sup>[2]</sup>。OPR应该满足以下两个条件: (1)胰胆管合流正常; (2)胰液逆流入胆道系

## ■同行评议者

梁力建, 教授, 中山大学附属第一医院肝胆外科

统. OPR的诊断首先需要借助影像学技术排除胰胆管合流异常的患者. 胰胆管合流异常(pancreaticobiliary maljunction, PBM)是指解剖上胰管与胆管在十二指肠壁外合流, 功能上由于胰液与胆汁相互混合及逆流入胆管和/或胰管, 导致胆道及胰腺的各种病理变化. 多数研究认为成人共同通道长 $\geq 15$  mm, 小儿 $\geq 5$  mm, 即可诊断为PBM<sup>[9-12]</sup>. 2002年Kamisawa等<sup>[1]</sup>研究发现, 当胆总管与主胰管汇合后形成的共同管道为6 mm时, 随着Oddi括约肌的收缩, 主胰管和胆总管汇合之处也随之闭塞, 故将共同管道 $\geq 6$  mm定义为胰胆管高位合流, 而且随着检测仪器的进步及对PBM认识的提高, 认为临床诊断PBM时, 共同管道的长度应该从 $\geq 15$  mm,  $\geq 12$  mm,  $\geq 8$  mm, 到 $\geq 6$  mm, 但是这种定义方法并没有被研究者广泛接受. 计算机断层扫描(computed tomography, CT)、内镜逆行性胰胆管造影术(endoscopic retrograde cholangiopancreatography, ERCP)、经皮肝穿刺胆道造影(percutaneous transhepatic cholangiography, PTC)、磁共振胰胆管成像(magnetic retrograde cholangiopancreatography, MRCP)、注射促胰液分泌素后行磁共振胰胆管成像(secretin-stimulating magnetic retrograde cholangiopancreatography, SMRCP)及术后胰胆管造影<sup>[13-21]</sup>等多种技术均可用来排除PBM. 值得一提的是SMRCP, 作为一种无创性的检查方法, 这种方法不仅可以排除PBM, 而且可以在不用测胆汁中的淀粉酶活性的情况下排除胰液-胆道系统逆流. Motosugi等认为胰胆管合流正常患者在注射促胰液分泌素后观察, 胆总管较注射前扩张暗示OPR, 而单纯的胆囊增大并不是OPR的特异性表现, 因为促胰液分泌素虽然促进胆汁的分泌, 但是并不能使胆管的直径增加<sup>[22,23]</sup>.

血中的淀粉酶主要由胰腺和唾液腺分泌, 罕见情况下甲状腺、前列腺、扁桃体、子宫内膜也可分泌少量的淀粉酶, 另外异位胰腺组织也可以分泌. 而胆汁中的淀粉酶若无异常, 一般认为是由血中淀粉酶经过肝脏过滤和胰液逆流入胆道系统而来<sup>[23,24]</sup>. Itokawa等<sup>[25]</sup>认为, 胆汁中的淀粉酶活性大于等于血清淀粉酶活性即可诊断为有胰液-胆道系统逆流. 但是理论上, 在不影响生理状况下收集胆汁较困难, 所以胆道中的淀粉酶活性不能完全代表生理情况下胆汁中淀粉酶的活性. 尽管如此, 大部分的学者仍然采用Itokawa等的这种定义方法. 目前可以通过内镜逆行性胰胆管造影术(magnetic retrograde chol-

angiopancreatography, ERCP), 术中或放置T型管来收集胆管内的胆汁, 测定胆汁中淀粉酶的活性从而确定是否有胰液-胆道系统逆流<sup>[26,27]</sup>.

## 2 OPR的发生原因和致病机制

多数研究者认为OPR发生的原因可能是由于Oddi括约肌的功能失调所致<sup>[4,23,28-31]</sup>. 引起Oddi括约肌功能失调的病理机制是Oddi括约肌器质性的狭窄或/和Oddi括约肌运动障碍. 其中Oddi括约肌运动障碍的特征是: Oddi括约肌发生周期性的运动障碍而导致患者胆管型的疼痛, 但相关检查显示患者并无胰腺及胆系的器质性病变. Oddi括约肌的器质性的狭窄以及Oddi括约肌的运动障碍不仅可以引起OPR, 而且也可以解释胆道系统良性变及胆囊癌的发生<sup>[2,4,29-35]</sup>. 此外, 不涉及复杂肌电改变的Oddi括约肌的短暂性的痉挛亦可能是OPR的发病原因<sup>[36-42]</sup>. Nomura等在研究PBM中发现, PBM患者Oddi括约肌的收缩段明显短于共同管道, 所有患者括约肌位于胰胆管汇合部的远侧; 相反正常人括约肌段较共同管道长, 并一直延伸到你近侧, 虽然有的患者共同管道长度超过15 mm, 但是在行ERCP时发现其Oddi括约肌收缩段位于胰胆管汇合的近侧, 其并不存在胰胆管汇合部的流体力学异常<sup>[43,44]</sup>. 可见Oddi括约肌的功能是否正常与胰液-胆道系统逆流有较大关系.

正常情况下, 胰胆管汇合处有Oddi括约肌, 他可以防止胰液-胆道系统逆流和/或胆汁-胰管逆流. 而胰管内的压力大于胆管内的压力, 故Oddi括约肌功能障碍时胰液-胆道系统逆流更为常见<sup>[45]</sup>. OPR的患者Oddi括约肌功能障碍导致胰液逆流入胆道系统, 并长期刺激胆道系统管壁, 致使胆管上皮细胞的慢性炎症并加快胆管上皮细胞的增殖速度, 从而导致胆管上皮细胞的增生和化生, 最终导致胆系的癌症<sup>[46-49]</sup>. 这与PBM的致病有异曲同工之处<sup>[12,18,45,50-55]</sup>.

## 3 OPR与胆道系统疾病

大量文献已经证实PBM与胆道系统疾病之间存在相关性, 其致病原因在干胰液逆流入胆道系统<sup>[56-65]</sup>, 这与OPR相似. 目前认为OPR很可能是某些胆道系统恶性肿瘤的高危因素, 而且可能是胆道系统某些良性疾病的致病因子.

3.1 胆囊/胆管的良性病变 研究发现, 胰胆管合流正常的胆石症及胆总管结石, 慢性非结石性胆囊炎的患者胆囊胆汁的淀粉酶活性均高于

### ■相关报道

Sakamoto等的研究发现胆囊黏膜发生肠上皮化生的患者中OPR的发生率较高(39.4%,  $P = 0.05$ ).



## ■创新盘点

本文就隐匿性胰液-胆道系统逆流的研究进展进行综述,着重介绍了隐匿性胰液-胆道系统逆流的发病机制及其与胆道系统疾病之间的相关性。

血清中淀粉酶的活性,且胆石症及胆总管结石的患者胆胆汁淀粉酶活性均较其他良性病变高( $P<0.001$ )<sup>[66]</sup>。Itokawa等<sup>[25]</sup>的研究也发现,OPR患者中胆总管结石的发病率高于无OPR的患者( $P<0.05$ ),与Sakamoto等<sup>[5]</sup>的报道相同。73%(38/52)的慢性结石性胆囊炎患者及87.5%(21/23)的急性结石性胆囊炎患者有OPR,37.5%的胆囊腺肌症患者胆汁中的淀粉酶活性升高( $n=8$ ,  $38\,964.3\text{ IU/L} \pm 100\,064.9\text{ IU/L}$ ),66.7%的慢性胆囊炎患者胆汁中淀粉酶活性升高( $n=3$ ,  $30\,690.0\text{ IU/L} \pm 26\,593.0\text{ IU/L}$ )<sup>[66,67]</sup>。这些数据在某种意义上暗示着OPR可能是这些胆囊良性病变的致病因子。

Sakamoto等<sup>[5]</sup>的研究发现胆囊黏膜发生肠上皮化生的患者中OPR的发生率较高(39.4%,  $P=0.05$ )。Horaguchi等<sup>[67]</sup>的研究发现OPR(高淀粉酶组)的患者胆囊黏膜的幽门腺化生较高(75%,  $P<0.05$ )。而这些病理改变往往都认为是癌前病变。Hidaka等报道,较长的共同管道患者由于胰液逆流而使K-ras基因突变,免疫组织化学也显示OPR患者胆囊上皮的Ki67-L1、P53、COX-2的表达率都高于无OPR的患者<sup>[67-69]</sup>。

**3.2 胆囊及胆管恶性肿瘤** 2002年日本学者Sai等<sup>[4]</sup>报道了1例OPR患者得胆囊癌的病例,之后引起了研究者的兴趣。在其随后的研究中发现有OPR的胆囊癌患者(3/4)胆胆汁中的淀粉酶活性明显升高( $68\,281\text{ IU/L}$ ,  $P<0.01$ ),远远高于胰胆管合流正常且无胰液-胆道系统逆流的胆囊癌患者( $4/60$ ,  $238\text{ IU/L}$ ),并发现所有OPR所致的胆囊癌中均未见结石,这与先前约75%研究者认为胆囊结石与胆囊癌的发生有关这一观点不同,他认为长期的OPR可能是胆囊癌的致病因素。在Inagaki等<sup>[6]</sup>的病例报道中,1例胰胆管合流正常的胆囊癌患者胆胆汁淀粉酶及脂肪酶活性分别为 $2\,604\text{ IU/L}$ 及 $752\text{ IU/L}$ (此患者血清淀粉酶及脂肪酶活性均在正常范围之内),而最能反映生理状态下胆汁中淀粉酶水平的C管中胆汁淀粉酶的活性在术后6及12 d分别为 $11\,950\text{ IU/L}$ 及 $22\,265\text{ IU/L}$ ,远远大于血清中淀粉酶及脂肪酶的活性。Beltran等<sup>[66]</sup>的研究亦表明OPR的胆囊癌患者胆胆汁中的淀粉酶活性大于胆囊良性病变的胆胆汁淀粉酶活性( $P<0.001$ )。Horaguchi等<sup>[67]</sup>的研究亦显示伴有OPR的胆囊癌患者胆总管胆汁淀粉酶活性明显升高( $17\,613.9\text{ IU/L}$ )。故推测长期的OPR致使胆汁中的淀粉酶活性增高可能是胆囊癌的致病因素。但研究表明<sup>[66]</sup>,胆汁中的淀粉酶及脂肪酶活性的高低与胆囊肿瘤的类型、

大小及分化程度之间并无相关性。

关于OPR与胆管恶性肿瘤相关性的研究较少,Horaguchi等的研究中,178例患者40例为胆管癌,其中17.5%的患者胆汁淀粉酶活性升高,胆汁中淀粉酶活性范围 $10\text{--}2\,410$ (平均活性为 $12.9 \pm 389.5\text{ IU/L}$ )<sup>[67]</sup>。而这些数据并不能显示OPR与胆管的恶性肿瘤之间有明确的相关性。

## 4 结论

目前对OPR还处于初步研究阶段,大部分研究认为OPR是胆囊癌发生的高危因素,并且认为OPR可能是某些胆系良性疾病的致病因子,而OPR可能的致病原因是Oddi括约肌功能失调。那么对OPR的深入研究,揭示其与胆道系统疾病的关系,能否对治疗胆道系统疾病触发新的理念并提供新的治疗途径?故对OPR的发病率,明确的诊断标准,确切的发病机制及其与胆道系统疾病的相关性都有待进一步研究。

## 5 参考文献

- 1 Kamisawa T, Amemiya K, Tu Y, Egawa N, Sakaki N, Tsuruta K, Okamoto A, Munakata A. Clinical significance of a long common channel. *Pancreatology* 2002; 2: 122-128
- 2 Sai JK, Suyama M, Kubokawa Y, Tadokoro H, Sato N, Maehara T, Iida Y, Kojima K. Occult pancreatobiliary reflux in patients with a normal pancreatobiliary junction. *Gastrointest Endosc* 2003; 57: 364-368
- 3 Anderson MC, Hauman RL, Suriyapa C, Schiller WR. Pancreatic enzyme levels in bile of patients with extrahepatic biliary tract disease. *Am J Surg* 1979; 137: 301-306
- 4 Sai JK, Ariyama J, Suyama M, Kubokawa Y, Sato N. Occult regurgitation of pancreatic juice into the biliary tract: diagnosis with secretin injection magnetic resonance cholangiopancreatography. *Gastrointest Endosc* 2002; 56: 929-932
- 5 Sakamoto H, Mutoh H, Ido K, Satoh S, Kumagai M, Hayakawa H, Tamada K, Sugano K. Intestinal metaplasia in gallbladder correlates with high amylase levels in bile in patients with a morphologically normal pancreatobiliary duct. *Hum Pathol* 2009; 40: 1762-1767
- 6 Inagaki M, Goto J, Suzuki S, Ishizaki A, Tanno S, Kohgo Y, Tokusashi Y, Miyokawa N, Kasai S. Gallbladder carcinoma associated with occult pancreatobiliary reflux in the absence of pancreatobiliary maljunction. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2007; 14: 529-533
- 7 Sai JK, Suyama M, Kubokawa Y, Tadokoro H, Kamiya T, Kato K, Matsumura Y, Inami K, Takahashi Y, Chikamori M, Nobukawa B, Suda K. [Occult pancreatobiliary reflux and gallbladder carcinoma]. *Nippon Rinsho* 2006; 64 Suppl 1: 448-450
- 8 Sai JK, Suyama M, Nobukawa B, Kubokawa Y, Sato N. Severe dysplasia of the gallbladder associated with occult pancreatobiliary reflux. *J Gastroenterol* 2005; 40: 756-760
- 9 Kimura K, Ohto M, Saisho H, Unozawa T, Tsuchiya

- Y, Morita M, Ebara M, Matsutani S, Okuda K. Association of gallbladder carcinoma and anomalous pancreaticobiliary ductal union. *Gastroenterology* 1985; 89: 1258-1265
- 10 陈凤, 汪健. 胰胆管合流异常及其相关疾病. 医学综述 2006; 12: 179-180
- 11 李索林, 张道荣, 时保军, 李振东, 陈新英. 先天性胆管囊状和柱状扩张的胆胰管合流异常. 中华外科杂志 2000; 38: 349-351
- 12 Matsumoto Y, Fujii H, Itakura J, Mogaki M, Matsuda M, Morozumi A, Fujino MA, Suda K. Pancreaticobiliary maljunction: etiologic concepts based on radiologic aspects. *Gastrointest Endosc* 2001; 53: 614-619
- 13 周存才, 李占元, 曾庆东, 李传福, 朱建人, 吉华明, 丁洪斌. 胰胆管合流异常的术后胆道造影表现. 放射学实践 2005; 20: 679-682
- 14 周存才, 李传福, 孙国瑞, 李占元, 董典宁, 王天宝, 张宗利, 姜旭生. 胰胆管合流异常的CT诊断(附3例报告). 放射学实践 2003; 18: 40-41
- 15 钟明安, 赵中辛, 周主青. 术中胆汁淀粉酶检测联合胆道造影诊断胆管非扩张型胰胆管合流异常. 肝胆外科杂志 2007; 15: 266-268
- 16 李臻, 马骥, 韩新巍. PTC对胰胆管合流异常的诊断. 世界华人消化杂志 2008; 16: 966-970
- 17 邢古生, 耿进朝. 胰胆管合流异常的病理、临床及影像学诊断. 中华放射学杂志 2006; 40: 216-219
- 18 Bheerappa N, Sastry RA. Pancreatico-biliary ductal union. *Trop Gastroenterol* 2001; 22: 190-193
- 19 靳二虎, 马大庆, 张澍田, 冀明, 张忠涛, 王强. 磁共振胰胆管成像诊断胰胆管合流异常的价值. 临床放射学杂志 2006; 25: 833-837
- 20 Hundt W, Petsch R, Scheidler J, Reiser M. Clinical evaluation of further-developed MRCP sequences in comparison with standard MRCP sequences. *Eur Radiol* 2002; 12: 1768-1777
- 21 于则利, 张立军, 李洁, 陈佛来. 胰胆管合流异常影像学诊断和外科治疗原则探讨. 中华消化内镜杂志 2002; 19: 346-348
- 22 Motosugi U, Ichikawa T, Araki T, Kitahara F, Sato T, Itakura J, Fujii H. Secretin-stimulating MRCP in patients with pancreaticobiliary maljunction and occult pancreatobiliary reflux: direct demonstration of pancreatobiliary reflux. *Eur Radiol* 2007; 17: 2262-2267
- 23 Donaldson LA, Joffe SN, McIntosh W, Brodie MJ. Amylase activity in human bile. *Gut* 1979; 20: 216-218
- 24 邹树, 田伏洲. 胆汁中淀粉酶过高的临床意义. 肝胆胰脾外科杂志 1997; 3: 188-189
- 25 Itokawa F, Itoi T, Nakamura K, Sofuni A, Kakimi K, Moriyasu F, Tsuchida A, Aoki T. Assessment of occult pancreatobiliary reflux in patients with pancreaticobiliary disease by ERCP. *J Gastroenterol* 2004; 39: 988-994
- 26 Sugiyama M, Atomi Y. Periapillary diverticula cause pancreatobiliary reflux. *Scand J Gastroenterol* 2001; 36: 994-997
- 27 Sugiyama M, Atomi Y. Does endoscopic sphincterotomy cause prolonged pancreatobiliary reflux? *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 795-798
- 28 Vracko J, Markovic S, Wiechel KL. Conservative treatment versus endoscopic sphincterotomy in the initial management of acute cholecystitis in elderly patients at high surgical risk. *Endoscopy* 2006; 38: 773-778
- 29 Vracko J, Wiechel KL. Increased gallbladder trypsin in acute cholecystitis indicates functional disorder in the sphincter of oddi and could make EPT a logical procedure. *Surg Laparosc Endosc Percutan Tech* 2003; 13: 308-313
- 30 Vracko J, Zemva Z, Pegan V, Wiechel KL. Sphincter of Oddi function studied by radioimmunoassay of biliary trypsin in patients with bile duct stones and in controls. *Surg Endosc* 1994; 8: 389-392
- 31 Sai JK, Suyama M, Nobukawa B, Kubokawa Y, Yokomizo K, Sato N. Precancerous mucosal changes in the gallbladder of patients with occult pancreatobiliary reflux. *Gastrointest Endosc* 2005; 61: 264-268
- 32 Wang HP, Wu MS, Lin CC, Chang LY, Kao AW, Wang HH, Lin JT. Pancreaticobiliary diseases associated with anomalous pancreaticobiliary ductal union. *Gastrointest Endosc* 1998; 48: 184-189
- 33 Yoshida T, Shibata K, Matsumoto T, Sasaki A, Hirose R, Kitano S. Carcinoma of the gallbladder associated with anomalous junction of the pancreaticobiliary duct in adults. *J Am Coll Surg* 1999; 189: 57-62
- 34 Sugiyama M, Haradome H, Takahara T, Izumisato Y, Abe N, Masaki T, Mori T, Hachiya J, Atomi Y. Biliopancreatic reflux via anomalous pancreaticobiliary junction. *Surgery* 2004; 135: 457-459
- 35 Kimura K, Ohto M, Ono T, Tsuchiya Y, Saisho H, Kawamura K, Yogi Y, Karasawa E, Okuda K. Congenital cystic dilatation of the common bile duct: relationship to anomalous pancreaticobiliary ductal union. *AJR Am J Roentgenol* 1977; 128: 571-577
- 36 Vracko J, Wiechel KL. The laparoscopic finding of pericholedochitis at cholecystectomy predicts the presence of unsuspected bile duct stones. *Surg Laparosc Endosc Percutan Tech* 2000; 10: 120-126; discussion 127
- 37 Prajapati DN, Hogan WJ. Sphincter of Oddi dysfunction and other functional biliary disorders: evaluation and treatment. *Gastroenterol Clin North Am* 2003; 32: 601-618
- 38 Tzovaras G, Rowlands BJ. Diagnosis and treatment of sphincter of Oddi dysfunction. *Br J Surg* 1998; 85: 588-595
- 39 Petersen BT. An evidence-based review of sphincter of Oddi dysfunction: part I, presentations with "objective" biliary findings (types I and II). *Gastrointest Endosc* 2004; 59: 525-534
- 40 Merg AR, Kalinowski SE, Hinkhouse MM, Mitros FA, Ephgrave KS, Cullen JJ. Mechanisms of impaired gallbladder contractile response in chronic acalculous cholecystitis. *J Gastrointest Surg* 2002; 6: 432-437
- 41 Yokohata K, Tanaka M. Cyclic motility of the sphincter of Oddi. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2000; 7: 178-182
- 42 Tanaka M. Advances in research and clinical practice in motor disorders of the sphincter of Oddi. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2002; 9: 564-568
- 43 胡冰, 周岱云, 吴萍, 潘亚敏, 马述春, 龚彪. 先天性胆胰管合流异常与胆囊癌的关联. 中华消化内镜杂志 2004; 21: 225-228
- 44 Nomura T, Shirai Y, Sandoh N, Nagakura S, Hatakeyama K. Cholangiographic criteria for anomalous union of the pancreatic and biliary ducts. *Gastrointest Endosc* 2002; 55: 204-208
- 45 Kaneko K, Ando H, Seo T, Ono Y, Tainaka T, Sumida W. Proteomic analysis of protein plugs: causative agent of symptoms in patients with choledochal cyst. *Dig Dis Sci* 2007; 52: 1979-1986
- 46 Tashiro S, Imaizumi T, Ohkawa H, Okada A, Katoh T, Kawaharada Y, Shimada H, Takamatsu H, Mi-

## 同行评价

本文学术性较好, 对于读者了解隐匿性胰液-胆管系统逆流的发生、诊断等奠定基础。

- yake H, Todani T. Pancreaticobiliary maljunction: retrospective and nationwide survey in Japan. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2003; 10: 345-351
- 47 Matsubara T, Sakurai Y, Sasayama Y, Hori H, Ochiai M, Funabiki T, Matsumoto K, Hirono I. K-ras point mutations in cancerous and noncancerous biliary epithelium in patients with pancreaticobiliary maljunction. *Cancer* 1996; 77: 1752-1757
- 48 Kaneko K, Ando H, Ito T, Kasai K, Watanabe Y, Seo T. Increased cell proliferation and transforming growth factor- $\alpha$  (TGF  $\alpha$ ) in the gall-bladder epithelium of patients with pancreaticobiliary maljunction. *Pathol Int* 1996; 46: 253-260
- 49 Matsubara T, Funabiki T, Jinno O, Sakurai Y, Hasegawa S, Imazu H, Ochiai M. p53 gene mutations and overexpression of p53 product in cancerous and noncancerous biliary epithelium in patients with pancreaticobiliary maljunction. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 1999; 6: 286-293
- 50 吴高松, 邹声泉. 胰胆管合流异常与胆道肿瘤. 中华外科杂志 2003; 41: 462-464
- 51 杨明, 乔岐禄. 胰胆管合流异常的研究进展. 世界华人消化杂志 2008; 16: 1215-1219
- 52 吴高松, 吴剑宏, 罗先文, 邹声泉. 胰胆管合流异常患者胆汁对人胆管癌细胞生长的影响. 肝胆外科杂志 2003; 11: 384-387
- 53 Sugiyama Y, Kobori H, Hakamada K, Seito D, Sasaki M. Altered bile composition in the gallbladder and common bile duct of patients with anomalous pancreaticobiliary ductal junction. *World J Surg* 2000; 24: 17-20; discussion 21
- 54 Yoon JH, Higuchi H, Werneburg NW, Kaufmann SH, Gores GJ. Bile acids induce cyclooxygenase-2 expression via the epidermal growth factor receptor in a human cholangiocarcinoma cell line. *Gastroenterology* 2002; 122: 985-993
- 55 Chijiwa K, Nagai E, Makino I, Shimada K. Are secondary bile acids in choledochal cysts important as a risk factor in biliary tract carcinoma? *Aust N Z J Surg* 1993; 63: 109-112
- 56 钟明安, 赵中辛. 成人胰胆管合流异常患者胆囊黏膜病理形态观察. 肝胆胰外科杂志 2007; 19: 346-348
- 57 Matsumoto Y, Fujii H, Itakura J, Matsuda M, Nobukawa B, Suda K. Recent advances in pancreaticobiliary maljunction. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2002; 9: 45-54
- 58 Kamisawa T, Okamoto A. Biliopancreatic and pancreaticobiliary refluxs in cases with and without pancreaticobiliary maljunction: diagnosis and clinical implications. *Digestion* 2006; 73: 228-236
- 59 张斌, 李长锋, 杨蕾, 李丹丹, 张宝刚. 胰胆管合流异常和胆道肿瘤的关系. 中国实验诊断学 2007; 11: 1124-1125
- 60 苗同国, 张静喆. 胰胆管合流异常与胆胰疾病. 肝胆外科杂志 2007; 15: 316-319
- 61 周瑾. 原发胆道结石与胰胆管合流异常关系的临床初步研究. 肝胆外科杂志 2000; 8: 364-365
- 62 公伟, 李占元. 胰胆管合流异常和胆胰疾病. 中国现代普通外科进展 2005; 8: 138-140
- 63 石景森, 王作仁. 胰胆管合流异常与胆道疾病的关系(附28例分析). 中国实用外科杂志 1995; 15: 600-601
- 64 赵中辛, 钟明安, 卢爱国, 韩俊毅, 肖现民. 成人胰胆管合流异常病人血清淀粉酶同工酶谱的临床观察. 外科理论与实践 2005; 10: 86-87
- 65 杨洋, 康世均, 李爱民. 先天性胰胆管合流异常与胆囊癌的关系. 中华肝胆外科杂志 2000; 6: 439-441
- 66 Beltrán MA, Vracko J, Cumsille MA, Cruces KS, Almonacid J, Danilova T. Occult pancreaticobiliary reflux in gallbladder cancer and benign gallbladder diseases. *J Surg Oncol* 2007; 96: 26-31
- 67 Horaguchi J, Fujita N, Noda Y, Kobayashi G, Ito K, Takasawa O, Obana T, Endo T, Nakahara K, Ishida K, Yonechi M, Hirasawa D, Suzuki T, Sugawara T, Ohhira T, Onochi K, Harada Y. Amylase levels in bile in patients with a morphologically normal pancreaticobiliary ductal arrangement. *J Gastroenterol* 2008; 43: 305-311
- 68 Itoi T, Tsuchida A, Itokawa F, Sofuni A, Kurihara T, Tsuchiya T, Moriyasu F, Kasuya K, Serizawa H. Histologic and genetic analysis of the gallbladder in patients with occult pancreatobiliary reflux. *Int J Mol Med* 2005; 15: 425-430
- 69 Hidaka E, Yanagisawa A, Seki M, Takano K, Setoguchi T, Kato Y. High frequency of K-ras mutations in biliary duct carcinomas of cases with a long common channel in the papilla of Vater. *Cancer Res* 2000; 60: 522-524

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

## 《世界华人消化杂志》栏目设置

**本刊讯** 本刊栏目设置包括述评, 基础研究, 临床研究, 焦点论坛, 文献综述, 研究快报, 临床经验, 病例报告, 会议纪要. 文稿应具科学性、先进性、可读性及实用性, 重点突出, 文字简练, 数据可靠, 写作规范, 表达准确.

# 益生菌在炎症性肠病中的应用

刘揆亮, 吕愈敏, 顾芳

刘揆亮, 吕愈敏, 顾芳, 北京大学第三医院消化科 北京市 100191

刘揆亮, 北京世纪坛医院消化内科 北京市 100038

作者贡献分布: 本文综述由刘揆亮完成; 吕愈敏与顾芳审核。

通讯作者: 吕愈敏, 教授, 主任医师, 100191, 北京市, 北京大学第三医院消化科, ddbbol@163.com

收稿日期: 2010-09-06 修回日期: 2010-11-05

接受日期: 2010-11-10 在线出版日期: 2010-12-28

## Role of probiotics in the management of inflammatory bowel disease

Kui-Liang Liu, Yu-Min Lv, Fang Gu

Kui-Liang Liu, Yu-Min Lv, Fang Gu, Department of Gastroenterology, Peking University Third Hospital, Beijing 100191, China

Kui-Liang Liu, Department of Gastroenterology, Beijing Shijitan Hospital, Beijing 100038, China

Correspondence to: Professor Kui-Liang Liu, Department of Gastroenterology, Peking University Third Hospital, Beijing 100191, China. ddbbol@163.com

Received: 2010-09-06 Revised: 2010-11-05

Accepted: 2010-11-10 Published online: 2010-12-28

## Abstract

Inflammatory bowel disease (IBD) is a disorder characterized by chronic recurrent colitis. Probiotics have emerged as a new therapy for IBD over the last decade. The efficacy of probiotics in attenuating experimental colitis and preventing clinical relapse had been proved in some animal and human studies but data are still inconsistent. There are many problems to be solved in future studies. This review focuses on recent advances in understanding the role of probiotics in the management of IBD.

**Key Words:** Probiotics; Inflammatory bowel disease; Experimental colitis

Liu KL, Lv YM, Gu F. Role of probiotics in the management of inflammatory bowel disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(36): 3891-3895

## 摘要

炎症性肠病(IBD)是一种慢性复发性肠道炎症性疾病, 益生菌是近10余年用于IBD治疗的新

兴药物。一些动物实验证实益生菌可减轻实验性结肠炎; 临床研究提示益生菌用于维持缓解可能有效, 但结果均不一致。益生菌用于IBD治疗还有许多问题有待解决。本文就益生菌在IBD中应用的研究情况作一简要综述。

**关键词:** 益生菌; 炎症性肠病; 实验性结肠炎

刘揆亮, 吕愈敏, 顾芳. 益生菌在炎症性肠病中的应用. *世界华人消化杂志* 2010; 18(36): 3891-3895

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/3891.asp>

## ■背景资料

益生菌是近10余年用于炎症性肠病治疗的新兴药物。一些研究提示益生菌可能有效, 但结果不太一致。益生菌用于IBD治疗还有许多问题有待解决。

## 0 引言

益生菌是“含有活的、达到一定数量的特定微生物, 能通过种植或定植改变宿主某一部位的微环境从而发挥有益的健康效应的制剂或产品”<sup>[1]</sup>。近10年来, 基于对炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)患者肠道菌群变化, 尤其是对双歧杆菌与乳酸杆菌等有益菌含量减少的认识, 人们一直在尝试以益生菌治疗IBD, 并已进行了大量的研究。

## 1 动物研究

益生菌减轻实验性结肠炎的作用在多种动物模型中均有证实。从目前的研究结果来看: 不同益生菌在同一动物模型中作用并不一致, 同一益生菌在不同动物模型中的作用也不一致; 益生菌对于实验性结肠炎的预防作用较治疗作用更为明显。

IL-10<sup>-/-</sup>小鼠可发生自发性结肠炎, 是IBD研究中最常用的基因缺陷动物模型。Madsen等<sup>[2]</sup>报道, 提前给予IL-10<sup>-/-</sup>小鼠罗伊乳杆菌(*Lactobacillus reuteri*)可减轻随后出现的自发结肠炎。Feighery等<sup>[3]</sup>则报道给予IL-10<sup>-/-</sup>小鼠唾液酸乳杆菌(*Lactobacillus salivarius*)对于自发性结肠炎既无预防作用也无治疗作用。三硝基苯磺酸(trinitrobenzene sulfonic acid, TNBS)诱导的结肠炎是IBD研究中最常用的化学诱导结肠炎模型之一。Kennedy等<sup>[4]</sup>最初发现以TNBS诱导大鼠结肠炎后24 h再给予植物乳杆菌(*Lactobacillus*

## ■同行评议者

吴军, 研究员, 军事医学科学院生物工程研究所

## ■相关报道

Miele等的研究中,对新诊断为UC的儿童患者在激素诱导缓解及美沙拉嗪维持缓解治疗的基础上加用VSL#3可将缓解率由36.4%提高到92.8%( $P < 0.001$ ),提示益生菌用于IBD的治疗仍有较好的前景。

*plantarum*)不能减轻大鼠结肠炎症,并推测由于该模型的结肠炎症为化学及免疫性损伤所致,不适宜用于评价益生菌的疗效。但随后Lamine等<sup>[5]</sup>发现在造模前提前给予香肠乳杆菌(*Lactobacillus farciminis*)可减轻结肠炎症。刘伟等<sup>[6]</sup>在TNBS灌肠后1 d给予大鼠双歧三联活菌[长双歧杆菌(*Bifidobacterium longum*)、嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*)与粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)的混合物]灌胃4 wk,发现大鼠结肠炎症明显改善。葡聚糖硫酸钠(dextran sulfate sodium, DSS)诱导的结肠炎是IBD研究中另一常用的化学性结肠炎模型。Mennigen等<sup>[7]</sup>的研究证实提前应用VSL#3[(一种由长双歧杆菌、婴儿双歧杆菌(*Bifidobacterium infantis*)、短双歧杆菌(*Bifidobacterium breve*)、嗜酸乳杆菌、干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*)、植物乳杆菌、保加利亚乳杆菌(*Lactobacillus bulgaricus*)与嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*)共8种益生菌组成的混合制剂)]可明显减轻DSS诱导的小鼠实验性结肠炎。而Gaudier等<sup>[8]</sup>在小鼠开始饮用DSS 5 d后给予VSL#3,虽然小鼠的结肠菌群有明显改善,但炎症程度并无减轻。

目前尚缺乏能较理想地模拟人类IBD发作-缓解-复发过程的动物模型,仅有少数研究评价益生菌对于实验性结肠炎复发的作用。Dieleman等<sup>[9]</sup>报道应用广谱抗生素控制HLA-B27转基因大鼠的自发结肠炎后给予鼠李糖乳杆菌GG(*Lactobacillus rhamnosus* GG)可明显减轻随后出现的结肠炎复发。Di Giacinto等<sup>[10]</sup>待给予TNBS灌肠诱导的结肠炎症缓解后给予小鼠VSL#3治疗,再次给予TNBS,灌肠模拟实验性结肠炎复发时,治疗组小鼠炎症较未应用VSL#3的对照组明显减轻。

## 2 临床研究

临床研究中,益生菌在克罗恩病(Crohn's disease, CD)治疗中的价值目前仍不明确。关于益生菌对CD诱导缓解治疗的作用目前仅有一项随机对照试验。Schultz等<sup>[11]</sup>对总共11例中度以上活动性CD患者在使用糖皮质激素及抗生素常规诱导缓解治疗的同时分别加用鼠李糖乳杆菌GG或安慰剂治疗6 mo,治疗组(5例)与对照组(6名)分别有4例(80%)与5名(83.3%)达到缓解( $P$ 值未报道)。Guslandi等认为在CD患者维持缓解治疗时联合应用布拉迪酵母菌(*Saccharomyces boulardii*)与美沙拉嗪可以减少美沙拉嗪的用量( $P = 0.04$ ),但进

一步的分析认为该结论并没有统计学意义<sup>[12,13]</sup>。Doherty等<sup>[14]</sup>的荟萃分析指出益生菌对于预防CD患者的术后复发无效。

益生菌在溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)中的作用也存在一定争议。Sang等<sup>[15]</sup>的荟萃分析指出益生菌辅助治疗并不能提高诱导缓解治疗的有效率,但在维持缓解治疗中较安慰剂有效。Zocco等<sup>[16]</sup>将187例缓解期UC患者随机分为3组,分别接受鼠李糖乳杆菌GG,美沙拉嗪(2.4 g/d)及鼠李糖乳杆菌GG+美沙拉嗪(剂量同前两组)治疗。发现3组患者治疗12 mo时的复发率均无显著差异( $P = 0.77$ ),但单独应用鼠李糖乳杆菌GG组及联合应用鼠李糖乳杆菌GG与美沙拉嗪组及美沙拉嗪组相比能有效延长维持缓解的时间( $P = 0.01, 0.03$ )。近年的研究发现益生菌混合制剂VSL#3可能具有较好的疗效。Sood等<sup>[17]</sup>将147例轻中度活动的UC患者随机分入VSL#3治疗组及安慰剂对照组,治疗3 mo时两组缓解率分别为42.9%与15.7%( $P < 0.001$ )。Miele等<sup>[18]</sup>对29名新诊断为UC的儿童在继续激素诱导缓解及美沙拉嗪维持缓解治疗的基础上随机加用VSL#3或安慰剂,两组的缓解率分别为92.8%与36.4%( $P < 0.001$ ),1年时两组的复发率分别为21.4%与73.3%( $P = 0.014$ )。

## 3 益生菌治疗IBD的可能机制

3.1 免疫调节作用 益生菌可抑制促炎细胞因子表达,还可抑制一些炎症相关的信号转导途径。Bai等<sup>[19]</sup>将长双歧杆菌与UC患者的黏膜活检标本共同孵育后,活检标本上清液中的白介素(interleukin, IL)-8与肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- $\alpha$ 的含量均明显降低。Cui等<sup>[20]</sup>发现双歧三联活菌可明显抑制缓解期UC患者肠黏膜内核因子(nuclear factor, NF)- $\kappa$ B的表达及其DNA结合活性。近年有研究认为,健康状态下益生菌主要具有免疫刺激作用,而益生菌减轻实验性结肠炎的作用可能是通过刺激免疫系统实现的。Pagnini等<sup>[21]</sup>发现,在衰老加快小鼠P1/YIT系(senescence-accelerated mouse P1/YIT strain, SAMP1/YIT)小鼠出现自发性结肠炎之前给予VSL#3可刺激小鼠肠道的免疫反应,激活NF- $\kappa$ B转导途径及促进TNF- $\alpha$ 表达,并且小鼠的自发性结肠炎明显减轻,黏膜屏障功能几乎恢复正常;而抗TNF- $\alpha$ 治疗可抑制益生菌的这种减轻结肠炎症的作用。这一发现对于深入认识益生菌减轻结肠炎症作用的机制具有重要意义。

## ■创新盘点

本文较全面地介绍了近年的相关研究成果,在国内益生菌用于炎症性肠病治疗的综述中,第一次对益生菌的菌种选择、用药剂量、疗程、时机等问题进行了归纳讨论。



3.2 增强肠黏膜屏障 益生菌可通过调节肠道菌群、增强机械屏障、调节肠黏膜免疫功能从而自生物屏障、机械屏障、免疫屏障三个层次增强肠黏膜屏障。Fuentes等<sup>[22]</sup>在健康人中应用干酪乳杆菌与植物乳杆菌的研究发现两种益生菌均可增加肠黏膜内乳酸杆菌属细菌的多样性。Mennigen等<sup>[7]</sup>则发现VSL#3不仅能维持ZO-1、claudin-1、claudin-3、claudin-4、claudin-5等多种紧密连接蛋白的表达,还可抑制肠上皮细胞的凋亡;值得注意的是,在诱导小鼠DSS结肠炎的同时给予VSL#3灌胃7 d后的小鼠,与对照组相比虽仍有轻度组织学炎症,但黏膜通透性、紧密连接蛋白表达水平及上皮细胞凋亡比例均明显改善,并与正常对照小鼠相当接近。Wang等<sup>[23]</sup>的研究证实VSL#3可改变不同表型及功能的树突细胞在小鼠肠黏膜固有层及PP中分布的比例,进而调节肠黏膜免疫功能。Kwon等<sup>[24]</sup>给予健康小鼠嗜酸乳杆菌、干酪乳杆菌、罗伊乳杆菌、双歧双歧杆菌(*Bifidobacterium bifidum*)与嗜热链球菌5种益生菌的混合物,证实其可诱导小鼠肠道内CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T淋巴细胞向CD4<sup>+</sup>分叉头盒状蛋白3(forkhead box protein 3, Foxp3)<sup>+</sup>调节性T淋巴细胞的分化并可增强CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性T淋巴细胞的抑炎效应。

#### 4 益生菌用于IBD治疗存在的问题

4.1 菌种选择 现有动物研究表明不同益生菌在同一动物模型中疗效并不相同,同一益生菌在不同动物模型中的作用及机制也不一致。Foligne等<sup>[25]</sup>发现即使同为嗜酸乳杆菌,不同菌株的抗炎效应也有显著差异,部分菌株对TNBS诱导结肠炎几乎没有保护作用。因此有必要在选择用于临床的益生菌前进行完善的评估。Foligne等<sup>[25,26]</sup>提出可应用人的外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)及TNBS诱导的实验性结肠炎模型建立相关的评价体系筛查适用于临床研究的益生菌。近年的动物及临床研究均提示益生菌混合制剂VSL#3的疗效较为理想。Timmerman等<sup>[27]</sup>提出多株益生菌的混合制剂可能有助于增加生物多样性,并构成一种有助于外源性益生菌定植的小生态环境(niche),使得益生菌更易定植于肠道;并且多株益生菌的混合制剂有助于综合发挥各益生菌株间的不同生物学特性,可能产生协同效应。不过混合制剂中各菌株之间的相互抑制作用也值得关注。Christensen等<sup>[28]</sup>发现不同种类的乳酸杆菌

也具有相互作用,如罗伊乳杆菌可抑制干酪乳杆菌对树突细胞表面B7-2分子的上调。对如何合理选择临床应用的益生菌株及益生菌混合制剂的疗效及作用机制均需要深入研究。

4.2 给药剂量、时机及疗程 Foligne等<sup>[26]</sup>的动物研究发现益生菌的保护作用与活菌数量具有明显量效关系。实际上,如将目前结果较为理想的动物实验中所用益生菌剂量换算为人类用量,其剂量远超过当前临床用药剂量<sup>[7]</sup>。在保证用药安全的前提下是否能够进一步提高临床用药的剂量,提高剂量是否有助于增强疗效均有待进一步研究。Mane等<sup>[29]</sup>在一组实验中比较了在TNBS诱导结肠炎前后分别开始益生菌治疗的疗效差异,证实提前应用益生菌可减轻结肠炎,但诱导结肠炎后开始益生菌治疗时则对结肠组织学评分没有明显影响。临床研究同样发现,益生菌单独应用于IBD活动期治疗时效果不佳,用于UC缓解期维持复发时疗效则与低剂量美沙拉嗪相当<sup>[16]</sup>,因此益生菌的最佳用药时机还有待商榷。Mane等<sup>[29]</sup>还发现,在TNBS诱导小鼠结肠炎中,当TNBS灌肠后开始益生菌治疗时,虽然治疗1 wk时益生菌组与对照组组织学评分无明显差别,但第2周及第3周时益生菌组的组织学评分明显低于对照组,提示益生菌的治疗作用还可能与其疗程相关,益生菌的适宜疗程的确定也有待进一步研究。

4.3 安全性 益生菌长期以来均被认为“通常比较安全”(generally regarded as safe, GRAS),但从治疗作用考虑而选择的益生菌株通常对肠上皮细胞具有较好的黏附能力,而这一特性也可导致细菌易位的可能性增加<sup>[30]</sup>。临床上已有益生菌在一些免疫力低下的个体中引起菌血症、感染性心内膜炎与肝脓肿的报道,不过这些情况多出现于存在基础疾病的患者,目前尚没有在健康人中引起相关病变的报道。2002年芬兰的一项前瞻性研究指出,虽然自20世纪90年代以后含鼠李糖乳杆菌GG的奶制品在芬兰使用迅速增加,但乳酸杆菌引起的败血症发生率并未增加<sup>[31]</sup>。目前使用益生菌的大规模临床试验中仅发现一些腹痛、腹泻、腹胀、便秘、胀气等轻微的不良反应。最近Conen等<sup>[32]</sup>报道1例38岁的女性UC患者因病情持续活动加用含益生菌的酸奶治疗2 mo后出现发热、颈痛, MRI证实为颈椎硬膜外脓肿及咽后脓肿,穿刺引流培养结果为鼠李糖乳杆菌感染,提示我们还需进一步关注益生菌用于治疗IBD时的安全性。

#### ■应用要点

本文对益生菌在炎症性肠病治疗中应用的研究思路与方向具有一定的提示作用。

## ■名词解释

肠黏膜屏障: 广义的肠黏膜屏障包括生物屏障(肠腔菌群), 机械屏障(肠上皮层)与免疫屏障(肠黏膜免疫系统), 近年的研究认为肠黏膜屏障缺陷在IBD的肠道炎症形成及维持过程中可能具有关键的作用, 而益生菌与肠黏膜屏障间的关系也受到广泛的关注。

## 5 结论

现有研究已证实益生菌在实验性结肠炎及IBD治疗中具有一定作用, 其临床应用价值主要在于预防缓解期UC患者的结肠炎复发。将来还需要进行大量的工作明确益生菌的确切疗效及作用机制。动物的实验性结肠炎模型是IBD研究的重要工具, 虽然近年来不断有学者开发新的动物模型或对经典的动物模型予以改进, 但目前仍缺乏可理想模拟IBD发病机制及其发作-缓解-发作为特点的疾病模型; 益生菌种类繁多, 各菌株之间生物学特性千差万别, 现有动物实验及临床研究提示益生菌混合制剂的疗效优于单一益生菌制剂, 益生菌混合制剂中各菌株间的相互作用仍需要进一步的关注; 益生菌虽已进入IBD的临床应用, 但用药的剂量、时机、疗程、安全性等诸多问题仍有待研究明确。

## 6 参考文献

- Schrezenmeir J, de Vrese M. Probiotics, prebiotics, and synbiotics--approaching a definition. *Am J Clin Nutr* 2001; 73: 361S-364S
- Madsen KL, Doyle JS, Jewell LD, Tavernini MM, Fedorak RN. Lactobacillus species prevents colitis in interleukin 10 gene-deficient mice. *Gastroenterology* 1999; 116: 1107-1114
- Feighery LM, Smith P, O'Mahony L, Fallon PG, Brayden DJ. Effects of Lactobacillus salivarius 433118 on intestinal inflammation, immunity status and in vitro colon function in two mouse models of inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 2008; 53: 2495-2506
- Kennedy RJ, Hoper M, Deodhar K, Kirk SJ, Gardiner KR. Probiotic therapy fails to improve gut permeability in a hapten model of colitis. *Scand J Gastroenterol* 2000; 35: 1266-1271
- Lamine F, Eutamène H, Fioramonti J, Buéno L, Théodorou V. Colonic responses to Lactobacillus farciminis treatment in trinitrobenzene sulphonic acid-induced colitis in rats. *Scand J Gastroenterol* 2004; 39: 1250-1258
- 刘伟, 丁伟群, 戎兰, 钟良, 蒋义斌. 益生菌对结肠炎大鼠黏膜细胞因子表达的影响. *中华消化杂志* 2006; 26: 801-804
- Mennigen R, Nolte K, Rijcken E, Utech M, Loeffler B, Senninger N, Bruewer M. Probiotic mixture VSL#3 protects the epithelial barrier by maintaining tight junction protein expression and preventing apoptosis in a murine model of colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009; 296: G1140-G1149
- Gaudier E, Michel C, Segain JP, Cherbut C, Hoebler C. The VSL# 3 probiotic mixture modifies microflora but does not heal chronic dextran-sodium sulfate-induced colitis or reinforce the mucus barrier in mice. *J Nutr* 2005; 135: 2753-2761
- Dieleman LA, Goerres MS, Arends A, Sprengers D, Torrice C, Hoentjen F, Grenther WB, Sartor RB. Lactobacillus GG prevents recurrence of colitis in HLA-B27 transgenic rats after antibiotic treatment. *Gut* 2003; 52: 370-376
- Di Giacinto C, Marinaro M, Sanchez M, Strober W, Boirivant M. Probiotics ameliorate recurrent Th1-mediated murine colitis by inducing IL-10 and IL-10-dependent TGF-beta-bearing regulatory cells. *J Immunol* 2005; 174: 3237-3246
- Schultz M, Timmer A, Herfarth HH, Sartor RB, Vanderhoof JA, Rath HC. Lactobacillus GG in inducing and maintaining remission of Crohn's disease. *BMC Gastroenterol* 2004; 4: 5
- Rolfe VE, Fortun PJ, Hawkey CJ, Bath-Hextall F. Probiotics for maintenance of remission in Crohn's disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2006; : CD004826
- Guslandi M, Mezzi G, Sorghi M, Testoni PA. Saccharomyces boulardii in maintenance treatment of Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 2000; 45: 1462-1464
- Doherty GA, Bennett GC, Cheifetz AS, Moss AC. Meta-analysis: targeting the intestinal microbiota in prophylaxis for post-operative Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2010; 31: 802-809
- Sang LX, Chang B, Zhang WL, Wu XM, Li XH, Jiang M. Remission induction and maintenance effect of probiotics on ulcerative colitis: a meta-analysis. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 1908-1915
- Zocco MA, dal Verme LZ, Cremonini F, Piscaglia AC, Nista EC, Candelli M, Novi M, Rigante D, Cazzato IA, Ojetti V, Armuzzi A, Gasbarrini G, Gasbarrini A. Efficacy of Lactobacillus GG in maintaining remission of ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 23: 1567-1574
- Sood A, Midha V, Makharia GK, Ahuja V, Singal D, Goswami P, Tandon RK. The probiotic preparation, VSL#3 induces remission in patients with mild-to-moderately active ulcerative colitis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2009; 7: 1202-1209. e1
- Miele E, Pascarella F, Giannetti E, Quaglietta L, Baldassano RN, Staiano A. Effect of a probiotic preparation (VSL#3) on induction and maintenance of remission in children with ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 2009; 104: 437-443
- Bai AP, Ouyang Q, Xiao XR, Li SF. Probiotics modulate inflammatory cytokine secretion from inflamed mucosa in active ulcerative colitis. *Int J Clin Pract* 2006; 60: 284-288
- Cui HH, Chen CL, Wang JD, Yang YJ, Cun Y, Wu JB, Liu YH, Dan HL, Jian YT, Chen XQ. Effects of probiotic on intestinal mucosa of patients with ulcerative colitis. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1521-1525
- Pagnini C, Saeed R, Bamias G, Arseneau KO, Pizarro TT, Cominelli F. Probiotics promote gut health through stimulation of epithelial innate immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 454-459
- Fuentes S, Egert M, Jiménez-Valera M, Ramos-Cormenzana A, Ruiz-Bravo A, Smidt H, Monteoliva-Sanchez M. Administration of Lactobacillus casei and Lactobacillus plantarum affects the diversity of murine intestinal lactobacilli, but not the overall bacterial community structure. *Res Microbiol* 2008; 159: 237-243
- Wang X, O'Gorman MR, Bu HF, Koti V, Zuo XL, Tan XD. Probiotic preparation VSL#3 alters the distribution and phenotypes of dendritic cells within the intestinal mucosa in C57BL/10J mice. *J Nutr* 2009; 139: 1595-1602
- Kwon HK, Lee CG, So JS, Chae CS, Hwang JS, Sahoo A, Nam JH, Rhee JH, Hwang KC, Im SH. Generation of regulatory dendritic cells and CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T cells by probiotics administration suppresses immune disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107:

- 2159-2164
- 25 Foligne B, Nutten S, Grangette C, Dennin V, Goudercourt D, Poirer S, Dewulf J, Brassart D, Mercenier A, Pot B. Correlation between in vitro and in vivo immunomodulatory properties of lactic acid bacteria. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 236-243
- 26 Foligné B, Nutten S, Steidler L, Dennin V, Goudercourt D, Mercenier A, Pot B. Recommendations for improved use of the murine TNBS-induced colitis model in evaluating anti-inflammatory properties of lactic acid bacteria: technical and microbiological aspects. *Dig Dis Sci* 2006; 51: 390-400
- 27 Timmerman HM, Koning CJ, Mulder L, Rombouts FM, Beynen AC. Monostrain, multistain and multispecies probiotics--A comparison of functionality and efficacy. *Int J Food Microbiol* 2004; 96: 219-233
- 28 Christensen HR, Frøkiaer H, Pestka JJ. Lactobacilli differentially modulate expression of cytokines and maturation surface markers in murine dendritic cells. *J Immunol* 2002; 168: 171-178
- 29 Mañé J, Lorén V, Pedrosa E, Ojanguren I, Xaus J, Cabré E, Domènech E, Gassull MA. Lactobacillus fermentum CECT 5716 prevents and reverts intestinal damage on TNBS-induced colitis in mice. *Inflamm Bowel Dis* 2009; 15: 1155-1163
- 30 Boyle RJ, Robins-Browne RM, Tang ML. Probiotic use in clinical practice: what are the risks? *Am J Clin Nutr* 2006; 83: 1256-1264; quiz 1446-1447
- 31 Salminen MK, Rautelin H, Tynkkynen S, Poussa T, Saxelin M, Valtonen V, Järvinen A. Lactobacillus bacteremia, species identification, and antimicrobial susceptibility of 85 blood isolates. *Clin Infect Dis* 2006; 42: e35-e44
- 32 Conen A, Zimmerer S, Trampuz A, Frei R, Battegay M, Elzi L. A pain in the neck: probiotics for ulcerative colitis. *Ann Intern Med* 2009; 151: 895-897

## ■同行评价

本文内容全面, 对益生菌用于IBD的治疗具有一定的参考价值。

编辑 李薇 电编 李薇

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

## • 消息 •

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

本刊讯 《中文核心期刊要目总览》(2008年版)采用了被索量、被摘量、被引量、他引量、被摘率、影响因子、获国家奖或被国内外重要检索工具收录、基金论文比、Web下载量等9个评价指标, 选作评价指标统计源的数据库及文摘刊物达80余种, 统计文献量达32 400余万篇次(2003-2005年), 涉及期刊12 400余种。本版还加大了专家评审力度, 5 500多位学科专家参加了核心期刊评审工作。经过定量评价和定性评审, 从我国正在出版的中文期刊中评选出1 980余种核心期刊, 分属七大编73个学科类目。《世界华人消化杂志》入选本版核心期刊库(见R5内科学类核心期刊表, 第66页)。(编辑部主任: 李军亮 2010-01-08)

# 脑室内注射瘦素对大鼠胃肠运动的影响

赵艳军, 吴瑞芹, 乔跃兵, 刘凤芹, 李学良, 林琳, 李炳庆

## ■背景资料

瘦素(Leptin)是一种主要由白色脂肪组织分泌的蛋白类激素,在调节摄食、体质量、能量消耗和神经内分泌方面发挥着重要的作用。

赵艳军, 刘凤芹, 李炳庆, 河北省承德医学院附属医院消化内科 河北省承德市 067000

吴瑞芹, 河北省承德医学院附属医院呼吸内科 河北省承德市 067000

乔跃兵, 河北省承德医学院解剖教研室 河北省承德市 067000

李学良, 林琳, 南京医科大学第一附属医院消化内科 江苏省南京市 210029

江苏省卫生厅卫生科技发展项目, No. H200607

河北省科学技术研究与发展计划项目, No. 08276101D-20

作者贡献分布: 此课题由赵艳军、乔跃兵、李学良及林琳共同设计; 研究过程、资料查找、数据统计、论文写作由赵艳军、吴瑞芹、乔跃兵、刘凤芹、李学良、林琳及李炳庆完成; 论文定稿由李学良与李炳庆完成。

通讯作者: 李炳庆, 主任医师, 067000, 河北省承德市, 河北省承德医学院附属医院消化内科, nobody50@163.com

收稿日期: 2010-10-14 修回日期: 2010-11-19

接受日期: 2010-11-23 在线出版日期: 2010-12-28

## Intracerebroventricular injection of leptin inhibits gastric emptying but has no effect on intestinal transit in rats

Yan-Jun Zhao, Rui-Qin Wu, Yue-Bing Qiao, Feng-Qin Liu, Xue-Liang Li, Lin Lin, Bing-Qing Li

Yan-Jun Zhao, Feng-Qin Liu, Bing-Qing Li, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Chengde Medical University, Chengde 067000, Hebei Province, China

Rui-Qin Wu, Department of Respiratory Medicine, the Affiliated Hospital of Chengde Medical University, Chengde 067000, Hebei Province, China

Yue-Bing Qiao, Department of Anatomy, Chengde Medical University, Chengde 067000, Hebei Province, China

Xue-Liang Li, Lin Lin, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

Supported by: the Health and Science Foundation of Health Department of Jiangsu Province, No. H200607; and the Science Research Foundation of the Scientific and Technological Department of Hebei Province, No. 08276101D-20

Correspondence to: Professor Bing-Qing Li, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Chengde Medical University, Chengde 067000, Hebei Province, China. nobody50@163.com

Received: 2010-10-14 Revised: 2010-11-19

Accepted: 2010-11-23 Published online: 2010-12-28

## Abstract

**AIM:** To investigate whether injection of leptin into the lateral cerebral ventricle has impact on gastrointestinal motility in rats.

**METHODS:** Fifty-two female Sprague-Dawley rats were randomly divided into two groups: normal control group and leptin group. The leptin group was further divided into three subgroups for detection at 1, 3, and 5 h. For intracerebroventricular infusion, a guide cannula was fixed into the lateral cerebral ventricle one week before the experiment. Under no anesthesia, leptin (3.5 g/L) was injected into the lateral cerebral ventricle through the implanted guide cannula. Equal volume of saline was injected as a control. After the injection, rats were subjected to measurement of the rate of gastric emptying and the rate of intestinal transit.

**RESULTS:** The rate of gastric emptying decreased more significantly in the three leptin subgroups than in the normal control group ( $54.7\% \pm 8.3\%$ ,  $54.6\% \pm 9.3\%$ ,  $57.4\% \pm 8.9\%$  vs  $70.0\% \pm 6.1\%$ , all  $P < 0.05$ ). However, there is no significant difference in the rate of intestinal transit between the leptin subgroups and normal control group ( $41.1\% \pm 4.9\%$ ,  $49.5\% \pm 13.6\%$ ,  $43.6\% \pm 5.5\%$  vs  $43.0\% \pm 6.3\%$ , all  $P > 0.05$ ).

**CONCLUSION:** Intracerebroventricular injection of leptin inhibits gastric emptying but has no effect on intestinal transit in rats.

**Key Words:** Leptin; Gastrointestinal motility; Rat; Intracerebroventricular injection

Zhao YJ, Wu RQ, Qiao YB, Liu FQ, Li XL, Lin L, Li BQ. Intracerebroventricular injection of leptin inhibits gastric emptying but has no effect on intestinal transit in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(36): 3896-3899

## 摘要

**目的:** 观察脑室内注射瘦素对大鼠胃肠运动的影响。

**方法:** ♀SD大鼠52只(180-220 g), 将大鼠随机分为对照组和瘦素干预组, 根据干预的时间再分为1、3、5 h 3个亚组。实验前1 wk行侧脑室置管, 在无麻醉状态下每只老鼠从侧脑室注射瘦素3.5 g/L, 对照组注射等量生理盐水。大鼠( $n = 28$ , 每组 $n = 7$ )处死前15 min以500 mg/L的

## ■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

酚红溶液2 mL灌胃, 取出整个鼠胃, 以蒸馏水冲洗胃内容物, 定容为20 mL, 加入20 mL 0.5 mol/L NaOH搅拌混匀, 取上清液以分光光度计于560 nm波长处测定吸光度值, 计算胃排空率. 大鼠( $n=24$ , 每组 $n=6$ )处死前15 min给予5%炭粉混悬液灌胃, 计算无张力下小肠推进指数.

**结果:** 瘦素给药1、3、5 h胃排空率低于对照组, 差异有统计学意义( $54.7\% \pm 8.3\%$ ,  $54.6\% \pm 9.3\%$ ,  $57.4\% \pm 8.9\%$  vs  $70.0\% \pm 6.1\%$ , 均 $P<0.05$ ). 瘦素给药各亚组之间相比, 差异无统计学意义. 瘦素1、3、5 h小肠推进率分别为 $41.1\% \pm 4.9\%$ 、 $49.5\% \pm 13.6\%$ 、 $43.6\% \pm 5.5\%$ , 与对照组( $43.0\% \pm 6.3\%$ )相比, 差异无统计学意义.

**结论:** 给大鼠侧脑室微量注射瘦素抑制了大鼠的胃排空, 对大鼠的小肠推进率却没有影响.

**关键词:** 瘦素; 胃肠运动; 大鼠; 侧脑室内注射

赵艳军, 吴瑞芹, 乔跃兵, 刘凤芹, 李学良, 林琳, 李炳庆. 脑室内注射瘦素对大鼠胃肠运动的影响. 世界华人消化杂志 2010; 18(36): 3896-3899

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/3896.asp>

## 0 引言

瘦素是一种主要由白色脂肪组织分泌的蛋白质类激素, 他是肥胖(obese, ob)基因的编码产物. 1994年美国洛克菲勒大学Friedman领导的实验室成员Zhang等<sup>[1]</sup>应用定位克隆法(positional cloning)首次从肥胖和糖耐量异常的小鼠成功地克隆了ob基因及人类的同源序列. 瘦素具有广泛的生物学效应, 包括: 抑制下丘脑食欲中枢, 使食欲减退, 能量消耗增加, 从而使体质量下降<sup>[2-5]</sup>; 参与生殖功能的调节<sup>[6]</sup>; 具有刺激造血功能的活性<sup>[7]</sup>; 直接参与血压的调节<sup>[8]</sup>; 刺激骨髓细胞和改变肾功能<sup>[9]</sup>. 瘦素通过与瘦素受体结合而发挥调节食物的摄入和能量平衡等生物学功能<sup>[1-3,10]</sup>. 摄食行为是由胃执行的, 胃的运动控制摄食量<sup>[11]</sup>, 因此瘦素如何调节胃肠运动并控制摄食量是目前研究的重要课题.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 动物及动物饲养条件遵照“中华人民共和国实验动物管理条例”和“实验动物质量管理办法”实施, ♀SD大鼠52只. 大鼠脑立体定位仪为淮北正华生物仪器设备有限公司产品, 微量注射器为上海光正医疗仪器有限公司产品.

其余实验材料包括: 脑室置管实验使用的外管(guide cannula)、相配套的内芯(dummy cannula), 苯酚红, NaOH, 三氯乙酸, 活性炭, 羧甲基纤维素钠, 分光光度计, 离心机, 软尺.

### 1.2 方法

**1.2.1 侧脑室置管:** 在10%水合氯醛麻醉下(3 mL/kg, 腹腔内注射), 将大鼠固定在脑立体定位仪上, 根据大鼠脑图, 从十字缝后方0.8 mm, 旁开1.5 mm, 深3.5 mm, 在颅盖骨上打开直径约2.0 mm的洞, 置入不锈钢导管(长13.0 mm, 外径0.64 mm, 内经0.39 mm); 用戴帽的不锈钢制导丝(长12 mm, 直径0.33 mm), 插入已经置入的不锈钢导管内用以封闭导管. 另外用2个不锈钢制的螺钉固定在置入导管两侧的头骨上, 用牙科黏合剂与导管固定. 手术后动物自由恢复1 wk.

**1.2.2 分组及给药:** 将置管恢复后的大鼠随机分为对照组和瘦素干预组, 根据干预的时间再分为1, 3, 5 h亚组, 每组13只(胃排空测定组 $n=7$ , 小肠推进率组 $n=6$ ). 大鼠禁食20-24 h后, 在清醒无麻醉状态、稍微限制活动情况下每只老鼠从侧脑室注射瘦素3.5 g/L<sup>[1]</sup>, 将瘦素溶液用微量注射器缓慢注入, 注射时间 $\geq 4$  min, 留置针头1 min, 然后注入20 g/L的美蓝溶液0.5  $\mu$ L, 确定注射位置, 药物未注入脑室不列入实验统计数内.

**1.2.3 胃排空测定:** 给大鼠以500 mg/L酚红溶液2 mL灌胃, 15 min后颈椎脱臼处死. 剖腹, 结扎贲门和幽门, 取出整个鼠胃, 沿胃大弯切开, 以蒸馏水冲洗胃内容物, 定容为20 mL. 加入20 mL 0.5 mol/L NaOH搅拌混匀, 静置1 h. 取5 mL上清液, 加入0.5 mL 20%三氯乙酸去蛋白, 3 500 r/min 4  $^{\circ}$ C离心10 min, 取上清液, 以分光光度计于560 nm波长处测定吸光度值. 另取2 mL酚红溶液, 加入18 mL蒸馏水、20 mL 0.5 mol/L NaOH、4 mL 20%三氯乙酸搅拌混匀, 测定吸光度值. 大鼠胃排空率 =  $(1 - \text{实测酚红吸光度值} / \text{标准酚红吸光度值}) \times 100\%$ .

**1.2.4 小肠推进率测定:** 每组大鼠处死前15 min以10 mL/kg体质量给予5%炭粉混悬液(活性炭和羧甲基纤维素钠各5%)灌胃, 剖腹取出全部小肠并计算无张力下小肠推进指数: 炭粉前端至幽门括约肌距离(cm)/幽门括约肌至小肠末端距离(cm)  $\times 100\%$ .

**统计学处理** 所有数据录入SPSS11.0统计软件包, 所有测定值以mean  $\pm$  SD表示, 统计学方法采用方差分析,  $P<0.05$ 差异有统计学意义.

## ■ 研发前沿

瘦素通过与瘦素受体结合而发挥调节食物的摄入和能量平衡等生物学功能. 摄食行为是由胃执行的, 胃的运动控制摄食量, 因此瘦素如何调节胃肠运动并控制摄食量是目前研究的重要课题.

## ■ 创新盘点

本研究中采用中枢给药方式, 给SD大鼠侧脑室注射瘦素, 通过酚红灌胃检测胃排空率, 炭末推进检测小肠推进率, 以此观察侧脑室内注射瘦素对大鼠胃肠运动的影响.



### ■应用要点

本研究通过给大鼠侧脑室注射瘦素, 观察对大鼠胃肠运动的影响。对于瘦素参与胃肠运动调节研究有一定的价值, 为瘦素生物学活性的进一步研究奠定了一定的基础。

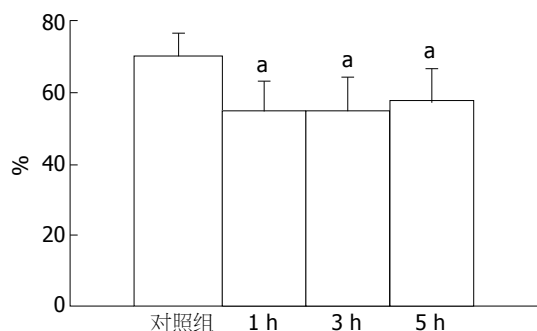


图1 瘦素中枢微量注射对大鼠胃排空的影响。\* $P < 0.05$  vs 对照组。

## 2 结果

**2.1 胃排空率** 瘦素给药1, 3, 5 h胃排空率分别为 $54.7\% \pm 8.3\%$ 、 $54.6\% \pm 9.3\%$ 、 $57.4\% \pm 8.9\%$ , 与对照组( $70.0\% \pm 6.1\%$ )相比, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 瘦素给药各亚组之间差异无统计学意义( $P > 0.05$ , 图1)。

**2.2 小肠推进率** 瘦素给药1, 3, 5 h小肠推进率分别为 $41.1\% \pm 4.9\%$ 、 $49.5\% \pm 13.6\%$ 、 $43.6\% \pm 5.5\%$ , 与对照组( $43.0\% \pm 6.3\%$ )相比, 差异无统计学意义( $P > 0.05$ , 图2)。

## 3 讨论

行为学、电生理学及临床研究发现瘦素缺乏将导致机体因摄食过量而肥胖, 证明瘦素是摄食调节和维持机体能量和代谢平衡的极其重要的影响因子<sup>[3]</sup>。在摄食过程中, 由食物消化物所激活的迷走神经可将与摄食相关的多种胃肠道信息, 如胃肠的扩张和收缩、十二指肠内的食糜刺激释放的胃肠激素和神经递质信息(如瘦素)传入孤束核和下丘脑。在整个作用环节中, 瘦素受体及迷走神经等在饱食信号的产生和传递中发挥了重要的作用, 因此瘦素的分泌异常及其受体的改变可能影响胃肠运动。本研究通过观察侧脑室内注射瘦素对大鼠胃肠运动的影响来进行初步的探讨。

本组给SD大鼠侧脑室注射瘦素, 抑制了大鼠注射后1、3、5 h的胃排空, 这与Smedh等<sup>[12]</sup>观察到向大鼠第4脑室注射瘦素可以抑制胃排空的结果一致。瘦素对胃排空的抑制作用, 在中枢主要作用靶器官是下丘脑。王礼建等<sup>[13]</sup>向下丘脑外侧区及腹内侧区注射微量瘦素研究对大鼠胃运动的作用, 观察到引起胃排空延迟时胃运动的变化, 研究发现, 当下丘脑内注射瘦素后, 使胃体和胃窦移行性运动复合波III相振幅产生剂量反应性抑制, 切断迷走神经则阻断下丘脑瘦

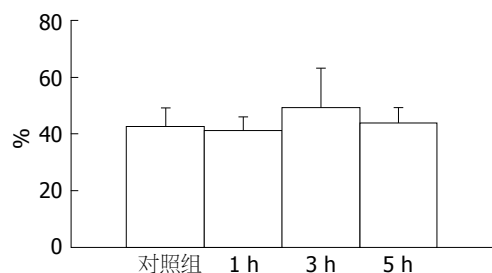


图2 瘦素中枢微量注射对大鼠小肠推进率的影响。

素对胃运动的抑制效应。进一步对于瘦素作用途径的研究, Cakir等<sup>[14]</sup>通过中枢给药法给SD大鼠注射瘦素, 发现瘦素对胃排空的延迟作用是通过激活肾上腺素能受体途径实现的。

目前已知胃动素、瘦素、酪酪肽以及胰岛素等均作用于脑干迷走复合体进而影响迷走神经的传出功能, 正是这一激素神经通路参与了对胃肠运动、食欲及摄食功能的调节<sup>[15]</sup>。研究证实瘦素具有与胆囊收缩素协同调节小肠运动的作用并且二者可能是通过共同作用于迷走神经调节小肠运动<sup>[16,17]</sup>。并且有研究证实肠黏膜中存在瘦素受体<sup>[18]</sup>, 与小肠动力相关的迷走神经也含有瘦素受体<sup>[19]</sup>, 提示瘦素可能与肠动力有关, 但对瘦素调节肠动力的相关研究很少。本文通过中枢注射给药观察瘦素对大鼠小肠推进率的影响, 与对照组相比, 差异无统计学意义。这一结果可能与迷走神经虽然支配整个胃肠系统, 但其主要实施对上消化道功能的调控, 迷走神经末梢在胃的分布最为密集, 其次为十二指肠, 随着消化道向下端的延伸, 迷走神经的分布逐渐减少有关。

本实验通过给大鼠侧脑室注射瘦素, 观察对大鼠胃肠运动的影响, 结果表明给大鼠侧脑室微量注射瘦素抑制了大鼠的胃排空, 对大鼠的小肠推进率却没有影响, 这对于瘦素参与胃肠运动调节的研究有一定的价值, 对于瘦素影响胃肠运动的可能机制还需要进一步的研究。

## 4 参考文献

- 1 Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994; 372: 425-432
- 2 Kamohara S, Burcelin R, Halaas JL, Friedman JM, Charron MJ. Acute stimulation of glucose metabolism in mice by leptin treatment. *Nature* 1997; 389: 374-377
- 3 Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 1998; 395: 763-770
- 4 Ziyen YZ, Baltaci AK, Mogulkoc R. Leptin transport

- in the central nervous system. *Cell Biochem Funct* 2009; 27: 63-70
- 5 Woods SC, D'Alessio DA. Central control of body weight and appetite. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93: S37-S50
  - 6 Mise H, Yura S, Itoh H, Nuamah MA, Takemura M, Sagawa N, Fujii S. The relationship between maternal plasma leptin levels and fetal growth restriction. *Endocr J* 2007; 54: 945-951
  - 7 Stefanou N, Satra M, Papanikolaou V, Kalala F, Gatselis N, Germentis A, Dalekos GN, Tsezou A. Leptin receptor isoforms mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells from patients with chronic viral hepatitis. *Exp Biol Med (Maywood)* 2006; 231: 1653-1663
  - 8 Brook RD, Bard RL, Bodary PF, Eitzman DT, Rajagopalan S, Sun Y, Depaoli AM. Blood pressure and vascular effects of leptin in humans. *Metab Syndr Relat Disord* 2007; 5: 270-274
  - 9 Nasri H. The association between serum leptin and blood lymphocytes in hemodialysis patients. *Bratisl Lek Listy* 2007; 108: 122-127
  - 10 Laws SC, Stoker TE, Ferrell JM, Hotchkiss MG, Cooper RL. Effects of altered food intake during pubertal development in male and female wistar rats. *Toxicol Sci* 2007; 100: 194-202
  - 11 周吕. 胃肠生理学. 北京: 科学出版社, 1991: 165-166
  - 12 Smedh U, Håkansson ML, Meister B, Uvnäs-Moberg K. Leptin injected into the fourth ventricle inhibits gastric emptying. *Neuroreport* 1998; 9: 297-301
  - 13 王礼建, 周吕, 袁勃, 王玲. 瘦素对大鼠胃运动的调节作用. *中华医学杂志* 2006; 86: 2266-2270
  - 14 Cakir B, Kasimay O, Devseren E, Yeğen BC. Leptin inhibits gastric emptying in rats: role of CCK receptors and vagal afferent fibers. *Physiol Res* 2007; 56: 315-322
  - 15 周吕. 胃肠激素与胃肠动力. *中国实用内科杂志* 2006; 26: 733-736
  - 16 Peters JH, Ritter RC, Simasko SM. Leptin and CCK selectively activate vagal afferent neurons innervating the stomach and duodenum. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2006; 290: R1544-R1549
  - 17 Gaigé S, Abysique A, Bouvier M. Effects of leptin on cat intestinal motility. *J Physiol* 2003; 546: 267-277
  - 18 Iñigo C, Patel N, Kellett GL, Barber A, Lostao MP. Luminal leptin inhibits intestinal sugar absorption in vivo. *Acta Physiol (Oxf)* 2007; 190: 303-310
  - 19 Buyse M, Ovesjö ML, Götiot H, Guilmeau S, Péranski G, Moizo L, Walker F, Lewin MJ, Meister B, Bado A. Expression and regulation of leptin receptor proteins in afferent and efferent neurons of the vagus nerve. *Eur J Neurosci* 2001; 14: 64-72

#### ■同行评价

本文选题恰当, 对于瘦素参与胃肠运动调节研究有一定的价值。

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

#### • 消息 •

### *WJC, WJGE, WJGO, WJGS, WJH, WJR* 6 本期刊 被 PMC 收录

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

# 丙型肝炎病毒E2结合蛋白基因在人胰腺细胞cDNA文库中的筛选

张 婷, 任 娜, 田梅梅, 李 贵, 张锦前, 成 军

## ■背景资料

随着人们生活水平的提高, 代谢性疾病对人类危害日益加大, 其中代谢综合征(MS)为主要表现之一。MS与肥胖、2型糖尿病、高脂血症、心血管系统疾病以及结肠癌、肾癌、胰腺癌和肝细胞癌等有关, 以中心性肥胖和胰岛素抵抗为重要致病因素, 主要病理生理基础是胰岛素抵抗。

张婷, 任娜, 田梅梅, 李贵, 张锦前, 成军, 北京地坛医院 首都医科大学传染病研究所 北京市 100015

国家自然科学基金资助项目, No. 30600524

作者贡献分布: 此课题由张锦前设计; 研究过程由张婷、任娜、田梅梅、李贵及张锦前操作完成; 数据分析由张婷、任娜、田梅梅、李贵及张锦前完成; 本论文写作由张婷、张锦前及成军完成。

通讯作者: 成军, 主任医师, 100015, 北京市朝阳区京顺东街8号, 北京地坛医院, 首都医科大学传染病研究所。

cj@genetherapy.com.cn

电话: 010-84322291

收稿日期: 2010-01-07 修回日期: 2010-11-02

接受日期: 2010-11-23 在线出版日期: 2010-12-28

## Screening of proteins binding to hepatitis C virus E2 protein from a human pancreas cDNA library

Ting Zhang, Na Ren, Mei-Mei Tian, Ben Li, Jin-Qian Zhang, Jun Cheng

Ting Zhang, Na Ren, Mei-Mei Tian, Ben Li, Jin-Qian Zhang, Jun Cheng, Beijing Ditan Hospital; Institute of Infectious Diseases of Capital Medical University, Beijing 100015, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30600524

Correspondence to: Jun Cheng, Beijing Ditan Hospital, Institute of Infectious Diseases of Capital Medical University, 8 Shundong Avenue, Chaoyang District, Beijing 100015, China. cj@genetherapy.com.cn

Received: 2010-01-07 Revised: 2010-11-02

Accepted: 2010-11-23 Published online: 2010-12-28

## Abstract

**AIM:** To screen proteins that interact with hepatitis C virus (HCV) E2 protein from a human pancreas cDNA library.

**METHODS:** A human pancreas cDNA library was amplified, purified and identified, and the purified library plasmid was transformed into yeast strain Y187. Bait plasmid pGBKT7-E2 was transformed into yeast strain AH109 and selected on SD/-Trp medium. Transformed AH109 clones were then mated with Y187 strain containing the library plasmid. The resulting diploid yeast cells were plated on SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade medium with or without X- $\alpha$ -

gal for selection. The plasmids in diploid yeast cells were prepared and electrotransformed into *E. coli* DH5 $\alpha$ . The plasmids in DH5 $\alpha$  were prepared, sequenced, and blasted against GenBank.

**RESULTS:** A human pancreas cDNA library was constructed successfully. The bait plasmid (pGBKT7-HCV E2) was transformed into AH109 yeast cells successfully. Eight proteins interacting with HCV E2 were identified, including chymotrypsinogen B1, trypsinogen, carboxyl ester lipase, CDK5, carboxypeptidase, human v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homologue, elastase 3A, and colipase.

**CONCLUSION:** Eight pancreatic proteins that interact with HCV E2 have been screened from a human pancreas cDNA library.

**Key Words:** Pancreas; Hepatitis C virus; Pancreas cDNA library; Hybridization; Genetics

Zhang T, Ren N, Tian MM, Li B, Zhang JQ, Cheng J. Screening of proteins binding to hepatitis C virus E2 protein from a human pancreas cDNA library. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(36): 3900-3904

## 摘要

**目的:** 筛选人胰腺细胞cDNA文库中与HCV包膜糖蛋白E2相互作用的结合蛋白的编码基因。

**方法:** 扩增人胰腺细胞cDNA文库进行纯化鉴定, 并将文库质粒转化酵母菌株Y187。诱饵质粒pGBKT7-E2转化酵母菌株AH109, 在色氨酸缺陷型培养基(SD/-Trp)上筛选阳性菌落。应用酵母双杂交系统3将阳性重组AH109菌株与重组酵母菌株Y187进行配合, 在4缺培养基(SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade)和铺有X- $\alpha$ -gal的4缺培养基上进行筛选, 提取蓝色酵母菌落质粒, 电转化大肠埃希菌DH5 $\alpha$ 后再提取质粒测序。测序结果进行序列比对。

**结果:** 成功构建人胰腺cDNA文库以及pGBKT7-HCV E2重组质粒, 筛选出8种与HCV E2蛋白相结合的蛋白基因, 分别为: 胰凝乳蛋

## ■同行评议者

吴君, 主任医师, 贵阳医学院附属医院感染科; 党双锁, 教授, 西安交通大学第二医院感染科

白酶原B1前体、胰蛋白酶原、胆盐刺激酯酶、CDK5、羧肽酶B1、人类v-Ki-ras2、鼠Kirsten肉瘤、弹性蛋白酶3A及辅脂肪酶。

**结论:** 筛选出的与HCV E2蛋白结合的人胰腺细胞蛋白基因中,部分与2型糖尿病、肝脏脂肪变性密切相关。

**关键词:** 胰腺; 丙型肝炎病毒; 人胰腺cDNA文库; 酵母菌杂交; 遗传

张婷, 任娜, 田梅梅, 李贵, 张锦前, 成军. 丙型肝炎病毒E2结合蛋白基因在人胰腺细胞cDNA文库中的筛选. 世界华人消化杂志 2010; 18(36): 3900-3904

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/3900.asp>

## 0 引言

随着人们生活水平的提高,代谢性疾病对人类危害日益加大,其中代谢综合征(metabolic syndrome, MS)为主要表现之一。MS与肥胖、2型糖尿病、高脂血症、心血管系统疾病以及结肠癌、肾癌、胰腺癌和肝细胞癌等有关,以中心性肥胖和胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)为重要致病因素,主要病理生理基础是IR。有相关研究报道,丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)感染与糖尿病、移植后糖尿病、地中海贫血患者伴发的糖尿病或糖代谢异常均有相关性<sup>[1]</sup>。而且,肝脂肪变的存在与慢性丙型肝炎(chronic hepatitis C, CHC)的疾病进展有关<sup>[2]</sup>。另外, Mason等<sup>[3]</sup>指出HCV感染与糖尿病(diabetes mellitus, DM)密切相关。HCV包膜糖蛋白E2是一种多功能蛋白质,与HCV感染的慢性化和抗病毒免疫关系密切。因此我们应用酵母双杂交技术筛选人胰腺细胞cDNA文库中的HCV E2结合蛋白基因,为研究HCV慢性感染与MS、IR之间的相关性及其作用机制,以及进而影响糖、脂类代谢的分子生物学机制提供了重要信息。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** YPDA SD/-Trp、SD/-Leu、SD/-Trp/-Leu、SD/-Trp/-Leu/-His以及SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade培养基均购自美国Clontech公司。酵母双杂交系统3试剂盒: 其中包括人胰腺细胞cDNA文库、pGADT7-AD克隆载体、pGBKT7-BD克隆载体、pGADT7-T对照质粒、pGBKT7-53对照质粒、酵母菌株AH109、酵母菌株Y187, 购自美国Clontech公司。引物合成由北京奥科生物技术公司完成。

## 1.2 方法

**1.2.1 酵母胰腺细胞cDNA文库的构建:** 按试剂盒说明书对文库进行扩增,纯化文库质粒后转化大肠埃希菌DH5 $\alpha$ 感受态细胞,随机挑取6个单克隆提取质粒, *Eco*R I、*Xho* I 双酶切鉴定cDNA文库的多样性。然后将该文库转化酵母菌株Y187,制备酵母胰腺细胞cDNA文库。提取新鲜生长的Y187酵母菌落(直径>2 mm)接种于150 mL YPDA液体培养基中,30℃振荡培养至 $A_{600}>1.5$ 时,把该培养物转摇至850 mL YPDA液体培养基中,30℃振荡培养至 $A_{600}=0.4-0.6$ 。以醋酸锂法将胰腺细胞cDNA文库质粒(0.25 mg)转化入酵母菌株Y187进行文库转化,然后将转化物铺SD/-Leu板50块,30℃倒置温育7 d。同时将转化产物按1:10、1:1 $\times 10^2$ 、1:1 $\times 10^4$ 、1:1 $\times 10^6$ 和1:1 $\times 10^8$ 分别铺于SD/-Leu培养基上检验转化效率。同时将pGADT7-AD和pGADT7-T对照质粒转化酵母菌株Y187。

**1.2.2 诱饵质粒转化酵母菌株及鉴定:** HCV E2蛋白的酵母表达载体pGBKT7-HCV E2由北京地坛医院传染病研究所构建,醋酸锂法转入酵母菌株AH109。转化后铺板于SD/-Trp固体培养基进行筛选,对直径>2 mm的菌落随机挑取进行菌落PCR鉴定。同时将pGBKT7-BD和pGBKT7-53对照质粒转化酵母菌株AH109。

**1.2.3 pGBKT7-HCV E2质粒转化的酵母菌株AH109与胰腺细胞cDNA文库质粒转化的酵母菌株Y187的配合:** 挑取新鲜生长的经菌落PCR鉴定正确的AH109酵母菌落(直径>2 mm),接种于SD/-Trp液体培养基中,30℃振荡至 $A_{600}=0.8-1.0$ 。重悬于50 mL 2 $\times$ YPDA培养基中,与4 mL含胰腺细胞cDNA文库的酵母细胞于摇床中30℃ 45 r/min(离心半径为5 mm)振荡培养配合24 h。观察到三叶草状的二倍体细胞后,将其重悬于10 mL 0.25 $\times$ YPDA培养基中,然后铺SD/-Trp/-Leu/-His平板和SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade平板各25块,置30℃温箱培养。同时将配合产物按1:10、1:1 $\times 10^2$ 和1:1 $\times 10^3$ 分别铺于SD/-Trp/-Leu、SD/-Trp、SD/-Leu培养基上检验配合效率。生长16 d后把直径>2 mm的菌落划线于铺有X- $\alpha$ -gal的SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade培养基上,在此培养基上生长且变成蓝色的为阳性菌落。同时设立阳性对照和阴性对照,阳性对照为pGADT7-T质粒转化的酵母菌株Y187与pGBKT7-53质粒转化的酵母菌株AH109配合;阴性对照为pGBKT7-BD质粒转化的酵母菌

## ■相关报道

王琳等运用酵母双杂交技术证实HCV核心蛋白可与肝细胞中的载脂蛋白Apo-A1结合,他们的结合可能会影响Apo-A1的结构及其脂质转运的功能,进而影响脂类的代谢过程。

## ■创新盘点

本文应用经典的验证蛋白质-蛋白质相互作用的酵母双杂交方法,在胰腺细胞cDNA文库中筛选出HCV E2结合蛋白,为研究慢性丙型肝炎患者出现糖、脂代谢异常及伴发代谢性疾病的机制提供了研究依据和方向。

## ■应用要点

HCV E2可能与胰腺细胞中的蛋白结合后进一步导致IR和糖、脂代谢异常,最终发展为2型糖尿病、脂肪肝和MS等代谢性疾病。

表 1 阳性克隆测序后Blast比对结果

序号	已知的同源序列编码蛋白基因	相同克隆数(n)	同源性(%)
1	胰凝乳蛋白酶原B1前体	2	100
2	胰蛋白酶原	3	100
3	胆盐刺激酯酶	2	99
4	CDK5	2	99
5	羧肽酶B1	1	99
6	人类v-Ki-ras2鼠Kirsten肉瘤	1	98
7	弹性蛋白酶3A	1	98
8	辅脂肪酶	1	100

株AH109与胰腺细胞文库质粒转化的酵母菌株Y187配合、pGBKT7-HCV E2质粒转化的酵母菌株AH109、胰腺细胞cDNA文库质粒转化的酵母菌株Y187。

1.2.4 阳性质粒的分析: 于SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade固体培养基上挑取阳性菌落, 于摇床中30℃, 250 r/min(离心半径为5 mm)振荡5 d后用酸化玻璃珠法提取酵母质粒。电穿孔法将提取的质粒转化大肠埃希菌, 并于含氨苄西林的LB平板上培养, 所获得菌落质粒用Bgl II酶切鉴定后测序, 测序结果与基因库中的序列进行比对分析。

## 2 结果

2.1 酵母胰腺细胞cDNA文库的成功构建及鉴定待转化的胰腺cDNA文库滴度在 $5 \times 10^7$  CFU/mL左右, 纯化后的质粒DNA浓度约为0.32 g/L。随机挑取文库菌落, 提取质粒, 用Bgl II酶切鉴定胰腺细胞cDNA文库的多样性, 结果显示插入片段大小不一, 说明文库具有良好的多样性, 见图1。胰腺细胞cDNA文库转化酵母菌株Y187后, 检验转化效率, 确定其滴度 $>1 \times 10^6$  CFU/mL, 确定胰腺细胞cDNA文库转化成功。

2.2 pGBKT7-HCV E2质粒转化AH109酵母菌株用醋酸锂法转化酵母细胞后在缺陷型SD-Trp培养基上筛选生长。培养4 d后, 挑取菌落进行PCR扩增HCV E2基因, 结果显示转化成功(图2)。

2.3 酵母双杂交系统3筛选与HCV E2结合的胰腺蛋白 配合时观察到的三叶草状二倍体酵母细胞, 见图3。

2.4 筛选出的胰腺细胞cDNA文库质粒测序与同源性分析 初步结果共筛选出13个阳性克隆, 其测序结果与基因库进行同源序列比对分析, 发

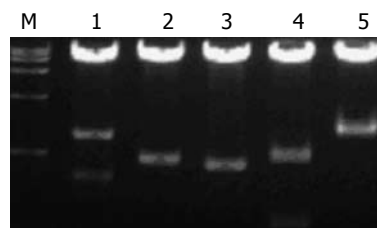


图 1 部分文库质粒鉴定结果. M: DNA Marker; 1-5: 部分文库质粒Bgl II酶切鉴定。

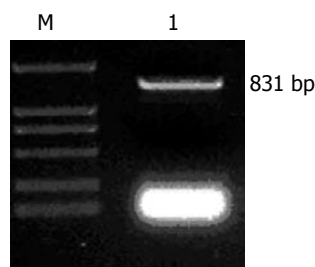
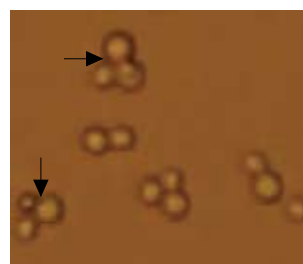


图 2 pGBKT7-HCV E2质粒转化AH109酵母菌株后菌落PCR的鉴定结果. M: DNA Marker; 1: pGBKT7-HCV E2质粒转化AH109酵母菌株后单克隆菌株PCR扩增结果。

图 3 三叶草状二倍体酵母细胞图. 胰腺细胞cDNA文库转化的酵母菌株Y187与pGBKT7-HCV E2质粒转化的AH109酵母菌株共同培养16 h后, 用显微镜( $\times 40$ )观察培养液可见配合生成的三叶草状二倍体酵母细胞(箭头指示)。

现HCV E2蛋白与8种人类基因表达蛋白可能存在相互作用, 见表1。阴性对照无酵母菌落生长, 阳性对照可见酵母菌落生长。

## 3 讨论

自1989年HCV发现以来, 人们研究发现HCV感染不仅导致肝损害, 并与肝外组织损害表现密切相关, 其中一个最主要的表现就是代谢性疾病。1992年, Thomssen等<sup>[4]</sup>就发现含有HCV RNA的病毒颗粒密度显著异常, 且与血清中 $\beta$ 脂蛋白有关, 1995年人们<sup>[5]</sup>注意到慢性丙型肝炎患者肝活检标本脂肪变性是其一大特征, 从而意识到HCV可能干扰了肝脏的脂肪代谢。近年来国内外研究证实慢性丙型肝炎发病机制之一是肝脏脂肪变性, 提示其是一种代谢性疾病, 丙型肝炎病毒与MS密切相关, 肝脏脂肪变性及IR可能是



HCV致MS的中心环节<sup>[6]</sup>. 2型糖尿病和脂肪肝是MS的部分表现,且大都存在IR,IR使胰岛B细胞代偿性增加,胰岛素分泌并促使胰岛B细胞功能逐步衰退,导致糖耐量异常和2型糖尿病,而糖、脂代谢异常也会加重IR,三者之间关系密切、互为因果、也可能相互促进,其中IR可能是中心环节,提示慢性丙型肝炎也是一种代谢性疾病<sup>[7]</sup>.因此IR被广泛认为是MS发病的核心,与糖代谢、脂代谢、高血压、肥胖等密切相关.由此,我们认为HCV慢性感染可能与MS密切相关.

目前,HCV感染引起的肝脏脂肪变的分子生物学机制尚无定论,但是推测HCV的结构蛋白和非结构蛋白对于肝脏细胞脂类代谢的干扰,甚至是HCV RNA与肝细胞脂类代谢物质的结合,可能是肝脏脂肪变形成的主要原因<sup>[8,9]</sup>.王琳等<sup>[10]</sup>运用酵母双杂交技术证实HCV核心蛋白可与肝细胞中的载脂蛋白Apo-A1结合,他们的结合可能会影响Apo-A1的结构及其脂质转运的功能,进而影响脂类的代谢过程.通过对重组的E1/E2包膜蛋白与低密度脂蛋白、极低密度脂蛋白和高密度脂蛋白结合的分子特性进行的研究,认为HCV进入血液后与脂滴结合形成复合物,通过低密度脂蛋白受体进入肝脏,进行复制,其产物与肝细胞中合成的载脂蛋白相互作用影响脂肪代谢,形成脂肪肝等表现<sup>[11,12]</sup>.

酵母双杂交系统是近年来新发展的分析蛋白-蛋白、蛋白-DNA、蛋白-RNA相互作用的一种有效的基因分析方法,为研究蛋白在体内生理情况下的相互作用提供了一种新的遗传学方法.酵母双杂交系统有3个表达基因进行筛选及作为严格的对照,且在增加报告基因的基础上,利用 $\alpha$ 型和 $\alpha$ 型酵母配合形成的二倍体细胞内,诱饵质粒与文库质粒所表达的蛋白质可相互作用的原理,解决了共转染两种质粒所带来的低效率问题,并将真阳性率提高至95%以上,而假阳性率在5%以下,增大了结果的可靠性.我们选择以HCV E2作为酵母双杂交的诱饵蛋白,从人胰腺细胞cDNA文库中筛选与其相互作用的蛋白基因,寻找其中与糖、脂代谢相关的蛋白基因,为相关的机制研究奠定基础.

本实验将胰腺细胞cDNA文库质粒扩增后成功转化酵母菌株Y187,构建成功酵母胰腺细胞cDNA文库,以备进一步更广泛的酵母双杂交筛选工作使用.成功构建pGBKT7-HCV E2诱饵质粒,在酵母菌株AH109中表达HCV E2蛋白,并进一步与前述构建好的酵母胰腺细胞cDNA文

库进行配合,筛选出可能与HCV E2蛋白存在相互作用的已知胰腺细胞蛋白基因8种.这些蛋白以参与三大物质消化、吸收的酶类为主,其中参与糖、脂代谢的酶主要有胰蛋白酶(原)、胆盐刺激酯酶、弹性蛋白酶和辅脂肪酶.有研究发现,弹性酶可抑制大白鼠和小白鼠自发性糖尿病,抑制试验性肝纤维化、增强脂肪肝时的肝脏脂肪分解.其作为药物主要可用于防治动脉硬化症、高脂血症、高血压、糖尿病和脂肪肝等<sup>[13-17]</sup>.另外实验发现,胰凝乳蛋白酶原B1前体是胰凝乳蛋白酶的前体,在小肠受到胰蛋白酶的分解,转变成具有活性的胰凝乳蛋白酶,主要分解多肽链中的芳香族氨基酸;羧肽酶B主要分解碱性氨基酸,其活性与锌有关.同时还发现,人类v-Ki-ras2鼠Kirsten肉瘤病毒致癌基因同源物蛋白也可以与HCV NS3蛋白相互作用,他在人类正常组织的增殖、分化和衰亡中有着非常重要的作用.有研究表明,HCV可在胰腺细胞中复制,HCV E2在胰腺细胞中与前述这些蛋白结合后可能会影响他们的结构和功能,从而影响糖、脂代谢过程.

我们此次应用经典的验证蛋白质-蛋白质相互作用的酵母双杂交方法,在胰腺细胞cDNA文库中筛选出HCV E2结合蛋白,为研究慢性丙型肝炎患者出现糖、脂代谢异常及伴发代谢性疾病的机制提供了研究依据和方向.根据本研究结果,我们推测HCV E2可能与胰腺细胞中的蛋白结合后进一步导致IR和糖、脂代谢异常,最终发展为2型糖尿病、脂肪肝和MS等代谢性疾病.

#### 4 参考文献

- 1 Saliba F, Lakehal M, Pageaux GP, Roche B, Vanlemmens C, Duvoux C, Dumortier J, Salamé E, Calmus Y, Maugeudre D. Risk factors for new-onset diabetes mellitus following liver transplantation and impact of hepatitis C infection: an observational multicenter study. *Liver Transpl* 2007; 13: 136-144
- 2 Soresi M, Tripi S, Franco V, Giannitrapani L, Alesandri A, Rappa F, Vuturo O, Montalto G. Impact of liver steatosis on the antiviral response in the hepatitis C virus-associated chronic hepatitis. *Liver Int* 2006; 26: 1119-1125
- 3 Mason AL, Lau JY, Hoang N, Qian K, Alexander GJ, Xu L, Guo L, Jacob S, Regenstein FG, Zimmerman R, Everhart JE, Wasserfall C, Maclaren NK, Perrillo RP. Association of diabetes mellitus and chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 1999; 29: 328-333
- 4 Thomssen R, Bonk S, Propfe C, Heermann KH, Köchel HG, Uy A. Association of hepatitis C virus in human sera with beta-lipoprotein. *Med Microbiol Immunol* 1992; 181: 293-300
- 5 Goodman ZD, Ishak KG. Histopathology of hepati-

#### ■名词解释

1 代谢综合征: 葡萄糖调节受损或糖尿病,和(或)胰岛素抵抗,并伴有另外两项以上的成分,例如: 高血压、高三酰甘油血症和(或)低高密度脂蛋白血症、中心肥胖、微量白蛋白尿。  
2 胰岛素抵抗: 机体对一定量胰岛素的生物学反应低于预计正常水平的一种现象。

## ■同行评价

本文方法可信, 结果可靠, 为研究慢性丙型肝炎患者出现糖、脂代谢异常及伴发代谢性疾病的机制奠定了研究基础。

- 6 tis C virus infection. *Semin Liver Dis* 1995; 15: 70-81
- 7 张锦前, 范小玲. 慢性丙型肝炎与代谢综合征. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 3482-3486
- 8 Koike K. Hepatitis C as a metabolic disease: Implication for the pathogenesis of NASH. *Hepatol Res* 2005; 33: 145-150
- 9 Cortez-Pinto H. Concluding remarks: metabolic syndrome, liver and HCV. *Aliment Pharmacol Ther* 2005; 22 Suppl 2: 83-85
- 10 Jan CF, Chen CJ, Chiu YH, Chen LS, Wu HM, Huang CC, Yen MF, Chen TH. A population-based study investigating the association between metabolic syndrome and hepatitis B/C infection (Keelung Community-based Integrated Screening study No. 10). *Int J Obes (Lond)* 2006; 30: 794-799
- 11 王琳, 李克, 成军, 陆荫英, 张健, 洪源, 刘妍, 王刚, 钟彦伟, 段惠娟, 芮莉莉. 丙型肝炎病毒核心蛋白与载脂蛋白A1结合的研究. *世界华人消化杂志* 2002; 10: 1018-1021
- 12 Sanyal AJ. Review article: non-alcoholic fatty liver disease and hepatitis C--risk factors and clinical implications. *Aliment Pharmacol Ther* 2005; 22 Suppl 2: 48-51
- 13 Yoon EJ, Hu KQ. Hepatitis C virus (HCV) infection and hepatic steatosis. *Int J Med Sci* 2006; 3: 53-56
- 14 Garcia-Touchard A, Henry TD, Sangiorgi G, Spagnoli LG, Mauriello A, Conover C, Schwartz RS. Extracellular proteases in atherosclerosis and restenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 1119-1127
- 15 张玲, 高军, 李兆申, 龚燕芳, 金晶, 吴洪玉, 满晓华. 胰腺癌和慢性胰腺炎中弹性蛋白酶3B(ELA3B)基因甲基化状态检测. *胃肠病学* 2007; 12: 461-4640
- 16 蒋建, 谭善忠, 谭春雨, 刘成海, 徐列明. 扶正化疗方对肝纤维化大鼠弹力蛋白酶表达的影响. *中华肝脏病杂志* 2005; 13: 307-308
- 17 舒强, 凌光烈, 蒋建. 血管紧张素转换酶抑制剂对损伤后的动脉弹性蛋白酶的影响. *中国病理生理学杂志* 2001; 17: 1172-1174
- 18 朱广博, 孙静, 刘静. 血清胰弹性蛋白酶- I 连续监测法实验探讨. *临床检验杂志* 2003; 21: 209-210

编辑 李军亮 电编 李薇

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

## • 消息 •

## 《世界华人消化杂志》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: <sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  ( $P > 0.05$  不注)。如同一表中另有一套  $P$  值, 则 <sup>c</sup> $P < 0.05$ , <sup>d</sup> $P < 0.01$ ; 第 3 套为 <sup>e</sup> $P < 0.05$ , <sup>f</sup> $P < 0.01$ 。  $P$  值后注明何种检验及其具体数字, 如  $P < 0.01$ ,  $t = 4.56$  vs 对照组等, 注在表的左下方。表内采用阿拉伯数字, 共同的计量单位符号应注在表的右上方, 表内个位数、小数点、±、- 应上下对齐。“空白”表示无此项或未测, “-”代表阴性未发现, 不能用同左、同上。等。表图勿与正文内容重复。表图的标目尽量用  $t/\text{min}$ ,  $c/(\text{mol/L})$ ,  $p/\text{kPa}$ ,  $V/\text{mL}$ ,  $t/^\circ\text{C}$  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) 志谢 后加冒号, 排在讨论后及参考文献前, 左齐。

# 侧群细胞对NOD/SCID小鼠NK细胞杀伤的抵抗作用

邱爽, 张会英

邱爽, 张会英, 北京积水潭医院检验科 北京市 100035  
作者贡献分布: 邱爽与张会英对此文所作贡献均等; 此课题由邱爽与张会英设计; 研究过程由邱爽操作完成; 本论文写作由邱爽与张会英完成。  
通讯作者: 张会英, 主任技师, 100035, 北京市, 北京积水潭医院检验科, qiudashuang@126.com  
电话: 010-58516688-6043  
收稿日期: 2010-09-02 修回日期: 2010-11-12  
接受日期: 2010-11-23 在线出版日期: 2010-12-28

## Side population cells isolated from hepatic carcinoma cell lines escape being killed by NK cells from NOD/SCID mice

Shuang Qiu, Hui-Ying Zhang

Shuang Qiu, Hui-Ying Zhang, Department of Clinical Laboratory, Beijing Jishuitan Hospital, Beijing 100035, China  
Correspondence to: Hui-Ying Zhang, Department of Clinical Laboratory, Beijing Jishuitan Hospital, Beijing 100035, China. qiudashuang@126.com  
Received: 2010-09-02 Revised: 2010-11-12  
Accepted: 2010-11-23 Published online: 2010-12-28

### Abstract

**AIM:** To examine whether side population (SP) cells isolated from hepatic carcinoma cell lines can escape being killed by NK cells from NOD/SCID mice.

**METHODS:** Sorted natural killer (NK) cells from NOD/SCID mice were seeded in dishes and cultured for three days in the presence of 25 ng/mL IL-2 and IL-15 to activate cells. SP cells and main population (MP) cells were sorted with the FACSAria from Huh7 and PLC/REF/5 cell lines and co-cultured with activated NK cells for 12 hours. Cell apoptosis was evaluated by annexin V/7-AAD staining and flow cytometry.

**RESULTS:** There are no significant differences in cell viability and apoptosis between MP cells and SP cells from Huh7 and PLC/REF/5 cell lines (all  $P > 0.05$ ). However, the proportions of annexin V<sup>+</sup>/7-AAD<sup>+</sup> cells in MP cells co-cultured with NK cells were significantly higher than those in MP cells cultured alone and SP cells co-cultured with NK cells (Huh7:  $8.43 \pm 1.56$  vs  $4.33$

$\pm 1.36$ ,  $4.41 \pm 0.70$ ; PLC/REF/5:  $7.89 \pm 1.53$  vs  $5.47 \pm 1.04$ ,  $4.94 \pm 0.95$ , all  $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** SP cells isolated from Huh7 and PLC/REF/5 cells could probably escape being killed by activated NK cells from NOD/SCID mice.

**Key Words:** Cancer stem cells; Natural killer cell; Side population; Apoptosis

Qiu S, Zhang HY. Side population cells isolated from hepatic carcinoma cell lines escape being killed by NK cells from NOD/SCID mice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(36): 3905-3909

### 摘要

**目的:** 探讨人肝癌细胞株Huh7、PLC/REF/5中以侧群(SP)细胞为标志的肿瘤干细胞抵抗NOD/SCID小鼠来源的NK细胞杀伤的作用。

**方法:** 分选所得NK细胞制成细胞悬液接种于培养皿中, 经小鼠重组IL2和IL15活化后, 同肝癌细胞株Huh7、PLC/REF/5经FACS Aria分选后所得主群(MP)、SP细胞共培养, 使NK细胞: 肿瘤靶细胞为6:1。经Annexin V和7AAD染色后, 流式细胞仪检测。

**结果:** 单独培养Huh7或PLC/REF/5细胞中MP与SP细胞比较, 其细胞活力(A值)及细胞凋亡比例无明显差别( $P > 0.05$ ); 而与NK共培养的MP细胞中AnnexinV<sup>+</sup>7AAD<sup>+</sup>细胞较单独培养的MP和与NK共培养的SP细胞明显升高(Huh7:  $8.43 \pm 1.56$  vs  $4.33 \pm 1.36$ ,  $4.41 \pm 0.70$ ; PLC/REF/5:  $7.89 \pm 1.53$  vs  $5.47 \pm 1.04$ ,  $4.94 \pm 0.95$ ,  $P < 0.05$ )。

**结论:** 通过细胞凋亡检测发现, Huh7和PLC/REF/5中SP能明显抵抗NK细胞诱导的杀伤作用, 提示肝癌细胞株Huh7、PLC/REF/5中SP细胞在体外具有主动的免疫逃逸能力。

**关键词:** 肿瘤干细胞; 自然杀伤细胞; 侧群; 凋亡

邱爽 张会英. 侧群细胞对NOD/SCID小鼠NK细胞杀伤的抵抗作用. *世界华人消化杂志* 2010; 18(36): 3905-3909

### ■背景资料

研究表明结肠癌、乳腺癌、黑色素瘤等恶性肿瘤中存在着具有持续驱动肿瘤生长的肿瘤干细胞, 侧群细胞能够伏击这样的肿瘤干细胞, 侧群细胞也就成为研究肿瘤干细胞时的常用的研究手段。对肿瘤干细胞、侧群细胞自身生长特性及其与宿主免疫系统的研究, 能够帮助人们更深入地认识肿瘤的发生、发展规律。

### ■同行评议者

肖文华, 主任医师, 中国人民解放军总医院第一附属医院肿瘤科; 朱亮, 副教授, 大连医科大学生理教研室

## ■研发前沿

目前国际上对侧群细胞、肿瘤干细胞的研究主要集中在能够帮助识别这些特殊肿瘤细胞群的表面标志物上,以及这些细胞的生长特性上。基于上面的研究基础,部分学者已将注意力转移至针对侧群细胞、肿瘤干细胞的治疗研究上。

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/3905.asp>

## 0 引言

肿瘤中存在极少量能驱动肿瘤生长的干细胞样癌细胞亚群,称为肿瘤干细胞(cancer stem cells, CSCs)。少量人CSCs反复接种在免疫缺陷小鼠体内,均能形成肿瘤移植瘤,目前这也是人肿瘤中CSCs存在的唯一鉴定方法<sup>[1-3]</sup>。大量研究表明某些肿瘤细胞经Hoechst33342染色后,形成的侧群(side population, SP)细胞,能够相对富集肿瘤干细胞,因而认为SP细胞可能也是一种CSCs。目前也有研究认为CSCs和SP细胞所使用免疫缺陷小鼠(NOD/SCID、SCID、Rag<sup>-/-</sup>)等,只是缺失了T、B淋巴细胞的获得性免疫能力,但仍然存在部分自然杀伤(natural killer, NK)细胞和全部髓系免疫细胞组成的天然免疫能力,仍然有一定的抗肿瘤的免疫能力<sup>[4-6]</sup>。因而提示少量CSCs或SP细胞在免疫缺陷小鼠体内驱动肿瘤形成的现象,可能是由其特殊的逃避免疫监视的能力所致。有研究表明在肝脏肿瘤中也存在CSCs<sup>[7]</sup>,实验中我们观察了肝癌细胞株Huh7、PLC/REF/5中的SP细胞<sup>[8]</sup>,对非肥胖糖尿病/重症联合免疫缺陷(non-obese diabetic/severe combined immunodeficiency, NOD/SCID)小鼠NK细胞杀伤的抵抗作用。

## 1 材料和方法

1.1 材料 人肝癌细胞株Huh7、PLC/REF/5由天津医科大学肿瘤医院提供,细胞于含100 mL/L FBS、1%青链霉素的DMEM培养基中,37℃、50 mL/L CO<sub>2</sub>常规培养。NOD/SCID小鼠,♂,周龄10 wk,由中国医学科学院实验动物研究所提供。Hoechst33342、烟曲霉素C(fumitremorgin C, FTC)、MTT由Sigma公司提供,小鼠重组细胞因子IL2、IL15购自PeproTech,抗小鼠CD49b(DX5)MicroBeads NK细胞分选磁珠试剂盒购自Miltenyibiotec, AlexaFluor@647标记抗小鼠NK1.1流式抗体为BioLegend产品, FITC标记AnnexinV凋亡检测试剂盒为eBioscience产品。SP细胞分选使用BD FACS Aria流式细胞仪。

### 1.2 方法

1.2.1 Hoechst33342标记肝癌细胞:处于对数生长期的Huh7、PLC/REF/5<sup>[9]</sup>细胞经胰酶-EDTA消化,用含50 mL/L FBS的PBS制备成10<sup>6</sup>细胞/mL的细胞悬液, Hoechst33342以10 mg/L的终浓度加入细胞悬液中;对照细胞中先加入ABCG2

抑制剂FTC,终浓度2 μmol/L, 37℃孵育15 min,再加入10 mg/L Hoechst33342, 37℃孵育90 min。孵育完成后,上述细胞中立即加入10倍体积冷PBS(含50 mL/L FBS), 4℃离心洗细胞2次,细胞在上流式细胞仪检测分选之前保持置于冰上<sup>[10]</sup>。

1.2.2 MTT检测主群细胞、SP细胞活力: Huh7、PLC/REF/5细胞经分选所得主群(main population, MP)、SP细胞分别接种于96孔板中, 5×10<sup>4</sup>/孔,分别培养12、24、48 h。然后弃去培养上清液,每孔中加入100 μL(0.5 g/L)的MTT(PBS)37℃孵育4 h,弃上清液,每孔加入100 μL DMSO,充分混匀溶解,用酶标仪检测每孔在570 nm处的吸光度值A。

1.2.3 NK细胞分选: NOD/SCID小鼠麻醉后取脾脏,脾脏分别经50目、300目筛网研磨、过滤,离心洗两次,最终制成10<sup>8</sup>细胞/mL,按细胞体积的10%加入抗小鼠CD49b(DX5)MicroBeads, 4℃孵育20 min,后经分选柱磁性分选,获得的分选阳性细胞须经纯度检测,纯度保持在90%以上。

1.2.4 细胞凋亡检测:用DMEM(100 mL/L FBS)将磁珠分选所得NK细胞制成细胞悬液接种于培养皿中,并在细胞悬液中加入终浓度为25 μg/L的小鼠重组IL2和IL15, 37℃、50 mL/L CO<sub>2</sub>孵育3 d后细胞接种于96孔板中,使孔中NK细胞数为3×10<sup>5</sup>/孔。肝癌细胞株Huh7、PLC/REF/5经FACS Aria分选后所得MP、SP细胞以5×10<sup>4</sup>/孔加入NK细胞中,使NK细胞:肿瘤靶细胞为6:1, 37℃、50 mL/L CO<sub>2</sub>孵育12 h后经Annexin V和7AAD染色后<sup>[11]</sup>,经流式细胞仪检测。

## 2 结果

2.1 Huh7及PLC/REF/5细胞株MP、SP细胞分析 3次Hoechst33342标记流式细胞仪检测显示, Huh7和PLC/REF/5细胞中SP比例分别为: 2.11±0.40和2.33±0.35。FTC能够完全抑制SP细胞的出现(图1)。

2.2 Huh7及PLC/REF/5 MP、SP细胞活力分析 MTT检测显示,在12、24、48 h Huh7及PLC/REF/5 MP、SP细胞增殖并没有显著差别(P>0.05,表1,图2)。

2.3 NK杀伤Huh7及PLC/REF/5 MP、SP细胞细胞活力检测显示12、24、48 h Huh7及PLC/REF/5的MP、SP细胞之间增殖活力并无显著差别,为避免MP、SP细胞之间增殖差别影响细胞凋亡检测,选取12 h作为NK细胞杀伤MP、SP细胞的观察点。

## ■相关报道

Kelly等认为:人SP细胞或CSCs能在免疫缺陷小鼠体内生长的原因是其更能适应小鼠体内的分子环境,或其能够分泌足量维持自身及其后代细胞生长的生长因子。

表 1 Huh7及PLC/REF/5 MP、SP细胞MTT检测 (mean  $\pm$  SD,  $A_{570}$ )

	Huh7 MP	Huh7 SP	PLC/PRF/5 MP	PLC/PRF/5 SP
12 h	0.95 $\pm$ 0.10	0.98 $\pm$ 0.11	1.01 $\pm$ 0.11	1.03 $\pm$ 0.12
24 h	1.15 $\pm$ 0.14	1.13 $\pm$ 0.15	1.14 $\pm$ 0.10	1.19 $\pm$ 0.12
48 h	1.30 $\pm$ 0.12	1.28 $\pm$ 0.09	1.33 $\pm$ 0.13	1.34 $\pm$ 0.14

表 2 MP、SP细胞AnnexinV<sup>+</sup>7AAD<sup>+</sup>的凋亡中晚期细胞比例 (mean  $\pm$  SD)

	MP	SP	NK : MP	NK : SP
Huh7	4.33 $\pm$ 1.36	4.59 $\pm$ 1.32	8.43 $\pm$ 1.56 <sup>ac</sup>	4.41 $\pm$ 0.70
PLC/PRF/5	5.47 $\pm$ 1.04	5.52 $\pm$ 1.23	7.89 $\pm$ 1.53 <sup>ac</sup>	4.94 $\pm$ 0.95

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 单独培养的MP细胞; <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs NK共培养的SP细胞。

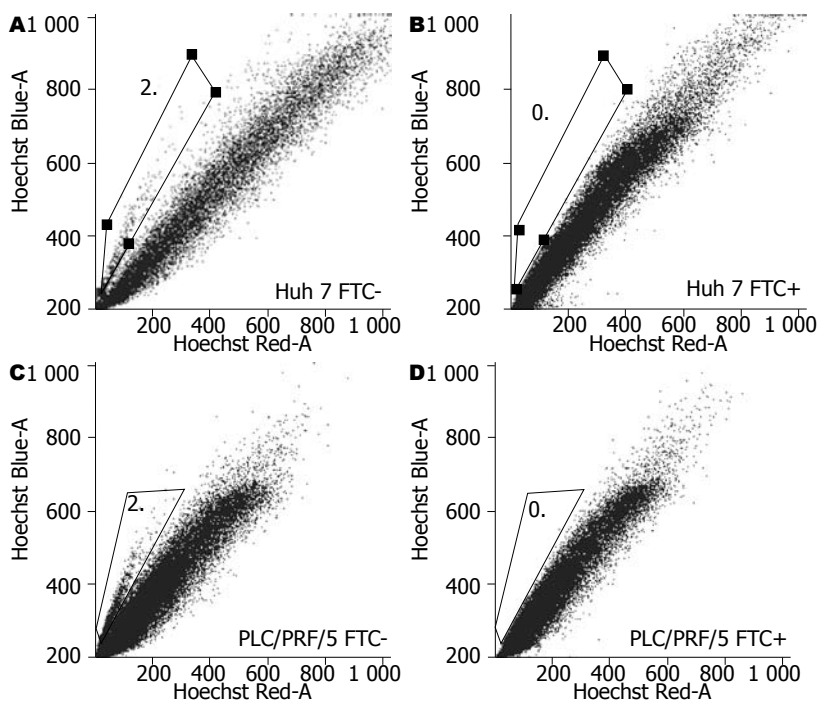


图 1 Huh7和PLC/PRF/5细胞中MP、SP细胞分析. Huh7和PLC/PRF/5细胞经Hoechst33342标记后, 流式细胞仪检测显示其SP细胞均为2%左右, 且FTC均可抑制Huh7、PLC/PRF/5细胞中SP细胞的出现, 图中为3次实验之一。

结果显示培养12 h, 肿瘤细胞中主要出现了AnnexinV<sup>+</sup>7AAD<sup>+</sup>的凋亡中晚期细胞(图3A); 单独Huh7和PLC/REF/5 MP、SP细胞单独培养12 h AnnexinV<sup>+</sup>7AAD<sup>+</sup>细胞比例无显著差别( $P > 0.05$ ). 同NK细胞共培养的MP细胞的AnnexinV<sup>+</sup>7AAD<sup>+</sup>细胞比例显著高于共培养的SP细胞及单独培养的MP细胞( $P < 0.05$ ); 共培养的SP细胞表现出明显的抵抗NK细胞杀伤的能力, 其AnnexinV<sup>+</sup>7AAD<sup>+</sup>细胞比例和单独培养的SP细胞相比, 无显著差异( $P > 0.05$ , 表2, 图3B)。

### 3 讨论

近年提出的CSCs学说认为: 肿瘤中存在极少量

能驱动肿瘤生长的干细胞样癌细胞亚群, 其具有无限增殖的潜能, 在启动肿瘤形成和生长中起着决定性的作用, 而其余的大多数细胞, 经过短暂的分化, 最终死亡. CSCs这种无限增殖的能力被称为自我更新(self renew)<sup>[1,12]</sup>. 通过反复在免疫缺陷小鼠体内接种少量(最少至100个细胞)人CSCs, 观察肿瘤生长与否能够验证人CSCs的自我更新能力, 目前这也是鉴定人肿瘤中CSCs存在的最可靠的方法. CSCs学说的提出也为肿瘤的研究与治疗提供了新的思路。

目前CSCs的分选标志有多种: 部分白血病细胞CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>细胞<sup>[1]</sup>, 乳腺癌中CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-/low</sup>细胞<sup>[13]</sup>, 胶质瘤、髓母细胞瘤及

### ■应用要点

人肿瘤SP细胞或CSCs在人体中处于同源的免疫环境, 其受到的免疫压力可能同其在免疫缺陷小鼠体内类似. 通过研究人肝癌细胞株Huh7、PLC/REF/5中SP细胞在NOD/SCID小鼠移植模型中的免疫逃逸作用, 对于探讨SP细胞或CSCs在人体内驱动肿瘤生长的机制应该具有一定意义。

### ■创新盘点

本文针对以往CSCs相关研究中, 大家不十分重视的SP细胞或CSCs与宿主免疫系统之间的相互作用设计研究方案. 初步证实了肝癌细胞株Huh7、PLC/REF/5中侧群细胞在体外具有主动的逃逸NK细胞免疫监视的能力。



### ■名词解释

1 侧群(SP)细胞: 是利用Hoechst 33342染料和流式细胞术进行造血干/祖细胞分离时发现的一群特殊细胞, 具有干细胞样自我更新能力, 其广泛分布于多种成体组织、胚胎和某些肿瘤细胞系中。

2 肿瘤干细胞(CSCs): AACR13 2006年将肿瘤干细胞定义为, 肿瘤中具有自我更新能力并能产生异质性肿瘤细胞的细胞。

3 自然杀伤(NK)细胞: 为含有穿孔素和颗粒酶的非特异性细胞毒淋巴细胞, 是固有免疫系统的主要成分, 对杀伤肿瘤细胞和病毒感染细胞起重要作用。

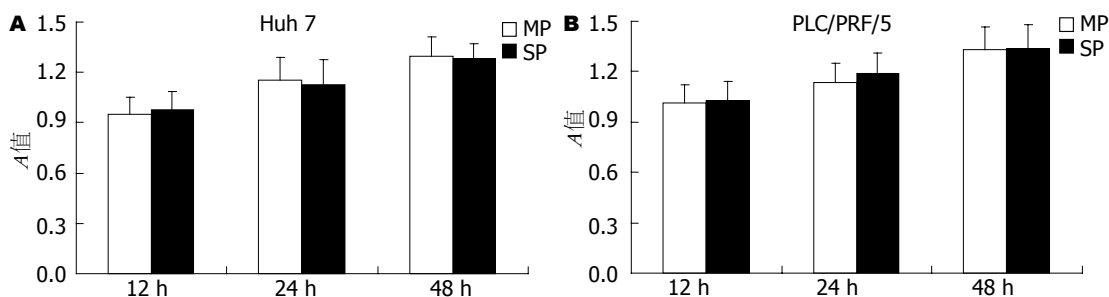


图2 Huh7和PLC/PRF/5细胞中MP、SP细胞活力分析。A: Huh 7; B: PLC/PRF/5。Huh7和PLC/PRF/5细胞中MP、SP细胞以  $5 \times 10^4$  接种后, 分别培养12、24、48 h MTT法检测细胞活力( $n = 10$ ), 并以此推断增殖情况, 结果表明Huh7和PLC/PRF/5细胞中MP、SP细胞48 h内增殖无明显差别( $P > 0.05$ )

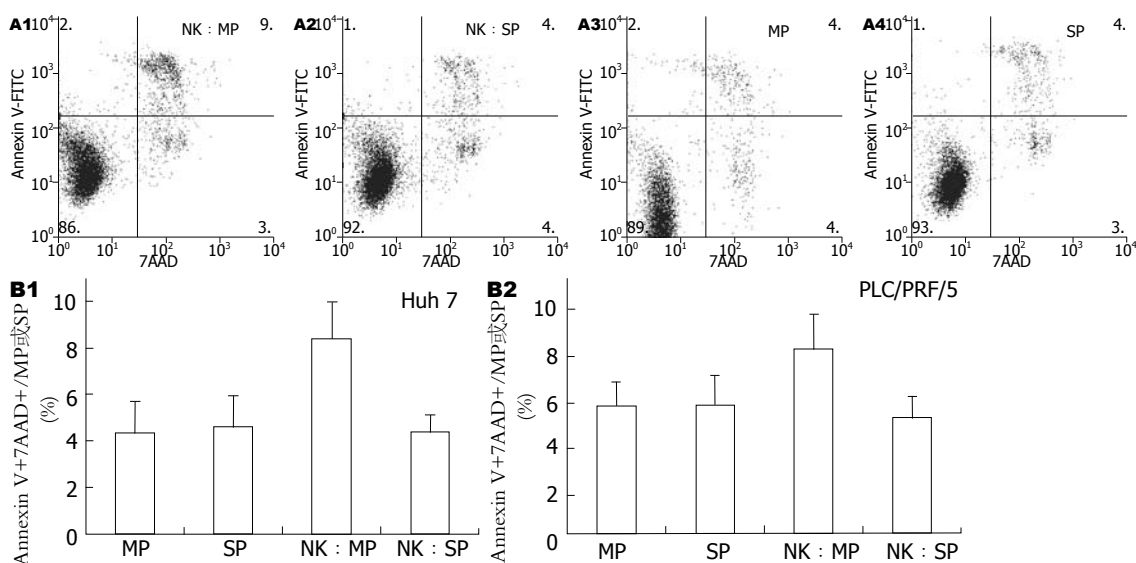


图3 Huh7和PLC/PRF/5细胞中MP、SP细胞凋亡的流式细胞仪检测。A: 流式细胞仪检测显示, NK细胞和Huh7 MP细胞共培养12 h后AnnexinV<sup>+</sup>7AAD<sup>+</sup>的凋亡中晚期细胞百分比升高较为明显; B: 单独培养Huh7或PLC/PRF/5细胞中MP、SP和与NK共培养的SP细胞中的AnnexinV<sup>+</sup>7AAD<sup>+</sup>细胞比例无明显差别; 而与NK共培养的MP细胞中AnnexinV<sup>+</sup>7AAD<sup>+</sup>细胞同单独培养的MP比较明显升高( $P < 0.05$ ), 其和与NK共培养的SP细胞比较也明显升高( $P < 0.05$ )。

结肠癌中CD133<sup>+</sup>细胞<sup>[3,14,15]</sup>。多数上述CSCs在进行Hoechst33342染色时都会表现出一定的SP现象, 因而SP也可作为一种通用的CSCs标志。

随着研究深入也有部分学者对SP细胞或CSCs驱动肿瘤生长持有不同观点, 同样在免疫缺陷小鼠体内接种少量小鼠普通肿瘤细胞和与人CSCs类似的小鼠CSCs时, 肿瘤的生长状况却非常相同。这种观点认为, 在排除免疫缺陷小鼠的免疫监视作用的情况下, 人CSCs能在免疫缺陷小鼠体内生长的原因是, 其更能适应小鼠体内的分子环境, 或其能够分泌足够维持自身及其后代细胞生长的生长因子<sup>[16,17]</sup>。

在2009年Nature报道了一篇文章<sup>[18]</sup>, 认为以往研究SP细胞或CSCs所使用免疫缺陷小鼠仍然存在部分免疫能力, 研究者使用IL2受体 $\gamma$ (Common  $\gamma$ )敲除的NOD/SCID小鼠作为受体, 任

意的单个肿瘤细胞均能生长出肿瘤。这就为SP细胞和CSCs研究引入了免疫学问题。目前研究所使用的免疫缺陷小鼠有NOD/SCID、SCID、Rag<sup>-/-</sup>等<sup>[4-6]</sup>, 这些品系均伴有不同程度的T、B淋巴细胞的缺失, 然而研究表明这些小鼠仍然存在十分健全的髓系免疫系统和功能部分受损的NK细胞。在Common  $\gamma$ 敲除的NOD/SCID小鼠髓系细胞仍然保存, 而NK细胞完全消失, 这是和其他免疫缺陷小鼠差别所在。这些提示我们少量人SP细胞或CSCs能在NOD/SCID、SCID、Rag<sup>-/-</sup>等免疫缺陷小鼠体内生长也可能是因其具有逃避NK细胞免疫监视所致。

本研究中我们分选得到了人肝癌细胞株Huh7、PLC/REF/5中SP细胞和MP细胞<sup>[9]</sup>, 在体外分别单独培养12、24、48 h, 细胞活力检测并无差别; 且反复培养扩增的Huh7、PLC/REF/5

细胞时, 其SP、MP细胞的比例并无变化. 这就提示我们SP细胞和MP细胞在NOD/SCID小鼠体内移植时也可能存在相似的无明显差别的生长状态. 那么, 假设NOD/SCID小鼠仅存的免疫系统对人肝癌SP细胞和MP细胞的排斥无差别, 说明这两种细胞的成瘤性应该大致相同. 然而事实是, 大部分学者只观察到了SP细胞发展成的肿瘤, 这就提示我们Huh7、PLC/REF/5中SP细胞可能具有逃避免疫监视的能力.

基于上述考虑, 本研究以人肝癌细胞株Huh7、PLC/REF/5中SP细胞和MP细胞为靶细胞<sup>[9]</sup>, 同NOD/SCID小鼠来源的NK细胞共培养, 发现Huh7和PLC/REF/5细胞株中SP细胞能明显抵抗NK细胞诱导的杀伤作用, 初步提示我们肝癌细胞株Huh7、PLC/REF/5中侧群细胞在体外具有主动的免疫逃逸能力.

人肿瘤SP细胞或CSCs在人体中处于一个同源的免疫环境, 其可能同在NOD/SCID小鼠中所遇到的免疫监视作用相似, 这种免疫监视作用可能都是由天然免疫系统的NK细胞或髓系免疫细胞组成. 那么研究人肿瘤SP细胞或CSCs在NOD/SCID小鼠移植模型中的免疫逃逸作用对于探讨SP细胞或CSCs在人体内驱动肿瘤生长的机制应该具有一定意义.

#### 4 参考文献

- Hope KJ, Jin L, Dick JE. Acute myeloid leukemia originates from a hierarchy of leukemic stem cell classes that differ in self-renewal capacity. *Nat Immunol* 2004; 5: 738-743
- Jin L, Hope KJ, Zhai Q, Smadja-Joffe F, Dick JE. Targeting of CD44 eradicates human acute myeloid leukemic stem cells. *Nat Med* 2006; 12: 1167-1174
- O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* 2007; 445: 106-110
- Shiokawa M, Takahashi T, Murakami A, Kita S, Ito M, Sugamura K, Ishii N. In vivo assay of human NK-dependent ADCC using NOD/SCID/gammac(null) (NOG) mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 399: 733-737
- André MC, Erbacher A, Gille C, Schmauke V, Goecke B, Hohberger A, Mang P, Wilhelm A, Mueller I, Herr W, Lang P, Handgretinger R, Hartwig UF. Long-term human CD34+ stem cell-engrafted nonobese diabetic/SCID/IL-2R gamma(null) mice show impaired CD8+ T cell maintenance and a functional arrest of immature NK cells. *J Immunol* 2010; 185: 2710-2720
- Davies E, Reid S, Medina MF, Lichty B, Ashkar AA. IL-15 has innate anti-tumor activity independent of NK and CD8 T cells. *J Leukoc Biol* 2010; 88: 529-536
- Teufel A, Galle PR. Collecting evidence for a stem cell hypothesis in HCC. *Gut* 2010; 59: 870-871
- Wulf GG, Wang RY, Kuehnle I, Weidner D, Marini F, Brenner MK, Andreeff M, Goodell MA. A leukemic stem cell with intrinsic drug efflux capacity in acute myeloid leukemia. *Blood* 2001; 98: 1166-1173
- 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
- Mathew G, Timm EA Jr, Sotomayor P, Godoy A, Montecinos VP, Smith GJ, Huss WJ. ABCG2-mediated DyeCycle Violet efflux defined side population in benign and malignant prostate. *Cell Cycle* 2009; 8: 1053-1061
- Derby E, Reddy V, Kopp W, Nelson E, Baseler M, Sayers T, Malyguine A. Three-color flow cytometric assay for the study of the mechanisms of cell-mediated cytotoxicity. *Immunol Lett* 2001; 78: 35-39
- Weissman IL, Anderson DJ, Gage F. Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001; 17: 387-403
- Zafarana G, Bristow RG. Tumor senescence and radioresistant tumor-initiating cells (TICs): let sleeping dogs lie! *Breast Cancer Res* 2010; 12: 111
- Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, Henkelman RM, Cusimano MD, Dirks PB. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 2004; 432: 396-401
- Read TA, Fogarty MP, Markant SL, McLendon RE, Wei Z, Ellison DW, Febbo PG, Wechsler-Reya RJ. Identification of CD15 as a marker for tumor-propagating cells in a mouse model of medulloblastoma. *Cancer Cell* 2009; 15: 135-147
- Kennedy JA, Barabé F, Poepl AG, Wang JC, Dick JE. Comment on "Tumor growth need not be driven by rare cancer stem cells". *Science* 2007; 318: 1722; author reply 1722
- Kelly PN, Dakic A, Adams JM, Nutt SL, Strasser A. Tumor growth need not be driven by rare cancer stem cells. *Science* 2007; 317: 337
- Quintana E, Shackleton M, Sabel MS, Fullen DR, Johnson TM, Morrison SJ. Efficient tumour formation by single human melanoma cells. *Nature* 2008; 456: 593-598

#### ■同行评价

本文创新性较好, 对理解侧群细胞的生物学特性, 侧群细胞与肿瘤干细胞的关系均有一定的科学意义.

编辑 曹丽鸥 电编 李薇

# 超声内镜在光滑型食管隆起性病变中的诊断价值

刘景华, 王进, 程鹏, 杨丽敏, 刘丽, 李山林, 刘利敏, 周永静

## ■背景资料

超声内镜是将内镜与超声技术融合为一体的新型检查技术,一方面通过内镜直接观察消化道腔内的形态改变,另一方面又可以进行实时超声扫描,以获得管道层次的组织学特征及周围邻近脏器的超声图像,从而提高了光滑型食管隆起性病变的诊疗水平。

刘景华, 王进, 程鹏, 杨丽敏, 刘丽, 李山林, 刘利敏, 周永静, 郑州大学第一附属医院消化内科 河南省郑州市 450052

**作者贡献分布:** 此课题由刘景华与王进共同设计; 研究过程由刘景华、王进、程鹏、杨丽敏、刘丽、李山林、刘利敏及周永静完成; 操作由王进完成; 数据整理由刘景华完成; 论文写作由刘景华与王进完成。

**通讯作者:** 王进, 教授, 主任医师, 450052, 河南省郑州市建设路1号, 郑州大学第一附属医院消化内科。

wangjin3@medmail.com.cn

电话: 0371-66295935

收稿日期: 2010-09-15 修回日期: 2010-11-10

接受日期: 2010-11-17 在线出版日期: 2010-12-28

## Role of endoscopic ultrasonography in the diagnosis and treatment of smooth esophageal protuberant lesions

Jing-Hua Liu, Jin Wang, Peng Cheng, Li-Min Yang, Li Liu, Shan-Lin Li, Li-Min Liu, Yong-Jing Zhou

Jing-Hua Liu, Jin Wang, Peng Cheng, Li-Min Yang, Li Liu, Shan-Lin Li, Li-Min Liu, Yong-Jing Zhou, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China

**Correspondence to:** Professor Jin Wang, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, 1 Jianshe Road, Zhengzhou 450052, Henan Province, China. wangjin3@medmail.com.cn

Received: 2010-09-15 Revised: 2010-11-10

Accepted: 2010-11-17 Published online: 2010-12-28

## Abstract

**AIM:** To investigate the role of endoscopic ultrasonography (EUS) in the diagnosis and treatment of smooth esophageal protuberant lesions.

**METHODS:** Three hundred and thirty patients with smooth esophageal protuberant lesions were examined by EUS. Of these patients, 100 were treated by endoscopic mucosal resection (EMR), 8 by loop ligature, and 7 by surgery.

**RESULTS:** Endoscopic treatment was successful at one time in all cases, and the success rate was 100%. Postoperative pathology revealed leiomyoma in 94 cases, interstitialoma in three cases, cavernous hemangioma in one case, granular cell tumor in one case, and cyst

in one case. The coincidence rate between endoscopic ultrasonography and pathology was 94%. No major complications such as hemorrhage and perforation occurred. No recurrence or metastasis occurred during 2-24-month follow-up.

**CONCLUSION:** EUS has high value in the diagnosis and treatment of smooth esophageal protuberant lesions.

**Key Words:** Endoscopic ultrasonography; Submucosal tumor; Endoscopic mucosal resection

Liu JH, Wang J, Cheng P, Yang LM, Liu L, Li SL, Liu LM, Zhou YJ. Role of endoscopic ultrasonography in the diagnosis and treatment of smooth esophageal protuberant lesions. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(36): 3910-3913

## 摘要

**目的:** 探讨超声内镜在光滑型食管隆起性病变诊断和治疗中的应用。

**方法:** 对330例普通内镜发现的光滑型食管隆起性病变行超声内镜检查,对100例患者行内镜下黏膜切除术,8例行尼龙圈套扎,7例行外科手术治疗。

**结果:** 内镜下治疗均一次性完成,手术成功率100%。术后病理示:平滑肌瘤94例,间质瘤3例,海绵状血管瘤1例,颗粒细胞瘤1例,囊肿1例。术后病理与超声内镜符合率94%,且无出血、穿孔等并发症。2 mo、1年、2年复查,无1例复发或转移。

**结论:** 超声内镜对光滑型食管隆起性病变具有较高的诊断价值,对内镜下治疗具有重要的指导意义。

**关键词:** 超声内镜; 黏膜下肿瘤; 内镜下黏膜切除术

刘景华, 王进, 程鹏, 杨丽敏, 刘丽, 李山林, 刘利敏, 周永静. 超声内镜在光滑型食管隆起性病变中的诊断价值. *世界华人消化杂志* 2010; 18(36): 3910-3913

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/3910.asp>

## ■同行评议者

张国梁, 主任医师, 天津市第一中心医院消化内科

## 0 引言

随着超声内镜的广泛应用, 普通内镜不能明确诊断的光滑型食管隆起性病变得到了明确的诊断, 超声内镜已成为食管隆起性病变诊断、鉴别诊断以及指导治疗的主要手段. 下面对郑州大学第一附属医院行微探头超声内镜诊断和治疗的330例光滑型食管隆起性病变进行总结, 报道如下.

## 1 材料和方法

1.1 材料 2007-05/2010-05常规胃镜检查发现光滑型食管隆起性病变并行超声内镜检查患者330例. 其中男152例, 女178例, 年龄14-81(中位46)岁. 主要临床表现有吞咽不适, 胸部闷胀, 中上腹部不适, 上腹疼痛, 反酸, 烧心等. 行内镜下黏膜切除术(endoscopic mucosal resection, EMR)、尼龙圈套扎以及外科手术治疗115例, 另外215例患者临床动态观察. 术前检查血常规、凝血酶原时间、凝血酶原时间活动度, 排除出血性疾病, 签署知情同意书, 并告知患者存在的益处和风险. 器械: 普通胃镜为Olympus GIF TYPE Q240, 微探头为Olympus JM-DP 12-25R, 频率为12 MHz, 双管胃镜为Olympus 2T 240, 高频电发生器ERBEICC200.

### 1.2 方法

1.2.1 一般准备: 患者行普通胃镜前常规准备, 检查前15 min口服盐酸达克罗宁胶浆麻醉喉头, 祛除腔道内泡沫. 发现光滑型食管隆起后行超声内镜检查. 因食管较难储水, 多采用双孔道胃镜. 发现病灶后冲洗腔内黏液, 再注入脱气水100-300 mL, 同时将超声微探头经胃镜活检通道插入, 采用直接浸润法进行扫描. 所有病例均行多倍图像放大处理.

1.2.2 手术方式: 直径<2 cm, 起源于黏膜下层以上, 排除血管性疾病的光滑型食管隆起, 可行EMR: 经内镜活检通道将圈套器置于病变上方周围, 收紧圈套器使瘤体于黏膜间形成亚蒂后直接行高频电切除术. 对于较小的食管隆起, 先于病变下注射无菌生理盐水, 使病变向腔内翻起, 形成亚蒂, 逐渐收紧圈套器, 行电凝电切摘除术. 术后观察病变的边缘, 创面有无渗血, 基底部有无残留等. 对于直径<2 cm且肿瘤起源于固有肌层者, 行尼龙圈套扎: 在胃镜顶端安装透明帽, 插胃镜至病变部位, 对准病变充分吸引, 待病变完全进入透明帽内并见视野完全发红后, 释放尼龙圈套扎肿瘤, 退镜观察. 直径<2 cm, 起

源于肌层者外科手术治疗.

1.2.3 术后的处理: 暂禁食1-3 d, 并给予质子泵抑制剂和黏膜保护剂抑酸、止血、促进创面的愈合, 常规抗感染以及营养支持等. 观察有无皮下气肿、腹痛、呕血、黑便等. 1 wk后由流质饮食逐渐过渡到正常饮食. 术后2-3 mo复查胃镜, 观察创面的愈合情况以及有无残留或者复发等.

## 2 结果

2.1 微探头超声内镜诊断结果 330例光滑型食管隆起性病变分别为平滑肌瘤、间质瘤、静脉瘤、囊肿以及食管外压迫(表1). 其中以平滑肌瘤多见, 占66.1%.

2.2 诊断依据 平滑肌瘤或间质瘤起源于肌层, 呈低回声改变; 静脉瘤多起源于黏膜下层, 呈无回声改变, 有时可见多个液性暗区相沟通, 表面多呈蓝色; 囊肿为第3层的无回声病灶, 边界清楚; 外压41例, 食管5层结构正常, 可见外压改变<sup>[1]</sup>.

2.3 手术及病理结果 起源于黏膜肌层的100例患者行EMR治疗, 病变均一次性完整切除, 创面干燥无渗血, 标本顺利回收, 术后无1例出血或穿孔. 术后病理结果示平滑肌瘤94例, 间质瘤3例, 颗粒细胞瘤1例, 海绵状血管瘤1例, 囊肿1例. 超声内镜与病理符合率达94%. 8例起源于固有肌层的直径<2 cm的黏膜下肿瘤行尼龙圈套扎, 均一次性套扎成功. 术后2 mo复查隆起性病变均完全脱落消失. 7例外科手术治疗, 术后病理示5例间质瘤, 2例平滑肌瘤. 超声内镜与病理符合率100%.

## 3 讨论

光滑型食管隆起性病变包括息肉、黏膜下肿瘤、食管腔外正常脏器及病变组织的压迫等. 不同性质和来源的光滑型食管隆起因覆盖有正常的黏膜, 在普通胃镜下表现极为相似, 多为圆形或椭圆形, 表面光滑, 色泽正常. 普通胃镜配合活体组织检查可以使食管黏膜表层的病变如息肉得到明确的诊断, 但是对黏膜下的肿瘤以及腔外组织脏器压迫等的诊断难以达到满意的效果, 常规活检难以钳取, 深挖活检危险性大. 体外超声容易受骨骼、脂肪组织以及气体的干扰. 上消化道造影具有垂直定位准确的优点, 但是难以定性. CT对于小的壁内病变往往也不能显示<sup>[2]</sup>. 孙思予等<sup>[3]</sup>研究证实病变直径<2.5 cm时, 细针穿刺很难获得足够组织. 而超声内镜是将内镜与超声技术融合为一体的新型检查技术,

### ■应用要点

内镜下治疗隆起性病变各种方法相互补充, 安全有效, 创伤小, 恢复快, 并发症少, 费用低, 不失为一种有效的治疗方法, 值得基层医院推广.



## ■同行评价

本文选题新颖, 具有较好的科学价值。

表 1 超声内镜对330例光滑型食管隆起性病变的诊断结果 (n)

部位	平滑肌瘤	间质瘤	静脉瘤	囊肿	外压
食管上段	50	4	6	2	6
食管中段	77	6	16	13	27
食管下段	91	7	8	9	8
合计	218	17	30	24	41

一方面通过内镜直接观察消化道腔内的形态改变, 另一方面又可以进行实时超声扫描, 以获得管道层次的组织学特征及周围邻近脏器的超声图像, 从而提高了内镜与超声的双重诊断水平<sup>[4,5]</sup>。超声内镜可分为专用超声内镜和微探头超声内镜。与专用超声内镜相比, 微探头超声内镜将超声微探头通过活检通道置于病变周围进行扫描, 无需更换内镜, 患者痛苦小, 易于接受; 且微探头口径小, 硬性部件短, 可通过狭窄部位, 减少对隆起病变的压迫以及对食管黏膜的损伤; 超声探头随内镜插入脏器腔内, 更接近病变部位, 缩短了超声波的传导途径并降低了声衰减, 提高了图像分辨率, 相应大大地提高了微小病灶的检出能力<sup>[6]</sup>。

内镜下治疗前确定肿瘤的起源非常重要, 特别是起源于固有肌层的肿瘤, 内镜下行EMR极易发生穿孔并发症。依据超声内镜检查能准确地判断肿瘤源于食管的哪一层, 是目前“金标准”<sup>[7]</sup>。

食管黏膜下隆起性病变以平滑肌瘤最为常见<sup>[8,9]</sup>。食管平滑肌瘤约占食管良性肿瘤发病率的50%-90%, 以食管中下段多见<sup>[6]</sup>。以往临床上对于小的肿瘤进行观察, 大的肿瘤行外科手术。临床动态观察患者存在心理负担, 外科手术治疗创伤大, 花费高。随着内镜和超声内镜的发展, 内镜下治疗已经成为一种趋势。本组330例患者在微探头超声内镜引导下100例行EMR, 8例行尼龙圈套扎。

EMR先后用于病变组织的大块活检、早期癌及癌前病变的切除, 现在广泛应用于黏膜下层以上的肿瘤、癌前病变以及无淋巴结转移、浸润深度表浅的早期肿瘤的治疗<sup>[10,11]</sup>。通过对行EMR的100例患者总结分析可知, 严格掌握手术适应证是行EMR进行治疗的关键, 要认真判断病变的范围、深度和性质。而微探头超声内镜可明确食管隆起的部位、大小、起源、回声强弱及是否均匀、与周围脏器的毗邻关系, 初步做出定位和定性诊断, 因此在微探头超声内镜

引导下EMR可减少和预防手术并发症的发生。

行EMR时, 我们有如下体会: (1)要清洁并充分暴露视野, 认真观察肿瘤基底部情况; (2)隆起较小时, 要在病变下足量注射无菌生理盐水, 使病变组织与固有肌层充分分离; (3)圈套器使用推顶法成功率高; (4)套扎部位要适当, 套扎过低时, 过多正常黏膜被结扎会增加出血或穿孔的发生并且造成周围黏膜的损伤, 套扎过高时可能导致肿瘤切除不全; (5)圈套器应置于隆起基底部, 逐渐收紧, 防止肿瘤直接被切割; (6)圈套器收紧隆起待病变发绀变紫后再通以高频电流, 多采用混合电流, 强度40-60 W, 根据需要适时调整模式。

超声内镜对隆起性病变可作定位和定性诊断, 但毕竟是一种影像学诊断方法, 确诊尚需组织病理学支持。行EMR的100例食管隆起性病变术后均送病理。病理结果显示: 平滑肌瘤94例, 间质瘤3例, 海绵状血管瘤1例, 颗粒细胞瘤1例, 囊肿1例。病理与超声内镜诊断符合率达94%。金震东等认为EUS对食管隆起性病灶的总诊断符合率达95.7%<sup>[12]</sup>。这与报道基本一致。依靠目前的超声技术很难将间质瘤与平滑肌瘤鉴别<sup>[13,14]</sup>, 当然食管隆起病变以平滑肌瘤最常见, 占食管良性病变的62.2%<sup>[15]</sup>。平滑肌瘤和梭形间质瘤细胞形态相似, 均成梭形或编织束状排列, 胞质丰富红染, 仅凭HE染色难以对两者进行区分<sup>[16]</sup>。免疫组织化学可协助诊断<sup>[17]</sup>。间质瘤一般存在*c-kit*基因突变及其蛋白(CD117)阳性表达<sup>[18,19]</sup>。间质瘤中, 无论肿瘤的大小、组织学表现、发生位置以及恶性程度的差异, 其细胞质呈弥漫强阳性表达CD117。CD117是胃肠道间质(gastrointestinal stromal tumor, GIST)的特异标志物, 是诊断间质瘤的理想指标<sup>[20]</sup>。而平滑肌肌动蛋白(smooth muscle actions, SMA)在平滑肌瘤中存在阳性表达, 在间质瘤中则为阴性, 所以通过CD117和SMA可协助诊断平滑肌瘤和间质瘤。本组34例患者行免疫组织化学病理诊断为平滑肌瘤31例, 间质瘤3例。3例间质瘤患者CD117均阳性表达,



31例平滑肌瘤患者SMA均阳性表达。

行EMR的患者3例术后出现胸骨后紧缩样疼痛, 给予质子泵后缓解。100例患者随访86例, 随访率达86%。随访时间分别为2 mo、1年、2年, 最长1例随访时间3年。术后2 mo复查胃镜6例可见白色瘢痕形成, 3例食管黏膜粗糙, 余未见明显异常。1、2年复查, 创面愈合良好, 与周围黏膜基本一致。所有行EMR治疗的患者均未见黏膜下肿瘤复发。

起源于固有肌层、直径<2 cm的8例黏膜下肿瘤, EMR极易发生急性穿孔或出血, 行尼龙圈套扎。采用尼龙圈套扎, 有瘤体脱落不完全的可能, 其次病灶组织无法回收, 无法获得准确的病理学诊断。

直径>2 cm起源于肌层的7例食管黏膜下肿瘤, 行外科手术治疗。术后病理5例间质瘤, 2例平滑肌瘤。超声与病理符合率100%。

随着内镜技术的发展和革新, 内镜下治疗已经成为光滑型食管隆起性病变尤其是食管黏膜下肿瘤治疗的主要方式。我们的体会是: 对于直径<2 cm起源于黏膜下层以上排除凝血性障碍的患者可行EMR。起源于固有肌层直径<2 cm的黏膜下肿瘤可行尼龙圈套扎。直径>2 cm起源于肌层者外科手术治疗。内镜下治疗隆起性病变各种方法相互补充, 既安全有效, 又降低医疗风险, 对肿瘤的发生起到很好的预防作用<sup>[15]</sup>, 值得基层医院推广。

#### 4 参考文献

- 1 史维, 赵聪, 农春燕, 孙晓滨, 李慧, 杨秀兰. 上消化道黏膜下肿瘤小探头内镜超声检查结果分析. *中华消化内镜杂志* 2002; 19: 179-180
- 2 张蓉, 李传行, 高小燕, 罗广裕, 林世永, 李茵, 徐国良. 食管黏膜下肿瘤的超声内镜诊断与内镜下微创治疗. *中国内镜杂志* 2010; 16: 21-24
- 3 孙思予, 吕庆杰, 秦波, 王占辉. 内镜超声引导下细针穿刺结合免疫组织化学鉴别上消化道固有肌层肿瘤. *中华消化内镜杂志* 2005; 22: 312-314
- 4 Ramesh J, Varadarajulu S. Interventional endoscopic ultrasound. *Dig Dis* 2008; 26: 347-355
- 5 Gilbert D, Penman ID. Endoscopic ultrasound. *Endoscopy* 2008; 40: 849-854
- 6 陈立刚, 任建林. 超声内镜在食管常见疾病诊断中的价值. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 3216-3218
- 7 苏鲁, 王伟, 潘洪珍, 赖雪珍, 陈晓莉, 杨维忠, 徐艺华, 庞华兰, 陈芳, 洪梅燕. 食管黏膜下肿瘤的内镜下切除术. *中国热带医学* 2008; 8: 1531-1535
- 8 Iwaya T, Maesawa C, Uesugi N, Kimura T, Ikeda K, Kimura Y, Mitomo S, Ishida K, Sato N, Wakabayashi G. Coexistence of esophageal superficial carcinoma and multiple leiomyomas: A case report. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 4588-4592
- 9 马大烈, 刘晓红, 白辰光, 吴丽莉, 谢强. 食管间质瘤的临床病理及免疫组织化学研究. *中华外科杂志* 2002; 40: 237
- 10 彭贵勇, 房殿春, 李超峰, 李向红. 内镜下黏膜切除术治疗消化道肿瘤. *中华消化内镜杂志* 2004; 21: 5-8
- 11 Ahmad NA, Kochman ML, Long WB, Furth EE, Ginsberg GG. Efficacy, safety, and clinical outcomes of endoscopic mucosal resection: a study of 101 cases. *Gastrointest Endosc* 2002; 55: 390-396
- 12 徐守余, 杨道华, 邱承敏, 张鸣, 何佩锋, 柳堤. 胃肠道间质瘤24例临床病理及免疫组织化学分析. *肿瘤* 2007; 27: 473
- 13 Zhu X, Zhang XQ, Li BM, Xu P, Zhang KH, Chen J. Esophageal mesenchymal tumors: endoscopy, pathology and immunohistochemistry. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 768-773
- 14 Lee IL, Lin PY, Tung SY, Shen CH, Wei KL, Wu CS. Endoscopic submucosal dissection for the treatment of intraluminal gastric subepithelial tumors originating from the muscularis propria layer. *Endoscopy* 2006; 38: 1024-1028
- 15 丁向萍, 张锦华, 庄剑波, 缪连生, 张富花, 袁菊霞, 陈丽. 超声内镜下诊治上消化道良性隆起型病变118例. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 2208-2211
- 16 刘翠平, 秦和平, 郭瑜, 白岚. 免疫组化及超声内镜在食管、胃间叶源性肿瘤中的诊断价值. *广东医学* 2009; 30: 1679-1681
- 17 邹晓平, 许国铭, 金震东, 李兆申. 胰腺假性囊肿内镜超声图像的特征. *中华消化内镜杂志* 2003; 20: 311-313
- 18 Kang JH, Lim JS, Kim JH, Hyung WJ, Chung YE, Choi JY, Park MS, Kim MJ, Kim KW. Role of EUS and MDCT in the diagnosis of gastric submucosal tumors according to the revised pathologic concept of gastrointestinal stromal tumors. *Eur Radiol* 2009; 19: 924-934
- 19 张妍, 韩真. CT和超声内镜诊断胃肠道间质瘤的现状. *国际消化病杂志* 2007; 27: 431-432
- 20 Fletcher CD, Berman JJ, Corless C, Gorstein F, Lasota J, Longley BJ, Miettinen M, O'Leary TJ, Remotti H, Rubin BP, Shmookler B, Sobin LH, Weiss SW. Diagnosis of gastrointestinal stromal tumors: a consensus approach. *Int J Surg Pathol* 2002; 10: 81-89

编辑 李薇 电编 何基才

# 电子胃镜联合腹部超声对肝硬化食管静脉曲张破裂出血的预测

郭世斌, 段志军

## ■背景资料

肝硬化食管静脉曲张破裂出血一直是临床的急症、重症, 死亡率较高。然而, 目前尚无一种既灵敏、特异, 又安全、无创伤性的预测方法。

郭世斌, 段志军, 大连医科大学附属第一医院消化科 辽宁省大连市 116001

作者贡献分布: 本文由郭世斌与段志军设计; 资料收集、数据分析由郭世斌完成; 本论文由郭世斌完成; 段志军指导、修改。

通讯作者: 段志军, 教授, 博士生导师, 116001, 辽宁省大连市, 大连医科大学附属第一医院消化科。cathydoctor@yahoo.com

电话: 0411-83635963 传真: 0411-83632383

收稿日期: 2010-09-08 修回日期: 2010-10-22

接受日期: 2010-10-26 在线出版日期: 2010-12-28

## Prediction of variceal bleeding in patients with liver cirrhosis by combined endoscopy and ultrasound

Shi-Bin Guo, Zhi-Jun Duan

Shi-Bin Guo, Zhi-Jun Duan, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116001, Liaoning Province, China

Correspondence to: Professor Zhi-Jun Duan, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116011, Liaoning Province, China. cathydoctor@yahoo.com

Received: 2010-09-08 Revised: 2010-10-22

Accepted: 2010-10-26 Published online: 2010-12-28

## Abstract

**AIM:** To evaluate the feasibility of combined endoscopy and ultrasound for prediction of variceal bleeding in patients with liver cirrhosis.

**METHODS:** One hundred and fifty-seven cirrhotic patients without variceal bleeding in recent two weeks were enrolled. These patients were randomly divided into two groups: patients undergoing endoscopic examination alone and those undergoing both endoscopic and color Doppler-ultrasonic examinations. The extent of esophageal varices was evaluated by endoscopy, and hemodynamic characteristics of the portal vein, left gastric vein and splenic vein were measured by ultrasound.

**RESULTS:** There was a positive correlation among the grade of varices, the diameter of the portal vein, left gastric vein and splenic vein, and the prevalence of variceal hemorrhage. With

the aggravation of varices, the diameter of the portal vein, left gastric vein and splenic vein increased. The diameter of the portal vein, splenic vein and left gastric vein was larger in patients with variceal bleeding than in those without variceal bleeding ( $15.3 \text{ mm} \pm 2.1 \text{ mm}$  vs  $12.1 \text{ mm} \pm 2.0 \text{ mm}$ ,  $11.2 \text{ mm} \pm 2.3 \text{ mm}$  vs  $9.3 \text{ mm} \pm 1.9 \text{ mm}$ ,  $5.3 \text{ mm} \pm 0.5 \text{ mm}$  vs  $3.6 \text{ mm} \pm 0.4 \text{ mm}$ , all  $P < 0.05$ ). There is a remarkable difference in blood flow of the left gastric vein from the liver to the esophageal plexus between patients with and without variceal bleeding ( $P < 0.01$ ). The specificity and positive predictive value of combined endoscopy and ultrasound for prediction of variceal bleeding in patients with liver cirrhosis were significantly higher than those of endoscopic examination alone ( $92.16\%$  vs  $74.47\%$ ,  $91.3\%$  vs  $73.33\%$ ,  $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** Combined endoscopy and ultrasound can improve the accuracy of prediction of variceal bleeding in patients with liver cirrhosis.

**Key Words:** Liver cirrhosis; Portal hypertension; Esophageal variceal hemorrhage; Endoscopic examination; Doppler sonography

Guo SB, Duan ZJ. Prediction of variceal bleeding in patients with liver cirrhosis by combined endoscopy and ultrasound. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(36): 3914-3917

## 摘要

**目的:** 探讨内镜及超声联合预测肝硬化门脉高压患者食管静脉曲张破裂出血危险性的价值。

**方法:** 157例2 wk内未出现上消化道出血的肝硬化患者, 随机分成A、B两组。A组单纯胃镜检查, 观察食管静脉曲张的程度; B组胃镜检查同期行超声多普勒检测, 检测门静脉、脾静脉、胃左静脉血流动力学特点。

**结果:** 随访3 mo, 61例患者至少发生1次曲张静脉出血。曲张静脉程度、门静脉、胃左静脉、脾静脉内径与肝硬化曲张静脉出血率呈

## ■同行评议者

金瑞, 教授, 首都医科大学附属北京佑安医院消化科

正相关;且随着食管静脉曲张程度的加重,门静脉、脾静脉以及胃左静脉内径均呈逐渐增宽的趋势,出血组明显大于非出血组( $15.3\text{ mm} \pm 2.1\text{ mm}$  vs  $12.1\text{ mm} \pm 2.0\text{ mm}$ ,  $11.2\text{ mm} \pm 2.3\text{ mm}$  vs  $9.3\text{ mm} \pm 1.9\text{ mm}$ ,  $5.3\text{ mm} \pm 0.5\text{ mm}$  vs  $3.6\text{ mm} \pm 0.4\text{ mm}$ , 均 $P<0.05$ );胃左静脉的离肝血流方向在出血组与非出血组之间存在显著性差异( $P<0.01$ ).胃镜联合超声预测食管静脉曲张出血的特异性与阳性预测值显著高于单纯胃镜检查( $92.16\%$  vs  $74.47\%$ ,  $91.3\%$  vs  $73.33\%$ , 均 $P<0.05$ ).

**结论:**胃镜联合超声检查可提高预测食管静脉曲张出血的准确性.

**关键词:**肝硬化;门脉高压;静脉曲张出血;内镜检查;多普勒超声

郭世斌, 段志军. 电子胃镜联合腹部超声对肝硬化食管静脉曲张破裂出血的预测. 世界华人消化杂志 2010; 18(36): 3914-3917

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/3914.asp>

## 0 引言

食管静脉曲张破裂出血是肝硬化门脉高压严重的并发症,也是主要的死亡原因.如何能安全、准确地预测门脉高压患者食管静脉曲张破裂出血的危险性,一直是当前各国学者研究的热点.门静脉及曲张静脉内压力的检测,对预测曲张静脉出血具有重要的意义,然而此类检测均为有创性的,风险性极大.也有学者采用超声、螺旋CT、核磁共振、血小板计数等方法来预测食管静脉曲张出血<sup>[1-5]</sup>,但这些方法都有其自身的局限性,预测的准确性不高.本组通过胃镜检查直观地观察曲张静脉程度,联合超声检测门静脉系统血流动力学变化,尤其是胃左静脉的内径及血流方向,来预测门脉高压引起的曲张静脉破裂出血的危险性,可提高预测的准确性,现总结如下.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 2005-04/2009-12门诊及住院近2 wk未出现上消化道出血的肝硬化患者157例,其中男114例,女43例,年龄32-79(平均58.1)岁,其中肝炎后肝硬化123例,酒精性肝硬化32例,胆汁淤积性肝硬化2例.排除标准包括:患有门静脉系统血栓、服用心得安等影响血流动力学药物、接受内镜下硬化或结扎治疗、肝癌、严重的出血凝血机制障碍、肝性脑病III或IV期、既往有分

表1 A组食管静脉曲张程度与上消化道出血的发生率

曲张静脉程度	n	出血数(n)	出血率(%)
无	5	0	0.0
轻	11	0	0.0
中	26	3	11.5
重	41	33	80.5

流或断流手术史.所有患者均签署知情同意书.临床表现:腹胀142例,食欲不振138例,乏力127例,脾大108例,腹水67例.

**1.2 方法** 157例患者随机分成A、B两组, A组83例,单纯胃镜检查;采用Pentax 3500型胃镜,检查前5 min,含服盐酸丁卡因胶浆1支(5 g: 0.05 g),检查患者有无食管静脉曲张; B组74例,该组患者行胃镜检查的同期接受彩色多普勒检查.超声检查仪器采用GE公司LOG IQ9型彩色超声诊断仪,探头频率3.5 Mhz.检查前患者空腹8 h以上,取平卧位,平静呼吸下,取样线和血流夹角 $\leq 60^\circ$ .测定门静脉内径,脾静脉内径及胃左静脉内径和最大血流速度.门静脉测定点距门静脉左右分支点2 cm处;脾静脉测定点在距脾0.5 cm处;胃左静脉在剑突下右斜切扫查获取,并测量血流方向;测量3次,取速度的均值.

**统计学处理** 结果采用SPSS10.0统计软件进行数据处理.所有结果以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示,组间比较用 $t$ 检验或 $\chi^2$ 检验. $P<0.05$ 时,认为差异有统计学意义.

## 2 结果

157例肝硬化患者中,142例有不同程度的食管胃底静脉曲张,随访3 mo,有61例患者至少发生1次曲张静脉出血,其中A组有36例, B组有25例.从A组中可以看出肝硬化患者上消化道出血的发生率与曲张静脉程度呈显著正相关关系( $P<0.05$ );重度静脉曲张患者发生上消化道出血的比例为80.5%,明显高于中度静脉曲张者(表1).从B组中可见,随着食管静脉曲张程度的加重,胃左静脉内径、门静脉内径以及脾静脉内径均呈逐渐增宽的趋势,其中食管静脉中度曲张组与无曲张组、食管静脉重度曲张组与轻度曲张组比较有显著性差异( $P<0.05$ ,表2);此外, B组中出血患者门静脉、脾静脉以及胃左静脉内径均较非出血患者增宽,两者相比差异显著( $P<0.01$ ,表3). B组中胃左静脉的离肝血流方向在出血组与非出血组之间存在显著性差异( $P<0.01$ ,表4).

## ■ 研发前沿

如何能安全、准确地预测门脉高压患者食管静脉曲张破裂出血的危险性,并提前采用合理的预防和治疗方式,一直是当前各国学者研究的热点.

## ■ 创新盘点

本研究通过电子胃镜直观地观察曲张静脉程度,联合腹部超声检测门静脉系统血流动力学变化,尤其是胃左静脉的内径及血流方向,来预测门脉高压引起的曲张静脉破裂出血的危险性,方法安全,且提高了预测的准确性.

## ■应用要点

本研究采用电子胃镜联合腹部超声的方法,可安全、准确地预测肝硬化食管静脉曲张破裂出血的危险性,从而使提前采取合理的预防、治疗方法成为可能。

表 2 B组食管静脉曲张程度与门脉系统血管内径关系 (mean ± SD)

曲张静脉程度	n	胃左静脉内径(mm)	门静脉内径(mm)	脾静脉内径(mm)
无	10	4.0 ± 1.4	10.4 ± 3.6	7.1 ± 0.7
轻	14	4.8 ± 1.1	11.7 ± 2.2	8.3 ± 1.0
中	22	5.0 ± 0.9 <sup>a</sup>	13.6 ± 3.0 <sup>a</sup>	9.6 ± 1.3 <sup>a</sup>
重	28	5.5 ± 1.8 <sup>c</sup>	14.7 ± 1.8 <sup>c</sup>	10.9 ± 1.8 <sup>c</sup>

<sup>a</sup>*P*<0.05 vs 无静脉曲张; <sup>c</sup>*P*<0.05 vs 轻度静脉曲张。

表 3 B组中出血与未出血患者门静脉、脾静脉以及胃左静脉内径比较 (mean ± SD)

分组	n	门静脉内径(mm)	脾静脉内径(mm)	胃左静脉内径(mm)
出血组	25	15.3 ± 2.1 <sup>b</sup>	11.2 ± 2.3 <sup>b</sup>	5.3 ± 0.5 <sup>b</sup>
非出血组	49	12.1 ± 2.0	9.3 ± 1.9	3.6 ± 0.4

<sup>b</sup>*P*<0.01 vs 非出血组。

表 4 B组中胃左静脉血流方向与曲张静脉出血关系 (n)

分组	n	离肝型	非离肝型
出血组	25	18 <sup>b</sup>	7
非出血组	49	5	44

<sup>b</sup>*P*<0.01 vs 非出血组。

## ■名词解释

1 红色征:是发生在曲张静脉表面上的血泡状改变,表明此处血管壁明显变薄,提示近期有可能出血。

2 胃左静脉:门脉系统的一个重要分支,是食管胃底静脉曲张血液的主要来源。正常情况下,胃左静脉压力大于门静脉,食管静脉丛的血液通过胃左静脉注入门静脉系统;当肝硬化患者门脉压力高于胃左静脉时,门脉血通过胃左静脉流入食管胃底静脉丛。

胃镜预测食管曲张静脉出血的标准为:患者有食管重度静脉曲张或中度静脉曲张伴有红色征;而联合检查法预测食管曲张静脉出血的标准为:患者有食管重度静脉曲张,超声示胃左静脉内血流呈现离肝型,或门静脉内径>15 mm、脾静脉内径>11 mm、胃左静脉内径>5.3 mm。A组胃镜预测45例患者出血,其中实际出血33例,漏诊3例,敏感性91.67%,特异性74.47%,阳性预测值73.33%;B组联合法预测23例患者出血,其中实际出血21例,漏诊4例,敏感性84%,特异性92.16%,阳性预测值91.3%。胃镜与超声联合预测食管静脉曲张出血,特异性及阳性预测值显著高于单纯胃镜检查(*P*<0.05)。

## 3 讨论

食管曲张静脉破裂出血是肝硬化门脉高压患者最主要且最致命的并发症之一,首次出血1 wk内死亡率为25%-50%<sup>[6]</sup>。对于门脉高压患者,如果能准确预测其食管曲张静脉破裂出血的危险性,并提前采用合理的预防和治疗方式,可起到事半功倍的效果。由于胃镜可直观地观察食管曲

张静脉的程度,其作为预测食管静脉曲张出血危险性的手段备受重视。食管静脉曲张程度可分为轻中重。轻度者曲张静脉占据食管下段,呈直线或迂曲,直径<3 mm;中度为曲张静脉占据食管中下段,呈蛇行迂曲隆起静脉直径3-6 mm之间;所谓重度即曲张静脉可占据全部食管,呈瘤状或结节状,直径>6 mm,部分可伴有红色征。本组研究显示,肝硬化患者食管曲张静脉出血的发生率与静脉曲张程度呈显著的正相关关系,重度静脉曲张患者发生上消化道出血的比例明显高于轻中度静脉曲张者。因此,静脉曲张的程度是预测其破裂出血的最好指标<sup>[7,8]</sup>。这可以由Laplace定律解释,血管张力=(血管内压-血管外压)×血管半径/血管壁的厚度。血管内压力越大,血管增粗,血管壁承受的张力也越大,血管壁越薄。当血管承受的张力超过了管壁的弹性极限,则会在管壁最薄弱处发生破裂、出血;而较细的食管曲张静脉,其血流阻力明显大于较粗的曲张静脉,血管阻力可使压力衰减。因此,较大的食管曲张静脉发生出血的机率要显著高于小静脉<sup>[9]</sup>。血管壁上的红色征,是发生在曲张静脉表面上的血泡状改变,表明此处血管壁明显变薄,提示近期有可能出血,也是预测曲张静脉出血的重要指标,应引起高度重视。

超声多普勒作为一种无创检查方法,通过检测门静脉系统血流动力学变化,来预测曲张静脉破裂出血,其应用价值逐渐受到临床的重视<sup>[10,11]</sup>。但单纯靠超声来预测上消化道出血的风险,其准确程度尚需进一步提高。门静脉高压时,由于



门脉系统血管内径增宽, 尽管血流速度降低, 其血流量无显著变化, 故目前研究多以测量门脉系统血管内径来预测曲张静脉出血的危险性. 本组结果显示, 肝硬化患者食管静脉曲张出血的发生率与门脉系统血管内径呈显著的正相关关系, 门脉系统血管内径越宽, 食管静脉曲张出血的发生率越高; 而且出血组患者的门静脉、脾静脉、胃左静脉内径大于非出血组, 二者具有差异性. 提示门脉系统血管内径, 可作为预测食管静脉曲张出血的一个重要的指标.

胃左静脉是门脉系统的一个重要分支, 其血流动力学变化与食管胃底静脉曲张的发生、发展和转归密切相关<sup>[12,13]</sup>. 正常情况下, 胃左静脉压力大于门静脉, 食管静脉丛的血液通过胃左静脉注入门静脉系统, 血流方向呈向肝型. 当肝硬化患者门脉压力高于胃左静脉时, 胃左静脉血流呈离肝型, 即门静脉血流通过胃左静脉流入食管胃底静脉丛, 最终导致食管静脉曲张、甚至破裂出血<sup>[14-16]</sup>. 在本组中, 胃左静脉血流呈离肝型的23例患者中, 有18例发生食管静脉曲张破裂出血; 而血流呈向肝型的51例患者中, 仅有7例发生出血. 胃左静脉血流呈离肝型在出血组与非出血组之间存在显著的差异性. 提示胃左静脉血流呈离肝型, 可作为预测食管静脉曲张出血的一个重要的指标.

本组研究结果显示, 随着食管静脉曲张程度的加重, 胃左静脉、门静脉以及脾静脉内径均呈逐渐增宽的趋势; 肝硬化患者食管静脉曲张出血的发生率与门脉系统血管内径以及曲张静脉程度均呈显著的正相关关系, 提示胃镜与超声在预测食管静脉曲张出血方面具有显著的一致性. 而我们发现采用胃镜联合超声多普勒的方法, 预测食管静脉曲张出血的特异性及阳性预测值都显著高于单纯胃镜检查(92.16% vs 74.47%, 91.3% vs 73.33%), 即胃镜联合超声检查提高了预测食管静脉曲张出血的准确性. 故内镜检查发现重度静脉曲张, 结合超声检查胃左静脉内血流呈现离肝型, 或门静脉内径>15 mm、脾静脉内径>11 mm、胃左静脉内径>5.3 mm, 可作为近期上消化道出血危险性预测指标. 但由于本组患者数量较少, 该方法尚需今后临床大样本的进一步观察检验.

#### 4 参考文献

- 1 Burroughs AK, Triantos CK, O'Beirne J, Patch D. Predictors of early rebleeding and mortality after acute variceal hemorrhage in patients with cirrho-

- 2 sis. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2009; 6: 72-73
- 2 Soga K, Tomikashi K, Miyawaki K, Fukumoto K, Wakabayashi N, Konishi H, Mitsufuji S, Yoshida N, Kokura S, Naito Y, Kataoka K, Yoshikawa T. MELD score, child-pugh score, and decreased albumin as risk factors for gastric variceal bleeding. *Hepatogastroenterology* 2009; 56: 1552-1556
- 3 Barrera F, Riquelme A, Soza A, Contreras A, Barrios G, Padilla O, Viviani P, Pérez-Ayuso RM. Platelet count/spleen diameter ratio for non-invasive prediction of high risk esophageal varices in cirrhotic patients. *Ann Hepatol* 2009; 8: 325-330
- 4 Mifune H, Akaki S, Ida K, Sei T, Kanazawa S, Okada H. Evaluation of esophageal varices by multidetector-row CT: correlation with endoscopic 'red color sign'. *Acta Med Okayama* 2007; 61: 247-254
- 5 Kuramochi A, Imazu H, Kakutani H, Uchiyama Y, Hino S, Urashima M. Color Doppler endoscopic ultrasonography in identifying groups at a high-risk of recurrence of esophageal varices after endoscopic treatment. *J Gastroenterol* 2007; 42: 219-224
- 6 Sharara AI, Rockey DC. Gastroesophageal variceal hemorrhage. *N Engl J Med* 2001; 345: 669-681
- 7 Bosch J, Abraldes JG, Groszmann R. Current management of portal hypertension. *J Hepatol* 2003; 38 Suppl 1: S54-S68
- 8 李定国, 范平. 肝硬化食管静脉曲张破裂出血危险的预测. *中华消化杂志* 2002; 22: 133-134
- 9 Kleber G, Sauerbruch T, Ansari H, Paumgartner G. Prediction of variceal hemorrhage in cirrhosis: a prospective follow-up study. *Gastroenterology* 1991; 100: 1332-1337
- 10 Irisawa A, Shibukawa G, Obara K, Saito A, Takagi T, Shishido H, Odajima H, Abe M, Sugino T, Suzuki T, Kasukawa R, Sato Y. Collateral vessels around the esophageal wall in patients with portal hypertension: comparison of EUS imaging and microscopic findings at autopsy. *Gastrointest Endosc* 2002; 56: 249-253
- 11 Bolognesi M, Sacerdoti D, Merkel C, Bombonato G, Gatta A. Noninvasive grading of the severity of portal hypertension in cirrhotic patients by echocolor-Doppler. *Ultrasound Med Biol* 2001; 27: 901-907
- 12 Li FH, Hao J, Xia JG, Li HL, Fang H. Hemodynamic analysis of esophageal varices in patients with liver cirrhosis using color Doppler ultrasound. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4560-4565
- 13 夏建国, 董胜翔, 李凤华. 正常人胃左静脉的声象图及血流动力学特征. *世界华人消化杂志* 2003; 11: 491-493
- 14 Hino S, Kakutani H, Ikeda K, Uchiyama Y, Sumiyama K, Kuramochi A, Kitamura Y, Matsuda K, Arakawa H, Kawamura M, Masuda K, Suzuki H. Hemodynamic assessment of the left gastric vein in patients with esophageal varices with color Doppler EUS: factors affecting development of esophageal varices. *Gastrointest Endosc* 2002; 55: 512-517
- 15 Matsutani S, Maruyama H, Sato G, Fukuzawa T, Mizumoto H, Saisho H. Hemodynamic response of the left gastric vein to glucagon in patients with portal hypertension and esophageal varices. *Ultrasound Med Biol* 2003; 29: 13-17
- 16 Wachsberg RH, Simmons MZ. Coronary vein diameter and flow direction in patients with portal hypertension: evaluation with duplex sonography and correlation with variceal bleeding. *AJR Am J Roentgenol* 1994; 162: 637-641

#### ■同行评价

本文实用性较好, 具有一定的临床指导意义.



# 奥曲肽治疗肠梗阻35例

孙昌泉, 石海, 许建明

## ■背景资料

肠梗阻最常见原因为粘连和肿瘤。对粘连性肠梗阻, 在确定没有绞窄的情况下可行保守治疗, 部分患者可避免手术; 对肿瘤所致恶性肠梗阻, 即使传统外科方法可以处理部分问题, 但手术风险高, 痛苦大, 症状改善不佳。

孙昌泉, 石海, 许建明, 安徽医科大学第一附属医院消化内科 安徽省消化病重点实验室 安徽省合肥市 230022

作者贡献分布: 此课题由许建明与石海设计; 研究过程由石海与孙昌泉完成; 研究所用试剂及分析工具由许建明与石海提供; 数据分析由孙昌泉完成; 本论文写作由石海与孙昌泉完成。

通讯作者: 石海, 副教授, 230022, 安徽省合肥市, 安徽医科大学第一附属医院消化内科. shmdah@163.com

电话: 0551-2922039

收稿日期: 2010-09-07 修回日期: 2010-10-23

接受日期: 2010-11-02 在线出版日期: 2010-12-28

## Efficacy of octreotide in the management of intestinal obstruction: an analysis of 35 cases

Chang-Quan Sun, Hai Shi, Jian-Ming Xu

Chang-Quan Sun, Hai Shi, Jian-Ming Xu, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022, Anhui Province, China

Correspondence to: Associate Professor Hai Shi, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022, Anhui Province, China. shmdah@163.com

Received: 2010-09-07 Revised: 2010-10-23

Accepted: 2010-11-02 Published online: 2010-12-28

## Abstract

**AIM:** To evaluate the efficacy of octreotide in the management of intestinal obstruction.

**METHODS:** Sixty-seven patients with intestinal obstruction diagnosed based on clinical grounds and confirmed by plain abdominal radiography were included in the study. These patients were randomly assigned to two groups: octreotide group ( $n = 35$ ) and control group ( $n = 32$ ). There are no significant differences between the two groups in terms of age, sex, time from disease onset to hospitalization, and causes of disease ( $P > 0.05$ ). Patients of the control group underwent routine therapy, including gastroenterol decompression, injection of vegetable oils through a gastric tube, intravenous replacement of fluid and electrolytes, total parenteral nutrition, and antibiotics. Patients of the octreotide group received routine therapy in combination with subcutaneous administration of octreotide 0.1 mg/8 h for 3-14 d.

**RESULTS:** After treatment, there is no signifi-

cant difference in the cure rate between the two groups ( $P > 0.05$ ). The remission rate of symptoms was significantly higher in the octreotide group than in the control group (85.7% vs 62.5%,  $P = 0.029$ ). The average amount of nasogastric drainage was significantly lower in the octreotide group than in the control group ( $355.50 \text{ mL/d} \pm 289.89 \text{ mL/d}$  vs  $595.63 \text{ mL/d} \pm 287.22 \text{ mL/d}$ ,  $P = 0.014$ ). Before treatment, 20 patients in the octreotide group and 16 in the control group had a gastric tube placed. After 72 h of treatment, 16 patients in the octreotide group and 4 in the control group had the gastric tube removed ( $P < 0.05$ ). The average time required to achieve abdominal pain relief, abdominal distention relief and first postoperative passage of gas was significantly lower in the octreotide group than in the control group ( $3.27 \text{ d} \pm 1.60 \text{ d}$  vs  $4.55 \text{ d} \pm 1.76 \text{ d}$ ,  $3.00 \text{ d} \pm 1.55 \text{ d}$  vs  $4.45 \text{ d} \pm 1.96 \text{ d}$ ,  $2.37 \text{ d} \pm 1.47 \text{ d}$  vs  $3.20 \text{ d} \pm 1.58 \text{ d}$ , all  $P < 0.05$ ). There is no significant difference in the length of average hospital stay between the two groups.

**CONCLUSION:** Administration of octreotide in combination with traditional pharmacological treatment is effective and safe in the management of bowel obstruction.

**Key Words:** Octreotide; Intestinal obstruction; Clinical effect

Sun CQ, Shi H, Xu JM. Efficacy of octreotide in the management of intestinal obstruction: an analysis of 35 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(36): 3918-3921

## 摘要

**目的:** 评估奥曲肽在肠梗阻治疗中的临床疗效。

**方法:** 根据临床表现及腹部立位平片诊断肠梗阻, 2009-06/2010-08 67例肠梗阻患者随机分为治疗组(35例)和对照组(32例), 两组年龄、性别、肠梗阻病因构成及发病至入院时间比较, 差异无统计学意义。对照组给予常规治疗, 包括禁饮食, 胃肠减压, 植物油胃管内注入, 纠正水电解质及酸碱平衡紊乱, 胃肠外营养, 抗生素应用等。治疗组除上述常规治疗外, 加用奥曲肽0.1 mg/8 h, 皮下注射, 疗程3-14 d。

## ■同行评议者

陈海龙, 教授, 大连医科大学附属第一医院院办

观察和比较两组治疗前后临床症状及体征改善情况、胃肠减压引流量、水电解质指标的改变及住院时间。

**结果:** 两组治愈率比较无显著性差异( $P>0.05$ ); 有效率比较: 奥曲肽组明显高于对照组(85.7% vs 62.5%,  $P=0.029$ ); 平均胃管引流量比较, 奥曲肽组低于对照组( $355.50\text{ mL/d} \pm 289.89\text{ mL/d}$  vs  $595.63\text{ mL/d} \pm 287.22\text{ mL/d}$ ,  $P=0.014$ ); 治疗72 h后, 治疗组20例中16例拔除胃管, 对照组16例中4例拔除胃管, 两组比较差异显著( $P<0.05$ ), 奥曲肽组3 d内拔管率明显高于对照组。两组住院时间比较无显著性差异。两组有效病例中临床症状缓解情况比较: 奥曲肽组腹痛缓解时间、腹胀缓解时间、肛门排气时间明显提前, 分别为( $3.27\text{ d} \pm 1.60\text{ d}$  vs  $4.55\text{ d} \pm 1.76\text{ d}$ ,  $P=0.015$ ;  $3.00\text{ d} \pm 1.55\text{ d}$  vs  $4.45\text{ d} \pm 1.96\text{ d}$ ,  $P=0.014$ ;  $2.37\text{ d} \pm 1.47\text{ d}$  vs  $3.20\text{ d} \pm 1.58\text{ d}$ ,  $P=0.044$ ); 奥曲肽组治疗中1例出现肺部感染, 其余病例未见明显不良反应。

**结论:** 奥曲肽可有效的控制肠梗阻的症状, 他是一种有效、安全的药物。

**关键词:** 奥曲肽; 肠梗阻; 临床疗效

孙昌泉, 石海, 许建明. 奥曲肽治疗肠梗阻35例. 世界华人消化杂志 2010; 18(36): 3918-3921

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/3918.asp>

## 0 引言

粘连和肿瘤为肠梗阻常见原因, 不同原因所致的梗阻, 其治疗及预后也有所不同。对梗阻处理的关键为是否存在绞窄或即将发生的绞窄, 对于绞窄患者, 外科手术为其主要治疗手段, 对于临床无绞窄征象的患者, 推荐保守治疗<sup>[1]</sup>。胃肠减压、补液为肠梗阻常规保守治疗方法。奥曲肽是人工合成的生长抑素的衍生物, 他除具有天然生长抑素的生理和药理作用外, 还具有作用时间长等优点, 现已广泛应用于消化道出血、急性胰腺炎、顽固性腹泻等消化系统疾病和内分泌肿瘤治疗, 具有较好的疗效。近年多篇文献报道了生长抑素及奥曲肽在肠梗阻中的疗效<sup>[2-9]</sup>, 均有良好的症状控制效果, 但是否能够提高治愈率, 各文献报道不一。本研究通过对67例肠梗阻患者的前瞻性研究观察, 进一步评估奥曲肽的临床疗效, 为临床应用提供依据。

## 1 材料和方法

1.1 材料 在患者知情同意及本院伦理委员会批

准的前提下, 施行本次试验。根据症状(腹痛、腹胀、呕吐、肛门停止排气、排便等)、体征(腹部肠型、腹部压痛、反跳痛、肠鸣音亢进或消失), 影像学提示肠腔扩张、多个液气平面确诊为肠梗阻。入选标准: 临床诊断为各型非绞窄性、不全性肠梗阻, 目前允许保守治疗患者。排除标准: (1)绞窄型肠梗阻; (2)合并有严重肝、肾脏器功能损害者; (3)对奥曲肽过敏者。根据入选及排除标准, 共入选67例, 奥曲肽组35例, 其中男16例, 女19例, 年龄 $59.94\text{岁} \pm 18.69\text{岁}$ , 其中粘连性肠梗阻10例, 老年人粪性肠梗阻4例, 各种恶性肠道肿瘤9例。不明原因及其他的肠梗阻12例。对照组32例, 其中男14例, 女18例, 年龄 $54.47\text{岁} \pm 17.70\text{岁}$ , 其中粘连性肠梗阻13例, 老年人粪性肠梗阻2例, 各种恶性肠道肿瘤8例, 不明原因及其他的肠梗阻9例。两组在性别、年龄、症状发作至入院时间、入院时白细胞计数(white blood cell count, WBC)是否异常及肠梗阻的病因构成之间比较, 差异无统计学意义( $P>0.05$ , 表1)。

### 1.2 方法

1.2.1 治疗: 对照组: 禁食、胃肠减压、植物油胃管内注入或口服、维持水电解质酸碱平衡、肠外营养及抗生素预防感染。奥曲肽组除以上治疗外, 加用奥曲肽 $0.1\text{ mg}$ , 皮下注射, 8 h 1次, 连用3-14 d(持续治疗3 d达不到好转标准, 则视为无效改为按常规治疗处理)。治疗前及治疗过程中监测腹部体征、血常规、电解质、腹部立位平片。治疗过程中任意组患者若出现手术指征者(均有外科主治医师会诊结果及辅检结果客观评价), 则立即手术治疗。

1.2.2 观测指标: 观察两组临床症状(腹痛、腹泻、呕吐)改善情况、胃肠减压量、肛门排便排气时间、血象、电解质变化以及住院时间。

1.2.3 治疗疗效评定: 根据以下疗效评定标准评定<sup>[10]</sup>: (1)治愈: 治疗结束后腹痛完全缓解, 恢复肛门排气、排便, X线检查肠腔扩张、积气积液消失, 电解质指标正常; (2)好转: 治疗结束后腹痛减轻, 有肛门排气、排便, X线检查肠腔扩张、积气积液部分缓解, 电解质指标接近正常; (3)无效: 治疗结束后腹痛无减轻或加剧, X线检查肠腔扩张、积气积液无好转或加剧, 电解质指标未改善。有效率 = (治愈例数+好转例数)/总例数 $\times 100\%$ ; 治愈率 = 治愈例数/总例数 $\times 100\%$ 。

1.2.4 转归: 两组的恶性肠道肿瘤患者均在治疗过程中, 行影像学检查或经肠镜病理诊断证实, 可手术者转外科手术, 对已广泛转移不宜

## ■研究前沿

奥曲肽(生长抑素类似物)可抑制胃肠液的分泌及部分肿瘤的生长, 可阻断由梗阻所致的“扩张-分泌-扩张”恶性循环, 改善梗阻的症状, 理论上降低绞窄, 从而降低手术率。但梗阻原因无法消除, 如何降低术后粘连、消化系肿瘤的早期诊断及处理、梗阻病因诊断、如何评定是否绞窄, 梗阻保守处理时间限定, 从而降低梗阻的发生率及病死率为其主要的研究方向。

## ■相关报道

Mercadante在1992年初报道了奥曲肽在恶性梗阻中应用后患者症状改善情况; 随后多个随机对照实验应用奥曲肽后均提示其具有良好症状控制效果, 对是否能够提高治愈率, 各文献报道不一。

# ■创新盘点

通过前瞻性研究试验,对可保守处理的梗阻患者随机分组,奥曲肽组在对照组治疗的基础上使用奥曲肽后观察各项指标变化,并对其进行评价。

表 1 入院时两组一般情况的比较

特征	奥曲肽组( <i>n</i> = 35)	对照组( <i>n</i> = 32)	<i>P</i> 值
男/女	16/19	14/18	>0.05
年龄(岁)	59.94 ± 18.69	54.47 ± 17.70	>0.05
症状发作至入本院时间	4.35 ± 1.88	4.78 ± 2.42	>0.05
WBC异常	11/35	10/32	>0.05
梗阻病因构成			>0.05
粘连	10	13	
肿瘤	9	8	
粪便嵌顿	4	2	
其他及原因不明	12	9	

手术治疗者分别进行了对照观察至出院。

**统计学处理** 采用SPSS8.0软件进行统计学处理。

## 2 结果

**2.1 疗效评价** 治疗组:治愈15例(42.9%);好转15例(42.9%);无效5例(14.2%)。对照组:治愈14例(43.8%);好转6例(18.7%);无效12例(37.5%)。两组治愈率比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。两组有效率之间比较差异显著( $P = 0.029$ ),奥曲肽组明显优于对照组。

**2.2 症状缓解情况** 两组治疗有效患者之间腹痛、腹胀、肛门排气时间比较,奥曲肽组腹痛缓解平均时间为3.27 d±1.60 d,腹胀缓解时间为3.00 d±1.55 d,平均肛门排气排便时间为2.37 d±1.47 d;而对照组分别为:4.55 d±1.76 d,4.45 d±1.96 d,3.20 d±1.58d;两组比较,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。

**2.3 胃肠减压量及拔除胃管情况** 胃肠减压量以患者接受治疗后的算术平均量为分析资料。观察每天胃管引流量变化及性质,若胃管引流量减少≥500 mL/d和/或引流液量<50 mL/d和/或腹胀、恶心、呕吐症状缓解,予鼻胃管拔除<sup>[11]</sup>,入院后行胃肠减压治疗患者,监测治疗前后胃肠减压量的变化,比较两组之间的变化。奥曲肽组入院后有20例患者使用胃肠减压,平均胃肠减压量为355.50 mL/d±289.89 mL/d,对照组入院后有16例患者使用胃肠减压,平均胃肠减压量为595.63 mL/d±287.22 mL/d,两组平均胃管引流量比较差异显著( $P = 0.014$ ),奥曲肽组胃管引流量明显降低。治疗72 h后,治疗组有20例中16例拔除胃管,对照组有16例中4例拔除胃管,两组比较差异显著( $P = 0.003$ ),奥曲肽组3 d内拔管率明显高于对照组。

**2.4 两组平均住院时间比较** 奥曲肽组8.91 d±3.32 d,对照组12.41 d±9.94 d,两组比较无统计学意义( $P = 0.159$ )。

**2.5 不良反应** 奥曲肽组治疗过程中有一例出现肺部感染,4例出现电解质紊乱,对照组5出现电解质紊乱,两组比较,无统计学意义,余无相关不良反应报道。

## 3 讨论

当肠道发生梗阻时,其基本病理生理变化<sup>[12]</sup>为:(1)肠管膨胀和压力升高;(2)肠腔释放抗吸收激素和旁分泌物质,使肠黏膜上皮增加分泌并抑制吸收液体,同时前列腺素的大量释放也加重液体的积聚;(3)肠系膜血供减少,灌注降低,使肠黏膜上皮缺血缺氧,毛细血管、通透性增加,使大量血管内液体移至肠腔这一隔离间隙内;(4)肠腔内细菌在缺氧情况下大量繁殖,更加重了产气和积液,肠管扩张和肠内压增加使肠壁静脉回流受阻,毛细血管及淋巴管淤积,引起肠壁充血水肿、通透性增加、液体外渗,形成恶性循环,最终动脉血流受阻导致肠坏死、穿孔,出现感染和低容量休克。治疗上只要能阻止以上任何一个环节,肠梗阻就有望得以治愈或缓解。

奥曲肽是一种人工合成的八肽,生长抑素类似物。在整个机体,尤其是中枢神经系统及胃肠道存在生长抑素及其受体<sup>[13]</sup>。天然的生长抑素半衰期短,只有2-3 min,而奥曲肽的半衰期达113 min。其作用效能为天然生长抑素的19倍<sup>[14]</sup>。

其对肠梗阻的作用机制为:抑制GI激素的释放和活性,通过减少胃酸分泌、减缓肠蠕动、减少胆汁量、增加黏液量和减少内脏血流量调控GI功能。能减少GI内容物,提高细胞间隙内水和电解质的吸收量<sup>[15,16]</sup>。这些作用可能归因于其对血管活性肠肽的抑制<sup>[17,18]</sup>。

# ■应用要点

奥曲肽为治疗肠梗阻的安全、有效的药物,可明显缓解梗阻症状。

在奥曲肽组,我们发现腹痛、腹胀缓解时间明显缩短,很多文章亦报道了生长抑素及奥曲肽的相似作用<sup>[2-9,19-21]</sup>。予奥曲肽的皮下注射可明显缓解胃肠道绞痛患者症状,在肠梗阻中使用奥曲肽缓解腹痛机制可能为<sup>[15,22,23]</sup>:(1)直接降低胃肠液的分泌,减少肠扩张;(2)中枢作用:多感受伤害的神经元的阻断作用,干扰P物质和其他肽类物质的分泌;(3)明显控制内脏血流量。

肠黏膜屏障功能的障碍可促进细菌移位。当细菌移位至肠系膜淋巴结、肺、肝和循环系统时,可致败血症和多脏器功能障碍综合征<sup>[24]</sup>。肠梗阻可损伤肠黏膜和增加其通透性。奥曲肽除具有强烈的抗分泌作用外,近期动物实验报道<sup>[25]</sup>其还具有保护肠黏膜细胞完整性及抑制细菌移位的作用,因此降低感染率。这点对年老体弱患者尤为重要。在本次试验中,因全部患者入院后即予以抗生素预防感染处理,仅奥曲肽组1例患者出现肺部感染,该患者老年,有慢性支气管炎病史,入院当时即有咳嗽症状及WBC增高,故考虑为个体因素所致。

本研究奥曲肽治疗组的有效率明显增高。且从症状(腹痛、腹胀)缓解速度、平均肛门排气时间、3 d内拔管率来比较,两组比较有明显差异( $P<0.05$ 或 $0.01$ )。两组平均住院时间比较,奥曲肽组比对照组短,但无统计学意义;奥曲肽治疗组35例患者中无明显奥曲肽相关不良反应。提示奥曲肽在治疗肠梗阻上有优于对照组之处,且是安全的。奥曲肽对治疗肠梗阻有效,但是否可以提高治愈率、降低手术率,缩短住院时间,仍需进一步大样本临床试验。

#### 4 参考文献

- Williams SB, Greenspon J, Young HA, Orkin BA. Small bowel obstruction: conservative vs. surgical management. *Dis Colon Rectum* 2005; 48: 1140-1146
- 李健, 金懋林, 沈琳. 醋酸奥曲肽在恶性肿瘤肠梗阻中的应用. *中华胃肠外科杂志* 2007; 10: 479-481
- 彭宝岗, 梁力建, 胡文杰, 王捷, 黄敏菁, 郑凯, 张卓军, 李威, 温思奇. 生长抑素治疗肠梗阻的临床研究. *中华胃肠外科杂志* 2004; 7: 474-476
- Zhang Y, Gao Y, Ma Q, Dang C, Wei W, De Antoni F, Rocci R, Chen W. Randomised clinical trial investigating the effects of combined administration of octreotide and methylglucamine diatrizoate in the older persons with adhesive small bowel obstruction. *Dig Liver Dis* 2006; 38: 188-194
- Mercadante S. Bowel obstruction in home-care cancer patients: 4 years experience. *Support Care Cancer* 1995; 3: 190-193
- Khoo D, Hall E, Motson R, Riley J, Denman K, Waxman J. Palliation of malignant intestinal obstruction using octreotide. *Eur J Cancer* 1994; 30A: 28-30
- Mercadante S, Maddaloni S. Octreotide in the management of inoperable gastrointestinal obstruction in terminal cancer patients. *J Pain Symptom Manage* 1992; 7: 496-498
- Mercadante S, Spoldi E, Caraceni A, Maddaloni S, Simonetti MT. Octreotide in relieving gastrointestinal symptoms due to bowel obstruction. *Palliat Med* 1993; 7: 295-299
- Mangili G, Franchi M, Mariani A, Zanaboni F, Rabaiotti E, Frigerio L, Bolis PF, Ferrari A. Octreotide in the management of bowel obstruction in terminal ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 1996; 61: 345-348
- 孙传兴. 临床疾病诊断依据治愈好转标准. 第2版. 北京: 人民军医出版社, 1998: 357
- Shima Y, Ohtsu A, Shirao K, Sasaki Y. Clinical efficacy and safety of octreotide (SMS201-995) in terminally ill Japanese cancer patients with malignant bowel obstruction. *Jpn J Clin Oncol* 2008; 38: 354-359
- Ripamonti CI, Easson AM, Gerdes H. Management of malignant bowel obstruction. *Eur J Cancer* 2008; 44: 1105-1115
- Green DW, Gomez G, Greeley GH Jr. Gastrointestinal peptides. *Gastroenterol Clin North Am* 1989; 18: 695-733
- Kutz K, Nüesch E, Rosenthaler J. Pharmacokinetics of SMS 201-995 in healthy subjects. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1986; 119: 65-72
- Ripamonti C, Panzeri C, Groff L, Galeazzi G, Boffi R. The role of somatostatin and octreotide in bowel obstruction: pre-clinical and clinical results. *Tumori* 2001; 87: 1-9
- Anthone GJ, Bastidas JA, Orandle MS, Yeo CJ. Direct proabsorptive effect of octreotide on ionic transport in the small intestine. *Surgery* 1990; 108: 1136-1141; discussion 1141-1142
- Neville R, Fielding LP, Cambria RP, Modlin I. Vascular responsiveness in obstructed gut. *Dis Colon Rectum* 1991; 34: 229-235
- Nellgård P, Bojö L, Cassuto J. Importance of vasoactive intestinal peptide and somatostatin for fluid losses in small-bowel obstruction. *Scand J Gastroenterol* 1995; 30: 464-469
- Cascinu S, Del Ferro E, Catalano G. A randomised trial of octreotide vs best supportive care only in advanced gastrointestinal cancer patients refractory to chemotherapy. *Br J Cancer* 1995; 71: 97-101
- Katai M, Sakurai A, Inaba H, Ikeo Y, Yamauchi K, Hashizume K. Octreotide as a rapid and effective painkiller for metastatic carcinoid tumor. *Endocr J* 2005; 52: 277-280
- Penn RD, Paice JA, Kroin JS. Intrathecal octreotide for cancer pain. *Lancet* 1990; 335: 738
- JMURASE K, Nedeljkovic V, Randić M. The actions of neuropeptides on dorsal horn neurons in the rat spinal cord slice preparation: an intracellular study. *Brain Res* 1982; 234: 170-176
- Randić M, Miletić V. Depressant actions of methionine-enkephalin and somatostatin in cat dorsal horn neurones activated by noxious stimuli. *Brain Res* 1978; 152: 196-202
- Liolios A, Oropello JM, Benjamin E. Gastrointestinal complications in the intensive care unit. *Clin Chest Med* 1999; 20: 329-345, viii
- Akyildiz M, Ersin S, Oymaci E, Dayangaç M, Kapkac M, Alkanat M. Effects of somatostatin analogues and vitamin C on bacterial translocation in an experimental intestinal obstruction model of rats. *J Invest Surg* 2000; 13: 169-173

#### ■同行评价

本文临床应用价值较高,对肠梗阻的治疗具有一定的指导意义。



# Gardner和Turcot综合征的临床特点93例

曹海龙, 王邦茂, 曹晓沧

## ■背景资料

家族性腺瘤性息肉病(FAP)是一种以消化系多发腺瘤性息肉为特征的常染色体显性遗传病, 是主要的遗传性大肠癌之一。目前认为Gardner综合征和Turcot综合征作为其临床亚型也归为FAP的范畴。

曹海龙, 王邦茂, 曹晓沧, 天津医科大学总医院消化科 天津市 300052

作者贡献分布: 此课题由曹海龙与王邦茂设计; 研究过程由曹海龙、王邦茂及曹晓沧操作完成; 数据分析由曹海龙与曹晓沧完成; 本论文写作由曹海龙、王邦茂及曹晓沧完成。

通讯作者: 王邦茂, 教授, 300052, 天津市和平区鞍山道154号, 天津医科大学总医院消化科. cao\_hailong@163.com

电话: 022-60362608 传真: 022-27813550

收稿日期: 2010-10-12 修回日期: 2010-11-08

接受日期: 2010-11-17 在线出版日期: 2010-12-28

## Clinical features of Gardner syndrome and Turcot syndrome in Chinese population: an analysis of 93 cases

Hai-Long Cao, Bang-Mao Wang, Xiao-Cang Cao

Hai-Long Cao, Bang-Mao Wang, Xiao-Cang Cao, Department of Gastroenterology, Tianjin Medical University General Hospital, Tianjin 300052, China

Correspondence to: Professor Bang-Mao Wang, Department of Gastroenterology, Tianjin Medical University General Hospital, 154 Anshan Road, Heping District, Tianjin 300052, China. cao\_hailong@163.com

Received: 2010-10-12 Revised: 2010-11-08

Accepted: 2010-11-17 Published online: 2010-12-28

## Abstract

**AIM:** To investigate the clinical characteristics of Gardner syndrome and Turcot syndrome, two variants of familial adenomatous polyposis, in Chinese population.

**METHODS:** The clinical data for Chinese patients with Gardner syndrome and Turcot syndrome were retrieved from Chinese Biomedical Database and PubMed (1983-2009) to conduct a meta-analysis.

**RESULTS:** A total of 37 sporadic cases of Gardner syndrome and 12 pedigrees containing 50 affected individuals were identified. In contrast, only six sporadic cases of Turcot syndrome were identified. Gardner syndrome often manifests itself as gastrointestinal polyposis combined with fibroma, osteoma and soft tissue neoplasm. Twenty-eight patients with Gardner syndrome had malignant polyps in the colon. Turcot syndrome often manifests itself as gastrointestinal polyposis and neoplasms of the central nervous

system. Five patients with Turcot syndrome had malignant polyps. Several cases of polyps in the stomach, duodenum and distal ileum were reported. However, an overall assessment of small intestinal lesions had not been performed. Some special clinical manifestations might be helpful for early diagnosis of the two diseases. Some patients had symptomatic response to comprehensive therapy.

**CONCLUSION:** Chinese patients with Gardner syndrome or Turcot syndrome have variable clinical manifestations, especially extraintestinal manifestations. Careful screening and case report standardization may promote a better understanding of the two rare disorders.

**Key Words:** Familial adenomatous polyposis; Gardner syndrome; Turcot syndrome

Cao HL, Wang BM, Cao XC. Clinical features of Gardner syndrome and Turcot syndrome in Chinese population: an analysis of 93 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(36): 3922-3925

## 摘要

**目的:** 分析中国人家族性腺瘤性息肉病亚型Gardner综合征和Turcot综合征的临床特点。

**方法:** 在CBM和PubMed中检索1983年-2009年中国人两类综合征的病例资料并进行回顾性分析。

**结果:** 发现Gardner综合征个案报道37例以及12个家系的患者50例。Turcot综合征报道6例, 未见家系报道。前者以结肠多发息肉合并纤维瘤、骨瘤和软组织肿瘤为主要表现, 28例息肉癌变; 后者主要表现为结肠多发息肉合并中枢神经系统肿瘤, 5例息肉癌变。少数报道胃、十二指肠和末端回肠息肉, 尚无对小肠病变的全面评价。一些特殊表现为疾病早期发现提供重要价值。综合防治可使部分患者得到改善。

**结论:** 中国人Gardner综合征和Turcot综合征的临床特点多种多样, 结肠外表现突出。详细进行筛查记录和规范化报道有助于对其深入认识。

## ■同行评议者

杨柏霖, 副主任医师, 南京中医药大学附属医院结直肠外科



**关键词:** 家族性腺瘤性息肉病; Gardner综合征; Turcot综合征

曹海龙, 王邦茂, 曹晓沧. Gardner和Turcot综合征的临床特点93例. 世界华人消化杂志 2010; 18(36): 3922-3925  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/3922.asp>

## 0 引言

家族性腺瘤性息肉病(familial adenomatous polyposis, FAP)是一种以消化道多发腺瘤性息肉为特征的常染色体显性遗传病, 约占大肠癌的1%, 是主要的遗传性大肠癌之一. 目前认为Gardner综合征和Turcot综合征作为其临床亚型也归为FAP的范畴<sup>[1]</sup>. 由于这两种综合征症状多种多样, 癌变率高, 肠外表现较为常见, 甚至可为首发症状, 如认识不足常会延误诊治. 本研究汇总分析中国人Gardner综合征和Turcot综合征的各种临床表现, 旨在为临床医师更准确地诊治提供参考.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 检索1983-2009年中国生物医学文献光盘数据库(CBM)、维普医药信息资源系统(VMIS)和PubMed数据库(Medline), 并通过参考文献追溯检索相关资料. 检索主题为“家族性腺瘤性息肉病、FAP、Gardner综合征、Gardner's综合征、加德纳综合征、Gardner syndrome、Gardner's syndrome、Turcot综合征、Turcot's综合征、Crail's综合征、胶质瘤息肉病综合征、Turcot syndrome、Turcot's syndrome、China和Chinese”. 文献纳入及排除标准: 收集所有包含中国人Gardner综合征和Turcot综合征的个案和家系描述性流行病学资料的文献, 剔除同一单位和相同作者的重复文献.

**1.2 方法** 逐篇复习文献, 进行质量评估. 对所选用的文献中所有的一般人口学特征、临床、病理、内镜、诊断及治疗转归等有关变量特征的数据进行转换、摘录. 2个评论员独立提取资料, 如遇不一致, 通过讨论协商解决.

**统计学处理** 对每篇文章中涉及临床、病理及诊断等有关变量特征的描述性流行病学资料数据采用Excel统计软件进行分类汇总分析.

## 2 结果

**2.1 一般资料** 经检索收集符合纳入标准的文献, 排除重复、无详细病例描述、与本研究无关的文献, 全部查找找到原文. Gardner综合征个案报道37例, 其中包括台湾报道1例<sup>[2]</sup>. 37例患者中男23

例, 女14例, 年龄15-68(平均38.43)岁, 30岁以下占32.43%, 13例患者有确切的家族史. 文献共报道12个Gardner综合征家系, 合计50例患者, 先证者中男6例, 女6例, 年龄25-70(平均37.42)岁, 报道患者最多的家系为4代77人中13人患病<sup>[3]</sup>. Turcot综合征合计报道6例, 未见家系报道, 其中男3例, 女3例, 年龄20-58(平均34.83)岁, 30岁以下占66.7%, 3例患者有确切的家族史.

**2.2 临床表现** 仔细阅读文献后收集包括家系报道的Gardner综合征总计87例, 主要临床表现包括: (1)排便性状和习惯改变: 87.36%(76/87)患者表现为排便性状和习惯改变, 表现为脓血便、黏液血便、慢性腹泻和排便困难等; (2)腹痛: 11.49%(10/87)患者表现为下腹部胀痛, 多合并腹泻和便血; (3)纤维瘤: 55.17%(48/87)患者出现腹壁、腹腔、肠系膜硬性纤维瘤, 24.14%(21/87)例患者可自行扪及腹部包块, 切除后极易复发. 若瘤体较大, 还可引起输尿管梗阻肾积水<sup>[2]</sup>及肠梗阻<sup>[4]</sup>等相应表现, 本组资料中还包括需要急诊手术解除梗阻的1例报道<sup>[4]</sup>; (4)骨瘤: 39.08%(34/87)患者出现骨瘤, 多见于下颌骨和颅骨, 呈多发性; (5)其他软组织肿瘤: 37.93%(33/87)患者出现皮肤表皮囊肿、皮肤脂肪瘤、皮脂腺囊肿等软组织肿瘤, 多分布于面部、背部和四肢等. 以上软组织肿瘤的突然增大增多与结肠息肉癌变有密切关系<sup>[5]</sup>; (6)牙齿异常: 11.49%(10/87)患者出现牙齿异常, 表现为阻生齿、隐藏齿、多生齿、缺齿和龋齿等; (7)特殊表现: 合并结肠外恶性肿瘤如甲状腺乳头状腺癌1例<sup>[6]</sup>. 另外还有合并先天性视网膜色素上皮增生(congenital hypertrophy of the rectal pigment epithelium, CHRPE)、连续性肢端皮炎、外阴和子宫发育不全以及无精症的男性不育症各1例报道.

Turcot综合征的主要临床表现包括: (1)便血: 33.3%(2/6)以便血为首发症状行结肠镜检查后发现; (2)头痛: 50%(3/6)患者表现为反复发作性头痛, 伴呕吐, 肢体乏力, 甚至还可出现抽搐和神志模糊. 6例患者中脑部胶质细胞瘤5例, 第四脑室髓母细胞瘤1例; (3)特殊表现: 1例患者以进食后上腹不适, 隐痛、反酸及嗝气等上消化系症状前来就诊, 行胃镜检查发现合并胃黏膜下脂肪瘤和胃及十二指肠多发息肉<sup>[7]</sup>; 1例患者皮肤发现Cafeauait斑<sup>[8]</sup>; 1例患者合并甲状腺癌<sup>[9]</sup>.

**2.3 内镜及病理学检查** Gardner综合征结肠镜下多表现为结直肠大小不等多发性息肉, 病理表

## ■创新盘点

本研究首次汇总分析了中国人Gardner综合征和Turcot综合征的各种临床表现, 旨在为临床医师更准确地诊治提供参考.

### ■同行评价

本研究设计科学, 结果客观、可信, 对指导临床医师对相关疾病的诊断与治疗提供了有价值的信息。

现为腺瘤或绒毛状-管状腺瘤。28例合并息肉癌变, 平均41.49岁。9例报道合并胃十二指肠息肉, 1例提示末端回肠多发息肉。Turcot综合征结肠镜下多表现为全结肠散在分布大小不等、有蒂或无蒂约百余枚息肉, 病理示管状腺瘤, 与Gardner综合征均符合FAP结肠镜下特征, 另有2例报道合并胃十二指肠息肉。5例Turcot综合征合并息肉癌变, 平均36.6岁。仅1例表现与遗传性非息肉性结直肠癌(hereditary nonpolyposis colorectal cancer, HNPCC)类似<sup>[10]</sup>, 该例与HNPCC不同之处在于合并中枢神经系统肿瘤, 且与结肠腺瘤组织学类型一致。然而文献尚无经小肠镜或胶囊镜检查对两类综合征小肠病变的全面描述。

2.4 治疗及预后 有治疗和预后记录的Gardner综合征43例, 均行全结肠切除术或次全切除术。12例因结肠手术后衰竭1年内死亡, 其中10例术前经内镜病理证实已发生息肉癌变。腹壁或腹腔侵袭性纤维瘤切除术后纤维瘤极易复发, 8例合并纤维瘤的患者行手术切除, 7例复发, 仅1例患者服用舒林酸和三苯氧胺, 随访4年肿瘤未复发<sup>[11]</sup>。Turcot综合征治疗和预后报道4例, 行全结肠切除术或次全切除术, 脑部肿瘤采用手术辅以放疗。3例因脑胶质细胞瘤复发而死亡, 另2例24岁女性患者先后行第四脑室髓母细胞瘤手术辅以放疗、双侧甲状腺全切术及全结肠切除术, 结肠手术后随访2年仍健在<sup>[9]</sup>。

### 3 讨论

Gardner综合征和Turcot综合征均为常染色体显性遗传病, 目前认为两者均是FAP的亚型而非另外不同疾病, 其发病与结肠腺瘤样息肉病(adenomatous polyposis coli, APC)基因突变有关。APC基因编码的氨基酸序列属Wnt信号传递途径, APC基因突变后使得 $\beta$ -连环蛋白(catenin)不能被有效降解, 胞质内大量非磷酸化的 $\beta$ -catenin蓄积, 进入细胞核导致调控下游基因的异常表达。新近理论还认为纤毛功能失调可能是Gardner综合征肠外表现潜在的病理机制<sup>[12]</sup>。约2/3 Turcot综合征患者由APC基因突变引起, 另外1/3则与HNPCC突变基因相同, 即由错配修复基因突变所致, 包括hMSH2、hPMS1和hPMS2等, 错配修复缺陷所致的微卫星DNA不稳定性还可对APC基因突变产生影响。

中国人Gardner综合征和Turcot综合征病例发病年龄、性别比例与国外报道相仿。患者肠道症状多表现为排便性状和习惯改变如脓血

便、黏液血便和排便困难等。有时伴随腹痛, 可能与肠管痉挛、蠕动亢进和肠道不全梗阻有关。少数病例报道提示合并胃十二指肠息肉和末端回肠息肉, 因此有必要运用小肠镜和胶囊镜对其小肠病变的情况进行评价。结肠多发腺瘤合并有骨瘤和软组织肿瘤为典型的Gardner三联征<sup>[3,4]</sup>, Turcot综合征则为同时患有结直肠多发性腺瘤和中枢神经系统肿瘤, 后者除外脑膜瘤、恶性淋巴瘤和转移性脑肿瘤<sup>[7-10]</sup>, 中国人病例与国外文献报道病例的临床特点基本相近。肠外表现可发生在结肠息肉之前、之后或者伴随发生, 在发病后10-15年腺瘤息肉可发生多中心癌变。因此当发现这些典型病变时应想到系FAP肠外表现的可能性。相反, 肠道息肉病患者也应注意有无其他部位的肿瘤。确诊后应对患者的全部家庭成员作进行检查。有研究报道一些特殊表现如CHRPE、连续性肢端皮炎及Cafeau lait斑等表现对诊断也具有重要提示价值<sup>[13,14]</sup>。

Gardner综合征和Turcot综合征治疗原则与FAP基本相同, 预后不良。一旦确诊后, 应以手术治疗为宜。全结肠切除术是防治结肠息肉癌变的重要方法, 应在结肠息肉发生癌变前进行预防性切除, 阻断其癌变过程, 以提高生存率<sup>[15]</sup>。纤维瘤<sup>[16]</sup>和中枢神经系统肿瘤仍以手术为主, 但均较容易复发, 成为导致患者死亡的重要原因。参考非甾体抗炎药COX-2抑制剂抑制FAP息肉生长的经验<sup>[17-19]</sup>, 少数患者使用非甾体抗炎药舒林酸防止腺瘤复发<sup>[11]</sup>, 具有一定前景, 仍需要大样本的临床试验进行疗效观察。

因此, 中国人FAP亚型Gardner综合征和Turcot综合征的临床特点多种多样, 结肠外表现突出, 然而由于相对少见的病例、临床资料不全、未做基因突变检查、家族成员过少、部分患者早期死亡以及隐匿发病等因素影响了对疾病的全面认识。有必要对每个病例仔细观察和认真随访、规范报告以及运用新的诊疗技术从而更加准确合理地进行临床诊治<sup>[20]</sup>。

### 4 参考文献

- 1 Galiatsatos P, Foulkes WD. Familial adenomatous polyposis. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 385-398
- 2 Ng TY, Yang MD, Chen YF, Chang CH. Resolution of hydronephrosis due to massive mesenteric fibromatosis using cyclo-oxygenase 2 inhibitors. *Urology* 2007; 70: 591.e3-591.e4
- 3 耿建芳, 肖月升, 樊瑞芬, 曹明耀, 刘延菊. Gardner综合征三个家系. *中华医学遗传学杂志* 2006; 23: 484-486
- 4 鲁嘉越, 王坚. Gardner综合征一例报告. *中国现代普通外科进展* 2008; 11: 453-454
- 5 冉隆武. Gardner综合征之软组织肿瘤的追踪观察与

- 研究. 中国肿瘤临床 2003; 30: 190-193
- 6 王卫东, 陈正堂, 王志新. Gardner's综合征伴甲状腺癌1例. 中国肿瘤临床 2000; 27: 40
  - 7 李宏伟, 鲁英姬, 矫铁文, 李辉. Turcot综合征伴胃脂肪瘤一例报告. 中华消化内镜杂志 1999; 16: 123
  - 8 曲牟文, 李国栋, 李华山, 寇玉明, 景建中, 杨景国. Turcot综合征一例报告. 中华肿瘤防治杂志 2009; 16: 1619-1620
  - 9 刘永军, 赵振刚, 孙爱武, 张奕荫, 俞江平, 陶亚莉, 阮荣蔚. Turcot综合征伴甲状腺癌一例. 中华消化内镜杂志 2008; 25: 43
  - 10 岑戎, 姚健凤, 徐富星, 项平, 于晓峰. Turcot综合征的内镜特点. 中国内镜杂志 2006; 12: 764-767
  - 11 王革非, 任建安, 黎介寿. Gardner综合征. 中华消化外科杂志 2007; 6: 351-355
  - 12 Gómez García EB, Knoers NV. Gardner's syndrome (familial adenomatous polyposis): a cilia-related disorder. *Lancet Oncol* 2009; 10: 727-735
  - 13 Juhn E, Khachemoune A. Gardner syndrome: skin manifestations, differential diagnosis and management. *Am J Clin Dermatol* 2010; 11: 117-122
  - 14 Half E, Bercovich D, Rozen P. Familial adenomatous polyposis. *Orphanet J Rare Dis* 2009; 4: 22
  - 15 顾国利, 王石林, 周晓武. Gardner综合征诊治1例. 世界华人消化杂志 2006; 14: 734-735
  - 16 Mátrai Z, Papp J, Polgár C, Hitre E, Köves I, Oláh E, Andi J, Kiss A, Vámosi Nagy I, Tóth L, Orosz Z. [Long-term experience with therapy of a female patient with Gardner's syndrome, first presenting with extra-abdominal desmoid tumor, and review of the literature] *Magy Seb* 2009; 62: 75-82
  - 17 Steinbach G, Lynch PM, Phillips RK, Wallace MH, Hawk E, Gordon GB, Wakabayashi N, Saunders B, Shen Y, Fujimura T, Su LK, Levin B. The effect of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med* 2000; 342: 1946-1952
  - 18 Phillips RK, Wallace MH, Lynch PM, Hawk E, Gordon GB, Saunders BP, Wakabayashi N, Shen Y, Zimmerman S, Godio L, Rodrigues-Bigas M, Su LK, Sherman J, Kelloff G, Levin B, Steinbach G. A randomised, double blind, placebo controlled study of celecoxib, a selective cyclooxygenase 2 inhibitor, on duodenal polyposis in familial adenomatous polyposis. *Gut* 2002; 50: 857-860
  - 19 Higuchi T, Iwama T, Yoshinaga K, Toyooka M, Taketo MM, Sugihara K. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of the effects of rofecoxib, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, on rectal polyps in familial adenomatous polyposis patients. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 4756-4760
  - 20 Fotiadis C, Tsekouras DK, Antonakis P, Sfiniadakis J, Genetzakis M, Zografos GC. Gardner's syndrome: a case report and review of the literature. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 5408-5411

编辑 李薇 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

## • 消息 •

### 汤姆森-路透公布 2009 年 WJG 影响因子 2.092

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

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

## 腹腔镜全/次结肠切除的临床应用24例

李栋, 张奇兵, 王权, 王超, 孙东辉, 所剑

### ■背景资料

研究家族性息肉病、溃疡性结肠炎、慢传输型便秘等结直肠良性疾病的手术治疗大多选择全结肠切除术。同传统开腹手术相比, 腹腔镜全结肠切除术具有明显的微创优势, 患者恢复快, 并发症少, 近远期效果均佳。但因切除范围广, 手术空间有限, 对于腔镜、手术器械, 以及术者及助手技术水平要求高, 国内真正有条件开展此类手术的单位不多。

### ■同行评议者

房林, 副教授, 同济大学附属上海市第十人民医院普外科

李栋, 王权, 王超, 孙东辉, 所剑, 吉林大学白求恩第一医院胃结直肠外科 吉林省长春市 130021

张奇兵, 大庆油田总医院普外科 黑龙江省大庆市 163001  
作者贡献分布: 李栋与张奇兵对此文所作贡献均等; 此课题由所剑、王权及李栋设计; 研究过程由所剑、王权、孙东辉、李栋、张奇兵及王超操作完成; 临床资料采集由李栋与张奇兵完成; 本论文写作由李栋与王权完成。

通讯作者: 王权, 副教授, 130021, 吉林省长春市, 吉林大学白求恩第一医院胃结直肠外科. wangquan-jlcc@hotmail.com

收稿日期: 2010-10-14 修回日期: 2010-11-19

接受日期: 2010-11-23 在线出版日期: 2010-12-28

### Laparoscopic total/subtotal colectomy for colorectal diseases: an analysis of 24 cases

Dong Li, Qi-Bing Zhang, Quan Wang, Chao Wang, Dong-Hui Sun, Jian Suo

Dong Li, Quan Wang, Chao Wang, Dong-Hui Sun, Jian Suo, Department of Gastric and Colorectal Surgery, the First Hospital of Jilin University, Changchun 130021, Jilin Province, China

Qi-Bing Zhang, Department of General Surgery, General Hospital of Daqing Oil Field, Daqing 163001, Heilongjiang Province, China

Correspondence to: Assistant Professor Quan Wang, Department of Gastric and Colorectal Surgery, the First Hospital of Jilin University, Changchun 130021, Jilin Province, China. wangquan-jlcc@hotmail.com

Received: 2010-10-14 Revised: 2010-11-19

Accepted: 2010-11-23 Published online: 2010-12-28

### Abstract

**AIM:** To evaluate the efficacy and safety of laparoscopic total/subtotal colectomy in the management of familial adenomatous polyposis (FAP), ulcerative colitis (UC) and slow transit constipation (STC).

**METHODS:** The clinical data for 24 patients (including four FAP patients, seven UC patients, and 13 STC patients) who underwent laparoscopic total/subtotal colectomy at our hospital were analyzed retrospectively. FAP patients and UC patients were treated by laparoscopic total colectomy, while STC patients received laparoscopic subtotal colectomy.

**RESULTS:** The surgery was successful in all the 24 patients. Mean operative duration was 280

min  $\pm$  60 min, and mean intraoperative blood loss was 220 mL  $\pm$  80 mL. The function of the stomach and intestine was restored in 1-3 d. Complications, such as hemorrhage, infections, intestinal fistula and intestinal obstruction, did not occur. Improved quality of life was achieved in all the patients, and no recurrence occurred.

**CONCLUSION:** Laparoscopic total/subtotal colectomy is effective and safe in the management of colorectal diseases.

**Key Words:** Laparoscopy; Colectomy; Colorectal disease

Li D, Zhang QB, Wang Q, Wang C, Sun DH, Suo J. Laparoscopic total/subtotal colectomy for colorectal diseases: an analysis of 24 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(36): 3926-3929

### 摘要

**目的:** 探讨腹腔镜全/次结肠切除术治疗家族性息肉病(familial adenomatous polyposis, FAP)、溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)、结肠慢传输型便秘(slow transit constipation, STC)的临床经验。

**方法:** 回顾性分析吉林大学白求恩第一医院2008-03/2010-05 24例腹腔镜结肠全/次切除术的临床资料, 其中FAP 4例, UC 7例, STC 13例。FAP和UC患者行腹腔镜全结肠切除术, STC行腹腔镜结肠次全切除术。

**结果:** 24例手术均获得成功; 手术时间约280 min  $\pm$  60 min, 术中失血约220 mL  $\pm$  80 mL; 患者术后1-2 d可离床活动; 肠道功能恢复1-3 d; 未出现腹腔出血、吻合口出血、肺部感染、腹腔感染、切口感染、吻合口瘘、肠梗阻等并发症。所有患者较术前生活质量明显改善, 无复发情况。

**结论:** 腹腔镜全/次结肠切除术作为安全、有效的术式, 是FAP、UC、STC等疾病微创手术治疗的良好选择, 值得推广。

**关键词:** 腹腔镜手术; 结肠切除术; 结直肠疾病

李栋, 张奇兵, 王权, 王超, 孙东辉, 所剑. 腹腔镜全/次结肠切除术的临床应用24例. 世界华人消化杂志 2010; 18(36): 3926-3929  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/3926.asp>

## 0 引言

自1991年美国的Jacobus等<sup>[1]</sup>进行了首例腹腔镜右半结肠切除术以来, 随着新型手术器械和设备(如血管闭合系统、超声刀等)不断研发, 基础研究的进一步深入, 手术技巧的提高, 应用腹腔镜技术完成较复杂的肠道手术已成为可能. 我们于2008-03/2010-05腹腔镜下全/次结肠切除术治疗结直肠良性广泛性病变24例, 治疗效果满意, 并获得结直肠良性广泛性病变的手术治疗经验. 现进行回顾性分析研究如下.

## 1 材料和方法

1.1 材料 本组病例24例. 男8例, 女16例, 年龄7-62岁, 其中家族性息肉病(familial adenomatous polyposis, FAP)4例, 溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)7例, 结肠慢传输型便秘(slow transit constipation, STC)13例. FAP患者年龄45岁以下, 经肠镜检查全结直肠弥漫性息肉增生, 长期腹泻, 生活质量低下; UC患者长期脓血便, 经过内科治疗无效, 有的患者严重营养消耗, 肠镜检查提示全结直肠泛发溃疡病变; STC患者顽固便秘, 合并腹痛腹胀, 长期保守治疗无效, 手术愿望强烈. 全部病例术前诊断明确, 掌握手术指征, 其中FAD、UC患者经术前病理诊断, 无恶性病变. 23例择期手术排除严重心肺疾病、手术禁忌证, 1例急诊手术为UC伴急性消化道出血.

### 1.2 方法

1.2.1 手术: 常规在腹腔镜下利用血管闭合系统(Ligasure)及超声刀自直肠-降结肠-横结肠-升结肠-回盲部顺序游离全结肠前提下, 病变切除范围、标本取出及消化道重建方式具有个体化差异.

1.2.2 游离全结肠: 气管插管全麻, 截石位, 于脐置气腹针建立气腹, 气腹压力12-14 mmHg, 置入10 mm trocar作观察孔, 观察腹腔情况后, 分别置trocar于右上腹5 mm、右下腹腹股沟韧带上方12 mm作主操作孔、左上腹10 mm、左下腹5 mm等位置. 术者位置根据手术进程而定, 行低位直肠、乙状结肠切除时, 术者立于患者右侧; 行左半结肠、横结肠切除时, 术者立于患者两腿之间; 右半结肠切除术时, 立于患者左侧; 相应调整助手、监视器位置及患者体位. 手术进行顺序按低位直肠游离-乙状结肠游离-左半结

肠游离-右半结肠游离; 运用超声刀切开乙状结肠与骨盆壁层腹膜愈着处, 锐性剥离乙状结肠系膜, 直肠系膜, 切开骶前间隙, 直肠侧韧带, 游离直肠; 锐性游离左半结肠侧腹膜及系膜, 注意保护输尿管, 沿肠管切断结扎结肠中动脉分支, 游离结肠脾曲和降结肠; 在横结肠上缘用超声刀切开胃结肠韧带, 提起横结肠, 沿升结肠外侧游离结肠肝曲及升结肠, 提起回肠末段, 自后腹膜游离回肠系膜. 至此将全部结肠, 部分直肠及系膜完整游离.

1.2.3 标本取出: 大部分病例用镜下切割闭合器(Endo-GIA)切断直肠, 关闭气腹后延长右下腹主操作孔作标本取出口或造瘘口将全结肠取出体外, 直视下切断回肠(全结肠切除术)或升结肠(次全切除术), 其断端置吻合器底座, 重建气腹后自肛门置吻合器钉砧完成消化道重建, 回肠造瘘则在直视下完成. 6例病例是利用经肛内镜显微手术器械自肛门拉出标本, 腹壁不另行延长切口, 直视或透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM)镜下完成消化道的重建.

1.2.4 消化道重建: 因患者病变范围、营养状况不同, 消化道重建方式是有一定差异的. FAP患者行腹腔镜全结肠切除、回肠-直肠下段吻合2例, 腹腔镜全结肠切除、回肠-直肠吻合、二期肠镜下残余直肠息肉电切1例, 腹腔镜全结直肠切除、联合TEM切除直肠下段黏膜、回肠-肛管吻合1例; UC患者行腹腔镜全结直肠切除、回肠造瘘3例, 腹腔镜全结肠切除、回肠-直肠吻合3例, 腹腔镜全结肠切除、联合TEM直肠下段黏膜切除、回肠肛管套入式吻合1例; STC 13例患者均行保留回盲部和回结肠血管的腹腔镜次全切除、升结肠-直肠吻合术. 术毕冲洗腹腔、盆腔置引流管一枚, 于左下腹操作孔引出, 切除标本送检病理, 术后处置同常规.

## 2 结果

2.1 住院期间 手术时间280 min $\pm$ 60 min, 术中失血220 mL $\pm$ 80 mL, 与手术例数、患者个体差异、消化道重建方式等具相关性; 辅助切口约1-5 cm, 示患者体态、标本取出难易程度选择切口长度, 6例借助TEM器械自肛门取出标本、腹壁未另行辅助切口; 所有患者术后切口疼痛轻, 翻身活动, 咳嗽不受影响; 术后1-2 d拔除尿管、离床活动; 肠道功能恢复1-3 d; 均未出现腹腔出血、吻合口出血、肺部感染、腹腔感染、切口

### ■ 相关报道

Larson等与Ses-hadri等研究表明腹腔镜手术和开腹手术在治疗上无差异, 而手术并发症发生率前者明显低于后者.



### ■应用要点

腹腔镜全/次结肠切除术作为安全、有效的手术方式,是FAP、UC、STC等疾病微创手术治疗的良好选择,值得推广。

感染、吻合口瘘、肠梗阻等并发症;术后平均住院7.5 d。

2.2 院外随访 13例STC患者术前便秘、腹胀症状严重,长期借助药物排便,生活质量痛苦,手术愿望强烈,行结肠次全切除术后腹胀症状1-2 wk后消失,排便每天1-3次。3例UC患者术前长期脓血便,慢性贫血,营养状况差,严重消耗,故给予行回肠造口术,术后未再发出血,营养状况明显改善,已参加正常社会工作。4例营养状况良好的UC患者及4例FAD患者行腹腔镜全结肠切除、回肠直肠(肛管)吻合术,术后有不同程度的腹泻每天10-20次,4 mo后大便次数控制在每天3-6次。1例FAD患者直肠残余息肉,术后3 mo后行“肠镜下息肉电切术”。所有患者较术前生活质量明显改善,无复发征象。

### 3 讨论

FAP、UC、STC等结直肠广泛性病变,内科治疗无效的情况下,多行外科全结肠切除术治疗。传统开腹手术,腹部切口大,腹腔内脏器干扰大,术后胃肠功能恢复慢,易发生肠粘连、肠梗阻、切口感染、切口裂开等并发症,患者痛苦大,住院时间长。大宗临床随机对比结果<sup>[2]</sup>表明,腹腔镜结直肠手术在术中出血、术后并发症和术后康复方面明显优于开腹手术。这种技术可通过腹部较小的操作孔完成结肠的游离和切断,避免或减少对腹腔内脏器的干扰,并且镜下超声刀和Ligasure的联合应用具有安全、止血可靠及体内无异物残留等优点,大大减少腹腔感染和粘连的几率<sup>[3]</sup>,给结直肠广泛性病变的手术治疗带来新的选择。Marcello等<sup>[4]</sup>最早开展了腹腔镜全结肠切除治疗UC和FAP,国际上逐步进行了一系列腹腔镜与开腹全结肠切除的对比性研究。Larson等<sup>[5]</sup>与Seshadri等<sup>[6]</sup>研究表明两种手术治疗上无差异,而手术并发症发生率腹腔镜手术明显低于开腹手术。我国学者<sup>[7,8]</sup>也认为腹腔镜全结肠切除术具有手术切口小、术中失血少、腹腔粘连轻、患者术后康复快等较传统开腹手术的优势。我们回顾了24例腹腔镜全/次结肠切除术,所有患者腹部切口5 cm以下,术后切口疼痛轻,翻身活动,咳嗽均不影响,术后1-2 d离床活动,肠道功能恢复快,未出现腹腔出血、肺部感染、腹腔感染、切口感染、肠梗阻等并发症,确实获得了良好的近期临床疗效,并且获得了几类结直肠良性广泛性病变的手术治疗经验。

FAP特征是结肠、直肠黏膜弥漫性腺瘤性

息肉,如不进行预防性治疗,患者到50岁几乎均恶变为结直肠癌<sup>[9]</sup>。是行全结肠切除的绝对手术适应证,治疗原则应早期预防性全结肠切除术,防止腺瘤恶变。我们经4例腹腔镜下手术治疗体会消化系重建应注重个体差异,建议行术中肠镜检查,确定病变累及范围,未累及直肠下段的病例行结肠切除、回肠直肠吻合(ileoproctostomy, IRA),操作较为简单,并发症少,排便功能好;病变累及全直肠,可能术中残留息肉的病例,我们的办法是:(1)二期治疗,术后3 mo行直肠镜电切或TEM镜下切除息肉或直肠黏膜;(2)一期治疗,应用TEM镜下切除残留远端直肠黏膜,行回肠-肛管套入式吻合;此操作较为复杂,但能够较好的控制局部息肉复发,并且利用TEM器械自肛门取出标本,腹壁不另行切口,更美观、微创<sup>[10]</sup>。需要注意的是IRA吻合方式有一定直肠残端癌发生率,有报道表明,吻合口在齿状线上1-2 cm比在壶腹部残端癌发生率明显下降,提示了切除范围的重要性。

UC目前以内科治疗为主,约10%-15%患者需外科手术治疗<sup>[11]</sup>。近年来,UC的治疗在观念上发生了改变,重度广泛病变早期积极选用外科手术可取得良好的效果,患者的生活质量有较大提高<sup>[12]</sup>。我们的体会UC如果病程迁延、反复便血、腹泻,会引起严重的营养消耗,而且长期服用激素、免疫抑制剂药物,肠穿孔、出血几率高,即使最终选择手术治疗,也失去了一期吻合的机会,而早期手术治疗可避免腹壁造口的痛苦。本组7例UC患者中,3例行回肠末端造瘘,其中2例均是长期内科药物维持治疗,病情反复,术前已经出现严重电解质紊乱、贫血、低蛋白血症;另1例为7岁先天性UC女患儿,急性便血至失血性休克,行急诊腹腔镜全结肠切除术抢救治疗,行回肠造瘘。其他营养状况良好的患者,我们均行腹腔镜全直切除、回肠-肛管一期吻合,未出现吻合口出血、吻合口漏的并发症;其中1例联合TEM镜下剥除直肠下段、肛管黏膜,肛管直肠鞘与末端回肠行套入式吻合,这种手术方式不仅切除足够病变,同时较好的保留肛内外门括约肌,控便功能良好<sup>[13]</sup>。

STC作为全结肠或节段性结肠推进性集团蠕动减弱,导致粪便在结肠内传输减弱,引起腹痛腹胀便秘淡漠症状的顽固性便秘。以育龄妇女多见。STC患者生活质量痛苦,手术愿望较强,并且绝大多数患者最终手术才能治愈<sup>[14]</sup>。作为良性疾病,进行复杂、切除肠管范围较广的腹腔手

术, STC患者对于微创的腔镜手术更加认可. 保留回盲部的结肠次全切除术, 可以保证远期效果的同时, 由于保留了回盲瓣结构, 术后无严重腹泻的并发症, 是目前公认的较好的手术方式<sup>[15]</sup>. 嵇武等<sup>[16]</sup>总结100例腹腔镜结肠次全切除术治疗功能性便秘近远期效果, 认为此术式值得推广. 我们13例患者STC手术均采用保留回盲部的腹腔镜次全切除、升结肠一直肠吻合术式, 术后疗效确实是满意的. 但STC并发结肠冗长、结肠扩张的病例常见, 增加了术中操作难度. 我们曾给1例STC合并横结肠冗长患者行腹腔镜手术, 术中见横结肠、大网膜粘连固定于前腹壁、封闭上腹, 回盲部粘连严重, 虽镜下切除顺利, 但手术困难程度很大, 耗时较多, 术中出血较多. 腹腔镜下结肠次全切除术, 由于需要保留回盲部, 应注意保护回结肠动脉、防止撕裂、离断, 尤其是系膜较短、需充分游离保证吻合口无张力的病例.

越来越多的研究表明, 腹腔镜全/次结肠切除术是安全、有效、可行的. 但手术难度大, 切除范围广, 对术者技术及镜下器械要求高, 故国内开展不多. 我们认为首先操作者应具有娴熟的开腹结直肠切除经验, 以及丰富的腹腔镜胃肠道外科技术的实践操作经验; 其次, 高质量、高清晰度、多功能的腹腔镜设备及高效切割器械、吻合器械如超声刀、Ligasure、Endo-GIA等也是手术顺利进行的良好保证; 同时重视个体差异如营养状况、病变范围, 而选择相应的切除范围、消化道重建方式, 达到良好的预期疗效是必要的. 总之, 腹腔镜结肠全/次切除术作为安全、有效的手术方式, 是FAP、UC、STC等结直肠广泛性病变微创手术治疗的良好选择, 值得推广.

#### 4 参考文献

- Jacobs M, Verdeja JC, Goldstein HS. Minimally invasive colon resection (laparoscopic colectomy). *Surg Laparosc Endosc* 1991; 1: 144-150
- Fleshman J, Sargent DJ, Green E, Anvari M, Stryker SJ, Beart RW Jr, Hellinger M, Flanagan R Jr, Peters W, Nelson H. Laparoscopic colectomy for cancer is not inferior to open surgery based on 5-year data from the COST Study Group trial. *Ann Surg* 2007; 246: 655-662; discussion 662-664
- 李瑾, 张雪峰, 王希泽, 吴国强, 宗修银. Ligasure在腹腔镜胃肠道手术中的应用. *中国微创外科杂志* 2004; 4: 493-494
- Marcello PW, Milsom JW, Wong SK, Brady K, Goormastic M, Fazio VW. Laparoscopic total colectomy for acute colitis: a case-control study. *Dis Colon Rectum* 2001; 44: 1441-1445
- Larson DW, Dozois EJ, Piotrowicz K, Cima RR, Wolff BG, Young-Fadok TM. Laparoscopic-assisted vs. open ileal pouch-anal anastomosis: functional outcome in a case-matched series. *Dis Colon Rectum* 2005; 48: 1845-1850
- Seshadri PA, Poulin EC, Schlachta CM, Cadeddu MO, Mamazza J. Does a laparoscopic approach to total abdominal colectomy and proctocolectomy offer advantages? *Surg Endosc* 2001; 15: 837-842
- 傅卫, 袁炯, 王德臣, 王港, 孙涛, 姚宏伟, 张同琳. 腹腔镜辅助次/全结-直肠切除的临床应用. *中国微创外科杂志* 2006; 6: 935-936
- 陶凯雄, 王国斌, 张波, 陈道达, 蔡开琳, 舒晓光, 卢晓明, 龙跃平, 陈景波. 腹腔镜辅助下全结直肠切除术治疗结直肠多发性疾病. *腹腔镜外科杂志* 2006; 11: 274-276
- Wu JS, Paul P, McGannon EA, Church JM. APC genotype, polyp number, and surgical options in familial adenomatous polyposis. *Ann Surg* 1998; 227: 57-62
- 孙东辉, 佟伟华, 王莹, 王权, 所剑. 腹腔镜联合TEM器械高位直结肠癌和乙状结肠癌体外根治切除的腹部无辅助切口手术19例报告. *健康必读* 2010; 7: 49
- 郭彭, 马振峰, 孙军席, 高峰, 刘永光, 徐静, 郑艳. 全结直肠切除回肠贮袋肛管吻合术治疗溃疡性结肠炎临床观察. *中华医学杂志* 2006; 86: 1435-1436
- 高枫. 溃疡性结肠炎的外科治疗进展. *中国现代手术学杂志* 2006; 10: 87-90
- 孙东辉, 王权, 佟伟华, 陈岩. 腹腔镜联合TEM手术全结直肠切除回肠-直肠肛管肌鞘套入式吻合的腹部无辅助切口手术2例. *医学信息·中旬刊* 2010; 5: 172-173
- Heitkemper M, Wolff J. Challenges in chronic constipation management. *Nurse Pract* 2007; 32: 36-42; quiz 42-43
- 张飞, 施明. 腹腔镜全结肠切除术治疗便秘一例. *临床外科杂志* 2006; 14: 322
- 嵇武, 姜军, 朱维铭, 冯啸波, 李宁, 黎介寿. 腹腔镜辅助结肠次全切除在重度功能性便秘治疗中的应用. *中国微创外科杂志* 2009; 9: 273-276

#### ■同行评价

本文实用性较好, 对临床医师有一定的参考作用.

编辑 李薇 电编 李薇

# 成人回肠末端Burkitt样淋巴瘤1例

张宪祥, 孙传东, 宋 樱, 张炳远, 卢 云, 赵 伟, 胡继霖

## ■背景资料

原发于成人回肠的Burkitt样淋巴瘤临床非常罕见, 属于高度恶性的非霍奇金淋巴瘤, 化疗是首选的治疗手段, 外科手术在Burkitt样淋巴瘤的治疗中有利亦有弊。

张宪祥, 孙传东, 张炳远, 卢云, 赵伟, 胡继霖, 青岛大学医学院附属医院普外二科 山东省青岛市 266003

宋樱, 青岛大学医学院附属医院病理科 山东省青岛市 266003

作者贡献分布: 张宪祥与孙传东对本文所作贡献均等; 资料分析和论文撰写由张宪祥完成; 临床资料的收集由张宪祥、孙传东、卢云完成; 文献检索由赵伟、胡继霖完成; 病理照片的处理由宋樱完成; 审校由张炳远完成。

通讯作者: 张炳远, 主任医师, 266003, 山东省青岛市市南区江苏路16号, 青岛大学医学院附属医院普外二科。

zhangby1962@163.com

收稿日期: 2010-08-27 修回日期: 2010-11-08

接受日期: 2010-11-17 在线出版日期: 2010-12-28

## Adult Burkitt-like lymphoma of the ileum: a case report and review of the literature

Xian-Xiang Zhang, Chuan-Dong Sun, Ying Song, Bing-Yuan Zhang, Yun Lu, Wei Zhao, Ji-Lin Hu

Xian-Xiang Zhang, Chuan-Dong Sun, Bing-Yuan Zhang, Yun Lu, Wei Zhao, Ji-Lin Hu, Department of General Surgery (Division II), the Affiliated Hospital of Medical College Qingdao University, Qingdao 266003, Shandong Province, China

Ying Song, Department of Pathology, the Affiliated Hospital of Medical College Qingdao University, Qingdao 266003, Shandong Province, China

Correspondence to: Bing-Yuan Zhang, Department of General Surgery (Division II), the Affiliated Hospital of Medical College Qingdao University, 16 Jiangsu Road, Shinan District, Qingdao 266003, Shandong Province, China. zhangby1962@163.com

Received: 2010-08-27 Revised: 2010-11-08

Accepted: 2010-11-17 Published online: 2010-12-28

## Abstract

In this article, we report a case of adult Burkitt-like lymphoma of the ileum. The clinical, histological, and immunohistochemical features of the disease in this case were analyzed. Moreover, a review of relevant literature was performed to summarize the clinicopathological characteristics, diagnosis, and treatment of the disease. Primary adult Burkitt-like lymphoma of the ileum is very rare and belongs to highly malignant non-Hodgkin's lymphoma. Chemotherapy is the preferred treatment while surgery shows pros and cons in the management of Burkitt-like lymphoma of the ileum. Clinicians need to raise awareness of this disease.

## ■同行评议者

曹杰, 主任医师, 广州医学院附属广州市第一人民医院胃肠外科

**Key Words:** Burkitt-like lymphoma; Ileum; Treatment; Immunohistochemistry

Zhang XX, Sun CD, Song Y, Zhang BY, Lu Y, Zhao W, Hu JL. Adult Burkitt-like lymphoma of the ileum: a case report and review of the literature. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(36): 3930-3933

## 摘要

本文对1例成人回肠末端Burkitt样淋巴瘤的临床特征、组织学及免疫组织化学进行观察, 并复习临床资料及国内外文献, 探讨该病的临床病理特点、诊断和治疗。原发于成人回肠的Burkitt样淋巴瘤临床非常罕见, 属于高度恶性的非霍奇金淋巴瘤, 化疗是首选的治疗手段, 外科手术在Burkitt样淋巴瘤的治疗中有利亦有弊, 临床医师需要提高对本病的认识。

**关键词:** Burkitt样淋巴瘤; 回肠; 治疗; 免疫组织化学

张宪祥, 孙传东, 宋樱, 张炳远, 卢云, 赵伟, 胡继霖. 成人回肠末端Burkitt样淋巴瘤1例. *世界华人消化杂志* 2010; 18(36): 3930-3933

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/3930.asp>

## 0 引言

原发性小肠淋巴瘤是一种非常少见的胃肠道肿瘤, 大约占胃肠道淋巴瘤的10%-20%, 占有原发性小肠肿瘤的0.2%-0.5%。大部分胃肠道淋巴瘤都属于非霍奇金淋巴瘤(non-hodgkins lymphoma, NHL), 而其中绝大多数均起源于B淋巴细胞。Burkitt淋巴瘤和Burkitt样淋巴瘤均属于高度恶性的NHL, 发生在胃肠道者很少见<sup>[1,2]</sup>, 大约占有胃肠道淋巴瘤的15%<sup>[3,4]</sup>, 预后极差, 化疗是目前对该病的唯一有效的治疗手段<sup>[5,6]</sup>。

## 1 病例报告

男, 52岁, 因餐后右下腹胀10余天, 查体发现右下腹占位2 d收入青岛大学医学院附属医院, 患者无腹痛、腹泻, 无发热、盗汗、无皮肤巩膜黄染, 大小便未见明显异常, 体质量下降约6 kg。既往33年前曾患甲肝治愈。入院时查体: 一般情



图1 盆腔CT扫描。

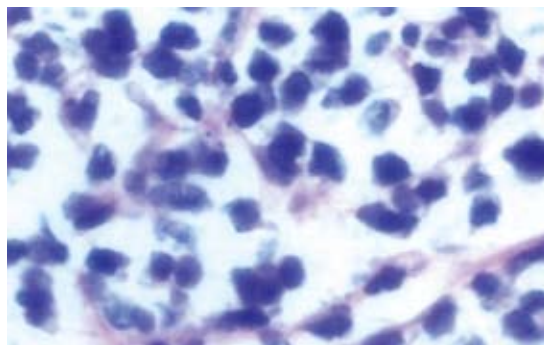


图2 肿瘤的HE染色结果(×400)。

### ■应用要点

原发于成人回肠的Burkitt样淋巴瘤临床非常罕见,极易造成临床医师的误诊、漏诊,本文对1例成人回肠末端Burkitt样淋巴瘤的临床特征、组织学及免疫组织化学进行观察,并复习临床资料及国内外文献,可以提高临床医师对本病的认识 and 关注,提高本病的诊治水平。

况可,神志清,精神可,浅表淋巴结未触及肿大,心肺检查未见明显异常,腹略膨隆,未见胃胃型及蠕动波,腹肌软,右下腹轻压痛,无反跳痛,右下腹可触及一包块,大小3 cm×5 cm,质韧,活动可,轻压痛,肝脾肋下未及,肝肾区无叩击痛,移动性浊音阴性,肠鸣音每分4-5次。B超示患者右下腹部盲肠区肠壁增厚,呈假肾征,范围约9 cm×8 cm,其内血流信号丰富,考虑盲肠癌可能性大;盆腔CT示右下腹部团块状软组织密度影,充盈对比剂边界不清,考虑回肠远端占位性病变(图1);肠镜检查进镜达回肠末端5 cm,所见肠黏膜大致正常。入院诊断为回盲部占位。积极完善术前检查后在全麻下行剖腹探查术,术中见回肠末端距回盲部约8 cm处可见一约9 cm×7 cm×6 cm大小的质硬肿块,环肠一周,浸透浆膜,遂行回肠末端肿瘤切除+回肠部分切除+回盲部切除+回肠升结肠吻合术。术后肿瘤标本用40 g/L甲醛液固定,常规脱水,石蜡包埋,4 μm连续切片,HE染色,光镜观察;同时对肿瘤组织的石蜡切片进行免疫组织化学染色,采用EnVision二步法,高温高压抗原修复,DAB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>显色。所用抗体为CD5、CD10、CD20、CD23、CD45RO、IgM TDT、Bcl-2、Cyclin D1和Ki-67。一抗和EnVision试剂盒均购自北京中杉生物技术有限公司。病理报告:(1)巨检:送检肠管一段,内含不规则肿瘤组织,大小9 cm×8 cm×7 cm,切面灰红色,鱼肉样;(2)镜检:肿瘤由中等大小、单一的瘤细胞组成,呈弥漫性浸润(图2),瘤细胞胞圆形或卵圆形,胞质较少,嗜碱性,核圆形,染色质颗粒状,核仁嗜碱性,核分裂象可见,可见吞噬细胞碎片的组织细胞散在分布于瘤细胞之间,形成特征性的“星空”现象,局部见极少数小淋巴细胞混杂;(3)免疫组织化学 CD20(+), CD10(+), CD45RO(-), CD5(-), Cyclin D1(-), Bcl-2(-), IgM(+/-), CD23(-), TDT(-), Ki-67约95%。

病理诊断:回肠末端非霍奇金淋巴瘤,意见为伯基特样淋巴瘤,大小8 cm×8 cm,侵达浆膜并累及阑尾末端浆膜,未累及回肠切缘及升结肠切缘,肠周淋巴结内未见癌转移(0/8)。术后患者恢复良好,治愈出院。患者于术后3 wk再次入青岛大学医学院附属医院肿瘤科行辅助治疗,行Pet-CT示小肠NHL术后,FDG显像未见明显肿瘤残留及转移,术区内侧脂肪间隙轻度FDG代谢增高,考虑术后周围炎性改变。浅表淋巴结B超未发现异常。骨髓穿刺检查示有核细胞增生低下,粒系增生不良,红系增生欠佳,诊断意见:增生低下骨髓象,粒红两系尚可,巨核数可,血小板多见。血常规示白细胞数低下(2009-08-13: WBC  $3.42 \times 10^9/L$ , N 34.6%; 2009-08-18: WBC  $2.74 \times 10^9/L$ , N 30.6%)。患者以风险大为由拒绝行腰穿脑脊液检查。再次入院诊断为小肠Burkitt样淋巴瘤术后(I A期),血骨髓抑制。患者骨髓增生低下可能与术后体质较差及外科药物应用造成骨髓抑制有关,患者不能耐受正规大剂量化疗,要求出院待体质恢复后再行进一步治疗。该患者目前仍在随访中。

## 2 讨论

Burkitt淋巴瘤属于高度恶性的NHL,占NHL的3%-5%,由Burkitt于1958年首先报道,其进展快,死亡率高,多发于非洲儿童,国内罕见,近年来偶有散在病例报道,发病率占儿童NHL的40%,成人NHL的2%。病因和发病机制与染色体易位、抑癌基因的失活和病毒感染等有关,尤其是EBV的感染,在Burkitt淋巴瘤的发生、进展中发挥重要作用。EB病毒检测阴性或未检测者不可确诊为Burkitt淋巴瘤,只能称为Burkitt样淋巴瘤。最新WHO分类根据其临床和遗传学的异质性将本病分为3个亚型<sup>[7]</sup>:(1)地区性Burkitt淋巴瘤:具有流行病学特征,发生在赤道非洲,儿童发病率



### ■同行评价

本文可读性较好,对临床医师认识和诊断成人回肠末端Burkitt样淋巴瘤提供帮助。

高,发病高峰4-7岁,男女性别比为2-3:1,发病与潮湿多雨气候有关,多发生于下颌骨或其他颌面骨<sup>[5-8]</sup>,文献报道约有95%的患者伴有EBV感染;(2)散发性Burkitt淋巴瘤:分布于全球,发病率低,主要见于儿童和青年人。发病与低社会经济状况和早期EBV感染(15%-20%)有关,常见于回盲部、回肠、盲肠、卵巢、肾、乳腺等淋巴结外部位,发生于浅表淋巴结者比较少,本文所报道病例即为此亚型;(3)免疫缺陷相关Burkitt淋巴瘤:主要见于HIV感染的患者,25%-40%病例EBV基因阳性。

Burkitt淋巴瘤主要的分子生物学改变为*c-myc*等细胞周期调节基因的异常<sup>[9,10]</sup>。遗传学上,所有Burkitt淋巴瘤患者都有*c-myc*基因异位,其中大多数有t(8;14)(q24;q32)易位,所有易位均导致*c-myc*基因失调表达,促使细胞进入增殖周期,其在Burkitt淋巴瘤的发生上起重要作用。

Burkitt淋巴瘤典型的病理特点是瘤细胞弥漫浸润,细胞大小、形态一致,胞质少,嗜碱性,核圆或卵圆形,核仁明显,胞质中常可见多数脂质小空泡。核分裂象多见。病变中散在有多数巨噬细胞,在低倍镜下呈现为特征性的“星空”现象。免疫表型显示B淋巴细胞的特点,CD20、CD79α、CD10、bcl-6阳性,而CD3、CD43、bcl-2、TdT阴性。>90%的瘤细胞Ki-67呈阳性。

Burkitt样淋巴瘤与Burkitt淋巴瘤在形态学上稍有不同,但患者大多有*c-Myc*异位,故将其归入Burkitt淋巴瘤中。文献报道,Burkitt样淋巴瘤瘤细胞大小介于典型的Burkitt淋巴瘤与大B细胞淋巴瘤之间,瘤细胞大小、形态有明显的多形性,有或没有星空现象,并表现出大量的细胞凋亡和很高的增殖指数,有时很难与Burkitt淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤伴母细胞分化、伴高增殖指数的弥漫性大B细胞淋巴瘤等相鉴别。Haralambieva等推荐了一组免疫表型鉴定标准,即>90%的细胞呈Ki-67阳性,CD10、bcl-6阳性,bcl-2阴性,如加上*c-myc*基因重排就更能增加Burkitt样淋巴瘤诊断的可信度。

Burkitt淋巴瘤肿瘤细胞倍增时间快,为24-48 h,具有高度增殖活性及高度侵袭性,少数病例可以出现弥漫性骨髓浸润(30%),中枢神经系统受累及(13%)<sup>[11]</sup>。研究显示Burkitt淋巴瘤出现中枢受累,外周血中发现Burkitt淋巴瘤细胞者,其预后差。

Burkitt淋巴瘤对化疗非常敏感,通过有效化疗,肿块可明显缩小甚至消除。因此,化疗应作

为首选的治疗手段。目前推荐的治疗方案为联合化疗和中枢神经系统预防性治疗,并根据具体情况配合进行局部放疗和/或手术治疗。目前对Burkitt淋巴瘤最为有效的单药为CTX,高剂量CTX治疗非洲儿童Burkitt淋巴瘤完全缓解率可达80%-95%。常用的化疗方案是COMP方案,对I、II期Burkitt淋巴瘤的治愈率为80%,文献报道5年生存率可达27%-55%<sup>[12,13]</sup>。国内大宗Burkitt淋巴瘤的研究亦认为,短疗程、高强度化疗联合中枢预防,疗效较好,患者生存有较明显的改善。有些患者进行自体骨髓移植或自体外周血干细胞移植也是一种可选择的治疗方法。目前国内外学者对外科手术在Burkitt淋巴瘤治疗中的地位尚无统一意见。我们认为,外科手术在Burkitt淋巴瘤治疗中有利亦有弊,外科手术不是必需的治疗手段,但对于单发、位置比较局限的肿瘤可先行手术切除,一方面可根治切除病灶或减轻肿瘤负荷,其次还可预防或解决可能出现的肠出血、肠梗阻或肠穿孔等并发症,术后再辅以强有力的化疗,患者可获得较好的生存率;另一方面,对Burkitt淋巴瘤首先选择外科手术切除,势必会延缓患者化疗的时间,增加并发症的发生率<sup>[4]</sup>。患者术后一段时间内将处于体质较差,免疫力尚未完全恢复阶段,可能无法耐受正规大剂量化疗,从而导致化疗延迟,对患者的最终治疗效果将产生较大的影响。本文所报道病例即是一个很好的例子。此外,因大部分胃肠道淋巴瘤都属于NHL,其中绝大多数均起源于B淋巴细胞,95%以上的B-NHL都表达CD20抗原(本文所述病例即是一例),因此抗CD20单克隆抗体(美罗华)可用于该病的辅助治疗,有文献报道,美罗华联合化疗治疗Burkitt淋巴瘤比单独化疗疗效显著。

### 3 参考文献

- 1 Isaacson PG. Gastrointestinal lymphoma. *Hum Pathol* 1994; 25: 1020-1029
- 2 Evens AM, Gordon LI. Burkitt's and Burkitt-like lymphoma. *Curr Treat Options Oncol* 2002; 3: 291-305
- 3 Wong MT, Eu KW. Primary colorectal lymphomas. *Colorectal Dis* 2006; 8: 586-591
- 4 Braziel RM, Arber DA, Slovak ML, Gulley ML, Spier C, Kjeldsberg C, Unger J, Miller TP, Tubbs R, Leith C, Fisher RI, Grogan TM. The Burkitt-like lymphomas: a Southwest Oncology Group study delineating phenotypic, genotypic, and clinical features. *Blood* 2001; 97: 3713-3720
- 5 Doolabh N, Anthony T, Simmang C, Bieligg S, Lee E, Huber P, Hughes R, Turnage R. Primary colonic lymphoma. *J Surg Oncol* 2000; 74: 257-262
- 6 Koch P, del Valle F, Berdel WE, Willich NA, Reers



- B, Hiddemann W, Grothaus-Pinke B, Reinartz G, Brockmann J, Temmesfeld A, Schmitz R, Rübe C, Probst A, Jaenke G, Bodenstern H, Junker A, Pott C, Schultze J, Heinecke A, Parwaresch R, Tiemann M. Primary gastrointestinal non-Hodgkin's lymphoma: I. Anatomic and histologic distribution, clinical features, and survival data of 371 patients registered in the German Multicenter Study GIT NHL 01/92. *J Clin Oncol* 2001; 19: 3861-3873
- 7 Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J, Lister TA, Bloomfield CD. The World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues. Report of the Clinical Advisory Committee meeting, Airlie House, Virginia, November, 1997. *Ann Oncol* 1999; 10: 1419-1432
  - 8 Fan CW, Changchien CR, Wang JY, Chen JS, Hsu KC, Tang R, Chiang JM. Primary colorectal lymphoma. *Dis Colon Rectum* 2000; 43: 1277-1282
  - 9 Shimazu S, Kobayashi M, Okabayashi T, Sugimoto T, Namikawa T, Okamoto K, Araki K. A case of GI Burkitt-like lymphoma. *Gastrointest Endosc* 2004; 60: 152-154
  - 10 Smeland S, Blystad AK, Kvaløy SO, Ikonomou IM, Delabie J, Kvalheim G, Hammerstrøm J, Lauritzsen GF, Holte H. Treatment of Burkitt's/Burkitt-like lymphoma in adolescents and adults: a 20-year experience from the Norwegian Radium Hospital with the use of three successive regimens. *Ann Oncol* 2004; 15: 1072-1078
  - 11 Kemeny MM, Magrath IT, Brennan MF. The role of surgery in the management of American Burkitt's lymphoma and its treatment. *Ann Surg* 1982; 196: 82-86
  - 12 Mead GM, Sydes MR, Walewski J, Grigg A, Hatton CS, Pescosta N, Guarnaccia C, Lewis MS, McKendrick J, Stenning SP, Wright D. An international evaluation of CODOX-M and CODOX-M alternating with IVAC in adult Burkitt's lymphoma: results of United Kingdom Lymphoma Group LY06 study. *Ann Oncol* 2002; 13: 1264-1274
  - 13 Spreafico F, Massimino M, Luksch R, Casanova M, Cefalo GS, Collini P, Ferrari A, Polastry D, Terenziani M, Gasparini M, Fossati-Bellani F. Intensive, very short-term chemotherapy for advanced Burkitt's lymphoma in children. *J Clin Oncol* 2002; 20: 2783-2788

编辑 曹丽鸥 电编 李薇

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

## • 消息 •

### WJG 成功通过评审被 PMC 收录

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

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

# 《世界华人消化杂志》投稿须知

《世界华人消化杂志》为保证期刊的学术质量, 对所有来稿均进行同行评议, 是一份被中国科技论文统计源核心期刊、中文核心期刊要目总览收录的学术类期刊。

## 1 投稿总则

1.1 性质 《世界华人消化杂志》[ISSN 1009-3079 (print), ISSN 2219-2859 (online), CN 14-1260/R]是一份同行评议性和开放获取(open access, OA)的旬刊。OA最大的优点是面向全国本领域专家及公众开放无需注册, 免费获取PDF等格式的全文, 切实破除了传统性期刊阻碍科学研究成果快速传播的障碍。OA是一项真正意义上的公益性科学传播工具, 编委、作者和读者利益的最大化的目标, 努力推进本学科的繁荣和发展。

《世界华人消化杂志》定价56.00元, 全年2016.00元, 邮发代号82-262, 由世界华人消化杂志编辑部出版。《世界华人消化杂志》主要报道胃肠病学、肝胆病学、胰腺病学、内镜介入与消化外科等多学科的评论及基础研究和临床实践等各类文章, 具体内容涉及: 食管疾病, 如反流性食管炎、Barret's食管、食管静脉曲张和食管癌等; 胃部疾病, 胃食管反流性疾病、胃炎、胃动力障碍、胃出血、胃癌和幽门螺杆菌感染等; 肠道疾病, 如肠道出血、肠穿孔、肠梗阻、肠道炎症(如IBD/CD等)、肠道感染、大肠癌和大肠腺瘤等; 肝胆部疾病如病毒性肝炎、肝硬化、脂肪肝、肝纤维化、肝衰竭、胆石病、胆汁郁积、梗阻性黄疸、肝癌、胆囊癌、胆管癌和门静脉高压等; 胰腺疾病, 如胰腺炎和胰腺癌等; 全身性疾病涉及消化系统, 如自身免疫性及瘀胆性疾病、腹腔疾病、消化不良和代谢性疾病等; 以及与以上疾病相关的基因及基因组学、微生物及分子生物学、病因学、流行病学、免疫学、临床内外科诊断与治疗(如影像、化疗、移植、营养等); 除以上外, 本刊也报道诊断与筛选、内窥镜检查法、影像及先进技术。

《世界华人消化杂志》被国际检索系统美国《化学文摘》(Chemical Abstracts, CA)、荷兰《医学文摘库/医学文摘(EMBase/Excerpta Medica, EM)》和俄罗斯《文摘杂志(Abstract Journal, AJ)》收录。国内为中国科技论文统计与分析期刊(科技部列选为中国科技论文统计源期刊)、《中文核心期刊要目总览》(2008年版)内科学类的核心期刊、《中国学术期刊评价研究

报告-RCCS权威、核心期刊排行榜与指南》和中国知识资源总库收录。2008年度《世界华人消化杂志》总被引频次为2480, 位居内科学类41种期刊的第6位; 影响因子为0.547, 位居内科医学类41种期刊的第17位。《世界华人消化杂志》即年指标0.059, 他引率0.79, 地区分布数29, 基金论文比0.340, 国际论文比0.00, 学科影响指标0.59, 综合评价总分49.5, 位居内科学类41种期刊的第8位。

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<sup>H</sup>, *H. pylori*不能写成HP,  $T_{1/2}$ 不能写成tl/2或T<sub>1/2</sub>, Vmax不能Vmax,  $\mu$ 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),  $\rho$ (密度, 体积质量, g/L), c(浓度, mol/L),  $\phi$ (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、CO<sub>2</sub>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 $1 \times 10^{-3}$  g与 $5 \times 10^{-7}$  g之类改成1 mg与0.5 mg, hr改成h, 重量γ改成mg, 长度m改成mm. 国际代号不用于无数字的文句中, 例如每天不写每d, 但每天8 mg可写8 mg/d. 在一个组合单位符号内不得有1条以上的斜线, 例如不能写成mg/kg/d, 而应写成mg/(kg·d), 且在整篇文章内应统一. 单位符号没有单、复数的区分, 例如, 2 min不是2 mins, 3 h不是3 hs, 4 d不是4 ds, 8 mg不是8 mgs. 半个月, 15 d; 15克, 15 g; 10%福尔马林, 40 g/L甲醛; 95%酒精, 950 mL/L乙醇; 5% CO<sub>2</sub>, 50 mL/L CO<sub>2</sub>; 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 =  $45 \times 10^{-6}$ ; 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(2009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: 010-85381901, 传真: 010-85381893, 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 $\chi^2$ ; (4)样本的相关系数用英文小写 $r$ ; (5)自由度用希文小写 $\nu$ ; (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 $\leq 100$ , 百分数到个位;  $101 \leq$  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: <sup>a</sup> $P<0.05$ , <sup>b</sup> $P<0.01$ ( $P>0.05$ 不注). 如同一表中另有一套 $P$ 值, 则<sup>c</sup> $P<0.05$ , <sup>d</sup> $P<0.01$ ; 第3套为<sup>e</sup> $P<0.05$ , <sup>f</sup> $P<0.01$ .  $P$ 值后注明何种检验及其具体数字, 如 $P<0.01$ ,  $t = 4.56$  vs 对照组等, 注在表的左下方. 表内采用阿拉伯数字, 共同的计量单位符号应注在表的右上方, 表内个位数、小数点、±、-应上下对齐. “空白”表示无此项或未测, “-”代表阴性未发现, 不能用同左、同上等. 表图勿与正文内容重复. 表图的标目尽量用 $t/\text{min}$ ,  $c/(\text{mol/L})$ ,  $p/\text{kPa}$ ,  $V/\text{mL}$ ,  $t/^\circ\text{C}$ 表达. 黑白图请附黑白照片, 并考入磁盘内; 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.

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

《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。

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,则在论述的句末右上角注角码号。如马连生<sup>[1]</sup>报告……,潘伯荣等<sup>[2-5]</sup>认为……;PCR方法敏感性高<sup>[6-7]</sup>。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](mailto: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处理费及发表费,文章发表后可获得1本样刊及10套单行本(稿酬)。

## 6 修回稿须知

6.1 修回稿信件 来稿包括所有作者签名的作者投稿函。内容包括: (1)保证无重复发表或一稿多投; (2)是否有经济利益或其他关系造成的利益冲突; (3)所有作者均审读过该文并同意发表,所有作者均符合作者条件,所有作者均同意该代表其真实研究成果,保证文责自负; (4)列出通讯作者的姓名、职称、地址、电话、传真和电子邮件; 通讯作者应负责与其他作者联系,修改并最终审核复核稿; (5)列出作者贡献分布; (6)来稿应附有作者工作单位的推荐信,保证无泄密,如果是几个单位合作的论文,则需要提供所有参与单位的推荐信; (7)愿将印刷版和电子版出版权转让给本刊编辑部。

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

6.3 版权 本论文发表后作者享有非专有权,文责由作者自负。作者可在本单位或本人著作集中汇编出版以及用于宣讲和交流,但应注明发表于《世界华人消化杂志》××年;卷(期):起止页码。如有国内外其他单位和个人复制、翻译出版等商业活动,须征得《世界华人消化杂志》编辑部书面同意,其编辑版权属本刊所有。

### 《世界华人消化杂志》编辑部

北京百世登生物医学科技有限公司  
100025, 北京市朝阳区东四环中路62号  
远洋国际中心D座903室  
电话: 010-5908-0035  
传真: 010-8538-1893  
E-mail: [wcjd@wjgnet.com](mailto:wcjd@wjgnet.com)  
<http://www.wjgnet.com>

## 2011年国内国际会议预告

2011-01-14/16

第一届全国结直肠癌多学科治疗中青年专家学术大会  
会议地点: 哈尔滨市  
联系方式: 0451-86298096

2011-01-20/22

2011年胃肠道癌症研讨会-胃肠道肿瘤的科学和多学科管理  
会议地点: 美国旧金山  
联系方式: giregistration@jspargo.com

2011-03

中华医学会第四次全国感染性疾病中青年学术会议  
会议地点: 长沙市  
联系方式: medcon@126.com

2011-03-01/31

湖北省医学会结直肠肛门外科学分会2011年学术会议  
会议地点: 十堰市  
联系方式: chqjiang@hotmail.com

2011-03-25

第六届中国消化外科学术会议暨第七届全军肝胆外科学术会议  
会议地点: 北京市  
联系方式: 010-67534765-8888

2011-03-25/27

首届中国腹膜后肿瘤论坛  
会议地点: 北京市  
联系方式: sjtcolorectalsurgery@gmail.com

2011-04-01/30

第九届全国儿童感染性疾病暨第十届全国儿童肝脏疾病学术会议  
会议地点: 扬州市  
联系方式: fuxiaoxia@cma.org.cn

2011-04-08

2011第五届中华消化病学年度讲坛  
会议地点: 北京市  
联系方式: cma\_spd@yahoo.com

2011-04-09/10

第四届NCCN亚洲学术会议暨2011NCCN指南中国版修订会  
会议地点: 上海市  
联系方式: nccn-asia@emdchina.com

2011-04-14/17

第四届全国消化内科危重疑难少见病学术大会  
会议地点: 桂林市  
联系方式: xiaohuayinan2011@yahoo.com.cn

2011-04-15/17

第二届中国肿瘤介入与微创治疗大会  
会议地点: 上海市  
联系方式: 010-84288944

2011-04-22/24

第九届全国内镜外科学术研讨会  
会议地点: 济南市  
联系方式: gandanbeijing@163.com

2011-05-01/31

2011年安徽省消化、消化内镜学术年会暨肝脏疾病诊治难点与对策学习班  
会议地点: 合肥市  
联系方式: meiqiaomq@yahoo.com.cn

2011-05-27/29

第十四届中西医结合学会大肠肛门病专业委员会学术研讨会  
会议地点: 沈阳市  
联系方式: gcyy88@163.com

2011-06-11/12

2011国际消化疾病论坛  
会议地点: 香港  
联系方式: www.iddforum.com

2011-06-16/20

第二十三次全国中西医结合消化学术会议  
会议地点: 太原市  
联系方式: 0351-4174328

2011-06-23/26

第十五次全国病毒性肝炎及肝病学术会议  
会议地点: 沈阳市  
联系方式: lijuyi@cma.org.cn

2011-07-07

第八届全国大肠癌学术会议暨2011哈尔滨国际结直肠癌外科周  
会议地点: 哈尔滨市  
联系方式: rainy\_gg@yeah.net

2011-08-04/07

第五届中国肿瘤内科大会  
会议地点: 北京市  
联系方式: 010-87788701

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

## 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!

曹杰 主任医师

广州医学院附属广州市第一人民医院胃肠外科

陈国凤 主任医师

中国人民解放军第302医院感染七科

陈卫昌 教授

苏州大学附属第一医院消化内科

戴冬秋 教授

中国医科大学附属第一医院肿瘤外科

党双锁 教授

西安交通大学第二医院感染科

丁惠国 主任医师

首都医科大学附属北京佑安医院肝病消化科

杜顺达 副主任医师

北京协和医院肝外科

樊红 教授

东南大学医学院发育与疾病相关基因教育部重点实验室

房林 副教授

同济大学附属上海市第十人民医院普外科

高国全 教授

中山大学中山医学院生化系

韩天权 教授

上海交通大学医学院附属瑞金医院外科, 上海消化外科研究所

洪天配 教授

北京大学第三医院内分泌科

季菊玲 副教授

南通大学医学院病理教研室

姜春萌 教授

大连医科大学附属第二医院消化科

李永翔 主任医师

安徽医科大学第一附属医院普外科

梁力建 教授

中山大学附属第一医院肝胆外科

刘超 副教授

中山大学孙逸仙纪念医院肝胆胰外科

刘改芳 主任医师

河北医科大学第三医院消化内科

齐清会 教授

大连医科大学附属第一医院普通外科

王德盛 副教授

中国人民解放军第四军医大学西京医院肝胆外科

王蒙 副教授

中国人民解放军第二军医大学附属东方肝胆外科医院肝外综合治疗一科

吴君 主任医师

贵阳医学院附属医院感染科

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

喻荣彬 副教授

南京医科大学公共卫生学院流行病与卫生统计学系

张春虎 副教授

中南大学湘雅医院中西医结合研究所

张力为 主任医师

新疆医科大学第一附属医院胸外科

张青云 研究员

北京大学临床肿瘤学院北京肿瘤医院检验科

张群华 教授

上海复旦大学附属华山医院外科

郑鹏远 教授

郑州大学第二附属医院消化科

邹小明 教授

哈尔滨医科大学附属第二医院普外二科