

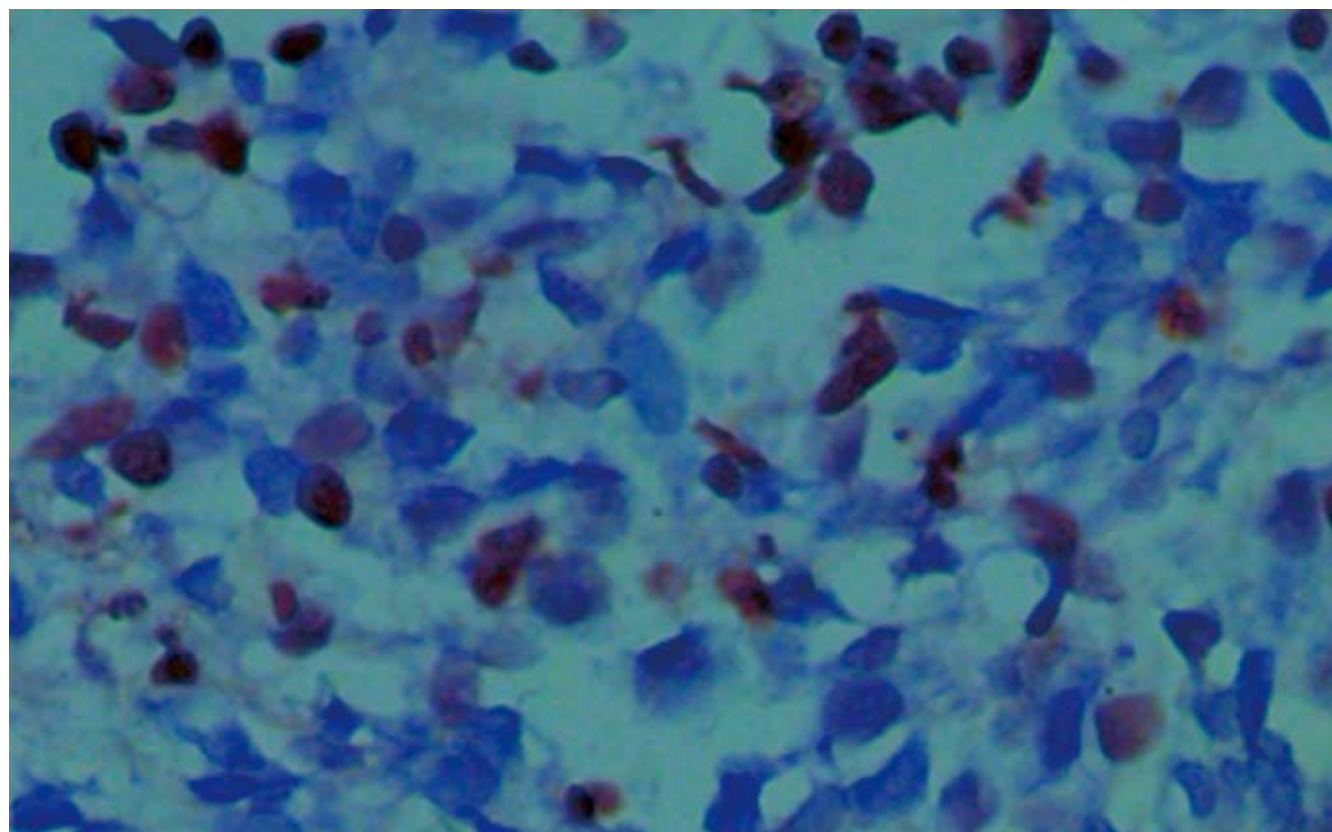
ISSN 1009-3079 (print)
ISSN 2219-2859 (online)
CN 14-1260/R

世界华人消化杂志®

**WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY**

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2012 年 4 月 28 日 第 20 卷 第 12 期 (Volume 20 Number 12)



12/2012

ISSN 1009-3079



9 771009 307056

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

世界华人消化杂志®

编辑委员会

2012-01-01/2014-12-31

wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

总顾问

陈可冀教授
黄志强教授
纪小龙教授
王宝恩教授
王苑本教授
杨春波教授
杨思凤教授
姚希贤教授
张万岱教授
周学文教授

名誉主编

潘伯荣教授

主编

程英升教授
党双锁教授
江学良教授
刘连新教授
刘占举教授
吕宾教授
马大烈教授
王小众教授
张宗明教授
姚登福教授

编委

消化内科学

白爱平副教授
陈国忠主任医师
陈洪副教授
陈其奎教授
陈卫昌教授
陈贻胜教授
程斌教授
迟宝荣教授
崔立红教授
丁士刚教授
董蕾教授
杜雅菊主任医师
杜奕奇副教授
樊晓明教授
房静远教授
冯志杰主任医师
傅春彬主任医师
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
黄培林教授
黄晓东主任医师
黄颖秋教授
黄缘教授
季国忠教授
江米足教授
姜春萌教授
姜慧卿教授
姜相君主任医师
金瑞教授
蓝宇教授
李淑德教授
李瑜元教授
李玉民教授

廖家智副主任医师

林志辉教授
刘冰熔教授
刘凤斌教授
刘改芳主任医师
刘海峰主任医师
刘海林主任医师
陆伦根教授
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
任粉玉教授
任建林教授
邵先玉教授
沈琳主任医师
沈薇教授
施瑞华教授
宋军副教授
唐世刚教授
田宇彬教授
宛新建副教授
王邦茂教授
王炳元教授
王承党教授
王江滨教授
王俊平教授
王晓艳副教授
夏冰教授
夏时海副教授
徐可树教授
杨建民教授

姚树坤教授
张国梁主任医师
张军教授
张小晋主任医师
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
周宇教授
邹晓平主任医师
诸琦教授
于珮主任医师

消化外科学

白雪巍副主任医师
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
陈凇教授
陈汝福教授
陈亚军主任医师
陈钟教授
程爱国教授
程树群副教授
崔云南教授
戴朝六教授
戴冬秋教授
丁义涛教授
杜顺达副教授
房林教授
傅红副教授
傅华群教授
傅志仁主任医师
高毅主任医师
葛海燕教授
巩鹏副教授
谷俊朝主任医师
顾国利副主任医师
顾岩教授
韩天权教授
郝纯毅主任医师
郝立强副教授
何超教授
何晓顺教授
何裕隆教授
黄志勇教授

季加孚教授
莫卫东教授
姜波健教授
金山主任医师
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
李胜研究员
李涛副主任医师
李文岗教授
李旭副教授
李永翔教授
李志霞教授
李宗芳教授
梁力建教授
刘宝林教授
刘超教授
刘建教授
刘颖斌主任医师
陆云飞教授
禄韶英副教授
吕云福教授
齐清会教授
秦春宏副主任医师
秦华东教授
秦环龙教授
秦建民主任医师
邱伟华主任医师
仇毓东教授
单云峰副主任医师
沈柏用副教授
施宝民教授
施诚仁教授
施晓雷副主任医师
石毓君研究员
宋振顺教授
孙诚谊教授
孙学英教授
邵升副教授
谭晓冬教授
汤朝晖副主任医师
汤绍涛教授
唐南洪教授
田晓峰教授
汪波主任医师
汪根树副教授
王德盛副主任医师
王凤山教授
王健生教授
王蒙副教授

王石林主任医师
王文跃主任医师
王悦华副主任医师
王振宁教授
王正康教授
王志刚副主任医师
王忠裕教授
吴泰璜教授
伍晓汀教授
谢敏主任医师
徐迅迪教授
徐泐副主任医师
许戈良教授
许剑民教授
薛东波教授
杨柏霖副主任医师
杨桦教授
杨家和主任医师
杨银学教授
殷正丰教授
于聪慧教授
于则利教授
禹正杨副教授
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
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
陈志辉副主任医师
丁惠国教授
范建高教授
范小玲主任医师
范学工教授
高润平教授
高泽立副教授
龚国忠教授
管世鹤副教授
胡国信主任医师
靳雪源主任医师
刘正稳教授
钱林学主任医师

世界华人消化杂志®

编辑委员会

孙殿兴主任医师
谭德明教授
汤华研究员
王凯教授
王怡主任医师
吴君主任医师
宣世英教授
杨江华副教授
姚鹏副教授
张明辉副主任医师
张占卿主任医师
赵桂鸣主任医师
赵秀英副教授
周霞秋教授
朱传武教授
庄林主任医师

消化中医药学

陈治水主任医师
杜群副研究员
黄恒青主任医师
李军祥教授
李康副教授
李晓波教授
李勇副教授
李振华教授
刘成海研究员

刘绍能主任医师
南极星教授
牛英才研究员
王富春教授
邢建峰副教授
徐列明教授
许玲教授
徐庆教授
袁红霞研究员
张声生教授

消化肿瘤学

曹秀峰教授
曹志成院士
代智副研究员
李璦教授
刘宝瑞教授
刘平教授
刘云鹏教授
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
张凤春教授

消化影像学

白彬主任医师

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

消化内镜及介入治疗学

郝俊鸣副主任医师
茅爱武教授
孙明军教授
万军教授
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

陈敬贤教授
陈志龙教授
崔莲花副教授
樊红教授
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
李刚教授
李君文研究员
李增山副教授
刘克辛教授
刘森副教授
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
汪思应教授
王钦红教授
魏继福研究员
吴道澄教授
吴军研究员

吴俊华副教授
徐宁志研究员
许文燮教授
阴赅宏研究员
郁卫东副研究员
喻荣彬教授
周南进研究员
周素芳教授
周晓武副主任医师

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
门秀丽教授
潘兴华副主任医师
王鲁平主任医师
王娅兰教授
颜宏利副教授
于颖彦教授
余宏宇教授
张锦生教授
赵春玲副教授
朱亮副教授

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ● 2012 年 4 月 28 日 第 20 卷 第 12 期 (总第380期)

基础研究

- 991 IL-17在炎症肠病中的表达及其与LPS协同诱导肠上皮细胞表达IL-8的作用机制
林艳华, 周平, 马培娥, 郭小芹, 夏廷毅, 沈倍奋, 黎燕, 韩根成
- 998 高糖对大鼠结肠平滑肌细胞表达内源性胰岛素样生长因子1的影响
徐新寓, 王云, 杨微微, 林琳
- 1004 人参皂苷Rg3对小鼠结肠癌原发瘤切除后肝转移瘤生长的抑制作用
郭刚, 许建华, 孙珏, 范忠泽

临床研究

- 1012 生物信息学方法对人类和小鼠共同肝癌相关基因的筛选
王云, 胡艳玲, 曹骥, 何敏
- 1018 Lumican蛋白在胰腺导管腺癌间质中的表达及其与Ki-67、VEGF及突变型P53表达的相关性
袁菲, 周尘飞, 金晓龙
- 1025 盆底失弛缓综合征患者盆底表面肌电的改变及临床意义
薛雅红, 丁曙晴, 丁义江, 张勇, 曾宪东, 钱雄杰, 刘峰, 王静

文献综述

- 1030 肝小静脉闭塞病的临床现状及研究进展
彭俏, 贺德志, 李建生
- 1036 益生菌对功能性便秘的防治进展
张莉芳, 赵小平

研究快报

- 1041 高渗盐胶体对失血性休克大鼠小肠黏膜形态的影响
李震, 欧阳军

临床经验

- 1046 超声内镜联合染色内镜在早期食管癌诊断中的应用价值
汪泳, 张方信, 常宗宏, 魏红梅, 赵海霞, 杨永林
- 1049 通用引物巢式PCR法对哈萨克族食管鳞癌HPV感染的检测
陈卫刚, 杨春梅, 徐丽红, 张宁, 刘晓燕, 马云贵, 霍小玲, 韩玉胜, 田德安, 郑勇
- 1054 Gilbert综合征9例
夏菲, 王雪莲, 李智伟
- 1057 内镜下乳头小切开加球囊扩张术治疗胆总管大结石80例
邵东, 庄耘, 徐馥, 陈建平
- 1061 十二指肠结节性病变病理分型及诊断17例
时晓鑫
- 1066 血浆中miR-144*直接扩增在大肠癌非侵入性诊断中的应用
桂银莉, 张金平, 李建生, 王静

病例报告

- 1071 嵌顿于膀胱子宫陷凹的腹内疝致小肠梗阻1例
黄颖秋

附 录	1074 《世界华人消化杂志》投稿须知 1079 2012年国内国际会议预告
志 谢	1080 志谢世界华人消化杂志编委
消 息	997 中国科技信息研究所发布《世界华人消化杂志》影响因子0.694 1003 《世界华人消化杂志》修回稿须知 1017 《世界华人消化杂志》栏目设置 1024 2011年度《世界华人消化杂志》发文情况 1035 《世界华人消化杂志》再次入选《中文核心期刊要目总览》(2011年版) 1040 《世界华人消化杂志》参考文献要求 1045 《世界华人消化杂志》被评为中国精品科技期刊 1053 《世界华人消化杂志》性质、刊登内容及目标 1056 《世界华人消化杂志》外文字符标准 1070 《世界华人消化杂志》正文要求 1073 《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》
封面故事	郭刚, 许建华, 孙珏, 范忠泽. 人参皂苷Rg3对小鼠结肠癌原发瘤切除后肝转移瘤生长的抑制作用. 世界华人消化杂志 2012; 20(12): 1004-1011 http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1004.asp
本期责任人	编务 周媛; 送审编辑 李军亮, 张姗姗; 组版编辑 闫晋利; 英文编辑 王天奇; 责任编辑 张姗姗; 形式规范审核编辑部主任 李军亮; 最终清样审核总编辑 马连生

<p>世界华人消化杂志</p> <p>Shijie Huaren Xiaohua Zazhi</p> <p>吴阶平 题写封面刊名 陈可冀 题写版权刊名 (旬刊)</p> <p>创 刊 1993-01-15 改 刊 1998-01-25 出 版 2012-04-28 原刊名 新消化病学杂志</p> <p>期 刊 名 称 世界华人消化杂志 主 管 单 位 山西省科学技术厅 主 办 单 位 太原消化病研治中心</p> <p>编 辑 世界华人消化杂志编辑委员会 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com</p> <p>出 版 世界华人消化杂志编辑部 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com</p>	<p>主 编 程英升, 教授, 200072, 上海市, 同济大学附属第十人民医院影像临床医学中心 党双锁, 教授, 710004, 陕西省西安市, 西安交通大学医学院第二附属医院感染科 江学良, 教授, 250031, 山东省济南市, 中国人民解放军济南军区总医院消化科 刘连新, 教授, 150001, 黑龙江省哈尔滨市, 哈尔滨医科大学第一临床医学院普外科 刘占举, 教授, 200072, 上海市, 同济大学附属第十人民医院胃肠内科 吕宾, 教授, 310006, 浙江省杭州市, 浙江中医药大学附属医院(浙江省中医院)消化科 马大烈, 教授, 200433, 上海市, 中国人民解放军第二军医大学附属长海医院病理科 王小众, 教授, 350001, 福建省福州市, 福建医科大学附属协和医院消化内科 姚登福, 教授, 226001, 江苏省南通市, 南通大学附属医院临床医学研究中心 张宗明, 教授, 100016, 北京市, 清华大学第一附属医院消化医学中心</p> <p>编 辑 部 主 任 李军亮</p>	<p>印刷 北京科信印刷厂 发行 国内: 北京报刊发行局 国外: 中国国际图书贸易总公司 (100044, 北京市399信箱) 订购 全国各地邮电局</p> <p>《世界华人消化杂志》是一份同行评议性的旬刊, 是一份被《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊.《世界华人消化杂志》的英文摘要被美国《化学文摘》, 荷兰《医学文摘库/医学文摘》和俄罗斯《文摘杂志》收录.</p> <p>《世界华人消化杂志》正式开通了在线办公系统(http://www.baishideng.com/wcjd/ch/index.aspx), 所有办公流程一律可以在线进行, 包括投稿、审稿、编辑、审读, 以及作者、读者、编者之间的信息反馈交流.</p> <p>特别声明 本刊刊出的所有文章不代表本刊编辑部和本刊编委会的观点, 除非特别声明. 本刊如有印装质量问题, 请向本刊编辑部调换.</p> <p>2012年版权归世界华人消化杂志所有</p>
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

World Chinese Journal of Digestology

April 2012 Contents in Brief Volume 20 Number 12

BASIC RESEARCH	<p>991 Expression of IL-17 in inflammatory bowel disease and synergistic action of IL-17 and LPS on IL-8 expression in intestinal epithelial cells <i>Lin YH, Zhou P, Ma PE, Guo XQ, Xia TY, Shen BF, Li Y, Han GC</i></p> <p>998 High glucose down-regulates the expression of endogenous insulin-like growth factor-1 in rat colonic smooth muscle cells <i>Xu XY, Wang Y, Yang WW, Lin L</i></p> <p>1004 Ginsenoside Rg3 inhibits growth of liver metastases in nude mice after surgical removal of primary tumor <i>Guo G, Xu JH, Sun J, Fan ZZ</i></p>
CLINICAL RESEARCH	<p>1012 Bioinformatic screening of key genes expressed in both human and mouse hepatocellular carcinoma <i>Wang Y, Hu YL, Cao J, He M</i></p> <p>1018 Lumican protein expression in pancreatic ductal adenocarcinoma: clinical significance and correlation with expression of Ki-67, VEGF and mutated P53 <i>Yuan F, Zhou CF, Jin XL</i></p> <p>1025 Clinical significance of pelvic floor surface electromyographic changes in patients with pelvic floor dyssynergia <i>Xue YH, Ding SQ, Ding YJ, Zhang Y, Zeng XD, Qian XJ, Liu F, Wang J</i></p>
REVIEW	<p>1030 Clinical research of hepatic veno-occlusive disease: current status and future prospects <i>Peng Q, He DZ, Li JS</i></p> <p>1036 Progress in the use of probiotics to prevent and treat functional constipation <i>Zhang LF, Zhao XP</i></p>
RAPID COMMUNICATION	<p>1041 Hypertonic sodium chloride hydroxyethyl starch injection reduces histopathological changes in the intestinal mucosa of rats with hemorrhagic shock <i>Li Z, Ouyang J</i></p>
CLINICAL PRACTICE	<p>1046 Diagnostic value of endoscopic ultrasound combined with Lugol's staining in patients with early esophageal cancer <i>Wang Y, Zhang FX, Chang ZH, Wei HM, Zhao HX, Yang YL</i></p> <p>1049 Detection of human papilloma virus in esophageal cancer in Xinjiang Kazakh patients by general primer-mediated polymerase chain reaction <i>Chen WG, Yang CM, Xu LH, Zhang N, Liu XY, Ma YG, Huo XL, Han YS, Tian DA, Zheng Y</i></p> <p>1054 Gilbert syndrome: An analysis of 9 cases <i>Xia F, Wang XL, Li ZW</i></p> <p>1057 Endoscopic sphincterotomy plus balloon dilation for large bile duct stones: An analysis of 80 cases <i>Shao D, Zhuang Y, Xu F, Chen JP</i></p> <p>1061 Clinical and pathologic features of nodular duodenum: An analysis of 17 cases <i>Shi XX</i></p> <p>1066 Expression of microRNA-144* in plasma of patients with colorectal cancer: A potential non-invasive diagnostic marker for colorectal cancer screening <i>Gui YL, Zhang JP, Li JS, Wang J</i></p>

CASE REPORT	1071 Small bowel obstruction caused by an incarcerated intraperitoneal hernia through the vesicouterine pouch: A case report <i>Huang YQ</i>
APPENDIX	1074 Instructions to authors of <i>World Chinese Journal of Digestology</i> 1079 Meeting events calendar in 2012
ACKNOWLEDGMENT	1080 Acknowledgments to reviewers of <i>World Chinese Journal of Digestology</i>
COVER	<i>Guo G, Xu JH, Sun J, Fan ZZ. Ginsenoside Rg3 inhibits growth of liver metastases in nude mice after surgical removal of primary tumor.</i> Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(12): 1004-1011 http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1004.asp
RESPONSIBLE EDITORS FOR THIS ISSUE	Assistant Editor: <i>Yuan Zhou</i> Review Editor: <i>Jun-Liang Li, Shan-Shan Zhang</i> Electronic Page Editor: <i>Jin-Li Yan</i> English Language Editor: <i>Tian-Qi Wang</i> Editor-in-Charge: <i>Shan-Shan Zhang</i> Proof Editor: <i>Jun-Liang Li</i> Layout Editor: <i>Lian-Sheng Ma</i>

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

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

Founded on January 15, 1993
Renamed on January 25, 1998
Publication date April 28, 2012

NAME OF JOURNAL
World Chinese Journal of Digestology

RESPONSIBLE INSTITUTION
Department of Science and Technology
of Shanxi Province

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

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

PRINTING
Beijing Kexin Printing House

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

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

EDITOR-IN-CHIEF

Ying-Sheng Cheng, Professor, Medical Imaging Center, Shanghai Tenth People's Hospital, Tongji University, Shanghai 200072, China

Shuang-Suo Dang, Professor, Department of Infectious Diseases, the Second Affiliated Hospital of Medical School of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, Shaanxi Province, China

Xue-Liang Jiang, Professor, Department of Gastroenterology, General Hospital of Jinan Military Command of Chinese PLA, Jinan 250031, Shandong Province, China

Lian-Xin Liu, Professor, Department of General Surgery, the First Clinical Medical College of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China

Zhan-Ju Liu, Professor, Department of Gastroenterology, Shanghai Tenth People's Hospital, Tongji University, Shanghai 200072, China

Bin Lv, Professor, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310006, Zhejiang Province, China

Da-Lie Ma, Professor, Department of Pathology, Changhai Hospital, the Second Military Medical University of Chinese PLA, Shanghai 200433, China

Xiao-Zhong Wang, Professor, Department of Gastroenterology, Union Hospital, Fujian Medical University, Fuzhou 350001, Fujian Province, China

Deng-Fu Yao, Professor, Clinical Research Center, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China

Zong-Ming Zhang, Professor, Department of General Surgery, Digestive Medical Center, the First Affiliated Hospital, School of Medicine, Tsinghua University, Beijing 100016, China

SCIENCE EDITORS

Director: Jun-Liang Li

SUBSCRIPTION

RMB 68 Yuan for each issue
RMB 2448 Yuan for one year

CSSN

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

COPYRIGHT

© 2012 Published by *World Chinese Journal of Digestology (WCJD)*. All rights reserved; no part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise without the prior permission of *WCJD*. Authors are required to grant *WCJD* an exclusive licence to publish.

SPECIAL STATEMENT

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

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

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

Copyright © 2012 by Editorial Department of *World Chinese Journal of Digestology*

IL-17在炎症肠病中的表达及其与LPS协同诱导肠上皮细胞表达IL-8的作用机制

林艳华, 周平, 马培娥, 郭小芹, 夏廷毅, 沈倍奋, 黎燕, 韩根成

林艳华, 周平, 夏廷毅, 中国人民解放军空军总医院肿瘤放疗科 北京市 100142

马培娥, 济南市第五人民医院 山东省济南市 250022

林艳华, 郭小芹, 沈倍奋, 黎燕, 韩根成, 中国人民解放军军事医学科学院基础医学研究所分子免疫室 北京市 100850
林艳华, 在读硕士, 主要从事自身免疫性炎症性肠病免疫学机制的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 81072475

国家973重点研究计划基金资助项目, No. 2007CB512406

作者贡献分布: 此课题由周平与韩根成设计; 研究过程由林艳华与郭小芹操作完成; 研究所用试剂及分析工具由韩根成、沈倍奋、黎燕、夏廷毅及马培娥提供; 数据分析由林艳华完成; 本文写作由林艳华完成。

通讯作者: 周平, 副主任医师, 100142, 北京市, 中国人民解放军空军总医院肿瘤放疗科. zhouping4946@yahoo.com.cn

收稿日期: 2011-12-23 修回日期: 2012-03-15

接受日期: 2012-03-25 在线出版日期: 2012-04-28

Expression of IL-17 in inflammatory bowel disease and synergistic action of IL-17 and LPS on IL-8 expression in intestinal epithelial cells

Yan-Hua Lin, Ping Zhou, Pei-E Ma, Xiao-Qin Guo, Ting-Yi Xia, Bei-Fen Shen, Yan Li, Gen-Cheng Han

Yan-Hua Lin, Ping Zhou, Ting-Yi Xia, Department of Tumor Radiotherapy, Air Force General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100142, China

Pei-E Ma, the Fifth People's Hospital of Jinan, Jinan 250022, Shandong Province, China

Yan-Hua Lin, Xiao-Qin Guo, Bei-Fen Shen, Yan Li, Gen-Cheng Han, Department of Molecular Immunology, Institute of Basic Medical Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 81072475; and the National "973" Program of China, No. 2007CB512406

Correspondence to: Ping Zhou, Associate Chief Physician, Department of Tumor Radiotherapy, Air Force General Hospital of Chinese PLA, 30 Fucheng Road, Haidian District, Beijing 100142, China. zhouping4946@yahoo.com.cn

Received: 2011-12-23 Revised: 2012-03-15

Accepted: 2012-03-25 Published online: 2012-04-28

Abstract

AIM: To investigate the expression of interleukin-17 (IL-17) in inflammatory bowel disease (IBD) in a mouse model and to examine the synergistic reaction of IL-17 and lipopolysaccharide (LPS) on interleukin-8 (IL-8) expression in intestinal epithelial cells (HT-29 cells).

tinal epithelial cells (HT-29 cells).

METHODS: A mouse model of inflammatory bowel disease was induced with TNBS to detect the expression of IL-17 and its receptor IL-17Ra in IBD. HT-29 cells were treated with IL-17 and/or different concentrations of LPS to examine their synergistic action on the expression of IL-8 mRNA and protein by FACS, real-time PCR, ELISA, and Western blot.

RESULTS: The expression of IL-17 and IL-17Ra in IBD was significantly increased (both $P < 0.05$). IL-17 and low doses of LPS showed a synergistic action on IL-8 expression in HT-29 cells (2187.61 ± 132.42 vs 2634.27 ± 134.63 , $P = 0.01$) by activating NF- κ B and promoting inflammation. However, high doses of LPS reduced the levels of IL-8, and their synergistic action with IL-17 disappeared (1841.43 ± 50.38 vs 1685.67 ± 71.47 , $P = 0.03$).

CONCLUSION: IL-17 has a synergistic action with low, but not high doses of LPS on the expression of inflammatory mediators in HT-29 cells.

Key Words: Interleukin-17; Inflammatory bowel disease; Lipopolysaccharides; Interleukin-8; HT-29 cells

Lin YH, Zhou P, Ma PE, Guo XQ, Xia TY, Shen BF, Li Y, Han GC. Expression of IL-17 in inflammatory bowel disease and synergistic action of IL-17 and LPS on IL-8 expression in intestinal epithelial cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(12): 991-997

摘要

目的: 探讨IL-17细胞因子在TNBS诱导的炎症肠病动物模型中的表达变化, 明确IL-17和脂多糖(LPS)在诱导HT-29肠上皮细胞IL-8表达中的协同作用及细胞内信号机制。

方法: 探讨IL-17及其受体在TNBS炎症肠病模型中的表达变化, 利用细胞培养、FACS、Real-time PCR、酶联免疫吸附(ELISA)、

■背景资料

目前炎症性肠病(IBD)的发病机制尚不完全明确, 其中某些细胞因子、信号传导通路等与IBD的发病机制密切相关。随着我国近年来IBD的发病率快速上升, 对这些方面因素的探讨具有重要的现实意义, 可为IBD的治疗提供新的靶点和方法。

■同行评议者

邢建峰, 副教授, 西安交通大学医学院

■ 研发前沿

IL-17具有抗感染和参与多种免疫损伤的双重作用,因此对IL-17/IL-17R的生理、病理效应及其机制进行深入探讨以便有效发挥其抗感染作用是当前研究的热点。

Western blot等技术,观察IL-17及不同剂量LPS干预人肠上皮细胞(HT-29细胞)后细胞因子IL-8在蛋白水平的表达,以及IL-17受体(IL-17Ra)在mRNA水平的表达变化及引起上述效应的细胞内信号传导机制。

结果: TNBS诱导的炎性肠病动物模型中IL-17以及IL-17Ra显著升高($P < 0.03$);炎症介质IL-17能与一定浓度范围内的LPS协同促进IL-8的表达(2187.61 ± 132.42 vs 2634.27 ± 134.63 , $P = 0.01$),增强NF- κ B信号通路的活化,促进炎症反应。但随着LPS剂量升高,LPS本身诱导IL-8表达的活性降低,且与IL-17的协同作用消失(1841.43 ± 50.38 vs 1685.67 ± 71.47 , $P = 0.03$)。

结论: IL-17与低浓度的LPS可协同促进HT-29细胞炎症介质的表达,但与高浓度LPS联合时,两者无协同效应。

关键词: 白介素-17; 炎症性肠病; 脂多糖; 白介素-8; HT-29细胞

林艳华, 周平, 马培娥, 郭小芹, 夏廷毅, 沈倍奋, 黎燕, 韩根成. IL-17在炎性肠病中的表达及其与LPS协同诱导肠上皮细胞表达IL-8的作用机制. 世界华人消化杂志 2012; 20(12): 991-997

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/991.asp>

0 引言

炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)是一种肠道慢性非特异性疾病,目前对其发病机制较一致的观点是遗传易感人群在环境危险因素及细菌感染等作用下,肠道免疫系统失调,募集炎症细胞释放炎症介质,造成组织损伤和功能障碍。Th17细胞是近几年研究自身免疫性疾病的一大热点,其是一群以分泌白介素17(interleukin-17, IL-17)为特征的CD4⁺ T细胞亚群,具有促进免疫反应的效应,在以慢性炎症为损伤机制的自身免疫疾病中具有重要作用。近年来,越来越多研究焦点落在Th17细胞及其细胞因子IL-17在自身免疫性炎性肠病发病机制中所起的作用上^[1-9],有望成为炎性肠病治疗的新靶点,但其具体的免疫机制尚不十分清楚。此外,肠上皮细胞可表达特异的Toll样受体-4(toll like receptor 4, TLR-4),而TLR-4又特异性识别脂多糖(lipopolysaccharides, LPS),LPS/TLR4通路在诱导炎症细胞因子的表达,增强局部炎症反应方面发挥重要作用^[10]。为深入认识炎性肠病的作用机制,本研究在证实IL-17/IL-17Ra通路在TNBS-

IBD模型中活性增强的基础上,以人肠上皮细胞系(HT-29细胞)为模型,探讨IL-17/IL-17Ra通路与LPS/TLR4通路间可能的相互作用及机制。

1 材料和方法

1.1 材料 BALB/c小鼠购自军事医学科学院动物中心; HT-29细胞购自ATCC; TNBS、嗜热菌蛋白酶为美国Sigma公司生产; LPS为美国Sigma公司生产; RPMI-1640、BCA蛋白定量试剂盒购自Thermo公司; 澳洲胎牛血清为Biowhittaker公司产品; IL-8 ELISA试剂盒、hIL-17a、IL-17Ra/PE、TLR-4/PE抗体为eBioscience公司产品; 脱脂奶粉为伊利高蛋白脱脂高钙奶粉; BSA(牛血清白蛋白v)购自Sigma公司; P65、P-P65、AKT、PAKT、I κ B一抗均购自CST公司; GAPDH一抗购自Calbio; 人抗兔二抗、人抗鼠二抗购自KPL公司; PCR仪、实时定量PCR仪购自Bio-Rad公司; 酶标仪购自Thermo公司。

1.2 方法

1.2.1 HT-29细胞培养: 人结肠癌细胞(HT-29细胞)用含100 mL/L胎牛血清RPMI-1640培养基培养,于37 °C、50 mL/L CO₂细胞孵箱中传代培养。

1.2.2 IBD动物模型的建立及肠上皮细胞中IL-17/IL-17Ra的表达分析: IBD动物模型的建立按我们已经发表的文献进行^[11],主要包括BALB/c小鼠,实验组: 2.5 mg TNBS/只($n = 21$), 150 μ L/只灌肠; 对照组: 等体积50%乙醇/只($n = 23$),观察小鼠体质量、粪便及精神等方面的变化。7 d后处死小鼠,腹正中垂直切口,取出肠组织(结肠、直肠、部分回肠),纵行剪开肠管,用生理盐水冲洗至干净,将肠组织先剪成长约2-3 mm的小片,再剪成约1 mm \times 1 mm \times 1 mm的小块,转入50 mL离心管中,静置15 min; 弃去上清,把沉淀转入50 mL三角瓶中,加入25 mL嗜热菌蛋白酶消化酶液,37 °C震荡2 h; 见消化液变浑浊,用10 mL玻璃吸管反复吹打5 min,把消化上清液转入50 mL离心管中; 850 g离心10 min,弃上清,每管沉淀中加入1 mL TRIzol混匀,移入1.5 mL进口EP管中(-70 °C保存)。肠上皮细胞总RNA提取严格按照Gibco TRIzol RNA提取试剂盒说明书操作。将总mRNA逆转录为cDNA,总体积为20 μ L, RNA 2 μ g,逆转录步骤严格按照RevertaidTM First stand cDNA synthesis kit(逆转录试剂盒)提供条件进行逆转录,转录后的cDNA保存于-70 °C冰箱备用。

Real-time PCR, 根据基因总长进行引物设

计, mIL-17Ra引物序列: 上游5'-AGCATCACCG-TAAGCG-3', 下游5'-CACAGTCAGGCACAAA-GA-3', 产物长度150 bp; mIL-17a引物序列: 上游5'-GCGTGTCCAAACACTGAGGCCA-3', 下游5'-TTCATTGCGGTGGAGAGTCCAGG-3', 产物长度150 bp; mGAPDH引物序列: 上游5'-TCTT-GGGCTACACTGAGGAC-3', 下游5'-CATAC-CAGGAAATGAGCTTGA-3', 产物长度126 bp. 引物由北京诺赛生物工程公司合成. RT-PCR扩增反应体系如下: 下游引物各0.25 μ L, 灭菌注射用水7.5 μ L, RT-PCR Mix 10 μ L, cDNA 2 μ L, 反应总体积20 μ L. 反应条件: 预变性95 $^{\circ}$ C 3 min; 变性95 $^{\circ}$ C 10 s, 退火60 $^{\circ}$ C 15 s, 延伸72 $^{\circ}$ C 10 s(收集荧光), 反应40个循环; 60 $^{\circ}$ C 30 s(收集溶解曲线), 反应71个循环. 扩增产物用实时定量PCR仪Bio-rad IQ5软件进行分析.

1.2.3 FACS检测HT-29细胞IL-17Ra、TLR-4的表达: 用100 mL/L FBS RPMI-1640培养液重悬细胞后, 按每管细胞数 5×10^5 加入流式管中, 3管细胞处理如下: (1)空白对照组; (2)单染hTLR-4/PE抗体; (3)单染hIL-17Ra/PE抗体. FACS步骤: (1)收集细胞: HT-29细胞, 分3管, 2 000 r/min, 离心5 min, 弃去上清, 余下沉淀重悬; (2)各管加FACS洗液1 mL, 2 000 r/min, 离心5 min, 弃去上清, 余下沉淀重悬; (3)1号管不处理, 2号管加hTLR-4/PE抗体、1 μ L, 3号管加hIL-17Ra/PE抗体、4 μ L, 避光4 $^{\circ}$ C 孵育30 min; (4)重复2步骤; (5)各管加200 μ L生理盐水, 上机检测. 结果根据FACS分析仪Winmdi程序进行分析.

1.2.4 hIL-17、LPS对HT-29细胞分泌IL-8的影响: 用100 mL/L FBS RPMI-1640培养液重悬细胞后, 细胞浓度为 1×10^5 cells/mL转种于24孔培养板, 每孔0.5 mL, 静置1 h后按以下分组处理: (1)检测LPS诱导IL-8表达的动态变化: 空白对照组、LPS(10、50、100 μ g/L), 刺激时间为6、12、24 h; (2)测LPS诱导IL-8表达的量效关系: 在24 h点分别设LPS浓度梯度为0、10、50、100 μ g/L, 1、5、10 mg/L; (3)检测hIL-17诱导IL-8表达的量效关系: 在24 h点分别设hIL-17浓度为0、10、20、50、100 μ g/L. 收取上清保存于-70 $^{\circ}$ C冰箱备用ELISA法测定IL-8浓度.

1.2.5 hIL-17和LPS联合作用对HT-29细胞分泌IL-8的影响: 用100 mL/L FBS RPMI-1640培养液重悬细胞后, 细胞浓度为 1×10^5 cells/mL转种于24孔培养板, 每孔0.5 mL, 静置1 h后按以下分组处理: (1)低浓度LPS联合hIL-17: 空白对照

组, LPS(50 μ g/L), hIL-17(50 μ g/L), LPS(50 μ g/L)+hIL-17(50 μ g/L); (2)高浓度LPS联合hIL-17: 空白对照组, LPS(1 mg/L), hIL-17(50 μ g/L), LPS(1 mg/L) +hIL-17(50 μ g/L), 培养24 h后, 收取上清保存于-70 $^{\circ}$ C冰箱备用ELISA法测定IL-8浓度. 结果通过酶标仪Ascent software version a软件进行分析.

1.2.6 Western blot: 用100 mL/L FBS RPM I-1640培养液重悬细胞后, 细胞浓度为 2.5×10^5 cells/mL转种于12孔培养板, 每孔2 mL, 培养24 h后, 按以下分组处理: 空白对照组, LPS(50 μ g/L), hIL-17(50 μ g/L), LPS(50 μ g/L)+hIL-17(50 μ g/L); 共3份, 分别刺激5、15、30 min. Western blot实验步骤: 参照试剂盒蛋白提取说明提取总蛋白, 制胶, 电泳, 转印(NC膜, 电压60 V, 180 min), 封闭(5%脱脂奶粉封闭液, 室温, 1 h), 依次加入一抗、4 $^{\circ}$ C、过夜(P65、P-P65、AKT、PAKT、I κ B抗体1:1 000稀释(5%BSA稀释), GAPDH抗体1:2 000稀释), 洗膜(TBST \times 3次, 10 min/次), 二抗: 室温、1 h(5%脱脂奶粉稀释), P65、P-P65、AKT、PAKT、I κ B均用辣根酶标记人抗兔抗体1:2 000; GAPDH辣根酶标记人抗鼠抗体1:2 000, 显色、成像, 实验结果经灰度扫描及灰度分析.

统计学处理 数据以mean \pm SD表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两组间比较采用 t 检验, 检验水准 $\alpha=0.05$.

2 结果

2.1 TNBS-IBD模型中IL-17、IL-17Ra的表达变化 TNBS动物模型中IL-17Ra和IL-17 mRNA均表现为实验组相比较对照组表达上升(图1), 表明在IBD中IL-17、IL-17Ra表达上调, 参与炎症反应, 与既往研究相一致.

2.2 人肠上皮细胞系HT-29中IL-17Ra、TLR4的表达 选取HT-29细胞作为研究对象, 首先检测了IL-17Ra分子在该细胞上的表达; 为探讨IL-17/IL-17RA通路LPS/TLR4通路间可能的相互作用, FACS的方法分析TLR4在HT-29细胞上的表达情况. 结果表明HT-29细胞高表达IL-17Ra及TLR4分子(图2), 该结果为我们深入分析IL-17/IL-17Ra的效应机制以及该通路LPS/TLR4通路之间的相互作用奠定了基础.

2.3 hIL-17及LPS对HT-29细胞的刺激效应 IL-17、LPS诱导HT-29细胞分泌IL-8的量-效关系曲线如图3A, B. 静息状态的HT-29细胞表达IL-8的水平

■相关报道

近年来, 大量研究发现在多种自身免疫病及相应动物模型的血清及组织中均检测到IL-17的高表达, 提示IL-17参与了多种自身免疫性疾病的免疫损伤过程.

■创新盘点

本研究探讨了在HT-29细胞中, IL-17/IL-17Ra通路及TLR4通路间可能的相互作用及机制, 表明Th17细胞不仅参与了自身免疫性炎症肠病的发生发展, 而且其可作为炎症肠病患者疾病严重程度的一个重要指标。

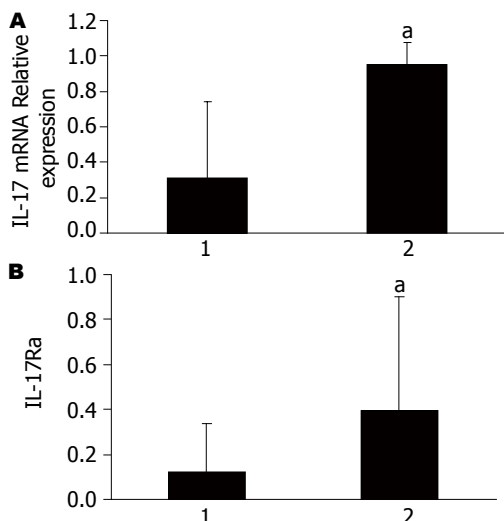


图1 Real-time PCR检测TNBS-IBD小鼠肠上皮细胞中IL-17/IL-17Ra mRNA的表达变化。A: IL-17; B: IL-17Ra。1: 对照组; 2: 实验组, ^a $P < 0.05$ vs 对照组。

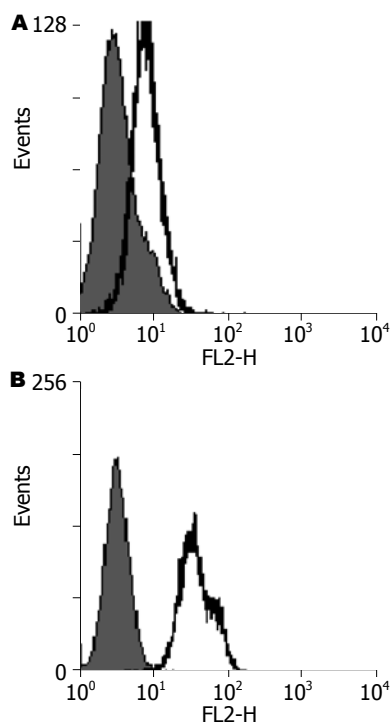


图2 FACS检测IL-17Ra、TLR-4在人肠上皮细胞系HT-29细胞中的表达。A: hIL-17Ra/PE; B: hTLR-4/PE。

低, LPS刺激(10 $\mu\text{g/L}$)6 h后肠上皮细胞开始表达IL-8, 第12小时IL-8的表达显著增加($P < 0.01$ vs 6 h), 第24小时达高峰($P < 0.01$ vs 12 h, 图3A)。有理由推断LPS是IBD炎症形成初始阶段重要的细胞因子之一; LPS诱发的炎症反应在很大程度上是通过诱导产生IL-8为代表的趋化因子所介导的。

2.4 IL-17与LPS在活化HT-29细胞中的协同作用 IL-17能与低浓度的LPS协同促进IL-8的分泌, 而

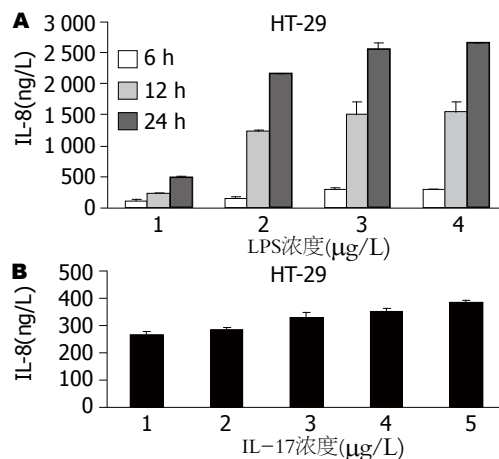


图3 LPS、IL-17单独诱导HT-29细胞分泌IL-8。A: LPS, 1-4: 0, 10, 50, 100 $\mu\text{g/L}$; B: IL-17, 1: 空白对照; 2-5: 0, 10, 50, 100 $\mu\text{g/L}$ 。

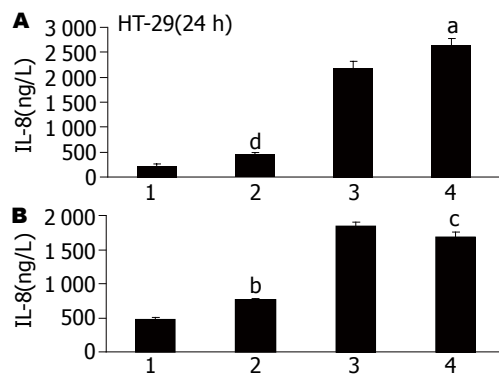


图4 不同浓度LPS联合IL-17诱导HT-29细胞分泌IL-8。A: 低浓度LPS联合IL-17; 1: 空白对照, 2: IL-17 (50 $\mu\text{g/L}$), 3: LPS (50 $\mu\text{g/L}$), 4: LPS (50 $\mu\text{g/L}$) + IL-17 (50 $\mu\text{g/L}$), ^a $P = 0.01$ vs LPS, ^d $P = 0.001$ vs 空白对照。B: 高浓度LPS联合IL-17; 1: 空白对照, 2: IL-17 (50 $\mu\text{g/L}$), 3: LPS (1 mg/L), 4: LPS (1 mg/L) + IL-17 (50 $\mu\text{g/L}$), ^b $P = 0.006$ vs 空白对照, ^c $P = 0.01$ vs LPS。

在LPS高浓度的情况下, 该协同作用不明显, 提示与低浓度LPS协同作用可能是IL-17发挥病理效应的机制之一(图4A, B)。

2.5 IL-17协同低浓度LPS促进HT-29细胞活化的信号传导机制 为了探讨IL-17协同低浓度LPS促进HT-29细胞活化的信号传导机制, 我们观察了在IL-17与LPS联合情况下细胞内PI3K-AKT通路以及NF- κ B通路的活化情况, 结果表明在2者联合的情况下PI3K-AKT通路以及NF- κ B通路的活化均显著增强(图5)。

3 讨论

Th17细胞是一种通过其分泌细胞因子在炎症性疾病及自身免疫性疾病的发生发展中发挥重要作用的新型CD4⁺效应T细胞, 他有别于传统的Th1、Th2型细胞^[12]。近年研究表明在自身免疫性炎症肠病如溃疡性结肠炎(ulcerative colitis,

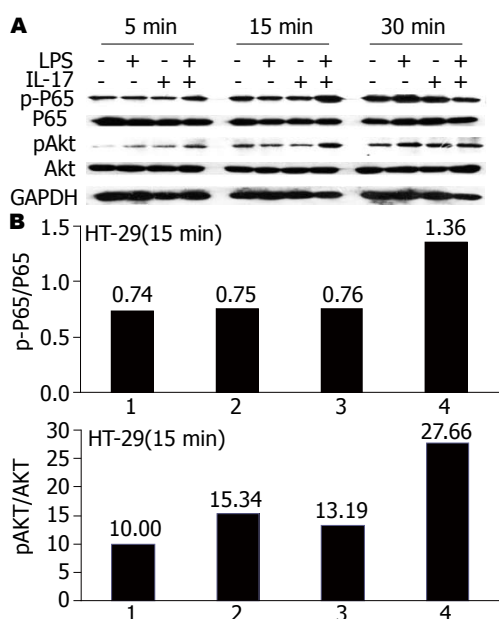


图 5 LPS联合IL-17诱导HT-29细胞后PI3K-AKT、NF-κB通路活化情况(LPS、IL-17均为50 μg/L)。A: 各时间点AKT、NF-κB磷酸化水平; B: 15 min时AKT、NF-κB磷酸化水平灰度扫描分析值。1: 空白对照, 2: LPS, 3: IL-17, 4: LPS+IL-17。

UC)和克罗恩病(crohn's disease, CD)患者肠黏膜中存在大量的IL-17⁺细胞^[1-13], 同时发现IL-17⁺细胞及其分泌的IL-17与患者病情严重程度密切相关。且近些年大量研究报道了新型CD4⁺效应T细胞-Th17细胞在微环境中微生物免疫和自身免疫性疾病的动物模型中发挥重要的作用, Elson等^[14]对小鼠诱导的结肠炎研究中通过比较Th1细胞和Th17细胞, 发现Th17细胞具有更显著的致病性。在DSS-IBD动物模型中发现相比野生型老鼠, 敲除IL-17a基因老鼠的死亡率得到很大程度的降低, 提示IL-17a为一致病因素^[15]。因此对Th17细胞在自身免疫性炎症肠病中的作用进一步研究, 有助于更好地揭示炎症肠病的发病机制, 可能为治疗自身免疫性疾病提供有效的新思路。

本研究在进一步证实TNBS动物模型中IL-17/IL-17Ra活性与炎症肠病发病相关的基础上, 为深入研究IL-17/IL-17Ra通路在肠上皮细胞中的效应机制, 我们采用结肠癌细胞系HT-29细胞作为研究对象。首先用FACS的方法分析发现, HT-29细胞高表达IL-17Ra及TLR4分子, 此结果为我们进一步探讨IL-17/IL-17Ra的效应机制以及该通路与LPS/TLR4通路之间的相互作用奠定了分子基础。

IL-17不仅对炎症肠病黏膜炎症反应的诱导和维持发挥了重要的作用, 同时也促进了多种

炎症细胞因子的分泌, 如IL-6、CC家族的趋化因子等^[2], 局部增多的炎症细胞因子提高了炎症反应的强度, 在炎症损伤中起着重要作用。而趋化因子能加快诱导炎症细胞应答和介导免疫细胞募集和活化。Grimm等^[16]研究发现在正常肠上皮细胞以及发生炎症反应的肠上皮细胞均可分泌IL-8的表达。IL-8是炎症介质网络中的关键成分, 为趋化因子家族的一员, 是一种有效的中性粒细胞趋化因子和活化因子, 其在IL-17诱导引起的反应中起着重要作用, 用抗IL-8的中和抗体发现其可以显著减少IL-17所引起的人中性粒细胞的趋化活性。国内外研究发现在自身免疫性炎症肠病患者血清或肠组织中IL-8的表达异常^[17-23], 且其水平不仅是评估炎症肠病活动的一个独立指标, 并能反映疾病的严重程度。本研究通过检测LPS诱导HT-29细胞分泌IL-8的量效关系, 证实IL-8属于一种可以由LPS诱导产生的趋化因子^[24-27], 且IL-8分泌水平与一定剂量范围内的LPS呈明显的时间、剂量依赖性(高浓度LPS诱导HT-29细胞分泌IL-8量效关系未显示), 与Cario等^[28]研究相一致。LPS作用6 h时, HT-29细胞即表达IL-8, 说明在肠道炎症过程中, HT-29细胞在短时间内即可表达IL-8, 并可能与其他炎症细胞因子形成网络, 相互调节, 共同参与机体免疫和炎症反应。因此我们有理由推断LPS是IBD炎症形成初始阶段重要的细胞因子之一, 且其诱发的炎症反应在很大程度上是通过诱导产生以IL-8为代表的趋化因子所介导的。

目前对IBD的致病机制研究主要表现在分子免疫学上, 其中肠黏膜免疫机制是研究的热点, 肠上皮细胞在其中扮演着非常重要的角色。正常情况下, 肠上皮细胞时刻都在接触大量的细菌及其内毒素, 但其本身却不被激活, 其中存在相应的耐受机制。但自身免疫性炎症肠病患者肠黏膜上皮存在严重异常时, 其耐受机制不再起保护作用。对于机体而言, 肠道正常菌群演变成致病菌, 释放出的LPS被肠上皮细胞特异表达的TLR-4所识别, 诱导炎症细胞因子的表达。生理情况下人肠道上皮细胞仅表达微量的TLR-4^[28], 但在自身免疫性炎症肠病患者的结肠中TLR-4的表达异常^[29,30], 这表明LPS/TLR4介导的信号转导通路与炎症肠病的发生密切相关。本研究在HT-29细胞高表达IL-17Ra、TLR-4分子, 及IL-17自身诱导HT-29细胞分泌IL-8水平低的基础上, 为进一步探讨IL-17/IL-17Ra通路与LPS/TLR-4通路间可能的相互作用, 我们通过观

同行评价

本研究较深入地探讨了IL-17/IL-17Ra与LPS/TLR4通路间可能的相互作用及机制, 为炎症肠病的临床治疗提供一新的靶点, 有一定的研究意义。

察IL-17与LPS联合刺激HT-29细胞的效应,发现IL-17能与低浓度的LPS协同促进IL-8的分泌,而在LPS高浓度的情况下,该协同作用不明显,提示IL-17发挥病理效应的机制之一可能是通过与低浓度LPS协同所介导的。但LPS和IL-17在诱导IL-8表达的机制并不相同,研究表明LPS介导的细胞启动首先与血清中LPS结合蛋白(LPS-binding protein, LBP)结合,再与CD14、TLR-4和MD22形成复合物,引起TLR-4活化,最终引起NF- κ B及PI3K-AKT等信号转导通路启动,导致细胞因子的表达,介导炎症肠病的发生。而IL-17主要通过IL-17A与IL-17F发挥生物学效应,IL-17对HT-29细胞表达IL-8的影响可能与此有关。其中NF- κ B通路是调控IL-8表达的关键因素之一,给予NF- κ B信号抑制剂干预NF- κ B信号通路可显著影响IL-8的表达。因此为探讨IL-17协同低浓度LPS促进HT-29细胞活化的信号传导机制,我们观察了在IL-17与LPS联合的情况下细胞内PI3K-AKT通路及NF- κ B通路活化的情况,结果表明在两者联合诱导的情况下,PI3K-AKT通路以及NF- κ B通路的活化均显著增强,为此我们有理由推论IL-17协同低浓度LPS促进HT-29细胞活化的信号传导机制是通过PI3K-AKT通路以及NF- κ B通路,介导IL-17病理效应,引起炎症肠病的发生,但国内外均未报道两者的相互作用。在LPS高浓度的情况下,该协同作用不明显,提示可能与HT-29细胞对LPS的长时间及高浓度刺激表现耐受相关。研究表明在LPS耐受的大鼠体内,单核/巨噬细胞表达的IL-8显著受到抑制,LPS耐受的机制可能与TLR-4及其下游的与LPS信号转导相关的接头蛋白和TLR信号通路的负性调节因子有关。关于HT-29细胞对LPS耐受性目前未见报道,其发生的机制是否类似于单核/巨噬细胞仍尚需进一步的研究。

总之,Th17细胞不仅参与了自身免疫性炎症肠病的发生发展,而且其可作为炎症肠病患者疾病严重程度的一个重要指标,其发挥病理效应机制可能是与低浓度的LPS协同所介导,而其信号传导机制是通过PI3K-AKT以及NF- κ B通路,因此我们可以通过阻断其信号传导通路,调控TH17及其细胞因子的生物学效应,进一步调节疾病的转归,为临床提供一新的靶点和治疗措施。

4 参考文献

- 1 Kobayashi T, Okamoto S, Hisamatsu T, Kamada N, Chinen H, Saito R, Kitazume MT, Nakazawa A, Sugita A, Koganei K, Isobe K, Hibi T. IL23 differen-

- tially regulates the Th1/Th17 balance in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut* 2008; 57: 1682-1689
- 2 Fujino S, Andoh A, Bamba S, Ogawa A, Hata K, Araki Y, Bamba T, Fujiyama Y. Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut* 2003; 52: 65-70
- 3 Shih DQ, Targan SR. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 390-400
- 4 Seiderer J, Elben I, Diegelmann J, Glas J, Stallhofer J, Tillack C, Pfennig S, Jürgens M, Schmechel S, Konrad A, Göke B, Ochsenkühn T, Müller-Myhsok B, Lohse P, Brand S. Role of the novel Th17 cytokine IL-17F in inflammatory bowel disease (IBD): upregulated colonic IL-17F expression in active Crohn's disease and analysis of the IL17F p.His161Arg polymorphism in IBD. *Inflamm Bowel Dis* 2008; 14: 437-445
- 5 Rovedatti L, Kudo T, Biancheri P, Sarra M, Knowles CH, Rampton DS, Corazza GR, Monteleone G, Di Sabatino A, Macdonald TT. Differential regulation of interleukin 17 and interferon gamma production in inflammatory bowel disease. *Gut* 2009; 58: 1629-1636
- 6 Leppkes M, Becker C, Ivanov II, Hirth S, Wirtz S, Neufert C, Pouly S, Murphy AJ, Valenzuela DM, Yancopoulos GD, Becher B, Littman DR, Neurath MF. RORgamma-expressing Th17 cells induce murine chronic intestinal inflammation via redundant effects of IL-17A and IL-17F. *Gastroenterology* 2009; 136: 257-267
- 7 Kleinschek MA, Boniface K, Sadokova S, Grein J, Murphy EE, Turner SP, Raskin L, Desai B, Faubion WA, de Waal Malefyt R, Pierce RH, McClanahan T, Kastelein RA. Circulating and gut-resident human Th17 cells express CD161 and promote intestinal inflammation. *J Exp Med* 2009; 206: 525-534
- 8 Abraham C, Cho J. Interleukin-23/Th17 pathways and inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2009; 15: 1090-1100
- 9 Andoh A, Yagi Y, Shioya M, Nishida A, Tsujikawa T, Fujiyama Y. Mucosal cytokine network in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 5154-5161
- 10 Levin A, Shibolet O. Toll-like receptors in inflammatory bowel disease-stepping into uncharted territory. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 5149-5153
- 11 Li X, Chen G, Li Y, Wang R, Wang L, Lin Z, Gao X, Feng J, Ma Y, Shen B, Li Y, Han G. Involvement of T cell Ig Mucin-3 (Tim-3) in the negative regulation of inflammatory bowel disease. *Clin Immunol* 2010; 134: 169-177
- 12 Infante-Duarte C, Horton HF, Byrne MC, Kamradt T. Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in Th cells. *J Immunol* 2000; 165: 6107-6115
- 13 Sugihara T, Kobori A, Imaeda H, Tsujikawa T, Amagase K, Takeuchi K, Fujiyama Y, Andoh A. The increased mucosal mRNA expressions of complement C3 and interleukin-17 in inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol* 2010; 160: 386-393
- 14 Elson CO, Cong Y, Weaver CT, Schoeb TR, McClanahan TK, Fick RB, Kastelein RA. Monoclonal anti-interleukin 23 reverses active colitis in a T cell-mediated model in mice. *Gastroenterology* 2007; 132: 2359-2370
- 15 Ito R, Kita M, Shin-Ya M, Kishida T, Urano A, Takada R, Sakagami J, Imanishi J, Iwakura Y, Okanoue T, Yoshikawa T, Kataoka K, Mazda O. Involvement of

- IL-17A in the pathogenesis of DSS-induced colitis in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 377: 12-16
- 16 Grimm MC, Elsbury SK, Pavli P, Doe WF. Interleukin 8: cells of origin in inflammatory bowel disease. *Gut* 1996; 38: 90-98
- 17 Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology* 1998; 115: 182-205
- 18 Sartor RB. Cytokines in intestinal inflammation: pathophysiological and clinical considerations. *Gastroenterology* 1994; 106: 533-539
- 19 Yang SK, Choi MS, Kim OH, Myung SJ, Jung HY, Hong WS, Kim JH, Min YI. The increased expression of an array of C-X-C and C-C chemokines in the colonic mucosa of patients with ulcerative colitis: regulation by corticosteroids. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 126-132
- 20 Melgar S, Drmotova M, Rehnström E, Jansson L, Michaëlsson E. Local production of chemokines and prostaglandin E2 in the acute, chronic and recovery phase of murine experimental colitis. *Cytokine* 2006; 35: 275-283
- 21 Banks C, Bateman A, Payne R, Johnson P, Sheron N. Chemokine expression in IBD. Mucosal chemokine expression is unselectively increased in both ulcerative colitis and Crohn's disease. *J Pathol* 2003; 199: 28-35
- 22 李春雷, 陈治水. 白介素在溃疡性结肠炎发病机制中的研究进展. *现代消化及介入诊疗* 2008; 13: 146-149
- 23 董玉柱. 溃疡性结肠炎患者血清TNF- α 、IL-8的检测及意义. *山东医药* 2010; 50: 97-98
- 24 Schuerer-Maly CC, Eckmann L, Kagnoff MF, Falco MT, Maly FE. Colonic epithelial cell lines as a source of interleukin-8: stimulation by inflammatory cytokines and bacterial lipopolysaccharide. *Immunology* 1994; 81: 85-91
- 25 Eckmann L, Jung HC, Schürer-Maly C, Panja A, Morzycka-Wroblewska E, Kagnoff MF. Differential cytokine expression by human intestinal epithelial cell lines: regulated expression of interleukin 8. *Gastroenterology* 1993; 105: 1689-1697
- 26 Eckmann L, Kagnoff MF, Fierer J. Epithelial cells secrete the chemokine interleukin-8 in response to bacterial entry. *Infect Immun* 1993; 61: 4569-4574
- 27 McCormick BA, Colgan SP, Delp-Archer C, Miller SI, Madara JL. Salmonella typhimurium attachment to human intestinal epithelial monolayers: transcellular signalling to subepithelial neutrophils. *J Cell Biol* 1993; 123: 895-907
- 28 Cario E, Podolsky DK. Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. *Infect Immun* 2000; 68: 7010-7017
- 29 Szebeni B, Veres G, Dezsöfi A, Rusai K, Vannay A, Mraz M, Majorova E, Arató A. Increased expression of Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in the colonic mucosa of children with inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol* 2008; 151: 34-41
- 30 Reaves TA, Chin AC, Parkos CA. Neutrophil trans-epithelial migration: role of toll-like receptors in mucosal inflammation. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005; 100 Suppl 1: 191-198

编辑 张姗姗 电编 闫晋利

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

• 消息 •

中国科技信息研究所发布《世界华人消化杂志》 影响因子 0.694

本刊讯 2011-12-02, 一年一度的中国科技论文统计结果由中国科技信息研究所(简称中信所)在北京发布.《中国科技期刊引证报告(核心版)》统计显示, 2010年《世界华人消化杂志》总被引频次3458次, 影响因子0.694, 综合评价总分60.6分, 分别位居内科学类49种期刊的第5位、第7位、第6位, 分别位居1 998种中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)的第79位、第320位、第190位; 其他指标: 他引率0.83, 被引半衰期4.9, 来源文献量712, 文献选出率0.90, 参考文献量17963, 平均引文数25.23, 平均作者数4.35, 地区分布数29, 机构分布数349, 基金论文比0.45, 海外论文比0.01. (编辑部主任: 李军亮 2012-01-01)

高糖对大鼠结肠平滑肌细胞表达内源性胰岛素样生长因子1的影响

徐新寓, 王云, 杨微微, 林琳

■背景资料

糖尿病胃肠动力障碍与胃肠自主神经、Cajal间质细胞及平滑肌细胞病变相关, 胰岛素样生长因子-1(IGF-1)可促进平滑肌细胞分化、增殖, 并保护Cajal间质细胞, 该因子缺乏是本疾病病理基础之一。

徐新寓, 王云, 杨微微, 林琳, 南京医科大学第一附属医院消化科 江苏省南京市 210029

徐新寓, 在读硕士, 主要从事胃肠动力性疾病方面的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30971354

江苏省国际科技合作计划基金资助项目, No. BZ2011044

江苏省研究生教育创新工程基金资助项目, No. CXZZ11_0704

作者贡献分布: 该课题由王云、徐新寓及林琳共同设计; 研究过程由徐新寓、王云及杨微微操作完成; 研究所用试剂及分析工具由王云与徐新寓提供; 数据分析由徐新寓完成; 论文撰写由徐新寓完成; 林琳与王云协助课题设计并修改论文。

通讯作者: 林琳, 教授, 210029, 江苏省南京市广州路300号, 南京医科大学第一附属医院消化科. lin9100@yahoo.com.cn

电话: 025-68136920

收稿日期: 2011-12-20 修回日期: 2012-02-20

接受日期: 2012-03-20 在线出版日期: 2012-04-28

High glucose down-regulates the expression of endogenous insulin-like growth factor-1 in rat colonic smooth muscle cells

Xin-Yu Xu, Yun Wang, Wei-Wei Yang, Lin Lin

Xin-Yu Xu, Yun Wang, Wei-Wei Yang, Lin Lin, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30971354; the International Science and Technology Cooperation Program of Jiangsu Province, No. BZ2011044; the Graduate Innovation Project Foundation of Jiangsu Province, No. CXZZ11_0704

Correspondence to: Lin Lin, Professor, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, 300 Guangzhou Road, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China. lin9100@yahoo.com.cn

Received: 2011-12-20 Revised: 2012-02-20

Accepted: 2012-03-20 Published online: 2012-04-28

Abstract

AIM: To investigate the effect of high glucose on the expression of endogenous insulin-like growth factor-1 (IGF-1) in rat colonic smooth muscle cells (SMCs).

METHODS: Rat colonic SMCs were separated, cultured, identified by immunofluorescence staining of α -actin, and divided into three groups: normal glucose group (5.5 mmol/L glucose), mannitol control group (5.5 mmol/L glucose plus 19.5

mmol/L mannitol) and high glucose group (25 mmol/L glucose). After treatment, cell proliferation was determined using Cell Counting Kit-8, and cell cycle analysis was performed by flow cytometry. ELISA was designed to measure the content of IGF-I in SMCs culture supernatants. Real-time quantitative-PCR and Western blotting were performed to analyze the mRNA and protein expression of IGF-1 in SMCs.

RESULTS: Compared to the normal glucose group, treatment with high glucose significantly inhibited the proliferation of rat colonic SMCs (0.494 ± 0.0030 vs 0.597 ± 0.044 , $P < 0.05$), resulted in cell accumulation in the G1 phase ($90.850\% \pm 0.706\%$ vs $55.202\% \pm 3.807\%$, $P < 0.05$) and a significant decrease in the percentage of cells in the S phase ($3.622\% \pm 0.156\%$ vs $30.780\% \pm 3.808\%$, $P < 0.05$), and decreased the content of IGF-I in SMCs culture supernatants (208.000 ng/L ± 31.443 ng/L vs 265.750 ng/L ± 26.538 ng/L, $P < 0.05$) and the expression of IGF-I mRNA and protein (2.037 ± 0.196 vs 2.257 ± 0.273 ; 0.247 ± 0.045 vs 0.906 ± 0.103 , both $P < 0.05$). However, there were no significant differences in the above parameters between the normal glucose group and mannitol control group.

CONCLUSION: High glucose inhibits the proliferation of rat colonic SMCs and decreases the expression of endogenous IGF-1 in SMCs.

Key Words: High glucose; Smooth muscle cell; Cell cycle; Insulin-like growth factor-1

Xu XY, Wang Y, Yang WW, Lin L. High glucose down-regulates the expression of endogenous insulin-like growth factor-1 in rat colonic smooth muscle cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(12): 998-1003

摘要

目的: 探讨高糖对大鼠结肠平滑肌细胞(SMCs)表达内源性胰岛素样生长因子1(IGF-1)的影响。

方法: 酶解法分离培养SD大鼠结肠SMCs, α -actin免疫荧光鉴定, 然后将大鼠结肠SMCs

■同行评议者

洪天配, 教授, 北京大学第三医院内分泌科

随机给予葡萄糖不同浓度(5.5 mmol/L和25 mmol/L)组及甘露醇对照组(5.5 mmol/L葡萄糖+19.5 mmol/L甘露醇)刺激, CCK8实验检测SMCs增殖情况; 流式细胞术检测SMCs细胞周期; ELISA检测培养液上清中IGF-1的含量; Western blot、Real-time PCR法检测SMCs合成内源性IGF-1的表达变化。

结果: 高糖(25 mmol/L)抑制大鼠结肠SMCs的增殖, 在24 h与正常糖浓度间差异最大(0.494 ± 0.003 vs 0.597 ± 0.044 , $P < 0.05$); 高糖使约90%的结肠SMCs停滞在G₁期($90.850\% \pm 0.706\%$ vs $55.202\% \pm 3.807\%$, $P < 0.05$), 进入S期的SMCs明显减少($3.622\% \pm 0.156\%$ vs $30.780\% \pm 3.808\%$, $P < 0.05$); 高糖环境中, 结肠SMCs合成分泌的IGF-1减少(208.000 ng/L ± 31.443 ng/L vs 265.750 ng/L ± 26.538 ng/L, $P < 0.05$), SMCs表达内源性的IGF-1 mRNA和蛋白也均减少(2.037 ± 0.196 vs 2.257 ± 0.273 ; 0.247 ± 0.045 vs 0.906 ± 0.103 , $P < 0.05$)。

结论: 高糖抑制大鼠结肠SMCs增殖, 使SMCs内源性IGF-1表达减少。

关键词: 高糖; 结肠平滑肌细胞; 细胞周期; 胰岛素样生长因子1

徐新寓, 王云, 杨微微, 林琳. 高糖对大鼠结肠平滑肌细胞表达内源性胰岛素样生长因子1的影响. 世界华人消化杂志 2012; 20(12): 998-1003
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/998.asp>

0 引言

糖尿病胃肠动力障碍是糖尿病(diabetes mellitus, DM)的慢性并发症之一, 发生于30%-50%的糖尿病患者^[1,2]。DM胃肠动力障碍不仅使患者出现诸多胃肠症状, 且使患者血糖更加难以控制, 严重影响患者生存质量, 并带来沉重的经济负担^[3,4]。目前有学者认为DM胃肠动力障碍是一种胃肠道神经肌肉的营养障碍, 而非单纯的“功能性”障碍。其发病与胃肠自主神经、Cajal间质细胞(interstitial cells of Cajal, ICC)及平滑肌细胞(smooth muscle cells, SMCs)病变有关, 而营养因子缺乏在细胞损伤中亦有不可或缺的作用^[5,6]。胰岛素样生长因子1(insulin-like growth factor 1, IGF-1)是胃肠道SMCs生长、增殖、分化的重要营养因子, 对胃肠道起搏细胞ICC亦具有保护作用。有研究证实该病与胃肠道IGF-1信号的缺乏密切相关^[6-8]。本文旨在探讨高糖是否影响结肠SMCs表达内源性的IGF-1, 为进一步探讨糖尿病

胃肠动力障碍的相关机制提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料 SD大鼠, 雌雄不拘, 体质量150-200 g, 由南京医科大学医学实验动物中心提供。低糖/高糖DMEM培养液(Gibco, USA)、甘露醇(Amresco)、胎牛血清(Gibco, USA)、II型胶原酶(Sigma)、大豆胰蛋白酶抑制剂(Gibco, USA)、青链霉素混悬液(Gibco, USA)、 α -actin抗体(北京博奥森), Cell Counting Kit-8(CCK-8试剂盒, 碧云天)、PI/RNase Staining Buffer(BD Pharmingen, USA)、IGF-1抗体(ab36532; Abcam, Cambridge, MA)、Quantikine Mouse/Rat IGF-I Immunoassay(R&D, UK)。

1.2 方法 IGF-1引物由Invitrogen公司合成, 序列参照文献[9,10]。

1.2.1 结肠SMCs的分离和培养^[11-13]: SD大鼠以10%水合氯醛腹腔麻醉后, 快速自肛门上2 cm取结肠10 cm左右, 用含抗生素的Hepes-Ringer缓冲液反复冲洗, 去除黏膜层和浆膜层。将平滑肌组织剪碎, 置入消化液(0.1%的II型胶原酶和0.01%的大豆胰蛋白酶抑制剂)中消化、离心, DMEM培养液重悬细胞, 过筛; 于950 mL/L O₂和50 mL/L CO₂, 37 °C孵育箱中培养, SMCs长至致密单层时, 传代培养。采用第2代SMCs进行实验。

1.2.2 结肠SMCs的鉴定^[11-13]: 取对数生长期的SMCs, 胰蛋白酶消化, 制成单细胞悬液; 将SMCs接种到放置载玻片的培养皿中, 置CO₂孵育箱中培养1-3 d待SMCs长至单层时, 取出载玻片。PBS冲洗、丙酮固定, 3% H₂O₂阻断内源性过氧化物酶; 滴加 α -actin一抗(1:100), 4 °C过夜, PBS冲洗, 滴加罗丹明标记的羊抗兔IgG二抗, 室温避光湿盒中孵育1 h, PBS冲洗, 滴加Hoechst染核, PBS冲洗、封片, 观察特异性荧光。

1.2.3 分组与处理: 将 2.5×10^8 /L的SMCs接种于含100 mL/L胎牛血清的DMEM培养液中培养至70%融和后, PBS洗涤, 加入含2.5 mL/L胎牛血清的培养基饥饿24 h。分别给予正常糖浓度组(5.5 mmol/L葡萄糖)、甘露醇高渗对照组(5.5 mmol/L葡萄糖+19.5 mmol/L甘露醇)和高糖浓度组(25 mmol/L)的培养液刺激。

1.2.4 CCK8实验检测细胞增殖情况: 收集对数期细胞, 调整细胞悬液浓度为5 000个细胞/100 μ L, 接种于96孔板, 入CO₂孵育箱培养过夜后显微镜下观察细胞单层铺盖满孔的60%, 给予含2.5 mL/L胎

■ 研发前沿

糖尿病胃肠动力障碍时可发生平滑肌萎缩、纤维化, 但平滑肌细胞病变在糖尿病胃肠动力障碍机制中的作用仍不清楚。

■相关报道

Kuemmerle等学者发现胃肠平滑肌合成内源性IGF-1; Horvath等发现IGF-1促进胃肠平滑肌细胞合成干细胞因子(SCF),以保护胃肠起搏细胞ICC.

牛血清的培养液饥饿24 h, 给予3种不同的培养液刺激, 收集不同时间点的细胞; 每孔加入10 μ L的CCK8溶液, 在培养箱内继续孵育1 h, 450 nm测定吸光度(A)值.

1.2.5 流式细胞术检测细胞周期: 将3组不同培养液处理的SMCs培养24 h, 胰酶消化收集细胞, 冰PBS洗2遍, 弃上清, 加入1 mL 70%预冷乙醇中, 吹打均匀, 4 $^{\circ}$ C固定过夜; 固定好的细胞离心, 弃上清, PBS洗2遍; 1 mL PBS重悬细胞后过滤, 离心弃上清后, 加入PI/RNase至终浓度50 g/L, 避光染色至少30 min, 上机检测.

1.2.6 ELISA法检测培养液上清中IGF-1的浓度: 收集不同组细胞培养液, 离心取上清, 加1:2稀释的待检样品100 μ L于上述已包被的反应孔中, 室温孵育2 h(同时做空白孔和标准孔); 洗涤5次后每孔加酶标抗体100 μ L, 室温孵育2 h; 洗涤5次后每孔加底物显色液100 μ L, 室温避光显色30 min; 每孔加入100 μ L的终止液终止反应, 在450 nm波长下读板.

1.2.7 Real-time PCR检测IGF-1 mRNA表达: 按TRIzol试剂提取各组细胞的总mRNA, 以cDNA为模板进行PCR扩增. PCR的反应条件: 95 $^{\circ}$ C预变性30 s; 95 $^{\circ}$ C退火5 s, 60 $^{\circ}$ C延伸30 s, 共循环40次. IGF-1上游引物: 5'-GGCATTGTG-GATGAGTGTG-3'; 下游引物: 5'-GTCTT-GGGCATGTCAGTGTG-3'. 18 S RNA上游引物: 5'-GGCATCGTTTATGGTCGGAAC-3'; 下游引物: 5'-GCGAAAGCATTGCGCAAGAA-3'.

1.2.8 Western blot法检测IGF-1蛋白表达: 蛋白裂解液提取各组细胞蛋白, BCA法测定蛋白浓度. 120 μ g蛋白/泳道加样, 恒流30 mA电泳, 恒压100 V转膜45 min, 封闭2 h. 加入IGF-1一抗(1:100), 4 $^{\circ}$ C过夜; 二抗(1:10 000), 37 $^{\circ}$ C孵育, 曝光、显影.

统计学处理 所有数据录入SPSS13.0软件包分析, 以mean \pm SD表示, 采用成组t检验, $P<0.05$ 为有显著性差异.

2 结果

2.1 不同浓度葡萄糖对大鼠结肠SMCs增殖的影响 与正常糖浓度组相比, 从12 h起高糖(25 mmol/L)在各时间点(24、48、72、96 h)均可抑制大鼠结肠SMCs的增殖, 差异有统计学意义(0.420 ± 0.025 vs 0.527 ± 0.069 ; 0.494 ± 0.003 vs 0.597 ± 0.044 ; 0.540 ± 0.024 vs 0.634 ± 0.049 ; 0.509 ± 0.118 vs 0.568 ± 0.008 ; 0.463

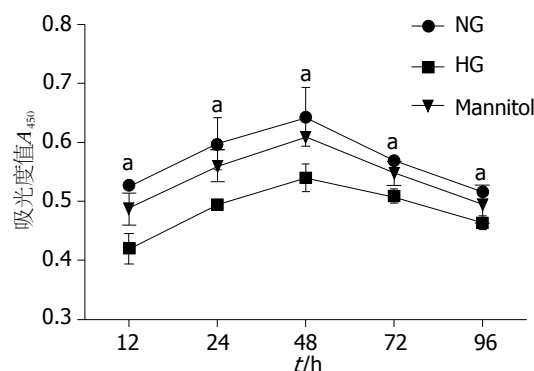


图1 不同浓度葡萄糖对大鼠结肠SMCs增殖的影响. NG: 正常糖浓度组; HG: 高糖浓度组; Mannitol: 甘露醇对照组. $^aP<0.05$ vs NG.

±0.109 vs 0.516 ± 0.008 , $P<0.05$), 在24 h两者间差异最为显著; 因此选用不同浓度葡萄糖培养第24小时的SMCs进行后续试验. 甘露醇对照组与正常糖浓度组比, 结肠SMCs增殖无差异($P>0.05$, 图1).

2.2 不同浓度葡萄糖对大鼠结肠SMCs细胞周期的影响 与正常糖浓度组相比, 高糖(25 mmol/L)使约90%的SMCs停滞在G1期($90.850\%\pm0.706\%$ vs $55.202\%\pm3.807\%$, $P<0.05$), S期细胞明显减少($3.622\%\pm0.156\%$ vs $30.780\%\pm3.808\%$, $P<0.05$), 提示高糖抑制SMCs进入S期; 而甘露醇对照组与正常糖浓度组比, 结肠SMCs的细胞周期变化无差异($P>0.05$, 表1).

2.3 不同浓度葡萄糖对大鼠结肠SMCs培养液上清中IGF-1含量的影响 与正常糖浓度组相比, 高糖(25 mmol/L)环境下, SMCs合成分泌IGF-1明显减少(208.000 ng/L \pm 31.443 ng/L vs 265.750 ng/L \pm 26.538 ng/L, $P<0.05$), 而甘露醇对照组与正常糖浓度组比, SMCs合成分泌的IGF-1无差异(247.000 ng/L \pm 36.833 ng/L vs 265.750 ng/L \pm 26.538 ng/L, $P>0.05$, 表2).

2.4 不同浓度葡萄糖对大鼠结肠SMCs表达内源性IGF-1 mRNA的影响 高糖(25 mmol/L)可抑制内源性IGF-1 mRNA的表达(2.037 ± 0.196 vs 2.257 ± 0.273 , $P<0.05$); 而甘露醇对照组与正常糖浓度组比, SMCs表达内源性IGF-1mRNA无差异($P>0.05$, 图2A).

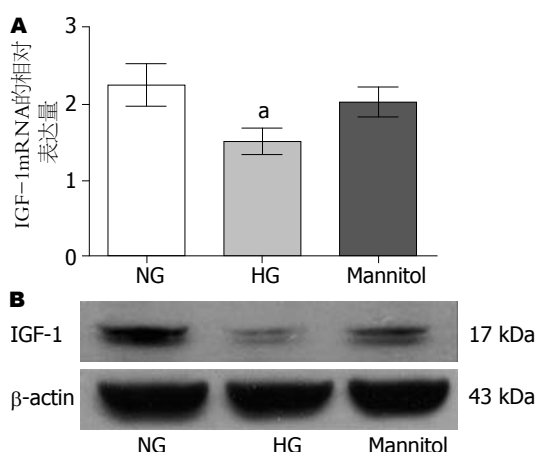
2.5 不同浓度葡萄糖对大鼠结肠SMCs表达内源性IGF-1蛋白的影响 Western blot结果与Real-time PCR结果一致, 即高糖(25 mmol/L)抑制内源性IGF-1蛋白的表达(0.247 ± 0.045 vs 0.906 ± 0.103 , $P<0.05$); 而甘露醇对照组与正常糖浓度组比, SMCs表达内源性IGF-1蛋白无差异($P>0.05$, 图2B).

表 1 不同浓度葡萄糖对大鼠结肠SMCs细胞周期的影响 (% , mean \pm SD)

分组	G0/1	S	G2/M
正常糖浓度组	55.202 \pm 3.807	30.780 \pm 3.808	13.918 \pm 1.112
甘露醇对照组	53.232 \pm 4.110	26.753 \pm 5.541	12.837 \pm 0.849
高糖浓度组	90.850 \pm 0.706 ^a	3.622 \pm 0.156 ^a	5.530 \pm 0.597 ^a

^a $P < 0.05$ vs 正常糖浓度组.表 2 不同浓度葡萄糖对大鼠结肠SMC培养液上清中IGF-1含量的影响 ($n = 3$, mean \pm SD)

分组	IGF-1浓度(ng/L)
正常糖浓度组	265.750 \pm 26.538
甘露醇对照组	247.000 \pm 36.833
高糖浓度组	208.000 \pm 31.443 ^a

^a $P < 0.05$ vs 正常糖浓度组.图 2 不同浓度葡萄糖对大鼠结肠SMCs表达内源性IGF-1的影响. A: IGF-1 mRNA; B: IGF-1蛋白. NG: 正常糖浓度组; HG: 高糖浓度组; Mannitol: 甘露醇对照组. ^a $P < 0.05$ vs NG.

3 讨论

DM胃肠动力障碍临床上主要表现为胃肠排空延迟^[14-16]. 有研究报道: 在病程长、血糖控制差的糖尿病患者^[17,18]及某些糖尿病动物模型^[8,19]的胃组织标本中发现平滑肌萎缩、纤维增生, SMCs超微结构破坏, 出现凋亡甚至坏死的现象. 然而在链脲霉素(streptozotocin, STZ)诱导的糖尿病大鼠^[20,21]和NOD小鼠^[22]中均发现有结肠SMCs肥大的现象. 是由于长期高糖作用, 还是其他因素导致胃肠平滑肌病变尚不明确. 因此, 本文探讨了高糖对体外培养大鼠结肠SMCs的直接作用. 本实验证实高糖可减少SMCs的DNA复制, 抑制结肠SMCs的增殖. 高糖是否促进大鼠结肠SMCs的凋亡, 尚需进一步研究.

■应用要点

本研究提示高糖影响大鼠结肠平滑肌细胞合成内源性IGF-1, 可能是糖尿病时胃肠局部营养因子缺乏的原因之一, 为临床治疗糖尿病胃肠动力障碍提供治疗靶点.

IGF-1是体内重要的生长因子, 可在机体的多数组织中表达, 通过内分泌、旁分泌、自分泌的途径发挥生物学作用^[23]. 在胃肠道, IGF-1可刺激肠上皮细胞、成纤维细胞、胃肠SMCs增殖, 且相比于血循环中的IGF-1, 由胃肠局部合成分泌的内源性IGF-1可能对肠道SMCs生长、分化及胃肠起搏细胞ICC体积的维持发挥更重要的作用^[24,25], 因为: (1)转基因小鼠模型中, 肠道局部过表达的IGF-1能促进小肠SMCs增生^[26,27]; (2)特异性敲除肝源性IGF-1的小鼠, 肠道局部IGF-1仍可刺激SMCs生长发育^[28]; (3)内源性IGF-1可促进体外培养的人肠道SMCs增殖, 抑制其凋亡^[24,29]; (4)在血糖正常的小鼠, 发现使其胃肠道局部IGF-1的合成减少可使胃肠起搏细胞ICC的体积明显下降^[6]. 本实验证实高糖使大鼠结肠SMCs内源性的IGF-1 mRNA表达减少, 且合成分泌的IGF-1蛋白亦减少. 我们推测: 糖尿病时, 可能由于高糖抑制胃肠道SMCs合成内源性IGF-1, 因而SMCs增殖受抑制.

在胃肠道中, ICC、肠神经元和SMCs构成“功能元件”, 共同调节胃肠道的生理功能^[30,31]. ICC作为胃肠道的起搏细胞, 对胃肠道的动力调节起主导作用^[32]. 而维持ICC成熟表型所需的干细胞生长因子(stem cell factor, SCF)主要来自SMCs. Horváth等^[7,8]在DM胃轻瘫小鼠的研究中发现: DM时IGF-1信号减弱, 导致SMCs萎缩, SCF表达减低, 从而使ICC数量缺失及功能障碍, 使小鼠出现胃轻瘫症状. 我们的前期实验亦证实: 体外培养大鼠胃窦、结肠SMCs, 给予外源性IGF-1, 可促进SMCs增殖和SCF表达^[33,34]. 因此IGF-1可能通过促进胃肠SMCs生长、抑制其凋亡、诱导其表达SCF而对ICC起保护作用, 因此在糖尿病胃肠动力障碍中, 高糖可能作为上游影响因子, 抑制SMCs合成分泌IGF-1, 进而导致SCF表达减少、ICC功能及网络结构受损.

总之, 本实验初步证实了高糖可抑制结肠SMCs增殖, 减少结肠SMCs表达内源性的IGF-1, 为进一步探讨DM胃肠动力障碍相关机制提供

■同行评价

本研究论点新颖,为探索糖尿病胃肠动力障碍、平滑肌病变提供了新思路。

了新的依据,也为DM胃肠动力障碍的治疗拓展了新的思路。但是高糖是否通过影响结肠SMCs内源性IGF-1的表达,进一步影响SMCs内SCF的合成,从而导致ICC的受损;以及高糖是如何影响结肠SMCs内源性IGF-1的表达,是否与IGF-1相关信号通路有关,有待进一步研究。

4 参考文献

- Icks A, Haastert B, Rathmann W, Wareham N. Prevalence of gastrointestinal symptoms in patients with type 2 diabetes: a population-based study. *Arch Intern Med* 2002; 162: 1067-109; author reply 1069
- Wang YR, Fisher RS, Parkman HP. Gastroparesis-related hospitalizations in the United States: trends, characteristics, and outcomes, 1995-2004. *Am J Gastroenterol* 2008; 103: 313-322
- Gautam A, Baluch A, Kaye AD, Frost EA. Modern strategies for the anesthetic management of the patient with diabetes. *Middle East J Anesthesiol* 2009; 20: 187-197
- Simmons RK, Unwin N, Griffin SJ. International Diabetes Federation: An update of the evidence concerning the prevention of type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 2010; 87: 143-149
- Vittal H, Farrugia G, Gomez G, Pasricha PJ. Mechanisms of disease: the pathological basis of gastroparesis--a review of experimental and clinical studies. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2007; 4: 336-346
- Ordög T, Hayashi Y, Gibbons SJ. Cellular pathogenesis of diabetic gastroenteropathy. *Minerva Gastroenterol Dietol* 2009; 55: 315-343
- Horváth VJ, Vittal H, Ordög T. Reduced insulin and IGF-I signaling, not hyperglycemia, underlies the diabetes-associated depletion of interstitial cells of Cajal in the murine stomach. *Diabetes* 2005; 54: 1528-1533
- Horváth VJ, Vittal H, Lörincz A, Chen H, Almeida-Porada G, Redelman D, Ordög T. Reduced stem cell factor links smooth myopathy and loss of interstitial cells of cajal in murine diabetic gastroparesis. *Gastroenterology* 2006; 130: 759-770
- Hamzeh M, Robaire B. Identification of early response genes and pathway activated by androgens in the initial segment and caput regions of the regressed rat epididymis. *Endocrinology* 2010; 151: 4504-4514
- Shynlova O, Tsui P, Dorogin A, Langille BL, Lye SJ. Insulin-like growth factors and their binding proteins define specific phases of myometrial differentiation during pregnancy in the rat. *Biol Reprod* 2007; 76: 571-578
- 袁玉丰, 余盈娟, 林琳. ERK1/2 siRNA干扰质粒对IGF-1诱导结肠平滑肌细胞产生干细胞因子的影响. *世界华人消化杂志* 2011; 19: 575-580
- 余盈娟, 袁玉丰, 林琳. 胰岛素对结肠平滑肌细胞增殖及其表达干细胞因子的影响. *世界华人消化杂志* 2011; 19: 674-679
- 余盈娟, 袁玉丰, 林琳. 胰岛素促进结肠平滑肌细胞合成干细胞因子的信号转导途径. *中华消化杂志* 2011; 31: 681-685
- Tang DM, Friedenberg FK. Gastroparesis: approach, diagnostic evaluation, and management. *Dis Mon* 2011; 57: 74-101
- Parkman HP, Hasler WL, Fisher RS. American Gastroenterological Association technical review on the diagnosis and treatment of gastroparesis. *Gastroenterology* 2004; 127: 1592-1622
- Friedenberg FK, Parkman HP. Advances in the management of gastroparesis. *Curr Treat Options Gastroenterol* 2007; 10: 283-293
- Pasricha PJ, Pehlivanov ND, Gomez G, Vittal H, Lurken MS, Farrugia G. Changes in the gastric enteric nervous system and muscle: a case report on two patients with diabetic gastroparesis. *BMC Gastroenterol* 2008; 8: 21
- Moscato GJ, Driver M, Guy RJ. A form of necrobiosis and atrophy of smooth muscle in diabetic gastric autonomic neuropathy. *Pathol Res Pract* 1986; 181: 188-194
- Diani AR, Gerritsen GC, Stromsta S, Murray P. A study of the morphological changes in the small intestine of the spontaneously diabetic Chinese hamster. *Diabetologia* 1976; 12: 101-109
- Forrest A, Parsons M. The enhanced spontaneous activity of the diabetic colon is not the consequence of impaired inhibitory control mechanisms. *Auton Autacoid Pharmacol* 2003; 23: 149-158
- Forrest A, Huizinga JD, Wang XY, Liu LW, Parsons M. Increase in stretch-induced rhythmic motor activity in the diabetic rat colon is associated with loss of ICC of the submuscular plexus. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008; 294: G315-G326
- Ordog T, Irwin N, Takayama I, Ward SM, Sanders KM. Depletion of interstitial cells of Cajal and electrical abnormalities in a murine model of diabetic colon dysfunction. *Neurogastroenterol Motil* 2004; 16: 664
- Ohlsson C, Mohan S, Sjögren K, Tivesten A, Isgaard J, Isaksson O, Jansson JO, Svensson J. The role of liver-derived insulin-like growth factor-I. *Endocr Rev* 2009; 30: 494-535
- Kuemmerle JF. Endogenous IGF-I protects human intestinal smooth muscle cells from apoptosis by regulation of GSK-3 beta activity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 288: G101-G110
- Flynn RS, Murthy KS, Grider JR, Kellum JM, Kuemmerle JF. Endogenous IGF-I and alphaVbeta3 integrin ligands regulate increased smooth muscle hyperplasia in stricturing Crohn's disease. *Gastroenterology* 2010; 138: 285-293
- Wang J, Niu W, Nikiforov Y, Naito S, Chernauek S, Witte D, LeRoith D, Strauch A, Fagin JA. Targeted overexpression of IGF-I evokes distinct patterns of organ remodeling in smooth muscle cell tissue beds of transgenic mice. *J Clin Invest* 1997; 100: 1425-1439
- Ohneda K, Ulshen MH, Fuller CR, D'Ercole AJ, Lund PK. Enhanced growth of small bowel in transgenic mice expressing human insulin-like growth factor I. *Gastroenterology* 1997; 112: 444-454
- Sjögren K, Liu JL, Blad K, Skrtic S, Vidal O, Wallenius V, LeRoith D, Törnell J, Isaksson OG, Jansson JO, Ohlsson C. Liver-derived insulin-like growth factor I (IGF-I) is the principal source of IGF-I in blood but is not required for postnatal body growth in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 7088-7092
- Kuemmerle JF. Autocrine regulation of growth in cultured human intestinal muscle by growth factors. *Gastroenterology* 1997; 113: 817-824
- Kito Y, Ward SM, Sanders KM. Pacemaker potentials generated by interstitial cells of Cajal in the murine intestine. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005; 288:

- C710-C720
- 31 Wang XY, Sanders KM, Ward SM. Intimate relationship between interstitial cells of cajal and enteric nerves in the guinea-pig small intestine. *Cell Tissue Res* 1999; 295: 247-256
- 32 Sanders KM, Koh SD, Ward SM. Interstitial cells of cajal as pacemakers in the gastrointestinal tract. *Annu Rev Physiol* 2006; 68: 307-343
- 33 宁月季, 张蔚, 成家飞, 李学良, 王美峰, 林琳. 胰岛素样生长因子1对大鼠结肠平滑肌细胞中干细胞因子表达的影响. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 3502-3506
- 34 宁月季, 张蔚, 李慧, 成家飞, 李学良, 林琳. 胰岛素样生长因子 I 对结肠平滑肌细胞产生干细胞因子的调控. *中华消化杂志* 2010; 30: 241-245

编辑 张姗姗 电编 闫晋利

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》修回稿须知

本刊讯 为了保证作者来稿及时发表, 同时保护作者与世界华人消化杂志的合法权益, 本刊对修回稿要求如下.

1 修回稿信件

来稿包括所有作者签名的作者投稿函. 内容包括: (1)保证无重复发表或一稿多投; (2)是否有经济利益或其他关系造成的利益冲突; (3)所有作者均审读过该文并同意发表, 所有作者均符合作者条件, 所有作者均同意该文代表其真实研究成果, 保证文责自负; (4)列出通讯作者的姓名、地址、电话、传真和电子邮件; 通讯作者应负责与其他作者联系, 修改并最终审核复核稿; (5)列出作者贡献分布; (6)来稿应附有作者工作单位的推荐信, 保证无泄密, 如果是几个单位合作的论文, 则需要提供所有参与单位的推荐信; (7)愿将印刷版和电子版版权转让给本刊编辑部.

2 稿件修改

来稿经同行专家审查后, 认为内容需要修改、补充或删节时, 本刊编辑部将把原稿连同审稿意见、编辑意见寄回给作者修改, 而作者必须于15 d内将单位介绍信、作者符合要点承诺书、版权转让信等书面材料寄回编辑部, 同时将修改后的电子稿件上传至在线办公系统; 逾期寄回的, 作重新投稿处理.

3 版权

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

人参皂苷Rg3对小鼠结肠癌原发瘤切除后肝转移瘤生长的抑制作用

郭刚, 许建华, 孙珏, 范忠泽

■背景资料

20(R)-人参皂苷Rg3 (20(R)-Ginsenoside-Rg3)属人参二醇型皂苷, 为五加科植物人参的主要有效成分之一, 在体内外具有很高的抗肿瘤活性。

郭刚, 许建华, 孙珏, 范忠泽, 上海中医药大学附属普陀医院肿瘤科 上海市 200062

郭刚, 在读硕士, 主要从事中西医结合防治肿瘤转移的研究。

作者贡献分布: 此课题由许建华、孙珏及范忠泽设计; 研究过程由郭刚与许建华完成; 数据分析由郭刚完成; 本论文写作由郭刚完成。

通讯作者: 许建华, 主任医师, 博士生导师, 200062, 上海市, 上海中医药大学附属普陀医院肿瘤科. xujianhua50@yahoo.com.cn
电话: 021-62572723-8173

收稿日期: 2011-11-29 修回日期: 2012-01-10

接受日期: 2012-03-15 在线出版日期: 2012-04-28

Ginsenoside Rg3 inhibits growth of liver metastases in nude mice after surgical removal of primary tumor

Gang Guo, Jian-Hua Xu, Jun Sun, Zhong-Ze Fan

Gang Guo, Jian-Hua Xu, Jun Sun, Zhong-Ze Fan, Department of Oncology, Putuo Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200062, China

Correspondence to: Jian-Hua Xu, Chief Physician, Department of Oncology, Putuo Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200062, China. xujianhua50@yahoo.com.cn

Received: 2011-11-29 Revised: 2012-01-10

Accepted: 2012-03-15 Published online: 2012-04-28

Abstract

AIM: To investigate the effect of 20(R)-Ginsenoside Rg3 on the growth of hepatic metastasis in nude mice after surgical removal of primary tumor.

METHODS: BALB/c mouse colon adenocarcinoma CT-26-GFP cell line was established by transfection of CT-26 cells with a lentiviral vector containing the enhanced green fluorescent protein (eGFP) gene. A nude mouse model of hepatic metastasis was then developed, and the mice were randomly divided into three groups: primary tumor resection group, primary tumor preservation group and Ginsenoside Rg3 group. After resection of the primary tumor and treatment with Ginsenoside Rg3 for 10 days, microvascular density (MVD) and cell multiplication of liver metastases were detected by immunohistochemistry, and tumor apoptosis was de-

tected by TUNEL assay. The green fluorescence was observed using a fluorescence *in vivo* imaging system.

RESULTS: The average fluorescence intensity of liver metastases in the Ginsenoside Rg3 group was significantly lower than that in the primary tumor preservation group and primary tumor resection group (314.17 ± 54.23 vs 388.82 ± 25.97 , 427.18 ± 44.31). The incidences of metastases in the Ginsenoside Rg3 group, primary tumor preservation group and primary tumor resection group were 40%, 50% and 100%, respectively. The average weight of the liver, MVD, and labeling index of Ki67 were lower and TUNEL apoptotic index was higher in the Ginsenoside Rg3 group than in the primary tumor preservation group and primary tumor resection group (liver weight: 2.92 ± 0.60 vs 3.80 ± 0.33 , 3.98 ± 0.52 ; MVD: 27.10 ± 3.41 vs 42.60 ± 8.42 , 62.40 ± 5.08 ; labeling index of Ki67: 34.70 ± 6.46 vs 54.30 ± 8.98 , 65.20 ± 3.82 ; apoptotic index: 28.37 ± 3.86 vs 12.50 ± 2.99 , 9.90 ± 2.88).

CONCLUSION: 20(R)-Ginsenoside-Rg3 could inhibit metastatic tumor growth, angiogenesis, proliferation and promote apoptosis in mice after surgical removal of primary tumor.

Key Words: 20(R)-Ginsenoside-Rg3; CT-26 cells; Liver metastasis; Surgical removal; Green fluorescence protein; Fluorescent antibody technique

Guo G, Xu JH, Sun J, Fan ZZ. Ginsenoside Rg3 inhibits growth of liver metastases in nude mice after surgical removal of primary tumor. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(12): 1004-1011

摘要

目的: 探讨人参皂苷Rg3对小鼠原发瘤切除后肝内转移瘤生长的荧光成像及血管生成的影响, 阐明人参皂苷Rg3抑制原发瘤切除促进转移瘤生长的内在机制。

方法: 慢病毒转染建立稳定表达绿色荧光

■同行评议者

曹秀峰, 教授, 南京医科大学附属南京第一医院肿瘤中心

蛋白(green fluorescent protein, GFP)基因的BALB/c小鼠结肠腺癌细胞株(BALB/c mice colon adenocarcinoma cell line, CT-26), 用细胞悬液法构建结肠癌肝转移瘤模型, 分为原发瘤切除组、原发瘤未切除组、人参皂苷Rg3组。采用切除原发瘤及人参皂苷Rg3治疗10 d, 通过小动物活体成像系统观察肝转移瘤的生长情况。应用组织切片苏木素-伊红染色法, 观察肿瘤转移灶情况。SP免疫组织化学法检测转移瘤MVD及细胞增殖, TUNEL技术检测转移瘤细胞凋亡。

结果: 应用慢病毒转染获得稳定表达高强度绿色荧光的CT-26-GFP细胞株。结肠癌肝转移模型治疗结束后, 用波长470 nm的蓝光激发, 通过荧光活体成像系统观察剖离肝脏转移灶发出绿色荧光。原发瘤切除后, 人参皂苷Rg3组平均肝转移灶荧光值较原发瘤未切除组及原发瘤切除组有明显的下降(314.17 ± 54.23 , 388.82 ± 25.97 , 427.18 ± 44.31); 人参皂苷Rg3组、原发瘤未切除组和原发瘤切除组转移瘤发生率分别为40%, 50%, 100%; 平均肝脏质量分别为 $2.92 \text{ g} \pm 0.60 \text{ g}$, $3.80 \text{ g} \pm 0.33 \text{ g}$, $3.98 \text{ g} \pm 0.52 \text{ g}$; 转移瘤血管密度分别为 27.10 ± 3.41 , 42.60 ± 8.42 , 62.40 ± 5.08 ; 转移瘤细胞Ki67的表达分别为 34.70 ± 6.46 , 54.30 ± 8.98 , 65.20 ± 3.82 ; 转移瘤细胞凋亡指数分别为 28.37 ± 3.86 , 12.50 ± 2.99 , 9.90 ± 2.88 。

结论: 稳定表达绿色荧光蛋白的CT-26-GFP细胞系及其动物模型可以为原发瘤切除研究提供理想的实验材料, 应用小动物活体成像系统能够客观定量评价肿瘤在小鼠肝脏的生长情况。人参皂苷Rg3明显抑制小鼠原发瘤切除后肝内转移瘤的生长, 明显抑制转移瘤的血管生成及细胞增殖, 促进细胞凋亡。

关键词: 20(R)-人参皂苷Rg3; 小鼠结肠腺癌细胞株CT-26; 肝转移; 手术切除; 绿色荧光蛋白质; 荧光抗体技术

郭刚, 许建华, 孙珏, 范忠泽. 人参皂苷Rg3对小鼠结肠癌原发瘤切除后肝转移瘤生长的抑制作用. 世界华人消化杂志 2012; 20(12): 1004-1011
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1004.asp>

0 引言

结直肠癌在发达国家是最常见的恶性实体肿瘤之一, 全世界每年有一百万新登记患者, 结直肠癌的发病率和死亡率逐年升高。手术切除是结直肠癌首选的治疗方法, 但不幸的是首诊时大

约有25%-33%已发生转移, 还有25%-30%根治性手术时, 虽没有可见的转移证据, 但将在5年内发生转移^[1]。虽然手术是结直肠癌的首选治疗, 但临床研究表明, 手术切除可能并不总是有益, 对部分患者来说, 对已有可见或不可见转移灶, 原发瘤的切除可加速转移灶的发展^[2]。荧光成像是利用激发光使得荧光基团达到较高的能量水平, 然后发射出波长较长的光进行检测^[3]。绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)基因是目前在光学分子成像中应用较多的一种报告基因, 广泛应用于各种蛋白质和细胞的标记以及特定基因表达的研究^[4,5]。利用光学成像对GFP标记细胞的组织分布进行定位, 能够提供高灵敏度、特意、便捷的观测手段。

1 材料和方法

1.1 材料 小动物荧光成像系统购自日本NIKON公司, MA200型, 分析软件为WinLight32。荧光倒置显微镜(日本Olympus公司CKX41SF), CO₂恒温培养箱(英国Galaxy公司170200 PLUS), 手术显微镜(苏州医疗器械厂YZ-20T4), 电动升降手术台(苏州医疗器械厂YT-2A), 显微外科手术器械包(上海手术器械厂SSW-3), 慢病毒载体系统包装质粒PLV120-EGFP-Neo、PCMV-delta8.91、PMD.G及新霉素(G418)抗性基因购自Trono lab公司, RPMI-1640培养基和DMEM培养基(美国GIBCO公司), 胎牛血清(美国GIBCO公司), 山羊抗小鼠CD34mAb、Ki67单克隆抗体工作液(美国R&D公司), 超敏SP鼠试剂盒(美国R&D公司), TUNEL试剂盒(德国Boehringer Mannheim公司), 20(R)-人参皂苷Rg3纯品由吉林亚泰制药股份有限公司惠赠(批号: 200075), 按20 g/kg体质量给药。

1.2 方法

1.2.1 细胞株培养: 小鼠结肠癌CT-26细胞株, 购自中国医学科学院实验动物研究所, 合格证号: (SCXK(京)2004-0001), 液氮冷冻保存。细胞培养于含100 mL/L胎牛血清(FBS, 美国Gibco公司)、青霉素100 U/mL、链霉素100 μg/mL的RPMI-1640培养基中, 在37 ℃、含50 mL/L CO₂饱和湿度培养箱中培养。SPF级BALB/c nu/nu裸鼠30只, 均为4-6周龄, ♂, 体质量18-22 g, 由上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供(SCXK(沪)2008-0016), 裸鼠实验操作及动物饲养严格按照SPF级标准进行。

1.2.2 细胞转染与筛选: 病毒包装细胞293T于含

■ 研究前沿

手术治疗是结直肠癌的首选, 但临床研究表明, 手术切除可能并不总是有益的, 对部分患者来说, 手术也可触发肿瘤的生长, 促进转移的发生, 对已有可见或不可见转移灶的结肠癌患者, 原发瘤的切除也可加速转移灶的发展。

■相关报道

Mochizuki研究显示人参皂苷Rg3对高转移性的小鼠黑色素瘤细胞(B16FE7)肺转移及BALB/c小鼠结肠癌细胞(26-M3.1)肺转移具有抑制作用。

100 mL/L胎牛血清DMEM培养基中培养。病毒包装:将293T细胞铺板于10 cm培养皿,每10 cm培养皿含 $(2-2.5) \times 10^6$ 个细胞,第2天进行细胞转染。3种质粒PLV120-EGFP-Neo 10 μ g、PCMV-delta8.91 7.5 μ g、PMD.G 5 μ g分别加水至500 μ g,加入500 μ g $2 \times$ HBS混匀。加入50 μ L 2 mol/L CaCl_2 轻轻混匀,室温放置15-25 min后,滴加培养液中。6-8 min后,更换培养液。48 h和72 h分别收集病毒,利用超滤浓缩管浓缩病毒,分装后置于-80 $^\circ\text{C}$ 保存。病毒感染:将CT-26细胞平铺于24孔板,每孔 1×10^4 个细胞,待细胞汇合度达到70%-80%时,移去培养液,加入慢病毒PLV-EGFP-neo, MOI = 1 000。荧光显微镜观察细胞GFP表达,转染符合要求,换用正常CT-26细胞培养液培养传代。经有限稀释法获得细胞单克隆并扩增培养,经观察倍增时间等细胞生物学行为和流式细胞仪检测后,挑选出荧光强度最强,细胞生物学行为无明显改变的一株用于动物实验。

1.2.3 细胞株阳性率的检测:利用流式细胞仪(FACSCAL IBAR, Becton Dickinson Company)计数样品细胞群中阳性细胞所占比例。将上述完成基因转染的肿瘤细胞制备成 2×10^6 /mL的细胞悬液,调整流式细胞仪的工作条件:激发光波长488 nm,发射波长510 nm,将所获得的5个阳性细胞株进行测定,同样的细胞株进行正常传代,传代后再次检测,共检测3代,每次每个样品获取细胞总数为10 000个。

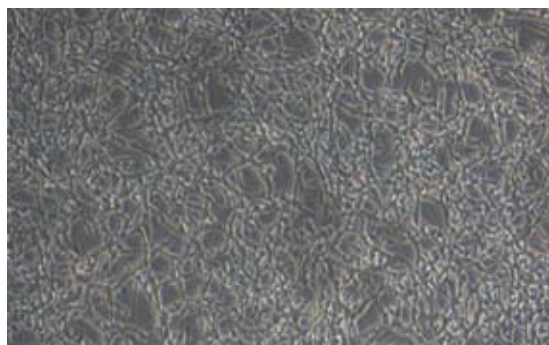
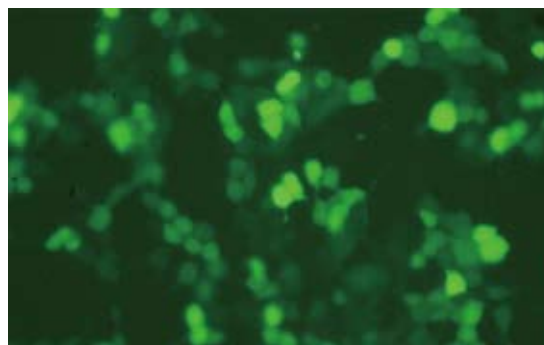
1.2.4 小鼠结肠癌肝转移瘤模型的制作及剖离肝脏成像:取对数生长期的小鼠结肠癌细胞CT-26,以适当的浓度混悬在PBS中,制成单细胞悬液,台盼蓝检测活细胞数>95%。取0.2 mL悬液(约含 5×10^6 个细胞)接种于BALB/c裸小鼠右腋下皮下视作原发瘤。当皮下肿瘤生长至500 mm^3 左右时,1%戊巴比妥钠(40 mg/kg)腹腔内注射麻醉后,取仰卧位固定四肢,无菌条件下中线切口部位行剖腹术,切开腹壁和腹膜,暴露十二指肠,用1 mL注射器(接29号针头)经门静脉注射小鼠结肠癌细胞CT-26,浓度为 3×10^6 /mL,每只0.1 mL,针头取出后用无菌可吸收棉条置于注射位置,防止出血和肿瘤细胞溢出^[6]。3 d后,随机选取20只小鼠切除原发瘤,分为原发瘤切除组及人参皂苷Rg3组,每组10只,另取10只作为原发瘤未切除组。原发瘤切除组和原发瘤未切除组分别灌注生理盐水0.4 mL/d,人参皂苷Rg3组灌注人参皂苷Rg3 0.4 mL/d,连续治疗10 d,第

11天摘除眼球取血,处死小鼠,剥出肝脏,由488 nm氩离子激光(INNOVA70, Coherent Corp.)激发,经520 nm长通滤光片滤光, Nikon活体成像仪下进行荧光成像。将小鼠肝脏固定于40 g/L甲醛液,48 h常规石蜡包埋切片,倒置显微镜(日本Olympus公司)观察病理变化。

1.2.5 肿瘤组织苏木素-伊红染色:取材组织块,经40 g/L甲醛溶液固定后,常规石蜡包埋,取完整的组织蜡块以最大面积5 μm 厚切片。在100倍光镜下随机选择3个高倍视野进行拍照,在专业图像处理软件Image Pro Plus6.0的辅助下观察肿瘤组织及血管形态学。

1.2.6 SP免疫组织化学染色观察CD34、Ki67表达:取存档蜡块制成4 μm 连续切片,二甲苯、梯度乙醇脱蜡水化,将切片依次经阻断灭活内源性过氧化物酶清除、0.01 mol/L枸橼酸缓冲液抗原修复、正常血清封闭、抗体结合、3, 3'-二氨基联苯胺(3, 3'-diaminobenzidine, DAB)染色、蒸馏水洗涤,再经苏木素衬染,盐酸酒精分化,稀氨水蓝化,递增梯度乙醇脱水,二甲苯透明,常规树脂封片。所用一抗为1:50稀释的山羊抗小鼠CD34mAb、Ki67单克隆抗体工作液,二抗为1:200生物素标记(针对Ki67二抗为1:100快捷型酶标羊抗鼠IgG聚合物),显色时加入1:200辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素工作液。微血管密度(microvascular density, MVD)的检测方法按Weidner等的方法进行。CD34阳性以血管内皮细胞呈棕色或棕黄色染色为标准;切片在100倍光镜下观察整张切片的血管分布情况,确定肿瘤区域内微血管分布最高密度的5个区域,在200倍光镜下计数不重复视野中被CD34染成棕黄色的微血管数,取5个区域的平均值作为MVD。每个与邻近微血管明显分离的阳性染色的血管内皮细胞或血管内皮细胞簇都视为独立的微血管;只要结构不相连,其分支结构也计作一个血管计数。Ki67以细胞核染色呈棕褐色或棕黄色颗粒为阳性,每例标本观察10个高倍视野,计算其中Ki67标记指数(labeling index, Ki67-LI)。

1.2.7 TUNEL法检测肿瘤凋亡:取存档蜡块制成4 μm 连续切片,采用TUNEL法检测细胞凋亡指数。光镜下观察切片的染色反应,结果判断标准为以细胞核有明显棕黄色为阳性细胞,计数细胞数不少于1 000个,计算TUNEL阳性标记指数(TUNEL labeling index, TUNEL-LI),即凋亡指数, $\text{TUNEL-LI} = (\text{表达阳性细胞数} / \text{总细胞数}) \times 100\%$ 。

图1 BALB/c小鼠结肠癌CT-26细胞株($\times 40$).图2 稳定高表达GFP的CT-26-GFP细胞株($\times 200$).

■应用要点

结肠癌患者在原发瘤切除后, 及时应用人参皂苷Rg3对抑制临床或亚临床转移灶生长具有潜在的临床价值.

表1 各组BALB/c nu nu 裸鼠治疗后肝脏转移瘤数及肝脏质量 (mean \pm SD, $n = 10$)

分组	荧光值	肝脏质量(g)
原发瘤切除组	427.18 \pm 44.31	3.98 \pm 0.52
原发瘤未切除组	388.82 \pm 25.97 ^b	3.80 \pm 0.33 ^b
人参皂苷Rg3组	314.17 \pm 54.23 ^{bc}	2.92 \pm 0.60 ^{bc}

^b $P < 0.01$ vs 原发瘤切除组; ^c $P < 0.05$ vs 原发瘤未切除组.

统计学处理 将所有数据用SAS8.2软件进行处理, 荧光值按公式进行计算: 平均荧光光子数 = 总光子数/荧光面积, 相关性采用Spearman等级相关进行分析. 计量资料以mean \pm SD表示, 先采用方差分析比较各组均数, 再用最小显著性差异法分析每2组之间差异, 以 $P < 0.05$ 为具有统计学显著性差异.

2 结果

2.1 稳定表达GFP的CT-26细胞株 将表达GFP的慢病毒表达载体转染病毒包装细胞293T后, 通过筛选培养收集上清液获得病毒并用来感染CT-26细胞, 在含有G418 800 mg/L的RPMI-1640培养基中筛选培养, 获得了稳定表达亮绿色荧光的CT-26细胞株, 并在撤除G418筛选压力后继续培养2 mo, 细胞仍能稳定表达GFP. 细胞贴壁生长, 荧光显微镜观察可见细胞表达的荧光信号较强, 荧光较为均匀地分布于整个细胞内, 转染率接近100%, 细胞在体外能够稳定表达绿色荧光蛋白, 并且随体外长期传代培养无明显消退(图1, 2).

2.2 GFP在裸鼠剥离肝脏中的表达 转移瘤组织发出强烈的绿色荧光, 说明肿瘤细胞在体内增殖过程中有GFP稳定、高水平的表达. 应用小动物荧光成像系统可监测到GFP在裸小鼠剥离肝脏的稳定表达, 转移瘤面积与荧光光子数成正

相关. 各组小鼠治疗后平均转移灶荧光值经方差分析有显著性差异, 人参皂苷Rg3组较原发瘤切除组及原发瘤未切除组平均肝转移灶荧光值明显降低($P < 0.01$), 原发瘤未切除组平均肝转移灶荧光值明显低于原发瘤切除组($P < 0.01$, 表1, 图3, 4).

2.3 裸小鼠模型治疗后的一般情况 各组裸小鼠初次接种CT-26细胞后7-11 d皮下全部成瘤, 肿瘤大小无统计学差异. 各组小鼠治疗10 d后, 原发瘤切除组10只小鼠均出现肝转移灶, 转移瘤发生率100%, 平均肝脏质量为3.98 g \pm 0.52 g, 腹水2例(20%); 原发瘤未切除组10只小鼠中, 有5只出现肝转移灶, 转移瘤发生率50%, 平均肝脏质量为3.80 g \pm 0.33 g, 腹水3例(30%); 人参皂苷Rg3组10只小鼠中, 有4只出现肝转移灶, 转移瘤发生率40%, 平均肝脏质量为2.92 g \pm 0.60 g, 无腹水. 第11天, 处死小鼠, 肝脏称质量, 人参皂苷Rg3组平均肝脏质量明显低于原发瘤切除组($P < 0.01$)及原发瘤未切除组($P < 0.01$), 原发瘤未切除组平均肝脏质量明显低于原发瘤切除组($P < 0.01$, 表1).

2.4 HE染色 原发瘤切除组及原发瘤未切除组肿瘤组织中细胞排列紧密, 核质比增大, 肿瘤实质和间质分界不清, 细胞形状不规则, 病理性核分裂象多见. 肿瘤间质内可见新生血管, 但基底膜不完整, 偶见肿瘤细胞侵入血管形成癌栓. 人参皂苷Rg3组肿瘤组织排列疏松, 瘤灶内出现片状坏死, 位于组织中心有许多空隙, 其间可见蛋白样物质及细胞碎片, 并可见血管轮廓被破坏(图5).

2.5 人参皂苷Rg3对原发瘤切除后转移瘤血管密度的影响 各组小鼠治疗后转移瘤微血管密度经方差分析有显著性差异. 镜下可见肿瘤组织血管内皮细胞呈棕色或棕黄色染色. 治疗后人参皂苷Rg3组微血管新生抑制作用明显高于原发瘤切除组($P < 0.01$), 且微血管分布较稀疏, 原发

■名词解释

伴发性肿瘤抵抗 (concomitant tumor resistance, CR): 原发瘤抑制转移瘤生长的现象。

绿色荧光蛋白基因: 维多利亚水母(Aequorea Victoria)发光现象中分离纯化出绿色荧光蛋白基因, 荧光稳定, 检测方便, 对活细胞无伤害等优点, 作为一种标记基因已经广泛应用到生物研究的各个领域, 是目前细胞生物学示踪研究中的一种重要手段。

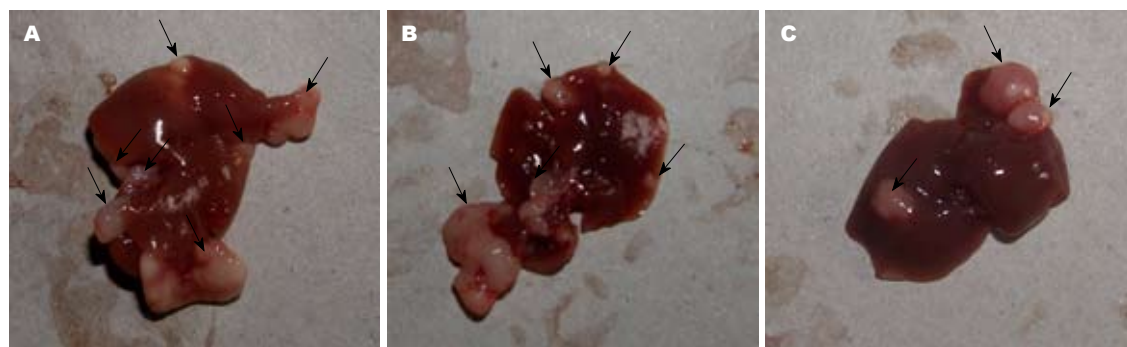


图3 治疗10 d后BALB/c nu nu 裸鼠结肠癌肝转移模型剖离肝脏情况。A: 原发瘤切除组; B: 原发瘤未切除组; C: 人参皂苷Rg3组。

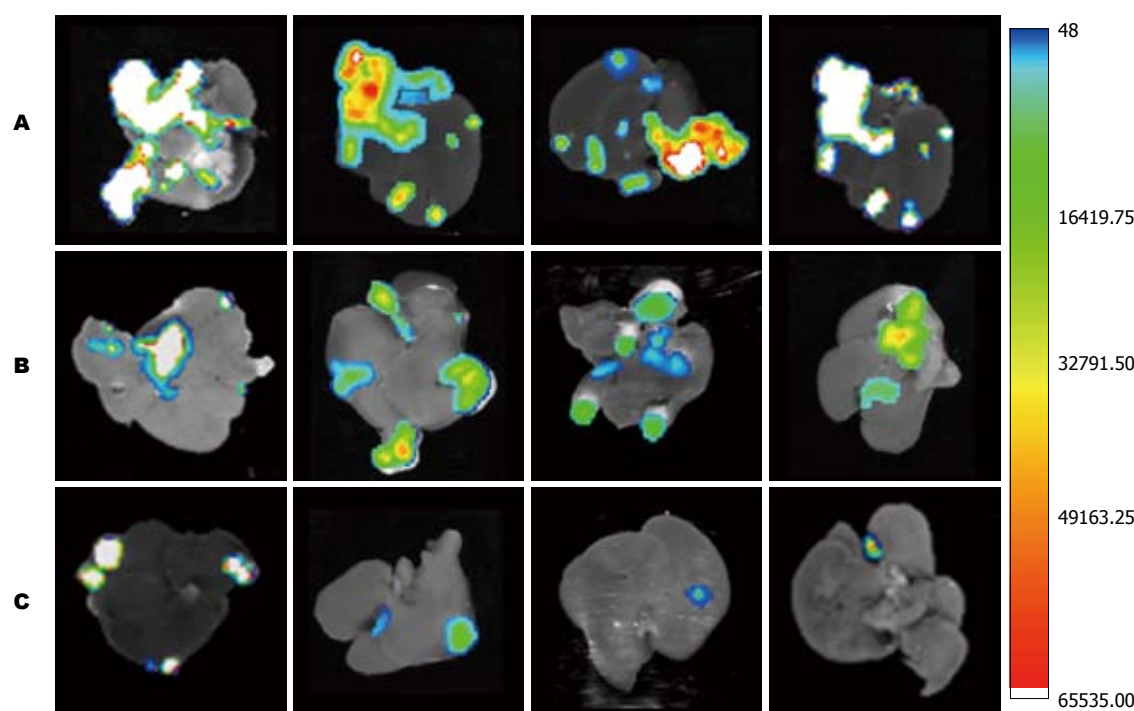


图4 荧光活体成像法观察治疗后结肠癌肝转移模型裸小鼠剖离肝脏GFP基因的表达。A: 原发瘤切除组; B: 原发瘤未切除组; C: 人参皂苷Rg3组。

瘤未切除组微血管新生抑制作用明显高于原发瘤切除组($P<0.01$), 抑制作用不及人参皂苷Rg3显著(表2, 图5)。

2.6 人参皂苷Rg3对原发瘤切除后转移瘤细胞增殖的影响 各组小鼠治疗后转移瘤Ki67表达经方差分析有显著性差异。Ki67主要在细胞核内表达, 染色阳性呈棕褐色或棕黄色颗粒。治疗后人参皂苷Rg3组与原发瘤切除组比较转移瘤细胞核Ki67的表达水平明显降低($P<0.01$), 原发瘤未切除组细胞核Ki67的表达水平明显低于原发瘤切除组($P<0.01$, 表2, 图5)。

2.7 人参皂苷Rg3对原发瘤切除后转移瘤细胞凋亡的影响 各组小鼠治疗后转移瘤细胞凋亡经方差分析有显著性差异。镜下可见凋亡细胞体积缩小, 核固缩呈棕色, 为新月形、类圆形或不规

则形, 固缩核分解碎裂形成凋亡小体。治疗后人参皂苷Rg3组细胞凋亡指数较原发瘤切除组和原发瘤未切除组有明显的升高($P<0.01$, 表2, 图5)。

3 讨论

转移瘤从形态上是一个孤立的病灶, 其实原发瘤与转移瘤之间存在着复杂的调控关系。原发性肿瘤(先前接种)抑制或减缓继发肿瘤(次后接种)生长的现象称作伴发性肿瘤抵抗(concomitant tumor resistance, CR), 1906年由Ehrlich等^[7]首先提出在双侧接种肉瘤的大鼠模型中, 次后接种的肿瘤生长明显滞后于先前接种(原发)的肿瘤。这种现象被忽视了将近60年^[8], 在随后的临床实践及基础研究发现, 对人类及小鼠的原发瘤切除后, 常导致转移瘤的发生^[9-15]。一个世

表 2 各组BALB/c nu nu 裸鼠结肠癌肝转移模型治疗后转移瘤MVD, Ki67及TUNEL表达水平 (mean \pm SD, $n = 10$)

分组	MVD	Ki67-LI	TUNEL-LI
原发瘤切除组	62.40 \pm 5.08	65.20 \pm 3.82	9.90 \pm 2.88
原发瘤未切除组	42.60 \pm 8.42 ^b	54.30 \pm 8.98	12.50 \pm 2.99
人参皂苷Rg3组	27.10 \pm 3.41 ^{bd}	34.70 \pm 6.46 ^{bd}	28.37 \pm 3.86 ^{bd}

^b $P < 0.01$ vs 原发瘤切除组; ^d $P < 0.01$ vs 原发瘤未切除组.

同行评价

本文主题明确, 实验方法科学合理, 结果可靠, 论述详细, 有一定的科学应用价值.

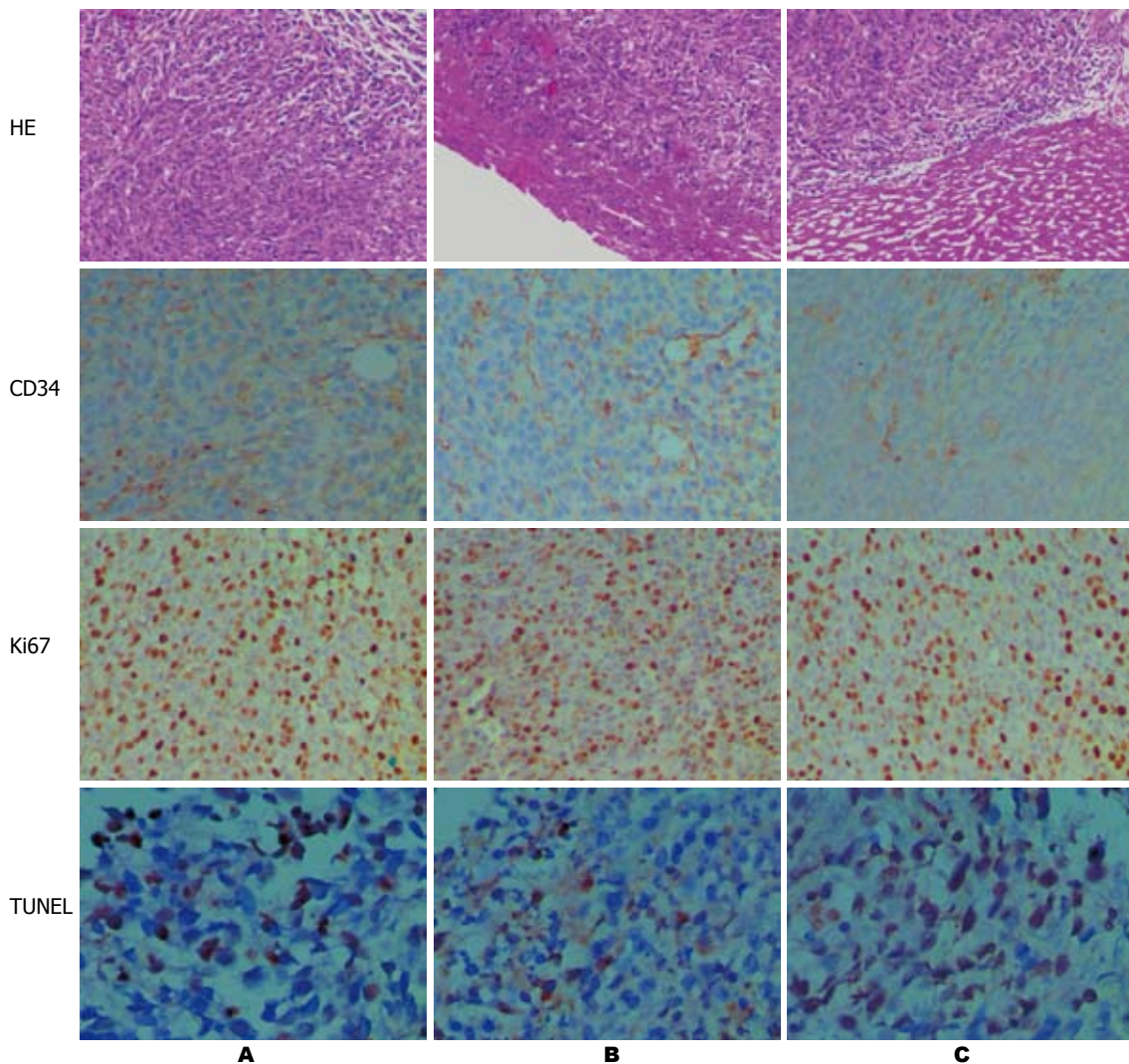


图 5 结肠癌肝转移模型中各组小鼠肝脏病理切片转移瘤情况(HE $\times 100$), Ki67, CD34及TUNEL表达水平(SP染色 $\times 200$, TUNEL染色 $\times 400$). A: 原发瘤切除组; B: 原发瘤未切除组; C: 人参皂苷Rg3组.

纪前, 临床及实验研究均发现人类和小鼠肿瘤切除后加快转移肿瘤的生长^[16,17]. Peeters等^[18-20]发现结直肠癌患者原发瘤切除后, 之前较稳定的肝转移灶活性增加, 肝脏转移灶血管密度增加, 肿瘤细胞凋亡减少, 肿瘤增大. Bashford等^[21]提出“伴随免疫”的假说, 肿瘤生长产生特异的免疫反应, 抑制次后接种的继发肿瘤生长. 我们应用免疫缺陷的裸鼠建立模型, 发现原发肿瘤切除后肝转移瘤发生率增高且转移灶较原发瘤未切除

组增大, 说明免疫反应并非主要影响因素.

Naylor等^[22,23]研究维多利亚水母(Aequorea Victoria)发光现象中分离纯化出GFP基因, 由于荧光稳定, 检测方便, 对活细胞无伤害等优点, 作为一种标记基因已经广泛应用到生物研究的各个领域, 是目前细胞生物学示踪研究中的一种重要手段. 研究表明, 这种荧光蛋白在接受蓝光或紫外辐射时引发生物发光反应(bioluminescence reaction)并辐射出绿光, 其吸收峰为 λ_{\max}

= 395 nm和 λ_{min} = 470 nm, 发射峰为 λ = 509 nm. 光激发GFP荧光是一种特异性的独立过程, 不需要任何的协同因子、底物或其他基因表达产物. 当能量由 Ca^{2+} 激活光蛋白(aequorin)传递给GFP时引发荧光. GFP的克隆及其在异源系统中的表达使其成为一种新的遗传标记系统^[24,25]. GFP与 β -半乳糖苷酶(LacZ)、萤火虫荧光素酶(Luc)等报告基因相比, GFP基因表达的绿色荧光蛋白受到蓝光或紫光照射时可自发出高强度的绿色荧光信号, 易于捕获, 无需辅助因子或其他底物的协助, 直接通过活体成像系统、激光共聚焦显微镜或流式细胞仪等检测, 观察简便^[26]. 此外, 他还具有稳定性好、耐受性强、对组织或细胞无毒性、易于构建载体等优势. 活体成像系统具有较高的灵敏性, 能够客观评价CT-26-GFP细胞在裸小鼠原发瘤切除后肝转移情况, 为成像系统在肠癌发展机制、药物治疗等方面研究提供重要的参考依据.

本实验应用慢病毒将携带GFP基因的质粒转染到小鼠肠癌细胞株中, 在体内和体外均能表达GFP, 通过活体成像系统检测证实该细胞能够稳定、持续、高效地表达绿色荧光, 但由于GFP的发射波长较短且穿透力较差, 对深部组织的原发与远处转移瘤灶的研究存在一定局限性. 因此我们将治疗结束的裸小鼠剖离肝脏成像, 成像系统测得荧光光子数客观准确反应转移瘤的大小, 有利于减少人为误差, 获得的实验结果较直观可靠. 本实验建立的荧光成像技术是一个初步模型, 为深入研究肿瘤的发生、迁移及早期诊断奠定基础.

基础医学及流行病学研究结果显示, 20(R)-人参皂苷Rg3属原人参二醇型皂苷, 为五加科植物人参(*Panax ginseng* C.A.Meyer)的主要有效成分之一, 在体内外具有很高的抗肿瘤活性, 对多种肿瘤均有抑制作用, 其抗癌活性引起广泛关注^[27]. 人参皂苷Rg3可选择性抑制癌细胞的浸润^[28], 并对高转移性的小鼠黑色素瘤细胞(B16FE7)肺转移及BALB/c小鼠结肠癌细胞(26-M3.1)肺转移具有抑制作用^[29]. 当肿瘤细胞进入靶器官后, 可以长期处于静息状态, 保持细胞生长和凋亡的相对平衡. 研究表明, 当转移瘤超过数毫米后进一步生长就必须依赖新生血管, 根据转移瘤新生血管形成情况, 可以将其分为无血管期(avascular phase)和血管期(vascular phase), 无血管期肿瘤为隐匿的亚临床病变, 直径<1-2 mm, 保持增生和凋亡的动态平衡, 转移

瘤一旦引入血管期, 肿瘤呈对数生长. 原发瘤切除可以激活无血管期转移瘤进入血管期. 血管生成(Angiogenesis)是指在已存在的血管床产生新血管的过程. 血管能携带氧气、营养物质(如氨基酸、电解质)、激素及血细胞到机体各个组织器官维持代谢、更新和生长, 对胚胎器官发育和成人伤口愈合等非常重要. 本研究发现结肠癌原发瘤切除后肝转移瘤发生率及大小均较未切除组明显增大, 血管密度也明显增加, 提示结肠癌原发瘤的切除可触发转移瘤的生长. 我们发现人参皂苷Rg3在原发瘤切除模型中均有明显下调CD34的表达继而降低血管密度的作用. 本研究采用TUNEL技术, 通过DNA末端转移酶将带标记的dNTP(多为dUTP)间接(通过地高辛)或直接连接到DNA片段的3'-OH端, 再通过酶联显色或荧光检测定量分析结果. 判断细胞发生凋亡的形态学特征为: 染色质固缩, 向核周移动, 核膜崩溃及形成凋亡小体等^[30]. Ki67是反映肿瘤细胞增殖活性的良好指标, 是判断肿瘤侵袭力及肿瘤预后的有效指标^[31]. 本研究还发现凋亡指数表达与Ki67表达呈负相关趋势. 实验结果发现人参皂苷Rg3治疗后转移瘤细胞增殖抑制, 同时出现凋亡指数上升、Ki67表达下降, 提示肿瘤细胞增殖减少, 细胞凋亡增加是人参皂苷Rg3抑制原发瘤切除后转移瘤生长的部分机制.

总之, 人参皂苷Rg3对小鼠结肠癌原发瘤切除后转移瘤生长有明显的抑制作用, 其机制可能是通过直接或间接的作用, 减少血管生成, 诱导细胞凋亡, 抑制细胞增殖. 结合实验结果, 我们认为结肠癌患者在原发瘤切除后, 及时应用人参皂苷Rg3对抑制临床或亚临床转移灶生长具有潜在的临床价值.

4 参考文献

- 1 Tsoulfas G, Pramateftakis MG, Kanellos I. Surgical treatment of hepatic metastases from colorectal cancer. *World J Gastrointest Oncol* 2011; 3: 1-9
- 2 van der Bij GJ, Oosterling SJ, Beelen RH, Meijer S, Coffey JC, van Egmond M. The perioperative period is an underutilized window of therapeutic opportunity in patients with colorectal cancer. *Ann Surg* 2009; 249: 727-734
- 3 Maggi A, Ciana P. Reporter mice and drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov* 2005; 4: 249-255
- 4 O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Moses M, Lane WS, Cao Y, Sage EH, Folkman J. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell* 1994; 79: 315-328
- 5 Cheng L, Fu J, Tsukamoto A, Hawley RG. Use of

- green fluorescent protein variants to monitor gene transfer and expression in mammalian cells. *Nat Biotechnol* 1996; 14: 606-609
- 6 Ohnishi Y, Fujii H, Hayakawa Y, Sakukawa R, Yamaura T, Sakamoto T, Tsukada K, Fujimaki M, Nunome S, Komatsu Y, Saiki I. Oral administration of a Kampo (Japanese herbal) medicine Juzen-taiho inhibits liver metastasis of colon 26-L5 carcinoma cells. *Jpn J Cancer Res* 1998; 89: 206-213
 - 7 Ehrlich P. Arbeiten Aus Dem Koniglichen Institut Fur Experimentelle Therapie Zu Frankfurt (1906). Whitefish: Kessinger Publishing, 1906: 77-103
 - 8 Gershon RK, Carter RL, Kondo K. On concomitant immunity in tumour-bearing hamsters. *Nature* 1967; 213: 674-676
 - 9 Sugarbaker EV, Ketcham AS. Mechanisms and prevention of cancer dissemination: an overview. *Semin Oncol* 1977; 4: 19-32
 - 10 Lange PH, Hekmat K, Bosl G, Kennedy BJ, Fraley EE. Accelerated growth of testicular cancer after cytoreductive surgery. *Cancer* 1980; 45: 1498-1506
 - 11 Liotta LA, Hart IR. Tumor invasion and metastasis. The Hague: Martinus Nijhoff Publisher, 1982: 113-131
 - 12 Bonfil RD, Ruggiero RA, Bustuoabad OD, Meiss RP, Pasqualini CD. Role of concomitant resistance in the development of murine lung metastases. *Int J Cancer* 1988; 41: 415-422
 - 13 Di Gianni P, Franco M, Meiss RP, Vanzulli S, Piazzone I, Pasqualini CD, Bustuoabad OD, Ruggiero RA. Inhibition of metastases by a serum factor associated to concomitant resistance induced by unrelated murine tumors. *Oncol Rep* 1999; 6: 1073-1084
 - 14 Qadri SS, Wang JH, Coffey JC, Alam M, O'Donnell A, Aherne T, Redmond HP. Can surgery for cancer accelerate the progression of secondary tumors within residual minimal disease at both local and systemic levels? *Ann Thorac Surg* 2005; 80: 1046-1050; discussion 1050-1051
 - 15 Beecken WD, Engl T, Jonas D, Blaheta RA. Expression of angiogenesis inhibitors in human bladder cancer may explain rapid metastatic progression after radical cystectomy. *Int J Mol Med* 2009; 23: 261-266
 - 16 Demicheli R, Retsky MW, Hrushesky WJ, Baum M, Gukas ID. The effects of surgery on tumor growth: a century of investigations. *Ann Oncol* 2008; 19: 1821-1828
 - 17 Retsky MW, Demicheli R, Hrushesky WJ, Baum M, Gukas ID. Dormancy and surgery-driven escape from dormancy help explain some clinical features of breast cancer. *APMIS* 2008; 116: 730-741
 - 18 Peeters CF, de Geus LF, Westphal JR, de Waal RM, Ruiter DJ, Wobbes T, Oyen WJ, Ruers TJ. Decrease in circulating anti-angiogenic factors (angiostatin and endostatin) after surgical removal of primary colorectal carcinoma coincides with increased metabolic activity of liver metastases. *Surgery* 2005; 137: 246-249
 - 19 Peeters CF, de Waal RM, Wobbes T, Ruers TJ. Metastatic dormancy imposed by the primary tumor: does it exist in humans? *Ann Surg Oncol* 2008; 15: 3308-3315
 - 20 Peeters CF, de Waal RM, Wobbes T, Westphal JR, Ruers TJ. Outgrowth of human liver metastases after resection of the primary colorectal tumor: a shift in the balance between apoptosis and proliferation. *Int J Cancer* 2006; 119: 1249-1253
 - 21 Bashford E. Third scientific report on the investigation of the Imperial Cancer Research Fund. London: Taylor and Francis, 1908: 262-268
 - 22 Naylor LH. Reporter gene technology: the future looks bright. *Biochem Pharmacol* 1999; 58: 749-757
 - 23 Ogawa H, Inouye S, Tsuji FI, Yasuda K, Umesono K. Localization, trafficking, and temperature-dependence of the Aequorea green fluorescent protein in cultured vertebrate cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 11899-11903
 - 24 Hastings JW. Chemistries and colors of bioluminescent reactions: a review. *Gene* 1996; 173: 5-11
 - 25 Inouye S, Tsuji FI. Aequorea green fluorescent protein. Expression of the gene and fluorescence characteristics of the recombinant protein. *FEBS Lett* 1994; 341: 277-280
 - 26 Winnard PT, Kluth JB, Raman V. Noninvasive optical tracking of red fluorescent protein-expressing cancer cells in a model of metastatic breast cancer. *Neoplasia* 2006; 8: 796-806
 - 27 Wang CZ, Zhang B, Song WX, Wang A, Ni M, Luo X, Aung HH, Xie JT, Tong R, He TC, Yuan CS. Steamed American ginseng berry: ginsenoside analyses and anticancer activities. *J Agric Food Chem* 2006; 54: 9936-9942
 - 28 Xu TM, Xin Y, Cui MH, Jiang X, Gu LP. Inhibitory effect of ginsenoside Rg3 combined with cyclophosphamide on growth and angiogenesis of ovarian cancer. *Chin Med J (Engl)* 2007; 120: 584-588
 - 29 Mochizuki M, Yoo YC, Matsuzawa K, Sato K, Saiki I, Tono-oka S, Samukawa K, Azuma I. Inhibitory effect of tumor metastasis in mice by saponins, ginsenoside-Rb2, 20(R)- and 20(S)-ginsenoside-Rg3, of red ginseng. *Biol Pharm Bull* 1995; 18: 1197-1202
 - 30 Mignotte B, Vayssiere JL. Mitochondria and apoptosis. *Eur J Biochem* 1998; 252: 1-15
 - 31 Bayrak A, Saadat P, Mor E, Chong L, Paulson RJ, Sokol RZ. Pituitary imaging is indicated for the evaluation of hyperprolactinemia. *Fertil Steril* 2005; 84: 181-185

编辑 曹丽鸥 电编 闫晋利

生物信息学方法对人类和小鼠共同肝癌相关基因的筛选

王云, 胡艳玲, 曹骥, 何敏

■背景资料

至今已有不少研究者利用生物信息学方法进行差异基因的筛选, 但对于在全基因组以及跨种属的肝癌相关基因的筛选研究却鲜有报道。

王云, 广西医科大学研究生学院 广西壮族自治区南宁市 530021

胡艳玲, 何敏, 广西医科大学医学科学实验中心 广西壮族自治区南宁市 530021

曹骥, 广西壮族自治区肿瘤防治研究所实验研究部 广西壮族自治区南宁市 530021

王云, 在读博士, 讲师, 主要从事统计基因组和生物信息学研究。国家自然科学基金资助项目, Nos. 30960332, 30960428

广西科学研究与技术开发计划基金资助项目, Nos. 桂科能0842009, 桂科攻0993003C-13

广西医科大学医学科学实验中心开放基金资助项目, No. KFJJ2010-45

作者贡献分布: 此课题由曹骥与何敏设计; 数据收集、分析由王云与胡艳玲完成; 文章撰写由王云完成; 课题指导、文章修改和审阅由何敏完成。

通讯作者: 何敏, 教授, 530021, 广西壮族自治区南宁市双拥路22号, 广西医科大学医学科学实验中心。m_h_m868@sina.com
电话: 0771-5358634

收稿日期: 2011-11-25 修回日期: 2012-01-29

接受日期: 2012-03-15 在线出版日期: 2012-04-28

Bioinformatic screening of key genes expressed in both human and mouse hepatocellular carcinoma

Yun Wang, Yan-Ling Hu, Ji Cao, Min He

Yun Wang, Postgraduate School of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Yan-Ling Hu, Min He, Medical Scientific Research Center, Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Ji Cao, Research Department of Guangxi Cancer Institute, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, Nos. 30960332 and 30960428; the Guangxi Scientific Research and Technological Development Foundation, Nos. 0842009 and 0993003C-13; the Open Fund of Medical Scientific Research Center of Guangxi Medical University, No. KFJJ2010-45

Correspondence to: Min He, Professor, Medical Scientific Research Center, Guangxi Medical University, 22 Shuangyong Road, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. m_h_m868@sina.com

Received: 2011-11-25 Revised: 2012-01-29

Accepted: 2012-03-15 Published online: 2012-04-28

Abstract

AIM: To mine and analyze large amounts of data generated by gene chips and screen key genes expressed in both human and mouse hepatocellular carcinoma using bioinformatic methods.

METHODS: Through literature search and collection, nine sets of gene chip data that meet the criteria were downloaded from GEO database. The data were standardized by using Bioconductor and R version 2.10.1. The original Affymetrix data were normalized, background corrected, standardized and log2 transformed using the RMA algorithm. Excel's TTEST function was used to calculate the significance of each gene. DAVID was used for gene ID conversion and a table was established for samples and the corresponding gene expression data. A meta-analysis was then performed to screen genes expressed in both human and mouse hepatocellular carcinoma. KEGG pathways were then enriched.

RESULTS: A total of 52 genes were found to be expressed in both human and mouse hepatocellular carcinoma. Five of them were up-regulated, while four of them down-regulated. Seven KEGG pathways were enriched, of which glycine, serine, threonine metabolic pathways and axon guidance pathway have been previously reported to associated with the development of hepatocellular carcinoma.

CONCLUSION: Bioinformatic tools allow us to identify key genes and pathways that are closely related to the development of hepatocellular carcinoma in both human and mice.

Key Words: Bioinformatics; Hepatocellular carcinoma; Cross species; Related genes; Screening

Wang Y, Hu YL, Cao J, He M. Bioinformatic screening of key genes expressed in both human and mouse hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(12): 1012-1017

摘要

目的: 研究应用生物信息学技术, 对基因芯片产生的大量数据进行系统地挖掘和分析, 筛选出人类和小鼠不同种属间在肝癌发生发展过程中起关键作用的共同基因。

方法: 首先通过文献检索和收集, 在GEO数据库中下载符合纳入标准的9套样本基因芯片数

■同行评议者

姜卫东, 教授, 安徽省立院肝胆外科

据, 运用bioconductor和Rversion的2.10.1版本对已下载数据进行标准化处理, 运用软件包affy中的RMA算法对affymetrix平台的原始数据进行背景校正、标准化和log2转换; 其次使用excel的TTEST函数计算每一个基因的显著性, DAVID进行探针基因名称转换, 建立基因名称与样本对应的表达数据表; 再进行Meta分析计算人类及小鼠的共同差显基因, 并通过DAVID中的KEGG库富集调控通路。

结果: 人类与小鼠在肝癌发生发展过程中的共同表达基因52个, 其中5个为上调基因, 4个为下调基因; 富集出7条通路, 其中甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸代谢通路和轴突引导通路是文献已报道的与肝癌发生发展密切相关通路。

结论: 通过生物信息学可快速筛选出人类与小鼠在肝癌发生发展过程中的共同关键基因及与肝癌发生发展密切相关通路。

关键词: 生物信息学; 肝癌; 跨种属; 相关基因; 筛选

王云, 胡艳玲, 曹骥, 何敏. 生物信息学方法对人类和小鼠共同肝癌相关基因的筛选. 世界华人消化杂志 2012; 20(12): 1012-1017

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1012.asp>

0 引言

肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC), 是世界第5大高发的恶性肿瘤, 在全球恶性肿瘤死因中名列第3^[1]. 至今为止在由世界各地不同实验室报道的巨量的肝癌相关分子中, 被一致认可者不多. 随着人类基因组和大鼠、小鼠等动物基因组测序工程的逐步完成, 基于生物信息学数据库的筛选方法也日益得到科研工作者的应用^[2,3]. 该方法可利用已有的数据信息, 进行大规模高通量筛选, 花费少、信息量大. 目前已有不少研究者利用这种方法进行差异基因的筛选^[4,5], 但是对于全基因组以及跨种属的肝癌相关基因的筛选研究却鲜有报道. 本研究采用计算机分析和统计学方法找出隐藏在全基因组表达芯片数据下的生物信息, 筛选出人类和小鼠共同肝癌相关差显基因, 为肝癌标志物的筛选策略提供新的思路。

1 材料和方法

1.1 材料 所有HCC有关的全基因组表达芯片数据均来源互联网开放的免费数据库, 从GEO数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)和ONCOMINE数据库(<http://www.oncomine.org>)下载。

小鼠文献收集在GEO数据库GEO Datasets中以“hepatocellular carcinoma, mus musculus”为关键词检索所有公开发表的文献; 人类文献收集在ONCOMINE数据库中以“hepatocellular carcinoma, homo sapiens”为关键词检索所有公开发表的文献。

1.2 方法

1.2.1 文献纳入标准: 符合以下标准的数据集将纳入研究对象: (1)数据集必须是全基因组的表达RNA芯片数据; (2)数据是关于HCC癌组织和正常组织对照; (3)均考虑经标准化或者原始数据集; (4)数据集必须包括超过3个样本以上; (5)物种包括人类和小鼠。

1.2.2 数据处理: 在GEO的supplementary file中下载基因芯片的CEL数据压缩包, 并解压至一个文件夹中待用, 同时下载TXT格式的样本原始数据; 若下载数据处显示无CEL数据压缩包提供, 则在scope、format、amount中分别选择samples、soft、full下载该样本TXT格式的原始数据, 将每套样本数据的基本信息记录在提供的excel里. 通过bioconductor和Rversion的2.10.1版本^[6]对已下载数据进行标准化处理, 运用软件包affy中的RMA算法^[7,8]对affymetrix平台的原始数据进行背景校正、标准化和log2转换。

1.2.3 基因差异表达的计算分析: 首先通过使用excel的TTEST函数计算每一个基因的显著性; 其次将得到的探针号通过DAVID(<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>)中的gene id conversion tool进行探针基因名称转换, 得到这些探针号的官方基因名称; 最后利用VLOOKUP函数替代原始数据里的探针号, 建立基因名称与样本对应的表达数据表。

1.2.4 Meta分析计算人类的共同差显基因、小鼠的共同差显基因: 为了能有效地解决样本太小问题, 把2套人类和7套小鼠数据集分别通过Meta进行分析, 在Meta分析中先用t检验计算每套数据的每个探针的P值, 再通过下列公式算出每个基因的卡方值:

$$\chi^2 = -2 \sum_{i=1}^k \log_e P_i$$

自由度为数据集K的2倍, 最后保留P<0.05的基因, 得到人类的共同差显基因、小鼠的共同差显基因。

1.2.5 人类和小鼠共有的差显基因表达水平: 人类与小鼠Meta分析出的P<0.05的基因结果进行比较得到人类与小鼠HCC共同差显基因, 对

■ 研发前沿

随着人类基因组和大鼠、小鼠等动物基因组测序工程的逐步完成, 带来了海量微阵列数据, 应用跨种属的比较基因组学研究策略, 对跨种属的生物芯片数据下的生物信息进行挖掘, 极有希望加速发现人类肿瘤基因的进程。

■应用要点

本研究所得结果对今后筛选跨种属肝癌标志物的鉴定奠定了基础,也为肿瘤标志物的筛选策略提供了新的思路。

表 1 9套全基因组数据集的基本情况

类别	GSE14323	GSE6764	GSE9809	GSE9012	GSE19004	GSE2127	GSE23680	GSE15251	GSE8642
物种	homo	homo	mus	mus	mus	mus	mus	mus	mus
文献	sapiens Mas等 ^[9]	sapiens Wurmb- ach等 ^[10]	musculus Liao等 ^[11]	musculus Khetcho- umian等 ^[12]	musculus 仅提供芯 片信息	musculus Sheth等 ^[13]	musculus Li等 ^[14]	musculus 仅提供芯 片信息	musculus 仅提供芯 片信息
芯片	GPL96, GPL571	GPL570	GPL1261	GPL1261	GPL1261	GPL339	GPL6246	GPL8308	GPL339
实验设计	unpaired tissues	unpaired tissues	unpaired +paired , tissues	unpaired tissues	unpaired tissues	unpaired +paired tissues	paired, tissues	unpaired tissues	unpaired tissues
探针数	22k	55K	45k	45k	45k	22k	48k	49k	41k
HCC组织	47	35	3	5	5	9	4	2	6
对照	19	10	7	5	4	6	4	5	9

paired: 对HCC癌组织组的对照来自HCC患者本人或者同只、同窝小鼠; unpaired: 对HCC癌组织组的对照来自其他正常人群或者小鼠。

以上基因的癌组织和正常对照2类样本的基因芯片数据进行整理,分类计算出样本数据的平均值,将HCC癌组织样本数据平均值高于正常对照平均值1.2倍的基因定为HCC上调基因;将HCC癌组织样本数据平均值<正常对照平均值0.9倍的基因定为HCC下调基因;同时,上调基因或者下调基因需出现在5套数据集以上(含5套数据集),才可最终确定该基因功能为上调或者下调。

1.2.6 人类和小鼠共同表达基因的通路富集: 对人类与小鼠HCC共同表达基因通过DAVID(<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>)中的KEGG库进行富集分析。

2 结果

2.1 纳入标准的研究对象 根据纳入标准最终9套样本作为研究对象(表1)。

2.2 人类数据套Meta分析 对2套人类数据单独进行 t 检验得出每个基因的 P 值后,通过选择的Meta公式进行整合分析,共筛出4 951个基因($P<0.05$)。

2.3 小鼠数据套Meta分析 对7套小鼠数据单独进行 t 检验得出每个基因的 P 值后,通过选择的Meta公式进行整合分析,共筛出116个基因($P<0.05$)。

2.4 人类与小鼠的共同基因分析 对人类与小鼠Meta分析出的 $P<0.05$ 的基因结果进行比较分析后发现人类与小鼠HCC共同表达基因有52个,其中表达水平上调的基因5个,表达水平下调的基因4个(表2)。

2.5 对人类与小鼠共同表达的52个基因通路富

集分析 通过DAVID中的KEGG库,对人类与小鼠共同表达的52个基因进行功能基因富集,分别富集出影响这些差显基因的主要通路7条,其中的2条通路甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸代谢通路和轴突引导通路是文献已报道与肝癌发生发展密切相关通路(表3)。

3 讨论

20世纪90年代初以来,生物芯片技术取得了迅猛发展,由此带来了海量微阵列数据,对这些数据进行挖掘和处理,找出隐藏在生物芯片数据下的生物信息,是生物信息学的重要任务之一。生物信息学基因芯片数据分析方法主要分为如下几大类: (1)基因差异表达分析; (2)聚类分析; (3)判别分析; (4)构建基因调控网络; (5)荟萃分析,即Meta分析。

已有的研究工作大都开始并集中于运用基因差异表达分析方法对肿瘤基因表达数据的特征提取和类别分类上,其主要目标就是发现与肿瘤病变有关的特征基因。如应用基因芯片筛选人肝癌、肝硬化及正常肝组织中差异表达的基因^[4],利用基因表达差异鉴别正常细胞与白血病细胞^[21],Rubin等^[22]利用基因芯片技术发现基因amacr在前列腺组织中明显升高,然后利用含342个标本的组织芯片进行检测,证实其在前列腺癌组织中高表达,并用94个细针穿刺标本进一步检测,发现其用于诊断前列腺癌的敏感性为97%,特异性为100%,提示amacr可能是前列腺癌良好的诊断指标。

而多癌症分子共性的Meta分析则是显著

表 2 人类与小鼠的共同差异基因

基因	基因名称	表达水平
<i>itm2b</i>	integral membrane protein 2B	
<i>abcc5</i>	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 5	
<i>arf3</i>	ADP-ribosylation factor 3	
<i>aspm</i>	asp (abnormal spindle)-like, microcephaly associated (Drosophila)	
<i>cdc20</i>	cell division cycle 20 homolog (S.cerevisiae)	上调
<i>cttn</i>	cortactin; predicted gene 8786	
<i>ddx39</i>	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 39	
<i>dnm1l</i>	dynamamin 1-like	
<i>fabp4</i>	fatty acid binding protein 4, adipocyte	上调
<i>gnb1</i>	guanine nucleotide binding protein (G protein), beta 1	
<i>golm1</i>	golgi membrane protein 1	上调
<i>gpr56</i>	G protein-coupled receptor 56	
<i>ier5</i>	immediate early response 5	
<i>itga3</i>	integrin alpha 3	
<i>itgb1</i>	integrin beta 1 (fibronectin receptor beta)	
<i>itm2c</i>	integral membrane protein 2C	
<i>itpr3</i>	inositol 1,4,5-triphosphate receptor 3	
<i>klf6</i>	Kruppel-like factor 6	
<i>lmna</i>	lamin A	
<i>lrrc59</i>	leucine rich repeat containing 59	
<i>ly6d</i>	lymphocyte antigen 6 complex, locus D	上调
<i>map4k4</i>	mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 4	
<i>meox1</i>	mesenchyme homeobox 1	
<i>nek2</i>	NIMA (never in mitosis gene a)-related expressed kinase 2	
<i>rac1</i>	RAS-related C3 botulinum substrate 1	
<i>scn8a</i>	sodium channel, voltage-gated, type VIII, alpha	
<i>slc1a4</i>	solute carrier family 1 (glutamate/neutral amino acid transporter), member 4	
<i>tagln2</i>	transgelin 2	
<i>tgfr2</i>	transforming growth factor, beta receptor II	
<i>tmc6</i>	transmembrane channel-like gene family 6	
<i>tpm1</i>	tropomyosin 1, alpha	
<i>trib3</i>	tribbles homolog 3 (Drosophila)	
<i>tspan8</i>	tetraspanin 8	上调
<i>wsb2</i>	WD repeat and SOCS box-containing 2	
<i>ywhaz</i>	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta	
	polypeptide; predicted gene 4202	
<i>crbn</i>	cereblon	
<i>abat</i>	4-aminobutyrate aminotransferase	
<i>acsl1</i>	acyl-CoA synthetase long-chain family member 1	
<i>akap1</i>	A kinase (PRKA) anchor protein 1	
<i>cbs</i>	cystathionine beta-synthase	
<i>cxcl12</i>	chemokine (C-X-C motif) ligand 12	下调
<i>gas1</i>	growth arrest specific 1	下调
<i>ghr</i>	growth hormone receptor	
<i>gnmt</i>	glycine N-methyltransferase	下调
<i>igfals</i>	insulin-like growth factor binding protein, acid labile subunit	下调
<i>masp1</i>	mannan-binding lectin serine peptidase 1	
<i>paics</i>	phosphoribosylaminoimidazole carboxylase, phosphoribosylaminoribosylaminoimidazole, succinocarboxamide synthetase; predicted gene 8445	
<i>pbld</i>	phenazine biosynthesis-like protein domain containing	
<i>plxnc1</i>	plexin C1; similar to plexin C1	
<i>sardh</i>	sarcosine dehydrogenase	
<i>scnn1a</i>	sodium channel, nonvoltage-gated 1 alpha	
<i>sirt3</i>	sirtuin 3 (silent mating type information regulation 2, homolog) 3 (S. cerevisiae)	

■同行评价

本文研究方法创新性好, 内容较新颖, 数据可靠, 结果有新意, 具有较好的科学意义。

表 3 人类与小鼠共同表达基因的通路分布

通路名称	基因	P值	与肝癌关系的文献报道
肥厚型心肌病	<i>Imna, itga3, tpm1, itgb1</i>	0.0088804	无
甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸代谢通路	<i>gnmt, sardh, cbs</i>	0.0106734	有 ^[15,16]
扩张型心肌病	<i>Imna, itga3, tpm1, itgb1</i>	0.0110271	无
轴突引导通路	<i>plxnc1, rac1, itgb1, cxcl12</i>	0.0270935	有 ^[17-20]
味觉转导	<i>gnb1, itpr3, scnn1a</i>	0.0285055	无
致病性大肠杆菌感染	<i>cttn, ywhaz, itgb1</i>	0.0337804	无
致心律失常型右室心肌病	<i>Imna, itga3, itgb1</i>	0.0568722	无

性差异表达研究的补充和发展^[23-25]。自2002年Rhodes等^[26]首先将Meta分析引入基因芯片数据分析领域以来,已经有非常多的关于Meta分析处理多试验基因芯片数据的报道^[26-29]。Rhodes等利用来自不同独立研究得到的单基因P值合并成一个综合P值,对4套来自不同实验室采用不同芯片平台产生的前列腺癌表达数据进行Meta分析,得到了一批在多个独立实验之间表现一致,与前列腺癌有关的基因。

因此,本研究主要也运用了上述的基因差异表达分析方法、Meta分析方法以及差异表达基因的功能富集分析方法进行基因芯片数据的生物信息学分析。通过对标准化以后的2套人类及7套小鼠HCC全基因组表达芯片数据,应用基因差异表达分析t检验、Meta分析及代谢通路富集分析,在人类与小鼠全基因组范围内比较正常肝组织与肝癌组织之间基因表达谱的差异,在 $P<0.05$ 水平,发现了52个在两种种属间共同表达的基因,其中5个为上调基因,4个为下调基因,可能为肝癌的发生发展密切相关的关键基因。美国冷泉港实验室最近以“加速发现肿瘤基因的整体肿瘤基因组学策略(integrative oncogenomic approaches for accelerated cancer-gene discovery)”^[30]为题撰文讨论跨种属的比较基因组学研究策略,认为这种高性价比的研究策略极有希望加速发现人类肿瘤基因的进程。

上述52个基因富集分析出7条代谢通路,其中已有文献报道^[15-20]甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸代谢通路和轴突引导通路与肝癌发生发展密切相关。富集于这两条通路上的GNMT, CBS, RAC1基因, Avila等^[15,16]在研究人类肝硬化和肝细胞癌的氨基酸代谢途径中发现GNMT, CBS的mRNA含量在人类肝硬化和肝细胞癌组织中显著减少,是HCC的肿瘤抑制基因,他们可通过与其他蛋白的直接作用来调节肿瘤的细胞生长、蛋白合成、核糖体生成及自我吞噬等;而

Rac1本身以及 Rac1的多种上下游分子如GEF、TRE(顺式作用元件)17等都是癌基因,他的激活能导致成纤维细胞的恶性转化,在肿瘤组织中表达较正常组织中明显升高,通过参与肿瘤的侵袭和转移、肿瘤细胞转录的调节、肿瘤新生血管的形成诸多环节促进肿瘤的发生、进展^[17-20]。

由此可见生物信息学在处理基因芯片产生的海量数据中是必不可少的工具。生物信息学筛选是一种快速有效的筛选方法。随着芯片应用的推进,芯片数据分析的新理论和新算法也将不断地被研究出来,本研究所得结果对今后筛选跨种属肝癌标志物的鉴定奠定了基础,也为肿瘤标志物的筛选策略提供了新的思路。

4 参考文献

- 1 Thun MJ, DeLancey JO, Center MM, Jemal A, Ward EM. The global burden of cancer: priorities for prevention. *Carcinogenesis* 2010; 31: 100-110
- 2 Rajkovic A, Yan M S C, Klysis M, Matzuk M. Discovery of germ cell-specific transcripts by expressed sequence tag database analysis. *Fertil Steril* 2001; 76: 550-554
- 3 Wang J, Liang P. DigiNorthern, digital expression analysis of query genes based on ESTs. *Bioinformatics* 2003; 19: 653-654
- 4 刘娟, 姚树坤, 殷飞. 应用基因芯片筛选人肝癌、肝硬化及正常肝组织中差异表达的基因. *基础医学与临床* 2007; 27: 57-62
- 5 周向东, 钱桂生, 刘凌志. 采用基因芯片技术筛选人小细胞肺癌SH77/CDDP多药耐药相关基因表达谱的研究. *第三军医大学学报* 2007; 29: 279-283
- 6 Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, Bolstad B, Dettling M, Dudoit S, Ellis B, Gautier L, Ge Y, Gentry J, Hornik K, Hothorn T, Huber W, Iacus S, Irizarry R, Leisch F, Li C, Maechler M, Rossini AJ, Sawitzki G, Smith C, Smyth G, Tierney L, Yang JY, Zhang J. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol* 2004; 5: R80
- 7 Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, Beazer-Barclay YD, Antonellis KJ, Scherf U, Speed TP. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* 2003; 4: 249-264
- 8 Gautier L, Cope L, Bolstad BM, Irizarry RA. affy-analysis of Affymetrix GeneChip data at the probe level. *Bioinformatics* 2004; 20: 307-315

- 9 Mas VR, Maluf DG, Archer KJ, Yanek K, Kong X, Kulik L, Freise CE, Olthoff KM, Ghobrial RM, McIver P, Fisher R. Genes involved in viral carcinogenesis and tumor initiation in hepatitis C virus-induced hepatocellular carcinoma. *Mol Med* 2009; 15: 85-94. Epub 2008 Dec 15
- 10 Wurmbach E, Chen YB, Khitrov G, Zhang W, Roayaie S, Schwartz M, Fiel I, Thung S, Mazzaferro V, Bruix J, Bottinger E, Friedman S, Waxman S, Llovet JM. Genome-wide molecular profiles of HCV-induced dysplasia and hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2007; 45: 938-947
- 11 Liao YJ, Liu SP, Lee CM, Yen CH, Chuang PC, Chen CY, Tsai TF, Huang SF, Lee YH, Chen YM. Characterization of a glycine N-methyltransferase gene knockout mouse model for hepatocellular carcinoma: Implications of the gender disparity in liver cancer susceptibility. *Int J Cancer* 2009; 124: 816-826
- 12 Khetchoumian K, Teletin M, Tisserand J, Mark M, Herquel B, Ignat M, Zucman-Rossi J, Cammas F, Lerouge T, Thibault C, Metzger D, Chambon P, Losson R. Loss of Trim24 (Tif1alpha) gene function confers oncogenic activity to retinoic acid receptor alpha. *Nat Genet* 2007; 39: 1500-1506
- 13 Sheth SS, Bodnar JS, Ghazalpour A, Thipphavong CK, Tsutsumi S, Tward AD, Demant P, Kodama T, Aburatani H, Lusis AJ. Hepatocellular carcinoma in Tnfrp-deficient mice. *Oncogene* 2006; 25: 3528-3536
- 14 Li H, Malani N, Hamilton SR, Schlachterman A, Bussadori G, Edmonson SE, Shah R, Arruda VR, Mingozzi F, Wright JF, Bushman FD, High KA. Assessing the potential for AAV vector genotoxicity in a murine model. *Blood* 2011; 117: 3311-3319
- 15 Avila MA, Berasain C, Torres L, Martín-Duce A, Corrales FJ, Yang H, Prieto J, Lu SC, Caballería J, Rodés J, Mato JM. Reduced mRNA abundance of the main enzymes involved in methionine metabolism in human liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2000; 33: 907-914
- 16 Yen CH, Lu YC, Li CH, Lee CM, Chen CY, Cheng MY, Huang SF, Chen KF, Cheng AL, Liao LY, Lee YH, Chen YM. Functional Characterization of Glycine N-methyltransferase and its Interactive Protein-DEPDC6/DEPTOR in Hepatocellular Carcinoma. *Mol Med* 2011; Dec 1. [Epub ahead of print]
- 17 陈保东, 高永中, 蒋太鹏, 丁建军, 姜晓丹, 徐如祥. Rac1在垂体腺瘤组织中的表达及意义. *中国微侵袭神经外科杂志* 2010; 15: 268-270
- 18 郭世洲, 原禄双, 张俊华. Rac1、Cdc42在肿瘤方面的研究. *医学综述* 2007; 13: 821-823
- 19 董朝富, 周安立, 陈刚, 朱智, 颜廷启, 刘顺方, 刘锋, 沈文状, 杨志芳, 易继林. 抑制Rac1的活性对人肝癌细胞生长及侵袭能力的影响. *肝胆胰外科杂志* 2009; 21: 288-291
- 20 Wu L, Cai C, Wang X, Liu M, Li X, Tang H. MicroRNA-142-3p, a new regulator of RAC1, suppresses the migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells. *FEBS Lett* 2011; 585: 1322-1330
- 21 Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, Huard C, Gaasenbeek M, Mesirov JP, Coller H, Loh ML, Downing JR, Caligiuri MA, Bloomfield CD, Lander ES. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* 1999; 286: 531-537
- 22 Rubin MA, Zhou M, Dhanasekaran SM, Varambally S, Barrette TR, Sanda MG, Pienta KJ, Ghosh D, Chinnaiyan AM. alpha-Methylacyl coenzyme A racemase as a tissue biomarker for prostate cancer. *JAMA* 2002; 287: 1662-1670
- 23 Smid M, Dorssers LC, Jenster G. Venn Mapping: clustering of heterologous microarray data based on the number of co-occurring differentially expressed genes. *Bioinformatics* 2003; 19: 2065-2071
- 24 Rhodes DR, Yu J, Shanker K, Deshpande N, Varambally R, Ghosh D, Barrette T, Pandey A, Chinnaiyan AM. Large-scale meta-analysis of cancer microarray data identifies common transcriptional profiles of neoplastic transformation and progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 9309-9314
- 25 Segal E, Friedman N, Koller D, Regev A. A module map showing conditional activity of expression modules in cancer. *Nat Genet* 2004; 36: 1090-1098
- 26 Rhodes DR, Barrette TR, Rubin MA, Ghosh D, Chinnaiyan AM. Meta-analysis of microarrays: inter-study validation of gene expression profiles reveals pathway dysregulation in prostate cancer. *Cancer Res* 2002; 62: 4427-4433
- 27 Conlon EM, Song JJ, Liu A. Bayesian meta-analysis models for microarray data: a comparative study. *BMC Bioinformatics* 2007; 8: 80
- 28 Conlon EM. A Bayesian mixture model for meta-analysis of microarray studies. *Funct Integr Genomics* 2008; 8: 43-53
- 29 Liang Y, Kelemen A. Bayesian models and meta analysis for multiple tissue gene expression data following corticosteroid administration. *BMC Bioinformatics* 2008; 9: 354
- 30 Zender L, Lowe SW. Integrative oncogenomic approaches for accelerated cancer-gene discovery. *Curr Opin Oncol* 2008; 20: 72-76

编辑 曹丽鸥 电编 闫晋利

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》栏目设置

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

Lumican蛋白在胰腺导管腺癌间质中的表达及其与Ki-67、VEGF及突变型P53表达的相关性

袁菲, 周尘飞, 金晓龙

■背景资料

胰腺癌恶性程度高, 预后不佳。肿瘤基质微环境在其发生发展中起重要作用。Lumican蛋白是细胞外间质成分之一, 属富含亮氨酸小分子蛋白聚糖家族。Lumican蛋白在肿瘤中表达特征及生物学功能研究结论尚存分歧。

袁菲, 金晓龙, 上海交通大学医学院附属瑞金医院病理科 上海市 200025

周尘飞, 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

袁菲, 副主任医师, 主要从事病理研究。

上海市卫生局科研基金资助项目, No. 2009047

作者贡献分布: 本课题由袁菲设计; 研究过程、统计分析及文章书写由袁菲与周尘飞完成; 金晓龙指导与审校。

通讯作者: 金晓龙, 教授, 200025, 上海市瑞金二路197号, 上海交通大学医学院附属瑞金医院病理科。xlj6@hotmail.com

电话: 021-64370045-662235 传真: 021-64373909

收稿日期: 2011-11-07 修回日期: 2012-01-29

接受日期: 2012-03-25 在线出版日期: 2012-04-28

Lumican protein expression in pancreatic ductal adenocarcinoma: clinical significance and correlation with expression of Ki-67, VEGF and mutated P53

Fei Yuan, Chen-Fei Zhou, Xiao-Long Jin

Fei Yuan, Xiao-Long Jin, Department of Pathology, Ruijin Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200025, China

Chen-Fei Zhou, Department of Surgery, Ruijin Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiaotong University; Shanghai Institute of Digestive Surgery, Shanghai 200025, China
Supported by: the Research Foundation of Shanghai Municipal Health Bureau, No. 2009047

Correspondence to: Xiao-Long Jin, Professor, Department of Pathology, Ruijin Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200025, China. xlj6@hotmail.com

Received: 2011-11-07 Revised: 2012-01-29

Accepted: 2012-03-25 Published online: 2012-04-28

Abstract

AIM: To detect the expression of Lumican in pancreatic ductal adenocarcinoma and to analyze its correlation with expression of Ki-67, VEGF and mutated P53.

METHODS: One hundred surgically resected cancer samples collected from patients with pathologically confirmed pancreatic ductal adenocarcinoma and 15 tumor-adjacent pancreatic tissue samples were used in the study. Lumican expression in these tissue samples was detected

by immunohistochemistry (IHC) and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Expression of Ki-67, VEGF and mutated P53 was detected by IHC.

RESULTS: The expression levels of Lumican mRNA and protein in cancer tissue were significantly higher than those in tumor-adjacent tissue. The positive rate of Lumican expression in tumor stroma was 83.0% (83/100). In poorly differentiated samples, stromal expression of Lumican was significantly correlated with TNM stage ($\chi^2 = 6.446$, $P < 0.05$), but not with age, gender, lymph node metastasis or distant metastasis. In well differentiated samples, stromal expression of Lumican had a significant negative correlation with expression of Ki-67 ($r = -0.28$, $P = 0.017$), VEGF ($r = -0.264$, $P = 0.025$) and mutated P53 ($r = -0.253$, $P = 0.032$), but had no correlation with pathological characteristics of pancreatic ductal adenocarcinoma.

CONCLUSION: Lumican expression is higher in pancreatic ductal adenocarcinoma than in tumor-adjacent tissue and correlates with TNM stage in poor differentiated samples. There is a negative correlation between expression of Lumican and that of Ki-67, VEGF and mutated P53 mutation in well differentiated samples.

Key Words: Pancreatic ductal adenocarcinoma; Lumican; Microenvironment

Yuan F, Zhou CF, Jin XL. Lumican protein expression in pancreatic ductal adenocarcinoma: clinical significance and correlation with expression of Ki-67, VEGF and mutated P53. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(12): 1018-1024

摘要

目的: 观察细胞外基质蛋白Lumican在胰腺导管腺癌(pancreatic ductal adenocarcinoma, PDA)中表达特征, 分析Lumican与Ki-67、VEGF、突变型P53等肿瘤恶性表型相关分子的关联。

方法: 采用免疫组织化学染色(IHC)和逆转录-

■同行评议者

谷俊朝, 主任医师, 首都医科大学附属北京友谊医院普外科

聚合酶链式反应(RT-PCR)检测PDA原发灶及对应癌旁胰腺组织中Lumican表达. IHC检测PDA原发灶Ki-67、VEGF及突变型P53表达. 用SPSS软件行统计学分析.

结果: PDA原发灶中, Lumican表达在mRNA及蛋白质水平均明显高于癌旁胰腺组织. 就该蛋白在癌灶中的分布特性而言, Lumican蛋白主要定位于癌间质, 阳性表达率为83.0%(83/100). 低分化PDA中, 癌间质过表达Lumican与TNM分期相关($\chi^2 = 6.446, P < 0.05$), 与年龄、性别、淋巴结转移、远处转移等无明显相关. 高中分化PDA中, 癌间质过表达Lumican与临床病理特征无关, 而与Ki-67($r = -0.28, P = 0.017$)、VEGF($r = -0.264, P = 0.025$)及突变型P53($r = -0.253, P = 0.032$)表达呈明显负相关.

结论: Lumican在PDA原发灶中表达高于癌旁胰腺组织, 主要分布于癌间质. Lumican在癌间质过表达与低分化PDA的TNM分期相关, 与高、中分化PDA的Ki-67、VEGF及突变型P53表达呈负相关.

关键词: 胰腺导管腺癌; Lumican; 肿瘤微环境

袁菲, 周尘飞, 金晓龙. Lumican蛋白在胰腺导管腺癌间质中的表达及其与Ki-67、VEGF及突变型P53表达的相关性. 世界华人消化杂志 2012; 20(12): 1018-1024
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1018.asp>

0 引言

胰腺癌发病率及死亡率均居我国恶性肿瘤前列^[1], 起病隐匿, 恶性程度高, 总体5年生存率不超过5%^[2], 其中90%左右为胰腺导管腺癌(pancreatic ductal adenocarcinoma, PDA)^[3]. PDA的发生、发展受众多因素调控, 肿瘤基质微环境异常是其中重要因素之一^[4]. 富亮氨酸小分子蛋白聚糖(small leucine-rich proteoglycan, SLRP)家族是细胞外基质的主要组成部分, 其成员包括decorin、biglycan、Lumican等^[5,6], 研究显示decorin能抑制肿瘤细胞增殖及迁移^[7]. Lumican亦被发现包括胰腺癌、乳腺癌、结直肠癌及肺癌等肿瘤中呈异常表达^[8-11], 可能影响肿瘤生物学行为, 但其确切生物学功能尚存争议. Lumican与胰腺癌细胞增殖、血管生成等恶性生物学行为的关系鲜见报道. 本研究通过构建组织芯片, 观察PDA间质中Lumican的表达特征, 分析其与临床病理特征的关系, 并研究Lumican与Ki-67、VEGF及突变型P53表达的相关性^[12], 以

初步探明Lumican与PDA癌细胞恶性表型的关系, 为后续研究积累基础.

1 材料和方法

1.1 材料 收集上海交通大学医学院附属瑞金医院2002-2007年手术切除的100例PDA癌组织标本, 40 g/L甲醛溶液固定, 石蜡包埋. 其中15例同时留取癌旁非肿瘤胰腺组织, 离体后即刻取部分成对组织于液氮冻存. 所有病例均有完整的临床病理资料. TNM分期按美国癌症联合会(AJCC)第6版胰腺癌分期标准进行^[13].

1.2 方法

1.2.1 组织芯片构建: 采用组织芯片(tissue microarray, TMA)制作仪, 穿取100例PDA癌组织, 制成组织微阵列蜡块, 4 μm 连续切片, 40 $^{\circ}\text{C}$ 贴片(载玻片经0.1%多聚赖氨酸防脱片处理), 56 $^{\circ}\text{C}$ 烤片3 h后至37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中过夜, 常温蜡封后保存备用.

1.2.2 免疫组织化学染色(immunohistochemistry, IHC): 切片经脱蜡至水, 微波煮沸修复抗原, 3% H_2O_2 封闭内源性过氧化物酶, 磷酸盐缓冲液洗涤后, 正常血清封闭20 min. 分别滴加一抗, Lumican(购自R&D Systems公司, 工作浓度1:100); Ki-67、VEGF、P53(购自DAKO公司, 工作浓度1:50), 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜. PBS洗涤后, 生物素二抗室温孵育10 min. PBS洗涤后, 链霉素-生物素-过氧化物酶室温孵育10 min. DAB显色, 光镜下观察及时终止显色反应. 苏木素复染细胞核, 常规分化、脱水、透明、封片. IHC标记结果判定: Lumican蛋白定位于组织间质, VEGF定位于细胞质, Ki-67及P53定位于细胞核. Lumican、VEGF、P53阳性强度评价: 阳性细胞数<5%为-; <25%为+; <50%为++; $\geq 50\%$ 为+++. Lumican表达评价: -为阴性表达; + - ++为阳性表达; +++为强阳性表达^[8]. Ki-67选取阳性细胞相对密集的10个高倍视野计算阳性细胞百分数.

1.2.3 逆转录聚合酶链式反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)检测Lumican基因表达: 将液氮中冻存的15例新鲜癌组织和癌旁非肿瘤胰腺组织匀浆, 抽提总RNA, 逆转录cDNA后行PCR扩增(以 β -actin为内参). Lumican引物序列, 正义链: 5'-CCACAACAACTTGACAGAGT-3'; 反义链: 5'-CAAGTTGATTGACCTCCAGG-3', 产物469 bp. 反应体系为: 10 \times buffer 2.5 μL , Mg^{2+} 2.5 μL , dNTP 0.5 μL , Lumican上下游引物各1 μL (5 $\mu\text{mol/L}$), Taq酶 0.1 μL ,

■研发前沿
Lumican蛋白在不同分化程度的胰腺导管腺癌中表达特征不同, 其具体生物学功能亟待明确.

■相关报道

Lu等发现, Lumican蛋白定位于胰岛 α 细胞及胰腺组织间质, 胰腺癌细胞表达聚乙酰氨基乳糖侧链修饰的Lumican糖蛋白. Ishiwata等发现, 胰腺癌间质Lumican阳性表达与女性患者、不良分期、后腹膜及十二指肠侵犯等临床病理因素相关.

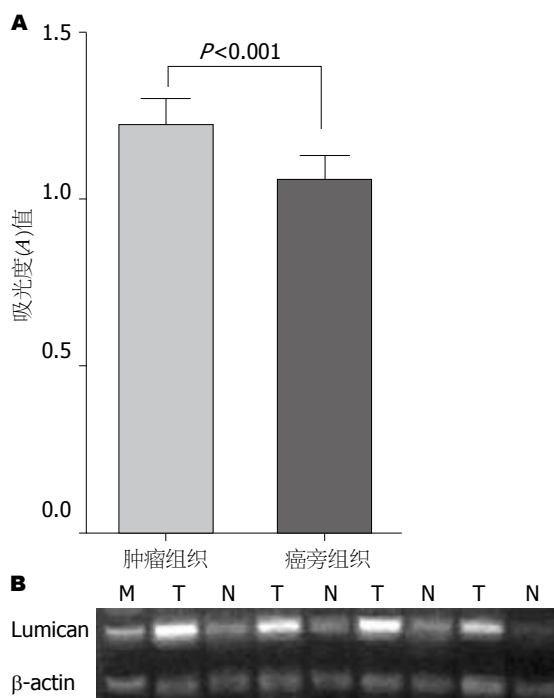


图1 PCR产物进行凝胶电泳分析显示Lumican在胰腺导管腺癌间质中的过表达.

ddH₂O 16.4 μ L, cDNA 1 μ L; 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 变性5 min; 95 $^{\circ}$ C 变性30 s, 60 $^{\circ}$ C 退火30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸30 s, 共36次循环; 最后72 $^{\circ}$ C 延伸10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存. 取PCR扩增产物5 μ L, 行凝胶电泳检测. 用Sysgene软件定量分析, 检测并计算Lumican与 β -actin表达的吸光度比值.

统计学处理 采用 χ^2 检验分析等级资料, 配对 t 检验分析吸光度(A)比值, Spearman相关性检验分析表达相关性. 所有检验均采用双侧 $P < 0.05$ 为有统计学意义. 统计分析使用SPSS13.0统计软件进行.

2 结果

2.1 Lumican在PDA癌组织中表达水平 Lumican在PDA癌组织中表达水平高于癌旁胰腺组织, 主要分布于癌间质. 将取自15对组织的PCR产物进行凝胶电泳分析显示, Lumican mRNA相对表达量在癌组织中明显高于癌旁胰腺组织(A值 1.22 ± 0.07 vs 1.05 ± 0.06 , $P < 0.001$, 图1). IHC显示, Lumican蛋白主要定位在组织间质中, 并在癌间质中呈高表达, 阳性率为83.0%(83/100), 在癌旁胰腺组织间质中呈低表达(图2).

2.2 低分化PDA中Lumican过表达与肿瘤TNM分期相关 100例PDA患者中, 男性60例, 女性40例; 中位年龄59岁(31-79岁); 根据AJCC 肿瘤TNM分期, I-II期患者83例, III-IV期患者17例; 高中分

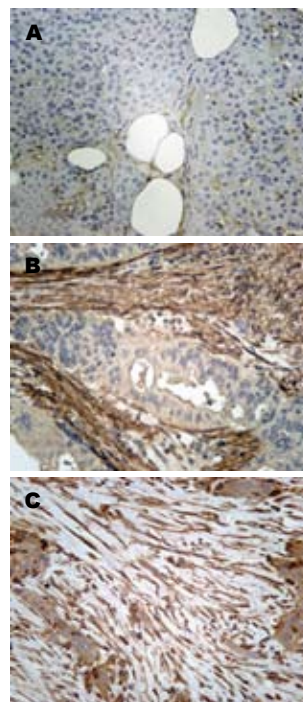


图2 Lumican在胰腺导管腺癌间质中过表达(免疫组织化学染色 $\times 200$). A: 癌旁非肿瘤胰腺组织间质; B: 高中分化癌间质; C: 低分化癌间质.

化腺癌72例, 低分化腺癌28例. Lumican在低分化PDA癌间质中表达率为78.6%(22/28), 高中分化癌间质表达率为84.7%(61/72), 两者无明显差异($P > 0.05$). 低分化癌间质中Lumican蛋白表达与肿瘤TNM分期相关; III-IV期PDA中, Lumican癌间质表达水平明显高于I-II期(6/6比16/22, $\chi^2 = 6.446$, $P = 0.031$). 而与患者年龄、性别、淋巴结转移、远处转移等临床病理特征无关. 在高中分化癌中, Lumican癌间质表达与患者临床病理特征无明显相关性(表1).

2.3 高中分化PDA中Lumican过表达与Ki-67、VEGF及突变型P53表达呈负相关 癌组织Ki-67、VEGF及突变型P53阳性表达率在高中分化PDA分别为54.2%、80.6%及94.4%, 在低分化PDA为78.6%、82.1%及96.4%. 低分化癌Ki-67表达阳性率明显高于高中分化癌($P = 0.025$), 而VEGF及突变型P53表达无明显差异($P = 0.456$, $P = 0.804$). 相关性分析显示, 高中分化腺癌中, Lumican癌间质表达强度与Ki-67($r = -0.28$, $P = 0.017$)、VEGF($r = -0.264$, $P = 0.025$)及突变型P53($r = -0.253$, $P = 0.032$)表达均呈负相关, 而在低分化腺癌中未显示明显相关性(表2, 图3).

3 讨论

本研究结果显示, Lumican蛋白在PDA癌间质中过表达, 并且在不同分化程度肿瘤的间质中表达特征存在差异. 在低分化腺癌中, Lumican癌间质过表达与肿瘤不良分期相关, 而在高中分

表 1 Lumican在不同分化胰腺导管腺癌间质中表达与临床病理特征关系

临床病理因素	高中分化(<i>n</i> = 72)			χ^2 值	<i>P</i> 值	低分化(<i>n</i> = 28)			χ^2 值	<i>P</i> 值
	阴性	阳性	强阳性			阴性	阳性	强阳性		
年龄										
<60	5	30	4	0.717	0.699	1	9	2	3.804	0.143
≥60	6	25	2			5	11	0		
性别										
男	7	30	4	0.561	0.755	4	14	1	0.785	1.000
女	4	25	2			2	6	1		
T分期										
T2-3	9	49	6	1.066	0.654	6	16	0	6.446	0.031
T4	2	6	0			0	4	2		
淋巴结转移										
N0	7	40	4	0.422	0.905	4	12	0	2.547	0.318
N1	4	15	2			2	8	2		
远处转移										
M0	11	52	6	0.488	1.000	6	19	2	1.586	1.000
M1	0	3	0			0	1	0		
TNM分期										
I-II	9	46	6	0.806	0.728	6	16	0	6.446	0.031
III-IV	2	9	0			0	4	2		
神经/脉管侵犯										
无	3	21	1	1.423	0.491	3	2	0	4.520	0.077
有	8	34	5			3	18	2		

表 2 肿瘤间质中Lumican与Ki-67、VEGF及P53表达水平相关性分析

检测项目	高中分化(<i>n</i> = 72)				低分化(<i>n</i> = 28)			
	<i>n</i>	%	<i>r</i> 值	<i>P</i> 值	<i>n</i>	%	<i>r</i> 值	<i>P</i> 值
Ki-67								
<5%	33	45.8	-0.280	0.017	6	21.4	0.140	0.478
≥5%	39	54.2			22	78.6		
VEGF								
-	14	19.4	-0.264	0.025	5	17.9	0.180	0.359
+	8	11.1			2	7.1		
++	21	29.2			5	17.9		
+++	29	40.3			16	57.1		
P53								
-	4	5.6	-0.253	0.032	1	3.6	0.091	0.645
+	10	13.8			6	21.4		
++	18	25.0			7	25.0		
+++	40	55.6			14	50.0		

化腺癌中, 则与肿瘤细胞增殖、血管生成等恶性表型相关因素Ki-67、VEGF及突变型P53表达水平呈负相关。

Lumican为分泌型蛋白, 属SLRP家族Ⅱ型成员之一, 定位于染色体12q21.3-q22区, 其核心蛋白分子量为37 kDa, 连接硫酸角质素或聚乙酰氨基乳糖侧链, 可形成相应的蛋白聚糖及糖蛋白结

构^[5]。Lumican在角膜组织、皮肤、肺、肾、脑等多脏器细胞外间质中广泛表达, 其基因同源缺失可导致小鼠眼角膜混浊及皮肤松弛^[14]。胰腺癌中, 肿瘤细胞及间质星形细胞均可表达Lumican蛋白^[8,15,16]。本研究亦显示, Lumican在PDA癌间质中过表达, 且明显高于癌旁非肿瘤胰腺组织。

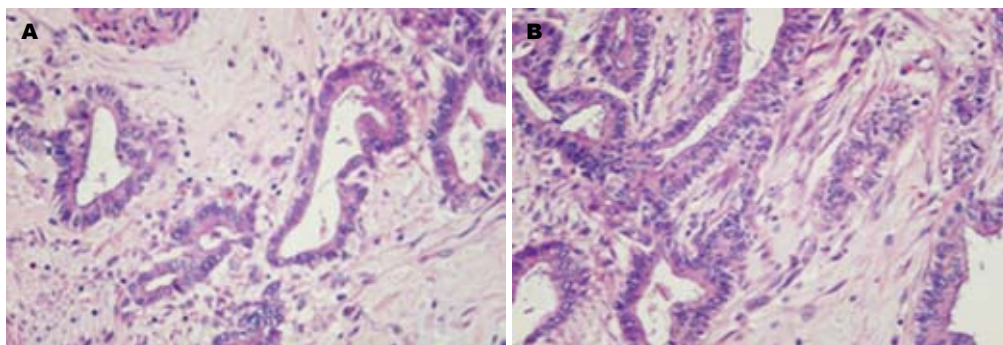
由于Lumican蛋白直接参与细胞外间质的

■创新盘点
除临床病理特征外, 本文进一步研究了在不同分化程度胰腺导管腺癌中, Lumican蛋白与肿瘤Ki-67、VEGF及突变型P53表达相关性。

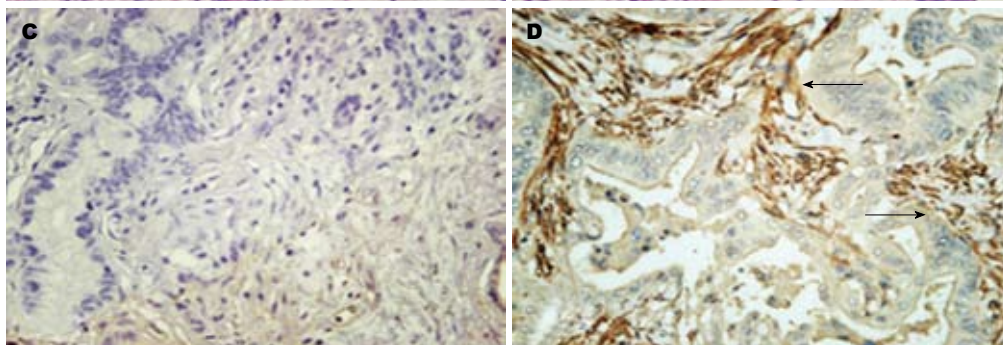
■应用要点

通过对胰腺导管腺癌中Lumican蛋白与肿瘤增殖、血管生成等相关因素分析,为进一步生物学功能研究的提供线索.

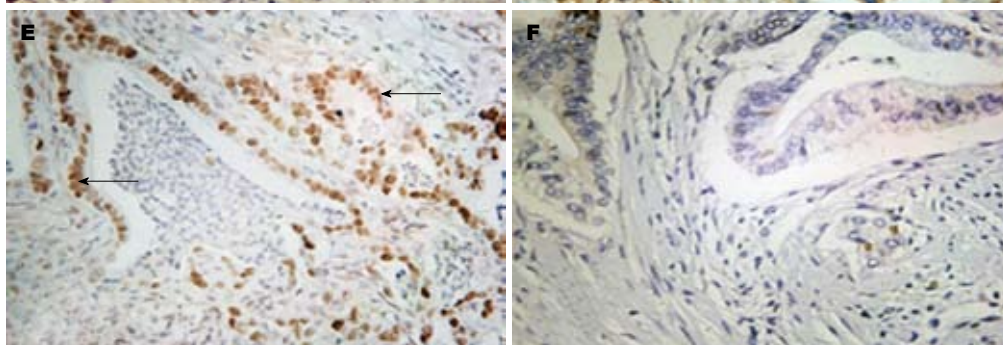
HE染色



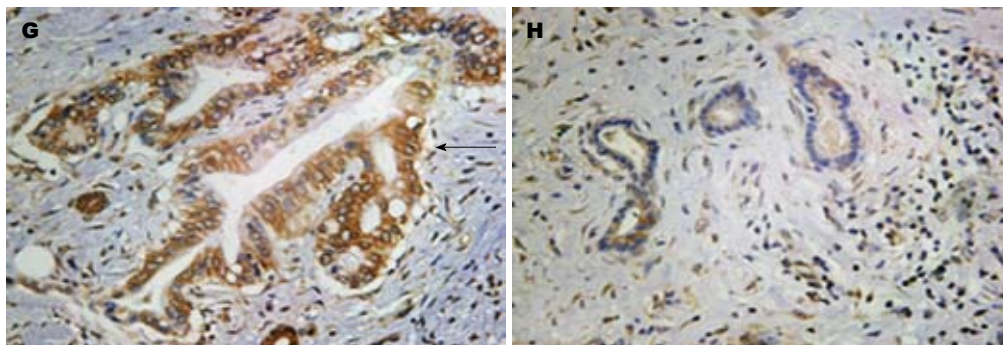
Lumican



Ki-67



VEGF



P53

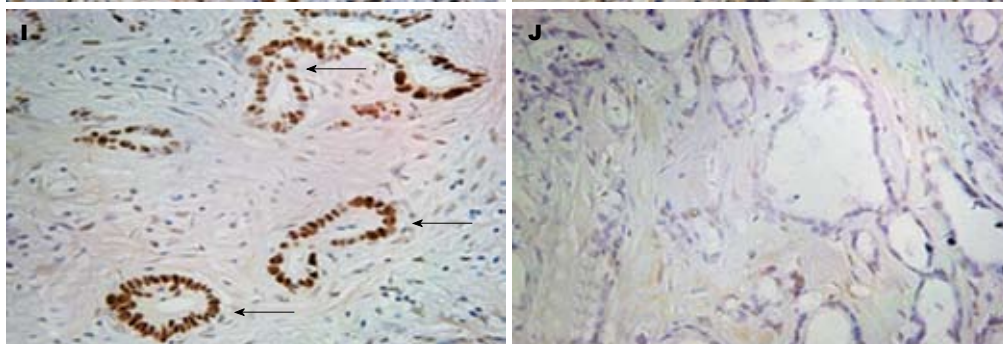


图 3 高中分化癌中Lumican、Ki-67、VEGF及突变型P53表达情况(DAB显色, $\times 200$). 在高中分化PDA中, Lumican蛋白表达与Ki-67、VEGF及突变型P53表达呈负相关. A, B: 高中分化癌组织HE染色; C, E, G, I: 低表达; D, F, H, J: 高表达.

构成,分析其在组织间质中的表达特征能够较准确地反映Lumican蛋白潜在生物学活性. 本研

究结果显示, 低分化PDA癌间质中Lumican蛋白过表达与肿瘤较大及较晚的TNM分期相关。提示Lumican癌间质的异常表达可能促进了低分化癌的恶性表型。Ishiwata等^[8]亦发现胰腺癌间质中Lumican过表达与肿瘤不良分期、后腹膜及十二指肠侵犯等因素相关。在肺鳞状细胞癌中, Lumican在肿瘤间质的过表达则与肿瘤血管侵犯相关^[11]。

Ki-67、VEGF过表达及突变型P53均为胰腺癌患者预后不良相关因素^[17,18], 本研究显示, 在高中分化PDA中, Lumican蛋白间质表达与Ki-67、VEGF过表达及突变型P53呈负相关。既往文献显示了Lumican作为肿瘤抑制相关基因的潜在可能, 体外研究发现, Lumican基因同源缺失小鼠胚胎成纤维细胞增殖能力增强而凋亡减少^[19]; 纤维肉瘤细胞在含Lumican蛋白的培养基中增殖能力下降, 抑癌相关基因p21表达增加^[20]; 小鼠胰腺癌细胞中过表达Lumican蛋白可抑制其体内成瘤能力, 并减少肿瘤血管生成^[21]。Lumican还可抑制内皮细胞增殖、脉管形成及侵袭能力^[22]。结合文献及本研究结果, 提示Lumican蛋白在高中分化PDA癌间质中的过表达亦可能参与抑制了肿瘤细胞增殖及血管生成等。在低分化PDA中, Lumican表达与Ki-67、VEGF过表达及P53突变相关性虽无统计学意义, 但相关系数(r)均为正值, 结合其与肿瘤不良分期的相关性, 提示Lumican与低分化PDA恶性生物学行为的潜在联系。综上所述, Lumican蛋白在不同分化程度PDA癌间质中潜在生物学行为可能不同。在对不同分化程度的人骨肉瘤细胞研究中发现, 敲低Lumican在细胞内表达后, 高分化Saos2细胞增殖能力增强, 而中分化MG-63增殖能力无明显改变^[23]。

造成Lumican蛋白功能差异的原因可能与其本身特征相关, Lumican侧链基团修饰是影响其生物学功能的重要因素之一, 其糖蛋白及蛋白聚糖形式在肿瘤研究中均有报道。胰腺癌细胞株分泌低硫酸角质素修饰的Lumican糖蛋白^[16], 黑色素瘤细胞株WM9及M5则表达硫酸角质素修饰的Lumican蛋白聚糖^[24]。转染外源性Lumican基因至小鼠B16F1黑色素瘤细胞中使Lumican糖蛋白分泌增加, 并抑制B16F1细胞的体内成瘤能力^[25]。然而, Lumican糖蛋白在角膜胚胎发育及促角膜上皮损伤后修复中起重要作用^[5,14]。显示了Lumican蛋白侧链修饰的组织特异性及功能差异, 本研究中, 不同分化程度的

PDA肿瘤间质中Lumican蛋白是否存在侧链修饰的差异, 进而影响其生物学功能尚待明确。

此外, SLRP家族蛋白通过结合细胞膜受体, 调控细胞内信号, 影响正常细胞增殖、分化、细胞黏附及迁徙等生物学行为。在胰腺癌中, Lumican受体及其相关下游信号通路尚未明确。细胞外Lumican蛋白结合至黑色素瘤细胞膜 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白后, 可抑制肿瘤细胞迁移^[26]。而在胰腺癌中, $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白与细胞外基质成分I型胶原蛋白相作用后, 则促进了细胞增殖及侵袭^[27]。

本研究结果提示, Lumican蛋白在PDA中异常表达, 且不同分化的肿瘤、癌间质中Lumican表达特征不同。因此, Lumican在PDA中的生物学功能尚待阐明, 明确其侧链修饰特异性及功能相关信号通路改变, 将有助于揭示其在不同分化PDA中差异表达机制及功能。

4 参考文献

- 1 Zhao P, Dai M, Chen W, Li N. Cancer trends in China. *Jpn J Clin Oncol* 2010; 40: 281-285
- 2 Maitra A, Hruban RH. Pancreatic cancer. *Annu Rev Pathol* 2008; 3: 157-188
- 3 Mihaljevic AL, Michalski CW, Friess H, Kleeff J. Molecular mechanism of pancreatic cancer--understanding proliferation, invasion, and metastasis. *Langenbecks Arch Surg* 2010; 395: 295-308
- 4 Farrow B, Albo D, Berger DH. The role of the tumor microenvironment in the progression of pancreatic cancer. *J Surg Res* 2008; 149: 319-328
- 5 Nikitovic D, Katonis P, Tsatsakis A, Karamanos NK, Tzanakakis GN. Lumican, a small leucine-rich proteoglycan. *IUBMB Life* 2008; 60: 818-823
- 6 Nikitovic D, Berdiaki K, Chalkiadaki G, Karamanos N, Tzanakakis G. The role of SLRP-proteoglycans in osteosarcoma pathogenesis. *Connect Tissue Res* 2008; 49: 235-238
- 7 Bi X, Pohl NM, Qian Z, Yang GR, Gou Y, Guzman G, Kajdacsy-Balla A, Iozzo RV, Yang W. Decorin-mediated inhibition of colorectal cancer growth and migration is associated with E-cadherin in vitro and in mice. *Carcinogenesis* 2012; 33: 326-330
- 8 Ishiwata T, Cho K, Kawahara K, Yamamoto T, Fujiwara Y, Uchida E, Tajiri T, Naito Z. Role of lumican in cancer cells and adjacent stromal tissues in human pancreatic cancer. *Oncol Rep* 2007; 18: 537-543
- 9 Troup S, Njue C, Kliever EV, Parisien M, Roskelley C, Chakravarti S, Roughley PJ, Murphy LC, Watson PH. Reduced expression of the small leucine-rich proteoglycans, lumican, and decorin is associated with poor outcome in node-negative invasive breast cancer. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 207-214
- 10 Seya T, Tanaka N, Shinji S, Yokoi K, Koizumi M, Teranishi N, Yamashita K, Tajiri T, Ishiwata T, Naito Z. Lumican expression in advanced colorectal cancer with nodal metastasis correlates with poor prognosis. *Oncol Rep* 2006; 16: 1225-1230
- 11 Matsuda Y, Yamamoto T, Kudo M, Kawahara K, Kawamoto M, Nakajima Y, Koizumi K, Nakazawa N, Ishiwata T, Naito Z. Expression and roles of lu-

■同行评价

本研究内容较新, 并对其在高中分化和低分化胰腺癌组织中的表达特征进行分析, 论述思路清晰, 语言较流畅。

- mican in lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. *Int J Oncol* 2008; 33: 1177-1185
- 12 Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* 1994; 54: 4855-4878
 - 13 Bilimoria KY, Bentrem DJ, Ko CY, Ritchey J, Stewart AK, Winchester DP, Talamonti MS. Validation of the 6th edition AJCC Pancreatic Cancer Staging System: report from the National Cancer Database. *Cancer* 2007; 110: 738-744
 - 14 Naito Z. Role of the small leucine-rich proteoglycan (SLRP) family in pathological lesions and cancer cell growth. *J Nihon Med Sch* 2005; 72: 137-145
 - 15 Köninger J, Giese T, di Mola FF, Wente MN, Esposito I, Bachem MG, Giese NA, Büchler MW, Friess H. Pancreatic tumor cells influence the composition of the extracellular matrix. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 322: 943-949
 - 16 Ping Lu Y, Ishiwata T, Asano G. Lumican expression in alpha cells of islets in pancreas and pancreatic cancer cells. *J Pathol* 2002; 196: 324-330
 - 17 Garcea G, Neal CP, Pattenden CJ, Steward WP, Berry DP. Molecular prognostic markers in pancreatic cancer: a systematic review. *Eur J Cancer* 2005; 41: 2213-2236
 - 18 Ai KX, Lu LY, Huang XY, Chen W, Zhang HZ. Prognostic significance of S100A4 and vascular endothelial growth factor expression in pancreatic cancer. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 1931-1935
 - 19 Vij N, Roberts L, Joyce S, Chakravarti S. Lumican suppresses cell proliferation and aids Fas-Fas ligand mediated apoptosis: implications in the cornea. *Exp Eye Res* 2004; 78: 957-971
 - 20 Iozzo RV, Schaefer L. Proteoglycans in health and disease: novel regulatory signaling mechanisms evoked by the small leucine-rich proteoglycans. *FEBS J* 2010; 277: 3864-3875
 - 21 Williams KE, Fulford LA, Albig AR. Lumican reduces tumor growth via induction of fas-mediated endothelial cell apoptosis. *Cancer Microenviron* 2010; 4: 115-126
 - 22 Albig AR, Roy TG, Becenti DJ, Schiemann WP. Transcriptome analysis of endothelial cell gene expression induced by growth on matrigel matrices: identification and characterization of MAGP-2 and lumican as novel regulators of angiogenesis. *Angiogenesis* 2007; 10: 197-216
 - 23 Nikitovic D, Berdiaki A, Zafiropoulos A, Katonis P, Tsatsakis A, Karamanos NK, Tzanakakis GN. Lumican expression is positively correlated with the differentiation and negatively with the growth of human osteosarcoma cells. *FEBS J* 2008; 275: 350-361
 - 24 Sifaki M, Assouti M, Nikitovic D, Krasagakis K, Karamanos NK, Tzanakakis GN. Lumican, a small leucine-rich proteoglycan substituted with keratan sulfate chains is expressed and secreted by human melanoma cells and not normal melanocytes. *IUBMB Life* 2006; 58: 606-610
 - 25 Vuillermoz B, Khoruzhenko A, D'Onofrio MF, Ramont L, Venteo L, Perreau C, Antonicelli F, Maquart FX, Wegrowski Y. The small leucine-rich proteoglycan lumican inhibits melanoma progression. *Exp Cell Res* 2004; 296: 294-306
 - 26 Zeltz C, Brézillon S, Kämpylä J, Eble JA, Bobichon H, Terryn C, Perreau C, Franz CM, Heino J, Maquart FX, Wegrowski Y. Lumican inhibits cell migration through $\alpha 2 \beta 1$ integrin. *Exp Cell Res* 2010; 316: 2922-2931
 - 27 Grzesiak JJ, Bouvet M. The $\alpha 2 \beta 1$ integrin mediates the malignant phenotype on type I collagen in pancreatic cancer cell lines. *Br J Cancer* 2006; 94: 1311-1319

编辑 曹丽鸥 电编 闫晋利

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

• 消息 •

2011 年度《世界华人消化杂志》发文情况

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

盆底失弛缓综合征患者盆底表面肌电的改变及临床意义

薛雅红, 丁曙晴, 丁义江, 张勇, 曾宪东, 钱雄杰, 刘峰, 王静

薛雅红, 丁曙晴, 丁义江, 王静, 南京中医药大学第三附属医院全国肛肠医疗中心 江苏省南京市 210001

张勇, 曾宪东, 沈阳市肛肠医院 辽宁省沈阳市 110000

钱雄杰, 刘峰, 湖州肛肠医院 浙江省湖州市 313000

薛雅红, 硕士, 主要从事肛肠疾病的研究。

江苏省科教“兴卫工程”临床医学中心开放课题基金资助项目, Nos. KF200908, KF200907

作者贡献分布: 此课题由丁曙晴、丁义江、曾宪东、钱雄杰、张勇及薛雅红共同设计; 研究过程及数据采集由丁曙晴、薛雅红、曾宪东、张勇、钱雄杰、刘峰及王静操作完成; 数据统计分析由薛雅红完成; 本论文写作由薛雅红、丁曙晴及丁义江完成。

通讯作者: 丁曙晴, 副教授, 副主任医师, 210001, 江苏省南京市金陵路1号, 南京中医药大学第三附属医院. njgczx@gmail.com
电话: 025-52276742 传真: 025-52276742

收稿日期: 2012-01-29 修回日期: 2012-03-13

接受日期: 2012-03-25 在线出版日期: 2012-04-28

Clinical significance of pelvic floor surface electromyographic changes in patients with pelvic floor dyssynergia

Ya-Hong Xue, Shu-Qing Ding, Yi-Jiang Ding, Yong Zhang, Xian-Dong Zeng, Xiong-Jie Qian, Feng Liu, Jing Wang

Ya-Hong Xue, Shu-Qing Ding, Yi-Jiang Ding, Jing Wang, National Colorectal Treatment Center of Chinese Medicine, the Third Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210001, Jiangsu Province, China

Yong Zhang, Xian-Dong Zeng, Anorectal Hospital of Shenyang, Shenyang 110000, Liaoning Province, China
Xiong-Jie Qian, Feng Liu, Anorectal Hospital of Huzhou, Huzhou 313000, Zhejiang Province, China

Supported by: the Open Fund of Clinical Medicine Center of Science and Education Department of Jiangsu Province, Nos. KF200908 and KF200907

Correspondence to: Shu-Qing Ding, Associate Professor, the Third Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, 1 Jinling Road, Nanjing 210001, Jiangsu Province, China. njgczx@gmail.com

Received: 2012-01-29 Revised: 2012-03-13

Accepted: 2012-03-25 Published online: 2012-04-28

Abstract

AIM: To evaluate the clinical significance of changes in pelvic floor surface electromyographic parameters in patients with pelvic floor dyssynergia.

METHODS: Seventy-three patients with pelvic floor dyssynergia and 80 healthy volunteers

were enrolled. Electromyographic parameters including amplitude, coefficient of variance (CV), onset time and median frequency (MF) in resting and contraction states were acquired by using the Glazer's protocol for pelvic floor surface electromyography.

RESULTS: Compared to the control group, the pelvic floor dyssynergia group had a higher amplitude during pre-baseline step (4.93 ± 3.01 vs 3.80 ± 1.97 , $P < 0.05$), CV during tonic step (0.38 ± 0.13 vs 0.31 ± 0.11 , $P < 0.05$), and CV during endurance step (0.35 ± 0.14 vs 0.28 ± 0.10 , $P < 0.05$), as well as a lower contraction amplitude during flick step (59.15 ± 28.14 vs 69.95 ± 31.05 , $P < 0.05$). A positive correlation was found between CV during tonic and endurance steps and age of patients (both $P < 0.05$).

CONCLUSION: Monitoring changes in pelvic floor surface electromyographic parameters may provide some clues to the diagnosis and treatment of pelvic floor dyssynergia.

Key Words: Pelvic floor dyssynergia; Pelvic floor; Surface electromyography

Xue YH, Ding SQ, Ding YJ, Zhang Y, Zeng XD, Qian XJ, Liu F, Wang J. Clinical significance of pelvic floor surface electromyographic changes in patients with pelvic floor dyssynergia. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(12): 1025-1029

摘要

目的: 探讨盆底失弛缓患者盆底表面肌电的特征。

方法: 盆底失弛缓综合征患者73例, 其中男31例, 女42例, 年龄18-40岁, 平均 28.04 ± 5.83 岁; 正常志愿者80例, 其中男31例, 女49例, 年龄21-40岁, 平均 27.20 ± 4.28 岁。采用Glazer盆底表面肌电评估方案采集2组表面肌电值, 分析比较静息状态的肌电波幅、变异系数和不同收缩状态下的肌电波幅、变异系数、收缩反应时间及中值频率。

结果: 与正常人群相比, 盆底失弛缓患者前基

■背景资料

盆底失弛缓综合征是功能性便秘中常见的一种类型, 指盆底肌反射性或随意性异常而引起的一组症候群, 临床主要表现为排便费时费力、肛门梗阻感和排便不尽感。本病多由于排便时盆底肌不恰当的收缩或放松引起。

■同行评议者

周士胜, 教授, 大连大学医学院医学研究中心

■创新盘点

国外对盆底表面肌电的研究多采用经阴道,只适用于女性,而本研究探讨了经肛盆底表面肌电,应用范围更广泛,同时在评估后盆盆底肌(肛门括约肌)功能上更有优势,有效地指导出口梗阻型便秘、大便失禁、肛门直肠痛的诊断和治疗。

线阶段静息波幅明显升高(4.93 ± 3.01 vs 3.80 ± 1.97 , $P < 0.05$);快速收缩阶段最大收缩波幅低(59.15 ± 28.14 vs 69.95 ± 31.05 , $P < 0.05$);持续收缩阶段变异系数升高(0.38 ± 0.13 vs 0.31 ± 0.11 , $P < 0.05$);耐久收缩阶段变异系数也明显升高(0.35 ± 0.14 vs 0.28 ± 0.10 , $P < 0.05$);不同性别盆底失弛缓患者各指标间无差异。同时,持续及耐久收缩阶段的变异系数与患者年龄呈正相关($P < 0.05$)。

结论:初步获得了盆底失弛缓患者盆底表面肌电值的特征,有利于指导临床诊断和治疗。

关键词:盆底失弛缓;盆底;表面肌电

薛雅红, 丁曙晴, 丁义江, 张勇, 曾宪东, 钱雄杰, 刘峰, 王静. 盆底失弛缓综合征患者盆底表面肌电的改变及临床意义. 世界华人消化杂志 2012; 20(12): 1025-1029

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1025.asp>

0 引言

盆底失弛缓综合征是功能性便秘中常见的一种类型,指盆底肌反射性或随意性异常而引起的一组症候群,临床主要表现是排便费时费力、肛门梗阻感和排便不尽感^[1]。本病多由于排便时盆底肌不恰当的收缩或放松引起^[2]。盆底表面肌电(pelvic floor sEMG)是采用经肛门/阴道电极记录盆底横纹肌潜在运动电位,分析肌电的波幅、变异性、运动肌纤维类型等来诊断和评估盆底肌功能异常。本文探讨了盆底失弛缓综合征患者盆底表面肌电的特征,用于指导临床诊断和生物反馈的治疗。

1 材料和方法

1.1 材料 选取2009-07/2011-05南京市中医院肛肠科盆底中心盆底失弛缓综合征患者73例,其中男31例,女42例,年龄18-40岁,平均 28.04 ± 5.83 岁。所有患者符合以下入选标准:(1)符合功能性便秘罗马III诊断标准;(2)显著症状:过度用力排便,越用力粪便排出越困难,肛门梗阻感和排便不尽感;(3)肛门指检:肛管张力较高,模拟排便动作时肛管不松弛反而收缩,肛直角变小或不变;(4)辅助检查:肛管直肠测压显示排便弛缓反射异常,排粪造影显示力排相肛直角不变或变小。同时需排除伴有直肠前突、直肠黏膜脱垂、直肠黏膜内套叠、会阴下降等盆底松弛表现者。同期采用多中心研究招募正常志愿者80例,分别为南京市中医院40例,沈阳肛肠医院

20例,湖州肛肠医院20例,其中男31例,女49例,年龄21-40岁,平均 27.20 ± 4.28 岁。所有正常志愿者签署知情同意书,取得所在医院伦理委员会的批准,同时排除以下标准:(1)盆底器质性及功能障碍性疾病者(包括泌尿、妇科、肛肠);(2)骨盆、脊髓外伤者;(3)妊娠、哺乳期及月经期妇女;(4)有精神心理障碍不能配合检查者。

生物反馈治疗仪(加拿大Thought -Technology公司, MyoTrac Infinity),其中带有Glazer盆底表面肌电评估方案软件。

1.2 方法

1.2.1 体位:取斜躺仰卧位120度,整个身体放松,双脚分开,与肩等宽,臀部旋转脚尖向外60度。

1.2.2 电极:采用经肛门表面肌电电极。

1.2.3 Glazer盆底表面肌电评估方案实施过程及检测指标:(1)前基线:休息1 min,检测波幅、变异系数(变异系数 = 标准差/均值,下同);(2)快速收缩:进行5次快速收缩,每次收缩之间有10 s休息,检测收缩反应时间,最大收缩波幅;(3)持续收缩:放松10 s-持续收缩10 s,共5次,检测收缩波幅、变异系数、中值频率;(4)耐久收缩:持续1 min收缩,检测收缩波幅、变异系数、中值频率;(5)后基线:再次1 min休息,检测波幅、变异系数。

1.2.4 注意事项:检测前医师详细介绍Glazer评估方法,包括检查目的、步骤要领、注意事项;移除被检测者身上的电子物件以免影响肌电信号,并让其自行插入电极,电极顶部不可用石蜡油等油性物质;做收缩动作时只运动盆底肌,辅助肌(臀肌、腹肌、四肢肌肉)不参与收缩。

统计学处理 采用SPSS16.0软件进行数据录入及统计分析,成组设计资料差异统计学意义比较,符合正态分布采用 t 检验,不符则采用非参数检验;相关性分析采用Pearson相关分析方法, $P < 0.05$ 表示有显著性差异。

2 结果

2.1 盆底失弛缓综合征患者盆底表面肌电特征 Glazer盆底表面肌电评估方案实施过程如图1。前基线阶段,盆底失弛缓患者静息波幅大于正常组,有显著性差异($P < 0.05$);快速收缩阶段,盆底失弛缓患者最大收缩波幅小于正常组,有显著性差异($P < 0.05$);持续收缩及耐久收缩阶段,盆底失弛缓患者变异系数大于正常组,有显著性差异($P < 0.05$,表1)。

2.2 盆底失弛缓综合征患者不同性别盆底表面

表 1 盆底失弛缓患者与正常人群盆底表面肌电的比较 (mean \pm SD)

检测阶段	检测指标	盆底失弛缓组($n = 73$)	正常组($n = 80$)	t 值	P 值
前基线	波幅(μV)	4.93 \pm 3.01	3.80 \pm 1.97	2.723	0.007
	变异系数	0.18 \pm 0.07	0.19 \pm 0.05	0.860	0.391
快速收缩	收缩反应时间(s)	1.85 \pm 0.39	1.91 \pm 0.40	0.953	0.342
	最大收缩波幅(μV)	59.15 \pm 28.14	69.95 \pm 31.05	2.245	0.026
持续收缩	收缩波幅(μV)	27.13 \pm 16.49	31.41 \pm 16.34	1.607	0.110
	变异系数	0.38 \pm 0.13	0.31 \pm 0.11	3.147	0.002
耐久收缩	中值频率(Hz)	86.83 \pm 18.25	85.44 \pm 10.44	0.581	0.562
	收缩波幅(μV)	24.05 \pm 14.58	23.85 \pm 11.65	0.092	0.927
	变异系数	0.35 \pm 0.14	0.28 \pm 0.10	4.094	0.000
后基线	中值频率(Hz)	85.53 \pm 19.81	86.29 \pm 11.36	0.292	0.771
	波幅(μV)	4.50 \pm 2.49	4.21 \pm 2.27	0.766	0.445
	变异系数	0.22 \pm 0.11	0.23 \pm 0.17	0.222	0.824

■应用要点

盆底表面肌电不仅可以作为诊断方法,更重要的是能指导生物反馈治疗方案的优选,进行疗效评估。

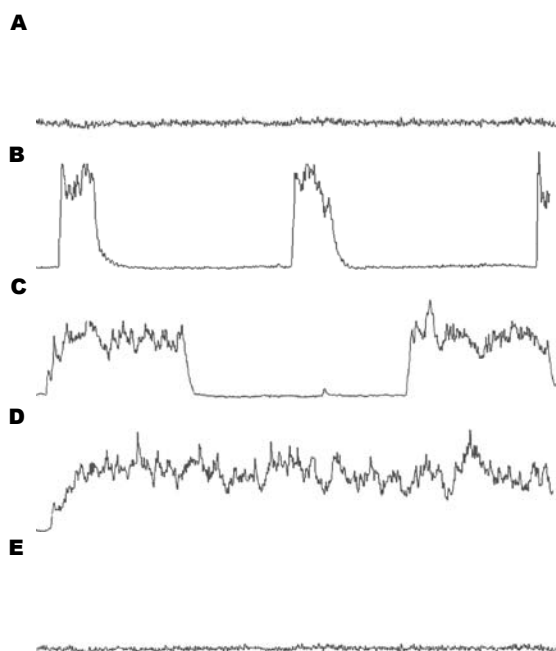


图 1 Glazer盆底表面肌电评估方案. A: 前基线; B: 快速收缩; C: 持续收缩; D: 耐久收缩; E: 后基线。

肌电值的比较 不同性别盆底失弛缓患者各测试阶段的盆底表面肌电指标均未见有差异(表2)。

2.3 盆底失弛缓综合征患者年龄与盆底表面肌电值的相关性 持续收缩和耐久收缩阶段的变异性与年龄呈正相关,有显著性差异($P < 0.05$, 表3)。

3 讨论

正常排便时当腹内压和直肠内压增加,肛门外括约肌、耻骨直肠肌和肛管内括约肌等处于松弛状态,肛直角增大,粪便排出;而盆底失弛缓综合征患者表现出盆底肌群的矛盾运动,使直肠肛管间不能形成有效压力梯度,是盆底肌功能障碍的一种表现。表面肌电能预测肌纤维的

类型,实时、准确和在非损伤状态下反映肌肉活动状态和功能状态^[3]。研究已经证实盆底表面肌电的可靠性和有效性,他能准确评估健康者静息和不同收缩状态盆底肌的功能^[4,5]。来自纽约康奈尔医学院的Glazer教授自1995年开始对盆底功能障碍患者表面肌电数据进行分析^[6],2005年^[7]提出盆底表面肌电评估方案(Glazer protocol),已广泛用于女性阴道痛、外阴前庭炎、男性慢性盆底痛综合征的诊断和治疗^[8-10]。在此方案中,主要测量盆底肌静息和收缩状态下的波幅、变异系数、收缩反应时间及中值频率。波幅属于表面肌电的时域分析,静息波幅指肌肉活动之前能量消耗的水平,是肌肉功能障碍的显著标志,波幅升高表示盆底肌处于过度活动的状态^[11,12];收缩波幅的不同代表参与收缩的肌纤维的数量不同,快速收缩时主要与快型肌纤维所占的比例呈正相关^[13],保持收缩时同时需要慢型肌的募集;中值频率属于表面肌电的频域分析,主要受肌肉组织中的快肌纤维和慢肌纤维的组成比例的影响,与慢型纤维比例的呈线性负相关,或与快型肌纤维比例呈正相关^[14],是临床判别肌肉活动时疲劳度的常用指标^[15]。快速收缩反应时间主要与快型肌功能相关。变异系数是反应快、慢型肌运动是否协调的指标,用来代表肌肉运动的稳定性^[16]。

在前基线阶段,盆底失弛缓患者静息波幅大于正常组,说明盆底失弛缓患者静息状态参与活动的肌纤维单位数量多,处于肌电过度活跃的状态;在快速收缩阶段,其最大收缩波幅小于正常组,说明快速收缩时主要是快型肌不能充分募集,功能较差;持续收缩及耐久收缩阶段,盆底失弛缓患者变异系数大于正常组,说明在

■名词解释

盆底肌纤维: 包括 I 型肌和 II 型肌, I 型肌为需氧的慢反应型肌, 耐疲劳, 主要完成支持功能; II 型为厌氧的快反应型肌, 不耐疲劳, 主要完成性功能; 混合型肌由两者共同组成, 主要完成括约功能。

表 2 盆底失弛缓患者不同性别盆底表面肌电值比较 (mean \pm SD)

检测阶段	检测指标	男(n = 31)	女(n = 42)	值	P值
前基线	波幅(μ V)	5.03 \pm 3.01	4.85 \pm 3.04	0.254	0.800
	变异系数	0.20 \pm 0.08	0.17 \pm 0.06	1.433	0.156
快速收缩	收缩反应时间(s)	1.91 \pm 0.40	1.80 \pm 0.38	1.271	0.208
	最大收缩波幅(μ V)	64.33 \pm 30.96	55.34 \pm 25.56	1.357	0.179
持续收缩	收缩波幅(μ V)	31.51 \pm 20.46	23.90 \pm 12.08	1.847	0.071
	变异系数	0.38 \pm 0.15	0.37 \pm 0.12	0.062	0.951
耐久收缩	中值频率(Hz)	91.70 \pm 25.77	83.23 \pm 8.24	1.765	0.086
	收缩波幅(μ V)	25.89 \pm 16.79	22.69 \pm 12.74	0.926	0.358
	变异系数	0.37 \pm 0.16	0.35 \pm 0.12	0.632	0.529
后基线	中值频率(Hz)	90.64 \pm 27.65	81.76 \pm 9.77	1.712	0.096
	波幅(μ V)	4.79 \pm 2.39	4.29 \pm 2.58	0.844	0.401
	变异系数	0.22 \pm 0.08	0.23 \pm 0.13	0.381	0.704

表 3 盆底失弛缓患者年龄与盆底表面肌电值的相关性

检测阶段	检测指标	r值	P值
前基线	波幅(μ V)	-0.229	0.051
	变异系数	-0.213	0.071
快速收缩	收缩反应时间(s)	-0.016	0.891
	最大收缩波幅(μ V)	0.003	0.981
持续收缩	收缩波幅(μ V)	-0.162	0.170
	变异系数	0.359	0.002
耐久收缩	中值频率(Hz)	0.029	0.808
	收缩波幅(μ V)	-0.131	0.271
	变异系数	0.274	0.019
后基线	中值频率(Hz)	0.080	0.500
	波幅(μ V)	-0.108	0.361
	变异系数	-0.109	0.359

保持收缩时盆底失弛缓患者快、慢型肌协调性差, 代表了盆底肌的不稳定。此外, 持续收缩和耐久收缩阶段的变异性与年龄呈正相关, 说明随着年龄的增加, 盆底失弛缓患者肌肉运动的协调性越来越差。一般来讲, 在动态采样过程中(收缩状态)肌电信号的募集水平随年龄的增大而降低^[17]。因此, 盆底失弛缓患者盆底肌功能障碍主要表现在以下3点: 静息状态盆底肌过度活动, 快型肌募集功能差, 盆底肌运动不协调。这与国外关于盆底痛表面肌电的研究结果相似, 外阴痛、膀胱疼痛综合征及肛门直肠痛患者表现为静息波幅高, 收缩波幅低, 稳定性差, 这是盆底肌慢性过度活动引起肌肉疲劳的典型标志^[18,19]。国内也有学者研究盆底失弛缓患者肛门括约肌肌电情况, 指出肛门括约肌高静息电位及其矛盾运动是盆底失弛缓的主要发病机制^[20]。

生物反馈(Biofeedback, BF)是治疗盆底功能

障碍性疾病的主要方法, 广泛应用于尿失禁、大便失禁、出口梗阻型便秘、盆底痛等的治疗。现代基于盆底表面肌电的生物反馈技术在盆底肌的再训练和康复方面起着关键作用, 训练患者准确地募集盆底肌, 进行合理的盆底肌训练, 同时具有无创、不良反应小、可反复治疗等优点^[21]。研究盆底表面肌电, 重要的是他能够指导盆底生物反馈方案的实施及监测治疗效果^[22]。如在治疗女性尿失禁方面, 根据盆底表面肌电值能选择最合理的生物反馈治疗方案, 明显提高盆底肌耐力, 改善症状和提高生活质量^[23,24]; 采用生物反馈治疗功能性肛门直肠痛、外阴痛、外阴前庭炎等盆底痛疾病, 根据表面肌电值进行放松训练、协调性训练等, 能明显改善盆底肌过度活跃状态、提高肌肉稳定性, 远期疗效显著^[25-27]。根据多项大样本随机对照研究显示, BF是治疗盆底失弛缓综合征的首选方法, 其治疗不协调性排便障碍的证据水平和推荐等级为 I A^[28]。BF主要通过神经肌肉训练纠正排便时腹部、肛门直肠肌肉的不协调运动, 同时改善患者的直肠感觉功能, 其治疗盆底失弛缓有效率在70.0%-81.5%^[29]。研究证实, 生物反馈训练能降低便秘患者静息状态下肌电幅值, 同时纠正盆底肌矛盾运动, 改善临床症状^[30]。根据盆底失弛缓表面肌电特征, 生物反馈训练主要包括3个方面: 放松训练、力量训练和协调性训练。临床训练的重点在于降低过度活动的盆底肌和提高肌肉的稳定, 因为在采用表面肌电评估盆底肌功能时, 静息波幅和肌肉稳定性比收缩波幅更可靠、合理^[6]。因此, 治疗前需向患者详细说明表面肌电评估指标的意义, 指导患者快速收缩时正确募集快型肌, 而持续和耐久收缩时正确募

集慢型肌, 主要训练慢型肌的稳定性。

总之, 本研究初次探讨了盆底失弛缓患者表面肌电的特征, 为临床诊断和生物反馈治疗提供了参考依据。但研究对象样本量有限, 同时在研究对象性别、年龄选取等方面存在一定的偏倚, 这些均有待于今后扩大多中心, 增加样本量来进一步研究。

4 参考文献

- 1 丁曙晴. 盆底失弛缓综合征所致便秘的诊治难点和策略. 临床外科杂志 2011; 19: 220-222.
- 2 Pourmomeny AA, Emami MH, Amooshahi M, Adibi P. Comparing the efficacy of biofeedback and balloon-assisted training in the treatment of dyssynergic defecation. *Can J Gastroenterol* 2011; 25: 89-92
- 3 吴冬梅, 孙欣, 张志成, 杜志江. 表面肌电信号的分析 and 特征提取. 中国组织工程研究与临床康复 2010; 14: 8073-8076
- 4 Grape HH, Dederling A, Jonasson AF. Retest reliability of surface electromyography on the pelvic floor muscles. *Neurourol Urodyn* 2009; 28: 395-399
- 5 Glazer HI, Romanzi L, Polaneczky M. Pelvic floor muscle surface electromyography. Reliability and clinical predictive validity. *J Reprod Med* 1999; 44: 779-782
- 6 Glazer HI, Rodke G, Swencionis C, Hertz R, Young AW. Treatment of vulvar vestibulitis syndrome with electromyographic biofeedback of pelvic floor musculature. *J Reprod Med* 1995; 40: 283-290
- 7 Glazer HI. Biofeedback vs electrophysiology. *Rehab Manag* 2005; 18: 32-34
- 8 Glazer HI, Marinoff SC, Sleight IJ. Web-enabled Glazer surface electromyographic protocol for the remote, real-time assessment and rehabilitation of pelvic floor dysfunction in vulvar vestibulitis syndrome. A case report. *J Reprod Med* 2002; 47: 728-730
- 9 White G, Jantos M, Glazer H. Establishing the diagnosis of vulvar vestibulitis. *J Reprod Med* 1997; 42: 157-160
- 10 Engman M, Lindehammar H, Wijma B. Surface electromyography diagnostics in women with partial vaginismus with or without vulvar vestibulitis and in asymptomatic women. *J Psychosom Obstet Gynaecol* 2004; 25: 281-294
- 11 Santoro GA, Wieczorek AP, Bartram CI. Pelvic Floor Disorders. 1st ed. Italy: Springer Verlag, 2010: 602-603
- 12 Gentilcore-Saulnier E, McLean L, Goldfinger C, Pukall CF, Chamberlain S. Pelvic floor muscle assessment outcomes in women with and without provoked vestibulodynia and the impact of a physical therapy program. *J Sex Med* 2010; 7: 1003-1022
- 13 余洪俊. 表面肌电图评价肌肉的功能状况. 中国临床康复 2002; 6: 3514-3515
- 14 王健. sEMG信号分析及其应用研究进展. 体育科学 2000; 20: 56-60
- 15 穆景颂, 倪朝民. 下背痛表面肌电的应用研究. 安徽医学 2010; 31: 287-289
- 16 Hetrick DC, Glazer H, Liu YW, Turner JA, Frest M, Berger RE. Pelvic floor electromyography in men with chronic pelvic pain syndrome: a case-control study. *Neurourol Urodyn* 2006; 25: 46-49
- 17 郑洁皎, 胡佑红, 俞卓伟. 表面肌电图在神经肌肉功能评定中的应用. 中国康复理论与实践 2007; 13: 741-742
- 18 Glazer HI, Jantos M, Hartmann EH, Swencionis C. Electromyographic comparisons of the pelvic floor in women with dysesthetic vulvodynia and asymptomatic women. *J Reprod Med* 1998; 43: 959-962
- 19 Hull TL, Milsom JW, Church J, Oakley J, Lavery I, Fazio V. Electrogalvanic stimulation for levator syndrome: how effective is it in the long-term? *Dis Colon Rectum* 1993; 36: 731-733
- 20 肖元宏, 刘洲禄, 刘贵麟, 彭少林, 王政, 彭正, 臧传波, 夏少友, 张艳君. 成人盆底痉挛综合征型便秘的分型及其病理生理机制. 世界华人消化杂志 2007; 15: 767-771
- 21 丁曙晴, 丁义江. 盆底表面肌电生物反馈在出口梗阻性便秘诊治中的应用. 中华物理与康复医学杂志 2009; 31: 349-350
- 22 丁曙晴. 表面肌电介导盆底生物反馈的发展. 临床外科杂志 2009; 17: 224-225
- 23 Jahr S, Gauruder-Burmester A, Tunn R, ReiBbauer A. Role of Pelvic Floor Intravaginal Surface EMG in the Diagnosis and Therapy of Female Urinary Incontinence. *Phys Med Rehab Kuror* 2005; 15: 20-26
- 24 Rett MT, Simoes JA, Herrmann V, Pinto CL, Marques AA, Morais SS. Management of stress urinary incontinence with surface electromyography-assisted biofeedback in women of reproductive age. *Phys Ther* 2007; 87: 136-142
- 25 薛雅红, 丁曙晴, 丁义江, 王岚. 生物反馈结合针刺治疗功能性肛门直肠痛40例临床疗效分析. 腹部外科 2011; 24: 174-176
- 26 Glazer HI. Dysesthetic vulvodynia. Long-term follow-up after treatment with surface electromyography-assisted pelvic floor muscle rehabilitation. *J Reprod Med* 2000; 45: 798-802
- 27 McKay E, Kaufman RH, Doctor U, Berkova Z, Glazer H, Redko V. Treating vulvar vestibulitis with electromyographic biofeedback of pelvic floor musculature. *J Reprod Med* 2001; 46: 337-342
- 28 Rao SS. Constipation: evaluation and treatment of colonic and anorectal motility disorders. *Gastroenterol Clin North Am* 2007; 36: 687-711, x
- 29 Rao SS. Biofeedback therapy for constipation in adults. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2011; 25: 159-166
- 30 杨柳明, 林济宝, 赵延龙, 梁绛菱, 林红, 钟智, 陈荣伟, 谢俊芳, 刘付妍, 吴志荣. 慢性功能性便秘肛直肠压力检测EMG生物反馈训练的疗效. 世界华人消化杂志 2004; 12: 730-733

■同行评价

本研究对临床上诊断和治疗盆底失弛缓综合征具有较好的参考价值 and 指导意义。

编辑 张姗姗 电编 闫晋利

肝小静脉闭塞病的临床现状及研究进展

彭 俏, 贺德志, 李建生

■背景资料

肝小静脉闭塞病(hepatic veno-occlusive disease, HVOD)是造血干细胞移植的主要并发症之一。目前该病的预防和治疗缺乏成熟方案,各种药物都需要进一步试验证实其疗效,其中去纤苷疗效最确切,其研究最为深入,即将进入Ⅲ期临床试验。

彭俏, 贺德志, 李建生, 郑州大学第一附属医院消化内科 河南省郑州市 450052

彭俏, 硕士, 主要研究方向是消化系统肿瘤。

作者贡献分布: 本综述由彭俏完成; 贺德志与李建生审校。

通讯作者: 李建生, 教授, 主任医师, 450052, 河南省郑州市, 郑州大学第一附属医院消化内科。lijiansheng@medmail.com.cn 电话: 0371-66295922

收稿日期: 2012-02-10 修回日期: 2012-03-14

接受日期: 2012-03-28 在线出版日期: 2012-04-28

Clinical research of hepatic veno-occlusive disease: current status and future prospects

Qiao Peng, De-Zhi He, Jian-Sheng Li

Qiao Peng, De-Zhi He, Jian-Sheng Li, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China
Correspondence to: Jian-Sheng Li, Professor, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China. lijiansheng@medmail.com.cn
Received: 2012-02-10 Revised: 2012-03-14
Accepted: 2012-03-28 Published online: 2012-04-28

Abstract

Hepatic veno-occlusive disease (HVOD) is one of the main complications of hematopoietic stem cell transplantation (HSCT). Its pathogenesis is mainly associated with a local hypercoagulable state, and the main pathological changes are occlusion of terminal hepatic venules and necrosis of liver cells. The diagnosis of HVOD depends on a liver biopsy. Identifying and avoiding the risk factors are main measures to reduce the incidence and mortality of HVOD, since drug prophylaxis lacks exact effect and has significant adverse reactions. Defibrotide is the most effective therapy for HVOD, while the efficacy of other drugs still needs to be verified. In this paper, we will review the current status and future prospects of clinical research of HVOD.

Key Words: Hepatic veno-occlusive disease; Prophylaxis; Therapy; Defibrotide

Peng Q, He DZ, Li JS. Clinical research of hepatic veno-

occlusive disease: current status and future prospects. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(12): 1030-1035

摘要

肝小静脉闭塞病(hepatic veno-occlusive disease, HVOD)是造血干细胞移植(hematopoietic stem cell transplantation, HSCT)的主要并发症之一。其发病机制主要是局部高凝状态,主要病理改变是终末肝小静脉的闭塞及肝细胞的坏死。HVOD的确诊依靠肝组织活检。明确并避免危险因素是降低HVOD的发病率及死亡率的主要措施,药物预防效果尚不确切并且多有不良反应。HVOD的治疗以去纤苷的效果最为肯定,其他药物的疗效仍需验证。本文就HVOD的临床现状及研究进展作一综述。

关键词: 肝小静脉闭塞性疾病; 预防; 治疗; 去纤苷

彭俏, 贺德志, 李建生. 肝小静脉闭塞病的临床现状及研究进展. *世界华人消化杂志* 2012; 20(12): 1030-1035
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1030.asp>

0 引言

肝小静脉闭塞病(hepatic veno-occlusive disease, HVOD), 也称为肝窦阻塞综合征(sinusoidal obstruction syndrome, SOS). 早在1953年Hill等^[1]便对该病进行了详细描述。HVOD以疼痛性肝肿大、体液潴留、黄疸为主要症状。HVOD是造血干细胞移植(hematopoietic stem cell transplantation, HSCT)的主要并发症之一, 不同研究报告其发生率在5%-70%^[2]。大量摄入含有吡咯烷生物碱(pyrrolizidine alkaloids, PA)的草药也是主要病因。食用被PA污染的面粉、蜂蜜、动物奶等可造成HVOD的流行^[3]。其他病因有放化疗、器官移植、口服避孕药、摄入酒精等^[2,4,5]。针对HVOD的研究已有很长时间, 我们对其发病机制及组织病理已有深入了解, 在诊断上也有成熟方法。由于HVOD的早期诊断困难并且重症患者死亡率高, 其预防及治疗十分重要, 但目前预防及治疗方法均不成熟并且有很大的研究空间, 这篇综述将总结HVOD的临床现状和

■同行评议者

姚鹏, 副教授, 中国人民解放军北京军区总医院全军肝病中心

研究进展, 特别是预防和治疗领域的成果和研究方向。

1 HVOD的发病机制及组织病理学

HVOD发生时, 肝小静脉内皮及肝窦内皮受到损伤, 促使TNF α 、IL-1 β 、von Willebrand因子(von Willebrand factor, vWF)等细胞因子释放, 激活外源性凝血途径, 促进血小板凝集, 同时抗凝血酶复合物作用减弱, 造成局部高凝状态并形成血栓, 导致肝窦和终末肝小静脉闭塞^[6-11]。血NO水平下降造成血管收缩, 加重血供障碍^[12]。肝腺泡III带肝细胞由于缺血而坏死。TNF β 水平升高促使成纤维细胞向受损部位迁移增殖并合成大量胶原蛋白, 导致肝脏纤维化^[13]。免疫因素也可能参与HVOD的发病机制。

HVOD的早期组织病理学表现为肝小静脉的损伤, 包括内皮下水肿、红细胞渗出和纤维蛋白、巨噬细胞、vWF在血管壁的沉积^[6,14,15], 继而进展至终末肝小静脉和肝窦的向心性狭窄、肝窦充血及不同程度的肝小叶中央凝固性坏死。晚期由于胶原蛋白的沉积, 内皮下及动脉外膜纤维化, 最终进展为肝硬化^[16-18]。

2 HVOD的诊断

HVOD的临床诊断遵照Seattle标准^[19,20]和Baltimore标准^[21]。Seattle标准指HSCT后30 d内出现黄疸、疼痛性肝肿大、体液潴留3项症状中至少2项。Baltimore标准指HSCT后21 d内出现高胆红素血症(血清总胆红素>34.2 $\mu\text{mol/L}$)合并下列症状中至少2项: 疼痛性肝肿大, 体质量增加>5%, 腹水。根据病程及预后, HVOD可分为轻、中、重度, 轻度HVOD可自愈, 中度HVOD经治疗后可完全缓解, 重度HVOD长期无缓解(>100 d)且死亡率达98%^[19]。

HVOD的超声表现有腹水, 肝肿大, 胆囊壁增厚, 肝脏血流信号衰减, 肝静脉显示不清, 门静脉血流减慢甚至离肝血流, 肝动脉阻力指数可能升高^[2,6,22-24]。Lassau等^[25]提出的多普勒超声定量评分有助于早期诊断HVOD并预测其严重程度。CT表现为肝动脉增粗迂曲, 肝实质呈“地图状”、斑片状强化, 肝静脉显示不清, 下腔静脉肝段受压, 下腔静脉、门静脉周围“晕环征”或“双轨征”, 门静脉血栓形成^[26-28]。

诊断HVOD的金标准是肝组织活检。由于HVOD多伴有凝血功能异常, 经皮肝穿可能引起大出血等严重后果, 故应用受限。经颈静脉

肝组织活检能减小出血风险并获取足量的组织样本^[6]。经颈静脉测量肝静脉压力梯度(hepatic venous pressure gradient, HVPBG)>10 mmHg对HVOD的诊断特异性达90%以上^[29]。一些血液生化指标如蛋白质C、抗凝血酶III(antithrombin III, ATIII)值的降低和纤溶酶原激活物抑制物-1(plasminogen activator inhibitor type 1, PAI-1)、III型前胶原肽值的升高有助于早期诊断HVOD^[6,30,31]。另外血清透明质酸、vWF裂解蛋白酶及CA125也能作为HVOD的早期标志物^[19]。

3 HVOD的预防

3.1 明确并避免HVOD的危险因素 预防HVOD的主要措施是明确并避免危险因素。已知HVOD的危险因素有: (1)基础肝病, 如乙肝、丙肝、肝纤维化、肝硬化; (2)既往有HVOD病史或HSCT预处理史; (3)高剂量的全身放疗, 特别是肝区放疗; (4)近期使用过吉妥珠单抗奥唑米星; (5)预处理方案包含环磷酰胺, 口服白消安或白消安的剂量过大; (6)预处理过程中应用两性霉素B、万古霉素、阿昔洛韦抗感染治疗; (7)HSCT患者使用环孢素A、甲氨蝶呤预防移植抗宿主病; (8)携带血色病C282Y等位基因等^[6,19,22]。有研究指出异基因造血干细胞移植者患HVOD的风险较自体造血干细胞移植(autologous HSCT, auto-HSCT)者大^[32]。对于具有以上危险因素的患者, 采用低强度预处理方案, 静脉应用白消安并个体化用药, 预处理中用氟达拉滨替代环磷酰胺和低剂量全身放疗可降低HVOD的发病率^[33-37]。女性HSCT患者使用炔诺酮增加患HVOD的风险, 应避免应用此类药物^[38]。

3.2 药物预防 肝素、前列腺素E1、熊去氧胆酸(ursodeoxycholic acid, UDCA)、己酮可可碱在一些随机对照试验中被证实有预防HVOD的效果^[22]。肝素降低高危人群HVOD患病率的效果仍不明确, 并可能引起致命性出血^[6,22]。前列腺素E1有舒张血管、抗凝和溶栓作用, 但使用过程中可能出现低血压、肢端疼痛、水肿、皮肤水疱等严重药物不良反应^[39]。UDCA在一些随机对照试验中预防HVOD效果明显并且药物不良反应小。Essell等^[40]的试验中, 试验组和对照组HVOD的发病率分别为15%和40%, Ohashi等^[41]的试验中则分别为3.0%和18.5%。然而另2项试验却未证实UDCA有明显的预防作用^[42,43]。己酮可可碱是一种甲基黄嘌呤类似物, 可抑制TNF α 相关基因转录, 其在预防HVOD方面应用较少,

■研发前沿

HVOD的早期诊断方法如多普勒超声定量评分及血清标志物的研究, 治疗药物如去纤苷、甲泼尼龙的疗效评价, 都逐渐受到关注。

■创新盘点

本文总结了HVOD诊断、预防、治疗的现状,并特别关注了预防及治疗方面存在的问题及发展方向。

效果尚待证实^[6]。一项历史对照研究显示对于血清铁蛋白显著升高($>1\,000\text{ ng/L}$)并接受大剂量化疗及auto-HSCT的患者,应用铁螯合剂可降低HVOD的发病率,但该种药物可能导致肾功能不全^[44]。Chalandon等^[45]的历史对照研究显示去纤苷联合肝素可有效预防HVOD(试验组发病率0,对照组发病率19%),并且无药物不良反应。国内刘嘉等^[46]运用中西医结合方法,采用复方丹参注射液联合前列腺素E1、低分子肝素钙及右旋糖酐预防HSCT后HVOD,效果良好(发病率0.19%),并且未出现凝血功能障碍等药物不良反应。

4 HVOD的治疗

4.1 对症支持治疗 确诊HVOD或出现疑似症状时,避免继续应用肝毒性药物并进行保肝治疗。HVOD的致死原因主要是多器官功能衰竭(multiple organ failure, MOF)^[22],所以对症支持治疗是基本措施。对症支持治疗的主要目的是维持水电解质平衡、解除体液潴留并维持有效循环血量和肾灌注。限水限钠及利尿治疗能减轻体液潴留,严重潴留者可行浆膜腔穿刺抽液。白蛋白和血浆因最终积聚在间质从而加重体液潴留,二者的应用仍有争议。肾功能衰竭的患者行血液透析。出现呼吸衰竭时给予吸氧或机械通气。重症患者还需纠正凝血功能异常及抗感染治疗^[2,6,19,22]。

4.2 重组组织型纤溶酶原激活剂 由于HVOD患者局部血液处于高凝状态,故促纤维蛋白溶解和抗凝是有效的治疗方法。已有病例分析研究了单独应用重组组织型纤溶酶原激活剂(recombinant tissue plasminogen activator, rt-PA)或与肝素联合应用的治疗方法。一项包括42名HVOD患者的病例分析显示联合应用rt-PA和肝素治疗的应答率为29%,但治疗过程中10名患者发生严重出血,并且重度HVOD合并MOF患者的应答率低下^[47]。在另一项包括17名HVOD患者的病例分析中rt-PA治疗的应答率为29%,百日生存率33%,无应答的患者大部分有既往肝损害病史并且百日生存率为0^[48]。由于其中12名患者同时应用了肝素,该试验无法确证rt-PA的疗效。目前缺乏rt-PA治疗HVOD的大样本随机对照试验。由于rt-PA治疗重度HVOD效果不佳并且能诱发致命的脑出血或肺出血^[49],建议早期干预并小剂量应用。

4.3 去纤苷 去纤苷是一种寡核苷酸,能调节血小板活性,抑制凝血酶释放及其活性,下调PAI-1水

平,有局部抗血栓形成及抗炎作用,并促进纤维蛋白溶解,选择性作用于小血管^[50]。去纤苷治疗HVOD效果肯定且药物不良反应小,是近年来研究的热点。在一项多机构临床研究中,采用去纤苷治疗88名重度HVOD患者(静脉用药,5-60 mg/(kg·d),中位应用时间为15 d),完全缓解(complete response, CR)率为36%,百日生存率为35%,无出血等明显不良反应。年龄较小、auto-HSCT、门静脉血流异常、治疗过程中肌酐和PAI-1水平降低者生存率较高,但预处理中应用白消安及出现脑病者预后较差^[51]。Corbacioglu等^[52]对45例应用去纤苷治疗儿童HVOD的病例进行回顾分析,总CR率为76%,百日生存率为64%,重度HVOD组的CR率及长期生存率分别为50%和36%,去纤苷剂量可能与应答率呈正相关(应答组平均剂量45 mg/(kg·d),无应答组平均剂量27 mg/(kg·d)),并且早期干预对CR有显著意义。近年一项多中心II期随机量效试验肯定了不同剂量(25 mg/(kg·d), 40 mg/(kg·d))的去纤苷对重度HVOD的疗效,儿童患者、早期治疗患者的CR率和生存率较高,大剂量组和小剂量组的总体CR率及生存率无显著性差异,药物不良反应发生率低且两组之间无显著性差异。研究小组拟选择25 mg/(kg·d)的剂量进行III期临床试验^[50]。在另一项临床对照试验中,所有患HVOD的受试者均表现出ATIII活性的降低,试验组应用ATIII联合去纤苷治疗后CR率达100%,百日存活率为93%,对照组未进行治疗,百日存活率为46%,该试验未验证去纤苷和ATIII是否有协同作用^[53]。

4.4 甲泼尼龙 Khoury等^[54]用大剂量甲泼尼龙冲击治疗20名HVOD患者(500 mg/m², iv, q12h, 共6次),应答率60%。在Al Beihany等^[55]的临床研究中,48名HVOD患者应用甲泼尼龙治疗后(0.5 mg/kg, iv, q12h, 共14次,骤停),30名患者胆红素下降超过50%。目前缺乏甲泼尼龙治疗HVOD的大样本随机对照试验,其治疗HVOD的效果需进一步研究证实。

4.5 经颈静脉肝内门体分流术 经颈静脉肝内门体分流术(transjugular intrahepatic portosystemic shunt, TIPS)用于治疗HVOD引起的门脉高压。Azoulay等^[56]的临床研究中,10名重度HVOD患者接受TIPS后,HVPG均下降,其中5人病情无好转,因MOF于10 d内死亡,另5人ALT、肌酐等指标有明显改善,其中4人于TIPS后11-54 d死亡,1人持续生存超过6 mo,因此单纯解决门脉高压不足以提高重度HVOD患者的生存率,后续治疗

仍然十分关键. 由于TIPS不能改善HVOD患者的预后, 故最近指南不建议TIPS治疗HVOD^[22].

4.6 肝移植 当内科治疗不能逆转病情, 最终出现肝衰竭的HVOD患者可以考虑肝移植, 目前成功的肝移植仅见于个案^[57-59]. 筛选合适的患者可提高肝移植的成功率. 恶性肿瘤及MOF是肝移植的禁忌证^[19,22]. 如果HVOD本身是由肝移植引起的, 只要不合并其他脏器的损害, 可以行第二次肝移植^[19].

5 结论

HVOD的临床难点在于预防及治疗. 明确并避免HVOD的危险因素对于预防十分重要. 预防性药物选择众多但有效性均没有被完全证实, 并且多数药物有程度不等的不良反应. HVOD的治疗以药物为主, 去纤苷疗效确切并且无明显药物不良反应. TIPS及肝移植对于HVOD的治疗应用范围十分有限并且效果欠佳. 今后在药物预防及治疗方面的深入研究将会进一步降低高危人群的HVOD发病率及死亡率.

6 参考文献

- HILL KR, RHODES K, STAFFORD JL, AUB R. Se-
rious hepatitis: a pathogenesis of hepatic fibrosis in
Jamaican children. *Br Med J* 1953; 1: 117-122
- Chen Z, Huo JR. Hepatic veno-occlusive disease as-
sociated with toxicity of pyrrolizidine alkaloids in
herbal preparations. *Neth J Med* 2010; 68: 252-260
- Kakar F, Akbarian Z, Leslie T, Mustafa ML, Watson
J, van Egmond HP, Omar MF, Mofleh J. An out-
break of hepatic veno-occlusive disease in Western
afghanistan associated with exposure to wheat flour
contaminated with pyrrolizidine alkaloids. *J Toxicol*
2010; 2010: 313280
- Azoulay D, Castaing D, Lemoine A, Samuel D,
Majno P, Reynes M, Charpentier B, Bismuth H.
Successful treatment of severe azathioprine-
induced hepatic veno-occlusive disease in a kidney-
transplanted patient with transjugular intrahepatic
portosystemic shunt. *Clin Nephrol* 1998; 50: 118-122
- Hola K, Brahm J, Alvo M, Cotera A, Passalacqua W,
Smok G. [Hepatic veno-occlusive disease associated
to the use of azathioprine in a renal transplant re-
cipient]. *Rev Med Chil* 1996; 124: 1489-1491
- Bearman SI. The syndrome of hepatic veno-occlu-
sive disease after marrow transplantation. *Blood*
1995; 85: 3005-3020
- Brett J, Gerlach H, Nawroth P, Steinberg S, Godman
G, Stern D. Tumor necrosis factor/cachectin in-
creases permeability of endothelial cell monolayers
by a mechanism involving regulatory G proteins. *J*
Exp Med 1989; 169: 1977-1991
- Gertler JP, Abbott WM. Prothrombotic and fibrin-
olytic function of normal and perturbed endothe-
lium. *J Surg Res* 1992; 52: 89-95
- Nawroth PP, Stern DM. Endothelial cell procoagu-
lant properties and the host response. *Semin Thromb*
Hemost 1987; 13: 391-397
- Collins PW, Gutteridge CN, O'Driscoll A, Blair S,
Jones L, Aitchison R, Kelsey SM, Chopra R, Gold-
stone A, Newland AC. von Willebrand factor as a
marker of endothelial cell activation following
BMT. *Bone Marrow Transplant* 1992; 10: 499-506
- Dittman WA, Majerus PW. Structure and function
of thrombomodulin: a natural anticoagulant. *Blood*
1990; 75: 329-336
- DeLeve LD, Wang X, Kanel GC, Ito Y, Bethea NW,
McCuskey MK, Tokes ZA, Tsai J, McCuskey RS.
Decreased hepatic nitric oxide production contrib-
utes to the development of rat sinusoidal obstruc-
tion syndrome. *Hepatology* 2003; 38: 900-908
- Anscher MS, Peters WP, Reisenbichler H, Petros
WP, Jirtle RL. Transforming growth factor beta as a
predictor of liver and lung fibrosis after autologous
bone marrow transplantation for advanced breast
cancer. *N Engl J Med* 1993; 328: 1592-1598
- Wadleigh M, Ho V, Momtaz P, Richardson P. He-
patic veno-occlusive disease: pathogenesis, diag-
nosis and treatment. *Curr Opin Hematol* 2003; 10:
451-462
- Shulman HM, Gown AM, Nugent DJ. Hepatic
veno-occlusive disease after bone marrow trans-
plantation. Immunohistochemical identification of
the material within occluded central venules. *Am J*
Pathol 1987; 127: 549-558
- Helmy A. Review article: updates in the pathogen-
esis and therapy of hepatic sinusoidal obstruction
syndrome. *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 23: 11-25
- Baron F, Deprez M, Beguin Y. The veno-occlusive
disease of the liver. *Haematologica* 1997; 82: 718-725
- DeLeve LD, McCuskey RS, Wang X, Hu L, McCus-
key MK, Epstein RB, Kanel GC. Characterization of
a reproducible rat model of hepatic veno-occlusive
disease. *Hepatology* 1999; 29: 1779-1791
- Senzolo M, Germani G, Cholongitas E, Burra P,
Burroughs AK. Veno occlusive disease: update on
clinical management. *World J Gastroenterol* 2007; 13:
3918-3924
- McDonald GB, Sharma P, Matthews DE, Shulman
HM, Thomas ED. Venocclusive disease of the liver
after bone marrow transplantation: diagnosis, inci-
dence, and predisposing factors. *Hepatology* 1984; 4:
116-122
- Jones RJ, Lee KS, Beschoner WE, Vogel VG, Gro-
chow LB, Braine HG, Vogelsang GB, Sensenbrenner
LL, Santos GW, Saral R. Venocclusive disease of
the liver following bone marrow transplantation.
Transplantation 1987; 44: 778-783
- DeLeve LD, Valla DC, Garcia-Tsao G. Vascular dis-
orders of the liver. *Hepatology* 2009; 49: 1729-1764
- Hommeyer SC, Teefey SA, Jacobson AF, Higano
CS, Bianco JA, Colacurcio CJ, McDonald GB. Ven-
occlusive disease of the liver: prospective study of
US evaluation. *Radiology* 1992; 184: 683-686
- Herbetko J, Grigg AP, Buckley AR, Phillips GL. Ve-
nocclusive liver disease after bone marrow trans-
plantation: findings at duplex sonography. *AJR Am*
J Roentgenol 1992; 158: 1001-1005
- Lassau N, Auperin A, Leclerc J, Bennaceur A, Val-
teau-Couanet D, Hartmann O. Prognostic value of
doppler-ultrasonography in hepatic veno-occlusive
disease. *Transplantation* 2002; 74: 60-66
- 张国华, 孔阿照, 方军伟, 陈岳进, 郑伟良, 董旦君, 章
士正. 肝小静脉闭塞病的CT表现(附14例分析). *中华*
放射学杂志 2006; 40: 250-253
- 裴贻刚, 胡道予, 沈亚琪, 王秋霞, 胡立吾. 多层螺旋

■名词解释

去纤苷: 抗凝血
药物, 是一种寡核
苷酸, 市售产品由
猪、牛、羊等哺
乳动物肺中提取
而得. 具有明显的
纤溶作用, 通常用
于预防深静脉血
栓形成及血栓性
静脉炎的治疗.

同行评价

本文阐述了HVOD的概况及一些进展,条理清晰,具有一定新意,并具有较好的临床借鉴意义。

- CT与核磁共振成像对肝小静脉闭塞病的诊断价值. 中华肝病杂志 2010; 18: 150-152
- 28 Coy DL, Ormazabal A, Godwin JD, Lalani T. Imaging evaluation of pulmonary and abdominal complications following hematopoietic stem cell transplantation. *Radiographics* 2005; 25: 305-317; discussion 318
- 29 Shulman HM, Gooley T, Dudley MD, Kofler T, Feldman R, Dwyer D, McDonald GB. Utility of transvenous liver biopsies and wedged hepatic venous pressure measurements in sixty marrow transplant recipients. *Transplantation* 1995; 59: 1015-1022
- 30 Eltumi M, Trivedi P, Hobbs JR, Portmann B, Cheeseman P, Downie C, Risteli J, Risteli L, Mowat AP. Monitoring of veno-occlusive disease after bone marrow transplantation by serum aminopropeptide of type III procollagen. *Lancet* 1993; 342: 518-521
- 31 Rio B, Bauduer F, Arrago JP, Zittoun R. N-terminal peptide of type III procollagen: a marker for the development of hepatic veno-occlusive disease after BMT and a basis for determining the timing of prophylactic heparin. *Bone Marrow Transplant* 1993; 11: 471-472
- 32 Carreras E, Bertz H, Arcese W, Vernant JP, Tomás JF, Häggglund H, Bandini G, Esperou H, Russell J, de la Rubia J, Di Girolamo G, Demuyneck H, Hartmann O, Clausen J, Ruutu T, Leblond V, Iriondo A, Bosi A, Ben-Bassat I, Koza V, Gratwohl A, Apperley JF. Incidence and outcome of hepatic veno-occlusive disease after blood or marrow transplantation: a prospective cohort study of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. European Group for Blood and Marrow Transplantation Chronic Leukemia Working Party. *Blood* 1998; 92: 3599-3604
- 33 Hogan WJ, Maris M, Storer B, Sandmaier BM, Maloney DG, Schoch HG, Woolfrey AE, Shulman HM, Storb R, McDonald GB. Hepatic injury after non-myeloablative conditioning followed by allogeneic hematopoietic cell transplantation: a study of 193 patients. *Blood* 2004; 103: 78-84
- 34 Bornhauser M, Storer B, Slattery JT, Appelbaum FR, Deeg HJ, Hansen J, Martin PJ, McDonald GB, Nichols WG, Radich J, Woolfrey A, Jenke A, Schleyer E, Thiede C, Ehninger G, Anasetti C. Conditioning with fludarabine and targeted busulfan for transplantation of allogeneic hematopoietic stem cells. *Blood* 2003; 102: 820-826
- 35 DeLima M, Ghaddar H, Pierce S, Estey E. Treatment of newly-diagnosed acute myelogenous leukaemia in patients aged 80 years and above. *Br J Haematol* 1996; 93: 89-95
- 36 Clift RA, Buckner CD, Appelbaum FR, Bearman SI, Petersen FB, Fisher LD, Anasetti C, Beatty P, Bensinger WI, Doney K. Allogeneic marrow transplantation in patients with acute myeloid leukemia in first remission: a randomized trial of two irradiation regimens. *Blood* 1990; 76: 1867-1871
- 37 Pidala J, Kim J, Anasetti C, Kharfan-Dabaja MA, Nishihori T, Field T, Perkins J, Perez L, Fernandez HF. Pharmacokinetic targeting of intravenous busulfan reduces conditioning regimen related toxicity following allogeneic hematopoietic cell transplantation for acute myelogenous leukemia. *J Hematol Oncol* 2010; 3: 36
- 38 Häggglund H, Remberger M, Klaesson S, Lönnqvist B, Ljungman P, Ringdén O. Norethisterone treatment, a major risk-factor for veno-occlusive disease in the liver after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 1998; 92: 4568-4572
- 39 Bearman SI, Shen DD, Hinds MS, Hill HA, McDonald GB. A phase I/II study of prostaglandin E1 for the prevention of hepatic venocclusive disease after bone marrow transplantation. *Br J Haematol* 1993; 84: 724-730
- 40 Essell JH, Schroeder MT, Harman GS, Halvorson R, Lew V, Callander N, Snyder M, Lewis SK, Allerton JP, Thompson JM. Ursodiol prophylaxis against hepatic complications of allogeneic bone marrow transplantation. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med* 1998; 128: 975-981
- 41 Ohashi K, Tanabe J, Watanabe R, Tanaka T, Sakamaki H, Maruta A, Okamoto S, Aotsuka N, Saito K, Nishimura M, Oh H, Matsuzaki M, Takahashi S, Yonekura S. The Japanese multicenter open randomized trial of ursodeoxycholic acid prophylaxis for hepatic veno-occlusive disease after stem cell transplantation. *Am J Hematol* 2000; 64: 32-38
- 42 Park SH, Lee MH, Lee H, Kim HS, Kim K, Kim WS, Jung CW, Im YH, Yoon SS, Kang WK, Park K, Park CH, Kim SW. A randomized trial of heparin plus ursodiol vs. heparin alone to prevent hepatic veno-occlusive disease after hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2002; 29: 137-143
- 43 Ruutu T, Eriksson B, Remes K, Juvonen E, Volin L, Remberger M, Parkkali T, Häggglund H, Ringdén O. Ursodeoxycholic acid for the prevention of hepatic complications in allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 2002; 100: 1977-1983
- 44 Chueh HW, Sung KW, Lee SH, Yoo KH, Koo HH, Kim JY, Cho EJ. Iron chelation treatment with deferasirox prior to high-dose chemotherapy and autologous stem cell transplantation may reduce the risk of hepatic veno-occlusive disease in children with high-risk solid tumors. *Pediatr Blood Cancer* 2012; 58: 441-447
- 45 Chalandon Y, Roosnek E, Mermillod B, Newton A, Ozsahin H, Wacker P, Helg C, Chapuis B. Prevention of veno-occlusive disease with defibrotide after allogeneic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2004; 10: 347-354
- 46 刘嘉, 张曦, 陈幸华, 孔佩艳, 王庆余, 高蕾, 张诚, 张颖, 李云龙, 曾毓璟. 中西医结合预防造血干细胞移植后肝静脉闭塞病的临床观察. 中国中西医结合杂志 2010; 30: 1049-1051
- 47 Bearman SI, Lee JL, Barón AE, McDonald GB. Treatment of hepatic venocclusive disease with recombinant human tissue plasminogen activator and heparin in 42 marrow transplant patients. *Blood* 1997; 89: 1501-1506
- 48 Kulkarni S, Rodriguez M, Lafuente A, Mateos P, Mehta J, Singhal S, Saso R, Tait D, Treleaven JG, Powles RL. Recombinant tissue plasminogen activator (rtPA) for the treatment of hepatic veno-occlusive disease (VOD). *Bone Marrow Transplant* 1999; 23: 803-807
- 49 Häggglund H, Ringdén O, Ericzon BG, Duraj F, Ljungman P, Lönnqvist B, Winiarski J, Tydén G. Treatment of hepatic venoocclusive disease with recombinant human tissue plasminogen activator or orthotopic liver transplantation after allogeneic bone marrow transplantation. *Transplantation* 1996; 62: 1076-1080
- 50 Richardson PG, Soiffer RJ, Antin JH, Uno H, Jin Z, Kurtzberg J, Martin PL, Steinbach G, Murray KF,

- Vogelsang GB, Chen AR, Krishnan A, Kernan NA, Avigan DE, Spitzer TR, Shulman HM, Di Salvo DN, Revta C, Warren D, Momtaz P, Bradwin G, Wei LJ, Iacobelli M, McDonald GB, Guinan EC. Defibrotide for the treatment of severe hepatic veno-occlusive disease and multiorgan failure after stem cell transplantation: a multicenter, randomized, dose-finding trial. *Biol Blood Marrow Transplant* 2010; 16: 1005-1017
- 51 Richardson PG, Murakami C, Jin Z, Warren D, Momtaz P, Hoppensteadt D, Elias AD, Antin JH, Soiffer R, Spitzer T, Avigan D, Bearman SI, Martin PL, Kurtzberg J, Vredenburgh J, Chen AR, Arai S, Vogelsang G, McDonald GB, Guinan EC. Multi-institutional use of defibrotide in 88 patients after stem cell transplantation with severe veno-occlusive disease and multisystem organ failure: response without significant toxicity in a high-risk population and factors predictive of outcome. *Blood* 2002; 100: 4337-4343
- 52 Corbacioglu S, Greil J, Peters C, Wulffraat N, Laws HJ, Dilloo D, Straham B, Gross-Wieltsch U, Sykora KW, Ridolfi-Lüthy A, Basu O, Gruhn B, Güngör T, Mihatsch W, Schulz AS. Defibrotide in the treatment of children with veno-occlusive disease (VOD): a retrospective multicentre study demonstrates therapeutic efficacy upon early intervention. *Bone Marrow Transplant* 2004; 33: 189-195
- 53 Haussmann U, Fischer J, Eber S, Scherer F, Seger R, Gungor T. Hepatic veno-occlusive disease in pediatric stem cell transplantation: impact of pre-emptive antithrombin III replacement and combined antithrombin III/defibrotide therapy. *Haematologica* 2006; 91: 795-800
- 54 Khoury H, Adkins D, Brown R, Trinkaus K, Vij R, Miller G, Goodnough LT, DiPersio J. Does early treatment with high-dose methylprednisolone alter the course of hepatic regimen-related toxicity? *Bone Marrow Transplant* 2000; 25: 737-743
- 55 Al Beihany A, Al Omar H, Sahovic E, Chaudhri N, Al Mohareb F, Al Sharif F, Al Zahrani H, Al Shanqeeti A, Seth P, Zaidi S, Morshed M, Al Anazi K, Mohamed G, Gyger M, Aljurf M. Successful treatment of hepatic veno-occlusive disease after myeloablative allogeneic hematopoietic stem cell transplantation by early administration of a short course of methylprednisolone. *Bone Marrow Transplant* 2008; 41: 287-291
- 56 Azoulay D, Castaing D, Lemoine A, Hargreaves GM, Bismuth H. Transjugular intrahepatic portosystemic shunt (TIPS) for severe veno-occlusive disease of the liver following bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2000; 25: 987-992
- 57 Koenecke C, Kleine M, Schrem H, Krug U, Nashan B, Neipp M, Ganser A, Hertenstein B, Klempnauer J. Sinusoidal obstruction syndrome of the liver after hematopoietic stem cell transplantation: decision making for orthotopic liver transplantation. *Int J Hematol* 2006; 83: 271-274
- 58 Mellgren K, Fasth A, Saalman R, Olausson M, Abrahamsson J. Liver transplantation after stem cell transplantation with the same living donor in a monozygotic twin with acute myeloid leukemia. *Ann Hematol* 2005; 84: 755-757
- 59 Kim ID, Egawa H, Marui Y, Kaihara S, Haga H, Lin YW, Kudoh K, Kiuchi T, Uemoto S, Tanaka K. A successful liver transplantation for refractory hepatic veno-occlusive disease originating from cord blood transplantation. *Am J Transplant* 2002; 2: 796-800

编辑 张姗姗 电编 闫晋利

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》再次入选《中文核心期刊要目总览》(2011年版)

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

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

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

益生菌对功能性便秘的防治进展

张莉芳, 赵小平

■背景资料

对于功能性便秘的干预,除了饮食、运动等生活方式的改变以外,最常用的方式是从肛门用润滑通便剂和/或口服泻药进行治疗。虽然传统的治疗方式是安全可靠的,且泻药能很快缓解便秘症状,但不能解决根本问题。因此,找寻一种安全有效的饮食或保健干预措施是非常必要的。

张莉芳, 赵小平, 右江民族医学院护理学院 广西壮族自治区百色市 533000

张莉芳, 讲师, 主管护师, 主要研究方向是社区护理。

作者贡献分布: 本文综述由张莉芳完成; 赵小平审校。

通讯作者: 张莉芳, 讲师, 主管护师, 533000, 广西壮族自治区百色市, 右江民族医学院护理学院, 596267924@qq.com
电话: 0776-2833147

收稿日期: 2011-11-22 修回日期: 2012-01-17

接受日期: 2012-03-25 在线出版日期: 2012-04-28

Progress in the use of probiotics to prevent and treat functional constipation

Li-Fang Zhang, Xiao-Ping Zhao

Li-Fang Zhang, Xiao-Ping Zhao, College of Nursing, Youjiang Medical College for Nationalities, Baise 533000, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Correspondence to: Li-Fang Zhang, College of Nursing, Youjiang Medical College for Nationalities, Baise 533000, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. 596267924@qq.com

Received: 2011-11-22 Revised: 2012-01-17

Accepted: 2012-03-25 Published online: 2012-04-28

Abstract

Due to the changes in diet structure and the increase in psychological and social pressure, constipation has become a very common health problem that seriously influences people's quality of life. Functional constipation (FC) is a kind of primary persistent constipation caused by non-systemic diseases or non-bowel diseases, with an incidence ranging from 2% to 37.5%. Although conventional treatments for FC are safe and reliable, and laxatives can quickly relieve constipation symptoms, they cannot resolve the fundamental problems. Therefore, it is essential to find a safe and effective diet or health care intervention for FC. The intestinal microecology of FC patients is different from that of healthy people, and the use of probiotics can help normalize intestinal function of FC patients. In this paper we discuss the recent progress in the use of probiotics to prevent and treat FC.

Key Words: Functional constipation; Probiotics; Research progress

Zhang LF, Zhao XP. Progress in the use of probiotics to prevent and treat functional constipation. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(12): 1036-1040

摘要

随着饮食结构的改变及精神和社会压力的增大,便秘已成为困扰现代人的主要问题之一,严重影响着人们的生活质量。功能性便秘是指非全身性疾病或肠道疾病引起的原发性持续性便秘,在不同人群中其发病率为2.0%-37.5%。传统的治疗功能性便秘的方式虽然安全可靠,且泻药能很快缓解便秘症状,但不能解决根本问题。因此,找寻一种安全有效的饮食或保健干预措施是非常必要的。便秘患者肠道微生态不同于健康人群,补充益生菌可改变这一现象。本文从介绍功能性便秘的发病现状入手,引入益生菌的概念,论述了益生菌防治便秘的机制、常用效应评价指标及目前的研究进展。

关键词: 功能性便秘; 益生菌; 研究进展

张莉芳, 赵小平. 益生菌对功能性便秘的防治进展. *世界华人消化杂志* 2012; 20(12): 1036-1040

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1036.asp>

0 引言

随着饮食结构的改变及精神和社会压力的增大,便秘已成为困扰现代人的主要问题之一,严重影响着人们的生活质量^[1-4]。在绝大多数的便秘患者中,如果没有发现导致便秘的器质性原因,即可诊断为功能性便秘^[5]。在北美地区,便秘的发病率在2.0%-7.0%,女性与男性发病率之比为2.2:1;随着年龄的增长,便秘的发病率相应提高^[6]。新加坡报道的结果为7.3%±3.5%^[7]。我国现有的调查显示,成年男性便秘的患病率为2.11%-6.10%,成年女性为9.68%-12.00%^[8,9]。老年人便秘发病率更高,王琳等^[10]对244例老年门诊的患者进行分析,便秘发病率为24.59%。陈长香等^[11]对唐山市老年女性的调查结果显示便秘发病率为37.5%。

对于功能性便秘的干预,除了饮食、运动等

■同行评议者

陈其奎, 教授, 中山大学附属第二医院消化内科

生活方式的改变以外^[12-14], 最常用的方式是从肛门用润滑通便剂和/或口服泻药进行治疗^[15-18]. 虽然传统的治疗方式安全可靠, 且泻药能很快缓解便秘症状, 但不能解决根本问题^[19]. 长期使用泻药还易造成肠道菌群失衡, 一些刺激性泻药甚至会损害肠道神经, 降低肠道对食物残渣刺激的敏感性, 一旦停用, 便秘症状会加重. 经肛门长期使用润滑通便剂会降低直肠黏膜对粪便刺激的敏感性, 从而加重便秘^[20]. 因此, 找寻一种安全有效的饮食或保健干预措施是非常必要的.

1 益生菌、益生素、合生元的概念

益生菌制剂可分为3大类: 主要的一类是益生菌, 益生菌是指“摄入足够数量后, 能对宿主起有益健康作用的活的微生物”^[21]. 目前广泛使用的益生菌主要包括双歧杆菌和乳酸杆菌2个属, 另外也有使用大肠杆菌、枯草杆菌、肠球菌、链球菌等活菌的报道; 第2类是益生素, 是指“通过选择性地促进肠道内一种或几种肠道微生物的生长与活性, 而对宿主产生有益影响, 从而改善宿主健康的不被消化的食品成分”^[22]. 益生素能为益生菌提供养分, 促进其生长, 常见的益生素包括低聚果糖、低聚半乳糖、乳果糖、母乳低聚糖、菊粉、果寡糖等^[23]. 如低聚异麦芽糖是一种益生素, 因其能有效促进人体内双歧杆菌的生长、繁殖, 故亦被称为“双歧因子”; 第3类是合生元, 为益生菌与益生素的混合物, 同时兼有益生菌和益生素2种功效. 要充分发挥合生元的功效, 需注意益生菌和益生素种类和数量的合理搭配, 合生元中的益生素才能最大程度地促进益生菌的生长. 因此, 不是所有混合物都是合生元^[24].

2 益生菌防治便秘的机制探索

2.1 改善肠道微环境, 促进排便 多项研究发现便秘者的肠道菌群的相对比例较健康人群发生了改变^[25]. Zoppi等^[26]对22名便秘儿童与20名健康儿童的粪便研究发现, 需氧菌和厌氧菌在总数量上无差别, 但是便秘儿童粪便中的梭状芽孢杆菌和双歧杆菌的数量高于健康儿童, 差别有统计学意义; 部分细菌, 如肠球菌、真菌在数量上有所降低, 但和健康人群相比差别无统计学意义. 王记成等^[27]对43例便秘者和9例健康人群的粪便化验分析后发现健康人群粪便中双歧杆菌的数量为 $8.95 \lg \text{cfu/g} \pm 0.92 \lg \text{cfu/g}$, 而便秘者为 $6.1 \lg \text{cfu/g} \pm 0.92 \lg \text{cfu/g}$, 给予便秘者连续

服用21 d动物双歧杆菌(*B. animalis* V9)菌粉 $1.0 \times 10^{10} \text{cfu/d}$ 后, 便秘者粪便中双歧杆菌数量上接近于健康人群水平, 而拟杆菌和肠球菌在数量上有不同程度的下降. 便秘者肠道细菌数量在相对比例上发生变化可以被认为是一种生态失衡. 到底是便秘导致了肠道菌群比例变化, 还是菌群比例变化是导致便秘的原因之一, 这有待进一步研究.

2.2 缩短结肠传输时间, 促进食物残渣快速通过结肠 有研究显示, 无论在健康人^[28]还是功能性便秘患者, 口服摄入一定量的乳双歧杆菌(*B. lactis* DN-173 010)可促进肠内容物通过结肠, 缩短结肠传输时间^[29]. 一项双盲的随机对照研究对72位健康成年人(21-42岁)用造影剂检查结肠的传输时间, 结果显示用活*B. animalis* DN-173010治疗后, 总的结肠传输时间缩短了21%, 乙状结肠的传输时间缩短39%, 尤其是女性更为显著(加热后的细菌服用后无效果)^[30]. Waller等^[31]将不同剂量的乳酸双歧杆菌HN019用于有功能性胃肠道症状的人身上, 发现与安慰剂组($n = 34$)相比, 高剂量($n = 33$)和低剂量乳酸双歧杆菌摄入者($n = 33$)的肠道转运时间缩短, 且排便时间缩短. 益生菌促进肠蠕动, 缩短结肠传输时间的机制尚不清楚, 可能与益生菌可产生乳酸、醋酸和短链脂肪酸, 而短链脂肪酸作用于肠道神经, 刺激肠蠕动有关^[32,33].

3 益生菌用于防治便秘的研究进展

3.1 不同研究者使用的益生菌菌株及剂量 研究者使用的双歧杆菌剂量级别均为 10^{10}cfu , 相差较少. 而使用乳酸杆菌干预者, 剂量相差较多. 使用其他活菌者较少. 只有摄入含有 10^6cfu/mL 以上的益生菌才能充分发挥其健康促进的特性(表1)^[41].

3.2 常用效应评价指标及干预效果

3.2.1 周排便次数: 导致便秘的直接原因之一是食物残渣在肠道内停留过久, 粪便内的水分被吸收, 从而使粪便变的干硬难以排出, 所以治疗便秘有效即可有排便次数增加. 每周排便次数是常用的效应指标. 周排便次数 <3 次为罗马III功能性便秘诊断标准的条件之一. 将排便次数作为效应指标, 既和罗马标准相一致, 又可以定量判断便秘情况. 用大肠杆菌^[39]、乳酸双歧杆菌^[34]分别干预8 wk、2 wk, 周排便次数试验组和对照组的差值的均数为4.1、1.5次, 干预后患者的周排便次数升至6.0、4.1次; 但对于后者, 经过2 wk干预,

■研究前沿

益生菌对便秘的作用被多位研究者进行研究, 各研究采用的益生菌菌株和剂量不同, 效应评价指标不同, 得出的结论也存在一定差异. 到底采用哪种菌株, 多大剂量才能达到治疗效果, 是将来研究需要关注的问题.

■创新盘点

本文论述了益生菌防治便秘的机制,总结了近年来发表的益生菌用于防治功能性便秘的文章,提炼出常用的效应评价指标,从理论性、可行性方面论述了在评价排便活动状况时宜选用的评价指标。

表 1 不同研究者使用的益生菌菌株及剂量

作者	菌株	剂量	是否使用益生元
Yang等 ^[34]	乳酸双歧杆菌(<i>B. lactis</i> DN-173 0101)	1.25×10^{10}	无
王记成等 ^[27]	动物双歧杆菌(<i>B. animalis</i> V9)	1.0×10^{10}	无
Koebnick等 ^[36]	嗜酸乳酸杆菌(<i>L. casei</i> Shirota)	6.5×10^9	无
Banaszkiewicz等 ^[36]	鼠李糖乳酸杆菌(<i>L. rhamnosus</i>)	2×10^9	乳果糖
Bu等 ^[37]	干酪乳酸杆菌(<i>L. casei</i> rhamnosus Lcr35)	8×10^8	无
Noor-L-Houda等 ^[38]	多种双歧杆菌及乳酸杆菌的混合活菌(<i>B. bifidum</i> , <i>B. infantis</i> , <i>B. longum</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. plantarum</i> and <i>L. rhamnosus</i>)	4×10^9	无
Möllenbrink等 ^[39]	大肠杆菌(<i>E. coli</i> Nissle 1917)	25×10^9	无
Rouzbeh等 ^[40]	双歧杆菌、乳酸杆菌、链球菌属(<i>Bifidobacterium</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Streptococcus</i> species)	1.0×10^8	低聚果糖 Fructooligosaccharide

试验组和对照组的均数和标准差为 4.1 ± 1.7 vs 2.6 ± 1.0 , 统计学差别有意义, 但其均数差值只提高了1.5次, 所以对其临床意义有研究者持保守态度^[18], 但不可否认补充相应数量的乳酸双歧杆菌对便秘仍有一定缓解作用。一项随机双盲平行对照研究对84例2-16岁儿童包括试验组(43例)采用鼠李糖乳酸杆菌加乳果糖干预, 对照组(41例)采用乳果糖, 经过12 wk的干预, 2组在每天排便次数、排便不尽感等方面无差别^[35]。乳果糖为一种渗透性轻泻剂, 在小肠内不被水解吸收, 其渗透性使水和电解质保留于肠腔, 在结肠中细菌将其分解成乳酸、醋酸, 使肠内渗透压进一步增高, 粪便容量增大, 刺激肠道蠕动, 产生缓和的导泻作用。乳果糖是一种益生菌, 所以长达12 wk的干预治疗中, 因其本身的药物作用, 而益生菌对便秘的治疗并不像泻药一样立竿见影, 所以出现试验组和对照组的差别没有统计学意义, 关于鼠李糖乳酸杆菌对便秘的作用还有待进一步的研究。

3.2.2 排出干硬粪便的次数: 至少有25%的排便为块状便或硬便为罗马III标准中诊断便秘的条件之一。粪便干硬, 呈块状, 如鹅卵石或坚果样一颗颗排出。有时粪便体积过大而难以排出甚至造成肛门局部堵塞, 用力排便会导致肛裂、痔疮出血等。有时, 粪便干硬, 体积过小而无法有效刺激直肠收缩或直肠收缩无力而难以排出粪便。将干硬粪便作为效应指标, 评价在干预时间内排出干硬粪便的次数, 本文认为既符合罗马标准, 又可定量测量, 是可取的指标。有研究结果显示, 用益生菌干预时间段内便秘者排出干硬粪便的次数显著减少^[35]。Bu等^[37]的研究结果证明, 试验组的干硬粪便发生率均数为22.4%, 而对照组为75.5%。Möllenbrink等^[39]研究结果显

示, 整个实验时间段内, 试验组的干硬粪便发生率均数为5.9%, 而对照组为53.3%。

3.2.3 粪便性状评分: Bristol粪便性状评分表是国内外研究中常用的评价粪便性状的工具, 其用直观的图片, 使患者易于判断自己的粪便性状属于几级。该量表不仅使医患之间关于粪便性状的沟通变得容易, 而且被建议应用于临床研究, 被证实是一简单实用的粪便评分量表^[42]。Bristol粪便性状评分表共包括7级, 依次记为1-7分。1级: 似坚果状; 2级: 腊肠状但成块; 3级: 腊肠状但表面有裂隙; 4级: 蛇形平滑软便; 5级: 柔软团块, 边缘清楚, 似软泥状物; 6级: 松散片状物、糊状便; 7级: 水样便。Bristol粪便性状评分与整个肠道的传输时间具有相关性^[43]。有研究显示在应用益生菌后, 患者的粪便性状评分提高, 治疗后第4周Bristol评分均数试验组比对照组高 0.91 , 95%CI $0.32-1.51$ ^[39]。

3.2.4 其他: 粪便残留感、腹痛、腹胀等症状也被作为评价指标使用。研究结果表明, 益生菌对便秘者腹痛、腹胀、食欲、粪便残留无影响^[35,44]。有研究者将干预后效果分为显效、有效、无效3级。如周建林^[44]经过15 d的干预后, 试验组有效率为90.16%, 对照组为52.5%; 停药2 wk后跟踪治疗效果, 试验组的复发率为8%, 而对照组为30%。也有研究者将便秘、肠胀气、腹胀分为4级, 评价经过干预后这些症状缓解情况^[35]。

4 结论

1857年, 法国微生物学家巴斯德对牛奶变酸过程的研究拉开了益生菌研究的帷幕^[45]。经过一个多世纪的研究及应用, 益生菌的功效已经得到了科学家和消费者的认同^[46]。益生菌制剂不仅对便秘有作用, 许多研究者亦将其应用于其他疾

病的治疗, 如抑制肿瘤生长^[47], 降低抗生素诱发的腹泻^[48,49].

益生菌用于治疗便秘始于研究者发现便秘者的肠道微生态不同于正常人群, 补充益生菌是符合常规治疗逻辑的, 且在诸多研究中均未发现益生菌的不良反应^[18], 但摄入的益生菌是不能永久定植的. 益生菌可以在肠道中生存一段时间, 为有益菌的生长创造良好的环境^[41]. 但各研究采用的菌株不同、剂量不同, 得出的结论也各异, 不同菌株、不同剂量、不同的联合食用方法对人体作用的差别是将来的研究需要关注的问题.

促成正常排便的因素还包括足够的食物摄入, 肠道正常的蠕动功能, 直肠对食物残渣的正常反应及排便反射. 如果个体经常有意识地制止便意, 就会使直肠渐渐失去对粪便压力刺激的敏感性, 加之粪便在大肠内停留过久, 水分吸收过多而干结, 就会造成排便困难, 这是产生便秘的最常见原因^[50]. 另外排便活动状况与情绪也有很大的关系^[51,52]. 所以便秘者必须在生活方式、饮食、运动、情绪等方面加以调节, 另辅以益生菌制剂, 方能取得满意的排便活动状况.

5 参考文献

- 刘新光. 慢性便秘的诊断标准及方法. 医学新知杂志 2003; 13: 185-186
- 丁淑平, 郝习君, 陈长香. 老年人便秘与焦虑、抑郁发生的相关性分析. 现代预防医学 2009; 36: 3488-3489
- Dennison C, Prasad M, Lloyd A, Bhattacharyya SK, Dhawan R, Coyne K. The health-related quality of life and economic burden of constipation. *Pharmacoeconomics* 2005; 23: 461-476
- 张宝莹, 韦爱玲, 陈兴洲, 蒋春燕, 陈雅娟, 吴耀生. 便秘与老年痴呆关系的调查. 中国老年学杂志 2009; 29: 2935-2937
- Rasquin A, Di Lorenzo C, Forbes D, Guiraldes E, Hyams JS, Staiano A, Walker LS. Childhood functional gastrointestinal disorders: child/adolescent. *Gastroenterology* 2006; 130: 1527-1537
- Higgins PD, Johanson JF. Epidemiology of constipation in North America: a systematic review. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 750-759
- Chen LY, Ho KY, Phua KH. Normal bowel habits and prevalence of functional bowel disorders in Singaporean adults--findings from a community based study in Bishan. *Community Medicine GI Study Group. Singapore Med J* 2000; 41: 255-258
- 李梅岭, 何洪芹, 陈信, 王文进, 王健莉, 张曼丽. 沧州市城乡居民便秘的流行病学调查. 现代预防医学 2011; 38: 603-605
- 郭晓峰, 柯美云, 潘国宗, 韩少梅, 方秀才, 鲁素彩, 郭慧平. 北京地区成人慢性便秘整群、分层、随机流行病学调查及其相关因素分析. 中华消化杂志 2002; 22: 637-638
- 王琳, 谢佩卿, 刘雪琴. 244例门诊老年人便秘情况分析. 广东医学 2011; 32: 80-81
- 陈长香, 郝习君, 李建民, 王敏. 老年女性便秘现状及其危险因素. 中国老年学杂志 2010; 30: 2041-2043
- 芦军萍, 黄瑛, 张烨, 王小卉, 邵彩虹. 小麦纤维素治疗儿童功能性便秘的疗效观察. 中国当代儿科杂志 2011; 13: 377-380
- Murakami K, Sasakii S, Okubo H, Takahashi Y, Hosono Y, Itabashi M. Food intake and functional constipation: a cross-sectional study of 3,835 Japanese women aged 18-20 years. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 2007; 53: 30-36
- 文金宁, 梁仕兰, 郭琳萍, 钱丹玲, 秦燊, 徐新华. 燕麦粥结合便秘体操预防住院精神病人便秘的效果观察. 护理研究 2011; 25: 1824-1825
- 刘川玉, 周劲刚, 何洁, 唐建红. 车前子不同炮制品对慢性功能性便秘的疗效. 中国实验方剂学杂志 2011; 17: 259-261
- 李天利. 改良开塞露灌肠法有效治疗便秘. 青海医药杂志 2011; 41: 19
- 陈慧, 殷玉兰, 邓珍良, 胡彩如, 肖佩如. 3种治疗长期卧床骨折患者便秘方法的效果比较. 现代临床护理 2011; 10: 16, 66
- Chmielewska A, Szajewska H. Systematic review of randomised controlled trials: probiotics for functional constipation. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 69-75
- Bongers ME, Benninga MA, Maurice-Stam H, Grootenhuys MA. Health-related quality of life in young adults with symptoms of constipation continuing from childhood into adulthood. *Health Qual Life Outcomes* 2009; 7: 20
- 孙健, 林晖. 功能性便秘的非药物治疗进展. 辽宁中医药大学学报 2011; 13: 207-209
- Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food; 2002 Apr 30-May 1; London Ontario, Canada
- Roberfroid MB, Van Loo JA, Gibson GR. The bifidogenic nature of chicory inulin and its hydrolysis products. *J Nutr* 1998; 128: 11-19
- Biliaderis CG, Izydorczyk MS. 功能性食品碳水化合物. 第1版. 北京: 中国轻工业出版社, 2009: 374
- Saarela M. 功能性乳制品. 第1版. 北京: 中国轻工业出版社, 2009: 73
- Salminen S, Salminen E. Lactulose, lactic acid bacteria, intestinal microecology and mucosal protection. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1997; 222: 45-48
- Zoppi G, Cinquetti M, Luciano A, Benini A, Muner A, Bertazzoni Minelli E. The intestinal ecosystem in chronic functional constipation. *Acta Paediatr* 1998; 87: 836-841
- 王记成, 高鹏飞, 周琦, 王秋实, 赵虎云, 张和平. 双歧杆菌V9对便秘和腹泻患者的临床研究. 营养学报 2001; 33: 70-74
- Picard C, Fioramonti J, Francois A, Robinson T, Neant F, Matuchansky C. Review article: bifidobacteria as probiotic agents -- physiological effects and clinical benefits. *Aliment Pharmacol Ther* 2005; 22: 495-512
- Agrawal A, Houghton LA, Morris J, Reilly B, Guyonnet D, Goupil Feuillerat N, Schlumberger A, Jakob S, Whorwell PJ. Clinical trial: the effects of a fermented milk product containing Bifidobacterium lactis DN-173 010 on abdominal distension and gastrointestinal transit in irritable bowel syndrome with constipation. *Aliment Pharmacol Ther* 2009; 29: 104-114
- Marteau P, Cuillerier E, Meance S, Gerhardt MF, Myara A, Bouvier M, Bouley C, Tondou F, Bom-

■同行评价

本文综述了益生菌对功能性便秘的防治进展, 文章具有一定的科学性和可读性, 并有较好的临床参考意义.

- melaer G, Grimaud JC. Bifidobacterium animalis strain DN-173 010 shortens the colonic transit time in healthy women: a double-blind, randomized, controlled study. *Aliment Pharmacol Ther* 2002; 16: 587-593
- 31 Waller PA, Gopal PK, Leyer GJ, Ouwehand AC, Reifer C, Stewart ME, Miller LE. Dose-response effect of Bifidobacterium lactis HN019 on whole gut transit time and functional gastrointestinal symptoms in adults. *Scand J Gastroenterol* 2011; 46: 1057-1064
 - 32 Yajima T. Contractile effect of short-chain fatty acids on the isolated colon of the rat. *J Physiol* 1985; 368: 667-678
 - 33 Mcmanus CM, Michel KE, Simon DM, Washabau RJ. Effect of short-chain fatty acids on contraction of smooth muscle in the canine colon. *Am J Vet Res* 2002; 63: 295-300
 - 34 Yang YX, He M, Hu G, Wei J, Pages P, Yang XH, Bourdu-Naturel S. Effect of a fermented milk containing Bifidobacterium lactis DN-173010 on Chinese constipated women. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 6237-6243
 - 35 Koebnick C, Wagner I, Leitzmann P, Stern U, Zunft HJ. Probiotic beverage containing Lactobacillus casei Shirota improves gastrointestinal symptoms in patients with chronic constipation. *Can J Gastroenterol* 2003; 17: 655-659
 - 36 Banaszkiwicz A, Szajewska H. Ineffectiveness of Lactobacillus GG as an adjunct to lactulose for the treatment of constipation in children: a double-blind, placebo-controlled randomized trial. *J Pediatr* 2005; 146: 364-369
 - 37 Bu LN, Chang MH, Ni YH, Chen HL, Cheng CC. Lactobacillus casei rhamnosus Lcr35 in children with chronic constipation. *Pediatr Int* 2007; 49: 485-490
 - 38 Bekkali NL, Bongers ME, Van den Berg MM, Liem O, Benninga MA. The role of a probiotics mixture in the treatment of childhood constipation: a pilot study. *Nutr J* 2007; 6: 17
 - 39 Möllenbrink M, Bruckschen E. [Treatment of chronic constipation with physiologic Escherichia coli bacteria. Results of a clinical study of the effectiveness and tolerance of microbiological therapy with the E. coli Nissle 1917 strain (Mutaflor)]. *Med Klin (Munich)* 1994; 89: 587-593
 - 40 Fateh R, Irvani S, Frootan M, Rasouli MR, Saadat S. Synbiotic preparation in men suffering from functional constipation: a randomised controlled trial. *Swiss Med Wkly* 2011; 141: w13239
 - 41 陈历俊. 乳品科学与技术. 第1版, 北京: 中国轻工业出版社, 2007: 291
 - 42 Riegler G, Esposito I. Bristol scale stool form. A still valid help in medical practice and clinical research. *Tech Coloproctol* 2001; 5: 163-164
 - 43 Degen LP, Phillips SF. How well does stool form reflect colonic transit? *Gut* 1996; 39: 109-113
 - 44 周建林. 微生态制剂和乳果糖协同治疗儿童功能性便秘临床分析. 海南医学院学报 2007; 13: 469-471
 - 45 许飞利, 李志刚, 付萍, 王洪新, 刘秀梅. 益生菌生理作用的最新进展. 卫生研究 2011; 40: 277-278
 - 46 美国推出益生菌巧克力. 中国食品学报 2011; 11: 220
 - 47 王红艳, 覃继辉, 邢咏梅, 宋静, 陈春燕, 齐眉, 栾怡, 于修平. 乳酸杆菌对Hela细胞免疫标志表达和效应影响的初步研究. 中华微生物学和免疫学杂志 2004; 24: 737
 - 48 李岩. 抗生素相关性腹泻. 中国实用内科杂志 2007; 27: 1012-1013
 - 49 Johnston BC, Goldenberg JZ, Vandvik PO, Sun X, Guyatt GH. Probiotics for the prevention of pediatric antibiotic-associated diarrhea. *Cochrane Database Syst Rev* 2011; 11: CD004827
 - 50 姜安丽. 新编护理学基础. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 365
 - 51 霍建勋, 张利霞, 杨翠英. 在校大学生功能性便秘精神心理因素分析. 中国学校卫生 2011; 32: 622-623
 - 52 蒋新玲, 杨娟娟. 癌症化疗患者便秘的相关因素及护理措施. 中国社区医师(医学专业) 2011; 21: 285

编辑 张姗姗 电编 闫晋利

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》参考文献要求

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

高渗盐胶体对失血性休克大鼠小肠黏膜形态的影响

李震, 欧阳军

李震, 欧阳军, 石河子大学医学院第一附属医院急诊外科 新疆维吾尔自治区石河子市 832000

李震, 硕士研究生, 主要从事腹部创伤与外科急腹症的研究。

作者贡献分布: 此课题由李震与欧阳军设计; 动物模型制作和血清NO浓度检测分析由李震操作完成; 论文写作由李震与欧阳军完成。

通讯作者: 欧阳军, 教授, 硕士生导师, 832000, 新疆维吾尔自治区石河子市, 石河子大学医学院第一附属医院急诊外科。

yifan.jzk@163.com

收稿日期: 2012-02-10 修回日期: 2012-03-15

接受日期: 2012-03-20 在线出版日期: 2012-04-28

Hypertonic sodium chloride hydroxyethyl starch injection reduces histopathological changes in the intestinal mucosa of rats with hemorrhagic shock

Zhen Li, Jun Ouyang

Zhen Li, Jun Ouyang, Department of Emergency Surgery, the First Affiliated Hospital, Medical School of Shihezi University, Shihezi 832000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Correspondence to: Jun Ouyang, Professor, Department of Emergency Surgery, the First Affiliated Hospital, Medical School of Shihezi University, Shihezi 832000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China. yifan.jzk@163.com

Received: 2012-02-10 Revised: 2012-03-15

Accepted: 2012-03-20 Published online: 2012-04-28

Abstract

AIM: To evaluate the effect of small-volume hypertonic sodium chloride hydroxyethyl starch injection on histopathological changes in the intestinal mucosa and plasma levels of NO in rats with hemorrhagic shock.

METHODS: Male SD rats were hemorrhaged to the mean arterial pressure of 40 mmHg \pm 5 mmHg for 30 min to induce hemorrhagic shock. Animals were randomly divided into three groups: rats resuscitated with 4 mL/kg of 5.0% hypertonic sodium chloride hydroxyethyl starch injection and retransfused shed blood, those resuscitated with lactated Ringer's solution (two times the volume of shed blood) and retransfused shed blood, and those undergoing sham hemorrhage. The dynamic changes in plasma NO

concentrations were monitored, and pathological changes in the small intestine were observed.

RESULTS: After resuscitation with hypertonic sodium chloride hydroxyethyl starch injection, NO showed no significant changes ($P > 0.05$), and pathological changes in the small intestine were significantly reduced. In contrast, plasma NO concentration significantly decreased ($P < 0.05$) and pathological damage to the small intestine showed no significant improvement in rats resuscitated with lactated Ringer's solution.

CONCLUSION: Resuscitation with hypertonic sodium chloride hydroxyethyl starch injection reduces intestinal damage in rats hemorrhagic shock possibly via a mechanism associated with protection of endothelial cell function.

Key Words: Hemorrhagic Shock; Hypertonic sodium chloride hydroxyethyl starch injection; Lactated Ringer's solution

Li Z, Ouyang J. Hypertonic sodium chloride hydroxyethyl starch injection reduces histopathological changes in the intestinal mucosa of rats with hemorrhagic shock. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(12): 1041-1045

摘要

目的: 研究小容量高渗盐羟乙基淀粉液(HSH)复苏失血性休克大鼠时肠黏膜形态的变化和血清NO浓度变化。

方法: SD大鼠麻醉后放血致平均动脉压40 mmHg \pm 5 mmHg, 维持30 min, SD大鼠随机分成3组: (1)高渗盐羟乙基淀粉复合液+回输失血(HSH组); (2)乳酸林格液复苏+回输失血(LR组); (3)假休克组, 只进行血管置管; 观察休克前后血浆NO浓度的动态变化, 并留取小肠组织观察病理改变。

结果: HSH组大鼠复苏后血浆NO无明显下降, 复苏前(30.03 μ mol/L \pm 4.77 μ mol/L)和复苏后(27.33 μ mol/L \pm 8.76 μ mol/L)比较, 无显著差异($P > 0.05$), 小肠的病理损伤也显著减轻。LR组血浆NO浓度明显降低, 复苏前(28.37 μ mol/L

■背景资料

小容量高渗盐溶液是近年来在创伤失血性休克复苏逐渐形成的又一新的休克复苏途径。NO作为强大的血管扩张剂和血管完整性的保护者发挥着有益的作用。

■同行评议者

汪波, 主任医师, 北京大学第一医院急诊科

■ 研究前沿

传统的复苏方法常常只恢复和维持血流动力学而不能恢复肠道的灌注,其导致的肠道缺血再灌注损伤在休克后肠源性的全身炎症反应的加重和器官障碍的发展中起作用,因此,防止肠道缺血再灌注损伤导致的肠屏障功能障碍尤其重要。

$L \pm 6.24 \mu\text{mol/L}$ 和复苏后($17.48 \mu\text{mol/L} \pm 5.24 \mu\text{mol/L}$)比较,有显著差异($P < 0.05$),小肠的病理损伤无明显改善。

结论:应用HSH有助于改善失血休克引起的肠道损伤;其机制可能与HSH减少内皮细胞功能损害有关。

关键词:失血性休克;高渗盐胶体复合液;乳酸林格氏液

李震, 欧阳军. 高渗盐胶体对失血性休克大鼠小肠黏膜形态的影响. 世界华人消化杂志 2012; 20(12): 1041-1045

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1041.asp>

0 引言

失血性休克液体复苏可以引起肠缺血再灌注损伤,从而导致肠黏膜损伤并破坏黏膜细胞的胃屏障作用,肠道内细菌和内毒素通过通透性增加的黏膜入侵机体,具有强烈致炎物质的刺激源肠道持续输送到机体,诱发多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)和脓毒症的最重要原因之一就是这一过程^[1]. 大量等渗晶体溶液复苏是传统复苏方法,组织容易水肿,尤其是发生肺水肿. 小容量高渗盐溶液是近年来在创伤失血性休克复苏逐渐形成的又一新的休克复苏途径. NO作为强大的血管扩张剂和血管完整性的保护者发挥着有益的作用. 许多研究显示NO降低缺血再灌注后黏膜损伤^[2]和减少肠缺血引起的肺损伤^[3]. 另一方面,NO与超氧阴离子结合生成过氧亚硝基阴离子(ONOO⁻),他是可以导致组织损伤的强氧化剂^[4]. 本研究的目的是以高容量的乳酸林格氏溶液为对照,探讨小容量高渗盐羟乙基淀粉复合液对失血性休克大鼠早期全身血流动力学、肠道组织灌注和血清NO的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 ♂ SD大鼠30只,体质量为 $250 \text{ g} \pm 50 \text{ g}$,由石河子大学医学院动物实验中心提供。

1.2 方法

1.2.1 失血性休克动物模型建立: SD大鼠称质量后,给予腹腔注射10%水合氯醛 $0.5 \text{ mL}/100 \text{ g}$ 麻醉,右颈内静脉置入套管针输液,左侧颈动脉置入套管针监测有创平均动脉压,右侧股动脉置入套管针备用放血和采血,15 min内分次放血容量占总血容量40%,使平均动脉压(MAP)稳定维持在35-45 mmHg 30 min,进入实验组。

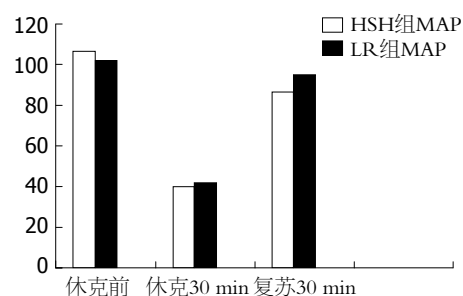


图1 两组休克前后鼠的平均动脉压变化($n = 10$, mean \pm SD).

1.2.2 分组: SD大鼠30只被随即分成A、B、C组,每组10只. A组(正常组)大鼠只进行动静脉置管测血压处理. B组(HSH组)用5%高渗盐羟乙基淀粉混合液进行容量复苏. C组(LR组)采用二倍失血量的乳酸林格氏溶液进行容量复苏. 所有液体均在30 min内输入,复苏溶液输注完毕后在30 min内回输失血。

1.2.3 血流动力学监测: 成都泰盟电子有限公司BL-420智能型生物信号采集与处理系统换能器连接左侧颈总动脉插管连续监测血压。

1.2.4 肠黏膜组织形态学观察: 实验组大鼠处死后取距回盲部4 cm处的小肠组织标本,标本约 $3 \text{ cm} \times 3 \text{ cm}$ 大小,保存在10%甲醛溶液中. 以同样的方法取正常组相同大小的小肠标本。

1.2.5 血清NO含量的检测: 在各时间点采集血样后,1500 r/min离心15 min后取血清备测. 检测试剂盒购自南京建成生物医学工程研究所,严格按试剂盒说明进行操作。

统计学处理 统计学分析应用SPSS17.0统计软件包. 计量资料数据用mean \pm SD表示,血流动力学及血清NO前后比较应用自身配对 t 检验,多组均数比较采用单因素方差分析的方法,均数间两两比较采用 q 检验,等级资料两样本比较采用秩和检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 血流动力学 2组动物在放血形成失血性休克模型后, MAP较基础正常明显下降,两组容量复苏所用液体量分别是: LR组2倍失血量; HSH组4 mL/kg. 两组溶液复苏完毕30 min,每组的平均动脉压均得到明显的改善,与休克时相比较均有明显的统计学差异($P < 0.05$),复苏30 min后,LR组和HSH组相比较平均动脉压回升稍高,但无统计学意义($P > 0.05$,图1)。

2.2 血清NO浓度变化 在休克前正常组血清NO浓度为 $30.98 \mu\text{mol/L} \pm 5.99 \mu\text{mol/L}$, HSH组为 $31.14 \mu\text{mol/L} \pm 5.57 \mu\text{mol/L}$, LR组为 $31.47 \mu\text{mol/L}$

■**相关报道**
Charles等发现小容量高渗盐复苏可以防止大容量复苏肠道水肿引起的肠道组织间隙压力升高;另外Lu等研究还表明,高渗盐复苏诱导血红素氧合酶(HO-1)的过度表达以防止肠道缺血再灌注损伤。

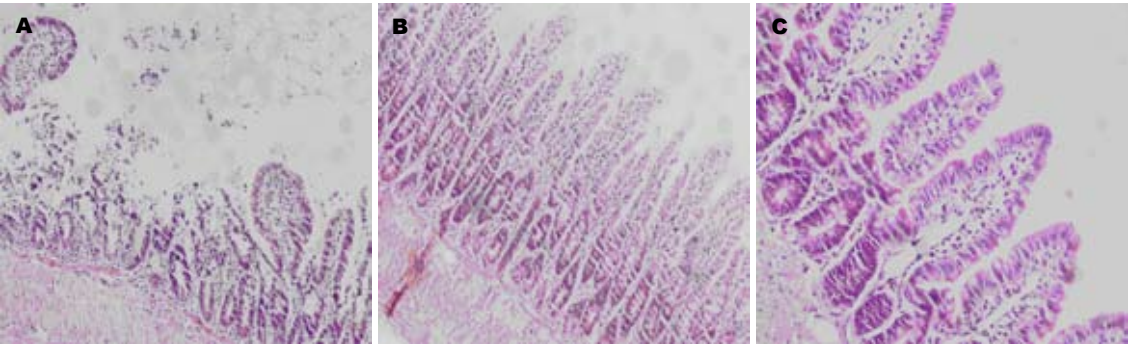


图 2 大鼠回肠病理学改变. A: LR组; B: 正常组; C: HSH组.

表 1 休克鼠血清NO浓度变化

分组	Pre-s	休克30 min	复苏60 min
正常组	30.98 ± 5.99	29.06 ± 5.93	28.92 ± 6.03
HSH组	31.14 ± 5.57	30.03 ± 4.77	27.33 ± 8.76
LR组	31.47 ± 5.27	28.37 ± 6.24	17.48 ± 5.24

表 2 大鼠失血再灌注后回肠黏膜损伤程度比较 (n)

分组	正常	轻度受损	中度受损	重度受损
正常组	10	0	0	0
HSH组	0	8	2	0
LR组	0	0	7	3

±5.27 μmol/L, 休克30 min后血清NO浓度HSH组为30.03 μmol/L ± 4.77 μmol/L, LR组为28.37 μmol/L ± 6.24 μmol/L, 正常组血清NO浓度为29.06 μmol/L ± 5.93 μmol/L, 复苏1 h, LR组血清NO含量明显降低, 与正常组、HSH组相比较有统计学意义($P < 0.05$, 表1).

2.3 回肠病理学改变 回肠黏膜病理分析, Chiu等^[5]对正常组、HSH组、LR组评分分别为0.34 ± 0.260、2.03 ± 0.438、3.50 ± 0.361, 正常组回肠表现为正常黏膜结构(图2); HSH组回肠黏膜受损明显轻于LR组, 所得数据使用非参数Kruskal-Wallis检验, $P < 0.05$, 提示三组之间有显著性差异. HSH组间与LR组, HSH组与正常组比较采用Dunn's Q检验, HSH组间与LR组, HSH组与正常组之间比较有显著性差异($P < 0.05$).

2.4 回肠黏膜损伤程度比较 回肠黏膜损伤程度比较结果见表2.

3 讨论

创伤导致大量失血是创伤患者和军事战斗人员死亡的首要原因. 休克导致血管不成比例的收缩和心输出量的再分配, 并由复苏、再灌注肠道触

发的全身炎症反应引起邻近和远处器官的损伤.

休克的创伤患者的传统治疗方法是用等渗林格氏液和输血快速恢复血容量. 从理论上讲, 休克患者晶体液和血液输入可以改善心脏充盈和输出, 并减少用于增加循环外周阻力而维持有效血压的药物使用. 传统的复苏方法常常只恢复和维持血流动力学而不能恢复肠道的灌注, 其导致的肠道缺血再灌注损伤在休克后肠源性的全身炎症反应加重和器官障碍的发展中起作用, 因此, 防止肠道缺血再灌注损伤导致的肠屏障功能障碍尤其重要. 自1980年以来, 大量的研究证明高渗溶液复苏失血性休克具有扩充血浆容量、改善心输出量、局部血流和微循环的生理效应^[6]. 近期高渗盐溶液的免疫调节效应研究表明, 高渗盐溶液单独或与右旋糖酐溶液能抑制中性粒细胞呼吸暴发和减少β2整合素表达, 超氧化物生产和弹性蛋白酶的释放^[7]. 高渗盐复苏通过增强TLR4表达和NF-κB活化降低烧伤后炎性细胞凋亡和增强了宿主对细菌的防御^[8]. 本研究结果显示, 大量乳酸林格液再灌注后, 回肠黏膜严重损伤, 表现为回肠黏膜绒毛水肿、明显脱落, 而且白细胞浸润黏膜. 小容量高渗盐胶体复苏效果较好, 表现为回肠黏膜绒毛水肿轻、脱落较少. 说明高渗盐胶体复苏对小肠失血再灌注有保护作用, 这与普遍认为高渗盐复苏可以减少失血性休克后肠道损伤和细胞凋亡相符合^[9]. 有研究发现, 即使平均动脉压接近休克水平, 小容量高渗盐可以依靠选择性扩张毛细血管前微动脉改善小肠灌^[10]. Shi等^[11]研究发现高渗盐可以改善创伤性休克后肠道黏膜屏障功能. Cox等^[12]发现小容量高渗盐复苏可以防止大容量复苏肠道水肿引起的肠道组织间隙压力升高;另外Lu等^[13]研究还表明, 高渗盐复苏诱导血红素氧合酶(HO-1)的过度表达以防止肠道缺血再灌注损伤;此外, 得出这样的结论: 抑制中

■同行评价

本研究探讨了小容量高渗盐羟乙基淀粉复合液对失血性休克大鼠早期全身血流动力学、肠道组织灌注和血清NO的影响,具有一定的临床医用价值。

性粒细胞有助于在体外经上皮跨膜迁移和在结肠炎小鼠模型体内的肠道组织损伤。因此,高渗盐可能有降低中性粒细胞介导的肠道损伤的临床应用价值^[14];最后Radhakrishnan等^[15]研究发现高渗盐水复苏引起肠道黏膜水通道蛋白4基因和蛋白表达上调,可减轻肠道水肿发展和促进流体再分配,增加浆肌和黏膜表面细胞膜导电性;高渗信号系统广泛存在于多种哺乳动物细胞说明,高渗盐复苏凭借提高血浆渗透压除了上面描述影响外,还有其他不为人知的影响。

高渗盐维持时间较短暂,采用羟乙基淀粉溶液配伍,可以通过提高血管内胶体渗透压和胶体在血管内的存留时间从而使高渗盐溶液的血流动力学效应增强和延长。Lobo等^[16]研究发现低容量晶体液和羟乙基淀粉溶液复苏可以减少兔子缺血肠道的水肿。

在失血性休克休克病理生理过程中NO浓度的变化说法不同,较早的研究认为NO在休克后合成减少。Szabó等^[17]研究证明在创伤性休克时结构性NOS合成NO减少。较近的研究: Xia等^[18]研究认为血清NO浓度在缺血再灌注后升高。值得注意的是影响血清NO浓度不是休克本身,而是主要由再灌注后组织代谢变化引起的,他可能为次要损伤器官的保护机制。本实验结果表现为休克缺血期NO水平没有显著改变,大容量复苏组复苏1 h后血清NO浓度和小容量高渗盐胶体组、正常组比较显著下降,其下降的原因可能是:大量乳酸林格液再灌注早期导致内皮细胞损伤,内皮细胞eNOS合成NO减少^[19];大量乳酸林格液复苏降低血液黏滞度,血流对血管壁切应力下降内皮细胞受刺激合成NO减少^[20];大量乳酸林格液复苏稀释血液影响NO浓度^[21];大量乳酸林格液复苏早期内源性NO合成降低,iNOS还没大量合成NO^[22]。

高渗盐胶体复苏早期NO无明显下降,并且从病理方面观察高渗盐胶体复苏组回肠黏膜绒毛水肿轻、脱落较少。Molnár等^[23]研究发现:HSD复苏显著提高冠脉流量和心肌收缩力,心脏指数,血浆NO和内皮素-1的水平。eNOS派生的NO是一个许多重要的胃肠黏膜功能稳态的调节因子,如维持足够的灌注,调节微血管和上皮的通透性。eNOS来源的NO是野生型小鼠循环中的亚硝酸盐的主要来源^[24]。而Dezfulian等^[25]研究显示亚硝酸盐对不同的I/R组织具有细胞保护作用,包括肝脏、心脏、肾脏和脑。NO供体吗多明减轻小肠缺血后再灌注损伤,同时恢复肠道

微循环血流和组织学损伤^[26]。提高灌注是一个很重要的因素,因为稀释缓冲了灌注损伤小肠的酸化固有层和清除毒素穿过上皮的媒介。

总之,在使用不同液体复苏过程中血清NO的水平变化和回肠组织形态学的改变,高渗盐胶体复苏减少血管内皮细胞再灌注损伤,内源性NO合成无明显减少,NO和高渗盐胶体协同发挥保护肠黏膜的作用,也许NO在高渗盐引起的血流动力学变化和肠道黏膜灌注中发挥着部分重要的作用,这有待我们去研究。

4 参考文献

- 1 Mythen MG, Webb AR. Intra-operative gut mucosal hypoperfusion is associated with increased post-operative complications and cost. *Intensive Care Med* 1994; 20: 99-104
- 2 Kubes P, Granger DN. Nitric oxide modulates microvascular permeability. *Am J Physiol* 1992; 262: H611-H615
- 3 Takada K, Yamashita K, Sakurai-Yamashita Y, Shigematsu K, Hamada Y, Hioki K, Taniyama K. Participation of nitric oxide in the mucosal injury of rat intestine induced by ischemia-reperfusion. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; 287: 403-407
- 4 Cuzzocrea S, Zingarelli B, Caputi AP. Role of constitutive nitric oxide synthase and peroxynitrite production in a rat model of splanchnic artery occlusion shock. *Life Sci* 1998; 63: 789-799
- 5 Chiu CJ, McArdle AH, Brown R, Scott HJ, Gurd FN. Intestinal mucosal lesion in low-flow states. I. A morphological, hemodynamic, and metabolic reappraisal. *Arch Surg* 1970; 101: 478-483
- 6 Dubick MA, Bruttig SP, Wade CE. Issues of concern regarding the use of hypertonic/hyperoncotic fluid resuscitation of hemorrhagic hypotension. *Shock* 2006; 25: 321-328
- 7 Pascual JL, Khwaja KA, Ferri LE, Giannias B, Evans DC, Razek T, Michel RP, Christou NV. Hypertonic saline resuscitation attenuates neutrophil lung sequestration and transmigration by diminishing leukocyte-endothelial interactions in a two-hit model of hemorrhagic shock and infection. *J Trauma* 2003; 54: 121-130; discussion 130-132
- 8 Chen LW, Su MT, Chen PH, Liu WC, Hsu CM. Hypertonic saline enhances host defense and reduces apoptosis in burn mice by increasing toll-like receptors. *Shock* 2011; 35: 59-66
- 9 Murao Y, Hata M, Ohnishi K, Okuchi K, Nakajima Y, Hiasa Y, Junger WG, Hoyt DB, Ohnishi T. Hypertonic saline resuscitation reduces apoptosis and tissue damage of the small intestine in a mouse model of hemorrhagic shock. *Shock* 2003; 20: 23-28
- 10 Zakaria el R, Tsakadze NL, Garrison RN. Hypertonic saline resuscitation improves intestinal microcirculation in a rat model of hemorrhagic shock. *Surgery* 2006; 140: 579-587; discussion 587-588
- 11 Shi HP, Deitch EA, Da Xu Z, Lu Q, Hauser CJ. Hypertonic saline improves intestinal mucosa barrier function and lung injury after trauma-hemorrhagic shock. *Shock* 2002; 17: 496-501
- 12 Cox CS, Radhakrishnan R, Villarrubia L, Xue H, Uray K, Gill BS, Stewart RH, Laine GA. Hypertonic

- saline modulation of intestinal tissue stress and fluid balance. *Shock* 2008; 29: 598-602
- 13 Lu YQ, Gu LH, Huang WD, Mou HZ. Effect of hypertonic saline resuscitation on heme oxygenase-1 mRNA expression and apoptosis of the intestinal mucosa in a rat model of hemorrhagic shock. *Chin Med J (Engl)* 2010; 123: 1453-1458
- 14 Tillinger W, McCole DF, Keely SJ, Bertelsen LS, Wolf PL, Junger WG, Barrett KE. Hypertonic saline reduces neutrophil-epithelial interactions in vitro and gut tissue damage in a mouse model of colitis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2008; 295: R1839-R1845
- 15 Radhakrishnan RS, Shah SK, Lance SH, Radhakrishnan HR, Xue H, Radhakrishnan GL, Ramaswamy US, Walker PA, Uray KS, Laine GA, Stewart RH, Cox CS. Hypertonic saline alters hydraulic conductivity and up-regulates mucosal/submucosal aquaporin 4 in resuscitation-induced intestinal edema. *Crit Care Med* 2009; 37: 2946-2952
- 16 Lobo SM, Orrico SR, Queiroz MM, Contrim LM, Cury PM. Comparison of the effects of lactated Ringer solution with and without hydroxyethyl starch fluid resuscitation on gut edema during severe splanchnic ischemia. *Braz J Med Biol Res* 2008; 41: 634-639
- 17 Szabó C, Thiemermann C. Invited opinion: role of nitric oxide in hemorrhagic, traumatic, and anaphylactic shock and thermal injury. *Shock* 1994; 2: 145-155
- 18 Xia G, Lara-Marquez M, Luquette MH, Glenn S, Haque A, Besner GE. Heparin-binding EGF-like growth factor decreases inducible nitric oxide synthase and nitric oxide production after intestinal ischemia/reperfusion injury. *Antioxid Redox Signal* 2001; 3: 919-930
- 19 Hansen PR. Inflammatory alterations in the myocardial microcirculation. *J Mol Cell Cardiol* 1998; 30: 2555-2559
- 20 赵克森, 金丽娟. 休克的细胞和分子基础. 北京: 科学出版社, 2002: 26-28
- 21 Gebhard F, Nüssler AK, Rösch M, Pfetsch H, Kinzl L, Brückner UB. Early posttraumatic increase in production of nitric oxide in humans. *Shock* 1998; 10: 237-242
- 22 Kelly E, Shah NS, Morgan NN, Watkins SC, Peitzman AB, Billiar TR. Physiologic and molecular characterization of the role of nitric oxide in hemorrhagic shock: evidence that type II nitric oxide synthase does not regulate vascular decompensation. *Shock* 1997; 7: 157-163
- 23 Molnár G, Csonka E, Vass A, Boros M, Kaszaki J. Circulatory consequences of reduced endogenous nitric oxide production during small-volume resuscitation. *Acta Physiol Hung* 2011; 98: 393-408
- 24 Lundberg JO, Weitzberg E, Gladwin MT. The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 2008; 7: 156-167
- 25 Dezfulian C, Raat N, Shiva S, Gladwin MT. Role of the anion nitrite in ischemia-reperfusion cytoprotection and therapeutics. *Cardiovasc Res* 2007; 75: 327-338
- 26 Oztürk H, Aldemir M, Dokucu AI, Yağmur Y, Kiliç N, Sahin AH. The nitric oxide donor molsidomine prevents ischemia/reperfusion injury of the adult rat small intestine. *Pediatr Surg Int* 2003; 19: 305-308

编辑 曹丽鸥 电编 闫晋利

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》被评为中国精品科技期刊

本刊讯 2011-12-02, 中国科学技术信息研究所在北京发布2010年中国科技论文统计结果, 经过中国精品科技期刊遴选指标体系综合评价, 《世界华人消化杂志》被评为2011年度中国精品科技期刊. 中国精品科技期刊以其整体的高质量示范作用, 带动我国科技期刊学术水平的提高. 精品科技期刊的遴选周期为三年. (编辑部主任: 李军亮 2012-01-01)

超声内镜联合染色内镜在早期食管癌诊断中的应用价值

汪泳, 张方信, 常宗宏, 魏红梅, 赵海霞, 杨永林

■背景资料

早期食管癌大约4-5年方能发展为进展癌, 因此为患者的早期诊断提供了可能性。但早期患者无特殊的临床症状, 诊断困难, 目前内镜检查是检出早期食管癌的重要手段。

汪泳, 张方信, 常宗宏, 魏红梅, 赵海霞, 杨永林, 中国人民解放军兰州军区兰州总医院消化科 甘肃省兰州市 730050

汪泳, 副主任医师, 主要研究方向是消化系统肿瘤的侵袭与转移。
作者贡献分布: 汪泳与张方信对此文所作贡献均等; 此课题由汪泳设计; 研究过程由汪泳、张方信、常宗宏、魏红梅、赵海霞及杨永林操作完成; 研究数据分析由汪泳完成; 本论文写作由汪泳与张方信完成。

通讯作者: 张方信, 主任医师, 730050, 甘肃省兰州市, 中国人民解放军兰州军区兰州总医院消化科。zhangfx2008@tom.com
电话: 0931-8994268

收稿日期: 2011-12-09 修回日期: 2012-02-09

接受日期: 2012-03-06 在线出版日期: 2012-04-28

Diagnostic value of endoscopic ultrasound combined with Lugol's staining in patients with early esophageal cancer

Yong Wang, Fang-Xin Zhang, Zong-Hong Chang, Hong-Mei Wei, Hai-Xia Zhao, Yong-Lin Yang

Yong Wang, Fang-Xin Zhang, Zong-Hong Chang, Hong-Mei Wei, Hai-Xia Zhao, Yong-Lin Yang, Department of Gastroenterology, Lanzhou General Hospital of Lanzhou Military Command of Chinese PLA, Lanzhou 730050, Gansu Province, China

Correspondence to: Fang-Xin Zhang, Chief Physician, Department of Gastroenterology, Lanzhou General Hospital of Lanzhou Military Command of Chinese PLA, Lanzhou 730050, Gansu Province, China. zhangfx2008@tom.com

Received: 2011-12-09 Revised: 2012-02-09

Accepted: 2012-03-06 Published online: 2012-04-28

Abstract

AIM: To evaluate the value of endoscopic ultrasound (EUS) combined with Lugol's staining in the diagnosis of early esophageal cancer (EEC).

METHODS: White light endoscopy (WLE) was used to identify focal lesions, which were defined as any small local mucosal lesions with abnormal shape or color. Biopsy with pathological examination was performed to test the diagnostic accuracy of EUS combined with Lugol's staining for EEC.

RESULTS: A total of 72 focal lesions from 67 patients were identified by WLE from August 2009 to September 2011. Of 72 focal lesions, 16 were pathologically diagnosed as EEC, including 9 treated by endoscopic submucosal dissection

(ESD) or endoscopic mucosal resection(EMR), and 7 resected surgically. The sensitivity, specificity and accuracy of conventional WLE for diagnosing EEC are 81.3%, 66% and 62.5%, respectively. The corresponding percentages for EUS combined with Lugol's staining are 87.5%, 98.2% and 95.8%, respectively.

CONCLUSION: EUS combined with Lugol's staining is an effective method for the diagnosis of EEC.

Key Words: Early esophageal cancer; Early diagnosis; Endoscopic ultrasound; Staining

Wang Y, Zhang FX, Chang ZH, Wei HM, Zhao HX, Yang YL. Diagnostic value of endoscopic ultrasound combined with Lugol's staining in patients with early esophageal cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(12): 1046-1048

摘要

目的: 分析超声内镜联合染色内镜技术诊断早期食管癌的准确性, 评价其临床应用价值。

方法: 2009-08/2011-09行普通白光内镜(WLE)检查发现食管黏膜可疑病变67例, 患者72处病灶纳入研究, 可疑病变包括食管黏膜粗糙、糜烂、颜色异常、微隆起等。所有病变行活组织病理检查, 分析超声内镜联合染色内镜诊断早期食管癌的准确性。

结果: 72处局灶性病变中, 病理组织学证实癌性病变16处(9处病变行内镜下黏膜切除术或内镜黏膜下剥离术治疗, 7处病变行手术治疗)。非癌性病变56处, 为慢性炎症、轻-中度不典型增生。WLE诊断早期食管癌的敏感度、特异度和准确性分别为: 81.3%、66%、62.5%; 超声内镜联合染色内镜对应值分别为: 87.5%、98.2%、95.8%。

结论: 超声内镜联合染色内镜对食管病变有较高的诊断价值, 尤其是对诊断早期食管癌及癌前病变有重要意义。

关键词: 早期食管癌; 早期诊断; 超声内镜; 染色法

■同行评议者

周国雄, 主任医师, 南通大学附属医院消化内科

汪泳, 张方信, 常宗宏, 魏红梅, 赵海霞, 杨永林. 超声内镜联合染色内镜在早期食管癌诊断中的应用价值. 世界华人消化杂志 2012; 20(12): 1046-1048
http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1046.asp

0 引言

食管癌是一种严重影响人民健康的恶性肿瘤, 提高患者生存率及降低死亡率的关键是早期发现、早期诊断和早期治疗^[1]. 随着内镜技术的发展, 内镜黏膜切除术(endoscopic mucosal resection, EMR)和内镜黏膜下剥离术(endoscopic submucosal dissection, ESD)已成为微创治疗早期食管癌的有效方法^[2,3]. 但如何早期发现食管癌及癌前病变是目前亟待解决的问题. 我们通过对超声内镜联合染色内镜诊断早期食管癌准确性的研究, 旨在评估其临床应用价值.

1 材料和方法

1.1 材料 2009-08/2011-09在我院行普通白光胃镜(white light endoscopy, WLE)检查发现食管黏膜可疑病变的患者纳入本次研究, 采用前瞻性队列研究方式, 共纳入67例, 其中男43例、女24例, 年龄38-76岁. 可疑病变包括食管黏膜粗糙、糜烂、颜色异常、微隆起等. 剔除标准: 进展期食管癌、黏膜下病变及有食管手术、放疗史者.

1.2 方法 入选患者均签署知情同意书. 采用Olympus GIF-260胃镜及12 MHz或20 MHz超声微探头(UM-2000).

1.2.1 Lugol液染色: 对内镜下观察食管有可疑病变者, 用蒸馏水冲洗食管后, 经活检孔插入喷雾塑料导管至病变处, 由上至下喷洒2.5%复方卢戈氏液(Lugol液)10 mL. 染色后仔细观察病灶及周围区域的着色情况, 并记录染色前后的病灶图像.

1.2.2 微探头超声检查: 经活检孔注入脱气水, 插入12 MHz或20 MHz超声微探头(UM-2000), 待病灶处食管腔充盈水后开始扫查, 连续多层次扫查病灶不着色或着色不均匀区域.

1.2.3 病理检查: 对食管黏膜染色异常区域进行3-5块活检送病理检查, 以病理组织学诊断为金标准. 早期食管癌需行EMR、ESD或外科手术进一步证实.

1.2.4 结果判定: 正常Lugol液染色: 内镜下病灶处染色与周围组织染色基本一致, 均匀着色呈棕褐色. 染色异常: 病灶处不着色或呈棕黄色. 超声内镜下食管壁7层结构清晰, 异常区域表现为层次不清、层次中断或消失、层次增厚, 有

表 1 普通白光内镜与病理学诊断结果比较 (n)

		普通白光内镜		合计
		非癌性病变	癌性病变	
病理诊断	非癌性病变	32	24	56
	癌性病变	3	13	16
合计		35	37	72

表 2 超声内镜联合染色内镜与病理学诊断结果比较 (n)

		超声内镜联合染色内镜		合计
		非癌性病变	癌性病变	
病理诊断	非癌性病变	55	1	56
	癌性病变	2	14	16
合计		57	15	72

低回声浸润.

统计学处理 差异分析采用 t 检验、 χ^2 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

本组资料共收集67例患者、72处可疑局灶病变, 16处癌性病变均经EMR、ESD或外科手术后病理学证实为早期食管癌.

普通白光内镜诊断为癌性病变37处, 其中病理学进一步证实13处为癌性病变; 24处为非癌性病变. 72处可疑病灶中WLE诊断为非癌性病变35处, 经病理进一步证实3例为癌性病变, 32处为非癌性病变. WLE诊断早期食管癌的敏感度、特异度和准确度分别为: 81.3%、66%和62.5%(表1).

超声内镜联合染色内镜对72处可疑病变进行检查, 依据染色结果和超声层次情况综合判断, 共诊断癌性病变15处, 其中病理学证实14处为癌性病变, 1处为非癌性病变. 72处可疑病灶中超声内镜联合染色内镜诊断为非癌性病变57处, 经病理进一步证实2处为癌性病变, 55处为非癌性病变. 超声内镜联合染色内镜诊断早期食管癌的敏感度、特异度和准确度分别为: 87.5%、98.2%和95.8%(表2).

超声内镜联合染色内镜诊断早期食管癌的准确度明显高于WLE(95.8% vs 62.5%, $P<0.05$).

3 讨论

我国是食管癌高发区, 严重影响着国人的健康水平, 其预后与临床TNM分期有关. 早期食管癌患者术后5年生存率可达90%, 而中晚期仅为

■ 研发前沿

随着内镜设备及技术的不断提高, 临床医师采用黏膜染色、超声内镜、NBI放大内镜等技术以期提高诊断阳性率, 但如何早期发现食管癌及癌前病变是目前亟待解决的问题.

■应用要点

随着内镜下微创治疗尤其是ESD技术的不断提高,早期食管癌诊断率的提高又为避免开胸术后带来的反流、狭窄等严重并发症提供了很好的帮助。

10%^[4,5], 如何做到早诊、早治有着十分重要的意义。

早期食管癌是指癌组织局限于食管黏膜下层以内, 未累及肌层, 无淋巴结转移, 包括原位癌、黏膜内癌、黏膜下癌^[6,7]。目前临床上WLE检查仍是食管癌诊断的主要方法, 然而早期食管癌在WLE下表现不典型, 病灶范围不清晰, 且受人为因素影响很大, 病检阳性率较低。食管黏膜染色自1966年津田等用于内镜检查以来对于早期食管癌及癌前病变有很重要价值。食管染色法有Lugol液染色法、甲苯胺蓝染色法, 常用Lugol液染色法。Lugol液是应用食管鳞状上皮内的糖原与碘发生变色反应的原理, 癌变和不典型增生的鳞状上皮细胞内糖原含量少甚至消失, 故病变区不着色或着色不均匀, 由此可清晰地显示食管黏膜表面的微小改变及病变的范围及轮廓, 有利于定位并指导活检的准确性, 提高检出率^[8-10]。

超声内镜是目前判断早期食管癌浸润深度最常用的方法^[11,12]。其通过内镜直接观察食管壁内形态改变, 同时又可以进行实时超声扫查, 显示食管壁各层结构, 判断肿瘤浸润深度和有无淋巴结肿大。食管壁在超声微探头下可分为7-9层结构。早期食管癌的超声内镜图像表现为管壁增厚、层次紊乱、中断及分界消失的不规则低回声且病变未突破黏膜下层。研究发现^[8,13], 超声微探头区分T1m和T1sm病变的精确度、敏感度和特异度分别为73.5%、62.0%、76.5%, 对病变高估率为18.6%。

本研究中, 我们通过WLE检查与超声内镜联合染色内镜检查的队列研究, 结果显示, 染色内镜可明显提高食管癌病检阳性率, 联合超声内镜检查对于诊断早期食管癌的准确性显著高于WLE, 这与文献报道的结果相一致^[14]。同时随着内镜下微创治疗尤其是ESD技术的不断提高, 早期食管癌诊断率的提高又为避开开胸术后带来的反流、狭窄等严重并发症提供了很好的帮助, 其社会效益不言而喻。

总之, WLE仍是早期食管癌筛查首选的检查方法, 对可疑病变可进一步行超声内镜联合染色内镜检查, 并以此指导下进行组织学活检,

对早期食管癌及癌前病变有较高的诊断价值。

4 参考文献

- 1 Crockett SD, Lippmann QK, Dellon ES, Shaheen NJ. Health-related quality of life in patients with Barrett's esophagus: a systematic review. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2009; 7: 613-623
- 2 Sepesi B, Watson TJ, Zhou D, Polomsky M, Little VR, Jones CE, Raymond DP, Hu R, Qiu X, Peters JH. Are endoscopic therapies appropriate for superficial submucosal esophageal adenocarcinoma? An analysis of esophagectomy specimens. *J Am Coll Surg* 2010; 210: 418-427
- 3 Shi Q, Zhong YS, Yao LQ, Zhou PH, Xu MD, Wang P. Endoscopic submucosal dissection for treatment of esophageal submucosal tumors originating from the muscularis propria layer. *Gastrointest Endosc* 2011; 74: 1194-1200
- 4 Song ZB, Gao SS, Yi XN, Li YJ, Wang QM, Zhuang ZH, Wang LD. Expression of MUC1 in esophageal squamous-cell carcinoma and its relationship with prognosis of patients from Linzhou city, a high incidence area of northern China. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 404-407
- 5 Wang GQ, Jiao GG, Chang FB, Fang WH, Song JX, Lu N, Lin DM, Xie YQ, Yang L. Long-term results of operation for 420 patients with early squamous cell esophageal carcinoma discovered by screening. *Ann Thorac Surg* 2004; 77: 1740-1744
- 6 Takubo K, Aida J, Sawabe M, Kurosumi M, Arima M, Fujishiro M, Arai T. Early squamous cell carcinoma of the oesophagus: the Japanese viewpoint. *Histopathology* 2007; 51: 733-742
- 7 陈龙奇. 食管癌国际TNM分期第7版解读与评价. *中华肿瘤杂志* 2010; 32: 237-241
- 8 Chemaly M, Scalone O, Durivage G, Napoleon B, Pujol B, Lefort C, Hervieux V, Scoazec JY, Souquet JC, Ponchon T. Miniprobe EUS in the pretherapeutic assessment of early esophageal neoplasia. *Endoscopy* 2008; 40: 2-6
- 9 王国清, 郝长青, 赖少清, 王贵齐, 吕宁, 林冬梅, 扬玲, 谢永强. 碘染色在食管癌高发区直接内镜普查中的应用和效果. *中华消化内镜杂志* 2003; 20: 377-379
- 10 张月明, 王贵齐. 早期食管癌的内镜诊断与治疗进展. *中国消化内镜* 2008; 2: 21-29
- 11 Kawano T, Ohshima M, Iwai T. Early esophageal carcinoma: endoscopic ultrasonography using the Sonoprobe. *Abdom Imaging* 2003; 28: 477-485
- 12 梁玮, 郑金辉, 邓万银, 王丽珍, 何利平. 超声内镜对食管癌治疗方式的术前评估价值. *中华消化内镜杂志* 2009; 26: 188-190
- 13 Rampado S, Bocus P, Battaglia G, Ruol A, Portale G, Ancona E. Endoscopic ultrasound: accuracy in staging superficial carcinomas of the esophagus. *Ann Thorac Surg* 2008; 85: 251-256
- 14 陆京京, 丁士刚, 张莉, 周丽雅, 林三仁. 内镜下卢戈氏液染色在早期食管癌及异型增生诊断中的应用价值. *中国内镜杂志* 2009; 15: 1253-1256

■同行评价

本文通过分析超声内镜联合染色内镜技术诊断早期食管癌的准确性, 评价其临床应用价值, 论文选题较好, 统计正确, 结论可靠, 有较好的临床指导价值。

编辑 张姗姗 电编 闫晋利

通用引物巢式PCR法对哈萨克族食管鳞癌HPV感染的检测

陈卫刚, 杨春梅, 徐丽红, 张宁, 刘晓燕, 马云贵, 霍小玲, 韩玉胜, 田德安, 郑勇

陈卫刚, 杨春梅, 徐丽红, 张宁, 刘晓燕, 郑勇, 新疆石河子大学医学院第一附属医院消化内科 新疆维吾尔自治区石河子市 832000

马云贵, 新疆伊犁哈萨克自治州新源县人民医院 新疆维吾尔自治区新源县 835800

霍小玲, 新疆生产建设兵团农四师医院 新疆维吾尔自治区伊宁市 835000

韩玉胜, 新疆伊犁哈萨克自治州友谊医院 新疆维吾尔自治区伊宁市 835000

田德安, 华中科技大学同济医学院附属同济医院消化内科 湖北省武汉市 43000

陈卫刚, 主任医师, 副教授, 主要从事消化系统肿瘤的基础与临床研究。

国家“十一五”科技支撑计划基金资助项目, No. 2009BAI82B05

作者贡献分布: 郑勇与田德安对此文所作贡献均等; 此课题由郑勇、田德安及陈卫刚设计; 研究过程由陈卫刚、徐丽红、张宁、杨春梅及刘晓燕操作完成; 研究所有组织收集工作由马云贵、霍小玲及韩玉胜共同完成; 数据分析由陈卫刚、杨春梅及刘晓燕完成; 本论文写作由郑勇、田德安及陈卫刚完成。

通讯作者: 郑勇, 主任医师, 教授, 博士生导师, 832000, 新疆维吾尔自治区石河子市, 石河子大学医学院第一附属医院消化内科. zy2850@126.com

电话: 0993-2858876

收稿日期: 2011-10-24 修回日期: 2012-01-29

接受日期: 2012-03-28 在线出版日期: 2012-04-28

Detection of human papilloma virus in esophageal cancer in Xinjiang Kazakh patients by general primer-mediated polymerase chain reaction

Wei-Gang Chen, Chun-Mei Yang, Li-Hong Xu, Ning Zhang, Xiao-Yan Liu, Yun-Gui Ma, Xiao-Ling Huo, Yu-Sheng Han, De-An Tian, Yong Zheng

Wei-Gang Chen, Chun-Mei Yang, Li-Hong Xu, Ning Zhang, Xiao-Yan Liu, Yong Zheng, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Medical College of Shihezi University, Shihezi 832000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Yun-Gui Ma, Xinyuan County People's Hospital, Xinyuan 835801, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Xiao-Ling Huo, Production and Construction Corps Nong-sishi Hospital, Yining 835000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Yu-Sheng Han, Youyi Hospital, Yining 835000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

De-An Tian, Department of Gastroenterology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China

Correspondence to: Yong Zheng, Professor, Chief Physician, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of the Medical College, Shihezi University, Shihezi 832000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China. zy2850@126.com

Received: 2011-10-24 Revised: 2012-01-29

Accepted: 2012-03-28 Published online: 2012-04-28

Abstract

AIM: To detect human papillomavirus (HPV) in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) in Xinjiang Kazakh patients by universal primer-mediated nested PCR to investigate the relationship between HPV infection and ESCC.

METHODS: DNA was isolated from ESCC and healthy esophageal mucosal specimens from Xinjiang Kazakh adults and used to amplify HPV using universal primers HPV MY09/11 and HPV-specific primers HPV G5+/6+ by nested PCR. The rate of HPV infection was then calculated.

RESULTS: The rate of HPV infection was 66.67% in the ESCC group and 12.12% in the healthy control group.

CONCLUSION: HPV infection may be involved in the development of ESCC in Xinjiang Kazakh adults. Universal primer-mediated nested PCR is a convenient and reliable method for detection of HPV-DNA.

Key Words: Esophageal squamous cell carcinoma; Human papilloma virus; Nested PCR

Chen WG, Yang CM, Xu LH, Zhang N, Liu XY, Ma YG, Huo XL, Han YS, Tian DA, Zheng Y. Detection of human papilloma virus in esophageal cancer in Xinjiang Kazakh patients by general primer-mediated polymerase chain reaction. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(12): 1049-1053

摘要

目的: 应用通用引物巢式PCR技术检测新疆哈萨克族食管鳞癌人乳头瘤病毒(HPV)的感染率, 并探讨HPV与新疆哈萨克族食管鳞癌的关系。

方法: 提取新疆哈萨克族食管鳞癌及正常食管组织的DNA, 应用通用引物HPV MY09/11及HPV G5+/6+进行巢式PCR, 检测新疆哈萨克族食管鳞癌中HPV的感染率。

■背景资料

人乳头瘤病毒(HPV)是双链DNA病毒, 与多种恶性肿瘤相关, 包括食管癌、口腔癌和肺癌等。然而, HPV在恶性肿瘤中的发病机制仍存在争议。

■同行评议者

任浩, 副教授, 中国人民解放军第二军医大学微生物学教研室

■研究前沿

HPV已经是导致食管癌发病率高的一个重要的病因学因素,更多研究证明HPV存在于食管鳞癌的早期发生过程中,有望成为食管癌早期诊断的分子生物学指标之一。

结果:巢式PCR法扩增后检测到食管鳞癌中HPV感染率为66.67%,正常对照组为12.12%,两者差异有统计学意义($P<0.05$)。

结论:本实验结果表明HPV可能是新疆哈萨克族食管癌发生的一个重要病因学因素,结合通用引物巢式PCR法可以更加方便可靠的检测HPV-DNA。

关键词:哈萨克族食管鳞癌;人乳头瘤病毒;巢式PCR法

陈卫刚, 杨春梅, 徐丽红, 张宁, 刘晓燕, 马云贵, 霍小玲, 韩玉胜, 田德安, 郑勇. 通用引物巢式PCR法对哈萨克族食管鳞癌HPV感染的检测. 世界华人消化杂志 2012; 20(12): 1049-1053
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1049.asp>

0 引言

人乳头瘤病毒(human papilloma virus, HPV)是双链DNA病毒^[1],与多种恶性肿瘤相关,包括食管癌、口腔癌和肺癌等^[2]。然而,HPV在恶性肿瘤中的发病机制仍存在争议。自1944年Syrjanen首次报道了HPV与食管鳞癌的关系后^[3,4],大量研究揭示HPV已经是导致食管癌发病率高的一个重要的病因学因素^[5-8],更多研究证明HPV存在于食管鳞癌的早期发生过程中,有望成为食管癌早期诊断的分子生物学指标之一。新疆哈萨克族是我国食管癌的高发民族,已有研究提示HPV16在哈萨克族食管癌中的感染率达到40%^[9]。然而,HPV在食管癌中的报道至今仍存在争议,在0-100%之间均有一些报道^[10],原因可能是检测感染率的方法不同引起的。本次研究首次应用巢式PCR法检测新疆哈萨克族食管癌中HPV的感染率,对新疆哈萨克族感染HPV的阳性率进行初步筛查,以期发现HPV与新疆哈萨克族食管癌高发的关系,并为后期进行哈萨克族食管癌HPV基因芯片的检测做好准备工作。

1 材料和方法

1.1 材料 本实验采用1:1病例对照,共收集132例食管组织作为研究对象,来自本课题组新疆伊犁哈萨克族聚集地-新源县现场,及新疆伊犁哈萨克族自治州友谊医院、兵团农四师医院和新源县人民医院于2009-2011年收集的标本。所有病例均未作任何化学、放射治疗,66例食管癌组织均经病理组织学确诊为鳞状细胞癌,其中男37例,女29例,平均年龄56(45-67)岁。收集66例未患食管癌的哈萨克族正常食管组织作为

对照组,其中男41例,女25例,年龄30-68岁,平均年龄49岁。DNA提取试剂盒购自QIAGEN公司;内参 β -actin引物、G5+/6+及MY09/11均由上海生物工程有限公司合成;PCR试剂购自北京天根生化科技有限公司;PCR扩增仪T-G ra-dient Thermoblock型(Biometra, 德国);GelDoc凝胶成像分析仪(Bio-Rad, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 DNA的提取:采用美国QIAGEN DNA Micro Kit试剂盒,具体步骤:将重量约为2-3 mg的食管黏膜置于1.5 mL EP管;加入180 μ L的ATL缓冲液和20 μ L的蛋白酶K,振荡混匀15 s后,置于56 $^{\circ}$ C水浴锅里过夜;次日加入200 μ L的AL缓冲液,振荡混匀15 s;加入200 μ L酒精,振荡15 s后室温静置5 min;将所有液体转移到离心柱里,以8 000 r/min离心1 min;加入500 μ L AW1缓冲液,以8 000 r/min离心1 min;加入500 μ L AW2缓冲液,以8 000 r/min离心1 min;以14 000 r/min离心3 min后将离心柱置于1.5 μ L的EP管;加入30 μ L的AE缓冲液后离心。所有DNA均经过分光光度计进行浓度及纯度测量, A_{260}/A_{280} 在1.7-2.1之间,DNA浓度平均在100 μ g/L,均为合格样本。提取DNA。

1.2.2 内参检测DNA:内参 β -actin引物序列为上游:ctccatcctggcctcgctgt,下游:rgctgtcaccttcaccgttcc,扩增片段为268 bp。反应条件为:94 $^{\circ}$ C 5 min预变性,94 $^{\circ}$ C 30 s \rightarrow 58 $^{\circ}$ C 45 s \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 45 s,35个循环,72 $^{\circ}$ C延伸10 min。应用内参行PCR。

1.2.3 巢式PCR法:此法采用两种HPV通用引物分别为:G5+/6+和MY09/11,引物具体序列见表1。所有PCR体系均采用25 μ L的反应体系。试验采用宫颈癌阳性标本作为对照,调整PCR反应条件。PCR方法:首先采用MY09/11进行首次PCR,10 \times Reaction Buffer 2.5 μ L, dNTP 2.5 μ L(200 mmol/L),引物1 μ L(0.15 mmol/L),Taq酶0.5 μ L,DNA 2.5 μ L(平均50 μ g/L);ddH₂O 16 μ L。反应条件为:94 $^{\circ}$ C 5 min预变性,94 $^{\circ}$ C 30 s \rightarrow 57 $^{\circ}$ C 30 s \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 45 s,35个循环,72 $^{\circ}$ C延伸10 min。再将扩增产物作为模板,用G5+/6+进行巢式PCR,反应条件为:94 $^{\circ}$ C 5 min预变性,94 $^{\circ}$ C 30 s \rightarrow 58 $^{\circ}$ C 30 s \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 45 s,35个循环,72 $^{\circ}$ C延伸10 min。取出3 μ L PCR反应产物,用2 \times 琼脂糖电泳,5 \times Loading Buffer进行染色,紫外线灯下分析结果。用MY09/11进行首次PCR。用G5+/6+进行巢式PCR。

统计学处理 采用SPSS13.0统计软件进行处理。阳性率的比较采用 χ^2 检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

表 1 引物序列				
引物	5'-3'序列	基因位置	长度(bp)	扩增大小(bp)
HPV/MY09	CGTCCMARRGGAWACTGATCa	L1	20	398
HPV/MY11	GCMCAGGGWCATAAYAATGGa	20	398	
HPV/G5+	TTTGTACTGTGGTAGATACTAC	L1	23	150
HPV/G6+	GAA AAATAAACTGTAAATCATATTC	25	150	

a: M = A+C; R = A+G; W = A+T; X = G+C.

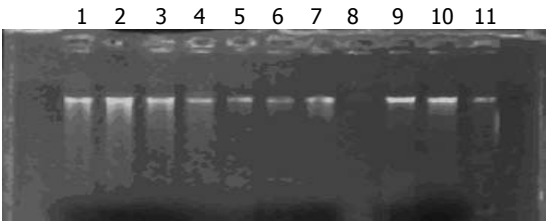


图 1 1%琼脂糖凝胶电泳检测食管组织DNA. 8: 阴性对照; 1-7, 9-11提取成功.

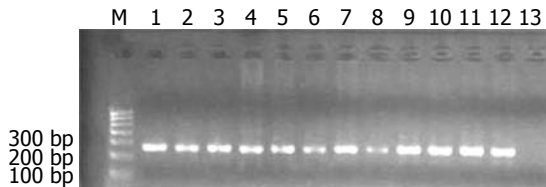


图 2 内参行PCR电泳图片. M: Marker1, 分子量约为268 bp; 1-12: 阳性标本; 13: 阴性标本.

2 结果

对提取的组织DNA的完整性进行电泳检测如图1, PCR检测内参表达结果如图2.

2.1 食管癌组HPV感染率与性别关系 食管鳞癌中HPV感染率无性别差异(表2).

2.2 食管癌组及正常对照组经通用引物巢式PCR后两组HPV感染率比较 用MY09/11进行首次PCR并结合G5+/6+进行巢式PCR的结果如图3, 4. 行巢式PCR后可检测到食管癌组HPV感染率为66.67%, 对照组为12.12%. 根据表的 χ^2 检验, 可得到 $P<0.05$, 表明新疆哈萨克族食管癌感染HPV的阳性率明显高于正常对照组, 两者阳性率差异具有统计学意义(表3).

3 讨论

HPV是一类双链闭合环状DNA病毒, 基因组约为8 000 bp^[11], HPV DNA基因组按其功能分为3个编码区: (1)早期基因编码参与病毒DNA复制、转录及细胞转化的蛋白; (2)晚期基因编码病毒结构蛋白; (3)上游调节区位于E区和L区之间, 包含启动子等调控元件, 与病毒DNA复制转

表 2 性别分布						
性别	<i>n</i>	阳性	阴性	阳性率(%)	χ^2 值	<i>P</i> 值
男性	37	28	9	64.86	0.12	>0.05
女性	29	24	5	64.96		
总数	66	52	14	66.67		

表 3 食管癌组和正常对照组HPV感染率					
分组	阳性	阴性	阳性率(%)	χ^2 值	<i>P</i> 值
食管癌组	44	22	66.67	41.12	<0.05
正常组	8	58	12.12		

录的调控有关^[12]. 现已经明确基因组全序列有80多种DNA病毒分型^[13]. 其中15种高危致病亚型包括HPV-16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73和82^[14,15], 与多种良恶性肿瘤有关^[16], 例如宫颈癌、肺癌、头颈部癌、消化系统肿瘤等. 目前已有证实HPV16和HPV18病毒分型与食管癌相关. 但是, 关于新疆食管癌高发民族-哈萨克族感染HPV的相关研究, 目前知之甚少.

本实验应用通用引物MY09/11行PCR后, 食管癌组HPV感染率仅为7.58%, 正常对照组均为阴性, 阳性率偏低. 再次应用通用引物GP5+/6+进行巢式PCR时就能出现明显的扩增产物, 食管癌组和对照组HPV感染率分别为66.67%和12.12%, 两组阳性率均明显增高. 表明巢式PCR法明显提高了灵敏度, 说明PGMY/GP方法是灵敏而可靠的^[17]. 阳性率提高的原因是因为MY09/11和GP5+/6+是从HPV-L1区中选择保守序列设计合成通用引物, 该引物与6, 11, 16, 18, 33型有互补序列, 可扩增其他型别的HPV^[18]. 本实验应用2种通用引物巢式PCR法一次检测包括HPV6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 45, 52, 53, 56和58共15个病毒型别, 初步筛查了新疆哈萨克族食管鳞癌的HPV感染率. 此外, 本次研究发现新疆哈萨克族食管鳞癌与HPV的关系, 根据实验结

■创新盘点

本实验应用通用引物巢式PCR法初步筛查了新疆哈萨克族食管鳞癌的HPV感染率并发现新疆哈萨克族食管鳞癌与HPV的关系.

■同行评价

本研究具有较强的创新性和较好的临床应用价值,为HPV与食管癌及后者的早期诊治提供了一定依据。

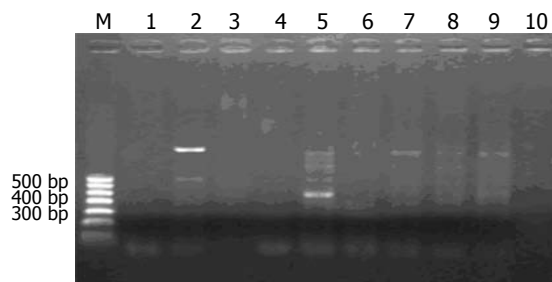


图3 应用MY09/11行PCR。M: 700 bp的Marker 1; 1-4, 6-10: 阴性; 5: HPV MY09/11的阳性位置, 在400 bp左右。

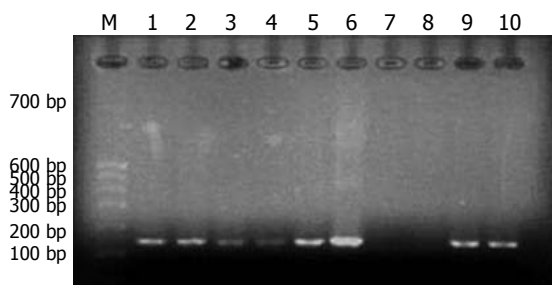


图4 巢式PCR。M: 700 bp的Marker 1; 1-6, 9-10: 巢式PCR法的阳性位置, 在150 bp左右; 7, 8: 阴性。

果哈萨克族食管癌HPV感染率无男女性别差异。

本次实验结果显示新疆哈萨克族食管癌中HPV的感染率为66.67%, 与端木忠等^[19]的汉族食管癌HPV感染率38.3%相比较。本实验结果与国内外相关实验不符的原因, 考虑存在以下3方面因素: (1)HPV感染可能存在种族差异; (2)HPV在正常人群消化系中都有一定的感染率, 具有自限性, 大部分感染是暂时的。当机体的防御机制改变或者宿主的基因发生突变时, HPV感染可发生恶性转化。而新疆哈萨克族生存环境较差, 饮食单一, 缺乏叶酸、维生素等营养物质, 又好食烫、咸奶茶, 结合肿瘤的发生是由多种因素共同作用形成^[20], 故考虑新疆哈萨克族食管癌中HPV的高感染率可能由于抑癌基因的失活、癌基因的激活等因素共同作用导致; (3)本次实验结果HPV感染率高可能为检测方法不同导致的, 本实验应用通用引物巢式PCR法一次可检测15种病毒型别在食管癌中感染率, 较单独设计15种病毒型别的引物检测HPV感染率更加方便、可靠, 当然, 此方法的不足之处是无法明确每个阳性标本中具体感染哪一种病毒分型, 或者是同时感染哪几种病毒分型。

总之, HPV感染是新疆哈萨克族食管鳞癌发生的重要危险因素之一, HPV可能是新疆哈萨克族食管癌发生的一个重要病因学因素。本次实验筛选出食管鳞癌组感染HPV的阳性标本后,

后续将针对阳性标本进行含有23种型别探针的基因芯片的检查, 以期发现与新疆哈萨克族食管癌发生密切相关的特异性HPV高危致病亚型, 为食管癌的分子生物学机制提供理论基础。

4 参考文献

- 1 廖佩花, 谭晓华, 张海峰, 雷丽娟, 曾同霞, 陈波, 李锋, 杨磊, 秦江梅. HPV6b感染与新疆哈萨克族食管癌的关系. 世界华人消化杂志 2009; 17: 194-197
- 2 Tew WP, Kelsen DP, Ilson DH. Targeted therapies for esophageal cancer. *Oncologist* 2005; 10: 590-601
- 3 Herrera-Goepfert R, Lizano M, Akiba S, Carrillo-García A, Becker-D'Acosta M. Human papilloma virus and esophageal carcinoma in a Latin-American region. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 3142-3147
- 4 Gao GF, Roth MJ, Wei WQ, Abnet CC, Chen F, Lu N, Zhao FH, Li XQ, Wang GQ, Taylor PR, Pan QJ, Chen W, Dawsey SM, Qiao YL. No association between HPV infection and the neoplastic progression of esophageal squamous cell carcinoma: result from a cross-sectional study in a high-risk region of China. *Int J Cancer* 2006; 119: 1354-1359
- 5 Xueqian Wang, Xiuyun Tian, Fangfang Liu, Yiqiang Zhao, Min Sun, Dafang Chen, Changdong Lu, Zhong Wang, Xiaotian Shi, Qingying Zhang, Donghong Zhang, Zhongying Shen, Feng Li, Curtis C Harris, Hong Cai, Yang Ke. Detection of HPV DNA in esophageal cancer specimens from different regions and ethnic groups: a descriptive study. *BMC Cancer* 2010; 10: 19-29
- 6 Mamas IN, Sourvinos G, Zaravinos A, Spandidos DA. Vaccination against human papilloma virus (HPV): epidemiological evidence of HPV in non-genital cancers. *Pathol Oncol Res* 2011; 17: 103-109. Epub 2010 Jul 18
- 7 Afonso LA, Moysés N, Cavalcanti SM. Human papillomavirus detection and p16 methylation pattern in a case of esophageal papilloma. *Braz J Med Biol Res* 2010; 43: 694-696
- 8 马群凤, 江红, 冯永强, 王小平, 周勇安, 刘锐, 贾再利. 食管鳞状细胞癌标本中乳头状瘤病毒DNA的检测. 世界华人消化杂志 2000; 8: 1218-1224
- 9 Ayshamgul H, Ma H, Ilyar S, Zhang LW, Abulizi A. Association of defective HLA-I expression with antigen processing machinery and their association with clinicopathological characteristics in Kazak patients with esophageal cancer. *Chin Med J (Engl)* 2011; 124: 341-346
- 10 Bohn OL, Navarro L, Saldivar J, Sanchez-Sosa S. Identification of human papillomavirus in esophageal squamous papillomas. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 7107-7111
- 11 Kusumoto-Matsuo R, Kanda T, Kukimoto I. Rolling circle replication of human papillomavirus type 16 DNA in epithelial cell extracts. *Genes Cells* 2011; 16: 23-33
- 12 Rachel Raybould, Alison Fiander, Sam Hibbitts. Human Papillomavirus Integration and its Role in Cervical Malignant Progression. *The Open Clinical Cancer Journal* 2011; 5: 1-7
- 13 Steben M, Duarte-Franco E. Human papillomavirus infection: epidemiology and pathophysiology. *Gynecol Oncol* 2007; 107: S2-S5
- 14 Alba A, Cararach M, Rodríguez-Cerdeira C. The Human Papillomavirus (HPV) in Human Pathol-

- ogy: Description, Pathogenesis, Oncogenic Role, Epidemiology and Detection Techniques. *The Open Dermatology Journal* 2009; 3: 90-102
- 15 Jalal H, Stephen H, Bibby DF, Sonnex C, Carne CA. Molecular epidemiology of genital human papillomavirus and Chlamydia trachomatis among patients attending a genitourinary medicine clinic - will vaccines protect? *Int J STD AIDS* 2007; 18: 617-621
- 16 姜蕊, 吴翠环, 郑丽端, 赵时宇, 陈多恩. 人乳头瘤病毒感染与非小细胞肺癌发生的相关性. *华中科技大学学报(医学版)* 2005; 34: 141-144
- 17 Winder DM, Ball SL, Vaughan K, Hanna N, Woo YL, Fränzer JT, Sterling JC, Stanley MA, Sudhoff H, Goon PK. Sensitive HPV detection in oropharyngeal cancers. *BMC Cancer* 2009; 9: 440
- 18 Cobo F, Talavera P, Concha A. Review article: relationship of human papillomavirus with papillary squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract: a review. *Int J Surg Pathol* 2008; 16: 127-136
- 19 端木忠, 田韧, 曹秀峰. HPV与食管癌的关系. *实用医技杂志* 2005; 12: 11-12
- 20 Lu Y, Zhang Z, Liu Q, Liu B, Song X, Wang M, Zhao X, Zhao Q. Immunological protection against HPV16 E7-expressing human esophageal cancer cell challenge by a novel HPV16-E6/E7 fusion protein based-vaccine in a Hu-PBL-SCID mouse model. *Biol Pharm Bull* 2007; 30: 150-156

编辑 张姗姗 电编 闫晋利

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》性质、刊登内容及目标

本刊讯 《世界华人消化杂志》[国际标准刊号ISSN 1009-3079 (print), ISSN 2219-2859 (online), 国内统一刊号CN 14-1260/R, Shijie Huaren Xiaohua Zazhi/*World Chinese Journal of Digestology*], 是一本由来自国内23个省、市、自治区、特别行政区的370位胃肠病学和肝病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。

Gilbert综合征9例

夏菲, 王雪莲, 李智伟

■背景资料

临床中因对Gilbert综合征缺乏认识, 常导致临床误诊、漏诊和患者不必要的就医。

夏菲, 王雪莲, 李智伟, 中国医科大学附属盛京医院 辽宁省沈阳市 110004

夏菲, 在读博士, 主要从事肝纤维化的研究。

作者贡献分布: 夏菲与王雪莲对此文所作贡献均等; 此课题由夏菲、王雪莲及李智伟设计; 研究过程由夏菲、王雪莲及李智伟操作完成; 数据分析由夏菲及王雪莲完成; 本论文写作由夏菲及王雪莲完成。

通讯作者: 李智伟, 教授, 110004, 辽宁省沈阳市和平区三好街36号, 中国医科大学附属盛京医院感染科。lizw@sj-hospital.org
电话: 024-96615-62311

收稿日期: 2011-12-27 修回日期: 2012-03-07

接受日期: 2012-03-25 在线出版日期: 2012-04-28

Gilbert syndrome: An analysis of 9 cases

Fei Xia, Xue-Lian Wang, Zhi-Wei Li

Fei Xia, Xue-Lian Wang, Zhi-Wei Li, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China

Correspondence to: Zhi-Wei Li, Professor, Shengjing Hospital of China Medical University, 36 Sanhao Street, Heping Region, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. lizw@sj-hospital.org

Received: 2011-12-27 Revised: 2012-03-07

Accepted: 2012-03-25 Published online: 2012-04-28

Abstract

AIM: To analyze the clinical and pathological characteristics of Gilbert syndrome.

METHODS: The clinical and pathological data for 9 patients who were diagnosed with Gilbert syndrome by the fasting test, phenobarbital test and liver tissue pathology were retrospectively analyzed.

RESULTS: The onset of Gilbert syndrome is more common in adolescence (77.8%). More males were affected than females. Most patients showed no clinical symptoms or signs, and had serum bilirubin levels lower than 50 $\mu\text{mol/L}$. Pathological changes in the liver were mild.

CONCLUSION: Gilbert syndrome is usually asymptomatic, results in mild pathological changes in the liver, and does not need treatment.

Key Words: Gilbert syndrome; Hepatic pathology; Diagnosis

Xia F, Wang XL, Li ZW. Gilbert syndrome: An analysis of 9 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(12): 1054-1056

摘要

目的: 总结Gilbert综合征的临床特点及肝组织改变情况, 提高临床医师对该疾病的认识, 掌握该病的诊断及治疗。

方法: 2007-2011年我科住院的9例患者, 排除其他慢性肝病导致肝功异常, 经饥饿实验、苯巴比妥试验及肝组织病理检查明确诊断为Gilbert综合征, 对其年龄、性别、症状、体征、实验室检查结果(血尿常规、肝功、肝炎病毒标志物)、肝胆脾彩超及肝组织病理结果等进行整理分析。

结果: Gilbert综合征患者多于青少年期发病(本研究中占77.8%), 男性多于女性。患者多无临床症状及异常体征, 血清胆红素水平大多波动于50 $\mu\text{mol/L}$ 以下, 且肝组织病理改变轻微, 无慢性肝炎及肝纤维化改变。

结论: Gilbert综合征症状及肝组织病理改变轻微, 不导致慢性肝炎及肝纤维化, 无需治疗, 不影响患者寿命。加强对该病的认识, 给予正确的诊断, 可以减少患者不必要的检查及治疗, 减轻患者的心理及经济负担。

关键词: Gilbert综合征; 肝组织病理; 诊断

夏菲, 王雪莲, 李智伟. Gilbert综合征9例. 世界华人消化杂志 2012; 20(12): 1054-1056

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1054.asp>

0 引言

Gilbert综合征又称体质性肝功能不良症, 是由于肝组织摄取非结合胆红素障碍或微粒体内葡萄糖醛酸转移酶不足, 致使血液中非结合胆红素显著增高而发生黄疸, 属一种常见的遗传性非结合胆红素血症。2007-2011年间我科经肝组织病理检查、饥饿试验及苯巴比妥试验确诊Gilbert综合征患者9例, 现对其临床资料进行分析。

■同行评议者

高润平, 教授, 吉林大学第一医院肝胆胰内科

1 材料和方法

1.1 材料 9例均为本院2007-2011年间住院诊断Gilbert综合征患者。其中男性6例(66.7%), 女性3例(33.3%), 年龄22-46岁, 其中19-30岁7例(77.8%), >45岁2例(22.2%)。

1.2 方法

1.2.1 症状和体征: 患者均因体检或其他疾病就医时化验肝功异常而入院检查。病史为0.5-20 mo 7例, 7年、10年各1例。合并慢性乙型病毒性肝炎1例, 入院后化验发现合并甲状腺功能亢进症1例, 入院行肝脏彩超检查提示轻度脂肪肝1例。无自觉症状7例(77.8%), 恶心伴腹胀2例(22.2%)。可见皮肤巩膜轻度黄染4例(44.4%), 脾大1例(11.1%), 余查体均未见异常。

1.2.2 诊断: 患者在肝功能、血液学、病毒学及肝脏彩超等常规检查基础上行饥饿试验、苯巴比妥试验及肝穿刺病理检查。

2 结果

2.1 肝功能 6例谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)正常, 3例ALT轻度升高(合并甲状腺功能亢进症患者ALT 97 U/L, 合并慢性乙型病毒性肝炎患者ALT 62 U/L, 合并轻度脂肪肝患者ALT 64 U/L)。血清总胆红素27.6-129.7 $\mu\text{mol/L}$ (8例患者为27.6-73.8 $\mu\text{mol/L}$, 1例合并慢性乙型病毒性肝炎患者胆红素为129.7 $\mu\text{mol/L}$); 以间接胆红素为主(19.8-109.6 $\mu\text{mol/L}$), 直接胆红素均正常。

2.2 血尿常规 血、尿常规均正常。

2.3 肝炎病毒标志物 1例HBsAg及HBVDNA阳性, 3例HBsAb阳性(曾注射乙肝疫苗), 甲肝、丙肝及戊肝抗体均阴性。

2.4 肝胆脾彩超 9例患者肝脏均未见明显异常, 1例脾大, 1例伴胆囊多发胆固醇性息肉及胆囊结石, 1例伴胆囊结石, 1例提示轻度脂肪肝。

2.5 饥饿试验及苯巴比妥试验 行饥饿试验^[1]后总胆红素上升至68.5-261 $\mu\text{mol/L}$, 以间接胆红素升高为主, 直接胆红素均正常。后予苯巴比妥诊断性治疗1 wk, 总胆红素降至11.1-70.7 $\mu\text{mol/L}$ 。

2.6 肝组织病理 合并慢性乙型病毒性肝炎患者提示轻度炎症(G₁), 合并甲状腺功能亢进症患者提示见少许肝细胞点状坏死, 无明显中毒性肝炎表现。另有1例见少许肝细胞点状坏死, 1例见少量淋巴细胞浸润, 1例示轻度脂肪肝, 其余患者均未见炎症及纤维化改变。

3 讨论

Gilbert综合征于1901年由Gilbert和Lereboulle

首先报道, 称为单纯性家族性胆血症。该病有2种亚型, 一种为常染色体显性遗传, 另一种为常染色体隐性遗传^[2]。病因与尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶(UDP glucuronosyl transferase, UGT)1A1基因多态性有关, 患者UGT活力下降, 间接胆红素转化为直接胆红素障碍^[3-6]。Gilbert综合征的发病率为3%-17%^[7,8], 其中男性多于女性, 且男性患者的平均胆红素水平显著高于女性, 大部分患者于青少年期发病。患者的血清胆红素水平大多波动于20-50 $\mu\text{mol/L}$, 很少超过85 $\mu\text{mol/L}$ ^[9,10]。

该病起病隐匿, 症状轻微, 肝组织病理改变轻微。本次报道9例患者均无明显临床症状, 因体检或其他疾病就医时发现胆红素升高而入院, 且胆红素多波动于50 $\mu\text{mol/L}$ 以下, 仅1例男性患者超过85 $\mu\text{mol/L}$ 。除1例合并慢性乙型病毒性肝炎患者肝组织病理检查提示轻度炎症(G₁), 其余2例见少许肝细胞点状坏死, 1例见少量淋巴细胞浸润, 1例示轻度脂肪肝, 余患者均未见炎症及纤维化改变。合并慢性乙型病毒性肝炎患者10年前因发现胆红素升高, 而化验乙肝病毒标志物阳性, 当时转氨酶正常, 现转氨酶轻度升高, 本次肝组织病理示轻度炎症, 考虑黄疸与慢性乙型病毒性肝炎无关。

Gilbert综合征不导致慢性肝炎及肝纤维化, 无需治疗, 不影响患者寿命^[11]。本次报道患者中有2例病史分别为7年、10年, 肝组织病理均未见严重改变也证明这一点。另外, 有报道因Gilbert综合征患者胆红素升高, 而胆红素具有的抗氧化作用可以降低患者心血管疾病的发生^[12-14]。因此, 加强对该病的认识, 给予正确诊断, 可以减少患者不必要的检查及治疗, 减轻患者的心理及经济负担。目前Gilbert综合征无特异性的诊断方法, 主要通过排除其他疾病, 结合饥饿试验及苯巴比妥诊断性治疗来诊断。

对于Gilbert综合征患者应指导其养成良好的生活习惯, 避免疲劳、酗酒及感染等因素而加重黄疸。另外, 有报道Gilbert综合征患者应用某些药物(如抗癌药物及蛋白酶抑制剂)时可能增加药物不良反应发生的风险^[15,16]。

4 参考文献

- 1 Detsyk IuI, Iushchik LV, Novyts'kyi IaD. [The clinical picture and diagnosis of the Gilbert-Meylengraht syndrome]. *Lik Sprava* 1997; (5): 139-142
- 2 梁扩寰, 李绍白. 肝脏病学. 第2版. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 1192-119

■研发前沿

有研究指出Gilbert综合征患者应用某些药物(如抗癌药物及蛋白酶抑制剂)时可能增加药物不良反应发生的风险, 并可能为某些肿瘤发生的危险因素, 临床中需引起重视。

■应用要点

本文通过对9例Gilbert综合征患者的临床资料及肝组织病理结果进行整理分析, 总结Gilbert综合征的临床特点及肝组织改变情况, 从而提高临床医师对该疾病的认识, 并掌握该病的诊断方法。

■同行评价

本研究报道了经饥饿试验、苯巴比妥试验和肝组织病理学确诊的9例Gilbert综合征,对肝病医师在诊断和处理Gilbert综合征的思路和方法上较有帮助。

- 3 Matsui K, Maruo Y, Sato H, Takeuchi Y. Combined effect of regulatory polymorphisms on transcription of UGT1A1 as a cause of Gilbert syndrome. *BMC Gastroenterol* 2010; 10: 57
- 4 Fretzayas A, Moustaki M, Liapi O, Karpathios T. Gilbert syndrome. *Eur J Pediatr* 2012; 171: 11-15
- 5 Mlakar SJ, Ostanek B. Development of a new DH-PLC assay for genotyping UGT1A (TA)_n polymorphism associated with Gilbert's syndrome. *Biochem Med (Zagreb)* 2011; 21: 167-173
- 6 Farrar JS, Palais RA, Wittwer CT. Snapback primer genotyping of the Gilbert syndrome UGT1A1 (TA)_n promoter polymorphism by high-resolution melting. *Clin Chem* 2011; 57: 1303-1310
- 7 Owens D, Evans J. Population studies on Gilbert's syndrome. *J Med Genet* 1975; 12: 152-156
- 8 Fertrin KY, Gonçalves MS, Saad ST, Costa FF. Frequencies of UDP-glucuronosyltransferase 1 (UGT1A1) gene promoter polymorphisms among distinct ethnic groups from Brazil. *Am J Med Genet* 2002; 108: 117-119
- 9 Tapan S, Karadurmus N, Dogru T, Ercin CN, Tasci I, Bilgi C, Kurt I, Erbil MK. Decreased small dense LDL levels in Gilbert's syndrome. *Clin Biochem* 2011; 44: 300-303
- 10 Hirschfield GM, Alexander GJ. Gilbert's syndrome: an overview for clinical biochemists. *Ann Clin Biochem* 2006; 43: 340-343
- 11 Strassburg CP. Pharmacogenetics of Gilbert's syndrome. *Pharmacogenomics* 2008; 9: 703-715
- 12 Vitek L, Kráslová I, Muchová L, Novotný L, Yamaguchi T. Urinary excretion of oxidative metabolites of bilirubin in subjects with Gilbert syndrome. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22: 841-845
- 13 Yesilova Z, Serdar M, Ercin CN, Gunay A, Kilciler G, Hasimi A, Uygur A, Kurt I, Erbil MK, Dagalp K. Decreased oxidation susceptibility of plasma low density lipoproteins in patients with Gilbert's syndrome. *J Gastroenterol Hepatol* 2008; 23: 1556-1560
- 14 Bulmer AC, Blanchfield JT, Toth I, Fassett RG, Coombes JS. Improved resistance to serum oxidation in Gilbert's syndrome: a mechanism for cardiovascular protection. *Atherosclerosis* 2008; 199: 390-396
- 15 Strassburg CP. Hyperbilirubinemia syndromes (Gilbert-Meulengracht, Crigler-Najjar, Dubin-Johnson, and Rotor syndrome). *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2010; 24: 555-571
- 16 Xu CF, Reck BH, Xue Z, Huang L, Baker KL, Chen M, Chen EP, Ellens HE, Mooser VE, Cardon LR, Spraggs CF, Pandite L. Pazopanib-induced hyperbilirubinemia is associated with Gilbert's syndrome UGT1A1 polymorphism. *Br J Cancer* 2010; 102: 1371-1377

编辑 张姗姗 电编 闫晋利

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》外文字符标准

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

内镜下乳头小切开加球囊扩张术治疗胆总管大结石80例

邵东, 庄耘, 徐馥, 陈建平

邵东, 庄耘, 徐馥, 陈建平, 常州市第一人民医院消化科 江苏省常州市 213003

邵东, 副主任医师, 主要研究方向是内镜对胆胰疾病的诊治。

作者贡献分布: 邵东与陈建平对此文所作贡献均等; 此课题由邵东、庄耘、徐馥及陈建平设计; 研究过程由邵东与陈建平操作完成; 论文写作由邵东完成。

通讯作者: 陈建平, 主任医师, 213003, 江苏省常州市局前街185号, 常州市第一人民医院消化科。cjp7668@sina.com

电话: 0519-68871103

收稿日期: 2011-12-07 修回日期: 2012-01-21

接受日期: 2012-03-20 在线出版日期: 2012-04-28

Endoscopic sphincterotomy plus balloon dilation for large bile duct stones: An analysis of 80 cases

Dong Shao, Yun Zhuang, Fu Xu, Jian-Ping Chen

Dong Shao, Yun Zhuang, Fu Xu, Jian-Ping Chen, Department of Gastroenterology, the First Hospital of Changzhou, Changzhou 213000, Jiangsu Province, China
Correspondence to: Jian-Ping Chen, Chief Physician, Department of Gastroenterology, the First Hospital of Changzhou, 185 Juqian Street, Changzhou 213003, Jiangsu Province, China. cjp7668@sina.com

Received: 2011-12-07 Revised: 2012-01-21

Accepted: 2012-03-20 Published online: 2012-04-28

Abstract

AIM: To evaluate the therapeutic efficacy and safety of endoscopic sphincterotomy (EST) plus balloon dilation for large bile duct stones.

METHODS: Eighty patients with bile duct stones larger than 1.2 cm, who received endoscopic retrograde cholangiopancreatography (ERCP) from January 2010 to October 2011 at our hospital, were randomly and equally divided into two groups to receive EST and EST plus balloon dilation (ESBD), respectively. Balloon dilation was conducted after small EST in the ESBD group, while conventional EST was used in the EST group.

RESULTS: All stones were removed successfully from 36 patients (90%) of the EST group and 38 (95%) patients of the ESBD group. Mechanical lithotripsy was used to fragment stones in 15 (37.5%) EST procedures and 4 (10%) ESBD

procedures. The operation time was longer in the EST group than in the ESBD group (41.78 ± 10.41 vs 36.28 ± 8.64 , $P < 0.05$). Bleeding occurred in two patients of the EST group but not in patients of the ESBD group. Fever, abdominal pain, and acute pancreatitis developed in 1, 1 and 2 patients in the EST group, while abdominal pain and acute pancreatitis in 2 and 1 patients in the ESBD group, respectively. There is no significant difference in the incidence of early complications between the two groups (10% vs 7.5%, $P > 0.05$). No patient died.

CONCLUSION: ESBD is superior to EST in terms of operating time and the use of mechanical lithotripsy in managing large bile duct stones.

Key Words: Bile duct stones; Endoscopic sphincterotomy; Balloon dilation

Shao D, Zhuang Y, Xu F, Chen JP. Endoscopic sphincterotomy plus balloon dilation for large bile duct stones: An analysis of 80 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(12): 1057-1060

摘要

目的: 探讨内镜下乳头小切开加球囊扩张术治疗胆总管大结石的有效性和安全性。

方法: 2010-01/2011-10我院消化内科住院行内镜下取石的胆总管结石直径 >1.2 cm的患者, 随机分为内镜下乳头括约肌切开术(EST)组及内镜下乳头小切开加球囊扩张术(ESBD)组, 每组40例。ESBD组在先行乳头小切开后行乳头球囊扩张; EST组按常规操作。

结果: EST组及ESBD组分别有36例(90%)及38例(95%)成功取净结石; 机械碎石网篮应用比例分别37.5%(15/40)和10%(4/40), $P < 0.05$; 取石时间分别为 $41.78 \text{ min} \pm 10.41 \text{ min}$ 和 $36.28 \text{ min} \pm 8.64 \text{ min}$, $P < 0.05$; 术中EST组有2例出现切开后出血, ESBD组无出血病例; EST组各有1例出现发热和腹痛患者, 有2例出现胰腺炎, ESBD组有2例腹痛, 无发热患者, 1例出现胰腺炎。术后早期并发症总发生率分别为10%(4/40)和7.5%(3/40), $P > 0.05$; 无

■背景资料

内镜下逆行胰胆管造影(ERCP)及乳头切开术(EST)已广泛应用于胆胰疾病的诊断和治疗, 尤其适用于胆总管结石。但对于较大胆总管结石, 内镜操作及乳头切开往往余地有限, 常给顺利取石带来困难。

■同行评议者

陈海龙, 教授, 大连医科大学附属第一医院院办

■相关报道

先行乳头括约肌小切开, 后采用大口径气囊(>10 mm)对胆管开口进行充分扩张(ESBD), 对清除胆管较大结石更为便利, 而且术后感染发生率较单纯EST无明显升高。

死亡病例。

结论: 对较大胆总管结石, ESD取石有与EST取石相近的成功率, 术后并发症无明显升高, 但在操作时间及碎石网篮使用上, ESD组更有优势。

关键词: 胆总管结石; 十二指肠乳头括约肌切开术; 内镜下乳头小切开加球囊扩张术

邵东, 庄耘, 徐馥, 陈建平. 内镜下乳头小切开加球囊扩张术治疗胆总管大结石80例. 世界华人消化杂志 2012; 20(12): 1057-1060

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1057.asp>

0 引言

内镜下逆行胰胆管造影(endoscopic retrograde cholangio pancreatography, ERCP)及乳头切开术(endoscopic sphincterotomy, EST)已广泛应用于胆胰疾病的诊断和治疗, 尤其适用于胆总管结石。但对于较大胆总管结石, 尤其合并有乳头旁巨大憩室、腔外病灶压迫、牵拉、粘连、毕Ⅱ式胃大部切除术的患者, 内镜操作及乳头切开往往余地有限, 常给顺利取石带来困难。近年来内镜下乳头球囊扩张术(endoscopic papillary balloon dilation, EPBD)在国内已广泛开展。有研究显示, 单纯EPBD适用于胆管较小结石、结石少于3枚, 可以保留乳头括约肌功能, 但术后胰腺炎发生率较高^[1,2], 从而限制了EPBD的使用。近来有学者建议先行乳头括约肌小切开, 后采用大口径气囊(>10 mm)对胆管开口进行充分扩张(endoscopic sphincterotomy plus balloon dilatation, ESD), 对清除胆管较大结石更为便利, 而且术后感染发生率较单纯EST无明显升高^[3]。

1 材料和方法

1.1 材料 2010-01/2011-10我科住院治疗并诊断胆总管结石患者。纳入标准: 经MRCP或ERCP提示胆管结石且直径超过1.2 cm; 年龄>18周岁。排除标准: 曾行EPBD或EST取石者; 凝血功能障碍(凝血酶原时间延长2倍或血小板计数<70×10⁹/L); 严重的心肺疾病患者无法耐受内镜检查。OlympusTJF260电子十二指肠镜, 高频电装置, 标准及超滑亲水导丝, Olympus聪明刀, 标准造影导管, 取石气囊, 网篮, 机械碎石网篮, 鼻胆引流管, 胆管塑料引流支架和推送导管, 扩张气囊(Boston Scientific)长度58 mm, 气囊压力表, 充盈后气囊

直径分别为12、14、15、20 mm。

1.2 方法

1.2.1 分组: 对纳入病例采用随机数字表法随机分为2组: 分别为EST组和ESBD组。

1.2.2 治疗: 常规术前准备, 胆管造影确认胆管结石的位置和大小。(1)EST组行乳头括约肌切开, 根据结石大小及乳头情况分别行大切开及中切开, 如结石较大, 可先行碎石网篮行机械碎石后再分次取出。术后气囊封堵胆管造影示胆管无充盈缺损, 常规置入鼻胆管1根, 根据患者情况引流3-5 d;(2)ESBD组首先行乳头小切开, 胆管留置导丝, 根据结石大小及胆总管下段直径选择合适扩张气囊, 沿导丝置入扩张气囊, 最大不超过胆总管下端直径, 气囊充填造影剂, 在X线和内镜监视下进行扩张, 直至X线下狭窄段腰线消失, 停留1 min后抽出造影剂、退出气囊, 用取石气囊、取石网篮取石, 如估计结石较大无法通过出口, 可先行机械碎石后再取出。术后胆管造影示胆管无充盈缺损, 常规置入鼻胆管1根, 根据患者情况引流3-5 d。

1.2.3 术后检测及随访: 分别于术后即刻、术后2 h及24 h查血常规、血淀粉酶, 并记录患者腹痛、腹胀、恶心呕吐、发热、出血等临床症状, 必要时腹部CT检查。经鼻胆引流管造影复查有无残余结石, 有残余结石者再次取石。

统计学处理 数据整理统计使用SPSS19.0统计软件, 两样本率比较采用 χ^2 检验, 两样本均数比较采用两样本 t 检验, 以 $P<0.05$ 认为有统计学意义。

2 结果

2.1 患者基本资料 两组患者年龄无明显差异(57.57 ± 15.07 vs 58.95 ± 16.18 , $P>0.05$), 但胆管直径及结石直径, ESD组>EST组(1.63 ± 0.27 vs 1.80 ± 0.33 , 1.38 ± 0.15 vs 1.54 ± 0.22 , $P<0.05$, $P<0.01$), 同时EST组多发结石少于ESBD组(3/40和12/40, $P<0.05$)。

2.2 取石情况 ESD组手术操作过程如图1所示。EST组共有4例未能取石成功(成功率90%), 分别为憩室内乳头2例, 切开余地小, 结石大; 1例为胆管下段狭窄, 结石无法取出; 1例结石过大、过多, 胆管腔充满充盈缺损影, 无法取出。ESBD组有2例患者取石失败, 均为巨大结石, 碎石网篮无法完整套住结石(成功率95%)。取石时间, ESD组少于EST组($41.78\text{ min}\pm 10.41\text{ min}$ vs $36.28\text{ min}\pm 8.64\text{ min}$, $P<0.05$); 碎石器的使用次数, ESD组少于EST组(15 vs 4, $P<0.05$)。EST

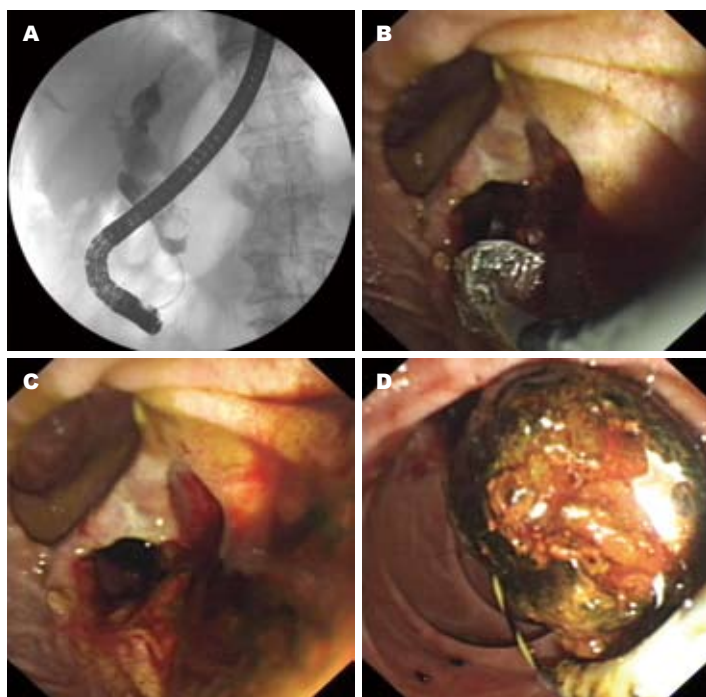


图1 ESDB组手术操作. A: 胆管造影示胆总管扩张(直径2.8 cm); B: 乳头上见1枚巨大憩室, 乳头小切开后发现结石(最大直径约2.5 cm), 直径2.0 cm气囊扩张乳头部; C: 扩张后的乳头开口; D: 取石网篮取出完整结石.

同行评价

本研究具有一定的创新性和临床实用价值, 对胆总管巨大结石患者效果明显, 值得临床推广.

组有2例取石过程中出现切开渗血不止, 予以局部电凝及喷洒肾上腺素冰盐水后, 出血停止, ESDB组无大量出血等情况发生.

2.3 术后并发症 EST组2例发生术后急性胰腺炎, 各有1例患者出现腹痛、发热等表现, 无消化系穿孔; ESDB组有1例患者出现急性胰腺炎, 2例出现腹痛, 无发热等感染表现, 无消化系穿孔发生. 胰腺炎患者予以生长抑素抑制胰酶分泌、抑酸、抗感染等治疗, 胰腺炎症状很快恢复, 腹痛、发热等并发症患者予以抗感染等处理, 腹痛、体温也很快恢复正常. 两组并发症比较, 差异无统计学意义(4/40和3/40, $P>0.05$).

3 讨论

ERCP+EST取石术已经成为胆总管结石治疗的金标准, 已被越来越多地应用于临床. 它具有创伤小、术后恢复快等优点, 但也有出血、穿孔、感染等各种并发症发生; 而且, 随着时间的推移, 尤其对年轻患者, EST术后由于括约肌功能丧失及肠液反流导致结石复发甚至癌变等受到人们广泛重视^[4-7]. 数篇报道认为EPBD可保护十二指肠乳头括约肌功能, 从而减少EST术后出血、穿孔、感染等各种并发症的发生, 尤其适用于年轻患者. 但另有研究显示单纯气囊扩张乳头易引起ERCP术后胰腺炎, 其安全性受到置疑, 很多学者不建议单独使用EPBD^[8]; 同时对于较大、较多胆总管结石, 单纯EPBD无法取出, 往往需要频繁使用碎石器, 这大大增加了术后

胆管炎及ERCP术后胰腺炎的发生^[9,10].

近年来由学者提出先行EST后再行ESBD可提高清除大结石的便利性和成功率, 同时降低术后感染、出血等并发症的风险^[11,12]. 乳头小切开后胆管和胰管开口相互分离, 同时胆管留置导丝后气囊扩张可以相对避开胰管方向扩张, 可以减少胰管开口的损伤、水肿, 减少术后胰腺炎的发生. 本研究结果显示, 相对于EST组, 虽然ESBD组结石直径大、多发结石多, 但ESBD组操作时间仍然较短, 同时碎石器使用率较低, 术后胰腺炎、发热、腹痛等感染并发症两组发生率无明显差异($P>0.05$). 考虑EST组使用碎石器较高, 反复碎石, 频繁进网篮、球囊、导丝等器械导致操作时间长, 同时极易导致乳头开口肿胀、出血等发生, 本实验EST组就发生了2例取较大结石通过乳头开口时导致乳头口出血、需要补充电凝及去甲肾上腺素冰盐水冲洗后才止血的情况. 而ESBD组可以根据结石大小及胆管下端直径选择不同扩张球囊, 增加了术者的主动性, 减少了碎石器的使用, 直径<1.5 cm结石往往可以一次性取出, 从而缩短操作时间, 减少了感染的发生. 对于多发结石, 遵循先取胆管远端结石为原则, 保持出口的通畅, 防止结石嵌顿于乳头开口导致取石失败. 相对于EST, ESDB组乳头口为钝性撕裂, 术后应常规放置ENBD, 以防术后胆管炎发生, 本组中均常规放置ENBD, 术后胆管感染发生率较EST组无明显差异.

对于扩张球囊的选择, 我们认为可以根据

结石大小及胆管下端直径来定,一般尽量不能超过胆管下端直径,如果球囊直径超过胆管下端直径很多,容易导致胆管穿孔,同时扩张应在X透视下进行,不能扩张过快,应缓和增加压力,过快扩张可能有导致胆管穿孔及大量出血的危险。目前已有乳头小切开联合乳头大气囊扩张发生胆管穿孔的临床报道^[13],本研究选用气囊最大直径2.0 cm,但患者胆管下段直径约2.8 cm,内有3枚约1.8-2.5 cm巨大结石,气囊扩张加机械碎石后成功取出,无穿孔等并发症发生。

总之,本研究显示对于胆总管较大结石,ESBD能达到同EST相同的取石效果,与国外报道相似^[14,15]。同时在术后并发症方面,无明显差异,尤其对于胆总管巨大结石、凝血功能障碍、乳头旁憩室、小乳头等EST大切开余地有限的患者,效果尤其明显,值得临床推广。同时对于其扩张后的结石复发率、乳头功能等有待于进一步长期临床随访和观察。

4 参考文献

- Akashi R, Kiyozumi T, Tanaka T, Sakurai K, Oda Y, Sagara K. Mechanism of pancreatitis caused by ERCP. *Gastrointest Endosc* 2002; 55: 50-54
- Disario JA, Freeman ML, Bjorkman DJ, Macmathuna P, Petersen BT, Jaffe PE, Morales TG, Hixson LJ, Sherman S, Lehman GA, Jamal MM, Al-Kawas FH, Khandelwal M, Moore JP, Derfus GA, Jamidar PA, Ramirez FC, Ryan ME, Woods KL, Carr-Locke DL, Alder SC. Endoscopic balloon dilation compared with sphincterotomy for extraction of bile duct stones. *Gastroenterology* 2004; 127: 1291-1299
- Ersoz G, Tekesin O, Ozutemiz AO, Gunsar F. Biliary sphincterotomy plus dilation with a large balloon for bile duct stones that are difficult to extract. *Gastrointest Endosc* 2003; 57: 156-159
- Bergman JJ, van der Mey S, Rauws EA, Tijssen JG, Gouma DJ, Tytgat GN, Huibregtse K. Long-term follow-up after endoscopic sphincterotomy for bile duct stones in patients younger than 60 years of age. *Gastrointest Endosc* 1996; 44: 643-649
- Lai KH, Peng NJ, Lo GH, Cheng JS, Huang RL, Lin CK, Huang JS, Chiang HT, Ger LP. Prediction of recurrent choledocholithiasis by quantitative cholescintigraphy in patients after endoscopic sphincterotomy. *Gut* 1997; 41: 399-403
- Sheth SG, Howell DA. What are really the true late complications of endoscopic biliary sphincterotomy? *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 2699-2701
- Paganini AM, Lezoche E. Follow-up of 161 unselected consecutive patients treated laparoscopically for common bile duct stones. *Surg Endosc* 1998; 12: 23-29
- Williams EJ, Green J, Beckingham I, Parks R, Martin D, Lombard M. Guidelines on the management of common bile duct stones (CBDS). *Gut* 2008; 57: 1004-1021
- Tsujino T, Kawabe T, Komatsu Y, Yoshida H, Isayama H, Sasaki T, Kogure H, Togawa O, Arizumi T, Matsubara S, Ito Y, Nakai Y, Yamamoto N, Sasahira N, Hirano K, Toda N, Tada M, Omata M. Endoscopic papillary balloon dilation for bile duct stone: immediate and long-term outcomes in 1000 patients. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007; 5: 130-137
- Baron TH, Harewood GC. Endoscopic balloon dilation of the biliary sphincter compared to endoscopic biliary sphincterotomy for removal of common bile duct stones during ERCP: a metaanalysis of randomized, controlled trials. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 1455-1460
- Kim HG, Cheon YK, Cho YD, Moon JH, Park do H, Lee TH, Choi HJ, Park SH, Lee JS, Lee MS. Small sphincterotomy combined with endoscopic papillary large balloon dilation versus sphincterotomy. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 4298-4304
- Lee JH, Kang DH, Park JH, Kim MD, Yoon KT, Choi CW, Kim HW, Cho M. Endoscopic removal of a bile-duct stone using sphincterotomy and a large-balloon dilator in a patient with situs inversus totalis. *Gut Liver* 2010; 4: 110-113
- Lee YS, Moon JH, Ko BM, Choi HJ, Cho YD, Park SH, Lee MS, Shim CS. Endoscopic closure of a distal common bile duct perforation caused by papillary dilation with a large-diameter balloon (with video). *Gastrointest Endosc* 2010; 72: 616-618
- Heo JH, Kang DH, Jung HJ, Kwon DS, An JK, Kim BS, Suh KD, Lee SY, Lee JH, Kim GH, Kim TO, Heo J, Song GA, Cho M. Endoscopic sphincterotomy plus large-balloon dilation versus endoscopic sphincterotomy for removal of bile-duct stones. *Gastrointest Endosc* 2007; 66: 720-726; quiz 768, 771
- Tae Hyeon Kim, Hyo Jeong Oh, Chong Ju Im, Chang Soo Choi, Ji Hye Kweon, Young Woo Sohn. A comparative study of outcomes between endoscopic sphincterotomy plus endoscope papillary large balloon dilatation and endoscopic sphincterotomy alone in patients with large extra-hepatic bile duct stones. *Gastrointest Endosc* 2009; 69: A156

编辑 张姗姗 电编 闫晋利

十二指肠结节性病变病理分型及诊断17例

时晓鑫

时晓鑫, 郑州市人民医院 河南省郑州市 450003

时晓鑫, 主治医师, 主要研究方向是消化内科.

通讯作者: 时晓鑫, 主治医师, 450003, 河南省郑州市, 郑州人民医院消化内科. 798242742@qq.com

电话: 0371-67077059

收稿日期: 2011-12-30 修回日期: 2012-02-13

接受日期: 2012-03-20 在线出版日期: 2012-04-28

Clinical and pathologic features of nodular duodenum: An analysis of 17 cases

Xiao-Xin Shi

Xiao-Xin Shi, the People's Hospital of Zhengzhou, Zhengzhou 572000, Henan Province, China

Correspondence to: Xiao-Xin Shi, Attending Physician, People's Hospital of Zhengzhou, Zhengzhou 450003, Henan Province, China. 798242742@qq.com

Received: 2011-12-30 Revised: 2012-02-13

Accepted: 2012-03-20 Published online: 2012-04-28

Abstract

AIM: To investigate the incidence, clinical presentations, histopathological features, natural history, and response to therapy of nodular duodenum.

METHODS: The clinical data for 17 patients with nodular duodenum were analyzed retrospectively, including age, sex, disease type, symptoms, final diagnosis, histopathology, hemoglobin, SF, AL, IG, and OVA.

RESULTS: Of 17 patients with nodular duodenum, 9 were male and 8 were female. Their mean age was 28.1 years. Approximately 47% of patients had stomachache. Sinus tubercle was most frequently seen endoscopically. Histology of duodenal nodules revealed chronic inflammation in all cases, intraepithelial eosinophilic granulocyte proliferation in 70.5% of cases, and villous atrophy in 47% of cases. Six patients had flagellate. Clinical diagnostic features included diarrhea, giardiasis, secretory IgA deficiency, and *Helicobacter pylori*-associated gastritis.

CONCLUSION: Nodular duodenum is an endoscopically distinct entity that may respond clinically

to antisecretory therapy but is difficult to eradicate.

Key Words: Diarrhea; Nodular dodecadactylon; Giardiasis; *Helicobacter pylori*; Lymph hyperplasia

Shi XX. Clinical and pathologic features of nodular duodenum: An analysis of 17 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(12): 1061-1065

摘要

目的: 确定十二指肠结节性病变组织病理学特征及分型.

方法: 统计分析经内镜下被确诊为十二指肠结节性病变患者的资料. 对其年龄、性别、类型、症状、最后诊断、相关疾病和组织病理学特点等记录进行回顾性研究. 同时亦分析患者血红蛋白、平均细胞体积、血清铁蛋白、白蛋白、免疫球蛋白、腹腔自身抗体、贾第虫和粪便OVA寄生虫, ELISA分析贾第虫的特异性抗原水平.

结果: 筛选出17例经内镜确诊为十二指肠结节性病变的患者. 诊断时平均年龄为28.1岁(17-56岁), 男9例, 女8例. 十二指肠结节性病变中, 腹痛(47%)是最常见的临床症状, 胃窦结节(41%)是最常见的内镜表现. 十二指肠结节性病变的组织病理学评估显示, 所有患者均有慢性炎症, 嗜酸性粒细胞在隐窝间和上皮内增殖占70.5%, 47%的患者存在绒毛萎缩. 通过组织学检查和/或特定的蓝氏贾第鞭毛虫粪便抗原阳性实验显示有6例患者感染贾第虫. 患者的临床诊断显示某些特征, 如腹泻、贾第虫病、分泌型IgA缺乏症和幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)胃炎, 并且他们中的一些与其他的有相关性.

结论: 十二指肠结节性病变其黏膜有明显淋巴细胞和/或嗜酸性粒细胞浸润, 建议应对造成这一显著炎症反应的微生物学和免疫学病因进行进一步研究.

关键词: 腹泻; 十二指肠结节性病变; 贾第虫病; 幽门螺杆菌; 结节样淋巴增生

■背景资料

十二指肠结节性病变内镜特点为十二指肠近端可见无数黏膜结节, 其大小不等, 直径为0.2-0.5 cm, 该结节并不常见且其确切病因尚不清楚.

■同行评议者

刘宝瑞, 教授, 南京大学医学院附属鼓楼医院肿瘤中心; 姜相君, 主任医师, 青岛市立医院消化科

■相关报道

在某些特定疾病如低丙球蛋白血症、终末期肾脏疾病及腹泻中曾发现十二指肠结节性病变。也有其与某些媒介物如 *H. pylori* 和贾第虫之间的相关性的研究。

时晓鑫. 十二指肠结节性病变病理分型及诊断17例. 世界华人消化杂志 2012; 20(12): 1061-1065

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1061.asp>

0 引言

十二指肠结节性病变内镜特点为十二指肠近端可见无数黏膜结节,其大小不等,直径为0.2-0.5 cm,该结节并不常见且其确切病因尚不清楚。可能是由十二指肠球炎引起,传染性病原体、环境、营养或其他个人因素也可能是十二指肠结节性病变的致病因素^[1,2]。本文回顾性分析我院病例,旨在定通过上消化道内镜检查发现十二指肠球部结节性病变患病率、临床意义和组织病理学特征。

1 材料和方法

1.1 材料 2006-02/2010-03由于各种胃肠道不适行胃镜检查或肠道活检内镜的患者。

1.2 方法

1.2.1 患者资料统计:选取分析20例,十二指肠结节性病变患者的内镜记录,对其年龄、性别、类型和症状、最后诊断、相关疾病和组织病理学特点等记录进行回顾性研究。同时亦分析患者血红蛋白、平均细胞体积、血清铁蛋白、白蛋白、免疫球蛋白、腹腔自身抗体、贾第虫和粪便OVA寄生虫,且ELISA分析贾第虫的特异性抗原水平。排除终末期肾脏疾病和恶性肿瘤。

1.2.2 组织病理学检查:十二指肠结节性病变定义为在十二指肠内镜检查下可见十二指肠近端存在多个散在的、直径0.2-0.5 cm的黏膜结节。对患者进行十二指肠结节区的活组织镜检,并记录食管、胃体、胃窦或十二指肠任何其他的异常情况。组织经苏木素-伊红和过碘酸-希夫(PAS)-阿新蓝染色后,由同1位病理专业主任医师(熟悉十二指肠内镜下的表现但并不清楚患者病史、临床表现和之前的检查结果)进行评估。

1.2.3 病理分级:绒毛/隐窝比率范围为0-4,规定0为正常,将绒毛萎缩分为4个级别,参考文献[3]。计数远离淋巴滤泡绒毛尖端的上皮内淋巴细胞(intraepithelial lymphocytes, IELs)的数量。对慢性和急性炎症均进行分级如下:0,正常;1,轻度;2,适中;3,严重,分级方法参照文献[4]。经苏木素/伊红染色,选择嗜酸性粒细胞浸润面积最大的区域,至少在1个高倍视野(high power field, HPF)对其进行计数。定义为嗜酸性粒细胞>20个/HPF伴随浸润到表面和/或隐窝黏膜内为异常嗜

酸性粒细胞浸润。

统计学处理 数据表示为mean±SD和百分数(%)。

2 结果

2006-02/2010-03我院约有1 040例上消化系内镜检查。经内镜确诊为十二指肠结节性病变共20例(1.9%)。其中3例因其十二指肠组织样本不可用而被排除。17例患者被纳入研究(表1),包括男9例(53%),女8例(47%),患者年龄范围19-67岁(平均35.1岁±2.7岁)。

胃窦结节(41%)是除十二指肠结节以外最常见的内镜发现。全黏膜红斑1例(6%)。11例患者行贾第虫特异性抗原粪便检查,呈阳性为5例。患者临床和实验室特征及内镜研究结果显示见表1。最常见的临床症状是腹痛,有8例患者(47%),其中37.5%局限在上腹部。疼痛持续时间从0.7-24 mo不等(平均10 mo±7.3 mo),常为间歇性和渐进性;恶心和呕吐患者5例(29%),身材矮小患者4例(23.5%),贫血和腹泻患者各3例(分别占18%)。

十二指肠结节性病变的内镜显示如图1。该疾病的组织病理学评价表明,在所有患者(100%)中慢性炎症浸润范围从轻微到严重,其中有6例为1级,4例为2级,7例为3级并伴有慢性淋巴滤泡增生性炎症,疑是结节性淋巴组织增生(nodular lymphoid hyperplasia, NLH);8例活检显示不同程度的绒毛萎缩,其中4例(严重3例)经相关科室及腹腔自身抗体测试被确诊为腹泻;17例活检中有12例(70.5%)可观察到其隐窝和上皮内的嗜酸性粒细胞的数量增加,但嗜酸性粒细胞的数量增加和贾第虫阳性之间没有相关性(表1)。此外,这些患者粪便中其他寄生虫的检查结果为阴性;患者胃上皮化生和Brunner腺增生症(brunner gland hyperplasia, BGH)不突出。患者组织病理学研究结果显示见表2。

对3例患者十二指肠黏膜表面的贾第虫滋养体进行病理检查。其中2例贾第虫粪便检查特定抗原阳性,其他原虫的病原体如隐孢子虫,经光镜未发现。患者无黏膜糜烂或溃疡。除1例IgA缺乏症患者的活检显示黏膜浆细胞明显减少外,所有活检固有层中浆细胞均易被发现。结构良好的肉芽肿或小集合组织细胞未识别。增生或腺瘤性息肉或任何其他恶性或组织病理学变化未发现。收集11例患者的胃活检样本,其中9例患者胃窦黏膜表面存在幽门螺杆菌(*Helicobacter*

表 1 患者详细资料、临床表现、内镜和病理组织学评价概要

年龄/ 性别	临床 表现	DS (mo)	临床诊断	内镜 特征 ¹	VA	IELs	CI	NLH	AI	AEI	GM	BGH	十二指 肠贾 第虫	胃窦 ² <i>H. pylori</i>	贾第虫特 异性抗原 粪便检查	最终诊断
19/M	贫血	4	IDA	胃窦结节 性病变	0	-	3	+	0	-	-	-	-	+	-	十二指肠炎, <i>H. pylori</i> 胃炎
21/M	身材小	72	贾第虫病	-	2	+	3	+	1	+	-	+		NA	+	贾第虫病, <i>H. pylori</i> 胃炎
45/F	贫血腹 泻	12	CD	-	3	+	3	+	2	+	+	-		NA	NA	CD
65/M	贫血	6	CD	胃窦结节 性病变	1	+	1	-	1	+	-	-	-	NA	-	CD
46/F	反复呕 吐	4	胃病	胃窦结节 性病变	0	+	3	+	1	+	-	-	-	+	-	十二指肠炎, <i>H. pylori</i> 胃炎
38/F	腹痛腹 泻	12	贾第虫病 IgA缺乏症	胃窦结节 性病变	0	+	3	+	2	+	+	+	-	+	+	贾第虫病, IgA缺乏症, <i>H. pylori</i> 胃炎
53/M	身材短 小	24	CDIDDM	-	3	+	1	-	1	-	-	-	+	-	NA	CD, IDDM, 贾 第虫病
41/F	腹痛	12	RAP胃病	胃窦结节 性病变	0	-	2	-	0	-	-	-	-	+	-	<i>H. pylori</i> 胃炎
25/M	腹痛	6	贾第虫病	-	0	-	1	-	0	+	-	-	-	-	+	贾第虫病
55/F	腹痛身 材短小	12	CD	-	4	+	2	-	1	+	+	-	-	NA	-	CD
20/M	恶心呕 吐	2	PT ² 胃病	-	0	-	3	+	1	-	-	-	-	+	NA	十二指肠炎, <i>H. pylori</i> 胃炎
67/M	腹痛呕 吐	0.7	胃病	胃体及胃 窦红斑样 改变	0	-	1	-	1	+	-	-	-	+	NA	<i>H. pylori</i> 胃炎
54/M	呕吐	1	胃病	-	0	-	2	-	1	+	-	-		+	NA	<i>H. pylori</i> 胃炎
35/F	腹痛	12	RAP胃病	胃窦结节 性病变	0	+	1	-	0	+	-	-	-	+	NA	十二指肠炎, <i>H. pylori</i> 胃炎
38/F	腹痛恶 心	2	功能性消 化不良	-	1	+	2	-	0	+	-	-	-	NA	-	十二指肠炎, 慢性胃炎
46/F	腹痛	24	贾第虫病	-	1	+	3	+	0	+	-	-	-	NA	+	贾第虫病
35/M	腹泻身 材短小	24	贾第虫病 IgA缺乏症	胃窦结节 性病变	1	+	2	-	0	-	-	-	+	+	+	贾第虫病, IgA缺乏症, <i>H. pylori</i> 胃炎

CD: 腹泻; RAP: 反复性腹痛; DS: 症状持续时间; IDDM: 胰岛素依赖性糖尿病; DN: 十二指肠结节性病变; IDA: 缺铁性贫血; VA: 绒毛萎缩(0-4级); IELs: 上皮内淋巴细胞增多; CI: 慢性炎症(0-3级); NLH: 结节性淋巴组织增生; AI: 急性炎症(0-3级); AEI: 异常嗜酸性粒细胞的炎症反应(>20/hpf); GM: 胃粘蛋白细胞化生; BGH: Brunner腺增生症; NA: 未评估; ¹除十二指肠结节性病变之外的内镜下表现; ²PT, 用抗结核药物治疗肺结核4 mo.

pylori, *H. pylori*, 表1)。在对6例胃窦结节性病变患者内镜检查中均发现结节性淋巴组织增生NLH和胃窦黏²*H. pylori*, 其中3人十二指肠活检中亦发现NLH。

3 讨论

十二指肠结节性病变是一种罕见的内镜发现, 该结节性病变的病因尚不明确。以往研究表明, 在某些特定疾病如低丙球蛋白血症、终末期肾脏疾病及腹泻中曾发现十二指肠结节性病变^[5-8]。

也有其与某些媒介物如²*H. pylori*和贾第虫之间的相关性研究^[9,10]。Langkemper等^[11]于1980年通过放射学及内镜发现了22例十二指肠存在结节样病变的成人患者。他们进行组织病理学研究后显示所有患者的十二指肠球部均有特征性外观, 将其归因于胃黏膜异位, 只有1例除外。Fernandez-Melone等^[1]报道十二指肠结节性炎在成人中的发生率为4%。他们推测其为层次分明、形态多样的非特异性十二指肠炎。Triadafilopoulos等^[2]报道了83例(发病率4%)患十二指

同行评价

文章选题新颖, 整体结构严谨, 思路清晰, 讨论全面。由于目前对本病尚缺乏公认的诊断标准, 所以本文有较好的临床指导意义。

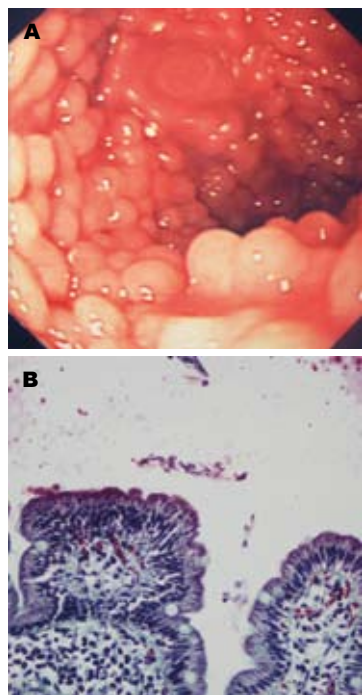


图 1 十二指肠结节性病变。
A: 十二指肠结节性病变内镜图, 十二指肠球部多发小结节性病变; B: 十二指肠表面蓝氏贾第鞭毛虫分组 (Gomori三色, $\times 400$)。

表 2 十二指肠结节性病变组织病理学特征

病理特征	<i>n</i>	%
慢性炎症	17	100
异常的嗜酸性粒细胞的炎症反应	12	70.5
IELs增多	10	59
急性炎症	10	59
绒毛萎缩	8	47
NLH	7	41
十二指肠黏膜表面蓝氏贾第虫	3	18
胃上皮化生	3	18
BGH	2	12

肠结节性病变的男退伍军人的临床及病理特征, 并认为十二指肠结节性病变可能是十二指肠炎的1个变种, 可能与酸消化性溃疡有关, 而且其组织病理学特征是可变的。所有的研究组包括成人患者及流行病学调查均显示其出现率大约为4%。我们观测了相当数量的十二指肠结节性病变患者, 并且发现其在国人人群中的出现率是1.9%。

据之前报道, 十二指肠结节性病变是十二指肠腹泻的一种内镜特征^[8,12]。在我们研究中有4例腹泻患者存在十二指肠球结节性病变, 并且在随访的腹泻患者中其出现率为4.6%, 这主要源于上下胃肠道的丙种球蛋白缺乏导致血症患者感染的风险将会增加。肠道免疫缺陷综合征的组织病理学特征是多样的, 但最常见的是NLH和绒毛萎缩^[13]。在先前的一个研究中32例成年患者行胃肠镜检查时发现普遍存在多种免疫缺陷, 其中31%的患者存在十二指肠结节性病变^[5]。十二指肠标本的组织学评估发现除十二指肠黏膜的正常组织外尚存在绒毛萎缩和NLH。我们有2名患者罹患选择性IgA缺乏症(6号和17号患者)。对其进行十二指肠的组织学检查发现均存在显著的淋巴细胞炎症, 1名为NLH而另1名为绒毛萎缩。虽然在对1名患者行十二指肠活检时发现了贾第虫滋养体, 但在别人的粪便样本中亦发现这种寄生虫的包囊和抗原。IgA抗肌内膜抗体以及IgA和IgG组织转谷氨酰胺酶抗体(tTG)对于这些腹泻患者是不兼有的。胃窦部黏

膜病理观察也发现了*H. pylori*, 患者接受针对贾第虫和*H. pylori*的治疗, 虽然6名患者的腹痛和腹泻已经治愈, 但在1年后的第2次胃镜检查中发现十二指肠的结节外观和病理组织学研究结果并未发生改变。我们认为NLH是一种局部针对免疫缺陷患者发生的肠道微生物抗原的免疫反应^[14]。另一方面, NLH不仅在免疫缺陷症患者中存在, 他也在无免疫缺陷、肠道细菌过度生长、腹泻的成人贾第鞭毛虫病患者中被发现^[15-17]。

本研究中有6例贾第鞭毛虫病患者, 其中2例为IgA缺乏症, 其余丙种球蛋白水平正常。尽管常规粪便检查检测贾第鞭毛虫滋养体或包囊可能会失败, 在粪便样本中行酶联免疫吸附测定法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)检测贾第鞭毛虫抗原则更敏感^[18]。在我们的研究中, 运用粪便样本中行ELISA检测贾第鞭毛虫抗原诊断贾第鞭毛虫病患者5例, 在十二指肠黏膜中也检测出有3例。虽然没有具体的贾第鞭毛虫感染病理发现, 但其具有不同程度的绒毛萎缩, 上皮内淋巴细胞数量增加以及先前描述的NLH表现^[10,18,19]。我们发现淋巴浸润增加5例、绒毛萎缩4例(1例腹泻, 7号患者), NLH 3例。

NLH被定义为形成大量浸润性具有明显生发中心的类淋巴细胞的淋巴滤泡, 其可能是解释十二指肠结节性病变的原因之一。然而, 尽管内镜检查下外观相同, 组织病理学检查表明NLH在仅41%的患者中被发现, 而非全部。另一方面, IEL浸润的增加和慢性炎症的出现率也较高(分别为59%和100%)。我们注意到本研究人群除有慢性炎症外, 在十二指肠黏膜内嗜酸性粒细胞亦有明显增加。虽然其没有高到足以断定为嗜酸性粒细胞胃肠病的程度^[20,21], 但本研究中70.5%患者有明显十二指肠黏膜内嗜酸性粒细胞浸润。

7例患者内镜检查同时发现存在胃窦结节性病变。我们收集了11例患者的胃窦活检标本(6例有胃窦结节性病变), 发现其中有9例在胃窦黏膜上有幽门螺旋杆菌。6例胃窦结节性病变患者中我们观察到在胃窦黏膜上NLH和*H. pylori*同时存在。以前报道称*H. pylori*感染和胃窦结节性胃炎关系密切, 尤其是儿童^[22,23]。在实验中, 我们也观察到胃窦结节性病变常伴有*H. pylori*胃炎, 但不存在十二指肠结节性病变。

Li等对86例十二指肠结节性病变患者资料进行研究探讨了*H. pylori*感染、胃上皮化生及十二指肠结节性病变之间的关系。他们发现在十二指肠结节性病变患者中*H. pylori*感染和胃上皮化生的出现率分别为58.1%和57%。经成功治疗之后的患者, 其胃上皮化生明显消退但内镜下十二指肠结节性病变的外观未改变。胃上皮化生在本研究中也不显著。*H. pylori*胃炎(伴/不伴胃窦结节性病变)与十二指肠结节性病变的关系尚不清楚。

总之, 本研究报道了17例十二指肠结节性病变患者的临床及病理表现, 该结节无显著的组织形态学特征, 患者最显著的组织形态学特征是在十二指肠黏膜上淋巴细胞的增多和嗜酸性粒细胞的浸润。但后续还需要大样本人群的研究证实。

4 参考文献

- 1 Fernandez-Melone JH, Triadafilopoulos G, Chandler JG. Nodular duodenitis and single duodenal nodules. *Am Surg* 1990; 56: 175-177
- 2 Triadafilopoulos G. Clinical and pathologic features of the nodular duodenum. *Am J Gastroenterol* 1993; 88: 1058-1064
- 3 Drut R, Rúa EC. Histopathologic diagnosis of celiac disease in children without clinical evidence of malabsorption. *Int J Surg Pathol* 2007; 15: 354-357
- 4 Guarner J, Herrera-Goepfert R, Mohar A, Sanchez L, Halperin D, Ley C, Parsonnet J. Interobserver variability in application of the revised Sydney classification for gastritis. *Hum Pathol* 1999; 30: 1431-1434
- 5 Luzi G, Zullo A, Iebba F, Rinaldi V, Sanchez Mete L, Muscaritoli M, Aiuti F. Duodenal pathology and clinical-immunological implications in common variable immunodeficiency patients. *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 118-121
- 6 Zukerman GR, Mills BA, Koehler RE, Siegel A, Harter HR, DeSchryver-Kecskemeti K. Nodular duodenitis. Pathologic and clinical characteristics in patients with end-stage renal disease. *Dig Dis Sci* 1983; 28: 1018-1024
- 7 Sotoudehmanesh R, Ali Asgari A, Ansari R, Nooraie M. Endoscopic findings in end-stage renal disease. *Endoscopy* 2003; 35: 502-505
- 8 Piazzzi L, Zancanella L, Chilovi F, Merighi A, De Vitis I, Feliciangeli G, Borgheresi P, Snider L, Grassi SA, Manfrini C, Orzes N, Bianco MA, Cugia L, Lenoci N, Castagnini A. Diagnostic value of endoscopic markers for celiac disease in adults: a multi-centre prospective Italian study. *Minerva Gastroenterol Dietol* 2008; 54: 335-346
- 9 Li XB, Ge ZZ, Chen XY, Liu WZ. Duodenal gastric metaplasia and *Helicobacter pylori* infection in patients with diffuse nodular duodenitis. *Braz J Med Biol Res* 2007; 40: 897-902
- 10 Pérez-Roldán F, Mate-Valdezate A, Villafañez-García MC, González Carro P, Legaz Huidobro ML. Nodular lymphoid hyperplasia by *Giardia lamblia*. *Endoscopy* 2008; 40 Suppl 2: E116-E117
- 11 Langkemper R, Hoek AC, Dekker W, Op den Orth JO. Elevated lesions in the duodenal bulb caused by heterotopic gastric mucosa. *Radiology* 1980; 137: 621-624
- 12 Lee SK, Lo W, Memeo L, Rotterdam H, Green PH. Duodenal histology in patients with celiac disease after treatment with a gluten-free diet. *Gastrointest Endosc* 2003; 57: 187-191
- 13 Washington K, Stenzel TT, Buckley RH, Gottfried MR. Gastrointestinal pathology in patients with common variable immunodeficiency and X-linked agammaglobulinemia. *Am J Surg Pathol* 1996; 20: 1240-1252
- 14 Webster AD, Kenwright S, Ballard J, Shiner M, Slavin G, Levi AJ, Loewi G, Asherson GL. Nodular lymphoid hyperplasia of the bowel in primary hypogammaglobulinaemia: study of in vivo and in vitro lymphocyte function. *Gut* 1977; 18: 364-372
- 15 Rubio-Tapia A, Hernández-Calleros J, Trinidad-Hernández S, Uscanga L. Clinical characteristics of a group of adults with nodular lymphoid hyperplasia: a single center experience. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 1945-1948
- 16 Kasirga E, Gülen H, Simşek A, Ayhan S, Yilmaz O, Ellidokuz E. Coexistence of symptomatic iron-deficiency anemia and duodenal nodular lymphoid hyperplasia due to giardiasis: case report. *Pediatr Hematol Oncol* 2009; 26: 57-61
- 17 Rambaud JC, De Saint-Louvent P, Marti R, Galian A, Mason DY, Wassef M, Licht H, Valleur P, Bernier JJ. Diffuse follicular lymphoid hyperplasia of the small intestine without primary immunoglobulin deficiency. *Am J Med* 1982; 73: 125-132
- 18 Vesey CJ, Peterson WL. Review article: the management of Giardiasis. *Aliment Pharmacol Ther* 1999; 13: 843-850
- 19 Eren M, Saltik-Temizel IN, Yüce A, Çağlar M, Koçak N. Duodenal appearance of giardiasis in a child with selective immunoglobulin A deficiency. *Pediatr Int* 2007; 49: 409-411
- 20 Chehade M, Magid MS, Mofidi S, Nowak-Węgrzyn A, Sampson HA, Sicherer SH. Allergic eosinophilic gastroenteritis with protein-losing enteropathy: intestinal pathology, clinical course, and long-term follow-up. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2006; 42: 516-521
- 21 Lowichik A, Weinberg AG. A quantitative evaluation of mucosal eosinophils in the pediatric gastrointestinal tract. *Mod Pathol* 1996; 9: 110-114
- 22 Cohen H, Laine L. Endoscopic methods for the diagnosis of *Helicobacter pylori*. *Aliment Pharmacol Ther* 1997; 11 Suppl 1: 3-9
- 23 Riddell RH. Pathobiology of *Helicobacter pylori* infection in children. *Can J Gastroenterol* 1999; 13: 599-603

血浆中miR-144*直接扩增在大肠癌非侵入性诊断中的应用

桂银莉, 张金平, 李建生, 王 静

■背景资料

大肠癌是消化系统常见恶性肿瘤之一,其发病是多因素、多步骤的复杂过程,传统的检查方法都有其明显弊端,血浆中miRNA水平的检测作为一种新的无创性检查应运而生。

桂银莉, 张金平, 李建生, 王静, 郑州大学第一附属医院消化内科 河南省郑州市 450000

桂银莉, 硕士, 主要研究方向是消化系统肿瘤。

作者贡献分布: 此课题由桂银莉、张金平及李建生设计; 研究过程由桂银莉与张金平操作完成; 桂银莉与王静共同收集标本及购买试验试剂; 本论文写作由桂银莉完成。

通讯作者: 李建生, 教授, 450000, 河南省郑州市, 郑州大学第一附属医院消化内科。lijiansheng@medmail.com.cn

电话: 0371-66295922

收稿日期: 2012-02-01 修回日期: 2012-02-29

接受日期: 2012-03-20 在线出版日期: 2012-04-28

Expression of microRNA-144* in plasma of patients with colorectal cancer: A potential non-invasive diagnostic marker for colorectal cancer screening

Yin-Li Gui, Jin-Ping Zhang, Jian-Sheng Li, Jing Wang

Yin-Li Gui, Jin-Ping Zhang, Jian-Sheng Li, Jing Wang, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450000, Henan Province, China

Correspondence to: Jian-Sheng Li, Professor, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450000, Henan Province, China. lijiansheng@medmail.com.cn

Received: 2012-02-01 Revised: 2012-02-29

Accepted: 2012-03-20 Published online: 2012-04-28

Abstract

AIM: To compare the levels of miR-144* in plasma of patients with colorectal carcinoma (CRC), those with colorectal adenoma, and those with inflammatory bowel disease (IBD), and to explore the role of miR-144* in the occurrence and development of colorectal cancer.

METHODS: Plasma samples were collected from 55 patients with CRC, 30 patients with colorectal adenoma, 30 patients with IBD, and 30 normal volunteers. All these samples were taken from patients without pre-treatment. In addition, postoperative plasma samples were collected from 43 patients with CRC and 30 patients with colorectal adenoma. Quantitative reverse transcription and real-time fluorescent quantitative PCR were performed to detect the expression of miR-144* in these plasma samples.

RESULTS: The expression of miR-144* in the plasma of CRC patients was significantly higher than that in non-carcinoma patients. High MiR-144* expression was associated with increased tumor size and advanced pT stage. Of 43 postoperative CRC patients, 30 underwent radical surgery and 27 of them had significantly reduced expression of miR-144* compared to pre-operative levels; 13 underwent palliative surgery and showed no significant change in miR-144* expression. There were no significant changes in miR-144* expression between preoperative and postoperative patients with either non-advanced or advanced adenoma.

CONCLUSION: Detection of miR-144* expression in plasma represents a non-invasive way to screen colorectal cancer and predict disease recurrence.

Key Words: Colorectal cancer; miR-144*; Plasma; Adenoma

Gui YL, Zhang JP, Li JS, Wang J. Expression of microRNA -144* in plasma of patients with colorectal cancer: A potential non-invasive diagnostic marker for colorectal cancer screening. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(12): 1066-1070

摘要

目的: 研究miR-144*在大肠癌(CRC)、大肠腺瘤、炎症性肠病(IBD)及健康对照组的血浆标本中直接扩增后的表达量,初步探索其在大肠癌的发生、发展中的作用。

方法: 分别收集CRC、大肠腺瘤、IBD及全结肠镜检查阴性的健康人的血浆标本55例、30例、30例、30例,上述标本均取自患者未治疗前;分别收集CRC、大肠腺瘤患者行肿瘤切除术后7 d的血浆标本43例、30例。利用TRIzol试剂进行上述标本中RNA的提取,得到纯化后的RNA样本,逆转录及实时荧光定量PCR反应检测miR-144*的表达,进行统计学分析。

结果: 在人大肠癌组血浆标本中,miR-144*较

■同行评议者

陈光, 教授, 吉林大学第一医院消化器官外科

非大肠癌组中表达增高, miR-144*的表达量与肿瘤的大小及浸润深度相关, 肿瘤越大, 浸润深度越深, miR-144*表达量越高. 在43例大肠癌患者术后7 d的血浆标本中, 30例行大肠癌根治术患者中27例miR-144*的表达量较术前降低, 13例行大肠癌姑息性手术患者的血浆miR-144*的表达量较术前无明显差异. 大肠腺瘤组中, 进展期腺瘤和非进展期腺瘤在行腺瘤切除术前miR-144*的表达量无明显变化.

结论: 血浆中miRNA-144*表达水平的检测, 可作为大肠癌非侵入性诊断方法并可以预测大肠癌的复发.

关键词: 结直肠肿瘤; miR-144*; 血浆; 大肠腺瘤

桂银莉, 张金平, 李建生, 王静. 血浆中miR-144*直接扩增在大肠癌非侵入性诊断中的应用. 世界华人消化杂志 2012; 20(12): 1066-1070
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1066.asp>

0 引言

小分子RNA(microRNAs, miRNA)是近年来新发现的一类具有短小、内源性、非编码特性的单链RNA分子, 其编码基因是目前最大的一类调节基因, 可以通过抑制或降解转录后的mRNA来调节某些基因的表达. miRNA通过对其靶基因的调控在组织发育、细胞增殖和细胞凋亡等基本生理学过程中发挥着重要作用^[1,2], 而细胞的过度增殖以及异常死亡都是癌症的显著特征, 由此提示肿瘤的发生、发展与miRNA之间可能存在着关联.

大肠癌(colorectal cancer, CRC)是消化系常见恶性肿瘤之一, 其发病是多因素、多步骤的复杂过程, 近年来我国大肠癌发病率呈逐年上升趋势. 由于多数大肠癌均以大肠内腺瘤样息肉为前期病变, 因此, 结肠肿瘤的筛查十分必要, 在欧美, 50岁及以上的人群, 都建议接受大肠癌的常规筛查^[3]. 传统检查方法有其明显的弊端, 而血浆中miRNA水平的检测作为一种新的无创性检查应运而生. 肿瘤源性miRNA能稳定存在于人体组织、血浆及粪便环境中, 并且不受内源性核糖核酸酶活动的影响^[4]. 特异miRNA的过度表达和沉默与大肠癌的进展有关, 组织、血液和粪便中特异miRNA的表达量不同, 提示了其在大肠癌早期发现和筛检中的应用前景^[5,6]. 本研究选用miR-144*作为研究对象, 初步探讨其在大肠癌非侵入性诊断中的作用.

1 材料和方法

1.1 材料 55例CRC、30例大肠腺瘤、30例炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)患者均由郑州大学第一附属医院2010-03/2011-12行结肠镜检查, 经组织病理检查明确诊断. 55例CRC组中, 男34例, 女21例, 年龄33-82岁; 大肠腺瘤组, 男22例, 女8例, 年龄29-72岁; 30例IBD患者中男性21例, 女性9例, 年龄范围21-69岁. 另选30例年龄匹配的全结肠镜检查阴性的健康人为健康对照组. 4组年龄和性别差异均无统计学意义. 收集上述患者未治疗前血浆标本, 收集43例CRC患者手术后7 d的血浆标本, 其中, 行大肠癌根治术患者30例, 行大肠癌姑息性手术患者13例. 收集大肠腺瘤患者行腺瘤切除后7 d的血浆标本.

1.2 方法

1.2.1 血浆中miR-144*的扩增: 将保存于-70 °C备用的经抗凝、500 g离心10 min、去除血细胞的血浆, 样本500 μL与500 μL的10% SDS(Merck)进行1:1混合, 4 °C条件下孵育1 h后, 利用TRIzol试剂进行样本中RNA的提取, 使用Beckman DU800型紫外分光光度计测定RNA提取液吸光度 A_{260} 值, 计算浓度, 得到纯化后的血浆RNA样本. 以30 μL DEPC H₂O溶解预处理后得到RNA样本, 取10 μL进行逆转录; 取2 μL逆转录获得的cDNA用于实时定量荧光PCR反应. 反应体系如下: 2.5 μL 10 × PCR扩增缓冲液, 0.5 μL dNTP(2.5 mmol/L), 1 μL SYBR Green 1, 0.2 μL Taq(5 U/μL), 以及1 μL扩增引物, 加入去离子水使反应体系至25 μL. 具体反应条件是95 °C预变性10 min; 95 °C变性15 s, 60 °C延伸1 min, 40个循环.

1.2.2 数据分析: 每个样本均做3个重复. 以U6管家基因做内参, 校正器采用Stamatopoulos方法. 计算方法为 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 相对定量法, 将不同标本的RQ值($RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$)进行比较. (Ct值是指在PCR反应体系中每个反应管内的荧光信号到达设定的阈值时所经历的循环数, $\Delta Ct =$ 目的基因Ct值-内参照基因Ct值, $\Delta\Delta Ct =$ 待测标本的 ΔCt -校正器 ΔCt).

统计学处理 采用SPSS17.0统计软件进行处理, miR-144*表达水平与临床病理资料的联系采用Chi-Square检验. $P < 0.05$ 认为有统计学差异. 检验水准 $\alpha = 0.05$.

2 结果

2.1 血浆中miR-144*表达 在大肠癌组血浆中

■ 研发前沿

生物体内众多的miRNA调节着肿瘤细胞的多种重要生物学行为. 目前发现很多肿瘤的发生发展都和miRNA异常表达息息相关.

■ 相关报道

基于血浆及粪便标本中的miRNA水平的监测可以为肠道肿瘤的诊断及治疗提供更好的方法。相关研究还证明基于miRNA水平的治疗可为肿瘤治疗提供一种新思路。

表 1 行不同手术的CRC组与大肠腺瘤组手术前后血浆中miR-144*表达水平比较

	手术前 Δ CT(mean \pm SD)	手术后 Δ CT(mean \pm SD)	P值
CRC根治手术组	4.08 \pm 0.92	6.79 \pm 1.03	0.021
CRC姑息手术组	2.57 \pm 1.15	2.07 \pm 1.10	0.230
大肠进展期腺瘤组	5.79 \pm 1.32	5.29 \pm 1.60	0.410
大肠非进展期腺瘤组	6.01 \pm 1.77	5.98 \pm 1.34	0.279

miR-144*较大肠腺瘤组、IBD组、对照组中表达增高,表达量依次为 3.28 ± 1.66 , 5.79 ± 2.32 , 6.17 ± 1.29 , 5.18 ± 1.40 ($P < 0.05$ vs 腺瘤组、IBD组, $P < 0.001$ vs 对照组)。

2.2 大肠癌术后血浆中miR-144*表达 在收集的43例行大肠癌手术的患者术后7 d的血浆标本中发现,30例行大肠癌根治术的患者,术后血浆标本中有27例miR-144*的表达量较手术前降低;13例行姑息性手术的患者,手术后血浆标本中miR-144*表达量较未手术前表达量无明显降低;姑息性手术组较行根治性手术组血浆miR-144*表达量高;30例大肠腺瘤组中,11例进展期腺瘤,19例非进展期腺瘤,手术前后其表达量均无明显变化(表1)。

2.3 miR-144*高表达与肿瘤大小及浸润深度的相关性 miR-144*的高表达与肿瘤的大小 ($P < 0.001$)与浸润深度 ($P = 0.026$)相关,肿瘤越大,浸润深度越深,miR-144*表达量越高。但miR-144*的高表达与性别、年龄、肿瘤位置、病理分级、病理N分期、病理TNM分期及淋巴管浸润因素无明显关系(表2)。

3 讨论

在转录水平上调基因表达的非蛋白编码小分子RNA-miRNA的发现,给肿瘤的研究开启了新的方向,成为近年来分子生物学研究的热点之一。自2002年,Calin等^[7]在人的慢性淋巴细胞白血病中发现miR-15a及miR-16-1低表达后,越来越多的研究发现miRNAs在多种人类肿瘤中存在异常表达。研究显示,超过50%的miRNA基因是位于癌症相关的基因组区域或脆性位点上^[8],进一步的研究证实,miRNA与肿瘤的增殖、分化及凋亡等多种因素相关,并且在肿瘤的发生与发展中发挥着重要的作用^[9]。近年已证实let-7、miR-143和miR-145等在大肠癌中存在异常表达^[10]并且与大肠癌的发生、发展密切相关^[11]。目前,对miRNA在肿瘤发生发展中的具

体作用机制仍不清楚,认为其在动物中主要作用机制为:miRNA通过RNA诱导的沉默复合物(RNA-induced silencing complex, RISC)与靶基因mRNA的3'端UTR区不完全互补结合^[12],抑制靶基因mRNA的翻译,进而影响靶基因蛋白的表达。即在正常情况下,成熟的miRNA通过调控靶基因mRNA的翻译或其稳定性来参与正常细胞稳态的维持,故而miRNA的异常表达可能导致其相应靶基因转录后水平的表达异常。

大部分的结肠癌均以大肠内腺瘤样息肉为前期病变,由腺瘤(息肉)进展至癌是一个包含在基因表达中不同序列DNA的异常和变化的过程^[13]。因此,结肠肿瘤的筛查十分必要,其一方面可以保证及时发现、摘除还未恶变的息肉,另一方面可以早期发现无症状的结肠恶性肿瘤。传统的筛查方法如结肠镜检查,属侵入性检查,费用高,患者比较痛苦,有潜在穿孔和出血可能,检查阳性率与患者肠道清洁程度明显相关。最近的研究表明,肿瘤源性miRNA可以非常稳定的形式存在于人体血清及组织中,并且不受内源性核糖核酸酶活动的影响^[14]。这些肿瘤源性miRNA以一个可用作检测肿瘤生物标志物的指标存在于血液循环及组织中,由于血浆和血清miRNA的水平联系紧密,血浆或血清miRNA都可以用作生物标志物^[6,13]。相对于传统的检查方法及有创性方法,基于血清样本采取获取肿瘤组织miRNA相对更便捷,因此很适于普查和预防及早期诊断。

miR-144*是新近发现的与肿瘤密切相关的miRNA,可在多种肿瘤组织中异常表达^[15],已有研究表明其参与细胞发育分化过程中关键蛋白的合成环节,但尚没有报道与CRC的发病率相关。本实验中我们发现CRC患者血浆样本中的miR-144*表达较腺瘤组和IBD组显著升高,差异具有统计学意义。研究发现miR-144*可能通过作用其靶基因编码蛋白凋亡蛋白酶活化因子1(apoptotic protease activating factor-1, APAF-1),启动或抑制细胞凋亡,涉及程序性细胞凋亡机

表 2 大肠癌组织中miR-144*的表达水平与临床病理资料的关系

	<i>n</i>	miR-144* ¹
性别		
男	34	0.11(0.05–0.31)
女	21	0.14(0.03–0.39)
<i>P</i> 值		0.792
年龄(岁)		
≤65	23	0.16(0.03–0.84)
>65	32	0.15(0.04–0.57)
<i>P</i> 值		0.586
肿瘤大小(cm)		
<6	43	0.11(0.04–0.32)
≥6	12	0.27(0.01–0.18)
<i>P</i> 值		<0.001
肿瘤位置 ²		
近端结肠	17	0.21(0.04–0.56)
远端结肠及直肠	38	0.18(0.05–0.31)
<i>P</i> 值		0.617
病理分级		
分化良好	37	0.17(0.03–0.46)
分化不良	18	0.22(0.04–0.66)
<i>P</i> 值		0.238
病理T分期		
T2+T3	39	0.18(0.04–0.59)
T4	16	0.04(0.01–0.08)
<i>P</i> 值		0.026
病理N分期		
N0	26	0.13(0.17–0.24)
N1	18	0.20(0.05–0.33)
N2	11	0.23(0.21–1.40)
<i>P</i> 值		0.250
病理TNM分期		
I	11	0.06(0.12–0.43)
II	25	0.13(0.20–0.34)
III	13	0.17(0.03–0.57)
IV	6	0.10(0.07–1.27)
<i>P</i> 值		0.501
淋巴管浸润		
阴性	31	0.15(0.02–0.48)
阳性	24	0.12(0.02–0.75)
<i>P</i> 值		0.625

¹miRNA相对表达的中位数, 括号中表示25%及75%百分位数。

²以结肠脾曲为界分为近端结肠及远端结肠。

制(<http://www.microrna.org/>)。APAF-1, 是与人类同源的线虫CED-4基因^[16], 该基因编码的蛋白是细胞凋亡调控网络的中心枢纽之一^[17]。另有研究表明miR-144*可能存在有其他潜在的目标基因和作用途径, 尚有待确定, 这也可以解释本试验过程中miR-144*在3例CRC血浆标本中低表

达的原因。

本研究还发现, 大肠癌行根治性肿瘤切除术后患者血浆中miR-144*表达水平在统计学意义上显著低于术前, 行姑息性手术患者的血浆中miR-144*的表达量较术前无明显变化, 大肠腺瘤组在行腺瘤切除前后, 血浆中miR-144*的表达量无明显变化。进一步的统计还发现miR-144*在大肠癌血浆中的表达量与肿瘤的大小及浸润深度相关, 这与文献报道的多数肿瘤相关miRNA的表达量与肿瘤的TNM分期及淋巴管浸润无关相符合, 说明miR-144*可能在大肠癌的发生、发展阶段发挥着重要的作用, 可能与肿瘤的愈后及复发相关。但由于个别样本的变化及样本数量的限制, 我们的数据可能会有失偏颇, 因此需要大规模的样本研究验证这些结果。然而最新研究显示, 在CRC患者的粪便样本中miR-144*呈过度表达, 也进一步证实检测miR-144*表达水平是一种可行的大肠癌非侵入性的诊断方法之一^[18-19]。

4 参考文献

- 1 Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature* 2004; 431: 350-355
- 2 Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004; 116: 281-297
- 3 Whitlock EP, Lin JS, Liles E, Beil TL, Fu R. Screening for colorectal cancer: a targeted, updated systematic review for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med* 2008; 149: 638-658
- 4 Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, Peterson A, Noteboom J, O'Brian KC, Allen A, Lin DW, Urban N, Drescher CW, Knudsen BS, Stirewalt DL, Gentleman R, Vessella RL, Nelson PS, Martin DB, Tewari M. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 10513-10518
- 5 Gilad S, Meiri E, Yogeve Y, Benjamin S, Lebanony D, Yerushalmi N, Benjamin H, Kushnir M, Cholak H, Melamed N, Bentwich Z, Hod M, Goren Y, Chajut A. Serum microRNAs are promising novel biomarkers. *PLoS One* 2008; 3: e3148
- 6 Ventura A, Jacks T. MicroRNAs and cancer: short RNAs go a long way. *Cell* 2009; 136: 586-591
- 7 Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, Di Leva G, Shimizu M, Wojcik SE, Iorio MV, Visone R, Sever NI, Fabbri M, Iuliano R, Palumbo T, Pichiorri F, Roldo C, Garzon R, Sevignani C, Rassenti L, Alder H, Volinia S, Liu CG, Kipps TJ, Negrini M, Croce CM. A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2005; 353: 1793-1801
- 8 Michael MZ, O'Connor SM, van Holst Pellekaan NG, Young GP, James RJ. Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Mol Cancer Res* 2003; 1: 882-891
- 9 Tang F, Hajkova P, O'Carroll D, Lee C, Tarakhovsky A, Lao K, Surani MA. MicroRNAs are tightly associ-

■创新盘点

本文选用了较新的miRNA分子, 提出了采用检测血浆中miRNA-144*分子的扩增水平作为大肠癌非侵入性诊断的方法。

■同行评价

本研究初步证明血液中miR-NA-144*的检测可作为非侵入性手段筛查大肠癌并可以预测疾病复发,该结论非常有创意,并具有较好的临床实用价值。

- ated with RNA-induced gene silencing complexes in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 372: 24-29
- 10 Fang WJ, Lin CZ, Zhang HH, Qian J, Zhong L, Xu N. Detection of let-7a microRNA by real-time PCR in colorectal cancer: a single-centre experience from China. *J Int Med Res* 2007; 35: 716-723
- 11 Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, Labourier E, Reinert KL, Brown D, Slack FJ. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell* 2005; 120: 635-647
- 12 Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, Guo J, Zhang Y, Chen J, Guo X, Li Q, Li X, Wang W, Zhang Y, Wang J, Jiang X, Xiang Y, Xu C, Zheng P, Zhang J, Li R, Zhang H, Shang X, Gong T, Ning G, Wang J, Zen K, Zhang J, Zhang CY. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res* 2008; 18: 997-1006
- 13 Park NJ, Zhou H, Elashoff D, Henson BS, Kastratovic DA, Abemayor E, Wong DT. Salivary microRNA: discovery, characterization, and clinical utility for oral cancer detection. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 5473-5477
- 14 Mestdagh P, Van Vlierberghe P, De Weer A, Muth D, Westermann F, Speleman F, Vandesompele J. A novel and universal method for microRNA RT-qPCR data normalization. *Genome Biol* 2009; 10: R64
- 15 Kalimutho M, Blanco Gdel V, Gravina P, Cretella M, Mannucci L, Mannisi E, Formosa A, Pallone F, Federici G, Bernardini S. Quantitative denaturing high performance liquid chromatography (Q-dHPLC) detection of APC long DNA in faeces from patients with colorectal cancer. *Clin Chem Lab Med* 2010; 48: 1303-1311
- 16 Robles AI, Bemmels NA, Foraker AB, Harris CC. APAF-1 is a transcriptional target of p53 in DNA damage-induced apoptosis. *Cancer Res* 2001; 61: 6660-6664
- 17 Mihara M, Erster S, Zaika A, Petrenko O, Chittenden T, Pancoska P, Moll UM. p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol Cell* 2003; 11: 577-590
- 18 Kalimutho M, Del Vecchio Blanco G, Di Cecilia S, Sileri P, Cretella M, Pallone F, Federici G, Bernardini S. Differential expression of miR-144* as a novel fecal-based diagnostic marker for colorectal cancer. *J Gastroenterol* 2011; 46: 1391-1402
- 19 Link A, Balaguer F, Shen Y, Nagasaka T, Lozano JJ, Boland CR, Goel A. Fecal MicroRNAs as novel biomarkers for colon cancer screening. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2010; 19: 1766-1774

编辑 张姗姗 电编 闫晋利

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》正文要求

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

嵌顿于膀胱子宫陷凹的腹内疝致小肠梗阻1例

黄颖秋

黄颖秋, 中国医科大学第五临床学院 本溪钢铁(集团)总医院
消化内科 辽宁省本溪市 117000

黄颖秋, 主任医师, 教授, 研究生导师, 主要从事胃肠动力疾病、
消化系统肿瘤及肝硬化的基础与临床研究。

通讯作者: 黄颖秋, 教授, 主任医师, 117000, 辽宁省本溪市平山区
人民路29号, 中国医科大学第五临床学院, 本溪钢铁(集团)总
医院消化内科. huangyingqiu_bx@126.com

电话: 0414-2215137

收稿日期: 2012-02-02 修回日期: 2012-03-02

接受日期: 2012-03-20 在线出版日期: 2012-04-28

Small bowel obstruction caused by an incarcerated intrapertitoneal hernia through the vesicouterine pouch: A case report

Ying-Qiu Huang

Ying-Qiu Huang, Department of Gastroenterology, General
Hospital of Benxi Steel & Iron (Group); the Fifth Clinical
College of China Medical University, Benxi 117000, Liaon-
ing Province, China

Correspondence to: Ying-Qiu Huang, Professor, Depart-
ment of Gastroenterology, General Hospital of Benxi Steel
& Iron (Group); the Fifth Clinical College of China Medical
University, 29 Renmin Road, Pingshan District, Benxi 117000,
Liaoning Province, China. huangyingqiu_bx@126.com

Received: 2012-02-02 Revised: 2012-03-02

Accepted: 2012-03-20 Published online: 2012-04-28

Abstract

Intrapertitoneal hernia is an uncommon acute abdominal disease that often manifests as an acute intestinal obstruction of small bowel loops that develops through normal or abnormal apertures. According to the anatomic structures, intrapertitoneal hernia can be divided into many types. An incarcerated intrapertitoneal hernia through the vesicouterine pouch is rarely seen. Here we report a case of incarcerated intrapertitoneal hernia through the vesicouterine pouch in a 35-year-old female who presented to our hospital with severe lower abdominal cramps for 2 hours. Abdominal color ultrasound and CT scans showed dilated and fluid-filled small bowel loops. A cluster of dilated bowel loops was located in front of the uterine and behind the bladder. An emergency laparotomy was then performed. Approximately 50 cm of the small

intestine, located 40 cm from the ileocecal valve, was found to be herniated through the vesicouterine pouch. Since no circulatory disorder was noted in the incarcerated intestine, only enterolysis was performed without enterectomy. Our case suggests that ultrasound and CT can help not only detect the cause of small bowel obstruction but also facilitate the diagnosis of a variety of internal hernias.

Key Words: Internal hernia; Vesicouterine pouch; Small bowel obstruction

Huang YQ. Small bowel obstruction caused by an incarcerated intrapertitoneal hernia through the vesicouterine pouch: A case report. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(12): 1071-1073

摘要

腹内疝是一种少见的外科急腹症, 最常表现为小肠肠管进入正常或异常孔隙而导致的肠梗阻。由于解剖结构的因素, 腹内疝有多种类型, 但嵌顿于膀胱子宫陷凹的腹内疝迄今未见报道。本文报道嵌顿于膀胱子宫陷凹的腹内疝致小肠梗阻1例。患者女性, 35岁, 以“下腹突发剧烈绞痛2 h”入院。腹部彩超和CT显示小肠肠管扩张, 肠管内积液。扩张肠管堆积位于子宫前方与膀胱后方。急诊剖腹探查发现, 距回盲瓣40 cm处见一约50 cm小肠经由膀胱子宫陷凹处疝入, 因无肠管血运异常, 仅行肠粘连松解术治疗。本病例提示, 超声和CT不仅有助于发现小肠梗阻的病因, 更有助于各型腹内疝的诊断。

关键词: 腹内疝; 膀胱子宫陷凹; 小肠梗阻

黄颖秋. 嵌顿于膀胱子宫陷凹的腹内疝致小肠梗阻1例. *世界华人消化杂志* 2012; 20(12): 1071-1073

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1071.asp>

0 引言

腹内疝是临床少见或罕见的外科急腹症, 常引发绞窄性小肠梗阻, 病情凶险, 因腹内疝的临床症状差别很大, 术前诊断十分困难。由于解剖结

■背景资料

腹内疝是指腹腔内容物经腹膜或肠系膜凸入腹腔裂隙中, 常导致绞窄性小肠梗阻。腹内疝在临床罕见, 类型不一, 但嵌顿于膀胱子宫陷凹的腹内疝迄今未见文献报道。

■同行评议者

于则利, 教授, 首都医科大学附属北京同仁医院外科

■相关报道

本文首次报道了嵌顿于膀胱子宫陷凹的腹内疝致小肠梗阻的病例,且术前既经超声和CT诊断,后经手术证实。

构的因素,腹内疝有多种类型,但嵌顿于膀胱子宫陷凹的腹内疝迄今未见国内外文献报道。本文报道嵌顿于膀胱子宫陷凹的腹内疝致小肠梗阻1例,以期对临床工作者有所借鉴。

1 病例报告

病历号: 0644104。患者,女,35岁,以“下腹突发剧烈绞痛2 h”于2011-08-08入院。患者于入院前2 h进食牛奶、面包后突然出现下腹剧烈疼痛,呈持续性绞痛,阵发性加剧,伴恶心,呕吐胃内容物1次,无呕血,无尿频、尿急、尿痛等膀胱刺激症状,发病后未排便,排气正常,伴下腹胀感,病来无发热。月经正常。无结核病史。既往I型糖尿病病史12年,甲状腺炎术后1年,腹膜外剖腹产术后9 mo。

入院查体: T 35.5 °C, P 96次/分, R 18次/分, BP 140/80 mmHg, 神清, 急性痛苦病容, 辗转不安, 极度呻吟, 大声喊叫, 颜面苍白, 肢端发凉, 出冷汗, 皮肤黏膜无黄染及皮疹, 全身浅表淋巴结无肿大, 心肺检查无异常, 腹平坦, 无胃肠型, 下腹正中及左下腹压痛, 无反跳痛、肌紧张, 未触及腹部包块, 肝脾肋下未触及, 移动性浊音(-), 肠鸣音6次/分, 无气过水声, 双下肢无水肿, 双侧肌力5级, 双侧Babinski征(-)。

实验室检查: 血白细胞(white blood cell, WBC) $10.86 \times 10^9/L$, 中性粒细胞 76.11%, 红细胞(red blood cell, RBC) $4.91 \times 10^{12}/L$, Hb 141 g/L, 血小板(Platelet, PLT) $298 \times 10^9/L$; 尿人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotropin, HCG)(-); 血糖13.6 mmol/L; 丙氨酸转氨酶16 U/L, 天门冬氨酸转氨酶24 U/L, 碱性磷酸酶113 U/L, 淀粉酶52 U/L, 总蛋白79.2 g/L, 白蛋白49.1 g/L, 总胆红素19.8 $\mu\text{mol/L}$; 尿素氮3.24 mmol/L, 肌酐42 $\mu\text{mol/L}$; HBsAb(-), HBsAg(-), HBeAg(-), HBeAb(-), HBcAb(-), S1(-), HAVAb(-), HCVAb(-); 凝血酶原时间12.0 s, 凝血酶原活动度78.5%; 结核抗体(-)。心电图示窦性心律, 心率96次/分。

腹部彩超: 肝胆脾胰双肾膀胱未见异常。子宫大小约 $4.2 \times 3.37 \times 3.6 \text{ cm}^3$, 肌层回声均匀, 内膜厚0.77 cm, 宫颈厚1.69 cm。双卵巢显示清晰。子宫前方与膀胱后方可见范围约 $6.8 \times 4.4 \text{ cm}^2$ 不均质回声团, 其内可见无回声区及扩张肠管, 肠管内径3.2 cm, 可见蠕动。

腹部CT: 肝表面光滑, 胆囊及胰腺大小、形态、密度均未见异常。脾不大, 密度均匀。双肾大小、形态、密度均未见异常。膀胱充盈尚可,

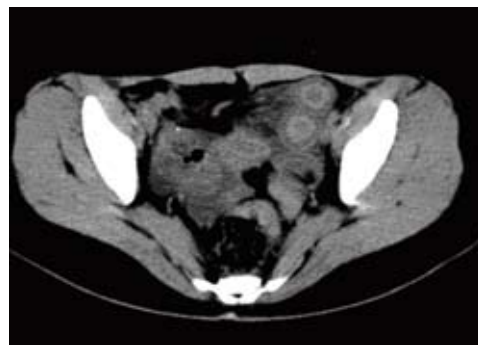


图1 CT示膀胱子宫陷凹的腹内疝。可见膀胱后区及子宫前区小肠扩张积液并堆积, 密度增高, 边缘模糊。

壁不厚。子宫大小形态正常, 壁不厚。膀胱后区及子宫前区小肠扩张积液并堆积, 密度增高, 边缘模糊(图1)。

根据上述资料, 考虑患者为膀胱子宫陷凹的腹内疝, 急性绞窄性肠梗阻, 转普外科行急诊手术治疗。术中探查发现, 距回盲部40 cm处见一约50 cm小肠经由膀胱子宫陷凹处疝入, 呈紫红色, 经热敷及肠系膜封闭后颜色渐转红, 肠蠕动存在, 相应系膜终末动脉搏动良好, 判定无坏死, 冲洗下腹腔并于盆腔放置一引流管, 术毕关腹。术中诊断: 腹内疝; 急性绞窄性肠梗阻。

2 讨论

腹内疝是指腹内脏器通过腹腔内孔隙偏离原来的位置, 形成隐匿于体内的异常突起, 其最常表现为小肠肠管进入孔隙而导致的肠梗阻, 而疝孔通常是已经存在的解剖结构, 如裂孔、隐窝和陷凹。根据发生疝的解剖结构不同, 腹内疝的类型不一。腹内疝是一种少见的外科急腹症, 常引发绞窄性肠梗阻, 病情凶险, 术前诊断十分困难, 除十二指肠旁疝^[1]相对发病率较高外, 而其他的一些腹内疝类型在临床上罕见, 包括Winslow孔疝^[2]、肠系膜疝^[3]、网膜疝^[4]、盲肠旁疝^[5]、乙状结肠系膜疝^[6]、膀胱上疝^[7]、盆腔疝^[8]、阔韧带疝^[9]及腹膜后疝^[10]等。

膀胱子宫陷凹是指女性膀胱子宫之间腹膜腔形成的生理性凹陷, 因陷凹较浅, 在此处形成腹内疝的可能性极低, 经文献检索, 迄今国内外尚无嵌顿于膀胱子宫陷凹的腹内疝的相关文献报道。本病例是一种十分特殊的腹内疝类型。该患以“下腹突发剧烈绞痛2 h”入院。彩超提示子宫前方与膀胱后方可见范围约 $6.8 \times 4.4 \text{ cm}^2$ 不均质回声团, 其内可见无回声区及扩张肠管, 肠管内径3.2 cm, 可见蠕动, 怀疑肠管疝入膀胱子宫之间形成腹内疝。腹部CT进一步检查显示,

■应用要点

该病例增加了腹内疝的新类型, 有助于拓宽临床诊断思路。

膀胱后区及子宫前区小肠扩张积液并堆积, 密度增高, 边缘模糊, 考虑为腹内疝致较窄性肠梗阻. 立即转普外科行急诊剖腹探查. 术中证实, 一段小肠嵌顿于膀胱子宫陷凹内, 形成较窄性小肠梗阻, 与术前诊断一致. 因诊断和治疗非常及时, 患者肠管未发生坏死, 仅行肠粘连松解术处理, 患者术后恢复良好. 该患缘何出现膀胱子宫陷凹的腹内疝, 原因尚不清楚, 可能与患者的膀胱子宫陷凹有先天畸形抑或是剖腹产导致的术后粘连有关.

本例患者为育龄女性, 以“下腹突发剧烈绞痛”入院, 病情十分凶险, 应与急性肠系膜动脉栓塞、卵巢囊肿扭转、黄体破裂、异位妊娠破裂、子宫扭转、膀胱结石绞痛、其他原因导致的肠套叠、腹内疝、肠梗阻等疾病鉴别. 本病例在第一时间准确诊断, 及时行外科手术治疗, 避免了肠坏死的发生, 得益于术前超声和CT的精确诊断.

总之, 本病例提示, 超声和CT不仅有助于发现小肠梗阻的病因, 更有助于腹内疝的诊断.

3 参考文献

- 1 Lu CW, Liu LC. Right-side paraduodenal hernia: unexplained recurrent abdominal pain. *Clin Imaging* 2012; 36: 68-71
- 2 Grisham A, Javan R. Image of the month. Foramen of Winslow hernia. *Arch Surg* 2011; 146: 1329-1330
- 3 Kakimoto Y, Abiru H, Kotani H, Ozeki M, Tsu-ruyama T, Tamaki K. Transmesenteric hernia due to double-loop formation in the small intestine: a fatal case involving a toddler. *Forensic Sci Int* 2012; 214: e39-e42
- 4 Le Moigne F, Lamboley JL, de Charry C, Vitry T, Salamand P, Farthouat P, Michel P. An exceptional case of internal transomental hernia: correlation between CT and surgical findings. *Gastroenterol Clin Biol* 2010; 34: 562-564
- 5 Nishi T, Tanaka Y, Kure T. A case of pericecal hernia with a hernial orifice located on the lateral side of the cecum. *Tokai J Exp Clin Med* 2011; 36: 71-74
- 6 Harrison OJ, Sharma RD, Niayesh MH. Early intervention in intersigmoid hernia may prevent bowel resection-A case report. *Int J Surg Case Rep* 2011; 2: 282-284
- 7 Cissé M, Konaté I, Ka O, Dieng M, Dia A, Touré CT. Internal supravescical hernia as a rare cause of intestinal obstruction: a case report. *J Med Case Reports* 2009; 3: 9333
- 8 Forgues A, Junes F, Gateau T, Geissman A, Merignargues F, Ballanger P, Robert G. [Right obstructive pyelonephritis due to supra-piriform herniation of the pelvic ureter: a clinical case]. *Prog Urol* 2011; 21: 887-890
- 9 Bangari R, Uchil D. Laparoscopic management of internal hernia of small intestine through a broad ligament defect. *J Minim Invasive Gynecol* 2012; 19: 122-124
- 10 Leão P, Vilaça S, Oliveira M, Falcão J. Giant recurrent retroperitoneal liposarcoma initially presenting as inguinal hernia: Review of literature. *Int J Surg Case Rep* 2012; 3: 103-106

■同行评价

文章的科学性、创新性和可读性能够较好地反映该作者的临床水平, 且该病例属于临床少见病例, 为临床提供了一种思路.

编辑 张姗姗 电编 闫晋利

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

• 消息 •

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

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

《世界华人消化杂志》投稿须知

《世界华人消化杂志》为保证期刊的学术质量, 对所有来稿均进行同行评议, 是一份被中国科技论文统计源核心期刊、中文核心期刊要目总览收录的学术类期刊。

1 投稿总则

1.1 性质 《世界华人消化杂志》[ISSN 1009-3079 (print), ISSN 2219-2859 (online), CN 14-1260/R]是一份同行评议性和开放获取(open access, OA)的旬刊。OA最大的优点是面向全国本领域专家及公众开放无需注册, 免费获取PDF等格式的全文, 切实破除了传统性期刊阻碍科学研究成果快速传播的障碍。OA是一项真正意义上的公益性科学传播工具, 编委、作者和读者利益的最大化的目标, 努力推进本学科的繁荣和发展。

《世界华人消化杂志》定价68.00元, 全年2448.00元, 邮发代号82-262, 由世界华人消化杂志编辑部出版。《世界华人消化杂志》主要报道胃肠病学、肝胆病学、胰腺病学、内镜介入与消化外科等多学科的评论及基础研究和临床实践等各类文章, 具体内容涉及: 食管疾病, 如反流性食管炎、Barret's食管、食管静脉曲张和食管癌等; 胃部疾病, 胃食管反流性疾病、胃炎、胃动力障碍、胃出血、胃癌和幽门螺杆菌感染等; 肠道疾病, 如肠道出血、肠穿孔、肠梗阻、肠道炎症(如IBD/CD等)、肠道感染、大肠癌和大肠腺瘤等; 肝胆部疾病如病毒性肝炎、肝硬化、脂肪肝、肝纤维化、肝衰竭、胆石病、胆汁郁积、梗阻性黄疸、肝癌、胆囊癌、胆管癌和门静脉高压等; 胰腺疾病, 如胰腺炎和胰腺癌等; 全身性疾病涉及消化系统, 如自身免疫性及瘀胆性疾病、腹腔疾病、消化不良和代谢性疾病等; 以及与以上疾病相关的基因及基因组学、微生物及分子生物学、病因学、流行病学、免疫学、临床内外科诊断与治疗(如影像、化疗、移植、营养等); 除以上外, 本刊也报道诊断与筛选、内窥镜检查法、影像及先进技术。

《世界华人消化杂志》被国际检索系统美国《化学文摘》(Chemical Abstracts, CA)、荷兰《医学文摘库/医学文摘(EMBase/Excerpta Medica, EM)》和俄罗斯《文摘杂志(Abstract Journal, AJ)》收录。国内为中国科技论文统计与分析期刊(科技部列选为中国科技论文统计源期刊)、《中文核心期刊要目总览》(2011年版)内科学类的核心期刊、《中国学术期刊评价研究报告-RCES权威、核心期刊排行榜与指南》

和中国知识资源总库收录。《中国科技期刊引证报告(核心版)》统计显示, 2010年《世界华人消化杂志》总被引频次3 458次, 影响因子0.694, 综合评价总分60.6分, 分别位居内科学类49种期刊的第5位、第7位、第6位, 分别位居1 998种中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)的第79位、第320位、第190位; 其他指标: 他引率0.83, 被引半衰期4.9, 来源文献量712, 文献选出率0.90, 参考文献量17 963, 平均引文数25.23, 平均作者数4.35, 地区分布数29, 机构分布数349, 基金论文比0.45, 海外论文比0.01。

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

2 撰稿要求

2.1 总体标准 文稿撰写应遵照国家标准GB7713科学技术报告、学位论文和学术论文的编写格式, GB6447文摘编写规则, GB7714文后参考文献著录规则, GB/T 3179科学技术期刊编排格式等要求; 同时遵照国际医学期刊编辑委员会(International Committee of Medical Journal Editors)制定的《生物医学期刊投稿的统一要求(第5版)》(Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals)。见: *Ann Intern Med* 1997; 126: 36-47。

2.2 名词术语 应标准化, 前后统一, 如原词过长且多次出现者, 可于首次出现时写出全称加括号内注简称, 以后直接用简称。医学名词以全国自然科学名词审定委员会公布的《生理学术名词》、《生物化学名词与生物物理学名词》、《化学名词》、《植物学名词》、《人体解剖学名词》、《细胞生物学名词》及《医学名词》系列为准, 药名以《中华人民共和国药典》和卫生部药典委员会编的《药名词汇》为准, 国家食品药品监督管理局批准的新药, 采用批准的药名; 创新性新药, 请参照我国药典委员会的“命名原则”, 新译名词应附外文。公认习用缩略语可直接应用(建议第一次也写出全称), 如ALT, AST, mAb, WBC, RBC, Hb, T, P, R, BP,

PU, GU, DU, ACTH, DNA, LD50, HBsAg, HCV RNA, AFP, CEA, ECG, IgG, IgA, IgM, TCM, RIA, ELISA, PCR, CT, MRI等. 为减少排印错误, 外文、阿拉伯数字、标点符号必须正确打印在A4纸上. 中医药名词英译要遵循以下原则: (1)有对等词者, 直接采用原有英语词, 如中风stroke, 发热fever; (2)有对应词者应根据上下文合理选用原英语词, 如八法eight principal methods; (3)英语中没有对等词或相应词者, 宜用汉语拼音, 如阴yin, 阳yang, 阴阳学说yinyangology, 人中renzhong, 气功qigong; 汉语拼音要以词为单位分写, 如weixibao nizhuanwan(胃细胞逆转丸), guizhitang(桂枝汤). 通常应小写.

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

2.4 计量单位 采用国际单位制并遵照有关国家

标准, GB3100-3102-93量和单位. 原来的“分子量”应改为物质的相对分子质量. 如30 kD改为 M_r 30 000或30 kDa(M大写斜体, r小写正体, 下角标); “原子量”应改为相对原子质量, 即 A_r (A大写斜体, r小写正体, 下角标); 也可采用原子质量, 其单位是u(小写正体). 计量单位在+、-及-后列出. 在±前后均要列出, 如37.6 °C ± 1.2 °C, 45.6岁 ± 24岁, 56.4 d ± 0.5 d. 3.56 ± 0.27 pg/ml应为3.56 ng/L ± 0.27 ng/L. BP用kPa(mmHg), RBC数用 1×10^{12} /L, WBC数用 1×10^9 /L, WBC构成比用0.00表示, Hb用g/L. M_r 明确的体内物质以nmol/L或mmol/L表示, 不明确者用g/L表示. 1 M硫酸, 改为1 mol/L硫酸, 1 N硫酸, 改为0.5 mol/L硫酸. 长10 cm, 宽6 cm, 高4 cm, 应写成10 cm × 6 cm × 4 cm. 生化指标一律采用法定计量单位表示, 例如, 血液中的总蛋白、清蛋白、球蛋白、脂蛋白、血红蛋白、总脂用g/L, 免疫球蛋白用mg/L; 葡萄糖、钾、尿素、尿素氮、CO₂结合力、乳酸、磷酸、胆固醇、胆固醇酯、三酰甘油、钠、钙、镁、非蛋白氮、氯化物; 胆红素、蛋白结合碘、肌酸、肌酐、铁、铅、抗坏血酸、尿胆元、氨、维生素A、维生素E、维生素B1、维生素B2、维生素B6、尿酸; 氢化可的松(皮质醇)、肾上腺素、汞、孕酮、甲状腺素、睾酮、叶酸用nmol/L; 胰岛素、雌二醇、促肾上腺皮质激素、维生素B12用pmol/L. 年龄的单位有日龄、周龄、月龄和岁. 例如, 1秒, 1 s; 2分钟, 2 min; 3小时, 3 h; 4天, 4 d; 5周, 5 wk; 6月, 6 mo; 雌性♀, 雄性♂, 酶活性国际单位IU = 16.67 nkat, 对数log, 紫外uv, 百分比%, 升L, 尽量把 1×10^{-3} g与 5×10^{-7} g之类改成1 mg与0.5 mg, hr改成h, 重量γ改成mg, 长度m改成mm. 国际代号不用于无数值的文句中, 例如每天不写每d, 但每天8 mg可写8 mg/d. 在一个组合单位符号内不得有1条以上的斜线, 例如不能写成mg/kg/d, 而应写成mg/(kg·d), 且在整篇文章内应统一. 单位符号没有单、复数的区分, 例如, 2 min不是2 mins, 3 h不是3 hs, 4 d不是4 ds, 8 mg不是8 mgs. 半个月, 15 d; 15克, 15 g; 10%福尔马林, 40 g/L甲醛; 95%酒精, 950 mL/L乙醇; 5% CO₂, 50 mL/L CO₂; 1 : 1 000肾上腺素, 1 g/L肾上腺素; 胃黏膜含促胃液素36.8 pg/mg, 改为胃黏膜蛋白含促胃液素36.8 ng/g; 10%葡萄糖改为560 mmol/L或100 g/L葡萄糖; 45 ppm = 45×10^{-6} ; 离心的旋转频率(原称转速)用r/min, 超速者用g; 药物剂量若按体质量计算, 一律以“/kg”表示.

2.5 统计学符号 (1)t检验用小写t; (2)F检验用英

《世界华人消化杂志》为中国科技论文统计源核心期刊(2010年)和中文核心期刊要目总览(北京大学图书馆, 2011年版)收录的学术期刊.

《世界华人消化杂志》编辑部, 100025, 北京市朝阳区, 东四环中路62号, 远洋国际中心D座903室, 电话: 010-5908-0035, 传真: 010-8538-1893, Email: wjcd@wjgnet.com; http://www.wjgnet.com

文大写 F ; (3)卡方检验用希文小写 χ^2 ; (4)样本的相关系数用英文小写 r ; (5)自由度用希文小写 ν ; (6)样本数用英文小写 n ; (7)概率用英文斜体大写 P . 在统计学处理中在文字叙述时平均数 \pm 标准差表示为 $\text{mean} \pm \text{SD}$, 平均数 \pm 标准误为 $\text{mean} \pm \text{SE}$. 统计学显著性用 $^aP < 0.05$, $^bP < 0.01$ ($P > 0.05$ 不注). 如同一表中另有一套 P 值, 则 $^cP < 0.05$, $^dP < 0.01$; 第三套为 $^eP < 0.05$, $^fP < 0.01$ 等.

2.6 数字用法 遵照国家标准GB/T 15835-1995出版物上数字用法的规定, 作为汉语词素者采用汉字数字, 如二氧化碳、十二指肠、三倍体、四联球菌、五四运动、星期六等. 统计学数字采用阿拉伯数字, 如1000-1500 kg, 3.5 mmol/L \pm 0.5 mmol/L等. 测量的数据不能超过其测量仪器的精密度, 例如6347意指6000分之一的精密度. 任何一个数字, 只允许最后一位有误差, 前面的位数不应有误差. 在一组数字中的 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 应考虑到个体的变差, 一般以SD的1/3来定位数, 例如 $3614.5 \text{ g} \pm 420.8 \text{ g}$, SD的1/3达一百多g, 平均数波动在百位数, 故应写成 $3.6 \text{ kg} \pm 0.4 \text{ kg}$, 过多的位数并无意义. 又如 $8.4 \text{ cm} \pm 0.27 \text{ cm}$, 其 $\text{SD}/3 = 0.09 \text{ cm}$, 达小数点后第2位, 故平均数也应补到小数点后第2位. 有效位数以后的数字是无效的, 应该舍. 末尾数字, 小于5则舍, 大于5则进, 如恰等于5, 则前一位数逢奇则进, 逢偶(包括“0”)且5之后全为0则舍. 末尾时只可1次完成, 不得多次完成. 例如23.48, 若不要小数点, 则应成23, 而不应该 $23.48 \rightarrow 23.5 \rightarrow 24$. 年月日采用全数字表达法, 请按国家标准GB/T 7408-94书写. 如1985年4月12日, 可写作1985-04-12; 1985年4月, 写作1985-04; 从1985年4月12日23时20分50秒起至1985年6月25日10时30分止, 写作1985-04-12 T23:20:50/1985-06-25 T10:30:00; 从1985年4月12日起至1985年6月15日止, 写作1985-04-12/06-16, 上午8时写作08:00, 下午4时半写作16:30. 百分数的有效位数根据分母来定: 分母 ≤ 100 , 百分数到个位; $101 \leq \text{分母} \leq 1000$, 百分数到小数点后1位; 余类推. 小数点前后的阿拉伯数字, 每3位间空1/4阿拉伯数字距离, 如1486800.475 65. 完整的阿拉伯数字不移行!

2.7 标点符号 遵照国家标准GB/T 15834-1995标点符号用法的要求, 本刊论文中的句号都采用黑圆点; 数字间的起止号采用“-”字线, 并列的汉语词间用顿号分开, 而并列的外文词、阿拉伯数字、外文缩略词及汉语拼音字母拼写词间改用逗号分开, 参考文献中作者间一律用逗号分开; 表示终了的标点符号, 如句号、逗号、顿

号、分号、括号及书名号的后一半, 通常不用于一行之首; 而表示开头的标点符号, 如括号及书名号的前一半, 不宜用于一行之末. 标点符号通常占一格, 如顿号、逗号、分号、句号等; 破折号应占两格; 英文连字符只占一个英文字符的宽度, 不宜过长, 如5-FU. 外文字符下划一横线表示用斜体, 两横线表示用小写, 三横线表示用大写, 波纹线表示用黑体.

3 稿件格式

3.1 题名 简明确切地反映论文的特定内容, 鲜明而有特色, 阿拉伯数字不宜开头, 不用副题名, 一般20个字. 避免用“的研究”或“的观察”等非特定词.

3.2 作者 论文作者的署名, 按照国际医学杂志编辑委员会(ICMJE, International Committee of Medical Journal Editors)作者资格标准执行. 作者标准为: (1)对研究的理念和设计、数据的获得、分析和解读做出重大贡献; (2)起草文章, 并对文章的重要的知识内容进行批评性修改; (3)接受对准备发表文章的最后一稿. 作者应符合条件1, 2, 3, 对研究工作有贡献的其他人可放入志谢中. 作者署名的次序按贡献大小排列, 多作者时姓名间用逗号, 如是单名, 则在姓与名之间空1格(正文和参考文献中不空格). 《世界华人消化杂志》要求所有署名人写清楚自己对文章的贡献. 世界华人消化杂志不设置共同第一作者和共同通信作者.

3.3 单位 作者后写单位的全称空1格后再写省市及邮政编码. 格式如: 张旭晨, 梅立新, 承德医学院病理教研室 河北省承德市 067000

3.4 第一作者简介 格式如: 张旭晨, 1994年北京中医药大学硕士, 讲师. 主要从事消化系统疾病的病理研究.

3.5 作者贡献分布 格式如: 陈湘川与庞丽娟对此文所作贡献两均等; 此课题由陈湘川、庞丽娟、陈玲、杨兰、张金芳、齐妍及李洪安设计; 研究过程由陈玲、杨兰、张金芳、蒋金芳、杨磊、李锋及曹秀峰操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由曹秀峰提供; 数据分析由陈湘川、杨兰及庞丽娟完成; 本论文写作由陈湘川、庞丽娟及李洪安完成.

3.6 同行评议者 为了确保刊出文章的质量, 本刊即将开始实行接受稿件的同行评议公开策略, 将同行评议者姓名, 职称, 机构的名称与文章一同在脚注出版. 格式如: 房静远, 教授, 上海交通大学医学院附属医院仁济医院, 上海市消化疾

病研究所。

3.7 基金资助项目 格式如: 国家自然科学基金资助项目, No. 30224801

3.8 通讯作者 格式如: 通讯作者: 黄缘, 教授, 330006, 江西省南昌市民德路1号, 南昌大学第二附属医院消化内科, 江西省分子医学重点实验室. huang9815@yahoo.com

电话: 0351-4078656 传真: 0351-4086337

收稿日期: 修回日期:

3.9 英文摘要

题名 文章的题名应言简意赅, 方便检索, 英文题名以不超过10个实词为宜, 应与中文题名一致。

作者 作者姓名汉语拼音拼写法规定为: 先名, 后姓; 首字母大写, 双名之间用半字线“-”分开, 多作者时姓名间加逗号。格式如: “潘伯荣”的汉语拼写法为“Bo-Rong Pan”。

单位 先写作者, 后写单位的全称及省市邮政编码。例如: Xu-Chen Zhang, Li-Xin Mei, Department of Pathology, Chengde Medical College, Chengde 067000, Hebei Province, China

基金资助项目 格式如: Supported by National Natural Science Foundation of China, No.30224801

通讯作者 格式如: Correspondence to: Dr. Lian-Sheng Ma, Taiyuan Research and Treatment Center for Digestive Diseases, 77 Shuangta Xijie, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China. wcjd@wjgnet.com

收稿及修回日期 格式如: Received: Revised:

摘要 包括目的、方法、结果、结论, 书写要求与中文摘要一致。

3.10 中文摘要 必须在300字左右, 内容应包括目的(应阐明研究的背景和设想、目的), 方法(必须包括材料或对象, 应描述课题的基本设计, 双盲、单盲还是开放性, 使用什么方法, 如何进行分组和对照, 数据的精确程度。研究对象选择条件与标准是否遵循随机化、齐同化的原则, 对照组匹配的特征。如研究对象是患者, 应阐明其临床表现, 诊断标准。如何筛选分组, 有多少例进行过随访, 有多少例因出现不良反应而中途停止研究), 结果(应列出主要结果, 包括主要数据, 有什么新发现, 说明其价值和局限, 叙述要真实、准确、具体, 所列数据经用何种统计学方法处理; 应给出结果的置信区间和统计学显著性检验的确切值; 概率写 P , 后应写出相应显著性检验值), 结论(全文总结, 准确无误的观点及价值)。

3.11 正文标题层次 0 引言; 1 材料和方法, 1.1 材料, 1.2 方法; 2 结果; 3 讨论; 4 参考文献。序号一

律左顶格写, 后空1格写标题; 2级标题后空1格接正文。正文内序号连排用(1), (2), (3)。以下逐条陈述。

0 引言 应包括该研究的目的和该研究与其他相关研究的关系。

1 材料和方法 应尽量简短, 但应让其他有经验的研究者能够重复该实验。对新的方法应该详细描述, 以前发表过的方法引用参考文献即可, 有关文献中或试剂手册中的方法的改进仅描述改进之处即可。

2 结果 实验结果应合理采用图表和文字表示, 在结果中应避免讨论。

3 讨论 要简明, 应集中对所得的结果做出解释而不是重复叙述, 也不应是大量文献的回顾。

图表的数量要精选。表应有表序和表题, 并有足够具有自明性的信息, 使读者不查阅正文即可理解该表的内容。表内每一栏均应有表头, 表内非公知通用缩写应在表注中说明, 表格一律使用三线表(不用竖线), 在正文中该出现的地方应注出。图应有图序、图题和图注, 以使其容易被读者理解, 所有的图应在正文中该出现的地方注出。同一个主题内容的彩色图、黑白图、线条图, 统一用一个注解分别叙述。如: 图1 萎缩性胃炎治疗前后病理变化。A: …; B: …; C: …; D: …; E: …; F: …; G: …。曲线图可按●、○、■、□、▲、△顺序使用标准的符号。统计学显著性用: ^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ ($P>0.05$ 不注)。如同一表中另有一套 P 值, 则^c $P<0.05$, ^d $P<0.01$; 第3套为^e $P<0.05$, ^f $P<0.01$ 。 P 值后注明何种检验及其具体数字, 如 $P<0.01$, $t = 4.56$ vs 对照组等, 注在表的左下方。表内采用阿拉伯数字, 共同的计量单位符号应注在表的右上方, 表内个位数、小数点、±、-应上下对齐。“空白”表示无此项或未测, “-”代表阴性未发现, 不能用同左、同上等。表图勿与正文内容重复。表图的标目尽量用 t/min , $c/(\text{mol/L})$, p/kPa , V/mL , $t/^\circ\text{C}$ 表达。

志谢 后加冒号, 排在讨论后及参考文献前, 左齐。

4 参考文献 本刊采用“顺序编码制”的著录方法, 即以文中出现顺序用阿拉伯数字编号排序。提倡对国内同行近年已发表的相关研究论文给予充分的反映, 并在文内引用处右上角加方括号注明角码。文中如列作者姓名, 则需在“Pang等”的右上角注角码号; 若正文中仅引用某文献中的论述, 则在该论述的句末右上角注码号。如马连生^[1]报告……, 潘伯荣等^[2-5]认为……; PCR方法敏感性高^[6-7]。文献序号作正

《世界华人消化杂志》自2006-01-01起改为旬刊发行, 每月8、18、28日出版。北京报刊发行局发行, 邮发代号: 82-262。

《世界华人消化杂志》坚持开放获取(open access, OA)的出版模式, 编辑出版高质量文章, 努力实现编委、作者和读者利益的最大化, 努力推进本学科的繁荣和发展, 向专业化、特色化和品牌化方向迈进。

文叙述时, 用与正文同号的数字并排, 如本实验方法见文献[8]。所引参考文献必须以近2-3年SCIE, PubMed, 《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊为准, 通常应只引用与其观点或数据密切相关的国内外期刊中的最新文献。期刊: 序号, 作者(列出全体作者), 文题, 刊名, 年, 卷, 起页-止页, PMID和DOI编号; 书籍: 序号, 作者(列出全部), 书名, 卷次, 版次, 出版地, 出版社, 年, 起页-止页。

5 网络版的发表前链接 本刊即将开始实行网络版的每篇文章上都有该文发表前纪录的链接, 包括首次提交的稿件, 同行评议人报告, 作者给审稿人回信和作者修回稿, 以PDF格式上传。读者可以针对论文、审稿意见和作者的修改情况发表意见, 指出问题与不足; 作者也可以随时修改完善自己发表的论文, 使文章的发表成为一个编者、同行评议者、读者、作者互动的动态过程。

4 写作格式实例

4.1 述评写作格式实例

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

4.2 研究原著写作格式实例

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

4.3 焦点论坛写作格式实例

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

4.4 文献综述写作格式实例

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

4.5 研究快报写作格式实例

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

4.6 临床经验写作格式实例

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

4.7 病例报告写作格式实例

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

5 投稿方式

接受在线投稿, 不接受其他方式的投稿, 如E-mail、打印稿。在线投稿网址: <http://www.baishideng.com/wcjd/ch/index.aspx>。无法在线提交的通过submission@wjgnet.com, 电话: 010-8538-1892, 传真: 010-8538-1893寻求帮助。投稿须知下载网址<http://www.wjgnet.com/1009-3079/tgxz.pdf>。审稿过程平均时间需要14-28 d。所有的来

稿均经2-3位同行专家严格评审, 2位或以上通过为录用, 否则将退稿或修改后再审。接受后的稿件作者需缴纳稿件发表费, 文章发表后可获得1本样刊及10套单行本(稿酬)。

6 修回稿须知

6.1 修回稿信件 来稿包括所有作者签名的作者投稿函。内容包括: (1)保证无重复发表或一稿多投; (2)是否有经济利益或其他关系造成的利益冲突; (3)所有作者均审读过该文并同意发表, 所有作者均符合作者条件, 所有作者均同意该文代表其真实研究成果, 保证文责自负; (4)列出通讯作者的姓名、职称、地址、电话、传真和电子邮件; 通讯作者应负责与其他作者联系, 修改并最终审核复核稿; (5)列出作者贡献分布; (6)来稿应附有作者工作单位的推荐信, 保证无泄密, 如果是几个单位合作的论文, 则需要提供所有参与单位的推荐信; (7)愿将印刷版和电子版出版权转让给本刊编辑部。

6.2 稿件修改 来稿经同行专家审查后, 认为内容需要修改、补充或删除时, 本刊编辑部将把原稿连同审稿意见、编辑意见寄回给作者修改, 而作者必须于15 d内将单位介绍信、作者符合要点承诺书、版权转让信等书面材料寄回编辑部, 同时将修改后的电子稿件上传至在线办公系统; 逾期寄回, 所造成的问题由作者承担责任。

6.3 版权 本论文发表后作者享有非专有权, 文责由作者自负。作者可在本单位或本人著作集中汇编出版以及用于宣讲和交流, 但应注明发表于《世界华人消化杂志》××年; 卷(期): 起止页码。如有国内外其他单位和个人复制、翻译出版等商业活动, 须征得《世界华人消化杂志》编辑部书面同意, 其编辑版权属本刊所有。

《世界华人消化杂志》编辑部

北京百世登生物医学科技有限公司
100025, 北京市朝阳区东四环中路62号
远洋国际中心D座903室
电话: 010-5908-0035
传真: 010-8538-1893
E-mail: wcjd@wjgnet.com
<http://www.wjgnet.com>

2012年国内国际会议预告

2012-05-26/31

2012年世界医学物理与生物医学工程大会

会议地点: 北京市

联系方式: info@wc2012.org

2012-06-01/03

2012中国北京超声医师学术大会

会议地点: 北京市

联系方式: zhumin301@163.com

2012-06-15/17

第一届糖尿病大会、第二届内分泌与代谢大会

会议地点: 北京市

联系方式: medical585@163.com

2012-06-15/17

第九届全国抗菌药物临床药理学术会议

会议地点: 北京市

联系方式: doctorzhengbo@163.com; liyun1907@sina.com

2012-06-29/07-01

第二十四次全国中西医结合消化学术会议

会议地点: 宁波市

联系方式: qgzxyjhxh@163.com

2012-06-30/07-01

中华医学会肝病与代谢学术研讨会

会议地点: 哈尔滨市

联系方式: lilyjia@163.com

2012-07-01/31

第一届全国普通外科青年医师学术论坛

会议地点: 北京市

联系方式: cmacjs@cma.org.cn

2012-07-01/31

第二届全国普通外科手术技术学术会议

会议地点: 青岛市

联系方式: lining@126.com

2012-07-27/29

第十届全国胃病学术大会

会议地点: 哈尔滨市

联系方式: xiaohuahuiyi2012@163.com

2012-08-08/10

第五届全国生物信息学与系统生物学学术大会暨国际生物信息学前沿研讨会

会议地点: 哈尔滨市

联系方式: bioinfo@hrbmu.edu.cn

2012-08-25/29

第八届世界华人药物化学研讨会暨第九届IUPAC化学生物学国际研讨会

会议地点: 北京市

联系方式: liangren@bjmu.edu.cn

2012-08-29/09-01

中华医学会第十一次全国内分泌学学术会议

会议地点: 广州市

联系方式: lilyjia@163.com

2012-09-01/30

中华医学会第三次全国肝纤维化、肝硬化学术会议

会议地点: 郑州市

联系方式: lijuyi@cma.org.cn

2012-09-01/30

第十五届全国中西医结合大肠肛门病学术交流会

会议地点: 济南市

联系方式: doclf@163.com

2012-09-14/16

中华医学会第十二次全国超声医学学术会议

会议地点: 青岛市

联系方式: lilyjia@163.com

2012-09-21/30

2012中华影像技术第20次全国学术大会暨国际影像技术论坛

会议地点: 长春市

联系方式: ting@dxyer.com

2012-09-23/27

第九届海峡两岸细胞生物学研讨会

会议地点: 丽江市

联系方式: cscb@sibs.ac.cn

2012-10-21/11-10

第十四次全国中医肛肠学术交流大会

会议地点: 长沙市

联系方式: gcfh2012@163.com

2012-10-25/28

第13届亚太临床微生物暨感染病会议(APCCMI)

会议地点: 北京市

联系方式: bianxiaoxue@mpco.cn

2012-12-21/23

2012生物医学工程生物信息学国际会议

会议地点: 昆明市

联系方式: beb2012@126.com

志谢世界华人消化杂志编委

本期文章审稿中(包括退稿), 我刊编委付出了宝贵的时间和大量的精力, 提高了《世界华人消化杂志》的学术质量, 在此表示衷心感谢!

陈海龙 教授

大连医科大学附属第一医院院办

茅爱武 教授

上海同仁医院介入中心

陈卫昌 教授

苏州大学附属第一医院消化内科

欧希龙 副教授

东南大学中大医院消化科

仇毓东 教授

南京大学医学院附属鼓楼医院

谭晓冬 教授

中国医科大学盛京医院胰腺甲状腺外科

杜奕奇 副教授

中国人民解放军第二军医大学长海医院消化内科

万军 教授

中国人民解放军总医院南楼老年消化科

傅春彬 主任医师

吉化集团公司总医院一院消化内科

汪思应 教授

安徽医科大学实验动物中心

高国全 教授

中山大学中山医学院生物化学教研室

王凯 研究员

山东大学齐鲁医院肝病科

高润平 教授

吉林大学第一医院肝病科

王娅兰 教授

重庆医科大学基础医学院病理教研室

管世鹤 副教授

安徽医科大学第一附属医院检验科

魏睦新 教授

南京医科大学第一附属医院

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

夏时海 副教授

武警后勤学院附属医院肝胆胰脾科(中心)

何敏 教授

广西医科大学医学科学实验中心

徐列明 教授

上海中医药大学附属曙光医院(东部)肝二科

姜春萌 教授

大连医科大学附属第二医院消化科

宣世英 教授

青岛市立医院肝病内科

李刚 教授

北京大学医学部生物化学与分子生物学系

杨桦 教授

山东省立医院肝胆外科

李健丁 教授

山西医科大学第一医院放射科CT室

杨家和 主任医师

中国人民解放军第二军医大学附属东方肝胆外科医院综合治疗三科

李勇 副教授

上海中医药大学附属市中医医院消化科

张力为 副教授

新疆医科大学第一附属医院胸外科

刘森 副教授

安徽医科大学病原生物学

周国雄 主任医师

南通大学附属医院消化内科