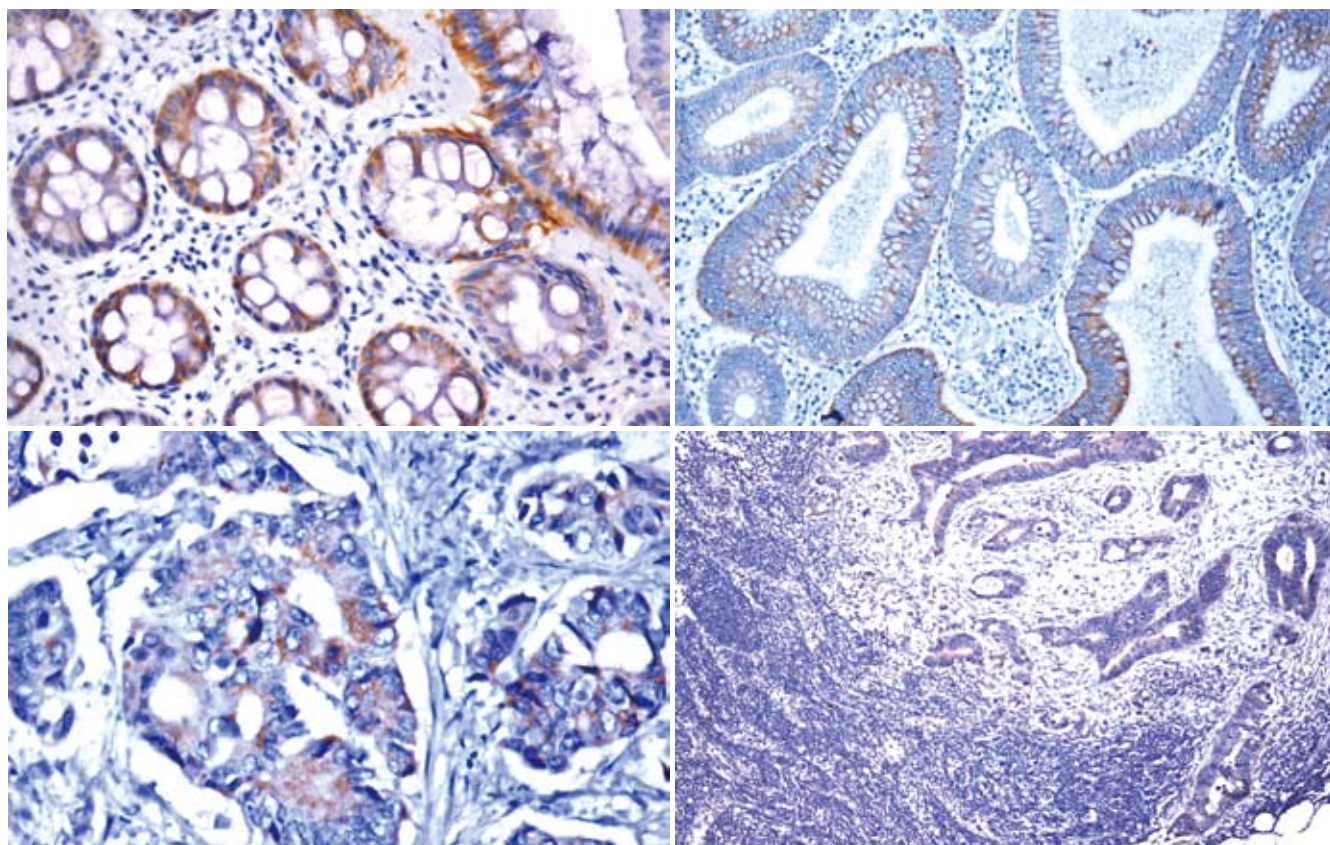


世界华人消化杂志®

WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2010年5月28日 第18卷 第15期 (Volume 18 Number 15)



15 / 2010

ISSN 1009-3079



9 771009 307056

名誉总编辑

潘伯荣

总编辑

马连生

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

世界华人消化杂志®

编辑委员会

2009-01-01/2011-12-31

wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

总顾问

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

名誉总编辑

潘伯荣教授

社长/总编辑

马连生教授

副总编辑

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

常务编委

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

编委

消化内科学

白爱平副教授
聂新明教授
陈洪副教授

陈其奎教授
陈卫昌教授
陈贻胜教授
程斌教授
迟宝荣教授
崔立红副教授
邓长生教授
丁士刚主任医师
董蕾教授
杜雅菊主任医师
樊晓明主任医师
房静远教授
冯志杰主任医师
傅春彬主任医师
高峰副教授
戈之铮教授
关玉盘教授
郭晓钟教授
郝建宇教授
何松教授
洪天配教授
胡伏莲教授
胡和平主任医师
黄晓东副主任医师
黄颖秋教授
黄缘教授
季国忠教授
江米足主任医师
姜春萌教授
姜慧卿教授
金瑞教授
蓝宇教授
李定国教授
李淑德教授
李瑜元教授
李玉民教授
李玉明教授
李祖国副教授
林志辉教授
刘冰熔教授
刘凤斌教授
刘改芳主任医师
刘海峰主任医师
刘海林主任医师
刘占举教授
陆伦根教授

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

消化外科学
蔡开琳副教授

蔡三军主任医师
曹杰主任医师
陈光教授
陈海龙教授
陈积圣教授
陈进宏副主任医师
陈力教授
陈立波教授
陈凇教授
陈强谱教授
陈汝福教授
陈亚军主任医师
陈钟教授
程爱国教授
程爱群主任医师
程树群副教授
仇毓东副教授
崔云甫教授
戴朝六教授
戴冬秋教授
单云峰副主任医师
丁义涛教授
董明教授
房林副教授
傅红副教授
傅华群教授
傅志仁主任医师
葛海燕教授
巩鹏副教授
谷俊朝主任医师
顾岩教授
韩天权教授
郝纯毅主任医师
何超教授
何裕隆教授
黄志勇教授
季加孚教授
莫卫东副主任医师
蒋龙元副教授
李国威教授
李华副教授
李华山主任医师
李奇林教授
李胜研究员
李涛副主任医师

李文岗教授
李旭副教授
李永翔主任医师
梁力建教授
刘超副教授
刘建教授
卢实春教授
陆才德教授
禄韶英副主任医师
吕明德教授
吕云福教授
彭吉润主任医师
彭心宇教授
秦春宏副主任医师
秦华东教授
秦环龙教授
秦建民副主任医师
邱宝安主任医师
邱双健副教授
邱伟华副主任医师
裘正军教授
沈柏用副教授
沈世强教授
施诚仁教授
石毓君副研究员
宋振顺教授
孙诚谊教授
孙学英教授
孙延平副主任医师
邵升副教授
汤恢煊教授
田晓峰教授
汪波副主任医师
汪根树副教授
王春友教授
王德盛副主任医师
王凤山教授
王广义教授
王健生教授
王鲁副教授
王蒙副教授
王石林主任医师
王文跃主任医师
王要军教授
王悦华副主任医师

世界华人消化杂志®

编辑委员会

王振宁教授
王正康教授
王志刚副主任医师
王忠裕教授
吴河水教授
吴健雄教授
吴金术教授
吴泰璜教授
吴志勇教授
谢敏主任医师
谢晓华副教授
邢光明教授
徐大华主任医师
徐迅迪副主任医师
徐泱副主任医师
许戈良教授
严律南教授
杨柏霖副主任医师
杨家和主任医师
杨秋蒙副主任医师
杨维良教授
伊力亚尔·夏合丁教授
殷正丰教授
于聪慧教授
于则利教授
郁宝铭教授
元云飞教授
张佳林教授
张进祥副教授
张俊副研究员
张群华教授
张水军教授
张宗明教授
周伟平教授
邹小明教授

消化感染病学

陈国凤主任医师
陈红松研究员
陈建杰教授
陈仕珠主任医师
陈志辉副主任医师
党双锁教授
丁惠国教授
范建高教授
范小玲主任医师
高润平教授

高泽立副教授
龚国忠教授
管世鹤副教授
何生松教授
胡国信副主任医师
林菊生教授
刘正稳教授
貌盼勇研究员
宁琴教授
钱林学主任医师
孙殿兴主任医师
谭德明教授
汤华研究员
唐霓副研究员
唐晓鹏教授
王凯教授
王怡主任医师
魏来教授
吴建国教授
吴君主任医师
宣世英教授
杨江华副主任医师
杨林副研究员
姚鹏副教授
张继明教授
张明辉副主任医师
张占卿主任医师
赵桂鸣主任医师
赵连三教授
周霞秋教授
朱传武主任医师
庄林主任医师

消化中医学

蔡淦教授
陈治水主任医师
杜群副研究员
黄恒青主任医师
李军祥教授
李康副教授
李勇副教授
李振华教授
刘成海研究员
刘孟安教授
刘平教授
刘绍能主任医师

沈洪教授
唐志鹏研究员
王富春教授
王新月教授
谢鸣教授
徐列明教授
许玲副教授
张声生教授

消化肿瘤学

曹秀峰教授
曹志成院士
陈公琰主任医师
李璦教授
刘宝瑞教授
刘彬彬副研究员
刘云鹏教授
沈克平主任医师
肖文华主任医师
熊斌教授
张凤春教授

消化影像学

白彬主任医师
陈克敏教授
官泳松教授
韩新巍教授
李健丁教授
龙学颖副主任医师
倪才方教授
魏经国教授
肖恩华教授
徐爱民副教授
徐克教授
严惟力副教授
杨业发教授
杨建勇教授
赵卫主任医师

消化内镜及介入治疗学

丁佑铭教授
郝俊鸣副主任医师
潘林娜教授
孙明军教授
万军教授
吴硕东教授

袁友红副教授

消化中西医结合学

唐文富副教授
王学美研究员
魏睦新教授
张春虎副教授

消化基础研究

曹洁副教授
曹鹏副研究员
樊红副教授
高春芳研究员
高国全教授
高英堂研究员
管冬元副教授
胡旭初副教授
黄园教授
黄文林教授
李刚教授
李杰副教授
李永哲副研究员
李增山副教授
刘克辛教授
梅林教授
钱睿哲教授
任超世研究员
任浩副教授
台桂香教授
谭学瑞教授
田文静副教授
田颖刚副研究员
王钦红教授
汪思应教授
吴军研究员
吴俊华副教授
徐宁志研究员
许文燮教授
姚登福教授
阴赅宏研究员
郁卫东副研究员
喻荣彬副教授
张青云研究员
张学教授
赵平副教授
周南进研究员

周士胜教授
周素芳教授
周晓东研究员
周晓武副主任医师

消化病理学

杜祥教授
李淳副教授
李晟磊副主任医师
刘丽江教授
刘勇钢副主任医师
马大烈教授
潘兴华副主任医师
王鲁平主任医师
王娅兰教授
魏蕾教授
颜宏利副教授
于颖彦教授
余宏宇教授
张锦生教授
赵景民教授
朱亮副教授

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ● 2010年5月28日 第18卷 第15期 (总第311期)

述 评

1521 蛋白质组学在肝癌发生机制及诊治中的作用

撒忠秋, 秦建民, 倪雷

基 础 研 究

1525 非酒精性脂肪肝大鼠L-FABP和PPAR- α mRNA的动态表达

朱金玲, 张虎, 张淑红, 姚海涛, 张金波, 祝丽玲

1531 野生型XPD转染对胆管癌QBC939细胞生物学行为的影响

王振杰, 龚辉, 龚丹, 朱水山

1537 紧密连接蛋白-2表达及定位变化与胰腺癌细胞解离的关系

谭晓冬, 周磊, 王巍, 王宝胜, 刘金钢, 戴显伟

1544 双歧杆菌对应激大鼠肠道菌群及促肾上腺皮质激素释放激素的影响

付蕾, 冀建伟, 郑鹏远, 罗予, 张军

1550 缺血性脑卒中大鼠小肠动力异常及与血清Ghrelin变化的关系

啜佳然, 朱玉群, 徐立新, 袁芳, 安博, 徐有青

临 床 研 究

1555 亚甲基四氢叶酸还原酶基因C677T多态性与HBV感染后疾病转归的关系

刘娟娟, 高英堂, 杜智, 杨斌, 经翔, 王毅军, 王凤梅, 景丽

1563 DR-nm23在大肠癌组织中的蛋白表达及意义

杨直, 曲利娟, 武一曼, 曾玲, 熊喜生

文 献 综 述

1569 创伤应激与肝细胞凋亡

廖永晖, 千年松, 张毅, 窦科峰

1577 补体与脂肪肝研究进展

王燕, 杨耀炯

1582 VEGF在原发性肝癌介入治疗中的价值

任勇军, 杨林, 翟昭华

研 究 快 报

1588 肝靶向一氧化氮释放药物对肝损伤的抑制作用及其细胞毒性的评价

靳雪源, 王慧芬, 李宏武, 仲伯华, 赵平

临 床 经 验

1594 军人在汶川地震中功能性胃肠病发病的调查及相关因素

李明阳, 王志强, 孙刚, 杨云生

1598 饮酒与肝功能及红细胞参数的关系

吴永梅, 侯振江

1602 妊娠期慢性乙型肝炎55例

哈明昊, 黎小珊, 卢晓玲, 温庆辉, 张曼莉

1605 门静脉高压症脾动脉栓塞术后再出血的断流术治疗

相亭海, 杜顺达, 巩本刚, 成丕光, 吴俊本, 张同军, 夏修良

1608 氟康唑预防重症急性胰腺炎真菌感染32例

汤可立, 石承先

1612 内镜治疗慢性胰腺炎合并胆总管良性狭窄22例

郑明伟, 秦鸣放, 王庆, 勾承月, 李宁

	<p>1616 幽门螺杆菌、胃肠激素与糖尿病胃轻瘫的关系 吴波, 郑长青</p> <p>1620 胰岛素瘤的流行病学特征及诊治经验调查3 524例 刘国强, 邱法波, 曲玉虎, 刘宁</p>
附 录	<p>1624 《世界华人消化杂志》投稿须知</p> <p>1629 2010年国内国际会议预告</p>
志 谢	1630 志谢世界华人消化杂志编委
消 息	<p>1543 《世界华人消化杂志》计量单位标准</p> <p>1549 《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》</p> <p>1562 《中国期刊引证报告(扩刊版)》发布《世界华人消化杂志》影响因子0.729</p> <p>1568 《世界华人消化杂志》按时完成2009年度出版任务</p> <p>1576 《世界华人消化杂志》性质、刊登内容及目标</p> <p>1581 2008年内科学类期刊总被引频次和影响因子排序</p> <p>1593 2009年《世界华人消化杂志》编委审稿总结</p> <p>1597 汤姆森-路透公布2008年WJG影响因子2.081</p> <p>1601 《世界华人消化杂志》栏目设置</p> <p>1611 《世界华人消化杂志》出版流程</p> <p>1623 WJG成功通过评审被PMC收录</p>
封面故事	<p>杨直, 曲利娟, 武一曼, 曾玲, 熊喜生. DR-nm23在大肠癌组织中的蛋白表达及意义. 世界华人消化杂志 2010; 18(15): 1563-1568 http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/1563.asp</p>
本期责任人	<p>编务 刘晓芳; 送审编辑 李军亮; 组版编辑 吴鹏朕; 英文编辑 王天奇; 责任编辑 李军亮; 形式规范 马连生</p>

<p>世界华人消化杂志</p> <p>Shijie Huaren Xiaohua Zazhi</p> <p>吴阶平 题写封面刊名 陈可冀 题写版权刊名 (旬刊)</p> <p>创 刊 1993-01-15 改 刊 1998-01-25 出 版 2010-05-28 原刊名 新消化病学杂志</p> <p>名誉总编辑 潘伯荣 总 编 辑 马连生 编辑部主任 李军亮 期 刊 名 称 世界华人消化杂志 主 管 单 位 山西省科学技术厅 主 办 单 位 太原消化病研治中心</p>	<p>编辑 世界华人消化杂志编辑委员会 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com</p> <p>出版 世界华人消化杂志编辑部 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com</p> <p>印刷 北京科信印刷厂</p> <p>发行 国内: 北京报刊发行局 国外: 中国国际图书贸易总公司 (100044, 北京市399信箱)</p> <p>订购 全国各地邮电局</p> <p>邮购 世界华人消化杂志编辑部 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com</p>	<p>世界华人消化杂志是一份同行评议性的旬刊, 是一份被《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊.《世界华人消化杂志》的英文摘要被美国《化学文摘》, 荷兰《医学文摘库/医学文摘》和俄罗斯《文摘杂志》收录.</p> <p>世界华人消化杂志正式开通了在线办公系统(http://www.baishideng.com/wcjd/ch/index.aspx), 所有办公流程一律可以在线进行, 包括投稿、审稿、编辑、审读, 以及作者、读者、编者之间的信息反馈交流.</p> <p>特别声明 本刊刊出的所有文章不代表本刊编辑部和本刊编委会的观点, 除非特别声明. 本刊如有印装质量问题, 请向本刊编辑部调换.</p> <p>2010年版权归世界华人消化杂志所有</p>
<p>中国标准连续出版物号 ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R</p>	<p>邮发代号 82-262 国外代号 M 4481</p>	<p>国内定价 每册56.00元 全年2016.00元 广告经营许可证 1401004000050</p>

World Chinese Journal of Digestology

May 2010 Contents in Brief Volume 18 Number 15

EDITORIAL	1521 Role of proteomics in exploring the pathogenesis, diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma <i>Sa ZQ, Qin JM, Ni L</i>
BASIC RESEARCH	<p>1525 Dynamic expression of L-FABP and PPAR-α mRNAs in nonalcoholic fatty liver disease in rats <i>Zhu JL, Zhang H, Zhang SH, Yao HT, Zhang JB, Zhu LL</i></p> <p>1531 Transfection of the wild-type xeroderma pigmentosum group D gene alters the biological behavior of human cholangiocarcinoma cell line QBC939 <i>Wang ZJ, Gong H, Gong D, Zhu SS</i></p> <p>1537 Correlation of tight junction protein-2 expression and localization with pancreatic cancer cell dissociation <i>Tan XD, Zhou L, Wang W, Wang BS, Liu JG, Dai XW</i></p> <p>1544 Influence of <i>Bifidobacterium</i> on the intestinal microflora and corticotropin-releasing factor in rats following chronic psychological stress <i>Fu L, Ji JW, Zheng PY, Luo Y, Zhang J</i></p> <p>1550 Changes in serum ghrelin and small intestinal motility in rats with cerebral arterial thrombosis <i>Chuai JR, Zhu YQ, Xu LX, Yuan F, An B, Xu YQ</i></p>
CLINICAL RESEARCH	<p>1555 Relationship between the MTHFR C677T polymorphism and the outcome of hepatitis B virus infection <i>Liu JJ, Gao YT, Du Z, Yang B, Jing X, Wang YJ, Wang FM, Jing L</i></p> <p>1563 Significance of DR-nm23 protein expression in colorectal carcinoma <i>Yang Z, Qu LJ, Wu YM, Zeng L, Xiong XS</i></p>
REVIEW	<p>1569 Traumatic stress and hepatocyte apoptosis <i>Liao YH, Qian NS, Zhang Y, Dou KF</i></p> <p>1577 Advances in understanding the role of complement in the pathogenesis of fatty liver disease <i>Wang Y, Yang YX</i></p> <p>1582 Clinical value of inhibition of vascular endothelial growth factor in primary hepatocellular carcinoma after transcatheter arterial chemoembolization <i>Ren YJ, Yang L, Zhai ZH</i></p>
RAPID COMMUNICATION	<p>1588 Efficacy and cytotoxicity of a liver-targeted nitric oxide-releasing drug in the treatment of liver injury in mice <i>Jin XY, Wang HF, Li HW, Zhong BH, Zhao P</i></p>
CLINICAL PRACTICE	<p>1594 Morbidity analysis of functional gastrointestinal disease in soldiers in the area affected by the Wenchuan earthquake <i>Li MY, Wang ZQ, Sun G, Yang YS</i></p> <p>1598 Correlation of liver function and red blood cell parameters with repeat drinking in alcohol-dependent patients <i>Wu YM, Hou ZJ</i></p> <p>1602 Pregnant women with chronic hepatitis B: an analysis of 55 cases <i>Ha MH, Li XS, Lu XL, Wen QH, Zhang ML</i></p> <p>1605 Devascularization operation for upper gastrointestinal rebleeding after partial splenic</p>

	<p>embolization in portal hypertensive patients <i>Xiang TH, Du SD, Gong BG, Cheng PG, Wu JB, Zhang TJ, Xia XL</i></p> <p>1608 Fluconazol prophylaxis against fungal infection in patients with severe acute pancreatitis: an analysis of 32 cases <i>Tang KL, Shi CX</i></p> <p>1612 Endoscopic treatment of chronic pancreatitis with benign biliary stricture: an analysis of 22 cases <i>Zheng MW, Qin MF, Wang Q, Gou CY, Li N</i></p> <p>1616 Relationship among <i>Helicobacter pylori</i> infection, gut hormones and diabetic gastroparesis <i>Wu B, Zheng CQ</i></p> <p>1620 Epidemiological features, diagnosis and treatment of insulinoma: an analysis of 3 524 cases <i>Liu GQ, Qiu FB, Qu YH, Liu N</i></p>
APPENDIX	<p>1624 Instructions to authors of World Chinese Journal of Digestology</p> <p>1629 Meeting events calendar in 2010</p>
ACKNOWLEDGMENT	1630 Acknowledgments to reviewers of World Chinese Journal of Digestology
COVER	<p>Yang Z, Qu LJ, Wu YM, Zeng L, Xiong XS. Significance of DR-nm23 protein expression in colorectal carcinoma.</p> <p>Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2010; 18(15): 1563-1568</p> <p>http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/1563.asp</p>
RESPONSIBLE EDITORS FOR THIS ISSUE	<p>Assistant Editor: <i>Xiao-Fang Liu</i> Review Editor: <i>Jun-Liang Li</i> Electronic Page Editor: <i>Peng-Zhen Wu</i></p> <p>English Language Editor: <i>Tian-Qi Wang</i> Editor-in-Charge: <i>Jun-Liang Li</i> Layout Editor: <i>Lian-Sheng Ma</i></p>

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

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

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

NAME OF JOURNAL

World Chinese Journal of Digestology

RESPONSIBLE INSTITUTION

Department of Science and Technology
of Shanxi Province

SPONSOR

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

EDITING

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

PRINTING

Beijing Kexin Printing House

PUBLISHING

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

OVERSEAS DISTRIBUTOR

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

HONORARY EDITOR-IN-CHIEF

Bo-Rong Pan

EDITOR-IN-CHIEF

Lian-Sheng Ma

SCIENCE EDITORS

Director: Jun-Liang Li

SUBSCRIPTION

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

CSSN

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

COPYRIGHT

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

SPECIAL STATEMENT

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

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

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

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

蛋白质组学在肝癌发生机制及诊治中的作用

撒忠秋, 秦建民, 倪雷

撒忠秋, 秦建民, 倪雷, 上海中医药大学附属普陀医院普外科 上海市 200062

上海市普陀区科委重点基金资助项目, No. B84

作者贡献分布: 本文由撒忠秋综述; 倪雷与秦建民审核。

通讯作者: 秦建民, 副教授, 上海市普陀区兰溪路164号, 上海中医药大学附属普陀医院普外科. jianminqin@yahoo.com

收稿日期: 2010-01-09 修回日期: 2010-03-29

接受日期: 2010-04-07 在线出版日期: 2010-05-28

Role of proteomics in exploring the pathogenesis, diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma

Zhong-Qiu Sa, Jian-Min Qin, Lei Ni

Zhong-Qiu Sa, Jian-Min Qin, Lei Ni, Department of General Surgery, Putuo Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200062, China

Supported by: the Key Project of the Science and Technology Commission of Shanghai Putuo District, No. B-84

Correspondence to: Associate Professor Jian-Min Qin, Department of General Surgery, Putuo Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200062, China. jianminqin@yahoo.com

Received: 2010-01-09 Revised: 2010-03-29

Accepted: 2010-04-07 Published online: 2010-05-28

Abstract

The development and progression of primary liver cancer are a very complicated process that involves multiple genes and steps. DNA sequencing can not thoroughly reveal the biological function of genes since a single gene can encode multiple proteins with distinct functions. The protein profiles of liver cancer cells, tissue and peripheral serum can be determined to analyze the structure and function of proteins involved in the development, progression, recurrence and metastasis of primary liver cancer. Proteomics plays an important role in exploring the pathogenesis, diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma.

Key Words: Proteomics; Primary liver cancer; Mechanism; Diagnosis; Treatment

Sa ZQ, Ni L, Qin JM. Role of proteomics in exploring the pathogenesis, diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(15): 1521-1524

摘要

原发性肝癌的发生、发展涉及一系列多基因参与、多步骤协同的复杂过程, 通过DNA序列无法解释所有的生物功能, 同样的基因组却表达出不同的蛋白质, 显示出不同的生物学功能. 通过检测肝癌细胞、组织及外周血清蛋白质表达谱, 深入开展肝癌发生、发展、复发与转移相关蛋白质结构和功能的研究, 对于阐明肝癌发病机制以及研究新的肝癌诊断与治疗方法, 具有重要的研究意义和应用价值.

关键词: 蛋白组学; 肝癌; 机制; 诊断; 治疗

撒忠秋, 秦建民, 倪雷. 蛋白质组学在肝癌发生机制及诊治中的作用. *世界华人消化杂志* 2010; 18(15): 1521-1524

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/1521.asp>

0 引言

原发性肝癌(primary liver cancer, PLC, 以下简称肝癌)是世界上第三大癌症, 每年约有100万以上的人口患病. 在我国每年约有20余万人患肝癌, 在我国恶性肿瘤死亡率中肝癌居第2位, 其5年生存率仅有5%-6%, 大部分肝癌患者(>80%)就诊时已属晚期, 无法手术切除, 即使可以手术切除的肝癌患者, 2年复发率依然高达50%, 严重影响肝癌治疗效果^[1-3]. 肝癌的发生发展是一系列多基因参与、多步骤协同的复杂过程, 为降低其发病率和死亡率, 诸多学者曾试图在基因水平上寻找肝癌分子靶标, 但随着人类基因组测序的完成, 人们意识到仅仅通过DNA序列无法解释所有的生物功能, 尽管所有的细胞都拥有同样的基因组, 但却表达出不同的蛋白质并显示出不同的生物学功能, 细胞差异很大程度是由基因表达的最终产物-蛋白质来决定的. 如何开展肝癌发生、发展、复发与转移相关蛋白质结构和功能的研究, 对肝癌发病机制与诊治的深入研究, 具有重要的应用前景.

1 肝癌蛋白质组学研究的意义

1994年澳大利亚Macquarie大学Wilkins和Williams首次提出“蛋白质组”这个概念^[4]. 蛋白质组学

■背景资料

目前对原发性肝癌的研究在基因水平虽然发现一些有价值的相关基因, 但对于阐明肝癌发生机制和临床诊治应用价值有限, 亟须从基因表达的最终产物-蛋白质水平进行深入研究, 以期对肝癌发病机制的揭示和临床早期诊治起到重要的研究价值.

■同行评议者

高润平, 教授, 吉林大学第一医院肝病科

■应用要点

从细胞、组织和血清三个方面研究肝癌蛋白质组学,能够从不同角度较为全面地揭示肝癌发生机制、临床诊治。

是指研究蛋白质组或应用大规模蛋白质分离和识别技术研究蛋白质组的一门学科,是对基因组所表达的整套蛋白质的分析,在蛋白质整体水平上对疾病机制、细胞模式、功能联系等方面进行探索的科学。主要涉及研究各种蛋白质组的组成成分,力图描绘出人类大约3-4万多基因编码的所有蛋白质谱,建立蛋白质组数据库-表达蛋白质组学;以及研究蛋白质组的各种功能,揭示细胞生理和病理状态的进程与本质,对外界环境刺激的反应途径,以及细胞调控机制,获得对某些关键蛋白的定性和功能分析-即功能蛋白质组学。随着人类基因组计划、计算机技术及网络技术的发展,蛋白质组生物信息学已经成为蛋白质组研究一个不可缺少的部分^[5]。蛋白质的生物信息学用来分析和构建双向凝胶电泳图谱,搜索与构建蛋白质组数据库。随着后基因组时代的到来,蛋白质组学研拳直接定位于蛋白质水平,从整体、动态、定量的角度去研究肝癌发生发展过程中蛋白质种类、数量、性质、功能及其动态改变,进一步揭示肝癌的发病机制,为肝癌的早期诊断及治疗开辟了新的途径。

2 肝癌细胞系蛋白质组学研究

近年来,肝癌细胞系的蛋白质组学研究为揭示肝癌发生机制奠定了重要的实验基础。Fujii等^[6,7]运用荧光饱和标记染色法、Western blot法、双向荧光差异凝胶电泳法等分析技术研究了约9株不同肝癌系细胞,不仅发现抑癌基因结合蛋白、转录调节蛋白、脂肪酸结合蛋白、细胞周期调节蛋白、增殖细胞核抗原、末端结合蛋白等在正常细胞和癌细胞之间表达的差异性,并且建立了肝癌细胞系HepG2的蛋白电泳图谱和数据库,鉴定了123个基因位点对应的92种蛋白,在肝癌蛋白质谱研究领域具有里程碑式的意义。Zhou等^[8]利用多种蛋白组织化学技术分析比较了人非肝癌但已发生变化的肝细胞系、未转移的HCC细胞系-Hep3B和高度转移的肝癌细胞系-MHCC97H的蛋白质谱,构建了该三种细胞系的糖蛋白组数据库,并发现该三种细胞系的糖蛋白及总蛋白的表达有着明显差异,认为可以通过检测肝组织蛋白糖基化变化对肝癌的发生及转移进行早期预测及诊断。He等^[9]构建了携带HBX基因的表达载体pEGFP2N1-X,然后将其转染到HepG2细胞,并在细胞质和核边缘表达,利用蛋白组化技术发现四种差异明显的蛋白在HBX转染的细胞中表达上调,考虑可能与

肝癌的发生及早期转移有关。Cui等^[10]运用2-DE技术比较分析了无转移的Hep3B的肝癌细胞系、低转移的MHCC97L肝癌细胞系和高转移MHCC97H肝癌细胞系的蛋白二维电泳图差异,并用液相色谱2电喷雾离子阱质谱鉴定了其中显著差异的26个蛋白,认为这些蛋白可能成为预测肝癌患者预后的蛋白标志物。Ding等^[11]运用蛋白质组学技术比较分析了高转移肝癌细胞系MHCC97H和低转移MHCC97L,发现细胞角蛋白CK19(cytokeratin19)在MHCC97H中高表达而在MHCC97L中低表达,并在102例有明显肝内转移的肝癌患者血清中检测出CK19蛋白阳性,该组研究还通过放射免疫技术发现肝细胞癌小鼠血清CK19的水平随着肿瘤的进展有所增加并在发生肺转移后显著增加,认为这些蛋白不仅可以成为预测肝癌患者早期转移的蛋白标志物,还可用于延缓或阻止肝癌的转移的治疗靶点。上述差异蛋白质的筛选、结构与功能的鉴定,为肝癌发病机制、靶向治疗和预后的研究提供了重要的研究平台。

3 肝癌患者血清蛋白质组学研究

Le Naour等^[12]用2-DE等方法分析了原发性肝癌患者和正常人的血清,发现8种蛋白的抗体在肝细胞癌中高表达,而在健康人群中无表达($P<0.05$)。Block等在土拨鼠肝癌模型鼠的血清中发现GP73蛋白明显高于正常鼠,而后发现肝癌患者血清中的GP73蛋白也明显高于正常人。Marrero等^[13]利用蛋白印迹技术比较了肝癌患者和肝硬化患者血清中GP73水平差异,其结果表明肝癌患者血清GP73水平明显高于肝硬化患者,且在肝癌早期检出的敏感性明显高于AFP($P<0.05$)。Capurro等^[14]运用蛋白组化技术研究近来肝癌早期诊断热点之一的磷脂酰肌醇蛋白聚糖3(GPC3)在不同人群中的表达差异,结果表明GPC3在肝癌患者血清中过度表达,而在肝炎等其他肝脏疾病患者及正常人群中低表达或不表达。Poon等^[15]利用蛋白组化技术对比分析了肝癌患者、肝硬化患者和正常人的血清,发现并归类分析了250个差异表达蛋白质点,这些差异蛋白能正确识别所有血清标本,能够无偏性的反应肝癌蛋白组特异性,展示了蛋白组学在肝癌标志物研究中的前景。Steel等^[16]利用2-DE及肽链指纹图谱鉴定技术分析肝癌患者和活性/隐匿性HBV感染而无任何临床症状的患者的血清,发现补体C3-C末端片段和载脂蛋白A1同源蛋白

质在肝细胞癌患者血清中含量相对较高, 有可能成为肝癌早期检测的标志物. Comunale等^[17]利用蛋白组学技术分析比较了HBV相关肝癌患者和、慢性肝炎患者以及正常人血清, 发现部分蛋白核心高度的岩藻糖基化, 包括AFP在内的19种岩藻糖基化蛋白明显升高, 并且这些岩藻糖基化蛋白在AFP阴性的肝癌患者中也明显升高, 其价值可能优于AFP, 可以进一步作为肝癌早期检查的血清标志物. 为进一步筛选肝癌早期诊断特异性标志物提供了新的研究依据.

4 肝癌肿瘤组织的蛋白组学研究

Kim等^[18]利用2-DE技术分析比较了肝癌组织和正常肝组织的蛋白位点差异, 鉴定出包括热休克蛋白27(hot shock protein 27, HSP27)、生长因子受体结合蛋白2(Grb2)、组织蛋白酶D(cathepsin D)等11个在肝癌发生发展过程中起重要的差异表达蛋白. Kim等^[19]利用蛋白组化技术比较了HBV阳性肝癌患者、HCV阳性肝癌患者和肝炎病毒阴性肝癌患者的组织蛋白表达图谱, 分析了60种蛋白质点在上述三者中的表达差异性, 有14种蛋白表达趋同, 有46种具有肝炎病毒表达特异性, 例如HSP27就在HCV阳性肝癌患者中高表达, 在HBV阳性患者中低表达. Yokoyama等^[20]利用蛋白组化技术对比分析了肝癌和癌旁组织的蛋白质组成分, 发现了11个差异蛋白质点, 其中有转铁蛋白轻链、精氨酸酶1、肝型醛缩酶、原肌球蛋白 β 链等8个蛋白质点在肝癌组织中表达下调, 这些蛋白大都与肝细胞功能缺失以及肝癌形成有关. Alaiya等^[21]用蛋白质组技术比较分析了肝癌组织和正常肝组织中的蛋白表达差异, 发现相关的基因编码在正常肝组织中表达的是相对分子质量为37 000 Da, 等电点为68的醛糖还原酶, 而在肝癌组织中表达的是一个相对分子质量为35 000 Da, 等电点为74的醛糖还原酶样蛋白, 经免疫组织化学证实, 正常人肝脏中无此蛋白表达, 在癌前病变和肝癌组织中表达明显, 而周围正常组织不表达, 研究者认为上述变化可能与肝癌的发病机制密切相关. Park等^[22]运用2-DE、Western blot、免疫组织化学等技术对比分析了肝癌患者癌组织和癌旁正常组织铁蛋白轻链水平, 发现癌组织中的铁蛋白轻链表达下调或缺失, 研究者进一步运用RT-PCR方法发现铁蛋白轻链mRNA翻译后修饰可能是抑制癌组织中轻链表达的原因, 为肝癌发病机制中铁缺失的研究提供新的研究方

向. 在White等^[23]的研究中, 他们首先建立了SD大鼠的肝癌模型, 再通过蛋白组学技术分析大鼠肝癌组织与正常鼠肝组织的蛋白表达差异, 发现核受体超家族成员中的多个差异蛋白质点, 包括细胞质环氧化物水解酶, 过氧化物酶体双功能酶, 羟甲基戊二酰辅酶A, 长链酰基辅酶A硫酯酶等, 认为核受体超家族成员蛋白组学变化可能与肝癌的发生机制有关. Lim等^[24]利用蛋白质组化技术, 对比分析了肝癌组织、癌旁组织、癌远端正常组织, 以及肝硬化患者和正常人的肝组织等的蛋白质表达谱, 鉴定出21种差异表达蛋白质点, 包括肝羧酸酯酶、层黏蛋白B1等, 这些蛋白质都可作为肝癌的标志物, 用于肝癌早期发现. Song等^[25]运用2-DE、免疫组织化学和Western blot等技术分析比较了12例肝细胞癌患者(6例转移, 6例未转移)病变肝脏组织中与伴侣蛋白、细胞流动性、细胞支架结构等有关的16种蛋白, 包括HSP27、S100A11、CK18等, 6例转移标本中HSP27高度表达, 认为HSP27过高表达可以作为肝癌转移的早期监测. Yokoo等^[26]利用蛋白质组学技术分析比较了12例肝癌术后6 mo内肝癌复发及15例术后2年内无复发的肝脏组织的蛋白表达情况, 发现磷酸丝氨酸氨基转移酶、膜联蛋白等在内的23种与早期肝癌复发高度相关的蛋白质参与了信号转导途径、葡萄糖代谢、胞骨架结构、细胞黏附、抗氧化剂等功能, 认为这些蛋白质对肝癌复发的早期发现和预后预测有重要意义. 肝癌组织蛋白质组学的研究, 为进一步揭示肝癌的发生、发展机制, 深入开展肝癌早期诊断与术后复发转移的预测奠定了重要的研究基础.

5 结论

随着后基因时代的来临, 蛋白组学技术已广泛深入到生命科学医药卫生的各个领域, 其理论和技术的高速发展为肝癌的诊治带来了新的思维方式和研究前景. 但是目前蛋白质组学研究本身还存在着许多不足, 包括蛋白质分离技术的滞后性、低敏感性, 蛋白质分析技术的复杂性和重复性差等, 同一研究在不同的单位研究结果存在差异, 尚未统一的“金标准”. 因此无论从样品的制备、分离到鉴定, 还是研究结果的归纳、总结到最后的实际应用, 都需要不断的发展和改进. 相信在不久的将来, 随着科技的不断发展, 蛋白质组学技术及相关数据库建设的进一步壮大充实, 蛋白质组学会有更广阔的

■研究前沿

近年来在筛选新的肝癌诊断标志物方面进行了大量的研究, 尤其是AFP阴性肝癌诊断问题一直是关注的焦点问题.

■同行评价

本文层次清楚,逻辑性较强,对从事肝癌的临床工作者及研究者具有指导意义。

发展前景,将会大大加快对肝癌发生机制、早期诊断、治疗、复发与转移的研究,造福于更多的肝病患者。

6 参考文献

- 1 Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55: 74-108
- 2 郭武华, 张吉翔. 肝癌综合治疗的现状. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 2199-2203
- 3 Thomas MB, Zhu AX. Hepatocellular carcinoma: the need for progress. *J Clin Oncol* 2005; 23: 2892-2899
- 4 Anderson NL, Anderson NG. Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words. *Electrophoresis* 1998; 19: 1853-1861
- 5 Liang RC, Neo JC, Lo SL, Tan GS, Seow TK, Chung MC. Proteome database of hepatocellular carcinoma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2002; 771: 303-328
- 6 Fujii K, Kondo T, Yokoo H, Yamada T, Iwatsuki K, Hirohashi S. Proteomic study of human hepatocellular carcinoma using two-dimensional difference gel electrophoresis with saturation cysteine dye. *Proteomics* 2005; 5: 1411-1422
- 7 Fujii K, Kondo T, Yokoo H, Okano T, Yamada M, Yamada T, Iwatsuki K, Hirohashi S. Database of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of proteins labeled with CyDye DIGE Fluor saturation dye. *Proteomics* 2006; 6: 1640-1653
- 8 Zhou H, Liu Y, Chui J, Guo K, Shun Q, Lu W, Jin H, Wei L, Yang P. Investigation on glycosylation patterns of proteins from human liver cancer cell lines based on the multiplexed proteomics technology. *Arch Biochem Biophys* 2007; 459: 70-78
- 9 He Y, Yang F, Wang F, Song SX, Li DA, Guo YJ, Sun SH. The upregulation of expressed proteins in HepG2 cells transfected by the recombinant plasmid-containing HBx gene. *Scand J Immunol* 2007; 65: 249-256
- 10 Cui JF, Liu YK, Pan BS, Song HY, Zhang Y, Sun RX, Chen J, Feng JT, Tang ZY, Yu YL, Shen HL, Yang PY. Differential proteomic analysis of human hepatocellular carcinoma cell line metastasis-associated proteins. *J Cancer Res Clin Oncol* 2004; 130: 615-622
- 11 Ding SJ, Li Y, Tan YX, Jiang MR, Tian B, Liu YK, Shao XX, Ye SL, Wu JR, Zeng R, Wang HY, Tang ZY, Xia QC. From proteomic analysis to clinical significance: overexpression of cytokeratin 19 correlates with hepatocellular carcinoma metastasis. *Mol Cell Proteomics* 2004; 3: 73-81
- 12 Le Naour F, Brichory F, Misek DE, Bréchet C, Hanash SM, Beretta L. A distinct repertoire of autoantibodies in hepatocellular carcinoma identified by proteomic analysis. *Mol Cell Proteomics* 2002; 1: 197-203
- 13 Marrero JA, Romano PR, Nikolaeva O, Steel L, Mehta A, Fimmel CJ, Comunale MA, D'Amelio A, Lok AS, Block TM. GP73, a resident Golgi glycoprotein, is a novel serum marker for hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2005; 43: 1007-1012
- 14 Capurro M, Wanless IR, Sherman M, Deboer G, Shi W, Miyoshi E, Filmus J. Glypican-3: a novel serum and histochemical marker for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2003; 125: 89-97
- 15 Poon TC, Yip TT, Chan AT, Yip C, Yip V, Mok TS, Lee CC, Leung TW, Ho SK, Johnson PJ. Comprehensive proteomic profiling identifies serum proteomic signatures for detection of hepatocellular carcinoma and its subtypes. *Clin Chem* 2003; 49: 752-760
- 16 Steel LF, Shumpert D, Trotter M, Seeholzer SH, Evans AA, London WT, Dwek R, Block TM. A strategy for the comparative analysis of serum proteomes for the discovery of biomarkers for hepatocellular carcinoma. *Proteomics* 2003; 3: 601-609
- 17 Comunale MA, Lowman M, Long RE, Krakover J, Philip R, Seeholzer S, Evans AA, Hann HW, Block TM, Mehta AS. Proteomic analysis of serum associated fucosylated glycoproteins in the development of primary hepatocellular carcinoma. *J Proteome Res* 2006; 5: 308-315
- 18 Kim J, Kim SH, Lee SU, Ha GH, Kang DG, Ha NY, Ahn JS, Cho HY, Kang SJ, Lee YJ, Hong SC, Ha WS, Bae JM, Lee CW, Kim JW. Proteome analysis of human liver tumor tissue by two-dimensional gel electrophoresis and matrix assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry for identification of disease-related proteins. *Electrophoresis* 2002; 23: 4142-4156
- 19 Kim W, Oe Lim S, Kim JS, Ryu YH, Byeon JY, Kim HJ, Kim YI, Heo JS, Park YM, Jung G. Comparison of proteome between hepatitis B virus- and hepatitis C virus-associated hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 5493-5500
- 20 Yokoyama Y, Kuramitsu Y, Takashima M, Iizuka N, Toda T, Terai S, Sakaida I, Oka M, Nakamura K, Okita K. Proteomic profiling of proteins decreased in hepatocellular carcinoma from patients infected with hepatitis C virus. *Proteomics* 2004; 4: 2111-2116
- 21 Alaiya AA, Franzén B, Auer G, Linder S. Cancer proteomics: from identification of novel markers to creation of artificial learning models for tumor classification. *Electrophoresis* 2000; 21: 1210-1217
- 22 Park KS, Kim H, Kim NG, Cho SY, Choi KH, Seong JK, Paik YK. Proteomic analysis and molecular characterization of tissue ferritin light chain in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2002; 35: 1459-1466
- 23 White IR, Man WJ, Bryant D, Bugelski P, Camilleri P, Cutler P, Hayes W, Holbrook JD, Kramer K, Lord PG, Wood J. Protein expression changes in the Sprague Dawley rat liver proteome following administration of peroxisome proliferator activated receptor alpha and gamma ligands. *Proteomics* 2003; 3: 505-512
- 24 Lim SO, Park SJ, Kim W, Park SG, Kim HJ, Kim YI, Sohn TS, Noh JH, Jung G. Proteome analysis of hepatocellular carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 291: 1031-1037
- 25 Song HY, Liu YK, Feng JT, Cui JF, Dai Z, Zhang LJ, Feng JX, Shen HL, Tang ZY. Proteomic analysis on metastasis-associated proteins of human hepatocellular carcinoma tissues. *J Cancer Res Clin Oncol* 2006; 132: 92-98
- 26 Yokoo H, Kondo T, Okano T, Nakanishi K, Sakamoto M, Kosuge T, Todo S, Hirohashi S. Protein expression associated with early intrahepatic recurrence of hepatocellular carcinoma after curative surgery. *Cancer Sci* 2007; 98: 665-673

非酒精性脂肪肝大鼠L-FABP和PPAR- α mRNA的动态表达

朱金玲, 张虎, 张淑红, 姚海涛, 张金波, 祝丽玲

朱金玲, 张虎, 张淑红, 姚海涛, 张金波, 祝丽玲, 佳木斯大学基础医学院, 黑龙江省佳木斯市 154007
朱金玲, 教授, 主要从事肿瘤标志物研究。
黑龙江省自然科学基金资助项目, No. D2007-59
黑龙江省教育厅科学技术研究基金资助项目, No. 11533071
作者贡献分布: 朱金玲与张虎对此文所作贡献均等; 此课题由朱金玲与姚海涛设计完成; 祝丽玲与张金波进行统计学分析; 张虎与张淑红完成研究过程; 张虎完成论文撰写; 朱金玲对本文修改。
通讯作者: 朱金玲, 教授, 154007, 黑龙江省佳木斯市, 佳木斯大学基础医学院生物教研室, zhujinling566@sohu.com
电话: 0454-8618903
收稿日期: 2010-02-22 修回日期: 2010-04-24
接受日期: 2010-04-27 在线出版日期: 2010-05-28

Dynamic expression of L-FABP and PPAR- α mRNAs in nonalcoholic fatty liver disease in rats

Jin-Ling Zhu, Hu Zhang, Shu-Hong Zhang, Hai-Tao Yao, Jin-Bo Zhang, Li-Ling Zhu

Jin-Ling Zhu, Hu Zhang, Shu-Hong Zhang, Hai-Tao Yao, Jin-Bo Zhang, Li-Ling Zhu, School of Basic Medical Sciences, Jiamusi University, Jiamusi 154007, Heilongjiang Province China

Supported by: the Natural Science Foundation of Heilongjiang Province, No. D2007-59; and the Scientific and Technological Research Foundation of Heilongjiang Provincial Education Department, No. 11533071

Correspondence to: Professor Jin-Ling Zhu, School of Basic Medical Sciences, Jiamusi University, Jiamusi 154007, Heilongjiang Province, China. zhujinling566@sohu.com

Received: 2010-02-22 Revised: 2010-04-24

Accepted: 2010-04-27 Published online: 2010-05-28

Abstract

AIM: To establish a rat model of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) to detect the changes in the expression of liver fatty acid-binding protein (L-FABP) and peroxisome proliferator-activated receptor- α (PPAR- α) mRNAs in NAFLD and to explore the mechanism underlying the pathogenesis of the disease.

METHODS: Eighty-four male Wistar rats were randomly and equally divided into two groups: control group (fed a normal diet for 18 weeks) and model group (fed a high-fat diet for 12 wk and a normal diet for another 6 wk). Each group

was further divided into 7 subgroups for testing at weeks 0, 2, 4, 8, 12, 16 and 18. Rats in the two groups were sacrificed at each time point. Blood samples were taken to measure serum ALT, TG, CHOL, HDL-C and LDL-C. Liver samples were taken for HE staining and for detection of the expression of L-FABP and PPAR- α mRNAs by real-time fluorescence quantitative RT-PCR.

RESULTS: The expression of L-FABP and PPAR- α mRNAs in control rats showed no obvious changes. No steatosis was observed at week 2 in rats fed a high-fat diet. The expression of L-FABP mRNA increased obviously in rats fed a high-fat diet at week 4 (0.59 ± 0.06 vs 0.52 ± 0.03 , $P < 0.05$), reaching the peak at weeks 8 and 12 (0.91 ± 0.07 and 0.92 ± 0.08 vs 0.52 ± 0.03 , respectively; both $P < 0.01$). At week 18, the expression level of L-FABP mRNA declined significantly (0.59 ± 0.04 vs 0.92 ± 0.08 , $P < 0.01$) but was still higher than that in the control group ($P < 0.05$). The expression of PPAR- α mRNA decreased obviously in rats fed a high-fat diet at week 4 (1.05 ± 0.09 vs 1.13 ± 0.07 , $P < 0.05$), reaching the lowest level at weeks 8 and 12 (0.89 ± 0.04 and 0.85 ± 0.07 vs 1.13 ± 0.07 , respectively; both $P < 0.01$). At week 18, the expression level of PPAR- α mRNA was elevated obviously (1.04 ± 0.07 vs 0.85 ± 0.07 , $P < 0.01$) but was still lower than that in the control group. Steatosis become worst at week 12 but was improved greatly at week 18.

CONCLUSION: In the progression of rat NAFLD, PPAR- α mRNA expression decreases and L-FABP mRNA expression increases as steatosis becomes worse. Steatosis can be improved through diet.

Key Words: Rat; High-rich diet; Nonalcoholic fatty liver disease; Liver fatty acid-binding protein; Peroxisome proliferator-activated receptor- α ; Fluorescence quantitative RT-PCR

Zhu JL, Zhang H, Zhang SH, Yao HT, Zhang JB, Zhu LL. Dynamic expression of L-FABP and PPAR- α mRNAs in nonalcoholic fatty liver disease in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(15): 1525-1530

■背景资料

在我国, 近年来非脂肪肝发病率成逐年上升趋势, 并且通常伴随并发症发生, 其发病机制得到广泛研究, 脂肪酸转运机制越来越受到重视。

■同行评议者

陈其奎, 教授, 中山大学附属第二医院消化内科

■研究前沿

脂类在肝脏、血液和脂肪组织的储存、降解平衡调控机制成为研究热点与重点。

摘要

目的: 检测非酒精性脂肪肝大鼠肝脏中L-FABP、PPAR- α mRNA的动态变化, 探讨非酒精性脂肪肝的发病机制。

方法: δ 大鼠84只, 体质量 $180\text{ g}\pm 10\text{ g}$, 随机分为饮食基础饲料的正常对照组和饮食高脂饲料的实验组; 各组又随机分为0、2、4、8、12、16、18 wk 7个时相组, 其中高脂饲料组在12 wk以后饮食正常饲料, 使其脂肪肝处于自然恢复状态。分别于不同时相从心脏取血, 测定血清中ALT、TG、CHOL、HDL-C和LDL-C的含量; 收集肝脏标本, 分别进行病理学检测和L-FABP和PPAR- α mRNA的动态变化检测。

结果: 对照组大鼠肝脏L-FABP和PPAR- α mRNA在不同时相间的表达无显著性变化。高脂饮食脂肪肝大鼠第2周时病理切片没有观察到脂肪变性。L-FABP mRNA在第4周升高(0.59 ± 0.06 vs 0.52 ± 0.03 , $P<0.05$), 第8、12周显著升高(0.91 ± 0.07 , 0.92 ± 0.08 vs 0.52 ± 0.03 , 均 $P<0.01$), 正常饮食6 wk后显著下降(0.59 ± 0.04 vs 0.92 ± 0.08 , $P<0.01$), 但是与对照组比较仍升高($P<0.05$)。PPAR- α mRNA在第4周下降(1.05 ± 0.09 vs 1.13 ± 0.07 , $P<0.05$), 第8、12周显著下降(0.89 ± 0.04 , 0.85 ± 0.07 vs 1.13 ± 0.07 , 均 $P<0.01$), 正常饮食6 wk后显著升高(1.04 ± 0.07 vs 0.85 ± 0.07 , $P<0.01$), 但是与对照组比较仍下降($P<0.05$)。脂肪变性面积在第12周时最大, 但未见明显的炎症反应, 正常饮食6 wk后脂肪变性明显好转。

结论: 高脂饮食脂肪肝大鼠模型L-FABP mRNA表达阈值的出现和PPAR- α mRNA表达下调可能在脂肪变性形成过程中起到重要作用, 且单纯脂肪变性在一定程度上是可以通过饮食调节自然恢复的。

关键词: 大鼠; 高脂饮食; 非酒精性脂肪肝; 肝型脂肪酸结合蛋白; 过氧化物酶体增殖物激活受体- α ; 荧光定量逆转录聚合酶链式反应

朱金玲, 张虎, 张淑红, 姚海涛, 张金波, 祝丽玲. 非酒精性脂肪肝大鼠L-FABP和PPAR- α mRNA的动态表达. 世界华人消化杂志 2010; 18(15): 1525-1530
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/1525.asp>

0 引言

肝型脂肪酸结合蛋白(liver fatty acid binding protein, L-FABP)是脂肪酸结合蛋白(fatty acid

binding proteins, FABPs)家族成员之一。L-FABP主要表达于肝脏组织, 介导脂肪酸及多种疏水基团转运, 涉及脂类代谢疾病的发病机制。多年来其转运机制备受关注^[1-4]。过氧化物酶体增殖物激活受体- α (peroxisome proliferator-activated receptor- α , PPAR- α)是一种由配体激活的核转录因子, 属于核受体超家族成员, 具有调节脂肪代谢、炎症、免疫以及细胞分化的作用, 从而参与脂肪性肝病的发病机制^[5-7]。本文结合非酒精性脂肪肝(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)大鼠模型建立及恢复过程中肝脏病理变化及血清指标的变化, 探讨L-FABP和PPAR- α 可能的作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料 清洁级Wistar大鼠, δ , 体质量 $180\text{ g}\pm 10\text{ g}$, 购自佳木斯大学实验动物中心, 实验动物中心许可证编号: SYXK(黑)2006-004。胆固醇、胆酸盐购自北京奥博星生物技术责任有限公司, 猪油自制。TRIzol购自Invitrogen公司, TaqMan[®] Reverse Transcription Reagents, TaqMan[®] Gene Expression Master Mix, TaqMan[®] Gene Expression Assays, Power SYBR[®] Green PCR Master Mix, Rnase抑制剂均购自美国ABI公司。PPAR- α 引物引自文献[8], β -actin引物由TaKaRa公司设计并合成。

1.2 方法

1.2.1 造模及分组: 大鼠84只饲养1 wk后, 随机分为正常对照组和高脂饮食组, 每组42只, 各组又分为0、2、4、8、12、16、18 wk 7个时相组, 每时相组6只。正常对照组给予基础饲料, 高脂饮食组饲料配比如下: 基础饲料87.8%、猪油10%、胆固醇2%、胆盐0.2%, 自然采食。分别于不同时相以 0.1 g/kg 体质量氯胺酮麻醉大鼠, 腹主动脉采血, 切取肝脏右叶 $0.5\text{ cm}\times 0.4\text{ cm}\times 0.5\text{ cm}$ 大小组织块浸泡在 100 g/L 酸性甲醛固定液中, 剩余肝脏储存于液氮中备用。

1.2.2 血清中指标测定: $3\ 000\text{ r/min}$ 离心血液10 min, 取上层血清, 通过采用自动生化分析仪测定丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、三酰甘油(triglyceride, TG)、胆固醇(cholesterol, CHOL)、高密度脂蛋白胆固醇(high-density lipoprotein cholesterol, HDL-C)和低密度脂蛋白胆固醇(low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C)。

1.2.3 病理学检查: 甲醛固定后进行石蜡切片, HE染色, 观察脂肪肝程度。

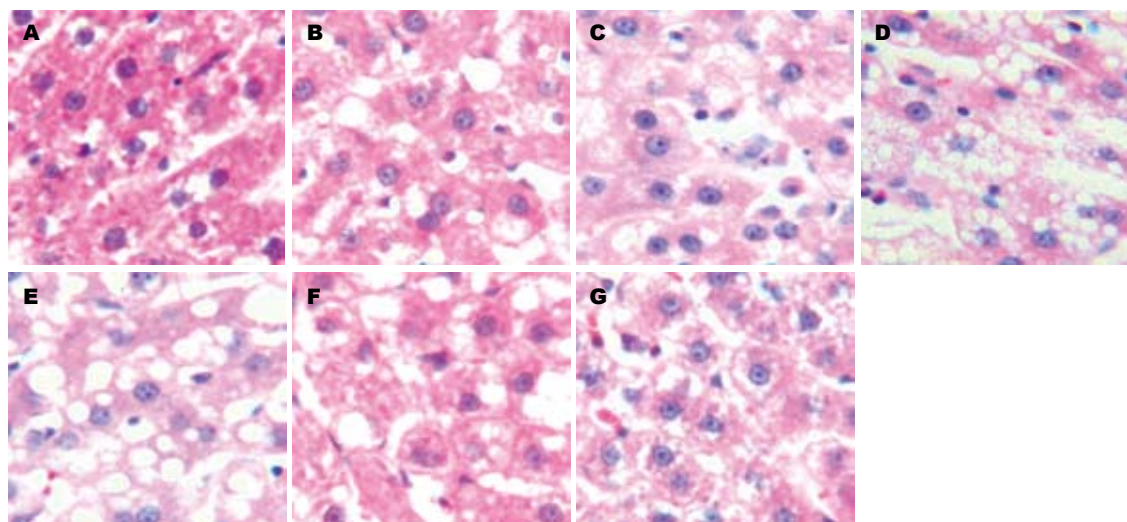


图1 大鼠脂肪肝程度(HE $\times 400$). A: 0 wk; B: A: 2 wk; C: 4 wk; D: 8 wk; E: 12 wk; F: 16 wk; G: 18 wk.

■ 相关报道

Schroeder等提出L-FABP介导支链脂肪酸至PPAR- α , 从而调控基因转录. Landrier等发现他汀类药物诱导L-FABP表达实验表明其表达水平上调机制中有PPAR- α 参与, 甚至PPAR- α 可能是他汀类药物的靶基因.

1.2.4 荧光定量RT-PCR: (1)RNA提取: 从液氮中取出肝脏组织, 研钵中边加液氮边研磨, 充分研磨, 取小米粒大小粉末放入Eppendorf管中, 加入1 mL TRIzol, 充分混匀. 加入0.2 mL氯仿, 剧烈震荡15 s, 室温孵育5 min. 4 $^{\circ}\text{C}$, 10 000 g , 离心15 min, 将0.4 mL无色水相移至另一Eppendorf管. 加入0.4 mL异丙醇, 静置10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 10 000 g 离心10 min, 弃上清. 沉淀加入750 mL/L乙醇1 mL, 洗涤沉淀物. 4 $^{\circ}\text{C}$ 7 500 r/min离心5 min, 弃上清. 自然干燥10 min, 加入10 μL DEPC处理的双蒸水溶解, 55 $^{\circ}\text{C}$ -60 $^{\circ}\text{C}$ 孵育10 min. 取1 μL 溶解好的RNA溶液, DEPC水稀释至100 μL , 微量分光光度计检测RNA纯度和浓度, 1%甲醛变性琼脂糖凝胶电泳检测RNA的完整性. (2)反转录: 依据说明书取总RNA 2 μg , 10 \times 反转录缓冲液2 μL , 100 mmol/L dNTP 0.8 μL , 10 \times 反转录随机引物2 μL , 50 U/ μL 反转录酶1 μL , 40 U/ μL RNA酶抑制剂0.5 μL , DEPC处理过的去离子水补至20 μL . 25 $^{\circ}\text{C}$ 10 min, 37 $^{\circ}\text{C}$ 120 min, 85 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存待用. (3)荧光定量PCR: 取500 ng cDNA依次梯度稀释1倍、10倍、10²倍、10³倍、10⁴倍, 分别作为模板按照以下反应体系和反应条件进行扩增, 7300 PCR仪自动生成标准曲线, 通过R²值检验标准曲线的可行性. 每一个待测指标对应一条标准曲线, 且标准曲线的模板来自同一管cDNA. 依据说明书取cDNA 50 ng, 2 \times TAQMAN PCR预混液10 μL , 20 \times 基因表达试剂盒1 μL , 灭菌去离子水补至20 μL , 50 $^{\circ}\text{C}$ 2 min预热, 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min预变性, 然后95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 40个循环. L-FABP和Actb的引物序列和探针序列均购自美国ABI公司, 编

号分别为: Rn00664587_m1, Fabp1, rCG56226, 扩增产物大小129 bp; Rn00667869_m1, Actb, rCG42822, 扩增产物大小91 bp. 依据说明书取cDNA 50 ng, 2 \times SYBR GREEN PCR预混液10 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ 的上下游引物各0.4 μL , 灭菌去离子水补至20 μL , 50 $^{\circ}\text{C}$ 2 min预热, 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min预变性, 然后95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 40个循环, 每个循环均设置荧光收集步骤: 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s. β -actin上游引物: 5'-CATCCGTAAAGACCTCTATGCCAAC-3', 下游引物: 5'-ATGGAGCCACCGATCCACA-3', 扩增产物长度171 bp. PPAR- α 上游引物: 5'-TGAACAAAGACGGGATG-3', 下游引物: 5'-TCAAACTTGGGTTCATGAT-3', 扩增产物长度106 bp.

统计学处理 实验所得计量资料用mean \pm SD表示, 应用SPSS15.0软件进行单因素方差分析(One-way ANOVA), $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义. 两两比较采用LSD检验.

2 结果

2.1 大鼠脂肪肝程度 高脂饮食脂肪肝大鼠造模过程中及恢复正常饮食过程中肝脏病理学变化见图1. 第4周时出现轻微脂肪变性, 第8周脂肪变性增强, 第12周时脂肪变性最严重, 但是并未发现明显的炎症反应. 恢复正常饮食4 wk后, 即第16周时还有较轻微的脂肪变性, 第18周恢复明显.

2.2 血清指标 高脂饮食脂肪肝大鼠造模过程中及恢复正常饮食过程中血清指标的动态变化(表1).

2.3 荧光定量RT-PCR 荧光定量RT-PCR标准曲线、溶解曲线及L-FABP和PPAR- α mRNA的动

■创新盘点

本文动态监测了高脂饮食导致脂肪肝形成过程中L-FABP和PPAR- α mRNA的表达变化,生理水平上揭示了其在脂类代谢中表达变化的相关性。

表 1 不同时相高脂组及恢复组大鼠血清中ALT、TG、CHOL、HDL-C和LDL-C的含量 ($n = 6$, mean \pm SD)

指标	对照组(0 wk)	高脂饮食组				恢复正常饮食组	
		第2周	第4周	第8周	第12周	第16周	第18周
ALT(U/L)	42.67 \pm 2.52	49.67 \pm 3.05	61.00 \pm 2.00 ^b	79.00 \pm 8.72 ^b	72.33 \pm 5.86 ^b	55.33 \pm 3.21 ^{bd}	48.67 \pm 1.53 ^d
TG(mmol/L)	0.62 \pm 0.04	0.64 \pm 0.04	0.72 \pm 0.03 ^a	0.75 \pm 0.05 ^b	0.86 \pm 0.04 ^b	0.76 \pm 0.07 ^{ac}	0.67 \pm 0.03 ^d
CHOL(mmol/L)	1.10 \pm 0.08	1.17 \pm 0.05	1.45 \pm 0.05 ^b	1.77 \pm 0.07 ^b	1.94 \pm 0.07 ^b	1.22 \pm 0.06 ^{ad}	1.17 \pm 0.02 ^d
HDL-C(mmol/L)	0.87 \pm 0.04	0.79 \pm 0.02 ^a	0.74 \pm 0.06 ^b	0.59 \pm 0.02 ^b	0.62 \pm 0.04 ^b	0.77 \pm 0.04 ^{ad}	0.81 \pm 0.03 ^d
LDL-C(mmol/L)	0.32 \pm 0.03	0.47 \pm 0.06	1.06 \pm 0.07 ^b	1.59 \pm 0.18 ^b	1.85 \pm 0.09 ^b	0.58 \pm 0.09 ^{ad}	0.38 \pm 0.03 ^d

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 对照组; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs 第12周。

表 2 不同时相的高脂组及恢复组大鼠肝脏L-FABP和PPAR- α mRNA的相对表达量 ($n = 6$, mean \pm SD)

指标	对照组(0 wk)	高脂饮食组				恢复正常饮食组	
		第2周	第4周	第8周	第12周	第16周	第18周
L-FABP	0.52 \pm 0.03	0.57 \pm 0.05	0.59 \pm 0.06 ^a	0.91 \pm 0.07 ^b	0.92 \pm 0.08 ^b	0.63 \pm 0.04 ^{bd}	0.59 \pm 0.04 ^{ad}
PPAR- α	1.13 \pm 0.07	1.15 \pm 0.06	1.05 \pm 0.09 ^a	0.89 \pm 0.04 ^b	0.85 \pm 0.07 ^b	0.94 \pm 0.09 ^{bc}	1.04 \pm 0.07 ^{ad}

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 对照组; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs 第12周。

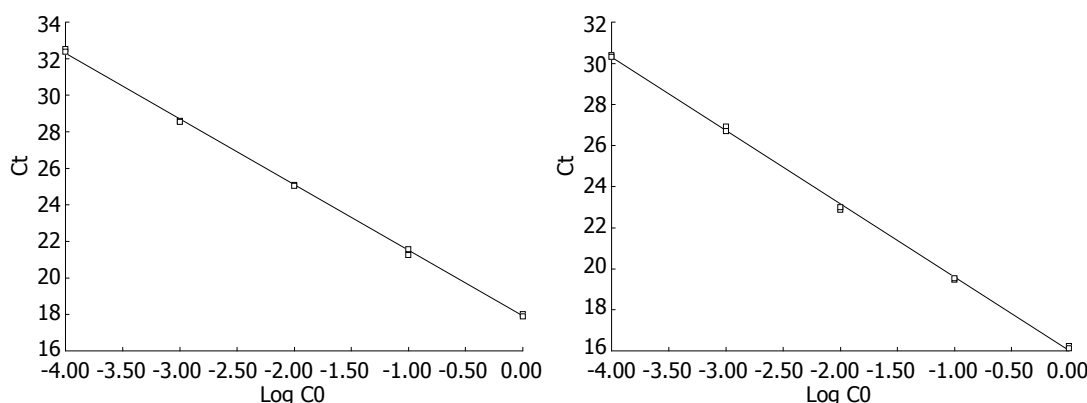


图 2 探针法检测L-FABP. A: L-FABP标准曲线; B: Actb标准曲线。

态表达量(图2, 3, 表2)。

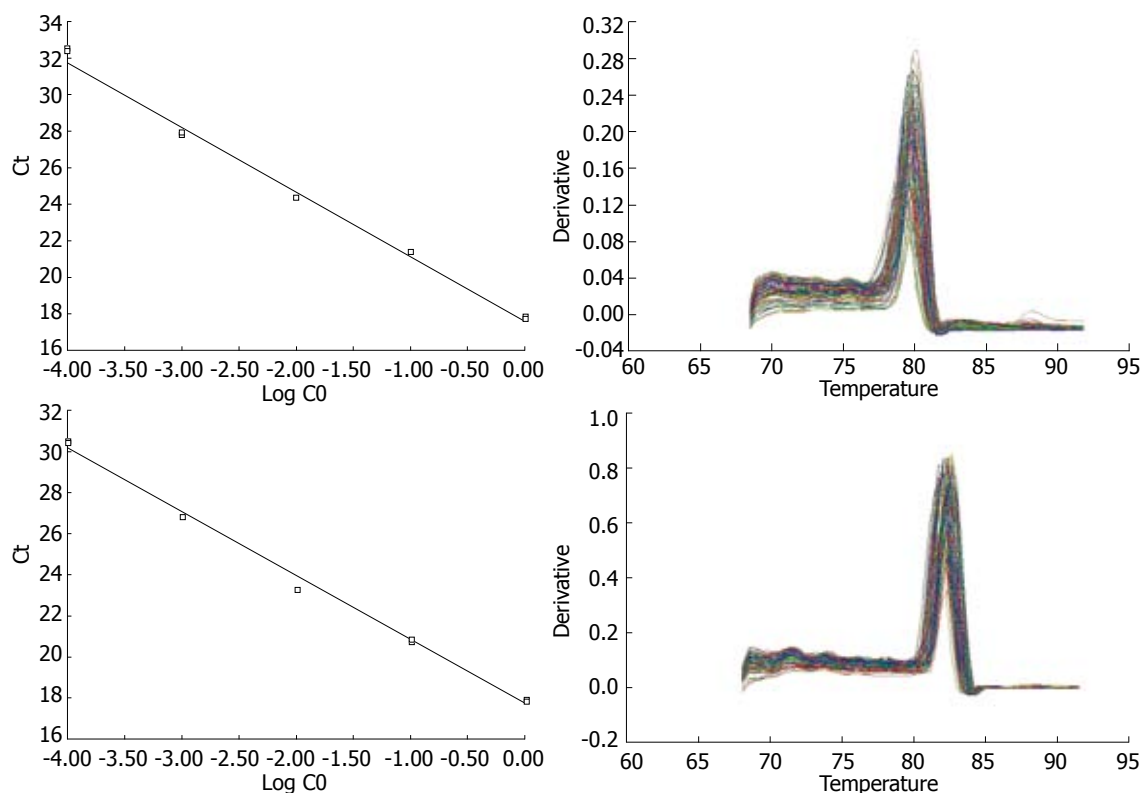
3 讨论

NAFLD是一种与代谢综合征(metabolic syndrome, MS)有关的肝病,其病程包括单纯性脂肪肝、脂肪性肝炎、脂肪性肝纤维化和肝硬化^[9]。最常见的危险因素是肥胖、糖尿病和高TG血症。其他诱因包括毒性物质、药物、先天性代谢障碍^[10-12]。NAFLD的病理生理学仍需深入研究,但是实质的证据已经揭示了几种机制。由胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)引起的过量的肝脏脂质聚积是“二次打击”学说的第一步。线粒体脂肪酸氧化引起的氧化应激, NF- κ B-依赖的炎症细胞因子表达和脂肪细胞因子是所有的被认为是导致第二次打击产生肝细胞损伤、炎症和纤维

化的潜在因素^[13-16]。

L-FABP是一种与遗传有关的脂肪酸连接蛋白家族成员,大量存在于胞质中。在许多代谢有关的疏水基团转运过程中起到重要作用,包括多不饱和脂肪酸、饱和脂肪酸、胆固醇和胆汁酸,还可以结合脂溶性肝细胞毒性物质^[17]。基因控制小鼠表明L-FABP^{-/-}小鼠体内长链脂肪酸(long-chain fatty acids, LCFA)的吸收、氧化和酯化水平都有所降低^[18-20]。PPAR- α 结合L-FABP基因启动子区是其体内表达调控所必要的,却不是足够的条件^[21]。

近来L-FABP通过增加PPAR- α 活性或者表达水平来影响LCFA代谢的可能性引起重视^[22-26]。PPAR作为核受体超家族的一员,其作用广泛,他涉及脂质和脂蛋白代谢、葡萄糖代谢、细胞增



■应用要点

本研究提示脂类代谢网络中可能存在调控关键点, 为药物治疗提供靶点. 且单纯性脂肪肝病可以通过饮食和体育锻炼逐渐好转.

图3 染料法检测PPAR- α . A: PPAR- α 标准曲线; B: β -actin溶解曲线; C: β -actin标准曲线; D: PPAR- α 溶解曲线.

殖分裂和凋亡. PPAR- α 在肝中高表达, 通过诱导线粒体和过氧化物酶体氧化水平及L-FABP基因表达来刺激脂肪酸分解代谢, 保护肝脏免受脂肪变性^[27]. ApoA-IV是人类肝脏中新发现的高度敏感性的PPAR- α 调节基因, 可能是PPAR- α 激动剂引导TG降低和HDL上升的机制之一^[28]. L-FABP与PPAR- α 有着相似的配给结合特性, 体内体外的一系列实验^[22,23]证明L-FABP很有可能作为脂肪酸和降脂类药物等PPAR- α 激动剂进入核的通道. Hostetler等^[29]首次发现葡萄糖可以直接结合PPAR- α , 改变构象. 数据表明PPAR- α 通过脂类和葡萄糖的浓度调节能量平衡, PPAR- α 介导的糖类和葡萄糖损伤不只是间接地通过增加长链脂肪酸的水平而且还可以通过葡萄糖直接作用于PPAR- α 来调节.

本实验观察脂肪肝形成及恢复过程中的病理变化, 同时检测L-FABP与PPAR- α mRNA在不同时期的动态表达. 病理切片在第4周时有轻微脂肪变性, 血清中ALT、TG、CHOL和LDL-C在脂肪肝形成过程中均有不同程度的升高直至饮食结构改变, 各指标才有所下降. HDL-C造模过程中显著下降直至饮食结构改变才有所上升. 血清指标显著性改变伴随甚至早于病理学明显改变, 说明血清指标变化可以作为脂肪肝发生

的一个重要参考. L-FABP和PPAR- α mRNA的表达与脂肪变性程度有关, 伴随脂肪变性的严重程度L-FABP mRNA首先表现为适应性升高, 升高至一定程度停止升高, 而脂肪变性则继续加重. 如果可以刺激L-FABP继续高表达, 使脂肪酸流动通畅, 可能在一定程度上减轻脂肪肝程度, 或者延迟脂肪肝的发生. PPAR- α mRNA伴随脂肪变性的严重程度一直降低直至饮食结构改变. 通过药物诱导PPAR- α 表达, 调节脂肪酸代谢相关基因的表达, 改善IR, 减缓脂肪变性, 可以作为治疗脂肪变性的一个途径. L-FABP介导配基进入细胞核激活PPAR- α 转录进而增加脂类物质燃烧, 影响脂类和葡萄糖的代谢和储存^[23], 但本实验高脂饮食过程中L-FABP mRNA的升高与PPAR- α mRNA的降低似乎是矛盾的. PPAR- α 配基的载体可能不止L-FABP一种, PPAR- α 的表达调控也没有揭示清楚. 脂肪变性机制将为患者早期发现和治疗靶位提供帮助, 且合理饮食可以有效改善肝脏脂肪变性程度.

4 参考文献

- 1 Rajaraman G, Roberts MS, Hung D, Wang GQ, Burczynski FJ. Membrane binding proteins are the major determinants for the hepatocellular transmembrane flux of long-chain fatty acids bound

■同行评价

本文具有一定的探索价值, 对非酒精性脂肪肝发病机制提供了一些有价值的信息。

- 2 Hung DY, Burczynski FJ, Chang P, Lewis A, Masci PP, Siebert GA, Anissimov YG, Roberts MS. Fatty acid binding protein is a major determinant of hepatic pharmacokinetics of palmitate and its metabolites. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003; 284: G423-G433
- 3 Hung DY, Siebert GA, Chang P, Burczynski FJ, Roberts MS. Reduced hepatic extraction of palmitate in steatosis correlated to lower level of liver fatty acid binding protein. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 288: G93-G100
- 4 张虎, 朱金玲, 张玉萍, 罗佳滨. 肝型脂肪酸结合蛋白与脂类转运. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 3065-3069
- 5 徐磊, 厉有名. 过氧化物酶体增殖物激活受体- α 在脂肪性肝病发病机制中的作用. *中华肝脏病杂志* 2005; 13: 715-717
- 6 石巧娟, 刘月环, 楼琦, 卢领群, 周莎桑, 柯贤福, 萨晓婴. 非酒精性脂肪肝大鼠PPAR- α 基因表达及脂代谢和胰岛素水平的变化. *中国比较医学杂志* 2009; 19: 26-31
- 7 Kersten S, Desvergne B, Wahli W. Roles of PPARs in health and disease. *Nature* 2000; 405: 421-424
- 8 Hoekstra M, Kruijt JK, Van Eck M, Van Berkel TJ. Specific gene expression of ATP-binding cassette transporters and nuclear hormone receptors in rat liver parenchymal, endothelial, and Kupffer cells. *J Biol Chem* 2003; 278: 25448-25453
- 9 Duvnjak M, Lerotic I, Barsic N, Tomasic V, Virovic Jukić L, Velagic V. Pathogenesis and management issues for non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 4539-4550
- 10 Bayard M, Holt J, Boroughs E. Nonalcoholic fatty liver disease. *Am Fam Physician* 2006; 73: 1961-1968
- 11 Abdelmalek MF, Diehl AM. Nonalcoholic fatty liver disease as a complication of insulin resistance. *Med Clin North Am* 2007; 91: 1125-1149, ix
- 12 Charlton M. Nonalcoholic fatty liver disease: a review of current understanding and future impact. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2004; 2: 1048-1058
- 13 田培营, 王炳芳. 非酒精性脂肪肝研究进展. *同济大学学报(医学版)* 2006; 27: 46-48
- 14 Hanley AJ, Williams K, Festa A, Wagenknecht LE, D'Agostino RB Jr, Haffner SM. Liver markers and development of the metabolic syndrome: the insulin resistance atherosclerosis study. *Diabetes* 2005; 54: 3140-3147
- 15 Marchesini G, Bugianesi E, Forlani G, Cerrelli F, Lenzi M, Manini R, Natale S, Vanni E, Villanova N, Melchionda N, Rizzetto M. Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. *Hepatology* 2003; 37: 917-923
- 16 李继昌. 非酒精性脂肪肝. *中国医刊* 2006; 41: 327-328
- 17 Chuang S, Velkov T, Horne J, Porter CJ, Scanlon MJ. Characterization of the drug binding specificity of rat liver fatty acid binding protein. *J Med Chem* 2008; 51: 3755-3764
- 18 Binas B, Erol E. FABPs as determinants of myocellular and hepatic fuel metabolism. *Mol Cell Biochem* 2007; 299: 75-84
- 19 Newberry EP, Kennedy SM, Xie Y, Sternard BT, Luo J, Davidson NO. Diet-induced obesity and hepatic steatosis in L-Fabp / mice is abrogated with SF, but not PUFA, feeding and attenuated after cholesterol supplementation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008; 294: G307-G314
- 20 Newberry EP, Xie Y, Kennedy S, Han X, Buhman KK, Luo J, Gross RW, Davidson NO. Decreased hepatic triglyceride accumulation and altered fatty acid uptake in mice with deletion of the liver fatty acid-binding protein gene. *J Biol Chem* 2003; 278: 51664-51672
- 21 Fujishiro K, Fukui Y, Sato O, Kawabe K, Seto K, Motojima K. Analysis of tissue-specific and PPARalpha-dependent induction of FABP gene expression in the mouse liver by an in vivo DNA electroporation method. *Mol Cell Biochem* 2002; 239: 165-172
- 22 Wolfrum C, Borrmann CM, Borchers T, Spener F. Fatty acids and hypolipidemic drugs regulate peroxisome proliferator-activated receptors alpha - and gamma-mediated gene expression via liver fatty acid binding protein: a signaling path to the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 2323-2328
- 23 Schroeder F, Petrescu AD, Huang H, Atshaves BP, McIntosh AL, Martin GG, Hostetler HA, Vespa A, Landrock D, Landrock KK, Payne HR, Kier AB. Role of fatty acid binding proteins and long chain fatty acids in modulating nuclear receptors and gene transcription. *Lipids* 2008; 43: 1-17
- 24 Huang H, Starodub O, McIntosh A, Kier AB, Schroeder F. Liver fatty acid-binding protein targets fatty acids to the nucleus. Real time confocal and multiphoton fluorescence imaging in living cells. *J Biol Chem* 2002; 277: 29139-29151
- 25 Erol E, Kumar LS, Cline GW, Shulman GI, Kelly DP, Binas B. Liver fatty acid binding protein is required for high rates of hepatic fatty acid oxidation but not for the action of PPARalpha in fasting mice. *FASEB J* 2004; 18: 347-349
- 26 Landrier JF, Thomas C, Grober J, Duez H, Percevault F, Souidi M, Linard C, Staels B, Besnard P. Statin induction of liver fatty acid-binding protein (L-FABP) gene expression is peroxisome proliferator-activated receptor-alpha-dependent. *J Biol Chem* 2004; 279: 45512-45518
- 27 Tanaka T, Masuzaki H, Nakao K. [Role of PPARs in the pathophysiology of nonalcoholic fatty liver disease] *Nippon Rinsho* 2005; 63: 700-706
- 28 Nagasawa M, Akasaka Y, Ide T, Hara T, Kobayashi N, Utsumi M, Murakami K. Highly sensitive upregulation of apolipoprotein A-IV by peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) agonist in human hepatoma cells. *Biochem Pharmacol* 2007; 74: 1738-1746
- 29 Hostetler HA, Huang H, Kier AB, Schroeder F. Glucose directly links to lipid metabolism through high affinity interaction with peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *J Biol Chem* 2008; 283: 2246-2254

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

野生型XPD转染对胆管癌QBC939细胞生物学行为的影响

王振杰, 龚辉, 龚丹, 朱水山

王振杰, 朱水山, 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 江西省南昌市 330006

龚辉, 南昌大学第四附属医院感染科 江西省南昌市 330013
龚丹, 南昌大学第二附属医院小儿科 江西省南昌市 330006

王振杰, 硕士, 主要从事消化系肿瘤基因治疗的基础研究.

作者贡献分布: 王振杰、龚辉、龚丹及朱水山对此文所作贡献均等; 此课题由朱水山与王振杰设计; 研究过程由王振杰、龚辉及龚丹共同操作完成; 数据分析与论文写作由王振杰与龚辉完成, 朱水山审核.

通讯作者: 朱水山, 教授, 330006, 江西省南昌市, 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.

shuishanzhuxh@yahoo.cn

电话: 0791-6277519

收稿日期: 2010-03-06 修回日期: 2010-05-05

接受日期: 2010-05-10 在线出版日期: 2010-05-28

Transfection of the wild-type xeroderma pigmentosum group D gene alters the biological behavior of human cholangiocarcinoma cell line QBC939

Zhen-Jie Wang, Hui Gong, Dan Gong, Shui-Shan Zhu

Zhen-Jie Wang, Shui-Shan Zhu, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Jiangxi Provincial Key Laboratory of Molecular Medicine, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China

Hui Gong, Department of Infectious Diseases, the Fourth Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330013, Jiangxi Province, China

Dan Gong, Department of Pediatrics, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China

Correspondence to: Professor Shui-Shan Zhu, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Jiangxi Provincial Key Laboratory of Molecular Medicine, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China. shuishanzhuxh@yahoo.cn

Received: 2010-03-06 Revised: 2010-05-05

Accepted: 2010-05-10 Published online: 2010-05-28

Abstract

AIM: To investigate the impact of transfection of the wild-type xeroderma pigmentosum group D (XPD) gene on the biological behavior of human cholangiocarcinoma cell line QBC939.

METHODS: Empty plasmid pEGFP-N2 and recombinant plasmid pEGFP-N2-XPD were digested with *KPN* I, *BGI* II and *SPH* I for plasmid identification. Cells were divided into four groups:

pEGFP-N2-XPD group, pEGFP-N2 group, Lipofectamine (Lip) group, and blank control group. Cells were transfected with Lipofectamine. The expression of green fluorescent protein (GFP) was observed under a fluorescence microscope. The mRNA expression of wild-type XPD, *p53*, cyclin D1 and *c-myc* was detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Flow cytometry (FCM) was employed for examining the cell cycle of transfected QBC939 cells. Cell proliferation was detected by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay.

RESULTS: The relative expression level of XPD mRNA in the pEGFP-N2-XPD group was significantly higher than those in the pEGFP-N2 group, Lip group and blank control group (0.778 ± 0.018 vs 0.561 ± 0.039 , 0.544 ± 0.035 and 0.542 ± 0.034 , respectively; all $P < 0.01$). The relative expression level of *p53* mRNA in the pEGFP-N2-XPD group was also significantly higher than those in the pEGFP-N2 group, Lip group and blank control group (0.421 ± 0.019 vs 0.256 ± 0.014 , 0.267 ± 0.015 and 0.274 ± 0.018 , respectively; all $P < 0.01$). The relative expression level of cyclin D1 mRNA in the pEGFP-N2-XPD group was significantly lower than those in the pEGFP-N2 group, Lip group and blank control group (0.339 ± 0.041 vs 0.560 ± 0.039 , 0.558 ± 0.050 and 0.560 ± 0.041 , respectively; all $P < 0.01$). The relative expression level of *c-myc* mRNA in the pEGFP-N2-XPD group was also significantly lower than those in the pEGFP-N2 group, Lip group and blank control group (0.355 ± 0.045 vs 0.570 ± 0.075 , 0.560 ± 0.041 and 0.537 ± 0.050 , respectively; all $P < 0.01$). FCM results showed that the percentage of cells in G₁ phase was significantly higher (81.65% vs 65.54%, 56.61% and 63.26%, respectively; all $P < 0.05$) and that in S1 phase was significantly lower (11.83% vs 24.10%, 29.52% and 27.28%; all $P < 0.05$) in the pEGFP-N2-XPD group than in the pEGFP-N2 group, Lip group and blank control group. MTT assay revealed that the growth rate of cells in the pEGFP-N2-XPD group was significantly lower than those in the other three groups (all $P < 0.01$).

CONCLUSION: Transfection of the wild-type

■背景资料

胆管癌由于其解剖位置特殊, 恶性程度高, 且起病隐匿, 早期诊断率很低. 胆管癌5年生存率不足5%. 中位生存期为18-30 mo. 早期手术根治切除为唯一治愈方法, 然而术后5年再发率高. 对于晚期胆管癌, 常选择化疗, 但效果甚微. 近年胆管癌发病率升高, 且病因不明. 因此, 积极寻找一条有效的新的胆管癌治疗途径, 显得尤为重要.

■同行评议者

邵升, 副教授, 哈尔滨医科大学附属二院肝胆外科

■研究前沿

近30年来胆管癌发病率增高趋势明显,但治疗效果不佳,目前尚无统一的治疗标准,已成为消化系统疾病的研究热点,现阶段仍无有效的治疗手段。

XPD gene can inhibit the proliferation of human QBC939 cells *in vitro*, down-regulate the expression of cyclin D1 and *c-myc* mRNAs, and up-regulate the expression of *p53* mRNA.

Key Words: Cholangiocarcinoma; QBC939; Xeroderma pigmentosum group D; *c-myc*; Cyclin D1; *p53*; Cell cycle

Wang ZJ, Gong H, Gong D, Zhu SS. Transfection of the wild-type xeroderma pigmentosum group D gene alters the biological behavior of human cholangiocarcinoma cell line QBC939. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(15): 1531-1536

摘要

目的: 探讨野生型XPD基因对人胆管癌QBC939细胞的生物学影响。

方法: 用碱裂解法提取空载质粒pEGFP-N2和重组质粒pEGFP-N2-XPD, 提取出的质粒以KPN I、BGI II和SPH I酶切鉴定。实验分4组, 重组质粒pEGFP-N2-XPD组、空载质粒pEGFP-N2组、脂质体组, 并用具有相同遗传背景和代数的QBC939细胞作为空白对照。用脂质体转染法瞬时转染四组细胞。荧光显微镜下观察转染后绿色荧光蛋白报告基因表达情况。提取各组细胞总RNA, 合成cDNA, 用聚合酶链反应(PCR)检测4组细胞中XPD、*p53*、cyclin D1、*c-myc*表达情况。并用四甲基偶氮唑盐(MTT)和流式细胞仪检测细胞增殖及其细胞周期的变化。

结果: pEGFP-N2-XPD细胞与pEGFP-N2、脂质体组和空白对照组相比, XPD mRNA表达量明显增加(0.778 ± 0.018 vs 0.561 ± 0.039 , 0.544 ± 0.035 , 0.542 ± 0.034 , 均 $P < 0.01$)。pEGFP-N2-XPD细胞中*p53* mRNA相对表达量与pEGFP-N2、脂质体组和空白对照组比较具有统计学意义(0.421 ± 0.019 vs 0.256 ± 0.014 , 0.267 ± 0.015 , 0.274 ± 0.018 , 均 $P < 0.01$)。pEGFP-N2-XPD细胞与其他组相比, cyclin D1 mRNA相对表达量明显降低(0.339 ± 0.041 vs 0.560 ± 0.039 , 0.558 ± 0.050 , 0.560 ± 0.041 , 均 $P < 0.01$)。pEGFP-N2-XPD细胞与其他组相比, *c-myc* mRNA相对表达量明显降低(0.355 ± 0.045 vs 0.570 ± 0.075 , 0.560 ± 0.041 , 0.537 ± 0.050 , 均 $P < 0.01$)。流式细胞仪检测pEGFP-N2-XPD组细胞周期G₁期为81.65%, S期为11.83%, 其他组G₁期分别为65.54%、56.61%、63.26%; S期分别为24.10%、29.52%、27.28%, 结果具有统计学意义($P < 0.05$)。MTT检测示pEGFP-N2-XPD细胞生长率为 0.249 ± 0.02 , 与其他组相比, 细胞增殖力明显减弱($P < 0.01$)。

结论: 野生型XPD基因可以抑制胆管癌细胞的生长, XPD基因可抑制*c-myc*、cyclin D1基因的表达, 增加*p53*基因表达。

关键词: 胆管癌; QBC939细胞; XPD; *c-myc*; Cyclin D1; *p53*; 细胞周期

王振杰, 龚辉, 龚丹, 朱水山. 野生型XPD转染对胆管癌QBC939细胞生物学行为的影响. *世界华人消化杂志* 2010; 18(15): 1531-1536

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/1531.asp>

0 引言

胆管癌(cholangiocarcinoma, CCA)是指来源于胆管系统上皮组织的恶性肿瘤, 包括肝内胆管癌和肝外胆管癌, 由于胆管癌起病隐匿、缺乏典型的症状和体征, 早期诊断困难, 且由于所处解剖位置的特殊性及其向周围组织、血管神经浸润的特点; 临床上手术切除率低, 预后差^[1-3]。近年来, 胆管癌的发病率与死亡率有递增趋势, 已成为胆道学科研究的热点之一^[4]。因此, 开辟一条新的有效治疗途径显得尤为重要。XPD蛋白是哺乳动物基本转录因子II H(TF II H)复合物的第二大亚基, 他与XPB、TTDA共同构成转录因子TFIIH的10个亚单位, 除具有核酸切除修复、基础转录和细胞周期调控作用^[5], 并影响多种癌基因及抑癌基因的表达, 还与肿瘤的形成甚至化疗药物耐药性的产生等多种生理及病理机制有关^[6]。本研究通过瞬时转染本实验室首次在国内构建带绿色荧光蛋白表达的pEGFP-N2-XPD重组表达质粒, 探讨XPD、*p53*、cyclin D1与*c-myc*之间相互作用, 以及转染野生型XPD基因前后胆管癌QBC939细胞生物学变化。

1 材料和方法

1.1 材料 人胆管癌细胞QBC-939购自中国典型培养物保藏中心。重组带绿色荧光蛋白质粒pEGFP-N2-XPD是本实验室国内首次构建的。RPMI 1640培养基(美国Gibco BRL公司), 胎牛血清(南非Hyclone公司), 胰蛋白酶(美国Sigma公司), M-MLV Reverse Transcriptase、Rnasin、dNTP、Oligo(dT)15(美国Promega公司), Lipofectamine 2000™、TRIzol™试剂(美国Invitrogen公司), DMSO、DEPC(美国Amresco公司), PCR引物由上海生物工程技术服务有限公司合成, Taq酶(日本TaKaRa公司), DNA 2000 Ladder Marker(北京华美生物工程公司), 北京天根无内毒素质粒大提试剂盒, 四甲基偶氮唑盐(MTT)为

上海普飞生物技术有限公司生产。

1.2 方法

1.2.1 引物设计: 根据Genbank上公布的人类XPD mRNA序列、*p53* mRNA序列、cyclin D1 mRNA序列以及*c-myc* mRNA序列, 应用Primer Premier 5软件设计引物, 由上海生工生物工程公司合成, XPD上下游引物分别为5'-TCTGCCTCTGCCCTATGAT-3'及5'-CGATTCCTCGGACACTTT-3', 扩增产物363 bp; *p53*上下游引物分别为5'-CCCAAGCAATGGATGAT-3'及5'-TGACAGGAAGCCAAAGG-3', 扩增产物379 bp; cyclin D1上下游引物分别为5'-GCGAGGAACAGAAAGTGCG-3'及5'-AGGCGGTAGTAGGACAGGAA-3', 扩增产物484 bp; *c-myc*上下游引物分别为5'-AACCCCTTGCCGCATCCAC-3'及5'-CCTCCTCGTCGCAGTAGAAA-3', 扩增产物317 bp。同一标本扩增以 β -actin作为内参照。 β -actin上下游引物分别为5'-CTTCCTGGGCATGGAGTC-3'、5'-GCCGATCCACACGGAGTA-3', 扩增产物232 bp。

1.2.2 分组及处理: 常规方法培养及转染胆管癌QBC-939细胞, 实验分为4组: (1)pEGFP-N2-XPD组; (2)pEGFP-N2组; (3)脂质体组; (4)空白对照组。将胆管癌细胞QBC939种于六孔板内, 每孔细胞数 2×10^5 , 待细胞覆盖率达70%后, 用0.01 mol/L磷酸盐缓冲液洗涤细胞2次, 于4孔中分别加入无血清1640培养液2 mL培养24 h后, 于2、3、4处理组中分别用Lipofectamine 2000加入pEGFP-N2-XPD、pEGFP-N2、脂质体(Lip)转染各组细胞, 置孵箱内培养48 h后, 收集细胞做逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)。

1.2.3 RT-PCR法检测各组细胞mRNA表达: 采用TRIzol试剂提取细胞总RNA, 合成cDNA。PCR扩增XPD、*p53*、cyclin D1及*c-myc*, 应用Primer Premier 5软件设计引物, 由上海生工生物工程公司合成, XPD上下游引物分别为5'-TCTGCCTCTGCCCTATGAT-3'及5'-CGATTCCTCGGACACTTT-3', 扩增产物363 bp; *p53*上下游引物分别为5'-CCCAAGCAATGGATGAT-3'及5'-TGACAGGAAGCCAAAGG-3', 扩增产物379 bp; cyclin D1上下游引物分别为5'-GCGAGGAACAGAAAGTGCG-3'及5'-AGGCGGTAGTAGGACAGGAA-3', 扩增产物484 bp; *c-myc*上下游引物分别为5'-AACCCCTTGCCGCATCCAC-3'及5'-CCTCCTCGTCGCAGTAGAAA-3', 扩增产物317 bp。同一

标本扩增以 β -actin作为内参照。 β -actin上下游引物分别为5'-CTTCCTGGGCATGGAGTC-3'、5'-GCCGATCCACACGGAGTA-3', 扩增产物232 bp。PCR通过94 °C预变性5 min, 94 °C 45 s, 55 °C 60 s, 72 °C 45 s, 35个循环后72 °C终末延伸10 min。PCR产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳(含5 mg/L溴化乙啶)后, 在紫外灯下观察结果。通过FR200图像分析软件(上海复日公司)读取目的电泳条带的斑点密度扫描值, 以各组 β -actin条带的扫描值为标准, 测算其相应组的XPD、*p53*、cyclin D1以及*c-myc*的mRNAs表达量。

1.2.4 四甲基偶氮唑盐(MTT)法检测细胞活性: 用酶联免疫检测仪在490 nm波长处测定其吸光度(A)值, 以间接反映各组活细胞数量。

1.2.5 流式细胞仪检测细胞周期: 用胰酶消化收集上述各组转染后的细胞, 应用FACSCalibur流式细胞仪(Beckton Dickinson, USA)分析, 氩离子激光器激发波长为488 nm, 在流式细胞仪上进行细胞周期分析, 得出细胞各周期的百分率。

统计学处理 数据以mean \pm SD表示, 应用SPSS12.0统计软件进行数据处理, 采用单因素方差分析, 并用LSD法行两两比较, 检验显著性水准取 $\alpha = 0.05$, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组细胞mRNA的表达 RT-PCR法检测结果显示, pEGFP-N2-XPD组中XPD的相对表达量为 0.778 ± 0.018 , 而pEGFP-N2组、Lip组、空白对照组的XPD相对表达量分别为 0.561 ± 0.040 、 0.544 ± 0.035 、 0.542 ± 0.034 。pEGFP-N2-XPD组与其他3组比较差异均有统计学意义($F = 198$, q 分别为18.94、20.42和20.58, 均 $P < 0.01$)。 *p53*的表达量pEGFP-N2-XPD组均较pEGFP-N2组、脂质体(Lip)组、空白对照组增高明显($P < 0.01$), 而cyclin D1及*c-myc*的表达量pEGFP-N2-XPD组较pEGFP-N2组、脂质体(Lip)组、空白对照明显降低($P < 0.01$)。 pEGFP-N2组、脂质体(Lip)组、空白对照组之间XPD、*p53*、cyclin D1以及*c-myc*的表达差异无统计学意义(表1, 图1)。

2.2 MTT结果 pEGFP-N2-XPD组、pEGFP-N2组、脂质体组及空白对照组A值分别为 0.249 ± 0.022 、 0.382 ± 0.025 、 0.375 ± 0.028 及 0.387 ± 0.033 , 差异有统计学意义($F = 46.71$, $P < 0.01$), pEGFP-N2-XPD组的A值明显低于pEGFP-N2组、脂质体组及空白对照组($t = 11.30$ 、 10.01 、 9.841 , 均 $P < 0.01$)。

■ 相关报道

梁刚等研究报道, XPD 312Asn等位基因以及751Gln等位基因可能是中国上海地区人群胆管癌尤其是壶腹部癌的遗传易感因素。

■ 创新盘点

本文以野生型XPD基因转染胆管癌QBC939细胞,观察转染前后*p53*、cyclin D1、*c-myc*基因表达及细胞的生物学变化,初步探讨XPD、*p53*、cyclin D1及*c-myc*之间的相互作用关系。

表 1 各组细胞RT-PCR结果分析 ($n = 6$)

分组	XPD	<i>p53</i>	cyclin D1	<i>c-myc</i>
pEGFP-N2-XPD组	0.778 ± 0.018	0.421 ± 0.019	0.339 ± 0.041	0.355 ± 0.045
pEGFP-N2组	0.561 ± 0.039	0.256 ± 0.014	0.560 ± 0.039	0.570 ± 0.075
Lip组	0.544 ± 0.035	0.267 ± 0.015	0.558 ± 0.050	0.566 ± 0.048
空白对照组	0.542 ± 0.034	0.274 ± 0.018	0.560 ± 0.041	0.537 ± 0.050
<i>F</i> 值	198.00	63.45	12.93	15.67

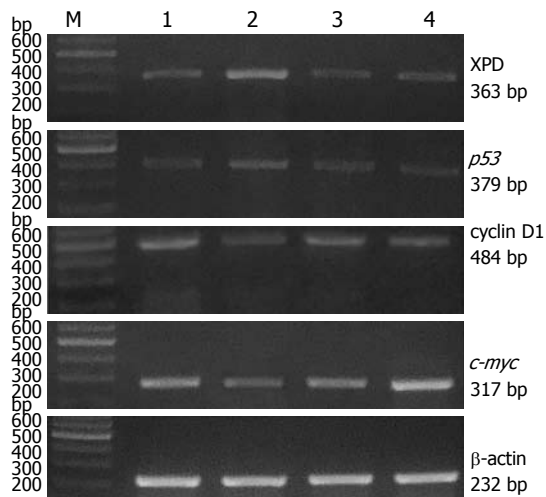


图 1 PCR产物电泳图. M: 相对分子质量标准; 1: pEGFP-N2组; 2: pEGFP-N2-XPD组; 3: Lip组; 4: 空白对照组.

2.3 流式细胞仪检测 pEGFP-N2-XPD组细胞周期G₁期为81.65%, S期为11.83%, pEGFP-N2组、Lip组、空白对照组G₁期分别为65.54%、56.61%、63.26%; S期分别为24.10%、29.52%、27.28%(图2). 由此可见, pEGFP-N2-XPD组细胞停滞G₁期的细胞明显增多, 而进入S期的细胞则显著减少.

3 讨论

肿瘤的发生是由于致癌物质、多基因协同作用的结果, 表现为基因突变、缺失、扩增、重排或表达失调, 从而使正常细胞分裂增殖能力增强和成熟分化能力减弱或分化异常. 环境致癌物及其代谢产物攻击机体细胞引起DNA损伤, 而DNA修复是维持人类基因组完整性的核心, 当DNA损伤不能及时有效地修复, 积累到一定程度导致基因组不稳定性升高, 引起细胞增殖和分化失控, 导致肿瘤的发生. 因此, DNA修复与肿瘤发生有着密不可分的联系, DNA修复能力的个体差异是决定肿瘤易感性的重要因素, DNA修复能力的下降常易发生癌变^[7]. XPD是哺乳动物基本TF II H核心成分之一, 参与基因转

录、核苷酸切除修复(NER)及细胞周期调控, 并影响多种抑癌基因和癌基因的表达^[8]. 研究表明, XPD基因还可激活*p53*, 并且影响其生物活性^[9]. XPD基因发生突变时, 机体发生肿瘤几率升高.

野生型*p53*功能的缺失是癌症发生的一个重要阶段. 野生型*p53*是公认的抑癌基因, 正常野生型*p53*活化后可诱导多种细胞生物学行为, 如调控细胞周期、诱导细胞凋亡、DNA修复以及抑制血管生成等, *p53*已发展为肿瘤基因治疗中非常有利的靶基因^[10]. *p53*是DNA损伤检控点中最关键的激活因子, 在细胞周期中, P53蛋白通过阻止G₁期细胞进入S期, 使受损的DNA或染色体有时间得以修复, 细胞周期中G₁/S期或G₂期的调控, 依赖于*p53*的活性^[11]. *p53*通常依靠对其下游因子的激活或抑制来调节细胞的生长与凋亡. *p53*可在多种信号因素作用下活化, 其中包括致癌因素诱导的DNA损伤和不正常的增殖信号. 现已研究表明多种人体肿瘤有*p53*基因突变或表达降低^[12]. 也有实验提示某些抗肿瘤药物对胆管癌细胞QBC939作用机制与其诱导*p53*上调相关^[13]. *p53*功能异常引起细胞癌变有两个途径: (1)失去适当的细胞周期停滞将引起不适当的DNA修复, 并且将固定的DNA损伤通过突变传递给子细胞; (2)当*p53*不再具有诱导凋亡作用, 这将使带有固定DNA损伤的细胞残存下来, 并再导致基因突变, 从而使细胞生长失控, 最终发展为癌^[14]. 抑癌基因*p53*不仅具有转录和DNA修复的重要作用, 而且与TF II H存在物理上和功能上的相互联系^[15].

同时, 肿瘤也是一种细胞周期性疾病. 异常的G₁-S细胞周期是胆管癌发生的主要机制之一^[16]. 正常细胞在生长因子的刺激下G₁期cyclin D1可与他的伴侣分子CDK4或CDK6结合进入胞核并被激活形成cyclin D1与CDK4/6的复合物, 使下游的蛋白质Rb(retinoblastoma protein; pRb)及其相关蛋白磷酸化, 磷酸化的pRb可解除对E2F等基因转录因子的抑制作用, 从而启动细胞DNA

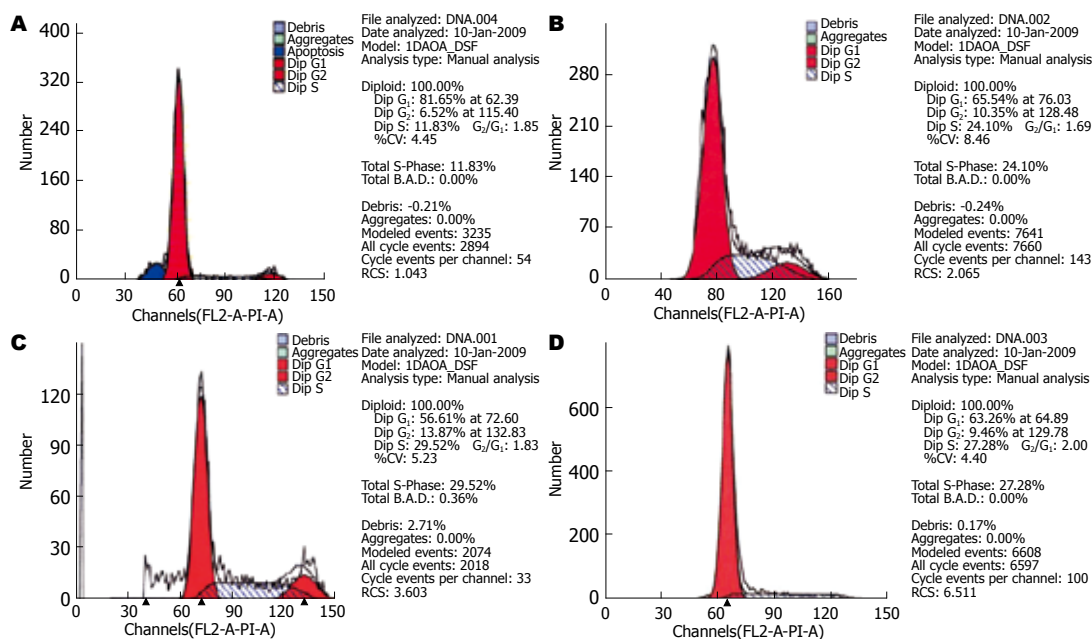


图2 各组细胞流式仪检测结果. A: pEGFP-N2-XPD组; B: pEGFP-N2组; C: Lip组; D: 空白对照组.

复制, 细胞通过G₁期进入S期. pRb作为cyclin D1与CDK4/CDK6的底物, 其磷酸化对细胞周期在G₁期的控制起关键作用. 当培养细胞中cyclin D1过度表达时可提高细胞周期转换速度, 促进细胞从G₁期进入S期, 细胞增殖失控, 发展为癌^[17]. 有研究提示胆管癌细胞中cyclin D1常常出现过表达, 且cyclin D1的表达与胆管癌临床预后密切相关^[18]. 若cyclin D1过表达, 结合p53的失活, 则将导致细胞的无限增殖化, 乃至肿瘤的发生. 有研究应用野生型p53结合反义cyclin D1可明显增强对肿瘤的凋亡诱导效果, 表明二者具有协同效应^[19].

*c-myc*在多种肿瘤中常常过表达, 如肝癌、胃癌、乳腺癌、宫颈癌等, 现在认为*c-myc*是重要的细胞调控基因, 其表达产物是细胞增殖信号转导的必需因子, 也是G₁期到S期的启动子. *c-myc*在多种肿瘤中常常过表达, 影响细胞的生长与增殖, 阻断细胞分化, 过表达时可促使肿瘤形成^[11]. 已有研究表明^[21], XPD突变可以阻断叶酸结合蛋白(FBP)的活化, 而后的活化可以使*c-myc*表达下降. 当XPD发生缺陷或突变时, *c-myc*表达量常增加. p53缺乏或突变也可以促使*c-myc*过表达, 促进癌细胞生长, 细胞凋亡减少.

本研究把野生型XPD基因瞬时转染胆管癌QBC939细胞, 发现胆管癌QBC939细胞中*c-myc*、cyclin D1基因在转录水平表达量明显下降($P<0.01$), 而p53基因在转录水平明显升高($P<0.01$), 细胞周期停滞在G₁期, 不能进入S

■名词解释

XPD蛋白: 基础转录因子TFⅡH复合物的第二大亚基, 在核苷酸切除修复(NER)中, 从5'→3'方向解开受损DNA双链, 使损伤特异性核酸酶切下受损DNA. 大量研究发现, XPD在TFⅡH介导的和转录过程中发挥重要作用, 并与细胞增殖、凋亡、肿瘤的发生甚至化疗药物抗药性的产生等多种生理及病理机制有关.

期, 胆管癌细胞QBC939增殖明显受抑($P<0.01$). XPD抑制胆管癌QBC939细胞增殖可能是通过与其他癌基因及抑癌基因相互作用而实现的, 其可能的机制: (1)XPD基因可以激活p53, 进一步激活DNA损伤检控点, 并且XPD基因与野生型p53结合促使损伤的基因得到修复; (2)XPD基因通过激活p53, 在DNA损伤时, 野生型p53积累, 上调其下游p21靶基因表达, p21表达产物P21^{WAF1}蛋白是一种依赖cyclin激酶(cdk)的抑制剂^[22]. 作为对p53的高表达和DNA损伤的应答, P21^{WAF1}蛋白主要结合于G₁期和S期的cyclin-cdk复合体, 与cyclin D1竞争结合CDK4/6, 使pRb无法磷酸化而抑制细胞周期进程, 导致G₁期阻滞, 使细胞在进入S期之前得以修复损伤的DNA. 再者, cyclin D1又是p53的间接靶基因, 一方面p53可通过诱导PC3基因介导的直接或间接抑制pRb功能来抑制cyclin D1转录和cyclin D1启动子活性从而下调cyclin D1表达并使细胞停滞于G₁期^[23]; 另一方面p53还可以选择性下调Bcl-3蛋白水平和诱导增加P52 NF-kappaB亚单位活性, 抑制cyclin D1启动子活性, 降低cyclin D1蛋白和mRNA的表达水平, 进而导致细胞在G₁阻滞^[24], 抑制细胞增殖; (3)XPD基因与野生型p53相互作用抑制*c-myc*转录, p53能通过结合转录因子E2F, 使E2F不能与*c-myc*的启动子结合, 致*c-myc*的表达量下降, 实现对细胞周期的阻滞, 且XPD活化Fuse结合蛋白(fuse binding protein, FBP), FBP是*c-myc*基因表达所必需的蛋白, 而FBP活化后结

■同行评价

本研究立意新颖,方法合理,结果可靠,具有较好的学术价值。

合*c-myc*基因单链上游活化元件来使*c-myc*的表达下降^[25],使细胞的生长能力减弱,抑制胆管癌的增殖。本组认为XPD抑制胆管癌细胞增殖的机制可能是多方面的,XPD与*p53*、cyclin D1、*c-myc*之间的相互作用具体机制尚未完全明了,有待于以后进一步深入研究。

4 参考文献

- Shen FZ, Zhang BY, Feng YJ, Jia ZX, An B, Liu CC, Deng XY, Kulkarni AD, Lu Y. Current research in perineural invasion of cholangiocarcinoma. *J Exp Clin Cancer Res* 2010; 29: 24
- Blechacz BR, Gores GJ. Cholangiocarcinoma. *Clin Liver Dis* 2008; 12: 131-150, ix
- Yang J, Yan LN. Current status of intrahepatic cholangiocarcinoma. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 6289-6297
- Ustundag Y, Bayraktar Y. Cholangiocarcinoma: a compact review of the literature. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 6458-6466
- Lehmann AR. XPD structure reveals its secrets. *DNA Repair (Amst)* 2008; 7: 1912-1915
- Zárate RN, Arias F, Bandres E, Cubedo E, Malumbres R, García-Foncillas J. Xeroderma pigmentosum group D 751 polymorphism as a predictive factor in resected gastric cancer treated with chemo-radiotherapy. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 6032-6036
- Clarkson SG, Wood RD. Polymorphisms in the human XPD (ERCC2) gene, DNA repair capacity and cancer susceptibility: an appraisal. *DNA Repair (Amst)* 2005; 4: 1068-1074
- Li X, Urwyler O, Suter B. Drosophila Xpd regulates Cdk7 localization, mitotic kinase activity, spindle dynamics, and chromosome segregation. *PLoS Genet* 2010; 6: e1000876
- Dumaz N, Drougard C, Quilliet X, Mezzina M, Sarasin A, Daya-Grosjean L. Recovery of the normal p53 response after UV treatment in DNA repair-deficient fibroblasts by retroviral-mediated correction with the XPD gene. *Carcinogenesis* 1998; 19: 1701-1704
- Levine AJ, Oren M. The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nat Rev Cancer* 2009; 9: 749-758
- Chung JH, Bunz F. Cdk2 is required for p53-independent G2/M checkpoint control. *PLoS Genet* 2010; 6: e1000863
- Robles AI, Harris CC. Clinical Outcomes and Correlates of TP53 Mutations and Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010; 2: a001016
- Han P, Kang JH, Li HL, Hu SX, Lian HH, Qiu PP, Zhang J, Li WG, Chen QX. Antiproliferation and apoptosis induced by tamoxifen in human bile duct carcinoma QBC939 cells via upregulated p53 expression. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 385: 251-256
- Hoogervorst EM, van Steeg H, de Vries A. Nucleotide excision repair- and p53-deficient mouse models in cancer research. *Mutat Res* 2005; 574: 3-21
- Ford JM. Regulation of DNA damage recognition and nucleotide excision repair: another role for p53. *Mutat Res* 2005; 577: 195-202
- Kang YK, Kim WH, Jang JJ. Expression of G1-S modulators (p53, p16, p27, cyclin D1, Rb) and Smad4/Dpc4 in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Hum Pathol* 2002; 33: 877-883
- Sugimachi K, Aishima S, Taguchi K, Tanaka S, Shimada M, Kajiyama K, Sugimachi K, Tsuneyoshi M. The role of overexpression and gene amplification of cyclin D1 in intrahepatic cholangiocarcinoma. *J Hepatol* 2001; 35: 74-79
- Briggs CD, Neal CP, Mann CD, Steward WP, Manson MM, Berry DP. Prognostic molecular markers in cholangiocarcinoma: a systematic review. *Eur J Cancer* 2009; 45: 33-47
- Sauter ER, Takemoto R, Litwin S, Herlyn M. p53 alone or in combination with antisense cyclin D1 induces apoptosis and reduces tumor size in human melanoma. *Cancer Gene Ther* 2002; 9: 807-812
- Wang H, Mannava S, Grachtchouk V, Zhuang D, Soengas MS, Gudkov AV, Prochownik EV, Nikiforov MA. c-Myc depletion inhibits proliferation of human tumor cells at various stages of the cell cycle. *Oncogene* 2008; 27: 1905-1915
- Liu J, Akoulitchev S, Weber A, Ge H, Chuikov S, Libutti D, Wang XW, Conaway JW, Harris CC, Conaway RC, Reinberg D, Levens D. Defective interplay of activators and repressors with TFIH in xeroderma pigmentosum. *Cell* 2001; 104: 353-363
- Zhang MF, Zhang ZY, Fu J, Yang YF, Yun JP. Correlation between expression of p53, p21/WAF1, and MDM2 proteins and their prognostic significance in primary hepatocellular carcinoma. *J Transl Med* 2009; 7: 110
- Rocha S, Martin AM, Meek DW, Perkins ND. p53 represses cyclin D1 transcription through down regulation of Bcl-3 and inducing increased association of the p52 NF-kappaB subunit with histone deacetylase 1. *Mol Cell Biol* 2003; 23: 4713-4727
- Guardavaccaro D, Corrente G, Covone F, Micheli L, D'Agnano I, Starace G, Caruso M, Tirone F. Arrest of G(1)-S progression by the p53-inducible gene PC3 is Rb dependent and relies on the inhibition of cyclin D1 transcription. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 1797-1815
- Hu GM, Liu LM, Zhang JX, Hu XD, Duan HJ, Deng H, He M, Luo ZJ, Liu JM, Luo J. The role of XPB in cell apoptosis and viability and its relationship with p53, p21(waf1/cip1) and c-myc in hepatoma cells. *Dig Liver Dis* 2006; 38: 755-761

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

紧密连接蛋白-2表达及定位变化与胰腺癌细胞解离的关系

谭晓冬, 周磊, 王巍, 王宝胜, 刘金钢, 戴显伟

谭晓冬, 周磊, 王巍, 王宝胜, 刘金钢, 戴显伟, 中国医科大学
附属盛京医院肝胆胰肿瘤外科 辽宁省沈阳市 110004
谭晓冬, 2005年日本熊本大学博士, 副教授, 主要从事胰腺癌侵
袭转移的机制研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30973501

作者贡献分布: 此课题由谭晓冬设计; 研究过程由谭晓冬、周磊
及王巍操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由刘金钢与戴显
伟提供; 数据分析由谭晓冬、周磊及王巍完成; 本论文写作由谭
晓冬完成。

通讯作者: 戴显伟, 教授, 110004, 辽宁省沈阳市三好街36号, 中
国医科大学附属盛京医院肝胆胰肿瘤外科. tanxd@hotmail.com
电话: 024-24521918

收稿日期: 2010-02-03 修回日期: 2010-04-28

接受日期: 2010-05-10 在线出版日期: 2010-05-28

Correlation of tight junction protein-2 expression and localization with pancreatic cancer cell dissociation

Xiao-Dong Tan, Lei Zhou, Wei Wang,
Bao-Sheng Wang, Jin-Gang Liu, Xian-Wei Dai

Xiao-Dong Tan, Lei Zhou, Wei Wang, Bao-Sheng
Wang, Jin-Gang Liu, Xian-Wei Dai, Department of Hep-
ato-Pancreato-Biliary Tumor Surgery, Shengjing Hospital
of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning
Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of
China, No. 30973501

Correspondence to: Professor Xian-Wei Dai, Department
of Hepato-Pancreato-Biliary Tumor Surgery, Shengjing
Hospital of China Medical University, 36 Sanhao Street,
Shenyang 110004, Liaoning Province,
China. tanxd@hotmail.com

Received: 2010-02-03 Revised: 2010-04-28

Accepted: 2010-05-10 Published online: 2010-05-28

Abstract

AIM: The investigate the correlation between
the expression and localization of tight junction
protein-2 (Tjp-2) and the dissociation of
pancreatic cancer cells.

METHODS: The expression of Tjp-2 mRNA and
protein in highly (PC-1.0) and weakly (PC-1)
invasive and metastatic pancreatic cancer cells
was detected by RT-PCR and Western blotting,
respectively. Immunocytochemistry was used
to observe the redistribution of Tjp-2 protein in
PC-1.0 and PC-1 cells. The correlation between
the expression and localization of Tjp-2 and the

dissociation of pancreatic cancer cells was then
analyzed.

RESULTS: Both Tjp-2 mRNA and protein were
overexpressed in PC-1.0 cells, but weakly ex-
pressed in PC-1 cells. Treatment with U0126, a
mitogen activated protein kinase kinase inhibi-
tor, inhibited Tjp-2 mRNA expression in PC-1.0
cells. Dissociation factor-conditioned medium
(DF-CM) significantly induced Tjp-2 mRNA ex-
pression in PC-1 cells. Tjp-2 protein was mainly
distributed in the cytoplasm of PC-1.0 cells
[fluorescence intensity (FI) = $3\,273.7 \pm 131.2$].
U0126 treatment obviously induced Tjp-2 pro-
tein expression at the sites of cell-cell contact
(FI = $2\,814.8 \pm 297.0$, $P = 0.003$). In PC-1 cells, Tjp-2
protein was mainly distributed at the sites of
cell-cell contact (FI = 401.5 ± 41.3). Treatment
with DF-CM suppressed Tjp-2 expression at the
sites of cell-cell contact (FI = 135.6 ± 15.8 , $P =$
 0.024). However, subsequent U0126 treatment
induced the re-accumulation of Tjp-2 protein at
the sites of cell-cell contact (FI = 382.6 ± 34.1 , $P =$
 0.072) in PC-1 cells.

CONCLUSION: The changes in Tjp-2 expression
and localization are involved in regulating the
dissociation of pancreatic cancer cells. Tjp-2 may
serve as a new target for molecular therapies
that prevent the invasion and metastasis of pan-
creatic cancer.

Key Words: Pancreatic cancer; Cell dissociation;
Tight junction protein-2; Invasion; Metastasis

Tan XD, Zhou L, Wang W, Wang BS, Liu JG, Dai XW.
Correlation of tight junction protein-2 expression and
localization with pancreatic cancer cell dissociation. *Shijie
Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(15): 1537-1543

摘要

目的: 探讨紧密连接蛋白-2(Tjp-2)表达及定位
变化与胰腺癌细胞解离的关系。

方法: 采用RT-PCR和Western blot分别检测解
离型高转移株(PC-1.0)和非解离型低转移株
(PC-1)胰腺癌细胞中Tjp-2的基因和蛋白表达,

■背景资料

肿瘤细胞从原发
部位解离是肿瘤
侵袭转移过程中
最为重要的一步。
明确细胞解离的
分子机制有助于
阐明胰腺癌侵袭
转移的分子机制,
并有利于开发针
对胰腺癌侵袭转
移的新型治疗方
法并改善患者的
预后。

■同行评议者

曹杰, 主任医师,
广州医学院附属
广州市第一人民
医院胃肠外科; 谷
俊朝, 主任医师,
首都医科大学附
属北京友谊医院
普外科

■研究前沿

本研究应用cDNA微阵列分析筛选出在PC-1.0和PC-1细胞中与侵袭转移密切相关的差异表达基因Tjp-2. 对于Tjp结构和生理学功能方面的研究取得了一定的进展, 但Tjp-2参与肿瘤侵袭转移, 尤其是细胞解离的相关机制尚未阐明.

利用免疫细胞化学方法确定PC-1.0和PC-1细胞中Tjp-2的细胞内定位变化. 最后分析Tjp-2的表达及细胞内定位变化与胰腺癌细胞解离的相关性.

结果: Tjp-2 mRNA和蛋白在PC-1.0细胞中过度表达, 在PC-1细胞中表达均较弱. U0126(丝裂原活化蛋白激酶抑制剂)抑制PC-1.0细胞中Tjp-2 mRNA的表达, 含细胞解离因子的培养液上清(DF-CM)则诱导PC-1细胞中Tjp-2 mRNA表达增加. 在PC-1.0细胞中Tjp-2蛋白主要分布于细胞质($FI = 3\,273.7 \pm 131.2$), U0126处理后细胞边缘部位的Tjp-2表达显著增强($FI = 2\,814.8 \pm 297.0$, $P = 0.003$). 在PC-1细胞中Tjp-2蛋白主要分布于细胞间连接部位($FI = 401.5 \pm 41.3$), 经DF-CM处理后细胞间连接部位Tjp-2表达明显减弱($FI = 135.6 \pm 15.8$, $P = 0.024$), 再经U0126处理后Tjp-2蛋白再次向细胞间连接部位聚集($FI = 382.6 \pm 34.1$, $P = 0.072$).

结论: Tjp-2基因表达及蛋白的细胞内定位变化参与调控胰腺癌细胞解离. Tjp-2可作为抗胰腺癌侵袭转移分子靶向治疗的新靶点.

关键词: 胰腺癌; 细胞解离; 紧密连接蛋白-2; 侵袭; 转移

谭晓冬, 周磊, 王巍, 王宝胜, 刘金钢, 戴显伟. 紧密连接蛋白-2表达及定位变化与胰腺癌细胞解离的关系. 世界华人消化杂志 2010; 18(15): 1537-1543

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/1537.asp>

0 引言

高侵袭转移是胰腺癌预后极差的重要原因之一. 有文献报道, 肿瘤细胞从原发部位解离是肿瘤侵袭转移过程中最为重要的一步^[1], 但胰腺癌细胞解离的分子机制尚不清楚. 明确细胞解离的分子机制有助于阐明胰腺癌侵袭转移的分子机制, 并有利于开发针对胰腺癌侵袭转移的新型治疗方法并改善患者的预后. 在前期研究中我们从解离型高转移株胰腺癌细胞PC-1.0的培养液上清中分离出胰腺癌细胞解离因子(dissociation factor, DF), DF可诱导非解离型低转移株胰腺癌细胞PC-1的细胞解离^[2,3]. 进一步研究发现, DF可激活丝裂原活化蛋白激酶2(mitogen-activated protein kinase 2, MEK2)/细胞外信号调节激酶2(extracellular signal-regulated kinase 2, ERK2)信号转导通路, 并通过此信号转导通路调控胰腺癌细胞解离^[4-7]. 在近期研究中, 我们应

用cDNA微阵列分析筛选出在PC-1.0和PC-1细胞中与侵袭转移密切相关的差异表达基因紧密连接蛋白2(tight junction protein-2, Tjp-2)^[8]. Tjp家族有3名成员, 分别为Tjp-1、Tjp-2和Tjp-3^[9-11]. Tjps属于膜相关鸟苷酸激酶(membrane-associated guanylate kinase, MAGUK)的同分异构体, 参与组成上皮和内皮细胞结构^[12]. Tjp与连接性跨膜蛋白(junctional transmembrane protein)的胞质侧C端结合, 使其与细胞骨架的肌动蛋白和信号转导通路分子连接^[13]. 目前, 对于Tjp结构和生理学功能方面的研究取得了一定的进展^[13], 但Tjp-2参与肿瘤侵袭转移, 尤其是细胞解离的相关机制尚未阐明^[14,15]. 本研究分析Tjp-2的表达及细胞内定位变化与胰腺癌细胞解离的关系, 以明确Tjp-2参与胰腺癌细胞解离的作用机制.

1 材料和方法

1.1 材料 PC-1细胞通过BOP诱导的叙利亚仓鼠实验性胰腺癌模型建立^[16]. PC-1.0细胞是由同系仓鼠皮下接种PC-1细胞后产生的转移性肿瘤而建立^[17,18]. 两种细胞均以RPMI 1640培养液(Gibco-BRL, Grand Island, NY)培养, 并加100 mL/L胎牛血清(Bioserum, Victoria, Australia)、100 kU/L青霉素G和100 mg/L链霉素, 并于含50 mL/L CO₂的37 °C孵箱内培养. 利用兔抗人Tjp-2及β-actin抗体(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)作为一抗. 利用辣根过氧化物酶结合抗体和FITC标记的荧光抗体(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)作为二抗.

1.2 方法

1.2.1 RT-PCR: 以PTC-200 PCR反应仪(Mjresearch公司, 美国)通过one-step法进行逆转录合成互补DNA(cDNA)第一链及PCR扩增. 合成cDNA第一链的总反应体积为25 μL, 取1 μg总RNA按说明书加入各种反应试剂, 条件如下: 95 °C预变性5 min后进行30个循环的PCR扩增(94 °C变性20 s, 63 °C复性30 s, 72 °C延伸60 s), 最后72 °C后延伸7 min. PCR扩增用引物序列如下: Tjp-2(245 bp): 5'-GCAGAGCGAACGAAGAGTATGG(forward), 5'-TGACGGGATGTTGATGAGGGT(reverse); β-actin(664 bp): 5'-GTGGGGCGCCCCAGGCACCA(forward), 5'-CTCCTTAAGTCACGCACGATTCC(reverse). PCR扩增产物于1.5%琼脂糖凝胶中电泳, 溴化乙锭染色后紫外灯下观察.

1.2.2 细胞样本制备: 细胞在含100 mL/L胎牛

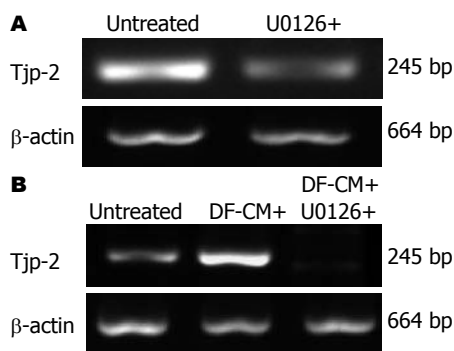


图 1 PC-1.0和PC-1细胞中Tjp-2 mRNA的表达变化。A: PC-1.0细胞; B: PC-1细胞。

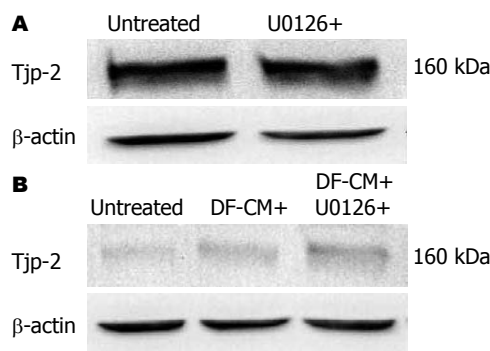


图 2 PC-1.0和PC-1细胞中Tjp-2蛋白的表达变化。A: PC-1.0细胞; B: PC-1细胞。

■ 相关报道

在胰腺癌细胞解离过程中Tjp-2的表达可能不仅受MEK2/ERK2信号转导通路调控,还可能受到其他因素影响。而据Goggins报道microRNA可能是其中的重要因素之一。此外,近年Bloomston等报道microRNA可调控细胞内的翻译过程。

血清的10 mL RPMI 1640培养液的90 mm细胞培养皿中培养。为了明确Tjp-2蛋白表达变化及其与胰腺癌细胞解离的关系,在非解离型低转移株细胞PC-1及解离型高转移株细胞PC-1.0中分别加入PC-1.0细胞的条件培养基(即DF-CM)和特异性MEK抑制剂U0126(Cell Signaling Technology, MA)^[5,19]。在活化实验中,PC-1细胞培养液中加入终浓度为40%的DF-CM后培养36 h。在抑制实验中,PC-1.0细胞培养液中加入10 μmol/L U0126后培养36 h。此外,加入DF-CM培养36 h的PC-1细胞培养液中再加入10 μmol/L U0126后培养36 h。细胞培养皿中加入1 mL RIPA蛋白裂解液(50 mmol/L Tris, 150 mmol/L NaCl, 1% NP-40, 0.5%脱氧胆酸钠, 0.1% SDS, pH7.5。使用前加入1 mmol/L苯甲磺酰氨, 1 g/L亮氨酸酶素, 1 g/L抑肽酶),冰上反应15 min。4℃ 5 000 r/min离心5 min后将细胞裂解产物的上清液保存于-80℃中备用。以β-actin作为内对照。

1.2.3 Western blot分析: Western blot实验步骤可参照前期实验^[20]。蛋白样本与4倍的加样缓冲液混合,95℃加热。取等量的20 μg样本行聚丙烯酰胺平板凝胶电泳,利用PVDF膜(Bio-Rad),以含5%脱脂牛奶和0.1% Tween-20的PBS液在室温下封闭转膜2 h,然后用0.1% PBS/Tween-20稀释的一抗在4℃下培养过夜。漂洗后用0.1% PBS/Tween-20以1:5000稀释马源性过氧化物酶结合的二抗,室温下培养2 h。利用柯达科学成像胶片(Eastman Kodak Company, Rochester, NY)通过化学发光法检测信号强度。

1.2.4 免疫荧光染色和荧光强度(fluorescence intensity, FI)分析: 上述细胞加入chamber slide中培养36 h。加入DF-CM或U0126处理细胞,以明确Tjp-2蛋白定位及Tjp-2表达与胰腺癌细胞解离的相关性。细胞处理方法见1.2.2描述。细胞加

入DF-CM或U0126孵育后,室温下以0.5%多聚甲醛固定10 min,再以10%山羊血清阻滞30 min,之后加入Tjp-2一抗(1:200,以含1%小牛白蛋白的PBS液稀释)4℃孵育过夜。再加入FITC标记的二抗室温孵育2 h。固定后利用共聚焦激光显微镜(FV500-IX, Olympus, Japan)获取图像。对照组标本制备如下:(1)切片不用一抗处理;(2)正常山羊血清和非特异山羊IgG代替Tjp-2一抗。最后,随机选取细胞核、细胞质、细胞膜及细胞总体的10个点,利用Fluoview 500(version 3.3, Olympus, Japan)软件检测Tjp-2表达的FI值。

统计学处理 采用Stat View计算机软件(SAS Institute, Inc., Cary, NC)利用非配对Student's t检验分析不同实验组细胞核、细胞质、细胞膜及细胞总体10个点的Tjp-2表达的平均FI值。 $P<0.05$ 认为差异具有显著性。

2 结果

2.1 PC-1.0与PC-1中Tjp-2的mRNA表达 Tjp-2 mRNA在PC-1.0细胞中过度表达,加入U0126培养24 h后Tjp-2 mRNA表达被明显抑制(图1A)。Tjp-2 mRNA在PC-1细胞中表达则较弱。加入DF-CM培养24 h后Tjp-2 mRNA表达明显增强。经U0126培养12 h后再经DF-CM培养24 h则Tjp-2 mRNA表达无明显变化(图1B)。

2.2 PC-1.0与PC-1中Tjp-2蛋白表达 Western blot结果显示Tjp-2蛋白在PC-1.0细胞中高表达(图2A)。与Tjp-2 mRNA的表达相比,经U0126培养36 h后Tjp-2蛋白的表达没有被抑制(图2A)。此外,在PC-1细胞中Tjp-2蛋白的表达较弱(图2B)。但与Tjp-2 mRNA表达不同,在PC-1细胞培养液中加入DF-CM未能诱导Tjp-2蛋白的表达增强(图2B)。

2.3 PC-1.0与PC-1中Tjp-2蛋白的定位变化 在未

■创新盘点

本研究中发现Tjp-2蛋白的细胞内定位和分布状态与胰腺癌细胞解离状态密切相关。提示Tjp-2蛋白在细胞间连接部的定位在维持细胞紧密连接的稳定和防止胰腺癌细胞解离及其后的侵袭转移中可能发挥重要作用, Tjp-2蛋白的细胞内定位变化可能参与调控细胞解离及侵袭转移。

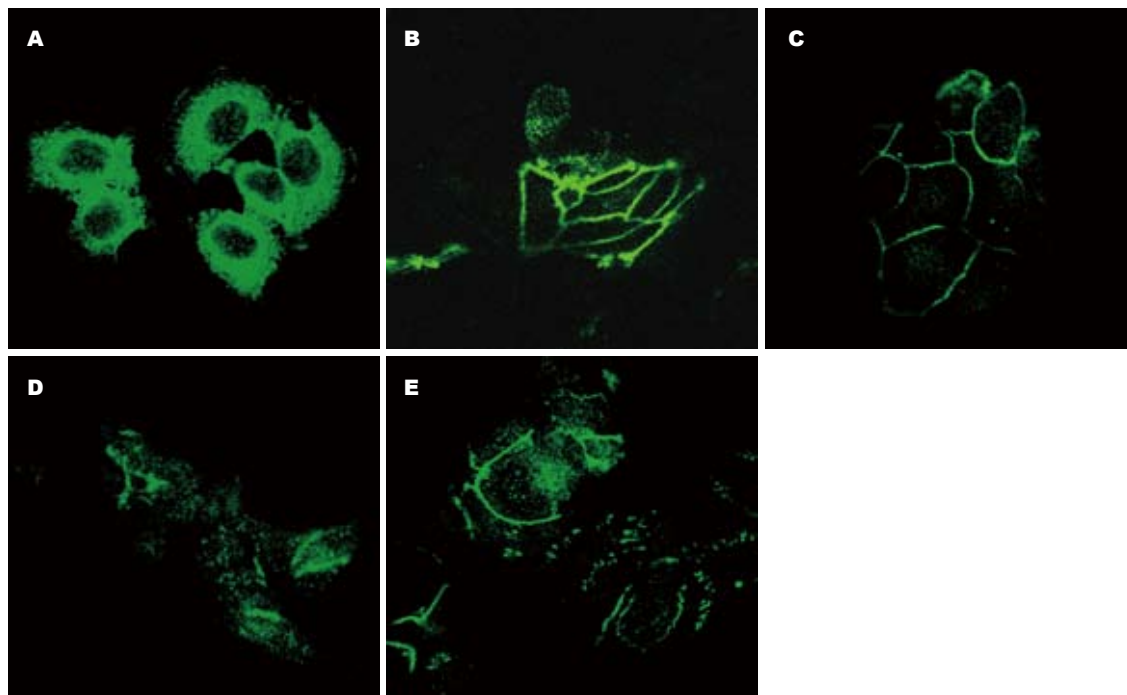


图3 PC-1.0和PC-1细胞中Tjp-2蛋白的定位变化(免疫荧光染色 $\times 400$)。A: 未处理PC-1.0细胞; B: U0126处理PC-1.0细胞; C: 未处理PC-1细胞; D: DF-CM处理; E: DF-CM处理后再经U0126处理。

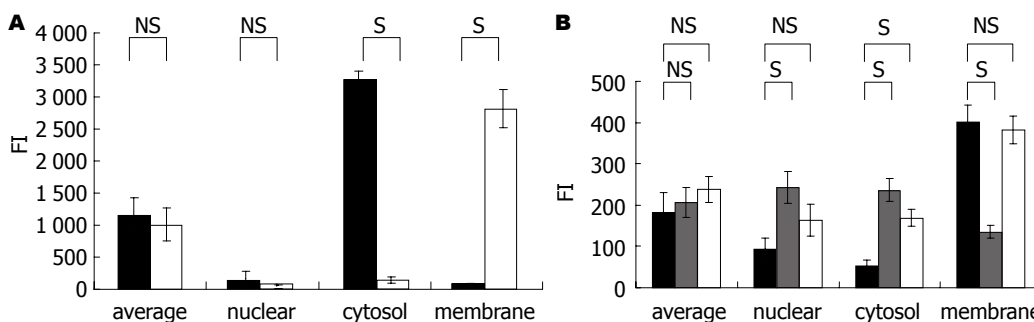


图4 PC-1.0和PC-1细胞中Tjp-2蛋白表达的荧光强度(FI)变化。A: PC-1.0细胞; B: PC-1细胞, 黑色柱: 未处理PC-1细胞; 灰色柱: DF-CM处理PC-1细胞; 白色柱: DF-CM处理后再经U0126处理。S: 显著; NS: 不显著。

处理的PC-1.0细胞中(图3A)。Tjp-2蛋白主要分布于细胞质, 在细胞边缘及细胞核中表达较弱。经U0126培养36 h后, 细胞间接触部位的Tjp-2蛋白表达显著增强(图3B)。与PC-1.0细胞相比, 未处理的PC-1细胞(图3C)中Tjp-2蛋白几乎全部分布于细胞间连接部位, 在细胞核及细胞质中表达较弱。经DF-CM培养36 h后细胞间连接部位分布的Tjp-2蛋白明显减少(图3D)。但经DF-CM处理的PC-1细胞再经U0126培养36 h后Tjp-2蛋白再次向细胞连接部位聚集, 该部位Tjp-2蛋白表达增强(图3E)。

2.4 PC-1.0与PC-1中Tjp-2蛋白表达的荧光强度变化 PC-1.0细胞及PC-1细胞中Tjp-2蛋白表达的荧光强度(FI)值分析结果列于图4。PC-1.0细胞中整体细胞的Tjp-2的表达较强(平均FI = 1160.7 ±

259.1, 图4A), 且Tjp-2蛋白主要定位于细胞质(FI = 3273.7 ± 131.2), 在细胞核(FI = 139.0 ± 115.7)和细胞边缘(FI = 69.5 ± 38.0)几乎未检测到荧光。经U0126处理24 h后, PC-1.0细胞中整体细胞的Tjp-2表达没有显著改变(平均FI = 1009.4 ± 257.8, $P > 0.05$)。但在细胞间连接部位(FI = 2814.8 ± 297.0, $P < 0.05$)的Tjp-2蛋白表达明显增强。此外, 在细胞核(FI = 75.3 ± 28.1, $P > 0.05$)中Tjp-2表达没有显著变化, 而在细胞质(FI = 139.5 ± 47.5, $P < 0.05$)中Tjp-2蛋白表达显著减少。

PC-1细胞(图4B)中整体细胞的Tjp-2表达平均FI值为182.3 ± 48.2。Tjp-2蛋白在细胞核(FI = 93.6 ± 27.2)及细胞质(FI = 52.1 ± 16.4)中表达较弱, 但在细胞间连接部位表达较强(FI = 401.5 ± 41.3)。与未处理细胞相比, 经DF-CM培养36

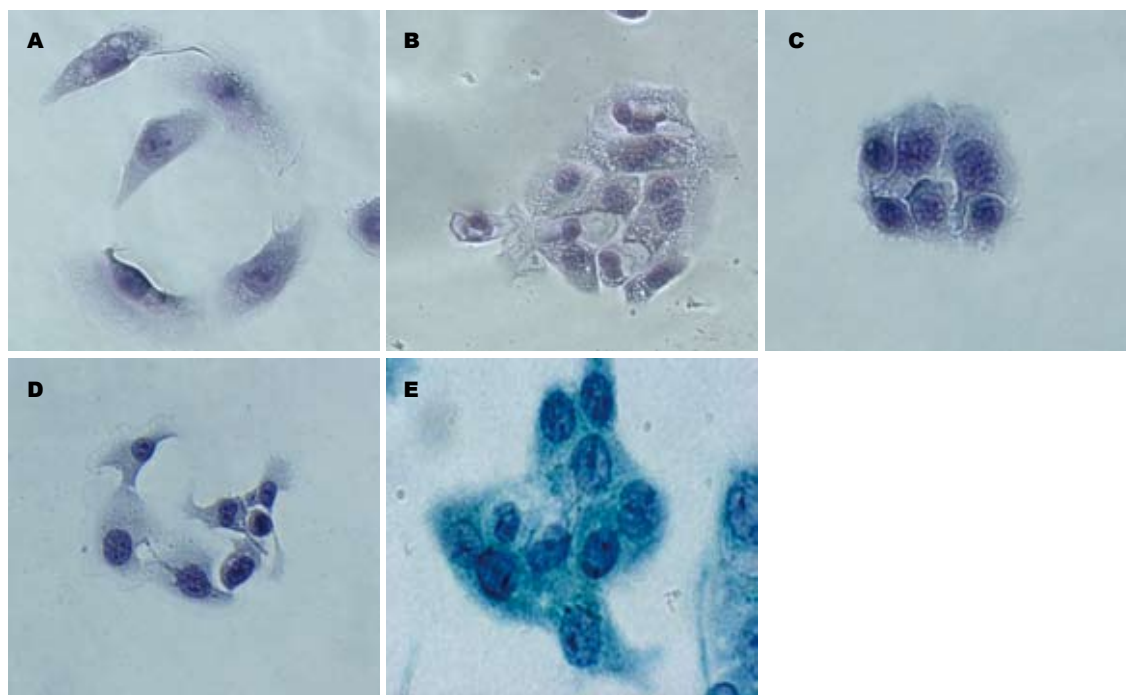


图 5 PC-1.0和PC-1细胞的形态学改变(巴氏染色×400). A: 未处理PC-1.0细胞; B: U0126处理PC-1.0细胞; C: 未处理PC-1细胞; D: DF-CM处理; E: DF-CM处理后再经U0126处理.

■应用要点

Tjp-2通过基因表达及细胞内定位的变化参与调控胰腺癌细胞解离. Tjp-2为开发针对胰腺癌侵袭转移的分子靶向治疗方法提供了一个具有重要价值的新靶点.

h后整体细胞的Tjp-2蛋白表达未见明显改变(平均FI = 207.1 ± 35.4 , $P > 0.05$), 其中在细胞核(FI = 242.7 ± 38.9 , $P < 0.05$)和细胞质(FI = 236.2 ± 27.3 , $P < 0.05$)的Tjp-2表达显著增加, 在细胞间连接部位的Tjp-2表达明显减弱(FI = 135.6 ± 15.8 , $P < 0.05$). 另外, 经U0126再培养36 h后PC-1细胞中细胞质的Tjp-2表达显著增加(FI = 169.1 ± 20.0 , $P < 0.05$), 但在整体细胞中(平均FI = 238.5 ± 31.6 , $P > 0.05$)、细胞核(FI = 163.7 ± 37.3 , $P > 0.05$)及细胞间连接部位(FI = 382.6 ± 34.1 , $P > 0.05$)Tjp-2表达的FI值变化不明显.

2.5 PC-1.0与PC-1的细胞形态学变化 光学显微镜图像显示未处理PC-1.0细胞以单个细胞方式生长(图5A). 添加U0126培养36 h后PC-1.0细胞聚集成岛样细胞克隆方式生长(图5B). 与PC-1.0细胞不同, 未处理的PC-1细胞呈岛样细胞克隆方式生长(图5C). 而经过DF-CM培养36 h后PC-1细胞的岛样克隆解离, 表现为类似于PC-1.0细胞的形态学改变: 细胞解离, 并伴有细胞伸长和伪足形成(图5D). 另外, 已解离的PC-1细胞再加入U0126培养36 h后细胞则重新聚集成团, 形成岛样细胞克隆(图5E).

3 讨论

前期研究中我们发现胰腺癌细胞DF能够诱导MEK2/ERK2信号转导通路的活化和胰腺癌

细胞的解离. 相反, MEK抑制剂U0126能抑制MEK2/ERK2信号转导通路的活化和胰腺癌细胞的解离^[5,6]. 此外, 我们通过基因组学方法发现Tjp-2在解离型高转移株细胞PC-1.0与非解离型低转移株细胞PC-1间基因表达存在明显差异, 是与侵袭转移密切相关的基因之一^[8].

本研究中我们证实了Tjp-2 mRNA在解离型高转移株细胞PC-1.0与非解离型低转移株细胞PC-1中表达的明显差异, 并发现DF和U0126能够分别增强和抑制Tjp-2 mRNA的表达. 提示Tjp-2可能参与胰腺癌细胞解离及其后侵袭转移过程的调控, 且Tjp-2基因表达可能受MEK2/ERK2信号转导通路调控.

另外, 虽然Tjp-2蛋白表达水平在PC-1.0和PC-1细胞中差异明显, 但是加入DF或U0126后Tjp-2蛋白水平变化不明显. 提示在胰腺癌细胞解离过程中Tjp-2的表达可能不仅受MEK2/ERK2信号转导通路调控, 还可能受到其他因素影响^[21]. 而microRNA可能是其中的重要因素之一^[22], 近年的文献报道microRNA可调控细胞内的翻译过程^[23,24].

本研究中我们还发现DF和U0126能明显改变Tjp-2蛋白在细胞内的定位, 同时Tjp-2蛋白的细胞内定位和分布状态与胰腺癌细胞解离状态密切相关. 提示Tjp-2蛋白在细胞间连接部的定位在维持细胞紧密连接的稳定和防止胰腺癌细胞解

■同行评价

本研究立意依据充分, 结果准确, 有一定学术价值与创新性。

离及其后的侵袭转移中可能发挥重要作用^[25,26], Tjp-2蛋白的细胞内定位变化可能参与调控细胞解离及侵袭转移。据文献报道, Tjp-2蛋白磷酸化状态的改变能够改变其细胞内定位^[27-30]。此外, 本研究结果提示Tjp-2蛋白在细胞核、细胞质及细胞膜的定位变化与MEK2/ERK2信号转导通路的活化(磷酸化)关系密切, Tjp-2蛋白的磷酸化状态变化可能通过MEK2/ERK2信号转导通路调控。但Tjp-2蛋白磷酸化在胰腺癌细胞解离及侵袭转移调控机制中的作用未来需进一步深入研究。

总之, Tjp-2通过基因表达及细胞内定位的变化参与调控胰腺癌细胞解离。Tjp-2为开发针对胰腺癌侵袭转移的分子靶向治疗方法提供了一个具有重要价值的新靶点。

志谢 感谢日本熊本大学医学院消化器外科马场秀夫教授惠赠PC-1及PC-1.0胰腺癌细胞株。

4 参考文献

- 1 Torimura T, Ueno T, Kin M, Harada R, Nakamura T, Kawaguchi T, Harada M, Kumashiro R, Watanabe H, Avraham R, Sata M. Autocrine motility factor enhances hepatoma cell invasion across the basement membrane through activation of beta1 integrins. *Hepatology* 2001; 34: 62-71
- 2 Hirota M, Egami H, Corra S, Fujii H, Chaney WG, Rizzino A, Pour PM. Production of scatter factor-like activity by a nitrosamine-induced pancreatic cancer cell line. *Carcinogenesis* 1993; 14: 259-264
- 3 Kurizaki T, Egami H, Hirota M, Akagi J, Ohmachi H, Yamamoto S, Ogawa M. Characterization of cancer cell dissociation factor in a highly invasive pancreatic cancer cell line. *Cancer* 1995; 75: 1554-1561
- 4 Ishikawa S, Egami H, Kurizaki T, Akagi J, Tamori Y, Yoshida N, Tan X, Hayashi N, Ogawa M. Identification of genes related to invasion and metastasis in pancreatic cancer by cDNA representational difference analysis. *J Exp Clin Cancer Res* 2003; 22: 299-306
- 5 Tan X, Egami H, Kamohara H, Ishikawa S, Kurizaki T, Yoshida N, Tamori Y, Takai E, Hirota M, Ogawa M. Involvement of the mitogen-activated protein kinase kinase 2 in the induction of cell dissociation in pancreatic cancer. *Int J Oncol* 2004; 24: 65-73
- 6 Tan X, Egami H, Ishikawa S, Kurizaki T, Tamori Y, Takai E, Hirota M, Ogawa M. Relationship between the expression of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and the dissociation of pancreatic cancer cells: Involvement of ERK1/2 in the dissociation status of cancer cells. *Int J Oncol* 2004; 24: 815-820
- 7 Tan X, Egami H, Ishikawa S, Nakagawa M, Ishiko T, Kamohara H, Hirota M, Ogawa M. Relationship between activation of epidermal growth factor receptor and cell dissociation in pancreatic cancer. *Int J Oncol* 2004; 25: 1303-1309
- 8 Tan X, Zhou L, Wang W, Wang B, Egami H, Baba H, Dai X. Genomic analysis of invasion-metastasis related factors in pancreatic cancer cells. *Exp Ther Med* 2010; 1: 211-216
- 9 Kiener TK, Sleptsova-Friedrich I, Hunziker W.

- Identification, tissue distribution and developmental expression of tjp1/zo-1, tjp2/zo-2 and tjp3/zo-3 in the zebrafish, *Danio rerio*. *Gene Expr Patterns* 2007; 7: 767-776
- 10 Gumbiner B, Lowenkopf T, Apatira D. Identification of a 160-kDa polypeptide that binds to the tight junction protein ZO-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 3460-3464
- 11 Singh D, Solan JL, Taffet SM, Javier R, Lampe PD. Connexin 43 interacts with zona occludens-1 and -2 proteins in a cell cycle stage-specific manner. *J Biol Chem* 2005; 280: 30416-30421
- 12 González-Mariscal L, Betanzos A, Avila-Flores A. MAGUK proteins: structure and role in the tight junction. *Semin Cell Dev Biol* 2000; 11: 315-324
- 13 Lapierre LA. The molecular structure of the tight junction. *Adv Drug Deliv Rev* 2000; 41: 255-264
- 14 Chlenski A, Ketels KV, Korovaitseva GI, Talamonti MS, Oyasu R, Scarpelli DG. Organization and expression of the human zo-2 gene (tjp-2) in normal and neoplastic tissues. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1493: 319-324
- 15 Glaunsinger BA, Weiss RS, Lee SS, Javier R. Link of the unique oncogenic properties of adenovirus type 9 E4-ORF1 to a select interaction with the candidate tumor suppressor protein ZO-2. *EMBO J* 2001; 20: 5578-5586
- 16 Egami H, Takiyama Y, Cano M, Houser WH, Pour PM. Establishment of hamster pancreatic ductal carcinoma cell line (PC-1) producing blood group-related antigens. *Carcinogenesis* 1989; 10: 861-869
- 17 Egami H, Tomioka T, Tempero M, Kay D, Pour PM. Development of intrapancreatic transplantable model of pancreatic duct adenocarcinoma in Syrian golden hamsters. *Am J Pathol* 1991; 138: 557-561
- 18 Pour PM, Egami H, Takiyama Y. Patterns of growth and metastases of induced pancreatic cancer in relation to the prognosis and its clinical implications. *Gastroenterology* 1991; 100: 529-536
- 19 Tan X, Egami H, Nozawa F, Abe M, Baba H. Analysis of the invasion-metastasis mechanism in pancreatic cancer: involvement of plasmin(ogen) cascade proteins in the invasion of pancreatic cancer cells. *Int J Oncol* 2006; 28: 369-374
- 20 Tan X, Egami H, Ishikawa S, Sugita H, Kamohara H, Nakagawa M, Nozawa F, Abe M, Ogawa M. Involvement of matrix metalloproteinase-7 in invasion-metastasis through induction of cell dissociation in pancreatic cancer. *Int J Oncol* 2005; 26: 1283-1289
- 21 Avila-Flores A, Rendón-Huerta E, Moreno J, Islas S, Betanzos A, Robles-Flores M, González-Mariscal L. Tight-junction protein zonula occludens 2 is a target of phosphorylation by protein kinase C. *Biochem J* 2001; 360: 295-304
- 22 Goggins M. Identifying molecular markers for the early detection of pancreatic neoplasia. *Semin Oncol* 2007; 34: 303-310
- 23 Bloomston M, Frankel WL, Petrocca F, Volinia S, Alder H, Hagan JP, Liu CG, Bhatt D, Taccioli C, Croce CM. MicroRNA expression patterns to differentiate pancreatic adenocarcinoma from normal pancreas and chronic pancreatitis. *JAMA* 2007; 297: 1901-1908
- 24 Cho WC. OncomiRs: the discovery and progress of microRNAs in cancers. *Mol Cancer* 2007; 6: 60
- 25 Métais JY, Navarro C, Santoni MJ, Audebert S, Borg JP. hScrib interacts with ZO-2 at the cell-cell

- junctions of epithelial cells. *FEBS Lett* 2005; 579: 3725-3730
- 26 Fink C, Weigel R, Hembes T, Lauke-Wettwer H, Kliesch S, Bergmann M, Brehm RH. Altered expression of ZO-1 and ZO-2 in Sertoli cells and loss of blood-testis barrier integrity in testicular carcinoma in situ. *Neoplasia* 2006; 8: 1019-1027
- 27 Sabath E, Negoro H, Beaudry S, Paniagua M, Angelow S, Shah J, Grammatikakis N, Yu AS, Denker BM. α 12 regulates protein interactions within the MDCK cell tight junction and inhibits tight-junction assembly. *J Cell Sci* 2008; 121: 814-824
- 28 Tsukamoto T, Nigam SK. Role of tyrosine phosphorylation in the reassembly of occludin and other tight junction proteins. *Am J Physiol* 1999; 276: F737-F750
- 29 Adachi M, Inoko A, Hata M, Furuse K, Umeda K, Itoh M, Tsukita S. Normal establishment of epithelial tight junctions in mice and cultured cells lacking expression of ZO-3, a tight-junction MAGUK protein. *Mol Cell Biol* 2006; 26: 9003-9015
- 30 Martin TA, Watkins G, Mansel RE, Jiang WG. Loss of tight junction plaque molecules in breast cancer tissues is associated with a poor prognosis in patients with breast cancer. *Eur J Cancer* 2004; 40: 2717-2725

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》计量单位标准

本刊讯 本刊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±前后都要列出. 如37.6 °C ±1.2 °C, 45.6岁 ±24岁, 56.4 d ±0.5 d. 3.56 pg/ml ±0.27 pg/ml 应为3.56 ng/L ±0.27 ng/L. BP用kPa(mmHg), RBC数用 $\times 10^{12}/L$, WBC数用 $\times 10^9/L$, WBC构成比用0.00表示, Hb用g/L. M_r 明确的体内物质以mmol/L, nmol/L或 μ mol/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 μ g, 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酒精; 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.

双歧杆菌对应激大鼠肠道菌群及促肾上腺皮质激素释放激素的影响

付蕾, 冀建伟, 郑鹏远, 罗予, 张军

■背景资料

IBS在人群中的发病率很高,越来越多的学者认为生活压力能够导致或加重IBS。益生菌是人类肠道的原籍菌,在维持宿主胃肠道正常生理功能中发挥重要作用。益生菌不仅能够调节肠道菌群失调,而且能够显著改善IBS和IBD患者的相关症状。

付蕾, 冀建伟, 郑州大学药学院 河南省郑州市 450001
郑鹏远, 张军, 郑州大学第二附属医院 郑州大学医学微生物学研究所 河南省郑州市 450014
罗予, 河南省医药科学研究所 河南省郑州市 450052
冀建伟, 2010年郑州大学在读硕士, 主要从事消化疾病的研究。
国家自然科学基金资助项目, No. 30772028
作者贡献分布: 付蕾、冀建伟及郑鹏远对此文贡献均等; 此课题由冀建伟、付蕾及郑鹏远设计; 研究过程由冀建伟与罗予完成; 研究所用新试剂和分析工具由付蕾、郑鹏远和罗予提供; 数据分析由冀建伟完成; 本论文写作由冀建伟、郑鹏远、付蕾及张军完成。
通讯作者: 付蕾, 450001, 河南省郑州市科学大道100号, 郑州大学药学院。 oldfu@zzu.edu.cn
电话: 0371-67781908
收稿日期: 2010-02-09 修回日期: 2010-05-03
接受日期: 2010-05-10 在线出版日期: 2010-05-28

Influence of *Bifidobacterium* on the intestinal microflora and corticotropin-releasing factor in rats following chronic psychological stress

Lei Fu, Jian-Wei Ji, Peng-Yuan Zheng, Yu Luo, Jun Zhang

Lei Fu, Jian-Wei Ji, School of Pharmaceutical Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, Henan Province, China

Peng-Yuan Zheng, Jun Zhang, the Second Affiliated Hospital of Zhengzhou University & Institute of Medical Microecology, Zhengzhou University, Zhengzhou 450014, Henan Province, China

Yu Luo, Henan Academy of Medical and Pharmaceutical Sciences, Zhengzhou 450052, Henan Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30772028

Correspondence to: Lei Fu, School of Pharmaceutical Sciences, Zhengzhou University, 100 Kexue Road, Zhengzhou 450001, Henan Province, China. oldfu@zzu.edu.cn

Received: 2010-02-09 Revised: 2010-05-03

Accepted: 2010-05-10 Published online: 2010-05-28

Abstract

AIM: To determine the influence of chronic psychological stress on intestinal microflora and corticotropin-releasing factor (CRF) and to investigate the protective effects of *Bifidobacterium* on intestinal function in rats.

METHODS: Fifty female Sprague-Dawley rats were randomly and equally divided into five

groups: normal group, stress group, *Bifidobacterium* group, Smecta group, and *Bifidobacterium* plus Smecta group. All these groups were subjected to either water avoidance stress (WAS) or normal condition for 2 h per day for 7 consecutive days. The *in vivo* intestinal permeability was evaluated by measuring urinary sucralose and other sugar probes including lactulose and mannitol using capillary column gas chromatography (CCGC). Some representative genera of gut flora in rat feces were counted on selective culture medium plates. The mesenteric lymph nodes (MLN) were removed, homogenized and cultured to determine bacterial translocation. The contents of serum CRF and adrenocorticotrophic hormone (ACTH) were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

RESULTS: Compared with the normal group, the number of *Escherichia coli* (7.347 ± 0.277 vs 7.078 ± 0.229 , $P < 0.05$), the 24-h urinary concentration of mannitol ($5.097\% \pm 0.453\%$ vs $4.718\% \pm 0.399\%$, $P < 0.05$), the rate of bacterial translocation to the MLN (40% vs 10% , $P < 0.05$), and the levels of CRF ($300.8 \text{ ng/L} \pm 34.3 \text{ ng/L}$ vs $267.0 \text{ ng/L} \pm 32.3 \text{ ng/L}$, $P < 0.05$) and ACTH ($6.79 \text{ ng/L} \pm 0.651 \text{ ng/L}$ vs $5.68 \text{ ng/L} \pm 0.799 \text{ ng/L}$, $P < 0.05$) increased significantly in the stress group. In comparison with the stress group, the number of *Escherichia coli* (7.044 ± 0.281 vs 7.347 ± 0.277 , $P < 0.05$) and bacteroid (9.075 ± 0.393 vs 9.485 ± 0.306 , $P < 0.05$); the rate of bacterial translocation to the MLN (10% vs 40% , $P < 0.05$) and ACTH level ($5.92 \text{ ng/L} \pm 0.477 \text{ ng/L}$ vs $6.79 \text{ ng/L} \pm 0.651 \text{ ng/L}$, $P < 0.05$) decreased significantly in the *Bifidobacterium* intervention group.

CONCLUSION: The disturbance of intestinal microflora occurs and CRF increases significantly in rats suffered from chronic psychological stress. *Bifidobacterium* could alleviate the disturbance of gut microflora caused by chronic psychological stress and partly restore intestinal barrier function.

Key Words: Probiotic; Chronic psychological stress;

■同行评议者

陈敬贤, 教授, 安徽医科大学微生物教研室

Intestinal permeability; Intestinal microflora; Corticotropin-releasing factor

Fu L, Ji JW, Zheng PY, Luo Y, Zhang J. Influence of *Bifidobacterium* on the intestinal microflora and corticotropin-releasing factor in rats following chronic psychological stress. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(15): 1544-1549

摘要

目的: 探讨应激对大鼠肠道菌群及血清促肾上腺皮质激素释放激素(CRF)的影响及双歧杆菌对应激大鼠肠道功能的调节作用。

方法: 50只SD大鼠随机分为5组: 正常对照组、压力实验组、双歧杆菌干预组、思密达干预组、双歧杆菌+思密达共同干预组。采用WAS(water avoidance stress)避水实验构建大鼠应激模型, 以三糖为探针, 衍生化毛细管气相色谱法测定大鼠尿液中三种糖的浓度, 以三氯蔗糖/甘露醇(S/M)评价大鼠肠道通透性; 取大鼠新鲜粪便, 用选择性培养基平皿计数法检测大鼠粪便菌群中几种代表性菌种的数量; 取肠系膜淋巴结(MLN)培养后测定细菌移位率; 用酶联免疫法测定大鼠血清中CRF和促肾上腺皮质激素(ACTH)的含量。

结果: 与正常对照组相比, 压力实验组大鼠粪便中以大肠杆菌杆菌为主的条件致病菌数量增多(7.347 ± 0.277 vs 7.078 ± 0.229 , $P < 0.05$); 24 h尿液中甘露醇量升高($5.097\% \pm 0.453\%$ vs $4.718\% \pm 0.399\%$, $P < 0.05$), MLN细菌移位率升高(40% vs 10% , $P < 0.05$); CRF ($300.8 \text{ ng/L} \pm 34.3 \text{ ng/L}$ vs $267.0 \text{ ng/L} \pm 32.3 \text{ ng/L}$, $P < 0.05$), ACTH ($6.79 \text{ ng/L} \pm 0.651 \text{ ng/L}$ vs $5.68 \text{ ng/L} \pm 0.799 \text{ ng/L}$, $P < 0.05$)水平升高。与压力实验组相比, 双歧杆菌干预组大肠杆菌(7.044 ± 0.281 vs 7.347 ± 0.277 , $P < 0.05$)、类杆菌(9.075 ± 0.393 vs 9.485 ± 0.306 , $P < 0.05$)数量显著下降, 细菌移位率下降(10% vs 40% , $P < 0.05$); ACTH水平下降($5.92 \text{ ng/L} \pm 0.477 \text{ ng/L}$ vs $6.79 \text{ ng/L} \pm 0.651 \text{ ng/L}$, $P < 0.05$)。

结论: 在慢性应激条件下, 大鼠出现肠道菌群失调、肠道通透性升高、神经内分泌处于应激状态的现象, 双歧杆菌能够缓解慢性应激所导致的上述现象。

关键词: 益生菌; 应激; 肠道通透性; 肠道菌群; 促肾上腺皮质激素释放激素

付蕾, 冀建伟, 郑鹏远, 罗予, 张军. 双歧杆菌对应激大鼠肠道菌群及促肾上腺皮质激素释放激素的影响. *世界华人消化杂志*

2010; 18(15): 1544-1549

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/1544.asp>

0 引言

近年来, 社会心理因素对压力相关性(stress-associated)疾病如肥胖、代谢综合征、II型糖尿病以及疼痛和慢性疲劳综合征的影响日益得到关注^[1,2]。越来越多的学者认为生活压力能够导致或加重功能性肠病如肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)^[3,4]以及炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD), 如克罗恩病、溃疡性结肠炎^[4,5]。在胃肠道门诊中仅IBS患者就达到了40%^[6], 而4%-31%的IBS与生活压力和细菌性肠胃炎有关^[7]。IBS等压力相关性胃肠道疾病的高发病率促使我们研究社会心理因素在胃肠道疾病发病机制中的具体作用并为其治疗寻找新的靶标。目前普遍认为, 促肾上腺皮质激素释放激素(corticotropin-releasing factor, CRF)在应激所导致的胃肠道疾病中发挥重要作用^[8]。CRF是应激反应系统中重要的效应因子。中枢CRF是调节自主神经系统重要神经递质, 在胃肠道也存在CRF的表达^[4,9], 二者通过调节自主神经系统、胃肠道神经系统和免疫系统在压力相关性的IBS和IBD中发挥作用^[6,10,11]。益生菌是人类肠道的原籍菌, 已经广泛应用于临床, 在维持宿主胃肠道正常生理功能中发挥重要作用。益生菌不仅能够调节肠道菌群失调, 而且能够显著改善IBS和IBD患者的相关症状^[12], 尽管大量的数据显示益生菌能够调节肠道免疫^[13]、阻断病原菌黏附提高黏膜屏障功能^[14,15], 但其在应激所导致的胃肠道疾病中的治疗作用研究较少。思密达是临床上常用的肠道黏膜屏障保护剂, 可抑制细菌移位, 临床上常用来治疗腹泻。在本实验中我们拟以避水实验模拟环境和心理压力, 观察在应激条件下大鼠肠道生理生化指标的变化, 使用长双歧杆菌、思密达干预应激大鼠, 观察二者对应激条件下大鼠肠道功能的调节作用以及在保护应激大鼠肠道黏膜屏障有无协同作用。

1 材料和方法

1.1 材料 SD大鼠(郑州大学实验动物中心合格证号SCXK(豫)2005-0001); 长双歧杆菌(自金双歧片中分离, 内蒙古双歧药业, 批号: 090106); 思密达(蒙脱石散, 博福-益普生天津制药公司, 批号: T0461); 大鼠CRF、ACTH-ELISA试剂盒(美国ADL公司); 乳果糖(纯度99%, 比利时Acros公司);

■ 研发前沿

压力相关性IBS的发病机制目前仍不清楚, 目前研究多集中在肠道菌群状态、肠道屏障功能等方面, 其中CRF作为应激反应中重要的效应因子备受研究者关注。

■相关报道

Zairian等研究发现益生菌能够提高应激大鼠肠道屏障功能、阻断细菌移位。Gareau等认为肠道微生物群的变化是结肠病变的病因,益生菌改善应激幼鼠的肠道功能可能与其调节HPA轴正常化有关。在本课题组的前期研究中也发现应激可以导致嗜酸性粒细胞释放CRF。

甘露醇(纯度98%,比利时Acros公司);三氯蔗糖(纯度99%,美国Sigma公司); α -D-甲基甘露糖苷(内标1,纯度99%,美国Sigma公司);蔗糖(内标2,纯度99%,美国Sigma公司);N-三甲硅烷基咪唑、吡啶、盐酸羟胺(美国Sigma公司)。

1.2 方法

1.2.1 分组及应激模型的建立:清洁级SD大鼠50只,♀,体质量 $200\text{ g}\pm 20\text{ g}$,随机分为5组:正常对照组(A)、压力实验组(B)、双歧杆菌干预组(C)、思密达干预组(D)、双歧杆菌+思密达共同干预组(E),每组10只。A、B、C、D、E组分别灌胃给以下列溶液2 mL(ig):生理盐水、生理盐水、长双歧杆菌 10^7 CFU/mL 、思密达0.6 g/kg、长双歧杆菌 10^7 CFU/mL +思密达0.6 g/kg,每日8:00给药1次。WAS(water avoidance stress)模型^[14]:每日称质量给药后,除A组外其余各组动物均放置到一个8 cm×6 cm的平台上,平台固定在一个直径为50 cm,深50 cm的有水塑料容器内,离水面的距离为1 cm,每次放置2 h(8:00-10:00am),实验周期为7 d。

1.2.2 肠道通透性测定:糖摄取和尿液采集:第8天早晨8:00开始,每组大鼠分别灌胃给予甘露醇(M)80 mg、三氯蔗糖(S)60 mg、乳果糖(L)120 mg后放入大鼠代谢笼,3 h后自由饮水,该过程禁食^[16]。收集前5 h和其后19 h尿液,记录尿液体积。实验结束后将采集到的尿液置于-20℃条件下储存,进行后续的分析。样品制备^[17]: -20℃冰箱内取出尿液样品解冻,取100 μL 样品加入20 μL 内标溶液(含5 g/L内标1、2 g/L内标2),混匀后70℃氮气吹干,干燥物加入200 μL 含25 g/L盐酸羟胺的无水吡啶溶液,70℃反应1 h后,样品于2 250 r/min离心5 min,取100 μL 上清液转移到小锥形瓶中,加入100 μL N-三甲硅烷基咪唑在70℃反应30 min,得到的硅烷化衍生物密封储存于-20℃冰箱。在大鼠空白尿液中加入已知量两种糖制成标准品平行分析。测定方法^[17]:衍生化毛细管气相色谱法(capillary column gas chromatography, CCGC)测定大鼠尿液中甘露醇、三氯蔗糖浓度。色谱柱: HP-5(5%苯甲基硅烷)柱(30 m×320 μm ×0.25 μm);流动相:高纯氮气,1.0 mL/min;柱温:程序升温;检测器:氢火焰离子化检测器, T=280℃;进样量:2 μL ,手动进样,进样口温度250℃。每种糖定位由相应标准品的保留时间来确定,内标标准曲线法计算样品中每种糖的量。在该色谱条件下,内标1、甘露醇、内标2、三氯蔗糖和乳果糖的保留时

间分别是3.5、4.6、13.7、14.6和15.8 min。

1.2.3 血清中CRF、ACTH测定:实验结束日采用断头法处死大鼠,收集血液,室温下凝固20 min,低温离心(4℃、4 000 r/min, 30 min)分离血清,采用ELISA法测定血清中CRF和促肾上腺皮质激素(adrenocorticotrophic hormone, ACTH)的量。

1.2.4 粪便菌群分析^[13]:大鼠处死后取其新鲜粪便0.1 g左右,立即装入已称质量并装有5 mL生理盐水和2-3粒玻璃珠的无菌试管中,然后用生理盐水以10倍的比例倍比稀释成系列混悬液。取上述系列稀释液25 μL 滴种到4种选择性培养基上:大肠杆菌(伊红美兰培养基)、类杆菌(Bds培养基)、乳酸杆菌(Lbs培养基)、双歧杆菌(Blb培养基)。大肠杆菌需氧培养24 h,其余三菌置于厌氧罐中厌氧培养48 h,记录菌落数。根据菌落形态、涂片分析及耐氧实验结果计算各个菌种每克粪便中菌落形成单位(CFU/g)。

1.2.5 细菌移位:大鼠处死后以750 mL/L乙醇溶液浸泡1 h,于超净台内无菌取肠系膜淋巴结(mesenteric lymph node, MLN),匀浆后接种于血琼脂平板,37℃需氧24 h后或厌氧48 h后观察是否有细菌生长并记录菌落数。平板有细菌生长者记为MLN细菌移位阳性。移位率=阳性大鼠个数/每组大鼠总数。

统计学处理 实验结果采用SPSS10.0统计软件包分析。组间均数比较选用单因素方差分析,移位率的比较采用行×列表 χ^2 检验。采用 $\alpha=0.05$ 为假设检验标准。

2 结果

2.1 粪便菌群分析 与正常对照组相比,压力实验组大肠杆菌数量显著增加($P<0.05$,表1),说明应激环境下大鼠肠道出现了条件致病菌增多,肠道菌群紊乱现象;与压力实验组相比,双歧杆菌干预组及思密达干预组的大肠杆菌数量显著下降,双歧杆菌和双歧杆菌+思密达干预组大鼠的类杆菌数量显著下降($P<0.05$),但三组实验组之间均无显著性差异,说明长双歧杆菌、思密达均能改善应激所导致的肠道菌群紊乱,二者无协同作用。

2.2 细菌移位 MLN培养结果显示各组大鼠均有细菌移位现象发生,但压力实验组细菌移位率显著高于其他各组($P=0.00$,表2)。双歧杆菌或思密达干预后,实验组移位率显著降低($P=0.00$);双歧杆菌+思密达组移位率与双歧杆菌组无明显差异。

2.3 大鼠肠道通透性的测定 在该实验中以大鼠

表 1 大鼠粪便菌群分析结果 (n = 10, LgCFU/g, mean ± SD)

分组	大肠杆菌	类杆菌	乳杆菌	双歧杆菌
正常组	7.078 ± 0.229	9.214 ± 0.323	8.158 ± 0.388	9.175 ± 0.312
压力组	7.347 ± 0.277 ^a	9.485 ± 0.306	8.066 ± 0.287	9.027 ± 0.353
双歧杆菌组	7.044 ± 0.281 ^c	9.075 ± 0.393 ^c	8.123 ± 0.245	9.088 ± 0.288
思密达组	7.054 ± 0.302 ^c	9.145 ± 0.381	8.039 ± 0.234	9.084 ± 0.352
双歧杆菌+思密达	7.128 ± 0.298	9.127 ± 0.328 ^c	8.040 ± 0.347	9.136 ± 0.401

^aP<0.05 vs 正常组; ^cP<0.05 vs 模型组.

表 2 各组大鼠细菌移位率结果

分组	正常组	压力组	双歧杆菌组	思密达组	双歧杆菌+思密达组
MLN阳性数	1	4	1	2	1
总动物数	10	10	10	10	10
移位率(%)	10 ^c	40 ^a	10 ^c	20 ^{ac}	10 ^c

^aP<0.05 vs 正常组; ^cP<0.05 vs 模型组.

表 3 24 h大鼠尿液中甘露醇、三氯蔗糖的量及S/M (n = 10, %, mean ± SD)

分组	甘露醇(M)	三氯蔗糖(S)	S/M
正常组	4.718 ± 0.399	6.997 ± 0.520	1.304 ± 0.119
压力组	5.097 ± 0.453 ^a	6.167 ± 0.588	1.252 ± 0.096
双歧杆菌组	4.753 ± 0.363	6.031 ± 0.477	1.242 ± 0.095
思密达组	4.826 ± 0.419	6.075 ± 0.520	1.259 ± 0.052
双歧杆菌+思密达	4.806 ± 0.370	6.041 ± 0.496	1.259 ± 0.079

^aP<0.05 vs 正常组.

尿液S/M值来评价其肠道通透性. 大鼠尿液5 h和24 h甘露醇、三氯蔗糖、S/M结果见表3. 5 h(数据未显示)和24 h时S/M值可以分别用来评价小肠的通透性及整个胃肠道的通透性. 从表3可以看出压力实验组24 h尿液中甘露醇的量与正常对照组有显著性差异, 应激条件下大鼠肠道通透性发生了改变.

2.4 应激对大鼠血清CRF、ACTH的影响 与正常对照组相比压力实验组血清CRF、ACTH水平都有显著升高(P<0.05, 表4); 与压力实验组相比, 双歧杆菌干预组和双歧杆菌+思密达干预组ACTH水平显著下降(P<0.001). 这说明在应激的环境下, 大鼠的神经内分泌处于应激状态, 而益生菌对这种应激状态有缓解作用.

3 讨论

近年来有关益生菌治疗应激所导致的胃肠道

疾病的研究进展迅速, 但其治疗机制目前仍不清楚. 关于其治疗作用目前主要集中在益生菌对CRF的调节作用上^[18]. 本实验中应激大鼠也出现了血清CRF升高、肠道通透性改变及肠道菌群紊乱现象, 而双歧杆菌能够缓解上述现象, 这与Gareau等^[15]的研究结果相符. 在应激反应中, CRF通过中枢的下丘脑-垂体-肾上腺轴(hypothalamic-pituitary- adrenal, HPA轴)或者外周的以CRF为基础的旁分泌系统的激活来调节胃肠道^[11]. 在一定程度上说明益生菌可能是通过HPA轴这样一个长反射弧来调节应激所导致的胃肠道功能紊乱: (1)在其生长的肠道上皮位置, 调节肠道菌群正常化, 阻止病原菌黏附, 通过保护肠上皮的完整性来增强肠道的屏障功能. (2)通过神经体液因子途径, 益生菌可能间接刺激传入神经纤维. (3)降低全身皮质酮和ACTH的分泌^[19].

■创新盘点

本文探讨双歧杆菌对应激大鼠肠道功能的保护作用, 可以恢复受损的肠道屏障功能, CCGC测定应激大鼠肠道通透性的方法专属性较高, 灵敏度高, 降低了实验成本.

■应用要点

双歧杆菌和思密达能部分缓解慢性应激所导致的肠道功能紊乱现象,但二者联合使用没有意义,提示在临床实践中可以单用益生菌治疗。

表 4 大鼠神经内分泌测定结果 ($n = 10$, ng/L, mean \pm SD)

	正常组	压力组	双歧杆菌组	思密达组	双歧杆菌+思密达组
CRF	267.0 \pm 32.3	300.8 \pm 34.3 ^a	279.5 \pm 29.6	281.6 \pm 32.3	277.8 \pm 31.9
ACTH	5.68 \pm 0.799	6.79 \pm 0.651 ^a	5.92 \pm 0.477 ^c	6.24 \pm 0.787	5.94 \pm 0.650 ^c

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

应激大鼠出现肠道通透性的改变可能有下列原因。CRF是HPA轴的重要神经递质,其分泌具有昼夜节律性。CRF由下丘脑室旁核小细胞部神经元产生,于垂体前叶与CRF受体结合诱导ACTH释放,进而刺激肾上腺糖皮质激素释放^[20],而糖皮质激素是调节炎症及免疫反应的重要物质。CRF受体是一种G蛋白偶联受体,其信号传导是由通过激动cAMP所介导的级联反应^[21],并最终增加细胞内Ca²⁺浓度^[22]改变膜电位来实现的。肥大细胞通过抑制Ca²⁺内流来抑制自身活化和脱颗粒,而CRF能够促进Ca²⁺内流从而激活肥大细胞^[23]。肠道的上皮细胞是由一层柱状细胞组成,通过紧密连接蛋白进行连接,阻止抗原等大分子物质和细菌等通过旁细胞途径进行渗透,并且能够分泌大量的黏液素和抑菌蛋白来阻断细菌黏附。在应激条件下,细菌和抗原等可以由滤泡相关细胞如肥大细胞或紧密连接结构断裂等方式通过上皮屏障而进入体内^[24],进而引起细菌移位,通透性发生改变,而使用肥大细胞稳定剂后没有出现应激相关性的肠道通透性升高^[3]。因此,CRF调节肠道通透性可能是通过肥大细胞实现的。CRF信号传导的活化,能够导致致炎因子的释放^[25],促进肥大细胞释放组胺、IL-1 β 、TNF- α 等炎症因子^[26]。在我们前期研究中发现应激可以导致嗜酸性粒细胞释放CRF^[27],而使用CRF受体阻断剂可以显著的改善应激所导致的肠道屏障功能紊乱^[28]。因此,CRF在应激相关肠道功能紊乱中起着重要作用,但其确切的作用机制如作用位点等仍需进一步研究。

肠道通透性的测量是评估肠道屏障功能完整性的最直接方法,常用大分子糖探针来进行测定。乳果糖和甘露醇的被认为是旁细胞和跨细胞途径通透性的反映,二者比率曾是一种灵敏度高的小肠通透性标记。但由于乳果糖是一种二糖易被结肠的细菌分解,改变的结肠pH,可能改变结肠微生物群,改变肠道通透性而不宜选用。而三氯蔗糖无这些缺点,尿液中三氯蔗糖的排泄可以应用于整个肠道(包括小肠和结肠)

通透性的评估^[17]。本实验中流动相采用了氮气得到的峰形较好,分离度能满足实验要求,降低了实验成本。由于相关文献较少,建立有效的三氯蔗糖与甘露醇比例(S/M)作为整体肠道通透性的标记的方法还需深入研究。本实验中应激大鼠虽出现肠道甘露醇的通透性升高,但S/M虽有升高趋势却无明显变化,可能有以下原因:大鼠对应激具有适应性、WAS模型刺激较弱需延长造模周期。该实验中采用了单一菌株干预且干预时间为较短,益生菌的联合长期应用值得我们进一步研究。

本实验中应激大鼠出现了肠道菌群失调、CRF水平升高、细菌移位等现象,大鼠的神经内分泌处于应激状态,肠道通透性亦发生了改变。本实验的结果也证实了双歧杆菌能够缓解上述现象,为益生菌治疗应激所导致的肠道相关疾病的治疗提供了实验依据。

4 参考文献

- 1 Miller G, Chen E, Cole SW. Health psychology: developing biologically plausible models linking the social world and physical health. *Annu Rev Psychol* 2009; 60: 501-524
- 2 Muscatell KA, Slavich GM, Monroe SM, Gotlib IH. Stressful life events, chronic difficulties, and the symptoms of clinical depression. *J Nerv Ment Dis* 2009; 197: 154-160
- 3 Santos J, Alonso C, Vicario M, Ramos L, Lobo B, Malagelada JR. Neuropharmacology of stress-induced mucosal inflammation: implications for inflammatory bowel disease and irritable bowel syndrome. *Curr Mol Med* 2008; 8: 258-273
- 4 Stengel A, Taché Y. Neuroendocrine control of the gut during stress: corticotropin-releasing factor signaling pathways in the spotlight. *Annu Rev Physiol* 2009; 71: 219-239
- 5 Maunier RG, Levenstein S. The role of stress in the development and clinical course of inflammatory bowel disease: epidemiological evidence. *Curr Mol Med* 2008; 8: 247-252
- 6 Taché Y, Brunnhuber S. From Hans Selye's discovery of biological stress to the identification of corticotropin-releasing factor signaling pathways: implication in stress-related functional bowel diseases. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1148: 29-41
- 7 Spiller R, Garsed K. Postinfectious irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2009; 136: 1979-1988
- 8 Yang PC, Jury J, Söderholm JD, Sherman PM,

- McKay DM, Perdue MH. Chronic psychological stress in rats induces intestinal sensitization to luminal antigens. *Am J Pathol* 2006; 168: 104-114; quiz 363
- 9 Fekete EM, Zorrilla EP. Physiology, pharmacology, and therapeutic relevance of urocortins in mammals: ancient CRF paralogs. *Front Neuroendocrinol* 2007; 28: 1-27
- 10 Fukudo S. Role of corticotropin-releasing hormone in irritable bowel syndrome and intestinal inflammation. *J Gastroenterol* 2007; 42 Suppl 17: 48-51
- 11 Paschos KA, Kolios G, Chatzaki E. The corticotropin-releasing factor system in inflammatory bowel disease: Prospects for new therapeutic approaches. *Drug Discov Today* 2009; 14: 713-720
- 12 Hörmannspurger G, Haller D. Molecular crosstalk of probiotic bacteria with the intestinal immune system: clinical relevance in the context of inflammatory bowel disease. *Int J Med Microbiol* 2010; 300: 63-73
- 13 张利利, 郑鹏远, 罗予, 王新亭, 刘志强, 黄煌. 双歧杆菌对食物过敏小鼠肠道屏障功能及Th1/Th2细胞因子的影响. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 450-550
- 14 Zareie M, Johnson-Henry K, Jury J, Yang PC, Ngan BY, McKay DM, Soderholm JD, Perdue MH, Sherman PM. Probiotics prevent bacterial translocation and improve intestinal barrier function in rats following chronic psychological stress. *Gut* 2006; 55: 1553-1560
- 15 Gareau MG, Jury J, MacQueen G, Sherman PM, Perdue MH. Probiotic treatment of rat pups normalises corticosterone release and ameliorates colonic dysfunction induced by maternal separation. *Gut* 2007; 56: 1522-1528
- 16 Meddings JB, Gibbons I. Discrimination of site-specific alterations in gastrointestinal permeability in the rat. *Gastroenterology* 1998; 114: 83-92
- 17 Farhadi A, Keshavarzian A, Holmes EW, Fields J, Zhang L, Banan A. Gas chromatographic method for detection of urinary sucralose: application to the assessment of intestinal permeability. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2003; 784: 145-154
- 18 Kiank C, Taché Y, Larauche M. Stress-related modulation of inflammation in experimental models of bowel disease and post-infectious irritable bowel syndrome: role of corticotropin-releasing factor receptors. *Brain Behav Immun* 2010; 24: 41-48
- 19 Eutamene H, Bueno L. Role of probiotics in correcting abnormalities of colonic flora induced by stress. *Gut* 2007; 56: 1495-1497
- 20 Lightman SL. The neuroendocrinology of stress: a never ending story. *J Neuroendocrinol* 2008; 20: 880-884
- 21 Hauger RL, Grigoriadis DE, Dallman MF, Plotsky PM, Vale WW, Dautzenberg FM. International Union of Pharmacology. XXXVI. Current status of the nomenclature for receptors for corticotropin-releasing factor and their ligands. *Pharmacol Rev* 2003; 55: 21-26
- 22 Gutknecht E, Van der Linden I, Van Kolen K, Verhoeven KF, Vauquelin G, Dautzenberg FM. Molecular mechanisms of corticotropin-releasing factor receptor-induced calcium signaling. *Mol Pharmacol* 2009; 75: 648-657
- 23 Wallon C, Yang PC, Keita AV, Ericson AC, McKay DM, Sherman PM, Perdue MH, Söderholm JD. Corticotropin-releasing hormone (CRH) regulates macromolecular permeability via mast cells in normal human colonic biopsies in vitro. *Gut* 2008; 57: 50-58
- 24 Al-Sadi R, Boivin M, Ma T. Mechanism of cytokine modulation of epithelial tight junction barrier. *Front Biosci* 2009; 14: 2765-2778
- 25 Gay J, Kokkotou E, O'Brien M, Pothoulakis C, Karalis KP. Corticotropin-releasing hormone deficiency is associated with reduced local inflammation in a mouse model of experimental colitis. *Endocrinology* 2008; 149: 3403-3409
- 26 Rao KN, Brown MA. Mast cells: multifaceted immune cells with diverse roles in health and disease. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1143: 83-104
- 27 Zheng PY, Feng BS, Oluwole C, Struiksma S, Chen X, Li P, Tang SG, Yang PC. Psychological stress induces eosinophils to produce corticotrophin releasing hormone in the intestine. *Gut* 2009; 58: 1473-1479
- 28 Teitelbaum AA, Gareau MG, Jury J, Yang PC, Perdue MH. Chronic peripheral administration of corticotropin-releasing factor causes colonic barrier dysfunction similar to psychological stress. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008; 295: G452-G459

■同行评价

本研究观察大鼠在应激模型中肠道主要菌群发生的改变, 以及双歧杆菌干预对此改变的调节作用, 有很好的科学意义。

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》入选《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)

缺血性脑卒中大鼠小肠动力异常及与血清Ghrelin变化的关系

啜佳然, 朱玉群, 徐立新, 袁芳, 安博, 徐有青

■背景资料

中国缺血性脑卒中发病率位居世界第一, 具有高致死率、高复发率、高致残率的特点。多数研究认为胃肠道是全身应激性炎症反应和多器官功能障碍的始动和扩大器官。

啜佳然, 朱玉群, 安博, 徐有青, 首都医科大学附属北京天坛医院消化内科 崇文区 100050

徐立新, 袁芳, 北京市神经外科研究所病理生理室 北京市 100050

啜佳然, 在读硕士, 主要从事消化系统疾病的研究。

首都医学发展科研基金资助项目, No. 2007-3098

作者贡献分布: 实验由朱玉群设计; 实验操作由啜佳然与安博完成, 袁芳与徐立新作指导; 数据分析由啜佳然完成; 本论文写作由啜佳然完成, 朱玉群、袁芳及徐有青作指导。

通讯作者: 朱玉群, 主任医师, 教授, 100050, 北京市, 首都医科大学附属北京天坛医院消化内科. amber1028@tom.com
电话: 010-67096580

收稿日期: 2009-12-15 修回日期: 2010-05-05

接受日期: 2010-05-10 在线出版日期: 2010-05-28

Changes in serum ghrelin and small intestinal motility in rats with cerebral arterial thrombosis

Jia-Ran Chuai, Yu-Qun Zhu, Li-Xin Xu, Fang Yuan, Bo An, You-Qing Xu

Jia-Ran Chuai, Yu-Qun Zhu, Bo An, You-Qing Xu, Department of Gastroenterology, Beijing Tiantan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China

Li-Xin Xu, Fang Yuan, Department of Pathophysiology, Beijing Neurosurgical Institute, Beijing 100050, China

Supported by: the Capital Medical Development and Research Foundation, No. 2007-3098

Correspondence to: Professor Yu-Qun Zhu, Department of Gastroenterology, Beijing Tiantan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China. amber1028@tom.com

Received: 2009-12-15 Revised: 2010-05-05

Accepted: 2010-05-10 Published online: 2010-05-28

Abstract

AIM: To determine the changes in serum ghrelin and small intestinal motility in rats with cerebral arterial thrombosis and to explore their relationship.

METHODS: Forty-eight Wistar rats were randomly divided into two groups: control group ($n = 8$) and middle cerebral artery occlusion (MCAO) group ($n = 40$). The MCAO group was further equally divided into 5 subgroups for testing at 3, 6, 12, 24 and 48 h after cerebral arterial thrombosis. MCAO was induced in rats using the thread occlusion method proposed

by Longa. Neurologic examinations were conducted and neurologic findings were scored at each time point. Triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining of brain tissue was performed. The content of serum ghrelin was determined by enzyme-linked immunosorbent assay, and small intestinal motility was measured by methylene blue staining. The ileum tissue was examined by light and electron microscopy.

RESULTS: The neurologic scores were 0 for all the rats in the control group and 1-3 for those in the MCAO group. Small intestinal motility was significantly lower in the MCAO group than in the control group ($P < 0.05$), reaching the lowest level at 24 h. Serum ghrelin level increased at 3 h and reached the peak at 24 h. Serum ghrelin level was significantly higher in the MCAO group than in the control group ($P < 0.05$). Correlation analysis showed a linear relationship between serum ghrelin levels and small intestinal motility ($r = -0.841$, $P < 0.05$) in rats with MCAO. Intestinal mucosal injury could be seen by light and electron microscopy, such as intestinal villus swelling, chondrosome swelling, vacuolar degeneration, apoptosis, etc.

CONCLUSION: Changes in serum ghrelin and small intestinal motility occur in rats with MCAO. The change of intestinal motility is significant at 24 h after cerebral ischemia.

Key Words: Middle cerebral artery occlusion; Ghrelin; Small intestinal motility

Chuai JR, Zhu YQ, Xu LX, Yuan F, An B, Xu YQ. Changes in serum ghrelin and small intestinal motility in rats with cerebral arterial thrombosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(15): 1550-1554

摘要

目的: 探讨缺血性脑卒中大鼠小肠动力的改变及与血清Ghrelin变化的关系。

方法: 48只♂ Wistar大鼠随机分为对照组($n = 8$)和实验组($n = 40$), 实验组按照3、6、12、

■同行评议者

李勇, 副教授, 上海中医药大学附属市中医医院消化科

24、48 h随机分为5个亚组, 每组大鼠8只. 采用Longa线栓法建立大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型(对照组大鼠仅切开皮肤, 不放线栓), 所有大鼠进行神经生物学评分, MCAO组进行脑组织TTC染色. 美蓝染色法检测肠动力; 酶联免疫法测定血清Ghrelin水平; 取距回盲部5 cm处小肠, 光镜及电镜下观察肠黏膜组织的变化.

结果: 对照组大鼠神经生物评分为0分, MCAO组大鼠神经生物评分为1-3分, MCAO组大鼠脑组织TTC染色可见缺血坏死区. MCAO各亚组的小肠推进比均明显低于对照组($P<0.05$), 脑缺血后24 h降至最低. MCAO各亚组血清Ghrelin水平均明显高于对照组($P<0.05$), 血清Ghrelin水平于术后3 h即升高, 24 h达峰值. 相关性分析显示缺血性脑卒中大鼠血清Ghrelin水平与小肠推进比之间呈线性关系($r = -0.841$, $P<0.05$). 光镜下MCAO组肠黏膜上皮细胞受损, 电镜下可见大量线粒体肿胀、嵴断裂, 细胞器空泡变性, 细胞间紧密连接偶见增宽, 可见凋亡细胞.

结论: MCAO大鼠局灶性脑缺血后出现肠动力改变、血清Ghrelin水平变化, 脑缺血24 h内小肠动力显著下降, 考虑可能与脑缺血应激后多种因素共同作用的结果, 其机制仍需进一步研究.

关键词: 大脑中动脉闭塞模型; Ghrelin; 小肠动力

阚佳然, 朱玉群, 徐立新, 袁芳, 安博, 徐有青. 缺血性脑卒中大鼠小肠动力异常及与血清Ghrelin变化的关系. 世界华人消化杂志 2010; 18(15): 1550-1554
http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/1550.asp

0 引言

缺血性脑卒中在近几年的发病率有明显升高趋势, 不但给患者带来痛苦, 而且引起一系列并发症, 造成患者预后不良、生活质量降低, 甚至死亡. 其中, 胃肠道反应不容忽略, 多数学者认为, 胃肠道通常是全身应激性炎症反应的始动和扩大器官, 因此, 胃肠动力障碍的病因和发病机制成为提高疗效、改善预后的一个突破口. 然而胃肠动力障碍的发病机制是复杂的、多因素参与的病理生理过程, 其发病机制至今尚未完全阐明. 本研究仅在一中胃肠激素Ghrelin与小肠动力之间作初步探讨.

1 材料和方法

1.1 材料 健康♂ Wistar大鼠48只(购自北京维通

利华实验动物技术有限公司), 体质量200-220 g, 尼龙栓线(购自北京沙东生物技术有限公司), Ghrelin试剂盒(购自北京康泰生物科技有限公司), 亚甲蓝(methylthioninium, 购自北京化学试剂有限公司).

1.2 方法

1.2.1 实验动物分组及模型建立: 实验动物分为6组. 对照组(假手术组)8只, 仅切开皮肤, 不放线栓; 实验组(MCAO模型组)40只, 随机分为3、6、12、24、48 h组, 每组8只. 采用Longa线栓法建立大鼠大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型^[1]. 各组手术时间相同, 无菌操作, 室温恒定为26 ℃.

1.2.2 神经生物学评分及脑组织TTC染色: 本研究MCAO模型, 实验动物行神经生物学评分及脑组织TTC染色, 模型成功者进行下一步实验研究, 大鼠清醒后参考Longa等^[1]的方法进行神经生物学评分, 确定MCAO模型的建立.

1.2.3 亚甲蓝染色法测小肠推进比: 预先用蒸馏水配制成50%的亚甲蓝染色剂, 所有大鼠术前正常进食、饮水, 将实验组大鼠分别于相应时间点前30 min自大鼠口腔插入鼠胃管, 注入染色剂1.0 mL, 30 min后麻醉大鼠, 开腹, 标志染料终末端, 测量幽门括约肌至蓝染小肠末端距离与整个小肠长度之比(幽门括约肌至回盲部), 为小肠推进比.

1.2.4 血清Ghrelin含量: 10%水合氯醛腹腔麻醉(4 mL/kg), 心脏取血3-4 mL, 采用酶联免疫法检测血清Ghrelin值. 操作按试剂盒说明书进行.

1.2.5 病理组织学观察: 取回肠末段(距回盲部5 cm)组织, 光镜、电镜下观察肠黏膜组织学变化.

统计学处理 用SPSS13.0统计软件对数据进行方差分析, 实验数据以mean±SD表示, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义; MCAO组小肠推进比和血清Ghrelin水平之间采用直线相关进行统计学分析.

2 结果

2.1 神经生物学评分及脑组织TTC染色 大鼠清醒后, 对照组大鼠未见神经生物学异常表现. MCAO组大鼠均出现行为学障碍, 主要表现为对侧肢体无力、触觉减低, 提尾时对侧前肢屈曲, 或不能直行仅向对侧转圈, 患侧出现Horner征, 神经生物学评分为1-3分. 其中, 对照、3、6、12、24、48 h的平均分分别为: 0、1.00、2.00、2.00、2.00、2.25. 将MCAO组大鼠断头

■ 研发前沿

针对Ghrelin促进胃肠动力以及保护神经细胞的作用, Ghrelin可能对改善脑缺血后胃肠功能障碍、减轻脑损伤具有一定意义, 亟待解决的问题是Ghrelin在人类患者中的可用性、剂量及给药时机.

■应用要点

本研究显示,脑缺血早期血清Ghrelin代偿性升高,但不足以维持肠动力,考虑外源性给予适量Ghrelin是否可以改善脑缺血后肠动力障碍,可能为脑缺血患者的早期临床干预提供依据,从而缩短疗程,改善预后。

表 1 脑缺血后小肠推进比及血清Ghrelin的变化 ($n = 8$, mean \pm SD)

	对照	3 h	6 h	12 h	24 h	48 h
推进比	0.65 \pm 0.05	0.53 \pm 0.02 ^a	0.44 \pm 0.03 ^{ad}	0.41 \pm 0.04 ^a	0.39 \pm 0.02 ^a	0.40 \pm 0.02 ^a
Ghrelin	1.89 \pm 0.24	2.81 \pm 0.26 ^a	3.87 \pm 0.14 ^{ae}	4.99 \pm 0.29 ^{ae}	5.55 \pm 0.42 ^a	3.64 \pm 0.51 ^{ae}

^a $P < 0.05$ vs 对照组; ^d $P < 0.01$ vs 3 h组; ^e $P < 0.05$ vs 前一组。

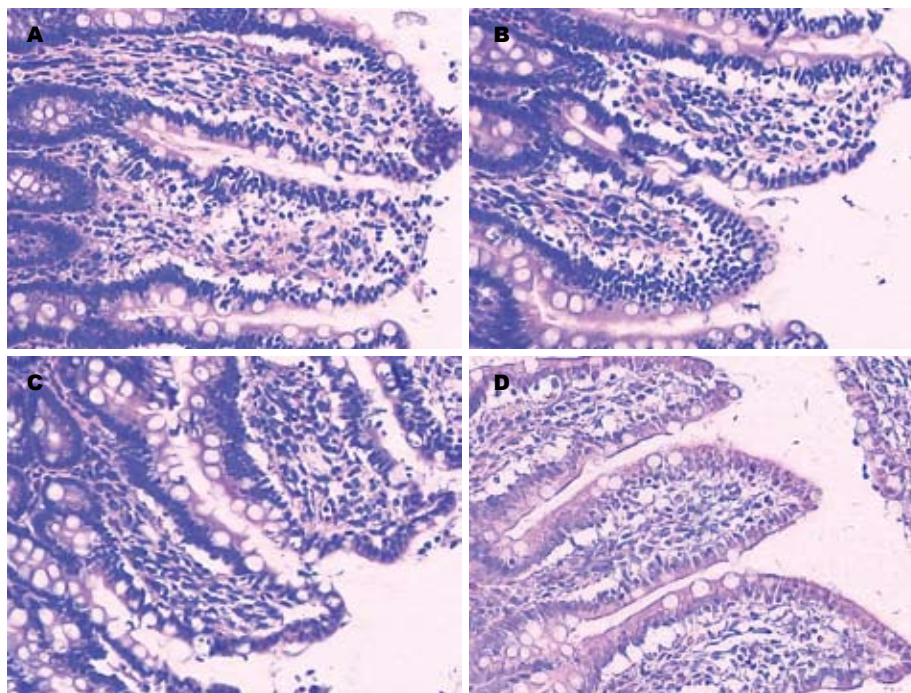


图 1 MCAO组术后光镜图($\times 200$). 可见小肠绒毛肿胀、增粗、缩短、变形,绒毛顶端破损、剥脱. A: MCAO后3 h; B: MCAO后12 h; C: MCAO后24 h; D: MCAO后6 h.

取脑,行TTC染色,可见脑组织存在未染色区域,为缺血坏死区.MCAO模型建立成功。

2.2 大鼠MCAO模型小肠推进比 MCAO组各时间点的小肠推进比均明显低于对照组,差异具有统计学意义($P < 0.05$).脑缺血后24 h小肠动力降至最低,至48 h有所恢复但仍未恢复正常(表1)。

2.3 血清Ghrelin水平 MCAO组各时间点血清Ghrelin水平均明显高于对照组,差异具有统计学意义($P < 0.05$).MCAO早期血清Ghrelin水平逐渐升高,于缺血后24 h达高峰,此后下降,至48 h未恢复正常(表1)。

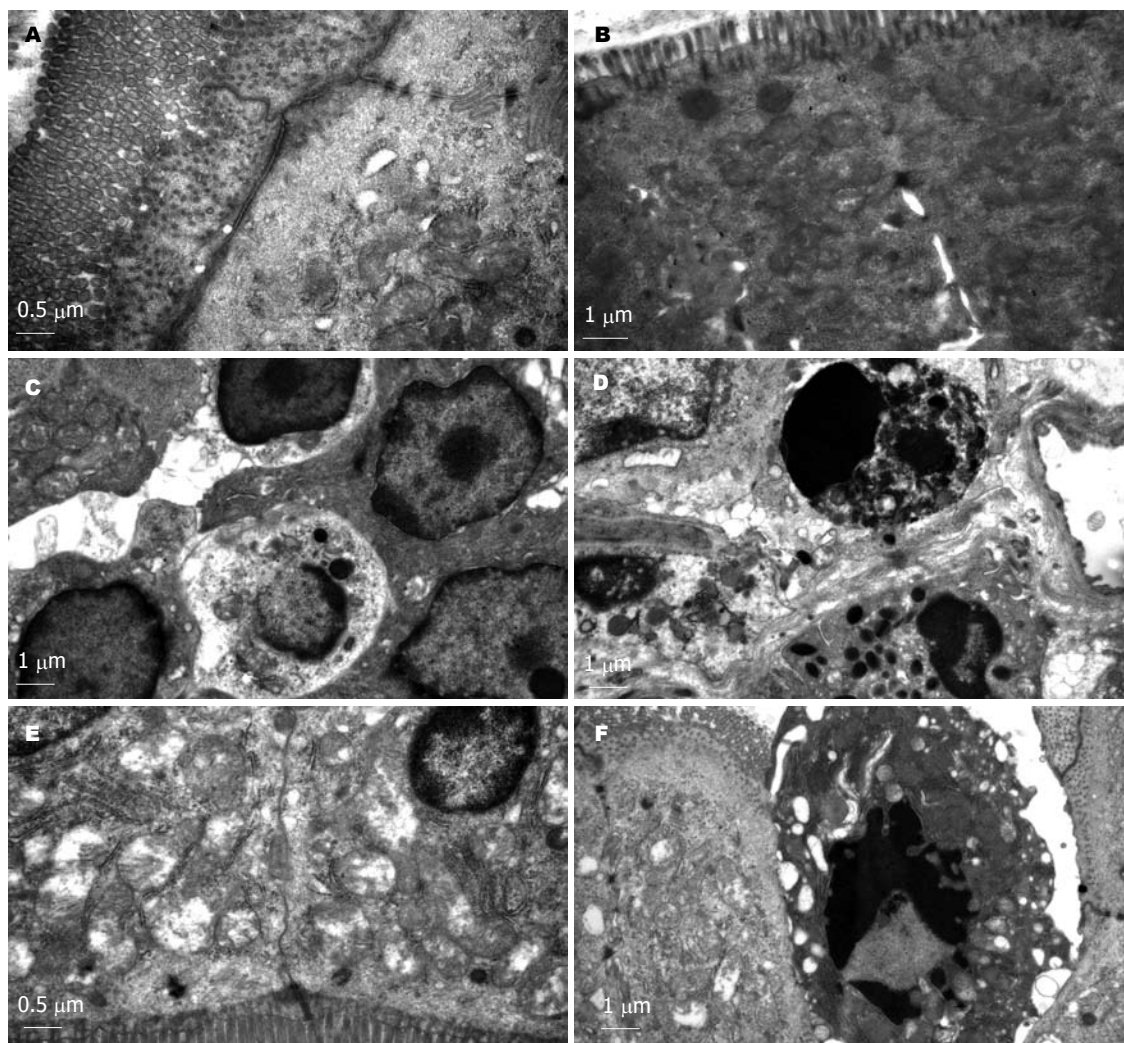
2.4 病理学检查 对照组在光镜、电镜下小肠黏膜结构基本完整.光镜下MCAO组术后可见小肠绒毛肿胀、增粗、缩短,绒毛顶端破损、剥脱,固有层裸露.电镜下MCAO组可见大量线粒体肿胀、嵴断裂,随者时间推移细胞器空泡变性程度加重,细胞间紧密连接偶见增宽,偶见凋亡细胞.对照组在光镜、电镜下小肠黏膜结构基本完整(图1,2)。

2.5 相关性分析 结果显示, MCAO大鼠血清Ghrelin水平与小肠推进比之间呈线性关系(相关系数 $r = -0.841$, $P < 0.05$),二者呈负相关(图3)。

3 讨论

临床和动物实验研究发现,缺血性脑卒中可引起胃肠动力的改变.多数实验结果显示,应激状态下结肠运动显著增强,而应激对胃和小肠运动的影响尚存在争议.本实验通过观察小肠推进比来反映肠道运动情况,结果显示MCAO各亚组小肠推进比均显著低于对照组,支持在缺血性脑卒中早期存在小肠运动功能障碍。

对于缺血性脑卒中后胃肠动力改变的机制尚不十分清楚.一些研究证明,应激后胃肠动力的改变可能与某些胃肠激素的改变有关.刘婧等^[2]在临床中观察了烧、烫伤急性期出现腹胀、恶心、呕吐等胃肠动力功能紊乱的患者,发现促胃肠动力的胆囊收缩素-8(CCK-8)、生长抑素(SS)、胃动素(GAS)水平显著升高,而起抑制作用的血管活性肠肽(VIP)水平降低;在动物实验研究



■同行评价
本文思路清晰, 实验设计合理, 技术手段以及统计学方法使用较为恰当, 具有一定的科学性。

图 2 MCAO组术后电镜图. A: MCAO后3 h, 少量细胞器空泡变性($\times 25\ 000$); B: MCAO后6 h, 偶见细胞间连接增宽($\times 15\ 000$); C: MCAO后12 h, 线粒体肿胀, 嵴断裂, 可见晚期凋亡细胞($\times 12\ 000$); D: MCAO后24 h, 细胞器空泡变性, 可见凋亡细胞($\times 12\ 000$); E: MCAO后24 h, 大量线粒体肿胀、空泡变性($\times 20\ 000$); F: MCAO后48 h, 大量细胞器空泡变性, 可见凋亡细胞($\times 12\ 000$).

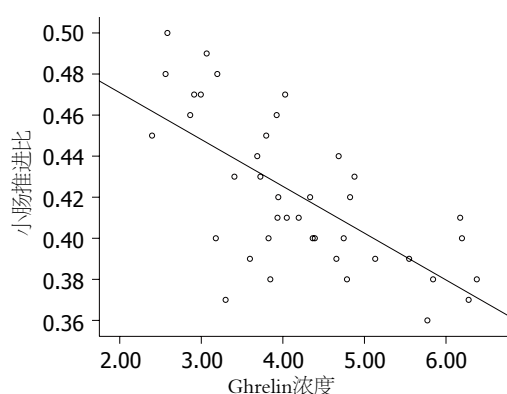


图 3 MCAO大鼠血清Ghrelin水平与小肠推进比.

发现, 应激使大鼠胃窦的规则收缩消失、运动加强, VIP对增强的胃运动有明显的抑制效应, 大鼠血浆内VIP含量在应激后1-2 h显著升高, CCK-8含量于应激后即刻升高, 随后恢复正常. Nakade

等^[3]通过动物实验发现, 束缚应激下的大鼠可以通过促肾上腺皮质激素释放因子(CRF)的作用延缓胃排空. 急性胰腺炎时小肠肌间神经丛和黏膜下层非肾上腺非胆碱能神经元中一氧化氮合酶(nNOS)表达增加、活性增强进而产生大量一氧化氮, 引起胃肠电生理紊乱, 抑制胃肠运动^[4].

Ghrelin作为新近发现的脑肠肽, 参与胃肠动力的调节, 但与缺血性脑卒中胃肠动力变化的相关研究不多. Ghrelin又叫胃促生长素, 是生长激素促分泌剂(GH-Ss)受体的内源性配体. 研究发现Ghrelin对大鼠的采食量和胃酸分泌有促进作用^[5,6]. Masada等^[7]描述了小鼠静脉内注射Ghrelin所出现的胃的收缩反应加强, 阿托品和迷走神经切断术可以阻断这种效应. Tebbe等^[8]研究提示Ghrelin在下丘脑室旁核可通过神经肽Y1受体和非选择性的促肾上腺皮质激素释放因子1受

体发挥胃肠动力的中枢调节作用. Ghrelin受营养状况和激素因素调节. 高脂饮食、高体质量指数、摄食增加可以抑制Ghrelin的分泌. 而饥饿、低蛋白饮食、体质量减轻则可以使Ghrelin分泌增多^[9-11].

大量的研究证明^[8,12], Ghrelin具有促进胃排空及肠运动的作用. 而本实验结果显示, MCAO组大鼠血清Ghrelin水平明显高于对照组, 与小肠推进比呈负相关, 这与我们最初的设想不一致. 其原因可能是: 脑缺血应激可能使多种促进和/或抑制胃肠运动的激素水平发生变化, 他们共同作用的结果导致小肠运动减慢, 与此同时, 小肠平滑肌形态学改变以及小肠电生理的变化亦是影响其运动的重要因素. 虽然在脑缺血24 h内血清Ghrelin水平代偿性升高, 但是仍不能逆转小肠运动减慢的最终结果. Masada等^[7]研究证实, 短时间(15 min)的大脑中动脉闭塞能诱导HSP70大量合成, 以减轻再次缺血造成的脑水肿和脑血管损伤, 外源性给予Ghrelin亦可提高HSP70的细胞保护作用.

从本研究可以看到MCAO组大鼠脑缺血早期即发生肠动力和血清Ghrelin水平的明显变化, 血清Ghrelin水平上升, 小肠运动功能降低, 二者呈明显的背向趋势, 我们考虑, 在脑缺血早期机体以代偿为主, 血清Ghrelin水平反应性上调以减轻脑损伤, 同时力求加快肠道蠕动, 以减轻肠黏膜屏障的损害, 体现了机体自身抗损伤能力. 脑缺血后小肠运动功能降低, 表明机体的代偿仍不能维持肠道正常的生理功能, 同时也表明脑缺血后肠运动功能障碍可能是由多种因素共同作用的结果, 血清Ghrelin水平变化可能不是其主要或者唯一的影响因素. 另外, 本实验光镜下观察小肠绒毛可见形态学异常改变, 透射电镜下肠黏膜细胞的超微结构亦出现异常改变. 其中, 线粒体的损伤提示肠黏膜细胞损伤的过程, 可能与小肠动力下降有关.

4 参考文献

1 Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R.

Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* 1989; 20: 84-91

2 刘婧, 李兆申. 烧伤应激对胃动力的影响. 世界华人消化杂志 2007; 15: 134-139

3 Nakade Y, Tsuchida D, Fukuda H, Iwa M, Pappas TN, Takahashi T. Restraint stress delays solid gastric emptying via a central CRF and peripheral sympathetic neuron in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005; 288: R427-R432

4 刘殿刚, 孙家邦, 张淑文, 李非, 朱斌, 王伟, 曲瑞瑶. 胰腺炎相关腹水对空肠运动和肠组织含nNOS神经的影响. 首都医科大学学报 2005; 26: 482-485

5 Asakawa A, Inui A, Fujimiya M, Sakamaki R, Shinfuku N, Ueta Y, Meguid MM, Kasuga M. Stomach regulates energy balance via acylated ghrelin and desacyl ghrelin. *Gut* 2005; 54: 18-24

6 Toshinai K, Yamaguchi H, Sun Y, Smith RG, Yamanaka A, Sakurai T, Date Y, Mondal MS, Shimbara T, Kawagoe T, Murakami N, Miyazato M, Kangawa K, Nakazato M. Des-acyl ghrelin induces food intake by a mechanism independent of the growth hormone secretagogue receptor. *Endocrinology* 2006; 147: 2306-2314

7 Masada T, Hua Y, Xi G, Ennis SR, Keep RF. Attenuation of ischemic brain edema and cerebrovascular injury after ischemic preconditioning in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 2001; 21: 22-33

8 Tebbe JJ, Mronga S, Tebbe CG, Ortmann E, Arnold R, Schäfer MK. Ghrelin-induced stimulation of colonic propulsion is dependent on hypothalamic neuropeptide Y1- and corticotrophin-releasing factor 1 receptor activation. *J Neuroendocrinol* 2005; 17: 570-576

9 Lee HM, Wang G, Englander EW, Kojima M, Greeley GH Jr. Ghrelin, a new gastrointestinal endocrine peptide that stimulates insulin secretion: enteric distribution, ontogeny, influence of endocrine, and dietary manipulations. *Endocrinology* 2002; 143: 185-190

10 Monteleone P, Seritella C, Martiadis V, Scognamiglio P, Maj M. Plasma obestatin, ghrelin, and ghrelin/obestatin ratio are increased in underweight patients with anorexia nervosa but not in symptomatic patients with bulimia nervosa. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93: 4418-4421

11 Mager U, Degenhardt T, Pulkkinen L, Kolehmainen M, Tolppanen AM, Lindström J, Eriksson JG, Carlberg C, Tuomilehto J, Uusitupa M. Variations in the ghrelin receptor gene associate with obesity and glucose metabolism in individuals with impaired glucose tolerance. *PLoS One* 2008; 3: e2941

12 Xu L, Depoortere I, Tomasetto C, Zandecki M, Tang M, Timmermans JP, Peeters TL. Evidence for the presence of motilin, ghrelin, and the motilin and ghrelin receptor in neurons of the myenteric plexus. *Regul Pept* 2005; 124: 119-125

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

亚甲基四氢叶酸还原酶基因C677T多态性与HBV感染后疾病转归的关系

刘娟娟, 高英堂, 杜智, 杨斌, 经翔, 王毅军, 王凤梅, 景丽

刘娟娟, 天津医科大学三中心临床学院 天津市 300170
高英堂, 杜智, 杨斌, 王凤梅, 景丽, 天津市第三中心医院 天津市人工细胞重点实验室 天津市 300170
经翔, 王毅军, 天津市第三中心医院肝胆外科 天津市 300170
刘娟娟, 天津医科大学硕士, 主要从事单核苷酸多态性与肝病之间关系的基础研究。

天津市科委攻关专项基金资助项目, No. 05YFSZSF02500

作者贡献分布: 刘娟娟与高英堂对此文所作贡献均等; 此课题的设计与写作由高英堂、杜智及刘娟娟完成; 标本采集由刘娟娟、景丽、经翔及王毅军完成; 研究过程由刘娟娟、杨斌及王凤梅完成; 数据分析由刘娟娟与高英堂完成。

通讯作者: 高英堂, 研究员, 300170, 天津市河东区津塘路83号, 天津市第三中心医院. gaoyt816@163.com

电话: 022-84112148 传真: 022-24382234

收稿日期: 2010-03-06 修回日期: 2010-04-30

接受日期: 2010-05-10 在线出版日期: 2010-05-28

Relationship between the MTHFR C677T polymorphism and the outcome of hepatitis B virus infection

Juan-Juan Liu, Ying-Tang Gao, Zhi Du, Bin Yang, Xiang Jing, Yi-Jun Wang, Feng-Mei Wang, Li Jing

Juan-Juan Liu, the Third Central Clinical College of Tianjin Medical University, Tianjin 300170, China
Ying-Tang Gao, Zhi Du, Bin Yang, Feng-Mei Wang, Li Jing, Tianjin Key Laboratory of Artificial Cell, Tianjin Third Central Hospital, Tianjin 300170, China
Xiang Jing, Yi-Jun Wang, Department of Hepatobiliary Surgery, Tianjin Third Central Hospital, Tianjin 300170, China

Supported by: the Key Science and Technology Project of Tianjin Science and Technology Commission, No. 05YF-SZSF02500

Correspondence to: Ying-Tang Gao, Tianjin Third Central Hospital, 83 Jintang Road, Hedong District, Tianjin 300170, China. gaoyt816@163.com

Received: 2010-03-06 Revised: 2010-04-30

Accepted: 2010-05-10 Published online: 2010-05-28

Abstract

AIM: To investigate the relationship between the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism and the outcome of hepatitis B virus (HBV) infection.

METHODS: TaqMan SNP genotyping and sequencing assays were employed to determine the genotypes of MTHFR C677T and the distribution of alleles at this locus in 152 healthy con-

trol subjects, 161 self-limited HBV patients, 173 patients with chronic hepatitis B, 138 patients with HBV-induced liver cirrhosis and 181 cases with HBV-related HCC.

RESULTS: Of the 805 subjects, 47.09% had the CT genotype, 30.43% had the TT genotype, and 22.48% had the CC genotype. The frequencies of C and T allele were 46.02% and 53.98%, respectively, which are significantly different from those reported previously. Males with the TT genotype had a reduced risk of liver diseases. The odds ratio (OR) of TT and CT was lowest in the liver cirrhosis group versus the self-limited group (0.675, 95% CI: 0.308-1.479; 0.510, 95% CI: 0.248-1.050). In contrast, females with the TT and CT genotypes had an increased risk of self-limited HBV infection, chronic hepatitis and liver cirrhosis. The liver cirrhosis group had the highest OR value versus the self-limited group (3.542, 95% CI: 0.885-14.171; 3.167, 95% CI: 0.821-12.211; $P = 0.022$). Females with the TT and CT genotypes had a reduced risk of HCC (OR = 0.638, 95% CI: 0.213-1.904; OR = 0.500, 95% CI: 0.175-1.432).

CONCLUSION: A relatively high frequency of the TT genotype is noted in a Chinese Han population in Tianjin. The MTHFR C677T polymorphism may play a role in influencing disease progression in patients with HBV infection.

Key Words: Methylenetetrahydrofolate reductase; C677T; Polymorphism; Hepatitis B virus; Disease progression

Liu JJ, Gao YT, Du Z, Yang B, Jing X, Wang YJ, Wang FM, Jing L. Relationship between the MTHFR C677T polymorphism and the outcome of hepatitis B virus infection. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(15): 1555-1562

摘要

目的: 探讨MTHFR C677T多态性对HBV感染后疾病转归的关系。

方法: 采用TaqMan SNP基因分型和基因测序

■背景资料

HBV感染是急、慢性肝病发生的最主要原因之一, 部分感染者将最终发展为慢性肝炎、肝硬化或原发性肝癌。随着SNP与疾病易感性研究工作的进展, 基因多态性的研究有望为筛选HBV感染高危人群以及肝病的预防工作提供可靠依据。

■同行评议者

张凤春, 教授, 上海交通大学医学院附属仁济医院肿瘤中心

■ 研究前沿

基因多态性与HBV感染研究一直是国内外学者研究的热点,其分布具有较强的地域和种族特征,因此对二者进行研究可能会为HBV感染后疾病转归的机制提供一定线索。

的方法检测152例健康对照人群、161例感染HBV后自愈者、173例慢性乙型肝炎患者、138例乙型肝炎肝硬化患者以及181例HBV相关性肝癌患者的MTHFR基因C677T位点的基因型及等位基因的分布及其差异。

结果: 805例研究对象的基因型分布为CT基因型占47.09%、TT占30.43%、CC占22.48%;等位基因频率: C为46.02%, T为53.98%, 此结果明显不同于以往报道。等位基因和基因型分布在各肝病组无统计学差异。分析不同性别在各组中的分布特征表明, 男性患者TT在各组中显示风险降低, 特别在肝硬化组TT和CT的OR值最低(与自愈组比较: 0.675, 95%CI: 0.308-1.479; 0.510, 95%CI: 0.248-1.050); 而在女性的自愈、慢乙型肝炎和肝硬化组, TT和CT显示风险度增加, 特别在肝硬化组OR值最高(与自愈组比较: 3.542, 95%CI: 0.885-14.171; 3.167, 95%CI: 0.821-12.211), 具有统计学差异($P = 0.022$)。同时, 在女性肝癌组却显示风险度降低(0.638, 95%CI: 0.213-1.904; 0.500, 95%CI: 0.175-1.432)。

结论: 本研究显示MTHFR C677T多态性在中国天津汉族人中显示了较高的TT基因型频率, 同时提示MTHFR C677T多态性在HBV感染后疾病发展的过程中发挥重要作用。

关键词: 亚甲基四氢叶酸还原酶; C677T; 多态性; 乙型肝炎病毒; 疾病进展

刘娟娟, 高英堂, 杜智, 杨斌, 经翔, 王毅军, 王凤梅, 景丽. 亚甲基四氢叶酸还原酶基因C677T多态性与HBV感染后疾病转归的关系. 世界华人消化杂志 2010; 18(15): 1555-1562
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/1555.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染可引起多种临床表现, 包括病毒清除后自愈、无症状病毒携带和持续感染进展为慢性肝炎、肝硬化或原发性肝癌等严重肝病^[1,2]。近年研究表明, 宿主基因亚甲基四氢叶酸还原酶(methylenetetrahydrofolate reductase, MTHFR)的多态性能够影响HBV感染后的疾病进程^[3-10]。MTHFR是叶酸代谢的关键酶, 其在DNA甲基化修饰和DNA合成修复过程中均发挥重要作用^[11,12]。MTHFR第677位核苷酸的C→T转换可使Ala变为Val, 使CT和TT基因型的酶活性仅为CC基因型的65%和30%^[13]。酶活性的降低可在DNA甲基化和DNA合成两个途径促进或抑制肿瘤的发生^[12,14]。尽管

许多研究报道了MTHFR C677T多态性与肿瘤易感性的关系, 但其结果在不同肿瘤间差异较大, 甚至同一种肿瘤在不同地区或民族中的研究结果也不尽相同^[15-19]。同样, MTHFR C677T多态性与肝病相关性研究的结果也存在明显差别^[3-10]。中国学者研究发现在江苏地区TT基因型携带者有更高的HCC发生风险^[5], 同样, 来自意大利的3篇报道也认为TT基因型增加欧洲白人发生HCC的风险^[4,8,9]; 与此相反, Yuan等^[6]结果表明TT基因型降低肝癌发生的风险, Saffroy等^[3]报道CC基因型增加肝癌发生的风险, 韩国学者Kwak等^[20]研究显示C677T多态性与HCC无关联。如此复杂而矛盾的结果可能既与MTHFR多态性对DNA甲基化及DNA合成作用的平衡相关, 也与其他环境因子的相互作用相关。目前尚无HBV感染后不同肝病阶段(如自愈、携带、慢肝、肝硬化和HCC等)的MTHFR C677T多态性分布的详细报道, 因此, 本研究通过检测其在各类HBV感染者中的分布特点, 进一步探讨其与HBV感染后疾病转归的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 参照2005年中华医学会《慢性乙型肝炎防治指南》和2009年《原发性肝癌规范化诊治专家共识》的诊断标准, 收集天津市第三中心医院2003-12/2009-06期间慢性乙型肝炎患者173例、乙型肝炎肝硬化患者138例和HBV相关性肝癌患者181例。健康对照组152例和乙型肝炎自愈组161例来自天津市第三中心医院健康查体, 健康对照组HBV免疫学标志物均为阴性, 且血常规、生化指标均正常; 自愈者均无肝病史, 具有曾感染HBV证据(HBsAb、HBeAb和HBcAb三种抗体至少两种阳性, HBsAg、HBeAg和HBV DNA均为阴性)且未经治疗而健康者。各研究对象均抽取空腹外周静脉血3 mL, 血清用于检测HBV免疫学指标、肝功能、HBV DNA和AFP等临床指标, 血凝块用于提取白细胞DNA。以上所有对象均为天津地区汉族人。本研究经天津市第三中心医院伦理委员会批准, 所有患者均签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 DNA提取: 用牙签将血凝块捣碎, 吸取100 μ L置于离心管中, 加入800 μ L溶血试剂(0.3 mol/L蔗糖, 1 mmol/L Tris-HCl(pH8.0), 5 mmol/L MgCl₂, 20 mmol/L Triton X-100), 震荡后8 000 r/min离心5 min; 吸出上清, 将沉淀捣碎并加入

表 1 MTHFR C677T各组基因型、等位基因频率和Hardy-Weinberg平衡检验

MTHFR	健康对	自愈组		慢乙型肝炎组		肝硬化组		肝癌组		总体
C677T	照组n(%)	n(%)	OR(95%CI)	n(%)	OR(95%CI)	n(%)	OR(95%CI)	n(%)	OR(95%CI)	n(%)
CC	37 (24.34)	35 (21.74)	1.0 (-)	35 (20.23)	1.0 (-)	35 (25.36)	1.0 (-)	39 (21.55)	1.0 (-)	181 (22.48)
CT	64 (42.11)	77 (47.83)	1.272 (0.720-2.246)	95 (54.91)	1.569 (0.896-2.748)	58 (42.03)	0.958 (0.535-1.716)	85 (46.96)	1.260 (0.724-2.194)	379 (47.09)
TT	51 (33.55)	49 (30.43)	1.016 (0.554-1.862)	43 (24.86)	0.891 (0.482-1.649)	45 (32.61)	0.933 (0.506-1.720)	57 (31.49)	1.060 (0.589-1.908)	245 (30.43)
C	138 (45.39)	147 (45.65)	1.0 (-)	165 (47.69)	1.0 (-)	128 (46.38)	1.0 (-)	163 (45.03)	1.0 (-)	741 (46.02)
T	166 (54.61)	175 (54.35)	0.990 (0.722-1.356)	181 (52.31)	0.912 (0.670-1.242)	148 (53.62)	0.961 (0.693-1.333)	199 (54.97)	1.015 (0.747-1.379)	869 (53.98)
χ^2 值	3.44	0.20		1.75		3.32		0.48		2.21
P值	0.05- 0.1	0.5- 0.75		0.1- 0.25		0.05- 0.1		0.25- 0.50		0.1- 0.25

■相关报道

Stern等通过对MTHFR与肿瘤的关系进行分析表明, MTHFR C677T多态性可导致酶活性的降低, 从DNA甲基化和DNA合成两个途径促进或抑制肿瘤的发生。

500 μ L消化液(0.1 mol/L NaCl, 10 mmol/L Tris-HCl(pH8.0), 30 mmol/L EDTA, 20 mmol/L SDS)和13.5 μ L蛋白酶K(5.4 μ mol/L), 震荡后60 $^{\circ}$ C水浴3 h; 再加500 μ L Tris饱和酚, 混匀, 12 000 r/min离心5 min; 吸取上层水相, 加入300 μ L氯仿: 异戊醇(24:1), 12 000 r/min离心10 min; 吸取上清, 加入1/10体积NaAC(3 mol/L, pH5.2)和等体积预冷的异丙醇, 12 000 r/min离心15 min, 弃上清, 沉淀加入250 μ L乙醇(700 mL/L)洗涤; 12 000 r/min离心5 min弃上清, DNA沉淀溶于50 μ L TE(pH8.0), 取2 μ L进行1.5%琼脂糖凝胶电泳检测其质量, 紫外分光光度计测定DNA浓度。

1.2.2 PCR扩增: 参照TaqMan[®] SNP Genotyping Assays Protocol(美国应用生物系统公司), PCR扩增体系为10 μ L, 含DNA模板1.5 μ L、2 \times TaqMan Genotyping Master Mix 5 μ L、40 \times TaqMan SNP Genotyping Assay Mix(rs1801133, C_1202883_20) 0.25 μ L和dH₂O 3.25 μ L。采用ABI PRISM[®] 7000 SDS进行PCR扩增, 每96孔板设置三个空白对照(NTC)。反应条件为: 95 $^{\circ}$ C热变性10 min; 92 $^{\circ}$ C变性15 s, 60 $^{\circ}$ C退火1 min, 共40个循环。

1.2.3 MTHFR C677T基因型分析: 在上述PCR基础上, 利用ABI PRISM[®] 7000 SDS进行等位基因识别分析, 设置FAM、VIC探针和样品孔、3个NTC, 点击Post-Read按钮, 读取荧光信号, 通过xy轴散点图分析各样本的基因型。

1.2.4 DNA测序分析: 为验证TaqMan[®] SNP基因分型方法的准确性, 随机挑取CC、TT和CT基因型各10个样品进行测序。参照人MTHFR序列

(GenBank Accession No. NC_000001)设计引物, 正向引物: 5'-TCCCTCGCCTTGAACAGGTG-3' (9 603-9 622 nt); 反向引物: 5'-CCAAGCAACGC TGTGCAAGTT-3'(10 003 nt -9 983 nt)。PCR扩增体系为100 μ L, 包括2 \times PCR Master Mix 50 μ L、上下游引物各2 μ L、酶4 μ L(1 U/ μ L)、DNA模板2 μ L和dH₂O 40 μ L。PCR扩增条件: 94 $^{\circ}$ C预变性2 min; 94 $^{\circ}$ C变性45 s, 58 $^{\circ}$ C退火45 s, 72 $^{\circ}$ C延伸45 s, 共35个循环; 72 $^{\circ}$ C延伸5 min。扩增产物长度为401 bp, 取5 μ L进行2.5%琼脂糖凝胶电泳, 剩余产物由上海Invitrogen公司测序。

统计学处理 采用SPSS13.0软件进行统计学分析, 总体和各组样本基因型分布均经Hardy-Weinberg平衡检验。以行 \times 列或连续校正卡方(χ^2)检验分析基因型和等位基因在不同组别之间的差异, 双侧检验 $P<0.05$ 表示差异显著, $P<0.01$ 表示差异极显著。

2 结果

2.1 PCR扩增和SNP分析 基因组DNA的MTHFR C677T双探针PCR扩增曲线良好(图1A)。SNP基因分型见图1B, 根据美国应用生物系统公司提供的信息, 等位基因分型图谱中X轴代表VIC探针(C), Y轴代表FAM探针(T), 样品集中分布在4个区域, 3个NTC空白对照在接近原点的对角线上, 靠近两轴的两组代表2种纯合子(CC或TT), 对角线上的一组为杂合子(CT)。参照空白对照, 各样本均能明确分析基因型。为验证TaqMan[®] SNP基因分型方法的准确性, 随机挑取3种基因型的30个样品进行DNA测序, 测序结果与Taq-

■创新盘点

MTHFR C677T多态性在中国天津汉族人中显示了较高的TT基因型,明显不同于以往汉族人的分布特点;而且其多态性对不同性别的人群感染HBV后疾病转归的影响有很大差别。

表 2 MTHFR C677T基因型、等位基因在男/女中的分布 $n(\%)$

		CC	CT	TT	C	T
健康对照组	男	14(17.50)	36(45.00)	30(37.50)	64(40.00)	96(60.00)
	女	23(31.94)	28(38.89)	21(29.17)	74(51.39)	70(48.61)
自愈组	男	18(20.93)	43(50.00)	25(29.07)	79(45.93)	93(54.07)
	女	17(22.67)	34(45.33)	24(32.00)	68(45.37)	82(54.67)
慢乙肝组	男	21(18.75)	65(58.04)	26(23.21)	107(47.77)	117(52.23)
	女	14(22.95)	30(49.18)	17(27.87)	58(47.54)	64(52.46)
肝硬化组	男	32(31.68)	39(38.62)	30(29.70)	103(50.99)	99(49.01)
	女	3(8.11)	19(51.35)	15(40.54)	25(33.78)	49(66.22)
肝癌组	男	29(19.08)	75(49.34)	48(31.58)	133(43.75)	171(56.25)
	女	10(34.48)	10(34.48)	9(31.04)	30(51.72)	28(48.28)

表 3 MTHFR C677T基因型、等位基因在各组男性中的风险度分析 $OR(95\%CI)$

	自愈组	慢乙肝组	肝硬化组	肝癌组
与健康对照比较				
CC	1.0(-)	1.0(-)	1.0(-)	1.0(-)
CT	0.929(0.406-2.124)	1.204(0.547-2.651)	0.474(0.218-1.028)	1.006(0.474-2.132)
TT	0.648(0.270-1.558)	0.578(0.245-1.360)	0.438(0.195-0.980)	0.772(0.353-1.692)
C	1.0(-)	1.0(-)	1.0(-)	1.0(-)
T	0.785(0.508-1.214)	0.729(0.483-1.099)	0.641(0.421-0.975)	0.857(0.581-1.625)
与自愈组比较				
CC		1.0(-)	1.0(-)	1.0(-)
CT		1.296(0.619-2.710)	0.510(0.248-1.050)	1.083(0.539-2.175)
TT		0.891(0.387-2.055)	0.675(0.308-1.479)	1.192(0.557-2.552)
C		1.0(-)	1.0(-)	1.0(-)
T		0.929(0.624-1.383)	0.816(0.543-1.227)	1.092(0.750-1.590)

Man SNP基因分型结果完全一致(图2)。

2.2 各组基因型、等位基因频率分析 各组MTHFR C677T基因型和等位基因分布情况见表1, 各组样本及总体均符合Hardy-Weinberg平衡。全部805例研究对象的基因型分布: CT基因型占47.09%、TT占30.43%、CC占22.48%; 等位基因频率: C为46.02%, T为53.98%。各组的等位基因和基因型分布无统计学差异。以健康人群为对照计算其他各组的 OR 值, CT基因型对慢乙型肝炎患者的风险度增加($OR = 1.569$, $95\%CI = 0.896-2.748$)。当以自愈组为对照计算其他组的 OR 值时, CT对慢乙型肝炎患者的风险度有所减缓($OR = 1.234$, $95\%CI = 0.707-2.153$), 其他组 OR 值无显著变化。

2.3 MTHFR C677T基因型和等位基因频率在不同临床特征的组别之间的比较 性别因素分层分析表明, 三种基因型在男/女中的分布(表2): CT为48.59%/44.16%、TT为29.94%/31.39%、CC占

21.47%/24.45%, 无统计学差异。进一步分析不同性别在各组中的分布特征, 以健康人群为对照计算其他各组的 OR 值, 男性患者TT在各组中显示风险降低, 特别在肝硬化组TT和CT的 OR 值最低(表3); 而在女性的自愈、慢乙肝和肝硬化组, CT和TT显示风险度增加, 特别在肝硬化组 OR 值最高, 具有统计学差异($P = 0.022$)(表4)。当以自愈组为对照计算其他肝病组的 OR 值时, TT和CT在男性肝硬化组仍显示风险降低(表3), 而在女性肝硬化组仍显示风险度增加, 同时, 在女性肝癌组却显示风险降低(表4)。

如表5所示, 在已知HBsAg状况的439例肝病患者中, 三种基因型分布在HBsAg+/-患者中具统计学差异($P = 0.005$), 阴性患者的C等位基因频率显著高于阳性患者($P = 0.001$), C更有利于HBsAg血清转化。当加入161例自愈组(HBsAg阴性)之后进行分析时, 未发现HBsAg+/-之间有统计学差异。另外, 基因型和等位基因在肝癌和

表 4 MTHFR C677T基因型、等位基因在各组女性中的风险度分析 OR(95%CI)

	自愈组	慢乙肝组	肝硬化组	肝癌组
与健康对照比较				
CC	1.0(-)	1.0(-)	1.0(-)	1.0(-)
CT	1.643(0.737-3.663)	1.760(0.759-4.080)	5.202(1.367-19.804)	0.821(0.292-2.314)
TT	1.546(0.656-3.646)	1.330(0.529-3.344)	5.476(1.387-21.627)	0.986(0.336-2.895)
C	1.0(-)	1.0(-)	1.0(-)	1.0(-)
T	1.275(0.806-2.016)	1.167(0.720-1.890)	2.072(1.158-3.708)	0.987(0.536-1.816)
与自愈组比较				
CC		1.0(-)	1.0(-)	1.0(-)
CT		1.071(0.453-2.535)	3.167(0.821-12.211)	0.500(0.175-1.432)
TT		0.860(0.335-2.205)	3.542(0.885-14.171)	0.638(0.213-1.904)
C		1.0(-)	1.0(-)	1.0(-)
T		0.915(0.567-1.478)	1.625(0.911-2.900)	0.774(0.422-1.420)

■应用要点

分析MTHFR基因多态性对天津地区汉族人感染HBV后疾病进展的影响,有助于对本地区肝病发生的病因学进行深入研究,在筛选HBV感染易感人群并采取有效的保护和干预措施等方面都具有潜在的应用前景。

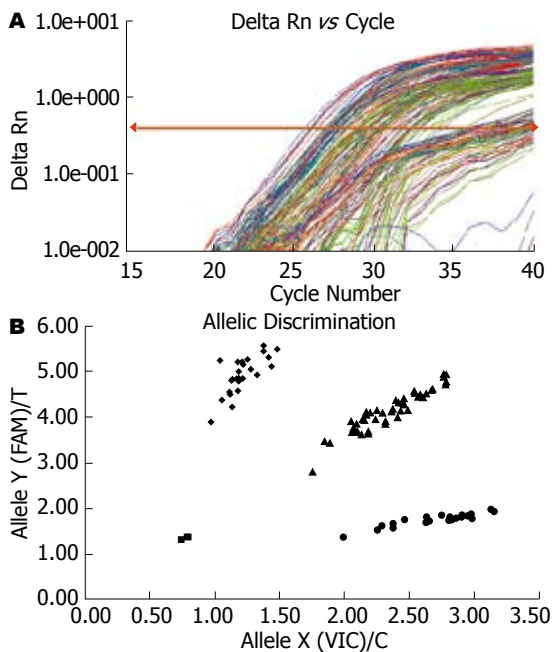


图 1 Taqman MGB探针SNP基因型分型方法检测MTHFR C677T基因型。A: 实时荧光定量PCR扩增图; B: 等位基因分析图。●: CC 基因型; ◆: TT基因型; ▲: CT 基因型; ■: NTC空白对照。

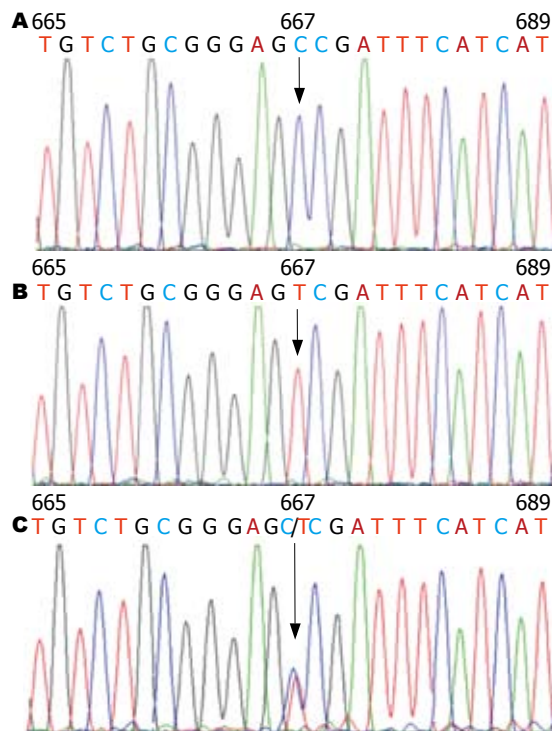


图 2 MTHFR基因测序结果。A: CC基因型; B: TT基因型; C: CT基因型。

肝硬化组的229例不同Child-Pugh肝功能分级、299例不同AFP水平以及所有患者组的433例不同DNA拷贝数之间的比较无统计学差异。

3 讨论

MTHFR作为叶酸代谢的关键酶,一方面通过催化5,10-亚甲基四氢叶酸转化为5-甲基四氢叶酸为下游各种甲基化反应提供甲基;另一方面,通过其底物5,10-亚甲基四氢叶酸提供的甲基使单磷酸脱氧尿苷(2'-deoxyuridine 5'-monophosphate, dUMP)转化为单磷酸脱氧胸苷(deoxythymidine

monophosphate, dTMP)^[11,12]。当MTHFR酶活性降低时,随着5,10-亚甲基四氢叶酸转化为5-甲基四氢叶酸的减少,参与各种甲基化反应的通用供体S-腺苷蛋氨酸(S-adenosylmethionine, SAM)也减少,最终导致基因组DNA低甲基化而增加患癌风险^[14];而另一方面,其活性降低可使5,10-亚甲基四氢叶酸水平升高,导致dUMP/dTMP的比值下降,在一定程度上减少尿嘧啶错误掺入DNA,避免DNA双链断裂而加强DNA稳定性^[12,14,21]。因此,从理论上分析, MTHFR酶活性降低的影响是双

■名词解释

基因多态性:指基因组序列上的变异,他是决定人体对疾病易感性与抵抗力、疾病临床表现及多样性、疾病进展以及不同个体对药物反应性的重要因素。

表 5 MTHFR C677T基因型和等位基因在不同临床特征的组别之间的比较 $n(\%)$

按临床特征分组	CC	CT	TT	C	T
HBsAg(不含自愈组)					
(-)	15(42.86)	15(42.86)	5(14.28)	45(64.29)	25(35.71)
(+)	82(20.30)	195(48.27)	127(31.43)	359(44.43)	359(44.44)
P 值		0.005			0.001
χ^2 值		10.767			10.223
HBsAg(含自愈组)					
(-)	50(25.51)	92(46.94)	54(27.55)	192(48.98)	200(51.02)
(+)	82(20.30)	195(48.27)	127(31.43)	359(44.43)	449(55.57)
P 值		0.310			0.138
χ^2 值		2.339			2.199
AFP(ng/mL)					
<400		104(45.41)	77(33.63)	200(43.67)	258(56.33)
>400	17(24.28)	31(44.29)	22(31.43)	65(46.43)	75(53.57)
P 值		0.833			0.331
χ^2 值		0.366			0.565
Child-Pugh分级					
A	20(22.99)	44(50.57)	23(26.44)	84(48.28)	90(51.72)
B	28(19.72)	62(43.66)	52(36.62)	116(41.14)	166(58.86)
P 值		0.281			2.229
χ^2 值		2.540			0.135
DNA(拷贝/mL)					
<1 000		119(49.17)	70(28.93)	225(46.49)	259(53.51)
$\geq 1 000$		88(46.07)	56(29.32)	182(47.64)	200(52.36)
P 值		0.756			0.735
χ^2 值		0.559			0.115

向的,既有增加患病风险的可能,也有降低患病风险的可能^[22]。

由于MTHFR C677T多态性影响酶活性而得到广泛研究,现有资料表明,MTHFR C677T的等位基因和基因型分布具有较强的地域和人种特征,T等位基因频率由低到高依次为非洲人(<10%)^[23]、欧洲白人(25.1%-46.0%,由北向南呈增加趋势)^[24]、中东人(17.4%-25.7%)^[23,24]、中国汉族人(21.0%-44.8%,由南向北呈增加趋势)^[5,6,24]和墨西哥人(57.0%)^[24],不同民族后裔的美国人与其原祖先有相近的频率^[5,24]。基因型分布在各地区或民族均以CC和CT为主,TT仅在墨西哥(32.2%)、意大利坎帕尼亚区(26.4%)和西里岛(20.1%)、中国北方(19.8%)显著升高^[24]。本文分析中国天津市152例健康汉族人的T等位基因频率为54.6%,CT、TT和CC基因型频率分别为42.1%、33.6%和24.3%;同样,全部805例汉族人的等位基因和基因型分布与此相近(无统计学差异),而显著高于其他汉族人的报道。此结果表明C677T在天津市汉族人中有一个独特的分布,其成因还有待深入研究,可能相关遗传因

素、环境因素和生活习惯等选择压力导致其在各地区及民族间的显著不同。另一方面,从方法学分析,多数研究采用PCR-RFLP方法,此限制性内切酶位点是T等位基因,如果酶切效率不能保证100%的话,会使基因型原本为TT的误认为CT,导致TT基因型频率的实测值小于真实值。本研究采用AB公司的SNP基因分型结合测序的方法,其准确性要高于PCR-RFLP^[25]。

人体感染HBV后病程如何演化是宿主和病毒等多种因素共同作用的结果,MTHFR作为DNA甲基化和DNA合成/修复的关键酶之一,也越来越得到重视。本文研究结果显示,MTHFR C677T基因型和等位基因频率在健康对照组与自愈组、慢乙型肝炎、肝硬化和肝癌组之间无统计学差异。这一点不同于以往关于T等位增加发生肝癌风险的分析^[4,5,8,9],而与韩国学者Kwak等^[20]结果相似。各研究结果的不一致性可能与MTHFR基因本身在影响DNA甲基化和DNA复制之间的平衡情况有关。

然而,令人感兴趣的是,在性别因素分层分析时,尽管三种基因型在总体男、女性中的分

布无统计学差异,但在各类肝病组中男、女性显示了不同的分布特征和风险.考虑到并不清楚健康人将来若感染HBV会如何进展,因此,以感染HBV后自愈者作为对照组分析可能更合理,更能准确说明在感染HBV这一共同环境因子时不同基因型对肝病的风险.通过对比分析以健康人群和自愈组为对照计算的OR值,TT和CT在男性肝硬化组显示风险降低,而在女性肝硬化组则显示风险度增加,同时,在女性肝癌组却显示风险降低.此结果表明,MTHFR C677T多态性对感染HBV的男、女性患者进展为肝硬化、肝癌的作用是不同的.目前尚不清楚造成这种差别的原因,可能由于性激素、血清同型半胱氨酸浓度、男女生活方式(如饮酒)以及基因-环境作用等在男/女性别中的差异^[26-28],导致TT型在不同性别的HBV感染者中参与甲基化和DNA合成的双向作用是不同的,进而表现为患肝病的风险也不相同甚至相反,更明确的机制尚需更深入的研究阐明.

总之,MTHFR C677T多态性在中国天津汉族人中显示了较高的TT基因型,明显不同以往汉族人的分布特点;同时,分析MTHFR C677T多态性在不同性别肝病患者的分布,提示TT和CT基因型降低男性HBV感染者患肝硬化的风险和女性HBV感染者患肝癌的风险,而增加女性HBV感染者患肝硬化的风险.为进一步验证此结果的准确性和探讨其机制,我们正在收集更多各类肝病患者进行MTHFR C677T多态性分析并检测MTHFR底物或代谢物的血清水平.

4 参考文献

- Rizzetto M, Ciancio A. Chronic HBV-related liver disease. *Mol Aspects Med* 2008; 29: 72-84
- Shi YH, Shi CH. Molecular characteristics and stages of chronic hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 3099-3105
- Saffroy R, Pham P, Chiappini F, Gross-Goupil M, Castera L, Azoulay D, Barrier A, Samuel D, Debuire B, Lemoine A. The MTHFR 677C > T polymorphism is associated with an increased risk of hepatocellular carcinoma in patients with alcoholic cirrhosis. *Carcinogenesis* 2004; 25: 1443-1448
- Ventura P, Rosa MC, Abbati G, Marchini S, Grandone E, Vergura P, Tremosini S, Zeneroli ML. Hyperhomocysteinemia in chronic liver diseases: role of disease stage, vitamin status and methylene tetrahydrofolate reductase genetics. *Liver Int* 2005; 25: 49-56
- Mu LN, Cao W, Zhang ZF, Cai L, Jiang QW, You NC, Goldstein BY, Wei GR, Chen CW, Lu QY, Zhou XF, Ding BG, Chang J, Yu SZ. Methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T and A1298C polymorphisms and the risk of primary hepatocellular carcinoma (HCC) in a Chinese population. *Cancer Causes Control* 2007; 18: 665-675
- Yuan JM, Lu SC, Van Den Berg D, Govindarajan S, Zhang ZQ, Mato JM, Yu MC. Genetic polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase and thymidylate synthase genes and risk of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2007; 46: 749-758
- Bronowicki JP, Abdelmouttaleb I, Peyrin-Biroulet L, Venard V, Khiri H, Chabi N, Amouzou EK, Barraud H, Halfon P, Sanni A, Bigard MA, Le Faou A, Guéant JL. Methylene tetrahydrofolate reductase 677 T allele protects against persistent HBV infection in West Africa. *J Hepatol* 2008; 48: 532-539
- Fabris C, Toniutto P, Falletti E, Fontanini E, Cussigh A, Bitetto D, Fornasiere E, Fumolo E, Avellini C, Minisini R, Pirisi M. MTHFR C677T polymorphism and risk of HCC in patients with liver cirrhosis: role of male gender and alcohol consumption. *Alcohol Clin Exp Res* 2009; 33: 102-107
- D'Amico M, Pasta L, Sammarco P. MTHFR C677T, PAI1 4G-4G, V Leiden Q506, and prothrombin G20210A in hepatocellular carcinoma with and without portal vein thrombosis. *J Thromb Thrombolysis* 2009; 28: 70-73
- Jin F, Qu LS, Shen XZ. Association between the methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism and hepatocellular carcinoma risk: a meta-analysis. *Diagn Pathol* 2009; 4: 39
- Rozen R. Genetic predisposition to hyperhomocysteinemia: deficiency of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). *Thromb Haemost* 1997; 78: 523-526
- Blount BC, Mack MM, Wehr CM, MacGregor JT, Hiatt RA, Wang G, Wickramasinghe SN, Everson RB, Ames BN. Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage: implications for cancer and neuronal damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 3290-3295
- Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, Boers GJ, den Heijer M, Kluijtmans LA, van den Heuvel LP. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995; 10: 111-113
- Stern LL, Mason JB, Selhub J, Choi SW. Genomic DNA hypomethylation, a characteristic of most cancers, is present in peripheral leukocytes of individuals who are homozygous for the C677T polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase gene. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000; 9: 849-853
- Boccia S, Hung R, Ricciardi G, Gianfagna F, Ebert MP, Fang JY, Gao CM, Götze T, Graziano F, Lacasaña-Navarro M, Lin D, López-Carrillo L, Qiao YL, Shen H, Stolzenberg-Solomon R, Takezaki T, Weng YR, Zhang FF, van Duijn CM, Boffetta P, Taioli E. Meta- and pooled analyses of the methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C polymorphisms and gastric cancer risk: a huge-GSEC review. *Am J Epidemiol* 2008; 167: 505-516
- Sun L, Sun YH, Wang B, Cao HY, Yu C. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and susceptibility to gastric cancer in Chinese populations: a meta-analysis. *Eur J Cancer Prev* 2008; 17: 446-452
- Kono S, Chen K. Genetic polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase and colorectal cancer

■同行评价

本研究阐述了MTHFR C677T多态性在中国天津汉族人中显示了较高的TT基因型频率,同时提示MTHFR C677T多态性在HBV感染后疾病发展的过程中发挥重要作用,是一篇较好的文章.

- and adenoma. *Cancer Sci* 2005; 96: 535-542
- 18 Pereira TV, Rudnicki M, Pereira AC, Pombo-de-Oliveira MS, Franco RF. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and acute lymphoblastic leukemia risk: a meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006; 15: 1956-1963
- 19 Mao R, Fan Y, Jin Y, Bai J, Fu S. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms and lung cancer: a meta-analysis. *J Hum Genet* 2008; 53: 340-348
- 20 Kwak SY, Kim UK, Cho HJ, Lee HK, Kim HJ, Kim NK, Hwang SG. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and methionine synthase reductase (MTRR) gene polymorphisms as risk factors for hepatocellular carcinoma in a Korean population. *Anticancer Res* 2008; 28: 2807-2811
- 21 Machover D, Zittoun J, Saffroy R, Broët P, Giraudier S, Magnaldo T, Goldschmidt E, Debuire B, Orrico M, Tan Y, Mishal Z, Chevallier O, Tonetti C, Jouault H, Ulusakarya A, Tanguy ML, Metzger G, Hoffman RM. Treatment of cancer cells with methioninase produces DNA hypomethylation and increases DNA synthesis. *Cancer Res* 2002; 62: 4685-4689
- 22 Lin J, Spitz MR, Wang Y, Schabath MB, Gorlov IP, Hernandez LM, Pillow PC, Grossman HB, Wu X. Polymorphisms of folate metabolic genes and susceptibility to bladder cancer: a case-control study. *Carcinogenesis* 2004; 25: 1639-1647
- 23 Schneider JA, Rees DC, Liu YT, Clegg JB. Worldwide distribution of a common methylenetetrahydrofolate reductase mutation. *Am J Hum Genet* 1998; 62: 1258-1260
- 24 Wilcken B, Bamforth F, Li Z, Zhu H, Ritvanen A, Renlund M, Stoll C, Alembik Y, Dott B, Czeizel AE, Gelman-Kohan Z, Scarano G, Bianca S, Ettore G, Tenconi R, Bellato S, Scala I, Mutchinick OM, López MA, de Walle H, Hofstra R, Joutchenko L, Kavteladze L, Bermejo E, Martínez-Frías ML, Gallagher M, Erickson JD, Vollset SE, Mastroiacovo P, Andria G, Botto LD. Geographical and ethnic variation of the 677C>T allele of 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): findings from over 7000 newborns from 16 areas world wide. *J Med Genet* 2003; 40: 619-625
- 25 Wong FL, Wang MK, Boo NY, Hamidah NH, Ainoon BO. Rapid detection of the UGT1A1 single nucleotide polymorphism G211A using real-time PCR with Taqman minor groove binder probes. *J Clin Lab Anal* 2007; 21: 167-172
- 26 Dierkes J, Jeckel A, Ambrosch A, Westphal S, Luley C, Boeing H. Factors explaining the difference of total homocysteine between men and women in the European Investigation Into Cancer and Nutrition Potsdam study. *Metabolism* 2001; 50: 640-645
- 27 Kluijtmans LA, Young IS, Boreham CA, Murray L, McMaster D, McNulty H, Strain JJ, McPartlin J, Scott JM, Whitehead AS. Genetic and nutritional factors contributing to hyperhomocysteinemia in young adults. *Blood* 2003; 101: 2483-2488
- 28 Adinolfi LE, Ingrosso D, Cesaro G, Cimmino A, D'Antò M, Capasso R, Zappia V, Ruggiero G. Hyperhomocysteinemia and the MTHFR C677T polymorphism promote steatosis and fibrosis in chronic hepatitis C patients. *Hepatology* 2005; 41: 995-1003

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

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

• 消息 •

《中国期刊引证报告(扩刊版)》发布《世界华人消化杂志》 2008年影响因子 0.729

本刊讯 《中国期刊引证报告(扩刊版)》是依托中国科学技术信息研究所国家工程技术数字图书馆“知识服务”系统,在“万方数据-数字化期刊群”基础上,结合中国科技论文与引文数据库(CSTPCD),以我国正式出版的各项6108种中英文期刊为统计源期刊。对全部期刊的引文数据,严格按题名、作者、刊名、年、卷、期、页等进行分项切分后,进行规范化处理和有效链接,经统计分析,编制而成。2008年《世界华人消化杂志》总被引频次3 683次,影响因子0.729,即年指标0.142,引用期刊数732,学科扩散指标0.533,被引半衰期4.303,H指数8。(编辑部主任:李军亮 2010-01-08)

DR-nm23在大肠癌组织中的蛋白表达及意义

杨直, 曲利娟, 武一曼, 曾玲, 熊喜生

杨直, 武一曼, 福建中医学院病理教研室 福建省福州市 350001

曲利娟, 曾玲, 熊喜生, 中国人民解放军南京军区福州总医院病理科 福建省福州市 350025

杨直, 2007年福建中医学院在读硕士, 主要从事大肠癌转移相关机制的研究。

福建省自然科学基金资助项目, No. X0650096

作者贡献分布: 本课题由曲利娟设计; 研究过程由杨直、曾玲及熊喜生操作完成; 数据整理分析由杨直与武一曼完成; 本文写作由杨直与曲利娟完成。

通讯作者: 曲利娟, 副主任医师, 350025, 福建省福州市西二环北路156号, 中国人民解放军南京军区福州总医院病理科。qljuan6516@sina.com.cn

电话: 0591-83717703

收稿日期: 2010-01-27 修回日期: 2010-04-20

接受日期: 2010-04-27 在线出版日期: 2010-05-28

Significance of DR-nm23 protein expression in colorectal carcinoma

Zhi Yang, Li-Juan Qu, Yi-Man Wu, Ling Zeng, Xi-Sheng Xiong

Zhi Yang, Yi-Man Wu, Department of Pathology, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350001, Fujian Province, China

Li-Juan Qu, Ling Zeng, Xi-Sheng Xiong, Department of Pathology, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Command, Fuzhou 350025, Fujian Province, China

Supported by: the Natural Science Foundation of Fujian Province, No. X0650096

Correspondence to: Li-Juan Qu, Department of Pathology, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Command, 156 Xi'erhuan North Road, Fuzhou 350025, Fujian Province, China. qljuan6516@sina.com.cn

Received: 2010-01-27 Revised: 2010-4-20

Accepted: 2010-04-27 Published online: 2010-05-28

Abstract

AIM: To investigate the relationship between the expression of DR-nm23 protein and the carcinogenesis, progression and metastasis of colorectal carcinoma.

METHODS: Ninety-eight colorectal carcinoma specimens, 57 adenoma specimens and 42 normal colorectal tissue specimens were examined by immunohistochemistry using the streptavidin-peroxidase method. The correlation of DR-nm23 protein expression with the carcinogenesis, progression, lymph node metastasis, histological type and differentiation grade of

colorectal carcinoma was then analyzed.

RESULTS: The positive rate of DR-nm23 protein expression was significantly higher in normal colorectal tissue than in adenoma and colorectal carcinoma (71.4% vs 38.6% and 35.7%, respectively; both $P < 0.01$). The positive rate of DR-nm23 protein expression was significantly lower in high-grade intraepithelial tumors than in low-grade intraepithelial tumors in the adenoma group (25.7% vs 59.1%, $P < 0.05$), and in metastatic colorectal carcinoma than in non-metastatic colorectal carcinoma (23.1% vs 44.1%, $P < 0.05$). The expression of DR-nm23 is negatively related to lymph node metastasis ($P < 0.05$). DR-nm23 expression is also closely related to histological type ($\chi^2 = 13.731$, $P < 0.01$) and differentiation grade ($\chi^2 = 12.198$, $P < 0.01$). The positive rate of DR-nm23 protein was higher in secondary tumors than in primary tumors in the metastatic colorectal carcinoma group though no significant difference was noted between them ($P > 0.05$).

CONCLUSION: Decreased DR-nm23 protein expression is closely related to tumor differentiation, carcinogenesis, progression and metastasis in colorectal carcinoma. DR-nm23 is an important parameter for evaluation of the biological behavior and prognosis of colorectal carcinoma.

Key Words: Colorectal neoplasm; DR-nm23 protein; Neoplasm metastasis; Immunohistochemistry

Yang Z, Qu LJ, Wu YM, Zeng L, Xiong XS. Significance of DR-nm23 protein expression in colorectal carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(15): 1563-1568

摘要

目的: 探讨DR-nm23蛋白在大肠癌组织中的表达及其与大肠癌发生发展和转移的关系。

方法: 应用SP免疫组织化学法检测98例大肠癌、57例大肠腺瘤及42例正常大肠黏膜组织中DR-nm23蛋白的表达, 统计学分析比较DR-nm23蛋白表达差异与大肠癌的发生、进展、淋巴结转移以及大肠癌组织学分型、病理分级的相关性。

■背景资料

大肠癌是常见的消化系统恶性肿瘤, 占恶性肿瘤发病率第二位, 严重危害人类健康。转移是大肠癌的重要生物学行为, 也是肿瘤患者死亡的主要原因之一。大肠癌转移涉及包括基因突变、激活, 肿瘤细胞的黏附、迁移、增殖, 细胞外基质降解, 组织免疫性及肿瘤血管形成等在内的多步骤、多因素、多基因共同参与的复杂病理过程, 及早确定其转移潜能及其相关因素对判断预后、指导治疗、提高生活质量具有十分重要的意义。DR-nm23基因是nm23肿瘤转移抑制基因家族成员之一, 近年来有关该基因与多种肿瘤形成和进展等方面的研究越来越受到关注, 但其与大肠癌组织的相关性研究未见报道。本文旨在探讨大肠癌组织中DR-nm23蛋白的表达与大肠癌浸润、转移及病理特征的相关性, 为大肠癌患者判断预后提供参考依据。

■同行评议者

刘丽江, 教授, 江汉大学医学院病理学

■研究前沿

DR-nm23基因是nm23肿瘤转移抑制基因家族成员之一,近年来有关该基因与多种肿瘤形成和进展等方面的研究越来越受到关注,但其与大肠癌组织的相关性研究未见报道。

结果: DR-nm23蛋白在正常组、腺瘤组和大肠癌组的表达逐渐下调,3组间表达差异具有显著性(71.4% vs 38.6%, 35.7%, 均 $P<0.01$)。腺瘤组中,高级别上皮内肿瘤的表达率低于低级别上皮内肿瘤(25.7% vs 59.1%, $P<0.05$);大肠癌无淋巴结转移组表达率高于淋巴结转移组,表达与淋巴结转移呈负相关(44.1% vs 23.1%, $P<0.05$); DR-nm23表达与组织学分型($\chi^2 = 13.731$, $P<0.01$)及病理分级($\chi^2 = 12.198$, $P<0.01$)均有相关性。转移组中,淋巴结转移癌DR-nm23蛋白表达率较原发癌高,但二者差异无显著性($P>0.05$)。

结论: DR-nm23参与大肠癌细胞的分化,其表达下调与大肠癌发生发展转移密切相关,可作为反映大肠癌生物学行为和判断预后的潜在重要指征。

关键词: 大肠肿瘤; 蛋白质DR-nm23; 肿瘤转移; 免疫组织化学

杨直, 曲利娟, 武一曼, 曾玲, 熊喜生. DR-nm23在大肠癌组织中的蛋白表达及意义. 世界华人消化杂志 2010; 18(15): 1563-1568

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/1563.asp>

0 引言

DR-nm23基因是nm23肿瘤转移抑制基因家族成员之一。1995年Ventruelli等^[1]利用cDNA文库差异显示筛选技术,从慢性粒细胞性白血病(chronic myelogenous leukemia, CML)急性发作期的原代细胞中克隆出与nm23-H1和nm23-H2具有65%-70%高度同源的DR-nm23 cDNA,之后有关该基因参与多种肿瘤形成和进展等方面的研究越来越受到关注,但其与大肠癌组织的相关性研究未见报道。本文采用SP免疫组织化学法检测大肠癌、腺瘤及正常肠黏膜组织中DR-nm23蛋白的表达,探讨DR-nm23蛋白与大肠癌发生发展及转移的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 选取中国人民解放军南京军区福州总医院2006-2008年经病理证实的大肠癌根治术标本98例,其中大肠癌不伴淋巴结转移组59例,大肠癌伴淋巴结转移组39例;39例转移组中同时具有原发癌和淋巴结转移癌29例。选取57例大肠管状绒毛状腺瘤为腺瘤组,其中腺瘤伴高级别上皮内肿瘤35例,腺瘤伴低级别上皮内肿瘤22例。另选取42例大肠癌无转移组配对邻近正常黏膜组

组织为正常组。98例大肠癌组中,男69例,女29例,年龄27-79(中位年龄57.84)岁。肿瘤发生部位:结肠46例,直肠52例。组织学类型:乳头状腺癌25例,管状腺癌30例,黏液腺癌14例,低分化腺癌17例,印戒细胞癌12例。病理分级(参照2000年WHO分级标准): I级25例, II级44例, III级29例。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学: 所有标本经40 g/L甲醛固定,常规石蜡包埋。浓缩型羊抗人DR-nm23(编号SC-50945)多克隆抗体及即用型SABC免疫组织化学试剂盒分别购自美国Santa Cruz Biotechnology公司和武汉博士德生物工程有限公司。采用SP法免疫组织化学法染色:切片脱蜡入水,组织抗原高压修复1 min 40 s, PBS 5 min $\times 2$; 3% H_2O_2 阻断过氧化氢酶活性10 min, PBS 5 min $\times 2$; 正常兔血清室温孵育15 min; 羊抗人DR-nm23抗体(工作浓度1:300), 4℃过夜12 h, PBS 3 min $\times 3$; 生物素标记二抗室温孵育15 min, PBS 3 min $\times 3$; 辣根酶标记链霉卵白素室温孵育15 min, PBS 3 min $\times 3$; DAB显色,显微镜观察,水洗终止; 苏木精复染,盐酸分化,水洗反蓝; 封固,光镜下观察。用PBS代替一抗作为阴性对照。

1.2.2 阳性结果判断: DR-nm23蛋白阳性表达颗粒定位于细胞质。每张切片根据免疫组织化学评分标准分别进行阳性率及着色强度评分:无着色为0分,浅黄色为1分,浅棕色为2分,深棕色为3分; 5%以下为0分, 6%-25%为1分, 26%-50%为2分, 51%-75%为3分, 76%以上为4分。将阳性率和着色强度两项评分的乘积进行评价,结果分为3级: 0-4分为阴性(-), 5-8分为弱阳性表达(+), 9-12分为强阳性表达(++).

统计学处理 应用SPSS 13.0统计软件包进行多个独立样本非参数Kreskas-Wallis H检验和两独立样本非参数Mann-Whitney U检验。

2 结果

2.1 正常组、腺瘤组和大肠癌组DR-nm23蛋白的表达 正常组DR-nm23蛋白表达率71.4%(30/42),其中强阳性19例(19/42, 45.2%),弱阳性11例(11/42, 26.2%),阴性12例(12/42, 28.6%);腺瘤组DR-nm23蛋白表达率38.6%(22/57),其中强阳性2例(2/57, 3.5%),弱阳性20例(20/57, 35.1%),阴性35例(35/57, 61.4%);大肠癌组DR-nm23蛋白表达率35.7%(25/98),其中强阳性10例(10/98, 10.2%),弱阳性25例(25/98, 25.5%),阴性63例(63/98, 64.3%)。阳性颗粒均定位于细胞质(图1)。

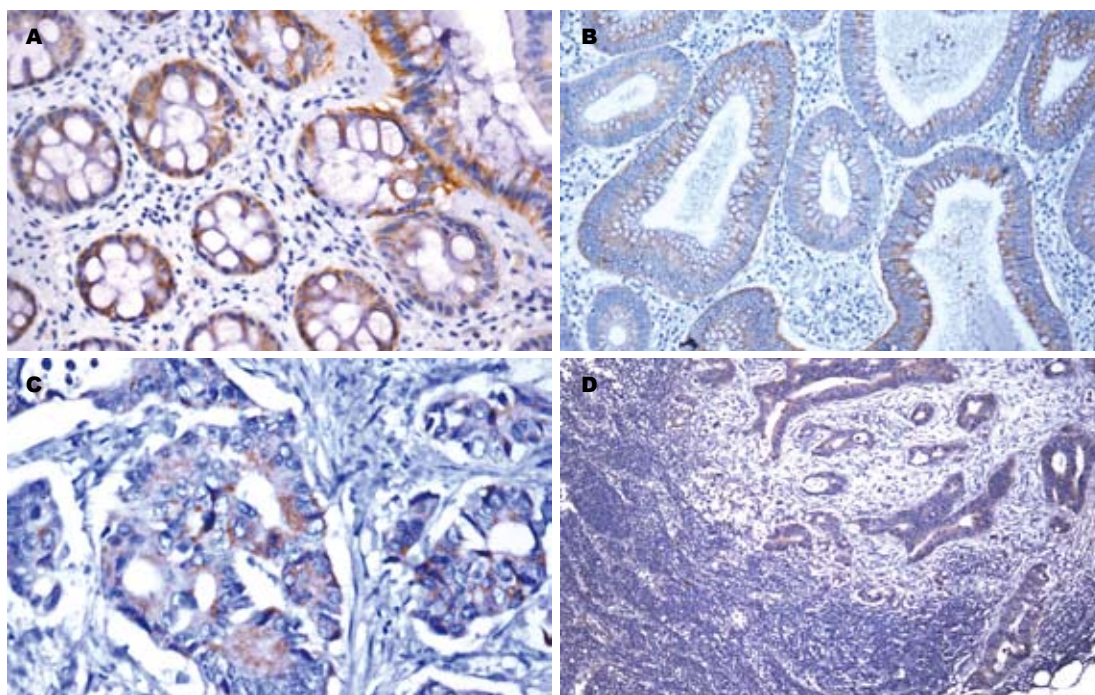


图 1 正常组、腺瘤组和大肠癌组DR-nm23蛋白的表达(SP法). A: 正常大肠黏膜组织; B: 大肠腺瘤伴高级别上皮内肿瘤; C: 大肠癌组织; D: 大肠癌淋巴结转移灶.

■ 相关报道

Amendola等研究发现神经母细胞瘤细胞株DR-nm23基因过度表达,且分化越好的表型表达水平越高. DR-nm23高表达的人SK-N-SH神经母细胞瘤细胞株通过降低细胞外基质的黏附性,抑制了其在琼脂中的生长;而鼠NLE-15神经母细胞瘤细胞株通过上调DR-nm23的表达,促进瘤细胞轴突快速生长,使 β -整联蛋白显著增多, I型胶原蛋白黏附性增加,从而抑制瘤细胞的生长.

表 1 正常组、腺瘤组及大肠癌组DR-nm23蛋白表达

分组	n	DR-nm23蛋白表达n(%)			阳性率(%)	P值
		-	+	++		
正常组	42	12(28.6)	11(26.2)	19(45.2)	71.4	
腺瘤组	57	35(61.4)	20(35.1)	2(3.5)	38.6 ^b	
大肠癌组	98	63(64.3)	25(25.5)	10(10.2)	35.7 ^b	0.000

^bP<0.01 vs 正常组.

正常组、腺瘤组和大肠癌组间DR-nm23蛋白表达差异具有显著性($\chi^2 = 25.852, P<0.01$). 两两比较, 正常组与腺瘤组($Z = -4.385, P<0.01$)、正常组与大肠癌组($Z = -4.606, P<0.01$)间DR-nm23蛋白表达差异均有显著性, 而腺瘤组与大肠癌组($Z = -0.024, P>0.05$)表达差异无显著性(表1).

2.2 腺瘤组中低级别与高级别上皮内肿瘤DR-nm23蛋白的表达 腺瘤伴低级别上皮内肿瘤组DR-nm23蛋白表达率59.1%(13/22), 其中强阳性2例(2/22, 9.1%), 弱阳性11例(11/22, 50.0%), 阴性9例(9/22, 40.9%); 腺瘤伴高级别上皮内肿瘤组DR-nm23蛋白表达率25.7%(9/35), 均为弱阳性, 阴性26例(26/35, 74.3%). 统计学分析二组表达差异具有显著性($Z = -2.646, P<0.05$, 表2).

2.3 大肠癌DR-nm23蛋白表达与大肠癌临床病理特征的关系 大肠癌伴淋巴结转移癌组与大肠

表 2 腺瘤组中低级别与高级别上皮内肿瘤DR-nm23蛋白表达

分组	n	DR-nm23蛋白表达n(%)			阳性率(%)	P值
		-	+	++		
低级别	22	9(40.9)	11(50.0)	2(9.1)	59.1	
高级别	35	26(74.3)	9(25.7)	0(0.0)	25.7	0.008

癌不伴淋巴结转移癌组DR-nm23蛋白表达率分别为23.1%(9/39)和44.1%(26/59), 统计学分析二组表达差异具有显著性($Z = -2.156, P<0.05$), 表达与淋巴结转移呈负相关; DR-nm23表达与组织学类型($\chi^2 = 13.731, P<0.01$)和病理分级($\chi^2 = 12.198, P<0.01$)均有相关性(表3).

2.4 大肠癌转移组中原发癌及其配对淋巴结转移癌DR-nm23蛋白的表达 转移组原发癌DR-nm23蛋白表达率20.7%(6/29), 其中强阳性1例(1/29, 3.5%), 弱阳性5例(5/29, 17.2%), 阴性23例(23/29, 79.3%); 淋巴结转移癌DR-nm23蛋白表达率27.6%(8/29), 其中强阳性1例(1/29, 3.5%), 弱阳性7例(7/29, 24.1%), 阴性21例(21/29, 72.4%). 统计学分析二组差异无显著性($Z = -0.585, P>0.05$, 表4).

3 讨论

DR-nm23基因是迄今nm23肿瘤转移抑制基因家族8个成员(nm23-H1-nm23-H8)之一, 又称

■创新盘点

本文较全面地观察了DR-nm23蛋白在大肠癌、腺瘤及正常组织中的表达,较早提出了DR-nm23蛋白表达水平下调与大肠癌发生发展以及肿瘤细胞的分化程度密切相关,且可能主要参与上皮内瘤变等癌前病变的过程;表达与大肠癌转移呈负相关性,而与大肠癌组织学类型和病理分级均无相关性等观点。

表 3 DR-nm23蛋白表达与大肠癌临床病理特征的关系

分组	n	DR-nm23蛋白表达n(%)			阳性率 (%)	P值
		-	+	++		
组织学分型						
乳头状腺癌	24	13	8	3	29.2	0.008
管状腺癌	30	14	11	5	53.3	
黏液腺癌	15	10	3	2	33.3	
低分化腺癌	17	16	1	0	5.9	
印戒细胞癌	12	10	2	0	16.7	
病理分级						
I	25	12	10	3	52.0	0.000
II	44	25	12	7	43.2	
III	29	26	3	0	10.0	
淋巴结转移						
有	39	30	7	2	23.1	0.031
无	59	33	18	8	44.1	

nm23-H3或NME3(non-metastasis cell 3). 基因定位于人染色体16q13, cDNA全长849 bp, 由6个外显子和5个内含子组成, 转录起始点位于翻译起始密码子上游170 bp和370bp, 启动子结构与该家族其他成员不同, 富含G+C, 几乎不含经典TATA框或CAAT框^[1]. 已证实该基因有Ap-2、SP1、Myb、ets、GATA和Hox-1等多个转录起始因子相关元件结合位点, 但只有Ap-2参与了调控基因的转录效率及活性, 激活DR-nm23基因的表达^[1,2]. 已知nm23基因家族所编码的蛋白质产物是二磷酸核苷激酶(nucleoside diphosphate kinase, NDPK), NDPK最早是在酵母菌和鸽子胸肌中发现, 随后又证实NDPK活性是该家族的共同特性, 与细胞的分化和增殖活动密切相关^[3-5], 具有组氨酸蛋白激酶活性、参与丝氨酸磷酸化、转录激活等生物学特性, 主要通过磷酸组氨酸中间产物将与蛋白质结合的二磷酸核苷可逆磷酸化为三磷酸核苷, 调节细胞内能量池的大小, 活化蛋白质, 参与蛋白质各种功能活动^[6-8].

目前有关DR-nm23参与肿瘤形成和进展的机制尚不十分明确, 一般认为可能也与NDPK的活性有关. 研究发现nm23肿瘤转移抑制基因家族不同成员的NDPK活性所表现的生物学效应不尽相同. nm23-H1基因产物NDPKA与肿瘤细胞的分化和转移密切相关^[9,10]; nm23-H2基因产物NDPKB调控*c-myc*原癌基因转录, 参与细胞的生长、分化^[11,12]等; nm23-H4基因产物是线粒体NDPK, 其氨基酸序列与NDPKA和NDPKB有58%-59%的同源性, 推测也与肿瘤的发生发

表 4 大肠癌转移组中原发癌和淋巴结转移癌DR-nm23蛋白表达 (n = 29)

分组	DR-nm23蛋白表达n(%)			阳性率 (%)	P值
	-	+	++		
大肠原发癌	23(79.31)	5(17.24)	1(3.45)	20.69	0.559
淋巴结转移癌	21(72.41)	7(24.14)	1(3.45)	27.59	

展和转移有关^[13,14]; 此外, 睾丸特异性表达基因nm23-H5和nm23-H6-nm23-H8的基因产物均被证实具有NDPK活性或NDPK样区域^[15], 可能参与细胞的分化和生长. 而DR-nm23的基因产物为NDPKC, 除了在氨基末端多17个氨基酸并组成疏水性基团, 使其具有膜连接活性^[16]外, NDPKC的长度和结构与NDPKA、NDPKB基本相同, 因此推测DR-nm23同样具有多种蛋白质功能^[17].

Venturelli等^[17]研究发现DR-nm23基因在CD34(+)髓细胞分化早期表达上调, 后期表达下调或缺失; 进一步研究发现DR-nm23的表达水平与CML慢性期向急性发作期转化密切相关. CML病程早期, DR-nm23过表达不仅能抑制粒细胞集落刺激因子诱导粒细胞分化, 同时促进粒细胞凋亡, 使病情处于相对静止的慢性期; 随着病程进展, DR-nm23表达上调, 粒细胞分化严重抑制甚至停滞, 髓前体细胞过度增殖, 使病情急转直下向急性发作期转化. 此外, 通过S61P突变和RGD缺失改变蛋白质结构, 影响粒细胞胞质内与线粒体膜上靶蛋白的相互作用, 也削弱了野生型DR-nm23的生物学效应. 提示DR-nm23在造血细胞分化早期发挥重要作用, 基因突变、缺失和CML不同阶段的差异表达, 可能与CML的发生、发展和恶化密切相关. Huang等^[18]利用cDNA表达芯片技术, 证实正常脑组织不表达DR-nm23, 而多数星形细胞瘤表达上调, 提示DR-nm23基因与星形细胞瘤的发生有关. Amendola等^[19]发现神经母细胞瘤细胞株DR-nm23基因过度表达, 且分化越好的表型表达水平越高; 未被DR-nm23 mRNA转染的SK-N-SH神经母细胞瘤细胞株, DR-nm23表达水平与瘤细胞分化诱导状态相关; 而稳定转染后的细胞株具备了波形蛋白表达增加、IV型胶原沉积增多等分化细胞的特性, 表明DR-nm23与神经母细胞瘤的分化密切相关.

本组实验结果显示: 正常组、腺瘤组和大肠癌组DR-nm23蛋白表达依次下调, 统计学分析表达差异具有显著性($P < 0.01$); 腺瘤组中, 高

级别上皮内肿瘤表达较低级别上皮内肿瘤显著性下调($P<0.05$), 但腺瘤组与大肠癌组间表达差异无显著性; DR-nm23蛋白表达与肿瘤病理分级和组织学分型均有相关性($P<0.01$). 提示DR-nm23蛋白表达水平下调与大肠癌发生发展以及肿瘤细胞的分化程度密切相关, 且可能主要参与与上皮内瘤变等癌前病变的过程.

有关该家族与肿瘤转移关系的研究报道已很多, 作为经典的肿瘤转移抑制基因nm23-H1, 其表达水平与不同肿瘤转移的相关性不尽相同. 研究证实nm23-H1表达与乳腺癌、胃癌、肝细胞癌、食道癌、肺癌、淋巴瘤等肿瘤转移呈负相关^[20-25], 与卵巢癌、前列腺癌等转移呈正相关^[26], 有些研究还发现nm23-H1表达水平与转移潜能无关^[27,28]. 此外, nm23-H1与大肠癌转移的相关性, 各家报道也不一致^[29-31]. 由此可见, nm23基因家族与肿瘤转移的关系十分复杂, 不同肿瘤组织、相同肿瘤组织不同发展阶段, nm23表达水平及其所诱导的生物学效应具有组织特异性, 深入研究nm23在不同肿瘤中的表达及其意义具有广阔的前景. 迄今, 有关DR-nm23与肿瘤转移关系的研究报道极少. Amendola等^[19]研究发现, DR-nm23高表达的人SK-N-SH神经母细胞瘤细胞株通过降低细胞外基质的黏附性, 抑制了其在软琼脂中的生长. 而鼠NLE-15神经母细胞瘤细胞株通过上调DR-nm23的表达, 促进瘤细胞轴突快速生长, 使 β -整联蛋白显著增多, I型胶原蛋白黏附性增加, 从而抑制瘤细胞的生长^[32]. Sun等^[33]应用肿瘤转移相关cDNA基因芯片技术, 检测已知447个转移相关基因在大肠癌中的表达, 发现51个基因(上调基因22个, 下调基因29个)与大肠癌转移密切相关, 其中DR-nm23是29个下调基因之一. 本组实验结果与他们相同, 淋巴结转移组DR-nm23蛋白表达较无淋巴结转移组高, 表达与淋巴结转移呈负相关性($P<0.05$), 提示DR-nm23蛋白可作为反映大肠癌生物学行为和预后的潜在重要指征之一. Negroni等认为DR-nm23蛋白的61位丝氨酸残基可能是赋予抑制肿瘤转移潜能的主要磷酸化位点, 其突变导致细胞分化能力的减弱, 使蛋白之间相互作用受到影响, 参与并促进肿瘤转移过程的发生^[34].

本组实验结果还显示: 转移组中, 原发癌与其匹配淋巴结转移癌的DR-nm23蛋白表达差异无显著性, 从另一方面也提示了大肠癌从原发灶向转移灶转移的过程, 不仅是多基因、多因素、多机制共同参与的复杂病理过程, 而且蛋白质表

达水平在转移过程中也可能发生相应变化.

4 参考文献

- 1 Venturelli D, Martinez R, Melotti P, Casella I, Peschle C, Cucco C, Spampinato G, Darzynkiewicz Z, Calabretta B. Overexpression of DR-nm23, a protein encoded by a member of the nm23 gene family, inhibits granulocyte differentiation and induces apoptosis in 32Dc13 myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 7435-7439
- 2 曲利娟, 丁彦青. DR-nm23基因与肿瘤发生发展关系的研究进展. *国外医学·肿瘤学分册* 2005; 32: 336-339
- 3 Postel EH. Multiple biochemical activities of NM23/NDP kinase in gene regulation. *J Bioenerg Biomembr* 2003; 35: 31-40
- 4 Kim HD, Youn B, Kim TS, Kim SH, Shin HS, Kim J. Regulators affecting the metastasis suppressor activity of Nm23-H1. *Mol Cell Biochem* 2009; 329: 167-173
- 5 Boissan M, Dabernat S, Peuchant E, Schlattner U, Lascu I, Lacombe ML. The mammalian Nm23/NDPK family: from metastasis control to cilia movement. *Mol Cell Biochem* 2009; 329: 51-62
- 6 Lombardi D, Mileo AM. Protein interactions provide new insight into Nm23/nucleoside diphosphate kinase functions. *J Bioenerg Biomembr* 2003; 35: 67-71
- 7 Miyamoto M, Iwashita S, Yamaguchi S, Ono Y. Role of nm23 in the regulation of cell shape and migration via Rho family GTPase signals. *Mol Cell Biochem* 2009; 329: 175-179
- 8 Postel EH, Zou X, Notterman DA, La Perle KM. Double knockout Nme1/Nme2 mouse model suggests a critical role for NDP kinases in erythroid development. *Mol Cell Biochem* 2009; 329: 45-50
- 9 Jin L, Liu G, Zhang CH, Lu CH, Xiong S, Zhang MY, Liu QY, Ge F, He QY, Kitazato K, Kobayashi N, Wang YF. Nm23-H1 regulates the proliferation and differentiation of the human chronic myeloid leukemia K562 cell line: a functional proteomics study. *Life Sci* 2009; 84: 458-467
- 10 Lee JH, Marshall JC, Steeg PS, Horak CE. Altered gene and protein expression by Nm23-H1 in metastasis suppression. *Mol Cell Biochem* 2009; 329: 141-148
- 11 Thakur RK, Kumar P, Halder K, Verma A, Kar A, Parent JL, Basundra R, Kumar A, Chowdhury S. Metastases suppressor NM23-H2 interaction with G-quadruplex DNA within c-MYC promoter nuclelease hypersensitive element induces c-MYC expression. *Nucleic Acids Res* 2009; 37: 172-183
- 12 Dexheimer TS, Carey SS, Zuohe S, Gokhale VM, Hu X, Murata LB, Maes EM, Weichsel A, Sun D, Meuillet EJ, Montfort WR, Hurley LH. NM23-H2 may play an indirect role in transcriptional activation of c-myc gene expression but does not cleave the nuclelease hypersensitive element III1. *Mol Cancer Ther* 2009; 12 [Epub ahead of print]
- 13 Tokarska-Schlattner M, Boissan M, Munier A, Borot C, Mailleau C, Speer O, Schlattner U, Lacombe ML. The nucleoside diphosphate kinase D (NM23-H4) binds the inner mitochondrial membrane with high affinity to cardiolipin and couples nucleotide transfer with respiration. *J Biol Chem* 2008; 283: 26198-26207
- 14 Lacombe ML, Tokarska-Schlattner M, Epand RF, Boissan M, Epand RM, Schlattner U. Interaction of

■应用要点

DR-nm23参与大肠癌细胞的分化, 其表达下调是大肠癌发生发展的重要分子事件, 与大肠癌发生发展及转移密切相关, 可作为大肠癌生物学行为和判断预后的潜在重要指征.

同行评价

本研究设计比较严谨,研究数据可支持其结论,具有较好的学术价值。

- NDPK-D with cardiolipin-containing membranes: Structural basis and implications for mitochondrial physiology. *Biochimie* 2009; 91: 779-783
- 15 Munier A, Serres C, Kann ML, Boissan M, Lesaffre C, Capeau J, Fouquet JP, Lacombe ML. Nm23/NDP kinases in human male germ cells: role in spermiogenesis and sperm motility? *Exp Cell Res* 2003; 289: 295-306
- 16 Erent M, Gonin P, Cherfils J, Tissier P, Raschella G, Giartosio A, Agou F, Sarger C, Lacombe ML, Konrad M, Lascu I. Structural and catalytic properties and homology modelling of the human nucleoside diphosphate kinase C, product of the DRnm23 gene. *Eur J Biochem* 2001; 268: 1972-1981
- 17 Venturelli D, Cesi V, Ransac S, Engelhard A, Perrotti D, Calabretta B. The nucleoside diphosphate kinase activity of DRnm23 is not required for inhibition of differentiation and induction of apoptosis in 32Dcl3 myeloid precursor cells. *Exp Cell Res* 2000; 257: 265-271
- 18 Huang H, Colella S, Kurrer M, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. Gene expression profiling of low-grade diffuse astrocytomas by cDNA arrays. *Cancer Res* 2000; 60: 6868-6874
- 19 Amendola R, Martinez R, Negroni A, Venturelli D, Tanno B, Calabretta B, Raschella G. DR-nm23 gene expression in neuroblastoma cells: relationship to integrin expression, adhesion characteristics, and differentiation. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89: 1300-1310
- 20 Bal A, Joshi K, Logasundaram R, Radotra B, Singh R. Expression of nm23 in the spectrum of pre-invasive, invasive and metastatic breast lesions. *Diagn Pathol* 2008; 3: 23
- 21 王轶淳, 孙明军, 傅宝玉. 胃癌组织中 β -catenin及nm23H1的表达及其临床意义. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 2144-2147
- 22 杨育生, 刘斌, 邢传平, 高自芳, 顾立萍, 钱震, 董亮, 苏勤军. 胃癌组织中Caveolin-1, nm23及MMP-2的表达及其意义. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 1725-1730
- 23 Boissan M, Lacombe ML. Nm23/NDP kinases in hepatocellular carcinoma. *J Bioenerg Biomembr* 2006; 38: 169-175
- 24 Niitsu N, Nakamine H, Okamoto M, Tamaru JI, Hirano M. A clinicopathological study of nm23-H1 expression in classical Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol* 2008; 19: 1941-1946
- 25 Guan-Zhen Y, Ying C, Can-Rong N, Guo-Dong W, Jian-Xin Q, Jie-Jun W. Reduced protein expression of metastasis-related genes (nm23, KISS1, KAI1 and p53) in lymph node and liver metastases of gastric cancer. *Int J Exp Pathol* 2007; 88: 175-183
- 26 Youn BS, Kim DS, Kim JW, Kim YT, Kang S, Cho NH. NM23 as a prognostic biomarker in ovarian serous carcinoma. *Mod Pathol* 2008; 21: 885-892
- 27 Murakami M, Meneses PI, Lan K, Robertson ES. The suppressor of metastasis Nm23-H1 interacts with the Cdc42 Rho family member and the pleckstrin homology domain of oncoprotein Dbl-1 to suppress cell migration. *Cancer Biol Ther* 2008; 7: 677-688
- 28 Wang YF, Chen JY, Chang SY, Chiu JH, Li WY, Chu PY, Tai SK, Wang LS. Nm23-H1 expression of metastatic tumors in the lymph nodes is a prognostic indicator of oral squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 2008; 122: 377-386
- 29 杨冬冬, 田素礼, 于金玲. 大肠癌中nm23-H1的表达及其与临床病理特征的关系. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 412-415
- 30 Pasz-Walczak G, Salagacka A, Potemski P, Balcerczak E, Kordek R, Mirowski M. Maspin and Nm23-H1 expression in colorectal cancer. *Neoplasma* 2010; 57: 95-101
- 31 Dusonchet L, Corsale S, Migliavacca M, Calò V, Bazan V, Amato A, Cammareri P, Totaro MS, Agnese V, Cascio S, La Rocca G, Sisto PS, Dardanoni G, Valerio MR, Grassi N, Latteri S, Cajozzo M, Buscemi M, Castorina S, Morello V, Tomasino RM, Gebbia N, Russo A. Nm23-H1 expression does not predict clinical survival in colorectal cancer patients. *Oncol Rep* 2003; 10: 1257-1263
- 32 Amendola R, Martinez R, Negroni A, Venturelli D, Tanno B, Calabretta B, Raschella G. DR-nm23 expression affects neuroblastoma cell differentiation, integrin expression, and adhesion characteristics. *Med Pediatr Oncol* 2001; 36: 93-96
- 33 Sun Q, Ding YQ, Gao XQ, Yan S, Han JX. [Development and application of cDNA microarray of tumor metastasis-associated genes] *Di Yi Junyi Daxue Xuebao* 2002; 22: 1070-1075
- 34 Negroni A, Venturelli D, Tanno B, Amendola R, Ransac S, Cesi V, Calabretta B, Raschella G. Neuroblastoma specific effects of DR-nm23 and its mutant forms on differentiation and apoptosis. *Cell Death Differ* 2000; 7: 843-850

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》按时完成2009年度出版任务

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

2010年,《世界华人消化杂志》将坚持开放获取(open access, OA)的出版模式,编辑出版高质量文章,努力实现编委、作者和读者利益的最大化,努力推进本学科的繁荣和发展,向专业化、特色化和品牌化方向迈进。

创伤应激与肝细胞凋亡

廖永晖, 千年松, 张毅, 窦科峰

廖永晖, 千年松, 张毅, 窦科峰, 中国人民解放军第四军医大学西京医院肝胆外科 陕西省西安市 710032
全军医药卫生科研基金资助项目, No. 08Z030
作者贡献分布: 本文综述由廖永晖完成; 张毅参与搜集整理文献; 窦科峰与千年松审校。
通讯作者: 窦科峰, 教授, 710033, 陕西省西安市, 中国人民解放军第四军医大学西京医院肝胆外科, gdwkgwx@fmmu.edu.cn
电话: 029-84771094
收稿日期: 2010-02-02 修回日期: 2010-04-29
接受日期: 2010-05-10 在线出版日期: 2010-05-28

Traumatic stress and hepatocyte apoptosis

Yong-Hui Liao, Nian-Song Qian, Yi Zhang, Ke-Feng Dou

Yong-Hui Liao, Nian-Song Qian, Yi Zhang, Ke-Feng Dou, Department of Hepatobiliary Surgery, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, Shaanxi Province, China
Supported by: the Medical and Health Research Foundation of Chinese PLA, No. 08Z030
Correspondence to: Professor Ke-Feng Dou, Department of Hepatobiliary Surgery, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, Shaanxi Province, China. gdwkgwx@fmmu.edu.cn
Received: 2010-02-02 Revised: 2010-04-29
Accepted: 2010-05-10 Published online: 2010-05-28

Abstract

Trauma can cause stress in organisms and may promote cell apoptosis and lead to pathological damage. A variety of factors are involved in this process. The mechanisms responsible for traumatic stress-induced apoptosis are complex and controversial, especially in non-nervous organs. The liver plays a key role in metabolism and is one of the target organs of severe stress. Stress-induced hyperglycemia, calcium overload, oxidative stress, ischemia/reperfusion, inflammatory response, and immunosuppression caused by traumatic stress may lead to hepatocyte apoptosis. Thus, it is of great significance to explore the relationship between traumatic stress and hepatocyte apoptosis.

Key Words: Trauma stress; Apoptosis; Stress-induced hepatic injury

Liao YH, Zhang Y, Qian NS, Dou KF. Traumatic stress and hepatocyte apoptosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi*

2010; 18(15): 1569-1576

摘要

创伤会使机体产生应激, 在多种因素作用下, 可能促使细胞凋亡导致病理损伤, 创伤应激致细胞凋亡的机制复杂, 仍有很多存在争议的问题, 尤其是对那些非神经系统器官而言。临床上很多肝脏疾病均受应激因素的影响, 导致肝细胞凋亡而产生肝损伤。目前应激损害研究主要集中在应激对心理造成的损害, 而对肝、脑、肺、肾等实质脏器的损害研究不多, 机制尚不明确。肝脏是人体新陈代谢的总枢纽, 是严重应激损伤的核心靶器官, 受创伤应激后的应激性高血糖、钙超载、氧化应激、缺血再灌注、炎症损伤和免疫抑制等因素影响, 可发生肝细胞凋亡等病理性损害, 故研究创伤应激与肝细胞凋亡的内在联系具有重要意义。

关键词: 创伤应激; 凋亡; 应激性肝损害

廖永晖, 千年松, 张毅, 窦科峰. 创伤应激与肝细胞凋亡. 世界华人消化杂志 2010; 18(15): 1569-1576
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/1569.asp>

0 引言

应激是机体对有害刺激所做出的适应性综合反应, 是机体对抗有害刺激的适应性保护机制。重症创伤刺激可引起机体出现明显的应激反应。机体遭受强烈刺激将产生一系列生物学反应, 致使机体内稳态破坏并出现细胞代谢障碍甚至死亡。应激与神经系统疾病、心血管病和肿瘤的发生有密切关系, 已有研究证实, 应激可以造成一些神经系统依赖的精神疾病^[1], 而且可以造成如心、肝等神经系统以外器官的结构改变^[2]。如束缚应激可以造成大脑结构的损害, 从而损害空间学习和记忆能力^[3]; 脑部创伤后除脑组织特异性损伤外, 一系列细胞生化级联反应可以导致全身性损害, 对其他器官功能产生负面影响, 并可能导致继发性损伤, 如常见的应激性溃疡等^[4]; 脊髓创伤、烧伤、冻伤、手术创伤和机械性损伤等创伤应激性损伤均有报道^[5-9]。应激

■背景资料

机体在创伤应激后产生一系列生物学反应, 致使机体内稳态破坏并出现细胞代谢障碍甚至死亡。目前应激损害研究主要集中在心理方面, 而对肝脏等重要实质脏器的损害研究不多, 肝脏在应激反应的调节中处于核心地位, 创伤应激与肝细胞凋亡之间的联系, 值得进一步研究。

■同行评议者

李胜, 研究员, 山东省肿瘤防治研究院肝胆外科

■ 研发前沿

创伤应激引起肝脏等实质器官多方面的功能障碍,影响患者的治疗和预后,影响因素涉及多个方面,炎症损伤和免疫抑制等在创伤应激性肝细胞凋亡中可能起主导作用

反应对于生命的重要性显而易见,关于应激病理生理学的细胞分子机制,尤其是对那些非神经系统器官而言,应激反应如何影响正常脏器的功能及其分子机制仍缺乏系统研究.我们对创伤应激引起肝细胞凋亡方面的机制作一综述.

1 肝细胞凋亡

肝脏是人体内各种营养代谢和储存的总枢纽,是维持人体生理活动的重要器官,在应激反应中起着决定性作用,是机体调节应激反应的核心.机体遭受创伤刺激时,肝脏血流量减少致肝脏缺血缺氧,肠黏膜屏障受损,内毒素通过门静脉入肝,加重肝脏损害,肝Kupffer细胞激活后,进一步促进炎性介质分泌,引起“瀑布效应”,加重肝和肠道的损伤,并引起其他重要器官损伤^[10,11].

肝细胞凋亡是调节肝组织正常细胞更新、增殖以及再生的重要机制,肝细胞凋亡有对抗感染、肿瘤及防止肝细胞自身免疫反应等作用,而肝细胞过度凋亡则会导致肝衰竭,同时肝细胞凋亡也是造成肝脏损伤和肝脏疾病的中心环节.多种因素可以诱导肝细胞凋亡,包括外源性化学物质、细胞生长因子缺乏、电离辐射、病毒感染和氧化性损伤等^[12].

人类创伤在直接造成局部器官组织损伤的同时,创伤应激后机体会产生一系列的生物学反应,通过应激变化、炎症反应等多种途径导致全身其他组织器官的功能改变^[13],以脊髓损伤为例,创伤大致有3个不同阶段:急性期,继发性损伤期及慢性期.急性期从受伤至数天内.在这个阶段发生电解质失衡,动作电位改变,局部水肿和脊髓休克.继发性损伤在数分钟之内开始,并持续数周进入慢性期.急性期的缺血和炎症反应则在第二阶段占主导地位.在受伤的最初15 min,兴奋性神经递质浓度的增加,最重要的是谷氨酸,细胞死亡时通常达到正常的6-8倍.谷氨酸介导的受体激活使脂质过氧化和细胞凋亡.创伤后体循环中的肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor α , TNF- α)浓度开始增加并在8 h后达到高峰^[5].TNF- α 在诱导细胞凋亡的过程中有重要作用,TNF- α 在肝脏主要由激活的Kupffer细胞产生,TNF- α 诱导肝细胞凋亡可能是肝组织损伤的重要启动因素^[14].

2 创伤应激致肝细胞凋亡的影响因素

创伤应激会影响非神经系统器官的功能,甚至产生损伤,如应激性肝损害(hepatic stress injury, HSI),其发病机制并不清楚,可能是多因素共同

作用的结果^[15-18],一系列代谢紊乱包括钙(Ca^{2+})内流,自由基生成、脂质过氧化和炎性因子释放等多种因素直接或间接参与了创伤后HSI的发病过程^[19-21].

2.1 应激性高血糖 创伤应激性会使儿茶酚胺、胰高血糖素、生长激素和糖皮质激素等应激激素释放,机体葡萄糖利用能力下降以及胰岛素相对不足而导致糖代谢紊乱.创伤后高血糖在临床相当常见^[22],应激性高血糖对于患者是一把双刃剑,而以往认为应激性高血糖对机体是不利的.创伤后早期机体处于消落期(ebb phase),高血糖可能属于机体自我保护的“良性应激”,在创伤应激后葡萄糖氧化利用能力下降是一个主动过程,亦是一种保护机制,通过优先利用脂肪供能而保留葡萄糖,其目的可能在于维持高血糖,以供葡萄糖依赖组织,如血细胞之用.这对机体的恢复有一定的好处,但随着机体进入应激代谢反应的起涨期(flow phase),创伤的机体内糖原不断消耗,糖原合成受抑制,供不应求,糖原逐渐消耗殆尽,糖原合成不足,能量供给不能满足需要,氧消耗及氧运输增加,组织器官缺血缺氧,最终是肝糖原耗竭,出现肝损伤^[23].

高血糖状态对外周循环主要是缩血管效应,加重局部缺血^[24-26].另外,应激性高血糖还可通过刺激细胞因子的释放加重胰岛素抵抗和糖耐量异常使血糖进一步升高,造成能量营养的供应障碍^[27].应激性高血糖可以通过抑制免疫系统,增加细胞毒T细胞生成而损害组织细胞,持续的应激性高血糖与患者感染并发症和多器官功能不全综合征的发生率增加有关^[28].

2.2 钙超载 在生理状态下, Ca^{2+} 在维持细胞增殖、分裂、能量代谢和氧代谢等过程中发挥着重要作用,在肝细胞外液 Ca^{2+} 浓度约为细胞内液的1万倍,细胞内 Ca^{2+} 维持稳定对于生命活动是至关重要的.细胞内钙超载对细胞结构和功能造成多方面甚至不可逆损伤,进而整个器官变性、死亡.维持细胞内外钙梯度相对稳定方面,主要依赖于 Ca^{2+} -ATP酶.细胞内钙排除是耗ATP的过程,肝脏应激缺血时,在缺血期氧的缺乏,干扰了细胞内氧化能量的产生,导致ATP水平的下降,随着ATP含量的下降,细胞膜 Ca^{2+} -ATP酶活力及钙摄取能力下降;细胞内钙离子和ATP的变化都将干扰线粒体内膜的静息电位,胞质中钙离子的浓度增高即可使得高电导性通道-通透性转换孔(permeability transition pore, PTP)开放,大量的钙离子进入线粒体,线粒体

也将出现钙超载^[29]. 最终导致PTP开放的关键因素就是线粒体钙超载, 尤其是同时伴有氧化应激^[30]. 氧自由基对质膜产生的脂质过氧化反应, 使膜的渗透性发生改变并可使质膜形成新的钙通道, 促使 Ca^{2+} 大量内流, 同时, 氧自由基破坏线粒体结构、干扰氧化磷酸化功能、加速ATP等高能磷酸化合物的耗竭, 使依赖能量的离子泵活性降低, 这些均使细胞内 Ca^{2+} 增加. 超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)及过氧化氢酶(catalase, CAT)可使 Ca^{2+} -ATP酶活性增高, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交换下降; 而黄嘌呤及黄嘌呤氧化酶使 Ca^{2+} -ATP酶活性受明显抑制, 胞质 Ca^{2+} 明显增高. 氧自由基能直接作用于 Ca^{2+} -ATP酶和 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交换载体蛋白, 促使钙超载. 另有研究表明, 高浓度的线粒体 Ca^{2+} 和氧自由基能使PTP开放, 允许线粒体 Ca^{2+} 外流, 减少ATP形成, 并导致触发凋亡的膜间蛋白释放入胞质. Ca^{2+} 内流及线粒体跨膜电位降低处于caspase级联反应的上游^[31]. 在创伤应激性对神经系统的损伤中, 积聚的 Ca^{2+} 是缺血性神经元出现谷氨酸依赖性兴奋性中毒的重要因素之一. 钙超载在细胞凋亡, 甚至在肝中毒性损伤中具有启动作用.

2.3 氧化应激及自由基损伤 机体在创伤应激状态下, 由于创伤局部组织微循环系统的损害和组织细胞的代谢功能受损, 导致SOD和GSH含量下降, 丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量升高, 机体抗氧化应激的能力下降. SOD活性下降引发脂质过氧化, 脂质过氧化是氧化应激引起的最常见的氧化损伤, 即脂肪的多不饱和脂肪酸的侧链通过自由基链反应而自动氧化, 是组织受创伤后发生远隔器官损伤的主要原因. 创伤后细胞受自由基攻击, 形成大量脂质过氧化物(lipid peroxide, LPO), LPO在金属离子存在下催化裂解产生MDA, MDA可以间接反映组织内的自由基水平及细胞损伤程度. MDA对细胞有毒性作用, 可与DNA反应而导致突变或蛋白质反应引起结构功能的变化, 损伤细胞膜, 最终造成肝细胞损害^[32].

细胞中因氧化应激产生的活性氧引发氧化还原平衡失调时, 氧化应激诱导肝细胞凋亡时, 细胞基因表达变化和多种酶的活性改变受多种调控机制的影响, 包括: MAPK(mitogen-activated protein kinase, MAPK)丝裂原活化蛋白激酶通路、核因子- κB (nuclear factor- κB , NF- κB)、天冬氨酸特异的半胱氨酸蛋白酶caspase、Bcl-2家

族及死亡受体(death receptor, DR)等, 可能诱发凋亡但也可能会释放促使正常细胞增殖的相应信号^[33], 可能受应激程度的影响.

自由基与凋亡的关系已经被研究了很多年, 活性氧自由基在线粒体介导的凋亡中有重要作用^[34,35]. 细胞内线粒体、内质网、细胞核和细胞内液中都可产生氧自由基, 异常情况下过量产生的氧自由基会对组织细胞造成损害^[36]. 氧化性损伤时经常发生谷胱甘肽(glutathione, GSH)缺乏和MDA蓄积, 是线粒体膜通透性转变(mitochondrial permeability transition, MPT)的重要诱因^[37,38], 一旦发生MPT, 将促使多种和凋亡相关的细胞因子释放, 如细胞色素C、凋亡诱导因子和核酸内切酶G等^[39,40]. 氧化应激主要作用于内质网(endoplasmic reticulum, ER)及钙泵, 氧化性DNA损伤和氧化介导的内质网应激(ER stress, ERS)也是氧化应激所激活的重要的凋亡信号级联反应, 氧自由基(reactive oxygen species, ROS)和氮自由基(reactive nitroxide species, RNS)被发现可以通过ERS介导的JNK激活、CHOP转录激活及caspase激活等来直接激活不同的信号级联通路, 诱导凋亡^[41]. 多种肝脏疾病的发生与ERS介导的肝细胞凋亡有关^[42], 严重的ERS会引起从ER到线粒体的凋亡信号传导, 最终激活caspases导致细胞凋亡^[43,44]. caspase-12是ERS介导凋亡途径的关键蛋白酶, 有研究发现, ERS介导caspase-12活化参与了炎症性急性肝功能衰竭肝细胞凋亡的过程, 而通过维持细胞钙平衡和减少自由基生成可以抑制ERS途径启动的caspase-12活化, 可能有助于保护肝细胞免于凋亡^[45]. 最近有报道认为电离辐射触发ERS, 而介导自体吞噬^[46]. 自体吞噬是一种与细胞器蛋白降解有关的受控通路^[47], 被认为是细胞适应氧化应激和维持内环境稳定的一个必要功能. 自体吞噬和凋亡是两个既相互独立又密切联系的过程, 自体吞噬可能具有促进凋亡或抗凋亡的双重功能, 他在细胞程序性死亡的早期阶段起到一个抗凋亡的保护性作用, 在后期则可能促进细胞凋亡^[48].

2.4 缺血再灌注损伤 创伤刺激时, 应激性高血糖和钙超载会在一定程度上促进血管收缩, 肝脏血流量减少致肝脏缺血缺氧, 会使肝脏产生缺血再灌注(ischemia reperfusion, IR)损伤, 肝脏IR损伤在临床上十分常见, 肝脏移植手术时, 缺血再灌注损伤是必然遇到的问题. IR发病机制十分复杂, 其中钙离子超载是一个重要的原因. 也有

■相关报道

已有研究证实, 重症创伤刺激可引起机体出现明显的应激反应, 可以造成一些神经系统依赖的精神疾病, 而且可以造成如心、肝等神经系统以外器官的结构改变.

■创新盘点

本文旨在综述创伤应激与肝细胞凋亡之间的联系,并较为全面地阐述了相关的影响因素和临床意义,概述了相关的最新研究进展,对进一步研究其机制有指导作用。

研究认为氧自由基及其引发的脂质过氧化反应在其发生机制上有重要作用。缺血和再灌注后不断产生的氧自由基损伤了细胞膜和线粒体膜,干扰了细胞内氧化能量的产生,导致ATP水平下降, Ca^{2+} -ATP酶活性不断降低, ATP大量耗损,并最终导致线粒体钙通道的开放,钙离子内流,形成细胞内钙超载。再灌注期线粒体迅速水肿,胞质 Ca^{2+} 增加引起磷脂酶触发的膜损伤,尤以再灌注后为重。再灌注时,胞质 Na^{+} 超载可以导致线粒体中 Ca^{2+} 释放,从而使胞质 Ca^{2+} 浓度增高。使不能将胞内的 Ca^{2+} 泵出胞外,从而导致细胞内的 Ca^{2+} 浓度明显增加^[49]。

近年有文献报道肝脏缺血再灌注会激活Kupffer细胞,增强表达致炎因子、细胞黏附分子及活性氧自由基。TNF- α 和IL-1来源于活化的Kupffer细胞,在肝缺血再灌注损伤中起重要作用。这些细胞因子能够上调黏附分子释放,促使多形核中性白细胞(polymorphonuclear neutrophils, PMN)黏附聚集并进一步产生活性氧。线粒体被认为是活性氧的主要来源。活性氧的大量生成与肝细胞和肝窦内皮细胞凋亡在肝I/R损伤中发挥核心作用^[50]。在IR损伤中,PTP的开放加重了钙超载、氧化应激和ATP的耗损^[51]。而PTP的开放可以引起凋亡前体蛋白、化学毒物及细胞色素C的释放,激活凋亡信号通路,如天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶(caspases)系统。caspases-9前体是由其激活酶和凋亡激活因子-1(apoptotic protease activating factor-1, Apaf-1)组成。细胞色素C在脱氧ATP的存在下,激活Apaf-1,从而使前体caspases-9成为有活性的caspases-9,进而激活caspases-3^[52]。caspases-3是凋亡的执行人,最终诱导肝细胞凋亡。

2.5 炎性损伤和免疫抑制 严重创伤引起的严重应激性损害可介导大量细胞因子生成和释放,并发生级联放大效应^[53]。适度的应激反应,特别是糖皮质激素(glucocorticoid, GC)的适度表达,有利于机体对抗有害刺激的作用,重症创伤合并创伤失血性休克时,包括神经系统在内的各组织、器官均可出现显著的微循环障碍,组织器官功能呈现出明显的低下状态,体内糖皮质激素受体(glucocorticoid receptor, GR)可被迅速消耗,GC效应明显降低,神经组织严重损伤致使促肾上腺皮质激素释放激素(corticotropin releasing hormone, CRH)和促肾上腺皮质激素(adrenocorticotrophic hormone, ACTH)生成与释放不

足,导致GC生成和释放减少对白介素-1(interleukin1, IL-1)、肿瘤坏死因子等细胞因子分泌的抑制作用减弱,可导致炎性细胞因子的增多,加重组织损害^[54]。各种创伤早期即有白细胞和内皮细胞的进行性增加,血管内皮细胞释放多种细胞黏附分子,促进PMN黏附和聚集,激活的PMN可分泌髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO),血浆及组织中MPO活性的高低基本上可定量反映PMN的聚集及组织损伤程度^[55]。

当机体受到外源性损伤或感染毒性物质的打击时,可促发初期炎症反应,同时机体产生的内源性免疫炎性因子并形成“瀑布效应”,创伤后肠道菌群易位和内毒素入血循环至肝脏,可损害肝细胞和Kupffer细胞^[13]。危重患者因机体代偿性抗炎反应能力降低以及代谢功能紊乱,还可能引发全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS),并可导致发生多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)。据报道,肿瘤坏死因子受体介导的毒性作用在大脑缺血后被上调,超氧化物歧化酶和其他抗氧化剂的大量表达可以明显降低TNF- α 水平^[56]。TNF- α 在肝脏主要由激活的Kupffer细胞产生,诱导肝细胞凋亡可能是肝组织损伤的重要启动因素,当大量凋亡的肝细胞不能为吞噬细胞清除时,中性粒细胞受到内源性递质TNF- α 的吸引而移动至肝脏,并受到没有被迅速清除的凋亡细胞的激活,中性粒细胞的激活可能是引起肝细胞损伤甚至凋亡的最后过程^[57,58]。

身体和心理上的应激会对免疫系统产生影响,很早就有研究认为应激影响了白细胞的细胞构成和免疫应答并使机体对多种疾病易感。严重创伤常伴随一系列免疫系统反应,在大型手术如肝移植术后,机体处于应激和高分解状态,移植肝受热缺血、冷缺血及再灌注损伤的影响加上术中创伤及术后免疫抑制剂的使用造成免疫功能低下,并可能导致继发性器官损伤和感染性并发症^[59]。创伤应激会使细胞或体液中免疫抑制性因子活动增强。免疫反应相关的巨噬细胞、中性粒细胞和树突状细胞(dendritic cells, DC)在相关因子介导和细胞相互作用下触发了这种免疫抑制反应,免疫抑制期的特征是细胞凋亡增加^[60]。细胞程序性死亡不仅发生在器官本身,而且还会发生在那些和宿主免疫应答相关的细胞上。应激机体神经内分泌系统功

能的变化对免疫系统的有抑制作用, 神经免疫内分泌网络的异常改变不仅使机体内稳态失衡, 而且可引起多种靶细胞, 特别是心脑血管中多种细胞因子如TNF、IL-1、2及ET-1等的分泌^[61]. 机体内稳态的失衡及细胞因子的分泌直接导致了细胞的死亡, 并通过对下丘脑-垂体-肾上腺皮质轴(HPA轴)的负反馈调节对机体产生更广泛和更严重的影响. 交感神经系统尤其是去甲肾上腺素能受体通过凋亡机制参与了创伤应激诱导的免疫功能障碍, Fas抗原的表达增加起了重要作用^[62]. Fas抗原是属于TNF受体家族和神经生长因子受体家族的一种I型跨膜蛋白, 他在活化的T细胞、B细胞、肝细胞和卵巢上皮细胞等多种细胞上均有表达. Fas是细胞表面重要的死亡受体, Fas-FasL在免疫系统调节中处于关键地位, 在肝细胞凋亡中有重要作用, 最近的研究表明创伤应激可以增加Fas在淋巴细胞中的表达^[63]. 交感/去甲肾上腺素能系统和HPA轴间有相互作用, 其机制尚待深入研究.

3 临床研究

肝脏是严重的应激损伤的核心靶器官, 创伤应激可以引发肝脏损伤, 并导致其他重要脏器的继发性损伤. 机体受到创伤后, 基因参与的全身性和细胞间的稳定性调节对机体的恢复发挥了重要作用. 细胞因子的信使RNA(mRNA)表达水平与细胞器官受到的创伤程度有关^[64], 而microRNAs通过完全或不完全的碱基互补绑定到mRNA上, 通过一种目前未知的机制抑制蛋白合成来保证mRNA的稳定性^[65], 对于多种功能蛋白的转录和表达调控具有重要作用, 继而产生一系列应激相关的生物学效应, microRNA是近年的研究热点, 对于创伤应激的研究有重要意义, 有助于发现新的应激基因和效应蛋白, 进一步明确应激损伤机制, 找到有效的干预手段.

创伤应激后机体内已知的应激性蛋白如热休克蛋白(heat-shock protein, HSP)、ER应激蛋白和HO-1等具有抗凋亡的作用. 如热休克蛋白具有保护神经细胞, 提高细胞对缺血缺氧的耐受性, 使变性损伤的蛋白得以迅速的处理和恢复, 维持细胞的稳定. HSP的发现及其在应激反应中的作用是应激医学研究中一个十分突出的研究热点. 几乎所有的应激原均可活化HSP基因, 应激机体中HSP表达增强, 可以有效地提高机体的应激适应能力^[66]. 最近HO-1和他的反应产物CO, 作为潜在的细胞抗凋亡机制吸引了很多关注,

尤其在缺血再灌注和移植排斥方面^[67]. 应激蛋白保护细胞免于凋亡的机制可能作为一个切入点, 在应激损伤的治疗中发挥重要作用, 对于新药研究也有指导意义.

在受到应激因素影响后, 应激细胞的增殖或凋亡受多个细胞信号传导通路参与调控, 如氧化应激可以介导c-Jun氨基末端激酶(JNK)和p38蛋白激酶(MAPK)激活并使肝细胞凋亡, 凋亡信号调节激酶1(apoptosis signal-regulating kinase 1, ASK1)可以调控这个过程^[68]; MAPK家族的3种主要蛋白激酶可以对不同细胞类型或诱导因子形成的凋亡过程产生正或负向调节的作用. 以JNK为例, 在同类细胞他的激活动力学不同也可能有双向调节作用^[69,70]. 另有报道认为JNK和p38在肝细胞凋亡过程中有重要作用, 他们的持续激活可能导致肝脏疾病的发生, 并证实p38激酶抑制剂可以减轻肝脏的缺血再灌注损伤^[71]. 有报道更多的信号通路参与创伤后的应激反应, 这些信号通路之间可以相互影响, 且具体机制复杂, 尚待进一步研究, 也正因此, 对于创伤应激所造成的多器官功能损害的治疗效果也尚不能令人满意.

对于应激性损伤的预防和治疗, 医学家们十分注重心理疏导, 采用了诸如参加体育和娱乐活动, 音乐疗法等多种方式, 间或使用一些抗抑郁药物等. 还有资料表明, 有人已根据对应激相关活性因子的认识, 研制减缓应激损伤的免疫类制剂. 我国传统中药常在一些诊断非常困难的疾病中保持令人惊异的治疗效果, 故中药在创伤应激中的作用及机制研究对临床应用有重要意义, 近年来, 许多研究发现, 多种植物具有减缓应激性损伤的作用. 已经有确定作用的植物类有: 银杏叶、麻醉椒、人参等10余种, 这类制剂将有望用于面临高应激负荷的人群, 发挥群体防护功能, 但尚待深入研究. 目前, 国外应激损伤防治方法的主要趋势在于保健食品和抗应激药品的使用, 多种草药如西番莲、麻醉椒等在西欧国家已用于应激损伤的预防, 并获准进入市场; 我们在最新的研究中证实中药方剂四逆散在慢性束缚应激模型中可以保护肝脏免受功能损害^[2], 对创伤应激的研究有参考价值.

4 结论

应激刺激与细胞凋亡关系密切, 在对应激与疾病发生发展关系的探索中, 学者们发现机体遭受创伤等强烈刺激后所产生的生物学级联反应

■应用要点

创伤等应激对实质器官的损害日益受到重视, 通过研究创伤应激与肝损害的关系, 可以改善相关患者治疗和预后, 有重要的临床意义, 也为进一步研究其机制开拓了思路.

■名词解释

应激性肝损伤(HSI): 是机体遭受强烈刺激后产生一系列生物学反应, 致使机体内稳态破坏, 并出现非神经系统器官细胞代谢障碍甚至死亡, 形成如应激性肝损伤等隐性损伤。

可以造成如心、肺、肝等神经系统以外器官的结构改变。在肝细胞凋亡的研究进展很快, 临床上各种肝脏疾病, 如肝癌、肝移植排斥反应、药物性肝炎、自身免疫性肝病、乙醇性肝病等均受应激因素的影响。肝应激性损伤的预防和治疗临床意义重大, 可以有效改善创伤机体的预后, 对传统中药等抗应激治疗的研究, 有广阔的临床应用前景。

5 参考文献

- Bryant RA, O'Donnell ML, Creamer M, McFarlane AC, Clark CR, Silove D. The psychiatric sequelae of traumatic injury. *Am J Psychiatry* 2010; 167: 312-320
- Kilicoglu B, Eroglu E, Kilicoglu SS, Kismet K, Eroglu F. Effect of abdominal trauma on hemorrhagic shock-induced acute lung injury in rats. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 3593-3596
- Yazihan N, Uzuner K, Salman B, Vural M, Koken T, Arslantas A. Erythropoietin improves oxidative stress following spinal cord trauma in rats. *Injury* 2008; 39: 1408-1413
- 王娟, 杨昭徐, 崔培林. 铝碳酸镁预防大鼠急性脑外伤后应激性溃疡的作用. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 2115-2118
- Yazihan N, Uzuner K, Salman B, Vural M, Koken T, Arslantas A. Erythropoietin improves oxidative stress following spinal cord trauma in rats. *Injury* 2008; 39: 1408-1413
- Jayaraman A, Maguire T, Vemula M, Kwon DW, Vannucci M, Berthiaume F, Yarmush ML. Gene expression profiling of long-term changes in rat liver following burn injury. *J Surg Res* 2009; 152: 3-17, e1-e2
- Fujimura M, Morita-Fujimura Y, Noshita N, Yoshimoto T, Chan PH. Reduction of the DNA base excision repair protein, XRCC1, may contribute to DNA fragmentation after cold injury-induced brain trauma in mice. *Brain Res* 2000; 869: 105-111
- Kara T, Canyigit M. Relationship between abdominal trauma or surgery and mesenteric panniculitis. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 6139
- Huser CA, Peacock M, Davies ME. Inhibition of caspase-9 reduces chondrocyte apoptosis and proteoglycan loss following mechanical trauma. *Osteoarthritis Cartilage* 2006; 14: 1002-1010
- Suzuki M, Takeuchi H, Kakita T, Unno M, Katayose Y, Matsuno S. The involvement of the intracellular superoxide production system in hepatic ischemia-reperfusion injury. In vivo and in vitro experiments using transgenic mice manifesting excessive CuZn-SOD activity. *Free Radic Biol Med* 2000; 29: 756-763
- Tselepidis S, Papazoglou L, Dessiris A, Vlemas I, Papageorgiou G, Stournara A, Minas A. Liver injury after ischemia and reperfusion: the role of oxygen free radicals. *Mil Med* 2004; 169: 531-535
- Sims NR, Muyderman H. Mitochondria, oxidative metabolism and cell death in stroke. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1802: 80-91
- 阴英, 蓝宇, 孙成栋. 创伤后肝功能变化及其临床意义. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 217-220
- Kodama Y, Taura K, Miura K, Schnabl B, Osawa Y, Brenner DA. Antiapoptotic effect of c-Jun N-terminal Kinase-1 through Mcl-1 stabilization in

TNF-induced hepatocyte apoptosis. *Gastroenterology* 2009; 136: 1423-1434

- Ott L, McClain CJ, Gillespie M, Young B. Cytokines and metabolic dysfunction after severe head injury. *J Neurotrauma* 1994; 11: 447-472
- Kamei H, Yoshida S, Yamasaki K, Tajiri T, Ozaki K, Shirouzu K. Severity of trauma changes expression of TNF-alpha mRNA in the brain of mice. *J Surg Res* 2000; 89: 20-25
- Fang CW, Yao YM, Zhai HX, Yu Y, Wu Y, Lu LR, Sheng ZY, Sheng CY. Tissue lipopolysaccharide-binding protein expression in rats after thermal injury: potential role of TNF-alpha. *Burns* 2004; 30: 225-231
- Xie GQ, Jiang JX, Chen YH, Liu DW, Zhu PF, Wang ZG. Induction of acute hepatic injury by endotoxin in mice. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2002; 1: 558-564
- Antoine DJ, Mercer AE, Williams DP, Park BK. Mechanism-based bioanalysis and biomarkers for hepatic chemical stress. *Xenobiotica* 2009; 39: 565-577
- Musso G, Gambino R, Cassader M. Recent insights into hepatic lipid metabolism in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Prog Lipid Res* 2009; 48: 1-26
- Roma MG, Sanchez Pozzi EJ. Oxidative stress: a radical way to stop making bile. *Ann Hepatol* 2008; 7: 16-33
- Digman C, Borto D, Nasraway SA Jr. Hyperglycemia in the critically ill. *Nutr Clin Care* 2005; 8: 93-101
- Hager P, Permert J, Wikström AC, Herrington MK, Ostenson CG, Strömmer L. Preoperative glucocorticoid administration attenuates the systemic stress response and hyperglycemia after surgical trauma in the rat. *Metabolism* 2009; 58: 449-455
- Esposito K, Marfella R, Giugliano D. Stress hyperglycemia, inflammation, and cardiovascular events. *Diabetes Care* 2003; 26: 1650-1651
- Choi SW, Benzie IF, Ma SW, Strain JJ, Hannigan BM. Acute hyperglycemia and oxidative stress: direct cause and effect? *Free Radic Biol Med* 2008; 44: 1217-1231
- Xing Y, Hua Y, Keep RF, Xi G. Effects of deferoxamine on brain injury after transient focal cerebral ischemia in rats with hyperglycemia. *Brain Res* 2009; 1291: 113-121
- Esposito K, Nappo F, Marfella R, Giugliano G, Giugliano F, Ciotola M, Quagliaro L, Ceriello A, Giugliano D. Inflammatory cytokine concentrations are acutely increased by hyperglycemia in humans: role of oxidative stress. *Circulation* 2002; 106: 2067-2072
- Dungan KM, Braithwaite SS, Preiser JC. Stress hyperglycaemia. *Lancet* 2009; 373: 1798-1807
- Belous A, Knox C, Nicoud IB, Pierce J, Anderson C, Pinson CW, Chari RS. Altered ATP-dependent mitochondrial Ca²⁺ uptake in cold ischemia is attenuated by ruthenium red. *J Surg Res* 2003; 111: 284-289
- Gomez L, Chavanis N, Argaud L, Chalabreysse L, Gateau-Roesch O, Ninet J, Ovize M. Fas-independent mitochondrial damage triggers cardiomyocyte death after ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 289: H2153-H2158
- Ruiz-Stewart I, Tiyyagura SR, Lin JE, Kazerounian S, Pitari GM, Schulz S, Martin E, Murad F, Waldman SA. Guanylyl cyclase is an ATP sensor coupling nitric oxide signaling to cell metabolism. *Proc Natl*

- Acad Sci U S A* 2004; 101: 37-42
- 32 Cherubini A, Ruggiero C, Polidori MC, Mecocci P. Potential markers of oxidative stress in stroke. *Free Radic Biol Med* 2005; 39: 841-852
 - 33 Xu J, Long YS, Gozal D, Epstein PN. Beta-cell death and proliferation after intermittent hypoxia: role of oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 2009; 46: 783-790
 - 34 Krähenbühl S, Talos C, Lauterburg BH, Reichen J. Reduced antioxidative capacity in liver mitochondria from bile duct ligated rats. *Hepatology* 1995; 22: 607-612
 - 35 Battaglia V, Compagnone A, Bandino A, Bragadin M, Rossi CA, Zanetti F, Colombatto S, Grillo MA, Toninello A. Cobalt induces oxidative stress in isolated liver mitochondria responsible for permeability transition and intrinsic apoptosis in hepatocyte primary cultures. *Int J Biochem Cell Biol* 2009; 41: 586-594
 - 36 朱玉群, 栾伟华, 王燕斌, 王天懿, 杨昭徐. 氧化应激在大鼠创伤性脑损伤后应激性肝损害中的作用. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 3433-3436
 - 37 Beddowes EJ, Faux SP, Chipman JK. Chloroform, carbon tetrachloride and glutathione depletion induce secondary genotoxicity in liver cells via oxidative stress. *Toxicology* 2003; 187: 101-115
 - 38 Herrera B, Alvarez AM, Sánchez A, Fernández M, Roncero C, Benito M, Fabregat I. Reactive oxygen species (ROS) mediates the mitochondrial-dependent apoptosis induced by transforming growth factor (beta) in fetal hepatocytes. *FASEB J* 2001; 15: 741-751
 - 39 van Gurp M, Festjens N, van Loo G, Saelens X, Vandenabeele P. Mitochondrial intermembrane proteins in cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 304: 487-497
 - 40 Hengartner MO. Apoptosis. DNA destroyers. *Nature* 2001; 412: 27, 29
 - 41 Franco R, Sánchez-Olea R, Reyes-Reyes EM, Panayiotidis MI. Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis: ménage à trois. *Mutat Res* 2009; 674: 3-22
 - 42 吴涛, 季光, 郑培永, 柳涛. 内质网应激与肝细胞凋亡. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 2507-2515
 - 43 Szegezdi E, Logue SE, Gorman AM, Samali A. Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Rep* 2006; 7: 880-885
 - 44 Boyce M, Yuan J. Cellular response to endoplasmic reticulum stress: a matter of life or death. *Cell Death Differ* 2006; 13: 363-373
 - 45 Voccoli V, Mazzoni F, Garcia-Gil M, Colombari L. Serum-withdrawal-dependent apoptosis of hippocampal neuroblasts involves Ca^{++} release by endoplasmic reticulum and caspase-12 activation. *Brain Res* 2007; 1147: 1-11
 - 46 Moretti L, Cha YI, Niermann KJ, Lu B. Switch between apoptosis and autophagy: radiation-induced endoplasmic reticulum stress? *Cell Cycle* 2007; 6: 793-798
 - 47 Chen N, Debnath J. Autophagy and tumorigenesis. *FEBS Lett* 2010; 584: 1427-1435
 - 48 Moore MN, Allen JI, Somerfield PJ. Autophagy: role in surviving environmental stress. *Mar Environ Res* 2006; 62 Suppl: S420-S425
 - 49 Fernández V, Tapia G, Varela P, Gaete L, Vera G, Mora C, Vial MT, Videla LA. Causal role of oxidative stress in liver preconditioning by thyroid hormone in rats. *Free Radic Biol Med* 2008; 44: 1724-1731
 - 50 Giakoustidis DE, Giakoustidis AE, Iliadis S, Koliakou K, Antoniadis N, Kontos N, Papanikolaou V, Papageorgiou G, Kaldrimidou E, Takoudas D. Attenuation of liver ischemia/reperfusion induced apoptosis by epigallocatechin-3-gallate via down-regulation of NF-kappaB and c-Jun expression. *J Surg Res* 2010; 159: 720-728
 - 51 Tang XH, Gao J, Fang F, Chen J, Xu LZ, Zhao XN, Xu Q. Hepatoprotection of oleanolic acid is related to its inhibition on mitochondrial permeability transition. *Am J Chin Med* 2005; 33: 627-637
 - 52 Chan WH, Yu JS, Yang SD. Apoptotic signalling cascade in photosensitized human epidermal carcinoma A431 cells: involvement of singlet oxygen, c-Jun N-terminal kinase, caspase-3 and p21-activated kinase 2. *Biochem J* 2000; 351: 221-232
 - 53 Titsworth WL, Liu NK, Xu XM. Role of secretory phospholipase a(2) in CNS inflammation: implications in traumatic spinal cord injury. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2008; 7: 254-269
 - 54 Perdrizet GA, Giles DL, Dring R, Agarwal SK Jr, Khwaja K, Gao YZ, Geary M, Cowell VL, Berman M, Brautigam R. Major hepatic trauma: warm ischemic tolerance of the liver after hemorrhagic shock. *J Surg Res* 2006; 136: 70-77
 - 55 Wong CH, Liu TZ, Chye SM, Lu FJ, Liu YC, Lin ZC, Chen CH. Sevoflurane-induced oxidative stress and cellular injury in human peripheral polymorphonuclear neutrophils. *Food Chem Toxicol* 2006; 44: 1399-1407
 - 56 Yamagishi S, Inagaki Y, Nakamura K, Abe R, Shimizu T, Yoshimura A, Imaizumi T. Pigment epithelium-derived factor inhibits TNF-alpha-induced interleukin-6 expression in endothelial cells by suppressing NADPH oxidase-mediated reactive oxygen species generation. *J Mol Cell Cardiol* 2004; 37: 497-506
 - 57 Oguma K, Sano J, Kano R, Watari T, Hasegawa A. In vitro effect of recombinant human tumor necrosis factor-alpha on canine neutrophil apoptosis. *Res Vet Sci* 2006; 80: 162-166
 - 58 Montalvo-Jave EE, Escalante-Tattersfield T, Ortega-Salgado JA, Piña E, Geller DA. Factors in the pathophysiology of the liver ischemia-reperfusion injury. *J Surg Res* 2008; 147: 153-159
 - 59 Gourishankar S, Halloran PF. Late deterioration of organ transplants: a problem in injury and homeostasis. *Curr Opin Immunol* 2002; 14: 576-583
 - 60 Hietbrink F, Koenderman L, Althuisen M, Leenen LP. Modulation of the innate immune response after trauma visualised by a change in functional PMN phenotype. *Injury* 2009; 40: 851-855
 - 61 Stahel PF, Smith WR, Moore EE. Role of biological modifiers regulating the immune response after trauma. *Injury* 2007; 38: 1409-1422
 - 62 Li-Weber M, Krammer PH. Function and regulation of the CD95 (APO-1/Fas) ligand in the immune system. *Semin Immunol* 2003; 15: 145-157
 - 63 Zhang Y, Foster R, Sun X, Yin Q, Li Y, Hanley G, Stuart C, Gan Y, Li C, Zhang Z, Yin D. Restraint stress induces lymphocyte reduction through p53 and PI3K/NF-kappaB pathways. *J Neuroimmunol* 2008; 200: 71-76
 - 64 Dai W, Cheng HL, Huang RQ, Zhuang Z, Shi JX. Quantitative detection of the expression of mitochondrial cytochrome c oxidase subunits mRNA in the cerebral cortex after experimental

同行评价

本文综述了创伤应激与肝细胞凋亡之间的联系, 具有一定的临床参考价值。

- traumatic brain injury. *Brain Res* 2009; 1251: 287-295
- 65 de Kloet ER, Fitzsimons CP, Datson NA, Meijer OC, Vreugdenhil E. Glucocorticoid signaling and stress-related limbic susceptibility pathway: about receptors, transcription machinery and microRNA. *Brain Res* 2009; 1293: 129-141
- 66 Kalmar B, Greensmith L. Induction of heat shock proteins for protection against oxidative stress. *Adv Drug Deliv Rev* 2009; 61: 310-318
- 67 Morse D, Lin L, Choi AM, Ryter SW. Heme oxygenase-1, a critical arbitrator of cell death pathways in lung injury and disease. *Free Radic Biol Med* 2009; 47: 1-12
- 68 Yan W, Arai A, Aoki M, Ichijo H, Miura O. ASK1 is activated by arsenic trioxide in leukemic cells through accumulation of reactive oxygen species and may play a negative role in induction of apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 355: 1038-1044
- 69 Shen HM, Lin Y, Choksi S, Tran J, Jin T, Chang L, Karin M, Zhang J, Liu ZG. Essential roles of receptor-interacting protein and TRAF2 in oxidative stress-induced cell death. *Mol Cell Biol* 2004; 24: 5914-5922
- 70 Ventura JJ, Hübner A, Zhang C, Flavell RA, Shokat KM, Davis RJ. Chemical genetic analysis of the time course of signal transduction by JNK. *Mol Cell* 2006; 21: 701-710
- 71 Kobayashi M, Takeyoshi I, Yoshinari D, Matsumoto K, Morishita Y. P38 mitogen-activated protein kinase inhibition attenuates ischemia-reperfusion injury of the rat liver. *Surgery* 2002; 131: 344-349

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》性质、刊登内容及目标

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

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

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

《世界华人消化杂志》的目标是出版高质量的胃肠病学和肝病学的专家评论及临床实践和基础研究相结合具有实践意义的文章, 为内科学、外科学、感染病学、中医药学、肿瘤学、中西医结合学、影像学、内镜学、介入治疗学、病理学、基础研究等医生和研究人员提供转换平台, 更新知识, 为患者康复服务。

补体与脂肪肝研究进展

王燕, 杨耀娴

王燕, 杨耀娴, 内蒙古科技大学包头医学院第二附属医院消化病研究所 内蒙古自治区包头市 014030

作者贡献分布: 本文由王燕综述, 杨耀娴审校。

通讯作者: 杨耀娴, 教授, 014030, 内蒙古自治区包头市, 内蒙古科技大学包头医学院第二附属医院消化病研究所。

wina7335831@sina.com

电话: 0472-3169716

收稿日期: 2010-01-24 修回日期: 2010-04-20

接受日期: 2010-04-27 在线出版日期: 2010-05-28

Advances in understanding the role of complement in the pathogenesis of fatty liver disease

Yan Wang, Yao-Xian Yang

Yan Wang, Yao-Xian Yang, Institute of Digestive Diseases, the Second Affiliated Hospital of Baotou Medical College, Baotou 014030, Inner Mongolia Autonomous Region, China

Correspondence to: Professor Yao-Xian Yang, Institute of Digestive Diseases, the Second Affiliated Hospital of Baotou Medical College, Baotou 014030, Inner Mongolia Autonomous Region, China. wina7335831@sina.com

Received: 2010-01-24 Revised: 2010-04-20

Accepted: 2010-04-27 Published online: 2010-05-28

Abstract

Patients with fatty liver disease (FLD) exhibit various immunologic abnormalities in the adipose tissue and the liver. Complement plays an important role in the development of FLD. Innate immune dysfunction in the adipose tissue can lead to abnormal production of adipose-derived factors, some of which can activate complement. Complement can not only amplify the inflammatory response and lead to mitochondrial damage, but also inhibit hepatic fat disposal and promote lipid accumulation in hepatocytes. An exploration of the relationship between complement and the liver can help us have a deep understanding of the mechanisms underlying the pathogenesis of FLD. The antagonists of the C5L2 receptor provide us potential new medicines for FLD. A further study of the role of complement in stress-induced liver remodeling can help clarify the role of complement in the development and progression of FLD.

Key Words: Fatty liver disease; Complement; In-

flammation

Wang Y, Yang YX. Advances in understanding the role of complement in the pathogenesis of fatty liver disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(15): 1577-1581

摘要

脂肪肝(fatty liver disease, FLD)存在脂肪组织和肝脏等的免疫功能紊乱, 补体参与了肝脏脂质沉积发生发展的全过程。肝脂肪变性时过多的脂肪细胞分泌的炎症因子可激活补体, 促进脂质沉积并使炎症反应级联放大, 继而激发肝细胞线粒体损伤, 加重脂质在肝细胞内积存。补体与脂肪肝关系的研究有助于我们对脂肪肝的发病机制进行更深入的认识, C5L2受体拮抗剂的研究有助于研制开发新一代治疗药物。因此需要进一步了解补体在肝脏代谢性应激状态下的免疫机制, 从而进一步澄清其在FLD发生发展中的作用, 并采取措施预防病变发展。

关键词: 脂肪肝; 补体; 炎症

王燕, 杨耀娴. 补体与脂肪肝研究进展. 世界华人消化杂志 2010; 18(15): 1577-1581

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/1577.asp>

0 引言

脂肪肝(fatty liver disease, FLD)是指弥漫性肝实质细胞大泡性脂肪变性和脂肪(主要是三酰甘油)蓄积为特征的临床病理综合征。脂肪肝可以演变为脂肪性肝炎(nonalcoholic steatohepatitis, NASH)、肝纤维化和肝硬化^[1]。近来研究发现FLD呈慢性炎症状态, 与免疫系统密切相关, 存在脂肪组织和肝脏的天然免疫功能紊乱^[2,3], 补体系统是自身免疫系统的一部分, 参与了肝脏脂质沉积的发生^[4]。研究显示肝脂肪变性时过多的脂肪细胞可分泌多种炎症因子^[5], 炎症因子可激活补体并介导一系列的炎症反应^[6], 补体又可抑制炎症细胞凋亡^[7], 引起上述炎症反应级联放大, 继而引起肝细胞线粒体损伤, 加重脂质在肝细胞内积存^[8]。补体在FLD的形成与演变中发挥重要作用, 本文就其在FLD发病机制中的作用作一综述。

■背景资料

脂肪肝(FLD)的发病机制尚未完全明确, 近来研究发现, FLD存在脂肪组织和肝脏等的天然免疫紊乱, 与补体密切相关, 来源于脂肪组织和肝脏的补体可能对FLD的发生发展起重要作用。

■同行评议者

黄晓东, 副主任医师, 武汉市中心医院消化内科

■研究前沿

补体参与FLD疾病的发生发展,但其具体作用机制错综复杂,如何进一步澄清其作用机制并采取措施预防疾病发生、发展是当前亟待解决的问题。

1 肝脏是补体产生的主要器官

FLD与免疫系统密切相关,存在脂肪组织和肝脏等的免疫功能紊乱。补体系统是获得性免疫系统重要的组成部分,参与了肝脏脂质沉积发生发展的全过程^[9]。自19世纪末发现补体以来,已明确多数补体分子属 β 球蛋白,少数属 α 球蛋白及 γ 球蛋白,补体组分中含量最高的成分是C3,正常人体血清中达1 200 mg/L, C3含量的高低与总补体含量平行,其水平是衡量体液免疫的重要指标。虽然机体不同组织细胞均能合成补体,但血浆中大部分补体组分由肝细胞合成分泌。

2 补体在脂质代谢中起重要作用

脂肪组织由成熟的脂肪细胞和间质细胞构成,后者包括与免疫相关的巨噬细胞、淋巴细胞、内皮细胞和未成熟的脂肪细胞(如前脂肪细胞)^[10]。近来研究发现,脂肪组织作为体内最大的能量贮库,并不是被动贮存脂肪的惰性组织,还可能是体内最大的内分泌器官^[11,12],肝脏细胞是产生脂质的主要细胞,而脂肪组织是储存三酰甘油的主要场所。脂肪代谢依赖于机体对能量的需要,并受营养成分、神经及内分泌激素的调节^[13]。近期的研究发现,脂肪组织不仅能储存能量,而且还可以分泌产生一些激素和细胞因子,积极参与能量平衡、神经内分泌及自身免疫的调节^[14]。有研究表明,脂肪细胞能分泌C3,表达C3a受体,其中补体C3加工转化生成促酰化蛋白(C3a desArg77, acylation stimulating protein, ASP)^[15-17], ASP进一步刺激脂肪细胞摄取血液中自由脂肪酸(free fatty acid, FFA)促进脂肪细胞合成三酰甘油(triacylglycerol, TG)^[18]。此外, Cianflone等报道在血液游离脂肪酸的刺激下,促使C3的 α 链氨基末端上的精氨酸-丝氨酸键断裂,在补体B参与下生成一分子C3a和一分子C3b。C3a羧基末端上的精氨酸(Arg)迅速被羧基肽酶B(carboxypeptidase B, CPB)移去,从而生成76个氨基酸肽链的酰化刺激蛋白,而C3裂解产生的C3b重新进入循环,从而不断扩大循环^[19]。C3a与ASP可结合受体C5L2,并促进TG的合成^[20-22]。血清ASP浓度随进食不断上升,并促进三酰甘油的合成与储存^[23]。脂肪萎缩小鼠ASP缺乏,餐后脂肪酸升高,三酰甘油合成减少^[17]。提示补体C3是促进脂质沉积的起始因素,其分解代谢产物促使脂肪细胞摄取脂质^[24]。

3 补体激活是脂肪肝形成的重要原因

肝脏是脂质合成和代谢的主要器官,脂质在脂

肪细胞中以TG的形式储存。当肝脏的脂质输入或生物合成远大于脂质氧化或输出时,脂质在肝细胞内蓄积,产生脂肪变性。

3.1 补体可以促进肝细胞脂质沉积 酒精性脂肪肝中乙醇可致磷酸甘油增多而促进三酰甘油的合成。且乙醇在代谢过程中,促进氧化型辅酶I转变为还原型辅酶I,故使依赖于NADH的生化反应加强,依赖NAD的反应如三羧酸循环、脂肪酸 β 氧化和氧化磷酸化、糖异生抑制。患者出现高乳酸血症、高尿酸血症、低血糖、高脂血症、FLD等^[25,26]。Pritchard等研究显示,在用酒精喂养的天然小鼠血清中补体C3、C5均升高,敲除C5基因小鼠与天然小鼠出现高TG血症,而敲除C3基因小鼠没有出现高TG血症,肝脏没有明显的脂质沉积,提示补体C3促进肝细胞内脂质的沉积,参与脂肪肝的发生与发展^[4,9,27]。

3.2 补体是参与脂肪肝炎性损害的重要因子 目前已证实脂肪肝存在氧化应激、脂质过氧化、线粒体功能失调、呼吸链复合物活性降低、活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)及肿瘤坏死因子生成增加,而TNF- α 和脂质过氧化物使电子在呼吸链中传递氧的能力降低,影响ATP的生成。大量ROS使体内抗氧化剂耗竭,导致体内氧自由基增多,进一步形成恶性循环^[3,28-29]。脂肪肝变性时过多的脂肪细胞可分泌多种炎性因子,导致肝细胞发生炎症浸润坏死,甚至进展为肝纤维化及肝硬化。炎症、坏死和凋亡激活补体,补体又通过多种途径激发炎症反应,导致肝脏促炎症(Th-1)和抗炎(Th-2)细胞因子的失调^[2,30]。炎症反应也可降低脂肪组织缓冲(nonesterified fatty acids, NEFA)的能力,尽管肥胖时机体的脂肪组织增加,但血液中游离脂肪酸水平仍很高。网膜释放出的NEFA通过门静脉沉积到肝脏内,导致脂质产生增多^[31,32]。

补体促进各种炎性因子的激活。有研究报道C5a、C5a desArg74、C4a、C4a desArg77结合其受体后,无TG的合成^[4]。Pritchard等研究报道用乙醇喂养后,去除C5基因的小鼠血清中ALT与TNF- α 不升高^[4],提示C5是重要的炎症介质,与脂肪肝脂质沉积无相关性,而与脂肪肝炎症反应的发生有关。相关机制有(1)C5a是炎症反应的重要介质和趋化因子,其受体广泛表达于肥大细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、中性粒细胞、单核巨噬细胞和内皮细胞等炎性细胞表面。C5a与相应受体结合,可介导肥大细胞和单核细胞释放炎性介质^[33]。(2)有研究报道C5a

通过其受体-CD88和C5L2(C5a like receptor-2)来实现生物学活性^[34,35]。C5a与CD88通过两点模型相互作用后,介导一系列的炎症反应,如激发细胞脱颗粒,释放组胺,增强血管通透性,诱导白细胞表达分泌IL-6、TNF- α 等细胞因子^[36]。有研究报道抗C5a单克隆抗体能够改善组织氧摄取并且降低IL-6和乳酸水平^[37]。(3)C5a还能激活花生四烯酸代谢的脂氧合酶途径,促进中性粒细胞和单核细胞进一步释放炎性介质。(4)补体C5对中性粒细胞有趋化作用,并且抑制中性粒细胞凋亡^[38]。C5a可直接作用于血管内皮细胞,导致血管渗透性增加并表达P-选择素,促进中性粒细胞黏着于血管内皮细胞^[39]。并且中性粒细胞和单核细胞的趋化因子、中性粒细胞所释放的溶酶体及炎症渗出物中的蛋白水解酶又能激活补体^[40],从而形成驱动中性粒细胞游走的反馈性环路,引起上述反应逐级发达,继而引起肝细胞线粒体损伤,脂蛋白形成减少^[34,41-42],减少脂质外运,加重脂质在肝细胞内存积^[43]。

4 补体在脂肪肝形成中起清除内毒素与自身抗原的重要作用

乙醇在小肠上段吸收的同时可使肠腔内毒素异位到门脉系统,肝脏的库普弗细胞通过表达CD14或TLR诱发CD14表达,促使其与异位内毒素成分脂多糖(LPS)结合,并释放TNF- α 激活一系列炎症反应。内毒素是所有革兰阴性菌的细胞壁成分,补体可清除内毒素。有报道1993年,英国Zenaide等对受脂多糖攻击的先天性C3缺陷狗进行观察,提示补体C3可保护机体免受细菌毒素(内毒素)的损伤。国内有实验证实,通过静脉注射纯化人重组iC3b片段,可以明显降低由大肠杆菌导致的小鼠内毒素休克的死亡率^[44]。提示补体参与了可以引发脂肪肝形成的内毒素的清除。

Th2辅助B细胞增殖,产生抗体,参与体液免疫应答。其中C3处于三种补体激活途径的中间环节,三途径最终形成C5转化酶,裂解C5,若此激活发生在脂质双层上,则形成C5b-9,即膜攻击复合物(MAC),清除抗原抗体免疫复合物。TUNEL法检测发现NASH大鼠的肝细胞凋亡显著高于正常大鼠,而且随着肝组织脂肪变、炎症和坏死的加重,肝细胞的凋亡也越明显^[45]。因此,补体可参与肝细胞坏死、凋亡细胞等自身抗原的清除。

5 结论

FLD是代谢综合征的肝脏组分,存在脂肪组织和肝脏等的天然免疫功能紊乱,补体系统是获得性自身免疫系统的一部分,脂肪因子和肝脏衍生的补体及致炎细胞因子与其受体结合,使肝脏从脂质沉积发展到脂肪肝,甚至脂肪性肝炎。补体与脂肪肝关系的研究有助于我们对脂肪肝的发病机制进行更深入的认识,C5L2受体拮抗剂的研究有助于研发新一代治疗药物。有必要深入了解补体在肝脏代谢性应激状态下的免疫机制,从而进一步澄清其在FLD发生发展中的作用,并采取措施预防病变发展。

6 参考文献

- 1 中华医学会肝病学分会脂肪肝和酒精性肝病学组. 非酒精性脂肪性肝病诊疗指南. 中华肝脏病杂志 2006; 14: 161-163
- 2 Li Z, Soloski MJ, Diehl AM. Dietary factors alter hepatic innate immune system in mice with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005; 42: 880-885
- 3 Leber B, Mayrhauser U, Rybczynski M, Stadlbauer V. Innate immune dysfunction in acute and chronic liver disease. *Wien Klin Wochenschr* 2009; 121: 732-744
- 4 Pritchard MT, McMullen MR, Stavitsky AB, Cohen JL, Lin F, Medof ME, Nagy LE. Differential contributions of C3, C5, and decay-accelerating factor to ethanol-induced fatty liver in mice. *Gastroenterology* 2007; 132: 1117-1126
- 5 Rector RS, Thyfault JP, Wei Y, Ibdah JA. Non-alcoholic fatty liver disease and the metabolic syndrome: an update. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 185-192
- 6 Choi S, Diehl AM. Role of inflammation in nonalcoholic steatohepatitis. *Curr Opin Gastroenterol* 2005; 21: 702-707
- 7 Li Z, Diehl AM. Innate immunity in the liver. *Curr Opin Gastroenterol* 2003; 19: 565-571
- 8 Solís Herruzo JA, García Ruiz I, Pérez Carreras M, Muñoz Yagüe MT. Non-alcoholic fatty liver disease. From insulin resistance to mitochondrial dysfunction. *Rev Esp Enferm Dig* 2006; 98: 844-874
- 9 Bykov I, Junnikkala S, Pekna M, Lindros KO, Meri S. Complement C3 contributes to ethanol-induced liver steatosis in mice. *Ann Med* 2006; 38: 280-286
- 10 Herrero L, Shapiro H, Nayer A, Lee J, Shoelson SE. Inflammation and adipose tissue macrophages in lipodystrophic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 240-245
- 11 Meier U, Gressner AM. Endocrine regulation of energy metabolism: review of pathobiochemical and clinical chemical aspects of leptin, ghrelin, adiponectin, and resistin. *Clin Chem* 2004; 50: 1511-1525
- 12 Waki H, Tontonoz P. Endocrine functions of adipose tissue. *Annu Rev Pathol* 2007; 2: 31-56
- 13 Schäffler A, Schölmerich J, Büchler C. Mechanisms of disease: adipocytokines and visceral adipose tissue--emerging role in nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2005; 2:

■ 相关报道

英国Zenaide等对受脂多糖攻击的先天性C3缺陷狗进行观察,提示补体C3可保护机体免受细菌毒素(内毒素)的损伤。国内有实验证实,通过静脉注射纯化人重组iC3b片段,可以明显降低由大肠杆菌导致的小鼠内毒素休克的死亡率。

■应用要点

本文通过FLD早期预警因子进行测定, 提高对其早期诊断。补体的分解产物ASP与受体C5L2结合后, 可促进脂肪细胞内三酰甘油的合成, 并调控肝脏成脂作用。可通过阻断其作用受体进行更早期的干预治疗。

- 273-280
- 14 Garruti G, Cotecchia S, Giampetruzzi F, Giorgino F, Giorgino R. Neuroendocrine deregulation of food intake, adipose tissue and the gastrointestinal system in obesity and metabolic syndrome. *J Gastrointest Liver Dis* 2008; 17: 193-198
- 15 Cianflone K, Xia Z, Chen LY. Critical review of acylation-stimulating protein physiology in humans and rodents. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1609: 127-143
- 16 Faraj M, Cianflone K. Differential regulation of fatty acid trapping in mouse adipose tissue and muscle by ASP. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004; 287: E150-E159
- 17 Cianflone K, Maslowska M, Sniderman AD. Acylation stimulating protein (ASP), an adipocyte autocrine: new directions. *Semin Cell Dev Biol* 1999; 10: 31-41
- 18 Yesilova Z, Ozata M, Oktenli C, Bagci S, Ozcan A, Sanisoglu SY, Uygur A, Yaman H, Karaeren N, Dagalp K. Increased acylation stimulating protein concentrations in nonalcoholic fatty liver disease are associated with insulin resistance. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 842-849
- 19 Yu H, Yang Y, Zhang M, Lu H, Zhang J, Wang H, Cianflone K. Thyroid status influence on adiponectin, acylation stimulating protein (ASP) and complement C3 in hyperthyroid and hypothyroid subjects. *Nutr Metab (Lond)* 2006; 3: 13
- 20 Kalant D, Cain SA, Maslowska M, Sniderman AD, Cianflone K, Monk PN. The chemoattractant receptor-like protein C5L2 binds the C3a des-Arg77/acylation-stimulating protein. *J Biol Chem* 2003; 278: 11123-11129
- 21 Paglialunga S, Schrauwen P, Roy C, Moonen-Kornips E, Lu H, Hesselink MK, Deshaies Y, Richard D, Cianflone K. Reduced adipose tissue triglyceride synthesis and increased muscle fatty acid oxidation in C5L2 knockout mice. *J Endocrinol* 2007; 194: 293-304
- 22 Okinaga S, Slattery D, Humbles A, Zsengeller Z, Morteau O, Kinrade MB, Brodbeck RM, Krause JE, Choe HR, Gerard NP, Gerard C. C5L2, a nonsignaling C5A binding protein. *Biochemistry* 2003; 42: 9406-9415
- 23 Murray I, Sniderman AD, Cianflone K. Mice lacking acylation stimulating protein (ASP) have delayed postprandial triglyceride clearance. *J Lipid Res* 1999; 40: 1671-1676
- 24 Xia Z, Stanhope KL, Digitale E, Simion OM, Chen L, Havel P, Cianflone K. Acylation-stimulating protein (ASP)/complement C3adesArg deficiency results in increased energy expenditure in mice. *J Biol Chem* 2004; 279: 4051-4057
- 25 Lee YJ, Lee HR, Lee JH, Shin YH, Shim JY. Association between serum uric acid and non-alcoholic fatty liver disease in Korean adults. *Clin Chem Lab Med* 2010; 48: 175-180
- 26 Lee K. Relationship between uric acid and hepatic steatosis among Koreans. *Diabetes Metab* 2009; 35: 447-451
- 27 Bykov I, Jauhiainen M, Olkkonen VM, Saarikoski ST, Ehnholm C, Junnikkala S, Väkevä A, Lindros KO, Meri S. Hepatic gene expression and lipid parameters in complement C3(-/-) mice that do not develop ethanol-induced steatosis. *J Hepatol* 2007; 46: 907-914
- 28 Morino K, Petersen KF, Shulman GI. Molecular mechanisms of insulin resistance in humans and their potential links with mitochondrial dysfunction. *Diabetes* 2006; 55 Suppl 2: S9-S15
- 29 Sariçam T, Kircali B, Köken T. Assessment of lipid peroxidation and antioxidant capacity in non-alcoholic fatty liver disease. *Turk J Gastroenterol* 2005; 16: 65-70
- 30 Li Z, Lin H, Yang S, Diehl AM. Murine leptin deficiency alters Kupffer cell production of cytokines that regulate the innate immune system. *Gastroenterology* 2002; 123: 1304-1310
- 31 Charlton M, Viker K, Krishnan A, Sanderson S, Veldt B, Kaalsbeek AJ, Kendrick M, Thompson G, Que F, Swain J, Sarr M. Differential expression of lumican and fatty acid binding protein-1: new insights into the histologic spectrum of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2009; 49: 1375-1384
- 32 Fabbrini E, deHaseth D, Deivanayagam S, Mohammed BS, Vitola BE, Klein S. Alterations in fatty acid kinetics in obese adolescents with increased intrahepatic triglyceride content. *Obesity (Silver Spring)* 2009; 17: 25-29
- 33 Woodruff TM, Ager RR, Tenner AJ, Noakes PG, Taylor SM. The Role of the Complement System and the Activation Fragment C5a in the Central Nervous System. *Neuromolecular Med* 2009 Sep 11. [Epub ahead of print]
- 34 Hollmann TJ, Mueller-Ortiz SL, Braun MC, Wetsel RA. Disruption of the C5a receptor gene increases resistance to acute Gram-negative bacteremia and endotoxic shock: opposing roles of C3a and C5a. *Mol Immunol* 2008; 45: 1907-1915
- 35 Monk PN, Scola AM, Madala P, Fairlie DP. Function, structure and therapeutic potential of complement C5a receptors. *Br J Pharmacol* 2007; 152: 429-448
- 36 Conroy A, Serghides L, Finney C, Owino SO, Kumar S, Gowda DC, Liles WC, Moore JM, Kain KC. C5a enhances dysregulated inflammatory and angiogenic responses to malaria in vitro: potential implications for placental malaria. *PLoS One* 2009; 4: e4953
- 37 Niederbichler AD, Hoesel LM, Westfall MV, Gao H, Ipaktchi KR, Sun L, Zetoun FS, Su GL, Arbabi S, Sarma JV, Wang SC, Hemmila MR, Ward PA. An essential role for complement C5a in the pathogenesis of septic cardiac dysfunction. *J Exp Med* 2006; 203: 53-61
- 38 Strey CW, Markiewski M, Mastellos D, Tudoran R, Spruce LA, Greenbaum LE, Lambris JD. The proinflammatory mediators C3a and C5a are essential for liver regeneration. *J Exp Med* 2003; 198: 913-923
- 39 Blatteis CM, Li S, Li Z, Perlik V, Feleder C. Signaling the brain in systemic inflammation: the role of complement. *Front Biosci* 2004; 9: 915-931
- 40 Mastroeni P, Clare S, Khan S, Harrison JA, Hormaeche CE, Okamura H, Kurimoto M, Dougan G. Interleukin 18 contributes to host resistance and gamma interferon production in mice infected with virulent *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun* 1999; 67: 478-483
- 41 Gentile CL, Pagliassotti MJ. The endoplasmic reticulum as a potential therapeutic target in nonalcoholic fatty liver disease. *Curr Opin Investig Drugs* 2008; 9: 1084-1088
- 42 Solís Herruzo JA, García Ruiz I, Pérez Carreras M, Muñoz Yagüe MT. Non-alcoholic fatty liver

- disease. From insulin resistance to mitochondrial dysfunction. *Rev Esp Enferm Dig* 2006; 98: 844-874
- 43 Ji C. Dissection of endoplasmic reticulum stress signaling in alcoholic and non-alcoholic liver injury. *J Gastroenterol Hepatol* 2008; 23 Suppl 1: S16-S24
- 44 Devlin LA, Nguyen MD, Figueroa E, Gordon LE, Feldhoff PW, Lassiter HA. Effects of endotoxin administration and cerebral hypoxia-ischemia on complement activity and local transcriptional regulation in neonatal rats. *Neurosci Lett* 2005; 390: 109-113
- 45 Wang Y, Ausman LM, Russell RM, Greenberg AS, Wang XD. Increased apoptosis in high-fat diet-induced nonalcoholic steatohepatitis in rats is associated with c-Jun NH2-terminal kinase activation and elevated proapoptotic Bax. *J Nutr* 2008; 138: 1866-1871

■同行评价

本文综述内容较为重要, 提供了有意义的信息。

编辑 李军亮 电编 何基才

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

●消息●

2008 年内科学类期刊总被引频次和影响因子排序

代码	期刊名称	总被引频次			影响因子		
		数值	学科排名	离均差率	数值	学科排名	离均差率
1170	JOURNAL OF GERIATRIC CARDIOLOGY	7	41	-0.99	0.043	41	-0.92
G275	WORLD JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY	5432	1	3.71	0.792	6	0.52
G803	肝脏	586	25	-0.49	0.594	11	0.14
G938	国际呼吸杂志	645	22	-0.44	0.294	34	-0.43
G415	国际内分泌代谢杂志	663	20	-0.43	0.379	28	-0.27
G501	临床肝胆病杂志	582	27	-0.50	0.441	22	-0.15
G658	临床荟萃	1709	8	0.48	0.356	32	-0.32
G257	临床内科杂志	875	16	-0.24	0.412	24	-0.21
G855	临床消化病杂志	314	32	-0.73	0.294	34	-0.43
G261	临床心血管病杂志	836	17	-0.28	0.371	29	-0.29
G293	临床血液学杂志	408	31	-0.65	0.329	33	-0.37
G491	岭南心血管病杂志	161	39	-0.86	0.158	40	-0.70
G662	内科急危重症杂志	308	34	-0.73	0.279	36	-0.46
G523	内科理论与实践	34	40	-0.97	0.171	39	-0.67
G746	实用肝脏病杂志	312	33	-0.73	0.562	14	0.08
G190	世界华人消化杂志	2480	6	1.15	0.547	17	0.05
G800	胃肠病学	619	23	-0.46	0.621	10	0.19
G326	胃肠病学和肝病杂志	580	28	-0.50	0.415	23	-0.20
G083	心肺血管病杂志	246	37	-0.79	0.361	31	-0.31
G419	心血管病学进展	585	26	-0.49	0.410	25	-0.21
G260	心脏杂志	553	29	-0.52	0.406	26	-0.22
G610	胰腺病学	268	35	-0.77	0.366	30	-0.30
G234	中国动脉硬化杂志	934	15	-0.19	0.557	16	0.07
G267	中国实用内科杂志	2309	7	1.00	0.487	20	-0.06
G211	中国糖尿病杂志	1567	11	0.36	0.570	13	0.10
G380	中国心血管杂志	256	36	-0.78	0.225	37	-0.57
G203	中国心脏起搏与心电生理杂志	657	21	-0.43	0.562	14	0.08
G633	中国血液净化	680	19	-0.41	0.546	18	0.05
G119	中国循环杂志	694	18	-0.40	0.406	26	-0.22
G231	中华肝脏病杂志	3283	4	1.84	1.119	2	1.15
G235	中华高血压杂志	1168	14	0.01	0.730	8	0.40
G639	中华老年多器官疾病杂志	166	38	-0.86	0.207	38	-0.60
G876	中华老年心脑血管病杂志	588	24	-0.49	0.442	21	-0.15
G155	中华内分泌代谢杂志	1612	10	0.40	0.897	5	0.73
G156	中华内科杂志	3484	3	2.02	0.788	7	0.52
G161	中华肾脏病杂志	1643	9	0.42	1.068	3	1.05
G285	中华消化内镜杂志	1314	13	0.14	0.578	12	0.11
G168	中华消化杂志	2571	5	1.23	1.025	4	0.97
G892	中华心率失常学杂志	494	30	-0.57	0.657	9	0.26
G170	中华心血管病杂志	4186	2	2.63	1.375	1	1.64
G172	中华血液学杂志	1501	12	0.30	0.489	19	-0.06
	平均值	1154			0.520		

以上数据摘自2009年版《中国科技期刊引证报告》(核心版). 科学技术文献出版社, 177-178.

VEGF在原发性肝癌介入治疗中的价值

任勇军, 杨林, 翟昭华

■背景资料

血管内皮生长因子(VEGF)是调节血管新生最重要的细胞因子之一, 他特异性地作用于血管内皮细胞, 参与实体瘤血管生成, 与实体瘤的侵袭、转移等生物学行为密切相关。近年来国内外研究表明VEGF与PHC关系密切。本文复习文献, 综述PHC介入治疗与VEGF的相关研究进展。

任勇军, 杨林, 翟昭华, 川北医学院附属医院放射科 四川省南充市 637000

四川省教育厅重点基金资助项目, No. 07ZA030

作者贡献分布: 任勇军、杨林及翟昭华对此文贡献均等; 本文综述由任勇军撰写完成, 杨林与翟昭华审校。

通讯作者: 杨林, 副主任医师, 副教授, 硕士生导师, 637000, 四川省南充市, 川北医学院附属医院放射科。linyangmd@163.com
电话: 0817-2262223

收稿日期: 2010-01-14 修回日期: 2010-04-16

接受日期: 2010-04-20 在线出版日期: 2010-05-28

Clinical value of inhibition of vascular endothelial growth factor in primary hepatocellular carcinoma after transcatheter arterial chemoembolization

Yong-Jun Ren, Lin Yang, Zhao-Hua Zhai

Yong-Jun Ren, Lin Yang, Zhao-Hua Zhai, Department of Radiology, the Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, Sichuan Province, China
Supported by: the Key Project of Education Department of Sichuan Province, No. 07ZA030

Correspondence to: Professor Lin Yang, Department of Radiology, the Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, Sichuan Province, China. linyangmd@163.com

Received: 2010-01-14 Revised: 2010-04-16

Accepted: 2010-04-20 Published online: 2010-05-28

Abstract

Vascular endothelial growth factor (VEGF) is a well-known potent angiogenic factor that correlates with tumor invasion and metastasis. Primary hepatocellular carcinoma (PHC) is a common highly malignant vascular tumor with a very high mortality. Angiogenesis is considered to be important for PHC progression. Transarterial chemoembolization (TACE) has been proved to be effective for unresectable PHC. This paper aims to make a literature review of the recent advances in understanding the clinical value of inhibition of VEGF in PHC after interventional therapy.

Key Words: Vascular endothelial growth factor; Primary hepatocellular carcinoma; Arterial perfusion; Chemoembolization

Ren YJ, Yang L, Zhai ZH. Clinical value of inhibition

of vascular endothelial growth factor in primary hepatocellular carcinoma after transcatheter arterial chemoembolization. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(15): 1582-1587

摘要

血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)特异性地作用于血管内皮细胞, 参与实体瘤血管的新生, 并且与实体瘤的侵袭、转移等生物学行为密切相关。研究表明VEGF与原发性肝癌(primary hepatic carcinoma, PHC)的发生、发展及转移密切相关。经导管动脉灌注化疗栓塞(transcatheter arterial chemoembolization, TACE)近期疗效肯定, 被广泛的应用于临床, 成为PHC非手术疗法中的首选方法, 但是, TACE远期疗效却并不理想。抑制VEGF和(或)VEGFR在PHC中的表达将会给PHC的治疗带来新的突破。本文复习文献, 综述PHC介入治疗与VEGF的相关研究进展。

关键词: 血管内皮生长因子; 原发性肝癌; 动脉灌注; 化疗栓塞

任勇军, 杨林, 翟昭华. VEGF在原发性肝癌介入治疗中的价值. 世界华人消化杂志 2010; 18(15): 1582-1587

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/1582.asp>

0 引言

我国是原发性肝癌(primary hepatic carcinoma, PHC)的高发地区, 每年约有11万人死于肝癌。PHC具有发病隐匿、进展快等特点, 大部分患者(>80%)就诊时已无法手术切除。经动脉灌注化疗栓塞术(transcatheter arterial chemoembolization, TACE)是治疗中晚期PHC的首选方法^[1,2]。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是调节血管新生最重要的细胞因子之一, 他特异性地作用于血管内皮细胞, 参与实体瘤血管生成, 与实体瘤的侵袭、转移等生物学行为密切相关^[3-5]。近年来国内外研究表明VEGF与PHC关系密切。本文复习文献, 综述PHC介入治疗与VEGF的相关研

■同行评议者

龙学颖, 副主任医师, 中南大学湘雅医院放射科

究进展.

1 VEGF与VEGF受体

血管生长因子与肿瘤的发生、发展密切相关. 目前研究较多的血管生长因子有: VEGF、碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)、血小板衍化内皮细胞生长因子(platelet-derived endothelial cell growth factor, PD-ECGF)等^[6]. 其中VEGF对于肿瘤血管生成有着尤为重要的作用. 人的VEGF主要有VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、VEGF-E. 其中VEGF-A有5种异构体, 即VEGF121、VEGF145、VEGF165、VEGF189、VEGF206. 在异构体中, VEGF121、VEGF145和VEGF165均能诱导血管内皮细胞增殖和新生血管形成, 其中VEGF165的活性最高.

VEGF受体(VEGFR)主要有: VEGFR-1(Flt-1)、VEGFR-2(FLK-1/KDR)、VEGFR-3三种, 属于酪氨酸激酶受体, VEGFR-1(Flt-1)和VEGFR-2(KDR)主要在血管内皮细胞表达、刺激内皮细胞增殖并促进血管形成. 其中, VEGFR-2具有强烈的酪氨酸激酶活性, 并有双重的血管生成调节功能^[7]: VEGFR-2可通过其酪氨酸激酶活性区域正性调节血管生成; VEGF与受体胞外区结合后, 诱导酪氨酸磷酸化, 传导胞内信号, 发挥生物学效应, 在肿瘤血管生成中起主要作用. VEGFR-3分布在淋巴管内皮细胞, 调节淋巴管生成.

2 VEGF的调控

多种因素可调节VEGF的表达. 缺氧、缺氧诱导因子、细胞因子、细胞内介质、类固醇激素等都可影响VEGF的调控^[8,9]. 其中, 缺氧诱导因子1- α (hypoxia-induced factor 1- α , HIF-1 α)在VEGF的调控中发挥了重要作用^[10,11]. 在缺氧条件下, HIF-1 α 和HIF-1 β 二聚化形成转录因子结合到VEGF基因启动子区域的乏氧反应元件(hypoxic response elements, HRE), 在其他激活因子的协同作用下, VEGF、VEGFR-1基因开始转录并活化, 活化的VEGF结合到VEGFR-1和VEGFR-2. VEGF与VEGFR-2发生二聚化、磷酸化反应, Ras-Raf-Mapk-Erk和Mapk通路被激活并调节DNA的复制, 上调VEGF的表达、细胞增殖和细胞的迁移^[12]. Elias等^[13]通过子宫内膜癌细胞的研究, 证实在低pH环境下调节VEGF-A的剪接, VEGF121显著升高, 这一过程可能是通过激活

P38和SR蛋白的参与实现的. Ray等^[14]研究了骨髓细胞在环境信号改变下VEGF3'-端非翻译区发生二元构象改变, 认为VEGF3'-端非翻译区的启动更加重要.

3 VEGF在PHC中的作用

VEGF的主要生物学作用^[15-19]: (1)细胞质的钙聚集作用, 几秒钟内可使钙离子浓度升高4倍以上. (2)促进内皮细胞增殖. (3)诱导血管生成. (4)增加血管通透性. VEGF具有很强的增加血管通透性的作用, 主要增加毛细血管后静脉和小静脉的通透性. (5)血管保护作用, 表现在抗血栓生成, 抑制血管平滑肌细胞过度生长, 抗内皮细胞损伤和凋亡, 抗炎及改变细胞外基质, 有利于血管以出芽方式向周围生长. (6)神经保护作用, Zachary等^[20]认为在活体内VEGF对神经细胞和神经胶质细胞具有神经营养和神经保护功能, 通过直接和间接作用刺激神经干细胞的增殖和生存, 特别是大脑在受伤后促进脑组织血管的生成.

VEGF是体内最强的一种血管生长因子, 在肝癌组织中高表达, 主要来自肝癌细胞和肝星状细胞旁分泌和自分泌^[21]. VEGF的增加可以诱导肿瘤血管的生成, 增加肝癌细胞的血供, 增加血管通透性, 促进肝癌细胞浸润和转移^[22,23]. Nakamura等^[24]研究发现VEGF与VEGFR-1在肝脏不典型增生结节中高表达并与癌前病变相关.

3.1 诱导肿瘤血管生成、增加肝癌细胞血供
肝癌细胞生长迅速, 对氧和营养的需求量较正常组织大, 导致癌组织内缺血缺氧, 而缺氧是VEGF最强烈的诱导剂, 促使VEGF大量分泌, 并与其受体相结合, 加速血管内皮细胞的增生和分化, 促使新生血管生成, 以满足肿瘤生长的需求^[25,26]. 肿瘤的恶性程度越高、体积越大、转移范围越广、浸润程度越深, 对氧的需求越高, VEGF的分泌越多^[27]. VEGF可激活血管内皮细胞基因, 增强尿激酶型纤溶酶原激活物(urokinase plasminogen activator, uPA)和组织型纤溶酶原激活物(tissue plasminogen activator, tPA), 并减弱纤溶酶原激活剂抑制物(plasminogen activator inhibitor, PAI-1)的表达, 进而诱导蛋白水解酶间质胶原酶和组织因子的产生, 促进血管形成, 改善癌细胞营养和氧的需求; VEGF促使血管内皮细胞产生基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinases 9, MMP-9), MMP-9使凝血酶原转化为凝血酶, 激活明胶酶原A, 降

■**研发前沿**
TACE在治疗PHC中发挥了重要作用, TACE后PHC的复发和转移越来越受到重视.

■相关报道

Nakamura等研究发现VEGF与VEGFR-1在肝脏不典型增生结节中高表达并与癌前病变相关。

解原来的基膜,促使血管形成,使肝癌营养和氧供给加大;VEGF可通过细胞内钙调节蛋白及磷酸肌醇途径,增强NO合酶(nitricoxide synthase, NOS)表达,导致NO生成增多,进而促进新生血管网建立和管腔的形成^[28-31]。

3.2 促进肝癌细胞浸润和转移^[26,27,30-32] VEGF促进肝癌细胞浸润和转移机制: (1)VEGF能促使血管内皮细胞产生基质降解蛋白酶类(如基质金属蛋白酶-2/MMP-2),可降解血管基底层和细胞外基质,增强血管壁的通透性,加之新生的肿瘤相关血管的结构不完善且通透性强,部分肿瘤细胞可以穿过血管壁进入血管向远处转移,故加速了肿瘤浸润和转移; (2)VEGF还可以通过结合分布于肝癌细胞膜上的VEGFR,促进肝癌细胞自身生长,并使肝癌细胞的伪足增长、增多,使之移动能力加强。通过直接黏附或吞噬靶细胞的方式增强癌细胞的浸润和转移能力; (3)VEGF作用于肝癌细胞后能降低癌细胞的同质黏附性,使之更易发生分离脱落,与基质胶原纤维黏附后利于其运动和转移,此现象与VEGF的剂量及作用时间呈依赖关系。因此,VEGF在整个肝癌发生发展过程和抗血管生成治疗中占有十分重要的地位。

4 VEGF在PHC介入治疗中的价值

肝脏是双重血供器官。肝动脉是肝脏的营养血管,内含丰富的氧和营养物质,供给肝脏的物质代谢,其血流量约占肝脏全部血流量的20%-30%。门静脉是肝脏的功能血管,其供血量占全肝血供量的70%-80%。PHC的血供全部或大部分来自肝动脉,较少来自门静脉,与正常肝实质相反。

TACE正是利用PHC的血供特点,经靶动脉灌注化疗药物、栓塞剂,使肿瘤组织因缺血、缺氧而坏死,而对于正常肝组织的影响却很小^[4,33,34]。TACE近期疗效肯定,被广泛的应用于临床,成为PHC非手术治疗的重要及首选方法^[4,5]。TACE远期疗效不理想的原因^[35,36]在于:栓塞后侧枝循环形成使病灶逐渐扩大,甚至发生转移;栓塞后缺氧可以诱导细胞因子的表达,增加VEGF基因转录,使VEGF mRNA的稳定性增加,上调VEGF mRNA及其受体的表达,以及癌细胞和内皮细胞之间的相互影响、双向旁分泌VEGF,从而促进血管的生成;TACE所致的组织缺氧和营养缺乏等改变还可以诱导血管内皮细胞和肝癌细胞分泌VEGF,分泌的VEGF促进肿瘤血管生长因子

的过量表达,使肿瘤血管增生;VEGF诱导新生的血管基底膜极其不完整,缺乏血管壁的屏障作用,肿瘤细胞极易通过基底膜而进入血液循环发生转移。

VEGF不仅与原发性肝癌的血管发生、增殖有关,而且直接同肿瘤的浸润和转移有关。血清VEGF水平与肿瘤的临床分期、肿瘤直径、门静脉癌栓、远处转移明显相关;随着疾病的进展,血清VEGF水平逐渐升高,合并有肝外转移者,其血清VEGF水平明显增高,与其他期别肿瘤患者的血清VEGF水平具有显著性差异;肿瘤患者血清VEGF的表达与其年龄、性别、HBV感染、HCV感染、肝硬化、肿瘤部位、组织学类型、病理分化程度、肝功能等临床病理特征无相关性^[37,38]。

资料^[26,27]表明监测接受TACE治疗患者血清中VEGF水平可以判断TACE疗效。TACE后诱导癌基因Bcl-2的表达上调,在肿瘤浸润的边缘和包膜附近均可看到VEGF强表达,可能与这些区域发生缺氧有关。TACE后VEGF升高者可能会在治疗后较早出现癌细胞扩散或转移。

肿瘤血管的生成对于实体瘤的发生、发展起着重要的作用,是影响肿瘤生物学行为和转移潜能的重要因素。对肝细胞癌免疫组织化学以及VEGF的定量研究表明,VEGF是肝细胞癌复发、远处转移以及预后的有效指标^[39,40]。血清中VEGF的水平是确定癌变以及转归的有效指标,其特异性、敏感性、准确性都已经达到了临床的需要标准^[41,42]。

5 VEGF和(或)VEGFR抑制剂

根据肿瘤血管形成机制,抑制血管内皮细胞对血管生成的作用,阻断或减少肿瘤组织的血管生成,就能有效的抑制肿瘤的生长和转移,就能达到治疗肿瘤的目的^[43-45]。抑制TACE后肝组织中VEGF的上调或者抑制VEGFR,就能减缓或终止肿瘤血管的生长,有望更好地中断PHC的血供,杀死肿瘤细胞,抑制肿瘤细胞的复发和转移。TACE治疗后,应用VEGF和(或)VEGFR抑制剂就能有效地治疗PHC^[42,46]。

近年来发现比较重要的血管抑制因子有血管内皮抑素(Endostatin-恩度)、肿瘤抑素(Tumstatin)^[47]、血小板反应素-1(Thrombospondin-1, TSP-1)^[48]、烟曲霉醇(TNP-470)、贝伐单抗(Bevacizumab)、舒尼替尼(Sunitinib)等。直接作用于血管生成的抑制剂主要有: Endostatin、Tum-

statin、TNP-470、TSP-1等. 间接作用于血管生成的抑制剂主要有: Bevacizumab、Sunitinib等. Bevacizumab^[49,50]是第一个被美国FDA(Food and Drug Administration)批准的抑制血管生成的抗癌药物. Tyagi^[51]认为Bevacizumab及5-FU是治疗转移性结肠癌的一线药物. Finn等^[52]通过对人肝细胞癌株小鼠模型的研究, 认为作为VEGF靶点治疗药物的Bevacizumab能有效治疗原发性肝细胞癌. Siegel等^[53]认为Bevacizumab治疗未转移、不能手术的原发性肝癌疗效明显. Endostatin是我国自主研发的世界第一个重组人血管内皮抑制素并上市, 研究发现^[54-58] Endostatin可以干扰VEGFR-2, 抑制内皮细胞的活性和增殖能力, 与金属蛋白酶-2牢固结合, 干扰催化作用, 诱发黏附激酶和柱蛋白的酪氨酸磷酸化干扰细胞和基质的作用; 在促进细胞凋亡方面, Endostatin下调Bcl-2、Bcl-xL、Bad等抗凋亡蛋白从而通过活化caspase-9, 激活促凋亡通路. Huang等认为Endostatin可以使肺癌血管及微环境正常化, 血管结构变规则^[48,59]. Norén-Nyström等^[60]认为TNP-470对各种内皮细胞具有强力的生长抑制能力. 体外培养和体内动物实验证实通过抑制血管生成, 有效的抑制肿瘤生长和转移. 体内抗肿瘤生长机制主要是TNP-470抑制肿瘤组织新生血管的生成, 使肿瘤细胞周期阻滞、加速凋亡. TNP-470不良反应较轻, 主要表现为眩晕、疲劳、焦虑、体质量下降、减少髓外红细胞生成等. Zhu等^[61]研究证实Sunitinib在治疗PHC上取得了较好疗效.

TACE直接将化疗药物经供瘤动脉注入, 肿瘤药物浓度明显高于静脉化疗, 而全身药物浓度较低. 这为经供瘤动脉注入血管抑制因子抗肿瘤血管生成提供了理论支持. 目前, 经导管动脉灌注血管抑制因子治疗PHC的文献报道较少. 杜海军^[62]经肝动脉灌注Endostatin化疗栓塞治疗中晚期肝癌, 1年生存率显著提高, AFP下降明显, 肿瘤新生血管、转移抑制明显, 并且安全. 文献报道经导管灌注非血管抑制因子治疗PHC亦取得一定疗效, 如灌注¹³¹I-肝癌抗体片断^[63-65]、CIK细胞^[66-68]、中药^[69-71]等.

6 结论

TACE在治疗PHC中发挥了重要作用, TACE后PHC的复发和转移越来越受到重视. VEGF在PHC的生长、转移、预后等方面起重要的作用. 研究发现, 抑制或减少VEGF和(或)VEGFR在

PHC的表达将会给PHC抗血管生成治疗带来新的突破. 目前经动脉灌注抗VEGF药物治疗PHC临床研究较少. 相信随着研究的不断深入, 将进一步阐明PHC介入治疗后VEGF变化及机制, 在提高PHC介入治疗疗效等方面发挥更加重要的作用.

7 参考文献

- 1 Ganeshan A, Upponi S, Hon LQ, Warakaulle D, Uberoi R. Hepatic arterial infusion of chemotherapy: the role of diagnostic and interventional radiology. *Ann Oncol* 2008; 19: 847-851
- 2 Iguchi T, Arai Y, Inaba Y, Yamaura H, Sato Y, Miyazaki M, Shimamoto H. Hepatic arterial infusion chemotherapy through a port-catheter system as preoperative initial therapy in patients with advanced liver dysfunction due to synchronous and unresectable liver metastases from colorectal cancer. *Cardiovasc Intervent Radiol* 2008; 31: 86-90
- 3 Mann CD, Neal CP, Garcea G, Manson MM, Dennison AR, Berry DP. Prognostic molecular markers in hepatocellular carcinoma: a systematic review. *Eur J Cancer* 2007; 43: 979-992
- 4 Tammela T, Zarkada G, Wallgard E, Murtomäki A, Suchting S, Wirzenius M, Waltari M, Hellström M, Schomber T, Peltonen R, Freitas C, Duarte A, Isoniemi H, Laakkonen P, Christofori G, Ylä-Herttuala S, Shibuya M, Pytowski B, Eichmann A, Betsholtz C, Alitalo K. Blocking VEGFR-3 suppresses angiogenic sprouting and vascular network formation. *Nature* 2008; 454: 656-660
- 5 Holash J, Maisonpierre PC, Compton D, Boland P, Alexander CR, Zagzag D, Yancopoulos GD, Wiegand SJ. Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science* 1999; 284: 1994-1998
- 6 Qin LX, Tang ZY. The prognostic molecular markers in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 385-392
- 7 Hiratsuka S, Maru Y, Okada A, Seiki M, Noda T, Shibuya M. Involvement of Flt-1 tyrosine kinase (vascular endothelial growth factor receptor-1) in pathological angiogenesis. *Cancer Res* 2001; 61: 1207-1213
- 8 Kiec-Wilk B, Razny U, Mathers JC, Dembinska-Kiec A. DNA methylation, induced by beta-carotene and arachidonic acid, plays a regulatory role in the pro-angiogenic VEGF-receptor (KDR) gene expression in endothelial cells. *J Physiol Pharmacol* 2009; 60: 49-53
- 9 Ernens I, Léonard F, Vausort M, Rolland-Turner M, Devaux Y, Wagner DR. Adenosine up-regulates vascular endothelial growth factor in human macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 392: 351-356
- 10 Byrne AM, Bouchier-Hayes DJ, Harmey JH. Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (VEGF). *J Cell Mol Med* 2005; 9: 777-794
- 11 张芳杰, 唐望先, 吴翠环, 姜维, 谷华. 缺氧诱导因子1 α 在肝癌中的表达及意义. *中华肝脏病杂志* 2006; 14: 281-284
- 12 Celec P, Yonemitsu Y. Vascular endothelial growth factor - basic science and its clinical implications.

■同行评价

本文立题有一定新颖性和重要性, 具有可读性.

- Pathophysiology* 2004; 11: 69-75
- 13 Elias AP, Dias S. Microenvironment Changes (in pH) Affect VEGF Alternative Splicing. *Cancer Microenviron* 2008; 1: 131-139
 - 14 Ray PS, Jia J, Yao P, Majumder M, Hatzoglou M, Fox PL. A stress-responsive RNA switch regulates VEGFA expression. *Nature* 2009; 457: 915-919
 - 15 Yamagishi S, Yonekura H, Yamamoto Y, Fujimori H, Sakurai S, Tanaka N, Yamamoto H. Vascular endothelial growth factor acts as a pericyte mitogen under hypoxic conditions. *Lab Invest* 1999; 79: 501-509
 - 16 Yu JX, Huang XF, Lv WM, Ye CS, Peng XZ, Zhang H, Xiao LB, Wang SM. Combination of stromal-derived factor-1 α and vascular endothelial growth factor gene-modified endothelial progenitor cells is more effective for ischemic neovascularization. *J Vasc Surg* 2009; 50: 608-616
 - 17 Jia H, Bagherzadeh A, Bicknell R, Duchon MR, Liu D, Zachary I. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-D and VEGF-A differentially regulate KDR-mediated signaling and biological function in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 2004; 279: 36148-36157
 - 18 Li B, Sharpe EE, Maupin AB, Teleron AA, Pyle AL, Carmeliet P, Young PP. VEGF and PlGF promote adult vasculogenesis by enhancing EPC recruitment and vessel formation at the site of tumor neovascularization. *FASEB J* 2006; 20: 1495-1497
 - 19 钱中清, 曾耀英, 王通, 林羿, 季煜华, 肇静娴. VEGF诱导血管内皮细胞产生H₂O₂及其促增殖作用. *中国病理生理杂志* 2007; 23: 533-535
 - 20 Zachary I. Neuroprotective role of vascular endothelial growth factor: signalling mechanisms, biological function, and therapeutic potential. *Neurosignals* 2005; 14: 207-221
 - 21 Zhang ZL, Liu ZS, Sun Q. Expression of angiopoietins, Tie2 and vascular endothelial growth factor in angiogenesis and progression of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 4241-4245
 - 22 Moon WS, Rhyu KH, Kang MJ, Lee DG, Yu HC, Yeum JH, Koh GY, Tarnawski AS. Overexpression of VEGF and angiopoietin 2: a key to high vascularity of hepatocellular carcinoma? *Mod Pathol* 2003; 16: 552-557
 - 23 李兴睿, 杨志芳, 易继林. 肝癌经肝动脉栓塞化疗后VEGF和CD44v6表达的意义. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 1305-1308
 - 24 Nakamura K, Zen Y, Sato Y, Kozaka K, Matsui O, Harada K, Nakanuma Y. Vascular endothelial growth factor, its receptor Flk-1, and hypoxia inducible factor-1 α are involved in malignant transformation in dysplastic nodules of the liver. *Hum Pathol* 2007; 38: 1532-1546
 - 25 Yoshiji H, Kuriyama S, Hicklin DJ, Huber J, Yoshii J, Miyamoto Y, Kawata M, Ikenaka Y, Nakatani T, Tsujinoue H, Fukui H. KDR/Flk-1 is a major regulator of vascular endothelial growth factor-induced tumor development and angiogenesis in murine hepatocellular carcinoma cells. *Hepatology* 1999; 30: 1179-1186
 - 26 von Marschall Z, Cramer T, Höcker M, Finkenzeller G, Wiedenmann B, Rosewicz S. Dual mechanism of vascular endothelial growth factor upregulation by hypoxia in human hepatocellular carcinoma. *Gut* 2001; 48: 87-96
 - 27 Senger DR, Perruzzi CA, Feder J, Dvorak HF. A highly conserved vascular permeability factor secreted by a variety of human and rodent tumor cell lines. *Cancer Res* 1986; 46: 5629-5632
 - 28 Peng JP, Zheng S, Xiao ZX, Zhang SZ. Inducible nitric oxide synthase expression is related to angiogenesis, bcl-2 and cell proliferation in hepatocellular carcinoma. *J Zhejiang Univ Sci* 2003; 4: 221-227
 - 29 Xiao G, Zhang WM, Zhang M, Xie D, Guo AL, Wen JM. [Expressions of inducible nitric oxide synthase and vascular endothelial growth factor and their relationship with microvessel density in hepatocellular carcinoma.] *Ai Zheng* 2005; 24: 99-103
 - 30 李明意, 姚金利, 周晓华, 杨永光. MKK-4、MMP-9基因的表达与原发肝癌肿瘤侵袭转移的关系. *中国病理生理杂志* 2006; 22: 1480-1483
 - 31 顾宇, 陆枫林. VEGF促进肝癌SMMC-7721细胞侵袭性的自分泌机制. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 3292-3295
 - 32 Ng IO, Poon RT, Lee JM, Fan ST, Ng M, Tso WK. Microvessel density, vascular endothelial growth factor and its receptors Flt-1 and Flk-1/KDR in hepatocellular carcinoma. *Am J Clin Pathol* 2001; 116: 838-845
 - 33 Zeng W, Gouw AS, van den Heuvel MC, Zwiers PJ, Zondervan PE, Poppema S, Zhang N, Platteel I, de Jong KP, Molema G. The angiogenic makeup of human hepatocellular carcinoma does not favor vascular endothelial growth factor/angiopoietin-driven sprouting neovascularization. *Hepatology* 2008; 48: 1517-1527
 - 34 Lubienski A, Simon M, Lubienski K, Gellissen J, Hoffmann RT, Jakobs TE, Helmberger T. [Update on chemoinfusion and chemoembolization treatments] *Radiologe* 2007; 47: 1097-1106, 1108
 - 35 Wang B, Xu H, Gao ZQ, Ning HF, Sun YQ, Cao GW. Increased expression of vascular endothelial growth factor in hepatocellular carcinoma after transcatheter arterial chemoembolization. *Acta Radiol* 2008; 49: 523-529
 - 36 Kobayashi N, Ishii M, Ueno Y, Kisara N, Chida N, Iwasaki T, Toyota T. Co-expression of Bcl-2 protein and vascular endothelial growth factor in hepatocellular carcinomas treated by chemoembolization. *Liver* 1999; 19: 25-31
 - 37 Yamaguchi R, Yano H, Nakashima Y, Ogasawara S, Higaki K, Akiba J, Hicklin DJ, Kojiro M. Expression and localization of vascular endothelial growth factor receptors in human hepatocellular carcinoma and non-HCC tissues. *Oncol Rep* 2000; 7: 725-729
 - 38 An FQ, Matsuda M, Fujii H, Matsumoto Y. Expression of vascular endothelial growth factor in surgical specimens of hepatocellular carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2000; 126: 153-160
 - 39 Sergio A, Cristofori C, Cardin R, Pivetta G, Ragazzi R, Baldan A, Girardi L, Cillo U, Burra P, Giacomini A, Farinati F. Transcatheter arterial chemoembolization (TACE) in hepatocellular carcinoma (HCC): the role of angiogenesis and invasiveness. *Am J Gastroenterol* 2008; 103: 914-921
 - 40 马立辉, 周健, 王助新, 胡大为, 史丽民, 敖亚洲, 张海峰. 血清VEGF及CRP表达对肝细胞癌术后早期复发的预测. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 3460-3464
 - 41 Zhao J, Hu J, Cai J, Yang X, Yang Z. Vascular endothelial growth factor expression in serum of patients with hepatocellular carcinoma. *Chin Med J (Engl)* 2003; 116: 772-776
 - 42 Baker AF, Dragovich T, Tate WR, Ramanathan

- RK, Roe D, Hsu CH, Kirkpatrick DL, Powis G. The antitumor thioredoxin-1 inhibitor PX-12 (1-methylpropyl 2-imidazolyl disulfide) decreases thioredoxin-1 and VEGF levels in cancer patient plasma. *J Lab Clin Med* 2006; 147: 83-90
- 43 Lin J, Yan XJ, Chen HM. Fascaplysin, a selective CDK4 inhibitor, exhibit anti-angiogenic activity in vitro and in vivo. *Cancer Chemother Pharmacol* 2007; 59: 439-445
- 44 Alfaro C, Suarez N, Gonzalez A, Solano S, Erro L, Dubrot J, Palazon A, Hervas-Stubbs S, Gurrpide A, Lopez-Picazo JM, Grande-Pulido E, Melero I, Perez-Gracia JL. Influence of bevacizumab, sunitinib and sorafenib as single agents or in combination on the inhibitory effects of VEGF on human dendritic cell differentiation from monocytes. *Br J Cancer* 2009; 100: 1111-1119
- 45 Pang R, Poon RT. Angiogenesis and antiangiogenic therapy in hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett* 2006; 242: 151-167
- 46 Ramanathan RK, Kirkpatrick DL, Belani CP, Friedland D, Green SB, Chow HH, Cordova CA, Stratton SP, Sharlow ER, Baker A, Dragovich T. A Phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of PX-12, a novel inhibitor of thioredoxin-1, in patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 2109-2114
- 47 Sudhakar A, Boosani CS. Inhibition of tumor angiogenesis by tumstatin: insights into signaling mechanisms and implications in cancer regression. *Pharm Res* 2008; 25: 2731-2739
- 48 Kazerounian S, Yee KO, Lawler J. Thrombospondins in cancer. *Cell Mol Life Sci* 2008; 65: 700-712
- 49 Ellis LM. Bevacizumab. *Nat Rev Drug Discov* 2005; Suppl: S8-S9
- 50 封宇飞, 雷静, 傅得兴. 血管内皮生长因子抑制剂-贝伐单抗. *中国药理学杂志* 2005; 40: 1519-1520
- 51 Tyagi P. Safety of bevacizumab with fluoropyrimidine-based regimens for first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer* 2006; 6: 189-191
- 52 Finn RS, Bentley G, Britten CD, Amado R, Busuttill RW. Targeting vascular endothelial growth factor with the monoclonal antibody bevacizumab inhibits human hepatocellular carcinoma cells growing in an orthotopic mouse model. *Liver Int* 2009; 29: 284-290
- 53 Siegel AB, Cohen EI, Ocean A, Lehrer D, Goldenberg A, Knox JJ, Chen H, Clark-Garvey S, Weinberg A, Mandeli J, Christos P, Mazumdar M, Popa E, Brown RS Jr, Rafii S, Schwartz JD. Phase II trial evaluating the clinical and biologic effects of bevacizumab in unresectable hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol* 2008; 26: 2992-2998
- 54 Urbich C, Reissner A, Chavakis E, Dernbach E, Haendeler J, Fleming I, Zeiher AM, Kaszkin M, Dimmeler S. Dephosphorylation of endothelial nitric oxide synthase contributes to the anti-angiogenic effects of endostatin. *FASEB J* 2002; 16: 706-708
- 55 Huang G, Chen L. Recombinant human endostatin improves anti-tumor efficacy of paclitaxel by normalizing tumor vasculature in Lewis lung carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2010 Feb 4. [Epub ahead of print]
- 56 Hanai J, Dhanabal M, Karumanchi SA, Albanese C, Waterman M, Chan B, Ramchandran R, Pestell R, Sukhatme VP. Endostatin causes G1 arrest of endothelial cells through inhibition of cyclin D1. *J Biol Chem* 2002; 277: 16464-16469
- 57 Dixelius J, Cross MJ, Matsumoto T, Claesson-Welsh L. Endostatin action and intracellular signaling: beta-catenin as a potential target? *Cancer Lett* 2003; 196: 1-12
- 58 Ma CH, Zhang Y, Wang XY, Gao LF, Liu H, Guo C, Liu SX, Cao YL, Zhang LN, Sun WS. Human endostatin gene transfer, either naked or with liposome, has the same inhibitory effect on growth of mouse liver tumor cells in vivo. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2874-2877
- 59 Huang G, Chen L. Discrepancies between antiangiogenic and antitumor effects of recombinant human endostatin. *Cancer Biother Radiopharm* 2009; 24: 589-596
- 60 Norén-Nyström U, Eriksson M, Eriksson B, Roos G, Bergh A, Holmberg D. Antitumor activity of the angiogenesis inhibitor TNP-470 on murine lymphoma/leukemia cells in vivo and in vitro. *Exp Hematol* 2003; 31: 143-149
- 61 Zhu AX, Sahani DV, Duda DG, di Tomaso E, Ancukiewicz M, Catalano OA, Sindhwani V, Blaszkowsky LS, Yoon SS, Lahdenranta J, Bhargava P, Meyerhardt J, Clark JW, Kwak EL, Hezel AF, Miksad R, Abrams TA, Enzinger PC, Fuchs CS, Ryan DP, Jain RK. Efficacy, safety, and potential biomarkers of sunitinib monotherapy in advanced hepatocellular carcinoma: a phase II study. *J Clin Oncol* 2009; 27: 3027-3035
- 62 杜海军. 重组人血管内皮抑素联合肝动脉灌注化疗栓塞治疗中晚期肝癌的临床应用. *介入放射学杂志* 2009; 18: 302-304
- 63 卢武胜, 李肖, 王朝华, 刘文秀, 焦和, 莫延树, 陈志南. 131I-HAb18F(ab')₂在肝癌病人体内的生物学分布. *生物医学工程学杂志* 2003; 20: 689-691
- 64 许国辉, 张智慧, 李政文, 文华长, 胡大武, 段天红, 文永君, 吴辉, 杨承莲, 曹蓉. 131I肝癌单抗片段 HAb18F(ab)₂灌注治疗原发性肝癌的临床研究. *介入放射学杂志* 2005; 14: 596-598
- 65 吴少平, 卢武胜, 徐大伟, 郑志勇. 肝癌DSA血供类型与经肝动脉灌注131 I -HAb18F(ab')₂治疗后瘤体大小变化的关系探讨. *介入放射学杂志* 2007; 16: 243-245
- 66 郝明志, 陈强, 叶韵斌, 肖景榕, 林海澜, 吴晖, 余文吕, 张孔志, 陈起忠, 刘友晓, 郑伟生. 肝动脉栓塞化疗联合CIK细胞疗法治疗原发性肝癌. *中国肿瘤生物治疗杂志* 2006; 13: 303-304
- 67 史跃, 高从敬, 苹生良, 陈复兴, 徐永茂. 细胞因子诱导杀伤细胞灌注治疗原发性肝癌临床应用. *介入放射学杂志* 2007; 16: 235-239
- 68 周启明, 吴沛宏, 赵明, 王其京, 黄丽惜, 李永强, 陈诗萍, 夏建川. 原发性肝癌经综合微创治疗后联合细胞因子诱导杀伤细胞灌注的近期疗效观察. *癌症* 2006; 25: 1414-1418
- 69 徐凯, 罗海英, 李柳宁, 邓宏, 白建平, 郑剑霄, 曾越灿, 刘宇龙. 中药灌注栓塞为主综合治疗原发性肝癌的临床研究. *中国中西医结合杂志* 2005; 25: 299-302
- 70 李肖, 官泳松, 周翔平, 孙龙, 刘源, 贺庆, 富力, 毛咏秋. 20(R)-人参皂甙Rg₃对大鼠肝癌细胞的作用. *四川大学学报(医学版)* 2005; 36: 217-220
- 71 陆运鑫, 黄丁平, 侯恩存, 秦冰, 黄妍. 康艾注射液联合肝动脉栓塞化疗治疗原发性肝癌临床疗效观察. *中国中药杂志* 2007; 32: 2655-2656

编辑 李军亮 电编 何基才

肝靶向一氧化氮释放药物对肝损伤的抑制作用及其细胞毒性的评价

靳雪源, 王慧芬, 李宏武, 仲伯华, 赵平

■背景资料

肝硬化是威胁人类健康的重大疾病, 门静脉高压为肝硬化的主要并发症之一, 是导致肝硬化患者死亡的重要原因。一氧化氮释放药物可通过释放一氧化氮分子抑制肝脏炎症的发展及肝纤维化的形成、降低门静脉高压, 进而产生治疗肝硬化和门静脉高压的疗效。

靳雪源, 王慧芬, 赵平, 中国人民解放军第302医院十二科 北京市 100039

李宏武, 仲伯华, 中国人民解放军军事医学科学院毒物药物研究所 北京市 100850

国家自然科学基金资助项目, No. 30572220

国家高技术研究发展计划基金资助项目, No.

8632006AA02A4C6

作者贡献分布: 此课题由仲伯华与赵平设计; 研究过程主要由靳雪源操作完成; 研究用药物由李宏武合成; 数据分析由靳雪源完成; 本论文写作由靳雪源完成。

通讯作者: 赵平, 主任医师, 100039, 北京市丰台区西四环中路100号, 中国人民解放军第302医院十二科. zhaop9262@sina.com 电话: 010-66933432

收稿日期: 2010-01-11 修回日期: 2010-03-31

接受日期: 2010-04-07 在线出版日期: 2010-05-28

Efficacy and cytotoxicity of a liver-targeted nitric oxide-releasing drug in the treatment of liver injury in mice

Xue-Yuan Jin, Hui-Fen Wang, Hong-Wu Li, Bo-Hua Zhong, Ping Zhao

Xue-Yuan Jin, Hui-Fen Wang, Ping Zhao, the 12th Department of the 302 Military Hospital of China, Beijing 100039, China

Hong-Wu Li, Bo-Hua Zhong, Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100039, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30572220; and the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program), No. 8632006AA02A4C6

Correspondence to: Ping Zhao, the 12th Department of the 302 Military Hospital of China, Beijing 100039, China. zhaop9262@sina.com

Received: 2010-01-11 Revised: 2010-03-31

Accepted: 2010-04-07 Published online: 2010-05-28

Abstract

AIM: To evaluate the efficacy and cytotoxicity of NO-040527, a new liver-targeted nitric oxide-releasing drug, in the treatment of liver injury induced with carbon tetrachloride, acetaminophen or *D*-galactosamine in mice.

METHODS: Liver injury was induced in mice by intraperitoneal injection of carbon tetrachloride, acetaminophen or *D*-galactosamine. NO-040527 was orally administered to animals 1 h before

and 12 h after the induction of liver injury. The animals were killed 24 h after drug delivery, and blood samples were taken to determine serum ALT and AST levels using an automatic biochemical analyzer. The cytotoxicity of the targeted conjugate was determined by methyl thiazol tetrazolium (MTT) assay.

RESULTS: NO-040527 could significantly inhibit carbon tetrachloride-induced elevation of ALT and AST in mice (both $P < 0.01$) in a dose-dependent manner. At the same dose (55 mg/kg), NO-040527 exhibited better efficacy than control drug NCX-1000 ($P < 0.05$) in lowering carbon tetrachloride-induced elevation of serum ALT and AST levels. Similarly, NO-040527 could also significantly inhibit acetaminophen-induced elevation of ALT and AST (both $P < 0.01$) though no dose-dependent effect was noted. At the same dose (55 mg/kg), NO-040527 exhibited similar efficacy to NCX-1000 in lowering acetaminophen-induced elevation of serum ALT and AST levels. NO-040527 showed no protective effects against liver injury induced with *D*-galactosamine. No significant differences were noted in serum ALT and AST levels between untreated mice with *D*-galactosamine-induced liver injury and those treated with medium- or low-dose NO-040527. However, the levels of serum ALT and AST in mice with *D*-galactosamine-induced liver injury treated with high-dose NO-040527 was higher than those in untreated ones. NO-040527 at a dose of 500 $\mu\text{mol/L}$ began to show cytotoxicity (cell viability rate: $45.96\% \pm 29.46\%$; $P = 0.058$). Significant cytotoxicity was noted when the dose of NO-040527 rose to 1000 $\mu\text{mol/L}$ ($P < 0.005$). NO-040527 at 50 and 100 $\mu\text{mol/L}$ could accelerate cell growth (cell viability rate: $137.67\% \pm 8.47\%$ and $152.65\% \pm 10.084\%$, respectively; both $P < 0.05$).

CONCLUSION: NO-040527 has good protective effects against carbon tetrachloride- or acetaminophen-induced liver injury in mice. NO-040527 is cytotoxic when used at high dose.

Key Words: Liver-targeted therapy; Nitric oxide;

■同行评议者

黄国, 教授, 四川大学华西药学院药剂系

Bile acid; Conjugate; Liver injury

Jin XY, Wang HF, Li HW, Zhong BH, Zhao P. Efficacy and cytotoxicity of a liver-targeted nitric oxide-releasing drug in the treatment of liver injury in mice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(15): 1588-1593

摘要

目的: 评价新型肝靶向一氧化氮释放药物 NO-040527 抗小鼠肝损伤的药效学及细胞毒性, 为进一步的临床前研究开发奠定基础。

方法: 通过腹腔注射四氯化碳、*D*-氨基半乳糖或对乙酰氨基酚, 制备肝损伤动物模型; 分别于造模前 1 h 和造模后 12 h 灌胃给予不同剂量的待测药物, 于第 2 次给药后 24 h, 眼眶取血, 留取血清标本, 测定血清中的 ALT, AST 水平。取对数生长期的 HepG2 细胞, 接种于 96 孔培养板, 长成单层, 加入不同浓度的待测药物, 继续培养 24 h, 用 MTT 法, 测定细胞的存活率。

结果: 肝靶向药物 NO-040527 能够显著降低 CCl₄ 所致小鼠肝损伤的转氨酶升高 ($P < 0.01$), 降酶作用具有良好的剂量依赖性; 在相同剂量 (55 mg/kg) 下, NO-040527 的降酶作用强于阳性对照药 NCX-1000 ($P < 0.05$)。同样, 肝靶向药物 NO-040527 能够显著降低对乙酰氨基酚所引起的小鼠转氨酶升高 ($P < 0.01$), 各剂量组之间降酶作用无显著性差异, 在相同剂量 (55 mg/kg) 下, NO-040527 的降酶作用与 NCX-1000 相当。NO-040527 对 *D*-氨基半乳糖所致小鼠肝损伤没有保护作用, 中低剂量组的小鼠血清 ALT、AST 值较模型组相比没有显著差异, 高剂量组转氨酶甚至略高于模型组。NO-040527 在 500 $\mu\text{mol/L}$ 浓度显示出细胞毒性, 细胞存活率为 $45.96\% \pm 29.46\%$ ($P = 0.058$); 在 1 000 $\mu\text{mol/L}$ 浓度具有显著的细胞毒性 ($P < 0.005$); 在 50 $\mu\text{mol/L}$ 和 100 $\mu\text{mol/L}$ 浓度时, NO-040527 显示出促细胞生长的作用, 细胞存活率分别为 $137.67\% \pm 8.47\%$ 和 $152.65\% \pm 10.084\%$, 显著高于溶剂组 ($P < 0.05$)。

结论: NO-040527 能够显著降低 CCl₄ 和对乙酰氨基酚所引起的小鼠转氨酶升高, 但 NO-040527 和 NCX-1000 对 *D*-氨基半乳糖所致小鼠肝损伤没有保护作用, 高剂量甚至加重转氨酶升高。NO-040527 在高浓度显示出细胞毒性, 低浓度显示出促细胞生长的作用。

关键词: 肝靶向治疗; 一氧化氮; 胆酸; 偶合物; 肝损伤

靳雪源, 王慧芬, 李宏武, 仲伯华, 赵平. 肝靶向一氧化氮释放药物对肝损伤的抑制作用及其细胞毒性的评价. *世界华人消化杂志*

2010; 18(15): 1588-1593

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/1588.asp>

0 引言

肝硬化是威胁人类健康的重大疾病。全球 5 亿多乙型肝炎和丙型肝炎患者中, 25% 将发展成为肝硬化; 各种原因 (酒精性、肥胖、糖尿病等) 引起的脂肪肝的发展也会导致肝硬化^[1-3]。门静脉高压为肝硬化的主要并发症之一, 患者会出现食管和胃底静脉曲张破裂出血、腹水等症状, 是导致肝硬化患者死亡的重要原因。目前临床尚没有理想的治疗肝硬化或门静脉高压的药物^[4]。一氧化氮释放药物可通过释放一氧化氮分子抑制肝脏炎症的发展及肝纤维化的形成、降低门静脉高压, 进而产生治疗肝硬化和门静脉高压的疗效。但是目前临床用于治疗肝硬化的有机硝酸酯类的一氧化氮释放药物, 由于其体内分布的非特异性, 从而产生比较广泛的全身不良反应^[5]。通过肝靶向给药技术将化学治疗药物选择性的投放于肝脏, 能够减轻或避免其全身的不良反应^[6-10]。胆汁酸是内源性的肝细胞特异性的天然配基, 包括胆酸、熊去氧胆酸等。胆汁酸具有高度的器官特异性和较高的转运能力。以胆酸为靶向载体, 不但能够实现药物的肝靶向性, 减少不良反应, 而且能够提高药物的口服生物利用度; 作为内源性的天然配基, 胆酸具有较好的生物相容性^[11,12]。肝靶向一氧化氮释放药物 NCX-1000 为硝酸酯与肝靶向载体熊去氧胆酸 (ursodeoxycholic acid, UA) 的偶联物, 能够通过胆酸的特异性转运机制, 将一氧化氮供体投放于肝脏中, 在肝内代谢释放出一氧化氮, 在发挥治疗作用的同时, 减少或避免一氧化氮的全身作用^[13-15]。*N*-熊去氧胆酰-*O*-硝基-*L*-苏氨酸 (NO-040527) 为军事医学科学院毒物药物研究所研发的新型肝靶向一氧化氮释放药物。本课题的研究目标就是对新型肝靶向一氧化氮释放药物 *N*-熊去氧胆酰-*O*-硝基-*L*-苏氨酸 (NO-040527) 进行抗小鼠肝损伤的初步药效学评价及细胞毒性的实验研究, 为该药物的进一步的临床前研究开发奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料 Baclb/c 小鼠, 体质量 20-25 g, 雌雄各半, 由中国人民解放军总医院动物中心提供。四氯化碳, 分析纯, 由北京化工厂生产; *D*-氨基半乳糖, 分析纯, 由南京泽众化学试剂试剂公司提供; 对

■ 研发前沿

通过肝靶向给药技术将化学治疗药物选择性的投放于肝脏, 能够减轻或避免其全身的不良反应。胆汁酸是内源性的肝细胞特异性的天然配基, 具有较好的生物相容性、高度的器官特异性和较高的转运能力。以胆酸为靶向载体, 不但能够实现药物的肝靶向性, 减少不良反应, 而且能够提高口服生物利用度。

■ 相关报道

Fiorucci 等报道了肝靶向一氧化氮释放药物 NCX-1000 为硝酸酯与肝靶向载体熊去氧胆酸的偶联物。该偶联物能够通过胆酸的特异性转运机制, 将一氧化氮供体投放于肝脏中, 在肝内代谢释放出一氧化氮, 在发挥治疗作用的同时, 减少或避免一氧化氮的全身作用。

■创新盘点

本文报道的肝靶向一氧化氮释放药物NO-040527将一氧化氮释放成分苏氨酸的硝酸酯,以酰胺键与熊去氧胆酸连接形成偶合物,保证了偶合物在血浆中的稳定性;而进入靶细胞后,硝酸酯与细胞中的巯基形成不稳定的S-亚硝基硫化物,进一步分解释放出NO分子,发挥药理作用。间隔基为天然氨基酸,具有良好的生物兼容性。

乙酰氨基酚由军事医学科学院毒物药物研究所提供。NCX-1000、NO-040527及熊去氧胆酸由军事医学科学院毒物药物研究所提供,纯度 $\geq 98\%$;与1%的羧甲基纤维素钠溶液一起研磨,制成均匀的悬浮液备用。全自动生化测定仪(Olympus AU5400, 日本)。HepG2细胞,由中国人民解放军302医院传染病研究所病毒性肝炎研究室提供。DMEM细胞培养液由中国人民解放军302医院传染病研究所病毒性肝炎研究室提供。MTT, Sigma公司;二甲亚砜,分析纯,博大泰克公司(BioDev)。酶联仪(Bio-RAD Model 550, Microplate Ready, 日本)。

1.2 方法

1.2.1 抗肝损伤实验: (1)抗CCl₄所致小鼠肝损伤: 将小鼠随机分组, 每组10只, 雌雄各半。通过灌胃给予不同剂量的待测药物或生理盐水, 1 h后, 按照10 mL/kg的剂量, 腹腔注射0.1%的CCl₄橄榄油溶液, 制备肝损伤模型; 皮下注射生理盐水作为正常对照组。造模后12 h, 再次灌胃给予不同剂量的待测药物。第2次给药后24 h, 眼眶取血, 留取血清标本, 用全自动生化仪测定血清中的ALT, AST水平。(2)抗D-氨基半乳糖所致小鼠肝损伤: 将小鼠随机分组, 每组10只, 雌雄各半。通过灌胃给予不同剂量的待测药物或生理盐水, 1 h后, 腹腔注射800 mg/kg的D-氨基半乳糖, 制备肝损伤模型; 皮下注射生理盐水作为正常对照组。造模后12 h, 再次灌胃给予不同剂量的待测药物。第2次给药后24 h, 眼眶取血, 留取血清标本, 用全自动生化仪测定血清中的ALT, AST水平。(3)抗对乙酰氨基酚所致小鼠肝损伤: 将小鼠随机分组, 每组10只, 雌雄各半。通过灌胃给予不同剂量的待测药物或生理盐水, 2 h后, 腹腔注射200 mg/kg的对乙酰氨基酚, 制备肝损伤模型; 皮下注射生理盐水作为正常对照组。造模后12 h, 再次灌胃给予不同剂量的待测药物。第2次给药后24 h, 眼眶取血, 留取血清标本, 用全自动生化仪测定血清中的ALT, AST水平。

1.2.2 细胞毒实验: 取对数生长期的HepG2细胞, 以 1×10^5 /mL接种96孔培养板。在长成单层的HepG2细胞的培养板中, 加入不同浓度的受试化合物溶液, 20 μ L/孔, 3复孔, 使药物终浓度分别为10、50、100、500或1 000 μ mol/L, 同时设阴性对照组和空白对照组, 37 $^{\circ}$ C、50 mL/L CO₂培养箱中继续培养24 h, 弃去旧培养液, 加入含MTT 0.5 g/L的培养液, 继续培养4 h后倾去培养液, 加入二甲基亚砜200 μ L/孔, 震荡溶解10 min,

酶联仪测定490 nm处的吸光度(A)值, 与溶剂组的A值比较, 按下式计算得到细胞的存活率: 存活率(%) = $A_{\text{药物}}/A_{\text{溶剂}}$ 。

统计学处理 应用SPSS10.1软件包进行单因素多个均数比较的方差分析, 在作方差齐性检验后, 进行各组数据两两之间的均数比较。

2 结果

2.1 抗肝损伤实验 实验期间正常组动物精力充沛, 活跃灵活, 饮食正常, 皮毛整洁, 无死亡, 模型组动物有不同程度的精神萎靡、活动迟钝、饮食减少、皮毛凌乱等表现。给药组动物的精神、饮食等整体情况明显优于对照组, 但较正常组稍差。与正常对照组比较, 生理盐水组的ALT、AST均明显高于正常对照组, 说明造模成功。

2.1.1 对CCl₄所致小鼠肝损伤的抑制作用: NO-040527治疗三个剂量组的小鼠血清ALT、AST值以及NCX-1000组较模型组均显著降低($P < 0.01$), 说明各治疗组均有降低转氨酶的作用, 靶向一氧化氮释放药物能够同时降低ALT和AST; NO-040527降低转氨酶的作用与给药剂量成正相关, 具有良好的剂量依赖性($P < 0.01$); 在相同剂量(55 mg/kg)下, NO-040527的降酶作用强于NCX-1000($P < 0.05$)。而载体熊去氧胆酸在110 mg/kg对转氨酶没有降低作用(表1)。

2.1.2 对对乙酰氨基酚所致小鼠肝损伤的保护作用: NO-040527治疗三个剂量组的小鼠血清ALT、AST值以及NCX-1000组较模型组均显著降低($P < 0.01$), 说明各治疗组均有降低转氨酶的作用, 靶向一氧化氮释放药物能够同时降低ALT和AST。NO-040527药物各剂量组之间降低转氨酶的作用无显著差异, 在相同剂量(55 mg/kg)下, NO-040527的降酶作用与NCX-1000相当。而载体熊去氧胆酸在110 mg/kg对转氨酶没有降低作用。与CCl₄所致小鼠肝损伤及对乙酰氨基酚所致小鼠肝损伤模型的结果不同, 肝靶向药物NO-040527对D-氨基半乳糖所致小鼠肝损伤没有保护作用(表1)。

2.1.3 对D-氨基半乳糖所致小鼠肝损伤的作用: NO-040527治疗中低剂量组的小鼠血清ALT、AST值较模型组相比没有显著差异, 高剂量组转氨酶甚至略高于模型组; 在55 mg/kg剂量下, NCX-1000能够导致转氨酶显著的进一步升高(表1)。

2.2 细胞毒实验 NO-040527的细胞毒性略低于

表 1 对CCl₄、对乙酰氨基酚及D-氨基半乳糖所致小鼠肝损伤的抑制作用 (*n* = 10, U/L, mean ± SD)

分组	剂量 (mg/kg)	CCl ₄		对乙酰氨基酚		D-氨基半乳糖	
		ALT	AST	ALT	AST	ALT	AST
正常对照		394 ± 141	499 ± 468	394 ± 141	499 ± 468	316 ± 68	1 440 ± 311
生理盐水		4 492 ± 5 607 ^d	4 060 ± 1 335 ^d	3 276 ± 3 980 ^d	3 875 ± 2 489 ^d	1 269 ± 751 ^d	2 691 ± 649 ^d
NO-040527	27	1 740 ± 2 399 ^b	2 572 ± 2 719 ^b	1 487 ± 1 361 ^b	2 077 ± 909 ^b	1 062 ± 710	2 948 ± 1 630
	55	861 ± 496 ^b	1 220 ± 1 065 ^b	1 261 ± 1 297 ^b	1 901 ± 763 ^b	1 296 ± 1 029	3 773 ± 1 805 ^a
	110	566 ± 198 ^b	872 ± 814 ^b	1 118 ± 1 056 ^b	1 546 ± 947 ^b	1 417 ± 1 907	3 586 ± 3 298 ^a
NX-1000	55	1 903 ± 1 266 ^b	3 233 ± 913 ^b	1 904 ± 1 172 ^b	2 377 ± 493 ^b	4 465 ± 3 644 ^a	7 532 ± 5 391 ^a
UB	110	4 977 ± 6 364	3 731 ± 1 791	3 297 ± 1 641	3 769 ± 2 240	ND	ND

^a*P* < 0.05, ^b*P* < 0.001 vs 生理盐水; ^d*P* < 0.01 vs 正常对照.

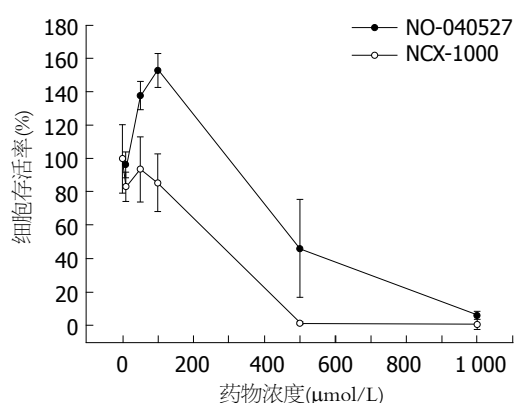


图 1 NO-040527与NCX-1000的细胞毒性的比较.

NCX-1000. NO-040527在500 μmol/L浓度显示出细胞毒性, 细胞存活率为45.96% ± 29.46%, 但是由于数据波动较大, 与溶剂组相比, 差异不显著(*P* = 0.058); 在1 000 μmol/L浓度具有显著的细胞毒性, 细胞存活率(5.78% ± 2.47%)显著低于溶剂组(*P* < 0.005); 在50和100 μmol/L浓度时, NO-040527还显示出促细胞生长的作用, 细胞存活率分别为137.67% ± 8.47%和152.65% ± 10.084%, 显著高于溶剂组(*P* < 0.05). NCX-1000在500 μmol/L时即显示出明显的细胞毒性, 细胞存活率为1.06% ± 0.53%, 显著低于溶剂组(*P* < 0.005, 图1).

3 讨论

门静脉高压为肝硬化的主要并发症之一, 患者会出现食管和胃底静脉曲张破裂出血、腹水等症状, 是导致肝硬化患者死亡的重要原因. 有研究发现^[16,17], 肝血管紧张度的增加引起肝硬化门静脉的升高, 因此, 使用血管舒张剂不但能够通过增加肝脏血流量降低门静脉高压, 而且能够改善肝功^[18]. 但是, 已有的血管舒张剂能够引起系统和脏器的血管舒张, 导致低血压, 从而加重

肝硬化患者业已存在的水钠潴留, 腹水和肾功能障碍^[19,20].

对NO与肝硬化关系的研究结果表明, 肝内NO释放的不足是增加肝硬化血管紧张度的主要因素之一^[21,22]. 因此, 理想的治疗策略是给肝脏提供足够的NO, 而不增加循环中的NO, 因为肝硬化时循环中的NO已经过量. 肝靶向NO释放药物能够通过胆酸的特异性转运机制, 将NO供体投放于肝脏中, 在肝内代谢释放出NO, 在发挥治疗作用的同时, 减少或避免NO的全身作用. 因此, 肝靶向NO释放药物有可能成为肝硬化门静脉高压的理想的治疗药物^[23].

N-熊去氧胆酰-O-硝基-L-苏氨酸(NO-040527)为军事医学科学院毒物药物研究所研发的新型肝靶向NO释放药物. 与NCX-1000相比, NO-040527分子中的一氧化氮释放成分苏氨酸的硝酸酯, 以酰胺键与熊去氧胆酸连接形成的偶合物, 保证了偶合物在血浆中的稳定性; 而进入靶细胞后, 硝酸酯与细胞中的巯基形成不稳定的S-亚硝基硫化物, 进一步分解释放出NO分子, 发挥药理作用. 间隔基为天然氨基酸, 具有良好的生物相容性. 本课题对NO-040527进行了初步的实验研究, 考察了其对于急性肝损伤的抑制作用, 为进一步的研究开发奠定了基础.

在抗肝损伤的评价方面, 我们选择致病机制不同的三种肝损伤模型. 四氯化碳所致肝损伤主要与其活性代谢产物三氯甲基自由基和氯自由基有关, 这些自由基可与细胞膜和细胞内的大分子发生共价结合, 使酶的功能失活, 细胞基质过氧化, 胞质钙浓度升高, 导致肝细胞损伤坏死, 胞质内氨基转移酶进入血液, 引起血中转氨酶浓度升高; D-氨基半乳糖所致肝损伤与其在肝内的代谢及随后对核酸合成的影响有关, 通过特异性消耗肝细胞内尿嘧啶核苷, 影响

■应用要点

本课题对NO-040527进行了初步的实验研究, 考察了其对于急性肝损伤的抑制作用, 为进一步的研发肝硬化治疗药物奠定了基础.

同行评价

本研究选题有临床意义,具有一定的参考价值。

肝细胞核酸代谢;对乙酰氨基酚通过代谢过程中产生的 N -乙酰对苯醌亚胺产生肝脏毒性^[24]。 CCl_4 、 D -氨基半乳糖及对乙酰氨基酚所致的动物肝损伤表现为血清转氨酶的升高;动物中毒后血清转氨酶升高的水平与肝细胞损伤程度密切相关。因此,通过测定血中转氨酶的变化能够方便的评价药物的抗肝损伤作用。

根据测定结果,我们首次发现肝靶向NO释放药物对致病机制不同的肝损伤可能具有不同的作用。NO-040527能够显著降低 CCl_4 所致小鼠肝损伤的转氨酶升高,降酶作用具有良好的剂量依赖性,在相同剂量(55 mg/kg)下,NO-040527的降酶作用强于NCX-1000;对于对乙酰氨基酚所致肝损伤,NO-040527也能显著降低转氨酶,但是各剂量组之间无显著差异,在相同剂量(55 mg/kg)下,NO-040527的降酶作用与NCX-1000相当;对 D -氨基半乳糖所致小鼠肝损伤,靶向药物中低剂量组小鼠血清ALT、AST值较模型组相比没有显著差异,高剂量组转氨酶甚至略高于模型组。

有研究表明,在LPS联合氨基半乳糖所致急性肝损伤中,动物体内NO生物合成机制被激活是其肝细胞损伤的重要机制之一。在细胞因子(如 $\text{TNF}\alpha$ 、内毒素等)的诱导下,广泛存在于巨噬细胞、肝细胞、中性粒细胞和淋巴细胞等细胞中的诱导性一氧化氮合成酶(iNOS)激活,产生NO,NO再通过多种途径对凋亡产生影响。超过正常水平的低剂量NO能损伤线粒体造成DNA受损,诱发细胞凋亡;而大剂量NO则主要是直接损伤细胞膜和DNA,导致细胞的大量坏死。NO、细胞凋亡及细胞坏死三者之间存在的密切关系:NO产生早期,细胞损伤以凋亡为主。随着NO产生量的增加,细胞开始发生坏死,并随时间的延长,细胞损伤也逐步以坏死为主,直至肝组织大片坏死,肝功能衰竭而致动物死亡^[25]。肝靶向NO释放药物可能通过进一步释放NO,加重氨基半乳糖所致的肝损伤。

一氧化氮在发挥有益的生理功能的同时,也会产生细胞毒性等不良反应。作用部位NO的浓度不同,其作用不同甚至相反;持续低浓度的NO具有肝保护作用,而高浓度NO则通过产生细胞毒性,诱导细胞凋亡造成肝损伤。因此,我们用MTT法测定了靶向药物对肝癌细胞的细胞毒性,发现药物在不同浓度下对细胞有不同的作用。NO-040527在500 $\mu\text{mol/L}$ 浓度显示出细胞毒性,细胞存活率为 $45.96 \pm 29.46\%$,但是与溶剂组相比,

差异不显著($P = 0.058$);在1 000 $\mu\text{mol/L}$ 浓度具有显著的细胞毒性,细胞存活率($5.78\% \pm 2.47\%$)显著低于溶剂组($P < 0.005$);但是在50和100 $\mu\text{mol/L}$ 浓度时,NO-040527显示出促细胞生长的作用,细胞存活率分别为 $137.67\% \pm 8.47\%$ 和 $152.65\% \pm 10.084\%$,显著高于溶剂组($P < 0.05$)。NCX-1000在500 $\mu\text{mol/L}$ 时即显示出明显的细胞毒性。

参考文献

- Lubel JS, Angus PW. Modern management of portal hypertension. *Intern Med J* 2005; 35: 45-49
- Sass DA, Chang P, Chopra KB. Nonalcoholic fatty liver disease: a clinical review. *Dig Dis Sci* 2005; 50: 171-180
- Lefton HB, Rosa A, Cohen M. Diagnosis and epidemiology of cirrhosis. *Med Clin North Am* 2009; 93: 787-99, vii
- 马晓, 刘冰熔. 门静脉高压药物治疗的新进展. 世界华人消化杂志 2008; 16: 3775-3781
- 孙群, 张强, 朱金水, 陈玮, 陈尼维. 一氧化氮、白介素、肿瘤坏死因子与肝硬化患者预后的关系. 世界华人消化杂志 2007; 15: 659-662
- Levy GA, Adamson G, Phillips MJ, Scrocchi LA, Fung L, Biessels P, Ng NF, Ghanekar A, Rowe A, Ma MX, Levy A, Kosciak C, He W, Gorczynski R, Brookes S, Woods C, McGilvray ID, Bell D. Targeted delivery of ribavirin improves outcome of murine viral fulminant hepatitis via enhanced antiviral activity. *Hepatology* 2006; 43: 581-591
- 靳雪源, 张玲霞, 楼敏, 谢建芳. 肝靶向基因给药系统AsOR-PL+PEG-PEI的研究. 世界华人消化杂志 2002; 10: 295-298
- Biessen EA, Valentijn AR, De Vruhe RL, Van De Bilt E, Sliedrecht LA, Prince P, Bijsterbosch MK, Van Boom JH, Van Der Marel GA, Abrahams PJ, Van Berkel TJ. Novel hepatotrophic prodrugs of the antiviral nucleoside 9-(2-phosphonylmethoxyethyl)adenine with improved pharmacokinetics and antiviral activity. *FASEB J* 2000; 14: 1784-1792
- Bijsterbosch MK, Ying C, de Vruhe RL, de Clercq E, Biessen EA, Neyts J, van Berkel TJ. Carrier-mediated delivery improves the efficacy of 9-(2-phosphonylmethoxyethyl)adenine against hepatitis B virus. *Mol Pharmacol* 2001; 60: 521-527
- Di Stefano G, Fiume L, Domenicali M, Busi C, Chieco P, Kratz F, Lanza M, Mattioli A, Pariali M, Bernardi M. Doxorubicin coupled to lactosaminated albumin: Effects on rats with liver fibrosis and cirrhosis. *Dig Liver Dis* 2006; 38: 404-408
- Trauner M, Boyer JL. Bile salt transporters: molecular characterization, function, and regulation. *Physiol Rev* 2003; 83: 633-671
- 靳雪源, 王惠芬. 肝靶向胆酸-脂肪酸偶合物的研究进展. 世界华人消化杂志 2008; 16: 3769-3774
- Fiorucci S, Antonelli E, Brancaleone V, Sanpaolo L, Orlandi S, Distrutti E, Acuto G, Clerici C, Baldoni M, Del Soldato P, Morelli A. NCX-1000, a nitric oxide-releasing derivative of ursodeoxycholic acid, ameliorates portal hypertension and lowers norepinephrine-induced intrahepatic resistance in the isolated and perfused rat liver. *J Hepatol* 2003; 39: 932-939
- Fiorucci S, Antonelli E, Distrutti E, Mencarelli A, Farneti S, Del Soldato P, Morelli A. Liver delivery

- of NO by NCX-1000 protects against acute liver failure and mitochondrial dysfunction induced by APAP in mice. *Br J Pharmacol* 2004; 143: 33-42
- 15 Fiorucci S, Antonelli E, Tocchetti P, Morelli A. Treatment of portal hypertension with NCX-1000, a liver-specific NO donor. A review of its current status. *Cardiovasc Drug Rev* 2004; 22: 135-146
- 16 Bosch J, García-Pagán JC, Feu F, Luca A, Fernández M, Pizcueta P, Rodés J. New approaches in the pharmacologic treatment of portal hypertension. *J Hepatol* 1993; 17 Suppl 2: S41-S45
- 17 Bosch J, Abraldes JG, Groszmann R. Current management of portal hypertension. *J Hepatol* 2003; 38 Suppl 1: S54-S68
- 18 Navasa M, Bosch J, Reichen J, Bru C, Mastai R, Zysset T, Silva G, Chesta J, Rodés J. Effects of verapamil on hepatic and systemic hemodynamics and liver function in patients with cirrhosis and portal hypertension. *Hepatology* 1988; 8: 850-854
- 19 Wiest R, Groszmann RJ. The paradox of nitric oxide in cirrhosis and portal hypertension: too much, not enough. *Hepatology* 2002; 35: 478-491
- 20 Salmerón JM, Ruiz del Arbol L, Ginès A, García-Pagán JC, Ginès P, Feu F, Claria J, Rivera F, Bosch J, Arroyo V. Renal effects of acute isosorbide-5-mononitrate administration in cirrhosis. *Hepatology* 1993; 17: 800-806
- 21 Gupta TK, Toruner M, Chung MK, Groszmann RJ. Endothelial dysfunction and decreased production of nitric oxide in the intrahepatic microcirculation of cirrhotic rats. *Hepatology* 1998; 28: 926-931
- 22 Mittal MK, Gupta TK, Lee FY, Sieber CC, Groszmann RJ. Nitric oxide modulates hepatic vascular tone in normal rat liver. *Am J Physiol* 1994; 267: G416-G422
- 23 Wiest R, Groszmann RJ. Nitric oxide and portal hypertension: its role in the regulation of intrahepatic and splanchnic vascular resistance. *Semin Liver Dis* 1999; 19: 411-426
- 24 黄正明, 杨新波. 抗肝炎中药现代研究与应用. 郑州: 郑州大学出版社, 2006: 312-329
- 25 Morikawa A, Kato Y, Sugiyama T, Koide N, Chakravorty D, Yoshida T, Yokochi T. Role of nitric oxide in lipopolysaccharide-induced hepatic injury in D-galactosamine-sensitized mice as an experimental endotoxic shock model. *Infect Immun* 1999; 67: 1018-1024

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

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

• 消息 •

2009年《世界华人消化杂志》编委审稿总结

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

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

军人在汶川地震中功能性胃肠病发病的调查及相关因素

李明阳, 王志强, 孙刚, 杨云生

■背景资料

功能性胃肠病(FGID)是常见的症候群,“5.12”汶川大地震发生后,抗震军人功能性胃肠病的发病率显著升高,主要与地震所带来的诸多应激因素有关。

李明阳, 王志强, 中国人民解放军总医院南楼消化内镜中心北京市 100853

孙刚, 杨云生, 中国人民解放军总医院消化内科北京市 100853
作者贡献分布: 此课题由王志强与李明阳共同设计; 研究过程由李明阳、孙刚及王志强操作完成; 数据分析由李明阳与孙刚完成; 本论文由李明阳撰写; 杨云生指导工作及帮助修改文章。

通讯作者: 王志强, 主任医师, 100853, 北京市, 中国人民解放军总医院南楼消化内镜诊疗科, wzq301@263.com

收稿日期: 2010-02-21 修回日期: 2010-04-30

接受日期: 2010-05-10 在线出版日期: 2010-05-28

Morbidity analysis of functional gastrointestinal disease in soldiers in the area affected by the Wenchuan earthquake

Ming-Yang Li, Zhi-Qiang Wang, Gang Sun, Yun-Sheng Yang

Ming-Yang Li, Zhi-Qiang Wang, Gastrointestinal Endoscopy Center, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China

Gang Sun, Yun-Sheng Yang, Department of Gastroenterology, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China

Correspondence to: Zhi-Qiang Wang, Gastrointestinal Endoscopy Center, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China. wzq301@263.com

Received: 2010-02-21 Revised: 2010-04-30

Accepted: 2010-05-10 Published online: 2010-05-28

Abstract

AIM: To analyze the incidence and risk factors of functional gastrointestinal disease (FGID) in soldiers in the area affected by the Wenchuan earthquake.

METHODS: Using random sampling method, a questionnaire survey was performed in soldiers in the area affected by the Wenchuan earthquake. FGID was diagnosed according to the Rome III criteria. Sleep investigation was performed to analyze the risk factors for FGID.

RESULTS: Of 903 soldiers surveyed, 387 (42.86%) were diagnosed with FGID; 42 (4.65%) had functional esophageal disease, 79 (8.75%) had functional gastroduodenal disease, 94 (10.41%) had functional enteric disease, 84 (9.30%) had functional abdominal pain syn-

drome, 27 (2.99%) had gallbladder dysfunction or oddis sphincter dysfunction, 61 (6.76%) had functional proctalgia or rectalgia. Of all FGID soldiers, 95.28% had sleep duration > 6 h/d before the earthquake, and only 75.62% had such sleep duration after the earthquake. Significant differences were noted in sleep latency, sleep maintenance, sleep quality, and daytime discomfort between soldiers with and without FGID (all $P < 0.01$). The incidence of FGID was significantly higher in first-line soldiers than in other ones.

CONCLUSION: There is a relatively high incidence of FGID in soldiers in the area affected by the Wenchuan earthquake. The incidence of FGID is significantly higher in first-line soldiers than in other ones. The incidence of post-earthquake FGID is related to sleep alterations.

Key Words: Functional gastrointestinal disease; Wenchuan; Earthquake

Li MY, Wang ZQ, Sun G, Yang YS. Morbidity analysis of functional gastrointestinal disease in soldiers in the area affected by the Wenchuan earthquake. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(15): 1594-1597

摘要

目的: 分析汶川地震中抗震军人的功能性胃肠病(functional gastrointestinal disease, FGID)发病情况及相关因素。

方法: 采用整群随机抽样方法, 对抗震部队进行问卷调查, 按照罗马Ⅲ标准诊断FGID, 并根据睡眠调查情况, 分析相关因素。

结果: 903名抗震军人中, 诊断为FGID的387例(42.86%)。其中, 诊断为功能性食管疾病的42例(4.65%); 诊断为功能性胃十二指肠病的79例(8.75%); 诊断为功能性肠道疾病的94例(10.41%); 诊断为功能性腹痛综合征的84例(9.31%); 诊断为胆囊和Oddi括约肌功能障碍27例(2.99%); 诊断为功能性肛门直肠痛61例(6.76%)。FGID军人震前睡眠时间>6 h/d的占95.28%, 震后睡眠时间>6 h/d的占75.62%。

■同行评议者

冯志杰, 主任医师, 河北医科大学第二医院消化内科; 张筱茵, 副教授, 中国人民解放军第四军医大学西京医院消化疾病研究所

FGID军人在睡眠潜伏期延长、睡眠维持障碍、睡眠质量下降、因睡眠不足而白天感到不适等方面均有显著差异($P<0.01$)。抗震中, 分工不同的军人, FGID患病率各不相同, 一线抗震官兵的患病率为59.47%, 明显高于其他抗震人员。

结论: 汶川地震后抗震军人的FGID发病率较高, 其中一线部队的患病率显著增高。震后FGID的发生与睡眠状况变差有关。

关键词: 功能性胃肠病; 汶川; 地震

李明阳, 王志强, 孙刚, 杨云生. 军人在汶川地震中功能性胃肠病发病的调查及相关因素. 世界华人消化杂志 2010; 18(15): 1594-1598
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/1594.asp>

0 引言

功能性胃肠病(functional gastrointestinal disease, FGID)是常见的证候群。国外文献报道, 总患病率为10%-25%^[1]。自从罗马III标准实施以来, 国内尚未有大标本的临床调查^[2]。本研究对汶川地震中参加抗震抢险的军人进行问卷调查, 并对FGID的发病情况及相关因素进行分析。

1 材料和方法

1.1 材料 以四川汶川地震中参与都江堰地区抗震抢险的军人903名作为调查对象, 年龄为18-28(平均年龄 20.34 ± 2.21)岁, 均为男性。

1.2 方法

1.2.1 抽样: 整群随机抽样方法如下: 以都江堰城区的东、南、西、北方向各抽一支驻军, 军种不限。

1.2.2 调查问卷: 问卷根据罗马III标准设计。包括: 姓名、性别、年龄(军龄)、职业(兵种)、文化程度等一般情况; 参与抗震的具体工作; 既往有无腹部大手术、消化性溃疡、炎性肠病、药物过敏、个人性格; 消化系统症状、表现的详细描述及解释; 睡眠情况等5个领域。

1.2.3 诊断标准: FGID的诊断主要根据罗马III标准。罗马III标准是目前全球用于诊断、治疗FGID的共识性文件。排除标准是既往史中有腹部大手术、消化性溃疡、炎性肠病(溃疡、克罗恩病)等病史。在胆囊和Oddi括约肌功能障碍的诊断中, 胆囊功能紊乱的诊断必须具备以下6条: (1)符合胆囊和Oddi括约肌功能障碍的诊断标准; (2)胆囊在位; (3)肝酶、结合胆红素淀粉酶/脂肪

表 1 各类型FGID患病率排序 ($n=903$)

疾病	<i>n</i>	患病率(%)
功能性肠道疾病	94	10.41
功能性腹痛综合征	84	9.31
功能性胃十二指肠病	79	8.75
功能性肛门直肠痛	61	6.76
功能性食管疾病	42	4.65
胆囊和Oddi括约肌功能障碍	27	2.99

酶正常; (4)无胆囊结石、胆泥及微小结石; (5)胆囊排空异常; (6)胆囊切除术后超过12 mo以上无复发性疼痛。功能性胆道Oddi括约肌疾病的诊断必须具备以下2条: (1)符合胆囊和Oddi括约肌功能障碍的诊断标准; (2)淀粉酶/脂肪酶正常。功能性胰腺Oddi括约肌功能障碍的诊断必须具备以下2条: (1)符合胆囊和Oddi括约肌功能障碍的诊断标准; (2)淀粉酶/脂肪酶升高。

1.2.4 调查: 此次去往抗震前线调查的消化专科医师均为主治医师以上人员构成, 具有多年的消化专业临床经验, 均具有硕士以上学历。在都江堰地区当地医院消化专业医师的协助下完成调查及填表。调查结束后, 复核问卷, 准确率97.9%。

统计学处理 用Epidata录入数据, SPSS13.0统计分析软件包进行统计分析。计数资料组间比较采用卡方检验, 等级资料采用Wilcoxon秩和检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

903名抗震军人中, 诊断为FGID的387例(42.86%, 387/903)。其中, 诊断为功能性食管疾病的42例(4.65%, 42/903); 诊断为功能性胃十二指肠病的79例(8.75%, 79/903); 诊断为功能性肠道疾病的94例(10.41%, 94/903); 诊断为功能性腹痛综合征的84例(9.30%, 84/903); 诊断为胆囊和Oddi括约肌功能障碍27例(2.99%, 27/903); 诊断为功能性肛门直肠痛61例(6.76%, 61/903)。FGID军人震前睡眠时间 >6 h/d的占95.09%(369/387), 震后睡眠时间 >6 h/d的占57.10%(221/387)。FGID军人在睡眠潜伏期延长、睡眠维持障碍、睡眠质量下降、因睡眠不足而白天感到不适等方面均有显著差异($P<0.01$)。抗震中一线抗震官兵的患病率为59.47%(292/491), 明显高于基地留守及后勤人员的患病率为17.56%(39/222)及医护人员的患病率为33.11%(51/154)。功能性肠道疾病的症

■研发前沿

自从2006年罗马III标准颁布后, 国内外尚无在地震后利用该标准对抗震一线人员进行大样本临床调查。本调查结果显示抗震军人的FGID发病率为42.86%, 显著高于国外报道的10%-25%。国外调查多为平时状态下, 而非地震等特大自然灾害后, 目前尚缺少国外在地震后的调查资料。

■相关报道

Vege等报道在睡眠障碍患者中功能性胃肠病的发病率较高, 而且睡眠障碍是IBS的独立相关因素。

■创新盘点

本文为首次对汶川地震发生后抗震一线军人的功能性胃肠病的发病及相关因素进行调查报道,并且利用罗马Ⅲ标准诊断功能性胃肠病,深入分析了抗震军人的睡眠情况及分工不同在FGID发病中的影响。

表 2 抗震军人FGID发病与睡眠情况的相关因素分析

睡眠情况	FGID(<i>n</i> = 387)		<i>P</i> 值
	震前	震后	
睡眠时间<6 h	22	90	<0.05
睡眠潜伏期延长	146	194	
睡眠维持障碍	99	221	
睡眠质量下降	149	187	
因睡眠不足白天感到不适	138	197	

表 3 抗震军人FGID前10位症状列表

症状	次数	%
腹痛	178	19.7
腹胀	159	17.6
便秘	121	13.4
恶心	99	10.9
排便障碍	87	9.6
腹泻	84	9.3
烧心	81	8.9
胸痛	47	5.2
癔球症	41	4.5
呕吐	35	3.9

状主要表现为腹胀(37.1%)、便秘(28.4%)、腹泻(19.6%)、无规律的腹痛(6.2%)和非特异性肠道症状(8.7%)(表1-4)。

3 讨论

FGID是胃肠道感觉和/或运动功能紊乱引起的疾病,其所导致的症状通常无法用器质性病变或生化异常来解释。按照罗马Ⅲ标准^[3](Rome III, 2006-05),将成人FGID分为6大类28小类,将儿童FGID分为2大类17小类。其中,成人FGID分为功能性食管疾病(功能性烧心、推测源自食管的功能性胸痛、功能性吞咽困难、癔球症),功能性胃十二指肠疾病(功能性消化不良、嗝气症、恶心呕吐、反刍综合征),功能性肠道疾病(肠易激综合征、功能性腹胀、功能性便秘、功能性腹泻、非特异性功能性肠病),功能性腹痛综合征,胆囊和Oddi括约肌功能障碍(胆囊功能障碍、功能性胆道Oddi括约肌疾病、胰腺Oddi括约肌功能障碍),功能性肛门直肠疾病(功能性大便失禁、功能性肛门直肠痛、功能性排便障碍)^[2]。

FGID有着较高的患病率,根据国内外不同文献报道,患病率相差较大。欧洲、北美国家为10%-15%,亚洲国家大多在5%-8%^[4]。我国北京地区18-70岁人群大样本流行病学调查,患病率

表 4 抗震军人FGID发病与分工不同的相关因素分析

人员分工	FGID		合计
	-	+(%)	
一线抗震官兵	199	292(59.47)	491
基地留守及后勤人员	183	39(17.56)	222
医护人员	103	51(33.11)	154
其他	31	5(13.89)	36
合计	516	387(42.86)	903

为0.82%(Rome II标准)^[5]。国内尚未有根据罗马Ⅲ标准的大样本调查^[6]。

汶川地震发生后,我们对部分参加抗震的军人进行调查。在全部903名受访人员中,总的患病率为42.86%,明显高于国内外文献报道值^[4,5]。地震作为应激因素,对抗震军人的精神、情绪以及心理状态产生了影响。根据“生物-心理-社会医学”模式分析,抗震军人FGID较高的患病率应该与地震后紧张、焦虑的心理状态、工作强度大、工作及居住环境差和睡眠情况显著变差有关^[7]。社会因素所造成的心理、精神障碍是FGID的发病原因之一^[8],睡眠障碍是机体对应激事件最早出现的客观体验,也是增加胃肠道症状发生的主要影响因素^[9-12]。

本调查研究显示,在FGID的各类型疾病中,功能性肠道疾病发生率最高(10.41%),胆囊和Oddi括约肌功能障碍发生率最低(2.99%)。在FGID的各种症状中,腹痛、腹胀、便秘、恶心、排便障碍、腹泻、烧心、肛门痛、癔球症及呕吐等症状的发生率高于其他症状。功能性肠道疾病的高发生率可能与肠道自主神经功能的高敏感性有关,腹痛、腹胀、便秘、腹泻等临床症状的高发可能与功能性胃肠病的各亚类疾病之间存在重叠现象有关。

FGID军人震前睡眠时间>6 h/d的占95.09%(369/387),震后睡眠时间>6 h/d的占57.10%(221/387)。FGID军人睡眠情况显著变差还表现为:睡眠潜伏期延长(入睡困难,入睡时间>30 min)、睡眠维持障碍(频繁觉醒,夜间觉醒次数>2次/晚)、睡眠质量下降(睡觉浅、多梦)、因睡眠不足而白天感到不适(早醒伴乏力)等4个方面,且上述4个方面均有显著差异(*P*<0.05)。文献报道^[9],睡眠障碍是FGID患者常见的非消化系表现,也是功能性胃肠病的重要影响因素,睡眠障碍与功能性胃肠病互为因果。本调查得出结果提示,患有FGID的军人震后睡眠时间>6 h的人数较震前显著减少。高强度的营救和重建

工作、紧张的精神因素、恶劣的自然环境以及居住环境, 导致抗震军人在睡眠过程中出现入睡困难、频繁觉醒、睡眠浅、多梦、白天感到乏力等表现。睡眠障碍是引起抗震军人FGID高患病率的关键因素。目前关于睡眠障碍与功能性胃肠疾病的相互影响机制尚不明确, 睡眠障碍可能是作为一种应激因素作用于胃肠道, 引起其运动障碍; 功能性胃肠病的症状又进一步影响了睡眠质量^[13]。

本次调查结果显示, 军人FGID的发病与抗震工作分工不同有一定的关系。在抗震一线军人中, FGID的发病率为59.47%, 明显高于基地留守人员(17.56%)及医护人员(33.11%)的发病率, 提示抗震一线军人的高患病率与应激暴露时间长、强度大、应激性症状发生频繁有关^[14,15]。抗震一线军人直接面对严重破坏的地震灾难现场, 心理、精神、情绪等受到巨大冲击, 不分昼夜的抢救伤员, 劳动时间长, 是造成其FGID高发病率的重要原因。

4 参考文献

- 1 Vege SS, Locke GR 3rd, Weaver AL, Farmer SA, Melton LJ 3rd, Talley NJ. Functional gastrointestinal disorders among people with sleep disturbances: a population-based study. *Mayo Clin Proc* 2004; 79: 1501-1506
- 2 姚欣, 杨云生. 从罗马Ⅱ到罗马Ⅲ—功能性胃肠病分类和诊断的变迁. *临床军医杂志* 2007; 35: 760-762
- 3 罗马委员会. 功能性胃肠病的罗马Ⅲ诊断标准. 现代

- 消化及介入诊疗 2007; 12: 137-140
- 4 Locke GR 3rd. The epidemiology of functional gastrointestinal disorders in North America. *Gastroenterol Clin North Am* 1996; 25: 1-19
- 5 平丽, 李瑜元, 聂玉强, 苏华. 体检人群中功能性胃肠病的患病情况调查. *中华消化杂志* 2002; 22: 190-192
- 6 宗春华, 周惠清, 李定国. 全国城市中、小学生功能性消化不良现状调查. *中华消化杂志* 2008; 28: 230-232
- 7 韩聚强, 李恕军, 冯军, 杨永红, 夏卫红, 马亚群, 赵京, 孙天胜. 震后灾区居民胃肠道应激症状现状调查. *中国健康教育* 2009; 25: 278-282
- 8 Locke GR 3rd, Weaver AL, Melton LJ 3rd, Talley NJ. Psychosocial factors are linked to functional gastrointestinal disorders: a population based nested case-control study. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 350-357
- 9 何剑琴, 王伟岸, 胡品津, 陈为. 肠易激综合征患者睡眠质量特征. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 744-747
- 10 Jarrett M, Heitkemper M, Cain KC, Burr RL, Hertig V. Sleep disturbance influences gastrointestinal symptoms in women with irritable bowel syndrome. *Dig Dis Sci* 2000; 45: 952-959
- 11 Mazure CM, Maciejewski PK, Jacobs SC, Bruce ML. Stressful life events interacting with cognitive/personality styles to predict late-onset major depression. *Am J Geriatr Psychiatry* 2002; 10: 297-304
- 12 Keefer L, Stepanski EJ, Ranjbaran Z, Benson LM, Keshavarzian A. An initial report of sleep disturbance in inactive inflammatory bowel disease. *J Clin Sleep Med* 2006; 2: 409-416
- 13 Chen CL, Lin HH. Gastric dysrhythmias and transient sleep impairment in healthy subjects. *Dig Dis Sci* 2004; 49: 176-179
- 14 韩聚强, 杨永红, 冯军. “5.12汶川大地震”灾后抗震救灾部队官兵健康状况调查研究. *现代预防医学* 2009; 36: 903-907
- 15 韩聚强, 冯军, 孙天胜. 部队官兵应对突发性灾难事件机体应激性疾病的预防. *中国健康教育* 2009; 25: 392-393

■应用要点

本文调查结果显示, 地震作为应激因素是造成抗震军人FGID高发病率的重要原因。应激条件下, 改善抗震军人的睡眠情况、降低劳动强度、缓解精神紧张因素、改善居住条件可能对减少FGID的发病有所帮助。

■同行评价

本研究可了解在突发事件下军人功能性胃肠病的发病情况及特点, 对进一步提高军队战斗力具有一定的临床意义。

编辑 李军亮 电编 何基才

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

• 消息 •

汤姆森—路透公布 2008 年 WJG 影响因子 2.081

本刊讯 据汤姆森-路透科技信息集团2009-06-19发布《期刊引证报告》(*Journal Citation Reports*)的统计结果: *World Journal of Gastroenterology(WJG)*的总被引次数(TC): 10 822; 影响因子(IF): 2.081; 即年指数: 0.274; 论文数量: 1 112; 半衰期: 3.1; 特征因子(EF): 0.05006。特征因子这个指标是今年期刊引证报告里新加的一个指标。与影响因子不同的是, 这个指标不仅考察了引文的数量, 而且考虑了施引期刊的影响力, 即: 某期刊如果越多地被高影响力的期刊引用, 则该期刊的影响力也越高。正如Google考虑超链接的来源, 特征因子也充分考虑引文的来源, 并在计算中赋予不同施引期刊的引文以不同的权重。特征因子分值的计算基于过去5年中期刊发表的论文在期刊引证报告统计当年的被引用情况。与影响因子比较, 期刊特征因子分值的优点主要有: (1)特征因子考虑了期刊论文发表后5年的引用时段, 而影响因子只统计了2年的引文时段, 后者不能客观地反映期刊论文的引用高峰年份; (2)特征因子对期刊引证的统计包括自然科学和社会科学, 更为全面、完整; (3)特征因子的计算扣除了期刊的自引; (4)特征因子的计算基于随机的引文链接, 通过特征因子分值可以较为合理地测度科研人员用于阅读不同期刊的时间。在55种国际胃肠病学和肝病学期刊中, *WJG*的EF, TC和IF分别名列第6, 9, 32位。(WJG编辑部主任: 程剑侠 2009-06-19)

饮酒与肝功能及红细胞参数的关系

吴永梅, 侯振江

■背景资料

随着我国社会经济的发展和生活水平的提高, 生活习惯和饮食结构发生明显的改变, 嗜酒者逐渐增多, 对人体各脏器的损害日趋突出, ALD的发病率已成为仅次于病毒性肝炎的第二大肝病。因此探讨ALD的监测指标成为目前研究的焦点。

吴永梅, 河北省黄骅市人民医院检验科 河北省黄骅市 061100

侯振江, 沧州医学高等专科学校医学技术系 河北省沧州市 061001

作者贡献分布: 吴永梅与侯振江贡献均等。

通讯作者: 侯振江, 教授, 061001, 河北省沧州市, 沧州医学高等专科学校医学技术系. houzhenjiang@sina.com

电话: 0317-5507809

收稿日期: 2010-02-05 修回日期: 2010-04-29

接受日期: 2010-05-10 在线出版日期: 2010-05-28

Correlation of liver function and red blood cell parameters with repeat drinking in alcohol-dependent patients

Yong-Mei Wu, Zhen-Jiang Hou

Yong-Mei Wu, Department of Clinical Laboratory, Huanghua People's Hospital, Huanghua 061100, Hebei Province, China.

Zhen-Jiang Hou, Department of Medical Technology, Cangzhou Medical College, Cangzhou 061001, Hebei Province, China

Correspondence to: Professor Zhen-Jiang Hou, Department of Medical Technology, Cangzhou Medical College, Cangzhou 061001, Hebei Province, China. houzhenjiang@sina.com

Received: 2010-02-05 Revised: 2010-04-29

Accepted: 2010-05-10 Published online: 2010-05-28

Abstract

AIM: To study the correlation of liver function and red blood cell parameters with repeat drinking in alcohol-dependent patients.

METHODS: Three hundred and twelve alcohol-dependent patients and 40 normal subjects were selected and compared in this study. The investigation included general state of health as well as liver function and red blood cell parameters. The correlation of liver function and red blood cell parameters with alcohol consumption and drinking time was then analyzed.

RESULTS: Compared with normal controls, alanine transaminase (ALT), aspartate transaminase (AST), gamma-glutamyl transpeptidase (GGT), cholyglycine (CG), mean corpuscular volume (MCV) and mean corpuscular hemoglobin (MCH) rose significantly, and hematocrit

declined significantly in alcohol-dependent patients (all $P < 0.001$). The changes in these parameters are correlated with alcohol consumption and drinking time ($r = 0.61$ and 0.59 , respectively; both $P < 0.01$).

CONCLUSION: Repeat drinking may result in abnormal liver function and red blood cell parameters in alcohol-dependent patients. Dynamic monitoring of GGT, ALT and AST is conducive to the diagnosis of alcoholic liver disease. MCV can be used as a parameter for evaluation of dangerous alcohol drinking.

Key Words: Alcohol dependence; Red blood cell parameter; Liver function; Repeat drinking

Wu YM, Hou ZJ. Correlation of liver function and red blood cell parameters with repeat drinking in alcohol-dependent patients. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(15): 1598-1601

摘要

目的: 探讨饮酒与肝功能及红细胞参数的相关性。

方法: 选择我院2007-2009年住院的酒精性肝病(alcoholic liver disease, ALD)患者312例, 与年龄相仿的正常非饮酒者40例作对照, 进行肝功能和红细胞参数的测定, 并与饮酒量和饮酒时间进行比较。

结果: 酒精性肝病患者丙氨酸氨基转移酶(ALT)、门冬氨酸氨基转移酶(AST)、谷氨酰转氨酶(GGT)、甘氨酸胆酸(CG)和平均红细胞体积(MCV)、平均血红蛋白量(MCH)均显著高于对照组($P < 0.001$), 而红细胞比容(HCT)显著下降($P < 0.001$), 其变化与饮酒时间和饮酒量密切相关($r = 0.61, 0.59$, 均 $P < 0.01$)。

结论: 长期饮酒可导致肝酶和红细胞参数异常, 动态监测饮酒者GGT、ALT和AST有助于酒精性肝病的诊断, MCV可作为危险饮酒的监测指标。

关键词: 酒精依赖; 红细胞参数; 肝功能; 反复饮酒

■同行评议者

张小晋, 主任医师, 北京积水潭医院消化内科

吴永梅, 侯振江. 饮酒与肝功能及红细胞参数的关系. 世界华人消化杂志 2010; 18(15): 1598-1601
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/1598.asp>

0 引言

随着我国社会经济的提高和生活水平的提高, 生活习惯和饮食结构发生了明显的改变, 嗜酒者逐渐增多, 饮酒对人体各脏器的损害日趋突出, 酒精性肝病(alcoholic liver disease, ALD)已有明显增加趋势, 发病率仅次于病毒性肝炎^[1]. ALD包括酒精性脂肪肝(alcoholic fatty liver, AF)、酒精性肝炎(alcoholic hepatitis, AH)和酒精性肝硬化(alcoholic cirrhosis, AC)^[2]. 早期的酒精性肝损伤可以逆转, 戒酒和治疗后可逐渐恢复, 但AH演变为肝纤维化和肝硬化则不易逆转^[3]. 因此, 早期诊断及戒酒和及时治疗更为重要. 本文对312例ALD病例进行回顾性分析, 并比较与饮酒量和饮酒时间的关系, 以探讨饮酒与肝功能和红细胞参数的相关性.

1 材料和方法

1.1 材料 病例来自我院2007-01/2009-12住院的ALD患者312例, 均为男性, 年龄为32-68岁, 平均43.8岁±10.4岁. 入选标准根据2002-10中华医学会肝病分会脂肪肝、酒精性肝病组制定的酒精性肝病诊断标准(草案)^[4]: (1)有长期饮酒史, 一般超过5年, 日折合酒精量超过40 g; (2)禁酒后ALT、AST、GGT明显下降, 4 wk内恢复正常, 即在2倍正常上限值以下; (3)诊断时注意是否合并HBV或HCV感染, 除外代谢异常和药物等引起的肝损伤; (4)诊断参考AST/ALT>2. 排除其他内科疾患引起的肝功能异常、自身免疫性肝病和药物性肝炎, 其中AF 149例(47.8%)、AH 108例(34.6%)和AC 55例(17.6%). 对照组40例均为我院健康体检的男性职工, 无心、肝、肺、肾等重要脏器疾病, 肝、肾功能试验正常, 甲型肝炎、乙型肝炎、丙型肝炎标志物均阴性, 年龄在25-60岁, 无长期饮酒史.

1.2 方法

1.2.1 肝功能测定: 采集清晨空腹静脉血3 mL, 及时分离血清备用. 试剂盒由北京首医临床医学科技中心提供, 用日立7600全自动生化分析仪测定ALT(>50 U/L为异常)、AST(>40 U/L为异常)、GGT(>54 U/L为异常)等指标.

1.2.2 红细胞参数测定: 乙二胺四乙酸二钾(EDTA-K)抗凝, 用sysmex XT-1800i全自动血液

分析仪测定.

1.2.3 日乙醇摄入量计算: 日乙醇摄入量(g) = 饮酒量(mL)×酒精度数×0.8.

统计学处理 所有数据用SPSS13.0统计软件处理, 结果以mean±SD表示, 两组之间比较采用t检验, $P<0.01$ 有统计学意义.

2 结果

2.1 对照组及患者ALT、GGT、AST及CG含量 ALT与AST、GGT、CG均呈显著正相关($r = 0.634, 0.714, 0.667$), 说明随血清ALT水平的升高, 其AST、GGT、CG水平也随之升高(表1).

2.2 酒精性肝病组与对照组红细胞参数的比较 酒精性肝病组与对照组红细胞参数的比较见表2.

2.3 日摄入乙醇量不同对肝功能的影响 日摄入乙醇量与肝功能的关系见表3.

2.4 日摄入乙醇量不同对红细胞参数的影响 日摄入乙醇量对红细胞参数的影响见表4.

3 讨论

肝脏是酒精代谢的唯一器官, 白酒中的主要成分乙醇占90%-95%, 进入人体后的酒精约有90%-95%的经肝脏代谢^[5], 2%-10%经肾和肺排出. 正常饮酒后1 h左右血中的浓度即可达到高峰, 肝脏以每小时7-8 g的速度迅速氧化分解, 经过肝乙醇脱氢酶、过氧化氢体分解酶和肝微粒体乙醇氧化酶系三条途径氧化为毒性较强的中间产物乙醛而损害肝脏^[6]. 加之乙醇在嗜酒者肝脏的代谢率和耗氧量增加等综合因素, 易引起肝细胞代谢紊乱. 乙醇及其代谢产物可对肝细胞、炎症细胞、肝星状细胞等产生致敏性损伤^[7]. 长期过度饮酒, 可影响肝脏的代谢功能, 使肝细胞受损, 造成肝脏不同程度的病变, 轻者有脂肪变性, 重者形成AH和肝纤维化, 再发展则导致不可逆转的肝硬化. 当今世界, 酗酒是一个重要的公共卫生问题, 目前嗜酒者在人群中的比例成倍增长, 嗜酒者的死亡率比一般人群高1-3倍, 其肝病、神经系统疾患、心血管病的发病率比一般人群高20%, ALD在西方国家较常见, 在饮酒人群中患病率达84%, 使肝细胞变性、坏死, 并发炎症反应. 因此, 酒精不仅能使健康人发生酒精性肝病, 还会加重肝炎后肝硬化患者的肝功能损害. 国外资料表明, 长期嗜酒不仅影响中枢神经系统、消化系统、血液系统, 还影响心血管系统、泌尿生殖系统、内分泌系统、肌肉骨骼系统等^[8], 尤以前三者为主.

■ 相关报道

宋佐莉等用ROC曲线评价ALD实验室诊断指标的价值, 发现GGT对ALD诊断的曲线下面积和敏感性与缺糖转铁蛋白很接近, 均在0.80以上, 可作为诊断ALD的辅助指标. 孙捷等认为GGT、ALT和AST与饮酒量成正比, 其中以GGT为著, 其次为AST, 且饮酒者随酒精摄入量的增加, MCV逐渐升高.

■创新盘点

动态监测饮酒者GGT、ALT和AST活性变化有助于ALD的诊断, MCV逐渐升高有可能成为危险饮酒的监测指标. 因此, 对长期饮酒者进行肝酶和红细胞参数等相关指标的监测有助于ALD的早期诊断和防治.

表 1 对照组与患者ALT、GGT、AST及CG含量测定结果比较 (mean ± SD)

分组	<i>n</i>	ALT(U/L)	GGT(U/L)	AST(U/L)	CG(μg/L)
酒精性脂肪肝	149	134.4 ± 71.2 ^b	89.4 ± 20.2 ^b	67.9 ± 5.2	268.4 ± 118.2 ^b
酒精性肝炎	108	631.5 ± 216.4 ^b	214.5 ± 69.4 ^b	229.0 ± 17.3	2641.2 ± 993.5 ^b
酒精性肝硬化	55	460.6 ± 96.3 ^b	233.1 ± 78.3 ^b	410.2 ± 84.5	2323.1 ± 876.2 ^b
对照组	40	15.2 ± 6.9	40.1 ± 16.6	29.0 ± 6.3	68.3 ± 20.8

^b*P* < 0.01 vs 对照组.

表 2 酒精性肝病组与对照组红细胞参数的比较 (mean ± SD)

分组	<i>n</i>	MCV(fL)	MCH(pg)	MCHC(g/L)	HCT(L/L)
酒精性脂肪肝	149	99.17 ± 5.60 ^a	43.27 ± 2.29 ^b	321.88 ± 6.11	0.384 ± 0.031 ^b
酒精性肝炎	108	102.30 ± 5.25 ^b	40.37 ± 2.71 ^b	345.66 ± 7.22	0.371 ± 0.051 ^b
酒精性肝硬化	55	112.71 ± 9.44 ^b	43.57 ± 4.78 ^b	332.18 ± 3.32	0.361 ± 0.023 ^b
对照组	40	91.99 ± 4.54	30.81 ± 3.54	332.92 ± 8.80	0.415 ± 0.022

^a*P* < 0.05, ^b*P* < 0.01 vs 对照组.

表 3 日摄入乙醇量与肝功能的关系 (*n*)

分组	<i>n</i>	ALT		AST		GGT	
		正常	异常	正常	异常	正常	异常
日摄入乙醇 < 20 g	237	14	223	13	224	9	228
20 g ≤ 日摄入乙醇 < 40 g	28	8	20	6	22	6	22
40 g ≤ 日摄入乙醇 < 80 g	26	11	15	4	22	5	21
日摄入乙醇 ≥ 80 g	21	8	23	5	16	5	16

表 4 日摄入乙醇量对红细胞参数的影响 (mean ± SD)

分组	<i>n</i>	MCV(fL)	MCH(pg)	MCHC(g/L)	HCT(L/L)
日摄入乙醇 < 20 g	237	90.52 ± 5.32	43.27 ± 4.58	341.11 ± 5.56	0.433 ± 0.046
20 g ≤ 日摄入乙醇 < 40 g	28	100.70 ± 5.71	40.37 ± 5.42	331.25 ± 7.22	0.404 ± 0.054
40 g ≤ 日摄入乙醇 < 80 g	26	101.51 ± 5.782	43.57 ± 4.78	332.18 ± 6.38	0.436 ± 0.048
日摄入乙醇 ≥ 80 g	21	105.49 ± 3.682	41.58 ± 5.52	312.31 ± 4.73	0.416 ± 0.055

近年来实验室诊断ALD的指标研究较多. 宋佐莉等^[9]用ROC曲线评价ALD实验室诊断指标的价值, 发现缺糖转铁蛋白(CDT)作为诊断ALD的指标, 其敏感性和特异性均高于GGT, 但现有的方法成本昂贵, 过程繁琐, 不利于普及推广, 而GGT对ALD诊断的曲线下面积和敏感性与CDT接近, 均在0.80以上, 虽然特异性稍欠缺, 但GGT的测定已高度标准化、自动化, 且价格便宜, 适于广泛应用, 也可作为ALD的辅助诊断指标^[10]. 孙捷等^[11]认为GGT、ALT和AST与饮酒量成正比, 其中以GGT为著, 其次为AST,

且饮酒者随酒精摄入量的增加, MCV逐渐升高. 郭永炼等^[12]对急性乙醇中毒患者检查发现, RBC、HGB、HCT、MCV、MCH、MCHC与正常对照组相比均增高. Alte等^[13]报道, 25%的酗酒者MCV增高. 本研究显示ALD患者RBC下降, MCV、MCH升高有极显著性差异(*P* < 0.001), Hb、HCT下降有显著性(*P* < 0.05). 这与37%的肝硬变患者MCV升高的报道一致^[14]. 可能与急性乙醇中毒处于应激状态, 水电解质、渗透压改变有关. 慢性酒精性肝病患者长期的营养缺乏, 胃肠道直接抑制吸收, 对造血干细胞的损害等

引起上述的改变。Avşaroglu等^[15]亦发现, 长期嗜酒者可致MCV、AST、GGT值的升高。对肝脏的损害与其他研究^[16]相仿, 表现为AST、ALT、AKP、GGT升高, 白蛋白下降。经住院治疗4 wk后, 各项指标有所恢复, 而RBC、白蛋白仍偏低($P<0.01$), MCV、GGT增高($P<0.001$), 说明经过一段时间治疗后, 患者躯体素质并未完全改善。笔者随访出院患者6 mo, 剔除2例死亡外, 对其余39例按复饮、未复饮分为2组进行相关分析, 研究显示入院时MCV、MCH与复饮相关性较高($r = 0.469, 0.487, P<0.01$), 而与文化程度、日饮酒量、饮酒时间、RBC、Hb、HCT以及肝功能状况无相关性或相关性极低。出院时MCV、MCH与复饮有相关性, 但程度下降($r = 0.387, 0.407, P<0.05$)。国外有研究显示Hb、HCT和复饮有较强相关性^[17]。

本研究结果表明, 长期饮酒组较对照组ALT、AST、GGT指标明显升高, 其变化与饮酒时间和饮酒量密切相关($r = 0.61$ 和 $0.59, P<0.01$)。主要因为正常饮酒后1-1.5 h血中乙醇浓度达到高峰, 乙醇在体内迅速分解, 并产生毒性较强的中间产物乙醛。因此, 在酒精长期作用下致使ALT、AST、GGT升高。另外, 酒精对肝细胞线粒体也有特殊的损害作用, 追踪测定AST及ALT, 还可判断肝细胞线粒体损伤的范围和类型。酒精还可引起胆汁淤积, 对肝合成 γ -GGT有诱导作用, 还可损害 γ -GGT的微粒体, 使其大量释放入血引起 γ -GGT明显升高。随日饮酒量增加, 其MCV逐渐增高, 因此, MCV的检测可作为监测长期大量饮酒者有无肝细胞损伤简单而有效的方法。

4 参考文献

1 王吉耀. 内科学(上、下册). 第1版. 北京: 人民卫生出

- 版社, 2006: 487
- 2 鲁晓岚, 陶明, 罗金燕, 耿燕, 赵平, 赵红莉. 西安酒精性肝病流行病学. 世界华人消化杂志 2003; 11: 719-722
- 3 侯振江. 现代实验诊断与临床. 第1版. 北京: 台海出版社, 2001: 221
- 4 酒精性肝病的诊断标准. 中华医学会肝脏学分会脂肪肝和酒精性肝病学组. 中华肝病杂志 2003; 11: 72-73
- 5 冯志强, 沈志祥, 谭诗云. 酒精性脂肪肝的发病机制研究进展. 世界华人消化杂志 2002; 10: 346-348
- 6 李姗姗. 酒精性肝病的实验室诊断的临床研究. 中国实验诊断学 2009; 13: 85-87
- 7 程德希. 酒精性脂肪肝患者戒酒前后血脂和血清酶的变化. 实用医学杂志 2009; 25: 1071-1072
- 8 汤义平, 陆强, 徐学明, 赵群峰, 袁银虹. 酒依赖患者肝功能、红细胞参数状况及与复饮相关性的研究. 现代中西医结合杂志 2007; 16: 4750-4751, 4760
- 9 宋佐莉, 刘树业, 丁贤. 应用ROC曲线评价酒精性肝病实验室诊断指标的价值. 临床肝胆病杂志 2008; 24: 353-354
- 10 Sillanauke P, Olsson U. Improved diagnostic classification of alcohol abusers by combining carbohydrate-deficient transferrin and gamma-glutamyltransferase. *Clin Chem* 2001; 47: 681-685
- 11 孙捷, 王春艳, 石晓东, 周海燕. 酒精摄入量与肝功能、平均红细胞体积的关系. 中国老年学杂志 2008; 28: 464-466
- 12 郭永炼, 吴统健, 孙林渥, 包炳辉, 邱温珠. 急性酒精中毒者血液红细胞参数的研究. 预防医学文献信息 2004; 10: 28-29
- 13 Alte D, Lüdemann J, Piek M, Adam C, Rose HJ, John U. Distribution and dose response of laboratory markers to alcohol consumption in a general population: results of the study of health in Pomerania (SHIP). *J Stud Alcohol* 2003; 64: 75-82
- 14 侯振江, 张宗英, 赵勇, 安国瑞, 耿素敏. 肝硬变患者红细胞血小板参数与直方图分析. 世界华人消化杂志 1998; 6: 138-139
- 15 Avşaroglu D, Inal TC, Demir M, Attila G, Acartürk E, Emre Evlice Y, Kayrin L. Biochemical indicators and cardiac function tests in chronic alcohol abusers. *Croat Med J* 2005; 46: 233-237
- 16 胡健, 冯磊光, 邬素萍. 慢性酒精中毒伴发营养不良和肝功能异常的研究. 中国临床营养杂志 2000; 8: 10-13
- 17 Pfefferbaum A, Rosenbloom MJ, Serventi KL, Sullivan EV. Brain volumes, RBC status, and hepatic function in alcoholics after 1 and 4 weeks of sobriety: predictors of outcome. *Am J Psychiatry* 2004; 161: 1190-1196

■同行评价

本文立意很好, 有很好的健康和临床指导意义。

编辑 李军亮 电编 吴鹏联

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》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。

妊娠期慢性乙型肝炎55例

哈明昊, 黎小珊, 卢晓玲, 温庆辉, 张曼莉

■背景资料

妊娠合并慢性乙型肝炎对母亲、胎儿危害极大; 尤其妊娠晚期慢性乙型肝炎患者肝功能损伤重, 重型肝炎发病率高。妊娠与慢性乙型肝炎互为不良因素, 慢乙型肝炎也可影响妊娠, 对孕妇和胎儿产生不良影响。

哈明昊, 黎小珊, 卢晓玲, 温庆辉, 张曼莉, 广东省东莞市人民医院感染科 广东省东莞市 523018

作者贡献分布: 哈明昊对此文作主要贡献; 此课题由哈明昊设计; 研究过程由哈明昊、黎小珊、卢晓玲、温庆辉及张曼莉操作完成; 研究用新试剂及分析工具由温庆辉提供; 数据分析由哈明昊、黎小珊及卢晓玲完成; 本论文写作由哈明昊、黎小珊及卢晓玲完成。

通讯作者: 哈明昊, 副主任医师, 博士, 523018, 广东省东莞市, 广东省东莞市人民医院感染科. hmh_1021@sina.com

电话: 0769-22223412-5505

收稿日期: 2010-01-09 修回日期: 2010-04-23

接受日期: 2010-04-27 在线出版日期: 2010-05-28

Pregnant women with chronic hepatitis B: an analysis of 55 cases

Ming-Hao Ha, Xiao-Shan Li, Xiao-Ling Lu, Qing-Hui Wen, Man-Li Zhang

Ming-Hao Ha, Xiao-Shan Li, Xiao-Ling Lu, Qing-Hui Wen, Man-Li Zhang, Department of Infectious Diseases, Dongguan People's Hospital, Dongguan 523018, Guangdong Province, China

Correspondence to: Ming-Hao Ha, Department of Infectious Diseases, Dongguan People's Hospital, Dongguan 523018, Guangdong Province, China. hmh_1021@sina.com

Received: 2010-01-09 Revised: 2010-04-23

Accepted: 2010-04-27 Published online: 2010-05-28

Abstract

AIM: To analyze the clinical and pathological characteristics of chronic hepatitis B in pregnancy and to explore the relationship between pregnancy and hepatitis B virus (HBV) infection.

METHODS: The clinical data of 55 pregnant women with chronic hepatitis B were retrospectively analyzed and compared with those of pregnant HBV carriers and normal pregnant women. The clinical and pathological characteristics of chronic hepatitis B in pregnancy were then analyzed.

RESULTS: The morbidity of hepatitis increased gradually with the increase in pregnancy duration. Compared with pregnant HBV carriers, ALT, AST, TBIL and DBIL significantly increased ($210.2 \text{ U/L} \pm 144.7 \text{ U/L}$ vs $22.7 \text{ U/L} \pm 11.6 \text{ U/L}$, $197.3 \text{ U/L} \pm 113.8 \text{ U/L}$ vs 19.1 U/L

$\pm 14.9 \text{ U/L}$, $64.9 \mu\text{mol/L} \pm 37.8 \mu\text{mol/L}$ vs $6.8 \mu\text{mol/L} \pm 5.8 \mu\text{mol/L}$, and $44.2 \mu\text{mol/L} \pm 23.8 \mu\text{mol/L}$ vs $4.8 \mu\text{mol/L} \pm 2.2 \mu\text{mol/L}$, respectively; all $P < 0.05$), and albumin and PTA decreased significantly ($31.3 \text{ G/L} \pm 7.3 \text{ G/L}$ vs $35.8 \text{ G/L} \pm 4.7 \text{ G/L}$; $66.4\% \pm 8.6\%$ vs $82.1\% \pm 8.7\%$, both $P < 0.05$) in pregnant women with chronic hepatitis B. The rates of HBeAg positivity and high HBV DNA load were especially higher in pregnant women with chronic hepatitis B than in other groups of subjects.

CONCLUSION: HBV infection in pregnant women occurs mainly during the middle to late stages of pregnancy. Many cases of chronic hepatitis B in pregnancy are serious. HBeAg positivity and high HBV DNA load could be used as parameters for predicting the occurrence of HBV infection.

Key Words: Pregnancy; Chronic hepatitis B; Hepatitis B virus; HBeAg

Ha MH, Li XS, Lu XL, Wen QH, Zhang ML. Pregnant women with chronic hepatitis B: an analysis of 55 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(15): 1602-1604

摘要

目的: 分析妊娠期慢性乙型肝炎发病特点和临床特征。

方法: 回顾性分析55例妊娠期慢性乙型肝炎患者的临床资料, 并与妊娠期乙型肝炎携带者(无症状妊娠组)及正常妊娠女性进行临床比较。

结果: 妊娠期慢性乙型肝炎发病集中于妊娠的中、晚期。与无症状妊娠组比较, 慢乙型肝炎妊娠组患者肝功能损害表现为ALT、AST、TBIL及DBIL明显升高($210.2 \text{ U/L} \pm 144.7 \text{ U/L}$ vs $22.7 \text{ U/L} \pm 11.6 \text{ U/L}$; $197.3 \text{ U/L} \pm 113.8 \text{ U/L}$ vs $19.1 \text{ U/L} \pm 14.9 \text{ U/L}$; $64.9 \mu\text{mol/L} \pm 37.8 \mu\text{mol/L}$ vs $6.8 \mu\text{mol/L} \pm 5.8 \mu\text{mol/L}$; $44.2 \mu\text{mol/L} \pm 23.8 \mu\text{mol/L}$ vs $4.8 \mu\text{mol/L} \pm 2.2 \mu\text{mol/L}$, 均 $P < 0.05$), 白蛋白、PTA降低($31.3 \text{ G/L} \pm 7.3 \text{ G/L}$ vs $35.8 \text{ G/L} \pm 4.7 \text{ G/L}$; $66.4\% \pm 8.6\%$ vs $82.1\% \pm 8.7\%$, 均 $P < 0.05$)。患者的病毒学特征表现为

■同行评议者

陈红松, 研究员, 北京大学人民医院肝病研究所; 范小玲, 主任医师, 北京地坛医院综合科

HBeAg阳性和HBV DNA高滴度.

结论: 妊娠期慢性乙型肝炎的发生多集中于妊娠的中、晚期; 临床类型以中、重度为主; HBeAg阳性和HBV DNA高滴度可作为妊娠期慢性乙型肝炎发生的预测指标.

关键词: 妊娠期; 慢性乙型肝炎; 乙型肝炎病毒; E抗原

哈明昊, 黎小珊, 卢晓玲, 温庆辉, 张曼莉. 妊娠期慢性乙型肝炎55例. 世界华人消化杂志 2010; 18(15): 1602-1604
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/1602.asp>

0 引言

妊娠期合并慢性乙型肝炎不仅常见, 而且易使肝炎病情加重, 有时还因病情重而被迫中止妊娠^[1-4]. 文献报道妊娠期慢性乙型肝炎的发病率、重型肝炎的发生率增加, 肝性脑病、肝肾综合征及感染等并发症明显超过非妊娠者^[5-9]. 但是对妊娠期慢性乙型肝炎发病特点和临床特征的研究尚不多见. 妊娠期慢性乙型肝炎发生的预测指标尚未明确, 从而未能建立预测妊娠期慢性乙型肝炎发生的临床模型. 本研究试就这一临床问题进行探讨.

1 材料和方法

1.1 材料 选取2009-01/2009-12在我院门诊就诊的妊娠合并乙型肝炎病毒(HBV)感染者115例, 其中慢性乙型肝炎组55例(慢乙型肝炎妊娠组), HBV携带者组60例(无症状妊娠组), 随机选择同期60例正常妊娠女性作为对照组. 3组妊娠妇女均无其他原发性疾病, 患者年龄、孕周相仿, 均无差异, 具有可比性.

1.2 方法 乙型肝炎诊断标准按2000年全国病毒性肝炎学术会议制定的标准诊断. 对3组患者检测肝功能、乙型肝炎两对半、HBV DNA、凝血功能.

统计学处理 3组间数据的比较采用单因素方差分析; 两组数据间比较采用 t 检验和 χ^2 检验; $P<0.05$ 被认为具有统计学意义.

2 结果

2.1 3组患者的肝功能检测结果比较 对照组、无症状妊娠组及慢乙型肝炎妊娠组肝功能检测结果比对分析发现: 与无症状妊娠组比较, 慢乙型肝炎妊娠组患者肝功能损害表现为ALT(22.7 ± 11.6 vs 210.2 ± 144.7 , $P<0.05$)、AST(19.1 ± 14.9

vs 197.3 ± 113.8 , $P<0.05$)、TBIL的明显升高(6.8 ± 5.8 vs 64.9 ± 37.8 , $P<0.05$), 白蛋白降低(35.8 ± 4.7 vs 31.3 ± 7.3 , $P<0.05$), PTA降低(82.1 ± 8.7 vs 66.4 ± 8.6 , $P<0.05$, 表1).

2.2 乙型肝炎两对半检测分析 与无症状妊娠组比较, 慢乙型肝炎妊娠组病毒学特征表现为HBeAg阳性率明显增高. E抗原(HBeAg)阳性者无症状妊娠组为14例, 慢乙型肝炎妊娠组为42例($P<0.05$). E抗体(HBeAb)阳性者无症状妊娠组46例, 慢乙型肝炎妊娠组13例($P<0.05$).

2.3 HBV DNA检测分析 HBV DNA检测下限为 1×10^3 copies/mL, 低于检测下限为HBV DNA阴性; HBV DNA检测结果为 1.1×10^3 - 9.9×10^4 copies/mL为HBV DNA低滴度; HBV DNA检测结果大于 1×10^5 copies/mL为HBV DNA高滴度(表2).

2.4 临床类型分布 慢性肝炎(轻度)14例(25.5%); 中度17例(30.9%); 重度24例(43.6%).

2.5 发病与孕周的关系 慢乙型肝炎妊娠组中, 妊娠早期(1-12 wk)发病10例(18.2%), 妊娠中期(13-27 wk)发病18例(32.7%), 妊娠晚期(28 wk以上)发病27例(49.1%).

3 讨论

慢性乙型肝炎是严重危害人类健康的传染病^[10,11], 妊娠与乙型肝炎互为不良因素影响, 慢性乙型肝炎也可影响妊娠的正常发展, 对母儿均可产生不良后果^[12,13]. 如流产、早产、死胎、低体重儿、新生儿窒息、新生儿垂直感染等^[14], 同时由于肝脏合成凝血因子功能减退, 出血倾向加重^[15], 易发生产后出血、妊高征、肝昏迷与剖宫产率增加等^[16]. 但是, 妊娠对慢性乙型肝炎病程转归的研究, 特别是妊娠前肝功能正常的慢性乙型肝炎患者, 妊娠中慢性乙型肝炎的发病率、临床类型及病毒学特征的研究尚不多见.

本研究发现, 妊娠前肝功能正常的慢性乙型肝炎患者发病多集中于妊娠的中、晚期. 妊娠中期(13-27 wk)发病18例(32.7%), 妊娠晚期(28 wk以上)发病27例(49.1%). 这与妊娠中、晚期, 妊娠加重肝脏负担、导致肝损加重; 由于维生素K的吸收、利用功能障碍, 肝内纤维蛋白等合成减少, 导致凝血功能障碍, PT延长有相关性.

在本研究中, 慢性乙型肝炎妊娠组患者肝功能损害表现为ALT、AST、TBIL的明显升高, 白蛋白降低, PTA减少. 慢性肝炎(轻度)14例(25.5%); 慢性肝炎(中度)17例(30.9%); 慢性肝炎(重度)24例(43.6%). 提示妊娠期慢性乙型肝炎发

■ 相关报道

刘一萍等发现母亲HBeAg阳性是婴儿发生HBV宫内传播的主要危险因素, 尤其是孕既往HBsAg携带分娩时HBeAg阳性是婴儿发生HBV宫内传播后形成乙型肝炎病毒携带的危险因素; 婴儿的免疫无应答判定为宫内感染; HBsAg阳性母亲妊娠过程中乙型肝炎加重, 同时也增大了宫内感染的危险.

■ 应用要点

本研究通过对妊娠期慢性乙型肝炎发生率预测指标的分析, 将能对准备妊娠及妊娠早期的患者提供指导性意见, 从而为早期临床干预治疗提供依据.

■同行评价

本文紧贴临床, 临床资料齐全, 条理清晰, 结果可靠, 结论明确, 具有一定的临床应用价值。

表 1 3组患者的肝功能检测结果比较

	对照组	无症状妊娠组	慢乙型肝炎妊娠组	P值
ALT(U/L)	20.3 ± 13.4	22.7 ± 11.6	210.2 ± 144.7	<0.05
AST(U/L)	18.2 ± 10.0	19.1 ± 14.9	197.3 ± 113.8	<0.05
TBIL(μmol/L)	7.2 ± 3.7	6.8 ± 5.8	64.9 ± 37.8	<0.01
DBIL(μmol/L)	4.7 ± 1.9	4.8 ± 2.2	44.2 ± 23.8	<0.01
ALB(g/L)	38.2 ± 3.8	35.8 ± 4.7	31.3 ± 7.3	<0.05
PTA(%)	94.3 ± 6.3	82.1 ± 8.7	66.4 ± 8.6	<0.05

表 2 HBV DNA检测分析

	无症状妊娠组	慢乙型肝炎妊娠组	P值
HBV DNA阴性	44	10	<0.05
HBV DNA低滴度	10	17	<0.05
HBV DNA高滴度	6	28	<0.05

病以中、重度为主。提示妊娠对慢性乙型肝炎的转归不利。

对慢乙型肝炎妊娠组和无症状妊娠组的比较分析发现: 慢乙型肝炎妊娠组HBeAg阳性和HBV DNA高滴度的患者明显多于无症状妊娠组。HBeAg阳性是提示HBV的复制和传染性高的指标, HBV DNA是对患者血中HBV复制状况的直观检测。本研究说明, 育龄患者中, HBeAg阳性和HBV DNA高滴度的患者在妊娠中晚期, 妊娠导致肝脏负担加重的情况下, 更容易发生中、重度的慢性肝炎。HBeAg阳性和HBV DNA高滴度可作为妊娠期慢性乙型肝炎发生的预测指标。

总之, 妊娠期慢性乙型肝炎的发生多集中于妊娠的中、晚期; 临床类型以中、重度为主; 患者的病毒学特征表现为HBeAg阳性和HBV DNA高滴度。

4 参考文献

- Shrestha P, Bhandari D, Sharma D, Bhandari BP. A study of viral hepatitis during pregnancy in Nepal Medical College Teaching Hospital. *Nepal Med Coll J* 2009; 11: 192-194
- Safir A, Levy A, Sikuler E, Sheiner E. Maternal hepatitis B virus or hepatitis C virus carrier status

as an independent risk factor for adverse perinatal outcome. *Liver Int* 2010; 30: 765-770

- Sinha S, Kumar M. Pregnancy and chronic hepatitis B virus infection. *Hepatol Res* 2010; 40: 31-48
- Shi Z, Li X, Ma L, Yang Y. Hepatitis B immunoglobulin injection in pregnancy to interrupt hepatitis B virus mother-to-child transmission-a meta-analysis. *Int J Infect Dis* 2010 Jan 25. [Epub ahead of print]
- Fiore S, Savasi V. Treatment of viral hepatitis in pregnancy. *Expert Opin Pharmacother* 2009; 10: 2801-2809
- Tharmaphornpilas P, Rasdjarmrearnsook AO, Plianpanich S, Sa-nguanmoo P, Poovorawan Y. Increased risk of developing chronic HBV infection in infants born to chronically HBV infected mothers as a result of delayed second dose of hepatitis B vaccination. *Vaccine* 2009; 27: 6110-6115
- Libbus MK, Phillips LM. Public health management of perinatal hepatitis B virus. *Public Health Nurs* 2009; 26: 353-361
- Sami S, Korejo R, Bhutta SZ. Prevalence of hepatitis B and C: a Jinnah Postgraduate Medical Centre experience. *J Obstet Gynaecol Res* 2009; 35: 533-538
- Tran TT. Management of hepatitis B in pregnancy: weighing the options. *Cleve Clin J Med* 2009; 76 Suppl 3: S25-S29
- Lee NM, Brady CW. Liver disease in pregnancy. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 897-906
- Liaw YF. Antiviral therapy of chronic hepatitis B: opportunities and challenges in Asia. *J Hepatol* 2009; 51: 403-410
- Chatterjee S, Ravishankar K, Chatterjee R, Narang A, Kinikar A. Hepatitis B Prevalence during pregnancy. *Indian Pediatr* 2009; 46: 1005-1008
- Peters MG. Special populations with hepatitis B virus infection. *Hepatology* 2009; 49: S146-S155
- Beasley RP. Rocks along the road to the control of HBV and HCC. *Ann Epidemiol* 2009; 19: 231-234
- Resuli B, Prifti S, Kraja B, Nurka T, Basho M, Sadiku E. Epidemiology of hepatitis B virus infection in Albania. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 849-852
- Jonas MM. Hepatitis B and pregnancy: an underestimated issue. *Liver Int* 2009; 29 Suppl 1: 133-139

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

门静脉高压症脾动脉栓塞术后再出血的断流术治疗

相亭海, 杜顺达, 巩本刚, 成丕光, 吴俊本, 张同军, 夏修良

相亭海, 巩本刚, 成丕光, 吴俊本, 张同军, 夏修良, 山东省滨州医学院附属滨州市人民医院肝胆外科 山东省滨州市 256600

杜顺达, 北京协和医院肝脏外科 北京市 100730

作者贡献分布: 相亭海与杜顺达对此文所作贡献均等; 本课题由相亭海与巩本刚设计; 研究过程由相亭海、巩本刚及杜顺达完成; 数据统计由成丕光、吴俊本、张同军及夏修良完成; 本文写作由相亭海、巩本刚及杜顺达完成。

通讯作者: 相亭海, 256600, 山东省滨州市, 山东省滨州医学院附属滨州市人民医院肝胆外科. xiangtinghai126@com

电话: 0543-3283293

收稿日期: 2010-01-25 修回日期: 2010-04-21

接受日期: 2010-04-27 在线出版日期: 2010-05-28

Devascularization operation for upper gastrointestinal rebleeding after partial splenic embolization in portal hypertensive patients

Ting-Hai Xiang, Shun-Da Du, Ben-Gang Gong, Pi-Guang Cheng, Jun-Ben Wu, Tong-Jun Zhang, Xiu-Liang Xia

Ting-Hai Xiang, Ben-Gang Gong, Pi-Guang Cheng, Jun-Ben Wu, Tong-Jun Zhang, Xiu-Liang Xia, Department of Hepatobiliary Surgery, Binzhou City People's Hospital Affiliated to Binzhou Medical College, Binzhou 256600, Shandong Province, China

Shun-Da Du, Department of Hepatic Surgery, Peking Union Medical College Hospital, Beijing 100730, China

Correspondence to: Ting-Hai Xiang, Department of Hepatobiliary Surgery, Binzhou City People's Hospital Affiliated to Binzhou Medical College, Binzhou 256600, Shandong Province, China. xiangtinghai126@com

Received: 2010-01-25 Revised: 2010-04-21

Accepted: 2010-04-27 Published online: 2010-05-28

Abstract

AIM: To explore the treatment of upper gastrointestinal rebleeding after partial splenic embolization (PSE) in portal hypertensive patients.

METHODS: The clinical data of 10 patients with upper gastrointestinal rebleeding after PSE for portal hypertension, who underwent hepatobiliary surgery at our hospital from January 2004 to October 2009, were retrospectively analyzed.

RESULTS: Compared to control subjects, the operation duration and hemorrhage volume were significantly higher in rebleeding patients

(4.5 h vs 3.0 h; 450 mL vs 1 000 mL, both $P < 0.05$) though there were no significant differences in the mortality rate and complication rate between the two groups.

CONCLUSION: For upper gastrointestinal rebleeding patients having Child-pugh class A or B liver function and controllable ascites, devascularization operation is a better choice if no contraindication exists. Devascularization operation should be carefully conducted to avoid massive hemorrhage.

Key Words: Portal hypertension; Devascularization; Partial splenic embolization

Xiang TH, Du SD, Gong BG, Cheng PG, Wu JB, Zhang TJ, Xia XL. Devascularization operation for upper gastrointestinal rebleeding after partial splenic embolization in portal hypertensive patients. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(15): 1605-1607

摘要

目的: 探讨门静脉高压症部分脾动脉栓塞术(partial splenic embolization, PSE)后再出血的治疗。

方法: 回顾性分析2004-01/2009-10山东省滨州医学院附属滨州市人民医院肝胆外科收治的10例门脉高压患者PSE术后再出血的临床病例资料。

结果: 门静脉高压PSE后再出血行断流手术治疗, 与对照组相比, 手术时间及术中出血量均明显增加(4.5 h vs 3.0 h, 450 mL vs 1 000 mL, 均 $P < 0.05$), 死亡率和并发症率无明显差别。

结论: 对于肝功能Child-pugh A或B级, 有可控性腹水, 巨脾, 反复上消化道出血的患者, 如无其他手术禁忌, 断流术是较好的选择。对PSE术后再出血手术的患者, 术中应仔细分离脾脏与周围粘连, 避免大出血。

关键词: 门脉高压症; 断流术; 部分脾动脉栓塞术

相亭海, 杜顺达, 巩本刚, 成丕光, 吴俊本, 张同军, 夏修良. 门静

■背景资料

肝硬化门脉高压是常见的消化系统疾病, 其治疗方法近年报道很多, 包括断流、分流术, 介入治疗, 内镜治疗以及肝移植等, 但对于介入治疗(主要是PSE)术后再出血手术治疗报道甚少。

■同行评议者

张宗明, 教授, 清华大学第一附属医院消化医学中心

■相关报道

2004年,日本Chikamori报道PSE联合内镜治疗严重食管胃底静脉曲张,取得较好效果,国内多报道PSE对脾功能亢进有较好效果。

脉高压症脾动脉栓塞术后再出血的断流术治疗. 世界华人消化杂志 2010; 18(15): 1605-1607

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/1605.asp>

0 引言

脾切除、食管下段贲门周围血管离断术(断流术)是治疗门静脉高压症食管胃底静脉曲张破裂出血的主要方法之一,该手术安全、有效、简便。部分脾动脉栓塞术(partial splenic embolization, PSE)近年来用于门脉高压症的治疗,取得了一定疗效。我院肝胆外科2004-01/2009-10共收治门静脉高压PSE后再出血患者10例,均行断流手术,现报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料 本组(治疗组)患者男7例,女3例,年龄38-64(平均46.5)岁。乙型肝炎病毒阳性者9例,乙型肝炎病毒合并丙型肝炎病毒者1例。行脾动脉栓塞前均有上消化道出血史。CT显示明显肝硬化、巨脾。再出血时间为栓塞术后4-12 mo,平均8.5 mo。断流术前有2例患者持续性低热,左上腹部疼痛不适。B超检查均示门静脉增宽,胃镜检查食管胃底静脉曲张均重度曲张,其中5例合并门静脉高压性胃黏膜病变,3例广泛糜烂出血,2例点片状出血。另设对照组20例,男12例,女8例,年龄41-66(平均48.3)岁,未曾行PSE治疗。肝功能均为Child B级。食管静脉曲张的分级参照国内2004年食管胃静脉曲张内镜下记录及分级标准^[1]。

1.2 方法

1.2.1 非手术治疗:禁饮食、胃肠减压、补液抗休克、纠正电解质紊乱、及时给予血浆、白蛋白、红细胞等;应用止血药物:如维生素K1、立芷雪、纤维蛋白原、凝血酶原复合物、垂体后叶素等;抑制胃液分泌药物奥美拉唑;降低门静脉高压药物如善宁(奥曲肽)、思他宁或垂体后叶素。

1.2.2 手术治疗:积极进行非手术治疗48 h止血不成功者2例,急诊手术。保守治疗成功8例,3 wk内择期手术,行脾切除,分别离断胃短静脉、胃后静脉、胃左静脉以及食管支,高位和异高位食管支血管,同时游离食管下段6-8 cm,使胃的上半部完全游离。

2 结果

2.1 术中出血 治疗组术中出血约700-2 500 mL,平均1 000 mL,手术时间4-5.5 h,平均4.5 h。对照组术中出血约300-800 mL,平均450 mL,手术时

间2.5-4 h,平均3 h(表1)。

2.2 术后并发症 治疗组术后死亡1例,为择期手术患者,死亡原因为严重的门静脉血栓形成,出现大量腹水、黄疸、肝衰竭。其余9例术后均出现不同程度的腹水,低蛋白血症,对症治疗后缓解出院。对照组死亡2例,死亡原因为肝衰竭,肝肾综合征,切口感染2例,另18例均有不同程度的腹水,短暂肝功能失代偿(表1)。

2.3 随访 随访时间1-4年,治疗组9例患者无上消化道再出血,随访期间经胃镜检查,2例术后分别1年、3年又出现食管下端重度静脉曲张,采用镜下套扎曲张血管。对照组术后3-3.5年2例再出血。

3 讨论

正常情况下门静脉血流约20%-30%来自脾动脉,而肝硬化门脉高压患者门静脉血流可有60%-70%来自脾动脉^[2],减少脾动脉血流对于减少肝硬化门脉高压患者的门脉血流有着重要的作用。PSE通常适用于各种原因所致的脾功能亢进^[3,4],也能减少脾静脉的回流量,降低门脉静脉压力,治疗上消化道出血^[5]。一般认为栓塞范围的大小与疗效不成正比,但术后并发症与栓塞面积呈正相关。有研究认为^[6,7]在达到有效治疗的栓塞面积时,合并严重并发症尤其是脾脓肿的风险增加,建议使用PSE应严格控制栓塞面积。从解剖学上分析,PSE相当于对脾脏行大约60%-70%的部分切除术,其治疗脾功能亢进或者上消化道出血的效果仅相当于脾切除术,而不及断流术。通常认为PSE术后可保留部分脾脏的免疫功能,预防感染,但有研究显示^[8]门脉高压脾切除术前免疫功能低于正常人,脾切除术后血液中免疫物质水平反而升高接近正常人,推测病变的脾脏免疫功能已受损害,因此,保留病变脾脏是否有益值得探讨。另外,严重脾亢的患者,全身免疫功能已显著下降,脾动脉栓塞术后坏死的脾脏在体内成为潜在的感染源,本组有1例表现为持续低热,腹部疼痛不适等,呈慢性消耗状态,持续感染进一步损害肝功能,病脾切除后,上述症状消失。

脾切除,贲门周围血管离断术(断流术)是目前国内治疗门静脉高压症并上消化道出血最常应用的术式^[9],该术式阻断了门奇静脉间血液返流而增加了门静脉的压力,能维持门静脉的向肝血流,有利于保护肝功能。可有效地预防和治疗门静脉高压食管胃底静脉曲张破裂出血。对

表 1 治疗组与对照组行断流术后比较

分组	n	手术时间(min)	出血量(mL)	死亡	并发症
治疗组	10	270 ± 40	1000 ± 455	1	9
对照组	20	180 ± 32	450 ± 210	2	18
		6.92 ^M	4.57 ^M	0 ^N	0 ^N
P值		<0.05	<0.05	>0.05	>0.05

^Mt检验; ^Nχ²检验.

肝功能Child-pugh A或B级者, 综合报道^[10-13]断流术后5年出血率约5%-13%; 术后5年生存率约70%-90%。术后近期再出血的首要原因是手术不彻底, 尤其要离断食管支、异高位食管支和胃后静脉, 这是手术成败的关键^[14]。在本组病例中, 10例脾动脉栓塞术后患者均发生了上消化道出血, 采用断流手术, 术中可见脾静脉炎, 脾门粘连, 胃后及胃底、食管周围显著曲张的静脉团, 脾脏体积依然较大, 坏死与增生脾组织交替相间, 呈花斑状, 周围再生了大量的侧支循环血管, 交通于脾膈、脾腹膜以及脾胃之间, 脾周众多炎性粘连束带, 脾脏质地更脆, 易破碎、易出血, 手术创面渗血, 使手术难度显著增加, 术中出血最少约700 mL, 最多1例达2 500 mL, 平均出血1 000 mL。断流术后1-4年的随访中均无再出血病例。现已认为, 预防性断流术一般不做, 但不是禁忌, 应根据患者的具体情况, 肝功能和静脉曲张严重程度, 来确定手术适应证^[15]。对于上消化道大出血, 非手术治疗无效; 食道静脉曲张, 脾大, 脾功能亢进明显; 反复上消化道出血, 老年, 体弱, 急诊或一般情况和肝功能较差者均为断流术的适应证。肝功能Child C级、明显腹水、黄疸甚至肝性脑病者不宜急诊手术。严重心肺疾患不能耐受手术者则为手术禁忌证。本治疗组患者因恐惧开腹手术或急性出血在外院采用PSE治疗, 再出血后行断流术无论在手术时间, 出血量均比对照组明显增加。

总之, 对肝功能较好, 可控性腹水, 巨脾, 反复上消化道出血的患者, 如无手术禁忌, 断流术是较好的选择。对暂时不能耐受手术的患者, 可先行PSE术, 待病情稳定后, 再行断流术, 术前对患者要有更加严格的评估, 充分备血, 必要时准

备凝血因子, 认识到手术的困难性, 术中最好先结扎脾动脉, 游离脾周的韧带或粘连时, 应谨慎分离, 逐一结扎、切断, 由于静脉壁薄且静脉压力大, 不宜电刀切断凝血, 以免大出血。

4 参考文献

- 中华医学会消化内镜学分会. 食管胃静脉曲张内镜下诊断和治疗规范试行方案(2003年). 中华消化内镜杂志 2004; 21: 149-151
- 姚元珠, 吴福仓. 部分性脾栓塞术对门脉血流动力学的影响. 中外健康文摘 2008; 5: 736-737
- Guralnik V, Schäffler A, Schölmerich J, Schlitt HJ, Müller-Wille R, Feuerbach S, Obermeier F. [Partial splenic artery embolization for the treatment of a patient with hypersplenism due to liver cirrhosis] *Dtsch Med Wochenschr* 2008; 133: 1893-1896
- Hayashi H, Beppu T, Masuda T, Mizumoto T, Takahashi M, Ishiko T, Takamori H, Kanemitsu K, Hirota M, Baba H. Predictive factors for platelet increase after partial splenic embolization in liver cirrhosis patients. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22: 1638-1642
- Ohmoto K, Yoshioka N, Tomiyama Y, Shibata N, Takesue M, Yoshida K, Kuboki M, Yamamoto S. Improved prognosis of cirrhosis patients with esophageal varices and thrombocytopenia treated by endoscopic variceal ligation plus partial splenic embolization. *Dig Dis Sci* 2006; 51: 352-358
- Hayashi H, Beppu T, Okabe K, Masuda T, Okabe H, Baba H. Risk factors for complications after partial splenic embolization for liver cirrhosis. *Br J Surg* 2008; 95: 744-750
- N'Kontchou G, Seror O, Bourcier V, Mohand D, Ajavon Y, Castera L, Grando-Lemaire V, Ganne-Carrie N, Sellier N, Trinchet JC, Beaugrand M. Partial splenic embolization in patients with cirrhosis: efficacy, tolerance and long-term outcome in 32 patients. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2005; 17: 179-184
- 王子成, 于庆云, 李富莲, 方汝亮, 张景潮. 肝炎肝硬化门脉高压症患者脾切除与脾切除后自体脾组织移植的临床对照研究. 实用肝脏病杂志 2007; 10: 220-222
- 蔡景修. 门静脉高压症外科治疗的探讨. 消化外科 2004; 3: 229-231
- 戴植本. 我国门脉高压症外科的展望. 腹部外科 1999; 12: 101-102
- 何强, 梁力建. 断流术治疗门静脉高压症的疗效分析. 中华普通外科杂志 2005; 20: 221-224
- 陈光, 任江, 王广义, 所剑, 谭毓铨. 断流术治疗门静脉高压症的疗效分析. 中华普通外科杂志 2006; 21: 315-317
- 徐新保, 蔡景修, 冷希圣, 董家鸿, 朱继业, 何振平, 王福顺, 别平, 李澍, 王曙光, 彭吉润, 韩本立, 祝学光. 外科治疗门静脉高压症手术适应证的初步探讨. 空军总医院学报 2006; 22: 154-161
- 杨镇, 孙政, 李崇健, 周永贵. 断流术的现状与展望. 肝胆外科杂志 2004; 12: 325-329
- 黄庭庭. 门静脉高压症外科治疗的出路何在. 中华肝胆外科杂志 2005; 11: 217-218

■同行评价

本文对临床医师有一定的参考价值。

编辑 李军亮 电编 吴鹏联

氟康唑预防重症急性胰腺炎真菌感染32例

汤可立, 石承先

■背景资料

重症急性胰腺炎(SAP)并发真菌感染占全部SAP感染患者的40%-70%,病死率高达20%-53.1%。大多数学者主张在临床明确真菌感染的依据后才开始抗真菌治疗,但疗效不甚满意,死亡率仍然很高。从本课题组的动物实验中观察到,急性胰腺炎大鼠在抗生素使用9 d后肠道真菌增殖明显并开始易位,但是在临床早期预防使用抗真菌药物能否抑制肠道真菌增殖和易位引起的真菌感染仍不清楚。

汤可立, 石承先, 贵州省人民医院肝胆外科 贵州省贵阳市550002

作者贡献分布: 汤可立与石承先对此文所作贡献均等。

通讯作者: 石承先, 主任医师, 550002, 贵州省贵阳市宝山路1号, 贵州省人民医院肝胆外科。chengxianl@yahoo.com.cn

电话: 0851-5937865

收稿日期: 2010-02-09 修回日期: 2010-04-29

接受日期: 2010-05-10 在线出版日期: 2010-05-28

Fluconazol prophylaxis against fungal infection in patients with severe acute pancreatitis: an analysis of 32 cases

Ke-Li Tang, Cheng-Xian Shi

Ke-Li Tang, Cheng-Xian Shi, Department of Hepatobiliary Surgery, Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang 550002, Guizhou Province, China

Correspondence to: Cheng-Xian Shi, Department of Hepatobiliary Surgery, Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang 550002, Guizhou Province, China. chengxianl@yahoo.com.cn

Received: 2010-02-09 Revised: 2010-04-29

Accepted: 2010-05-10 Published online: 2010-05-28

Abstract

AIM: To investigate the prophylactic effect of fluconazol against fungal infection in patients with severe acute pancreatitis (SAP).

METHODS: Ninety-eight SAP patients treated at our hospital from January 2005 to December 2009 were divided into treatment group ($n = 32$) and control group ($n = 66$). The treatment group underwent routine therapy plus intravenous fluconazol 200 mg once daily for 5 d, while the control group underwent routine therapy alone. The incidence and duration of fungal infection, mortality and the length of hospital stay were compared between the two groups.

RESULTS: The incidence of fungal infection and mortality in the treatment group were lower than those in the control group (9.4% vs 27.3% and 0% vs 12.1%, respectively; both $P < 0.05$). The length of hospital stay in the treatment group was shorter than that in the con-

trol group ($28.3 \text{ d} \pm 16.9 \text{ d}$ vs $37.4 \text{ d} \pm 22.3 \text{ d}$, $P < 0.05$). The duration of fungal infection in the treatment group was longer than that in the control group ($26.5 \text{ d} \pm 9.3 \text{ d}$ vs $14.4 \text{ d} \pm 6.8 \text{ d}$, $P < 0.05$).

CONCLUSION: Fluconazol can significantly reduce the incidence of fungal infection, mortality and the length of hospital stay in SAP patients.

Key Words: Fluconazol; Fungal infection; Severe acute pancreatitis; Treatment

Tang KL, Shi CX. Fluconazol prophylaxis against fungal infection in patients with severe acute pancreatitis: an analysis of 32 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(15): 1608-1611

摘要

目的: 探讨氟康唑预防重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)真菌感染的效果。

方法: 对符合要求的98例SAP进行对比临床研究, 其中使用抗生素治疗, 第7-12天预防性使用氟康唑抗真菌治疗者为治疗组($n = 32$), 其余为对照组($n = 66$)。治疗组在常规治疗的基础上加每日静脉点滴氟康唑200 mg, 连续5 d, 对照组仅给予常规治疗。观察两组患者的真菌感染发生率、病死率、住院时间和真菌感染发生时间。

结果: 治疗组与对照组的真菌感染率(9.4% vs 27.3%, $P < 0.05$)、病死率(0% vs 12.1%, $P < 0.05$)、住院时间($28.3 \text{ d} \pm 16.9 \text{ d}$ vs $37.4 \text{ d} \pm 22.3 \text{ d}$, $P < 0.05$)均明显低于对照组, 真菌感染发生时间为明显晚于对照组($26.5 \text{ d} \pm 9.3 \text{ d}$ vs $14.4 \text{ d} \pm 6.8 \text{ d}$, $P < 0.05$)。

结论: 预防使用氟康唑可明显降低SAP患者的真菌感染发生率、病死率、缩短住院时间。

关键词: 氟康唑; 真菌感染; 重症急性胰腺炎; 治疗

汤可立, 石承先. 氟康唑预防重症急性胰腺炎真菌感染32例. *世界华人消化杂志* 2010; 18(15): 1608-1611

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/1608.asp>

■同行评议者

巩鹏, 教授, 大连医科大学附属第一医院普外二科

0 引言

重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)病死率仍然很高, 主要有两个死亡高峰, 早期(病程的2 wk内)死亡原因主要是由于全身炎症反应综合征导致的多脏器功能不全以致衰竭; 中后期(2 wk后, 特别是6-8 wk后)死亡原因主要是感染. SAP后期死因的80%是由感染所致^[1]. 近年SAP并发深部真菌感染的发生率逐渐增加, 约占10%-41%, 真菌感染的自然病死率超过50%^[2]. 研究表明, 在急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)使用抗生素6 d后, 肠道真菌增殖明显, 9 d后开始出现肠道真菌易位^[3]. SAP的治疗中抗生素是主要措施之一^[4], 但在治疗SAP过程中, 是否需要和在什么时候预防使用抗真菌药物意见并未一致. 我们根据动物实验研究的结果^[3], 设计对比临床研究, 观察预防使用氟康唑预防SAP真菌感染的效果. 现报道如下.

1 材料和方法

1.1 材料 我院2005-01/2009-12共收治SAP患者203例, 根据实验设计和纳入、排除标准, 从中筛选出98例患者作为观察对象.

1.2 方法

1.2.1 观察对象: 纳入标准和排除标准: (1)病例符合中华医学会消化病学分会胰腺疾病学组2004年制定的SAP临床诊断标准^[4], 并使用抗生素治疗者; (2)院外病程不超过72 h; (3)观察指标的资料齐全; (4)排除入院时已使用氟康唑等抗真菌治疗者和已存在真菌感染者.

1.2.2 分组: 符合上述SAP诊断标准的98例患者进行对比临床研究, 98例患者均使用抗生素治疗, 将其中使用抗生素(抗生素主要为能透过血胰屏障的头孢三代, 如头孢哌酮; 若对头孢类过敏者使用喹诺酮类药物)治疗第7-12天预防性使用氟康唑抗真菌治疗者为治疗组(32例), 其余为对照组(66例). 两组患者的年龄、肠内营养例数、分组前手术例数、Balthazar CT评分、并发症数和APACHE-II评分分别为43.95岁±20.01岁与48.96岁±14.51岁; 20/32例与47/66例; 0/32例与0/66例; 4.25分±1.65分与4.93分±1.52分; 0.24个±0.43个与0.37个±0.71个; 12.25分±4.46分与13.46分±6.27分. 两组之间上述项目无明显差别($P>0.05$), 具有可比性.

1.2.3 SAP的治疗措施: 对两组SAP患者均采用下列常规治疗方法: 大部分患者(55例)一经诊断明确后即入外科重症监护病房(SICU)监护, 同时

采用禁食、胃肠减压、抗感染、纠正水电解质紊乱、抑制胰酶(用善宁或思他宁)、肠外营养(PN, 86例)和(或)鼻空肠肠内营养(EN, 共67例, 其中治疗组20例、对照组47例)等基础治疗; 对有明显肾衰竭者行血液透析(血浆置换、血液滤过共17次)、对有明显呼吸困难或低氧血症者行气管插管(或气管切开)呼吸机辅助呼吸(15例)、有胆道梗阻者作内镜下十二指肠乳头切开取石及鼻胆管引流(7例)、行胆囊切除胆道探查(共5例, 治疗组2例、对照组3例), 胆囊切除胆道探查及胰周引流(共5例, 治疗组1例、对照组4例). 其中治疗组在上述常规治疗基础上在使用抗生素治疗后的第7-12天时加用氟康唑, 用法为每天静脉滴注200 mg, 共5 d; 治疗组和对照组仍继续上述常规治疗. 治疗组和对照组的肠内营养和手术数无明显差别.

1.2.4 SAP合并深部真菌感染的诊断标准^[5]: (1)可疑临床表现: 广谱抗生素治疗无效的发热, 排除耐药细菌感染; 咳嗽, 咳黏液胶状痰或血丝痰, 口腔假膜或溃疡, 尿路刺激症状, 腹泻褐色果酱样大便; 视觉障碍; 不明原因的意识改变, 或与胰腺病变不相关的出血(如胆道、消化道瘘出血). (2)病原学证据: 血真菌培养阳性, 中心静脉导管真菌培养阳性, 术前腹腔穿刺液、术中抽取的腹水、胰腺坏死组织或引流的胆汁等处标本涂片找到真菌或真菌培养阳性; 腹腔渗液、感染伤口脓液、咽喉、痰、尿、粪等处标本涂片找到真菌或真菌培养阳性. 对有可疑的临床表现加一个系统两次或以上、两个或两个系统以上检出同一真菌即诊断合并深部真菌感染.

1.2.5 治疗方案: 治疗组和对照组在明确有真菌感染后先用氟康唑每次200 mg, 2次/天, 然后根据治疗效果调整药物, 直到体温正常后3 d, 相关体液或标本真菌检查无真菌. 氟康唑治疗无效或治疗效果不佳时, 改用两性霉素B或卡泊芬净.

1.2.6 观察指标: (1)真菌检查: 真菌每周2次以上进行腹腔渗液、感染伤口脓液、咽喉、痰、尿、粪、血等处标本涂片找真菌和/或真菌培养; 怀疑深静脉导管感染时, 拔除导管进行培养; (2)真菌感染发生率和真菌感染发生时间; (3)病死率; (4)住院时间.

统计学处理 数据用mean±SD表示, 使用SPSS11.5软件进行统计分析. 真菌感染发生率、病死率之间的比较用 χ^2 检验; 两组真菌感染发生时间和住院时间之间的比较应用 t 检验.

■研发前沿

SAP患者使用抗生素后, 何时发生真菌感染、什么时候开始使用抗真菌药物和使用何种抗真菌药物, 各家报道不一, 成为研究热点.

■相关报道

SAP并发真菌感染近年来有增多趋势, 从一些回顾性的分析提示在抗生素使用12 d左右即可出现真菌感染, 但鲜有对SAP患者使用抗生素后第7-12天预防使用氟康唑抗真菌感染的对比临床研究.

■创新盘点

本研究设计的对比临床研究发现,在SAP患者使用抗生素后第7-12天预防性使用氟康唑可明显降低真菌感染率、病死率、缩短住院时间。

2 结果

两组患者的真菌感染情况及治疗效果:治疗组发生真菌感染3例(9.4%)、死亡0例(0%)、住院时间 $28.3 \text{ d} \pm 16.9 \text{ d}$ 、真菌感染时间为应用抗生素后 $26.5 \text{ d} \pm 9.3 \text{ d}$;对照组发生真菌感染18例(27.3%)、死亡8例(12.1%)、住院时间 $37.4 \text{ d} \pm 22.3 \text{ d}$ 、真菌感染时间为应用抗生素后 $14.4 \text{ d} \pm 6.8 \text{ d}$ 。治疗组真菌感染发生率($\chi^2 = 8.318, P = 0.040 < 0.05$)、病死率($\chi^2 = 14.85, P = 0.000 < 0.05$)、住院时间($t = 2.364, P = 0.034 < 0.05$)均显著低于对照组,治疗组真菌感染发生时间明显晚于对照组($t = 2.918, P = 0.021 < 0.05$)。

治疗组3例真菌感染中2例为白色念珠菌,1例为曲霉菌,经继续使用氟康唑治疗后治愈;对照组18例真菌感染中16例(88.9%)为白色念珠菌,1例为平滑念珠菌,1例为热带念珠菌。对照组18例真菌感染病例中,8例用氟康唑治疗后病情治愈,1例改用两性霉素B和1例改用卡泊芬净治疗后治愈,8例抗真菌治疗无效而死亡。8例死亡患者中7例死于真菌感染导致的多器官功能衰竭,1例死于腹膜后多次出血。

3 讨论

临床研究表明,深部真菌感染的早期诊断仍然是困惑医师的一道难题,临床常用的检查尿液、痰液或血液等真菌存在的方法,多提示真菌已易位至这些组织器官内,并将是或已经是这些器官发生真菌感染。多组织器官真菌感染将严重打击重病中的患者,SAP真菌感染的病死率高达20%-53.1%^[6-8]。因此能否预防真菌感染是改善预后的重要方面。

肠道是体内最大的细菌库,也是最大的真菌库。正常健康者,肠道正常菌群可以对真菌的生长起到抑制作用,使得真菌数量相对恒定,但是当某些因素,特别是长期、大剂量的使用抗生素杀灭了大量的肠道正常菌群,从而导致肠道菌群失调,肠道真菌因而大量繁殖进而发生肠外易位导致全身真菌感染^[9-11]。研究表明,在AP使用抗生素6 d后,肠道真菌增殖明显并开始易位,9 d后肠道真菌易位至肠系膜组织、胰、肺等显著^[3]。本观察显示,预防使用抗真菌的治疗组真菌感染发生率、病死率、住院时间明显低于对照组,说明在治疗SAP使用抗生素6 d后,预防使用抗真菌药物可明显减少严重的真菌感染。与骨髓移植或大剂量化疗患者预防性应用氟康唑可降低真菌感染发生率相一致^[12]。进一

步分析发现,在治疗SAP中,没有预防使用抗真菌药物的对照组,发生真菌感染的时间为应用抗生素后 $14.4 \text{ d} \pm 6.8 \text{ d}$,提示应用抗生素治疗SAP 6 d后真菌增殖明显并开始易位,与动物实验研究结果比较一致^[3],与其他临床观察结果也比较吻合^[13,14],提示在治疗SAP中,应用抗生素后7-12 d预防使用氟康唑,可能显著抑制处于明显增殖或开始易位阶段的肠道等真菌,使真菌感染明显减少。

深部真菌感染大多数致病菌为白色念珠菌^[13],本观察与此相一致。白色念珠菌对氟康唑敏感,且氟康唑不良反应少,价格便宜,预防用药较合适。本观察结果也证明了这一点。

本观察还发现,治疗组还有3例发生真菌感染,发生时间明显晚于对照组,为应用抗生素后 $26.5 \text{ d} \pm 9.3 \text{ d}$;本研究原设计预防使用氟康唑是在应用抗生素后第7-12天,连续应用5 d,提示停用氟康唑后继续应用抗生素治疗时,肠道真菌可能再次发生增殖而易位,从而发生真菌感染。这时是否应该再次预防使用氟康唑,有待进一步研究。

4 参考文献

- Gloor B, Müller CA, Worni M, Martignoni ME, Uhl W, Büchler MW. Late mortality in patients with severe acute pancreatitis. *Br J Surg* 2001; 88: 975-979
- 汤耀卿, 秦帅, 张圣道. 重症急性胰腺炎合并深部真菌感染的危害及诊治对策. *中华肝胆外科杂志* 2001; 7: 515-517
- 石承先, 陈喜. 抗生素治疗大鼠急性胰腺炎后肠道真菌的变化与易位的关系. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 2714-2717
- 中华医学会消化病学分会胰腺疾病学组. 中国急性胰腺炎诊治指南(草案). *胰腺病学* 2004; 4: 35-38
- 何跃明, 吕新生, 黄建华, 艾中立, 刘志芬, 雷道雄, 钱群, 孙权, 王波涌, 江从庆, 袁玉峰. 重症急性胰腺炎合并深部真菌感染(附40例报告). *中国普通外科杂志* 2002; 11: 135-138
- Alberti C, Brun-Buisson C, Burchardi H, Martin C, Goodman S, Artigas A, Sicignano A, Palazzo M, Moreno R, Boulmé R, Lepage E, Le Gall R. Epidemiology of sepsis and infection in ICU patients from an international multicentre cohort study. *Intensive Care Med* 2002; 28: 108-121
- Hoerauf A, Hammer S, Müller-Myhsok B, Rupprecht H. Intra-abdominal Candida infection during acute necrotizing pancreatitis has a high prevalence and is associated with increased mortality. *Crit Care Med* 1998; 26: 2010-2015
- 孔雷, 汤耀卿, 韩天权, 雷若庆, 张圣道. 重症急性胰腺炎并发神经精神障碍55例. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 2239-2241
- 陈尔真, 黄小林, 袁祖荣, 张圣道. 48例重症急性胰腺炎合并真菌感染的临床分析. *中华医院感染学杂志* 2004; 14: 759
- 滕维压, 狄惠芝. 深部真菌感染研究进展. *中华医院感染学杂志* 1999; 9: 62-64
- 秦帅, 汤耀卿, 瞿洪平, 刘伟, 毛恩强. 重症急性胰腺

- 炎合并深部真菌感染易感因素剖析. 外科理论与实践 2001; 6: 96-99
- 12 Edwards JE Jr, Bodey GP, Bowden RA, Büchner T, de Pauw BE, Filler SG, Ghannoum MA, Glauser M, Herbrecht R, Kauffman CA, Kohno S, Martino P, Meunier F, Mori T, Pfaller MA, Rex JH, Rogers TR, Rubin RH, Solomkin J, Viscoli C, Walsh TJ, White M. International Conference for the Development of a Consensus on the Management and Prevention of Severe Candidal Infections. *Clin Infect Dis* 1997; 25: 43-59
- 13 陈荣巧, 黄瑾, 王卓, 胡晋红. 回顾性抽样分析64例急性胰腺炎病人抗菌药物的应用. 药学服务与研究 2008; 8: 55
- 14 胡晋红. 重症急性胰腺炎合并真菌感染的临床意义. 山东医学高等专科学校学报 2008; 30: 365-367

■同行评价

本文具有一定的临床意义, 为临床预防性使用抗真菌药物及使用的时间提供依据。

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》出版流程

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

内镜治疗慢性胰腺炎合并胆总管良性狭窄22例

郑明伟, 秦鸣放, 王庆, 勾承月, 李宁

■背景资料

CP是由于各种原因引起的以胰腺细胞破坏、进行性纤维化为主的病变, 发病率较低, 但近年来随着人们生活水平的提高有升高趋势。CP所致胆道梗阻以肝外胆管胰腺段较为常见, 如纠正不及时可导致梗阻性黄疸、胆汁性肝硬化, 严重的可出现急性胆管炎, 必须进行积极的治疗。

郑明伟, 天津医科大学 天津市 300070

秦鸣放, 王庆, 勾承月, 李宁, 天津市南开医院微创外科中心 天津市 300100

作者贡献分布: 郑明伟与秦鸣放对此文所作贡献均等; 此研究由郑明伟与秦鸣放设计; 研究过程由秦鸣放、王庆、勾承月、李宁及郑明伟操作完成; 数据分析由郑明伟完成; 本论文写作由郑明伟与秦鸣放完成。

通讯作者: 秦鸣放, 教授, 300100, 天津市, 天津市南开医院微创外科中心。missyouxj@163.com

电话: 022-27435268

收稿日期: 2010-02-09 修回日期: 2010-04-28

接受日期: 2010-05-10 在线出版日期: 2010-05-28

Endoscopic treatment of chronic pancreatitis with benign biliary stricture: an analysis of 22 cases

Ming-Wei Zheng, Ming-Fang Qin, Qing Wang, Cheng-Yue Gou, Ning Li

Ming-Wei Zheng, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

Ming-Fang Qin, Qing Wang, Cheng-Yue Gou, Ning Li, Minimally Invasive Surgical Center, Tianjin Nankai Hospital, Tianjin 300100, China

Correspondence to: Professor Ming-Fang Qin, Minimally Invasive Surgical Center, Tianjin Nankai Hospital, Tianjin 300100, China. missyouxj@163.com

Received: 2010-02-09 Revised: 2010-04-28

Accepted: 2010-05-10 Published online: 2010-05-28

Abstract

AIM: To explore the value of endoscopy in the treatment of chronic pancreatitis with benign biliary stricture.

METHODS: The clinical data of 22 patients with chronic pancreatitis and benign biliary stricture who underwent endoscopic treatment were retrospectively analyzed.

RESULTS: A total of 35 endoscopic treatments were performed in 22 patients. The rates of technical success and complications were 95.5% and 22.7%, respectively. Abdominal pain completely disappeared or was partially improved in 14 patients. Hepatic function recovered in all patients.

CONCLUSION: Endoscopic treatment is a safe, effective and mini-invasive method for chronic

pancreatitis with benign biliary stricture.

Key Words: Endoscopy; Chronic pancreatitis; Benign biliary stricture; Plastic stent

Zheng MW, Qin MF, Wang Q, Gou CY, Li N. Endoscopic treatment of chronic pancreatitis with benign biliary stricture: an analysis of 22 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(15): 1612-1615

摘要

目的: 探讨内镜在治疗慢性胰腺炎合并胆总管良性狭窄中的临床应用价值。

方法: 回顾性分析2005-01/2009-09内镜治疗慢性胰腺炎合并胆总管良性狭窄患者22例的临床疗效。

结果: 22例患者共行内镜治疗35次, 平均1.59次/人, 操作成功率95.5%(21/22), 1例治疗失败行外科手术治疗。并发症发生率为22.7%(5/22), 其中急性胰腺炎1例, 术后高淀粉酶血症3例, 轻度胆管炎1例。22例患者中14例治疗后腹痛消失或明显减轻, 所有治疗后复查肝功能指标均有明显改善。

结论: 内镜治疗慢性胰腺炎合并胆总管良性狭窄是一种安全、微创、有效的方法。

关键词: 内镜; 慢性胰腺炎; 胆总管良性狭窄; 塑料支架

郑明伟, 秦鸣放, 王庆, 勾承月, 李宁. 内镜治疗慢性胰腺炎合并胆总管良性狭窄22例. *世界华人消化杂志* 2010; 18(15): 1612-1615

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/1612.asp>

0 引言

慢性胰腺炎(chronic pancreatitis, CP)是一种慢性进行性胰腺炎症, 临床表现为腹痛、胰腺内外分泌功能障碍及发生于胰腺本身和邻近脏器的局部并发症, 严重影响患者的生活质量。胆道疾病是CP的主要病因之一, CP合并胆道良性狭窄在临床上较为常见。本文就2005-01/2009-09经内

■同行评议者

徐大华, 副主任医师, 首都医科大学宣武医院普外科; 陈立波, 教授, 华中科技大学同济医学院附属协和医院肝胆外科中心

表 1 16例腹痛患者内镜治疗前后的疼痛程度变化

疼痛程度(评分)	治疗前	治疗后1 mo
轻度(1-3)	75.00%(12/16)	31.25%(5/16) ^a
中度(4-6)	18.75%(3/16)	12.50%(2/16)
重度(7-10)	6.25%(1/16)	0.00

^a $P<0.05$ vs 治疗前。

镜治疗的CP合并胆总管良性狭窄患者22例, 分析报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料 本组22例, 男15例, 女7例。平均年龄54.3岁(22-79岁)。其中16例因上腹部胀痛就诊, 伴有腰背部放射痛、腹泻、纳差、消瘦等消化系症状; 因腹泻就诊者1例; 因黄疸就诊者2例; 1例因急性胆管炎就诊; 2例体检发现。病程3 d-15年。22例患者中有长期饮酒史10例, 有胆道疾病病史者17例。所有病例行内镜治疗前均经临床检查、实验室检查、CT、B超或MRCP检查, 明确CP诊断(采用2005年南京标准), 同时伴有胆总管良性狭窄, 其中胆总管胰腺段狭窄15例(包括胆总管结石1例), 胆总管十二指肠壁内段狭窄5例(包括胆总管结石3例), 2例胆总管中段狭窄(均有胆总管探查术病史); 胆总管狭窄段长度3-20 mm; 22例患者肝功能回报均提示胆红素、ALT升高。

1.2 方法 常规行十二指肠镜逆行胆胰管造影(endoscopic retrograde cholangiopancreatography, ERCP)了解胆胰管情况, 确认有无胰管狭窄、胰管结石、胰腺假性囊肿、胆总管结石、胆总管狭窄等情况, 制定相应的治疗方案。一般先行解决胆道情况, 行内镜括约肌切开术(endoscopic sphincterotomy, EST), 对有胆总管结石的行内镜取石治疗, 对胆总管狭窄部位扩张后行鼻胆管引流(endoscopic nasobiliary drainage, ENBD)或置入胆道塑料支架(endoscopic retrograde biliary drainage, ERBD)引流; 对CP胰管狭窄者, 行内镜下胰管括约肌切开术(endoscopic pancreatic sphincterotomy, EPS), 使用扩张气囊扩张狭窄部, 留置胰管塑料支架(endoscopic retrograde pancreatic drainage, ERPD); 对于CP胰管结石的患者, 后用取石网篮或取石气囊取出结石, 若结石>1.0 cm, 用网篮碎石后取石, 如果一次难以取净, 可分次取石, 取石间隔采用ENPD引流, 如仍存在取石困难, 行ERP引流; 对于CP胰腺假性囊肿者, 可选择采取ERP经乳头引流。

表 2 21例CP患者内镜治疗前后血清胆红素及ALT变化

程度	治疗前	治疗后7 d
总胆红素(mmol/L)	66.2 ± 39.6	29.9 ± 26.3 ^a
直接胆红素(mmol/L)	37.8 ± 31.9	18.3 ± 15.3 ^a
ALT(U/L)	88.2 ± 41.2	50.9 ± 20.3 ^a

^a $P<0.05$ vs 治疗前。

术后禁食1-2 d, 监测血清淀粉酶, 观察生命体征和腹部体征的变化。对术后腹痛症状定期随访, 采用国际通用的疼痛数字分级法(NSR)对CP患者的内镜治疗前后疼痛程度进行评分, 疼痛评分在1-3分, 为轻度疼痛; 疼痛评分在4-6分, 为中度疼痛; 疼痛评分7-10分, 为重度疼痛; 记录内镜治疗前后肝功能变化(血清胆红素、ALT), 进行统计学分析。随访过程中发现支架阻塞、移位或胰腺炎急性发作者及时更换支架。

统计学处理 数据用SPSS10.0软件进行计算机处理, 计量资料采用mean ± SD表示, 采用 t 检验; 率的比较采用 χ^2 检验。 $P<0.05$ 为有显著性差异。

2 结果

22例患者中CP胰管结石11例, 胰管狭窄9例, 胰腺假性囊肿2例, 合并胆总管结石4例。共行ERCP治疗35次, 平均1.59次/例, 操作成功率95.5%(21/22)。

首次入院期间, 22例患者全部行EST治疗, 19例ENBD, ENPD治疗3例, 18例行EPS, 6例行网篮或气囊取胰石, 6例行ERP+ERBD, 行ERP 5例(2例置入副胰管支架), 3例行ERBD, 9例行胰管扩张, 在11例胰管结石患者中取净结石者8例, 2例因取石困难置入胰管支架, 1例胰管结石取石失败行外科手术治疗。

22例患者随访1-57 mo(平均26.3 mo), 16例腹痛患者中14例(87.5%)症状完全或部分缓解(表1), 其他消化系症状有所好转; 2例黄疸患者及1例急性胆管炎患者术后黄疸明显缓解, 随访中1例患者黄疸再次发作并伴有间断上腹胀痛, 经更换胆管、胰管支架后好转; 内镜治疗成功的21例患者术后复查肝功能, 胆红素及ALT均较术前有所下降(表2)。至随访结束, 共置入胰管支架22枚, 直径5-10 Fr, 胆管支架17枚, 直径7-11 Fr, 有9例更换支架, 其中1例放置4次胰管支架, 5例放置3次(包括ERP+ERBD 1例, ERP 2例, ERBD 2例)。

■研发前沿

CP合并胆总管良性狭窄患者传统多依赖于外科手术, 但因同时涉及胆管、胰腺, 手术方式较为复杂, 创伤较大, 术后并发症发生率高, 疗效不十分理想。近年来, 随着内镜技术的不断发展, 内镜治疗胆胰疾病的研究正逐渐深入。

■相关报道

Vitale等曾报道内镜治疗25例CP继发胆总管狭窄患者, 但随访时间较短, 对CP胰管结石、胰腺假性囊肿等并未进行相关内镜下治疗。

■创新盘点

对CP合并胆总管良性狭窄患者行胆胰管双支架置入进行详细讨论,提出解除支架引流的适应证,同时对患者进行长期随访,平均26.3 mo.

本组并发症发生率为22.7%(5/22),其中急性胰腺炎1例,术后高淀粉酶血症3例,轻度胆管炎1例,经非手术治疗后在72 h内恢复正常,无出血、穿孔、胰腺假性囊肿感染或复发、胰管结石复发及重型胰腺炎等并发症发生.

3 讨论

CP是由于各种原因引起的以胰腺细胞破坏、进行性纤维化为主的病变.在我国CP发病率较低,但近年来随着人们生活水平的提高有升高趋势^[1].由于胆道系统疾病是CP的主要病因之一,二者可互为因果,因此CP合并胆总管良性狭窄在临床上并不少见.王洛伟等^[2]报道CP合并梗阻性黄疸的发生率约为13.4%.CP所致胆道梗阻的部位以肝外胆管胰腺段较为常见,多认为是胰头部慢性炎症纤维化压迫及浸润经胰腺后方穿行的胆管壁而造成胆管狭窄所致.临床上一部分CP合并胆总管良性狭窄患者不表现为显性黄疸,而仅表现为胆总管扩张,直径一般不超过1.5 cm,同时伴有血清胆红素和转氨酶轻度升高,但是这种慢性胆道梗阻如纠正不及时可导致梗阻性黄疸、胆汁性肝硬化,严重的可出现急性胆管炎,必须进行积极的治疗.

CP合并胆总管良性狭窄患者传统多依赖于外科手术,但因同时涉及胆管、胰腺,手术方式较为复杂,创伤较大,术后并发症发生率高,疗效不十分理想.近年来,随着内镜技术的不断发展,内镜治疗胆胰疾病已为人们所广泛接受,对于CP合并胆总管良性狭窄的患者,内镜集诊断与治疗于一身,充分体现了微创优势.其主要治疗原则是解除胆胰管梗阻,通畅引流胆汁胰液,进而改善胰腺的内外分泌功能和肝功能.

EST可解决括约肌狭窄造成的胆总管、胰管远端狭窄,Ewald等对60例十二指肠壶腹部狭窄的患者行EST治疗,随访3年发现80%的患者不仅腹痛症状有不同程度的缓解,同时肝功能和胰腺外分泌功能也有所改善^[3].对于胰管括约肌良性狭窄者可行EPS术或胰管扩张术,具有直接的治疗作用.Jakobs等对171例CP患者行EPS,成功率为97.7%,可明确缓解患者的腹痛症状^[4].本组22例患者均行EST术,18例患者行EPS术,主要目的是解决胆胰管括约肌的狭窄,同时为进一步取石或引流等治疗打下基础.

对胆道炎性狭窄患者,如单纯行扩张治疗容易复发.需行ERBD治疗才能巩固疗效.支架直径在10 Fr以上较为合适,支撑时间一般在1年

以上.时间过短会引起狭窄复发,再次狭窄后形成的胆道瘢痕会给操作带来极大的困难.ERBD术治疗胆总管狭窄取得良好的效果,Kassab等^[5]报道65例医源性胆管狭窄患者性ERBD治疗,45例患者取得满意效果,随访28 mo无复发.Catalano等^[6]报道置入多个胆道塑料支架对于改善胆总管炎性狭窄的效果要优于单支架.胆道金属支架一般很少用于治疗胆总管良性狭窄,因为金属支架会嵌入胆管壁,一旦堵塞难以回收,因此对于预计生存期限超过2年的患者不推荐使用^[7].

对于CP胰管狭窄、胰管结石后胰管狭窄和取石困难者、胰腺假性囊肿与主胰管相通的,可行ERPD治疗,解除胰管梗阻,缓解CP症状.文献报道ERPD成功率可达90%,术后CP症状缓解率为66%-82.7%^[8,9].而且,ERPD治疗后(5.4 mm)和治疗后1年(5.8 mm)主胰管直径与治疗前(7.6 mm)相比明显减小^[10].Vitale报道89例患者共行ERPD术407次,没有与支架置入和移除相关严重并发症,其中62例(82.7%)认为治疗成功,且麻醉药物用量减少^[8].Weckman等^[11]报道79例胰腺假性囊肿行ERPD术,成功率90.8%,每2-3 mo复查CT,观察囊肿变化,移除或更换支架.本组2例胰腺假性囊肿患者均行ERPD治疗成功,其中1例随访5个月因支架堵塞发作上腹胀痛、尿淀粉酶及胆红素升高,再次行ERBD+ERPD治疗,但未见囊肿复发,另1例随访12 mo无异常,移除支架.

对CP伴有胆、胰管狭窄者,最好同时行ERBD+ERPD治疗.胆、胰管双支架联合引流操作要较单一支架引流难度大.操作要点:(1)常规ERCPC以明确胆胰管狭窄情况,确定置入支架长度与外径,一般胆管支架外径尽可能大些,以维持通畅较长时间,胰管支架的外径大小依胰管扩张程度而定,轻中度扩张外径5-7.0 Fr支架即可,重度扩张可置入8.5 Fr以上支架.(2)确定双支架联合引流治疗方案后,即向胆胰管内分别置入导丝至狭窄部位以上,注意维持导丝位置不变.(3)一般情况下,因胰管支架直径较小,可先置入胰管支架,成功后即退出胰管导丝,此过程中应注意不影响胆管内导丝,再向胆管内置入支架,最后进一步观察双支架位置及引流情况.Vitale等^[12]报道内镜治疗25例CP继发胆总管狭窄患者,平均随访13 mo,其中20例(80%)腹痛症状和胆总管狭窄引起的肝功能异常得到满意解决.本组22例中16例患者伴有腹痛症状,术后14例(87.5%)症状消失或明显减轻,治疗后复查

■应用要点

内镜治疗可改善患者腹痛、腹胀、消化不良等症状,提高患者的生存状态,具有创伤小,安全性高和疗效确切等优点,可重复性强,术后并发症少,可作为CP合并胆总管良性狭窄治疗的首选方法,具有广阔的应用前景.

肝功能指标均有明显改善。

值得一提的是,目前在胰管支架留置的时间上仍然存在争议,有报道胰管支架会引起胰管形态学上的变化,约75%的病例ERCP会显示异常,然而在随访中,支架移除后70%的ERCP影像会完全恢复正常^[13]。尽管如此,许多学者仍不主张长期留置胰管支架,建议每2-3 mo复查ERCP,根据症状及胰管狭窄的改善情况移除或更换支架^[14]。我们认为,先置入7 Fr的支架解除胰管梗阻,后每3 mo更换直径为8.5 Fr或10 Fr支架,如支架置入期间出现腹痛或淀粉酶升高超过3次,则应更换支架。

我们认为,如果ERCP示8-10 mm气囊可顺利通过狭窄段或造影剂在5 min内顺畅排入十二指肠,则认为胆管或胰管狭窄得到解除可移除内引流。本组16例患者已移除内引流,随访过程中未发生腹痛加重或肝功能异常情况。

在并发症方面,内镜治疗的并发症主要为术后急性胰腺炎、出血、感染、穿孔、胆管炎等,一般经保守治疗后均可治愈。本组22例患者共行ERCP治疗35次,其中急性胰腺炎1例,术后高淀粉酶血症3例,轻度胆管炎1例,经非手术治疗后在72 h内恢复正常,无出血、穿孔、胰腺假性囊肿感染或复发、胰管结石复发及重型胰腺炎等并发症发生。

总之,虽然内镜治疗不能完全从根本上解除病因,仅对胆胰管的狭窄、阻塞引起的腹痛、腹胀、消化不良等相应症状有所缓解,但其可改善患者的进食和精神状态,增强身体素质,减少对麻醉药物的依赖,明显改善患者的生存状态^[9,15],同时具有创伤小,安全性高和疗效确切等优点,可重复性强,术后并发症少,而且如果治疗不成功,对外科手术无特殊影响,可作为CP合并胆总管良性狭窄治疗的首选方法。

4 参考文献

- 1 钱家鸣, 李景南. 215例慢性胰腺炎病因学分析. 胃肠病学 2001; 6: 153-155
- 2 王洛伟, 李兆申, 李淑德, 陈浮. 慢性胰腺炎全国多中心流行病学调查. 胰腺病学 2007; 7: 1-5
- 3 Ewald N, Marzeion AM, Bretzel RG, Kloer HU, Hardt PD. Endoscopic sphincterotomy in patients with stenosis of ampulla of Vater: three-year follow-up of exocrine pancreatic function and clinical symptoms. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 901-905
- 4 Jakobs R, Benz C, Leonhardt A, Schilling D, Pereira-Lima JC, Riemann JF. Pancreatic endoscopic sphincterotomy in patients with chronic pancreatitis: a single-center experience in 171 consecutive patients. *Endoscopy* 2002; 34: 551-554
- 5 Kassab C, Prat F, Liguory C, Meduri B, Ducot B, Fritsch J, Choury AD, Pelletier G. Endoscopic management of post-laparoscopic cholecystectomy biliary strictures. Long-term outcome in a multicenter study. *Gastroenterol Clin Biol* 2006; 30: 124-129
- 6 Catalano MF, Linder JD, George S, Alcocer E, Geenen JE. Treatment of symptomatic distal common bile duct stenosis secondary to chronic pancreatitis: comparison of single vs. multiple simultaneous stents. *Gastrointest Endosc* 2004; 60: 945-952
- 7 Siriwardana HP, Siriwardana AK. Systematic appraisal of the role of metallic endobiliary stents in the treatment of benign bile duct stricture. *Ann Surg* 2005; 242: 10-19
- 8 Vitale GC, Cothron K, Vitale EA, Rangnekar N, Zavaleta CM, Larson GM, Binford J, Hammond B. Role of pancreatic duct stenting in the treatment of chronic pancreatitis. *Surg Endosc* 2004; 18: 1431-1434
- 9 Farnbacher MJ, Mühldorfer S, Wehler M, Fischer B, Hahn EG, Schneider HT. Interventional endoscopic therapy in chronic pancreatitis including temporary stenting: a definitive treatment? *Scand J Gastroenterol* 2006; 41: 111-117
- 10 Sasahira N, Tada M, Isayama H, Hirano K, Nakai Y, Yamamoto N, Tsujino T, Toda N, Komatsu Y, Yoshida H, Kawabe T, Omata M. Outcomes after clearance of pancreatic stones with or without pancreatic stenting. *J Gastroenterol* 2007; 42: 63-69
- 11 Weckman L, Kylänpää ML, Puolakkainen P, Halttunen J. Endoscopic treatment of pancreatic pseudocysts. *Surg Endosc* 2006; 20: 603-607
- 12 Vitale GC, Reed DN Jr, Nguyen CT, Lawhon JC, Larson GM. Endoscopic treatment of distal bile duct stricture from chronic pancreatitis. *Surg Endosc* 2000; 14: 227-231
- 13 Morgan DE, Smith JK, Hawkins K, Wilcox CM. Endoscopic stent therapy in advanced chronic pancreatitis: relationships between ductal changes, clinical response, and stent patency. *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 821-826
- 14 Bartoli E, Delcenserie R, Yzet T, Brazier F, Geslin G, Regimbeau JM, Dupas JL. Endoscopic treatment of chronic pancreatitis. *Gastroenterol Clin Biol* 2005; 29: 515-521
- 15 Topazian M, Aslanian H, Andersen D. Outcome following endoscopic stenting of pancreatic duct strictures in chronic pancreatitis. *J Clin Gastroenterol* 2005; 39: 908-911

■同行评价

本文总结了内镜治疗CP合并胆总管良性狭窄的资料经验,有一定临床参考价值。

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

幽门螺杆菌、胃肠激素与糖尿病胃轻瘫的关系

吴波, 郑长青

■背景资料

糖尿病胃轻瘫是糖尿病患者常见的并发症, 目前认为糖尿病胃轻瘫除了与神经病变、高血糖有关外, 还与幽门螺杆菌(*H.pylori*)的感染密切相关。目前研究对糖尿病胃轻瘫患者血清胃泌素、生长抑素及*H.pylori*在糖尿病胃轻瘫中的作用及相关性仍不明确。

吴波, 中国医科大学附属盛京医院内分泌科 辽宁省沈阳市 110004

郑长青, 中国医科大学附属盛京医院消化科 辽宁省沈阳市 110004

作者贡献分布: 吴波与郑长青对此文所作贡献均等; 此课题由吴波与郑长青设计; 研究过程由吴波完成; 研究所用新试剂及分析工具由郑长青提供; 数据分析由吴波完成; 本论文写作由吴波与郑长青完成。

通讯作者: 郑长青, 教授, 110004, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学附属盛京医院消化科. zhengchangqing88@163.com

收稿日期: 2010-02-11 修回日期: 2010-04-26

接受日期: 2010-05-10 在线出版日期: 2010-05-28

Relationship among *Helicobacter pylori* infection, gut hormones and diabetic gastroparesis

Bo Wu, Chang-Qing Zheng

Bo Wu, Department of Endocrinology, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China

Chang-Qing Zheng, Department of Gastroenterology, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China

Correspondence to: Professor Chang-Qing Zheng, Department of Gastroenterology, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. zhengchangqing88@163.com

Received: 2010-02-11 Revised: 2010-04-26

Accepted: 2010-05-10 Published online: 2010-05-28

Abstract

AIM: To investigate the relationship among serum gastrin (GAS) and somatostatin (SS) and *Helicobacter pylori* (*H.pylori*) in patients with diabetic gastroparesis (DGP).

METHODS: Fifty-six patients with type 2 diabetes mellitus were divided into simple diabetes mellitus group and DGP group. Forty-seven non-diabetes mellitus patients were divided into control group and simple gastroparesis group. *H.pylori* infection in the mucosa of sinus ventriculi was evaluated by rapid urease test and Giemsa staining. The contents of serum GAS and SS were measured by radioimmunoassay.

RESULTS: There was no significant difference between the rapid urease test and Giemsa staining in

detecting *H.pylori*. The detection rate of *H.pylori* was comparable between the simple diabetes mellitus group and the control group. The detection rate of *H.pylori* was higher in the simple gastroparesis group than in the control group (rapid urease test: 73.3% vs 47.1%, $P < 0.05$), and in the DGP group than in the control group (rapid urease test: 87.8% vs 47.1%, $P < 0.01$; Giemsa staining: 81.9% vs 41.2%, $P < 0.01$), the simple diabetes mellitus group (rapid urease test: 87.8% vs 47.8%, $P < 0.01$; Giemsa staining: 81.9% vs 43.5%, $P < 0.05$) and the simple gastroparesis group (rapid urease test: 87.8% vs 73.3%, $P < 0.01$; Giemsa staining: 81.9% vs 66.7%, $P < 0.01$). In *H.pylori*-positive patients, the level of serum GAS in the DGP group was higher than that in the control group (147.58 ± 16.68 vs 80.91 ± 15.23 , $P < 0.01$), and the level of serum SS in the DGP group was lower than that in the control group (16.29 ± 4.27 vs 47.81 ± 16.88 , $P < 0.01$). In *H.pylori*-negative patients, there was no significant differences in serum GAS and SS levels between different groups.

CONCLUSION: *H.pylori* infection can increase serum GAS level but decrease serum SS level. The pathological alterations in the gastric mucosa induced by *H.pylori* infection are closely related with the development of DGP.

Key Words: Diabetic gastroparesis; *Helicobacter pylori*; Gastrin; Somatostatin

Wu B, Zheng CQ. Relationship among *Helicobacter pylori* infection, gut hormones and diabetic gastroparesis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(15): 1616-1619

摘要

目的: 探讨糖尿病胃轻瘫(DGP)患者血清胃泌素(GAS)、生长抑素(SS)及幽门螺杆菌(*H.pylori*)在DGP中的作用及相关性。

方法: 2型糖尿病患者56例, 经核素标记胃半排时间测定分为单纯糖尿病组与DGP组。非糖尿病对照组患者47名, 经核素标记胃半排时间测定分为正常对照组与单纯胃轻瘫组。应用快速尿素酶实验法及Giemsa染色法检查各组病例胃窦黏膜*H.pylori*。应用放射免疫法测定各组病例血清GAS、SS含量。

■同行评议者

洪天配, 教授, 北京大学第三医院内分泌科

结果:快速尿素酶实验法和Giemsa染色法检测 *H.pylori* 在各组中均无差别。单纯糖尿病组与正常对照组的 *H.pylori* 检出率无明显差异;单纯胃轻瘫组的 *H.pylori* 检出率显著高于正常对照组(快速尿素酶实验法: 73.3% vs 47.1%, $P<0.05$); DGP组的 *H.pylori* 检出率显著高于正常对照组(快速尿素酶实验法: 87.8% vs 47.1%, $P<0.01$; Giemsa染色法: 81.9% vs 41.2%, $P<0.01$)、单纯糖尿病组(快速尿素酶实验法: 87.8% vs 47.8%, $P<0.01$; Giemsa染色法: 81.9% vs 43.5%, $P<0.05$)及单纯胃轻瘫组(快速尿素酶实验法: 87.8% vs 73.3%, $P<0.01$; Giemsa染色法: 81.9% vs 66.7%, $P<0.01$)。 *H.pylori*(+)组: DGP组的气体均高于正常对照组(147.58 ± 16.68 vs 80.91 ± 15.23 , $P<0.01$), SS低于正常对照组(16.29 ± 4.27 vs 47.81 ± 16.88 , $P<0.01$); *H.pylori*(-)组: 各组的气体SS水平无明显差异。

结论: *H.pylori* 感染可使DGP患者GAS升高, SS降低, *H.pylori* 感染导致的胃黏膜病变与糖尿病胃轻瘫有密切关系。

关键词: 糖尿病胃轻瘫; 幽门螺杆菌; 胃泌素; 生长抑素

吴波, 郑长青. 幽门螺杆菌、胃肠激素与糖尿病胃轻瘫的关系. 世界华人消化杂志 2010; 18(15): 1616-1619
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/1616.asp>

0 引言

糖尿病胃轻瘫(diabetic gastroparesis, DGP)是糖尿病患者常见的并发症。自1958年Kassander首次命名DGP以来, 许多学者进行了广泛大量的研究, 目前认为DGP除了与神经病变、高血糖有关外, 还与幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H.pylori*)的感染密切相关^[1,2]。近年来研究发现胃肠激素参与了 *H.pylori* 感染后的 *H.pylori* 相关疾病的病理过程^[3]。本研究通过对DGP患者血清胃泌素(gastrin, GAS)、生长抑素(somatostatin, SS)的测定和胃窦部 *H.pylori* 的观察, 旨在分析三者在DGP中的作用及相关性, 探讨DGP的发生机制。

1 材料和方法

1.1 材料 病例选自2003-10/2005-06在中国医科大学附属盛京医院内科住院及门诊的103例患者。其中2型糖尿病患者56例(除DGP外无其他胃肠道疾病史), 均符合1997年WHO关于2型糖尿病的诊断标准, 经核素标记胃半排时间测定分为单纯糖尿病组23例(男13例, 女10例, 平均年龄 50.22 ± 10.38

岁, 病程2-8年); DGP组33例(男17例, 女16例, 平均年龄 53.59 ± 14.67 岁, 病程3-15年)。非糖尿病对照组患者47名, 均无糖尿病史, 无胃肠疾病史, 肝肾功能正常, 近期内无服药史。经核素标记胃半排时间测定分为正常对照组17例(男10例, 女7例, 平均年龄 47.09 ± 6.76 岁); 单纯胃轻瘫组30例(男16例、女14例, 平均年龄 45.60 ± 11.33 岁)。所有患者在测定GAS、SS的同时, 进行 *H.pylori* 的检查。取材部位: 胃窦部大弯侧距幽门3 cm以内取活检2块。胃 *H.pylori* 诊断试纸由珠海珠信生物工程制品有限公司提供。Giemsa染料由珠海贝索生物技术有限公司提供。GAS放免盒由北京原子能研究所产品提供。SS放免盒由上海第二军医大学研究所提供。产品GAS及SS的放免测定严格按说明书操作。

1.2 方法 本实验采用快速尿素酶实验法及Giemsa染色法两种方法检测胃窦部黏膜的 *H.pylori*。(1)快速尿素酶法: 经电子胃镜钳取2块黏膜组织, 其中1块放于内含尿素和酚红指示剂的试纸中, 观察1 min内试纸的颜色变化。如试纸由黄色变成樱红色为阳性, 3 min内变成红色为弱阳性, 不变色为阴性。(2)Giemsa染色法: 另1块组织经常规石蜡包埋处理后, 先做HE染色, 然后进行Giemsa染色, 镜下根据细菌形态特征判定是否有 *H.pylori* 感染。

统计学处理 采用SPSS13.0软件进行统计学分析, *H.pylori* 感染率、血清GAS和SS的含量用 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示, 组间比较用 *t* 检验或 χ^2 检验, 计数资料采用 χ^2 检验, 当 $P<0.05$ 时有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 *H.pylori* 检出率 应用快速尿素酶实验法和Giemsa染色法, 正常对照组 *H.pylori* 的检出率分别为(47.1%, 41.2%), 单纯胃轻瘫组为(73.3%, 66.7%), 单纯糖尿病组为(47.8%, 43.5%), 糖尿病胃轻瘫组为(87.8%, 81.9%), 两种方法差异无统计学意义($P>0.05$)。单纯糖尿病组与正常对照组的 *H.pylori* 检出率组间比较差异无统计学意义($P>0.05$); 单纯胃轻瘫组的 *H.pylori* 检出率显著高于正常对照组(快速尿素酶实验法: $P<0.05$); DGP组的 *H.pylori* 检出率显著高于正常对照组(快速尿素酶实验法: $P<0.01$; Giemsa染色法: $P<0.01$)、单纯糖尿病组(快速尿素酶实验法: $P<0.01$; Giemsa染色法: $P<0.05$)及单纯胃轻瘫组(快速尿素酶实验法: $P<0.01$; Giemsa染色法: $P<0.01$)。表明胃轻瘫与 *H.pylori* 感染有关, 而DGP的患者90%左右有 *H.pylori* 感染, 进一步说

■研发前沿

近年来, 对于 *H.pylori* 与上消化道疾病关系的研究已经很多, 在与糖尿病胃轻瘫的关系方面亦有报道。 *H.pylori* 与糖尿病胃轻瘫的关系非常密切, 但 *H.pylori* 与糖尿病胃轻瘫的关系中是否涉及胃泌素、生长抑素水平很值得探讨。

■创新盘点

本研究探讨了 *H.pylori*、胃肠激素与糖尿病胃轻瘫的关系。结果说明 *H.pylori* 的感染可以引起胃泌素分泌增加和其抑制因子生长抑素分泌的低下, *H.pylori* 感染导致的胃黏膜病变与糖尿病胃轻瘫有密切关系。因此对糖尿病胃轻瘫患者及时进行根除 *H.pylori* 治疗, 对于改善糖尿病胃轻瘫患者的症状及胃肠道功能有积极意义。

■应用要点

本研究发现 *H.pylori* 感染导致的胃黏膜病变与糖尿病胃轻瘫有密切关系, 因此对糖尿病胃轻瘫患者进行 *H.pylori* 检测和抗 *H.pylori* 治疗是很有必要的。

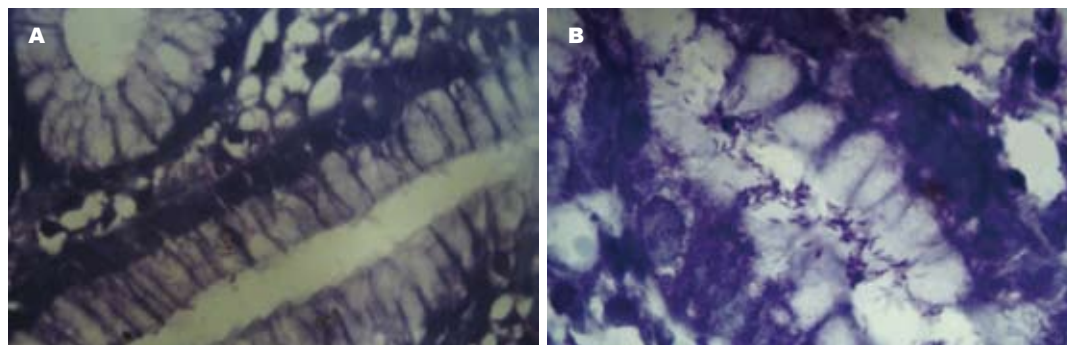


图1 胃组织黏膜图(Giemsa染色×1000). A: *H.pylori*(-); B: *H.pylori*(+).

表1 各组 *H.pylori* 检出率

分组	n	尿素酶			Giemsa		
		<i>H.pylori</i> (+)	<i>H.pylori</i> (-)	检出率(%)	<i>H.pylori</i> (+)	<i>H.pylori</i> (-)	检出率(%)
正常组	17	8	9	47.1	7	10	41.2
胃轻瘫组	30	22	8	73.3 ^a	20	10	66.7
糖尿病组	23	11	12	47.8	10	13	43.5
DGP组	33	29	4	87.8 ^{bdf}	27	6	81.9 ^{bef}

^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ vs 正常对照组; ^c $P<0.05$, ^d $P<0.01$ vs 单纯糖尿病组; ^e $P<0.01$ vs 单纯胃轻瘫组。

明 *H.pylori* 感染可以加重 DGP (表1)。

2.2 *H.pylori* 的形态分布 普通光镜下观察: Giemsa 染色 *H.pylori*(+) 时, *H.pylori* 染成淡紫色, 细菌呈弧形, 在胃中的分布特点是存在于胃黏液层下、上皮细胞的表面。凡是 *H.pylori* 存在处, 均有上皮细胞不同程度的破坏, 而 *H.pylori*(-) 的腺腔内, 上皮细胞排列规整, 细胞间的连接完好 (图1)。

2.3 *H.pylori*、GAS、SS 与 DGP 的关系 *H.pylori*(+) 组: DGP 组的 GAS 均高于对照组 ($P<0.01$), SS 低于对照组 ($P<0.01$); *H.pylori*(-) 组: 各组的 GAS, SS 差异无统计学意义 ($P>0.05$); 正常组、胃轻瘫组、糖尿病组: *H.pylori*(+) 和 *H.pylori*(-) 的血清 GAS、SS 差异无统计学意义 ($P>0.05$); DGP 组: 血清 GAS 水平 *H.pylori*(+) 组高于 *H.pylori*(-) 组 ($P<0.05$); 血清 SS 水平 *H.pylori*(+) 组低于 *H.pylori*(-) 组 ($P<0.05$, 表2)。

3 讨论

DGP 是糖尿病的常见并发症之一, 临床主要表现为恶心、呕吐、腹痛不适、腹胀等症状, 主要特点是胃扩张、胃蠕动减慢和排空延迟, 且症状反复, 不易治愈。因此近年来逐渐被国内外研究者重视, 进行了多方面的研究。目前对 DGP 发病机制还不十分明确, 普遍认为与神经病变、高血糖、血清胃肠激素、微血管病变及代谢紊乱等

因素有关^[4]。*H.pylori* 是定植于胃黏膜表面与黏膜层之间的微需氧菌, 该菌与慢性胃炎、消化性溃疡、胃癌等密切相关^[5]。多项研究证实, *H.pylori* 是 DGP 发生发展的一个危险因素。*H.pylori*(+) 的糖尿病患者胃黏膜病变的发生率明显增高, 胃黏膜病变的范围及程度均比 *H.pylori*(-) 者更重, 合并有 *H.pylori* 感染的糖尿病患者更易出现胃轻瘫的相应临床表现^[6]。在本文所观察的 *H.pylori*(+) 的 DGP 患者中, 血清 GAS 显著高于 *H.pylori*(+) 的正常对照组, 而 SS 含量显著低于 *H.pylori*(+) 正常对照组; *H.pylori*(-) 各组的 GAS、SS 无差别, 说明 *H.pylori* 的感染可以引起 GAS 分泌增加和其抑制因子 SS 分泌的低下, *H.pylori* 感染导致的胃黏膜病变与糖尿病胃轻瘫有密切关系。因此对 DGP 患者及时进行根除 *H.pylori* 治疗, 对于改善糖尿病胃轻瘫患者的症状及胃肠道功能有积极意义。其他一些研究的结论与本文相似^[2,7,8]。

近年来, 对于 *H.pylori* 与上消化道疾病关系的研究已经很多, 在与 DGP 的关系方面亦有报道, 但未得出一致性结论^[2,9]。*H.pylori* 与 DGP 的关系非常密切, 但在 *H.pylori* 与 DGP 的关系中是否涉及 GAS、SS 水平很值得探讨。目前普遍认为这可能与糖尿病的慢性并发症有关^[10,11]。在糖尿病的病变过程中, 某些因素引起毛细血管数量减少和血管内皮基底膜增厚, 从而导致组织

表 2 *H.pylori*感染与未感染的各组GAS、SS含量 (ng/L)

分组	n	<i>H.pylori</i> (+)		<i>H.pylori</i> (-)	
		GAS	SS	GAS	SS
正常组	17	80.91 ± 15.23	47.81 ± 16.88	87.77 ± 13.82	52.66 ± 15.05
胃轻瘫组	30	72.95 ± 15.35	62.65 ± 12.47	102.86 ± 23.92	56.41 ± 11.61
糖尿病组	23	105.84 ± 16.86	44.32 ± 10.09	97.10 ± 27.31	38.00 ± 13.04
DGP组	33	147.58 ± 16.68 ^{ab}	16.29 ± 4.27 ^{ab}	101.03 ± 23.84	36.29 ± 11.88

^a*P*<0.05 vs *H.pylori*(-)的DGP组; ^b*P*<0.01 vs 正常对照组、单纯胃轻瘫组、单纯糖尿病组。

缺氧, 并有实验证实*H.pylori*相关性高GAS血症并不是通过G细胞数量的增加来实现的, 可能与D细胞的数量减少, 功能受损, SS的抑制作用减弱有关^[12]。虽然胃黏膜中是否同样存在这种病理变化, 目前尚无报道, 但微血管病变可引起自主神经髓鞘样改变, 使胃肠蠕动减慢, 食物在胃内滞留时间延长, 会刺激GAS和胃酸分泌增加, 使胃黏膜更适宜*H.pylori*生长^[13]。*H.pylori*感染后可直接刺激和损害胃黏膜, 还可分泌毒素和引起宿主自身免疫反应而导致胃黏膜病变, 使SS的分泌细胞D细胞的结构破坏, 数量减少, 导致SS分泌降低, 而GAS分泌增加, 加重DGP^[14]。Brzozowski等^[15]在*H.pylori*根除治疗后, 发现幽门部SS浓度和D细胞密度显著增加, 幽门部GAS浓度和血清GAS水平均有下降。目前有研究发现^[16], *H.pylori*感染引起GAS的升高和SS低下的机制可能与D细胞近旁的炎症有关, 特别是细胞因子的影响, 如TNF- α 能以不同的方式调节培养的D细胞的SS释放, 且此效应可被IF-8所增强, 并认为*H.pylori*(+)者GAS分泌亢进的原因是幽门部SS分泌下降所致, 而*H.pylori*(-)者GAS分泌亢进可能与迷走神经抑制性控制有关。

总之, *H.pylori*感染可使DGP患者GAS升高, SS降低, 这一结果说明*H.pylori*感染导致的胃黏膜病变与糖尿病胃轻瘫有密切关系, 因此对糖尿病胃轻瘫患者进行*H.pylori*检测和抗*H.pylori*治疗是很有必要的。但是*H.pylori*感染引起高GAS血症的机制目前还不十分明确, 因此今后应继续在分子生物学及细胞学上进行深入的研究。

4 参考文献

- 1 张谦, 杨文奇. 2型糖尿病患者幽门螺旋杆菌感染及其临床意义. 长春中医药大学学报 2007; 23: 71
- 2 张丽婷, 胡团敏. 糖尿病胃轻瘫与幽门螺杆菌感染率的关系. 人民军医 2005; 48: 381-382
- 3 Intagliata N, Koch KL. Gastroparesis in type 2 diabetes mellitus: prevalence, etiology, diagnosis,

and treatment. *Curr Gastroenterol Rep* 2007; 9: 270-279

- 4 刘云, 孙岩, 薛绮萍, 李建民. 糖尿病胃轻瘫的诊断及发病机制. 世界华人消化杂志 2007; 15: 290-293
- 5 黄象谦. 续述幽门螺杆菌感染与胃肠激素的联系. 世界华人消化杂志 2005; 13: 280-285
- 6 郭昱, 郭霞, 姚希贤. 幽门螺杆菌对胃肠激素的影响. 世界华人消化杂志 2003; 11: 1752-1754
- 7 张荔群, 张鸣青. 2型糖尿病患者幽门螺杆菌感染致胃轻瘫临床分析. 中国慢性病预防与控制 2009; 17: 413-414
- 8 孙士东, 王淑芳, 倪永泽, 解洪媛, 徐飞, 毕英杰. 根除幽门螺杆菌对糖尿病胃轻瘫的疗效观察. 现代消化及介入诊疗 2009; 14: 24-25
- 9 Güvener N, Akcan Y, Paksoy I, Soylu AR, Aydin M, Arslan S, Gedik O. Helicobacter pylori associated gastric pathology in patients with type II diabetes mellitus and its relationship with gastric emptying: the Ankara study. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 1999; 107: 172-176
- 10 Schubert ML, Peura DA. Control of gastric acid secretion in health and disease. *Gastroenterology* 2008; 134: 1842-1860
- 11 Migdalis L, Thomaides T, Chairopoulos C, Kalogeropoulou C, Charalabides J, Mantzara F. Changes of gastric emptying rate and gastrin levels are early indicators of autonomic neuropathy in type II diabetic patients. *Clin Auton Res* 2001; 11: 259-263
- 12 Czaja M, Szarszewski A, Kamińska B, Bogotko-Szarszewska M, Luczak G, Kozielska E, Delińska-Galińska A, Korzon M. Serum gastrin concentration and changes in G and D cell densities in gastric antrum in children with chronic gastritis. *Int J Clin Pract* 2008; 62: 1044-1049
- 13 Joseph IM, Kirschner D. A model for the study of Helicobacter pylori interaction with human gastric acid secretion. *J Theor Biol* 2004; 228: 55-80
- 14 林辉, 任建林. 幽门螺杆菌与胃黏膜保护研究进展. 世界华人消化杂志 2005; 13: 2586-2590
- 15 Brzozowski T, Konturek PC, Mierzwa M, Drozdowicz D, Bielanski W, Kwiecien S, Konturek SJ, Stachura J, Pawlik WW, Hahn EG. Effect of probiotics and triple eradication therapy on the cyclooxygenase (COX)-2 expression, apoptosis, and functional gastric mucosal impairment in Helicobacter pylori-infected Mongolian gerbils. *Helicobacter* 2006; 11: 10-20
- 16 Wiedemann T, Loell E, Mueller S, Stoesselhuber M, Stolte M, Haas R, Rieder G. Helicobacter pylori cag-Pathogenicity island-dependent early immunological response triggers later precancerous gastric changes in Mongolian gerbils. *PLoS One* 2009; 4: e4754

■同行评价

本研究选题尚可, 设计合理, 具有参考价值。

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

胰岛素的流行病学特征及诊治经验调查3 524例

刘国强, 邱法波, 曲玉虎, 刘宁

■背景资料

胰岛素瘤是临床上少见疾病。Nicholis于1902年首先在尸检中发现胰岛素瘤,胰岛素瘤主要是合成和分泌过多的胰岛素,使血浆胰岛素浓度绝对升高。近年有很多个案报道,但对其流行病学特点尚无统一认识。本文复习中国近10年的文献资料,探讨胰岛素瘤的流行病学特征和诊治经验。

刘国强, 邱法波, 曲玉虎, 刘宁, 青岛大学医学院附属医院肝胆外科 山东省青岛市 266003

作者贡献分布: 刘国强与邱法波对此论文贡献均等; 此课题有刘国强与邱法波设计; 研究过程由刘国强、邱法波、曲玉虎及刘宁操作完成; 数据分析由刘国强、曲玉虎及刘宁完成; 本论文写作由刘国强与邱法波完成。

通讯作者: 邱法波, 副主任医师, 266003, 山东青岛市市南区江苏路16号, 青岛大学医学院附属医院肝胆外科。qiufabo@sina.com.cn 电话: 0532-82911323

收稿日期: 2010-02-03 修回日期: 2010-04-27

接受日期: 2010-05-10 在线出版日期: 2010-05-28

Epidemiological features, diagnosis and treatment of insulinoma: an analysis of 3 524 cases

Guo-Qiang Liu, Fa-Bo Qiu, Yu-Hu Qu, Ning Liu

Guo-Qiang Liu, Fa-Bo Qiu, Yu-Hu Qu, Ning Liu, Department of Hepatobiliary Surgery, the Affiliated Hospital of Medical College of Qingdao University, Qingdao 266003, Shandong Province, China.

Correspondence to: Fa-Bo Qiu, Department of Hepatobiliary Surgery, the Affiliated Hospital of Medical College of Qingdao University, 16 Jiangsu Road, Shinan District, Qingdao 266003, Shandong Province, China. qiufabo@sina.com.cn

Received: 2010-02-03 Revised: 2010-04-27

Accepted: 2010-05-10 Published online: 2010-05-28

Abstract

AIM: To study the epidemiological features of insulinoma in China during the last 10 years and to analyze its diagnosis and treatment.

METHODS: The reports of insulinoma published from 2000 to 2009 were retrieved from various databases, such as the China National Knowledge Infrastructure (CNKI). The epidemiological features, diagnosis and treatment of the disease were then analyzed.

RESULTS: A total of 3524 patients with insulinoma were reported in China during the last 10 years. The male to female ratio was approximately 1.02:1. The mean age of patients at the time of diagnosis was 40.7 years. Paroxysmal hypoglycemia was the main clinical manifestation of insulinoma. Epileptic manifestations were found in 17.6% of the patients. Surgical resection

was the most frequently used procedure for the treatment of insulinoma.

CONCLUSION: Insulinoma is mainly distributed in East and North China. It is difficult to diagnose insulinoma preoperatively. Surgery is effective for the disease. Neoplastic resection is the most frequently used procedure for the treatment of insulinoma.

Key Words: Insulinoma; Epidemiological feature; Diagnosis; Treatment

Liu GQ, Qiu FB, Qu YH, Liu N. Epidemiological features, diagnosis and treatment of insulinoma: an analysis of 3 524 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(15): 1620-1623

摘要

目的: 探讨中国近10年胰岛素的流行病学特征和诊疗经验。

方法: 联合检索中国生物医学文献数据库和中国知网等多家中文数据库有关胰岛素瘤的文章, 总结分析胰岛素的流行病学特征和诊治经验。

结果: 中国近10年共报道3 524例胰岛素瘤, 男女比例为1.02 : 1, 平均年龄40.7岁, 56.4%分布在华东、华北地区, 以阵发性发作的低血糖表现为主要症状, 17.6%的患者有癫痫表现。肿瘤摘(挖)除术是最主要的治疗手段。

结论: 胰岛素瘤主要分布在华东、华北地区, 术前诊断困难, 易被误诊, 手术切除是治疗此病有效方法, 手术以肿瘤摘(挖)除为主。

关键词: 胰岛素瘤; 流行病学特征; 诊断; 治疗

刘国强, 邱法波, 曲玉虎, 刘宁. 胰岛素的流行病学特征及诊治经验调查3 524例. *世界华人消化杂志* 2010; 18(15): 1620-1623
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/1620.asp>

0 引言

胰岛素瘤(insulinoma)为胰岛B细胞肿瘤, 亦称内

■同行评议者

戴朝六, 教授, 中国医科大学第二临床学院(盛京医院)肝胆外科

源性高胰岛素血症, 是胰岛B细胞形成的具有内分泌功能的腺瘤或癌(少数为增生), 是最常见的胰岛细胞肿瘤^[1]. 但临床上少见, 临床表现多样, 部分患者以精神症状为主要表现^[2,3], 治疗以手术为主^[4,5]. 近年有很多个案报道, 但对其流行病学特点尚无统一认识. 本文复习中国近10年的文献资料, 探讨胰岛素瘤的流行病学特征和诊治经验.

1 材料和方法

1.1 材料 以胰岛素瘤为检索关键词, 联合检索中国生物医学文献数据库和中国知识资源总库等多家中文数据库2000-2009年的相关文献, 检索到293篇文献, 共报道病例5 013例.

1.2 方法 选取可获得全文并可获得相关信息的文章. 首先去除重复文献, 其次同一医院不同时期的病例报道, 无重叠病例者全部选用, 重叠病例选用时间跨度最长、病例数最多的文献. 最后共得到有效统计文献共191篇, 共有3 524例胰岛素瘤. 应用回顾性的分析方法对胰岛素瘤的流行强度、时间分布、空间分布、人群分布、预后转归、误诊原因等进行描述分析.

2 结果

每年年度报道的文献及病例情况见图1.

2.1 地区 相关文献报道中, 3 491例患者有地区信息报道, 按照7个地区划分: 东北地区456例(13.1%), 发病率约为1/23.4万(各地人口数据按第五次全国人口普查统计); 华北地区802例(23.0%), 发病率约为1/18.5万; 西北地区109例(3.1%), 发病率约为1/84.1万; 华东地区1 166例(33.4%), 发病率约为1/31.3万; 华南地区149例(4.3%), 发病率约为1/97.9万; 华中地区635例(18.2%), 发病率约为1/34.2万; 西南地区174例(5.0%), 发病率为约1/112.0万. 中国的胰岛素瘤主要(56.4%)分布在华北、华东地区. 这可能与当地气候或饮食有关.

2.2 性别和年龄 3 460例患者有性别信息报道, 这其中男1 750例, 女1 710例, 男女比例约为1.02:1, 男性发病例数约等于女性, 这与部分文献^[6]所报道的该病多发于女性有所不同. 本组病例中, 年龄7-81岁, 平均40.7岁, 年龄分布广泛, 但主要集中在30-50岁.

2.3 症状 患者以Whipple三联征表现为主要表现, 所有患者均表现出Whipple三联征. 另外, 1 937例有明确症状报道的患者当中: 有精神紊乱症

状(昏迷、意识障碍等)的患者有1 061例(54.8%), 有癫痫(意识丧失、肌肉痉挛等)表现的患者340例(17.6%), 因此该病易被诊断成为癫痫、癔症等疾病.

2.4 入院诊断 有明确入院诊断的1 512例患者中416例(27.5%)入院诊断为癫痫, 入院诊断为癔症103例(6.8%)、入院诊断为神经系统障碍(包括脑出血等中枢神经器质性病变)141例(9.3%). 可见该病易被误诊(总误诊率为43.7%).

2.5 实验学诊断 所有患者均行血糖测定, 均为低血糖(以血糖<2.8 mmol/L为准); 1 124例患者行反应性胰岛素测定, 阳性1 040例(92.5%); 行胰岛素/血糖(以IRI/G>0.3为准)检测1286例, 阳性1 226例(95.3%); 行饥饿实验286例, 阳性280例(97.9%); 行糖耐量实验650例, 阳性453例(69.7%); 行血C肽水平测定240例, 阳性223例(92.9%). 可见饥饿实验是最准确的实验学检查方法.

2.6 影像学诊断及定位

2.6.1 术前诊断及定位: 患者中行超声(主要指B超)检查1 777例, 阳性674例(37.9%), 准确定位505例(28.4%); 行内镜超声(EUS)检查122例, 阳性95例(77.9%), 准确定位89例(73.0%); 行腹腔镜超声(LIOUS)检查45例, 阳性41例(91.1%), 准确定位41例(91.1%); 行超声造影(CEUS)检查42例, 阳性38例(90.4%), 准确定位38例(90.4%); 行CT检查1 410例, 阳性781例(55.4%), 准确定位763例(54.1%); 行MRI检查344例, 阳性198例(57.6%), 准确定位194例(56.4%); 行DSA造影检查529例, 阳性410例(77.5%), 准确定位377例(71.3%); 行选择性动脉钙刺激肝静脉采血测胰岛素(ASVS)检查68例, 阳性61例(89.7%), 准确定位61例(89.7%); 行经皮肝穿刺门、脾静脉测定胰岛素(PTPC)检查60例, 阳性53例(88.3%), 准确定位53例(88.3%). 可见腹腔镜超声等有创检查的准确率较高.

2.6.2 术中定位: 250例患者有明确术中触诊定位报道, 准确定位206例(82.4%); 516例患者行术中B超检查, 准确定位493例(95.5%); 行脾静脉分段取血测定胰岛素35例, 准确定位32例(91.4%).

2.7 手术治疗

2.7.1 手术方式: 2 357例患者有明确手术方式报道, 其中行肿瘤摘除术(包括腹腔镜肿瘤切除术)1 668例(70.8%); 行肿瘤及部分胰腺组织切除术(胰腺区段性切除包括行相关的吻合术)105例(4.5%); 行胰体尾切除术(合并脾切除术)379例

■创新盘点

本文系统地分析疾病的流行病学特征及诊治经验, 对胰岛素瘤消长及特征变化规律进行描述, 完整揭示胰岛素瘤自然转归史.

应用要点

本文主要是系统性的介绍胰岛素的流行病学特征及诊治经验,为探索胰岛素瘤病因,加强对胰岛素瘤的诊断提供帮助,并为胰岛素瘤的临床治疗提供思路。

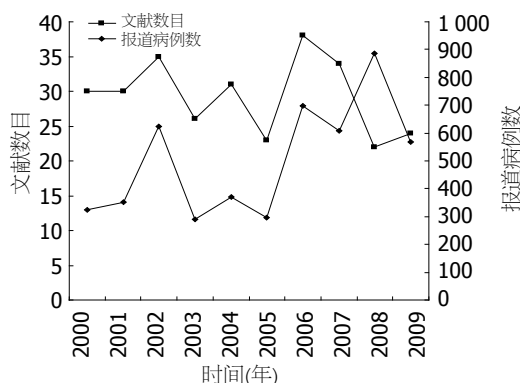


图1 中国胰岛素瘤年度报道情况。

(16.1%); 行胰体尾切除术(不合并脾切除术)155例(6.6%); 行胰十二指肠切除术38例(1.6%); 仅行剖腹探查活检术12例(0.51%)。余病例患者因经济状况等原因未行手术治疗,或无报道。

2.7.2 术后并发症: 2262例手术有明确的术后并发症报道,术后出现胰瘘440例(19.45%); 胰腺假性囊肿20例(0.88%); 腹腔感染或脓肿45例(1.99%); 急性胰腺炎52例(2.30%); 其他(包括切口愈合不良、胃排空障碍、肺部感染等非特异性并发症)83例(3.67%)。可见胰瘘是最主要的术后并发症。

2.8 肿瘤情况

2.8.1 肿瘤单多发: 3279例患者中单发肿瘤3055例(93.2%); 多发肿瘤224例(6.8%)。

2.8.2 肿瘤分布: 2864例肿瘤分布于胰头及钩突部854例(29.8%); 胰颈部58例(2.0%); 胰体部896例(31.3%); 胰尾部1042例(36.4%); 异位肿瘤16例(0.6%)。肿瘤全胰腺均有分布,胰头、胰体、胰尾约各占1/3。

2.8.3 肿瘤大小: 本组病例中1126例肿瘤有大小报道,其中<10.0 mm 166例(14.7%); 10.0-19.9 mm 696例(61.8%); 20.0-29.9 mm 186例(16.5%); ≥30.0 mm 78例(6.9%)。

2.8.4 病理诊断: 2533例肿瘤中良性肿瘤2325例(91.8%); 恶性肿瘤166例(6.6%); 胰岛细胞增生42例(1.7%)。有报道的56例恶性肿瘤中41例(73.2%)有转移。

2.9 辅助治疗 恶性胰岛素瘤的辅助治疗包括动脉栓塞、介入化疗、生长抑素治疗等,在恶性胰岛素瘤的治疗中占有重要位置,链脲霉素由于能够选择性破坏胰腺内分泌细胞,被公认为恶性胰岛瘤化疗的首选药物,但由于实践中链脲霉素不易取得,因此应用较少。也有用FAM(5-FU、EPI、MMC)+IL-2的化疗方案,也取得了比

较理想的效果,本研究共报道3例患者接受上述方案化疗后,效果良好。

2.10 预后 共有1689例报道治疗结果,其中治愈1562例(92.5%)、未愈57例(3.4%)、复发42例(2.5%)、死亡28例(1.7%)。

3 讨论

胰岛素瘤是一种少见病,有报道称发病率为1/25万^[7,8],但临床并不罕见。该病导致低血糖反复发作,给患者带来极大危害,必须进行外科手术才能治愈。由于其临床症状复杂多变,易于误诊,治疗也有其特殊性和复杂性。自发现该病至今的100余年来,随着对胰岛素瘤认识水平的提高,影像学技术的进步和外科手术技术的发展,胰岛素瘤在定位诊断和外科治疗方面均发生了显著变化。

胰岛素瘤的病因还不清楚,可能与下列因素有关: 基因突变、细胞凋亡、神经递质、生长因子、胃肠激素^[9]。

胰岛素瘤一般具有明显的低血糖及神经系统症状,加之由于发病率较低,因此容易被误诊成各种神经系统疾病[本组病例误诊为癫痫27.5%,误诊为癔症6.8%、其他神经系统障碍(包括脑出血等中枢神经器质性病变)9.3%]。

胰岛素瘤定性诊断依然依靠Whipple三联征以及低血糖发作时IRI/G(本文统计病例中具有上述典型症状的比例为95.3%),但有少部分患者血糖可在正常范围,且影响血糖的因素很多,如肝肾功能不佳、营养不良等皆可出现低血糖,Whipple三联征并非胰岛素瘤所特有,如腺垂体功能减退、肾上腺皮质功能不足、严重的肝病和肿瘤等均有Whipple三联征,可借助饥饿试验等方法进行诊断和鉴别诊断^[10]。C肽测定等新的实验学方法也开始广泛应用。

关于定位诊断胰岛素瘤的定位诊断经历了从简单到复杂的过程。目前胰岛素瘤的定位诊断方法较多,但均存在一定的局限性^[11]。B超、CT、MRI等传统影像学方法仍然在胰岛素瘤的定性、定位诊断中占有重要地位,由于胰岛素瘤多数较小(国外报道78%的肿瘤直径小于2 cm^[12],本组数据76.6%的肿瘤直径小于2 cm),而胰岛素瘤的组织密度和正常胰腺相近,所以非侵入性检查如B超、CT的阳性率不高,虽然其准确率稍低(本组实验定位准确率分别为28.4%、54.1%、56.4%)但具有无创、操作简单等优点。虽然一些有创检查如PTPC和ASVS对许多疑难

胰岛素瘤的诊断发挥了重要作用,但这些有创检查费用高、创伤大、技术复杂仅限在一些大型医疗中心开展^[13,14]。术中定位诊断仍然发挥着重要作用,最佳定位手段是术中超声加外科医师探查^[15],盲切已逐渐废弃^[16,17]。

胰岛素瘤的治疗仍以手术为主,由于胰岛素瘤全胰腺均有分布,因此手术多样,本组病例中肿瘤摘除术(包括腹腔镜肿瘤切除术)(70.8%),肿瘤及部分胰腺组织切除术(胰腺区段性切除包括行相关的吻合术)(4.5%),胰体尾切除术(合并脾切除术)(16.1%),胰体尾切除术(不合并脾切除术)(6.6%),胰十二指肠切除术(1.6%)。胰岛素瘤以良性为主(本组91.8%为良性),且具有较好的预后。

总之,胰岛素瘤属少见疾病,其诊断和处理具有特殊性,因此处理此类患者应具有丰富的临床经验,以期获得满意效果。定位诊断发展迅速,已进入了以多排螺旋CT胰腺灌注,结合EUS等无创检查手段为主的新时代。随着外科技术进步,对胰岛素瘤的手术处理方式也多样,对多发胰岛素瘤仍应仔细探查,避免遗漏病灶。对于部分恶性肿瘤患者,化疗也可有效地缓解低血糖症状,改善生活质量,延长生存时间^[18,19]。

4 参考文献

- Jensen RT. Pancreatic endocrine tumors: recent advances. *Ann Oncol* 1999; 10 Suppl 4: 170-176
- 曾纡, 王凌云, 郑民纡, 张成, 张为西. 55例胰岛素瘤所致神经精神症状的临床研究. *中国神经精神疾病杂志* 2006; 32: 176-178
- 茅江泳, 林擎天. 胰岛素瘤的诊断和治疗. *肝胆胰外科杂志* 2006; 18: 170-171
- 赵玉沛, 朱预. 胰岛素瘤的手术治疗. *胃肠病学和肝病学杂志* 1996; 5: 245-250, 253
- 马英梅, 袁淑兰. 胰岛素瘤12例的围手术期护理. *中国误诊学杂志* 2007; 7: 873-874
- Pereira PL, Wiskirchen J. Morphological and functional investigations of neuroendocrine tumors of the pancreas. *Eur Radiol* 2003; 13: 2133-2146
- 魏伟, 汤恢煊, 霍胜军, 李巨仕. 胰岛素瘤的诊断和治疗: 附30例报告. *中国普通外科杂志* 2008; 17: 261-263
- 赵玉沛, 丛林, 张太平, 廖泉, 戴梦华, 刘子文, 蔡力行, 朱预. 胰岛素瘤404例诊治分析. *中国实用外科杂志* 2008; 28: 357-359
- 王雪梅. 胰岛素瘤的发病机制. *临床内科杂志* 2002; (S1): 42-44
- 公伟, 李占元, 曾庆东, 梁飞. 胰岛素瘤的诊治分析(附49例报告). *中华肝胆外科杂志* 2004; 10: 514-516
- 冯静, 李启富. 禁食激发试验在胰岛素瘤患者诊断中的意义研究. *临床荟萃* 2007; 22: 648-649
- Lo CY, Lam KY, Kung AW, Lam KS, Tung PH, Fan ST. Pancreatic insulinomas. A 15-year experience. *Arch Surg* 1997; 132: 926-930
- Wiesli P, Brändle M, Schmid C, Krähenbühl L, Furrer J, Keller U, Spinass GA, Pfammatter T. Selective arterial calcium stimulation and hepatic venous sampling in the evaluation of hyperinsulinemic hypoglycemia: potential and limitations. *J Vasc Interv Radiol* 2004; 15: 1251-1256
- 张太平, 赵玉沛, 蔡力行, 朱预. 胰岛素瘤定位诊断方法的选择与评价. *中华肝胆外科杂志* 2005; 11: 818-820
- 赵玉沛, 张太平. 胰岛素瘤诊断的进展. *中国实用外科杂志* 1997; 17: 74-75
- 赵玉沛, 王欣, 杨波, 肖毅, 蔡力行, 钟守先, 朱预. 220例胰岛素瘤诊治分析. *中华外科杂志* 2000; 38: 10-13
- Hirshberg B, Libutti SK, Alexander HR, Bartlett DL, Cochran C, Livi A, Chang R, Shawker T, Skarulis MC, Gorden P. Blind distal pancreatectomy for occult insulinoma, an inadvisable procedure. *J Am Coll Surg* 2002; 194: 761-764
- Hirshberg B, Cochran C, Skarulis MC, Libutti SK, Alexander HR, Wood BJ, Chang R, Kleiner DE, Gorden P. Malignant insulinoma: spectrum of unusual clinical features. *Cancer* 2005; 104: 264-272
- 王磊, 赵玉沛, 陈革, 廖泉. 恶性胰岛素瘤的诊断和治疗(附9例报道). *肝胆外科杂志* 2004; 12: 88-90

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

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

• 消息 •

WJG 成功通过评审被 PMC 收录

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

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

《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, CN 14-1260/R)》是一份同行评议性和开放获取(open access, OA)的旬刊。OA最大的优点是面向全国本领域专家及公众开放无需注册, 免费获取PDF等格式的全文, 切实破除了传统性期刊阻碍科学研究成果快速传播的障碍。OA是一项真正意义上的公益性科学传播工具, 编委、作者和读者利益的最大化的目标, 努力推进本学科的繁荣和发展。

《世界华人消化杂志》定价56.00元, 全年2016.00元, 邮发代号82-262, 由世界华人消化杂志编辑部出版。《世界华人消化杂志》主要报道胃肠病学、肝胆病学、胰腺病学、内镜介入与消化外科等多学科的评论及基础研究和临床实践等各类文章, 具体内容涉及: 食管疾病, 如反流性食管炎、Barret's食管、食管静脉曲张和食管癌等; 胃部疾病, 胃食管反流性疾病、胃炎、胃动力障碍、胃出血、胃癌和幽门螺杆菌感染等; 肠道疾病, 如肠道出血、肠穿孔、肠梗阻、肠道炎症(如IBD/CD等)、肠道感染、大肠癌和大肠腺瘤等; 肝胆部疾病如病毒性肝炎、肝硬化、脂肪肝、肝纤维化、肝衰竭、胆石病、胆汁郁积、梗阻性黄疸、肝癌、胆囊癌、胆管癌和门静脉高压等; 胰腺疾病, 如胰腺炎和胰腺癌等; 全身性疾病涉及消化系统, 如自身免疫性及瘀胆性疾病、腹腔疾病、消化不良和代谢性疾病等; 以及与以上疾病相关的基因及基因组学、微生物及分子生物学、病因学、流行病学、免疫学、临床内外科诊断与治疗(如影像、化疗、移植、营养等); 除以上外, 本刊也报道诊断与筛选、内窥镜检查法、影像及先进技术。

《世界华人消化杂志》被国际检索系统美国《化学文摘》(Chemical Abstracts, CA)、荷兰《医学文摘库/医学文摘(EMBase/Excerpta Medica, EM)》和俄罗斯《文摘杂志(Abstract Journal, AJ)》收录。国内为中国科技论文统计与分析期刊(科技部列选为中国科技论文统计源期刊)、《中文核心期刊要目总览》(2008年版)内科学类的核心期刊、《中国学术期刊评价研究

报告-RCCS权威、核心期刊排行榜与指南》和中国知识资源总库收录。2008年度《世界华人消化杂志》总被引频次为2480, 位居内科学类41种期刊的第6位; 影响因子为0.547, 位居内科医学类41种期刊的第17位。《世界华人消化杂志》即年指标0.059, 他引率0.79, 地区分布数29, 基金论文比0.340, 国际论文比0.00, 学科影响指标0.59, 综合评价总分49.5, 位居内科学类41种期刊的第8位。

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

2 撰稿要求

2.1 总体标准 文稿撰写应遵照国家标准GB7713科学技术报告、学位论文和学术论文的编写格式, GB6447文摘编写规则, GB7714文后参考文献著录规则, GB/T 3179科学技术期刊编排格式等要求; 同时遵照国际医学期刊编辑委员会(International Committee of Medical Journal Editors)制定的《生物医学期刊投稿的统一要求(第5版)》(Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals)。见: *Ann Intern Med* 1997; 126: 36-47。

2.2 名词术语 应标准化, 前后统一, 如原词过长且多次出现者, 可于首次出现时写出全称加括号内注简称, 以后直接用简称。医学名词以全国自然科学名词审定委员会公布的《生理学名词》、《生物化学名词与生物物理学名词》、《化学名词》、《植物学名词》、《人体解剖学名词》、《细胞生物学名词》及《医学名词》系列为准, 药名以《中华人民共和国药典》和卫生部药典委员会编的《药名词汇》为准, 国家食品药品监督管理局批准的新药, 采用批准的药名; 创新性新药, 请参照我国药典委员会的“命名原则”, 新译名词应附外文。公认习用缩略语可直接应用(建议第一次也写出全称), 如ALT, AST, mAb, WBC, RBC, Hb, T, P, R, BP, PU, GU, DU, ACTH, DNA, LD50, HBsAg, HCV

RNA, AFP, CEA, ECG, IgG, IgA, IgM, TCM, RIA, ELISA, PCR, CT, MRI等. 为减少排印错误, 外文、阿拉伯数字、标点符号必须正确打印在A4纸上. 中医药名词英译要遵循以下原则: (1)有对等词者, 直接采用原有英语词, 如中风stroke, 发热fever; (2)有对应词者应根据上下文合理选用原英语词, 如八法eight principal methods; (3)英语中没有对等词或相应词者, 宜用汉语拼音, 如阴yin, 阳yang, 阴阳学说yinyangology, 人中renzhong, 气功qigong; 汉语拼音要以词为单位分写, 如weixibao nizhuanwan(胃细胞逆转丸), guizhitang(桂枝汤). 通常应小写.

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

2.4 计量单位 采用国际单位制并遵照有关国家

标准, GB3100-3102-93量和单位. 原来的“分子量”应改为物质的相对分子质量. 如30 kD改为 M_r 30 000或30 kDa(M大写斜体, r小写正体, 下角标); “原子量”应改为相对原子质量, 即 A_r (A大写斜体, r小写正体, 下角标); 也可采用原子质量, 其单位是u(小写正体). 计量单位在+、-及-后列出. 在±前后均要列出, 如37.6 °C ± 1.2 °C, 45.6岁 ± 24岁, 56.4 d ± 0.5 d. 3.56 ± 0.27 pg/ml应为3.56 ng/L ± 0.27 ng/L. BP用kPa(mmHg), RBC数用 1×10^{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字的文句中, 例如每天不写每d, 但每天8 mg可写8 mg/d. 在一个组合单位符号内不得有1条以上的斜线, 例如不能写成mg/kg/d, 而应写成mg/(kg·d), 且在整篇文章内应统一. 单位符号没有单、复数的区分, 例如, 2 min不是2 mins, 3 h不是3 hs, 4 d不是4 ds, 8 mg不是8 mgs. 半个月, 15 d; 15克, 15 g; 10%福尔马林, 40 g/L甲醛; 95%酒精, 950 mL/L乙醇; 5% CO₂, 50 mL/L CO₂; 1 : 1 000肾上腺素, 1 g/L肾上腺素; 胃黏膜含促胃液素36.8 pg/mg, 改为胃黏膜蛋白含促胃液素36.8 ng/g; 10%葡萄糖改为560 mmol/L或100 g/L葡萄糖; 45 ppm = 45×10^{-6} ; 离心的旋转频率(原称转速)用r/min, 超速者用g; 药物剂量若按体质量计算, 一律以“/kg”表示.

《世界华人消化杂志》为中国科技论文统计源核心期刊(2009年)和中文核心期刊要目总览(北京大学图书馆, 2008年版)收录的学术期刊.

《世界华人消化杂志》编辑部, 100025, 北京市朝阳区, 东四环中路62号, 远洋国际中心D座903室, 电话: 010-85381901, 传真: 010-85381893, Email: wjcd@wjgnet.com; http://www.wjgnet.com

2.5 统计学符号 (1) t 检验用小写 t ; (2) F 检验用英文大写 F ; (3)卡方检验用希文小写 χ^2 ; (4)样本的相关系数用英文小写 r ; (5)自由度用希文小写 ν ; (6)样本数用英文小写 n ; (7)概率用英文斜体大写 P . 在统计学处理中在文字叙述时平均数 \pm 标准差表示为 $\text{mean} \pm \text{SD}$, 平均数 \pm 标准误为 $\text{mean} \pm \text{SE}$. 统计学显著性用 $^aP < 0.05$, $^bP < 0.01$ ($P > 0.05$ 不注). 如同一表中另有一套 P 值, 则 $^cP < 0.05$, $^dP < 0.01$; 第三套为 $^eP < 0.05$, $^fP < 0.01$ 等.

2.6 数字用法 遵照国家标准GB/T 15835-1995出版物上数字用法的规定, 作为汉语词素者采用汉字数字, 如二氧化碳、十二指肠、三倍体、四联球菌、五四运动、星期六等. 统计学数字采用阿拉伯数字, 如1000-1500 kg, 3.5 mmol/L \pm 0.5 mmol/L等. 测量的数据不能超过其测量仪器的精密度, 例如6347意指6000分之一的精密度. 任何一个数字, 只允许最后一位有误差, 前面的位数不应有误差. 在一组数字中的 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 应考虑到个体的变差, 一般以SD的1/3来定位数, 例如3614.5 g \pm 420.8 g, SD的1/3达一百多g, 平均数波动在百位数, 故应写成3.6 kg \pm 0.4 kg, 过多的位数并无意义. 又如8.4 cm \pm 0.27 cm, 其SD/3 = 0.09 cm, 达小数点后第2位, 故平均数也应补到小数点后第2位. 有效位数以后的数字是无效的, 应该舍. 末尾数字, 小于5则舍, 大于5则进, 如恰等于5, 则前一位数逢奇则进, 逢偶(包括“0”)且5之后全为0则舍. 末尾时只可1次完成, 不得多次完成. 例如23.48, 若不要小数点, 则应成23, 而不应该23.48 \rightarrow 23.5 \rightarrow 24. 年月日采用全数字表达法, 请按国家标准GB/T 7408-94书写. 如1985年4月12日, 可写作1985-04-12; 1985年4月, 写作1985-04; 从1985年4月12日23时20分50秒起至1985年6月25日10时30分止, 写作1985-04-12 T23:20:50/1985-06-25 T10:30:00; 从1985年4月12日起至1985年6月15日止, 写作1985-04-12/06-16, 上午8时写作08:00, 下午4时半写作16:30. 百分数的有效位数根据分母来定: 分母 ≤ 100 , 百分数到个位; $101 \leq$ 分母 ≤ 1000 , 百分数到小数点后1位; 余类推. 小数点前后的阿拉伯数字, 每3位间空1/4阿拉伯数字距离, 如1486800.475 65. 完整的阿拉伯数字不移行!

2.7 标点符号 遵照国家标准GB/T 15834-1995标点符号用法的要求, 本刊论文中的句号都采用黑圆点; 数字间的起止号采用“-”字线, 并列的汉语词间用顿号分开, 而并列的外文词、阿拉伯数字、外文缩略词及汉语拼音字母拼写词间改用逗号分开, 参考文献中作者间一律用逗号

分开; 表示终了的标点符号, 如句号、逗号、顿号、分号、括号及书名号的后一半, 通常不用于一行之首; 而表示开头的标点符号, 如括号及书名号的前一半, 不宜用于一行之末. 标点符号通常占一格, 如顿号、逗号、分号、句号等; 破折号应占两格; 英文连字符只占一个英文字符的宽度, 不宜过长, 如5-FU. 外文字符下划一横线表示用斜体, 两横线表示用小写, 三横线表示用大写, 波纹线表示用黑体.

3 稿件格式

3.1 题名 简明确切地反映论文的特定内容, 鲜明而有特色, 阿拉伯数字不宜开头, 不用副题名, 一般20个字. 避免用“的研究”或“的观察”等非特定词.

3.2 作者 论文作者的署名, 按照国际医学杂志编辑委员会(ICMJE, International Committee of Medical Journal Editors)作者资格标准执行. 作者标准为: (1)对研究的理念和设计、数据的获得、分析和解读做出重大贡献; (2)起草文章, 并对文章的重要的知识内容进行批评性修改; (3)接受对准备发表文章的最后一稿. 作者应符合条件1, 2, 3, 对研究工作有贡献的其他人可放入致谢中. 作者署名的次序按贡献大小排列, 多作者时姓名间用逗号, 如是单名, 则在姓与名之间空1格(正文和参考文献中不空格). 《世界华人消化杂志》要求所有署名人写清楚自己对文章的贡献. 世界华人消化杂志不设置共同第一作者和共同通信作者.

3.3 单位 作者后写单位的全称空1格后再写省市及邮政编码. 格式如: 张旭晨, 梅立新, 承德医学院病理教研室 河北省承德市 067000

3.4 第一作者简介 格式如: 张旭晨, 1994年北京中医药大学硕士, 讲师. 主要从事消化系统疾病的病理研究.

3.5 作者贡献分布 格式如: 陈湘川与庞丽娟对此文所作贡献两均等; 此课题由陈湘川、庞丽娟、陈玲、杨兰、张金芳、齐妍及李洪安设计; 研究过程由陈玲、杨兰、张金芳、蒋金芳、杨磊、李锋及曹秀峰操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由曹秀峰提供; 数据分析由陈湘川、杨兰及庞丽娟完成; 本论文写作由陈湘川、庞丽娟及李洪安完成.

3.6 同行评议者 为了确保刊出文章的质量, 本刊即将开始实行接受稿件的同行评议公开策略, 将同行评议者姓名, 职称, 机构的名称与文章一同在脚注出版. 格式如: 房静远, 教授, 上海交通大学

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。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。黑白图请附黑白照片, 并考入磁盘内; 彩色图请提供冲洗的彩色照片, 请不要提供计算机打印的照片。彩色图片大小 $7.5\text{ cm}\times 4.5\text{ cm}$, 必须使用双面胶条粘贴在正文内, 不能使用浆糊粘贴。

志谢 后加冒号, 排在讨论后及参考文献前, 左齐。

4 参考文献 本刊采用“顺序编码制”的著录方法, 即以文中出现顺序用阿拉伯数字编号排序。提倡对国内同行近年已发表的相关研究论文给予充分的反映, 并在文内引用处右上

《世界华人消化杂志》自2006-01-01起改为旬刊发行, 每月8、18、28日出版。北京报刊发行局发行, 邮发代号: 82-262。

2010年,《世界华人消化杂志》将坚持开放获取(open access, OA)的出版模式,编辑出版高质量文章,努力实现编委、作者和读者利益的最大化,努力推进本学科的繁荣和发展,向专业化、特色化和品牌化方向迈进。

角加方括号注明角码。文中如列作者姓名,则需在“Pang等”的右上角注角码号;若正文中仅引用某文献中的论述,则在论述的句末右上角注角码号。如马连生^[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。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。参考文献格式如下:

- 1 Jung EM, Clevert DA, Schreyer AG, Schmitt S, Rennert J, Kubale R, Feuerbach S, Jung F. Evaluation of quantitative contrast harmonic imaging to assess malignancy of liver tumors: A prospective controlled two-center study. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 6356-6364 [PMID: 18081224; DOI: 10.3748/wjg.13.6356]
- 2 马连生, 潘伯荣, 马景云. 世界胃肠病学杂志英文版的现状. *世界华人消化杂志* 2001; 9: 855-863
- 3 Lam SK. Academic investigator's perspectives of medical treatment for peptic ulcer. In: Swabb EA, Azabo S, eds. *Ulcer disease: investigation and basis for therapy*. New York: Marcel Dekker, 1991: 431-450
- 4 尚克中, 陈九如. 胃肠道造影原理与诊断. 第1版. 上海: 上海科学技术文献出版社, 1995: 382-385

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 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处理费及发表费,文章发表后可获得1本样刊及10套单行本(稿酬)。

5 修回稿须知

5.1 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。

5.2 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。

5.3 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: 010-8538-1892
传真: 010-8538-1893
E-mail: wcjd@wjgnet.com
<http://www.wjgnet.com>

2010年国内国际会议预告

2010-05-28/31

2010中国普外科焦点问题学术论坛

会议地点: 兰州市

联系方式: 2010fis@gmail.com

2010-06-04/06

2010国际腹部创伤暨第十届全国脾脏外科学术研讨会

会议地点: 合肥市

联系方式: qiaohaiquan2008@yahoo.com.cn

2010-06-04/06

第二届世纪坛国际结直肠肛门病论坛

会议地点: 北京市

联系方式: luoch301@gmail.com

2010-06-17/21

2010年全国肝脏疾病临床学术大会暨欧洲肝病学会日

会议地点: 厦门市

联系方式: zhgz@vip.163.com

2010-07-15/18

第四届地坛国际感染病会议(DICID)

会议地点: 北京市

联系方式: info@bjditan.org

2010-08-18/21

第二十一届世界癌症大会

会议地点: 深圳市

联系方式: bgs@caca.sina.net

2010-08-19/22

第二十二次全国中西医结合消化学术会议

会议地点: 苏州市

联系方式: szzyy88@163.com

2010-09-01

中华医学会第十次全国消化系统疾病学术会议

会议地点: 成都市

联系方式: <http://www.csgd.org.cn/2010/>

2010-09-01

第二次肝纤维化、肝硬化学术会议

会议地点: 太原市

联系方式: lijuyi@cma.org.cn

2010-09-08/12

第九届全国介入放射学学术大会

会议地点: 广州市

联系方式: csir2010@163.com

2010-09-09/11

中华医学会第十一次全国感染病学术会议

会议地点: 重庆市

联系方式: infectioncma@163.com

2010-09-10/12

第四届国际肝病学会年会

会议地点: 加拿大, 蒙特利尔

联系方式: info@ilca-online.org

2010-09-16/19

第十三届全国临床肿瘤学大会暨2010年CSCO学术年会

会议地点: 北京市

联系方式: <http://reg.cSCO.org.cn/reg2010/>

2010-09-21/25

肝脏疾病病理基础及治疗进展

会议地点: 西安市

联系方式: 029-85323924

2010-10-23/27

第十八届欧盟胃肠病周

会议地点: 西班牙, 巴塞罗那

联系方式: <http://uegw10.uegf.org/>

2010-10-28/30

中华医学会第十次全国消化系统疾病学术会议

会议地点: 成都市

联系方式: yjliu@cma.org.cn

2010-11-17/20

中华医学会糖尿病学分会第十四次全国学术会议

会议地点: 苏州市

联系方式: fredfeng@cma.org.cn

2010-11-18/21

第十四届全国胆道外科学术会议暨2010中国国际肝胆外科论坛

会议地点: 上海市

联系方式: ncbs_cifhbs@126.com

2010-12-02/06

第九届广东省消化内镜学术年会

会议地点: 广州市

联系方式: 020-61641541

2010-12-26/30

肝胆疾病-肝功能衰竭治疗新理念

会议地点: 南京市

联系方式: 025-83106666-66866

志谢世界华人消化杂志编委

本期文章审稿中(包括退稿), 我刊编委付出了宝贵的时间和大量的精力, 提高了《世界华人消化杂志》的学术质量, 在此表示衷心感谢!

曹杰 主任医师
广州医学院附属广州市第一人民医院胃肠外科

陈红松 研究员
北京大学人民医院肝病研究所

陈敬贤 教授
合肥市梅山路安徽医科大学微生物教研室

陈立波 教授
华中科技大学同济医学院附属协和医院肝胆外科中心

陈其奎 教授
中山大学附属第二医院消化内科

戴朝六 教授
中国医科大学第二临床学院(盛京医院)肝胆外科

范小玲 主任医师
北京地坛医院综合科

房静远 教授
上海交通大学医学院附属仁济医院, 上海市消化疾病研究所

冯志杰 主任医师
河北医科大学第二医院消化内科

高润平 教授
吉林大学第一医院肝病科

巩鹏 教授
大连医科大学附属第一医院普外二科

谷俊朝 主任医师
首都医科大学附属北京友谊医院普外科

洪天配 教授
北京大学第三医院内分泌科

黄晓东 副主任医师
武汉市中心医院消化内科

黄国 教授
四川大学华西药学院药剂系

李胜 研究员
山东省肿瘤防治研究院肝胆外科

李勇 副教授
上海中医药大学附属市中医院消化科

刘宝瑞 教授
南京大学医学院附属鼓楼医院肿瘤中心

刘克辛 教授
大连医科大学药学院

刘丽江 教授
江汉大学医学院病理学

龙学颖 副主任医师
中南大学湘雅医院放射科

沈洪 教授
南京中医药大学附属医院江苏省中医院消化科

孙明军 教授
中国医科大学附属第一医院内镜中心

邵升 副教授
哈尔滨医科大学附属二院肝胆外科

徐大华 副主任医师
首都医科大学宣武医院普外科

张凤春 教授
上海交通大学医学院附属仁济医院肿瘤中心

张小晋 主任医师
北京积水潭医院消化内科

张筱茵 副教授
中国人民解放军第四军医大学西京医院消化疾病研究所

张宗明 教授
清华大学第一附属医院消化医学中心

周伟平 教授
中国人民解放军第二军医大学东方肝胆外科医院肝外三科