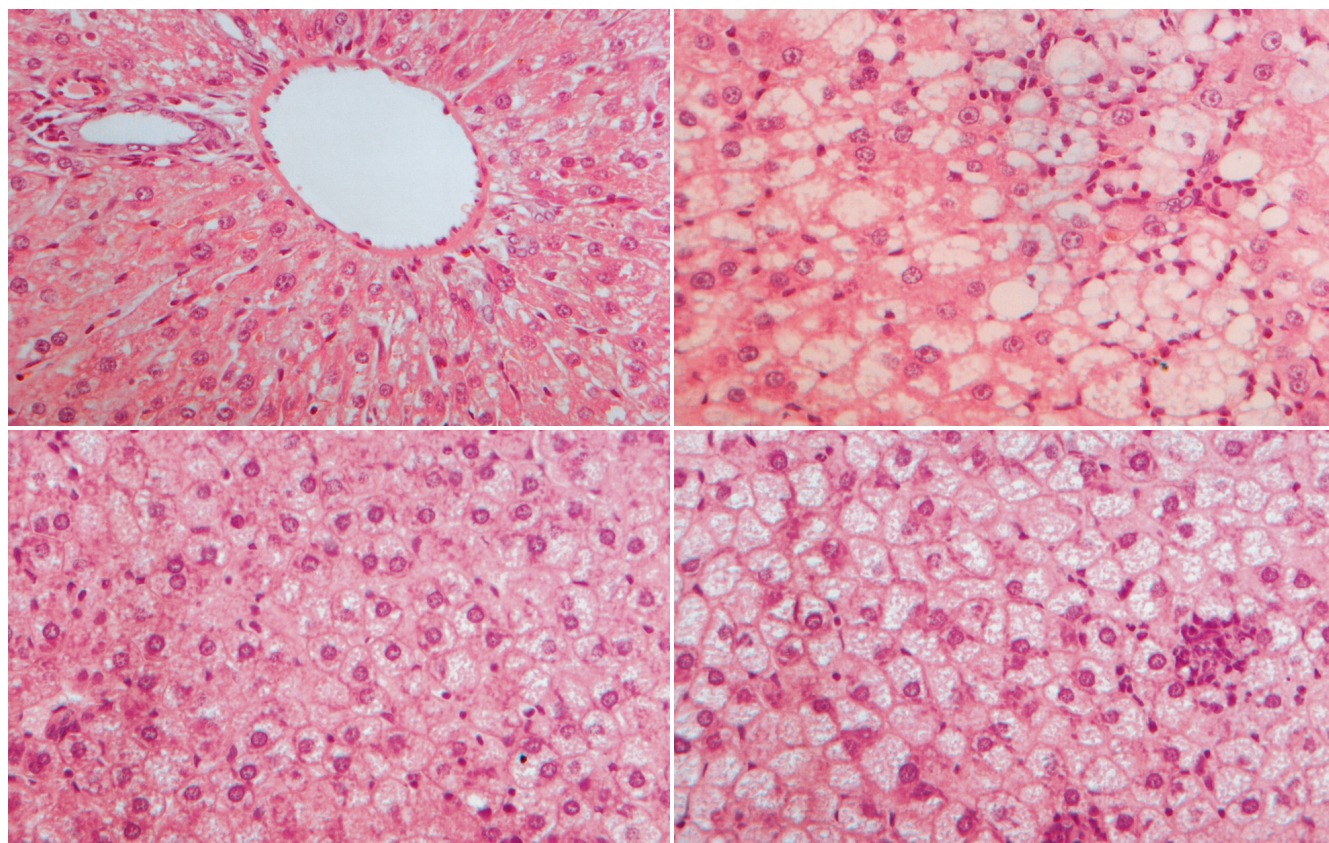


世界华人消化杂志®

WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2007 年 3 月 28 日 第 15 卷 第 9 期 (Volume 15 Number 9)



9 / 2007

名誉总编辑

潘伯荣

总编辑

马连生

《世界华人消化杂志》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》，俄罗斯《文摘杂志》收录。

世界华人消化杂志®

编辑委员会

2006-01-01/2008-12-31

wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

总顾问

陈可冀教授
黄象谦教授
黄志强教授
裘法祖教授
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

陈士葆教授
房殿春教授
纪小龙教授
姜洪池教授
王苑本教授
吴云林教授
徐克成教授
杨思凤教授
姚希贤教授
岳茂兴教授
张万岱教授
周学文教授

常务编委

成军教授
程英升副教授
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
聂青和副教授
王小众教授

编委

白爱平主治医师

白文元教授
白玉贤教授
别平教授
蔡淦教授
蔡开琳副教授
蔡三军主任医师
曹洁副教授
曹志成院士
陈国凤主任医师
陈公球主任医师
陈海龙教授
陈红松副研究员
陈积圣教授
陈建杰教授
陈建荣副教授
陈立波副教授
陈凇教授
陈其奎教授
陈强谱教授
陈仕珠主任医师
陈卫昌教授
陈耀凯副教授
陈贻胜教授
陈知水教授
陈治水主任医师
陈祖林副教授
程爱国教授
程爱群主任医师
程红岩教授
程树群副教授
迟宝荣教授
崔云甫教授
代文杰教授
戴朝六教授
戴冬秋教授
党双锁副教授
邓长生教授
董蕾教授
董明主任医师
杜群副研究员
樊红副教授
范建高教授
范小玲主任医师
范志宁主任医师
房静远教授
冯志杰主任医师

傅春彬主任医师
傅红副教授
傅志仁主任医师
高成新教授
高春芳研究员
高峰教授
高润平教授
戈之铮教授
龚国忠教授
龚建平教授
巩鹏副教授
谷俊朝主任医师
关玉盘教授
管冬元副教授
郭克建教授
郭晓钟教授
郭新宁教授
韩天权教授
韩新巍教授
郝春秋副教授
郝俊鸣副主任医师
何超教授
何裕隆教授
何振平教授
洪天配教授
侯晓华教授
胡伏莲教授
胡和平主任医师
黄恒青主任医师
黄金华副教授
黄晓东副主任医师
黄颖秋教授
黄裕新教授
黄志勇副教授
季国忠副教授
季加孚教授
姜慧卿教授
蒋龙元副教授
金瑞教授
匡安仁教授
兰平教授
蓝宇教授
劳绍贤教授
李定国教授
李东辉教授
李方儒教授

李国威教授
李华山副主任医师
李继强教授
李靖副教授
李军祥教授
李奇林教授
李胜研究员
李淑德教授
李涛主治医师
李晓宇主任医师
李旭副教授
李延青教授
李永哲副研究员
李玉民教授
李瑗教授
李增山副教授
李兆申教授
李志霞教授
李宗芳教授
梁力建教授
林胜璋副教授
林勇讲师
刘宝瑞教授
刘彬彬副研究员
刘冰熔教授
刘成海研究员
刘海林主任医师
刘平教授
刘杞教授
刘铁夫教授
刘颖斌副教授
刘占举教授
刘正稳教授
刘作金副教授
龙致贤教授
鲁华玉研究员
陆才德教授
陆伦根教授
陆云飞教授
禄韶英主治医师
吕明德教授
吕宁主任医师
吕云福教授
吕志武教授
马大烈教授
茅爱武主任医师

世界华人消化杂志®

编辑委员会

梅林教授	谭学瑞教授	徐小元教授	张宗明教授
孟庆华教授	汤展宏副教授	徐迎新研究员	赵桂珍教授
宁琴教授	唐采白副教授	徐智教授	赵景民教授
牛建昭教授	唐芙爱教授	许春舫主任医师	赵连三教授
欧希龙副教授	唐霓副研究员	许玲副教授	赵平副教授
潘林娜教授	唐文富主治医师	许文燮教授	赵增仁副主任医师
潘兴华副主任医师	唐文皓副主任医师	许亚平副教授	郑民华教授
潘秀珍教授	唐旭东主任医师	宣世英教授	郑鹏远教授
彭波副教授	唐志鹏副研究员	闫惠平研究员	智发朝教授
彭吉润主任医师	田素礼教授	严律南教授	周伯平教授
彭曦副研究员	屠红副研究员	严以群主任医师	周丁华主任医师
彭心宇教授	万军教授	阎晓初副教授	周国雄主任医师
彭志海教授	汪波副主任医师	杨冬华教授	周士胜教授
朴熙绪主任医师	汪思应教授	杨广顺教授	周伟平教授
钱建民教授	王承党副教授	杨建勇教授	周霞秋教授
钱林学主任医师	王春友教授	杨林副研究员	周晓东研究员
秦波教授	王广义教授	杨维良教授	周晓武副主任医师
秦成勇教授	王吉耀教授	杨希山教授	朱传武副主任医师
秦华东教授	王健生副教授	杨云生教授	朱春兰主任医师
秦环龙教授	王鲁副教授	杨昭徐教授	朱立元教授
秦仁义教授	王晓艳副教授	姚登福教授	朱人敏教授
邱宝安主任医师	王效民教授	姚树坤教授	庄林主任医师
邱双健副教授	王新月教授	伊力亚尔·夏合丁教授	邹小明教授
邱伟华副主任医师	王学美研究员	阴赅宏研究员	左国营副主任药师
曲智威副主任医师	王正康教授	殷正丰教授	
任超世研究员	王志刚副主任医师	于恩达教授	
任建安教授	王忠裕教授	于红刚副教授	
任建林教授	卫洪波教授	于健春教授	
邵成浩讲师	魏经国教授	于颖彦教授	
邵先玉教授	魏来教授	余宏宇教授	
邵永孚教授	闻勤生教授	郁宝铭教授	
沈洪教授	吴德全教授	喻荣彬副教授	
沈琳副教授	吴建国教授	展玉涛副主任医师	
沈薇教授	吴健雄教授	张柏和教授	
施诚仁教授	吴君主任医师	张方信主任医师	
施瑞华教授	吴萍主任医师	张吉翔教授	
石统东副教授	吴志勇教授	张锦生教授	
宋世兵主任医师	席启主任医师	张军教授	
宋于刚教授	夏建川研究员	张明辉副主任医师	
宋振顺教授	向德兵讲师	张青云研究员	
孙诚谊教授	肖恩华教授	张群华教授	
孙殿兴主任医师	谢晓华副教授	张水军教授	
孙家邦教授	徐爱民副教授	张小晋主任医师	
孙秀发教授	徐存拴教授	张晓岚教授	
孙学英教授	徐大华主任医师	张绪清副教授	
孙延平副主任医师	徐德忠教授	张学教授	
邵升副教授	徐列明教授	张占卿主任医师	

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ● 2007 年 3 月 28 日 第 15 卷 第 9 期 (总第197期)

述 评

921 乙型肝炎病毒基因型及其临床意义的研究进展 游晶, 庄林, 陈红英, 杨海秋, 唐宝璋, 黄梦玲

基 础 研 究

- 929 hFXyD6反义核酸对胆管癌细胞体外增殖和侵袭能力的影响
窦春青, 岳鑫, 周宁新
- 936 消痰散结方对裸鼠人胃癌血管生成的影响
郑国静, 于有德, 石健
- 941 过氧化物酶体增殖剂激活受体- γ 在白藜芦醇抑制胃癌SGC-7901细胞增殖中的作用
胡光胜, 曹文涛, 廖爱军, 曾斌, 廖丹, 石巍
- 947 环氧合酶-2和基质金属蛋白酶-2在大鼠非酒精性脂肪肝炎中的作用
刘晓璐, 沈滨, 杜雅菊
- 953 大肠癌细胞系Lovo中亚群(SP)细胞的分离培养和鉴定
王锡山, 刘彦龙, 杨艳梅

临 床 研 究

- 960 终末期肝病模型对失代偿期肝硬化患者预后的回顾性分析
吕晓辉, 刘红波, 宋敏, 王炳元
- 964 幽门螺杆菌与胃黏膜bFGF, FGFR-2表达的关系及意义
李信, 姜海行, 陈昱, 雷琳, 覃山羽
- 970 儿童胰腺实性假乳头状肿瘤的潜在恶性表现及其临床处理
肖元宏, 刘洲禄, 郭爱桃, 王政, 彭少林

文 献 综 述

- 975 胃癌细胞增殖相关基因研究进展 李春杰, 魏品康
- 980 胃泌素受体作为分子靶向在肿瘤中的表达及应用 江春平, 孔诚, 丁义涛
- 986 蛋白酶激活受体-2与消化系统疾病的研究进展 刘建, 李非
- 991 梗阻性黄疸围手术期细胞免疫功能障碍发生机制研究进展 江涛, 朱永康
- 994 超声内镜在胰腺疾病诊断和介入治疗中的应用 汤茂春, 徐敏

研 究 快 报

- 1000 胃癌MKN-28肿瘤细胞系SP细胞亚群初步分析
王宁, 陈凛, 卫勃, 赵向阳, 鲁文静, 沈丽
- 1004 血管紧张素II对肝星状细胞迁移和增殖的影响
杨玲, 朱清静, 侯晓华, 胡胜军, 徐敏, 朱锐
- 1008 葡萄糖神经酰胺合成酶基因在人胃癌细胞SGC-7901及SGC-7901/VCR的表达和意义
张艳, 刘宗文, 贾丹辉, 乐晓萍, 张钦宪

临 床 经 验

- 1012 幽门螺杆菌临床分离株耐药特点分析
杨行堂, 张俊杰, 张琦晴, 余远怀, 陈锡美, 王志荣
- 1016 蛋白芯片检测多肿瘤标志物对原发性肝癌的诊断价值评价
周秀艳, 侯振江, 邢桂芝
- 1020 EVS、EVS+EVL续贯EVS和EVL续贯EVS治疗食管静脉曲张的疗效比较
蔺武, 刘心娟, 姜国俊, 魏南, 芦月霞, 郭晶, 程留芳
- 1024 内镜下气囊扩张治疗贲门失弛缓症81例
杨艳, 于皆平, 李欢, 曹俊, 于红刚
- 1027 胃镜诊断胃黏膜脱垂365例
田新社, 章振国

	<p>1030 清热化痰汤对老年胃食管反流病患者血清超氧化物歧化酶及脂质过氧化物的影响 余国英, 钟森, 徐剑刚, 李敬会, 李德梅, 余武</p> <p>1034 腹腔镜胆囊切除联合内镜乳头括约肌切开 I 期治疗胆道结石15例 何忠野, 郭仁宣</p> <p>1037 大肠癌患者的临床、病理及预后分析576例 赖琳, 詹俊, 李楚强, 于钟, 姚和瑞</p> <p>1041 手术联合腹腔热化疗及免疫疗法治疗腹膜恶性间皮瘤11例 黄晓辉, 陈凛, 李荣</p>
附 录	1045 世界华人消化杂志投稿须知
致 谢	1050 致谢世界华人消化杂志编委
消 息	<p>935 2005年内科学类期刊总被引频次和影响因子排序表</p> <p>946 2007全国器官移植学术会议征文通知</p> <p>959 2007年协和肝脏外科新技术学习班通知</p> <p>974 中国科学技术信息研究所情报方法研究中心关于2005年世界华人消化杂志指标检索报告</p> <p>979 2007年国际会议</p> <p>990 欢迎订阅2007年《世界华人消化杂志》</p> <p>993 世界华人消化杂志电子杂志的开放存取出版</p> <p>1007 中国学术期刊综合引证报告(2006)</p> <p>1015 世界华人消化杂志关于作者署名的声明</p> <p>1023 全国消化及消化内镜诊断与治疗进展学术研讨会征文启事</p> <p>1026 世界华人消化杂志在线办公系统</p> <p>1033 肝胆胰外科领域新技术研讨会通知</p> <p>1033 第三届全军胃肠外科学术会议暨2007年普通外科高峰论坛征文通知</p> <p>1036 第七届全国消化道恶性病变介入诊疗暨第四届消化介入新技术研讨会会议及征文通知</p> <p>1044 第十九届全国中西医结合消化会议征文通知</p>
封面故事	<p>刘晓璐, 沈滨, 杜雅菊. 环氧合酶-2和基质金属蛋白酶-2在大鼠非酒精性脂肪肝炎中的作用. 世界华人消化杂志 2007;15(9):947-952</p> <p>http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/947.asp</p>
国际会议	<p>9th World Congress on Gastrointestinal Cancer</p> <p>20-23 June 2007</p> <p>Barcelona</p> <p>Imedex</p> <p>meetings@imedex.com</p>

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

吴阶平 题写封面刊名
陈可冀 题写版权刊名
(旬刊)

创 刊 1993-01-15
改 刊 1998-01-25
出 版 2007-03-28
原刊名 新消化病学杂志

名誉总编辑 潘伯荣 社长总编辑 马连生
编辑部主任 张海宁 英文编辑 张海宁 张焕兰
中文编辑 潘伯荣 张焕兰 王晓瑜
电子编辑 张敏 李琪
本期责任编辑 张焕兰

编辑 世界华人消化杂志编辑委员会

出版 世界胃肠病学杂志社
100023, 北京市2345信箱
E-mail: wjgd@wjgnet.com
<http://www.wjgnet.com>
电话: 010-85381901
传真: 010-85381893

印刷 北京科信印刷厂

发行 国内: 北京报刊发行局
国外: 中国国际图书贸易总公司
(100044, 北京市399信箱)

订购 全国各地邮电局

邮购 世界胃肠病学杂志社发行部
(100023, 北京市2345信箱)
电话: 010-85381901
传真: 010-85381893

《世界华人消化杂志》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》, 俄罗斯《文摘杂志》收录。

特别声明

本刊刊出的所有文章不代表世界胃肠病学杂志社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。

2007年版权归世界胃肠病学杂志社所有

ISSN 1009-3079
CN 14-1260/R

邮发代号
82-262

国外代号
M 4481

国内定价
每期24.00元 全年864.00元

广告经营许可证
1401004000050

www.wjgnet.com

World Chinese Journal of Digestology

March 2007 Contents in Brief Volume 15 Number 9

EDITORIAL	921 Advances in the researches on hepatitis B virus genotyping and its clinical significance <i>You J, Zhuang L, Chen HY, Yang HQ, Tang BZ, Huang ML</i>
BASIC RESEARCH	<p>929 Effect of human antisense FXYD6 on the proliferation and invasion of human cholangiocarcinoma cells <i>in vitro</i> <i>Dou CQ, Yue X, Zhou NX</i></p> <p>936 Effect of Xiaotan Sanjie recipe on the angiogenesis of nude mice with human gastric carcinoma <i>Zheng GJ, Yu YD, Shi J</i></p> <p>941 Role of peroxisome proliferator-activated receptor-γ in resveatrol-induced proliferation inhibition of gastric cancer cell line SGC-7901 <i>Hu GS, Cao WT, Liao AJ, Zeng B, Liao D, Shi W</i></p> <p>947 Role of cyclooxygenase-2 and matrix metalloproteinase-2 in nonalcoholic steatohepatitis of rats <i>Liu XJ, Shen B, Du YJ</i></p> <p>953 Isolation and identification of side population in Lovo colon cancer cell line <i>Wang XS, Liu YL, Yang YM</i></p>
CLINICAL RESEARCH	<p>960 Prognosis analysis of patients with decompensated liver cirrhosis using the model of end-stage liver disease <i>Lv XH, Liu HB, Song M, Wang BY</i></p> <p>964 Correlations of <i>Helicobacter pylori</i> infection with the expression of basic fibroblast growth factor and fibroblast growth factor receptor-2 in gastric mucosa and their significances <i>Li X, Jiang HX, Chen G, Lei L, Qin SY</i></p> <p>970 Potential malignancy and clinical management of solid pseudopapillary tumor of pancreas in children <i>Xiao YH, Liu ZL, Guo AT, Wang Z, Peng SL</i></p>
REVIEW	<p>975 Research progress on gene expression correlated with gastric cancer cell proliferation <i>Li CJ, Wei PK</i></p> <p>980 Expression of gastrin receptor in tumors and its application as a molecular target for cancer diagnosis and therapy <i>Jiang CP, Kong C, Ding YT</i></p> <p>986 New developments in the relationship between protease activated receptor-2 and alimentary system diseases <i>Liu J, Li F</i></p> <p>991 Advance on the mechanisms of cellular immune dysfunction during the perioperative stage of obstructive jaundice patients <i>Jiang T, Zhu YK</i></p> <p>994 Application of endoscopic ultrasonography in the diagnosis and interventional treatment of pancreatic diseases <i>Tang MC, Xu M</i></p>
RAPID COMMUNICATION	<p>1000 Primary analysis of side population in human a gastric cancer cell line MKN-28 <i>Wang N, Chen L, Wei B, Zhao XY, Lu WJ, Shen L</i></p> <p>1004 Effect of angiotensin II on the proliferation and migration of hepatic stellate cells <i>Yang L, Zhu QJ, Hou XH, Hu SJ, Xu M, Zhu R</i></p>

	<p>1008 Expression of glucosylceramide synthase gene and its significance in human gastric carcinoma SGC-7901 and SGC-7901/VCR cells <i>Zhang Y, Liu ZW, Jia DH, Le XP, Zhang QX</i></p>
CLINICAL PRACTICE	<p>1012 Characteristics of antibiotic resistance of <i>Helicobacter pylori</i> strain isolated from patients <i>Yang XT, Zhang JJ, Zhang YQ, Yu YH, Chen XM, Wang ZR</i></p> <p>1016 Values of multi-tumor marker protein-chip diagnostic system in the diagnosis of primary hepatic cancer <i>Zhou XY, Hou ZJ, Xing GZ</i></p> <p>1020 Comparison among endoscopic variceal sclerotherapy, endoscopic variceal sclerotherapy with sequential endoscopic variceal ligation plus endoscopic variceal sclerotherapy, and endoscopic variceal ligation plus endoscopic variceal sclerotherapy for esophageal varicosis <i>Lin W, Liu XJ, Jiang GJ, Wei N, Lu YX, Guo J, Cheng LF</i></p> <p>1024 Endoscopic pneumatic dilation in treatment of achalasia: an analysis of 81 cases <i>Yang Y, Yu JP, Li H, Cao J, Yu HG</i></p> <p>1027 Gastroscopic diagnosis of gastric mucosal prolapse: an analysis of 365 cases <i>Tian XS, Zhang ZG</i></p> <p>1030 Effect of Qingre Huayu decoction on the contents of superoxide dismutase and lipid peroxide in old patients with gastroesophageal reflux disease <i>Yu GY, Zhong S, Xu JG, Li JH, Li DM, Yu W</i></p> <p>1034 Treatment of cholecystocholedocholithiasis by single-stage laparoscopic cholecystectomy combined with endoscopic sphincterotomy: an analysis of 15 cases <i>He ZY, Guo RX</i></p> <p>1037 Analysis on clinicopathological characteristics and prognosis of 576 patients with primary colorectal cancer <i>Lai L, Zhan J, Li CQ, Yu Z, Yao HR</i></p> <p>1041 Treatment of malignant peritoneal mesothelioma by operation combined with intraperitoneal hyperthermic perfusion chemotherapy and immunotherapy: an analysis of 11 cases <i>Huang XH, Chen L, Li R</i></p>
APPENDIX	<p>1045 Instructions to authors of World Chinese Journal of Digestology</p>
ACKNOWLEDGMENT	<p>1050 Acknowledgments to reviewers of World Chinese Journal of Digestology</p>
COVER	<p><i>Liu XJ, Shen B, Du YJ.</i> Role of cyclooxygenase-2 and matrix metalloproteinase-2 in nonalcoholic steatohepatitis of rats. <i>Shijie Huaren Xiaohua Zazhi</i> 2007;15(9):947-952 http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/947.asp</p>
INTERNATIONAL MEETINGS	<p>9th World Congress on Gastrointestinal Cancer 20-23 June 2007 Barcelona Imedex meetings@imedex.com</p>

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

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

World Chinese Journal of Digestology

Founded on January 15, 1993

Renamed on January 25, 1998

Publication date March 28, 2007

Honorary-Editor-in-Chief

Bo-Rong Pan

President and Editor-in-Chief

Lian-Sheng Ma

Edited by Editorial Board of

World Chinese Journal of Digestology

PO Box 2345, Beijing 100023, China

Published by The WJG Press

PO Box 2345, Beijing 100023, China

Overseas Distributor

China International Book Trading Corporation

PO Box 399, Beijing 100044, China

Code No.M4481

Mail-Order Circulation Section, The WJG Press

PO Box 2345, Beijing 100023, China

Telephone: +86-10-85381901

Fax: +86-10-85381893

Email: wcjd@wjgnet.com

<http://www.wjgnet.com>

ISSN 1009-3079 **CN** 14-1260/R

Copyright © 2007 by The WJG Press

乙型肝炎病毒基因型及其临床意义的研究进展

游晶, 庄林, 陈红英, 杨海秋, 唐宝璋, 黄梦玲

游晶, 陈红英, 杨海秋, 唐宝璋, 黄梦玲, 昆明医学院第一附属医院感染病科 云南省昆明市 650032

庄林, 昆明市第三人民医院肝病科 云南省昆明市 650041

游晶, 博士, 副教授, 副主任医师, 硕士生导师, 主要从事病毒性肝炎及感染性疾病的基础与临床研究.

通讯作者: 游晶, 650032, 云南省昆明市西昌路295号, 昆明医学院第一附属医院感染病科. jingyoukm@126.com

电话: 0871-5324888

收稿日期: 2006-12-29 接受日期: 2007-01-20

Advances in the researches on hepatitis B virus genotyping and its clinical significance

Jing You, Lin Zhuang, Hong-Ying Chen, Hai-Qiu Yang, Bao-Zhang Tang, Meng-Ling Huang

Jing You, Hong-Ying Chen, Hai-Qiu Yang, Bao-Zhang Tang, Meng-Ling Huang, Department of Infectious Diseases, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650032, Yunnan Province, China

Lin Zhuang, Department of Hepatopathy, the Third People's Hospital of Kunming Municipality, Kunming 650041, Yunnan Province, China

Correspondence to: Dr. Jing You, Department of Infectious Diseases, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650032, Yunnan Province, China. jingyoukm@126.com

Received: 2006-12-29 Accepted: 2007-01-20

Abstract

The genotyping of hepatitis B virus (HBV) is a highlight of the studies associated with chronic hepatitis B inside and outside the country nowadays. HBV infection can lead to chronic carriage of the virus and progressive liver disease, including liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. The serological heterogeneity of HBsAg has been well established. HBV isolates have been classified into 10 different subtypes according to the antigenic determinants of their HBsAg. However, the classification of HBV by serologic subtyping is not rational because a single point mutation at the S gene may result in a change in subtype. Therefore, worldwide HBV isolates have been classified into eight genotypes: A, B, C, D, E, F, G and H, based on the comparison of complete HBV genomes, which is the gold standard for genotyping. The eight genotypes have a distinct characteristic geographical distribu-

tion and an HBV genotypic difference in HBV pathogenicity. It has been reported that there are remarkable differences in the clinical and virologic characteristics between the patients with different genotypes. Studies have revealed the association of HBV genotypes with the severity and outcome of chronic liver disease, but the results including the influence of genotypes on therapeutic responses are not consistent.

Key Words: Hepatitis B virus; Genotyping; Mutation; Clinical significance

You J, Zhuang L, Chen HY, Yang HQ, Tang BZ, Huang ML. Advances in the researches on hepatitis B virus genotyping and its clinical significance. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(9):921-928

摘要

乙型肝炎病毒(HBV)基因型的研究是目前乙型肝炎国内外研究的热点. HBV基因分型比血清亚型更能准确地反映原型病毒株之间的自然异质性, HBV基因分型方法有多种, 以全基因测序为HBV基因分型的金标准, 基于全基因核苷酸序列比较, HBV可分为A, B, C, D, E, F, G, H 8个基因型. HBV基因型呈地理区域性分布, 且不同基因型致病性不同, HBV基因型与乙型肝炎病情的进展、临床表现、治疗、预后有着密切的关系. 本文就近几年HBV基因型及其临床意义的研究进展作一综述.

关键词: 乙型肝炎病毒; 基因分型; 变异; 临床意义

游晶, 庄林, 陈红英, 杨海秋, 唐宝璋, 黄梦玲. 乙型肝炎病毒基因型及其临床意义的研究进展. *世界华人消化杂志* 2007;15(9):921-928

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/921.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)为一双链DNA病毒, 属嗜肝DNA病毒(hepadnaviridae). HBV感染是一个全球性的健康问题, 世界上有20亿人感染过HBV, 目前全球大约有3.8亿HBV慢性感染者, 仅中国就有1.5亿, 其中2000万人为

■背景资料

HBV感染是一个全球性的健康问题. 近年来, 随着分子生物学技术的迅猛发展和对HBV认识的不断深入, 国内外许多学者对HBV基因分型及其与临床的相关性开展了大量的研究. HBV基因分型比血清亚型更能准确地反映原型病毒株之间的自然异质性, HBV基因型与乙型肝炎病情的进展、临床表现、治疗、预后有着密切的关系.

■研究前沿

HBV基因型的研究是目前乙型肝炎国内外研究的热点, HBV基因型呈地理区域性分布, 并与致病性密切相关; HBV基因型与病毒复制与清除、病毒变异、临床表现、治疗应答和预后均有一定的关系. HBV基因型与疾病的关系及其相关机制需要深入研究.

慢性乙肝患者, 每年因此导致大约50万人死亡^[1]. 近年来, 随着分子生物学技术的迅猛发展和对HBV认识的不断深入, 国内外许多学者对HBV基因分型及其与临床的相关性开展了大量的研究. HBV基因分型比血清亚型更能准确地反映原型病毒株之间的自然异质性, HBV基因分型方法有多种, 以全基因测序为HBV基因分型的金标准, 基于全基因核苷酸序列比较, HBV可分为A, B, C, D, E, F, G, H 8个基因型. HBV基因型呈地理区域性分布, 且不同基因型致病性不同, HBV基因型与乙型肝炎病情的进展、临床表现、治疗、预后有密切的关系. 为此, 本文就近几年HBV基因型及其临床意义的研究进展作一综述.

1 乙型肝炎病毒的特点及基因组结构

HBV是已知最小的DNA病毒, HBV基因组又称HBV DNA, 约由3200个碱基对组成. HBV基因组结构特殊, 成不完全闭合的双链形式, 双链长度不对称, 有一个6000-1200单链核苷酸缺口, 负链为全长基因, 约含3200个核苷酸, 带有与5'末端共价连接的多肽, 而正链是负链长度的20%-80%, 5'端在1560位, 3'端的位置可变. HBV基因组环状的维持是通过5'端250-300 bp的互补序列实现的, 病毒颗粒内含有DNA聚合酶. 在所有已知可感染人体而且具有独立复制能力的双链DNA病毒中, HBV基因组是最小但又是最高效的. 其高度重叠的4个基因区编码至少8种蛋白, 即S基因编码的大、中、小HBs; C基因的前C, HBc, HBe; P基因的聚合酶和X基因的HBx. HBV具有病毒复制产量高(10^{12-13} 病毒粒/天)和突变率高(10^{10-11} 点突变/天)的特征. 高突变是由于高复制, 特别是由于HBV的复制特点是以mRNA为中间体的逆转录复制, 由于这一过程中HBV DNA聚合酶缺乏校正功能, 而容易发生碱基配对错误, 因而HBV基因突变十分频繁.

2 HBV基因型的发现、确立和发展

1965年, Blumberg *et al*^[2]发现了HBV表面的澳大利亚抗原(HBsAg), 人们从此开始认识HBV. 1988年, Okamoto *et al*^[3]测定了来源于日本和印度尼西亚的3株血清adw亚型的HBV DNA全基因系列, 研究表明日本和印尼株间的核苷酸异源性仅为3.9%-5.6%, 而与美国adw亚型株间的异源性达8.3%-9.3%, 认为血清亚型的区分并不能真正反映HBV基因组的差异; 随后进一步分

析了18株不同血清型HBV的全基因核苷酸系列, 建立了以HBV全基因系列核苷酸异源性 $\geq 8\%$ 为不同基因型的分型标准, 并将这18株HBV划分为A, B, C, D 4种基因型, 从而首次提出了HBV基因型的概念和基因分型法. 1992年, Norder *et al*^[4-5]对HBV的S基因系列进行分析, 根据S基因异源性 $\geq 4\%$, 发现了2种新基因型E和F, 并由此简化了分型方法, 并于1994年通过全基因系列测定加以证实. 依据以上分型标准, 2000年Stuyver *et al*^[6]分析了来自法国和美国的121例HBV慢性感染者的全基因核苷酸系列, 发现了第7种基因型G; 2002年Arauz-Ruiz *et al*^[7]通过对来自西班牙、瑞典、中非、尼加拉瓜和美国共10株HBV进行全基因系列分析又发现了H基因型, 脱胎于F型HBV. 同年, Kao *et al*^[8]在研究日本献血员B, C型HBV血清时发现存在混合型感染, 考虑可能是重叠感染或基因型之间部分转换而来. 到目前为止, 根据HBV全基因系列异源性 $\geq 8\%$ (同源性 $<92\%$)或者S基因系列核苷酸差异度 $\geq 4\%$ (同源性 $<96\%$), 已将乙型肝炎病毒株分为A-H 8种基因型. 其中, 基因型A还可分为Ae(e代表欧洲)和Aa(a代表亚洲和非洲)2个亚型^[9], 基因B又可分为Ba(a代表亚洲)和Bj(j代表日本)2个亚型^[10], 基因型C可分为C1和C2 2个亚型^[11], 基因型F又可分为4个分支(I-IV), 亚基因型F1属于分支I, 亚基因型F2属于分支II和IV, 基因型H属于基因型F的分支III, 基因型H的全基因序列与基因型F相差7.5%-9.6%, 所以把他从基因型F中分离出来作为一种新的基因型^[7,12-13]. 此外, 还发现了A/D, B/C, Ba和Bj等不同的重组体^[14], 即HBV可发生不同基因组间的重组, 重组主要发生在B基因型和C基因型之间, B基因型可能在前C区和C区1740-1838-2443-2485间, 特别是1740-1838间或2443-2485间. 当B基因型在前C和C区没有重组的C基因型序列时, 称之为Bj, 主要分布在日本, 而含有重组C基因型序列的B基因型被称之为Ba, 主要分布在日本以外的其他亚洲国家, 如中国、印度尼西亚、泰国、越南等. 沙特阿拉伯地区发现有10%为A, D, E, F, G的不同基因型间的重组体感染^[15]. 虽然近几年对HBV基因型的研究迅速增多, 但尚处于探索阶段, 随着HBV基因分型的广泛开展, 新的基因型、基因亚型会逐渐被发现, 基因分型方法逐渐简化、灵敏和准确, 便于广泛应用, 基因型与临床的关系将日趋明朗.

3 HBV基因型和血清型的关系及流行病学分布

3.1 HBV基因型与血清型的关系 根据HBV包膜蛋白上的一个共同抗原决定簇“a”和两个亚型决定簇“d/y”和“w/r”, 将HBV血清型分为4个亚型: ayw, adw, ayr, adr, 又将w分为w1-4, q分为q+和q-, 使其扩展为ayw1, ayw2, ayw3, ayw4, ayr, adw2, adw4, adrq+, adrq-和adw4q-共10个血清亚型^[16-18]. 而基因型目前已知的有A-H 8种, 但由于血清亚型是外膜蛋白的表现型, 是由病毒外膜蛋白上的一些氨基酸残基决定的, 从基因密码到蛋白质要经过转录和翻译, 再经过修饰加工形成功能蛋白质, 因而蛋白质的种类和数目多于基因的种类和数目, 并不能真正反映病毒基因组的差异, 基因型能更好地反映HBV核苷酸的自然异质性. 研究发现不同血清亚型可属于同一基因型, 而同一血清亚型可分布于不同基因型, 但HBV血清亚型和基因型之间有一定的相关性, 他们的关系为: A型(adw2, ayw1), B型(adw2, ayw1), C型(ayr, adrq+, adrq-, adw2), D型(ayw2, ayw3), E型(ayw4), F型(ayw4, adw2, adw4q-), G型(adw2), H型(adw3); 即adr和ayr亚型与C基因型相关, ayw2和ayw3与D基因型相关, ayw4与E基因型相关, adw4和F基因型相关, 然而血清亚型与基因型间的相关性并非绝对相对应, 在A, B, C基因型中均可出现adw2^[16-18].

3.2 HBV基因型流行病学分布 近年来HBV基因型分布的研究渐成为国内外学者关注的研究热点. 研究发现, HBV基因型的分布具有一定的区域性^[6,16,19-26], A型主要分布于西欧、北欧、北美洲及非洲地区; B型和C型是亚洲和大洋洲的特征性基因型, B型主要见于中国、日本、印度尼西亚、越南和巴西, 其中Bj基因型在日本被发现, 而Ba基因型则分布在整个亚洲; C型主要见于中国、韩国、日本、越南和玻利尼西亚; D型分布最为广泛, 主要分布于中东、北非和南欧, 亦是地中海地区HBV的主要基因型, 还发现于亚洲少数地区; E型主要分布于非洲撒哈拉沙漠地带; F型主要分布于美国、南美洲的土著居民; G型在法国、美国、德国、英国和意大利被发现; H型已在尼加拉瓜、墨西哥及美国加利福尼亚地区被发现. Chu *et al*^[27]报道A-G 7种基因型均在美国被发现, 其中, A型占33%, B型占21%, C型占34%, D型占9%, E型占1%, F型占1%, G型占1%. 有研究表明基因分布还受种族背景的影响, 基因A, D型主要在白种人中被发现, 而亚洲的感染者主要是基因型B和C^[28]. 大量研究表明,

我国HBV基因型南方以B型为主, 北方以C型为主, D型仅见于西部及少数民族地区, A, F型偶有发现, 还未发现其他型别^[19-23]. 也有学者研究发现D基因型在我国宁夏地区、广东地区和香港地区约占感染者的15%, 因而HBV基因型在我国的确切分布状况仍不十分清楚^[22]. 目前普遍认为, 不同地区优势基因型反映了HBV自然感染史发生的变异特点, 是病毒变异进化的后果.

人类感染HBV病毒基因型的型别可能与感染途径有一定的相关性, 东方国家以母婴传播为主, 而西方国家则以性传播及静脉注射毒品传播为主. Michielsen *et al*^[29]认为, 母婴传播的危险性取决于HBV复制水平. HBsAg和HBeAg均阳性的母亲有80%-90%的母婴传播危险性, 约有85%的婴儿日后成为慢性HBV携带者; HBsAg阳性和HBeAg阴性的母亲仅有2%-15%的母婴传播危险性, 且后代很少成为慢性HBV携带者. nt1896变异呈现高流行趋势、地域分布广泛, 尤其以B, C型为优势基因型的东亚地区更为普遍, 其HBV呈高复制水平. 因此, 这也可能是东亚地区慢性HBV感染以母婴垂直传播为主的原因之一.

4 HBV基因型的分型方法

1988年Okamoto首先提出了乙型肝炎病毒基因分型法. 随着分子生物学技术的发展, 基因分型的方法也在不断进步, 渐趋简化、准确. HBV基因分型方法主要有: (1)HBV全基因测序: 由Okamoto *et al*^[3]首先提出, 根据HBV核苷酸全序列异质性 $\geq 8\%$ 、同源性 $< 92\%$ 进行分型, 是HBV基因分型的金标准. 该方法直接、可靠, 但繁琐、费时、费用高, 不适宜广泛开展; (2)S基因序列测定: Norder *et al*^[4]用S基因序列测定分型替代全基因序列分析, 根据S基因核苷酸异质性 $\geq 4\%$ 、同源性 $< 96\%$ 进行分型, 初步简化了HBV的基因分型方法. 仍存在繁琐、费用高等缺点, 难以广泛开展; (3)S基因聚合酶链反应-限制性片段长度多态性分析(PCR-RFLP): Lindh *et al*先以PCR扩增HBV “S” 基因的Pre-S区, 再以一组能区分HBV基因型的限制性内切酶消化扩增产物, 电泳后, 根据酶切图谱进行分型^[30-31]. 与其他分型方法相比, RFLP是目前临床最常用的HBV分型方法, 其方法简单且易于操作, 但HBV分子进化速率很快, 其基因组的变异常导致分型错误甚至无法确定型别; (4)HBV基因型特异性表位单克隆抗体的ELISA: Usuda *et al*^[32]通过制备

■应用要点

HBV基因分型的研究为乙肝病毒变异的研究、发病机制的探讨、病情评估、治疗药物的选择和预后判定以及分子流行病学研究提供了有力工具.

■同行评价

HBV基因型的研究是目前乙型肝炎国内外研究的热点。HBV基因分型与致病性密切相关,本文较为详细的描述了HBV基因型与乙型肝炎病情的进展、临床表现、治疗、预后有密切的关系。内容比较全面,有参考意义,是一篇较好的文章。

前S2区域基因型特异性表位mAb,并用辣根过氧化物酶进行标记,更简化了检测方法,适用于大规模的流行病学调查,但本法对于不同基因型混合感染或基因型特异性表位存在点突变时则不能分型,同时需要建立一套mAb;(5)HBV基因型特异性线性探针检测法: Van Geyt *et al*依A-F基因型的保守序列设计了18种型特异性探针与HBV S基因的PCR产物进行杂交实现分型;(6)HBV基因型特异性引物PCR(PCR-SSP): Naito *et al*^[33]设计了A-F 6种基因型的型特异性引物进行套式PCR。首先用共用引物扩增S开放读码区,再加入型特异性引物的混合物进行第二轮PCR,这样扩增出不同长度的核苷酸片段,从而达到分型的目的。操作较简单准确,可用于HBV感染的分子诊断和大范围的调查;(7)PCR微板核酸分子杂交-ELISA法: 该方法将基因扩增、核酸分子杂交和酶联免疫显色三种诊断技术融为一体,发挥了核酸分子杂交技术特异性高,PCR检测技术灵敏度高和酶联显色检测方便的优点,将待测核酸经PCR扩增后,分别与各型探针同时杂交,然后通过酶联免疫显色判定结果^[34]。该方法杂交时间短、分型准确可靠、操作简单、自动化程度高,可大规模进行HBV基因分型;(8)反向杂交(reverser dot blot, RDB): RDB是Saiki *et al*^[35]提出的一种斑点杂交技术,该技术较正向斑点杂交和凝胶电泳印迹转移杂交具有快速、简便、高敏感性、特异性强的特点,尤其是基因分型、基因突变检测、病原体的检测等方面有其独特的优势;(9)基因芯片技术: 基因芯片(gene chip),又称基因微矩阵(microarray),其原理是将大量特定的基因片段或寡核苷酸片段作为探针有序地和高密度地排列固定于玻璃或硅等载体上,然后与待测的有荧光标记的样品核酸按碱基配对的原则进行杂交,通过激光共聚焦系统检测杂交信号强度,经计算机分析处理数据资料,获取样品分子的数量和序列信息,从而可对核酸序列进行大规模、高通量的研究。基因芯片技术是近几年发展起来的新技术,他通过借鉴电子计算机芯片阵列寻址原理,利用核酸分子杂交和化学发光技术,使检测结果具有灵敏度高、所需样本微量和操作简便等特点。

5 HBV基因型的临床意义

5.1 HBV基因型与病毒复制及变异的关系 HBV基因型与病毒复制水平及病毒标志物的表达有一定的相关性。Watanabe *et al*^[36-40]研究报道,基

因C型的HBeAg阳性率高于B型和A型,而B型HBeAg阴性率高于C型,同时B型血清HBeAg清除率较C型显著常见且较早发生;基因C型血清HBV DNA水平显著高于B型;A型的HBV DNA自然清除率高于D型和F型,同时A型的HBsAg自然清除率也比D型高;以上均提示C型HBV复制较活跃,易形成持续病毒血症,不易发生e系统血清转换,而B型血清转换发生快,免疫清除HBV较C型早。

HBV在宿主体内感染的过程中会发生自然变异,变异的不断积累也使HBV的基因组核苷酸序列产生了较大的变化,在此基础上形成了不同的基因型,所以这两者之间有一定的相关性。但目前的研究还仅限于前C区和C区突变。1896G→A是前C区变异的热点,该变异使前C区第28位氨基酸密码由色氨酸(TGG)变为终止密码(TAG),从而导致HBeAg合成终止,使血清中HBeAg呈阴性。该变异多发生在亚洲东部及西欧地区,发生率高达47%-60%,而在美国较低,约为10%。

HBV前C区(precure)可发生1896A, 1862T, 1899A等部位的变异,最常见的是1896A变异, nt1896(前C nt83)的G→A(A83)点突变,使AA28由色氨酸(TGG)变为终止密码子(TAG, 终28),使前C/C区编码的HBeAg合成终止,导致感染1896A变异株的患者血清中HBeAg阴性。这一突变主要见于基因型B, C, D, E, F, G而不发生于基因型A^[40-44],其原因为基因型B, D, E, G和一些基因型C中1858位的碱基为T,所以终止密码子发生1896A变异后可与1858位的碱基T组成稳定的T-A结构,所以这些基因型易发生前C区终止密码子1896A变异;而在基因型A及一些基因型C和F中因1858位的碱基C和1896位的碱基G组成稳定的G-C结构,所以不易发生前C区终止密码子1896A变异,从而使HBeAg的血清转换延迟或不发生^[45]。Stuyver *et al*^[46]在研究HBeAg阴性变异时发现,A型很少发生nt1896G→A变异,而其他型多见。Mangia *et al*^[41]研究表明, nt1896G→A变异也只在C, D基因型中出现。Lindh *et al*^[40]研究表明, nt1896G→A变异存在基因型(B, C, D, E型)依赖性。Arauz-Ruiz, Franca *et al*^[42-43]研究均表明, nt1896G→A变异也存在F型依赖性,大部分HBeAb阳性的F型慢性感染者存在前C区 nt1896G→A变异。Grandjacques *et al*^[44]研究表明,在HBeAg阴性者中,C基因型的HBV前C/C区变异发生率高于B型,变异后毒株的血清HBV

DNA水平明显高于非变异株. 提示C型HBV通过本身活跃的复制能力和变异能力, 逃避宿主免疫和药物的双重压力, 维持持久的病毒血症, 经过自然选择的作用而成为优势感染毒株.

除了nt1896位G→A突变外, 基本核心启动子(BCP)的“双突变”(nt1762的A→T, nt1764的G→A)也与基因型有关^[36,40,46-49], 此两点变异极大地降低了C编码区的转录, 为BCP的热点变异. HBV前C区1896A, 1862T, 1899A变异及HBV BCP 1762T和1764A双突变均可导致血清HBeAg阴性. BCP双突变表现为基因A和D型的依赖性, 在基因A型中较D型频繁, 在基因C型中较B型频繁^[36,40,46-49], 并认为与感染时间较长有关且发现与肝硬化及肝细胞癌的发生有明显的相关性^[50-51].

5.2 HBV基因型与临床疾病谱及疾病预后的关系 HBV感染不仅可以引起急、慢性病毒性肝炎, 而且还与肝硬化(LC)和肝细胞癌(HCC)的发生、发展有密切关系. HBV感染的临床转归一方面决定于患者的年龄和免疫能力, 另一方面也与感染病毒株的基因型种类密切相关. 人类感染HBV基因型的不同类型, 与感染后的临床疾病谱及疾病预后有一定的相关性, 提示不同的基因型有致病性差异. 近年研究发现HBV基因型是影响慢性乙型肝炎的临床转归的主要决定因素之一, 在以B, C为优势的地区, C型具有较强的致病能力, 预后差; 在以A, D为优势的地区, D型具有较强的致病性, 肝病严重, 预后不良; 基因型C在乙肝后肝硬化的发病中起一定的作用, 然而基因型B与年轻无肝硬化患者肝癌的发生有关^[25,36,39-40,52-53]. Mayerat和Akuta *et al*^[28,39]报道HBV急性感染后, A型易成为慢性持续感染, 而D型在急性肝炎中最常见. Kao *et al*^[38]报道我国台湾地区以B, C型为优势株, 50岁以上HCC和LC患者中以C型为优势基因型, 而50岁以下以B型为主, 提示C型与严重肝病有关, 而B型似乎与年轻人肝癌有关. Chan *et al*^[54]报道C型患者炎症坏死指数分值高于B型. Sakugawa *et al*^[55]报道日本冲绳地区以B型为优势基因型, 而该地区是乙型肝炎高发区, 但因肝病死亡的比例却最低, 提示B型预后良好. Thakur *et al*^[56]对印度慢性肝病患者的研究发现, 印度以A, D两型为主, 基因型D和许多严重的肝病密切相关, 可能预示着在印度年轻患者中肝细胞癌的发生率高. Sanchez-Tapias *et al*^[57]报道基因型F引起的肝病的死亡率要比基因型A或D高. Yotsuyanagi *et al*^[58]则报道

急性乙肝中以基因型A最常见, A型较C型有较低的最高ALT水平, 且较C型有较长及较轻的临床经过.

5.3 HBV基因型与抗病毒疗效之间的关系 抗病毒治疗的疗效既可能与感染者自身的免疫状况有关, 也可能与病毒的基因特性有关. 目前, 干扰素是公认的治疗HBV感染的首选药之一, 干扰素抗病毒作用是通过激活干扰素激活基因, 编码产生一系列抗病毒蛋白来完成, 大量研究已发现, 干扰素抗病毒疗效与HBV基因型有一定的相关性, 基因C和D对干扰素的治疗反应比基因型A和B要差^[52,59-61]. Erhardt *et al*^[60]对165例慢性乙肝患者的研究发现, 不论是HBeAg阳性或是阴性者, 干扰素治疗后的持久应答A基因型比D型好. Kao *et al*^[62]对58例患者用干扰素-α2b治疗24 wk并随访24 wk后ALT复常率B, C基因型分别为50%和17%, 完全应答率则分别为41%和15%. Flink *et al*^[63]对266例HBeAg阳性患者的研究发现, 干扰素治疗对基因A型可产生较好的HBsAg清除率. Wai *et al*^[64]应用干扰素-α治疗HBeAg阳性慢性乙肝患者, 结果表明B基因型的应答率高于C型. 通过多变量分析基因型、治疗前ALT水平和HBV DNA水平与干扰素应答之间的关系, 发现B基因型、治疗前低HBV DNA水平和高ALT水平与干扰素高应答率有关, 因而, 他们认为, 与C基因型相比, B型有较高的干扰素诱导的HBeAg清除率.

核苷类似物具有较强的抑制HBV复制的作用, 拉米夫定抑制HBV DNA聚合酶, 从而有效抑制HBV的复制. 阿德福韦酯口服后最终在细胞内转化为阿德福韦双磷酸酯, 后者可选择性抑制HBV DNA聚合酶. 研究发现, 对拉米夫定治疗的疗效及停药后疗效的持久性基因B型明显较C型好, 而对拉米夫定耐药性的发生率基因型A高于D^[61,65-68]. Kao *et al*^[65]对31例HBeAg阳性慢性乙肝患者经拉米夫定治疗后, B, C型的HBeAg血清转换率分别为23%和11%, 耐药发生率分别为15%和22%, 提示B型对拉米夫定的病毒学应答率高于C型. Suzuki *et al*^[66]对日本234例用拉米夫定治疗的研究结果提示B型对拉米夫定的生化学和病毒学应答率均高于C型. 目前众多临床研究发现, 长期使用拉米夫定可引起HBV耐药或病毒变异, 常见的变异为YMDD变异(包括YIDD和YVDD变异). Zollner *et al*^[67]研究发现, 出现YIDD变异者, D型中有67%, A型中有19%, 而出现YVDD变异者, A型中有81%, D型中

有33%,提示不同的基因型可能对YMDD变异产生不同的影响。但是,对中国慢性乙肝患者的研究发现,HBV基因型B和C对抗病毒治疗的反应及YMDD变异的发生率均无差别^[68]。目前研究表明,阿德福韦酯抗病毒疗效与HBV基因型、HBeAg及种族均没有明显相关性^[69-70]。

总之,HBV基因型与病毒复制与清除、病毒变异、临床表现、治疗应答和预后均有一定的关系,提示不同基因型具有不同的致病性。基因分型的研究为乙肝病毒变异的研究、发病机制的探讨、病情评估、治疗药物的选择和预后判定以及分子流行病学研究提供了有力工具。由于不同HBV基因型有不同的地域分布,各地区慢性乙型肝炎患者的疾病特征和抗病毒疗法的应答,很大程度上是由于感染的HBV基因型不同。抗病毒疗效受到诸多因素的影响,包括选择有适应症的治疗对象、把握恰当的治疗时机、针对病毒的不同变异株和基因型采用适当的治疗药物和治疗方案、维持足够的疗程等。HBV基因型与疾病的关系及其相关机制需要深入研究,以便将HBV基因型包括在对慢性HBV感染患者的临床评价和治疗预测中。因此,慢性乙型肝炎的诊断和治疗仍然是需要深入研究的复杂而长期的课题。

6 参考文献

- WHO Fact Sheets, available at www.who.int. Accessed: September 24, 2004
- Blumberg BS, Sutnick AI, London WT, Millman I. Australia antigen and hepatitis. *N Engl J Med* 1970; 283: 349-354
- Okamoto H, Tsuda F, Sakugawa H, Sastrosoewignjo RI, Imai M, Miyakawa Y, Mayumi M. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. *J Gen Virol* 1988; 69 (Pt 10): 2575-2583
- Norder H, Hammas B, Lofdahl S, Courouge AM, Magnius LO. Comparison of the amino acid sequences of nine different serotypes of hepatitis B surface antigen and genomic classification of the corresponding hepatitis B virus strains. *J Gen Virol* 1992; 73 (Pt 5): 1201-1208
- Norder H, Courouge AM, Magnius LO. Complete genomes, phylogenetic relatedness, and structural proteins of six strains of the hepatitis B virus, four of which represent two new genotypes. *Virology* 1994; 198: 489-503
- Stuyver L, De Gendt S, Van Geyt C, Zoulim F, Fried M, Schinazi RF, Rossau R. A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness. *J Gen Virol* 2000; 81: 67-74
- Arauz-Ruiz P, Norder H, Robertson BH, Magnius LO. Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. *J Gen Virol* 2002; 83: 2059-2073
- Kao JH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. Clinical and virological aspects of blood donors infected with hepatitis B virus genotypes B and C. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 22-25
- Sugauchi F, Kumada H, Acharya SA, Shrestha SM, Gamutan MT, Khan M, Gish RG, Tanaka Y, Kato T, Orito E, Ueda R, Miyakawa Y, Mizokami M. Epidemiological and sequence differences between two subtypes (Ae and Aa) of hepatitis B virus genotype A. *J Gen Virol* 2004; 85: 811-820
- Sugauchi F, Orito E, Ichida T, Kato H, Sakugawa H, Kakumu S, Ishida T, Chutaputti A, Lai CL, Ueda R, Miyakawa Y, Mizokami M. Hepatitis B virus of genotype B with or without recombination with genotype C over the precore region plus the core gene. *J Virol* 2002; 76: 5985-5992
- Huy TT, Ushijima H, Quang VX, Win KM, Luengrojanakul P, Kikuchi K, Sata T, Abe K. Genotype C of hepatitis B virus can be classified into at least two subgroups. *J Gen Virol* 2004; 85: 283-292
- Mbayed VA, Barbini L, Lopez JL, Campos RH. Phylogenetic analysis of the hepatitis B virus (HBV) genotype F including Argentine isolates. *Arch Virol* 2001; 146: 1803-1810
- Norder H, Arauz-Ruiz P, Blitz L, Pujol FH, Echevarria JM, Magnius LO. The T(1858) variant predisposing to the precore stop mutation correlates with one of two major genotype F hepatitis B virus clades. *J Gen Virol* 2003; 84: 2083-2087
- Sugauchi F, Orito E, Ichida T, Kato H, Sakugawa H, Kakumu S, Ishida T, Chutaputti A, Lai CL, Gish RG, Ueda R, Miyakawa Y, Mizokami M. Epidemiologic and virologic characteristics of hepatitis B virus genotype B having the recombination with genotype C. *Gastroenterology* 2003; 124: 925-932
- Abdo AA, Al-Jarallah BM, Sanai FM, Hersi AS, Al-Swat K, Azzam NA, Al-Dukhayil M, Al-Maarik A, Al-Faleh FZ. Hepatitis B genotypes: relation to clinical outcome in patients with chronic hepatitis B in Saudi Arabia. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 7019-7024
- Jazayeri MS, Basuni AA, Cooksley G, Locarnini S, Carman WF. Hepatitis B virus genotypes, core gene variability and ethnicity in the Pacific region. *J Hepatol* 2004; 41: 139-146
- Magnius LO, Norder H. Subtypes, genotypes and molecular epidemiology of the hepatitis B virus as reflected by sequence variability of the S-gene. *Intervirology* 1995; 38: 24-34
- Liu CJ, Kao JH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. Molecular epidemiology of hepatitis B viral serotypes and genotypes in taiwan. *J Biomed Sci* 2002; 9: 166-170
- 范金水, 庄辉, 李远贵, 朱晓洁, 徐德忠, 马为民, 王跃民, 陈雅洁, 姜国强, 马廷贤. 我国8城市HBsAg阳性和阴性乙肝患者的病毒血清型和基因型分析. *中华微生物学和免疫学杂志* 1998; 18: 88-91
- 刘兴, 唐红, 何芳. 乙型肝炎病毒基因型研究新进展. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 2211-2216
- 黄晶, 高志良. 乙型肝炎病毒基因型研究现状. *中华传染病杂志* 2002; 20: 251-253
- 阎丽, 侯金林, 郭亚兵, 王战会, 林裕龙, 骆抗先. 乙型肝炎病毒基因型S基因PCR-RFLP分型方法的建立. *中华传染病杂志* 2001; 19: 224-228
- 宋淑静, 何忠平, 庄辉, 闫杰, 董庆鸣. 中国北方5城市慢性乙型肝炎患者的基因分型. *中国公共卫生* 2004;

- 20: 166-167
- 24 Lindh M, Andersson AS, Gusdal A. Genotypes, nt 1858 variants, and geographic origin of hepatitis B virus-large-scale analysis using a new genotyping method. *J Infect Dis* 1997; 175: 1285-1293
- 25 Yuen MF, Sablon E, Tanaka Y, Kato T, Mizokami M, Doutreloigne J, Yuan HJ, Wong DK, Sum SM, Lai CL. Epidemiological study of hepatitis B virus genotypes, core promoter and precore mutations of chronic hepatitis B infection in Hong Kong. *J Hepatol* 2004; 41: 119-125
- 26 Kato H, Orito E, Gish RG, Sugauchi F, Suzuki S, Ueda R, Miyakawa Y, Mizokami M. Characteristics of hepatitis B virus isolates of genotype G and their phylogenetic differences from the other six genotypes (A through F). *J Virol* 2002; 76: 6131-6137
- 27 Chu CJ, Lok AS. Clinical significance of hepatitis B virus genotypes. *Hepatology* 2002; 35: 1274-1276
- 28 Mayerat C, Mantegani A, Frei PC. Does hepatitis B virus (HBV) genotype influence the clinical outcome of HBV infection? *J Viral Hepat* 1999; 6: 299-304
- 29 Michielsen PP, Van Damme P. Viral hepatitis and pregnancy. *Acta Gastroenterol Belg* 1999; 62: 21-29
- 30 Lindh M, Gonzalez JE, Norkrans G, Horal P. Genotyping of hepatitis B virus by restriction pattern analysis of a pre-S amplicon. *J Virol Methods* 1998; 72: 163-174
- 31 Mizokami M, Nakano T, Orito E, Tanaka Y, Sakugawa H, Mukaide M, Robertson BH. Hepatitis B virus genotype assignment using restriction fragment length polymorphism patterns. *FEBS Lett* 1999; 450: 66-71
- 32 Usuda S, Okamoto H, Tanaka T, Kidd-Ljunggren K, Holland PV, Miyakawa Y, Mayumi M. Differentiation of hepatitis B virus genotypes D and E by ELISA using monoclonal antibodies to epitopes on the preS2-region product. *J Virol Methods* 2000; 87: 81-89
- 33 Naito H, Hayashi S, Abe K. Rapid and specific genotyping system for hepatitis B virus corresponding to six major genotypes by PCR using type-specific primers. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 362-364
- 34 王虹, 万成松, 王省良, 彭华国. 采用PCR微板核酸杂交-ELISA技术进行HBV DNA基因分型的研究. *中华微生物学和免疫学杂志* 2001; 21: 234-236
- 35 Saiki RK, Walsh PS, Levenson CH, Erlich HA. Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 6230-6234
- 36 Watanabe K, Takahashi T, Takahashi S, Okoshi S, Ichida T, Aoyagi Y. Comparative study of genotype B and C hepatitis B virus-induced chronic hepatitis in relation to the basic core promoter and precore mutations. *J Gastroenterol Hepatol* 2005; 20: 441-449
- 37 Kobayashi M, Arase Y, Ikeda K, Tsubota A, Suzuki Y, Saitoh S, Kobayashi M, Suzuki F, Akuta N, Someya T, Matsuda M, Sato J, Kumada H. Clinical characteristics of patients infected with hepatitis B virus genotypes A, B, and C. *J Gastroenterol* 2002; 37: 35-39
- 38 Kao JH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. Hepatitis B genotypes correlate with clinical outcomes in patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 2000; 118: 554-559
- 39 Akuta N, Suzuki F, Kobayashi M, Tsubota A, Suzuki Y, Hosaka T, Someya T, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kumada H. The influence of hepatitis B virus genotype on the development of lamivudine resistance during long-term treatment. *J Hepatol* 2003; 38: 315-321
- 40 Lindh M, Hannoun C, Dhillon AP, Norkrans G, Horal P. Core promoter mutations and genotypes in relation to viral replication and liver damage in East Asian hepatitis B virus carriers. *J Infect Dis* 1999; 179: 775-782
- 41 Mangia A, Chung YH, Hoofnagle JH, Birkenmeyer L, Mushahwar I, Di Bisceglie AM. Pathogenesis of chronic liver disease in patients with chronic hepatitis B virus infection without serum HBeAg. *Dig Dis Sci* 1996; 41: 2447-2452
- 42 Arauz-Ruiz P, Norder H, Visona KA, Magnus LO. Genotype F prevails in HBV infected patients of hispanic origin in Central America and may carry the precore stop mutant. *J Med Virol* 1997; 51: 305-312
- 43 Franca PH, Gonzalez JE, Munne MS, Brandao LH, Gouvea VS, Sablon E, Vanderborgh BO. Strong association between genotype F and hepatitis B virus (HBV) e antigen-negative variants among HBV-infected argentinean blood donors. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 5015-5021
- 44 Grandjacques C, Pradat P, Stuyver L, Chevallier M, Chevallier P, Pichoud C, Maisonnas M, Trepo C, Zoulim F. Rapid detection of genotypes and mutations in the pre-core promoter and the pre-core region of hepatitis B virus genome: correlation with viral persistence and disease severity. *J Hepatol* 2000; 33: 430-439
- 45 Miyakawa Y, Mizokami M. Classifying hepatitis B virus genotypes. *Intervirology* 2003; 46: 329-338
- 46 Huy TT, Ushijima H, Quang VX, Ngoc TT, Hayashi S, Sata T, Abe K. Characteristics of core promoter and precore stop codon mutants of hepatitis B virus in Vietnam. *J Med Virol* 2004; 74: 228-236
- 47 Tanaka Y, Hasegawa I, Kato T, Orito E, Hirashima N, Acharya SK, Gish RG, Kramvis A, Kew MC, Yoshihara N, Shrestha SM, Khan M, Miyakawa Y, Mizokami M. A case-control study for differences among hepatitis B virus infections of genotypes A (subtypes Aa and Ae) and D. *Hepatology* 2004; 40: 747-755
- 48 Duong TN, Horiike N, Michitaka K, Yan C, Mizokami M, Tanaka Y, Jyoko K, Yamamoto K, Miyaoka H, Yamashita Y, Ohno N, Onji M. Comparison of genotypes C and D of the hepatitis B virus in Japan: a clinical and molecular biological study. *J Med Virol* 2004; 72: 551-557
- 49 Orito E, Mizokami M, Sakugawa H, Michitaka K, Ishikawa K, Ichida T, Okanoue T, Yotsuyanagi H, Iino S. A case-control study for clinical and molecular biological differences between hepatitis B viruses of genotypes B and C. Japan HBV Genotype Research Group. *Hepatology* 2001; 33: 218-223
- 50 Song BC, Kim H, Kim SH, Cha CY, Kook YH, Kim BJ. Comparison of full length sequences of hepatitis B virus isolates in hepatocellular carcinoma patients and asymptomatic carriers of Korea. *J Med Virol* 2005; 75: 13-19
- 51 Yuen MF, Tanaka Y, Mizokami M, Yuen JC, Wong DK, Yuan HJ, Sum SM, Chan AO, Wong BC, Lai CL. Role of hepatitis B virus genotypes Ba and C, core promoter and precore mutations on hepatocellular carcinoma: a case control study. *Carcinogenesis* 2004;

- 25: 1593-1598
- 52 Kao JH. Hepatitis B virus genotypes and hepatocellular carcinoma in Taiwan. *Intervirology* 2003; 46: 400-407
- 53 Chen CH, Lee CM, Lu SN, Changchien CS, Eng HL, Huang CM, Wang JH, Hung CH, Hu TH. Clinical significance of hepatitis B virus (HBV) genotypes and precore and core promoter mutations affecting HBV e antigen expression in Taiwan. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 6000-6006
- 54 Chan HL, Tsang SW, Liew CT, Tse CH, Wong ML, Ching JY, Leung NW, Tam JS, Sung JJ. Viral genotype and hepatitis B virus DNA levels are correlated with histological liver damage in HBeAg-negative chronic hepatitis B virus infection. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 406-412
- 55 Sakugawa H, Nakasone H, Nakayoshi T, Orito E, Mizokami M, Yamashiro T, Maeshiro T, Kinjo F, Saito A, Miyagi Y. Preponderance of hepatitis B virus genotype B contributes to a better prognosis of chronic HBV infection in Okinawa, Japan. *J Med Virol* 2002; 67: 484-489
- 56 Thakur V, Gupta RC, Kazim SN, Malhotra V, Sarin SK. Profile, spectrum and significance of HBV genotypes in chronic liver disease patients in the Indian subcontinent. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17: 165-170
- 57 Sanchez-Tapias JM, Costa J, Mas A, Bruguera M, Rodes J. Influence of hepatitis B virus genotype on the long-term outcome of chronic hepatitis B in western patients. *Gastroenterology* 2002; 123: 1848-1856
- 58 Yotsuyanagi H, Okuse C, Yasuda K, Orito E, Nishiguchi S, Toyoda J, Tomita E, Hino K, Okita K, Murashima S, Sata M, Hoshino H, Miyakawa Y, Iino S. Distinct geographic distributions of hepatitis B virus genotypes in patients with acute infection in Japan. *J Med Virol* 2005; 77: 39-46
- 59 Halfon P, Bourliere M, Pol S, Benhamou Y, Ouzan D, Rotily M, Khiri H, Renou C, Penaranda G, Saadoun D, Thibault V, Serpaggi J, Varastet M, Tainturier MH, Poynard T, Cacoub P. Multicentre study of hepatitis B virus genotypes in France: correlation with liver fibrosis and hepatitis B e antigen status. *J Viral Hepat* 2006; 13: 329-335
- 60 Erhardt A, Blondin D, Hauck K, Sagir A, Kohnle T, Heintges T, Haussinger D. Response to interferon alfa is hepatitis B virus genotype dependent: genotype A is more sensitive to interferon than genotype D. *Gut* 2005; 54: 1009-1013
- 61 Enomoto M, Tamori A, Nishiguchi S. Hepatitis B virus genotypes and response to antiviral therapy. *Clin Lab* 2006; 52: 43-47
- 62 Kao JH, Wu NH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. Hepatitis B genotypes and the response to interferon therapy. *J Hepatol* 2000; 33: 998-1002
- 63 Flink HJ, van Zonneveld M, Hansen BE, de Man RA, Schalm SW, Janssen HL. Treatment with Peg-interferon alpha-2b for HBeAg-positive chronic hepatitis B: HBsAg loss is associated with HBV genotype. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 297-303
- 64 Wai CT, Chu CJ, Hussain M, Lok AS. HBV genotype B is associated with better response to interferon therapy in HBeAg(+) chronic hepatitis than genotype C. *Hepatology* 2002; 36: 1425-1430
- 65 Kao JH, Liu CJ, Chen DS. Hepatitis B viral genotypes and lamivudine resistance. *J Hepatol* 2002; 36: 303-304
- 66 Suzuki F, Tsubota A, Arase Y, Suzuki Y, Akuta N, Hosaka T, Someya T, Kobayashi M, Saitoh S, Ikeda K, Kobayashi M, Matsuda M, Satoh J, Takagi K, Kumada H. Efficacy of lamivudine therapy and factors associated with emergence of resistance in chronic hepatitis B virus infection in Japan. *Intervirology* 2003; 46: 182-189
- 67 Zollner B, Petersen J, Puchhammer-Stockl E, Kletzmayer J, Sterneck M, Fischer L, Schroter M, Laufs R, Feucht HH. Viral features of lamivudine resistant hepatitis B genotypes A and D. *Hepatology* 2004; 39: 42-50
- 68 Yuen MF, Yuan HJ, Sablon E, Wong DK, Chan AO, Wong BC, Lai CL. Long-term follow-up study of Chinese patients with YMDD mutations: significance of hepatitis B virus genotypes and characteristics of biochemical flares. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 3932-3936
- 69 Westland C, Delaney W 4th, Yang H, Chen SS, Marcellin P, Hadziyannis S, Gish R, Fry J, Brosgart C, Gibbs C, Miller M, Xiong S. Hepatitis B virus genotypes and virologic response in 694 patients in phase III studies of adefovir dipivoxil. *Gastroenterology* 2003; 125: 107-116
- 70 Westland CE, Yang H, Delaney WE 4th, Gibbs CS, Miller MD, Wulfsohn M, Fry J, Brosgart CL, Xiong S. Week 48 resistance surveillance in two phase 3 clinical studies of adefovir dipivoxil for chronic hepatitis B. *Hepatology* 2003; 38: 96-103

电编 张敏 编辑 张焕兰

hFXYP6反义核酸对胆管癌细胞体外增殖和侵袭能力的影响

窦春青, 岳鑫, 周宁新

窦春青, 周宁新, 中国人民解放军总医院全军肝胆外科研究所 北京市 100853

岳鑫, 北京大学神经科学研究所 北京市 100083

窦春青, 博士, 主治医师, 主要从事胆道生理病理及胆管癌基因诊断治疗研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30471699

通讯作者: 周宁新, 100853, 北京市, 北京市解放军总医院全军肝胆外科研究所. zhounx301@163.com

收稿日期: 2006-12-25 接受日期: 2007-01-20

Effect of human antisense FXYP6 on the proliferation and invasion of human cholangiocarcinoma cells *in vitro*

Chun-Qing Dou, Xin Yue, Ning-Xin Zhou

Chun-Qing Dou, Ning-Xin Zhou, Institute of Hepatobiliary Surgery, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China

Xin Yue, Neuroscience Research Institute, Peking University, Beijing 100083, China

Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30471699

Correspondence to: Ning-Xin Zhou, Institute of Hepatobiliary Surgery, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China. zhounx301@163.com

Received: 2006-12-25 Accepted: 2007-01-20

Abstract

AIM: To investigate the effect of human antisense FXYP6 (FXYP6 domain containing ion transport regulator 6) on the proliferation and invasion of human cholangiocarcinoma cell line QBC939 *in vitro*.

METHODS: Human cholangiocarcinoma cell line QBC939 was transfected with the plasmid expressing human antisense FXYP6. Meanwhile, the empty vector and non-transfection group were designed. The mRNA transcription level of hFXYP6 was assayed by real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) with SYBR Green I, and the expression of hFXYP6 protein was detected by immunohistochemistry. MTT and the colony-forming assay were used to measure the ability of cell growth. The cell cycle distribution was analyzed by flow cytometry and Transwell chamber model was

employed to test the ability of cell invasion *in vitro*.

RESULTS: In comparison with the cells transfected with empty vector or without transfection, QBC939 cells transfected with antisense hFXYP6 had a significant decrease in mRNA transcription and protein expression. The cell doubling time was augmented (46.8 h *vs* 34.5 h, 35.3 h), whereas the colony formation was decreased ($24.3\% \pm 5.3\%$ *vs* $61.0\% \pm 8.5\%$, $58.0\% \pm 5.6\%$; $P < 0.001$). The G1-phase cell population was obviously increased ($66.4\% \pm 2.9\%$ *vs* $33.5\% \pm 2.3\%$, $39.4\% \pm 3.7\%$, $P < 0.001$), but the S-phase one was decreased ($18.6\% \pm 1.6\%$ *vs* $36.2\% \pm 2.1\%$, $34.1\% \pm 1.6\%$, $P < 0.001$). The cells moved from the upper chamber into the lower one in Transwell chamber assay had no marked difference. Between the cells without transfection and transfected with empty vector, there were no significant differences in cell doubling time, colony forming ability, cell cycle distribution and the ability of cell invasion *in vitro*.

CONCLUSION: Transfection of antisense hFXYP6 can inhibit the ability of cell proliferation, but it has no effect on the ability of cell invasion in human cholangiocarcinoma cell line QBC939 *in vitro*.

Key Words: FXYP6 domain containing ion transport regulator 6; Antisense; Cholangiocarcinoma; Proliferation; Invasion; Real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction; Immunohistochemistry; Flow cytometry

Dou CQ, Yue X, Zhou NX. Effect of human antisense FXYP6 on the proliferation and invasion of human cholangiocarcinoma cells *in vitro*. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(9):929-935

摘要

目的: 研究hFXYP6基因反义核酸对人胆管癌QBC939细胞体外增殖和侵袭能力的影响。

方法: 构建hFXYP6基因反义核酸真核表达载体pcDNA3.1(-)/hFXYP6(-)并转染人胆管癌

■背景资料

胆管癌分化程度是影响预后的重要因素之一。高低分化癌相比,低分化癌细胞往往具有更强的增殖和侵袭能力。基于现有理论及治疗方法,筛选胆管癌分化相关基因,能提高诊断灵敏性及特异性,同时还能揭示胆管癌发生、发展的分子机制。

■相关报道

FXYP6为FXYP蛋白家族组成之一。因FXYP2为 Na^+/K^+ -ATPase亚基,故FXYP蛋白家族也称为 Na^+/K^+ -ATPase亚基蛋白家族。已发现的FXYP家族蛋白有7个,目前证实FXYP3与FXYP5为肿瘤相关抗原,其中FXYP3在胰腺癌、乳腺癌及前列腺癌等异常高表达,降低FXYP3表达可抑制肿瘤细胞的增殖能力;而FXYP5在胃癌、结肠癌、食管鳞状细胞癌、胰腺癌、舌癌、宫颈癌等异常高表达,降低FXYP5表达则抑制肿瘤细胞的侵袭能力。这为研究FXYP6与胆管癌细胞增殖侵袭开拓了思路。

QBC939细胞,同时设pcDNA3.1(-)空载体对照组和空白对照组。SYBR Green I荧光定量RT-PCR和免疫组化分别检测hFXYP6 mRNA及蛋白表达;MTT、平板克隆形成实验检测细胞体外增殖活性;流式细胞仪检测细胞周期;Transwell侵袭小室模型检测细胞体外侵袭能力。

结果:与空白组和空载体组比较,反义组细胞hFXYP6 mRNA及蛋白表达量降低;细胞群体倍增时间增加(46.8 h vs 34.5 h, 35.3 h),细胞克隆形成率降低($24.3\% \pm 5.3\%$ vs $61.0\% \pm 8.5\%$, $58.0\% \pm 5.6\%$, $P < 0.001$);细胞周期中G1期细胞比例明显升高($66.4\% \pm 2.9\%$ vs $33.5\% \pm 2.3\%$, $39.4\% \pm 3.7\%$, $P < 0.001$),S期比例明显减少($18.6\% \pm 1.6\%$ vs $36.2\% \pm 2.1\%$, $34.1\% \pm 1.6\%$, $P < 0.001$);Transwell侵袭小室中24 h穿膜细胞数无显著改变。空白组和空载体组细胞间均无明显差异。

结论:hFXYP6反义核酸抑制人胆管癌QBC939细胞体外增殖能力,但对其侵袭能力无明显作用。

关键词:FXYP6;反义核酸;胆管癌;增殖;侵袭;荧光定量RT-PCR;免疫组化;流式细胞术

窦春青, 岳鑫, 周宁新. hFXYP6反义核酸对胆管癌细胞体外增殖和侵袭能力的影响. 世界华人消化杂志 2007;15(9):929-935
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/929.asp>

0 引言

FXYP6基因全称是包含FXYP结构的离子转运调节子6(FXYP domain containing ion transport regulator 6, FXYP6),是一功能尚不明确的新基因。在胆管癌的差异显示PCR中,我们发现,FXYP6基因与胆管癌的分化相关,随分化程度降低FXYP6基因表达递增^[1-4]。原位RT-PCR结果进一步证实:低分化胆管癌FXYP6 mRNA表达高于高分化胆管癌。FXYP6为FXYP蛋白家族组成之一。已证实FXYP3在胰腺癌^[5]、乳腺癌^[6]及前列腺癌^[7]等异常高表达,降低FXYP3表达可抑制肿瘤细胞的增殖能力;而FXYP5在胃癌^[8]、结肠癌^[9]、食管鳞状细胞癌^[10]、胰腺癌^[11]、舌癌^[12]、宫颈癌^[13]等异常高表达,降低FXYP5表达则抑制肿瘤细胞的侵袭能力。本实验通过hFXYP6反义核酸真核表达载体的构建及对胆管癌细胞QBC939的基因转染,并利用SYBR Green I荧光定量RT-PCR、免疫组化、

MTT、流式细胞术和体外侵袭模型等方法,研究了hFXYP6反义核酸对胆管癌细胞QBC939体外增殖和侵袭能力的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 人胆管癌细胞系QBC939购自中南大学人类干细胞国家工程研究中心细胞库;内切酶EcoR I, Kpn I及T4 DNA连接酶(Promega公司);DMEM培养基、胎牛血清、Lipofectamine 2000、G418、MTT和TRIzol均购自美国Gibco公司;细胞在含100 mL/L胎牛血清的培养基中置于37℃, 50 mL/L CO₂孵箱内常规培养;人FXYP6真核细胞表达载体pcDNA3.1(+)/hFXYP6由我室前期构建;空载体pcDNA3.1(-)由我室保存;兔抗人FXYP6多克隆抗体由我室制备;羊抗兔IgG荧光抗体(北京中杉金桥生物技术有限公司);Transwell侵袭小室(美国Costar公司);Matrigel人工基质胶(美国BD)。

1.2 方法

1.2.1 hFXYP6反义核酸真核表达载体构建 用限制性核酸内切酶EcoR I/Kpn I双酶切pcDNA3.1(-)空载体和pcDNA3.1(+)/hFXYP6,所得pcDNA3.1(+)/hFXYP6酶切产物小片段(300 bp)和pcDNA3.1(-)空载体经切胶回收纯化后以T4 DNA连接酶连接,经测序鉴定后命名为pcDNA3.1(-)/hFXYP6(-)。

1.2.2 细胞转染 pcDNA3.1(-)空载体及所得pcDNA3.1(-)/hFXYP6(-)经Bgl II酶切线性化并纯化后用于细胞转染。G418预筛选确定胆管癌细胞QBC939基因转染后G418抗性筛选浓度。采用Lipofectamine 2000介导基因的转染(按说明书进行),并按已确定的G418浓度进行抗性筛选。3-4 wk后,见有抗性细胞集落形成时,挑取细胞克隆并放大培养。分别称为反义组(细胞转染hFXYP6反义核酸)、空载体组(细胞仅转染空载体)和空白组(细胞未转染反义核酸及空载体)细胞。

1.2.3 SYBR Green I荧光定量RT-PCR法检测 hFXYP6 mRNA表达 TRIzol一步法提取细胞总RNA(按试剂盒说明)并纯化除去DNA。取1 μg RNA,以Oligo-dT为引物反转录合成cDNA。实时荧光定量RT-PCR: 50 μL反应体系中含有25 μL 2×SYBR Green I qPCR mix, 2 μL cDNA模板, hFXYP6或hGAPDH上下游引物各1 μL。hFXYP6上游引物序列5'-AACAGAGCCCCAGAAAGCAGA -3', 下

游引物序列5'-CCGGTTTTCTTAAGCATCG ACA-3'; hGAPDH上游引物序列5'-TCCTCT GACTTCAACAGCGACA-3', 下游引物序列5'-CCCTGTT GCTGTAGCCAAATTC-3'。同时设无模板对照、无RT对照和阳性对照。扩增条件: 95℃ 10 min, 95℃ 15 s, 60℃ 15 s, 72℃ 20 s, 低于溶解温度2℃时检测荧光, 共40个循环。扩增完毕进行溶解曲线分析。采用相对定量法, 以hGAPDH为参照, 利用Ct值计算hFXVD6的相对量。

1.2.4 免疫组化检测hFXVD6表达 采用荧光免疫组织化学法, 主要操作步骤如下: 将无菌盖玻片置培养皿中, 细胞按 $5 \times 10^7/L$ 接种于培养皿中制备细胞爬片。细胞爬片以PBS洗2次, 3 min/次; 40 g/L多聚甲醛室温下固定30 min; PBS洗2次, 3 min/次; 30 mL/L H_2O_2 室温孵育10 min; PBS洗2次, 5 min/次; 10 mL/L正常山羊血清封闭30 min; 加1:100兔抗人FXVD6多克隆抗体, 4℃孵育过夜; PBS洗3次, 5 min/次; 加荧光素标记二抗, 37℃孵育60 min; PBS洗3次, 5 min/次, 封片。PBS代替一抗作为阴性对照。激光共聚焦显微镜观察摄片。

1.2.5 MTT法绘制细胞生长曲线 将3组细胞分别以 1×10^4 /孔接种于96孔板, 共5块板, 每块板各组细胞分别接种3孔。次日开始每日取一块96孔板做MTT测定。测定时每孔加入5 g/L MTT液20 μ L, 37℃作用4 h, 弃MTT后, 每孔加入100 μ L DMSO, 振荡10 min后酶标仪测定 A_{540} 值, 以只加培养液不加细胞的阴性对照孔调零。绘制细胞生长曲线并按文献[14]方法计算细胞群体倍增时间。

1.2.6 平板克隆形成实验检测细胞克隆形成能力 将对数生长期的3组细胞分别以2.5 g/L胰蛋白酶消化成单个细胞悬液, 并作梯度倍比稀释, 按每孔50个细胞接种于24孔板, 每组细胞各接种6孔。静止培养2-3 wk, 当培养板出现肉眼可见的克隆时终止培养。PBS清洗后加纯甲醇1 mL固定15 min, 吉姆萨液染色。将培养板置于显微镜低倍数下计数大于50个细胞的克隆数, 按公式计算克隆形成率。克隆形成率(%) = 克隆数/接种数 $\times 100\%$

1.2.7 流式细胞仪检测细胞周期 将对数生长期的3组细胞分别以2.5 g/L胰蛋白酶消化成单个细胞悬液, 离心重悬后700 mL/L乙醇固定, 4℃保存。PBS清洗后加入碘化丙啶(PI)染液, 混匀, 4℃放置30 min, 调整细胞浓度为 $1 \times 10^9/L$, 流式细胞

仪检测并软件分析结果, 每组重复3次。

1.2.8 Transwell侵袭小室模型测定细胞体外侵袭能力 将浓度为0.5 g/L Matrigel人工基质胶20 μ L铺于Transwell侵袭小室聚碳酸酯微孔膜(孔径8 μ m)的上表面, 置37℃ 30 min使其聚成凝胶。Transwell上室中分别加入已消化重悬的各组细胞100 μ L ($1 \times 10^8/L$), 下室中加入600 μ L含趋化因子无血清DMEM培养基, 培养24 h后取出, PBS清洗, 棉签去除滤膜上层细胞, 将已经侵入并贴附于微孔膜下层的细胞固定并吉姆萨液染色, 显微镜下直接观察穿过膜的细胞数。随机计数5个视野, 计数每个视野内穿过8 μ m微孔的细胞数。以侵袭细胞的相对数目来表示肿瘤细胞的侵袭能力。

统计学处理 以SPSS13.0软件进行统计分析, 所有计量资料以mean \pm SD表示, 采用单因素方差分析, 两组间比较行SNK-q检验; $P < 0.05$ 为统计学差异显著。

2 结果

2.1 hFXVD6反义核酸真核表达载体构建 成功构建人类FXVD6反义核酸真核表达载体pcDNA3.1(-)/hFXVD6(-), 其测序结果如图1。

2.2 SYBR Green I荧光定量RT-PCR法检测hFXVD6 mRNA表达 筛选出的3株反义组细胞hFXVD6 mRNA相对含量分别为0.6, 0.7和0.9; 空白组细胞为11.2; 空载组细胞为11.8。反义组细胞hFXVD6 mRNA相对量低于空白组及空载组细胞; 空白组及空载组细胞间无明显差异。在转录水平表明, hFXVD6反义核酸转染成功。

2.3 免疫组化检测hFXVD6蛋白表达 3组细胞胞质中均出现绿色荧光, 提示各组细胞中均有hFXVD6蛋白表达, 但反义组细胞表达强度明显较空白组和空载组减弱, 空白组和空载组间无显著差别(图2)。在翻译水平表明, hFXVD6反义核酸转染成功。

2.4 MTT法测定细胞群体倍增时间 反义组细胞生长速率明显低于空白组和空载组细胞, 而空白组和空载组细胞间生长速率无明显差异(图3)。空白组、空载组及反义组细胞群体倍增时间分别为34.5, 35.3和46.8 h。表明反义hFXVD6基因转染抑制QBC939细胞生长速率。

2.5 平板克隆形成实验检测细胞克隆形成能力 3组细胞2 wk后均有克隆形成。反义组细胞克隆形成率为 $24.3\% \pm 5.3\%$; 空白组细胞为 $61.0\% \pm 8.5\%$; 空载组细胞为 $58.0\% \pm 5.6\%$ 。反义组细胞

■创新盘点

本文采用反义核酸技术, 首次证实胆管癌分化相关基因FXVD6可促进胆管癌细胞增殖, 而与细胞侵袭无明显关系。

应用要点

本研究通过体外实验探讨FXD6反义核酸对胆管癌细胞的抑制作用, 试图找到一种抑制胆管癌生长和转移的新途径, 为FXD6反义核酸在临床治疗胆管癌提供实验依据。

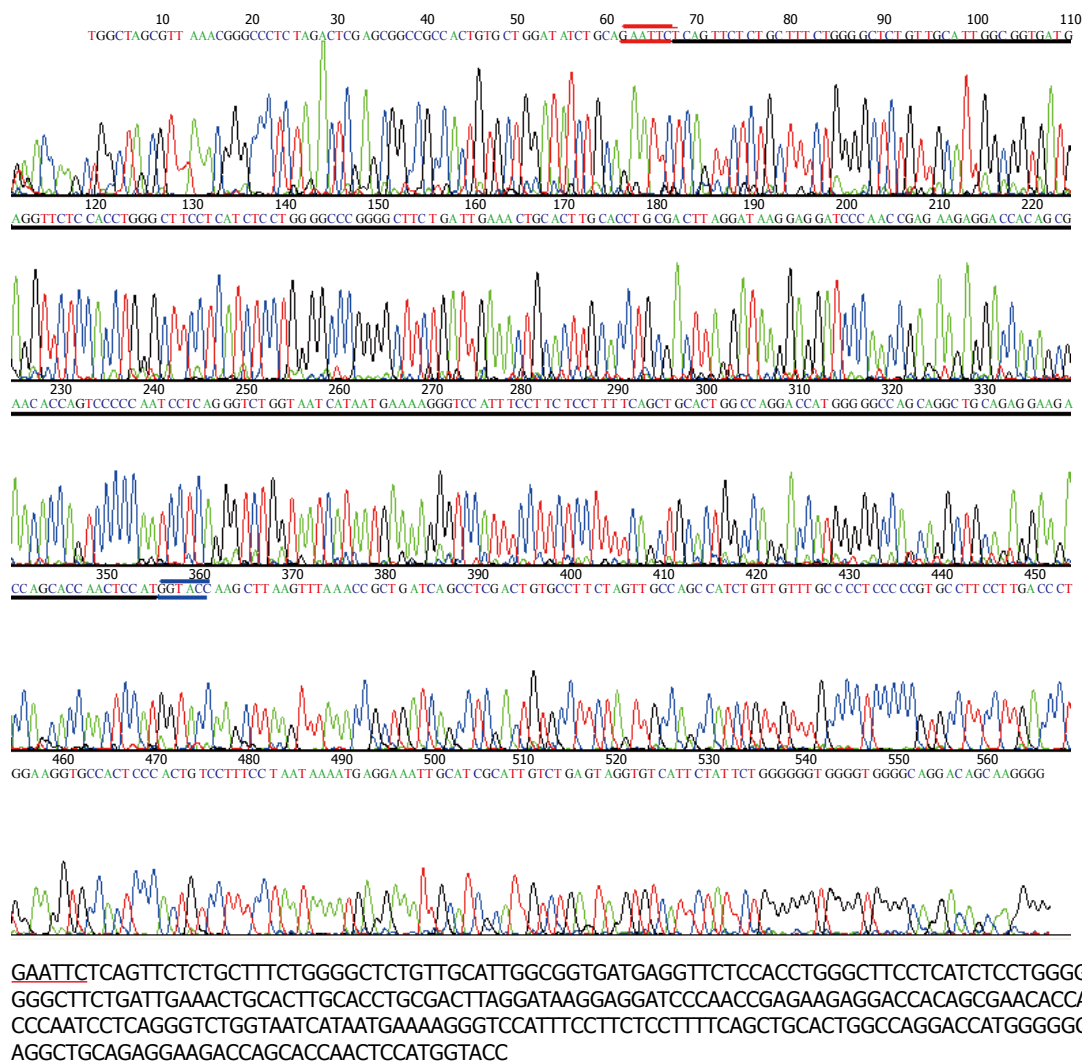


图1 pcDNA3.1(-)/hFXD6(-)测序图。红线部分为EcoR I 酶切位点; 蓝线部分为Kpn I 酶切位点; 中间部分为hFXD6(-)序列(共288 bp)。

克隆形成率较空白组和空载组明显减小, 差异有显著意义(P 均 <0.001); 空白组与空载组比较无差异($P = 0.442$), 表明反义hFXD6基因转染降低QBC939细胞克隆形成能力。

2.6 流式细胞仪检测细胞周期 反义组细胞G1期和S期细胞比例分别为 $66.4\% \pm 2.9\%$, $24.3\% \pm 5.3\%$; 空白组细胞分别为 $33.5\% \pm 2.3\%$, $61.0\% \pm 8.5\%$; 空载组细胞分别为 $39.4\% \pm 3.7\%$, $58.0\% \pm 5.6\%$ 。与空白组及空载组细胞相比, 反义组G1期细胞比例明显升高(P 值均 <0.001), 而S期细胞所占比例明显降低(P 值均 <0.001)(图4); 空白组和空载组间G1期和S期细胞均无显著差异(分别为 $P = 0.199$, $P = 0.056$)。提示反义hFXD6基因转染后QBC939细胞DNA合成能力受限。

2.7 Transwell侵袭小室模型测定细胞体外侵袭能力 反义组细胞在Transwell侵袭小室中24 h穿膜细胞数为 32.8 ± 6.2 ; 空白组细胞为 34.4 ± 5.3 ; 空

载组细胞为 29.4 ± 5.2 。3组间比较无明显差异(分别为 $P = 0.659$, $P = 0.355$, $P = 0.183$)。表明反义hFXD6基因转染对QBC939细胞体外侵袭能力无显著影响。

3 讨论

本课题组前期的差显PCR结果发现, FXD6 mRNA表达与胆管癌分化程度呈负性相关。随后的原位RT-PCR半定量实验证实: 从正常胆管上皮细胞、高分化胆管癌细胞到低分化胆管癌细胞, FXD6 mRNA含量依次递增。染色体比较基因组杂交结果表明, 11号染色体长臂是包括胆管癌在内的多种肿瘤细胞最常见的异常区域^[15], 而FXD6基因正是定位于11号染色体长臂(11q23.3)。那么FXD6对于胆管癌细胞的增殖转移有何影响? 通过反义核酸技术, 本实验进行了初步探讨。

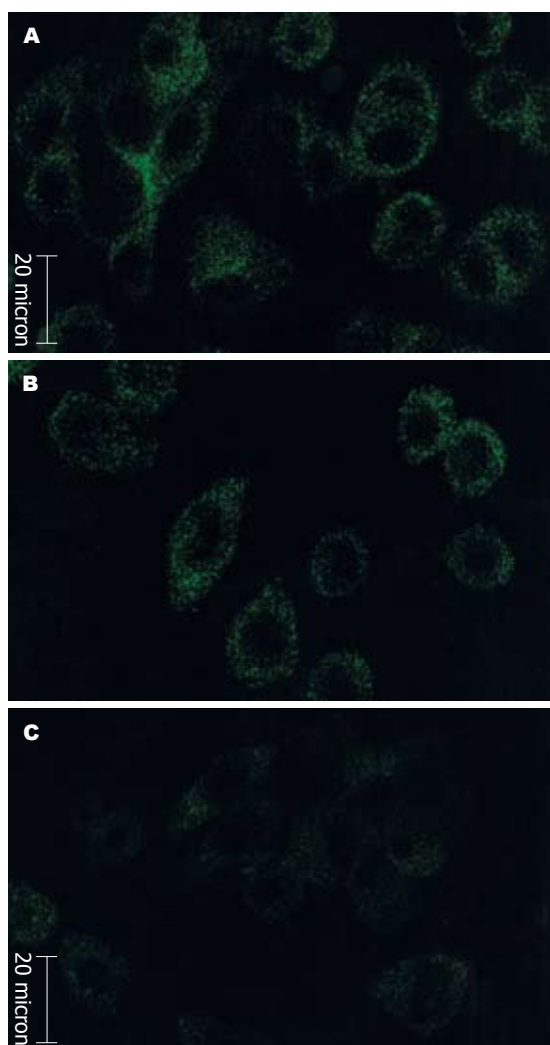


图 2 荧光免疫组化图. A: 空白组; B: 空载组; C: 反义组; Bar = 20 μ m.

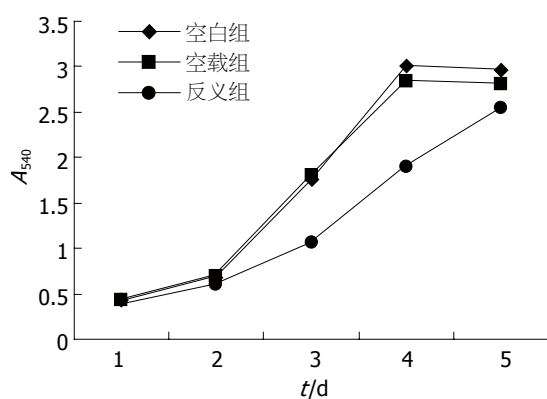


图 3 细胞生长曲线图.

首先利用pcDNA3.1(+)和pcDNA3.1(-)质粒 *EcoR* I 与 *Kpn* I 酶切位点顺序相反的特点, 通过双酶切pcDNA3.1(+)/hFXYP6获得hFXYP6 ORF区序列后反向插入pcDNA3.1(-)空载的方法, 我们构建了hFXYP6反义核酸真核表达载体

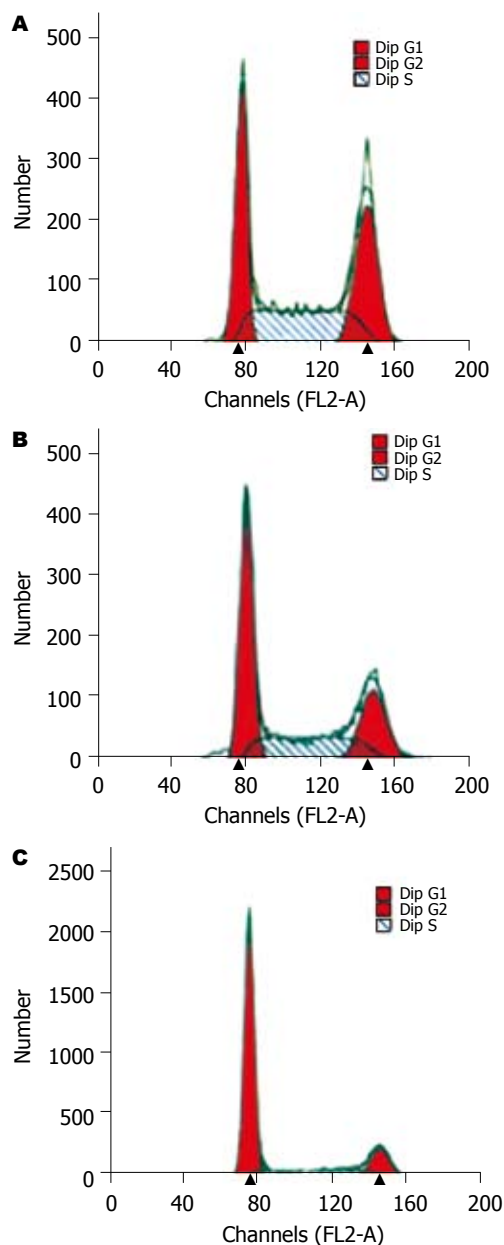


图 4 流式细胞仪细胞周期检测图. A: 空白组; B: 空载组; C: 反义组.

pcDNA3.1(-)/hFXYP6(-), 随后的测序结果证实载体构建成功. 细胞转染后通过SYBR Green I实时荧光定量RT-PCR和免疫组化, 分别在转录及翻译水平证实反义核酸转染成功.

通过MTT法绘制细胞生长曲线并计算细胞群体倍增时间、平板克隆形成实验检测细胞克隆形成能力、流式细胞仪检测细胞周期及Transwell侵袭小室模型测定细胞体外侵袭能力, 发现与空白组及空载组细胞相比, 转染hFXYP6反义核酸的胆管癌细胞群体倍增时间增加, 平板克隆形成率降低, S期细胞减少而G1期细胞增多; 而在体外侵袭实验中穿膜细胞数并无显著差异.

■名词解释

FXYP蛋白家族: 是近年来发现的 Na^+/K^+ -ATPase组织特异性调节子, 是小分子(66氨基酸-178氨基酸)不溶于水的I型膜蛋白, 其结构上包含有相似的细胞外固定FXYP序列的单跨膜片段, 并按发现时间顺序分别命名为FXYP1-7. 该家族蛋白在哺乳动物中广泛分布, 所有蛋白在胚胎早期均有表达, 成年后则主要在转运液体和溶质的组织器官中表达, 如肾、乳腺、胰腺、前列腺、结肠、肝、肺和胎盘; 在电兴奋组织, 如神经系统和肌肉中亦有表达.

同行评价

本文实验设计合理, 选题新颖, 采用方法得当、有创新, 统计学结果正确, 在结果和结论中有新的见解, 是一篇较好的论著。

总之, 本实验结果表明, hFXYP6反义核酸抑制人胆管癌QBC939细胞体外增殖能力, 但对其侵袭能力无明显作用。目前对FXYP6的初步认识是 Na^+/K^+ -ATPase调节蛋白^[16-21]。 Na^+/K^+ -ATPase活性的抑制可导致EGFR的持续激活^[22-25], 而胆管癌细胞的EGFR表达较正常胆管上皮细胞明显提高, 且EGFR激活可促进肿瘤细胞增殖^[26-31]。FXYP6是否通过抑制 Na^+/K^+ -ATPase活性而激活EGFR以促进细胞增殖? 具体机制有待于进一步研究。

参考文献

- 1 张效东, 周宁新, 卢柏松, 贾熙华, 黄培堂. 不同分化胆管癌差异表达基因的分离、克隆和功能研究. 中华外科杂志 2002; 40: 399
- 2 张效东, 周宁新, 卢柏松, 贾熙华, 黄培堂. 不同分化胆管癌间差异表达基因的研究. 消化外科 2002; 1: 13-15
- 3 张效东, 周宁新, 卢柏松, 黄培堂. 应用基因芯片技术比较两种不同表型的胆管癌组织中基因表达的差异. 消化外科 2002; 1: 181-184
- 4 万涛, 倪彬, 刘建伟, 叶玲, 周宁新. 人胆管癌相关基因CCR-L2/FXYP6大片段克隆与鉴定. 中华实验外科杂志 2003; 20: 393-395
- 5 Kaye H, Kleeff J, Kolb A, Ketterer K, Keleg S, Felix K, Giese T, Penzel R, Zentgraf H, Buchler MW, Korc M, Friess H. FXYP3 is overexpressed in pancreatic ductal adenocarcinoma and influences pancreatic cancer cell growth. *Int J Cancer* 2006; 118: 43-54
- 6 Morrison BW, Moorman JR, Kowdley GC, Kobayashi YM, Jones LR, Leder P. Mat-8, a novel phospholemman-like protein expressed in human breast tumors, induces a chloride conductance in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem* 1995; 270: 2176-2182
- 7 Grzmil M, Voigt S, Thelen P, Hemmerlein B, Helmke K, Burfeind P. Up-regulated expression of the MAT-8 gene in prostate cancer and its siRNA-mediated inhibition of expression induces a decrease in proliferation of human prostate carcinoma cells. *Int J Oncol* 2004; 24: 97-105
- 8 Shimada Y, Yamasaki S, Hashimoto Y, Ito T, Kawamura J, Soma T, Ino Y, Nakanishi Y, Sakamoto M, Hirohashi S, Imamura M. Clinical significance of dysadherin expression in gastric cancer patients. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 2818-2823
- 9 Aoki S, Shimamura T, Shibata T, Nakanishi Y, Moriya Y, Sato Y, Kitajima M, Sakamoto M, Hirohashi S. Prognostic significance of dysadherin expression in advanced colorectal carcinoma. *Br J Cancer* 2003; 88: 726-732
- 10 Shimada Y, Hashimoto Y, Kan T, Kawamura J, Okumura T, Soma T, Kondo K, Teratani N, Watanabe G, Ino Y, Sakamoto M, Hirohashi S, Imamura M. Prognostic significance of dysadherin expression in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncology* 2004; 67: 73-80
- 11 Shimamura T, Yasuda J, Ino Y, Gotoh M, Tsuchiya A, Nakajima A, Sakamoto M, Kanai Y, Hirohashi S. Dysadherin expression facilitates cell motility and metastatic potential of human pancreatic cancer cells. *Cancer Res* 2004; 64: 6989-6995
- 12 Nakanishi Y, Akimoto S, Sato Y, Kanai Y,

Sakamoto M, Hirohashi S. Prognostic significance of dysadherin expression in tongue cancer: immunohistochemical analysis of 91 cases. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2004; 12: 323-328

- 13 Wu D, Qiao Y, Kristensen GB, Li S, Troen G, Holm R, Nesland JM, Suo Z. Prognostic significance of dysadherin expression in cervical squamous cell carcinoma. *Pathol Oncol Res* 2004; 10: 212-218
- 14 Yin W, Cheepala S, Roberts JN, Syson-Chan K, DiGiovanni J, Clifford JL. Active Stat3 is required for survival of human squamous cell carcinoma cells in serum-free conditions. *Mol Cancer* 2006; 5: 15
- 15 Rijken AM, Hu J, Perlman EJ, Morsberger LA, Long P, Kern SE, Hruban RH, Yeo CJ, Griffin CA. Genomic alterations in distal bile duct carcinoma by comparative genomic hybridization and karyotype analysis. *Genes Chromosomes Cancer* 1999; 26: 185-191
- 16 Li C, Grosdidier A, Crambert G, Horisberger JD, Michielin O, Geering K. Structural and functional interaction sites between Na, K-ATPase and FXYP proteins. *J Biol Chem* 2004; 279: 38895-38902
- 17 Geering K. Function of FXYP proteins, regulators of Na, K-ATPase. *J Bioenerg Biomembr* 2005; 37: 387-392
- 18 Geering K. FXYP proteins: new regulators of Na-K-ATPase. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006; 290: F241-250
- 19 Garty H, Karlish SJ. Role of FXYP proteins in ion transport. *Annu Rev Physiol* 2006; 68: 431-459
- 20 Lindzen M, Aizman R, Lifshitz Y, Fuzesi M, Karlish SJ, Garty H. Domains involved in the interactions between FXYP and Na, K-ATPase. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 986: 530-531
- 21 Geering K, Beguin P, Garty H, Karlish S, Fuzesi M, Horisberger JD, Crambert G. FXYP proteins: new tissue- and isoform-specific regulators of Na,K-ATPase. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 986: 388-394
- 22 Haas M, Askari A, Xie Z. Involvement of Src and epidermal growth factor receptor in the signal-transducing function of Na^+/K^+ -ATPase. *J Biol Chem* 2000; 275: 27832-27837
- 23 Haas M, Wang H, Tian J, Xie Z. Src-mediated inter-receptor cross-talk between the Na^+/K^+ -ATPase and the epidermal growth factor receptor relays the signal from ouabain to mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* 2002; 277: 18694-18702
- 24 Kometiani P, Li J, Gnudi L, Kahn BB, Askari A, Xie Z. Multiple signal transduction pathways link Na^+/K^+ -ATPase to growth-related genes in cardiac myocytes. The roles of Ras and mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* 1998; 273: 15249-15256
- 25 Mohammadi K, Kometiani P, Xie Z, Askari A. Role of protein kinase C in the signal pathways that link Na^+/K^+ -ATPase to ERK1/2. *J Biol Chem* 2001; 276: 42050-42056
- 26 Javle MM, Yu J, Khoury T, Chadha KS, Iyer RV, Foster J, Kuvshinov BW, Gibbs JF, Geradts J, Black JD, Brattain MG. Akt expression may predict favorable prognosis in cholangiocarcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21: 1744-1751
- 27 Yoon JH, Gwak GY, Lee HS, Bronk SF, Werneburg NW, Gores GJ. Enhanced epidermal growth factor receptor activation in human cholangiocarcinoma cells. *J Hepatol* 2004; 41: 808-814
- 28 Tsubouchi H. Sustained activation of epidermal growth factor receptor in cholangiocarcinoma: a

- potent therapeutic target? *J Hepatol* 2004; 41: 859-861
- 29 庄大勇, 梁平, 范西红, 陈海. 肝内胆管癌形成过程中表皮生长因子及其受体与转化生长因子- α 的表达意义. *中华肝脏病杂志* 2004; 12: 55-56
- 30 赵海鹰, 戴显伟, 李冠群, 王宝胜, 王惠忠, 姜卫国. 胆管癌表皮生长因子受体、增殖细胞核抗原的表达. *中华实验外科杂志* 1997; 14: 71-72
- 31 顾广玉, 朱明华, 王文亮, 詹镭洲. 表皮生长因子受体在肝细胞癌及胆管细胞癌中的表达. *临床与实验病理学杂志* 1999; 15: 385-386

电编 张敏 编辑 王晓瑜

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

2005 年内科学类期刊总被引频次和影响因子排序表¹

代码	期刊名称	总被引频次	学科内排名	影响因子	学科内排名
G275	WORLD JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY	2665	1	1.062	5
G803	肝脏	369	17	0.428	15
G257	临床内科杂志	383	16	0.289	22
G855	临床消化病杂志	173	24	0.163	28
G261	临床心血管病杂志	589	13	0.289	22
G293	临床血液学杂志	256	22	0.340	19
G662	内科急危重症杂志	134	27	0.172	27
G190	世界华人消化杂志	2079	4	0.485	14
G800	胃肠病学	271	20	0.324	20
G326	胃肠病学和肝病学杂志	292	19	0.282	24
G083	心肺血管病学杂志	154	25	0.192	26
G419	血管病学进展	297	18	0.238	25
G260	心脏杂志	394	15	0.355	17
G610	胰腺病学	137	26	0.589	11
G234	中国动脉硬化杂志	670	12	0.662	10
G267	中国实用内科杂志	1167	8	0.312	21
G444	中国体外循环杂志	68	28	0.354	18
G203	中国心脏起搏与心电生理杂志	415	14	0.563	12
G633	中国血液净化	229	23	0.391	16
G231	中华肝脏病杂志	2014	5	1.573	1
G155	中华内分泌代谢杂志	1249	7	0.981	6
G156	中华内科杂志	2409	3	0.903	7
G161	中华肝脏病学杂志	1003	9	1.077	4
G211	中华糖尿病学杂志	859	11	1.209	3
G285	中华消化内镜杂志	934	10	0.782	9
G168	中华消化杂志	1645	6	0.798	8
G892	中华心律失常学杂志	269	21	0.514	13
G170	中华心血管病学杂志	2622	2	1.272	2
	平均值	849		0.593	

¹中国科技期刊引证报告/潘云涛, 马峥著. 北京: 科学技术文献出版社, 2006. 10

消痰散结方对裸鼠人胃癌血管生成的影响

郑国静, 于有德, 石 健

■背景资料

血管生成是目前肿瘤研究中的热点问题, 抑制肿瘤的血管生成从理论上可以抑制肿瘤的生长及转移, 但其确切机制及作用通路尚不明确。就目前的研究来看, 其是多途径、多靶点共同作用的结果。消痰散结方是魏品康教授的经验方, 前期的实验研究主要是从影响相关基因的表达探讨其抑制胃癌血管生成的机制。

郑国静, 石健, 临淄区人民医院肿瘤科 山东省淄博市 255400
于有德, 临淄区人民医院胸外科 山东省淄博市 255400
郑国静, 2005年第二军医大学临床医学博士, 主要从事中西医结合防治消化道肿瘤的基础与临床研究。

通讯作者: 郑国静, 255400, 山东省淄博市临淄区桓公路139号, 临淄区人民医院肿瘤科. zhengguojinglinzi@yahoo.com.cn
电话: 0533-7162026 传真: 0533-7180469

收稿日期: 2006-12-10 接受日期: 2006-12-27

Effect of Xiaotan Sanjie recipe on the angiogenesis of nude mice with human gastric carcinoma

Guo-Jing Zheng, You-De Yu, Jian Shi

Guo-Jing Zheng, Jian Shi, Department of Oncology, People's Hospital of Linzi District, Zibo 255400, Shandong Province, China

You-De Yu, Department of Thoracic Surgery, People's Hospital of Linzi District, Zibo 255400, Shandong Province, China

Correspondence to: Guo-Jing Zheng, Department of Oncology, People's Hospital of Linzi District, 139 Huangong Road, Linzi District, Zibo 255400, Shandong Province, China. zhengguojinglinzi@yahoo.com.cn

Received: 2006-12-10 Accepted: 2006-12-27

Abstract

AIM: To investigate the effect of Xiaotan Sanjie recipe (XSR) on the angiogenesis of nude mice with human gastric carcinoma.

METHODS: The model of nude mice with human gastric carcinoma was made, and then all the mice were randomly divided into group A, B and C, treated with normal saline, XSR (0.2 mL once a day, ig) and XSR (0.2 mL once a day, ig) plus 5-fluorouracil (0.2 mL, once a week), respectively, for 6 weeks. The experiment was terminated in the 11th week. All the mice were detected by the color Doppler, and the images were three-dimensionally rebuilt by TOMTEC imaging system to evaluate the vascularity volume index (VI). All the mice were sacrificed and the tumor tissues were collected for the observation of CD34 using Envision immunohistochemical staining. Finally, the microvessel density

(MVD) was calculated.

RESULTS: In comparison with that in group A (2.14 ± 0.43 g), the tumor weight in group B (1.12 ± 0.38 g) and C (0.77 ± 0.26 g) was significantly lighter (both $P < 0.05$). Meanwhile, the tumor weight was also markedly different between group B and C ($P < 0.05$). The blood flow was obviously decreased in group B and C as compared with that in group A. In comparison with those in group A, the values of VI and MVD in group B and C were significantly decreased (VI: $18.87\% \pm 3.74\%$, $14.97\% \pm 3.61\%$ vs $31.00\% \pm 4.06\%$, $P < 0.05$; MVD: 27.3 ± 8.8 , 25.8 ± 8.6 vs 49.3 ± 15.3 , $P < 0.05$).

CONCLUSION: XSR can significantly suppress the angiogenesis of nude mice with human gastric carcinoma.

Key Words: Xiaotan Sanjie recipe; Gastric carcinoma; Angiogenesis; Microvessel density; Vascularity volume index; Three-dimensional ultrasound

Zheng GJ, Yu YD, Shi J. Effect of Xiaotan Sanjie recipe on the angiogenesis of nude mice with human gastric carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(9):936-940

摘要

目的: 探讨中药消痰散结方对实验性裸鼠人胃癌血管生成的影响。

方法: 建立裸鼠人胃癌原位种植模型, 将动物随机分为空白对照组、中药组和联合组 ($n = 10$), 中药组予消痰散结方0.2 mL灌胃, 联合组同时予5-FU溶液0.2 mL腹腔注射。第11周结束实验, 动物行超声探查, 利用TOMTEC imaging system对超声图像进行三维重建, 计算肿瘤组织的三维超声血管容积指数(VI), 处死动物, 取瘤组织, Envision法免疫组化染色CD34, 计数微血管密度(MVD)。

结果: 与空白对照组(2.14 ± 0.43 g)相比, 中药组(1.12 ± 0.38 g, $P < 0.05$)和联合组(0.77 ± 0.26 g), 瘤质量明显减低($P < 0.05$); 联合组比

中药组瘤质量明显减低($P<0.05$). 中药组和联合组的血流较空白对照组明显减少. 中药组和联合组VI和MVD与空白对照组相比, 明显减低(VI: $18.87\%\pm 3.74\%$, $14.97\%\pm 3.61\%$ vs $31.00\%\pm 4.06\%$, $P<0.05$; MVD: 27.3 ± 8.8 , 25.8 ± 8.6 vs 49.3 ± 15.3 , $P<0.05$).

结论: 消痰散结方可以明显抑制裸鼠人胃癌原位种植瘤的血管生成.

关键词: 消痰散结方; 胃癌; 血管生成; 微血管密度; 血管容积指数; 三维超声

郑国静, 于有德, 石健. 消痰散结方对裸鼠人胃癌血管生成的影响. 世界华人消化杂志 2007;15(9):936-940
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/936.asp>

0 引言

消痰散结方主要由生南星、生半夏等组成, 是魏品康教授治疗胃癌的经验方, 在临床应用中取得了满意的效果, 对104例中晚期胃癌患者进行的临床疗效观察表明, 消痰散结方能明显提高患者生存质量, 延长生存期^[1]. 前期关于消痰散结方抗胃癌的实验研究表明, 消痰散结方可以通过多途径、多靶点抗肿瘤^[2-15], 其中可以通过下调VEGF的表达而明显抑制鸡胚绒毛尿囊膜血管生成模型的血管生成^[12,14], 本研究旨在通过对肿瘤血管生成定量指标的研究, 进一步探讨消痰散结方抑制动物实验性胃癌血管生成的作用.

1 材料和方法

1.1 材料 BALB/c nu/nu裸鼠, 购于中科院上海斯莱克实验动物有限责任公司, 30只, ♂, 6周龄, 体质量18-20 g, SPF级条件下饲养于上海第二医科大学实验动物科学部. 消痰散结方主要由生南星、生半夏等中药组成, 所用药材均购自上海雷允上药业有限公司, 产地明确, 经第二军医大学药学院生药教研室鉴定. 药物采用传统煎煮方法, 水浴浓缩至生药含量为1 kg/L, 分装备用, 4℃冰箱保存. 海普牌生理盐水注射液, 上海旭东海普药业有限公司产品; 海普牌5-FU注射液, 25 g/L, 上海旭东海普药业有限公司产品, 生理盐水稀释至6 g/L; 中西牌氯胺酮注射液, 50 g/L, 上海化学试剂公司产品; 田霞牌OB生物胶, 广州白云医用胶公司产品; 兔抗人CD₃₄一抗, 美国Neomarkers公司产品, 稀释度为1:50; 即用型Envision试剂, 丹麦Dako生物制品有限公司产

品; 100 g/L多聚赖氨酸, Sigma生物制品有限公司产品; HDI-5000型彩色多普勒, 德国SIMENS公司产品; TOMTEC imaging systems, 德国汤姆麦克公司产品.

1.2 方法 选取传代后14 d的荷瘤鼠备用, 常规消毒, 从右腋部皮下完整剥取瘤块, 剔除纤维包膜, 切开, 选取生长良好、呈乳白色、鱼肉状的瘤组织, 剪成约1 mm×1 mm×1 mm小块, 浸泡于生理盐水中备用. 荷瘤鼠所用细胞株为SGC-7901, 瘤源为第6代. 造模方法参考文献^[16]并有所改进: 所有实验动物术前禁食不禁水6 h, 氯胺酮75 mg/kg腹腔麻醉满意后, 常规手术皮肤消毒, 选择左侧正中旁切口进腹, 暴露胃壁, 在胃小弯近胃窦处选择黏膜表面血管丰富的地方用医用缝合针划破胃壁肌浆层, 在破损处放一瘤块, 在瘤块表面滴一滴OB生物胶, 使其覆盖瘤组织表面, 约5 s凝固后将胃壁回纳入腹腔, 3/0丝线关腹. 以上操作均在超净台内进行, 严格遵循无菌操作. 所有动物无麻醉意外, SPF级条件下饲养, 禁食不禁水6 h后正常饲养.

造模后第2周, 采用完全随机设计法, 利用随机数字表将动物随机分为空白对照组、中药组和联合组, 每组10只动物, 空白对照组给予生理盐水0.2 mL灌胃, 每日1次; 中药组给予消痰散结方0.2 mL灌胃, 每日1次; 联合组给予消痰散结方0.2 mL灌胃, 每日1次, 同时给予5-FU溶液0.2 mL腹腔注射(60 mg/kg), 每周1次. 给药时间为6 wk, 第8周停止给药, SPF条件下正常饲养, 每周定期观察各组动物一般情况及成瘤情况, 至第11周结束实验. 活体动物行超声探查, HDI-5000彩色多普勒, 线阵式超宽频探头, 频率为5-12 MHz, 彩色增益为81%, 探测深度为2 cm. 运用TOMTEC imaging systems对影像进行三维重建, 计算肿瘤三维超声血管容积指数(VI), 脱颈椎处死动物, 取瘤, 称取瘤重, 计算抑瘤率, Envision法染色CD₃₄, 计数微血管密度(MVD).

统计学处理 结果以均数±标准差(mean±SD)的形式表达, 多样本均数的两两比较采用 q 检验, SPSS10.0统计软件进行处理.

2 结果

造模后第7周, 空白对照组部分裸鼠可在胃部触及较硬肿块, 后肿块明显增大, 第9周, 其余各组也出现相同情况, 中药组及联合组动物一般情况明显好于空白对照组. 处死动物打开腹腔可以看到, 原位种植瘤呈实质性, 突向腹腔生长,

■相关报道

自1970年代Folkman教授提出“血管生成”的概念以来, 这一理论得到了相关实验的证实, 为抗肿瘤治疗提供了新的思路与方法.

■创新盘点

作者运用超声探测血流,可以很直观的观察血流的变化的,同时运用相关软件的计算功能,使直观的结果具体化、客观化。

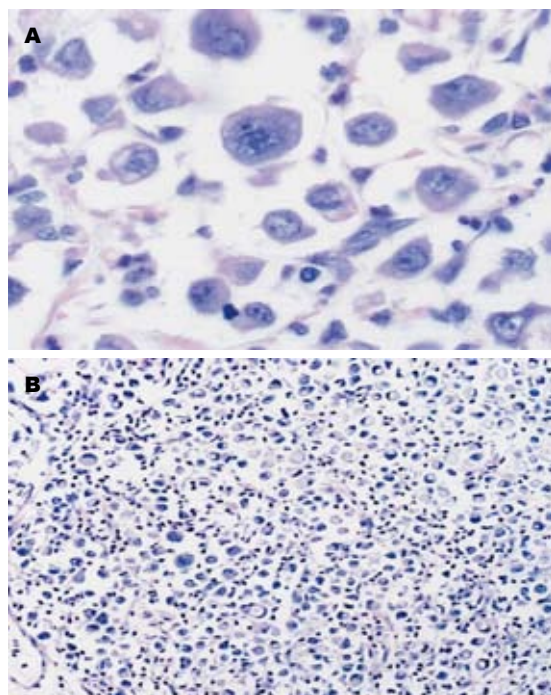


图1 原位瘤体组织学特点. A: $\times 400$; B: $\times 200$.

乳白色,有包膜,有分叶,呈菜花样,胃被包绕在瘤块中,瘤块与周围脏器,如肝脏、肠、肺脏、肾脏等有不同程度的黏连.部分肿瘤切开后,中间可见有灰白色液化、坏死的组织.原位瘤体组织切片HE染色证实为低分化腺癌,细胞为圆形、椭圆形,胞质丰富,核大畸形,核仁深染,核分裂相多见,癌细胞排列成索状、巢状,细胞间有结缔组织(图1).

2.1 抑瘤率的比较 抑瘤率 = (空白对照组瘤重-治疗组瘤重)/空白对照组瘤重 $\times 100\%$ (表1).中药组和联合组瘤重与空白对照组相比,明显减小,差异有统计学意义(q 分别为4.62和6.38, $P < 0.05$),联合组瘤重与中药组相比,明显减小,差异有统计学意义($q = 3.77$, $P < 0.05$).

2.2 血流情况的比较 多于瘤内或瘤内、瘤周同时探及混合性血流,走行不规则,形成如折转血流、分叉血流、网状血流等,而且随着肿瘤体积增大,血供增多,肿瘤周边血流量较中心丰富,血流速度也较快,中药组和联合组的血流较空白对照组明显减少(图2).

2.3 肿瘤VI的比较 通过手动描记肿瘤的边界,软件自动计算出肿瘤的容积、肿瘤内彩色血管的容积及肿瘤内血管容积指数VI, $VI(\%) = \text{肿瘤内彩色血管的容积}/\text{肿瘤的容积} \times 100\%$.中药组和联合组VI与空白对照组VI相比均明显减少,差

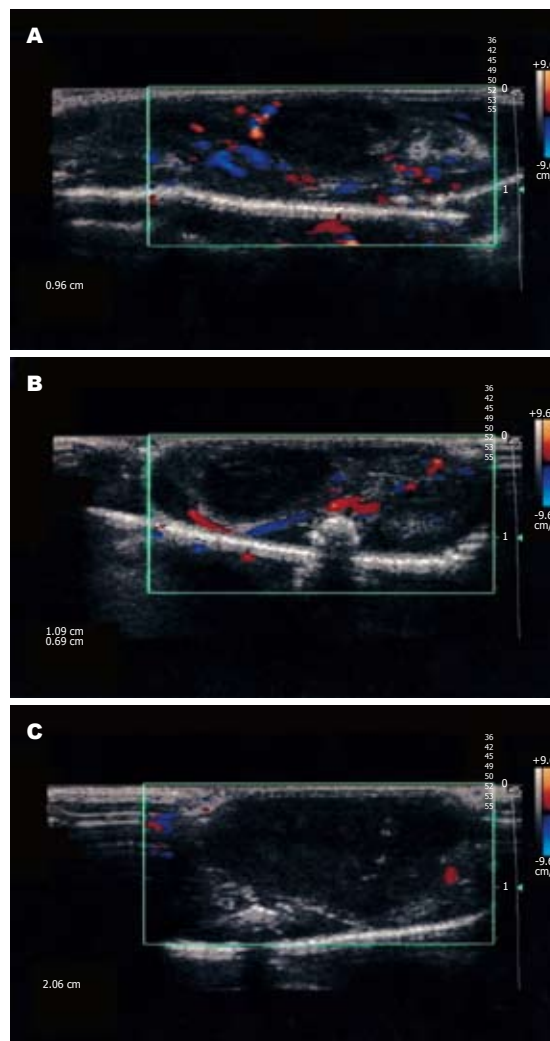


图2 超声探查各组血流情况的比较. A: 空白对照组; B: 中药组; C: 联合组.

异有统计学意义(q 分别为4.47和7.63, $P < 0.05$);联合组VI和中药组VI相比无明显减少,差异无统计学意义($q = 2.78$, $P > 0.05$)(表1).

2.4 MVD的比较 CD_{34} 染色肿瘤微血管内皮细胞,内皮细胞呈黄染(图3),采用Weidner方法^[17]计数微血管密度.中药组和联合组MVD与空白对照组MVD相比明显降低,差异有统计学意义(q 分别为5.94和6.51, $P < 0.05$);联合组MVD和中药组MVD相比无明显降低,差异无统计学意义($q = 1.97$, $P > 0.05$)(表1).

3 讨论

1970年代初, Folkman^[18]提出了“肿瘤生长依赖血管性”的假说.肿瘤发生时,首先要经历一个无血管生长期,其后进入能使肿瘤生长的血管期^[19],肿瘤的生长与转移有赖于肿瘤的血管生成^[20-28].许多实验证实了肿瘤的生长依赖于血管

■应用要点

本文主要是研究中药的作用机制, 综合前期的研究结果, 表明中药是多靶点、多途径发挥作用, 同时为消痰散结方进一步的开发提供实验基础。

表 1 各组瘤重、抑瘤率、Vl和肿瘤MVD的比较(n = 10)

分组	瘤重(g)	抑瘤率(%)	Vl(%)	MVD/(mm ²)
空白对照组	2.14 ± 0.43	0	31.00 ± 4.06	49.3 ± 15.3
中药组	1.12 ± 0.38 ^a	47.66	18.87 ± 3.74 ^a	27.3 ± 8.8 ^a
联合组	0.77 ± 0.26 ^{ab}	64.02	14.97 ± 3.61 ^a	25.8 ± 8.6 ^a

^aP<0.05 vs 对照组; ^bP<0.05 vs 中药组。

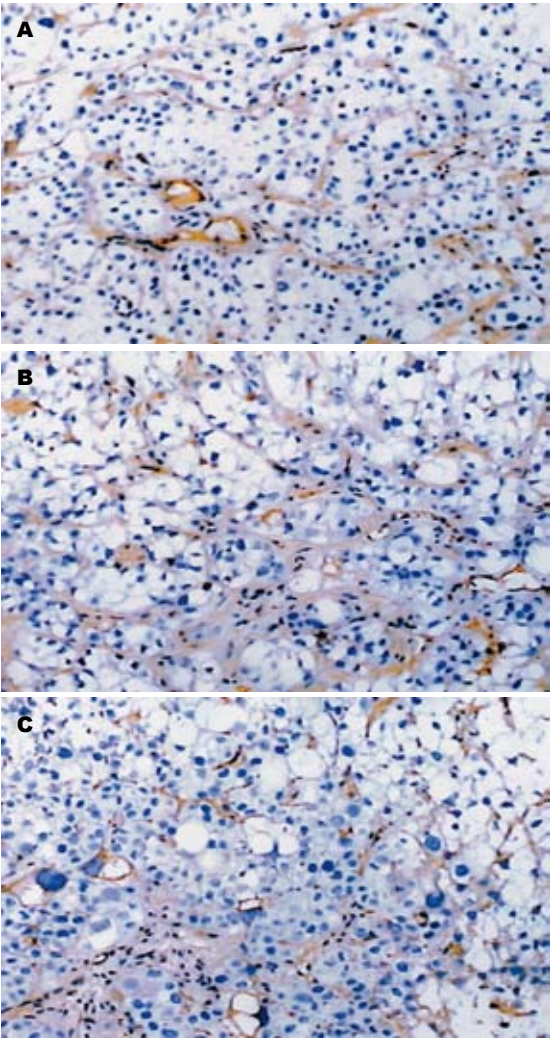


图 3 肿瘤微血管内皮细胞CD₃₄染色(×200). A: 空白对照组; B: 中药组; C: 联合组。

生成^[29-30]: 在鸡胚绒毛尿囊膜(CAM)上生长的肿瘤, 体积大于1 mm³后, 如果3 d内无血管长入, 肿瘤将发生坏死和自溶, 如有血管长入, 肿瘤体积快速生长; 裸鼠皮下移植瘤在无血管期呈线性生长, 而血管长入后呈指数生长; 血管抑制剂对体外生长的肿瘤(无血管供应)无抑制作用, 而对体内生长的肿瘤有抑制作用, 说明抑制血管生成能抑制肿瘤生长。

在本实验中, 运用体视学的方法, 采用超声手段, 对肿瘤血管及血流情况进行彩色多普勒探测, 结果显示, 肿瘤的血流多位于肿瘤周边或肿瘤内部、周边同时出现混合性血流, 血管走行不规则、粗细不均、紊乱, 形成如折转血流、分叉血流、网状血流等, 肿瘤周边血流量较中心丰富, 血流速度也较快, 进一步对肿瘤组织三维重建显示血管树的结果表明, 肿瘤周边血管结构较内部明显丰富, 以小的毛细血管为

主, 走行蜿蜒, 在较粗大迂曲的血管间形成交通支, 构成网状, 形成密布的毛细血管网, 而且随着肿瘤体积增大, 内部血管结构减少, 这与肿瘤以微循环改变为特征的病理表现相符。肿瘤周边血流量较中心丰富, 其机制可能为肿瘤外缘由于靠近正常组织延伸出的毛细血管, 肿瘤细胞尚可被氧合, 而肿瘤组织的毛细血管, 由于存在血管功能不全, 同时还由于肿瘤细胞的增殖, 使肿瘤血管周围压力增高, 压迫肿瘤血管, 出现血流减少甚至中断。本实验的结果表明, 消痰散结方可以明显减少肿瘤组织的血供, 这可能是中药组和联合组的肿瘤较空白对照组明显减小的机制之一。

研究表明, MVD可作为衡量肿瘤血管生成的金标准之一^[31], 在MVD技术标准方面, 目前多数学者采用Weidner的技术^[17], 然而测定的关键在于抗体的选择。针对MVD检测的抗体, 现应用较广泛的有FVIII-RA, CD₃₄, CD₃₁等, Martin *et al*^[32]应用上述3种mAb分别标记浸润性乳腺癌组织血管内皮细胞, 进行MVD的检测, 认为CD₃₄抗体在微血管中表达最强, 为最敏感的内皮细胞标记物, 并且CD₃₄标记的MVD对预后的价值也最大。

本实验采用CD₃₄对肿瘤新生血管进行染色, 光镜下可以观察到, 染色部位在血管内皮细胞和小血管壁, 显示在肿瘤细胞间质中清晰可见微血管, 管腔不规则, 管壁不完整, 癌组织内微血管不仅形态异常, 差异显著, 而且密度分布不均, 血管管腔的大小可由裂隙样的细胞簇到能容纳大量血细胞的海绵样结构, 癌组织边缘的微血管多呈簇状和发芽状生长, 部分区域甚至形成血管球样或花蕾状, 血管数量远高于中央区域, 最高微血管染色区域(hotspots)几乎总是在肿瘤与周围组织交界的浸润缘, 这与能量多普勒探查到的肿瘤周边血流量较中心丰富结果一致。癌组织中微血管不仅在数量上有改变, 其

■同行评价

本文研究了消痰散结方对裸鼠人胃癌血管生成的影响,文章设计合理,层次清楚,观点鲜明,结果可靠。

形态结构上也存在明显缺陷,有的新生微血管基底膜不完整,管壁仅为一层有较大裂隙的内皮细胞。本实验的结果表明,消痰散结方可以明显减少肿瘤组织的MVD。

总之,消痰散结方可以通过减少肿瘤组织的血供而抑制肿瘤的生长,其中抑制肿瘤血管生成是其途径之一,这与我们前期的研究结果一致。

致谢: 本课题实验过程中,得到上海长征医院超声诊断科张建全副主任医师和临淄区人民医院病理科全体医师的大力支持,在此表示衷心的感谢。

4 参考文献

- 1 李相勇,魏品康. 金龙蛇口服液治疗晚期胃癌的疗效观察. 湖北中医杂志 2001; 23: 3-4
- 2 郭晓冬,魏品康,许玲. 消痰散结方对裸鼠MKN-45胃癌组织中PCNA表达的影响. 广州中医药大学学报 2000; 17: 152-154
- 3 肖艳,魏品康,许玲,秦志丰. 消痰散结方对裸鼠MKN-45人胃癌组织中MMP₂表达的影响. 成都中医药大学学报 2002; 25: 32-35
- 4 王建平,李毅华,魏品康,许玲. 消痰散结方对MKN-45人胃癌细胞黏附分子CD₄₄V₆表达的影响. 山东中医药大学学报 2002; 26: 69-70
- 5 王建平,魏品康,许玲. 消痰散结方对MKN-45人胃癌细胞ICAM-1表达的影响. 中医药研究 2002; 18: 38-39
- 6 王建平,魏品康,许玲,耿怀成. 消痰散结方对裸鼠MKN-45人胃癌组织中E-Cad表达的影响. 中医研究 2002; 15: 18-20
- 7 李相勇,魏品康,许玲,秦志丰. 消痰散结方对人胃癌细胞周期及CDK4表达影响的实验研究. 广州中医药大学学报 2003; 20: 233-236
- 8 李峻,魏品康,许玲,秦志丰,高勇. 消痰散结方对血管内皮细胞小管形成的影响. 成都中医药大学学报 2003; 26: 25-26
- 9 苏晓妹,魏品康,许玲,陈亚琳. 消痰散结方抑制胃癌生长和转移的实验研究. 成都中医药大学学报 2003; 26: 20-23
- 10 肖艳,魏品康,尤清波,许玲,秦志丰. 消痰散结方对裸鼠MKN-45人胃癌组织中MT₁-MMP表达的影响. 辽宁中医学院学报 2003; 5: 271-272
- 11 陈亚琳,魏品康,许玲,苏晓妹,边莉. 消痰散结方对胃癌组织中P21ras及P185蛋白表达的影响. 山东中医药大学学报 2003; 27: 374-376
- 12 苏晓妹,李峻,许玲,陈亚琳,郑国静. 消痰散结方对鸡胚绒毛尿囊膜血管生成及胃癌组织中VEGF表达的影响. 山东中医药大学学报 2003; 27: 296-297
- 13 许玲,魏品康,陈亚琳,苏晓妹,秦志丰,施俊,李峻,何金. 中药消痰散结方抑制裸鼠原位移植人胃癌SGC-7901的生长转移. 世界华人消化杂志 2004; 12: 1015-1020
- 14 许玲,苏晓妹,陈亚琳,魏品康. 中药消痰散结方对人胃癌裸鼠原位移植瘤VEGF, KDRmRNA表达的影响. 世界华人消化杂志 2004; 12: 988-990
- 15 肖艳,魏品康,李玉莉,何金,许玲,秦志丰. 消痰散结方对胃癌基质金属蛋白酶及其抑制剂表达的影响. 湖

北中医杂志 2005; 27: 8-10

- 16 许玲,陈亚琳,苏小妹,魏品康. 裸鼠人胃癌SGC-7901原位移植模型的构建及其生物学特性. 肿瘤防治杂志 2003; 10: 476-478
- 17 Weidner N, Folkman J, Pozza F, Bevilacqua P, Allred EN, Moore DH, Meli S, Gasparini G. Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1992; 84: 1875-1887
- 18 Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971; 285: 1182-1186
- 19 Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1995; 1: 27-31
- 20 Compagni A, Christofori G. Recent advances in research on multistage tumorigenesis. *Br J Cancer* 2000; 83: 1-5
- 21 Detmar M. Tumor angiogenesis. *J Investig Dermatol Symp Proc* 2000; 5: 20-23
- 22 Maehara Y, Kabashima A, Koga T, Tokunaga E, Takeuchi H, Kakeji Y, Sugimachi K. Vascular invasion and potential for tumor angiogenesis and metastasis in gastric carcinoma. *Surgery* 2000; 128: 408-416
- 23 Sabo E, Boltenko A, Sova Y, Stein A, Kleinhaus S, Resnick MB. Microscopic analysis and significance of vascular architectural complexity in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 533-537
- 24 Zhao HC, Qin R, Chen XX, Sheng X, Wu JF, Wang DB, Chen GH. Microvessel density is a prognostic marker of human gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 7598-7603
- 25 Lazar D, Raica M, Sporea I, Taban S, Goldis A, Cornianu M. Tumor angiogenesis in gastric cancer. *Rom J Morphol Embryol* 2006; 47: 5-13
- 26 Jiang XT, Tao HQ, Zou SC. Effect of angiogenesis inhibitor SU6668 on the growth and metastasis of gastric cancer in SCID mice. *Zhonghua Wei Chang Wai Ke Za Zhi* 2006; 9: 335-337
- 27 Han HS, Hwang TS. Angiogenesis in gastric cancer: importance of the thymidine phosphorylase expression of cancer cells as an angiogenic factor. *Oncol Rep* 2007; 17: 61-65
- 28 Song ZJ, Gong P, Wu YE. Relationship between the expression of iNOS, VEGF, tumor angiogenesis and gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 591-595
- 29 Carron CP, Meyer DM, Pegg JA, Engleman VW, Nickols MA, Settle SL, Westlin WF, Ruminiski PG, Nickols GA. A peptidomimetic antagonist of the integrin alpha(v)beta3 inhibits Leydig cell tumor growth and the development of hypercalcemia of malignancy. *Cancer Res* 1998; 58: 1930-1935
- 30 Thaloor D, Singh AK, Sidhu GS, Prasad PV, Kleinman HK, Maheshwari RK. Inhibition of angiogenic differentiation of human umbilical vein endothelial cells by curcumin. *Cell Growth Differ* 1998; 9: 305-312
- 31 Acenero MJ, Gonzalez JF, Gallego MG, Ballesteros PA. Vascular enumeration as a significant prognosticator for invasive breast carcinoma. *J Clin Oncol* 1998; 16: 1684-1688
- 32 Martin L, Green B, Renshaw C, Lowe D, Rudland P, Leinster SJ, Winstanley J. Examining the technique of angiogenesis assessment in invasive breast cancer. *Br J Cancer* 1997; 76: 1046-1054

电编 李琪 编辑 张焕兰

过氧化物酶体增殖剂激活受体- γ 在白藜芦醇抑制胃癌 SGC-7901细胞增殖中的作用

胡光胜, 曹文涛, 廖爱军, 曾斌, 廖丹, 石巍

胡光胜, 曹文涛, 廖爱军, 曾斌, 廖丹, 石巍, 南华大学第一附属医院消化内科 湖南省衡阳市 421001
通讯作者: 胡光胜, 421001, 湖南省衡阳市, 南华大学第一附属医院消化内科. hugs7321@163.com
电话: 0734-8279064
收稿日期: 2006-09-08 接受日期: 2006-12-01

Role of peroxisome proliferator-activated receptor- γ in resveratrol-induced proliferation inhibition of gastric cancer cell line SGC-7901

Guang-Sheng Hu, Wen-Tao Cao, Ai-Jun Liao, Bin Zeng, Dan Liao, Wei Shi

Guang-Sheng Hu, Wen-Tao Cao, Ai-Jun Liao, Bin Zeng, Dan Liao, Wei Shi, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanhua University, Hengyang 421001, Hunan Province, China

Correspondence to: Guang-Sheng Hu, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanhua University, Hengyang 421001, Hunan Province, China. hugs7321@163.com

Received: 2006-09-08 Accepted: 2006-12-01

Abstract

AIM: To investigate the role of peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR- γ) in the inhibitory effects of resveratrol (Res) on gastric cancer cell SGC-7901 proliferation *in vitro*.

METHODS: After human gastric cancer cell SGC-7901 was cultured *in vitro*, MTT assay was used to detect the inhibitory effect of Res and GW9662 (specific blocker of PPAR- γ) on cell proliferation. Flow cytometry was used to detect cell cycle, and PPAR- γ , Cyclin D1 mRNA was measured quantitatively by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The expression of PPAR- γ protein was measured quantitatively by Western blot, and the expression of Cyclin D1 protein in gastric cancer cells was detected by immunohistochemistry.

RESULTS: Res inhibited the proliferation of

SGC-7901 cells in a dose- and time-dependent manner ($P < 0.05$), and flow cytometry analysis revealed that the cell cycle was blocked at G1-phase. RT-PCR and Western blot showed that both PPAR- γ mRNA and protein were expressed in SGC-7901 cells, and Res enhanced PPAR- γ mRNA expression. After SGC-7901 cells were treated by Res with the concentration of 25, 50, 75 and 100 $\mu\text{mol/L}$, the relative percentages of PPAR- γ mRNA expression were 122.2%, 195.1%, 232.9% and 277.1% of those in the controls ($P < 0.05$), but the expression of PPAR- γ protein didn't changed. The high levels of Cyclin D1 mRNA and protein expression were detected in SGC-7901 cells, while Res significantly decreased the expression of Cyclin D1. After SGC-7901 cells were treated by Res with the concentration of 25, 50, 75 and 100 $\mu\text{mol/L}$, the inhibitory rates of Cyclin D1 mRNA were 11.3%, 24.3%, 35.4% and 59.5%, respectively, while GW9662 markedly decreased the above effects of Res.

CONCLUSION: Res can significantly inhibit Cyclin D1 expression partly by activating PPAR- γ in gastric cancer cells SGC-7901, which results in the blockage of cell cycle at G1 phase and inhibition of cell proliferation.

Key Words: Peroxisome proliferator-activated receptor- γ ; Cyclin D1; Resveratrol; Gastric cancer cell line

Hu GS, Cao WT, Liao AJ, Zeng B, Liao D, Shi W. Role of peroxisome proliferator-activated receptor- γ in resveratrol-induced proliferation inhibition of gastric cancer cell line SGC-7901. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(9):941-946

摘要

目的: 探讨过氧化物酶体增殖剂激活受体- γ (PPAR- γ) 在白藜芦醇(Res)抑制人胃癌细胞 SGC-7901增殖中的作用。

方法: 体外常规培养人胃癌细胞SGC-7901, MTT法检测Res和GW9662(PPAR- γ 特异阻断

■背景资料

白藜芦醇抗肿瘤作用机制研究热点主要集中在其可能经过诱导肿瘤细胞凋亡, 干预细胞周期, 抑制增殖; 抗氧化、抗自由基及抗突变; 干扰信号传导通路; 抑制与肿瘤发生有关的酶等途径相关。近年来研究表明PPAR- γ 以失活状态在多种肿瘤中高表达, 同时大量文献证实PPAR- γ 配体可以通过激活PPAR- γ 而发挥潜在的抗肿瘤作用, 对白藜芦醇抗肿瘤是否与PPAR- γ 相关进行初步的研究, 有望为白藜芦醇的临床应用提供新的理论依据。

■相关报道

近来,大量研究发现白藜芦醇在非肿瘤细胞中能够激活核转录因子PPAR- γ ,这些都表明白藜芦醇是PPAR- γ 的天然配体激活剂。Sato *et al*研究发现在高、中、低分化的人类胃癌细胞株中PPAR- γ 均呈高表达,PPAR- γ 激动剂对胃癌细胞的增殖呈剂量依赖性抑制效应。

剂)对SGC-7901细胞的增殖抑制作用,流式细胞仪测定对细胞周期的影响,RT-PCR方法检测PPAR- γ , Cyclin D1的mRNA表达,Western blot检测PPAR- γ 蛋白的表达,免疫细胞化学检测Cyclin D1蛋白表达的改变。

结果: Res以时间、浓度依赖性方式抑制胃癌细胞SGC-7901的增殖($P < 0.05$),使细胞周期停留在G1期;胃癌细胞SGC-7901存在PPAR- γ mRNA和蛋白的表达, Res呈浓度依赖性的激活PPAR- γ mRNA的转录。25, 50, 75, 100 $\mu\text{mol/L}$ Res作用于胃癌细胞后,细胞中PPAR- γ mRNA相对表达分别是空白对照组的122.2%, 195.1%, 232.9%和277.1%($P < 0.05$),而PPAR- γ 蛋白的表达几乎没有变化;胃癌SGC-7901细胞高水平表达Cyclin D1, Res显著的抑制Cyclin D1的表达。经25, 50, 75, 100 $\mu\text{mol/L}$ Res处理后, Cyclin D1 mRNA抑制率分别为11.3%, 24.3%, 35.4%, 59.5%,而GW9662能够明显降低Res的上述作用。

结论: Res在胃癌SGC-7901细胞中部分的通过激活PPAR- γ 从而抑制Cyclin D1的表达,使癌细胞停留在G1期,抑制细胞的增殖。

关键词: 过氧化物酶体增殖剂激活受体- γ ; 细胞周期素D1; 白藜芦醇; 胃肿瘤

胡光胜, 曹文涛, 廖爱军, 曾斌, 廖丹, 石巍. 过氧化物酶体增殖剂激活受体- γ 在白藜芦醇抑制胃癌SGC-7901细胞增殖中的作用. 世界华人消化杂志 2007;15(9):941-946

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/941.asp>

0 引言

白藜芦醇(resveratrol, Res)是广泛地存在于葡萄、花生和多种药用植物中的一种多酚类化合物,目前至少已经在21个科、31个属的72种植物中发现了Res。早期的研究发现, Res具有保护心血管、调节血脂、抗病原微生物、护肝等多种生物学作用。自从Jang *et al*^[1]于1997年系统地报道了Res的抗肿瘤作用后,迄今发现他能抑制多种癌细胞的生长,包括胃癌、肠癌、乳腺癌、白血病等,但其作用机制仍未明确^[2]。本实验以胃癌SGC-7901细胞为靶细胞,研究Res影响肿瘤细胞增殖的机制。

1 材料和方法

1.1 材料 Res购自Sigma公司,用DMSO配成10 mmol/L -20℃贮存备用。甲氮甲唑蓝(MTT)、GW9662(PPAR- γ 特异阻断剂)为Sigma

产品, RPMI1640培养基, 美国Gibco公司产品, 新生牛血清为杭州四季青公司产品。RNA提取试剂盒、MMLV逆转录试剂盒、PCR试剂盒均购自上海生工生物公司。山羊抗人actin多克隆抗体、山羊抗人过氧化物酶体增长因子活化受体 γ (peroxisome proliferators-activated receptor- γ , PPAR- γ)多克隆抗体及ECL显影剂(美国Santa Cruz公司)。Cyclin D1小鼠mAb为博士德公司产品。SP试剂盒及DAB试剂均购自北京中杉试剂有限公司。人胃癌SGC-7901细胞株购自中科院上海细胞所,培养于含100 mL/L新生牛血清的RPMI1640培养液中,加入 1×10^5 U/L青霉素, 100 mg/L链霉素,置于孵箱,在37℃, 50 mL/L CO₂饱和湿度的条件下培养,实验时取对数生长期细胞。

1.2 方法

1.2.1 MTT 检测胃癌细胞的增殖 收集细胞,将细胞重新接种至96孔板中,使其每孔细胞数为 1×10^3 - 1×10^4 个,分别以不同终浓度的GW9662和或Res的RPMI1640培养液100 μL 作用细胞,对照组和调零组加100 μL 完全培养基,每组设6个平行孔,实验时间后,加5 g/L MTT 20 μL /孔(调零组除外),再培养4 h,然后吸去上清液,每孔加入150 μL DMSO溶解样品,用酶联免疫检测仪测定各孔490 nm吸光度值。按公式计算药物对细胞生长抑制率(IR): $\text{IR}(\%) = (1 - \text{试验孔A均值} / \text{对照孔A均值}) \times 100\%$ 。

1.2.2 细胞周期的测定 收集培养48 h后的对照组和实验组的细胞,用体积分数为75%的乙醇固定,经0.5 g/L的RnaseA消化30 min,终浓度65 mg/L的碘化丙啶(propidium iodidu, PI)染色1 h后流式细胞仪(型号为FACS420)测定细胞周期。

1.2.3 半定量RT-PCR检测PPAR- γ , Cyclin D1的mRNA表达 采用RNA提取试剂盒提取总RNA,获得的RNA按MMLV第一链cDNA合成试剂盒说明书合成cDNA。PCR引物用Primer 5.0搜索,由上海生物工程技术有限公司合成。PPAR- γ 的上游引物为: 5'-TGTGAAGCCCATTGAAGACA-3', 下游引物为: 5'-GAGCGGGTGAAGACTCATGT-3', 扩增产物为199 bp, Tm 53℃; Cyclin D1的上游引物为: 5'-GAGGCGGAGGAGAACAACA-3', 下游引物为: 5'-GAAGCGTGTGAGGCGGTAG-3', 扩增产物为189 bp, Tm 59℃。内参GAPDH上游引物为: 5'-GTGGACATCCGCAAA GAC-3', 下游引物为: 5'-TCAACGCAATGTGGG

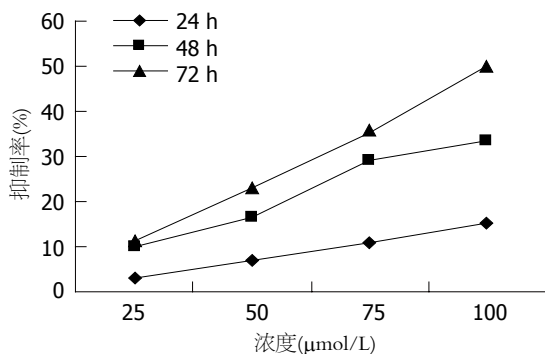


图 1 不同浓度的Res对胃癌细胞增殖的影响。

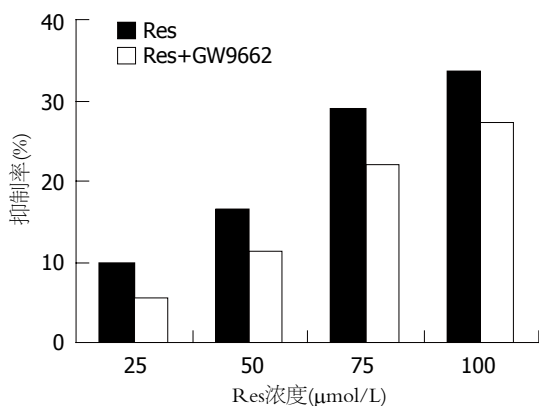


图 2 不同浓度的Res和Res+GW9662作用于胃癌细胞48 h后的抑制作用。

AAAG-3'; 扩增产物为697 bp, T_m 56℃. 扩增产物进行15 g/L琼脂糖凝胶电泳, 采用凝胶成像系统做积分A值测定, 以各组PPAR- γ , Cyclin D1与GAPDH的A值的比值表示相对表达量。

1.2.4 Western blot检测PPAR- γ 蛋白的表达 提取总蛋白并按PIERCE BCA蛋白定量试剂盒说明书操作, 取细胞溶解液蛋白50 μ g在80 g/L的SDS聚丙烯酰胺凝胶上电泳后, 冰上恒压100 V电转1 h, 蛋白转至PVDF膜上, 加入1:200稀释的兔抗鼠PPAR- γ 抗体, 4℃过夜. TBST漂洗后加入1:400生物素化的羊抗兔二抗, 室温下摇床杂交1 h. TBST漂洗后以ECL化学发光底物系统放射自显影. 以相同方法测定内参照 β -actin的表达. PPAR- γ 相对分子质量55 000, β -actin相对分子质量42 000. 通过Bandsan 510软件进行灰度测定, PPAR- γ 的表达水平以PPAR- γ 灰度值与 β -actin灰度值的相对值(相对灰度值)表示。

1.2.5 免疫细胞化学法检测Cyclin D1蛋白表达 将盖玻片分别置于各处理组的细胞培养液中, 待细胞爬片后取出固定, 固定的细胞片按照SP试剂盒说明操作, 胞质及胞核呈棕黄色颗粒者视为免疫阳性细胞。

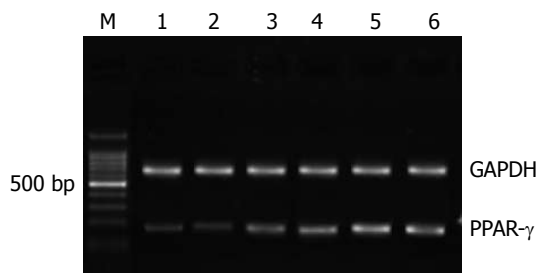
图 3 Res和Res+GW9662对胃癌SGC-7901细胞PPAR- γ mRNA表达的影响. M: 标准参照物; 1: 对照组; 2: 25 μ mol/L Res; 3: 50 μ mol/L Res; 4: 75 μ mol/L Res; 5: 100 μ mol/L Res; 6: 100 μ mol/L Res+10 μ mol/L GW9662.

表 1 Res/Res+GW9662对SGC-7901细胞生长周期的影响(%)

分组	G0/G1	S	G2/M
对照组	40.7	48.7	10.6
50 μ mol/L Res	52.5	36.4	11.1
100 μ mol/L Res	67.4	25.1	7.5
100 μ mol/L Res+ 10 μ mol/L GW9662	63.4	28.1	8.6

统计学处理 计量资料用mean \pm SD表示, 采用SPSS11.0统计分析软件进行分析. $P<0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 Res对胃癌细胞增殖的影响 Res以时间、浓度依赖性方式抑制胃癌SGC-7901细胞的生长, 作用72 h抑制率最高达49.8%, 最低达11.2%(图1); 但在48 h以相同浓度的Res加上GW9662 10 μ mol/L干预胃癌SGC-7901细胞时, 其抑制率比同浓度的Res低($P<0.05$)(图2)。

2.2 流式细胞术检测Res对细胞周期的影响 不同浓度Res抑制胃癌SGC-7901细胞的生长, 使细胞停滞在G1期. 加药48 h结果如表1所示。

2.3 Res对PPAR- γ mRNA表达的影响 Res能明显激活胃癌细胞中PPAR- γ mRNA表达. 经过25, 50, 75, 100 μ mol/L Res作用于胃癌细胞48 h后, 细胞中PPAR- γ mRNA相对表达分别是空白对照组的122.2%, 195.1%, 232.9%和277.1%($P<0.05$), 而GW9662 10 μ mol/L+100 μ mol/L Res处理的胃癌细胞PPAR- γ mRNA相对表达是空白对照组的261.1%, 与同浓度的Res处理组相比($P<0.05$)(图3)。

2.4 Res对PPAR- γ 蛋白表达的影响 经50, 100 μ mol/L Res及GW9662 10 μ mol/L+100

■应用要点

研究白藜芦醇对胃癌细胞增殖的影响, 白藜芦醇对PPAR- γ 基因及对PPAR- γ 下游基因Cyclin D1在防治胃癌中起到的作用, 探讨白藜芦醇抗癌的分子机制, 为流行病学和临床应用白藜芦醇作为肿瘤预防提供理论基础。

■名词解释

1 过氧化物酶体增殖因子活化受体 γ (PPAR- γ): 是一类由配体激活的核转录因子, 为核激素受体超家族中的成员之一。
2 细胞周期素D1(Cyclin D1): 是细胞周期G1期的重要调节因子, Cyclin D1的过表达加速细胞从G1-S期转变过程, 促使肿瘤的形成。

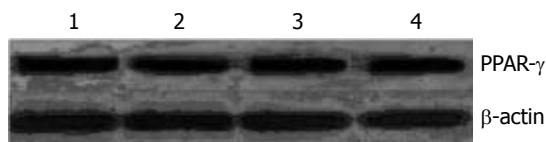


图4 Res和Res+GW9662对胃癌SGC-7901细胞PPAR- γ 蛋白表达的影响。1: 对照组; 2: 50 $\mu\text{mol/L}$ Res; 3: 100 $\mu\text{mol/L}$ Res; 4: 100 $\mu\text{mol/L}$ Res+10 $\mu\text{mol/L}$ GW9662。

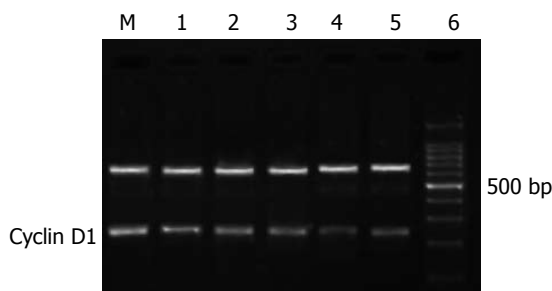


图5 Res和Res+GW9662对胃癌SGC-7901细胞Cyclin D1 mRNA表达的影响。M: 标准参照物; 1: 对照组; 2: 25 $\mu\text{mol/L}$ Res; 3: 50 $\mu\text{mol/L}$ Res; 4: 75 $\mu\text{mol/L}$ Res; 5: 100 $\mu\text{mol/L}$ Res; 6: 100 $\mu\text{mol/L}$ Res+10 $\mu\text{mol/L}$ GW9662。

$\mu\text{mol/L}$ Res处理胃癌细胞后, 其PPAR- γ 蛋白表达的相对灰度值为 (0.39733 ± 0.00603) , (0.39800 ± 0.00265) , (0.39333 ± 0.00603) , 与未加药物处理胃癌细胞的相对灰度值 (0.39067 ± 0.00404) 相比, $P > 0.05$ (图4)。

2.5 Res对Cyclin D1 mRNA表达的影响 未加药物处理的对照组胃癌SGC-7901细胞高水平表达Cyclin D1 mRNA, 经25, 50, 75, 100 $\mu\text{mol/L}$ Res处理48 h后, Cyclin D1 mRNA的电泳条带亮度比对照组的暗($P < 0.05$), 随着浓度的增加, 条带亮度越暗, 其抑制率分别为11.3%, 24.3%, 35.4%, 59.5%; 而同时使用PPAR- γ 抑制剂GW9662和Res处理的胃癌细胞Cyclin D1 mRNA生成的抑制作用明显下降, 其抑制率为40.7%, 与同浓度的Res处理组相比($P < 0.05$)(图5)。

2.6 Res对Cyclin D1蛋白表达的影响 用50, 100 $\mu\text{mol/L}$ Res处理胃癌SGC-7901细胞48 h后, 免疫组化图片结果显示, 空白对照组染色较强, 胞质及胞核可见均匀的棕黄色颗粒; 而处理组细胞Cyclin D1蛋白表达水平与对照组比较明显下降; 加用PPAR- γ 抑制剂GW9662的处理组, Cyclin D1蛋白表达与同浓度的Res处理组相比要多(图6)。

3 讨论

PPAR- γ 是一类由配体激活的核转录因子, 为核

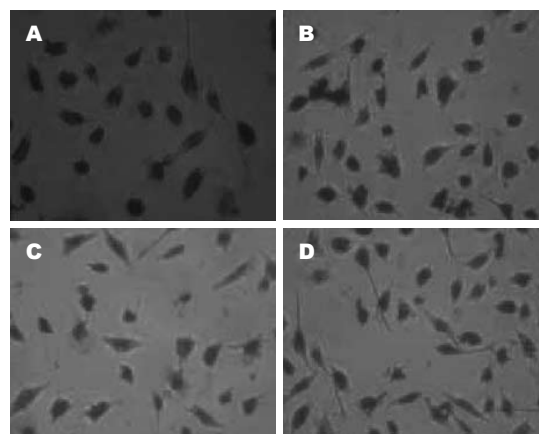


图6 Res和Res+GW9662对胃癌SGC-7901细胞Cyclin D1蛋白表达的影响(SP $\times 400$)。A: 对照组; B: 50 $\mu\text{mol/L}$ Res; C: 100 $\mu\text{mol/L}$ Res; D: 100 $\mu\text{mol/L}$ Res+10 $\mu\text{mol/L}$ GW9662。

激素受体超家族中的成员。PPAR- γ 转录后调控作用依赖于与其配体的结合, 当其被配体激活后, 常与视黄酸X受体(retinoid X receptor, RXR)或糖皮质激素受体结合形成异二聚体后, 再与位于其上游的靶基因的特异性DNA序列过氧化物酶体增殖物反应元件(peroxisome proliferator responsive element, PPRE)结合, 使靶基因活化, 而发挥其转录后调控作用。PPAR- γ 的表达具有组织特异性, 主要在脂肪细胞内表达, 在调节脂肪细胞的分化方面起重要作用。近年来研究表明PPAR- γ 以失活状态在多种肿瘤中高表达, 同时大量文献证实PPAR- γ 配体可以通过激活PPAR- γ 而发挥潜在的抗肿瘤作用^[3-5]。

Res是一种多酚类化合物, 通过抗氧化、抗自由基及抗突变; 干扰信号传导通路; 抑制与肿瘤发生有关的酶等途径对肿瘤的起始、促进、发展三个阶段均有抑制作用^[1-2], 但是其作用机制还不是很清楚。近来, 研究者发现Res能够结合配体激活的转录因子受体PPAR- γ 。Inoue *et al*^[6]通过体内外实验表明了Res在鼠重要皮质区、牛脑微血管内皮细胞、人的脐静脉内皮细胞和牛的动脉内皮细胞中呈剂量依赖性地活化核受体PPAR- γ 。在鼠的脂肪细胞中, Picard *et al*^[7]研究发现Res通过激活过氧化物酶体增殖物激活受体PPAR- γ 诱导甘油三酯的脂解和脂肪酸动员。我国学者葛恒 *et al*^[8]也发现在自身不表达PPAR- γ 蛋白的人类组织细胞淋巴瘤U937细胞中电穿孔共转染PPAR- γ 表达质粒和其报告质粒, 从而构建PPAR- γ 激动剂筛选模型, 同时在U937细胞内单独转染PPAR- γ 报告质粒作为阴性对照, 发现Res能够剂量依赖的激动PPAR- γ 。

最近, Ricketts *et al*^[9]研究发现Res在肾脏内皮细胞株CV-1及大量的血管内皮细胞中剂量依赖性地激活核受体PPAR- γ .在胃癌中, Sato *et al*^[10]研究发现在高、中、低分化的人类胃癌细胞株中PPAR- γ 均呈高表达, PPAR- γ 激动剂对胃癌细胞的增殖呈剂量依赖性抑制效应. 根据以上研究, 我们假设Res可以通过激活PPAR- γ 抑制胃癌细胞的增殖. 研究发现Res以时间、浓度依赖性方式抑制胃癌SGC-7901细胞的生长; 但以相同浓度的Res加上PPAR- γ 特异的抑制剂GW9662干预胃癌SGC-7901细胞时, 其抑制率比同浓度的Res低; 细胞周期分析表明: 用药组细胞G1期增大, S期减小, 而加用PPAR- γ 特异的抑制剂GW9662处理组具有一定的逆转作用, 说明Res部分地通过PPAR- γ 途径抑制胃癌细胞的生长. 为了进一步证明PPAR- γ 在Res抗增殖的作用, 我们用RT-PCR和Western blot检测PPAR- γ mRNA和蛋白的表达变化, 发现Res呈浓度依赖性地激活PPAR- γ mRNA的转录, 特异的PPAR- γ 抑制剂GW9662能够阻止Res对PPAR- γ mRNA的激活; 而加药处理组及对照组PPAR- γ 蛋白的表达几乎没有变化, 有研究表明被JNK和/或ERK磷酸化的PPAR- γ 蛋白无生物活性^[11-12], 而Res可以阻断JNK和/或ERK的信号传导途径^[13], 在本实验中可能是Res使PPAR- γ 蛋白去磷酸化而恢复了PPAR- γ 活性, 从而调节下游基因的转录, 抑制胃癌SGC-7901细胞的生长.

本实验流式细胞术检测发现Res作用于胃癌SGC-7901细胞后G1期比例增加, S期下降, G2期基本上没有什么变化. Cyclin D1是细胞周期G1期的重要调节因子, 越来越多的研究表明, Cyclin D1的过表达加速细胞从G1-S期转变过程, 最终形成肿瘤^[14-15]. 以前的研究证明, Res可以抑制Cyclin D1的表达, 从而阻止肿瘤细胞的增殖, 但是其机制还不清楚^[16]. 本实验研究发现, Cyclin D1在胃癌SGC-7901细胞中高表达, Res以剂量依赖性的方式抑制Cyclin D1的翻译和转录, 而加用PPAR- γ 特异的抑制剂GW9662的处理组其抑制作用减弱, 以上说明, Res部分的通过激活PPAR- γ 抑制Cyclin D1的表达, 从而使胃癌SGC-7901细胞停留在G1期, 抑制其增殖. 也有研究认为Cyclin D1的过度表达竞争性抑制PPAR- γ 功能, 抑制Cyclin D1的过度表达可以恢复PPAR- γ 活性, 其两者存在什么样的关系需要进一步的研究.

总之, Res在胃癌SGC-7901细胞中部分的通

过激活PPAR- γ 抑制Cyclin D1的表达, 使癌细胞停留在G1期, 抑制细胞的增殖. Res是通过何种机制激活PPAR- γ 的表达, 恢复PPAR- γ 的活性, 是否通过激活PPAR- γ 具有广泛的抗癌作用, 还有待于进一步研究.

4 参考文献

- 1 Jang M, Cai L, Udeani GO, Slowing KV, Thomas CF, Beecher CW, Fong HH, Farnsworth NR, Kinghorn AD, Mehta RG, Moon RC, Pezzuto JM. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* 1997; 275: 218-220
- 2 Delmas D, Lancon A, Colin D, Jannin B, Latruffe N. Resveratrol as a chemopreventive agent: a promising molecule for fighting cancer. *Curr Drug Targets* 2006; 7: 423-442
- 3 Ray DM, Bernstein SH, Phipps RP. Human multiple myeloma cells express peroxisome proliferator-activated receptor gamma and undergo apoptosis upon exposure to PPARgamma ligands. *Clin Immunol* 2004; 113: 203-213
- 4 陈白莉, 曾志荣, 胡品津, 唐保东, 何瑶, 陈为. 幽门螺杆菌感染与慢性胃炎胃黏膜组织中COX-2、iNOS表达的相关性研究. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 902-906
- 5 周静平, 邓长生. 罗格列酮对大鼠溃疡性结肠炎肠黏膜NF- κ B, ICAM-1表达的影响. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 104-108
- 6 Inoue H, Jiang XF, Katayama T, Osada S, Umesono K, Namura S. Brain protection by resveratrol and fenofibrate against stroke requires peroxisome proliferator-activated receptor alpha in mice. *Neurosci Lett* 2003; 352: 203-206
- 7 Picard F, Kurtev M, Chung N, Topark-Ngarm A, Senawong T, Machado De Oliveira R, Leid M, McBurney MW, Guarente L. Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR-gamma. *Nature* 2004; 429: 771-776
- 8 葛恒, 张俊峰, 王彬尧, 王长谦. 白藜芦醇对PPAR- γ 激动作用的研究. *中国药学杂志* 2005; 40: 905-908
- 9 Ricketts ML, Moore DD, Banz WJ, Mezei O, Shay NF. Molecular mechanisms of action of the soy isoflavones includes activation of promiscuous nuclear receptors. A review. *J Nutr Biochem* 2005; 16: 321-330
- 10 Sato H, Ishihara S, Kawashima K, Moriyama N, Suetsugu H, Kazumori H, Okuyama T, Rumi MA, Fukuda R, Nagasue N, Kinoshita Y. Expression of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)gamma in gastric cancer and inhibitory effects of PPARgamma agonists. *Br J Cancer* 2000; 83: 1394-1400
- 11 Camp HS, Tafuri SR. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity by mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 1997; 272: 10811-10816
- 12 Camp HS, Tafuri SR, Leff T. c-Jun N-terminal kinase phosphorylates peroxisome proliferator-activated receptor-gamma1 and negatively regulates its transcriptional activity. *Endocrinology* 1999; 140: 392-397
- 13 Kutuk O, Poli G, Basaga H. Resveratrol protects against 4-hydroxynonenal-induced apoptosis by

■同行评价

本文研究了PPAR- γ 在白藜芦醇抑制胃癌SGC-7901细胞增殖的作用, 结果发现白藜芦醇通过激活PPAR- γ 抑制Cyclin D1的表达, 使癌细胞停留在G1期, 抑制细胞的增殖, 对于揭示白藜芦醇的抗癌机制有重要意义. 文章内容丰富, 论述充分且比较全面.

- blocking JNK and c-JUN/AP-1 signaling. *Toxicol Sci* 2006; 90: 120-132
- 14 Kiyokawa H, Kineman RD, Manova-Todorova KO, Soares VC, Hoffman ES, Ono M, Khanam D, Hayday AC, Frohman LA, Koff A. Enhanced growth of mice lacking the cyclin-dependent kinase inhibitor function of p27(Kip1). *Cell* 1996; 85: 721-732
- 15 童锦禄, 冉志华. G1/S检测点调控机制研究进展. 世界华人消化杂志 2005; 13: 2036-2039
- 16 Takada Y, Bhardwaj A, Potdar P, Aggarwal BB. Nonsteroidal anti-inflammatory agents differ in their ability to suppress NF-kappaB activation, inhibition of expression of cyclooxygenase-2 and cyclin D1, and abrogation of tumor cell proliferation. *Oncogene* 2004; 23: 9247-9258

电编 张敏 编辑 张焕兰

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

2007 全国器官移植学术会议征文通知

本刊讯 由中华医学会器官移植学分会主办, 中山大学附属第三医院、中山大学器官移植研究所承办的“2007年全国器官移植学术会议”定于2007-11-09/11在美丽的花城广州召开. 经报中华医学会批准, 参加会议者可获得国家一类继续医学教育学分, 会议交流的论文颁发中华医学会论文证书.

1 征文内容

(1)各种器官、组织、细胞移植的基础与临床研究; (2)与移植有关的器官切取、保存、运输及分配问题; (3)器官移植术后感染、肿瘤复发、血管、胆管等并发症的防治; (4)新型免疫抑制剂的临床应用和基础研究; (5)移植免疫学的问题; (6)影响移植长期存活、改善受者生活质量以及器官移植术后的中长期管理的相关问题; (7)器官移植的相关学科研究, 如麻醉、ICU、护理、心理学等基础与临床研究; (8)异种移植; (9)与移植有关的组织工程学; (10)与移植有关的伦理学、社会学和经济学等.

2 征文要求

(1)报送会议的论文请寄全文及800字以内摘要各一份(请自留底稿). 请尽量以电子邮件投稿. 无电子版(软盘及电子邮件)论文摘要者恕不录入论文汇编. 稿件请用A4纸打印, 并寄软盘(word格式); (2)凡在国内外公开发刊刊物上发表过的论文, 不予受理; (3)截稿日期: 2007-08-31(以邮戳及电子邮件收到日期为准); (4)来稿请寄: 广州市天河路600号中山大学附属第三医院肝移植中心 张俊峰收 邮编: 510630, 请在信封右上角注明: 会议征文; 电话/传真号: 020-87595523; 电子邮件: qgyz2007@126.com; 联系人: 张俊峰.

环氧合酶-2和基质金属蛋白酶-2在大鼠非酒精性脂肪肝炎中的作用

刘晓璐, 沈滨, 杜雅菊

刘晓璐, 哈尔滨医科大学附属第二医院急诊内科 黑龙江省哈尔滨市 150086

沈滨, 哈尔滨医科大学附属第二医院普外二科 黑龙江省哈尔滨市 150086

杜雅菊, 哈尔滨医科大学附属第二医院消化内科 黑龙江省哈尔滨市 150086

刘晓璐, 主治医师, 主要从事肝病的研究。

通讯作者: 杜雅菊, 150086, 黑龙江省哈尔滨市, 哈尔滨医科大学附属第二临床医院消化内科. duyaju@medmail.com

收稿日期: 2006-11-11 接受日期: 2006-12-18

Role of cyclooxygenase-2 and matrix metalloproteinase-2 in nonalcoholic steatohepatitis of rats

Xiao-Jun Liu, Bin Shen, Ya-Ju Du

Xiao-Jun Liu, Department of Emergency, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China

Bin Shen, Department of General Surgery, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China

Ya-Ju Du, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China

Correspondence to: Ya-Ju Du, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China. duyaju@medmail.com

Received: 2006-11-11 Accepted: 2006-12-18

Abstract

AIM: To observe the roles of cyclooxygenase-2 (COX-2) and matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in the pathogenesis and development of rats with nonalcoholic steatohepatitis (NASH).

METHODS: Thirty Wistar rats were randomly divided into model group ($n = 24$) and control group ($n = 6$), treated with high-fat diet (100 g/L lard, 20 g/L cholesterol, 5 g/L sodium cholate and 875 g/L basal forage) and basal forage, respectively. Eight rats in the model group and 2 rats in the control group were killed randomly in the 12th, 16th and 24th week, respectively, and two pieces of liver tissues were obtained. One was fixed in 40 g/L formaldehyde solution and

stained for the sake of histopathological observation and the other was stored in -80°C refrigerator after being quickly frozen by liquid nitrogen in order to extract RNA and detect the relative amount of COX-2 mRNA and MMP-2 mRNA in liver tissues by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR).

RESULTS: COX-2 mRNA was expressed in the model group in a time-dependent manner, but it was not detected in liver tissues of the control group. The relative amount of COX-2 mRNA expression in the 24th week was significantly higher than that in the 12th and 16th week (1.035 ± 0.040 vs 0.533 ± 0.059 , 0.699 ± 0.062 , $P < 0.05$). There was no obvious difference in the relative amount of MMP-2 mRNA expression between the model group and the control group in the 12th week. However, the relative amount of MMP-2 mRNA expression in the 16th and 24th week in the model group was markedly higher than that in the 12th week (0.952 ± 0.124 , 0.726 ± 0.064 vs 0.454 ± 0.061 , $P < 0.05$), and the difference was also observed between the 16th and 24th week ($P < 0.05$). Correlation was detected between the expression of COX-2 mRNA and MMP-2 mRNA in liver tissues of NASH rats ($r = 0.794$, $P < 0.05$).

CONCLUSION: COX-2 and MMP-2 mRNA are highly expressed in liver tissues of NASH rats, which may take part in the pathogenesis and development of NASH.

Key Words: Cyclooxygenase-2; Matrix metalloproteinase-2; Nonalcoholic steatohepatitis; Reverse transcription-polymerase chain reaction; Rat

Liu XJ, Shen B, Du YJ. Role of cyclooxygenase-2 and matrix metalloproteinase-2 in nonalcoholic steatohepatitis of rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(9):947-952

摘要

目的: 探讨环氧合酶-2(cyclooxygenase, COX-2)和基质金属蛋白酶-2(matrix metalloproteinase, MMP-2)在非酒精性脂肪性

■背景资料

非酒精性脂肪性肝炎(NASH)是发展为肝纤维化的前提条件,如不能及时阻止炎症、坏死进展,将最终导致肝纤维化和肝硬化。环氧合酶-2(COX-2)和基质金属蛋白酶-2(MMP-2)在多种组织炎症损伤、纤维化形成的病理过程中起作用。因此检测肝组织COX-2、MMP-2 mRNA的表达,探讨COX-2和MMP-2在NASH的发生、发展过程的作用具有一定的理论价值。

■同行评价

本文研究了COX-2和MMP-2在大鼠非酒精性脂肪肝中作用,文章写作规范,设计较为合理,有一定的理论价值。

肝炎(nonalcoholic steatohepatitis, NASH)的发生、发展过程的作用。

方法: 取30只Wistar大鼠随机分成2组: 模型组24只饲以高脂饲料(100 g/L猪油、20 g/L胆固醇、5 g/L胆酸钠、875 g/L基础饲料)和正常对照组6只以基础饲料饲养。分别于实验第12、16、24周随机处死模型组大鼠8只和正常对照组2只,取肝组织用于HE染色和RNA提取,应用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测肝组织COX-2 mRNA和MMP-2 mRNA的相对含量。

结果: 正常对照组肝组织COX-2 mRNA无表达; 模型组均表达, 并且随着造模时间延长COX-2 mRNA表达增强, 造模第24周肝组织COX-2 mRNA表达明显高于第12、16周(1.035 ± 0.040 vs 0.699 ± 0.062 , 0.533 ± 0.059 , $P < 0.05$); MMP-2 mRNA相对表达量在造模第12周与正常组相比无明显升高, 而造模第16、24周, 显著高于第12周(0.952 ± 0.124 , 0.726 ± 0.064 vs 0.454 ± 0.061 , $P < 0.05$), 造模第24周和第16周之间亦有差别($P < 0.05$); NASH大鼠肝组织COX-2 mRNA和MMP-2 mRNA表达有相关性($r = 0.794$, $P < 0.05$)。

结论: NASH大鼠肝组织中高表达COX-2 mRNA和MMP-2 mRNA, 他们可能共同参与了NASH的形成、发展过程。

关键词: 环氧合酶-2; 基质金属蛋白酶-2; 逆转录聚合酶链反应; 非酒精性脂肪性肝炎; 大鼠

刘晓琨, 沈滨, 杜雅菊. 环氧合酶-2和基质金属蛋白酶-2在大鼠非酒精性脂肪肝中的作用. 世界华人消化杂志 2007;15(9):947-952

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/947.asp>

0 引言

近年来大量研究表明, 非酒精性脂肪肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)的发生、发展伴随着物质代谢紊乱及肝细胞坏死、炎变和纤维化的形成。而非酒精性脂肪性肝炎(nonalcoholic steatohepatitis, NASH)是发展为肝纤维化的前提条件^[1], 如不能及时阻止炎症、坏死进展, 将最终导致肝纤维化和肝硬化。环氧合酶-2(cyclooxygenase, COX-2)和基质金属蛋白酶-2(matrix metalloproteinase, MMP-2)在多种组织炎症损伤、纤维化形成的病理过程中起作用。我们通过建立大鼠NASH模型, 应用RT-PCR方法检测肝组织COX-2, MMP-2 mRNA的表达, 探

讨COX-2和MMP-2在NASH的发生、发展过程的作用。

1 材料和方法

1.1 材料 ♂ Wistar大鼠30只, 体质量 150 ± 10 g, 由哈尔滨医科大学附属第二医院动物中心提供。冰冻高速离心机, PTC-100热循环仪, GE-100电泳仪, 全自动凝胶成像系统, 紫外分光光度计。胆固醇、胆酸钠购自北京奥博星生物技术有限公司; 猪油自备; TRIzol试剂购于Gibco BRL公司; 三氯甲烷, 异丙醇分别由北京化工厂和天津市凯通化学试剂公司提供; dNTP, DNA Marker购自宝生物工程有限公司; M-MLV Reverse Transcriptase, Taq DNA聚合酶为Primer产品; COX-2和MMP-2引物由上海生工合成, 甘油三酯测定试剂盒、胆固醇测定试剂盒、ALT检测试剂盒、AST检测试剂盒由北京中生生化试剂有限公司提供。

1.2 方法

1.2.1 实验动物及分组 30只Wistar大鼠正常喂养1 wk后, 随机分成2组: 模型组24只, 饲以高脂饲料(100 g/L猪油、20 g/L胆固醇、5 g/L胆酸钠、875 g/L基础饲料)和正常对照组6只, 以基础饲料饲养, 2组大鼠均自由饮水, 分别于实验第12、16、24周随机处死模型组大鼠8只和正常对照组2只。动物处死前隔夜禁食水, 以100 g/L水合氯醛腹腔麻醉, 取肝右叶中部2小块肝组织, 一块用40 g/L甲醛溶液固定, 石蜡包埋, 切片, HE染色; 另一块液氮速冻后存于-80℃冰箱, 用于RNA提取。

1.2.2 肝脏病理学观察 肝脏石蜡切片HE染色观察肝细胞脂肪变性、炎症及坏死情况。

1.2.3 总RNA提取 从液氮中取100 mg肝组织在冰上碾磨成细粉末, 加入1 mL TRIzol试剂, 按说明书提取总RNA。10 g/L琼脂糖凝胶电泳显示28S和18S亚基; 紫外分光光度计测定总RNA含量及纯度, A_{260}/A_{280} 比值为1.8-2.0, 说明提取RNA质量较好。

1.2.4 cDNA合成 反应体系: 5×Buffer 5 μL, dNTP (2.5 mmol/L) 5 μL, 下游引物(10 pmol/L) 1 μL, M-MLV(反转录酶) 1 μL, 总RNA 2 μg, 焦碳酸二乙酯(diethylpyrocarbonate, DEPC)水补足总体积25 μL; 反应参数: 42℃ 30 min。

1.2.5 PCR扩增 根据GenBank引物设计为: COX-2上游: 5'-CCATGTCAAAACCGTGGTGAATG-3'(197-219), 下游: 5'-ATGGGAGTTGGGC

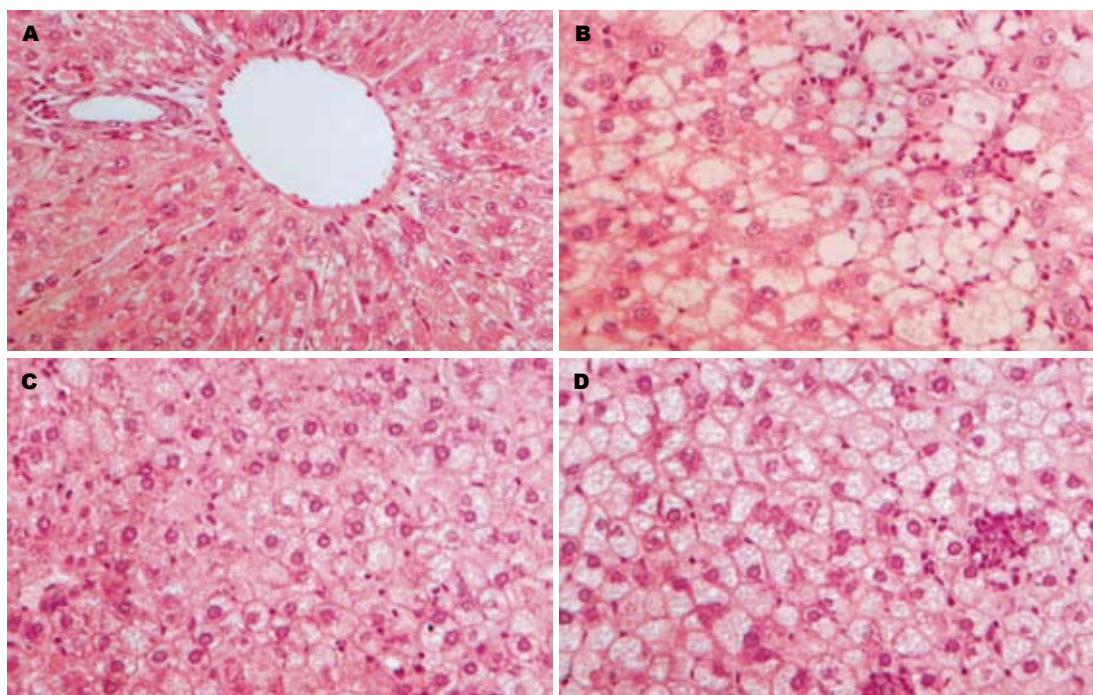


图1 肝组织学改变(HE × 400). A: 正常组; B: 造模第12周; C: 造模第16周; D: 造模第24周.

AGTCATCAG-3'(549-570), 扩增片段长度为374 bp; MMP-2上游: 5'-CCATGTGTCTTCCCCTTAC-3'(1515-1534), 下游: 5'-CGATGCCATCAAA GACAATG-3'(1895-1915), 扩增片段长度为442 bp; 设置 β -actin为阳性参照, 引物序列: 上游: 5'-AACCTAAGGCCAACCGTGAAAAG-3', 下游: 5'-TCATGAGGTAGTCTGTGAGGT-3', 扩增片段长度是241 bp; 同时设水为阴性对照. COX-2及 β -actin PCR反应体系: 10×Buffer 2.5 μ L, dNTP (2.5 mmol/L) 2 μ L, $MgCl_2$ (25 mmol/L) 1.5 μ L, 上、下游引物(10 pmol/L)各0.75 μ L, Taq DNA聚合酶0.5 μ L, cDNA 2 μ L, 水补足体系至25 μ L; 反应参数: 95℃预变性5 min; 94℃ 45 s, 61℃ 45 s, 72℃ 60 s, 32个循环; 72℃ 7 min. MMP-2 PCR反应体系: 10×Buffer 2.5 μ L, dNTP (2.5 mmol/L) 2 μ L, $MgCl_2$ (25 mmol/L) 1.8 μ L, 上、下游引物(10 pmol/L)各1 μ L, Taq DNA聚合酶0.5 μ L, cDNA 2 μ L, 水补足体系至25 μ L; 反应参数: 95℃预变性5 min; 94℃ 45 s, 58℃ 60 s, 72℃ 60 s, 32个循环; 72℃ 7 min. 产物于20 g/L琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色(10 mg/L)后, 通过凝胶成像系统对目的电泳条带进行光密度扫描, 与 β -actin形成条带进行比较, 表示COX-2, MMP-2 mRNA的相对表达水平.

统计学处理 所有数据以均数±标准差表示, 并进行方差分析及 q 检验.

2 结果

实验动物无1例死亡, 正常组大鼠, 毛有光泽、体质量逐渐增长、反应灵敏、活跃. 高脂组大鼠体质量增加明显, 但16 wk后出现体毛无光泽、发黄, 精神萎靡, 懒动, 进食量减少, 体质量增长缓慢.

2.1 肝组织学改变 肉眼观, 正常组大鼠肝脏外观呈红褐色, 形状规则, 表面光滑; 模型组大鼠肝脏体积增大, 外形饱满, 呈土黄色, 表面有弥漫性细颗粒样隆起, 切面油腻, 质地较脆. 镜下所见, 正常组大鼠肝组织结构完整、清晰, 肝小叶结构正常, 肝细胞排列成肝索, 在中央静脉周围呈放射状分布, 细胞呈多边形; 造模12 wk出现单纯性脂肪肝, 肝细胞体积增大, 脂肪变以大泡性为主, 细胞核被挤向一边, 弥漫累及整个肝小叶; 16 wk及24 wk肝细胞脂肪变基础上出现气球样变、胞质疏松化, 小叶内炎症细胞浸润, 部分可见散在点状坏死(图1).

2.2 TG, TC, ALT及AST含量变化 大鼠血清甘油三酯(TG)在造模12 wk就出现增长, 第16周和第24周显著高于第12周($P<0.05$); 血清胆固醇(TC)、ALT及AST在造模第12周较正常对照组没有明显变化, 而造模第16周和第24周则明显升高($P<0.05$)(表1).

2.3 COX-2 mRNA表达 正常对照组肝组织COX-2 mRNA无表达; 模型组均表达, 造模第

表 1 大鼠血清TG, TC, AST, ALT含量(mean \pm SD)

分组	<i>n</i>	TG(mmol/L)	TC(mmol/L)	ALT(nkat/L)	AST(nkat/L)
对照组	6	0.59 \pm 0.12	1.39 \pm 0.11	50.83 \pm 11.83	89.17 \pm 13.83
模型组(12 wk)	8	1.13 \pm 0.36 ^a	1.60 \pm 0.16	53.38 \pm 11.13	87.00 \pm 10.50
模型组(16 wk)	8	1.87 \pm 0.17 ^c	2.08 \pm 0.30 ^c	90.75 \pm 9.75 ^c	144.00 \pm 24.25 ^c
模型组(24 wk)	8	2.33 \pm 0.41 ^{ce}	2.90 \pm 0.54 ^{ce}	123.63 \pm 23.13 ^{ce}	188.50 \pm 33.00 ^{ce}

^a $P < 0.05$ vs 对照组; ^c $P < 0.05$ vs 模型组(12 wk); ^e $P < 0.05$ vs 模型组(16 wk).

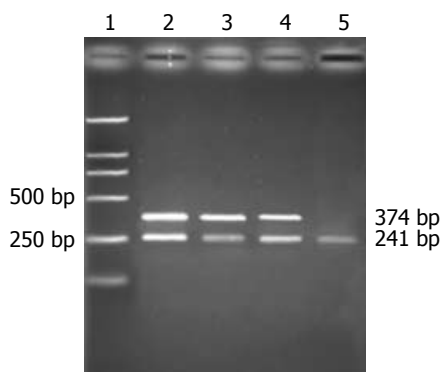


图 2 COX-2 PCR扩增条带. 1: Maker; 2-5: 造模第24, 16, 12周和正常对照组.

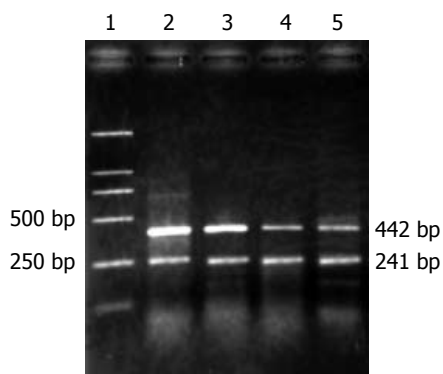


图 3 MMP-2 PCR扩增条带. 1: Maker; 2-5: 造模第24, 16, 12周和正常对照组.

12周大鼠肝脏组织COX-2 mRNA表达的相对量是0.533, 造模第16周和第24周肝组织COX-2 mRNA的相对表达量显著高于第12周($P < 0.05$, 表2, 图2).

2.4 MMP-2 mRNA表达 正常对照组MMP-2 mRNA表达相对量为0.41, 造模第12周大鼠肝脏组织MMP-2 mRNA相对表达量无明显升高; 造模16 wk和24 wk大鼠肝脏组织MMP-2 mRNA表达的相对量显著高于第12周($P < 0.05$); 造模第24周和第16周之间亦有差别($P < 0.05$)(表2, 图3).

2.5 COX-2与MMP-2表达的相关性 随着造模

表 2 COX-2和MMP-2 mRNA相对表达量(mean \pm SD)

分组	<i>n</i>	COX-2	MMP-2
对照组	6	0	0.41 \pm 0.21
模型组(12 wk)	8	0.533 \pm 0.059	0.454 \pm 0.061
模型组(16 wk)	8	0.699 \pm 0.062 ^a	0.726 \pm 0.064 ^a
模型组(24 wk)	8	1.035 \pm 0.040 ^{ac}	0.952 \pm 0.124 ^{ac}

^a $P < 0.05$ vs 模型组(12 wk); ^c $P < 0.05$ vs 模型组(16 wk).

时间延长, NASH的形成, 大鼠肝组织COX-2 mRNA表达增强, MMP-2 mRNA表达亦增多, 具有相关性($r = 0.794$, $P < 0.05$).

3 讨论

COX是合成前列腺素(prostaglandins, PGs)的关键酶, COX有3种同工酶. COX-2是经刺激迅速产生的诱导酶, 正常情况下, COX-2在多数组织不表达或低表达, 而在炎症、肿瘤等病理状态下起重要作用, 其表达上调出现于许多疾病过程中^[2-3]. 近年的研究表明, COX-2与急慢性肝损伤的发病密切相关^[4-6]. 大量实验证明COX-2在酒精性肝病(alcoholic liver disease, ALD)时阳性表达^[7-10]. 还有研究显示, COX-2在慢性乙型肝炎中随着肝脏炎症活动程度的加重而表达相应增加^[11-12]. 本实验中正常对照组大鼠肝组织结构正常, RT-PCR检测未见COX-2 mRNA表达, 与Okamoto *et al*^[13]结论一致; 观察发现, 在造模第12周, 单纯性脂肪肝形成阶段已有COX-2 mRNA表达, 并且随着造模时间延长, NASH形成和发展, 肝脏组织COX-2 mRNA表达亦增强.

在NASH患者中, 内毒素或内源性酒精可使库普弗细胞被激活^[14]. 诸多研究显示库普弗细胞在许多不同类型的肝损害的发病过程中起作用^[15-16]. 库普弗细胞是COX-2 mRNA的主要来源, Mohammed *et al*^[17]通过免疫组化的方法发现, 在有炎性细胞浸润的肝组织中, 除了有COX-1表

此外, COX-2表达明显升高, 而正常对照组库普弗细胞只表达COX-1. Enomoto *et al*^[18]证明, 在ALD中, 库普弗细胞被激活, 表达COX-2增高, 其产物PGE₂水平升高; 灭活库普弗细胞后, PGE₂水平下降, 可以减轻乙醇诱导的肝脂肪变性. 在NASH患者中, 内毒素刺激多种细胞合成花生四烯酸(AA), 成为诱导COX-2的主要因素之一. 脂质过氧化物可以诱导COX-2基因表达, 反应性氧中间介质可参与炎症因子刺激引起的COX-2表达的诱导. Yu *et al*^[19]在PPAR- α (-/-)的脂肪肝鼠模型中发现COX-2表达增加, 同时有NF- κ B的激活和TNF- α , 白介素-6(IL-6), 细胞间黏附分子-1(ICAM-1)等细胞因子的表达增加, 得出结论, PPAR- α 禁止炎症反应, 改善NASH炎症程度是通过抑制COX-2活性而实现的. 研究显示, 高表达的COX-2使炎症介质PGE₂和TXB₂等生成增加, 促进炎症细胞浸润; 同时还可通过调节NF- κ B释放多种炎症介质, 如TNF- α 、白介素-8(IL-8)、ICAM-1、E选择素(E-selectin)等^[20-21]. 这些炎症介质又可进一步激活COX-2的表达, 形成一种正反馈环路, 扩大炎症反应, 延长炎症过程, 最终造成更严重的肝损害.

MMPs是细胞外基质大分子降解的主要酶类, 在损伤组织的修复和重建过程中起着重要作用^[22]. MMP-2是MMPs家族中的主要成员之一, 又称明胶酶A. MMP-2主要降解基底膜成份, 启动和加重肝纤维化, 并在肝纤维化过程中持续升高^[23]. 大量的动物实验和临床研究已经验证在慢性肝损伤的肝组织修复、肝纤维化形成过程中有MMP-2的高表达^[24-26]. 我们在造模第12周, 病理显示为单纯性脂肪肝, 肝组织MMP-2 mRNA相对含量增高, 但与正常对照组没有明显差别; 于造模第16, 24周, 肝组织MMP-2 mRNA相对含量显著高于正常对照组, 并且第24周与第16周之间亦有差别. MMP-2的表达增加可能与炎症坏死的肝细胞, 尤其是库普弗细胞释放的多种细胞因子调节有关^[27], 如胰岛素样生长因子、血小板衍生生长因子等可以激活肝星状细胞, 上调MMP-2酶原的表达; TNF- α 可以激活转录因子NF- κ B, 后者跨膜激活p53, 间接诱导MMP-2的转录.

Callejas *et al*^[28]报道, 用致炎细胞因子(proinflammatory cytokines)、内毒素和肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)处理原代培养的胎肝细胞, 促进COX-2的表达和大量PGs的合成的同时, MMP-2, 9的活性形式可以释放

到细胞外介质, 而使用COX-2抑制剂可以抑制这一过程, 这说明COX-2及其PGs产物可以促进生长因子、炎性介质刺激的胎肝细胞释放MMPs. Nunez *et al*^[29]观察了32例抗-HCV(+)和10例抗-HCV(-)患者肝活检组织, 证实在抗-HCV(+)患者肝组织中COX-2, MMP-2和MMP-9的表达是显著增高的, 并且促进了肝纤维化的发生、发展. 在我们的实验中, 高脂饮食第16, 24周的大鼠形成NASH, 大鼠肝组织COX-2 mRNA表达增强, MMP-2 mRNA表达亦增多, 二者有明显的相关性($P < 0.05$). COX-2及其产物PGE₂、PGI₂相互作用, 可以刺激肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)增生, 应用选择性COX-2抑制剂SC-236, 可以增加HSC凋亡, 诱导PPAR- γ 的表达和激活, 使肝纤维化得到改善^[30]. 大多数学者通过HSC分离培养的研究表明, HSC特别是激活的HSC是肝内MMP-2的主要来源. 而激活的MMP-2又能够降解HSC周围的基底膜的正常基质成分如IV型胶原、层黏连蛋白等, 改变细胞的微环境, 进一步刺激HSC活化, 增殖、转变成肌成纤维细胞样细胞, 促进包括I, III型胶原纤维在内的ECM形成, 而I型胶原沉积在过度状态或已转化的HSC周围, 使模型基质金属蛋白酶I表达增加, 后者刺激MMP-2酶原的激活和上调MMP-2的表达, 继续降解周围基质, 促进未转化的HSC活化, 各种细胞因子释放, 促进ECM分泌增多, 造成恶性循环, 最终导致纤维化的形成与发展.

我们通过实验证实, 在NASH大鼠肝组织中有COX-2 mRNA和MMP-2 mRNA的高表达, 并且二者的表达呈现明显的相关性, 推测他们共同参与了NASH的形成、发展过程, 这为NASH的防治提供了新的靶点.

4 参考文献

- 1 Brunt EM. Nonalcoholic steatohepatitis. *Semin Liver Dis* 2004; 24: 3-20
- 2 Eschwege P, de Ledinghen V, Camilli T, Kulkarni S, Dalbagni G, Droupy S, Jardin A, Benoit G, Weksler BB. Arachidonic acid and prostaglandins, inflammation and oncology. *Presse Med* 2001; 30: 508-510
- 3 Gilroy DW, Colville-Nash PR. New insights into the role of COX 2 in inflammation. *J Mol Med* 2000; 78: 121-129
- 4 田耕, 于皆平, 罗和生, 余保平, 李建英. 环氧合酶-2在急性肝损害中的作用机制. *世界华人消化杂志* 2002; 10: 24-27
- 5 Tsukada K, Hasegawa T, Tsutsumi S, Kuwano H. Roles of cyclooxygenase-2 in tissue injury during hemorrhagic shock. *Shock* 2000; 13: 392-396
- 6 邱德凯, 马雄, 彭延申, 陈晓宇. 原发性肝细胞癌及癌旁组织中环氧合酶-2的表达及其意义. *中华消化杂志*

- 2001; 21: 142-144
- 7 Mathurin P, Deng QG, Keshavarzian A, Choudhary S, Holmes EW, Tsukamoto H. Exacerbation of alcoholic liver injury by enteral endotoxin in rats. *Hepatology* 2000; 32: 1008-1017
- 8 周华丽, 虞朝辉, 陈韶华, 陈卫星, 王丽君, 应李雄, 厉有名. 核因子 κ B和环氧合酶-2在酒精性肝病大鼠模型中的表达. *中华肝脏病杂志* 2004; 12: 568-569
- 9 易辉, 王新, 苗继延, 杜静平, 潘阳林, 刘娜, 张宇梅, 樊代明. 选择性环氧合酶-2抑制剂对大鼠酒精性肝损伤的保护作用. *中华肝脏病杂志* 2003; 11: 663-666
- 10 Nanji AA, Jokelainen K, Tipoe GL, Rahemtulla A, Dannenberg AJ. Dietary saturated fatty acids reverse inflammatory and fibrotic changes in rat liver despite continued ethanol administration. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 299: 638-644
- 11 邵建国, 谢幸尔, 姚建国, 屈莉红, 顾春燕, 包蕾. 环氧合酶2在慢性乙型肝炎肝组织中的表达. *第二军医大学学报* 2004; 25: 1383-1384
- 12 Cheng J, Imanishi H, Iijima H, Shimomura S, Yamamoto T, Amuro Y, Kubota A, Hada T. Expression of cyclooxygenase 2 and cytosolic phospholipase A(2) in the liver tissue of patients with chronic hepatitis and liver cirrhosis. *Hepatol Res* 2002; 23: 185-195
- 13 Okamoto T, Hino O. Expression of cyclooxygenase-1 and -2 mRNA in rat tissues: tissue-specific difference in the expression of the basal level of mRNA. *Int J Mol Med* 2000; 6: 455-457
- 14 丁效蕙, 赵景民. 非酒精性脂肪性肝炎的发病机制及治疗的研究进展. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 371-375
- 15 Watanabe N, Miura S, Zeki S, Ishii H. Hepatocellular oxidative DNA injury induced by macrophage-derived nitric oxide. *Free Radic Biol Med* 2001; 30: 1019-1028
- 16 Enomoto N, Ikejima K, Yamashina S, Hirose M, Shimizu H, Kitamura T, Takei Y, Sato And N, Thurman RG. Kupffer cell sensitization by alcohol involves increased permeability to gut-derived endotoxin. *Alcohol Clin Exp Res* 2001; 25: 51S-54S
- 17 Mohammed NA, Abd El-Aleem SA, El-Hafiz HA, McMahon RF. Distribution of constitutive (COX-1) and inducible (COX-2) cyclooxygenase in postviral human liver cirrhosis: a possible role for COX-2 in the pathogenesis of liver cirrhosis. *J Clin Pathol* 2004; 57: 350-354
- 18 Enomoto N, Ikejima K, Yamashina S, Enomoto A, Nishiura T, Nishimura T, Brenner DA, Schemmer P, Bradford BU, Rivera CA, Zhong Z, Thurman RG. Kupffer cell-derived prostaglandin E(2) is involved in alcohol-induced fat accumulation in rat liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 279: G100-106
- 19 Yu J, Ip E, Dela Pena A, Hou JY, Sessa J, Pera N, Hall P, Kirsch R, Leclercq I, Farrell GC. COX-2 induction in mice with experimental nutritional steatohepatitis: Role as pro-inflammatory mediator. *Hepatology* 2006; 43: 826-836
- 20 Leclercq IA, Farrell GC, Sempoux C, dela Pena A, Horsmans Y. Curcumin inhibits NF-kappaB activation and reduces the severity of experimental steatohepatitis in mice. *J Hepatol* 2004; 41: 926-934
- 21 Spitzer JA, Zheng M, Kolls JK, Vande Stouwe C, Spitzer JJ. Ethanol and LPS modulate NF-kappaB activation, inducible NO synthase and COX-2 gene expression in rat liver cells *in vivo*. *Front Biosci* 2002; 7: a99-108
- 22 李保森, 游绍莉, 赵志海, 辛绍杰, 赵景民, 王松山. 实验性肝纤维化形成过程中几种基质金属蛋白酶表达的研究. *世界华人消化杂志* 2003; 11: 483-485
- 23 孟二红, 赵景民, 王松山, 刘旺霞, 刘平, 周光德, 张泰和. 基质金属蛋白酶在非酒精性脂肪性肝炎患者肝组织中的表达. *世界华人消化杂志* 2002; 10: 1257-1260
- 24 Knittel T, Mehde M, Grundmann A, Saile B, Scharf JG, Ramadori G. Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors during hepatic tissue repair in the rat. *Histochem Cell Biol* 2000; 113: 443-453
- 25 Galli A, Svegliati-Baroni G, Ceni E, Milani S, Ridolfi F, Salzano R, Tarocchi M, Grappone C, Pellegrini G, Benedetti A, Surrenti C, Casini A. Oxidative stress stimulates proliferation and invasiveness of hepatic stellate cells via a MMP2-mediated mechanism. *Hepatology* 2005; 41: 1074-1084
- 26 王迎春, 王英德. 基质金属蛋白酶-2及其抑制物在慢性肝炎和肝硬化肝组织中的表达. *中华肝脏病杂志* 2004; 12: 248-249
- 27 Knittel T, Mehde M, Kobold D, Saile B, Dinter C, Ramadori G. Expression patterns of matrix metalloproteinases and their inhibitors in parenchymal and non-parenchymal cells of rat liver: regulation by TNF-alpha and TGF-beta1. *J Hepatol* 1999; 30: 48-60
- 28 Callejas NA, Casado M, Diaz-Guerra MJ, Bosca L, Martin-Sanz P. Expression of cyclooxygenase-2 promotes the release of matrix metalloproteinase-2 and -9 in fetal rat hepatocytes. *Hepatology* 2001; 33: 860-867
- 29 Nunez O, Fernandez-Martinez A, Majano PL, Apolinario A, Gomez-Gonzalo M, Benedicto I, Lopez-Cabrera M, Bosca L, Clemente G, Garcia-Monzon C, Martin-Sanz P. Increased intrahepatic cyclooxygenase 2, matrix metalloproteinase 2, and matrix metalloproteinase 9 expression is associated with progressive liver disease in chronic hepatitis C virus infection: role of viral core and NS5A proteins. *Gut* 2004; 53: 1665-1672
- 30 Planaguma A, Claria J, Miquel R, Lopez-Parra M, Titos E, Masferrer JL, Arroyo V, Rodes J. The selective cyclooxygenase-2 inhibitor SC-236 reduces liver fibrosis by mechanisms involving non-parenchymal cell apoptosis and PPARgamma activation. *FASEB J* 2005; 19: 1120-1122

电编 张敏 编辑 王晓瑜

大肠癌细胞系Lovo中亚群(SP)细胞的分离培养和鉴定

王锡山, 刘彦龙, 杨艳梅

王锡山, 刘彦龙, 哈尔滨医科大学附属肿瘤医院腹外科 黑龙江省哈尔滨市 150040

杨艳梅, 黑龙江省肿瘤研究所 黑龙江省哈尔滨市 150040

王锡山, 教授, 博士生导师, 主要从事腹部肿瘤的基础研究和外科治疗.

通讯作者: 王锡山, 150040, 哈尔滨市南岗区哈平路150号, 哈尔滨医科大学附属肿瘤医院腹外科. wxshan1208@yahoo.com.cn
电话: 0451-86298898

收稿日期: 2007-01-23 接受日期: 2007-01-31

Isolation and identification of side population in Lovo colon cancer cell line

Xi-Shan Wang, Yan-Long Liu, Yan-Mei Yang

Xi-Shan Wang, Yan-Long Liu, Department of Abdominal Surgery, the Affiliated Tumor Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150040, Heilongjiang Province, China
Yan-Mei Yang, Institute of Tumor research, Harbin 150040, Heilongjiang Province, China

Correspondence to: Xi-Shan Wang, Department of Abdominal Surgery, the Affiliated Tumor Hospital of Harbin Medical University, 150 Haping Road, Nangang District, Harbin 150040, Heilongjiang Province, China. wxshan1208@yahoo.com.cn

Received: 2007-01-23 Accepted: 2007-01-31

Abstract

AIM: To investigate whether colon cancer cell line Lovo contains side population (SP) with cancer stem cell-like properties.

METHODS: Lovo cell line was cultivated in serum-free medium and SP cells reforming into floating spheres were isolated. The isolated SP cells were identified by limiting-dilution assay, differentiation assay, self-renewal assay, alternative cultivation assay and immunocytochemical staining with anti-Mus-1 assay.

RESULTS: In the absence of serum, a minority (0.54%-0.62%) of SP cells in Lovo cells survived, proliferated and assembled into the suspended tumor cell spheres. Lovo SP cells possessed proliferative, self-renewal and differentiation potential, which were responsible for the floating tumor clone. Serum addition into SFM resulted in the proliferation of SP cells; after several generations and alternated cultivation in SSM and

SFM, SP cells maintained their characters. The stem cell surface marker Mus-1 was observed in Lovo SP cells after Musashi-1 staining.

CONCLUSION: Lovo cell line contains a tiny minority of SP cells with stem cell properties that can be maintained in SFM using a floating-culture method for a long time.

Key Words: Lovo colon cancer cell line; Side population; Tumor stem cells; Serum-free culture medium; Floating-culture system

Wang XS, Liu YL, Yang YM. Isolation and identification of side population in Lovo colon cancer cell line. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(9):953-959

摘要

目的: 应用无血清培养液(SFM)培养Lovo细胞系, 克隆分离具有干细胞样特性SP细胞.

方法: 应用SFM培养Lovo细胞, 分离成球样生长的细胞群作为SP细胞, 并通过有限稀释, 分化, 自我更新, 含血清培养基(SSM)和SFM交替培养及Musashi-1化学染色方法来鉴定SP细胞.

结果: Lovo细胞中约含有0.54%-0.62%的SP能够在无血清培养基中能够存活、增殖, 形成悬浮的肿瘤细胞球; 在SFM中加入血清可促使SP细胞分化; SP细胞可以连续传代, 并可交替培养于SSM和SFM中, 细胞形态无明显变化; SP细胞Musashi-1染色阳性.

结论: 应用SFM可从Lovo细胞中分离出极少量的具有干细胞特性的SP细胞.

关键词: Lovo大肠癌细胞系; 细胞亚群; 肿瘤干细胞; 悬浮培养; 无血清培养基

王锡山, 刘彦龙, 杨艳梅. 大肠癌细胞系Lovo中亚群(SP)细胞的分离培养和鉴定. *世界华人消化杂志* 2007;15(9):953-959
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/953.asp>

0 引言

癌症细胞和干细胞一样具有无限增殖的能力.

■背景资料

肿瘤细胞与干细胞具有许多相似的特殊特性. 他们均为不死细胞, 并具有良好的分化能力. 而且, 器官形成和癌发生具有相似的过程. 最近, 越来越多的证据显示肿瘤是一种干细胞疾病, 是由具有成瘤能力的肿瘤细胞增殖发育而成的异常组织. 目前在白血病、乳腺癌、脑肿瘤和胰腺癌中已经论证了肿瘤干细胞的存在.

■ 研发前沿

目前尚不能从形态学来鉴定肿瘤干细胞,而是用功能学方法,即对其自我更新能力和分化潜力两个主要特征进行评价。当今研究主要集中在耐药性、基因表达差异以及表型鉴定等方面。

近年来,在白血病^[1-2]和一些实体肿瘤中,包括乳腺癌^[3]、胰腺癌^[4]、头颈鳞状细胞癌^[5]、肝癌^[6]和脑肿瘤^[7-10]中已发现了具有干细胞特征的细胞,我们称之为癌症干细胞(CSCs)。虽然这种细胞的数量极少,但能够瘤性克隆生长,从而产生不同表型的癌细胞亚群^[11-12]。当前认为在经过放化疗后,CSCs是导致肿瘤复发的原因^[1,3]。因此,研究CSCs有利于更好的理解肿瘤复发、转移和耐药性产生的机制,从而制定更为合理的治疗方案。大肠癌是一种常见肿瘤,其生物学行为较其他消化道肿瘤的恶性度低,术后5 a生存率较高,但是仍有40%-50%的患者因为复发而需放化疗。研究CSCs可以提高治疗的针对性和有效性,具有更为实际的意义。我们通过无血清培养基培养Lovo细胞系,克隆分离癌细胞亚群(side-population, SP),并从形态学、分化、自我更新、交替培养以及细胞化学免疫等方面进行鉴定。

1 材料和方法

1.1 材料 细胞株为大肠癌细胞系Lovo(黑龙江省肿瘤研究所提供)。传统含血清培养基(serum-supplemented medium, SSM)为含100 mL/L胎牛血清的DMEM/F12(1:1, invitrogen-gibco)培养基,并添加L-谷氨酰胺(Sigma) 2 mL/L,胰岛素(Sigma) 4 U/L,青霉素G 10^5 U/L和链霉素100 mg/L。无血清培养基(serum-free medium, SFM)为不含牛血清的DMEM/F12(1:1)培养基,并添加重组表皮生长因子EGF(20 μ g/L, PeproTech)、碱性成纤维生长因子bFGF(20 μ g/L, PeproTech)和白血病抑制因子LIF(20 μ g/L, PeproTech),以及1 mg/L胰岛素, 1×10^{-7} mol/L地塞米松(Sigma), 10 mmol/L尼克酰胺(Sigma), 2 mmol/L L-谷氨酰胺(Sigma), 50 μ mol/L 2-巯基乙醇(Sigma), 5 mmol/L HEPES, 10^5 U/L青霉素G和100 mg/L链霉素。

1.2 方法

1.2.1 SP的培养分离和传代 先将Lovo细胞系接种于传统SSM中,在培养瓶中传代。选择对数生长长期的细胞,用D-Hanks液清洗,胰酶(2.5 g/L)消化,重悬于SFM,台盼兰染色并计数,以 1×10^5 /孔接种于6孔板中,继续在37℃, 50 mL/L CO₂培养箱中培养。待增殖形成细胞球3-4 d后,将其收集并机械吹打成单细胞悬液,重悬于SFM,按1:4的比例传代于6孔中。

1.2.2 有限稀释法 有限稀释采用Bellows *et al*^[13],

Tropepe *et al*^[14]的方法,将贴壁生长于SSM中的细胞经胰酶消化,吹打成单细胞悬液,计数后重悬于SFM,按每孔200 μ L分别接种320, 160, 80, 40, 20, 10和5个细胞稀释,接种于96孔板。以每个浓度未形成肿瘤球的孔的百分比为应变量,以每孔中接种的细胞数为自变量,作直线回归分析并用方差分析作拟和优度检测。回归方程中与以应变量37%相对应的自变量值就是要形成一个肿瘤球所需的接种细胞量,因为每个肿瘤细胞球均有一个肿瘤干细胞形成,所以根据这一细胞量求出肿瘤干细胞在细胞系中的比例。此试验重复5次。

1.2.3 SP细胞的自我更新与诱导分化 在Lovo细胞培养于SFM的第7天,分别分离细胞球和单细胞,并将细胞球机械吹打成单细胞悬液,分别重悬于SFM液中,培养于37℃, 50 mL/L CO₂培养箱中。在原发肿瘤干细胞球形成的第2天,吸出肿瘤球,分别平铺于放有涂有多聚赖氨酸的盖玻片24孔板中,换成添加100 mL/L FBS的SFM培养液,7 d后进行免疫荧光化学染色。

1.2.4 SP交替在SSM和SFM培养基中培养 按照1.2.1的方法,待Lovo细胞系在SFM中细胞球2 d后,收集并重悬于SSM液中,待其呈单层细胞生长后,再收集并重悬于SFM液中,呈细胞球样悬浮生长,如此反复3次。

1.2.5 Musashi-1细胞化学染色 把SP形成的肿瘤球吸出,平铺于放有涂有多聚赖氨酸的24孔板中,培养于添加100 mL/L FBS的SFM中4 h,在室温下用40 g/L多聚甲醛-PBS固定20 min。用冷2 g/L TritonX-100/PBS在4℃下透膜10 min,然后在4℃下与Musashi-1 mAb过夜(1:200; Chemicon)。用冷2 g/L TritonX-100/PBS 4℃下冲洗5 min,冲洗3次,再用含有30 g/L牛血清白蛋白的冷2 g/L TritonX-100/PBS 4℃下冲洗5 min。用FITC抗兔IgG1检测一抗。然后用含有PI的封固剂复染鉴定细胞核,在荧光倒置显微镜(Nikon)下观察。同理在分化的第7天和贴壁培养的第2天进行免疫化学染色。

2 结果

2.1 肿瘤细胞球的形成 Lovo在SFM中培养24-48 h后可产生少量体积较小的悬浮肿瘤球(图1A),72 h后肿瘤球体积增大,随着时间的延长,在1 wk左右所形成的肿瘤球一部分肿瘤球较松散,此为黏附细胞团,一部分肿瘤球形态较一致且比较致密(图1B),3 wk左右均形成致密的形态一致的肿瘤球(图1C),而且经过传代后

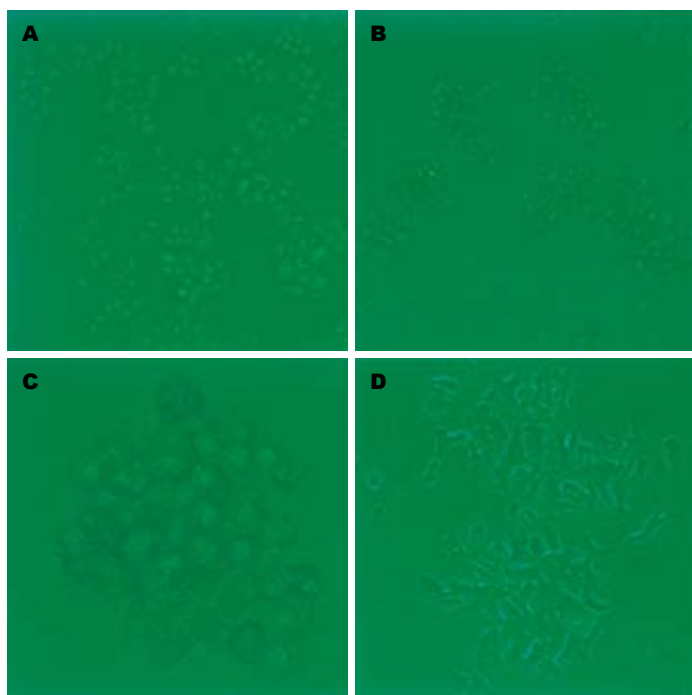


图1 Lovo中肿瘤细胞球的形成过程. A: 在SFM中培养24–48 h($\times 100$); B: 在SFM中培养1 wk左右($\times 100$); C: 在SFM中培养3 wk左右($\times 400$); D: 在SSM中培养48 h($\times 100$).

■创新盘点

本文优化配制了胃肠道肿瘤干细胞培养基, 成功分离培养出悬浮样生长的肿瘤干细胞球, 并首次鉴定出这种细胞球表达Musashi-1, 这被认为是胃肠道肿瘤干细胞的标记物.

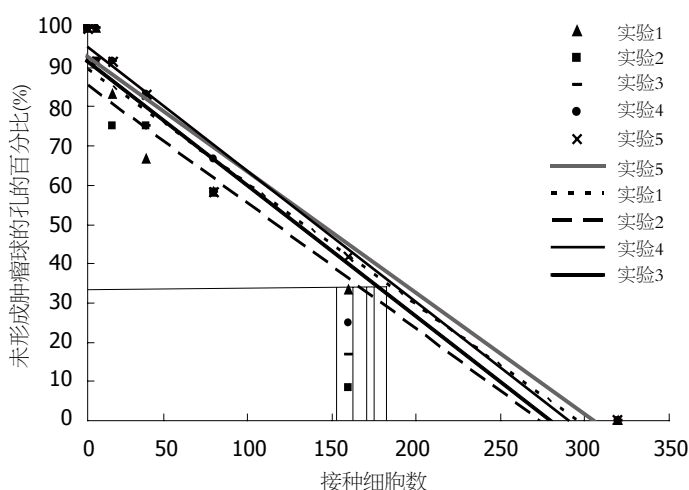


图2 有限稀释试验单克隆试验的直线回归分析. 以每孔中接种的细胞数为自变量, 以每个浓度未形成肿瘤球的孔的百分比为应变量, 作回归直线, 以应变量37%相对应的自变量的值就是要形成一个肿瘤球所需的细胞数.

肿瘤球的总数量大量扩增. 这部分肿瘤球细胞我们称之为SP细胞. 剩余的大多数肿瘤细胞即N-SP(non-side population)呈现黏附, 不具有增殖和分化的能力. 而用SSM培养的Lovo时, 接种后数小时内开始贴壁, 48 h后形成单层贴壁细胞层, 没有悬浮细胞团产生(图1D).

2.2 Lovo细胞中含有0.54%-0.62%的具有形成肿瘤球能力的SP细胞. 采用Bellows *et al*^[13], Tropepe *et al*^[14]的方法, 经有限稀释、单克隆形成试验和直线回归分析, 在用SFM培养Lovo时, 要形成一个肿瘤细胞球所需的细胞数为 173.68 ± 11.02 (SD), 这证明了Lovo中有 $0.58\% \pm 0.04\%$ (SD)的能够形成肿瘤细胞球的SP细胞, 而其他大多数细胞不具备这种能力(图2, 表1).

2.3 SP细胞的自我更新 我们观察到Lovo细胞在

表1 Lovo细胞系中肿瘤球的比例

试验次数	R ²	形成一个肿瘤球时每孔所需的细胞数	肿瘤球的比例(%)
实验1	0.926	175.70	0.57
实验2	0.860	157.73	0.63
实验3	0.897	168.73	0.59
实验4	0.944	179.63	0.56
实验5	0.971	186.61	0.54
mean \pm SD		173.68 ± 11.02	0.58 ± 0.04

每次试验的回归直线见图2, R²为直线回归的决定系数, 接近于1. 每次试验均用方差分析作拟和优度检验($P < 0.05$).

SFM培养形成肿瘤球后, 经机械吹打后培养于SFM中, 1-2 wk后仍可形成肿瘤细胞球和一些单

■应用要点

本试验优化配置了干细胞培养基,并鉴定出肿瘤干细胞球表达Musashi-1,为胃肠道肿瘤中是否存在干细胞提供了证据,可以为癌症的诊断和治疗提供更为有效的方法。

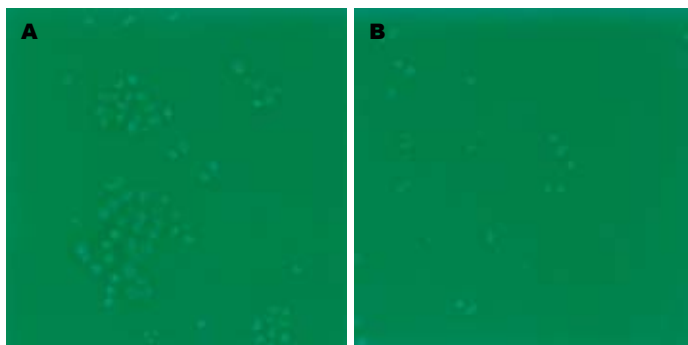


图 3 Lovo中SP细胞的自我更新($\times 100$).
A: SP; B: 单细胞.

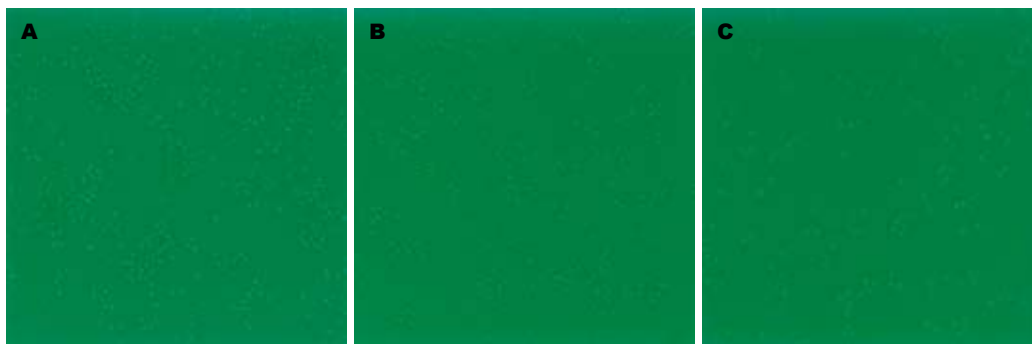


图 4 Lovo中SP细胞在加有血清的SFM中的分化过程($\times 100$). A: 24-48 h内; B: 5 d; C: 7 d左右.

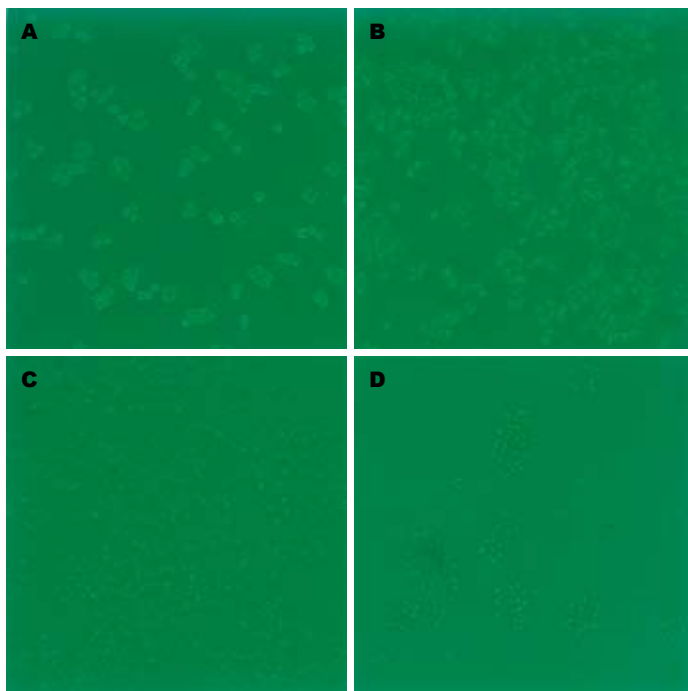


图 5 Lovo在SSM和SFM两种培养基中交替转化. A: 将肿瘤球重铺于SSM中, 12 h内($\times 200$); B: 24 h左右($\times 200$); C: 48 h后($\times 200$); D: 消化单层Lovo细胞, 重新培养于SFM中, 仍可形成肿瘤细胞球($\times 100$).

细胞,其形态与原代相同(图3A),而单细胞则不具有这种功能,只能形成单细胞(图3B).

2.4 血清促使SP细胞分化 当SP细胞形成肿瘤球后,在SFM中滴加FBS,并隔日补充,24-48 h内肿瘤球无明显变化,单细胞黏附生长明显(图4A),72 h肿瘤球开始变小,单细胞增多,第5天时肿瘤球开始裂解成多个小细胞团(图4B),7 d左右时

肿瘤球消失,均为单细胞,且多为黏附生长(图4C).

2.5 Lovo在SSM和SFM两种培养基中交替转化 将上述方法获得的肿瘤球重铺于SSM中,12 h内细胞贴壁,细胞平贴培养板底(图5A),24 h左右细胞数量增多并形成小片状细胞岛(图5B),48 h后细胞岛扩大,并开始与邻近的细胞岛融合,并

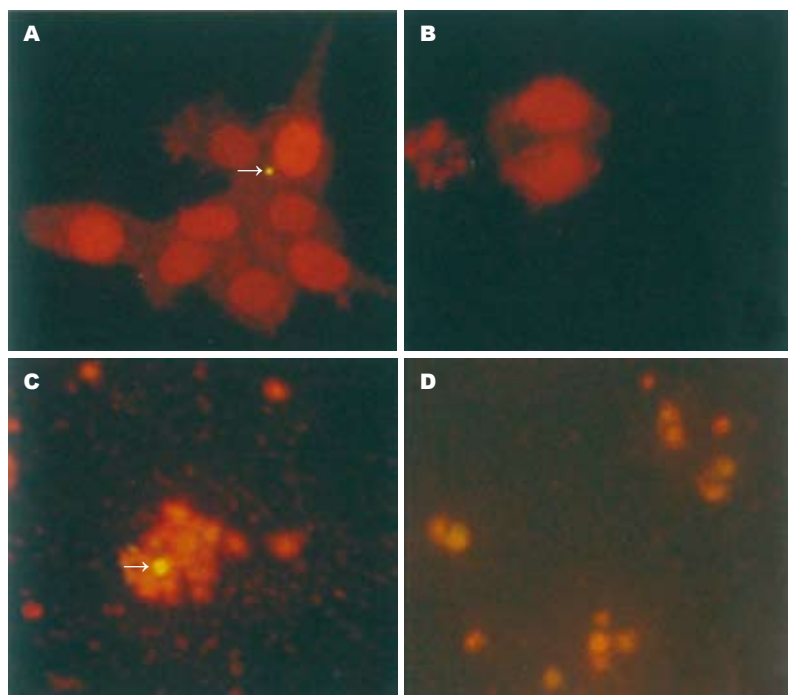


图 6 SP细胞Musashi-1染色结果($\times 400$)。A: Lovo细胞在SSM中培养24 h后, 只有极少量的细胞表达Musashi-1, 细胞核较圆, 并且比较小; B: Lovo细胞在SSM中培养24 h后, Musashi-1阴性的肿瘤细胞核呈长椭圆形, 核较大; C: Lovo中SP细胞在SFM中培养形成的肿瘤球表达Musashi-1; D: SP细胞分化培养7 d后, Musashi-1呈阴性表达。

■名词解释

肿瘤干细胞: 肿瘤细胞中仅有极少数的细胞具有成瘤潜能, 他们数量虽少, 但具有干细胞特征, 可无限增殖, 并可以不对称分裂。他们在肿瘤的形成和生长过程中起到了决定性作用。

逐渐形成单层的Lovo细胞层, 显微镜下与传统培养形成的单细胞层无明显差异(图5C)。消化单层Lovo细胞, 重新培养于SFM中, 仍可形成肿瘤细胞球, 其形态与原代相同(图5D)。

2.6 SP细胞Musashi-1染色 我们首先对SSM培养下的Lovo细胞进行染色, 我们发现在Lovo中只有极少量的细胞表达Musashi-1, 细胞核较圆, 并且比较小(图6A), 而Musashi-1阴性的肿瘤细胞核呈长椭圆形, 核较大(图6B)。SP细胞形成的肿瘤细胞球表达Musashi-1(图6C), 而SP细胞经分化7 d后则不表达(图6D)。

3 讨论

SP细胞的分离最初主要应用于鉴定造血干细胞, 并且通常认为在不同的组织和器官中均富含干细胞^[15-16]。目前认为在癌细胞中也存在着干细胞样肿瘤细胞, 富含于SP细胞中^[17-18]。Haraguchi *et al*^[19]指出, 在不同的胃肠道癌症细胞系中鉴定出含有0.3%-2.2%的SP细胞, 在干细胞培养基中一般呈悬浮的肿瘤球样生长。在国内, 我们首次把Lovo细胞系培养于干细胞培养基中, 分离呈悬浮肿瘤球生长的SP细胞, 利用有限稀释试验计算出SP细胞大约占0.54%-0.62%, 并进一步通过自我更新、分化能力、交替生长和Musashi-1免疫化学染色试验来鉴定其是否具有干细胞特性。

为了有效的分离SP细胞, 我们首先优化配制肿瘤干细胞培养基。无血清培养基能够使胚

胎干细胞处于未分化状态, 有助于培养人类胚胎干细胞^[20]。在SFM中额外加入bFGF和EGF能够诱导神经干细胞的多能增殖、自我更新和扩张^[21-22]。Kondo *et al*^[7]指出了胶质瘤C6 SP细胞生长在加有bFGF和PDGF的无血清培养液中, 10 d以后呈现悬浮和神经样细胞集落生长现象; 并进一步说明了bFGF能够维持C6 SP细胞的生长和扩增, 但是PDGF刺激这些细胞进行增殖。Haraguchi *et al*^[19]指出在加有bFGF和EGF的无血清培养基中额外加入LIF能够有效的扩增HuH7 SP细胞。通过论证, 我们在无血清培养基中加入EGF, bFGF和LIF, 可以有效的从Lovo中培养分离呈悬浮细胞球样生长的SP细胞。

Singh *et al*^[23]通过原代培养分离出的SP细胞具有快速增殖和自我更新的能力, 并论证了SP细胞在无血清培养基中呈悬浮球样生长, 并且随着时间的延长, SP所占的比例增加。本实验Lovo中的SP细胞具有以下特征: 在SFM中呈悬浮样生长, 并能形成克隆性的细胞球-肿瘤干细胞球, 并能连续传代; 随着时间的延长, 其肿瘤细胞球的数量增加, 体积增大, 体现出SP细胞的快速增殖性; SP形成的肿瘤细胞球制备成单细胞后仍可以形成肿瘤细胞球, 但是N-SP不具有这样的能力。Lovo细胞能够在传统的含血清培养基中长期培养, 也能在无血清培养基中长期增殖、传代, 使细胞系得以长期维持; 并且观察到随着培养基和培养方式的更换, 能在悬浮的肿瘤细胞球和贴壁的单细胞层之间转换。这样,

■同行评价

本文进行了大肠癌细胞系Lovo中亚群(SP)细胞的分离培养和鉴定,内容新颖,结果可信,有较高的科学价值。

我们可以根据需要进行培养。

Musashi-1是种RNA连接蛋白,可以标记增殖神经祖细胞包括中枢神经系统的干细胞^[24]。Musashi-1通过抑制特异的mRNAs转录来维持干细胞状态、分化和肿瘤发生,在哺乳动物中,Musashi-1则主要是通过抑制m-Numb激活Notch信号^[25]。目前,越来越多的证据显示Musashi-1可以作为肠道干细胞的标记^[26-29]。朱永良 *et al*^[30]从人胚胎中分离正常大肠干细胞,用RT-PCR检测示该细胞株表达Musashi-1 mRNA,存在非对称性有丝分裂。在本实验里,我们发现,在SFM培养的细胞中,并非所有的细胞球均染色阳性,这种细胞球可能为细胞黏附团,也可能是肿瘤细胞球并非均含有肿瘤干细胞;部分悬浮的单个细胞染色也可阳性,这可能是由于肿瘤干细胞正处于不同的生长周期,也可能说明了SP细胞中富含干细胞,但并不是唯一所在^[31]。但是,在SFM中额外加入FBS后,可以促使单细胞黏附,肿瘤细胞球逐渐分裂、变小,直至最后变为没有增殖、分化以及自我更新能力的N-SP细胞,其Musashi-1染色阴性。这与Tomita *et al*^[32]观察结果相似。

总之,我们通过形态、分化、自我更新、交替培养和细胞化学染色试验说明了Lovo细胞系中含有少量的能够在无血清培养基中存活、增殖,自我更新并呈悬浮肿瘤细胞球生长以及Musashi-1阳性的SP细胞。我们应该进一步纯化SP细胞,以便更好的研究癌症干细胞的特性。

4 参考文献

- 1 Wulf GG, Wang RY, Kuehnle I, Weidner D, Marini F, Brenner MK, Andreeff M, Goodell MA. A leukemic stem cell with intrinsic drug efflux capacity in acute myeloid leukemia. *Blood* 2001; 98: 1166-1173
- 2 Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 1997; 3: 730-737
- 3 Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 3983-3988
- 4 Yasuda A, Sawai H, Takahashi H, Ochi N, Matsuo Y, Funahashi H, Sato M, Okada Y, Takeyama H, Manabe T. The stem cell factor/c-kit receptor pathway enhances proliferation and invasion of pancreatic cancer cells. *Mol Cancer* 2006; 5: 46
- 5 Prince ME, Sivanandan R, Kaczorowski A, Wolf GT, Kaplan MJ, Dalerba P, Weissman IL, Clarke MF, Ailles LE. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 973-978
- 6 颜政, 方驰华. 人肝细胞癌细胞亚群的克隆分离及异

质性机制的初步研究. 世界华人消化杂志 2006; 14: 481-485

- 7 Kondo T, Setoguchi T, Taga T. Persistence of a small subpopulation of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 781-786
- 8 Hirschmann-Jax C, Foster AE, Wulf GG, Nuchtern JG, Jax TW, Gobel U, Goodell MA, Brenner MK. A distinct "side population" of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 14228-14233
- 9 Hemmati HD, Nakano I, Lazareff JA, Masterman-Smith M, Geschwind DH, Bronner-Fraser M, Kornblum HI. Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 15178-15183
- 10 Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, Henkelman RM, Cusimano MD, Dirks PB. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 2004; 432: 396-401
- 11 Pardoll R, Clarke MF, Morrison SJ. Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 895-902
- 12 Beachy PA, Karhadkar SS, Berman DM. Tissue repair and stem cell renewal in carcinogenesis. *Nature* 2004; 432: 324-331
- 13 Bellows CG, Aubin JE. Determination of numbers of osteoprogenitors present in isolated fetal rat calvaria cells *in vitro*. *Dev Biol* 1989; 133: 8-13
- 14 Tropepe V, Sibilia M, Ciruna BG, Rossant J, Wagner EF, van der Kooy D. Distinct neural stem cells proliferate in response to EGF and FGF in the developing mouse telencephalon. *Dev Biol* 1999; 208: 166-188
- 15 Goodell MA, Brose K, Paradis G, Conner AS, Mulligan RC. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating *in vivo*. *J Exp Med* 1996; 183: 1797-1806
- 16 Shimano K, Satake M, Okaya A, Kitanaka J, Kitanaka N, Takemura M, Sakagami M, Terada N, Tsujimura T. Hepatic oval cells have the side population phenotype defined by expression of ATP-binding cassette transporter ABCG2/BCRP1. *Am J Pathol* 2003; 163: 3-9
- 17 Falciatori I, Borsellino G, Haliassos N, Boitani C, Corallini S, Battistini L, Bernardi G, Stefanini M, Vicini E. Identification and enrichment of spermatogonial stem cells displaying side-population phenotype in immature mouse testis. *FASEB J* 2004; 18: 376-378
- 18 Hadnagy A, Gaboury L, Beaulieu R, Balicki D. SP analysis may be used to identify cancer stem cell populations. *Exp Cell Res* 2006; 312: 3701-3710
- 19 Haraguchi N, Utsunomiya T, Inoue H, Tanaka F, Mimori K, Barnard GF, Mori M. Characterization of a side population of cancer cells from human gastrointestinal system. *Stem Cells* 2006; 24: 506-513
- 20 Hong-mei P, Gui-an C. Serum-free medium cultivation to improve efficacy in establishment of human embryonic stem cell lines. *Hum Reprod* 2006; 21: 217-222
- 21 Reynolds BA, Weiss S. Clonal and population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell. *Dev Biol* 1996; 175: 1-13
- 22 Reynolds BA, Tetzlaff W, Weiss S. A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell

- produces neurons and astrocytes. *J Neurosci* 1992; 12: 4565-4574
- 23 Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, Dirks PB. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* 2003; 63: 5821-5828
- 24 Sakakibara S, Okano H. Expression of neural RNA-binding proteins in the postnatal CNS: implications of their roles in neuronal and glial cell development. *J Neurosci* 1997; 17: 8300-8312
- 25 Okano H, Imai T, Okabe M. Musashi: a translational regulator of cell fate. *J Cell Sci* 2002; 115: 1355-1359
- 26 Dekaney CM, Rodriguez JM, Graul MC, Henning SJ. Isolation and characterization of a putative intestinal stem cell fraction from mouse jejunum. *Gastroenterology* 2005; 129: 1567-1580
- 27 Nishimura S, Wakabayashi N, Toyoda K, Kashima K, Mitsufuji S. Expression of Musashi-1 in human normal colon crypt cells: a possible stem cell marker of human colon epithelium. *Dig Dis Sci* 2003; 48: 1523-1529
- 28 Booth C, Potten CS. Gut instincts: thoughts on intestinal epithelial stem cells. *J Clin Invest* 2000; 105: 1493-1499
- 29 Potten CS, Booth C, Tudor GL, Booth D, Brady G, Hurley P, Ashton G, Clarke R, Sakakibara S, Okano H. Identification of a putative intestinal stem cell and early lineage marker; musashi-1. *Differentiation* 2003; 71: 28-41
- 30 朱永良, 钟献, 郑树. 正常大肠干细胞的条件永生性. *浙江大学学报(医学版)* 2004; 33: 379-384
- 31 Mitsutake N, Iwao A, Nagai K, Namba H, Ohtsuru A, Saenko V, Yamashita S. Characterization of side population in thyroid cancer cell lines: cancer stem-like cells are enriched partly but not exclusively. *Endocrinology* 2007
- 32 Tomita Y, Matsumura K, Wakamatsu Y, Matsuzaki Y, Shibuya I, Kawaguchi H, Ieda M, Kanakubo S, Shimazaki T, Ogawa S, Osumi N, Okano H, Fukuda K. Cardiac neural crest cells contribute to the dormant multipotent stem cell in the mammalian heart. *J Cell Biol* 2005; 170: 1135-1146

电编 张敏 编辑 王晓瑜

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

2007 年协和肝脏外科新技术学习班通知

本刊讯 为了提高我国肝脏外科学临床与研究水平, 学习该领域国际先进技术和理念, 促进学术交流和学科发展, 由洛克菲勒基金会设立的CMB基金会资助, 中国医学科学院、中国协和医科大学、北京协和医院主办, 天津第一中心医院东方器官移植中心、中山大学第一附属医院器官移植中心协办, 中国医学科学院国际会议中心承办的“07年协和肝脏外科新技术学习班”将于2007-04下旬在北京市中国协和医科大学新科研教学楼举行。

培训班将邀请国内外肝脏外科领域著名专家黄洁夫教授、钟守先教授、芝加哥大学移植中心主任Michael Millis教授、瑞典Lund 大学肝外科主任Bengt Jeppsson教授、香港范上达教授、冷希圣教授、叶胜龙教授、沈中阳教授、何晓顺教授、朱继业教授、戴朝六教授等任教。培训班除邀请国内知名专家作专题学术讲座外, 还有机会在天津第一中心医院东方器官移植中心进行临床肝移植的学习和观摩; 本培训班的另一个特点是参加培训的学员有申请CMB基金会合作课题并得到适当的基金资助的机会; 培训班将给予国家级继续教育学分10分。我们真诚欢迎各位肝脏外科领域的同仁参加培训班, 共同促进和加强肝脏外科学的学术交流与合作, 推动我国肝脏外科学的发展。

收费标准: 培训费680元/人(含材料费和讲课费, 食宿自理)

通讯地址: 北京东城区东单三条9号中国医学科学院/中国协和医科大学国际合作处 邮编: 100730 联系人: 乔楠、蒋育红 电话: 010-65105934, 65105935, 65253447 传真: 010-65124876 E-mail: jiangyuhong@yzjg.pumc.edu.cn; dakuansun@yahoo.com.cn.

终末期肝病模型对失代偿期肝硬化患者预后的回顾性分析

吕晓辉, 刘红波, 宋敏, 王炳元

■背景资料

终末期肝病模型(MELD)是2000年由美国Mayo Clinic的Malinchoc和Kamath提出的一个新的评分模型,最初是用来判断肝硬化患者经颈静脉肝内门腔吻合术(TIPS)的短期预后。MELD以血清胆红素、肌酐和凝血酶原时间国际标准化比值等3个指标为主要依据,因其客观性强、重复性好等特点而逐渐引起大家的重视。

■研发前沿

如何正确评价MELD在终末期肝病预后判断中的作用及地位,已成为目前国际上广泛关注的热点问题。MELD是否能取代Child-Pugh分级在肝病中的作用尚需要进一步研究。

吕晓辉, 王炳元, 中国医科大学附属第一医院消化内科 辽宁省沈阳市 110001
刘红波, 中国医科大学统计学教研室 辽宁省沈阳市 110001
宋敏, 中国医科大学病理学教研室 辽宁省沈阳市 110001
国家“十五”科技攻关课题, No. 20003BA753C
通讯作者: 宋敏, 110001, 辽宁省沈阳市和平区北二马路92号, 中国医科大学病理学教研室. songmin@163.com
电话: 024-83282199
收稿日期: 2007-01-04 接受日期: 2007-01-20

Prognosis analysis of patients with decompensated liver cirrhosis using the model of end-stage liver disease

Xiao-Hui Lv, Hong-Bo Liu, Min Song, Bing-Yuan Wang

Xiao-hui Lv, Bing-Yuan Wang, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China
Hong-Bo Liu, Department of Health Statistics, China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China
Min Song, Department of Pathology, China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China
Supported by the National Medical Science and Technology Foundation during the 10th Five-Year Plan Period, No. 20003BA753C

Correspondence to: Min Song, Department of Pathology, China Medical University, 92 Bei'er Road, Heping District, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. songmin@163.com
Received: 2007-01-04 Accepted: 2007-01-20

Abstract

AIM: To compare the capability of the model for end-stage liver disease (MELD) and Child-Turcotte-Pugh (CTP) in predicting the prognosis of patients with decompensated liver cirrhosis (DLC) using receiver operating characteristic (ROC) curve.

METHODS: The data of 171 DLC patients were analyzed with a cohort method. The patients were graded with MELD formula into 4 (MELD ≤ 9 , $10 \leq \text{MELD} \leq 19$, $20 \leq \text{MELD} \leq 29$, MELD ≥ 30) and 3 (A, B and C) groups, respectively. The death rate was observed within 1 month and 3 months in different groups. The predictive accuracy of the two systems was evaluated by ROC curve.

RESULTS: The mortality rates of patients with

MELD ≤ 9 , $10 \leq \text{MELD} \leq 19$, $20 \leq \text{MELD} \leq 29$ and MELD ≥ 30 were 10.6%, 23.9%, 68.0% and 75.0% within 1 month respectively, and 10.6%, 28.4%, 80.0% and 84.4% within 3 months respectively. While the mortality rates of patients with Child-Pugh A, B and C were 9.7%, 21.1% and 44.9% within 1 month respectively, and 9.7%, 23.9% and 52.2% within 3 months respectively. When MELD was used to predict the mortality within 1 and 3 months, the values of area under the curve (AUC) were 0.832 and 0.844, respectively, higher than those as CTP was used (0.768 and 0.772).

CONCLUSION: Both MELD and Child-Pugh scores can predict the short-term prognosis of DLC patients, but the predictive capability of MELD system is better than that of CTP systems.

Key Words: Liver cirrhosis; Prognosis; Model for end-stage liver disease; Child-Pugh; Receiver operating characteristic curve

Lv XH, Liu HB, Song M, Wang BY. Prognosis analysis of patients with decompensated liver cirrhosis using the model of end-stage liver disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(9):960-963

摘要

目的: 应用受试者运行曲线(ROC)比较终末期肝病模型(MELD)及Child-Pugh分级(CTP)对失代偿期肝硬化患者短期生存率的预测能力。

方法: 对171例住院的失代偿期肝硬化患者进行回顾性分析,按MELD模型及Child-Pugh分级评分。根据MELD分值分为4组(MELD ≤ 9 , $10 \leq \text{MELD} \leq 19$, $20 \leq \text{MELD} \leq 29$, MELD ≥ 30), Child-Pugh分级分成A级、B级及C级3组,计算各组患者1 mo及3 mo的死亡率;应用ROC曲线评价每一预测模型对于失代偿期肝硬化患者短期生存率的预测结果。

结果: MELD ≤ 9 , $10 \leq \text{MELD} \leq 19$, $20 \leq \text{MELD} \leq 29$, MELD ≥ 30 患者1 mo的死亡率分别为10.6%, 23.9%, 68.0%及75.0%, 3 mo的死亡率分别为10.6%, 28.4%, 80.0%及84.4%; Child-

Pugh A级, B级及C级1 mo的死亡率分别为9.7%, 21.1%及44.9%, 3 mo死亡率分别为9.7%, 23.9%及52.2%; MELD分值能够预测失代偿期肝硬化患者短期生存率(ROC曲线下面积1 mo及3 mo分别为0.832和0.844), 优于Child-Pugh分级(ROC曲线下面积1 mo及3 mo分别为0.768和0.772).

结论: MELD模型及Child-Pugh分级能够预测失代偿期肝硬化患者短期生存率, 而且MELD模型的预测能力优于Child-Pugh分级.

关键词: 肝硬化; 预后; 终末期肝病模型; Child-Pugh分级; ROC曲线

吕晓辉, 刘红波, 宋敏, 王炳元. 终末期肝病模型对失代偿期肝硬化患者预后的回顾性分析. 世界华人消化杂志 2007;15(9):960-963

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/960.asp>

0 引言

如何评估失代偿期肝硬化患者的病情严重程度, 众多学者对其提出了评价方法, 但不同方法对疾病预后的预测能力尚有争议. 终末期肝病模型(modle for end-stage liver disease, MELD)及Child-Pugh分级(CTP)预测系统是目前国际上广泛用于评价肝病严重程度及预后的预测模型^[1-3]. CTP是临床常用的评价肝硬化患者肝功能储备以及预后的一项指标, 但是存在很多局限性. 2000年Malinchoc *et al*^[4]通过研究肝硬化患者经颈静脉肝内门腔吻合术(TIPS)的短期预后, 创立了一个判断此类患者短期预后的新的评分模型. 2001年Kamath *et al*^[5]对其进行改进, 称为MELD. 研究表明MELD可以评估肝硬化患者TIPS术的短期预后^[4,6], 但其对失代偿期肝硬化患者短期预后的报道国内甚少. 我们旨在应用ROC曲线分析MELD模型及CTP对失代偿期肝硬化患者短期预后的评估能力.

1 材料和方法

1.1 材料 回顾性收集我院2002-2004住院的具有完整资料的失代偿期肝硬化患者171例, 男144例, 女27例, 年龄30-60岁. 诊断依据为符合2000年病毒性肝炎防治方案^[7]. 其中乙型肝炎145例, 酒精性肝病24例, 自身免疫性肝病2例.

1.2 方法 收集患者住院后的首次实验室检查指标, 包括白蛋白、总胆红素、肌酐、凝血酶原时间、凝血酶原时间国际标准化比值(INR). 判

表 1 肝硬化失代偿期患者MELD分值与1 mo及3 mo病死率比较

分组	n	1 mo病死率(%)	3 mo病死率(%)
MELD≤9	47	10.6 ^{a,g}	10.6 ^{c,e,g}
10≤MELD≤19	67	23.9 ^{a,g}	28.4 ^{e,g}
20≤MELD≤29	25	68.0 ^{a,c}	80.0 ^{a,c}
MELD≥30	32	75.0 ^{a,c}	84.4 ^{a,c}

^a*P*<0.05 vs MELD≤9; ^c*P*<0.05 vs 10≤MELD≤19; ^e*P*<0.05 vs 20≤MELD≤29; ^g*P*<0.05 vs MELD≥30.

表 2 肝硬化失代偿期患者CTP分级与1 mo及3 mo病死率比较

分组	n	1 mo病死率(%)	3 mo病死率(%)
A	31	9.7 ^e	9.7 ^e
B	71	21.1 ^e	23.9 ^e
C	69	44.9 ^{a,c}	52.2 ^{a,c}

^a*P*<0.05 vs A级; ^c*P*<0.05 vs B级; ^e*P*<0.05 vs C级.

断其入院时的腹水及肝性脑病情况, 同时了解其1 mo及3 mo预后情况. MELD评分及CTP: MELD计算公式^[2,8-9]: MELD分值 = $3.8 \times \log_e[\text{胆红素(mg/dL)}] + 11.2 \times \log_e(\text{INR}) + 9.6 \times \log_e[\text{肌酐(mg/dL)}] + 6.4 \times (\text{病因: 胆汁性或酒精性为0; 其他为1})$. CTP参照文献^[10].

统计学处理 应用SPSS13.0统计软件进行 χ^2 检验. 应用ROC曲线评价两种评分方法的预测能力. 根据ROC曲线的敏感性和特异性决定CTP及MELD模型对失代偿期肝硬化患者短期生存率预测的最佳临界值. *P*<0.05认为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 MELD评分结果及与患者短期预后的关系 按照MELD模型公式对患者进行评分, 计算后发现患者的MELD分值平均为13.43±10.01. 根据MELD分值不同分为4组: MELD≤9, 10≤MELD≤19, 20≤MELD≤29及MELD≥30. 其中MELD≤9分者47例, 占27.5%(47/171); 10-19分者67例, 占39.2%(67/171); 20-29分者25例, 占14.6%(25/171); 30分以上者32例, 占18.7%(32/171).

MELD不同分值的四组肝硬化失代偿期患者1 mo的病死率分别为10.6%, 23.9%, 68.0%和75.0%, 四组比较 $\chi^2 = 49.47$, *P*<0.0005, 差异有

■ 相关报道

Botta *et al*认为MELD评分是评价欧洲肝硬化患者短期和中期存活率较好的方法, 他至少与Child-Pugh评分一样好. 但也有一部分研究则认为MELD的这种优势并不明显. 而且MELD建立的数据来源于国外的肝硬化患者, 国外肝硬化病因以酒精性及丙型肝炎为主, 国内肝硬化病因则以乙型肝炎为主, 因此其是否适用于我国肝硬化患者仍有待大量临床病例去证明.

■ 创新盘点

本文回顾性分析了171例失代偿期肝硬化患者的临床资料, 应用ROC曲线比较了MELD评分及Child-Pugh分级评估失代偿期肝硬化患者短期预后的能力, 并充分分析了MELD优于Child-Pugh分级的原因, 具有重要的临床指导意义.

■名词解释

ROC曲线: 是以假阳性率(1-特异性)为横坐标, 敏感性为纵坐标, 依照连续变化的诊断阈值, 由不同灵敏度和特异度绘制曲线, 用于二分类判别效果的评价。其AUC越大, 诊断的准确性越高。

表 3 MELD及CTP评价患者生存1 mo及3 mo的ROC分析

	1 mo					3 mo				
	敏感性(%)	特异性(%)	最佳临界值	AUC	95%CI	敏感性(%)	特异性(%)	最佳临界值	AUC	95%CI
MELD	78	82	17	0.832	0.765-0.898	82	87	18	0.844	0.779-0.909
CTP	83	51	9	0.768	0.687-0.849	65	71	9	0.772	0.689-0.855

统计学意义。各组两两比较, MELD \leq 9分組和10-19分組分别与20-29分組和 \geq 30分組差异有统计学意义(表1)。MELD不同分值的肝硬化失代偿期患者3 mo的病死率分别为10.6%, 28.4%, 80.0%和83.0%, 四组之间比较 $\chi^2 = 62.69$, $P < 0.01$, 差异有统计学意义。各组两两比较, 除20-29分組和 \geq 30分組差异无统计学意义外, 其余各组差异均有统计学意义(表1)。说明肝硬化失代偿期患者1 mo及3 mo病死率与MELD分值有关。

2.2 CTP评分结果及与患者短期预后的关系 按照CTP对患者进行评分, 患者的分值平均为 8.92 ± 2.21 , 其中A级患者31例, 占18.1% (31/171); B级患者71例, 占41.5% (71/171); C级患者69例, 占40.4%。

CTP分级A级、B级及C级患者1 mo病死率分别为9.7%, 21.1%及44.9%, CTP评分三组之间比较 $\chi^2 = 16.37$, $P < 0.01$, 差异有统计学意义。三组之间两两比较, A级及B级分别与C级相比差异有统计学意义(表2)。CTP分级A级、B级及C级患者3 mo病死率分别为9.7%, 23.9%及52.2%, CTP评分三组之间比较 $\chi^2 = 21.81$, $P < 0.01$, 差异有统计学意义。三组之间两两比较, A级及B级分别与C级相比差异有统计学意义(表2)。说明肝硬化失代偿期患者3 mo病死率与CTP分值有关。

2.3 应用ROC曲线比较MELD, CTP系统的预测能力 应用ROC曲线分析MELD及CTP系统预测失代偿期肝硬化患者1 mo及3 mo内的病死率(图1)。患者入院时MELD分值能够非常好的预测失代偿期肝硬化患者1 mo及3 mo内的病死率, 曲线下面积(AUC)分别为0.832(95%CI: 0.765-0.898)及0.844(95%CI: 0.779-0.909)。CTP系统的AUC分别为0.768(95%CI: 0.687-0.849)及0.772(95%CI: 0.689-0.855)。表3显示了各预测系统评估患者1 mo及3 mo病死率的敏感性、特异性、最佳临界值、AUC及95%CI。

3 讨论

人们对失代偿期肝硬化患者预后评价方法的评价结果一直存在争议。Child和Turcotte于1964年

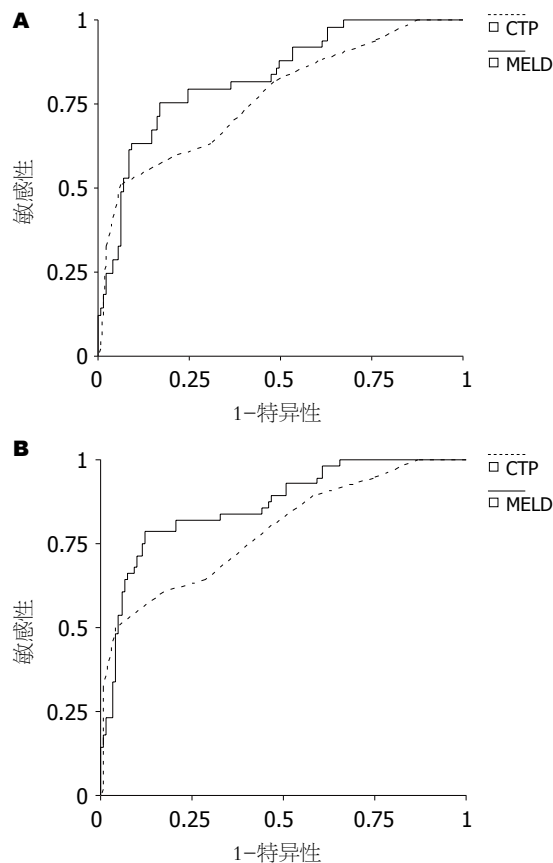


图 1 MELD及CTP的ROC曲线。A: 1 mo; B: 3 mo。

提出了Child Turcotte分级, 1972年Pugh对其修改而形成CTP, 其是否可以准确预测肝硬化患者的预后说法不一。Kamath *et al*^[5]用CTP评价了失代偿期肝硬化患者3 mo的病死率, A级B级C级分别为4%, 14%, 51%, 说明他可以预测失代偿期肝硬化患者3 mo的病死率。然而CTP有其缺点, 如其评价指标肝性脑病及腹水评价的主观性强, 而且失代偿期肝硬化患者的一个重要并发症是肝肾综合征, CTP却未考虑肾功能。Malinchoc *et al*^[4]的研究也认为CTP结合肾功能检查可更准确预测肝硬化患者的短期生存率。

MELD模型最早是出于对器官移植优先选择权的考虑而提出的。Kamath *et al*^[5]对终末期肝病患者的研究显示, 终末期肝病住院患者3 mo病死率为: MELD评分9者为4%, 10-19分者为

27%, 20-29分者为76%, 30-39分者为83%, 40分者为100%。Wiesner *et al*^[11]发现, 未行肝移植的肝硬化患者中, MELD评分>18分者, 3 mo后病死率为29%, 而MELD评分<18分者, 登记3 mo后病死率为6%, 两者差异有显著性。Merion *et al*^[12]对终末期肝病进行回顾性分析, 发现在30 d内MELD分值增加超过5的患者, 其死亡风险就会比MELD分值逐渐增加的患者高3倍。Wiesner *et al*^[13]对终末期肝衰竭患者进行了前瞻性的研究, 发现患者3 mo死亡率与MELD分值高低有直接关系。

本研究回顾性分析了171例失代偿期肝硬化患者1 mo及3 mo的短期预后, 应用MELD评分及CTP对其预后进行评估。结果表明, 随着CTP A, B, C级的增加患者1 mo及3 mo的病死率逐渐增加。人为将MELD评分分为四组(MELD≤9分、10-19分、20-29分、>30分)可见随着MELD分值的增加患者1 mo及3 mo病死率逐渐增加。表明MELD评分及CTP分级可以预测失代偿期肝硬化患者的短期预后。但是究竟哪一种方法更准确呢?

Botta *et al*^[14]评估了129例肝硬化患者的生存率, 计算每例患者的MELD与CTP。他认为, MELD评分是评价欧洲肝硬化患者短期和中期存活率较好的方法, 他至少与CTP一样好。近来, Salerno *et al*^[15]亦证实预测患者TIPS术后3 mo病死率方面, MELD评分明显优于CTP。但是MELD评分在预测我国失代偿期肝硬化患者短期预后方面是否也优于CTP呢? 于是我们进一步应用ROC曲线分析发现, MELD ROC曲线下的面积(AUC) 1 mo及3 mo分别为0.832及0.844, 而CTP分级为是0.768及0.722, 因此认为MELD预测失代偿期肝硬化患者短期预后的能力优于CTP。这可能与以下因素有关: (1)MELD模型充分考虑了肾功能这一肝硬化重要的预后因子; (2) MELD分值是连续的, 能更好地区别病情的轻重; (3)MELD模型中指标更客观, 无腹水、肝性脑病等主观性指标; (4)MELD模型考虑了不同病因对疾病预后的影响。

总之, 本研究表明MELD评分可以预测失代偿期肝硬化患者的短期预后, 并且其预测结果优于CTP。

4 参考文献

1 Chan HL, Chim AM, Lau JT, Hui AY, Wong

- VW, Sung JJ. Evaluation of model for end-stage liver disease for prediction of mortality in decompensated chronic hepatitis B. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 1516-1523
- 2 Dunn W, Jamil LH, Brown LS, Wiesner RH, Kim WR, Menon KV, Malinchoc M, Kamath PS, Shah V. MELD accurately predicts mortality in patients with alcoholic hepatitis. *Hepatology* 2005; 41: 353-358
- 3 Forman LM, Lucey MR. Predicting the prognosis of chronic liver disease: an evolution from child to MELD. *Mayo End-stage Liver Disease. Hepatology* 2001; 33: 473-475
- 4 Malinchoc M, Kamath PS, Gordon FD, Peine CJ, Rank J, ter Borg PC. A model to predict poor survival in patients undergoing transjugular intrahepatic portosystemic shunts. *Hepatology* 2000; 31: 864-871
- 5 Kamath PS, Wiesner RH, Malinchoc M, Kremers W, Therneau TM, Kosberg CL, D'Amico G, Dickson ER, Kim WR. A model to predict survival in patients with end-stage liver disease. *Hepatology* 2001; 33: 464-470
- 6 张铁英, 赵金满, 施贵静. 肝硬化患者肝储备功能对TIPS术后近期疗效的影响. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 415-418
- 7 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会. 病毒性肝炎防治方案. *中华肝脏病杂志* 2000; 8: 324-329
- 8 Weng ZH, Cai SQ. Analysis of prognosis on patients with severe viral hepatitis using the model for end-stage liver disease. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 899-902
- 9 Papatheodoridis GV, Cholongitas E, Dimitriadou E, Touloumi G, Sevastianos V, Archimandritis AJ. MELD vs Child-Pugh and creatinine-modified Child-Pugh score for predicting survival in patients with decompensated cirrhosis. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 3099-3104
- 10 陈灏珠. 实用内科学. 第10版. 北京: 人民卫生出版社, 1997: 1673-1689
- 11 Wiesner RH, McDiarmid SV, Kamath PS, Edwards EB, Malinchoc M, Kremers WK, Krom RA, Kim WR. MELD and PELD: application of survival models to liver allocation. *Liver Transpl* 2001; 7: 567-580
- 12 Merion RM, Wolfe RA, Dykstra DM, Leichtman AB, Gillespie B, Held PJ. Longitudinal assessment of mortality risk among candidates for liver transplantation. *Liver Transpl* 2003; 9: 12-18
- 13 Wiesner R, Edwards E, Freeman R, Harper A, Kim R, Kamath P, Kremers W, Lake J, Howard T, Merion RM, Wolfe RA, Krom R. Model for end-stage liver disease (MELD) and allocation of donor livers. *Gastroenterology* 2003; 124: 91-96
- 14 Botta F, Giannini E, Romagnoli P, Fasoli A, Malfatti F, Chiarbonello B, Testa E, Risso D, Colla G, Testa R. MELD scoring system is useful for predicting prognosis in patients with liver cirrhosis and is correlated with residual liver function: a European study. *Gut* 2003; 52: 134-139
- 15 Salerno F, Merli M, Cazzaniga M, Valeriano V, Rossi P, Lovaria A, Mereaglia D, Nicolini A, Lubatti L, Riggio O. MELD score is better than Child-Pugh score in predicting 3-month survival of patients undergoing transjugular intrahepatic portosystemic shunt. *J Hepatol* 2002; 36: 494-500

■同行评价

文章仿照国外研究方法, 回顾分析了171例肝硬化失代偿患者的短期预后, 得出了较明确的结论, 具有可读性和一定的临床参考价值。

电编 张敏 编辑 王晓瑜

幽门螺杆菌与胃黏膜bFGF, FGFR-2表达的关系及意义

李信, 姜海行, 陈昱, 雷琳, 覃山羽

■背景资料

胃癌是人类最常见的恶性肿瘤, 其发生机制目前尚未明确。1994年, 世界卫生组织属下的国际癌肿研究机构就宣布了 *H pylori* 是人类胃癌的 I 类致癌原, 但 *H pylori* 致胃癌发生的确切作用机制至今尚未明了。bFGF 是一种肽类细胞生长因子, 属于成纤维细胞生长因子家族, 通过与相关受体的结合发挥促进细胞增殖、毛细血管形成、创伤修复等作用。

李信, 姜海行, 雷琳, 覃山羽, 广西医科大学第一附属医院消化内科 广西壮族自治区南宁市 530021

陈昱, 广西医科大学病理学教研室 广西壮族自治区南宁市 530021

李信, 硕士研究生, 主要从事幽门螺杆菌及胃癌发病机制的研究。

通讯作者: 姜海行, 530021, 广西壮族自治区南宁市双拥路22号, 广西医科大学第一附属医院消化内科。jihaxi@263.net
电话: 0771-5356501 传真: 0771-5354506

收稿日期: 2006-09-11 接受日期: 2007-01-04

Correlations of *Helicobacter pylori* infection with the expression of basic fibroblast growth factor and fibroblast growth factor receptor-2 in gastric mucosa and their significances

Xin Li, Hai-Xing Jiang, Gang Chen, Lin Lei, Shan-Yu Qin

Xin Li, Hai-Xing Jiang, Lin Lei, Shan-Yu Qin, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Gang Chen, Department of Pathology, Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Correspondence to: Dr. Hai-Xing Jiang, Department of Gastroenterology, the First affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. jihaxi@263.net

Received: 2006-09-11 Accepted: 2007-01-04

Abstract

AIM: To study the expression of basic fibroblast growth factor (bFGF) and fibroblast growth factor receptor-2 (FGFR-2) in gastric mucosal epithelia with *H pylori* infection and their significances in the carcinogenesis of stomach cancer.

METHODS: A total of 30 patients with chronic superficial gastritis (CGS), 29 with intestinal metaplasia (IM), 31 with dysplasia (Dys) and 55 with gastric cancer (GC) were included in this study. The expression of bFGF and FGFR-2 were assessed by immunohistochemistry (SP method). Rapid urease test and histological examination with Warthin-Starry were used to determine the

status of *H pylori* infection.

RESULTS: The expression of bFGF and FGFR-2 in CSG patients were significantly lower than those in the other patients (IM: $\chi^2 = 4.002$, $P < 0.05$; $\chi^2 = 4.163$, $P < 0.05$; Dys: $\chi^2 = 15.779$, $P = 0.000$; $\chi^2 = 15.949$, $P = 0.000$; GC: $\chi^2 = 24.110$, $P = 0.000$; $\chi^2 = 18.736$, $P = 0.000$). The expression of bFGF and FGFR-2 in IM patients were significantly lower than those in Dys and GC patients (Dys: $\chi^2 = 4.258$, $P < 0.05$; $\chi^2 = 4.212$, $P < 0.05$; GC: $\chi^2 = 7.786$, $P < 0.01$; $\chi^2 = 4.687$, $P < 0.05$). But there was no significant difference between Dys and GC patients. The positive rates of bFGF and FGFR-2 expression were significantly higher in *H pylori*-infected IM and Dys patients than those in the patients without *H pylori* infection (IM: $\chi^2 = 10.076$, $P < 0.01$; $\chi^2 = 7.535$, $P < 0.01$; Dys: $\chi^2 = 11.501$, $P < 0.01$; $\chi^2 = 8.330$, $P < 0.01$). The positive rates of bFGF and FGFR-2 expression in *H pylori*-infected Dys patients were significantly higher than those in GC group (bFGF: $\chi^2 = 4.201$, $P < 0.05$; FGFR-2: $\chi^2 = 3.982$, $P < 0.05$), while no significant difference was found between GC and IM patients. The expression of bFGF in Dys and IM patients without *H pylori* infection were significantly lower than that in GC patients (Dys: $\chi^2 = 5.736$, $P < 0.05$; IM: $\chi^2 = 17.113$, $P = 0.000$), and FGFR-2 expression in *H pylori*-negative IM patients was significant lower than that in GC patients ($\chi^2 = 11.091$, $P < 0.05$). No significant difference was found between *H pylori*-negative Dys and GC patients.

CONCLUSION: *H pylori* may induce over-expression of bFGF and FGFR-2 in gastric mucosal epithelia, which may play a vital role in the carcinogenesis of stomach cancer.

Key Words: *Helicobacter pylori*; Basic fibroblast growth factor; Fibroblast growth factor receptor-2; Gastric mucosal; Carcinogenesis; Immunohistochemistry

Li X, Jiang HX, Chen G, Lei L, Qin SY. Correlations of *Helicobacter pylori* infection with the expression of basic fibroblast growth factor and fibroblast growth factor receptor-2 in gastric mucosa and their significances. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(9):964-969

摘要

目的: 探讨幽门螺杆菌(*H pylori*)感染的胃黏膜上皮细胞碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、成纤维细胞生长因子受体-2(FGFR-2)的表达及其在胃黏膜癌变过程中的意义。

方法: 选择慢性浅表性胃炎(CSG) 30例、胃黏膜肠上皮化生(IM) 29例、不典型增生(Dys) 31例及胃癌(GC) 55例。采用免疫组化SP法检测胃黏膜上皮细胞bFGF, FGFR-2表达状况, 用快速尿素酶试验和组织学Warthin-Starry嗜银染色法联合检测胃黏膜*H pylori*感染情况。

结果: CSG组bFGF, FGFR-2的表达显著低于其余三组(IM组: $\chi^2 = 4.002, P < 0.05$; $\chi^2 = 4.163, P < 0.05$; Dys组: $\chi^2 = 15.779, P = 0.000$; $\chi^2 = 15.949, P = 0.000$; GC组: $\chi^2 = 24.110, P = 0.000$; $\chi^2 = 18.736, P = 0.000$), IM组的表达低于Dys组及GC组(Dys组: $\chi^2 = 4.258, P < 0.05$; $\chi^2 = 4.212, P < 0.05$; GC组: $\chi^2 = 7.786, P < 0.01$; $\chi^2 = 4.687, P < 0.05$), 而Dys组与GC组间无显著性差异。*H pylori*阳性IM及Dys组bFGF, FGFR-2的表达均显著高于阴性组(IM组: $\chi^2 = 10.076, P < 0.01$; $\chi^2 = 7.535, P < 0.01$; Dys组: $\chi^2 = 11.501, P < 0.01$; $\chi^2 = 8.330, P < 0.01$)。 *H pylori*阳性Dys组bFGF, FGFR-2表达显著高于GC组($\chi^2 = 4.201, P < 0.05$; $\chi^2 = 3.982, P < 0.05$), *H pylori*阳性IM组则与GC组的表达无显著性差异; *H pylori*阴性Dys组及IM组bFGF的表达均显著低于GC组($\chi^2 = 5.736, P < 0.05$; $\chi^2 = 17.113, P = 0.000$), *H pylori*阴性Dys组FGFR-2表达与GC组无显著性差异而IM组的FGFR-2的表达显著低于GC组($\chi^2 = 11.091, P < 0.05$)。

结论: *H pylori*感染引起胃黏膜上皮细胞bFGF及FGFR-2的过度表达可能与*H pylori*感染致胃黏膜上皮细胞的癌变有关。

关键词: 幽门螺杆菌; 碱性成纤维细胞生长因子; 成纤维细胞生长因子受体-2; 胃黏膜; 癌变; 免疫组织化学

李信, 姜海行, 陈罡, 雷琳, 覃山羽. 幽门螺杆菌与胃黏膜bFGF, FGFR-2表达的关系及意义. 世界华人消化杂志 2007;15(9):964-969
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/964.asp>

0 引言

胃癌(gastric carcinoma, GC)是人类最常见的恶性肿瘤之一, 据研究幽门螺杆菌(*H pylori*)与

GC发生、发展密切相关, 但其确切的作用机制至今尚未明了, 近年来细胞生长因子及其在*H pylori*致GC发生、发展过程中的作用是国内外研究的热点, 过量表达的细胞生长因子及其受体可能引起细胞增殖失控最终导致肿瘤的发生。我们通过观察*H pylori*感染的胃黏膜病变中碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)、成纤维细胞生长因子受体-2(fibroblast growth factor receptor-2, FGFR-2)表达的变化, 了解*H pylori*感染对胃黏膜上皮bFGF, FGFR-2表达的影响及其在胃黏膜癌变过程中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料 选择我院2001-2005手术切除或内镜活检的胃黏膜标本145例, 包括慢性浅表性胃炎(chronic superficial gastritis, CSG)30例, 胃黏膜肠上皮化生(intestinal metaplasia, IM)29例, 不典型增生(dysplasia, Dys)31例, GC 55例, 其中男82例, 女63例, 年龄19-84(48.97±13.88)岁。快速尿素酶试验试剂盒购于深圳市赛尔生物技术有限公司, Warthin-Starry嗜银染色试剂盒购于上海市仁宝医用试剂研究有限公司, bFGF兔抗人多克隆抗体及免疫组化SP试剂盒购于福州迈新生物技术有限公司, FGFR-2兔抗人多克隆抗体购于武汉博士德生物工程有限公司。

1.2 方法

1.2.1 *H pylori*感染的检测及评定 采用快速尿素酶试验和组织切片Warthin-Starry嗜银染色法联合检测。两项结果均为阳性者判定为*H pylori*感染阳性, 均阴性者判定为*H pylori*感染阴性。

1.2.2 bFGF, FGFR-2检测 采用免疫组化SP法。参照试剂盒说明书进行。以PBS代替一抗作为阴性对照, 分别以已知的bFGF, FGFR-2表达阳性的GC组织为阳性对照。bFGF, FGFR-2均以细胞质中出现棕黄色颗粒为阳性显色, 以染色强度和阳性细胞比例评定阳性表达: CSG, IM和Dys组的切片在显微镜下随机选取10个高倍视野, 每个视野计数100个胃黏膜上皮细胞, GC组每张切片在诊断确实的GC组织中随机选取10个高倍视野, 每个视野计数100个肿瘤细胞。染色强度分级: 无着色为0, 淡棕黄色为1, 棕黄色及更深颜色为2; 阳性细胞数分级: 阳性细胞数≤50%为0, 51%-75%为1, ≥76%为2。两项得分相加结果大于2为阳性表达病例^[1]。

统计学处理 采用SPSS13.0统计学分析

■ 研发前沿

胃黏膜上皮细胞PCNA的表达在*H pylori*感染时升高, 且在CSG, IM, Dys及GC组中逐渐增强, *H pylori*感染可能通过诱导胃黏膜上皮细胞过度增殖, 最终导致胃黏膜细胞增殖失去调控诱发GC, 近年来细胞生长因子的过度表达在*H pylori*致胃癌发生过程中的作用是国内外研究的热点, 过量表达的细胞生长因子及其受体可能引起细胞增殖失控最终导致肿瘤的发生。

■创新盘点

FGFs家族与胃癌浸润转移的关系已有大量研究证实, bFGF与胆管癌的发生亦有文献报道, 但目前 *H pylori*, bFGF, FGFR-2三者之间的相互关系及其与胃癌发生的关系未见有文献报道。

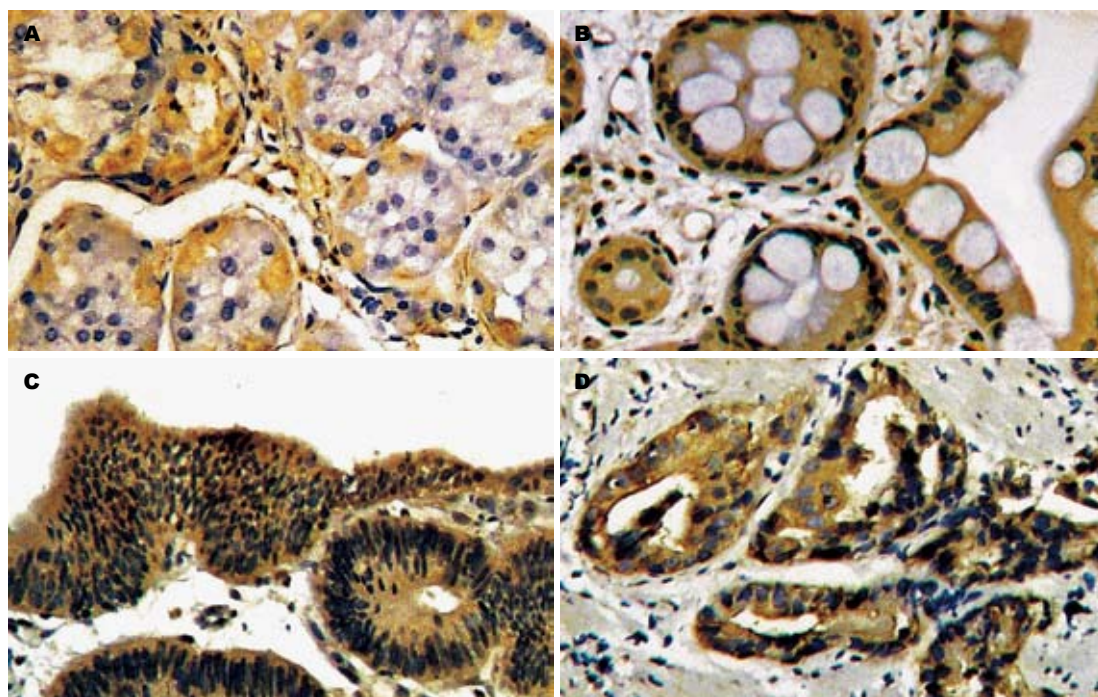


图1 bFGF的表达(SP法, ×200). A: CSG组; B: IM组; C: Dys组; D: GC组.

软件, 组间阳性表达率比较用 χ^2 检验, bFGF与FGFR-2表达相关性用Spearman秩相关分析. 以 $P<0.05$ 判为差异有显著性意义.

2 结果

2.1 bFGF与FGFR-2阳性信号均定位于细胞质内, FGFR-2偶见细胞质和细胞膜同时出现阳性信号. 阳性细胞包括胃黏膜腺上皮细胞和GC细胞; 细胞间质中的成纤维细胞、平滑肌细胞、血管内皮细胞及炎性细胞等(图1-2).

2.2 bFGF, FGFR-2表达阳性率与胃黏膜病理类型的关系 bFGF, FGFR-2表达在CSG组、IM组、Dys组及GC组中逐渐增加, 除了Dys组与GC组表达无显著性差异, 其余各组间两两比较差异均有统计学意义(分别 $P<0.05$, $P<0.01$, 表1).

2.3 *H pylori*与胃黏膜bFGF, FGFR-2表达的关系 CSG中, *H pylori*感染阴性组与*H pylori*感染阳性组间bFGF, FGFR-2表达阳性率无显著性差异. IM组*H pylori*感染阴性组与*H pylori*感染阳性组间bFGF, FGFR-2表达阳性率有显著性差异(均 $P<0.01$). Dys组*H pylori*感染阴性组与*H pylori*感染阳性组间bFGF, FGFR-2表达阳性率有显著性差异(均 $P<0.01$). bFGF, FGFR-2在*H pylori*阳性Dys组表达高于GC组, 差异有统计学意义($P<0.05$), 而在*H pylori*阳性IM组的表达与GC相似, 差异无显著性. *H pylori*阴性Dys组bFGF表达低于GC组, 差异有统计学意义($P<0.05$), 而两组

表1 bFGF, FGFR-2表达与胃黏膜病理类型的关系

分组	n	bFGF阳性 (%)	FGFR-2阳性 (%)
CSG	30	7(23.33%) ^a	6(20%) ^b
IM	29	14(48.28%) ^{cf}	13(44.83%) ^{lk}
Dys	31	23(74.19%)	22(70.97%)
GC	55	43(78.18%)	38(69.09%)

$\chi^2 = 4.002$, ^a $P<0.05$ vs IM组; $\chi^2 = 4.258$, ^c $P<0.05$ vs Dys组; $\chi^2 = 7.786$, ^f $P<0.01$ vs GC组; $\chi^2 = 4.163$, ^b $P<0.05$ vs IM组; $\chi^2 = 4.212$, ^l $P<0.05$ vs Dys组; $\chi^2 = 4.687$, ^k $P<0.05$ vs GC组.

FGFR-2表达无显著性差异(表2).

2.4 bFGF, FGFR-2表达的相关性 *H pylori*感染阴性组及阳性组中, bFGF与FGFR-2之间均呈正相关关系($r = 0.731$, $P = 0.000$; $r = 0.684$, $P = 0.000$).

3 讨论

1994年, 世界卫生组织属下的国际癌肿研究机构就宣布了*H pylori*是人类GC的I类致癌原, 在实验室中也成功地以*H pylori*直接诱发蒙古沙鼠发生GC, 但*H pylori*致癌的机制尚未明了. 多数报道认为*H pylori*能促进胃上皮细胞增殖, 成功根除*H pylori*以后, 胃上皮的高增殖状态明显降低^[2], 细胞增殖既增加了DNA复制错误的机会, 又增加了DNA发生突变的机会, 这是*H pylori*可能诱发癌变的机制之一^[3]. 早在1992年Correa^[4]就提出*H pylori*可能在正常胃黏膜→慢性胃炎→

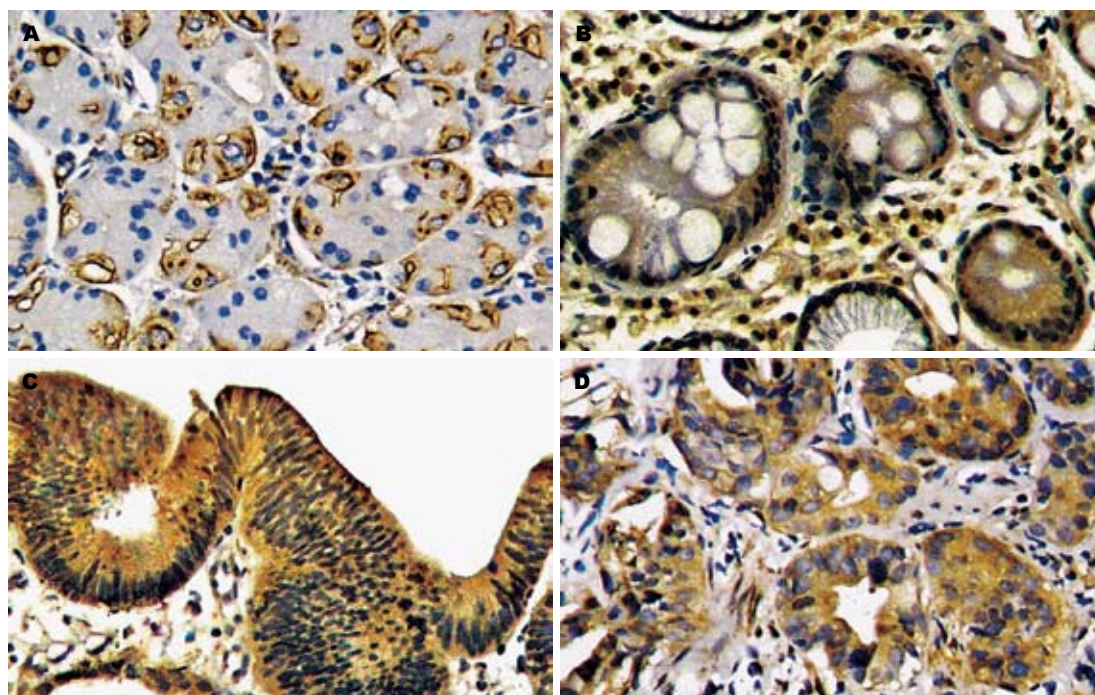


图 2 FGFR-2的表达(SP法, ×200). A: CSG组; B: IM组; C: Dys组; D: GC组.

■应用要点

目前临床上一些细胞生长因子受体拮抗剂如吉非替尼[一种选择性表皮生长因子受体(EGFR)酪氨酸激酶抑制剂]用于肿瘤的治疗取得了一定的疗效,若bFGF, FGFR-2确实在胃癌的发生过程中发挥作用,那么在早期应用该种因子的拮抗剂或许可以预防胃癌的发生.

表 2 *H. pylori*感染对胃黏膜bFGF, FGFR-2的影响

分组	<i>n</i>		bFGF阳性 <i>n</i> (%)		FGFR-2阳性 <i>n</i> (%)	
	<i>H. pylori</i> (-)	<i>H. pylori</i> (+)	<i>H. pylori</i> (-)	<i>H. pylori</i> (+)	<i>H. pylori</i> (-)	<i>H. pylori</i> (+)
CSG	15	15	2(13.33%)	5(33.33%)	1(6.67%)	5(33.33%)
IM	17	12	4(23.53%) ^b	10(83.33%)	4(23.53%) ^{ik}	4(75%)
Dys	15	16	7(46.67%) ^{di}	16(100%) ^m	7(46.67%) ^h	15(93.75%) ^o
GC		55		43(78.18%)		38(69.09%)

$\chi^2 = 10.076$, ^b $P < 0.01$ vs *H. pylori*(+)IM组; $\chi^2 = 11.501$, ^d $P < 0.01$ vs *H. pylori*(+)Dys组; $\chi^2 = 7.535$, ⁱ $P < 0.01$ vs *H. pylori*(+)IM组; $\chi^2 = 8.330$, ^h $P < 0.01$ vs *H. pylori*(+)Dys组; $\chi^2 = 5.736$, ⁱ $P < 0.05$ vs GC组; $\chi^2 = 11.091$, ^k $P < 0.05$ vs GC组; $\chi^2 = 4.201$, ^m $P < 0.05$ vs GC组; $\chi^2 = 3.982$, ^o $P < 0.05$ vs GC组.

萎缩性胃炎→肠上皮化生→不典型增生→胃癌变化过程中的早期阶段起作用. 有研究显示, 胃黏膜上皮细胞COX-2, TGF- β 1, PCNA的表达在*H. pylori*感染时升高, 且在CSG, IM, Dys组及GC组中逐渐增强, 说明*H. pylori*感染可能通过诱导COX-2和TGF- β 1等致炎因子和某些细胞生长因子的过度表达引起胃黏膜上皮细胞过度增殖, 最终导致胃黏膜细胞增殖失去调控诱发GC^[5-8].

bFGF是一种作用广泛的肽类细胞生长因子, 广泛分布于各种正常组织和器官, 通过与FGFRs的结合发挥对多种来源的细胞的促分裂、增殖和促进血管生成作用, 是一种强有力的细胞丝裂原和血管生成因子^[9]. 大量文献报道, 在多种肿瘤组织包括中bFGF呈高表达, 并与

肿瘤的浸润转移和预后有关^[10-14], 其机制可能是bFGF促进肿瘤血管内皮细胞增殖分裂, 诱导肿瘤间质新生血管大量形成从而使肿瘤细胞易于转移播散^[15], 研究表明, bFGF及其受体的过量表达致胆管上皮细胞过度增殖, 与胆管癌的发生有密切联系^[16], 国外的研究亦发现bFGF表达异常升高与多种肿瘤的发生有关^[17], 提示bFGF及其受体的过量表达可致细胞的癌变, 但bFGF与GC发生之间以及*H. pylori*对其表达的影响目前罕见有文献报道. FGFRs是一个多基因家族, 属免疫球蛋白基因超家族成员, 共有4个结构类似的成员: FGFR-1, FGFR-2, FGFR-3, FGFR-4, 分别由4个独立的基因编码, 由于基因的选择性剪辑, 每一个成员又可以分为不同的亚型, FGFR

■名词解释

Correa胃癌发生模式:是指胃癌的发生是由正常胃黏膜→慢性胃炎→萎缩性胃炎→肠上皮化生→不典型增生→胃癌的变化过程,1992年Correa就提出*H pylori*可能在这一模式的早期阶段起作用。

家族成员都是酪氨酸激酶受体,通过与FGFs的结合在细胞的增殖、分化、血管生成、骨骼发育及生长和发育相关的进程中起着十分重要的作用^[18-19],目前FGFR-2与GC之间关系的文献报道比较少见,*H pylori*感染与FGFR-2表达的关系未见报道。

按照Correa的GC发生模式,我们根据*H pylori*感染的情况和胃黏膜的病理类型进行分组检测,结果显示bFGF,FGFR-2的表达在CSG→IM→Dys过程中呈现递增现象,且在Dys组就到达高峰,达到了GC水平,bFGF,FGFR-2表达具有正相关性,提示bFGF,FGFR-2的过量表达可能共同参与了GC的发生过程。在IM及Dys组中,*H pylori*阳性组bFGF,FGFR-2表达均高于阴性组且两者之间表达具有正相关性,说明*H pylori*感染可引起胃黏膜bFGF,FGFR-2表达升高,我们推测*H pylori*感染后诱导bFGF及FGFR-2的表达上调,导致胃黏膜上皮细胞过度增殖,最终细胞生长失去调控导致GC的发生,CSG组*H pylori*感染对bFGF,FGFR-2表达的影响没有统计学意义,推测可能是样本例数过少所致。GC的发生是一个漫长的过程,其中癌前病变是一个关键步骤,*H pylori*感染阳性时bFGF,FGFR-2在IM时已达到GC水平,在Dys组达到高峰甚至超过GC水平,而*H pylori*感染阴性时IM和Dys组bFGF和*H pylori*感染阴性IM组FGFR-2的表达低于GC组,提示*H pylori*感染致bFGF,FGFR-2的过度表达可能在胃黏膜上皮细胞Dys→GC的转变过程中或者更早期的阶段发挥作用。由于bFGF,FGFR-2在胃黏膜发生肉眼可见的癌变之前就已经在癌前病变组织中出现了异常高表达,故bFGF,FGFR-2可作为*H pylori*感染诱发GC早期诊断的参考指标,伴*H pylori*感染的胃癌前病变应及时处理。

以往的研究发现,FGFR-2具有抑癌作用,Ricol *et al*^[20]用FGFR2-IIIb cDNA转染两种膀胱癌细胞株J82, T24(这两种细胞本身无FGFR2-IIIb表达),发现FGFR2-IIIb稳定转染细胞T24在体外的生长速度比未转染的细胞J82减缓,且在裸鼠体内形成肿瘤少且生长速度更缓慢。我们的研究发现FGFR-2在CorreaGC发生模式中呈递增表达,且与bFGF表达呈正相关,两者可能相互作用引起胃黏膜癌变,这与FGFR-2抑制肿瘤细胞生长和恶性转化的观点是不符的,我们做了以下几点推测:(1)GC发生过程中由于某种因素如*H pylori*感染导致FGFR-2基因发生了突变,此时

FGFR-2已不具有抑癌的作用,Jang *et al*^[21]就曾报道FGFR-2的突变在胃、结肠、直肠癌的发生中起着十分重要的作用;(2)也可能是FGFR-2只对癌细胞的生长有抑制作用而不抑制细胞癌变的过程;(3)并未有文献报道FGFR-2对胃癌细胞的生长是否有抑制作用,可能FGFR-2的抑癌作用具有组织特异性,这些观点尚待实验证实。

近年来研究发现*H pylori*除了影响胃上皮的增殖,亦可致胃上皮细胞凋亡增加^[22-26],破坏胃黏膜上皮凋亡/增殖平衡^[27-28],体外试验发现较低浓度的*H pylori*作用于胃上皮细胞时,细胞增殖增加,凋亡也增加;但较高浓度的*H pylori*的作用使细胞增殖受到抑制,而细胞凋亡仍然增加,胃上皮细胞凋亡增加将打破细胞增殖与细胞丢失间的平衡,使胃黏膜细胞的数量不断减少,细胞凋亡又可代偿性地引起细胞增殖增加,尽管细胞增殖可能是维持组织完整性的重要的生理反应,但只要增殖存在,就有可能使新产生的细胞发生某种基因变异或对凋亡机制更具有抗性,最终也可导致组织Dys和肿瘤形成^[29],bFGF可通过抑制p53, bax, Wtp53, c-jun, c-fos蛋白的表达及促进bcl-2蛋白表达来抑制细胞凋亡^[30-31],bFGF,FGFR-2高表达可能参与了*H pylori*感染胃黏膜上皮凋亡/增殖失衡的过程从而导致胃黏膜发生癌变。

*H pylori*感染作为GC的一个重要致病因子,对胃黏膜上皮细胞bFGF,FGFR-2表达的上调、致FGFR-2基因的突变以及参与胃黏膜上皮凋亡/增殖失衡可能是GC发生过程的一个重要机制,是GC发生多步骤、多阶段过程中的一个早期事件。除了根治*H pylori*,检测bFGF,FGFR-2在胃黏膜上皮细胞的表达及其基因分析、应用bFGF抑制剂可能成为早期预防预测GC发生的一条有效途径,因FGFR-2基因的突变可能参与了GC的发生,故用转基因疗法重现正常FGFR-2的抑癌功能也可能成为预防GC发生、发展的新途径。

4 参考文献

- 1 于敏,李姝玉,于湛,邱雪杉,侯萍,王恩华,PECKER Iris. 肝素酶和碱性成纤维细胞生长因子与非小细胞肺癌转移和预后的关系. 中华病理学杂志 2005; 34: 36-41
- 2 Peek RM Jr, Wirth HP, Moss SF, Yang M, Abdalla AM, Tham KT, Zhang T, Tang LH, Modlin IM, Blaser MJ. Helicobacter pylori alters gastric epithelial cell cycle events and gastrin secretion in Mongolian gerbils. *Gastroenterology* 2000; 118: 48-59
- 3 罗玉琴,吴开春,孙安华,潘伯荣,张学庸,樊代明. 浅表性胃炎、胃粘膜不典型增生及胃癌组织中COX-1、COX-2、iNOS表达的意义. 中华消化杂志

- 2000; 20: 223-226
- 4 Correa P. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process-First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. *Cancer Res* 1992; 52: 6735-6740
 - 5 丁小云, 李定国, 陆汉明. 幽门螺杆菌感染的胃黏膜上皮细胞环氧化酶-2表达及意义. *中华肿瘤杂志* 2005; 27: 232-234
 - 6 Chan FK, To KF, Ng YP, Lee TL, Cheng AS, Leung WK, Sung JJ. Expression and cellular localization of COX-1 and -2 in *Helicobacter pylori* gastritis. *Aliment Pharmacol Ther* 2001; 15: 187-193
 - 7 庄则豪, 陈玉丽, 王承党, 陈奕贵. 胃粘膜组织幽门螺杆菌感染与TGF- β 1表达的关系. *世界华人消化杂志* 1999; 7: 1090-1091
 - 8 孟华, 刘丽娜, 孟晓光. 胃癌及癌前病变中PCNA、p53表达及其与*H. pylori*感染的关系. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 1253-1255
 - 9 Wilkie AO, Patey SJ, Kan SH, van den Ouweland AM, Hamel BC. FGFs, their receptors, and human limb malformations: clinical and molecular correlations. *Am J Med Genet* 2002; 112: 266-278
 - 10 Ruotsalainen T, Joensuu H, Mattson K, Salven P. High pretreatment serum concentration of basic fibroblast growth factor is a predictor of poor prognosis in small cell lung cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002; 11: 1492-1495
 - 11 赵仲生, 茹国庆, 马杰. 碱性成纤维细胞生长因子mRNA表达与微血管密度和胃癌的发展及预后. *中华病理学杂志* 2003; 32: 57-58
 - 12 Zhao ZS, Zhou JL, Yao GY, Ru GQ, Ma J, Ruan J. Correlative studies on bFGF mRNA and MMP-9 mRNA expressions with microvascular density, progression, and prognosis of gastric carcinomas. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 3227-3233
 - 13 Poon RT, Ng IO, Lau C, Yu WC, Fan ST, Wong J. Correlation of serum basic fibroblast growth factor levels with clinicopathologic features and postoperative recurrence in hepatocellular carcinoma. *Am J Surg* 2001; 182: 298-304
 - 14 Rasmuson T, Grankvist K, Jacobsen J, Ljungberg B. Impact of serum basic fibroblast growth factor on prognosis in human renal cell carcinoma. *Eur J Cancer* 2001; 37: 2199-2203
 - 15 郭新, 李玉林, 张丽红. 胃癌组织碱性成纤维细胞生长因子表达及对血管新生和肿瘤进展的影响. *中华消化杂志* 2002; 22: 209-212
 - 16 蔡欣然, 黄长玉, 杨发端. 人肝胆管癌中碱性成纤维细胞生长因子及其受体的表达. *中华实验外科杂志* 2000; 17: 82
 - 17 Raimondi AR, Molinolo AA, Itoiz ME. Fibroblast growth factor-2 expression during experimental oral carcinogenesis. Its possible role in the induction of pre-malignant fibrosis. *J Oral Pathol Med* 2006; 35: 212-217
 - 18 Plotnikov AN, Schlessinger J, Hubbard SR, Mohammadi M. Structural basis for FGF receptor dimerization and activation. *Cell* 1999; 98: 641-650
 - 19 Hanneken A. Structural characterization of the circulating soluble FGF receptors reveals multiple isoforms generated by secretion and ectodomain shedding. *FEBS Lett* 2001; 489: 176-181
 - 20 Ricol D, Cappellen D, El Marjou A, Gil-Diez-de-Medina S, Girault JM, Yoshida T, Ferry G, Tucker G, Poupon MF, Chopin D, Thiery JP, Radvanyi F. Tumour suppressive properties of fibroblast growth factor receptor 2-IIIb in human bladder cancer. *Oncogene* 1999; 18: 7234-7243
 - 21 Jang JH, Shin KH, Park JG. Mutations in fibroblast growth factor receptor 2 and fibroblast growth factor receptor 3 genes associated with human gastric and colorectal cancers. *Cancer Res* 2001; 61: 3541-3543
 - 22 Satoh K, Kawata H, Tokumaru K, Kumakura Y, Ishino Y, Kawakami S, Inoue K, Kojima T, Satoh Y, Mutoh H, Kihira K, Sugano K. Change in apoptosis in the gastric surface epithelium and glands after eradication of *Helicobacter pylori*. *Dig Liver Dis* 2003; 35: 78-84
 - 23 Shirin H, Hibshoosh H, Kawabata Y, Weinstein IB, Moss SF. p16Ink4a is overexpressed in *H. pylori*-associated gastritis and is correlated with increased epithelial apoptosis. *Helicobacter* 2003; 8: 66-71
 - 24 Zhang Z, Yuan Y, Gao H, Dong M, Wang L, Gong YH. Apoptosis, proliferation and p53 gene expression of *H. pylori* associated gastric epithelial lesions. *World J Gastroenterol* 2001; 7: 779-782
 - 25 Kohda K, Tanaka K, Aiba Y, Yasuda M, Miwa T, Koga Y. Role of apoptosis induced by *Helicobacter pylori* infection in the development of duodenal ulcer. *Gut* 1999; 44: 456-462
 - 26 班宗文, 吕宗舜, 阎雪艳, 王绪林, 王邦茂, 杨玉龙, 姜葵. 幽门螺杆菌感染对Fas/FasL表达的影响在胃癌发生中的作用. *中华消化杂志* 2002; 22: 206-208
 - 27 姜海行, 聂海明, 邓德海, 覃山羽, 陶霖, 黄振宁. 幽门螺杆菌体外诱导大鼠胃黏膜上皮细胞凋亡. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 2838-2841
 - 28 Houghton J, Korah RM, Condon MR, Kim KH. Apoptosis in *Helicobacter pylori*-associated gastric and duodenal ulcer disease is mediated via the Fas antigen pathway. *Dig Dis Sci* 1999; 44: 465-478
 - 29 杨艺, 邓长生, 彭俊忠. 幽门螺杆菌对体外培养的胃上皮细胞增殖与凋亡的影响. *中华微生物学和免疫学杂志* 2002; 22: 10-13
 - 30 牛膺筠, 高云霞, 袁春燕, 丁玉芝, 杨文毅. 碱性成纤维细胞生长因子对视网膜缺血再灌注损伤中凋亡相关基因表达的影响. *中华眼底病杂志* 2005; 21: 310-313
 - 31 刘雷, 裴福兴, 屠重棋, 池雷霆, 王光林, 杨静. 碱性成纤维细胞生长因子对大鼠牵张性脊髓损伤后细胞凋亡及基因表达的影响. *中华实验外科杂志* 2005; 22: 724-726

■同行评价

本文通过观察*H. pylori*感染的胃黏膜病变中bFGF, FGFR-2表达的变化, 了解*H. pylori*感染对胃黏膜上皮bFGF, FGFR-2表达的影响及其在胃黏膜癌变过程中的作用. 文章条理清楚, 有较高的科学性.

电编 张敏 编辑 张焕兰

儿童胰腺实性假乳头状肿瘤的潜在恶性表现及其临床处理

肖元宏, 刘洲禄, 郭爱桃, 王政, 彭少林

■背景资料

目前已经明确手术完整切除是治愈胰腺实性假乳头状肿瘤唯一有效的方法, 而该肿瘤中那些潜在恶性程度相对较高者手术完整切除具有相当难度, 因此分析其临床表现形式, 探讨适宜的手术处理方式及围手术期注意事项, 肿瘤预后的判断等均具有非常重要的临床意义。

肖元宏, 刘洲禄, 王政, 彭少林, 中国人民解放军总医院小儿外科北京市 100853

郭爱桃, 中国人民解放军总医院病理科北京市 100853

肖元宏, 2006年解放军总医院博士, 研究方向主要为排便功能异常的直肠肛门动力研究。

通讯作者: 肖元宏, 100853, 北京市, 中国人民解放军总医院小儿外科. xiaoyh28@sina.com

电话: 010-66937123

收稿日期: 2006-12-11 接受日期: 2007-01-19

Potential malignancy and clinical management of solid pseudopapillary tumor of pancreas in children

Yuan-Hong Xiao, Zhou-Lu Liu, Ai-Tao Guo, Zheng Wang, Shao-Lin Peng

Yuan-Hong Xiao, Zhou-Lu Liu, Zheng Wang, Shao-Lin Peng, Department of Pediatric Surgery, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China

Ai-Tao Guo, Department of Pathology, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China

Correspondence to: Yuan-Hong Xiao, Department of Pediatric Surgery, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China. xiaoyh28@sina.com

Received: 2006-12-11 Accepted: 2007-01-19

Abstract

AIM: To discuss the potential malignant presentation and clinical management of solid pseudopapillary tumor of pancreas (SPNP) in children.

METHODS: In combination with literature review, the clinical presentation, pathological characteristics, surgical management and following-up results of 4 SPNP patients were concluded and analyzed.

RESULTS: Three cases received the removal of the tumor and spleen due to the adhesion with the spleen veins and difficulty to dissection. One case received partial resection of the tumor due to its adhesion and embrace with supra-mesenteric blood vessels and duodenum. The three patients with complete tumors removal had no distant metastasis at the time of hospital admission. After following-up for 16 to 53 months, all the three cases survived without local recurrence and metastasis. The case with partial resection

was in following up for 29 months, and no local enlargement and distant metastasis were found.

CONCLUSION: Surrounding-tissue invasion exists in SPNP children, and complete removal is the best choice. Meanwhile, spleen resection or decreasing-size operation is also valuable.

Key Words: Children; Solid pseudopapillary tumor of pancreas; Complete removal; Spleen resection; Decreasing-size operation

Xiao YH, Liu ZL, Guo AT, Wang Z, Peng SL. Potential malignancy and clinical management of solid pseudopapillary tumor of pancreas in children. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(9):970-974

摘要

目的: 探讨儿童实性假乳头状肿瘤的潜在恶性表现及其临床处理方式。

方法: 结合文献归纳比较4例伴有周围脏器浸润的儿童实性假乳头状肿瘤的临床表现, 病理特点, 手术处理方法, 术后恢复及随访情况。

结果: 3例肿瘤占据胰体尾部并浸润脾静脉, 术中分离困难, 行肿瘤完整切除的同时一并切除脾脏。另1例肿瘤位于胰头, 因肿瘤包裹并浸润肠系膜上动静脉、十二指肠等, 无法分离, 仅行部分肿瘤切除术。前3例患儿就诊时均未发现远隔转移, 随访16-53 mo, 患儿均存活, 无局部复发及远隔转移。后1例行减体积手术者随访29 mo, 未见肿瘤局部明显增大及远隔转移。

结论: 儿童胰腺实性假乳头状肿瘤浸润周围重要组织器官, 从一个侧面说明了该肿瘤具有潜在恶性的生物学行为。在保留临近脏器的情况下完整切除肿瘤是最佳选择, 同时脾切除或减体积手术也有其存在的合理性。

关键词: 儿童; 胰腺实性假乳头状肿瘤; 完整切除; 脾切除; 减体积手术

肖元宏, 刘洲禄, 郭爱桃, 王政, 彭少林. 儿童胰腺实性假乳头状肿瘤的潜在恶性表现及其临床处理. *世界华人消化杂志* 2007;15(9):970-974

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/970.asp>

0 引言

实性假乳头状肿瘤是一种少见的胰腺肿瘤, 91%发生于年轻的女性, 尤其是青春期的女孩^[1]. Pichlmayr *et al*^[2]报道, 1959年V.K.Frantz首次将其归类为一种新型的胰腺疾病, 至2005-08的统计结果显示, 已经有887例的报道, 其发病率由1980年代占胰腺所有外分泌肿瘤的0.17%-2.7%上升至2003年的6%^[3]. 目前, WHO已将其归入胰腺外分泌部交界性肿瘤范围, 其恶性潜在风险为5%-10%^[4]. 由于临床实践已经明确手术完整切除是治愈该肿瘤的唯一方法^[5-7], 而该肿瘤中那些潜在恶性程度相对较高者手术完整切除具有相当难度, 因此分析其临床病理表现形式, 探讨适宜的手术处理方式及围手术期注意事项, 肿瘤预后的判断, 均具有非常重要的临床意义. 现将我院自2003-01/2006-10收治的4例儿童患者报道如下.

1 材料和方法

1.1 材料 总结4例术后病理诊断为胰腺实性假乳头状肿瘤患儿的症状、体征、病程、术前诊断、术中所见、手术方式、术后处理, 并对每一例患儿术后情况进行电话随访及客观资料复习.

1.2 方法 请一名有经验的病理医生复查4例患儿的所有病理切片, 并对病理特征做出评价.

2 结果

2.1 临床特点 4例患儿均为女性, 均无明显症状, 3例为无意发现腹部包块, 1例因过敏性紫癜肾炎行腹部超声检查时无意中发现胰腺肿物. 3例患儿自发现肿瘤到接受手术治疗的时间均较短, 病程为4 d-1 mo, 1例发现肿瘤后1年2个月行手术切除, 观察期间肿瘤体积变化不明显(表1, 图1-2).

2.2 病理特点 4例病理检查显微镜下均见肿瘤细胞排列成实性细胞巢, 其间有丰富的血管, 小血管周的肿瘤细胞围绕小血管形成所谓的假乳头状排列, 无真正的腺腔形成, 瘤细胞核较一致, 间质有不同程度的透明变性及黏液变性; 免疫组化染色显示, 肿瘤细胞CD10(+), CD56(+), 病理诊断均为胰腺实性假乳头状肿瘤(表2, 图3).

2.3 术后处理 术后体温恢复正常的时间为4-9 d, 平均为1 wk. 血小板峰值时间为术后10-12 d, 平

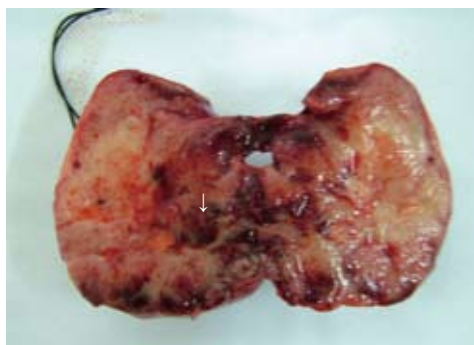


图1 胰腺实性假乳头状瘤外观及切面观, 实质性肿瘤组织之间有坏死囊性变(箭头).



图2 CT表现为胰腺体尾部占位病变, 与脾静脉、肠系膜上动静脉及门静脉关系密切.

均11 d; 血小板平均峰值为 $1228 \times 10^9/L$, 变化范围为 1220×10^9 - $1243 \times 10^9/L$. 口服抗血小板聚集药物开始时间为术后1 wk, 停止服药的标准为血小板降至 $400 \times 10^9/L$.

2.4 随访 4例患儿随访1年4个月, 4年5个月, 2年5个月及1年5个月, 均未见肿瘤局部复发、转移或体积明显增大.

3 讨论

目前, 胰腺实性假乳头状肿瘤手术完整切除者, 绝大部分可以治愈, 但仍有少数复发和转移的病例报道, 此外尚有肿瘤对局部重要组织器官进行浸润性生长而无法完整切除、只能行肿瘤部分切除的减体积手术者, 说明该肿瘤病理特点介于良性与恶性之间, 有一定的恶性倾向, 在某种条件下可逐渐向恶性发展, 表现为侵犯包膜和周围组织^[8]. 因此研究该肿瘤恶性倾向的临床表现和处理原则, 有重要的理论和实际意义.

浸润性生长为大多数恶性肿瘤的生长方式^[9], 文献报道该肿瘤对重要器官和血管的侵犯率达16%^[10], 但很少造成胆管闭塞^[11]. 本研究发现, 肿瘤生长到一定程度, 如平均直径超过10 cm, 并且

■应用要点

本文提示了具有周围重要组织器官浸润生长的恶性程度相对较高的儿童胰腺实性假乳头状肿瘤合适的手术处理方式、围手术期注意事项, 以及不能完整切除起源于胰头部者残余肿瘤的辅助治疗方法等, 概括的阐述了该肿瘤临床病理及治疗情况.

■名词解释

胰腺实性假乳头状肿瘤: 一种少见的胰腺肿瘤, 91%发生于年轻的女性, 尤其是青春期的女孩, 1959年V.K.Frantz首次将其归类为一种新型的胰腺疾病, WHO已将其归入胰腺外分泌部交界性肿瘤范围, 其恶性潜在风险为5%-10%。其发病率已由1980年代占胰腺所有外分泌肿瘤的0.17%-2.7%上升至2003年的6%。临床实践已经明确手术完整切除是治愈该肿瘤的唯一方法, 对于浸润重要组织器官不能完整切除者尚需探讨其他有效的辅助治疗手段。

表 1 4例胰腺实性假乳头状肿瘤患儿的临床特点

No	年龄(岁)	病程	临床诊断	术中肿瘤位置	体积(cm ³)	表面特征	与周围组织关系	手术方式
1	9	1 mo	胰腺占位病变	胰颈体交界部	10×7×4.5	富含血管, 凸凹不平, 包膜不完整, 破溃区域约4 cm×3 cm	浸润门静脉表面完全分离困难, 脾静脉浸润严重无法分离	肿瘤完整切除+脾切除
2	10	10 d	腹膜后肿瘤	胰体尾	16×13×6	凸凹不平, 外周许多血管进入瘤体, 大部分区域缺乏包膜	侵及脾门	肿瘤完整切除+脾切除
3	13	4 d	胰腺肿瘤	胰头	10×9×4.5	包膜不完整, 表面富含血管	肿瘤与十二指肠壁黏连, 无法分离, 肠系膜上动静脉自瘤体中央出入, 无法分离	肿瘤部分切除+脾切除
4	11	1年2个月	上腹部肿瘤	胰头体交界部	7.5×6.5×3	球形, 包膜完整, 表面富含血管	与脾静脉、肠系膜上静脉、门静脉黏连	肿瘤完整切除+脾切除

表面凹凸不平, 呈富含血管状外观时, 起源于胰腺体尾部者往往已造成对脾静脉的广泛浸润而难以分离, 但因与肠系膜血管及十二指肠尚存在一定距离, 因此可以通过体尾部肿瘤切除并脾切除达到根治目的; 国外文献报道该肿瘤胰尾发病偏多, 占40%^[12]。而起源于胰头部者因肿瘤与十二指肠黏连, 肠系膜动静脉自瘤体中央传出, 无法完成与上述结构的分离, 而仅完成了减体积手术。另外术中分离肿瘤与血管之间的黏连时常因血管壁破损而需要缝合, 存在失血性休克的风险, 因此具有上述病理特点的胰腺实性假乳头状肿瘤具有恶性倾向, 临床工作中应给予高度关注。

本研究发现, 脾切除术后2 wk血小板达到峰值 $1228 \times 10^9/L$, 口服抗凝剂的合适时机为术后1 wk, 停药指征为血小板降至 $400 \times 10^9/L$ ^[13]。3例脾切除者均无血栓形成等并发症。国内外有报道: 保留胃短血管和脾上极, 应用超声刀行部分脾切除术, 以保持免疫功能^[14-15]。胰头部肿瘤的手术处理方式除包括剥除肿瘤、减体积手术之外, 还可行child术或whipple术等^[6,16-17]。目前的观点认为, 由于该肿瘤生长非常缓慢, 因此即使肿瘤浸润性生长入周围重要的组织器官使无法完成肿瘤完整切除时, 也宜行肿瘤减体积手术, 而不应该行姑息性内引流或外引流术, 减体积手术对患儿的良好预后和生存有好处^[18-21]。该肿瘤转移灶的生长也非常缓慢, 有报道2例患者就诊时因肿瘤侵犯血管而无法切除, 随诊13 a和1 a患者仍存活^[11]。本研究的1例患儿发现肿瘤后1年2个月瘤体体积无显著增大, 另1例行减体积手术患儿随访2年5个月至今仍存活, 瘤体变化不明

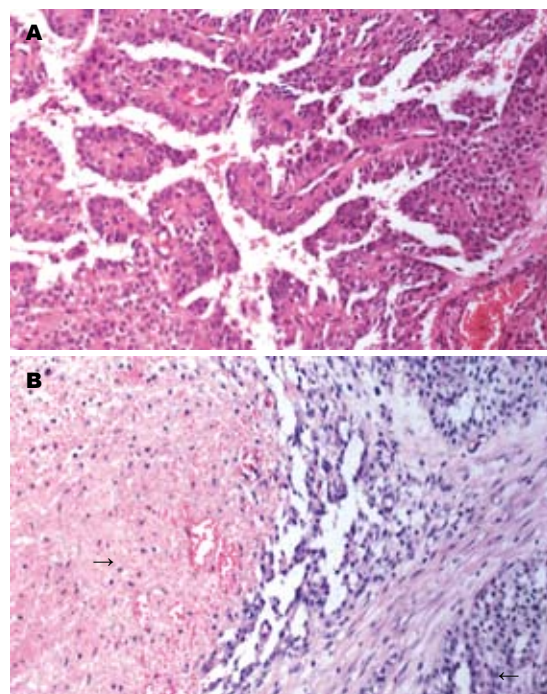


图 3 胰腺实性假乳头状肿瘤的病理特点(HE × 100)。A: 肿瘤细胞巢呈假乳头状排列, 其间有丰富的血管; B: 部分肿瘤细胞大片状坏死(箭头左), 部分肿瘤细胞排列成假乳头状结构(箭头右)。

显并且无远隔转移。

其他有关儿童胰腺实性假乳头状肿瘤的恶性倾向还包括如下几个方面, 加以明确有助于判断肿瘤的预后。(1)预后不良的病理特征^[5,11]: 大面积区域弥散的、瘤细胞层状生长方式、细胞核多形性增加, 核DNA非整倍体, 有丝分裂率显著增加, 核等级高, 存在明显的渐进性坏死巢, 甚至含有肉瘤样腺癌的焦点病灶, 侵犯静脉, 或存在淋巴结转移; (2)肿瘤复发: 肿瘤完整切除后

表 2 4例胰腺实性假乳头状肿瘤的病理特点

No	切面	核异型性	Ki-67指数	坏死	肉瘤样结构	脏器浸润	淋巴结转移
1	周边灰白色, 中央见出血及囊性变	轻度	<5%	大片状坏死	无	脾脏未见肿瘤	0/7
2	灰白间灰红色, 伴囊性变	轻度	<5%	无	无	脾脏未见著变	0/1
3	灰白色, 实性, 质地中等	轻度	<5%	无	无	十二指肠及肠系膜上动静脉	未见淋巴结
4	灰白色, 实性, 质地中等, 见出血及囊性变	轻度	<1%	无	无	脾脏未见著变	未见淋巴结

是否复发有不同观点, 有肿瘤完整切除后未见复发的报道, 并且认为无论是局部的、血管的还是神经旁的侵犯均不构成肿瘤复发的预后因素^[8]. 还有报道发现, 即使肿瘤切除, 仍有极小部分会发生复发和转移^[21]. 有报道确诊时已经有血性腹水者应给予高度关注, 因血性腹水可以导致腹腔大网膜, 小网膜, 肝脾表面等种植性转移, 但手术切除这些转移灶容易、不具挑战性^[5]; (3)肿瘤转移: 不常见, 其中肝脏为最常见的远隔转移部位, 有报道肝脏转移的发生率为7%^[10], 罕见的转移部位为肺和皮肤^[6], 尚有更罕见的淋巴结及腹腔播散的报道. 但肿瘤的扩散并非长期存活预后不良的一个指标, 有转移患者长期存活4 a和11 a的报道^[11]. 本研究4例患儿病理表现为轻度的核异型性, Ki-67指数阳性范围为1%-5%, 有1例表现为肿瘤细胞大片状坏死, 无肉瘤样结构和淋巴结转移, 脾脏未见肿瘤浸润, 上述病理特点决定了本组患儿预后不良的程度不重. 随访1年4个月-4年5个月, 均未见局部复发和转移, 行减体积手术者未见瘤体明显增大.

Kosmahl *et al*^[22]通过免疫组化的综合研究将该肿瘤的免疫全貌与来源于体腔上皮和卵巢网细胞的免疫全貌相结合后推测, 由于胰腺始基和左侧生殖嵴在器官发生上非常接近, 因此可能有部分生殖细胞掺合到胰腺组织中, 这一理论支持了该肿瘤好发于青春期女孩, 以及肿瘤可能对性激素有反应等特点, 但是尚未见到与该肿瘤类似的卵巢肿瘤类型. 现有文献有关该肿瘤的孕激素及雌激素受体的研究结果差异很大, Kosmahl *et al*^[22]报道57例患儿100%孕激素受体阳性, 而Mao报道的46例患者仅9例孕激素受体阳性, 2例雌激素受体阳性. Lam *et al*^[23]报道的8例患者无一出现上述两种激素受体的阳性. 考虑到上述差异很大的结果以及该肿瘤也可见于

男性, 加上怀孕期间肿瘤生长迅速的特点推测: 激素受体的表达增加与肿瘤的生长有关而与病理发生关系不大^[5]. 基于上述推测, 有用枸橼酸三苯氧胺成功治疗1例雌激素受体阳性患者的报道^[24]. 直到目前尚未发现化疗和放疗对该肿瘤的确切作用^[5], 由于该肿瘤具有很高的切除率, 因此辅助治疗仅见于肿瘤无法完整切除、复发或转移等恶性程度相对高的病例, 有报道系列化疗药对该肿瘤无反应, 也有应用IPE(异环磷酸胺, 顺铂, VP16)进行成功治疗的报道. 放疗不常用, 有报道1例表现为肿瘤局部浸润性生长侵犯门静脉者, 对4000cGy 6 wk的放疗有反应, 并已经随诊了3 a. 由此可见, 对于具有恶性倾向的胰腺实性假乳头状肿瘤的辅助治疗尚需积累更多的临床经验, 并获得对临床有指导意义的客观依据.

4 参考文献

- Yeo CJ, Cameron JL, Sohn TA, Lillemoe KD, Pitt HA, Talamini MA, Hruban RH, Ord SE, Sauter PK, Coleman J, Zahurak ML, Grochow LB, Abrams RA. Six hundred fifty consecutive pancreaticoduodenectomies in the 1990s: pathology, complications, and outcomes. *Ann Surg* 1997; 226: 248-257; discussion 257-260
- Pichlmayr R, Weimann A, Klempnauer J, Oldhafer KJ, Maschek H, Tusch G, Ringe B. Surgical treatment in proximal bile duct cancer. A single-center experience. *Ann Surg* 1996; 224: 628-638
- Siquini W, Marmorale C, Guercioni G, Stortoni P, Bearzi I, Fianchini A, Landia E. Solid pseudopapillary tumor of the pancreas. A report of 3 cases and a review of the literature. *Chir Ital* 2006; 58: 235-245
- 陈杰, 刘彤华. 外分泌胰腺的交界性肿瘤. *中华病理学杂志* 2001; 30: 219-221
- Rebhandl W, Felberbauer FX, Puig S, Paya K, Hochschorner S, Barlan M, Horcher E. Solid-pseudopapillary tumor of the pancreas (Frantz tumor) in children: report of four cases and review of the literature. *J Surg Oncol* 2001; 76: 289-296
- Pisters PW, Hudec WA, Hess KR, Lee JE, Vauthey JN, Lahoti S, Raijman I, Evans DB.

■同行评价

本文在临床资料方面有一定价值, 但随访时间较短, 对手术效果和肿瘤良恶性的判断在时间上还显不够, 但总体上有一定意义.

- Effect of preoperative biliary decompression on pancreaticoduodenectomy-associated morbidity in 300 consecutive patients. *Ann Surg* 2001; 234: 47-55
- 7 Eder F, Schulz HU, Rocken C, Lippert H. Solid-pseudopapillary tumor of the pancreatic tail. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4117-4119
- 8 Kloppel G, Kosmahl M. Cystic lesions and neoplasms of the pancreas. The features are becoming clearer. *Pancreatol* 2001; 1: 648-655
- 9 杨光华. 病理学. 第5版. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 86-91
- 10 Hochwald SN, Burke EC, Jarnagin WR, Fong Y, Blumgart LH. Association of preoperative biliary stenting with increased postoperative infectious complications in proximal cholangiocarcinoma. *Arch Surg* 1999; 134: 261-266
- 11 Martin RC, Klimstra DS, Brennan MF, Conlon KC. Solid-pseudopapillary tumor of the pancreas: a surgical enigma? *Ann Surg Oncol* 2002; 9: 35-40
- 12 Wang KS, Albanese C, Dada F, Skarsgard ED. Papillary cystic neoplasm of the pancreas: a report of three pediatric cases and literature review. *J Pediatr Surg* 1998; 33: 842-845
- 13 王政, 刘贵麟. 小儿脾切除术后血小板变化规律及其临床意义. *临床儿科杂志* 2004; 22: 316-318
- 14 Snajdauf J, Pycha K, Rygl M, Kocmichova B, Kodet R, Koutecky J, Cumlivska E. Papillary cystic and solid tumor of the pancreas--surgical therapy with the use of CUSA, and a review of the pediatric literature. *Eur J Pediatr Surg* 1999; 9: 416-419
- 15 祝秀丹, 何乐健, 曾津津. 儿童胰腺囊实性瘤的诊断与治疗. *中华医学杂志* 2002; 82: 1180-1182
- 16 Karatag O, Yenice G, Ozkurt H, Basak M, Basaran C, Yilmaz B. A case of solid pseudopapillary tumor of the pancreas. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 6239-6243
- 17 Huang HL, Shih SC, Chang WH, Wang TE, Chen MJ, Chan YJ. Solid-pseudopapillary tumor of the pancreas: clinical experience and literature review. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 1403-1409
- 18 Faraj W, Jamali F, Khalifeh M, Hashash J, Akel S. Solid pseudopapillary neoplasm of the pancreas in a 12-year-old female: case report and review of the literature. *Eur J Pediatr Surg* 2006; 16: 358-361
- 19 Kato T, Egawa N, Kamisawa T, Tu Y, Sanaka M, Sakaki N, Okamoto A, Bando N, Funata N, Itoyama T. A case of solid pseudopapillary neoplasm of the pancreas and tumor doubling time. *Pancreatol* 2002; 2: 495-498
- 20 Sanfey H, Mendelsohn G, Cameron JL. Solid and papillary neoplasm of the pancreas. A potentially curable surgical lesion. *Ann Surg* 1983; 197: 272-275
- 21 Meshikhes AW, Atassi R. Pancreatic pseudopapillary tumor in a male child. *JOP* 2004; 5: 505-511
- 22 Kosmahl M, Seada LS, Janig U, Harms D, Kloppel G. Solid-pseudopapillary tumor of the pancreas: its origin revisited. *Virchows Arch* 2000; 436: 473-480
- 23 Lam KY, Lo CY, Fan ST. Pancreatic solid-cystic-papillary tumor: clinicopathologic features in eight patients from Hong Kong and review of the literature. *World J Surg* 1999; 23: 1045-1050
- 24 Sclafani LM, Reuter VE, Coit DG, Brennan MF. The malignant nature of papillary and cystic neoplasm of the pancreas. *Cancer* 1991; 68: 153-158

电编 张敏 编辑 王晓瑜

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

中国科学技术信息研究所情报方法研究中心关于 2005年世界华人消化杂志指标检索报告

本刊讯 2005年度《世界华人消化杂志》的总被引频次为2079, 位居全部1652种中国科技论文统计源期刊的第51位, 内科医学类28种期刊的第4位. 2005年《世界华人消化杂志》的影响因子为0.485, 位居全部1652种中国科技论文统计源期刊的第449位, 内科医学类28种期刊的第14位. 《世界华人消化杂志》的即年指标0.070, 他引率0.66, 地区分布数26, 基金论文比0.43, 国际论文比0.02, 学科影响指标0.46. (世界胃肠病学杂志社2006-10-27)

胃癌细胞增殖相关基因研究进展

李春杰, 魏品康

李春杰, 魏品康, 中国人民解放军第二军医大学长征医院中医科 上海市 200003
通讯作者: 魏品康, 200003, 上海市, 中国人民解放军第二军医大学长征医院中医科. czyk@smmu.edu.cn
电话: 021-63610109-73408
收稿日期: 2007-01-15 接受日期: 2007-02-07

Research progress on gene expression correlated with gastric cancer cell proliferation

Chun-Jie Li, Pin-Kang Wei

Chun-Jie Li, Pin-Kang Wei, Department of Traditional Chinese Medicine, Changzheng Hospital of the Second Military Medical University, Shanghai 200003, China
Correspondence to: Pin-Kang Wei, Department of Traditional Chinese Medicine, Changzheng Hospital of the Second Military Medical University, Shanghai 200003, China. czyk@smmu.edu.cn
Received: 2007-01-15 Accepted: 2007-02-07

Abstract

Malignant tumor is difficult to be treated and has a poor prognosis due to its easy recurrence and metastasis, and the transfer and proliferation of tumor cells are closely related to cell proliferation activity. Therefore, the sticking point in the treatment of malignant tumor is to inhibit the proliferation of tumor cells. The article focuses on the aberrant expression and significances of proto-oncogenes, tumor suppressor genes and genes associated with the proliferation process of gastric cells such as telomerase, transcription factor and cyclooxygenase, etc. These genes, alone or synergically, participate in gastric cancer cell proliferation, resulting in an uncontrolled growth characterized by over-proliferation of decreased apoptosis of gastric cancer cells.

Key Words: Gastric cancer; Cells proliferation; Gene; Progression

Li CJ, Wei PK. Research progress on gene expression correlated with gastric cancer cell proliferation. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(9):975-979

摘要

恶性肿瘤治疗困难和预后不良的主要原因, 就在于其易复发转移, 而恶性肿瘤细胞转移扩散与其细胞增殖活性密切相关. 因此抑制肿瘤细胞的恶性增殖, 是治疗恶性肿瘤的关键所在. 本文着重阐述了与胃癌细胞增殖过程密切相关的端粒酶、核转录因子、环氧化酶等基因以及参与细胞周期调控的原癌基因、抑癌基因的异常表达及临床意义, 这些基因或单独作用, 或相互协同, 参与胃癌细胞的增殖, 使肿瘤细胞生长以增殖过多、凋亡过少的失控性生长为特征.

关键词: 胃癌; 细胞增殖; 基因; 研究进展

李春杰, 魏品康. 胃癌细胞增殖相关基因研究进展. *世界华人消化杂志* 2007;15(9):975-979
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/975.asp>

0 引言

胃癌是一种常见的恶性肿瘤, 在我国常见的恶性肿瘤中, 胃癌发病率居第二位, 死亡率则位居第一^[1], 严重危害人类健康. 恶性肿瘤治疗困难和预后不良的主要原因, 就在于其易复发转移, 而恶性肿瘤细胞转移扩散与其细胞增殖活性密切相关. 恶性肿瘤最大的特点就是肿瘤细胞生长的无休止性、不可调控性. 肿瘤细胞的增殖是多步骤、多因素参与的过程, 笔者就与胃癌细胞增殖的相关基因方面作一综述.

1 端粒与端粒酶

端粒是真核细胞染色体末端的一种具有保护作用的特殊结构, 含有许多简单重复的DNA序列及相关蛋白质. 端粒序列长度有随着年龄增加而逐步变短的趋势, 这可能是衰老发展的一种内在机制. 1984年Greider *et al*^[2]证实了在细胞内存在一种可延长端粒的酶-即端粒酶, 可使端粒维持一定的长度. 端粒酶为由RNA和蛋白质组成的核糖核蛋白复合物, 能以自身RNA为模板催化合成染色体端粒, 从而延长细胞寿命, 使细

■背景资料

转移是恶性肿瘤最重要的特征之一, 也是导致胃癌死亡率居高不下的主要原因. 而恶性肿瘤细胞转移扩散与其细胞增殖活性密切相关, 细胞增殖加速是肿瘤复发转移的物质基础.

■研究前沿

目前研究证实胃癌细胞的增殖过程除与端粒酶、核转录因子、环氧化酶的异常表达有关外,还与参与细胞周期调控的原癌基因、抑癌基因的变异或表达异常有密切关系,这些基因或单独作用,或相互协同,参与胃癌细胞的增殖,使肿瘤细胞凋亡、增殖失衡。

细胞得到永生^[3]。有研究表明肿瘤细胞“永生”与端粒酶活性密切相关。正常体细胞端粒酶不表达,肿瘤细胞端粒酶表达,并且肿瘤细胞缺乏调节端粒酶活性的机制,因而无限制增殖,从而促使肿瘤复发与转移。端粒酶可能是多种肿瘤的共同标记,可用于判别肿瘤的发展,并有可能成为肿瘤治疗的靶子,即通过抑制端粒酶活性而制止肿瘤发展。端粒酶与肿瘤细胞永生关系的确立,使端粒酶成为国际医学界高度重视的肿瘤分子病理学研究中的一个热点,已成为当今肿瘤治疗研究中最有前景的靶基因之一。许多学者已开始探索用端粒酶抑制剂来治疗肿瘤。研究证实,一些核苷类似物、分化诱导剂及某些抗肿瘤药物(如顺铂)能抑制端粒酶的活性。但端粒酶抑制剂对正常细胞可能产生的毒副作用有待进一步的研究。如果某一药物仅抑制端粒酶活性而不影响正常细胞,将是一种极理想的抗癌药^[4-5]。中医中药以其相对安全有效的优势,在临床得到广泛应用。由于端粒酶研究在国际上1990年代后期才开展起来,国内开展较迟,中医中药对其影响的研究较少。端粒、端粒酶的发现及其与胃癌关系的研究为中西医防治胃癌提供了一个全新的视角。如果能够充分利用祖国传统医学的优势,采用中西医结合的手段,从端粒、端粒酶方面入手开展胃癌防治研究一定会取得突破性进展。

2 核转录因子(nuclear factor- κ B, NF- κ B)

NF- κ B是1986年首先由Sen和Baltimore^[6]发现,随着对NF- κ B深入研究结果显示, NF- κ B是调节细胞基因转录的多功能关键因子,参与了多种细胞因子、增殖基因的转录,在肿瘤的发生、发展中发挥重要作用^[7]。NF- κ B通常以NF- κ B(Re1)家族组成的同源或异源复合物形式存在,在静息状态时, NF- κ B常与其抑制物(I κ B)结合形成三聚体以无活性复合物形式存在于胞质,当细胞受到胞外信号刺激时,通过一个或多个信号转导途径,激活一系列激酶,使I κ B降解, NF- κ B与I κ B发生解离,并迅速从胞质易位到胞核,在胞核内与相应基因上的 κ B位点发生特异性结合,调控相关基因表达^[8-9]。在肿瘤细胞分裂过程中,正常情况下细胞凋亡与增殖维持动态平衡,但当受到细胞因子及凋亡和与细胞分裂增殖有关的外来因素刺激时,引起凋亡抑制、肿瘤细胞恶性增殖,维持端粒的稳定性,使细胞

永生化。

近来的研究倾向于NF- κ B可拮抗细胞凋亡,并在晚G期抑制细胞周期的进程,促进细胞增殖^[10]。将NF- κ B作为肿瘤治疗的新靶点,对其活性进行选择调控,为包括胃癌在内的肿瘤治疗开辟了一条新途径。而且目前不少研究也显示了NF- κ B与端粒酶的相关性:两者均在G期阻滞细胞周期进程,抑制凋亡,促进增殖;两者在活化和调控中均涉及到一系列蛋白质磷酸化过程^[11-12],也许是细胞内复杂的信号传导通路中的两环,而两者之间的具体作用机制和联系还需进一步研究。

3 环氧化酶(cyclooxygenase, COX)

COX是花生四烯酸代谢过程中前列腺素(PGs)合成的限速酶,环氧化酶有COX-1和COX-2两种同工酶。COX-1为原生型,而COX-2为诱生型,静息状态下在正常组织中无表达或弱表达,当受到各种生长因子、细胞因子等刺激后大量表达,炎症和肿瘤组织中有高度表达,可能与炎症反应和肿瘤的发生、发展有关。COX-2不仅是启动炎症反应的关键酶,而且还参与多种肿瘤的发生和发展过程,可能通过其下游产物前列腺素或血栓素而促进肿瘤发生。COX-2的致癌机制,可能为COX-2的过表达可促进肿瘤细胞增殖,抑制凋亡发生,促进细胞黏附,也可使癌组织中前列腺素水平增高,抑制免疫系统的监管作用,有利于癌细胞的免疫逃逸;COX-2过表达与肿瘤新生血管形成有关^[13-14]。有研究发现, COX-2与胃癌的发生密切相关, Ratnasinghe *et al*^[15]检测了贲门腺癌19例,胃体腺癌15例及邻近的正常上皮组织中COX-2表达,结果发现36%的贲门腺癌及60%的胃体腺癌呈阳性表达。COX-2的过度表达主要见于大部分胃体腺癌和少部分贲门腺癌组织中。最近研究报道, COX-2的启动子区域含有NF- κ B结合位点, NF- κ B调控的靶基因包括COX-2,在各种刺激或其他致癌因素作用下,激活NF- κ B,进而促进COX-2的表达上调,从而引起细胞凋亡、增殖失衡^[16-17]。

流行病学研究也表明,使用COX-2抑制剂可使胃肠道肿瘤的发生率和死亡率下降40%。越来越多的证据表明, NSAIDs可抑制上皮细胞生长,阻断肿瘤的血管生成,从而抑制结肠肿瘤及其他胃肠道肿瘤的生长。尽管胃癌的发生、发展呈多基因、多因素、多步骤的协同作用过程,

但由于COX-2抑制剂对胃癌及癌前病变的化学预防作用,使得新型COX-2抑制剂的开发与研制有可能为胃癌的治疗及化学预防开辟新途径。

4 增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)

PCNA又称为周期蛋白,由Miyachi *et al* 1978年在系统性红斑狼疮(SLE)患者的血清中首次发现并命名^[18]。PCNA为肿瘤标志物,是一种与细胞增殖相关的核蛋白,在增殖细胞中合成与表达,能参与DNA的合成并在细胞周期中起重要的调控作用,因此,细胞核中PCNA的表达程度常被用于细胞增殖动力学的研究^[19],PCNA在G₁/S转换期发生磷酸化,激活DNA复制因子,促进细胞增殖,属细胞周期调控机制的“油门”。PCNA和周期素依赖激酶共同参与细胞周期的调控和DNA的合成,DNA的合成是细胞增殖的必要条件,因此PCNA与细胞增殖有着密切的关系,可被用来作为评价细胞增殖状态、反映细胞增殖动力学的指标。无限制增殖和永生化是恶性肿瘤的重要生物学特征,近年来研究表明,PCNA作为DNA聚合酶的辅助蛋白直接参与细胞增殖的DNA复制,在细胞周期的S期明显增多,G₂-M期迅速减少,其合成及表达与DNA复制及肿瘤细胞增殖密切相关。胃癌多发生于增殖活跃的细胞,PCNA呈过度表达,PCNA的过度表达可能是端粒酶激活的重要途径之一,因此端粒酶的激活和PCNA的过度表达在胃癌细胞增殖中起重要作用。以PCNA为靶点,抑制胃癌细胞增殖,为胃癌治疗提供了一条新思路。

5 P27^{kip1}蛋白

现代医学认为肿瘤是一种细胞周期病,表现为细胞周期调控机制紊乱,肿瘤细胞增殖过多、凋亡过少为主要形式地失控性生长。抑制肿瘤细胞增殖是目前肿瘤治疗的主要目的之一。细胞周期受到细胞周期蛋白(Cyclin)、细胞周期蛋白依赖性激酶(CDKs)及其抑制剂(CDKIs)的共同调控。可以将细胞周期驱动机制比做一辆汽车的引擎(engine),有加速其运行的(positive agents)“油门”(gas),也有阻止其运行的(negative agents)“刹车”(brake)。P27^{kip1}蛋白是细胞周期的负性调节剂,其通过表达量的增减来调控细胞周期,主要使细胞周期阻滞于G₁期而抗肿瘤增殖,其通过抑制Cyclins-CDKs复合物在

Thr-160磷酸化的能力,从而竞争性抑制ATP结合。P27^{kip1}的主要功能是抗肿瘤细胞增殖,属于抑制蛋白,并可抗肿瘤转移^[20],其对CDK2的抑制作用最为显著,属细胞周期调控机制的“刹车”。

6 Ras基因家族

在人类基因中,Ras基因家族包括3个功能基因,即H-Ras, N-Ras, Ki-Ras基因,编码分子量为21 kDa的蛋白质,称P21蛋白,P21蛋白在细胞质内合成,经翻译修饰后与类脂结合,然后从合成部位转移到质膜,定位在细胞膜的内表面。当Ras基因发生点突变而活化时,P21蛋白可为细胞生长传递持续性促有丝分裂信号,导致细胞不断增殖,从而诱发肿瘤的发生。Ras基因参与对细胞增殖的调控,P21蛋白在肠化、不典型增生的胃黏膜上皮中均有阳性表达,提示Ras基因的激活与细胞增长、增殖有关。特别是H-Ras基因与胃癌关系较为密切,其所编码的蛋白质Ras P21具有调节细胞生长和生化的功能,他的异常表达对细胞恶变和胃癌的恶性表型起着重要作用。

7 P53基因

胃癌的发生是一个涉及多个基因改变的多步骤演变过程,有多种原癌基因和抑癌基因会发生结构和表达上的改变,造成细胞内蛋白质合成紊乱,细胞的生长、分化和调节失控而自主性生长。其中野生型P53基因的突变有着重要的意义^[21]。P53蛋白的生化功能为调节因子,对细胞周期中的增殖细胞具有调控作用,能控制G₀或G₁期细胞进入S期,从而抑制细胞的增殖。野生型P53被称作人体内“分子警察”,监测细胞基因的完整性,预防突变细胞的产生。而一旦P53基因发生缺失或突变,则丧失上述监视功能,且对细胞增殖转化起促进作用。

野生型P53基因作为抑癌基因,其表达蛋白具有监测细胞基因组完整的功能,可介导DNA损伤后细胞周期的抑制和损伤修复,从而抑制细胞的增殖,此外还有诱导细胞凋亡的功能,一些携带损伤DNA的细胞在其生命期限的早期,就依赖野生型P53基因表达的途径发生病理性细胞凋亡。而当其突变后,突变型P53基因通过抑制野生型P53基因的活性,失去抑制细胞周期运行和触发细胞凋亡的功能,使细胞正常增生转变成增生分化不良或过度增生,发生癌变。而

■ 相关报道

研究已经证实,在胃癌及癌前期病变中已出现端粒酶活性和端粒长度的改变。广州中医药大学唐纯志 *et al* 提出假设,中医药防治胃癌、中医药逆转胃癌前病变很有可能通过中药抑制端粒酶活性而达到防治目的,为中西医结合防治胃癌提供了新的思路。

■名词解释

1 端粒(telomere): 是位于真核细胞染色体末端的一种特殊结构, 他是由染色体末端DNA和末端结合蛋白形成的复合体。端粒的功能是“盖在”染色体两个末端, 完成并保持染色体末端复制, 防止染色体发生降解、融合、重组和丢失, 在维持染色体稳定性等方面起重要作用。

2 端粒酶: 一种核糖核蛋白体, 主要由RNA和蛋白质组成, 有逆转录酶活性, 他能以自身RNA为模版, 逆转录合成端粒的重要序列, 加入到缩短了的端粒中去以补偿细胞分裂时染色体端粒的缩短, 从而维持其原有长度, 使细胞得到“永生性”。

且新近研究表明, P53与COX-2的表达关系密切^[22], 推测COX-2可能P53基因突变参与胃癌发生的重要介质。

8 c-myc基因

原癌基因c-myc是c-myc基因家族的三大成员之一, 是一个具有多重功能的癌基因, 具有转录因子活性, 可诱导细胞凋亡抑制细胞分化, 调节细胞周期并参与细胞凋亡, 具有刺激细胞增殖和诱导细胞凋亡的双重作用, 当c-myc基因表达, 而又有生长因子存在时, 细胞则出现大量增殖, 因此, c-myc基因的表达与胃癌的转移密切相关。Onoda *et al*^[23]研究发现, c-myc基因在胃转移癌中的表达明显高于胃原发癌, 并通过分析得出, 表达c-myc mRNA的癌细胞容易转移, 且转移后表达更高。c-myc蛋白的作用位点在细胞核内参与细胞分化、增殖周期的调控。c-myc原癌基因激活的主要机制有扩增、重排和异常高表达。对有丝分裂能起调节作用, 胃癌癌前病变中c-myc基因表达从肠化、不典型增生至胃癌呈递增趋势。

细胞增殖是所有生命的重要特征, 细胞增殖周期的正常调控, 是细胞完成增殖分裂并且将遗传信息准确无误的传达到子代细胞的前提, 细胞通过细胞周期的完成, 进行增殖以繁衍后代。细胞增殖周期的调控失常可导致细胞异常增殖, 而发生肿瘤。总之, 胃癌细胞的增殖过程除与端粒酶、核转录因子、环氧化酶的异常表达有关外, 还与参与细胞周期调控的原癌基因、抑癌基因的变异或表达异常有密切关系, 这些基因或单独作用, 或相互协同, 参与胃癌细胞的增殖, 使肿瘤细胞生长以增殖过多、凋亡过少的失控性生长特征。因此抑制肿瘤细胞的恶性增殖, 是治疗恶性肿瘤的关键所在。如果能研究开发出一种药物直接针对肿瘤细胞增殖而起作用, 抑制肿瘤细胞生长, 使胃癌患者能够带瘤长期生存, 改善生存质量, 延长生存期, 其研究的理论和现实意义是十分明显的。

9 参考文献

- 1 孙秀娣, 牧人, 周有尚, 戴旭东, 张思维, 皇甫小梅, 孙杰, 李连弟, 鲁凤珠, 乔友林. 中国胃癌死亡率20年变化情况分析及其发展趋势预测. 中华肿瘤杂志 2004; 26: 4-9
- 2 Greider CW, Blackburn EH. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell* 1985; 43: 405-413
- 3 Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley

CB, West MD, Ho PL, Coviello GM, Wright WE, Weinrich SL, Shay JW. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 1994; 266: 2011-2015

- 4 杨金亮, 房殿春, 杨仕明, 罗元辉, 鲁荣, 刘为纹. 抑制端粒酶活性能增加胃癌细胞对顺铂的敏感性. 中华内科杂志 2001; 40: 478-479
- 5 何兴祥, 王家驹, 吴捷莉, 袁顺玉, 艾莉. 人端粒酶RNA的cDNA探针制备及其对胃粘膜细胞端粒酶RNA表达的检测. 华中科技大学学报(医学版) 2003; 32: 259-262
- 6 Sen R, Baltimore D. Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell* 1986; 47: 921-928
- 7 Li-Weber M, Laur O, Dern K, Krammer PH. T cell activation-induced and HIV tat-enhanced CD95(APO-1/Fas) ligand transcription involves NF-kappaB. *Eur J Immunol* 2000; 30: 661-670
- 8 Dupraz P, Cottet S, Hamburger F, Dolci W, Felley-Bosco E, Thorens B. Dominant negative MyD88 proteins inhibit interleukin-1beta /interferon-gamma-mediated induction of nuclear factor kappa B-dependent nitrite production and apoptosis in beta cells. *J Biol Chem* 2000; 275: 37672-37678
- 9 蔡跃芳, 张明亮, 严悦卿, 陈韬, 吴浪庭, 骆训武. 胃癌中COX-2及NF-κB的表达与其病理特征的关系. 中国现代医学杂志 2005; 15: 1830-1833
- 10 Grumont RJ, Rourke IJ, O'Reilly LA, Strasser A, Miyake K, Sha W, Gerondakis S. B lymphocytes differentially use the Rel and nuclear factor kappaB1 (NF-kappaB1) transcription factors to regulate cell cycle progression and apoptosis in quiescent and mitogen-activated cells. *J Exp Med* 1998; 187: 663-674
- 11 任芳丽. 端粒和端粒酶与衰老关系的研究进展. 动物医学进展 2002; 23: 19-20
- 12 Terasawa K, Sagae S, Takeda T, Ishioka S, Kobayashi K, Kudo R. Telomerase activity in malignant ovarian tumors with deregulation of cell cycle regulatory proteins. *Cancer Lett* 1999; 142: 207-217
- 13 Leung WK, To KF, Go MY, Chan KK, Chan FK, Ng EK, Chung SC, Sung JJ. Cyclooxygenase-2 upregulates vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis in human gastric carcinoma. *Int J Oncol* 2003; 23: 1317-1322
- 14 Tsujii M, Kawano S, Tsuji S, Sawaoka H, Hori M, DuBois RN. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell* 1998; 93: 705-716
- 15 Ratnasinghe D, Tangrea JA, Roth MJ, Dawsey SM, Anver M, Kasprzak BA, Hu N, Wang QH, Taylor PR. Expression of cyclooxygenase-2 in human adenocarcinomas of the gastric cardia and corpus. *Oncol Rep* 1999; 6: 965-968
- 16 Schmedtje JF Jr, Ji YS, Liu WL, DuBois RN, Runge MS. Hypoxia induces cyclooxygenase-2 via the NF-kappaB p65 transcription factor in human vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 1997; 272: 601-608
- 17 王维, 罗和生, 余保平. 胃癌及癌前病变中核因子-kappaB和端粒酶逆转录酶的表达与意义. 中国癌症杂志 2002; 12: 289-292
- 18 Garcia RL, Coltrera MD, Gown AM. Analysis of proliferative grade using anti-PCNA/cyclin monoclonal antibodies in fixed, embedded tissues. Comparison with flow cytometric analysis. *Am J*

- Pathol* 1989; 134: 733-739
- 19 Waga S, Hannon GJ, Beach D, Stillman B. The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature* 1994; 369: 574-578
 - 20 Coqueret O. New roles for p21 and p27 cell-cycle inhibitors: a function for each cell compartment? *Trends Cell Biol* 2003; 13: 65-70
 - 21 Wiksten JP, Lundin J, Nordling S, Kokkola A, von Boguslawski K, Haglund C. The prognostic value of p27 in gastric cancer. *Oncology* 2002; 63: 180-184
 - 22 Shun CT, Wu MS, Huang SP, Wang HP, Chuang SM, Lin JT. Cyclooxygenase-2 expression correlates with nuclear p53 accumulation in gastric carcinoma. *Hepatogastroenterology* 2003; 50: 988-992
 - 23 Onoda N, Maeda K, Chung YS, Yano Y, Matsui-Yuasa I, Otani S, Sowa M. Overexpression of c-myc messenger RNA in primary and metastatic lesions of carcinoma of the stomach. *J Am Coll Surg* 1996; 182: 55-59

■同行评价

本文综述了胃癌细胞增殖相关基因研究进展, 内容新颖, 有较高的学术价值。

电编 张敏 编辑 张焕兰

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

2007 年国际会议

Meeting Falk Symposium 159: IBD 2007 - Achievements in Research and Clinical Practice

4-5 May 2007

Istanbul

symposia@falkfoundation.de

Meeting ESGAR 2007 18th Annual Meeting and Postgraduate Course

12-15 June 2007

Lisbon

fca@netvisao.pt

Meeting European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition Congress 2007

9-12 May 2007

Barcelona

espghan2007@colloquium.fr

Meeting Falk Symposium 160: Pathogenesis and Clinical Practice in Gastroenterology

15-16 June 2007

Portoroz

symposia@falkfoundation.de

Digestive Disease Week

19-24 May 2007

Washington Convention Center, Washington DC

Meeting ILTS 13th Annual International Congress

20-23 June 2007

Rio De Janeiro

www.ilts.org

Meeting Gastrointestinal Endoscopy Best Practices: Today and Tomorrow, ASGE Annual Postgraduate Course at DDW

23-24 May 2007

Washington - DC

tkoral@asge.org

Meeting 9th World Congress on Gastrointestinal Cancer

27-30 June 2007

Barcelona

meetings@imedex.com

胃泌素受体作为分子靶向在肿瘤中的表达及应用

江春平, 孔 诚, 丁义涛

■背景资料

Gas广泛存在于胃肠道和胰腺组织内,在调控生理功能及某些疾病的发病机制中都有重要作用。近年来研究表明, Gas对肿瘤细胞尤其是消化系肿瘤的生长具有促进作用,其相关肿瘤组织中存在胃泌素受体。

江春平, 丁义涛, 南京大学医学院附属鼓楼医院肝胆外科 江苏省南京市 210008
孔诚, 江苏省肿瘤医院 江苏省南京市 210009
卫生部重点课题, No. WKJ2005-2-032
通讯作者: 丁义涛, 210008, 江苏省南京市中山路321号, 南京大学医学院附属鼓楼医院肝胆外科. dingyitao@yahoo.com.cn
电话: 025-83304616-11902
收稿日期: 2006-09-18 接受日期: 2006-11-16

Expression of gastrin receptor in tumors and its application as a molecular target for cancer diagnosis and therapy

Chun-Ping Jiang, Cheng Kong, Yi-Tao Ding

Chun-Ping Jiang, Yi-Tao Ding, Department of Hepatobiliary Surgery, Nanjing Drum Tower Hospital, Medical College of Nanjing University, Nanjing 210008, Jiangsu Province, China

Cheng Kong, Jiangsu Cancer Hospital, Nanjing 210009, Jiangsu Province, China

Supported by the Fund from Ministry of Health in China, No. WKJ2005-2-032

Correspondence to: Yi-Tao Ding, Department of Hepatobiliary Surgery, Nanjing Drum Tower Hospital, Medical College of Nanjing University, 321 Zhongshan Road, Nanjing 210008, Jiangsu Province, China. dingyitao@yahoo.com.cn

Received: 2006-09-18 Accepted: 2006-11-16

Abstract

Gastrin is widely distributed in gastrointestinal tract and pancreatic tissues, and it plays important roles in the modulation of physiological functions and pathogenic mechanism of some diseases. Recent studies showed that gastrin might promote the pathogenesis and growth of tumors, especially digestive tumors such as gastric cancer and colorectal cancer. The biological effect of gastrin is mainly mediated by cholecystokinin (CCK) receptors. Gastrin mRNA has been found in CCK-receptor positive small-cell lung carcinoma, breast cancer, ovarian cancer and cancer stem cells of various origins and it may serve as the indicator of self-secretive regulation. The tumors with over-expressed gastrin receptor can be diagnosed and treated by radio-labelling or linking to the cytotoxic agents with gastrin peptide and analogs, and scintigraphy

was used to visualize the image *in vivo*.

Key Words: Gastrin; Gastrin receptor; Cholecystokinin; Tumor

Jiang CP, Kong C, Ding YT. Expression of gastrin receptor in tumors and its application as a molecular target for cancer diagnosis and therapy. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(9):980-985

摘要

胃泌素(Gas)广泛存在于胃肠道和胰腺组织内,在调控生理功能及某些疾病的发病机制中都有重要作用。近来研究表明, Gas能够促进肿瘤尤其是胃癌、大肠癌等消化系肿瘤的发生、发展。Gas的生物作用主要通过CCK受体介导, Gas mRNA在一些CCK受体阳性的小细胞肺癌、乳腺癌、卵巢癌,不同来源的癌干细胞,已经发现有表达,可能作为这些肿瘤自分泌生长调节的指示指标。对于过表达胃泌素受体的肿瘤,可以给予胃泌素多肽及类似物作放射性标记或连接细胞毒药物,体内用闪烁成像法跟踪显像,从而用于肿瘤的诊断和治疗。

关键词: 胃泌素; 胃泌素受体; 肿瘤

江春平, 孔诚, 丁义涛. 胃泌素受体作为分子靶向在肿瘤中的表达及应用. *世界华人消化杂志* 2007;15(9):980-985

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/980.asp>

0 引言

胃泌素(gastrin, Gas)是研究最早、最多的胃肠激素,广泛存在于胃肠道和胰腺组织内,在调控生理功能及某些疾病的发病机制中都有重要作用。近年来,动物实验及人体外细胞系的研究表明, Gas对肿瘤细胞尤其是消化系肿瘤的生长具有促进作用,其相关肿瘤组织中存在胃泌素受体(gastrin receptor, GR)。但Gas及其受体在肿瘤组织中表达的意义尚不十分清楚。现综述之。

1 Gas, GR及受体拮抗剂

人体Gas称为 I 型Gas或按所含氨基酸数称为 G-17, 他的修饰体, 即一个硫酸基团与12位酪

氨酸发生酯化称为II型Gas或按所含氨基酸数称为G-34. 而G-17的缩短形式含13个氨基酸称为微Gas. 此外在基础研究中还有甘氨酸Gas(Gly-G)和C端酰胺化Gas. Gas主要由胃窦及小肠黏膜的G细胞分泌, 另外人胰岛的D细胞也分泌. 在中枢神经系统、延髓的迷走神经背核也含有Gas. Gas的作用很多. 对消化系统, 刺激胃酸分泌, 促进胃肠生理运动变化. 而幽门螺杆菌诱导的高Gas血症, 一直是消化道溃疡的重要发病机制. 另外Gas可作为大部分胃肠道的生理生长因子, 促进胃肠黏膜上皮细胞增殖, 也是一些肿瘤如结肠, 胃, 脑肿瘤的生长因子. Gas的生物作用主要通过CCK2受体介导^[1], 而与CCK1受体的亲和力相对较低, 不同非多肽选择性CCK拮抗剂(nonpeptidic selective CCK antagonists)与CCK2受体的亲和力也不尽相同. 最近, 其他的CCK受体被描述, 如CCK-C或一种存在于瑞士人的3T3纤维原细胞中的Gas受体^[2].

CCK1和CCK2受体已在一些正常组织中识别^[3]. CCK2受体主要在肠黏膜中表达, 在内分泌腺及脑组织中也有表达^[4]. 近期有报道, 人胰腺腺泡细胞, 与大鼠胰腺腺泡细胞相比, 不表达有意义的CCK受体数量^[5].

2 Gas与消化道肿瘤的关系

2.1 Gas对消化道肿瘤发生的促进作用 Gas对消化道上皮细胞的刺激生长作用吸引着人们对其在肿瘤发生特别是结直肠癌的发生中的作用进行了广泛的探索. Gas和结直肠癌的关系一直是有争议的, 但近几年的几个发现使得人们较清楚的理解Gas在这些常见肿瘤中的作用. 研究表明, Gas及GR基因的异常表达, 可以介导有力的下游事件, Gas基因可以引起抗凋亡属性, 同时GR活化一些因子的转录包括EGF受体配基, REG蛋白和基质金属蛋白酶. 在结肠癌的发生中, Gas和GR的基因表达在上皮细胞内活化腺瘤→腺癌顺序的早期阶段. 这些可以解释高Gas血症与肿瘤的形成有关的相关证据.

现已明确, 长期高Gas血症可导致胃ECL (enterochromaffin-like) 细胞类癌的形成. Gas不仅通过刺激ECL细胞合成和释放组胺, 介导对壁细胞胃酸分泌的刺激作用, 亦刺激ECL细胞过度增殖, 形成肿瘤. GR拮抗剂可抑制高Gas血症介导的ECL细胞过度增殖.

Sobhani *et al*^[6]对23例高Gas血症的卓一艾综合征患者进行结肠镜检和细胞增殖动力学研究.

结果表明长期高胃泌素血症可以促进结肠黏膜过度增生而发生癌变. 生大豆粉长期饲养大鼠可导致持续高Gas血症, 引起胰腺局灶性增生、癌变. 内源性高Gas血症与消化道肿瘤自然形成的关系, 文献报道差异较大^[7]. Osbuch *et al*^[8]对97例卓一艾综合征患者的研究并未发现结肠癌发生率升高. 内源性高Gas血症虽可明显促进胰腺蛋白和DNA合成, 但对胰腺癌自然发生和致癌剂诱发胰腺癌均无明显影响^[9].

胃窦幽门螺杆菌(*H pylori*)感染与消化道肿瘤形成的关系正受到人们的重视, 可能与其诱导的高Gas血症有关^[10]. Wang *et al*^[11]研究发现, 高Gas血症与*H pylori*感染在胃癌的发生、发展过程中有协同作用.

有研究表明, Gas可增加化学致癌剂的作用, 从而增加诱癌率. 但有实验结果显示, Gas可加速致癌剂引起的胃黏膜损伤的愈合, 从而抑制胃癌发生^[12]. Gas在化学致癌剂诱发消化道肿瘤中的作用仍有争议. 虞积耀 *et al*^[13]认为Gas可能具有促癌因子的作用. 产生不同结论的原因可能与致癌剂种类、剂量、投放方式、Gas分子形式、观察时间、进食成分等因素有关. Gas对肿瘤发生的促进作用究竟是始动因素或继发因素有待进一步研究.

2.2 Gas对消化道肿瘤的促生长作用 Gas作为一种营养性胃肠激素, 不仅能刺激正常黏膜组织的生长, 而且还能刺激胃癌、大肠癌等肿瘤细胞的生长. 最近在起源于Gas前体的非经典Gas的工作及在过表达Gas基因的小鼠及Gas基因敲除小鼠的研究指出Gas迄今毫无疑问的调节肿瘤细胞增殖, 迁移, 分化的作用. 其作用机制目前尚未完全阐明, 大多数研究认为肿瘤细胞能分泌释放自己的Gas, 通过自分泌的形式起作用. 同时肿瘤又表达GR/CCK2受体(或/和异构体的复合体), 介导增殖作用. 当在腺瘤→腺癌顺序的早期阶段的表达, 自分泌Gas也对肿瘤的发展起作用. 一些动物模型试验显示了全身的高Gas血症促进了正常及结肠肿瘤上皮细胞的增殖. 在人中观察到高Gas血症时结肠上皮细胞的高度增生, 同时一个设计较好的流行病学试验显示了结直肠癌增长的发病率. 一般认为Gas与其受体结合后通过细胞内信号传导途径来调节肿瘤细胞的生长. 肿瘤细胞产生的Gas与其自身的受体结合后, 刺激肿瘤细胞生长. 体外实验表明, Gas对表达GR的肿瘤细胞有刺激生长的作用, 而对GR阴性的肿瘤细胞则无此作用, 且Gas对GR

■研发前沿

类似于生长抑素的应用原理, 对于过表达GR的肿瘤, 可以利用配基受体的高亲和力、高特异性的结合, 给予Gas多肽及类似物作放射性标记或连接细胞毒药物, 体内用闪烁成像法跟踪显像, 从而用于肿瘤的诊断和治疗. 不同的研究小组最近尝试研发基于多肽的CCK2选择性的放射性药物, 适合于体内的CCK2受体闪烁成像法和放射治疗. 在体内通过用¹¹¹In-DTPA-微Gas标记的CCK2受体闪烁成像法, 大部分的肿瘤位点是可视化的.

■应用要点

随着肿瘤生长调节机制研究的不断深入,人们可望通过阻断调节过程中的多个环节来抑制肿瘤细胞的生长,包括内源性激素水平的调节,受体的结合,细胞内信号传导以及Gas基因的表达等方面。为进一步提高防治肿瘤的疗效,人们一直在寻求更加安全有效的治疗方法,目前内分泌疗法正引起人们的广泛兴趣。在不远的将来,小分子多肽及其受体相关新药的不断问世必将带给肿瘤的诊疗治疗带来新的希望。

阳性肿瘤细胞的促生长过程符合受体结合的饱和和学说。可见GR在肿瘤细胞的自分泌生长过程中发挥重要作用。Gas促进细胞生长的模式有两种^[14]:一种是细胞外环路, Gas分泌至细胞外,并结合于细胞表面的GR, 信号传至细胞内,促进细胞增殖。另外,与GR结合后还可增加细胞内cAMP水平,通过cAMP将信息最终传入细胞内,调节细胞的生长与分化。另一种模式是细胞内环路,细胞内的Gas与胞内受体结合。信号传至核内,从而促进细胞增殖。大量的体外实验证明, Gas可刺激多种GR阳性的肿瘤细胞株的生长,如MKN45, Lovo, Colo320, HT19和AR42J等细胞株在加有Gas的培养基中其细胞增殖加快, DNA、蛋白质合成旺盛。但也有学者认为大肠癌细胞对Gas存在依赖与非依赖的不同,这种差异与癌细胞的分化程度有关^[15]。Mauss *et al*^[16]发现Gas对结肠癌细胞株的生长作用是有选择性的。17肽Gas可刺激H729, Lovo, Colo320等细胞株的生长,却抑制T84, HCT-116细胞株的生长,而对HT-29, NCS-H719的生长刺激作用仅在高浓度下进行。Ishizuka *et al*^[17]试图阐明Gas刺激胃癌细胞生长的机制,他们观察了G-17对胃癌细胞株AGS-9, AGS-10(具有GR)和AGS-12(不具有GR)的作用,发现Gas可促进有GR的AGS-9和AGS-10肿瘤细胞株的生长,GR阻滞剂JMV520能抑制这两种细胞株对Gas的反应。Gas不影响无GR的AGS-12的生长。许多实验还证明, Gas能激活I型cAMP依赖型蛋白激酶。增加鸟氨酸脱羧酶活性,这两种酶与细胞的增殖与分化密切相关^[18]。

最近, Gas对消化道肿瘤细胞凋亡的影响已引起人们的关注。肿瘤的发生、生长是细胞增殖和凋亡消长的结果。有研究指出,细胞凋亡障碍在消化道肿瘤的发生和失控性生长中有重要作用。Kidd *et al*^[19]对高Gas血症动物模型的研究提出, Gas可能通过调节bcl-2基因家族蛋白的水平和比例,抑制细胞凋亡,从而促进胃癌的发生和生长。

3 肿瘤组织或细胞中GR的表达

CCK2受体在小细胞肺癌中的表达已经被明确了很长时间,但在非小细胞性肺癌却没有发现^[20]。在胃肠肿瘤中这方面的发现仍是可疑的^[21]。尽管较早的研究报道了CCK2受体在结肠癌和胃癌中的表达,但最近的调查在这些肿瘤中却没有发现高亲和力的CCK2受体蛋白^[22],尽管其mRNA常常被识别^[23]。在外分泌胰腺癌也可能存

在类似的情况,尽管CCK1和CCK2受体mRNA在大多数肿瘤中可以被识别到^[24-25]。在肿瘤细胞自身,这种受体蛋白很难被检测到。在胰腺癌标本中,最常检测到CCK受体表达的组织是神经(CCK1)和胰岛(CCK2),但不是肿瘤^[26]。对这种矛盾的一种可能的解释是CCK2受体的突变的存在在胰腺、结直肠和胃癌^[27-29]。在这些肿瘤中已经被检测到的CCK2受体的一种错剪接形式具有组成性的活性和营养性的效果^[27-28]。这些突变的受体可能改变了绑定属性。但是最近,正常CCK2受体蛋白在髓型甲状腺癌中高发生率被发现(92%),尽管在分化型甲状腺癌中没有发现^[30-32]。CCK2受体也常在星形细胞瘤中发现(65%),在性索间质卵巢癌(100%);在一些神经内分泌胃肠胰肿瘤(特别是胰岛瘤);在乳腺和子宫内膜腺癌;在几种软组织肿瘤,特别在平滑肌肉瘤^[33]。他们在下列肿瘤中极少表达或不表达:脑膜瘤,成神经细胞瘤,施旺细胞瘤,胶质母细胞瘤,淋巴瘤,肾细胞癌,前列腺癌,肝细胞性肝癌,以及神经内分泌肿瘤如垂体腺瘤,嗜铬细胞瘤,副神经节瘤,甲状旁腺腺瘤。CCK1受体在神经内分泌肺和胃肠胰肿瘤,脑膜瘤,成神经细胞瘤^[34]。用免疫组化检测到肿瘤中CCK1或CCK2受体还没有被报道过。

用原位杂交测量Gas mRNA在一些CCK受体阳性的小细胞肺癌,乳腺癌,卵巢癌,不同来源的干细胞癌,已经发现有表达,可能作为这些肿瘤自分泌生长调节的指示指标^[33]。相反, Gas和CCK mRNAs在CCK2受体表达的髓型甲状腺癌却没有发现。

4 Gas、受体、受体拮抗剂在临床中的应用

4.1 肿瘤组织、血清中Gas测定的临床意义 有关消化道肿瘤组织、血清中Gas水平的研究结果尚不一致,多数研究结果显示肿瘤患者组织、血清中Gas含量高于健康对照组和胃肠道良性疾病组^[35-37]。肿瘤患者手术后血清Gas含量明显降低,认为血清Gas含量测定对诊断消化道肿瘤有一定的临床意义。但有实验结果显示胃癌患者基础状态下Gas水平明显低于各良性疾病^[38]。也有研究指出,胃癌患者血清Gas含量升高是一种继发性改变,不能作为一种肿瘤标志物,也不能作为一个预后因素。造成研究结果不一致的原因除了Gas本身性质的不稳定,以及测定方法、检测指标不统一外,还可能与观察例数、血清标本的处理及实验设计等多种因素有关。

血清Gas水平不一定能反映癌组织中Gas水平的变化, 血清Gas水平很容易受进食、生理因素、病理状况等的影响。赵双罗 *et al*报道胃癌患者Gas水平升高与*H. pylori*感染有关, 肿瘤的不同发病部位、分化程度等也可能有影响。因此, 在监测或评估Gas水平时, 应注意排除这些干扰因素的影响。

4.2 放射标记或细胞毒多肽结合GR用于诊断和靶向治疗 类似于生长抑素的应用原理, 对于过表达GR的肿瘤, 可以利用配基受体的高亲和力、高特异性的结合, 给予Gas多肽及类似物作放射性标记或连接细胞毒药物, 体内用闪烁成像法跟踪显像, 从而用于肿瘤的诊断和治疗。

4.2.1 靶向药物 不同的研究小组最近尝试发展基于多肽的CCK2-选择性的放射性药物, 适合于体内的CCK2受体闪烁成像法和放射治疗。化合物的一组是基于螯合剂(例如DTPA或DOTA)连接的非硫酸化的CCK八肽类似物, 用¹¹¹In标记, 比如¹¹¹In-DTPA-[α -Asp²⁶, Nle^{28,31}]CCK^[39]。化合物的另一组是基于¹³¹I标记的或¹¹¹In-DTPA标记的微Gas^[40]。所有的化合物能够通过其高亲和力的结合, 特异性的标记CCK2受体, 同样也能体内结合动物的CCK2受体, 特别是在胃和在表达CCK2的裸鼠异种移植TT癌细胞^[39-40]。

4.2.2 闪烁成像法和放射治疗 体外受体绑定研究已表明高CCK2受体发生率在髓型甲状腺癌^[41]。因此, 这些肿瘤被选择用来指导临床调查^[40]。在体内通过用¹¹¹In-DTPA-微Gas标记的CCK2受体闪烁成像法, 大部分的肿瘤位点是可视化的。Kwekkeboom *et al*^[42]作的另一项研究在晚期转移性髓型甲状腺癌患者中也在体内显现肿瘤位点, 通过¹¹¹In-DTPA-[α -Asp²⁶, Nle^{28,31}]CCK。但是在这个研究中, 并不是所有的肿瘤都被检测到。观察者提出一些未分化癌可能丢失了CCK2受体或者所使用的放射性配基不是足够敏感的。1例令人印象深刻的转移性髓型甲状腺癌的全身闪烁成像显示, 在胸腹头表达CCK2受体阳性的转移灶是相当丰富的。同样, 令人鼓舞的初步研究表明, 用放射标记的微Gas作放射性治疗在髓型甲状腺癌患者中可以减少瘤负荷^[43]。但其肾毒性可能是个问题。因为这个原因, 新的CCK类似物带有较少的肾吸收, 最近已经被发展。所有的髓型甲状腺癌研究, 利用闪烁成像质量的内部阳性对照在每个患者中, 也即是一种非病理的组织, 胃黏膜, 可能一直是显像的。在脑组织之后, 胃黏膜具有最高的CCK2受体表达。髓型甲

状腺癌是第一个显示表达了足够密度CCK2受体的人类肿瘤, 以用于确定体内CCK2受体闪烁成像法和放射治疗的原理的证据。用CCK2受体定靶髓型甲状腺癌可能比用SSTR定靶更加有价值, CCK2受体的发生率比SST2受体要高。诊断学上的细分, 例如CCK2受体阳性髓型甲状腺癌与阴性髓型甲状腺癌, 可能同样是有价值的。不久的将来我们将明白是否相同的靶向方法对于其他的CCK2表达肿瘤是否能被应用。例如, 小细胞肺癌, 星细胞瘤, 卵巢性索间质细胞瘤或一些神经内分泌胃肠肿瘤例如胰岛瘤。结直肠癌和胰腺癌, 两种在体外CCK2受体蛋白表达的数据还有争议的肿瘤类型, 用以上提到的技术在体内是否显像还有待研究。其他主要的CCK受体亚型, CCK1受体表现为优先表达在几种人类肿瘤类型中, 比如胃肠神经内分泌肿瘤, 脑膜瘤和成神经细胞瘤。CCK1选择性多肽放射性药物目前对于这些肿瘤的体内靶向并不是可用的。因为这些以上提到的肿瘤表达CCK1受体经常也表达大量的SSTR, 以及后者能被用奥曲肽成功的靶向结合。发展CCK1选择性放射性药物的需要的优先权较低。

4.3 非放射性, 非细胞毒性的GR拮抗剂对肿瘤的抑制作用 甘氨酸Gas(G-Gly), Gas前体(pro-gastrin)的生长促进效果, 已经在一些例子中被报道^[2,44-45]。但是仍不清楚这些多肽优先通过哪些CCK/GR(CCK1, CCK2, CCK-C或其他类型)起作用^[21]。尽管大量的高效能和选择性CCK1和CCK2类似物, 但没有成功的临床研究用这些非放射性类似物作为生长抑制剂用于长期的肿瘤治疗^[21]。相反, 最新发展的¹¹¹In-和⁹⁰Y-标记的CCK/Gas放射性药物看来更适合于诊断和可能治疗CCK/GR表达肿瘤。许多有效的非多肽CCK1和CCK2受体拮抗剂在过去的20 a中已被发展, 主要为治疗胃肠道功能紊乱^[21,46]。尽管许多在动物和肿瘤细胞中的研究已经表明这些拮抗剂及类似物的一致的抗增殖作用, 但没有临床研究可以毫无疑问的明确CCK1或CCK2介导的肿瘤生长控制在人肿瘤中的作用。GR拮抗剂及抗分泌药物已经显示出无明显效果, 新的抑制方法, 包括抗Gas抗体的应用, 正在被评估。目前发现有三类药物能抑制Gas对肿瘤细胞的营养作用。第一类是GR拮抗剂, 如谷丙胺。体外实验证明, 不同浓度Gas对BGC-823细胞株的生长均有显著促进作用, 而这种作用可被其受体拮抗剂谷丙胺和L-365260所抑制^[47]。谷丙胺是一种

■同行评价

本文系统综述了Gas的促肿瘤生长作用以及受体拮抗剂的临床应用, 论据充足, 论点明确, 有一定的新颖性和指导意义。

较弱的受体拮抗剂。第二类是生长抑素类,他可通过本身的抑癌作用,降低血清Gas,诱导肿瘤细胞凋亡等途径抑制癌细胞生长。第三类为前列腺素类,前列腺素E2能降低血清Gas水平和抑制癌细胞释放Gas,从而抑制癌细胞生长。此三类药物仅对具有GR的肿瘤有效。随着Gas及其受体的深入研究,消化道肿瘤的发病机制进一步揭示,临床设计更高效能和选择性的受体激动剂和拮抗剂成为可能,将为消化道肿瘤的内分泌治疗开辟新的途径。

总之,随着肿瘤生长调节机制研究的不断深入,人们可望通过阻断调节过程中的多个环节来抑制肿瘤细胞的生长,包括内源性激素水平的调节,受体的结合,细胞内信号传导以及Gas基因的表达等方面。为进一步提高防治肿瘤的疗效,人们一直在寻求更加安全有效的治疗方法,目前内分泌疗法正引起人们的广泛兴趣。在不远的将来,小分子多肽及其受体相关新药的不断问世必将带给肿瘤的诊断治疗带来新的希望。

5 参考文献

- Wank SA, Pisegna JR, de Weerth A. Brain and gastrointestinal cholecystokinin receptor family: structure and functional expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 8691-8695
- Baldwin GS, Shulkes A. Gastrin, gastrin receptors and colorectal carcinoma. *Gut* 1998; 42: 581-584
- Noble F, Wank SA, Crawley JN, Bradwejn J, Seroogy KB, Hamon M, Roques BP. International Union of Pharmacology. XXI. Structure, distribution, and functions of cholecystokinin receptors. *Pharmacol Rev* 1999; 51: 745-781
- Reubi JC, Waser B, Laderach U, Stettler C, Friess H, Halter F, Schmassmann A. Localization of cholecystokinin A and cholecystokinin B-gastrin receptors in the human stomach. *Gastroenterology* 1997; 112: 1197-1205
- Ji B, Bi Y, Simeone D, Mortensen RM, Logsdon CD. Human pancreatic acinar cells lack functional responses to cholecystokinin and gastrin. *Gastroenterology* 2001; 121: 1380-1390
- Sobhani I, Lehy T, Laurent-Puig P, Cadiot G, Ruszniewski P, Mignon M. Chronic endogenous hypergastrinemia in humans: evidence for a mitogenic effect on the colonic mucosa. *Gastroenterology* 1993; 105: 22-30
- 张国尧, 张丰深, 马宽生. Gastrin/CCK在消化道肿瘤发生中的作用. *临床消化病杂志* 2003; 15: 91-93
- Orbuch M, Venzon DJ, Lubensky IA, Weber HC, Gibril F, Jensen RT. Prolonged hypergastrinemia does not increase the frequency of colonic neoplasia in patients with Zollinger-Ellison syndrome. *Dig Dis Sci* 1996; 41: 604-613
- Chu M, Kullman E, Rehfeld JF, Borch K. Effect of chronic endogenous hypergastrinaemia on pancreatic growth and carcinogenesis in the hamster. *Gut* 1997; 40: 536-540
- Fireman Z, Trost L, Kopelman Y, Segal A, Sternberg A. *Helicobacter pylori*: seroprevalence and colorectal cancer. *Isr Med Assoc J* 2000; 2: 6-9
- Wang TC, Dangler CA, Chen D, Goldenring JR, Koh T, Raychowdhury R, Coffey RJ, Ito S, Varro A, Dockray GJ, Fox JG. Synergistic interaction between hypergastrinemia and *Helicobacter* infection in a mouse model of gastric cancer. *Gastroenterology* 2000; 118: 36-47
- Townsend CM Jr, Singh P, Thompson JC. Effects of gastrointestinal peptides on gastrointestinal cancer growth. *Gastroenterol Clin North Am* 1989; 18: 777-791
- 虞积耀, 王鲁平, 吴集义, 吴霞, 姚林. 胃内分泌细胞增生的分类与内分泌肿瘤的诊断. *诊断病理学杂志* 1994; 1: 78-80
- 杨川华, 萧树东. 胃泌素和结肠肿瘤. *国外医学·消化系疾病分册* 2001; 21: 13-16
- 何双梧, 李家琪. 胃泌素及其受体与大肠癌关系研究进展. *中国普外基础与临床杂志* 1998; 5: 51-52
- Mauss S, Niederau C, Hengels KJ. Effects of gastrin, proglumide, loxiglumide and L-365,260 on growth of human colon carcinoma cells. *Anticancer Res* 1994; 14: 215-220
- Ishizuka J, Martinez J, Townsend CM Jr, Thompson JC. The effect of gastrin on growth of human stomach cancer cells. *Ann Surg* 1992; 215: 528-534
- 朱建伟, 陈玉泉. 胃泌素与恶性肿瘤. *普外临床* 1996; 11: 7-9
- Kidd M, Tang LH, Modlin IM, Zhang T, Chin K, Holt PR, Moss SF. Gastrin-mediated alterations in gastric epithelial apoptosis and proliferation in a mastomys rodent model of gastric neoplasia. *Digestion* 2000; 62: 143-151
- Matsumori Y, Katakami N, Ito M, Taniguchi T, Iwata N, Takaishi T, Chihara K, Matsui T. Cholecystokinin-B/gastrin receptor: a novel molecular probe for human small cell lung cancer. *Cancer Res* 1995; 55: 276-279
- Jensen RT. Involvement of cholecystokinin/gastrin-related peptides and their receptors in clinical gastrointestinal disorders. *Pharmacol Toxicol* 2002; 91: 333-350
- Imdahl A, Mantamadiotis T, Eggstein S, Farthmann EH, Baldwin GS. Expression of gastrin, gastrin/CCK-B and gastrin/CCK-C receptors in human colorectal carcinomas. *J Cancer Res Clin Oncol* 1995; 121: 661-666
- Clerc P, Dufresne M, Saillan C, Chastre E, Andre T, Escricut C, Kennedy K, Vaysse N, Gespach C, Fourmy D. Differential expression of the CCK-A and CCK-B/gastrin receptor genes in human cancers of the esophagus, stomach and colon. *Int J Cancer* 1997; 72: 931-936
- Goetze JP, Nielsen FC, Burcharth F, Rehfeld JF. Closing the gastrin loop in pancreatic carcinoma: coexpression of gastrin and its receptor in solid human pancreatic adenocarcinoma. *Cancer* 2000; 88: 2487-2494
- Weinberg DS, Ruggeri B, Barber MT, Biswas S, Miknyocki S, Waldman SA. Cholecystokinin A and B receptors are differentially expressed in normal pancreas and pancreatic adenocarcinoma. *J Clin Invest* 1997; 100: 597-603
- Reubi JC, Waser B, Gugger M, Friess H, Kleeff J, Kaye H, Buchler MW, Laissue JA. Distribution of

- CCK1 and CCK2 receptors in normal and diseased human pancreatic tissue. *Gastroenterology* 2003; 125: 98-106
- 27 Hellmich MR, Rui XL, Hellmich HL, Fleming RY, Evers BM, Townsend CM Jr. Human colorectal cancers express a constitutively active cholecystokinin-B/gastrin receptor that stimulates cell growth. *J Biol Chem* 2000; 275: 32122-32128
- 28 Ding WQ, Kuntz SM, Miller LJ. A misspliced form of the cholecystokinin-B/gastrin receptor in pancreatic carcinoma: role of reduced sellular U2AF35 and a suboptimal 3'-splicing site leading to retention of the fourth intron. *Cancer Res* 2002; 62: 947-952
- 29 Laghi L, Ranzani GN, Bianchi P, Mori A, Heinimann K, Orbetegli O, Spauldo MR, Luinetti O, Francisconi S, Roncalli M, Solcia E, Malesci A. Frameshift mutations of human gastrin receptor gene (hGARE) in gastrointestinal cancers with microsatellite instability. *Lab Invest* 2002; 82: 265-271
- 30 Reubi JC, Waser B. Unexpected high incidence of cholecystokinin-B/gastrin receptors in human medullary thyroid carcinomas. *Int J Cancer* 1996; 67: 644-647
- 31 Amiri-Mosavi A, Ahlman H, Tisell LE, Wangberg B, Kolby L, Forssell-Aronsson E, Lundberg PA, Lindstedt G, Nilsson O. Expression of cholecystokinin-B/gastrin receptors in medullary thyroid cancer. *Eur J Surg* 1999; 165: 628-631
- 32 Blaker M, de Weerth A, Tometten M, Schulz M, Hoppner W, Arlt D, Hoang-Vu C, Dralle H, Terpe H, Jonas L, von Schrenck T. Expression of the cholecystokinin 2-receptor in normal human thyroid gland and medullary thyroid carcinoma. *Eur J Endocrinol* 2002; 146: 89-96
- 33 Schaer JC, Reubi JC. High gastrin and cholecystokinin (CCK) gene expression in human neuronal, renal, and myogenic stem cell tumors: comparison with CCK-A and CCK-B receptor contents. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 233-239
- 34 Mailleux P, Vanderhaeghen JJ. Cholecystokinin receptors of A type in the human dorsal medulla oblongata and meningiomas, and of B type in small cell lung carcinomas. *Neurosci Lett* 1990; 117: 243-247
- 35 许曼华, 翟卫中, 吴自英. 消化道肿瘤血清胃泌素的测定及其临床价值的探讨. *江苏医药* 1997; 23: 550-551
- 36 张鸿坤, 林建灿. 大肠癌中胃泌素和胃泌素mRNA检测的临床意义. *大肠肛门病外科杂志* 1998; 4: 20-23
- 37 颜鸣, 范跃祖, 朱上林, 林言箴, 叶元康, 汤如勇. 结直肠癌胃泌素水平及其受体表达的研究. *上海医学* 2001; 24: 678-680
- 38 王明玉, 王学红, 田春铎, 师成杰. 消化道良性疾病与胃癌患者血清胃泌素水平观察. *齐鲁肿瘤杂志* 1996; 3: 34-35
- 39 Reubi JC, Waser B, Schaer JC, Laederach U, Erion J, Srinivasan A, Schmidt MA, Bugaj JE. Unsulfated DTPA- and DOTA-CCK analogs as specific high-affinity ligands for CCK-B receptor-expressing human and rat tissues *in vitro* and *in vivo*. *Eur J Nucl Med* 1998; 25: 481-490
- 40 Behr TM, Jenner N, Radetzky S, Behe M, Gratz S, Yucekent S, Raue F, Becker W. Targeting of cholecystokinin-B/gastrin receptors *in vivo*: preclinical and initial clinical evaluation of the diagnostic and therapeutic potential of radiolabelled gastrin. *Eur J Nucl Med* 1998; 25: 424-430
- 41 Reubi JC, Schaer JC, Waser B. Cholecystokinin(CCK)-A and CCK-B/gastrin receptors in human tumors. *Cancer Res* 1997; 57: 1377-1386
- 42 Kwekkeboom DJ, Bakker WH, Kooij PP, Erion J, Srinivasan A, de Jong M, Reubi JC, Krenning EP. Cholecystokinin receptor imaging using an octapeptide DTPA-CCK analogue in patients with medullary thyroid carcinoma. *Eur J Nucl Med* 2000; 27: 1312-1317
- 43 Behr TM, Behe MP. Cholecystokinin-B/Gastrin receptor-targeting peptides for staging and therapy of medullary thyroid cancer and other cholecystokinin-B receptor-expressing malignancies. *Semin Nucl Med* 2002; 32: 97-109
- 44 Rehfeld JF, van Solinge WW. The tumor biology of gastrin and cholecystokinin. *Adv Cancer Res* 1994; 63: 295-347
- 45 Singh P, Velasco M, Given R, Varro A, Wang TC. Progastrin expression predisposes mice to colon carcinomas and adenomas in response to a chemical carcinogen. *Gastroenterology* 2000; 119: 162-171
- 46 de Tullio P, Delarge J, Pirotte B. Therapeutic and chemical developments of cholecystokinin receptor ligands. *Expert Opin Investig Drugs* 2000; 9: 129-146
- 47 王俊平, 黄乃霞, 黄象谦, 吴琳. 胃泌素及其受体拮抗剂对BGC-823细胞系生长的调节. *胃肠病学和肝病学杂志* 1996; 5: 276-279

电编 张敏 编辑 张焕兰

蛋白酶激活受体-2与消化系统疾病的研究进展

刘建, 李非

■背景资料

蛋白酶激活受体-2(PAR-2)是10余年前发现的一种细胞膜表面受体, 属于G蛋白耦联受体家族。PAR-2广泛分布于全身多种器官组织, 可被多种分子激活, 其中最有效的生理激活剂是胰蛋白酶。目前关于PAR-2病理生理作用的研究主要集中在消化系统、肿瘤、心血管系统、变态反应、疼痛等。

刘建, 李非, 首都医科大学宣武医院普外科 北京市 100053
通讯作者: 刘建, 100053, 北京市宣武区长椿街45号, 首都医科大学宣武医院普外科. walterasdfg@163.com
电话: 010-83198835 传真: 010-83198731
收稿日期: 2007-01-15 接受日期: 2007-01-31

New developments in the relationship between protease activated receptor-2 and alimentary system diseases

Jian Liu, Fei Li

Jian Liu, Fei Li, Department of general surgery, Xuanwu Hospital, Capital Medical University, Beijing 100053, China

Correspondence to: Jian Liu, Department of general surgery, Xuanwu Hospital, Capital Medical University, 45 Changchun Street, Beijing, 100053, China. walterasdfg@163.com

Received: 2007-01-15 Accepted: 2007-01-31

Abstract

Protease-activated receptor-2 (PAR-2) is a G-protein-coupled receptor, and its special molecule structure and activation way are similar to other protease-activated receptors. PAR-2 is widely distributed in alimentary system and series of effects are produced when it is activated by certain proteases. For example, PAR-2 exerts gastric mucosal cytoprotective effect, influences the secretion of digestive glands and movement of gastrointestinal tract, participates in the development of pancreatitis, and associates closely with malignant tumors in alimentary system. More and more researches are now focusing on the relationship between PAR-2 and alimentary system diseases.

Key Words: Protease activated receptor-2; Gastric mucosal cytoprotective effect; Pancreatitis; Cancer

Liu J, Li F. New developments in the relationship between protease activated receptor-2 and alimentary system diseases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(9):986-990

摘要

蛋白酶激活受体-2(protease activated

receptor-2, PAR-2)属于G蛋白耦联受体, 具有蛋白酶受体家族较特异的分子结构与激活方式, 广泛分布于胃肠道, 可被多种蛋白酶激活, 产生多种生物学效应, 包括影响多种消化腺的分泌, 具有胃黏膜保护作用, 影响胃肠道运动, 参与胰腺炎的发生、发展, 与消化道恶性肿瘤密切相关。PAR-2与消化系统疾病的关系正成为当前研究的一个热点。

关键词: 蛋白酶激活受体-2; 胃黏膜保护; 胰腺炎; 癌

刘建, 李非. 蛋白酶激活受体-2与消化系统疾病的研究进展. 世界华人消化杂志 2007;15(9):986-990

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/986.asp>

0 引言

Nystedt^[1]于1994年首先在鼠DNA序列中发现了一种G蛋白耦联受体的基因序列, 表达出的目的蛋白因具有类似于凝血酶受体的结构和活化机制, 故被命名为蛋白酶激活受体-2(protease activated receptor-2, PAR-2)。PAR-2属于蛋白酶激活受体家族(PARs), 该家族目前已发现的受体有4种亚型, 分别被命名为PAR-1, PAR-2, PAR-3, PAR-4。PAR-2在体内分布较广泛, 尤其是胃肠道; 胃肠道内同时富含能将其激活的多种蛋白酶, 被激活后可产生多种生物学效应, 影响消化系统功能, 与消化系统疾病关系密切, 本文将近年研究进展综述如下。

1 PAR-2的结构特点及激活

人PAR-2基因位于5q13, 由两个外显子组成。在蛋白质水平推测由397个氨基酸残基构成, 与小鼠PAR-2的氨基酸序列有83%的同源性。分子结构方面, PAR-2由细胞外区(N-末端和细胞外袢)、跨膜区(7个跨膜螺旋)及细胞内区(细胞内袢和C-末端)组成^[2]。其中N-末端含丝氨酸蛋白酶裂解位点, 细胞外袢在PAR-2激活过程中起关键作用, 而C-端可能在受体活化后起信号转导的作用。PAR-2可被体内多种分子激活, 目

前已发现的有:胰蛋白酶、类胰蛋白酶、膜型丝氨酸蛋白酶-1、人气道胰蛋白酶样蛋白酶、精子顶体酶、组织因子Xa、活化的凝血因子VIIa和Xa、具有丝氨酸蛋白酶活性的尘螨抗原等.人工合成的PAR-2活化肽如丝-亮-异亮-甘-精-亮(SLIGRL)也具有激活作用.

PAR-2的生理激活有赖于上述分子对受体N-末端的裂解.激活剂识别裂解位点,裂解N-末端的特殊部位,完整受体的N-末端被裂解后形成新的N-末端(即系锁配体),系锁配体与细胞外样相互作用进而激活PAR-2.激活PAR-2后的大部分信号传导途径是由活化磷脂酶C通过 $G_{q/11}$ 蛋白介导的^[3].PAR-2的激活是不可逆的,即N-末端一旦被裂解,蛋白酶的裂解部位丢失,故不能够被再次裂解.激活剂持续或反复刺激可导致受体对激活剂的反应性下降(即受体脱敏),脱敏后的PAR-2还可复敏,PAR-2的脱敏及复敏与PAR-2内陷有关.一些人工合成的短肽包括PAR-2活化肽及反义活化肽本身无蛋白酶活性,不能裂解受体N-末端,但可直接结合到细胞外样上起激活PAR-2的作用.这些短肽仅含几个氨基酸序列,实验研究中被用来激活或封闭PAR-2.

2 PAR-2与消化系统疾病的关系

2.1 唾液腺 腮腺、舌下腺及颌下腺均已发现有PAR-2的表达.腮腺腺泡细胞PAR-2被激活后可刺激唾液及淀粉酶的分泌^[4],并可引起三叉神经伤害性神经元的活化.激活鼠舌下腺PAR-2可刺激淀粉酶及黏液的分泌^[5],酪氨酸激酶抑制剂可以减少黏液的分泌量^[6].

2.2 食管 食管上皮细胞已发现PAR-2的表达.食管炎症时白介素-8水平升高,而胰蛋白酶或PAR-2活化肽可促进食管上皮细胞分泌IL-8,与食管炎的发生有关^[7];Naito *et al*^[8]也得出了类似结论.

2.3 胃 PAR-2在胃主细胞胞膜及胞质均有表达,被激活后可通过 Ca^{2+} -ERK依赖的途径刺激胃蛋白酶原的分泌^[9].PAR-2活化肽可抑制卡巴胆碱、胃泌素、2-甲基-D-葡萄糖引起的胃酸分泌^[10],同时刺激黏液的分泌,呈现剂量依赖性.静脉给活化肽可引起胃血流量的短暂增加,通过刺激感觉神经元分泌CGRP及缓激肽可以明显减轻盐酸/乙醇、吡罗美辛导致的胃黏膜损害,且随PAR-2浓度的增加损害程度减轻^[11].蛋白酶激活受体-1(PAR-1)也具有胃黏膜保护作用,但两者作用机制不同.PAR-2还可影响胃的运动,引起

胃纵形肌的收缩,这种作用可被环氧化酶抑制剂及酪氨酸激酶抑制剂所阻断^[12].在胃底则具有引起舒张及随后收缩的双重效应.

2.4 肠道 在肠道PAR-2分布于肠道上皮细胞顶端及基膜侧、平滑肌细胞、成纤维细胞、肌间及黏膜下神经丛神经元、内皮细胞及一些免疫细胞.生理情况下上皮细胞就直接暴露于胰蛋白酶、类胰蛋白酶、细菌分泌的一些蛋白酶等.(1)对分泌功能的影响:激活PAR-2可促进小肠、结肠、直肠氯离子的分泌,进而可能引起腹泻,这一过程在小肠与肠神经系统无关,在结肠则依赖神经元的参与.还发现激活PAR-2能刺激前列腺素 E_2 和 F_1 的分泌,可能具有调节肠道分泌及肠道保护的作用^[13];(2)对肠道运动的影响:激活PAR-2后通过神经机制促进小肠平滑肌的运动,这一过程依赖感觉神经通路及 NK_1 及 NK_2 受体的参与^[14].在体外,PAR-2激活剂可抑制结肠环形肌的自主性收缩,纵形肌则呈现收缩或先松弛随后收缩的双期效应;(3)其他:PAR-2可介导肠道的痛觉过敏,如结肠内灌注PAR-2活化肽可加重腹痛.PAR-2还参与肠道炎症的发生^[15],在结肠炎症中的作用是复杂的,既有前炎症效应又有抗炎效应.Jacob *et al*^[16]认为,应激状态及炎症时,肥大细胞释放类胰蛋白酶激活结肠上皮细胞的PAR-2,增加上皮的通透性,促进炎症反应.结肠内给予PAR-2激动剂可引起结肠炎症的迅速发展,辣椒素敏感性神经元、NO和细胞渗透性改变参与了此机制^[17].而Fiorucci *et al*^[18]皮下给PAR-2活化肽可以阻止Th1细胞介导的实验性结肠炎的发展,减轻炎症程度,呈现剂量依赖性.肠易激综合征时肠道生理的变化包括肠道运动模式的改变、炎症介质的释放、肠道通透性的改变、离子转运障碍及改变伤害性疼痛的产生等,而这些改变均有PAR-2的参与,推测PAR-2与肠易激综合征的发生有关.

2.5 胆囊及肝脏 激活离体胆囊内PAR-2后可引起剂量依赖性的胆囊收缩效应,这一过程与神经机制无关,可能是由前列腺素的释放引起^[19].在肝脏则可刺激星状细胞的增生和胶原的形成,可能与肝脏纤维化的维持有关^[20].肝硬变时肝内肥大细胞的数量增加,而PAR-2 mRNA及蛋白的表达与肥大细胞的量呈正比^[21].

2.6 胰腺 PAR-2在胰腺腺泡及导管细胞高表达^[22],导管或细胞间隙的胰蛋白酶原活化后即可激活细胞膜上的PAR-2,而胰蛋白酶是目前发现的最有效的PAR-2生理激活剂,因而PAR-2与胰腺疾

■ 研发前沿

目前研究热点主要集中在PAR-2对恶性肿瘤生物学行为、对胃黏膜保护作用、对消化系统炎症的影响等.但仍有许多问题有待解决,研究的当务之急是尽快发现能特异性阻断PAR-2活性的多肽或抗体.

■同行评价

本文综述了PAR-2与消化系统疾病的研究进展,内容较新,有参考价值和一定的指导意义。

病的关系引起了人们的关注。(1)对胰腺外分泌的影响:激活PAR-2后胰液的分泌量先增加,之后经历了先短暂下降后轻度升高的过程^[4];十二指肠内淀粉酶的量增加,NO可能参与PAR-2介导的胰腺淀粉酶的分泌^[23]。向离体胰腺腺泡细胞培养液中加入胰蛋白酶或PAR-2活化肽后发现淀粉酶水平升高。另有体外实验发现激活PAR-2后HCO₃⁻的分泌减少,提示可能是胰腺炎时胰液分泌受到抑制的原因^[24];(2)胰腺细胞损害时的表达及作用:腺泡/导管细胞在胰腺损伤时高表达PAR-2^[25]。PAR-2可参与胰腺炎的发生及发展,在胰腺炎时可能发挥胰腺局部保护作用。当使用PAR-2活化肽预处理腺泡细胞并暴露于低浓度胆汁时细胞死亡率下降,提示PAR-2可能拮抗腺泡和导管细胞的细胞损害^[22]。PAR-2基因缺失的胰腺炎模型大鼠其胰腺炎症程度要明显重于野生型组,使用PAR-2活化肽预处理后胰腺炎症程度明显减轻^[22,26]。但也有研究表明,PAR-2基因缺失大鼠的胰腺炎症程度与野生型组相比无明显差异^[27]。PAR-2具有这种保护作用的机制尚不明确, Singh *et al*^[28]认为与其促进胰腺外分泌有关。PAR-2可能还参与急性胰腺炎时的一些全身反应。激活PAR-2后血中NF- κ B, IL-8的水平升高^[29]; PAR-2抗体可以抑制胰腺炎时血中IL-6, IFN- γ 的升高^[29]。Hirota *et al*^[30]认为PAR-2活化后通过产生细胞因子提示机体胰腺腺泡细胞内已有大量胰蛋白酶产生,即将发生腺泡细胞损害。合并内毒素血症时胰蛋白酶对肺PAR-2的激活可以调节MIF的转录水平,增加MIF引起的肺TLR-4的表达,从而导致急性肺损伤的形成^[31]。激活PAR-2可使胰腺炎时动脉血压下降,舒张压的下降更明显^[22];(3)其他:Hoogerwerf *et al*^[32]认为,胰蛋白酶通过激活PAR-2来介导急性胰腺炎时的疼痛反应; Kawabata *et al*^[27]则认为,激活PAR-2后可减轻胰腺炎相关的腹部疼痛/痛觉过敏,但两人均认为上述过程与胰腺炎症程度本身无关。在慢性胰腺炎合并重度纤维化时PAR-2表现为高水平,并可通过刺激胰腺星状细胞的增生及胶原的产生来维持胰腺纤维化^[33]。

2.7 肿瘤 肿瘤细胞本身既可表达PAR-2,又可分泌类胰蛋白酶等分子;同时肿瘤微环境内充满了多种可以激活PAR-2的蛋白酶,作用于PAR-2后可影响肿瘤细胞的增生、分化、侵袭性等;(1)胃癌: PAR-2在胃癌细胞中过表达,体外研究发现,他可以反式激活EGFR,从而刺激癌细胞的增生^[34]。免疫组化检查提示,42.1%的人胃

癌组织内发现PAR-2的表达,原发部位癌细胞的胞膜呈高表达,表达程度还与肿瘤的浸润深度、淋巴结及静脉侵犯与否、是否有肝转移有关,阳性表达PAR-2的肿瘤患者预后较差,提示PAR-2与胃癌的进展有关^[35];(2)胰腺癌:多组体内体外实验均发现PAR-2被胰蛋白酶、人工合成的活化肽激活后可刺激胰腺癌细胞系的增生。此时COX-2的表达升高,PAR-2抗体可抑制细胞的增生;临床上85.0%的导管内乳头状癌患者及65.8%的浸润性导管癌患者的癌组织表达PAR-2^[36];并与癌细胞的侵袭性、纤维化的诱导有关。肿瘤呈浸润性生长时比膨胀性生长时更多的表达PAR-2,纤维化程度越重,PAR-2的表达越高^[37];(3)结肠癌:激活PAR-2可刺激结肠癌细胞的增生,甚至有些结肠癌细胞系可自主分泌胰蛋白酶,其浓度足以激活PAR-2,发挥自分泌或旁分泌的作用^[38-39];(4)胆囊癌:一组临床病理分析数据表明64%的胆囊癌患者癌组织表达PAR-2,且以乳头状腺癌多见(94%的此类患者表达PAR-2),表达程度与肿瘤是否有淋巴结转移及静脉侵犯无关^[40]。

总之,PAR-2作为一种未被完全了解的丝氨酸蛋白酶受体,广泛分布于消化道及消化腺,其生理作用可能与促进营养物质的转运有关^[41]。目前人们对PAR-2在消化系统的活化、生物学效应等有了一定的了解,还有必要对其与消化系统相关疾病的关系以及致病机制进行更深入的研究。相信随着对PAR-2研究的深入及其病理生理作用的进一步阐明,PAR-2可能为某些消化系统疾病的研究提供一个新的方向,如胃黏膜保护,内脏疼痛及肠道炎症性疾病的治疗,肠易激综合征的治疗,急性胰腺炎的发病机制及治疗,消化道恶性肿瘤的研究等。

3 参考文献

- 1 Nystedt S, Emilsson K, Wahlestedt C, Sundelin J. Molecular cloning of a potential proteinase activated receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 9208-9212
- 2 Macfarlane SR, Seatter MJ, Kanke T, Hunter GD, Plevin R. Proteinase-activated receptors. *Pharmacol Rev* 2001; 53: 245-282
- 3 窦勇鹰, 谢立群, 李俊美, 华建平. 蛋白酶激活受体的研究进展. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 1206-1209
- 4 Kawabata A, Nishikawa H, Kuroda R, Kawai K, Hollenberg MD. Proteinase-activated receptor-2 (PAR-2): regulation of salivary and pancreatic exocrine secretion *in vivo* in rats and mice. *Br J Pharmacol* 2000; 129: 1808-1814
- 5 Nishikawa H. Roles of protease-activated receptor-2 (PAR-2), a G protein-coupled receptor, in

- modulation of exocrine gland functions. *Yakugaku Zasshi* 2006; 126: 481-488
- 6 Kawabata A, Morimoto N, Nishikawa H, Kuroda R, Oda Y, Kakehi K. Activation of protease-activated receptor-2 (PAR-2) triggers mucin secretion in the rat sublingual gland. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 270: 298-302
- 7 Yoshida N, Katada K, Handa O, Takagi T, Kokura S, Naito Y, Mukaida N, Soma T, Shimada Y, Yoshikawa T, Okanoue T. Interleukin-8 production via protease-activated receptor 2 in human esophageal epithelial cells. *Int J Mol Med* 2007; 19: 335-340
- 8 Naito Y, Uchiyama K, Kuroda M, Takagi T, Kokura S, Yoshida N, Ichikawa H, Yoshikawa T. Role of pancreatic trypsin in chronic esophagitis induced by gastroduodenal reflux in rats. *J Gastroenterol* 2006; 41: 198-208
- 9 Kawao N, Sakaguchi Y, Tagome A, Kuroda R, Nishida S, Irimajiri K, Nishikawa H, Kawai K, Hollenberg MD, Kawabata A. Protease-activated receptor-2 (PAR-2) in the rat gastric mucosa: immunolocalization and facilitation of pepsin/pepsinogen secretion. *Br J Pharmacol* 2002; 135: 1292-1296
- 10 Nishikawa H, Kawai K, Nishimura S, Tanaka S, Araki H, Al-Ani B, Hollenberg MD, Kuroda R, Kawabata A. Suppression by protease-activated receptor-2 activation of gastric acid secretion in rats. *Eur J Pharmacol* 2002; 447: 87-90
- 11 Kawabata A, Kinoshita M, Nishikawa H, Kuroda R, Nishida M, Araki H, Arizono N, Oda Y, Kakehi K. The protease-activated receptor-2 agonist induces gastric mucus secretion and mucosal cytoprotection. *J Clin Invest* 2001; 107: 1443-1450
- 12 al-Ani B, Saifeddine M, Hollenberg MD. Detection of functional receptors for the proteinase-activated-receptor-2-activating polypeptide, SLIGRL-NH₂, in rat vascular and gastric smooth muscle. *Can J Physiol Pharmacol* 1995; 73: 1203-1207
- 13 Ossovskaya VS, Bunnett NW. Protease-activated receptors: contribution to physiology and disease. *Physiol Rev* 2004; 84: 579-621
- 14 Zhao A, Shea-Donohue T. PAR-2 agonists induce contraction of murine small intestine through neurokinin receptors. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003; 285: G696-703
- 15 Yoshida N, Isozaki Y, Takagi T, Takenaka S, Uchikawa R, Arizono N, Yoshikawa T, Okanoue T. Review article: anti-tryptase therapy in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 24 Suppl 4: 249-255
- 16 Jacob C, Yang PC, Darmoul D, Amadesi S, Saito T, Cottrell GS, Coelho AM, Singh P, Grady EF, Perdue M, Bunnett NW. Mast cell tryptase controls paracellular permeability of the intestine. Role of protease-activated receptor 2 and beta-arrestins. *J Biol Chem* 2005; 280: 31936-31948
- 17 Cenac N, Garcia-Villar R, Ferrier L, Larauche M, Vergnolle N, Bunnett NW, Coelho AM, Fioramonti J, Bueno L. Proteinase-activated receptor-2-induced colonic inflammation in mice: possible involvement of afferent neurons, nitric oxide, and paracellular permeability. *J Immunol* 2003; 170: 4296-4300
- 18 Fiorucci S, Mencarelli A, Palazzetti B, Distrutti E, Vergnolle N, Hollenberg MD, Wallace JL, Morelli A, Cirino G. Proteinase-activated receptor 2 is an anti-inflammatory signal for colonic lamina propria lymphocytes in a mouse model of colitis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 13936-13941
- 19 Tognetto M, Trevisani M, Maggiore B, Navarra G, Turini A, Guerrini R, Bunnett NW, Geppetti P, Harrison S. Evidence that PAR-1 and PAR-2 mediate prostanoid-dependent contraction in isolated guinea-pig gallbladder. *Br J Pharmacol* 2000; 131: 689-694
- 20 Gaca MD, Zhou X, Benyon RC. Regulation of hepatic stellate cell proliferation and collagen synthesis by proteinase-activated receptors. *J Hepatol* 2002; 36: 362-369
- 21 Xu KS, Li Q, Zhou X. Changes of mast cells and protease activated receptor-2 in experimental rat liver fibrosis. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 2006; 14: 753-756
- 22 Namkung W, Han W, Luo X, Muallem S, Cho KH, Kim KH, Lee MG. Protease-activated receptor 2 exerts local protection and mediates some systemic complications in acute pancreatitis. *Gastroenterology* 2004; 126: 1844-1859
- 23 Kawabata A, Kuroda R, Nishida M, Nagata N, Sakaguchi Y, Kawao N, Nishikawa H, Arizono N, Kawai K. Protease-activated receptor-2 (PAR-2) in the pancreas and parotid gland: Immunolocalization and involvement of nitric oxide in the evoked amylase secretion. *Life Sci* 2002; 71: 2435-2446
- 24 Alvarez C, Regan JP, Merianos D, Bass BL. Protease-activated receptor-2 regulates bicarbonate secretion by pancreatic duct cells *in vitro*. *Surgery* 2004; 136: 669-676
- 25 Olejar T, Matej R, Zadinova M, Pouckova P. Expression of proteinase-activated receptor 2 during taurocholate-induced acute pancreatic lesion development in Wistar rats. *Int J Gastrointest Cancer* 2001; 30: 113-121
- 26 Sharma A, Tao X, Gopal A, Ligon B, Andrade-Gordon P, Steer ML, Perides G. Protection against acute pancreatitis by activation of protease-activated receptor-2. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 288: G388-395
- 27 Kawabata A, Matsunami M, Tsutsumi M, Ishiki T, Fukushima O, Sekiguchi F, Kawao N, Minami T, Kanke T, Saito N. Suppression of pancreatitis-related allodynia/hyperalgesia by proteinase-activated receptor-2 in mice. *Br J Pharmacol* 2006; 148: 54-60
- 28 Singh VP, Bhagat L, Navina S, Sharif R, Dawra R, Saluja AK. PAR-2 Protects against Pancreatitis by Stimulating Exocrine Secretion. *Gut* 2006
- 29 Maeda K, Hirota M, Kimura Y, Ichihara A, Ohmuraya M, Sugita H, Ogawa M. Proinflammatory role of trypsin and protease-activated receptor-2 in a rat model of acute pancreatitis. *Pancreas* 2005; 31: 54-62
- 30 Hirota M, Ohmuraya M, Baba H. The role of trypsin, trypsin inhibitor, and trypsin receptor in the onset and aggravation of pancreatitis. *J Gastroenterol* 2006; 41: 832-836
- 31 Matsuda N, Nishihira J, Takahashi Y, Kemmotsu O, Hattori Y. Role of macrophage migration inhibitory factor in acute lung injury in mice with acute pancreatitis complicated by endotoxemia. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006; 35: 198-205
- 32 Hoogerwerf WA, Shenoy M, Winston JH, Xiao SY,

- He Z, Pasricha PJ. Trypsin mediates nociception via the proteinase-activated receptor 2: a potentially novel role in pancreatic pain. *Gastroenterology* 2004; 127: 883-891
- 33 Masamune A, Kikuta K, Satoh M, Suzuki N, Shimosegawa T. Protease-activated receptor-2-mediated proliferation and collagen production of rat pancreatic stellate cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 312: 651-658
- 34 Caruso R, Pallone F, Fina D, Gioia V, Peluso I, Caprioli F, Stolfi C, Perfetti A, Spagnoli LG, Palmieri G, Macdonald TT, Monteleone G. Protease-activated receptor-2 activation in gastric cancer cells promotes epidermal growth factor receptor transactivation and proliferation. *Am J Pathol* 2006; 169: 268-278
- 35 Fujimoto D, Hirono Y, Goi T, Katayama K, Hirose K, Yamaguchi A. Expression of protease activated receptor-2 (PAR-2) in gastric cancer. *J Surg Oncol* 2006; 93: 139-144
- 36 Yada K, Shibata K, Matsumoto T, Ohta M, Yokoyama S, Kitano S. Protease-activated receptor-2 regulates cell proliferation and enhances cyclooxygenase-2 mRNA expression in human pancreatic cancer cells. *J Surg Oncol* 2005; 89: 79-85
- 37 Ikeda O, Egami H, Ishiko T, Ishikawa S, Kamohara H, Hidaka H, Mita S, Ogawa M. Expression of proteinase-activated receptor-2 in human pancreatic cancer: a possible relation to cancer invasion and induction of fibrosis. *Int J Oncol* 2003; 22: 295-300
- 38 Ducroc R, Bontemps C, Marazova K, Devaud H, Darmoul D, Laburthe M. Trypsin is produced by and activates protease-activated receptor-2 in human cancer colon cells: evidence for new autocrine loop. *Life Sci* 2002; 70: 1359-1367
- 39 Soreide K, Janssen EA, Korner H, Baak JP. Trypsin in colorectal cancer: molecular biological mechanisms of proliferation, invasion, and metastasis. *J Pathol* 2006; 209: 147-156
- 40 Shibata K, Yada K, Matsumoto T, Sasaki A, Ohta M, Kitano S. Protease-activating-receptor-2 is frequently expressed in papillary adenocarcinoma of the gallbladder. *Oncol Rep* 2004; 12: 1013-1016
- 41 Matej R, Housa D, Olejar T. Acute pancreatitis: proteinase-activated receptor-2 as Dr. Jekyll and Mr. Hyde. *Physiol Res* 2006; 55: 467-474

电编 张敏 编辑 王晓瑜

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

欢迎订阅 2007 年《世界华人消化杂志》

本刊讯 《世界华人消化杂志》为中国科技核心期刊、2003年百种中国杰出学术期刊、《中文核心期刊要目总览》2004年版内科学类的核心期刊、中国科技论文统计源期刊,《世界华人消化杂志》发表的英文摘要被美国《化学文摘(Chemical Abstracts)》,荷兰《医学文摘库/医学文摘(EMBASE/Excerpta Medica)》,俄罗斯《文摘杂志(Abstracts Journals)》收录。

《世界华人消化杂志》综合介绍以下领域的内容:消化基础研究、消化临床研究、消化内科、消化内镜、消化外科、消化肿瘤、消化介入治疗、消化护理、消化医学影像、消化病理、消化预防医学、消化误诊误治、消化中西医结合、消化检验、消化新技术应用、消化病诊断、消化病治疗、消化新药应用、消化专家门诊。

《世界华人消化杂志》2007年由北京报刊发行局发行,国际标准刊号 ISSN 1009-3079,国内统一刊号CN 14-1260/R,邮发代号82-262,出版日期每月8,18,28日,月价72.00,年价864元。欢迎广大消化科医务工作者及科教人员、各大图书馆订阅。联系地址:100023,北京市2345信箱,世界胃肠病学杂志社。联系电话:010-85381901-1020;传真:010-85381893;E-mail:wcjd@wjgnet.com;网址:www.wjgnet.com。

梗阻性黄疸围手术期细胞免疫功能障碍发生机制研究进展

江涛, 朱永康

江涛, 南京中医药大学2004级硕士研究生 江苏省南京市 210029
朱永康, 江苏省中医院普外科 江苏省南京市 210029
通讯作者: 江涛, 210029, 江苏省南京市, 南京中医药大学.
xiaoyubvb@sina.com
收稿日期: 2006-11-20 接受日期: 2006-12-27

Advance on the mechanisms of cellular immune dysfunction during the perioperative stage of obstructive jaundice patients

Tao Jiang, Yong-Kang Zhu

Tao Jiang, Postgraduates from Class 2004 of Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China
Yong-Kang Zhu, Department of General Surgery, Jiangsu Provincial University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China
Correspondence to: Tao Jiang, Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China. xiaoyubvb@sina.com
Received: 2006-11-20 Accepted: 2006-12-27

Abstract

The dysfunction of cellular immunity is a significant cause of the high complication incidence during the perioperative stage of obstructive jaundice patients. Through reviewing the research data in the past 20 years, we try to analyze mechanisms of cellular immune dysfunction during this stage and consider that it is correlated with bilirubin toxicity, bile acid toxicity, endotoxemia, primary disease, operation and anesthesia.

Key Words: Perioperative stage; Obstructive jaundice; Cellular immunity

Jiang T, Zhu YK. Advance on the mechanisms of cellular immune dysfunction during the perioperative stage of obstructive jaundice patients. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(9):991-993

摘要

细胞免疫功能障碍是梗阻性黄疸围手术期并

发症发生率较高的重要原因. 本文通过回顾近20 a的研究资料, 对梗阻性黄疸围手术期细胞免疫功能障碍的发生机制进行分析, 认为高胆红素、高胆汁酸、内毒素血症、原发病、手术及麻醉都可能与之相关.

关键词: 围手术期; 梗阻性黄疸; 细胞免疫

江涛, 朱永康. 梗阻性黄疸围手术期细胞免疫功能障碍发生机制研究进展. *世界华人消化杂志* 2007;15(9):991-993
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/991.asp>

■背景资料

梗阻性黄疸围手术期细胞免疫功能障碍的发生机制问题一直是外科临床争论的热点, 梗阻性黄疸时机体伴随着复杂的病理生理变化, 手术和麻醉对机体的影响更增加了临床研究和动物实验的难度.

0 引言

梗阻性黄疸是肝、胆、胰外科疾病中较常见的一种临床表现, 根据梗阻原因的不同, 可分为由恶性肿瘤占位导致的恶性梗阻性黄疸以及以结石梗阻为主要病因的良性梗阻性黄疸, 因常需手术治疗, 又称外科黄疸. 经研究发现, 梗阻性黄疸时机体存在细胞和体液免疫功能障碍, 细胞免疫功能障碍较体液免疫更为严重^[1], 是术后并发症发生率较高的原因之一. 目前, 对围手术期梗阻性黄疸细胞免疫功能障碍发生机制的认识尚不十分清楚, 原发病、手术及麻醉都可能对其存在影响, 从分子生物学角度来看, 则可能与高胆红素、高胆汁酸血症、内毒素血症有关.

1 高胆红素、高胆汁酸血症的作用

多篇文献报道, 高胆红素血症对免疫功能有抑制作用^[2-3]. Amato *et al*^[4]证实, 胆红素抑制细胞ATP酶和蛋白激酶, 抑制线粒体功能及改变细胞膜的通透性. Gianni *et al*^[5]认为, 高浓度的胆汁酸或胆盐直接损害淋巴细胞膜的结构和功能. 体外实验也已证明, 胆汁酸可抑制淋巴细胞对丝裂原的刺激增殖能力, 使活性淋巴因子产生减少, 自然杀伤细胞(NKC)杀伤活性下降^[6].

2 内毒素血症的作用

梗阻性黄疸患者常伴有内毒素血症, 众多学者认为肠黏膜屏障功能受损, 肠内细菌移位是梗

■应用要点

本文认为梗阻性黄疸围手术期细胞免疫功能障碍是以原发病和手术为主因的多因素致病的结果,对其发生机制的进一步探索有一定指导意义。

阻性黄疸内毒素血症的主要因素。内毒素血症是机体免疫功能受损的结果,反过来又加重机体免疫系统的损害,形成恶性循环。Greve *et al*^[2]对比研究无菌BDL大鼠和有菌BDL大鼠的细胞免疫功能变化,发现无菌大鼠的淋巴细胞刺激反应性正常,而注射内毒素后可出现与有菌大鼠相同的细胞免疫抑制现象,证明内毒素可导致淋巴细胞功能下降。高浓度内毒素可直接与细胞膜结合,破坏细胞内线粒体结构及溶酶体酶,导致免疫器官损伤。而内毒素血症刺激炎症细胞产生的细胞因子及炎症介质被认为可能是抑制细胞免疫的主要因素。(1)细胞因子的作用:细胞因子属多肽类介质,主要由单核-巨噬细胞、淋巴细胞、血管内皮细胞产生。Sheen-Chen *et al*^[7]认为,内毒素可刺激巨噬细胞产生TNF,通过TNF抑制宿主细胞免疫功能。Kimura *et al*^[8]报道梗阻性黄疸患者的可溶性肿瘤坏死因子受体(sTNFr)P55和P75及白介素6(IL-6)均较正常组明显增高。高浓度IL-6则可明显抑制T淋巴细胞白介素2(IL-2)及白介素2受体(IL-2R)的合成水平,并可促进急性炎症反应,IL-6的显著升高往往与感染的发生率明显相关;sTNFr与肿瘤坏死因子(TNF)结合后可阻断TNF与靶细胞TNF受体结合,抑制TNF的生物学活性,从而抑制细胞免疫。Yuceyar *et al*^[9]研究认为,梗阻性黄疸时可溶性白介素2受体(sIL-2R)明显高于正常,sIL-2R作为低亲和力受体,通过与细胞膜上IL-2R竞争结合IL-2,起到封闭因子的作用;同时他能中和活化的T淋巴细胞周围的IL-2,减弱机体的自分泌效应,抑制已活化的T细胞的克隆样扩增,使T细胞介导的免疫功能受抑;(2)炎症介质的作用:炎症介质中前列腺素E₂(PGE₂)能抑制T淋巴细胞生成干扰素(IFN)和IL-2,抑制T淋巴细胞增殖及T淋巴细胞亚群的激活,降低NKC活性。实验证明,BDL大鼠腹腔巨噬细胞分泌PGE₂明显增多。血小板活化因子(PAF)是一种磷脂起源的炎症介质,PAF能促进血管内皮细胞、单核巨噬细胞等分泌PGE₂,IL-6及氧自由基,而这些物质又能促进PAF的生成和释放形成正反馈循环,从而对细胞免疫功能产生抑制。Zhou *et al*^[10]报道,BDL大鼠结扎胆总管1 wk后,其肝组织PAF含量可增加6倍以上。组胺是I型变态反应的重要介质,传统观念认为组胺与细胞免疫关系不大,近年由于组胺受体研究的进展,发现组胺可通过T细胞上的H₂受体影响细胞免疫。Nielsen *et al*^[11]报道雷尼替丁可通过阻断组织胺与T淋巴细胞膜上的

H₂受体结合而提高患者的细胞免疫功能。尹国华 *et al*^[12]通过组胺与CD4⁺和CD8⁺T细胞进行培养,结果显示,组胺可显著抑制CD4⁺,CD8⁺T细胞增殖和IL-2产生,西咪替丁阻断培养显示,西咪替丁可明显阻断组胺对CD4⁺和CD8⁺T细胞的抑制作用,亦间接说明组胺可抑制细胞免疫。

3 原发病的影响

梗阻性黄疸的病因在临床一般可分为3类:(1)良性的胆道结石或胆道蛔虫病;(2)恶性的胆管癌、壶腹周围癌或胰头癌;(3)性质不定的硬化性胆管炎、外伤性或医源性的胆管狭窄^[13]。有关恶性肿瘤与细胞免疫的研究很多,而其他病因与细胞免疫有何关系尚未见报道。一般认为,细胞免疫是抗肿瘤免疫的主力,当宿主免疫抑制时,肿瘤发病率增高,而肿瘤进行性生长时,免疫功能受到抑制,两者互为因果^[14]。恶性肿瘤患者的免疫功能低下目前认为可能由以下原因所致:(1)恶性肿瘤细胞自分泌以及诱导邻近炎症细胞释放一些抑制性细胞因子,如转化生长因子-β(TGF-β)、血管内皮生长因子(VEGF)、白介素10(IL-10),这些细胞因子均有抑制T细胞增殖、活化的作用;(2)激活的T细胞在渗透入肿瘤组织发挥抗肿瘤作用的同时,可能释放出大量IL-2Rα链,造成肿瘤患者血清sIL-2R升高,sIL-2R与膜IL-2R竞争性结合IL-2,中和活化T细胞周围的IL-2,减弱机体的自分泌效应,引起免疫水平降低;(3)恶性肿瘤患者往往存在恶病质状态,可伴有免疫功能低下;(4)恶性肿瘤骨髓转移,由于肿瘤细胞的大量增殖,“排挤”了正常的免疫活性细胞,从而影响患者的免疫功能。

4 手术及麻醉的影响

有学者认为,手术前后时期的心理应激和生理应激均可抑制细胞免疫功能,主要表现为T淋巴细胞和NKC减少和活性减弱,手术创伤越大,对免疫的抑制作用越强^[15]。Ben-Eliyahu^[16]认为手术对梗阻性黄疸患者机体细胞免疫功能的抑制主要与手术创伤引起的应激反应有关,应激时下丘脑-垂体-肾上腺轴兴奋产生的皮质醇,交感神经系统兴奋产生的儿茶酚胺,多种抑制免疫细胞因子的释放都可以抑制细胞免疫,而抑制程度决定于手术创伤的大小。麻醉对细胞免疫的影响主要源于麻醉引起的应激反应及麻醉药物,并与麻醉时间、麻醉深浅有一定关系。静脉麻醉药物中阿片类药物是公认的免疫抑制剂,吗

啡是其中的典型代表. 长时间大剂量使用吗啡能抑制NK、T及B淋巴细胞的增殖, 减少细胞因子如IL-2, IL-4, IL-6的产生; 其他常用药如异丙酚、硫喷妥钠、氯胺酮, 都有一定的免疫抑制作用. 但是目前还没有确切的临床资料证明麻醉产生的免疫功能改变对术后恢复会产生何种影响.

研究围手术期梗阻性黄疸细胞免疫功能障碍的发生机制, 可以为找到并选择促进梗阻性黄疸患者术后细胞免疫功能恢复的有效途径奠定理论基础, 对降低梗阻性黄疸围手术期并发症发生率及死亡率, 具有重要的临床意义. 目前认为, 梗阻性黄疸患者围手术期细胞免疫功能障碍是多种因素相互作用的结果, 但各个因素的致病机制仍不清楚, 有待我们进一步探索.

5 参考文献

- 1 黎介寿, 吴孟超, 黄志强. 普通外科学. 第2版. 北京: 人民军医出版社, 2005: 663-664
- 2 Greve JW, Gouma DJ, Soeters PB, Buurman WA. Suppression of cellular immunity in obstructive jaundice is caused by endotoxins: a study with germ-free rats. *Gastroenterology* 1990; 98: 478-485
- 3 王卉放, 许化溪, 严俊, 黄治森, 刘恭植. 胆红素抗氧化作用与免疫调节关系的研究. *中国应用生理学杂志* 1997; 13: 39
- 4 Amato M. Mechanisms of bilirubin toxicity. *Eur J Pediatr* 1995; 154: S54-59
- 5 Gianni L, Di Padova F, Zuin M, Podda M. Bile acid-induced inhibition of the lymphoproliferative response to phytohemagglutinin and pokeweed mitogen: an *in vitro* study. *Gastroenterology* 1980; 78: 231-235
- 6 Aouad K, Calmus Y, Nordlinger B, Myara A, Weill B, Poupon R. Immunosuppressive effects of endotoxins and bile acids *in vivo* in the rat. *Eur J Clin Invest* 1996; 26: 45-48
- 7 Sheen-Chen SM, Chen HS, Ho HT, Chen WJ, Sheen CC, Eng HL. Effect of bile acid replacement on endotoxin-induced tumor necrosis factor- α production in obstructive jaundice. *World J Surg* 2002; 26: 448-450
- 8 Kimura F, Miyazaki M, Suwa T, Sugiura T, Shinoda T, Itoh H, Nagakawa K, Ambiru S, Shimizu H, Yoshitome H. Anti-inflammatory response in patients with obstructive jaundice caused by biliary malignancy. *J Gastroenterol Hepatol* 2001; 16: 467-472
- 9 Yuceyar H, Kokuludag A, Coker A, Ersoz G, Keskinoglu A, Guler A, Cavusoglu H. The serum levels of soluble interleukin-2 receptor levels in patients with obstructive jaundice. *Hepatogastroenterology* 1996; 43: 949-953
- 10 Zhou W, Chao W, Levine BA, Olson MS. Role of platelet-activating factor in hepatic responses after bile duct ligation in rats. *Am J Physiol* 1992; 263: G587-592
- 11 Nielsen HJ, Hammer JH, Moesgaard F, Kehlet H. Possible role of histamine-2 receptor antagonists for adjuvant treatment in colorectal cancer. Clinical review. *Eur J Surg* 1991; 157: 437-441
- 12 尹国华, 张开明, 温江阳. 组胺对T细胞IL-2产生及增殖活性影响的实验研究. *中国免疫学杂志* 2002; 18: 505-506
- 13 钱礼, 张启瑜. 钱礼腹部外科学. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 862-863
- 14 陈慰峰, 金伯泉. 医学免疫学. 第4版. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 222-223
- 15 彭聿平, 邱一华. 手术应激与免疫抑制. *生理科学进展* 2006; 37: 31-36
- 16 Ben-Eliyahu S. The promotion of tumor metastasis by surgery and stress: immunological basis and implications for psychoneuroimmunology. *Brain Behav Immun* 2003; 17 Suppl 1: S27-36

■同行评价

本文对梗阻性黄疸围手术期细胞免疫功能障碍发生机制做了系统研究, 选题较好, 新颖度高, 但对围手术期对细胞免疫功能的影响强调不够.

电编 张敏 编辑 王晓瑜

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

世界华人消化杂志电子杂志的开放存取出版

本刊讯 《世界华人消化杂志》采取开放存取出版方式, 自1995年起, 发表的文章可以在线免费阅读全文 (<http://www.wjgnet.com/1009-3079/index.jsp>). 自2003-04-15至今2006-11-27, 电子版的点击次数为13708834, 平均每天点击10409次. 总下载次数166750, 平均每天下载126次. (世界胃肠病学杂志社2007-03-28)

超声内镜在胰腺疾病诊断和介入治疗中的应用

汤茂春, 徐敏

■背景资料

超声内镜(EUS)是将内镜与超声两种图像技术相结合的新型检查方法。自问世以来, EUS在临床上得到了广泛的应用和发展, 尤其是对消化道疾病的无创诊断。EUS能够提供高分辨率的胰腺及其邻近组织的图像, 是目前除无创性的CT/MRI以外对胰腺疾病的诊断和介入治疗的一种新型有效的影像学方法。近年来, EUS-FNA和EUS引导下的介入治疗技术的研究是EUS发展的一个方向。

汤茂春, 徐敏, 上海交通大学附属第一人民医院消化科 上海市 200080

通讯作者: 徐敏, 200080, 上海市, 上海交通大学附属第一人民医院消化科. zhengxu19721973@yahoo.com.cn
电话: 021-63240090-3141

收稿日期: 2006-11-27 接受日期: 2007-01-31

Application of endoscopic ultrasonography in the diagnosis and interventional treatment of pancreatic diseases

Mao-Chun Tang, Min Xu

Mao-Chun Tang, Min Xu, Department of Gastroenterology, the First People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200080, China

Correspondence to: Min Xu, Department of Gastroenterology, the First People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200080, China. zhengxu19721973@yahoo.com.cn

Received: 2006-11-27 Accepted: 2007-01-31

Abstract

Pancreas is located behind the peritoneum without bone tissues, and general body examination and imaging detection have some limitations in the diagnosis of pancreatic diseases, which leads to the failure of early diagnosis. Endoscopic ultrasonography can provide us with high-resolution images of the pancreas the nearby structures, and it is an effective imaging modality for the diagnosis of pancreatic diseases with a high specificity and sensitivity. In this article, we reviewed the value of endoscopic ultrasonography in the diagnosis and interventional therapy for pancreatic diseases.

Key Words: Endoscopic ultrasonography; Pancreatic disease

Tang MC, Xu M. Application of endoscopic ultrasonography in the diagnosis and interventional treatment of pancreatic diseases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(9):994-999

摘要

胰腺是位于腹膜后的器官, 没有骨性组织, 一

般的体格检查和普通的影像学检查对诊断胰腺疾病有一定的局限性, 限制了对胰腺疾病的早期诊断。超声内镜能够提供高分辨率的胰腺实质、导管及其邻近组织的图像, 对胰腺疾病的诊断有着较高的特异性和灵敏度, 是诊断胰腺疾病的一种有效的影像学方法。本文就超声内镜在胰腺疾病的诊断及介入治疗中的应用作一综述。

关键词: 超声内镜; 胰腺疾病

汤茂春, 徐敏. 超声内镜在胰腺疾病诊断和介入治疗中的应用. *世界华人消化杂志* 2007;15(9):994-999

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/994.asp>

0 引言

自1980年Di Magnò首次报道超声内镜(endoscopic ultrasonography, EUS)以来, EUS的临床应用已取得飞速发展。EUS检查是将内镜与超声两种图像技术相结合的新型检查方法, 他将微型高频超声探头(5.0-30 MHz)安置在内镜顶端, 内镜插入消化道后, 通过直接观察和同时进行实时超声扫描显像, 可详细观察黏膜和黏膜下的组织结构特征, 以及周围邻近器官。EUS显像可避免腹壁脂肪和腔内气体的干扰, 获得管道层次的组织学特征及邻近脏器的高分辨率清晰超声图像, 有助于消化系统疾病的诊断。EUS是一项比较成熟且有着较高临床应用价值的技术, 并且发展出了彩色多普勒EUS(color doppler EUS)、对比增强EUS(contrast-enhanced EUS)和管内超声(intraductal ultrasonography, IDUS)。由于超声探头接近病变部位且采用高频技术, 明显提高了图像分辨率, 能够发现细小病灶, 从而提高了内镜和超声的诊断水平。EUS的检查禁忌症大致与普通内镜相同, 因此EUS是一种患者耐受性好、安全性高的检查方法。EUS主要用于判断消化道肿瘤的侵犯深度及邻近的淋巴结转移, 黏膜下隆起性病变的组织起源和性质, 以及探索十二指肠壶腹区和胰腺。EUS插入胃和十二指肠肠腔, 可经胃壁和十二指肠肠壁

观察邻近的胆总管、壶腹区和胰腺, 清晰看到胰腺实质和导管, 这是EUS在胰腺疾病临床应用的突出优点, 对胰腺疾病的诊断方面有着较高的特异性和灵敏度. 由于胰腺是位于腹膜后的器官, 没有骨性组织, 一般的体格检查和普通的影像学检查对诊断胰腺疾病有一定的局限性, 限制了对胰腺疾病的早期诊断. 而EUS的应用, 则成为除无创性的上腹部CT/MRI以外对胰腺疾病的诊断和介入治疗的一种新型有效的影像学方法.

1 急性胰腺炎

急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)是胰腺的急性炎症过程, 其临床表现有上腹疼痛, 伴有不同程度的腹膜炎体征, 血/尿淀粉酶升高等. 急性胰腺炎时十二指肠和胃幽门部水肿, 妨碍EUS检查胰腺, 所以AP的定性诊断不是EUS检查的指征, 但EUS对AP的病因诊断却具有一定的临床价值. 在我国, AP的病因以胆石症居首位. 常规非侵入性检查, 如腹部超声(transabdominal ultrasonography, US)、计算机断层扫描(computed tomography, CT)等在判断急性胆源性胰腺炎(acute biliary pancreatitis, ABP)患者的胆总管结石方面的能力是有限的. 内镜下逆行性胰胆管造影(endoscopic retrograde cholangiopancreatography, ERCP)检查作为诊断ABP中胆总管结石的标准之一, 在疾病早期的检查及治疗可以降低死亡率, 但是该操作会给患者带来一定的痛苦和相关的并发症. 目前EUS被认为是有效的检查胆总管结石的方法, 有时比ERCP更有效, 且较之安全性高、费用少, 可以减少不必要的ERCP检查. Sugiyama *et al*^[1]比较了EUS, US, CT对胆总管结石病的诊断, 通过对155例怀疑胆总管结石的患者的研究发现, EUS诊断胆总管结石(96%)比US(63%)和CT(71%)灵敏($P < 0.001$), EUS(100%)的特异性比US(95%)和CT(97%)高. Liu *et al*^[2]在一项前瞻性研究中发现, EUS较US在发现胆囊结石方面更灵敏(分别是100%和84%, $P < 0.005$); EUS与ERCP在发现胆总管结石方面的灵敏度都是97%, 但准确率分别为98%和96%, 受检者对EUS的耐受性较ERCP好, 研究中没有发现与EUS相关的并发症. 作者认为EUS可用于筛选需要行治疗性ERCP的患者, 从而避免诊断性ERCP及与之相关的并发症给患者造成的伤害. 他们在另一项研究中比较了EUS, ERCP对ABP患者的诊断后认为, EUS能够安全的替代

ERCP筛选患有胆总管结石的ABP患者去行治疗性的ERCP, 较之有更高的成功率和灵敏度及相对低的致病率^[3]. Napoleon *et al*^[4]也认为对可疑胆道梗阻的患者在做US后先做EUS, ERCP仅用于治疗; 诊断性ERCP减少, ERCP的并发症也减少. 鉴于EUS在判断胆总管结石时有着优秀的表现, 可以考虑将EUS作为诊断胆总管结石的首选方法.

在临床上, 约有10%-30%的AP患者通过传统的常规检查方式, 如US, CT/MRI, ERCP等, 不能发现明确的病因, 而称为特发性急性胰腺炎(idiopathic acute pancreatitis, IAP). 评价EUS对AP的诊断价值的工作开展较晚, 目前认为AP期间行EUS检查有助于发现CT, ERCP等难以发现的病因. Norton *et al*^[5]评估了EUS对IAP的诊断. 44例诊断为IAP的患者为试验组(其中8例为胆囊切除术后, 10例在此之前曾发作过一次或数次AP), 25例行EUS检查食管或胃的患者(既往无胆胰疾病)为对照组. 试验组除1例不能耐受EUS检查外其余患者均做了EUS检查. 在试验组中发现34例患者存在异常(胆囊结石9例, 胆囊和胆总管结石、胆囊切除后胆总管结石、胆总管结石各2例, 微小结石11例, 胰腺分裂、胰腺肿瘤、胆囊息肉和壶腹部疤痕各1例, 慢性胰腺炎改变4例). 对照组中只有2例发现有胆结石. 提示在诊断IAP时需要认识到患者存在潜在病因的可能, 如Oddi's括约肌功能紊乱、未发现的胆石症等, 而EUS则能够发现那些被诊断为IAP的患者所存在的明显病理改变. Tandon *et al*^[6]对31例IAP患者做了EUS检查, 发现了其中21例患者的病因, 包括5例微小结石病、14例慢性胰腺炎、2例胰腺分裂、1例胰腺癌, 还有10例没有确诊. 在接下来的16 mo通过电话随访, 4例患者的诊断被改变, 9例由于症状持续或者AP复发而行了ERCP. 做为一种比ERCP侵入性低的检查方法, EUS提示了2/3 IAP患者的病因, 因此相对于ERCP而言, EUS是IAP患者更好的选择. Yusoff *et al*^[7]比较了EUS在初发与复发性IAP中的作用. 共研究了370例患者(246例无胆囊切除史, 其中134例是初发AP, 112例为复发; 124例为胆囊切除术后, 其中67例初发, 57例复发). 总体上, EUS在其中29.2%的患者中有阳性发现. 在非胆囊切除组, 初发患者中EUS的阳性发现较复发患者没有显著差异(31.3% vs 32.1%, $P = 0.89$); 在胆囊切除组, 两种患者的EUS阳性发现没有显著差异(29.9% vs 17.5%, $P = 0.15$); 在非胆囊切除组和

■应用要点

本综述能较好的反映目前国内外EUS在胰腺疾病诊断和治疗应用的新进展, 也提到EUS应用的局限性和缺点, 使读者更好的了解EUS对胰腺疾病诊断和治疗的适应症, 进一步提高胰腺疾病及其并发症的临床诊断和治疗水平.

■同行评价

本文能较好的反映目前国内外超声内镜在胰腺疾病中的应用,对于胰腺疾病包括胰腺炎、胰腺良恶性肿瘤都有涉及,同时还对超声内镜在胰腺疾病治疗中的作用做了综述,有一定的临床应用价值。

胆囊切除组中慢性胰腺炎的发现率是30.9% vs 26.6% ($P = 0.24$)。EUS的阳性发现是四个亚组中最普遍存在的异常发现(16.4%-42%);复发性AP中的EUS阳性发现率近乎初发者的两倍(非胆囊切除组: 42.0% vs 21.6%, $P = 0.0008$; 胆囊切除组: 38.6% vs 16.4%, $P = 0.008$); EUS有阳性发现的患者趋向于年老者;初发或复发时EUS检查结果并没有显著差异。据此,作者认为对初发的IAP患者,尤其是老年患者,进行EUS检查是合理的。在香港的一项研究中,18例经过传统影像学检查初步被诊断为IAP的患者经过EUS的检查,发现其中14例存在有小的胆结石,而复查US只能发现9例(50%)、CT发现6例(33%)、ERCP发现13例(72%)^[8]。由此可见,与传统的影像学诊断方法相比,EUS能够更灵敏地发现部分所谓IAP患者的潜在病因,如胆囊结石、微小结石、胰腺分裂、胰腺肿瘤等,从而能够指导合适的治疗。因此临床上在诊断IAP之前,应先做EUS检查,可以降低未知病因所致的AP复发率,而且EUS可以决定患者是否需要进一步做ERCP检查^[9]。

2 慢性胰腺炎

慢性胰腺炎(chronic pancreatitis, CP)是由不同因素造成的胰腺组织和功能的持续性损害,导致胰腺内、外分泌功能永久性丧失。CP的临床症状无特异性,早期诊断困难。EUS是诊断和评估慢性胰腺炎的一种很好的方法。由于不受肠道气体影响和高频探头的使用,他能获得高分辨率的胰腺图像,从而能直观地观察胰腺实质和胰管的形态改变,判断是否存在病变。在传统的检查方法中,ERCP被认为是诊断慢性胰腺炎的“金标准”,他主要通过发现胰管结构的改变和胰管结石来诊断CP。有研究表明,EUS是发现CP早期慢性改变的最灵敏的影像学方法。CP的EUS阳性表现主要有4方面:(1)胰腺实质回声不均匀,因为CP时胰腺实质中有小的纤维间隔呈高回声,将低回声的炎性实质组织分隔;(2)重症CP患者可有主胰管不规则或呈局部扩张;(3)20%-40% CP患者有假性囊肿,EUS可查出直径 ≥ 1 cm的小囊肿;(4)CP的实质中可有微小钙化灶。Kahl *et al*^[10]做了一项前瞻性的随访研究以调查EUS诊断早期CP的价值。130例有慢性饮酒史和反复腹痛的患者入选,CP和可疑CP各51例和79例,先后行ERCP和EUS,所有被ERCP诊断为CP的患者均被EUS证实存在有胰腺实质或胰管的病理改变,38例ERCP正常但是EUS发现

其中32例有形态学改变,通过对这32例患者的随访,其中22例被ERCP证实为CP。通过对数据的分析,EUS和ERCP初次检查的灵敏度分别是100%和80.7% ($P < 0.001$)。可见对有慢性饮酒和腹痛史的患者,EUS可以较ERCP更灵敏地发现CP早期的形态学改变。Catalano *et al*^[11]研究了ERCP,EUS和血清学检查在早期CP中的作用,80例复发性胰腺炎患者做了上述三项检查。EUS评估了组织改变:高回声点(钙化)、突出的小叶间隔(纤维化)、小囊肿(水肿)、腺体分叶(纤维化或萎缩)和异类组织,以及胰管改变:胰管扩张、胰管不规则、高回声线(纤维化)、胰管分支的扩张和结石。以1-2项改变为轻度,3-5项改变为中度,5项以上改变为重度。结果显示血清学检查、ERCP完全符合根据EUS标准所判断的正常胰腺和重症CP,对轻度的符合率分别为13%和17%,中度分别为50%和92%。作者认为引用以上EUS标准就可以不依赖ERCP与血清学来诊断CP。通过以上研究表明,EUS对诊断重度CP有着极高的灵敏度,能够准确地排除正常胰腺。同时,Thuler *et al*^[12]的研究发现,对于长期酗酒者,即使无临床症状,EUS也能够发现酗酒患者早期的慢性胰腺炎改变。

一些学者指出,EUS对CP的诊断同时依赖于胰管和胰腺实质的标准,在评估慢性胰腺炎方面只是一种影像学选择,还存在有一定的局限性,如果加上EUS引导下的细针穿刺胰腺细胞学病理检查,则能进一步提高慢性胰腺炎诊断的特异性。目前阻止EUS成为慢性胰腺炎诊断金标准的主要因素之一就是尚缺乏统一的诊断标准^[13]。诊断标准的缺乏不利于临床医生进一步评价EUS诊断CP的灵敏度和特异性,而且还可能怀疑EUS“过度”诊断CP。所以建立普遍接受的CP诊断标准是必须,因此,还需要进一步的研究,以更好地评估EUS在诊断CP中的作用。

3 胰腺癌

胰腺癌是胰腺恶性肿瘤中最常见的一种,其恶性程度高、进展迅速,预后甚差,病死率很高。胰腺癌早期症状隐匿,缺乏特异性表现,早期诊断十分困难。EUS从胃后壁和十二指肠探测整个胰腺,能避免胃肠道气体和腹壁脂肪的干扰,对胰腺癌,包括早期胰腺癌的诊断有较大的价值。EUS在检测小胰腺癌、判断周围血管侵犯、远处转移、获取原发肿瘤和淋巴结活检组织方面有着较高的优越性^[14],可用于诊断阻塞性黄疸、

小的囊性或实性胰腺损害、胰腺内分泌肿瘤以及胰腺肿瘤的术前分期. EUS在胰腺癌的总检出率为96.6%, 对直径<2 cm的肿瘤的检出率可高达100%(除外原位肿瘤)^[15]. 但是, EUS在诊断的灵敏度和特异性方面要稍逊于CT, Long *et al*^[16]在综合了1999, 2002, 2004年的相关文献后比较了CT与EUS对胰腺癌分期的灵敏度和特异性, EUS分别为77%, 96%, CT分别为90%, 99%. Soriano *et al*^[17]对62个认为适合手术治疗的胰腺癌患者行了EUS, CT, MRI和血管造影术检查, 研究了各自对判断原发肿瘤、局部扩散、淋巴结转移、血管侵犯、远处转移、TNM分期和肿瘤可切除性的能力, 研究结果均与手术结果相比较. 研究发现EUS在判断肿瘤大小、淋巴结转移方面准确率最高, 而螺旋CT在判断原发肿瘤范围、局部扩散、血管侵犯、远处转移和肿瘤的可切除性方面准确率最高. Maluf-Filho *et al*^[18]的研究发现对于有阻塞性黄疸的患者, EUS诊断胰腺癌的准确率较螺旋CT更高(分别是87.0%和67.4%, $P = 0.04$). Aslanian *et al*^[19]对EUS检测胰腺肿瘤血管侵犯的结果与其术后所见、术后组织学检查结果做了比较, EUS的灵敏度、特异性、阳性预测率和阴性预测率分别为63%, 64%, 43%和80%, 从而认为EUS在判断血管侵犯方面的灵敏度、特异性和阳性预测率较低.

然而随着CT三维成像等新的影像学技术的发展, EUS在诊断胰腺癌方面的优势在逐渐减弱, 但是EUS与EUS介入技术的结合, 可以提高肿瘤的检出率.

4 胰腺内分泌肿瘤

临床诊断胰腺内分泌肿瘤主要根据症状、体征和实验室检查结果. 位于胰腺的内分泌肿瘤以胰岛素瘤和胃泌素瘤较为常见, 其他有生长抑素瘤、血管活性肽瘤、胰高血糖素瘤等. 其中胰岛素瘤约90%位于胰腺, 而胃泌素瘤有30%-40%位于胰腺外或胰腺附近. 因此EUS对胰岛素瘤的定位诊断效果比胃泌素瘤更好, 因胃泌素瘤较多位于胰腺外. 胰腺内分泌肿瘤的EUS表现是均匀低回声肿块、边缘光滑, 但也有个别肿瘤回声稍强, 与周围胰腺组织相似.

EUS能检出小的胰腺肿瘤, 通过十二指肠壁或胃壁能看清直径0.5 cm的胰内肿瘤. Rosch^[20]报告一组多中心研究结果, 在37例患者中检出39个肿瘤, 都是经腹部超声和CT检查结果阴性的病例. 经手术和病理免疫组织化学证实诊断,

其中31个胰岛素瘤, 7个胃泌素瘤, 1个胰高血糖素瘤. 肿瘤的平均直径1.4 cm(范围0.5-2.5 cm). 一组术前曾作过动脉造影的病例检出27%, 而EUS检出80%. 在19名无胰腺内分泌肿瘤患者中, EUS阴性18例, 特异性95%. 其中1例假阳性的病例经手术证实为一个淋巴结. Maluf-Filho *et al*^[18]也认为EUS对胰腺内分泌肿瘤的检测有着较高的价值.

5 EUS引导下的介入技术

EUS在介入诊断和治疗方面也得到了发展. 近20 a内镜领域的最大进展之一就是EUS成像及其EUS引导下的细针抽吸活检术(endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration, EUS-FNA). EUS-FNA的应用, 极大的提高了EUS的诊断收益, 对EUS所见的病变能给医师提供细胞学和组织学样本, 从而可以发现传统检查方法所不能发现的肿瘤. EUS-FNA适用于鉴别诊断良恶性肿瘤、肿瘤分期以及放、化疗前明确组织学类型等, 也可用于分析自身免疫性胰腺炎、恶性淋巴瘤等疾病的病因. Takahashi *et al*^[21]通过EUS-FNA所获取的组织样本对局灶性CP和胰腺肿瘤进行了鉴别分析, 结果显示细胞病理学的灵敏度、特异性、总准确率、阳性预测率和阴性预测率分别为82%, 100%, 86%, 100%和58%, 组织病理学则分别为44%, 100%, 55%, 100%和32%, 在74%的胰腺癌患者中发现有K-ras点突变而CP患者中则没有发现. 可见EUS-FNA能很好的帮助鉴别由局灶性CP或胰腺癌引起的胰腺损害. 近有报道指出, EUS-FNA联合分子学检查较单纯K-ras点突变或细胞学检测更能提高灵敏度(81%)、特异性(100%)、准确率(85%)^[22]. 但是, Varadarajulu *et al*^[23]的研究表明, EUS-FNA对CP背景下的胰腺肿块样病变的诊断灵敏度较低, 但可以通过多部位取样, 克服并提高诊断的准确率. EUS-FNA能够鉴别腹腔、腹主动脉丛或肠系膜区域的淋巴结是否存在肿瘤转移, 被认为是唯一能在术前证明以上区域淋巴结是否存在肿瘤转移的手段^[24]. 囊性胰腺肿瘤较少见, 有时难以与胰腺囊肿相鉴别, 而EUS-FNA通过抽取囊肿液进行细胞学、肿瘤标志物(如CEA等)等检查可以提高诊断的灵敏度. 而对于导管内乳头状黏液性肿瘤, EUS-FNA所获取标本的细胞学或组织学检测的灵敏度较低^[25].

有较多的报道表明EUS引导下胰腺假性囊肿内引流较外科介入治疗和经皮穿刺外引流术

的成功率高、并发症少。Kahaleh *et al*^[26]对EUS和传统的ERCP引导下囊肿引流做了比较,发现传统ERCP引流方法和EUS引导下引流在安全性和效率上并没有多大的差异。提示应根据患者的个体情况和当地的专业条件,选择合适的引流方法。EUS引导下的介入治疗对胰腺坏死和胰腺脓肿也有较好的作用,能在一定的程度上替代外科手术治疗^[27],但要掌握好介入治疗的时机,以避免继发感染的发生。

EUS引导下的腹腔神经丛松解术或阻滞术能很好的缓解慢性胰腺炎或胰腺癌引起的疼痛,且持续时间较长,能减少止痛药物的使用及其产生的副作用^[28]。EUS引导下的治疗,包括胰腺局部注射、激光、微波、低温冷冻等消融技术,在理论上也是可行的。一些关于胰腺癌的EUS引导下的细胞和基因治疗已经进入了试验。

EUS-FNA常见的并发症包括消化道穿孔、消化道出血、感染和AP等,但发生率很低。Louis Buscail *et al*^[29]总结了相关文献,发现并发症的发病率在1%-3%左右,死亡率0%-0.1%,AP的发生率为0.5%-2%,菌血症在5.8%-6%左右,出血的发生率不超过1%。由于操作需要在麻醉状态下进行且时间较一般内镜长,所以也可能并发相关的心肺疾病。

EUS目前已经成为诊断胰腺疾病的一项有用检查,EUS及其引导下的介入方法的结合应用极大的提高了胰腺疾病及其并发症的诊断和治疗水平。常规检查方法诊断为IAP的患者,可以通过EUS的检查发现微小结石、胰腺分裂、胰腺肿瘤等来帮助发现病因。在ABP患者,EUS能够很灵敏地发现胆总管结石。EUS还可用于筛选治疗性ERCP的患者,使得许多患者可以避免诊断性ERCP及由此产生的并发症;有助于诊断和评估慢性胰腺炎,其灵敏度与ERCP相接近,但耐受性与安全性较好。近年来,EUS对自身免疫性胰腺炎的诊断,结合血清免疫学检查,可以避免一些创伤性检查或手术给患者带来的痛苦^[30]。EUS-FNA能够提供诊断所需要的组织和细胞标本,可以有效帮助鉴别胰腺慢性炎症和胰腺肿瘤。EUS引导下的胰腺假性囊肿引流可以使部分患者避免外科手术的治疗。将来随着EUS技术及相应设备的发展,EUS-FNA将如同胃肠内镜直视下病理取样一般被常规使用。EUS的治疗性应用,如EUS引导下的腹腔神经丛阻滞、胰腺肿瘤切除、胰腺假性囊肿引流以及研究、发展中的靶向介入治疗等,将是EUS未来发展的方

向。EUS目前主要由消化内科医师操作,有赖于操作者的知识、经验和操作水平。这就要求相关的消化内科医师接受严格的训练,能够熟练地操作EUS和进行介入治疗。但是目前这种训练缺乏规范的教程和条件、花费较昂贵,这就制约了从事该项技术的人员的数量。而且EUS的操作过程与CT/MRI的自动化、标准化不同,操作者对图像的判断带有一定的主观性,因此操作者对该技术掌握的熟练程度与疾病诊断的敏感性和特异性有很大的相关性,一定程度上影响诊断的准确性。同时,由于生产商对EUS相关设备更新慢、患者接受诊疗的费用较高,也不利于EUS的发展和推广。现阶段EUS还是继普通内镜、腹部超声和CT等常用方法后的补充诊断方法。随着EUS的临床广泛应用和发展,其在诊治胰腺疾病方面的作用将进一步扩大。

6 参考文献

- 1 Sugiyama M, Atomi Y. Endoscopic ultrasonography for diagnosing choledocholithiasis: a prospective comparative study with ultrasonography and computed tomography. *Gastrointest Endosc* 1997; 45: 143-146
- 2 Liu CL, Lo CM, Chan JK, Poon RT, Lam CM, Fan ST, Wong J. Detection of choledocholithiasis by EUS in acute pancreatitis: a prospective evaluation in 100 consecutive patients. *Gastrointest Endosc* 2001; 54: 325-330
- 3 Liu CL, Fan ST, Lo CM, Tso WK, Wong Y, Poon RT, Lam CM, Wong BC, Wong J. Comparison of early endoscopic ultrasonography and endoscopic retrograde cholangiopancreatography in the management of acute biliary pancreatitis: a prospective randomized study. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2005; 3: 1238-1244
- 4 Napoleon B, Dumortier J, Keriven-Souquet O, Pujol B, Ponchon T, Souquet JC. Do normal findings at biliary endoscopic ultrasonography obviate the need for endoscopic retrograde cholangiography in patients with suspicion of common bile duct stone? A prospective follow-up study of 238 patients. *Endoscopy* 2003; 35: 411-415
- 5 Norton SA, Alderson D. Endoscopic ultrasonography in the evaluation of idiopathic acute pancreatitis. *Br J Surg* 2000; 87: 1650-1655
- 6 Tandon M, Topazian M. Endoscopic ultrasound in idiopathic acute pancreatitis. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 705-709
- 7 Yusoff IF, Raymond G, Sahai AV. A prospective comparison of the yield of EUS in primary vs. recurrent idiopathic acute pancreatitis. *Gastrointest Endosc* 2004; 60: 673-678
- 8 Liu CL, Lo CM, Chan JK, Poon RT, Fan ST. EUS for detection of occult cholelithiasis in patients with idiopathic pancreatitis. *Gastrointest Endosc* 2000; 51: 28-32
- 9 Wilcox CM, Varadarajulu S, Eloubeidi M. Role of endoscopic evaluation in idiopathic pancreatitis: a systematic review. *Gastrointest Endosc* 2006; 63:

- 1037-1045
- 10 Kahl S, Glasbrenner B, Leodolter A, Pross M, Schulz HU, Malfertheiner P. EUS in the diagnosis of early chronic pancreatitis: a prospective follow-up study. *Gastrointest Endosc* 2002; 55: 507-511
- 11 Catalano MF, Lahoti S, Geenen JE, Hogan WJ. Prospective evaluation of endoscopic ultrasonography, endoscopic retrograde pancreatography, and secretin test in the diagnosis of chronic pancreatitis. *Gastrointest Endosc* 1998; 48: 11-17
- 12 Thuler FP, Costa PP, Paulo GA, Nakao FS, Ardengh JC, Ferrari AP. Endoscopic ultrasonography and alcoholic patients: can one predict early pancreatic tissue abnormalities? *JOP* 2005; 6: 568-574
- 13 Jenssen C, Dietrich CF. Endoscopic ultrasound in chronic pancreatitis. *Z Gastroenterol* 2005; 43: 737-749
- 14 Kahl S, Malfertheiner P. Role of endoscopic ultrasound in the diagnosis of patients with solid pancreatic masses. *Dig Dis* 2004; 22: 26-31
- 15 Maguchi H. The roles of endoscopic ultrasonography in the diagnosis of pancreatic tumors. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2004; 11: 1-3
- 16 Long EE, Van Dam J, Weinstein S, Jeffrey B, Desser T, Norton JA. Computed tomography, endoscopic, laparoscopic, and intra-operative sonography for assessing resectability of pancreatic cancer. *Surg Oncol* 2005; 14: 105-113
- 17 Soriano A, Castells A, Ayuso C, Ayuso JR, de Caralt MT, Gines MA, Real MI, Gilabert R, Quinto L, Trilla A, Feu F, Montanya X, Fernandez-Cruz L, Navarro S. Preoperative staging and tumor resectability assessment of pancreatic cancer: prospective study comparing endoscopic ultrasonography, helical computed tomography, magnetic resonance imaging, and angiography. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 492-501
- 18 Maluf-Filho F, Sakai P, Cunha JE, Garrido T, Rocha M, Machado MC, Ishioka S. Radial endoscopic ultrasound and spiral computed tomography in the diagnosis and staging of periampullary tumors. *Pancreatol* 2004; 4: 122-128
- 19 Aslanian H, Salem R, Lee J, Andersen D, Robert M, Topazian M. EUS diagnosis of vascular invasion in pancreatic cancer: surgical and histologic correlates. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 1381-1385
- 20 Rosch T. Endoscopic ultrasonography: imaging and beyond. *Gut* 2003; 52: 1220-1226
- 21 Takahashi K, Yamao K, Okubo K, Sawaki A, Mizuno N, Ashida R, Koshikawa T, Ueyama Y, Kasugai K, Hase S, Kakumu S. Differential diagnosis of pancreatic cancer and focal pancreatitis by using EUS-guided FNA. *Gastrointest Endosc* 2005; 61: 76-79
- 22 Tada M, Komatsu Y, Kawabe T, Sasahira N, Isayama H, Toda N, Shiratori Y, Omata M. Quantitative analysis of K-ras gene mutation in pancreatic tissue obtained by endoscopic ultrasonography-guided fine needle aspiration: clinical utility for diagnosis of pancreatic tumor. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 2263-2270
- 23 Varadarajulu S, Tamhane A, Eloubeidi MA. Yield of EUS-guided FNA of pancreatic masses in the presence or the absence of chronic pancreatitis. *Gastrointest Endosc* 2005; 62: 728-736; quiz 751, 753
- 24 Williams DB, Sahai AV, Aabakken L, Penman ID, van Velse A, Webb J, Wilson M, Hoffman BJ, Hawes RH. Endoscopic ultrasound guided fine needle aspiration biopsy: a large single centre experience. *Gut* 1999; 44: 720-726
- 25 Maire F, Couvelard A, Hammel P, Ponsot P, Palazzo L, Aubert A, Degott C, Dancour A, Felce-Dachez M, O'toole D, Levy P, Ruszniewski P. Intraductal papillary mucinous tumors of the pancreas: the preoperative value of cytologic and histopathologic diagnosis. *Gastrointest Endosc* 2003; 58: 701-706
- 26 Kahaleh M, Shami VM, Conaway MR, Tokar J, Rockoff T, De La Rue SA, de Lange E, Bassignani M, Gay S, Adams RB, Yeaton P. Endoscopic ultrasound drainage of pancreatic pseudocyst: a prospective comparison with conventional endoscopic drainage. *Endoscopy* 2006; 38: 355-359
- 27 Kruger M, Schneider AS, Manns MP, Meier PN. Endoscopic management of pancreatic pseudocysts or abscesses after an EUS-guided 1-step procedure for initial access. *Gastrointest Endosc* 2006; 63: 409-416
- 28 Gunaratnam NT, Sarma AV, Norton ID, Wiersema MJ. A prospective study of EUS-guided celiac plexus neurolysis for pancreatic cancer pain. *Gastrointest Endosc* 2001; 54: 316-324
- 29 Buscail L, Faure P, Bournet B, Selves J, Escourrou J. Interventional endoscopic ultrasound in pancreatic diseases. *Pancreatol* 2006; 6: 7-16
- 30 Farrell JJ, Garber J, Sahani D, Brugge WR. EUS findings in patients with autoimmune pancreatitis. *Gastrointest Endosc* 2004; 60: 927-936

电编 张敏 编辑 张焕兰

胃癌MKN-28肿瘤细胞系SP细胞亚群初步分析

王宁, 陈凇, 卫勃, 赵向阳, 鲁文静, 沈丽

■背景资料

肿瘤干细胞已成为肿瘤研究的热点之一, 其首要问题就是肿瘤干细胞的分离和鉴定. SP分离是研究肿瘤干细胞的重要方法.

王宁, 陈凇, 卫勃, 赵向阳, 中国人民解放军总医院普通外科北京市 100853

鲁文静, 沈丽, 北京大学干细胞研究中心 北京市 100083

国家自然科学基金资助项目, No. 30570522

通讯作者: 陈凇, 100853, 北京市复兴路28号, 中国人民解放军总医院普通外科. chenlinbj@vip.sina.com

电话: 010-66937846 传真: 010-68181689

收稿日期: 2007-01-11 接受日期: 2007-01-31

Primary analysis of side population in human a gastric cancer cell line MKN-28

Ning Wang, Lin Chen, Bo Wei, Xiang-Yang Zhao, Wen-Jing Lu, Li Shen

Ning Wang, Lin Chen, Bo Wei, Xiang-Yang Zhao, Department of General Surgery, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China

Wen-Jing Lu, Li Shen, Center for Stem Cell Research, Peking University, Beijing 10083, China

Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30570522

Correspondence to: Lin Chen, Department of General Surgery, General Hospital of Chinese PLA, 28 Fuxing Road, Beijing 100853, China. chenlinbj@vip.sina.com

Received: 2007-01-11 Accepted: 2007-01-31

Abstract

AIM: To identify the side population (SP) of cancer stem-like cells in gastric cancer cell line MKN-28.

METHODS: Immunofluorescence assay was used to determine the expression of ABCG2, an indicator of stem cells, in gastric cancer cell line MKN-28. MKN-28 tumor cells suspension was stained with Hoechst33342 and propidium iodide (PI) with the absence or presence of verapamil. Then the SP was analyzed by fluorescence-activated cell sorter.

RESULTS: A little amount of ABCG2 expression was found in MKN-28 cells, and the ABCG2-positive cells covered a percentage of 1.7%. SP cells accounted for 0.25% of the MKN-28 cells, which was decreased to 0.05% after the treatment of verapamil.

CONCLUSION: SP cancer stem-like cells exist in

gastric cancer cell line MKN-28, and they can be decreased by verapamil.

Key Words: Gastric cancer; MKN-28 cells; ABCG2; Side population; Cancer stem cell

Wang N, Chen L, Wei B, Zhao XY, Lu WJ, Shen L. Primary analysis of side population in human a gastric cancer cell line MKN-28. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(9):1000-1003

摘要

目的: 分析胃癌细胞株MKN-28中是否包含肿瘤干细胞相关的SP(side population)细胞亚群.

方法: 采用免疫荧光方法检测干细胞标记ABCG2在胃癌细胞株MKN-28的表达; 制备MKN-28细胞悬液, 经Hoechst33342染色, 流式细胞仪分析SP亚群.

结果: ABCG2在胃癌细胞系MKN-28中有少量表达, ABCG2阳性细胞约占1.7%. SP亚群占MKN-28细胞的0.25%, 维拉帕米阻断后减少为0.05%.

结论: 人胃癌细胞株MKN-28中存在SP细胞亚群, 提示胃癌干细胞的存在.

关键词: 胃癌; MKN-28细胞; ABCG2; SP亚群; 肿瘤干细胞

王宁, 陈凇, 卫勃, 赵向阳, 鲁文静, 沈丽. 胃癌MKN-28肿瘤细胞系SP细胞亚群初步分析. 世界华人消化杂志 2007;15(9):1000-1003

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1000.asp>

0 引言

肿瘤干细胞学说认为肿瘤组织中存在极少量肿瘤细胞, 具有自我更新能力和分化潜能, 是肿瘤增殖生长、转移和复发的根源, 肿瘤干细胞已成为肿瘤研究的热点^[1]. 但是由于缺乏特异的表面标记, 肿瘤干细胞的分离纯化一直是长期以来各国科学家亟待解决的难题之一. 2001年, 美国德州St.Jude儿童研究医院Brian Sorrentino博

■研发前沿

利用流式细胞仪分选SP细胞, 是近年来国际上研究肿瘤干细胞的热点之一. 这种方法具有普遍适用性, 是肿瘤干细胞研究中很有应用价值的一种方法.

士领导的研究人员认为ABCG2是一个“通用的”干细胞标记^[2]。ABCG2高表达的细胞可高效外排DNA荧光染料Hoechst33342,从而能通过流式分选分析系统分选出SP(side population)细胞。在某些恶性肿瘤中,SP细胞具有肿瘤干细胞的特性,如人脑瘤、乳腺癌、消化道恶性肿瘤以及肝癌等肿瘤干细胞的研究就是采用了这种方法^[3-8]。目前,关于胃癌干细胞的研究尚处于探索阶段,国内外尚无胃癌干细胞分离、鉴定成功的报道。本研究探讨ABCG2在胃癌细胞系MKN-28中的表达,对胃癌SP细胞的分选进行了初步尝试,并成功分析了胃癌细胞系MKN-28的SP亚群,为我国胃癌干细胞的研究奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料 人胃癌细胞株MKN-28(上海第二军医大学长海医院消化科实验室馈赠),低糖DMEM培养液(Gibco),胎牛血清、胰蛋白酶(武汉博士德公司),Hoechst33342、PI、维拉帕米(Sigma),ABCG2-BXP21鼠抗人mAb, FITC标记山羊抗小鼠(Chemicon吉泰生物公司北京分公司)。

1.2 方法 人胃癌细胞株MKN-28,用含100 mL/L胎牛血清、100 kU/L青霉素和100 kU/L链霉素的低糖DMEM培养液,在37℃、饱和湿度、含50 mL/L CO₂条件下培养。2.5 g/L的胰蛋白酶消化、传代。实验选用对数生长期细胞。

1.2.1 免疫荧光染色 将MKN-28细胞悬液接种到放有载玻片的六孔板上铺片,加入适量L-DMEM培养液,放于37℃培养箱中静置培养过夜。次日拿出细胞至室温,吸弃培养液, PBS洗3次。多聚甲醛溶液固定,封闭,加入ABCG2 mAb(1:50),阴性对照组加入小鼠正常IgG(1:50),4℃过夜。加FITC标记的山羊抗鼠二抗(1:50),37℃ 30 min,用DAPI复染细胞核,防淬灭封片剂封片。将切片置于荧光显微镜下,以488 nm为激发波长进行观察, CCD成像,利用IMAGE-PRO软件进行图像分析。ABCG2染色阳性细胞为膜染色。随机取5个100×视野,分别计数100个细胞,计算ABCG2染色阳性细胞百分比。

1.2.2 细胞染色和SP分析 培养皿细胞换液,将Hoechst33342加入培养液,终浓度为5 mg/L。同时一瓶培养液中加入50 μmol/L的维拉帕米(verapamil)作阴性对照。37℃恒温箱90 min孵育后,倒掉培养液,加入2.5 g/L的胰蛋白酶1 mL消化,制备成1×10⁶单细胞悬液,低温离心。收集沉淀, PBS重悬,用4℃ PI 2 μg共染,标记死细胞。

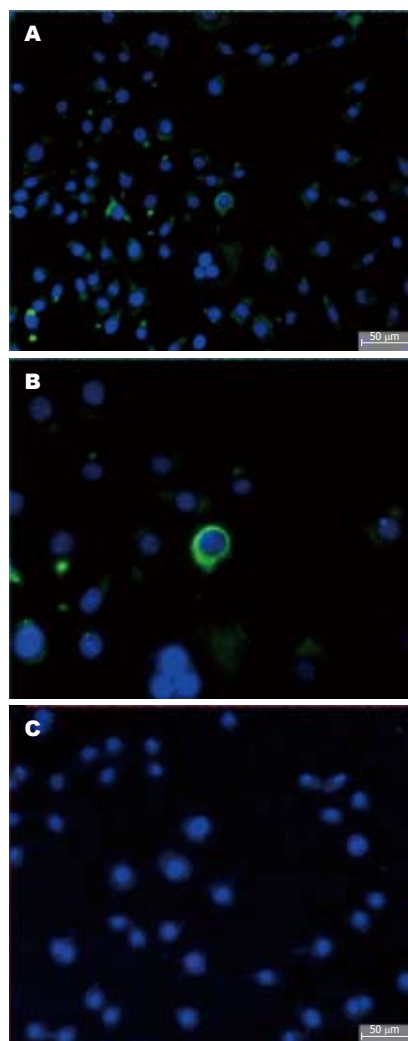


图1 荧光显微镜观察ABCG2染色细胞。A: ABCG2阳性(×200); B: ABCG2阳性(×400); C: IgG阴性对照(×200)。

PBS(含20 mL/L胎牛血清)冲洗2次,上流式分析。

2 结果

2.1 免疫荧光染色 实验证实ABCG2在胃癌MKN-28细胞系中有表达。荧光显微镜下观察,阴性对照组无特异性染色。与阴性对照片比较,ABCG2表达阳性的绿光主要分布在细胞膜表面。大部分细胞没有被染色,只有少数细胞膜呈现绿色荧光,说明染色特异。ABCG2阳性细胞与阴性细胞在形态学上无明显差异。计数ABCG2阳性细胞,约占1.7%(图1)。

2.2 SP细胞分析 决定所分选的胃癌细胞株MKN-28中是否含有SP细胞,看维拉帕米能否阻断Hoechst33342染色。通过Hoechst33342蓝光和红光双参数图,SP细胞亚群位于左下角两种荧光均阴性或很弱的区域,胃癌细胞株MKN-28中SP细胞比例约为0.25%,经维拉帕米阻断后SP

■相关报道

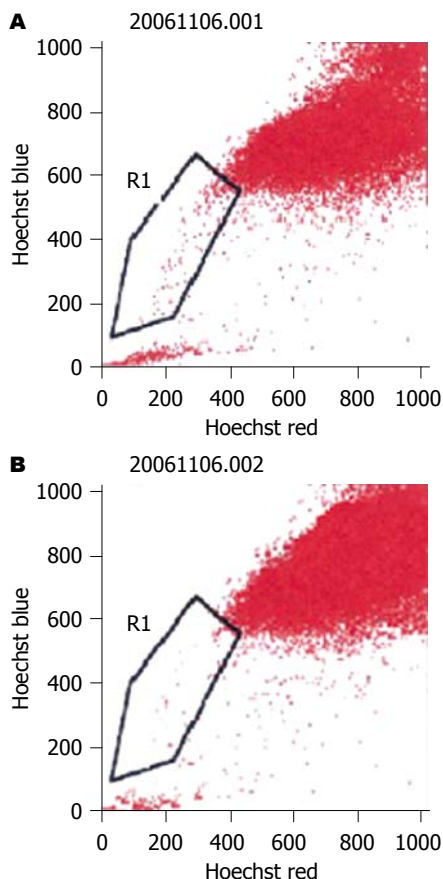
2006年Haraguchi *et al*在《干细胞》杂志上首次发表关于胃肠道肿瘤细胞系SP细胞分选的文章,证实胃肠道肿瘤细胞系中包含SP细胞,并且证明肝癌细胞株SP细胞具有干细胞特性,同时发现胃癌MKN1, MKN7, MKN28等细胞系中存在SP细胞。

■创新盘点

国内外尚无关于胃癌干细胞分离、鉴定成功的报道。本文利用流式细胞仪对胃癌SP细胞的分选进行了初步尝试,并成功分析了胃癌细胞系MKN-28的SP亚群,为我国胃癌干细胞的研究奠定了基础。

■应用要点

本文利用流式细胞仪对胃癌SP细胞的分选,这种方法更为切实、方便和经济,具有普遍适用性,是肿瘤干细胞研究中很有应用价值的一种方法。



File: 20061106.001 Gate: No Gate
Gated Events: 50000 Total Events: 50000

Regio	Events	%	Gate %	Total	× Mean
R1	73	0.25		0.25	317.12

图2 SP细胞分析。A: MKN-28胃癌细胞系中SP细胞占0.25%; B: 经维拉帕米处理后SP细胞下降至0.05%。

File: 20061106.002 Gate: No Gate
Gated Events: 50000 Total Events: 50000

Regio	Events	%	Gate %	Total	× Mean
R1	77	0.05		0.05	323.66

细胞比例减少至0.05%。加入维拉帕米后SP细胞亚群数量明显减少,证实胃癌细胞株MKN-28中确实存在SP细胞(图2)。

3 讨论

荧光染料Hoechst33342是一种脂溶性DNA结合染料,可以穿过细胞膜而与DNA结合。其激发光为350 nm,在424-444 nm之间可以检测到发射光值,一直以来在细胞周期研究方面得到广泛的应用。某些癌细胞和干细胞可以将Hoechst33342排出细胞,表现为细胞核不着色或者很低程度的着色,利用流式细胞仪可以将这些不着色细胞加以分离,人们将这种可以排出Hoechst33342的特性称为SP表型,将利用该特性分离的这部分细胞称为SP细胞^[9]。SP细胞能向不同类型和不同胚层的组织细胞分化,很可能代表了一群更原始的干细胞,且与干细胞的可塑性相关。在骨髓、骨骼肌及神经组织均发现了SP细胞^[10]。

ABC转运蛋白ABCG2基因在不同来源SP细胞均呈高表达,且该基因表达与SP细胞表型密切相关。ABCG2在造血及神经等组织来源的SP干细胞中的特异表达,使得该转运蛋白成为从不同组织中分选多潜能干细胞的一种新的表型

标记^[11]。

在肿瘤细胞系中,肿瘤细胞并不是均一的,是由不同状态的细胞群体组成,只有少量细胞具有肿瘤起始的功能,肿瘤细胞系中的SP细胞亚群具有肿瘤干细胞样的特性。Setoguchi *et al*^[12]发现很多肿瘤细胞系中都存在一小群SP细胞,SP细胞富含肿瘤干细胞。Kondo *et al*^[3]证实大鼠胶质瘤细胞系C6中分离的SP细胞亚群在体内可分化为神经元细胞和胶质细胞,提示C6中SP细胞是典型的干细胞样细胞,也就是肿瘤干细胞。Chiba *et al*^[6]在肝癌细胞系Huh7和PLC/PRE/5中分选出SP细胞,分别占了0.80%和0.25%,并证实SP细胞具有肿瘤干细胞样的特性。

现有文献所报道的肿瘤细胞系中,分选SP细胞的方法均利用了细胞对核DNA荧光染料Hoechst33342的排斥特性,分选出的肿瘤SP细胞具有干细胞的某些特性,ABCG2的表达与SP表型呈强相关^[9,13-14]。本研究首先探讨了ABCG2在胃癌MKN-28中的表达,发现ABCG2在胃癌MKN-28细胞系中有一定程度的表达。荧光显微镜下观察,ABCG2表达阳性的绿光主要分布在细胞膜表面,这与Diestra *et al*^[15]所描述的一致。大部分细胞没有被染色,只有少数细胞膜呈现绿色荧光。ABCG2阳性细胞与阴性细胞在形

■名词解释

SP细胞:某些癌细胞和干细胞可以将荧光染料Hoechst33342排出细胞,表现为细胞核不着色或者很低程度的着色,利用流式细胞仪可以将这些不着色细胞加以分离,人们将这种可以排出Hoechst33342的特性称为SP表型,将利用该特性分离的这部分细胞称为SP细胞。

态学上无明显差异, ABCG2阳性细胞约占1.7%。这样就提示胃癌MKN-28细胞系中可能含有SP细胞亚群。

ABCG2高表达的细胞可高效外排DNA荧光染料Hoechst33342, 从而能通过流式分选分析系统分选出SP细胞, 这种方法是目前利用最多的肿瘤干细胞分选方法。相对于其他方法, 如球形培养、特异性分子标记等, SP分离结果更为简便、确实, 是肿瘤干细胞研究中很有应用价值的一种方法。SP分离的最优化条件是用355 nm左右的紫外光激发, 但是紫外光需要特殊的氦气或氩气激光光源, 因功率高, 需水冷却系统及相应的滤片, 这些设备昂贵、庞大, 一般的流式细胞仪都不配备, 而且样本染色的过程和仪器的操作都会影响SP的分离结果, 这也正是这一方法在我国没有推广开展的原因。

本研究分选胃癌细胞株MKN-28中SP细胞比例约为0.25%, 低于Haraguchi *et al*^[5]的0.8%, 这可能与细胞样本染色过程以及仪器的操作误差有关。ABCG2能够被钙离子拮抗剂维拉帕米非特异性阻断, 抑制染料外排, 减少SP细胞。本实验分析胃癌细胞株MKN-28的SP亚群, 加入维拉帕米后SP细胞降至0.05%, 数量明显减少, 证实胃癌细胞株MKN-28中确实存在SP细胞, 这也提示胃癌干细胞的存在。

总之, 国内外尚无胃癌干细胞分离、鉴定成功的报道。本实验所分选出的胃癌SP细胞数量稀少, 并且不知道胃癌SP细胞的培养条件, 所以难于培养、鉴定, 这也是我们下一步研究的重点和难点。

4 参考文献

- 1 Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001; 414: 105-111
- 2 Zhou S, Schuetz JD, Bunting KD, Colapietro AM, Sampath J, Morris JJ, Lagutina I, Grosveld GC, Osawa M, Nakauchi H, Sorrentino BP. The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nat Med* 2001; 7: 1028-1034
- 3 Kondo T, Setoguchi T, Taga T. Persistence of a small subpopulation of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101:

- 781-786
- 4 Patrawala L, Calhoun T, Schneider-Broussard R, Zhou J, Claypool K, Tang DG. Side population is enriched in tumorigenic, stem-like cancer cells, whereas ABCG2+ and ABCG2- cancer cells are similarly tumorigenic. *Cancer Res* 2005; 65: 6207-6219
- 5 Haraguchi N, Utsunomiya T, Inoue H, Tanaka F, Mimori K, Barnard GF, Mori M. Characterization of a side population of cancer cells from human gastrointestinal system. *Stem Cells* 2006; 24: 506-513
- 6 Chiba T, Kita K, Zheng YW, Yokosuka O, Saisho H, Iwama A, Nakauchi H, Taniguchi H. Side population purified from hepatocellular carcinoma cells harbors cancer stem cell-like properties. *Hepatology* 2006; 44: 240-251
- 7 Seigel GM, Campbell LM, Narayan M, Gonzalez-Fernandez F. Cancer stem cell characteristics in retinoblastoma. *Mol Vis* 2005; 11: 729-737
- 8 Hirschmann-Jax C, Foster AE, Wulf GG, Nuchtern JG, Jax TW, Gobel U, Goodell MA, Brenner MK. A distinct "side population" of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 14228-14233
- 9 Zhou S, Morris JJ, Barnes Y, Lan L, Schuetz JD, Sorrentino BP. Bcrp1 gene expression is required for normal numbers of side population stem cells in mice, and confers relative protection to mitoxantrone in hematopoietic cells *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 12339-12344
- 10 Gussoni E, Soneoka Y, Strickland CD, Buzney EA, Khan MK, Flint AF, Kunkel LM, Mulligan RC. Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* 1999; 401: 390-394
- 11 Bunting KD. ABC transporters as phenotypic markers and functional regulators of stem cells. *Stem Cells* 2002; 20: 11-20
- 12 Setoguchi T, Taga T, Kondo T. Cancer stem cells persist in many cancer cell lines. *Cell Cycle* 2004; 3: 414-415
- 13 Scharenberg CW, Harkey MA, Torok-Storb B. The ABCG2 transporter is an efficient Hoechst 33342 efflux pump and is preferentially expressed by immature human hematopoietic progenitors. *Blood* 2002; 99: 507-512
- 14 Kim M, Turnquist H, Jackson J, Sgagias M, Yan Y, Gong M, Dean M, Sharp JG, Cowan K. The multidrug resistance transporter ABCG2 (breast cancer resistance protein 1) effluxes Hoechst 33342 and is overexpressed in hematopoietic stem cells. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 22-28
- 15 Diestra JE, Scheffer GL, Catala I, Maliepaard M, Schellens JH, Scheper RJ, Germa-Lluch JR, Izquierdo MA. Frequent expression of the multidrug resistance-associated protein BCRP/MXR/ABCP/ABCG2 in human tumours detected by the BXP-21 monoclonal antibody in paraffin-embedded material. *J Pathol* 2002; 198: 213-219

■同行评价

本研究探讨ABCG2在胃癌细胞系MKN-28中的表达, 对胃癌SP细胞的分选进行了初步尝试, 实验设计合理, 有较高的理论价值。

电编 张敏 编辑 张焕兰

血管紧张素II对肝星状细胞迁移和增殖的影响

杨玲, 朱清静, 侯晓华, 胡胜军, 徐敏, 朱锐

■背景资料

肝星状细胞(HSC)是肝纤维化发生、发展的关键环节, ANG II在肝纤维化的进展过程中发挥了重要作用。

杨玲, 侯晓华, 胡胜军, 徐敏, 朱锐, 华中科技大学同济医学院附属协和医院消化内科 湖北省武汉市 430022
朱清静, 湖北省中医院肝病中心 湖北省武汉市 430061
国家自然科学基金青年基金资助项目, No. 30500658
中国博士后科学基金资助项目, No. 2004035198
湖北省自然科学基金资助项目, No. 2004ABA236
通讯作者: 侯晓华, 430022, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院附属协和医院消化内科. houxh@public.wh.hb.cn
电话: 027-85726930
收稿日期: 2006-12-25 接受日期: 2007-01-20

Effect of angiotensin II on the proliferation and migration of hepatic stellate cells

Ling Yang, Qing-Jing Zhu, Xiao-Hua Hou, Sheng-Jun Hu, Min Xu, Rui Zhu

Ling Yang, Xiao-Hua Hou, Sheng-Jun Hu, Min Xu, Rui Zhu, Department of Gastroenterology, Union Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China
Qing-Jing Zhu, Center of Liver Diseases, Hubei Hospital of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430061, Hubei Province, China

Supported by National Natural Science Foundation (Youth Foundation) of China, No. 30500658, the Postdoctoral Science Foundation of China, No. 2004035198, and the Natural Science Foundation of Hubei Province, No. 2004ABA236
Correspondence to: Xiao-Hua Hou, Department of Gastroenterology, Union Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China. houxh@public.wh.hb.cn
Received: 2006-12-25 Accepted: 2007-01-20

Abstract

AIM: To explore the changes of the proliferation and migration ability of hepatic stellate cells (HSCs) induced by angiotensin II (ANG II).

METHODS: HSCs were incubated *in vitro*. The proliferation and migration ability of HSCs induced by ANG II at different concentration were observed with MTT assay and Transwell chamber assay, respectively.

RESULTS: The proliferation of HSCs was significantly increased when ANG II was used at the concentrations of 1, 2, 4, 8 and 10 $\mu\text{mol/L}$ in comparison with that in the control cells ($F = 2.305, P < 0.05; F = 4.003, 6.833, 8.855, 21.066, P < 0.01$). With the increasing of ANG II concen-

tration, the proliferative activity was increased, showing a positive correlation ($r = 0.917, P < 0.01$). ANG II at the concentrations of 10, 8 and 4 $\mu\text{mol/L}$ markedly induced the migration of HSCs ($F = 22.084, 15.155, 10.392, P < 0.01$). The migration ability of HSCs was also positively correlated with the concentrations of ANG II ($r = 0.952, P < 0.01$).

CONCLUSION: ANG II can significantly induce the proliferation and migration of HSCs in a dose-dependent manner.

Key Words: Angiotensin II; Hepatic stellate cell; Migration; Proliferation; MTT assay

Yang L, Zhu QJ, Hou XH, Hu SJ, Xu M, Zhu R. Effect of angiotensin II on the proliferation and migration of hepatic stellate cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(9):1004-1007

摘要

目的: 探讨血管紧张素II (ANG II)对肝星状细胞(HSC)增殖、迁移活性的影响。

方法: 体外培养HSC, 在不同浓度的ANG II作用下, 观察HSCs生长情况并绘制生长曲线, 采用MTT法测定细胞增殖、Transwell小室检测细胞迁移。

结果: 1, 2, 4, 8, 10 $\mu\text{mol/L}$ ANG II可显著促进HSC增殖, 与空白对照组相比有显著差异($F = 2.305, P < 0.05; F = 4.003, 6.833, 8.855, 21.066, P < 0.01$)。随作用浓度的增加, 细胞增殖活性显著提高, 相关分析显示呈正相关($r = 0.917, P < 0.01$)。10, 8, 4 $\mu\text{mol/L}$ 的ANG II可显著诱导HSC迁移, 与空白对照组相比差异显著($F = 22.084, 15.155, 10.392, P < 0.01$)。随ANG II浓度的增加, 细胞迁移率显著升高, 相关分析显示呈正相关($r = 0.952, P < 0.01$)。

结论: ANG II可显著诱导HSC增殖与迁移, 并随剂量的增加作用加强。

关键词: 血管紧张素II; 肝星状细胞; 细胞迁移; 增殖; MTT法

杨玲, 朱清静, 侯晓华, 胡胜军, 徐敏, 朱锐. 血管紧张素II对肝星状细胞迁移和增殖的影响. 世界华人消化杂志 2007;15(9):1004-1007
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1004.asp>

0 引言

肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSC)位于Disse间隙, 紧贴肝窦内皮细胞和肝细胞, 正常肝脏中HSC的数目很少, 约占肝细胞总数的5%-8%, 富含VitA脂滴, 参与VitA代谢和合成细胞外基质(extracellular matrix, ECM)^[1-2]. 当肝脏受到各种损伤时, HSC被活化并向肌纤维母细胞转化, 主要表现为细胞增殖、游动、收缩能力增强及细胞因子(TGF- β , TGF- α , FGF, IGF-1等)和ECM的大量合成, 从而对自身增殖、ECM的合成和静止期HSC的增生、转化及蛋白多糖合成进行调控. 因此目前认为HSC活化是肝纤维化发生、发展的关键环节.

血管紧张素II(angiotensin II, ANG II)为肾素-血管紧张素系统(RAS)最主要的生物活性肽, ANG II在肝纤维化的进展过程中发挥了重要作用. 研究显示, ANG II可诱导HSC增殖、收缩^[3]、分泌细胞外基质, 调节肝窦微循环^[4]; 同时HSC可表达AT1R^[5], 并能分泌ANG II^[6]. ANG II参与组织损伤修复, 而损伤肝组织局部ANG II分泌增加是否与ANG II促进HSC向损伤部位迁移有关, 尚较少有报道. 本文观察了ANG II对HSC增殖、迁移的影响, 现报道如下.

1 材料和方法

1.1 材料 HSC系(HSC-T6)由上海中医药大学徐列明教授惠赠. DMEM培养基购自Gibco公司, TRIzol试剂盒为罗氏公司产品, RNA酶抑制剂、M-MLV逆转录酶及PCR扩增试剂均购自Promega公司. MTT, ANG II购自Sigma公司. Transwell小室购自Corning公司.

1.2 方法

1.2.1 HSC的培养及增殖的测定 HSC-T6于37℃、50 mL/L CO₂的含100 mL/L小牛血清、10⁵ U/L青霉素、100 g/L链霉素、10 g/L L-谷氨酰胺的DMEM培养液中培养, 24 h后去培养基, 加入含0, 1, 2, 4, 8, 10 μ mol/L ANG II的50 mL/L小牛血清DMEM继续培养48 h后进行MTT实验, 每组3复孔. 去培养基(翻板), 每孔加20 μ L 5 g/L MTT溶液, 孵育4 h, 每孔加入二甲基亚砜(DMSO) 100 μ L, 在微型混合器上振荡2 min, 10 min后于全自动酶标仪上测定A₄₉₀值.

1.2.2 细胞迁移实验 采用Transwell法, Transwell小室滤膜为8 μ m孔径的聚碳酸脂微孔滤膜. Transwell小室下室中分别加入0.6 mL含4, 8, 10 μ mol/L ANG II的DMEM培养液(含50 mL/L小牛血清)作为化学趋化物, 取对数生长期HSC-T6用EDTA消化后, DMEM培养基调成单细胞悬液, 细胞浓度为1.0 \times 10⁵/L, 加入0.2 mL于上室, 37℃培养24 h后取出滤膜, 棉签拭去上室滤膜内表面残存细胞, 对迁移至滤膜外表面的细胞用20 g/L多聚甲醛固定, PBS洗涤, 苏木素染色. 显微镜下计数, 每张滤膜随机取5个视野(\times 200)计穿膜细胞数并取均值.

统计学处理 结果用均数 \pm 标准差(mean \pm SD)表示, 用SPSS11.5软件进行单因素方差分析, 以 $P<0.05$ 为有统计学差异.

2 结果

2.1 不同浓度ANG II对HSC增殖的影响 与空白组比较, 1, 2, 4, 8, 10 μ mol/L ANG II可显著促进HSC增殖, F 值分别为2.305($P<0.05$), 4.003($P<0.01$), 6.833($P<0.01$), 8.855($P<0.01$), 21.066($P<0.01$). 随作用浓度的增加, 细胞增殖活性显著提高, 相关分析显示相关系数 $r = 0.917$, $P<0.01$ (表1).

2.2 不同浓度ANG II对HSC迁移的影响 与空白对照组比较, 10, 8, 4 μ mol/L ANG II组 F 值分别为22.084, 15.155, 10.392, 均 $P<0.01$, 表明经ANG II诱导后HSC的迁移能力显著增加, 随ANG II浓度的增加, 细胞迁移率显著升高, 相关分析显示相关系数 $r = 0.952$, 差异有显著性($P<0.01$, 表2).

3 讨论

HSC是肝纤维化形成的主要效应细胞, 致纤维化因子激活HSC, 使其获得肌成纤维细胞表型, 表现为细胞增殖, 合成大量的细胞外基质, 分泌趋化因子、细胞因子, 并获得细胞运动和收缩功能, 向损伤部位迁移聚集, 直接参与损伤修复, 加速胶原沉积, 促进纤维化进程.

ANG II是由内皮细胞及循环中血管紧张素转换酶作用产生的, 为经典的内分泌激素, 在调节血压及钠稳态方面发挥了重要作用. ANG II尚具有独立于调节血压以外的其他作用, 如促进细胞有丝分裂增殖等. ANG II作为一种强烈的有丝分裂原, 最近有证据显示ANG II可能是促肝纤维化重要的介质: 在肝硬化患者通常伴

■研究前沿

ANG II可诱导HSC增殖、收缩、分泌细胞外基质, 调节肝窦微循环; 同时HSC可表达AT1R, 并能分泌ANG II. ANG II参与组织损伤修复, 而损伤肝组织局部ANG II分泌增加是否与ANG II促进HSC向损伤部位迁移有关, 尚较少有报道.

■应用要点

本文观察了ANG II对HSC增殖、迁移的影响,发现活化的HSC经ANG II诱导后,迁移能力显著增强,并随ANG II诱导浓度的增加,HSC迁移能力也随之提高,说明ANG II作为一种趋化因子,可通过诱导HSC迁移,促进肝纤维化的发生。有效阻止HSC向损伤部位的迁移,则有利于阻止肝纤维化的进展。

表 1 不同浓度ANG II对HSC增殖的影响(mean ± SD, n = 3)

分组	A ₄₉₀ 吸光值	F值
0 μmol/L	0.1097 ± 0.0020	—
1 μmol/L	0.1287 ± 0.0035 ^a	2.305
2 μmol/L	0.1427 ± 0.0158 ^a	4.003
4 μmol/L	0.1660 ± 0.0122 ^b	6.833
8 μmol/L	0.1827 ± 0.0038 ^b	8.855
10 μmol/L	0.2833 ± 0.0136 ^b	21.066

^aP<0.05, ^bP<0.01 vs ANG II 0 μmol/L组。

有血清ANG II水平的升高和肝组织中血管紧张素转化酶及ANG II 1型受体的表达增强^[7];在实验性肝纤维化动物模型中也发现肝组织局部的肾素血管紧张素系统是上调表达的^[8];ANG II水平呈进展性升高,与肝纤维化程度及肝功能减退密切相关^[9];应用ANG II进行全身灌注则可显著加速实验大鼠肝纤维化的进程^[10]。临床上具有ANG II遗传多态性并伴有ANG II合成增加的丙型肝炎患者,常更易发展为重度的肝纤维化^[11];在非酒精性脂肪性肝炎患者,应用ANG II受体拮抗剂则可显著抑制HSC的活化^[12]。而且动物实验显示,抑制ANG II的合成和/或阻断ANG II受体的作用,则可显著减轻肝脏炎症反应及纤维化程度^[13]。因此有效抑制ANG II的生物学效应,为肝纤维化防治的重要策略。进一步研究显示,ANG II可促进肝脏细胞外基质增生,直接刺激细胞内Ca²⁺内流,诱导HSC收缩活化、促使静息性HSC向活化性HSC转化,并导致静息性HSC的进一步激活,启动肝纤维化进程^[3];通过其受体AT1R可刺激TGF-β₁分泌,增强TGF-β₁的致纤维化作用;通过上调间质α-肌动蛋白的表达,促进成纤维细胞的表型转化或增加成纤维细胞数目,促进间质增生及结构基质蛋白(胶原及FN)合成^[14]。本研究亦证实ANG II可显著诱导HSC增殖,随剂量的增加作用加强,但在药物作用浓度上与其他研究存在一定差异^[15],这可能与实验条件及所用的细胞不同有关。

细胞迁移是机体正常生长发育必不可少的重要环节,在组织损伤或感染过程中,通常伴有特定细胞向损伤部位的迁移。肝纤维化是肝脏对各种因素所致的慢性损伤的一种修复反应^[16]。活化的HSC向损伤部位迁移,分泌细胞外基质,促进瘢痕的形成,从而促进肝纤维化的发生和肝窦微循环的障碍。因此有效阻止HSC向损伤

表 2 不同浓度ANG II对HSC迁移的影响(mean ± SD, n = 3)

分组	细胞迁移数	F值
0 μmol/L	1.600 ± 0.547	—
4 μmol/L	9.000 ± 1.581 ^b	10.392
8 μmol/L	12.600 ± 1.140 ^b	15.155
10 μmol/L	17.400 ± 2.073 ^b	22.084

^aP<0.05, ^bP<0.01 vs ANG II 0 μmol/L组。

部位的迁移,则可阻止肝纤维化的进展。ANG II作为一种致炎因子,可显著诱导血管平滑肌细胞、成纤维细胞及肾小球系膜细胞迁移^[17-19],在心肌纤维化、肾脏纤维化及皮肤斑痕形成方面发挥了重要作用。肝损伤时,活化的HSC可分泌多种致纤维化细胞因子,ANG II作为主要的致纤维化介质是否参与了活化HSC的迁移呢?我们采用Transwell小室在体外观察了ANG II对HSC迁移的影响,发现活化的HSC经ANG II诱导后,迁移能力显著增强,并随ANG II诱导浓度的增加,HSC迁移能力也随之提高,说明ANG II作为一种趋化因子,可通过诱导HSC向损伤局部组织迁移,促进损伤部位细胞外基质的合成,加速肝纤维化的进程。而如何在体内模型中证实ANG II在肝损伤后细胞迁移中的作用及ANG II调控HSC迁移的机制则是今后进一步研究的重点。

4 参考文献

- 1 张锦生. 肝星状细胞激活的内在机制. 世界华人消化杂志 2005; 13: 831-834
- 2 饶慧琪, 魏来. 肝星状细胞的生物学特性及活化调控机制. 世界华人消化杂志 2005; 13: 671-674
- 3 Bataller R, Gines P, Nicolas JM, Gorbis MN, Garcia-Ramallo E, Gasull X, Bosch J, Arroyo V, Rodes J. Angiotensin II induces contraction and proliferation of human hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 2000; 118: 1149-1156
- 4 张芝军, 杨希山, 吴平生, 张晓峰, 陈晓清, 曾建英. 血管紧张素II和洛沙坦对肝星状细胞合成胶原的影响. 中国病理生理杂志 2004; 20: 1842-1845
- 5 Wei H, Lu H, Li D, Zhan Y, Wang Z, Huang X. The expression of AT1 receptor on hepatic stellate cells in rat fibrosis induced by CCl₄. *Chin Med J (Engl)* 2001; 114: 583-587
- 6 Bataller R, Sancho-Bru P, Gines P, Lora JM, Al-Garawi A, Sole M, Colmenero J, Nicolas JM, Jimenez W, Weich N, Gutierrez-Ramos JC, Arroyo V, Rodes J. Activated human hepatic stellate cells express the renin-angiotensin system and synthesize angiotensin II. *Gastroenterology* 2003; 125: 117-125
- 7 Ikura Y, Ohsawa M, Shirai N, Sugama Y, Fukushima H, Suekane T, Hirayama M, Ehara

- S, Naruko T, Ueda M. Expression of angiotensin II type 1 receptor in human cirrhotic livers: Its relation to fibrosis and portal hypertension. *Hepatol Res* 2005; 32: 107-116
- 8 Wei HS, Lu HM, Li DG, Zhan YT, Wang ZR, Huang X, Cheng JL, Xu QF. The regulatory role of AT 1 receptor on activated HSCs in hepatic fibrogenesis: effects of RAS inhibitors on hepatic fibrosis induced by CCl₄(4). *World J Gastroenterol* 2000; 6: 824-828
- 9 Pereira RM, Dos Santos RA, Teixeira MM, Leite VH, Costa LP, da Costa Dias FL, Barcelos LS, Collares GB, Simoes E Silva AC. The renin-angiotensin system in a rat model of hepatic fibrosis: Evidence for a protective role of Angiotensin-(1-7). *J Hepatol* 2006
- 10 Bataller R, Gabele E, Parsons CJ, Morris T, Yang L, Schoonhoven R, Brenner DA, Rippe RA. Systemic infusion of angiotensin II exacerbates liver fibrosis in bile duct-ligated rats. *Hepatology* 2005; 41: 1046-1055
- 11 Powell EE, Edwards-Smith CJ, Hay JL, Clouston AD, Crawford DH, Shorthouse C, Purdie DM, Jonsson JR. Host genetic factors influence disease progression in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2000; 31: 828-833
- 12 Yokohama S, Tokusashi Y, Nakamura K, Tamaki Y, Okamoto S, Okada M, Aso K, Hasegawa T, Aoshima M, Miyokawa N, Haneda M, Yoneda M. Inhibitory effect of angiotensin II receptor antagonist on hepatic stellate cell activation in non-alcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 322-326
- 13 Nabeshima Y, Tazuma S, Kanno K, Hyogo H, Iwai M, Horiuchi M, Chayama K. Anti-fibrogenic function of angiotensin II type 2 receptor in CCl₄-induced liver fibrosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 346: 658-664
- 14 Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, Ikenaka Y, Noguchi R, Nakatani T, Tsujinoue H, Fukui H. Angiotensin-II type 1 receptor interaction is a major regulator for liver fibrosis development in rats. *Hepatology* 2001; 34: 745-750
- 15 张芝军, 杨希山, 吴平生, 李旭, 张晓峰, 陈晓清, 余中逊. 血管紧张素II和洛沙坦对肝星状细胞生长、增殖的影响. 第一军医大学学报 2003; 23: 219-227
- 16 Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 2005; 115: 209-218
- 17 Takeuchi Y, Yamauchi K, Nakamura J, Shigematsu S, Hashizume K. Angiotensin II regulates migration in mouse cultured mesangial cells: evidence for the presence of receptor subtype-specific regulation. *J Endocrinol* 2006; 191: 361-367
- 18 Yahata Y, Shirakata Y, Tokumaru S, Yang L, Dai X, Tohyama M, Tsuda T, Sayama K, Iwai M, Horiuchi M, Hashimoto K. A novel function of angiotensin II in skin wound healing. Induction of fibroblast and keratinocyte migration by angiotensin II via heparin-binding epidermal growth factor (EGF)-like growth factor-mediated EGF receptor transactivation. *J Biol Chem* 2006; 281: 13209-13216
- 19 Yang X, Zhu MJ, Sreejayan N, Ren J, Du M. Angiotensin II promotes smooth muscle cell proliferation and migration through release of heparin-binding epidermal growth factor and activation of EGF-receptor pathway. *Mol Cells* 2005; 20: 263-270

■同行评价

本文研究了血管紧张素II对HSC迁移、增殖的影响, 文章内容较新颖, 有较高研究意义。

电编 张敏 编辑 王晓瑜

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

中国学术期刊综合引证报告(2006)

本刊讯 根据《中国学术期刊综合评价数据库(CAJCED)》2005年6182种统计刊源析出的214万条中国期刊引文数据库及CNKI“中国期刊网”中心网站2005-01/12全文下载记录(1.5亿篇次)的大样本数据统计分析得到: 世界华人消化杂志[标准刊号: ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R; 类目名称: 医药科学\临床医学\呼吸及消化系统疾病(YK5.2.3)]总被引频次为2471, 影响因子为0.661, 5年影响因子为0.644, 即年指标为0.079, 他引总引比为0.73, 被引期刊数为491, 被引半衰期为4.6, 2005载文量为768, 基金论文比为0.44, Web即年下载率为0.6。[中国学术期刊(光盘版)电子杂志社; 中国科学文献计量评价研究中心]。

葡萄糖神经酰胺合成酶基因在人胃癌细胞SGC-7901及SGC-7901/VCR的表达和意义

张艳, 刘宗文, 贾丹辉, 乐晓萍, 张钦宪

■背景资料

胃癌是威胁人类生命的严重疾病, 是消化系统最常见的恶性肿瘤, 其发病机制十分复杂, 病因目前尚未阐明。葡萄糖神经酰胺合成酶(GCS)是神经酰胺代谢的关键酶, 近年来研究发现, 他参与了肿瘤细胞的增殖、分化和耐药。其活性增高被认为是引起肿瘤获得性多药耐药产生的原因之一。

■研发前沿

GCS在癌细胞的表达和意义愈来愈被人们重视, 现已有报道GCS在很多肿瘤细胞中都呈高表达趋势, 抑制GCS可显著提高肿瘤对于化疗的敏感性, 以此为热点的研究将为肿瘤耐药的逆转治疗提供新的方向。

张艳, 贾丹辉, 郑州大学基础医学院药理学教研室 河南省郑州市 450052

刘宗文, 河南省肿瘤病理重点实验室 河南省郑州市 450052
乐晓萍, 张钦宪, 郑州大学基础医学院组织胚胎学教研室 河南省郑州市 450052

通讯作者: 张钦宪, 450052, 郑州市大学路40号, 郑州大学基础医学院组织胚胎学教研室, qxz53@zzu.edu.cn

电话: 0371-66658153 传真: 0371-66658153

收稿日期: 2006-12-20 接受日期: 2007-01-10

Expression of glucosylceramide synthase gene and its significance in human gastric carcinoma SGC-7901 and SGC-7901/VCR cells

Yan Zhang, Zong-Wen Liu, Dan-Hui Jia, Xiao-Ping Le, Qin-Xian Zhang

Yan Zhang, Dan-Hui Jia, Department of Pharmacology, College of Basic Medical Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, He'nan Province, China

Zong-Wen Liu, He'nan Key Laboratory for Tumor Pathology, Zhengzhou 450052, He'nan Province, China

Xiao-Ping Le, Qin-Xian Zhang, Department of Histology and Embryology, College of Basic Medical Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, He'nan Province, China

Correspondence to: Dr. Qin-Xian Zhang, Department of Histology and Embryology, College of Basic Medical Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, He'nan Province, China. qxz53@zzu.edu.cn

Received: 2006-12-20 Accepted: 2007-01-10

Abstract

AIM: To investigate the expression of glucosylceramide synthase (GCS) gene and its significance in human gastric carcinoma SGC-7901 and SGC-7901/VCR cells.

METHODS: Human gastric carcinoma SGC-7901/VCR and SGC-7901 cells were cultured *in vitro*, and the total RNA was extracted by TRIzol method. MTT was adopted to evaluate the drug resistance of SGC-7901/VCR cells. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to detect the expression of GCS mRNA, and Western blotting and immu-

nocytochemistry were performed to measure the expression of GCS protein.

RESULTS: The half inhibitory concentrations (IC_{50}) for SGC-7901 and SGC-7901/VCR were 1.40 ± 0.06 and 86.20 ± 0.50 mg/L, respectively, and the drug-resistant index of SGC-7901/VCR cells was 61 times as high as that of SGC-7901 cells. GCS mRNA was expressed in both SGC-7901/VCR and SGC-7901 cells, and there was significant difference between them (GCS index: 3.9 vs 0.5 , $P < 0.05$). Moreover, GCS protein expression was significantly different between SGC-7901/VCR and SGC-7901 cells (65% vs 18% , $P < 0.05$).

CONCLUSION: GCS gene expresses in human gastric cancer cells and it plays an important role in the carcinogenesis and development of gastric carcinoma. The high expression of GCS is closely related with the multidrug resistance of tumors.

Key Words: Human gastric carcinoma cell; Glucosylceramide synthase; Gene expression; Multidrug resistance

Zhang Y, Liu ZW, Jia DH, Le XP, Zhang QX. Expression of glucosylceramide synthase gene and its significance in human gastric carcinoma SGC-7901 and SGC-7901/VCR cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(9):1008-1011

摘要

目的: 研究葡萄糖神经酰胺合成酶(glucosylceramide synthase, GCS)基因在人胃癌细胞SGC-7901和SGC-7901/VCR的表达并探讨其对人胃癌发生、发展的意义。

方法: 体外培养人亲本敏感胃癌细胞SGC-7901和人耐长春新碱胃癌细胞SGC-7901/VCR。采用MTT法检测半数细胞抑制浓度(IC_{50})和SGC-7901/VCR耐药倍数; RT-PCR法检测SGC-7901和SGC-7901/VCR两种细胞GCS mRNA的表达, 免疫组化法测定GCS蛋白表达水平。

结果: SGC-7901和SGC-7901/VCR的 IC_{50} 分别为 1.40 ± 0.06 和 86.20 ± 0.50 mg/L. SGC-7901/VCR细胞耐药指数是亲本细胞SGC-7901的61倍, SGC-7901和SGC-7901/VCR两种细胞均有GCS mRNA表达, 且SGC-7901/VCR细胞GCS mRNA表达水平(GCS指数为3.9)较SGC-7901细胞(GCS指数为0.5)有显著升高($P < 0.05$), 耐药细胞GCS蛋白表达阳性率(65%)显著高于亲本细胞(18%)($P < 0.05$).

结论: GCS基因在人胃癌耐药细胞和亲本敏感细胞均有表达, 耐药细胞GCS mRNA及蛋白均高表达. GCS可能参与了胃癌的发生过程, 且与肿瘤多药耐药有密切关系.

关键词: 人胃癌细胞; 葡萄糖神经酰胺合成酶; 基因表达; 多药耐药

张艳, 刘宗文, 贾丹辉, 乐晓萍, 张钦宪. 葡萄糖神经酰胺合成酶基因在人胃癌细胞SGC-7901及SGC-7901/VCR的表达和意义. 世界华人消化杂志 2007;15(9):1008-1011
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1008.asp>

0 引言

葡萄糖神经酰胺合成酶(glucosylceramide synthase, GCS)是调控神经酰胺代谢的关键酶之一, 其活性水平与肿瘤细胞多药耐药有密切关系. 有研究报道GCS在人卵巢癌细胞、人口腔表皮癌细胞^[1-2]、人黑色素瘤细胞^[3]、人乳腺癌细胞^[4]及人胆囊癌^[5]中均有表达. 目前为止, 未见有关GCS基因在人胃癌细胞中表达的报道. 我们采取体外培养人耐长春新碱(vincristine, VCR)胃癌细胞和人敏感胃癌细胞, 应用RT-PCR、免疫细胞化学技术对人胃癌细胞中GCS基因表达及意义进行了探讨和研究.

1 材料和方法

1.1 材料 人耐VCR胃癌细胞株SGC-7901/VCR由第四军医大学西京医院消化病研究所樊代明教授惠赠, 本室传代培养; 人亲本敏感胃癌细胞株SGC-7901由郑州大学基础医学院组织胚胎学教研室保存. RPMI-1640培养基为Gibco公司产品, TRIzol为Invitrogen公司产品, AMV第一链cDNA合成试剂盒及PCR扩增试剂盒为上海生工生物工程技术有限公司产品, VCR为广州白云山明兴制药有限公司产品, 四甲基偶氮唑盐(MTT)为Sigma公司产品, GCS抗体由美国Mayo Clinic Center的David Marks教授惠赠.

1.2 方法 SGC-7901用含100 mL/L灭活胎牛血清

的1640培养液, 置37℃ 50 mL/L CO₂的恒温孵箱中培养, 胰酶、EDTA混合液消化, 2-3 d传代一次, 维持细胞处于对数生长期. SGC-7901/VCR在培养液中加VCR 1 mg/L, 培养条件同上.

1.2.1 SGC-7901/VCR耐药性的检测 采用常规MTT法^[6-7], 自动酶标仪570 nm波长测各孔吸光度值(A), 计算相对抑制率(%) = (平均A_{对照} - 平均A_{加药}) / 平均A_{对照} × 100%, 然后以肿瘤细胞抑制率为纵坐标, 药物浓度的对数为横坐标, 制作半对数图, 计算50%细胞生长抑制所需的药物浓度(IC₅₀)、耐药指数(RI) = IC₅₀(SGC-7901/VCR) / IC₅₀(SGC-7901).

1.2.2 RT-PCR检测GCS mRNA的表达 细胞数量达到 2×10^7 个时, 进行总RNA提取^[8]. 分别收集SGC-7901和SGC-7901/VCR, 加入1 mL TRIzol反复吹打, 室温放置5 min, 加入0.2 mL氯仿, 充分混匀, 室温放置2 min. 12 000 g 4℃离心15 min, 取上清, 加入0.5 mL异丙醇室温放置10 min, 12 000 g 4℃离心10 min, 弃上清, 750 mL/L乙醇洗两次, 弃去乙醇, 倒置于空气中干燥5 min, DEPC水溶解沉淀, 用紫外分光光度计检测260 nm和280 nm波长的吸光度值(A值), 计算A₂₆₀/A₂₈₀比值(纯度)及RNA含量, 并用琼脂糖凝胶电泳检查RNA的完整性. GCS基因引物根据Primer5.0分析软件自行设计, 上游引物: 5'-CCTTTCCTCTCCCCACCTTCCTCT-3', 下游引物: 5'-GGTTTCAGAAAGAGAGACACCTGGG-3', 扩增片段为302 bp; GAPDH为内参照, 序列为上游: 5'-CGCTGAGTACGTCTGGAGT-3', 下游: 5'-ATGTCATCATATTGGCAGGTT-3', 扩增片段为501 bp. 用提取的总RNA为模板, 以Oligo为引物进行逆转录, 合成单链cDNA. 以cDNA为模板进行PCR扩增, PCR反应体系25 μL: Taq酶1 U, 上下游引物各1.5 μL, 逆转录产物5 μL, dNTP 2 μL. PCR反应条件为94℃预变性5 min, 95℃变性30 s, 60℃退火30 s, 72℃延伸90 s, 30个循环后, 72℃延伸5 min. 取PCR产物5 μL与上样缓冲液混合后进行15 g/L琼脂糖凝胶电泳, 紫外灯下观察并照相. 使用Syngene凝胶分析系统软件扫描各条带灰度值, 以GCS指数(GCS灰度值和内参照灰度值的比值)进行GCS mRNA表达水平的半定量分析.

1.2.3 免疫细胞化学检测GCS的表达^[9] 分别将SGC-7901细胞、SGC-7901/VCR细胞接种于6孔板, 6孔板内预先放置盖玻片, 待细胞爬片过夜后, 取出盖玻片, 丙酮固定, SABC法免疫组化染色, DAB显色. 按SABC试剂盒说明操作, 结果判

■ 相关报道

Weiss、扬泉、孙妍琳、李江涛 *et al* 研究报道了人黑色素瘤细胞、人口腔表皮样癌、人乳腺癌细胞、人胆囊癌中葡萄糖神经酰胺合成酶基因的表达和意义, 为本实验立题参考提供了帮助.

■ 创新盘点

本实验采取体外培养人耐长春新碱胃癌细胞和人敏感胃癌细胞, 应用RT-PCR、免疫细胞化学技术对人胃癌细胞中GCS基因表达及意义进行了探讨和研究, 国内外尚未见相关报道, 因此具有一定的创新性.

■应用要点

本实验采取体外培养人耐长春新碱胃癌细胞和人敏感胃癌细胞,通过MTT法检测耐药倍数,RT-PCR法检测SGC-7901和SGC-7901/VCR两种细胞GCS mRNA的表达,免疫组化法测定GCS蛋白表达水平,发现胃癌细胞特别是耐药细胞SGC-7901/VCR中GCS基因高表达,为胃癌耐药性的进一步研究打下基础,也为临床胃癌耐药的逆转治疗提供了新的思路。

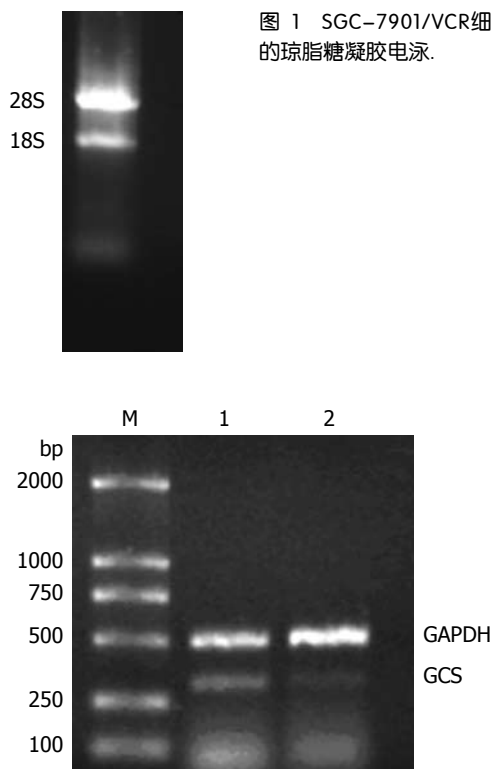


图2 RT-PCR检测GCS mRNA的表达。M: Marker; 1: SGC-7901细胞; 2: SGC-7901/VCR细胞。

定:胞质出现棕黄色染色为阳性着色细胞。随机观察10个高倍镜视野计算细胞阳性率。

统计学处理 数据采用SPSS10.0统计软件做单因素方差分析和成组设计的 t 检验, $P < 0.05$ 表示有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞耐药性的测定 以药物浓度的对数为横坐标,以细胞生长的抑制率为纵坐标求出SGC-7901, SGC-7901/VCR细胞的 IC_{50} 值分别为 1.40 ± 0.06 mg/L和 86.20 ± 0.50 mg/L, SGC-7901/VCR细胞耐药指数约为61。

2.2 RNA纯度及完整性测定 $RNA A_{260}/A_{280} = 1.9$, 琼脂糖凝胶电泳结果(图1)显示28S及18S条带清晰, RNA纯度及完整性符合后续实验要求。

2.3 亲本细胞和耐药细胞GCS mRNA表达 亲本细胞株SGC-7901及耐药株SGC-7901/VCR均表达GCS基因,但SGC-7901/VCR表达强于SGC-7901, SGC-7901/VCR细胞GCS指数为3.9, SGC-7901细胞指数为0.5,二者差异有统计学意义($P < 0.05$, 图2)。

2.4 亲本细胞和耐药细胞GCS蛋白表达 免疫细胞化学的标本上, GCS阳性呈棕黄色颗粒,位于胞质内,在SGC-7901细胞中,大多数阳性颗粒细

图1 SGC-7901/VCR细胞RNA的琼脂糖凝胶电泳。

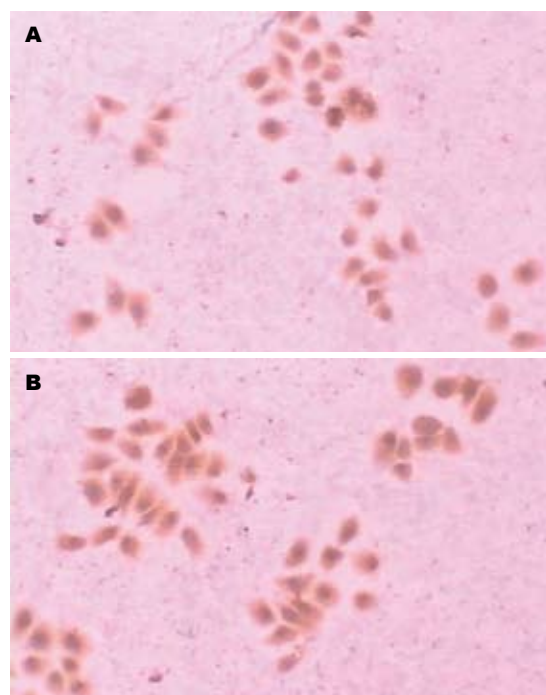


图3 GCS蛋白表达(SABC, ×200)。A: SGC-7901细胞; B: SGC-7901/VCR细胞。

小,少数细胞阳性颗粒粗大(图3A), SGC-7901/VCR细胞阳性颗粒粗大,数量多,着色深(图3B)。SGC-7901细胞和SGC-7901/VCR细胞GCS蛋白表达阳性率分别为18%和65%,二者差异有统计学意义($P < 0.05$)。

3 讨论

葡萄糖神经酰胺(glucosylceramide, GlcCer)是由葡萄糖神经酰胺合成酶催化尿苷二磷酸葡萄糖(uridine diphosphate glucose, UDP-glucose)上的糖基以 β 型糖苷键与神经酰胺相结合而生成的^[10],他是细胞合成其他鞘糖脂(glycosphingolipids, GSLs)的前体物质, GlcCer与肿瘤细胞的生物学行为密切相关,不仅维持着细胞的正常结构功能,还参与了细胞增殖,分化及肿瘤细胞的发生与发展^[11-12],同时GCS使神经酰胺糖基化为葡萄糖神经酰胺,降低了神经酰胺的促凋亡作用,促进了肿瘤细胞多药耐药的发生^[13],其活性增高被认为是引起肿瘤获得性多药耐药产生的原因之一。GCS在癌细胞的表达和意义愈来愈被人们重视, Senchenkov *et al*^[14]报道,在乳腺癌细胞株MCF-7中转入神经酰胺糖基合成酶基因后,细胞内神经酰胺表达减少,糖基化的神经酰胺表达增多,肿瘤细胞凋亡减少。有报道GCS基因在乳腺癌细胞中表达, GCS对于乳腺癌的发生、发展具有重要作用^[15]。人耐VCR的

■名词解释

1 葡萄糖神经酰胺合成酶(glucosylceramide synthase, GCS):是调控神经酰胺代谢的关键酶之一,其活性水平与肿瘤细胞多药耐药有密切关系。

2 葡萄糖神经酰胺:是由葡萄糖神经酰胺合成酶催化UDP glucose上的糖基以 β 型糖苷键与神经酰胺相结合而生成的,不仅维持着细胞的正常结构功能,还参与了细胞增殖,分化及肿瘤细胞的发生与发展。

HL-60及耐阿霉素的KB细胞GCS表达也较其敏感株有显著增加^[13,16-17]。GCS使神经酰胺糖基化导致其细胞毒性效应减弱,促进了肿瘤耐药的发生,抑制GCS可显著提高肿瘤对于化疗的敏感性。

本实验结果显示,在人敏感胃癌细胞中和耐药胃癌细胞中都有GCS基因的表达,且耐药胃癌细胞中GCS基因表达显著高于亲本敏感胃癌细胞,耐药细胞GCS蛋白表达也显著高于敏感细胞的GCS蛋白表达,提示GCS基因在胃癌细胞中表达,GCS促进胃癌细胞的增殖分化,GCS基因对于胃癌的发生、发展具有重要作用,耐药胃癌细胞中GCS蛋白高表达,表明GCS参与了肿瘤耐药的发生,与肿瘤多药耐药密切相关。GCS基因在人胃癌细胞表达为临床肿瘤治疗提供了新的思路,GCS基因在耐药细胞的表达增加提示降低或封闭GCS的表达可以提高肿瘤的药物敏感性,化疗时合用抑制该靶点的药物,可提高胃癌细胞对药物的敏感性,提高化疗疗效,这为肿瘤耐药的逆转治疗提供了新的方向。

4 参考文献

- 1 Lavie Y, Cao H, Bursten SL, Giuliano AE, Cabot MC. Accumulation of glucosylceramides in multidrug-resistant cancer cells. *J Biol Chem* 1996; 271: 19530-19536
- 2 Gouaze V, Yu JY, Bleicher RJ, Han TY, Liu YY, Wang H, Gottesman MM, Bitterman A, Giuliano AE, Cabot MC. Overexpression of glucosylceramide synthase and P-glycoprotein in cancer cells selected for resistance to natural product chemotherapy. *Mol Cancer Ther* 2004; 3: 633-639
- 3 Weiss M, Hettner S, Smith P, Ladisch S. Inhibition of melanoma tumor growth by a novel inhibitor of glucosylceramide synthase. *Cancer Res* 2003; 63: 3654-3658
- 4 孙妍琳, 周庚寅, 李锴男, 林晓燕, 高鹏, 郭成浩, 侯丽. 人乳腺癌细胞中葡萄糖神经酰胺合成酶基因的表达和意义. *中国现代普通外科进展* 2005; 8: 141-143
- 5 李江涛, 彭淑牖, 刘颖斌, 王新保, 王海军, 王建伟, 许斌, 李海军, 冯雪冬, 钱浩然, 吴育连, 方河清. 糖基化神经酰胺合成酶及相关基因的表达与人胆囊癌多药耐药. *中华普通外科杂志* 2005; 20: 382-383
- 6 李杰, 刘玉琴. MTT法在肿瘤研究中的改良及应用进展. *中国肿瘤临床* 1998; 25: 312-313
- 7 马荣, 陈曦海, 张岂凡, 唐丽萍. 反义Survivin核酸诱导凋亡及逆转胃癌耐药机制的实验研究. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 1139-1145
- 8 J.萨母布鲁克, D.W.拉塞尔. 分子克隆实验指南. 第3版. 北京: 科学出版社, 2003: 522-525
- 9 Wu XX, Kakehi Y, Mizutani Y, Lu J, Terachi T, Ogawa O. Activation of caspase-3 in renal cell carcinoma cells by anthracyclines or 5-fluorouracil. *Int J Oncol* 2001; 19: 19-24
- 10 Bleicher RJ, Cabot MC. Glucosylceramide synthase and apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1585: 172-178
- 11 Reynolds CP, Maurer BJ, Kolesnick RN. Ceramide synthesis and metabolism as a target for cancer therapy. *Cancer Lett* 2004; 206: 169-180
- 12 Uchida Y, Murata S, Schmutz M, Behne MJ, Lee JD, Ichikawa S, Elias PM, Hirabayashi Y, Holleran WM. Glucosylceramide synthesis and synthase expression protect against ceramide-induced stress. *J Lipid Res* 2002; 43: 1293-1302
- 13 Shabbits JA, Mayer LD. P-glycoprotein modulates ceramide-mediated sensitivity of human breast cancer cells to tubulin-binding anticancer drugs. *Mol Cancer Ther* 2002; 1: 205-213
- 14 Senchenkov A, Litvak DA, Cabot MC. Targeting ceramide metabolism-a strategy for overcoming drug resistance. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93: 347-357
- 15 Gouaze V, Liu YY, Prickett CS, Yu JY, Giuliano AE, Cabot MC. Glucosylceramide synthase blockade down-regulates P-glycoprotein and resensitizes multidrug-resistant breast cancer cells to anticancer drugs. *Cancer Res* 2005; 65: 3861-3867
- 16 Uchida Y, Itoh M, Taguchi Y, Yamaoka S, Umehara H, Ichikawa S, Hirabayashi Y, Holleran WM, Okazaki T. Ceramide reduction and transcriptional up-regulation of glucosylceramide synthase through doxorubicin-activated Sp1 in drug-resistant HL-60/ADR cells. *Cancer Res* 2004; 64: 6271-6279
- 17 Litvak DA, Bilchik AJ, Cabot MC. Modulators of ceramide metabolism sensitize colorectal cancer cells to chemotherapy: a novel treatment strategy. *J Gastrointest Surg* 2003; 7: 140-148; discussion 148

■同行评价

本文分析了胃癌细胞GCS基因和蛋白水平的表达,发现胃癌细胞,尤其是耐长春新碱细胞株表达高水平的GCS,提示GCS可能参与了胃癌的发生过程,文章的科学性较高。

电编 张敏 编辑 张焕兰

幽门螺杆菌临床分离株耐药特点分析

杨行堂, 张俊杰, 张旖晴, 余远怀, 陈锡美, 王志荣

■背景资料

*H. pylori*是胃炎、消化性溃疡及胃黏膜相关组织淋巴瘤的重要致病因素,也是胃癌发生的I类致病因子。因此,近年来根除*H. pylori*治疗备受重视,抗生素广泛使用,导致日益严重的*H. pylori*抗生素耐药现象。

杨行堂, 张俊杰, 张旖晴, 余远怀, 陈锡美, 王志荣, 同济大学附属同济医院消化科, 同济大学消化疾病研究所 上海市200065

上海市科委科技发展基金项目, No. 044119647

通讯作者: 王志荣, 200065, 上海市新村路389号, 同济大学附属同济医院消化内科, 同济大学消化疾病研究所。

wzr62@yahoo.com.cn

电话: 021-56050408

收稿日期: 2007-01-02 接受日期: 2007-01-20

Characteristics of antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* strain isolated from patients

Xing-Tang Yang, Jun-Jie Zhang, Yi-Qing Zhang, Yuan-Huai Yu, Xi-Mei Chen, Zhi-Rong Wang

Xing-Tang Yang, Jun-Jie Zhang, Yi-Qing Zhang, Yuan-Huai Yu, Xi-Mei Chen, Zhi-Rong Wang, Department of Gastroenterology, Tongji Hospital of Tongji University; Institute of Digestive Diseases, Tongji University, Shanghai 200065, China

Supported by Shanghai Foundation for the Development of Science and Technology, No. 044119647

Correspondence to: Zhi-Rong Wang, Department of Gastroenterology, Tongji Hospital of Tongji University; Institute of Digestive Diseases, Tongji University, 389 Xincun Road, Shanghai 200065, China. wzr62@yahoo.com.cn

Received: 2007-01-02 Accepted: 2007-01-20

Abstract

AIM: To analyze the resistance of clinical isolated *H. pylori* strain to common antibiotics.

METHODS: *H. pylori* strains were obtained by inoculating the specimens of 61 patients in the selective media for 96 hours at 37°C under microaerophilic conditions. Kirby-Bauer test was performed to detect the drug sensitivity of the 61 isolated *H. pylori* strains to metronidazole, clarithromycin, amoxicillin and furazolidone.

RESULTS: The antibiotic resistant rates of *H. pylori* strains to metronidazole, clarithromycin, amoxicillin and furazolidone were 54.1%, 37.7%, 41.0% and 45.9%, respectively, and there were no significant difference among them ($P > 0.05$). The resistance *H. pylori* strains to metronidazole was related to the sex of patients ($P = 0.037$), and

the resistance of *H. pylori* strains to metronidazole, clarithromycin and amoxicillin was closely related to the history of antibiotic usage ($P = 0.028$; $P = 0.034$; $P = 0.005$). No significant relationship existed between the antibiotic resistance of *H. pylori* in the type of disease and the age of patients ($P > 0.05$).

CONCLUSION: *H. pylori* has high resistance to metronidazole, clarithromycin, amoxicillin, and furazolidone, which is associated with the history of antibiotic application, but not with the disease category and age of patients.

Key Words: *Helicobacter pylori*; Antibiotics; Drug resistance

Yang XT, Zhang JJ, Zhang YQ, Yu YH, Chen XM, Wang ZR. Characteristics of antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* strain isolated from patients. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(9):1012-1015

摘要

目的: 探讨幽门螺杆菌(*H. pylori*)对常用抗生素的耐药特点。

方法: 将来自不同患者的胃镜活检标本分别涂布接种幽门螺杆菌培养基后37°C微需氧环境下培养96 h, 得61株*H. pylori*临床分离株。对其采用Kirby-Bauer法行甲硝唑、克拉霉素、阿莫西林、呋喃唑酮4种抗生素药敏试验, 并分析其特点。

结果: *H. pylori*临床分离株对甲硝唑、克拉霉素、阿莫西林、呋喃唑酮4种抗生素的耐药率分别为54.1%, 37.7%, 41.0%和45.9%。4种抗生素耐药率比较无统计学差异($P > 0.05$)。甲硝唑耐药存在性别差异($P = 0.037$)。甲硝唑、克拉霉素、阿莫西林耐药与患者用药史相关($P = 0.028$; $P = 0.034$; $P = 0.005$)。4种抗生素耐药与患者疾病类型及年龄无关($P > 0.05$)。

结论: 4种抗生素耐药率均较高。耐药率与用药史相关, 与疾病类型及年龄未见相关性。

关键词: 幽门螺杆菌; 抗生素; 耐药

杨行堂, 张俊杰, 张旖晴, 余远怀, 陈锡美, 王志荣. 幽门螺杆菌临床分离株耐药特点分析. 世界华人消化杂志 2007;15(9):1012-1015

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1012.asp>

0 引言

幽门螺杆菌(*H pylori*)是胃炎、消化性溃疡的重要致病因素, WHO于1994年将其列为胃癌 I 类致病因子, 并与胃淋巴瘤的发生密切相关. 故 *H pylori* 感染的治疗受到重视. 根除 *H pylori* 的抗生素广泛使用, 随之产生抗生素耐药现象也日益突出. 为进一步了解 *H pylori* 对常用抗生素的耐药情况, 指导临床合理选用抗生素, 本研究对 *H pylori* 临床株行药敏试验并对耐药特点进行分析.

1 材料和方法

1.1 材料 61例 *H pylori* 培养阳性病例来自我院胃镜检查患者, 其中男40例, 女21例, 平均年龄40岁; 胃溃疡9例, 十二指肠球部溃疡21例, 胃炎31例; 3 mo内使用过甲硝唑的22例、克拉霉素的17例、阿莫西林的26例、呋喃唑酮的22例. *H pylori* 培养基及琼脂分别购自上海市疾病预防控制中心及Sigma公司; 药敏纸片购自英国Oxid公司; *H pylori* 临床株来自本院胃镜活检标本经培养分离得到.

1.2 方法 对胃镜检查快速尿素酶试验阳性患者, 活检取材胃窦小弯侧组织标本, 立即床边酒精灯旁接种于 *H pylori* 培养基上, 然后转至具换气功能含50 mL/L O₂, 100 mL/L CO₂, 850 mL/L N₂, 湿度95%以上的微需氧培养罐中, 培养96 h. 由菌落外观、革兰氏染色镜下形态、尿素酶、氧化酶、过氧化物酶试验等进行 *H pylori* 培养结果综合判定; 共得来自61例 *H pylori* 培养阳性患者的61株 *H pylori* 临床分离株. 采用Kirby-Bauer法进行药敏试验. 将甲硝唑、克拉霉素、阿莫西林、呋喃唑酮4种抗生素的药敏纸片置于接种 *H pylori* 菌液后数分钟的 *H pylori* 培养皿中, 菌液浓度为0.5麦氏标准浊度, 纸片放入到培养开始控制在15 min内, 37℃微需氧环境孵育96 h, 取出平板, 观察抑菌圈大小. 参考相关文献[1-3]并根据该实验情况制定药敏结果判定标准, 分为高度敏感: 抑菌圈直径≥15 mm, 中度敏感: 10 mm≤抑菌圈直径<15 mm, 低度敏感: 6 mm<抑菌圈直径<10 mm, 不敏感: 无抑菌圈. 统计时将无效、低敏算作耐药, 中敏和高敏定为敏感.

表 1 抗生素耐药率的比较

项目	甲硝唑 (%)	克拉霉素 (%)	阿莫西林 (%)	呋喃唑酮 (%)	P值
耐药	33(54.1)	23(37.7)	25(41.0)	28(45.9)	0.288
敏感	28(45.9)	38(62.3)	36(59.0)	33(54.1)	

表 2 抗生素耐药与疾病类型关系(n)

疾病类型	甲硝唑		克拉霉素		阿莫西林		呋喃唑酮	
	耐药	敏感	耐药	敏感	耐药	敏感	耐药	敏感
球部溃疡	14	7	9	12	10	11	12	9
胃溃疡	6	3	3	6	2	7	4	5
胃炎	13	18	11	20	13	18	12	19
P值	0.164		0.829		0.427		0.494	

表 3 抗生素耐药与性别的关系(n)

抗生素	男		女		P值
	耐药	敏感	耐药	敏感	
甲硝唑	26	15	7	13	0.037
克拉霉素	18	23	5	15	0.153
阿莫西林	14	27	11	9	0.120
呋喃唑酮	22	19	6	14	0.082

统计学处理 实验数据采用SAS8.0统计软件包行卡方检验.

2 结果

2.1 抗生素耐药率的比较 甲硝唑、克拉霉素、阿莫西林、呋喃唑酮的耐药率分别是54.1%, 37.7%, 41.0%, 45.9%. 4种抗生素耐药率相比较差异无统计学意义($P>0.05$, 表1).

2.2 抗生素耐药与疾病类型的关系 4种不同抗生素的耐药情况与疾病类型关系进行比较, 未见抗生素耐药与疾病类型有统计学相关($P>0.05$, 表2).

2.3 抗生素耐药与性别的关系 4种不同抗生素的耐药情况在男、女性间进行比较, 结果发现除甲硝唑耐药在男、女间存在统计差异($P<0.05$)外, 其余抗生素耐药未见和性别有统计学相关性, $P>0.05$ (表3).

2.4 抗生素耐药与年龄的关系 4种不同抗生素的耐药情况与患者年龄的关系进行比较, 结果未见有统计学差异($P>0.05$), 即未见相关性(表4).

2.5 抗生素耐药与用药史的关系 4种不同抗生素

■创新盘点

既往虽见一些有关 *H pylori* 耐药情况的文献报道, 但大多仅涉及耐药率或某一些方面的报道, 本文除对 *H pylori* 对常用抗生素耐药率的情况进行分析外, 尚对 *H pylori* 临床分离株的抗生素耐药与疾病类型、性别、年龄、用药史等因素的关系进行了分析, 以期对 *H pylori* 抗生素耐药研究及临床治疗提供参考.

■应用要点

本文对*H pylori*临床分离株行药敏实验并分析其耐药特点,以便临床更好的了解和认识*H pylori*临床分离株目前的耐药情况,并为临床根除*H pylori*时规范使用抗生素、制定合理用药方案、研制开发新的抗*H pylori*药物的必要性等提供了很好的临床依据。

表 4 抗生素耐药和年龄的关系(n)

抗生素		年龄组(岁)							P值
		16-19	19-29	30-39	40-49	50-59	60-69	70-73	
甲硝唑	耐药	2	6	8	9	3	4	1	0.870
	敏感	4	2	9	4	6	2	1	
克拉霉素	耐药	0	6	7	4	2	3	1	0.130
	敏感	5	3	13	8	7	1	1	
阿莫西林	耐药	3	6	7	5	1	2	1	0.330
	敏感	4	3	11	7	9	1	1	
呋喃唑酮	耐药	3	7	6	6	3	2	1	0.625
	敏感	5	2	10	6	7	3	0	

表 5 抗生素耐药和用药史的关系(n)

	近期用药史	耐药	敏感	P值
甲硝唑	无	17	22	0.028
	有	16	6	
克拉霉素	无	13	31	0.034
	有	10	7	
阿莫西林	无	9	26	0.005
	有	16	10	
呋喃唑酮	无	16	23	0.309
	有	12	10	

耐药情况与近期用药史(3 mo之内)的关系进行比较,结果显示,除呋喃唑酮耐药未见与近期用药史有统计差异($P>0.05$),其余3种抗生素耐药均和近期用药史有统计学相关($P<0.05$,表5)。

3 讨论

自1983年澳大利亚学者Warren和Marshall首次从胃炎患者的胃黏膜中分离出*H pylori*至今,国内外大量研究证实,*H pylori*为慢性胃炎、胃溃疡、十二指肠溃疡的主要致病因素,流行病学调查证实,*H pylori*与胃癌发病机制关系密切,也是胃黏膜相关淋巴组织(MALT)淋巴瘤的重要致病因子。WHO于1994年将其列为胃癌的I类致病因子。因此抗*H pylori*治疗备受关注,但抗生素广泛使用或者滥用抗生素使得*H pylori*耐药现象也日益突出^[4-7]。

该研究显示,61例*H pylori*临床株对于临床上常用甲硝唑、阿莫西林、克拉霉素及呋喃唑酮4种抗生素均出现较高耐药率,与国内外一些文献报道基本一致^[8-10]。*H pylori*对4种抗生素的耐药与近期用药史有关,主要为滥用或不合理应用抗生素导致根治失败产生的继发耐药,这

和Toracchio *et al*^[4]研究一致。日本学者Taneike *et al*^[5]报道由*H pylori*家族聚积性传播感染的日本儿童对克拉霉素耐药率高达42.9%,其感染多来自和其父母相同*H pylori*品系,但父母的耐药率为零,也远高于该国成人患者该药的11.1%的耐药率,可能与过去10 a来该类药在儿科感染,尤其呼吸道感染中应用增加有关。*H pylori*对克拉霉素耐药的分子基础可能与抗生素选择性压力下23SrRNA肽酰转移酶基因点突变及0mp31耐药基因有关^[5,11-12]。研究结果显示*H pylori*临床株对甲硝唑、阿莫西林、克拉霉素及呋喃唑酮耐药率比较无统计学差异;对甲硝唑的耐药率相对较高,且与性别有关;男性的耐药率高于女性,与此前Glupczynski *et al*^[13]报道相反。既往有关*H pylori*对甲硝唑的耐药率为女性高于男性,认为可能与该药较广泛用于妇科疾病治疗、致细菌的硝基还原酶rdxA及frxA基因突变有关^[14]。本研究观察的病例数相对较少,男性病例数多于女性,故认为甲硝唑耐药可能属于继发耐药,而并非真正与性别相关。有报道*H pylori*耐药与患者年龄有关^[15]。该研究未见*H pylori*对抗生素耐药与患者年龄有相关性。*H pylori*耐药和疾病类型间关系的报道较少。Lui *et al*^[16]研究结果显示,感染*H pylori*的非溃疡性功能性消化不良(non-ulcer dyspepsia, NUD)及消化性溃疡者的甲硝唑耐药率分别为56.4%, 19.8%;前者的耐药率明显高于后者。本研究并未发现*H pylori*耐药与患者的疾病类型有关。其结果的不同是否与样本大小、样本群体来源不同等有关,有待进一步研究证实。

总之,临床分离株*H pylori*对常用抗生素的耐药率较高,可能与滥用及不合理用药有关。日益增高的*H pylori*耐药率给临床根治*H pylori*感染带来许多困难。如何规范施用抗生素、制定

合理的抗*H pylori*治疗方案、研制及开发新的抗*H pylori*药物, 有效根除*H pylori*感染, 将是有关*H pylori*感染临床治疗的研究重点。

4 参考文献

- 1 管远志, 王艾琳, 李坚. 医学微生物学实验技术. 第1版. 北京: 化学工业出版社, 2006: 105-146
- 2 胡文华, 徐采朴. 幽门螺杆菌菌株的7种药物体外药敏试验研究. 第三军医大学学报 1996; 18: 457-458
- 3 Yakoob J, Fan X, Hu G, Liu L, Zhang Z. Antibiotic susceptibility of *Helicobacter pylori* in the Chinese population. *J Gastroenterol Hepatol* 2001; 16: 981-985
- 4 Toracchio S, Marzio L. Primary and secondary antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* strains isolated in central Italy during the years 1998-2002. *Dig Liver Dis* 2003; 35: 541-545
- 5 Taneike I, Goshi S, Tamura Y, Wakisaka-Saito N, Matsumori N, Yanase A, Shimizu T, Yamashiro Y, Toyoda S, Yamamoto T. Emergence of clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* (CRHP) with a high prevalence in children compared with their parents. *Helicobacter* 2002; 7: 297-305
- 6 McMahon BJ, Hennessy TW, Bensler JM, Bruden DL, Parkinson AJ, Morris JM, Reasonover AL, Hurlburt DA, Bruce MG, Sacco F, Butler JC. The relationship among previous antimicrobial use, antimicrobial resistance, and treatment outcomes for *Helicobacter pylori* infections. *Ann Intern Med* 2003; 139: 463-469
- 7 Perez Aldana L, Kato M, Nakagawa S, Kawarasaki M, Nagasako T, Mizushima T, Oda H, Kodaira J, Shimizu Y, Komatsu Y, Zheng R, Takeda H, Sugiyama T, Asaka M. The relationship between consumption of antimicrobial agents and the prevalence of primary *Helicobacter pylori* resistance. *Helicobacter* 2002; 7: 306-309
- 8 郝庆, 李岩, 张智杰, 刘勇, 王晓. 沈阳地区幽门螺杆菌耐药情况的研究. 世界华人消化杂志 2002; 10: 480-481
- 9 Godoy AP, Ribeiro ML, Benvengo YH, Vitiello L, Miranda Mde C, Mendonca S, Pedrazzoli J Jr. Analysis of antimicrobial susceptibility and virulence factors in *Helicobacter pylori* clinical isolates. *BMC Gastroenterol* 2003; 3: 20
- 10 Wu H, Shi XD, Wang HT, Liu JX. Resistance of *Helicobacter pylori* to metronidazole, tetracycline and amoxycillin. *J Antimicrob Chemother* 2000; 46: 121-123
- 11 郝庆, 李岩, 高红, 张显忠. 幽门螺杆菌对克拉霉素耐药的分子基础. 世界华人消化杂志 2003; 11: 1485-1487
- 12 姜葵, 何利华, 赵飞, 王邦茂, 张建中. 一种新的幽门螺杆菌克拉霉素耐药相关基因. 世界华人消化杂志 2006; 14: 1516-1519
- 13 Glupczynski Y, Megraud F, Lopez-Brea M, Andersen LP. European multicentre survey of *in vitro* antimicrobial resistance in *Helicobacter pylori*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2001; 20: 820-823
- 14 Marais A, Bilardi C, Cantet F, Mendz GL, Megraud F. Characterization of the genes *rdxA* and *frxA* involved in metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. *Res Microbiol* 2003; 154: 137-144
- 15 Meyer JM, Silliman NP, Wang W, Siepmann NY, Sugg JE, Morris D, Zhang J, Bhattacharyya H, King EC, Hopkins RJ. Risk factors for *Helicobacter pylori* resistance in the United States: the surveillance of *H. pylori* antimicrobial resistance partnership (SHARP) study, 1993-1999. *Ann Intern Med* 2002; 136: 13-24
- 16 Lui SY, Yeoh KG, Ho B. Metronidazole-resistant *Helicobacter pylori* is more prevalent in patients with nonulcer dyspepsia than in peptic ulcer patients in a multiethnic Asian population. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 5011-5014

■同行评价

本文报告了61例患者*H pylori*阳性耐药检测结果, 相关报道不多, 有一定的临床意义。

电编 张敏 编辑 张焕兰

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

世界华人消化杂志关于作者署名的声明

本刊讯 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。第一方面是直接参与, 包括: (1)酝酿和设计实验; (2)采集数据; (3)分析/解释数据。第二方面是文章撰写, 包括: (1)起草文章; (2)对文章的知识性内容作批评性审阅。第三方面是工作支持, 包括: (1)统计分析; (2)获取研究经费; (3)行政、技术或材料支持; (4)指导; (5)支持性贡献。每个人必须在第一至第三方面至少具备一条, 才能成为文章的署名作者。世界华人消化杂志不设置共同第一作者和共同通信作者。(世界胃肠病学杂志社2007-03-28)

蛋白芯片检测多肿瘤标志物对原发性肝癌的诊断价值评价

周秀艳, 侯振江, 邢桂芝

■背景资料

AFP是目前公认的肝癌诊断最佳标志物,但其受肿瘤大小及其基因表达缺失的影响,使近1/3的肝癌患者呈阴性反应,表明AFP用于肝癌的诊断仍有不足之处,多肿瘤标志物的联合检测已成为人们探讨的热点,该文采用蛋白芯片技术联合检测血清AFP及其他肿瘤标志物可望提高PHC的早期诊断率。

周秀艳, 河北省唐山市人民医院检验科 河北省唐山市 063001

侯振江, 沧州医学高等专科学校 河北省沧州市 061001

邢桂芝, 唐山市工人医院检验科 河北省唐山市 063000

河北省科学技术发展和规划项目, No. 052761288

通讯作者: 周秀艳, 063001, 河北省唐山市, 唐山市人民医院检验科. zhouxiuyan6666@sina.com

电话: 0315-2875147

收稿日期: 2006-11-22 接受日期: 2007-01-20

Values of multi-tumor marker protein-chip diagnostic system in the diagnosis of primary hepatic cancer

Xiu-Yan Zhou, Zhen-Jiang Hou, Gui-Zhi Xing

Xiu-Yan Zhou, Department of Clinical Laboratory, Tangshan People's Hospital, Tangshan 063001, Hebei Province, China

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

Gui-Zhi Xing, Department of Clinical Laboratory, Tangshan Worker's Hospital, Tangshan 063000, Hebei Province, China

Correspondence to: Xiu-Yan Zhou, Department of Clinical Laboratory, Tangshan People's Hospital, Tangshan 063001, Hebei Province, China.

zhouxiuyan6666@sina.com

Received: 2006-11-22 Accepted: 2007-01-20

Abstract

AIM: To discuss the diagnostic values of multi-tumor marker protein-chip diagnostic system for primary hepatic cancer (PHC).

METHODS: By the multi-tumor-marker protein-chip diagnostic system, we detected 12 kinds of tumor indicators, which included carbohydrate antigen 199 (CA199), alphafetoprotein (AFP), neuron-specific enolase (NSE), free prostate specific antigen (f-PSA), carcinoembryonic antigen (CEA), prostate specific antigen (PSA), carbohydrate antigen 242 (CA242), carbohydrate antigen 125 (CA125), carbohydrate antigen 153 (CA153), ferritin (FER), human growth hormone (HGH) and β human chorionic gonadotropin (β -HCG), in 73 cases of PHC, 48 cases of benign hepatic diseases and 40 cases of healthy individuals as controls.

RESULTS: The positive rates of AFP, CA199, CA125, CEA, CA242, FER and β -HCG were significantly increased in PHC patients in comparison with those in patients with benign hepatic diseases (65.7% vs 25.0%, $P < 0.01$; 49.3% vs 31.3%, $P < 0.05$; 45.2% vs 22.9%, $P < 0.05$; 21.9% vs 4.2%, $P < 0.05$; 19.1% vs 6.3%, $P < 0.05$; 41.1% vs 29.2%, $P < 0.05$; 6.8% vs 0, $P < 0.05$). As the single index, AFP presented the highest diagnostic efficiency (79.6%), while AFP+FER and AFP+FER+CA125 had the highest efficiency (both 83.9%) as associated indexes.

CONCLUSION: AFP, FER and CA125 are the perfect indexes for the associated diagnosis of hepatic cancer.

Key Words: Primary hepatic cancer; Tumor marker; Protein chip

Zhou XY, Hou ZJ, Xing GZ. Values of multi-tumor marker protein-chip diagnostic system in the diagnosis of primary hepatic cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(9):1016-1019

摘要

目的: 探讨多肿瘤标志物蛋白芯片诊断系统对原发性肝癌的诊断价值。

方法: 采用多肿瘤标志物蛋白芯片诊断系统,检测分析73例原发性肝癌(PHC)患者、48例良性肝病患者的血清和40例健康对照者血清的12种常见肿瘤标志物,包括糖原199(CA199)、甲胎蛋白(AFP)、神经原特异性烯醇化酶(NSE)、游离前列腺特异抗原(f-PSA)、癌胚抗原(CEA)、前列腺特异抗原(PSA)、糖原242(CA242)、糖原125(CA125)、糖原153(CA153)、铁蛋白(FER)、人生长激素(HGH)和 β -人绒毛膜促性腺激素(β -HCG)。

结果: PHC组AFP, CA199, CA125, CEA, CA242, FER和 β -HCG的阳性检出率分别为65.7%, 49.3%, 45.2%, 21.9%, 19.1%, 41.1%和6.8%, 与良性肝病组(25.0%, 31.3%, 22.9%, 4.2%, 6.3%, 29.2%, 0)比较均显著增高($P < 0.01$)。

或 $P<0.05$). AFP的诊断效率在单项指标中居首位(79.6%), AFP+FER 和AFP+FER+CA125的诊断效率最高(均为83.9%).

结论: AFP, FER, CA125是肝癌联合诊断的理想指标, 其联合检测有利于提高PHC的诊断率.

关键词: 原发性肝癌; 肿瘤标志物; 蛋白芯片

周秀艳, 侯振江, 邢桂芝. 蛋白芯片检测多肿瘤标志物对原发性肝癌的诊断价值评价. 世界华人消化杂志 2007;15(9):1016-1019

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1016.asp>

0 引言

原发性肝癌(PHC)是常见的恶性肿瘤, 发病率高, 预后差, 及早发现和诊断对患者的治疗和预后具有重要意义. 血清甲胎蛋白(AFP)对PHC的早期诊断具有重要价值. 但由于10%-30%的PHC患者血清中的AFP可呈阴性^[1], 故联合检测血清AFP及其他肿瘤标志物可望提高PHC的早期诊断率. 肿瘤标记物的检测方法主要有酶联免疫试验(EIA)、放射免疫试验(RIA)、电化学发光(ECL)测试等. 这些方法每次只能分析单项指标, 用这些方法对每份标本进行多指标分析费用昂贵, 而且需要的血清量较大. 蛋白芯片是近年来在生命科学领域中迅速发展起来的一项高新技术, 上海数康公司的多肿瘤标志物蛋白芯片诊断系统可以同时检测12种常见肿瘤标志物, 包括糖原199(CA199)、神经原特异性烯醇化酶(NSE)、癌胚抗原(CEA)、糖原242(CA242)、铁蛋白(FER)、 β -人绒毛膜促性腺激素(β -HCG)、甲胎蛋白(AFP)、游离前列腺特异抗原(f-PSA)、前列腺特异抗原(PSA)、糖原125(CA125)、人生长激素(HGH)、糖原153(CA153). 我们用蛋白芯片法检测了PHC患者12项肿瘤标志物水平, 以探讨其对PHC的诊断价值.

1 材料和方法

1.1 材料 PHC组73例, 男46例, 女27例, 年龄34-78岁; 良性肝病组(肝炎或肝硬化)48例, 男36例, 女12例, 年龄36-74岁; 以上病例均为我院2005-06/2006-04住院患者; 另设40例健康对照组, 男21例, 女19例, 年龄38-58岁, 均为来我院健康体检者. 上海数康生物科技有限公司生产的HD-2001A蛋白芯片仪及多肿瘤标志物C-12蛋白芯

片诊断试剂.

1.2 方法 将各待测血清或不同浓度的标准品混合液各100 μ L滴加到不同的芯片分格内, 将蛋白芯片在37.0℃温育振荡30 min, 倾倒入孔内液体, 吸取200 μ L洗涤液加入芯片格内, 振荡洗涤8 min, 弃去洗涤液4次, 芯片小方格内各加入100 μ L反应液, 再次置37.0℃温育振荡30 min, 取出弃去孔内液体, 按上述方法重复洗涤2次, 剥离蛋白芯片集成块的上部在每个芯片的膜表面加入20 μ L已等体积混合15 min的检测液A和B混合液, 静置2 min, 用HD-2001A蛋白芯片仪对蛋白芯片读取数据.

12项指标正常参考范围: CA199<35 kU/L, NSE<35 μ g/L, CEA<5 μ g/L, CA242<20 kU/L, FER<322 μ g/L(男), FER<219 μ g/L(女), β -HCG<3 μ g/L, AFP<20 μ g/L, f-PSA<1 μ g/L, PSA<5 μ g/L, CA125<35 kU/L, HGH<7.5 μ g/L, CA153<35 kU/L. 超出此临界值为阳性.

统计学处理 在SPSS10.0上进行统计分析, 显著性检验使用 χ^2 检验, 用多元逐步回归方法筛选出联合诊断有意义的指标.

2 结果

2.1 PHC组和良性肝病组及健康对照组12项肿瘤标志物的检测结果 12项肿瘤标志物检测结果显示: PHC组患者血清AFP, CA199, CEA, CA125, FER, CA153, 和CA242显著高于健康对照组和良性肝病组, 差异均有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$, 表1).

2.2 73例肝癌患者及48例良性肝病患者各血清肿瘤标志物检测阳性结果 肝癌患者中AFP阳性率为65.7%, CA199阳性率为49.3%, FER阳性率为41.1%, CA125阳性率为45.2%; 与良性肝病组比较均显著增高具有统计学意义, 分别为 $P<0.01$, $P<0.05$, $P<0.05$ 和 $P<0.05$ (表2); 结果显示, AFP对肝癌的诊断价值最大.

2.3 12项肿瘤标志物及不同组合诊断肝癌的敏感性、特异性、诊断效率、阳性预测值、阴性预测值比较 以病理组织诊断为金标准: 分别计算敏感性、特异性和诊断效率(符合率即一致性)^[2], 结果显示AFP的诊断效率为79.6%, 在单项指标中居首位, FER的诊断效率列单项指标的第3位, 为67.3%; AFP+FER和AFP+FER+CA125的诊断效率最高, 诊断效率均为83.9%, 显示组合后较单项指标有更高的诊断效率(表3).

■同行评价

本文使用蛋白芯片技术对73例肝癌患者的血清进行了12种肿瘤标志物的检测, 发现 AFP, FER及CA125联合检测可提高肝癌的检测率, 具有较高临床实际意义.

表 1 PHC组和良性肝病组及健康对照组12项肿瘤标志物浓度的比较(mean ± SD)

检测项目	对照组 (<i>n</i> = 40)	良性肝病组 (<i>n</i> = 48)	PHC组 (<i>n</i> = 73)
CA199(kU/L)	10.08 ± 6.03	17.89 ± 19.45	76.46 ± 115.37 ^{bc}
AFP(μg/L)	0.66 ± 0.77	8.22 ± 23.25	119.11 ± 120.04 ^{bd}
NSE(μg/L)	3.11 ± 2.24	1.77 ± 1.28	3.08 ± 5.46
f-PSA(μg/L)	0.07 ± 0.10	0.06 ± 0.09	0.09 ± 0.14
CEA(μg/L)	1.25 ± 0.97	1.77 ± 3.02	5.61 ± 9.12 ^{bc}
PSA(μg/L)	0.29 ± 0.52	0.25 ± 0.55	0.43 ± 0.71
CA125(kU/L)	5.44 ± 7.23	12.52 ± 19.98	132.50 ± 180.60 ^{bd}
CA242(kU/L)	2.35 ± 1.76	3.98 ± 6.43	20.80 ± 46.77 ^{bd}
FER(μg/L)	171.87 ± 89.87	170.68 ± 102.27	246.37 ± 175.74 ^{bc}
HGH(μg/L)	2.01 ± 1.82	1.24 ± 1.80	3.06 ± 4.66
β-HCG(μg/L)	0.53 ± 0.58	0.49 ± 0.72	1.74 ± 4.25
CA153(kU/L)	9.75 ± 5.81	9.58 ± 9.15	16.25 ± 13.57 ^{ac}

^a*P*<0.05, ^b*P*<0.01 vs 对照组; ^c*P*<0.05, ^d*P*<0.01 vs 良性肝病组.

表 2 蛋白芯片检测各血清肿瘤标志物的阳性率

项目	PHC组 (<i>n</i> = 73)		良性肝病组 (<i>n</i> = 48)	
	阳性例数	阳性率(%)	阳性例数	阳性率(%)
CA199	36	49.3 ^a	15	31.3
NSE	2	2.7	0	0
CEA	16	21.9 ^a	2	4.2
CA242	14	19.1 ^a	3	6.3
FER	30	41.1 ^b	14	29.2
β-HCG	5	6.8 ^a	0	0
AFP	48	65.7 ^b	12	25.0
f-PSA	0	0	0	0
PSA	1	1.4	0	0
CA125	33	45.2 ^a	11	22.9
HGH	5	6.8	0	0
CA153	10	13.7	5	10.4

^a*P*<0.05, ^b*P*<0.01 vs 良性肝病组.

表 3 12项指标及不同组合诊断肝癌的敏感性、特异性、诊断效率、阳性预测值和阴性预测值比较(%)

项目	敏感性	特异性	诊断效率	预期值	
				阳性	阴性
CA199	47.3	87.9	67.8	80.3	63.0
NSE	2.7	100.0	50.3	100.0	50.0
CEA	21.9	79.1	55.5	62.1	54.6
CA242	19.1	90.3	55.0	68.0	52.8
FER	41.1	93.8	67.3	87.4	61.2
β-HCG	6.8	97.0	53.4	77.3	51.9
AFP	65.7	67.9	79.6	97.6	71.4
f-PSA	0	100.0	50.0	0	50.0
PSA	1.4	100.0	50.4	100.0	50.4
CA125	45.2	84.9	62.9	72.4	59.0
HGH	6.8	98.1	52.4	83.1	51.9
CA153	13.7	94.9	54.9	76.8	52.7
AFP+	73.6	94.0	83.9	92.5	78.3
FER					
AFP+	75.8	82.1	78.8	80.7	78.0
CA125					
AFP+	84.8	82.4	83.9	83.0	85.2
FER+CA125					

2.4 可靠性评价 采用倪宗瓚^[3]推荐的一致性相关系数(*r*)评价其可靠性, 随即收集体检者40例作重复检测, 各指标一致性相关系数(*r*)为: CA199(*r* = 0.845, *P*<0.01)、NSE(*r* = 0.859, *P*<0.01)、CEA(*r* = 0.905, *P*<0.01)、CA242(*r* = 0.866, *P*<0.01)、FER(*r* = 0.914, *P*<0.01)、β-HCG(*r* = 0.890, *P*<0.01)、AFP(*r* = 0.893, *P*<0.01)、f-PSA(*r* = 0.835, *P*<0.01)、PSA(*r* = 0.874, *P*<0.01)、CA125(*r* = 0.866, *P*<0.01)、HGH(*r* = 0.888, *P*<0.01)、CA153(*r* = 0.876, *P*<0.01)。

3 讨论

肝癌是临床常见的恶性肿瘤, 其发病率目前有上升趋势, 死亡率列消化系统肿瘤的第3位, 我国每年约有33万人死于肝癌, 因此, 早期诊断、早期治疗尤为重要^[4]。自从1960-1970年代发现AFP、

CEA并在临床上应用以来, 肿瘤标志物检测已经成为常规的肿瘤检测手段之一, 为肿瘤的诊断和疗效观察起到一定的作用, 但单一标志物的检测始终存在着特异性不强、阳性率较低等不足。特别是对早期肿瘤的检测率不高^[5]。周信达^[6]在临床观察中也发现, 有22.2%的患者首次手术与复发时AFP不相符, 即有些患者首次时AFP阳性而复发时AFP阴性, 有些患者原阴性者复发时阳性。因此, 为了提高恶性肿瘤的诊断敏感性, 临床上常对现有的肿瘤标志物进行联合检测。蛋白芯片是在一个基因芯片大小的载体上, 点布高密度不同种类的蛋白质, 然后再用标记了荧光染料的已知抗体或配体等, 与待测样本中的抗体或配体一起同芯片上的蛋白质竞争结合, 在扫描仪上读

出荧光强弱, 计算机分析计算待测结果^[7-8]. AFP是目前诊断原发性肝癌的最敏感和特异的肿瘤标志物, 灵敏度可达70%-90%^[9], 但并非所有肝癌患者的肝细胞都分泌AFP. AFP浓度通常与肝癌大小呈正相关, 小肝癌呈阴性或低浓度, 活动性慢性肝炎和肝硬化病例中有20%-45%的AFP呈阳性. 本研究蛋白芯片技术检测AFP的灵敏度为65.7%, 有34.7%的漏诊率; 特异性为67.9%, 误诊率为32.1%. 12种肿瘤标志物中, FER, CA125, CA153, CA199, CA242和CEA在肝癌组中都有不同程度阳性率, 分别为41.1%(30/73)、45.2%(33/73)、13.7%(10/73)、49.3%(36/73)、19.1%(14/73)、21.9%(16/73). 本组12项指标经多元回归法筛选具有统计学意义的指标为: AFP, FER和CEA. 本组肝癌的阳性率为65.7%与有关报道相一致^[9]. AFP的诊断效率为79.6%, 在单项指标中居首位. FER的诊断效率列单项指标的第3位, 为67.3%, FER在多种疾病中均可能升高, 特异性不强, 但本组结果显示, 其用于肝癌联合诊断有一定价值. CA125是卵巢癌的相关抗原, 对恶性卵巢癌的诊断及疗效观察有重要价值; 本组肝癌CA125的阳性率达45.2%, 诊断效率为62.9%, 本组肝癌CA199阳性率为47.3%. 诊断效率居几项指标的第2位(67.8%), 但多元逐步回归将其排除在肝癌联合诊断的有效指标之外, 提示其联合应用时价值不大. 对多元回归筛出的指标进行组合判别, AFP+FER和AFP+FER+CA125的诊断效率最高, 诊断效率均为83.9%, 显示组合后较单项指标有更高的诊断效率. 增加CA125虽未见诊断效率提高但敏感性特异性更趋平稳. 因此AFP、FER、CA125是肝癌联合诊断较为理想的指标.

虽然目前全自动生化分析仪的发展可以对

常规生化指标实现简便、快速的分析, 但作为肿瘤相关生物标志多为大分子蛋白(CEA, AFP等)和小分子多肽[血管内皮生长因子(VEGF)、细胞间黏附分子-1(ICAM-1)、血管细胞黏附分子-1(VCAM-1)等, 一般采用免疫化学分析(如ELISA等), 价格昂贵、且操作复杂费时. 因此, 人们致力于发展简便、快速、小型、廉价的分析技术, 即蛋白芯片技术^[10]. 蛋白芯片技术为多标志物联合检测提供了理想的工具, 节约了人力, 提高了检出率^[11].

4 参考文献

- 1 Tamura A, Oita T, Sakizono K, Nakajima T, Kasakura S. Clinical usefulness of lectin-reactive fraction of alpha-fetoprotein in hepatocellular carcinoma. *Rinsho Byori* 1998; 46: 158-162
- 2 袁聚祥, 黄悦勤, 刘桂芬. 预防医学. 第二版. 北京: 北京大学医学出版社, 2000: 208-210
- 3 倪宗瓚. 卫生统计学. 第四版. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 122-123
- 4 侯振江, 王秀文, 张丽华, 周秀艳, 戴殿禄, 闫金辉. 原发性肝癌患者血清leptin, VEGF和AFP表达的意义. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 3195-3200
- 5 Kayaba H. Tumor markers: essential diagnostic tools for radiologists. *Nippon Igaku Hoshasen Gakkai Zasshi* 2003; 63: 133-139
- 6 周信达. 肝癌复发转移防治的研究进展. *世界华人消化杂志* 1999; 7: 260-261
- 7 Chapman K. The ProteinChip Biomarker System from Ciphergen Biosystems: a novel proteomics platform for rapid biomarker discovery and validation. *Biochem Soc Trans* 2002; 30: 82-87
- 8 Lin S, Tornatore P, King D, Orlando R, Weinberger SR. Limited acid hydrolysis as a means of fragmenting proteins isolated upon ProteinChip array surfaces. *Proteomics* 2001; 1: 1172-1184
- 9 叶任高, 陆再英. 内科学. 第五版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 471-475
- 10 田亚平. 从生化检验发展史看生物芯片的现状与未来. *中华检验医学杂志* 2003; 10: 577-578
- 11 邹雄. 肿瘤标志物在肿瘤早期诊断中的研究与应用进展. *中华检验医学杂志* 2002; 2: 71-72

电编 李琪 编辑 张焕兰

EVS、EVS+EVL续贯EVS和EVL续贯EVS治疗食管静脉曲张的疗效比较

蔺武, 刘心娟, 姜国俊, 魏南, 芦月霞, 郭晶, 程留芳

■背景资料

食管静脉曲张是肝硬化的常见并发症, 更是肝硬化常见的致死原因。因此, 在临床上, 控制活动性出血和预防再出血就显得非常重要。食管静脉曲张硬化治疗(EVS)和套扎治疗(EVL)是内镜下治疗食管静脉曲张出血两种有效的方法, 各有优缺点, 近年来有较多EVS和EVL联合治疗的研究, 但对各种联合方式的疗效存在争议。

蔺武, 刘心娟, 姜国俊, 魏南, 芦月霞, 郭晶, 北京世纪坛医院消化内科 北京市 100038
程留芳, 中国人民解放军总医院消化内科 北京市 100853
通讯作者: 蔺武, 100038, 北京市海淀区铁医路10号, 北京世纪坛医院消化内科. linwu.2007@yahoo.com.cn
电话: 010-63926370
收稿日期: 2006-11-14 接受日期: 2006-12-18

Comparison among endoscopic variceal sclerotherapy, endoscopic variceal sclerotherapy with sequential endoscopic variceal ligation plus endoscopic variceal sclerotherapy, and endoscopic variceal ligation plus endoscopic variceal sclerotherapy for esophageal varicosis

Wu Lin, Xin-Juan Liu, Guo-Jun Jiang, Nan Wei, Yue-Xia Lu, Jing Guo, Liu-Fang Cheng

Wu Lin, Xin-Juan Liu, Guo-Jun Jiang, Nan Wei, Yue-Xia Lu, Jing Guo, Department of Gastroenterology, Beijing Shijitan Hospital, Beijing 100038, China
Liu-Fang Cheng, Department of Gastroenterology, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China
Correspondence to: Wu Lin, Department of Gastroenterology, Beijing Shijitan Hospital, 10 Tieyi Road, Beijing 100038, China. linwu.2007@yahoo.com.cn
Received: 2006-11-14 Accepted: 2006-12-18

Abstract

AIM: To compare the efficacies for esophageal varicosis treated by endoscopic variceal sclerotherapy (EVS), endoscopic variceal sclerotherapy with sequential endoscopic variceal ligation plus endoscopic variceal sclerotherapy (EVS + EVL + EVS), and endoscopic variceal ligation plus endoscopic variceal sclerotherapy (EVL + EVS).

METHODS: One hundred and thirty type B viral hepatitis-caused liver cirrhosis patients complicated with esophageal bleeding were allocated into 3 groups: 50 cases in EVS group, 40 in EVS

+ EVL + EVS group, and 40 in EVL + EVS group.

RESULTS: The cure rate of varicosis was not significantly different among these three groups. The amount of sclerosant, time of therapy and in-hospital days were significantly higher in EVS group than the other two groups (95.64 ± 37.51 mL vs 55.90 ± 38.93 mL, 32.15 ± 26.97 mL; 3.64 ± 1.32 vs 1.85 ± 1.18 , 1.35 ± 0.88 ; 25.92 ± 8.69 d vs 20.6 ± 5.00 d, 17.55 ± 4.62 d; all $P < 0.05$), but there was no significant difference between EVS + EVL + EVS group and EVL + EVS group. Varicosis recurrence was more frequently happened in EVL + EVS group than that in the other groups (45% vs 12% , 20% , $P < 0.05$), but there was no significant difference between the later two groups. No significant difference was observed in the rate of repeated bleeding and complications among these groups.

CONCLUSION: The efficacy of EVS + EVL + EVS and EVL + EVS, especially EVS + EVL + EVS, are superior to that of EVS.

Key Words: Esophageal varices; Sclerotherapy; Ligation

Lin W, Liu XJ, Jiang GJ, Wei N, Lu YX, Guo J, Cheng LF. Comparison among endoscopic variceal sclerotherapy, endoscopic variceal sclerotherapy with sequential endoscopic variceal ligation plus endoscopic variceal sclerotherapy, and endoscopic variceal ligation plus endoscopic variceal sclerotherapy for esophageal varicosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(9):1020-1023

摘要

目的: 比较内镜下食管静脉曲张硬化治疗(EVS)、EVS+EVS加套扎(EVL)续贯EVS和EVL续贯EVS治疗食管静脉曲张的疗效。

方法: 乙型病毒性肝炎肝硬化食管静脉曲张破裂出血患者130例, 随机分为EVS治疗组50例, EVS+EVL续贯EVS组40例, EVL续贯EVS组40例, 比较3组食管静脉曲张的消失率、并发症、硬化剂总用量, 患者住院天数和远期复发出血率。

结果: 三组患者治疗后食管静脉曲张消失率无差异; EVS组硬化剂应用总量、治疗次数和住院天数都高于EVS+EVL续贯EVS组, EVL续贯EVS组(95.64 ± 37.51 mL vs 55.90 ± 38.93 mL, 32.15 ± 26.97 mL; 3.64 ± 1.32 vs 1.85 ± 1.18 , 1.35 ± 0.88 ; 25.92 ± 8.69 d vs 20.6 ± 5.00 d, 17.55 ± 4.62 d; P 均 <0.05), 而后两组之间没有差异; EVL续贯EVS组食管静脉曲张复发率高于另外两组(45% vs 12% , 20% , $P<0.05$), 而后两组间没有差异. 3组间再出血发生率及并发症的发生率没有差别.

结论: EVL续贯EVS和EVS+EVL续贯EVS在食管静脉曲张的治疗上优于单纯EVS, 尤其后者兼具EVL和EVS的优点.

关键词: 食管静脉曲张; 硬化剂治疗; 套扎治疗

简武, 刘心娟, 姜国俊, 魏南, 芦月霞, 郭磊, 程留芳. EVS、EVS+EVL续贯EVS和EVL续贯EVS治疗食管静脉曲张的疗效比较. 世界华人消化杂志 2007;15(9):1020-1023
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1020.asp>

0 引言

为比较内镜下食管静脉曲张硬化治疗(endoscopic injection sclerotherapy, EVS)、EVS加套扎(endoscopic variceal ligation, EVL)续贯EVS和EVL续贯EVS的疗效, 我们对2002-01/2004-12期间130例乙型病毒性肝炎肝硬化食管静脉曲张破裂出血患者, 随机分为EVS组、EVS+EVL续贯EVS组和EVL续贯EVS组, 进行了前瞻性对照研究, 重点比较3组食管静脉曲张的消失率、并发症、硬化剂总用量、患者住院天数和远期复发出血率.

1 材料和方法

1.1 材料 130例患者均为乙型病毒性肝炎肝硬化门脉高压、食管静脉曲张, 近期有食管静脉曲张破裂出血史. 分为EVS组50例、EVS+EVL续贯EVS组40例和EVL续贯EVS组40例. 3组性别、年龄、治疗前出血次数、食管静脉曲张程度及肝功能经方差分析(q 检验)或 χ^2 检验, 差异无显著($P>0.05$), 具有可比性(表1).

1.2 方法 EVS组: 采用内镜下少点、较大剂量、快速静脉内注射法, 硬化剂为10 mL/L乙氧硬化醇. 首次平均用量 29.52 ± 4.29 mL, 间隔7 d注射1次, 每例注射次数2-5次. EVS+EVL续贯EVS组: 先采用与EVS组相同的方法行硬化剂注射治疗,

表 1 各食管静脉曲张患者的一般情况

项目	EVS组	EVS+EVL 续贯EVS组	EVL续贯 EVS组
例数(n)	50	40	40
男/女(n)	36/14	34/6	32/8
年龄范围(岁)	34-70	33-67	34-76
平均年龄(岁)	50.20 ± 12.61	44.45 ± 8.40	45.05 ± 11.23
出血次数	1-6	1-5	1-6
平均出血次数	2.64 ± 1.66	2.40 ± 1.67	2.30 ± 1.38
Child分级			
A	38	34	34
B	12	6	6
静脉曲张分级 ^[1]			
G III期(n)	50	40	40

表 2 各组治疗后食管静脉曲张消失率的比较

	消失	基本消失	G I ^[1]	有效率
EVS组	20	22	8	84.00%
EVS+EVL续贯EVS组	20	16	4	90.00%
EVL续贯EVS组	14	23	3	92.50%

然后采用国产6环TZQ液压式套扎器, 从齿状线上开始结扎, 自下向上沿静脉纵行向上逐条结扎, 间隔10-14 d后行第二次EVS治疗, 此后每隔7 d注射1次. EVL续贯EVS组: 采用国产6环TZQ液压式套扎器, 与EVS+EVL续贯EVS组相同的方法进行结扎, 相隔10-14 d后行第一次EVS治疗, 此后每隔7 d注射1次. 3组患者于疗程结束后复查胃镜判断静脉曲张消失情况, 出院后3-6 mo来院复查胃镜, 了解静脉曲张复查情况, 如有必要, 追加治疗.

统计学处理 方差分析(q 检验)、 χ^2 检验及确切概率法.

2 结果

2.1 静脉曲张消失率 EVS组有42例消失或基本消失, 有效率为84.00%; EVS+EVL续贯EVS组有36例消失或基本消失, 有效率为90.00%; EVL续贯EVS组有37例消失或基本消失, 有效率为92.50%; 3组间食管静脉曲张消失率无差异($P>0.05$, 表2).

2.2 3组所用硬化剂总量、治疗次数及治疗天数 EVS组硬化剂应用总量、治疗次数和治疗天数都高于EVS+EVL续贯EVS组和EVL续贯EVS组; EVS+EVL续贯EVS组硬化剂应用总量高于EVL

■创新盘点

近期国内的一项循征医学研究认为, 套扎疗法较硬化剂疗法在治疗肝硬化食管静脉曲张中能更好的预防再出血. 本研究中, 3组的再出血发生率没有差异, 可能与各组均运用了硬化剂疗法有关. 因此, 所发生的并发症没有明显区别.

■应用要点

近年来,国内外对EVS与EVL联合治疗食管静脉曲张进行了有益的探索,尽管所得结果并不一致,但本文认为,EVL续贯EVS和EVS+EVL续贯EVS仍有他们的优势,尤其是后者兼据EVL及EVS的优点,但需扩大使用病例及总结经验。

表 3 各组治疗所用硬化剂总量、治疗次数和治疗天数

	硬化剂总量(mL)	治疗次数	治疗天数(d)
EVS组	95.64 ± 37.51	3.64 ± 1.32	25.92 ± 8.69
EVS+EVL续贯EVS组	55.90 ± 38.93 ^a	1.85 ± 1.18 ^a	20.6 ± 5.00 ^a
EVL续贯EVS组	32.15 ± 26.97 ^{ac}	1.35 ± 0.88 ^a	17.55 ± 4.62 ^a

^a $P < 0.05$ vs EVS组; ^c $P < 0.05$ vs EVS+EVL续贯EVS组。

续贯EVS组;而EVS+EVL续贯EVS组和EVL续贯EVS组的治疗次数和治疗天数之间没有差别(表3)。

2.3 随访 3组均随访12-24 mo. EVS组随访期间再出血2例,静脉曲张复发6例,占12%,无死亡病例;EVS+EVL续贯EVS组再出血2例,静脉曲张复发8例,占20%,无死亡病例。EVL续贯EVS组再出血4例,静脉曲张复发18例,45%。EVL续贯EVS组食管静脉曲张复发率高于EVS组和EVS+EVL续贯EVS组,而后两者之间没有差别。3组再出血发生率没有显著性差异。

2.4 并发症 EVS组术后体温37.5-38℃ 10例,并发食管轻度狭窄1例。EVS+EVL续贯EVS组术后体温37.5-38℃ 7例。EVL续贯EVS组术后体温37-38℃ 8例。经 χ^2 检验及确切概率法分析,3组之间各并发症的发生率没有差别。

3 讨论

EVS和EVL是内镜下治疗食管静脉曲张出血两种有效的方法,各有优缺点^[2-5]。为提高疗效,缩短疗程,减少食管静脉曲张复发率和并发症,近年来有较多EVS和EVL联合治疗的研究^[6-9]。本研究EVS组、EVS+EVL续贯EVS组和EVL续贯EVS组食管静脉曲张消失和基本消失率分别为84.00%, 90.00%和92.50%。3组相比无明显差异,其中后二组近期疗效较EVS组更为明显。达到静脉曲张消失所需硬化剂总剂量EVS+EVL续贯EVS组和EVL续贯EVS组明显少于EVS组;治疗次数及治疗天数,EVS+EVL续贯EVS组和EVL续贯EVS组明显少于EVS组。而前两组之间没有明显差异,与文献报道相似^[10-11]。远期食管静脉曲张复发率EVL续贯EVS组为45%,高于EVS组的12%和EVS+EVL续贯EVS组的20%。国内外的一些文献报道认为EVL后食管静脉曲张复发出现早、复发率高,考虑与结扎术后病理改变有关,结扎固有层静脉使静脉缺血,血栓形成静脉闭塞,仍留有交通支和外膜层静脉,致使EVL

后静脉曲张复发,固有层静脉出现再通^[8,10]。EVL术后续贯EVS试图闭塞交通支和外膜层静脉,减低静脉曲张复发。该方法优于单纯EVL,但仍高于EVS,可能与续贯EVS闭塞部分交通支和外膜静脉但不能全部闭塞静脉有关。EVS+EVL续贯EVS兼有两种治疗方法的优点,是比单纯应用EVS消除曲张血管所需的治疗次数少,硬化剂的用量少,效果之所以较好是因为EVS后马上进行了套扎,使局部与血管内皮接触的硬化剂浓度升高,同时能防止注射部位出血^[12]。而远期静脉曲张复发率,低于EVL续贯EVS,与EVS相近。近期国内的一项循征医学研究认为,套扎疗法较硬化剂疗法在治疗肝硬化食管静脉曲张中能更好的预防再出血^[13]。本研究中,3组的再出血发生率没有差异,可能与各组均运用了硬化剂疗法有关。从本研究结果看,3组患者均进行了硬化剂治疗,因此所发生的并发症没有明显区别。

近年来,国内外对EVS与EVL联合治疗食管静脉曲张进行了有益的探索,尽管所得结果并不一致,但我们认为EVL续贯EVS和EVS+EVL续贯EVS仍有他们的优势,尤其是后者兼据EVL及EVS的优点,但需扩大使用病例,总结经验。

4 参考文献

- 1 中华消化内镜学会. 食管胃底静脉曲张内镜下诊断和治疗规范试行方案. 中华消化内镜杂志 2000; 17: 198-199
- 2 Helmy A, Hayes PC. Review article: current endoscopic therapeutic options in the management of variceal bleeding. *Aliment Pharmacol Ther* 2001; 15: 575-594
- 3 Wong T, Pereira SP, McNair A, Harrison PM. A prospective, randomized comparison of the ease and safety of variceal ligation using a multiband vs. a conventional ligation device. *Endoscopy* 2000; 32: 931-934
- 4 Yoshida H, Tajiri T, Mamada Y, Taniai N, Hirakata A, Kawano Y, Mizuguchi Y, Shimizu T, Takahashi T. Comparison of characteristics of recurrent esophageal varices after endoscopic ligation versus endoscopic ligation plus sclerotherapy. *Hepatogastroenterology* 2004; 51: 457-461
- 5 Baroncini D, Milandri GL, Borioni D, Piemontese A, Cennamo V, Billi P, Dal Monte PP, D'Imperio

- N. A prospective randomized trial of sclerotherapy versus ligation in the elective treatment of bleeding esophageal varices. *Endoscopy* 1997; 29: 235-240
- 6 Garg PK, Joshi YK, Tandon RK. Comparison of endoscopic variceal sclerotherapy with sequential endoscopic band ligation plus low-dose sclerotherapy for secondary prophylaxis of variceal hemorrhage: a prospective randomized study. *Gastrointest Endosc* 1999; 50: 369-373
- 7 Masumoto H, Toyonaga A, Oho K, Iwao T, Tanikawa K. Ligation plus low-volume sclerotherapy for high-risk esophageal varices: comparisons with ligation therapy or sclerotherapy alone. *J Gastroenterol* 1998; 33: 1-5
- 8 Umehara M, Onda M, Tajiri T, Toba M, Yoshida H, Yamashita K. Sclerotherapy plus ligation versus ligation for the treatment of esophageal varices: a prospective randomized study. *Gastrointest Endosc* 1999; 50: 7-12
- 9 Cheng YS, Pan S, Lien GS, Suk FM, Wu MS, Chen JN, Chen SH. Adjuvant sclerotherapy after ligation for the treatment of esophageal varices: a prospective, randomized long-term study. *Gastrointest Endosc* 2001; 53: 566-571
- 10 程留芳, 蔡逢春, 令狐恩强, 王志强. 食管静脉曲张内镜下结扎和硬化治疗前瞻性对照研究. *解放军医学杂志* 1999; 24: 414-416
- 11 程留芳, 令狐恩强, 王志强, 黄启阳, 毛永平. 食管静脉曲张硬化与结扎加硬化治疗食管静脉曲张的对照研究. *中华消化内镜杂志* 2001; 18: 213-215
- 12 吴建新, 孟祥军, 李定国. 内镜下硬化剂注射与套扎术治疗食管静脉曲张的比较与评价. *胃肠病学和肝病科学杂志* 2002; 11: 190-192
- 13 范铁艳, 程留芳. 结扎和硬化疗法治疗肝硬化食管静脉曲张出血疗效比较的荟萃分析. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 1704-1709

■同行评价

本文做了大量的临床工作, 通过3种不同的方法探讨了治疗食管静脉曲张的疗效, 其研究结果对选择食管静脉曲张治疗方法有较高参考价值。

电编 张敏 编辑 张焕兰

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

全国消化及消化内镜诊断与治疗进展学术研讨会征文启事

本刊讯 为提高我国消化内镜诊疗技术的整体水平,《中华消化内镜杂志》编辑部拟于2007-08在新疆乌鲁木齐市召开“全国消化及消化内镜诊断与治疗进展学术研讨会”,邀请消化和消化内镜专家作有关专题学术报告.会议将出论文集,并授予继续教育 I 类学分,《中华消化内镜杂志》将择优刊登应征论文。

1 征文内容

征文内容包括消化系统疾病的内镜(食管镜、胃镜、十二指肠镜、小肠镜、大肠镜、肠道镜、腹腔镜、超声内镜等)诊疗技术;内镜外科的临床应用及进展;食管、胃、肠、肝胆、胰腺疾病的基础研究、临床诊治及其进展(炎症、溃疡、出血、肿瘤、异物等);消化系统疾病的中医、中西医结合治疗及其进展;消化内镜消毒及护理技术,消化系统疾病的急诊护理。

2 征文要求

应征文章按《中华消化内镜杂志》稿约要求撰写打印,并寄3000字以内全文及500字以内的论文摘要各一份;已投《中华消化内镜杂志》尚未发表的稿件,请注明稿号.应征文章经单位推荐盖章后,寄南京市紫竹林3号《中华消化内镜杂志》编辑部卜小乐、赵在文同志收.邮编:210003.信封左下脚注“征文”字样,同时汇寄审稿费10元.请自留底稿,恕不退稿.截稿日期2007-05-31.有关会议的具体事项另行通知.联系电话:025-83472831,86086091.

内镜下气囊扩张治疗贲门失弛缓症81例

杨艳, 于皆平, 李欢, 曹俊, 于红刚

■背景资料

贲门失弛缓症是一种食管动力紊乱性疾病。以下食管括约肌(LES)张力增高, 食管体部正常蠕动消失及LES在吞咽时松弛障碍为特征。贲门失弛缓症病因不清, 缺乏特异性根治疗法。临床治疗的目的是降低LES的压力, 减轻LES的梗阻, 从而缓解症状。其治疗方法主要有药物治疗、手术治疗、气囊扩张、肉毒毒素注射等。近年来随着内镜的应用, 扩张治疗成为治疗贲门失弛缓症首选的非手术治疗方法。

■研发前沿

气囊扩张术的应用越来越广泛, 但对球囊直径、扩张压力、次数、时间等影响疗效的重要因素的具体数据, 文献报道不一, 怎样做到既无穿孔等并发症出现, 又保持了很好的疗效的方案, 是研究者研究的重点。

杨艳, 于皆平, 李欢, 曹俊, 于红刚, 武汉大学人民医院消化内科 湖北省武汉市 430060

通讯作者: 杨艳, 430060, 湖北省武汉市, 武汉大学人民医院消化内科. luobo543@163.com

电话: 027-88075724 传真: 027-88041911-8455

收稿日期: 2007-01-09 接受日期: 2007-01-30

Endoscopic pneumatic dilation in treatment of achalasia: an analysis of 81 cases

Yan Yang, Jie-Ping Yu, Huan Li, Jun Cao, Hong-Gang Yu

Yan Yang, Jie-Ping Yu, Huan Li, Jun Cao, Hong-Gang Yu, Department of Gastroenterology, People's Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei Province, China

Correspondence to: Yan Yang, Department of Gastroenterology, People's Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei Province, China. luobo543@163.com

Received: 2007-01-09 Accepted: 2007-01-30

Abstract

AIM: To investigate the efficacy of endoscopic pneumatic dilation (EPD) in the treatment of achalasia of cardia (AC).

METHODS: A total of 81 AC patients with achalasia of cardia were treated with endoscopic pneumatic dilation. Then the clinic symptoms were observed, and gastroscopy and X-ray examination were performed to evaluate the therapeutic efficacy.

RESULTS: The remission rate for dysphagia was 100%. No perforation or other serve complications occurred. The reexaminations of gastroscopy and X-ray indicated that the symptoms were improved obviously in comparison with those before EPD treatment. After following up for about 0.5 to 5 years, no one recurred.

CONCLUSION: EPD is effective, safe, and economical in the treatment of AC with less suffering, and it is the ideal choice to treat AC.

Key Words: Achalasia of cardia; Endoscopic pneumatic dilation; Dysphagia

Yang Y, Yu JP, Li H, Cao J, Yu HG. Endoscopic pneumatic

dilation in treatment of achalasia: an analysis of 81 cases. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(9):1024-1026

摘要

目的: 探讨内镜下气囊扩张术治疗贲门失弛缓症的方法与疗效。

方法: 内镜下气囊扩张术治疗81例贲门失弛缓症患者, 观察其临床症状, 复查胃镜及X线检查, 以了解其疗效。

结果: 81例患者吞咽困难缓解率100%, 无穿孔等严重并发症发生; 复查胃镜及X线检查均较扩张前明显改善, 随访0.5-5 a, 无1例复发。

结论: 内镜下气囊扩张术治疗贲门失弛缓症因疗效确切、安全性高、费用低、痛苦小, 是贲门失弛缓症较为理想的首选和主要治疗方法。

关键词: 贲门失弛缓症; 内镜下气囊扩张术; 吞咽困难

杨艳, 于皆平, 李欢, 曹俊, 于红刚. 内镜下气囊扩张治疗贲门失弛缓症81例. 世界华人消化杂志 2007;15(9):1024-1026

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1024.asp>

0 引言

贲门失弛缓症(achalasia)又称贲门痉挛、巨食管, 是由食管神经肌肉功能障碍所致的疾病, 其主要特征是食管缺乏蠕动, 食管下端括约肌(LES)高压和对吞咽动作的松弛反应减弱。临床表现主要为吞咽困难、反流、胸骨后不适或疼痛、体质量减轻以及因反流引起的呼吸道症状。其治疗方法主要有药物治疗、手术治疗、气囊扩张、肉毒毒素注射等, 其中气囊扩张术是目前临床上最主要疗法之一。我们收集了武汉大学人民医院1994-02/2006-06贲门失弛缓症病例81例, 均应用气囊扩张术治疗, 疗效满意。

1 材料和方法

1.1 材料 武汉大学人民医院1994-02/2006-06贲

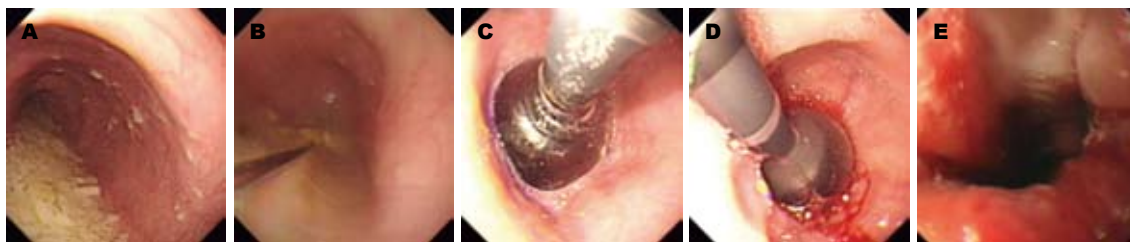


图1 内镜下气囊扩张治疗贲门失弛缓症全过程. A: 扩张前, 食管下段狭窄, 可见液体和食糜; B: 置入导丝; C, D: 气囊扩张中; E: 扩张后, 贲门口松弛, 黏膜撕裂伴少量渗血.

■应用要点

本文认为内镜直视下气囊扩张治疗贲门失弛缓症可行性高、安全性好、治疗时间短、创伤小、显效快、痛苦少、患者易接受、且远期疗效理想, 故可作为贲门失弛缓症的首选和主要治疗方法.

门失弛缓症患者81例, 其中男36例, 女45例, 年龄16-78(平均 39.6 ± 15.6)岁, 病程3 mo-20余年. 吞咽困难按Stooler分级法分4级: I级: 能进软食; II级: 能进半流饮食; III级: 能进流质饮食; IV级: 不能进食. 本组均有不同程度的吞咽困难, 其中I级8例, II级31例, III级28例, IV级14例. 此外, 呕吐与反流72例, 胸骨后不适或胸痛者56例. 钡餐检查均示有食管近段扩张、食管下段狭窄、贲门开放迟缓, 钡剂通过贲门受阻、呈鸟嘴征. 内镜检查发现食管腔扩张、内有较多液体和食物残渣潴留(图1A)、管壁见多个轮状收缩环, 胃镜通过有阻力, 但均可通过贲门进入胃腔, 其中食管炎44例, 慢性浅表性胃炎58例, 消化性溃疡12例, 胃黏膜脱垂及十二指肠炎27例.

1.2 方法 (1)术前准备: 所有病例均常规检查血常规、出凝血系列及心电图, 确定无内镜检查禁忌症及出血倾向. 术前禁食8 h, 禁饮4 h. 使用器械: 采用日本Olympus公司GIF-240型电子胃镜、美国Boston公司Rigiflex-ABD气囊扩张导管(直径35 mm)及配套的超硬导丝、压力泵. (2)操作步骤: 术前15 min肌注654-2 10 mg, 安定10 mg, 度冷丁50 mg, 常规口咽部麻醉. 取左侧屈膝卧位, 上牙托, 先行常规的胃镜检查, 排除食管、贲门和胃的其他疾病, 插入胃镜至胃窦, 经活检孔道置入导丝, 保留导丝在胃窦内退出胃镜(图1B), 沿导丝插入涂有润滑油的气囊扩张器; 再次插入胃镜, 内镜直视下将气囊之中点定位于贲门狭窄处. 胃镜退至距气囊口侧端2-3 cm处, 直视下缓缓充气扩张(图1C-D), 以有胸骨后疼痛且患者能够忍受为限. 治疗过程中注意保持气囊位置, 使其中点始终处于贲门狭窄处. 一般扩张压力为15 PSI(pounds per square inch, 磅/英寸², 1 PSI = 6.89 kPa)、持续3 min, 间歇3 min后再次扩张, 一共3次. 对于老年患者及疼痛耐受差者, 气囊内压力可适当降低, 持续时间可稍减少. 扩张完后放气退出气囊及导丝, 内镜观察贲门损伤及出血的情

况, 若渗血较多, 局部喷洒去甲肾上腺素止血. 术中术后严密观察有无剧烈腹痛、气促、出血、发热等情况, 术后禁食1 d. 常规给予抑酸、黏膜保护剂、消炎及对症处理, 嘱患者头高足低位防止胃液返流. 术后1-2 wk复查胃镜. 疗效判断: 根据扩张后患者自觉症状改善情况分显效: 进食基本正常; 有效: 进食明显改善; 无效: 进食情况无改善.

2 结果

根据上述结果评价指标, 本组81例患者扩张后显效率100%. 术后镜下观察贲门口松弛, 进镜无阻力; 所有患者均有不同程度贲门黏膜撕裂、伴有少量渗血(图1E), 术后常规止血治疗, 无活动性出血. 无1例并发大出血、穿孔、窒息及心脑血管并发症. 定期随访0.5-5 a, 吞咽困难缓解率100%, 无1例复发.

3 讨论

贲门失弛缓症是LES运动障碍性疾病, 其主要特点为吞咽后LES松弛障碍, 伴有LES压力升高, 残余压升高, 以致食物不能顺利进入胃内, 产生滞留, 从而出现一系列症状及体征. 贲门失弛缓症的病因还不十分清楚, 可能与遗传、自身免疫、感染因素等有关, 缺乏特异性根治方法. 其治疗方法主要有药物治疗、手术治疗、气囊扩张、肉毒毒素注射等. 其中药物治疗作用时间短, 疗效差, 只能作为辅助治疗; 手术治疗创伤大, 花费高, 术后并发症多, 患者难以接受; 食管下括约肌内肉毒毒素注射治疗近期疗效较好, 但需长期反复治疗, 有的患者会出现原发耐受性, 并且长期注射是否会出现类似肉毒毒素治疗骨骼肌疾病中出现的问题, 尚不明确^[1].

近年来气囊扩张术的应用越来越广泛. 其原理是外力强行使部分食管下括约肌纤维断裂, 解除食管远端梗阻, 使患者症状缓解^[2]. 一般认为黏膜撕裂出血是扩张成功的标志^[3]. 据研究,

■同行评价

本文对内镜下气囊扩张治疗贲门失弛缓症进行了临床分析,病例较多,讨论较全面,但遗憾的是该文对治疗效果的分析没有任何统计学分析,对病例的随访年限及不同随访年限患者所占百分比的相关数据没有呈现,从而大大降低了其科学性,因而也降低了其应有的临床参考价值。

扩张治疗可使患者的LES松弛率升高, LES压力下降, 残余压下降, 通过改善贲门失弛缓症的病理生理而达到治疗目的^[4]。其优点: 可直视下观察; 扩张最大直径固定, 压力过高亦不会使充气气囊进一步显著横向扩张; 操作简单, 损伤小, 并发症少。气囊定位是否准确和扩张过程中保持这一位置不变与否是影响疗效的重要因素^[5]。本组操作完全脱离放射线, 将全部的操作过程完全置于内镜的直视下进行, 这样使气囊的定位准确无误, 不仅大大的提高了疗效, 使吞咽困难缓解率达到了100%, 也使患者和操作者免受射线照射之苦。

球囊直径, 扩张压力、次数、时间也是影响疗效的重要因素。有学者曾提出扩张治疗球囊的直径应大于3.0 cm, 才能保证扩张有效^[6], 与我们临床实践相同, 我们一般采用扩张直径为3.5 cm, 承受压力12-18 PSI。此外扩张次数与时间也同样有相当的要求。本组采取逐渐加压、多次扩张的方法, 一般3次; 关于扩张的时间文献报道不一, 有的文献报道每次扩张5 min, 间歇3 min, 有的采用1次扩张且保持1 min的方法^[6-7]。笔者采用扩张3次、间歇3 min的方法, 既无并发症出现, 又保持了很好的疗效。

气囊扩张产生穿孔等严重并发症为目前治疗贲门失弛缓症的主要弊端。文献报道穿孔率高达1%-10%^[8]。本资料无1例穿孔。有报道认为穿孔病例多为原有膈上憩室或heller术后复发患者, 这类患者行扩张治疗应谨慎^[1]。我们认为与下列因素有关: 首次加压过猛过高导致食管壁

急剧扩张撕裂; 采用软导丝, 在插入气囊时在贲门部受阻, 其尖端滑向扩张变薄的食管下端, 刺穿食管壁; 扩张时患者恶心、呃逆、咳嗽等突然增加腹压的因素可使气囊内压力突然增高而导致穿孔。因此为避免穿孔, 首次充气时应缓慢增加压力, 扩张压力不可太高; 术中采用超硬导丝, 忌用软导丝; 术前给予654-2、安定及度冷丁肌注, 以保持患者术中处于安静状态。

总结本组资料及结合相关文献, 我们认为胃镜直视下气囊扩张治疗可行性高、安全性好、治疗时间短、创伤小、显效快、痛苦少、患者易接受、且远期疗效理想, 可作为贲门失弛缓症的首选和主要治疗方法。

4 参考文献

- 1 程凡, 谢惠君, 朱克利. 内镜下气囊扩张治疗贲门失弛缓症39例分析. 中国综合临床 2004; 20: 607-608
- 2 Karamanolis G, Sgouros S, Karatzias G, Papadopoulou E, Vasiliadis K, Stefanidis G, Mantides A. Long-term outcome of pneumatic dilation in the treatment of achalasia. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 270-274
- 3 李惠民, 王明奎, 林素洁, 王贵才, 潘志丽, 郝童. 带囊导管扩张术治疗贲门失弛缓症95例经验总结. 实用放射学杂志 1997; 13: 86-88
- 4 范一宏, 吕宾, 徐毅, 孙翠萍. 贲门失弛缓症贲门扩张前后食管测压变化. 中华消化内镜杂志 2004; 21: 121-122
- 5 朱敬松, 王传平, 宋静. 球囊扩张术治疗贲门失弛缓症76例疗效分析. 山东医药 2006; 46: 31
- 6 Vaezi MF. Achalasia: diagnosis and management. *Semin Gastrointest Dis* 1999; 10: 103-112
- 7 张泰昌, 沙忠芬, 张丽萍. 气囊扩张治疗贲门失弛缓症. 中华消化内镜杂志 1997; 14: 32-35
- 8 Reynolds JC, Parkman HP. Achalasia. *Gastroenterol Clin North Am* 1989; 18: 223-255

电编 张敏 编辑 张焕兰

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

世界华人消化杂志在线办公系统

本刊讯 自2005-12-15起, 世界华人消化杂志正式开通了在线办公系统(<http://www.wjgnet.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。凡在线办公系统注册的用户, 将可获得世界华人消化杂志最新出版消息。(世界胃肠病学杂志 2007-03-28)

胃镜诊断胃黏膜脱垂365例

田新社, 章振国

田新社, 章振国, 襄樊市康达医院消化内科 湖北省襄樊市 441003
通讯作者: 田新社, 441003, 湖北省襄樊市, 康达医院消化内科.
tianxs@xfskdyy.cn
电话: 0710-3021517
收稿日期: 2006-09-19 接受日期: 2006-10-18

Gastrosopic diagnosis of gastric mucosal prolapse: an analysis of 365 cases

Xin-She Tian, Zhen-Guo Zhang

Xin-She Tian, Zhen-Guo Zhang, Department of Gastroenterology, Kangda Hospital, Xianfan 441003, Hubei Province, China

Correspondence to: Xin-She Tian, Department of Gastroenterology, Kangda Hospital, Xianfan 441003, Hubei Province, China. tianxs@xfskdyy.cn

Received: 2006-09-19 Accepted: 2006-10-18

Abstract

AIM: To study the gastroscopic manifestation and its significance of gastric mucosal prolapse.

METHODS: According to the clinical symptoms, the gastroscopic manifestations (using Olympus140) of 365 GMP patients were respectively analyzed.

RESULTS: GMP was found in the patients of 10 to 80 years old. One piece of AMP was observed in 285 cases, 2 pieces in 60 cases, and 3 pieces in 20 cases. AMP was located at the lesser curvature in 324 cases and the greater curvature in 30 cases, and on the anterior wall in 33 cases and the posterior wall in 48 cases. Re-examination of gastroscopy showed that the site of AMP hadn't changed in 74 cases. A total of 249 cases were complicated with gastritis, 115 with yellow mucus pool, and 67 with esophagitis.

CONCLUSION: GMP may be an independent disease, which is the important cause of gastritis and esophagitis.

Key Words: gastric mucosal prolapse; diagnosis; gastroscopy; gastritis; esophagitis

Tian XS, Zhang ZG. Gastrosopic diagnosis of gastric mucosal prolapse: an analysis of 365 cases. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(9):1027-1029

摘要

目的: 研究胃黏膜脱垂(gastric mucosal prolapse, GMP)胃镜下表现及其临床意义.

方法: 根据临床症状, 回顾性研究365例GMP患者电子胃镜(Olympus140)图像资料.

结果: 10-80岁各年龄段均可见GMP; 脱垂黏膜为1条者285例, 2条者60例, 3条者20例; 脱垂黏膜处在小弯侧324例, 大弯侧、前后壁分别为30、33和48例; 74例行胃镜复查脱垂黏膜位置恒定; 伴胃炎249例, 黏液池黄染115例, 食管炎67例.

结论: GMP可能为一独立疾病, 同时也可能是导致胃炎、食管炎的重要病因.

关键词: 胃黏膜脱垂; 诊断; 胃镜; 胃炎; 食管炎

田新社, 章振国. 胃镜诊断胃黏膜脱垂365例. 世界华人消化杂志 2007;15(9):1027-1029
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1027.asp>

0 引言

由于缺乏特异性病理意义的报告和特异性临床症状, 长期以来胃黏膜脱垂(prolapse of gastric mucosa, GMP)未受到足够重视. 近年, 随着胃镜的普及使用, 有关GMP胃镜诊断及胃镜下治疗逐渐引起临床工作者的关注. 现就本院近3 a来胃镜诊断的365例GMP病例进行回顾性分析研究, 并作一报告. 本院胃镜室3 a来在1972例接受胃镜检查的患者中诊断胃黏膜脱垂近400例. 现就其中资料完整的365例进行回顾性分析研究并报告如下.

1 材料和方法

1.1 材料 我院胃镜室2003-07/2006-06诊断的资料完整的研究GMP病例进行回顾性研究, 除外十二

■背景资料

胃黏膜脱垂主要是因为黏膜过于松弛、肥厚、冗长, 在胃蠕动收缩的同时, 将该处的黏膜推送挤压, 因脱离原来的位置而下入到十二指肠引起的, 其临床表现包括, 腹部疼痛、不适、打嗝、烧心, 侧卧时容易疼痛, 没有规律性, 难于掌握和控制.

■研究前沿

由于缺乏特异性病理意义的报告和特异性临床症状,长期以来胃黏膜脱垂(prolapse of gastric mucosa, GMP)未受到足够重视。近年,随着胃镜的普及使用,有关GMP胃镜诊断及胃镜下治疗逐渐引起临床工作者的关注。

指肠球部溃疡,变形者,和合并肝、胆、胰腺疾病的患者。365例中,男207例,女158例,男女之比为1.3:1,年龄13-79(平均 44.2 ± 12.3)岁。临床表现:腹胀246例,占67.4%;腹痛220例,占60.3%;反酸118例,占32.3%;烧心97例,占26.6%;并发上消化道出血75例,占20.5%;呕吐50例,占13.7%;暖气43例,占11.8%;恶心10例,占2.7%。

1.2 方法

1.2.1 诊断标准 (1)幽门口关闭时可见一至数条异常粗大胃黏膜皱襞走行,通过幽门口进入十二指肠球部,导致幽门口关闭不全;(2)幽门口开全时仍见异常粗大胃黏膜皱襞走行,通过幽门口进入十二指肠;(3)幽门口变形。

1.2.2 幽门螺旋杆菌(*H pylori*)检测 在胃窦部取材进行快速尿素酶试验及病理HE染色,两种方法均为阳性者为*H pylori*阳性。

2 结果

2.1 年龄分布 <20岁者6例;21-30岁41例;31-40岁98例;41-50岁102例;51-60岁82例;61-70岁34例;71-80岁2例。

2.2 脱垂黏膜条数及位置 1条285例,2条60例,3条20例。若为1条以上脱垂黏膜根据所处不同位置分别计入,若在同一位置则按1例统计。小弯侧324例,大弯侧30例,前壁33例,后壁48例。365例中有74例在4 wk至1 a时再次胃镜检查时与初诊图像比较,脱垂黏膜仍然存在,且位置恒定。

2.3 伴随病变情况 脱垂黏膜表面有炎症性改变者有149例,其中充血101例,糜烂48例。胃黏膜炎症共249例,其中胃底炎症29例,胃体炎症53例,胃窦部炎症228例。表现为黏膜充血91例,隆起糜烂49例,平坦糜烂17例,黏膜明显红白相间88例,黏膜变薄,血管透见22例。合并胃溃疡12例。伴黏液池发黄115例。合并食管炎67例,其中食道黏膜充血渗出45例,糜烂14例,溃疡8例。合并食管癌2例。十二指肠炎28例。十二指肠球部息肉9例。胃息肉8例。

2.4 胃部黏膜病理情况 68例行胃黏膜活检,其中淋巴细胞浸润13例,嗜酸性粒细胞浸润12例,肠化生9例,非典型性增生6例,肠化生伴颈部腺体增生4例,非典型性增生伴颈部腺体增生5例,淋巴滤泡增殖5例,黏膜萎缩4例。慢性浅表性炎症10例。*H pylori*阳性者41例,占11.2%。与X线造影检出比较,其中66例患者先后行X线钡餐造影检查,诊断GMP 8例。X线造影与胃镜检查阳性符合率12.1%(8/66)。

3 讨论

GMP是指幽门处胃黏膜通过幽门口进入十二指肠的异常改变。1911年由Von Schmieleen首先报告^[1]。发作时临床表现有:不规则上腹疼痛、饱胀、暖气恶心、呕吐。症状往往因进食、餐后右侧卧位诱发或加重,呕吐或左侧卧位减轻或缓解,抗酸治疗一般无效。严重者可出现幽门梗阻症状及上消化道出血^[2],但其症状缺乏特异性且与其他上消化道疾病症状重叠。其诊断依赖X线钡餐造影或胃镜检查。本组365例主要临床表现为:腹胀、腹痛、反酸、烧心、上消化道出血、呕吐、暖气、恶性等。与李国庆 *et al*报道相似^[3]。

GMP的发生原因不是十分清楚。生理变异或窦部黏膜发生炎症、水肿、肥厚及黏膜下层松弛,导致胃窦黏膜正常活动性丧失,肥大的黏膜作为异物,被增强的胃蠕动挤向幽门管形成GMP^[4]。在上述基础上,一切能引起胃剧烈运动的原因如精神、机械、烟、酒、茶等刺激均可成为本病的诱因^[5]。既往GMP多通过X线钡餐造影作出诊断,线钡餐造影表现为:幽门增宽,十二指肠球部基底处呈蕈状、伞状充盈缺损,也可见粗大的胃窦黏膜经幽门管突至十二指肠球部等征象^[6]。但临床诊断率不高,国外检出率1.3%-14%^[2],国内检出率为1.05%-2.03%^[3]。而作为对上消化道疾病特别是上消化道黏膜改变的观察最有价值的胃镜检查,诊断GMP的报道却很少。这主要是因为GMP缺乏病理意义的报告,同时胃镜检查时有诸如溃疡、炎症、肿瘤、萎缩、*H pylori*感染等更多的其他阳性发现,因而未能引起胃镜医师的足够重视。胃镜检出的上消化道疾病以消化性溃疡为第一位,其后依次为胆汁反流、恶性肿瘤、息肉、食管静脉曲张、良性肿瘤等^[7]。随着对GMP认识的提高其检出率可能会上升。

由于内镜检查的直视性,其对GMP的观察应较之X线钡餐造影更敏感,更准确。本组资料中有66例先后行X线钡餐造影检查,诊断为GMP仅8例,与胃镜检查符合率12.1%。因此胃镜诊断GMP具有方便、快捷、直观等优点,克服了X线钡餐造影检查的不足^[8]。胃镜检查过程中,当窦部收缩时,胃黏膜形成多条纵行皱襞达到幽门口。很明显,如何界定正常与异常之间的区别对胃镜诊断GMP至关重要。正常情况下胃收缩时,到达幽门口的黏膜呈均匀分布,且胃窦舒张、幽门开圆时,这些纵行的皱襞都会消失。在GMP患者,通过幽门的黏膜异常粗大,与其他黏膜不

对称,且可持续存在,幽门口开全时仍存在,并导致幽门关闭不全.因此,胃镜诊断GMP要点在于:脱垂黏膜较其他正常胃黏膜异常粗大;脱垂黏膜通过幽门口进入十二指肠球部并造成幽门口关闭不全.以此为标准,本组资料在1972例胃镜检查者中检出GMP365例,检出率为18.5%.可见,GMP的存在比较普遍.

既往也有人认为,GMP多为一种可复性病变,不能作为独立性疾病^[4].在本组资料中,74例重复检查的患者其脱垂黏膜继续存在且位置恒定.因此,GMP可能为一独立疾病.

本组资料中,GMP 365例中合并各种胃炎249例,占68.2%,并发慢性胃炎比例很高.推测GMP可能是慢性胃炎的重要病因之一.黏液池发黄115例,占31.5%,GMP也可能是导致肠胃反流的重要原因之一.十二指肠胃反流的发生需要两个前提^[2]:(1)逆行的十二指肠收缩活动推动十二指肠内容物逆向移动;(2)幽门口关闭不全.任何导致胃肠道动力紊乱和解剖结构异常的因素均可能引起病理性胃黏膜脱垂,导致幽门口关闭不全造成十二指肠胃反流.近年随着胃内24 h pH监测、24 h胆红素检测等检查手段的应用,发现十二指肠胃反流也是慢性胃炎常见原因之一,并且十二指肠胃反流性慢性胃炎的临床特点、病理特点与既往描述的典型的胆汁反流性胃炎有较大的不同^[10-11].同时,胆汁反流还可导致胃黏膜的急性损害^[12],这与胃黏膜脱垂的临床症状可能有一定联系.并发反流性食管炎67例,占18.4%,发生率也比较高.幽门、十二指肠运动不协调,可使胃排空减慢胃排空延迟可能是胃食管反流病发病的重要因素^[13],而GMP导致十二指肠胃反流的过程中可能也延缓了胃的排空,进而引起食管的酸碱反流损害而形成反流性食管炎.有研究显示胆汁反流可能导致Barrett食管发病率上升,从而食管腺癌发生率亦上升^[14].这些研究结果提示,我们需要重新认识十二指肠胃反流性慢性胃炎的地位,也需要重视GMP的病理意义.

本组资料中GMP在10-80岁各年龄组均存在,以1条脱垂黏膜居多,有285例,占78.1%,2条、3条依次减少,分别为60例占16.4%和20例占5.5%.脱垂黏膜的多少是否与患者的年龄及病程有关尚有待进一步研究.脱垂黏膜的位置可以

在幽门四壁的任何方向,但绝大多数处在幽门小弯侧,共324例,占74.5%其余依次为后壁48例、前壁33例、大弯侧30例,分别占11.0%,7.6%及6.9%.*H pylori*感染率11.7%与报道相近,推测GMP与*H pylori*感染无关^[4].

传统上GMP的治疗以内科保守治疗为主,仅在出现幽门嵌顿或并发上消化道大出血及不能区别其他严重疾病,如肿瘤、多发息肉等情况时可考虑手术治疗^[2].近来,采用胃镜下微波、高频电刀治疗GMP的报道较多并取得了较好疗效^[15-17].

GMP可能为十二指肠胃反流及相应的慢性胃炎和胃食管反流及反流性食管炎的重要病因.及时诊断GMP并采取相应的针对性治疗,可望提高慢性胃炎、胃食管反流病的治疗水平,应该引起临床医师的充分重视.

4 参考文献

- 1 郑芝田. 胃肠病学: 胃黏膜脱垂症. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 1986: 246-248
- 2 于皆平, 沈志祥, 罗和生. 胃黏膜脱垂症. 实用消化病学. 第一版. 北京: 科学出版社, 1999: 547-551
- 3 李国庆, 张明亮. 胃黏膜脱垂症的内镜诊断及其微波治疗体会. 湖南医学 1999; 16: 346-347
- 4 朱元民, 刘玉兰, 张艳. 胃黏膜脱垂与慢性胃炎关系探讨. 胃肠病学和肝病学杂志 2005; 14: 178-180
- 5 陈灏珠. 实用内科学: 胃黏膜脱垂症. 第11版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 1752-1753
- 6 潘国宗, 曹世植. 现代胃肠病学: 胃黏膜脱垂症. 北京: 科学出版社, 1998: 1036-1037
- 7 陈世耀, 吴同法, 刘厚钰, 王吉耀, 张善身, 张希德. 十年内镜检查分析. 世界华人消化杂志 1999; 7: 15-17
- 8 江庆丰. 胃镜诊断胃黏膜脱垂症及微波治疗观察与探讨. 医师进修杂志 1999: 44
- 9 朱元民, 张向东, 黄勇, 刘玉兰. 胃黏膜脱垂的内镜表现. 实用医学杂志 2005; 21: 703-704
- 10 朱爱勇, 许国铭, 李兆申, 尹宁, 邹多武. 慢性胃炎患者胃内24小时胆汁监测. 中华消化杂志 2002; 22: 530-531
- 11 林金坤, 曾志荣, 高修仁, 陈为, 胡品津. 十二指肠胃反流与胃黏膜炎症关系探讨. 中华消化杂志 2004; 24: 87-89
- 12 罗和生, 陈敏. 胆汁反流与急性胃黏膜病变. 世界华人消化杂志 2005; 13: 1489-1492
- 13 李林, 杨晓川, 匡安仁, 李力霞, 欧阳钦. 胃食管反流病的胃排空功能研究. 中华核医学杂志 2000; 20: 172-174
- 14 台卫平, 张玫, 罗和生. 胆汁反流与Barrett食管及食管肿瘤. 世界华人消化杂志 2006; 14: 884-887
- 15 周国华, 冷明芳, 周红宇. 内镜下微波治疗胃黏膜脱垂症的临床研究. 中国内镜杂志 2005; 11: 539-541
- 16 沙夕华, 陈建飞. 内镜下治疗胃黏膜脱垂的观察. 山西医药杂志 2005; 34: 233-234
- 17 陈哲, 邹尤宝. 高频电圈套切除法在胃黏膜脱垂中的应用. 广西医科大学学报 2005; 22: 913-914

■同行评价

本文做了胃镜诊断胃黏膜脱垂365例的回顾性临床研究, 样本量大, 结论可靠, 有较高的临床指导意义.

电编 李琪 编辑 王晓瑜

清热化痰汤对老年胃食管反流病患者血清超氧化物歧化酶及脂质过氧化物的影响

余国英, 钟森, 徐剑刚, 李敬会, 李德梅, 余武

■背景资料

胃食管反流病是指胃、十二指肠内容物反流入食管,引起烧心、胸痛等症状,并可能导致食管炎和咽喉、气管等食管以外的组织损害的疾病,是消化系统常见病。自由基在胃肠道疾病中起重要作用,是胃黏膜的攻击因子之一。

余国英, 钟森, 徐剑刚, 李敬会, 李德梅, 余武, 鄱阳医学院附属医院 湖北省十堰市 442000

通讯作者: 余国英, 442000, 湖北省十堰市, 鄱阳医学院附属医院. yugy9888@163.com

电话: 0719-8637558 传真: 0719-8637558

收稿日期: 2006-09-28 接受日期: 2007-01-10

Effect of Qingre Huayu decoction on the contents of superoxide dismutase and lipid peroxide in old patients with gastroesophageal reflux disease

Guo-Ying Yu, Sen Zhong, Jian-Gang Xu, Jing-Hui Li, De-Mei Li, Wu Yu

Guo-Ying Yu, Sen Zhong, Jian-Gang Xu, Jing-Hui Li, De-Mei Li, Wu Yu, People's Hospital Affiliated to Yunyang Medicine College, Shiyan 442000, Hubei Province, China
Correspondence to: Guo-Ying Yu, People's Hospital Affiliated to Yunyang Medicine College, Shiyan 442000, Hubei Province, China. yugy9888@163.com

Received: 2006-09-28 Accepted: 2007-01-10

Abstract

AIM: To observe the effect of Qingre Huayu decoction (QHD) on the contents of superoxide dismutase (SOD) and lipid peroxide (LPO) in old patients with gastroesophageal reflux disease (GERD).

METHODS: A total of 160 cases of old patients with GERD were randomly divided into group A ($n = 80$) and B ($n = 80$), treated with QHD and Western medicine, respectively. The serum contents of SOD and LPO before and after treatment were detected by double antibody method and thiobarbituric acid reaction, respectively. The results were analyzed with *t*-test statistically.

RESULTS: After treatment, SOD content was increased in both groups, but got close to the normal level in group A. There was significant difference between group A and B (26.01 ± 2.56 kU/L vs 23.02 ± 2.54 kU/L, $P < 0.05$). How-

ever, the content of LPO was decreased in both groups after treatment, and there was also significant difference between group A and B (4.19 ± 0.52 mol/L vs 4.96 ± 1.13 mol/L, $P < 0.05$).

CONCLUSION: QHD has a favorable effect in the treatment of GERD by ameliorating the metabolic disorder of free radicals.

Key Words: Gastroesophageal reflux disease; Qingre Huayu decoction; Superoxide dismutase; Lipid peroxide

Yu GY, Zhong S, Xu JG, Li JH, Li DM, Yu W. Effect of Qingre Huayu decoction on the contents of superoxide dismutase and lipid peroxide in old patients with gastroesophageal reflux disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(9):1030-1033

摘要

目的: 观察清热化痰汤治疗对老年胃食管反流病患者血清超氧化物歧化酶(SOD)及脂质过氧化物(LPO)的影响。

方法: 将160例老年胃食管反流病患者随机分为观察组($n = 80$)和对照组($n = 80$),分别给予内服清热化痰汤和口服西药治疗。治疗前后分别检测血清SOD(双抗体法)和LPO(硫代巴比妥酸法)的含量,并用*t*检验方法进行统计学分析。

结果: 治疗后两组SOD含量均呈上升趋势,但观察组明显上升,且接近正常值水平,与对照组比较有显著性差异(26.01 ± 2.56 kU/L vs 23.02 ± 2.54 kU/L, $P < 0.05$);治疗后两组LPO含量均呈下降趋势,但观察组明显下降,且接近正常值水平,与对照组比较差异显著(4.19 ± 0.52 mol/L vs 4.96 ± 1.13 mol/L, $P < 0.05$)。

结论: 清热化痰汤治疗胃食管反流病,具有明显改善自由基代谢紊乱的作用。

关键词: 胃食管反流病; 清热化痰汤; 血清超氧化物歧化酶; 脂质过氧化物

余国英, 钟森, 徐剑刚, 李敬会, 李德梅, 余武. 清热化痰汤对老年胃食管反流病患者血清超氧化物歧化酶及脂质过氧化物的影响. 世界华人消化杂志 2007;15(9):1030-1033

http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1030.asp

0 引言

胃食管反流病(gastroesophageal reflux disease, GERD)是指胃、十二指肠内容物反流入食管, 引起烧心、胸痛等症状, 并可导致食管炎和咽喉、气管等食管以外的组织损害的疾病, 是消化系统常见病. 我科自2003-05/2006-04用清热化痰汤加减治疗本病, 取得了显著疗效. 为深入探讨其作用机制, 我们观察了胃食管反流病患者治疗前后血清超氧化物歧化酶(SOD)及脂质过氧化物(LPO)含量的变化, 现报告如下.

1 材料和方法

1.1 材料 160例患者均为门诊及住院病例, 随机分为两组. 观察组80例, 男65例, 女15例, 年龄60-78(平均65.6)岁; 病程2 mo-2 a, 平均为10 mo. 对照组80例, 男64例, 女16例, 年龄60-77(平均65.7)岁; 病程2 mo-2 a, 平均为9.5 mo. 两组间性别、年龄、病程及治疗前病情无显著性差异($P>0.05$). 全部病例均符合胃食管反流病诊断标准^[1]. 临床表现: 反流症状: 反酸、反胃、反食、嗝气等; 反流物刺激食管引起的症状: 烧心、胸痛、吞咽困难等; 食管以外的刺激症状: 咳嗽、哮喘及咽喉炎; 其他: 咽部不适, 异物感, 棉团感或堵塞感. 胃镜检查: 采用洛杉矶分级法. 正常: 食管黏膜没有破损; A级: 一个或一个以上食管黏膜破损, 长径 <5 mm; B级: 一个或一个以上食管黏膜破损, 长径 >5 mm, 但没有融合性病变; C级: 黏膜破损融合, 但 $<75\%$ 的食管周径; D级: 黏膜破损融合, 至少达到75%的食管周径.

1.2 方法

1.2.1 清热化痰汤加减治疗观察组 药物组成: 丹参30 g, 蒲公英30 g, 枳实12 g, 竹茹10 g, 玫瑰花10 g, 莪术12 g, 广三七粉6 g(另包冲服), 川大黄6 g, 茯苓15 g, 莱菔子15 g, 海螵蛸12 g, 甘草6 g. 加减: 烧心明显者加川黄连6 g; 反酸明显者加煅瓦楞子15 g; 疼痛明显者加延胡索10 g、川楝子6 g; 恶心呕吐者加姜半夏6 g、旋覆花6 g; 吞咽困难者加浙贝母12 g、山豆根10 g; 咽部异物感明显者加厚朴花6 g、绿萼梅6 g. 尚伴其他症状者酌情加减. 每日1剂, 水煎分2次口服. 20 d为1疗程, 间隔5 d继服, 治疗2个疗程后评定疗效.

表 1 两组治疗前后SOD和LPO含量变化的比较(mean \pm SD, $n=80$)

分组	SOD(kU/L)	LPO(mol/L)
观察组		
治疗前	19.42 \pm 2.07	5.58 \pm 1.25
治疗后	26.01 \pm 2.56 ^{bc}	4.19 \pm 0.52 ^{ac}
对照组		
治疗前	19.45 \pm 2.09	5.57 \pm 1.26
治疗后	23.02 \pm 2.54	4.96 \pm 1.13

^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ vs 治疗前; ^c $P<0.05$ vs 对照组.

1.2.2 西药治疗对照组 口服洛赛克片20 mg, 每日2次; 莫沙必利片5 mg, 每日3次. 共服8 wk后评定疗效.

1.2.3 检测方法 治疗前1 d清晨空腹抽取肘静脉血3 mL, 4000 r/min离心3 min, 吸取血清待测. SOD: 采用双抗体法; LPO: 采用硫代巴比妥酸法, 试剂盒购自上海第二军医大学. 治疗结束后, 复查上述各项检测指标.

统计学处理 数据以均值 \pm 标准差(mean \pm SD)表示, 两组间比较采用 t 检验方法.

2 结果

治疗后两组SOD含量均呈上升趋势, 但观察组明显上升, 且接近常值水平, 与对照组比较, 有显著性差异($P<0.05$); 治疗后两组LPO含量均呈下降趋势, 但观察组下降明显, 且接近常值水平, 与对照组比较, 有显著性差异($P<0.05$). 表明清热化痰汤治疗胃食管反流病, 具有明显改善自由代谢紊乱的作用(表1).

3 讨论

GERD根据其临床表现, 当属中医学“胃痛”、“反胃”、“噎膈”、“吐酸”、“嘈杂”等范畴. 中医学方面, 马银成^[2]认为是外邪入侵, 食滞肝郁等原因, 使胃气郁而不降, 胃郁日久, 易从阳化热, 中焦气滞, 运化失司, 水湿内停, 从而导致胃气不降, 湿热中阻. 吴志光^[3]认为本病病位在肝、脾(胃)两脏. 病机多为肝失疏泄, 横逆犯胃; 或脾虚湿盛, 痰浊内生; 或肝脾失和, 中焦壅滞, 邪郁胸膈, 气机升降失常. 本病初期病在气分, 后期入血分, 发为血瘀、气滞或痰瘀互结. 王贤斌 *et al*^[4]认为本病临床证候以热、实为主, 病势以上逆为特征, 多因肝胆郁热, 横逆脾胃, 脾胃升降失常, 浊气上逆所致. 黄贤樟 *et al*^[5]

■应用要点

本文观察了GERD患者治疗前后血清超氧化物歧化酶及脂质过氧化物含量的变化. 结果表明, 清热化痰汤治疗GERD, 具有明显改善自由代谢紊乱的作用. 研究者在治疗时, 贯穿清热、理气、化痰、活血于病程始终, 且根据个体差异而有所侧重并灵活加减. 全方清热化痰, 行气化痰, 健脾利湿, 切中本病病机, 能明显改善患者的临床症状, 尤对烧心、胃脘灼痛、反酸、反胃、胸骨后疼痛、口苦的改善非常明显, 值得临床进一步研究和推广应用.

同行评价

本文研究了清热化痰汤对老年胃食管反流病患者血清超氧化物歧化酶及脂质过氧化物的影响,方法可靠,结果可信,所选病例亦较多,有一定的临床指导意义。

认为病机关键在于胃气上逆,酸水泛滥,且认为本病病机与肺肝功能失调有密切关系。王晞星 *et al*^[6]认为本病病在食管,属胃所主;胃失和降,胃气上逆是其基本病机;情志不畅,肝气犯胃是其发病关键;气机郁滞,郁久化热,是其传变特点;痰浊血瘀是其最终结局。现代医学认为^[7]:本病的主要发病机制是下食管括约肌功能降低,尤其是一过性下食管括约肌松弛是引起胃食管反流的主要因素。另外,胃食管黏膜防御平衡机制遭到攻击因子如胃酸、胃蛋白酶等破坏;其次,因病变后造成其功能紊乱,也是发病的重要因素。

正常人体内存在清除氧自由基的防御系统,使其生成量不至于达到损伤组织的程度。机体自身抗氧化系统主要包括酶系清除系统和非酶系清除系统。前者包括SOD、过氧化氢酶(CAT)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)等;后者包括维生素E、A、C和硒,以及半胱氨酸和谷胱甘肽等。SOD活力在一定程度上反映了机体的抗氧化能力^[8]。LPO是氧自由基作用于细胞生物膜上的多不饱和脂肪酸形成的代谢产物。在人体内LPO含量的多少反映了氧自由基对细胞膜性结构的氧化程度,并反映了体内脂质过氧化的速度和强度,脂质过氧化是氧自由基引起组织损伤的主要机制^[9]。

机体清除氧自由基的能力是有限的,氧自由基产生过多时,就会造成组织损伤^[10-11]。氧自由基具有杀菌、细胞毒和促进炎症渗出、水肿等重要炎症介质作用。由于氧自由基作用的靶细胞和分子无特异选择性,故氧自由基在参与杀菌等防御作用的同时,也会给组织细胞造成损伤。幽门螺旋杆菌(*H pylori*)感染、非甾体类抗炎药(NSAIDs)、乙醇等坏死因子、缺血再灌注损伤、应激、幽门结扎等所致胃黏膜损伤的模型中,均涉及氧自由基的作用。可以认为,氧自由基参与了绝大多数致溃疡因子的致病过程,与慢性胃炎、急性胃黏膜损伤、胃溃疡和胃癌的形成有密切关系^[12-14]。Sakai *et al*^[15]研究兔胃黏膜氧自由基的变化,发现胃黏膜损伤与氧自由基有密切关系。Brzozowski *et al*^[16]研究证实阿司匹林所致的急性胃黏膜病变过程中存在氧自由基反应,黏膜组织中LPO产物丙二醛(MDA)的含量明显增高。其他一些研究也支持上述观点,但详细机制有待进一步研究^[17-19]。

清热化痰汤以蒲公英清热解毒、丹参活血化瘀为主,莪术、三七粉共奏活血化瘀之效,辅

以竹茹清热化痰,枳实化痰消积,玫瑰花行气解郁,莱菔子降气化痰,大黄清热泻火,茯苓健脾利湿,海螵蛸固涩止酸。加减药中川黄连清热燥湿,煅瓦楞子制酸止痛,延胡索、川楝子活血行气止痛,姜半夏、旋覆花和胃降逆止呕,浙贝母、山豆根清热散结利咽,厚朴花、绿萼梅可疏肝理气化痰。全方清热化痰,行气化痰,健脾利湿,本研究表明其能显著提高患者血清SOD活性,抑制血浆脂质过氧化反应,具有明显改善自由基代谢紊乱的作用,值得深入研究。

参考文献

- 1 孙传兴. 临床疾病诊断依据治愈好转标准. 第2版. 北京: 人民军医出版社, 2002: 69-70
- 2 马银成. 清热化湿和胃降逆法治疗反流性食管炎30例. 河北中医 2000; 22: 186
- 3 吴志光. 中西医结合治疗反流性食管炎疗效观察. 河北中医 1999; 21: 311
- 4 王贤斌, 傅赛萍. 经方组合治疗反流性食管炎. 湖北中医杂志 1997; 19: 20-21
- 5 黄贤樟, 邝卫红. 反流性食管炎的中医病机及临床治疗探讨. 新中医 1998; 30: 3-5
- 6 王晞星, 李廷荃, 肖汉玺从肝论治反流性食管炎经验. 中国中西医结合脾胃杂志 2000; 8: 38
- 7 叶任高, 陆再英. 内科学. 第6版. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 369-373
- 8 袁英, 孙阿娟, 谢元华, 孙超, 马文珠. 电针“足三里”对胃黏膜损伤大鼠SOD、MDA影响的时效关系. 针刺研究 2005; 30: 29-30
- 9 陆为民, 单兆伟, 沈洪, 吴静, 王丽珠, 王瑶. 胃舒胶囊对大鼠萎缩性胃炎癌前病变血液LPO、SOD、GSH-PX的影响. 世界华人消化杂志 2000; 8: 480-481
- 10 Waluga M, Hartleb M. Alcoholic liver disease. *Wiad Lek* 2003; 56: 61-70
- 11 Baldari CT, Lanzavecchia A, Telford JL. Immune subversion by *Helicobacter pylori*. *Trends Immunol* 2005; 26: 199-207
- 12 Muraoka S, Miura T. Salicylic acid-induced inactivation of creatine kinase in the presence of lactoperoxidase and H₂O₂. *Chem Biol Interact* 2005; 151: 63-70
- 13 Villegas I, Martin AR, Toma W, de la Lastra CA. Rosiglitazone, an agonist of peroxisome proliferator-activated receptor gamma, protects against gastric ischemia-reperfusion damage in rats: role of oxygen free radicals generation. *Eur J Pharmacol* 2004; 505: 195-203
- 14 De Luca A, Iaquinto G. *Helicobacter pylori* and gastric diseases: a dangerous association. *Cancer Lett* 2004; 213: 1-10
- 15 Sakai H, Ohira Y, Tanaka A, Suzuki T, Ikari A, Morii M, Takeguchi N. Inhibition of small-conductance Cl⁻ channels by the interleukin-1beta-stimulated production of superoxide in rabbit gastric parietal cells. *J Physiol* 2003; 551: 207-217
- 16 Brzozowski T, Konturek PC, Konturek SJ, Kwiecien S, Sliwowski Z, Pajdo R, Duda A, Ptak A, Hahn EG. Implications of reactive oxygen species and cytokines in gastroprotection against stress-induced gastric damage by nitric oxide releasing aspirin. *Int J Colorectal Dis* 2003; 18: 320-329
- 17 Brzozowski T, Kwiecien S, Konturek PC, Konturek

- SJ, Mitis-Musiol M, Duda A, Bielanski W, Hahn EG. Comparison of nitric oxide-releasing NSAID and vitamin C with classic NSAID in healing of chronic gastric ulcers; involvement of reactive oxygen species. *Med Sci Monit* 2001; 7: 592-599
- 18 Pohle T, Brzozowski T, Becker JC, Van der Voort IR, Markmann A, Konturek SJ, Moniczewski A, Domschke W, Konturek JW. Role of reactive oxygen metabolites in aspirin-induced gastric damage in humans: gastroprotection by vitamin C. *Aliment Pharmacol Ther* 2001; 15: 677-687
- 19 Izgut-Uysal VN, Agac A, Derin N. Effect of carnitine on stress-induced lipid peroxidation in rat gastric mucosa. *J Gastroenterol* 2001; 36: 231-236

电编 张敏 编辑 王晓瑜

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

肝胆胰外科领域新技术研讨会通知

本刊讯 为了推动肝胆胰外科临床及科研工作的深入开展, 由哈尔滨医科大学附属第一医院肝胆胰外科与《World Journal of Gastroenterology》杂志共同举办的国家继续教育项目“肝胆胰外科领域新技术研讨会”拟于2007-08-03/05在哈尔滨召开。届时将邀请日本及国内肝胆胰领域知名专家进行讲座和学术交流, 会议将对活体肝移植供受体手术、肝脏手术、血管技术在肝胆胰手术中的应用、如何提高胰十二指肠手术切除率以及生物人工肝脏等技术的新进展进行深入讨论, 学习该领域国内外先进技术和理念, 促进学术交流和学科发展。与会者将被授予国家I类继续教育学分12分。欢迎各位肝胆胰及相关领域同仁参加。

通讯地址: 黑龙江省哈尔滨市南岗区邮政街23号, 哈尔滨医科大学附属第一医院肝胆胰腺外科 邮编: 150001 联系人: 吴祥松 电话: 0451-53643849-5721, 13633621389 E-mail: wxs417@yahoo.com.cn

收费标准: 500元(含资料费及午间工作餐, 统一安排食宿, 费用自理)。报到日期: 2007-08-02。

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

第三届全军胃肠外科学术会议暨 2007年普通外科高峰论坛征文通知

本刊讯 全军胃肠外科学术委员会定于2007-06月上旬在贵阳市召开“第三届全军胃肠外科学术会议暨2007年普通外科高峰论坛”。会议将邀请国内、军内著名外科专家, 对热点问题作专题演讲与探讨。代表获得国家继续医学教育I类学分。

1 征文内容

(1)胃肠外科和普通外科的新进展、新技术、新手术、新经验; (2)实验研究; (3)腹腔镜手术; (4)围手术期肿瘤放化疗; (5)围手术期营养支持; (6)围手术期护理等。

2 征文要求

论文全文和摘要(600字左右)各一份, 并附拷贝软盘, 请寄: 100700北京市东城区南门仓5号 北京军区总医院全军普通外科中心 李世拥 收; 电话: 010-66721188; 截稿日期: 2007-05-01。

腹腔镜胆囊切除联合内镜乳头括约肌切开 I 期治疗胆道结石15例

何忠野, 郭仁宣

■背景资料

随着外科微创技术的发展, 腹腔镜胆囊切除术、内镜逆行性胰胆管造影及内镜乳头括约肌切开取石在胆囊、胆总管结石治疗中的作用日益明显。

何忠野, 郭仁宣, 中国医科大学附属第一医院普外科 辽宁省沈阳市 110001

通讯作者: 郭仁宣, 110001, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学附属第一医院普外科. hzy1971@163.com
电话: 024-81793381

收稿日期: 2007-01-12 接受日期: 2007-01-31

Treatment of cholecystocholedocholithiasis by single-stage laparoscopic cholecystectomy combined with endoscopic sphincterotomy: an analysis of 15 cases

Zhong-Ye He, Ren-Xuan Guo

Zhong-Ye He, Ren-Xuan Guo, Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Correspondence to: Ren-Xuan Guo, Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. hzy1971@163.com

Received: 2007-01-12 Accepted: 2007-01-31

Abstract

AIM: To evaluate the clinical values of laparoscopic cholecystectomy (LC) combined with endoscopic sphincterotomy (EST) in treatment of patients with cholecystocholedocholithiasis.

METHODS: Fifteen cases, diagnosed with cholecystocholedocholithiasis by B-ultrasound and magnetic resonance cholangiopancreatography (MRCP), were selected in this study. EST was firstly performed, and then LC operation was achieved. After the operation, the following measures were administrated, such as fasting, water deprivation, liquid supplement, reducing the activity of pancreatin and anti-inflammatory therapy. Meanwhile, the level of blood amylase was monitored.

RESULTS: EST was successfully accomplished in all the 15 cases. A little haemorrhage occurred in 1 case after the operation. Three cases ex-

hibited high amylase level temporarily, but no pancreatitis appeared. All the patients recovered well after the operation, and no severe complications were observed. The in-hospital time was 5 to 7 days, and a favorable result of following up was obtained.

CONCLUSION: The single-stage LC combined with EST is feasible and safe in the treatment of patients with cholecystocholedocholithiasis.

Key Words: Cholecystocholedocholithiasis; Laparoscopic cholecystectomy; Endoscopic sphincterotomy

He ZY, Guo RX. Treatment of cholecystocholedocholithiasis by single-stage laparoscopic cholecystectomy combined with endoscopic sphincterotomy: an analysis of 15 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(9):1034-1036

摘要

目的: 探讨联合应用腹腔镜胆囊切除术(laparoscopic cholecystectomy, LC)和内镜乳头括约肌切开(endoscopic sphincterotomy, EST)胆总管取石 I 期治疗胆囊及胆总管结石的临床应用价值。

方法: 对15例胆囊及胆总管结石患者(术前经B超及MRCP确诊)行EST, 胆总管取石成功后行三孔法LC手术。术后禁食、禁水、补液支持治疗, 抑制胰酶活性并预防性抗炎治疗, 同时监测血淀粉酶。

结果: 15例EST均获成功。1例有少量出血后止, 3例出现一过性血淀粉酶升高, 但无胰腺炎发生。患者术后均恢复顺利, 术中和术后无严重并发症发生, 术后5-7 d出院。随访治疗效果满意。

结论: LC联合应用EST取石 I 期治疗胆囊及胆总管结石切实可行, 该方法具有微创、安全的特点, 充分发挥了微创外科手术的优势。

关键词: 胆总管结石; 腹腔镜胆囊切除术; 括约肌切开取石术

何忠野, 郭仁宣. 腹腔镜胆囊切除联合内镜乳头括约肌切开 I 期治疗胆道结石 15 例. 世界华人消化杂志 2007;15(9):1034-1036
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1034.asp>

0 引言

随着外科微创技术的发展, 腹腔镜胆囊切除术(laparoscopic cholecystectomy, LC), 内镜逆行性胰胆管造影(endoscopic retrograde cholangiopancreatography, ERCP)及内镜乳头括约肌切开取石(endoscopic sphincterotomy, EST)在胆囊、胆总管结石治疗中的作用日益明显. 我们 2001-05/2006-05 联合应用 LC+EST I 期治疗胆囊及胆总管结石 15 例, 取得满意效果, 现报告如下.

1 材料和方法

1.1 材料 慢性结石性胆囊炎患者 15 例, 男 6 例、女 9 例, 年龄 35-76(平均 57)岁. 其中 4 例近期有胆绞痛发作病史, 全组患者均无黄疸及发热症状, 无心、肺、肝、肾等重要器官功能损害及其他手术禁忌症. B 超提示, 胆囊多发结石、胆囊炎, 胆囊壁厚 3-5(平均 4.1) mm, 胆总管内有结石. 进而磁共振胰胆管造影(magnetic resonance cholangiopancreatography, MRCP)显示, 胆总管内结石直径为 5-12(平均 9) mm, 胆总管直径 8-13(平均 11) mm.

1.2 方法 全麻后插入十二指肠镜选择性胆管造影成功后, 行 EST 取石. EST 切口长度为 10-15 mm, 沿 11-12 点方向切开, 对于直径 >10 mm 难于取出的结石, 在 EST 后通过网篮机械碎石后取出, 所有患者均常规行鼻胆管引流. 胆总管取石成功后行三孔法 LC 手术. 术后禁食、禁水、补液支持治疗. 给甲磺酸加贝酯 300 mg, 每日 2 次, 抑制胰酶活性, 预防胰腺炎发生. 同时, 预防性应用三代头孢菌素抗炎治疗. 并监测血淀粉酶, 在血淀粉酶恢复正常 48 h 后, 拔除鼻胆管引流, 进食. LC 术后腹腔引流无液体引出后 48 h, 拔除腹腔引流管.

2 结果

15 例 EST 均获成功, 其中 2 例因结石较大, 应用机械碎石后取出; 1 例 EST 术中见少量出血, 用 1:1000 去甲肾上腺素喷洒及烧灼后止血; 3 例出现一过性血淀粉酶升高, 但无胰腺炎发生. 15 例患者术后均恢复顺利, 术后 5-7 d 出院. 所有患者随访 3 mo-1 a, 平均 8 mo, 未发现胆管结石复发、残留及胆管狭窄, 也无腹痛、发热、黄疸等症

状发生.

3 讨论

胆囊结石伴有胆总管结石占 12%-20%^[1]. 随着 LC 广泛开展和内镜技术的发展, 内镜与 LC 结合治疗胆囊及胆总管结石的报道日益增多. 但通常的方法是两者分期进行^[2], 这一治疗方案的缺点是: 治疗步骤繁琐, 患者住院时间较长. 另外, 先行 LC 术后, 再进行 EST, 如果取石失败, 则需要开腹手术, 增加了患者的痛苦, 从而失去微创手术的意义. 如果 EST 取石后再行 LC 手术, 在二次操作间期结石有可能移入胆总管, 造成 LC 术后胆总管残余结石率升高^[3]. 为此, 我们对 EST+LC 联合应用 I 期治疗胆囊及胆总管结石的方法进行了初步探索, 取得了一定经验.

总结本组经验, 我们认为选择 I 期联合治疗胆囊及胆总管结石的手术适应症是: 近期(3-6 mo)无发热、黄疸症状; 血常规白细胞计数正常; B 超检查提示: 胆囊结石, 胆囊壁厚 <5 mm, 胆囊无明显萎缩, 胆总管内无结石; 进一步进行 MRCP 显示胆总管走行直径接近正常, 胆总管内结石直径 <15 mm. 在手术实施中, 我们认为先行 EST 再进行 LC 手术为佳, 理由是: EST 同时进行胆道选择性造影, 可以进一步了解胆道内结构, 避免了 LC 手术时的胆道损伤; 当结石较大或胆道异常时导致 EST 取石失败, 则可中转开腹, 避免了盲目行 LC 手术.

EST+LC 联合 I 期治疗胆囊及胆总管结石, 可以一次性治愈疾病, 缩短住院时间, 减轻患者痛苦. 而且, 术中胆道选择性造影及术后鼻胆管引流, 可以在 LC 手术前后进一步了解胆道的情况, 从而增加了 LC 手术的安全性. 二者几乎同时进行, 也避免了以往 EST 及 LC 分期进行时在治疗间期结石排入胆总管, 减少了 LC 术后胆总管结石残留、复发的可能性. 两种技术同时应用, 取长补短, 进一步放大了微创手术的优势. 当然, EST 联合 LC I 期手术, 需要内镜医生和外科医生同期配合, 在临床应用上有一定难度, 使这一技术的临床可操作性下降^[4]. 因此在早期开展阶段, 需要形成一个较为固定的治疗小组, 包括富有经验的 LC 医师、EST 内镜医师及熟练的器械护士. 同时应该严格把握手术适应症, 以逐步提高这一技术的治疗成功率.

4 参考文献

- 1 Duensing RA, Williams RA, Collins JC, Wilson SE. Managing choledocholithiasis in the laparoscopic

■同行评价

胆总管结石合并胆囊结石是临床常见的疾病, 常可引起急性胰腺炎、化脓性胆管炎等, 目前微创治疗可取得良好的疗效. 以往对同时患有上述两种疾病的患者是采取分步手术的方法, 作者探讨了将两种手术结合起来的治疗方法, 具有很好的临床意义, 如果可推广可降低患者的治疗费用, 减少并发症的发生率. 但如何选择患者, 如何达到较好的治疗目的还需进一步研究, 增加病例数.

- era. *Am J Surg* 1995; 170: 619-623
- 2 所广军, 张辉, 赵中辛. 腹腔镜胆囊切除联合逆行胰胆管造影术在胆总管结石治疗中的应用. *外科理论与实践* 2005; 10: 559-560
- 3 De Palma GD, Angrisani L, Lorenzo M, Di Matteo E, Catanzano C, Persico G, Tesaro B. Laparoscopic cholecystectomy (LC), intraoperative endoscopic sphincterotomy (ES), and common bile duct stones (CBDS) extraction for management of patients with cholecystocholedocholithiasis. *Surg Endosc* 1996; 10: 649-652
- 4 刘扬, 宗明, 龚彪, 姚晓平, 吴孟超. 腹腔镜胆囊切除结合内镜Oddi's括约肌切开取石二期治疗胆道结石. *肝胆胰外科杂志* 2003; 15: 239-240

电编 张敏 编辑 张焕兰

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

第七届全国消化道恶性病变介入诊疗暨第四届 消化介入新技术研讨会会议及征文通知

本刊讯 第七届全国消化道恶性病变介入诊疗研讨会是卫生部“十年百项”适宜技术推广、上海市重大医学成果转化及国家级继续医学教育项目, 为进一步提升国内消化系疾病尤其是消化道恶性病变介入诊治的技术水平, 我们联合上海同仁医院、山东省立医院和山东省医学影像研究所, 定于2007-09-21/25在山东省济南市举办第七届全国消化道恶性病变介入诊疗暨消化介入新技术研讨会, 参会者可获得国家级一类继续医学教育学分12分. 会议将以专题讲座、论文交流、操作演示及研讨沙龙多种形式相结合, 安排相关学科的著名专家着重介绍消化道病变内镜治疗、介入放射学治疗、外科治疗、肿瘤化学治疗的新理论、新技术和新方法.

1 征文内容

包括消化道恶性病变内镜治疗、介入放射治疗、外科治疗、肿瘤化学治疗、生物治疗及免疫治疗等. 消化系良性病变如门静脉高压、胆道结石、消化道出血等的内镜及介入新技术应用. 消化病诊治边沿交叉学科与消化介入诊治新技术相关的论著、文献综述、临床经验、个案报告等各类稿件.

2 征文要求

专题讲座由组委会约稿, 也可自荐, 需全文. 论著需1000字以内的标准论文摘要, 经验交流、短篇报道等全文限1000字以内. 所有稿件内容应科学、创新、实用、数据准确, 书写规范, 稿件应是未发表过的论文, 优秀论文将安排在国家级杂志上发表. 所有稿件一律要求电脑打印(WORD格式), 邮寄者需附软盘; 特别鼓励用E-mail投稿(用附件WORD格式). 截稿日期: 2007-07-31. 征集疑难病例: 会议将安排专门时间研讨疑难病例, 欢迎与会代表将临床中遇到的疑难病例带到会上讨论. 通信地址: 山东省立医院消化科张春清收, 济南市经五路纬七路324号, 邮编: 250021. 联系电话: 0531-85186350, 86701337; 传真: 0531-87902348; 手机: 0531-86701339. E-mail: zhchqing@medmail.com.cn.

大肠癌患者的临床、病理及预后分析576例

赖琳, 詹俊, 李楚强, 于钟, 姚和瑞

赖琳, 湖北省恩施州中心医院肿瘤科 湖北省恩施市 445000
詹俊, 李楚强, 于钟, 姚和瑞, 中山大学附属第二医院消化内科 广东省广州市 510120
通讯作者: 詹俊, 510120, 广东省广州市沿江西路107号, 中山大学附属第二医院消化内科. lotussnowyh@yahoo.com.cn
电话: 020-81332598 传真: 020-81332244
收稿日期: 2006-12-26 接受日期: 2007-01-27

Analysis on clinicopathological characteristics and prognosis of 576 patients with primary colorectal cancer

Lin Lai, Jun Zhan, Chu-Qiang Li, Zhong Yu, He-Rui Yao

Lin Lai, Department of Oncology, Central Hospital of Enshi Prefecture, Enshi 445000, Hubei Province, China
Jun Zhan, Chu-Qiang Li, Zhong Yu, He-Rui Yao, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510120, Guangdong Province, China
Correspondence to: Jun Zhan, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510120, Guangdong Province, China. lotussnowyh@yahoo.com.cn
Received: 2006-12-26 Accepted: 2007-01-27

Abstract

AIM: To analyze the clinicopathological characteristics of primary colorectal cancer and explore the influencing factors on the prognosis of patients.

METHODS: The clinical data of 576 patients with colorectal cancer diagnosed by colonoscopy during the past five years in the second affiliated hospital of Sun Yat-Sen University were analyzed retrospectively.

RESULTS: The occurrence rate of colorectal cancer was not significantly different between patients of different ages. The frequency of abdominal pain ($\chi^2 = 7.20, P < 0.05$), the proportion of mucinous adenocarcinoma ($\chi^2 = 43.71, P < 0.05$) and the rate of lymph node metastasis ($\chi^2 = 4.47, P < 0.05$) in adolescent group were significantly higher than those in the mid-aged and aged one. The number of thin individuals was markedly higher in the aged group than that in

the adolescent and mid-aged group ($\chi^2 = 9.64, P < 0.05$). High differentiation was also observed in the aged patients ($\chi^2 = 8.06, P < 0.05$). The overall 5-year survival rate was 61.79% (43.64%, 87.16% and 53.79% in the adolescent, mid-aged, and aged patients, respectively). The prognosis of colorectal cancer was associated with the age, tumor cell differentiation, lymph node metastasis, Dukes stages and the radical operation.

CONCLUSION: The frequency of abdominal pain, the malignant degree and the proportion of lymph node metastasis are the highest in the young patients. Age and Dukes staging are the independent factors correlated with the prognosis.

Key Words: Colorectal cancer; Age; Pathology; Prognosis

Lai L, Zhan J, Li CQ, Yu Z, Yao HR. Analysis on clinicopathological characteristics and prognosis of 576 patients with primary colorectal cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(9):1037-1040

摘要

目的: 分析不同年龄组大肠癌患者的临床特点并探讨影响大肠癌预后的因素。

方法: 对近5 a我院576例大肠癌患者进行回顾性分析, 比较不同年龄组大肠癌患者的临床、病理及预后资料。

结果: 不同年龄组之间各部位大肠癌发生率无显著性差异。腹痛在青年组中发生频率显著高于中年组和老年组($\chi^2 = 7.20, P < 0.05$); 消瘦在老年组中发生频率显著高于青年组和中年组($\chi^2 = 9.64, P < 0.05$)。与中年组和老年组相比青年组黏液腺癌发生率高($\chi^2 = 43.71, P < 0.05$), 老年组高分化癌发生率高($\chi^2 = 8.06, P < 0.05$)。青年组淋巴结转移率较老年组高($\chi^2 = 4.47, P < 0.05$)。总体5 a生存率为61.79%±5.48%; 青年组、中年组、老年组5 a生存率分别为43.64%±21.24%, 87.16%±5.44%和53.79%±6.69%, 3组间差异显著($P < 0.05$)。影响大肠癌患者预后的因素有年龄、肿瘤细胞分化程

■背景资料

大肠癌是世界上最常见的恶性肿瘤之一, 预后较差。近年来研究发现大肠癌的发病特点发生了变化: 大肠癌的发病部位由远端向近端转移, 此外, 不同年龄阶段的大肠癌患者, 在临床、病理、预后等各方面都有所不同, 但各家意见仍存在很多不一致。

■创新盘点

本文对576例大肠癌的临床、病理及预后做了相关的统计学分析,总结了青年和老年大肠癌的特点及影响大肠癌患者预后的独立因素。年龄造成预后差异性的原因,多数人认为可能是青年患者黏液腺癌和低分化癌比例高及淋巴结转移率高,肿瘤侵袭性强,或延迟诊断的时间长,确诊时多已为中晚期而造成的。但本研究经多因素分析,年龄仍是影响预后的独立性因素。

度、有无淋巴结转移、Dukes分期、是否根治性手术。

结论: 青年大肠癌患者腹痛多见,恶性程度高,淋巴结转移常见,预后差。老年患者消瘦多见,癌肿分化好,预后较好。影响大肠癌患者预后的独立因素有年龄、Dukes分期等。

关键词: 大肠癌; 年龄; 病理; 预后

赖琳, 詹俊, 李楚强, 于钟, 姚和瑞. 大肠癌患者的临床、病理及预后分析576例. 世界华人消化杂志 2007;15(9):1037-1040

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1037.asp>

0 引言

大肠癌(colorectal cancer, CRC)是人类最常见的恶性肿瘤之一,其发病率呈上升趋势^[1-2]。本研究通过对近5 a我院576例大肠癌患者进行回顾性分层分析,按年龄分为青年组(<40岁),中年组(40-59岁),老年组(≥60岁),比较不同年龄组大肠癌患者的临床、病理、预后资料,探讨不同年龄组大肠癌患者的特点。

1 材料和方法

1.1 材料 1999-08/2004-08于中山大学附属第二医院行OlympusCF-130I电子结肠镜检查经临床和病理确诊为大肠癌,排除大肠癌手术后复查患者576例。病理分期参照1984年全国大肠癌临床病理分期方案^[3]。年龄16-92(中位62)岁。青年组61例;中年组189例;老年组326例。男306例,女270例。

1.2 方法 2004-12/2005-03随访患者的生存情况,包括目前的健康状况或死亡时间,死亡原因等。随访方式采用电话、信访、人访相结合。根据随访资料,用直接法计算手术后的生存时间(未手术者,计算结肠镜检查之后的生存时间)。非大肠癌死亡按失访处理。资料收集后能进行随访者229例,获得随访资料141例,随访率61.57%。

统计学处理 用SPSS11.0软件进行处理, $P<0.05$ (双侧)表示差异有统计学意义。计数资料率的比较采用 χ^2 检验。生存率的计算采用Kaplan-Meier法并采用Log-Rank检验。单因素分析有意义的变量,通过变量逐步引入的方法进入COX风险比例函数模型分析。

2 结果

2.1 大肠癌的临床、病理特点 将整个大肠分为三段:右半结肠(盲肠至横结肠)、左半结肠(降

表1 青年组、中年组、老年组主要症状分布情况

症状	青年组(%) (n = 57)	中年组(%) (n = 151)	老年组(%) (n = 270)	χ^2 值	P值
大便习惯 性状改变	40(70.18)	90(59.60)	173(64.07)	2.12	0.34
血便	33(57.89)	88(58.28)	156(57.78)	0.01	0.99
腹痛	32(56.14)	68(45.03)	102(37.78)	7.20	0.02
腹部包块	7(12.28)	15(9.93)	14(5.19)	5.23	0.07
肛门肿物	0(0.00)	1(0.66)	3(1.11)	0.78	0.67
肠梗阻	2(3.51)	6(3.97)	12(4.44)	0.13	0.93
消瘦	5(8.77)	17(11.26)	57(21.11)	9.64	0.01
贫血	6(10.53)	9(5.96)	13(4.81)	2.79	0.24
肠外表现	2(3.51)	0(0.00)	2(0.74)	6.21	0.04

结肠及乙状结肠)、直肠。青年组、中年组、老年组右半结肠癌各有16例(26.23%)、52例(27.51%)、72例(22.09%);左半结肠癌各有16例(26.23%)、61例(32.28%)、107例(32.82%);直肠癌各有26例(42.62%)、71例(37.56%)、134例(41.10%);多原发癌各有3例(4.92%)、5例(2.65%)、13例(3.99%)。经 χ^2 检验,各组在各段癌肿发生率无显著性差异($P>0.05$)。

青年组、中年组、老年组有疾病症状记载者分别为57例、151例、270例。三组症状的分布情况见表1。经 χ^2 检验,青年组中腹痛、肠外表现发生频率明显高于中年组、老年组,差异显著($P<0.05$);老年组消瘦的发生频率明显高于青年组、中年组,差异显著($P<0.05$);其余各症状在各组间出现的频率均未发现有显著性差异($P>0.05$)。

青年组癌肿隆起型、溃疡型、浸润型各有36例(59.02%)、6例(9.84%)、18例(29.51%),1例同时具有隆起型和溃疡型(1.63%)。中年组分别为117例(61.90%)、27例(14.29%)、44例(23.28%),1例同时具有隆起型和溃疡型(0.53%)。老年组分别为219例(67.18%)、33例(10.12%)、71例(21.78%),1例同时具有隆起型和溃疡型(0.31%),2例同时具有隆起型和浸润型(0.61%)。经 χ^2 检验,三组癌肿大体病理类型无显著性差异($P>0.05$)。

青年组、中年组、老年组管状腺癌各有36例(59.01%)、149例(80.98%)、266例(81.85%);黏液腺癌各有15例(24.59%)、12例(6.52%)、8例(2.46%)。经 χ^2 检验,三组间管状腺癌、黏液腺癌有显著性差异(χ^2 值分别为16.77, 43.71, $P = 0.00<0.05$)。其中,青年组、中年组、老年组高分化腺癌分别有13例(43.33%)、85例(64.39%)、

158例(69.30%), 中分化腺癌分别有12例(40.00%)、38例(28.79%)、57例(25.00%), 低分化腺癌分别有5例(16.67%)、9例(6.82%)、13例(5.70%)。经 χ^2 检验, 三组之间高分化腺癌所占比例、青年组与老年组之间低分化所占比例有显著性差异(χ^2 值分别为8.06, 4.91, $P=0.02<0.05$)。

三组有转移情况记载者各有30例、69例、140例。其中青年组、中年组、老年组有淋巴结转移者各有16例(53.33%)、30例(43.48%)、46例(32.86%); 有远处器官转移者三组各有6例(20.00%)、12例(17.39%)、37例(26.43%)。青年组淋巴结转移率高于老年组($\chi^2=4.47$, $P=0.03<0.05$); 三组癌肿远处器官转移率无显著性差异($P>0.05$)。

2.2 大肠癌患者的生存情况 资料收集后能进行随访者229例, 获得随访资料141例, 随访率61.57%。各组5 a生存率及预后因素的筛选情况见表2。

单因素分析结果: 与大肠癌患者预后的相关因素有年龄、分化程度、有无淋巴结转移、Dukes分期、是否根治性手术, 而性别、肿瘤部位、大体类型、组织学类型与预后无关。

多因素分析结果: 将上述单因素分析中有意义的变量引入COX模型分析, 结果显示Dukes分期和年龄是影响大肠癌患者预后的独立因素, 分期越晚, 预后越差, Dukes分期每增加一级, 其死亡的相对风险就增加2.68倍。中年组预后最好, 老年组次之, 青年组预后最差。青年组与老年组相比, 其死亡的相对风险是老年组的1.164倍; 中年组与老年组相比, 其死亡的相对风险是0.301倍。

3 讨论

近年来报告大肠癌的发病部位右移, 即右半结肠癌发生率高^[4-5]。但不同年龄组大肠癌的解剖部位分布, 国内外报告尚不一致, 有报告老年患者右半结肠癌发生率高^[6-7], 也有报告青年患者右半结肠癌发生率高^[8-9], 还有报告解剖分布上无显著性差异^[10-11], 本研究显示各年龄组右半结肠癌、左半结肠癌、直肠癌的发生率并无显著性差异, 与谢正勇 *et al*^[10]报告一致。

年龄对大肠癌的临床症状、病理、生物学行为有一定影响。青年组的腹痛发生频率明显高于中年组、老年组。可能由于青年人痛觉较为敏感, 耐受性差, 而老年人反应迟钝有关。提醒我们在青年人出现无法解释的腹痛时, 及早

表2 大肠癌患者预后因素筛选情况

备选因素	n	5 a生存率 \pm SE(%)	χ^2 值	P值
年龄			8.46	0.01
青年	11	43.64 \pm 21.24		
中年	45	87.16 \pm 5.44		
老年	85	53.79 \pm 6.69		
性别			0.06	0.80
男	70	57.99 \pm 9.01		
女	71	64.91 \pm 6.37		
肿瘤部位			0.66	0.71
右半结肠	41	67.47 \pm 8.64		
左半结肠	47	55.76 \pm 10.53		
直肠	53	63.72 \pm 8.24		
大体类型			2.56	0.27
隆起型	120	57.83 \pm 6.12		
溃疡型	9	88.89 \pm 10.48		
浸润型	12	83.33 \pm 10.76		
组织学类型			1.50	0.22
非黏液腺癌	126	59.42 \pm 5.85		
黏液腺癌	15	86.67 \pm 8.78		
分化程度			6.71	0.03
高分化	82	65.16 \pm 7.45		
中分化	48	66.14 \pm 7.80		
低分化	11	27.71 \pm 15.37		
淋巴结转移			5.50	0.01
有	49	45.79 \pm 10.11		
无	64	75.75 \pm 6.18		
Dukes分期			40.43	0.00
A	16	93.75 \pm 6.05		
B	39	75.98 \pm 8.73		
C	35	56.72 \pm 13.13		
D	32	13.79 \pm 10.61		
手术			15.31	0.00
根治术	101	67.74 \pm 5.79		
姑息术或未手术	28	20.77 \pm 15.45		

■应用要点

近年来大肠癌的发病特点发生了变化, 不同年龄阶段的大肠癌患者临床、病理、预后等各方面都有所不同, 本研究可增加临床医师对本病的认识, 提高警惕, 早期发现、早期诊断、早期治疗, 最大限度地改善大肠癌患者的生存状况。

进行结肠镜检查, 以达到早期诊断、早期治疗^[9]。青年组中黏液腺癌所占比例高于中年组、老年组, 低分化所占比例高于老年组, 与文献[11-13]一致。提示青年患者肿瘤恶性程度比较高。至于为什么青年患者黏液腺癌多见, 其机制尚有待探讨。另外, 青年组淋巴结转移率高于老年组, 可能与青年组黏液腺癌多见有关。Kanemitsu *et al*^[14]报道, 黏液腺癌淋巴结转移率高。此外, 赵川 *et al*^[15]研究表明c-erbB-2蛋白的阳性表达与大肠癌的淋巴结转移呈显著的正相关, nm23蛋白的阳性表达与淋巴结转移呈负相关。而青年大肠癌c-erbB-2蛋白表达高, nm23蛋白表达低, 可能是造成青年大肠癌淋巴结转移率高的分子生

■同行评价

本文对576例大肠癌的临床、病理及预后做了相关的统计学分析,得出了青年患者腹痛多见,恶性程度高,淋巴结转移常见,预后差。老年患者消瘦多见,癌肿分化好,预后较好,影响大肠癌患者预后的独立因素有年龄、Dukes分期等结论。此研究样本量较大,统计学分析尚可靠,有较高的临床价值。

物学机制。

癌肿的预后是我们最关心的问题,本研究显示年龄和Dukes分期是影响大肠癌患者预后的独立因素。本研究中,青年组、中年组、老年组5 a生存率分别为43.64%±21.24%, 87.16%±5.44%, 53.79%±6.69%, 年龄差异对预后的影响非常明显。多数人认为可能是青年患者黏液腺癌和低分化癌比例高及淋巴结转移率高,肿瘤侵袭性强,或延迟诊断的时间长,确诊时多已为中晚期而造成的^[11,14]。本研究发现,青年组与老年组比,黏液腺癌、低分化癌较多见,淋巴结转移较多见,这些因素对患者的预后也有一定影响。经多因素分析,年龄仍是影响预后的独立性因素。朱武凌 *et al*^[16]发现青年大肠癌具有c-erbB-2蛋白高表达及DNA异倍体癌发生率高的特点,而c-erbB-2蛋白高表达者及DNA异倍体癌预后差。这可能是造成青年人大肠癌预后较差的分子生物学基础。此外,Dukes分期是影响大肠癌患者预后的最重要、可靠的因素^[3,17-20]。实质上,Dukes分期是包含肿瘤浸润深度和淋巴结转移及远处转移的综合指标。Dukes分期越高,大肠癌的生存时间越短,Dukes分期每增加一级,其死亡的相对风险就增加2.68倍。临床Dukes分期作为影响大肠癌患者的预后因素已基本成定论,我们应该加强普查和早诊的意识,早期发现、早期诊断、早期治疗,最大限度地改善大肠癌患者的生存状况。

4 参考文献

- 1 Ferlay J, Autier P, Boniol M, Heanue M, Colombet M, Boyle P. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Ann Oncol* 2007; 18: 581-592
- 2 王振军, 黄庭庭. 应进一步加强我国结肠癌的基础研究. *中华医学杂志* 2004; 84: 705-707
- 3 卿三华. 结、直肠癌临床病理分期系统及其临床意义. *世界华人消化杂志* 2003; 11: 1760-1763
- 4 谢正勇, 卿三华. 结直肠癌发病率及解剖部位变化趋势. *世界华人消化杂志* 2003; 11: 1050-1053
- 5 Cheng X, Chen VW, Steele B, Ruiz B, Fulton J, Liu L, Carozza SE, Greenlee R. Subsite-specific incidence rate and stage of disease in colorectal cancer by race, gender, and age group in the United States, 1992-1997. *Cancer* 2001; 92: 2547-2554
- 6 Okamoto M, Shiratori Y, Yamaji Y, Kato J, Ikenoue T, Togo G, Yoshida H, Kawabe T, Omata M. Relationship between age and site of colorectal cancer based on colonoscopy findings. *Gastrointest Endosc* 2002; 55: 548-551
- 7 Sarli L, Michiara M, Sgargi P, Iusco D, De Lisi V, Leonardi F, Bella MA, Sgobba G, Roncoroni L. The changing distribution and survival of colorectal carcinoma: an epidemiological study in an area of northern Italy. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2005; 17: 567-572
- 8 Savas N, Dagli U, Akbulut S, Yuksel O, Sahin B. Colorectal Cancer Localization in Young Patients: Should We Expand the Screening Program? *Dig Dis Sci* 2007
- 9 杨磊, 丁彦青, 张进华. 广东地区2037例大肠癌临床病理分析. *第一军医大学学报* 2003; 23: 1171-1173
- 10 谢正勇, 卿三华. 国人青年结直肠癌解剖部位分布及临床病理特点. *世界华人消化杂志* 2003; 11: 1511-1514
- 11 Chiang JM, Chen MC, Changchien CR, Chen JS, Tang R, Wang JY, Yeh CY, Fan CW, Tsai WS. Favorable influence of age on tumor characteristics of sporadic colorectal adenocarcinoma: patients 30 years of age or younger may be a distinct patient group. *Dis Colon Rectum* 2003; 46: 904-910
- 12 Liang JT, Huang KC, Cheng AL, Jeng YM, Wu MS, Wang SM. Clinicopathological and molecular biological features of colorectal cancer in patients less than 40 years of age. *Br J Surg* 2003; 90: 205-214
- 13 Fairley TL, Cardinez CJ, Martin J, Alley L, Friedman C, Edwards B, Jamison P. Colorectal cancer in U.S. adults younger than 50 years of age, 1998-2001. *Cancer* 2006; 107: 1153-1161
- 14 Kanemitsu Y, Kato T, Hirai T, Yasui K, Morimoto T, Shimizu Y, Kadera Y, Yamamura Y. Survival after curative resection for mucinous adenocarcinoma of the colorectum. *Dis Colon Rectum* 2003; 46: 160-167
- 15 赵川, 普萃, 付红梅. c-erbB-2, nm23蛋白在结直肠癌组织中的表达及其意义. *实用癌症杂志* 2003; 18: 380-393
- 16 朱武凌, 范秉琳, 崔静, 赵卫星. 青年结直肠癌c-erbB-2蛋白高表达的病理学意义. *肿瘤防治杂志* 2004; 11: 612-614
- 17 汪建平, 杨祖立, 王磊, 董文广, 黄奕华, 覃建章, 詹文华. 结直肠癌临床病理特征与预后的多因素回归分析. *中华肿瘤杂志* 2003; 25: 59-61
- 18 Newland RC, Dent OF, Lyttle MN, Chapuis PH, Bokey EL. Pathologic determinants of survival associated with colorectal cancer with lymph node metastases. A multivariate analysis of 579 patients. *Cancer* 1994; 73: 2076-2082
- 19 Ponz de Leon M, Sant M, Micheli A, Sacchetti C, Di Gregorio C, Fante R, Zanghieri G, Melotti G, Gatta G. Clinical and pathologic prognostic indicators in colorectal cancer. A population-based study. *Cancer* 1992; 69: 626-635
- 20 Korsgaard M, Pedersen L, Sorensen HT, Laurberg S. Reported symptoms, diagnostic delay and stage of colorectal cancer: a population-based study in Denmark. *Colorectal Dis* 2006; 8: 688-695

电编 张敏 编辑 张焕兰

手术联合腹腔热化疗及免疫疗法治疗腹膜恶性间皮瘤11例

黄晓辉, 陈凛, 李荣

黄晓辉, 陈凛, 李荣, 中国人民解放军总医院普通外科 北京市 100853

通讯作者: 黄晓辉, 100853, 北京市海淀区复兴路28号, 中国人民解放军总医院普通外科. huangxhhh@sina.com

电话: 010-66937217

收稿日期: 2006-12-29 接受日期: 2007-01-27

Treatment of malignant peritoneal mesothelioma by operation combined with intraperitoneal hyperthermic perfusion chemotherapy and immunotherapy: an analysis of 11 cases

Xiao-Hui Huang, Lin Chen, Rong Li

Xiao-Hui Huang, Lin Chen, Rong Li, Department of General Surgery, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China

Correspondence to: Xiao-Hui Huang, Department of General Surgery, General Hospital of Chinese PLA, 28 Fuxing Road, Haidian District, Beijing 100853, China. huangxhhh@sina.com

Received: 2006-12-29 Accepted: 2007-01-27

Abstract

AIM: To discuss the efficacy of surgical treatment combined with intraperitoneal hyperthermic perfusion (IPHP) chemotherapy or immunotherapy for malignant peritoneal mesothelioma (MPM).

METHODS: Seventeen MPM patients were divided 3 groups. The former two groups ($n = 11$, $n = 4$) were treated with operation plus IPHP chemotherapy or immunotherapy and systematic chemotherapy, respectively, while the latter group ($n = 2$) received no treatment. The clinical data of the 17 cases were analyzed retrospectively. All the patients were followed up to observe the survival time.

RESULTS: All the patients, including 3 cases of small cell type, 5 cases of epithelial type, 4 cases of diffuse infiltration type and 6 unclassified cases, were diagnosed by pathological examination. The follow-up time was 5 to 67 months, and

the medium survival time was 35 months. The survival time was 35.5 months in the combined treatment group, 11.3 months in the systematic chemotherapy group, and 4.5 months in the untreated group. The survival time was longer in the former one group than that in the latter two.

CONCLUSION: The diagnosis of MPM mainly depends on hydroperitoneal cytology, exploratory laparotomy and laparoscopy biopsy. The survival time can be prolonged by cytoreductive surgery combined with IPHP chemotherapy and immunotherapy.

Key Words: Peritoneal neoplasm; Mesothelioma; Diagnosis; Combined treatment

Huang XH, Chen L, Li R. Treatment of malignant peritoneal mesothelioma by operation combined with intraperitoneal hyperthermic perfusion chemotherapy and immunotherapy: an analysis of 11 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(9):1041-1044

摘要

目的: 探讨减瘤手术联合术后腹腔热灌注化疗或免疫治疗等综合治疗方法对腹膜恶性间皮瘤的治疗效果。

方法: 腹膜恶性间皮瘤17例分为3组: 联合治疗组(减瘤手术+术后腹腔热灌注化疗或联合DC免疫治疗, $n = 11$), 单独全身化疗组($n = 4$)和未治疗组($n = 2$)。回顾性分析其临床资料及治疗经过, 所有患者全部随访, 观察生存期。

结果: 17例均经组织病理学确诊, 其中小细胞型2例, 上皮型5例, 弥漫浸润型4例, 未明确分型6例。随访时间5-67(平均35) mo, 中位生存期32.5 mo, 其中联合治疗生存期约35.5 mo, 单独全身化疗生存期约11.3 mo, 未治疗者生存期约4.5 mo。联合治疗组患者生存期较其他两组延长。

结论: 腹水细胞学检查、剖腹探查及腹腔镜活检为腹膜恶性间皮瘤的主要诊断方法。采用减瘤手术治疗联合术后腹腔热灌注化疗或免疫治疗等综合治疗, 可以提高患者生存期。

■背景资料

腹膜恶性间皮瘤是一种罕见疾病, 诊断有一定困难, 目前缺乏统一有效治疗方法, 其起病隐匿, 临床表现无特异性, 易误诊, 预后差。

■应用要点

本文主要探讨综合治疗方法对其疗效,认为减瘤手术联合术后腹腔热灌注化疗及免疫治疗是目前较好的治疗手段,值得临床推广研究。

关键词: 腹膜肿瘤; 间皮瘤; 诊断; 联合疗法

黄晓辉, 陈凇, 李荣. 手术联合腹腔热化疗及免疫疗法治疗腹膜恶性间皮瘤11例. 世界华人消化杂志 2007;15(9):1041-1044
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1041.asp>

0 引言

恶性腹膜间皮瘤(malignant peritoneal mesothelioma, MPM)是原发于腹膜间皮细胞的肿瘤,非常少见,在美国约占全部恶性间皮瘤的10%-20%^[1-2]. 其起病隐匿,临床表现无特异性,易误诊,预后差. 我院2000-01/2006-07共收治17例经病理证实的MPM病例,现报道如下.

1 材料和方法

1.1 材料 2000-01/2006-07共收治经病理证实的MPM 17例,其中男11例,女6例;年龄23-71(中位45)岁. 自出现症状到就诊时间为1-21(中位时间8) mo. 全部病例均无明确石棉接触史. 患者首发症状表现为腹胀12例,腹痛7例,发热3例,腹部盆腔包块4例;体质量明显下降5例,无明显变化12例;腹水征阳性14例,阴性3例. 本组有14例发现腹水:外观呈血性者4例,黄色10例. 反复多次穿刺抽吸腹水细胞学检查,发现间皮细胞4例(但均未见典型恶性间皮细胞),未发现间皮细胞10例;腹水细菌学、结核杆菌培养全部阴性. 腹水肿瘤标志物检测:CA125, CA199, CA724, CEA均正常6例,CA125升高9例,CA199升高、CA724升高各1例. 腹水透明质酸酶升高1例. 17例均行B超及CT检查. B超检查发现大量腹水14例,腹膜、网膜不规则增厚6例,盆腹腔巨大囊实性混合瘤4例,左下腹肠壁增厚、包裹积液1例. CT检查发现有大量腹水14例,右膈下腹膜增厚5例,左下腹肠壁增厚、包裹积液3例,大网膜增厚2例. B超、CT检查均未发现肝、胆、胰腺等的合并症. 17例均行经组织病理学检查,其中剖腹探查活检6例,腹腔镜检查活检10例, B超引导下腹膜穿刺活检1例.

1.2 方法 17例患者分为3组: (1)联合治疗组: 减瘤手术+术后腹腔热化疗和或联合DC免疫治疗; (2)单独全身化疗组; (3)未治疗组. 其中联合治疗组11例,接受减瘤手术治疗(cytoreductive surgery, CRS): 肿瘤大部切除术6例(包括大网膜、阑尾、子宫、卵巢、部分肠管等切除及腹膜部分切除),肿瘤部分切除术5例(包括大网膜、阑尾及腹膜部分切除,残余肿瘤氩气电刀烧灼); 术后全部接受腹腔热灌注化疗(intraperitoneal hyperthermic

perfusion, IPHP), 选用阿霉素、卡铂、环磷酰胺、长春新碱、5-FU等药物联合化疗. 化疗时腹腔内放置4根导管, 2根流入管, 1根置于右侧膈下, 1根置于盆腔深部, 2根流出管, 1根置于左侧膈下, 1根置于盆腔浅部, 化疗过程中腹腔内温度维持在42-42.5℃. 其中7例顽固性腹水患者接受减瘤手术治疗(大网膜、阑尾及腹膜部分切除,残余肿瘤氩气电刀烧灼)及IPHP后给予肿瘤抗原致敏的树突状细胞(DC)介导的免疫治疗2次. 单独全身化疗组4例, 给予阿霉素、卡铂、环磷酰胺、长春新碱等药物联合化疗. 未治疗组2例, 患者确诊后放弃治疗、主动要求出院.

2 结果

17例病理切片结果均诊断为恶性腹膜间皮瘤. 组织学类型: 小细胞型2例, 上皮型5例, 弥漫浸润型4例, 未明确分型6例. 接受CRS及IPHP后给予肿瘤抗原致敏的DC介导的免疫治疗2次的7例顽固性腹水患者, 腹水生成速度明显减慢, 患者腹胀明显缓解. 接受单独全身化疗4例中2例接受4次化疗, 1例接受2次, 1例化疗1次后因恶液质放弃治疗.

住院期间因腹腔热化疗致严重感染死亡1例. 余病例全部随访, 随访时间5-67 mo, 平均35 mo, 中位生存期32.5 mo, 采用CRS联合术后腹腔热灌注化疗或免疫治疗等综合治疗生存期约35.5 mo, 最长1例确诊后行CRS加IPHP, 约5 a后再次出现顽固性腹水、腹部包块, 未再次手术, 接受全身化疗2次, 5 mo后去世; 接受单独全身化疗者生存期约11.3 mo; 未治疗者生存期约4.5 mo. 联合治疗组患者生存期较其他两组延长.

3 讨论

MPM的病因目前认为与接触石棉有关, 但本组病例均无明确石棉接触史. 有作者认为, 本病的发生还可能与放射物质、病毒、遗传易感性及慢性炎症等有关^[3].

本病腹水的发生率很高, 在90%以上. 腹水细胞学检查以及特殊化验对本病的诊断具有特殊价值, 如能在离心后找到大量异形或恶性间皮细胞对本病的诊断具有较高价值, 但阳性率低, 本组中腹水细胞学检查仅4例(28%, 4/14)发现间皮细胞, 但未找到典型恶性间皮细胞, 无法确诊. MPM能分泌大量透明质酸, 但无分泌破坏透明质酸的透明质酸酶, 故腹水中透明质酸含量极高, 腹水透明质酸定量检测对本病有诊断

意义, 本组中仅1例检测出腹水透明质酸, 含量亦高于正常值. 本组中腹水肿瘤标志物检测发现9例(53%, 9/17)患者CA125升高, 提示CA125在MPM的诊断中的意义有待进一步研究. B超与CT检查在本病的诊断中缺乏特异性, 但对观察病变进展及疗效有重要价值. 当然, 确诊还需要组织病理学检查, 目前认为, 剖腹探查和腹腔镜活检是诊断MPM最可靠的手段. 值得注意的是此种肿瘤极易在穿刺通道或腹壁切口发生种植转移, 手术或腹腔镜腹检查时一定要仔细.

目前, 对该病仍缺乏规范、有效的治疗方法. 过去多种治疗方法被推荐, 包括单独的或联合的, 但对减轻症状或改变预后多无明显效果. 致死机制与腹腔浸润有关, 患者在大部分自然病程中腹腔内始终含有肿瘤^[4]. 目前多数学者认为CRS联合IPHP是治疗MPM的比较理想的标准方案, CRS完成与否及残余肿瘤的数量是最重要的预后因素^[5-8], 而且最大限度的减少残余肿瘤数量是肿瘤组织对化疗药物起反应的重要因素^[9], 当残余肿瘤直径在2-5 mm时即使给予腹腔热化疗药物渗透至肿瘤组织中的浓度亦是有限的^[10]. 通常评价CRS完成情况(CC分级)分为: CC0为无肉眼可见肿瘤残余; CC1为残余肿瘤结节直径<2.5 mm; CC2为残余肿瘤结节直径>2.5 mm<2.5 cm; CC3为残余肿瘤结节直径>2.5 cm^[12]. Brigand *et al*^[7]报道应用此种方法治疗MPM后1, 2, 3和5 a的生存率分别为69.3%, 57.7%, 43.3%和28.9%, CC分级与预后明显相关, CC0, CC1较CC2, CC3的生存率明显延长. 本组中亦显示CRS联合IPHP治疗MPM的患者生存期较单独化疗组及未治疗组明显延长, 联合治疗组中位生存期达到35.5 mo. CRS在MPM的治疗中极为重要, 外科医生应加深对其理解, 对弥漫性MPM亦不要輕易放弃手术. CRS联合IPHP治疗MPM虽已取得较好效果, 但其并发症及病死率仍较高, 分别为27%-35%, 1.5%-12%^[12-13]. 本组中亦有1例因腹腔热化疗致严重感染死亡, 病死率14%(1/7). 用过继性细胞免疫疗法能改善宿主的免疫功能, 短期内对控制腹水有一定的效果, 本组中7例顽固性腹水患者减瘤术后接受肿瘤抗原致敏的DC介导的免疫治疗2次, 腹水生产速度明显减慢, 提示免疫治疗可起到缓解症状、提高患者生存质量的作用. 目前DC介导的免疫治疗应用于胃肠道恶性肿瘤的治疗已取得一定疗效^[14-15], 免疫治疗在MPM的治疗中作用值得进一步研究. 表皮生长因子受体(EGFR)是

一种与细胞生长分化有关的受体, 在大约70%的MPM中过度表达, EGFR抑制剂ZD1839用于MPM治疗的体外实验中取得了良好的效果^[16], 临床应用值得期待.

由于MPM的罕见性, 对于MPM的流行病学规律、有效治疗方法及预后因素的了解尚不完善, 有待进一步大样本的前瞻性研究.

4 参考文献

- 1 Connelly RR, Spirtas R, Myers MH, Percy CL, Fraumeni JF Jr. Demographic patterns for mesothelioma in the United States. *J Natl Cancer Inst* 1987; 78: 1053-1060
- 2 Antman KH, Osteen RT, Klegar KL, Amato DA, Pomfret EA, Larson DA, Corson JM. Early peritoneal mesothelioma: a treatable malignancy. *Lancet* 1985; 2: 977-981
- 3 赵亚刚, 郭学刚, 周兰, 孙安华. 原发性恶性腹膜间皮瘤临床回顾分析. *中国医师杂志* 2003; 5: 777-778
- 4 Deraco M, Santoro N, Carraro O, Inglese MG, Rebuffoni G, Guadagni S, Somers DC, Vaglini M. Peritoneal carcinomatosis: feature of dissemination. A review. *Tumori* 1999; 85: 1-5
- 5 Sugarbaker PH, Welch LS, Mohamed F, Glehen O. A review of peritoneal mesothelioma at the Washington Cancer Institute. *Surg Oncol Clin N Am* 2003; 12: 605-621, xi
- 6 Feldman AL, Libutti SK, Pingpank JF, Bartlett DL, Beresnev TH, Mavroukakis SM, Steinberg SM, Liewehr DJ, Kleiner DE, Alexander HR. Analysis of factors associated with outcome in patients with malignant peritoneal mesothelioma undergoing surgical debulking and intraperitoneal chemotherapy. *J Clin Oncol* 2003; 21: 4560-4567
- 7 Brigand C, Monneuse O, Mohamed F, Sayag-Beaujard AC, Isaac S, Gilly FN, Glehen O. Peritoneal mesothelioma treated by cytoreductive surgery and intraperitoneal hyperthermic chemotherapy: results of a prospective study. *Ann Surg Oncol* 2006; 13: 405-412
- 8 Deraco M, Nonaka D, Baratti D, Casali P, Rosai J, Younan R, Salvatore A, Cabras Ad AD, Kusumura S. Prognostic analysis of clinicopathologic factors in 49 patients with diffuse malignant peritoneal mesothelioma treated with cytoreductive surgery and intraperitoneal hyperthermic perfusion. *Ann Surg Oncol* 2006; 13: 229-237
- 9 Glehen O, Mithieux F, Osinsky D, Beaujard AC, Freyer G, Guertsch P, Francois Y, Peyrat P, Panteix G, Vignal J, Gilly FN. Surgery combined with peritonectomy procedures and intraperitoneal chemohyperthermia in abdominal cancers with peritoneal carcinomatosis: a phase II study. *J Clin Oncol* 2003; 21: 799-806
- 10 van Ruth S, Verwaal VJ, Hart AA, van Slooten GW, Zoetmulder FA. Heat penetration in locally applied hyperthermia in the abdomen during intra-operative hyperthermic intraperitoneal chemotherapy. *Anticancer Res* 2003; 23: 1501-1508
- 11 Jacquet P, Sugarbaker PH. Clinical research methodologies in diagnosis and staging of patients with peritoneal carcinomatosis. *Cancer Treat Res* 1996; 82: 359-374

■同行评价

腹膜恶性间皮瘤是一种少见病, 恶性程度高, 病程短, 缺乏有效的治疗手段, 国际比较公认的有效治疗方法是综合应用化疗、剖腹施行细胞减数法及连续加温抗癌药物进行腹腔内灌注. 本文选题较好, 有一定的创新之处.

- 12 Glehen O, Osinsky D, Cotte E, Kwiatkowski F, Freyer G, Isaac S, Trillet-Lenoir V, Sayag-Beaujard AC, Francois Y, Vignal J, Gilly FN. Intraperitoneal chemohyperthermia using a closed abdominal procedure and cytoreductive surgery for the treatment of peritoneal carcinomatosis: morbidity and mortality analysis of 216 consecutive procedures. *Ann Surg Oncol* 2003; 10: 863-869
- 13 Ma LS, Pan BR. Strengthen international academic exchange and promote development of gastroenterology. *World J Gastroenterol* 1998; 4: 1
- 14 宁敏曼, 王立. 树突状细胞肿瘤疫苗用于胃癌免疫治疗的新进展. *医学综述* 2006; 12: 200-202
- 15 Homma S, Kikuchi T, Ishiji N, Ochiai K, Takeyama H, Saotome H, Sagawa Y, Hara E, Kufe D, Ryan JL, Ohno T, Toda G. Cancer immunotherapy by fusions of dendritic and tumour cells and rh-IL-12. *Eur J Clin Invest* 2005; 35: 279-286
- 16 Janne PA, Taffaro ML, Salgia R, Johnson BE. Inhibition of epidermal growth factor receptor signaling in malignant pleural mesothelioma. *Cancer Res* 2002; 62: 5242-5247

电编 张敏 编辑 张焕兰

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

第十九届全国中西医结合消化会议征文通知

本刊讯 中国中西医结合学会消化系统疾病专业委员会决定于2007-08下旬在石家庄市召开第十九届全国中西医结合消化学术交流会, 并同时举办全国中西医结合消化疾病诊治新进展学习班。

1 征文内容和要求

征文内容: (1)有关消化系统疾病包括食管、胃、肝、胰等诊疗、实验研究进展; (2)中西医结合对慢性肝炎(病)、肝纤维化临床诊治以及基础、实验研究; (3)中西医结合对消化系统肿瘤诊治经验与实验研究; (4)中西医结合对“淤血症”以及脾胃学说与脾虚证研究进展。征文要求: 来稿请附800字论文摘要, 并附软盘或发电子邮件至211zyke@163.com或czs.xiaohua@163.com(尽量以电子邮件发送)。征文请于2007-06-30前邮寄。

2 学习班招收对象

学习班招收对象: 从事中西医结合、中医或西医消化专业医师以上人员。参加学习班者授予国家继续教育学分12分; 在大会论文报告者另授继续教育学分6分。

3 联系方式

(1) 黑龙江省哈尔滨市南岗区学府路45号 解放军第211医院中医科(中国中西医结合学会消化系统疾病专业委员会), 邮编: 150080, 联系人: 李春雷, 贾云, 联系电话: 0451-57752440或86632450, 传真: 0451-86603878或0451-57752440; (2) 河北省石家庄和平西路215号河北医科大学附属第二医院, 邮编: 050000, 联系人: 姚希贤, 冯志杰, 联系电话: 0311-87222301或13333015658。

世界华人消化杂志投稿须知

1 投稿总则

1.1 性质 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, 大 16开, 旬刊, 每期160页, 定价24元, 全年864元, 邮发代号82-262, 由世界胃肠病学杂志社出版。世界华人消化杂志主要报道消化基础研究、消化临床研究、消化内科、消化内镜、消化外科、消化肿瘤、消化介入治疗、消化病理、消化预防医学、消化护理、消化医学、影像消化误诊误治、消化中西医结合、消化检验、消化新技术应用、消化诊断指南、消化治疗指南、消化病诊断、消化病治疗、消化新药应用、消化专家门诊。世界华人消化杂志被国际权威检索系统美国《化学文摘》(Chemical Abstracts, CA)、荷兰《医学文摘库/医学文摘(EMBase/Excerpta Medica, EM)》和俄罗斯《文摘杂志(Abstract Journal, AJ)》收录。国内为中国科技论文统计与分析(科技部列选为中国科技论文统计源期刊)、《中文核心期刊要目总览》2004年版内科学类的核心期刊、中国学术期刊文摘、中国生物医学文献光盘数据库、中文科技资料目录医药卫生、解放军医学图书馆CMCC系统、中国医学文摘外科学分册(英文版)、中国医学文摘内科学分册(英文版)收录。2005年度《世界华人消化杂志》的总被引频次为2079, 位居全部1652种中国科技论文统计源期刊的第51位, 内科医学类28种期刊的第4位。2005年《世界华人消化杂志》的影响因子为0.485, 位居全部1652种中国科技论文统计源期刊的第449位, 内科医学类28种期刊的第14位。《世界华人消化杂志》的即年指标0.070, 他引率0.66, 地区分布数26, 基金论文比0.43, 国际论文比0.02, 学科影响指标0.46。

1.2 栏目 述评, 食管癌, 胃癌, 肝癌, 病毒性肝炎, 大肠癌, 幽门螺杆菌, 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。专家述评4 000字以内, 研究原著6 000字以内, 焦点论坛4 000字以内, 文献综述6 000字以内, 研究快报4 000字以内, 临床经验1 800字以内, 病例报告800字以内。

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

《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。

《世界华人消化杂志》为中国科技论文统计源核心期刊(国家科技部, 2003年)和中文核心期刊要目总览(北京大学图书馆, 2004年版)收录的学术期刊。世界胃肠病学杂志社, 100023, 北京市2345信箱郎辛庄北路58号院怡寿园1066号, 电话: 010-85381901 Email: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com.

ig. s(秒)不能写成S, kg不能写成Kg, mL不能写成ML, lcpm(应写为1/min)÷E%(仪器效率)÷60=Bq, pH不能写PH或P^H, *H pylori*不能写成HP, $T_{1/2}$ 不能写成tl/2或 $T_{1/2}^1$, 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30kDa(*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. 如37.6±1.2°C, 45.6±24岁, 56.4±0.5 d. 3.56±0.27 pg/ml应为3.56±0.27 ng/L, 131.6±0.4 mmol/L, *t* =28.4±0.2°C. BP用kPa(mmHg), RBC数用×10¹²/L, WBC数用×10⁹/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; 七年, 7 a; 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年, 10 a; 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.

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±标准差表示为mean±SD, 平均数±标准误为mean±SE. 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; 第三套为^e*P* <0.05, ^f*P* <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1 000-1 500 kg, 3.5±

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6 347意指6 000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mean \pm SD应考虑到个体的变差,一般以SD的1/3来定位数,例如3 614.5 \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 \pm 0.4 kg,过多的位数并无意义。又如8.4 \pm 0.27 cm,其SD/3=0.09 cm,达小数点后第2位,故平均数也应补到小数点后第2位。有效位数以后的数字是无效的,应该舍。末尾数字,小于5则舍,大于5则进,如恰等于5,则前一位数逢奇则进,逢偶(包括“0”)且5之后全为0则舍。末尾时只可1次完成,不得多次完成。例如23.48,若不要小数点,则应成23,而不应该23.48 \rightarrow 23.5 \rightarrow 24。年月日采用全数字表达法,请按国家标准GB/T 7408-94书写。如1985年4月12日,可写作1985-04-12;1985年4月,写作1985-04;从1985年4月12日23时20分50秒起至1985年6月25日10时30分止,写作1985-04-12 T23:20:50/1985-06-25 T10:30:00;从1985年4月12日起至1985年6月15日止,写作1985-04-12/06-16,上午8时写作08:00,下午4时半写作16:30。百分数的有效位数根据分母来定:分母 \leq 100,百分数到个位;101 \leq 分母 \leq 1 000,百分数到小数点后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1 486 800.475 65。完整的阿位伯数字不移行!

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个字左右,最好不超过26个字。避免用“的研究”或“的观察”等非特定词。

3.2 作者 论文署名作者不宜过多,一般不超过8人,主要应限于参加研究工作并能解答文章有关问题、能对文稿内容负责者,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。第一方面是直接参与,包括:(1)酝酿和设计实验;(2)采集数据;(3)分析/解释数据。第二方面是文章撰写,包括:(1)起草文章;(2)对文章的知识性内容作批评性审阅。第三方面是工作支持,包括:(1)统计分析;(2)获取研究经费;(3)行政、技术或材料支持;(4)指导;(5)支持性贡献。每个人必须在第一至第三方面至少具备一条,才能成为文章的署名作者。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,男,1966-02-26生,河北省定县人,汉族。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 基金资助项目 格式如:国家自然科学基金资助项目, No.30224801

3.6 通讯作者 格式如:通讯作者:马连生, 030001, 山西省太原市双塔西街77号, 太原消化病研治中心。wcjd@wjgnet.com

电话: 0351-4078656 传真: 0351-4086337

收稿日期: 接受日期:

3.7 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 署名一般不超过8人。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-

World Journal of Gastroenterology
自2005-01-01起
为周刊发行,每月
7、14、21、28日
出版。北京报刊发
行局发行,邮发代
号: 82-261。WJG
出版的模式为开
放存取+印刷版。
免费通过<http://www.wjgnet.com/1007-9327/index.jsp>获取,即:
阅读、下载、复
制、打印和检索
论文的全文。

《世界华人消化杂志》自2006-01-01起为旬刊发行,每月8、18、28日出版。北京报刊发行局发行,邮发代号:82-262。《世界华人消化杂志》出版的模式为开放存取+印刷版。免费通过<http://www.wjgnet.com/1009-3079/index.jsp>获取,即:阅读、下载、复制、打印和检索论文的全文。

Sheng Ma, Taiyuan Research and Treatment Center for Digestive Diseases, 77 Shuangta Xijie, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China. wjcd@wjgnet.com

收稿及接受日期 格式如: Received: Accepted:

摘要 包括目的、方法、结果、结论,书写要求与中文摘要一致。格式如下:

Abstract

AIM:

METHODS:

RESULTS:

CONCLUSION:

Zhang XC, Gao RF, Li BQ, Ma LS, Mei LX, Wu YZ, Liu FQ, Liao ZL. Effects of Weixibao nizhuanwan on gastric precancerous lesions 300 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006; 14:

3.8 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),中文摘要格式如下:

摘要

目的:

方法:

结果:

结论:

张旭晨, 高瑞丰, 李炳庆, 马连生, 梅立新, 吴玉珍, 刘凤芹, 廖振林. 胃细胞逆转丸治疗胃癌前期病变300例. *世界华人消化杂志* 2006;14:

3.9 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)。

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 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。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 $7.5\text{ cm}\times 4.5\text{ cm}$, 必须使用双面胶条黏贴在正文内, 不能使用浆糊黏贴。

致谢 致谢后加冒号, 排在讨论后及参考文献前, 左齐。

4 参考文献 本刊采用“顺序编码制”的著录方法, 即以文中出现顺序用阿拉伯数字编号排序。提倡对国内同行近年已发表的相关研究论文给予充分的反映, 并在文内引用处右上角加方括号注明角码。文中如列作者姓名, 则需在“Pang *et al*”的右上角注角码号; 若正文中仅引用某文献中的论述, 则在该论述的句末右上角注角码。如马连生^[1]报告……, 潘伯荣 *et al*^[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年核心期刊为准, 引用被PubMed收录的期刊文献用英文表达, 请附引用文献网上摘要打印件, 包括PMID编号(摘要的左下方). 按顺序编号装订, 并考入磁盘内. 在引用参考文献页码末尾注明PMID编号; 无PMID编号的期刊请删除(重要文献必须保留者, 请附首页复印件). 期刊: 序号, 作者(列出全体作者). 文题, 刊名, 年, 卷, 起页-止页, PMID编号; 书籍: 序号, 作者(列出全部), 书名, 卷次, 版次, 出版地, 出版社, 年, 起页-止页. 参考文献格式如下:

- 1 Ma LS, Pan BR. Strengthen international academic exchange and promote development of gas-troenterology. *World J Gastroenterol* 1998; 4: 1 [PMID: 11819215]
- 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

4 投稿须知

4.1 投稿信件 来稿包括所有作者签名的作者投稿函. 内容包括: (1)保证无重复发表或一稿多投; (2)是否有经济利益或其他关系造成的利益冲突; (3)所有作者均审读过该文并同意发表, 所有作者均符合作者条件, 所有作者均同意该文代表其真实研究成果, 保证文责自负; (4)列出通讯作者的姓名、地址、电话、传真和电子邮件; 通讯作者应负责与其他作者联系, 修改并最终审核复核稿; (5)可建议熟悉该专业的审稿人或因利益冲突而不适宜审阅该稿的审稿人姓名; (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, 所有来稿均需接受同行审阅.

4.2 审稿过程 所有来稿均经2位同行专家的严格评审, 所有审稿人的姓名对作者通常是保密的. 投稿时, 作者可以提出要求回避的同行专家名

单, 也可以推荐2位非本单位的审稿人, 尤其是本刊编委会成员. 审稿过程大约需要1 mo.

4.3 录用 来稿经本刊编辑部初审、2位同行专家评审, 将评审后的稿件分为优先发表、可以发表、修改后发表、修改后再审、退稿等项处理. 录用稿件作者需交纳发表费, 发表后可获得2本样刊及20套单行本(稿酬).

4.4 修改时间 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寄回给作者自行修改. 当原稿退还作者修改时, 作者必须于1 mo内将修改后的稿件及光盘寄回编辑部; 逾期寄回的, 作重新投稿处理.

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

4.6 投稿清单 (1)投稿函; (2)第1部分为题名及作者, 作者及单位, 第1作者简介, 基金资助项目, 通讯作者Email, 电话, 传真, 收稿日期, 接受日期; (3)第2部分英文摘要; (4)第3部分中文摘要; (5)第4部分为0引言, 1 材料和方法, 1.1 材料, 1.2 方法, 统计学处理, 2 结果, 3 讨论, 致谢, 4 参考文献.

4.7 投稿地址 在线投稿: <http://www.wjgnet.com/wcjd/ch/index.aspx>. 邮局寄送(已在线提交的稿件不必再寄): 请将打印的稿件一式2份(附高质量的图)、存有全文(文字、图表)的磁盘和其他信息(全部文件的清单, 各文件的名称、格式和使用平台等)寄往: 100023, 北京市2345信箱, 世界胃肠病学杂志社.

世界胃肠病学杂志社
100023, 北京市2345信箱
郎辛庄北路58号院怡寿园1066号
电话: 010-85381901
传真: 010-85381893
Email: wcjd@wjgnet.com
<http://www.wjgnet.com>

World Journal of Gastroenterology创刊于1995-10-01, 原刊名《China National of New Gastroenterology》, 1995-06-27 国科发信字(95) 225号批准国内外公开发行. 1998-02-12经国家科学技术部和国家新闻出版总署批准更名为WJG, 国科发信字(1998)027号. 2002-11-14经国家工商行政管理总局商标局核定使用商品(第16类), 获得商标注册证第2001158号.

致谢世界华人消化杂志编委

本期文章审稿中(包括退稿), 我刊编委付出了宝贵的时间和大量的精力, 提高了《世界华人消化杂志》的学术质量, 在此表示衷心感谢!

陈凇 教授
中国人民解放军总医院普通外科

陈其奎 教授
中山大学附属第二医院消化内科

陈卫昌 教授
苏州大学附属第一医院消化内科

党双锁 副教授
西安交通大学第二医院感染科

范志宁 主任医师
南京医科大学第二附属医院内镜中心

房林 副教授
同济大学附属上海市第十人民医院普外科

傅春彬 主任医师
吉化集团公司总医院一院消化内科

高润平 教授
吉林大学第一医院肝病科

郝纯毅 主任医师
北京大学临床肿瘤学院肿瘤外科

何裕隆 教授
中山大学附属第一医院胃肠胰腺外科

纪小龙 教授
武警总医院病理科

金瑞 教授
首都医科大学附属北京佑安医院消化科

李军祥 教授
北京中医药大学附属东方医院消化内科

李旭 副教授
广州南方医院急诊科

李延青 教授
山东大学齐鲁医院消化科

刘铁夫 教授
哈尔滨医科大学附属第四医院消化科

刘占举 教授
郑州大学第二附属医院消化内科

刘作金 副教授
重庆医科大学附属第二医院肝胆外科

吕明德 教授
中山大学附属第一医院肝胆外科

秦华东 教授
黑龙江省哈尔滨医科大学附属第二医院普外四科

任建林 教授
厦门大学附属中山医院消化内科, 厦门市消化疾病研究所

沈柏用 副教授
上海市交通大学医学院附属瑞金医院

沈薇 教授
重庆医科大学附属第二医院消化内科

施瑞华 教授
南京医科大学第一附属医院消化科

王振宁 教授
中国医科大学附属第一医院肿瘤外科

王志刚 副主任医师
上海市第六人民医院普外科

闻勤生 教授
第四军医大学唐都医院消化科

徐列明 教授
上海中医药大学附属曙光医院(东部)肝二科

张吉翔 教授
南昌大学第二附属医院消化内科

张晓岚 教授
河北医科大学第二医院消化内科

张筱茵 副教授
第四军医大学西京医院消化疾病研究所

朱春兰 主任医师
黑龙江省医院附属消化病医院消化二科