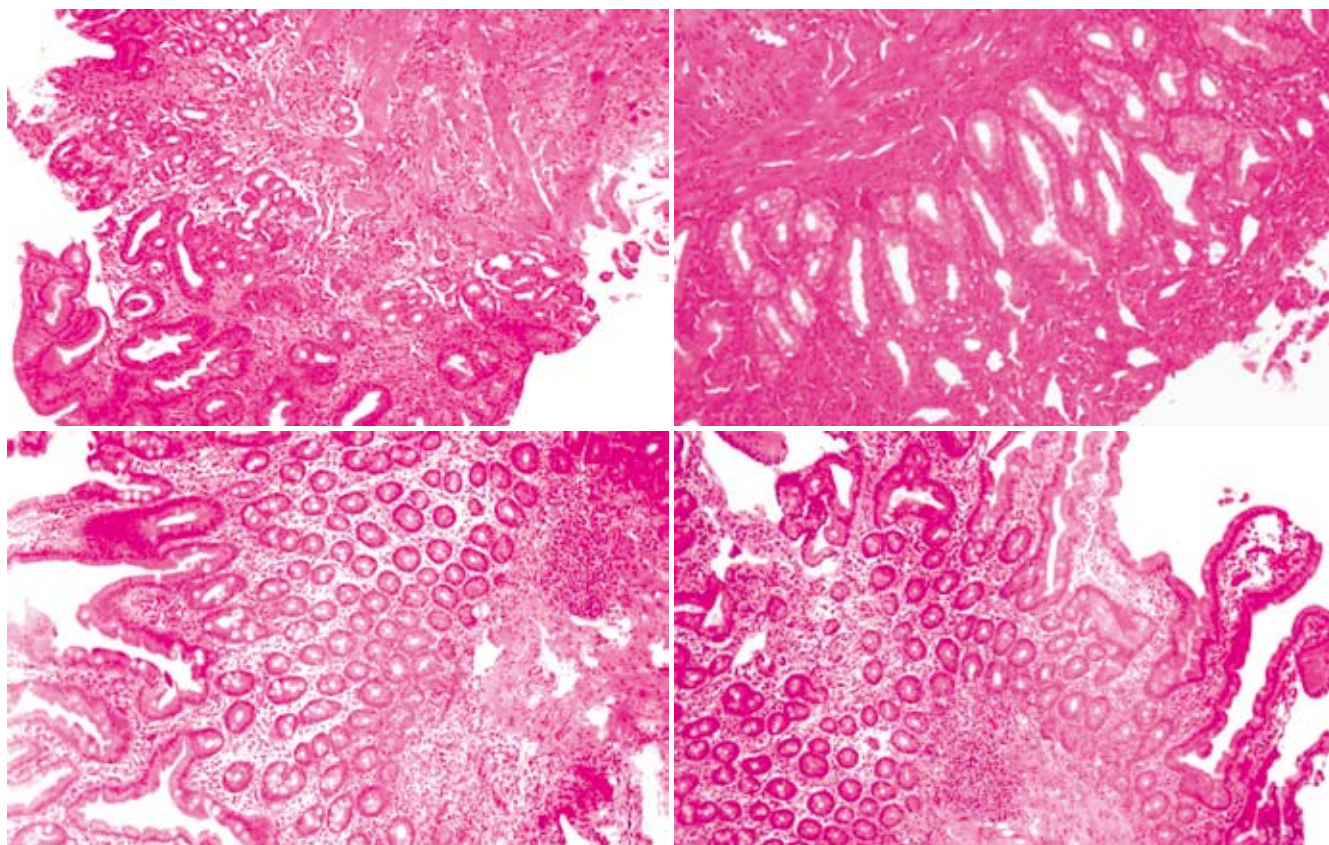


世界华人消化杂志®

WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2008 年 12 月 18 日 第 16 卷 第 35 期 (Volume 16 Number 35)



35 / 2008

ISSN 1009-3079



9 771009 307056

名誉总编辑

潘伯荣

总编辑

马连生

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

世界华人消化杂志®

编辑委员会

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

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

编委

消化内科学

白爱平副教授
白文元教授
苒新明教授
陈洪副教授
陈军贤主任医师
陈尼维主任医师
陈其奎教授
陈卫昌教授

陈贻胜教授
陈玉林教授
程斌副教授
迟宝荣教授
邓长生教授
丁士刚主任医师
董蕾教授
杜雅菊主任医师
樊晓明主任医师
房静远教授
冯红主任医师
冯志杰主任医师
傅春彬主任医师
高峰副教授
戈之铮教授
关晓辉主任医师
关玉盘教授
郭晓钟教授
郭新宁教授
洪天配教授
侯晓华教授
胡伏莲教授
胡和平主任医师
黄晓东副主任医师
黄颖秋教授
黄裕新教授
霍丽娟主任医师
季国忠副教授
姜春萌教授
姜慧卿教授
金懋林教授
金瑞教授
蓝宇教授
李定国教授
李继强教授
李淑德教授
李晓宇主任医师
李延青教授
李瑜元教授
李玉民教授
李玉明教授
林志辉教授
刘冰熔教授
刘改芳主任医师
刘海林主任医师
刘铁夫教授
刘占举教授
陆伦根教授
吕志武教授
马金城教授
马欣主任医师

毛高平主任医师
倪润洲教授
欧希龙副教授
潘秀珍教授
朴熙绪主任医师
朴云峰教授
秦成勇教授
曲智威副主任医师
任粉玉副教授
任建林教授
邵先玉教授
沈琳主任医师
沈守荣教授
沈薇教授
施瑞华教授
宋于刚教授
孙富强副教授
孙侃教授
孙自勤教授
唐采白副教授
唐芙爱教授
唐丽安教授
田德安主任医师
童强主任医师
宛新建副教授
王邦茂教授
王炳元教授
王承党副教授
王吉耀教授
王莉瑛教授
王晓艳副教授
闻勤生教授
吴萍主任医师
夏时海副教授
徐秀英副教授
许春舫主任医师
许乐主任医师
许亚平副教授
杨冬华教授
杨建民教授
杨希山教授
杨幼林主任医师
杨云生教授
杨昭徐教授
姚树坤教授
叶红军主任医师
于红刚副教授
于晓峰主任医师
袁伟建教授
展玉涛副主任医师
张春清教授

张方信主任医师
张国梁主任医师
张吉翔教授
张集昌主任医师
张军教授
张小晋主任医师
张晓岚教授
张筱茵副教授
张志坚教授
赵晓晏教授
郑鹏远教授
智发朝教授
周国雄主任医师
朱春兰主任医师
朱人敏教授
邹晓平主任医师

消化外科学

别平教授
蔡开琳副教授
蔡三军主任医师
曹杰主任医师
陈光教授
陈海龙教授
陈积圣教授
陈建荣副教授
陈克能主任医师
陈力教授
陈立波副教授
陈凇教授
陈强谱教授
陈亚军主任医师
陈知水教授
陈祖林副教授
程爱国教授
程爱群主任医师
程树群副教授
迟强教授
仇毓东副教授
崔彦教授
崔云甫教授
戴朝六教授
戴冬秋教授
丁义涛教授
董明教授
房林副教授
傅红副教授
傅华群教授
傅廷亮教授
傅志仁主任医师
高成新教授
葛海燕教授

龚建平教授
巩鹏教授
谷俊朝主任医师
顾岩教授
郭克建教授
韩天权教授
郝纯毅主任医师
何超教授
何生教授
何裕隆教授
何振平教授
黄志勇副教授
季加孚教授
姜波健教授
蒋龙元副教授
兰平教授
黎乐群教授
李国威教授
李华山副主任医师
李靖副教授
李奇林教授
李胜研究员
李涛副主任医师
李文岗副教授
李小荣教授
李旭副教授
李志霞教授
李宗芳教授
梁力建教授
林胜璋副教授
刘建教授
刘颖斌副教授
刘志苏教授
刘作金副教授
卢实春教授
陆才德教授
陆云飞教授
吕明德教授
吕云福教授
梅铭惠教授
彭波副教授
彭吉润主任医师
彭心宇教授
彭志海教授
钱建民教授
乔岐禄主任医师
秦春宏副主任医师
秦华东教授
秦环龙教授
秦仁义教授
邱宝安主任医师
邱双健副教授
邱伟华副主任医师

世界华人消化杂志®

编辑委员会

裴正军教授
任建安教授
荣大庆教授
邵永孚教授
沈柏用副教授
沈世强教授
沈岩主任医师
师英强教授
施诚仁教授
宋世兵主任医师
宋振顺教授
孙诚谊教授
孙家邦教授
孙学英教授
孙延平副主任医师
邵升副教授
谭群友副教授
汤恢焕教授
汤展宏副教授
唐文皓副主任医师
田素礼教授
田晓峰教授
万德森教授
汪波副主任医师
汪根树副教授
王春友教授
王凤山副教授
王广义教授
王济明教授
王健生副教授
王烈主任医师
王鲁副教授
王蒙副教授
王石林主任医师
王文跃主任医师
王效民教授
王要军教授
王振宁教授
王正康教授
王志刚副主任医师
王忠裕教授
卫洪波教授
吴德全教授
吴河水教授
吴健雄教授
吴金术教授
吴泰瑞教授
吴志勇教授
席启主任医师
谢敏主任医师
谢晓华副教授
邢光明教授
徐大华主任医师
徐智教授

许戈良教授
严律南教授
严以群主任医师
杨广顺教授
杨维良教授
杨尹默教授
伊力亚尔·夏合丁教授
殷正丰教授
于聪慧教授
于恩达教授
于健春教授
于良副教授
于则利教授
郝宝铭教授
郝正亚副教授
曾勇教授
张柏和教授
张群华教授
张水军教授
张肇达教授
张宗明教授
赵增仁副主任医师
郑民华教授
钟德珩教授
周丁华主任医师
周伟平教授
朱立元教授
邹小明教授

消化感染病学

陈国凤主任医师
陈红松副研究员
陈建杰教授
陈仕珠主任医师
陈耀凯副教授
党双锁教授
丁惠国教授
范建高教授
范小玲主任医师
高润平教授
高泽立副教授
龚国忠教授
管世鹤副教授
郝春秋副教授
何生松教授
江家骥教授
李智伟教授
林菊生教授
刘杞教授
刘正稳教授
孟庆华教授
宁琴教授
牛俊奇教授
钱林学主任医师

秦波教授
石统东副教授
孙殿兴主任医师
谭德明教授
唐霓副研究员
唐世刚教授
唐晓鹏教授
王凯教授
王怡主任医师
魏来教授
吴建国教授
吴君主任医师
谢青教授
徐小元教授
宣世英教授
闫惠平研究员
杨林副研究员
姚鹏副教授
张继明教授
张明辉副主任医师
张绪清副教授
张占卿主任医师
赵桂鸣主任医师
赵桂珍教授
赵连三教授
周伯平教授
周文兴教授
周霞秋教授
朱传武副主任医师
庄林主任医师

消化中医药学

蔡淦教授
陈治水主任医师
杜群副研究员
黄恒青主任医师
劳绍贤教授
李军祥教授
李勇副教授
李振华教授
刘成海研究员
刘平教授
刘绍能主任医师
龙致贤教授
牛建昭教授
沈洪教授
唐旭东主任医师
唐志鹏研究员
王新月教授
徐列明教授
许玲副教授
张声生教授

消化肿瘤学

白玉贤教授
曹秀峰主任医师
曹志成院士
陈公琰主任医师
李瑗教授
刘宝瑞教授
刘彬彬副研究员
刘云鹏教授
马力文主任医师
吴晴教授
熊斌教授
张凤春教授

消化影像学

陈克敏教授
程红岩教授
褚建国主任医师
官泳松教授
韩新巍教授
胡红杰主任医师
黄金华副教授
匡安仁教授
李健丁教授
鲁华玉研究员
施海彬教授
魏经国教授
肖恩华教授
徐爱民副教授
徐克教授
杨业发教授
杨建勇教授
赵卫主任医师

消化内镜学

崔毅主任医师
丁佑铭教授
郝俊鸣副主任医师
刘海峰主任医师
潘林娜教授
沈俊教授
孙明军教授
万军教授

消化介入治疗学

卢榜裕教授
茅爱武主任医师
倪才方教授
吴硕东教授
袁友红副教授
郑加生主任医师

消化中西医结合学

崔乃强教授
李方儒教授

刘鲁明教授
唐文富副主任医师
王学美研究员

消化基础研究

曹洁副教授
樊红副教授
高春芳研究员
高峰教授
高英堂研究员
管冬元副教授
黄文林教授
李东辉教授
李杰副教授
李永哲副研究员
李增山副教授
梅林教授
彭曦副研究员
钱睿哲教授
任超世研究员
孙秀发教授
谭学瑞教授
屠红副研究员
汪思应教授
吴晓东教授
夏建川研究员
徐存拴教授
徐德忠教授
徐宁志研究员
徐迎新研究员
许文燮教授
姚登福教授
阴赧宏研究员
喻荣彬副教授
张青云研究员
张学教授
赵平副教授
周士胜教授
周晓东研究员
周晓武副主任医师
左国营副主任药师

消化病理学

杜祥教授
刘勇钢副主任医师
吕宁主任医师
马大烈教授
潘兴华副主任医师
阎晓初副教授
易永芬教授
于颖彦教授
余宏宇教授
张锦生教授
赵景民教授

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ● 2008 年 12 月 18 日 第 16 卷 第 35 期 (总第259期)

述 评	3933 门脉高压性胆病诊治进展 张晓岚, 安君艳
基 础 研 究	3937 pEGFP-restin重组质粒的构建及其在BGC-803胃癌细胞中的表达 戴聪, 李锦毅 3941 短发夹RNA对胰腺癌细胞PANC-1突变型K-ras基因表达的影响 李冬斌, 郑志刚, 许香梅, 郭华, 赵雪莲, 黄林凤, 蔡建辉 3946 CD/5-FC自杀基因体系对肝、胆、胰肿瘤细胞的杀伤作用及机制 刘国彦, 罗琪, 庄维纯, 杨素梅, 魏黎煜 3953 结肠癌细胞中CacyBP/SIP的表达及核转位现象 翟惠虹, 陈雄, 卢媛媛, 王新, 樊代明
临 床 研 究	3958 急性胰腺炎多层螺旋CT灌注成像的应用价值 王芳军, 陈卫昌, 郭亮, 方向明 3963 SFRP2和 β -catenin在大肠癌中的表达及其临床意义 刘宁, 姜海行, 黄振宁, 覃山羽, 李信
文 献 综 述	3970 神经节内板状末梢与食管内脏感觉 孔炫, 许树长 3974 缺血性肝炎 饶珊珊, 李建英 3979 溃疡性结肠炎的中西药物治疗概况 于海食, 洪纓, 王玉蓉
研 究 快 报	3984 胃癌相关基因GCRG123的克隆及其在大肠杆菌中的表达 伍银桥, 王刚石, 王孟薇, 吴本俨, 尤纬缔 3988 内毒素休克小鼠肝脏细胞质膜差异蛋白质组的二维液相色谱分析 李红梅, 陈丽, 夏高晓, 赵明哲, 胡水旺, 姜勇
临 床 经 验	3993 原发性胆汁反流性胃炎胃黏膜ghrelin的表达 李凌燕, 王青, 许琳 3997 周剂量紫杉醇联合奥沙利铂二线治疗晚期胃癌23例 伍小平, 庄英帆, 姜浩, 伍尤华, 戴文香, 艾小红, 唐三元 4000 血浆置换治疗重型肝炎42例 张利, 蒋红樱, 罗志航, 李品贵, 张安妮, 李素琴 4004 胆石病患者胆汁细菌学检查分析 李奉达, 邱法波, 刘宁 4008 胆囊癌肉瘤的临床病理学特征分析 李柏峰, 刘永锋, 石蕊, 刘作良 4012 酪氨酸激酶受体RON在胰腺癌中的表达及意义 周坤, 汪宏, 涂从银, 吴立胜

	<p>4015 Midkine和Caspase-3在胰腺癌中的表达与细胞凋亡的关系 龙辉, 吴清明, 马松林, 刘群, 张金华, 陈新胜, 汪得胜, 赵丽莎, 李欢</p> <p>4020 转化生长因子β1基因C-509T多态与结直肠癌遗传易感性的相关性 吴慧民, 范跃祖, 刘文方, 何向蕾, 朱冠山, 朱忠政, 王爱忠</p> <p>4024 气管插管麻醉在双气囊电子小肠镜检查中的应用 黄俊梅, 张亮, 杨晓明, 薛晓东, 毛高平</p>
病例报告	<p>4027 以渗出性腹水为首表现的克罗恩病1例 刘玉然, 邱菁华, 张晓岚, 房澍名, 任锡玲</p>
致 谢	4030 致谢世界华人消化杂志编委
消 息	<p>3945 中国科技期刊引证报告(核心版)发布WJG 2007年影响因子0.745</p> <p>3952 世界华人消化杂志名词术语标准</p> <p>3962 世界华人消化杂志网络版的发表前链接</p> <p>3969 世界华人消化杂志外文字符标准</p> <p>3973 世界华人消化杂志性质、刊登内容及目标</p> <p>3983 世界华人消化杂志修回稿须知</p> <p>3987 世界华人消化杂志参考文献要求</p> <p>3992 WJG荣获2007年“中国百种杰出学术期刊”和2008年中国国际化精品科技期刊</p> <p>4003 世界华人消化杂志标点符号用法</p> <p>4023 中国科技期刊引证报告(核心版)发布世界华人消化杂志2007年影响因子0.568</p> <p>4029 世界华人消化杂志正文要求</p>
封面故事	<p>Boscá MM, Añón R, Mayordomo E, Villagrasa R, Balza N, Amorós C, Cortés JR, Benages A. Methotrexate induced sprue-like syndrome. <i>World J Gastroenterol</i> 2008; 14(45): 7009-7011 http://www.wjgnet.com/1007-9327/14/7009.asp</p>
本期责任人	<p>编务 李慧; 送审编辑 李军亮; 组版编辑 吴鹏朕; 责任编辑 李军亮; 英文编辑 张海宁; 审核编辑 张海宁; 形式规范 马连生</p>

<div><p>Shijie Huaren Xiaohua Zazhi</p><p>吴阶平 题写封面刊名 陈可冀 题写版权刊名 (旬刊)</p><p>创 刊 1993-01-15 改 刊 1998-01-25 出 版 2008-12-18 原刊名 新消化病学杂志</p></div>		<p>编辑 世界华人消化杂志编辑委员会 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com</p> <p>出版 世界华人消化杂志编辑部 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com</p> <p>印刷 北京科信印刷厂</p> <p>发行 国内: 北京报刊发行局 国外: 中国国际图书贸易总公司 (100044, 北京市399信箱)</p> <p>订购 全国各地邮电局</p> <p>邮购 世界华人消化杂志编辑部 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com</p>		<p>世界华人消化杂志是一份同行评议性的旬刊, 是一份被《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊.《世界华人消化杂志》的英文摘要被美国《化学文摘》, 荷兰《医学文摘库/医学文摘》和俄罗斯《文摘杂志》收录.</p> <p>世界华人消化杂志正式开通了在线办公系统(http://wcjd.wjgnet.com), 所有办公流程一律可以在线进行, 包括投稿、审稿、编辑、审读, 以及作者、读者、编者之间的信息反馈交流.</p> <p>特别声明 本刊刊出的所有文章不代表本刊编辑部和本刊编委会的观点, 除非特别声明. 本刊如有印装质量问题, 请向本刊编辑部调换.</p> <p>2008年版权归世界华人消化杂志所有</p>	
<p>中国标准连续出版物号 ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R</p>		<p>邮发代号 82-262</p>	<p>国外代号 M 4481</p>	<p>国内定价 每期24.00元 全年864.00元</p>	<p>广告经营许可证 1401004000050</p>

World Chinese Journal of Digestology

December 2008 Contents in Brief Volume 16 Number 35

EDITORIAL	3933 Advance in treatment and diagnosis of portal hypertensive biliopathy <i>Zhang XL, An JY</i>
BASIC RESEARCH	<p>3937 Construction of pEGFP-restin recombinant plasmid and its expression in BGC-803 gastric cancer cells <i>Dai C, Li JY</i></p> <p>3941 Effect of short hairpin RNA on K-ras expression in human pancreatic cancer cell line <i>Li DB, Zheng ZG, Xu XM, Guo H, Zhao XL, Huang LF, Cai JH</i></p> <p>3946 Anticancer effect of cation lipofectin-mediated CD/5-FC suicide gene system on liver, biliary duct and pancreas carcinoma cells <i>in vitro</i> <i>Liu GY, Luo Q, Zhuang WC, Yang SM, Wei LY</i></p> <p>3953 Expression and nucleus translocation of calcyclin binding protein in colon cancer cells <i>Zhai HH, Chen X, Lu YY, Wang X, Fan DM</i></p>
CLINICAL RESEARCH	<p>3958 Multisection spiral CT perfusion for patients with acute pancreatitis <i>Wang FJ, Chen WC, Guo L, Fang XM</i></p> <p>3963 Expression of SFRP2 and β-catenin in the carcinogenesis and progression of colorectal carcinoma <i>Liu N, Jiang HX, Hang ZN, Qin SY, Li X</i></p>
REVIEW	<p>3970 Intraganglionic laminar endings and esophageal visceral perception <i>Kong X, Xu SC</i></p> <p>3974 Ischemic hepatitis <i>Rao SS, Li JY</i></p> <p>3979 Situation in treatment of ulcerative colitis by Chinese and Western medicine <i>Yu HS, Hong Y, Wang YR</i></p>
RAPID COMMUNICATION	<p>3984 Cloning and expression of gastric cancer related gene GCRG123 in <i>E.coli</i> <i>Wu YQ, Wang GS, Wang MW, Wu BY, You WD</i></p> <p>3988 Two-dimensional liquid chromatography analysis of differential proteome of liver plasma membrane in mice with endotoxic shock <i>Li HM, Chen L, Xia GX, Zhao MZ, Hu SW, Jiang Y</i></p>
CLINICAL PRACTICE	<p>3993 Expression of ghrelin in gastric mucosa of patients with primary bile reflux gastritis <i>Li LY, Wang Q, Xu L</i></p> <p>3997 Therapy of paclitaxel plus oxaliplatin as a second line chemotherapy for patients with advanced gastric cancer: an analysis of 23 cases <i>Wu XP, Zhuang YZ, Jiang H, Wu YH, Dai WX, Ai XH, Tang SY</i></p> <p>4000 Plasma replacement therapy for severe viral hepatitis: an analysis of 42 cases <i>Zhang L, Jiang HY, Luo ZH, Li PG, Zhang AN, Li SQ</i></p> <p>4004 Bile bacterial investigation in patients with cholelithiasis <i>Li FD, Qiu FB, Liu N</i></p> <p>4008 Clinicopathologic features of gallbladder carcinosarcoma <i>Li BF, Liu YF, Shi R, Liu ZL</i></p>

	<p>4012 Expression of recepteur d'origine nantais in pancreatic cancer and its significance <i>Zhou K, Wang H, Tu CY, Wu LS</i></p> <p>4015 Expression of Midkine and Caspase-3 and their relationship with apoptosis in pancreatic cancer <i>Long H, Wu QM, Ma SL, Liu Q, Zhang JH, Chen XS, Wang DS, Zhao LS, Li H</i></p> <p>4020 Transforming growth factor-beta 1 gene C-509T polymorphism and genetic susceptibility to colorectal cancer <i>Wu HM, Fan YZ, Liu WF, He XL, Zhu GS, Zhu ZZ, Wang AZ</i></p> <p>4024 Anesthetic management in double-balloon video enteroscopy <i>Huang JM, Zhang L, Yang XM, Xue XD, Mao GP</i></p>
CASE REPORT	<p>4027 Exudative ascites as initial presentation of Crohn's disease: a case report <i>Liu YR, Di JH, Zhang XL, Fang SM, Ren XL</i></p>
ACKNOWLEDGMENT	<p>4030 Acknowledgments to reviewers of World Chinese Journal of Digestology</p>
COVER	<p><i>Boscá MM, Añón R, Mayordomo E, Villagrasa R, Balza N, Amorós C, Corts JR, Benages A.</i> Methotrexate induced sprue-like syndrome. <i>World J Gastroenterol</i> 2008; 14(45): 7009-7011 http://www.wjgnet.com/1007-9327/14/7009.asp</p>
RESPONSIBLE EDITORS FOR THIS ISSUE	<p>Assistant Editor: <i>Hui Li</i> Review Editor: <i>Jun-Liang Li</i> Electronic Page Editor: <i>Peng-Zhen Wu</i> Editor-in-Charge: <i>Jun-Liang Li</i> English Language Editor: <i>Hai-Ning Zhang</i> Proof Editor: <i>Hai-Ning Zhang</i> Layout Editor: <i>Lian-Sheng Ma</i></p>

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

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

Founded on January 15, 1993
Renamed on January 25, 1998
Publication date December 18, 2008

NAME OF JOURNAL
World Chinese Journal of Digestology

RESPONSIBLE INSTITUTION
Department of Science and Technology
of Shanxi Province

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

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

PRINTING
Beijing Kexin Printing House

PUBLISHING

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

OVERSEAS DISTRIBUTOR

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

HONORARY EDITOR-IN-CHIEF
Bo-Rong Pan

EDITOR-IN-CHIEF
Lian-Sheng Ma

SCIENCE EDITORS
Director: Hai-Ning Zhang

SUBSCRIPTION
RMB 24 Yuan for each issue
RMB 864 Yuan for one year

CSSN

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

COPYRIGHT

© 2008 Published by *WCJD*. All rights reserved; no part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise without the prior permission of *WCJD*. Authors are required to grant *WCJD* an exclusive licence to publish.

SPECIAL STATEMENT

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

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

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

Copyright © 2008 by Editorial Department of *World Chinese Journal of Digestology*

门脉高压性胆病诊治进展

张晓岚, 安君艳

张晓岚, 安君艳, 河北医科大学第二医院消化科 河北省石家庄市 050000

张晓岚, 教授, 主任医师, 主要从事肝纤维化和炎症性肠病发病机制的研究。

作者贡献分布: 张晓岚负责本文的构思、设计, 写作由张晓岚和安君艳完成。

通讯作者: 张晓岚, 050000, 河北省石家庄市, 河北医科大学第二医院消化科, xiaolanzh@126.com

电话: 0311-66002301

收稿日期: 2008-12-02 修回日期: 2008-12-11

接受日期: 2008-12-15 在线出版日期: 2008-12-18

Advance in treatment and diagnosis of portal hypertensive biliopathy

Xiao-Lan Zhang, Jun-Yan An

Xiao-Lan Zhang, Jun-Yan An, Department of Gastroenterology, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China

Correspondence to: Xiao-Lan Zhang, Department of Gastroenterology, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China. xiaolanzh@126.com

Received: 2008-12-02 Revised: 2008-12-11

Accepted: 2008-12-15 Published online: 2008-12-18

Abstract

Portal hypertensive biliopathy (PHB) refers to abnormalities of the entire biliary tract including intrahepatic and extrahepatic bile ducts, cystic duct and gallbladder in patients with portal hypertension. The pathogenesis of PHB is not clearly known and it has been postulated that external pressure by dilated veins of portal cavernoma and/or ischaemic strictures of the bile duct may play a role. Approximately 20% of patients are with symptoms of biliary system, which is associated with higher age, longer duration of diseases, higher frequency of common bile duct (CBD) stones and gallbladder stones, and abnormal liver function. Magnetic resonance (MR) cholangiography and MR portography are the initial choice of investigation in the evaluation of PHB. Endoscopy or surgical method is optional to treat patients with symptoms, aiming at management of portal hypertension and relief of obstructive jaundice.

Key Words: Portal hypertensive biliopathy; Extrahepatic portal venous obstruction; Diagnosis; Treatment

Zhang XL, An JY. Advance in treatment and diagnosis of portal hypertensive biliopathy. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(35): 3933-3936

摘要

门脉高压性胆病(PHB)为继发于门静脉高压特别是肝外门静脉阻塞患者的肝内、外胆管和/或胆囊壁、胆囊管的异常改变。PHB的发病机制尚不完全清楚, 目前认为与门静脉海绵状血管瘤曲张压迫胆管和胆管壁缺血性损害有关。约20% PHB患者存在胆道系统症状, 且与年龄、疾病持续时间、胆石症的发生频率以及肝功能异常相关。磁共振胆管造影术和门静脉造影术是PHB患者的首选检查方法, 有症状者可予内镜或外科手术治疗, 治疗目的为降低门脉高压和解除梗阻。

关键词: 门脉高压性胆病; 肝外门静脉阻塞; 诊断; 治疗

张晓岚, 安君艳. 门脉高压性胆病诊治进展. *世界华人消化杂志* 2008; 16(35): 3933-3936

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3933.asp>

0 引言

肝外门静脉阻塞(extrahepatic portal venous obstruction, EHPVO)是门脉高压的常见病因, 在发展中国家占到了40%, 也是儿童上消化道出血的常见病因。早在1965年, Gibson *et al*^[1]就报道了EHPVO与黄疸的相关性; 1992年, Sarin *et al*^[2]将这种继发于门脉高压患者的肝内、外胆管和/或胆囊壁的异常改变称为门脉性胆道病(portal biliopathy); 此后, 又有多位学者报道了因EHPVO、门静脉海绵状血管变形而并发的症状性胆管梗阻病例; 2007年, Dhiman *et al*^[3]建议将这种门脉高压导致的胆管异常称之为门脉高压性胆病(portal hypertensive biliopathy, PHB)。胆管异常包括局部狭窄、扩张、壁凹凸不平、成角、移位及结石形成等, 胆囊管偶被累及。

1 病因和发病机制

1.1 病因 PHB可继发于任何病因引起的门脉高

■背景资料

门脉高压性胆病为门脉高压症的晚期并发症, 肝外门静脉阻塞是其主要病因。由于大多数患者无症状, 故极易引起漏诊, 目前国内报道罕见。

■同行评议者

刘绍能, 主任医师, 中国中医科学院广安门医院消化科

■研发前沿

随着检测水平的提高,门脉高压性胆病亦开始引起临床工作者的关注,研究热点主要集中在该病的发病机制、诊断及治疗措施的合理选择。

压症,但以EHPVO多见。Dialawari *et al*统计521例门脉高压症患者发现,由EHPVO引起者占40%,肝硬变占41%,非硬变性门脉纤维化占18%,其中在EHPVO的原因中,门静脉血栓是主因^[4]。经内镜下逆行性胰胆管造影(endoscopic retrograde cholangiopancreatography, ERCP)证实, EHPVO患者中81%-100%有胆病表现,远高于肝硬化患者(0%-33%)或特发性门脉高压患者(9%-40%)^[5]。

门静脉血栓形成为EHPVO的重要病因和发病机制,而引起门静脉血栓形成的因素有以下3类:(1)直接损伤门静脉的病变,如脐炎、脐静脉插管、新生儿腹膜炎、腹腔内各种化脓性感染、急性慢性胰腺炎、腹部创伤、肝癌及其他肿瘤浸润等;(2)门静脉先天性畸形,如门静脉狭窄、闭锁或发育不全等;(3)间接引起门静脉血栓形成的疾病,如败血症、脱水以及骨髓增生性病变,遗传性天然抗凝物质如AT II、蛋白C、蛋白S缺乏等引起的高凝状态。

1.2 发病机制 PHB的发病机制尚不完全清楚。目前认为肝门部海绵状血管瘤的压迫和/或胆管壁缺血可能发挥着关键作用^[6-7]。

肝外胆管环绕两个静脉系统:(1)胆总管上静脉丛-Saint网状静脉丛,为紧贴胆总管和肝管外壁的纤细网状血管丛,正常情况下内径不超过1 mm;(2)胆总管旁静脉丛-Petren静脉丛,他与胆管壁平行,直接与胃、胰十二指肠静脉和门静脉相通,汇入肝内静脉。门静脉血栓形成或EHPVO发生后,即可导致门脉周围与胆管周围向肝性侧支循环的发生,形成所谓门脉海绵窦样转化(cavernous transformation of the portal vein, CTPV)或门脉海绵状血管瘤。由于胆管壁薄而软,被侧支血管以及胆管旁曲张的静脉压迫后,凸入胆管腔内,血供受损而发生缺血性改变,使胆管内壁凹凸不平,并可形成细小的不规则瓣膜样改变,呈现类似食管静脉曲张的外观。病变主要位于胆总管,左肝管也常受累,且较严重,可能与脐静脉汇入门静脉左支处易形成显著侧支血管有关。上述病变导致了胆管造影上的各种改变,包括:不规则状、局灶性狭窄,成角、变位、充盈缺损,波浪状与口径改变,狭窄以上胆管扩张,这些改变称为“胆管周围静脉曲张外压性改变”或“假性硬化性胆管炎”,或“假性胆管癌征”,可继发病状性胆道梗阻、胆管炎与结石形成。

组织学和形态学研究表明,海绵状血管瘤的形成不仅与门静脉周围静脉曲张有关,而且与静脉内血栓形成导致的脉管新生和结缔组织

生成有关,后者可导致疏松的、肿瘤样固体物质形成,且在分流手术后不能消失^[6,8]。

除静脉曲张压迫胆管而致胆病外,胆道系统的改变可能还与引流胆管的静脉内血栓形成致胆管壁缺血性损害有关,但其引起胆管损伤的机制尚不清楚。有学者认为,门静脉血栓导致的静脉损伤,可通过损害毛细血管和小动脉形成的血管网而引起胆管的狭窄和扩张,进而导致胆管的缺血坏死。经胆管造影证实,PHB患者的肝内和肝外胆管狭窄或扩张与肝移植后缺血引起的胆管改变相类似^[9],说明缺血可能在PHB的发病中发挥着一定作用。

Dhiman *et al*^[3]认为这两种机制可同时存在,因为胆病的一些表现如切迹形成、管壁凹凸不平、光滑压迹引起的狭窄等在外科分流术后,随胆总管旁侧支血管的消失而消失;但另一些变化如胆管成角、扩张则可持续存在,提示系缺血引起的胆管固定性狭窄和梗阻^[10]。

2 临床表现

虽然大部分EHPVO患者均存在胆道的异常,但仅少数患者有腹痛、黄疸、瘙痒或发热等症状。其临床特征可分为两类:(1)与慢性胆汁淤积相关的症状,这主要是由扩张的静脉丛压迫胆管或缺血所致;(2)与胆石相关的症状,即胆绞痛和胆囊炎。

据Dhiman *et al*^[3]报道,53例EHPVO患者中,仅13例(24.5%)有胆道系统症状,其中腹痛10例(18.9%),黄疸9例(17%),发热2例(15%),胆管炎3例(23%)。同无症状的患者相比,这些患者的症状与年龄、疾病持续的时间、胆结石的发生频率以及肝功能异常有关。Sezgin *et al*^[11]调查表明存在胆道系统症状的EHPVO患者中位年龄为39岁,提示有症状的患者多为成年人,这可能与其EHPVO病程较长有关。

此外,尚有少数患者存在胆总管结石,Bhatia *et al*^[12]认为可能是由胆管狭窄引起的胆汁淤积所致;还有一些患者存在肝功能的异常,表现为腹水、低白蛋白血症和凝血酶原时间延长,且随年龄增长和疾病持续时间延长,肝功能异常增多^[13],再次表明PHB为EHPVO的晚期并发症。

另有一些患者因消化道出血就诊,经检查证实为食管静脉曲张破裂出血,并伴有胆病。EHPVO患儿常发育迟缓,多伴有脾功能亢进。

3 辅助检查

3.1 ERCP ERCP被视为诊断PHB的最重要手段,不但能对病变进行诊断,必要时还可进行针对

■相关报道

Dhiman *et al*报道,53例肝外门静脉阻塞患者中,仅13例(24.5%)有胆道系统症状,其中腹痛10例(18.9%),黄疸9例(17%),发热2例(15%),胆管炎3例(23%)。

性治疗, 且对儿童患者的诊断也极有价值. PHB患者的胆管造影可见各种改变, 主要表现为胆总管和/或肝管壁凹凸不平, 局灶性或多发性的、长度不等的狭窄, 局灶性结节状扩张, 结石引起的充盈缺损, 胆管移位, 切迹、成角畸形, 肝内胆管聚集或呈人工修剪状. 有些征象易与硬化性胆管炎或胆管癌相混淆. 多数患者(55%-100%)左肝管异常, 壁凹凸不平, 肝内分支呈葡萄串样扩张; 右肝管变化则不明显, 少数充盈欠佳. 大多数肝硬化或特发性门脉高压症患者仅可见肝内胆管的异常, 而EHPVO患者同时存在肝内和肝外胆管的异常^[14]. 此外, 少数患者还可看到胆囊管或胆囊壁的异常.

根据ERCP所见, 可将PHB分为4型. I型: 病变仅累及肝外胆管; II型: 仅肝内胆管受累; III型: 同时累及肝外和一侧(左或右)肝内胆管; IV型: 肝外胆管和两侧肝内胆管同时受累.

3.2 磁共振胆管造影术和门静脉造影术 磁共振胆管造影术为非侵入性检查, 可清晰显示扩张的管道且不受肠腔气体的干扰, 缺点是无法测量血流频谱, 不能了解血流走行方向. 磁共振造影术在检查EHPVO患者的胆汁异常方面同ERCP技术不相上下, 但在检测肝内胆管异常以及鉴别胆总管扩张与胆总管结石方面则优于ERCP^[3,15]. Condat *et al*^[6]认为, 磁共振造影术的检测结果与ERCP相类似, 但后者属于半侵入性检查手段, 对有症状的PHB患者应当限制使用. 门静脉造影术可清晰显示门静脉系统血管构成异常, 特别是门静脉与腔静脉间的侧支循环形成及严重程度, 也可发现EHPVO及CTPV等改变. 因此, 磁共振胆管造影术和门静脉造影术应当作为PHB患者的首选检查手段.

3.3 超声 PHB患者肝脏回声多正常; 典型者门静脉呈蜂窝状或多囊状, 血流方向不规则, 可呈动静脉混合性血流, 其他患者可见门静脉血栓、变形、狭窄或显示不清, 门静脉壁增厚及周围有多少不等的增粗迂曲的侧支血管; 因肝门处回声改变, 原有解剖结构紊乱, 胆管难以辨认. 肝门处胆管局部扩张, 可合并胆管结石; 胆管被扭曲的侧支血管环绕; 部分患者肝内胆管扩张. 胆囊常增大, 约30%-55%患者可见胆囊静脉曲张, 声像图见胆囊壁内或其周围、胆囊窝中扭曲扩张的血管; 胆囊收缩功能正常, 且很少合并胆囊结石. 脾脏增大, 脾静脉扩张, 脾门、胰腺和左肾周围均可见侧支血管.

3.4 超声内镜 超声内镜(endoscopic ultrasonography, EUS)在鉴别胆总管扩张和/或胆总管结石方

面有较大的应用价值. Palazzo *et al*^[16]对21例患者进行超声内镜检查发现, 16例患者(76%)可见胆总管壁静脉曲张, 11例患者胆总管周围静脉曲张(52%), 9例患者存在胆囊血管曲张(43%), 其中3例患者表现为梗阻性黄疸, 且这3例患者的静脉曲张均在胆总管.

在诊断PHB中, 应联合应用超声内镜, 因其在诊断肝外胆管病变方面可提供有价值的信息, 尤其是当其他影像学检查无阳性发现时, 其可揭示胆道阻塞的病因, 包括血管曲张、结石、狭窄或肿瘤.

3.5 实验室检查 部分患者血清胆红素升高(37.6-164.2 $\mu\text{mol/L}$). 血清碱性磷酸酶常明显升高, 可达患者年龄上限值的2-5倍; 此项检查有助于门静脉高压疑似合并胆病患者的随访. 免疫学指标如血清抗核抗体、抗线粒体抗体及抗平滑肌抗体等一般阴性.

3.6 其他检查 (1)内镜: EHPVO患者发生其他异位静脉曲张的概率明显增高, 可达20%-30%. Bayraktar *et al*报道了17例存在“假性胆管癌征”的CTPV患者, 经内镜检查发现患者均有不同程度的十二指肠静脉曲张, 多位于降部大弯侧^[17]. (2)肝活检: EHPVO患者的肝组织学检查未发现胆管缺失、胆小管增生、汇管区炎症或肝硬化等改变.

4 治疗

迄今, 尚未对PHB的治疗达成共识. 无症状的PHB患者无需治疗, 对有症状的PHB患者强调个体化治疗, 原则上应着重处理肝外型门脉高压所致的出血和解除胆道梗阻.

4.1 内镜治疗 内镜治疗包括内镜下括约肌切开术、取石术、机械性碎石术以及胆管狭窄扩张术等, 其中内镜下乳头括约肌切开取石和/或放置胆管支架是治疗存在胆总管结石或胆管结石合并胆管炎的PHB患者的首选方法. 但内镜治疗不能解除原发的胆管梗阻, 故术后结石的复发率很高. 切开乳头取石时应谨防损伤位于壶腹及其附近的粗大侧支血管, 以免引发大出血. 并发食管静脉曲张破裂出血的患者可注射硬化剂, 但硬化疗法会加重胆总管旁静脉曲张, 使PHB恶化.

4.2 外科手术 有症状的胆管阻塞患者不能接受内镜治疗时, 以及内镜治疗后胆管梗阻复发或进展时, 均应考虑外科手术治疗. 在EHPVO门静脉高压十分明显的状态下, 肝门处被具有多条曲张静脉的纤维组织包裹, 肝十二指肠韧带增厚、纤维变性, 也存在大量扭曲的静脉; 胆总管显示不清, 术者常将侧支血管误认为胆总管; 施行胆

■应用要点

本文围绕门脉高压性胆病的发病机制、诊断和治疗进展进行了综合、详细的介绍, 总结了各种检测手段的应用价值, 探讨了内镜治疗和手术治疗的适应证、临床应用的利弊以及当前门脉高压性胆病治疗中的一些误区, 强调应选择个体化治疗方案, 对临床工作具有指导意义.

■同行评价

门脉高压性胆病在临床上应是较多见,但研究较少。本文综述了目前的研究进展,较好地反映了门脉高压性胆病的病因、发病机制、诊断及治疗现状,具有一定的可读性。

道手术十分棘手,术中可能伤及丰富的侧支血管,发生大出血的危险性极大。因此,首先应认清PHB之主要矛盾是门脉高压,即门静脉主干闭塞引起的EHPVO所继发的肝十二指肠韧带内、门脉周围、胆管周围甚至胆管的静脉曲张,引起的胆道梗阻。综上,门体分流应是一线的根本治疗。

业已证实,症状性PHB是门体分流术的指征之一^[18]。手术可减少侧支循环形成、减轻围绕胆总管的侧支静脉曲张程度,缓解因其压迫而造成的胆管梗阻。而且门体分流术还能预防消化道静脉曲张破裂出血,减轻继发于PHB的肝功能改变,并有助于纠正患儿发育迟缓。EHPVO患者的肝功能相对较好,甚至能耐受紧急情况下的门体分流术。但手术仍有一定死亡率,有时术中找不到可供分流的血管。

有一些患者在门体分流术后胆道系统的改变和症状仍然存在,须接受Ⅱ期手术:肝空肠吻合术方能解除胆道梗阻^[10,19]。但手术常因为腹腔内存在大量侧支静脉或其他原因而失败^[20]。对内窥镜治疗或外科手术失败的难治性患者,肝移植将成为其唯一选择。

4.3 其他治疗 近年报道,PHB患者在经颈静脉肝内门体分流(transjugular intrahepatic portosystem shunt, TIPS)术后胆管病变也可消失^[19]。经皮经肝途径充气扩张狭窄胆管取石也曾获得成功^[20]。

5 结论

PHB是继发于门脉高压的胆道系统异常,ERCP或胆总管造影术往往有阳性发现。在各种原因引起的门脉高压中,EHPVO导致的PHB最为多见,但也可见于肝硬化患者或特发性门脉高压患者。大多数PHB患者或被其他症状所掩盖,仅约有1/5的患者可表现出腹痛、黄疸、发热等胆道系统症状。PHB的发病机制尚不完全清楚,可能与肝门部海绵状血管瘤的压迫和胆管壁缺血有关。无症状的PHB患者无需治疗,有症状的PHB患者应根据其疾病特征选择个体化的治疗方案,主要包括内镜治疗和外科手术治疗,但两种治疗手段并不矛盾,而是互相补充。

6 参考文献

- Gibson JB, Johnston GW, Fulton TT, Rodgers HW. Extrahepatic portal-venous obstruction. *Br J Surg* 1965; 52: 129-139
- Sarin SK, Bhatia V, Makwana U. Portal biliopathy in extrahepatic portal venous obstruction. *Indian J Gastroenterol* 1992; 11(Suppl 1): A82
- Dhiman RK, Behera A, Chawla YK, Dilawari JB, Suri S.

- Portal hypertensive biliopathy. *Gut* 2007; 56: 1001-1008
- Dilawari JB, Chawla YK. Pseudosclerosing cholangitis in extrahepatic portal venous obstruction. *Gut* 1992; 33: 272-276
- Chandra R, Kapoor D, Tharakan A, Chaudhary A, Sarin SK. Portal biliopathy. *J Gastroenterol Hepatol* 2001; 16: 1086-1092
- Condat B, Vilgrain V, Asselah T, O'Toole D, Rufat P, Zappa M, Moreau R, Valla D. Portal cavernoma-associated cholangiopathy: a clinical and MR cholangiography coupled with MR portography imaging study. *Hepatology* 2003; 37: 1302-1308
- Dhiman RK, Puri P, Chawla Y, Minz M, Bapuraj JR, Gupta S, Nagi B, Suri S. Biliary changes in extrahepatic portal venous obstruction: compression by collaterals or ischemic? *Gastrointest Endosc* 1999; 50: 646-652
- Chaudhary A, Dhar P, Sarin SK, Sachdev A, Agarwal AK, Vij JC, Broor SL. Bile duct obstruction due to portal biliopathy in extrahepatic portal hypertension: surgical management. *Br J Surg* 1998; 85: 326-329
- Cameron AM, Busuttil RW. Ischemic cholangiopathy after liver transplantation. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2005; 4: 495-501
- Sarin SK, Agarwal SR. Extrahepatic portal vein obstruction. *Semin Liver Dis* 2002; 22: 43-58
- Sezgin O, Oğuz D, Altıntaş E, Sarıtaş U, Sahin B. Endoscopic management of biliary obstruction caused by cavernous transformation of the portal vein. *Gastrointest Endosc* 2003; 58: 602-608
- Bhatia V, Jain AK, Sarin SK. Choledocholithiasis associated with portal biliopathy in patients with extrahepatic portal vein obstruction: management with endoscopic sphincterotomy. *Gastrointest Endosc* 1995; 42: 178-181
- Rangari M, Gupta R, Jain M, Malhotra V, Sarin SK. Hepatic dysfunction in patients with extrahepatic portal venous obstruction. *Liver Int* 2003; 23: 434-439
- Malkan GH, Bhatia SJ, Bashir K, Khemani R, Abraham P, Gandhi MS, Radhakrishnan R. Cholangiopathy associated with portal hypertension: diagnostic evaluation and clinical implications. *Gastrointest Endosc* 1999; 49: 344-348
- Shin SM, Kim S, Lee JW, Kim CW, Lee TH, Lee SH, Kim GH. Biliary abnormalities associated with portal biliopathy: evaluation on MR cholangiography. *AJR Am J Roentgenol* 2007; 188: W341-W347
- Palazzo L, Hochain P, Helmer C, Cuillerier E, Landi B, Roseau G, Cugnenc PH, Barbier JP, Cellier C. Biliary varices on endoscopic ultrasonography: clinical presentation and outcome. *Endoscopy* 2000; 32: 520-524
- Bayraktar Y, Balkanci F, Kayhan B, Ozenç A, Arslan S, Telatar H. Bile duct varices or "pseudocholangiocarcinoma sign" in portal hypertension due to cavernous transformation of the portal vein. *Am J Gastroenterol* 1992; 87: 1801-1806
- Vibert E, Azoulay D, Aloia T, Pascal G, Veilhan LA, Adam R, Samuel D, Castaing D. Therapeutic strategies in symptomatic portal biliopathy. *Ann Surg* 2007; 246: 97-104
- He ZP, Fan LJ. Diagnosis and treatment of portal biliopathy. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2002; 1: 581-586
- Perego P, Cozzi G, Bertolini A. Portal biliopathy. *Surg Endosc* 2003; 17: 351-352

pEGFP-restin重组质粒的构建及其在BGC-803胃癌细胞中的表达

戴聪, 李锦毅

戴聪, 辽宁医学院研究生院 辽宁省锦州市 121001
李锦毅, 武警总医院临床教研室 北京市 100039
戴聪, 硕士, 住院医师, 主要从事消化系统肿瘤分子机制的研究工作。
国家自然科学基金资助项目, No. 30672771
作者贡献分布: 本课题由戴聪与李锦毅设计; 研究过程由戴聪操作完成; 研究所用新试剂及工具由李锦毅提供; 数据分析与论文写作由戴聪完成。
通讯作者: 李锦毅, 100039, 北京市海淀区永定路69号, 武警总医院临床教研室, lijinyi.li@vip.sina.com
电话: 010-88276846
收稿日期: 2008-11-19 修回日期: 2008-12-05
接受日期: 2008-12-08 在线出版日期: 2009-12-18

Construction of pEGFP-restin recombinant plasmid and its expression in BGC-803 gastric cancer cells

Cong Dai, Jin-Yi Li

Cong Dai, School of Postgraduate, Liaoning Medical College, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China
Jin-Yi Li, Department of Clinical Medicine, General Hospital of Chinese People's Armed Police Forces, Beijing 100039, China
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30672771
Correspondence to: Dr. Jin-Yi Li, Department of Clinical Medicine, General Hospital of Chinese People's Armed Police Forces, 69 Yongding Road, Haidian District, Beijing 100039, China. lijinyi.li@vip.sina.com
Received: 2008-11-19 Revised: 2008-12-05
Accepted: 2008-12-08 Published online: 2008-12-18

Abstract

AIM: To construct a vector containing human restin gene and observe its expression in gastric cancer cells BGC-803 with green fluorescence protein as the reporter gene.

METHODS: Restin gene was amplified from mRNA of fetal kidney tissue by RT-PCR. The RT-PCR products and pEGFP-C1 were simultaneously digested, then purified, ligated, and transformed to construct the recombinant vector pEGFP-restin. Then the recombinant pEGFP-restin was transfected into gastric cancer cells BGC-803. The expression of green fluorescence protein was observed by fluorescence micros-

copy, and Western blot was used to examine the expression of target protein.

RESULTS: Agarose gel electrophoresis showed a 600-bp band of the RT-PCR product, which matched the expected size. Through digestion, the inserted DNA sequence was confirmed to be the premature gene of restin, which was ligated to pEGFP-C1 and transfected into BGC-803 cells successfully. The strong expression of green fluorescence protein was observed by fluorescence microscopy, and the expression of target protein was identified using Western blot.

CONCLUSION: The recombinant vector pEGFP-restin is successfully constructed, providing important subject for further investigation of restin function.

Key Words: Restin gene; Green fluorescent protein; Plasmid construction; Gene transfection; Gastric cancer

Dai C, Li JY. Construction of pEGFP-restin recombinant plasmid and its expression in BGC-803 gastric cancer cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(35): 3937-3940

摘要

目的: 构建一种含人肿瘤休眠蛋白基因(restin)的质粒, 以绿色荧光蛋白作为报告基因, 观察其在胃癌细胞中的表达, 为探讨其抗肿瘤作用的分子机制打下基础。

方法: 从人胚肾组织中, 以RT-PCR方法扩增restin基因片段, 将restin片段和增强型绿色荧光表达质粒pEGFP-C1酶切、纯化、连接、转化、筛选, 构建pEGFP-restin重组质粒, 转染胃癌细胞, 荧光显微镜下观测绿色荧光蛋白的表达, 并对表达产物进行Western blot鉴定。

结果: RT-PCR产物经琼脂糖电泳, 在预期位置(600 bp)处阳性条带表达; 重组载体经酶切分析, 插入片段表达restin基因; pEGFP-restin重组质粒成功转染胃癌细胞, 在荧光显微镜下强绿色荧光蛋白表达, Western blot鉴定结果显示

■背景资料

目前传统的肿瘤治疗特异性差, 毒副作用大, 而靶向基因治疗能通过细胞因子、受体及信号传导过程在肿瘤局部发挥作用, 可有效避免骨髓抑制、胃肠道反应及心脏损害等毒性反应, 靶向基因治疗将成为抗肿瘤的一个重要途径。

■同行评议者

李淑德, 教授, 中国人民解放军第二军医大学长海医院消化内科

■研发前沿

restin基因与内皮抑素同源,有研究表明其可抑制肿瘤血管细胞生成,通过将其与GFP构建,转染入胃癌细胞,将为动态连续观测restin蛋白抑制肿瘤血管形成及肿瘤细胞侵袭和转移的研究奠定实验基础。

pEGFP-restin上的restin基因在BGC-803细胞中正确表达。

结论:成功构建了pEGFP-restin重组质粒,为进一步研究restin的功能提供了重要的实验材料。

关键词:休眠基因;绿色荧光蛋白;质粒构建;基因转染;胃癌

戴聪, 李锦毅. pEGFP-restin重组质粒的构建及其在BGC-803胃癌细胞中的表达. 世界华人消化杂志 2008; 16(35): 3937-3940

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3937.asp>

0 引言

1999年Ramchandran *et al*^[1]发现, restin蛋白可以通过抑制肿瘤血管生成而达到控制裸鼠肿瘤生长的作用. restin蛋白与人体胶原X V α 1链羧基末端非胶原结构域(NC10 domain of α 1 chain of collagen type X V)具有相同的氨基酸序列, 由180个氨基酸组成, 广泛分布于各种组织基底膜, 尤其在心脏、骨骼肌、胎肝肾、胎盘中高表达^[2-3]. 我们前期研究发现, restin基因通过抑制肿瘤血管形成, 在肿瘤浸润及转移中发挥作用, 但目前其分子机制尚不清楚^[4]. 本实验构建了真核表达载体pEGFP-restin, 转染至胃癌细胞株BGC-803, 在荧光显微镜下观察到重组蛋白的表达, 并对表达的蛋白产物进行了Western blot鉴定. 为研究restin蛋白抗肿瘤作用奠定了实验基础。

1 材料和方法

1.1 材料 pEGFP-C1质粒由军事医学科学院庞博博士惠赠, 胃癌细胞株BGC-803由北京肿瘤医院基础所惠赠, 人胚肾组织本院妇产科提供. One Step PCR Kit(AMV)试剂盒、T4 DNA连接酶、限制性内切酶BamH I 和EcoR I、DL2000 Plus DNA-Marker, 购自北京天佑达生物科技有限公司. TRIzol-RNA提取试剂盒、DNA凝胶纯化试剂盒, 购自北京全式金生物技术有限公司. 脂质体Lipofectamin购于美国Invitron公司. PVDF膜购自美国Millipore公司. β -actin单克隆抗体、抗restin抗体购自美国Stratagene公司。

1.2 方法

1.2.1 restin基因序列的生物信息学分析及引物合成:使用Primer5.0引物设计并合成引物, 上游序列引入BamH I 酶切位点P1: 5'-ggatccatttcaagtggccaatcatgagaagcct-3'; 下游序列引入EcoR I 酶切位点P2: 5'-gaattcttacttctagcgtctgtcatgaaact-3'。

1.2.2 restin cDNA的克隆扩增与鉴定:取人胚肾组织研碎, TRIzol法提取总RNA, TaKaRa One Step RNA PCR Kit(AMV)行RT-PCR, 反应体系50 μ L: dNTP 1 μ L, RNA 1 μ g, P1、P2引物各1 μ L, AMV-Taq DNA聚合酶1 μ L, AMV-反转录酶1 μ L, 10 \times Buffer(mol/L) 2 μ L, 去离子水补充至50 μ L. 反应程序: 50 $^{\circ}$ C 30 min, mRNA逆转录为cDNA; 94 $^{\circ}$ C预变性2 min; 30个PCR循环: 94 $^{\circ}$ C变性30 s, 60 $^{\circ}$ C退火30 s, 72 $^{\circ}$ C延伸60 s; 72 $^{\circ}$ C延伸10 min. RT-PCR产物2 μ L进行15 g/L琼脂糖凝胶电泳, 与标准DNA片段(Marker)对照, 紫外线检测仪观察。

1.2.3 真核表达载体pEGFP-restin的构建、鉴定与测序:回收PCR产物, BamH I 和EcoR I 双酶切, T4连接酶连接, 重组质粒命名为pEGFP-restin, 连接产物转化感受态DNA5 α , 卡那霉素和蓝-白斑筛选阳性克隆, 接种LB培养基, 摇菌过夜, 质粒提取, PCR及酶切鉴定, 最后测序证实。

1.2.4 重组质粒: pEGFP-restin体外转染胃癌细胞:用脂质体LipofectamineTM 2000介导转染BGC-803胃癌细胞. 根据转染质粒的不同分为: pEGFP-restin转染组; 未转染重组质粒的BGC-803细胞空白对照组. 转染方法按照LipofectamineTM 2000说明书进行: 转染前胰酶消化BGC-803细胞, 接种100 mL培养瓶, 每瓶计数细胞在3 \times 10⁶个, 培养过夜细胞融合率达90%-95%, 4 μ g pEGFP-restin质粒溶于RPMI 1640, 8 μ L LipofectamineTM 2000溶于50 μ L RPMI 1640, 混合物滴入培养瓶孵育. 设对照组: 无质粒DNA的脂质体与BGC-803孵育。

1.2.5 荧光显微镜观察绿色荧光蛋白表达:在激发波长488 nm, 发射波长507 nm的荧光显微镜(Nikon-TE300)下, 观察转染后胃癌细胞内绿色荧光表达。

1.2.6 表达产物的Western blot鉴定:转染36 h后, 分别将野生型BGC-803细胞、转染空质粒pEGFP-C1和转染pEGFP-restin的BGC-803细胞培养皿置于冰上, 用冰预冷的PBS漂洗两遍, 加入150 μ L细胞裂解液, 刮取细胞移入1.5 mL EP管中, 3000 r/min离心5 min后, 收集上清. 分别上样, 进行120 g/L SDS-PAGE分离蛋白质, 并电转移至PVDF膜上. 将PVDF膜移入培养皿中, 加入50 g/L脱脂奶粉, 封闭1 h, TTBS漂洗3次后, 加入鼠抗人restin抗体(1:1000), 4 $^{\circ}$ C孵育过夜; TTBS漂洗3次, 再加入辣根过氧化酶标记的羊抗鼠IgG抗体(1:2000), 孵育1 h. 最后曝光显色, 通过IS2000R多功能影像系统获得图像. 以 β -actin为

■相关报道

自1971年Folkman首次提出“肿瘤的生长浸润依赖于肿瘤内新生血管的形成”以来, 在这一领域的研究逐渐深入, 针对肿瘤新生血管的治疗策略层出不穷, 有理由相信抗血管生成治疗特别是靶向基因治疗将成为抗肿瘤的一个重要途径。

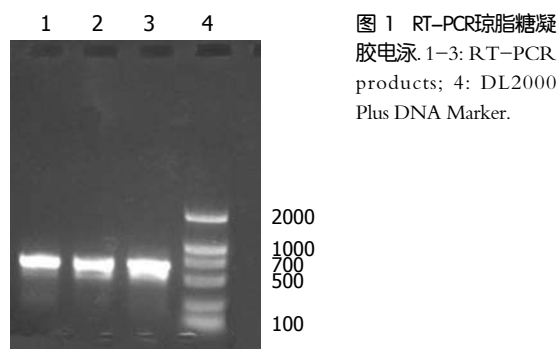


图1 RT-PCR琼脂糖凝胶电泳. 1-3: RT-PCR products; 4: DL2000 Plus DNA Marker.

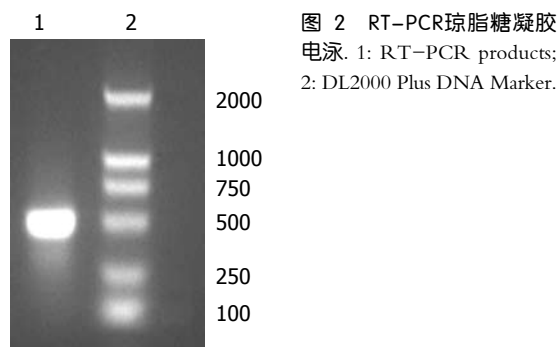


图2 RT-PCR琼脂糖凝胶电泳. 1: RT-PCR products; 2: DL2000 Plus DNA Marker.

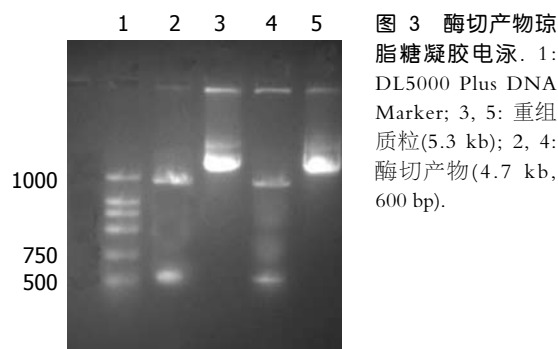


图3 酶切产物琼脂糖凝胶电泳. 1: DL5000 Plus DNA Marker; 3, 5: 重组质粒(5.3 kb); 2, 4: 酶切产物(4.7 kb, 600 bp).

内对照, 分别检测三组实验细胞restin的表达.

2 结果

2.1 restin基因总RNA表达 总RNA经琼脂糖凝胶电泳分析, 观察到5S、18S、28S条带, 有较好的完整性; RNA样本经紫外分光光度计测定值 A_{260nm}/A_{280nm} 介于1.8-2.0, RNA纯度较高.

2.2 restin基因RT-PCR结果 RNA制备目的cDNA, 以restin mRNA为模板, 反转录及Taq酶进行RT-PCR扩增, 得到目的基因片段, 经10 g/L琼脂糖凝胶电泳见特异性扩增条带, 大小约600 bp, 与理论值相符(图1-2).

2.3 重组质粒pEGFP-restin酶切鉴定及测序鉴定 pEGFP-restin重组质粒经BamH I 和EcoR I 双酶切后电泳显示, PCR产物及目的基因片段长度相符, 初步确定得到预期重组质粒(图3), 对酶切鉴定的重组质粒pEGFP-restin测序, 结果正确, 无碱基突变.

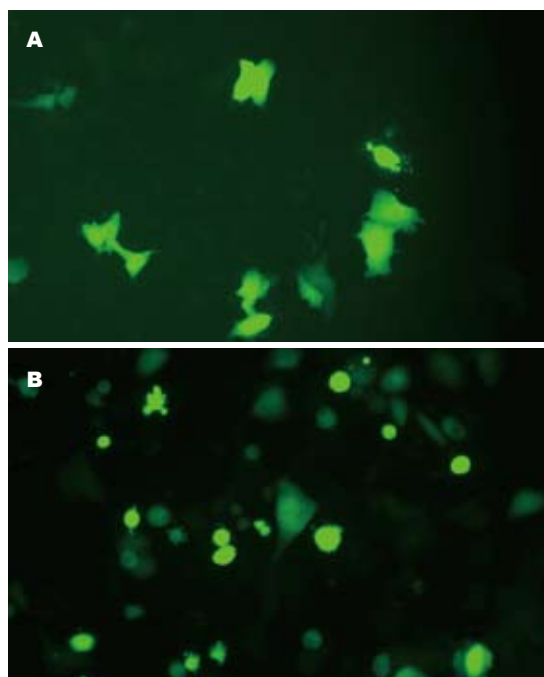


图4 荧光显微镜下重组质粒转染的BGC-803细胞(荧光显微镜×400). A: 转染后48 h的BGC-803细胞; B: 转染后72 h的BGC-803细胞.

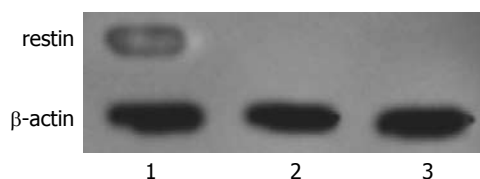


图5 Western blot鉴定结果. 1: 转染pEGFP-restin的BGC-803细胞; 2: 转染空质粒pEGFP-C1的BGC-803细胞; 3: 野生型BGC-803细胞.

2.4 胃癌细胞BGC-803转染的观察 重组质粒pEGFP-restin的表达采用脂质体法对胃癌细胞BGC-803转染和G418筛选, 荧光显微镜观察, 细胞内可见绿色荧光表达(图4).

2.5 restin基因表达产物的Western blot分析 在转染pEGFP-restin重组质粒的BGC-803细胞裂解液上清中, 发现有一特异性蛋白条带, 而转染pEGFP-C1空载体及野生型的BGC-803细胞裂解液上清中, 均未发现相应条带, 表明pEGFP-restin上的restin基因在BGC-803细胞中得到了表达(图5).

3 讨论

restin蛋白是Ramchandran *et al*^[1]在1999年发现的血管生成抑制因子, 该因子能够抑制裸鼠移植瘤的生长. 国内Xu *et al*^[5]曾经利用大肠杆菌表达了鼠源的restin蛋白, 该蛋白可抑制牛主动脉内皮细胞(BAEC)的生长, 并且引起BAEC凋亡,

■创新盘点

本文通过将restin基因与GFP构建重组质粒, 转染胃癌细胞, 并经Western blot鉴定表达蛋白、荧光显微镜观察转染的细胞, 为研究restin蛋白抑制肿瘤血管形成及肿瘤细胞侵袭和转移奠定了实验基础.

同行评价

本研究构建pEGFP-restin重组质粒,筛选出pEGFP-restin融合蛋白并在胃癌细胞中表达,对揭示胃癌转移的分子机制有重要意义。

restin蛋白与内皮抑素同为来自胶原蛋白的血管生成抑制因子,但与内皮抑素(endostatin)一样无任何毒副作用,是一种稳定的蛋白质。

绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)来源于海洋生物水母,在蓝光或紫光下可发出荧光,可以进行实时检测,已被广泛的用作报告基因进行在体和离体的实验研究^[6-7]。同时在研究基因表达,细胞分化及蛋白在生物体内定位和转运方面作用显著^[8-11],而且还能检测目的基因的高效转染和表达^[12-13]。

本课题构建了pEGFP-restin表达质粒,对克隆载体pEGFP-C1进行BamH I和EcoR I双酶切,设计了restin cDNA与pEGFP-C1相同的酶切位点,将载体片段和插入片段连接起来,形成非同源的黏-黏末端,进行定向克隆,既有效地限制了载体分子的自身环化,降低了非重组子的背景,又提高了连接效率。转化感受态菌DNA5 α 中,pEGFP-C1表达载体上含有卡那霉素抗性基因,构建的重组质粒保留了相同的抗性基因,转化了重组质粒的感受态菌在含卡那霉素的LB培养基上存活,取抗性克隆进行小量制备,经BamH I和EcoR I双酶切得到4.7 kb载体片段和600 bp插入片段,由此鉴别含有restin基因的重组质粒。将重组质粒转染入BGC-803细胞中,经G418筛选出表达pEGFP-restin的融合蛋白,N端为增强型绿色荧光蛋白EGFP,C端为restin蛋白,荧光显微镜下可直接观察到细胞发出较强的绿色荧光,且荧光强度不衰减,说明融合蛋白在BGC-803细胞中高表达,对细胞生长繁殖无不良影响。并经Western blot鉴定正确表达出restin蛋白,为初步探讨体内restin蛋白抑制肿瘤血管形成的研究奠定了实验基础。同时GFP转染肿瘤细胞后,将随着肿瘤细胞的分裂,生长而传给下代,也将随着肿瘤细胞的死亡而消亡^[14-17],因此可以动态连续检测restin蛋白对肿瘤细胞侵袭和转移的影响。

参考文献

- Ramchandran R, Dhanabal M, Volk R, Waterman MJ, Segal M, Lu H, Knebelmann B, Sukhatme VP. Antiangiogenic activity of restin, NC10 domain of human collagen XV: comparison to endostatin. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 255: 735-739
- Myers JC, Dion AS, Abraham V, Amenta PS. Type XV collagen exhibits a widespread distribution in human tissues but a distinct localization in basement membrane zones. *Cell Tissue Res* 1996; 286: 493-505
- Hagg PM, Horelli-Kuitunen N, Eklund L, Palotie A, Pihlajaniemi T. Cloning of mouse type XV collagen sequences and mapping of the corresponding gene

to 4B1-3. Comparison of mouse and human alpha 1 (XV) collagen sequences indicates divergence in the number of small collagenous domains. *Genomics* 1997; 45: 31-41

- 戴聪. 肿瘤细胞休眠与转移的生物学特性. *国际肿瘤学杂志* 2008; 35: 83-86
- Xu R, Xin L, Zhang JM, Li ZP, Gan RB. [Restin expressed in vivo suppresses the growth of tumors in nude mice] *Shengwu Huaxue Yu Shengwu Wuli Xuebao* (Shanghai) 2002; 34: 571-575
- Kisgati M, Asmis R. Generation of retroviruses for the overexpression of cytosolic and mitochondrial glutathione reductase in macrophages in vivo. *Cytotechnology* 2007; 54: 5-14
- Santos MG, Jorge SA, Brillet K, Pereira CA. Improving heterologous protein expression in transfected Drosophila S2 cells as assessed by EGFP expression. *Cytotechnology* 2007; 54: 15-24
- Malecaze F, Couderc B, de Neuville S, Serres B, Mallet J, Douin-Echinard V, Manenti S, Revah F, Darbon JM. Adenovirus-mediated suicide gene transduction: feasibility in lens epithelium and in prevention of posterior capsule opacification in rabbits. *Hum Gene Ther* 1999; 10: 2365-2372
- Hanawa H, Hematti P, Keyvanfar K, Metzger ME, Krouse A, Donahue RE, Kepes S, Gray J, Dunbar CE, Persons DA, Nienhuis AW. Efficient gene transfer into rhesus repopulating hematopoietic stem cells using a simian immunodeficiency virus-based lentiviral vector system. *Blood* 2004; 103: 4062-4069
- Lin Y, Luo E, Chen X, Liu L, Qiao J, Yan Z, Li Z, Tang W, Zheng X, Tian W. Molecular and cellular characterization during chondrogenic differentiation of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and cartilage formation in vivo. *J Cell Mol Med* 2005; 9: 929-939
- Zhong F, Zhong ZY, Liang S, Li XJ. [Transfection of GFP mRNA in dendritic cells and analysis of some factors involved] *Xibao Yu Fenzi Mianyixue Zazhi* 2006; 22: 716-719
- 张倩倩, 李春伶, 王运平, 李锦毅. 树突状细胞转染绿色荧光蛋白基因后生长特性和表型的变化. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 2607-2612
- Malecaze F, Couderc B, de Neuville S, Serres B, Mallet J, Douin-Echinard V, Manenti S, Revah F, Darbon JM. Adenovirus-mediated suicide gene transduction: feasibility in lens epithelium and in prevention of posterior capsule opacification in rabbits. *Hum Gene Ther* 1999; 10: 2365-2372
- Staton CA, Stribbling SM, Tazzyman S, Hughes R, Brown NJ, Lewis CE. Current methods for assaying angiogenesis in vitro and in vivo. *Int J Exp Pathol* 2004; 85: 233-248
- Shepherd FA. Angiogenesis inhibitors in the treatment of lung cancer. *Lung Cancer* 2001; 34 Suppl 3: S81-S89
- Sako A, Kitayama J, Koyama H, Ueno H, Uchida H, Hamada H, Nagawa H. Transduction of soluble Flt-1 gene to peritoneal mesothelial cells can effectively suppress peritoneal metastasis of gastric cancer. *Cancer Res* 2004; 64: 3624-3628
- Liu H, Peng CH, Liu YB, Wu YL, Zhao ZM, Wang Y, Han BS. Inhibitory effect of adeno-associated virus-mediated gene transfer of human endostatin on hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 3331-3334

短发夹RNA对胰腺癌细胞PANC-1突变型K-ras基因表达的影响

李冬斌, 郑志刚, 许香梅, 郭华, 赵雪莲, 黄林凤, 蔡建辉

李冬斌, 蔡建辉, 河北医科大学第二医院胃肠外科 河北省石家庄市 050000

郑志刚, 许香梅, 河北省石家庄市第一医院 河北省石家庄市 050011

赵雪莲, 河北医科大学第二医院整形外科 河北省石家庄市 050000

黄林凤, 河北衡水市第三人民医院 河北省衡水市 053100

郭华, 河北省石家庄市中心医院 河北省石家庄市 050011

李冬斌, 2004年河北医科大学硕士, 主治医师, 主要从事消化系统肿瘤的临床研究治疗。

作者贡献分布: 课题由蔡建辉设计; 李冬斌与郑志刚操作完成并撰写论文; 许香梅与郭华参与小鼠的饲养及成瘤实验及部分实验数据的统计分析; 赵雪莲与黄林凤负责参与部分标本的收集。

通讯作者: 蔡建辉, 050000, 河北省石家庄市和平西路215号, 河北医科大学第二医院胃肠外科。jianhuicai2001@163.com
电话: 0311-66002983

收稿日期: 2008-08-13 修回日期: 2008-11-03

接受日期: 2008-11-10 在线出版日期: 2008-12-18

Effect of short hairpin RNA on K-ras expression in human pancreatic cancer cell line

Dong-Bin Li, Zhi-Gang Zheng, Xiang-Mei Xu, Hua Guo, Xue-Lian Zhao, Lin-Feng Huang, Jian-Hui Cai

Dong-Bin Li, Jian-Hui Cai, Department of Gastrointestinal Surgery, the Second Affiliated Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China

Zhi-Gang Zheng, Xiang-Mei Xu, the First Hospital of Shijiazhuang, Shijiazhuang 050011, Hebei Province, China

Xue-Lian Zhao, the Second Affiliated Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China

Lin-Feng Huang, the Third Hospital of Hengshui, Hengshui 053000, Hebei Province, China

Hua Guo, the Central Hospital of Shijiazhuang, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China

Correspondence to: Jian-Hui Cai, Research Center for Surgery, the Second Affiliated Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China. jianhuicai2001@163.com

Received: 2008-08-13 Revised: 2008-11-03

Accepted: 2008-11-10 Published online: 2008-12-18

Abstract

AIM: To study the specific inhibitory effect of short hairpin RNA (shRNA) on the mutant K-ras gene expression in PANC-1 cells.

METHODS: Plasmid pGensil-1 recombinant plasmids targeting mutant K-ras gene was established. After transfection into PANC-1 cells,

the expression of K-ras gene was detected using RT-PCR, Western blot techniques, and the effect of cell proliferation was determined by CCK-8 test. And a tumor model of nude mouse was constructed through rejecting the recombination plasmids to observe the volume of tumor.

RESULTS: The recombinant plasmid encoding mutant-specific shRNA for K-ras inhibited the expression of mutant K-ras significantly ($P = 0.01$). Rates of K-ras protein expression in non-treatment group, negative control group and treatment group were 100%, $99.0\% \pm 0.73\%$, $39.9\% \pm 2.1\%$, respectively. No significant difference in K-ras protein expression was observed between non-treatment group and negative control group. A 60.1% reduction in K-ras protein expression from the treatment group to non-treatment group indicated that cell growth was significantly inhibited ($P = 0.02$); and after fourteen day's recombinant plasmid treatment, the volume of tumor grew slowly in nude mice and was significantly decreased compared with the control group ($P = 0.03$).

CONCLUSION: The specific shRNA inhibits the K-ras expression efficiently, and the growth of cells and nude mice is inhibited.

Key Words: Pancreatic cancer; K-ras; RNA interference; Short hairpin RNA

Li DB, Zheng ZG, Xu XM, Guo H, Zhao XL, Huang LF, Cai JH. Effect of short hairpin RNA on K-ras expression in human pancreatic cancer cell line. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(35): 3941-3945

摘要

目的: 研究短发夹RNA(short hairpin RNA, shRNA)对人胰腺癌细胞PANC-1中突变型K-ras基因表达的抑制作用。

方法: 构建特异性针对胰腺癌PANC-1细胞突变型K-ras基因的重组质粒pGensil-1-P1, 阴性对照质粒pGensil-1-HK并采用脂质体介导的

■背景资料

胰腺癌是严重危害人类生命健康的恶性肿瘤之一, 其恶性程度极高, 难以早期诊断和治疗, 预后极差。除早期手术外, 尚无其他有效治疗措施。随着分子生物学的发展, RNA干扰作为一种新的高效抑制特定基因表达的技术, 成为基因治疗领域的强有力的工具, 因此基于RNA干扰技术的基因治疗方法成为攻克胰腺癌新的希望。

■同行评议者

何裕隆, 教授, 中山大学附属第一医院胃肠胰腺外科

■研究前沿

K-ras基因在胰腺癌中的点突变率平均在80%左右,其中大于98%的突变形式是第12位密码子的点突变,抑制突变的K-ras基因的表达成为胰腺癌基因治疗的重点。基于RNA干扰技术的基因治疗方法能否抑制胰腺癌细胞的生长成为本研究的重点。

方法转染胰腺癌细胞。应用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)和蛋白免疫印迹(Western blot)检测K-ras基因mRNA和蛋白的表达, CCK-8方法测量细胞生长曲线。并建立人胰腺癌细胞PANC-1裸鼠皮下移植瘤模型,分别注射Pgenesil-1-P1、Pgenesil-1-HK质粒,动态观察并处死裸鼠计算肿瘤体积。

结果:测序证实质粒表达载体构建成功,短发夹RNA(shRNA)使胰腺癌细胞PANC-1突变型K-ras基因的mRNA较未治疗组、阴性对照组相比明显减少($P = 0.01$);未治疗组、阴性对照组及治疗组的K-ras蛋白表达率分别为100%, $99.0\% \pm 0.73\%$, $39.9\% \pm 2.1\%$,前两组K-ras蛋白表达差异无统计学意义,治疗组较未治疗组K-ras蛋白表达下调了约60.1%;细胞生长受到明显抑制($P = 0.02$);经重组质粒治疗14 d后,裸鼠皮下移植瘤生长缓慢,相较于对照组瘤体明显缩小($P = 0.03$)。

结论:shRNA对特异性转染组的胰腺癌细胞的突变K-ras基因表达有抑制作用,使细胞以及裸鼠移植瘤的生长受到抑制。

关键词:胰腺癌; K-ras; RNA干扰; 短发夹RNA

李冬斌, 郑志刚, 许香梅, 郭华, 赵雪莲, 黄林凤, 蔡建辉. 短发夹RNA对胰腺癌细胞PANC-1突变型K-ras基因表达的影响. 世界华人消化杂志 2008; 16(35): 3941-3945
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3941.asp>

0 引言

胰腺癌(pancreatic carcinoma)是严重危害人类生命健康的恶性肿瘤之一,其恶性程度极高而且发病隐匿,难以早期诊断和治疗,预后极差。在所有参与胰腺癌发生、发展的基因中,与其最为密切的是K-ras基因。K-ras基因在胰腺癌中的突变率平均在80%左右,其中以12位密码子突变最为常见。第12位密码子的点突变以GAT(46%), GTT(32%)和CGT(13%)三种形式最为多见^[1]。Ras基因定位于11q13,其基因家族包括H-ras、K-ras和N-ras。其编码的蛋白是位于细胞膜上的鸟苷酸结合蛋白,负责将外部信号转导到细胞内部。有研究表明抑制突变K-ras的表达,可有效抑制胰腺癌细胞的生长^[2-3]。RNA干扰(RNA interference, RNAi)技术是一项近年来发现的抑制基因表达的新技术,由于其具有特异性强、效率高等优点而成为在肿瘤研究中的热点。本实验构建针对胰腺癌细胞PANC-1突变型K-ras基因的质粒载体,建立裸鼠皮下移植瘤模型,在

体外及体内水平观察RNA干扰作用于K-ras基因突变型胰腺癌的治疗效果,为胰腺癌的基因治疗寻找新的途径。

1 材料和方法

1.1 材料 人胰腺癌细胞株PANC-1(K-ras第12位密码子突变形式为GAT)购自中科院上海细胞库。Pgenesil-1质粒购自武汉晶赛公司,质粒中量抽提纯化的试剂盒购自Promega公司。小牛血清购自杭州四季青生物有限公司,DMEM培养基购自美国Gibco公司。TRIzol及Lipofectamine™ 2000转染试剂盒均购自Invitrogen公司。cDNA第一链反应试剂盒购自Fermentas公司,PCR引物序列由上海生工生物公司合成。K-ras小鼠mAb购自Abcam公司,Actin小鼠多克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司,细胞裂解液购自华瑞公司。主要实验仪器:日本Olympus倒置显微镜;二氧化碳细胞培养箱,日本Sanyo公司;超净工作台,苏州安泰公司;HITACHI HIMAC低温离心机;电泳仪,双垂直电泳槽,水平电泳槽,北京六一仪器厂;GIS凝胶图像处理系统,上海天能科技公司;紫外线分光光度计,山东高密分析仪器厂;PCR扩增仪,美国Thermo Hybaid公司。

1.2 方法

1.2.1 质粒载体的构建、扩增和纯化:根据GenBank数据库提供的已知K-ras基因[GI: 20147726]的序列,在29-48 bp位点,选择一段19个碱基的核苷酸片段,把第12位密码子的GGT换成GAT作为靶序列,经Blast同源序列分析软件证实与人类其他基因无同源性。人工合成一对针对PANC-1细胞K-ras基因的特异性shRNA的DNA插入片段。构建治疗组重组质粒载体pGensil-1-P1以及阴性对照组质粒pGensil-1-HK。pGensil-1-P1质粒序列: 5'-gat ccG AGC TGA TGG CGT AGG CAA ttc aag acg TTG CCT ACG CCA TCA GCT Ctt ttt tgt cga ca-3', 3'-gCT CGA CTA CCG CAT CCG TTa agt tct gcA ACG GAT GCG GTA GTC GAG aaa aaa cag ctg ttc ga-5'。阴性对照组Pgenesil-1-hk质粒不针对任何mRNA序列, pGensil-1-hk质粒序列: 5'-gat ccG ACT TCA TAA GGC GCA TGC ttc aag acg GCA TGC GCC TTA TGA AGT Ctt ttt tgt cga ca-3', 3'-gCT GAA GTA TTC CGC GTA CGa agt tct gcC GTA CGC GGA ATA CTT CAG aaa aaa cag ctg ttc ga-5'将重组质粒以常规方法转化感受态大肠杆菌DH5α后,在含有卡那霉素的LB固体培养皿

里培养, 12 h后, 挑取单克隆摇菌, 重组质粒经测序证实。两种重组质粒的扩增及纯化, 参照Promega质粒中量抽提纯化试剂盒中的说明书进行。

1.2.2 细胞的培养和转染: 人胰腺癌细胞株PANC-1(K-ras第12位密码子突变形式为GAT)和Miapaca-2细胞, 用含100 mL/L小牛血清的DMEM培养基, 置于50 mL/L CO₂, 37℃条件下培养, 当细胞生长至80%融合时传代。转染前1天, 将细胞置于无抗生素的培养基中, 当细胞融合达90%-95%时按Lipofectamine™ 2000转染试剂盒的说明书进行转染。

1.2.3 RT-PCR方法检测K-ras mRNA的表达: 按cDNA第一链反应试剂盒说明书采用随机引物法合成cDNA。用β-action作为内参照进行PCR扩增。提取的总RNA通过紫外分光光度计法, 进行定量, 并调整RNA浓度, 按照cDNA第一链反应试剂盒说明, 加入各种试剂后, 用PCR仪以Oligo引物为引物合成cDNA第一链。以β-action为内参进行PCR。K-ras引物上游为: 5'-AGA GTG CCT TGA CGA TAC AGC-3', 下游: 5'-ACA AAG AAA GCC CTC CCC AGT-3', 扩增长度为198 bp。β-actin引物, 上游: 5'-AGC GGG AAA TCG TGC GTG AC-3', 下游: 5'-TGG AAG GTG GAC AGC GAG GC-3', 扩增长度为445 bp。PCR反应条件: 94℃ 5 min变性; 94℃ 1 min, 59℃ 1 min, 72℃ 30 s, 30个循环; 72℃延伸5 min。反应产物于20 g/L琼脂糖凝胶中电泳, 电压100 V, 45 min, 并用Gel 1D凝胶图像分析系统分析其光密度。

1.2.4 Western blot检测K-ras蛋白的表达: 转染48 h后, 用细胞裂解液提取胞质蛋白, 总胞质蛋白用考马斯亮蓝试剂盒定量。根据测定的蛋白样品的实际浓度, 按每个加样孔120 μg的上样量计算各组样品的实际上样量, SDS-PAGE凝胶电泳分离蛋白后, 100 V转膜60 min, 凝胶上的蛋白转移至PVDF膜; 50 g/L脱脂奶粉封闭1 h, 按1:200加入K-ras一抗, 37℃孵育2 h, 封闭液漂洗3次, 每次5 min。按1:2500加入辣根过氧化物酶标及的二抗, 37℃孵育1 h, PBST缓冲液漂洗3次, 每次5 min。化学发光法显影于胶片上。Gel 1D凝胶图像分析系统分析其光密度。

1.2.5 测定细胞生长曲线: 细胞转染后, 以1×10⁷/L接种于96孔板, 每孔100 μL, 自转染当天开始, 每天取3孔细胞应用CCK-8法检测各孔吸光度值, 绘制细胞生长曲线。

1.2.6 裸鼠皮下移植瘤实验: 将裸鼠置于SPF级环

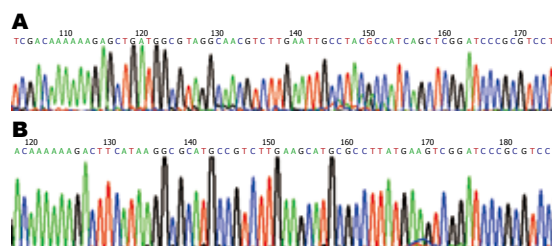


图1 质粒测序图。A: pGenesil-1-P1; B: pGenesil-1-HK。

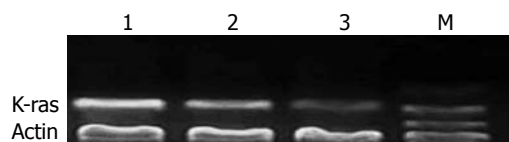


图2 RT-PCR检测PANC-1细胞K-ras mRNA的表达。1: 未治疗组; 2: 阴性对照组; 3: 治疗组; M: Marker。

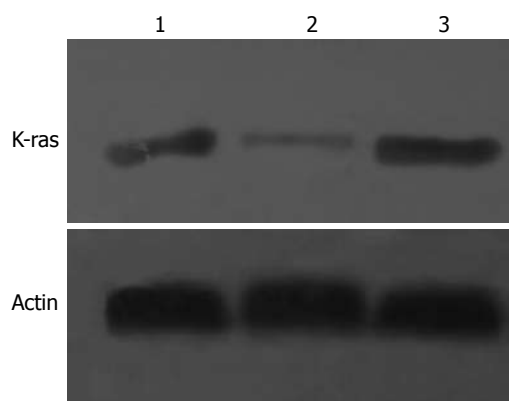


图3 Western blot结果。1: 未治疗组; 2: 治疗组; 3: 阴性对照组。

境中饲养1 wk以适应环境, 将PANC-1细胞浓度调整为4×10⁶/0.2 mL, 选取裸鼠颈部背侧皮肤为接种点, 每次接种0.2 mL。定期测量肿瘤的长径和短径, 计算肿瘤体积 = 0.5×长径×短径²。待肿瘤体积长至40-50 mm³时将裸鼠随机分为3组, 每组5只, 治疗组和阴性对照组分别注射pGenesil-1-P1、pGenesil-1-HK质粒, 每次50 μg, 隔日1次, 共7次, 未治疗组不予干预。14 d后处死, 剥离皮下肿瘤并用游标卡尺测量肿瘤体积。

统计学处理 数据用mean±SD表示, 采用SPSS13.0统计软件行t检验。

2 结果

2.1 质粒表达载体的构建 将重组质粒进行测序, 测序证实质粒载体构建成功(图1)。

2.2 半定量RT-PCR RT-PCR扩增产物琼脂糖凝胶电泳结果显示, 治疗组细胞的K-ras基因mRNA表达较阴性对照组和未治疗组的K-ras基

■ 相关报道

RNA干扰技术以原癌基因或突变的抑癌基因为靶点, 可以恢复肿瘤细胞的正常基因调控, 基因表达降低, 癌细胞生长受抑制, 从而达到治疗的目的。基于RNA干扰技术的基因治疗方法在前列腺癌、乳腺癌、结肠癌等以及在抵抗病毒感染试验中被证明是有效的。

■创新盘点

本文在体内及体外水平观察以质粒作为载体的短发夹RNA转染到胰腺癌细胞后其突变型K-ras基因mRNA及其蛋白的表达均减少,对于胰腺癌细胞生长以及对裸鼠移植瘤生长具有明显的抑制的作用。

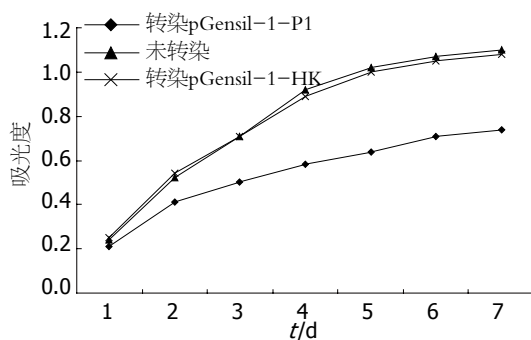


图4 CCK-8法测定转染后的细胞生长曲线。

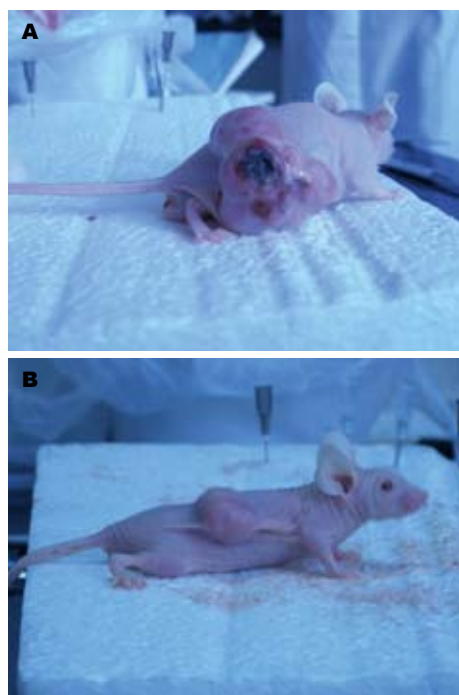


图5 裸鼠皮下移植瘤形成。

因mRNA表达明显下降,差异有统计学意义($P = 0.01 < 0.05$, 图2)。

2.3 Western blot结果 Western blot结果显示,其中1为未治疗组K-ras蛋白的表达,2和3分别为治疗组及阴性对照组的K-ras蛋白的表达。蛋白表达率分别为100%、39.9%±2.1%、99.0%±0.73%。统计分析结果表明,1、3中K-ras蛋白的表达差异无统计学意义;2较1中K-ras蛋白表达下调了约60.1%(图3)。

2.4 shRNA对细胞生长的影响 CCK-8所测细胞生长曲线显示特异性转染组较未转染组和阴性对照转染组相比细胞生长受到抑制,差异有统计学意义($P = 0.02 < 0.05$, 图4)。

2.5 裸鼠皮下移植瘤生长抑制实验 所有裸鼠对质粒注射耐受良好,治疗组的瘤体增长缓慢,而阴性对照组与未治疗组的瘤体生长速度相似,

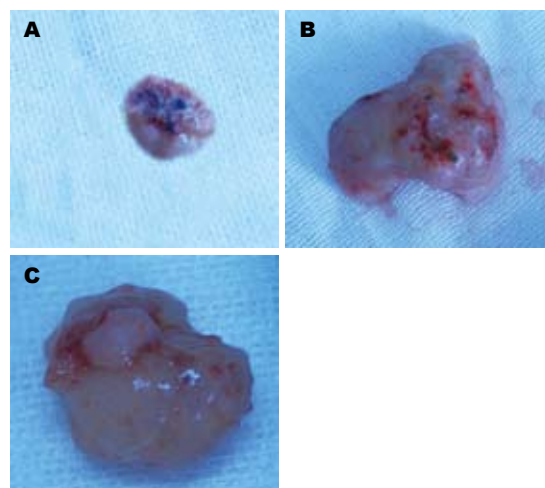


图6 离体后肿瘤体积。A: 治疗组肿瘤; B: 对照组肿瘤; C: 未治疗组肿瘤。

表1 重组质粒对裸鼠皮下移植瘤生长的影响

分组	4 wk后瘤体积(mm ³)	P值
治疗组	1.12 ± 0.04 ^{ac}	0.03
未治疗组	6.73 ± 0.14	0.64
阴性对照组	6.58 ± 0.17	0.61

^a $P < 0.05$ vs 未治疗组; ^c $P < 0.05$ vs 阴性对照组。

治疗组的平均体积抑瘤率为82.5%(图5-6, 表1)。

3 讨论

胰腺癌是常见严重危害人类生命健康的恶性肿瘤,是死亡率最高的人类恶性肿瘤之一,近年来发病率逐年上升。RNAi是由双链RNA分子介导的序列特异性转录后基因沉默现象(post transcriptional gene silencing, PTGS)^[4]。RNAi作为一种新的、强有力的研究工具,具有快速、有效、序列特异性强等优点,在某种程度上可以替代传统的反义核酸技术和基因敲除技术。研究发现RNAi抑制目的基因的作用强于反义寡核苷酸^[5]。

近年来RNAi技术已逐渐应用于肿瘤的基因治疗研究^[6-9],并已取得初步效果。肿瘤的形成是一个多阶段多步骤的发生过程,是细胞内多种基因突变累积的结果。胰腺癌是人类常见的恶性肿瘤,自1992年Cerny *et al*^[10]发现在胰腺癌的早期就有K-ras的突变后,掀起了人们对胰腺癌基因治疗研究的热潮。Brummelkamp *et al*^[2]最先用逆转录病毒介导的RNAi技术抑制了第12位密码子突变形式为GTT的胰腺癌突变型K-ras基因,未发现对野生型K-ras的影响。随后,Chen *et al*^[11]

和Fleming *et al*^[12]也用RNAi技术特异地抑制了K-ras基因的表达。

多数学者认为, 抑制细胞生长的机制是诱导细胞凋亡或阻滞细胞周期。但也有少数结果显示单纯阻断突变型K-ras基因的表达并不能有效诱导细胞凋亡, 因此, RNAi作用于胰腺癌K-ras基因的确切的机制尚需进一步研究。另外我们目前对基因功能复杂性的认识仍然不够, 尤其对外源基因表达的时空性的控制很难准确操纵, 当一些蛋白的表达受抑制时, 为维持正常代谢功能, 其他相关补偿途径可能被激活。RNAi效应分子对基因的抑制率一般也很难达到100%。因此RNAi虽然具有特异性好, 效率高等优点, 但在临床应用中仍然具有一定的风险, 尚需进一步继续研究。

本研究利用RNAi技术, 采用pGensil-1质粒构建重组质粒载体, 并成功转导入人胰腺癌细胞株PANC-1, 通过RT-PCR、Western blot方法验证了含shRNA的重组质粒载体可有效抑制人胰腺癌细胞中突变型K-ras基因的表达, CCK-8法示可明显抑制细胞的增殖, 而且将重组的pGensil-1-P1质粒注射到荷瘤裸鼠的瘤体内后可以减缓瘤体增长速度, 呈现明显的抑瘤效应。因此我们可以认为以突变型K-ras基因为靶点, 利用RNAi技术治疗肿瘤可望成为一种有效的基因治疗方法。

4 参考文献

- 1 Howe JR, Conlon KC. The molecular genetics of pancreatic cancer. *Surg Oncol* 1997; 6: 1-18
- 2 Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. Stable suppression of tumorigenicity by virus-mediated RNA interference. *Cancer Cell* 2002; 2: 243-247
- 3 Shen YM, Yang XC, Yang C, Shen JK. Enhanced therapeutic effects for human pancreatic cancer by application K-ras and IGF-IR antisense oligodeoxynucleotides. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 5176-5185
- 4 Downward J. RNA interference. *BMJ* 2004; 328: 1245-1248
- 5 Aoki Y, Cioca DP, Oidaira H, Kamiya J, Kiyosawa K. RNA interference may be more potent than antisense RNA in human cancer cell lines. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2003; 30: 96-102
- 6 Wang S, Chai YB, Liu F, Zhang XY, Jia W, Xie X, Yu WQ, Shang ZC, Jin BQ, Sun BZ. [Effect of specific siRNA targeting against bcr-abl chimeric gene on chronic myelogenous leukemia cells] *Zhonghua Yixue Zazhi* 2005; 85: 198-202
- 7 Wilda M, Fuchs U, Wössmann W, Borkhardt A. Killing of leukemic cells with a BCR/ABL fusion gene by RNA interference (RNAi). *Oncogene* 2002; 21: 5716-5724
- 8 Wang YH, Liu S, Zhang G, Zhou CQ, Zhu HX, Zhou XB, Quan LP, Bai JF, Xu NZ. Knockdown of c-Myc expression by RNAi inhibits MCF-7 breast tumor cells growth in vitro and in vivo. *Breast Cancer Res* 2005; 7: R220-R228
- 9 Zhao H, Ardelt B, Ardelt W, Shogen K, Darzynkiewicz Z. The cytotoxic ribonuclease onconase targets RNA interference (siRNA). *Cell Cycle* 2008; 7: 3258-3261
- 10 Cerny WL, Mangold KA, Scarpelli DG. K-ras mutation is an early event in pancreatic duct carcinogenesis in the Syrian golden hamster. *Cancer Res* 1992; 52: 4507-4513
- 11 Chen LM, Le HY, Qin RY, Kumar M, Du ZY, Xia RJ, Deng J. Reversal of the phenotype by K-rasval12 silencing mediated by adenovirus-delivered siRNA in human pancreatic cancer cell line Panc-1. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 831-838
- 12 Fleming JB, Shen GL, Holloway SE, Davis M, Brekken RA. Molecular consequences of silencing mutant K-ras in pancreatic cancer cells: justification for K-ras-directed therapy. *Mol Cancer Res* 2005; 3: 413-423

■同行评价

本文选题是医学目前仍难以攻克的恶性肿瘤治疗的基础研究, RNA干扰技术也是近年来研究的热点。虽内容上创新性稍嫌不足, 参考文献较旧, 但实验方法、结果和统计分析过程均较为严谨, 可重复性较高, 因此结论可靠。

编辑 史景红 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

中国科技期刊引证报告(核心版)发布 WJG 2007 年影响因子 0.745

本刊讯 2007年World Journal of Gastroenterology(WJG)的总被引频次为4431, 位居全部1723种中国科技论文统计源期刊的第14位, 内科医学类28种期刊的第1位。2007年WJG的影响因子为0.745, 内科医学类28种期刊的第10位。即年指标0.163, 他引率0.85, 引用刊数482种, 扩散因子10.88, 学科影响指标0.73。(编辑: 程剑侠 2008-12-18)

CD/5-FC自杀基因体系对肝、胆、胰肿瘤细胞的杀伤作用及机制

刘国彦, 罗琪, 庄维纯, 杨素梅, 魏黎煜

■背景资料

自杀基因又称化疗敏感基因, 化疗药物前体活化基因, 是存在于细菌或真菌中的一类基因, 哺乳动物体内缺乏。他通过编码特异的酶而转化低毒的或无毒的前体药物为具有毒性的代谢产物而发挥很强的抗肿瘤活性。

刘国彦, 罗琪, 庄维纯, 杨素梅, 魏黎煜, 厦门大学附属中山医院普外科 厦门大学消化疾病研究所 福建省厦门市 361004

刘国彦, 硕士, 主治医师, 主要从事普通外科的研究。

福建省厦门市卫生局基金资助项目, No. wsk0509

作者贡献分布: 课题设计及实验、数据分析及文章写作由刘国彦完成; 罗琪指导课题、实验及写作; 庄维纯、杨素梅及魏黎煜协助实验完成及数据整理。

通讯作者: 罗琪, 361004, 福建省厦门市, 厦门大学附属中山医院普外科; 厦门大学消化疾病研究所. xzmsh.luo@163.com
电话: 0592-2993162

收稿日期: 2008-08-05 修回日期: 2008-11-10

接受日期: 2008-11-10 在线出版日期: 2008-12-18

Anticancer effect of cation lipofectin-mediated CD/5-FC suicide gene system on liver, biliary duct and pancreas carcinoma cells *in vitro*

Guo-Yan Liu, Qi Luo, Wei-Chun Zhuang, Su-Mei Yang, Li-Yu Wei

Guo-Yan Liu, Qi Luo, Wei-Chun Zhuang, Su-Mei Yang, Li-Yu Wei, Department of General Surgery, Zhongshan Hospital; Research Institute of Digestive Diseases, Xiamen University, Xiamen 361004, Fujian Province, China
Supported by: the Foundation of Board of Health of Xiamen, No. wsk0509

Correspondence to: Dr. Qi Luo, Department of General Surgery, Zhongshan Hospital of Xiamen University, Xiamen 361004, Fujian Province, China. xzmsh.luo@163.com
Received: 2008-08-05 Revised: 2008-11-10

Accepted: 2008-11-10 Published online: 2008-12-18

Abstract

AIM: To investigate the anticancer effect of the CD/5-FC suicide gene system on carcinoma cells of liver (Bel7402), biliary duct (QBC) and pancreas (Bxpc3), and to explore the possible anticancer mechanism.

METHODS: The growth curve and multiplication time of Bel-7402 QBC and Bxpc-3 were monitored by MTT; the transfection efficiency of the three kinds of carcinoma cells were detected by FACS after instant transfection. The anticancer efficiency of cation lipofectin-mediated CD/5-FC suicide gene system were monitored by MTT *in vitro*. Then, we analyzed the relation among

multiplication time, transfection efficiency and anticancer effect; the apoptosis of CD/5-FC on the three cell lines were analyzed by FAM, and the apoptosis cells were stained by Hoechst33342.

RESULTS: The multiplication time of Bel-7402, QBC and Bxpc-3 was 34.48, 64.94 and 26.29 h respectively, and difference between QBC and BEL-7402, Bxpc-3 was significant ($P < 0.05$); the transfection efficiency of the three cell line were 26.99%, 2.25% and 30.36%, and the difference between QBC, and BEL-7402 and Bxpc-3 was significant ($P < 0.05$); the anticancer efficiency was 83.24%, 16.97% and 92.32%, respectively. The apoptosis rates of the three kinds of carcinoma cells induced by CD/5-FC suicide gene system were 27.8%, 5.49% and 36.5%, respectively.

CONCLUSION: Carcinoma cells with shorter growth cycle and less multiplication time have higher instant transfection efficiency, and are more responsive to CD/5-FC suicide gene therapy. This suicide gene therapy may be a promising method for later malignant tumor in clinic.

Key Words: Suicide gene; 5-fluorocytosine; Cytosine deaminase gene; Instant transfection; Liver; Biliary duct; Pancreas; Cancer

Liu GY, Luo Q, Zhuang WC, Yang SM, Wei LY. Anticancer effect of cation lipofectin-mediated CD/5-FC suicide gene system on liver, biliary duct and pancreas carcinoma cells *in vitro*. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(35): 3946-3952

摘要

目的: 通过CD/5-FC自杀基因体系对肝BEL-7402、胆QBC、胰Bxpc-3三系肿瘤细胞杀伤效率的比较, 探讨影响这种杀伤差异的可能机制。

方法: 测定BEL-7402、QBC、Bxpc-3三系肿瘤细胞的生长周期及倍增时间。FACS测定阳离子脂质体介导的三系肿瘤细胞瞬时转染效率。MTT法测定阳离子脂质体介导CD/5-FC自

■同行评议者

沈柏用, 副教授, 上海市交通大学医学院瑞金医院肝胆胰外科中心

杀基因体系对瞬时转染的肝胆胰三系肿瘤细胞体外杀伤效率. 观察细胞倍增时间与转染效率与杀伤效率之间的关系. FACS对三系肿瘤细胞瞬时转染自杀基因后凋亡进行比较, 并用Hochest33342染色后进行观察.

结果: BEL-7402、QBC、BXPC-3的倍增时间分别是34.48、64.94、26.29 h. QBC细胞同BEL-7402及BXPC-3相比差异有显著性($P<0.05$); BEL-7402、QBC、BXPC3三系细胞阳离子脂质体介导的转染率分别为26.99%、2.25%、30.36%. BEL-7402和BXPC-3同QBC细胞有显著差异($P<0.05$); 瞬时转染自杀基因后抑制效率分别为83.24%, 16.97%, 92.32%; 在CD/5-FC杀伤三系细胞可能的机制-凋亡的研究中, 三者凋亡率分别为27.8%, 5.49%, 36.5%.

结论: 生长周期短, 倍增时间快的细胞系瞬时转染率高, 对CD/5-FC自杀基因疗法比较敏感, 该自杀基因疗法可能对临床晚期消化系统恶性肿瘤是一种很有前景的治疗方法.

关键词: 自杀基因; 五氟胞嘧啶; 胞嘧啶脱氨酶; 瞬时转染; 肝; 胆管; 胰腺; 肿瘤

刘国彦, 罗琪, 庄维纯, 杨素梅, 魏黎煜. CD/5-FC自杀基因体系对肝、胆、胰肿瘤细胞的杀伤作用及机制. 世界华人消化杂志 2008; 16(35): 3946-3952

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3946.asp>

0 引言

自杀基因(suicide gene)^[1-3]又称化疗敏感基因(chemosensitive gene)^[4], 化疗药物前体活化基因(prodrug activation gene)^[5], 是存在于细菌或真菌中的一类基因, 哺乳动物体内缺乏. 他通过编码特异的酶而转化低毒的或无毒的前体药物为具有毒性的代谢产物而发挥很强的抗肿瘤活性^[6], 其中CD/5-FC^[7-8]自杀基因体系杀伤效果好、旁观者效应(bystander effect)^[9]显著, 目前逐渐成了研究的热点. 本工作通过对消化系统三种不同器官来源细胞系的体外杀伤比较研究阳离子脂质体介导CD/5-FC自杀基因体系, 以期为临床应用提供更多的依据.

1 材料和方法

1.1 材料 细胞: 肝癌BEL-7402、胆管癌QBC为北京军事医学科学院王玉芝研究员惠赠, 胰腺癌BXPC-3为本课题组保存; 绿色荧光蛋白的真核表达质粒pEGFP-N1为北京军事医学科学院王玉

芝教授惠赠. MTT购自Sigma公司, Hochest33342购自Sigma公司, RNA酶购自Gibco公司, 阳离子脂质体LipofectamineTM购自Invetrogen, 胎牛血清购自北京军马所, RPMI 1640培养基购自Hyclone公司. 流式细胞仪(FCM)BD公司FACStar, America, 荧光显微成像系统Olympus os701.

1.2 方法

1.2.1 细胞生长曲线及倍增时间: 将指数生长期的三系细胞 2×10^3 、0.1 mL接种于96孔板, 37℃, CO₂恒温箱中培育4 h, 将第一组加入MTT液15 mL, 再恒温箱中培养5 h, 取出加入0.1 mL、100 mL/L SDS继续恒温培养, 此组细胞数为起点, 计为时间0 h, 后在12、24、36、48、60、72、84、96、108 h分别加入MTT液15 mL及100 mL/L SDS、0.1 mL, 每组重复4孔. 最后在酶标仪492 nm上测定吸收值(A). 将A值连起绘制细胞生长曲线, 按照公式: $T_D = t \times \log 2 / (\log N - \log N_0)$ 计算各细胞倍增时间.

1.2.2 三细胞系瞬时转染效率的比较: 将指数生长期细胞各 1×10^5 接种于6孔板中, 37℃恒温CO₂孵箱中培育12 h, 取出生理盐水洗两次, 加入配制好的转染液(脂质体: 质粒PEGFP-N1 = 10 L : 2 g), 再37℃恒温培养5 h, 去掉转染液, 加入含200 mL/L胎牛血清RPMI 1640培养液同上培养12 h, 换100 mL/L胎牛血清RPMI 1640培养基培养36 h, 去掉培养液, 胰酶消化制成单细胞悬液, FACS测定各细胞系转染率. 设定同样的条件下无脂质体介导的裸质粒转染为对照.

1.2.3 脂质体介导瞬时转染CD基因表达的检测: 将三系细胞各 5×10^5 个接种于90 mm培养皿中, 转染方法同“1.2.2”, 脂质体: 质粒 = 30 L : 6 g, 培养48 h, RNA提取试剂盒(Sigama公司试剂盒)提取RNA, 设计引物序列进行RT-PCR反应. CD基因引物上游序列: 5'-GTGAATTCAGGCTAGCAATGTCGAATAACGCT-3', 下游序列: 5'-GTGGATCCTCAACGTTTGTAAATCGATGGCTTC-3'. 看家基因为GAPDH, CD基因的PCR条件为: 94℃变性40 s, 55℃退火40 s, 72℃延长1 min, 32个循环, PCR产物经10 g/L琼脂糖凝胶电泳(80 V、1 h)鉴定结果.

1.2.4 5-FC对细胞瞬时转染CD基因杀伤及抑制的比较: 将指数生长期细胞 5×10^3 接种于96孔板, 每组重复4孔, 培养12 h, 去掉培养液, 生理盐水洗过2次, 加入瞬时转染液(方法同2)37℃培养5 h, 换200 mL/L胎牛血清培养液, 加入5-FC(5 mmol/L的终浓度)37℃恒温培养, MTT法(方法同

■**研发前沿**
CD/5-FC自杀基因体系杀伤效果好、旁观者效应显著, 目前逐渐成了研究的热点.

■相关报道

刘国彦 *et al* 针对有免疫力动物的体内CD/5-FC实验研究表明: 正常免疫力可有效增强CD/5-FC的旁观者效应, 且在配合使用 γ -IFN条件下旁观者效应进一步增强。

1.2.1) 检测24、48、72 h杀伤及抑制效率, 每组重复4孔, 绘制杀伤及抑制曲线。生长抑制率(%) = (对照组A值-实验组A值)/对照组A值, 杀伤率(%) = (起点A值-实验组A值)/起点A值。

1.2.5 细胞凋亡的比较: 将指数生长期细胞 5×10^5 个接种于90 mm培养皿, 100 mL/L胎牛血清RMPI 1640培养12 h, 加入配置好的瞬时转染液(脂质体:pCDNA3-CD = 30 L:6 g), 培养5 h, 换成200 mL/L胎牛血清RMPI 1640培养基培养12 h, 换成100 mL/L胎牛血清RMPI培养并加入5-FC(终浓度5 mmol/L), 分别取4、12、24、48 h四个时间点, 胰酶消化制成单细胞悬液, 取出0.1 mL用于Hoechst33342染色镜下观察。余下700 mL/L乙醇固定, RNA酶处理30 min后FACS检测细胞凋亡。

2 结果

2.1 细胞倍增时间 按MTT值绘制三种细胞的生长曲线图, 由各增长最快时间段计算BEL-7402、QBC、BXP3-3细胞的倍增时间(计算公式: $T_D = t \times \log 2 / (\log N - \log N_0)$) 分别是: 34.48、64.94、26.29 h。BEL-7402和BXP3-3同QBC相比倍增时间差异有显著性意义($P < 0.05$), 而BEL-7402和BXP3-3之间差异没有显著性(图1)。

2.2 细胞瞬时转染率的比较 阳离子脂质体介导的BEL-7402、QBC、BXP3-3的瞬时转染率分别为26.99%、2.2%、30.3%, BEL-7402和BXP3-3同QBC相比差异有显著性; 三种细胞裸质粒的转染率分别为0.22%、0.29%、0.18%, 三者差异没有显著性(图2)。这表明阳离子脂质体介导的转染同前面细胞的倍增时间有很好的相关性, 倍增时间快的细胞, 脂质体有更高的转染效率。而裸质粒的转染则与这关系不大。

2.3 阳离子脂质体介导瞬时转染的表达 采用RT-PCR法检测, 设脂质体介导的不带CD基因的PCDNA3.1质粒为对照。10 mL/L琼脂糖凝胶(80 V, 1 h)电泳检测。结果显示CD基因表达很好(图3-4)。

2.4 CD/5-FC对瞬时转染细胞的杀伤抑制 MTT法测细胞的相对数量。红线为对照组细胞, 瞬时转染后不加入5-FC, 蓝线为实验组细胞, 加入5-FC(终浓度5 mmol/L), 均每组重复四孔。CD/5-FC对BEL-7402细胞的杀伤率72 h为55.08%, 对其生长的抑制率为83.24%; CD/5-FC对QBC细胞的杀伤率为10.02%, 对其生长的抑制率为16.97%, CD/5-FC对BXP3-3的杀伤率72 h为68.14%, 生长抑制率为92.32%, 比较CD/5-FC

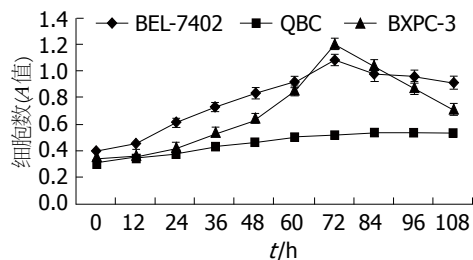


图1 三细胞系生长曲线。BEL-7402和BXP3-3生长速度均明显较QBC细胞快, 生长旺盛, 而BEL-7402和BXP3-3在高峰期几乎一致, 生长曲线也有交叉重叠, 差异不显著。

对BEL-7402细胞、QBC、BXP3-3的杀伤和抑制, BEL7402、BXP3-3均和QBC有显著差异($P < 0.05$), 而BEL7402和BXP3-3没有显著差异($P > 0.05$, 图5)。

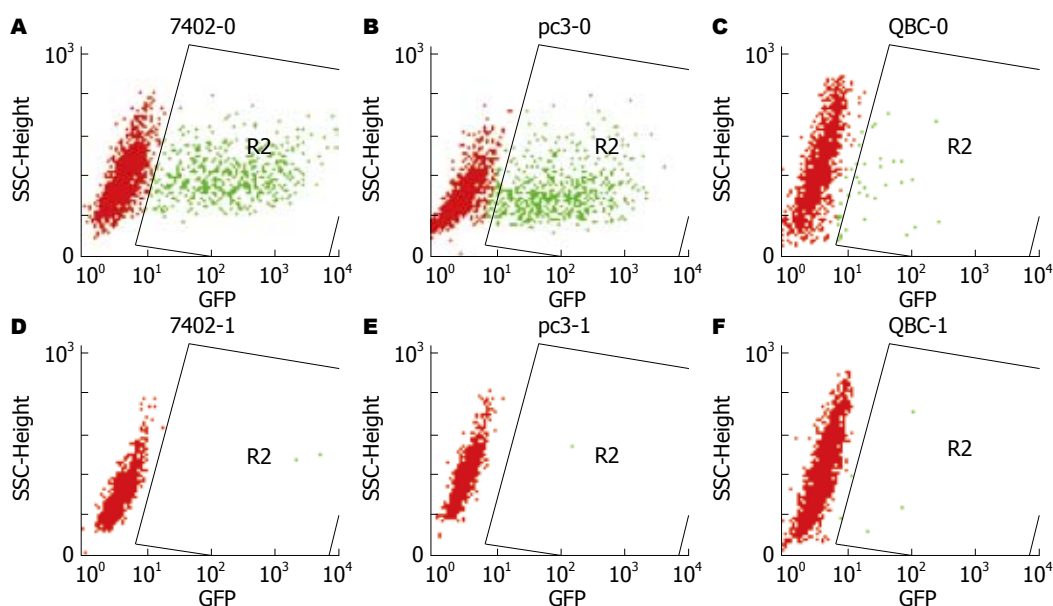
2.5 CD/5-FC诱导细胞的凋亡 BEL-7402细胞凋亡高峰在48 h, 凋亡率为27.8%, QBC细胞凋亡高峰在48 h, 凋亡率为5.49%, BXP3-3细胞凋亡高峰在24 h, 凋亡率为36.5%。按4、12、24、48 h时间点BEL-7402凋亡率分别为: 4.88%, 7.27%, 19.8%和27.8%; QBC细胞凋亡率分别为: 2.82%, 3.98%, 3.55%, 5.44%和5.49%; BXP3-3凋亡率分别为: 5.30%、8.82%、8.86%、36.5%和16.7%(图6)。

2.6 细胞凋亡的Hoechst33342染色 BEL7402凋亡染色可见有典型的凋亡出现, 且凋亡的细胞较多; QBC中凋亡细胞少。BXP3-3中凋亡细胞较多(图7)。

3 讨论

随着分子生物学技术的迅猛发展, 基因治疗迅速成为肿瘤治疗领域极有希望的一种治疗措施, 已成为包括肝癌、胰腺癌、胆管癌在内的肿瘤治疗研究领域的一大热点^[10-12]。基因治疗临床具体实现的方法之一就是利用载体在肿瘤所在的部位瞬时转染治疗基因, 本课题则就瞬时转染后的自杀基因治疗做一系列研究。当前的转染载体都存在一个转染率低和安全的问题。脂质体(liposome)以无毒、无免疫源性、使用方便、重复性好、能携带大片段DNA。同时, 作为基因或核酸载体脂质体可以抵御核酸酶的水解, 延缓基因内含物的降解, 安全可靠等优点, 现已被美国癌症协会批准为临床基因治疗的首选方案, 并且已有商品化的脂质体用于临床应用。

细胞分裂在阳离子脂质体介导的基因转染中有促进的作用^[13], Mortimer *et al*^[13]表明: 当SK-OV-3细胞aphidiodin处理, 同步化在G₁期则不能



■应用要点
脂质体介导瞬时转染下的特异性的启动子、多自杀基因联合及辅助免疫增强生物因子将很大的提高了自杀基因的应用前景, 对高度恶性实体肿瘤的治疗提供有效的帮助。

图 2 细胞的瞬时转染率. A, D: S7402; B, E: BXPC-3; C, F: QBC, 0: 阳离子脂质体介导的转染; 1: 裸质粒的转染。

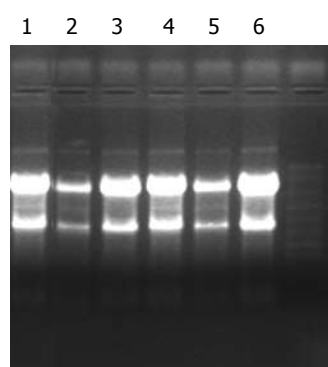


图 3 细胞 RNA 甲醛变性电泳结果. 1: BXPC3-PCDNA3.1; 2: QBC-PCDNA3.1; 3: BEL7402-PCDNA3.1; 4: BXPC3-PCDNA3.1-CD; 5: QBC-PCDNA3.1-CD; 6: BEL7402-PCDNA3.1-CD.

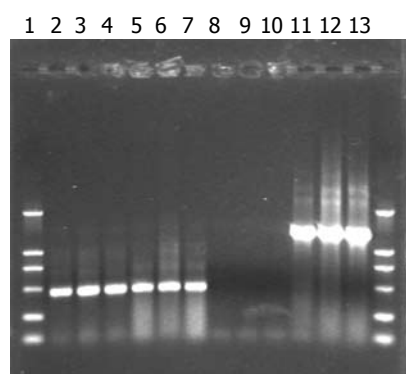


图 4 CD 基因表达的 RT-PCR 结果. 1: Marker 条带; 2: GAPDH-BXPC3-PCDNA3; 3: GAPDH-QBC-PCDNA3; 4: GAPDH-BEL7402-PCDNA3; 5: GAPDH-BXPC3-CD; 6: GAPDH-QBC-CD; 7: GAPDH-BEL7402-CD; 8: BXPC3-PCDNA3; 9: QBC-PCDNA3; 10: BEL7402-PCDNA3; 11: BXPC3-CD; 12: QBC-CD; 13: BEL7402-CD.

被有效转染, 而当细胞重新通过细胞周期时, 特别是在使用阳离子转染试剂之后, 细胞即时已具有分裂活性, 则转染效率最高. Wilke *et al*^[14]

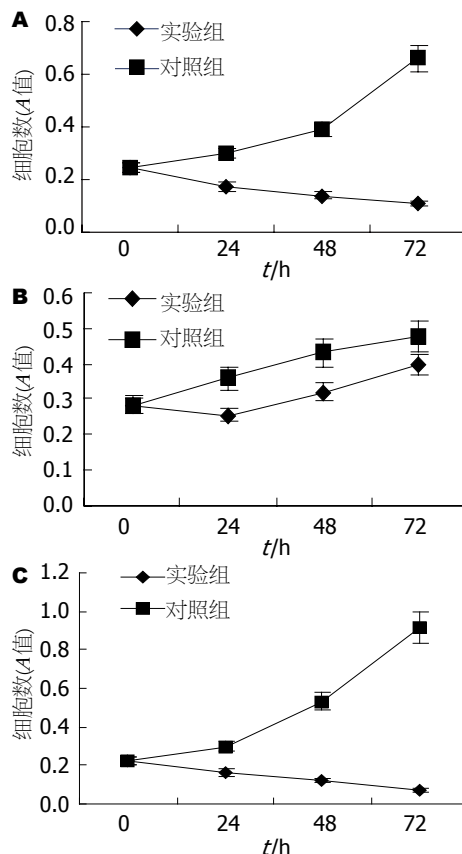


图 5 CD/5-FC 的生长抑制效果. A: BEL-7402; B: QBC; C: BXPC3.

研究表明: 生长在无血清培养基中增殖受阻的 LLC-PK1 细胞, 当用 Lipofectin 进行转染时, 其转染效率低于生长在有血清的对照增殖细胞. 此外当 NIH3T3 细胞暴露于胸腺嘧啶中被阻止在 S 期时, 不能被脂质体有效转染, 而当阻止剂被

同行评价

本研究选题符合该领域的研究热点,设计科学、合理,作者掌握了相关的实验基础理论和专门实验技术,统计处理符合统计学方法,结论可靠,但讨论不够深入、全面,若结合实验结果做出相关分析,提出自己的见解则更好。

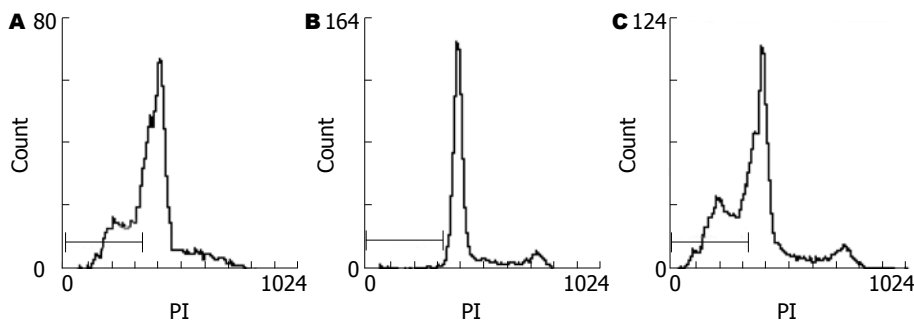


图 6 BEL-7402、QBC、BXPC-3的凋亡。A: BEL-7402; B: QBC; C: BXPC-3。

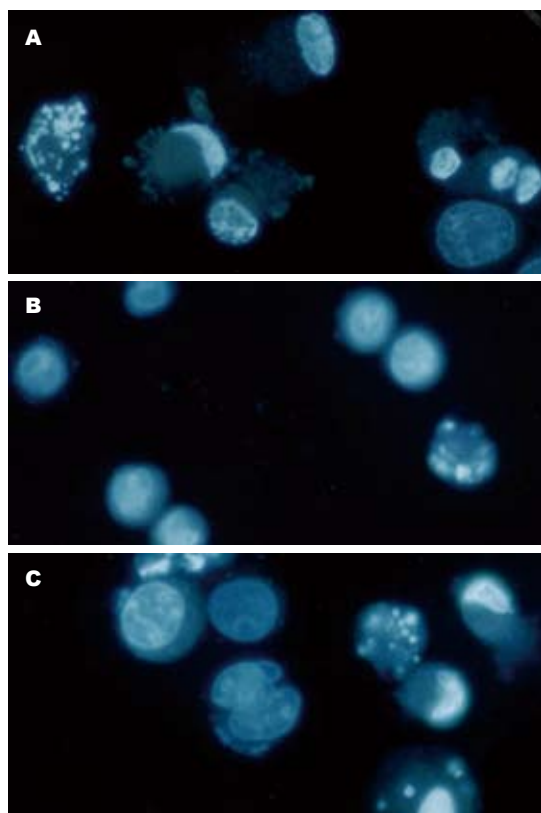


图 7 细胞凋亡。A: BEL-7402; B: QBC; C: BXPC-3。

去掉,细胞恢复通过细胞周期时,则被转染的能力又恢复。

不同的细胞类型有着自己不同的细胞特性,不同的细胞周期、生长曲线、倍增时间,阳离子脂质体介导的转染效率可能有显著的差别,CD/5-FC自杀基因治疗的结果则有显著的差异。在机体内一般细胞处于分裂期的细胞数小于20%。通常肿瘤组织和那些生长旺盛的细胞分裂期的细胞比例较高,这实际上就形成了一定的阳离子脂质体介导转染的定向导向性,当脂质体介导CD/5-FC用于高度恶性肿瘤的基因治疗时,阳离子脂质体定向的介导转染那些生长旺盛的恶性肿瘤组织细胞,导致被CD/5-FC自杀基因体系定向杀伤,且治疗效果较好,而当用于低度恶性肿瘤的治疗时则效果不理想,这有很重

要的临床意义:临床上,高度恶性肿瘤细胞生长旺盛,倍增时间短,容易早期就有转移和远处的转移,临床手术的效果不理想。该项自杀基因研究表明:高度恶性实体肿瘤的CD/5-FC治疗方法脂质体瞬时转染效率高、肿瘤抑杀效果好,可能成为手术治疗的较好补充,为提高该类疾病的治疗提出了新的思路;而低度恶性肿瘤细胞生长周期长,倍增时间要长,转移及远处转移发生晚,手术为治疗的首选,且效果也比较好,该类型脂质体转染效率差,自杀基因疗法效果差,且也无需基因治疗来作为补充。

CD/5-FC体系治疗肿瘤时可产生具有临床应用实际价值的BE^[15-16],即肿瘤细胞少量的转染可导致更多的肿瘤细胞被抑杀,为高度恶性肿瘤细胞的“根治性抑杀”带来希望。谭宇惠 *et al*^[17]构建的大鼠肝癌细胞HSV-tk/GCV自杀基因系统体外旁观者效应的研究中,当转染率为5%-10%就已有较低的BE。陈海金 *et al*^[18]研究慢病毒介导的KDR启动子驱动CD/TK双自杀基因系统对大肠肿瘤细胞选择性杀伤作用,观察到双自杀基因在体外的显著的BE。张雷 *et al*^[19]研究比较了CD/5-FC系统和HSV-tk/GCV系统对人胰腺癌细胞的疗效,发现两者都有很好的抗肿瘤活性,但前者BE要显著大于后者。其良好的BE与以下一些机制有关: (1)细胞间缝隙连接(gap junctional intercellular communication, GJIC)介导的细胞毒性药物或(和)凋亡小体传递^[21-23]。多数学者认为GJIC是自杀基因表达产物前药代谢为细胞毒性产物5-FU的良好通道。Kuriyama *et al*和Huber *et al*认为CD/5-FC的BE是由于5-FC的代谢产物5-FU通过非易化扩散自由进出细胞,并不仅仅依靠GJIC^[24-25]。BE使靶细胞内基因表达产物通过GJIC传递到周围细胞,在杀伤周围细胞同时延长了自杀基因的表达和其自身的存活时间,这无疑增强了BE^[26]。(2)激活免疫机制。肿瘤细胞被自杀基因杀伤后,其残余碎片含有肽类物质,这些肽类物质被浸润的巨嗜细胞等

抗原递呈细胞摄取加工, 然后递呈给CD4⁺T淋巴细胞, 进而激活CD8⁺T淋巴细胞, 并使其增殖, 扩大其肿瘤杀伤作用及产生杀灭机体远处部位接种的肿瘤细胞. 具有弱免疫原性的靶细胞转入CD基因后, 能被5-FC抑杀, 而且能够产生免疫记忆, 故经5-FC抑杀后的肿瘤细胞可作为抗癌疫苗^[27-28]. CD/5-FC自杀基因体系良好的旁观者效益, 结合该脂质体介导瞬时转染肿瘤抑杀研究, 对高度恶性实体肿瘤的手术疗效不足可能可起到较好的补充. 拓展了新的思路.

许多研究表明自杀基因导致肿瘤细胞死亡以及旁观者效应可能的机制为细胞凋亡, 本实验研究表明, 凋亡是导致细胞死亡的可能途径之一. 目前在自杀基因的研究中, 针对驱动子选择性的双自杀基因的研究则成了该研究领域的热点. 如利用肿瘤特异性基因调控元件调控自杀基因表达, *erbB-2*, α -人乳白蛋白(hALA)启动子驱动自杀基因进行乳腺癌基因治疗, 甲胎蛋白(AFP)基因启动子用于肝癌自杀基因疗法, 癌胚抗原(CEA)基因启动子用于肠道肿瘤自杀基因疗法. 又如李强 *et al*^[29]的研究表明: KDR启动子驱动双自杀基因靶向选择性地杀伤人胃癌SCG7901细胞, 并存在BE, 且较单自杀基因有更好的抑杀效果. Rogulski *et al*^[30]实验表明转导CD/HSV-1TK融合基因的神经胶质瘤细胞易被杀灭, 该基因表达具有双重作用的融合蛋白(CDglyTK), 他导致的协同细胞毒作用是单用的2-3倍, 且可使表达细胞有更好的放射敏感性, 是单用CD/5-FC体系的2.44倍. Rogulski *et al*^[31]的研究表明, 双自杀基因(CD-HSV-TK)治疗对大的肿瘤组织更加有效, 可使其体积减少99%, 显著降低肿瘤的压迫效应. 在刘国彦 *et al*^[32]针对有免疫力动物的体内CD/5-FC实验研究中表明: 正常免疫力可有效增强CD/5-FC的旁观者效益, 且在配合使用 γ -IFN条件下旁观者效益进一步增强. 将来脂质体介导瞬时转染下的特异性的启动子、多自杀基因联合及辅助免疫增强生物因子将很大的提高了自杀基因的应用前景, 对高度恶性实体肿瘤的治疗提供有效的帮助.

4 参考文献

- Gabel M, Kim JH, Kolozsvary A, Khil M, Freytag S. Selective in vivo radiosensitization by 5-fluorocytosine of human colorectal carcinoma cells transduced with the *E. coli* cytosine deaminase (CD) gene. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1998; 41: 883-887
- Huber BE, Austin EA, Richards CA, Davis ST, Good SS. Metabolism of 5-fluorocytosine to 5-fluorouracil

- in human colorectal tumor cells transduced with the cytosine deaminase gene: significant antitumor effects when only a small percentage of tumor cells express cytosine deaminase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 8302-8306
- Wasserman D, Geijer T, Sokolowski M, Rozanov V, Wasserman J. Nature and nurture in suicidal behavior, the role of genetics: some novel findings concerning personality traits and neural conduction. *Physiol Behav* 2007; 92: 245-249
- Bachvarov D, L'esperance S, Popa I, Bachvarova M, Plante M, Têtu B. Gene expression patterns of chemoresistant and chemosensitive serous epithelial ovarian tumors with possible predictive value in response to initial chemotherapy. *Int J Oncol* 2006; 29: 919-933
- Aghi M, Hochberg F, Breakefield XO. Prodrug activation enzymes in cancer gene therapy. *J Gene Med* 2000; 2: 148-164
- Khalighinejad N, Hariri H, Behnamfar O, Yousefi A, Momeni A. Adenoviral gene therapy in gastric cancer: a review. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 180-184
- Lü SQ, Liu YS, Yang H. [Effects of CD/5-FC suicide gene therapy system on human malignant glioma cells in vitro] *Zhongnan Daxue Xuebao Yixueban* 2004; 29: 174-176, 180
- Lv SQ, Yang H, He JQ, Wang B, Yoshimura I, Liu YS. Effects of CD/5-FC suicide gene therapy system on human malignant glioma cells in vitro. *Shengwu Huaxue Yu Shengwu Wuli Xuebao (Shanghai)* 2003; 35: 430-434
- Ballarini F, Alloni D, Facchetti A, Mairani A, Nano R, Ottolenghi A. Modelling radiation-induced bystander effect and cellular communication. *Radiat Prot Dosimetry* 2006; 122: 244-251
- Bochner BH. Gene therapy in bladder cancer. *Curr Opin Urol* 2008; 18: 519-523
- Russ V, Wagner E. Cell and tissue targeting of nucleic acids for cancer gene therapy. *Pharm Res* 2007; 24: 1047-1057
- Takahashi S, Sugimoto Y. [Gene therapy for breast cancer] *Nippon Rinsho* 2007; 65 Suppl 6: 135-141
- Mortimer I, Tam P, MacLachlan I, Graham RW, Saravolac EG, Joshi PB. Cationic lipid-mediated transfection of cells in culture requires mitotic activity. *Gene Ther* 1999; 6: 403-411
- Wilke M, Fortunati E, van den Broek M, Hoogeveen AT, Scholte BJ. Efficacy of a peptide-based gene delivery system depends on mitotic activity. *Gene Ther* 1996; 3: 1133-1142
- Moolten FL. Tumor chemosensitivity conferred by inserted herpes thymidine kinase genes: paradigm for a prospective cancer control strategy. *Cancer Res* 1986; 46: 5276-5281
- Mullen CA. Metabolic suicide genes in gene therapy. *Pharmacol Ther* 1994; 63: 199-207
- 谭宇蕙, 吴映雅, 杜标炎, 胡岳山, 赵鹏, 李杰芬. 大鼠肝癌细胞HSV-tk/GCV自杀基因系统的构建及其旁观者效应. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 2069-2073
- 陈海金, 黄宗海, 苏国强, 吴爱国, 俞金龙. 慢病毒介导的双自杀基因对大肠癌细胞的靶向杀伤作用. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 1681-1687
- 张雷, 刘彤华, 崔全才. 不同药物敏感基因对人胰腺癌细胞PC-2的杀伤作用. *中华病理学杂志* 1998; 44: 412-415
- Deonarain MP, Epenetos AA. Targeting enzymes for cancer therapy: old enzymes in new roles. *Br J*

- Cancer* 1994; 70: 786-794
- 21 Dilber MS, Abedi MR, Christensson B, Björkstrand B, Kidder GM, Naus CC, Gahrton G, Smith CI. Gap junctions promote the bystander effect of herpes simplex virus thymidine kinase in vivo. *Cancer Res* 1997; 57: 1523-1528
- 22 Ishii-Morita H, Agbaria R, Mullen CA, Hirano H, Koeplin DA, Ram Z, Oldfield EH, Johns DG, Blaese RM. Mechanism of 'bystander effect' killing in the herpes simplex thymidine kinase gene therapy model of cancer treatment. *Gene Ther* 1997; 4: 244-251
- 23 Mesnil M, Piccoli C, Tiraby G, Willecke K, Yamasaki H. Bystander killing of cancer cells by herpes simplex virus thymidine kinase gene is mediated by connexins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 1831-1835
- 24 Kuriyama S, Masui K, Sakamoto T, Nakatani T, Kikukawa M, Tsujinoue H, Mito A, Yamazaki M, Yoshiji H, Fukui H, Ikenaka K, Mullen CA, Tsujii T. Bystander effect caused by cytosine deaminase gene and 5-fluorocytosine in vitro is substantially mediated by generated 5-fluorouracil. *Anticancer Res* 1998; 18: 3399-3406
- 25 Huber BE, Austin EA, Good SS, Knick VC, Tibbels S, Richards CA. In vivo antitumor activity of 5-fluorocytosine on human colorectal carcinoma cells genetically modified to express cytosine deaminase. *Cancer Res* 1993; 53: 4619-4626
- 26 Wygoda MR, Wilson MR, Davis MA, Trosko JE, Rehemtulla A, Lawrence TS. Protection of herpes simplex virus thymidine kinase-transduced cells from ganciclovir-mediated cytotoxicity by bystander cells: the Good Samaritan effect. *Cancer Res* 1997; 57: 1699-1703
- 27 Mullen CA, Coale MM, Lowe R, Blaese RM. Tumors expressing the cytosine deaminase suicide gene can be eliminated in vivo with 5-fluorocytosine and induce protective immunity to wild type tumor. *Cancer Res* 1994; 54: 1503-1506
- 28 Nielsen CS, Moorman DW, Levy JP, Link CJ Jr. Herpes simplex thymidine kinase gene transfer is required for complete regression of murine colon adenocarcinoma. *Am Surg* 1997; 63: 617-620
- 29 李强, 黄宗海, 俞金龙, 苏国强, 厉周, 周光军. KDR启动子驱动双自杀基因靶向杀伤人胃癌细胞的作用. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 2997-3001
- 30 Rogulski KR, Kim JH, Kim SH, Freytag SO. Glioma cells transduced with an Escherichia coli CD/HSV-1 TK fusion gene exhibit enhanced metabolic suicide and radiosensitivity. *Hum Gene Ther* 1997; 8: 73-85
- 31 Rogulski KR, Zhang K, Kolozsvary A, Kim JH, Freytag SO. Pronounced antitumor effects and tumor radiosensitization of double suicide gene therapy. *Clin Cancer Res* 1997; 3: 2081-2088
- 32 刘国彦, 姚娇, 罗琪. CD/5-FC自杀基因体系在正常免疫力动物体内的抑瘤及旁观者效应. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 554-560

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志名词术语标准

本刊讯 本刊名词术语一律标准化, 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. (常务副总编辑: 张海宁 2008-12-18)

结肠癌细胞中CacyBP/SIP的表达及核转位现象

翟惠虹, 陈雄, 卢媛媛, 王新, 樊代明

翟惠虹, 宁夏医科大学附属医院消化内科 宁夏回族自治区银川市 750004

陈雄, 卢媛媛, 王新, 樊代明, 肿瘤生物学国家重点实验室 中国人民解放军第四军医大学西京医院消化病研究所 陕西省西安市 710032

翟惠虹, 副主任医师, 主要从事消化系统肿瘤的机制研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30860321

作者贡献分布: 本课题由樊代明与王新选题并指导设计; 研究过程由陈雄, 卢媛媛及翟惠虹操作完成; 数据分析及论文写作由翟惠虹完成。

通讯作者: 翟惠虹, 750004, 宁夏回族自治区银川市, 兴庆区胜利街704号, 宁夏医科大学附属医院消化内科. zhaihuihong@263.net

电话: 0951-6743234 传真: 0951-6744200

收稿日期: 2008-10-07 修回日期: 2008-11-15

接受日期: 2008-11-17 在线出版日期: 2008-12-18

Expression and nucleus translocation of calyculin binding protein in colon cancer cells

Hui-Hong Zhai, Xiong Chen, Yuan-Yuan Lu, Xin Wang, Dai-Ming Fan

Hui-hong Zhai, Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, Ningxia Hui Autonomous Region, China

Xiong Chen, Yuan-Yuan Lu, Xin Wang, Dai-Ming Fan, State Key Laboratory of Cancer Biology; Institute of Digestive Diseases of Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University of Chinese PLA, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30860321

Correspondence to: Dr. Hui-hong Zhai, Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, Ningxia Hui Autonomous Region, China. Zhaihuihong@263.net

Received: 2008-10-07 Revised: 2008-11-15

Accepted: 2008-11-17 Published online: 2008-12-18

Abstract

AIM: To verify expression and location of CacyBP/SIP in colon cancer cells, so to explore the role of CacyBP/SIP in colon cancer.

METHODS: The expression of CacyBP/SIP in the three colon cancer cell lines was detected using Western blot. The location of CacyBP/SIP in the colon cancer cell and location after stimulation by KCl, gastrin(10^{-8} mol/L) were determined separately by indirect immunofluorescence. The change of Ca^{2+} concentration in

the colon cancer cells stimulated by gastrin was detected by laser copolymerization focal.

RESULTS: CacyBP/SIP was detected in the HT29 and SW480 colon cancer cells and undetected in the Lovo colon cancer cells. CacyBP/SIP was located in the cytoplasm of colon cancer cells. After stimulation by KCl, CacyBP/SIP translocated into nucleus; after KCl was washed off, CacyBP/SIP was relocated in the cytoplasm. Upon stimulation by gastrin, CacyBP/SIP also translocated into the nucleus. Compared with the colon cancer cell without gastrin, intra-cellular Ca^{2+} concentration with gastrin was increased (25.33 ± 0.57 vs 21 ± 1 , $P < 0.05$).

CONCLUSION: CacyBP/SIP is expressed in the colon cancer cells and located in the cytoplasm. CacyBP/SIP could translocate into the nucleus after increased intra-cellular Ca^{2+} concentration. These results suggest that CacyBP/SIP may be involved in the progression of colon cancer through nuclear translocation.

Key Words: Calyculin-binding-protein; Gastrin; Colon cancer; Nuclear translocation

Zhai HH, Chen X, Lu YY, Wang X, Fan DM. Expression and nucleus translocation of calyculin binding protein in colon cancer cell. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(35): 3953-3957

摘要

关键词: CacyBP/SIP; 胃泌素; 结肠癌; 核转位

翟惠虹, 陈雄, 卢媛媛, 王新, 樊代明. 结肠癌细胞中CacyBP/SIP的表达及核转位现象. *世界华人消化杂志* 2008; 16(35): 3953-3957

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3953.asp>

0 引言

在我国, 结肠癌已位居恶性肿瘤第五位, 随着饮食结构变化及人口老龄化, 其发病率呈逐年上升的趋势. 虽然目前已明确, 在结肠癌进展中,

■背景资料

在我国, 结肠癌已位居恶性肿瘤第五位, 随着饮食结构变化及人口老龄化, 其发病率呈逐年上升的趋势. 虽然目前已明确, 在结肠癌进展中, K-ras、APC基因的突变及p53基因的失活与其密切相关, 但对于结肠癌的早期诊断特异性欠佳.

■同行评议者

刘连新, 教授, 哈尔滨医科大学第一临床医学院普外科三病房

■ 研发前沿

CacyBP/SIP, 1998年从艾氏腹水瘤细胞中克隆, 是一个26 kDa大小以钙依赖的方式结合Calcyclin的蛋白, 可与S100A1、A6、A12、B、P结合, 他们均与肿瘤的进展及转移有关。

K-ras、APC基因的突变及p53基因的失活与其密切相关, 但对于结肠癌的早期诊断仍特异性欠佳。所以全面理解结肠癌发生发展过程中诸多基因表达的变化尤其是早期基因表达的变化, 可以提高其早期诊断率并为结肠癌的基因治疗提供理论依据。

钙周期素结合蛋白(Calcyclin-binding-protein, 亦称siah-interaction-protein, CacyBP/SIP)是一个26 kDa大小以钙依赖的方式结合S100家族的蛋白, 最早从艾氏腹水瘤细胞中克隆^[1]。我所在2001年研究胃癌多药耐药时发现CacyBP/SIP在胃癌阿霉素耐药细胞SGC7901/ADR中高表达并参与胃癌细胞的多药耐药^[2-3], 为进一步研究其功能, 制备了小鼠源性抗人CacyBP/SIP mAb^[4], 在组织分布的研究中发现, CacyBP/SIP在正常结肠组织不表达, 高表达于结肠癌组织, 定位于细胞胞质及胞核^[5]。本研究旨在上述研究的基础上, 应用蛋白质印迹法(Western blot)和细胞免疫荧光染色, 明确结肠癌细胞中CacyBP/SIP的表达及定位, 进一步探讨CacyBP/SIP在结肠癌发生发展中的意义。

1 材料和方法

1.1 材料 RPMI 1640购于Gibco公司; 小牛血清购于四季青公司; BCA蛋白定量试剂盒购自碧云天公司; CacyBP/SIP mAb由本实验室自制; HRP标记羊抗鼠抗体、FITC标记的羊抗鼠IgG为中山公司产品; HEPES、NC膜购自Merck公司; 超级化学发光试剂盒购自Pierce公司; X光片购自Kodak公司; 鼠抗人 β -actin、胃泌素、Fluo-3-AM为Sigma公司产品; 激光共聚焦显微镜为Bio-Rad公司; 35 mm Petri细胞培养皿由Meridian提供。

1.2 方法

1.2.1 细胞株及其培养条件: 人结肠癌细胞HT29、SW480、Lovo细胞引自中国人民解放军军事医学科学院, 本实验室传代保存, 细胞在37℃、50 mL/L CO₂、饱和湿度培养箱中培养, 培养基为含100 mL/L热灭活小牛血清、100 000 U/L青霉素和100 000 U/L链霉素的RPMI 1640培养基。

1.2.2 Western blot法检测: 参照Santa Cruz公司提供的方法, 应用RIPA组织裂解液分别裂解结肠癌细胞, 提取细胞总蛋白, 按照蛋白定量试剂盒的说明测定细胞提取液的蛋白浓度。取相同的细胞上样量行120 g/L SDS-PAGE, 电转移至NC膜, 封闭后, 加入一抗(CacyBP/SIP单抗, 1:100)及用

HRP标记的山羊抗小鼠Ig(1:2000), 按常规方法进行化学发光, 曝光, 显影。以 β -actin作为内对照。

1.2.3 细胞免疫荧光染色: 收获对数生长期的HT29细胞, 计数并调整细胞密度 $2-3 \times 10^4$, 接种于无菌盖玻片上; 37℃培养24-36 h后, 取出盖玻片, PBS冲洗3次, 经无水乙醇固定, 0.3% Triton-100增加通透性, 山羊非免疫血清去除非特异结合, 加入抗CacyBP/SIP mAb(1:10), 湿盒中4℃过夜; 加FITC标记羊抗鼠IgG(1:50), 湿盒中37℃孵育2 h; 500 mL/L甘油缓冲液封片, 激光共聚焦显微镜观察并拍照。以上实验细胞分KCL实验组及胃泌素实验组; 在KCL实验组中, 细胞培养液中加入KCL(终浓度30 mmol/L)作用10 min后, 行细胞爬片及免疫荧光染色; KCL洗脱组中, 加入KCL作用10 min后用PBS洗脱后, 行细胞爬片及免疫荧光染色。在胃泌素实验组中, 细胞培养液中加入胃泌素(10^{-8} mol/L), 与细胞共同孵育4 h后行细胞爬片及免疫荧光染色; 无胃泌素组中细胞直接行细胞免疫荧光染色。

1.2.4 激光共聚焦显微镜检测细胞内Ca²⁺浓度: 取HT29细胞以 $5 \times 10^5/\text{cm}^2$ 的浓度接种于35 mm Petri培养皿底部的盖玻片上, 培养24 h后, 吸除培养皿内的培养液, 用10 mmol/L HEPES冲洗3次, 加入浓度为20 $\mu\text{mol/L}$ 钙荧光探针Fluo-3-AM 20 μL 、37℃避光孵育30 min, HEPES冲洗3次, 加入0.5 mL HEPES缓冲液, 将培养皿置于激光扫描共聚焦显微镜载物台上, 选用40倍物镜。确定激发光波长为488 nm, 选择合适视野, 预扫描后确定最佳扫描参数, 波长为488 nm时开始扫描, 计算机记录扫描结果并计算出整张照片细胞的平均荧光强度和标准差。

统计学处理 应用SPSS11.0统计软件行统计学处理, 采用t检验。

2 结果

2.1 CacyBP/SIP在结肠癌细胞系中的表达 对3种人结肠癌细胞系中CacyBP/SIP的表达进行Western blot检测, 结果显示结肠癌细胞系HT29及SW480均有较高水平的CacyBP/SIP表达, 而Lovo细胞中CacyBP/SIP表达缺失(图1)。提示结肠癌细胞系中普遍表达CacyBP/SIP。

2.2 细胞免疫荧光检测CacyBP/SIP在结肠癌细胞的定位 激光共聚焦显示, CacyBP/SIP在HT29细胞中主要分布在胞质内(图2A); 给予KCL刺激后, CacyBP/SIP在细胞胞质和胞核中都有分布, 主要集中于核膜处(图2B); 洗脱KCL后, CacyBP/

SIP重新分布于胞质中(图2C). 提示CacyBP/SIP在给予KCL刺激后, 细胞内 Ca^{2+} 浓度后升高后可转位至细胞核.

2.3 胃泌素可诱导CacyBP/SIP核转位 激光共聚焦显示, 在无胃泌素刺激的结肠癌细胞HT29中, CacyBP/SIP主要分布在胞质内(图3A); 给予 10^{-8} mol/L胃泌素刺激后, CacyBP/SIP在胞核和胞质都有分布(图3D). 提示胃泌素可诱导CacyBP/SIP核转位(图3).

2.4 细胞内 Ca^{2+} 浓度升高 图4A和图4B分别显示对照组、胃泌素刺激组的HT29细胞内荧光强度, 以Fluo-3-AM的荧光强度表示 Ca^{2+} 浓度. 从图5可以看出, 对照组HT29细胞Fluo-3-AM的荧光值分别为 21 ± 1 , 胃泌素刺激组HT29细胞的荧光强度为 25.33 ± 0.57 . 说明给予胃泌素刺激后HT29细胞内 Ca^{2+} 浓度显著高于对照组, 具有统计学差异($P < 0.05$).

3 讨论

CacyBP/SIP, 1998年从艾氏腹水瘤细胞中克隆, 是一个26 kDa大小以钙依赖的方式结合Calcyclin的蛋白. CacyBP/SIP可做为S100蛋白家族的靶蛋白, S100蛋白家族是 Ca^{2+} 结合蛋白家族中最大的亚类, 以组织特异性的方式作为钙信号的传导器, 与特异的靶蛋白相互作用, 介导钙信号对细胞的调控. 现发现CacyBP/SIP可与S100A1、A6、A12、B、P结合, 他们均与肿瘤的进展及转移有关^[6].

Matsuzawa *et al*^[7]在研究泛素降解途径时发现: SIP(siah binding protein), 与CacyBP/SIP编码氨基酸完全相同的cDNA全长, 可与Skp1-cullin-Fbox Ebi泛肽连接酶结合. 泛素-蛋白酶体通路是生物体内进行蛋白质选择性降解的重要途径之一, 而细胞周期调控蛋白P27、细胞周期蛋白D1、B、E等均是泛素酶SCF降解的^[8]. CacyBP/SIP/SIP可与SCF结合, 参与泛素化蛋白降解具有重要意义.

我所在制备CacyBP/SIP单克隆抗体的基础上, 检测了CacyBP/SIP在正常组织及肿瘤组织中的表达分布, 结果发现: CacyBP/SIP在正常结肠组织中不表达, 在结肠癌组织中高表达, 主要定位于胞质/胞核. 这种现象有何意义, 定位于细胞核对其功能的发挥到底有何作用值得进一步研究.

为探讨这种现象在结肠癌细胞中是否存在, 我们首先应用Western blot检测了结肠癌细胞

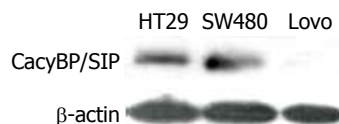


图1 CacyBP/SIP在结肠癌细胞系中的表达.

SW480、HT29及Lovo中CacyBP/SIP的表达, 结果发现: CacyBP/SIP在SW480及HT29中均表达, 说明结肠癌细胞中普遍表达CacyBP/SIP. 随后行细胞免疫荧光检测CacyBP/SIP在结肠癌细胞中的定位, 研究表明CacyBP/SIP主要定位于胞质.

Filipek *et al*^[9]及Wu *et al*^[10]均发现CacyBP/SIP具有依赖 Ca^{2+} 浓度的核转位及磷酸化现象, 那么在结肠癌细胞中存在这种现象吗? 我们首先给予KCL, 可诱发细胞游离钙离子浓度升高, 给予KCL刺激后发现CacyBP/SIP可转位至细胞核, 洗脱KCL后, 这种转位现象即消失, 此时CacyBP/SIP分布于胞质. 这同其他研究报道一致.

在生物体内, 细胞通过激素、生长因子等将信号由胞膜传递至胞质/胞核. 钙信号通路在其中起着重要的作用. 那么, CacyBP/SIP这种依赖于 Ca^{2+} 浓度的核转位现象是否与胞外信号传递相关呢? CacyBP/SIP入核后究竟引起细胞何种功能的变化?

为进一步回答这些问题, 我们选用胃泌素作为刺激剂, 因为既往研究已表明, 胃泌素除了对正常的胃肠道黏膜起生长促进的作用^[11-12], 亦可促进结肠癌的增殖、迁移及浸润^[13-14], 是促结肠癌增殖的生长因子. 流行病学调查及动物体内研究均证实: 高胃泌素血症促进结肠癌的发生并且在肿瘤的生长中起重要作用^[15]. 此外, 在动物模型中发现: 应用胃泌素受体CCK-2拮抗剂可逆转高胃泌素血症促结肠癌生长的作用, 说明扰乱胃泌素的信号可降低肿瘤的增殖^[16].

胃泌素与相应受体结合后可增加细胞内 Ca^{2+} 浓度, 那么此时CacyBP/SIP在胃泌素诱导下可入核吗? 我们的研究发现: 胃泌素可以诱导CacyBP/SIP入核. 那么是否通过升高细胞内 Ca^{2+} 从而诱导CacyBP/SIP入核呢?

胃泌素的CCK-2受体属于G蛋白偶联受体超家族, 与胃泌素结合后可活化磷脂酶C(PLC), 水解磷脂酰肌醇二磷酸成为肌醇-1, 4, 5-三磷酸(IP3)和二酰基甘油(DAG), IP3可促进 Ca^{2+} 自内质网释放, 细胞内 Ca^{2+} 增高, DAG则能激活蛋白激酶c(PKC), 亦增高细胞内 Ca^{2+} ^[17-18]. 给予胃泌素后, 我们测定结肠癌细胞内的 Ca^{2+} 浓度, 与无胃泌素组相比, 发现其明显升高($P < 0.05$), 由此我们得出结论: 胃泌素通过升高结肠细胞内 Ca^{2+} 浓

■ 相关报道

Zhao *et al*在2001年研究胃癌多药耐药时发现CacyBP/SIP在胃癌阿霉素耐药细胞SGC7901/ADR中高表达并参与胃癌细胞的多药耐药. Zhai *et al*的研究发现, CacyBP/SIP在正常结肠组织不表达, 高表达于结肠癌组织, 定位于细胞胞质及胞核.

同行评价

本文科学性较强,有一定的创新性,对于后续的研究工作有一定的参考意义。

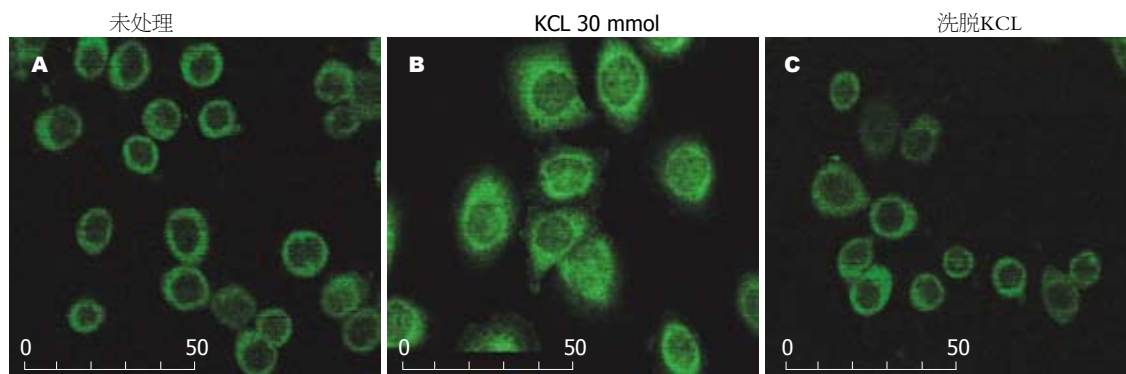


图2 KCL刺激对CacyBP/SIP在HT29细胞中分布位置的影响. A: 位于胞质内; B: 位于细胞核及核膜处; C: 位于胞质内.

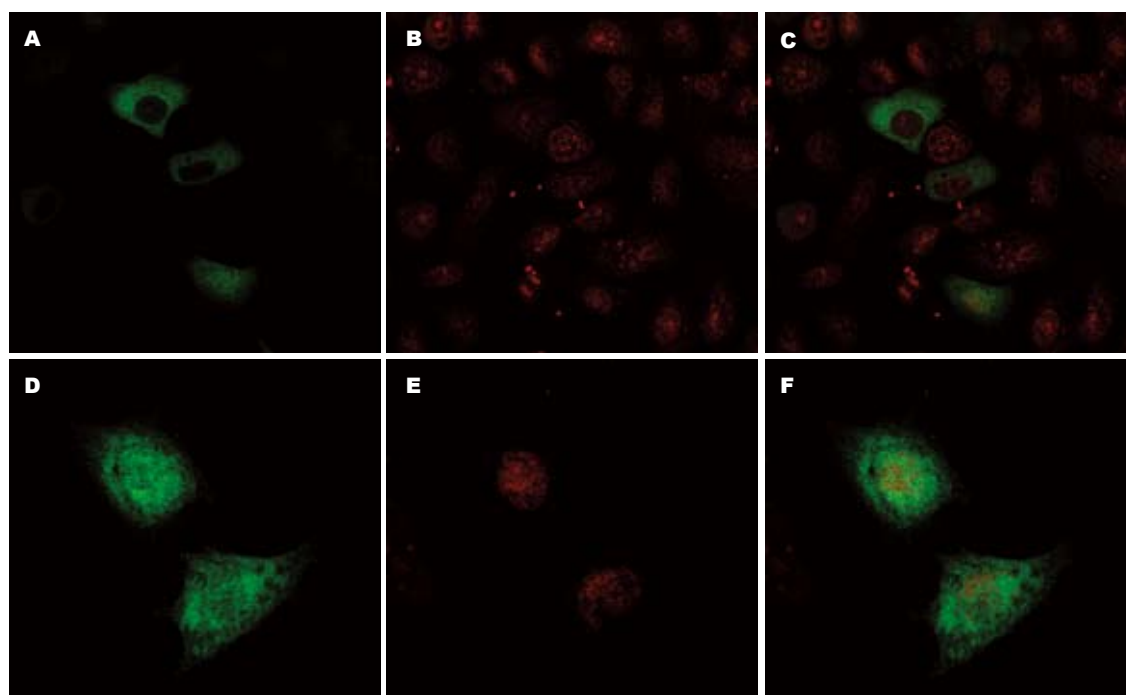


图3 胃泌素刺激对CacyBP/SIP在HT29细胞中分布位置的影响. A-C: 无胃泌素刺激, D-F: 胃泌素刺激; A, D: 间接免疫荧光; B, E: DAPI染色; C, F: 重叠图像.

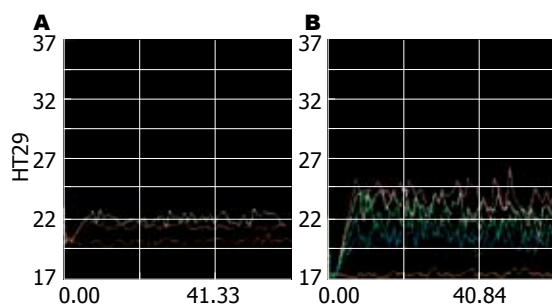


图4 结肠癌细胞Fluo-3/AM荧光强度扫描. A: 对照组; B: 胃泌素刺激组(10^{-8} mol/L).

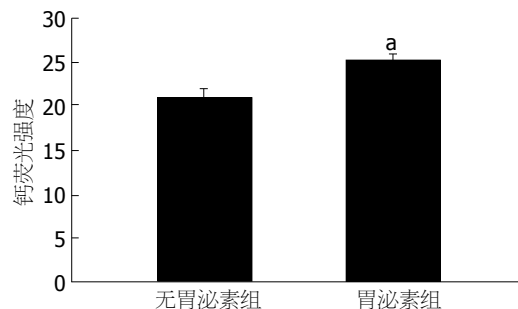


图5 结肠癌HT29无/有胃泌素组细胞内 Ca^{2+} 浓度的变化. $^aP<0.05$ vs 胃泌素组.

度,从而诱导CacyBP/SIP核转位.

总之, CacyBP/SIP在结肠癌细胞中表达,胃泌素可诱导CacyBP/SIP核转位,具有依赖 Ca^{2+} 浓度的核转位现象.细胞核是细胞增殖、分化、

代谢的控制中枢,蛋白转位至细胞核且发生磷酸化对于传递细胞外信号,调控下游基因表达具有重要意义. CacyBP/SIP在外界刺激下可入

核, 从组织学及细胞水平均得到证实, 均提示CacyBP/SIP可能通过入核来参与结肠癌的发生发展. 这使我们进一步思考, 其他生长因子刺激后有核转位现象吗? 胃泌素是促结肠癌增殖的生长因子, 他诱导CacyBP/SIP核转位后是否传递其促结肠癌增殖的信号? 这均为我们下一步的研究方向.

4 参考文献

- 1 Filipek A, Kuznicki J. Molecular cloning and expression of a mouse brain cDNA encoding a novel protein target of calyculin. *J Neurochem* 1998; 70: 1793-1798
- 2 Zhao Y, You H, Liu F, An H, Shi Y, Yu Q, Fan D. Differentially expressed gene profiles between multidrug resistant gastric adenocarcinoma cells and their parental cells. *Cancer Lett* 2002; 185: 211-218
- 3 Shi Y, Hu W, Yin F, Sun L, Liu C, Lan M, Fan D. Regulation of drug sensitivity of gastric cancer cells by human calyculin-binding protein (CacyBP). *Gastric Cancer* 2004; 7: 160-166
- 4 Zhai H, Shi Y, Yu J, Hong L, Tang H, Wang J, Hu S, Bai F, Fan D. Establishment and characterization of calyculin binding protein (CacyBP) monoclonal antibody. *Hybridoma (Larchmt)* 2006; 25: 91-94
- 5 Zhai H, Shi Y, Jin H, Li Y, Lu Y, Chen X, Wang J, Ding L, Wang X, Fan D. Expression of calyculin-binding protein/Siah-1 interacting protein in normal and malignant human tissues: an immunohistochemical survey. *J Histochem Cytochem* 2008; 56: 765-772
- 6 Marenholz I, Heizmann CW, Fritz G. S100 proteins in mouse and man: from evolution to function and pathology (including an update of the nomenclature). *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 322: 1111-1122
- 7 Matsuzawa SI, Reed JC. Siah-1, SIP, and Ebi collaborate in a novel pathway for beta-catenin degradation linked to p53 responses. *Mol Cell* 2001; 7: 915-926
- 8 Nakayama KI, Nakayama K. Ubiquitin ligases: cell-cycle control and cancer. *Nat Rev Cancer* 2006; 6: 369-381
- 9 Filipek A, Jastrzebska B, Nowotny M, Kwiatkowska K, Hetman M, Surmacz L, Wyroba E, Kuznicki J. Ca²⁺-dependent translocation of the calyculin-binding protein in neurons and neuroblastoma NB-2a cells. *J Biol Chem* 2002; 277: 21103-21109
- 10 Wu J, Tan X, Peng X, Yuan J, Qiang B. Translocation and phosphorylation of calyculin binding protein during retinoic acid-induced neuronal differentiation of neuroblastoma SH-SY5Y cells. *J Biochem Mol Biol* 2003; 36: 354-358
- 11 Sobhani I, Lehy T, Laurent-Puig P, Cadiot G, Ruzsiewicz P, Mignon M. Chronic endogenous hypergastrinemia in humans: evidence for a mitogenic effect on the colonic mucosa. *Gastroenterology* 1993; 105: 22-30
- 12 Johnson LR. The trophic action of gastrointestinal hormones. *Gastroenterology* 1976; 70: 278-288
- 13 Smith JP, Solomon TE. Effects of gastrin, proglumide, and somatostatin on growth of human colon cancer. *Gastroenterology* 1988; 95: 1541-1548
- 14 Watson SA, Durrant LG, Crosbie JD, Morris DL. The in vitro growth response of primary human colorectal and gastric cancer cells to gastrin. *Int J Cancer* 1989; 43: 692-696
- 15 Thorburn CM, Friedman GD, Dickinson CJ, Vogelmann JH, Orentreich N, Parsonnet J. Gastrin and colorectal cancer: a prospective study. *Gastroenterology* 1998; 115: 275-280
- 16 Watson SA, Smith AM. Hypergastrinemia promotes adenoma progression in the APC(Min-/+) mouse model of familial adenomatous polyposis. *Cancer Res* 2001; 61: 625-631
- 17 Seva C, Scemama JL, Pradayrol L, Sarfati PD, Vaysse N. Coupling of pancreatic gastrin/cholecystokinin-B (G/CCKB) receptors to phospholipase C and protein kinase C in AR4-2J tumoral cells. *Regul Pept* 1994; 52: 31-38
- 18 Bertrand V, Bastie MJ, Vaysse N, Pradayrol L. Inhibition of gastrin-induced proliferation of AR4-2J cells by calcium channel antagonists. *Int J Cancer* 1994; 56: 427-432

编辑 史景红 电编 吴鹏朕

急性胰腺炎多层螺旋CT灌注成像的应用价值

王芳军, 陈卫昌, 郭亮, 方向明

■背景资料

急性胰腺炎(AP)是消化内科临床常见急腹症之一,微循环障碍在急性胰腺炎发病、发展中起重要作用。AP临床症状轻重不一,病因复杂,病情变化快,轻重型预后差异大,对AP病情严重程度及时的、准确评估显得非常重要。

王芳军, 陈卫昌, 苏州大学附属第一医院消化科 江苏省苏州市 215006

郭亮, 方向明, 苏州大学附属第一医院影像科 江苏省苏州市 215006

王芳军, 硕士, 现在江阴市人民医院工作, 研究方向: 急性胰腺炎的基础与临床。

作者贡献分布: 王芳军与陈卫昌对此文所作贡献均等; 此课题由王芳军, 陈卫昌及郭亮设计; 研究过程由王芳军与方向明等操作完成; 研究所用试剂及分析工具由郭亮提供; 数据分析由王芳军, 陈卫昌及郭亮完成; 本论文写作由王芳军与陈卫昌完成。

通讯作者: 陈卫昌, 215006, 江苏省苏州市十梓街188号, 苏州大学附属第一医院消化科. weichangchen@126.com

电话: 0512-65223637-8374

收稿日期: 2008-09-19 修回日期: 2008-10-17

接受日期: 2008-11-03 在线出版日期: 2008-12-18

Multisection spiral CT perfusion for patients with acute pancreatitis

Fang-Jun Wang, Wei-Chang Cheng, Liang Guo, Xiang-Ming Fang

Fang-Jun Wang, Wei-Chang Chen, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Suzhou University, Suzhou 215006, Jiangsu Province, China

Liang Guo, Xiang-Ming Fang, Department of Radiology, the First Affiliated Hospital of Suzhou University, Suzhou 215006, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Dr. Wei-Chang Chen, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Suzhou University, 188 Shizi Street, Suzhou 215006, Jiangsu Province, China. weichangchen@126.com

Received: 2008-09-19 Revised: 2008-10-17

Accepted: 2008-11-03 Published online: 2008-12-18

Abstract

AIM: To examine the blood perfusion characteristics of acute pancreatitis (AP) using multisection dynamic CT, and to detect relationship between perfusion parameters and severity indicators in acute pancreatitis.

METHODS: A total of 112 cases (30 cases with normal pancreas and 82 AP patients) were examined for pancreatic perfusion from August in 2006 to January in 2008. These data were processed on a SIEMENS workstation using PCT software package, and the mean BF, BV, TTP, PS were measured and statistically analyzed in 112 patients.

RESULTS: BF and BV had a significant decrease

between acute pancreatitis group and normal control group (110.57 ± 60.04 vs 133.55 ± 25.70 , 156.68 ± 65.11 vs 193.78 ± 27.01 , both $P < 0.05$), but TTP and PS showed no significant change. Compared with mild acute pancreatitis, severe pancreatitis showed longer hospital stay (11.51 ± 8.46 d vs 20.91 ± 8.40 d, $P < 0.05$), longer but not significant time for easing abdominal pain. Acute pancreatitis CT perfusion parameters BF, BV were related to pain of time, total time of hospitalization, and local complications ($P < 0.05$).

CONCLUSION: Multisection Spiral CT (MSCT) perfusion imaging may reflect the features of pancreatic perfusion in acute pancreatitis. The BF and BV are markedly decreased in AP. The BF and BV are predictors for assessing acute pancreatitis patients.

Key Words: Pancreatitis; X-ray computed; Tomography; Perfusion

Wang FJ, Chen WC, Guo L, Fang XM. Multisection spiral CT perfusion for patients with acute pancreatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(35): 3958-3962

摘要

目的: 应用多层螺旋CT探讨急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)患者胰腺CT灌注的变化以及CT灌注参数与急性胰腺炎临床常用病情指标的关系,以探讨CT灌注成像在急性胰腺炎中的临床应用价值。

方法: 2006-08/2008-01急性胰腺炎患者82例,入院后2-3 d采用德国Siemens somatom Sensation 64层螺旋CT进行动态增强扫描,其中5例因患者移动等致胰腺CT灌注成像失败。30例对照组,其中3例健康志愿者,27例因其他疾病行腹部CT检查患者。利用螺旋CT自带软件PCT进行处理得到灌注参数:BF(血流量)、BV(血容量)、TTP(峰值时间)、PS(表面通透性)等。

结果: 急性胰腺炎组BF、BV较正常对照组相比下降明显(110.57 ± 60.04 vs 133.55 ± 25.70 , 156.68 ± 65.11 vs 193.78 ± 27.01 , 均 $P < 0.05$),

■同行评议者

程英升, 主任医师, 上海交通大学附属第六人民医院放射科、上海交通大学影像医学研究所

TTP、PS变化无统计学意义。重型急性胰腺炎与轻型急性胰腺炎相比, 住院时间延长(11.51 ± 8.46 d vs 20.91 ± 8.40 d, $P < 0.05$), 而腹痛缓解时间离散度大, 虽有延长趋势, 但无统计学意义。急性胰腺炎CT灌注参数BF、BV与腹痛缓解时间、住院总时间、局部并发症间存在相关关系($P < 0.05$)。

结论: 急性胰腺炎患者胰腺血流灌注降低, 灌注参数BV、BF与AP临床常用病情指标存在相关关系, CT灌注成像在AP病情评估中具有临床应用价值。

关键词: 胰腺炎; X线计算机体层摄影术; 灌注

王芳军, 陈卫昌, 郭亮, 方向明. 急性胰腺炎多层螺旋CT灌注成像的应用价值. 世界华人消化杂志 2008; 16(35): 3958-3962
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3958.asp>

0 引言

急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)是消化内科临床常见急腹症之一, 微循环障碍在急性胰腺炎发病、发展中起重要作用^[1], AP临床症状轻重不一, 病因复杂, 病情变化快, 轻重型预后差异大, 对AP病情严重程度的及时、准确评估显得非常重要。目前尚无理想的单一急性胰腺炎病情严重程度的评估指标。CT灌注成像是可获得器官灌注绝对值的新型功能成像技术, 在肝脏、肿瘤、脑的血流灌注应用日趋成熟, 但胰腺的CT血流灌注研究较少, 急性胰腺炎的CT血流灌注成像研究刚起步, 急性胰腺炎的CT灌注成像报道较少^[2-6], 胰腺CT灌注参数与AP临床常用病情指标关系研究未见报道。本研究应用64层螺旋CT观察AP患者胰腺CT灌注变化特征及灌注参数与AP临床常用病情指标的关系, 以研究CT灌注成像在急性胰腺炎中的临床应用价值。

1 材料和方法

1.1 材料 2006-08/2008-01急性胰腺炎患者82例, 诊断均符合中国急性胰腺炎诊治指南^[7], 入院后2-3 d行多层螺旋CT(MSCT)胰腺灌注成像, 其中5例因患者移动等致胰腺CT灌注成像失败。77例CT灌注成像成功的急性胰腺炎中, 男43例, 女34例。30例对照组, 其中3例健康志愿者, 27例因其他疾病行腹部CT检查患者。收集资料包括: (1) 患者年龄、性别、急性胰腺炎病因。(2) 患者腹痛缓解时间(入院至腹痛缓解时间)、局部并发症(胰腺脓肿、假性囊肿)、全身并发症(器官衰

竭^[8]、感染)、住院总时间。

1.2 方法 入院后2-3 d, 采用德国Siemens somatom Sensation 64层螺旋CT进行动态增强扫描。患者仰卧位, 先常规腹CT平扫: 层厚5 mm, 层间距5 mm, 螺距为1。然后选定胰腺显示最完整层面作为灌注扫描层面, 总灌注扫描厚度28.8 mm。选择BODY PCT模式。层厚2.4 mm, 管电压100 kV, 管电流120 mA。对比剂欧乃派克(300 g/L)100 mL, Irich missouri高压自动注射器自动注射, 注射速率为5 mL/s, 注射50 mL。延迟6 s开始扫描, 扫描开始前要求患者深吸气后屏住呼吸, 年纪大者尽可能长时间屏气, 达不到30 s者平静呼吸。每1 s扫描1次, 共扫描30 s。灌注扫描后再注射造影剂50 mL完成常规增强扫描。在Siemens somatom Sensation 64层螺旋CT工作站上利用Siemens somatom Sensation型64层螺旋CT自带软件PCT对扫描传入的数据进行处理。CT灌注图像由2名放射科医师独立读片。

统计学处理 应用SPSS13.0统计学软件进行数据分析, 结果以mean±SD表示, 急性胰腺炎组和对照组之间的胰腺灌注各参数值分别进行方差分析, 各CT灌注参数与临床指标的相关性采用Spearman等级相关分析, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 77例CT灌注成功的急性胰腺炎中, 平均年龄 51.38 ± 15.25 岁, 胆源性63例, 高血脂6例, 酒精性1例, 7例原因不明。按中国急性胰腺炎诊治指南^[7]分为: 轻型急性胰腺炎组(MAP)54例, 重型急性胰腺炎组(SAP)23例。14例出现假性囊肿, 12例出现呼吸衰竭, 平均住院时间14.58(1-59) d, 其中SAP平均住院时间 20.91 ± 8.40 d, MAP平均住院时间 11.51 ± 8.46 d, SAP平均腹痛缓解时间 78.96 ± 72.73 h, MAP平均腹痛缓解时间 67.11 ± 66.06 h。所有病例均经内科治疗痊愈出院, 无1例死亡。

2.2 急性胰腺炎组各CT灌注参数的变化 由图1所示, 对照组胰腺边界清楚, 强化均匀, 各灌注图示胰头、胰体、胰尾部血流灌注丰富、均匀; 由图2所示, 急性胰腺炎组, 平扫及增强示胰头颈部液体积聚, 各血流量(blood flow, BF)、血容量(blood volume, BV)图示灌注降低, 表面通透性(permeability surface, PS)有增高趋势。急性胰腺炎组与对照组相比, AP患者BF、BV下降($P < 0.05$)。对比剂峰值时间(time to peak, TTP)、

■ 研发前沿

CT灌注成像是可获得器官灌注绝对值的新型功能成像技术, 在肝脏、肿瘤、脑的血流灌注应用日趋成熟, 但胰腺的CT血流灌注研究较少。

■应用要点

CT灌注可用于急性胰腺炎患者的病情严重程度评估, 灌注参数BF、BV有望成为急性胰腺炎病情严重程度评估新的客观指标。

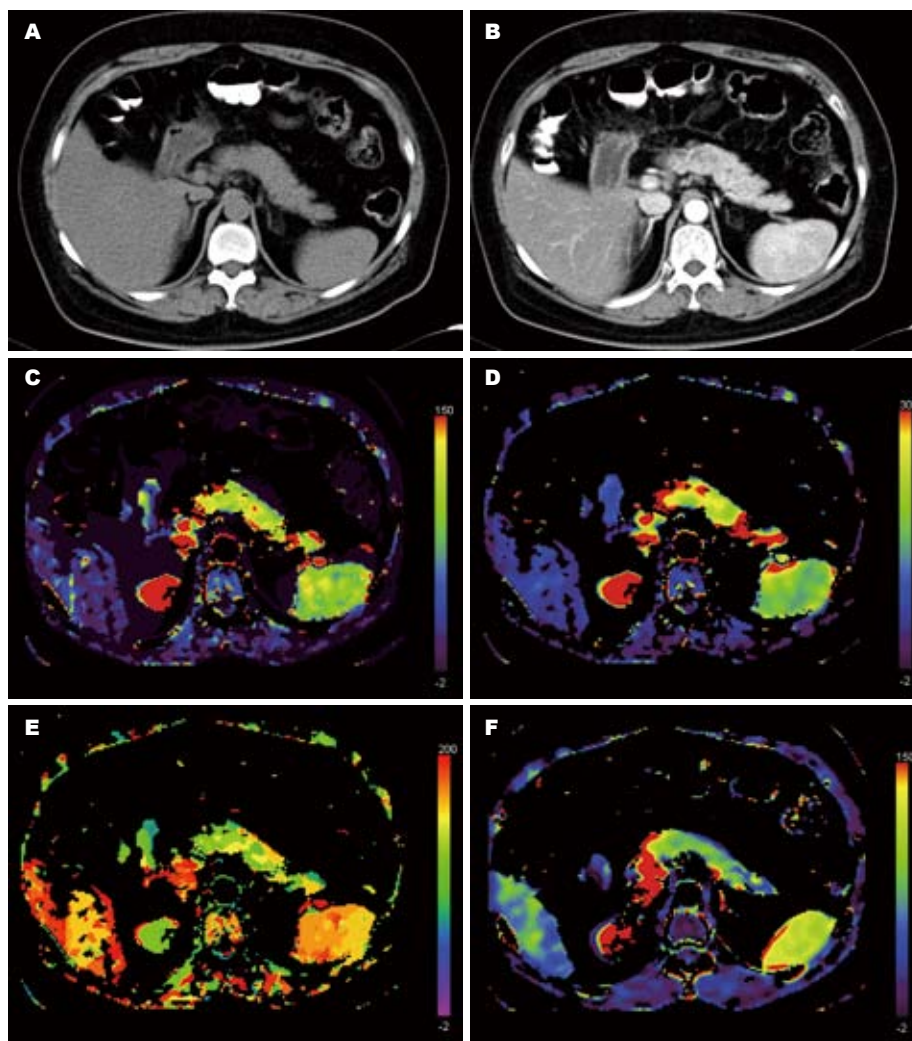


图1 对照组CT扫描和CT灌注. A: 平扫; B: 增强; C: BF; D: BV; E: TTP; F: PS.

PS与对照组相比差异无统计学意义(表1, 图2).

2.3 急性胰腺炎CT灌注参数与临床观测指标间相关性 重型急性胰腺炎与轻型急性胰腺炎相比, 住院时间延长($P<0.05$), 而腹痛缓解时间离散度大, 虽有延长趋势, 但无统计学意义($P>0.05$, 表2). 急性胰腺炎CT灌注参数BF、BV与腹痛缓解时间、住院总时间、局部并发症间存在相关关系($P<0.05$), TTP、PS与腹痛缓解时间、住院总时间、局部并发症间无相关关系($P>0.05$, 表3).

3 讨论

AP是消化内科临床常见急腹症之一, 是胰酶消化自身胰腺及其周围组织所引起的化学性炎症. 急性胰腺炎的总死亡率约5%, 间质性胰腺炎为3%, 坏死性胰腺炎为17%, 多系统器官衰竭者为47%(28%-69%)^[8].

目前对其发病机制尚未完全清楚, 大量的实验研究证实, 在AP的病理生理过程中, 突出存在以胰腺缺血为主的胰腺微循环障碍. 自20世纪90年代以来, 有关AP与胰腺微循环之间关系

表1 急性胰腺炎组和正常对照组之间胰腺CT灌注各参数比较 (mean \pm SD)

CT灌注参数	急性胰腺炎	对照组
BF mL/(100 mL \cdot min)	110.57 \pm 60.04 ^a	133.55 \pm 25.70
BV (mL/L)	156.68 \pm 65.11 ^a	193.78 \pm 27.01
TTP (0.1s)	146.58 \pm 29.46	142.41 \pm 13.95
PS 0.5 mL/(100 mL \cdot min)	110.73 \pm 62.66	128.72 \pm 34.53

^a $P<0.05$ vs 对照组.

的研究逐渐增多, 特别是胰腺微循环障碍在SAP发病中的作用越来越受到重视. 目前尚无理想的直观显示胰腺微循环状况的方法.

准确评估AP病情严重程度及判断预后是摆在临床医师面前的一大难题. 根据临床表现判断胰腺炎严重度的准确性很差. 腹部压痛、腹

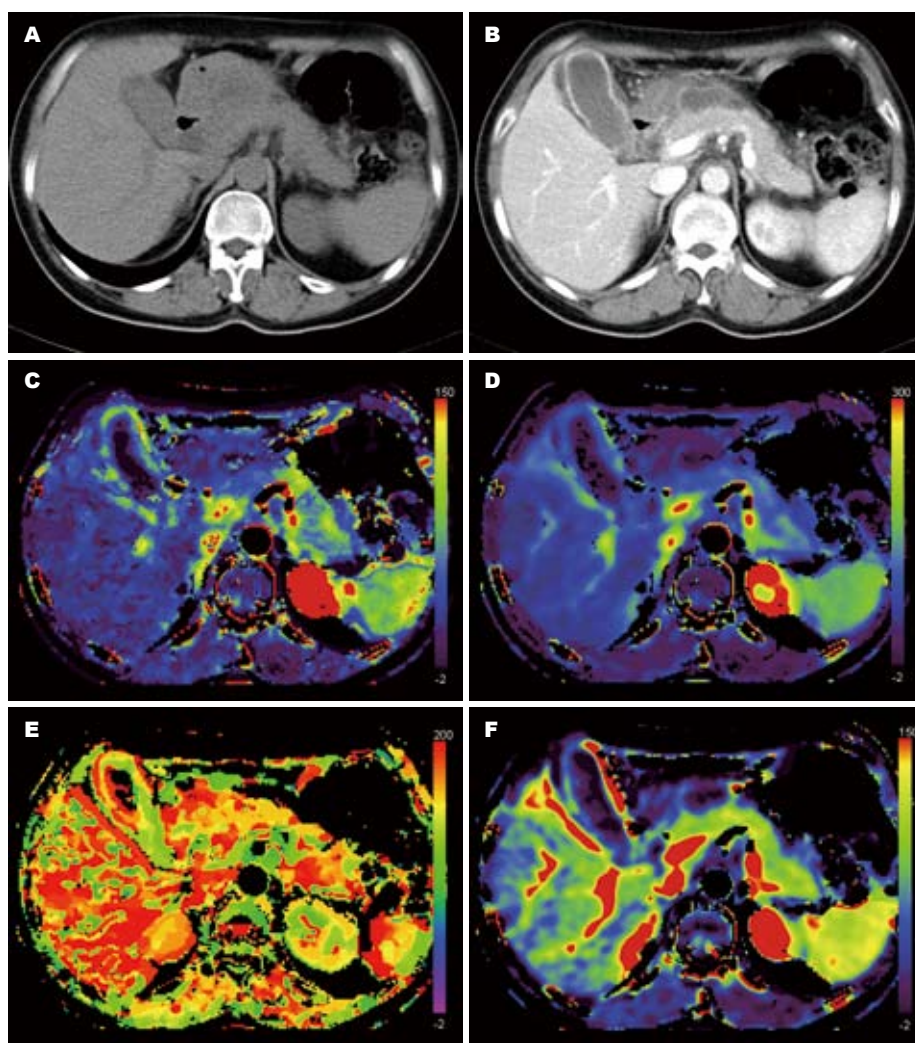


图 2 急性胰腺炎组CT图和CT灌注. A: 平扫; B: 增强; C: BF; D: BV; E: TTP; F: PS.

■同行评价
本研究设计合理、方法科学、结论可靠,是一篇好的临床研究论文。

表 2 急性胰腺炎不同病情间临床指标变化 (mean ± SD)

	MAP(<i>n</i> = 54)	SAP(<i>n</i> = 23)
腹痛缓解时间(h)	67.11 ± 66.06	78.96 ± 72.73
住院总时间(d)	11.51 ± 8.46	20.91 ± 8.40 ^a

^a*P* < 0.05 vs MAP组.

胀、呼吸窘迫、腹部包块等表现在急性胰腺炎患者中表现差异太大,经常是严重病例并不一定有这些表现. Grey-Turner's和Cullen's^[9]特异性强,出现这种表现几乎均为重型,但他们仅存在于1%-3%的病例,而且一般出现于起病48 h之后^[10]. 临床常用的急性胰腺炎病情评估标准有APACHE(acute physiology and chronic health evaluation, APACHE)、CT严重指数(CT Severity Index, CTSI)、Ranson标准、C-反应蛋白^[11-13]等在AP的病情评估各有其独特作用,但目前尚无理想的单一急性胰腺炎病情严重程度的评估指标.

CT灌注成像是在静脉团注对比剂后对选

表 3 急性胰腺炎CT灌注参数与临床指标相关性 (*r*)

CT灌注参数	腹痛缓解时间	住院总时间	局部并发症
BF	-0.266 ^a	-0.243 ^a	-0.296 ^b
BV	-0.348 ^b	-0.362 ^b	-0.386 ^b
TTP	-0.053	0.030	0.084
PS	-0.126	0.017	0.026

^a*P* < 0.05, ^b*P* < 0.01.

定层面进行同层动态扫描,以获得该层面内每一像素的时间-密度曲线(timedensity curve, TDC),根据该曲线利用不同的数学模型计算出各种灌注参数,一般常用的有BF、BV、对比剂的平均通过时间(mean transit time, MTT)、TTP和PS等参数,并可通过色阶赋值形成灌注影像,以此来了解器官及病变的血流灌注特点. CT灌注成像技术自20世纪80年代首次运用以来^[14],诸多学者对人体各大器官的CT血流灌注进行了大量研究. 尤其是脑部疾病、肝脏疾病

及肿瘤的CT灌注成像研究较为成熟. Siemens公司64层螺旋CT扫描速度快、灌注覆盖层范围广(28.8 mm), 基本覆盖全部胰腺, 利于胰腺不同部位灌注情况观察, 采用容积扫描, 可进行随意重建, 一般2.4 mm/12层和7.2 mm/4层. 后处理软件可以有选择地删除运动伪影较大的图像而不影响计算的结果, 且具有二维、三维校正功能, 以降低移动影响, 最大限度提高计算准确性.

目前国内外胰腺CT灌注的临床研究还较少, 本研究对77例AP行胰腺CT灌注, 结果提示AP患者CT灌注下降, 以BF、BV明显($P<0.05$), 测得AP患者BF为 110.57 ± 60.04 mL/(100 mL·min), 与王琦 *et al*^[3]及王欣 *et al*^[4]的结果相似, 较Bize *et al*^[5]的结果高. BV为 156.68 ± 65.11 mL/L与王欣 *et al*^[4]的结果相似但较Bize *et al*^[5]为低. 考虑可能与所用仪器、处理软件及病例组中急性胰腺炎病情严重程度不同等有关.

本研究显示BF、BV与AP患者住院时间、局部并发症相关、腹痛缓解时间($P<0.05$). PS、TTP与AP病情评估指标无明显相关性($P>0.05$). 提示CT灌注可用于急性胰腺炎患者的病情严重程度评估, 灌注参数BF、BV有望成为急性胰腺炎病情严重程度评估新的客观指标.

总之, CT灌注成像技术作为一种能获得组织灌注绝对值的方法, 能有效显示AP患者胰腺灌注变化特点, 且BF、BV与临床常用AP病情评估指标住院时间、局部并发症存在相关性, 表明CT灌注成像技术可用于AP患者病情严重程度评估, 检测BF、BV有助于急性胰腺炎病情严重度的评估, 具有良好的临床应用前景.

4 参考文献

1 Banerjee AK, Steele RJ. Current views on the

pathophysiology of acute biliary pancreatitis. *Gut* 1995; 36: 803-805

2 Tsuji Y, Yamamoto H, Yazumi S, Watanabe Y, Matsueda K, Yamamoto H, Chiba T. Perfusion computerized tomography can predict pancreatic necrosis in early stages of severe acute pancreatitis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007; 5: 1484-1492

3 王琦, 徐荣天, 王欣, 李德阳, 李檀, 赵宇, 卢涛. 急性胰腺炎多层螺旋CT灌注成像的初步研究. *中国医科大学学报* 2006; 35: 185-186

4 王欣, 徐荣天, 卢涛, 赵宇. 急性胰腺炎的多层螺旋CT灌注成像研究. *中国医学影像技术* 2006; 22: 100-102

5 Bize PE, Platon A, Becker CD, Poletti PA. Perfusion measurement in acute pancreatitis using dynamic perfusion MDCT. *AJR Am J Roentgenol* 2006; 186: 114-118

6 李震, 胡道予, 肖明, 宋金梅. 轻症急性胰腺炎多层螺旋CT灌注成像. *放射学实践* 2006; 21: 446-448

7 中华医学会消化病学分会胰腺疾病学组. 中国急性胰腺炎诊治指南(草案). *中华内科杂志* 2004; 43: 236-238

8 Banks PA, Freeman ML. Practice guidelines in acute pancreatitis. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 2379-2400

9 Brisinda G, Maria G, Ferrante A, Civello IM. Evaluation of prognostic factors in patients with acute pancreatitis. *Hepatogastroenterology* 1999; 46: 1990-1997

10 Malfertheiner P, Kemmer TP. Clinical picture and diagnosis of acute pancreatitis. *Hepatogastroenterology* 1991; 38: 97-100

11 Leung TK, Lee CM, Lin SY, Chen HC, Wang HJ, Shen LK, Chen YY. Balthazar computed tomography severity index is superior to Ranson criteria and APACHE II scoring system in predicting acute pancreatitis outcome. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 6049-6052

12 Chatzicostas C, Roussomoustakaki M, Vardas E, Romanos J, Kouroumalis EA. Balthazar computed tomography severity index is superior to Ranson criteria and APACHE II and III scoring systems in predicting acute pancreatitis outcome. *J Clin Gastroenterol* 2003; 36: 253-260

13 Dervenis C, Johnson CD, Bassi C, Bradley E, Imrie CW, McMahon MJ, Modlin I. Diagnosis, objective assessment of severity, and management of acute pancreatitis. Santorini consensus conference. *Int J Pancreatol* 1999; 25: 195-210

14 Axel L. Cerebral blood flow determination by rapid-sequence computed tomography: theoretical analysis. *Radiology* 1980; 137: 679-686

编辑 史景红 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志网络版的发表前链接

本刊讯 本刊即将开始实行网络版的每篇文章上都有该文发表前纪录的链接, 包括首次提交的稿件, 同行评议人报告, 作者给审稿人回信和作者修回稿, 以PDF格式上传. 读者可以针对论文、审稿意见和作者的修改情况发表意见, 指出问题与不足; 作者也可以随时修改完善自己发表的论文, 使文章的发表成为一个编者、同行评议者、读者、作者互动的动态过程. (常务副总编辑: 张海宁 2008-12-18)

SFRP2和 β -catenin在大肠癌中的表达及其临床意义

刘宁, 姜海行, 黄振宁, 覃山羽, 李信

刘宁, 姜海行, 黄振宁, 覃山羽, 李信, 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

刘宁, 硕士, 主要从事大肠癌早期诊断及发病机制的研究。

作者贡献分布: 刘宁与姜海行对此文所作贡献均等; 此课题由刘宁与姜海行设计; 研究过程由刘宁, 覃山羽及李信操作完成; 研究所用试剂及分析工具由姜海行与黄振宁提供; 数据分析由刘宁, 覃山羽及李信完成; 本论文写作由刘宁与姜海行完成。

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: 2008-10-22 修回日期: 2008-11-11

接受日期: 2008-11-17 在线出版日期: 2008-12-18

Expression of SFRP2 and β -catenin in the carcinogenesis and progression of colorectal carcinoma

Ning Liu, Hai-Xing Jiang, Zhen-Ning Huang, Shan-Yu Qin, Xin Li

Ning Liu, Hai-Xing Jiang, Zhen-Ning Huang, Shan-Yu Qin, Xin Li, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of 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: 2008-10-22 Revised: 2008-11-11

Accepted: 2008-11-17 Published online: 2008-12-18

Abstract

AIM: To investigate the role of Secreted Frizzled-related proteins 2 (SFRP2) and β -catenin in carcinogenesis and progression of colorectal carcinoma.

METHODS: Expression of SFRP2 and β -catenin proteins were examined immunohistochemically in 20 cases of normal colorectal mucosa, 20 cases of colorectal polyp, 36 cases of colorectal adenomas and 42 cases of colorectal carcinoma. The corresponding clinical data between the expression of SFRP2 and β -catenin proteins were analyzed retrospectively.

RESULTS: The positive expression rates of SFRP2 were significantly lower in colorectal carcinoma and colorectal adenoma than in normal colorectal mucosa and colorectal polyp

(28.57% vs 100.0%, 95.0%; 36.11% vs 100.0%, 95.0%, all $P < 0.05$). The reduced membranous β -catenin expression rate was significantly higher in colorectal carcinoma than in normal colorectal mucosa, colorectal polyp and colorectal adenoma (52.4% vs 0%, 0%, 11.1%, all $P < 0.05$). The cytoplasmic and nuclear β -catenin expression rates were significantly higher in colorectal carcinoma and colorectal adenomas than in normal colorectal mucosa and colorectal polyp (64.3% vs 0%, 0%; 30.6% vs 0%, 0%, all $P < 0.05$), higher in colorectal carcinoma than in colorectal adenomas ($P < 0.05$). The positive expression of SFRP2, reduced membranous β -catenin expression and cytoplasmic and nuclear β -catenin expression in colorectal carcinoma were significantly correlated with the tumor differentiation, but not with the tumor position, morphology or size, lymph node metastasis or Duke's stage. Besides, the positive expression of SFRP2 was significantly correlated with the depth of invasion in colorectal carcinoma. The positive expression of SFRP2 was negatively correlated with the reduced membranous β -catenin expression ($r = -0.452$, $P = 0.003$) and cytoplasmic and nuclear β -catenin expression ($r = -0.519$, $P = 0.000$). There existed positive correlation between the reduced membranous β -catenin expression and cytoplasmic and nuclear β -catenin expression ($r = 0.782$, $P = 0.000$).

CONCLUSION: The expression of SFRP2 and β -catenin are closely correlated with the carcinogenesis and progression of colorectal carcinoma, and may be an early event. The positive expression of SFRP2 is negatively correlated with the reduced membranous β -catenin expression and cytoplasmic and nuclear β -catenin expression. The former may inhibit carcinogenesis and latter may promote carcinogenesis.

Key Words: Colorectal carcinoma; SFRP2; β -catenin; Expression

Liu N, Jiang HX, Hang ZN, Qin SY, Li X. Expression of SFRP2 and β -catenin in the carcinogenesis and progression of colorectal carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(35): 3963-3969

■背景资料

大肠癌(CRC)是世界第三大常见的恶性肿瘤,在美国国家恶性肿瘤死因的第二位,但其发病机制尚不清楚。研究证实Wnt/ β -catenin信号通路在大肠癌的发生发展中起着重要的作用。

■同行评议者

王蒙, 副教授, 中国人民解放军第二军医大学附属东方肝胆外科医院肝外综合治疗一科

■研发前沿

针对Wnt/ β -catenin信号通路的分子靶向治疗是目前研究热点、重点。

摘要

目的: 探讨分泌型Frizzled相关蛋白2(Secreted Frizzled-related proteins 2, SFRP2)和 β -连接素(β -catenin)在大肠癌发生、发展中的作用。

方法: 采用免疫组化SP法检测20例正常大肠黏膜、20例非腺瘤性息肉、36例大肠腺瘤和42例大肠癌组织中的SFRP2和 β -catenin蛋白的表达情况,分析二者表达的差异及其与临床病理参数的关系。

结果: 大肠癌和大肠腺瘤组SFRP2的阳性表达率显著低于正常大肠黏膜和非腺瘤性息肉组(28.57% vs 100.0%, 95.0%; 36.11% vs 100.0%, 95.0%, 均 $P < 0.05$); 大肠癌中 β -catenin膜表达缺失率显著高于正常大肠黏膜、非腺瘤性息肉及大肠腺瘤组(52.4% vs 0%, 0%, 11.1%, 均 $P < 0.05$); 大肠癌和大肠腺瘤组 β -catenin异位表达率显著高于正常大肠黏膜和非腺瘤性息肉组(64.3% vs 0%, 0%; 30.6% vs 0%, 0%, 均 $P < 0.05$), 大肠癌 β -catenin异位表达率高于大肠腺瘤($P < 0.05$); SFRP2表达、 β -catenin膜表达缺失及异位表达与大肠癌患者的肿瘤部位、大体形态、肿瘤直径、淋巴转移和Dukes分期无明显关系,而与大肠癌的分化程度密切相关,其中SFRP2表达还与大肠癌的浸润深度密切相关; SFRP2表达与 β -catenin膜表达缺失、异位表达均呈明显负相关($r = -0.452$, $P = 0.003$; $r = -0.519$, $P = 0.000$),而 β -catenin膜表达缺失与异位表达呈明显正相关($r = 0.782$, $P = 0.000$)。

结论: SFRP2和 β -catenin的表达与大肠癌的发生、发展密切相关,可能是大肠癌发生的早期事件,且SFRP2表达与 β -catenin膜表达缺失、异位表达均呈负相关,前者起抑癌作用,后者起促癌作用。

关键词: 大肠癌; SFRP2; β -catenin; 表达

刘宁, 姜海行, 黄振宁, 覃山羽, 李信. SFRP2和 β -catenin在大肠癌中的表达及其临床意义. 世界华人消化杂志 2008; 16(35): 3963-3969

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3963.asp>

■相关报道

Suzuki报道在大肠癌中频繁出现SFRP2启动子甲基化, β -catenin胞核内异位可作为大肠癌预后评估及治疗模式选择的重要参考指标; Muller发现SFRP2甲基化检测诊断大肠癌的敏感性和特异性分别为77%-99%和77%。

近研究发现, 90%以上的结肠癌和直肠癌存在Wnt/ β -catenin信号转导通路的激活, 以及继发于此的 β -catenin蛋白在细胞内的集聚^[4]。Wnt信号通路控制着细胞的生长、运动和分化, 已被确认是与肿瘤相关的一个关键性信号通路^[5]。本研究应用免疫组化技术检测Wnt信号通路拮抗剂SFRP2和Wnt信号通路关键蛋白 β -catenin在大肠癌发生、发展过程中的表达及相互关系, 以探讨二者在大肠癌发生、发展中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料 病例标本来源于广西医科大学第一附属医院2004-2007手术切除或内镜活检的病理确诊组织118例, 分为4组: (1)大肠癌组42例, 男24例, 女18例, 年龄30-87(中位年龄61)岁。所有病例术前均未经放疗和化疗。其中结肠癌23例, 直肠癌19例; 肿瘤局限于黏膜下层/肌层12例, 浸润至浆膜/浆膜外30例; 有淋巴结转移18例, 无淋巴结转移24例; Duke's分期A期9例, B期13例, C+D期20例。(2)大肠腺瘤组36例。(3)非腺瘤性息肉组20例, 其中炎症性息肉8例, 增生性息肉10例, 幼年性息肉1例, P-J息肉1例。(4)正常大肠黏膜组20例, 均为内镜下活检的正常大肠黏膜。

兔抗人SFRP2多克隆抗体购自美国Santa Cruz公司, 兔抗人 β -catenin抗体购自美国Thermo公司, 免疫组化SP试剂盒、DAB显色试剂盒购自福州迈新生物技术有限公司。

1.2 方法 采用免疫组化SP法。所有操作严格按产品说明书进行。PBS代一抗作阴性对照, 分别以已知的SFRP2, β -catenin表达阳性的正常大肠黏膜作阳性对照。免疫组化染色阳性信号为棕黄色细小颗粒。SFRP2染色结果依据染色强度和阳性细胞率综合计算评分。染色强度分级: 无染色为0, 淡黄色为1, 棕黄色及更深颜色为3; 阳性细胞率: $\leq 50\%$ 为0, 51%-75%为1, $\geq 76\%$ 为2。两项得分相加结果 >2 为阳性表达^[6]。 β -catenin染色结果的判断标准按照Maruyama *et al*^[7]方法, 分别从细胞膜、细胞质、细胞核三方面判断其在细胞内的分布情况。细胞膜 $>70\%$ 细胞阳性为正常表达, 反之为膜表达缺失; 细胞质或细胞核 $>10\%$ 细胞阳性为胞质或胞核阳性表达, 即异位表达。

统计学处理 应用SPSS13.0统计软件对所得数据进行 χ^2 检验和Spearman相关分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SFRP2、 β -catenin在不同类型大肠病变组

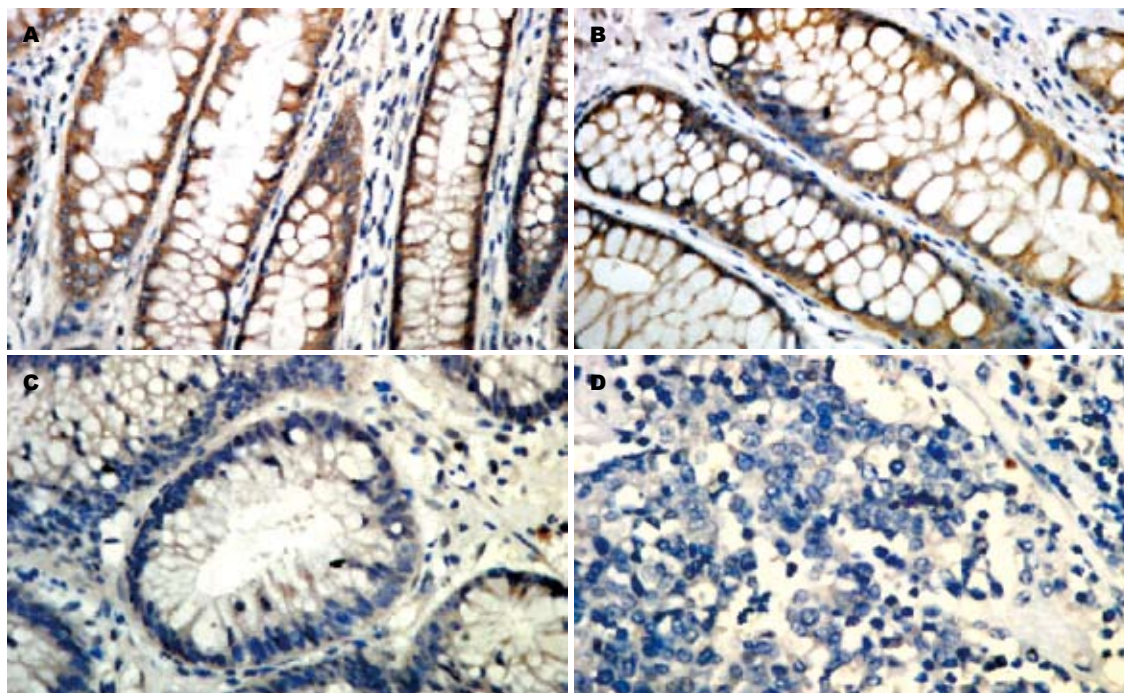


图1 SFRP2在不同类型大肠病变组织中的表达(SP法 $\times 200$)。A: 正常大肠黏膜组; B: 非腺瘤性息肉组; C: 大肠腺瘤组; D: 大肠癌组。

■创新盘点

本研究将SFRP2和 β -catenin放在一起研究, 阐明了二者在大肠癌发生、发展中的相互作用及对大肠癌的影响。

表1 SFRP2、 β -catenin在不同类型大肠病变组织中的表达 $n(\%)$

组织类型	n	β -catenin		SFRP2表达
		膜表达缺失	异位表达	
正常大肠黏膜	20	0(0.00) ^a	0(0.00) ^{ac}	20(100.0) ^{ac}
非腺瘤性息肉	20	0(0.00) ^a	0(0.00) ^{ac}	19(95.00) ^{ac}
腺瘤	36	4(11.11) ^a	11(30.56) ^a	13(36.11)
大肠癌	42	22(52.38)	27(64.29)	12(28.57)

^a $P < 0.05$ vs 大肠癌; ^c $P < 0.05$ vs 腺瘤。

组织中的表达 正常大肠黏膜和非腺瘤性息肉组中SFRP2阳性信号主要定位于胞质(图1A-B), β -catenin主要定位于细胞膜(图2A-B), 而大肠癌和大肠腺瘤组SFRP2表达降低(图1C-D), β -catenin呈不同程度的膜表达缺失和胞质/胞核异位表达(图2C-D)。大肠癌和大肠腺瘤组SFRP2阳性率均显著低于正常大肠黏膜和非腺瘤性息肉组($P < 0.05$, 表1), 其二者之间无显著性差异。大肠癌中 β -catenin膜表达缺失率显著高于正常大肠黏膜、非腺瘤性息肉和腺瘤组($P < 0.05$, 表1), 腺瘤组与正常大肠黏膜、非腺瘤性息肉组之间无显著性差异。大肠癌和腺瘤组 β -catenin异位表达率均显著高于正常大肠黏膜和非腺瘤性息肉组, 大肠癌中 β -catenin异位表达率也高于腺瘤组($P < 0.05$, 表1)。

2.2 SFRP2、 β -catenin表达与大肠癌临床病理

参数之间的关系 SFRP2表达与大肠癌患者肿瘤部位、大体形态、肿瘤直径、淋巴结转移和Duke's分期均无明显关系, 与分化程度、浸润深度密切相关($P < 0.05$, 表2); β -catenin膜表达缺失、异位表达与大肠癌患者肿瘤部位、大体形态、肿瘤直径、浸润深度、淋巴结转移和Duke's分期均无明显关系, 与大分化程度密切相关($P < 0.05$, 表2); 随着大肠癌恶性程度的增高SFRP2表达逐渐减少, β -catenin膜表达缺失及异位表达越来越明显。

2.3 大肠癌中SFRP2、 β -catenin表达的相关性 Spearman相关分析显示, SFRP2表达与 β -catenin膜表达缺失、异位表达均呈明显负相关($r = -0.452$, $P = 0.003$; $r = -0.519$, $P = 0.000$, 表3); β -catenin膜表达缺失、异位表达间呈明显正相关($r = 0.782$, $P = 0.000$, 表3)。

■应用要点

针对Wnt/ β -catenin信号通路的检测及分子靶向治疗是诊断、治疗大肠癌的一种新策略。

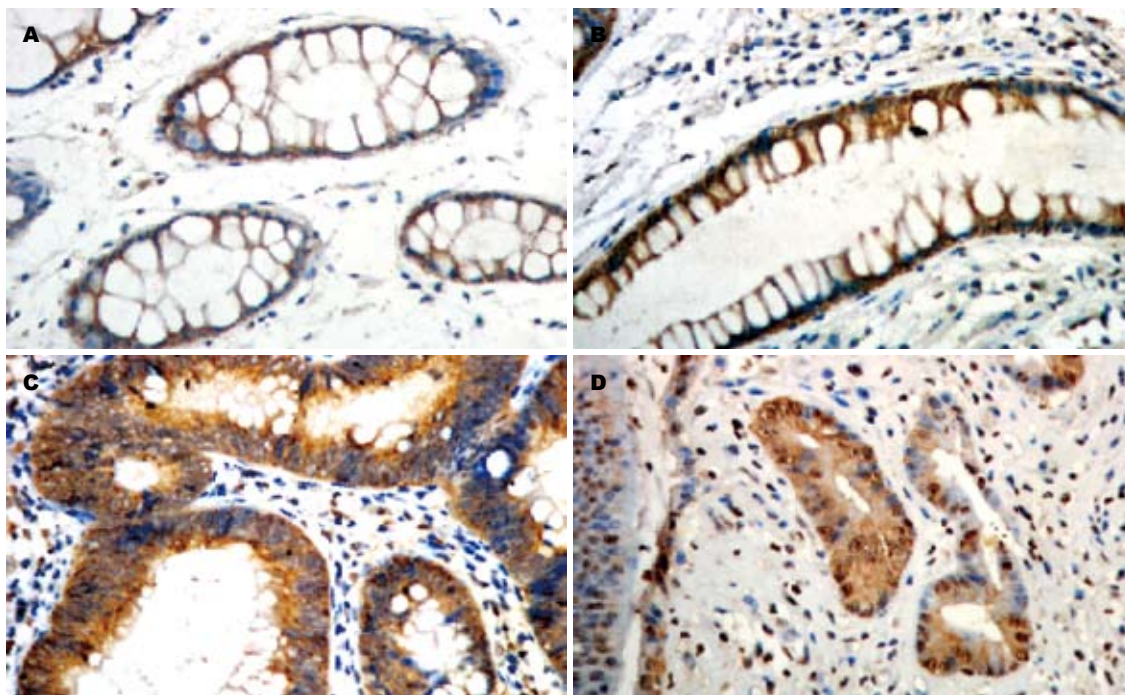


图2 β -catenin在不同类型大肠病变组织中的表达(SP法 $\times 200$)。A: 正常大肠黏膜组; B: 非腺瘤性息肉组; C: 大肠腺瘤组; D: 大肠癌组。

3 讨论

Wnt/ β -catenin信号转导通路在肿瘤的发生、发展、侵袭、转移中起着非常重要的作用^[8], 其异常活化与肿瘤的发生、发展密切相关。在成熟机体此通路是关闭的, 体内几乎没有Wnt信号, 绝大部分(约90%)的 β -catenin都被束缚在E-钙粘素(E-cadherin, E-Cad)分子上形成 β -catenin-E-cadherin复合体, 介导同型细胞间相互黏附。胞质内极少量游离态的 β -catenin与APC等结合形成“破坏复合体”被泛素-蛋白酶体系统(ubiquitin-proteasome system)降解。SFRP2含有与Wnt受体Frizzled(Fz)相似的半胱氨酸富集区(cysteine-rich domain, CRD), CRD是Wnt蛋白与Fz受体结合的区域, 这样SFRP2借CRD与Wnt蛋白结合阻止Wnt结合到Fz受体上, 或者与Fz受体形成无功能的复合物来封闭Wnt信号^[9]。肿瘤发生时该通路重要的拮抗剂SFRP2表达消失或减少使Wnt/ β -catenin信号转导通路保持激活状态, 或通路中某成分突变(如APC或 β -catenin突变), 致使 β -catenin不能被降解而在胞质内积聚, 积聚的游离 β -catenin可进入胞核与Tcf/Lef转录因子协调作用, 激活Wnt靶基因CyclinD1, c-myc等, 导致细胞增殖而发生癌变^[10-12]。近来有研究表明, β -catenin异常表达与结直肠癌、乳腺癌和胃癌等多种肿瘤发生有关^[13-15]。Bafico *et al*^[16]研究表明, SFRP2的表达沉默将很可能提供生长优势。

据Suzuki *et al*报道, 在大肠癌中频繁出现SFRP2启动子甲基化及表达沉默^[17-19]。Huang *et al*报道, 在大肠癌、大肠腺瘤、增生性息肉和溃疡性结肠炎中SFRP2的甲基化率分别为94.2%、52.4%、37.5%和16.7%^[20-21]。Qi *et al*^[22]在对不同阶段结直肠癌SFRP2基因甲基化及表达的研究中发现, 正常大肠黏膜不存在SFRP2基因甲基化, 在结直肠癌、腺瘤、变性隐窝灶(ACF)中甲基化率分别为83.3%、81.8%和77.8%。SFRP2基因在ACF中已出现高频率甲基化, 可能导致其表达下调, 是结直肠肿瘤发生常见的早期事件。本研究检测了大肠不同病变组织中SFRP2和 β -catenin的表达, 结果显示, 在正常大肠黏膜 \rightarrow 非腺瘤性息肉 \rightarrow 腺瘤 \rightarrow 大肠癌发展过程中, SFRP2表达逐渐减少, 而 β -catenin的膜表达缺失及异位表达变得越来越明显。大肠癌和大肠腺瘤组SFRP2阳性率分别为28.6%、36.1%显著低于正常大肠黏膜(100.0%)和非腺瘤性息肉组(95.0%, $P<0.05$), 与Qi *et al*^[22]所测结直肠癌、腺瘤中SFRP2基因甲基化率83.3%、81.8%大致相符。大肠癌和腺瘤组 β -catenin异位表达率分别为64.3%、30.6%, 顾国利 *et al*^[23]研究发现 β -catenin在60例大肠癌中的异位表达率为66.7%(40/60), 这与我们的研究结果是基本一致的, 说明 β -catenin在大肠癌中出现异位表达是很普遍的现象。以上结果提示 β -catenin从胞膜转位到胞质/胞核在大肠癌发生

表 2 SFRP2、 β -catenin表达与大肠癌临床病理参数的关系 $n(\%)$

	n	SFRP2	β -catenin	
		阳性表达	膜表达缺失	异位表达
肿瘤部位				
结肠	23	5(21.74)	10(43.48)	15(65.22)
直肠	19	7(36.84)	12(63.16)	12(63.16)
P		>0.05	>0.05	>0.05
大体形态				
溃疡	11	2(18.18)	6(54.55)	7(63.64)
肿块	27	9(33.33)	14(51.85)	17(62.96)
浸润	4	1(25.00)	2(50.00)	3(75.00)
P		>0.05	>0.05	>0.05
肿瘤直径(cm)				
≥ 5	27	5(18.52)	16(59.26)	20(74.07)
<5	15	7(46.67)	6(40.00)	7(46.67)
P		>0.05	>0.05	>0.05
分化程度				
高	14	7(50.00)	4(28.57)	6(42.86)
中	14	4(28.57)	7(50.00)	8(57.14)
低	14	1(7.14)	11(78.57)	13(92.86)
P		<0.05	<0.05	<0.05
浸润深度				
黏膜下	12	7(58.33)	6(50.00)	6(50.00)
层/肌层				
浆膜/浆	30	5(16.67)	16(53.33)	21(70.00)
膜外				
P		<0.05	>0.05	>0.05
淋巴结转移				
有	18	3(16.67)	11(61.11)	13(72.22)
无	24	9(37.50)	11(45.83)	14(58.33)
P		>0.05	>0.05	>0.05
Duke's分期				
A	9	5(55.56)	5(55.56)	5(55.56)
B	13	4(30.77)	6(46.15)	7(53.85)
C+D	20	3(15.00)	11(55.00)	15(75.00)
P		>0.05	>0.05	>0.05

的早期就已经存在,是大肠癌发生的一个早期事件。

本研究还发现SFRP2表达、 β -catenin膜表达缺失及异位表达与患者的肿瘤部位、大体形态、肿瘤直径、淋巴结转移和Duke's分期无明显相关,而与分化程度密切相关。SFRP2表达还与肿瘤的浸润深度相关。马思平 *et al*^[24]研究发现, β -catenin异常表达只与大肠癌分化程度呈负相关,其异常表达越明显,癌细胞分化越差。顾国利 *et al*^[23]研究发现 β -catenin异位表达与肿瘤的侵犯深度和是否转移密切相关。结果的差别考虑与患者的选择、免疫组化的方法、抗体的来源、免

表 3 大肠癌中SFRP2、 β -catenin表达的相关性 (n)

	SFRP2表达		β -catenin异位表达	
	+	-	+	-
β -catenin膜表达缺失				
+	2	20	22	0
-	10	10	5	15
	$r = -0.452$		$r = 0.782$	
	$P = 0.003$		$P = 0.000$	
β -catenin异位表达				
+	3	24		
-	9	6		
	$r = -0.519 \quad P = 0.000$			

疫染色的判断标准等不同有关。Bánkfalvi *et al*^[25]对乳腺癌研究发现, β -catenin主要在正常乳腺管腔及基底细胞、良性增生和腺管内早期肿瘤病灶有强阳性表达,而在伴有淋巴转移的病灶表达明显下降。Brabletz *et al*^[26]认为 β -catenin胞核表达与大肠癌淋巴结转移及Duke's分期有关。总的来说,较多研究发现 β -catenin的异常表达与肿瘤不良分化、分期增高、淋巴结及远隔转移有相关性。这些分化不良、分期高、有转移的肿瘤趋向于一种向周围组织侵袭和脱离原发灶的潜能,提示 β -catenin异常表达与肿瘤侵袭和转移存在相关性。这可能由于 β -catenin从胞膜移位导致 β -catenin-E-cadherin复合体解离,使同型细胞间黏附能力下降,从而增强了肿瘤细胞的转移能力^[27]。研究证实,细胞间黏附的紊乱是肿瘤侵袭和转移到先决条件,核内 β -catenin高表达可使癌细胞具备上皮-间质转化(epithelial mesenchymal transition, EMT)和干细胞形成的能力,这两种能力可能导致肿瘤干细胞扩散,进而导致肿瘤的侵袭与转移。本研究显示,大肠癌中SFRP2表达与 β -catenin膜表达缺失、异位表达均呈明显负相关, β -catenin膜表达缺失与异位表达呈明显正相关。提示SFRP2表达减低是 β -catenin表达异常的重要前提。

总之,SFRP2和 β -catenin的表达异常贯穿于大肠癌发生、发展的全过程。因此,检测SFRP2、 β -catenin对大肠癌早期诊断和预后评估有重要的临床价值。研究表明,除粪便标本DNA突变分析和蛋白质分析外,SFRP2甲基化检测是早期诊断大肠癌的敏感方法之一^[28-31]。Müller *et al*^[28]发现SFRP2甲基化检测诊断大肠癌的敏感性和特异性分别为77%-99%和77%。粪便SFRP2基因甲基化检测具有标本收集简便、

■名词解释

Wnt/ β -catenin信号通路:“Wnt经典通路”,是Wnt信号通路中研究得最为深入的一条分支。他通过激活 β -catenin在核内的功能来调节靶基因的表达水平,影响细胞增殖、细胞存活和细胞命运。

同行评价

本研究科研性较好,希望作者能够采用更加深的方法来研究SFRP2和 β -catenin在大肠癌和大肠腺癌群组中的不同表达。

无创的特点,是早期诊断大肠癌的一种新策略。Elzagheid *et al*^[32]和Suzuki *et al*^[33]提出 β -catenin胞核内异位可作为大肠癌预后评估及治疗模式选择的重要参考指标。除此之外,Wnt信号转导通路可以作为大肠癌分子靶向治疗的潜在靶点^[34-36],一些非甾体抗炎药、植物类化合物、酪氨酸激酶抑制剂和血管生成抑制剂等能抑制Wnt/ β -catenin信号转导通路过度激活,这些都为大肠癌的治疗提供了新的思路。

参考文献

- Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2007. *CA Cancer J Clin* 2007; 57: 43-66
- 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
- 王双双, 关景明, 范玉晶. 大肠癌发病的相关因素. 世界华人消化杂志 2005; 13: 534-536
- Giles RH, van Es JH, Clevers H. Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1653: 1-24
- Behrens J, Lustig B. The Wnt connection to tumorigenesis. *Int J Dev Biol* 2004; 48: 477-487
- 于敏, 李妹玉, 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
- Maruyama K, Ochiai A, Akimoto S, Nakamura S, Baba S, Moriya Y, Hirohashi S. Cytoplasmic β -catenin accumulation as a predictor of hematogenous metastasis in human colorectal cancer. *Oncology* 2000; 59: 302-309
- Reya T, Clevers H. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* 2005; 434: 843-850
- Kawano Y, Kypta R. Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. *J Cell Sci* 2003; 116: 2627-2634
- Mazieres J, He B, You L, Xu Z, Jablons DM. Wnt signaling in lung cancer. *Cancer Lett* 2005; 222: 1-10
- Prasad CP, Gupta SD, Rath G, Ralhan R. Wnt signaling pathway in invasive ductal carcinoma of the breast: relationship between β -catenin, dishevelled and cyclin D1 expression. *Oncology* 2007; 73: 112-117
- Ravindranath A, O'Connell A, Johnston PG, El-Tanani MK. The role of LEF/TCF factors in neoplastic transformation. *Curr Mol Med* 2008; 8: 38-50
- Kawasaki T, Noshio K, Ohnishi M, Suemoto Y, Kirkner GJ, Dehari R, Meyerhardt JA, Fuchs CS, Ogino S. Correlation of β -catenin localization with cyclooxygenase-2 expression and CpG island methylator phenotype (CIMP) in colorectal cancer. *Neoplasia* 2007; 9: 569-577
- Zhang YG, DU J, Tian XX, Zhong YF, Fang WG. Expression of E-cadherin, β -catenin, cathepsin D, gelatinases and their inhibitors in invasive ductal breast carcinomas. *Chin Med J (Engl)* 2007; 120: 1597-1605
- Udhayakumar G, Jayanthi V, Devaraj N, Devaraj H. Interaction of MUC1 with β -catenin modulates the Wnt target gene cyclinD1 in H. pylori-induced gastric cancer. *Mol Carcinog* 2007; 46: 807-817
- Bafico A, Liu G, Goldin L, Harris V, Aaronson SA. An autocrine mechanism for constitutive Wnt pathway activation in human cancer cells. *Cancer Cell* 2004; 6: 497-506
- Suzuki H, Gabrielson E, Chen W, Anbazhagan R, van Engeland M, Weijenberg MP, Herman JG, Baylin SB. A genomic screen for genes upregulated by demethylation and histone deacetylase inhibition in human colorectal cancer. *Nat Genet* 2002; 31: 141-149
- Suzuki H, Watkins DN, Jair KW, Schuebel KE, Markowitz SD, Chen WD, Pretlow TP, Yang B, Akiyama Y, Van Engeland M, Toyota M, Tokino T, Hinoda Y, Imai K, Herman JG, Baylin SB. Epigenetic inactivation of SFRP genes allows constitutive WNT signaling in colorectal cancer. *Nat Genet* 2004; 36: 417-422
- Suzuki H, Toyota M, Nojima M, Mori M, Imai K. [SFRP, a family of new colorectal tumor suppressor candidate genes] *Nippon Rinsho* 2005; 63: 707-719
- Huang ZH, Li LH, Yang F, Wang JF. Detection of aberrant methylation in fecal DNA as a molecular screening tool for colorectal cancer and precancerous lesions. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 950-954
- Huang Z, Li L, Wang J. Hypermethylation of SFRP2 as a potential marker for stool-based detection of colorectal cancer and precancerous lesions. *Dig Dis Sci* 2007; 52: 2287-2291
- Qi J, Zhu YQ, Luo J, Tao WH. Hypermethylation and expression regulation of secreted frizzled-related protein genes in colorectal tumor. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 7113-7117
- 顾国利, 魏学明, 王石林, 任力, 郑爱民, 黄蓉蓉, 胡益云. 大肠癌E-cadherin, β -catenin, MMP-7表达及其临床意义. 世界华人消化杂志 2007; 15: 375-380
- 马思平, 单吉贤, 王辉. E-cadherin和 β -catenin在大肠癌组织中的表达及与预后的关系. 实用肿瘤学杂志 2003; 17: 268-270
- Bänkfalvi A, Terpe HJ, Breukelmann D, Bier B, Rempe D, Pschadka G, Krech R, Lellé RJ, Boecker W. Immunophenotypic and prognostic analysis of E-cadherin and β -catenin expression during breast carcinogenesis and tumour progression: a comparative study with CD44. *Histopathology* 1999; 34: 25-34
- Brabletz T, Jung A, Kirchner T. β -catenin and the morphogenesis of colorectal cancer. *Virchows Arch* 2002; 441: 1-11
- Bonitsis N, Batistatou A, Karantima S, Charalabopoulos K. The role of cadherin/catenin complex in malignant melanoma. *Exp Oncol* 2006; 28: 187-193
- Müller HM, Oberwalder M, Fiegl H, Morandell M, Goebel G, Zitt M, Mühlthaler M, Ofner D, Margreiter R, Widschwendter M. Methylation changes in faecal DNA: a marker for colorectal cancer screening? *Lancet* 2004; 363: 1283-1285
- Davies RJ, Freeman A, Morris LS, Bingham S, Dilworth S, Scott I, Laskey RA, Miller R, Coleman N. Analysis of minichromosome maintenance proteins as a novel method for detection of colorectal cancer in stool. *Lancet* 2002; 359: 1917-1919
- Wang DR, Tang D. Hypermethylated SFRP2 gene in fecal DNA is a high potential biomarker for colorectal cancer noninvasive screening. *World J*

- Gastroenterol 2008; 14: 524-531
- 31 Oberwalder M, Zitt M, Wöntner C, Fiegl H, Goebel G, Zitt M, Köhle O, Mühlmann G, Ofner D, Margreiter R, Müller HM. SFRP2 methylation in fecal DNA--a marker for colorectal polyps. *Int J Colorectal Dis* 2008; 23: 15-19
- 32 Elzagheid A, Buhmeida A, Korkeila E, Collan Y, Syrjanen K, Pyrhonen S. Nuclear beta-catenin expression as a prognostic factor in advanced colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 3866-3871
- 33 Suzuki H, Masuda N, Shimura T, Araki K, Kobayashi T, Tsutsumi S, Asao T, Kuwano H. Nuclear beta-catenin expression at the invasive front and in the vessels predicts liver metastasis in colorectal carcinoma. *Anticancer Res* 2008; 28: 1821-1830
- 34 Paul S, Dey A. Wnt signaling and cancer development: therapeutic implication. *Neoplasia* 2008; 55: 165-176
- 35 Bordonaro M, Lazarova DL, Sartorelli AC. Hyperinduction of Wnt activity: a new paradigm for the treatment of colorectal cancer? *Oncol Res* 2008; 17: 1-9
- 36 Takemaru KI, Ohmitsu M, Li FQ. An oncogenic hub: beta-catenin as a molecular target for cancer therapeutics. *Handb Exp Pharmacol* 2008: 261-284

编辑 史景红 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志外文字符标准

本刊讯 本刊论文出现的外文字符应注意大小写、正斜体与上下角标。静脉注射iv, 肌肉注射im, 腹腔注射ip, 皮下注射sc, 脑室注射icv, 动脉注射ia, 口服po, 灌胃ig。s(秒)不能写成S, kg不能写成Kg, mL不能写成ML, lcpm(应写为1/min)÷E%(仪器效率)÷60=Bq, pH不能写PH或P^H, *H pylori*不能写成HP, T_{1/2}不能写成tl/2或T_{1/2}, V_{max}不能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。(常务副总编辑: 张海宁 2008-12-18)

神经节内板状末梢与食管内脏感觉

孔 炫, 许树长

■背景资料

食管内脏感觉异常与胃食管反流病、功能性烧心、非心源性胸痛等食管功能性疾病的发生密切相关, 神经节内板状末梢(IGLEs)作为消化系中迷走传入神经机械感受器的一种特殊类型, 可能在食管功能性疾病的发生发展过程中起到了重要的作用。

孔炫, 许树长, 同济大学附属同济医院消化内科 上海市 200065
上海市科委基金资助项目, No. 054119544

作者贡献分布: 本文综述由孔炫完成; 审校由许树长完成。

通讯作者: 许树长, 200065, 上海市, 同济大学附属同济医院消化内科, xschang@163.com

电话: 021-66111287

收稿日期: 2008-10-30 修回日期: 2008-11-20

接受日期: 2008-11-24 在线出版日期: 2008-12-18

Intraganglionic laminar endings and esophageal visceral perception

Xuan Kong, Shu-Chang Xu

Xuan Kong, Shu-Chang Xu, Department of Gastroenterology, Tongji Hospital of Tongji University, Shanghai 200065, China

Supported by: the Science Committee Foundation of Shanghai Municipality, No. 054119544

Correspondence to: Shu-Chang Xu, Department of Gastroenterology, Tongji Hospital, Tongji University, Shanghai 200065, China. xschang@163.com

Received: 2008-10-30 Revised: 2008-11-20

Accepted: 2008-11-24 Published online: 2008-12-18

Abstract

Abnormal visceral perception participates in the occurrence of gastroesophageal reflux and is considered to be one important mechanisms in non-erosive reflux disease, functional heartburn and noncardiac chest pain. Generally, it is believed that vagal nerves take part in the regulation of esophageal physiology. Intraganglionic laminar ending (IGLE) is a special type of vagal afferent mechanoreceptors. This article reviews the characteristics of the IGLEs, including morphology, structure, distribution, and the mechanisms of esophageal visceral perception regulation.

Key Words: Intraganglionic laminar ending; Vagal afferent nerve; Esophageal visceral perception

Kong X, Xu SC. Intraganglionic laminar endings and esophageal visceral perception. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(35): 3970-3973

摘要

食管内脏感觉异常参与了胃食管反流病

(GERD)等疾病的发生, 被认为是非糜烂性反流病(NERD)、功能性烧心(FH)、非心源性胸痛(NCCP)重要的发病机制之一。通常认为迷走神经主要参与食管生理功能的调节。神经节内板状末梢(intraganglionic laminar endings, IGLEs)是一类特殊的迷走神经机械感受器, 本文就其形态、结构、分布等特性, 与其调节食管内脏感觉的机制作一综述。

关键词: 神经节内板状末梢; 迷走传入神经; 食管内脏感觉

孔炫, 许树长. 神经节内板状末梢与食管内脏感觉. 世界华人消化杂志 2008; 16(35): 3970-3973

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3970.asp>

0 引言

食管感觉受脊神经和迷走神经双重支配。通常认为脊神经感受来自食管的有害刺激从而引发烧心、胸痛等感知学改变, 而迷走神经主要参与食管生理功能的调节^[1]。食管内脏感觉异常参与了胃食管反流病(gastroesophageal reflux disease, GERD)等疾病的发生, 他被认为是非糜烂性反流病(non-erosive reflux disease, NERD)、功能性烧心(functional heartburn, FH)、非心源性胸痛(noncardiac chest pain, NCCP)重要的发病机制之一^[2]。近来发现, 食管壁内存在一类名为“神经节内板状末梢”(intraganglionic laminar endings, IGLEs)的特殊迷走神经机械感受器。本文就IGLEs的特性及其参与调节食管内脏感觉的机制作一综述。

1 IGLEs的形态与结构

IGLEs是迷走神经传入纤维末梢在肠肌间神经丛内形成的特殊结构。IGLEs由沿肠神经节表面分布, 平行于消化系平滑肌层走行的迷走神经传入纤维末梢, 形成特殊的表面筛孔样板状结构得名。神经胶质将IGLEs与肠神经节、消化系外层肌肉分隔开来。空间上IGLEs包绕在肠神经元周围, 这样的结构提示他可能具有传导消化系中与牵拉和扩张相关的剪切力的功能。单根迷走神经

■同行评议者

彭曦, 副研究员,
重庆市西南医院
烧伤研究所

传入纤维分为数个短终树突, 每个短终树突末梢构成一个IGLE, 与IGLEs相连的消化系壁即构成其感受域. 这些树枝样分叉的短终树突将无数的IGLEs分配到相邻的肠神经节或“神经池”(由数个神经节组成), 从而构成交叉重叠的网络结构供迷走传入神经支配^[3].

2 IGLEs的分布范围

通过神经示踪法和全样本定量技术证实IGLEs广泛分布于消化系中, 其中在胃底、胃体及十二指肠起始段分布最为密集, 而在胃肠道括约肌和远端肠道密度较低. 整个消化系中IGLEs分布密度自头端至尾端呈递减趋势^[4]. Zagorodnyuk *et al*^[5]则进一步证实IGLEs在豚鼠食管中作为感受扩张刺激的传导位点, 沿横纹肌分布. 在正常生理情况下(如食团在食管里推行性蠕动过程中), 或非生理性机械性刺激中(如食管球囊扩张), IGLEs可能参与了食管感觉的发生.

3 IGLEs的电生理特性

研究发现, 电压门控钾离子通道可能参与调节IGLEs的适应性, 并引发机械刺激后IGLEs的“沉默时期”(silent period). Zagorodnyuk *et al*发现低剂量4-氨基嘧啶(4-AP, 电压门控钾离子通道K_v阻滞剂)、 α -树眼镜蛇毒素和树眼镜蛇毒素K(α -DnTX和DnTX K, K_v1.1、K_v1.2和K_v1.6阻滞剂)可使IGLEs兴奋性显著增强;同时RT-PCR证实K_v1.1、K_v1.2和K_v1.6功能亚单位mRNA和相关蛋白在大鼠结状神经节中表达^[6-7], 提示在迷走传入神经末梢上可能存在电压门控钾离子通道. 研究还发现在无Ca²⁺的Kreb液中豚鼠食管IGLEs兴奋性增强, 这可能与Ca²⁺依赖K⁺通道有关. 在离体豚鼠食管中机械刺激(如牵拉)单一IGLE后, 神经末梢兴奋产生动作电位, 细胞内Ca²⁺浓度升高, Ca²⁺依赖K⁺通道开放几率大大增加, 引起周边其他IGLEs产生协同兴奋, 而对接下来的机械刺激产生“后超极化现象”(after-hyperpolarization, AHP), 即是“沉默时期”^[7]. 这为我们提供了一条线索, 即是高选择性的钙离子通道拮抗剂, 或是电压门控钾离子通道阻滞剂可能今后被用于治疗一些IGLEs相关性的食管内脏感觉异常的疾病, 如GERD、FH等.

4 IGLEs的生理功能

4.1 IGLEs作为机械感受器(mechanoreceptor) IGLEs特殊的形态、几何学结构和分布范围决定了他对消化系中复杂的节律性运动敏感, 研

究证实在食管中IGLEs主要作为迷走神经机械感受器^[3]. IGLEs作为食管中的机械刺激传入通路, 接受相应刺激进而在中枢(或外周)水平上产生内脏感觉. 研究证实在NERD患者中食管球囊扩张可引起胸骨后明显疼痛, 而在正常人群中对球囊扩张程度并不引起明显胸痛, 即提示了NERD患者食管内机械感受器阈值明显低于正常人群, 存在内脏高敏感性, IGLEs可能参与其中. Zagorodnyuk *et al*^[8]通过使用von Frey毛刺激离体豚鼠食管黏膜中的游离迷走神经末梢, 记录其电生理变化, 描绘出黏膜感受区内的热点图(hot-spots); 并用神经顺行标记技术显示记录到这些热点的神经干, 描述出其大致结构图像、刺激阈值及电生理特性, 证实食管壁内感受机械刺激的为IGLEs; Yang *et al*^[9]应用活性依赖性荧光染料FM1-43结合牵拉刺激豚鼠食管显示激活的IGLEs结构, 验证IGLEs是迷走传入神经在胃肠道内感受机械刺激的位点.

辣椒素(瞬时感受器电位香草素受体TRPV受体激动剂)和 α , β -meATP(ATP门控阳离子通道型受体P2X受体激动剂)可呈剂量依赖性地激活豚鼠食管中的IGLEs, 亦表明IGLEs可感受机械刺激, 进一步猜测它具有阳离子通道的特性; 表皮钠离子通道(ENaC)阻滞剂Benzamil可明显阻断牵拉刺激时IGLEs的激活, 因此推断机械刺激激活IGLEs可能是通过某种ENaC, 而非其他细胞释放某种神经递质, 亦非通过谷氨酸盐或是ATP来完成^[10].

4.2 IGLEs作为痛觉感受器(noniceptor) 部分迷走神经参与调节食管对有害刺激(如过度扩张)的自主反应, 参与食管痛觉的产生. Yu *et al*^[11]认为这类对扩张敏感的痛觉感受纤维主要来源于结状神经节(nodose ganglion)的C类纤维组成; 并发现在豚鼠食管中此类纤维对P2X受体激动剂 α , β -meATP敏感, 故而认为IGLEs可能就是此类传导痛觉信息的神经纤维, 提示了IGLEs可能参与了部分GERD患者与NCCP患者胸骨后疼痛症状的发生. 然而目前研究尚无法解释一种神经纤维末梢如何感受两种性质截然不同的机械刺激(有害与无害), 亦尚未证实IGLEs能否感受化学性刺激从而引起食管内脏感觉改变.

5 IGLEs与其他递质、受体的关系

5.1 IGLEs与谷氨酸盐受体GluRs 在豚鼠食管IGLEs中探测到谷氨酸囊泡转运体1/2(VGluT1/2), 证实其除感受机械刺激外还可能

■研发前沿

目前对IGLEs的研究还仅限于动物模型中, 缺少足够证据证实IGLEs直接参与痛觉的传导, 他与相关神经递质、受体的关系尚未明确, 有待进一步研究发现.

■相关报道

Yang *et al*应用活性依赖性荧光染料FM1-43结合牵拉刺激豚鼠食管显示激活的IGLEs结构,验证IGLEs是迷走传入神经在胃肠道内感受机械刺激的位点;Wang *et al*通过免疫组化的方法在大鼠食管中IGLEs上检测到P2X₂和P2X₃受体表达。

具有释放内源性谷氨酸盐(EAAs)的功能。通过检测IGLEs中突触结合蛋白(synaptotagmin)和突触素(synaptophysin)的免疫活性,明确EAAs在IGLEs中是通过快突触(fast synaptic)机制释放到肠神经元。应用离子型谷氨酸盐受体iGluRs阻滞剂(AP5, memantine, DNQX)及代谢型谷氨酸盐受体mGluRs阻滞剂(PHCCC, MPPG)对牵拉迷走神经机械感受器产生的反应均未见明显影响,提示谷氨酸盐对豚鼠食管中IGLEs无明显兴奋作用^[10]。最近在大鼠食管中的IGLEs中亦检测到VGluT1/2存在^[12-13],通过细胞免疫组化的方法更进一步证实VGluT2仅在IGLEs上特异性表达,因此VGluT2可作为支配食管感觉的传入神经纤维中IGLEs的特异性标志^[14]。IGLEs可能为肠神经元中重要的谷氨酸盐来源(但并非唯一的)^[15],后者作用于肠神经元或迷走传入神经上谷氨酸盐受体间接参与了食管机械(或化学)刺激的调节。然而目前尚未找到充足证据表明IGLEs可通过释放EAAs调节自身机械感觉传导功能。

5.2 IGLEs与ATP门控阳离子通道型受体P2X受体 Wang *et al*通过免疫组化的方法在大鼠食管中IGLEs上检测到P2X₂和P2X₃受体表达^[16-17],研究还证实豚鼠食管的IGLEs中亦能检测到P2X受体的免疫活性。P2X受体在不同物种间分布差异性较大:α, β-meATP可激活豚鼠食管中近乎所有的IGLEs,但大鼠中被激活的IGLEs不足一半,在雪貂中α, β-meATP对IGLEs的兴奋性全无影响,这可能与不同物种间食管P2X受体中P2X₃与P2X_{2/3}所占比例不同所致^[18]。应用P2X受体阻滞剂PPADS可消除α, β-meATP对豚鼠食管中IGLEs的兴奋性,但单用PPADS并不影响机械刺激(如牵拉)激活IGLEs,提示ATP并不通过IGLEs参与机械刺激感受传导的过程^[10]。现已证实P2X受体在外周及中枢水平都参与了食管内机械和化学刺激的感受和调控,P2X受体在IGLEs表达提示后者可能通过P2X受体从而感受机械或化学性刺激。

5.3 IGLEs与P物质(SP) Raab *et al*^[14]通过免疫组化和逆行示踪等方法证实了SP与VGluT2在IGLEs中共同表达(co-localization),SP广泛分布于中枢与外周神经系统^[19],主要由伤害性C类纤维释放,是参与痛觉信息一级传递的兴奋性神经递质,通过参与食管内脏感觉信息的传递,以及引起“神经源性炎症”(neurogenic inflammation)等方式致食管感觉异常^[20]。IGLEs可能通过释放SP作用于肠神经元从而调节食管内脏感觉,而机械刺激

(如球囊扩张)也是一种有效的促使IGLEs释放SP的方法。但并无证据表明SP通过作用于IGLEs调节内脏感觉神经中机械刺激的传导。

6 结论

神经节内板状末梢(IGLEs)是一类特殊的迷走神经机械感受器,他广泛分布于消化系中,直接感受并传导机械刺激,从而调节食管内脏感觉。然而目前对IGLEs的研究还仅限于动物模型中,缺少足够证据证实IGLEs直接参与痛觉的传导,他与相关神经递质、受体的关系尚未明确。以上还有待进一步研究发现。

7 参考文献

- Gebhart GF. Visceral pain-peripheral sensitisation. *Gut* 2000; 47 Suppl 4: iv54-iv55; discussion iv58
- Knowles CH, Aziz Q. Visceral hypersensitivity in non-erosive reflux disease. *Gut* 2008; 57: 674-683
- Powley TL, Phillips RJ. Musings on the wanderer: what's new in our understanding of vago-vagal reflexes? I. Morphology and topography of vagal afferents innervating the GI tract. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 283: G1217-G1225
- Wang FB, Powley TL. Topographic inventories of vagal afferents in gastrointestinal muscle. *J Comp Neurol* 2000; 421: 302-324
- Zagorodnyuk VP, Brookes SJ. Transduction sites of vagal mechanoreceptors in the guinea pig esophagus. *J Neurosci* 2000; 20: 6249-6255
- Glazebrook PA, Ramirez AN, Schild JH, Shieh CC, Doan T, Wible BA, Kunze DL. Potassium channels Kv1.1, Kv1.2 and Kv1.6 influence excitability of rat visceral sensory neurons. *J Physiol* 2002; 541: 467-482
- Zagorodnyuk VP, Chen BN, Costa M, Brookes SJ. 4-aminopyridine- and dendrotoxin-sensitive potassium channels influence excitability of vagal mechano-sensitive endings in guinea-pig oesophagus. *Br J Pharmacol* 2002; 137: 1195-1206
- Zagorodnyuk VP, Chen BN, Brookes SJ. Intraganglionic laminar endings are mechanotransduction sites of vagal tension receptors in the guinea-pig stomach. *J Physiol* 2001; 534: 255-268
- Yang X, Liu R. Intraganglionic laminar endings act as mechanoreceptors of vagal afferent nerve in guinea pig esophagus. *Shengli Xuebao* 2006; 58: 171-176
- Zagorodnyuk VP, Chen BN, Costa M, Brookes SJ. Mechanotransduction by intraganglionic laminar endings of vagal tension receptors in the guinea-pig oesophagus. *J Physiol* 2003; 553: 575-587
- Yu S, Undem BJ, Kollarik M. Vagal afferent nerves with nociceptive properties in guinea-pig oesophagus. *J Physiol* 2005; 563: 831-842
- Kraus T, Neuhuber WL, Raab M. Distribution of vesicular glutamate transporter 1 (VGLUT1) in the mouse esophagus. *Cell Tissue Res* 2007; 329: 205-219
- Raab M, Neuhuber WL. Vesicular glutamate transporter 2 immunoreactivity in putative vagal mechanosensor terminals of mouse and rat esophagus: indication of a local effector function? *Cell Tissue Res* 2003; 312: 141-148
- Raab M, Neuhuber WL. Intraganglionic laminar endings and their relationships with neuronal

- and glial structures of myenteric ganglia in the esophagus of rat and mouse. *Histochem Cell Biol* 2004; 122: 445-459
- 15 Kirchgessner AL. Glutamate in the enteric nervous system. *Curr Opin Pharmacol* 2001; 1: 591-596
- 16 Wang ZJ, Neuhuber WL. Intraganglionic laminar endings in the rat esophagus contain purinergic P2X2 and P2X3 receptor immunoreactivity. *Anat Embryol (Berl)* 2003; 207: 363-371
- 17 Castelucci P, Robbins HL, Poole DP, Furness JB. The distribution of purine P2X(2) receptors in the guinea-pig enteric nervous system. *Histochem Cell Biol* 2002; 117: 415-422
- 18 Page AJ, O'Donnell TA, Blackshaw LA. P2X purinoceptor-induced sensitization of ferret vagal mechanoreceptors in oesophageal inflammation. *J Physiol* 2000; 523 Pt 2: 403-411
- 19 Kressel M, Radespiel-Troger M. Anterograde tracing and immunohistochemical characterization of potentially mechanosensitive vagal afferents in the esophagus. *J Comp Neurol* 1999; 412: 161-172
- 20 Miwa H, Minoo T, Hojo M, Yaginuma R, Nagahara A, Kawabe M, Ohkawa A, Asaoka D, Kurosawa A, Ohkusa T, Sato N. Oesophageal hypersensitivity in Japanese patients with non-erosive gastro-oesophageal reflux diseases. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 20 Suppl 1: 112-117

■同行评价

本文有一定新意,但综述显得较为单薄,板状末梢与各种食管疾病的关系没有论述,这是临床医生最感兴趣的地方,对食管疾病的治疗有什么理论指导价值论文体现得不充分,希望增加这部分内容,使该综述更丰满,对临床有更好的指导意义。

编辑 史景红 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志性质、刊登内容及目标

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

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

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

《世界华人消化杂志》的目标是出版高质量的胃肠病学和肝病学领域的专家评论及临床实践和基础研究相结合具有实践意义的文章, 为内科学、外科学、感染病学、中医药学、肿瘤学、中西医结合学、影像学、内镜学、介入治疗学、病理学、基础研究等医生和研究人員提供转换平台, 更新知识, 为患者康复服务。(常务副总编辑: 张海宁 2008-12-18)

缺血性肝炎

饶珊珊, 李建英

■背景资料

缺血性肝炎是由于肝脏缺血缺氧导致的非炎症性肝细胞坏死, 是一种特殊类型的肝脏损害, 死亡率较高, 目前多数临床医师对此缺乏了解。其转氨酶水平在短时间内呈急剧的升高, 很容易被误诊为暴发性肝炎, 故应该引起临床医生足够的重视。

饶珊珊, 李建英, 福建省消化系疾病研究所 福建医科大学附属协和医院消化内科 福建省福州市 350001

作者贡献分布: 本论文由饶珊珊文献检索和写作; 由李建英审核和指导。

通讯作者: 饶珊珊, 350001, 福建省福州市, 福建医科大学附属协和医院消化内科。rao-33@163.com

电话: 0591-83357896-8568

收稿日期: 2008-10-22 修回日期: 2008-11-17

接受日期: 2008-11-24 在线出版日期: 2008-12-18

Ischemic hepatitis

Shan-Shan Rao, Jian-Ying Li

Shan-Shan Rao, Jian-Ying Li, Department of Gastroenterology, Union Hospital of Fujian Medical University; Fujian Provincial Institute of Digestive Diseases, Fuzhou 350001, Fujian Province, China

Correspondence to: Shan-Shan Rao, Department of Gastroenterology, Union Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350001, Fujian Province, China. rao-33@163.com

Received: 2008-10-22 Revised: 2008-11-17

Accepted: 2008-11-24 Published online: 2008-12-18

Abstract

Ischemic hepatitis, otherwise known as “shock liver” and “hypoxic hepatitis”, usually is secondary to a clinical setting of severe heart failure or shock. The main clinical manifestations are shown as the symptoms of primary diseases such as cardiac failure or shock, and gastrointestinal symptoms similar to viral hepatitis. Laboratory tests show an acute elevation in serum aminotransferase level, 25-250 times as high as the upper limit of normal (ULN) during a 12-48 hour period, which is rapidly recovered in about 7-14 days after treatment. Secondary to circulatory failure, there is a high rate of renal dysfunction in ischemic hepatitis. Treatment and prognosis depend on the protopathy.

Key Words: Ischemic hepatitis; Etiopathogenesis; Pathogenesis; Diagnosis

Rao SS, Li JY. Ischemic hepatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(35): 3974-3978

摘要

缺血性肝炎(hypoxic hepatitis), 又叫休克肝、

缺氧性肝炎, 大多继发于严重的心衰、休克等基础疾病。临床表现多为心衰、休克等原发病症状, 及与病毒性肝炎相似的消化道症状。其实实验室检查主要为血清转氨酶在发病后12-48 h内急剧升高至正常值上限的25-250倍, 经治疗后在10-14 d内降至正常。因常继发于循环衰竭, 其肾功能不全的发生率亦较高。缺血性肝炎的治疗与预后多与其原发病有关。本文就缺血性肝炎的病因、临床表现等作一综述。

关键词: 缺血性肝炎; 病因; 发病机制; 诊断

饶珊珊, 李建英. 缺血性肝炎. 世界华人消化杂志 2008; 16(35): 3974-3978

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3974.asp>

0 引言

1979年, Bynum *et al*^[1]报道了7例病例, 首次提出了缺血性肝炎(ischemic hepatitis)这一概念, 其临床特点为心衰的情况下血清转氨酶活性的显著升高, 组织学特征为在肝脏血流灌注减少后发生肝小叶中央区细胞的坏死。1981年, Arcidi *et al*^[2]提到休克状态下所产生的缺氧才能发生肝小叶中央区细胞的坏死, 因此, 又被称为“休克肝(shock liver)”。1990年, Henrion和Luwaert *et al*^[3]报道了45例缺血性肝炎的病例, 只有47%发生了休克, 2003年, Henrion *et al*^[4]连续观察了142例病例, 其中只有55%有休克状态, 因此进一步提出缺血性肝炎及休克肝的概念应该被更准确的表达为缺氧性肝炎(hypoxic hepatitis)。

1 发生率及常见病因

一般认为, 缺血性肝炎在内科重症监护病房的发生率为0.16%-0.50%^[5]。Fuchs *et al*^[6]在39 mo的时间里, 观察了连续进入ICU的2155个患者中有33个发生了缺血性肝炎, 其患病率为1.5%, 而同期入住普通内科病房的9977个患者中只有3人有缺血性肝炎, 患病率为0.03%。其中, 91.2%有心力衰竭(左心衰26.5%, 右心衰5.9%, 全心衰58.8%)、58.8%有COPD, 55.9%有慢性肾功能衰

■同行评议者

孙殿兴, 主任医师, 白求恩国际和平医院肝病科; 唐晓鹏, 教授, 中南大学肝病研究所/中南大学湘雅二医院感染科

竭. *Henrion et al*^[4]观察的142例缺氧性肝炎的患者, 占了同期入住ICU的15619个患者中的0.9%, CCU的患病率较高为1.3%, 而外科和其余内科ICU的患病率为0.6%, 其中有70%发生心衰, 13%发生慢性呼吸衰竭, 13%发生中毒性/脓毒性休克. 而*Seeto et al*^[7]观察的31例缺血性肝炎的患者, 有29例明确有右心衰竭. 这些研究均说明了缺血性肝炎多易于在重症监护病房观察到, 患者多原有心、肺、肾等重要脏器的基础疾病, 其中, 心力衰竭是缺血性肝炎最常见的基础病因.

另外, 2002年, *Rashed et al*^[8]前瞻性观察了1905个老年患者, 有19个发生了缺血性肝炎, 发病率为1%, 其中有12个有左心衰(63%). 因老年人多有心血管的基础疾病, 因此缺血性肝炎虽然比较少见但在老年人中发生的并不少.

其他有报道过的病因还有阻塞性睡眠呼吸暂停综合征^[9]、重度呼吸道感染^[10]、慢性阻塞性肺部疾病发生肠系膜扭转^[11]、酒精性肝硬化患者因出血及脓毒血症而引发的缺血性肝病^[12]、主动脉腔静脉瘘^[13]、重度贫血^[14]、夹层动脉瘤、周围血管病、蜂窝组织炎、脱水、中暑、创伤、烧伤、癫痫^[15]、肝癌破裂^[16]等等.

2 发病机制

目前对于缺血性肝炎的发病机制还不是很明确, 但大多数学者均同意1973年*Dunn et al*^[17]提出的三个导致缺血性肝炎的血流动力学机制: 肝血流量减少导致的肝脏缺血, 右心衰竭导致的静脉瘀血和回心血氧含量减少导致的动脉低氧血症.

肝脏缺血是缺血性肝炎发生的主要机制. 肝脏是一个有着丰富血运的器官, 同时由门静脉和肝动脉双重供血, 占整个心输出量的20%, 其中70%来自于门静脉系统, 30%来自于肝动脉, 各提供肝脏50%的氧供^[18-19]. 同时, 肝脏也是一个内皮细胞非常丰富的器官, 对缺血缺氧极其敏感^[20]. 当任何原因引起心输出量减少时, 肝脏的血流也平行减少, 此时肝脏可以通过增加从血液中的摄氧量而维持正常的氧供, 正是肝脏的这种代偿保护机制及双重血供系统, 避免其出现缺氧性损伤. 但是当肝脏组织灌流量持续减少超过阈值后, 此种代偿机制不足, 就会使肝细胞发生缺氧性损伤^[21]. 而在缺血的情况下, 已经发生损伤的肝细胞如果再次接触氧, 则可引起肝脏进一步的再灌注损伤. 再灌注产生了大量的氧自由基, 通过氧化反应直接导致肝细胞的损伤^[22].

心力衰竭尤其是右心衰引起的静脉瘀血也是缺血性肝炎的另一重要机制, 具体还不明确, *Seeto et al*^[7]指出可能是因为低血压引起的静脉瘀血影响了肝脏的正常血流运行, 使肝细胞发生缺氧性损伤. 重度的中心静脉充血导致门静脉高压, 从而改变血流模式, 在低收缩压的患者, 这能使已经异常的肝脏血流进一步恶化. 而且, 长期处于高压状态的肝细胞对相对短暂的缺氧会更加敏感. 另外, 虽然缺血性肝炎的患者血压会恢复, 但是由于之前的血流灌注不足而发生缺氧, 可能会使有严重心衰的患者的肝细胞受到慢性复发性损伤. 最后, 长期的右心室充盈压的升高也可能导致慢性肝细胞损伤, 使其易于发生急性缺血性肝炎. 当然, 这个机制还需要进一步研究证实.

作为肝脏缺氧的理论机制之一, 动脉低氧血症通常被认为是不重要的^[17,23]. 但是, *Henrion et al*^[24]及*Mathurin et al*^[19]报道了有关于阻塞性睡眠呼吸暂停引起的严重低氧血症所导致的缺氧性肝炎的病例, 均提出了严重的低氧血症可以作为单独的一个导致缺氧性肝炎的机制. 而1999年, *Henrion et al*^[25]对比研究了17例慢性呼吸衰竭急性恶化所导致的缺氧性肝炎的患者, 发现其全身血管阻力是降低的, 导致心脏指数的增高, 而尽管呼吸衰竭的患者心脏指数增高, 因为极度的动脉低氧血症, 导致其供氧量也减少, 因而发生缺氧性肝损害. 由此得出结论, 在慢性呼吸衰竭的情况下, 发生缺氧性肝炎是动脉极度缺氧的结果, 输氧量减少只继发于极度动脉低氧血症, 而没有心输出量的减少. 一些动物实验也显示了极度的低血氧会导致耗氧量的降低, 从而引起肝小叶中心区细胞的坏死, 这与上述结论相符合^[26-27]. 因此, 在与慢性呼吸衰竭相关的缺氧性肝炎的患者, 低氧血症起着很重要的作用.

然而, 到目前为止, 这三个血流动力学机制还没有在人体验证过, 需要进一步的证据证实.

此外, *Henrion et al*^[4]在2003年发表的研究报告中提到了其中的19例中毒性/脓毒性休克并发缺血性肝炎的病例, 这些患者的中心静脉压和氧分压都是正常的, 心脏指数和氧含量是高的. 这与很多研究结果一致^[28-29]: 在败血症的患者, 内脏血流量尤其是肝血流量普遍是增加的. 但是尽管心脏指数和氧含量是高的, 这些患者的肝实质内的氧分压却仍然是低的. 因此提出了一个假设的机制, 脓毒性/中毒性休克所发生的缺氧性肝炎, 可能是肝脏的需氧量增加和无力

■ 研发前沿

目前缺血性肝炎的国内相关文献不多见, 以往这方面的文献亦较少.

肝炎的一个显著特征, 可能是继发于肝肾损害导致的糖原异生的减少. 而Henrion *et al*^[4]观察的142例中却有4例发生低血糖(<700 mg/L), 39例发生高血糖(>2000 mg/L). 因此, 缺血性肝炎与血糖的关系还需要进一步的研究以明确.

6 诊断标准

目前大多数学者均同意Gibson *et al*^[21]及Gitlin *et al*^[15]等提出的诊断标准: (1)具有心源性休克、循环性休克、或呼吸衰竭等原发病; (2)血清转氨酶水平快速、显著的增高达正常值上限的20倍以上, 并且具有可逆性, 于7-10 d内降至或接近正常; (3)排除其他原因引起的急性肝炎, 如各种类型的病毒性肝炎、中毒性肝炎及药物性肝炎等等. 由于缺血性肝病的患者病情多较严重, 具有凝血功能紊乱、血流动力学不稳定等状态, 常不能耐受肝活组织检查, 因此, 当上面三个条件同时满足时, 不一定要行肝活检以明确诊断. Henrion *et al*^[34]则提出血清转氨酶水平达到正常值上限的20-25倍时可不必行肝活检, 但如果低于正常值上限的20倍, 则必须行肝活检以明确诊断.

因缺血性肝炎的转氨酶水平呈急剧的升高, 很容易被误诊为暴发性肝炎. 因而2004年, Denis *et al*^[30]回顾性分析了14例曾在其他等级较高的医院诊断为暴发性肝炎, 后来确诊为缺血性肝炎的病例, 提出当临床上怀疑是暴发性肝炎时, 应该通过两个检查协助鉴别: (1)腹部超声提示具有特征性的下腔静脉和肝静脉的扩张; (2)多普勒超声心动图证实心脏基础疾病的诊断. 从而在没有行肝脏活检的情况下以明确缺血性肝炎的诊断. 另外, 缺血性肝炎一开始即可合并有较重的肾功能损害, 这也是与暴发性肝炎的鉴别点之一.

7 治疗

缺血性肝炎的治疗原则主要是针对原发病的治疗, 积极纠正心衰及抗休克, 恢复心输出量, 纠正缺血缺氧状态, 同时还要注意保护其他脏器在低灌注中的损伤. 但应注意, 在纠正心衰的治疗中, 利尿剂可进一步降低血容量, 加重肝细胞坏死, 导致预后不良, 故应慎用^[15]. 血管内应用小剂量的多巴胺可以增加内脏的血流灌注和具有正性肌力作用, 能够阻止肝脏缺氧损伤的发展^[35]. 而如果使用钙离子拮抗剂或抗心律失常药物, 则预后不良, 死亡率增加^[36].

其他目前正在研究使用的药物还包括N-乙酰半胱氨酸、谷胱甘肽、硫辛酸等抗氧化剂.

N-乙酰半胱氨酸是肝内还原型谷胱甘肽的前体, 不仅能够通过促进谷胱甘肽在肝细胞的合成而起到抗氧化的作用, 还可以通过增加肝脏毛细血管床的灌注而改善肝脏的血供^[37]. 硫辛酸通过介导促凋亡基因Bad的灭活和抗凋亡基因Bcl-2的表达而有效地减少肝脏的缺血再灌注损伤^[38].

但是, 目前对于上述的治疗, 尚缺少可靠的资料支持, 故还需要进一步行系统性的研究探讨.

8 结论

根据Johnson *et al*^[39]的统计, 缺血性肝炎的预后不良, 死亡率高达76%, 远高于同期比较的其他病因引起的转氨酶极度升高患者的死亡率(33%). 而目前大多数学者报告的缺血性肝炎的死亡率也较高, 均大于50%, 死亡的原因多数是由于全身的基础疾病, 而不是缺血性肝损害或肝衰竭^[4,5,21,33]. 另外, 在肝硬化合并缺血性肝炎的患者, 由于肝脏储备功能较差, 死亡率更高, 可达60%-100%^[12,40].

总之, 缺血性肝炎有着独特的发病机制、病理学特点和临床特征, 是一种特殊类型的肝脏损害, 死亡率亦较高, 应该引起临床医生足够的重视. 当患有心脏、肺、肾等重要脏器基础疾病的患者发生心衰、呼吸困难及休克时, 要考虑到肝脏缺血缺氧性损伤的可能性, 及时发现肝脏损害, 积极治疗原发病, 从而避免肝脏发生不可逆性损伤.

9 参考文献

- 1 Bynum TE, Boitnott JK, Maddrey WC. Ischemic hepatitis. *Dig Dis Sci* 1979; 24: 129-135
- 2 Arcidi JM Jr, Moore GW, Hutchins GM. Hepatic morphology in cardiac dysfunction: a clinicopathologic study of 1000 subjects at autopsy. *Am J Pathol* 1981; 104: 159-166
- 3 Henrion J, Luwaert R, Colin L, Schmitz A, Schapira M, Heller FR. [Hypoxic hepatitis. Prospective, clinical and hemodynamic study of 45 cases] *Gastroenterol Clin Biol* 1990; 14: 836-841
- 4 Henrion J, Schapira M, Luwaert R, Colin L, Delannoy A, Heller FR. Hypoxic hepatitis: clinical and hemodynamic study in 142 consecutive cases. *Medicine (Baltimore)* 2003; 82: 392-406
- 5 Hickman PE, Potter JM. Mortality associated with ischaemic hepatitis. *Aust N Z J Med* 1990; 20: 32-34
- 6 Fuchs S, Bogomolski-Yahalom V, Paltiel O, Ackerman Z. Ischemic hepatitis: clinical and laboratory observations of 34 patients. *J Clin Gastroenterol* 1998; 26: 183-186
- 7 Seeto RK, Fenn B, Rockey DC. Ischemic hepatitis: clinical presentation and pathogenesis. *Am J Med* 2000; 109: 109-113
- 8 Rashed KA, McNabb WR, Lewis RR. Ischaemic

■应用要点

本文对缺血性肝炎的发生率、常见病因、发病机制、病理特点、临床表现、实验室检查、诊断标准、治疗及预后等方面进行了全面的综述. 对于临床诊断和治疗缺血性肝炎有一定指导意义, 实用性较强.

■同行评价

本文对缺血性肝炎的发病机制、病理学特点和临床特征进行了综述报道。缺血性肝炎的国内相关文献不多见,选题较新颖,对于临床诊断和治疗缺血性肝炎有一定指导意义,实用性较强。

- 9 Mathurin P, Durand F, Ganne N, Mollo JL, Lebre D, Degott C, Erlinger S, Benhamou JP, Bernuau J. Ischemic hepatitis due to obstructive sleep apnea. *Gastroenterology* 1995; 109: 1682-1684
- 10 Eisenhut M. Ischemic hepatitis and collateral damage to the liver in severe viral respiratory tract infections. *Am J Pathol* 2006; 169: 1100; author reply 1100
- 11 Nakajima T, Konishi H, Sakamoto Y, Tatsumi Y, Itoh Y, Tokita K, Katoh M, Yamane Y, Okanoue T, Kashima K, Amaike H, Sugihara H, Tsuchihashi Y. Ischemic hepatitis induced by mesenteric volvulus in a patient with chronic obstructive lung disease. *J Gastroenterol* 2000; 35: 168-172
- 12 Henrion J, Colin L, Schmitz A, Schapira M, Heller FR. Ischemic hepatitis in cirrhosis. Rare but lethal. *J Clin Gastroenterol* 1993; 16: 35-39
- 13 Sobrinho G, Ferreira ME, Albino JP, Gomes H, Capitão LM. Acute ischemic hepatitis in aortocaval fistula. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2005; 29: 239-243
- 14 Blich M, Edelstein S, Mansano R, Edoute Y. Ischemic hepatitis induced by severe anemia. *Isr Med Assoc J* 2003; 5: 208-209
- 15 Gitlin N, Serio KM. Ischemic hepatitis: widening horizons. *Am J Gastroenterol* 1992; 87: 831-836
- 16 Castiella A, Cancio M, García-Bengoechea M, Lobo C, Bujanda L, Arenas JL. Ischemic hepatitis secondary to the spontaneous rupture of a hepatocellular carcinoma in a patient with cirrhosis. *Liver* 1996; 16: 147-150
- 17 Dunn GD, Hayes P, Breen KJ, Schenker S. The liver in congestive heart failure: a review. *Am J Med Sci* 1973; 265: 174-189
- 18 Tygstrup N, Winkler K, Mellengaard K, Andreassen M. Determination of the hepatic arterial blood flow and oxygen supply in man by clamping the hepatic artery during surgery. *J Clin Invest* 1962; 41: 447-454
- 19 Richardson PD, Withrington PG. Liver blood flow. I. Intrinsic and nervous control of liver blood flow. *Gastroenterology* 1981; 81: 159-173
- 20 Suzuki S, Konno H, Nakamura S. [Role of cytokines in hepatic ischemia and reperfusion injury] *Nippon Geka Gakkai Zasshi* 1999; 100: 325-330
- 21 Gibson PR, Dudley FJ. Ischemic hepatitis: clinical features, diagnosis and prognosis. *Aust N Z J Med* 1984; 14: 822-825
- 22 Henrion J. Ischemia/reperfusion injury of the liver: pathophysiologic hypotheses and potential relevance to human hypoxic hepatitis. *Acta Gastroenterol Belg* 2000; 63: 336-347
- 23 Ware AJ. The liver when the heart fails. *Gastroenterology* 1978; 74: 627-628
- 24 Henrion J, Colin L, Schapira M, Heller FR. Hypoxic hepatitis caused by severe hypoxemia from obstructive sleep apnea. *J Clin Gastroenterol* 1997; 24: 245-249
- 25 Henrion J, Minette P, Colin L, Schapira M, Delannoy A, Heller FR. Hypoxic hepatitis caused by acute exacerbation of chronic respiratory failure: a case-controlled, hemodynamic study of 17 consecutive cases. *Hepatology* 1999; 29: 427-433
- 26 Carlson RP, Lefer AM. Hepatic cell integrity in hypodynamic states. *Am J Physiol* 1976; 231: 1408-1414
- 27 Grum CM. Tissue oxygenation in low flow states and during hypoxemia. *Crit Care Med* 1993; 21: S44-S49
- 28 Dahn MS, Lange MP, Wilson RF, Jacobs LA, Mitchell RA. Hepatic blood flow and splanchnic oxygen consumption measurements in clinical sepsis. *Surgery* 1990; 107: 295-301
- 29 Ruokonen E, Takala J, Kari A, Saxén H, Mertsola J, Hansen EJ. Regional blood flow and oxygen transport in septic shock. *Crit Care Med* 1993; 21: 1296-1303
- 30 Denis C, De Kerguenec C, Bernuau J, Beauvais F, Cohen Solal A. Acute hypoxic hepatitis ('liver shock'): still a frequently overlooked cardiologic diagnosis. *Eur J Heart Fail* 2004; 6: 561-565
- 31 Kamiyama T, Miyakawa H, Tajiri K, Marumo F, Sato C. Ischemic hepatitis in cirrhosis. clinical features and prognostic implications. *J Clin Gastroenterol* 1996; 22: 126-130
- 32 Ebert EC. Hypoxic liver injury. *Mayo Clin Proc* 2006; 81: 1232-1236
- 33 Cassidy WM, Reynolds TB. Serum lactic dehydrogenase in the differential diagnosis of acute hepatocellular injury. *J Clin Gastroenterol* 1994; 19: 118-121
- 34 Henrion J, Schapira M, Heller FR. Ischemic hepatitis: the need for precise criteria. *J Clin Gastroenterol* 1996; 23: 305
- 35 Naschitz JE, Yeshurun D. Compensated cardiogenic shock: a subset with damage limited to liver and kidneys. The possible salutary effect of low-dose dopamine. *Cardiology* 1987; 74: 212-218
- 36 Potter JM, Hickman PE. Cardiodepressant drugs and the high mortality rate associated with ischemic hepatitis. *Crit Care Med* 1992; 20: 474-478
- 37 Rank N, Michel C, Haertel C, Lenhart A, Welte M, Meier-Hellmann A, Spies C. N-acetylcysteine increases liver blood flow and improves liver function in septic shock patients: results of a prospective, randomized, double-blind study. *Crit Care Med* 2000; 28: 3799-3807
- 38 Duenschede F, Erbes K, Riegler N, Ewald P, Kircher A, Westermann S, Schad A, Miesmer I, Albrecht-Schock S, Gockel I, Kiemer AK, Junginger T. Protective effects of ischemic preconditioning and application of lipoic acid prior to 90 min of hepatic ischemia in a rat model. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 3692-3698
- 39 Johnson RD, O'Connor ML, Kerr RM. Extreme serum elevations of aspartate aminotransferase. *Am J Gastroenterol* 1995; 90: 1244-1245
- 40 Pauwels A, Lévy VG. Ischemic hepatitis in cirrhosis: not so rare, not always lethal. *J Clin Gastroenterol* 1993; 17: 88-89

编辑 史景红 电编 吴鹏朕

溃疡性结肠炎的中西药物治疗概况

于海食, 洪纘, 王玉蓉

于海食, 洪纘, 北京中医药大学中药学院中药药理系 北京市 100102

王玉蓉, 北京中医药大学中药学院中药制药系 北京市 100102

国家科技支撑计划项目, No. 2006BAI09B08

作者贡献分布: 此文由洪纘设计与审校, 于海食完成; 王玉蓉参与审校。

通讯作者: 洪纘, 100102, 北京市, 北京中医药大学中药学院中药药理系. yhong2000@hotmail.com

电话: 010-84738626

收稿日期: 2008-10-23 修回日期: 2008-11-24

接受日期: 2008-12-01 在线出版日期: 2008-12-18

Situation in treatment of ulcerative colitis by Chinese and Western medicine

Hai-Shi Yu, Ying Hong, Yu-Rong Wang

Hai-Shi Yu, Ying Hong, Department of Traditional Chinese Medicine and Pharmacology, School of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China

Yu-Rong Wang, Department of Traditional Chinese Medicine and Pharmaceutics, School of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China

Supported by: the National Science and Technology Pillar Program, No. 2006BAI09B08

Correspondence to: Ying Hong, Department of Traditional Chinese Medicine and Pharmacology, School of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China. yhong2000@hotmail.com

Received: 2008-10-23 Revised: 2008-11-24

Accepted: 2008-12-01 Published online: 2008-12-18

Abstract

In recent years, the incidence of ulcerative colitis (UC) has been increasing. The lesions may involve the rectum, sigmoid colon, left colon (distal spleen curve area), proximal colon spleen curve area, and even the whole colon. Drug formulations should be different according to the involved scopes. This article reviews and summarizes the advancements of Chinese and Western drug formulations in treating UC, and discusses the great significance in choosing drug formulations for improvement of the disease and the life quality of patients.

Key Words: Ulcerative colitis; Drug formulation; Therapy

Yu HS, Hong Y, Wang YR. Situation in treatment of ulcerative colitis by Chinese and Western medicine. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(35): 3979-3983

摘要

近年来, 溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)的发病率无论在国外还是国内均有逐年增高的趋势. 其病变累及范围包括直肠、乙状结肠、左半结肠(脾曲以远)、广泛结肠(脾曲以近)、全结肠. 对于不同的病变范围患者, 需要给予不同的药物剂型. 本文对治疗UC的药物剂型的发展进行了总结和回顾, 讨论了药物剂型的选择对提高疗效和改善患者的生存质量的意义.

关键词: 溃疡性结肠炎; 药物剂型; 治疗

于海食, 洪纘, 王玉蓉. 溃疡性结肠炎的中西药物治疗概况. 世界华人消化杂志 2008; 16(35): 3979-3983

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3979.asp>

0 引言

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)又称非特异性溃疡性结肠炎, 是炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)的一种类型. UC患者临床表现有持续或反复发作的腹泻、黏液脓血便伴腹痛、里急后重和不同程度的全身症状. 其病理改变为弥漫的组织反应, 包括溃疡形成、隐窝脓肿、小血管炎症、杯状细胞减少以及各种类型炎细胞浸润等非特异性表现^[1-2]. 由于UC病变范围广泛、病情反复发作、治疗效果欠佳, 病情迁延不愈, 癌变可能性大等特点, 该病已被世界卫生组织确定为现代难治疾病^[3]. UC的治疗方法包括药物治疗、营养治疗、心理治疗及手术治疗, 其中药物治疗是治疗溃疡性结肠炎的主要方法. 近年来治疗UC的药物有较大发展, 如抗肿瘤坏死因子(TNF)mAb Infliximab(英夫利昔)等生物制剂对UC的疗效已获得肯定, 同时一些新的药物剂型也在不断的发展, 如控释剂, 可使药物直达病变部位, 减少全身不良反应, 提高患者顺应性, 增强药物治疗效果, 对提高UC的药

■背景资料

溃疡性结肠炎(UC)又称非特异性溃疡性结肠炎, 是炎症性肠病(IBD)的一种类型. 由于UC病变范围广泛、病情反复发作、治疗效果欠佳, 病情迁延不愈, 癌变可能性大等特点, 该病已被世界卫生组织确定为现代难治疾病.

■同行评议者

梅林, 教授, 北京大学医学部生理学与病理生理学系神经调节和消化内分泌研究室

■ 研发前沿

UC的治疗方法包括药物治疗、营养治疗、心理治疗及手术治疗,其中药物治疗是治疗溃疡性结肠炎的主要方法。

物治疗效果起到积极作用。现就近年中西药物治疗UC的进展综述如下。

1 传统治疗药物

1.1 氨基水杨酸类 柳氮磺胺吡啶(SASP)是第一个用于临床且目前仍常用的药物,由于其价廉有效,是治疗UC尤其是轻、中型UC的首选药物。用法:初始剂量0.5 g/次,每天2次,在2-3 d内增加治疗剂量达4-6 g/d,可减少不良反应的发生,维持剂量一般为2-4 g/d,维持至少1年以上。对孕妇和哺乳期妇女可用低维持量如1.5 g/d。儿童按体表面积计算,1.5-2 g/(m²·d)是安全的。SASP主要以口服为主,对左半结肠甚至横结肠UC,可采用SASP局部灌肠治疗,董军梅 *et al*发现单用SASP为主保留灌肠疗效并不令人满意,SASP保留灌肠加电磁波治疗UC或SASP与其他药物联合灌肠则收到满意的疗效^[4-5]。SASP的不良反应主要由磺胺吡啶(SP)引起,5-氨基水杨酸(5-ASA)为该药活性成分,然而5-ASA是非水溶性的,在水和阳光中性质不稳定,因次灌肠液的配制相当困难,而且最佳治疗剂量和疗程还有待进一步研究确定。近年来,着眼于提高5-ASA在结肠的浓度,降低不良反应,国内外已开发出许多5-ASA的新制剂。这类制剂有:奥沙拉嗪(Olsalazine)、美沙拉嗪(mesalamine)、巴柳氮(balsalazide)、爱迪莎(etiasa)控释型、颇得斯安(pentasa)缓释型、葡聚糖5-ASA酯、5-ASA甘氨酸盐、5-ASA谷氨酸盐等,有栓剂、泡沫和液态灌肠剂3种剂型。

美沙拉嗪(Mesalazine)化学名为5-氨基-2-羟基苯甲酸,有口服剂、灌肠剂、栓剂。研究人员不断地开发出美沙拉嗪的新剂型,新型美沙拉嗪制剂共有4种类型,分别是缓释型如阿沙可(Asacol)2.4-4.8 g/d、慢释型如阿肠克錠(Mesasal)1.5-3 g/d、可控慢释型如艾迪莎(Etiasa)1 g/次,每日3次、延长释放型如颇得斯安(Pentasa)2-4 g/d分次口服。口服后,大部分在回肠及结肠释放,疗效好,作用时间长,毒副作用小^[6-8]。对于直肠和远端结肠患者,可用美沙拉嗪灌肠剂20-40 g/L治疗UC,安全有效和易于耐受。病变在直肠者可用美沙拉嗪肛栓剂500 mg/g,每天2-3次,不良反应少,患者顺应性好,尤其对SASP不耐受或过敏者尤为适用。目前文献报道美沙拉嗪缓释颗粒致胃痛1例,美沙拉嗪肠溶片致严重肝损害1例,美沙拉嗪片致药物热1例^[9-11]。

巴柳氮(balsalazide)是以一分子4-氨基苯丙酸(4-aminobenzoylalanine, 4-ABA)作为载体,

通过偶氮键与另一分子5-ASA结合而成,品名为Colazide(国产品有塞来得等)。巴柳氮胶囊和SASP均能有效地治疗轻、中度溃疡性结肠炎,但前者的临床疗效明显优越于SASP,王丹 *et al*考察巴柳氮的临床疗效及不良反应发现,巴柳氮不良反应发生率低于SASP,患者对巴柳氮的耐受性大于SASP^[12-15]。巴柳氮以口服为主,2-6 g/d,分3次服,维持量2-4 g/d,目前对此尚有争议。巴柳氮栓剂目前也有报道,朱淑芳 *et al*^[16]以巴柳氮颗粒做对照,考察巴柳氮栓剂的临床疗效,结果表明巴柳氮栓剂与口服巴柳氮颗粒制剂治疗效果相似,但巴柳氮栓剂起效快,治疗周期短,可作为治疗溃疡性结肠炎的有效药物剂型,值得在临床推广使用。

奥柳氮(olsalazine, 即Dipentum, 又称奥沙拉嗪, 国产品有畅美等, 1.5-3 g/d), 是2分子5-ASA, 通过偶氮键联合而成的二聚体。口服后在结肠细菌产生的偶氮键还原酶作用下使二聚体分解成2个5-ASA分子发挥作用。因此,其用药剂量为SASP的一半,且不良反应显著低于SASP^[17]。给药方式主要有口服、灌肠。韩英 *et al*通过奥沙拉嗪与SASP灌肠治疗溃疡性结肠炎的疗效对比观察,发现奥沙拉嗪灌肠方治疗活动性溃疡性结肠炎有较好的疗效,且主要不良反应腹泻明显减少^[18-19]。

1.2 糖皮质激素类 主要用于SASP、5-ASA疗效不佳及严重的UC患者,可以全身用药,也可局部用药。但此类药物长期应用易产生不良反应。近年局部应用的新型糖皮质激素制剂发展良好。

传统制剂: (1)强的松或强的松龙0.75-1 mg/(kg·d)或 40-60 mg/d, *po*, 清晨1次给药;或强的松龙20-30 mg/d局部灌肠; (2)甲基强的松龙20 mg/次 *po*, 3次/d; (3)氢化考的松0.2-0.3 g/d, 静脉滴注;或氢化考的松100-125 mg/d; 局部灌肠; (4)倍他米松 *po*, 5 mg/d; 或倍他米松局部灌肠, 5 mg/d。

新型(难吸收型)制剂: (1)氢化考的松泡沫剂80 mg/d, 保留灌肠, 因其肠内吸收差, 全身不良反应减少; (2)倍氯米松二丙酸盐(beclomethasone dipropionate, BDP)0.5 mg/d, 保留灌肠, 肝内首过效应增加, 不良反应比传统倍他米松少; (3)布地奈德盐酸丁地松20 mg/d, 肝内首过效应极快, 无全身不良反应, 疗程可较一般糖皮质激素制剂长, 甚至有主张用于维持治疗者^[20-21]。

1.3 免疫抑制剂 早期用于治疗UC的免疫抑制剂有硫唑嘌呤(Azathioprine, AZA), 用法: 每日

1.5-2.5 mg/kg, po; 6-巯基嘌呤(6-mercaptopurine, 6-MP)开始常用50 mg/d, 然后逐渐增到最大剂量1.5 mg/(kg·d); 氨甲喋呤(methotrexate, MTX), 用法: 25 mg肌肉注射每周1次。但由于该类药物起效较慢, 毒性较大, 特别是对骨髓造血功能有影响, 因此其应用受到限制。

20世纪70年代从真菌代谢产物中提取出环孢素, 是一种具有强免疫抑制作用的脂溶性多肽, 通过抑制T细胞IL-2的产生, 影响免疫反应的诱导和进展, 而发挥作用。环孢素主要用于激素治疗无效的重症UC患者, 使其渡过危险期, 是糖皮质激素安全、有效的替代治疗药物, 用法: 口服剂量8 mg/(kg·d), 静脉注射剂量4 mg/(kg·d), 灌肠法给药剂量为2500-3000 mg/L, 每晚1次。环孢素具有多方面的不良反应: 肝功能损害、骨髓抑制及血肌酐升高^[22-23]; 其中肺囊虫与细胞巨病毒的机会性感染, 在接受环孢素及激素长期治疗的老年患者中尤易发生; 另一严重的不良反应是环孢素的疏水性赋形剂所致的癫痫样发作^[24]。他克莫司(tacrolimus, FK506)为一大环内酯类抗生素, 与环孢素有相似的免疫调节作用, 生物利用度低(21%-27%), 但个体差异很小。FK506(0.01-0.02 mg/kg静脉用或0.1-0.2 mg/kg po), 是长期使用环孢素的极佳代用品。最常见的不良反应是震颤、高血糖、高血压和感染, 肾损害罕见, 停药后消失^[25-26]。

2 生物制剂治疗

除上述传统的3类药外, 生物治疗已经逐渐从实验室走向临床, 抗肿瘤坏死因子(TNF- α)人鼠嵌合mAb Infiximab(英夫利昔)对UC的疗效和安全性已获得肯定^[27-29], 并在美国批准用于UC的治疗。Infiximab在临床上采用静脉滴注给药, iv 2 h起效, 推荐剂量5 mg/kg分别在0, 2和6 wk应用, 以后仍以5 mg/kg, 每8周1次维持治疗^[30-31]。由于不同的人群对Infiximab的反应不同, 因此, 临床上应谨慎使用^[32-34]。阿达木单抗(adalimumab)和CDP-870(certolizumab)为人抗TNF- α mAb, 在临床上同样采用静脉给药, 无法耐受英夫利昔单抗的患者, 对阿达木单抗和CDP-870的耐受性均较好。虽然人抗TNF- α mAb相对于英夫利昔单抗更为安全, 不良反应较少, 患者耐受性更好, 但其疗效不及英夫利昔单抗^[35]。除此之外还有依那西普(etanercept)和奥那西普(onercept)、生长因子、抑制丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)和其他酶可调节基因表达和细胞增

殖的CNI-1493(semapimod)、抑制TNF- α 合成的RDP-58(一种新的口服免疫肽类)、转录因子抑制剂、抗白细胞黏附治疗、T细胞增殖抑制因子、抗CD3抗体治疗等^[36-38]。

3 中医药治疗

中医认为溃疡性结肠炎主要由外邪内侵、饮食所伤、内伤七情、脾胃虚弱所致。属中医泄泻、肠风、便血、腹痛等范畴, 中医药治疗本病已显示出其优越性和广阔的前景。针对湿热壅盛患者, 芍药汤、白头翁汤、香连丸、葛根芩连汤多被选用以清热燥湿。而胃苓汤、当归四逆汤、香砂六君子、不换金正气散多在临床用以温散寒湿。连理汤、乌梅丸、薏苡附子败酱散、半夏泻心汤多用以温中清肠。部分肝郁脾虚患者, 大多数医家在临床治疗中多采用痛泻要方、小柴胡汤、四君子汤、逍遥散等以达调和肝脾之目的。结合UC反复发作, 迁延难愈, 久之伤气血、损脾肾的特点, 补涩兼施在治疗中突显重要性, 十全大补汤、参苓白术散、真人养脏汤、温脾汤、黄土汤、四神丸、附子理中丸驻车丸、四君子汤较多被选用, 以补脾益肾、调整脏腑功能。主张活血化瘀治疗的医家多选用桃红四物汤、血府逐瘀汤、少腹逐瘀汤等^[39]。

中药治疗UC主要采用口服剂型配以灌肠剂(煎剂灌肠)。但由于口服药多在胃内吸收, 生物利用度低, 且不太适应溃疡性结肠炎病灶散布于结肠各段的病理特点; 煎剂灌肠, 患者顺应性较差, 在一定程度上降低了中医药治疗UC的疗效。最近, 由龙致贤 *et al*^[40]提出的“一种剂型、胃肠二步释药模式”的新理念, 为治疗溃疡性结肠炎提供了新方法。并通过临床经验方“肠安康”进行了研究: 将黄芪、补骨脂、木香等提取物在胃内先行释放, 使其发挥补气升阳、补肾壮阳、健脾益气作用; 将黄连、金银花等提取物在小肠开始释放, 在结肠部位富集, 发挥局部清热解毒利湿的作用, 达到标本兼治效果。采用人体X-射线造影, 结果显示新制剂口服后5-7 h逐步在结肠定位, 说明该技术可达到预期目的, 证实了其方法的可行性^[40], 为提高中医药治疗UC的临床疗效提供了有效技术手段。

4 中西医结合治疗

以往治疗UC单用西药或中药, 但最近通过中西医结合治疗, 取得了令人满意的效果。苏东平 *et al*^[41]以对照组仅用西药(0.9%生理盐水100 mL, 庆大

■相关报道

韩英 *et al*发现奥沙拉嗪灌肠方治疗活动性溃疡性结肠炎有较好的疗效, 且主要不良反应腹泻明显减少; 苏东平 *et al*研究发现中西医结合治疗溃疡性结肠炎疗效优于单用西药治疗。

同行评价

本文内容有一定重要性,讨论条理分明,可读性能够较好地反映我国胃肠病学临床研究的水平。

霉素针16万U,地塞米松针5 mg, 0.002 g/L利多卡因20 mL),治疗组给予中药(大青叶50-80 g,板蓝根80 g,黄柏15 g,乌贼骨30 g,薏苡仁、苦参各50 g)与西药交替保留灌肠对患者60例进行治疗,结果治疗组有效率为93.3%,对照组有效率为66.7%,显示中西医结合疗法治疗溃疡性结肠炎疗效优于单用西药治疗。陆宇平 *et al*^[42]通过中西医结合组给予口服益气健脾、清热解毒、化瘀通络的中药,每剂加水煎至 300 mL, 100 mL/次, 3次/d *po*,基本组方:黄芪30 g,肉桂10 g,炮姜10 g,败酱草20 g,白头翁15 g,黄连10 g,白术15 g,苍术15 g,青黛15 g,苦参15 g,丹参15 g,炙甘草10 g;同时服用艾迪莎4 g/d。中药组及西药组分别口服上述基本方及艾迪莎,服用方法及药物剂量同上。各组均4周为1个疗程,2个疗程后进行疗效评价。综合疗效:中西医结合组总有效率为96.7%,中药组总有效率为82.0%,西药组总有效率为77.5%。3组综合疗效比较差异有统计学意义($P<0.05$),中西医结合组疗效优于西药组。中西医结合治疗溃疡性结肠炎较单纯西医治疗临床效果更为显著,值得临床推广应用。

我国近10年国内文献报道的UC病例数超过前10年3倍多。随着对UC认识的不断深入,新疗法如骨髓干细胞移植^[43]、新药物(如生物制剂等)、新剂型(控释剂、缓释剂、局部治疗栓剂、水剂、泡沫剂等)及新疗法(如中西医结合治疗)的出现,根据患者的基因型、免疫学特性和临床表现型特征确定个体化治疗方案,将有利于改善或治愈UC者的症状及肠道病变,使UC的治疗更加经济有效。

参考文献

- 中华医学会消化病学分会炎症性肠病协作组. 对我国炎症性肠病诊断治疗规范的共识意见. 胃肠病学 2007; 12: 488-495
- 欧阳钦. 炎症性肠病的诊治. 胃肠病学和肝病杂志 2008; 17: 255-260
- 江学良, 崔慧斐. 溃疡性结肠炎治疗的新思路. 世界华人消化杂志 2007; 15: 319-322
- 董军梅, 魏琴. 柳氮磺吡啶保留灌肠加电磁波治疗溃疡性结肠炎. 中国中医药现代远程教育 2008; 6: 784
- 吴小珑, 陈健芳. 柳氮磺胺吡啶等保留灌肠治疗溃疡性结肠炎. 基层医学论坛 2006; 10: 719-720
- 程军, 李鹏. 美沙拉嗪在溃疡性结肠炎治疗中疗效的研究. 天津医科大学学报 2007; 13: 419-421
- 向莉琳, 邓伟强, 颜彪华. 美沙拉嗪治疗156例溃疡性结肠炎的疗效观察. 现代医药卫生 2007; 23: 2593
- 郑家驹. 水杨酸类制剂在炎症性肠病中的应用. 中国实用内科杂志 2007; 27: 1422-1426
- 姜绍连. 美沙拉嗪缓释颗粒致胃痛1例. 医学理论与实践 2007; 20: 505
- 雷新惠. 美沙拉嗪肠溶片致严重肝损害1例. 医药导报

- 2007; 26: 442
- 王颖华, 马西宽. 美沙拉嗪致药物热1例. 临床军医杂志 2006; 34: 24
- 王丹, 郭小林, 朴云峰. 巴柳氮治疗轻、中度溃疡性结肠炎24例. 中国新药与临床杂志 2006; 25: 273-276
- 丹惠军, 吴松. 治疗溃疡性结肠炎新药-巴柳氮. 中国新药杂志 2001; 10: 173-175
- 陈苏红. 巴柳氮治疗轻中度溃疡性结肠炎. 国外医学·药学分册 2003; 30: 104-106
- 朱淑芳, 侯明辉. 巴柳氮钠治疗溃疡性结肠炎25例. 中国药业 2007; 16: 49
- 朱淑芳, 侯明辉, 张红. 巴柳氮栓剂的制备及临床应用. 实用医技杂志 2007; 14: 1430-1431
- 方毅, 詹忆波, 蒋顺录. 奥沙拉嗪治疗溃疡性结肠炎的临床疗效观察. 浙江临床医学 2007; 9: 359-360
- 韩英, 韩者艺, 郭学刚, 时全金, 吴开春, 樊代明. 奥沙拉嗪与SASP灌肠治疗溃疡性结肠炎的疗效对比观察. 胃肠病学和肝病杂志 2006; 15: 152-154
- 胡志刚, 杨大鸿. 奥沙拉嗪与水杨酸偶氮磺胺吡啶灌肠治疗溃疡性结肠炎的疗效对比观察. 现代中西医结合杂志 2008; 17: 168-170
- 严明确, 白学松, 任文涛. 溃疡性结肠炎药物治疗的现状. 现代医药卫生 2006; 22: 2817-2818
- 宋卫生, 刘思德. 溃疡性结肠炎药物治疗进展. 中国消化内镜 2008; 2: 18-20
- 陈莹, 谭华, 刘文天, 韩玉山, 杨健. 环孢菌素A治疗重度溃疡性结肠炎的临床观察. 临床荟萃 2008; 23: 19-22
- 刘静. 环孢菌素A治疗炎症性肠病11例分析. 四川医学 2007; 28: 867-868
- 郑家驹. 溃疡性结肠炎的药物疗法. 中国处方药 2005; 4: 18-23
- 陈斌, 马爱民, 林建群. 他克莫司的不良反应. 海峡药学 2007; 19: 130-131
- 贺智. 他克莫司的临床应用与不良反应. 河北医药 2007; 29: 261-262
- Järnerot G. Infliximab or cyclosporine for severe ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2006; 130: 286; author reply 287
- Rutgeerts P, Sandborn WJ, Feagan BG, Reinisch W, Olson A, Johanns J, Travers S, Rachmilewitz D, Hanauer SB, Lichtenstein GR, de Villiers WJ, Present D, Sands BE, Colombel JF. Infliximab for induction and maintenance therapy for ulcerative colitis. *N Engl J Med* 2005; 353: 2462-2476
- 何相宜, 陈维雄. 英昔单抗治疗中至重度溃疡性结肠炎的研究进展. 国际消化病杂志 2007; 27: 169-171
- 钱家鸣, 路新卿. 肿瘤坏死因子拮抗剂治疗炎症性肠病. 中国实用内科杂志 2007; 27: 1442-1444
- 夏冰, 程虹. 溃疡性结肠炎的生物治疗. 临床消化病杂志 2007; 19: 1-19
- 杨景勋. Infliximab不良反应. 药物不良反应杂志 2001; 3: 176-178
- 张道权, 吴正祥. 炎症性肠病的抗肿瘤坏死因子治疗安全评价. 临床荟萃 2007; 22: 145-147
- Lees CW, Ali A, Thompson AI, Ho GT, Forsythe RO, Marquez L, Cochrane CJ, Aitken S, Fennell J, Rogers P, Shand AG, Penman ID, Palmer KR, Wilson DC, Arnott ID, Satsangi J. The safety profile of anti-TNF therapy in inflammatory bowel disease in clinical practice: analysis of 620 patient-years follow-up. *Aliment Pharmacol Ther* 2008 Nov 4. [Epub ahead of print]
- Shah SB, Hanauer SB. Risks and benefits of the use of concomitant immunosuppressives and biologics in inflammatory bowel disease. *Rev Gastroenterol Disord* 2008; 8: 159-168
- 陈尉华, 陆陆根. 炎症性肠病生物制剂治疗的研究进

- 展. 胃肠病学 2007; 12: 252-254
- 37 庞智, 郑家驹. 炎症性肠病生物学治疗的研究进展. 中国处方药 2007; 6: 39-41
- 38 何影, 欧阳钦. 生长因子治疗炎症性肠病. 国际消化病杂志 2007; 27: 164-166
- 39 李金萍, 李卫青. 中医药治疗溃疡性结肠炎的研究进展. 山西中医 2008; 24: 53-55
- 40 龙致贤, 杨可立, 王玉蓉. 肠安康制剂的“一种剂型、胃肠二步释药模式”研究. 世界中医药 2007; 2: 334-335
- 41 苏东平, 王东. 中西医结合灌肠治疗溃疡性结肠炎临床观察. 山西中医 2008; 24: 34
- 42 陆宇平, 王长洪, 王立新, 杨卓, 麻树人, 陈山泉, 刘杨, 高文艳, 巩阳, 林一帆, 朱虹. 中西医结合治疗溃疡性结肠炎的临床研究. 中国中西医结合消化杂志 2008; 16: 91-93
- 43 薛如意, 张顺财. 造血干细胞移植治疗炎症性肠病进展. 国际消化病杂志 2007; 27: 162-166

编辑 史景红 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志修回稿须知

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

1 修回稿信件

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

2 稿件修改

来稿经同行专家审查后, 认为内容需要修改、补充或删除时, 本刊编辑部将把原稿连同审稿意见、编辑意见寄回给作者修改, 而作者必须于15 d内将修改后的稿件及光盘寄回编辑部, 同时将修改后的电子稿件上传至在线办公系统; 逾期寄回的, 作重新投稿处理.

3 版权

本论文发表后作者享有非专有权, 文责由作者自负. 作者可在本单位或本人著作集中汇编出版以及用于宣讲和交流, 但应注明发表于《世界华人消化杂志》××年; 卷(期); 起止页码. 如有国内外其他单位和个人复制、翻译出版等商业活动, 须征得《世界华人消化杂志》编辑部书面同意, 其编辑版权属本刊所有. 编辑部可将文章在《中国学术期刊光盘版》等媒体上长期发布; 作者允许该文章被美国《化学文摘》、《荷兰医学文摘库/医学文摘》、俄罗斯《文摘杂志》、《中国生物学文摘》等国内外相关文摘与检索系统收录. (常务副总编辑: 张海宁 2008-12-18)

胃癌相关基因GCRG123的克隆及其在大肠杆菌中的表达

伍银桥, 王刚石, 王孟薇, 吴本俨, 尤纬缔

■背景资料

GCRG123是本实验室筛选出的1条在进展期胃癌、癌旁和正常胃黏膜组织间差异表达的新基因序列, 其与人lamin样蛋白80%同源, 而A型lamin与肿瘤相关。最近的研究又发现GCRG123为LINE-1家族成员。为了进一步研究GCRG123在胃癌发生发展中的作用, 本课题组构建融合基因表达载体, 并在大肠杆菌中高效表达了Thioredoxin/GCRG123融合蛋白, 为后续的功能研究、蛋白制备及其抗体研制提供了良好的实验材料。

伍银桥, 王刚石, 王孟薇, 吴本俨, 尤纬缔, 中国人民解放军总医院南楼消化科 北京市 100853

军队“十五”重点科研基金资助项目, No. 01Z035

作者贡献分布: 此课题由王孟薇、吴本俨、王刚石及伍银桥共同设计; 研究过程由伍银桥、王刚石及尤纬缔操作完成; 本论文写作由伍银桥完成。

通讯作者: 伍银桥, 100853, 北京市复兴路28号, 中国人民解放军总医院南楼消化内科. wuyq56@hotmail.com
电话: 010-66876246

收稿日期: 2008-11-05 修回日期: 2008-11-19

接受日期: 2008-11-24 在线出版日期: 2008-12-18

Cloning and expression of gastric cancer related gene GCRG123 in *E.coli*

Yin-Qiao Wu, Gang-Shi Wang, Meng-Wei Wang, Ben-Yan Wu, Wei-Di You

Yin-Qiao Wu, Gang-Shi Wang, Meng-Wei Wang, Ben-Yan Wu, Wei-Di You, Department of Gastroenterology, South Building, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China

Supported by: Key Project Grant in Medical Sciences

from the Tenth Five-year Plan of Chinese PLA, No. 01Z035

Correspondence to: Yin-Qiao Wu, Department of Gastroenterology, South Building, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China. wuyq56@hotmail.com

Received: 2008-11-05 Revised: 2008-11-19

Accepted: 2008-11-24 Published online: 2008-12-18

Abstract

AIM: To express gastric cancer related gene GCRG123 by using thioredoxin fusion expression system.

METHODS: GCRG123 cDNA with complete open reading frame was amplified by PCR from plasmid pGEM-T, and then cloned into thioredoxin fusion expression vector pET102/D-TOPO. The recombinant plasmid was further transformed into *E.coli* BL21 strain. After induction with IPTG, thioredoxin-GCRG123 fusion protein was expressed in *E.coli*.

RESULTS: SDS-PAGE analysis showed the thioredoxin-GCRG123 fusion protein with relative molecule mass of 18 700 was highly expressed. The thin layer gel scanning analysis showed that the yield of GCRG123 fusion protein was 23.6% of the total bacterial protein.

CONCLUSION: The GCRG123 recombinant fusion protein is successfully expressed in *E.coli*.

Key Words: Gastric cancer; Gene; GCRG123; Prokaryotic expression

Wu YQ, Wang GS, Wang MW, Wu BY, You WD. Cloning and expression of gastric cancer related gene GCRG123 in *E.coli*. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(35): 3984-3987

摘要

目的: 利用硫氧还蛋白融合表达系统表达胃癌相关基因GCRG123。

方法: 采用PCR技术从pGEM-T质粒上扩增出含完整ORF的GCRG123 cDNA序列, 将其克隆至硫氧还蛋白融合表达载体pET102/D-TOPO中, 转化大肠杆菌BL21, 经IPTG诱导表达重组融合蛋白, SDS-PAGE分析表达产物。

结果: 工程菌经IPTG诱导后, 高效表达出相对分子质量约18 700的重组融合蛋白。薄层凝胶扫描显示, 其表达量占菌体总蛋白质的23.6%。

结论: 在大肠杆菌中成功表达了GCRG123重组融合蛋白。

关键词: 胃癌; 基因; GCRG123; 原核表达

伍银桥, 王刚石, 王孟薇, 吴本俨, 尤纬缔. 胃癌相关基因GCRG123的克隆及其在大肠杆菌中的表达. *世界华人消化杂志* 2008; 16(35): 3984-3987

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3984.asp>

0 引言

研究表明, 胃癌的发生发展过程中涉及到多种癌基因、抑癌基因的变化^[1], 但迄今仍未从基因角度完全阐明胃癌发生、浸润或转移等方面的机制, 胃癌的早期诊断、预后判断和治疗等各方面尚无突破, 其年死亡率在我国仍高居不下。我们应用荧光标记的mRNA差异显示技术分析了我中国人胃窦部进展期腺癌组织、癌旁组织和正常胃黏膜组织之间表达基因的差异, 从

■同行评议者

樊晓明, 主任医师, 复旦大学附属金山医院消化科

中筛选并克隆出1条基因序列, 命名为GCRG123, 其在正常和癌旁组织中的表达高于癌组织, 生物信息学分析显示其与人类lamin样蛋白80%同源, 其编码产物为一个新的lamin样蛋白^[2-3]; 最近发现GCRG123为LINE-1家族成员^[4]. 为了获得GCRG123蛋白并进一步研究其在胃癌发生发展中的作用, 我们扩增了含完整ORF的GCRG123 cDNA序列, 采用基因重组技术, 构建了融合基因表达载体, 并在大肠杆菌中高效表达了Thioredoxin/GCRG123融合蛋白.

1 材料和方法

1.1 材料 含目的片段的pGEM-T质粒由本室王刚石博士构建保存. *E. coli* TOP10, BL21 StarTM(DE3)菌株, platinum[®] Pfx DNA polymerase和pET102/D-TOPO载体均为Invitrogen公司产品. IPTG, 质粒提取试剂盒购自Promega公司. DNA分子质量标准DL2000购自宝生物工程有限公司(TaKaRa). 蛋白质分子质量标准购自北京原平皓生物有限公司. SDS, Tris碱为Gibco公司产品. 丙烯酰胺, 甘氨酸为Sigma公司产品.

1.2 方法

1.2.1 引物设计与合成: 按照GCRG123的cDNA序列设计了一对引物, 并根据表达载体要求在上游引物5'端加入CACC序列, 以便于后续的定向克隆. 引物由中国科学院微生物所合成. 引物序列如下: P1: 5'-C ACC AAT AAT GAA ATG AAG GCA GA-3', P2: 5'-GTA TCT CCT TCA GTT CTG CTC T-3'.

1.2.2 PCR扩增: 以pGEM-T质粒为模板, 以P1、P2为引物, 用Pfx DNA polymerase扩增出含完整ORF的GCRG123 cDNA序列. PCR扩增的条件是: 94℃变性30 s, 51℃退火30 s, 68℃延伸1 min, 25次循环反应后, 于68℃继续延伸10 min.

1.2.3 表达载体的构建及鉴定: 按产品说明将PCR产物与pET102/D-TOPO载体连接, 转化TOP10感受态菌, 随机挑取10个菌落, 进行PCR鉴定. 选取经过PCR初步鉴定的阳性菌落, 送上海博亚生物工程公司测序.

1.2.4 融合蛋白的表达: 将质粒DNA转化BL21 StarTM(DE3)感受态菌, 接种于10 mL含氨苄青霉素(100 mg/L)的LB液体培养基中, 37℃过夜培养后按1:50放大培养至 A_{600} 达0.5-0.6, 加入IPTG至浓度为1 mmol/L, 诱导培养3-4 h. 收集菌体进行SDS-PAGE凝胶电泳检测.

1.2.5 SDS-PAGE分析表达产物: 离心收集诱导培

养的工程菌菌体, 悬浮于裂解缓冲液中, 经反复冷融或超声破碎后离心, 沉淀不溶解蛋白, 上清即为可溶组分, 再进行SDS-PAGE凝胶电泳. 根据上清组分与沉淀组分中的蛋白的含量, 判断其表达形式.

2 结果

2.1 目的基因片段的扩增及序列分析 PCR扩增产物经琼脂糖凝胶电泳后, 可见1条清晰、单一、大小约266 bp的特异性扩增条带(图1), 其大小与预计的相吻合. 序列测定结果与理论预期一致.

2.2 融合蛋白表达的鉴定 SDS-PAGE分析表明, 工程菌经IPTG诱导后, 在相对分子质量约18 700处出现了1条明显的新蛋白带, 其大小与理论推算的融合蛋白相对分子质量相符合, 未诱导的工程菌中未见此带. 在诱导后1 h该蛋白即开始表达, 3-4 h达高峰. 凝胶薄层扫描分析显示其表达量约占菌体总蛋白的23.6%. 将菌体进行冻融裂解或超声破碎、离心后分别取其上清和沉淀进行SDS-PAGE凝胶电泳检测, 发现无论诱导时间长短, Thioredoxin/GCRG123融合蛋白均主要以包涵体形式存在于沉淀中, 菌体裂解物上清在相应位置没有明确条带出现(图2).

3 讨论

癌基因和抑癌基因以及与肿瘤发生相关的其他因素的研究一直是近年来肿瘤研究的焦点^[5]. 在胃癌的发生发展过程中涉及到HER2/neu, met, k-sam, ras, c-myc, bcl-2, APC, E-Cadherin, p53, Rb, cyclin等多种基因. 但这些基因在胃癌组织中变异的特异性不强, 仍很难用作胃癌的监测指标. GCRG123是本实验室应用荧光标记的mRNA差异显示技术(DDRT-PCR)从我国人胃窦部进展期腺癌组织、癌旁组织和正常胃黏膜组织中筛选并克隆出的1条差异表达基因序列. GCRG123由445 bp组成, 具有完整的开放阅读框架, 编码含有49个氨基酸的产物. 该核苷酸序列登录GenBank, 登录号AF454554. 生物信息学分析显示其与人类lamin样蛋白80%同源^[3], lamin即核纤层蛋白, 是核纤层的主要组成成分, 而核纤层是真核细胞中紧贴内核膜内层的纤维状网状结构, 对稳定细胞核的形状和染色质高度有序性, 以及调节染色质的螺旋化和解螺旋等均有重要作用. 文献已报道多个lamin样蛋白^[6], 但对各种lamin样蛋白的功能尚缺乏了解.

根据lamin的序列、在有丝分裂中的行为

■应用要点

对GCRG123的深入研究, 有助于阐明胃癌的发病机制, 也将为胃癌的诊断、治疗和预后判断提供新的思路 and 手段.

■名词解释

lamin: 核纤层蛋白, 是核纤层的主要组成成分, 而核纤层是真核细胞中紧贴内核膜内层的纤维状网状结构, 对稳定细胞核的形状和染色质高度有序性, 以及调节染色质的螺旋化和解螺旋等均有重要作用。

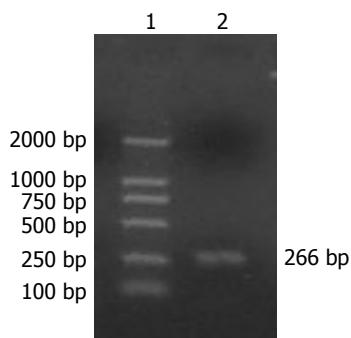


图 1 GCRG123 PCR扩增片段. 1: DNA marker; 2: PCR product.

和组织特异性表达特征的不同, 将其分为A型和B型lamin, A型lamin包含lamin A和lamin C. B型lamin在所有的胚胎和体细胞中均表达, 而A型lamin则在不同分化的细胞和组织中呈现不同的表达特征. 研究表明, 人类lamin A基因的突变与一些疾病有关, 包括Emery-Dreifuss肌营养不良、扩张性心肌病、先天性脂肪代谢障碍等. 许多类型的肿瘤均出现A型lamin的表达下调, 包括小细胞肺癌、睾丸生殖细胞肿瘤和皮肤基底细胞癌等^[3,7-8]. 核lamin表达在消化系统肿瘤中也很常见, 结直肠癌中A型lamin高表达者预后差^[9]. 在胃癌的各种癌前损害中, 不典型增生可见到lamin表达下调, 而肠化和萎缩性胃炎却无此现象^[10]. 本实验室通过原位杂交检测显示, GCRG123在正常的胃粘膜上皮细胞和幽门腺高表达, 而在胃腺癌组织、不典型增生组织及部分肠化生组织低表达^[3], 与lamin样蛋白表达特征基本一致, GCRG123基因产物可能为一个新的lamin样蛋白. 而最近的研究发现GCRG123为LINE-1家族成员, 且在胃印戒细胞癌中高表达^[4].

为了进一步弄清楚GCRG123在胃癌发生发展中的作用及在胃癌诊断中的意义. 我们以获得的含完整开放阅读框架的GCRG123 cDNA片段为切入点, 利用大肠杆菌高密度生长的优势和易于表达蛋白、纯化简单, 尤其是以融合蛋白表达的形式等特点, 进行了GCRG123 cDNA片段在原核系统中的表达, 为后续的功能研究、蛋白制备及其抗体研制提供了良好的实验材料. 可以预期, 对GCRG123的深入研究, 不仅有助于阐明胃癌的发病机制, 也将为胃癌的诊断、治疗和预后判断提供新的思路 and 手段. 通常PCR产物与载体的直接连接效率不高, 并且有非特异性背景菌落产生, 造成后续的筛选困难. 而拓朴异构酶 I 却能高效且快速地将PCR产物与载体相连, 同时我们使用的TOPO平端克隆方法主要是载体进行了改良设计, 含有ccdB(control of cell death)基因^[11-12], 可降低非特

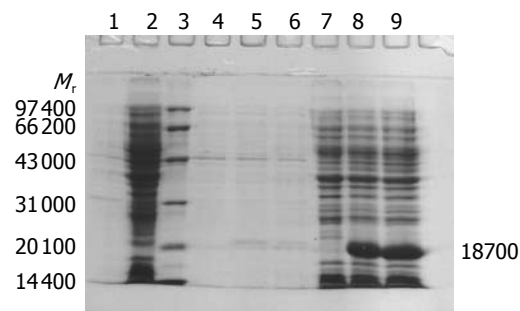


图 2 GCRG123蛋白表达形式的确定. 1-2: 未诱导4 h上清和沉淀; 3: Marker; 4, 7: IPTG诱导前上清和沉淀; 5, 8: IPTG诱导3 h上清和沉淀; 6, 9: IPTG诱导4 h上清和沉淀.

异性背景菌落, 也易于筛选. 在原核细胞表达时, 为获得产量高、利于基因工程下游纯化的工作, 目前多主张选用以融合蛋白表达形式的载体, 这样既能解决表达蛋白的纯化, 又可防止宿主菌蛋白酶对融合蛋白的降解, 有利于保护目的蛋白的生物活性. 我们选用pET102/D-TOPO表达载体, 是近年构建的新型载体, 带有强大的T7表达启动子, 给实验操作带来极为有利的方便.

我们以pET102/D-TOPO载体高水平地表达了人thioredoxin/GCRG123融合蛋白, 产物表达量占菌体总蛋白的23.6%. 选用pET102/D-TOPO载体除了希望得到高水平表达的重组融合蛋白, 同时还希望获得可溶性蛋白, 但其表达仍主要以包涵体的形式存在. 究其形成包涵体的原因, 可能有以下几个方面: (1)重组蛋白的高水平表达. 一般而言, 包涵体的形成是外源蛋白在大肠杆菌中高效表达时的普遍现象. (2)大肠杆菌胞质与真核细胞胞质环境的差异使重组的外源蛋白不能在大肠杆菌中进行正常的折叠^[13-14]. (3)包涵体的形成虽与所表达蛋白的分子无关, 但却受肽链氨基酸组成的影响, 大量疏水氨基酸的存在易促进蛋白的聚集. (4)细菌培养温度、pH等也可能影响包涵体的形成^[15]. 包涵体蛋白虽然往往无生物活性, 需要重新溶解和复性, 但也为重组蛋白纯化带来了极大的方便, 此外, 包涵体的形成有利于防止蛋白酶对表达蛋白的降解, 增加了产物的稳定性.

4 参考文献

- 1 Tamura G. Alterations of tumor suppressor and tumor-related genes in the development and progression of gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 192-198
- 2 Wang G, Wang M, You W, Li H. [Cloning and primary expression analyses of down-regulated cDNA fragment in human gastric cancer] *Zhonghua Yixue Yichuanxue Zazhi* 2001; 18: 43-47
- 3 Wang G, Wang M, Wu B, You W. [A lamin-like protein

- gene is down-regulated in human gastric cancer] *Zhonghua Yixue Yichuanxue Zazhi* 2003; 20: 119-122
- 4 Wang GS, Wang MW, Wu BY, Yang XY, Wang WH, You WD. LINE-1 family member GCRG123 gene is up-regulated in human gastric signet-ring cell carcinoma. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 758-763
- 5 Fujiwara Y, Doki Y, Taniguchi H, Sohma I, Takiguchi S, Miyata H, Yamasaki M, Monden M. Genetic detection of free cancer cells in the peritoneal cavity of the patient with gastric cancer: present status and future perspectives. *Gastric Cancer* 2007; 10: 197-204
- 6 Foisy S, Joly EC, Bibor-Hardy V. Purification of intact nuclear lamina and identification of novel laminlike proteins in Raji, a cell line devoid of lamins A and C. *Biochem Cell Biol* 1997; 75: 721-732
- 7 Venables RS, McLean S, Luny D, Moteleb E, Morley S, Quinlan RA, Lane EB, Hutchison CJ. Expression of individual lamins in basal cell carcinomas of the skin. *Br J Cancer* 2001; 84: 512-519
- 8 Tilli CM, Ramaekers FC, Broers JL, Hutchison CJ, Neumann HA. Lamin expression in normal human skin, actinic keratosis, squamous cell carcinoma and basal cell carcinoma. *Br J Dermatol* 2003; 148: 102-109
- 9 Willis ND, Cox TR, Rahman-Casañs SF, Smits K, Przyborski SA, van den Brandt P, van Engeland M, Weijenberg M, Wilson RG, de Bruijne A, Hutchison CJ. Lamin A/C is a risk biomarker in colorectal cancer. *PLoS ONE* 2008; 3: e2988
- 10 Moss SF, Krivosheyev V, de Souza A, Chin K, Gaetz HP, Chaudhary N, Worman HJ, Holt PR. Decreased and aberrant nuclear lamin expression in gastrointestinal tract neoplasms. *Gut* 1999; 45: 723-729
- 11 Van Melderden L. Molecular interactions of the CcdB poison with its bacterial target, the DNA gyrase. *Int J Med Microbiol* 2002; 291: 537-544
- 12 Dao-Thi MH, Charlier D, Loris R, Maes D, Messens J, Wyns L, Backmann J. Intricate interactions within the ccd plasmid addiction system. *J Biol Chem* 2002; 277: 3733-3742
- 13 Carrio MM, Villaverde A. Role of molecular chaperones in inclusion body formation. *FEBS Lett* 2003; 537: 215-221
- 14 Middelberg AP. Preparative protein refolding. *Trends Biotechnol* 2002; 20: 437-443
- 15 Yang Q, Xu J, Li M, Lei X, An L. High-level expression of a soluble snake venom enzyme, glosheobin, in *E. coli* in the presence of metal ions. *Biotechnol Lett* 2003; 25: 607-610

■同行评价

本文利用硫氧还蛋白融合表达系统在大肠杆菌中成功表达了GCRG123重组融合蛋白,为后续的功能研究、蛋白制备及其抗体研制提供了良好的实验材料。也有助于利用GCRG123重组融合蛋白,进一步研究阐明GCRG123在胃癌发生中的生物学作用,学术价值较好。

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志参考文献要求

本刊讯 本刊采用“顺序编码制”的著录方法,即以文中出现顺序用阿拉伯数字编号排序。提倡对国内同行近年已发表的相关研究论文给予充分的反映,并在文内引用处右上角加方括号注明角码。文中如列作者姓名,则需在“Pang *et al*”的右上角注角码;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SCIE, PubMed,《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊为准,通常应只引用与其观点或数据密切相关的国内外期刊中的最新文献,包括世界华人消化杂志(<http://www.wjgnet.com/1009-3079/index.jsp>)和 *World Journal of Gastroenterology* (<http://www.wjgnet.com/1007-9327/index.jsp>)。期刊: 序号, 作者(列出全体作者), 文题, 刊名, 年, 卷, 起页-止页, PMID编号; 书籍: 序号, 作者(列出全部), 书名, 卷次, 版次, 出版地, 出版社, 年, 起页-止页。(常务副总编辑: 张海宁 2008-12-18)

内毒素休克小鼠肝脏细胞质膜差异蛋白质组的二维液相色谱分析

李红梅, 陈丽, 夏高晓, 赵明哲, 胡水旺, 姜勇

■背景资料

脂多糖, 或称为内毒素, 被认为是引起脓毒症的主要作用分子。内毒素信号转导通路是内毒素致病过程中的重要环节, 近年发现LPS受体识别是多种生物活性分子相互作用, 聚集在一起形成LPS受体簇, 共同完成LPS的跨膜信号转导。目前蛋白质组学技术不断发展, 为寻找参与内毒素休克过程中的生物活性分子提供了有效的手段。

李红梅, 陈丽, 夏高晓, 赵明哲, 胡水旺, 姜勇, 南方医科大学病理生理学教研室 广东省蛋白质组学重点实验室 广东省广州市 510515

国家自然科学基金委-广东省人民政府自然科学基金重点资助项目, No. U0632004

国家自然科学基金资助项目, No. 30572151; No. 30670828

教育部长江学者和创新团队发展计划基金资助项目, No. IRT0731

作者贡献分布: 此课题由李红梅和姜勇设计; 研究过程由李红梅、陈丽、夏高晓、赵明哲及胡水旺操作完成; 数据分析由李红梅和陈丽完成; 本论文写作由李红梅和姜勇完成。

通讯作者: 姜勇, 510515, 广东省广州市, 南方医科大学病理生理学教研室. yjiang@fimmu.com

电话: 020-61648172 传真: 020-87705671

收稿日期: 2008-09-24 修回日期: 2008-11-22

接受日期: 2008-11-24 在线出版日期: 2008-12-18

Two-dimensional liquid chromatography analysis of differential proteome of liver plasma membrane in mice with endotoxic shock

Hong-Mei Li, Li Chen, Gao-Xiao Xia, Ming-Zhe Zhao, Shui-Wang Hu, Yong Jiang

Hong-Mei Li, Li Chen, Gao-Xiao Xia, Ming-Zhe Zhao, Shui-Wang Hu, Yong Jiang, Department of Pathophysiology and Key Laboratory of Proteomics of Guangdong Province, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China-Guangdong Provincial People's Government of the Joint Natural Science Fund Projects, No. U0632004; National Natural Science Foundation of China, No. 30572151, No. 30670828; the Program for Changjiang Scholars and Innovative Research Team in University, No. IRT0731

Correspondence to: Yong Jiang, Department of Pathophysiology of Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China. yjiang@fimmu.com

Received: 2008-09-24 Revised: 2008-11-22

Accepted: 2008-11-24 Published online: 2008-12-18

Abstract

AIM: To establish and optimize the methods for plasma membrane proteome research, and comparatively analyze plasma membrane proteomes of normal control group and the group treated with LPS for 3 h.

METHODS: Twenty BALB/c mice were assigned to 2 groups: the control group and LPS-

treated group. Plasma membrane of liver cells from mice was extracted using differential centrifugation and sucrose density-gradient centrifugation. Plasma membrane proteins of two groups were fractionated according to pI using chromatofocusing with analytical columns in the first dimension, followed by separation of the proteins in each pI fraction using nonporous reversed-phase high performance liquid chromatography (HPLC). A two-dimensional map of the protein content for each group based upon pI versus hydrophobicity as detected by UV absorption was generated and a differential display map indicating the presence of up- or down-regulated proteins was exhibited using ProteoVue and DeltaVue software.

RESULTS: Image analysis of two-dimensional map revealed 24 differentially expressed proteins between the normal control group and that treated with LPS for 3 h. Compared with normal control, 16 protein fractions were up-regulated and 8 protein fractions were down-regulated in the group treated with LPS for 3 h.

CONCLUSION: There is a significant difference of plasma membrane proteome between the normal control and the mice treated with LPS.

Key Words: Endotoxic shock; Plasma membrane proteome; Two-dimensional liquid chromatographic fractionation

Li HM, Chen L, Xia GX, Zhao MZ, Hu SW, Jiang Y. Two-dimensional liquid chromatography analysis of differential proteome of liver plasma membrane in mice with endotoxic shock. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(35): 3988-3992

摘要

目的: 建立和优化肝脏细胞质膜蛋白质研究的方法系统, 并对正常组小鼠和内毒素休克小鼠组肝脏细胞质膜蛋白质进行二维液相色谱分离, 分析两者之间的差异表达谱。

方法: BALB/c小鼠20只随机分为正常组和内

■同行评议者

姚登福, 教授, 南通大学附属医院分子医学中心

毒素休克小鼠组(10只, LPS刺激3 h, LPS剂量为35 mg/kg), $n = 10$. 采用差速离心结合蔗糖密度梯度离心法分离和富集两组肝脏细胞质膜蛋白, 分别将两组样品按蛋白质PI进行一维的色谱聚焦分离, 然后每个PI组分再按蛋白质的疏水性经二维HPLC分离, 利用ProteoVue软件将UV光吸收图谱转换成PI对疏水性的胶样图谱, 再利用DeltaVue软件分析两组肝脏质膜蛋白质组的表达差异。

结果: 图像分析显示两组比值在 ≥ 2.0 及 ≤ 0.5 的差异蛋白点共有24个, 与正常组比较, 在内毒素休克小鼠的肝脏质膜蛋白中有16个蛋白点表达上调, 8个蛋白点表达下调。

结论: 正常组和内毒素休克小鼠组的肝脏质膜蛋白质组有明显差异。

关键词: 内毒素休克; 质膜蛋白质组; 二维液相色谱分离

李红梅, 陈丽, 夏高晓, 赵明哲, 胡水旺, 姜勇. 内毒素休克小鼠肝脏细胞质膜差异蛋白质组的二维液相色谱分析. 世界华人消化杂志 2008; 16(35): 3988-3992
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3988.asp>

0 引言

目前, 尽管抗生素被广泛应用, 并且有重症监护的支持, 感染和中毒性休克(septic shock)仍然是住院患者, 特别是创伤、烧伤和手术后患者面临的一个严重的问题, 其死亡率高达35%-60%^[1-2]. 其中革兰氏阴性(G)菌感染导致的中毒性休克是这类患者死亡的主要原因. 近年来对革兰氏阴性菌引起中毒性休克的机制已有了比较深入的了解. 虽然革兰氏阴性菌内毒素(Endotoxin), 即脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)的确切作用现在仍有争论, 但他在启动体内免疫系统反应, 导致中毒性休克的重要性已经得到普遍认识. LPS与细胞质膜上的内毒素受体相互作用可以激活致炎细胞因子系统而介导细胞毒反应, 引起肺损伤、急性呼吸窘迫综合征, 最终导致脓毒性休克甚至多器官功能障碍综合征^[3-4].

细胞质膜作为细胞与外界进行物质、能量和信息交流的场所, 在细胞的生命活动中起着至关重要的作用. 膜蛋白行使着独特的、联系生物膜内外环境的功能, 如细胞信号转导、细胞间相互作用、细胞器与细胞内的区室化作用、离子和溶质的传输、能量产生等; 同时, 也是许多药物的作用靶标. 据估计, 膜蛋白只占人

类基因编码蛋白质的20%-30%^[5], 但是在已经发现的药靶中大约有70%是质膜蛋白质^[6]. 蛋白质组学研究具有大规模、高通量及高灵敏度的特点, 因此本文利用蛋白质组学的技术方法研究内毒素休克小鼠肝脏细胞质膜蛋白质组的变化, 为了解内毒素休克时肝脏参与内毒素休克的分子机制提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料 SPF级BALB/c δ 小鼠, 7周龄, 15-19 g, 由南方医科大学实验动物中心提供. 二维液相色谱系统ProteomeLabTM PF2D及其配套试剂盒(ProteomeLabTM PF2D Kit)均为贝克曼(Beckman)公司产品, 试剂盒包括HPCF 1D色谱柱(2.1 mm \times 250 mm)、HPRP 2D无孔硅胶C18反相色谱柱(4.6 mm \times 33 mm)、起始缓冲液(start Buffer, SB)、洗脱缓冲液(eluent buffer, EB)和PD10 G-25脱盐柱(SephadexTM G-25, Amersham Pharmacia Biotech). LPS(血清型O111: B4)、正辛基 β -D-吡喃葡萄糖苷(n-octyl- β -D-glucopyranoside, OG)、蛋白酶抑制剂混合物(protease inhibitor cocktail)、尿素、硫脲、SB3-10、亚氨基二乙酸(iminodiacetic)、氨水均购自Sigma公司. 乙腈、三氟乙酸(TFA)、甲醇、异丙醇均为色谱级, 购于Fisher公司. 系统用水为利用ELGA Ultra-pure water系统制备的18.2 M Ω 的水. 2-D quant kit蛋白浓度检测试剂盒购于GE公司。

1.2 方法

1.2.1 BALB/c小鼠内毒素休克模型的制备: SPF级 δ BALB/c小鼠20只, 7周龄, 15-19 g, 随机平均分为2组, 每组10只: 一组为正常对照组, 另一组为LPS处理组. 小鼠经乌拉坦(0.6 mL/100 g)ip麻醉后, 固定并分离右侧颈总动脉. 将PE50聚乙烯管插入右侧颈总动脉, 插管与压力传感器和4道生理记录仪连接. 所有动物经插管手术后均需稳定30-60 min后, 再记录正常平均动脉压(mean arterial pressure, MAP). ip LPS(35 mg/kg), 监测血压8 h, 然后放回笼内观察动物死亡时间. 对照组小鼠ip等量无致热源的PBS. 另取20只SPF级 δ BALB/c小鼠, 7周龄, 15-19 g, 随机平均分为2组, 每组10只: 一组为正常对照组, 另一组为LPS处理3 h组, LPS的剂量同上, 对照组ip等量无致热源的PBS, 3 h后两组小鼠摘眼球放血处死, 取其肝脏, 提取肝脏细胞质膜。

1.2.2 小鼠肝脏质膜的提取: 小鼠肝脏用冰的磷酸盐缓冲液(KCl: 0.2 g, KH₂PO₄: 0.2 g, NaCl: 8.0

■ 相关报道

近年来对LPS受体识别机制的研究取得了较大进展, 发现识别LPS的受体并非单一受体。

■应用要点

本文利用蛋白质组学的技术方法研究内毒素休克小鼠肝脏细胞质膜蛋白质组的变化, 为了解内毒素休克时肝脏参与内毒素休克的分子机制提供理论基础。

g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$: 3.9054 g, pH7.4, 1000 mL)漂洗3次以充分去除血液, 滤纸拭干, 称质量。小鼠肝脏质膜的分离参照文献[7], 并作了一些改动, 所有操作均在4℃下进行, 每一步均需要加入蛋白酶抑制剂。用眼科小剪尽快剪碎组织块, 将剪碎的组织倒入玻璃匀浆管中, 按质量: 体积加入5倍体积的匀浆液(0.25 mol/L蔗糖, 10 mmol/L HEPE, pH7.5)进行匀浆, 按捣杆垂直插入套管中上下转动研磨数十次, 充分研碎, 使组织匀浆化。匀浆液1000 g离心10 min, 收集沉淀, 沉淀用5 mL的Buffer A(0.3 mol/L蔗糖, 50 mmol/L Tris, 3 mmol/L MgCl_2 , pH7.5)重悬, 加入9倍体积的Buffer B(1.98 mol/L蔗糖, 50 mmol/L Tris, 3 mmol/L MgCl_2 , pH7.5)以形成1.8 mol/L的蔗糖密度, 上层用0.25 mol/L SHE(0.25 mol/L蔗糖, 10 mmol/L HEPES, pH7.5, 1 mmol/L EDTA)填满离心管, 此蔗糖的密度为83%(w/w), 70 900 g离心90 min, 收集0.25 mol/L/1.8 mol/L界面的膜层, 此为质膜的粗提物(crude plasma membrane, CPM)。将质膜粗提物用适量的0.25 mol/L SHE重悬, 加入适量体积的2.4 mol/L SHE(2.4 mol/L蔗糖, 10 mmol/L HEPES, pH7.5, 1 mmol/L EDTA)使蔗糖终浓度达到1.45 mol/L(42% w/w), 上层用0.25 mol/L SHE填满离心管, 68 400 g离心60 min, 收集0.25 mol/L/1.45 mol/L(8.3%/42%)界面的膜层。该膜层用适量的0.25 mol/L SHE重悬, 加入适量体积的2.4 mol/L SHE使蔗糖终浓度达到1.35 mol/L, 230 000 g离心60 min, 收集0.25/1.35(8.3%/39%)界面的膜层, 此膜层即为纯的细胞质膜(purified plasma membrane, PPM)。用10 mmol/L HEPES(pH7.5)洗涤细胞质膜以去除蔗糖, 1000 g离心10 min, 沉淀溶于膜裂解液(5 mol/L尿素, 2 mol/L硫脲, 10%甘油, 50 mmol/L Tris pH8.0, 2.0% OG, 2.5% SB3-10, 1×蛋白酶抑制剂)中, 充分震荡溶解后, 20 000 g离心1 h, 收集上清, 上清即为膜蛋白, 分装后冻存于-80℃。

1.2.3 样品的脱盐浓缩: 利用25 mL起始缓冲液SB平衡脱盐柱PD-10, 弃去洗脱液, 加入2.5 mL膜蛋白裂解液, 再用SB洗脱并收集前3.5 mL洗脱液, 通过2D quant kit测定蛋白浓度。根据所测浓度, 用SB缓冲液配制浓度为2 g/L的上样样品。

1.2.4 一维色谱聚焦分离: (1)分离条件: 利用HPCF 1D色谱柱, 流动相A1-A4分别为SB(pH8.5), EB(pH4.0), 1 mol/L NaCl和HPLC级水, 所有溶液在实验前均通过0.2 μm滤膜过滤并超声5 min, 设定流速为0.2 mL/min, 检测波长为

280 nm(室温下进行), 流动相pH由系统pH计在线检测, 并在每次运行前利用pH标准液(pH4.00, pH7.00, pH10.01)校正。(2)分离程序: 由仪器自带的32 Karat软件控制自动运行, 首先以30倍柱体积(column volume, CV)的SB平衡柱子, 然后由进样器进样2 mL样品, 蛋白上样量为4 mg, 用SB洗脱20 min, 再用EB洗脱, 约在45 min时, pH值开始下降, 每间隔0.3个pH单位收集1份样品。当流出液的pH为4.0时, 用10 CV的1 mol/L NaCl和水依次洗脱柱子。共收集到pH值在8.5-4.0之间的16份样品。

1.2.5 二维反相色谱分离: 分离条件: 利用HPRP 2D色谱柱, 流动相A为0.1% TFA水溶液, 流动相B为0.08% TFA乙腈溶液, 实验前超声5 min, 设定流速为0.75 mL/min, 检测波长为214 nm, 50℃恒温下进行洗脱分离。分离程序: 由32 Karat软件控制自动运行, 首先以5 CV的流动相B和10 CV的流动相A平衡柱子后, 将一维分离的pH值在8.5-4.0之间的组份分别以0%-100%梯度的流动相B在30 min内进行分离。

1.2.6 蛋白质表达的差异比较: 用ProteoVue软件将二维分离的UV吸收光谱图(线图)转换成胶图(每1个pI组份为1个泳道), 建立小鼠肝脏质膜蛋白的吸收峰/等电点(UV/pI)图谱。用DeltaVue软件分析两组样品间相同的pI组份的差异蛋白, 根据保留时间对相应的色谱峰面积进行比较, 获得相应的比值。将比值变化超过2倍(即比值>2.0和比值<0.5)的组份作为正常组和LPS刺激3 h组中表达有差异的蛋白, 比值<0.5的组份称之为上调, 比值>2.0的组份称之为下调。

2 结果

2.1 BALB/c小鼠内毒素休克模型 BALB/c小鼠ip LPS(35 mg/kg)后, 开始记录小鼠动脉血压(图1)。LPS ip 45 min后, 血压开始下降, 但是下降速度缓慢, 到120 min时, 血压迅速下降到80 mmHg以下, 135 min时有所回升, 150 min时开始迅速下降, 180 min时血压降至50 mmHg左右, 并在此后的时间内持续下降, 形成较典型的“双峰型”曲线。至240 min时接近重度休克(血压低于40 mmHg)。10只小鼠在注射12-16 h内死亡。

2.2 膜蛋白的二维液相色谱分析 膜蛋白通过一维色谱聚焦分离, 收集了pH在8.5-4.0之间的组份, 共获得16个组份, 图2是两组小鼠肝脏细胞质膜蛋白的一维色谱聚焦图谱。将两组样品一维获得的组份分别通过二维反相色谱在流动相

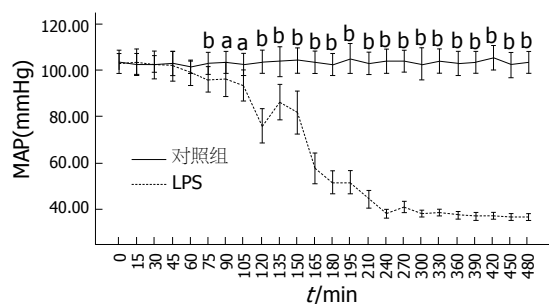


图 1 BALB/c小鼠平均动脉血压变化. ^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$.

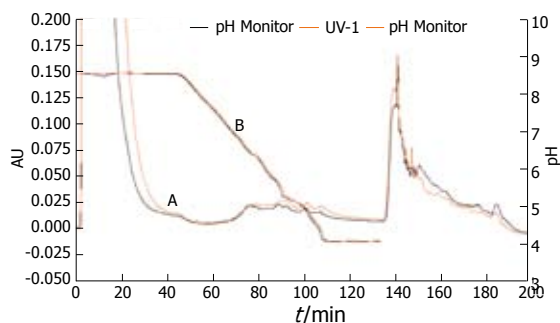


图 2 两组蛋白样品的PF2D第一维分离图谱. A: 两组蛋白分离的UV图; B: pH梯度形成图; 黑色: 正常组样品; 红色: LPS刺激3 h组样品.

(0.08%乙腈)0%-100%的洗脱梯度下进行二维分离, 将得到的二维信息通过仪器自带的ProteoVue软件转换成直观的高分辨彩色二维蛋白质组图谱(PI/UV). 将两组ProteoVue文件配对, 然后将数据输入DeltaVue软件中, 将各组pH梯度信息输入, 然后软件会展示两组间相同pI组对比线图和胶图, 即为DeltaVue差异图谱, 如图3所示. 通过图谱分析, 找到了24个差异点, 其中上调的有16个, 下调的有8个.

3 讨论

蛋白质组学作为一种新兴的技术, 已经为揭示疾病发病机制、寻找新的检测指标蛋白和治疗靶点以及新药研发提供了有力的工具. 目前蛋白质组的研究工作主要分两个方面, 一是通过双向凝胶电泳等技术得到正常生理条件下的机体、组织或细胞的全部蛋白质的图谱, 建立参考图谱和数据库, 另一方面是进行不同条件下的蛋白质组差异比较分析. 目前蛋白质组学的发展既受技术的推动也受技术水平的限制, 传统的双向凝胶电泳技术仍然是目前复杂蛋白组份分离的主流技术, 但其分离能力有一定的限度, 重复性差, 上样量小, 难以检测到低丰度和难溶于水的蛋白^[8-10]. 而往往这些蛋白对生理和病理过程具有关键性的调节作用. 目前以高效

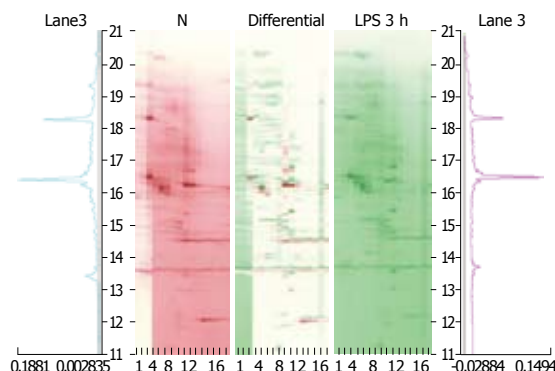


图 3 正常组和LPS刺激3 h组蛋白差异的UV/pI图.

液相色谱方法(HPLC)为主的技术平台是传统凝胶电泳技术的有效补充. 我们使用的Beckman的ProteomeLab™PF2D系统是由第一维的色谱聚焦和第二维的无孔硅胶反相HPLC组成, 在液态状态下对蛋白进行分离. 从第二维洗脱的蛋白质可用电喷雾离子阱质谱(ESI-MS)直接检测, 或用基质辅助激光解吸质谱(MALDI-MS)鉴定蛋白质. 该方法具有以下几个优点: (1)上样量大, 最大上样量可达5 mg, 为传统凝胶电泳的5倍, 有利于低丰度蛋白质的检测; (2)自动化程度高, 所有分离收集过程由系统自动操作; (3)分辨率高, 可根据样品特点改变一维及二维洗脱条件提高分辨率; (4)重现性好; (5)与质谱兼容性好, 可以实现在线连用; (6)自带软件分析直观方便, 通过ProteoVue软件将二维UV图转换成直观的PI/UV图谱, 然后通过DeltaVue软件可比较两个样品的二维图谱差异^[11-13]. 因此, 应用二维液相色谱分离方法研究蛋白质组的差异有可能成为有效的方法之一.

LPS信号转导通路的启动是内毒素致病过程中的重要环节, 而LPS与细胞膜上的受体相结合是其启动细胞内信号反应的第一步. 近年来对LPS受体识别机制的研究取得了较大进展, 发现识别LPS的受体并非单一受体^[14-17]. 在LPS的跨膜信号转导过程中, LPS与分化抗原-14(CD-14)结合后作用于细胞膜脂质双分子层并激发多种生物活性分子, 他们相互作用, 聚集在一起形成LPS受体簇, 共同完成LPS的跨膜信号转导. 与正常细胞相比较, 受刺激细胞表面许多分子的活性部位暴露, 一些与病理相关的分子启动表达或表达增高, 提示受刺激的细胞与正常细胞表面存在着差异的分子, 这些分子可能与内毒素休克的发生发展密切相关, 因此, 研究LPS刺激后的细胞膜脂质层中的蛋白质可能对LPS致病机制的认识具有推动作用. 在本实验

同行评价

本研究对照设计合理, 论据充足, 结果可信, 讨论条理分明, 学术价值较好.

中, 我们利用LPS成功复制了内毒素休克小鼠模型, 并应用差速离心结合蔗糖密度梯度离心富集了小鼠肝脏细胞质膜, 运用二维液相色谱对两组细胞质膜蛋白进行分离, 初步建立了正常组和内毒素休克小鼠肝脏细胞质膜蛋白的差异图谱, 为下一步运用质谱技术鉴定差异蛋白打下基础。

4 参考文献

- 1 Sakaguchi S, Furusawa S. Oxidative stress and septic shock: metabolic aspects of oxygen-derived free radicals generated in the liver during endotoxemia. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2006; 47: 167-177
- 2 Balk RA. Optimum treatment of severe sepsis and septic shock: evidence in support of the recommendations. *Dis Mon* 2004; 50: 168-213
- 3 丁宁, 姜勇. 细菌脂多糖识别系统. *中国生物化学与分子生物学报* 2007; 23: 711-717
- 4 Annane D, Bellissant E, Cavaillon JM. Septic shock. *Lancet* 2005; 365: 63-78
- 5 Zhang L, Xie J, Wang X, Liu X, Tang X, Cao R, Hu W, Nie S, Fan C, Liang S. Proteomic analysis of mouse liver plasma membrane: use of differential extraction to enrich hydrophobic membrane proteins. *Proteomics* 2005; 5: 4510-4524
- 6 Schindler J, Nothwang HG. Aqueous polymer two-phase systems: effective tools for plasma membrane proteomics. *Proteomics* 2006; 6: 5409-5417
- 7 Song Y, Hao Y, Sun A, Li T, Li W, Guo L, Yan Y, Geng C, Chen N, Zhong F, Wei H, Jiang Y, He F. Sample preparation project for the subcellular proteome of mouse liver. *Proteomics* 2006; 6: 5269-5277
- 8 Gorg A, Weiss W, Dunn MJ. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics* 2004; 4: 3665-3685
- 9 Li X, Gong Y, Wang Y, Wu S, Cai Y, He P, Lu Z, Ying W, Zhang Y, Jiao L, He H, Zhang Z, He F, Zhao X, Qian X. Comparison of alternative analytical techniques for the characterisation of the human serum proteome in HUPO Plasma Proteome Project. *Proteomics* 2005; 5: 3423-3441
- 10 Hamler RL, Zhu K, Buchanan NS, Kreunin P, Kachman MT, Miller FR, Lubman DM. A two-dimensional liquid-phase separation method coupled with mass spectrometry for proteomic studies of breast cancer and biomarker identification. *Proteomics* 2004; 4: 562-577
- 11 Pirondini A, Visioli G, Malcevski A, Marmiroli N. A 2-D liquid-phase chromatography for proteomic analysis in plant tissues. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2006; 833: 91-100
- 12 Linke T, Ross AC, Harrison EH. Proteomic analysis of rat plasma by two-dimensional liquid chromatography and matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2006; 1123: 160-169
- 13 Soldi M, Sarto C, Valsecchi C, Magni F, Proserpio V, Ticozzi D, Mocarelli P. Proteome profile of human urine with two-dimensional liquid phase fractionation. *Proteomics* 2005; 5: 2641-2647
- 14 Triantafilou M, Brandenburg K, Kusumoto S, Fukase K, Mackie A, Seydel U, Triantafilou K. Combinational clustering of receptors following stimulation by bacterial products determines lipopolysaccharide responses. *Biochem J* 2004; 381: 527-536
- 15 Triantafilou M, Triantafilou K. Heat-shock protein 70 and heat-shock protein 90 associate with Toll-like receptor 4 in response to bacterial lipopolysaccharide. *Biochem Soc Trans* 2004; 32: 636-639
- 16 Triantafilou M, Triantafilou K. The dynamics of LPS recognition: complex orchestration of multiple receptors. *J Endotoxin Res* 2005; 11: 5-11
- 17 Calderwood SK, Theriault J, Gray PJ, Gong J. Cell surface receptors for molecular chaperones. *Methods* 2007; 43: 199-206

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

WJG 荣获 2007 年“中国百种杰出学术期刊” 和 2008 年中国国际化精品科技期刊

本刊讯 由中国科学技术信息研究所主办的中国科技论文统计结果发布会于2008-12-09在北京国际会议中心召开, *World Journal of Gastroenterology* (WJG)总编辑马连生和编辑部主任程剑侠参加此项发布会。本会议介绍了中国精品科技期刊服务与保障系统, 中国科技论文研究项目进展及精品科技期刊遴选, 百篇最具影响学术论文评选, 世界科技产出趋势和利用科学计量学工具分析领域发展趋势以及发布了中国科技论文统计结果。根据2007年度中国科技论文与引文数据库(CSTPCD2007)统计结果, WJG荣获2007年度“中国百种杰出学术期刊”称号, 同时被选入2008年中国国际化精品科技期刊。(编辑: 程剑侠 2008-12-18)

原发性胆汁反流性胃炎胃黏膜ghrelin的表达

李凌燕, 王青, 许琳

李凌燕, 王青, 许琳, 青岛大学医学院附属青岛市立医院东区消化科 山东省青岛市 266071

作者贡献分布: 此课题由李凌燕, 王青及许琳设计; 研究过程由李凌燕, 王青及许琳操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由许琳提供; 数据分析由李凌燕完成; 本论文的写作由李凌燕与许琳完成。

通讯作者: 王青, 266071, 山东省青岛市东海中路5号, 青岛大学医学院附属青岛市立医院东区消化科。

wangq2008001@163.com

电话: 0532-88905630

收稿日期: 2008-09-23 修回日期: 2008-10-14

接受日期: 2008-10-27 在线出版日期: 2008-12-18

Expression of ghrelin in gastric mucosa of patients with primary bile reflux gastritis

Ling-Yan Li, Qing Wang, Lin Xu

Ling-Yan Li, Qing Wang, Lin Xu, Department of Gastroenterology, the Affiliated Municipal Hospital of Qingdao University, Qingdao 266071, Shandong Province, China

Correspondence to: Dr. Qing Wang, Department of Gastroenterology, the Affiliated Municipal Hospital of Qingdao University, 5 Donghaizhong Road, Qingdao 266071, Shandong Province, China. wangq2008001@163.com

Received: 2008-09-23 Revised: 2008-10-14

Accepted: 2008-10-27 Published online: 2008-12-18

Abstract

AIM: To investigate the expression of ghrelin in gastric mucosa of primary bile reflux gastritis.

METHODS: Ninety-six patients with primary bile reflux gastritis at our hospital from June 2007 to November 2007 were divided two groups: low reflux group and high reflux group. Thirty subjects with similar endoscopic findings and without bile reflux were taken as control group. The expression of ghrelin in biopsy specimens were detected by immunohistochemistry.

RESULTS: The expression of ghrelin was lower in the superficial gastritis group, the atrophy group, the intestinal metaplasia group, and the atypical hyperplasia group than in the control subjects (653.822 ± 99.303 , 98.913 ± 14.079 , 65.875 ± 13.844 , 52.290 ± 11.463 vs $884.420 \pm$

126.362 , all $P < 0.05$). In the superficial gastritis group, the atrophy group and the intestinal metaplasia group, the expression of ghrelin was significantly different between the *H pylori* positive group and the *H pylori* negative group (599.320 ± 87.300 vs 721.950 ± 67.836 , 47.157 ± 9.582 vs 55.283 ± 11.580 , 92.700 ± 10.372 vs 107.600 ± 17.560 , all $P < 0.05$).

CONCLUSION: Bile reflux is a risk factor for gastric mucosa injury. Gastric mucosa atrophy is increased with bile reflux and decreased expression of ghrelin.

Key Words: Primary bile reflux gastritis; Ghrelin; *Helicobacter pylori*; Immunohistochemistry

Li LY, Wang Q, Xu L. Expression of ghrelin in gastric mucosa of patients with primary bile reflux gastritis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(35): 3993-3996

摘要

目的: 探讨原发性胆汁反流性胃炎患者胃黏膜ghrelin的表达变化。

方法: 选取我院2007-06/2007-11就诊的原发性十二指肠胃返流患者96例, 分为低反流组和高反流组, 同时选取胃镜检查大致正常, 没有胆汁反流者30例为对照组。免疫组化法检测胃黏膜ghrelin的表达。

结果: ghrelin在浅表性胃炎组、肠上皮化生组、不典型增生组和萎缩性胃炎组中的表达均低于正常对照组(653.822 ± 99.303 , 98.913 ± 14.079 , 65.875 ± 13.844 , 52.290 ± 11.463 vs 884.420 ± 126.362 , 均 $P < 0.05$)。浅表性胃炎组、萎缩性胃炎组和肠上皮化生组中的*H pylori*阳性组的ghrelin表达与*H pylori*阴性组比较均有显著性差异(599.320 ± 87.300 vs 721.950 ± 67.836 , 47.157 ± 9.582 vs 55.283 ± 11.580 , 92.700 ± 10.372 vs 107.600 ± 17.560 , 均 $P < 0.05$)。

结论: 胆汁反流是造成胃黏膜损伤的危险因素, 随着胆汁反流程度加重, 胃黏膜萎缩程度加重, ghrelin表达减少。

■背景资料

胆汁反流性胃炎是由于含有胆酸、溶血磷脂酰胆碱及胰液的十二指肠内容物反流入胃, 破坏胃黏膜屏障, 引起氢离子向胃上皮细胞内反渗, 造成胃黏膜慢性炎症、糜烂。发生于非手术胃的胆汁反流性胃炎, 称为原发性胆汁反流性胃炎。在20世纪70年代, 合成了几种新的刺激和增加生长素分泌波动变化, 而不依赖于生长素释放激素作用的肽类和非肽类衍生物。这些分子家族已被命名为生长素促泌物。随后发现了他们的天然受体, 生长素促泌物受体, 这意味着新的调节系统参与生长素分泌的调控。3年后, 生长激素促泌物受体的天然配体被发现并定义为ghrelin。

■同行评议者

戈之铮, 教授, 上海交通大学医学院附属仁济医院消化科

■研发前沿

ghrelin是一种内源性生长激素释放肽,近年来的研究已对其与消化系统的关系有了较为广泛的认识,而ghrelin的具体作用机制、调节方式、受体的种类及分布等问题还有待进一步阐明.这将为胃肠动力疾病如原发性胆汁反流性胃炎等的治疗开辟新的前景.

■相关报道

Tatsuguchi *et al*调查了61例*H pylori*阳性患者;22名*H pylori*阴性健康者作为对照.结果显示*H pylori*阳性患者的胃黏膜和血浆ghrelin含量均低于*H pylori*阴性者,差异有统计学显著性.*H pylori*根除后,胃组织ghrelin mRNA的表达明显增加,ghrelin水平亦显著提高,同时患者的食欲和体质量也相应增加.

关键词: 原发性胆汁反流性胃炎; Ghrelin; 幽门螺杆菌; 免疫组化法

李凌燕, 王青, 许琳. 原发性胆汁反流性胃炎胃黏膜ghrelin的表达. 世界华人消化杂志 2008; 16(35): 3993-3996
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3993.asp>

0 引言

十二指肠内容物反流入胃,引起的胃黏膜慢性炎症、糜烂,称胆汁反流性胃炎(bile reflux gastritis).胃-幽门-十二指肠协调运动失调被认为是原发性胆汁反流性胃炎的主要发病机制.ghrelin是近年来新发现的一种由28个氨基酸残基组成的脑肠肽激素,主要由胃底部黏膜分泌腺X/A细胞合成并分泌入血,表现出与胃动素类似的加速胃排空的作用.胆汁反流是否影响胃黏膜ghrelin的表达及幽门螺旋杆菌(*H pylori*)的感染目前文献报道较少,本文就原发性胆汁反流性胃炎与ghrelin的表达及*H pylori*三者的关系作一初步探讨.

1 材料和方法

1.1 材料 选取于我院2007-06/2007-11就诊的原发性十二指肠胃反流患者96例,男56例,女40例,年龄24-76(平均44.75±14.13)岁.纳入标准:具有上腹痛、腹胀、吐苦水、体质量下降、烧心、早饱、恶心等症状,且至少存在4 wk以上.胃镜检查具备以下4个特征:(1)胃黏膜,尤其是胃窦黏膜水肿、充血或脆性增加;(2)胃镜插至胃内静止不动1 min后,仍可见到DGR;(3)胃黏液湖有黄色或绿色胆汁染色;(4)胃黏膜有胆汁染色.且胃镜检查除外上消化道其他器质性病变,无胃肠道手术史,经超声、血液生化等检查除外其他器质性疾病.然后行便携式胆汁监测仪(Bilitec 2000)检测确诊为胆汁反流:胃内记录到胆红素吸收值≥0.25为胆汁反流.胆红素吸收值以0.25为界值时,取反流时间百分比的中位数(23.60%)作为分界将反流分为低反流组(反流时间百分比小于23.60%者)和高反流组(反流时间百分比大于23.60%者).选择胃镜检查大致正常,没有胆汁反流者30例做对照组,其中男16例,女14例,年龄28-72(平均48.33±14.69)岁.免疫组化广谱试剂盒, DAB显色剂均购自福州迈新生物技术开发公司.兔抗人ghrelin多克隆抗体购自英国剑桥科学园的Abcam公司.便携式胆汁监测仪(Bilitec 2000)由瑞典Medtronic Syntectics公司生产.病理图像分析采用德国生产的VIDAS计算机图像分

析系统.

1.2 方法

1.2.1 标本采集: 受试者行胃镜检查时活检取材,根据新悉尼系统取胃窦胃小弯处黏膜2块,深达黏膜肌层.活检标本经甲醛固定,行胃黏膜垂直包埋、切片,分别用于HE染色、AB-PAS染色和改良Giemsa染色.其中快速尿素酶实验阳性和改良Giemsa染色镜检找到*H pylori*同时成立作为*H pylori*阳性标准^[1].

1.2.2 免疫组织化学染色: 采用SP法,一抗浓度为2 mg/L. ghrelin阳性染色主要位于固有层腺体内,为棕黄色颗粒沉积,免疫组织化学结果定量判断标准:染色后先在光镜下做定性观察,然后于高倍镜下(×200)观察胃黏膜ghrelin阳性表达情况,并随机选取互不重叠的5个视野,用VIDAS计算机图像分析系统测定每个视野阳性染色的积分光吸光度(积分吸光度=染色强度×染色面积),取其平均值作为该切片胃黏膜ghrelin表达的定量指标.

统计学处理 应用SPSS11.5软件,对所得计数资料的阳性率的比较采用 χ^2 检验.计量资料数据均以mean±SD表示,多组资料间比较采用单因素方差分析,以 $P<0.05$ 作为差异有显著意义的检验标准.

2 结果

2.1 高反流组和低反流组胃黏膜萎缩、肠化生、不典型增生检出率的比较 低反流组与高反流组相比,其胃窦部黏膜萎缩检出率(29.2% vs 50.0%),肠上皮化生检出率(20.8% vs 45.8%),不典型增生检出率(4.2% vs 12.5%),高反流组胃窦部黏膜萎缩检出率和肠上皮化生检出率显著高于低反流组($P<0.05$),高反流组胃窦部黏膜不典型增生检出率与低反流组之间无显著性差异($P>0.05$,表1).

2.2 高反流组和低反流组*H pylori*感染的比较 高反流组感染*H pylori*的阳性率为37.5%,低于低反流组感染*H pylori*的阳性率62.5%,两组之间有显著性差异($P<0.05$).

2.3 ghrelin在正常对照组,浅表性胃炎组,萎缩性胃炎组,肠上皮化生组,不典型增生组的表达 浅表性胃炎组、肠上皮化生组、不典型增生组和萎缩性胃炎组的ghrelin积分吸光度均较正常对照组显著下降($P<0.05$).肠上皮化生组、不典型增生组和萎缩性胃炎组的ghrelin积分吸光度均较浅表性胃炎组明显降低($P<0.05$).不典型增生

表 1 高反流组和低反流组胃黏膜萎缩、肠化生、不典型增生比较 ($n = 48$, %)

分组	萎缩 检出率	肠上皮化生 检出率	不典型增生 检出率
低反流组	14(29.2)	10(20.8)	2(4.2)
高反流组	24(50.0) ^a	22(45.8) ^a	6(12.5)

^a $P < 0.05$ vs 低反流组.表 2 不同胃黏膜病变中ghrelin的表达 (mean \pm SD)

分组	n	ghrelin积分吸光度
正常对照组	30	884.420 \pm 126.362
浅表性胃炎组	18	653.822 \pm 99.303 ^a
肠上皮化生组	32	98.913 \pm 14.079 ^{ac}
不典型增生组	8	65.875 \pm 13.844 ^{ace}
萎缩性胃炎组	38	52.290 \pm 11.463 ^{aceg}

^a $P < 0.05$ vs 正常对照组; ^c $P < 0.05$ vs 浅表性胃炎组; ^e $P < 0.05$ vs 肠上皮化生组; ^g $P < 0.05$ vs 不典型增生组.

组和萎缩性胃炎组的ghrelin积分吸光度均较肠上皮化生组显著下降($P < 0.05$). 萎缩性胃炎组的ghrelin积分吸光度较不典型增生组亦有明显下降($P < 0.05$, 表2).

2.4 *H pylori*感染对胃黏膜不同病变中ghrelin表达的影响 浅表性胃炎组、萎缩性胃炎组和肠上皮化生组中, *H pylori*阳性组的ghrelin积分吸光度均较*H pylori*阴性组显著下降, 两组之间有显著性差异($P < 0.05$). 不典型增生组中*H pylori*阳性组与*H pylori*阴性组的ghrelin积分吸光度无明显差异($P > 0.05$, 表3). 可能为例数过少, 不足说明.

3 讨论

原发性胆汁反流性胃炎目前还没有明确的发病机制, 胆汁反流、*H pylori*感染是胃黏膜损伤的重要致病因素. 胆汁反流在胃良性或恶性病变中所起的作用越来越受到重视, 他与非酸反流不是同一概念^[1]. 探讨胆汁反流严重程度、*H pylori*感染和胃黏膜病理组织学之间的关系是目前特别受关注的课题, 此方面的研究有所报道^[2].

本研究发现, 高反流组胃窦部黏膜萎缩检出率和肠上皮化生检出率显著高于低反流组, 过多的胆汁反流都与胃窦黏膜损伤相关, 随着胆汁反流程度加重, 胃窦部黏膜损伤程度加重. 国外学者报道, 存在胃黏膜肠上皮化生的患者其胃内总

表 3 *H pylori*感染对胃黏膜病变中ghrelin表达的影响 (mean \pm SD)

分组	n	<i>H pylori</i>	n	ghrelin积分吸光度
浅表性胃炎组	18	阳性	10	599.320 \pm 87.300 ^a
		阴性	8	721.950 \pm 67.836
萎缩性胃炎组	38	阳性	14	47.157 \pm 9.582 ^a
		阴性	24	55.283 \pm 11.580
肠上皮化生组	32	阳性	20	92.700 \pm 10.372 ^a
		阴性	12	107.600 \pm 17.560
不典型增生组	8	阳性	4	64.350 \pm 16.454
		阴性	4	67.400 \pm 13.048

^a $P < 0.05$ vs 同组*H pylori*阴性.

胆酸的浓度显著高于无肠上皮化生者^[3].

*H pylori*是慢性胃炎重要的致病因素之一, *H pylori*与胆汁反流的关系目前还存在争议, 体外研究已经证明, 胆汁中的胆汁酸对*H pylori*的生长有抑制作用^[4-5], 通常认为大量的胆汁反流可使*H pylori*的生存环境丧失, 因而胆汁反流的反流量与*H pylori*感染呈反比^[6]. 一些学者研究发现, 部分胃切除术后反流性胃炎患者中*H pylori*的感染率较高^[7-8], Kawai *et al*^[9]报道反流性胃炎患者*H pylori*感染率减低. 但有研究显示, 胆汁反流可与*H pylori*感染并存, 而胆汁不会影响*H pylori*定植^[10]. 本研究中高反流组*H pylori*感染率显著低于低反流组, 说明胆汁反流可能抑制胃内*H pylori*的生长. 并且随着胆汁反流程度的增加, 这种抑制作用也随着增加. *H pylori*在高浓度的胆汁酸作用下, 其外形由原来的杆状变成表面带有气泡的球状, 最后浓缩呈团块状而失去活性. 因此, 在原发性胆汁反流性胃炎患者中*H pylori*感染率较低.

ghrelin是由28个氨基酸组成的小分子多肽, 由胃黏膜内分泌细胞(主要为x/A样细胞)分泌, 在小肠、肾脏、下丘脑、胰腺、心脏、卵巢及胎盘等处有少量分泌, 通过内分泌或旁分泌形式作用于受体, 在局部发挥作用. ghrelin的生物学作用十分广泛, 可调节GH、催乳素、肾上腺素等多种激素释放, 维持体内激素平衡; 促进摄食, 减少脂肪利用, 影响能量代谢; 调节血流动力, 降低平均动脉压, 增加心脏指数和心搏出量; 调节胃动力和胃酸分泌, 发挥胃黏膜保护作用; 抑制肿瘤细胞增殖; 对肝脏甲状腺和肾脏的功能亦有一定的调节作用^[11]. 本研究发现, 胆汁反流患者的胃黏膜ghrelin的表达较正常对照组减少, 从浅表性胃炎、肠上皮化生到不典型

■创新盘点

本文将胆汁反流性胃炎分为高低反流两个组别进行对比研究, 然后按内镜下病理改变进行分组, 并研究其ghrelin的表达及其与*H pylori*感染的关系.

■应用要点

本文初步探讨了原发性胆汁反流性胃炎与ghrelin的表达及*H pylori*三者的关系, 在临床与基础结合的基础上, 对原发性胆汁反流性胃炎的诊断及治疗提供了新的思路.

■名词解释

ghrelin: 1999年 Kojima *et al*发现的第一个生长激素促分泌(GHSs)受体的内源性配体,是由28个氨基酸组成的小分子多肽,结构不同于其他合成的GHSs. 他的序列为GSSFLSPEQKAQQKESKPPAKLQPR,第3位丝氨酸上有酰化基团,该基团对于其生理活性很重要. 具有调节GH分泌、摄食、能量代谢、内分泌、记忆、睡眠、胃肠功能等多种生物学作用,已引起人们广泛的关注,成为近年来的研究热点.

增生、萎缩性胃炎中ghrelin表达呈下降趋势,各组之间差异均有显著性. Osawa *et al*^[12]报道一个160例患者的*H pylori*感染对ghrelin影响的对照研究,结果*H pylori*阳性患者ghrelin转录水平和血清浓度均较*H pylori*阴性患者下降,并且与萎缩程度相关. 但是,此实验所选择的患者中包括消化性溃疡、息肉和胃癌的患者,其中单纯慢性胃炎患者仅23例,总体*H pylori*阳性患者的ghrelin水平下降是*H pylori*感染的原因,还是因为胃黏膜萎缩或其他原因(如肿瘤)所造成,未能明确. Nwokolo *et al*^[13]报道,10例无症状*H pylori*阳性志愿者根治*H pylori*后,血清ghrelin水平明显升高. 但此实验样本量较小,并且受试者均为无症状的志愿者,与慢性胃炎患者结果是否一致待研究. Tatsuguchi *et al*^[14]研究发现独立于胃黏膜萎缩等因素,*H pylori*感染对ghrelin的表达呈负面影响. 本研究显示,在浅表性胃炎组、萎缩性胃炎组和肠上皮化生组中,*H pylori*感染组的ghrelin表达均较*H pylori*阴性组明显下降,推测*H pylori*所致的萎缩性胃炎使胃产生ghrelin的功能受损,导致ghrelin表达下降. 在不典型增生组无明显差异,可能与胃黏膜萎缩程度、幽门螺杆菌致病力、取材部位等因素有关,其具体机制有待进一步研究.

总之,胆汁反流是造成胃黏膜损伤的危险因素,胆汁反流可能导致肠上皮化生,随着胆汁反流程度加重,胃黏膜损伤程度加重. 胆汁反流可能抑制胃内*H pylori*的生长,并且随着胆汁反流程度的增加,这种抑制作用也随着增加. ghrelin随着胃黏膜萎缩程度的加重,表达逐渐减少,而感染*H pylori*后,表达亦减少,即胃黏膜ghrelin的表达可能与*H pylori*感染呈负相关,有待进一步探讨研究.

■同行评价

本文总体设计合理,文字表达清晰流畅,学术价值较好.

4 参考文献

- 1 Pace F, Sangaletti O, Pallotta S, Molteni P, Porro GB. Biliary reflux and non-acid reflux are two distinct phenomena: a comparison between 24-hour

- multichannel intraesophageal impedance and bilirubin monitoring. *Scand J Gastroenterol* 2007; 42: 1031-1039
- 2 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
- 3 Nakamura M, Haruma K, Kamada T, Mihara M, Yoshihara M, Imagawa M, Kajiyama G. Duodenogastric reflux is associated with antral metaplastic gastritis. *Gastrointest Endosc* 2001; 53: 53-59
- 4 Han SW, Evans DG, el-Zaatari FA, Go MF, Graham DY. The interaction of pH, bile, and *Helicobacter pylori* may explain duodenal ulcer. *Am J Gastroenterol* 1996; 91: 1135-1137
- 5 Itoh M, Wada K, Tan S, Kitano Y, Kai J, Makino I. Antibacterial action of bile acids against *Helicobacter pylori* and changes in its ultrastructural morphology: effect of unconjugated dihydroxy bile acid. *J Gastroenterol* 1999; 34: 571-576
- 6 O'Connor HJ, Dixon MF, Wyatt JL, Axon AT, Ward DC, Dewar EP, Johnston D. Effect of duodenal ulcer surgery and enterogastric reflux on *Campylobacter pyloridis*. *Lancet* 1986; 2: 1178-1181
- 7 Nagahata Y, Azumi Y, Numata N, Yano M, Akimoto T, Saitoh Y. *Helicobacter pylori* may cause "reflux" gastritis after gastrectomy. *J Gastrointest Surg* 1997; 1: 479-486
- 8 Charitopoulos NC, Karkanas GG, Dimitraki TV, Papadimitriou C, Golematas BC. Postoperative alkaline reflux gastritis following vagotomy. *Hepatogastroenterology* 1994; 41: 542-545
- 9 Kawai Y, Tazuma S, Inoue M. Bile acid reflux and possible inhibition of *Helicobacter pylori* infection in subjects without gastric surgery. *Dig Dis Sci* 2001; 46: 1779-1783
- 10 饶正伟, 姚芳, 冯远碧, 冯刚, 王克兵. 幽门螺杆菌与胆汁反流性胃炎关系的探讨. *临床消化病杂志* 2005; 17: 179-181
- 11 Katergeri SA, Milousis A, Pagonopoulou O, Asimakopoulos B, Nikolettos NK. ghrelin in pathological conditions. *Endocr J* 2008; 55: 439-453
- 12 Osawa H, Nakazato M, Date Y, Kita H, Ohnishi H, Ueno H, Shiya T, Satoh K, Ishino Y, Sugano K. Impaired production of gastric ghrelin in chronic gastritis associated with *Helicobacter pylori*. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 10-16
- 13 Nwokolo CU, Freshwater DA, O'Hare P, Randeva HS. Plasma ghrelin following cure of *Helicobacter pylori*. *Gut* 2003; 52: 637-640
- 14 Tatsuguchi A, Miyake K, Gudis K, Futagami S, Tsukui T, Wada K, Kishida T, Fukuda Y, Sugisaki Y, Sakamoto C. Effect of *Helicobacter pylori* infection on ghrelin expression in human gastric mucosa. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 2121-2127

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

周剂量紫杉醇联合奥沙利铂二线治疗晚期胃癌23例

伍小平, 庄英帆, 姜浩, 伍尤华, 戴文香, 艾小红, 唐三元

伍小平, 庄英帆, 姜浩, 伍尤华, 戴文香, 艾小红, 唐三元, 南华大学附属第一医院肿瘤内科 湖南省衡阳市 421001

作者贡献分布: 伍小平对此文作出主要贡献; 此课题由伍小平, 庄英帆及姜浩设计; 研究过程由伍小平, 伍尤华, 戴文香及艾小红操作完成; 研究所用病例由伍小平, 艾小红及唐三元提供; 数据分析与论文写作由伍小平完成。

通讯作者: 伍小平, 421001, 湖南省衡阳市船山路69号, 南华大学附属第一医院肿瘤内科. wxp19730806@sina.com

电话: 0734-8279059

收稿日期: 2008-10-28 修回日期: 2008-11-25

接受日期: 2008-12-01 在线出版日期: 2008-12-18

Therapy of paclitaxel plus oxaliplatin as a second-line chemotherapy for patients with advanced gastric cancer: an analysis of 23 cases

Xiao-Ping Wu, Ying-Zhi Zhuang, Hao Jiang, You-Hua Wu, Wen-Xiang Dai, Xiao-Hong Ai, San-Yuan Tang

Xiao-Ping Wu, Ying-Zhi Zhuang, Hao Jiang, You-Hua Wu, Wen-Xiang Dai, Xiao-Hong Ai, San-Yuan Tang, Department of Oncology, the First Affiliated Hospital of Nanhua University, Hengyang 421001, Hunan Province, China
Correspondence to: Xiao-Ping Wu, Department of Oncology, the First Affiliated Hospital of Nanhua University, 69 Chuanshan Road, Hengyang 421001, Hunan Province, China. wxp19730806@sina.com

Received: 2008-10-28 Revised: 2008-11-25

Accepted: 2008-12-01 Published online: 2008-12-18

Abstract

AIM: To evaluate the efficacy and adverse effects of paclitaxel combined with oxaliplatin as a second-line chemotherapy for patients with advanced gastric cancer.

METHODS: Twenty-three cases with advanced gastric cancer who failed first-line therapy received paclitaxel combined with oxaliplatin chemotherapy from July first, 2006 to January 31, 2008. Paclitaxel (70 mg/m²) was administered by intravenous drip for 1 h on the first, eighth, fifteenth day; oxaliplatin 100 mg/m² was administered by intravenous drip for 2 h on the second day. Each treatment cycle included 28 days. Each patient was treated for more than two circles and evaluated four weeks later.

RESULTS: Of the 23 patients, none showed com-

plete remission (CR), 8 (34.8%) showed partial remission (PR), 8 (34.8%) showed stable disease (SD) and 7 (30.4%) showed progressive disease (PD). The overall response rate was 34.8% with a 95%CI (range: 16%-57%); and 16 patients (69.6%) benefited (CR+PR+SD) from the clinical therapy with a 95%CI (range: 47%-87%). The mean time to tumor progression (TTP) was 3.93 ± 1.47 months. The main side effects were alopecia, myelosuppression and peripheral neuropathy.

CONCLUSION: The regimen of paclitaxel plus oxaliplatin has a definite effect with acceptable toxicity for patients with advanced gastric cancer.

Key Words: Advanced gastric cancer; Paclitaxel; Oxaliplatin; Second line chemotherapy

Wu XP, Zhuang YZ, Jiang H, Wu YH, Dai WX, Ai XH, Tang SY. Therapy of paclitaxel plus oxaliplatin as a second-line chemotherapy for patients with advanced gastric cancer: an analysis of 23 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(35): 3997-3999

摘要

目的: 观察周剂量紫杉醇联合奥沙利铂二线治疗晚期胃癌的疗效和不良反应。

方法: 收集2006-07-01/2008-01-31我科以周剂量紫杉醇联合奥沙利铂治疗一线化疗失败的晚期胃癌患者23例, 给予紫杉醇70 mg/m², 静脉滴注1 h, 第1、8、15天; 奥沙利铂100 mg/m², 静脉滴注2 h, 第2天, 每28天为1个周期。每例患者治疗至少2个周期, 2个周期化疗完成后4 wk评价疗效。

结果: 在可评价疗效的23例患者中, 完全缓解(CR)0例, 部分缓解(PR)8例(34.8%), 疾病稳定(SD)8例(34.8%), 疾病进展(PD)7例(30.4%); 总有效率(CR+PR)34.8%, 95%CI为16%-57%; 临床获益者(CR+PR+SD)共16例(69.6%), 95%CI为47%-87%。平均肿瘤进展时间(TTP)为3.93 ± 1.47 mo。不良反应主要为脱发、骨髓抑制和外周神经毒性。

结论: 周剂量紫杉醇联合奥沙利铂二线治疗晚期胃癌疗效好, 不良反应可耐受。

■背景资料

在我国, 胃癌是最常见的恶性肿瘤之一, 胃癌的粗死亡率为25.2/10万, 占全部恶性肿瘤死亡的23.2%, 其死亡率仅低于肺癌, 居各种恶性肿瘤的第2位。晚期胃癌的治疗是以期达到延长生存期, 提高生活质量的姑息治疗为目的。化疗治疗晚期胃癌较最好支持治疗无论是延长生存期还是提高生活质量都有显著优势。

■同行评议者

黄颖秋, 教授, 本溪钢铁(集团)有限责任公司总医院消化内科

■研发前沿

胃癌是相对化疗敏感的恶性肿瘤,晚期胃癌患者化疗完全缓解率很低,有效持续时间和肿瘤进展时间都很短。时至今日,胃癌治疗依然没有所谓的“金标准”一线/二线化疗方案。所以几乎所有的晚期胃癌患者经过一线化疗后疾病都会进展,需要二线方案行挽救性治疗。

■相关报道

晚期胃癌患者从二线方案的治疗中获益程度如何到目前还没有定论,进入新世纪多种新药(如紫杉类、奥沙利铂、伊立替康及卡培他滨等)组成二线方案来治疗晚期胃癌,取得了一定的疗效,并能改善患者的生活质量。

关键词: 晚期胃癌; 紫杉醇; 奥沙利铂; 二线化疗

伍小平, 庄英帆, 姜浩, 伍尤华, 戴文香, 艾小红, 唐三元. 周剂量紫杉醇联合奥沙利铂二线治疗晚期胃癌23例. 世界华人消化杂志 2008; 16(35): 3997-3999

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3997.asp>

0 引言

在我国,胃癌是最常见的恶性肿瘤之一,胃癌的粗死亡率为25.2/10万,占全部恶性肿瘤死亡的23.2%,其死亡率仅低于肺癌,居各种恶性肿瘤的第2位^[1]。2006-07-01/2008-01-31我科以周剂量紫杉醇联合奥沙利铂治疗一线化疗失败的晚期胃癌患者23例,现报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料 本组23例患者中,男15例,女8例,年龄38-64(中位年龄52)岁。13例因有远处转移未行手术治疗,10例为手术后复发转移,所有患者均通过胃镜或手术活检取得病理确诊,所有患者的病灶均可通过测量评价疗效,预计生存期超过3 mo,所有患者都经过一线化疗治疗后疾病进展,使用过的一线化疗方案有ECF、PF、FOLFOX等,血常规、心脏、肝肾功能均正常, Karnofsky评分 ≥ 60 分。

1.2 方法 紫杉醇70 mg/m²,静脉滴注1 h,第1、8、15天;奥沙利铂100 mg/m²,静脉滴注2 h,第2天,每28天为1个周期,每例患者治疗至少2个周期,2个周期化疗完成后4 wk评价疗效,每个周期化疗前后复查血常规、心电图、肝肾功能。23例患者共接受104个周期化疗,每例患者平均疗程数为4.5个周期。疗效评定根据WHO关于实体瘤的客观疗效评定标准分为:完全缓解(CR),部分缓解(PR),疾病稳定(SD),疾病进展(PD)。有效率(RR)为CR+PR病例数占可评价疗效病例数的百分数。不良反应按WHO关于抗癌药物常见毒副作用分级标准分为0-IV度。采用电话随访,最后随访时间2008-06-30,本组病例失访率为0。

统计学处理 数据分析利用SPSS11.0统计软件包进行处理,计算有效率及临床获益率的95%可信区间及平均肿瘤进展时间(TTP)。

2 结果

2.1 临床疗效 在可评价疗效的该组23例患者中,CR 0例,PR 8例(34.8%),SD 8例(34.8%),PD 7例(30.4%),总有效率(CR+PR)34.8%,其95%可信区间为16%-57%;临床获益者(CR+PR+SD)共16例,

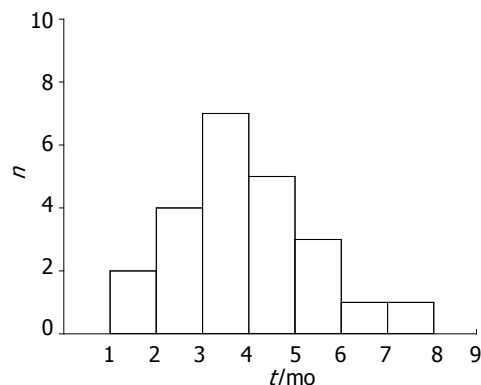


图1 紫杉醇联合奥沙利铂二线治疗23例晚期胃癌的TTP。

占69.6%,其95%可信区间为47%-87%。周剂量紫杉醇联合奥沙利铂二线治疗23例晚期胃癌患者的TTP见图1。平均肿瘤进展时间(TTP)为3.93 \pm 1.47 mo。

2.2 不良反应 本组患者化疗不良反应见表1:不良反应以脱发、骨髓抑制、外周神经毒性为主,III-IV度不良反应少,患者的化疗耐受性好。

3 讨论

目前我国胃癌的防治现状是“三低一高”,即早期诊断率低,手术切除率低,5年生存率低,根治术后复发转移率高^[2]。我国的胃癌患者在确诊时大多数已存在不同程度的转移,使术后很快复发或根本失去手术机会,晚期胃癌的治疗是以期达到延长生存期,提高生活质量的姑息治疗为目的,化疗治疗晚期胃癌较最佳支持治疗无论是延长生存期还是提高生活质量都有显著优势^[3]。然而胃癌是相对化疗敏感的恶性肿瘤,晚期胃癌患者化疗完全缓解率很低,有效持续时间和肿瘤进展时间都很短。时至今日,胃癌治疗依然没有所谓的“金标准”一线/二线化疗方案^[4]。所以几乎所有的晚期胃癌患者经过一线化疗后疾病都会进展,需要二线方案行挽救性治疗。

晚期胃癌患者从二线或挽救性方案的治疗中获益程度如何到目前还没有定论,进入新世纪多种新药(如紫杉类、奥沙利铂、伊立替康及卡培他滨等)组成二线方案来治疗晚期胃癌,取得了一定的疗效^[5,8-12],并能改善患者的生活质量^[6]。

紫杉醇是一种新型抗微管药,通过促进微管蛋白装配成微管,并抑制其解聚,从而影响细胞的有丝分裂和增殖,其主要毒副作用为骨髓抑制及脱发,其他副作用较弱,每周使用可使紫杉醇的骨髓抑制减弱,患者的耐受性增强,且每周使用较3周使用疗效增加^[7],对胃癌的二线治

表 1 周剂量紫杉醇联合奥沙利铂二线治疗23例晚期胃癌的不良反应

不良反应	0	I	II	III	IV	总发生率(%)	III-IV度发生率(%)
脱发	2	5	8	6	2	91.3	34.8
骨髓抑制	5	5	6	4	3	78.3	30.4
外周神经毒性	11	4	5	3	0	52.1	13.0
黏膜炎	17	4	1	1	0	26.0	4.3
肌肉关节痛	15	4	3	1	0	34.8	4.3
肝功能异常	21	2	0	0	0	8.7	0.0

疗可取得较好的疗效^[8-10]。奥沙利铂是第三代的铂类化合物,其剂量限制性毒性为周围神经毒性,胃肠道反应及骨髓抑制较小,且挽救治疗晚期胃癌有一定效果^[11-12]。而晚期胃癌尤其是一线治疗后失败的患者,一般情况欠佳,消化功能差,化疗的耐受性差,所以我们在对晚期胃癌的患者进行二线或挽救性治疗时,在追求疗效的同时要充分考虑到治疗的毒副作用和患者的耐受性。本组细胞周期特异性药物周剂量的紫杉醇联合相对较小剂量细胞周期非特异性药物奥沙利铂的方案,充分考虑到组织联合化疗的原则(单药有效,副作用不叠加,作用机制不同等)、晚期胃癌患者体质特点、姑息性化疗的目的及28 d一周期有利患者血象/体能恢复。所以本方案有充分的理论依据,考虑全面,其较好的疗效得到本组临床观察的支持,且本方案不良反应小,患者的耐受性好。

我科临床观察周剂量紫杉醇联合奥沙利铂二线治疗晚期胃癌,总有效率(CR+PR)34.8%,95%可信区间为(16%-57%);临床获益者(CR+PR+SD)共16例,占69.6%,95%可信区间为(47%-87%);二线治疗开始后的平均肿瘤进展时间(TTP)为 3.93 ± 1.47 mo。化疗的疗效好,化疗后晚期胃癌患者的生活质量得到提高,且不良方应小,不良反应有脱发和骨髓抑制、外周神经毒性、黏膜炎、肌肉关节痛、肝功能异常等,尤其是患者难以耐受的III/IV度不良反应发生率(主要为脱发、骨髓抑制和外周神经毒性,发生率>10%),无粒缺性发热的发生,经升血治疗后不影响下一周期化疗的进行。少数患者经以上治疗进展后采用了三线化疗(含伊立替康、卡培他滨等),故本组患者未观察生存期。

总之,周剂量紫杉醇联合奥沙利铂方案二线治疗晚期胃癌疗效好,不良反应小,患者对治疗耐受性好,很好地达到晚期胃癌姑息治疗的目的,值得临床推广。

4 参考文献

- 1 孙秀娣, 牧人, 周有尚, 戴旭东, 乔友林, 张思维, 皇普小梅, 孙杰, 李连弟, 鲁凤珠. 中国1990-1992年胃癌死亡调查分析. 中华肿瘤杂志 2002; 24: 4-8
- 2 金懋林. 胃癌内科化学治疗的新进展. 医学临床研究 2003; 20: 735-738
- 3 Casaretto L, Sousa PL, Mari JJ. Chemotherapy versus support cancer treatment in advanced gastric cancer: a meta-analysis. *Braz J Med Biol Res* 2006; 39: 431-440
- 4 储大同. 当代肿瘤内科治疗方案评价. 第2版. 北京: 北京大学医学出版社, 2004: 83
- 5 Ueda S, Hironaka S, Boku N, Fukutomi A, Yoshino T, Onozawa Y. Combination chemotherapy with irinotecan and cisplatin in pretreated patients with unresectable or recurrent gastric cancer. *Gastric Cancer* 2006; 9: 203-207
- 6 Park SH, Lee WK, Chung M, Bang SM, Cho EK, Lee JH, Shin DB. Quality of life in patients with advanced gastric cancer treated with second-line chemotherapy. *Cancer Chemother Pharmacol* 2006; 57: 289-294
- 7 Sparano JA, Wang M, Martino S, Jones V, Perez EA, Saphner T, Wolff AC, Sledge GW Jr, Wood WC, Davidson NE. Weekly paclitaxel in the adjuvant treatment of breast cancer. *N Engl J Med* 2008; 358: 1663-1671
- 8 Ito S, Kodaera Y, Mochizuki Y, Yamamura Y. [Feasibility study of weekly paclitaxel as second-line chemotherapy against 5-FU-refractory gastric carcinoma] *Gan To Kagaku Ryoho* 2005; 32: 1427-1430
- 9 Hironaka S, Zenda S, Boku N, Fukutomi A, Yoshino T, Onozawa Y. Weekly paclitaxel as second-line chemotherapy for advanced or recurrent gastric cancer. *Gastric Cancer* 2006; 9: 14-18
- 10 Kodaera Y, Ito S, Mochizuki Y, Fujitake S, Koshikawa K, Kanyama Y, Matsui T, Kojima H, Takase T, Ohashi N, Fujiwara M, Sakamoto J, Akimasa N. A phase II study of weekly paclitaxel as second-line chemotherapy for advanced gastric Cancer (CCOG0302 study). *Anticancer Res* 2007; 27: 2667-2671
- 11 Qian J, Qin SK, Mei JF, Chen YX, Shao ZJ, He ZM. [Oxaliplatin plus capecitabine as a second line chemotherapy for patients with advanced gastric cancer] *Zhonghua Zhongliu Zazhi* 2004; 26: 746-748
- 12 Jeong J, Jeung HC, Rha SY, Im CK, Shin SJ, Ahn JB, Noh SH, Roh JK, Chung HC. Phase II study of combination chemotherapy of 5-fluorouracil, low-dose leucovorin, and oxaliplatin (FLOX regimen) in pretreated advanced gastric cancer. *Ann Oncol* 2008; 19: 1135-1140

■应用要点

经过一线治疗失败的晚期胃癌患者具有体能状况较差、消化功能差、耐受性差等体质特点,而本方案毒副作用小,应用起来简易方便,近期及远期疗效好,值得临床推广使用。

■同行评价

本文对晚期胃癌的二线化疗方案进行了有益的尝试,对临床工作有一定参考价值,若增加临床观察样本将更有意义。

编辑 史景红 电编 何基才

血浆置换治疗重型肝炎42例

张利, 蒋红樱, 罗志航, 李品贵, 张安妮, 李素琴

■背景资料

重型肝炎能导致低血压、腹水、电解质紊乱、肝性脑病、肝昏迷、肝肾综合征等各种并发症, 严重威胁患者生命。内科治疗效果不佳。非生物型人工肝支持系统是近年来抢救治疗重型肝炎、肝衰竭的有效治疗手段, 其中的血浆置换疗法应用最为广泛。

张利, 蒋红樱, 李品贵, 张安妮, 李素琴, 昆明医学院第二附属医院肾内科 云南省昆明市 650101
罗志航, 昆明医学院第二附属医院核医学科 云南省昆明市 650101

云南省教育厅科学研究基金资助项目, No. 06Z170C

作者贡献分布: 本实验设计张利由完成; 收集整理病例由蒋红樱与罗志航完成; 数据分析由李品贵与张安妮完成; 论文写作张利与李素琴完成。

通讯作者: 张利, 650101, 云南省昆明市, 昆明医学院第二附属医院肾内科。zhangli0921@yahoo.com.cn

电话: 0871-5351281-2278

收稿日期: 2008-11-17 修回日期: 2008-12-06

接受日期: 2008-12-08 在线出版日期: 2008-12-18

Plasma replacement therapy for severe viral hepatitis: an analysis of 42 cases

Li Zhang, Hong-Ying Jiang, Zhi-Hang Luo, Pin-Gui Li, An-Ni Zhang, Su-Qin Li

Li Zhang, Hong-Ying Jiang, Pin-Gui Li, An-Ni Zhang, Su-Qin Li, Department of Nephrology, the Second Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650101, Yunnan Province, China

Zhi-Hang Luo, Department of Nuclear Medicine, the Second Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650101, Yunnan Province, China

Supported by: Scientific Research Projects of Yunnan Provincial Educational Bureau, No. 06Z170C

Correspondence to: Li Zhang, Department of Nephrology, the Second Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650101, Yunnan Province, China. zhangli0921@yahoo.com.cn

Received: 2008-11-17 Revised: 2008-12-06

Accepted: 2008-12-08 Published online: 2008-12-18

Abstract

AIM: To explore the clinical efficacy and side effects of plasma replacement therapy for severe viral hepatitis.

METHODS: Forty-two cases of severe hepatitis patients were enrolled who were not responsive to medication therapy. Clinical symptoms and signs, liver and kidney function, electrolytes and coagulation of patients were observed for the first three times before and after treatment.

RESULTS: Clinical symptoms, signs and liver function improved significantly after treatment with plasma replacement. Compared with pre-

treatment, ALB and CHE after treatment increased significantly, but ALT, AST, ALP, GGT, TBA and TBIL decreased significantly. There was a significance difference in ammonia level between the third time and pre-treatment (49.00 ± 12.03 vs 69.96 ± 34.87 , $P < 0.05$). There were no significant differences in blood electrolyte change, coagulation and kidney function between post-treatment and pre-treatment.

CONCLUSION: Plasma replacement therapy remove toxins of hepatitis patients, supply biologically active substances in patients with liver dysfunction, improve the local environment and liver function, prevent complications, decrease mortality and improve the prognosis.

Key Words: Plasma exchange; Severe viral hepatitis; Liver and kidney function; Electrolytes

Zhang L, Jiang HY, Luo ZH, Li PG, Zhang AN, Li SQ. Plasma replacement therapy for severe viral hepatitis: an analysis of 42 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(35): 4000-4003

摘要

目的: 探讨应用血浆置换治疗重型肝炎的临床疗效及不良反应。

方法: 我院住院的重型肝炎患者42例, 在内科治疗效果不佳时, 给予血浆置换治疗。观察患者三次治疗前后的临床症状、体征和肝肾功能、电解质、凝血功能的变化。

结果: 42例患者经血浆置换治疗后, 临床症状及体征均有明显改善, 肝功能有明显好转。三次治疗后与治疗前相比, ALB、CHE显著升高, 而ALT、AST、ALP、GGT、TBA、TBIL明显下降, 均有显著性差异, 血NH₃第3次和第1次治疗前比较明显下降, 有显著性差异 (49.00 ± 12.03 vs 69.96 ± 34.87 , $P < 0.05$), 血电解质变化不大, 凝血功能有所改善, 肾功能有轻微下降, 但均无显著性差异。

结论: 应用血浆置换治疗重症肝炎, 可以广泛迅速地清除肝衰竭患者体内的多种毒素, 同时

■同行评议者

刘绍能, 主任医师, 中国中医科学院广安门医院消化科

补充肝功能不全患者所缺乏的多种生物活性物质, 改善机体内环境和肝功能, 防治并发症, 降低病死率, 改善预后。

关键词: 血浆置换; 重症肝炎; 肝肾功能; 电解质

张利, 蒋红樱, 罗志航, 李品贵, 张安妮, 李素琴. 血浆置换治疗重型肝炎42例. 世界华人消化杂志 2008; 16(35): 4000-4003
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/4000.asp>

0 引言

重症肝炎是由不同病因所导致的肝细胞大量坏死, 肝功能急剧恶化至衰竭的临床症候群, 病死率高, 而内科治疗效果不佳. 非生物型人工肝支持系统是近年来抢救治疗重型肝炎、肝衰竭的有效治疗手段, 其中的血浆置换疗法应用最为广泛^[1]. 我们在临床中应用血浆置换疗法治疗重症肝炎42例, 取得较好疗效, 报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料 选择2007-01/2008-06住我院治疗的重型肝炎患者42例, 男31例, 女11例. 年龄 44.70 ± 11.70 岁. 病因: 乙型肝炎17例, 戊型肝炎2例, 原发性胆汁性肝硬化6例, 酒精性肝病5例, 药物性肝损伤5例, 原因不明7例. 所有病例诊断均符合2000年西安全国传染病与寄生虫和肝病学术会议修改的标准. 按临床分型慢性重型肝炎36例, 亚急性重型肝炎6例. 慢性重型肝炎分期: 早期5例, 中期4例, 晚期27例. 治疗前所有患者均出现恶心、乏力、纳差、巩膜及全身皮肤重度黄染. 其中合并低血压4例, 出现双下肢浮肿3例, 腹水征阳性20例, 皮肤瘀斑5例、肝性脑病3例, 肝昏迷1例。

1.2 方法 所有患者均给予保肝、退黄、营养支持及对症处理, 纠正水电解质平衡紊乱等内科综合治疗, 经上述治疗病情无明显好转时给予血浆置换治疗. 采用治疗前后自身对照的方法进行观察. 机器为B-BraunCRRT机血浆置换模式, 费森尤斯Psu2S血浆分离器, 穿刺股静脉留置双腔导管建立血管通路. 置换液为新鲜冰冻血浆和林格氏液, 胶体与晶体比例为1:1-1:1.5, 每次置换液量2000-4500 mL, 平均3250 mL. 每例患者根据病情治疗1-5次. 治疗前常规给予地塞米松5-10 mg预防过敏反应, 并在治疗前和治疗中常规给予10%葡萄糖酸钙10-40 mL预防低血钙发生. 根据病情及凝血功能分别给予肝素或低分子肝素抗凝, 对有高度出血倾向

者用无肝素治疗, 合并低钠血症者给予高渗氯化钠10-20 mL. 血流量100-200 mL/min, 血浆分离速度20-30 mL/min, 平均治疗时间1.5-3 h. 开始治疗连续做2 d, 1 d/次, 以后间隔1-5 d重复治疗. 42例患者共行116次血浆置换治疗, 平均每人治疗2.8次。

观察记录患者治疗前后的临床症状和体征的变化及治疗过程中发生的不良反应, 并在治疗前后采血化验肝功能, 如血清总蛋白(TP)、血清白蛋白(ALB)、血清前白蛋白(PA)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)、 γ -谷氨酰基转移酶(GGT)、胆碱酯酶(CHE)、总胆汁酸(TBA)、总胆红素(TBIL); 血氨(NH₃); 血尿素氮(Bun)、血肌酐(Scr); 电解质, 如血钾(K⁺)、血钠(Na⁺)、血氯(Cl⁻)、血钙(Ca²⁺)、凝血酶原时间(PT)、活化部分凝血活酶时间(APTT)等指标, 观察其发生的变化。

统计学处理 使用SPSS12.0统计软件包, 数据处理均采用mean \pm SD. 计量资料组间比较采用F检验, 治疗前后对照用自身配对t检验, 计数资料采用卡方检验。

2 结果

2.1 治疗前后临床症状体征变化及转归 42例患者中有38例在治疗后一般情况明显好转, 腹胀、乏力、恶心减轻或消失, 食欲改善, 精神好转, 双眼巩膜和全身皮肤黄染明显减轻或消失; 有3例患者临床症状改善不明显. 3例肝性脑病患者治疗后意识有好转; 1例患者治疗前有肝昏迷, 治疗后未见明显好转. 其中的5例药物性肝损伤患者中有4例经治疗后病情明显好转, 肝功能化验指标接近正常后出院; 25例患者治疗后病情好转出院. 自动放弃治疗6例中, 1例为为药物性肝损伤, 5例为慢性重肝晚期. 死亡7例中, 1例为亚急性重肝, 6例为慢性重肝晚期。

2.2 治疗前后各项化验指标变化 ALB、CHE在每次治疗前与治疗后相比明显升高, 有显著性差异($P < 0.05$); ALT、AST、ALP、GGT、TBA、TBIL在每次治疗前与治疗后相比明显下降, 有显著性差异($P < 0.05$); 血NH₃在每次治疗前后相比有显著性差异($P < 0.05$). 电解质治疗前后变化均不大, 无显著性差异. 凝血功能有所改善, 但无显著性差异. 肾功能在每次治疗前后相比有所下降, 但无显著性差异. ALB、CHE第2、3

■ 相关报道

Clemmesen *et al*表明血浆置换能有效改善肝衰竭患者的血清生物化学指标和临床症状; Sadahiro *et al*报道应用血浆置换治疗易出现低钠血症、低钙血症等电解质紊乱; Blei *et al*研究尽早对慢性重型肝炎晚期患者行人工肝支持治疗可以部分缓解病情, 防治并发症, 尽量延长存活时间。

■创新盘点

本文同之前大量关于血浆置换治疗重型肝炎的报道的不同点是对多次治疗前后进行了详尽的分析,除了对肝肾功能指标有分析外,还对血清电解质作了全面的检测。

表 1 治疗前后各项化验指标变化

指标	第1次		第2次		第3次	
	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
TP(g/L)	56.09 ± 7.87	43.07 ± 5.98 ^a	51.64 ± 7.52	42.21 ± 8.21	49.46 ± 7.89 ^a	40.22 ± 6.27 ^a
ALB(g/L)	28.54 ± 3.93	25.41 ± 2.73 ^a	28.31 ± 2.21 ^a	31.77 ± 2.17	28.92 ± 4.23 ^a	24.92 ± 3.81 ^a
PA(mg/L)	59.27 ± 36.04	101.84 ± 23.68 ^a	88.32 ± 44.09	115.37 ± 35.48 ^c	97.54 ± 33.77	114.86 ± 57.16
ALT(U/L)	190.05 ± 217.55	84.10 ± 82.37 ^a	81.08 ± 67.13	49.46 ± 36.97 ^c	108.60 ± 77.05	39.40 ± 26.67
AST(U/L)	210.30 ± 175.29	96.30 ± 58.82 ^a	116.31 ± 76.6	77.08 ± 37.72 ^c	147.00 ± 86.23	81.00 ± 23.15
ALP(U/L)	147.42 ± 48.62	71.61 ± 26.99 ^a	122.42 ± 40.57 ^a	69.75 ± 23.50 ^c	100.00 ± 25.97 ^a	57.00 ± 27.56
GGT(U/L)	72.58 ± 45.17	28.61 ± 14.65 ^a	61.67 ± 49.54	32.42 ± 20.98 ^c	80.20 ± 53.67	40.00 ± 28.18 ^a
CHE(U/L)	2780.45 ± 1220.69	3570.75 ± 588.35 ^a	3410.08 ± 1121.84 ^a	3939.15 ± 615.22 ^c	3595.80 ± 664.30 ^a	3681.80 ± 758.70 ^a
TBA(μmol/L)	214.10 ± 54.07	187.90 ± 46.79 ^a	201.68 ± 60.06	173.75 ± 62.15 ^c	179.36 ± 47.70	177.76 ± 30.95 ^a
TBIL(μmol/L)	436.50 ± 120.56	232.92 ± 67.76 ^a	317.48 ± 122.35 ^a	189.62 ± 72.46 ^c	395.10 ± 99.91 ^a	220.52 ± 67.25 ^a
NH ₃ (μmol/L)	69.96 ± 34.87	27.86 ± 13.67 ^a	62.00 ± 28.12	26.32 ± 11.26	49.00 ± 12.03 ^a	18.00 ± 6.32
Bun(mmol/L)	6.41 ± 5.62	6.14 ± 5.34	4.00 ± 1.99	3.86 ± 0.93	8.39 ± 6.12	3.10 ± 1.20
Scr(μmol/L)	82.61 ± 42.20	75.88 ± 36.88 ^a	62.00 ± 1.41	58.50 ± 3.54	60.00 ± 1.53	60.00 ± 1.54
K ⁺ (mmol/L)	3.92 ± 0.56	3.90 ± 0.50	4.44 ± 1.10	4.00 ± 0.61	4.21 ± 0.80	3.70 ± 0.34
Na ⁺ (mmol/L)	134.44 ± 4.88	134.58 ± 2.35	129.88 ± 13.72	132.03 ± 6.15	131.50 ± 5.18	138.00 ± 3.61
Cl ⁻ (mmol/L)	98.43 ± 6.58	97.45 ± 2.93	96.90 ± 3.14	99.30 ± 3.73	96.10 ± 2.51	102.00 ± 5.15
Ca ²⁺ (mmol/L)	2.03 ± 0.17	1.98 ± 0.26	2.03 ± 0.14	2.07 ± 0.20	1.91 ± 0.20	2.10 ± 0.23
PT(s)	16.84 ± 5.43	15.33 ± 4.55	16.31 ± 4.31	12.00 ± 2.53	13.35 ± 4.21	13.20 ± 4.09
APTT(s)	40.44 ± 11.36	38.36 ± 8.58	37.24 ± 8.03	36.12 ± 7.29	36.34 ± 8.00	30.00 ± 8.01

^a $P < 0.05$, ^c $P < 0.05$, ^a $P < 0.05$ vs 同次治疗前。

次治疗前高于第1次治疗前($P < 0.05$)。TBIL第2、3次治疗前均低于第1次治疗前($P < 0.05$)。血NH₃第3次和第1次治疗前比较明显下降,有显著性差异($P < 0.05$,表1)。

2.3 治疗中不良反应 42例患者在治疗中和治疗后发生口唇发麻9例,并全身发麻6例,出现皮疹5例,低血压5例,恶心呕吐6例。经给予地塞米松、葡萄糖酸钙、保暖及补液后症状减轻或消失。其中1例低血压患者使用升压药维持血压,1 wk后恢复正常。

3 讨论

重型肝炎是由各种不同病因引起的肝细胞大量坏死,肝功能急剧恶化至衰竭的危重病症。肝细胞坏死后导致肝功能急剧下降,机体代谢紊乱,大量毒性物质和代谢产物堆积(如内毒素、胆红素、胆汁酸、各种细胞因子等)^[2],导致各种并发症出现如低血压、腹水、电解质紊乱、肝性脑病、肝昏迷、肝肾综合征等,严重威胁患者生命。非生物型人工肝又称物理型人工肝,主要通过物理或机械的方法和(或)借助化学的方法进行治疗,血浆置换是目前主要和最常用的人工肝方法。已有研究表明^[3],血浆置换能有效改

善肝衰竭患者的血清生物化学指标和临床症状,其机制在于他可清除重症肝炎患者体内含有大量内毒素、胆红素、病毒、引起肝性脑病的各种有毒物质的血浆,同时为患者补充大量新鲜冰冻血浆。新鲜冰冻血浆中含有蛋白质、凝血因子、免疫球蛋白及调理素等生物活性物质,可代替肝脏的部分代谢功能,及时纠正机体内环境的紊乱,阻断各种有害物质对肝脏的损害,从而有利于肝细胞的再生和修复^[4],使肝功能得到好转或完全逆转。

我们在本组患者经药物治疗效果不佳时,及时进行了血浆置换治疗。结果表明治疗后患者的临床症状明显改善,肝功能各项指标明显好转。其中PA和CHE在三次治疗前后都有升高,差异显著($P < 0.05$)。TBIL、TBA、ALT、AST、ALP、GGT、NH₃在3次治疗前后相比都有下降,差异有显著性($P < 0.05$)。特别是ALB、CHE在第2、3次治疗前高于第1次治疗前($P < 0.05$)。TBIL第2、3次治疗前均低于第1次治疗前($P < 0.05$)。血NH₃第3次和第1次治疗前比较明显下降,有显著性差异($P < 0.05$),表明多次血浆置换治疗的效果优于单次治疗,多次血浆置换治疗不仅能使临床症状持续改善,更重要的是持续维持了机

体内环境的稳定, 为肝细胞再生创造了条件, 这与文献^[5]报道相符。

在本研究中, 水电解质治疗前后相比没有显著差异。文献^[6]报道, 应用血浆置换治疗易出现低钠血症、低钙血症等电解质紊乱。但本组患者在治疗后电解质变化不明显, 无显著差异, 这可能与我们在治疗时及时纠正电解质紊乱, 酌情补充了高渗氯化钠和葡萄糖酸钙有关, 这不仅可纠正患者的低钠和低钙血症, 同时也提高了血浆晶体渗透压, 有利于防止治疗中低血压的发生。

在本组治疗的患者中, 有4例药物性肝损害患者经血浆置换治疗后肝功能逐步恢复, 最后治愈出院。而重型肝炎中, 早、中期和晚期的部分患者经过治疗, 病情减轻, 肝功能有所恢复, 病情平稳后出院, 与文献^[7]报道相符。死亡的7例患者中, 1例为不明原因的亚急性重型肝炎, 其余均为慢性重型肝炎晚期患者, 其中包括合并肝性脑病和肝昏迷的4例患者, 肝性脑病是重症肝炎的严重并发症, 是重症肝炎的终末期表现, 预后差, 生存率极低, 这几例患者尽管做了血浆置换治疗后病情一度缓解, 但终因病情过重而死亡。因此, 本组研究提示, 对重症肝炎患者宜尽早行人工肝支持治疗, 特别对部分亚急性重型肝炎患者, 可以改善肝功能, 争取肝细胞的再生和修复, 达到康复的目的; 而对慢性重型肝炎晚期患者, 也可以部分缓解病情, 防治并发症, 尽量延长存活时间^[8]。

在本组资料中, 每次治疗前后的血白蛋白下降较明显, 差异显著($P<0.05$), 可能因为在治

疗时丢弃了大量血浆, 而置换液中的胶体补充不够, 这是血浆置换的不足之处, 可在治疗后输注人体白蛋白来进行纠正。

总之, 我们的研究结果均提示, 对重型肝炎患者在进行内科治疗的基础上, 应尽早行血浆置换治疗, 可及时纠正机体内环境紊乱, 争取肝细胞的再生和修复, 能够明显缓解病情, 延长生存时间, 改善预后。

4 参考文献

- 1 Kjaergard LL, Liu J, Als-Nielsen B, Gluud C. Artificial and bioartificial support systems for acute and acute-on-chronic liver failure: a systematic review. *JAMA* 2003; 289: 217-222
- 2 虞岱斌, 李亚明, 段钟平. 细胞因子与肝损伤及人工肝治疗对细胞因子的影响. *国际移植与血液净化杂志* 2006; 4: 26-29
- 3 Clemmesen JO, Kondrup J, Nielsen LB, Larsen FS, Ott P. Effects of high-volume plasmapheresis on ammonia, urea, and amino acids in patients with acute liver failure. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 1217-1223
- 4 张勇, 曾维政, 蒋明德, 陈晓斌, 王钊, 余佳慧. 血浆置换治疗慢性重型肝炎临床疗效观察. *临床消化病杂志* 2005; 17: 4
- 5 张晶, 段钟平, 何金秋, 张伦理, 陈士彬, 邹春毅, 辛绍杰, 武文芳, 马斌荣, 陈煜, 孔明, 刘梅, 韩大康. 人工肝治疗对重型肝病患者生存期的影响. *中华肝脏病杂志* 2006; 14: 647-651
- 6 Sadahiro T, Hirasawa H, Oda S, Shiga H, Nakanishi K, Kitamura N, Hirano T. Usefulness of plasma exchange plus continuous hemodiafiltration to reduce adverse effects associated with plasma exchange in patients with acute liver failure. *Crit Care Med* 2001; 29: 1386-1392
- 7 李兰娟, 黄健荣, 陈月美. 人工肝支持系统治疗重型肝炎临床应用研究. *中华传染病杂志* 1999; 17: 228-230
- 8 Blei AT. Medical therapy of brain edema in fulminant hepatic failure. *Hepatology* 2000; 32: 666-669

编辑 史景红 电编 何基才

■同行评价

本文设计合理, 统计恰当, 论据充足, 结论明确, 科学性、创新性和可读性均较好。

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志标点符号用法

本刊讯 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。(常务副总编辑: 张海宁 2008-12-18)

胆石病患者胆汁细菌学检查分析

李奉达, 邱法波, 刘宁

■背景资料

胆汁及胆结石中细菌的存在是细菌在胆结石形成中起作用的最可靠、最客观的证据。有实验表明细菌培养结果与胆道疾病的严重程度、胆石的成分、胆石的位置和既往手术史等因素有关。本研究意在青岛地区的胆石病患者中展开调查, 通过术中胆汁细菌培养结果来判断不同情况下细菌的分布情况, 为胆石病的治疗提供思路。

李奉达, 邱法波, 刘宁, 青岛大学医学院附属医院肝胆外科
山东省青岛市 266000

作者贡献分布: 此课题由邱法波设计; 研究过程由邱法波、李奉达及刘宁操作完成; 数据统计分析与论文写作由李奉达完成。

通讯作者: 邱法波, 266003, 山东省青岛市江苏路16号, 青岛大学医学院附属医院肝胆外科. qiu fabo@sina.com.cn

电话: 0532-82911323

收稿日期: 2008-10-25 修回日期: 2008-11-25

接受日期: 2008-12-01 在线出版日期: 2008-12-18

Bile bacterial investigation in patients with cholelithiasis

Feng-Da Li, Fa-Bo Qiu, Ning Liu

Feng-Da Li, Fa-Bo Qiu, Ning Liu, Department of Hepatobiliary Surgery, Hospital Affiliated to Medical College of Qingdao University, Qingdao 266003, Shandong Province, China

Correspondence to: Fa-Bo Qiu, Department of Hepatobiliary Surgery, Hospital Affiliated to Medical College of Qingdao University, 16 Jiangsu Road, Qingdao 266003, Shandong Province, China. qiu fabo@sina.com.cn

Received: 2008-10-25 Revised: 2008-11-25

Accepted: 2008-12-01 Published online: 2008-12-18

Abstract

AIM: To examine characteristics and drug sensitivity of biliary bacteria for effective antibiotic application.

METHODS: Bile of 138 patients was collected, and germ culture and antibiotic susceptibility were carried out. The patients were divided into different groups according to symptom, position of stone and surgical operation history.

RESULTS: Of 138 cases of bile culture, 88 were positive with a positive rate of 63.8%. Twenty five kinds and 94 strains bacteria were identified, of which, 61 were Gram-negative (64.8%), 30 were Gram-positive (31.9%), and 3 were fungi (3.19%). The resistance rates of the main bacteria against imipenem, meropenem, vancomycin, teicoplanin, amikacin, and cefepime in bile were low, and against amoxicillin, piperacillin, ticarcillin, ciprofloxacin were very high.

CONCLUSION: The positive rate of biliary bacterial culture in cholelithiasis is related to sever-

ity of biliary infection, bile stone position and operation history. The most common bacteria in bile have a high resistant rate to most common antibiotics, and monitoring should be strengthened.

Key Words: Cholelithiasis; Bile; Bacteria culture; Bacterial sensitivity tests

Li FD, Qiu FB, Liu N. Bile bacterial investigation in patients with cholelithiasis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(35): 4004-4007

摘要

目的: 了解青岛地区胆石病患者的胆汁细菌培养种类及特点。

方法: 对2007-02/2008-08期间入住我科138例胆石病患者术中抽取胆汁进行细菌培养并进行鉴定及药敏分析。根据发病时情况、结石部位及既往手术史分别进行分组分析。

结果: 138份胆汁中共有88例培养出细菌, 阳性检出率为63.8%; 共培养出细菌25种94株, 革兰阴性杆菌61株(占64.8%), 革兰阳性菌30株(占31.9%), 真菌3株(占3.19%)。胆汁中的主要细菌对亚胺培南、美洛培南、万古霉素、替考拉宁、阿米卡星、头孢吡肟的耐药率很低, 对阿莫西林、哌拉西林、替卡西林、环丙沙星等的耐药率非常高。

结论: 患者症状不同、结石部位不同及既往手术史不同, 培养结果有差异; 培养出的细菌对临床常用抗菌素的耐药率较高, 应加强监测。

关键词: 胆石病; 胆汁; 细菌培养; 药敏试验

李奉达, 邱法波, 刘宁. 胆石病患者胆汁细菌学检查分析. *世界华人消化杂志* 2008; 16(35): 4004-4007

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/4004.asp>

0 引言

胆石病是常见病, 胆石的形成被认为是多因素相互作用的结果, 但是确切的发病机制仍不十

■同行评议者

魏经国, 教授, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院放射科

分清楚. 胆汁、结石中细菌的存在是细菌在胆石形成中可靠、客观的证据^[1]. 胆道系统致病菌种除与其原发病有关外, 还与其解剖学位置有重要关系. 因此, 研究胆石病患者胆汁中细菌培养类型并对其进行药敏分析, 对于胆石病的预防和治疗具有重要意义. 本研究通过对近期入住我科手术治疗的胆石病患者138例进行其胆汁细菌培养结果及药敏分析, 为本地区胆石病的预防及治疗提供依据.

1 材料和方法

1.1 材料 选取2007-02/2008-08入住我科手术治疗的胆石病患者138例. 其中男66例, 女72例, 年龄23-85(平均 59.5 ± 13.1)岁. 所有患者中11例入院时伴随腹痛、发热、黄疸等胆系感染症状. 胆囊结石24例, 胆总管结石18例, 肝内胆管结石29例, 肝内胆管及胆总管结石30例, 胆囊及胆总管结石22例, 胆囊、胆总管及肝内胆管结石15例(各分组相互间不包括). 32例既往有胆道手术史.

1.2 方法 所有患者于手术中切开胆总管前用5 mL无菌注射器直接穿刺胆囊或胆总管抽取胆汁3-5 mL, 按《全国临床检验操作规程》进行细菌培养及药敏试验. 质控菌株为大肠埃希氏菌标准菌株(ATCC25922), 铜绿假单胞菌标准菌株(ATCC27853), 金黄色葡萄球菌(ATCC25923). 判定标准依据美国临床实验室国家标准化委员会(NCCLS)公布的标准. ESBLs检测采用NCCLS推荐的双纸片确证实验方法.

统计学处理 使用SPSS13.0统计分析软件对各组数据行四格表资料的卡方检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有显著性.

2 结果

2.1 细菌分布 138份胆汁中共有88例培养出细菌, 阳性检出率为63.8%; 共培养出细菌25种94株, 其中23例检出2种细菌, 分布见表1. 检出的细菌中革兰阴性杆菌62株占65.3%, 以大肠埃希菌和克雷伯菌为主. 革兰阳性菌30株占31.6%, 以粪肠球菌和链球菌为主. 真菌3株占3.1%.

2.2 各组的细菌培养结果 11例有胆道感染症状的患者中, 有9例检出细菌, 无感染症状的127例患者中有79例检出细菌, 两组的阳性率差别有统计学意义($\chi^2 = 8.092$, $P < 0.01$). 32例既往有胆道手术史患者中, 共有27例检出细菌, 116例初次手术患者共有61例检出细菌, 两组间的细菌培养阳性率差别明显($\chi^2 = 10.514$, $P < 0.01$). 不同结石部位的胆汁培养可以看出, 单纯胆囊结

石的细菌培养阳性率最低(16.7%), 培养阳性率最高者为胆囊、胆总管及肝内胆管均存在结石时. 各组之间的细菌培养阳性率差别有意义($\chi^2 = 30.805$, $P < 0.01$, 表2).

2.3 药敏分析 由表3可见, 革兰阴性杆菌对头孢吡肟、美洛培南、亚胺培南的耐药率最低, 对阿莫西林、替卡西林、头孢噻吩等均有较高耐药率. 由表4可见, 革兰阳性球菌对万古霉素、替考拉宁的耐药率最低, 而对阿莫西林、氨苄西林及头孢他啶的耐药率较高. 培养出的2例白假丝酵母菌对大扶康、伊曲康唑、两性霉素B及5-FU均敏感. 1例曲霉属未做药敏试验.

3 讨论

正常情况下胆汁内无细菌生长. 由于胆道与肠道是相通的, 胆道感染时, 特别是胆总管的梗阻致胆汁排泄不畅, 其致病菌主要来自肠道的逆行性感染, 所以胆道感染的致病菌的种类一般情况下与肠道细菌的种类基本一致^[2].

既往多数研究表明, 胆道感染的致病菌以G⁻杆菌为主, 且主要为大肠埃希杆菌属、克雷伯杆菌属和肠杆菌属, 而G⁺球菌相对较少, 主要为肠球菌属^[3]. 感染胆汁细菌分布以绿脓杆菌为主, 而G⁺球菌则以粪链球菌为主, 且构成比较明显增加^[4]. 本组138例标本中共检出两种或两种以上细菌的标本共有23例. 需氧菌94株, G⁻主要为大肠埃希菌, 占39.4%, G⁺为粪肠球菌与肺炎克雷伯菌, 此检出结果与以上文献报道相吻合. 其中粪肠球菌的检出比例有所上升, 可能与近年来抗菌药物大量普遍应用有关.

年龄是影响胆汁细菌培养阳性率的一个重要因素. 老年人胃酸浓度常偏低, 胃肠功能易出现紊乱, 肠道细菌易逆行感染而致胆管炎. 此外, 老年人合并糖尿病、高血压等疾病, 免疫功能降低, 胆汁分泌量少, 在存在诱发因素如胆总管结石时, 也易出现胆道细菌感染^[5].

Csendes *et al*^[6]发现胆汁培养阳性率随疾病严重程度增加而增加. 众多研究表胆急性胆囊炎、急性胆管炎、梗阻性黄疸是胆汁细菌培养高阳性率的危险因素^[7]. 本组资料有感染症状的11中, 虽然术前已根据经验应用抗菌素, 仍然有10例培养出细菌, 阳性率为90.9%, 无症状患者阳性率为61.4%, 符合上述特点. 因此对于有感染症状的患者, 术前应根据症状选择合理抗菌素.

关于不同胆石部位与细菌培养阳性率之间的关系有不同的观点, 一般认为胆总管结石的患者胆汁细菌培养阳性率高于胆囊结石^[1]. Ohdan

■ 研发前沿

前期研究显示细菌感染在胆色素类结石的形成中起着决定性的作用. 通过细菌培养、显微形态学、PCR方法证明在大多数的胆色素类结石和部分胆固醇类结石中都有细菌存在, 细菌可通过复杂的、多样的机制来诱发和促进胆石的形成.

■ 相关报道

国内外已有研究表明胆汁中细菌的存在在结石形成中的作用.

■创新盘点

本文通过对本地区胆石病患者的不同情况进行分组,从而揭示胆汁细菌在胆石病患者症状、结石部位及手术史不同时的差别。

表 1 94株胆汁细菌的构成比

细菌种类	菌株数	构成比(%)
革兰氏阴性杆菌	61	64.89
大肠埃希菌	30	31.91
大肠埃希菌-ESBL(+)	7	7.45
肺炎克雷伯菌肺炎亚种	7	7.45
土生克雷伯菌	2	2.13
产酸克雷伯菌	4	4.26
弗氏柠檬酸杆菌群	4	4.26
阴沟肠杆菌	2	2.13
嗜水/豚鼠气单胞菌	1	1.06
铜绿假单胞菌	1	1.06
副溶血弧菌	1	1.06
阪崎肠杆菌	1	1.06
普通变形杆菌	1	1.06
革兰阳性球菌	30	31.92
粪肠球菌	15	15.96
粪肠球菌-HLAR	1	1.06
D群链球菌	1	1.06
B群链球菌	1	1.06
禽链球菌	4	4.26
变异链球菌	1	1.06
坚韧链球菌	3	3.19
牛链球菌 I 型	1	1.06
金黄色葡萄球菌	1	1.06
鸡葡萄球菌	1	1.06
浅绿气球菌	1	1.06
真菌	3	3.19
白假丝酵母菌	2	2.13
曲霉属	1	1.06
合计	94	

表 2 结石不同部位的胆汁细菌培养情况

结石部位	细菌阳性例数(n)	培养阳性率(%)
肝内胆管	23	79.3
胆总管	11	61.1
胆囊	4	16.7
肝内胆管+胆总管	21	70.0
胆囊+胆总管	16	72.7
胆囊+胆总管+肝内胆管	13	86.7

■应用要点

对胆石病患者的不同情况分别进行胆汁细菌培养,并对其结果进行药敏分析,为胆石病的治疗提供依据。

et al^[7]报道胆囊结石患者胆汁细菌培养阳性率为23.4%,混合感染为3.9%,显著低于胆总管结石的83.3%和45.8%。据本组资料显示结石部位不同,细菌培养的阳性率有明显差异,以肝内胆管与胆总管结石培养阳性率为著。可能与不同结石部位结石的成分及梗阻的症状不同有关。

对于有胆道手术史的患者胆汁培养阳性率为84.4%,明显高于无手术史患者(52.6%),与已

表 3 主要革兰阴性杆菌对20种抗菌素的耐药率(%)

抗菌素	大肠埃希菌(n=37)	克雷伯菌(n=13)	肠杆菌属(n=3)	其他G ⁻ 菌(n=8)
AMO阿莫西林	68	85	100	75
AMC阿莫西林+棒酸	24	0	33	63
PIC派拉西林	54	38	67	38
TZP派拉西林+他唑巴坦	11	8	33	13
TIC替卡西林	62	77	100	75
TCC替卡西林+棒酸	32	15	33	38
CFT头孢噻吩	62	69	67	50
CXT头孢西丁	32	54	67	50
CTX头孢噻肟	24	15	33	13
CAZ头孢他啶	22	8	33	13
FEP头孢吡肟	14	0	0	0
CXM头孢呋辛	41	38	67	13
MERO美洛培南	0	0	0	0
IMI亚胺培南	0	0	0	0
TSU复方新诺明	41	38	67	25
TOB妥布霉素	24	15	67	13
AKN阿米卡星	8	0	33	0
GEN庆大霉素	19	31	67	13
NET奈替米星	14	0	33	0
CIP环丙沙星	57	38	67	50

表 4 主要革兰阳性杆菌对种抗菌药的耐药率(%)

抗菌素	粪肠球菌(n=16)	葡萄球菌(n=2)	链球菌属(n=12)
阿莫西林	13	100	42
氨苄西林	6	50	25
哌拉西林+他唑巴坦	6	0	8
头孢他啶	25	0	33
舒普深	6	0	8
替考拉宁	0	0	0
万古霉素	0	0	0
特治星	6	0	17
庆大霉素	6	0	25
环丙沙星	13	50	42

有报道相吻合。其结果可能与胆道手术后改变了胆道正常的解剖关系,以及瘢痕形成等影响因素,导致胆道梗阻狭窄,从而引起细菌的繁殖。*Cetta et al*^[8]报道行过Oddi括约肌切开或括约肌成形术的患者易复发胆总管胆色素类结石,推测可能为括约肌损伤,十二指肠液返流入胆总管与胆汁混合的结果。

胆汁中的细菌大多来自于肠道,为条件致

病菌. 由于胆道菌群是以G⁺为主体的多种细菌, 因此治疗时须选用对G⁺有较强杀伤力的抗生素, 对于混合感染者必须联合用药^[9]. 本组胆汁培养出G⁺致病菌对氨基糖甙类的阿米卡星、奈替米星、头孢菌素、哌拉西林+他唑巴坦、亚胺培南及美洛培南的敏感率较高, 其中主要致病菌大肠埃希菌有7例为ESBL(+), 对头孢类抗生素几乎全耐药. ESBL全称超广谱 β -内酰胺酶(extended-spectrum β -lactamase, ESBL), 主要在肺炎克雷伯菌和大肠埃希菌中发现, 在肠杆菌属、变形杆菌属、沙雷菌属等其他肠杆菌科及铜绿假单胞菌中也多有发现, 其导致细菌对第三代头孢菌素、氨曲南及第四代头孢菌素耐药, 可考虑采用含酶抑制剂的复合制剂与试验为敏感的药物联合治疗.

本组培养出的G⁺球菌主要以粪肠球菌为主, 该菌亦为条件致病菌. 由于肠球菌属多重耐药细菌, 临床用药选择性较小^[10], 药敏结果显示对头孢他啶的耐药率最高, 对阿莫西林及临床常用的环丙沙星亦有较高耐药率. 其他肠球菌对阿莫西林、氨苄西林及庆大霉素和环丙沙星的耐药率均较高, 反映了临床此类抗生素过高的使用率或滥用.

在有临床症状的感染患者中, 即使术前据经验应用抗生素, 胆汁细菌的控制情况仍不理想, 原因可能为: (1)梗阻患者胆汁排泄不畅, 胆汁细菌滞留繁殖快. (2)在胆道梗阻时, 胆道内压力升高, 影响抗生素进入胆汁. Yamamoto *et al*^[11]通过ERCP方法测量胆道压力, 对胆道梗阻患者胆道压力变化与一些抗生素在胆汁中排泄的影响作过研究, 证实胆道梗阻时胆道压力较正常平均升高约5倍, 其胆汁内抗生素浓度只有不到胆道压力正常时1/20, 而当胆道压力升到30 mmHg时, 胆汁内抗生素浓度近乎测不到. 因此, 在临床的实际工作中, 对于胆石病患者, 一般应根据经验选用对革兰阴性杆菌敏感度高的抗

菌素, 可改用或联用对革兰阳性菌敏感的抗菌素, 同时要注意存在的厌氧菌. 头孢三代、甲硝唑等药物在胆汁中排泄率较高, 是控制胆道感染的理想药物. 喹诺酮类抗生素在胆汁中浓度远高于血药浓度^[12]. 在较严重的胆道感染中, 疗效肯定价格低廉的甲硝唑可作为首选的抗厌氧菌药与其他药物联合应用. 另外, 及时的通过手术、内镜下胆道引流或PTCD引流等降低胆道内压力, 以利于抗菌素进入胆道系统充分发挥作用也显得特别重要.

4 参考文献

- 1 于宏. 细菌与胆石症的关系. 中华肝胆外科杂志 1999; 5: 353-356
- 2 陈学中, 孔刚, 杨小清. 胆汁细菌培养与临床抗生素的应用. 中国医药导报 2006; 3: 7-9
- 3 许春森, 黄长玉, 黄建富, 陈大良, 黄心宏, 殷凤峙. 近年急性重症胆管炎胆汁病原学及药敏分析. 肝胆外科杂志 2001; 9: 108-109
- 4 郭学刚, 孙安华, 詹志刚, 李彩宁, 丁杰, 樊代明. 胆道疾病患者胆汁菌群分布及药物敏感性的变化. 中华消化内镜杂志 2003; 20: 24-26
- 5 叶国良, 陈会松, 盛红, 程德希. 胆石症并胆道感染患者胆汁细菌分布及与年龄性别关系探讨. 浙江临床医学 2005; 6: 626-627
- 6 Csendes A, Burdiles P, Maluenda F, Diaz JC, Csendes P, Mitru N. Simultaneous bacteriologic assessment of bile from gallbladder and common bile duct in control subjects and patients with gallstones and common duct stones. Arch Surg 1996; 131: 389-394
- 7 Ohdan H, Oshiro H, Yamamoto Y, Tanaka I, Inagaki K, Sumimoto K, Hinoi T. Bacteriological investigation of bile in patients with cholelithiasis. Surg Today 1993; 23: 390-395
- 8 Cetta F. The role of bacteria in pigment gallstone disease. Ann Surg 1991; 213: 315-326
- 9 孙桂华, 孙大勇. 胆系感染及抗生素应用现状与展望. 广东医学 2002; 23: 1114-1115
- 10 张正, 王贺, 许淑珍, 赵素蕊, 刘文云, 严薇. 553株肠球菌药敏结果分析. 临床检验杂志 2003; 21: 374-375
- 11 Yamamoto S, Kubota Y, Takaoka M, Ogura M, Tsuji K, Yanagitani K, Shimatani M, Shibatani N, Imai Y, Takamidoh S, Inoue K. The effect of biliary decompression on antibiotic biliary excretion. Hepatogastroenterology 2002; 49: 330-334
- 12 厉学民, 张家敏, 毛根军, 许龙堂, 吴荣进, 郑樟栋. 胆总管探查术中胆汁细菌培养及药敏分析. 肝胆外科杂志 2007; 15: 181-183

■同行评价

本文报道具有科学性, 文字书写也较严谨, 具有逻辑性, 但其相关内容已有很多报道, 缺乏创新性.

编辑 史景红 电编 吴鹏朕

胆囊癌肉瘤的临床病理学特征分析

李柏峰, 刘永锋, 石蕊, 刘作良

■背景资料

胆囊癌肉瘤是一种发生在胆囊的, 恶性上皮成分与恶性间叶成分交织混合生长的恶性肿瘤, 恶性度高, 预后差。该病十分罕见, 至今国外报道不足100例, 国内仅10余例。胆囊癌肉瘤的诊断几乎全部为手术后病理诊断, 预后主要与肿瘤分期有关。

李柏峰, 刘永锋, 石蕊, 刘作良, 中国医科大学附属第一医院普通外科教研室肝胆外科 辽宁省沈阳市 110001

作者贡献分布: 李柏峰与刘永锋对本论文贡献均等; 本研究由刘永锋与李柏峰设计; 研究过程由李柏峰, 刘永锋, 石蕊及刘作良完成; 本论文写作由刘永锋与李柏峰完成。

通讯作者: 刘永锋, 110001, 辽宁省沈阳市南京北街155号, 中国医科大学附属第一医院普通外科教研室肝胆外科。

yfliu@mail.cmu.edu.cn

电话: 024-83283308

收稿日期: 2008-08-19 修回日期: 2008-10-09

接受日期: 2008-10-27 在线出版日期: 2008-12-18

Clinicopathologic features of gallbladder carcinosarcoma

Bai-Feng Li, Yong-Feng Liu, Rui Shi, Zuo-Liang Liu

Bai-Feng Li, Yong-Feng Liu, Rui Shi, Zuo-Liang Liu, Department of General Surgery, the First Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Correspondence to: Dr Yong-Feng Liu, Department of General Surgery, the First Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. yfliu@mail.cmu.edu.cn

Received: 2008-08-19 Revised: 2008-10-09

Accepted: 2008-10-27 Published online: 2008-12-18

Abstract

AIM: To study the clinical and pathological feature of gallbladder carcinosarcoma and to investigate its differential diagnosis, treatment and prognosis.

METHODS: One case of gallbladder carcinosarcoma was treated in our hospital. We studied this disease with its clinical data, histopathology and immunohistochemistry, and relative literature were reviewed, in order to reveal the characteristics of this disease.

RESULTS: The tumor had infiltrated into liver and muscular layer of colon. Histopathology and immunohistochemistry showed neoplasm of carcinoma and sarcoma simultaneously co-existed, and no transitional areas were detected between carcinoma and sarcoma. The prognosis of this disease was poor.

CONCLUSION: Gallbladder carcinosarcoma is a rare tumor with high malignant neoplasm,

which needs to be discriminated from several similar diseases. Its prognosis is correlated with the stage of the tumor.

Key Words: Gallbladder; Carcinosarcoma; Immunohistochemistry

Li BF, Liu YF, Shi R, Liu ZL. Clinicopathologic features of gallbladder carcinosarcoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(35): 4008-4011

摘要

目的: 探讨胆囊癌肉瘤患者的诊断与鉴别诊断, 以及治疗方法和预后。

方法: 我院收治1例胆囊癌肉瘤患者, 研究其临床表现及诊疗经过, 并进行随访, 同时对标本进行病理学检查, 再结合有关文献, 探讨该病的特点。

结果: 肿瘤侵犯肝脏并侵犯结肠至肌层。病理可见上皮源性肿瘤成分与间叶源性肿瘤成分同时存在且没有移行现象, 且该病预后极差。

结论: 胆囊癌肉瘤是一种罕见的高度恶性肿瘤, 需要与肉瘤样癌等并相鉴别, 预后与肿瘤分期有关。

关键词: 胆囊; 癌肉瘤; 免疫组织化学

李柏峰, 刘永锋, 石蕊, 刘作良. 胆囊癌肉瘤的临床病理学特征分析. *世界华人消化杂志* 2008; 16(35): 4008-4011

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/4008.asp>

0 引言

胆囊癌肉瘤(gallbladder carcinosarcoma)是一种恶性上皮成分与恶性间叶成分交织混合生长的恶性肿瘤, 恶性度高, 预后差, 十分罕见。上皮成分主要为腺癌、鳞状细胞癌或两者均有; 间叶成分表现多样, 包括纤维肉瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、血管肉瘤、骨肉瘤、软骨肉瘤和神经肉瘤等^[1-5]。肿瘤可以呈弥漫性生长或呈巨大的息肉样凸入胆囊腔内生长, 并有坏死^[3,6-7]。本文报道1例我院治疗的胆囊癌肉瘤病例, 并结

■同行评议者

戴朝六, 教授, 中国医科大学第二临床学院(盛京医院)肝胆外科

合以往文献探讨该病的发生发展、临床表现、病理学特征, 以及诊断治疗和预后转归。

1 材料和方法

1.1 材料 患者, 男, 64岁, 因“右季肋部疼痛2 mo”于2007-11入院。疼痛为阵发性胀痛, 进行性加重, 无明显诱因, 可放散至右肩背部, 消瘦明显, 无发热, 无黄疸。既往有胆囊结石病史10年, 保守治疗。体检: 一般状态可, 皮肤巩膜无黄染, 右上腹肋下4 cm可触及肿大胆囊, 质硬, 不活动, 无压痛。行增强CT。肿瘤系列: CA19-9: 399.45 kU/L(0-37 kU/L), CEA: 5.75 μ g/L(0-5 μ g/L), AFP: 2.54 kIU/L(0-9 kIU/L)。治疗: 行胆囊切除, 右半结肠切除, 肝脏转移病灶切除。术后12 d, CA19-9降至94.17 kU/L。术后1 mo入我院肿瘤内科开始正规化疗, 同时增强CT发现肝脏再次出现多发转移病灶, 伴有脊椎转移, CA19-9再次升高达283.2 kU/L。患者术后3 mo死于脑转移。

1.2 方法 手术结合术中超声, 将胆囊、肝脏VI段, 和所有肝脏转移病灶(共10处), 以及右半结肠整块切除。肿瘤经40 g/L甲醛溶液固定, 石蜡包埋, HE染色。免疫组化采用EnVison方法, 一抗为CK(H), CK(L), CEA, CD68, Vimentin。

2 结果

2.1 大体所见 胆囊大小约13 cm \times 6 cm \times 5 cm, 内有两枚直径约2.5 cm结石; 肿瘤位于胆囊底, 大小约4 cm \times 3 cm \times 3 cm, 黄白色, 质脆, 向胆囊腔内生长, 占据囊腔大部分, 并沿胆囊壁向肝脏浸润生长, 范围约2 cm, 同时向下侵及结肠肝曲, 形成一大约10 cm \times 8 cm \times 8 cm质硬肿块; 肝脏转移病灶共10处, 最大者3 cm \times 3 cm \times 2 cm, 位于肝II段, 其余病灶直径约1-2 cm, 散在分布肝脏各段, 均为灰白色结节; 结肠肝曲浆膜面被肿瘤侵及, 界限不清, 黏膜未见明显异常, 肠系膜有一枚直径约1.5 cm质硬结节。

2.2 增强CT提示 胆囊结石, 胆囊癌, 癌肿侵及结肠肝曲, 肝脏多发转移癌(图1)。

2.3 镜下所见 肿瘤由两种成分组成: 一种是排列呈不规则形腺管状、实性团片状, 弥漫分布, 瘤细胞胞质较丰富、核大深染、卵圆形或不规则形, 染色质粗, 有清楚的核仁, 核异形性明显, 并可见较多病理性核分裂象, 呈腺癌表现; 另一种为梭形细胞, 排列成束状交织, 细胞大小不一, 异型性明显, 边界不清, 核染色深, 核分裂多见, 具有肉瘤特征。癌和肉瘤之间无过度现象。肿瘤侵犯肝脏并侵犯结肠至肌层(图2)。

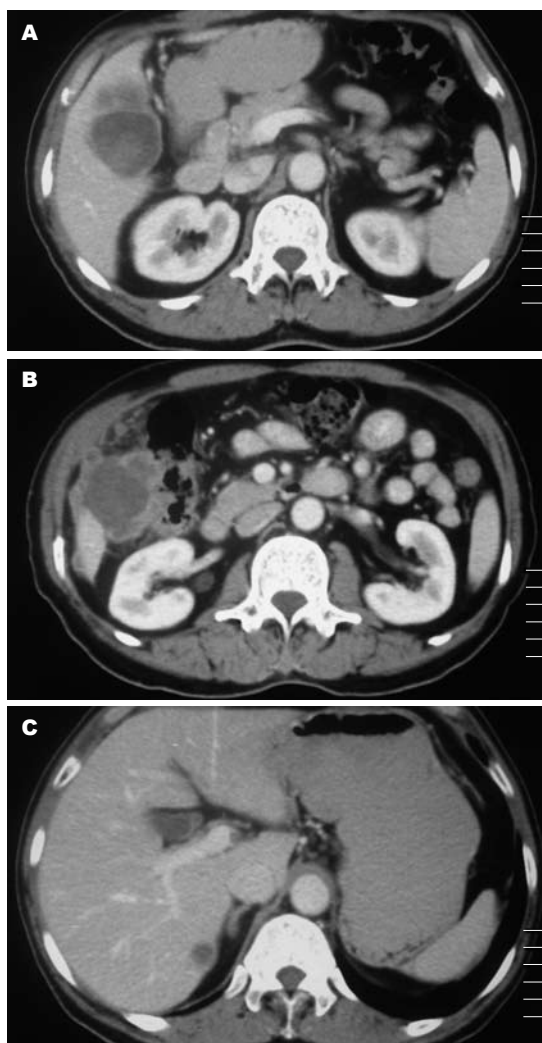


图1 胆囊肿瘤增强CT。A: 胆囊肿瘤浸润至肝脏; B: 肿瘤侵及结肠肝曲; C: 肝脏转移病灶。

2.4 免疫组化染色 上皮源性肿瘤成分CK(L)(+), CEA(±), 肉瘤成分Vimentin(+), 两者同时存在, 无过渡现象。病理诊断为胆囊癌肉瘤。

3 讨论

1907年Hugu^[4]报道了第1例原发于胆囊的癌肉瘤, 截至2005年国外报道不足100例^[5], 国内仅10余例。Kubota *et al*^[11]总结了文献报道的18例胆囊癌肉瘤的临床病理特征, 发现恶性上皮成分中腺癌占50%, 腺癌伴鳞癌或鳞化占28%, 鳞状细胞癌占11%; 50%的病例间质成分为同源性肉瘤, 另50%的病例中出现恶性骨、软骨及其他异源性间质组织。患者多为女性, 是男性的4.3倍; 发病年龄从45-90岁, 平均69.8岁。82%的患者伴有胆囊结石。术后患者生存时间0.5-8 mo, 平均生存时间2.9 mo。本例患者手术后1 mo即有肿瘤复发并远隔转移, 术后生存时间为3 mo, 与以往文献报道相一致。

■ 相关报道

研究表明, 胆囊癌肉瘤的临床表现与生物学行为与胆囊癌相似, 当癌肉瘤局限在胆囊浆膜时, 外科治疗后可长期存活。

■应用要点

胆囊癌肉瘤患者多伴有多年胆囊结石、慢性胆囊炎病史,故考虑该病的高危因素可能与胆囊结石的长期刺激有关。

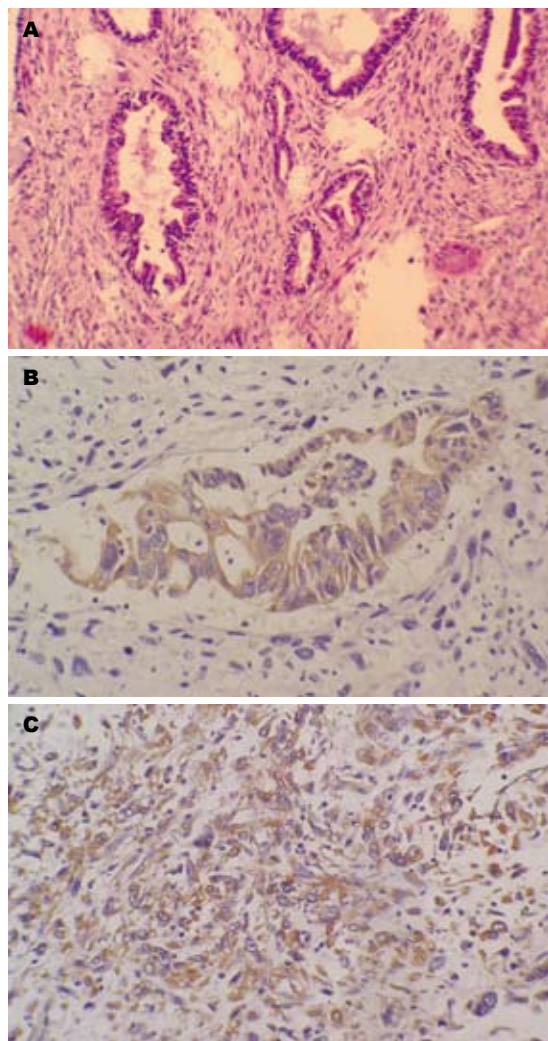


图2 肿瘤组织病理改变(IHE及免疫组化染色 $\times 200$)。A: 腺癌与肉瘤同时存在(HE染色); B: CK(L)(+); C: Vimentin(+).

胆囊癌的高危因素考虑与胆囊结石的长期刺激有关,胆囊癌肉瘤的发生是否与慢性胆囊炎、胆囊结石有关尚无相关文献报道。但从以往文献中可以看出,胆囊癌肉瘤患者多伴有多年胆囊结石、慢性胆囊炎病史。本例患者有胆囊结石病史10年,术中发现胆囊内2枚直径约2.5 cm结石,故考虑该病可能与结石长期刺激有关。

癌肉瘤在其他部位(如宫颈、肺、膀胱等)也有报道^[8-10],但限于病例数少,所以癌肉瘤确切的发生机制尚不清楚。目前关于癌肉瘤的发生主要有两种假说,一是“聚合”假说(convergence hypothesis),认为该肿瘤由两种或多种干细胞分化而来,不同来源的细胞相互混合生长,肿瘤为多克隆性;二是“发散”假说(divergence hypothesis),认为癌肉瘤中的两种异质性成分是由全能干细胞向上皮及间叶两种不同方向分化的结果,肿瘤为单克隆性。

近年来由于分子生物学及分子遗传学技术的发展,许多学者就这两种假说做了定量的研究,提出了一些有利的证据。有研究者通过分子生物学手段检测相关的基因片段,证明发生于子宫、乳腺、肺和胃肠道的癌肉瘤均为单克隆性^[11]。Dacic *et al*^[12]利用显微切割技术分别获得了纯度较高的癌细胞和肉瘤细胞,发现两者具有部分相同的染色体等位基因缺失位点,从而证实癌肉瘤中的两种异质性成分来源于全能干细胞,肿瘤为单克隆性;同时还发现肉瘤细胞具有更丰富的遗传学变异,提示在癌肉瘤的形成过程中全能干细胞很可能先转化为癌细胞,继而转化为肉瘤细胞。尚需更多的病例以及检测更多的染色体等位基因缺失位点,才能明确全能干细胞如何转化为癌细胞和上皮细胞,阐明癌肉瘤的发生机制。

胆囊癌肉瘤多发生于中、老年女性,早期发现困难,发病时常已与周围组织粘连,就诊时多已发生周围器官、淋巴结或远处器官的转移。本病例就诊时肿瘤已经侵及结肠肝曲,伴有肝脏广泛转移。本病临床表现及影像学检查与胆囊癌类似,可以表现为反复发作的上腹疼痛或饱胀不适,食欲下降,也有体检时无意中发现胆囊肿物;B超或CT提示胆囊腔内息肉状或结节状肿物,可伴有或不伴胆囊结石。

CA19-9作为胆道系统恶性肿瘤的标志物已经得到一定的认识。在本例胆囊癌肉瘤的诊疗经过中,术前CA19-9显著高于正常值(399.45 kU/L)。随着肿瘤及其转移病灶的切除,CA19-9迅速下降(94.17 kU/L);而当肿瘤复发时,该标记再次升高(283.2 kU/L)。这提示CA19-9在胆囊癌肉瘤的诊断和判断复发方面,有一定意义。

胆囊癌肉瘤的诊断几乎全部为手术后病理诊断。其组织学诊断比较困难,要明确诊断胆囊癌肉瘤,尚需和以下几种疾病鉴别:(1)胆囊肉瘤样癌(sarcomatoid carcinoma,梭形细胞癌或未分化癌),属上皮源性肿瘤,本质上属于分化差的癌。肿瘤的部分区域由于细胞分化程度低而呈梭形或多形性,而貌似肉瘤。肉瘤样癌上皮样恶性细胞与肉瘤样恶性细胞之间有过渡现象,电镜下其肉瘤成分具有桥粒连接,胞质内有张力微丝等上皮细胞的超微结构特征,并可清晰显示两种成分的移行形态^[3,13]。免疫组织化学肉瘤成份既表达上皮性标志物,也可表达间叶性标记。而癌肉瘤没有上述电镜特征,且癌肉瘤上皮与间叶成份两者分界清楚无过渡现象。梭

形细胞角蛋白染色阴性有助于癌肉瘤与肉瘤样癌鉴别。(2)胆囊肉瘤中夹杂陷入的正常胆囊上皮成份, 仔细观察可以发现, 夹杂的上皮成分无组织结构 and 细胞形态异型性, 无病理性核分裂象。(3)胆囊癌中出现偶见的化生性改变, 如鳞化、软骨化、骨化, 化生病灶为成熟间质结构, 无细胞异型性; 还有反应性间质纤维组织增生, 如果间质增生活跃, 也可似肉瘤样结构, 但细胞无异型性, 也无病理性核分裂象, 均为成熟的间叶结构。(4)胆囊腺肌瘤病(腺肌瘤性增生, adenomyomatosis), 该病是一种获得性良性变病, 以表面上皮广泛延伸至增厚的胆囊肌层, 常常达浆膜层为特征。腺上皮形成腺管长入肌层, 有时位置可以深达胆囊浆膜层, 腺管周围纤维组织、平滑肌组织不同程度的增生, 腺上皮及间叶组织成份均无异型性。而癌肉瘤的上皮和间叶成份均为恶性, 细胞异型性明显。

目前的治疗方式依然以手术为主, 但远期疗效并不理想。Kubota *et al*^[1]指出该病的临床表现与生物学行为与胆囊癌相似, 分期相同时生物学行为相同, 当癌肉瘤局限在胆囊浆膜时, 外科治疗后可长期存活。

胆囊癌肉瘤的预后主要与肿瘤分期有关^[14], 分期可参考胆囊癌TNM系统分期标准^[15-16]。根据不同的T、N、M分类将胆囊癌分5期: 0期指原位癌; I期指侵犯局限于黏膜层或黏膜肌层, 无淋巴结转移; II期指肿瘤侵犯全层, 未侵犯周围脏器, 无淋巴结转移; III期指肿瘤突破浆膜层或直接侵犯一个邻近脏器(肝脏浸润深度<2 cm)或N1淋巴结转移; IV期指出现远处转移或侵犯两个以上的邻近脏器, 或N2淋巴结转移。本病例术前肿瘤就已经侵犯肝脏和结肠肝曲, 可归为IV期, 恶性程度很高。

胆囊肉瘤就诊时多处于晚期, 因此往往错过了手术根治肿瘤的最佳时机, 预后更差。典型病例多死于诊断后6 mo内, 生存期很少超过20 mo。

4 参考文献

- 1 Kubota K, Kakuta Y, Kawamura S, Abe Y, Inamori M, Kawamura H, Kirikoshi H, Kobayashi N, Saito S, Nakajima A. Undifferentiated spindle-cell carcinoma of the gallbladder: an immunohistochemical study. *J Hepatobiliary Pancreat*

- Surg* 2006; 13: 468-471
- 2 Ajiki T, Nakamura T, Fujino Y, Suzuki Y, Takeyama Y, Ku Y, Kuroda Y, Ohbayashi C. Carcinosarcoma of the gallbladder with chondroid differentiation. *J Gastroenterol* 2002; 37: 966-971
- 3 Kim MJ, Yu E, Ro JY. Sarcomatoid carcinoma of the gallbladder with a rhabdoid tumor component. *Arch Pathol Lab Med* 2003; 127: e406-e408
- 4 Huguet KL, Hughes CB, Hewitt WR. Gallbladder carcinosarcoma: a case report and literature review. *J Gastrointest Surg* 2005; 9: 818-821
- 5 Sodergren MH, Silva MA, Read-Jones SL, Hubscher SG, Mirza DF. Carcinosarcoma of the biliary tract: two case reports and a review of the literature. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2005; 17: 683-685
- 6 de Aretxabala X, Roa I, Burgos L, Losada H, Roa JC, Mora J, Hepp J, Leon J, Maluenda F. Gallbladder cancer: an analysis of a series of 139 patients with invasion restricted to the subserosal layer. *J Gastrointest Surg* 2006; 10: 186-192
- 7 Takahashi Y, Fukushima J, Fukusato T, Shiga J. Sarcomatoid carcinoma with components of small cell carcinoma and undifferentiated carcinoma of the gallbladder. *Pathol Int* 2004; 54: 866-871
- 8 Laterza R, Seveso A, Zefiro F, Formenti G, Mellana L, Donadello N, Ghezzi F, Bolis P, Riva C. Carcinosarcoma of the uterine cervix: case report and discussion. *Gynecol Oncol* 2007; 107: S98-S100
- 9 Wright JL, Black PC, Brown GA, Porter MP, Kamat AM, Dinney CP, Lin DW. Differences in survival among patients with sarcomatoid carcinoma, carcinosarcoma and urothelial carcinoma of the bladder. *J Urol* 2007; 178: 2302-2306; discussion 2307
- 10 Venissac N, Pop D, Lassalle S, Berthier F, Hofman P, Mouroux J. Sarcomatoid lung cancer (spindle/giant cells): an aggressive disease? *J Thorac Cardiovasc Surg* 2007; 134: 619-623
- 11 Sung MT, Wang M, MacLennan GT, Eble JN, Tan PH, Lopez-Beltran A, Montironi R, Harris JJ, Kuhar M, Cheng L. Histogenesis of sarcomatoid urothelial carcinoma of the urinary bladder: evidence for a common clonal origin with divergent differentiation. *J Pathol* 2007; 211: 420-430
- 12 Dacic S, Finkelstein SD, Sasatomi E, Swalsky PA, Yousem SA. Molecular pathogenesis of pulmonary carcinosarcoma as determined by microdissection-based allelotyping. *Am J Surg Pathol* 2002; 26: 510-516
- 13 长哉根, 叶明福, 谢青, 王亚丽, 汤金梁. 肉瘤样癌的病理解剖与鉴别诊断研究. 第三军医大学学报 2002; 24: 958-960
- 14 Zhang L, Chen Z, Fukuma M, Lee LY, Wu M. Prognostic significance of race and tumor size in carcinosarcoma of gallbladder: a meta-analysis of 68 cases. *Int J Clin Exp Pathol* 2008; 1: 75-83
- 15 Principe A, Del Gaudio M, Ercolani G, Golfieri R, Cucchetti A, Pinna AD. Radical surgery for gallbladder carcinoma: possibilities of survival. *Hepatogastroenterology* 2006; 53: 660-664
- 16 Chijiwa K, Kai M, Nagano M, Hiyoshi M, Ohuchida J, Kondo K. Outcome of radical surgery for stage IV gallbladder carcinoma. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2007; 14: 345-350

■同行评价

本文报告1例胆囊癌肉瘤, 并复习了相关文献, 对于系统了解该病的临床病理特点有一定实用价值。

编辑 李军亮 电编 何基才

酪氨酸激酶受体RON在胰腺癌中的表达及意义

周 坤, 汪 宏, 涂从银, 吴立胜

■背景资料

胰腺癌是消化外科恶性肿瘤死亡率最高的疾病之一, 胰腺癌发生发展的分子机制, 探寻各种上游蛋白表达、信号通路与胰腺癌的内在联系成为当前研究的热点。酪氨酸激酶受体(RTK)介导许多关键的细胞功能, 在肿瘤的发生、发展和转移中扮演着重要的角色。RON属于RTK亚家族中成员之一, 主要表达在上皮来源的细胞, RON活化后引起细胞转化、生长、迁移和基质侵袭。有关RON在胰腺肿瘤细胞运动、黏附、侵袭性增加中的作用, 目前尚未十分清楚。

周坤, 汪宏, 涂从银, 吴立胜, 安徽医科大学第三附属医院普外科 安徽省合肥市 230061

作者贡献分布: 周坤与汪宏对此文所作贡献均等; 此课题由汪宏, 周坤及吴立胜设计; 研究过程由周坤, 汪宏及吴立胜操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由汪宏与涂从银提供; 数据分析由周坤与汪宏完成; 本论文写作由周坤与汪宏完成。

通讯作者: 汪宏, 230061, 安徽省合肥市, 安徽医科大学第三附属医院普外科. wangh1956@163.com
电话: 0551-2183370

收稿日期: 2008-10-22 修回日期: 2008-11-16

接受日期: 2008-11-17 在线出版日期: 2008-12-18

Expression of recepteur d'origine nantais in pancreatic cancer and its significance

Kun Zhou, Hong Wang, Cong-Yin Tu, Li-Sheng Wu

Kun Zhou, Hong Wang, Cong-Yin Tu, Li-Sheng Wu, Department of General Surgery, the Third Hospital Affiliated to Anhui Medical University, Hefei 230061, Anhui Province, China

Correspondence to: Hong Wang, Department of General Surgery, the Third Hospital Affiliated to Anhui Medical University, Hefei 230061, Anhui Province, China. wangh1956@163.com

Received: 2008-10-22 Revised: 2008-11-16

Accepted: 2008-11-17 Published online: 2008-12-18

Abstract

AIM: To examine the expression and significance of Tyrosine Kinase Receptor RON in pancreatic cancer and its significance.

METHODS: The expression of RON was detected in 31 pancreatic cancer tissue specimens and 31 adjacent pancreatic tissue specimens and 8 normal pancreatic tissues were using immunohistochemistry.

RESULTS: The expression of RON was detected in all the pancreatic cancer tissues, the normal pancreatic tissues and in adjacent tissues. The RON expression level in all the pancreatic cancer tissues and adjacent tissues was significantly higher than those of the normal pancreatic tissues; RON expression was higher in pancreatic cancer tissues than in adjacent tissues ($P < 0.05$). The expression level of RON in pancreatic cancer tissue was correlated with

tumor differentiation and clinical stage and lymph node metastasis, and not correlated with age, tumor size, histological type or tumor location ($P < 0.05$).

CONCLUSION: Elevated RON expression may contribute to pancreatic carcinogenesis.

Key Words: Pancreatic neoplasm; Receptor protein-tyrosine kinases; Recepteur d'origine nantais; Immunohistochemistry

Zhou K, Wang H, Tu CY, Wu LS. Expression of recepteur d'origine nantais in pancreatic cancer and its significance. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(35): 4012-4014

摘要

目的: 研究酪氨酸激酶RON(recepteur d'origine nantais)在胰腺癌组织中的表达及其意义。

方法: 收集胰腺癌组织及相关癌旁组织31例, 正常胰腺组织8例, 采用免疫组织化学技术检测组织中RON的表达。

结果: RON在正常胰腺组织、癌旁组织、胰腺癌组织中均见阳性表达, 胰腺癌及癌旁中的表达强度高于正常胰腺组织, 胰腺癌RON的表达强度强于癌旁组织($P < 0.05$)。RON表达与患者年龄、肿瘤大小、组织学类型和肿瘤部位等均无关, 与胰腺癌临床分期、分化程度及淋巴结转移相关($P < 0.05$)。

结论: RON表达量的增多与胰腺癌的发生、发展有关。

关键词: 胰腺癌; 受体蛋白质酪氨酸激酶类; RON; 免疫组织化学

周坤, 汪宏, 涂从银, 吴立胜. 酪氨酸激酶受体RON在胰腺癌中的表达及意义. *世界华人消化杂志* 2008; 16(35): 4012-4014
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/4012.asp>

0 引言

胰腺癌起病隐匿, 恶性程度高。美国由癌症导致的死亡, 胰腺癌居于第4位, 2006年约32 000名患

■同行评议者

巩鹏, 教授, 大连医科大学附属第一医院普外二科; 周国雄, 主任医师, 南通大学附属医院消化内科

者死于胰腺癌, 中位生存期<1年, 确诊后的5年生存率<4%^[1]. RON属于RTK亚家族中成员之一, 主要表达在上皮来源的细胞, RON活化后引起细胞转化、生长、迁移和基质侵袭. 目前研究已经证实, RON在人和小鼠胰腺癌细胞株^[2]和大肠癌临床标本^[3]中均有表达, 明显高于正常上皮. 本研究采用免疫组织化学法检测RON在胰腺癌组织、癌旁组织和正常胰腺组织中的表达情况, 并探讨RON与胰腺癌组织病理意义的关系.

1 材料和方法

1.1 材料 收集安徽医科大学第三附属医院普外科2005-01/2008-05胰腺癌手术标本31例, 以及8例正常胰腺组织来源于同期良性胰腺肿瘤切除距病变部位边缘2 cm的正常组织. 癌症患者男21例, 女10例; 年龄34-70(中位年龄为53)岁; 肿瘤部位: 胰头部22例, 胰体尾部9例; 组织类型: 导管腺癌29例, 腺泡细胞癌1例, 囊腺癌1例; TNM分期: I-II期14例, III-IV期17例; 淋巴结阳性19例, 淋巴结阴性12例; 肿瘤直径<2 cm 10例, ≥2 cm 21例; 所有患者术前均未进行化疗或放疗; 所有病例均同时取新鲜癌组织和癌旁组织标本, 取材后用250 g/L甲醛固定, 石蜡包埋; 所有肿瘤标本均经病理诊断证实. 兔抗人RON抗体(RON-βc-20, Santa Cruz公司); 即用型免疫组织化学超敏SP试剂盒购自福州迈新生物技术开发公司; 免疫组化染色结果判定采用HPIAS-100高清晰度彩色病理图文分析系统9.0.

1.2 方法 全部组织标本以100 g/L甲醛固定, 石蜡包埋, 4 μm连续切片后进行免疫组化染色. 本实验采用免疫组织化学方法(SP法), 按照SP试剂盒说明书操作. 一抗作用时间为室温条件下0.5 h, 稀释浓度为1:100. 以转染RON的NIH-3T3细胞为阳性对照, 以PBS代替一抗作为阴性对照. 镜下观察肿瘤细胞胞质内出现淡黄色至棕黄色颗粒为阳性染色; 采用灰度扫描, 染色强度越高, 灰度值越小.

统计学处理 采用SPSS11.0统计软件进行数据分析, 计量资料采用单因素方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 RON在肿瘤组织、癌旁组织及正常胰腺组织中的表达 RON在正常胰腺组织、癌旁组织、胰腺癌组织中均见阳性表达. 胰腺癌及癌旁中的表达强度高于正常胰腺组织, 胰腺癌RON的表达强度强于癌旁组织($P<0.05$). 几乎所有的肿瘤细胞均见RON阳性表达(图1).

表 1 RON在胰腺癌组织中的表达与临床病理学特征的关系

	<i>n</i>	RON表达灰度值
年龄(岁)		
<55	18	82.41 ± 5.74
≥55	13	79.69 ± 5.12
肿块大小(cm)		
<2	10	81.31 ± 4.79
≥2	21	80.63 ± 4.98
淋巴结转移		
有	19	74.53 ± 4.33
无	12	83.03 ± 4.47
TNM分期		
I-II	14	87.28 ± 5.78
III-IV	17	78.09 ± 4.27
病理类型		
导管腺癌	29	80.21 ± 5.22
腺泡细胞癌	1	78.19
囊腺癌	1	77.72
肿瘤位置		
胰头部	22	79.27 ± 4.46
胰体尾部	9	78.23 ± 5.61

2.2 RON在胰腺癌组织中的表达与临床病理学特征的关系 RON蛋白表达与患者年龄、肿瘤大小、组织学类型和肿瘤部位等均无关. 胰腺癌组织中RON的表达与肿瘤的分化程度和临床分期有关, 分化程度越低, RON的表达强度越高, III、IV期肿瘤RON的表达高于I、II期, 且RON表达强度随淋巴结转移而增高($P<0.05$, 表1).

3 讨论

RON基因含有20个外显子和19个内含子, 位于人染色体3p21, 其在胚胎发育中是不可或缺的. 成熟的RON蛋白是由40 kDa α链和150 kDa β链组成的180 kDa异二聚体, 跨膜β链具有酪氨酸激酶活性, 前体(pro-RON)以单链形式存在^[4-5]. RON胞外序列包含氨基末端semaphoring(Sema), plexin, semaphor-, integrin(PSI), 以及四个免疫球蛋白样IPT域等结构域. 目前已知6种变异体^[6-8], 根据分子质量大小命名为RONΔ170, RONΔ165, RONΔ160, RONΔ155, RONΔ110和RONΔ55. 主要通过交变的pre-mRNA剪接、蛋白质平截和替代转录等机制产生变异体^[9]. MSP是RON特异性配体, 也称为肝细胞生长因子样蛋白, 人MSP基因在3号染色体上, MSP并非胚胎发育所必须的. RON激活后通过不同级联途径转导信号, 这些途径包括Ras/MAPK, PI3K/AKT, junN-末端激酶(JNK)/应激激活蛋白激酶,

■研发前沿

近年的研究热点主要集中在研究RON在肿瘤发生、发展的分子机制, 探寻RON表达与肿瘤的内在联系, 确定RON表达强度与胰腺上皮内瘤变(PanINs)演变至胰腺癌之间的关系, 以及激活后下游信号通路之间的交互作用.

■相关报道

近年来研究发现, RON可在某些正常细胞被发现, 但在多数上皮源性肿瘤等可以检测到RON高表达. 转基因小鼠中高表达RON的肺模型, 最终导致肺癌的发生和发展. RON表达在小鼠乳腺中, 不仅可导致腺癌的发生, 还会引起肿瘤的快速转移.

创新盘点

本实验证实了RON在胰腺癌细胞内呈过表达;且强度与肿瘤临床分期、分化程度及淋巴结转移相关,为进一步研究RON在胰腺癌中的作用奠定了基础。

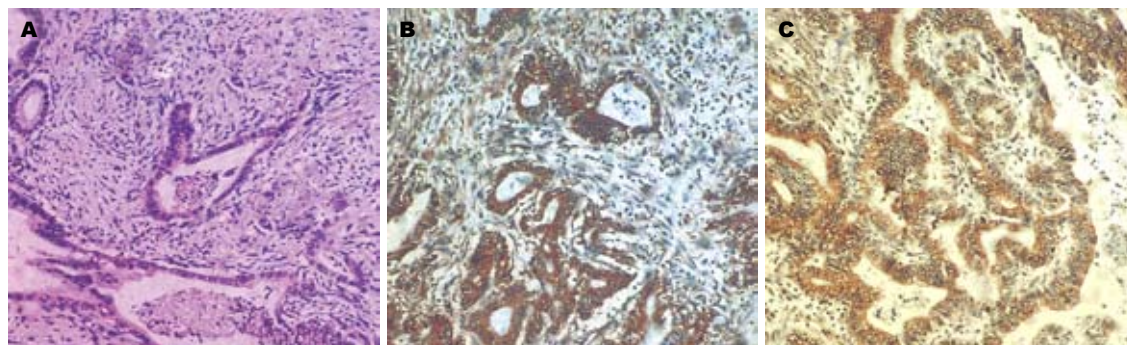


图1 RON在各组织中的表达(SP染色×100)。A: 正常胰腺组织; B: 胰腺癌旁组织; C: 胰腺癌组织。

β -catenin, Smad和核因子- κ B(NF- κ B)分子等^[9]。

免疫组织化学染色显示,胰腺癌中RON表达显著高于正常胰腺组织。实验中我们还发现胰腺上皮内瘤变(pancreatic intraepithelial neoplasias, PanINs)中RON的高表达,也暗示了RON与肿瘤的早期发生相关,但其作用机制尚未十分知晓,有待进一步研究证实。在上皮性肿瘤细胞中RON的表达发生了改变^[10-14],其异常变化如细胞黏附力、运动、侵袭性的增加、促使EMT(epithelial-mesenchymal transition)形成等可能参与了胰腺组织恶性变过程。本实验证实了RON在肿瘤细胞内呈过表达;且强度与肿瘤临床分期、分化程度及淋巴结转移相关。根据以上结果我们初步推测,在胰腺癌的发生发展过程中,RON过度激活,促进胰腺导管上皮细胞中的干细胞自我更新,然而长期慢性刺激使下游信号持续活化,最终导致干细胞恶性转化和过度增殖。

本研究初步证明,RON与胰腺癌的发生密切相关。同时应进一步探寻RON及其信号通路与肿瘤的内在联系,深入阐明其分子作用机制、配体与受体结合机制,洞悉其靶基因的转录机制及在细胞增殖和细胞转化中的作用机制。以开展针对RON为靶点的生物治疗研究,为胰腺癌临床治疗提供新手段。RON表达量的增多、异常突变体的出现与胰腺癌的发生、发展有关。

参考文献

- American Cancer Society. Cancer Facts and Figures 2006. Atlanta: American Cancer Society, Inc., 2006: 1-51
- Camp ER, Yang A, Gray MJ, Fan F, Hamilton SR, Evans DB, Hooper AT, Pereira DS, Hicklin DJ, Ellis LM. Tyrosine kinase receptor RON in human pancreatic cancer: expression, function, and validation as a target. *Cancer* 2007; 109: 1030-1039
- 孟庆勇, 卓文莹, 俞吉霞, 余永明. RON与转化生长因子- β 1在大肠癌中的表达及意义. *中华消化杂志* 2007; 27: 552-553
- Ronsin C, Muscatelli F, Mattei MG, Breathnach R.

A novel putative receptor protein tyrosine kinase of the met family. *Oncogene* 1993; 8: 1195-1202

- Gaudino G, Follenzi A, Naldini L, Collesi C, Santoro M, Gallo KA, Godowski PJ, Comoglio PM. RON is a heterodimeric tyrosine kinase receptor activated by the HGF homologue MSP. *EMBO J* 1994; 13: 3524-3532
- Lu Y, Yao HP, Wang MH. Multiple variants of the RON receptor tyrosine kinase: biochemical properties, tumorigenic activities, and potential drug targets. *Cancer Lett* 2007; 257: 157-164
- Xu XM, Zhou YQ, Wang MH. Mechanisms of cytoplasmic {beta}-catenin accumulation and its involvement in tumorigenic activities mediated by oncogenic splicing variant of the receptor originated from Nantes tyrosine kinase. *J Biol Chem* 2005; 280: 25087-25094
- Xu XM, Wang D, Shen Q, Chen YQ, Wang MH. RNA-mediated gene silencing of the RON receptor tyrosine kinase alters oncogenic phenotypes of human colorectal carcinoma cells. *Oncogene* 2004; 23: 8464-8474
- Wang MH, Wang D, Chen YQ. Oncogenic and invasive potentials of human macrophage-stimulating protein receptor, the RON receptor tyrosine kinase. *Carcinogenesis* 2003; 24: 1291-1300
- Zhou YQ, He C, Chen YQ, Wang D, Wang MH. Altered expression of the RON receptor tyrosine kinase in primary human colorectal adenocarcinomas: generation of different splicing RON variants and their oncogenic potential. *Oncogene* 2003; 22: 186-197
- Lee WY, Chen HH, Chow NH, Su WC, Lin PW, Guo HR. Prognostic significance of co-expression of RON and MET receptors in node-negative breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 2222-2228
- Cheng HL, Liu HS, Lin YJ, Chen HH, Hsu PY, Chang TY, Ho CL, Tzai TS, Chow NH. Co-expression of RON and MET is a prognostic indicator for patients with transitional-cell carcinoma of the bladder. *Br J Cancer* 2005; 92: 1906-1914
- Maggiora P, Lorenzato A, Fracchioli S, Costa B, Castagnaro M, Arisio R, Katsaros D, Massobrio M, Comoglio PM, Flavia Di Renzo M. The RON and MET oncogenes are co-expressed in human ovarian carcinomas and cooperate in activating invasiveness. *Exp Cell Res* 2003; 288: 382-389
- Wang MH, Lee W, Luo YL, Weis MT, Yao HP. Altered expression of the RON receptor tyrosine kinase in various epithelial cancers and its contribution to tumorigenic phenotypes in thyroid cancer cells. *J Pathol* 2007; 213: 402-411

编辑 史景红 电编 何基才

www.wjgnet.com

同行评价

本文研究了酪氨酸激酶RON在胰腺癌组织中的表达及其意义,选题较好,层次分明,统计正确,有一定的学术价值,但内容过于简单。

Midkine和Caspase-3在胰腺癌中的表达与细胞凋亡的关系

龙辉, 吴清明, 马松林, 刘群, 张金华, 陈新胜, 汪得胜, 赵丽莎, 李欢

龙辉, 吴清明, 马松林, 刘群, 张金华, 陈新胜, 汪得胜, 赵丽莎, 李欢, 武汉科技大学附属天佑医院消化内科 湖北省武汉市 430064

武汉科技大学附属天佑医院中青年科研基金资助项目, No. zq2008006

作者贡献分布: 此课题由龙辉, 吴清明及马松林查阅文献设计; 由龙辉, 马松林, 刘群及张金华完成免疫组化部分; 由吴清明, 陈新胜, 汪得胜及赵丽莎完成凋亡检测部分; 统计分析由李欢完成; 由龙辉, 吴清明及马松林完成资料查阅, 论文撰写及修改。

通讯作者: 马松林, 430064, 湖北省武汉市, 武汉科技大学附属天佑医院消化内科. songlinma@126.com

电话: 027-62858868

收稿日期: 2008-10-29 修回日期: 2008-11-18

接受日期: 2008-11-24 在线出版日期: 2008-12-18

Expression of Midkine and Caspase-3 and their relationship with apoptosis in pancreatic cancer

Hui Long, Qing-Min Wu, Song-Lin Ma, Qun Liu, Jin-Hua Zhang, Xin-Sheng Chen, De-Sheng Wang, Li-Sha Zhao, Huan Li

Hui Long, Qing-Min Wu, Song-Lin Ma, Qun Liu, Jin-Hua Zhang, Xin-Sheng Chen, De-Sheng Wang, Li-Sha Zhao, Huan Li, Department of Gastroenterology, Affiliated Tianyou Hospital of Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430064, Hubei Province, China

Supported by: Scientific Research Fund for Young Researchers Provided by Affiliated TianYou Hospital of Wuhan University of Science and Technology, No. zq2008006

Correspondence to: Song-Lin Ma, Department of Gastroenterology, Affiliated Tianyou Hospital of Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430064, Hubei Province, China. songlinma@126.com

Received: 2008-10-29 Revised: 2008-11-18

Accepted: 2008-11-24 Published online: 2008-12-18

Abstract

AIM: To study the expression of Midkine (MK) protein and Caspase-3 protein in human pancreatic cancer and to investigate their association with cell apoptosis.

METHODS: The immunohistochemical staining (SP) method was used to detect the expression of MK protein and Caspase-3 in 49 cases of pancreatic cancer tissues and 15 cases of normal pancreatic tissues. The TUNEL method was used to detect apoptotic index in pancreatic cancer tissues.

RESULTS: The positive rates of MK protein and

Caspase-3 protein were significantly higher in pancreatic cancer tissue than in normal pancreatic tissue (71.4% vs 0, $P < 0.01$; 77.6% vs 46.7%, $P < 0.05$). Expression of MK protein was correlated with tumor's histological grading, clinical stages and lymph node metastasis ($P < 0.05$) while expression of Caspase-3 protein was only correlated with tumor's histological grading ($P < 0.05$). The mean apoptotic index was significantly lower in MK positive expression group than in MK negative expression group (5.13 ± 2.69 vs 7.93 ± 6.65 , $P < 0.05$). The expression level of MK protein had a negative correlation with Caspase-3 ($r = -0.34$, $P < 0.05$).

CONCLUSION: The gene of Midkine and Caspase-3 participate in development of pancreatic cancer, and high express of Midkine has a biological function of inhibiting cell apoptosis possibly through suppressing cell activity of Caspase-3 protein.

Key Words: Pancreatic cancer; Midkine; Caspase-3; Apoptosis

Long H, Wu QM, Ma SL, Liu Q, Zhang JH, Chen XS, Wang DS, Zhao LS, Li H. Expression of Midkine and Caspase-3 and their relationship with apoptosis in pancreatic cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(35): 4015-4019

摘要

目的: 研究人胰腺癌组织中Midkine(MK)和Caspase-3蛋白的表达特点, 探讨其表达与胰腺癌细胞凋亡的关系。

方法: 收集人胰腺癌组织标本49例, 免疫组织化学SP法检测MK和Caspase-3蛋白的表达, 原位凋亡检测试剂盒辣根过氧化物酶(TUNEL)检测细胞凋亡指数。以同期15例正常胰腺组织标本为对照。

结果: MK蛋白、Caspase-3蛋白在胰腺癌组织中的阳性表达率高于正常胰腺组织(71.4% vs 0, $P < 0.01$; 77.6% vs 46.7%, $P < 0.05$), MK蛋白表达与胰腺癌组织学分化、临床分期和淋巴转移相关($P < 0.05$), Caspase-3蛋白表达仅与

■背景资料

胰腺癌因恶性程度高、治疗困难、预后差, 仍是肿瘤病学的一大挑战。研究并找到一种与胰腺癌发生发展密切相关的分子生物学标志物, 使其能够运用于筛查、早期诊断和(或)使其成为治疗靶标是当前胰腺肿瘤研究工作者最迫切的任务之一。

■同行评议者

李淑德, 主任医师, 中国人民解放军第二军医大学长海医院消化内科; 刘海林, 主任医师, 上海交通大学医学院附属第九人民医院消化科

■ 研发前沿

Midkine基因自1988年Ka *et al*从小鼠胚胎肿瘤细胞(HM-1)的cDNA文库中发现至今,被越来越多的研究证实其在多种恶性肿瘤中高度表达,而不见表达于相应的正常组织。在恶性肿瘤患者血液和尿液中能够检测到Midkine表达,且其表达浓度明显高于正常人并与肿瘤临床病理存在一定相关性,这使Midkine很有希望成为一种新的肿瘤标志物在肿瘤的诊断、治疗和判断预后中发挥作用。

组织学分化有关;胰腺癌组织标本中,MK阳性表达组凋亡指数显著低于MK阴性表达组(5.13 ± 2.69 vs 7.93 ± 6.65 , $P < 0.05$);胰腺癌组织中MK与Caspase-3蛋白的表达呈负相关($r = -0.34$, $P < 0.05$)。

结论: MK和Caspase-3参与了胰腺癌的发生发展,MK在胰腺癌组织中的高表达具有抑制细胞凋亡的生物学功能,其作用机制可能是通过抑制Caspase-3的活性。

关键词: 胰腺癌; Midkine; Caspase-3; 细胞凋亡

龙辉, 吴清明, 马松林, 刘群, 张金华, 陈新胜, 汪得胜, 赵丽莎, 李欢. Midkine和Caspase-3在胰腺癌中的表达与细胞凋亡的关系. 世界华人消化杂志 2008; 16(35): 4015-4019
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/4015.asp>

0 引言

细胞凋亡(apoptosis)是一种由基因控制的细胞自主性死亡方式。正常状态下细胞凋亡与细胞增殖维持着动态平衡,对维护机体内环境的稳定具有至关重要的作用。大量体内外相关研究表明,肿瘤的发生发展与肿瘤细胞的凋亡现象共存,与细胞的凋亡速度密切相关,促进细胞凋亡在抑制肿瘤发生、发展中的作用日益为人们所重视^[1]。Midkine(MK)是一种新的肝素结合性生长分化因子,近年来被越来越多的研究证实其在多种恶性肿瘤中高度表达,由于其独特的结构、特殊的组织分布与抗凋亡、促血管新生等生物学功能,引起了肿瘤研究工作者的浓厚兴趣,使其成为目前研究的热点之一^[2],在胰腺癌中也证实MK的过表达^[3],但具体的生物学功能及作用机制尚不清楚。Caspase-3是凋亡信号传导通路中的重要执行分子,其表达具有反映凋亡启动因素存在和凋亡发生的双重生物学效应,其激活后导致细胞的不可逆性凋亡^[4]。

本实验采用免疫组织化学SP法检测胰腺癌组织中MK和Caspase-3蛋白的表达情况,并用原位凋亡检测TUNEL法检测胰腺癌组织中的细胞凋亡,拟探讨MK和Caspase-3蛋白在胰腺癌组织中的表达特点及其与细胞凋亡的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 收集武汉同济医院及武汉科技大学附属天佑医院2000-01/2007-10外科手术切除的胰腺癌标本49例,患者术前均未行放疗及化疗,术后经组织病理学证实为胰腺腺癌。其中男30例,女19例,年龄21-75岁;组织学分级高中分化30例,

低分化19例;伴有淋巴结转移31例,无淋巴结转移18例;按TNM分期标准I、II期21例,III、IV期28例。另取同期病理证实的15例正常胰腺组织作为对照,主要来自尸检标本。所有标本常规石蜡包埋,4 μ m连续切片。

兔抗人MK、Caspase-3多克隆抗体购自武汉博士德生物工程有限公司,工作浓度1:50;兔抗SP试剂盒、DAB显色试剂盒、原位凋亡检测试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 检测: 免疫组化实验步骤按SP试剂盒说明书进行,以微波枸橼酸盐进行抗原热修复,DAB显色,苏木素复染。用已知的MK和Ki67阳性片作为阳性对照,PBS代替一抗作为阴性对照。TUNEL法检测凋亡按试剂盒说明进行,DAB显色,苏木素复染。

1.2.2 结果判定: MK及Caspase-3蛋白的表达以细胞胞质中出现清晰棕黄色颗粒为阳性细胞,计算阳性细胞百分率,阳性细胞数 $< 5\%$ 为阴性(-), $\geq 5\%$ 为阳性(+). 凋亡细胞以细胞胞核被染成棕黄色为阳性细胞,高倍镜下随机计数至少10个视野1000个细胞,计算凋亡指数(Apoptosis index, AI) = 阳性细胞总数/1000 $\times 100\%$ 。

统计学处理 MK及Caspase-3蛋白的表达用阳性例数计数表示,凋亡指数用mean \pm SD表示,所有数据均用SPSS12.0统计软件包进行统计学处理,结果分析用 χ^2 检验或Fisher精确概率法及相关性分析,两组间AI分析用 t 检验。以 $P < 0.05$ 为有显著统计学意义。

2 结果

2.1 MK和Caspase-3在胰腺癌及正常胰腺组织中的表达特点 49例胰腺癌组织中MK蛋白阳性表达率为71.4%,其阳性表达主要定位于肿瘤细胞胞质,细胞外间质中血管密集处血管内皮细胞也有阳性染色(图1)。MK蛋白在胰腺癌组织中的表达与性别、年龄无关,组织学分级低分化者MK表达阳性率高于高中分化者($P < 0.05$),TNM分期III、IV期者高于I、II期者($P < 0.05$),有淋巴结转移者高于无淋巴结转移者($P < 0.05$,表1)。15例正常胰腺组织中均未见MK阳性表达,与胰腺癌组织组织统计学差异性极其显著($P < 0.01$)。

49例胰腺癌组织中有38例Caspase-3蛋白阳性表达率为77.6%(38/49)。胰腺癌组织中Caspase-3蛋白的阳性表达主要定位于细胞胞质(图2)。Caspase-3蛋白在胰腺癌组织中的表达与性别、年龄无关,组织学分级低分化者低于高中

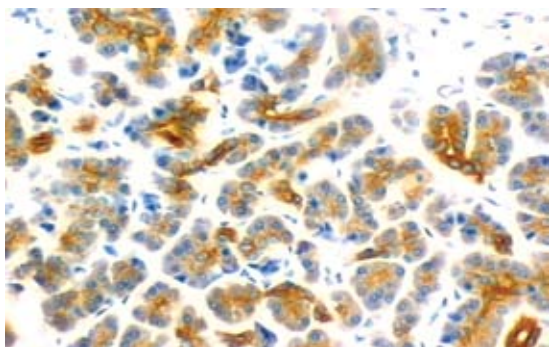


图 1 胰腺癌组织中Midkine强阳性表达(SP × 200, 阳性表达主要见于胞质)。

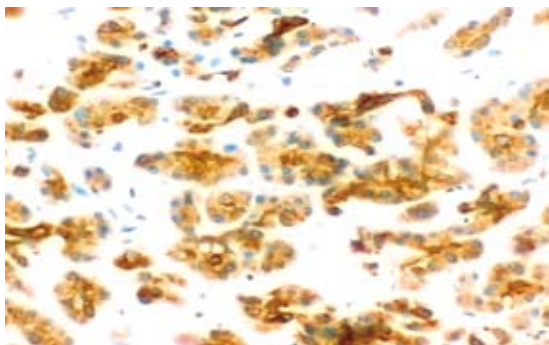


图 2 Caspase-3在胰腺癌组织中强阳性表达(SP × 200, 阳性表达主要见于胞质)。

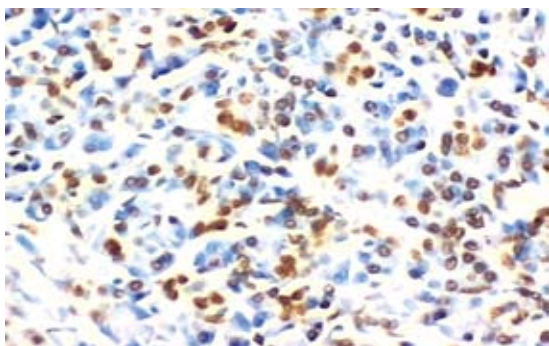


图 3 胰腺癌组织中细胞凋亡(TUNEL × 200, 凋亡细胞核固缩, 呈棕黄色)。

分化者($P < 0.01$), TNM分期III、IV期者与I、II期者无显著统计学差异性, 有淋巴转移者与无淋巴转移者也无显著统计学差异性。Caspase-3蛋白在15例正常胰腺组织中有7例阳性表达, 阳性率为46.7%(7/15), 低于胰腺癌组织($P < 0.05$)。

2.2 AI(mean ± SD) 15例正常胰腺组织中细胞凋亡程度较低, 平均凋亡指数为 0.63 ± 0.21 。所有胰腺癌组织标本均可检测到凋亡细胞(图3), 49例胰腺癌组织平均凋亡指数为 5.93 ± 4.18 。胰腺癌组织中的凋亡指数高于正常胰腺组织, 两者有显著统计学差异性($P < 0.01$)。

表 1 胰腺癌组织中Midkine及细胞凋亡指数与肿瘤临床病理之间的联系

分组	n	Midkine		细胞凋亡	
		阳性数	P值	AI	P值
性别					
男	30	21	0.781	5.56 ± 3.94	0.440
女	19	14		6.51 ± 4.54	
年龄					
≥50	37	27	0.958	5.97 ± 4.23	0.850
<50	12	8		5.86 ± 3.57	
组织学分级					
高中分化	30	18	0.026	7.04 ± 4.77	0.023
低分化	19	17		4.17 ± 2.99	
临床分期					
I + II期	21	11	0.011	7.83 ± 4.91	0.008
III + IV期	28	24		4.51 ± 3.54	
淋巴转移					
有	31	26	0.011	4.73 ± 3.79	0.011
无	18	9		7.99 ± 4.79	

表 2 胰腺癌组织中MK蛋白的表达与细胞凋亡的关系

MK	细胞凋亡		t	P
	n	AI		
+	35	5.13 ± 2.69	2.120	0.039
-	14	7.93 ± 6.65		

胰腺癌组织标本中, 凋亡指数与性别、年龄无关($P > 0.05$), AI有随肿瘤进展而降低的趋势, 组织学分级高中分化者AI大于低分化者($P < 0.05$), TNM分期I、II期者AI大于III、IV期者($P < 0.01$), 无淋巴转移者AI大于有淋巴转移者($P < 0.05$, 表1)。

2.3 MK在胰腺癌中的表达与细胞凋亡的关系 49例胰腺癌组织按MK蛋白是否阳性表达分成两组进行统计分析。MK阳性表达组(35例)平均凋亡指数为 5.13 ± 2.69 , 显著低于MK阴性表达组(14例)凋亡指数 7.93 ± 6.65 ($P < 0.05$, 表2)。

2.4 胰腺癌组织中MK和Caspase-3蛋白表达之间的关系 将49例胰腺癌组织分为MK阳性表达组(35例)和MK阴性表达组(14例)进行统计分析, MK阳性表达组中Caspase-3蛋白阳性率为68.6%(24例), MK阴性表达组中Caspase-3蛋白阳性率为100%(14例), 且两组间具有显著性差异($P < 0.05$)。胰腺癌组织中MK与Caspase-3蛋白的表达存在负相关($r = -0.34$, $P < 0.05$, 表3)。

3 讨论

细胞凋亡又称程序性细胞死亡(programmed cell

■相关报道

Owada *et al*发现Midkine基因可以抑制Caspase介导的细胞凋亡。

■创新盘点

本研究表明, Midkine在胰腺癌组织中存在过表达, 其过表达可能起到抑制胰腺肿瘤细胞凋亡的目的, 其机制可能是通过抑制凋亡相关蛋白Caspase-3的活性, 为进一步研究其生物学意义打开思路。

表 3 胰腺癌组织中MK与Caspase-3蛋白表达的关系 (n)

MK	Caspase-3		<i>r</i>	<i>P</i>
	+	-		
+	24	11	-0.340	0.021
-	14	0		

death, PCD), 是一种基因控制的细胞自主性死亡过程, 是维持机体内环境稳定的重要机制之一。他是多细胞生物体内的一个重要生命现象, 既出现在个体发育过程中, 也出现在正常生理状态或疾病中, 既在体内发生, 也出现在体外培养物中。细胞凋亡在胚胎发育、神经系统的功能完善以及免疫功能调节等方面具有关键性的作用。细胞凋亡功能亢进与组织损伤和器官功能衰竭的发病密切相关, 而细胞凋亡功能的抑制将导致肿瘤的发生及免疫功能的异常^[1]。

细胞凋亡的机制尚不完全清楚。但在过去的几年里, 凋亡的基础研究已取得了巨大进展, 认为细胞内所发生的与凋亡有关的一系列有序的级联反应, 关键是激活了一组被称为Caspase的蛋白酶^[5]。

Caspase是一组半胱氨酸蛋白酶家族, 其家族成员在细胞凋亡过程中起重要作用。他们通过切断与周围细胞的联络、重组细胞骨架、关闭DNA复制核修复、破坏DNA和核结构、诱导凋亡小体的形成等途径促使细胞凋亡。通过生物化学和遗传研究表明, Caspase蛋白酶家族在细胞凋亡发生过程中的各个阶段都发挥重要作用。在细胞凋亡过程中根据Caspase的作用不同, 研究者将Caspase分为始动Caspase和执行Caspase, 前者包括Caspase-8、Caspase-9、Caspase-10, 后者包括Caspase-3、Caspase-6、Caspase-7。其中Caspase-3是已知的该家族成员中执行细胞凋亡的关键酶之一, 许多的细胞外凋亡信号使之激活, 使胞质、胞核及细胞骨架的重要蛋白酶失活, 引发细胞凋亡。目前相关研究认为Caspase-3与胰腺癌细胞凋亡也是密切相关的^[6-8]。

MK表达于多种恶性肿瘤中, 在消化系统肝癌、胆囊癌、食管癌、胃癌、大肠癌均有MK过表达报导^[9-10], 但目前有关MK基因在胰腺癌中表达及其生物学功能的报道尚少。从本实验研究结果我们看到MK蛋白在正常胰腺组织中不表达, 而在胰腺癌组织中呈高表达71.4%(35/49), 且MK蛋白的表达与胰腺癌组织

学分级、临床分期、淋巴转移密切相关, 在胰腺癌早期就存在MK的过表达, 但随肿瘤进展其表达增高。提示我们MK不仅参与了胰腺癌的发生, 且与胰腺癌的进展密切相关。而其在正常胰腺组织中完全不表达, 提示MK蛋白不仅可望成为胰腺癌早期诊断的标志物之一, 并可作为评估胰腺癌手术治疗后疗效及判断预后的一个辅助指标。

在分析Caspase-3表达特点时发现, Caspase-3在正常胰腺组织和胰腺癌组织标本中均高表达, 但在胰腺癌组织中表达更高, 其表达与组织学分级相关, 低分化者低于高中分化者($P<0.05$), 提示在肿瘤分化的不同阶段肿瘤凋亡蛋白Caspase-3的表达程度亦不同。

有意义的是, 本实验中我们发现, 胰腺癌组织中细胞凋亡明显强于正常胰腺组织细胞凋亡, 但在胰腺癌进展过程中, 细胞凋亡有随肿瘤进展而降低的趋势, 高中分化者大于低分化者($P<0.05$), TNM分期 I、II期者大于III、IV期者($P<0.01$), 无淋巴转移者大于有淋巴转移者($P<0.05$)。提示我们在胰腺癌发生发展过程中, 细胞凋亡被抑制起着非常重要的作用: 在胰腺癌早期, 机体存在较高的细胞凋亡, 这种较高的细胞凋亡可能是机体的一种防御性反应来清除病变细胞。但随着肿瘤进展, 由于各种因素导致凋亡受抑, 肿瘤细胞呈无限制增殖状态从而使胰腺癌病变不断进展恶化。

本实验在研究MK蛋白的表达与肿瘤细胞凋亡关系时发现: 35例MK阳性表达组中平均凋亡指数为 5.13 ± 2.69 , 显著低于MK阴性表达组平均凋亡指数 7.93 ± 6.65 , 差异具有显著性($P<0.05$), 提示MK蛋白在胰腺癌组织中的高表达可能抑制细胞凋亡。

目前已有相关的实验在研究MK抑制细胞凋亡的具体途径。Salama *et al*^[11]发现MK可与层黏蛋白连接蛋白前体结合, 之后转移至细胞核发挥作用; Stoica *et al*^[12]证实MK可紧密连接于细胞表面受体间变性淋巴瘤激酶(ALK), 并进一步激活磷脂酰肌醇3激酶和丝裂素活化蛋白激酶转导途径; Shibata *et al*^[13]发现外源性MK通过低密度脂蛋白受体相关蛋白结合后, 经胞饮作用进入细胞膜后转移至核内发挥其生理、病理作用, 此过程可能与MK抗凋亡作用相关。确切的生物学机制仍有待进一步实验研究。

从我们实验结果中进一步分析MK和Caspase-3蛋白在胰腺癌组织中表达与细胞凋亡

关系时发现, 35例MK蛋白阳性表达组Caspase-3蛋白阳性率为68.6%, 14例MK蛋白阴性表达组中有全部Caspase-3蛋白阳性表达, 阳性率为100%, 两者差异有显著性且存在负相关($r = -0.34$, $P < 0.05$). 即MK蛋白在胰腺癌组织中的高表达与Caspase-3蛋白的表达负相关, 提示MK可能是通过调控Caspase-3的表达从而实现其部分生物学功能的. 而Caspase-3是已知的执行细胞凋亡的关键酶之一, 故进一步提示我们MK可能是通过抑制Caspase-3的活性从而抑制胰腺癌细胞凋亡. 这对于更深层次的研究MK在胰腺癌中过表达的生物学意义很有帮助.

由于胰腺癌早期诊断率低, 确诊时往往已属晚期, 因此根治手术机会较小, 且胰腺癌对放化疗均不敏感, 故基因治疗成为目前胰腺癌治疗研究的热点之一. 胰腺癌基因治疗的关键是由载体将目的基因安全、特异、高效地转染至靶细胞, 目前多采用病毒及脂质体方法, 但转染效率较低^[14]. 近年来MK基因已成为抗肿瘤治疗的研究方向之一^[15-16]. Takei *et al*在体外和动物实验中设计MK反义寡脱氧核糖核苷酸用于直肠癌等肿瘤基因治疗, 实验结果显示能够抑制肿瘤细胞生长^[17-18]. Inoh *et al*^[19]试验将阿霉素结合的抗MK mAb用于抗肿瘤治疗. 本研究发现MK在胰腺癌组织中高表达而不表达于相应正常胰腺组织, 且MK在胰腺癌组织中可能具有的抑凋亡作用, 并与Caspase-3的表达具有负相关关系, 从而提示我们提示通过基因或药物方法特异性阻断MK的表达, 和(或)抑制Caspase-3活性从而阻断其作用途径, 可能达到促进胰腺癌肿瘤细胞凋亡的目的从而使MK基因成为胰腺癌基因治疗的新靶点和基因方法, 这也是我们下一步实验的目的.

4 参考文献

- 1 Evan GI, Vousden KH. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 2001; 411: 342-348
- 2 Kadomatsu K, Muramatsu T. Midkine and pleiotrophin in neural development and cancer. *Cancer Lett* 2004; 204: 127-143
- 3 Ohhashi S, Ohuchida K, Mizumoto K, Egami T, Yu J, Cui L, Toma H, Takahata S, Nabae T, Tanaka M. Midkine mRNA Is Overexpressed in Pancreatic Cancer. *Dig Dis Sci* 2008 Aug 21. [Epub ahead of print]
- 4 Sun BH, Zhang J, Wang BJ, Zhao XP, Wang YK, Yu ZQ, Yang DL, Hao LJ. Analysis of in vivo patterns of caspase 3 gene expression in primary hepatocellular carcinoma and its relationship to p21(WAF1) expression and hepatic apoptosis. *World J Gastroenterol* 2000; 6: 356-360
- 5 Gao C, Tsuchida N. Activation of caspases in p53-induced transactivation-independent apoptosis. *Jpn J Cancer Res* 1999; 90: 180-187
- 6 Satoh K, Kaneko K, Hirota M, Toyota T, Shimosegawa T. The pattern of CPP32/caspase-3 expression reflects the biological behavior of the human pancreatic duct cell tumors. *Pancreas* 2000; 21: 352-357
- 7 Meggiato T, Calabrese F, De Cesare CM, Baliello E, Valente M, Del Favero G. C-JUN and CPP32 (CASPASE 3) in human pancreatic cancer: relation to cell proliferation and death. *Pancreas* 2003; 26: 65-70
- 8 Chen MJ, Chang WH, Lin CC, Liu CY, Wang TE, Chu CH, Shih SC, Chen YJ. Caffeic acid phenethyl ester induces apoptosis of human pancreatic cancer cells involving caspase and mitochondrial dysfunction. *Pancreatol* 2008; 8: 566-576
- 9 王明海, 滕木俭, 王兴国, 段升军, 潘乐玉. 原发性肝癌患者外周血中期因子水平与肝癌临床病理特征及预后的关系. *中华普通外科杂志* 2006; 21: 826-827
- 10 赵治国, 史非涛, 周明锴, 崔静, 付刚, 刘占举. 胃癌组织中MK、VEGF表达的意义. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 3517-3520
- 11 Salama RH, Muramatsu H, Zou K, Inui T, Kimura T, Muramatsu T. Midkine binds to 37-kDa laminin binding protein precursor, leading to nuclear transport of the complex. *Exp Cell Res* 2001; 270: 13-20
- 12 Stoica GE, Kuo A, Powers C, Bowden ET, Sale EB, Riegel AT, Wellstein A. Midkine binds to anaplastic lymphoma kinase (ALK) and acts as a growth factor for different cell types. *J Biol Chem* 2002; 277: 35990-35998
- 13 Shibata Y, Muramatsu T, Hirai M, Inui T, Kimura T, Saito H, McCormick LM, Bu G, Kadomatsu K. Nuclear targeting by the growth factor midkine. *Mol Cell Biol* 2002; 22: 6788-6796
- 14 巩鹏, 王忠裕. 胰腺癌基因治疗进展. *国外医学·肿瘤学分册* 2003; 30: 463-465
- 15 Hoffmann D, Wildner O. Restriction of adenoviral replication to the transcriptional intersection of two different promoters for colorectal and pancreatic cancer treatment. *Mol Cancer Ther* 2006; 5: 374-381
- 16 Toyoda E, Doi R, Kami K, Mori T, Ito D, Koizumi M, Kida A, Nagai K, Ito T, Masui T, Wada M, Tagawa M, Uemoto S. Midkine promoter-based conditionally replicative adenovirus therapy for midkine-expressing human pancreatic cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 2008; 27: 30
- 17 Takei Y, Kadomatsu K, Matsuo S, Itoh H, Nakazawa K, Kubota S, Muramatsu T. Antisense oligodeoxynucleotide targeted to Midkine, a heparin-binding growth factor, suppresses tumorigenicity of mouse rectal carcinoma cells. *Cancer Res* 2001; 61: 8486-8491
- 18 Takei Y, Kadomatsu K, Itoh H, Sato W, Nakazawa K, Kubota S, Muramatsu T. 5'-,3'-inverted thymidine-modified antisense oligodeoxynucleotide targeting midkine. Its design and application for cancer therapy. *J Biol Chem* 2002; 277: 23800-23806
- 19 Inoh K, Muramatsu H, Torii S, Ikematsu S, Oda M, Kumai H, Sakuma S, Inui T, Kimura T, Muramatsu T. Doxorubicin-conjugated anti-midkine monoclonal antibody as a potential anti-tumor drug. *Jpn J Clin Oncol* 2006; 36: 207-211

■同行评价

本文探讨胰腺癌Midkine和Caspase-3表达, 有重要理论和临床意义.

编辑 史景红 电编 何基才

转化生长因子 β 1基因C-509T多态与结直肠癌遗传易感性的相关性

吴慧民, 范跃祖, 刘文方, 何向蕾, 朱冠山, 朱忠政, 王爱忠

■背景资料

TGF- β 1基因与恶性肿瘤发生密切相关, 近来有关该基因C-509T多态性与肿瘤遗传易感性关系的研究备受关注。目前TGF- β 1 C-509T与结直肠癌相关性的报道缺乏一致性。

吴慧民, 范跃祖, 刘文方, 同济大学附属同济医院普外科 上海市 200065

何向蕾, 宁波市李惠利医院病理科 浙江省宁波市 315041

朱冠山, 阿斯利康中国创新中心 上海市 201203

朱忠政, 王爱忠, 中国人民解放军第一一三医院病理科 浙江省宁波市 315040

国家自然科学基金资助项目, No. 30470791

南京军区医学科学技术研究“十一五”计划资助项目, No. 06MA27

作者贡献分布: 此课题由吴慧民, 范跃祖, 刘文方, 何向蕾, 朱冠山, 朱忠政及王爱忠设计; 研究过程由吴慧民, 刘文方及朱冠山操作完成; 数据分析由吴慧民, 刘文方, 何向蕾, 朱忠政及王爱忠完成; 本论文写作由吴慧民, 范跃祖, 朱忠政及王爱忠完成。

通讯作者: 王爱忠, 315040, 浙江省宁波市中山东路377号, 中国人民解放军第一一三医院病理科. waz1113@126.com

电话: 0574-27754043

收稿日期: 2008-10-25 修回日期: 2008-11-12

接受日期: 2008-11-17 在线出版日期: 2008-12-18

Transforming growth factor-beta 1 gene C-509T polymorphism and genetic susceptibility to colorectal cancer

Hui-Min Wu, Yue-Zu Fan, Wen-Fang Liu, Xiang-Lei He, Guan-Shan Zhu, Zhong-Zheng Zhu, Ai-Zhong Wang

Hui-Min Wu, Yue-Zu Fan, Wen-Fang Liu, Department of General Surgery, Tongji Hospital Affiliated to Tongji University, Shanghai 200065, China

Xiang-Lei He, Department of Pathology, Lihuili Hospital, Ningbo 315041, Zhejiang Province, China

Guan-Shan Zhu, Innovation Center China, AstraZeneca Global R&D, Shanghai 201203, China

Zhong-Zheng Zhu, Ai-Zhong Wang, Department of Pathology, No. 113 Hospital of People's Liberation Army, Ningbo 315040, Zhejiang Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30470791; and Medical Science and Technology Research Foundation for the 11th 5-Year Program of Chinese PLA, Nanjing Branch, P.R. China, No. 06MA27

Correspondence to: Dr. Ai-Zhong Wang, Department of Pathology, No. 113 Hospital of People's Liberation Army, 377 East Zhongshan Road, Ningbo 315040, Zhejiang Province, China. waz1113@126.com

Received: 2008-10-25 Revised: 2008-11-12

Accepted: 2008-11-17 Published online: 2008-12-18

Abstract

AIM: To examine the possible association between the C-509T polymorphism of transforming growth factor-beta 1 (TGF- β 1) gene

and susceptibility to colorectal cancer (CRC) in Chinese population.

METHODS: The TGF- β 1 C-509T genotypes were determined by using the real-time PCR technology with TaqMan MGB probes in 345 CRC cases and 670 controls matched with sex and age. Odds ratios (ORs) for CRC and 95% confidence intervals (CIs) from unconditional logistic regression models were used to evaluate relative risks. Potential CRC risk factors, including sex, age, cigarette smoking, alcohol drinking, body mass index (BMI) and family history of colorectal cancer were included in the logistic regression models as a covariate in the multivariate analyses on genotype and CRC risk.

RESULTS: The T allele frequencies of the TGF- β 1 C-509T polymorphism were 0.435 in CRC cases and 0.488 in controls, respectively. The T allele had a significantly decreased risk for CRC (95%CI 0.68-0.99, $P = 0.037$) as compared with the C allele. When compared with CC homozygote, CT heterozygote had a 0.79-fold decreased risk (95%CI 0.58-1.08, $P = 0.137$), whereas TT homozygote had a 0.66-fold significantly decreased risk (95%CI 0.45-0.96, $P = 0.032$) of CRC. The T-allele carriers (CT or TT genotypes) had a marginally significantly decreased CRC risk ($OR = 0.75$, 95%CI 0.56-1.00, $P = 0.052$) when compared with CC genotype.

CONCLUSION: The T allele of TGF- β 1 C-509T was associated with the decreased risk of CRC and TT homozygote is potentially one of the genetic protective factors for CRC in Chinese population.

Key Words: Colorectal cancer; Transforming growth factor- β 1; Genetic polymorphism; Genetic susceptibility

Wu HM, Fan YZ, Liu WF, He XL, Zhu GS, Zhu ZZ, Wang AZ. Transforming growth factor-beta 1 gene C-509T polymorphism and genetic susceptibility to colorectal cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(35): 4020-4023

■同行评议者

王振宇, 教授, 中国医科大学附属第一医院肿瘤外科; 王晓艳, 副教授, 湖南长沙中南大学湘雅三医院消化内科

摘要

目的: 探讨转化生长因子 $\beta 1$ 基因(TGF- $\beta 1$)C-509T多态与结直肠癌(colorectal cancer, CRC)遗传易感性的关系。

方法: 采用TaqMan方法检测345例CRC与670名对照的TGF- $\beta 1$ C-509T基因型分布及差异。

结果: CRC组与对照组T等位基因频率分别为43.5%、48.8%, T的CRC发病风险是C的0.82倍(95%CI 0.68-0.99, $P = 0.037$)。与CC纯合子相比, CT杂合子引起CRC风险为0.79倍(95%CI 0.58-1.08, $P = 0.137$), 而TT纯合子引起CRC风险显著降低至0.66倍(95%CI 0.45-0.96, $P = 0.032$)。将CT、TT基因型合并计算, 则其CRC发病风险与CC基因型相比降低至0.75倍(95%CI 0.56-1.00, $P = 0.052$)。

结论: TGF- $\beta 1$ 基因C-509T多态是中国人重要的CRC遗传保护因子, 可作为CRC发病风险评估的筛选指标。

关键词: 结直肠癌; 转化生长因子 $\beta 1$; 基因多态; 遗传易感性

吴慧民, 范跃祖, 刘文方, 何向蕾, 朱冠山, 朱忠政, 王爱忠. 转化生长因子 $\beta 1$ 基因C-509T多态与结直肠癌遗传易感性的相关性. 世界华人消化杂志 2008; 16(35): 4020-4023
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/4020.asp>

0 引言

大量的研究表明, 转化生长因子 $\beta 1$ (transforming growth factor beta 1, TGF- $\beta 1$)信号传导通路通过控制细胞增殖、分化和凋亡在肿瘤的发生中发挥重要的作用, 而作为该通路的核心基因, TGF- $\beta 1$ 异常表达与肿瘤发生密切相关^[1]。研究发现, TGF- $\beta 1$ 的基因表达受遗传学调控, 因此, 其基因启动子区域的遗传多态性改变可能参与基因的表达调控, 从而修饰肿瘤的发病风险。目前研究最多的TGF- $\beta 1$ 基因启动子区域的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)位点是转录起始点前第509位点的C或T多态(C-509T)。已有功能学研究显示, 这种C-509T多态性可能改变TGF- $\beta 1$ 基因的转录水平, 从而影响TGF- $\beta 1$ 基因的表达^[2]。近来, 有关TGF- $\beta 1$ C-509T与包括结直肠癌(colorectal cancer, CRC)在内的肿瘤遗传易感性关系的研究备受关注。本研究在大样本基础上探讨了TGF- $\beta 1$ C-509T与中国人CRC发病风险的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 宁波中国人民解放军第一一三医院和李惠利医院于2003-2005年收治的345例住院CRC患者设为病例组, 诊断均经组织病理学证实, 其中男198例, 女147例, 患者年龄25-85(平均 58.7 ± 13.5)岁。病例组对象纳入标准包括: 汉族; 年龄 ≥ 25 岁; 组织病理学诊断为原发性结直肠癌; 术前未经放疗、化疗等治疗。剔除标准为家族性腺瘤性息肉病和遗传性非腺瘤性结肠癌。对照组为同时期同一地区健康无血缘关系的个体, 共670名。对照组与病例组在性别、年龄、吸烟和饮酒方面保持均衡可比。以问卷调查和病历记录方法取得所有研究对象的有关资料。本研究经医院伦理委员会批准, 所有研究对象均同意并填写知情同意书^[3]。

1.2 方法 按常规蛋白酶K、酚/氯仿法提取外周血白细胞基因组DNA。采用TaqMan方法检测TGF- $\beta 1$ C-509T基因型, 由上海基康生物技术有限公司完成。引物和探针序列: 上游引物F, 5'-AAG GAG AGC AAT TCT TAC AGG TGT CT-3'; 下游引物R, 5'-GCC TCC GGA GGG TGT CA-3'; 等位基因T特异性TaqMan探针, 5'-FAM-CAT CCT TCA GGT GTC-MGB-3'; 等位基因C特异性TaqMan探针, 5'-TET-CCA TCC CTC AGG TGT-MGB-3'; 扩增片段长度93 bp。PCR扩增体系(25 μ L)中含: 1 \times TaqMan PCR master mix(Applied Biosystems, Foster City, CA), 1 μ L(50 mg/L)基因组DNA, 1 μ mol/L上游引物, 1 μ mol/L下游引物, 0.2 μ mol/L FAM-标记探针, 0.2 μ mol/L TET-标记探针。扩增参数: 50 $^{\circ}$ C预热2 min, 95 $^{\circ}$ C预变性10 min, 然后95 $^{\circ}$ C变性15 s, 62 $^{\circ}$ C复性1 min, 共40个循环。最后在ABI 7900上检测荧光信号。基因型分析结果用Sequence Detector System 2.0软件(Applied Biosystems, Foster City, CA)。

统计学处理 以非条件Logistic回归法计算表示相对危险度的比值比(OR)及其95%可信区间(CI)。OR值均经性别、年龄、吸烟、饮酒、体质指数和CRC家族史因素校正。两组人群CRC混淆因素比较采用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 作为有统计学意义。采用统计分析系统Stata9.0进行数据分析。

2 结果

2.1 两组人群CRC混淆因素比较 两组人群的性别、年龄、吸烟、饮酒和体质指数构成差异

■研究前沿

近年来, TGF- $\beta 1$ 基因多态性与肿瘤相关性研究日益受到重视, 但结果存在分歧, 可能与样本量小、种族差异和疾病遗传异质性等有关, 需要进一步扩大样本、统一研究方法及统计标准, 深入研究。

■应用要点

TGF- β 1 基因 C-509T 多态是中国人患结直肠癌的一个遗传保护分子,可作为结直肠癌发病风险的评价指标之一。

表 1 两组对象多种混淆因素频率比较 $n(\%)$

分组	n	性别		年龄(岁)		吸烟		饮酒		体质量指数(kg/m ²)		CRC家族史	
		女	男	≤60	>60	否	是	否	是	≤22.9	>22.9	无	有
CRC	345	147 (42.6)	198 (57.4)	178 (51.6)	167 (48.4)	231 (67.0)	114 (33.0)	263 (76.2)	82 (23.8)	196 (56.8)	149 (43.2)	307 (89.0)	38 (11.0)
对照	670	290 (43.3)	380 (56.7)	336 (50.1)	334 (49.9)	464 (69.3)	206 (30.7)	500 (74.6)	170 (25.4)	400 (59.7)	270 (40.3)	637 (95.1)	33 (4.9)
χ^2		0.042		0.190		0.557		0.314		0.785		12.979	
P 值 ¹		0.837		0.663		0.456		0.575		0.376		<0.001	

¹双侧 χ^2 检验。

表 2 TGF- β 1 C-509T 频率分布及其与CRC风险

TGF- β 1 C-509T	对照组 $n(\%)$	CRC组 $n(\%)$	校正OR(95%CI) ¹	P 值 ¹
基因型				
CC	176(26.3)	109(31.6)	1.00(Reference)	
CT	340(50.7)	172(49.9)	0.79(0.58-1.08)	0.137
TT	154(23.0)	64(18.6)	0.66(0.45-0.96)	0.032
CT+TT	494(73.7)	236(68.4)	0.75(0.56-1.00)	0.052
等位基因型				
C	692(51.6)	390(56.5)	1.00	
T	648(48.8)	300(43.5)	0.82(0.68-0.99)	0.037

¹经性别、年龄、吸烟、饮酒、体质量指数和CRC家族史因素校正。

无显著意义。CRC组和对照组的一级亲属CRC家族史阳性者分别占11.0%和4.9%,且前者明显高于后者($P<0.01$,表1)。

2.2 TGF- β 1 C-509T与CRC风险 对照组CC、CT及TT基因型频率分别为26.3%、50.7%和23.0%,符合Hardy-Weinberg遗传平衡定律($P=0.678$),而CRC组的基因型频率为CC 31.6%、CT 49.9%和TT 18.6%。据此计算,CRC组与对照组T等位基因频率分别为43.5%和48.8%,T的CRC发病风险是C的0.82倍(95%CI: 0.68-0.99, $P=0.037$)。与CC纯合子相比,CT杂合子引起CRC风险为0.79倍(95%CI: 0.58-1.08, $P=0.137$),而TT纯合子引起CRC风险则显著降低至0.66倍(95%CI: 0.45-0.96, $P=0.032$)。将CT、TT基因型合并计算,则其CRC发病风险与CC基因型相比降低至0.75倍(95%CI: 0.56-1.00, $P=0.052$,表2)。

3 讨论

在肿瘤形成的早期阶段,TGF- β 1通过调控细胞周期、抑制细胞增殖和诱导细胞凋亡发挥抗肿瘤作用^[1]。研究表明,TGF- β 1的表达受遗传学调控。TGF- β 1基因C-509T单核苷酸多态位点位于

基因上游转录起始点前509 bp,处于-731 bp至-453 bp间,而此区域恰是TGF- β 1基因的负性调控区^[4]。功能学研究显示,-509C→T多态性改变可提高TGF- β 1的转录水平^[2],结果TGF- β 1基因的表达增加,肿瘤发生风险随之降低。与此功能学研究相一致,本研究结果显示-509T等位基因降低CRC发病风险。以往研究显示,TGF- β 1 C-509T降低中国人群胃癌和食管癌的发病风险^[5-6]。结合本研究结果,我们推测,TGF- β 1 C-509T是我国人群多种恶性肿瘤共同的遗传易感基础之一。因此,TGF- β 1 C-509T与我国人群其他肿瘤,特别是消化系肿瘤风险关系的研究值得进行。

近来,有关TGF- β 1 C-509T与CRC发病风险关系的研究备受关注。Chung *et al*^[7]以韩国人群为对象的研究结果显示,-509T等位基因携带者的CRC发病风险降低,这与我们的结果一致。另有研究显示,C-509T与苏格兰、德国、意大利、美国等欧美人群的CRC发病风险无关^[8-11]。鉴于C-509T基因型在欧美与亚洲人群中的分布存在明显不同^[12],种族差异可能是导致结果不一致的主要原因。然而国内仅有的一项有关C-509T与CRC风险关系的研究结果提示,-509T

等位基因携带者的CRC发病风险增加^[13]。导致该研究与我们研究结果相反的原因尚不清楚。Shin *et al*^[14]对TGF- $\beta 1$ C-509T和乳腺癌发病风险关系的研究结果提示, -509T降低早期但增加晚期乳腺癌的发病风险。这提示, 病例组中不同分期(早期、晚期)的CRC样本构成差异可能是造成韦良宏 *et al*^[13]成与本研究结论相反的重要原因之一。

总之, TGF- $\beta 1$ 基因C-509T多态是中国人重要的CRC遗传保护因子, 可作为CRC发病风险评估的筛选指标。进一步探讨TGF- $\beta 1$ C-509T多态与不同分期(早期、晚期)CRC发病风险的关系对于揭示该多态在CRC发生和/或发展中的确切作用具有重要意义。

4 参考文献

- 1 Massagué J. TGF β in Cancer. *Cell* 2008; 134: 215-230
- 2 Silverman ES, Palmer LJ, Subramaniam V, Hallock A, Mathew S, Vallone J, Faffe DS, Shikanai T, Raby BA, Weiss ST, Shore SA. Transforming growth factor-beta1 promoter polymorphism C-509T is associated with asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 169: 214-219
- 3 Jia HR, He XL, Zhu ZZ, Jin XX, Wang AZ, Huang HY, Zhu J, Yu GB, Zhu GS. [TP53 gene polymorphisms and colorectal cancer risk in Chinese population] *Zhonghua Yixue Zazhi* 2007; 87: 1448-1451
- 4 Luedeking EK, DeKosky ST, Mehdi H, Ganguli M, Kamboh MI. Analysis of genetic polymorphisms in the transforming growth factor-beta1 gene and the risk of Alzheimer's disease. *Hum Genet* 2000; 106: 565-569
- 5 Jin G, Wang L, Chen W, Hu Z, Zhou Y, Tan Y, Wang J, Hua Z, Ding W, Wang L, Shen J, Zhang Z, Wang X, Xu Y, Shen H. Variant alleles of TGF $\beta 1$ and TGF $\beta 2$ are associated with a decreased risk of gastric cancer in a Chinese population. *Int J Cancer* 2007; 120: 1330-1335
- 6 Jin G, Deng Y, Miao R, Hu Z, Zhou Y, Tan Y, Wang J, Hua Z, Ding W, Wang L, Chen W, Shen J, Wang X, Xu Y, Shen H. TGF $\beta 1$ and TGF $\beta 2$ functional polymorphisms and risk of esophageal squamous cell carcinoma: a case-control analysis in a Chinese population. *J Cancer Res Clin Oncol* 2008; 134: 345-351
- 7 Chung SJ, Kim JS, Jung HC, Song IS. Transforming growth factor-[beta]1 -509T reduces risk of colorectal cancer, but not adenoma in Koreans. *Cancer Sci* 2007; 98: 401-404
- 8 Macarthur M, Sharp L, Hold GL, Little J, El-Omar EM. The role of cytokine gene polymorphisms in colorectal cancer and their interaction with aspirin use in the northeast of Scotland. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14: 1613-1618
- 9 Crivello A, Giacalone A, Vaglica M, Scola L, Forte GI, Macaluso MC, Raimondi C, Di Noto L, Bongiovanni A, Accardo A, Candore G, Palmeri L, Verna R, Caruso C, Lio D, Palmeri S. Regulatory cytokine gene polymorphisms and risk of colorectal carcinoma. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1089: 98-103
- 10 吴国洋, 王效民, Michael Keese, Till Hasenberg, Jörg W. Sturm. TGF- $\beta 1$ -509 T/T基因型与结直肠癌患者术后结肠吻合口瘘的关系. *中华普通外科杂志* 2007; 22: 359-361
- 11 Saltzman BS, Yamamoto JF, Decker R, Yokochi L, Theriault AG, Vogt TM, Le Marchand L. Association of genetic variation in the transforming growth factor beta-1 gene with serum levels and risk of colorectal neoplasia. *Cancer Res* 2008; 68: 1236-1244
- 12 Wei YS, Xu QQ, Wang CF, Pan Y, Liang F, Long XK. Genetic variation in transforming growth factor-beta1 gene associated with increased risk of esophageal squamous cell carcinoma. *Tissue Antigens* 2007; 70: 464-469
- 13 韦良宏, 陈凤坤, 谭宗群, 陈海东. 转化生长因子 $\beta 1$ 基因多态性与结直肠癌关系的研究. *肿瘤* 2007; 27: 383-385
- 14 Shin A, Shu XO, Cai Q, Gao YT, Zheng W. Genetic polymorphisms of the transforming growth factor-beta1 gene and breast cancer risk: a possible dual role at different cancer stages. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14: 1567-1570

■同行评价

本研究的样本量较大, 同时没有回避国内已有的相反实验结果, 分析比较客观, 具有一定的可读性。

编辑 史景红 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

中国科技期刊引证报告(核心版)发布世界华人消化杂志 2007年影响因子 0.568

本刊讯 2007年世界华人消化杂志的总被引频次为2353, 位居全部1723种中国科技论文统计源期刊的第86位, 内科医学类28种期刊的第5位。2007年世界华人消化杂志的影响因子为0.568, 内科医学类28种期刊的第15位。即年指标0.082, 他引率0.69, 引用刊数372种, 扩散因子15.81, 学科影响指标0.54。(编辑: 程剑侠 2008-12-18)

气管插管麻醉在双气囊电子小肠镜检查中的应用

黄俊梅, 张亮, 杨晓明, 薛晓东, 毛高平

■背景资料

双气囊电子小肠镜由于其能够对深部小肠进行直视检查和组织活检, 显著提高了小肠疾病的诊断率。但小肠镜检查是一种侵入性操作, 有一定的创伤和痛苦, 要提高患者的依从性和检查质量, 麻醉下进行是很必要的。

黄俊梅, 张亮, 杨晓明, 薛晓东, 毛高平, 中国人民解放军空军总医院麻醉科消化科 北京市100036

作者贡献分布: 此课题由黄俊梅, 杨晓明及薛晓东设计并完成; 论文撰写由黄俊梅完成; 张亮与毛高平参与操作。

通讯作者: 黄俊梅, 100036, 北京市海淀区阜成路30号, 中国人民解放军空军总医院麻醉科, huangjunmei67@tom.com

收稿日期: 2008-09-09 修回日期: 2008-10-26

接受日期: 2008-11-03 在线出版日期: 2008-12-18

Anesthetic management in double-balloon video enteroscopy

Jun-Mei Huang, Liang Zhang, Xiao-Ming Yang, Xiao-Dong Xue, Gao-Ping Mao

Jun-Mei Huang, Liang Zhang, Xiao-Ming Yang, Xiao-Dong Xue, Gao-Ping Mao, Departments of Anesthesiology and Gastroenterology, Chinese PLA General Air-force Hospital, Beijing 100036, China

Correspondence to: Jun-Mei Huang, Departments of Anesthesiology, Chinese PLA General Air-force Hospital, 30 Fucheng Road, Haidian District, Beijing 100036, China. huangjunmei67@tom.com

Received: 2008-09-09 Revised: 2008-10-26

Accepted: 2008-11-03 Published online: 2008-12-18

Abstract

AIM: To evaluate the clinical application of anesthesia for double-balloon video enteroscopy.

METHODS: A total of 99 patients with suspected small bowel disease underwent per oral double-balloon video enteroscopy. The patients were put under intravenous anesthesia plus a tracheal intubation. HR, SBP, DBP and SpO₂ were monitored.

RESULTS: There was no significant difference in SBP, DBP, HR and SpO₂ before, during and after endoscopy. DBE procedures were performed on all patients (oral approach). The mean duration of the procedure was 75.5 ± 25.5 min. The operations were completed safely and no complications occurred.

CONCLUSION: Double-balloon video enteroscopy under general anesthesia is a safe and effective procedure. To avoid any possible respiratory complication, it is advisable to add a

tracheal intubation in the procedure.

Key Words: General anaesthesia; Double-balloon video enteroscopy; Small bowel disease

Huang JM, Zhang L, Yang XM, Xue XD, Mao GP. Anesthetic management in double-balloon video enteroscopy. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(35): 4024-4026

摘要

目的: 评价气管插管麻醉在双气囊电子小肠镜检查中的临床应用价值。

方法: 对99例疑有小肠疾病需要经口检查的患者, 行气管插管全麻: 静脉复合应用异丙酚、芬太尼、阿曲库胺。记录检查前、中、后血压、心率、血氧饱和度的数值, 以及患者的不良反应。

结果: 全组血压、心率、血氧饱和度在检查前、中、后均无明显变化, 均能安全的完成检查。99例接受检查的患者中, 1例因回盲部变形、狭窄, 小肠镜未能通过狭窄部, 4例因回肠末端狭窄中止进镜, 2例因十二指肠水平部狭窄停止进镜。其余患者经口检查均到达回肠上段或中段, 平均检查时间75.5 ± 25.5 min。全组生命体征均处于安全范围, 无并发症发生。

结论: 气管插管麻醉下行电子小肠镜检查是一种安全有效的方法。

关键词: 气管插管麻醉; 双气囊电子小肠镜; 小肠疾病

黄俊梅, 张亮, 杨晓明, 薛晓东, 毛高平. 气管插管麻醉在双气囊电子小肠镜检查中的应用. *世界华人消化杂志* 2008; 16(35): 4024-4026

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/4024.asp>

0 引言

双气囊电子小肠镜于2001年由日本Yamamoto *et al*首次介绍^[1-2], 2003年应用于小肠疾病诊断和

■同行评议者

刘改芳, 主任医师, 河北医科大学第三医院消化内科

治疗, 由于其能够对深部小肠进行直视检查和组织活检, 显著提高了小肠疾病的诊断率, 并逐步成为诊断小肠疾病的金标准^[3-6]。但小肠镜检查是一种侵入性操作, 有一定的创伤和痛苦, 加之操作时间长, 因此小肠镜的操作给患者带来生理和心理上的变化, 尤其是中老年合并有心、脑血管病的患者, 小肠镜的操作更是一种具有潜在风险的检查和治疗手段。要安全顺利地完

1 材料和方法

1.1 材料 2003-12/2008-03我院对99例疑有小肠疾病的患者进行了经口双气囊电子小肠镜检查, 男60例, 女39例, 年龄15-70(平均48.5)岁, 其中高血压2级11例, 冠心病9例, 糖尿病9例。小肠镜检查使用富士能EN 450P5型双气囊电子小肠镜。

1.2 方法

1.2.1 麻醉过程: 检查前经口者禁食12 h以上。常规心电图和胸片检查以了解呼吸和心血管系统情况。患者入室后开放静脉, 予以心电监护和麻醉机面罩吸氧2-4 L/min流量。静脉给予异丙酚1-2 mg/kg, 芬太尼4 μg/kg, 阿曲库胺0.15 mg/kg静脉诱导, 完成气管插管, 呼吸机控制呼吸, 潮气量6-8 mL/kg, 患者取左侧卧位, 套上治疗口垫开始双气囊小肠镜操作, 以后使用微泵维持(得普利麻约0.5-1 mg/(kg·h), 用量视患者体质量及反应等具体情况而定), 检查中加用阿曲库胺1-2 mg, 维持, 至出镜前30 min时停止用药。

1.2.2 观察指标: 记录检查前、检查中、检查后用多功能监测仪监测的血压、心率、血氧饱和度(SpO₂)的数值。

1.2.3 小肠镜操作: 由术者和助手双人配合操作, 术者双手持镜, 控制进镜方向及活检或黏膜染色; 助手控制送镜、外套管及气囊使用, 利用双气囊交替充气、放气, 内镜和外套管相对滑动推送进镜。

统计学处理 计量数据以mean±SD表示, 用SPSS10.0 for Windows统计软件包, 采用方差分析。P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血压、血氧饱和度及心率的变化及停药后苏醒时间 患者术后5-15 min内清醒, 患者自主呼

表 1 三组血压、血氧饱和度及心率比较 (mean ± SD)

	检查前	检查中	检查后
SBP(mmHg)	135.5 ± 15.7	122.2 ± 9.3	128.2 ± 10.3
DBP(mmHg)	89.5 ± 7.5	80.2 ± 1.3	87.2 ± 8.0
HR(min)	78.2 ± 5.2	71.5 ± 8.1	80.4 ± 6.0
SpO ₂ (%)	96.0 ± 1.3	99.4 ± 2.6	96.8 ± 2.3

吸恢复, 保护性反射恢复后拔除气管导管, 醒后15例有头昏, 28例感乏力、嗜睡, 30 min内均完全恢复正常, 术后无内镜检查及任何痛苦记忆。全组血压、心率、血氧饱和度在检查前、检查中、检查后均无明显差异(P>0.05, 表1)。

2.2 完成率、完成时间及到达部位 患者均安全完成检查, 99例接受检查的患者中, 有1例因回盲部变形、狭窄, 小肠镜未能通过狭窄部, 有4例因回肠末段狭窄(距回盲瓣30 cm以内)中止进镜, 有2例因十二指肠水平部狭窄停止进镜。其余患者经口检查均到达回肠上段或中段, 平均检查时间75.5 ± 25.5 min。

2.3 不良反应 全组生命体征均处于安全范围, 无心脑血管并发症的发生, 术后无腹痛、出血、穿孔等并发症发生。

3 讨论

小肠是人体质量要的消化和吸收器官, 位于胃和结肠之间, 长度约5-7 m。长期以来, 小肠疾病受起病隐匿、症状特异性不强和病变部位深等众多因素影响, 诊断非常困难。双气囊小肠镜(DBE)是小肠疾病检查手段上的突破性进展, 使人们可以在不开腹的情况下对全小肠进行直视检查。DBE对小肠疾病的诊断价值已经得到了充分肯定, 对小肠疾病的总诊断率达到60%-80%^[7-11]。但是, 双气囊小肠镜的检查时间较长, 而且在操作中因肠痉挛和人为肠袢的影响, 绝大多数患者均感到难受、痛苦。因此, 双气囊电子小肠镜检查时, 为提高患者的依从性和检查质量, 麻醉下进行是很必要的, 尤其是伴有心脑血管疾病者^[12-14]。如何选择麻醉方案是保证检查安全的重要条件。国内内镜室受各种条件的限制, 以往多采用静脉注射安定镇痛, 但效果欠佳, 也有报道得普利麻复合芬太尼全麻下完成的, 该方法提高了患者对检查的依从性, 但因无气管插管, 对于老年患者、合并心脑血管疾病者, 以及需要长时间治疗的患者, 检查过程中一旦出现无法纠正的呼吸抑制, 喉痉挛等无法

■创新盘点

选择麻醉方案是保证检查安全的重要条件。特别是经口检查治疗的患者, 采用气管插管全麻, 麻醉用药以得普利麻、芬太尼和阿曲库胺为主, 在很大程度上提高了麻醉的可控性和安全性。

■应用要点

无痛内镜技术在临床的应用日益广泛, 麻醉的介入提高了患者的依从性, 避免了手术治疗, 从而降低费用。在临床上有着广泛的应用前景。

■同行评价

本文选题新颖, 表达清晰, 条理性好, 具有一定的临床使用价值。

进行面罩给氧而危及患者的生命, 特别是经口检查治疗的患者。本组患者均采用气管插管全麻, 麻醉用药以得普利麻、芬太尼和阿曲库铵为主, 得普利麻作为一种新的麻醉药, 因可控性强, 安全有效, 清醒迅速而在临床上倍受推崇^[15]。得普利麻iv 1-2 mg/kg后0.5-1 min意识消失, 停药后2-10 min即清醒并能作答, 类似睡眠清醒过程。但得普利麻具有心肌抑制和外周血管的扩张作用, 注射应缓慢, 否则可能引起心率减慢血压下降和呼吸抑制。芬太尼是一种强效镇痛剂, 对心血管系统的抑制作用较小, 临床用药安全。但剂量过大或注射药物速度过快对呼吸系统有抑制作用。而两种药物联合使用可以增强效果, 减少用药剂量及不良反应的发生, 肌松药选择阿曲库铵, 其在体内消除迅速, 不受肝肾功能影响, 停药后呼吸恢复迅速^[16], 麻醉中加强监测, 用多功能监测仪监测血压、心率、SpO₂的数值, 及时处理出现的异常情况。本组患者检查前、检查中、检查后血压、心率、血氧饱和度均保持稳定, 30 min内均清醒拔管。研究表明, 经口者实施气管插管全麻管理, 可以最大程度保护患者的安全。同时操作者要熟练掌握小肠镜检查技术, 尽量缩短操作时间。因采用全凭静脉麻醉, 如何维持更稳定的血药浓度, 减少对呼吸循环的抑制, 检查后尽早清醒, 麻醉管理有待完善。总之, 联合应用得普利麻、芬太尼和阿曲库铵等气管插管全麻辅助双气囊小肠镜检查, 可以保证患者安全, 值得临床推广应用。

4 参考文献

- 1 Yamamoto H, Sekine Y, Sato Y, Higashizawa T, Miyata T, Iino S, Ido K, Sugano K. Total enteroscopy with a nonsurgical steerable double-balloon method. *Gastrointest Endosc* 2001; 53: 216-220
- 2 Lakatos PL, Fuszek P, Horvath HC, Zubek L, Haller P, Papp J. Double-balloon enteroscopy for the diagnosis and treatment of obscure bleeding, inflammatory bowel diseases and polyposis syndromes: we see more but do we know more? *Hepatogastroenterology* 2008; 55: 133-137
- 3 John S, Appleyard M. Role of double balloon enteroscopy in obscure gastrointestinal bleeding. *J Gastroenterol Hepatol* 2008; 23: 994-996
- 4 毛高平, 宁守斌, 曹传平, 周平, 杨春敏. 双气囊小肠镜对不明原因消化道出血的诊断价值. *中华消化内镜杂志* 2005; 22: 337-339
- 5 Tamura H, Ogata K, Kondo A, Wakita T, Inami M, Mizuki T, Hyodo H, Shioi Y, Nakamura K, Mitsui K, Tanaka S, Sakamoto C, Dan K. [Double balloon enteroscopy as a useful tool for the diagnosis and treatment of four cases of primary small intestinal lymphoma] *Rinsho Ketsueki* 2007; 48: 510-513
- 6 Higuchi K, Komatsu K, Wakamatsu H, Kawasaki H, Murata M, Miyazaki K, Oikawa K, Ohwada M, Nanjo H, Otaka M, Watanabe S, Komatsu K. Small intestinal follicular lymphoma with multiple tumor formations diagnosed by double-balloon enteroscopy. *Intern Med* 2007; 46: 705-709
- 7 毛高平, 宁守斌, 白丽, 曹传平, 杨春敏, 唐杰, 陈英. 双气囊电子小肠镜在小肠疾病诊断与治疗中的应用研究. *中国消化内镜* 2007; 1: 28-30
- 8 Kita H, Yamamoto H, Yano T, Miyata T, Iwamoto M, Sunada K, Arashiro M, Hayashi Y, Ido K, Sugano K. Double balloon enteroscopy in two hundred fifty cases for the diagnosis and treatment of small intestinal disorders. *Inflammopharmacology* 2007; 15: 74-77
- 9 May A, Nachbar L, Pohl J, Ell C. Endoscopic interventions in the small bowel using double balloon enteroscopy: feasibility and limitations. *Am J Gastroenterol* 2007; 102: 527-535
- 10 Matsushita M, Shimatani M, Uchida K, Okazaki K. Association of hyperamylasemia and longer duration of peroral double-balloon enteroscopy: present and future. *Gastrointest Endosc* 2008; 68: 811; author reply 811-812
- 11 毛高平, 宁守斌. 双气囊小肠镜在小肠疾病诊治中的应用进展. *中国消化内镜* 2007; 1: 9-13
- 12 周平, 毛高平, 曹传平, 宁守斌, 杨春敏, 唐杰, 陈英, 王建荣, 杜斌. 双气囊小肠镜在Peutz-Jeghers综合征中的诊治作用. *中国内镜杂志* 2008; 14: 575-581
- 13 宁守斌, 毛高平, 曹传平, 白莉, 唐杰, 杨春敏, 周平, 陈英, 杜斌. 双气囊小肠镜对Peutz-Jeghers综合征患者小肠息肉的治疗价值. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 1588-1591
- 14 毛高平, 宁守斌, 杨春敏, 周平, 曹传平, 白莉. 麻醉/镇静状态下双气囊小肠镜检查对小肠疾病的诊断价值. *中华消化杂志* 2006; 26: 46-47
- 15 杨国强, 贾荣强, 陈祥毅, 陈文明. 异丙酚复合小剂量芬太尼用于无痛胃镜麻醉760例临床观察. *福建医药杂志* 2008; 12: 34-36
- 16 邹伟, 王瑞, 高春霖, 薛玉良. 全凭静脉麻醉下持续输注国产阿曲库铵的药效学观察. *中国药房* 2005; 16: 926-928

编辑 李军亮 电编 何基才

以渗出性腹水为首发表现的克罗恩病1例

刘玉然, 邸菁华, 张晓岚, 房澍名, 任锡玲

刘玉然, 邸菁华, 张晓岚, 房澍名, 任锡玲, 河北医科大学第二医院消化科 河北省石家庄市 050000

刘玉然, 深泽县医院 河北省深泽县 052560

作者贡献分布: 此课题由张晓岚、房澍名及任锡玲设计; 病例收集由刘玉然、邸菁华完成; 本论文写作由刘玉然与邸菁华完成, 张晓岚修改论文。

通讯作者: 张晓岚, 050000, 河北省石家庄市, 河北医科大学第二医院消化科, xiaolanzh@126.com

收稿日期: 2008-08-03 修回日期: 2008-10-22

接受日期: 2008-11-03 在线出版日期: 2008-12-18

Exudative ascites as initial presentation of Crohn's disease: a case report

Yu-Ran Liu, Jing-Hua Di, Xiao-Lan Zhang, Shu-Ming Fang, Xi-Ling Ren

Yu-Ran Liu, Jing-Hua Di, Xiao-Lan Zhang, Shu-Ming Fang, Xi-Ling Ren, Department of Gastroenterology, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China

Yu-Ran Liu, Shenze County Hospital, Shenze 052560, Hebei Province, China

Correspondence to: Xiao-Lan Zhang, Department of Gastroenterology, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China. xiaolanzh@126.com

Received: 2008-08-03 Revised: 2008-10-22

Accepted: 2008-11-03 Published online: 2008-12-18

Abstract

A 52-year-old woman was admitted to our hospital for abdominal pain, abdominal distension and fatigue. Abdominal ultrasonography confirmed the ascites. Colonoscopy examination revealed five aphthous ulcers of different sizes with the normal mucosa among the ulcers. There was a large amount of inflammatory cells and non-caseous granulomas in the mucosa and submucosa. So the diagnosis of Crohn's disease was established. After treatment with olsalazine, the symptoms of the patient were relieved and ascites were diminished. One month later, abdominal ultrasonography revealed no ascites and colonoscopy only found a small ulcer in the terminal ileum.

Key Words: Crohn's disease; Ascites; Intestinal tuberculosis

Liu YR, Di JH, Zhang XL, Fang SM, Ren XL. Exudative ascites as initial presentation of Crohn's disease: a case report. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(35): 4027-4029

摘要

患者, 女性, 因腹胀腹痛乏力1 mo入院。B超示腹部大量游离液体。肠镜见末端回肠大小不等的5个阿弗他溃疡, 溃疡之间黏膜正常。病理见黏膜及黏膜下大量炎症细胞浸润及非干酪样坏死性肉芽肿。诊断为“克罗恩病”。予以奥沙拉嗪口服, 后患者腹痛、腹胀减轻, 腹水消退。1 mo后复查B超示腹水消失, 肠镜仅见末端回肠一小溃疡, 余未见异常。

关键词: 克罗恩病; 腹腔积液; 肠结核

刘玉然, 邸菁华, 张晓岚, 房澍名, 任锡玲. 以渗出性腹水为首发表现的克罗恩病1例. *世界华人消化杂志* 2008; 16(35): 4027-4029

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/4027.asp>

0 引言

克罗恩病(Crohn's disease, CD)是一种病因尚不十分清楚的胃肠道慢性炎症性肉芽肿性疾病。病变多位于末端回肠和邻近结肠, 呈节段性或跳跃式分布。CD临床表现呈多样性, 以腹腔积液为首发表现者罕见^[1-3], 我们遇到1例以渗出性腹水为首发表现, 且不存在其他引起腹水的病因, 结合文献进行复习。

1 病例报告

患者, 女, 52岁, 主因腹胀、腹痛、乏力1 mo入院。患者入院前1 mo无明显原因出现腹胀, 腹部逐渐膨隆, 间断隐痛, 最初为左右两侧侧腹部痛, 后来固定于中下腹部, 进食后腹胀加重, 活动及排便后腹胀减轻, 立位时腹部有下坠感, 伴厌食、乏力, 且逐渐加重, 1 mo内体重下降约4 kg。

查体: 体温波动于36.3-37.5℃之间, 消瘦, 浅表淋巴结不大, 口腔无溃疡, 双肺呼吸音清晰, 无干湿性啰音。心率每分80次, 节律规整, 心音有

■背景资料

克罗恩病(CD)是病因未明的胃肠道肉芽肿性炎症性疾病, CD临床表现呈多样性, 主要表现为腹痛、腹泻、腹块、瘻管形成及肠梗阻, 伴有发热、贫血等, 部分患者有鹅口疮性口炎、结节性红斑、杵状指、皮肤溃疡、关节炎和肝肿大等肠外表现, 严重者可有贫血、消瘦、低蛋白血症及水电解质紊乱, 以腹腔积液为首发表现者罕见。

■同行评议者

张小晋, 主任医师, 北京积水潭医院消化内科

■ 研发前沿

CD是由Burill Crohn在1932年最早描述的,1973年WHO将其定为Crohn病。本病以欧美国家发病多,近几年我国发病率呈增加趋势。CD合并渗出性腹水机制不明,有待进一步研究。

力。腹膨隆,左中下腹有压痛,无反跳痛及肌紧张,无包块,两侧腹叩浊音,移动性浊音阳性。肛门及外生殖器未见异常。既往无“肝炎”、“结核”病史。

辅助检查:WBC $9.5 \times 10^9/L$,中性81.2%,PLT $539 \times 10^9/L$;血沉58 mm/h;肝功能:ALT、AST正常,白蛋白33 g/L,球蛋白37.2 g/L,A/G 0.9;腺苷脱氨酶ADA 4 U/L;肾功能、电解质正常。腹部B超示腹部大量游离液体,最深约6.5 cm,伴分隔,但门静脉、肝静脉未见血栓形成。两次腹水化验均为黄色,微混浊,李凡他试验阳性,白细胞 $1400 \times 10^6/L - 4200 \times 10^6/L$,单核为60%-80%;腹腔积液生化:腺苷脱氨酶ADA 21 U/L,葡萄糖3.9 mmol/L。肠镜检查于末端回肠可见大小不等的5个阿弗他溃疡,表面覆白苔,周围轻度水肿,最大者约0.6 cm \times 0.8 cm,溃疡之间黏膜正常;回盲瓣呈唇样,舒缩正常,阑尾窝存在,盲肠、结肠及直肠各肠段黏膜光滑,血管纹理清晰,未见溃疡及赘生物。于溃疡边缘活检4块,病理示黏膜及黏膜下可见大量急、慢性炎症细胞浸润,以多量淋巴细胞为主,并形成淋巴滤泡,伴纤维组织增生并可见非干酪样坏死肉芽肿结构。病理诊断回肠末端克罗恩病。

诊治经过:入院后积极检查以明确诊断,未给予特殊治疗。病理结果回报后给予5-氨基水杨酸制剂奥沙拉嗪(olsalazine)口服。治疗7 d患者腹痛缓解,腹胀消失,腹水明显减少,入院第4天,腹部B超示腹水最深约3.7 cm,第8天肠间隙可探及直径0.8 cm的液性暗区。1 mo后复查,血沉6 mm/h,血常规WBC $8.1 \times 10^9/L$,中性70.9%,淋巴23.6%,HGB 154 g/L,PLT $374 \times 10^9/L$,腹部B超示腹水消失。复查结肠镜示末端回肠仅可见一处0.4 cm \times 0.4 cm大小的溃疡,表面覆白苔,余未见异常。

2 讨论

CD是由Burill Crohn在1932年最早描述的,又称局限性肠炎或节段性肠炎。1973年世界卫生组织(WHO)将其定为Crohn病。本病以欧美国家发病多,一般认为我国和亚洲其他国家发病率低,据调查近几年我国发病率呈增加趋势。

CD内镜下病变呈节段性或跳跃性,而不呈连续性分布,黏膜溃疡早期呈鹅口疮样(阿弗他溃疡),随着溃疡增大形成纵行溃疡和裂隙溃疡、鹅卵石样改变,病变累及肠壁全层,肠壁增厚变硬出现肠腔狭窄。组织学上可见发生在肠

壁各层和局部淋巴结的由类上皮细胞和多核巨细胞构成非干酪样坏死性肉芽肿;深达黏膜下层甚至肌层的裂隙溃疡,固有膜底部和黏膜下层淋巴细胞聚集,而陷窝结构正常。该例符合2000年成都全国慢性炎症性肠病学术会议制定的CD诊断标准,为CD小肠型、中度、活动期。

腹腔积液常见于肝硬化、结核性腹膜炎、恶性肿瘤腹膜转移、结缔组织病、Meigs综合征、Budd-Chiari综合征、缩窄性心包炎及低蛋白血症等。该患者的腹腔积液为草黄色,微混浊,李凡他实验阳性,WBC $1400 \times 10^6 - 4200 \times 10^6$,单核为60%-80%,符合渗出性特点,不支持肝硬化、缩窄性心包炎及低蛋白血症之诊断。患者有低热,ESR 58 mm/h,结核菌素试验(PPD)阳性,符合结核的特点,但是我国结核病发病率高,而克罗恩病中不乏有分枝杆菌致病的假设^[4],ESR和PPD(强阳性除外)在结核和克罗恩病中均无显著差异。CD与结核的鉴别诊断虽然困难,但是组织、病理和病原学检查仍是国内外公认的金标准。该患者无结核的过去史和现在史,入院后X线检查及内镜未发现结核病灶,结核菌素实验不为强阳性,腹腔积液的腺苷脱氨酶(ADA)活性不高,两次腹腔积液的细菌培养未发现结核分枝杆菌,回肠黏膜病理可见非干酪样坏死性肉芽肿结构,更重要的是该患者未经抗结核治疗,发热、腹痛缓解,腹水消失,进一步为该患者排除结核提供了依据。该病例临床及辅助检查亦排除了肿瘤、结缔组织病及Meigs综合征等。

众所周知,CD活动期体内存在高凝状态^[5],血栓前状态分子标志物凝血酶原片段(F1+2)及D-二聚体(D-d)在活动期明显增高,F1+2增高说明克罗恩病体内纤维蛋白水平较高,有易形成血栓的倾向,D-d升高,促进局部炎症细胞合成,并释放某些细胞因子(IL-1、IL-6)纤溶酶原抑制剂增多,导致凝血更加亢进,加重血栓形成的危险,特别是肝静脉、门静脉血栓形成,甚至肺栓塞。血栓形成是CD患者出现腹水的最常见原因之一,发生率可达33%^[1]。该患者尽管10 mo前曾患有左下肢静脉栓塞,入院后化验纤维蛋白原(Fib)5.99 g/L,PLT $539 \times 10^9/L$,说明该患者体内存在高凝状态,但B型超声检查肝静脉、门静脉无血栓形成。

迄今为止,CD合并渗出性腹水罕见,其产生机制不明,推测可能与肠壁的透壁性炎症、腹膜反应及淋巴管阻塞有关^[1]。另一方面,就治疗反应来说,该患者未应用利尿剂、白蛋白,仅仅

使用奥沙拉嗪, 短期内腹水消失, 支持该病的诊断. 这一病例提示我们, 临床医生对无明显原因的腹腔积液患者, 在除外常见病因以外, 还要想到CD的可能.

4 参考文献

- 1 Tekin F, Vatansever S, Ozütemiz O, Musoğlu A, Ilter T. Severe exudative ascites as an initial presentation of Crohn's disease. *Turk J Gastroenterol*

- 2005; 16: 171-173
- 2 原蔚红, 谢鹏雁. 以腹水为首发症状的盲肠克罗恩病1例. *北京医科大学学报* 1999; 31: 16
- 3 Paspatis GA, Kissamitaki V, Kyriakakis E, Aretoulaki D, Giannikaki ES, Kokkinaki M, Kabbalo T, Xroniaris N. Ascites associated with the initial presentation of Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 1974-1976
- 4 曾锐, 欧阳钦. 克罗恩病肠组织中副结核分枝杆菌DNA检出率分析. *四川医学* 2006; 27: 240-242
- 5 陈隆典, 杨英. 炎症性肠病疾病活动程度与血小板参数的相关性分析. *中华消化杂志* 2006; 26: 771

■同行评价

本文书写流畅, 内容较全面, 逻辑性较强, 临床医生可以借鉴.

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志正文要求

本刊讯 本刊正文标题层次为 0 引言; 1 材料和方法, 1.1 材料, 1.2 方法; 2 结果; 3 讨论; 4 参考文献. 序号一律左顶格写, 后空1格写标题; 2级标题后空1格接正文. 以下逐条陈述: (1)引言 应包括该研究的目的和该研究与其他相关研究的关系. (2)材料和方法 应尽量简短, 但应让其他有经验的研究者能够重复该实验. 对新的方法应该详细描述, 以前发表过的方法引用参考文献即可, 有关文献中或试剂手册中的方法的改进仅描述改进之处即可. (3)结果 实验结果应合理采用图表和文字表示, 在结果中应避免讨论. (4)讨论 要简明, 应集中对所得的结果做出解释而不是重复叙述, 也不应是大量文献的回顾. 图表的数量要精选. 表应有表序和表题, 并有足够具有自明性的信息, 使读者不查阅正文即可理解该表的内容. 表内每一栏均应有表头, 表内非公知通用缩写应在表注中说明, 表格一律使用三线表(不用竖线), 在正文中该出现的地方应注出. 图应有图序、图题和图注, 以使其容易被读者理解, 所有的图应在正文中该出现的地方注出. 同一个主题内容的彩色图、黑白图、线条图, 统一用一个注解分别叙述. 如: 图1 萎缩性胃炎治疗前后病理变化. A: …; B: …; C: …; D: …; E: …; F: …; G: … 曲线图可按●、○、■、□、▲、△顺序使用标准的符号. 统计学显著性用: ^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ ($P>0.05$ 不注). 如同一表中另有一套 P 值, 则¹ $P<0.05$, ² $P<0.01$; 第3套为³ $P<0.05$, ⁴ $P<0.01$. P 值后注明何种检验及其具体数字, 如 $P<0.01$, $t=4.56$ vs 对照组等, 注在表的左下方. 表内采用阿拉伯数字, 共同的计量单位符号应注在表的右上方, 表内个位数、小数点、±、-应上下对齐. “空白”表示无此项或未测, “-”代表阴性未发现, 不能用同左、同上等. 表图勿与正文内容重复. 表图的标目尽量用 t/min , $c/(\text{mol/L})$, p/kPa , V/mL , $t/^\circ\text{C}$ 表达. 黑白图请附黑白照片, 并拷入光盘内; 彩色图请提供冲洗的彩色照片, 请不要提供计算机打印的照片. 彩色图片大小 $7.5\text{ cm}\times 4.5\text{ cm}$, 必须使用双面胶条黏贴在正文内, 不能使用浆糊黏贴. (5)致谢 后加冒号, 排在讨论后及参考文献前, 左齐. (常务副总编辑: 张海宁 2008-12-18)

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!

陈国凤 主任医师
中国人民解放军第302医院感染七科

陈积圣 教授
中山大学孙逸仙纪念医院肝胆外科

陈其奎 教授
中山大学附属第二医院消化内科

陈耀凯 副教授
中国人民解放军第三军医大学西南医院全军感染病研究所

陈贻胜 教授
福建省立医院消化内科

程爱群 主任医师
上海华东医院普外科

戴朝六 教授
中国医科大学第二临床学院(盛京医院)肝胆外科

丁惠国 主任医师
首都医科大学附属北京佑安医院肝病消化科

杜祥 教授
复旦大学附属肿瘤医院病理科

樊晓明 主任医师
复旦大学附属金山医院消化科

高春芳 研究员
中国人民解放军第二军医大学附属长征医院全军医学免疫诊断中心/实验诊断科

郝纯毅 主任医师
北京肿瘤医院肿瘤外科

黄颖秋 教授
本溪钢铁(集团)有限责任公司总医院消化内科

黄志勇 副教授
华中科技大学同济医院普外科

江学良 主任医师
中国人民解放军济南军区总医院消化科

姜春萌 教授
大连医科大学附属第二医院消化科

李华山 副主任医师
中国中医科学院广安门医院肛肠科

梁力建 教授
中山大学附属第一医院肝胆外科

秦环龙 教授
上海交通大学附属第六人民医院外科

石统东 副教授
重庆医科大学附属第二医院感染病科

孙诚谊 教授
贵阳医学院附属医院院长办

王鲁 副教授
复旦大学附属中山医院肝外科, 复旦大学肝癌研究所

王文跃 主任医师
北京中日友好医院普外科

王晓艳 副教授
湖南长沙中南大学湘雅三医院消化内科

王正康 教授
北京中日友好医院普外科

殷正丰 教授
中国人民解放军第二军医大学东方肝胆外科医院

于聪慧 教授
中国人民解放军北京军区总医院肝胆外科

于颖彦 教授
上海交通大学医学院附属瑞金医院器官移植中心病理室

张吉翔 教授
南昌大学第二附属医院消化内科

周士胜 教授
大连大学医学院医学研究中心