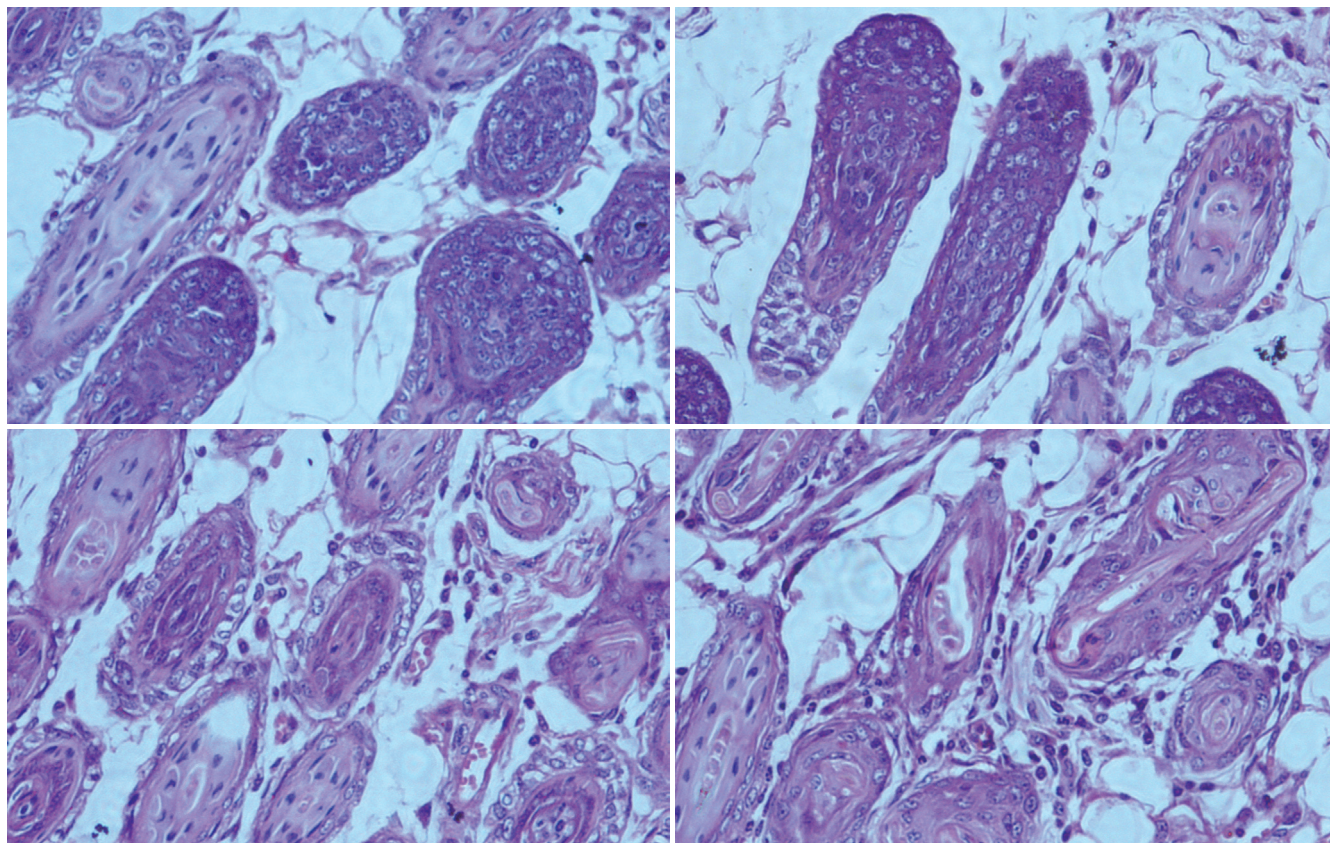


世界华人消化杂志®

WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2009年11月8日 第17卷 第31期 (Volume 17 Number 31)



31 / 2009

ISSN 1009-3079



9 771009 307056

名誉总编辑

潘伯荣

总编辑

马连生

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

世界华人消化杂志®

编辑委员会

2009-01-01/2011-12-31

wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

总顾问

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

名誉总编辑

潘伯荣教授

社长/总编辑

马连生教授

副总编辑

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

常务编委

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

编委

消化内科学
白爱平副教授
聂新明教授
陈洪副教授

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

倪润洲教授
欧希龙副教授
潘秀珍教授
朴云峰教授
秦成勇教授
任粉玉副教授
任建林教授
邵先玉教授
沈琳主任医师
沈守荣教授
沈薇教授
施瑞华教授
宋军副教授
宋于刚教授
唐世刚教授
田宇彬教授
王邦茂教授
王炳元教授
王承党副教授
王晓艳副教授
闻勤生教授
夏冰教授
夏时海副教授
徐可树教授
许乐主任医师
杨建民教授
姚树坤教授
叶红军主任医师
张春清教授
张国梁主任医师
张军教授
张小晋主任医师
张晓岚教授
张筱茵副教授
张志坚教授
郑培永副教授
郑鹏远教授
周国雄主任医师
周晓东副教授
朱春兰主任医师
邹晓平主任医师
消化外科学
蔡开琳副教授
蔡三军主任医师

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

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

世界华人消化杂志®

编辑委员会

王振宁教授	高泽立副教授	沈洪教授	消化中西医结合学	消化病理学
王正康教授	龚国忠教授	唐志鹏研究员	唐文富副教授	杜祥教授
王志刚副主任医师	管世鹤副教授	王富春教授	王学美研究员	李淳副教授
王忠裕教授	何生松教授	王新月教授	魏睦新教授	刘丽江教授
吴河水教授	胡国信副主任医师	谢鸣教授	张春虎副教授	刘勇钢副主任医师
吴健雄教授	林菊生教授	徐列明教授		马大烈教授
吴金术教授	刘正稳教授	许玲副教授	消化基础研究	潘兴华副主任医师
吴泰璜教授	貌盼勇研究员	张声生教授	曹洁副教授	王鲁平主任医师
吴志勇教授	宁琴教授		曹鹏副研究员	王娅兰教授
谢敏主任医师	钱林学主任医师	消化肿瘤学	樊红副教授	魏蕾教授
谢晓华副教授	孙殿兴主任医师	曹秀峰教授	高春芳研究员	颜宏利副教授
邢光明教授	谭德明教授	曹志成院士	高国全教授	于颖彦教授
徐大华主任医师	汤华研究员	陈公琰主任医师	高英堂研究员	余宏宇教授
徐迅迪副主任医师	唐霓副研究员	李璦教授	管冬元副教授	张锦生教授
徐泱副主任医师	唐晓鹏教授	刘宝瑞教授	胡旭初副教授	赵景民教授
许戈良教授	王凯教授	刘彬彬副研究员	黄园教授	朱亮副教授
严律南教授	王怡主任医师	刘云鹏教授	黄文林教授	
杨柏霖副主任医师	魏来教授	沈克平主任医师	李刚教授	
杨家和主任医师	吴建国教授	肖文华主任医师	李杰副教授	
杨秋蒙副主任医师	吴君主任医师	熊斌教授	李永哲副研究员	
杨维良教授	宣世英教授	张凤春教授	李增山副教授	
伊力亚尔·夏合丁教授	杨江华副主任医师		刘克辛教授	
殷正丰教授	杨林副研究员	消化影像学	梅林教授	
于聪慧教授	姚鹏副教授	白彬主任医师	钱睿哲教授	
于则利教授	张继明教授	陈克敏教授	任超世研究员	
郁宝铭教授	张明辉副主任医师	官泳松教授	任浩副教授	
元云飞教授	张占卿主任医师	韩新巍教授	台桂香教授	
张佳林教授	赵桂鸣主任医师	李健丁教授	谭学瑞教授	
张进祥副教授	赵连三教授	龙学颖副主任医师	田颖刚副研究员	
张俊副研究员	周霞秋教授	倪才方教授	汪思应教授	
张群华教授	朱传武主任医师	魏经国教授	吴军研究员	
张水军教授	庄林主任医师	肖恩华教授	吴俊华副教授	
张宗明教授		徐爱民副教授	徐宁志研究员	
周伟平教授	消化中医药学	徐克教授	许文燮教授	
邹小明教授	蔡淦教授	扬业发教授	姚登福教授	
	陈治水主任医师	杨建勇教授	阴赅宏研究员	
消化感染病学	杜群副研究员	赵卫主任医师	郁卫东副研究员	
陈国凤主任医师	黄恒青主任医师		喻荣彬副教授	
陈红松研究员	李军祥教授	消化内镜及介入治疗学	张青云研究员	
陈建杰教授	李康副教授	丁佑铭教授	张学教授	
陈仕珠主任医师	李勇副教授	郝俊鸣副主任医师	赵平副教授	
陈志辉副主任医师	李振华教授	潘林娜教授	周南进研究员	
党双锁教授	刘成海研究员	孙明军教授	周士胜教授	
丁惠国教授	刘孟安教授	万军教授	周素芳教授	
范建高教授	刘平教授	吴硕东教授	周晓东研究员	
范小玲主任医师	刘绍能主任医师	袁友红副教授	周晓武副主任医师	
高润平教授				

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ● 2009 年 11 月 8 日 第 17 卷 第 31 期 (总第291期)

述 评

- 3181 非酒精性脂肪性肝炎发病机制的研究进展
黄颖秋

基 础 研 究

- 3189 5-HT及其阻断剂脑内微注射和微电刺激对家兔胃电活动的影响
张慧, 欧阳守, 黄伟锋
- 3197 塞来昔布对大鼠重症急性胰腺炎的治疗作用
薛翠华, 高振军, 李秋萍, 许亚平, 周春锁, 姚俊, 付白清
- 3203 丹参酮 A对小鼠肠癌皮下移植瘤血管新生的抑制作用
周利红, 刘宣, 王炎, 范忠泽, 孙珏, 李琦
- 3210 人FUT3基因真核表达载体的构建与表达
岳丽玲, 樊丽, 刘吉成

临 床 研 究

- 3214 HPV16与新疆维吾尔族食管鳞癌的相关性
周素明, 伊力亚尔·夏合丁, 杨婷, 张力为, 阿仙姑·哈斯木, 卢晓梅, 买地尼也提·尼亚孜, 刘涛
- 3218 DAPK mRNA和蛋白在食管鳞癌组织中的表达及意义
刘莺, 李克, 刘文静, 王居峰, 樊青霞

文 献 综 述

- 3223 Fibroscan对肝纤维化诊断价值的研究进展
温欣, 王学梅, 王炳元
- 3229 神经性疼痛机制在慢性胰腺炎中的作用
廖兴志, 熊源长
- 3233 NKG2D及其配体在消化系统肿瘤中的研究进展
万娟, 李国华

研 究 快 报

- 3237 α -2a干扰素对大鼠肝组织**bcl-2**基因表达的影响及意义
席文娜, 孙水林, 李方春, 罗杰, 肖影群, 章萍, 张伟
- 3241 西罗莫司对肝癌HepG2细胞的增殖及mTOR、HIF-1 α 的抑制作用
王渝, 熊晶, 程恒辉, 周晟, 赵秋
- 3244 不同药物干预防治大鼠NSAID相关小肠损伤的观察
方莉, 吕宾, 孟立娜, 张烁, 吴炜烽

临 床 经 验

- 3249 Barrett's食管、糜烂性食管炎及非糜烂性反流病发生机制的比较
张峻, 徐有青, 杨昭徐
- 3255 TAP2基因多态性及遗传因素与新疆哈萨克族食管癌的相关性
曾同霞, 张海峰, 雷丽娟, 蔡金凤, 李锋, 廖佩花, 秦江梅
- 3259 改良胰胃吻合在胰头十二指肠切除术中重建消化系的应用
吴兴桂, 张庆林, 李颖, 蔺桂恒
- 3263 TNF- α 、TGF- β 1和IL-10基因多态性与乙型肝炎后肝硬化的关系
姜在来, 张玮, 张辉, 刘一博, 苏式兵

	<p>3269 乙型肝炎患者并发慢加急性肝衰竭诱因及转归分析289例 赵振刚, 韩涛, 高英堂, 高艳颖, 张晔, 吴珍萍</p> <p>3273 红霉素在急性上消化道出血紧急内镜检查中应用的系统评价 周隼, 何继东, 王一平, 欧阳晓波</p>
致 谢	3278 致谢世界华人消化杂志编委
消 息	<p>3188 汤姆森-路透公布2008年WJG影响因子2.081</p> <p>3202 《世界华人消化杂志》名词术语标准</p> <p>3209 《世界华人消化杂志》标点符号用法</p> <p>3222 《世界华人消化杂志》外文字符标准</p> <p>3248 《世界华人消化杂志》作者署名要求</p> <p>3254 《中国期刊引证报告(扩刊版)》发布《世界华人消化杂志》影响因子0.729</p> <p>3262 《世界华人消化杂志》中文摘要要求</p> <p>3268 《世界华人消化杂志》修回稿须知</p> <p>3277 《世界华人消化杂志》被收录情况</p>
封面故事	<p>Xing CG, Zhu BS, Fan XQ, Liu HH, Hou X, Zhao K, Qin ZH. Effects of LY294002 on the invasiveness of human gastric cancer <i>in vivo</i> in nude mice. <i>World J Gastroenterol</i> 2009; 15(40): 5044-5052 http://www.wjgnet.com/1007-9327/17/5044.asp</p>
本期责任人	<p>编务 刘晓芳; 送审编辑 李军亮; 组版编辑 吴鹏朕; 英文编辑 王天奇; 责任编辑 李瑞敏; 审核编辑 李军亮; 形式规范 马连生</p>

<p>世界华人消化杂志</p> <p>Shijie Huaren Xiaohua Zazhi</p> <p>吴阶平 题写封面刊名 陈可冀 题写版权刊名 (旬刊)</p> <p>创 刊 1993-01-15 改 刊 1998-01-25 出 版 2009-11-08 原刊名 新消化病学杂志</p> <p>名誉总编辑 潘伯荣 总 编 辑 马连生 常务副总编辑 张海宁 编辑部主任 张海宁 期 刊 名 称 世界华人消化杂志 主 管 单 位 山西省科学技术厅 主 办 单 位 太原消化病研治中心</p>	<p>编辑 世界华人消化杂志编辑委员会 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com</p> <p>出版 世界华人消化杂志编辑部 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com</p> <p>印刷 北京科信印刷厂 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 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>2009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

November 2009 Contents in Brief Volume 17 Number 31

EDITORIAL	3181 Recent advances in understanding the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis <i>Huang YQ</i>
BASIC RESEARCH	<p>3189 Effects of intracerebral microinjection of 5-hydroxytryptamine and its blocking agents and intracerebral microelectric stimulation on gastric electrical activity in rabbits <i>Zhang H, Ouyang S, Huang WF</i></p> <p>3197 Efficacy of celecoxib in the treatment of severe acute pancreatitis in rats <i>Xue CH, Gao ZJ, Li QP, Xu YP, Zhou CS, Yao J, Fu BQ</i></p> <p>3203 Tanshinone IIA inhibits angiogenesis in subcutaneous colorectal cancer xenografts in mice <i>Zhou LH, Liu X, Wang Y, Fan ZZ, Sun J, Li Q</i></p> <p>3210 Construction of human FUT3 eukaryotic expression vector and its expression in human breast adenocarcinoma cells <i>Yue LL, Fan L, Liu JC</i></p>
CLINICAL RESEARCH	<p>3214 Relationship between human papillomavirus 16 and esophageal squamous cell carcinoma in Uyghur population in Xinjiang Uyghur Autonomous Region <i>Zhou SM, Ilyar SH, Yang T, Zhang LW, Ayxiam H, Lu XM, Medinyet N, Liu T</i></p> <p>3218 Significance of death-associated protein kinase expression in esophageal squamous cell carcinoma <i>Liu Y, Li K, Liu WJ, Wang JF, Fan QX</i></p>
REVIEW	<p>3223 Recent advances in the use of Fibroscan for diagnosis of liver fibrosis <i>Wen X, Wang XM, Wang BY</i></p> <p>3229 Role of neuropathic pain mechanisms in the pathogenesis of pain in chronic pancreatitis <i>Liao XZ, Xiong YC</i></p> <p>3233 Advances in understanding the role of NKG2D and its ligands in digestive system tumors <i>Wan J, Li GH</i></p>
RAPID COMMUNICATION	<p>3237 Effects of IFNα-2a on <i>bcl-2</i> expression in the fibrotic liver of rats <i>Xi WN, Sun SL, Li FC, Luo J, Xiao YQ, Zhang P, Zhang W</i></p> <p>3241 Sirolimus inhibits cell proliferation and downregulates mTOR and HIF-1α expression in human hepatic carcinoma HepG2 cells <i>Wang Y, Xiong J, Cheng HH, Zhou S, Zhao Q</i></p> <p>3244 Preventive effects of different drugs on intestinal damage induced by non-steroidal anti-inflammatory drugs in rats <i>Fang L, Lv B, Meng LN, Zhang S, Wu WF</i></p>
CLINICAL PRACTICE	<p>3249 Comparison of clinical characteristics among Barrett's esophagus, erosive esophagitis and non-erosive reflux disease <i>Zhang J, Xu YQ, Yang ZX</i></p> <p>3255 Correlation of Tap2 gene polymorphisms and genetic factors with esophageal cancer in Kazakh population in Xinjiang Uyghur Autonomous Region</p>

	<p><i>Zeng TX, Zhang HF, Lei LJ, Cai JF, Li F, Liao PH, Qin JM</i></p> <p>3259 Modified pancreaticogastrostomy for digestive tract reconstruction after pancreatoduodenectomy</p> <p><i>Wu XG, Zhang QL, Li Y, Lin GH</i></p> <p>3263 Relationship between TNF-α, TGF-β1 and IL-10 genetic polymorphisms and post-hepatitis B cirrhosis</p> <p><i>Jiang ZL, Zhang W, Zhang H, Liu YB, Su SB</i></p> <p>3269 Causes and clinical outcomes of acute-on-chronic liver failure in patients with hepatitis B virus infection: an analysis of 289 cases</p> <p><i>Zhao ZG, Han T, Gao YT, Gao YY, Zhang Y, Wu ZP</i></p> <p>3273 Erythromycin infusion prior to emergency endoscopy for acute upper gastrointestinal bleeding: a systematic review</p> <p><i>Zhou J, He JD, Ouyang XB, Wang YP</i></p>
ACKNOWLEDGMENT	3278 Acknowledgments to reviewers of World Chinese Journal of Digestology
COVER	<p><i>Xing CG, Zhu BS, Fan XQ, Liu HH, Hou X, Zhao K, Qin ZH.</i> Effects of LY294002 on the invasiveness of human gastric cancer <i>in vivo</i> in nude mice.</p> <p><i>World J Gastroenterol</i> 2009; 15(40): 5044-5052</p> <p>http://www.wjgnet.com/1007-9327/17/5044.asp</p>
RESPONSIBLE EDITORS FOR THIS ISSUE	<p>Assistant Editor: <i>Xiao-Fang Liu</i> Review Editor: <i>Jun-Liang Li</i> Electronic Page Editor: <i>Peng-Zhen Wu</i></p> <p>English Language Editor: <i>Tian-Qi Wang</i> Editor-in-Charge: <i>Rui-Min Li</i> Proof Editor: <i>Jun-Liang Li</i></p> <p>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 November 8, 2009

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

© 2009 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 © 2009 by Editorial Department of *World Chinese Journal of Digestology*

非酒精性脂肪性肝炎发病机制的研究进展

黄颖秋

黄颖秋, 中国医科大学第五临床学院 本溪钢铁(集团)有限责任公司总医院消化内科 辽宁省本溪市 117000

黄颖秋, 主任医师, 教授, 研究生导师, 主要从事胃肠动力疾病、消化系统肿瘤及肝硬化的基础与临床研究。

通讯作者: 黄颖秋, 教授, 主任医师, 117000, 辽宁省本溪市平山区人民路29号, 中国医科大学第五临床学院, 本溪钢铁(集团)有限责任公司总医院消化内科. huangyingqiu_bx@126.com
电话: 0414-2215137

收稿日期: 2009-09-24 修回日期: 2009-10-20

接受日期: 2009-11-02 在线出版日期: 2009-11-08

Recent advances in understanding the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis

Ying-Qiu Huang

Ying-Qiu Huang, Department of Gastroenterology, General Hospital of Benxi Steel & Iron (Group) Co., Ltd, the Fifth Clinical College of China Medical University, Benxi 117000, Liaoning Province, China

Correspondence to: Professor Ying-Qiu Huang, Department of Gastroenterology, General Hospital of Benxi Steel & Iron (Group) Co., Ltd, the Fifth Clinical College of China Medical University, 29 Renmin Road, Pingshan District, Benxi 117000, Liaoning Province, China. huangyingqiu_bx@126.com

Received: 2009-09-24 Revised: 2009-10-20

Accepted: 2009-11-02 Published online: 2009-11-08

Abstract

Nonalcoholic steatohepatitis (NASH) is a pathological condition characterized by macrovesicular steatosis, necroinflammation, loss of hepatocytes and fibrosis. NASH is often associated with type 2 diabetes mellitus, hypertension, hyperlipoproteinemia and obesity. Recent studies emphasize the role of insulin resistance, oxidative stress and subsequent lipid peroxidation, proinflammatory cytokines, adipokines and mitochondrial dysfunction in the development and progression of NASH. In this article, we will review the role of insulin resistance, oxidative stress and subsequent lipid peroxidation, mitochondrial dysfunction, proinflammatory cytokines, adipokines such as resistin, leptin, adiponectin and PPAR- α , apoptosis, NF kappa B, SREBP-1c, endotoxaemia, and iron overload in the pathogenesis of NASH. The pathogenesis of NASH is thought to be related mainly with

insulin resistance and oxidative stress and subsequent lipid peroxidation. Adipocytokines also play an important role in the pathogenesis of NASH through complex and interactive paracrine and endocrine mechanisms. Understanding of the mechanisms responsible for the pathogenesis of NASH has important implications for the treatment of NASH.

Key Words: Nonalcoholic steatohepatitis; Pathogenesis; Advance

Huang YQ. Recent advances in understanding the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(31): 3181-3188

摘要

非酒精性脂肪性肝炎(NASH)是以肝细胞丧失、脂肪变性、气球样变、炎性坏死及纤维化形成为特征的病理状态。NASH常见于2型糖尿病、高血压、高脂血症及肥胖患者。新近的一些研究着重于胰岛素抵抗、氧应激及脂质过氧化损伤、促炎症细胞因子、脂肪细胞因子以及线粒体功能障碍在NASH发生发展中的作用。本文系统阐述了胰岛素抵抗、氧应激及脂质过氧化损伤、炎症细胞因子、抵抗素、瘦素、脂联素、PPAR- α 等脂肪因子、细胞凋亡、NF- κ B、SREBP-1c、肠源性内毒素血症以及铁超载等在NASH发病机制中的作用。NASH的致病机制主要与胰岛素抵抗、氧应激及脂质过氧化损伤有关,而脂肪细胞因子通过其内分泌和旁分泌间的复杂相互作用也在NASH的发病机制中起重要作用。这些发病机制的最新进展为NASH的针对性治疗提供了新的思路。

关键词: 非酒精性脂肪性肝炎; 发病机制; 进展

黄颖秋. 非酒精性脂肪性肝炎发病机制的研究进展. *世界华人消化杂志* 2009; 17(31): 3181-3188

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3181.asp>

0 引言

非酒精性脂肪性肝炎(nonalcoholic steatohepatitis,

背景资料

随着生活水平的提高和膳食习惯的改变,以及糖尿病、高脂血症、肥胖和代谢综合征等发病率的增加,NASH的发病率也呈逐年上升趋势。他已成为肝硬化甚至肝癌的致病因素之一,因此,对NASH的发病机制研究已越来越受到人们的重视。除胰岛素抵抗、氧应激和脂质过氧化损伤等主要发病机制外,抵抗素、瘦素、脂联素等脂肪细胞因子在NASH发病机制中的作用已成为新的研究热点。

同行评议者

迟宝荣, 教授, 吉林大学第一医院 消化内科

研究前沿
SREBP-1c、PPAR- α 、NF- κ B、铁超载及肠源性内毒素血症等因素在NASH发病机制中的作用已成为新的研究方向。

NASH)是与胰岛素抵抗和遗传易感性密切相关的获得性代谢疾病,作为单纯性脂肪肝发展为肝纤维化的一段病理阶段,常见于肥胖、2型糖尿病、高脂血症等代谢综合征患者^[1-2]。近年来,随着人们生活水平的提高、膳食结构的改变以及药物的滥用等因素影响,NASH的发病率呈逐年上升趋势。而且随着肥胖症儿童的增多,NASH的患病年龄也呈现低龄化趋势^[2]。NASH的持续存在已成为肝硬化甚至肝癌的重要因素之一^[3]。15%-20%的NASH患者在10-20年内可进展为肝硬化^[2,4]。NASH的发病机制尚未十分明确,遗传易感性与多元代谢紊乱的相互作用可能是其主要的发病因素^[1]。目前,对其发病机制的研究已成为新的研究热点,应引起足够重视。

1 NASH的概念

NASH是以无过量饮酒史(或酒精摄入量<20 g/d)以及肝细胞脂肪变性、气球样变、弥散性肝小叶轻度炎症和/或肝中央静脉、肝窦周围胶原沉积等为病理特征的慢性肝脏炎性疾病^[5-6]。

2 NASH的发病机制

2.1 氧应激和脂质过氧化损伤 氧应激是过氧化物和抗氧化物之间的一种动态失衡状态,是指来自于分子氧的游离基或反应性氧化物及其代谢产物等作用增大或自身抗氧化剂(肝细胞内的还原型谷胱甘肽等)作用下降而产生的一种生理平衡失调^[1,5,7]。反应性氧化物(reactive oxygen species, ROS)是氧化还原产生含有氧化学性质异常活跃的一类物质,包括自由基和H₂O₂^[5]。氧应激在脂肪沉积的肝组织中显著增强,ROS与NASH的病变程度密切相关。ROS与生物膜的磷脂、酶及膜受体(Fas、TNF- α 受体家族)相关的多价不饱和脂肪酸(USFA)以及核酸等物质发生脂质过氧化反应,诱导TNF- α 释放,促进自由基和过氧化氢增加,致使细胞膜的流动性和通透性异常,引起肝细胞破裂、凋亡。此外,ROS通过活化中性粒细胞,引发肝小叶内炎症细胞浸润及纤维化^[5-7]。当肝脏摄取游离脂肪酸(free fatty acid, FFA)过多或在线粒体内氧化磷酸化和 β 氧化受抑制时,不仅FFA转化成甘油三酯(triglyceride, TG)明显增多,CYP2E1、CYP4A等脂质过氧化的催化酶的活性也显著增强,在其诱导下,FFA的过氧化物酶体 β 氧化和微粒体 ω 氧化即发挥重要作用。这两种氧化反应能产生H₂O₂、 ω 羟基代谢物及超氧化物等大量的代谢产物。由此

生成的过多ROS可活化核因子- κ B(nuclear factor kappa B, NF- κ B),从而促进中性粒细胞趋化和Kupffer细胞分泌大量TNF- α ,最终引发肝细胞的炎症反应及纤维化的形成^[1,5-7]。脂质过氧化产物增多可改变线粒体DNA,抑制呼吸链的电子传递,进一步损伤线粒体,并与ROS相互作用形成恶性循环。此外,ROS和过多的脂质过氧化物可消耗细胞内的抗氧化系统,导致抗氧化物质缺乏,进一步加重此恶性循环。NASH患者体内的脂质过氧化产物丙二醛(malondialdehyde, MDA)、4-羟壬烯醇等含量显著增高^[8],MDA可使蛋白质交联,形成Mallory小体而诱发自身免疫反应。4-羟壬烯醇能直接趋化中性粒细胞引发炎症反应。此外,MDA与4-羟壬烯醇可诱发Apo-B水解,使TG通过极低密度脂蛋白输出肝脏减少,且阻碍蛋白质与核苷酸合成,减少还原型谷胱甘肽、增加TNF- α 引发肝细胞坏死及纤维化^[8]。

2.2 胰岛素抵抗(insulin resistance, IR) IR是指胰岛素的靶器官和组织对胰岛素生物学效应的反应性降低或消失而产生的一种临床病理状态,即正常浓度的胰岛素不能发挥其正常的生物学效应,因而常表现为高胰岛素血症,其发生机制主要涉及受体前、受体及受体后水平的缺陷。胰岛素信号传递受阻或减弱是导致IR的主要原因^[9]。其中,磷脂酰肌醇3激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3-K)通路是肝脏胰岛素信号传导中的主要通路。胰岛素刺激PI-3K减少常导致IR^[9]。胰岛素首先与细胞表面的胰岛素受体(insulin receptor, InSR)结合并激活其 β -亚基的酪氨酸蛋白激酶(protein tyrosine kinase, PTK),PTK再磷酸化胰岛素受体底物(insulin receptor substrates, IRSs)蛋白中特定酪氨酸残基,磷酸化的IRSs能与含SH2结构域的信号分子结合,从而活化细胞信号转导中起关键作用的多个分子,激活PI3-K AS/RAF/MAPK途径,再作用于下游靶分子,以调节细胞的代谢、生长、分化^[10]。肝细胞内脂质特别是TG蓄积是NASH形成和进展的基础^[4]。IR致肝细胞内TG蓄积被认为是NASH的重要致病因素^[11]。IR主要通过促进脂肪分解和高胰岛素血症这2种途径导致脂肪在肝细胞内的蓄积。其一,胰岛素是促进合成代谢和调节血糖稳定的主要激素,能有效抑制脂肪分解,降低血液中FFA浓度,IR可导致外周脂肪分解增加和血液中FFA增多,肝细胞对脂肪酸的摄入增加致使

线粒体氧化超负荷,加重肝细胞内FFA的蓄积。而FFA本身又具有细胞毒性,可诱导CYP2E1活化,促使微粒体氧应激,在微粒体内的脂肪酸被氧化成二羟基脂肪酸,降解生成短链酰基CoA和酰基CoA而增加肝细胞对“二次打击”的易感性^[12]。此外,过多的FFA还可以在InSR或受体后水平发生作用,从而促进基础状态的胰岛细胞生长及分泌胰岛素^[8],致使IR进一步加重。这可能是IR参与NASH的发病因素之一。其二,高胰岛素血症致使糖降解加速而使脂肪酸合成过多,并可使极低密度脂蛋白合成不足或分泌减少而致TG蓄积于肝细胞内^[12]。

2.3 FFA FFA是中性脂肪的分解产物。FFA增多与IR之间有很强的相关性,是导致IR的重要原因^[13-14]。肥胖者及NASH患者肝组织及血清内FFA含量均显著增多。长期大量的高脂饮食使FFA摄入增多、IR使中性脂肪分解释放FFA增多、肝细胞线粒体脂肪酸 β 氧化减少均使得肝脏和血清中FFA增多^[13,15]。FFA具有较强的细胞毒性,可导致肝细胞线粒体肿胀通透性增强、肝细胞变性、坏死及中性粒细胞浸润^[15-16],还可致溶酶体功能障碍^[17]。研究显示,FFA刺激HepG2细胞致胞质内脂质大量沉积,同时依赖于TNF- α 的组织蛋白酶B也在胞质内广泛分布^[17],提示FFA可导致溶酶体通透性增强和细胞凋亡率增加。FFA可通过脂质过氧化损伤而间接破坏肝细胞,通过活化蛋白激酶C- ω ,引起c-jun氨基末端激酶-1与IRS-1和IRS-2结合,改变细胞增殖信号而致细胞凋亡^[12]。FFA可促进肝星状细胞增殖而加重肝纤维化^[5]。此外,在IR时,USFA还可通过活化Kupffer细胞内的NF- κ B致使Kupffer细胞分泌大量TNF- α 而引发FFA增多^[5,13,18],由此使肝细胞的损伤形成恶性循环。

2.4 线粒体功能障碍 线粒体是肝细胞内最敏感的细胞器之一,内含具氧化作用的呼吸链酶体系、氧化磷酸化酶体系及脂肪酸氧化酶体系等,是生理状态下脂肪酸氧化代谢的主要场所^[13,19]。NASH患者的线粒体结构及功能异常。NASH患者体内脂肪酸的显著增多使线粒体内的氧化磷酸化作用代偿性增加,引发负反馈生成过多的乙酰-CoA,经三羧酸循环产生大量的NADH和FADH₂^[14,19],再通过呼吸链酶体系的氧化作用释放出大量ROS。而生成的ROS又反过来攻击线粒体,不仅使线粒体的超微结构毁损、DNA数量减少,而且使由其DNA编码参与

ATP合成的复合体I、III、IV、V的活性显著降低,从而导致线粒体内呼吸链功能障碍,ATP合成能力下降^[19]。此外,ROS不仅使线粒体DNA变化,还能与线粒体蛋白质发生反应,减少呼吸链蛋白质表达,影响呼吸链的功能,产生更多的ROS,从而诱发更多的脂质过氧化损伤,导致Kupffer细胞内更多的TNF- α 分泌^[20]。动物实验发现,TNF- α 还可通过特异性抗体破坏线粒体并阻碍其功能^[21],由此反复形成恶性循环。细胞因子(cytokine, CK)和ROS在线粒体的功能障碍中起重要作用。研究显示,通过过氧化物酶体增殖物激活受体 α (peroxisome proliferator-activated receptor α , PPAR- α)诱发的解偶联蛋白(uncoupling protein, UCP)-2作用,FFA能促进电子传递链跨膜泵出线粒体的质子不经ATP合成途径而跨膜扩散回漏到线粒体基质内,由此而形成呼吸链驱动的质子泵出和回漏的无效循环通路^[22],这可能是线粒体功能障碍的又一机制。

2.5 细胞因子(CK) CK是由多种细胞分泌的能调节细胞生长分化、介导机体免疫功能、参与炎症反应的一类小分子多肽。CK在NASH的发展进程中起重要作用^[3]。参与NASH的CK很多,包括TNF- α 、IL-6、IL-8、IL-12、IL-15、IL-18等。其中,TNF- α 的致病作用尤为显著,他不仅参与炎症反应,还是脂肪细胞因子,在脂肪代谢中起重要作用^[3,23-24]。TNF- α 对脂蛋白脂酶有较强的抑制作用,大量的TNF- α 可减少外周脂肪组织分解,并促进肝细胞合成TG^[3,23]。TNF- α 通过诱导肝细胞的UCP-2基因表达,而抑制线粒体内的ATP合成,促进肝细胞的坏死^[22],并通过抑制PI3-K活性、降低葡萄糖转运子(glucose transporter, GLUT)4的基因表达而诱发IR^[24]。TNF- α 还可通过下调PPAR- α 、脂联素、IRS-1等损害胰岛素敏感性^[24]。此外,TNF- α 诱生的IL-6也可加重IR^[3]。肥胖或肝脏脂肪过多沉积时,肝脏的Kupffer细胞也能分泌大量的TNF- α ,脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)可增加TNF- α 对肝细胞损伤的敏感性^[25],LPS还可诱导H₂O₂大量产生,并激活对氧应激敏感的NF- κ B,后者可上调Kupffer细胞中CK的基因表达,从而加重肝损伤^[21]。LPS又是Kupffer细胞的激活因子,会不断促使其分泌更多的CK,导致肝损伤的恶性循环。IL-6不仅参与炎症,还是脂肪细胞因子,在能量代谢平衡中起重要调节作用^[24]。NASH患者血浆及肝组织中IL-6 mRNA呈高度表达^[26]。IL-6能显著抑制胰岛素依赖的

相关报道

Polyzos *et al*对胰岛素抵抗和脂肪细胞因子在NASH发病机制中的最新进展进行了综述,着重阐述了脂肪细胞因子通过其内分泌和旁分泌的复杂作用对胰岛素分泌的影响,为认识NASH的发病机制提供了新的线索。

创新盘点

本文对NASH发病机制中胰岛素抵抗、氧应激和脂质过氧化损伤等研究进展进行了综述,对细胞因子、细胞凋亡、脂肪因子、NF- κ B、SREBP-1c、肠源性内毒素血症以及铁超载等因素在NASH中的作用也进行了阐述,希望为NASH发生机制的探索提供依据。

AKT激活,还能抑制IRS-1、GLUT4和PI3-K的表达,从而影响胰岛素受体后信号转导,引发IR^[24]。IL-6基因启动子区的基因变异和基因多态性也可导致IR^[27]。有研究发现,NASH患者IL-6基因启动子-572位点的C等位基因频率显著增高^[27]。NASH患者IL-8水平显著增高,且与肝损伤的严重程度密切相关^[28]。IL-8通过对中性粒细胞的活化和趋化作用导致肝细胞的炎症反应。肝细胞内的脂肪沉积可以刺激IL-8的产生,加重NASH的发展^[24,29]。IL-15可阻止NK细胞和特殊的T细胞凋亡,导致体内大量的NK细胞和CD8(+)T细胞蓄积,而IL-12、IL-18可调节NK细胞分化,致使NK细胞亚群增加,从而生成大量的干扰素(interferon, IFN)^[30]。IFN可增强TNF- α 活性而加重LPS对肝细胞损伤。此外,CK还可激活T细胞介导的免疫反应,而引发肝细胞的炎性改变^[3]。

2.6 细胞凋亡 细胞凋亡是一个由基因决定的细胞主动而有序的死亡方式。肝细胞凋亡与NASH直接相关,且凋亡程度与NASH的严重性有密切关系,NASH患者存在大量肝细胞凋亡现象^[13,31]。研究发现,NASH患者肝细胞线粒体的嵴和类晶体缺失,线粒体的结构破坏及功能异常,而对照组则无此现象^[12],说明NASH存在病理条件下的细胞凋亡。肝细胞主要通过膜死亡受体Fas途径和线粒体途径完成凋亡过程^[32]。Fas在NASH患者的肝细胞内过度表达,他可以传导凋亡信号并通过caspase-8裂解Bid致线粒体损伤。Fas受体与Fas配体结合后即启动凋亡信号转导机制。Fas受体的胞质内含有一个“死亡域”序列,与Fas配体结合后诱导caspase-8前体生成死亡诱导信号复合体(death-inducing signaling complex, DISC),引起细胞凋亡^[33]。NASH患者存在线粒体功能障碍,致使ROS增多,后者能诱导线粒体膜通透性改变,降低线粒体跨膜电位,促进细胞色素C释放至胞质内^[19]。细胞色素C释放至胞质的另一个机制是DNA断裂后p53的激活,从而引发Bcl-2家族中的Bax进入线粒体,使线粒体外膜形成小孔,而促进细胞色素C的释放^[33-34]。此外,Bcl-2家族中的另一成员Bid也介导了线粒体细胞色素C胞质内的释放^[34-35],作为caspase-8作用的底物,Bid转化成tBid后可破坏线粒体膜,使细胞色素C释放至胞质。细胞色素C与凋亡蛋白活化因子-1、dATP及caspase-9前体结合成凋亡小体^[32,35],DISC通过线粒体及凋亡小体后其死亡诱导信号明显加强,而导致肝细胞凋亡^[32]。胰岛素

和其他一些相关增长因素能阻止细胞凋亡并且通过PI-3K/AKT机制加速细胞增殖,说明PI-3K的激活从机能上可能阻止了细胞死亡信号,并且进一步可以改善NASH^[36]。

2.7 PPAR- α PPAR- α 是由配体激活的核转录因子,在转录水平通过3条氧化代谢途径对脂肪酸进行调节。

其转录激活依赖于与相应配体结合后的活化。PPAR- α 通过对脂肪酸氧化基因表达的调控,在肝脏的脂肪细胞分化、脂质储存、转运及脂肪酸氧化中起重要作用^[37]。PPAR- α 不仅能诱导线粒体、过氧化物酶体及微粒体氧化酶体的产生,还能促使参与脂肪重新合成及与糖异生相关的酶的生成,从而加速肝脏脂肪酸的氧化,减少肝脏脂肪酸的含量^[37-38]。PPAR- α 的转录受TNF- α 负反馈调节,NASH血清TNF- α 含量显著增高,PPAR- α 的表达明显受抑^[39]。此外,PPAR- α 还可通过NF- κ B、信号转导子、转录激活子、活化蛋白-1和非分泌型磷脂酶A2等途径发挥负向转录调节作用^[37-38]。PPAR- α 还能调节c-myc、c-jun等生长调控基因的表达,对肝细胞分化及肝癌的发生起重要作用。PPAR- α 缺乏不仅加重TG在肝脏的沉积,还可引起脂质和碳水化合物代谢紊乱。PPAR- α 表达减少可导致与脂质代谢相关的酶基因转录水平降低,致使脂肪酸在肝脏氧化减少,加速脂质在肝脏沉积,从而促发NASH的发生发展^[37]。

2.8 抵抗素 抵抗素(resistin)是由脂肪组织分泌,属于富含半胱氨酸的分泌型抵抗素样蛋白质分子家族中的一员,可通过IRS-1/Akt1途径在肥胖和IR之间建立联系,通过降低GLUT4的转运功能,影响糖的摄取^[24,40]。NASH患者血清抵抗素水平较单纯性脂肪肝患者升高,且抵抗素水平与NASH的严重程度呈正相关^[24]。研究显示,NASH患者抵抗素基因启动子-420G等位基因的出现频率远高于正常对照组^[41]。NASH患者中,与其他基因型相比,GG基因型携带者的抵抗素血清含量更高,更易发生糖耐量异常,肝纤维化程度也更重,说明,抵抗素基因启动子-420G等位基因在NASH的发病机制中可能起作用^[41]。

2.9 CYP 细胞色素P450(CYP)是肝细胞微粒体复合功能氧化酶系,是一组结构和功能相关的基因编码的同工酶,CYP2E1和CYP4A是其中2个亚酶。微粒体内脂肪酸的 ω 氧化是依赖CYP2E1和CYP4A来完成的。在正常肝组织中,微粒体的

ω 氧化在脂肪酸氧化代谢中所占比例很小,但在NASH患者的肝组织中,微粒体的脂肪酸 ω 氧化却显著增强^[12,42]. FFA增多和IR是促进CYP产生的机制^[3,12], PPAR- α 依赖性的CYP4A过度表达也参与此机制^[43]. CYP2E1和CYP4A作为促氧化物可产生大量的ROS,并激活Kupffer细胞释放大量的TNF- α . 过多的ROS加重NASH患者肝组织的炎症变化, TNF- α 通过抑制PPAR- α 表达,引发与脂质代谢相关的蛋白质和酶基因的转录水平下降^[43],而促进NASH进一步发展.

2.10 瘦素 瘦素是脂肪组织分泌的一种激素,通过血液循环分布到全身各种组织,与其受体ob-R结合,经由Janus家族酪氨酸激酶/信号传导与转录激活因子JAK/STAT3途径产生生物学效应^[24]. 瘦素通过抑制食欲,减少能量摄入,增加能量释放,抑制脂肪细胞的合成,而使体质量减轻. 此外,瘦素还能控制非脂细胞内TG含量,避免非脂细胞脂毒性的发生. 瘦素缺乏以及瘦素受体基因的敲除可导致NASH的形成^[43]. 瘦素可通过其信号转导,抑制胰岛素原的mRNA表达而减少胰岛素分泌,还可通过使胰岛B细胞超极化而抑制胰岛素分泌,从而形成一个脂肪组织和胰岛B细胞之间的双向反馈调节环^[24,44]. 在病理状态下,当ob-R的敏感性降低,出现瘦素抵抗,使双向反馈调节失效,导致高胰岛素血症,从而加速糖降解,合成过多脂肪酸,并可使极低密度脂蛋白合成不足而促进TG在肝细胞内的沉积^[24]. 此外,瘦素可通过激活IL-8和TNF- α ,诱发T细胞介导的肝毒性,导致肝细胞的炎症反应,并可选择性促进IL-6、IL-12及TNF- α 分泌,加重炎症反应,促进NASH的发生和肝纤维化的形成^[45].

2.11 脂联素 脂联素是肝脏脂肪细胞分泌的一种内源性生物活性多肽,在调节脂肪代谢、参与炎症反应等过程中发挥生物学效应^[24]. 此外,他还有胰岛素增敏、抗高血糖和拮抗TNF- α 作用^[24]. 与其他脂肪因子不同,随着脂肪容量增大,脂联素的分泌反而减少. 伴有IR的肥胖患者其血清脂联素水平显著下降,脂肪组织中的脂联素基因也呈低表达,而血清抵抗素含量则显著升高,这将有助于预测NASH的发生^[46]. 研究发现,肥胖者血清脂联素含量显著降低^[46-47]. 脂联素通过使乙酰-CoA羧化酶(ACC)、脂肪酸合成酶(FAS)失活及活化PPAR- α 对TNF- α 产生抑制作用,此作用可被抵抗素拮抗^[24,46,48]. NASH患者血清脂联素水平降低,并与NASH病变程度密切相关^[24,49]. 但也有研

究发现, NASH患者肝组织内脂联素mRNA呈过度表达,而IL-6 mRNA则呈低表达^[50],其机制尚不清楚.

2.12 固醇调节元件结合蛋白-1c(sterol regulatory element-binding protein -1c, SREBP-1c) SREBP-1c是肝细胞脂质稳态的转录调节物,可直接激活多个参与胆固醇、脂肪酸、TG及磷脂的合成和摄取,以及辅助因子NADPH等基因的表达,从而调控胆固醇及脂肪酸等脂类的代谢过程. SREBP-1c的表达受IRS-1/PI3-K调控,胰岛素可持续刺激SREBP-1c表达. IRS-2缺乏导致的SREBP-1c过度表达,可能与IRS-1/PI3-K信号代偿性上调有关^[51]. SREBP-1c被胰岛素、肝脏受体(LXR)- α 、内源性大麻素受体CB1激活后能促进ACC和FAS表达^[52]. 大麻素能激活肝细胞大麻素受体,使SREBP-1c过度表达,导致肝细胞的大量脂肪沉积^[53]. 脂肪肝及NASH患者SREBP-1c的表达显著升高,并随脂肪肝病程度的加重而增加, SREBP-1c的过表达与肝细胞的脂质沉积密切相关,可能在NASH的发生发展中起致病作用^[47]. 食用富含USFA的食物能有效抑制TG在肝细胞的沉积,从而减轻脂肪肝和NASH的程度,这可能与上调脂肪酸 β -氧化、脂酰辅酶A氧化酶和中链酰基辅酶A脱氢酶的基因表达,下调SREBP-1c的基因表达,从而改善IR等机制有关^[54].

2.13 NF- κ B NF- κ B是一种重要的核转录因子,可被多种刺激因素激活,由p50和p65多肽亚基组成同源及异源二聚体,并易位至细胞核,与相应的靶基因结合,启动基因转录^[3,5]. NF- κ B可调控TNF- α 等多种细胞因子表达,在NASH的形成中起病理生理学作用^[5,7]. 氧应激等因素可激活NF- κ B,使其进入细胞核,与DNA分子特定基因启动子区域上的NF- κ B结合位点结合,启动基因转录,介导肝细胞的炎症及免疫反应^[55]. 研究证实, NASH的病损程度与NF- κ B的过度表达密切相关^[55].

2.14 肠源性内毒素血症 肠源性内毒素血症(intestinal endotoxemia, IETM)是指血液中内毒素源于肠道的菌群代谢,而非革兰氏阴性细菌感染所致. NASH广泛存在IETM. 内毒素可使肠黏膜屏障的完整性破坏,导致肠黏膜通透性增强,内毒素吸收增多,从而促使Kupffer细胞释放更多的TNF- α ,进一步加重NASH^[56]. LPS是内毒素的主要致病成分,他能导致严重的肝损伤^[57]. 内毒素不仅直接损伤肝细胞致代谢功能紊乱,更重

应用要点
本文系统阐述了多种致病因素在NASH发病机制中的研究进展,为NASH的预防和针对性治疗开拓了新的思路.

名词解释

固醇调节元件结合蛋白(SREBPs): 是一类固定于内质网和核被膜上的膜连接蛋白。现已确认的SREBPs有3种, 分别是SREBP-1a, SREBP-1c及SREBP-2。肝脏和组织能量代谢平衡主要靠SREBP-1c进行调节。

要的是其与内毒素结合蛋白结合后, 通过CD14和信号受体, 激活Kupffer细胞释放大量的TNF- α , 还可通过活化NF- κ B及CCAAT增强子结合蛋白等转录因子, 而促进TNF- α 、IL-1、IL-6、IL-8等细胞因子的增加, 导致NASH产生^[58]。

2.15 铁超载 NASH患者存在血清铁水平升高和铁超载现象, 轻度铁超载会使肝脏纤维化危险性增加^[59]。铁与十六烷酸(PA)结合后毒性作用显著增加, PA通过转铁蛋白受体依赖的机制使铁易位到细胞, 并使已易位的铁进入线粒体内, 导致线粒体功能障碍、细胞凋亡和染色体突变。细胞内的铁超载导致ROS过度产生和脂质过氧化。PA使铁易位是因为Fe/PA介导的细胞外的氧应激及随后的膜渗透增高导致的膜损伤^[60]。

2.16 遗传因素和免疫反应 家族性肥胖及代谢综合征患者的NASH发病率显著增高, NASH和隐匿性肝硬化有家族性发病的现象, 均提示遗传易感因素在NASH的发病中可能起一定作用^[7,12,61]。脂质过氧化损伤释放的MDA和HNE通过共价键与蛋白质交联, 参与形成Mallory小体, 后者作为一种抗原引发免疫反应^[8,62], 从而导致NASH发生。

3 结论

NASH的发病机制非常复杂, 且未完全阐明。在“初次打击”诱发脂肪肝的前提下, 以氧应激和脂质过氧化损伤为轴心的“二次打击”在NASH的发生发展中起重要作用。氧应激产生的过多ROS为脂肪肝的发病基础, 而线粒体是ROS的主要攻击目标。FFA增多、TNF- α 大量释放、肝细胞CYP2E1过度表达以及IR等诸多因素通过氧应激和脂质过氧化损伤导致脂肪肝发生炎症反应及纤维化形成, 从而诱发及加重NASH。除上述机制外, NASH还受遗传易感性、环境、免疫反应等因素的影响。随着研究的进一步深入, 细胞凋亡、细胞因子、抵抗素、瘦素、脂联素、SREBP-1c、NF- κ B、PPAR- α 及铁超载等因素在NASH发病机制中的作用逐渐引起了人们的重视。因此, 该领域的研究空间十分广阔。重视NASH的发病机制研究对于NASH的预防和针对性治疗具有十分的重要意义。

4 参考文献

- Paschos P, Paletas K. Non alcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome. *Hippokratia* 2009; 13: 9-19
- Greenfield V, Cheung O, Sanyal AJ. Recent advances in nonalcoholic fatty liver disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2008; 24: 320-327
- Polyzos SA, Kountouras J, Zavos C. Nonalcoholic

fatty liver disease: the pathogenetic roles of insulin resistance and adipocytokines. *Curr Mol Med* 2009; 9: 299-314

- Kashi MR, Torres DM, Harrison SA. Current and emerging therapies in nonalcoholic fatty liver disease. *Semin Liver Dis* 2008; 28: 396-406
- Björnsson E, Angulo P. Non-alcoholic fatty liver disease. *Scand J Gastroenterol* 2007; 42: 1023-1130
- Hübscher SG. Histological assessment of non-alcoholic fatty liver disease. *Histopathology* 2006; 49: 450-465
- McCullough AJ. Pathophysiology of nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Gastroenterol* 2006; 40 Suppl 1: S17-S29
- Chiarotto E, Castello L, Leonarduzzi G, Biasi And F, Poli G. Role of 4-hydroxy-2,3-nonenal in the pathogenesis of fibrosis. *Biofactors* 2005; 24: 229-236
- Morino S, Kondo T, Sasaki K, Adachi H, Suico MA, Sekimoto E, Matsuda T, Shuto T, Araki E, Kai H. Mild electrical stimulation with heat shock ameliorates insulin resistance via enhanced insulin signaling. *PLoS One* 2008; 3: e4068
- 谢平, 宋惠萍. 胰岛素信号蛋白与胰岛素抵抗. 国外医学·生理、病理科学与临床分册 2001; 21: 48-50
- Deivanayagam S, Mohammed BS, Vitola BE, Naguib GH, Keshen TH, Kirk EP, Klein S. Nonalcoholic fatty liver disease is associated with hepatic and skeletal muscle insulin resistance in overweight adolescents. *Am J Clin Nutr* 2008; 88: 257-262
- Macías-Rodríguez RU, Torre A. [Pathophysiology of non-alcoholic steatohepatitis. An insulin resistance overview] *Rev Invest Clin* 2009; 61: 161-172
- de Alwis NM, Day CP. Non-alcoholic fatty liver disease: the mist gradually clears. *J Hepatol* 2008; 48 Suppl 1: S104-S112
- Fan JG, Farrell GC. VAT fat is bad for the liver, SAT fat is not! *J Gastroenterol Hepatol* 2008; 23: 829-832
- Malhi H, Gores GJ. Molecular mechanisms of lipotoxicity in nonalcoholic fatty liver disease. *Semin Liver Dis* 2008; 28: 360-369
- Jou J, Choi SS, Diehl AM. Mechanisms of disease progression in nonalcoholic fatty liver disease. *Semin Liver Dis* 2008; 28: 370-379
- Feldstein AE, Werneburg NW, Canbay A, Guicciardi ME, Bronk SF, Rydzewski R, Burgart LJ, Gores GJ. Free fatty acids promote hepatic lipotoxicity by stimulating TNF- α expression via a lysosomal pathway. *Hepatology* 2004; 40: 185-194
- Pessayre D. Role of mitochondria in non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22 Suppl 1: S20-S27
- Serviddio G, Sastre J, Bellanti F, Viña J, Vendemiale G, Altomare E. Mitochondrial involvement in non-alcoholic steatohepatitis. *Mol Aspects Med* 2008; 29: 22-35
- Tomita K, Tamiya G, Ando S, Ohsumi K, Chiyo T, Mizutani A, Kitamura N, Toda K, Kaneko T, Horie Y, Han JY, Kato S, Shimoda M, Oike Y, Tomizawa M, Makino S, Ohkura T, Saito H, Kumagai N, Nagata H, Ishii H, Hibi T. Tumour necrosis factor alpha signalling through activation of Kupffer cells plays an essential role in liver fibrosis of non-alcoholic steatohepatitis in mice. *Gut* 2006; 55: 415-424
- García-Ruiz I, Rodríguez-Juan C, Díaz-Sanjuan T, del Hoyo P, Colina F, Muñoz-Yagüe T, Solís-Herruzo JA. Uric acid and anti-TNF antibody

- improve mitochondrial dysfunction in ob/ob mice. *Hepatology* 2006; 44: 581-591
- 22 Serviddio G, Bellanti F, Tamborra R, Rollo T, Capitanio N, Romano AD, Sastre J, Vendemiale G, Altomare E. Uncoupling protein-2 (UCP2) induces mitochondrial proton leak and increases susceptibility of non-alcoholic steatohepatitis (NASH) liver to ischaemia-reperfusion injury. *Gut* 2008; 57: 957-965
 - 23 Carter-Kent C, Zein NN, Feldstein AE. Cytokines in the pathogenesis of fatty liver and disease progression to steatohepatitis: implications for treatment. *Am J Gastroenterol* 2008; 103: 1036-1042
 - 24 Tsochatzis EA, Papatheodoridis GV, Archimandritis AJ. Adipokines in nonalcoholic steatohepatitis: from pathogenesis to implications in diagnosis and therapy. *Mediators Inflamm* 2009; 2009: 831670
 - 25 Diehl AM. Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis IV. Nonalcoholic fatty liver disease abnormalities in macrophage function and cytokines. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 282: G1-G5
 - 26 Dogru T, Erzin CN, Erdem G, Sonmez A, Tapan S, Tasci I. Increased hepatic and circulating interleukin-6 levels in human nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol* 2008; 103: 3217-3218
 - 27 马瑞宏, 黄颖秋. 白介素6基因启动子-572C/G多态性与非酒精性脂肪肝炎的关系. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 635-639
 - 28 Bahcecioglu IH, Yalniz M, Ataseven H, Ilhan N, Ozercan IH, Seckin D, Sahin K. Levels of serum hyaluronic acid, TNF-alpha and IL-8 in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatogastroenterology* 2005; 52: 1549-1553
 - 29 Joshi-Barve S, Barve SS, Amancherla K, Gobejishvili L, Hill D, Cave M, Hote P, McClain CJ. Palmitic acid induces production of proinflammatory cytokine interleukin-8 from hepatocytes. *Hepatology* 2007; 46: 823-830
 - 30 Lauwerys BR, Garot N, Renauld JC, Houssiau FA. Cytokine production and killer activity of NK/T-NK cells derived with IL-2, IL-15, or the combination of IL-12 and IL-18. *J Immunol* 2000; 165: 1847-1853
 - 31 Feldstein AE, Canbay A, Angulo P, Taniai M, Burgart LJ, Lindor KD, Gores GJ. Hepatocyte apoptosis and fas expression are prominent features of human nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 2003; 125: 437-443
 - 32 Jaeschke H, Bajt ML. Regulation of apoptotic signaling pathways in hepatocytes in vivo. *Hepatology* 2003; 37: 942-945
 - 33 Ayed-Boussema I, Bouaziz C, Rjiba K, Valenti K, Laporte F, Bacha H, Hassen W. The mycotoxin Zearalenone induces apoptosis in human hepatocytes (HepG2) via p53-dependent mitochondrial signaling pathway. *Toxicol In Vitro* 2008; 22: 1671-1680
 - 34 Yang X, Chan C. Repression of PKR mediates palmitate-induced apoptosis in HepG2 cells through regulation of Bcl-2. *Cell Res* 2009; 19: 469-486
 - 35 Ramalho RM, Cortez-Pinto H, Castro RE, Solá S, Costa A, Moura MC, Camilo ME, Rodrigues CM. Apoptosis and Bcl-2 expression in the livers of patients with steatohepatitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2006; 18: 21-29
 - 36 Pagliassotti MJ, Wei Y, Wang D. Insulin protects liver cells from saturated fatty acid-induced apoptosis via inhibition of c-Jun NH2 terminal kinase activity. *Endocrinology* 2007; 148: 3338-3345
 - 37 Kallwitz ER, McLachlan A, Cotler SJ. Role of peroxisome proliferators-activated receptors in the pathogenesis and treatment of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 22-28
 - 38 Tanaka T, Masuzaki H, Nakao K. [Role of PPARs in the pathophysiology of nonalcoholic fatty liver disease] *Nippon Rinsho* 2005; 63: 700-706
 - 39 Svegliati-Baroni G, Candelaresi C, Saccomanno S, Ferretti G, Bachetti T, Marziani M, De Minicis S, Nobili L, Salzano R, Omenetti A, Pacetti D, Sigmund S, Benedetti A, Casini A. A model of insulin resistance and nonalcoholic steatohepatitis in rats: role of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and n-3 polyunsaturated fatty acid treatment on liver injury. *Am J Pathol* 2006; 169: 846-860
 - 40 Norata GD, Ongari M, Garlaschelli K, Tibolla G, Grigore L, Raselli S, Vettoretti S, Baragetti I, Noto D, Cefalu AB, Buccianti G, Averna M, Catapano AL. Effect of the -420C/G variant of the resistin gene promoter on metabolic syndrome, obesity, myocardial infarction and kidney dysfunction. *J Intern Med* 2007; 262: 104-112
 - 41 马瑞宏, 黄颖秋, 西元利治. 抵抗素基因启动子-420C/G多态性与日本高知地区非酒精性脂肪肝炎的相关性. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 3204-3209
 - 42 Schattenberg JM, Wang Y, Singh R, Rigoli RM, Czaja MJ. Hepatocyte CYP2E1 overexpression and steatohepatitis lead to impaired hepatic insulin signaling. *J Biol Chem* 2005; 280: 9887-9894
 - 43 Chitturi S, Farrell GC. Etiopathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Semin Liver Dis* 2001; 21: 27-41
 - 44 Yalniz M, Bahcecioglu IH, Ataseven H, Ustundag B, Ilhan F, Poyrazoglu OK, Erensoy A. Serum adipokine and ghrelin levels in nonalcoholic steatohepatitis. *Mediators Inflamm* 2006; 2006: 34295
 - 45 Tsochatzis E, Papatheodoridis GV, Archimandritis AJ. The evolving role of leptin and adiponectin in chronic liver diseases. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 2629-2640
 - 46 Baranova A, Gowder SJ, Schlauch K, Elariny H, Collantes R, Afendy A, Ong JP, Goodman Z, Chandhoke V, Younossi ZM. Gene expression of leptin, resistin, and adiponectin in the white adipose tissue of obese patients with non-alcoholic fatty liver disease and insulin resistance. *Obes Surg* 2006; 16: 1118-1125
 - 47 Fu Y, Luo N, Klein RL, Garvey WT. Adiponectin promotes adipocyte differentiation, insulin sensitivity, and lipid accumulation. *J Lipid Res* 2005; 46: 1369-1379
 - 48 Marra F, Bertolani C. Adipokines in liver diseases. *Hepatology* 2009; 50: 957-969
 - 49 Nannipieri M, Cecchetti F, Anselmino M, Mancini E, Marchetti G, Bonotti A, Baldi S, Solito B, Giannetti M, Pinchera A, Santini F, Ferrannini E. Pattern of expression of adiponectin receptors in human liver and its relation to nonalcoholic steatohepatitis. *Obes Surg* 2009; 19: 467-474
 - 50 Uribe M, Zamora-Valdés D, Moreno-Portillo M, Bermejo-Martínez L, Pichardo-Bahena R, Baptista-González HA, Ponciano-Rodríguez G, Uribe MH, Medina-Santillán R, Méndez-Sánchez N. Hepatic expression of ghrelin and adiponectin and their

同行评价

本文能准确反映我国非酒精性脂肪肝病研究领域的先进水平, 具有较好的科学性、创新性与可读性。

- receptors in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Ann Hepatol* 2008; 7: 67-71
- 51 Ide T, Shimano H, Yahagi N, Matsuzaka T, Nakakuki M, Yamamoto T, Nakagawa Y, Takahashi A, Suzuki H, Sone H, Toyoshima H, Fukamizu A, Yamada N. SREBPs suppress IRS-2-mediated insulin signalling in the liver. *Nat Cell Biol* 2004; 6: 351-357
 - 52 Tsukamoto H, She H, Hazra S, Cheng J, Wang J. Fat paradox of steatohepatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2008; 23 Suppl 1: S104-S107
 - 53 Osei-Hyiaman D, DePetrillo M, Pacher P, Liu J, Radaeva S, Bátkai S, Harvey-White J, Mackie K, Offertáler L, Wang L, Kunos G. Endocannabinoid activation at hepatic CB1 receptors stimulates fatty acid synthesis and contributes to diet-induced obesity. *J Clin Invest* 2005; 115: 1298-1305
 - 54 Murase T, Aoki M, Tokimitsu I. Supplementation with alpha-linolenic acid-rich diacylglycerol suppresses fatty liver formation accompanied by an up-regulation of beta-oxidation in Zucker fatty rats. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1733: 224-231
 - 55 Ribeiro PS, Cortez-Pinto H, Solá S, Castro RE, Ramalho RM, Baptista A, Moura MC, Camilo ME, Rodrigues CM. Hepatocyte apoptosis, expression of death receptors, and activation of NF-kappaB in the liver of nonalcoholic and alcoholic steatohepatitis patients. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 1708-1717
 - 56 Farhadi A, Gundlapalli S, Shaikh M, Frantzides C, Harrell L, Kwasny MM, Keshavarzian A. Susceptibility to gut leakiness: a possible mechanism for endotoxaemia in non-alcoholic steatohepatitis. *Liver Int* 2008; 28: 1026-1033
 - 57 Ruiz AG, Casafont F, Crespo J, Cayón A, Mayorga M, Estebanez A, Fernandez-Escalante JC, Pons-Romero F. Lipopolysaccharide-binding protein plasma levels and liver TNF-alpha gene expression in obese patients: evidence for the potential role of endotoxin in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Obes Surg* 2007; 17: 1374-1380
 - 58 Li Z, Yang S, Lin H, Huang J, Watkins PA, Moser AB, Desimone C, Song XY, Diehl AM. Probiotics and antibodies to TNF inhibit inflammatory activity and improve nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2003; 37: 343-350
 - 59 Cojocariu C, Trifan A, Stanciu C. [Involvement and role of iron in nonalcoholic steatohepatitis] *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi* 2008; 112: 308-312
 - 60 Yao D, Shi W, Gou Y, Zhou X, Yee Aw T, Zhou Y, Liu Z. Fatty acid-mediated intracellular iron translocation: a synergistic mechanism of oxidative injury. *Free Radic Biol Med* 2005; 39: 1385-1398
 - 61 Struben VM, Hespenheide EE, Caldwell SH. Nonalcoholic steatohepatitis and cryptogenic cirrhosis within kindreds. *Am J Med* 2000; 108: 9-13
 - 62 Younossi ZM, Diehl AM, Ong JP. Nonalcoholic fatty liver disease: an agenda for clinical research. *Hepatology* 2002; 35: 746-752

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

汤姆森-路透公布 2008 年 WJG 影响因子 2.081

本刊讯 据汤姆森-路透科技信息集团2009-06-19发布《期刊引证报告》(*Journal Citation Reports*)的统计结果: *World Journal of Gastroenterology*(WJG)的总被引次数(TC): 10 822; 影响因子(IF): 2.081; 即年指数: 0.274; 论文数量: 1112; 半衰期: 3.1; 特征因子(EF): 0.05006. 特征因子这个指标是今年期刊引证报告里新加的一个指标. 与影响因子不同的是, 这个指标不仅考察了引文的数量, 而且考虑了施引期刊的影响力, 即: 某期刊如果越多地被高影响力的期刊引用, 则该期刊的影响力也越高. 正如Google考虑超链接的来源, 特征因子也充分考虑引文的来源, 并在计算中赋予不同施引期刊的引文以不同的权重. 特征因子分值的计算基于过去5年中期刊发表的论文在期刊引证报告统计当年的被引用情况. 与影响因子比较, 期刊特征因子分值的优点主要有: (1)特征因子考虑了期刊论文发表后5年的引用时段, 而影响因子只统计了2年的引文时段, 后者不能客观地反映期刊论文的引用高峰年份; (2)特征因子对期刊引证的统计包括自然科学和社会科学, 更为全面、完整; (3)特征因子的计算扣除了期刊的自引; (4)特征因子的计算基于随机的引文链接, 通过特征因子分值可以较为合理地测度科研人员用于阅读不同期刊的时间. 在55种国际胃肠病学和肝病学期刊中, WJG的EF, TC和IF分别名列第6, 9, 32位. (WJG编辑部主任: 程剑侠 2009-11-08)

5-HT及其阻断剂脑内微注射和微电刺激对家兔胃电活动的影响

张 慧, 欧阳守, 黄伟锋

张慧, 欧阳守, 黄伟锋, 厦门市医药研究所 福建省厦门市 361003

张慧, 2008年福建中医学院硕士, 主要从事消化系统疾病的生理研究。

厦卫科教中医(2006)363号基金资助项目, No. WZK21

厦卫科教中医(2007)480号基金资助项目, No. 3502z20077077

福建省科技计划重点项目基金资助项目, No. 2009D026

作者贡献分布: 此课题由张慧与欧阳守设计; 研究过程由张慧与黄伟锋等完成; 相关分析工具由张慧提供; 数据分析由张慧与欧阳守完成; 论文写作由张慧完成; 欧阳守指导课题完成。

通讯作者: 欧阳守, 研究员, 361003, 福建省厦门市同安路2号, 厦门市医药研究所. xmmri@xmu.edu.cn

电话: 0592-2043066 传真: 0592-2043066

收稿日期: 2009-08-26 修回日期: 2009-10-26

接受日期: 2009-11-02 在线出版日期: 2009-11-08

Effects of intracerebral microinjection of 5-hydroxytryptamine and its blocking agents and intracerebral microelectric stimulation on gastric electrical activity in rabbits

Hui Zhang, Shou Ouyang, Wei-Feng Huang

Hui Zhang, Shou Ouyang, Wei-Feng Huang, Xiamen Medical Research Institute, Xiamen 361003, Fujian Province, China

Supported by: the Health Bureau Foundation of Xiamen, Nos. WZK21 and 3502z20077077; and the Major Science and Technology R&D Project of Fujian Province, No. 2009D026

Correspondence to: Shou Ouyang, Xiamen Medical Research Institute, 2 Tongan Road, Xiamen 361003, Fujian Province, China. xmmri@xmu.edu.cn

Received: 2009-08-26 Revised: 2009-10-26

Accepted: 2009-11-02 Published online: 2009-11-08

Abstract

AIM: To observe the effects of microinjection of 5-hydroxytryptamine (5-HT) and its blocking agents into the paraventricular nucleus (PVN) and nucleus raphe magnus (RM) and microelectric stimulation of the PVN on gastric electrical activity (GEA) in rabbits, and explore the central role of the PVN in controlling gastrointestinal movement.

METHODS: The stereopositioning of the PVN

and RM was performed using a stereo positioner (model SN-2). Microinjection of 5-HT and its blocking agents ondansetron and ciproheptadine into the PVN and RM and electrical stimulation of the PVN were then performed. GEA was measured using four bipolar serosal electrodes (gastric body I-III and gastric antrum) in a rabbit. The parameters of GEA detected included average frequency, phase difference, the ratio of negative phase, amplitude, etc.

RESULTS: Paraventricular injection of 2 μ g of 5-HT accelerated the electric frequencies of gastric body I-II and gastric antrum, and the change in the electric frequency of gastric body II was statistically significant (4.44 ± 0.09 vs 4.24 ± 0.09 , $P = 0.034$). Subsequent microinjection of 5 μ g of ondansetron slowed down the frequencies of gastric body I-III and gastric antrum, and the changes in the frequencies of gastric body II-III were statistically significant ($P = 0.032$ and 0.043 , respectively). Microinjection of 5 μ g of ciproheptadine following 5-HT injection accelerated the electric frequencies of gastric body I-II and gastric antrum, and the change in the electric frequency of gastric body II was statistically significant ($P = 0.044$). Electrical stimulation of the PVN slowed down the frequencies of gastric body I and III and gastric antrum, and the changes in the frequencies of gastric body I and III were statistically significant ($P = 0.030$ and 0.029 , respectively). Microinjection of 10 μ g of 5-HT into the RM significantly slowed down the frequency of gastric body II (4.13 ± 0.11 vs 4.33 ± 0.09 , $P = 0.021$), while subsequent injection of 10 μ g of ciproheptadine accelerated the frequency of gastric body II ($P = 0.034$). Electrical stimulation of the PVN following microinjection of 10 μ g of 5-HT into the RM slowed down the frequencies of II-III and gastric antrum, and the change in the frequency of gastric antrum was statistically significant (3.93 ± 0.14 vs 4.46 ± 0.14 , $P = 0.006$).

CONCLUSION: Microinjection of 5-HT into the PVN mainly exerts stimulating effects on GEA, in which the 5-HT₃ receptor pathway may

背景资料

5-HT又称为血清素, 是重要的神经递质, 近年来的研究提示5-HT广泛分布在于中枢神经和胃肠道, 并通过与其受体相互作用, 在胃肠动力、感觉及分泌中发挥重要作用。研究表明5-HT是“脑-肠轴”中具有重要意义的单胺神经递质, 在“脑-肠轴”功能中起重要作用。

同行评议者

任超世, 研究员, 中国医学科学院生物医学工程研究所

相关报道

Deponi *et al* 研究发现5-HT可促进胃肠道运动,使移行性复合运动波(MMC)出现次数增多,并可导致内脏痛觉敏感。

play an important role. Microinjection of 5-HT into the RM exerts inhibitory effects on GEA, in which 5-HT₂ receptor may play an important role. There is a synergistic effect between microinjection of 5-HT into the RM and microelectric stimulation of the PVN. These results further demonstrate the existence of "a descending inhibitory system and a descending exciting system" in the central nervous system, both of which modulate GEA together.

Key Words: 5-hydroxytryptamine; Paraventricular nucleus; Nucleus raphe magnus; Ondansetron; Cyproheptadine

Zhang H, Ouyang S, Huang WF. Effects of intracerebral microinjection of 5-hydroxytryptamine and its blocking agents and intracerebral microelectric stimulation on gastric electrical activity in rabbits. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(31): 3189-3196

摘要

目的: 观察室旁核及中缝大核微注射5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)及其各种阻断剂和电刺激对家兔胃电活动的影响,探讨室旁核影响胃肠运动的中枢地位。

方法: 注射5-HT及其各种阻断剂和电刺激家兔室旁核,然后采用胃浆膜双极4导联同步记录,分析其胃体、胃窦部胃电的平均频率、相位差、负相位比率、波形对应率、幅度等指标,考察室旁核及中缝大核微量注射5-HT及各种阻断剂和电刺激对家兔胃电活动的影响。

结果: 室旁核注射2 μ g 5-HT后,除胃体3外胃电频率均加快,其中胃体2差异显著(4.44 ± 0.09 vs 4.24 ± 0.09 , $P = 0.034$),再注射5 μ g丹司琼后胃电频率均减慢,其中胃体2、3差异显著($P = 0.032$, 0.043);室旁核注射2 μ g 5-HT再注射5 μ g赛庚啶后,胃电频率加快,胃体2差异显著($P = 0.044$);室旁核电刺激后,除胃体2外胃电频率均减慢,胃体1和胃体3差异显著($P = 0.03$, 0.029);中缝大核注射10 μ g 5-HT后,胃体2胃电频率明显减慢(4.13 ± 0.11 vs 4.33 ± 0.09 , $P = 0.021$),再注射10 μ g赛庚啶后,胃体2胃电频率则加快($P = 0.034$);注射10 μ g 5-HT再室旁核电刺激后,除胃体1外胃电频率均减慢,胃窦部位差异显著(3.93 ± 0.14 vs 4.46 ± 0.14 , $P = 0.006$)。

结论: 室旁核微量注射5-HT对胃电活动主要为激动作用,可能是通过5-HT₂受体途径发挥作用;而中缝大核注射5-HT则为抑制作用,可

能是通过5-HT₂受体途径发挥作用;中缝大核微量注射5-HT的同时室旁核电刺激对胃电的抑制似具协同作用,进一步证实了中枢同时存在“下行性抑制”和“下行性兴奋”两个系统共同调控消化道功能的概念。

关键词: 5-羟色胺; 室旁核; 中缝大核; 昂丹司琼; 赛庚啶

张慧, 欧阳守, 黄伟锋. 5-HT及其阻断剂脑内微注射和微电刺激对家兔胃电活动的影响. *世界华人消化杂志* 2009; 17(31): 3189-3196

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3189.asp>

0 引言

室旁核(paraventricular nucleus, PVN)位于视上核的后上方第三脑室两侧,其细胞功能复杂,具有神经和体液双重调控功能,是调节内脏活动的较高级中枢。PVN和胃之间存在敏感的神经联系,他对生理及应激状态下的胃酸分泌、胃电及胃运动及各种原因所致的胃黏膜损伤具有广泛的调节作用^[1-2]。一些资料证实, PVN和脑内5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)主要来源的中缝背核(dorsal raphe nucleus, DRN)间有往返纤维联系^[3],离体脑片的研究表明, PVN上存有5-HT受体,可被5-HT激活^[4]。中缝大核(nucleus raphe magnus, Rm)是延脑后部中缝处的一个重要核团。许多研究表明Rm参与了动物胃运动和胃电的调节,该核团内的胃泌素, 5-HT^[5]和P物质与此调节作用有关。

目前对PVN在应激高血压发病中的作用^[6]、外周5-HT对胃肠道的作用^[7]等^[8-9]方面做了较深入研究,但关于5-HT在PVN对胃肠道的影响中的作用还未有报道,因此本实验希望通过研究下丘脑PVN微注射5-HT对胃电活动的影响,发现中枢神经系统中5-HT的新功能。

1 材料和方法

1.1 材料 健康新西兰白兔,雌雄不限,体质量2.0 \pm 0.2 kg;中国生旺实验动物养殖有限公司,生产许可证号: SCXK(沪)2002-0011; 5-HT、西沙必利购自Sigma公司;昂丹司琼购自齐鲁制药有限公司;赛庚啶购自Aldrich公司;纳洛酮购自北京四环医药科技股份有限公司;脑立体定位仪购自日本。

1.2 方法

1.2.1 手术: 健康新西兰白兔,术前禁食18 h以上,自由饮水。兔耳缘静脉注射40 mg/kg氯醛糖与

表 1 正常胃电 (mean \pm SD, $n = 20$)

分组	频率	相位差(s)	负相位比率	波形对应率
胃体1	3.60 \pm 0.36	-	-	0.91 \pm 0.08
胃体2	3.69 \pm 0.48	0.46 \pm 2.50	0.41 \pm 0.30	0.86 \pm 0.09
胃体3	3.48 \pm 0.33	1.03 \pm 3.89	0.37 \pm 0.32	0.84 \pm 0.11
胃窦	3.77 \pm 0.45	0.25 \pm 2.55	0.42 \pm 0.27	0.87 \pm 0.09

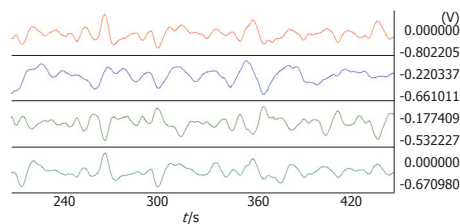


图 1 正常胃电.

表 2 PVN注射5-HT前后胃电 (mean \pm SD, $n = 20$)

分组	频率		相位差(s)		负相位比率		波形对应率	
	前	后	前	后	前	后	前	后
胃体1	4.04 \pm 0.13	4.07 \pm 0.10	-	-	-	-	0.87 \pm 0.02	0.87 \pm 0.02
胃体2	4.24 \pm 0.09	4.44 \pm 0.09 ^a	-0.05 \pm 0.45	0.27 \pm 0.37	0.48 \pm 0.05	0.47 \pm 0.04	0.73 \pm 0.02	0.77 \pm 0.02
胃体3	4.48 \pm 0.10	4.39 \pm 0.07	0.11 \pm 0.35	0.26 \pm 0.34	0.49 \pm 0.04	0.47 \pm 0.04	0.73 \pm 0.03	0.78 \pm 0.03
胃窦	4.24 \pm 0.10	4.26 \pm 0.13	0.42 \pm 0.30	0.73 \pm 0.34	0.45 \pm 0.04	0.40 \pm 0.03	0.72 \pm 0.03	0.74 \pm 0.03

^a $P < 0.05$ vs 注射前.

0.5 g/kg乌拉坦混合液. 兔腹部剪毛后, 从剑突下2 cm沿腹白线作1个约10 cm的纵行切口, 尽量避开血管, 钝性分离, 暴露大部分胃. 在胃浆膜下植入双极电极, 共埋4对记录电极: 为Ag-AgCl针形电极, 直径1 mm, 分别埋在胃起步点下方(胃体1)、胃大弯处(胃体2)、胃大弯与胃窦之间(胃体3)和胃窦(胃体4). 每对电极的双极间距离大约3-5 mm, 沿着胃环形肌方向与纵形肌相垂直, 用缝线作2点固定. 连接4对胃体记录电极到MP100WSW 16导生物信号采集分析系统, 动物术后恢复2-3 h.

1.2.2 脑定位: 将兔头部固定于脑立体定位仪上, 剪去颅顶毛. 按脑立体定位图谱定位室旁核PVN(坐标: AP 0.0 mm, L(R) \pm 0.5 mm, H 13.5 mm)和P9(坐标: AP 9.0 mm, L(R) 0.0 mm, H 颅底下2 mm处). 用微型电钻在颅顶延人字缝, 分别在PVN和Rm(P9)钻出2个小洞(尽量不要弄破脑膜, 使脑部少出血)以备刺激电极与微注射器的插入. 部分动物采用开颅、吸小脑、直接暴露第IV脑室的方法, 直观直接定位. 颅顶钻孔的动物, 实验结束时, 开颅吸除小脑, 以观察证实脑电极的真实定位.

1.2.3 实验记录: 待动物胃电恢复正常后, PVN插入注射器作为对照胃电, 再注射5-HT, 观察并记录胃电变化. 在5-HT的有效作用时间内PVN注射分别注射昂丹司琼、西沙必利、纳洛酮、赛庚啶继续观察并记录胃电变化. 待动物胃电恢复正常后, PVN插入注射器记录正常胃电, 再注

射生理盐水观察并记录胃电变化. P9同上.

PVN插入电极, 待动物胃电恢复正常后记录对照胃电, 再PVN电刺激(八通道数码触摸式液晶显示刺激器: 刺激波形为连续方波串, 每串10个刺激、串长200 ms、波宽2 ms、间隔18 ms、频率50 Hz、强度1-4 μ A、时间5 min), 记录胃电变化.

P9插入注射器, 待动物胃电恢复正常后记录对照胃电, 再注射5-HT记录胃电变化, 再PVN脑刺激记录胃电变化.

观察并记录: 相位差、波形对应率、负相位比率、平均频率、幅度(峰-峰, P-P)值.

统计学处理 各组实验数据以mean \pm SD表示, 差异显著性检验用配对 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 正常胃电 术后2 h恢复后的正常胃电频率为3.48-3.77 cpm, 与以往的实验相同. 相位差均为正值, 各项指标均正常(图1, 表1).

2.2 PVN

2.2.1 5-HT对PVN的影响: PVN注射2 μ g 5-HT后胃体2频率明显加快(4.44 \pm 0.09 vs 4.24 \pm 0.09, $P = 0.034$). 相位差有变大的趋势但差异不显著、负相位比率及波形对应率变化均不明显(图2, 表2).

2.2.2 PVN注射昂丹司琼对5-HT的影响: PVN注射2 μ g 5-HT后再注射5 μ g昂丹司琼, 胃体2、3的频率明显减慢(3.98 \pm 0.10 vs 4.28 \pm 0.09; 4.13 \pm

创新盘点

本研究通过考察室旁核及中缝大核微量注射5-HT及各种阻断剂和电刺激对家兔胃电活动的影响, 进一步证实本实验室所提出的中枢同时存在“下行性抑制”和“下行性兴奋”两个系统共同调控消化道功能的概念.

应用要点

本研究提示, PVN微量注射5-HT对胃电主要为激动作用, 可能是通过5-HT₃受体途径发挥作用。而Rm注射5-HT则为抑制作用, 可能是通过5-HT₂受体途径发挥作用。胃电活动的“跟随”可能有一个“调整”与“适应”的过程, 对临床电起搏治疗功能性胃肠道疾病具有很好的指导意义。

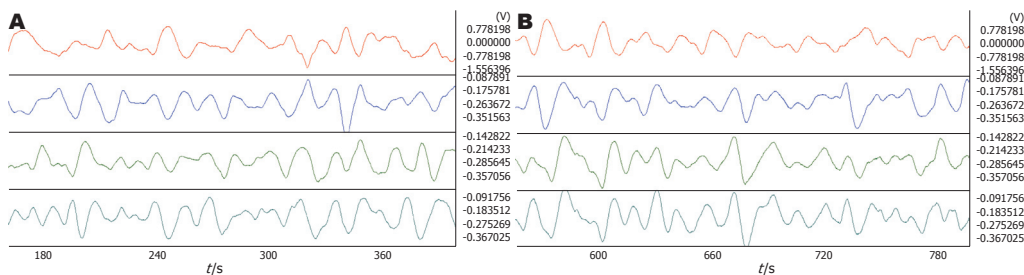


图2 PVN注射5-HT前后胃电。A: 注射前; B: 注射后。

表3 PVN注射5-HT, 再注射昂丹司琼前后胃电 (mean \pm SD, $n = 19$)

	频率		相位差(s)		负相位比率		波形对应率	
	前	后	前	后	前	后	前	后
胃体1	3.95 \pm 0.08	3.74 \pm 0.10	-	-	-	-	0.84 \pm 0.02	0.85 \pm 0.02
胃体2	4.28 \pm 0.09	3.98 \pm 0.10 ^a	1.85 \pm 0.56	2.61 \pm 0.57	0.34 \pm 0.04	0.31 \pm 0.04	0.76 \pm 0.02	0.78 \pm 0.02
胃体3	4.38 \pm 0.08	4.13 \pm 0.09 ^a	1.54 \pm 0.47	2.50 \pm 0.65 ^a	0.40 \pm 0.03	0.35 \pm 0.04	0.79 \pm 0.02	0.80 \pm 0.02
胃窦	4.27 \pm 0.09	4.16 \pm 0.10	1.19 \pm 0.51	2.47 \pm 0.53 ^b	0.41 \pm 0.04	0.33 \pm 0.03 ^a	0.77 \pm 0.02	0.78 \pm 0.02

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 昂丹司琼注射前。

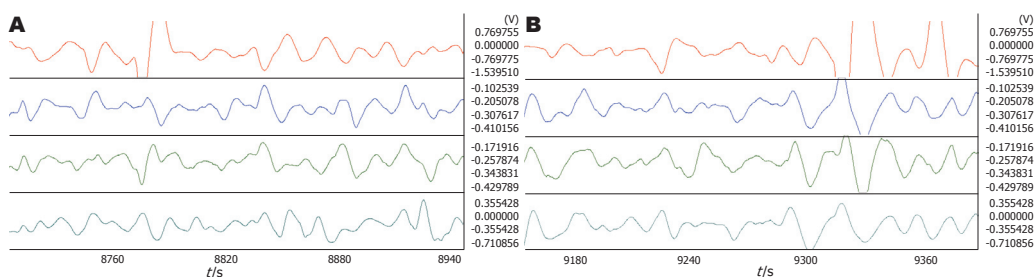


图3 PVN注射5-HT, 再注射昂丹司琼前后胃电。A: 昂丹司琼注射前; B: 昂丹司琼注射后。

表4 PVN注射5-HT, 再注射赛庚啶前后胃电 (mean \pm SD, $n = 20$)

	频率		相位差(s)		负相位比率		波形对应率	
	前	后	前	后	前	后	前	后
胃体1	4.01 \pm 0.11	4.09 \pm 0.11	-	-	-	-	0.88 \pm 0.03	0.88 \pm 0.02
胃体2	4.32 \pm 0.08	4.50 \pm 0.07 ^a	0.46 \pm 0.39	0.12 \pm 0.44	0.46 \pm 0.04	0.47 \pm 0.04	0.77 \pm 0.02	0.76 \pm 0.02
胃体3	4.39 \pm 0.07	4.37 \pm 0.08	0.11 \pm 0.35	0.26 \pm 0.34	0.45 \pm 0.04	0.50 \pm 0.04	0.77 \pm 0.03	0.74 \pm 0.02
胃窦	4.12 \pm 0.11	4.26 \pm 0.11	0.51 \pm 0.39	0.13 \pm 0.36	0.38 \pm 0.03	0.47 \pm 0.03 ^a	0.73 \pm 0.03	0.74 \pm 0.02

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 赛庚啶注射前。

0.09 vs 4.38 \pm 0.08, $P = 0.032$, 0.043)。胃体3(2.50 \pm 0.65 vs 1.54 \pm 0.47, $P = 0.049$)、胃窦(2.47 \pm 0.53 s vs 1.19 \pm 0.51 s, $P = 0.001$)相位差增大。负相位比率减小, 胃窦差异显著(0.33 \pm 0.03 vs 0.41 \pm 0.04, $P = 0.025$)(图3, 表3)。

2.2.3 PVN注射赛庚啶对5-HT的影响: PVN注射2 μ g 5-HT后再注射5 μ g赛庚啶, 胃体2的频率明

显加快(4.50 \pm 0.07 vs 4.32 \pm 0.08, $P = 0.044$), 胃窦的负相位比率明显升高(0.47 \pm 0.03 vs 0.38 \pm 0.03, $P = 0.037$)。相位差及波形对应率变化不明显(图4, 表4)。

2.2.4 PVN注射西沙必利、纳洛酮对5-HT的影响: PVN注射5-HT后再注射西沙必利、纳洛酮, 频率、相位差、负相位比率及波形对应率均无

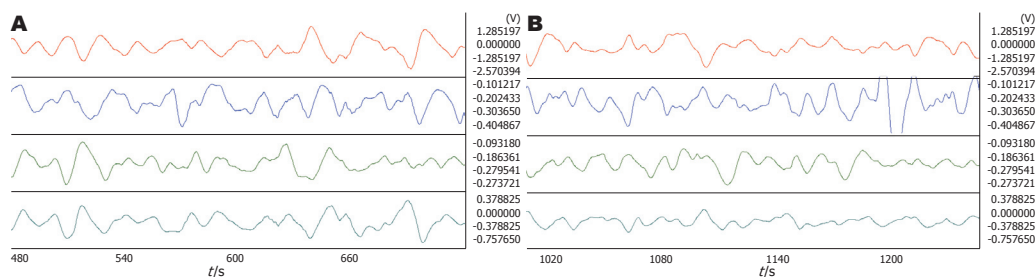


图 4 PVN注射5-HT,再注射赛庚啶前后胃电. A: 赛庚啶注射前; B: 赛庚啶注射后.

同行评价
本研究方法合理,为兔胃电活动及其影响因素的研究提供了很好的参考,具有较好的学术价值.

表 5 PVN电刺激前后胃电 (mean \pm SD, $n = 20$)

	频率		相位差(s)		负相位比率		波形对应率	
	前	后	前	后	前	后	前	后
胃体1	4.10 \pm 0.11	3.81 \pm 0.12 ^a	-	-	-	-	0.82 \pm 0.04	0.86 \pm 0.04
胃体2	4.15 \pm 0.09	4.24 \pm 0.08	1.10 \pm 0.36	0.40 \pm 0.35	0.39 \pm 0.03	0.44 \pm 0.04	0.73 \pm 0.05	0.70 \pm 0.04
胃体3	4.27 \pm 0.07	4.06 \pm 0.07 ^a	0.38 \pm 0.32	0.55 \pm 0.35	0.45 \pm 0.03	0.45 \pm 0.03	0.73 \pm 0.03	0.75 \pm 0.05
胃窦	4.19 \pm 0.11	4.03 \pm 0.07	0.73 \pm 0.35	0.75 \pm 0.40	0.47 \pm 0.03	0.47 \pm 0.04	0.74 \pm 0.02	0.73 \pm 0.02

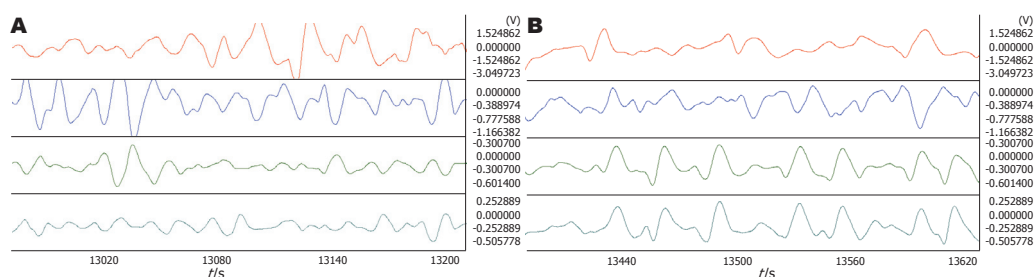
^a $P < 0.05$ vs 电刺激前.

图 5 PVN电刺激前后胃电. A: 电刺激前; B: 电刺激后.

表 6 Rm注射5-HT前后胃电 (mean \pm SD, $n = 20$)

	频率		相位差(s)		负相位比率		波形对应率	
	前	后	前	后	前	后	前	后
胃体1	3.88 \pm 0.08	3.90 \pm 0.07	-	-	-	-	0.86 \pm 0.02	0.89 \pm 0.02
胃体2	4.33 \pm 0.09	4.13 \pm 0.11 ^a	0.11 \pm 0.23	0.32 \pm 0.32	0.52 \pm 0.02	0.47 \pm 0.04	0.78 \pm 0.02	0.75 \pm 0.02
胃体3	4.20 \pm 0.08	4.06 \pm 0.07	0.60 \pm 0.34	0.59 \pm 0.33	0.44 \pm 0.04	0.42 \pm 0.04	0.73 \pm 0.02	0.73 \pm 0.02
胃窦	4.12 \pm 0.12	4.01 \pm 0.09	0.71 \pm 0.32	0.71 \pm 0.37	0.41 \pm 0.04	0.40 \pm 0.04	0.72 \pm 0.03	0.76 \pm 0.02

^a $P < 0.05$ vs 注射前.

明显变化. 说明西沙必利、纳洛酮对5-HT的阻断作用不明显.

2.2.5 PVN注射生理盐水: PVN注射生理盐水后, 频率、相位差、负相位比率及波形对应率变化均不明显.

2.2.6 PVN电刺激: PVN脑刺激后, 胃体1(3.81 \pm 0.12 vs 4.10 \pm 0.11, $P = 0.030$)和胃体3(4.06 \pm 0.07 vs 4.27

\pm 0.07, $P = 0.029$)频率均明显减慢. 相位差、负相位比率及波形对应率变化均不明显(图5, 表5).

2.3 Rm

2.3.1 5-HT对Rm的影响: Rm注射10 μ g 5-HT后, 胃体2频率明显减慢(4.13 \pm 0.11 vs 4.33 \pm 0.09, $P = 0.021$). 相位差、负相位比率及波形对应率变化均不明显(图6, 表6).

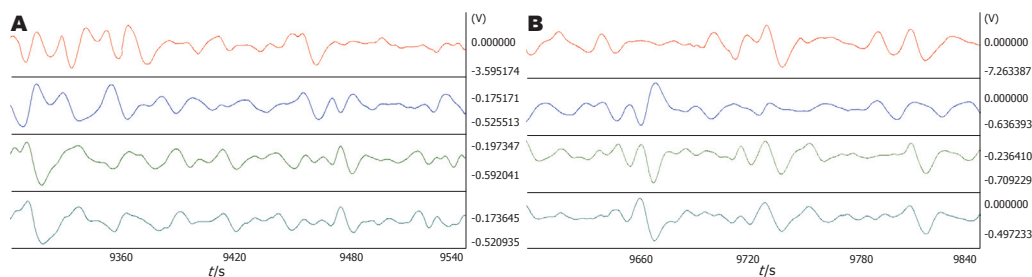


图 6 Rm注射5-HT前后胃电. A: 注射前; B: 注射后.

表 7 Rm注射5-HT, 再注射赛庚啶前后胃电 (mean \pm SD, $n = 20$)

	频率		相位差(s)		负相位比率		波形对应率	
	前	后	前	后	前	后	前	后
胃体1	3.91 \pm 0.09	3.92 \pm 0.08	-	-	-	-	0.87 \pm 0.02	0.86 \pm 0.02
胃体2	4.19 \pm 0.11	4.41 \pm 0.09 ^a	0.29 \pm 0.31	0.16 \pm 0.32	0.46 \pm 0.04	0.50 \pm 0.04	0.74 \pm 0.02	0.78 \pm 0.02
胃体3	4.12 \pm 0.07	4.17 \pm 0.06	0.71 \pm 0.28	0.64 \pm 0.28	0.42 \pm 0.03	0.43 \pm 0.03	0.72 \pm 0.03	0.76 \pm 0.02
胃窦	4.11 \pm 0.07	4.08 \pm 0.08	0.45 \pm 0.26	0.45 \pm 0.30	0.45 \pm 0.03	0.46 \pm 0.02	0.74 \pm 0.02	0.74 \pm 0.03

^a $P < 0.05$ vs 赛庚啶注射前.

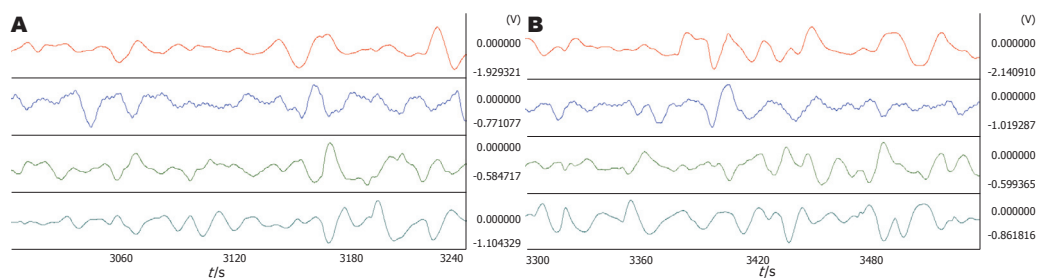


图 7 Rm注射5-HT, 再注射赛庚啶前后胃电. A: 赛庚啶注射前; B: 赛庚啶注射后.

表 8 Rm注射5-HT, 再PVN电刺激前后胃电 (mean \pm SD, $n = 10$)

	频率		相位差(s)		负相位比率		波形对应率	
	前	后	前	后	前	后	前	后
胃体1	3.75 \pm 0.17	3.82 \pm 0.17	-	-	-	-	0.89 \pm 0.02	0.87 \pm 0.03
胃体2	4.28 \pm 0.12	4.04 \pm 0.11	0.69 \pm 0.36	1.13 \pm 0.41	0.37 \pm 0.05	0.34 \pm 0.05	0.74 \pm 0.02	0.77 \pm 0.02
胃体3	4.43 \pm 0.10	4.28 \pm 0.16	0.01 \pm 0.25	0.20 \pm 0.54	0.49 \pm 0.05	0.47 \pm 0.06	0.77 \pm 0.02	0.75 \pm 0.04
胃窦	4.46 \pm 0.14	3.93 \pm 0.14 ^a	0.04 \pm 0.46	0.10 \pm 0.45	0.48 \pm 0.04	0.51 \pm 0.05	0.72 \pm 0.03	0.71 \pm 0.04

^a $P < 0.05$ vs 电刺激前.

2.3.2 Rm注射赛庚啶对5-HT的影响: Rm注射10 μ g 5-HT后再注射10 μ g赛庚啶, 胃体2频率明显加快(4.41 \pm 0.09 vs 4.19 \pm 0.11, $P = 0.034$), 能翻转注射5-HT对胃体2胃电的影响. 相位差、负相位比率及波形对应率变化均不明显(图7, 表7).

2.3.3 Rm注射昂丹司琼、西沙必利对5-HT的影响: Rm注射5-HT后再注射昂丹司琼、西沙必利,

频率、相位差、负相位比率、波形对应率变化不明显.

2.3.4 Rm注射生理盐水: Rm注射生理盐水后, 频率、相位差、负相位比率及波形对应率变化均不明显.

2.3.5 PVN电刺激对Rm注射5-HT的影响: Rm注射5-HT后再刺激PVN, 胃窦频率明显减慢(3.93

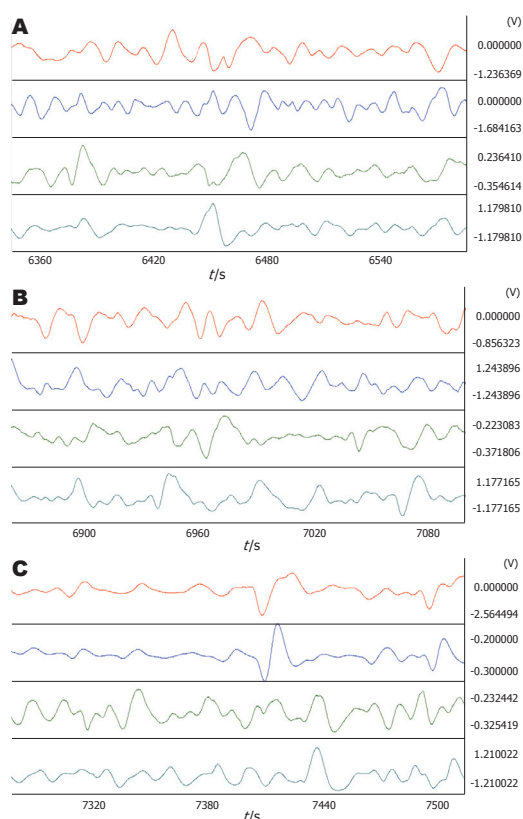


图8 Rm注射5-HT, 再PVN电刺激前后胃电. A: Rm对照; B: 电刺激前; C: 电刺激后.

± 0.14 vs 4.46 ± 0.14 , $P = 0.006$). 相位差、负相位比率及波形对应率均无明显变化(图8, 表8).

3 讨论

实验中兔正常胃电频率为3.48-3.77 cpm, 与以往实验结果相同, 说明在胃体埋植双极电极记录家兔胃电的方法是可靠的. 相位差可能是表示胃电传导(扩布)的一个较好的指标. 4导同时记录胃体起步点(胃体1)、胃体2、胃体3及胃窦部胃电, 如果远端波形先于起步点者即为负相位差, 说明胃电传导(扩布)异常, 相位差若由负转正则说明胃电传导转向正常. 欧阳守 *et al* 有关胃肠起步点和胃肠起搏的研究证实, 胃肠各部都存在自主的、但接受中枢与肠神经系统(脑-肠轴)调控的起步点活动及其相位差^[10-11]. 周吕 *et al*^[12]在“延髓最后区(area postrema, AP)”的研究中证实, AP调控周期性发放的消化间期复合肌电锋电位的移行, 其作用途径是通过胃动素等实现的. 许多实验都表明胃电传导(扩布)接受中枢胆碱能、肾上腺能或肽能神经元下行性抑制或下行性兴奋的调控^[13-14]. 欧阳守 *et al* 有关胃肠平滑肌细胞离子通道的实验证明, 钙、钾通道胃肠动力有着不可忽视的作用^[15-16], 以

Cajal间质细胞(interstitial cells of Cajal, ICC)为原动力的肠肌丛在胃电传导(扩布)中起决定性的作用. 可以肯定脑-肠轴共同对胃肠电的起源、传导(扩布)的精细调节, 是胃肠道正常功能活动的保障.

5-HT又称为血清素, 是重要的神经递质, 人体内95%的5-HT在胃肠道的肠嗜铬细胞及肠神经元中合成. 5-HT通过与其受体相互作用, 在胃肠动力、感觉及分泌中发挥重要作用. 进一步研究表明5-HT是在“脑-肠轴”中具有重要意义的单胺神经递质. 大脑通过交感神经或副交感神经的传入或传出调节肠神经系统的活动. 双向的脑肠互动包含可通过5-HT通路影响效应器系统. 姜敏 *et al*^[17]也认为近年来的研究提示5-HT广泛分布在于中枢神经和胃肠道, 5-HT在中枢神经系统的降低可导致精神方面的障碍, 而其在肠道的降低则可影响肠道的运动和分泌; 同时5-HT与肠道动力学和肠道敏感性的改变也有一定的关系. De Ponti *et al*^[18]研究发现5-HT可促进胃肠道运动, 使移行性复合运动波(migrating motor complex, MMC)出现次数增多, 并可导致内脏痛觉敏感. 故深入开展5-HT及其相关药物的研究, 对临床上寻求更安全有效的药物具有重要临床意义.

本实验PVN注射昂丹司琼(5-HT₃受体拮抗剂)可翻转5-HT对胃电的效应. 说明5-HT可能是通过5-HT₃受体途径发挥作用. PVN注射5-HT后再注射赛庚啶, 胃体2的频率也明显加快, 但胃窦的负相位比率明显升高. 赛庚啶是5-HT₂受体阻断剂, 能改善中枢水平调控, 治疗具有中枢因素的周期性呕吐患者及其胃肠动力障碍. 本实验PVN注射5-HT可能不是通过5-HT₂受体途径发挥作用的. PVN注射赛庚啶后波形变差, 可能跟频率过快导致的节律紊乱有关.

PVN脑刺激后, 胃体1与胃体3频率均明显减慢, 可能跟脑刺激后PVN内递质的改变有关.

PVN注射5-HT后再注射纳洛酮或西沙必利(非选择性5-HT₄受体激动剂)无显著变化. 说明5-HT在PVN可能不是通过肽能及5-HT₄受体途径发挥作用.

近年来的研究表明, Rm是内源性镇痛系统中实现下行抑制的关键核团之一, 并与血压、呼吸等功能调节有关. 在胃肠功能调节方面, 欧阳守 *et al*^[14]的实验表明, 电流刺激Rm对猫胃电基本电节律的影响以抑制为主, 切断猫双侧迷走神经或内脏大、小神经后, 刺激Rm对猫胃电

的抑制作用大为减弱,提示下行抑制的传出途径可能与自主神经有某种联系。欧阳守的实验首次提出与下行性抑制并存的“下行性兴奋系统”,并解释了电刺激中枢某些核团能兴奋胃肠功能。

Rm微量注射5-HT可抑制家兔的胃运动。Rm微量注射赛庚啶后可使家兔的胃运动增强,胃电传导转向正常,与何建华 *et al*^[5]的实验结果相符。据Couch报道^[19],5-HT对Rm的神经元多数引起兴奋效应。本实验中,Rm内微量注射5-HT后可能是5-HT增强了Rm的活动,并通过中缝-脊髓下行通路,直接兴奋了交感节前神经元,进而抑制了胃运动和胃电。赛庚啶是5-HT₂受体阻断剂,本实验结果表明Rm内的5-HT₂受体可能参与了胃运动胃电的调节作用。Rm注射5-HT后再注射昂丹司琼、西沙必利,无显著变化。

Rm注射5-HT后频率减慢,PVN脑刺激后可进一步减慢胃电频率。已知Rm与PVN有密切的纤维联系,Rm可能作为PVN的下级中枢,传达或执行更高中枢的指令,共同调控胃肠的功能活动。

总之,PVN微量注射5-HT对胃电主要为激动作用,可能是通过5-HT₃受体途径发挥作用。而Rm注射5-HT则为抑制作用,可能是通过5-HT₂受体途径发挥作用;进一步证实本实验室先前提出的中枢同时存在“下行性抑制”和“下行性兴奋”两个系统共同调控消化道功能的概念。PVN脑刺激抑制胃电活动,并可进一步加强Rm注射5-HT对胃电的抑制作用。下级中枢可能传达或执行更高中枢的指令,共同调控胃肠的功能活动。本实验还发现每当胃电频率发生变化的同时,相位差通常发生紊乱、波形对应率较差,频率是影响相位差及波形的一个重要因素。胃电活动的“跟随”可能有一个“调整”与“适应”的过程,对临床电起搏治疗功能性胃肠道疾病具有很好的指导意义。

4 参考文献

- 1 Guth PH, Aures D, Paulsen G. Topical aspirin plus

- HCl gastric lesions in the rat. Cytoprotective effect of prostaglandin, cimetidine, and probanthine. *Gastroenterology* 1979; 76: 88-93
- 2 Flanagan LM, Dohanics J, Verbalis JG, Stricker EM. Gastric motility and food intake in rats after lesions of hypothalamic paraventricular nucleus. *Am J Physiol* 1992; 263: R39-R44
- 3 邢宝仁, 罗丕福, 陈宜张. 大鼠下丘脑室旁核神经元对电刺激蓝斑和中缝背核的反应. *生理学报* 1988; 40: 303-307
- 4 邢宝仁, 甘晟光, 顾勤, 夏金辉, 郭益明, 陈宜张. 5-羟色胺对大鼠下丘脑薄片室旁核神经元自发电活动的作用. *生理学报* 1990; 42: 302-306
- 5 何建华, 柳滨, 陈香梅. 中缝大核对胃运动胃电调节作用的实验研究. *四川解剖学杂志* 2004; 12: 192-194
- 6 常彦忠, 顾蕴辉. 谷氨酸钠兴奋室旁核引起的升压效应及其与蓝斑-升压反应和A₁-降压反应间的关系. *生理学报* 1992; 44: 22-30
- 7 刘丽宏, 梅其炳, 张峰, 陈蕾, 赵德化. 二氢吡啶类钙拮抗剂对抗5-HT引起的胃底平滑肌细胞的增殖及其机制. *中国药理学通报* 2003; 19: 796-800
- 8 张建福, 郑芳, 詹茂程, 孙东, 阎长栋. 电刺激室旁核对大鼠应激性胃粘膜损伤的影响. *生理学报* 1992; 44: 583-590
- 9 张咏梅, 张文文, 张建福. JNK在室旁核内微量注射催产素对大鼠胃缺血-再灌注调控中的作用. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 1919-1924
- 10 欧阳守. 胃肠起步点. *科学* 1998; 12: 56-59
- 11 Ouyang S, Zhang YP, Lin YB, Lin JJ, Li SY. Analysis of Phase Difference of Electrogastrography. Program of Eighth International Workshop on Electrogastrography. San Diego, USA. May 2000: 41
- 12 王礼建, 周吕, 张春玥. 延髓最后区(AREA POSTREMA)对狗胃肠电活动的调节作用. *基础医学与临床* 2001; 21: 85
- 13 王东岩, 刘志敏, 陈宝忠, 牛淑东. 中枢P物质参与电针对家兔胃运动、胃电的抑制效应. *针灸临床杂志* 2000; 16: 53-55
- 14 欧阳守, 孙东, 许冠荪. 电针及刺激延髓中缝大核对猫胃电的影响. *生理学报* 1983; 35: 34-41
- 15 李世英, 欧阳守. 豚鼠结肠平滑肌细胞L型钙通道特性研究. *基础医学与临床* 2003; 23: 109
- 16 黄伟锋, 欧阳守, 张慧. 豚鼠结肠平滑肌细胞大电导钙激活钾通道特性及氧化修饰的影响. *生理学报* 2009; 61: 285-291
- 17 姜敏, 凌立平, 傅宝玉. 肠易激综合征患者结肠5-HT的分布特点. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 541-543
- 18 De Ponti F, Tonini M. Irritable bowel syndrome: new agents targeting serotonin receptor subtypes. *Drugs* 2001; 61: 317-332
- 19 Couch JR Jr. Responses of neurons in the raphe nuclei to serotonin, norepinephrine and acetylcholine and their correlation with an excitatory synaptic input. *Brain Res* 1970; 19: 137-150

编辑 李瑞敏 电编 吴鹏朕

塞来昔布对大鼠重症急性胰腺炎的治疗作用

薛翠华, 高振军, 李秋萍, 许亚平, 周春锁, 姚俊, 付白清

薛翠华, 高振军, 李秋萍, 许亚平, 周春锁, 姚俊, 付白清, 江苏大学附属人民医院消化科 江苏省镇江市 212002
高振军, 江苏省连云港市第一人民医院消化科 江苏省连云港市 222002

薛翠华, 主任医师, 主要从事胰腺疾病研究。

作者贡献分布: 此课题由薛翠华与高振军设计; 研究过程由薛翠华、高振军、李秋萍、许亚平、周春锁、姚俊及付白清完成; 薛翠华与高振军进行数据分析并完成写作。

通讯作者: 薛翠华, 主任医师, 212002, 江苏省镇江市电力路8号, 江苏大学附属人民医院消化科。ceng-lu@163.com

电话: 0511-88915031 传真: 0511-88915031

收稿日期: 2009-08-03 修回日期: 2009-09-23

接受日期: 2009-10-12 在线出版日期: 2009-11-08

Efficacy of celecoxib in the treatment of severe acute pancreatitis in rats

Cui-Hua Xue, Zhen-Jun Gao, Qiu-Ping Li, Ya-Ping Xu, Chun-Suo Zhou, Jun Yao, Bai-Qing Fu

Cui-Hua Xue, Zhen-Jun Gao, Qiu-Ping Li, Ya-Ping Xu, Chun-Suo Zhou, Jun Yao, Bai-Qing Fu, Department of Gastroenterology, the People's Hospital, Affiliated to Jiangsu University, Zhenjiang 212002, Jiangsu Province, China
Zhen-Jun Gao, Department of Gastroenterology, the First People's Hospital of Lianyungang, Lianyungang 222002, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Cui-Hua Xue, Department of Gastroenterology, the People's Hospital, Affiliated to Jiangsu University, 8 Dianli Road, Zhenjiang 212002, Jiangsu Province, China. ceng-lu@163.com

Received: 2009-08-03 Revised: 2009-09-23

Accepted: 2009-10-12 Published online: 2009-11-08

Abstract

AIM: To investigate the efficacy of celecoxib in the treatment of severe acute pancreatitis (SAP) in rats and explore potential mechanisms involved.

METHODS: A total of 135 Sprague-Dawley rats were used in this study, of which 75 were randomly and equally divided into three groups (SAP model control group, low-dose and high-dose celecoxib treatment groups) to investigate the survival rate, and 60 were randomly and equally divided into four groups (sham operation group, SAP model control group and low-dose and high-dose celecoxib treatment groups) to detect pancreatic histopathological changes, serum tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β) and interleukin-6 (IL-6)

levels, and pancreatic expression of cyclooxygenase-2 (COX-2). SAP was induced in rats by retrograde injection of sodium taurocholate into the biliopancreatic duct. The histopathological changes in the pancreas of rats were evaluated using a semi-quantitative scoring method. The changes in serum TNF- α , IL-1 β and IL-6 levels at different time points were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The expression of COX-2 mRNA in the pancreas was detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR).

RESULTS: Celecoxib ameliorated pancreatic pathological damage in SAP rats. High-dose celecoxib could significantly mitigate edema at 24 hours (2.28 ± 0.30 vs 2.73 ± 0.22 , $P < 0.05$), acinar necrosis at 12 and 24 hours (2.03 ± 0.15 vs 2.48 ± 0.24 and 2.09 ± 0.10 vs 2.65 ± 0.25 , respectively; both $P < 0.05$), and inflammatory cell infiltration at 12 and 24 hours (1.80 ± 0.22 vs 2.51 ± 0.17 and 1.57 ± 0.26 vs 2.20 ± 0.22 , respectively; both $P < 0.05$). The levels of serum TNF- α , IL-1 β and IL-6 in SAP rats were significantly higher than those in normal control mice at all time points. After celecoxib treatment, the levels of serum TNF- α , IL-1 β and IL-6 significantly decreased in SAP rats, especially prominent in the high-dose group ($P < 0.05$). Celecoxib treatment could also improve the survival rate of SAP rats (16% vs 52% , $P < 0.05$).

CONCLUSION: Celecoxib can ameliorate pathological damage in the pancreas of SAP rats possibly by inhibiting the production of serum TNF- α , IL-1 β and IL-6 and the expression of COX-2 in the pancreas.

Key Words: Severe acute pancreatitis; Cytokine; Inflammation; Cyclooxygenase-2; Celecoxib

Xue CH, Gao ZJ, Li QP, Xu YP, Zhou CS, Yao J, Fu BQ. Efficacy of celecoxib in the treatment of severe acute pancreatitis in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(31): 3197-3202

摘要

目的: 探讨塞来昔布对大鼠重症急性胰腺炎

背景资料

目前认为SAP实质上是细胞因子及炎性介质大量释放所致的严重的全身炎症反应综合征。近年来大量的研究表明, 炎性细胞因子在导致全身炎症反应中发挥着主要作用。COX-2是SAP中重要的致病因子, 有研究认为COX-2抑制剂有可能成为新的重症胰腺炎的治疗途径。

同行评议者

李国威, 教授, 西安交通大学医学院第二附属医院普通外科; 谷俊朝, 主任医师, 首都医科大学附属北京友谊医院普外科

相关报道

Song *et al*证实COX-2自身受某些炎症因子的调节,其在SAP发生发展中的具有重要的作用. Lankisch *et al*报道,有一些前列腺素衍生物对急性胰腺炎发病中具有保护作用,但应用消炎痛抑制前列腺素对急性胰腺炎无效.

(severe acute pancreatitis, SAP)治疗效果及机制.

方法: SD大鼠共135只,其中75只随机平均分为SAP组,低剂量及高剂量塞来昔布组,观察其生存率; 60只SD大鼠随机平均分为对照组(假手术组), SAP组, 低剂量及高剂量塞来昔布组. 胆胰管内注射牛磺胆酸钠溶液造模, ELISA法检测大鼠血清TNF- α 、IL-1 β 及IL-6的表达; RT-PCR检测胰腺组织COX-2 mRNA的表达; HE染色、胰腺组织半定量积分评价胰腺病理学改变.

结果: 塞来昔布可降低大鼠SAP的病理损害积分, 高剂量组在造模后的24 h可显著减低组织水肿(2.28 ± 0.30 vs 2.73 ± 0.22 , $P < 0.05$); 在12和24 h均可显著降低腺泡坏死(2.03 ± 0.15 vs 2.48 ± 0.24 , 2.09 ± 0.10 vs 2.65 ± 0.25 , 均 $P < 0.05$)及炎性细胞浸润(1.80 ± 0.22 vs 2.51 ± 0.17 , 1.57 ± 0.26 vs 2.20 ± 0.22 , 均 $P < 0.05$). 造模后COX-2 mRNA表达及TNF- α 、IL-1 β 及IL-6产生增加, 塞来昔布治疗组上述检测指标明显低于SAP组(均 $P < 0.05$), 且随塞来昔布剂量的增加其抑制作用逐渐增强. 塞来昔布高剂量治疗组可显著提高大鼠SAP的生存率(16% vs 52%, $P < 0.05$).

结论: 塞来昔布可能通过抑制TNF- α 、IL-1 β 及IL-6的表达, 改善胰腺局部病理改变及预后.

关键词: 重症急性胰腺炎; 细胞因子; 炎症; 环氧合酶-2; 塞来昔布

薛翠华, 高振军, 李秋萍, 许亚平, 周春锁, 姚俊, 付白清. 塞来昔布对大鼠重症急性胰腺炎的治疗作用. 世界华人消化杂志 2009; 17(31): 3197-3202

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3197.asp>

0 引言

重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)是一种发病急、进展快、并发症多、死亡率高凶险的内外科急症^[1]. 胰腺的自身消化和微循环的破坏是急性胰腺炎病理生理学重要的2个部分^[2], 胰腺炎局部的严重性和系统的复杂性与炎性细胞因子的过度上调及一些次级调控因子, 如组胺、前列腺素、血栓素、白三烯、NO和血小板活化因子等密切相关^[3-6]. 前列腺素被认为是急性胰腺炎发病的重要调控因子, 前列腺素类因子的失衡是急性胰腺炎相关微循环紊乱的重要因素, 前列腺素还具有保护内脏器官及维持膜的完整性的作用^[5,7-8]. 环氧合酶(cyclooxygenase, COX)是由花生四烯酸合成

前列腺素的关键限速酶, 目前已知有2种亚型, COX-1属结构型酶, 在多种组织中呈微量表达, 其催化产物只要参与维持细胞结构的完整性, COX-2属诱生型酶, 正常组织中很少表达, 在各种刺激因素如炎性细胞因子等作用下, 表达上调. COX-2是SAP中重要的致病因子, 有研究认为COX-2抑制剂有可能成为新的重症胰腺炎的治疗途径^[9-10]. 塞来昔布(Celecoxib)是新一代的非甾体类化合物, 可选择性抑制COX-2而阻止炎性PGs类物质的产生, 达到抗炎、镇痛及退热的作用. 本研究旨在探讨炎性因子和COX-2在大鼠SAP发病机制中的作用, 并观察塞来昔布对SAP大鼠的胰腺病理组织学、生存率等方面的变化来揭示COX-2抑制剂在SAP治疗中可能的治疗作用.

1 材料和方法

1.1 材料 δ SD大鼠135只, 体质量230-280 g, 清洁级, 购自中国科学研究院上海动物中心, 其中75只分为3组进行生存率实验, 其余60只分为4组进行血清细胞因子、病理学及COX-2检测. 所有大鼠均给予普通颗粒饲料喂养, 自由饮水, 人工光循环12 h/12 h, 温度为 $21^{\circ}\text{C} \pm 2.0^{\circ}\text{C}$, 湿度为 $55\% \pm 2\%$, 喂养1 wk后进行实验. 牛磺胆酸钠、戊巴比妥钠购自Sigma公司、COX-2抑制剂塞来昔布(辉瑞药厂提供)、TNF- α 、IL-1 β 及IL-6检测试剂盒购自R&D公司.

1.2 方法

1.2.1 造模: 实验前禁食不禁水12 h, 10 g/L巴比妥钠溶液腹腔麻醉. 严格消毒、铺巾, 正中中线剖腹, 置管于胆胰管内, 在微量输液泵的控制下向胆胰管内注射5%牛磺胆酸钠溶液, 剂量1 mL/kg, 0.2 mL/min, 留置导管10 min后拔管, 术后皮下注射生理盐水(2 mL/100 g), 术后自由饮水, 对照组大鼠仅作剖腹术. 治疗组将塞来昔布溶解于2 mL生理盐水, 并在造模后即腹腔注射. SAP组和对照组注射等剂量生理盐水.

1.2.2 生存率测定: 75只大鼠随机平均分为SAP组、SAP+塞来昔布低剂量(10 g/L)治疗组和SAP+塞来昔布高剂量(30 g/L)治疗组, 观察24 h, 每隔6 h观察1次.

1.2.3 胰腺组织病理学评分: 取胰腺组织经常规脱水、包埋、切片、HE染色, 由专一病理医师观察切片. 胰腺组织半定量积分参照Schmidt *et al*^[11]的方法.

1.2.4 血清TNF- α 、IL-1 β 及IL-6浓度测定: 60

表 1 大鼠SAP病理学积分 ($n = 5$, mean \pm SD)

	水肿	腺泡坏死	出血	炎症细胞浸润
SAP组				
6 h	2.55 \pm 0.23	2.15 \pm 0.25	0.32 \pm 0.07	2.83 \pm 0.31
12 h	3.08 \pm 0.27	2.48 \pm 0.24	0.39 \pm 0.07	2.51 \pm 0.17
24 h	2.73 \pm 0.22	2.65 \pm 0.25	0.50 \pm 0.03	2.20 \pm 0.22
SAP+塞来昔布低剂量治疗组				
6 h	2.39 \pm 0.14	2.04 \pm 0.18	0.34 \pm 0.06	2.26 \pm 0.16 ^a
12 h	2.77 \pm 0.16	2.29 \pm 0.06	0.35 \pm 0.06	2.08 \pm 0.26 ^a
24 h	2.59 \pm 0.23	2.54 \pm 0.31	0.46 \pm 0.05	1.87 \pm 0.19 ^a
SAP+塞来昔布高剂量治疗组				
6 h	2.26 \pm 0.22	1.94 \pm 0.11	0.35 \pm 0.05	2.15 \pm 0.17 ^a
12 h	2.61 \pm 0.12	2.03 \pm 0.15 ^a	0.35 \pm 0.06	1.80 \pm 0.22 ^a
24 h	2.28 \pm 0.30 ^a	2.09 \pm 0.10 ^a	0.42 \pm 0.03	1.57 \pm 0.26 ^a

^a $P < 0.05$ vs SAP组.

只大鼠随机平均分为对照组(假手术组)、SAP组、SAP+塞来昔布低剂量治疗组和SAP+塞来昔布高剂量治疗组, 分别于术后6、12、24 h分批处死动物, 每次每组处死5只. 留取血液检测血清血清TNF- α 、IL-1 β 、IL-6采用ELISA方法检测, 按说明书要求操作. 同时取少量新鲜胰腺组织-70℃冻存, 行RT-PCR检测; 其余组织置于4%甲醛溶液固定, 行胰腺组织病理学评分.

1.2.5 RT-PCR: 用TRIzol按说明书要求提取组织总RNA, 行RT-PCR, 以GAPDH为内参照, 引物序列: COX-2上游为5'-GTTGAAAGCCCTCTACCATGACA-3'; 下游为5'-TTGAGGCAGTGTGATGATCCT-3'; GADPH上游为5'-GGTGAAGGTCGTGTGAACGGA-3', 下游为5'-TGTTAGTGGGTCTCGCTCCTG-3'; 引物由上海生工合成. 扩增产物置20 g/L琼脂糖电泳, 紫外灯下观察, 凝胶分析系统拍照.

统计学处理 实验结果以mean \pm SD表示, 采用SASS6.12统计软件分析, 采用ANOVA单因素方差分析. 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 生存率分析 观察24 h, SAP组生存率为16%, SAP+低剂量塞来昔布组为24%, 与SAP组相比无显著差异($P = 0.505$); SAP+高剂量塞来昔布组为52%, 与SAP组相比差异有显著性($P = 0.009$, 图1).

2.2 胰腺组织病理学改变 光镜下见SAP模型组大鼠胰腺组织间质明显水肿, 导致叶间隔、小叶间隔甚至腺泡间隔增宽, 血管扩张充血, 并见出血区域, 腺泡坏死呈灶性、小叶性分布, 可见

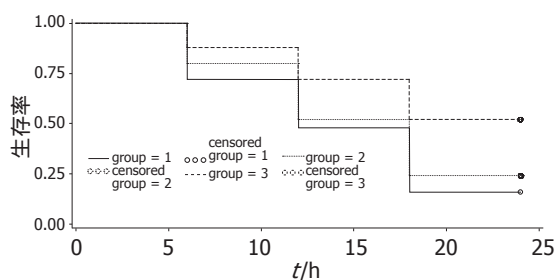


图 1 塞来昔布治疗大鼠SAP的生存率分析.

多个大片坏死区域, 血管周围见单核、中性粒细胞积聚, 胰腺间质中见大量单核及中性粒细胞浸润. 塞来昔布低剂量(10 g/L)治疗组炎性细胞浸润程度较SAP模型组显著减轻, 塞来昔布高剂量治疗组胰腺组织水肿、坏死和炎性细胞浸润程度较SAP模型组均显著减轻, 尤以12 h和24 h为明显, 但出血程度3组相比无明显变化(表1, 图2).

2.3 塞来昔布对SAP大鼠血清TNF- α 、IL-1 β 及IL-6水平的影响 SAP大鼠血清中, TNF- α 、IL-1 β 及IL-6水平均较对照组(假手术组)明显增高, 在24 h内随时间延长有增加的趋势, 应用塞来昔布治疗后, TNF- α 、IL-1 β 及IL-6水平均显著降低, 塞来昔布高剂量治疗组降低更为明显(表2).

2.4 SAP大鼠胰腺组织COX-2 mRNA的变化 对照组大鼠胰腺组织COX-2无表达, SAP模型组明显表达, 用塞来昔布治疗后, COX-2 mRNA表达显著降低($P < 0.05$, 图3).

3 讨论

COX是花生四烯酸代谢过程中前列腺素合成

创新盘点

本研究通过探讨炎症因子和COX-2在大鼠SAP发病机制中的作用, 并观察塞来昔布对SAP大鼠的胰腺病理组织学、生存率等方面的变化来揭示COX-2抑制剂在SAP治疗中可能的治疗作用, 为COX-2抑制剂在SAP治疗中的应用提供理论依据.

应用要点

本研究证实, 选择性COX-2抑制剂塞来昔布在一定剂量时可改善SAP的局部病理表现, 降低死亡率, 有可能成为SAP的辅助治疗药物。

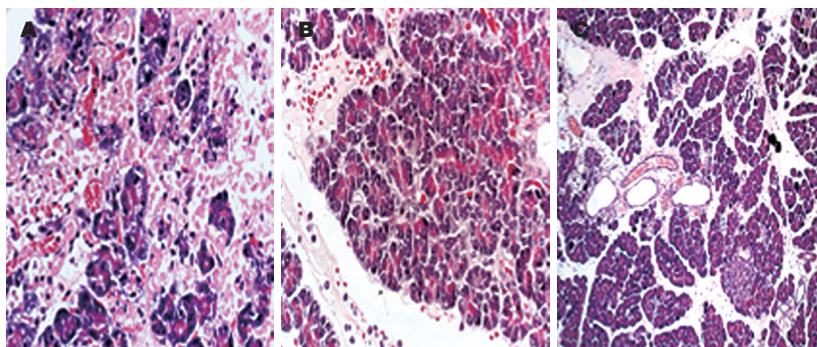


图 2 大鼠SAP胰腺组织病理学表现(HE × 200). A: SAP组; B: SAP+塞来昔布低剂量治疗组; C: SAP+塞来昔布高剂量治疗组。

表 2 大鼠血清TNF- α 、IL-1 β 及IL-6浓度 (ng/L, mean \pm SD)

分组	时间点		
	6 h	12 h	24 h
对照组			
TNF- α	11.28 \pm 3.27	12.54 \pm 3.93	11.83 \pm 2.85
IL-1 β	1.58 \pm 0.35	2.06 \pm 0.56	1.89 \pm 0.44
IL-6	38.42 \pm 6.54	50.80 \pm 11.20	45.63 \pm 9.78
SAP组			
TNF- α	98.65 \pm 15.49	156.78 \pm 22.3	178.86 \pm 23.12
IL-1 β	45.82 \pm 7.87	58.60 \pm 9.06	62.91 \pm 8.31
IL-6	134.69 \pm 18.52	142.54 \pm 21.97	160.47 \pm 23.86
SAP+塞来昔布低剂量治疗组			
TNF- α	89.54 \pm 13.93	122.65 \pm 22.3 ^a	133.27 \pm 23.12 ^a
IL-1 β	27.80 \pm 5.84 ^a	33.5 \pm 11.04 ^a	38.58 \pm 9.74 ^a
IL-6	119.33 \pm 24.56	121.70 \pm 35.31 ^a	152.53 \pm 31.69 ^a
SAP+塞来昔布高剂量治疗组			
TNF- α	54.65 \pm 8.62 ^a	87.56 \pm 10.59 ^a	86.65 \pm 7.76 ^a
IL-1 β	11.83 \pm 2.63 ^a	13.42 \pm 3.59 ^a	18.50 \pm 5.03 ^a
IL-6	64.52 \pm 13.72 ^a	67.80 \pm 20.07 ^a	68.02 \pm 18.55 ^a

^a $P < 0.05$ vs SAP组。

的限速酶, 目前已经知道其至少存在2种亚型, COX-1属结构型酶, 在多种组织中呈微量表达, 其催化产物只要参与维持细胞结构的完整性, COX-2属诱导型酶, 正常组织中很少表达, 在各种刺激因素如细胞因子, 炎性递质以及促癌剂等作用下, 表达迅速. COX-2自身受某些炎症因子的调节, 其在SAP发生发展中的具有重要的作用^[10,12-18]. 在本研究中发现, COX-2在对照组无表达, 但在SAP组6 h即有明显表达, 提示COX-2有可能参与了SAP的发展. 目前认为SAP实质上是细胞因子及炎性介质大量释放所致的严重的全身炎症反应综合征. 近年来大量的研究表明, 炎性细胞因子在导致全身炎症反应中发挥着主要作用, SAP早期过度的炎症反应也是造成SIRS和MODS的主要原因^[3]. 炎症反应涉及炎症性细胞因子和抗炎性细胞因子. 炎症性细胞因子包

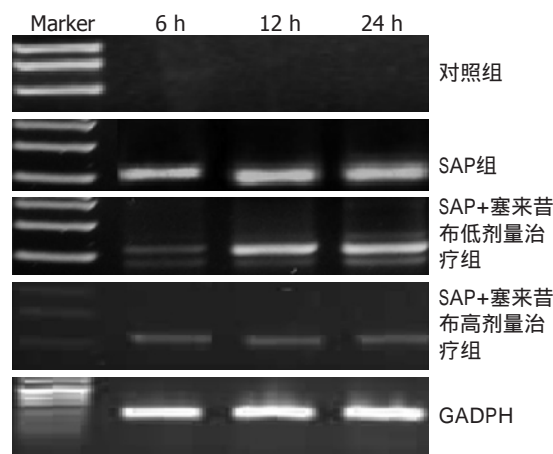


图 3 SAP大鼠胰腺组织COX-2 mRNA表达。

括TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、血小板活化因子等, 炎性细胞因子包括TGF- β 和IL-10等^[19-26]. 在本研究中发现, 造模6 h, TNF- α 、IL-1 β 、IL-6等炎

症性细胞因子也明显增加, 随时间延长进一步增加, 并与病理改变相一致, 证实TNF- α 、IL-1 β 、IL-6等炎症性细胞因子参与了胰腺炎发展的过程。

非甾体类消炎药(non-steroid anti-inflammation drugs, NSAIDs)是一类广泛应用于消炎、止痛的药物, 主要不良反应为消化系反应, 尤其是出血及穿孔, 但亦有少量个案报道认为NSAIDs与急性胰腺炎发病有关, 但缺乏流行病学调查^[27-29]。近来的研究认为, 塞来昔布诱发急性胰腺炎的可能性要显著低于其他NSAIDs药物^[30]。前列腺素和胰腺炎的关系已被研究过^[8], 有一些前列腺素衍生物对急性胰腺炎发病中具有保护作用, 但应用消炎痛抑制前列腺素对急性胰腺炎无效^[5], 这种情况最近被认为是消炎痛同时抑制了COX-1和COX-2的表达所致, 这是因为在急性胰腺炎时COX-2表达上调, 而COX-1表达并无明显变化^[31]。近来有少量研究在选择性COX-2抑制剂对胰腺炎的治疗中发现, 在造模前和造模后应用COX-2抑制剂均可抑制全身并发症的发生^[7,9-10,32], 有报道认为应用COX-2抑制剂可抑制胰腺组织水肿及坏死^[10,32], 但亦有报道认为应用COX-2抑制剂对胰腺组织水肿及坏死无明显影响^[7,9], 这有可能与用药方式及观察时间的长短有一定关系, 在本研究中发现, 塞来昔布低剂量(10 g/L)治疗组炎性细胞浸润程度较SAP模型组显著减轻, 塞来昔布高剂量治疗组胰腺组织水肿、坏死和炎性细胞浸润程度较SAP模型组均显著减轻, 尤以12 h和24 h为明显, 但出血程度3组相比无明显变化, 实验中也发现塞来昔布治疗可改善大鼠生存率, 提示塞来昔布在适当剂量时可改善SAP的局部病理表现及预后, 实验中证实, 塞来昔布尤其是高剂量时可显著抑制TNF- α 、IL-1 β 及IL-6的产生, 在局部抑制了炎性细胞的浸润, 从而抑制了炎症的级联放大效应。

总之, 本研究证实, 选择性COX-2抑制剂塞来昔布在一定剂量时可改善SAP的局部病理表现, 降低死亡率, 有可能成为SAP的辅助治疗药物。

4 参考文献

- 1 王远志, 丁岩冰, 吴健, 邓彬, 肖炜明. 早期肠内营养联合肠屏障保护剂治疗急性重症胰腺炎64例. 世界华人消化杂志 2007; 15: 3545-3548
- 2 王黎明, 罗华, 王懿娜, 曾英, 苏惠芬. 中西医结合治疗急性重症胰腺炎28例. 世界华人消化杂志 2007; 15: 2747-2749
- 3 Papachristou GI. Prediction of severe acute pancreatitis: current knowledge and novel insights.

- World J Gastroenterol 2008; 14: 6273-6275
- 4 Alhan E, Cicek R, Erçin C, Orem A, Vanizor B, Cinel A. Effects of the tyrosine kinase inhibitor tyrphostin AG 556 on acute necrotizing pancreatitis in rats. *Eur J Surg* 2002; 168: 557-562
- 5 Lankisch PG, Koop H, Winckler K, Kunze H, Vogt W. Indomethacin treatment of acute experimental pancreatitis in the rat. *Scand J Gastroenterol* 1978; 13: 629-633
- 6 任双义, 陈海龙. ASC在大鼠胰腺炎肺损伤发病中的作用及中药清胰汤对其表达的影响. 世界华人消化杂志 2006; 14: 1058-1063
- 7 Alhan E, Kalyoncu NI, Erçin C, Kural BV. Effects of the celecoxib on the acute necrotizing pancreatitis in rats. *Inflammation* 2004; 28: 303-309
- 8 Yücel K, Alhan E, Küçüktülü U, Piri M, Erçin C, Deger O. The effects of prostaglandin E1 on the microperfusion of the pancreas during acute necrotizing pancreatitis in rats. *Hepatogastroenterology* 2002; 49: 544-548
- 9 Foitzik T, Hotz HG, Hotz B, Wittig F, Buhr HJ. Selective inhibition of cyclooxygenase-2 (COX-2) reduces prostaglandin E2 production and attenuates systemic disease sequelae in experimental pancreatitis. *Hepatogastroenterology* 2003; 50: 1159-1162
- 10 Song AM, Bhagat L, Singh VP, Van Acker GG, Steer ML, Saluja AK. Inhibition of cyclooxygenase-2 ameliorates the severity of pancreatitis and associated lung injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 283: G1166-G1174
- 11 Schmidt J, Rattner DW, Lewandrowski K, Compton CC, Mandavilli U, Knoefel WT, Warshaw AL. A better model of acute pancreatitis for evaluating therapy. *Ann Surg* 1992; 215: 44-56
- 12 Yang R, Shaufl AL, Killeen ME, Fink MP. Ethyl pyruvate ameliorates liver injury secondary to severe acute pancreatitis. *J Surg Res* 2009; 153: 302-309
- 13 Lankisch PG. Indomethacin may reduce the incidence and severity of acute pancreatitis after ERCP. *Am J Gastroenterol* 2008; 103: 244
- 14 Mennecier D, Ceppa F, Sinayoko L, Corberand D, Harnois F, Thiolet C, Farret O. [Acute pancreatitis after treatment by celecoxib] *Gastroenterol Clin Biol* 2007; 31: 668-669
- 15 Chan YC, Leung PS. Angiotensin II type 1 receptor-dependent nuclear factor-kappaB activation-mediated proinflammatory actions in a rat model of obstructive acute pancreatitis. *J Pharmacol Exp Ther* 2007; 323: 10-18
- 16 Seo SW, Jung WS, Piao TG, Hong SH, Yun KJ, Park RK, Shin MK, Song HJ, Park SJ. Selective cyclooxygenase-2 inhibitor ameliorates cholecystokinin-octapeptide-induced acute pancreatitis in rats. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 2298-2304
- 17 Zhou YJ, Xiong YX, Zhou T, Fan W, Wu XT. [Role of cyclooxygenase-2 in pulmonary microcirculation disorder in rats with acute pancreatitis] *Sichuan Daxue Xuebao Yixueban* 2007; 38: 250-254
- 18 Chan YC, Leung PS. Acute pancreatitis: animal models and recent advances in basic research. *Pancreas* 2007; 34: 1-14
- 19 Zhang X, Wu D, Jiang X. Icam-1 and acute pancreatitis complicated by acute lung injury. *JOP* 2009; 10: 8-14
- 20 Viterbo D, Bluth MH, Mueller CM, Zenilman

同行评价

本文研究了塞来昔布对大鼠重症急性胰腺炎治疗作用, 有一定的实用价值和可读性。

- ME. Mutational characterization of pancreatitis-associated protein 2 domains involved in mediating cytokine secretion in macrophages and the NF-kappaB pathway. *J Immunol* 2008; 181: 1959-1968
- 21 Viterbo D, Bluth MH, Lin YY, Mueller CM, Wadgaonkar R, Zenilman ME. Pancreatitis-associated protein 2 modulates inflammatory responses in macrophages. *J Immunol* 2008; 181: 1948-1958
- 22 Hartwig W, Schimmel E, Hackert T, Fortunato F, Bergmann F, Baczako A, Strobel O, Büchler MW, Werner J. A novel animal model of severe pancreatitis in mice and its differences to the rat. *Surgery* 2008; 144: 394-403
- 23 de-Madaria E, Martínez J, Sempere L, Lozano B, Sánchez-Payá J, Uceda F, Pérez-Mateo M. Cytokine genotypes in acute pancreatitis: association with etiology, severity, and cytokine levels in blood. *Pancreas* 2008; 37: 295-301
- 24 Martín Alonso MA, Santamaría A, Saracíbar E, Arranz E, Garrote JA, Almaraz A, Caro-Patón A. [Cytokines and other immunological parameters as markers of distant organ involvement in acute pancreatitis] *Med Clin (Barc)* 2007; 128: 401-406
- 25 Kazbay K, Tarnasky PR, Hawes RH, Cotton PB. Increased transforming growth factor beta in pure pancreatic juice in pancreatitis. *Pancreas* 2001; 22: 193-195
- 26 钟荣德, 周杰, 廖柳清, 符方勇, 李湘站, 林艺雄. 脂体介导核因子- κ B 诱捕物寡聚脱氧核苷酸对重症急性胰腺炎大鼠胰腺炎症因子 mRNA 表达和胰腺损伤的影响. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 813-819
- 27 Cobb TK, Pierce JR Jr. Acute pancreatitis associated with ketoprofen. *South Med J* 1992; 85: 430-431
- 28 Guerra M. Toxicity of indomethacin. Report of a case of acute pancreatitis. *JAMA* 1967; 200: 552-553
- 29 McArthur KE. Review article: drug-induced pancreatitis. *Aliment Pharmacol Ther* 1996; 10: 23-38
- 30 Sørensen HT, Jacobsen J, Nørgaard M, Pedersen L, Johnsen SP, Baron JA. Newer cyclo-oxygenase-2 selective inhibitors, other non-steroidal anti-inflammatory drugs and the risk of acute pancreatitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 24: 111-116
- 31 Zabel-Langhennig A, Holler B, Engeland K, Mössner J. Cyclooxygenase-2 transcription is stimulated and amylase secretion is inhibited in pancreatic acinar cells after induction of acute pancreatitis. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 265: 545-549
- 32 Ethridge RT, Chung DH, Slogoff M, Ehlers RA, Hellmich MR, Rajaraman S, Saito H, Uchida T, Evers BM. Cyclooxygenase-2 gene disruption attenuates the severity of acute pancreatitis and pancreatitis-associated lung injury. *Gastroenterology* 2002; 123: 1311-1322

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009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, 采用批准的药名; 创新性新药, 请参照我国药典委员会的“命名原则”, 新译名词应附外文. 公认习用缩略语可直接应用(建议第一次也写出全称), 如ALT, AST, mAb, WBC, RBC, Hb, T, P, R, BP, PU, GU, DU, ACTH, DNA, LD₅₀, HBsAg, HCV RNA, AFP, CEA, ECG, IgG, IgA, IgM, TCM, RIA, ELISA, PCR, CT, MRI等. 为减少排印错误, 外文、阿拉伯数字、标点符号必须正确打印在A4纸上. 中医药名词英译要遵循以下原则: (1)有对等词者, 直接采用原有英语词, 如中风stroke, 发热fever; (2)有对应词者应根据上下文合理选用原英语词, 如八法eight principal methods; (3)英语中没有对等词或相应词者, 宜用汉语拼音, 如阴yin, 阳yang, 阴阳学说yinyangology, 人中renzhong, 气功qigong; 汉语拼音要以词为单位分写, 如weixibao nizhuanwan(胃细胞逆转丸), guizhitang(桂枝汤). 通常应小写. (科学编辑: 李军亮 2009-11-08)

丹参酮 II A 对小鼠肠癌皮下移植瘤血管新生的抑制作用

周利红, 刘宣, 王炎, 范忠泽, 孙珏, 李琦

周利红, 刘宣, 王炎, 范忠泽, 孙珏, 李琦, 上海中医药大学附属普陀医院肿瘤科 上海市 200062
周利红, 上海中医药大学硕士, 主要从事中西医结合防治肿瘤的临床及实验研究。

上海市重点学科(第三期)基金资助项目, No. S30302

上海市自然科学基金资助项目, No. 09ZR1428500

作者贡献分布: 本课题由李琦与范忠泽设计; 研究过程由周利红、王炎及刘宣共同完成; 研究所用试剂及分析工具由李琦与范忠泽提供; 结果与数据分析由王炎与孙珏完成; 论文写作由周利红与李琦共同完成。

通讯作者: 李琦, 副教授, 副主任医师, 200062, 上海市兰溪路164号, 上海中医药大学附属普陀医院肿瘤科。

lzwf@hotmail.com

电话: 021-62572723-4308 传真: 021-62161216

收稿日期: 2009-09-15 修回日期: 2009-10-23

接受日期: 2009-10-26 在线出版日期: 2009-11-08

Tanshinone IIA inhibits angiogenesis in subcutaneous colorectal cancer xenografts in mice

Li-Hong Zhou, Xuan Liu, Yan Wang, Zhong-Ze Fan, Jue Sun, Qi Li

Li-Hong Zhou, Xuan Liu, Yan Wang, Zhong-Ze Fan, Jue Sun, Qi Li, Department of Oncology, Putuo District Center Hospital, Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200062, China

Supported by: the 3rd Shanghai Leading Academic Discipline Project, No. S30302; and the Natural Science Foundation of Shanghai, No. 09ZR1428500

Correspondence to: Professor Qi Li, Department of Oncology, Putuo District Center Hospital, Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, 164 Lanxi Road, Shanghai 200062, China. lzwf@hotmail.com

Received: 2009-09-15 Revised: 2009-10-23

Accepted: 2009-10-26 Published online: 2009-11-08

Abstract

AIM: To investigate the effects of tanshinone IIA (an active component of traditional Chinese medicine *salvia miltiorrhiza*) on angiogenesis in subcutaneous colorectal cancer xenografts in mice.

METHODS: An ectopic mouse model of colorectal cancer was established by subcutaneously inoculating colon carcinoma C26 cells into the armpit of mice. The mice were then randomly divided into 5 groups: model control group, low-dose tanshinone IIA group [0.5 mg/(kg·d)], mid-dose tanshinone IIA group [1 mg/(kg·d)], high-dose tanshinone IIA group [2 mg/(kg·d)], and 5-fluorouracil

(5-FU) group [1 mg/(kg·d)]. Normal saline (model control group), tanshinone IIA of different doses and 5-FU were injected via the vena caudalis once daily for one week, respectively. Seven days later, the eyeballs were removed to collect blood samples, and the tumors were peeled off to measure tumor size and weight. The microvessel density (MVD) was tested by immunohistochemistry. Tumor necrosis was detected by hematoxylin and eosin staining. Serum VEGF level was assayed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

RESULTS: Compared with the model control group, tumor weight decreased by 45.8%, 60.3% and 84.5% in the low-, mid- and high-dose tanshinone IIA groups, respectively. Corresponding tumor size decreased by 50.5%, 60.7% and 84.2%, respectively. Tumor necrosis was mild in the model control group and low-dose tanshinone IIA group, but moderate to severe in the mid- and high-dose tanshinone IIA groups. The MVD was higher in the model control group and low-dose tanshinone IIA group than in the mid- and high-dose tanshinone IIA groups (86.5 ± 14.6 and 73.5 ± 19.8 vs 48.6 ± 15.2 and 19.4 ± 6.6 , respectively). Serum VEGF level was significantly higher in the model control group than in the normal control group. Compared to the model control group, serum VEGF levels decreased by 15.8%, 34.2% and 74.8% in the low-, mid- and high-dose tanshinone IIA groups, respectively.

CONCLUSION: Tanshinone IIA can inhibit tumor angiogenesis and growth of colorectal cancer xenografts in mice perhaps via inhibition of VEGF and MVD.

Key Words: Tanshinone IIA; Angiogenesis; Mouse; Colorectal cancer; Vascular endothelial growth factor

Zhou LH, Liu X, Wang Y, Fan ZZ, Sun J, Li Q. Tanshinone IIA inhibits angiogenesis in subcutaneous colorectal cancer xenografts in mice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(31): 3203-3209

摘要

目的: 探讨中药丹参活性成分Tan A对肠癌

背景资料

自1971年美国波士顿儿童医院Folkman教授首先提出血管新生学说以来, 血管新生与肿瘤的关系越来越受到科研人员的重视。研究证实, 微血管生成在大肠癌的发生、发展、侵袭、转移中发挥重要作用, 已经成为大肠癌向其他脏器转移扩散和手术后复发的关键因素。

同行评议者

杜群, 副研究员, 广州中医药大学脾胃研究所药理室

血管生成、侵袭、转移是肿瘤治疗的最大的障碍,如何在肿瘤形成过程中抑制肿瘤血管新生,阻断原发瘤向其他器官的侵袭转移是防治大肠癌的一个重要手段,也是目前肿瘤综合治疗亟待解决的问题。

小鼠皮下移植瘤微血管生成的抑制作用。

方法:通过腋下接种小鼠C26肠癌细胞,建立小鼠结肠癌移植瘤模型,随机分为:模型组、Tan A低[0.5 mg/(kg·d)]、中[1 mg/(kg·d)]、高[2 mg/(kg·d)]剂量组、5-氟脲嘧啶[1 mg/(kg·d)]组,经尾静脉分别给予生理盐水、不同浓度的Tan A及5-氟脲嘧啶,每天1次,给药1 wk,给药7 d后摘除眼球取血,剥离瘤体,测量大小及质量,免疫组织化学法检测MVD, HE染色检测肿瘤组织坏死情况, ELISA法检测小鼠血清VEGF的表达。

结果: Tan A低、中、高剂量的肿瘤质量抑制率分别为: 45.8%、60.3%及84.5%, 肿瘤体积抑制率为: 50.5%、60.7%及84.2%; 模型组与低剂量组肿瘤组织以轻度坏死为主, MVD值分别为: 86.5 ± 14.6 与 73.5 ± 19.8 , 中、高剂量组则以中、重度坏死为主, MVD值分别为: 48.6 ± 15.2 与 19.4 ± 6.6 ; 模型组血清VEGF的浓度显著高于空白组, Tan A低、中、高剂量组VEGF抑制率分别为: 15.8%、34.2%及74.8%。

结论: Tan A能够抑制小鼠肠癌微血管生成,并对肠癌的生长有明显抑制作用,其抗肠癌作用与抑制VEGF、MVD有关。

关键词: 丹参酮 A; 血管新生; 小鼠; 结肠癌; 血管内皮生长因子

周利红, 刘宣, 王炎, 范忠泽, 孙珏, 李琦. 丹参酮 A对小鼠肠癌皮下移植瘤血管新生的抑制作用. 世界华人消化杂志 2009; 17(31): 3203-3209
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3203.asp>

0 引言

大肠癌是临床上常见的消化系恶性肿瘤之一,发病率仅次于胃癌和肝癌,并呈现逐年上升的趋势^[1],成为严重威胁人类健康的重大疾病. 肿瘤微血管生成在大肠癌的发生、发展、侵袭转移过程起着重要的作用^[2]. 丹参酮 II A(tanshinone II A, Tan II A) 是中药丹参的有效活性成分,最早用于心血管疾病,近年来发现具有明显的抗肿瘤作用,其抗癌机制涉及抑制细胞增殖^[3]、促进细胞凋亡^[4]、诱导肿瘤细胞分化^[5-6]等. 但对肠癌血管新生的作用尚未见报道. 本研究建立C26细胞小鼠结肠癌移植瘤模型,体内研究Tan II A对肠癌微血管生成的作用及对血管内皮生长因子(vascular endothelial growth

factor, VEGF)和微血管密度(microvessel density, MVD)的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 Babl/c F1代小鼠60只,♂, 体质量 18 ± 2 g, 清洁级, 购自上海斯莱克实验动物有限责任公司, 饲养于上海中医药大学附属普陀医院实验动物室. 合格证编号: SCHK(沪) 2007-0005; 小鼠C26结肠癌细胞(购自上海医药工业研究院); Tan II A, 含量>98%, 西安冠宇生物技术有限公司, 批号: 20070621; 5氟脲嘧啶(5-FU)为上海旭东海普药业有限公司生产, 批号: 20070802; 小鼠VEGF ELISA试剂盒(美国Bio Sources公司); 山羊抗小鼠CD34 mAb(美国R&D公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: 小鼠结肠癌C26细胞引自上海医药工业研究院药理研究室. 细胞培养于含100 mL/L胎牛血清、 1×10^5 U/L青霉素、链霉素的RPMI 1640培养液中, 37℃, 50 mL/L CO₂培养箱内常规传代培养。

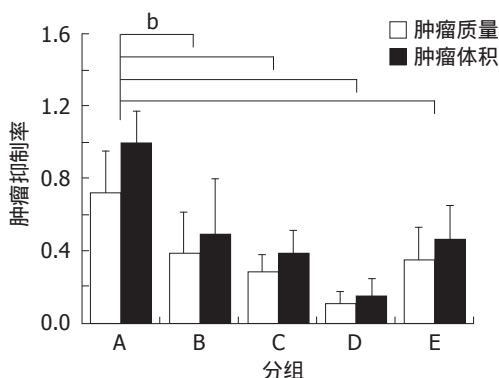
1.2.2 小鼠肠癌模型的制作及分组给药: 参照文献报道的方法^[7], 取对数生长的C26细胞, 以 5×10^6 只数量接种于小鼠腋下. 7-10 d后形成肿瘤, 生长旺盛期的瘤组织剪切成 1 mm^3 左右, 在无菌条件下, 接种于小鼠右侧腋窝皮下, 如此传3代后, 大批接种小鼠腋下, 待瘤体生长约 100 mm^3 随机分为5组, 每组8只, 分别为模型组、Tan II A低、中、高剂量组^[8]和5-FU组. Tan II A低、中、高剂量组分别经尾静脉注射0.5、1、2 mg/(kg·d)的Tan II A, 5-FU组尾静脉注射1 mg/(kg·d)的5-FU, 空白组和模型组每天注射等量的生理盐水, 连续给药1 wk. 给药7 d后, 小鼠摘除眼球取血, 以颈椎脱臼法处死, 剥离剥离体, 剔除结缔组织, 测量肿瘤长、宽及质量后, 以40 g/L甲醛溶液固定, 石蜡包埋, 4 μm 厚连续切片。

1.2.3 抑瘤率的计算: 抑瘤率以模型组和给药组肿瘤体积及瘤体质量的变化进行计算, 肿瘤体积(TV)的计算公式^[9]为: $TV = ab^2/2$, 其中a、b分别表示瘤体的长、宽. 肿瘤体积抑制率 = $(1 - \text{实验组平均瘤体积} / \text{对照组平均瘤体积}) \times 100\%$, 瘤重抑制率 = $(1 - \text{实验组平均瘤质量} / \text{对照组平均瘤质量}) \times 100\%$ 。

1.2.4 HE染色: 取材组织块, 经40 g/L甲醛溶液固定后, 常规石蜡包埋, 取完整的肿瘤蜡块以最大面积4 μm 厚切片, 在100倍光学显微镜下挑

表 1 各组小鼠瘤体质量、体积及各给药组肿瘤抑制率 ($n = 8$, mean \pm SD)

分组	质量(g)	质量抑制率(%)	体积(cm^3)	体积抑制率(%)
模型组	0.73 ± 0.22	-	1.00 ± 0.17	-
Tan A低剂量组	0.40 ± 0.22^b	45.8	0.50 ± 0.30^b	50.5
Tan A中剂量组	0.29 ± 0.09^b	60.3	0.40 ± 0.12^b	60.7
Tan A高剂量组	0.11 ± 0.06^b	84.5	0.16 ± 0.09^b	84.2
5-FU组	0.36 ± 0.17^b	50.3	0.47 ± 0.18^b	53.1

^b $P < 0.01$ vs 模型组.图 1 各给药组小鼠瘤质量及体积抑制率. A: 模型组; B: Tan A低剂量组; C: Tan A中剂量组; D: Tan A高剂量组; E: 5-FU组. ^b $P < 0.01$ vs 模型组.

选坏死面积最高密度区域, 在200倍光镜下随机选择3个高倍视野进行拍照, 在专业图像处理软件Image Pro Plus 6.0的辅助下采用双盲法分别进行切片坏死面积统计. 坏死面积占切片总面积的 $<5\%$ 记0分、 $5\%-25\%$ 记1分、 $25\%-50\%$ 记2分、 $>50\%$ 记3分^[10].

1.2.5 SP免疫组织化学染色: 取存档蜡块制成4 μm 连续切片, 二甲苯脱蜡, 梯度酒精脱水. 将切片依次经内源性过氧化物酶清除、抗原修复、正常血清封闭、抗体结合、DAB染色、蒸馏水洗涤, 再经苏木素衬染, 烟酸酒精分化, 稀氨水蓝化. 递增梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 常规树脂封片. 所用一抗为1:50稀释的山羊抗小鼠CD34 mAb, 二抗为1:200生物素标记二抗, 显色时加入1:200辣根酶标记链霉卵白素, 3种试剂均以磷酸盐缓冲液稀释. MVD的检测方法按Weidner法^[11]进行: (1)CD34阳性以血管内皮细胞呈棕色或棕黄色染色为标准; (2)切片在100倍光镜下挑选微血管分布最高密度区域, 在200倍光镜下计数不重复视野中被CD34染成棕黄色的微血管数, 取其平均值作为MVD. 每个与邻近微血管明显分离的阳性染色的血管内皮细胞或血管内皮细胞簇都视为独立的微血管; 只要结构不

相关报道

20世纪70年代, Folkman教授就提出, 肿瘤生长与血管生成有重要的联系: 一方面, 肿瘤生长需要血管为之提供养料并运走代谢废料. 另一方面, 肿瘤组织内血管密度的增加、肿瘤边缘部位的瘤细胞与血管接触增多, 也进一步促使肿瘤细胞随细胞数量的增多而脱落进入血管的机会增加.

相连, 其分支结构也计作一个血管计数.

1.2.6 酶联免疫吸附试验(ELISA法): 将经眼球静脉丛取出的正常组、模型组及给药组的小鼠全血离心后, 收集血清, 采用小鼠VEGF ELISA检测试剂盒分别测定各组小鼠血清VEGF的表达情况, 具体检测方法参照美国Bio Source公司提供的试剂盒说明书进行. 将检测结果用ELISA标准曲线专用软件作出VEGF浓度的标准曲线, 分别用标准曲线计算出各检测孔中VEGF的浓度.

统计学处理 采用PEMS3.1医学统计软件包对数据进行统计分析, 所得到的计量资料数据以mean \pm SD表示, 多样本均数比较用单因素方差分析, 各组两两比较采用Student-Newman-Keuls检验, 等级资料使用等级资料频数表表示, 数据统计用多个样本比较的秩和检验, 各组两两比较采用Wilcoxon检验, 统计结果以 $P < 0.05$ 为差异有显著性.

2 结果

2.1 Tan A对小鼠肠癌的抑制作用 肠癌皮下移植瘤小鼠造模7 d后, 游标卡尺测量给药前各组小鼠肿瘤体积大小, 各组之间无明显差异. 经尾静脉给予不同浓度的Tan II A后, 各组均有不同程度的抑制作用, Tan II A低、中、高剂量的肿瘤质量抑制率分别为45.8%、60.3%、84.5%, 肿瘤体积抑制率分别为50.5%、60.7%、84.2%, 与模型组比较, 各给药组肿瘤质量及体积均低于模型组(均 $P < 0.01$). 中剂量的Tan II A与同剂量的5-FU瘤质量抑制率分别为60.3%和50.3%, 体积抑制率分别为60.7%和53.1%, 2组相比无统计学意义($P > 0.05$, 表1, 图1-2).

2.2 Tan A对肠癌小鼠肿瘤组织坏死的影响 给药前, 肉眼观察各组荷瘤小鼠肿瘤体积大小无明显差异, 大小约为100 mm^3 . 给药7 d后, 各组肿瘤均有不同程度的增长, 其中以模型组增长最快. 处死小鼠后取出瘤体进行HE染色, 结果显

创新盘点

传统中医药以其独特的理论体系与悠久的临床实践为基础, 结合现代的研究方法与手段在肿瘤治疗中发挥着重要的作用, 特别是对于早期肿瘤的预防有着很好的疗效。本研究将具有活血化瘀、凉血消痛的中药丹参提取物丹参酮 A 作用于小鼠肠癌模型, 观察丹参酮 A 对肠癌血管新生的抑制作用。

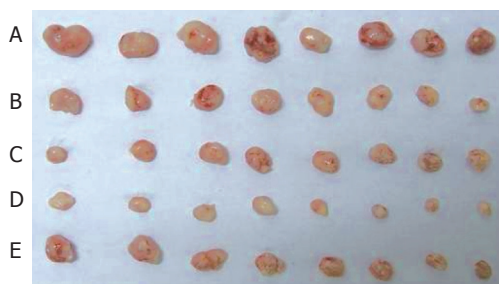


图 2 各组小鼠瘤体大小. A: 模型组; B: Tan A 低剂量组; C: Tan A 中剂量组; D: Tan A 高剂量组; E: 5-FU 组.

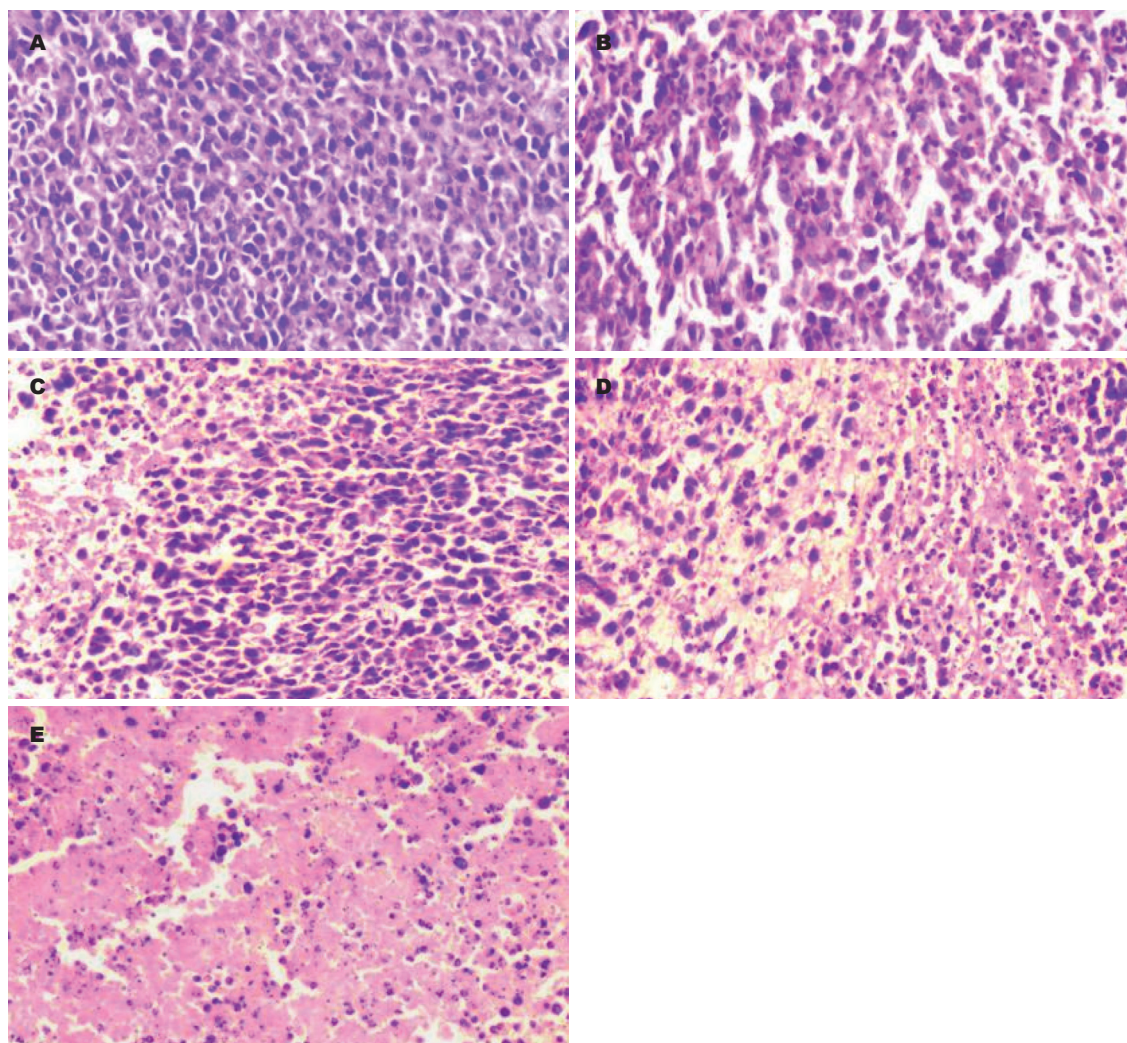


图 3 各给药组小鼠瘤体坏死情况(H&E × 200). A: 模型组; B: 5-FU 组; C: Tan A 低剂量组; D: Tan A 中剂量组; E: Tan A 高剂量组.

示, 模型组以无坏死和轻度坏死为主, Tan II A 各剂量组以中重度坏死为主, 细胞核萎缩、变形及破碎, 细胞排列稀疏, 以胞质着紫色及粉红色为主, 中、高剂量组的肿瘤坏死程度与生理盐水组相比, 具有显著性差异(均 $P < 0.05$); 5-FU 组以轻、中度坏死为主($P > 0.05$), 坏死程度略高于模型组及低剂量 Tan II A 组, 但不及中、高剂量

表 2 各给药组小鼠瘤体坏死情况 ($n = 24$)

分组	各组坏死程度 (n)				
	0分	1分	2分	3分	总分
模型组	13	11	0	0	11
Tan A 低剂量组	7	13	3	1	25
Tan A 中剂量组	2	7	12	3	44 ^a
Tan A 高剂量组	1	2	10	11	55 ^a
5-FU 组	3	9	10	2	35

^a $P < 0.05$ vs 模型组.

Tan II A 组(表2, 图3).

2.3 Tan A 对肠癌小鼠肿瘤微血管形成的影响
免疫组织化学测定给药7 d 的各组肠癌小鼠微血管密度, 结果发现, 模型组肿瘤组织微血管新生最为明显, 200倍光镜视野下满布密集的微血管, MVD 值为 86.5 ± 14.6 . 各给药组也有部分微血管新生, 但微血管密度随药物剂量的加大而减少,

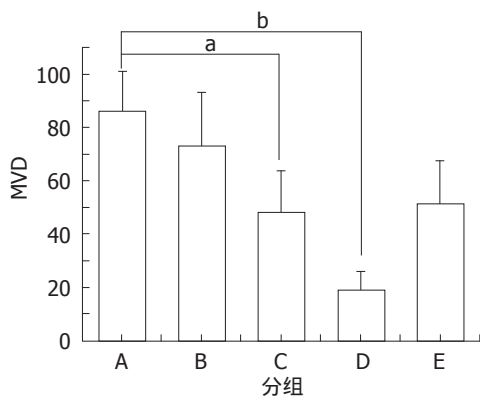


图 4 各组小鼠瘤体MVD. A: 模型组; B: Tan II A低剂量组; C: Tan II A中剂量组; D: Tan II A高剂量组; E: 5-FU组. ^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ vs 模型组.

MVD值以Tan II A高剂量组的 19.4 ± 6.6 最低, 其次为中剂量组的 48.6 ± 15.2 和5-FU组的 51.9 ± 15.8 , 而低剂量组则为 73.5 ± 19.8 . 与模型组比较, Tan II A高剂量组最具统计学意义($P<0.01$), 肿瘤微血管新生抑制作用最明显, Tan II A中剂量组和5-FU组抑制作用不如高剂量组, 但也有统计意义(均 $P<0.05$), 低剂量组则无明显差别(图4-5).

2.4 各组小鼠血清VEGF的表达情况 给药后小鼠眼球取血, ELISA法测得模型组血清VEGF的浓度显著高于空白组(415.4 ± 14.2 ng/L vs 292.0 ± 13.5 ng/L, $P<0.01$), Tan II A各组VEGF的抑制作用随浓度的增加而增强, 低、中、高浓度的抑制率分别为15.8%、34.2%和74.8%, 低、中剂量组作用明显低于高剂量组. 中浓度的Tan II A与同等剂量的5-FU相比, 两者对VEGF的抑制作用无明显的统计学意义(表3, 图6).

3 讨论

肿瘤血管新生(tumor angiogenesis)或血管生成(vascularization)是实体瘤生长非常关键的因素, 不但成为肿瘤生长的基础, 而且构成了肿瘤细胞侵袭转移的首要靶目标, 肿瘤细胞转移及其在转移部位的生长也依赖于肿瘤血管生成. 早在20世纪70年代, Folkman教授就提出, 肿瘤生长与血管生成有重要的联系: 一方面, 肿瘤生长需要血管为之提供养料并运走代谢废料. 没有血管, 肿瘤一般只生长到1-2 mm; 另一方面, 肿瘤组织内血管密度的增加、肿瘤边缘部位的瘤细胞与血管接触增多, 也进一步促使肿瘤细胞随细胞数量的增多而脱落进入血管的机会增加^[12]. 肿瘤血管生成受血管生成因子和血管生成抑制因子的两者有机调控: 一旦血管生成因子上调或血管生成抑制因子功能障碍, 二者平衡被打破

表 3 各组小鼠血清VEGF浓度及药物抑制率

分组	n	VEGF (ng/L)	抑制率(%)
空白组	8	292.0 ± 13.5^b	-
模型组	16	415.4 ± 14.2	-
Tan II A低剂量组	16	395.9 ± 11.9	15.8
Tan II A中剂量组	16	373.2 ± 9.3^a	34.2
Tan II A高剂量组	16	323.1 ± 14.2^b	74.8
5-FU组	16	384.1 ± 20.4	25.6

^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ vs 模型组.

即发生肿瘤血管新生^[13-14]. 肿瘤细胞分泌的血管生成因子能将增强新血管生成和增殖的特殊基因激活和蛋白表达的信号传递到正常组织周围, 从而使血管内皮细胞加速分化, 产生微血管包绕到肿瘤组织周围, 从而促进肿瘤侵袭和转移. 因此, 肿瘤血管生成对肿瘤细胞的转移有直接的和间接的促进作用, 可有效调控血管生成和抑制因子间的动态平衡, 是抗肿瘤血管生成治疗的关键和作用靶点^[15].

近年来肠癌的发病率呈逐年上升趋势, 手术作为治疗大肠癌的重要手段之一是必不可少的, 但是术后5年生存率为50%-60%左右^[16], 扩大手术范围则无法提高患者的受益率. 近20年来, 大肠癌术后防治研究虽然已有长足的发展, 治疗手段不断提高(手术、放疗、化疗、生物反应调节治疗等), 但5年生存率并没有得到明显提高^[17], 其主要原因是由于肿瘤血管新生导致的肿瘤向其他脏器组织侵袭、转移. 因此, 肿瘤形成过程的血管生成、侵袭、转移是肿瘤治疗的最大的障碍, 如何在肿瘤形成过程中抑制肿瘤血管新生, 阻断原发瘤向其他器官的侵袭转移是防治大肠癌的一个重要手段, 也是目前肿瘤综合治疗亟待解决的问题.

Tan II A是从中药丹参中提取的脂溶性有效成分, 具有抗氧化、抗心脑血管疾病、抗菌消炎等药理作用, 近年研究发现Tan II A对肝癌、胃癌、肠癌等肿瘤细胞具有杀伤作用. Tan II A为活血化瘀中药丹参提取的有效活性成分, 体外研究显示Tan II A对多种肿瘤细胞(肝癌、胃癌、结直肠癌、鼻咽癌等)具有抑增殖、促凋亡的作用, 是一种较好的抗肿瘤中药单体, 但Tan II A体内抗肿瘤效应及作用机制研究目前报道不多.

目前对肿瘤新生血管形成研究中最常用的方法是MVD的测定, 大量研究证明, MVD与血

应用要点

本研究提示, Tan II A具有较好的抑制肠癌生长和抗肿瘤血管新生的作用, 随给药剂量的加大抑制作用更明显, 其抗肿瘤作用与下调肿瘤组织VEGF表达有关, 且抑制作用具有剂量依从性. 对于明确中药的抗肿瘤活性有着重要的推动作用.

同行评价
本研究具有较好的科学意义, 方法先进, 具有一定的创新性以及参考价值。

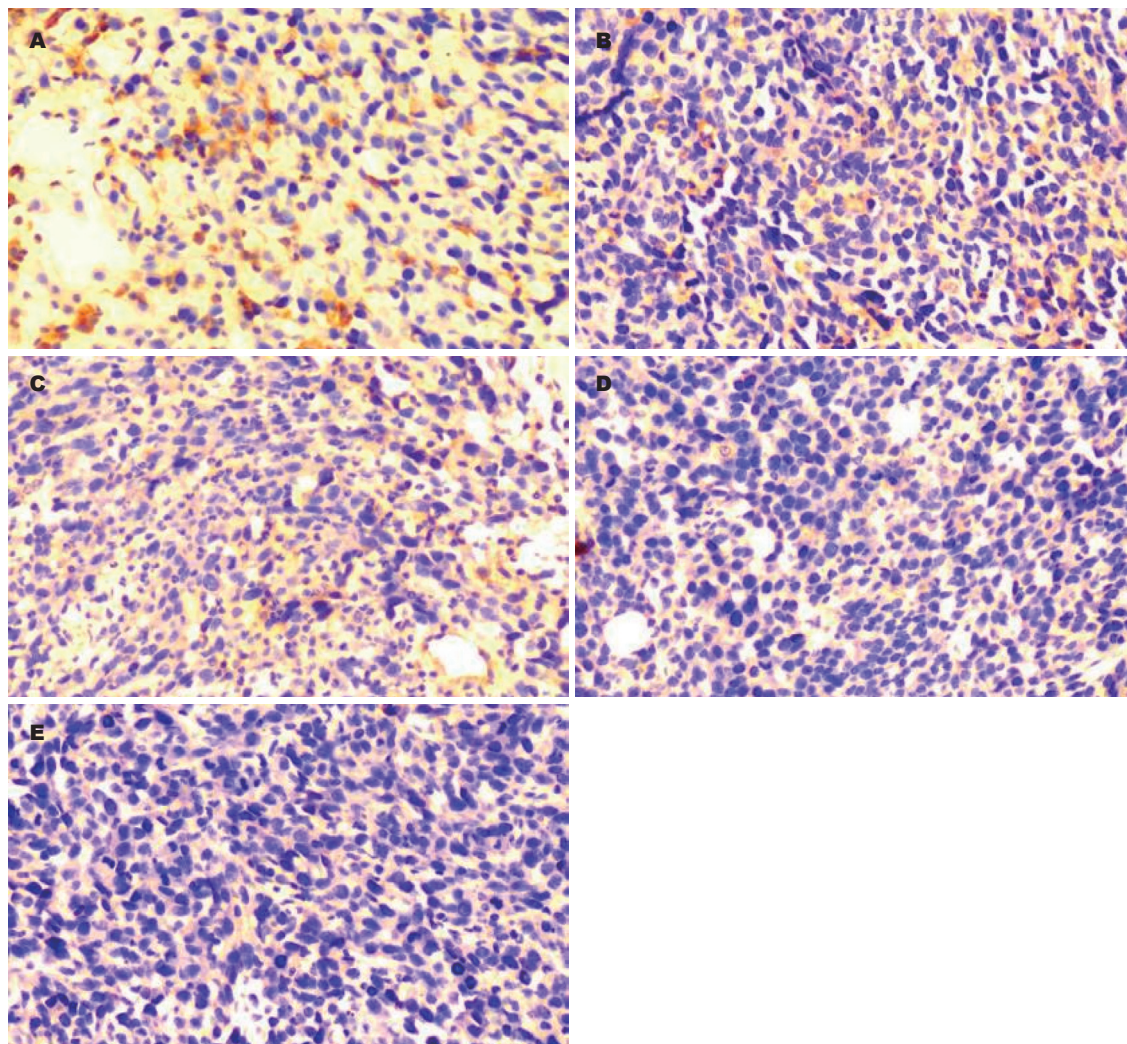


图 5 各组小鼠肠癌微血管生长情况(SP × 200). A: 模型组; B: 5-FU组; C: Tan II A低剂量组; D: Tan II A中剂量组; E: Tan II A高剂量组.

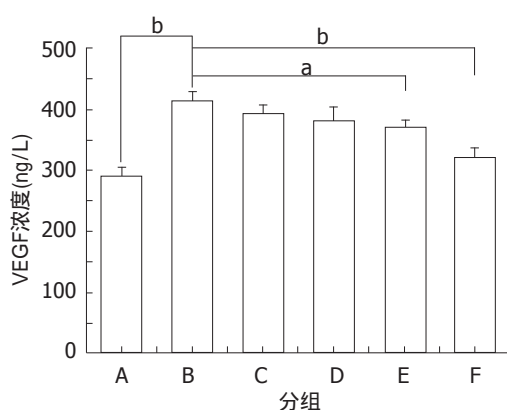


图 6 各组小鼠血清VEGF浓度及药物抑制率. A: 空白组; B: 模型组; C: 5-FU组; D: Tan II A低剂量组; E: Tan II A中剂量组; F: Tan II A高剂量组. ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 模型组.

道转移密切相关^[18-19], 是一种较为可靠的研究方法. MVD被认为是判断肿瘤进展及转移潜力的指标, 是影响患者生存的独立预后因素^[20], 目前评价肿瘤血管形成大多经免疫组织化学微血

管计数来分析肿瘤新生血管^[21], 常用标记物有F82RA、CD34、CD31等. 本研究以CD34为标记对象, 以小鼠C26肠癌细胞接种Bab/c F1代小鼠建立的小鼠肠癌异位移植瘤模型为研究对象, 分别从抑制率、MVD计数和组织坏死情况3个方面考察Tan II A对肠癌小鼠肿瘤的抑制作用及肿瘤血管新生的影响. 结果显示, Tan II A具有较好的抑制肠癌生长和抗肿瘤血管新生的作用, 随给药剂量的加大抑制作用更明显, 其抗肿瘤作用与下调肿瘤组织VEGF表达有关, 且抑制作用具有剂量依从性.

4 参考文献

- 1 蔡三军, 彭俊杰. 大肠癌肝转移的诊治进展. 临床肿瘤学杂志 2006; 11: 881-886
- 2 庄建良, 苏子剑, 潘群雄, 许荣誉, 李明珠. 大肠癌CD24的表达及其与肿瘤细胞增殖和血管形成的关系. 世界华人消化杂志 2007; 15: 260-265
- 3 郑燕彬, 王国红, 洪琛, 梁盈, 李祺福. 丹参酮 A对成人成骨肉瘤MG-63细胞增殖的抑制作用. 厦门大学学报

- (自然科学版) 2006; 45: 1-5
- 4 徐俊丽, 和水祥, 陈静宏, 符寒, 赵刚, 王艳丽, 任牡丹. 丹参酮 A 对肝癌SMMC-7721细胞COX-2表达的影响. 世界华人消化杂志 2006; 14: 1352-1356
- 5 梁勇, 羊裔明, 袁淑兰, 孟文彤, 刘震, 贾永前. 丹参酮 A 诱导早幼粒细胞白血病细胞分化及其分子机制研究. 中华血液杂志 2000; 21: 23-26
- 6 陈坚, 钟良, 钱立平, 蒋蔚茹, 黄剑平, 邱冬妮. 丹参酮 A 磺酸钠对MKN-45胃癌裸鼠移植瘤增殖及血管生成的影响. 世界华人消化杂志 2008; 16: 2507-2511
- 7 程鑫, 曲林涛, 张仕状, 王滨, 潘小杰. 小鼠结肠癌移植瘤模型的建立及其多鼠MRI研究. 中国医学影像技术 2008; 24: 1345-1347
- 8 王炎, 李琦, 冯年平, 范忠泽, 南艺蕾, 鲍文磊, 隋华, 饶娅敏, 刘宁宁, 李先茜. 丹参酮 A 纳米粒治疗小鼠肝癌及其对Cyclin E表达的影响. 上海中医药杂志 2007; 41: 74-77
- 9 Iwanuma Y, Chen FA, Egilmez NK, Takita H, Bankert RB. Antitumor immune response of human peripheral blood lymphocytes coengrafted with tumor into severe combined immunodeficient mice. *Cancer Res* 1997; 57: 2937-2942
- 10 Kato H, Yoshikawa M, Miyazaki T, Nakajima M, Fukai Y, Masuda N, Fukuchi M, Manda R, Tsukada K, Kuwano H. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors (Flt-1 and Flk-1) in esophageal squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* 2002; 22: 3977-3984
- 11 Banerji S, Ni J, Wang SX, Clasper S, Su J, Tammi R, Jones M, Jackson DG. LYVE-1, a new homologue of the CD44 glycoprotein, is a lymph-specific receptor for hyaluronan. *J Cell Biol* 1999; 144: 789-801
- 12 Folkman J. Tumor angiogenesis. *Adv Cancer Res* 1974; 19: 331-358
- 13 Folkman J. Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Clinical applications of research on angiogenesis. *N Engl J Med* 1995; 333: 1757-1763
- 14 Bikfalvi A, Bicknell R. Recent advances in angiogenesis, anti-angiogenesis and vascular targeting. *Trends Pharmacol Sci* 2002; 23: 576-582
- 15 Hedley BD, Winkquist E, Chambers AF. Therapeutic targets for antimetastatic therapy. *Expert Opin Ther Targets* 2004; 8: 527-536
- 16 李玉明, 詹文华, 韩方海, 何裕隆, 彭俊生, 董文广, 汪建平, 蔡世荣, 马晋平, 赵刚. 大肠癌同时性肝转移外科治疗的预后因素分析. 中华普通外科杂志 2005; 20: 625-628
- 17 张燕捷, 房静远. 大肠癌筛查方法与效果评价. 国际消化病杂志 2006; 6: 367-369
- 18 Breiteneder-Geleff S, Matsui K, Soleiman A, Meraner P, Poczewski H, Kalt R, Schaffner G, Kerjaschki D. Podoplanin, novel 43-kd membrane protein of glomerular epithelial cells, is down-regulated in puromycin nephrosis. *Am J Pathol* 1997; 151: 1141-1152
- 19 Mouta Carreira C, Nasser SM, di Tomaso E, Padera TP, Boucher Y, Tomarev SI, Jain RK. LYVE-1 is not restricted to the lymph vessels: expression in normal liver blood sinusoids and down-regulation in human liver cancer and cirrhosis. *Cancer Res* 2001; 61: 8079-8084
- 20 Giatromanolaki A, Koukourakis MI, Stathopoulos GP, Kapsoritakis A, Paspatis G, Kakolyris S, Sivridis E, Georgoulas V, Harris AL, Gatter KC. Angiogenic interactions of vascular endothelial growth factor, of thymidine phosphorylase, and of p53 protein expression in locally advanced gastric cancer. *Oncol Res* 2000; 12: 33-41
- 21 Kato H, Yoshikawa M, Miyazaki T, Nakajima M, Fukai Y, Masuda N, Fukuchi M, Manda R, Tsukada K, Kuwano H. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors (Flt-1 and Flk-1) in esophageal squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* 2002; 22: 3977-3984

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009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. (科学编辑: 李军亮 2009-11-08)

人FUT3基因真核表达载体的构建与表达

岳丽玲, 樊丽, 刘吉成

背景资料
细胞癌变过程中总伴有糖链结构的改变。岩藻糖残基是细胞表面寡糖链中重要基团之一, 可参与构成某些重要黏附分子的糖链结构, 如Lewis抗原决定簇(LeA、LeX、sLeA和sLeX)。sLeX和sLeA作为肿瘤相关抗原在许多恶性肿瘤细胞表面高度表达, 而 α 1, 3-岩藻糖基转移酶(FUT3)是参与合成Lewis抗原的关键酶之一。

岳丽玲, 樊丽, 刘吉成, 齐齐哈尔医学院医药科学研究所 黑龙江省齐齐哈尔市 161006
岳丽玲, 黑龙江中医药大学 黑龙江省哈尔滨市 150040
岳丽玲, 在读博士, 副教授, 主要从事多糖抗肿瘤的研究。
国家自然科学基金资助项目, No. 30772751
黑龙江省青年科学基金资助项目, No. QC08C28
作者贡献分布: 本课题由岳丽玲与樊丽设计; 研究过程由岳丽玲与樊丽操作, 刘吉成指导完成; 本论文写作由岳丽玲完成。
通讯作者: 刘吉成, 教授, 博士生导师, 161006, 黑龙江省齐齐哈尔市, 齐齐哈尔医学院医药科学研究所. qyybliu@126.com
电话: 0452-2663103
收稿日期: 2009-09-02 修回日期: 2009-11-02
接受日期: 2009-11-02 在线出版日期: 2009-11-08

Construction of human FUT3 eukaryotic expression vector and its expression in human breast adenocarcinoma cells

Li-Ling Yue, Li Fan, Ji-Cheng Liu

Li-Ling Yue, Li Fan, Ji-Cheng Liu, Medicine and Drug Research Institute, Qiqihar Medical University, Qiqihar 161006, Heilongjiang Province, China
Li-Ling Yue, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, Heilongjiang Province, China
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30772751; and the Youth Science Foundation of Heilongjiang Province, No. QC08C28
Correspondence to: Professor Ji-Cheng Liu, Medicine and Drug Research Institute, Qiqihar Medical University, Qiqihar 161006, Heilongjiang Province, China. qyybliu@126.com
Received: 2009-09-02 Revised: 2009-11-02
Accepted: 2009-11-02 Published online: 2009-11-08

Abstract

AIM: To construct the human FUT3 (α 1, 3-fucosyltransferase) eukaryotic expression vector and analyze its expression in human breast adenocarcinoma MDA-MB-231 cells.

METHODS: The full-length FUT3 cDNA was obtained by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and cloned into pMD18-T simple vector for sequence analysis. Then the FUT3 gene was subcloned into pEGFP-C1 plasmid. The resulting recombinant vector pEGFP-C1-FUT3 was identified by digestion with restriction endonucleases and transfected into MDA-MB-231 cells. A stably transfected cell line was established using G418 selection. The expression of FUT3 was

observed under a fluorescence microscope and examined by semi-quantitative RT-PCR.

RESULTS: The full-length human FUT3 cDNA was successfully obtained, and the recombinant plasmid pEGFP-C1-FUT3 was successfully constructed. After transfection into MDA-MB-231 cells, green fluorescence (green fluorescent protein) was observed. Semi-quantitative RT-PCR analysis showed that FUT3 was highly expressed in MDA-MB-231 cells.

CONCLUSION: The FUT3 eukaryotic expression vector pEGFP-C1-FUT3 that can express FUT3 in MDA-MB-231 cells is constructed successfully and can be used to study the biological functions of the FUT3 gene.

Key Words: α 1, 3-fucosyltransferase III; Enhanced green fluorescent protein; Gene cloning

Yue LL, Fan L, Liu JC. Construction of human FUT3 eukaryotic expression vector and its expression in human breast adenocarcinoma cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(31): 3210-3213

摘要

目的: 构建增强型绿色荧光蛋白为报告基因的pEGFP-C1-FUT3真核表达载体, 分析其在细胞系MDA-MB-231中的表达。

方法: 采用RT-PCR扩增FUT3全长基因片段, 克隆至pMD18-T载体进行测序分析, 将FUT3亚克隆至pEGFP-C1表达载体并酶切鉴定。利用脂质体将重组真核表达载体pEGFP-C1-FUT3转染入人乳腺癌细胞MDA-MB-231中, 经G418筛选获得稳定转染的细胞系, 荧光显微镜观察及RT-PCR检测FUT3的表达。

结果: 成功获得人全长FUT3基因并构建了真核表达载体pEGFP-C1-FUT3, 体外转染MDA-MB-231细胞后荧光显微镜下可见绿色荧光蛋白的表达, 半定量RT-PCR检出高水平表达的FUT3。

结论: 成功构建了增强型绿色荧光蛋白为

同行评议者
李增山, 副教授, 中国人民解放军第四军医大学病理教研室

报告基因的FUT3真核表达载体,并在MDA-MB-231中稳定表达,为进一步研究FUT3的生物学功能提供基础。

关键词: α 1, 3-岩藻糖基转移酶; 增强型绿色荧光蛋白; 基因克隆

岳丽玲, 樊丽, 刘吉成. 人FUT3基因真核表达载体的构建与表达. 世界华人消化杂志 2009; 17(31): 3210-3213
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3210.asp>

0 引言

肿瘤复发转移是癌症患者死亡的主要原因,异常糖基化是恶性肿瘤转移的重要机制之一. Lewis寡糖抗原是细胞表面糖复合物(糖蛋白、糖脂和蛋白聚糖)中的糖链成分,已经发现其在多种肿瘤中的合成异常增加,与肿瘤增殖、浸润、转移、临床分期及预后密切相关^[1]. 岩藻糖基转移酶(fucosyltransferase, FUT)是参与合成Lewis寡糖抗原的关键酶,催化GDP-Fuc的Fuc转移至糖链中N-乙酰氨基乳糖残基的N-乙酰氨基葡萄糖上,并以 α 1, 2-、 α 1, 3/4和 α 1, 6岩藻糖苷键相连接^[2]. α FUT共有9个亚型,其中只有 α FUT3可以形成 α 1, 3以及 α 1, 4两类键,故又称为 α 1, 3/1, 4 FUT3,既可合成LeX、LeY及sLeX,又可合成LeA、LeB及sLeA^[3]. 本研究成功地构建人FUT3基因真核表达载体pEGFP-C1-FUT3,并体外转染人乳腺癌细胞系MDA-MB-231,为进一步研究FUT3及其产物Lewis抗原的表达调控提供实验基础。

1 材料和方法

1.1 材料 人乳腺癌细胞株MDA-MB-231购自上海中科院细胞库;大肠杆菌DH5 α 感受态细胞由本室保存;脂质体(lipofectamineTM 2000)及TRIzol为Invitrogen公司产品; pEGFP-C1质粒购自Biosciences Clontech公司;胎牛血清、Leibovitz's L-15培养基购自Gibco公司;血液总RNA提取试剂盒、质粒小量及中量提取试剂盒、凝胶回收试剂盒购自Omega公司;限制性内切酶EcoR I、Xho I、T4 DNA连接酶、pMD18-T Simple、RT-PCR试剂盒为TaKaRa公司产品,引物由上海生工生物工程技术有限公司合成. 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 目的基因FUT3的RT-PCR扩增: 参照GenBank FUT3基因ORF序列通过Primer 5.0软件设计特异性引物: 上游5'-ccgctcgagTTCGCAA

CCCATACAGTGAA-3', 下游5'-ccggaattcCAGGCAGATGAGGTTCCCC-3', 分别在5'端加上Xho I和EcoR I的酶切位点. 采用Omega血液总RNA提取试剂盒提取健康男性外周血总RNA. 以总RNA为模板,使用TaKaRa cDNA Kit进行逆转录反应,获得cDNA. PCR扩增FUT3基因,反应体系按说明书,反应条件为: 95℃预变性5 min, 95℃变性50 s, 62.8℃退火1 min, 72℃延伸1.5 min, 35个循环;最后72℃延伸10 min,扩增片段长度为1172 bp. PCR扩增产物用1.0%琼脂糖凝胶电泳进行鉴定。

1.2.2 T载体克隆和测序: DNA凝胶回收试剂盒回收纯化PCR产物,将目的片段与pMD18-T载体16℃过夜连接. 取连接产物转化DH5 α 感受态大肠杆菌,蓝白斑筛选挑取阳性克隆送交Invitrogen公司测序鉴定。

1.2.3 pEGFP-C1-FUT3真核表达载体的构建: 用Xho I、EcoR I分别双酶切重组pMD18-T-FUT3质粒及pEGFP-C1空载体,凝胶电泳回收并纯化目的基因片段,用T4 DNA连接酶连接,过夜. 次日,连接产物转化DH5 α 感受态大肠杆菌, Omega小提质粒试剂盒抽提质粒DNA,内切酶Xho I和EcoR I双酶切鉴定。

1.2.4 真核表达载体pEGFP-C1-FUT3转染人乳腺癌细胞MDA-MB-231: 转染前24 h将处于对数生长长期的人乳腺癌细胞MDA-MB-231用胰酶消化,按4 \times 10⁵个细胞/孔的浓度接种于6孔板内,37℃培养至细胞密度为80%-90%时换无血清无双抗Leibovitz's L-15培养基,用脂质体lipofectamineTM 2000分别介导空质粒及重组质粒转染MDA-MB-231细胞,按试剂说明书进行操作. 转染24 h后,换用含有G418(800 mg/L)的L-15培养液进行筛选,2 wk后G418改为400 mg/L维持剂量筛选. 分离出抗G418的阳性克隆,然后再扩大培养,得到稳定传代的细胞克隆,荧光显微镜下观察增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)的表达情况。

1.2.5 RT-PCR鉴定FUT3基因在MDA-MB-231细胞中的稳定表达: 收集稳定转染FUT3基因的乳腺癌MDA-MB-231细胞,用TRIzol提取细胞总RNA,进行逆转录. 以 β -actin为内参照,半定量PCR鉴定FUT3基因. FUT3引物序列为: 上游5'-GAAGCTGTGGAGGAACGC-3', 下游5'-TGAACCAAGCCGCTATGC3-3', 扩增片段为308 bp; β -actin引物序列为: 上游5'-GTGGACATCCGCAAAGAC-3', 下游5'-GAAAGGGTGTA

创新盘点
本研究首次克隆人FUT3的基因,并且转染至MDA-MB-231细胞中获得稳定表达的细胞株。

应用要点

本文成功地构建人FUT3基因真核表达载体pEGFP-C1-FUT3, 并体外转染人乳腺癌细胞系MDA-MB-231, 为深入研究FUT3对糖抗原合成的调控及FUT3对肿瘤细胞行为学的影响提供了理想的载体。

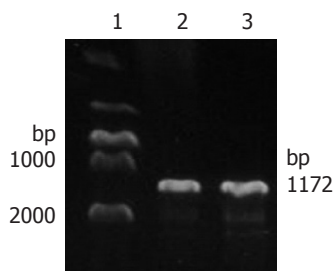


图1 FUT3基因PCR产物的琼脂糖电泳。1: DL-2000 DNA Marker; 2-3: FUT3 PCR产物。

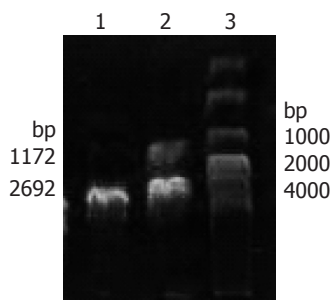


图2 pMD18-T-FUT3质粒酶切后琼脂糖凝胶电泳图。1: pMD18-T-FUT3; 2: pMD18-T-FUT3/*Xho*I + *Eco*R I; 3: DL-10000 DNA Marker。

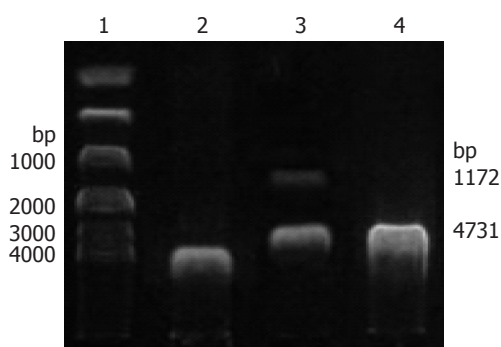


图3 重组质粒pEGFP-C1-FUT3双酶切鉴定。1: DL10 000 DNA Marker; 2: pEGFP-C1-FUT3; 3: pEGFP-C1-FUT3/*Xho*I + *Eco*R I; 4: pEGFP-C1。

CGCAACT-3', 扩增片段为303 bp。1.5%琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物。

2 结果

2.1 FUT3目的基因的PCR扩增 以人外周血白细胞提取的RNA为模板, 逆转录合成cDNA, PCR扩增产物经1.0%琼脂糖凝胶电泳可见1172 bp处有明显的扩增条带, 与预期结果一致(图1)。

2.2 T载体克隆的鉴定 目的基因与T载体连接后, pMD18-T-FUT3重组体经*Xho*I与*Eco*R I双酶切后产生2692 bp的pMD18-T载体片段和1172 bp的FUT3基因片段2个条带, 表明pMD18-T-FUT3质粒构建成功(图2)。菌液测序结果显示: 插入T载体的序列与GenBank中登录的人FUT3基因编码区(CDS)报道序列完全一致。

2.3 真核表达载体pEGFP-C1-FUT3的酶切鉴定 重组质粒pEGFP-C1-FUT3经限制性内切酶*Xho*I和*Eco*R I双酶切后, 经琼脂糖凝胶电泳

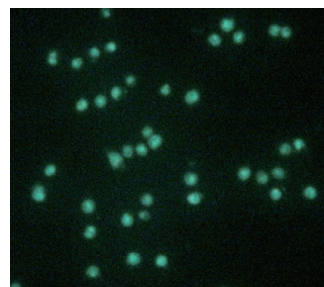


图4 荧光显微镜观察转染pEGFP-C1-FUT3的MDA-MB-231细胞($\times 200$)。

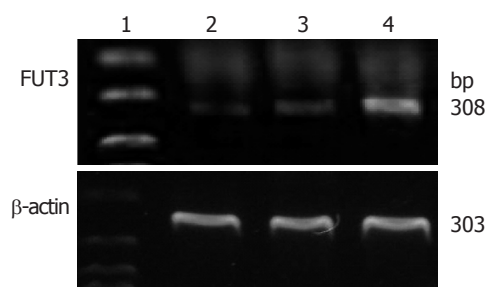


图5 各转染组细胞FUT3基因的mRNA水平。1: DL 2000 DNA Marker; 2: 未转染细胞组; 3: 转染pEGFP-C1空载体组; 4: 转染pEGFP-C1-FUT3组。

显示在4731 bp和1172 bp处有2个片段, 分别与pEGFP-C1载体以及FUT3目的基因大小一致, 证明FUT3已经成功构建到pEGFP-C1载体中(图3)。

2.4 荧光显微镜检测 FUT3在MDA-MB-231细胞中的表达 利用脂质体转染技术, 将重组质粒pEGFP-C1-FUT3与空载体质粒pEGFP-C1转染入MDA-MB-231细胞中, 倒置荧光显微镜下观察到转染pEGFP-C1-FUT3细胞内有较强的绿色荧光, EGFP-FUT3融合蛋白主要定位在细胞质(图4)。

2.4 目的基因FUT3在MDA-MB-231细胞中的mRNA表达 308 bp处有目的基因表达, 转染pEGFP-C1-FUT3组的细胞FUT3基因表达与未转染组及转空载体组相比, 表达量有明显增高, 而未转染组与转空载体组细胞FUT3表达量均较低(图5)。

3 讨论

细胞癌变过程中总伴有糖链结构的改变, 黏附、迁移及侵袭等重要的细胞学行为都与特定的糖链的结构或糖基有关^[3]。岩藻糖残基是细胞表面寡糖链中的重要基团之一, 可参与构成某些重要黏附分子的糖链结构, 如Lewis抗原决定簇(LeA、LeX、sLeA及sLeX)的构成^[4]。许多恶性肿瘤细胞表面有LeX及其相关结构的高度表达, sLeX与sLeA在某些类型的肿瘤中作为肿瘤标志物, 与患者生存率直接相关并可作为转移性疾病的预后指标^[5-7]。LeX结构的表达取决于 $\alpha 1, 3/4$ FUT, 是LeX抗原合成中的最后一步。该

基因编码6种 $\alpha 1, 3/4$ FUTs家族成员(FUT3-7与FUT9)^[8-9]. FUT3(Lewis血型)主要分布在肾、胆囊、乳汁中^[10], 是唯一可形成 $\alpha 1, 3$ 与 $\alpha 1, 4$ 两类键的FUT, 既能合成带 $\alpha 1, 3$ -Fuc的LeX、LeY、sLeX, 又能唯一合成带 $\alpha 1, 4$ -Fuc的LeA、LeB及sLeA. 研究表明^[11-13], FUT3基因与FUT6基因与某些肿瘤的sLeX合成相关. Kazuhiro *et al*^[14]测得在15株上皮细胞癌细胞系中有14株表达sLeX结构, 8株表达sLeA, 其中14株细胞系中能检测到FUT3的mRNA, 与sLeX在细胞表面的表达相一致. Kimura *et al*^[15]利用免疫组织化学染色检测正常结肠组织中FUT3表达很少, 而在结肠肿瘤组织中, FUT3呈现大量增强的表达, 呈分散、随机分布. 因此, 建立一个具有生物学功能的FUT3蛋白表达系统, 对深入研究FUT3的生物学功能及分子机制有着十分重要的作用.

为了明确在肿瘤转移过程中FUT3基因调控机制, 本实验克隆了FUT3基因的全序列, 并成功地构建了以EGFP为报告基因的真核表达质粒pEGFP-C1-FUT3, 通过脂质体2000成功地稳定转染靶细胞MDA-MB-231, 荧光检测及RT-PCR证实FUT3在MDA-MB-231细胞中有效表达. 表达载体的构建是在细菌质粒上引入一个真核启动子, 在启动子的下游插入目的蛋白的编码基因, 由于质粒上不仅有大肠杆菌的复制起点, 而且有真核启动子, 所以表达载体既可在大肠杆菌中复制又在真核细胞中表达. 同时pEGFP-C1表达载体中含有EGFP, 该基因与目的基因连接形成融合蛋白, 可以进行细胞水平上的快速筛选、检测该载体的转染和表达效率, 而不影响目的基因的表达.

总之, 本研究成功构建了EGFP为报告基因的真核表达载体pEGFP-C1-FUT3, 为深入研究FUT3对糖抗原合成的调控及FUT3对肿瘤细胞行为学的影响提供了理想的载体, 同时为下一步的重组质粒实验奠定了基础.

4 参考文献

- Brooks SA, Leatham AJ. Expression of the CD15 antigen (Lewis x) in breast cancer. *Histochem J* 1995; 27: 689-693
- Prorok-Hamon M, Notel F, Mathieu S, Langlet C, Fukuda M, El-Battari A. N-glycans of core2 beta(1,6)-N-acetylglucosaminyltransferase-I (C2GnT-I) but not those of alpha(1,3)-fucosyltransferase-VII (FucT-VII) are required for the synthesis of functional P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1): effects on P-, L- and E-selectin binding. *Biochem J* 2005; 391: 491-502
- Ito H, Hiraiwa N, Sawada-Kasugai M, Akamatsu S,

- Tachikawa T, Kasai Y, Akiyama S, Ito K, Takagi H, Kannagi R. Altered mRNA expression of specific molecular species of fucosyl- and sialyl-transferases in human colorectal cancer tissues. *Int J Cancer* 1997; 71: 556-564
- Raes G, Ghassabeh GH, Brys L, Mpofu N, Verschueren H, Vanhecke D, De Baetselier P. The metastatic T-cell hybridoma antigen/P-selectin glycoprotein ligand 1 is required for hematogenous metastasis of lymphomas. *Int J Cancer* 2007; 121: 2646-2652
- Kimura H, Shinya N, Nishihara S, Kaneko M, Irimura T, Narimatsu H. Distinct substrate specificities of five human alpha-1,3-fucosyltransferases for in vivo synthesis of the sialyl Lewis x and Lewis x epitopes. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 237: 131-137
- Magnani JL. The discovery, biology, and drug development of sialyl Lea and sialyl Lex. *Arch Biochem Biophys* 2004; 426: 122-131
- Miyoshi E, Moriwaki K, Nakagawa T. Biological function of fucosylation in cancer biology. *J Biochem* 2008; 143: 725-729
- Kudo T, Fujii T, Ikegami S, Inokuchi K, Takayama Y, Ikehara Y, Nishihara S, Togayachi A, Takahashi S, Tachibana K, Yuasa S, Narimatsu H. Mice lacking alpha1,3-fucosyltransferase IX demonstrate disappearance of Lewis x structure in brain and increased anxiety-like behaviors. *Glycobiology* 2007; 17: 1-9
- Escrevente C, Machado E, Brito C, Reis CA, Stoeck A, Runz S, Marme A, Altevogt P, Costa J. Different expression levels of alpha3/4 fucosyltransferases and Lewis determinants in ovarian carcinoma tissues and cell lines. *Int J Oncol* 2006; 29: 557-566
- Narimatsu H. [Human fucosyltransferases: tissue distribution of blood group antigens, cancer-associated antigens and fucosyltransferases] *Tanpakushitsu Kakusan Koso* 1998; 43: 2394-2403
- Togayachi A, Kudo T, Ikehara Y, Iwasaki H, Nishihara S, Andoh T, Higashiyama M, Kodama K, Nakamori S, Narimatsu H. Up-regulation of Lewis enzyme (Fuc-TIII) and plasma-type alpha1,3fucosyltransferase (Fuc-TVI) expression determines the augmented expression of sialyl Lewis x antigen in non-small cell lung cancer. *Int J Cancer* 1999; 83: 70-79
- Johnson PH, Donald AS, Clarke JL, Watkins WM. Purification, properties and possible gene assignment of an alpha 1,3-fucosyltransferase expressed in human liver. *Glycoconj J* 1995; 12: 879-893
- Malagolini N, Santini D, Chiricolo M, Dall'Olio F. Biosynthesis and expression of the Sda and sialyl Lewis x antigens in normal and cancer colon. *Glycobiology* 2007; 17: 688-697
- Yago K, Zenita K, Ginya H, Sawada M, Ohmori K, Okuma M, Kannagi R, Lowe JB. Expression of alpha-(1,3)-fucosyltransferases which synthesize sialyl Le(x) and sialyl Le(a), the carbohydrate ligands for E- and P-selectins, in human malignant cell lines. *Cancer Res* 1993; 53: 5559-5565
- Kimura H, Kudo T, Nishihara S, Iwasaki H, Shinya N, Watanabe R, Honda H, Takemura F, Narimatsu H. Murine monoclonal antibody recognizing human alpha(1,3/1,4)fucosyltransferase. *Glycoconj J* 1995; 12: 802-812

同行评价
本研究构建了FUT3的绿色荧光表达载体, 为阐释其在肿瘤中的生物学作用奠定了基础, 有一定的参考意义.

HPV16与新疆维吾尔族食管鳞癌的相关性

周素明, 伊力亚尔·夏合丁, 杨 婷, 张力为, 阿仙姑·哈斯木, 卢晓梅, 买地尼也提·尼亚孜, 刘 涛

背景资料
最早在1982年由 Syrijanen提出, 食管鳞癌有HPV感染。20多年来, 有关HPV与食管鳞癌的报道颇多, 其感染率在不同的国家、地区及同一地区差异极大。

周素明, 伊力亚尔·夏合丁, 张力为, 卢晓梅, 买地尼也提·尼亚孜, 新疆医科大学第一附属医院胸外科 新疆维吾尔自治区食管癌研究所 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830054
杨婷, 刘涛, 新疆医科大学第一临床医学院医学研究中心 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830054
阿仙姑·哈斯木, 新疆医科大学基础医学院 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市830054
国家自然科学基金资助项目, No. 30960383
周素明, 新疆医科大学在读硕士研究生, 主要从事食管癌的基础与临床研究。
作者贡献分布: 此课题的设计与论文写作由周素明和伊力亚尔·夏合丁完成; 研究过程由周素明、杨婷、卢晓梅、买地尼也提·尼亚孜及刘涛操作完成; 数据分析由周素明、张力为、阿仙姑·哈斯木及伊力亚尔·夏合丁完成。
通讯作者: 伊力亚尔·夏合丁, 教授, 主任医师, 博士生导师, 830054, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市鲤鱼山路1号, 新疆医科大学第一附属医院胸外科, 新疆维吾尔自治区食管癌研究所。
ilyarsha@hotmail.com
电话: 0991-4366286 传真: 0991-4327997
收稿日期: 2009-09-12 修回日期: 2009-10-31
接受日期: 2009-11-02 在线出版日期: 2009-11-08

Relationship between human papillomavirus 16 and esophageal squamous cell carcinoma in Uygur population in Xinjiang Uygur Autonomous Region

Su-Ming Zhou, Ilyar Sheyhidin, Ting Yang, Li-Wei Zhang, Ayxiam Hasim, Xiao-Mei Lu, Medinyet Niyaz, Tao Liu

Su-Ming Zhou, Ilyar Sheyhidin, Li-Wei Zhang, Xiao-Mei Lu, Medinyet Niyaz, Department of Thoracic Surgery, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Esophageal Cancer Research Institute of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumuqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China
Ting Yang, Liu Tao, Medical Research Center, the First Teaching Hospital of Xinjiang Medical University, Urumuqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China
Ayxiam Hasim, Preclinical Medical College, Xinjiang Medical University, Urumuqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30960383
Correspondence to: Professor Ilyar, Department of Thoracic Surgery, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Esophageal Cancer Research Institute of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumuqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China. ilyarsha@xj.cninfo.net
Received: 2009-09-12 Revised: 2009-10-31
Accepted: 2009-11-02 Published online: 2009-11-08

Abstract

AIM: To investigate the infection rate of

human papillomavirus 16 (HPV16) in Uygur patients with esophageal squamous cell carcinoma in Xinjiang.

METHODS: Eighty-two paraffin-embedded specimens of esophageal carcinoma and 80 tumor-adjacent specimens were used in the study. The presence of HPV16 in these specimens was detected by high-sensitivity polymerase chain reaction (PCR) using the type-specific E6 primers.

RESULTS: The infection rates of HPV16 in esophageal squamous cell carcinoma and tumor-adjacent tissue were 31.7% (26/82) and 12.5% (10/80), respectively, showing significant difference between the two groups. HPV16 infection was not correlated with patient's age and sex as well as pathological differentiation and clinical stage of the carcinoma ($\chi^2 = 0.301, 0.149, 2.876$ and 0.105 , respectively; all $P > 0.05$).

CONCLUSION: HPV 16 infection is possibly correlated with esophageal squamous cell carcinoma in Uygur population in Xinjiang but showed no correlation with patient's age and sex as well as pathological differentiation and clinical stage of the carcinoma.

Key Words: Human papillomavirus 16; Esophageal squamous cell carcinoma; Polymerase chain reaction

Zhou SM, Ilyar SH, Yang T, Zhang LW, Ayxiam H, Lu XM, Medinyet N, Liu T. Relationship between humanpapilloma virus 16 and esophageal squamous cell carcinoma in Uygur population in Xinjiang Uygur Autonomous Region. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(31): 3214-3217

摘要

目的: 调查新疆维吾尔族食管鳞癌患者中人乳头瘤状病毒(HPV)16型的感染率。

方法: 采用PCR技术检测82例新疆维吾尔族食管鳞癌和80例癌旁正常食管黏膜石蜡包埋组织HPV16的感染率, 分析其与新疆维吾尔族食管鳞癌发生的关联性。

同行评议者
陈洪, 副教授, 东南大学附属中大医院消化科; 唐世刚, 教授, 大连大学附属中山医院消化内科

结果: 在新疆维吾尔族食管鳞癌组织中, HPV16型检出率为31.7%(26/82), 与对照组12.5%(10/80)相比, 差异有统计学意义($\chi^2=8.643$, $P<0.05$); 按照年龄、性别、病理分化程度及临床分期对维吾尔族食管鳞癌中的HPV16感染状况比较, 差异均无统计学意义($\chi^2=0.301$ 、0.149、2.876、0.105, 均 $P>0.05$).

结论: HPV16型感染与新疆维吾尔族食管鳞癌的发生存在一定的相关性, 但与患者的年龄、性别、病理分化程度及临床分期无明显的关联性.

关键词: 人乳头瘤状病毒16型; 食管鳞癌; 聚合酶链式反应

周素明, 伊力亚尔·夏合丁, 杨婷, 张力为, 阿仙姑·哈斯木, 卢晓梅, 买地尼也提·尼亚孜, 刘涛. HPV16与新疆维吾尔族食管鳞癌的相关性. 世界华人消化杂志 2009; 17(31): 3214-3217
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3214.asp>

0 引言

人类乳头状瘤病毒(human papilloma virus, HPV)是一种DNA肿瘤病毒, 与多种肿瘤发生有关, 且其致癌性已在宫颈癌中得到证实. 高危型HPV(16型)有2种可转化基因产物E6、E7蛋白, 他们可干扰抑癌基因如p53、Rb使其失去正常功能. 近年来, 随着HPV与人类恶性肿瘤的关系的深入研究, 有关HPV与食管癌的研究也有大量的报道. Lu *et al*^[1]通过INNO-LiPA HPV基因分型技术检测67例新疆哈萨克族食管癌患者中的HPV, 检出率为30%. 最近刘红彦 *et al*^[2]提出HPV可能是宫颈癌与食管癌2种肿瘤的共同致病因素. 拉莱·苏祖克 *et al*^[3]研究发现维吾尔族妇女子宫颈癌HPV感染率高达94%. 由于食管与宫颈有相似的鳞状上皮, 且HPV易侵袭人类皮肤黏膜, 我们推测HPV感染与新疆维吾尔族食管癌发生可能有关系. 因此, 本研究采用聚合酶链反应(PCR)技术对新疆维吾尔族食管鳞癌和癌旁正常食管黏膜标本中的HPV16型感染状况进行检测和分析, 初步探讨HPV16感染与维吾尔族食管鳞癌发生的相关性, 为本地区维吾尔族食管癌积累流行病学资料及干预治疗提供生物学依据.

1 材料和方法

1.1 材料 收集新疆医科大学第一附属医院胸外科手术切除的维吾尔族食管癌标本82例, 并取同组远离癌灶近端手术切缘标本80例(其中非典型

增生上皮18例, 正常食管黏膜62例). 82例食管癌标本经病理诊断均为鳞癌(其中高分化鳞癌30例, 中分化鳞癌42例, 低分化鳞癌10例). 82例食管癌患者, 男56例, 女26例, 平均年龄为 57 ± 9 岁, 所有患者术前均未做过任何放疗和化疗.

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取: 用德国Qiagen公司石蜡块组织DNA提取试剂盒抽提患者不同部位组织标本中DNA.

1.2.2 引物的合成: 引物由TaKaRa Biotechnology公司(Dalian)合成. 通过复习文献[4]选择引物, 引物序列和扩增目的基因片段长度, 见表1.

1.2.3 PCR检测HPV16 E6: 所有标本处理完毕、进行HPV PCR 方法检测之前, 先行 β -actin PCR作为内对照, 检测DNA的质和量. 剔除 β -actin PCR阴性或弱阳性标本. 对质和量符合要求的标本, 行HPV16 E6 PCR检测. PCR反应体系为: $10\times$ PCR缓冲液2.5 μ L, 0.2 μ mol/L的引物(HPV16 E6 For、HPV16 E6 Rev, 200 μ mol/L)的各种dNTP和0.5 U Taq DNA 聚合酶, 加双蒸水至20 μ L. 反应条件: 95 $^{\circ}$ C预变性4 min, 94 $^{\circ}$ C变性45 s, 52.4 $^{\circ}$ C复性45 s, 72 $^{\circ}$ C延伸45 s, 共35个循环, 然后72 $^{\circ}$ C再延伸7 min. 阳性对照为SiHa细胞DNA(新疆医科大学基础医学院实验室赠)(为HPV-16阳性), 阴性对照选择PCR扩增未见特异目的片段的正常食管样本, 空白对照以水为模板. 取10 μ L PCR扩增产物经2%琼脂糖凝胶电泳(电压120 V), 30 min后在紫外线凝胶成像仪下观察结果并拍照.

1.2.4 测序: PCR产物由上海生物制品有限公司纯化并测序.

统计学处理 采用SPSS16.0统计软件, χ^2 检验进行统计学处理.

2 结果

2.1 新疆维吾尔族食管鳞癌和正常食管黏膜组织中的HPV16型 新疆维吾尔族食管鳞癌组织中HPV16检出率与对照组相比, 差异有统计学意义($\chi^2=8.643$; $P<0.05$, 图1-2, 表2).

2.2 患者临床病例特征与HPV16感染的相关性 按照年龄、性别、病理分化程度、TNM分期对新疆维吾尔族食管鳞癌中的HPV16感染状况进行比较分析, 结果见表3, 差异均无统计学意义($\chi^2=0.301$, 0.149, 2.876, 0.105; 均 $P>0.05$).

2.3 HPV16 E6-PCR扩增产物抽样测序结果 与GenBank注册的标准序列(序列号: AF534061)比对, 同源率达98%(图3).

创新盘点
本研究采用敏感性较好的聚合酶链反应(PCR)技术首次对新疆维吾尔族食管鳞癌和癌旁正常食管黏膜标本中的HPV16型感染状况进行检测和分析, 初步探讨了HPV16感染与维吾尔族食管鳞癌发生的相关性.

应用要点

本研究首次为新疆地区维吾尔族食管癌积累流行病学资料及干预治疗提供生物学依据,可能对本地区开展高危型HPV感染的预防及降低新疆地区维吾尔族食管癌发病率有重要的指导意义。

表 1 目的基因HPV16E6及内参基因 β -actin的引物序列

引物名称	引物序列	产物长度(bp)
HPV16E6		
For	TCA AAA GCC ACT GTG TCC TG	120
Rev	CGT GTT CTT GAT GAT CTG CA	120
β -actin		
For	TCA CCC ACA CTG TGC CCA TCT	106
Rev	GTG AGG ATC TTC ATG AGG TAG TCA GTC	106

表 2 病例组与对照组HPV16型感染率 $n(\%)$

分组	n	HPV+	HPV-	χ^2 值	P 值
食管鳞癌	82	26(31.7)	56(68.3)	8.643	0.003
正常食管黏膜	80	10(12.5)	70(87.5)		

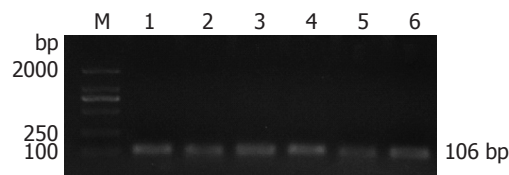
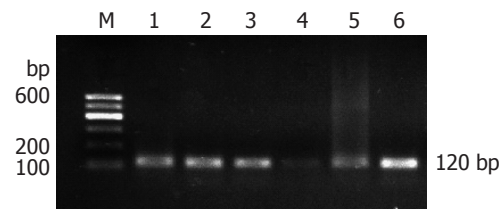
图 1 β -actin PCR扩增电泳图. M: 100-2000 bp Marker; 1-6: 食管鳞癌模板DNA β -actin PCR扩增结果, 长度为106 bp.

图 2 HPV16 E6 PCR扩增电泳图. M: 100-600 bp Marker; 1-6: 食管鳞癌组织HPV16 E6 PCR扩增的阳性结果, 可见一明显条带, 长度为120 bp.

3 讨论

食管癌是世界上最常见的恶性肿瘤之一, 其发病率在世界范围内存在着明显的地域性差异和一定的民族差异^[5-8], 体现出人群对疾病的遗传易感性, 提示人群的遗传背景与环境因素在食管癌的发生与发展过程中所起的独特作用. 早在1982年Syrjanen *et al*^[9]通过组织学观察发现食管鳞癌有HPV感染以来, 有关HPV与食管鳞癌的报道颇多, 其感染率在不同的国家、不同的地区及同一地区差异极大, 检出率在0%-69%^[5-8], 造成这些差异的原因可能与病例的来源、环境地理因素、遗传易感性和分析方法不同有关^[10]. 近年有学者研究表明, HPV16、18也是食管癌的主要高危亚

表 3 HPV16在食管鳞癌中的感染状况 $n(\%)$

	n	HPV+	HPV-	χ^2 值	P 值
年龄(岁)					
<50	19	7(36.8)	12(63.2)	0.301	0.583
50	63	19(30.2)	44(69.8)		
性别					
男	56	17(30.4)	39(69.6)	0.149	0.700
女	26	9(34.6)	17(65.4)		
病理分化程度					
高分化	30	10(33.3)	20(66.7)	0.061	0.970
中分化	42	13(31.0)	29(69.0)		
低分化	10	3(30.0)	7(70.0)		
临床分期(TNM)					
T ₁	30	10(33.3)	20(66.7)	0.105	0.991
T ₂	12	4(33.3)	8(66.7)		
T ₃	30	9(30.0)	21(70.0)		
T ₄	10	3(30.0)	7(70.0)		

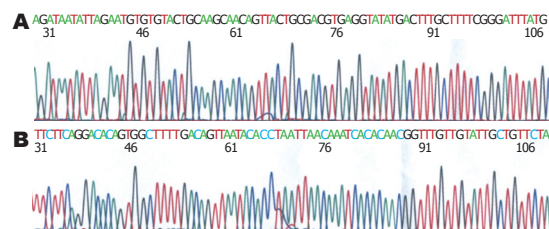


图 3 HPV16 E6-PCR扩增产物正反方向抽样测序结果. A: 正方向; B: 反方向.

型^[11-14], 在食管鳞癌中以HPV16型为主.

新疆是一个多民族居住区, 也是我国食管癌高发区之一, 其发病率以哈萨克族最高, 其次是维吾尔族和汉族, 塔吉克族最低^[15]. 近年来, 本地区研究人员对新疆哈萨克族食管癌与HPV的关系进行了探讨, 陈玲 *et al*^[16]运用半巢式PCR技术检测了150例哈萨克族食管癌, HPV16型检出率为38.7%. 郭伟鹏 *et al*^[17]采用PCR技术扩增哈萨克族食管癌患者HPV16 E6基因, 阳性率为44.4%, 并对其进行了克隆及全序列分析. 结果证实了HPV16感染与新疆哈萨克族食管癌的发生密切相关, 但作为发病率仅次于哈萨克族的维吾尔族食管癌与HPV的相关性研究未见明确的报道.

本研究通过PCR法揭示在新疆维吾尔族食管鳞癌病变组和癌旁正常食管黏膜组HPV16的感染率的分布, 分别为31.7%和12.5%, 食管鳞癌病变组明显高于癌旁正常食管黏膜组, 两者相比差异有统计学意义($P<0.05$), 这提示HPV16的感染与食管鳞癌的发生有一定的关系. 我们

的研究与本地区哈萨克族食管癌中的HPV感染的研究结果一致^[18-19]。同时, 按照病理资料分析, HPV16感染与食管鳞癌的发病年龄、性别、病理分化程度以及肿瘤的临床分期无明显的关联性, 其差异均无统计学意义(χ^2 分别为0.301, 0.149, 2.876, 0.105; 均 $P>0.05$)。在宫颈癌的研究结果中^[19-20]也发现HPV检出率与肿瘤临床病理指标(如肿瘤大小、组织分化程度、淋巴结转移、TNM分期等)之间无显著的相关性。

总之, 从我们的研究中证实HPV16感染的确存在于新疆维吾尔族食管鳞癌中, HPV16感染与其存在一定的相关性。HPV16感染可能在食管癌的发生与发展中的发挥一定的作用, 我们认为, 尚需加大样本量和采取相应的分子生物学技术进一步研究。我们的研究结果对于预防治疗食管癌具有重要的意义。

4 参考文献

- 1 Lu XM, Monnier-Benoit S, Mo LZ, Xu SY, Prétet JL, Liu Z, Vuitton DA, Mougin C. Human papillomavirus in esophageal squamous cell carcinoma of the high-risk Kazakh ethnic group in Xinjiang, China. *Eur J Surg Oncol* 2008; 34: 765-770
- 2 刘红彦, 袁翎, 乔玉环, 荆建红, 张冬云. 子宫颈、食管鳞状细胞癌人乳头状瘤病毒感染的比较研究. 临床与实验病理学杂志 2009; 25: 119-121, 126
- 3 拉莱·苏祖克, Noffsinger AE, 买买提艾力. 新疆维吾尔族妇女子宫颈活体组织中人类乳头瘤病毒DNA的检测. 中华妇产科杂志 1997; 32: 405-408
- 4 Zhang H, Jin Y, Chen X, Jin C, Law S, Tsao SW, Kwong YL. Papillomavirus type 16 E6/E7 and human telomerase reverse transcriptase in esophageal cell immortalization and early transformation. *Cancer Lett* 2007; 245: 184-194
- 5 Morgan RJ, Perry AC, Newcomb PV, Hardwick RH, Alderson D. Human papillomavirus and oesophageal squamous cell carcinoma in the UK. *Eur J Surg Oncol* 1997; 23: 513-517
- 6 邢鲁奇, 李淑凤, 刘鸿瑞, 任宗仁, 潘建国, 申伟, 吴慧. 食管鳞癌组织中乳头瘤病毒感染情况检测. 中华病理学杂志 2000; 29: 216-220
- 7 Si HX, Tsao SW, Poon CS, Wang LD, Wong YC, Cheung AL. Viral load of HPV in esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 2003; 103: 496-500
- 8 Van Doornum GJ, Korse CM, Buning-Kager JC, Bonfrer JM, Horenblas S, Taal BG, Dillner J. Reactivity to human papillomavirus type 16 L1 virus-like particles in sera from patients with genital cancer and patients with carcinomas at five different extragenital sites. *Br J Cancer* 2003; 88: 1095-1100
- 9 Syrjanen KJ. Histological changes identical to those of condylomatous lesions found in esophageal squamous cell carcinomas. *Arch Geschwulstforsch* 1982; 52: 283-292
- 10 Sur M, Cooper K. The role of the human papilloma virus in esophageal cancer. *Pathology* 1998; 30: 348-354
- 11 Gillison ML, Koch WM, Capone RB, Spafford M, Westra WH, Wu L, Zahurak ML, Daniel RW, Viglione M, Symer DE, Shah KV, Sidransky D. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 709-720
- 12 Bahnassy AA, Zekri AR, Abdallah S, El-Shehaby AM, Sherif GM. Human papillomavirus infection in Egyptian esophageal carcinoma: correlation with p53, p21, mdm2, C-erbB2 and impact on survival. *Pathol Int* 2005; 55: 53-62
- 13 Katiyar S, Hedau S, Jain N, Kar P, Khuroo MS, Mohanta J, Kumar S, Gopalkrishna V, Kumar N, Das BC. p53 gene mutation and human papillomavirus (HPV) infection in esophageal carcinoma from three different endemic geographic regions of India. *Cancer Lett* 2005; 218: 69-79
- 14 Acevedo-Nuño E, González-Ojeda A, Vázquez-Camacho G, Balderas-Peña Luz Ma A, Moreno-Villa H, Montoya-Fuentes H. Human papillomavirus DNA and protein in tissue samples of oesophageal cancer, Barrett's oesophagus and oesophagitis. *Anticancer Res* 2004; 24: 1319-1323
- 15 张月明. 新疆食管癌的分布. 新疆医学院学报 1988; 11: 139-145
- 16 陈玲, 杨兰, 李锋, 孙振柱, 张海洋, 任涛, 庞丽娟, 常彬, 齐妍, 蒋金芳, 梁伟华, 李峰. 人乳头瘤状病毒16型与新疆哈萨克族食管鳞癌的相关性研究. 农垦医学 2008; 30: 1-3
- 17 郭伟鹏, 卢晓梅, 赵学信, 林仁勇, 库热西·玉努斯. 新疆哈萨克族食管癌患者HPV16 E6基因的克隆及序列分析. 新疆医科大学学报 2005; 28: 318-320
- 18 Ikenberg H, Sauerbrei W, Schottmuller, Spitz C, Pfleiderer A. Human papillomavirus DNA in cervical carcinoma--correlation with clinical data and influence on prognosis. *Int J Cancer* 1994; 59: 322-326
- 19 Burger RA, Monk BJ, Kurosaki T, Anton-Culver H, Vasilev SA, Berman ML, Wilczynski SP. Human papillomavirus type 18: association with poor prognosis in early stage cervical cancer. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88: 1361-1368

同行评价
本研究采用合理的方法对HPV16与新疆维吾尔族食管鳞癌的相关性进行分析, 对研究新疆地区食管癌发病机制有一定的价值。

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

DAPK mRNA和蛋白在食管鳞癌组织中的表达及意义

刘 莺, 李 克, 刘文静, 王居峰, 樊青霞

背景资料
死亡相关蛋白激酶(DAPK)具有促细胞凋亡、抑制细胞黏附、抑制细胞迁移等作用, 在肿瘤的发生、发展及转移中发挥着重要作用。

刘莺, 刘文静, 王居峰, 河南省肿瘤医院肿瘤内科 河南省郑州市 450003

李克, 樊青霞, 郑州大学第一附属医院肿瘤科 河南省郑州市 450052

刘莺, 硕士, 主治医师, 河南省肿瘤医院肿瘤内科, 主要从事恶性肿瘤的综合治疗研究。

河南省科技厅科技攻关基金资助项目, No. 072102310054

作者贡献分布: 刘莺与樊青霞对此文所作贡献均等; 此课题由刘莺与樊青霞设计; 研究过程由刘莺、李克、刘文静及王居峰操作完成; 数据分析由刘莺与李克完成; 本论文写作由刘莺与樊青霞完成。

通讯作者: 樊青霞, 教授, 博士生导师, 450052, 河南省郑州市, 郑州大学第一附属医院肿瘤科. fqx2243@yahoo.com.cn
电话: 0371-66862243

收稿日期: 2009-08-27 修回日期: 2009-10-09

接受日期: 2009-10-22 在线出版日期: 2009-11-08

Significance of death-associated protein kinase expression in esophageal squamous cell carcinoma

Ying Liu, Ke Li, Wen-Jing Liu, Ju-Feng Wang, Qing-Xia Fan

Ying Liu, Wen-Jing Liu, Ju-Feng Wang, Department of Oncology, Henan Tumor Hospital, Zhengzhou 450003, Henan Province, China

Ke Li, Qing-Xia Fan, Department of Oncology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China

Supported by: the Key Item of Science and Technology Department of Henan Province, No. 072102310054

Correspondence to: Professor Qing-Xia Fan, Department of Oncology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China. fqx2243@yahoo.com.cn

Received: 2009-08-27 Revised: 2009-10-09

Accepted: 2009-10-22 Published online: 2009-11-08

Abstract

AIM: To explore the significance of death-associated protein kinase (DAPK) expression in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) derived from a high-incidence area in Henan Province.

METHODS: Fifty ESCC samples, 17 tumor-adjacent samples and 20 normal esophageal mucosa samples were used in the study. The expression of DAPK mRNA and protein was detected by in situ hybridization and immunohistochemistry, respectively. The correlations of DAPK expres-

sion with clinicopathological features were analyzed.

RESULTS: There were significant differences in the relative contents of DAPK mRNA and protein among normal mucosa tissue, tumor-adjacent tissue and cancer tissue ($\chi^2 = 14.655$ and 7.998 , respectively; both $P < 0.05$). The relative contents of DAPK mRNA and protein were significantly correlated with TNM stage and lymph node metastasis (both $P < 0.05$). In addition, a positive correlation was also noted in the expression of DAPK mRNA and protein in esophageal squamous cell carcinoma ($\gamma = 0.743$, $P = 0.000$).

CONCLUSION: The expression of DAPK mRNA and protein is downregulated in ESCC, suggesting that DAPK may be related to the oncogenesis of ESCC. Combined detection of the expression of DAPK mRNA and protein may be used for early diagnosis and prognosis of ESCC.

Key Words: Death-associated protein kinase; Esophageal squamous cell carcinoma; In situ hybridization; Immunohistochemistry

Liu Y, Li K, Liu WJ, Wang JF, Fan QX. Significance of death-associated protein kinase expression in esophageal squamous cell carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(31): 3218-3222

摘要

目的: 探讨河南省食管癌高发区居民食管鳞癌组织中DA PK mRNA和蛋白的表达特征及意义。

方法: 应用原位杂交和免疫组织化学法检测50例食管鳞癌组织、17例癌旁不典型增生组织及20例正常食管黏膜组织中DA PK mRNA和蛋白的表达, 并分析DA PK表达与临床病理特征的关系。

结果: 在食管鳞癌癌变过程中DA PK在正常黏膜组织、癌旁不典型增生组织及癌组织中mRNA及蛋白的表达组间比较有明显差异($\chi^2 = 14.655$, 7.998 , 均 $P < 0.05$); 不同TNM分级及有无淋巴结转移的食管鳞癌组织之间DA PK

同行评议者
黄晓东, 副主任医师, 武汉市中心医院消化内科

mRNA及蛋白表达差异均有统计学意义(均 $P<0.05$). DAPK mRNA及蛋白食管鳞癌组织中的表达呈正相关关系($\gamma=0.743$, $P=0.000$).

结论: 食管鳞癌组织中DAPK mRNA与蛋白表达均降低, 其表达降低或者缺失可能与食管鳞癌发生发展有关; 检测DAPK mRNA及蛋白的表达有望成为食管鳞癌早期诊断和判断预后的分子指标之一.

关键词: 死亡相关蛋白激酶; 食管鳞癌; 原位杂交; 免疫组织化学

刘莺, 李克, 刘文静, 王居峰, 樊青霞. DAPK mRNA和蛋白在食管鳞癌组织中的表达及意义. 世界华人消化杂志 2009; 17(31): 3218-3222
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3218.asp>

0 引言

死亡相关蛋白激酶(death associated protein kinase, DAPK)^[1]是在基因组中扫描启动细胞凋亡的基因和抑制肿瘤基因时发现的一种促凋亡蛋白. 研究显示, DAPK参与了多条细胞凋亡信号转导途径, 导致细胞增殖与细胞凋亡之间的动态失衡, 变异基因积累, 细胞生长周期延长致使肿瘤发生^[2-4]. 本研究采用原位杂交及免疫组织化学2种方法联合检测了食管癌高发区河南省安阳市的食管癌患者手术切除的癌组织DAPK mRNA和蛋白的表达情况, 旨在进一步探讨DAPK在食管癌发生发展中的作用, 寻找检测食管癌的新的分子生物学指标.

1 材料和方法

1.1 材料 所有标本均取自食管癌高发区河南省安阳市肿瘤医院, 所有病例术前均无化疗、放疗及免疫治疗史. 其中男37例, 女13例, 年龄41-72(平均 59.3 ± 8.1)岁.

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学和原位杂交染色: 50例标本分别取自无坏死癌灶、癌旁3 cm以内及远端正常黏膜组织(经HE染色证实, 癌旁组织中17例有中-重度以上不典型增生或原位癌), 经40 g/L多聚甲醛固定, 常规脱水, 石蜡包埋, 连续切片, 切片厚度4-6 μm , 分别用于HE、免疫组织化学及原位杂交染色. 50例均经组织学证实为鳞状细胞癌. 其中组织学分级 I 级17例, II 级11例, III级22例; 伴淋巴结转移者18例, 无淋巴结转移者32例; 浸润黏膜下层或浅肌层者19例, 浸润深肌层或外

膜层者31例; TNM分期(按1997年UICC的TNM分期): I - II 期16例, III-IV期34例. 兔抗人多克隆抗体DAPK购自武汉博士德公司, SP免疫组织化学试剂盒购自北京中杉金桥生物技术开发公司. 采用SP法, DAPK单抗稀释, 稀释倍数均为1:150, DAB显色, 苏木素复染. 染色步骤严格按说明书进行, 以PBS液代替一抗作为阴性对照. 原位杂交预杂交液、SA-Bio-AP、BCIP/NBT均购自武汉博士德生物技术有限公司. 原位杂交5'端生物素标记、全硫代修饰探针由北京奥科生物技术有限公司合成. DAPK探针序列: CAGCTCGCCACCTGCAACGA. 标本经新鲜配制二甲苯脱蜡, 梯度酒精脱水后, 用新鲜配制的0.5% H_2O_2 室温处理30 min, 以灭活内源性过氧化物酶; 3%柠檬酸新鲜配制蛋白酶(0.01 g/L), 37℃, 10 min, 消化标本DNA结合蛋白; 每张玻片滴加20 μL 不含探针的预杂交液(42℃), 预杂交4 h; 加含探针(1 ng/L)的杂交液, 42℃湿盒内杂交12 h; 0.1 \times 标准柠檬酸盐(SSC)42℃洗后, 加SA-Bio-AP 37℃, 10 min; 漂洗后加BCIP/NBT, 避光显色2-4 h. 以不含探针的标本作阴性对照.

1.2.2 免疫组织化学及原位杂交染色结果判定: DAPK蛋白阳性信号呈浅黄色至棕黄色颗粒, 位于细胞质内; mRNA阳性信号呈棕紫蓝色颗粒样物质, 也位于细胞质内. 高倍镜下随机选取5个视野(每个视野观察细胞数不少于200个), 按阳性细胞所占百分比及着色深浅进行结果判定^[5-6]. 采用9分评分制: 按照阳性细胞比例 $\leq 10\%$ 为1分, 10%-50%为2分, $>50\%$ 为3分; 按染色强弱: 阴性为0分; 淡黄(蓝)色染色为1分; 中度黄(蓝)色染色为2分, 棕黄(紫蓝)色染色为3分. 然后按照“阳性细胞得分 \times 染色强弱得分”计总分, 总分 <3 为阴性, 总分 ≥ 3 为阳性.

统计学处理 应用SPSS13.0统计学软件, 行 χ^2 检验和Spearman相关系数分析, 检验水准 $\alpha=0.05$.

2 结果

2.1 DAPK mRNA在食管鳞癌组织、癌旁不典型增生组织及正常黏膜组织中mRNA及蛋白的表达 DAPK mRNA定位于细胞胞质中, 呈蓝紫色颗粒. 对照组标本中无阳性信号显示(表1, 图1). DAPK蛋白定位于细胞胞质中, 呈浅黄色至棕黄色颗粒. 对照组标本中无阳性信号显示(表1, 图2).

2.2 DAPK蛋白及mRNA表达与食管鳞癌临床生物学行为的关系 在食管鳞癌癌变过程中DAPK

研发前沿
目前DAPK和肿瘤细胞浸润、转移机制的研究已成为热点. 有关DAPK异常表达与食管鳞癌浸润、转移关系的研究, 迄今国内外均未见报道.

创新盘点

本研究首次采用免疫组织化学及原位杂交技术联合检测 DAPK 在 50 例食管鳞癌组织、17 例癌旁不典型增生组织及 20 例正常食管黏膜组织的表达情况,探讨 DAPK 在食管癌发生、发展中的作用。

表 1 DAPK 在正常黏膜组织、癌旁不典型增生组织及食管鳞癌组织中蛋白及 mRNA 的表达

分组	DAPK 蛋白				DAPK mRNA		
	<i>n</i>	阳性 n (%)	χ^2 值	<i>P</i> 值	阳性 n (%)	χ^2 值	<i>P</i> 值
正常黏膜上皮	20	17(85.0)			14(70.0)		
非典型增生	17	11(64.7)	14.655	0.001	9(52.9)	7.998	0.018
鳞癌	50	19(38.0)			17(34.0)		

表 2 DAPK 蛋白及 mRNA 表达与食管鳞癌临床生物学行为

病理特征	<i>n</i>	DAPK 蛋白			DAPK mRNA		
		阳性 n (%)	χ^2 值	<i>P</i> 值	阳性 n (%)	χ^2 值	<i>P</i> 值
组织学级							
	17	7(41.2)	0.714	0.700	4(23.5)		
	11	3(27.0)			5(45.5)	1.554	0.460
	22	9(40.9)			8(36.4)		
浸润深度							
浅层	19	5(26.3)	1.066	0.302	4(21.1)	1.453	0.228
深层	31	14(45.2)			13(41.9)		
淋巴结转移							
无	32	16(50.0)	4.110	0.043	15(46.9)	5.069	0.024
有	18	3(16.7)			2(11.1)		
TNM 分期							
、	16	11(68.8)	7.621	0.006	10(62.5)	6.752	0.009
、	34	8(23.5)			7(20.6)		

表 3 DAPK 蛋白及 mRNA 在食管鳞癌中的表达及相关性

DAPK 蛋白表达	<i>n</i>	DAPK mRNA 表达		<i>r</i> 值	<i>P</i> 值
		+	-		
+	19	15	4	0.743	0.000
-	31	2	29		

蛋白及 mRNA 表达与食管鳞癌患者的性别、年龄、组织学分级及浸润深度无关($P>0.05$),与淋巴结转移及 TNM 分期有关(均 $P<0.05$,表2)。

2.3 DAPK 蛋白及 mRNA 在食管鳞癌组织中的表达的相关性分析 DAPK 蛋白及 mRNA 在食管鳞癌组织中的表达呈正相关关系,在 DAPK 蛋白表达阳性的 19 病例中,其 mRNA 表达阳性的占 15 例,而在 DAPK 蛋白表达阴性的 31 病例中,其 mRNA 表达阴性的占 29 例($r = 0.743$, $P = 0.000$,表3)。

3 讨论

DAPK 定位于人类染色体 9q34.1,相对分子质量 160 kDa^[7],是一种钙离子/钙调蛋白调节的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,具有调节细胞的生存和凋亡及抑制肿瘤的作用^[8-10]。DAPK 在多种肿瘤细

胞和组织中出现表达丢失,而且该表达缺失也与其 CpG 的甲基化改变密切相关。DAPK 的结构包括一个核心的激酶区、钙离子/钙调蛋白结合区、锚蛋白重复序列区、P-环、细胞骨架结合区、死亡区和富含丝氨酸的尾部 7 个部分。核心激酶区位于钙离子/钙调蛋白结合区与 N-端之间,由 11 个丝/苏氨酸结构组成,还含有一个保守的赖氨酸残基,该残基与 ATP 的结合有关,若发生突变(K42W 或 K42A)会引起凋亡作用的消失^[11-12]。

由于 DAPK 具有促细胞凋亡、抑制细胞黏附、抑制细胞迁移等作用,因而在肿瘤的发生、发展及转移中发挥重要作用^[13-16]。DAPK 基因启动子甲基化后,表达降低,抑制细胞移动和促进凋亡的作用降低或消失,从而影响肿瘤的病理类型、分期、及转移状态。其在不同的细胞中的影响也有所不同^[17-18]。本试验研究结果显示, DAPK 基因在正常食管组织、食管癌旁不典型增生组织及癌组织中均有表达,但在癌组织中的表达水平显著降低,其表达差异有统计学意义。说明 DAPK 低表达的肿瘤具有更强的侵袭能力。研究结果还显示, DAPK 基因

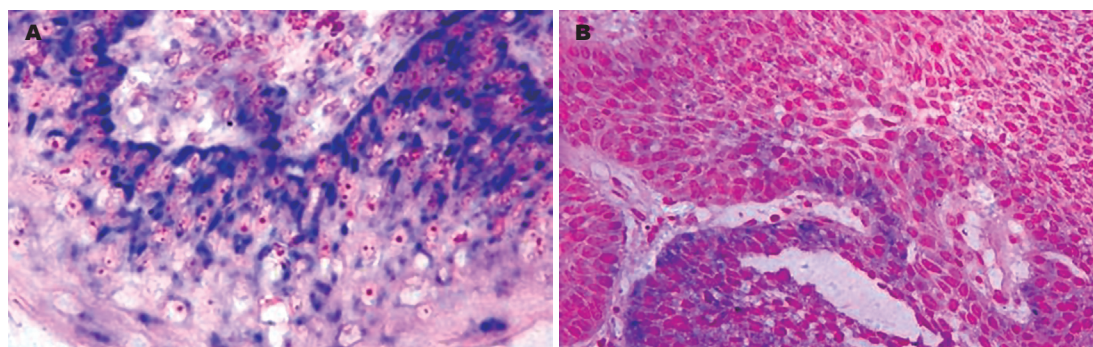


图 1 食管组织中DAPK mRNA的表达(ISH × 400). A: 食管鳞癌组织; B: 正常食管黏膜.

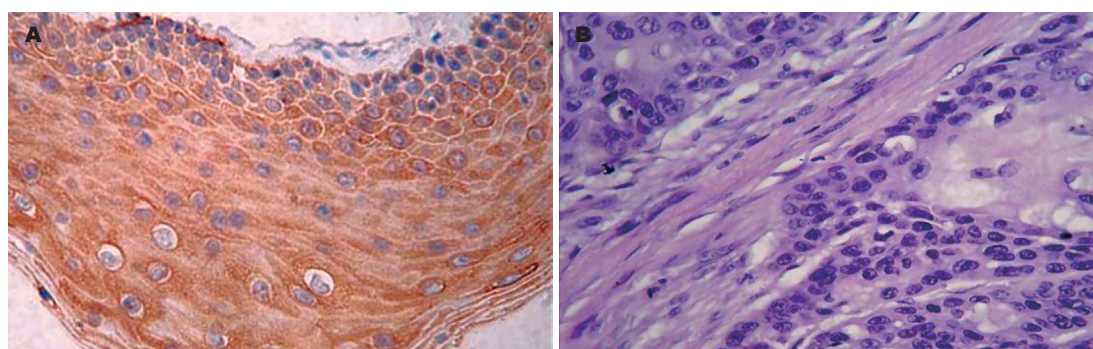


图 2 食管组织中DAPK蛋白的表达(SP × 400). A: 食管鳞癌组织; B: 正常食管黏膜.

的异常表达还与食管鳞癌的不同TNM分级及有无淋巴结转移密切相关, 这就提示了DAPK的异常表达可能与预后有关, 可作为判断预后的一项指标, 有利于我们进一步的了解食管癌的生物行为, 为食管癌的早期诊断和治疗提供一个新的途径. 进一步分析试验结果, 我们发现采用原位杂交和免疫组织化学两种方法检测DAPK mRNA与蛋白在食管癌组织中的阳性表达是一致的, DAPK蛋白表达阳性率与DAPK mRNA的表达结果之间呈正相关($P < 0.01$), 但DAPK mRNA在食管癌中表达率较DAPK蛋白低, 这可能与实验过程中的mRNA被部分降解有关, 而DAPK mRNA与蛋白表达一致性提示应用简易的免疫组织化学法检测食管癌组织中DAPK蛋白表达水平可能可以间接反映出DAPK的mRNA水平.

总之, 我们采用了原位杂交及免疫组织化学法检测了食管鳞癌细胞中DAPK mRNA及蛋白的表达, 初步证明了DAPK表达的降低或者缺失可能是导致食管癌发生发展的作用机制之一, 但DAPK的确切功能目前尚不完全清楚. 因此对DAPK基因进行深入、广泛的研究, 了解其抑制肿瘤浸润和转移的具体机制, 可为肿瘤的预后评估及临床治疗提供理论依据.

4 参考文献

- Deiss LP, Feinstein E, Berissi H, Cohen O, Kimchi A. Identification of a novel serine/threonine kinase and a novel 15-kD protein as potential mediators of the gamma interferon-induced cell death. *Genes Dev* 1995; 9: 15-30
- Brabender J, Arbab D, Huan X, Vallböhmer D, Grimminger P, Ling F, Neiss S, Bollschweiler E, Schneider PM, Hölscher AH, Metzger R. Death-associated protein kinase (DAPK) promoter methylation and response to neoadjuvant radiochemotherapy in esophageal cancer. *Ann Surg Oncol* 2009; 16: 1378-1383
- Tong A, Lynn G, Ngo V, Wong D, Moseley SL, Ewbank JJ, Goncharov A, Wu YC, Pujol N, Chisholm AD. Negative regulation of *Caenorhabditis elegans* epidermal damage responses by death-associated protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 1457-1461
- Li H, Ray G, Yoo BH, Erdogan M, Rosen KV. Down-regulation of death-associated protein kinase-2 is required for beta-catenin-induced anoikis resistance of malignant epithelial cells. *J Biol Chem* 2009; 284: 2012-2022
- 高冬玲, 李晟磊, 陈奎生, 赵志华, 赵秋民, 刘宗文, 张云汉. 金属蛋白酶抑制基因RECK在食管鳞癌中的表达及生物学意义. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 1634-1638
- 高冬玲, 李晟磊, 赵志华, 赵秋民, 刘宗文, 陈奎生, 张云汉. 食管鳞癌组织中RECK和MMP-9基因mRNA检测与分析. *中国肿瘤临床* 2008; 13: 748-751
- Lou C, Yang B, Gao YT, Wang YJ, Nie FH, Yuan Q, Zhang CL, Du Z. [Aberrant methylation of multiple genes and its clinical implication in hepatocellular carcinoma] *Zhonghua Zhongliu Zazhi* 2008; 30:

应用要点
本研究提示, DAPK可作为食管癌早期诊断和判断预后的分子指标, 为食管癌的早期诊断和治疗提供了一个新的发展方向.

同行评价

本研究采用原位杂交及免疫组织化学法检测食管鳞癌细胞中DAPK mRNA及蛋白的表达,为该领域的研究提供了充足的有意义的信息,具有一定新颖性和可读性。

- 831-836
- 8 Xu NR, Liu CX, Zheng SB, Li HL, Xu YW, Xu K. [Reversion transcriptional expression of DAPK in bladder cancer T24 cells 5-aza-2'-deoxycytidine.] *Nanjing Yike Daxue Xuebao* 2009; 29: 1882-1886
- 9 Bajbouj K, Poehlmann A, Kuester D, Drewes T, Haase K, Hartig R, Teller A, Kliche S, Walluscheck D, Ivanovska J, Chakilam S, Ullrich A, Bommhardt U, Leverkus M, Roessner A, Schneider-Stock R. Identification of phosphorylated p38 as a novel DAPK-interacting partner during TNF α -induced apoptosis in colorectal tumor cells. *Am J Pathol* 2009; 175: 557-570
- 10 Zalckvar E, Berissi H, Eisenstein M, Kimchi A. Phosphorylation of Beclin 1 by DAP-kinase promotes autophagy by weakening its interactions with Bcl-2 and Bcl-XL. *Autophagy* 2009; 5: 720-722
- 11 Zhao XL, Meng ZY, Qiao YH, Zhang HL. [Promoter methylation of DAPK gene in cervical carcinoma] *Ai Zheng* 2008; 27: 919-923
- 12 Yanagawa N, Osakabe M, Hayashi M, Tamura G, Motoyama T. Detection of HPV-DNA, p53 alterations, and methylation in penile squamous cell carcinoma in Japanese men. *Pathol Int* 2008; 58: 477-482
- 13 Hoffmann AC, Vallböhmer D, Prenzel K, Metzger R, Heitmann M, Neiss S, Ling F, Hölscher AH, Schneider PM, Brabender J. Methylated DAPK and APC promoter DNA detection in peripheral blood is significantly associated with apparent residual tumor and outcome. *J Cancer Res Clin Oncol* 2009; 135: 1231-1237
- 14 Fendri A, Masmoudi A, Khabir A, Sellami-Boudawara T, Daoud J, Frikha M, Ghorbel A, Gargouri A, Mokdad-Gargouri R. Inactivation of RASSF1A, RAR β 2 and DAP-kinase by promoter methylation correlates with lymph node metastasis in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Biol Ther* 2009; 8: 444-451
- 15 Mukhopadhyay R, Ray PS, Arif A, Brady AK, Kinter M, Fox PL. DAPK-ZIPK-L13a axis constitutes a negative-feedback module regulating inflammatory gene expression. *Mol Cell* 2008; 32: 371-382
- 16 Gozuacik D, Bialik S, Raveh T, Mitou G, Shohat G, Sabanay H, Mizushima N, Yoshimori T, Kimchi A. DAP-kinase is a mediator of endoplasmic reticulum stress-induced caspase activation and autophagic cell death. *Cell Death Differ* 2008; 15: 1875-1886
- 17 Christoph F, Hinz S, Weikert S, Kempkensteffen C, Schostak M, Miller K, Schrader M. Comparative promoter methylation analysis of p53 target genes in urogenital cancers. *Urol Int* 2008; 80: 398-404
- 18 Amara K, Trimeche M, Ziadi S, Laatiri A, Hachana M, Korbi S. Prognostic significance of aberrant promoter hypermethylation of CpG islands in patients with diffuse large B-cell lymphomas. *Ann Oncol* 2008; 19: 1774-1786

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》外文字符标准

本刊讯 本刊论文出现的外文字符应注意大小写、正斜体与上下角标。静脉注射iv, 肌肉注射im, 腹腔注射ip, 皮下注射sc, 脑室注射icv, 动脉注射ia, 口服po, 灌胃ig. s(秒)不能写成S, kg不能写成Kg, mL不能写成ML, lcpm(应写为1/min)÷E%(仪器效率)÷60=Bq, pH不能写PH或P^H, *H pylori*不能写成HP, T_{1/2}不能写成tl/2或T_{1/2}, V_{max}不能写Vmax, μ 不写为英文u. 需排斜体的外文字, 用斜体表示. 如生物学中拉丁学名的属名与种名, 包括亚属、亚种、变种. 如幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H pylori*), *Ilex pubescens* Hook, et Arn.var.*glaber* Chang(命名者勿划横线); 常数K; 一些统计学符号(如样本数n, 均数mean, 标准差SD, F检验, t检验和概率P, 相关系数r); 化学名中标明取代位的元素、旋光性和构型符号(如N, O, P, S, d, l)如ln-(normal, 正), N-(nitrogen, 氮), o-(ortho, 邻), O-(oxygen, 氧, 习惯不译), d-(dextro, 右旋), p-(para, 对), 例如n-butyl acetate(醋酸正丁酯), N-methylacetanilide(N-甲基乙酰苯胺), o-cresol(邻甲酚), 3-O-methyl-adrenaline(3-O-甲基肾上腺素), d-amphetamine(右旋苯丙胺), l-dopa(左旋多巴), p-aminosalicylic acid(对氨基水杨酸). 拉丁字及缩写in vitro, in vivo, in situ; Ibid, et al, po, vs; 用外文字母代表的物理量, 如m(质量), V(体积), F(力), p(压力), W(功), v(速度), Q(热量), E(电场强度), S(面积), t(时间), z(酶活性, kat), t(摄氏温度, °C), D(吸收剂量, Gy), A(放射性活度, Bq), ρ (密度, 体积质量, g/L), c(浓度, mol/L), ϕ (体积分数, mL/L), w(质量分数, mg/g), b(质量摩尔浓度, mol/g), l(长度), b(宽度), h(高度), d(厚度), R(半径), D(直径), T_{max}, C_{max}, 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. (科学编辑: 李军亮 2009-11-08)

Fibroscan对肝纤维化诊断价值的研究进展

温欣, 王学梅, 王炳元

温欣, 王学梅, 王炳元, 中国医科大学附属第一医院 辽宁省沈阳市 110001

作者贡献分布: 本文综述由王炳元提供文献资料, 温欣撰写并检索部分文献; 由王学梅审核。

通讯作者: 王学梅, 教授, 主任医师, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学附属第一医院超声诊断科。wxmmt@yahoo.com.cn

电话: 024-83282098

收稿日期: 2009-08-22 修回日期: 2009-10-22

接受日期: 2009-10-26 在线出版日期: 2009-11-08

Recent advances in the use of Fibroscan for diagnosis of liver fibrosis

Xin Wen, Xue-Mei Wang, Bing-Yuan Wang

Xin Wen, Xue-Mei Wang, Bing-Yuan Wang, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Correspondence to: Professor Xue-Mei Wang, Department of Medical Ultrasonics, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. wxmmt@yahoo.com.cn

Received: 2009-08-22 Revised: 2009-10-22

Accepted: 2009-10-26 Published online: 2009-11-08

Abstract

In recent years, non-invasive methods for assessment of liver fibrosis have attracted worldwide attention. However, although many biochemical markers and imaging examinations have been used for evaluation of liver fibrosis, their sensitivity and specificity are low. Fibroscan (transient elastography) is a new non-invasive technology to assess the degree of liver fibrosis by measuring liver stiffness. Although Fibroscan has been extensively used to evaluate chronic hepatitis C and its complications in other countries, its use is uncommon in China. In this article, we will review its working principle, diagnostic value, and application status.

Key Words: Fibroscan; Liver fibrosis; Diagnostic value

Wen X, Wang XM, Wang BY. Recent advances in the use of Fibroscan for diagnosis of liver fibrosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(31): 3223-3228

摘要

近年来, 国内外学者关注于肝纤维化的无创

性诊断。其中, 多种血清纤维化指标检验及影像学检查是目前临床较为常用的无创性评估肝纤维化的方法, 但敏感性和特异性不高。Fibroscan是一种对肝纤维化进行定量诊断的新技术, 以瞬时弹性成像为原理, 通过对肝脏硬度指标的测量进行肝纤维化程度评估。本文就其工作原理、临界值确定、诊断价值及应用现状进行综述。

关键词: Fibroscan; 肝纤维化; 诊断价值

温欣, 王学梅, 王炳元. Fibroscan对肝纤维化诊断价值的研究进展. *世界华人消化杂志* 2009; 17(31): 3223-3228

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3223.asp>

0 引言

肝纤维化是各种慢性肝病损伤修复过程的共同结果, 也是各种慢性肝病向肝硬化发展的可逆中间环节。肝纤维化甚至早期肝硬化得到及时治疗可发生逆转, 因此, 及时准确地判定肝纤维化的程度, 对慢性肝病的防治及其预后评价具有重要意义。

1 目前公认的诊断肝纤维化经典方法

1.1 病理组织学 目前诊断肝纤维化的最可靠指标是病理组织学检查, 但存在局限性^[1-2]。首先, 因其有创性而很难成为诊断肝纤维化的常规方法, 也不易反复取材来对肝纤维化动态观察。其次, 肝穿取样组织只占整个肝脏的五万分之一, 加之纤维化分布不均匀, 导致肝穿刺活检存在取样误差(10%-45%), 影响准确性。另外, 病理观察者自身以及观察者之间存在的差异, 也会对肝纤维化及其分级的评价产生影响。

1.2 血清生化学 血清纤维化指标是临床上最常用的无创诊断方法^[3], 被应用较多的指标和模型包括: 血清透明质酸、层粘连蛋白、III型前胶原氨基端肽、IV胶原、基质金属蛋白酶、APRI(ALT/血小板指数), Fibrotest评分(包括 α 2-巨球蛋白、结合珠蛋白、载脂蛋白A1、 γ -谷氨酰转肽酶和总胆红素五项指标), FIB-4评分^[4-5](包

背景资料

Fibroscan目前主要研究对象是丙型肝炎患者, 我国以乙型肝炎患者为主, 对此项技术的研究对其在我国的广泛应用有指导意义。

同行评议者

杜雅菊, 主任医师, 哈尔滨医科大学附属第二医院消化内科

研发前沿

目前Fibroscan测量肝脏硬度值的分期临界值仍没有公认的确切数值,其应用领域也是各学者研究的主要方向。

括年龄、血小板计数、ALT和AST 4项指标)。但通常认为血清学指标对肝纤维化的诊断特异性较低。

1.3 影像学 CT和普通超声等影像学检查,可以通过观察肝脏大小、边缘、实质密度回声、血管走行及血流频谱,为肝纤维化的诊断提供形态学参考,但其诊断肝纤维化的敏感性并不高。近年来,许多学者对诊断肝纤维化的无创性方法进行研究。2003年法国学者Sandrin *et al*^[6]根据声波传导速率与组织硬度相关的原理,用一种切变弹性探测仪,测量106例慢性丙型肝炎患者的肝脏硬度,结果测量值与肝纤维化分期有显著相关性。这种仪器测量的可重复性好,被认为是一种快速定量检测肝纤维化的方法,因此众多学者对其深入研究,对工作原理、应用价值以及影响因素有了更为准确的认识。

2 肝脏瞬时弹性探测仪-FibroScan

FibroScan是一种新型的肝纤维化检测仪器,是一项建立在超声诊断基础上的快速便捷、非侵袭性新技术^[7]。通过测定肝脏瞬时弹性图谱来反映肝实质硬度,当肝组织出现纤维化病理改变时,可评估肝脏纤维化的程度并进行定量分级。

2.1 工作原理 超声换能器产生小振幅的低频振动,在通过肝组织时引起弹性剪切波,此波被一种脉冲回波超声捕获装置跟踪,测得的波速与组织弹性直接相关,组织硬度越高,波速越快。波速经运算转换为弹性值,结果用千帕(kPa)表示。被测处肝脏的厚度不少于6 cm,且无大的血管结构。探头下2.5-6.5 cm之间是实际被测部位。每个被测者,应成功捕获其10次回波,取中位数代表肝脏的弹性值,并要求四分位间距小于中位数的1/3。成功率(成功捕获回波次数/总发射次数)≥60%,才视其为可靠的肝脏硬度指标结果^[8]。

2.2 肝脏硬度指标临界值的确定及其诊断价值 目前,越来越多的国内外学者致力于FibroScan的研究,将其与肝穿刺活检进行对照,得出各期纤维化肝脏硬度指标(LSM)的临界值。现在普遍认为,LSM正常上限值为6.1 kPa,而肝硬化患者的LSM值为12.5-75.5 kPa,但如此界定的临床价值仍不确切^[9-10]。

Ziol *et al*^[11]以327例丙型肝炎患者为研究对象,采用Mmetavir评分系统对其肝纤维化分期,并将F0和F1合并为无明显纤维化组, F2, F3, F4合并为有纤维化组。发现以8.8 kPa为临界值诊断

F≥2期,敏感性为0.56,特异性为0.91;以9.6 kPa为临界值诊断F≥3期,敏感性为0.86,特异性为0.85;以14.6 kPa为临界值诊断F4期,敏感性为0.86,特异性为0.96。提示以9.6 kPa和14.6 kPa为分界值是诊断重度肝纤维化和肝硬化可靠的非创伤性指标。

Foucher *et al*^[12]学者则选取各种病因的慢性肝病患者711例。结果肝脏明显纤维化(F2)、严重纤维化(F3)以及肝硬化(F4)患者其ROC面积分别为0.80(95%CI: 0.75-0.84), 0.90(95%CI: 0.86-0.93)与0.96(95%CI: 0.94-0.98)。肝脏硬度临界值为17.6 kPa时,诊断肝硬化的阳性预测值与阴性预测值均在90%以上。

另外,法国学者Castera *et al*^[13]测量了183例连续的慢性丙型肝炎患者的肝硬度值(2.3-75.4 kPa)。以7.1 kPa为临界值,诊断F≥2期肝纤维化的敏感度为0.67,特异性为0.89;以9.5 kPa为临界值,诊断F≥3期的敏感度为0.73,特异性为0.91;以12.5 kPa为临界值,诊断F≥4期的敏感度为0.87,特异性为0.91。

总之, Fibroscan对F3及F4期肝纤维化诊断临界值更为明确,且诊断敏感性和特异性较F1和F2期更高^[14]。Fibroscan诊断肝纤维化的硬度临界值范围分别为: F≥2期7.1-8.8 kPa, F≥3期9.5-9.6 kPa, F≥4期12.5-17.6 kPa时,对肝纤维化各期别的划分更为确切。

2.3 Fibroscan评价肝组织硬度的应用 随着对Fibroscan认识的加深拓展,专家学者对其在各种原因导致的病理性肝组织硬度评价的应用,也有了更广泛的研究。

2.3.1 一般人群筛查: Roulot *et al*^[15]在表现健康的一般人群中选取1358例为研究对象,抽取45岁以上的1120例,以14.6 kPa为临界值来诊断肝硬化,特异性和阳性预测值为100%,被筛选人群中有0.7%以上诊断为肝硬化。在肝硬度测量值大于8 kPa者中,有50%与非酒精性脂肪肝有关,其肝硬度值可高度预测肝纤维化。可见, Fibroscan可用于对一般人群肝纤维化存在状态进行筛选。

2.3.2 甲型病毒性肝炎: 韩国学者Seo *et al*^[16]以31名急性甲型肝炎患者为对象,研究其急性过程中肝脏硬度值的变化。结果发现,凝血化验指标INR(国际标准化比率)是肝脏硬度测量值LSM峰值的独立影响因素,出现LSM峰值和INR峰值当日的胆红素水平是甲型肝炎急性期病程的影响因素。可见,急性甲型肝炎进程中肝硬度测量值是动态变化的,变化形式可能与炎症程度

有关^[17-18]。另有研究表明, LSM值与转氨酶水平相关, 随着转氨酶的下降而明显下降^[19], 因此有学者指出Fibroscan不适用于急性肝炎的检测^[20]。

2.3.3 乙型病毒性肝炎: Hilleret *et al*^[21]对Fibroscan诊断乙型肝炎病毒携带者肝纤维化的价值进行研究, 发现在Fibrotest评分<0.21的携带者中, 有95.6%的肝硬度值<7 kPa, 可认为提示无明显纤维化。在17个Fibrotest评分>0.21的携带者中, 有5人肝硬度值>7 kPa, Fibrotest评分范围为0.23-0.33, 肝硬度测量值范围为7.2-10.4 kPa, 可认为提示明显的肝纤维化。携带者与e抗原阳性者比较, 前者肝硬度测量值(4.9 kPa)和Fibrotest评分(0.15)都分别明显低于后者(8.1 kPa, 0.28)。Sporea *et al*^[22]也通过以丙型肝炎患者做对比, 评价了乙型肝炎活动期患者和乙型肝炎病毒携带者肝脏的硬度。结果表明, 同种程度的肝纤维化, 乙型肝炎患者和丙型肝炎患者的肝硬度测量值并无明显不同, 乙型肝炎病毒携带者的肝硬度测量值(2.7-20.1 kPa)比正常者高。

2.3.4 丙型病毒性肝炎: Cardoso *et al*^[23]对136名丙型病毒性肝炎患者进行回顾性研究, 结果出现过腹水者测得的平均硬度值(37.6 kPa)高于未出现过腹水者(12.1 kPa); 食管静脉曲张患者的硬度值(30.4 kPa)高于无食管静脉曲张者(11.8 kPa); 低于 $1.5 \times 10^5/\text{mm}^3$ 的血小板水平与高硬度测量值相关。可见, 高硬度测量值与腹水史、低血小板计数及食管静脉曲张表现有关。有研究发现, 合并HIV感染的丙型肝炎患者与单纯丙型肝炎患者的Fibroscan下表现并无差异^[24-25]。另有学者对肝移植后复发的丙型肝炎患者研究, 发现严重肝纤维化的LSM在6.9-8.5 kPa之间^[26-27]。上述皆可提示Fibroscan有助于对各种丙型肝炎患者进行随访病情监测^[28-32]。

2.3.5 酒精性肝病和非酒精性脂肪肝: 酒精性肝病患者的肝脏呈现纤维化、脂肪变及胆汁淤积共存的状态, 而炎症和胆汁淤积都严重干扰肝脏硬度测量值^[33-34]。Mueller *et al*^[35]的研究发现, 当酒精性肝病患者AST水平低于100 U/mL且直接胆红素水平稳定时, 以14.7 kPa为诊断F4期的临界值, 肝硬度测量值的ROC面积为0.94。另一项对非酒精性脂肪肝的研究结果显示了Fibroscan对F4期诊断的准确性达0.99^[36]。

2.3.6 药物性肝病: 长期应用氨甲蝶呤与肝纤维化的发生有相关性。有学者对应用氨甲蝶呤的类风湿、炎性肠病、银屑病患者的肝硬度测

量值做了研究^[37-38]。Barbero-Villares *et al*^[39]用Fibroscan分析了重度纤维化患者的进展与用药时间的相关性, 发现肝硬度值与氨甲蝶呤累积应用剂量无明显相关, 氨甲蝶呤的一般常用量不会导致严重肝纤维化的发生。因此认为Fibroscan是一种无边缘效应的工具, 有助于对肝纤维化患者进行评价和随访。

2.3.7 肝移植适合者筛选: Vergniol *et al*^[40]比较Fibroscan, Fibrotest, APRI, FIB-4, Child-Pugh评分等无创性诊断方法对慢性肝病肝硬化失代偿期者生存率的预测价值, 发现Fibroscan的测量结果>20 kPa, Fibrotest评分>0.74, APRI>2, FIB-4>3, Child-Pugh评分>6时, 生存率明显降低, 门脉高压、肝细胞癌的发生率也升高。通过与Child-Pugh评分>6对比, 认为Fibroscan是唯一与生存率及门脉压力升高相关的预测方法, 因此提示, Fibroscan会对筛选进行肝移植的患者有应用意义。

2.3.8 食管静脉曲张: 有研究认为肝脏硬度指标可提示肝硬化患者是否患有重度食管静脉曲张^[41], 有助于选择可进行内镜检查的患者。当出现食管静脉曲张时, 反映肝脏硬度的ROC面积为0.84, 当静脉曲张程度 \geq II度时, 该面积为0.83。肝脏硬度测量值<19 kPa则明确提示不存在II度及以上的食管静脉曲张^[42]。

2.3.9 门静脉高压: 有研究认为, Fibroscan诊断肝硬化门脉高压(门静脉压力>6 mmHg)的临界值为8 kPa时, 敏感性为90%, 特异性为81%。诊断严重门脉高压(门静脉压力 \geq 10 mmHg)临界值为11.7 kPa时, 敏感性为94%, 特异性为74%; 临界值为21 kPa时, 敏感性为90%, 特异性为93%。由此, Fibroscan对门脉高压的诊断也有一定意义^[43-44]。

2.4 影响硬度测量值准确性的因素 在研究过程中, 学者们也发现了影响肝脏硬度指标准确性甚至导致失败值和不可靠值出现的诸多因素。

2.4.1 探头位置: Zelber-Sagi *et al*^[45]以371名慢性肝病患者为研究对象, 取第7, 8肋间隙腋前线至腋中线右上腹的3处位置作为探头置放点, 测量肝脏硬度值。结果有68.2%患者在3个位置处测量值相同, 另外31.8%存在不一致。Ingiliz *et al*^[46]也发现以肝穿刺活检为标准, Fibroscan选取测量位置的不同会使LSM值出现差异。

2.4.2 食物摄入: Mederacke *et al*^[47]选取56名慢性丙型肝炎病毒感染者为研究对象, 以其肝硬度值<6 kPa, 6-10 kPa和>10 kPa分为3组, 并且都进

创新盘点
本文将目前国外Fibroscan的应用领域及肝纤维化分期较为公认的临界值范围加以总结, 对其在我国的应用具有指导作用。

应用要点
Fibroscan能定量评价肝纤维化,临床可联合血清生化学共同诊断,并早期指导临床治疗。

行3种状态下的肝脏硬度测量:空腹状态、摄取标准早餐后立即测量、早餐后1 h。结果,在摄入食物及其后1 h再次测得的硬度值,较空腹时至少增加1 kPa,3组增加的平均值分别为:1.5、3.0和4.6 kPa。

2.4.3 valsalva动作: Millonig *et al*^[48]评估了24例健康人在Valsalva动作前后的肝脏硬度值,其平均值从4.4 kPa上升到6.6 kPa。如以6.1 kPa为正常临界值,则健康者的肝脏硬度值可因Valsalva动作从正常值上升至肝纤维化正常临界值以上。

2.4.4 受检者及操作者因素: 有研究发现,糖尿病、肥胖者和肋间隙狭窄者的肝硬度值不易获得^[49-51]。Castera *et al*^[52]的研究检测中,肝脏硬度值测量失败率为3.1%,不可靠结果占15.8%。与测量失败率独立相关的因素: BMI>30 kg/m²、操作者经验500例、年龄>52岁以及糖尿病;与不可靠测量值独立相关的因素: 操作者经验<500例、BMI>30 kg/m²、年龄>52岁、糖尿病、高血压以及女性。此外,研究发现受检者血小板计数、总胆红素、白蛋白、碱性磷酸酶、AST及ALT水平的变化都可影响测量值^[53-54]。

因此,应用Fibroscan得到的测量值一定要与临床、生物学及形态学相结合,来综合评价各种原因导致的肝纤维化及其并发症^[55-56]。

3 结论

目前, Fibroscan在国外已有广泛研究,最近又有关于联合血清生化学及放射学共同诊断肝纤维化的诸多报道^[5,57-59]。但研究对象仍主要集中在慢性丙型肝炎、酒精性肝病等疾病^[60],相对而言对于乙型肝炎病毒引起的纤维化或肝硬化的研究却较少^[61]。现在,我国关于Fibroscan对乙型肝炎肝纤维化程度的诊断正在研究中。相信在发现并总结可能影响肝硬度测量值的因素后,有关乙型肝炎肝纤维化的大量更为准确的研究成果会为Fibroscan的应用提供良好的参考依据。建立能监测纤维化发生发展的联合检查系统,将有助于及时发现处于肝功能代偿状态但有进展性肝纤维化的患者,减少慢性肝病患者肝活检的需要,更对指导临床治疗有着极为重要的意义。

4 参考文献

- Modig J, Busch C, Waernbaum G. Effects of graded infusions of monomethylmethacrylate on coagulation, blood lipids, respiration and circulation. An experimental study in dogs. *Clin Orthop Relat Res* 1975; : 187-197
- Wong GL, Wong VW, Choi PC, Chan AW, Chum

- RH, Chan HK, Lau KK, Chim AM, Yiu KK, Chan FK, Sung JJ, Chan HL. Assessment of fibrosis by transient elastography compared with liver biopsy and morphometry in chronic liver diseases. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2008; 6: 1027-1035
- Poynard T, Morra R, Ingiliz P, Imbert-Bismut F, Thabut D, Messous D, Munteanu M, Massard J, Benhamou Y, Ratzu V. Assessment of liver fibrosis: noninvasive means. *Saudi J Gastroenterol* 2008; 14: 163-173
- Castéra L, Le Bail B, Roudot-Thoraval F, Bernard PH, Foucher J, Merrouche W, Couzigou P, de Ledinghen V. Early detection in routine clinical practice of cirrhosis and oesophageal varices in chronic hepatitis C: comparison of transient elastography (FibroScan) with standard laboratory tests and non-invasive scores. *J Hepatol* 2009; 50: 59-68
- Sánchez-Conde M, Montes-Ramírez ML, Miralles P, Castro Alvarez JM, Bellón JM, Ramírez M, Arribas JR, Gutiérrez I, López JC, Cosín J, Alvarez E, González J, Berenguer J. Comparison of transient elastography and liver biopsy for the assessment of liver fibrosis in HIV/hepatitis C virus-coinfected patients and correlation with noninvasive serum markers. *J Viral Hepat* 2009 Sep 2. [Epub ahead of print]
- Sandrin L, Fourquet B, Hasquenoph JM, Yon S, Fournier C, Mal F, Christidis C, Ziol M, Poulet B, Kazemi F, Beaugrand M, Palau R. Transient elastography: a new noninvasive method for assessment of hepatic fibrosis. *Ultrasound Med Biol* 2003; 29: 1705-1713
- Vergniol J, de Ledinghen V. [Transient elastography (FibroScan): a new tool in hepatology] *Presse Med* 2009; 38: 1516-1525
- 王宇, 贾继东. Fibroscan评价肝纤维化进程. *肝脏* 2007; 12: 336-338
- Poynard T, Halfon P, Castera L, Munteanu M, Imbert-Bismut F, Ratzu V, Benhamou Y, Bourlière M, de Ledinghen V. Standardization of ROC curve areas for diagnostic evaluation of liver fibrosis markers based on prevalences of fibrosis stages. *Clin Chem* 2007; 53: 1615-1622
- Takemoto R, Nakamuta M, Aoyagi Y, Fujino T, Yasutake K, Koga K, Yoshimoto T, Miyahara T, Fukuizumi K, Wada Y, Takami Y, Saito H, Harada N, Nakashima M, Enjoji M. Validity of FibroScan values for predicting hepatic fibrosis stage in patients with chronic HCV infection. *J Dig Dis* 2009; 10: 145-148
- Ziol M, Handra-Luca A, Kettaneh A, Christidis C, Mal F, Kazemi F, de Ledinghen V, Marcellin P, Dhumeaux D, Trinchet JC, Beaugrand M. Noninvasive assessment of liver fibrosis by measurement of stiffness in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2005; 41: 48-54
- Foucher J, Chanteloup E, Vergniol J, Castéra L, Le Bail B, Adhoute X, Bertet J, Couzigou P, de Ledinghen V. Diagnosis of cirrhosis by transient elastography (FibroScan): a prospective study. *Gut* 2006; 55: 403-408
- Castera L, Foucher J, Bertet J, Couzigou P, de Ledinghen V. FibroScan and FibroTest to assess liver fibrosis in HCV with normal aminotransferases. *Hepatology* 2006; 43: 373-374; author reply 375-376
- Castera L, Vergniol J, Foucher J, Le Bail B,

- Chanteloup E, Haaser M, Darriet M, Couzigou P, De Lédighen V. Prospective comparison of transient elastography, Fibrotest, APRI, and liver biopsy for the assessment of fibrosis in chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2005; 128: 343-350
- 15 Roulot D, Buyck J, Gambier N, Warzocha U, Czernichow S, Costes JL, Le Clesiau H, Beaugrand M. Liver Stiffness Measurement: An Appropriate Screening Method To Detect Liver Fibrosis In The General Population. *Hepatology* 2009; 50: S89
- 16 Seo YS, An H, Jung ES, Keum B, Yim HJ, Jeon YT, Chun HJ, Kim CD, Ryu HS, Um SH. Dynamic Change Of Liver Stiffness During The Course Of Acute Hepatitis A. *Hepatology* 2009; 50: S157
- 17 Coco B, Oliveri F, Maina AM, Ciccorossi P, Sacco R, Colombatto P, Bonino F, Brunetto MR. Transient elastography: a new surrogate marker of liver fibrosis influenced by major changes of transaminases. *J Viral Hepat* 2007; 14: 360-369
- 18 Sagir A, Erhardt A, Schmitt M, Haussinger D. Transient elastography is unreliable for detection of cirrhosis in patients with acute liver damage. *Hepatology* 2008; 47: 592-595
- 19 Arena U, Vizzutti F, Corti G, Ambu S, Stasi C, Bresci S, Moscarella S, Boddi V, Petrarca A, Laffi G, Marra F, Pinzani M. Acute viral hepatitis increases liver stiffness values measured by transient elastography. *Hepatology* 2008; 47: 380-384
- 20 张琪, 戴琳, 陈永鹏, 彭劼, 冯筱榕, 郭亚兵, 侯金林. FibroScan弹性值测定在HBV感染所致肝衰竭患者中的应用价值. *中国康复杂志* 2009; 24: 120-122
- 21 Hilleret MN, Cheveau A, Renversez JC, Sturm N, Zarski JP, Leroy V. Usefulness Of Fibrotest And Fibroscan For The Diagnosis Of HBsAg Inactive Carriage. *Hepatology* 2009; 50: S138
- 22 Sporea I, Sirli R, Deleanu A, Tudora A, Bota S, Cornianu M. Liver Stiffness Evaluated Through Transient Elastography In Patients Chronically Infected With HBV. *Hepatology* 2009; 50: S143
- 23 Cardoso AC, Stern C, Moucari R, Figueiredo-Mendes C, Giuily N, Marcellin P. Liver Stiffness Is Associated With Clinical Outcome Of HCV Related Cirrhosis. *Hepatology* 2009; 50: S148
- 24 Vergara S, Macias J, Rivero A, Gutierrez-Valencia A, Gonzalez-Serrano M, Merino D, Ríos MJ, García-García JA, Camacho A, López-Cortés L, Ruiz J, de la Torre J, Viciano P, Pineda JA. The use of transient elastometry for assessing liver fibrosis in patients with HIV and hepatitis C virus coinfection. *Clin Infect Dis* 2007; 45: 969-974
- 25 De Ledinghen V, Douvin C, Kettaneh A, Ziol M, Roulot D, Marcellin P, Dhumeaux D, Beaugrand M. Diagnosis of hepatic fibrosis and cirrhosis by transient elastography in HIV/hepatitis C virus-coinfected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2006; 41: 175-179
- 26 Rigamonti C, Donato MF, Fraquelli M, Agnelli F, Ronchi G, Casazza G, Rossi G, Colombo M. Transient elastography predicts fibrosis progression in patients with recurrent hepatitis C after liver transplantation. *Gut* 2008; 57: 821-827
- 27 Carrion JA, Navasa M, Bosch J, Bruguera M, Gilabert R, Forns X. Transient elastography for diagnosis of advanced fibrosis and portal hypertension in patients with hepatitis C recurrence after liver transplantation. *Liver Transpl* 2006; 12: 1791-1798
- 28 Vergniol J, Foucher J, Castéra L, Bernard PH, Tournan R, Terrebbonne E, Chanteloup E, Merrouche W, Couzigou P, de Lédighen V. Changes of non-invasive markers and FibroScan values during HCV treatment. *J Viral Hepat* 2009; 16: 132-140
- 29 Foucher J, Reiller B, Jullien V, Léal F, di Cesare ES, Merrouche W, Delile JM, de Lédighen V. FibroScan used in street-based outreach for drug users is useful for hepatitis C virus screening and management: a prospective study. *J Viral Hepat* 2009; 16: 121-131
- 30 Muñoz R, Ramírez E, Fernandez I, Martin A, Romero M, Romero E, Dominguez-Gil B, Hernandez A, Morales E, Andres A, Castellano G, Morales JM. Correlation between fibroscan, liver biopsy, and clinical liver function in patients with hepatitis C virus infection after renal transplantation. *Transplant Proc* 2009; 41: 2425-2426
- 31 Sebastiani G, Halfon P, Castera L, Pol S, Thomas DL, Mangia A, Di Marco V, Pirisi M, Voiculescu M, Guido M, Bourliere M, Noventa F, Alberti A. SAFE biopsy: a validated method for large-scale staging of liver fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2009; 49: 1821-1827
- 32 Tsertsivadze T, Dolmazashvili E, Abutidze A, Sharvadze L, Karchava M. Assessment of liver fibrosis and cirrhosis by transient elastography among patients with chronic HBV and HCV infection in Georgia. *Georgian Med News* 2008; (165): 38-42
- 33 Corpechot C, El Naggar A, Poujol-Robert A, Ziol M, Wendum D, Chazouilleres O, de Lédighen V, Dhumeaux D, Marcellin P, Beaugrand M, Poupon R. Assessment of biliary fibrosis by transient elastography in patients with PBC and PSC. *Hepatology* 2006; 43: 1118-1124
- 34 Gomez-Dominguez E, Mendoza J, Garcia-Buey L, Trapero M, Gisbert JP, Jones EA, Moreno-Otero R. Transient elastography to assess hepatic fibrosis in primary biliary cirrhosis. *Aliment Pharmacol Ther* 2008; 27: 441-447
- 35 Mueller S, Millionig G, Sarovska L, Friedrich S, Reimann F. M, Pritsch M, Eisele S, Sticke F, Longerich T, Schirmacher P, Seitz H. K. Alcoholic Steatohepatitis Increases Liver Stiffness Independent Of Fibrosis Stage : Criteria For Noninvasive Fibrosis Assessment. *Hepatology* 2009; 50: S366
- 36 Yoneda M, Yoneda M, Fujita K, Inamori M, Tamano M, Hiriishi H, Nakajima A. Transient elastography in patients with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Gut* 2007; 56: 1330-1331
- 37 Laharie D, Zerbib F, Adhoute X, Boue-Lahorgue X, Foucher J, Castera L, Rullier A, Bertet J, Couzigou P, Amouretti M, de Lédighen V. Diagnosis of liver fibrosis by transient elastography (FibroScan) and non-invasive methods in Crohn's disease patients treated with methotrexate. *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 23: 1621-1628
- 38 Berends MA, Snoek J, de Jong EM, Van Krieken JH, de Knecht RJ, van Oijen MG, van de Kerkhof PC, Drenth JP. Biochemical and biophysical assessment of MTX-induced liver fibrosis in psoriasis patients: Fibrotest predicts the presence and Fibroscan predicts the absence of significant liver fibrosis. *Liver Int* 2007; 27: 639-645
- 39 Barbero-Villares A, Mendoza J, Esteban C, Gomez-Dominguez E, Moreno-Monteagudo J. A, Garcia-Buey L, Gomez-Gil R, Sanz T, Dauden E, Mate1 J,

同行评价
本文对Fibroscan在我国的应用研究有一定的指导意义,可读性较好。

- Gisbert J. P, Moreno-Otero R. Evaluation Of Hepatic Fibrosis By Transient Elastography (Fibroscan) In Methotrexate-treated Patients. *Hepatology* 2009; 50: S220
- 40 Vergnio J, Foucher J, Terrebbonne E, Font J, Merrouche W, Couzigou P, Ledinghen V. Prognostic Value Of Transient Elastography And Noninvasive Markers Of Fibrosis In Patients With Chronic Liver Disease A Prospective Analysis Of 4935 Person-Years. *Hepatology* 2009; 50: S93
- 41 Chang HK, Park YJ, Koh H, Kim SM, Chung KS, Oh JT, Han SJ. Hepatic fibrosis scan for liver stiffness score measurement: a useful preendoscopic screening test for the detection of varices in postoperative patients with biliary atresia. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2009; 49: 323-328
- 42 Kazemi F, Kettaneh A, N'kontchou G, Pinto E, Ganne-Carrie N, Trinchet JC, Beaugrand M. Liver stiffness measurement selects patients with cirrhosis at risk of bearing large oesophageal varices. *J Hepatol* 2006; 45: 230-235
- 43 Vizzutti F, Arena U, Romanelli RG, Rega L, Foschi M, Colagrande S, Petrarca A, Moscarella S, Belli G, Zignego AL, Marra F, Laffi G, Pinzani M. Liver stiffness measurement predicts severe portal hypertension in patients with HCV-related cirrhosis. *Hepatology* 2007; 45: 1290-1297
- 44 Bureau C, Metivier S, Peron JM, Selves J, Robic MA, Gourraud PA, Rouquet O, Dupuis E, Alric L, Vinel JP. Transient elastography accurately predicts presence of significant portal hypertension in patients with chronic liver disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2008; 27: 1261-1268
- 45 Zelber-Sagi S, Yeshua H, Levit S, Luria Y, Blendis L, Leshno M, Halpern Z, Oren R. Discordance Between Three Successive Fibroscan Measurements Mirrors The Variability Of Liver Fibrosis. *Hepatology* 2009; 50: S375
- 46 Ingiliz P, Chhay KP, Munteanu M, Lebray P, Ngo Y, Roulot D, Benhamou Y, Thabut D, Ratzliff V, Poynard T. Applicability and variability of liver stiffness measurements according to probe position. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 3398-3404
- 47 Mederacke I, Wursthorn K, Rifai K, Manns M. P, Wedemeyer H, Bahr M. J. Food Intake Increase Liver Stiffness In Patients With Chronic Hepatitis C Virus Infection. *Hepatology* 2009; 50: S154
- 48 Millonig G, Friedrich S, Adolf S, Chl GP, Stiefel P, Seitz HK, Mueller S. Increased Venous Pressure Increases Liver Stiffness (Fibroscan) Independent Of Liver Fibrosis. *Hepatology* 2009; 50: S83
- 49 Foucher J, Castéra L, Bernard PH, Adhoute X, Laharie D, Bertet J, Couzigou P, de Ledinghen V. Prevalence and factors associated with failure of liver stiffness measurement using FibroScan in a prospective study of 2114 examinations. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2006; 18: 411-412
- 50 Kettaneh A, Marcellin P, Douvin C, Poupon R, Zioli M, Beaugrand M, de Ledinghen V. Features associated with success rate and performance of FibroScan measurements for the diagnosis of cirrhosis in HCV patients: a prospective study of 935 patients. *J Hepatol* 2007; 46: 628-634
- 51 Sánchez Antolin G, García Pajares F, Vallecillo MA, Fernández Orcajo P, Gómez de la Cuesta S, Alcaide N, González Sagrado M, Velicia R, Caro-Patón A. FibroScan evaluation of liver fibrosis in liver transplantation. *Transplant Proc* 2009; 41: 1044-1046
- 52 Castera L, Foucher J, Bernard PH, Carvalho F, Allaix D, Merrouche W, Couzigou P, de Ledinghen V. Prevalence And Factors Associated With Liver Stiffness Measurement Failure And Unreliable Results Using Fibroscan : A 5 Year Experience In 13369 Examinations. *Hepatology* 2009; 50: S52
- 53 de Ledinghen V, Le Bail B, Rebouissoux L, Fournier C, Foucher J, Miettinen V, Castéra L, Sandrin L, Merrouche W, Lavrand F, Lamireau T. Liver stiffness measurement in children using FibroScan: feasibility study and comparison with Fibrotest, aspartate transaminase to platelets ratio index, and liver biopsy. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2007; 45: 443-450
- 54 Kim SU, Kim DY, Park JY, Lee JH, Ahn SH, Kim JK, Paik YH, Lee KS, Chon CY, Choi EH, Song KJ, Park YN, Han KH. How Can We Enhance the Performance of Liver Stiffness Measurement Using FibroScan in Diagnosing Liver Cirrhosis in Patients With Chronic Hepatitis B? *Clin Gastroenterol* 2009 Jul 14. [Epub ahead of print]
- 55 Ganne-Carrie N, Zioli M, de Ledinghen V, Douvin C, Marcellin P, Castera L, Dhumeaux D, Trinchet JC, Beaugrand M. Accuracy of liver stiffness measurement for the diagnosis of cirrhosis in patients with chronic liver diseases. *Hepatology* 2006; 44: 1511-1517
- 56 Smith JO, Sterling RK. Systematic review: non-invasive methods of fibrosis analysis in chronic hepatitis C. *Aliment Pharmacol Ther* 2009; 30: 557-576
- 57 Afdhal NH, Nunes D. Evaluation of liver fibrosis: a concise review. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 1160-1174
- 58 Maor Y, Halfon P, Bashari D, Pénaranda G, Morali G, Klar R, Bar-Meir S, Martinowitz U, Oren R. Fibrotest or Fibroscan for evaluation of liver fibrosis in haemophilia patients infected with hepatitis C. *Haemophilia* 2009 Aug 21. [Epub ahead of print]
- 59 Friedrich-Rust M, Müller C, Winckler A, Kriener S, Herrmann E, Holtmeier J, Poynard T, Vogl TJ, Zeuzem S, Hammerstingl R, Sarrazin C. Assessment of Liver Fibrosis and Steatosis in PBC With FibroScan, MRI, MR-spectroscopy, and Serum Markers. *J Clin Gastroenterol* 2009 Jul 2. [Epub ahead of print]
- 60 Colletta C, Smirne C, Fabris C, Toniutto P, Rapetti R, Minisini R, Pirisi M. Value of two noninvasive methods to detect progression of fibrosis among HCV carriers with normal aminotransferases. *Hepatology* 2005; 42: 838-845
- 61 袁敏, 杨长青. 瞬时弹性成像在肝纤维化无创性诊断中的应用. *国际消化病杂志* 2008; 28: 468-470

神经性疼痛机制在慢性胰腺炎中的作用

廖兴志, 熊源长

廖兴志, 熊源长, 中国人民解放军第二军医大学长海医院麻醉科 上海市 200433

廖兴志, 中国人民解放军第101医院麻醉科 江苏省无锡市 214044

上海市科学技术发展基金资助项目, No. 064119513

作者贡献分布: 本文由廖兴志完成; 熊源长指导.

通讯作者: 熊源长, 教授, 200433, 上海市长海路168号, 中国人民解放军第二军医大学长海医院麻醉科. ychxiong@sina.com

电话: 021-81878485 传真: 021-81878484

收稿日期: 2009-08-28 修回日期: 2009-10-21

接受日期: 2009-10-26 在线出版日期: 2009-11-08

Role of neuropathic pain mechanisms in the pathogenesis of pain in chronic pancreatitis

Xing-Zhi Liao, Yuan-Chang Xiong

Xing-Zhi Liao, Yuan-Chang Xiong, Department of Anesthesiology, Changhai Hospital, the Second Military Medical University of Chinese PLA, Shanghai 200433, China
Xing-Zhi Liao, Department of Anesthesiology, the 101st Hospital of Chinese PLA, Wuxi 214044, Jiangsu Province, China

Supported by: the Shanghai Science & Technology Development Foundation, No. 064119513.

Correspondence to: Professor Yuan-Chang Xiong, Department of Anesthesiology, Changhai Hospital, the Second Military Medical University of Chinese PLA, Shanghai 200433, China. ychxiong@sina.com

Received: 2009-08-28 Revised: 2009-10-21

Accepted: 2009-10-26 Published online: 2009-11-08

Abstract

Abdominal pain is a major clinical symptom in patients with chronic pancreatitis. Alleviation of abdominal pain is important in the treatment of chronic pancreatitis. More and more studies show that the pain in chronic pancreatitis is similar to neuropathic pain. In this article, we will review the role of neuropathic pain mechanisms in the pathogenesis of pain in chronic pancreatitis by describing the clinical features of the pain, peripheral sensitization, central sensitization and changes in electroencephalogram. Understanding of the mechanisms responsible for pain in chronic pancreatitis may have important implications for the treatment of the disease.

Key Words: Chronicity; Pancreatitis; Pain; Mechanism

Liao XZ, Xiong YC. Role of neuropathic pain mechanisms in the pathogenesis of pain in chronic pancreatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(31): 3229-3232

摘要

腹痛是慢性胰腺炎患者的主要临床症状, 因此缓解腹痛在慢性胰腺炎的治疗中占有重要的地位. 越来越多的文献表明慢性胰腺炎疼痛有类似神经性疼痛的地方. 本文从慢性胰腺炎的腹痛特点、外周敏化、中枢敏化以及脑电图改变等方面阐述了神经性疼痛机制在慢性胰腺炎发病过程中的作用, 以便于提高我们对慢性胰腺炎的疼痛治疗水平.

关键词: 慢性; 胰腺炎; 疼痛; 机制

廖兴志, 熊源长. 神经性疼痛机制在慢性胰腺炎中的作用. 世界华人消化杂志 2009; 17(31): 3229-3232

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3229.asp>

0 引言

腹痛是慢性胰腺炎的主要临床症状, 他不但是患者就诊的主要原因, 而且也严重地影响着患者的生活质量, 因此, 缓解疼痛在慢性胰腺炎的治疗中占有相当重要的地位. 对于一些胰外疾病(如消化系溃疡)和胰内疾病(胰管梗阻或胰腺假囊肿)的患者, 疼痛是能解释的, 而且也有适当的方法可以治疗. 但是, 对于大多数患者来说疼痛的原因仍不清楚, 治疗往往不太理想. 近来, 有关实验表明在慢性胰腺炎的疼痛过程中, 中枢神经系统改变是异常的, 在一些病例中情况与神经性疼痛疾病非常相似^[1-3]. 因此, 本文从以下几个方面着手, 阐述神经性疼痛机制是如何在慢性胰腺炎发病过程中发挥作用的.

1 临床疼痛特点

神经性疼痛被定义为“周围或中枢神经系统原发或继发性损害或功能障碍引起的疼痛”^[4], 其特点包括依赖刺激性疼痛和不依赖刺激性疼痛. 慢性胰腺炎患者具有的餐后痛和自发痛就与这两种情况类似.

背景资料

慢性胰腺炎患者的疼痛治疗一直是一个棘手的问题. 随着对其机制的研究, 发现神经性疼痛机制在慢性胰腺炎疼痛的发生发展过程中起着重要作用, 引起了人们越来越多的关注.

同行评议者
崔云南, 教授, 哈尔滨医科大学第二附属医院普外一科

相关报道

Drewes *et al*在2008年的《Gut》杂志上从多个角度指出了慢性胰腺炎疼痛和神经性疼痛之间有着非常相似之处,为研究神经性疼痛机制在慢性胰腺炎中的作用打下了基础。

慢性胰腺炎患者进餐后,胰腺将被膨胀的胃挤压,这将影响胰液的分泌,导致胰腺组织压力增加,特别是在胰管狭窄或有结石时,这种情况就更容易出现。胰内压力增加将导致胰内神经受压,出现神经源性炎症,这引起神经递质释放扩散增加,从而影响邻近神经,使得他们更加敏感。而在中枢,随着伤害性感受器的增加,二级神经元中枢兴奋性增加,能在较低的阈值被激活,结果就是产生依赖刺激性疼痛。另外,在脊髓感知触觉的A β 纤维会芽生终止于“接受伤害性信号”的脊髓第2层,与正常情况下传递疼痛的神经元相联系,这种改变也促使了依赖刺激性疼痛的产生^[5]。所谓的不依赖刺激性疼痛也是外周和中枢神经系统改变的结果。在外周神经系统,神经损伤造成钠通道和 α 肾上腺素受体增多,以及初级传入神经元细胞膜改变。这些变化使得轴突自发性发放增加。而在脊髓,神经重塑和胞膜特性的改变导致了次级神经元自发性电活动的发放。另外,下行抑制系统活性会出现下降,脊髓阿片受体数量也会降低。这些变化的出现,导致了自发性疼痛的产生。

2 外周敏化机制

2.1 神经病变 有文献表明在慢性胰腺炎组织标本中观察到增粗的胰内神经数量明显增多^[6]。胰内神经增多增粗及疼痛的严重程度和生长相关蛋白43(growth-associated protein 43, GAP-43)有关^[7]。这些发现表明慢性胰腺炎神经元的改型过程可能与疼痛的产生及维持有关。因此,一些神经营养因子被分析,用来判断在慢性胰腺炎的病理改变中,他们是否与增粗的胰内神经有关,是否影响着疼痛的发生。其中,神经生长因子(nerve growth factor, NGF)和他的高亲和力受体TrkA,脑衍生神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)和artemin近来吸引了大家的关注。在慢性胰腺炎的发病过程中他们都出现了上调。NGF, BDNF和artemin的上调可能是局部对胰内神经、胰内神经节和/或施万氏细胞开始损伤后的一种反应,目的是开始神经再生。这些神经营养因子随后使神经病变恶化,从而加速了胰内神经增粗的形成,并且也降低了疼痛传递的阈值。这个假设被Malin和Elitt的观察所支持^[8-9],即在鼠的后足注射胶质细胞神经营养因子(glial-derived neurotrophic factor, GDNF), artemin和NGF能引起急性周围神经痛觉过敏。这表明他们在伤害性感受器的敏化和炎性痛觉

过敏的产生方面都起着重要作用。

2.2 神经源性炎症 神经及其周围的改变对于疼痛的发病机制是重要的。在慢性胰腺炎,胰内神经的神经束膜频繁的被免疫细胞浸润。由于神经束膜的破裂,神经对有害物质和细胞因子的敏感性增加,其结果就是导致更多的免疫细胞浸润,产生所谓的“神经炎”,从而引起慢性胰腺炎患者严重的疼痛^[10]。

神经肽P物质是一个速激肽,参加感觉神经信息的传递,并能参与局部炎症的形成。他通过和其特异性G蛋白偶联神经激肽受体NK-1R, NK-2R和NK-3R的结合能介导神经系统和免疫系统之间的相互作用。通过NK-1R受体, P物质能增加中性粒细胞的外渗,吸引和激活巨噬细胞,导致嗜中性粒细胞趋化和肥大细胞脱颗粒^[11-12]。在慢性胰腺炎,免疫细胞浸润常能在增粗的神经和神经节周围看到,这些神经和神经节显示出对P物质和降钙素基因相关肽(calcitonin gene-related peptide, CGRP)有着强烈的免疫反应性。这2种肽类通常被认为是介导疼痛的神经递质,因此这就充分证明胰腺神经对于慢性胰腺炎长期的疼痛综合征有着直接联系。

NGF在慢性胰腺炎神经源性炎症的发生中也起着重要作用,他能激活炎症区域内感觉神经和交感神经表达的其高亲和力受体TrkA。研究显示NGF和TrkA mRNA的表达与疼痛强度相关联^[13]。而且,这种敏化能诱导神经肽P物质和CGRP在脊髓背角的释放增加。在外周出现炎症情况后,其他神经营养因子如BDNF以及artemin的表达都是增加的^[14-15]。另外,大麻酸受体1的表达在急性胰腺炎时也是增加的,同时伴有内源性大麻酸的增加^[16]。

以上结果表明在慢性胰腺炎时,炎症细胞、神经纤维、神经肽及其受体之间相互作用,导致外周神经系统出现敏化。

2.3 瞬时受体电位香草酸亚型1 瞬时受体电位香草酸亚型1(transient receptor potential vanilloid 1, TRPV1)是一个非选择性的阳离子通道,可以允许如钠离子和钙离子这样的阳离子进入细胞内。阳离子的流入使表达TRPV1的神经元去极化,从而刺激神经递质如P物质和CGRP从神经末梢释放^[17]。通过这种激活, TRPV1可能参与了: (1)急性伤害性感受; (2)神经源性炎症; (3)外周感觉神经元的激活^[18]。对慢性胰腺炎大鼠模型的研究发现,胰腺相关的背根神经节内TRPV1表达上调,从而增强内向电流,与大鼠的疼痛反应

有一定的相关性^[19]. Hartel *et al*^[20]的研究证实了在人类的慢性胰腺炎和胰腺癌也有同样的结论. 因此, 他们认为在慢性胰腺炎, TRPV1的上调和敏化促进了痛觉过敏.

3 中枢敏化机制

3.1 长时程增强效应 对于大多数有慢性疼痛或神经性疼痛的疾病而言, 神经系统的敏化是一个主要特点. 这种敏化导致脊髓水平及脊髓上水平的神经元出现可塑性变化. 已经有研究证明在脊髓背角这种神经元的可塑性变化和“长时程增强”效应机制有关^[21]. 长时程增强效应能引起突触传递效能增加, 产生更多电生理活动, 传递更多感觉信息, 最终导致中枢神经系统的自发状态: 没有外周刺激也会产生疼痛信号^[22]. 这种功能性改变会造成中枢重塑和“疼痛记忆”. 在慢性疼痛状态下, 中枢系统的这种持续性改变要比原发病存在的时间还长. 因此, 当外周刺激消退时, 被敏化的二级神经元仍能持续放电, 仍能被阈下刺激所激活, 产生痛感.

3.2 下行抑制系统 兴奋系统和抑制系统之间的平衡是最终决定疼痛产生的主要因素, 而大脑控制疼痛感知主要是通过脑干发出的下行抑制^[23]. 在持续性胰腺疼痛的动物模型上, Vera-Portocarrero *et al*^[24]发现在胰腺疼痛的维持上延髓头端腹内侧的下行易化系统起着关键作用. 另一方面, 有器官疾病的患者下行抑制系统可能会被充分激活, 这将阻止病损组织疼痛信号传入增多所带来的痛觉过敏. 因此, 在食管炎病和消化性溃疡病的患者, 给予试验性内脏刺激常常会出现痛觉减退^[25-26]. 慢性胰腺炎患者也可能激活了下行抑制系统, 从而平衡从胰腺传导的伤害性神经信号. 但是, 激活的下行控制系统可能广泛的影响脊髓, 导致对身体其他部位的刺激出现广泛性的痛觉减退.

3.3 中枢皮层重组 慢性疼痛与大脑皮层的功能性重组有关. 近期对慢性胰腺炎患者的研究显示, 刺激他们的上消化道能引起大脑岛叶的功能性重组^[2]. 大脑岛叶和边缘系统在内脏感觉和运动功能的整合上起着非常重要的作用, 他们与运动皮层以及神经基底节的联系都比较紧密. 因此, 慢性胰腺炎患者岛叶的改变会引起严重的内脏疼痛感觉过程的紊乱. 这些发现说明慢性胰腺炎疼痛能导致伤害性信号传导系统皮层投射的变化, 这进一步支持了胰腺疼痛机制中神经病理成分的存在.

4 脑电图改变

不同种类的神经性疼痛患者中都会出现脑电图 δ 波的改变. 近来, Sarnthein *et al*^[27]指出神经性疼痛疾病的患者静止脑电图会出现高频的 δ 波, 在成功治疗后会好转. 因此, 有人提出了 δ 波可能反映中枢认知功能紊乱的假设. Drewes *et al*^[28]在最近的试验中对慢性胰腺炎患者进行食管刺激, 并记录脑电图. 和对照组相比, 慢性胰腺炎组 δ 波活动频率明显增加, 这也支持了胰腺疼痛中包含神经性疼痛这个假设.

5 慢性胰腺炎疼痛治疗

慢性胰腺炎的治疗包括多种方法, 如假囊肿、胰管梗阻可以通过内窥镜或者体外冲击波碎石术予以治疗, 外科手术可以做局部病灶清除, 神经松解术和神经阻滞术等. 然而, 对于大多数患者而言, 药物治疗还是占主要地位^[22,29]. 慢性胰腺炎的疼痛治疗是困难的, 因此我们往往需要使用强效的阿片类药物. 而神经性疼痛治疗的基石是依靠多功能性药物, 能作用于中枢的不同靶点, 例如三环类抗抑郁药, 加巴喷丁或普瑞巴林, 曲马多, 及最终选择-阿片类药物. 有研究显示对神经性疼痛治疗有效的药物好像对慢性胰腺炎也是行之有效的, 如Drewes *et al*^[26]证明, 三环类抗抑郁药和普瑞巴林对于疼痛难以缓解的患者是有价值的, 能作为镇痛的辅助用药. 另外, Simley *et al*^[30]指出加巴喷丁可以增强胰腺炎动物模型上吗啡的药效. 因此, 将来慢性胰腺炎的疼痛药物治疗应该多考虑联合用药.

6 结论

神经性疼痛机制在慢性胰腺炎患者的疼痛发生发展过程中应该起到了一定作用, 这可能也是为何慢性胰腺炎患者疼痛难以治疗的原因之一. 因此, 在对于慢性胰腺炎患者进行疼痛治疗时, 我们应该注意联合用药, 作用于中枢的不同靶点, 从而更好的缓解疼痛. 希望将来通过不断的深入研究, 能进一步了解慢性胰腺炎的疼痛机制, 为患者的临床治疗提供确切的治疗靶点和有效的理论依据.

7 参考文献

- 1 Staahl C, Dimcevski G, Andersen SD, Thorsgaard N, Christrup LL, Arendt-Nielsen L, Drewes AM. Differential effect of opioids in patients with chronic pancreatitis: an experimental pain study. *Scand J Gastroenterol* 2007; 42: 383-390
- 2 Dimcevski G, Sami SA, Funch-Jensen P, Le Pera D, Valeriani M, Arendt-Nielsen L, Drewes AM. Pain

创新盘点

本文从基础到临床, 从中枢到外周探讨了神经性疼痛机制在慢性胰腺炎中的作用, 不但有助于增加临床工作者对慢性胰腺炎腹痛的认识, 同时也指出了该研究重要的临床意义.

同行评价
本文立意新颖, 有助于提高国内学者对慢性胰腺炎疼痛机制的了解, 具有较好的参考价值。

- in chronic pancreatitis: the role of reorganization in the central nervous system. *Gastroenterology* 2007; 132: 1546-1556
- 3 Dimcevski G, Staahl C, Andersen SD, Thorsgaard N, Funch-Jensen P, Arendt-Nielsen L, Drewes AM. Assessment of experimental pain from skin, muscle, and esophagus in patients with chronic pancreatitis. *Pancreas* 2007; 35: 22-29
- 4 Baron R. Mechanisms of disease: neuropathic pain—a clinical perspective. *Nat Clin Pract Neurol* 2006; 2: 95-106
- 5 Hughes DI, Scott DT, Todd AJ, Riddell JS. Lack of evidence for sprouting of Abeta afferents into the superficial laminae of the spinal cord dorsal horn after nerve section. *J Neurosci* 2003; 23: 9491-9499
- 6 Friess H, Shrikhande S, Shrikhande M, Martignoni M, Kulli C, Zimmermann A, Kappeler A, Ramesh H, Büchler M. Neural alterations in surgical stage chronic pancreatitis are independent of the underlying aetiology. *Gut* 2002; 50: 682-686
- 7 Di Sebastiano P, Fink T, Weihe E, Friess H, Innocenti P, Beger HG, Büchler MW. Immune cell infiltration and growth-associated protein 43 expression correlate with pain in chronic pancreatitis. *Gastroenterology* 1997; 112: 1648-1655
- 8 Elitt CM, McIlwrath SL, Lawson JJ, Malin SA, Molliver DC, Cornuet PK, Koerber HR, Davis BM, Albers KM. Artemin overexpression in skin enhances expression of TRPV1 and TRPA1 in cutaneous sensory neurons and leads to behavioral sensitivity to heat and cold. *J Neurosci* 2006; 26: 8578-8587
- 9 Malin SA, Molliver DC, Koerber HR, Cornuet P, Frye R, Albers KM, Davis BM. Glial cell line-derived neurotrophic factor family members sensitize nociceptors in vitro and produce thermal hyperalgesia in vivo. *J Neurosci* 2006; 26: 8588-8599
- 10 Di Sebastiano P, di Mola FF, Buchler MW, Friess H. Pathogenesis of pain in chronic pancreatitis. *Dig Dis* 2004; 22: 267-272
- 11 Joos GF, Pauwels RA. Pro-inflammatory effects of substance P: new perspectives for the treatment of airway diseases? *Trends Pharmacol Sci* 2000; 21: 131-133
- 12 Bhatia M, Brady M, Shokuhi S, Christmas S, Neoptolemos JP, Slavin J. Inflammatory mediators in acute pancreatitis. *J Pathol* 2000; 190: 117-125
- 13 Friess H, Zhu ZW, di Mola FF, Kulli C, Graber HU, Andren-Sandberg A, Zimmermann A, Korc M, Reinshagen M, Büchler MW. Nerve growth factor and its high-affinity receptor in chronic pancreatitis. *Ann Surg* 1999; 230: 615-624
- 14 Cho HJ, Kim SY, Park MJ, Kim DS, Kim JK, Chu MY. Expression of mRNA for brain-derived neurotrophic factor in the dorsal root ganglion following peripheral inflammation. *Brain Res* 1997; 749: 358-362
- 15 Ceyhan GO, Bergmann F, Kadihasanoglu M, Erkan M, Park W, Hinz U, Giese T, Müller MW, Büchler MW, Giese NA, Friess H. The neurotrophic factor artemin influences the extent of neural damage and growth in chronic pancreatitis. *Gut* 2007; 56: 534-544
- 16 Michalski CW, Laukert T, Sauliunaite D, Pacher P, Bergmann F, Agarwal N, Su Y, Giese T, Giese NA, Bátkai S, Friess H, Kuner R. Cannabinoids ameliorate pain and reduce disease pathology in cerulein-induced acute pancreatitis. *Gastroenterology* 2007; 132: 1968-1978
- 17 Liddle RA. The role of Transient Receptor Potential Vanilloid 1 (TRPV1) channels in pancreatitis. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1772: 869-878
- 18 Immke DC, Gavva NR. The TRPV1 receptor and nociception. *Semin Cell Dev Biol* 2006; 17: 582-591
- 19 Xu GY, Winston JH, Shenoy M, Yin H, Pendyala S, Pasricha PJ. Transient receptor potential vanilloid 1 mediates hyperalgesia and is up-regulated in rats with chronic pancreatitis. *Gastroenterology* 2007; 133: 1282-1292
- 20 Hartel M, di Mola FF, Selvaggi F, Mascetta G, Wente MN, Felix K, Giese NA, Hinz U, Di Sebastiano P, Büchler MW, Friess H. Vanilloids in pancreatic cancer: potential for chemotherapy and pain management. *Gut* 2006; 55: 519-528
- 21 Liu XG, Sandkuhler J. Activation of spinal N-methyl-D-aspartate or neurokinin receptors induces long-term potentiation of spinal C-fibre-evoked potentials. *Neuroscience* 1998; 86: 1209-1216
- 22 van Esch AA, Wilder-Smith OH, Jansen JB, van Goor H, Drenth JP. Pharmacological management of pain in chronic pancreatitis. *Dig Liver Dis* 2006; 38: 518-526
- 23 Giamberardino MA. Recent and forgotten aspects of visceral pain. *Eur J Pain* 1999; 3: 77-92
- 24 Vera-Portocarrero LP, Xie JY, Kowal J, Ossipov MH, King T, Porreca F. Descending facilitation from the rostral ventromedial medulla maintains visceral pain in rats with experimental pancreatitis. *Gastroenterology* 2006; 130: 2155-2164
- 25 Mertz H, Fullerton S, Naliboff B, Mayer EA. Symptoms and visceral perception in severe functional and organic dyspepsia. *Gut* 1998; 42: 814-822
- 26 Drewes AM, Reddy H, Pedersen J, Funch-Jensen P, Gregersen H, Arendt-Nielsen L. Multimodal pain stimulations in patients with grade B oesophagitis. *Gut* 2006; 55: 926-932
- 27 Sarnthein J, Stern J, Aufenberg C, Rousson V, Jeanmonod D. Increased EEG power and slowed dominant frequency in patients with neurogenic pain. *Brain* 2006; 129: 55-64
- 28 Drewes AM, Krarup AL, Detlefsen S, Malmström ML, Dimcevski G, Funch-Jensen P. Pain in chronic pancreatitis: the role of neuropathic pain mechanisms. *Gut* 2008; 57: 1616-1627
- 29 Andren-Sandberg A, Hoem D, Gislason H. Pain management in chronic pancreatitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002; 14: 957-970
- 30 Smiley MM, Lu Y, Vera-Portocarrero LP, Zidan A, Westlund KN. Intrathecal gabapentin enhances the analgesic effects of subtherapeutic dose morphine in a rat experimental pancreatitis model. *Anesthesiology* 2004; 101: 759-765

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

NKG2D及其配体在消化系统肿瘤中的研究进展

万娟, 李国华

万娟, 李国华, 南昌大学第一附属医院消化科 江西省南昌市 330006

国家自然科学基金资助项目, No. 30760086

作者贡献分布: 本课题由李国华设计; 万娟撰写; 李国华审校。

通讯作者: 李国华, 教授, 330006, 江西省南昌市永外正街17号, 南昌大学第一附属医院消化科. liguohua98@sohu.com

电话: 0411-83600680 传真: 0411-83631284

收稿日期: 2009-09-07 修回日期: 2009-11-02

接受日期: 2009-11-02 在线出版日期: 2009-11-08

Advances in understanding the role of NKG2D and its ligands in digestive system tumors

Juan Wan, Guo-Hua Li

Juan Wan, Guo-Hua Li, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nan Chang 330006, Jiangxi Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30760086

Correspondence to: Professor Guo-Hua Li, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, 17 Yongwai Center Street, Nan Chang 330006, Jiangxi Province, China. liguohua98@sohu.com

Received: 2009-09-07 Revised: 2009-11-02

Accepted: 2009-11-02 Published online: 2009-11-08

Abstract

Natural killer group 2D (NKG2D) is a C-type lectin-like activating receptors on natural killer (NK) cells. The ligands for NKG2D are frequently expressed on the surface of inflammatory cells and tumor cells, but are rarely detected in healthy cells and tissues. In recent years, some studies have proved that there is decreased expression of NKG2D but increased expression of its ligands in tumor cells. NKG2D-mediated antitumor response plays an important role in innate immunity. More and more researchers believe that NKG2D and its ligands have great value for early identification, diagnosis and treatment of tumors. In this article, we will review recent discoveries concerning the role of NKG2D and its ligands in signal transduction and tumor immunity, especially in digestive system tumors.

Key Words: NKG2D; Digestive system tumors; Immune surveillance; Immune escape

Wan J, Li GH. Advances in understanding the role of

NKG2D and its ligands in digestive system tumors. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2009; 17(31): 3233-3236

摘要

NKG2D为NK细胞表面的C型凝集素样活化性受体, 其配体主要表达于炎性细胞和肿瘤细胞表面, 在正常细胞表面很少表达甚至不表达。近来实验证实肿瘤细胞中, NKG2D表达下调, 而其可溶性配体的表达明显增加, NKG2D介导的抗肿瘤反应在天然免疫中起重要作用。越来越多研究者认为NKG2D及其配体对肿瘤的早期识别、诊断及治疗研究具有重要意义。本文就NKG2D及其配体的介绍、信号传导、肿瘤免疫, 特别是消化系统肿瘤中的研究现状和诊治中的应用等方面作一综述。

关键词: NKG2D; 消化系统肿瘤; 免疫监视; 免疫逃逸

万娟, 李国华. NKG2D及其配体在消化系统肿瘤中的研究进展. 世界华人消化杂志 2009; 17(31): 3233-3236

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3233.asp>

0 引言

NKG2D(natural killer group 2D)是20世纪90年代发现的免疫受体, 可表达于多种免疫细胞上, 参与适应性及固有性免疫应答, 调节自然杀伤(natural killer, NK)细胞、T细胞、巨噬细胞、树突状细胞的功能。NKG2D配体为HLA-I类相关基因产物, 在人类和鼠类中有所不同, 但相同的是这些分子在正常的细胞不表达或低表达, 却在应激细胞、肿瘤细胞及病原体感染细胞上表达上调, 且研究证实表达NKG2D配体的多种肿瘤和肿瘤细胞系对NK细胞的免疫杀伤有较高的敏感性, 表达NKG2D配体的肿瘤细胞更易被机体清除。这为肿瘤的早期诊断及免疫治疗带来了新希望, 在此我们就NKG2D在消化系统肿瘤方面的研究现状进行了回顾。

1 NKG2D及其配体

1.1 NKG2D NKG2D属于NKG2家族, 在人类由位于12p12.3-p13.1(鼠类位于6号染色体)的NK基因

背景资料

NKG2D是NK细胞表面的活化性受体, 属于NKG2家族, 其配体主要表达于应激细胞和肿瘤细胞表面, 很少表达甚至不表达于正常细胞表面, NKG2D介导的抗肿瘤反应在天然免疫中起重要作用。消化系统肿瘤的发病率长期居高不下, 使NKG2D及其配体在消化系统肿瘤的早期识别、诊断及免疫治疗等方面具有重要价值。

同行评议者

曹志成, 英国生物医学科学研究所院士, 伊利沙伯医院临床肿瘤科; 张国梁, 主任医师, 天津市第一中心医院消化内科

相关报道

Guerra *et al*通过敲除NKG2D编码基因,首次在基因水平证明了NKG2D在原发性肿瘤中有重要的免疫监视作用. Park *et al*通过多元RT-PCR检测,发现胃肠道肿瘤组织较周围邻近组织中的NKG2D配体的表达水平明显增高,因此认为此多元RT-PCR可能成为一种有效诊断胃肠道肿瘤的方式.

复合体中的klrk1编码,为II型膜蛋白,相对分子质量为42 kDa,是多种免疫细胞表面的C型凝集素样受体,在NK、 $\gamma\delta^+$ T细胞和CD8⁺ T细胞介导的对肿瘤和感染的免疫反应起重要作用.

1.2 NKG2D配体 迄今为止,人们已经发现了多种NKG2D配体,人类NKG2D的配体有MHC-I类相关分子MICA、MICB和另一类MHC-I类相关分子ULBP. 鼠类中与NKG2D相结合的是次要组织相容性抗原H260、视黄酸可诱导蛋白(Rae1)、H60、Mult1等,他们表达于多种肿瘤细胞表面.

人类MIC基因定位于6号染色体短臂的MHC I类基因区, MICA和MICB编码区有84%的同源序列,而与经典I类分子仅有28%-30%的同源性. 其具有高度多态性,主要是胞外区有50个位点的氨基酸变化不定^[1], MICA有54个等位基因, MICB也有17个等位基因^[2]. MIC分子有 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 和 $\alpha 3$ 3个胞外结构域,一个跨膜区和一个羧基胞质区. 与经典MHC I类分子明显不同的是, MICs的分子折叠、结构稳定性及其在细胞表面的表达均不需要结合抗原肽和 $\beta 2$ 微球蛋白的辅助^[3]. 在正常人体内MIC分布仅局限于胃肠道上皮、内皮细胞以及成纤维细胞. 而在感染、肿瘤以及器官移植受体组织细胞中都有MIC的表达.

ULBP即人巨细胞病毒蛋白UL16的结合蛋白,同样属于MHC-I类相关分子家族, ULBP基因家族由10个成员组成,其中6个编码潜在功能的糖蛋白,他们定位于6q24.2-6q25.3长臂近末端,接近于人类相当位置是鼠H2环绕的t复合体. 在对该蛋白家族和小鼠蛋白进行相关性对比中,发现这个亚染色体区域类似于鼠10号染色体片段,即MHC-I相关视黄酸早期转录场所^[4]. 不同ULBP分子有50%-60%的相同氨基酸序列,与MIC和MHC-I类分子之间大约有25%的序列同源. ULBP结构均带有MHC-I类分子样 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 结构域,但是缺乏免疫球蛋白样 $\alpha 3$ 结构域,同样也不与 $\beta 2$ 微球蛋白结合. 其中ULBP1、ULBP2、ULBP3和RAET1L都是通过糖基磷脂酰肌醇(glycosyl-phosphatidyl inositol, GPI)与膜靶向联接的,而ULBP4、RAET1E和RAET1G有跨膜区和胞质区,无需和GPI结合^[5]. 与MIC相比, ULBP表达更为广泛,可以表达于多种细胞、组织、肿瘤.

小鼠体内,视黄酸早期转录因子1(retinoic acid early transcript 1, Rae1)和组织相容性抗

原60(histocompatibility 60, H60),他们和人的NKG2D配体MICA/MICB无相关性,表达于肿瘤及应激细胞表面. 小鼠ULBP样转录因子1(routine ULBP-like transcript 1, Mult1)在许多组织中都有表达,在一些小鼠肿瘤细胞株中也有表达. 当靶细胞异位产生Mult1时,能激活NK细胞和巨噬细胞的杀伤活性,有效地诱导抗肿瘤反应. Rae1、H60、Mult1三者之间大约有20%-28%相同氨基酸序列.

2 NKG2D 信号传导

NKG2D与其配体形成六聚体结构. 在鼠类,NKG2D存在2种截然不同的链接类型. NKG2D-L较NKG2D-S在N基末端多有13种氨基酸. NKG2D活化信号的传导主要依靠接头蛋白(adaptor protein)与受体结合. 最初报道, NKG2D-S与DAP10和DAP12链接,而NKG2D-L不与DAP12链接,但是最近研究表明DAP10和DAP12同等竞争不同种NKG2D. 这些研究都是在基于转染其受体的细胞中进行的,而在原代NK细胞方面的证据仍未见报道, NKG2D-L表达于静止NK细胞表面, NKG2D-S通过激活诱导. DAP10与DAP12的主要差别在于胞质区结构, DAP12含典型的免疫受体酪氨酸活化基序(ITAM)Yxx(L/I)x11Yxx(L/I)序列,通过酪氨酸激酶磷酸化后,激活SyK、ZAP-70. 而DAP10不含ITAM,但含与CD28胞质段类似的YxxM基序,即SH2功能区,可与磷脂酰肌醇-3-激酶(Phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)的p85亚基结合,通过PI3K可以活化下游分子^[6].

在CD8⁺ T细胞,缺乏DAP12的表达, NKG2D与DAP10特异性结合. 敲除小鼠DAP10基因后,小鼠NK细胞表面NKG2D分子表达降低,而CD8⁺ T细胞上则不再表达NKG2D,其抗肿瘤应答也受到损伤,说明DAP10有助于NKG2D的表达,且能通过其他途径抗肿瘤免疫作用^[7]. Zompi *et al*^[8]发现NKG2D/DAP10可以直接使活化的鼠NK细胞脱颗粒,产生细胞毒作用,但不引起细胞因子的表达. 在人类是否也存在这种现象尚需进一步研究. 而抑制PI-3K的活性可以干扰NK细胞释放的穿孔素(perforin)和粒酶B(granzyme B)趋向靶细胞,从而阻止NK细胞杀伤及溶解靶细胞.

NKG2D还可作为协同刺激分子传递第二信号增强其他活化性受体对NK细胞的激活作用^[24]. NKG2D配体ULBP结合NKG2D后有多种下游信号分子发生变化,如Ca²⁺流动,磷酸化JAK2、STAT5、ERK、AKT等信号分子^[9].

3 NKG2D及其配体与肿瘤免疫

Guerra *et al*^[7]通过敲除NKG2D编码基因, 发现鼠原发性肿瘤明显增多, 首次在基因水平证明了NKG2D在原发性肿瘤中有重要的免疫监视作用, 并且表明了NKG2D介导的免疫监视在限制肿瘤早期发生中的作用. 研究发现, 在肿瘤患者大量的肿瘤浸润和相对应的外周血T细胞中, NKG2D的表达显著减少^[10]. NKG2D与配体结合后可激活NK细胞和CD8⁺效应细胞, 产生IFN- γ 并对肿瘤细胞发挥细胞毒性作用, 从而引起NKG2D的免疫监视作用. 而肿瘤免疫逃逸与可溶性配体增加^[11-15]; MICA与内质网蛋白-5(endoplasmic reticulum protein 5, ERp5)相互作用并通过基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)从细胞表面脱落, 引起NKG2D的下调或封闭; TGF- β 、IFN- γ 降低NKG2D及其配体的表达等有关^[6].

4 消化系肿瘤中NKG2D研究现状

消化系肿瘤中NKG2D均明显下调. 胃癌患者NKG2D较健康者明显降低^[12]. NK细胞对肝癌细胞有较强的细胞毒效应, 加入抗NKG2DpAb后, 可显著抑制NK细胞对HepG2细胞的细胞毒效应^[16]. CD8⁺ T细胞表面NKG2D表达的下调程度与胃癌的分期、分化程度相关^[17]. 结肠癌细胞上的MIC通过Fas配体激动NKG2D介导的细胞杀伤作用^[18], 通过下调NKG2D配体来逃避机体的免疫监视^[19-20].

消化系肿瘤及癌前病变中可溶性MICA/B表达升高. 有学者检测发现慢性肝病和原发性肝癌患者的血清可溶性MICA/B的水平明显高于健康志愿者, 且与肝脏损害程度和是否合并肿瘤都明显相关^[21]. MICA/B不仅表达于HCC组织而且也表达于肝硬化的肝脏, 经肝动脉栓塞治疗显著降低了血清可溶性MICA的水平, 并且增加了NK细胞及CD8⁺ T细胞表面NKG2D的表达. 王山川的研究中, 胃癌患者血清sMICA明显高于健康对照组, 且胃癌患者血清sMICA水平的高低与胃癌发展阶段和转移程度相关^[20]. Marten *et al*^[22]研究发现胰腺癌细胞表达MIC及患者血清中可溶性MIC升高水平与肿瘤的分期及分化程度相关, 可溶性MIC通过直接削弱NK和 $\gamma\delta$ T的细胞杀伤性降低NKG2D介导的抗胰腺癌的肿瘤免疫, IFN- α 可能部分是通过上调MIC的表达而非降低可溶性MIC的释放来辅助胰腺癌的治疗的. 抗肿瘤药物表柔比星则可通过下

调金属蛋白10的表达来抑制可溶性MICA分子的脱落, 从而达到治疗肝细胞癌的目的^[23].

消化系肿瘤中配体增加与基因启动子甲基化相关. 研究表明在甲基转移酶缺陷的HCT116大肠癌细胞中, 在大量免疫基因上调的同时, MHC基因HLA-A1/A2和ULBP2基因, 编码NKG2D活性配体, 并发现ULBP2启动子的去甲基化与ULBP2的表达增加密切相关^[24].

5 NKG2D在消化系肿瘤诊治中的应用

目前的一些研究涉及NKG2D在消化系肿瘤诊治中的应用, 提示NKG2D及其配体的相互作用可能清除肿瘤细胞, 或使肿瘤细胞逃避免疫杀伤, 肿瘤细胞表面配体的表达水平起关键作用. Park *et al*^[25]通过RT-PCR检测, 发现胃肠道肿瘤组织较周围邻近组织中的NKG2D配体的表达水平明显增高, 因此认为此方式的多元RT-PCR可能成为一种有效诊断胃肠道肿瘤的方式. 还有研究人员以编码NKG2D配体H60和肿瘤相关抗原survivin/CEA的联合DNA疫苗治疗小鼠肿瘤, 发现联合应用的疫苗比单独应用肿瘤相关抗原或NKG2D配体的疫苗抗肿瘤能力明显增强^[26]. 无疑NKG2D配体具有潜在治疗肿瘤价值, 编码NKG2D配体的DNA疫苗作为免疫佐剂可能是一种有效治疗肿瘤的方式. 另外, 抗肿瘤治疗可能有助于NKG2D介导的抗肿瘤免疫. Guerra *et al*^[7]的研究说明癌症的免疫治疗中可能可以加入一些新的治疗性操作, 这些操作与NKG2D相关性肿瘤免疫有关. 但从致癌相关性的肉瘤模型中可以看出, 由于NKG2D相关性免疫监视的肿瘤易感性并不广泛, 所以这种基因治疗需要修饰而适合特定的肿瘤亚型. 而NKG2D相关的肿瘤靶向治疗有待进一步研究, 目前尚属空白.

6 结论

目前关于NKG2D的研究不断增多, 但还是有许多问题仍然有待于进一步的探索和证实. 首先对于NKG2D的下游信号传导尚不很清楚, 主要参与此途径的调节的分子也不清楚. 其次, 肿瘤细胞为什么表达导致自身死亡的MICA/B配体, 而正常细胞只有少部分细胞表达; 可溶性MICA/B虽然可以使肿瘤细胞产生免疫逃逸, 但他是否导致免疫细胞NKG2D下降, 具体机制又是什么? 第三, 是否有其他可溶性NKG2D配体参与肿瘤的免疫逃逸尚不清楚. 第四, 在消化系

创新盘点
本文系统介绍了NKG2D及其配体, 相关信号传导, 总结了NKG2D及其配体在肿瘤免疫, 特别是消化系肿瘤早期诊断, 免疫治疗等方面的最新国内外研究进展. 这将为消化系疾病相关早期检测、免疫治疗试剂及相关肿瘤疫苗的开发提供理论依据.

同行评价
本文能较好地反映国内外消化系统肿瘤基础研究水平,具有一定的科学性和参考价值。

肿瘤中,目前的研究基本局限在NKG2D及其配体MICA/B的表达研究,对其信号传导分子及其他配体等的研究很少。在临床上是否能成为早期诊断、疾病复发、治疗效果评价工具尚不清楚。虽然部分研究提示可能成为消化系统肿瘤治疗的靶点之一,但结果有待进一步验证和探索。

7 参考文献

- Mizutani K, Terasaki P, Bignon JD, Hourmant M, Cesbron-Gautier A, Shih RN, Pei R, Lee J, Ozawa M. Association of kidney transplant failure and antibodies against MICA. *Hum Immunol* 2006; 67: 683-691
- Ahmad T, Marshall SE, Mulcahy-Hawes K, Orchard T, Crawshaw J, Armuzzi A, Neville M, van Heel D, Barnardo M, Welsh KL, Jewell DP, Bunce M. High resolution MIC genotyping: design and application to the investigation of inflammatory bowel disease susceptibility. *Tissue Antigens* 2002; 60: 164-179
- Holmes MA, Li P, Petersdorf EW, Strong RK. Structural studies of allelic diversity of the MHC class I homolog MIC-B, a stress-inducible ligand for the activating immunoreceptor NKG2D. *J Immunol* 2002; 169: 1395-1400
- Radosavljevic M, Cuillerier B, Wilson MJ, Clément O, Wicker S, Gilfillan S, Beck S, Trowsdale J, Bahram S. A cluster of ten novel MHC class I related genes on human chromosome 6q24.2-q25.3. *Genomics* 2002; 79: 114-123
- Chalupny NJ, Sutherland CL, Lawrence WA, Rein-Weston A, Cosman D. ULBP4 is a novel ligand for human NKG2D. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 305: 129-135
- Nausch N, Cerwenka A. NKG2D ligands in tumor immunity. *Oncogene* 2008; 27: 5944-5958
- Guerra N, Tan YX, Joncker NT, Choy A, Gallardo F, Xiong N, Knoblaugh S, Cado D, Greenberg NM, Raulet DH. NKG2D-deficient mice are defective in tumor surveillance in models of spontaneous malignancy. *Immunity* 2008; 28: 571-580
- Zompi S, Hamerman JA, Ogasawara K, Schweighoffer E, Tybulewicz VL, Di Santo JP, Lanier LL, Colucci F. NKG2D triggers cytotoxicity in mouse NK cells lacking DAP12 or Syk family kinases. *Nat Immunol* 2003; 4: 565-572
- Sutherland CL, Chalupny NJ, Schooley K, VandenBos T, Kubin M, Cosman D. UL16-binding proteins, novel MHC class I-related proteins, bind to NKG2D and activate multiple signaling pathways in primary NK cells. *J Immunol* 2002; 168: 671-679
- Groh V, Wu J, Yee C, Spies T. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature* 2002; 419: 734-738
- Cao W, Xi X, Hao Z, Li W, Kong Y, Cui L, Ma C, Ba D, He W. RAET1E2, a soluble isoform of the UL16-binding protein RAET1E produced by tumor cells, inhibits NKG2D-mediated NK cytotoxicity. *J Biol Chem* 2007; 282: 18922-18928
- Watson NF, Spendlove I, Madjd Z, McGilvray R, Green AR, Ellis IO, Scholefield JH, Durrant LG. Expression of the stress-related MHC class I chain-related protein MICA is an indicator of good prognosis in colorectal cancer patients. *Int J Cancer* 2006; 118: 1445-1452
- 王义平. NKG2D配体在13种肿瘤细胞系中的表达及意义. *癌症* 2008; 27: 243-248
- Song H, Kim J, Cosman D, Choi I. Soluble ULBP suppresses natural killer cell activity via down-regulating NKG2D expression. *Cell Immunol* 2006; 239: 22-30
- Holdenrieder S, Stieber P, Peterfi A, Nagel D, Steinle A, Salih HR. Soluble MICA in malignant diseases. *Int J Cancer* 2006; 118: 684-687
- 杨林, 刘映霞. 肝细胞癌NKG2D表达及对NK细胞细胞毒的影响. *医学临床研究* 2004; 21: 475-477
- Osaki T, Saito H, Yoshikawa T, Matsumoto S, Tatebe S, Tsujitani S, Ikeguchi M. Decreased NKG2D expression on CD8+ T cell is involved in immune evasion in patients with gastric cancer. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 382-387
- Ebert EC, Groh V. Dissection of spontaneous cytotoxicity by human intestinal intraepithelial lymphocytes: MIC on colon cancer triggers NKG2D-mediated lysis through Fas ligand. *Immunology* 2008; 124: 33-41
- 刘丹, 贾筱琴, 龚卫娟, 田芳, 李明春. 不同淋巴细胞亚群NKG2D的表达与结肠癌发病关系的研究. *实用临床医药杂志* 2008; 12: 47-50
- 王山川. 胃癌患者NK细胞活化性受体NKG2D及其可溶性配体MICA表达的初步研究. *山西医药杂志* 2008; 37: 427-428
- Kohga K, Takehara T, Tatsumi T, Ohkawa K, Miyagi T, Hiramatsu N, Kanto T, Kasugai T, Katayama K, Kato M, Hayashi N. Serum levels of soluble major histocompatibility complex (MHC) class I-related chain A in patients with chronic liver diseases and changes during transcatheter arterial embolization for hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci* 2008; 99: 1643-1649
- Märten A, von Lilienfeld-Toal M, Büchler MW, Schmidt J. Soluble MIC is elevated in the serum of patients with pancreatic carcinoma diminishing gamma delta T cell cytotoxicity. *Int J Cancer* 2006; 119: 2359-2365
- Kohga K, Takehara T, Tatsumi T, Miyagi T, Ishida H, Ohkawa K, Kanto T, Hiramatsu N, Hayashi N. Anticancer chemotherapy inhibits MHC class I-related chain a ectodomain shedding by downregulating ADAM10 expression in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2009; 69: 8050-8057
- Sers C, Kuner R, Falk CS, Lund P, Sueltmann H, Braun M, Bunes A, Ruschhaupt M, Conrad J, Mang-Fatehi S, Stelniec I, Krapfenbauer U, Poustka A, Schäfer R. Down-regulation of HLA Class I and NKG2D ligands through a concerted action of MAPK and DNA methyltransferases in colorectal cancer cells. *Int J Cancer* 2009; 125: 1626-1639
- Park SW, Bae JH, Kim SD, Son YO, Kim JY, Park HJ, Lee CH, Park DY, Kim JY, Lee MK, Chung BS, Kim SH, Kang CD. Comparison of level of NKG2D ligands between normal and tumor tissue using multiplex RT-PCR. *Cancer Invest* 2007; 25: 299-307
- Zhou H, Luo Y, Lo JF, Kaplan CD, Mizutani M, Mizutani N, Lee JD, Primus FJ, Becker JC, Xiang R, Reisfeld RA. DNA-based vaccines activate innate and adaptive antitumor immunity by engaging the NKG2D receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 10846-10851

α -2a干扰素对大鼠肝组织*bcl-2*基因表达的影响及意义

席文娜, 孙水林, 李方春, 罗杰, 肖影群, 章萍, 张伟

席文娜, 孙水林, 张伟, 南昌大学第二附属医院感染科 江西省南昌市 330006

李方春, 江西省丰城市人民医院感染科 江西省丰城市 331100

罗杰, 江西中医学院科技学院 江西省南昌市 330006

肖影群, 章萍, 南昌大学附属感染病医院病理科 江西省南昌市 330006

作者贡献分布: 本课题由孙水林与罗杰设计; 研究过程由席文娜、肖影群、章萍、李方春及张伟共同操作完成; 数据分析由席文娜完成; 论文写作由席文娜与孙水林共同完成。

通讯作者: 孙水林, 教授, 主任医师, 330006, 江西省南昌市, 南昌大学第二附属医院感染科. sunshuilin2280@126.com

电话: 0791-6291817

收稿日期: 2009-08-07 修回日期: 2009-11-02

接受日期: 2009-11-02 在线出版日期: 2009-11-08

Effects of IFN α -2a on *bcl-2* expression in the fibrotic liver of rats

Wen-Na Xi, Shui-Lin Sun, Fang-Chun Li,
Ying-Qun Xiao, Ping Zhang, Wei Zhang

Wen-Na Xi, Shui-Lin Sun, Wei Zhang, Department of Infectious Diseases, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China

Fang-Chun Li, Department of Infectious Diseases, the People's Hospital of Fengcheng, Fengcheng 331100, Jiangxi Province, China

Jie Luo, College of Science and Technology, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China

Ying-Qun Xiao, Ping Zhang, Department of Pathology, Nanchang Infectious Disease Hospital, Affiliated to Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China

Correspondence to: Professor Shui-Lin Sun, Department of Infectious Diseases, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China. sunshuilin2280@126.com

Received: 2009-08-07 Revised: 2009-11-02

Accepted: 2009-11-02 Published online: 2009-11-08

Abstract

AIM: To investigate the effects of interferon α -2a (IFN α -2a) on *bcl-2* gene expression in the fibrotic liver of rats and explore potential mechanisms involved.

METHODS: Hepatic fibrosis was induced in rats by subcutaneous injection of carbon tetrachloride (CCl₄). Sprague-Dawley rats were randomly divided into normal control group, fibrosis mod-

el group and IFN α -2a intervention group. The expression of *bcl-2* gene in the liver was detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Liver tissue samples were taken for conventional hematoxylin and eosin (HE) staining and reticular fiber staining to observe histological changes.

RESULTS: A rat model of liver fibrosis was successfully established. IFN α -2a treatment significantly ameliorated liver fibrosis and fatty degeneration, but showed no impact on hepatic inflammation in fibrotic rats. The expression level of *bcl-2* mRNA in the IFN α -2a intervention group was significantly lower than that in the fibrosis model group ($P < 0.01$), but higher than that in the normal control group ($P < 0.01$).

CONCLUSION: IFN α -2a can effectively ameliorate CCl₄-induced hepatic fibrosis and liver fatty degeneration possibly via a mechanism associated with downregulating *bcl-2* gene expression and controlling apoptosis of HSC.

Key Words: Hepatic fibrosis; Interferon α -2a; *bcl-2* gene

Xi WN, Sun SL, Li FC, Luo J, Xiao YQ, Zhang P, Zhang W. Effects of IFN α -2a on *bcl-2* expression in the fibrotic liver of rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(31): 3237-3240

摘要

目的: 探讨 α -2a干扰素(IFN α -2a)对大鼠肝组织*bcl-2*基因表达的影响和对肝纤维化的作用及其机制。

方法: 将SD大鼠随机分成纤维化模型组(A组, CCl₄诱导形成大鼠肝纤维化模型), 对照组(B组)及IFN α -2a干预组(C组)。用RT-PCR法检测各组大鼠肝脏*bcl-2*的表达, 常规HE和网状纤维染色检测肝组织标本。

结果: C组纤维化程度及肝细胞脂肪变性较A组显著减轻, 但肝组织炎症改变无显著差异性。C组*bcl-2*基因蛋白表达显著低于A组($P < 0.01$), 但显著高于B组*bcl-2*基因蛋白表达

背景资料

肝纤维化是一切慢性肝病的共同病理基础, HSC是参与肝纤维化过程的重要细胞, 其活化增殖是肝纤维化发生机制的中心环节, 抑制HSC增殖, 诱导其凋亡是抗纤维化的重要策略。

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

相关报道

Watanabe *et al*报道 IFN α 可提高MMP活性,促进ECM降解. Ninomiya *et al*认为IFN α 可以直接影响MMP及TIMP的比率,从而促进胶原的降解,使肝纤维化改善.

的量($P<0.01$).

结论: IFN α -2a能够阻断CCl $_4$ 诱导的肝纤维化和减少肝脂肪变性. 其机制与*bcl-2*基因表达有关,可能通过调节*bcl-2*基因表达与HSC凋亡,从而阻断肝纤维化和减少肝脂肪变性.

关键词: 肝纤维化; α -2a干扰素; *bcl-2*基因

席文娜, 孙水林, 李方春, 罗杰, 肖影群, 章萍, 张伟. α -2a干扰素对大鼠肝组织*bcl-2*基因表达的影响及意义. 世界华人消化杂志 2009; 17(31): 3237-3240
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3237.asp>

0 引言

肝纤维化是一切慢性肝病的共同病理基础,其实质是组织发生修复反应时细胞外基质(extracellular matrix, ECM)合成、降解与沉积不平衡而引起的病理过程^[1]. 肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)是参与肝纤维化过程的重要细胞,他的活化增殖是肝纤维化发生机制的中心环节,抑制HSC增殖,诱导其凋亡是抗纤维化的重要策略^[2-3].

α -干扰素(interferon α , IFN α)能直接抑制ECM形成,对已经形成的肝纤维化,使ECM降解是抗肝纤维化的重要策略^[4-6]. IFN α 可提高基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)活性,促进ECM降解^[7]. IFN α 可以直接影响MMP及组织金属蛋白酶抑制剂(tissue inhibitor of metalloproteinase, TIMP)的比率,从而促进胶原的降解,使肝纤维化改善^[8]. 但IFN α 是否能通过细胞凋亡通路阻断肝纤维化,目前报道少见.

本研究旨在观察IFN α -2a对大鼠肝组织*bcl-2*基因表达的影响,以探讨IFN α -2a对肝纤维化的作用及其机制.

1 材料和方法

1.1 材料 SD大鼠, δ , 体质量 250 ± 20 g,由南昌大学医学院动物科学部提供. 总RNA提取试剂盒(北京天根公司), 逆转录酶, PCR试剂(上海Promega公司), 引物设计参考文献[9], 借助Pubmed Nucleotide获取目的基因全序列, 验证参考文献引物. PCR引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成. IFN α -2a由长春长生基因药业股份有限公司生产.

1.2 方法

1.2.1 分组及造模: 实验大鼠随机分为3组. 纤维化模型组(A组, $n=15$): 按0.3 mL/100 g皮下注射

50% CCl $_4$ (用花生油稀释), 每周2次, 共8 wk; 对照组(B组, $n=10$): 以等量生理盐水皮下注射, 每周2次, 共8 wk; IFN α -2a组(C组, $n=15$): 在用CCl $_4$ 建立肝纤维化模型的同时隔日肌肉注射IFN α -2a 6×10^4 U/(kg \cdot d), 共8 wk. 在实验结束时, 总共8只大鼠死亡, 其中A组5只, C组3只. 其余大鼠处死前12 h禁食禁水, 用10%戊巴比妥麻醉大鼠.

1.2.2 取材及染色: 在无茵条件下迅速剪切50-100 g肝脏尾状叶组织, 放入无茵弯盘, 剪成碎块, 用无茵PBS液冲洗2-3次, 再放入RNAstore液, -20 $^{\circ}$ C冷藏提取RNA用. 剩余肝脏组织用100 g/L甲醛固定, 石蜡切片用于检测项目. HE染色: 经100 g/L甲醛固定, 石蜡包埋切片处理后制成4 μ m厚连续切片6张, 切片面积约1 cm \times 1 cm, 常规HE染色. 特殊染色: 网状纤维染色.

1.2.3 *bcl-2* mRNA检测: 采用RT-PCR技术, 设置 β -actin为内对照, 引物序列: β -actin: 上游: 5'-TCAGGTCATCACTATCGGCAAT-3', 下游: 5'-AAAGAAAGGGTGTA AAA CGCA-3'(扩增产物为462 bp); *bcl-2*: 上游 5'-CGGGAGAACAGGGTATGA-3'; 下游5'-CA GGCTGGAAGGAGAAGAT-3'(扩增产物为149 bp). PCR反应参数: 94 $^{\circ}$ C预变性5 min, 94 $^{\circ}$ C变性35 s, 52 $^{\circ}$ C退火35 s, 72 $^{\circ}$ C延伸35 s, 30循环; 72 $^{\circ}$ C延伸7 min.

1.2.4 结果判定: 将RT-PCR产物在15 g/L琼脂糖凝胶上进行电泳, 用BANDLEAD系统测量扩增条带辉度值, 以*bcl-2*/ β -actin的比值分别表示*bcl-2*的相对水平, 并进行统计学处理.

统计学处理 所有指标均用mean \pm SD表示, 采用SPSS16.0统计软件进行方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 病理学改变 纤维化模型组肝组织纤维化程度明显, 表现为肝细胞结构紊乱, 广泛肝细胞脂肪变性, 坏死及弥漫的纤维间隔形成, 但肝组织炎症轻度(图1A, 图2A); IFN α -2a干预组肝细胞脂肪变性及肝纤维化程度较模型对照组显著减轻, 肝组织炎症也为轻度, 较纤维化模型组无显著差异性(图1B, 图2B); 对照组可见炎症不明显, 极少数芒状纤维形成(图1C, 图2C).

2.2 Bcl-2蛋白表达 纤维化模型组、对照组、IFN α -2a干预组*bcl-2*/ β -actin相对吸光度比值分别为 0.98 ± 0.03 、 0.86 ± 0.03 、 0.96 ± 0.02 . IFN α -2a干预组*bcl-2*基因蛋白表达显著低于纤

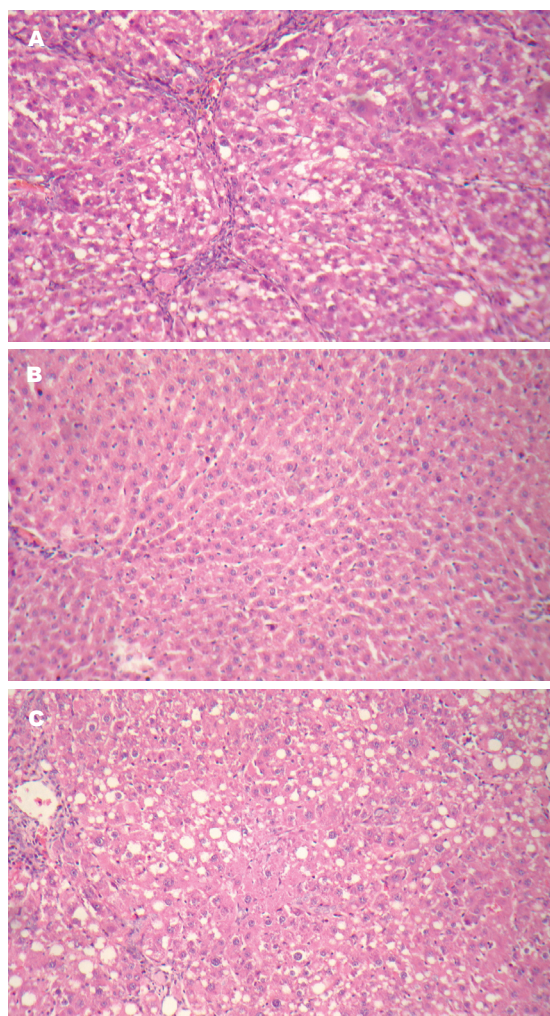


图 1 肝组织病理学改变(HE × 100). A: 纤维化模型组; B: 对照组; C: IFN α -2a干预组.

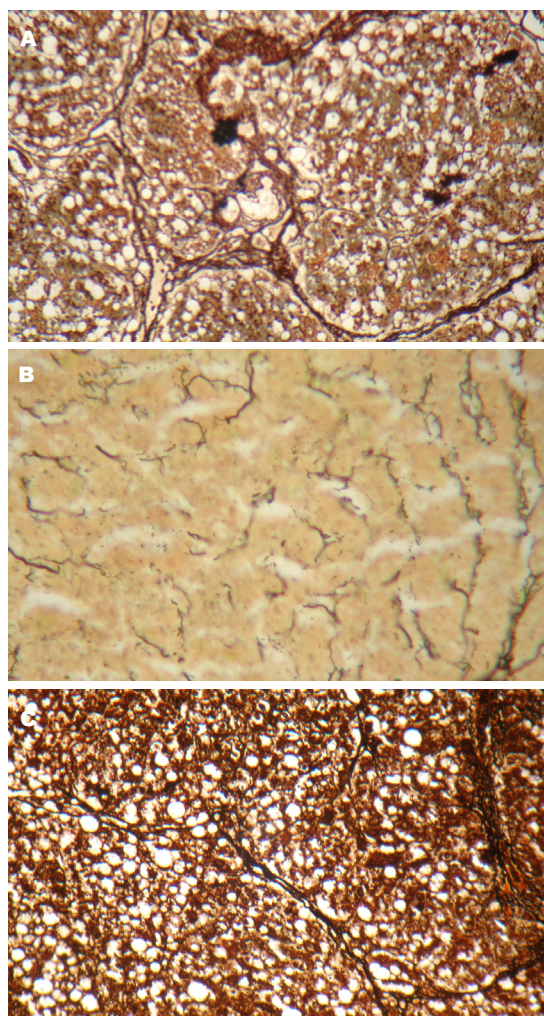


图 2 肝组织病理学改变(网状纤维染色 × 100). A: 纤维化模型组; B: 对照组; C: IFN α -2a干预组.

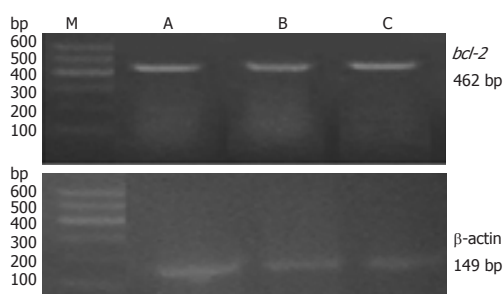


图 3 各实验组肝组织 β -actin和**bcl-2**基因蛋白表达. M: 100 bp DNA Marker; A: 纤维化模型组; B: 对照组; C: IFN α -2a干预组.

纤维化模型组($P < 0.01$); 对照组**bcl-2**基因蛋白表达显著低于纤维化模型组和IFN α -2a干预组(均 $P < 0.01$, 图3).

3 讨论

目前国内外研究表明肝纤维化的发病机制和HSC凋亡密切相关, 研究HSC与肝纤维化的内在

创新点
IFN α 是否能够通过细胞凋亡通路阻断肝纤维化, 目前报道少见. 本研究旨在观察IFN α -2a对大鼠肝组织**bcl-2**基因表达的影响, 以探讨IFN α -2a对肝纤维化的作用及其机制.

联系, 对预防肝纤维化有着重要的临床意义. 近年发现, **bcl-2**为一种细胞凋亡抑制基因. HSC是否发生凋亡主要受**bcl-2**家族的调控. 其中**bcl-2**是最重要的抗凋亡因子. 在慢性肝病的研究中发现**bcl-2**过表达^[10]; 在肝纤维化时, HSC凋亡障碍与**bcl-2**表达上调导致细胞对CD95等凋亡信号敏感性降低有关^[11]; **bcl-2**在人肝纤维化过程中呈过表达, 导致HSC持续活化, 这也是慢性肝病迁延难愈的原因之一^[10-11].

IFN α 抗病毒、抗肿瘤和免疫调节作用已人所共知, 国内外学者也逐渐公认IFN α 有预防肝纤维化形成的作用^[5]. IFN α 抗纤维化的机制是通过抗病毒、抗炎作用减少对肝纤维化形成细胞的刺激^[12], 还是通过促进肝内ECM降解^[7], 或者通过细胞凋亡途径具有抗肝纤维化作用. 目前具体机制尚不十分透彻. 该研究旨在观察IFN α -2a对大鼠肝组织**bcl-2**基因表达的影响, 以探讨IFN α -2a对肝纤维化的作用及其机制.

同行评价
本研究设计合理,
可为干扰素 α -2a
抗肝纤维化作用
机制提供参考,具
有一定可读性。

本实验结果表明对照组仅见极少数芒状纤维形成, IFN α -2a干预组和纤维化模型组纤维化明显, 但IFN α -2a干预组纤维化程度较纤维化模型组显著减轻, 提示IFN α -2a能够阻断CCl₄诱导的肝纤维化。对照组肝组织炎症不明显, IFN α -2a干预组和纤维化模型组炎症均为轻度, 并无显著差异性。提示IFN α -2a阻断由CCl₄引起的肝纤维化并不是直接通过抗炎作用实现, 可能存在其他途径。细胞凋亡途径也许起了至关重要的作用, 因为实验中发现, 纤维化模型组肝组织中**bcl-2**基因表达最强, 对照组**bcl-2**基因表达最弱, 而IFN α -2a干预组肝组织中**bcl-2**基因的表达介于两者之间, 有显著差异性($P<0.01$)。IFN α -2a干预组显著抑制了肝纤维化肝组织中**bcl-2**基因的表达。由此可见, 随着肝纤维化程度加重, **bcl-2**基因的表达也增强。有研究认为**bax/bcl-2**基因表达比值与肝纤维化程度正相关^[13]。Novo *et al*^[11]认为激活的人HSC对大多数预凋亡刺激抵抗都归咎于**bcl-2**的过度表达。这种特征在肝脏疾病纤维化进程中也起着至关重要的作用。可见, **bcl-2**基因的表达在肝纤维化发生发展中起了重要的作用。因此, 我们认为IFN α -2a可能通过调节**bcl-2**基因表达, 从而阻断CCl₄诱导的肝纤维化, 但IFN α -2a又是如何通过调节**bcl-2**基因表达阻断肝纤维化的呢? 有报道IFN α 通过抑制HSC和胶原的激活来阻断由猪血清诱导的大鼠肝纤维化^[14]; IFN α 能够抑制转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β)的表达, 减少HSC的激活和刺激他的凋亡^[15]。这些资料均提示IFN α 抗纤维化的作用与HSC凋亡密切相关。因此, 我们认为IFN α -2a可能通过调节**bcl-2**基因表达, 调控HSC凋亡, 阻断CCl₄诱导的肝纤维化。研究中还发现, IFN α -2a干预组肝细胞脂肪变性减少, 提示IFN α -2a能够减少由CCl₄的肝脂肪变性, 其机制尚未见报道, 可能也与**bcl-2**基因密切相关, 具体机制还有待于进一步研究。

总之, IFN α -2a能够阻断CCl₄诱导的肝纤维化和减少肝脂肪变性。其机制与**bcl-2**基因表达有关, 可能通过调节**bcl-2**基因表达, 调控HSC凋亡, 从而阻断肝纤维化和减少肝脂肪变性。

参考文献

- 1 Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 2005; 115: 209-218
- 2 李石. 肝纤维化发生机制. 中华消化杂志 1999; 19: 48-50
- 3 王丽辉, 童坦君. 神经生长因子. 生物化学与生物物理进展 1992; 19: 29
- 4 Friedman SL. Mechanisms of disease: Mechanisms of hepatic fibrosis and therapeutic implications. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2004; 1: 98-105
- 5 Okazaki I, Watanabe T, Inagaki Y. [Recent advance in understanding mechanisms of fibrogenesis and fibrolysis in hepatic fibrosis] *Nippon Shokakibyo Gakkai Zasshi* 2002; 99: 353-364
- 6 Brenard R. Practical management of patients treated with alpha interferon. *Acta Gastroenterol Belg* 1997; 60: 211-213
- 7 Watanabe T, Niioka M, Ishikawa A, Hozawa S, Arai M, Maruyama K, Okada A, Okazaki I. Dynamic change of cells expressing MMP-2 mRNA and MT1-MMP mRNA in the recovery from liver fibrosis in the rat. *J Hepatol* 2001; 35: 465-473
- 8 Ninomiya T, Yoon S, Nagano H, Kumon Y, Seo Y, Kasuga M, Yano Y, Nakaji M, Hayashi Y. Significance of serum matrix metalloproteinases and their inhibitors on the antifibrogenetic effect of interferon-alfa in chronic hepatitis C patients. *Intervirology* 2001; 44: 227-231
- 9 Cheng Y, Ping J, Xu LM. Effects of curcumin on peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression and nuclear translocation/redistribution in culture-activated rat hepatic stellate cells. *Chin Med J (Engl)* 2007; 120: 794-801
- 10 Mutluay R, Ozenirler S, Poyraz A. The expression of bcl-2 in chronic liver diseases. *Saudi Med J* 2005; 26: 1245-1249
- 11 Novo E, Marra F, Zamara E, Valfrà di Bonzo L, Monitillo L, Cannito S, Petrai I, Mazzocca A, Bonacchi A, De Franco RS, Colombatto S, Autelli R, Pinzani M, Parola M. Overexpression of Bcl-2 by activated human hepatic stellate cells: resistance to apoptosis as a mechanism of progressive hepatic fibrogenesis in humans. *Gut* 2006; 55: 1174-1182
- 12 Maria Elzbieta SL, Marek LD. Histological outcome of chronic hepatitis B in children treated with interferon alpha. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 7179-7182
- 13 李继强, 柳恽, 刘文忠, 马雄, 朱红音, 陈晓宇, 彭延申. 依那普利对肝组织bax和bcl-2基因表达的影响. 中华消化杂志 2006; 26: 539-543
- 14 Wu CS, Piao XX, Piao DM, Jin YR, Li CH. Treatment of pig serum-induced rat liver fibrosis with Boschniakia rossica, oxymatrine and interferon-alpha. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 122-126
- 15 Chang XM, Chang Y, Jia A. Effects of interferon-alpha on expression of hepatic stellate cell and transforming growth factor-beta1 and alpha-smooth muscle actin in rats with hepatic fibrosis. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 2634-2636

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

西罗莫司对肝癌HepG2细胞的增殖及mTOR、HIF-1 α 的抑制作用

王渝, 熊晶, 程恒辉, 周晟, 赵秋

王渝, 熊晶, 程恒辉, 周晟, 华中科技大学同济医学院附属同济医院病理科 湖北省武汉市 430030

赵秋, 华中科技大学同济医学院附属同济医院消化内科 湖北省武汉市 430030

作者贡献分布: 此课题由赵秋与王渝设计; 研究过程由王渝与周晟操作完成; 数据分析由王渝、熊晶及程恒辉完成; 本论文写作由赵秋与王渝完成。

通讯作者: 赵秋, 教授, 430030, 湖北省武汉市汉口区解放大道1095号, 华中科技大学同济医学院附属同济医院消化内科。

tongji461@sina.com

电话: 027-83663611

收稿日期: 2009-09-10 修回日期: 2009-10-22

接受日期: 2009-10-26 在线出版日期: 2009-11-08

Sirolimus inhibits cell proliferation and downregulates mTOR and HIF-1 α expression in human hepatic carcinoma HepG2 cells

Yu Wang, Jing Xiong, Hen-Hui Cheng, Sheng Zhou, Qiu Zhao

Yu Wang, Jing Xiong, Hen-Hui Cheng, Sheng Zhou, Department of Pathology, Tongji Hospital, Affiliated to Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China

Qiu Zhao, Department of Gastroenterology, Tongji Hospital, Affiliated to Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China

Correspondence to: Professor Qiu Zhao, Department of Gastroenterology, Tongji Hospital, Affiliated to Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, 1095 Jiefang Avenue, Hankou District, Wuhan 430030, Hubei Province, China. tongji461@sina.com

Received: 2009-09-10 Revised: 2009-10-22

Accepted: 2009-10-26 Published online: 2009-11-08

Abstract

AIM: To investigate the inhibitory effects of sirolimus on cell proliferation and mammalian target of rapamycin (mTOR) and hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) expression in human hepatic carcinoma HepG2 cells, and explore the potential mechanisms involved in the therapeutic effects of sirolimus against hepatic carcinoma.

METHODS: HepG2 cells were cultured under hypoxic conditions. Different concentrations of sirolimus (0.1-1000 nmol/L) were incubated

with HepG2 cells for 24 hours. Cell proliferation was measured by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay. The expression of mTOR and HIF-1 α proteins was determined by Western blot.

RESULTS: Sirolimus could significantly inhibit the proliferation of HepG2 cells in a concentration-dependent manner (all $P < 0.05$). The expression levels of mTOR and HIF-1 α proteins were significantly lower in sirolimus-treated HepG2 cells than in untreated cells (both $P < 0.05$).

CONCLUSION: Sirolimus exerts anticancer activity possibly by downregulating HIF-1 α expression and inducing apoptosis in HepG2 cells under hypoxia conditions via a mechanism dependent on the mTOR signaling pathway.

Key Words: Sirolimus; Hepatic carcinoma; Mammalian target of rapamycin; hypoxia inducible factor-1 α

Wang Y, Xiong J, Cheng HH, Zhou S, Zhao Q. Sirolimus inhibits cell proliferation and downregulates mTOR and HIF-1 α expression in human hepatic carcinoma HepG2 cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(31): 3241-3243

摘要

目的: 观察西罗莫司对体外培养的肝癌HepG2细胞增殖及mTOR、HIF-1 α 基因的抑制作用, 探讨以mTOR为靶点治疗肝癌可能的细胞内信号转导机制。

方法: 缺氧培养HepG2细胞, 外源性给予不同浓度的西罗莫司(0.1-1000 nmol/L)刺激细胞24 h, MTT法检测不同浓度药物对肝癌细胞增殖的影响。Western blot法检测药物刺激后HepG2细胞内mTOR和HIF-1 α 蛋白的表达。

结果: 西罗莫司可显著抑制肝癌细胞HepG2的增殖, 其抑制率随药物浓度的增加而上升(均 $P < 0.05$)。在西罗莫司的干预下, HepG2细胞中mTOR和HIF-1 α 蛋白的表达水平显著下降, 实验组与对照组比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。

背景资料

西罗莫司, 原称雷帕霉素, 是从吸水性链霉菌发酵液中提取出的一种大环内酯类抗生素, 是哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)特异性抑制剂, 起初作为一种器官移植抗排斥的新型高效免疫抑制剂, 新近研究发现他还具有良好的抗肿瘤活性, 但其抗肿瘤分子机制尚待进一步研究。

同行评议者
党双锁, 教授, 西安交通大学第二医院感染科

创新盘点

本文通过外源性给予不同浓度的西罗莫司, 观察缺氧条件下药物对肝癌细胞增殖及mTOR、HIF-1 α 基因表达的影响, 探讨以mTOR为靶点治疗肝癌的可行性及分子生物学基础。

结论: 在缺氧条件下, 西罗莫司可通过mTOR信号转导途径下调肝癌HepG2细胞内HIF-1 α 蛋白表达, 诱导细胞凋亡, 这可能是西罗莫司发挥抗肿瘤效应的机制之一。

关键词: 西罗莫司; 肝癌; 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白; 缺氧诱导因子-1 α

王渝, 熊晶, 程恒辉, 周晟, 赵秋. 西罗莫司对肝癌HepG2细胞的增殖及mTOR、HIF-1 α 的抑制作用. 世界华人消化杂志 2009; 17(31): 3241-3243

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3241.asp>

0 引言

哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)是一种高度保守的蛋白质, 具有蛋白激活酶的活性, 在许多人类肿瘤中高表达; 与肿瘤的发生、发展, 正常细胞向癌细胞转化以及癌细胞的生长增殖密切相关^[1]. 西罗莫司, 是mTOR特异性抑制剂, 起初作为一种器官移植抗排斥新型高效免疫抑制剂. 近年来, 有研究发现他具有良好的抗肿瘤活性. 本研究拟选取人肝癌HepG2细胞系, 观察不同浓度的西罗莫司对HepG2细胞增殖及mTOR和HIF-1 α 基因表达的影响, 探讨以mTOR为靶点治疗肝癌的可行性及分子生物学基础。

1 材料和方法

1.1 材料 人肝癌HepG2细胞株由本所冻存. 西罗莫司购自福建科瑞药业, 兔抗人mTOR多克隆抗体购自Santa Cruz, 鼠抗人HIF-1 α mAb购自RnD.

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: 常氧培养: 细胞置于37℃、50 mL/L CO₂的普通CO₂培养箱内培养. 缺氧培养: 细胞置于37℃、10 mL/L O₂、50 mL/L CO₂、940 mL/L N₂的三气培养箱中培养.

1.2.2 分组: 将细胞随机分为4组: (1)常氧对照组, 不添加任何药物; (2)缺氧对照组, 不添加任何药物; (3)低剂量药物组(10 nmol/L西罗莫司); (4)高剂量药物组(1000 nmol/L西罗莫司). 细胞常氧培养24 h后, 将后3组细胞转置于缺氧培养箱中缺氧培养24 h.

1.2.3 MTT法检测西罗莫司对HepG2细胞增殖的抑制作用: 取对数生长期的细胞制成单细胞悬液, 按每孔 1×10^4 个细胞接种进96孔板中, 常氧培养24 h后, 分别加入终浓度为0.1、1、10、100、1000 nmol/L的西罗莫司, 每浓度设4个复孔, 以不含西罗莫司培养基的细胞作为阴性对

照, 空白孔调零. 继续培养24 h后, 每孔加MTT 20 μ L, 4 h后弃上清, 每孔加DMSO 150 μ L, 振荡10 min, 492 nm测定各孔的吸光值(A值). 按以下公式计算抑制率: 抑制率(%) = (1-试验组平均A值/对照组平均A值) \times 100%

1.2.4 Western blot法检测各组细胞内mTOR、HIF-1 α 蛋白的表达: 提取各组细胞总蛋白, 测定蛋白含量. 蛋白经SDS-PAGE电泳分离, 电转至NC膜上, 50 g/L的脱脂奶粉37℃封闭2 h. 分别加入兔抗人mTOR一抗(1:200)、兔抗人HIF-1 α 一抗(1:200)和鼠抗人 β -actin一抗(1:100)4℃孵育过夜, TBST洗3次, 1:3000加入HRP标记的羊抗兔IgG或羊抗鼠IgG, 37℃孵育1 h, ECL显色, 压片曝光, 洗片.

统计学处理 所有实验数据均以mean \pm SD, 以SPSS13.0统计软件进行数据分析, 多组间比较采用单因素方差分析, 两组间比较采用S-N-K检验.

2 结果

2.1 西罗莫司对SW1990细胞增殖的影响 MTT结果显示, 不同浓度的西罗莫司均能有效抑制HepG2细胞的增殖, 且其抑制率随药物浓度的增加而上升. 在0.1、1、10、100、1000 nmol/L药物梯度, 细胞生长的抑制率分别为39.35% \pm 3.47%、43.47% \pm 4.25%、51.12% \pm 2.31%、60.23% \pm 1.76%、69.52% \pm 2.60%. 随着药物作用浓度的增大, 细胞生长抑制率呈显著上升趋势(均 $P < 0.05$).

2.2 西罗莫司对mTOR、HIF-1 α 蛋白表达的影响 Western blot结果显示(图1), mTOR蛋白在缺氧对照组细胞内的表达与空白对照组相比无明显差异; 空白对照组细胞内HIF-1 α 蛋白的表达较弱, 缺氧对照组HIF-1 α 蛋白的表达明显增强, 2组间存在显著性差异($P < 0.05$). 在不同药物浓度组, 西罗莫司均可明显抑制HepG2细胞内mTOR、HIF-1 α 蛋白的表达, 并且这种抑制作用与药物作用浓度密切相关(均 $P < 0.05$).

3 讨论

西罗莫司(silrolimus), 原称雷帕霉素(rapamycin), 是Ayerst研究所从太平洋Easter岛土壤样品中分离的大环内酯类抗生素. 起初作为一种器官移植抗排斥的新型高效免疫抑制剂, 近年来研究发现他还具有良好的抗肿瘤活性. 西罗莫司在哺乳动物细胞内的靶点是mTOR, 他进入细胞后与FKBP12结合, 形成一种“功能获得性”复合物-rapamycin/FKBP12, 强烈抑制mTOR的蛋白激酶催化活性, 使之对其下游底物的磷酸化调节作用减弱或消失^[2-4]. 目前, 西罗莫司对肿

应用要点

本研究结果提示, mTOR信号转导通路有望成为癌症分子治疗中又一极具潜力的靶点, 为恶性肿瘤的靶向治疗提供新的途径。

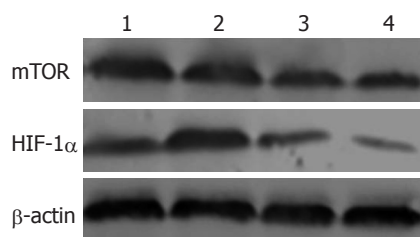


图1 西罗莫司对肝癌细胞mTOR、HIF-1 α 蛋白表达的影响。1: 常氧对照组; 2: 缺氧对照组; 3: 低剂量药物组(10 nmol/L西罗莫司); 4: 高剂量药物组(1000 nmol/L西罗莫司)。

瘤细胞生长的抑制作用和促进凋亡的作用已经在多种肿瘤中得到证实^[5-7]。mTOR作为一种重要的调节基因, 不仅在正常细胞的生长增殖中起着极其重要的作用, 而且与正常细胞向癌细胞转化以及癌细胞的生长增殖密切相关, 是细胞生长、分化的中心调控者^[8-9]。因此深入研究mTOR基因及其信号通路, 可能为肿瘤的靶向治疗提供新的思路和方法。本研究通过给予不同浓度的西罗莫司干预人肝癌HepG2细胞, 采用Western blot法检测各组中mTOR的表达水平, 发现西罗莫司对mTOR的表达有明显抑制作用, 且西罗莫司作用浓度越高, 其抑制作用越强。

HIF-1 α 是目前发现的氧依赖的信号传递途径当中极其重要的一个转录因子, 其高水平表达与肿瘤的发生、发展和转移密切相关^[10-12]。HIF-1 α 能激活多种缺氧适应性基因如VEGF、EPO、NOS等的表达, 对维持肿瘤细胞的能量代谢、刺激新血管生成、促进肿瘤增殖和转移起重要作用^[13-15]。有研究提示^[16]西罗莫司作为一种高度特异的mTOR抑制剂, 既能抑制HIF-1 α 的合成, 又能增加其降解, 并能调节HIF-1 α 基因调控的其他基因的表达。本研究结果显示, 不同浓度的药物均可显著抑制HIF-1 α 蛋白的表达。此外, 随着药物作用浓度的增高, HIF-1 α 蛋白的表达水平呈下降趋势, 进一步表明西罗莫司可通过mTOR信号途径在蛋白水平上调控HIF-1 α 基因的表达。

总之, 西罗莫司对肝癌HepG2细胞的增殖有明显的抑制作用。在缺氧条件下, 西罗莫司可显著抑制HepG2细胞中mTOR、HIF-1 α 的表达, 表明西罗莫司可能通过抑制mTOR信号转导途径下调HepG2细胞内HIF-1 α 的表达, 进而抑制肿瘤的增殖。本研究结果提示mTOR信号转导通路有望成为癌症分子治疗中又一极具潜力的靶点, 为恶性肿瘤的靶向治疗提供新的途径。

4 参考文献

- Schmelzle T, Hall MN. TOR, a central controller of cell growth. *Cell* 2000; 103: 253-262
- Huang S, Houghton PJ. Inhibitors of mammalian target of rapamycin as novel antitumor agents: from bench to clinic. *Curr Opin Investig Drugs* 2002; 3: 295-304
- Chen F, Omasa M, Kondo N, Fujinaga T, Shoji T, Sakai H, Bando T. Sirolimus treatment for recurrent lymphangioleiomyomatosis after lung transplantation. *Ann Thorac Surg* 2009; 87: e6-e7
- Hay N, Sonenberg N. Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev* 2004; 18: 1926-1945
- Hidalgo M, Rowinsky EK. The rapamycin-sensitive signal transduction pathway as a target for cancer therapy. *Oncogene* 2000; 19: 6680-6686
- Benito AI, Furlong T, Martin PJ, Anasetti C, Appelbaum FR, Doney K, Nash RA, Papayannopoulou T, Storb R, Sullivan KM, Witherspoon R, Deeg HJ. Sirolimus (rapamycin) for the treatment of steroid-refractory acute graft-versus-host disease. *Transplantation* 2001; 72: 1924-1929
- Cejka D, Preusser M, Fuehrer T, Sieghart W, Werzowa J, Strommer S, Wacheck V. mTOR inhibition sensitizes gastric cancer to alkylating chemotherapy in vivo. *Anticancer Res* 2008; 28: 3801-3808
- Vignot S, Faivre S, Aguirre D, Raymond E. mTOR-targeted therapy of cancer with rapamycin derivatives. *Ann Oncol* 2005; 16: 525-537
- Pene F, Claessens YE, Muller O, Viguié F, Mayeux P, Dreyfus F, Lacombe C, Bouscary D. Role of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and mTOR/P70S6-kinase pathways in the proliferation and apoptosis in multiple myeloma. *Oncogene* 2002; 21: 6587-6597
- Semenza GL. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J Appl Physiol* 2000; 88: 1474-1480
- Carmeliet P, Dor Y, Herbert JM, Fukumura D, Brusselmans K, Dewerchin M, Neeman M, Bono F, Abramovitch R, Maxwell P, Koch CJ, Ratcliffe P, Moons L, Jain RK, Collen D, Keshert E. Role of HIF-1 α in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature* 1998; 394: 485-490
- Jung HJ, Park JW, Lee JS, Lee SR, Jang BC, Suh SI, Suh MH, Baek WK. Silibinin inhibits expression of HIF-1 α through suppression of protein translation in prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 390: 71-76
- Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 721-732
- Wang W, Xu GL, Jia WD, Wang ZH, Li JS, Ma JL, Ge YS, Xie SX, Yu JH. Expression and correlation of hypoxia-inducible factor-1 α , vascular endothelial growth factor and microvessel density in experimental rat hepatocarcinogenesis. *J Int Med Res* 2009; 37: 417-425
- Denko NC. Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour. *Nat Rev Cancer* 2008; 8: 705-713
- Hudson CC, Liu M, Chiang GG, Otterness DM, Loomis DC, Kaper F, Giaccia AJ, Abraham RT. Regulation of hypoxia-inducible factor 1 α expression and function by the mammalian target of rapamycin. *Mol Cell Biol* 2002; 22: 7004-7014

同行评价

本研究设计合理, 结论对于阐述西罗莫司发挥抗肿瘤效应的机制有一定的意义。

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

不同药物干预防治大鼠NSAID相关小肠损伤的观察

方莉, 吕宾, 孟立娜, 张烁, 吴炜烽

背景资料
非甾体类抗炎药(NSAID)具有解热、镇痛、抗炎、抗风湿和抗血小板聚集等作用, 广泛用于内、外、妇、儿科疾病。然而可引发胃肠道黏膜充血、水肿、糜烂及一过性浅表溃疡, 重者可造成多发溃疡合并消化系出血、穿孔, 甚至危及生命。NSAID的严重不良事件大大限制了其临床应用。

方莉, 吕宾, 孟立娜, 张烁, 吴炜烽, 浙江中医药大学附属第一医院消化科 浙江省杭州市 310006

作者贡献分布: 此课题由方莉、吕宾、孟立娜、张烁及吴炜烽设计; 研究过程由方莉与吴炜烽操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由方莉与张烁提供; 数据分析由方莉完成; 本论文写作由方莉、吕宾及孟立娜完成。

通讯作者: 孟立娜, 教授, 主任医师, 310006, 浙江省杭州市邮电路54号, 浙江中医药大学附属第一医院消化科。mln6713@163.com
电话: 0571-86620283

收稿日期: 2009-03-26 修回日期: 2009-08-26

接受日期: 2009-10-12 在线出版日期: 2009-11-08

Preventive effects of different drugs on intestinal damage induced by non-steroidal anti-inflammatory drugs in rats

Li Fang, Bin Lv, Li-Na Meng, Shuo Zhang, Wei-Feng Wu

Li Fang, Bin Lv, Li-Na Meng, Shuo Zhang, Wei-Feng Wu, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310006, Zhejiang Province, China

Correspondence to: Professor Li-Na Meng, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, 54 Youdian Road, Hangzhou 310006, Zhejiang Province, China. mln6713@163.com
Received: 2009-03-26 Revised: 2009-08-26

Accepted: 2009-10-12 Published online: 2009-11-08

Abstract

AIM: To compare the preventive effects of different drugs on diclofenac sodium-induced intestinal injury in rats.

METHODS: Forty-eight male Sprague-Dawley rats were randomly and equally divided into six groups: normal control group, receiving distilled water 1 mL/(100 g·d) for 5 days; model control group, receiving diclofenac sodium 7.8 mg/(kg·d) for 5 days; and five treatment groups, receiving teprenone 15.63 mg/(kg·d), esomeprazole 4.17 mg/(kg·d), gefarnate 31.25 mg/(kg·d) and metronidazole 156.25 mg/(kg·d) for six days, respectively, beginning from the day before diclofenac sodium was given as the model control group. Intestinal mucosal samples were taken 24 hours after the last drug administration to observe and compare morphological and histological changes.

同行评议者
房静远, 教授, 上海交通大学医学院附属仁济医院, 上海市消化疾病研究所

RESULTS: Compared with the normal control group, the morphological and histological scores increased significantly in the model control group (4.38 ± 1.41 and 4.00 ± 1.85 vs 0, respectively; both $P < 0.05$). The morphological scores were much lower in all treatment groups than in the model control group (2.38 ± 1.69 , 2.00 ± 2.27 , 1.13 ± 1.36 and 2.00 ± 1.60 vs 4.38 ± 1.41 , respectively; all $P < 0.05$). The histological scores were also significantly lower in the esomeprazole treatment group, gefarnate treatment group and metronidazole treatment group than in the model control group (1.88 ± 1.25 , 1.75 ± 0.71 and 2.00 ± 1.07 vs 4.00 ± 1.85 , respectively; all $P < 0.05$). There was no significant differences in the morphological and histological scores among each treatment group (all $P > 0.05$).

CONCLUSION: Teprenone, esomeprazole, gefarnate and metronidazole can exert protective effects on intestinal injury induced by non-steroidal anti-inflammatory drugs in rats.

Key Words: Different drugs; Intestinal damage; Non-steroidal anti-inflammatory drug

Fang L, Lv B, Meng LN, Zhang S, Wu WF. Preventive effects of different drugs on intestinal damage induced by non-steroidal anti-inflammatory drugs in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(31): 3244-3248

摘要

目的: 通过短期小剂量双氯酚酸口服制备大鼠NSAID相关小肠损伤模型, 探讨不同药物干预对大鼠NSAID相关小肠损伤的影响。

方法: 48只♂SD大鼠随机分为空白组、实验对照组、药物干预组, 其中药物干预组又分为替普瑞酮组、埃索美拉唑组、吉法酯组及甲硝唑组, 每组8只。采用双氯芬酸0.78 mg/(kg·d), 共5 d灌胃制备大鼠小肠损伤模型; 替普瑞酮、埃索美拉唑、吉法酯、甲硝唑组分别以15.63、4.17、31.25、156.25 mg/(kg·d), 于造模前1 d起灌胃, 每天1次, 共6 d。实验期间大鼠正常饮食饮水。5 d后处死所有大鼠, 观察小肠黏膜的大体及组织学损伤情况。

结果: 实验对照组大鼠大体评分及组织学评分均较空白组明显升高(4.38 ± 1.41 , 4.00 ± 1.85 vs 0, 均 $P < 0.05$); 与实验对照组比较, 替普瑞酮、埃索美拉唑、吉法酯、甲硝唑组大体评分均明显降低(2.38 ± 1.69 , 2.00 ± 2.27 , 1.13 ± 1.36 , 2.00 ± 1.60 vs 4.38 ± 1.41 , 均 $P < 0.05$), 组织学评分除替普瑞酮组外, 其余各组均有显著下降(2.25 ± 1.39 , 1.88 ± 1.25 , 1.75 ± 0.71 , 2.00 ± 1.07 vs 4.00 ± 1.85 , 均 $P < 0.05$); 各药物干预组间比较, 差异无统计学意义(均 $P > 0.05$).

结论: 短期小剂量双氯芬酸口服即可致小肠黏膜损伤, 替普瑞酮、埃索美拉唑、吉法酯、甲硝唑对大鼠NSAID相关小肠损伤具有保护作用, 可有效减轻大鼠小肠损伤.

关键词: 不同药物; 小肠损伤; 非甾体抗炎药

方莉, 吕宾, 孟立娜, 张烁, 吴炜烽. 不同药物干预防治大鼠NSAID相关小肠损伤的观察. 世界华人消化杂志 2009; 17(31): 3244-3248
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3244.asp>

0 引言

非甾体类抗炎药(non-steroidal anti-inflammatory drug, NSAID)通过抑制环氧合酶(cyclooxygenase, COX)减少前列腺素(prostaglandins, PGs)合成而起到解热、镇痛、抗炎、抗风湿和抗血小板聚集等作用, 其临床疗效得到公认. 目前NSAID是处方药和非处方药中用量最大的药物之一, 广泛用于内、外、妇、儿科疾病^[1]. 然而, NSAID广泛应用的同时, 其不良反应报道日益增多, 涉及多个系统和器官. 据美国FDA资料显示, NSAID所致不良事件约占药物不良反应的1/3^[2], 其中对胃肠损害的研究与报道最多. 虽然NSAID胃肠不良事件相当普遍, 其临床价值仍无可替代, 积极寻找防治NSAID相关胃肠损伤的理想药物仍是当前研究的重点. 本研究选择了消化系不同类药物替普瑞酮、埃索美拉唑、吉法酯、甲硝唑, 观察其对大鼠NSAID相关小肠损伤是否具有预防保护作用, 以期临床防治工作提供实验依据.

1 材料和方法

1.1 材料 健康♂ SPF级SD大鼠48只, 8-9周龄, 体重220-260 g(浙江中医药大学动物实验中心提供). 双氯芬酸缓释片(北京诺华制药有限公司), 国药准字H10980297; 替普瑞酮(日本卫材株式

会社制造), 国药准字J20030052; 埃索美拉唑(阿斯利康制药有限公司), 国药准字H20046379; 吉法酯(日本生晃荣养药品株式会社), 进口药品注册证号H20040173; 甲硝唑片(浙江医药股份有限公司新昌制药厂), 国药准字H33020249.

1.2 方法

1.2.1 分组: 48只♂ SD大鼠采用随机抽签法随机分成6组, 分别为空白组、实验对照组、替普瑞酮组、埃索美拉唑组、吉法酯组、甲硝唑组, 每组8只.

1.2.2 模型制备: 参照文献[3]及预实验结果, 设定双氯芬酸造模剂量为7.8 mg/(kg·d). 将双氯芬酸溶于生理盐水中, 配置成浓度为0.78 g/L双氯酚酸溶液. 造模前1 d, 施维舒组、耐信组、惠加强组、甲硝唑组分别予15.63、4.17、31.25、156.25 mg/(kg·d)(人类日常口服剂量折算而成)灌胃1次. 造模当日起, 空白组予1 mL/100 g体重生理盐水灌胃1次, 共5 d; 实验对照组予7.8 mg/kg双氯芬酸溶液灌胃1次, 共5 d; 各药物干预组于各药物相应剂量灌胃1 h后再予造模剂量双氯芬酸灌胃1次, 共5 d. 造模期间大鼠正常饮食饮水.

1.2.3 标本处理: 末次给药24 h后, 以3%戊巴比妥钠0.15 mL/100 mg腹腔注射麻醉处死所有大鼠, 打开腹腔, 观察腹腔情况, 分离肠系膜, 距回盲部40 cm近侧端取空肠1 cm, 用冰生理盐水冲洗干净后, 将标本肠黏膜层向上平铺于硬纸板上, 大头针固定, 置于40 g/L甲醛液中固定, 常规石蜡包埋切片, 苏木精-伊红(HE)染色, 镜下观察并进行组织学损伤评分. 将剩余小肠肠腔剪开, 放大镜观察全小肠大体损伤情况.

1.2.4 肠黏膜损伤评分: 肠黏膜损伤大体形态评分按下列标准进行^[4]: 0分: 无损伤; 1分: 局部充血、水肿但未出现溃疡; 2分: 有溃疡, 但不伴黏膜明显充血水肿等炎性表现; 3分: 有溃疡, 且伴一处黏膜炎症; 4分: 有多处溃疡和炎症, 溃疡<1 cm; 5分: 有多处溃疡和炎症, 且至少一处溃疡>1 cm.

1.2.5 肠黏膜组织学损伤评分: 光镜下观察病理变化, 按Chiu *et al*^[5]氏法分6级: 0分: 肠黏膜绒毛正常; 1分: 绒毛顶端上皮出现囊状间隙, 并伴有毛细血管充血; 2分: 上皮间间隙扩大, 中度固有层水肿, 中央乳糜管扩张; 3分: 固有层明显水肿, 肠黏膜上皮层细胞变性、坏死, 少数绒毛顶端脱落; 4分: 上皮细胞层变性坏死、脱落, 部分绒毛脱落、固有层裸露, 毛细血管扩张、充血;

研发前沿
NSAID不良反应可涉及胃肠道、心血管、肾脏、肝脏、神经等器官或系统. 其中, 胃肠道刺激和组织损伤尤为常见, 主要是因为肠黏膜屏障受到破坏, 如何尽可能减小NSAID药物的不良反应, 保护并维持肠屏障功能, 已成为目前关注的焦点.

相关报道

Yanagawa *et al*报道, 替普瑞酮可改善NSAID引起的胃黏液减少, 并降低NSAID溃疡发生率。

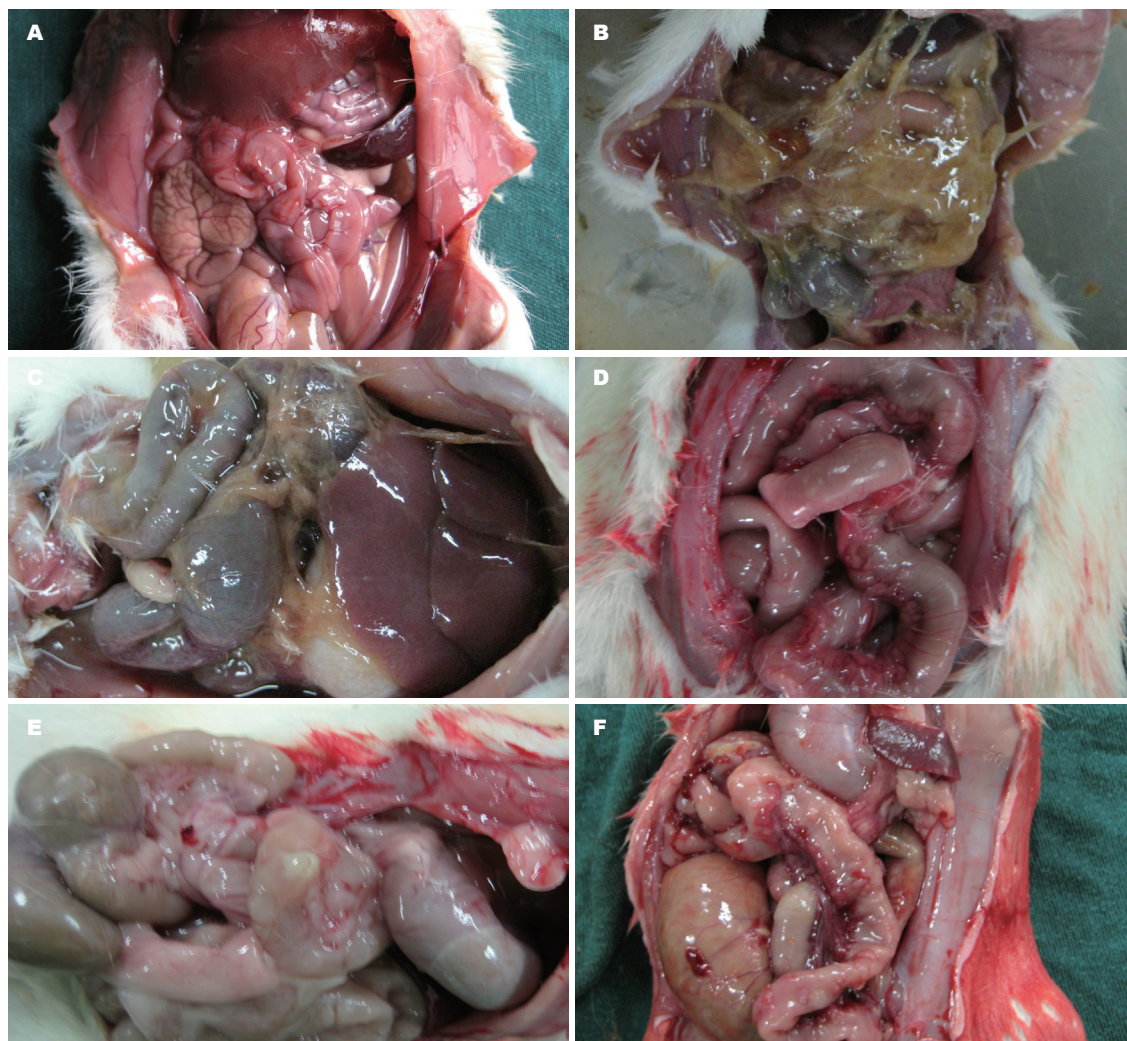


图1 各组大鼠小肠损伤大体观. A: 空白组; B: 实验对照组; C: 替普瑞酮组; D: 埃索美拉唑组; E: 吉法酯组; F: 甲硝唑组.

5分: 绒毛脱落, 固有层崩解, 出血或溃疡形成. 每个样本随机计数20个视野, 对每个视野按标准进行单独评分, 取20个视野最后平均数为最终病理评分.

统计学处理 实验结果均采用 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示, 运用SPSS10.0统计软件包分析. 两组间比较采用秩和检验, 统计量采用Mann-Whitney U 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 一般情况 造模第1天大鼠食欲良好, 大便成形; 造模第3天开始实验对照组大鼠有摄食减少, 懒动拱背, 毛发枯黄, 缺乏光泽, 大便减少, 部分大鼠消瘦, 腹壁毛发湿透, 有腹水形成; 造模第4天实验对照组大鼠死亡2只, 解剖发现死亡大鼠腹腔恶臭, 小肠肠管有明显扩张及出血. 造模第5天实验对照组大鼠濒死3只, 施维舒组大鼠死亡1只, 解剖发现均有腹腔肠道出血穿孔, 中到

大量恶臭腹水, 部分覆黄色脓稠苔.

2.2 肠黏膜大体形态学观察 空白组大鼠无肉眼可见损伤. 实验对照组存活3只大鼠均有小肠黏膜充血红斑, 可见黏膜局部结节样增厚及溃疡形成, 部分肠管发生出血、坏死; 5只死亡大鼠均有肠粘连, 有肠管扩张及肠腔狭窄, 小肠壁多发溃疡灶, 圆形或椭圆形, 沿肠管纵轴分布, 边缘黏膜水肿, 其中1只大鼠发生小肠节段性出血坏死, 1只大鼠并发肠穿孔; 部分小肠内见黑便积聚. 各药物干预组小肠黏膜损伤程度轻重不一, 多表现为黏膜局部充血水肿, 部分出现肠壁散发溃疡及肠壁局部结节样增厚. 比较各组大鼠小肠黏膜大体损伤情况, 死亡大鼠按最高级别评分. 实验对照组明显高于空白组($P < 0.05$), 差异有统计学意义. 各药物干预组小肠损伤则较实验对照组明显减轻(均 $P < 0.05$), 差异有统计学意义(表1, 图1).

2.3 肠黏膜病理组织学观察 肠黏膜HE切片示:

表 1 各组大鼠小肠黏膜大体形态学评分及病理组织学评分 ($n = 8$, mean \pm SD)

分组	大体形态学评分	病理组织学评分
空白组	0.00 \pm 0.00 ^c	0.00 \pm 0.00 ^c
实验对照组	4.38 \pm 1.41 ^a	4.00 \pm 1.85 ^a
替普瑞酮组	2.38 \pm 1.69 ^{ac}	2.25 \pm 1.39 ^a
埃索美拉唑组	2.00 \pm 2.27 ^{ac}	1.88 \pm 1.25 ^{ac}
吉法酯组	1.13 \pm 1.36 ^{ac}	1.75 \pm 0.71 ^{ac}
甲硝唑组	2.00 \pm 1.60 ^{ac}	2.00 \pm 1.07 ^{ac}

^a $P < 0.05$ vs 空白组; ^c $P < 0.05$ vs 实验对照组.

空白组小肠黏膜组织形态正常, 绒毛完整无脱落. 实验对照组小肠黏膜组织结构异常, 绒毛中心分离坏死、脱落, 固有层崩解, 出血伴溃疡形成, 黏膜下可见大量中性粒细胞浸润, 间质有充血、水肿, 组织学损伤评分较空白组明显升高 ($P < 0.05$). 各药物干预组小肠黏膜组织学改变程度不一, 可见轻中度炎性改变, 溃疡散发, 肉芽组织形成等, 除替普瑞酮组外, 其余各组组织学损伤评分均较实验对照组明显降低 (均 $P < 0.05$), 而各干预药物组组间比较 (均 $P > 0.05$), 差异无统计学意义 (表1).

3 讨论

NSAID不良反应可涉及胃肠道、心血管、肾脏、肝脏、神经等器官或系统. 其中, 胃肠道刺激和组织损伤尤为常见, 轻者表现为黏膜充血、水肿、糜烂及一过性浅表溃疡, 重者可造成多发溃疡合并消化系出血、穿孔, 甚至危及生命^[6]. 由于NSAID本身的镇痛作用, 其所致肠道损伤多表现为“无痛性” (即使已存在溃疡、出血)^[7], 且无症状性溃疡更易并发出血、穿孔, 其中15%的患者可有呕血, 黑便发生率高达50%^[8-9]. 我们的实验通过7.8 mg/(kg·d)剂量双氯芬酸灌胃5 d, 实验对照组大鼠死亡5只, 并可见肠腔中到大量恶臭腹水, 肠壁粘连, 多发溃疡、出血坏死、穿孔等, 提示小剂量双氯芬酸即可引起大鼠小肠黏膜受损, 肠屏障破坏. NSAID的严重不良事件大大限制了其临床应用.

肠道是人体与外界环境的最大通道, 肠腔内有大量的细菌和多种毒素. 正常情况下, 人们并不发生严重的感染或中毒性疾病. 这主要与肠黏膜屏障的存在有关, 他包括机械屏障、化学屏障、微生物屏障、免疫屏障等. 机械屏障由黏液层、黏膜上皮细胞以及细胞间紧密连接构成; 化学屏障也称“肠-肝轴”, 主要由胃酸、胆

汁、各种消化酶等化学物质构成; 微生物屏障即由肠道菌群构成的微生态平衡; 免疫屏障则由肠道免疫系统的细胞群构成. 正常情况下, 肠黏膜屏障能有效阻挡外来微生物和毒素的侵袭, 保证机体健康. 然而, 在多种应激情况下或肠黏膜局部受到破坏时, 这种屏障功能减弱, 肠黏膜通透性增加, 存在于肠腔中的致病性微生物和毒素便可跨过肠屏障, 进入淋巴系统和血循环, 导致细菌移位, 引起菌血症或毒血症, 甚至发生炎性级联反应, 最终导致多脏器功能损害. 如何尽可能减小NSAID药物的不良反应, 保护并维持肠屏障功能, 已成为目前关注的焦点.

我们的实验选择了常用于胃黏膜保护及胃溃疡治疗的不同药物: 替普瑞酮、埃索美拉唑、吉法酯、甲硝唑等对大鼠NSAID相关小肠损伤进行干预保护. 替普瑞酮为萜烯类衍生物, 对各种实验性溃疡及胃黏膜病变有较强的抗溃疡和改善胃黏膜病变作用^[10-11], 其主要功能包括增加黏液和磷脂合成, 促进PGs合成, 促进上皮和腺体增生, 促进表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)及碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)等生长因子表达, 诱导热休克蛋白(heat shock protein, HSP)生成提高细胞耐受性以及抑制黏膜炎症和过氧化反应, 增加胃黏膜血流. 已有研究报道, 替普瑞酮可改善NSAID引起的胃黏液减少, 并降低NSAID溃疡发生率^[12]. 埃索美拉唑为奥美拉唑S异构体, 通过特异性靶向性作用机制, 即选择性抑制细胞膜 H^+-K^+-ATP 酶, 阻断胃酸分泌的最终步骤, 产生显著的抑酸分泌作用, 从而减轻胃肠黏膜损伤. 吉法酯主要成分为金合欢乙酸香叶醇酯, 可直接作用于胃肠黏膜上皮细胞, 加速细胞新陈代谢并促进PGs合成, 用于预防NSAID、激素、放化疗以及应激性因素、精神因素引起的胃黏膜损伤, 临床常用于防治NSAID胃病. 甲硝唑作为硝咪唑类抗生素, 除抗菌作用外, 还可降低细胞线粒体氧耗. NSAID的酸性部分可直接损伤膜磷脂, 并使氧化磷酸化解偶联而损伤线粒体, 导致细胞能量耗竭及大量自由基产生等, 结果导致细胞间完整性破坏, 小肠通透性增加, 肠腔细菌侵袭和中性粒细胞浸润等, 这种作用似乎可被甲硝唑所阻断, 可能与甲硝唑可降低线粒体氧耗有关^[13]. 我们的研究发现甲硝唑也明显减轻肠道损伤, 具体机制尚需进一步研究证实.

我们的实验发现各药物干预组大鼠死亡率明显下降, 仅替普瑞酮组大鼠于造模第5天死亡

同行评价
本研究探讨不同药物干预对NSAID相关性大鼠小肠损伤的影响, 实用性强, 有一定的参考价值.

1只,死因为肠道出血穿孔,剩余大鼠小肠黏膜损伤情况较实验对照组均有不同程度减轻,其中溃疡发生率(5/31),肠壁局限性增厚(5/31),其余大鼠均未见明显溃疡发生或仅表现为局部黏膜发红.统计分析亦发现除替普瑞酮组大鼠小肠组织学损伤评分与实验对照组比较无明显差异外,其余各组大鼠小肠大体评分及组织学损伤评分均有明显下降,提示替普瑞酮、埃索美拉唑、吉法酯、甲硝唑对NSAID相关小肠损伤具有保护作用,可不同程度减轻小肠损伤.因此,我们推测其在有效保护胃黏膜,预防胃溃疡的同时亦可积极应用于防治小肠疾病,减轻肠道炎症,从而减少NSAID相关胃肠不良事件的发生.

4 参考文献

- 1 姚中强,于孟学,韩淑玲.非甾体抗炎药.北京医学 2005; 7: 295-299
- 2 Griffin MR. Epidemiology of nonsteroidal anti-inflammatory drug-associated gastrointestinal injury. *Am J Med* 1998; 104: 23S-29S; discussion 41S-42S
- 3 Yamada T, Deitch E, Specian RD, Perry MA, Sartor RB, Grisham MB. Mechanisms of acute and chronic intestinal inflammation induced by indomethacin. *Inflammation* 1993; 17: 641-662
- 4 Zhu F, Qian J, Pan G. [The establishment of TNBS-induced experimental colitis] *Zhongguo Yixue Kexueyuan Xuebao* 1998; 20: 271-278
- 5 Chiu CJ, McArdle AH, Brown R, Scott HJ, Gurd FN. Intestinal mucosal lesion in low-flow states. I. A morphological, hemodynamic, and metabolic reappraisal. *Arch Surg* 1970; 101: 478-483
- 6 彭南安.不同抗酸药防治非甾体类抗炎药胃黏膜损伤的疗效观察.实用药物与临床 2007; 10: 212-214
- 7 崔忠敏,李兆申,范群铭.非甾体类抗炎药胃肠黏膜损伤流行病学及其临床特点.中华消化杂志 2003; 23: 748-750
- 8 Hawkey CJ. Nonsteroidal anti-inflammatory drug gastropathy. *Gastroenterology* 2000; 119: 521-535
- 9 László A, Kelly JP, Kaufman DE, Sheehan JE, Rétsági G, Wiholm BE, Koff RS, Sundström A, Shapiro S. Clinical aspects of upper gastrointestinal bleeding associated with the use of nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Am J Gastroenterol* 1998; 93: 721-725
- 10 Ohta Y, Kobayashi T, Inui K, Yoshino J, Kitagawa A, Nakazawa S. Preventive effect of teprenone on acute gastric mucosal lesion progression in compound 48/80-treated rats. *Eur J Pharmacol* 2004; 487: 223-232
- 11 Takano T, Tsutsumi S, Tomisato W, Hoshino T, Tsuchiya T, Mizushima T. Geranylgeranylacetone protects guinea pig gastric mucosal cells from gastric stressor-induced apoptosis. *Dig Dis Sci* 2002; 47: 1546-1553
- 12 Yanagawa A, Endo T. Retrospective 10 years large scale evaluation of gastrointestinal lesion associated with NSAIDs in 9,084 patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis and prophylactic efficacy of teprenone against NSAIDs AGML. *Inflamm Regen* 2001; 21: 149-153
- 13 Fortun PJ, Hawkey CJ. Nonsteroidal antiinflammatory drugs and the small intestine. *Curr Opin Gastroenterol* 2005; 21: 169-175

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》作者署名要求

本刊讯 本刊论文署名作者不宜过多,一般不超过8人,主要应限于参加研究工作并能解答文章有关问题、能对文稿内容负责者,对研究工作有贡献的其他人可放入致谢中.作者署名的次序按贡献大小排列,多作者时姓名间用逗号,如是单名,则在姓与名之间空1格(正文和参考文献中不空格).《世界华人消化杂志》要求所有署名人写清楚自己对文章的贡献.第一方面是直接参与,包括:(1)酝酿和设计实验;(2)采集数据;(3)分析/解释数据.第二方面是文章撰写,包括:(1)起草文章;(2)对文章的知识性内容作批评性审阅.第三方面是工作支持,包括:(1)统计分析;(2)获取研究经费;(3)行政、技术或材料支持;(4)指导;(5)支持性贡献.每个人必须在第一至第三方面至少具备一条,才能成为文章的署名作者.《世界华人消化杂志》不设置共同第一作者和共同通信作者.(科学编辑:李军亮 2009-11-08)

Barrett's食管、糜烂性食管炎及非糜烂性反流病发生机制的比较

张峻, 徐有青, 杨昭徐

张峻, 徐有青, 杨昭徐, 首都医科大学附属北京天坛医院消化内科 北京市 100050

作者贡献分布: 此课题由杨昭徐与徐有青设计; 操作过程由张峻完成; 数据分析与论文写作由张峻完成。

通讯作者: 张峻, 主治医师, 100050, 北京市, 首都医科大学附属北京天坛医院消化内科. zhangjun173@126.com

电话: 010-67096644

收稿日期: 2009-09-14 修回日期: 2009-10-24

接受日期: 2009-10-26 在线出版日期: 2009-11-08

Comparison of clinical characteristics among Barrett's esophagus, erosive esophagitis and non-erosive reflux disease

Jun Zhang, You-Qing Xu, Zhao-Xu Yang

Jun Zhang, You-Qing Xu, Zhao-Xu Yang, Department of Gastroenterology, Beijing Tiantan Hospital, Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100050, China

Correspondence to: Jun Zhang, Department of Gastroenterology, Beijing Tiantan Hospital, Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100050, China. zhangjun173@126.com

Received: 2009-09-14 Revised: 2009-10-24

Accepted: 2009-10-26 Published online: 2009-11-08

Abstract

AIM: To explore etiological differences among erosive esophagitis (EE), non-erosive reflux disease (NERD) and Barrett's esophagus (BE) by comparing their reflux characteristics.

METHODS: A total of 105 gastroesophageal reflux disease (GERD) patients, including 35 EE patients, 34 BE patients and 36 NERD patients, and 30 healthy controls were enrolled in the study. All subjects underwent esophageal manometry, 24-hour ambulatory esophageal pH monitoring using the Synectics Digitrapper MkIII and bilirubin measurement using the Bilitec 2000.

RESULTS: The lower esophageal sphincter pressure (LESP) in all GERD patients, especially EE patients, was lower than that of healthy controls ($P < 0.05$). No statistical significance was

observed in the LESP among different groups of GERD patients. The amplitude of distal esophageal body contraction and the percentage of effective esophageal movements were both lower in EE and BE patients than in NERD patients and healthy controls (all $P < 0.05$). The acid reflux index (e.g., DeMeester score) was highest in EE patients. The bile reflux index (e.g., the percentage of total time of bilirubin absorbance level > 0.14) was highest in BE patients. Only 52.8% of NERD patients had abnormal reflux. The percentages of double reflux (acid and bile) in EE, BE and NERD patients were 68.57%, 84.38% and 63.15%, respectively.

CONCLUSION: The majority of GERD patients have abnormal esophageal exposure to both acid and bile (double reflux), which tend to contribute to more severe mucosa injuries. Bile reflux may play an important role in the pathogenesis of Barrett's esophagus.

Key Words: Gastroesophageal reflux disease; Barrett's esophagus; Esophageal manometry; pH monitoring; Bilitec monitoring

Zhang J, Xu YQ, Yang ZX. Comparison of clinical characteristics among Barrett's esophagus, erosive esophagitis and non-erosive reflux disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(31): 3249-3254

摘要

目的: 比较糜烂性食管炎(EE)、非糜烂性反流病(NERD)及Barrett's食管(BE)患者反流发生特点, 探讨不同类型GERD的可能发病机制。

方法: 105例GERD患者根据胃镜及病理情况分为: EE组(35例)、BE组(34例)及NERD组(36例), 对照组30例为健康志愿者。比较4组受检者食管测压与24 h食管pH及胆汁反流同步监测结果的差异。

结果: 与对照组相比, GERD各组LES静息压均有不同程度减低, 以EE组最明显($P < 0.05$)。EE与BE组患者远段食管收缩波幅及有效

背景资料

胃食管反流病(GERD)是一种严重影响患者的生活质量的常见慢性疾病, 且发病率有逐年增高趋势。

同行评议者
王小众, 教授, 福建医科大学附属协和医院消化内科

相关报道

Hak *et al* 的临床研究表明, 酸和胆汁的混合反流是GERD患者的主要反流形式. 动物实验也提示胆汁反流在BE和食管腺癌发展中起重要作用.

蠕动百分比明显低于NERD组与对照组(均 $P<0.05$). DeMeester评分等酸反流指标在EE组最高. BE组Abs >0.14 时间百分比等长时间胆汁反流指标最高. NERD患者中仅52.8%存在病理性反流. 各组中混合反流类型占各组病理性反流总人数的比例分别为68.57%(EE组)、84.38%(BE组)及63.15%(NERD组).

结论: 胃酸与胆汁的混合反流是GERD患者中最常见病理性反流类型, 且对食管黏膜的损害较单纯酸或胆汁反流为重, 胆汁反流在BE的发病机制中占有重要地位.

关键词: 胃食管反流病; Barrett's食管; 食管测压; pH监测; 胆汁反流监测

张峻, 徐有青, 杨昭徐. Barrett's食管、糜烂性食管炎及非糜烂性反流病发生机制的比较. 世界华人消化杂志 2009; 17(31): 3249-3254
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3249.asp>

0 引言

胃食管反流病(gastroesophageal reflux disease, GERD)是一种由胃内容物反流引起症状和(或)并发症的疾病, 临床十分常见, 而且严重影响人们的生活质量. GERD可分为糜烂性食管炎(erosive esophagitis, EE)、非糜烂性反流病(non-erosive reflux disease, NERD)和Barrett's食管(Barrett's esophagus, BE)3种类型. 不同类型各有其内镜及病理改变, 其发病机制及抑酸治疗效果也不尽相同. EE患者的反流症状和黏膜损害均较明显; NERD患者有反流症状但内镜下黏膜损害不明显; 而BE作为一种癌前病变也备受关注. 研究发现, 十二指肠液中的胆盐在BE的发生和发展中起重要作用^[1]. 近年来关于GERD不同类型的关系及其发病机制的研究结论并不完全一致. 关于EE、NERD与BE三者发病机制的综合比较研究较少, 同时设有健康对照组的报道则更少. 本研究通过分析我院近2年就诊的不同类型GERD患者及健康志愿者的食管测压及24 h食管pH和胆汁反流同步监测等相关数据, 比较各组患者的反流发生特点, 探讨不同类型GERD患者的可能发病机制.

1 材料和方法

1.1 材料 GERD患者及对照组(健康志愿者)共135例. GERD患者入选标准为具有典型的反流症状(烧心和反流), 且对患者的生活质量产生明显负面影响(即不适症状)^[2]. 所有入选GERD病例(共

105例)均为我院消化科2007-01/2009-01门诊及住院患者, 且均无消化性溃疡病、腹部手术史、糖尿病、恶性肿瘤及重要脏器功能衰竭, 其中男53例, 女52例, 年龄18-85岁(平均 57.24 ± 11.32)岁. 健康志愿者30例(男15例, 女15例)作为对照组, 均无反流相关不适症状, 无消化系及全身器质性疾病, 无腹部手术史. 所有入选者均接受内镜检查、食管测压及24 h食管pH和胆汁反流监测. 根据《中国胃食管反流病共识意见》的定义, 将受试对象分为4组: (1)EE组: 内镜下可见食管远段黏膜破损($n=35$); (2)BE组: 内镜见食管远段的鳞状上皮被柱状上皮取代或活检病理证实为肠上皮化生者($n=34$); (3)NERD组: 内镜下未见明显食管黏膜损伤者($n=36$); (4)对照组(健康志愿者, $n=30$). 4组患者的年龄、性别、身高及体质量分布无明显差异. 本研究经本院伦理委员会批准, 入选者均知情同意.

1.2 方法

1.2.1 内镜检查: 使用Olympus EVIS LUCERA CV-260型电子内镜, 由2名固定医师操作. 内镜下EE的诊断分级按洛杉矶分类法.

1.2.2 食管测压: 使用Synectics PC Polygraf多导生理记录仪及气液压毛细管灌注系统. 经鼻孔插入导管, 采用定点牵拉法测量食管下括约肌压力(LESP)和湿咽时食管体部蠕动收缩功能(咽水5 mL, 间隔30 s, 重复10次)、食管体部蠕动收缩功能(包括食管各段蠕动收缩幅度、食管体部蠕动波传导速度, 计算有效蠕动百分比^[3]等).

1.2.3 24 h食管pH和胆汁监测: 采用Digitrapper Mk III和Bilitec 2000(瑞典Medtronic Synectics公司生产)检测仪, 同步开启pH和胆汁监测记录. 受试者检查前至少停用质子泵抑制剂7 d, 其他抑酸剂和胃肠动力药物3 d. 禁食12 h, 检查过程中嘱患者尽量保持原有的生活习惯, 正常作息、运动; 并禁食可能会影响到测试结果的可乐和酸性食物、饮料等.

统计学处理 采用单因素方差分析与非参数检验, 计数资料采用卡方检验. 所有数据应用SPSS13.0进行分析, $P<0.05$ 为有统计学意义.

2 结果

2.1 各组受检者食管测压比较 GERD各组与对照组相比, LES静息压均有不同程度减低, 以EE组和BE组最明显($P<0.05$). 各组间LES总长度差异无统计学意义. EE组和BE组患者远段食管收缩波幅分别为(36.80 ± 19.41) mmHg和(34.97

表 1 GERD患者不同类型组及对照组间食管动力

分组	n	LES静息压(mmHg)	食管收缩波幅(mmHg)		远段食管有效收缩(%)
			近段食管	远段食管	
EE组	35	11.72 ± 4.45 ^a	37.08 ± 18.24 ^a	36.80 ± 19.41 ^a	49.86 ± 8.21 ^a
BE组	34	12.47 ± 3.17 ^a	59.74 ± 19.56	37.97 ± 18.36 ^a	53.41 ± 7.02 ^a
NERD组	36	15.89 ± 5.24	63.51 ± 20.13	69.22 ± 16.97	78.23 ± 8.95
对照组	30	16.21 ± 5.33	67.32 ± 19.25	74.41 ± 17.53	90.35 ± 9.63

^a*P*<0.05 vs 对照组.

表 2 GERD患者不同类型组及对照组间食管pH监测

分组	n	酸反流		DeMeester评分	pH<4时间百分比(%)	
		总次数	长时间反流次数		总时间	卧位时间
EE组	35	188.71 ± 129.38 ^a	19.34 ± 12.66 ^a	124.21 ± 70.42 ^b	22.34 ± 5.45 ^a	19.56 ± 15.42 ^a
BE组	34	162.52 ± 120.63 ^a	15.89 ± 10.83 ^a	88.63 ± 61.12 ^{bc}	19.11 ± 2.32 ^a	17.32 ± 15.44 ^a
NERD组	36	143.35 ± 118.66 ^a	8.25 ± 5.79	57.25 ± 32.34 ^{bc}	18.51 ± 0.62 ^a	10.14 ± 6.37
对照组	30	39.62 ± 29.32	4.81 ± 2.04	8.01 ± 3.25 ^d	2.35 ± 1.53	8.69 ± 3.45

^a*P*<0.05, ^b*P*<0.01 vs 对照组; ^c*P*<0.05, ^d*P*<0.01 vs EE组.

±18.36) mmHg, 均明显低于NERD组及对照组(均*P*<0.05), EE组和BE组间无统计学差异. EE组患者近段食管收缩波幅亦明显低于其他各组(*P*<0.05), BE组及NERD组较对照差异无统计学意义. EE组及BE组食管远段有效蠕动百分比均明显低于NERD组及对照组(*P*<0.05), NERD组与对照组间差异无统计学意义(表1).

2.2 各组受检者24 h食管pH监测 GERD各组酸反流总次数、pH<4总时间百分比、DeMeester评分等酸反流指标明显高于对照组(*P*<0.05). GERD各组间酸反流总次数及pH<4总时间百分比差异均无统计学意义. EE组和BE组长时间酸反流次数、最长反流时间、及pH<4卧位时间百分比明显高于NERD组及对照组(*P*<0.05), 以EE组最高(与BE组差异无统计学意义), NERD组与对照组间差异无统计学意义. EE组DeMeester评分最高, BE组次之, 各GERD组间差异有统计学意义(表2).

2.3 各组受检者24 h食管胆汁反流监测 EE组和BE组胆汁反流总次数、Abs>0.14总时间百分比等各指标均高于对照组, 以BE组最高. BE组较EE组Abs>0.14总时间百分比增高有统计学意义(*P*<0.05). BE组较NERD组胆汁反流各指标增高差异均有统计学意义. NERD胆汁反流总次数及Abs>0.14总时间百分比高于对照组(*P*<0.05), 其他胆汁反流指标较对照组无明显差异(表3).

2.4 不同组GERD患者反流类型的比较 30例健康对照者24 h食管pH监测DeMeester评分平均为8.01±3.25, Abs>0.14总时间百分比平均为1.98±0.86. 以超过95%健康对照者的评分范围, 即DeMeester评分≥13.56为病理性酸反流标准. 以超过95%健康对照者Abs范围, 即Abs>0.14总时间百分比≥2.23%为病理性DGER标准. 105例GERD患者中, 有19例患者未发现病理性反流(其中NERD组17例, BE组2例). 86例有病理性反流患者中, 单纯酸反流患者14例、单纯胆汁反流患者9例、混合反流患者63例. EE组、BE组和NERD组中混合反流类型占各组病理性反流总人数的比例分别为68.57%、84.38%、63.15%, 病理性单纯酸反流患者分别为20%、3.1%、37.6%, 病理性单纯胆汁反流患者分别为11.42%、12.50%、5.26%(图1).

3 讨论

GERD是一种多因素导致的常见的慢性疾病, 易反复发作, 严重影响患者生活质量, 也造成了沉重的经济负担和社会负担, 因此该病日益受到广泛关注. 近年来的流行病学研究显示, 胃食管反流病发病率有逐年增高趋势^[4]. NERD最为常见, EE可合并食管狭窄、溃疡和消化系出血, BE有可能发展为食管腺癌. 关于GERD的病因和发病机制的研究很多, 不同类型GERD患者临床症状

创新盘点

目前GERD的研究多为EE与NERD的对照研究, 本研究同时监测了3种不同类型胃食管反流病的反流类型差异, 且设有健康对照组.

应用要点

本研究提示,反流症状基础上进行内镜、食管pH和胆汁反流同步监测可提供不同类型GERD患者病理生理学参考,为GERD诊断和治疗提供帮助。

表 3 GERD患者不同类型组及对照组间食管胆汁反流情况

分组	n	胆汁反流		Abs>0.14时间百分比(%)	
		总次数	长时间反流次数	总时间	卧位时间
EE组	35	112.54 ± 98.25 ^b	17.76 ± 10.29 ^a	16.04 ± 7.25 ^{bc}	14.25 ± 10.01 ^b
BE组	34	141.32 ± 109.33 ^b	19.32 ± 12.34 ^a	23.12 ± 15.41 ^b	16.89 ± 11.14 ^b
NERD组	36	78.54 ± 56.41 ^{ac}	4.83 ± 2.29 ^c	9.33 ± 4.14 ^{ac}	1.24 ± 1.03 ^d
对照组	30	12.76 ± 6.97 ^d	2.15 ± 1.36 ^c	1.98 ± 0.86 ^d	0.83 ± 0.62 ^d

^aP<0.05, ^bP<0.01 vs 对照组; ^cP<0.05, ^dP<0.01 vs BE组。

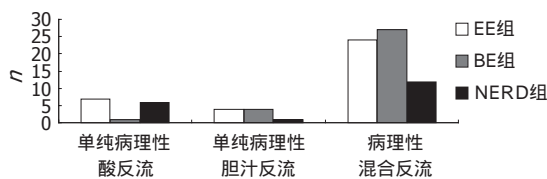


图 1 不同组GERD患者反流类型的比较。

相似,但食管黏膜损伤及对抑酸等治疗的效果不同,可能是由于其发病机制不完全相同所致。多数研究显示动力异常是GERD的基础,其中包括食管下括约肌和食管体部运动障碍、胃排空障碍及胃十二指肠协调运动障碍等。LES降低及一过性下食管括约肌松弛(transient lower esophageal sphincter relaxation, TLESR)是导致反流发生的常见原因,有效的食管蠕动是食管清除反流物的决定性因素^[5]。食管廓清能力主要是依靠食管的推动性蠕动、唾液的中和作用、食丸的重力和食管黏膜下分泌的碳酸氢盐等多种因素发挥其对反流物的清除作用,从而起到防止反流食管炎的作用。孙晓红 *et al*^[6]报道,GERD患者的食管远端蠕动波幅和有效收缩率明显低于健康对照组,且与酸反流程度呈负相关,表明食管远端酸清除障碍在反流中起重要作用。本研究中食管测压结果显示,与对照组相比,不同类型的GERD患者均存在不同程度的食管动力异常,表现为下食管括约肌静息压下降、食管体部远段收缩波幅减低、有效蠕动百分比减低等动力异常,以EE组最明显,与国内外报道一致。另外,本研究中24 h食管pH及胆汁反流监测结果显示,EE组及BE组的患者长时间酸反流和胆汁暴露的持续时间均较NERD组及对照组明显延长,卧位时更明显,与下食管括约肌静息压下降一致,提示2组患者的抗反流屏障及食管廓清能力存在缺陷,夜间卧位时食管酸廓清明显延迟,故夜间胃食管反流的危害更为严重。而NERD组患者虽也存在LES压力下降及明显异常反流,

但其食管体部远段收缩波幅及有效蠕动百分比减低不明显,食管廓清能力尚可,进而部分解释3种GERD类型中RE及EE组较NERD患者内镜下黏膜损害重的原因。促动力治疗对改善EE及BE患者的病理性反流有帮助。

EE是GERD的常见类型,多数患者有反酸、烧心等反流症状,其内镜下黏膜损伤也较明显,目前公认其发病机制与胃食管动力障碍、反流物的侵袭作用等有关。胃液(胃酸及胃蛋白酶)及十二指肠内容物(胆汁、胰液及肠液)反流均可损伤食管黏膜,组织学上表现为食管上皮部分或全层缺损、固有层炎性反应、上皮乳头延长、基底层细胞增厚等。本研究结果也发现EE组患者LES及食管体部功能障碍明显重于BE组NERD组,其各酸反流及胆汁反流指标也明显高于无内镜下黏膜损害的NERD组,其中反映食管酸暴露情况的综合指标DeMeester评分明显高于其他GERD各组患者,这与EE患者的临床症状及内镜表现相符,支持食管黏膜损伤程度与酸反流关系密切,强力抑酸剂对EE患者效果较好^[7]。

NERD是GERD中最常见的类型,约占GERD的70%^[8]。这类患者有烧心、反酸等典型GERD症状和食管外表现,内镜下无食管黏膜破损,但临床症状严重程度与EE相似,且对抑酸剂、质子泵抑制剂(proton pump inhibitor, PPI)等的治疗反应不如EE患者理想,生活质量更受影响^[9],提示NERD和EE可能存在不同的动力和感觉发病基础。丁召路 *et al*^[10]的研究表明,与健康组比,虽然NERD与RE患者LES功能均受损,但与NERD组比,RE患者的LES静息压和膈角压受损显著,而NERD的膈角功能完好,提示RE和NERD有不同的胃食管交界处屏障功能基础。本研究发现虽然与健康组比,NERD、BE与EE患者LES功能均受损,但EE组最重,NERD组相对较轻,虽然也有病理性酸和胆汁反流现象,但NERD组患者食管体部功能损害较轻,食管

廓清能力无明显缺陷, 从病理生理上部分解释了为什么NERD患者不发生内镜下食管黏膜损害. 本研究还显示有反流症状的36例NERD患者中仅52.8%存在病理性反流, 与国内外报道相符. 另有研究发现, 正常酸反流NERD患者对酸敏感性高于异常酸反流、NERD患者和反流性食管炎患者, 存在内脏高敏状态^[11], 食管高敏感性、非酸性反流、心理因素等可能与NERD发病相关^[12]. 因此诊断上可综合利用反流症状问卷、心理测评、PPI试验、高分辨率内镜、食管24 h pH及胆汁监测等了解反流病理生理情况, 除抑酸治疗外, 综合考虑多种因素以提高疗效.

虽然亚洲患者的BE发病率普遍较低^[8], 但BE属于癌前病变, 其腺癌年患病率为0.5%, 因此积极诊治BE防止其癌变具有重要的临床意义. BE与长期胃食管反流有关, 本质是食管黏膜的胃化生或肠化生性变化, 常为反流性食管炎后期的一种形态学改变, 十二指肠内容物、胆汁和胃酸在BE的发病机制中占有重要地位, 长时期接触反流物质的黏膜上皮受损, 从而激活黏膜上皮中多潜能干细胞向着柱状细胞分化, 在损伤修复过程中定殖而形成Barrett上皮化生. 胃酸一直是公认的黏膜侵袭因素, 与食管炎症密切相关, 十二指肠胃食管反流(duodenogastroesophageal reflux, DGER)在胃食管反流病中的作用越来越受到重视, 且发现胆汁反流与BE及食管腺癌有关联. Barrett上皮异型增生也与食管下端酸暴露增加有关. Buttar *et al*^[13]的研究发现, 长期胆汁反流能诱导食管黏膜COX-2表达, 使PGE2水平升高, 导致食管黏膜炎症. 炎症时氧化应激活跃, 产生大量氧自由基, 可能与BE形成、不典型增生、基因突变形成腺癌等有关. 另有证据显示只有在胆盐被酸化的情况下, 才可以诱导COX-2和c-myc的上调, 而在中性pH值环境中则不然^[14].

Hak *et al*^[15]的临床研究表明, NERD、RE和BE中的DGER发生率依次增高; 酸和胆汁的混合反流是GERD患者的主要反流形式. 动物实验中张涛 *et al*^[16]建立的胃食管反流大鼠模型研究结果表明, 胃、十二指肠液反流均造成食管黏膜损伤, 后者更为严重, 十二指肠液反流在BE和食管腺癌发展中发挥着更为关键性的作用. 张茹 *et al*^[17]建立了不同反流类型的实验SD大鼠模型, 发现混合反流损伤最大, 其次为无胃酸的十二指肠液反流, 无胆汁的混合反流损害最小; 对实验SD大鼠食管黏膜病理学检查发现无胆汁

的混合反流所致食管黏膜损伤中未见Barrett上皮出现, 而无胃酸的十二指肠液反流或含有胆汁的混合反流均有Barrett上皮出现, 推测Barrett上皮的发生可能与胆汁损伤食管黏膜上皮细胞有关. 本研究对105例GERD患者的24 h同步食管pH及胆汁反流监测显示, 绝大多数EE和BE患者均存在病理性反流, GERD各组的反流类型中均以混合反流占优势, BE组中混合反流及单纯胆汁反流更明显, 与国内外研究相符. 以上研究提示胆汁反流在BE及食管腺癌的发病机制中占有重要地位; 酸和胆汁的混合反流更具有破坏性. 因此对BE患者, 抑酸治疗可以缓解其症状, 减轻炎症, 降低溃疡、狭窄等并发症的发生, 同时联合应用中和胆盐的黏膜保护剂、胃肠动力药对改善反流有一定帮助. 选择性环氧合酶抑制对BE患者的作用尚需进一步临床研究. 近年来对BE的内镜下治疗也有一定进展, 定期复查胃镜及病理有助于早期发现食管癌.

由此可见: EE、BE、NERD 3种不同类型GERD患者均存在不同程度的食管动力障碍和病理性反流. EE组患者的动力障碍、异常酸反流和黏膜损害更明显; 食管高敏感性、非酸性反流、心理因素等可能与NERD发病相关; 胆汁反流在BE的发病机制中占有重要地位. 胃酸和胆汁的混合反流是GERD患者的最常见反流类型, 且对食管黏膜的损害较单纯酸或胆汁反流为重. 下食管括约肌及食管体部运动功能受损程度、病理性酸和胆汁反流情况的差异可部分解释3种不同类型GERD的发病机制. 反流症状基础上进行内镜及病理组织活检、24 h食管pH和胆汁反流同步监测可提供不同类型GERD患者病理生理学参考, 为其诊断和治疗提供帮助.

4 参考文献

- 1 Hu Y, Williams VA, Gellersen O, Jones C, Watson TJ, Peters JH. The pathogenesis of Barrett's esophagus: secondary bile acids upregulate intestinal differentiation factor CDX2 expression in esophageal cells. *J Gastrointest Surg* 2007; 11: 827-834
- 2 Vakil N, van Zanten SV, Kahrilas P, Dent J, Jones R. The Montreal definition and classification of gastroesophageal reflux disease: a global evidence-based consensus. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 1900-1920; quiz 1943
- 3 Nguyen NQ, Tippet M, Smout AJ, Holloway RH. Relationship between pressure wave amplitude and esophageal bolus clearance assessed by combined manometry and multichannel intraluminal impedance measurement. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 2476-2484
- 4 Goh KL. Changing epidemiology of gastroesophageal reflux disease in the Asian-Pacific

同行评价
本研究通过对食管压力、pH和胆汁反流进行检测, 探讨胃食管反流的发病机制, 对该病临床诊疗具有一定指导意义.

- region: an overview. *J Gastroenterol Hepatol* 2004; 19 Suppl 3: S22-S25
- 5 Stacher G, Lenglinger J, Eisler M, Hoffmann M, Goll A, Bergmann H, Stacher-Janotta G. Esophageal acid exposure in upright and recumbent postures: roles of lower esophageal sphincter, esophageal contractile and transport function, hiatal hernia, age, sex, and body mass. *Dig Dis Sci* 2006; 51: 1896-1903
- 6 孙晓红, 柯美云, 王智凤, 方秀才. 膈脚屏障及食管体部清除功能在胃食管反流中的作用. *中国医学科学院学报* 2002; 24: 289-293
- 7 Pace F, Tonini M, Pallotta S, Molteni P, Porro GB. Systematic review: maintenance treatment of gastro-oesophageal reflux disease with proton pump inhibitors taken 'on-demand'. *Aliment Pharmacol Ther* 2007; 26: 195-204
- 8 Rosaida MS, Goh KL. Gastro-oesophageal reflux disease, reflux oesophagitis and non-erosive reflux disease in a multiracial Asian population: a prospective, endoscopy based study. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004; 16: 495-501
- 9 刘晓红, 柯美云, 宋志强, 罗金燕, 袁耀宗, 侯晓华, 朱有玲, 孙菁, 查慧. 雷贝拉唑对胃食管反流病患者生活质量的影响. *中华内科杂志* 2005; 44: 818-821
- 10 丁召路, 王智凤, 李鸿斌, 孙晓红, 许琳, 柯美云. 胃食管反流病患者胃食管连接部屏障功能的探讨. *中华医学杂志* 2006; 34: 2382-2384
- 11 Thoua NM, Khoo D, Kalantzis C, Emmanuel AV. Acid-related oesophageal sensitivity, not dysmotility, differentiates subgroups of patients with non-erosive reflux disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2008; 27: 396-403
- 12 Naliboff BD, Mayer M, Fass R, Fitzgerald LZ, Chang L, Bolus R, Mayer EA. The effect of life stress on symptoms of heartburn. *Psychosom Med* 2004; 66: 426-434
- 13 Buttar NS, Wang KK, Leontovich O, Westcott JY, Pacifico RJ, Anderson MA, Krishnadath KK, Lutzke LS, Burgart LJ. Chemoprevention of esophageal adenocarcinoma by COX-2 inhibitors in an animal model of Barrett's esophagus. *Gastroenterology* 2002; 122: 1101-1112
- 14 Tselepis C, Morris CD, Wakelin D, Hardy R, Perry I, Luong QT, Harper E, Harrison R, Attwood SE, Jankowski JA. Upregulation of the oncogene c-myc in Barrett's adenocarcinoma: induction of c-myc by acidified bile acid in vitro. *Gut* 2003; 52: 174-180
- 15 Hak NG, Mostafa M, Salah T, El-Hemaly M, Haleem M, Abd El-Raouf A, Hamdy E. Acid and bile reflux in erosive reflux disease, non-erosive reflux disease and Barrett's esophagus. *Hepatogastroenterology* 2008; 55: 442-447
- 16 张涛, 王云杰, 张峰, 朱以芳, 刘锬, 张传山. 胃酸在十二指肠液反流诱发食管腺癌中的作用. *中华消化杂志* 2002; 22: 92-95
- 17 张茹, 龚均, 史冉庚, 王涛, 王莉. 胆汁反流对大鼠食管粘膜炎症损伤和凋亡的作用. *四川大学学报(医学版)* 2006; 37: 750-753

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

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

本刊讯 《中国期刊引证报告(扩刊版)》是依托中国科学技术信息研究所国家工程技术数字图书馆“知识服务”系统,在“万方数据-数字化期刊群”基础上,结合中国科技论文与引文数据库(CSTPCD),以我国正式出版的各学科6108种中英文期刊为统计源期刊。对全部期刊的引文数据,严格按题名、作者、刊名、年、卷、期、页等进行分项切分后,进行规范化处理和有效链接,经统计分析,编制而成。2008年《世界华人消化杂志》总被引频次3683次,影响因子0.729,即年指标0.142,引用期刊数732,学科扩散指标0.533,被引半衰期4.303,H指数8。(科学编辑:李军亮 2009-11-08)

TAP2基因多态性及遗传因素与新疆哈萨克族食管癌的相关性

曾同霞, 张海峰, 雷丽娟, 蔡金凤, 李 锋, 廖佩花, 秦江梅

曾同霞, 蔡金凤, 李锋, 秦江梅, 新疆地方病与民族高发病省部共建重点实验室 石河子大学医学院预防医学系 新疆维吾尔自治区石河子市 832002
张海峰, 雷丽娟, 伊犁哈萨克自治州新华医院消化内科 新疆维吾尔自治区伊犁哈萨克自治州伊宁市 835000
廖佩花, 新疆生产建设兵团医院科教科 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830002
国家自然科学基金资助项目, No. 30660161
国家重点基础研究发展规划基金资助项目(973计划), No. 2005CCA03700
2006年教育部科学技术研究重点基金资助项目, No. 206167
国家973计划前期研究专项基金资助项目, No. 2007CB516804
作者贡献分布: 此课题由秦江梅与李锋设计并组织实施; 曾同霞、张海峰及雷丽娟负责问卷调查与标本的收集工作; 曾同霞、蔡金凤及廖佩花参与TAP2基因多态实验与数据分析; 本文写作由曾同霞与秦江梅完成。
通讯作者: 秦江梅, 教授, 832002, 新疆维吾尔自治区石河子市, 新疆地方病与民族高发病省部共建重点实验室, 石河子大学医学院预防医学系. qinjiangmei@yahoo.com.cn
电话: 0993-2596036 传真: 0993-2057153
收稿日期: 2009-09-18 修回日期: 2009-10-25
接受日期: 2009-11-02 在线出版日期: 2009-11-08

Correlation of Tap2 gene polymorphisms and genetic factors with esophageal cancer in Kazakh population in Xinjiang Uygur Autonomous Region

Tong-Xia Zeng, Hai-Feng Zhang, Li-Juan Lei, Jin-Feng Cai, Feng Li, Pei-Hua Liao, Jiang-Mei Qin

Tong-Xia Zeng, Jin-Feng Cai, Feng Li, Jiang-Mei Qin, Key Laboratory of Xinjiang Endemic and Ethnic Diseases, Department of Preventive Medicine, Shihezi University, Shihezi 832002, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Hai-Feng Zhang, Li-Juan Lei, Department of Gastroenterology, Xinhua Hospital of Yili Canton, Yining 835000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Pei-Hua Liao, Department of Scientific Education, Hospital of Xinjiang Production and Construction Corp, Urumqi 830002, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30660161; the Major State Basic Research Development Program of China (973 program), No. 2005CCA03700; the Foundation for Key Program of Ministry in Education, China, No. 206167; and the Special Foundation for 973 Program of China, No. 2007CB516804

Correspondence to: Professor Jiang-Mei Qin, Key Laboratory of Xinjiang Endemic and Ethnic Diseases, Department of Preventive Medicine, Shihezi University, Shihezi 832002, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China. qinjiangmei@yahoo.com.cn

Received: 2009-09-18 Revised: 2009-10-25

Accepted: 2009-11-02 Published online: 2009-11-08

Abstract

AIM: To evaluate the association between the genetic polymorphisms (Tap2379/Tap2665) of the transporter associated with antigen processing 2 (TAP2) gene and esophageal cancer (EC) in Kazakh population in Xinjiang Uygur Autonomous Region.

METHODS: A case-control study was conducted using 165 EC patients and 330 control patients who were endoscopically diagnosed as non-esophageal diseases. Tap2379/Tap2665 genotypes were detected by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). A conditional logistic regression model was used for data analysis.

RESULTS: Tap2379 genotype frequencies were significantly different between EC patients and control ones ($\chi^2 = 5.295$, $P < 0.05$, $OR = 1.750$). Multivariate conditional logistic regression analysis showed that history of esophageal or stomach diseases and family history of esophageal cancer were significantly different between EC patients and control ones ($\chi^2 = 4.797$ and 24.803 ; $P < 0.05$ and 0.01 ; and $OR = 2.160$ and 3.638 , respectively). Individuals with Tap2379 A/A or A/G genotype had a 1.673-fold (95%CI = 1.115-5.511) increased risk for developing EC compared with those with Tap2379G/G genotype after excluding potential confounding factors such as age, sex, history of esophageal or stomach disease and family history of esophageal cancer.

CONCLUSION: Tap2379 genetic polymorphisms, history of esophageal or stomach diseases and family history of esophageal cancer are important risk factors for EC.

Key Words: Kazakh population; Esophageal Cancer; Tap2379; Tap2665; Case-control study

Zeng TX, Zhang HF, Lei LJ, Cai JF, Li F, Liao PH, Qin JM. Correlation of Tap2 gene polymorphisms and genetic factors with esophageal cancer in Kazakh population in Xinjiang Uygur Autonomous Region. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(31): 3255-3258

摘要

目的: 探讨Tap2379及Tap2665基因多态性与新

背景资料

哈族食管癌高发与少食蔬菜水果、吸烟饮酒相关,且这些与相关代谢基因亚甲基四氢叶酸还原酶(C677T)、细胞色素P4502E1(CYP2E1)多态性存在交互作用;免疫相关基因LMP2/LMP7及Tap1637基因多态性及HLA-DR9阳性等均与哈族食管癌存在相关性。

同行评议者

姜春萌, 教授, 大连医科大学附属第二医院消化科

相关报道

Sumiyoshi *et al*认为HLA-DR抗原参与了食管鳞状上皮发育不良部位的局部免疫应答,且HLA-DR抗原的表达可以防止肿瘤的侵袭,对机体具有保护作用. Lin *et al*运用PCR-SSP检测42例食管癌患者与136例对照组中HLA-DRB1等位基因与食管癌的遗传易感性,结果发现携带HLA-DRB10901等位基因的个体对食管癌具有易感性.

哈萨克族(简称哈族)食管癌的相关性.

方法: 采用1:2配比的病例对照研究,收集哈族食管癌患者165例,对照330例(对照部分来源于同一所医院门诊胃镜非食管疾病患者,部分来源于食管癌高发区正常人群),运用序列特异性引物聚合酶链反应-限制片段长度多态技术(PCR-RFLP)检测tap2379与ap2665基因多态性,采用多因素Logistic回归进行统计分析.

结果: Tap2379基因型在病例组与对照组间比较,差异有统计学意义($\chi^2 = 5.295$, $P < 0.05$, $OR = 1.750$);多因素Logistic回归显示:食管或胃疾病史、食管癌家族史在2组间均存在差异($\chi^2 = 4.797$, $OR = 2.160$; $\chi^2 = 24.803$, $OR = 3.638$, $P < 0.05$ 或 0.01);在控制了年龄、性别、食管或胃疾病史、食管癌家族史等潜在混杂因素的情况下, Tap2379位A/A型及A/G型的个体患食管癌的风险是G/G型的1.673倍(95%CI = 1.115-5.511).

结论: Tap2379位G→A转变、食管或胃疾病史及食管癌家族史为食管癌的危险因素.

关键词: 哈萨克族; 食管癌; Tap2379; Tap2665; 病例对照研究

曾同霞, 张海峰, 雷丽娟, 蔡金凤, 李锋, 廖佩花, 秦江梅. TAP2基因多态性及遗传因素与新疆哈萨克族食管癌的相关性. 世界华人消化杂志 2009; 17(31): 3255-3258
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3255.asp>

0 引言

位于中国北部的新疆哈萨克族(哈族)是食管癌的高发民族,哈族食管癌高发与少食蔬菜水果、吸烟饮酒相关,且这些与相关代谢基因亚甲基四氢叶酸还原酶(C677T)、细胞色素P4502E1(CYP2E1)多态性存在交互作用^[1-3];免疫相关基因LMP2/LMP7等基因多态性及HLA-DR9阳性等均与哈族食管癌存在相关性^[4-5]. 抗原加工相关转运体(transporter of antigen processing, Tap)是主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)-I限制性免疫应答途径中的一种重要分子,在MHC-I类分子的成熟及膜表面表达中起着十分重要的作用, Tap具有多态性,其多态性影响到对肽的选择性转运^[6],而Tap2基因的单个氨基酸取代也可能导致对抗原肽的选择转运产生较大变化^[7-8]. Tap2基因多态性与宫颈癌、乳腺癌等恶性肿瘤的发生有关^[9-10]. Tap2379位异亮氨酸携带者是汉族食管癌的危险因素^[11].

而哈族食管癌与Tap2基因多态相关性研究未见报道,为进一步探讨哈族食管癌高发的病因机制,本研究从遗传因素和免疫相关基因角度探讨该人群食管癌高发原因,为进一步干预研究提供更多的生物学证据.

1 材料和方法

1.1 材料 2005-03/2009-08在新疆北部哈族聚集地区的六所医院共收集哈萨克族新发食管癌病例165例,对照330例.对照部分来源于同一所医院门诊胃镜非食管疾病患者,部分来源于食管癌高发区正常人群,所有标本均经组织病理学确诊或排除.对照的匹配条件:同民族、同性别、年龄相差不超过5岁、居住同一地区.病例和对照均要签署知情同意书.采用自行设计的调查表进行问卷调查,内容包括:(1)一般情况:年龄、性别、婚姻状况等社会学指标;(2)饮食、生活习惯:包括吸烟史、饮酒史、饮茶、饮水、新鲜蔬菜水果摄入、蛋白摄入、热烫饮食、不规律饮食、特色饮食等;(3)病史:消化系统疾病史及食管癌家族史.主要仪器与试剂:PCR仪(德国Biometra公司);离心机(德国Thermo公司);紫外分光光度仪(北京普析通用仪器公司);琼脂糖(上海杰瑞公司);PCR扩增试剂:三磷酸碱基脱氧核苷酸(dNTP),Taq酶,10×PCR Buffer及Msp I内切酶(大连宝生物公司),Bst I内切酶(Fermentas公司).

1.2 方法 食管癌病例及对照均取新鲜全血,-80℃低温保存备用.基因组DNA提取采用酚-氯仿-异戊醇法;所有抽提的DNA均经1%琼脂糖凝胶电泳验证.PCR扩增所使用的引物参考文献[12], Tap2379: F 5'GCCCCGTGCCTTGACCTGCGC3' R5'ACCCCCAAGTGGAGCAC3',共212 bp; Tap2665 F5'-GGTGATTGCTCACAGGCTGCCG-3', R5'-CACAGCTCTAGGGAACTC-3',共227 bp.反应总体积25 μL,基因组DNA2 μL,引物(25 pmol/μL)各0.8 μL, dNTP2.0 μL、Taq酶(2.5 U/μL)0.4 μL, 10×PCR Buffer(含Mg²⁺)2.5 μL. PCR扩增条件为:94℃预变性5 min, 94℃, 45 s、56℃, 45 s、72℃, 45 s,共35个循环,最后72℃延伸10 min. Tap2379 PCR产物用Bst I内切酶酶切, Tap2 665 PCR产物用Msp I内切酶酶切,均37℃水浴12 h.酶切产物检测及鉴定:3%琼脂糖凝胶电泳鉴定其基因型,用DNA Marker I (100-600 bp)作为参照, Tap2379基因型分3种: G/G、G/A、A/A,片段长度分别

表 1 Tap2379基因多态性与哈族食管癌的关系

病例组基因多态性	对照组基因多态性			合计
	++	+-	--	
+	4	26	38	68
-	10	45	42	97
合计	14	71	80	165

$$\chi^2 = 5.295, g = 1, P < 0.05.$$

表 2 Tap2665基因多态性与哈族食管癌的关系

病例组基因多态性	对照组基因多态性			合计
	++	+-	--	
+	10	36	22	68
-	15	43	39	97
合计	25	79	61	165

$$\chi^2 = 0.130, g = 1, P > 0.05.$$

表 3 哈族食管癌的多因素条件Logistic回归分析

	偏回归系数	标准误	χ^2 值	P值	OR(95%CI)
食管或胃疾病史(对照 = 无)	0.770	0.352	4.797	0.029	2.160(1.804-4.304)
家族史(对照 = 无)	1.291	0.259	24.803	0.000	3.638(2.188-6.047)
Tap2379(对照 = G/G型)	0.515	0.207	6.185	0.013	1.673(1.115-5.511)

为193+20 bp、213+193+20 bp、213 bp; Tap2665基因型分3种: A/A、A/G、G/G, 片段长度分别为227 bp、227+207+20 bp、207+20 bp.

统计学处理 使用Epidata建立数据库, 采用SPSS13.0统计软件进行分析, 以1:2配对资料 χ^2 检验、P值及OR 95%CI确定tap2665及tap2379基因多态性在病例和对照组中的分布差异, 多因素Logistic回归进行危险度分析, 1:2配对资料 χ^2 检验涉及的公式^[13]有:

n_2 的期望值: $E(n_2) = (n_2 + n_4)/3$, n_2 的方差: $Var(n_2) = 2(n_2 + n_4)/9$, n_1 的期望值: $E(n_1) = 2(n_1 + n_3)/3$, n_1 的方差: $Var(n_1) = 2(n_1 + n_3)/9$, $\chi^2 = [n_2 - E(n_2) + n_1 - E(n_1)]^2 / [Var(n_2) + Var(n_1)]$, $OR = (n_1 + 2n_2) / (2n_3 + n_4)$.

2 结果

2.1 一般情况 调查对象均为哈族, 食管癌组165例, 其中男107例, 女58例; 对照组330例, 其中男214例, 女116例, 2组差异无统计学意义($\chi^2 = 0.000$, $P = 1.000$); 病例组年龄35.33-80.20(平均58.425 ± 9.681)岁, 对照组年龄33.58-80.40(平均58.715 ± 9.432)岁, 2组差异无统计学意义($t = 0.320$, $P = 0.749$). 病例组和对照组性别、年龄分布均衡.

2.2 Hardy Weinberg遗传平衡检验 为检验人群Tap2379和Tap2665基因型频率是否达到Hardy Weinberg遗传平衡, 将对照组Tap2379基因型频率观察值与期望值进行比较, 差异无统计学意义($\chi^2 = 4.771$, $g = 2$, $P > 0.05$), 将对照组Tap2665基因型频率观察值与期望值进行比较, 差异无统计学意义($\chi^2 = 5.672$, $g = 2$, $P > 0.05$), 说明Tap2379和Tap2665基因型频率已达到遗传平衡,

具有人群代表性.

2.3 Tap2379基因多态性与哈族食管癌的关系 表1所示, 以Tap2379突变杂合型(G/A)和突变纯合型(A/A)为暴露, 用“+”表示; Tap2379野生纯合型(G/G)为非暴露, 以“-”表示. 1:2配对, 每个对子有3例, 1个病例, 2个对照, 三者的暴露情况出现六种可能组合: +++、++-、+-、-+-、--+、---. 经1:2配对资料的卡方检验 $\chi^2 = 5.295$, $P < 0.05$, 差异有统计学意义, 其OR值为1.570(95%CI: 1.069-2.303).

2.4 Tap2665基因多态性与哈族食管癌的关系 表2所示, 以Tap2665突变杂合型(A/G)和突变纯合型(G/G)为暴露, 以“+”表示; Tap2665野生纯合型(A/A)为非暴露, 以“-”表示. 食管癌病例组和对照组Tap2665基因型分布经1:2配对资料的卡方检验, $\chi^2 = 0.130$, $P > 0.05$, 差异无统计学意义, 其OR值为1.096(95%CI: 0.667-1.801).

2.5 哈族食管癌的多因素条件Logistic回归分析 本研究对年龄、性别、民族、居住地等易成为混杂因素的因子进行了严格匹配, 为进一步控制可能同遗传、免疫相关的其他混杂因素的作用, 将调查因素中的食管或胃疾病史、食管癌家族史与单因素结果分析中有意义的Tap2379基因多态性引入多因素条件Logistic回归模型, 用逐步法进行分析, 结果显示: 有食管或胃疾病史的个体患食管癌的风险是无疾病史的2.160倍(95%CI = 1.804-4.304); 有食管癌家族史的个体患食管癌的风险是无家族史的3.638倍(95%CI = 2.188-6.047); 在控制了食管或胃疾病史、食管癌家族史的情况下, Tap2379位A/A型及A/G型的个体患食管癌

创新盘点

本研究首次对新疆哈族食管癌及对照人群Tap2基因多态性进行检测, 分析了哈萨克族食管癌与Tap2基因多态性的关系, 为哈族食管癌的预防及干预策略提供有价值的参考依据.

同行评价
本文得出的结论有利于新疆哈萨克族食管癌防治工作水平的提高,具有较强的现实意义和可读性。

的风险是G/G型的1.673倍(95%CI = 1.115-5.511)。

3 讨论

Tap是一种属于ATP结合匣超家族的转运蛋白,由Tap1和Tap2两个亚单位组成,并以异二聚体的形式发挥作用。Tap2基因多态性与多种恶性肿瘤的发生相关,且其与汉族食管癌存在相关性^[11]。

本研究采用PCR-RFLP技术分别对165例哈萨克族食管癌病例与330例对照中的Tap2基因多态性进行检测,结果提示,在哈萨克族食管癌中, Tap2379处G→A的转变是哈萨克族食管癌的危险因素($\chi^2 = 5.295$, $P < 0.05$), 杂合型(G/A)及突变型(A/A)较野生型(G/G)能够提高个体患病风险1.570倍(95%CI: 1.069-2.303); Tap2665未发现有此作用($\chi^2 = 0.130$, $P > 0.05$)。其原因可能是:肿瘤细胞在与宿主的相互作用中,为求生存可建立一系列免疫逃避机制以抵抗机体免疫系统的攻击。其中对MHC-I类分子限制性抗原递呈途径进行干扰则被认为是内源性抗原(肿瘤抗原、病毒抗原等)逃避免疫识别免遭清除的主要机制之一。该机制中,针对抗原加工转运蛋白(TAP)的干扰是一关键环节。Tap2379处及Tap2665处存在2个位点多态性: Tap2379处存在G→A的多态性,该多态性导致编码的Tap2蛋白第379位密码子由GTA置换为ATA,相应的导致氨基酸由缬氨酸(Val)变为异亮氨酸(Ile)。Tap2665处存在A→G的多态性,该多态性导致编码的Tap2蛋白第665位密码子由ACA置换为GCA,相应的导致氨基酸由苏氨酸(Thr)变为丙氨酸(Ala),这种多态性在正常人群中普遍存在。抗原呈递时,肿瘤抗原在抗原呈递细胞(APC)内与泛素结合后经蛋白酶复合物(LMP2/7/10、PA28)水解成长度为8-10个氨基酸的肽段。合适大小的抗原肽结合至TAP胞质侧的抗原结合槽,该阶段无须ATP供能,在两者结合后TAP上的ATP酶便被激活,ATP水解释放能量促使TAP二聚体结构发生改变,跨膜通道开放,胞质侧的抗原肽随即被转位于内质网腔内^[14]。在tapasin、calnexin、calreticulin的协同作用下与内质网中新合成组装完整的MHC-I α/β 2m分子上的肽结合沟槽结合,形成稳定的MHC-I抗原肽复合物。经分泌途径表达于APC表面,被CD8⁺ T细胞识别从而引起免疫应答。Tap基因的缺失或突变可能导致Tap表达下降或功能障碍,当Tap功能障碍或表达下降都将导致肿瘤抗原不能被有效地转运,从而使肿瘤逃逸

免疫监视。

本研究在控制年龄、性别、居住地、食管或胃疾病史、食管癌家族史等因素的基础上仍显示Tap2379位A/A型及A/G型的个体患食管癌的风险是G/G型的1.673倍(95%CI = 1.115-5.511),是对上述原理的一个初步印证。

4 参考文献

- 1 王秀梅, 张卫群, 陈波, 何玲, 阿力木太. MTHFR基因多态性与哈萨克族食管癌易感性. 中国公共卫生 2007; 23: 937-938
- 2 陈波, 马彦清, 杨磊, 李锋, 王秀梅. 哈萨克族食管癌与CYP2E1基因多态性及烟酒嗜好的关系. 世界华人消化杂志 2007; 15: 3852-3855
- 3 秦江梅, 王秀梅, 陈波, 杨磊, 李锋, 何玲, 廖佩花. 新疆哈萨克族食管癌与叶酸摄入水平、亚甲基四氢叶酸还原酶基因多态关系的研究. 中华流行病学杂志 2008; 29: 27-30
- 4 杨兰, 陈玲, 孙振柱, 张海洋, 任涛, 齐妍, 李洪安, 蒋金芳, 梁伟华, 秦江梅, 李锋. LMP7基因多态性与新疆哈萨克族食管鳞癌易感性的研究. 农垦医学 2007; 29: 249-253
- 5 廖佩花, 马彦清, 曾同霞, 陈波, 杨磊, 李锋, 何玲, 秦江梅. 哈萨克族食管癌与HLA-DR9等位基因关系. 中国公共卫生 2009; 25: 798-800
- 6 Lauvau G, Kakimi K, Niedermann G, Ostankovitch M, Yotnda P, Firat H, Chisari FV, van Enderd PM. Human transporters associated with antigen processing (TAPs) select epitope precursor peptides for processing in the endoplasmic reticulum and presentation to T cells. *J Exp Med* 1999; 190: 1227-1240
- 7 Powis SJ, Young LL, Joly E, Barker PJ, Richardson L, Brandt RP, Melief CJ, Howard JC, Butcher GW. The rat cim effect: TAP allele-dependent changes in a class I MHC anchor motif and evidence against C-terminal trimming of peptides in the ER. *Immunity* 1996; 4: 159-165
- 8 Yan G, Shi L, Faustman D. Novel splicing of the human MHC-encoded peptide transporter confers unique properties. *J Immunol* 1999; 162: 852-859
- 9 张笑人, 蔡晓敏. 卵巢癌细胞HLA类分子表达异常和TAP, LMP基因表达的关系. 中国肿瘤生物治疗杂志 1999; 6: 257-260
- 10 海米提·阿布都力木, 杜靖, 拉莱·苏祖克, 郝治. 子宫颈癌鳞癌中MHC-I类呈递抗原相关蛋白表达与HPV16相关性的研究. 临床与实验病理学杂志 2008; 24: 411-415
- 11 Cao B, Tian X, Li Y, Jiang P, Ning T, Xing H, Zhao Y, Zhang C, Shi X, Chen D, Shen Y, Ke Y. LMP7/TAP2 gene polymorphisms and HPV infection in esophageal carcinoma patients from a high incidence area in China. *Carcinogenesis* 2005; 26: 1280-1284
- 12 瞿金霞, 沈冲, 叶冬青. 抗原肽处理相关运载蛋白体基因多态性与1型糖尿病. 中国慢性病预防与控制 2007; 15: 28-31
- 13 许春雷, 千新来, 周小山, 赵清正, 李艳春. HPV16型-E6、E7在食管鳞癌组织与非癌组织中的表达. 癌症 2004; 23: 165-168
- 14 Reits EA, Griekspoor AC, Neefjes J. How does TAP pump peptides? insights from DNA repair and traffic ATPases. *Immunol Today* 2000; 21: 598-600

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

改良胰胃吻合在胰头十二指肠切除术中重建消化系的应用

吴兴桂, 张庆林, 李颖, 蔺桂恒

吴兴桂, 张庆林, 李颖, 蔺桂恒, 中国人民解放军第152医院
普通外科 河南省平顶山市 467000

作者贡献分布: 此课题由吴兴桂设计; 手术由吴兴桂主刀, 其他
作者协助实施; 由张庆林、李颖及蔺桂恒负责统计临床资料及
随访; 吴兴桂负责文献撰写。

通讯作者: 吴兴桂, 副主任医师, 467000, 河南省平顶山市, 中国
中国人民解放军第152医院普通外科. puwai152@yahoo.com.cn
电话: 0375-3843076

收稿日期: 2009-08-20 修回日期: 2009-10-22

接受日期: 2009-10-26 在线出版日期: 2009-11-08

Modified pancreaticogastrostomy for digestive tract reconstruction after pancreatoduodenectomy

Xing-Gui Wu, Qing-Lin Zhang, Ying Li, Gui-Heng Lin

Xing-Gui Wu, Qing-Lin Zhang, Ying Li, Gui-Heng Lin,
Department of General Surgery, the 152nd Hospital of Chi-
nese PLA, Pingdingshan 467000, Henan Province, China

Correspondence to: Wu Xing-gui, Department of General
Surgery, the 152nd Hospital of Chinese PLA, Pingdingshan
467000, Henan Province, China. puwai152@yahoo.com.cn

Received: 2009-08-20 Revised: 2009-10-22

Accepted: 2009-10-26 Published online: 2009-11-08

Abstract

AIM: To investigate the safety and efficacy of modified pancreaticogastrostomy (PG) for digestive tract reconstruction after pancreatoduodenectomy (PD).

METHODS: A total of 44 patients who underwent modified PG after PD at our hospital from March 2006 to July 2009 were retrospectively analyzed.

RESULTS: The mean operation time was 260 min (range: 200-420 min). The mean blood loss was 260 mL (range: 150-1600 mL). No mortality occurred postoperatively. The postoperative pancreatic leakage occurred in 2 patients (4.55%, 2/44), both of which were cured by conservative management. Delayed gastric emptying occurred in 5 patients (11.36%, 5/44). The bleeding of the pancreatic stump occurred in 1 patient (2.27%, 1/44). No surgical wound infection or abdominal infection occurred. The mean postoperative length of stay (LOS) was 15 days (range: 13-27 days). The postoperative follow-up, which lasted from 3 months to 3

years, was carried out in all patients, and no long-term complications were found.

CONCLUSION: Modified PG after PD is a safe and easy procedure for digestive tract reconstruction.

Key Words: Pancreatoduodenectomy; Pancreaticogastrostomy; Pancreatic leakage

Wu XG, Zhang QL, Li Y, Lin GH. Modified pancreaticogastrostomy for digestive tract reconstruction after pancreatoduodenectomy. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(31): 3259-3262

摘要

目的: 探讨胰十二指肠切除术中将改良胰胃吻合应用于重建消化系的手术安全性及其近期疗效。

方法: 收集我院2006-03/2009-07采用改良胰胃吻合胰十二指肠切除术治疗44例患者的临床资料, 对其进行回顾性分析。

结果: 患者手术时间200-420(平均260) min, 失血量150-1600(平均260) mL, 无手术死; 出现胰瘘2例(4.55%, 2/44), 经保守治疗后痊愈; 5例出现胃排空障碍(11.36%, 5/44); 胰腺残端出血1例(2.27%, 1/44); 无手术伤口感染或腹腔感染的病例; 术后住院时间13-27(平均15)d; 随访率100%, 随访6 mo至3年, 无远期手术并发症发生。

结论: 改良胰胃吻合使胰十二指肠切除成为一种操作容易、安全可靠的术式, 值得各级医院推广。

关键词: 胰十二指肠切除术; 胰胃吻合; 胰瘘

吴兴桂, 张庆林, 李颖, 蔺桂恒. 改良胰胃吻合在胰头十二指肠切除术中重建消化系的应用. *世界华人消化杂志* 2009; 17(31): 3259-3262

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3259.asp>

0 引言

近年来, 随着外科手术技术提高及围手术期处

背景资料

近年来, 胰头十二指肠切除术(PD)的手术死亡率已经明显下降, 但并发症的发生率仍高达30%-50%, 其中胰瘘是最主要的并发症, 其可导致一系列的继发并发症, 如腹腔内脓肿、感染、出血等, 是导致患者术后死亡的主要原因。

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

相关报道

Takao *et al*早在1993年就介绍了胰头十二指肠切除中应用胰胃吻合的手术方式,但未得到广泛推广,近年越来越多的研究者采用胰胃吻合,并演变出多种吻合方式。

理的进步,胰十二指肠切除术(pancreaticoduodenectomy, PD)死亡率已普遍降低,但其并发症的发生率仍然较高,其中胰瘘是最严重的并发症之一。为降低胰瘘的发生率,我院2006-03/2009-07采用改良胰胃吻合(pancreaticogastrostomy, PG)的PD治疗患者44例,本研究对其进行回顾性分析,并评价其安全性。

1 材料和方法

1.1 材料 本组患者44例,男28例,女16例;年龄45-72(平均58)岁;其中胰头癌21例,壶腹癌11例,胆总管下段癌8例,十二指肠腺癌4例。所有病例皆有阻塞性黄疸表现,术前皆有B超、CT或MRCP证实胆总管下端有阻塞或有胰头占位征象,有3例壶腹癌及2例十二指肠癌患者有术前经十二指肠镜取活检得以证实,所有病例均不保留幽门,消化系重建中均采用PG。

1.2 方法

1.2.1 手术: 经上腹正中切口进腹,按经典方式探查、切除胰头十二指肠,空肠及胃分别用GIA切开闭合,常规廓清第7, 8, 9, 12, 14, 15, 16a, 16b1组淋巴结。有合并肠系膜上静脉受侵者,将胰头及受侵血管一并切除,若吻合有张力,则可切开升结肠外侧腹膜、回盲部下方腹膜及小肠系膜根部后腹膜直至曲氏韧带,实施中肠去旋转手法,在无张力的情况下直接门静脉肠系膜上静脉端端吻合。切除标本后,游离胰腺残端约3 cm,在胰腺断面寻找到主胰管,将一与主胰直径相匹配的硅胶管向尾侧插入约3 cm,并予以妥善缝合固定,交锁褥式缝合胰腺断端,暂不剪断缝线以备牵引。在胰腺断端对应位置切开胃后壁全层,长度约等于胰腺断端宽度,离胃后壁切口周围约1.5 cm围绕该切口做外荷包,暂不打结。在胃后壁开口相对胃前壁横行切开胃壁全层,长度较胃后壁开口稍长,经胃前、后壁开口将胰腺断端牵入胃腔,此时即可在直视下间断缝合胃后壁开口与胰腺断端前后缘,缝合完毕后,暂不剪线,向前牵引胰腺断端,收紧胃后壁荷包缝线并打结,打结松紧以不影响胰腺断端血液循环为度(可容一血管钳尖),此时胰胃吻合口被套入胃腔。在胃前壁另外戳小孔引出胰液引流硅胶管,荷包缝合小孔并将其妥善固定。提起横结肠,在横结肠系膜无血管区切开约10 cm,经该开口将近段空肠提至结肠上区,按胆肠吻合、胃肠吻合的顺序完成消化道重建,并使上述两吻合口的距离相距约40 cm,胆道常规放置T管,胃

前壁开口可籍以用圆形吻合器完成胃空肠端侧吻合,闭合胃前壁开口。关闭各肠系膜孔洞。在右肝上间隙、胆肠吻合口、胰胃吻合口下方分别放置橡皮管引流,在腹壁戳孔分别引出各引流管。

1.2.2 结果评判标准: 术后3 d以上,引流管引出含淀粉酶大于正常血清淀粉酶3倍以上的引流液,液体量每天超过50 mL;手术后胃潴留时间大于5 d作为判断胃排空延迟的标准。

2 结果

手术时间200-420(平均260) min,手术失血量150-1600(平均260) mL,无手术死亡;出现胰瘘2例(每日均少于200 mL),发生率为4.55%(2/44),均经保守治疗后痊愈;5例出现胃排空障碍(11.36%, 5/44),经红霉素静脉注射后恢复正常;胰腺残端出血1例(2.27%, 1/44),因患者误拔胰管支撑引流管所致,经保守治疗第2天停止;无手术伤口感染或腹腔感染的病例。术后住院时间13-27(平均18) d。所有患者都得到随访,随访6 mo-3年,无远期手术并发症。

3 讨论

近年来,随着外科手术技术提高及围手术期处理的进步,PD的手术死亡率已经明显下降,但并发症的发生率仍高达30%-50%,其中胰瘘是最主要的并发症,并可导致一系列的继发并发症,如腹腔内脓肿、感染、出血等,是导致患者术后死亡的主要原因^[1]。PD中消化系重建按胰腺断端与消化系吻合的部位而言有胰空肠吻合(pancreaticojejunostomy, PJ)和PG两种方式,这两种吻合方式优劣目前尚无定论,有些学者认为两种吻合方式术后胰瘘的发生率无明显区别^[2-3]。但近年来有许多作者的研究显示PG较胰肠吻合有明显低的胰瘘发生率^[4-7]。一些研究虽然不能证实PG较胰肠吻合有明显低的胰瘘发生率,但有较低的死亡率、较低的并发症发生率,且发生并发症后易于处理等优点,是一种安全的胰腺残端的处理方式^[8-12]。国内几组资料^[13-15]报道,PG术后胰瘘发生率分别为2.6%-8.3%。本组病例资料中术后胰瘘的发生率为4.55%,处于一个较低的水平,亦证明PG是一种安全、可靠的手术。

不同的作者所报道的PG的具体操作方式不尽相同,大致有以下几种方式:(1)胰腺断端胃后壁全层单层吻合^[16];(2)胰腺断端胃后壁全层吻

合+浆肌层胰腺包埋^[17]; (3)胰腺断端胃后壁全层吻合+浆肌层胰腺包埋+胰管置管外引流^[18]; (4)胰管胃黏膜对黏膜吻合+浆肌层胰腺包埋^[19-20]; (5)胰腺断端胃后壁切口褥式缝合^[21]。本组病例中我们的PG方式在Takano *et al*^[22]的基础上进行改良, 与上述几种方式约有不同: (1)经胃前壁开口胃腔内直视下完成PG; (2)用吻合口周围胃壁荷包缝合适度捆扎胰腺代替浆肌层包埋; (3)胃前壁开口还可置入圆形吻合器, 方便完成胃空肠端侧吻合。

一般认为PG有如下优点^[24]: (1)胰腺与胃后壁紧贴, 利于无张力吻合; (2)胃壁厚软, 血供好, 利于吻合部愈合; (3)胃腔大, 无胰肠吻合出现的套入困难; (4)由于胃酸的作用和缺乏肠激酶, 胰酶不能被激活, 可减少对胰胃吻合口的消化作用; (5)无长的空肠襻, 可避免因大量胰液和胆汁聚积使腔内压增高而产生的牵拉作用, 从而减少吻合部裂开的危险性; (6)可通过胰液分泌量判断吻合部通畅程度, 并可通过胃镜直接观察吻合口情况。

在44例PG的实践中, 在标本切除范围方面我们按如下原则施行: (1)在确保胃离断处距肿瘤边缘不少于5 cm前提下, 尽量使胃的离断线靠近幽门, 以便采用圆形吻合器行胃空肠端侧吻合; (2)胆管的离断位置在胆囊管汇入主胆道的上方; (3)空肠的离断位置为距曲氏韧带远侧15 cm处; (4)常清扫行第7, 8, 9, 12, 14, 15, 16a, 16b1组淋巴结。如果术中探查发现肠系膜上静脉受侵, 则适当游离, 如果无张力可直接吻合; 如果有张力, 行中肠去旋转手法, 在无张力的情况下吻合静脉血管, 肠系膜上血管的阻断时间限制在1 h之内; 如果发现脾静脉若受侵可与肾静脉或肠系膜上静脉行端侧吻合, 亦可结扎。胰腺断端按如下方法处理: (1)对胰腺断端行交锁褥式缝合, 以防止术后出血; (2)胰腺断端游离约3 cm, 游离太少不利于完成高质量吻合; (3)主胰管常规放置适当管径的硅胶管, 经胃前壁戳孔引出体外。按胰胃、胆肠、胃肠吻合的顺序重建消化系, 经过胃前壁开窗, 采用胃腔内直视下单层缝合吻合胰胃, 用吻合口周围胃壁荷包缝合适度捆扎胰腺代替浆肌层包埋, 胆肠与胃肠吻合口的距离约40 cm; 胃前壁开口可籍以用圆形吻合器完成胃空肠端侧吻合; 肝总管内常规放置T管。

本研究所采用的消化道重建方式有如下优点: (1)采用上腹部正中切口, 手术野显露更佳,

更方便各项操作; (2)对胰腺断端行交锁褥式缝合, 既能防止术后出血, 同时缝扎了小胰管, 因而也减少了胰瘘发生的几率; (3)经过胃前壁开口胃腔内直视下间断缝合胃与胰腺断端, 不仅操作较为容易, 而且吻合口自然内翻, 吻合更为可靠; (4)用吻合口周围胃壁荷包缝合适度捆扎胰腺代替浆肌层包埋, 减少了针眼出血和“针眼瘘”的发生^[22]; (5)胰管置管外引流, 既能在PG过程中误缝主胰管的几率, 又能减少胰瘘的发生几率^[23]; (6)肝总管内常规放置T管可以增加胃肠减压的效果, 使有多个吻合口的近段空肠及胃腔内得到充分减压, 因此亦有减少吻合口瘘发生的作用^[24]; (7)凭借胃前壁开口可用圆形吻合器完成胃空肠吻合, 缩短了手术时间。

本组病例手术时间200-420(平均260) min, 大部分手术在4 h内完成, 我们认为这与PG使手术得以简化有关。本组病例无手术死亡, 仅出现2例胰瘘(4.55%, 2/44)、5例胃排空障碍(11.36%, 5/44)、1例胰腺残端出血(2.27%, 1/44)、无手术伤口感染或腹腔感染的病例, 术后住院时间13-27(平均17)d, 随访期间未发现远期并发症。本组资料说明PG和上述其他防止并发症的措施并用, 使PD手术难度降低, 成为一种操作容易, 而且安全可靠的手术方式。经过44例PD中采用PG的实践, 我们体会到新的术式使PD的手术难度大为降低, 手术时间大为缩短, 术后并发症发生率明显降低, 且并发症的处理更为容易, 因而术后恢复更加顺利, 术后住院时间亦相应缩短, 并且未发现例有远期并发症, 所以我们认为尽管目前有关PG和PJ孰优孰劣尚无定论, 但PG的操作更为容易毋庸置疑, PG应该被更多的外科医生接受, 使我们至少在遇到复杂情况时多一种方法可以选择。

总之, PG使PD作为一种操作容易、安全可靠的术式, 值得各级医院推广。

4 参考文献

- 1 Kleespies A, Albertsmeier M, Obeidat F, Seeliger H, Jauch KW, Bruns CJ. The challenge of pancreatic anastomosis. *Langenbecks Arch Surg* 2008; 393: 459-471
- 2 李汉贤. 胰十二指肠切除术消化道重建方法的争议和评价. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 476-481
- 3 Nanashima A, Sumida Y, Abo T, Shindo H, Fukuoka H, Tanaka K, Takeshita H, Hidaka S, Sawai T, Yasutake T, Nagayasu T. Comparative study of anastomosis in pancreaticogastrostomy and pancreaticojejunostomy after pancreaticoduodenectomy. *Hepatogastroenterology* 2007; 54: 1243-1246
- 4 Schlitt HJ, Schmidt U, Simunek D, Jäger M,

创新盘点

本研究经过胃前壁开口胃腔内直视下间断缝合胃与胰腺断端, 不仅操作较为容易, 而且吻合口自然内翻, 吻合更为可靠; 用吻合口周围胃壁荷包缝合适度捆扎胰腺代替浆肌层包埋, 减少了针眼出血和“针眼瘘”的发生; 凭借胃前壁开口可用圆形吻合器完成胃空肠吻合, 缩短了手术时间。

同行评价
本研究结果显示
改良胰胃吻合使
胰十二指肠切除
术操作容易、安
全可靠,具有较好
临床实用价值。

- Aselmann H, Neipp M, Piso P. Morbidity and mortality associated with pancreatogastrostomy and pancreaticojejunostomy following partial pancreaticoduodenectomy. *Br J Surg* 2002; 89: 1245-1251
- 5 Oida T, Mimastu K, Kawasaki A, Kuboi Y, Kano H, Amano S. Toward zero pancreatic leakage after pancreaticoduodenectomy for soft pancreas in low-volume pancreatic surgery centers. *Hepatogastroenterology* 2009; 56: 886-890
- 6 Aranha GV, Hodul PJ, Creech S, Jacobs W. Zero mortality after 152 consecutive pancreaticoduodenectomies with pancreaticogastrostomy. *J Am Coll Surg* 2003; 197: 223-231; discussion 231-232
- 7 Kim JH, Yoo BM, Kim JH, Kim WH. Which method should we select for pancreatic anastomosis after pancreaticoduodenectomy? *World J Surg* 2009; 33: 326-332
- 8 Aranha GV, Hodul P, Golts E, Oh D, Pickleman J, Creech S. A comparison of pancreaticogastrostomy and pancreaticojejunostomy following pancreaticoduodenectomy. *J Gastrointest Surg* 2003; 7: 672-682
- 9 Bassi C, Falconi M, Molinari E, Salvia R, Butturini G, Sartori N, Mantovani W, Pederzoli P. Reconstruction by pancreaticojejunostomy versus pancreaticogastrostomy following pancreatectomy: results of a comparative study. *Ann Surg* 2005; 242: 767-771, discussion 771-773
- 10 McKay A, Mackenzie S, Sutherland FR, Bathe OF, Doig C, Dort J, Vollmer CM Jr, Dixon E. Meta-analysis of pancreaticojejunostomy versus pancreaticogastrostomy reconstruction after pancreaticoduodenectomy. *Br J Surg* 2006; 93: 929-936
- 11 Sledziński Z, Kostro JZ, Zadrozny D, Pirski I, Lukiański M, Głowacki J. Results of pancreaticogastrostomy after pancreaticoduodenectomy in 159 consecutive cases. *Pancreatology* 2008; 8: 36-41
- 12 Oussoultzoglou E, Bachellier P, Bigourdan JM, Weber JC, Nakano H, Jaeck D. Pancreaticogastrostomy decreased relaparotomy caused by pancreatic fistula after pancreaticoduodenectomy compared with pancreaticojejunostomy. *Arch Surg* 2004; 139: 327-335
- 13 王建玲, 王强, 田志龙. 胰十二指肠切除术的单层胰胃吻合. 中国普外基础与临床杂志 2001; 8: 416-417
- 14 刘海, 马勇, 任祖海. 胰腺-胃吻合术在胰十二指肠切除术中的应用(附24例报告). 中国普外基础与临床杂志 2007; 14: 210-211
- 15 陈泉宁, 彭承宏, 范跃祖, 韩宝三, 程东峰. 胰胃吻合在胰十二指肠切除术中的应用. 中国普外基础与临床杂志 2009; 16: 223-225
- 16 Aranha GV. A technique for pancreaticogastrostomy. *Am J Surg* 1998; 175: 328-329
- 17 Takano S, Ito Y, Watanabe Y, Yokoyama T, Kubota N, Iwai S. Pancreaticojejunostomy versus pancreaticogastrostomy in reconstruction following pancreaticoduodenectomy. *Br J Surg* 2000; 87: 423-427
- 18 Takao S, Shimazu H, Maenohara S, Shinchi H, Aikou T. Modified pancreaticogastrostomy following pancreaticoduodenectomy. *Am J Surg* 1993; 165: 317-321
- 19 Payne RF, Pain JA. Duct-to-mucosa pancreaticogastrostomy is a safe anastomosis following pancreaticoduodenectomy. *Br J Surg* 2006; 93: 73-77
- 20 Murakami Y, Uemura K, Hayashidani Y, Sudo T, Hashimoto Y, Nakagawa N, Ohge H, Sueda T. No mortality after 150 consecutive pancreaticoduodenectomies with duct-to-mucosa pancreaticogastrostomy. *J Surg Oncol* 2008; 97: 205-209
- 21 Ohigashi H, Ishikawa O, Eguchi H, Sasaki Y, Yamada T, Kishi K, Noura S, Takachi K, Miyashiro I, Oue M, Yano M, Imaoka S. A simple and safe anastomosis in pancreaticogastrostomy using mattress sutures. *Am J Surg* 2008; 196: 130-134
- 22 Takano S, Iwai S, Tanaka T. Improved technique for pancreaticogastrostomy with implantation method after pancreaticoduodenectomy. *Int Surg* 1998; 83: 128-130
- 23 白明东, 刘颖斌, 李海军, 彭淑牖. 胰肠吻合方法的演进. 世界华人消化杂志 2003; 11: 591-593
- 24 王建伟, 许斌, 蔡秀军, 李海军, 刘颖斌, 彭淑牖. 胰十二指肠切除术后胰漏的发生机制. 世界华人消化杂志 2003; 11: 589-590

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》中文摘要要求

本刊讯 本刊中文摘要必须在350字左右,内容应包括目的(应阐明研究的背景和设想、目的),方法(必须包括材料或对象、应描述课题的基本设计,双盲、单盲还是开放性,使用什么方法,如何进行分组和对照,数据的精确程度,研究对象选择条件与标准是否遵循随机化、齐同化的原则,对照组匹配的特征,如研究对象是患者,应阐明其临床表现、诊断标准,如何筛选分组,有多少例进行过随访,有多少例因出现不良反应而中途停止研究),结果(应列出主要结果,包括主要数据,有什么新发现,说明其价值和局限,叙述要真实、准确、具体,所列数据经用何种统计学方法处理;应给出结果的置信区间和统计学显著性检验的确切值;概率写 P ,后应写出相应显著性检验值),结论(全文总结,准确无误的观点及价值)。(科学编辑:李军亮 2009-11-08)

TNF- α 、TGF- β 1和IL-10基因多态性与乙型肝炎后肝硬化的关系

姜在来, 张 玮, 张 辉, 刘一博, 苏式兵

姜在来, 张辉, 苏式兵, 上海中医药大学中医复杂系统研究中心 上海市 201203

张玮, 刘一博, 上海中医药大学附属龙华医院肝病科 上海市 201203

国家科技支撑计划基金资助项目, No. 2006BAI08B02-06

上海市教委基金资助项目, No. 07ZZ51

艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治基金资助项目, No. 2009ZX10004-601

上海市教委高校高水平特色发展基金资助项目, No. 2005-81

作者贡献分布: 姜在来负责实验检测、部分临床资料采集及论文撰写; 张辉负责部分实验检测; 张玮与刘一博负责临床资料采集; 苏式兵负责实验设计与论文撰写指导。

通讯作者: 苏式兵, 教授, 201203, 上海市浦东新区蔡伦路1200号, 上海中医药大学中医复杂系统研究中心。

shibingsu@yahoo.com

电话: 021-51323013 传真: 021-51323013

收稿日期: 2009-06-23 修回日期: 2009-10-10

接受日期: 2009-10-19 在线出版日期: 2009-11-08

Relationship between TNF- α , TGF- β 1 and IL-10 genetic polymorphisms and post-hepatitis B cirrhosis

Zai-Lai Jiang, Wei Zhang, Hui Zhang, Yi-Bo Liu, Shi-Bing Su

Zai-Lai Jiang, Hui Zhang, Shi-Bing Su, Research Center for Complex System of Traditional Chinese Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

Wei Zhang, Yi-Bo Liu, Department of Hepatology, Longhua Hospital, Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

Supported by: the National Key Technology R&D Program, No. 2006BAI08B0206; the Shanghai Municipal Education Commission Project, No. 07ZZ51; the National S&T Major Project of China, No. 2009ZX10004-601; and the Shanghai Municipal University High-level Feature Development Project, No. 2005-81

Correspondence to: Professor Shi-Bing Su, Research Center for Complex System of Traditional Chinese Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, 1200 Cai Lun Road, Shanghai Pudong New Area, Shanghai 201203, China. shibingsu@yahoo.com

Received: 2009-06-23 Revised: 2009-10-10

Accepted: 2009-10-19 Published online: 2009-11-08

Abstract

AIM: To investigate the relationship between single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the tumor necrosis factor- α (TNF- α), transforming

growth factor- β 1 (TGF- β 1) and interleukin-10 (IL-10) genes and post-hepatitis B cirrhosis in the Shanghai Chinese population.

METHODS: The TNF- α -308G/A, TGF- β 1-509T/C and IL-10-592A/C SNPs were determined by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) in combination with sequence analysis in 169 patients with post-hepatitis B cirrhosis and 119 healthy controls. The genotypes and allele frequency distribution of these SNPs were then analyzed.

RESULTS: TNF- α -308 GG genotype and G allele frequency in patients with post-hepatitis B cirrhosis were significantly higher than those in healthy controls ($P < 0.001$, $OR > 3$). Although there were no significant differences in TGF- β 1-509 genotypes between post-hepatitis B patients and healthy controls, the T allele frequency was significantly higher in post-hepatitis B patients than in healthy controls ($P < 0.05$). There were also no significant differences in IL-10-592 genotypes and allele frequencies between post-hepatitis B patients and healthy controls.

CONCLUSION: The TNF- α -308G/A and TGF- β 1-509T/C SNPs may be related to the susceptibility to post-hepatitis B cirrhosis.

Key Words: Post-hepatitis cirrhosis; Hepatitis B; Polymorphism; Genetic susceptibility; Relationship

Jiang ZL, Zhang W, Zhang H, Liu YB, Su SB. Relationship between TNF- α , TGF- β 1 and IL-10 genetic polymorphisms and post-hepatitis B cirrhosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(31): 3263-3268

摘要

目的: 探讨上海人群中TNF- α 、TGF- β 1及IL-10单核苷酸多态性与乙型肝炎后肝硬化的关联。

方法: 运用PCR-RFLP结合测序的方法, 测定119例健康对照者与169例肝硬化患者TNF- α

背景资料

乙型肝炎后肝硬化的发病主要是由HBV感染和侵袭引起, 同时还与患者的遗传易感性及免疫功能等相关。SNPs是遗传易感性研究的主要生物学标志之一, 他与感染性疾病的进展有关。

同行评议者

高润平, 教授, 吉林大学第一医院肝病科

相关报道

Miyazoe *et al* 研究了TNF- α -308位点在日本人群中的多态性,对213例HBV携带者和52例健康对照者进行检测,结果表明肝硬化患者(包括乙型肝炎)与HBV无症状携带者之间没有差异。

基因-308G/A、TGF- β 1基因-509T/C、IL-10基因-592A/C的多态性,并确定其基因型与等位基因频率的分布。

结果:乙型肝炎后肝硬化患者TNF- α 的GG基因型和G等位基因出现的频率明显高于健康对照者($P<0.001$, $OR>3$); TGF- β 1-509位点的3种基因型整体间没有差异,但T等位基因出现的频率明显高于健康对照者($P<0.05$); IL-10-592A/C的多态性在乙型肝炎后肝硬化患者与健康对照者之间差异没有统计学意义。

结论: TNF- α -308G/A与TGF- β 1-509T/C的多态性可能与乙型肝炎后肝硬化的遗传易感性有关。

关键词: 肝炎后肝硬化; 乙型肝炎; 多态性; 遗传易感性; 关联

姜在来, 张玮, 张辉, 刘一博, 苏式兵. TNF- α 、TGF- β 1和IL-10基因多态性与乙型肝炎后肝硬化的关系. 世界华人消化杂志 2009; 17(31): 3263-3268
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3263.asp>

0 引言

肝硬化是一种严重危害人们健康的疾病,在我国乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)慢性感染是引起肝硬化的主要原因^[1]。健康者感染HBV后是否会进展成肝硬化,可能与个人的体质不同或与患者的遗传易感性有关。因为不同人群和不同个体DNA序列的差异,即基因多态性常反映了慢性疾病发病的遗传易感性,所以,研究肝硬化患者的基因多态性有助于了解肝硬化的产生、发展以及对药物治疗的反应。已有研究表明,单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNPs)与肝硬化的发生及严重程度等密切相关^[2-4]。因此,本研究旨在探讨上海人群中肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、转化生长因子- β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)和白介素-10(interleukin-10, IL-10)SNPs与乙型肝炎后肝硬化的关联。

1 材料和方法

1.1 材料 收集上海市龙华医院住院和门诊患者乙型肝炎后肝硬化患者169例,年龄为18-65岁,其中男97例,女72例,均排除其他肝炎病毒感染和酒精、药物等其他原因引起的肝硬化。肝硬化诊断标准参考“病毒性肝炎防治方案”^[5]。献血中心献血员和健康志愿者119例,男80例,女

39例,年龄18-50岁。DNA提取试剂盒(Tianamp Blood DNA Kit)购自上海TIANGEN公司。RNase A、Taq聚合酶和限制性内切酶Nco I 购自上海生工公司。LA Taq聚合酶、限制性内切酶Eco81 I 和限制性内切酶Afa I 购自上海宝生物公司。超低温冰箱(-70℃ Thermo)用来储存DNA。DNA循环合成仪(Ampgene9700)、水平电泳仪和电泳槽(Tanon EPs 300)、紫外透射仪(Tanon UV-2000)、凝胶成像分析系统(Alpha Innotech)以及测序仪(ABI3730)用来做基因型鉴定。本研究经上海中医药大学伦理委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 标本采集: 分别抽取乙型肝炎后肝硬化患者和正常献血者全血1 mL,以EDTA抗凝。在4℃条件下3000 r/min,离心5 min,分离去除上清液(血清)。沉淀物(血细胞)用于基因组DNA的提取。

1.2.2 模板DNA的提取: 采用Tianamp Blood DNA Kit提取基因组DNA,具体操作按其说明书进行。

1.2.3 基因型鉴定: 采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)结合测序的方法。

(1)PCR扩增: 分别扩增包含308位点的TNF- α 、包含509位点的TGF- β 和包含592位点的IL-10。PCR反应总体积为20 μ L,基因组DNA 2 μ L,上、下游引物(表1)各1 μ L, LA Taq酶1 U, 10 \times PCR Buffer 2 μ L、25 mmol/L MgCl₂ 2 μ L、25 mmol/L dNTPs 2 μ L、去离子水9.8 μ L; 先94℃ 5 min; 再94℃ 30 s、60℃ 30 s及72℃ 45 s, 35个循环; 72℃延伸10 min。IL-10退火温度为58℃,其他条件同上。(2)PCR扩增产物经含EB替代品的10 g/L琼脂糖凝胶上电泳,于紫外灯下观察结果,与Marker相对照若为所需要的扩增片段则进行下一步酶切试验。(3)直接用PCR产物作为酶切底物,具体反应体积配置参照各内切酶(表1)的说明书。酶切后于30 g/L的琼脂糖凝胶上电泳2 h,在凝胶成像分析系统下拍照。(4)为确保试验结果的可靠性,我们从肝硬化患者和健康对照者中随机抽取5%的样本,委托生物芯片上海国家工程研究中心试验室进行了测序。

统计学处理 所有数据运用SPSS15.0进行计算,两组间的差异用四格表 χ^2 检验,设定 $P<0.05$ 为有统计学意义,并认为组间存在显著性差异。

2 结果

2.1 TNF- α -308G/A 多态性的分析 扩增含有-308位点的TNF- α , PCR产物大小为346 bp,如果-308位点为G则会被内切酶Nco I 切成2个片段24 bp

表 1 引物序列、PCR产物大小及相应内切酶

	引物序列	PCR产物(bp)	内切酶
TNF- α -308	上游引物: 5'-AGGCAATAGGTTTGGAGGGCCAT-3' 下游引物: 5'-GAGCGTCTGCTGGCTGGGTG-3'	346	<i>Nco</i> (24 bp/322 bp)
TGF- β 1-509	上游引物: 5'-CTCCATTTCCAGGTGTGGTCCCA-3' 下游引物: 5'-CACCAAAGCGGGTGATCCAGAT-3'	865	<i>Eco</i> 81 (237 bp/628 bp)
IL-10-592	上游引物: 5'-GGTGAGCACTACCTGACTAGC-3' 下游引物: 5'-CCTAGGTCACAGTGACGTGG-3'	412	<i>Afa</i> (176 bp/236 bp)

和322 bp, 由于24 bp片段太小, 在琼脂糖凝胶上看不到, 所以只显示有一条322 bp的片段; 如果-308位点为A则不会被内切酶*Nco* I 切开, 只显示有一条346 bp的片段. 纯合子GG基因型为1条带(322 bp), 突变杂合子GA基因型为2条带(322 bp/346 bp), 突变纯合子AA基因型应为1条带(346 bp)(图1A).

在169例乙型肝炎后肝硬化患者和119例健康对照者中3种基因型GA、AA、GG出现的频率分别是11%和32%, 3%和8%及86%和60%, 3组数据整体之间存在显著性差异(均 $P < 0.001$, 表2). 乙型肝炎后肝硬化患者中突变杂合子GA出现的频率低于健康对照者, 二者之间存在显著性差异(11% vs 32%, $P < 0.001$); 突变纯合子AA出现的频率也低于健康对照者(3% vs 8%), 但没有统计学意义; 而纯合子GG基因型出现的频率高于健康对照者(86% vs 60%), 将GG基因型与含有A等位基因的基因型进行四格表检验, 发现二者之间存在显著性差异($OR = 4.085$, $P < 0.001$, 表3). 乙型肝炎后肝硬化患者和健康对照者中等位基因G和A出现的频率分别是91%和77%, 9%和23%, 有统计学意义($OR = 3.308$, $P < 0.001$, 表4).

2.2 TGF- β 1-509T/C多态性的分析 扩增含有-509位点的TGF- β 1, PCR产物大小为865 bp, 如果-509位点为C则会被内切酶*Eco*81 I 切成2个片段237 bp和628 bp; 如果-509位点为T则不会被内切酶*Eco*81 I 切开, 只显示有一条865 bp的片段. 突变纯合子CC基因型应为2条带(237 bp/628 bp), 纯合子TT基因型为1条带(865 bp), 突变杂合子CT基因型为3条带(237 bp/628 bp/865 bp), 3种基因型见图1B. 乙型肝炎后肝硬化患者和健康对照者的3种基因型CC、CT、TT出现的频率分别是22%和33%、47%和44%及31%和23%, 3组数据间整体差异没有统计学意义(表1), 但是等位基因C和T在这两组中出现的频率分别是46%和55%, 54%和45%, 有统计学意义($OR = 1.421$, $P < 0.05$, 表4).

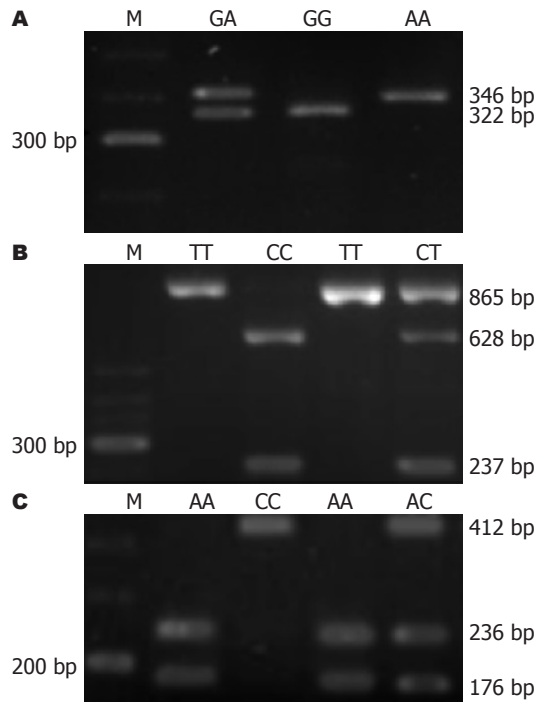


图 1 基因型示意图. A: TNF- α ; M: 50 bp DNA Ladder; B: TGF- β 1-509; M: 50 bp DNA Ladder; C: IL-10-592; M: 100 bp DNA Ladder.

2.3 IL-10-592A/C多态性的分析 扩增含有-592位点的IL-10, PCR产物大小为412 bp, 如果592位点为A则会被内切酶*Afa* I 切成2个片段176 bp和236 bp; 如果-592位点为C则不会被内切酶*Afa* I 切开, 只显示有1条412 bp的片段. 纯合子AA基因型为2条带(176 bp/236 bp), 突变纯合子CC基因型应为1条带(412 bp), 突变杂合子AC基因型为3条带(176 bp/236 bp/412 bp), 3种基因型见图1C. 在此位点对乙型肝炎后肝硬化患者和健康对照者的基因型和等位基因出现的频率进行统计分析, 未发现统计学差异(表2, 表4).

3 讨论

乙型肝炎后肝硬化的发病主要是由HBV的感染和侵袭引起, 同时还与患者的遗传易感性及其免疫功能等相关. SNPs是遗传易感性研究的主

创新盘点

本研究针对上海人群, 研究了TNF- α -308G/A、TGF- β 1-509T/C和IL-10-592A/C这3个位点多态性与肝硬化的关系, 发现TNF- α GG基因型和G等位基因以及TGF- β 1-509T等位基因在乙型肝炎后肝硬化患者中出现的频率明显高于健康对照者, 推测TNF- α GG基因型和G等位基因以及TGF- β 1-509T等位基因可能是乙型肝炎后肝硬化的易感标志.

同行评价
本研究设计合理,方法先进,从某些细胞因子基因多态性的角度来研究和探讨HBV感染后肝硬化的遗传易感性,具有实际意义和较好的参考价值。

表 2 健康对照者和乙型肝炎后肝硬化患者基因型分布

基因型	健康者n(%)	肝硬化患者n(%)	P值	OR值	95%CI
TNF- α -308G/A			0.000		
GA	38(32)	18(11)	0.000	2.998	1.632-5.506
AA	10(8)	6(3)	0.095	2.367	0.837-6.690
GG	71(60)	145(86)	0.053	1.438	0.995-2.078
TGF- β 1-509T/C			0.121		
CC	39(33)	38(22)	0.142	1.458	0.880-2.414
CT	52(44)	79(47)	0.754	0.935	0.613-1.425
TT	28(23)	52(31)	0.307	0.765	0.457-1.281
IL-10-592A/C			0.821		
AA	51(43)	75(44)	0.873	0.966	0.631-1.479
AC	56(47)	74(44)	0.736	1.075	0.707-1.634
CC	12(10)	20(12)	0.677	0.852	0.401-1.810

表 3 健康对照者和乙型肝炎后肝硬化患者在TNF- α -308位点GG纯合子和含有A等位基因的分布

基因型	健康者n(%)	肝硬化患者n(%)	P值	OR	95%CI
GA+AA	48(40)	24(14)	0.000	2.840	1.650-4.890
GG	71(60)	145(86)	0.000	4.085	2.318-7.196

表 4 健康对照者和乙型肝炎后肝硬化患者的等位基因频率分布

基因型	等位基因频率		P值	OR值	95%CI
	健康者n(%)	肝硬化患者n(%)			
TNF- α -308G/A					
G	180(77)	308(91)	0.000	3.308	2.052-5.333
A	58(23)	30(9)			
TGF- β 1-509T/C					
C	130(55)	155(46)	0.038	1.421	1.019-1.983
T	108(45)	183(54)			
IL-10-592A/C					
A	158(67)	224(66)	0.977	0.995	0.700-1.413
C	80(33)	114(34)			

要生物学标志之一,他与感染性疾病的进展有关^[6-7]。患者通过SNPs表现出来的遗传易感性,既可能成为HBV的持续存在而不发生乙型肝炎或某些乙型肝炎患者更易进展成肝硬化的原因,也可能是影响药物治疗的效果的缘由。研究表明IL-10^[2]和TGF- β 1^[3-4]启动子区某些位点的多态性与乙型肝炎的进展有关,因此有必要研究乙型肝炎后肝硬化的候选基因,探讨这些基因对肝硬化的影响以及某些位点的基因型是否为该病易感基因的生物学标志。

HBV的清除主要依赖细胞免疫,特别是细胞毒性T淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL),

CTL通过清除HBV感染的细胞和分泌细胞因子而清除HBV^[8]。IL-10主要是由巨噬细胞分泌,他能下调Th1型细胞因子的表达,是一种强有力的免疫抑制因子和协调刺激分子^[9],从而影响机体对HBV的清除。本试验研究了119例健康对照者和169例肝硬化患者,探讨IL-10-592A/C位点SNPs与乙型肝炎后肝硬化的关系,没有发现该位点的多态性与肝硬化的易感性有关,这与Miyazoe *et al*^[2]的报道一致。另外,Edwards-Smith *et al*^[10]研究IL-10(-1082/-819/-592)3个位点多态性与药物治疗的关系,发现单倍体ATA与丙型肝炎患者抵抗干扰素 α 治疗有关。

TGF- β 1和TNF- α 可以通过不同途径影响肝纤维化的进程, 其中TGF- β 1是促进肝纤维化形成的一个重要的细胞因子, 该细胞因子可以通过刺激细胞外基质的表达和沉积、抑制细胞外基质的降解等多种机制参与肝纤维化的形成^[11]; 而TNF- α 的产生是受遗传控制的, 他是机体针对炎症应答过程中产生的第一个细胞因子^[12]. TNF- α 主要由单核细胞、枯否氏细胞产生, 可促进肝星状细胞增生和纤维增生, 并与其他细胞因子一起对抗肝细胞生长, 阻止延缓肝细胞的再生, 参与肝硬化的形成和发展. 持续高诱导水平的TNF- α , 可加速病情的进展. 体外研究表明, TNF- α 基因启动子-308A等位基因与TNF- α 基因转录活性升高有关^[13], 因此-308A等位基因常被选为肝硬化易感基因的遗传标记.

本试验没有发现TGF- β 1-509位点基因型与乙型肝炎后肝硬化的发生有关, 这与杨再兴 *et al*^[3-4]和Kim *et al*^[14]所报道的结果一致, 但是我们发现T等位基因在乙型肝炎后肝硬化患者中出现的频率明显高于健康对照组, 同时 $OR>1$ 说明T等位基因的危险性高, 推测T等位基因可能是乙型肝炎后肝硬化的易感标记. 另外杨再兴 *et al*^[4]还发现TGF的-509位点和codon10位点等位基因存在连锁不平衡, 其单倍型形式主要是C-T和T-C, 其中单倍型C-T影响TGF- β 1的血浆浓度, 并且与肝硬化的发生有关. 对TNF- α -308位点的研究报道不一, 程元桥 *et al*^[15]和林菊生 *et al*^[16]研究表明肝硬化患者TNF- α -308GA基因型频率明显高于对照组, 并且携带TNF- α -308A等位基因的危险性也高于对照组; Miyazoe *et al*^[2]研究了TNF- α -308位点在日本人群中的多态性, 对213例HBV携带者和52例健康对照者进行检测, 结果表明肝硬化患者(包括乙型肝炎)与HBV无症状携带者之间没有差异; 本试验与以上学者的研究结果均不同, 我们发现GG基因型和G等位基因在乙型肝炎后肝硬化患者中出现的频率明显高于健康对照组, 并且 $OR>3$ 表明GG基因型和G等位基因的危险性比较高, 推测GG基因型和G等位基因可能与乙型肝炎后肝硬化的易感性有关. 程元桥 *et al*^[15]和林菊生 *et al*^[16]的报道中没有发现-308AA基因型, 可能是由于所选样本的偏倚引起, 而本试验中AA基因型在乙型肝炎后肝硬化患者和健康对照者中出现的频率分别是3%和8%, 这可能是导致试验结果差异的主要原因. Miyazoe *et al*^[2]的报道是针对日本人群, 而本试验是针对上海人群的, 种族差异也可能是引起

结果不同的原因.

总之, 我们针对上海人群, 研究了TNF- α -308G/A、TGF- β 1-509T/C和IL-10-592A/C这3个位点多态性与肝硬化的关系, 发现TNF- α GG基因型和G等位基因以及TGF- β 1-509T等位基因在乙型肝炎后肝硬化患者中出现的频率明显高于健康对照者, 推测TNF- α GG基因型和G等位基因以及TGF- β 1-509T等位基因可能是乙型肝炎后肝硬化的易感标志. 试验结果与已报道的有所异同, 这可能是由于所选的样本例数以及地域和种族的不同所引起的. 乙型肝炎后肝硬化与SNPs的相关性及其发病机制仍需进一步研究.

4 参考文献

- 1 王吉耀, 廖二元, 胡品津. 内科学. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 496
- 2 Miyazoe S, Hamasaki K, Nakata K, Kajiya Y, Kitajima K, Nakao K, Daikoku M, Yatsuhashi H, Koga M, Yano M, Eguchi K. Influence of interleukin-10 gene promoter polymorphisms on disease progression in patients chronically infected with hepatitis B virus. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 2086-2092
- 3 杨再兴, 王皓, 万漠彬, 王晓今, 高春芳. 转化生长因子- β 1基因多态性与乙型肝炎后肝硬化的关系研究. *临床检验杂志* 2005; 23: 168-171
- 4 杨再兴, 王皓, 高春芳, 徐玲玲, 赵文静. 转化生长因子 β 1基因多态性对乙型肝炎肝硬化的影响. *中华医学杂志* 2005; 85: 1021-1026
- 5 病毒性肝炎防治方案. *中华传染病杂志* 2001; 19: 56-62
- 6 Helminen M, Lahdenpohja N, Hurme M. Polymorphism of the interleukin-10 gene is associated with susceptibility to Epstein-Barr virus infection. *J Infect Dis* 1999; 180: 496-499
- 7 Mozzato-Chamay N, Mahdi OS, Jallow O, Mabey DC, Bailey RL, Conway DJ. Polymorphisms in candidate genes and risk of scarring trachoma in a Chlamydia trachomatis--endemic population. *J Infect Dis* 2000; 182: 1545-1548
- 8 王义国, 李雷, 陈自平. 慢性乙型肝炎病变活动与血清HBV-DNA含量的关系. *中国现代医学杂志* 2001; 11: 102-104
- 9 Redpath S, Ghazal P, Gascoigne NR. Hijacking and exploitation of IL-10 by intracellular pathogens. *Trends Microbiol* 2001; 9: 86-92
- 10 Edwards-Smith CJ, Jonsson JR, Purdie DM, Bansal A, Shorthouse C, Powell EE. Interleukin-10 promoter polymorphism predicts initial response of chronic hepatitis C to interferon alfa. *Hepatology* 1999; 30: 526-530
- 11 Gewaltig J, Mangasser-Stephan K, Gartung C, Biesterfeld S, Gressner AM. Association of polymorphisms of the transforming growth factor-beta1 gene with the rate of progression of HCV-induced liver fibrosis. *Clin Chim Acta* 2002; 316: 83-94
- 12 Warzocha K, Ribeiro P, Bienvenu J, Roy P, Charlot C, Rigal D, Coiffier B, Salles G. Genetic polymorphisms in the tumor necrosis factor locus

- influence non-Hodgkin's lymphoma outcome. *Blood* 1998; 91: 3574-3581
- 13 Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HO, Duff GW. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 3195-3199
- 14 Kim YJ, Lee HS, Im JP, Min BH, Kim HD, Jeong JB, Yoon JH, Kim CY, Kim MS, Kim JY, Jung JH, Kim LH, Park BL, Shin HD. Association of transforming growth factor-beta1 gene polymorphisms with a hepatocellular carcinoma risk in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Exp Mol Med* 2003; 35: 196-202
- 15 程元桥, 林菊生, 田德英, 梁扩寰, 熊平. 肿瘤坏死因子 α 基因启动子多态性与肝硬化相关性的研究. *世界感染杂志* 2003; 3: 186-190
- 16 林菊生, 程元桥, 田德英, 廖家志, 刘南植, 熊平, 梁扩寰. HLA-DRB1和肿瘤坏死因子 α 基因多态性与肝硬化的遗传易感性. *中华内科杂志* 2002; 41: 818-821

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009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, 修改并最终审核核稿; (5)列出作者贡献分布; (6)来稿应附有作者工作单位的推荐信, 保证无泄密, 如果是几个单位合作的论文, 则需要提供所有参与单位的推荐信; (7)愿将印刷版和电子版版权转让给本刊编辑部.

2 稿件修改

来稿经同行专家审查后, 认为内容需要修改、补充或删节时, 本刊编辑部将把原稿连同审稿意见、编辑意见寄回给作者修改, 而作者必须于15 d内将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, 须经得《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. (科学编辑: 李军亮 2009-11-08)

乙型肝炎患者并发慢加急性肝衰竭诱因及转归分析289例

赵振刚, 韩涛, 高英堂, 高艳颖, 张晔, 吴珍萍

赵振刚, 天津医科大学三中心临床学院 天津市 300170
韩涛, 高英堂, 高艳颖, 张晔, 吴珍萍, 天津市第三中心医院
天津市人工细胞重点实验室 天津市 300170
国家重点基础研究发展规划基金资助项目(973计划), No. 2007CB512801
科技部科技重大专项基金资助项目, No. 2008ZX10002-005
天津市科委重点攻关专项基金资助项目, No. 05YFSZSF02500
天津市科委应用基础研究计划面上基金资助项目, No. 06YFJMJ13100
作者贡献分布: 赵振刚与韩涛对此文所作贡献均等; 此课题的设计与写作由赵振刚与韩涛完成; 数据采集由赵振刚、高艳颖及高英堂完成; 研究过程由赵振刚、张晔及吴珍萍完成; 数据分析由赵振刚、韩涛及高英堂完成。
通讯作者: 韩涛, 教授, 主任医师, 300170, 天津市河东区津塘路83号, 天津市第三中心医院, 天津市人工细胞重点实验室。
hantaomd@126.com
电话: 022-84112298 传真: 022-24382234
收稿日期: 2009-08-31 修回日期: 2009-10-27
接受日期: 2009-11-02 在线出版日期: 2009-11-08

Causes and clinical outcomes of acute-on-chronic liver failure in patients with hepatitis B virus infection: an analysis of 289 cases

Zhen-Gang Zhao, Tao Han, Ying-Tang Gao,
Yan-Ying Gao, Ye Zhang, Zhen-Ping Wu

Zhen-Gang Zhao, the Third Central Clinical College of
Tianjin Medical University, Tianjin 300170, China
Tao Han, Ying-Tang Gao, Yan-Ying Gao, Ye Zhang,
Zhen-Ping Wu, Tianjin Key Laboratory of Artificial Cells,
Tianjin Third Central Hospital, Tianjin 300170, China
Supported by: the Major State Basic Research Development
Program of China (973 program), No. 2007CB512801;
the Major Research Project of the Ministry of Science and
Technology of China, No. 2008ZX10002-005; the Key Science
and Technology Project of Tianjin Municipal Science
and Technology Committee, No. 05YFSZSF02500; and the
General Program of Applied Basic Research Foundation of
Tianjin Municipal Science and Technology Committee, No.
06YFJMJ13100
Correspondence to: Professor Tao Han, Tianjin Key Laboratory of Artificial Cells, Tianjin Third Central Hospital,
83 Jintang Road, Hedong District, Tianjin 300170,
China. hantaomd@126.com
Received: 2009-08-31 Revised: 2009-10-27
Accepted: 2009-11-02 Published online: 2009-11-08

Abstract

AIM: To investigate the causes and clinical outcomes of acute-on-chronic liver failure (ACLF) in patients with hepatitis B virus (HBV) infection.

METHODS: The clinical data of 289 HBV infection patients with ACLF were retrospectively analyzed.

RESULTS: The most common cause of ACLF in HBV infection patients was HBV infection and mutation (50.52%). The other six predominant causes of ACLF included nonviral infections (24.57%), bleeding (4.50%), drug use (4.15%), diarrhea (3.46%), alcohol use (2.42%), and hepatitis E virus (HEV) infection (2.42%), respectively. Of 289 patients, 80.28% ranged in age from 40 to 70 years old. After treatment, the improvement rate was 45.33%, and the mortality rate was 44.98%.

CONCLUSION: HBV infection and mutation are the most common cause of ACLF in patients with HBV infection. The improvement rates achieved in patients with ACLF induced by HBV, HEV and autoimmune hepatitis (AIH) are higher than that in patients with liver carcinoma-induced ACLF.

Key Words: Acute-on-chronic liver failure; Hepatitis B; Cause

Zhao ZG, Han T, Gao YT, Gao YY, Zhang Y, Wu ZP. Causes and clinical outcomes of acute-on-chronic liver failure in patients with hepatitis B virus infection: an analysis of 289 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(31): 3269-3272

摘要

目的: 探讨乙型肝炎并发慢加急性肝衰竭的诱因及其转归。

方法: 回顾289例乙型肝炎并发慢加急性肝衰竭患者临床资料, 对其病因、转归等进行分析。

结果: HBV活动及变异为乙型肝炎并发慢加急性肝衰竭最主要诱因(占50.52%), 感染(非病毒性)、消化道出血、药物、腹泻、酒精、HEV分别占: 24.57%、4.50%、4.15%、3.46%、2.42%、2.42%。289例患者中(年龄40-70岁之间的达80.28%)226例接受了人工肝治疗, 总好转率为45.33%, 死亡率为44.98%。

结论: HBV活动及变异居乙型肝炎并发慢加急性肝衰竭所有诱因之首。乙型肝炎基础上的HEV、HBV活动及变异、自身疫性肝病诱

背景资料
肝功能衰竭是临床常见的严重肝病症候群, 死亡率极高。慢加急性肝衰竭是我国肝衰竭中最常见类型, 随着临床研究的深入, 积极了解其病因学特点有助于提高诊疗水平。

同行评议者
孙殿兴, 主任医师, 白求恩国际和平医院肝病科; 王炳元, 教授, 中国医科大学附属第一医院消化内科

相关报道
刘晓燕 *et al* 对1977例肝衰竭患者的病因与转归分析表明, HBV感染居肝衰竭病因之首, HEV感染性肝衰竭治愈、好转率相对较高。

发的慢加急性肝衰竭好转率高于肝癌诱发慢加急性肝衰竭好转率。

关键词: 慢加急性肝衰竭; 乙型肝炎; 诱因

赵振刚, 韩涛, 高英堂, 高艳颖, 张晔, 吴珍萍. 乙型肝炎患者并发慢加急性肝衰竭诱因及转归分析289例. 世界华人消化杂志 2009; 17(31): 3269-3272

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3269.asp>

0 引言

肝功能衰竭(liver failure)是临床常见的严重肝病症候群, 死亡率极高. 肝功能衰竭是多种因素引起的严重肝脏损害, 导致其合成、解毒、排泄及生物转化等功能发生严重障碍或失代偿, 出现以凝血功能障碍和黄疸、肝性脑病、腹水等为主要表现的一组临床症候群. 在我国引起肝功能衰竭的主要病因是肝炎病毒(主要是HBV), 其次是药物及肝毒性物质(如乙醇、化学制剂等)^[1]. 慢加急性肝衰竭(acute-on-chronic liver failure, ACLF)定义是慢性肝病(先前诊断或未诊断)基础上, 因急性诱因作用, 临床表现为黄疸和凝血障碍, 4 wk内并发腹水和/或肝性脑病^[2]. ACLF仍是我国肝衰竭中最常见类型, 其中仅单一HBV感染性ACLF肝衰竭总数的82.80%^[3]. 本文收集近年我科收治住院乙型肝炎并发ACLF患者临床资料, 对其诱因及转归进行分析.

1 材料和方法

1.1 材料 调查2002-02/2009-06我院收治ACLF住院病例, 入选289例, 其中男214例, 女75例, 年龄17-79(平均51.05±10.97)岁.

1.2 方法

1.2.1 诊断方法: (1)ACLF的诊断参照2006年中华医学会感染病学分会肝功能衰竭与人工肝学组、中华医学会肝病学会重型肝病与人工肝学组联合制定的《肝功能衰竭诊疗指南》, ACLF在慢性肝病基础上, 短期内发生肝功能失代偿的临床表现(血清胆红素≥171.1 μmol/L及PTA≤40%)^[4]; (2)入选条件: 符合上述ACLF诊断且合并乙型肝炎的患者; (3)转归判定标准: 症状体征有好转, 肝功能明显好转(ALT及血清总胆红素较原水平下降50%以上), 且无明显波动者为临床好转; 而经治疗患者症状体征改善不明显(ALT及血清总胆红素较原水平下降不足50%或较前加重), 随访1 mo未死亡为未愈; 住院期间或出院1 mo内死亡者为死亡.

1.2.2 调查方法: 复习住院的乙型肝炎合并ACLF

病历并对其合并HAV、HBV、HCV、HDV、HEV、非病毒性感染(呼吸道、消化道、泌尿道、胆道、胸膜腔及腹膜腔等感染)、消化道出血、药物(包括肝毒性药物及中成药)、腹泻、酒精、肝癌(包括肝癌破裂、肝癌压迫胆道及肝癌进展)、劳累、妊娠、自身免疫性肝病(包括自身免疫性肝炎、肝硬化及原发性胆汁性肝硬化)、胆管结石以及乙型肝炎病毒活动及YMDD变异、停用核苷类似物等诱因及相关转归临床资料进行登记(55例合并肝癌中有49例肝衰竭为非肿瘤性诱因, 分别计入其各自诱因组; 3例合并丙型肝炎感染, HCV定量均阴性, 其肝衰竭诱因分别为消化道出血、腹泻及HBV活动, 计入各自诱因组; 2例患者分别同时有消化道出血及腹膜炎, 计入消化道出血组; 此外HAV、HDV各1例、妊娠、胆管结石致胆道梗阻各2例, 其病死率及好转率的比较无意义).

统计学处理 用SPSS17.0软件进行 t 检验与Fisher确切概率法统计学分析, $P<0.05$ 表示具有统计学意义.

2 结果

2.1 诊断结果 共收集病例289例, 其中合并肝癌55例, 合并戊型肝炎7例, 丙型肝炎3例, 甲型肝炎、丁型肝炎各1例, 酒精性肝病8例, 男女比为2.85:1, 其中好转131例, 死亡130例, 未愈28例, 总好转率45.33%, 总死亡率44.98%, 未愈9.69%; 年龄分布: 80.28%患者分布于40-70年龄组, 该年龄组患者男女比2.57:1, 其中好转99例, 死亡110例, 未愈23例, 该年龄组好转率42.67%.

2.2 诱因及转归 HBV活动及变异为乙型肝炎合并ACLF主要的诱发因素, 占有诱因的50.52%(其中YMDD变异26例, 停用核苷类似物3例), 此外乙型肝炎并发非病毒性感染、消化道出血、药物、腹泻、酒精、HEV、肝癌、劳累、自身免疫性肝病、妊娠、胆管结石、甲型肝炎、丁型肝炎分别占: 24.57%、4.50%、4.15%、3.46%、2.42%、2.42%、2.08%、2.08%、1.73%、0.69%、0.69%、0.35%以及0.35%, 所有诱因中, 乙型肝炎并发肝癌所致ACLF死亡率最高(83.33%), 而合并自身免疫性肝病和HEV好转率最高, 分别为: 80.00%与71.43%(表1).

所有病例中, 226例接受了血浆置换、血液灌流、血液透析及血液滤过等人工肝治疗. 各诱因好转率分别为: 自身免疫性肝病80.00%、HEV 71.43%、劳累66.66%, 酒精57.14%、腹泻

表 1 2002-2009年我院乙型肝炎合并ACLF病例诱发因素及转归

诱发因素	n	构成比(%)	病死率(%)	好转率(%)
HBV活动或变异	146	50.52	44.52	46.58 ^a
YMDD变异	26	9.00	57.69	34.62
停用核苷类似物	3	1.04	33.33	33.33
HEV	7	2.42	28.57	71.43 ^a
HAV	1	0.35	0.00	100.00
HDV	1	0.35	100.00	0.00
非病毒性感染	71	24.57	59.15	39.44
消化道出血	13	4.50	53.85	46.15
药物	12	4.15	33.33	41.66
腹泻	19	3.46	10.00	50.00
酒精	7	2.42	14.29	57.14
肝癌	6	2.08	83.33	00.00
劳累	6	2.08	0.00	66.66
自身免疫性肝病	5	1.73	20.00	80.00 ^a
妊娠	2	0.69	50.00	50.00
胆管结石	2	0.69	50.00	50.00
合计	289	100.00	44.98	45.33

^a $P<0.05$ vs 肝癌组。

50.00%、HBV活动及变异46.58%、消化道出血46.15%、药物41.66%、非病毒性感染39.44%、肝癌0.00%，所有诱因中不同诱因转归间进行两两比较，HEV、HBV活动及变异、自身免疫性肝病致ACLF好转率高于肝癌所致ACLF好转率($P=0.016, 0.027, 0.015, P<0.05$, 表1); 总样本中HBeAg(+)患者104例，HBeAg(-)患者185例，两者之间HBV DNA水平之间比较差异有统计学意义($t=4.02, P<0.001$)，可以认为乙型肝炎并发ACLF患者中HBeAg(+)者较HBeAg(-)者HBV DNA水平高；但是2组死亡之间比较差异无统计学意义($t=1.048$, 表2)。

2.3 YMDD变异 总变异例数26例，其中YIDD 14例，YVDD 8例，YIDD+YVDD 4例，其死亡率57.69%，非YMDD变异组HBV DNA(4.70 ± 1.68 copies/mL, log10)，YMDD变异组HBV DNA(5.88 ± 1.70 copies/mL, log10)，变异组与非变异组HBV DNA水平比较，差异有统计学意义($t=3.43, P<0.001$)，YMDD变异后HBV DNA水平增高(表3)。

3 讨论

回顾所收集乙型肝炎并发ACLF病例，根据2008-03亚太肝病学会(APASL)《慢加急性肝衰竭共识讨论草案》^[2]，其常见的诱因有：其一为感染因素：(1)HBV活动或变异(142例占50.52%)：HBV

表 2 2002-2009年我院乙型肝炎并发ACLF病例HBeAg分布、HBV DNA水平 (copies/mL, log10)

诱发因素	n	HBV DNA(mean \pm SD)	病死(n)
HBeAg(-)组	185	4.51 ± 1.69^b	79
HBeAg(+)组	104	5.33 ± 1.63	51
合计	289	4.81 ± 1.71	130

^b $P<0.001$ vs HBeAg(+)组。

表 3 2002-2009年我院乙型肝炎合并ACLF病例HBV DNA水平 (copies/mL, log10)

诱发因素	n	HBV DNA
非YMDD变异组	263	4.70 ± 1.68^b
YMDD变异组	26	5.88 ± 1.70
合计	289	4.81 ± 1.71

^b $P<0.001$ vs YMDD变异组。

感染可导致慢性肝炎、肝硬化及细胞癌^[4]，慢性肝病的基础上HBV活动或变异可导致肝功能受损乃至衰竭，一般认为HBV基因突变导致病毒生物学特性改变是影响HBV感染转归的重要因素之一^[5]。本样本289例患者中发生YMDD变异26例，占9.00%，15例病毒变异患者死亡，YMDD变异患者死亡率达57.69%高于本样本总死亡率，提示YMDD变异后，病毒较之前更不易控制。本样本HBeAg(+)者较HBeAg(-)者HBV DNA水平高，但2组之间死亡率无差异，其可能原因如下：HBV发生前C区变异，作为血清免疫清除的重要决定簇，HBeAg在前C区变异后就无法产生，失去这一靶位，变异病毒得以逃避免疫清除而使感染持续^[6]，前C区终止密码变异的乙型肝炎患者血清中HBeAg含量下降明显并伴有向抗HBeAg转换，从而使免疫耐受被打破，诱发病情加重，重型乙型肝炎发生率显著升高^[7]；此外，除HBV因素外，其他诱因以及患者性别、年龄、治疗依从性等对于肝衰竭发生的促进作用不容忽视，应综合考虑；(2)其他嗜肝病毒：HAV、HCV、HDV及HEV感染，重叠嗜肝病毒感染是发生致死性肝衰竭的重要原因，有报道HAV、HCV、HDV及HEV可分别占慢性乙型肝炎并发肝衰竭的1.40%、9.60%、1.80%及30.10%^[8]，本样本HEV好转率71.43%高于总样本好转率，考虑与其本身生物学特性有关；(3)其他感染因素(非病毒性)：占乙型肝炎合并ACLF诱因24.57%，感染与肝衰竭发生互为因果，相互作用，感染易引起脓毒血症(Sepsis)，他是引起ACLF

应用要点

本研究提示，在临床工作中应合理应用抗HBV药物以控制HBV活动及其变异，尽量避免各种诱发因素的出现，从而减少乙型肝炎并ACLF的发生，降低乙型肝炎患者肝衰竭发病率及病死率。

同行评价
本研究病例丰富,方法先进,为该领域的研究提供大量有意义的信息,具有较好的参考价值。

的常见原因^[9],包括:呼吸道、消化道、泌尿道、胆道、胸腔、腹腔等,本样本中腹腔感染为所有感染之首,占75.34%,临床中对于腹腔感染应高度警惕,及时处理,避免诱发肝衰竭。其二为非感染因素:(1)消化道出血:消化道出血可导致肝脏缺血缺氧,肝细胞代谢障碍、肝功能严重受损从而引起、加重肝衰竭,本样本该诱因患者病死率53.85%,高于总样本病死率,究其原因可能与急性失血并发多脏器功能不全及存在人工肝及肝移植治疗相对禁忌、消化道出血后禁食水口服抗病毒药物不能持续应用等因素有关;(2)药物因素:在已上市应用的化学性或生物性药物中,有1100种以上具有潜在的肝毒性,很多药物的赋形剂、中草药以及保健药亦有导致肝损伤的可能。其中,急性肝损伤是药物性肝病最常见的发病形式,占报道病例数的90%以上,少数患者可发生威胁生命肝功能衰竭^[10];本样本中中药诱因3例,西药诱因9例,中药多见于皮肤病、骨科等用药,西药则以抗结核药、抗抑郁药、抗凝药、降脂药、抗甲状腺药、抗生素及恶性肿瘤化疗药物等引起肝衰竭多见,随人们保健意识增强、不规范用药物的增多,药物所致ACLF有可能进一步呈上升趋势;(3)酒精因素:大量一次性过量饮酒,可直接导致急性酒精中毒并严重损害肝脏,在长期过量饮酒的人群中,有90%-100%的机率患有酒精性脂肪肝,10%-35%患有酒精性肝炎,8%-20%患有酒精性肝硬化^[11],在原有乙型肝炎基础上,酒精对于肝脏的协同损害可致ACLF发生几率增加,随人们生活水平的提高,酒精所致肝衰竭比例在逐年增加^[3];(4)腹泻、劳累:患者个人的生活方式、精神状态等宿主因素不容忽视,患者抵抗力下降,免疫功能失调可使原有呈免疫耐受状态的HBV活跃,进而可造成严重肝功损伤;(5)肝癌:本样本病死率高达83.33%,并且所有诱因中好转率最低,考虑与肝癌本身高度为恶性疾患、且晚期肿瘤目前尚无特效治疗手段有关;(6)自身免疫病:主要为自身免疫性肝炎、肝硬化及原发性胆汁性肝硬化,本诱因组患者经过血浆置换等人工肝治疗后好转率高达80.00%,可能与该治疗同时可清除免疫机制中相关的抗原、抗体、免疫复合物及炎症因子等物质从而中断肝衰竭发生机制有关;(7)妊娠:妊娠期肝脏负担加重,肝脏与妊娠相互影响,妊娠合并病毒性肝炎更易发展成肝衰竭,易合并出血、感染及多脏器功能衰竭等严重并发症,目前,HBV感染及高

水平复制仍然是引起妊娠期间肝衰竭的重要原因之一且预后差^[12],因此,如何选择抗病毒药物及何时开始应用也是临床医师面临的研究课题。

总之,病毒因素、感染(非病毒性)、酒精、药物、腹泻及出血为乙型肝炎并发ACLF最主要诱因,其中以HBV活动和变异最为常见。随核苷类似物的广泛应用,乙型肝炎病毒变异成为病毒生物性改变的一个重要原因,停用核苷类似物后病毒爆发同样可致ACLF,另外在HBV感染基础之上,并发非病毒性感染、消化道出血、药物(肝毒性药物及中成药)、腹泻、酒精、HEV、劳累、自身免疫性肝病、妊娠、胆管结石、HAV、HDV等致病因素的作用,亦可诱发ACLF,故在临床工作中,除合理应用抗HBV药物以控制HBV病毒活动及其变异外,尽量避免上述诱发因素的出现亦非常重要,从而减少乙型肝炎并ACLF的发生。

4 参考文献

- 1 中华医学会感染病学分会肝衰竭与人工肝学组、中华医学会肝病学会重型肝病与人工肝学组. 肝衰竭诊疗指南. 中华肝脏病杂志 2006; 14: 463-466
- 2 Liaw YF, Leung N, Kao JH, Piratvisuth T, Gane E, Han KH, Guan R, Lau GK, Locarnini S. Asian-Pacific consensus statement on the management of chronic hepatitis B: a 2008 update. *Hepatology* 2008; 2: 263-283
- 3 刘燕华, 胡锦华, 王慧芬, 陈菊梅. 1977例急性、亚急性、慢加急性肝衰竭患者的病因与转归分析. 中华肝脏病杂志 2008; 10: 772-775
- 4 Liang TJ. Hepatitis B: the virus and disease. *Hepatology* 2009; 49: S13-S21
- 5 李梵, 王慧芬, 徐东平. 乙型肝炎病毒基因突变与重型肝炎/肝衰竭发生的关系. 实用肝脏病杂志 2008; 11: 203-205
- 6 Kobayashi M, Arase Y, Ikeda K, Tsubota A, Suzuki Y, Saitoh S, Kobayashi M, Suzuki F, Akuta N, Hosaka T, Someya T, Matsuda M, Sato J, Takagi K, Miyakawa Y, Kumada H. Precore wild-type hepatitis B virus with G1896 in the resolution of persistent hepatitis B virus infection. *Intervirology* 2003; 46: 157-63
- 7 赵巍, 张汉荣, 刘新钰, 孙梅, 钟备. 乙型肝炎病毒C基因启动子和前C基因变异对HBeAg表达及病情的影响. 中国生化药物杂志 2004; 5: 165-166
- 8 柯伟民, 林国莉, 叶一龙, 赖簪, 李建国. 慢性乙肝发生致死性重型肝炎与重叠嗜肝病毒感染及HBeAg系统状态关系的研究. 中华实验和临床病毒学杂志 2005; 19: 52-54
- 9 Jalan R, Williams R. Acute-on-chronic liver failure: pathophysiological basis of therapeutic options. *Blood Purif* 2002; 20: 252-261
- 10 中华医学会消化病学分会肝胆疾病协作组. 急性药物性肝损伤诊治建议. 中华消化杂志 2007; 27: 765-767
- 11 韩婷, 井源, 吴静, 董视虎. 酒精性脂肪肝研究现状与进展. 胃肠病学和肝病杂志 2008; 17: 862-866
- 12 戴炜, 禹弘, 王东, 邹明, 岳建荣, 胡敏东, 李炜, 张振宇. 妊娠肝衰竭临床特征及影响预后的相关因素分析. 中国血液净化 2006; 5: 842-844

红霉素在急性上消化道出血紧急内镜检查中应用的系统评价

周隼, 何继东, 欧阳晓波, 王一平

周隼, 何继东, 欧阳晓波, 雅安市第二人民医院消化内科 四川省雅安市 625000
王一平, 四川大学华西医院消化内科 四川省成都市 610041
作者贡献分布: 周隼、何继东及欧阳晓波负责文献检索、文献质量评价、提取资料及论文撰写; 王一平负责论文审阅及修改。
通讯作者: 何继东, 主治医师, 625000, 四川省雅安市, 雅安市第二人民医院消化内科. hjdshare@sina.com
电话: 0835-2622511
收稿日期: 2009-06-12 修回日期: 2009-08-18
接受日期: 2009-09-07 在线出版日期: 2009-11-08

Erythromycin infusion prior to emergency endoscopy for acute upper gastrointestinal bleeding: a systematic review

Jun Zhou, Ji-Dong He, Xiao-Bo Ouyang, Yi-Ping Wang

Jun Zhou, Ji-Dong He, Xiao-Bo Ouyang, Department of Gastroenterology, the Second People's Hospital of Yaan, Yaan 625000, Sichuan Province, China
Yi-Ping Wang, Department of Gastroenterology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China
Correspondence to: Ji-Dong He, Department of Gastroenterology, the Second People's Hospital of Yaan, Yaan 625000, Sichuan Province, China. hjdshare@sina.com
Received: 2009-06-12 Revised: 2009-08-18
Accepted: 2009-09-07 Published online: 2009-11-08

Abstract

AIM: To determine the efficacy and safety of erythromycin infusion prior to emergency endoscopy for acute upper gastrointestinal bleeding.

METHODS: A computer-based search of the Cochrane library, Medline, PubMed and China Journal Full-text database and a manual search of Gastroenterology Week and the American Gastroenterological Association Conference Proceedings to identify relevant controlled trials, regardless of language. The references were manually retrieved according to reference index. The randomized controlled trials that evaluated the use of erythromycin in endoscopy for acute upper gastrointestinal bleeding were included in our study. A meta-analysis was conducted using the method for Cochrane systematic review.

RESULTS: Three trials involving 245 patients were included in the systematic review. The meta-analysis showed that erythromycin was superior to placebo in gastric emptying and second-look endoscopy ($OR = 5.10$ and 0.48 ; $95\%CI$: $1.96-13.27$ and $0.27-0.88$; $P = 0.0008$ and 0.02 , respectively), but no more effective than placebo in mean duration of endoscopy, mean blood transfusion volume and mean hospital stay ($P = 0.84$, 0.07 and 0.36 , respectively). No complications were observed in all patients.

CONCLUSION: Erythromycin infusion is effective and safe in improving endoscopic view in patients with acute upper gastrointestinal bleeding.

Key Words: Erythromycin; Acute upper gastrointestinal bleeding; Emergency endoscopy; Systematic review; Meta-analysis

Zhou J, He JD, Ouyang XB, Wang YP. Erythromycin infusion prior to emergency endoscopy for acute upper gastrointestinal bleeding: a systematic review. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(31): 3273-3277

摘要

目的: 系统评价红霉素在急性上消化道出血紧急内镜检查中应用的有效性和安全性。

方法: 计算机检索Cochrane图书馆临床对照试验, Medline、PubMed及中国期刊全文数据库等中外文数据库。手工检索消化病学周会和美国胃肠病学学会会议论文集; 查阅检索到所有文献的参考文献索引, 手工检索文献。凡评价急性上消化道出血紧急内镜检查中红霉素应用的随机对照试验, 无论语种、是否采用盲法均纳入, 应用国际Cochrane协作网系统评价方法对其进行Meta分析。

结果: 共纳入3个试验包括245例患者。红霉素组与安慰剂组比较, 2组在胃排空和需要二次内镜检查方面的差异有统计学意义($OR = 5.10$, $95\%CI$: $1.96-13.27$, $P = 0.0008$; $OR = 0.48$, $95\%CI$: $0.27-0.88$, $P = 0.02$); 内镜检查时间、输血量及住院时间的平均值差异无统计

背景资料
急性上消化道出血是最常见的危及生命的内科急症。随着消化内镜技术的发展, 紧急内镜检查在急性上消化道出血的诊断和治疗中起着关键的作用。然而由于急性出血时内镜视野欠清晰, 影响诊断和治疗。红霉素是一种大环内酯类抗生素, 可潜在的应用于内镜检查前视野的清除, 因此, 紧急内镜检查前应用红霉素可能提高内镜检查质量。

同行评议者
杨建民, 教授, 浙江省人民医院消化内科

创新盘点
本研究在全世界范围内收集3个急性上消化道出血紧急内镜检查中红霉素应用的随机对照试验,并进行系统评价,为红霉素在急性上消化道出血紧急内镜检查的应用提供了依据。

学意义($P = 0.84$ 、 0.07 及 0.36); 3篇试验均无不良反应的报道。

结论: 急性上消化道出血紧急内镜检查中应用红霉素,在改善内镜视野上是安全有效的

关键词: 红霉素; 急性上消化道出血; 紧急内镜检查; 系统评价; Meta分析

周隽, 何继东, 欧阳晓波, 王一平. 红霉素在急性上消化道出血紧急内镜检查中应用的系统评价. 世界华人消化杂志 2009; 17(31): 3273-3277
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3273.asp>

0 引言

急性上消化道出血是临床实践中最常见威胁生命的,需要紧急处理的内科急症. 流行病学研究显示年发病率为50/10万-150/10万,且发病率随年龄增长而增加,病死率为6%-10%^[1-4]. 国外的成本分析显示每年为急性上消化道出血患者进行诊治的费用为750万美元^[5],为卫生医疗事业造成极大的经济负担,因此,急性上消化道出血已经成为现代社会医疗卫生的一个具有挑战性的主要问题. 近年来,急性上消化道出血的临床研究有了长足的发展,特别是内镜技术的普及和各种内镜下治疗方法的广泛开展,使紧急内镜成为诊治显性急性上消化道出血的首选方法. 但由于急性出血时,插入内镜往往胃内有较多的血液或血凝块,视野欠清晰,降低了病变的检出率. 红霉素是一种大环内酯类抗生素,可以与胃动素结合而发挥促胃动力作用,临床研究显示可诱导胃排空,可潜在的应用于内镜检查前视野的清除^[6]. 因此,紧急内镜检查前应用红霉素可能提高内镜检查质量. 国外几个随机对照试验显示结果有效且无不良反应发生^[7-9],但这些研究的质量有待系统的评价. 本研究旨在应用Cochrane协作网的方法系统评价急性上消化道出血紧急内镜检查中红霉素应用的有效性和安全性,为临床实践提供循证医学的最佳证据。

1 材料和方法

1.1 材料 计算机检索Cochrane图书馆临床对照试验(2009年第1期)、Medline或PubMed数据库(1978-2009年)、Embase光盘数据库(1978-2009年)、OVID数据库(1978-2009年)、中国生物医学文献数据库(CBM Disc)(1978-2009年)、维普中文数据库(1989-2009年)、万方学位论文数据库(1978-2009年)、中国期刊全文数据库(1979-2009

年). 手工检索消化病学周会和美国胃肠病学学会会议论文集; 查阅检索到所有文献的参考文献索引,手工检索相关文献。

1.2 方法 凡评价急性上消化道出血紧急内镜检查中红霉素应用的随机对照试验,无论语种及是否采用盲法均纳入. 由2位研究者独立进行文献质量评价并按设计好的表格提取资料,如遇分歧,通过讨论或根据第3位研究人员的意见解决. 纳入研究的方法学质量评价采用Cochrane协作网推荐的方法进行,文献质量评价包括以下内容: 随机分配方法; 分配方案的隐藏; 盲法; 是否描述了失访、退出的发生; 是否进行了意向性分析(intention to treat, ITT)^[10].

统计学处理 统计分析使用Cochrane协作网提供的Revman 4.2.8软件. 各临床试验结果的异质性检验采用卡方检验,检验水准取 $\alpha = 0.1$. 若无统计学异质性,Meta分析选择固定效应模型,否则在解释异质性可能的原因后选择随机效应模型或进行定性的系统评价^[10]. 计数资料计算比值比(OR)及其95%CI. 对于计量资料,当各临床试验对同一疗效指标采用相同的测量工具进行测量时,计算加权均数差值(WMD)及其95%CI,否则计算标准化均数差值(SMD)及其95%CI. 各个疗效判定指标的分析均采用ITT分析。

2 结果

2.1 纳入研究的特点及方法学质量 最初检索到相关文章94篇. 阅读题目及摘要后,排除综述类文章及信件,筛选得到治疗性临床试验类文章12篇. 最后纳入3个试验^[7-9]包括245例患者进入本系统评价. 3个试验均为国外研究^[7-9]. 所有试验均有明确的纳入标准和排除标准. 3篇均描述了随机方法,其中2篇采用随机数字表^[7-8],1篇采用计算机随机^[9]. 3篇均对随机方法进行充分的隐藏. 2篇采用了双盲法^[7,9]. 3篇试验均明确指出两组基线情况具有可比性,并有详细的资料. 3篇试验均^[7-9]报道了受试者退出失访的情况,并对具体原因进行了详细的说明,同时对疗效指标采用了ITT分析^[7-9]. 3个试验的特点见附表1。

2.2 Meta分析结果

2.2.1 胃排空: 3篇试验^[7-9]的Meta分析结果显示各试验间有异质性($P = 0.09$),故采用随机效应模型. 红霉素组胃排空有效率为78.15%,安慰剂组为42.85%,2组间差异有统计学意义($OR = 5.10$, 95%CI: 1.96-13.27, $P = 0.0008$)(表2).

2.2.2 需要2次内镜检查: 3篇试验^[7-9]的Meta分析

表 1 纳入随机对照试验的质量评估及研究特点

作者	<i>n</i>	基线情况	随机方法	盲法	分配隐藏	失访	干预措施(<i>n</i>)
Frossard <i>et al</i> ^[7] 2002	105	可比	清楚	双盲	充分	报道清楚	红霉素(51) 安慰剂(54)
Coffin <i>et al</i> ^[8] 2002	41	可比	清楚	不清楚	充分	报道清楚	红霉素(19) 安慰剂(22)
Carbonell <i>et al</i> ^[9] 2006	100	可比	清楚	双盲	充分	报道清楚	红霉素(49) 安慰剂(50)

表 2 胃排空影响的Meta分析

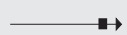
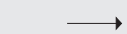


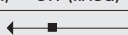



Study or sub-category	Erythromycin (<i>n</i> / <i>N</i>)	Placebo (<i>n</i> / <i>N</i>)	OR (random) 95% CI	权重(Weight)(%)	OR (random) 95% CI
Coffin <i>et al</i> 2002	17/19	12/22		20.77	7.08 [1.31, 38.33]
Frossard <i>et al</i> 2002	42/51	18/54		38.23	9.33 [3.74, 23.32]
Carbonell <i>et al</i> 2006	34/49	24/50		41.00	2.46 [1.08, 5.59]
合计(95%CI)	119	126		100.00	5.10 [1.96, 13.27]
总事件(Total events): 93 (Erythromycin), 54 (Placebo)					
异质性检验(Test for heterogeneity): $\chi^2 = 4.78$, <i>df</i> = 2 (<i>P</i> = 0.09), <i>I</i> ² = 58.1%					
合并效应量的检验(Test for overall effect): <i>Z</i> = 3.34 (<i>P</i> = 0.0008)					
0.1 0.2 0.5 1 2 5 10 Favours Placebo Favours Erythromycin					

表 3 二次内镜检查的Meta分析

Study or sub-category	Erythromycin (<i>n</i> / <i>N</i>)	Placebo (<i>n</i> / <i>N</i>)	OR (fixed) 95% CI	权重(Weight)(%)	OR (fixed) 95% CI
Coffin <i>et al</i> 2002	3/19	10/22		24.90	0.23 [0.05, 1.00]
Frossard <i>et al</i> 2002	6/51	17/54		46.49	0.29 [0.10, 0.81]
Carbonell <i>et al</i> 2006	12/49	12/50		28.62	1.03 [0.41, 2.58]
合计(95%CI)	119	126		100.00	0.48 [0.27, 0.88]
总事件(Total events): 21 (Erythromycin), 39 (Placebo)					
异质性检验(Test for heterogeneity): $\chi^2 = 4.54$, <i>df</i> = 2 (<i>P</i> = 0.10), <i>I</i> ² = 55.9%					
合并效应量的检验(Test for overall effect): <i>Z</i> = 2.36 (<i>P</i> = 0.02)					
0.1 0.2 0.5 1 2 5 10 Favours Erythromycin Favours Placebo					

结果显示各试验间无异质性($P = 0.10$), 故采用固定效应模型。红霉素组需要二次内镜检查的病例占17.65%, 安慰剂组占30.95%, 2组间差异有统计学意义($OR = 0.48$, 95%CI: 0.27-0.88, $P = 0.02$, 表3)。

2.2.3 平均内镜检查时间: 2篇试验^[7,9]的Meta分析结果显示各试验间有异质性($P = 0.03$), 故采用随机效应模型。红霉素组与安慰剂组在平均内镜检查时间上, 2组间差异无统计学意义(WMD = -0.47, 95%CI: (-5.07)-4.13, $P = 0.84$, 表4)。

2.2.4 平均需要输血量: 2篇试验^[7,9]的Meta分析结果显示各试验间无异质性($P = 0.72$), 故采用固定效应模型。红霉素组与安慰剂组在平均需要输血量上, 2组间差异无统计学意义(WMD = -0.46, 95%CI: (-0.97)-0.04, $P = 0.07$, 表5)。

2.2.5 平均住院时间: 3篇试验^[7-9]的Meta分析结果显示各试验间无异质性($P = 0.32$), 故采用固定效应模型。红霉素组与安慰剂组在平均住院时间上, 2组间差异无统计学意义(WMD = -0.86, 95%CI: (-2.71)-0.98, $P = 0.36$, 表6)。

2.2.6 不良反应: 3篇试验^[7-9]均无不良反应的报道。

3 讨论

急性上消化道出血是最常见的危及生命的内科急症, 随着消化内镜技术的发展, 紧急内镜检查在急性上消化道出血的诊断和治疗中起着关键的作用。然而由于急性出血时内镜视野欠清晰, 影响诊断和治疗。因此, 寻找安全有效的方法具有重要临床意义。本研究在全世界范围内收集3个急性上消化道出血紧急内镜检查中红霉素应

应用要点

本研究提示, 今后开展的临床研究应充分考虑到现有研究的局限性, 改进研究的方法学缺陷, 尽量减少偏倚, 必要时结合经济学评价, 为临床应用提供更多的证据。

同行评价

本文采用现代循证医学方法,对本领域符合条件的3篇国外论文进行了分析和评价,可读性强,有一定的临床实用价值。

表 4 平均内镜检查时间的Meta分析

Study or sub-category	<i>n</i>	Erythromycin (mean ± SD)	<i>n</i>	Placebo (mean ± SD)	WMD (random) 95% CI	权重(Weight) (%)	WMD (fixed) 95% CI
Frossard <i>et al</i> 2002	51	18.00 ± 9.00	54	16.00 ± 8.00	■	47.41	2.00 [-1.26, 5.26]
Carbonell <i>et al</i> 2006	49	13.70 ± 4.50	50	16.40 ± 7.80	■	52.59	-2.70 [-5.20, -0.20]
合计(95% CI)	119		104		◆	100.00	-0.47 [-5.07, 4.13]
总事件(Total events): 21 (Erythromycin), 39 (Placebo)							
异质性检验(Test for heterogeneity): $\chi^2 = 5.02$, <i>df</i> = 1 (<i>P</i> = 0.03), <i>I</i> ² = 80.1%							
合并效应量的检验(Test for overall effect): <i>Z</i> = 0.20 (<i>P</i> = 0.84)							
					-10 -5 0 5 10	Favours Erythromycin Favours Placebo	

表 5 平均需要输血量的Meta分析

Study or sub-category	<i>n</i>	Erythromycin (mean ± SD)	<i>n</i>	Placebo (mean ± SD)	WMD (random) 95% CI	权重(Weight) (%)	WMD (fixed) 95% CI
Frossard <i>et al</i> 2002	51	1.90 ± 1.50	54	2.30 ± 1.70	■	68.08	-0.40 [-1.01, 0.21]
Carbonell <i>et al</i> 2006	49	1.34 ± 1.40	50	1.94 ± 2.90	■	31.92	-0.60 [-1.49, 0.29]
合计(95% CI)	119		104		◆	100.00	-0.46 [-0.97, 0.04]
异质性检验(Test for heterogeneity): $\chi^2 = 0.13$, <i>df</i> = 1 (<i>P</i> = 0.72), <i>I</i> ² = 0%							
合并效应量的检验(Test for overall effect): <i>Z</i> = 1.80 (<i>P</i> = 0.07)							
					-10 -5 0 5 10	Favours Erythromycin Favours Placebo	

表 6 平均住院时间的Meta分析

Study or sub-category	<i>n</i>	Erythromycin (mean ± SD)	<i>n</i>	Placebo (mean ± SD)	WMD (random) 95% CI	权重(Weight) (%)	WMD (fixed) 95% CI
Coffin <i>et al</i> 2002	19	6.00 ± 0.00	22	9.00 ± 0.00			Not estimable
Frossard <i>et al</i> 2002	51	10.20 ± 6.40	54	12.20 ± 8.70	■	40.15	-2.00 [-4.91, 0.91]
Carbonell <i>et al</i> 2006	49	7.50 ± 6.00	50	7.60 ± 6.10	■	59.85	-0.10 [-2.48, 2.28]
合计(95% CI)	119		126		◆	100.00	-0.86 [-2.71, 0.98]
异质性检验(Test for heterogeneity): $\chi^2 = 0.98$, <i>df</i> = 1 (<i>P</i> = 0.32), <i>I</i> ² = 0%							
合并效应量的检验(Test for overall effect): <i>Z</i> = 0.92 (<i>P</i> = 0.36)							
					-10 -5 0 5 10	Favours Erythromycin Favours Placebo	

用的随机对照试验,并进行系统评价。红霉素具有胃动素受体激动剂的特性,通过诱导胃窦收缩及消化间期移行性复合运动,促进胃动力^[11-13]。Sears *et al*^[14]的研究显示通过静脉滴注红霉素,促进胃排空,可以达到清除内镜视野的目的。随后的临床试验也显示急性上消化道出血中紧急内镜检查中红霉素的应用具有较好的安全性和有效性。

本系统评价中,纳入3篇试验^[7-9]的Meta分析结果显示,急性上消化道出血的紧急内镜检查中,红霉素组在胃排空有效率及需要二次内镜检

查上优于安慰剂组。3篇试验^[7-9]均描述了随机序列产生的方法,2篇试验^[7,9]报道采用双盲,3篇试验^[7-9]对分配方案进行了充分的隐藏,但由于纳入试验少,且纳入试验样本量小。有待大样本随机对照试验及系统评价的证据。纳入2篇试验^[7,9]的Meta分析结果显示,急性上消化道出血的紧急内镜检查中,红霉素组与安慰剂比较,在平均内镜检查时间及平均需要输血量上无差异。2篇试验^[7,9]均描述了随机序列产生的方法,且采用双盲,并对分配方案进行了充分的隐藏,但由于纳入试验少,且纳入试验样本量小。有待大样本随

机对照试验及系统评价的证据. 纳入3篇试验^[7-9]的Meta分析结果显示, 急性上消化道出血的紧急内镜检查中, 红霉素组在平均住院时间上优于安慰剂组, 但差异无统计学意义. 3篇试验^[7-9]均描述了随机序列产生的方法, 2篇试验^[7,9]报道采用双盲, 3篇试验^[7-9]对分配方案进行了充分的隐藏, 但由于纳入试验少, 且纳入试验样本量小. 有待大样本随机对照试验及系统评价的证据. 3篇试验均未报道不良反应的发生, 提供了安全性的证据.

总之, 从现有的资料和Meta分析结果来看, 急性上消化道出血紧急内镜检查中应用红霉素, 在改善内镜视野上是安全有效的. 但其临床其他收益有限. 且由于纳入研究及样本量小. 结果应谨慎对待. 今后有必要进行高质量、大样本的设计严格的随机对照试验予以证实. 今后开展的临床研究应充分考虑到现有研究的局限性, 改进研究的方法学缺陷, 尽量减少偏倚, 必要时结合经济学评价, 以为临床应用提供更多的证据.

4 参考文献

- 1 Non-variceal upper gastrointestinal haemorrhage: guidelines. *Gut* 2002; 51 Suppl 4: iv1-iv6
- 2 Longstreth GF. Epidemiology of hospitalization for acute upper gastrointestinal hemorrhage: a population-based study. *Am J Gastroenterol* 1995; 90: 206-210
- 3 Rockall TA, Logan RF, Devlin HB, Northfield TC. Incidence of and mortality from acute upper gastrointestinal haemorrhage in the United Kingdom. Steering Committee and members of the National Audit of Acute Upper Gastrointestinal Haemorrhage. *BMJ* 1995; 311: 222-226
- 4 Blatchford O, Davidson LA, Murray WR, Blatchford M, Pell J. Acute upper gastrointestinal haemorrhage in west of Scotland: case ascertainment study. *BMJ* 1997; 315: 510-514
- 5 Jiranek GJ, Kozarek RA, Brandabur JJ. Hospital cost analysis of peptic ulcer hemorrhage. *Gastroenterology* 1995; 110: A20
- 6 Lawrence SP, McNally PR. Intravenous erythromycin to clear the stomach of obstructing clot. *Gastrointest Endosc* 1994; 40: 774-775
- 7 Frossard JL, Spahr L, Queneau PE, Giostra E, Burckhardt B, Ory G, De Saussure P, Armenian B, De Peyer R, Hadengue A. Erythromycin intravenous bolus infusion in acute upper gastrointestinal bleeding: a randomized, controlled, double-blind trial. *Gastroenterology* 2002; 123: 17-23
- 8 Coffin B, Pocard M, Panis Y, Riche F, Laine MJ, Bitoun A, Lemann M, Bouhnik Y, Valleur P. Erythromycin improves the quality of EGD in patients with acute upper GI bleeding: a randomized controlled study. *Gastrointest Endosc* 2002; 56: 174-179
- 9 Carbonell N, Pauwels A, Serfaty L, Boelle PY, Becquemont L, Poupon R. Erythromycin infusion prior to endoscopy for acute upper gastrointestinal bleeding: a randomized, controlled, double-blind trial. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 1211-1215
- 10 Higgins JPT, Green S, editors. Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions 4.2.4 [updated March 2005]. Section 8.7.2. In: The Cochrane Library, Issue 2. Chichester: Wiley, 2005
- 11 Charles L, Segreti J. Choosing the right macrolide antibiotic. *Drugs* 1997; 53: 349-357
- 12 Lin HC, Sanders SL, Gu YG, Doty JE. Erythromycin accelerates solid emptying at the expense of gastric sieving. *Dig Dis Sci* 1994; 39: 124-128
- 13 Weber FH Jr, Richards RD, McCallum RW. Erythromycin: a motilin agonist and gastrointestinal prokinetic agent. *Am J Gastroenterol* 1993; 88: 485-490
- 14 Sears RJ, Duckworth C, Balaban DH, Han KH, Goldin GF, Oelsner DH, Yeaton P. Erythromycin versus gastric lavage for preendoscopic preparation of patients with upper gastrointestinal bleeding. *Gastrointest Endosc* 1996; 43: 358

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》被收录情况

本刊讯 《世界华人消化杂志》被国际权威检索系统美国《化学文摘》(Chemical Abstracts, CA)、荷兰《医学文摘库/医学文摘》(EMBASE/Excerpta Medica, EM)和俄罗斯《文摘杂志》(Abstract Journal, AJ)收录. 国内为中国科技论文统计与分析(科技部遴选为中国科技论文统计源期刊)、《中文核心期刊要目总览》2008年版内科学类的核心期刊、中国学术期刊文摘、中国生物医学文献光盘数据库、中文科技资料目录医药卫生、解放军医学图书馆CMCC系统、中国医学文摘外科学分册(英文版)、中国医学文摘内科学分册(英文版)收录. (科学编辑: 李军亮 2009-11-08)

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!

曹志成 英国生物医学科学研究所院士
香港伊利沙伯医院临床肿瘤科

陈洪 副教授
东南大学附属中大医院消化科

迟宝荣 教授
吉林大学第一医院消化内科

崔云甫 教授
哈尔滨医科大学第二附属医院普外一科

党双锁 教授
西安交通大学第二医院感染科

杜群 副研究员
广州中医药大学脾胃研究所药理室

杜雅菊 主任医师
哈尔滨医科大学附属第二医院消化内科

房静远 教授
上海交通大学医学院附属仁济医院, 上海市消化疾病研究所

冯志杰 主任医师
河北医科大学第二医院消化内科

高润平 教授
吉林大学第一医院肝病科

谷俊朝 主任医师
首都医科大学附属北京友谊医院普外科

黄晓东 副主任医师
武汉市中心医院消化内科

姜春萌 教授
大连医科大学附属第二医院消化科

李定国 教授
上海交通大学医学院附属新华医院消化内科

李国威 教授
西安交通大学医学院第二附属医院普通外科

李勇 副教授
上海中医药大学附属市中医医院消化科

李增山 副教授
中国人民解放军第四军医大学病理教研室

刘海峰 教授
武警总医院消化科

刘绍能 主任医师
中国中医科学院广安门医院消化科

刘占举 教授
同济大学附属第十人民医院胃肠内科

任超世 研究员
中国医学科学院生物医学工程研究所

邵先玉 主任医师
泰山医学院附属医院消化内科

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

孙殿兴 主任医师
白求恩国际和平医院肝病科

唐世刚 教授
大连大学附属中山医院消化内科

王炳元 教授
中国医科大学附属第一医院消化内科

王小众 教授
福建医科大学附属协和医院消化内科

杨建民 教授
浙江省人民医院消化内科

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

张国梁 主任医师
天津市第一中心医院消化内科