

郎格汉斯组织细胞增多症的消化系表现、诊断及治疗

陈 晶, 杜雅菊

陈晶, 杜雅菊, 哈尔滨医科大学附属二院消化内科 黑龙江省哈尔滨市 150086

杜雅菊, 教授, 医学博士, 主要从事消化系统肿瘤的临床和基础研究.

作者贡献分布: 本文综述由陈晶和杜雅菊完成, 杜雅菊审核.

通讯作者: 杜雅菊, 教授, 150086, 黑龙江省哈尔滨市, 哈尔滨医科大学附属二院消化内科. duyaju@medmail.com.cn

电话: 0451-86605143 传真: 0451-86605980

收稿日期: 2009-11-21 修回日期: 2010-01-15

接受日期: 2010-01-19 在线出版日期: 2010-02-28

Digestive system manifestations, diagnosis and treatment of Langerhans cell histiocytosis

Jing Chen, Ya-Ju Du

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

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

Received: 2009-11-21 Revised: 2010-01-15

Accepted: 2010-01-19 Published online: 2010-02-28

Abstract

Langerhans cell histiocytosis (LCH) is a rare disease characterized by an abnormal proliferation of histiocytes, known as Langerhans cells (LCs). At present, the pathogenesis of LCH remains unknown. LCH often involves the bone, skin, lung, bone marrow and lymph nodes. Besides, the liver, bile duct and gastrointestinal tract may also be affected. LCH has no specific clinical manifestations compared to other digestive system diseases. Once digestive system involvement is diagnosed in LCH patients, prompt treatment (even liver transplantation) should be given. In this paper, we will review the digestive system manifestations, diagnosis and treatment of LCH.

Key Words: Langerhans cell histiocytosis; Gastrointestinal tract; Clinical manifestation; Therapy

Chen J, Du YJ. Digestive system manifestations, diagnosis and treatment of Langerhans cell histiocytosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(6): 531-535

摘要

郎格汉斯组织细胞增多症是一种少见的全身多系统受侵犯的组织细胞异常增生性疾病, 常见受累部位为骨、皮肤、肺脏、骨髓、淋巴结等, 除此之外, 尚可侵犯肝脏、胆道及胃肠道等消化器官, 临床表现与其他消化系统疾病相比缺乏特异性, 故诊断难度较大. 一旦郎格汉斯组织细胞增多症患者明确诊断消化系统受累, 则需要系统性治疗, 甚至是肝脏移植. 本文综述郎格汉斯组织细胞增多症的消化系统表现, 从而对其早期诊断及治疗提供帮助.

关键词: 郎格汉斯细胞性组织细胞增多症; 消化系统; 临床表现; 治疗

陈晶, 杜雅菊. 郎格汉斯组织细胞增多症的消化系表现、诊断及治疗. *世界华人消化杂志* 2010; 18(6): 531-535

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/531.asp>

0 引言

郎格汉斯细胞性组织细胞增多症(langerhans cell histiocytosis, LCH)是一组病因未明的组织细胞(单核巨噬细胞系统和树突状细胞系统)增殖性疾病, 因1868年Paul Langerhans最早在表皮组织中描述而得名. 本病为少见疾病, 好发于婴儿和儿童, 成人尤为罕见^[1-3]. 最近, 法国的1项流行病学调查结果表明, 该病年发病率为4.6/100万儿童(0-14岁)^[4], 而在成年人中的发病率仅为1/100万-2/100万^[5]. LCH可侵犯1个或多个器官和组织, 骨骼系统较为多见, 亦可侵犯如皮肤、肺脏、下丘脑、垂体、淋巴结、肝脏和脾脏等^[6-16]. 其病因和发病机制尚未明确, 近年来研究发现多与体内免疫调节紊乱有关^[17-24]. 其病程可呈迅速进展致死, 也可缓慢进展. 研究显示, 其临床进展、治疗的效果及预后与郎格汉斯细胞(langerhans cells, LCs)侵犯的部位有关^[25]. LCH临床表现各异, 消化系统脏器中肝脏、胆道、胃肠道等均可受累, 可为唯一受累器官, 也可多为多系统LCH受累部位之一, 并可能为多系统LCH患者的首发症状. 成人LCH患者通常因为其症状而就诊于不同的专科门诊, 这就为

■背景资料

郎格汉斯组织细胞增多症属组织细胞疾病范畴, 国际组织细胞学会为国际上研究此疾病的最权威机构. 在我国, 郎格汉斯组织细胞增多症患者多于血液科治疗, 但因其浸润器官的多样性, 消化科医生也可能首诊此类患者. 因此, 消化科医生有必要掌握郎格汉斯组织细胞增多症的临床特点及其消化系统表现.

■同行评议者

王文跃, 主任医师, 中日友好医院普通外科; 李旭, 副教授, 广东省广州市南方医院急诊科; 李淑德, 主任医师, 中国人民解放军第二军医大学长海医院消化内科

■研究前沿

目前国内外学者普遍认为郎格汉斯组织细胞增多症可以侵犯多种消化器官,并且与疾病预后相关。但因郎格汉斯组织细胞增多症属少见疾病,尤其在成人中更为罕见,目前发表的文章多为个案报道,其典型的消化系统临床表现仍无系统总结。

其疾病的明确诊断带来了很大的困难。因此,消化科医生应该充分认识LCH的消化系统表现,有助于患者尤其是成年患者的早期诊断、选择恰当的治疗方案及其正确判断预后。为此,本文将对LCH的消化系统表现、诊断和治疗进行综述。

1 LCH的消化系统表现

1.1 肝脏 LCH是一种临床表现多样的疾病,可仅表现为无需或仅需微小干预治疗的孤立皮疹或者单纯的骨溶解,也可浸润到内脏器官,如肝脏、脾脏,引起肝、脾肿大。肝脏受累较为常见,肿大程度不一,大多为轻至中度肿大^[26]。

肝脏可为LCH患者唯一的受累部位,也可作为多器官损害之一。典型的多器官LCH患者肝脏受侵犯的比例为20%,脾脏30%,淋巴结为50%。因此,当患者出现肝脾肿大,同时伴有淋巴结肿大时,应警惕LCH的可能。无症状性的肝脏肿大、黄疸、生化异常,如转氨酶升高、高胆红素血症和/或凝血酶原时间延长,提示肝脏LCH的存在^[27]。目前,组织细胞学会提出的对于肝脏受累的诊断标准为:肝肿大,锁骨中线肋缘下>3 cm和/或肝功能异常(如排除其他原因所致的低蛋白血症<55 g/L,低白蛋白血症<25 g/L)和/或肝脏组织病理学诊断。这一诊断标准被临床工作者广泛接受并应用于临床。在组织学上,肝脏病变可分为4个病理分期,即增殖期、肉芽肿期、黄瘤期和纤维化期。受LCs浸润的肝脏可表现为3种不同的病理学形态,一为汇管区的炎症细胞浸润,炎症细胞主要由淋巴细胞构成,同时伴有数目不等中性粒细胞和嗜酸细胞^[26];二为汇管区被S-100染色阳性的LC浸润,并沿胆管规则排列,为LCH最常见的组织学表现^[28];三为与组织细胞浸润相关的汇管区纤维化。影像学能够显现病理活检漏诊的病变,对于疾病分级和评估肝脏受累的程度具有重要意义。在影像学上,肝脏病变与疾病的4个病理分期相关。在增殖期和肉芽肿期,汇管区有LC浸润、炎症和水肿,在超声上表现为汇管区低回声,CT上为低回声,注入对比剂后可增强^[29]。MRI T1-W像低信号、T2-W像高信号^[29,30]。黄瘤期门脉周围的脂肪浸润在超声上表现为高回声,而在CT上仍为低密度结节,MRI则为T1-W像高信号、T2-W像低信号^[29,31]。在纤维化期组织学上表现为管周纤维化和由硬化性胆管炎引起的结节性胆汁性肝硬化,超声上表现边界清晰的汇管区低回声病灶,有局灶性钙化。胆管造影和磁共振胰胆管水成像

见胆管扩张,可呈串珠状^[29,32]。

1.2 胆道 LC可浸润胆管系统,引起胆管的组织学改变^[33]。典型的病理改变为硬化性胆管炎(sclerosing cholangitis, SC),表现为胆管弥漫性炎症、广泛纤维化增厚和胆管狭窄。多发生于治疗无效的病情活动的LCH患者及既往有LCH病史而无病情活动迹象的患者^[34-36]。SC可发生于小胆管和大胆管甚至是胆总管,可表现为不规则的胆管狭窄和/或扩张,胆管壁钙化增厚,在成人可合并胆管结石,最终可发展为肝硬化。LCH是儿童SC的主要原因之一,大约有^[33]的儿童SC继发于LCH。在成人中,仅有部分病例报道,尚无系统统计。

1.3 胃肠道 胃肠道功能紊乱在LCH患者中很常见,但是有关胃肠道LCs浸润的证据很少。只有在内镜活检阳性时,才能够明确胃肠道受累的诊断。胃肠道受累常见部位为食管、胃、十二指肠、直肠乙状结肠及回盲部。内镜下胃及十二指肠多表现为多发浅溃疡形成,可伴有黏膜下出血;结肠镜下除多发浅溃疡形成外,尚可见结肠和末端回肠的结节性增生及管腔狭窄^[37]。此外,尚有成人LCH仅表现为孤立的结肠息肉而无其他器官受累的报道^[38]。

Hait等^[39]检索了从1966-2004年Medline发表的英文文献,关键词为“Langerhans cell histiocytosis”“colitis”和“gastrointestinal tract”。共检索到明确诊断胃肠道受累的LCH病例报道22例。分析发现,其主要症状为便血(59%)、无血性腹泻(18%)、肛周瘘管(4%)和便秘(9%)。便血仅发生在多器官受累的LCH患者,77%的患者同时合并低蛋白血症。86%(12/14)行胃镜检查的患者存在十二指肠LCH的组织学证据,其中8例存在下消化系症状(便血,腹泻)。上消化系活检阳性率高(100%),而下消化系活检阳性率仅为64%。

2 诊断

LCH的诊断依靠典型的临床表现和病理组织学以及免疫组织化学结果,确定诊断要靠病理组织学的典型镜下表现(且S-100a免疫染色阳性或电镜下Birbeck颗粒阳性)^[40-42]。LCH主要的病理改变为病变组织中存在数量不等的组织细胞,即郎格汉斯细胞,此细胞在光镜下为单个核细胞,平均直径12 μm,胞质中等量质匀,有细小的粉红色颗粒,少见有胞质空泡和吞噬现象。胞核常有折叠或切迹(核沟),或呈多叶状,核染色质

不规则, 含有1-3个嗜碱性的核仁融合的组织细胞, 偶可形成多核巨细胞. 有丝分裂相缺如病变组织内尚可见少量嗜酸性粒细胞、淋巴细胞、浆细胞和中性粒细胞. 在透射电镜下LCH胞质内含有一种特殊的细胞器, 朗格汉斯细胞颗粒或称Birbeck颗粒, 其功能尚未明了, 这种Birbeck颗粒为LCs所特有.

3 治疗

2008年国际组织细胞学会发表了LCH的推荐意见^[40]指出, LCH侵犯器官的发生率与患者的年龄相关, 通常情况下, 儿童多见单病灶或多病灶的骨损害, 成人则单病灶的肺脏损害多见. 并提出了LCH疾病严重程度的临床分层, 将其分为单器官系统疾病(single organ system disease)和多器官疾病(multi-organ disease), 前者包括单病灶(unifocal)和多病灶(multifocal), 后者又分为无器官功能障碍(no organ dysfunction)和器官功能障碍(organ dysfunction). 器官功能障碍依据受累的器官又可分为低风险(侵犯皮肤、骨、淋巴结、脑垂体)和高风险(侵犯肺脏、肝脏、脾脏、造血系统). 并根据此临床分层选择相应的治疗方案^[43].

通常情况下, 单器官单病灶的LCH需要最小的治疗, 如单病灶骨病变仅需要局部活检刮除^[44-46]. 如果没有合并器官功能障碍, 也可以采取等待的方案, 给病灶自愈的时间及机会. 多系统多病灶的LCH需要系统治疗, 系统治疗可以降低患者的死亡率和复发率^[47-55]. 2009年公布的LCH III治疗指南是目前对LCH患者治疗方案选择的最权威意见, 指南中包括对各种临床分层的儿童LCH患者的推荐治疗方案^[56].

LCH与肝脏疾病的关系包括急性LCH导致的肝脏病变和LCH的肝脏后遗症, 鉴于两者治疗不同, 要严格区分以上两种情况. 急性LCH肝脏受累患者的死亡率是不受累患者的3倍, 大约有65%的患者经过化疗后肝脏病变可以消退, 35%的患者肝脏病变会持续进展^[53]. 急性硬化性胆管炎的儿童在诊断后立即行肝脏移植, 不发生移植后复发或者对化疗敏感者预后较好, 可不进一步发展为慢性肝病和终末期肝硬化^[57].

LCH导致的终末期肝病和急性LCH肝脏受累且对化疗不敏感患者也需要进行肝移植, 其长期存活率约为80%, 但很多患者移植后出现急性排斥反应, 部分对激素治疗无效者需行再次肝移植^[58]. 虽然肝脏移植后LCH的肝外复发并不

少见, 但是肝内复发的病例很少见, 直到最近才有相关报道^[59].

目前报道胃肠道受累的LCH病例预后极差, 18 mo内的死亡率为59%, 化疗后完全缓解率仅为18%^[39]. 因明确诊断胃肠道受累的LCH患者报道例数极少, 缺乏治疗经验, 原则上多器官多部位受累患者需进行系统治疗.

4 结论

LCH是一组少见的组织细胞增殖性疾病, 其发病机制尚未明确, 其临床表现各异, 多器官多部位均可受累, 因此增加了临床的诊断难度. 目前对儿童LCH的系统性研究较多, 其治疗方案也日渐成熟; 但对于成人LCH, 仅有少量病例报道, 仍缺乏相应的治疗指南. 国际组织细胞学会一直致力于成人及儿童LCH诊断及治疗的基础及临床试验的研究. 2009-04, 国际组织细胞学会批准了LCH的评价和治疗指南, 为临床LCH的治疗提供了新的有力的武器.

5 参考文献

- 1 Salotti JA, Nanduri V, Pearce MS, Parker L, Lynn R, Windebank KP. Incidence and clinical features of Langerhans cell histiocytosis in the UK and Ireland. *Arch Dis Child* 2009; 94: 376-380
- 2 Stålemark H, Laurencikas E, Karis J, Gavhed D, Fadeel B, Henter JI. Incidence of Langerhans cell histiocytosis in children: a population-based study. *Pediatr Blood Cancer* 2008; 51: 76-81
- 3 Aricò M. Langerhans cell histiocytosis in adults: more questions than answers? *Eur J Cancer* 2004; 40: 1467-1473
- 4 Guyot-Goubin A, Donadieu J, Barkaoui M, Bellec S, Thomas C, Clavel J. Descriptive epidemiology of childhood Langerhans cell histiocytosis in France, 2000-2004. *Pediatr Blood Cancer* 2008; 51: 71-75
- 5 Stocksclaeder M, Sucker C. Adult Langerhans cell histiocytosis. *Eur J Haematol* 2006; 76: 363-368
- 6 Diederichs G, Hauptmann K, Schröder RJ, Kivelitz D. Case 147: langerhans cell histiocytosis of the femur. *Radiology* 2009; 252: 309-313
- 7 Querings K, Starz H, Balda BR. Clinical spectrum of cutaneous Langerhans' cell histiocytosis mimicking various diseases. *Acta Derm Venereol* 2006; 86: 39-43
- 8 Chaulagain CP. Pulmonary langerhans' cell histiocytosis. *Am J Med* 2009; 122: e5-e6
- 9 Makras P, Alexandraki KI, Chrousos GP, Grossman AB, Kaltsas GA. Endocrine manifestations in Langerhans cell histiocytosis. *Trends Endocrinol Metab* 2007; 18: 252-257
- 10 Tazi A. Adult pulmonary Langerhans' cell histiocytosis. *Eur Respir J* 2006; 27: 1272-1285
- 11 Scolozzi P, Lombardi T, Monnier P, Jaques B. Multisystem Langerhans' cell histiocytosis (Hand-Schüller-Christian disease) in an adult: a case report and review of the literature. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2004; 261: 326-330
- 12 Kaltsas GA, Powles TB, Evanson J, Plowman PN,

■应用要点

本文通过对郎格汉斯组织细胞增多症的疾病特点及消化系统表现的详尽描述, 对此疾病的早期诊断及预后评估起到了积极的作用.

同行评价

本文就郎格汉斯组织细胞增多症在消化系统的临床表现、发病机制和临床表现做了综述,对于早期识别和治疗这种罕见的疾病有一定的参考价值。

- Drinkwater JE, Jenkins PJ, Monson JP, Besser GM, Grossman AB. Hypothalamo-pituitary abnormalities in adult patients with langerhans cell histiocytosis: clinical, endocrinological, and radiological features and response to treatment. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 1370-1376
- 13 Khadilkar UN, Rao AT, Sahoo KK, Pai MR. Langerhans cell histiocytosis of mediastinal node. *Indian J Pediatr* 2008; 75: 294-296
- 14 Liu YH, Fan XH, Fang K. Langerhans' cell histiocytosis with multisystem involvement in an adult. *Clin Exp Dermatol* 2007; 32: 765-768
- 15 Makras P, Samara C, Antoniou M, Zetos A, Papadogias D, Nikolakopoulou Z, Andreacos E, Toloumis G, Kontogeorgos G, Piaditis G, Kaltsas GA. Evolving radiological features of hypothalamo-pituitary lesions in adult patients with Langerhans cell histiocytosis (LCH). *Neuroradiology* 2006; 48: 37-44
- 16 Shima H, Inokuchi M, Shimada H. A case of multisystem Langerhans cell histiocytosis with primary hypothyroidism followed by type 1 diabetes mellitus. *Pediatr Blood Cancer* 2009; 53: 232-234
- 17 Coury F, Annels N, Rivollier A, Olsson S, Santoro A, Spezianni C, Azocar O, Flacher M, Djebali S, Tebib J, Brytting M, Egeler RM, Rabourdin-Combe C, Henter JL, Arico M, Delprat C. Langerhans cell histiocytosis reveals a new IL-17A-dependent pathway of dendritic cell fusion. *Nat Med* 2008; 14: 81-87
- 18 Amir G, Weintraub M. Association of cell cycle-related gene products and NF-kappaB with clinical parameters in Langerhans cell histiocytosis. *Pediatr Blood Cancer* 2008; 50: 304-307
- 19 Schouten B, Egeler RM, Leenen PJ, Taminiau AH, van den Broek LJ, Hogendoorn PC. Expression of cell cycle-related gene products in Langerhans cell histiocytosis. *J Pediatr Hematol Oncol* 2002; 24: 727-732
- 20 Aricò M, Danesino C. Langerhans' cell histiocytosis: is there a role for genetics? *Haematologica* 2001; 86: 1009-1014
- 21 Scappaticci S, Danesino C, Rossi E, Klersy C, Fiori GM, Clementi R, Russotto VS, Bossi G, Aricò M. Cytogenetic abnormalities in PHA-stimulated lymphocytes from patients with Langerhans cell histiocytosis. AIEOP-Istiocitosi Group. *Br J Haematol* 2000; 111: 258-262
- 22 da Costa CE, Szuhai K, van Eijk R, Hoogeboom M, Sciot R, Mertens F, Björgvinsdóttir H, Debiec-Rychter M, de Krijger RR, Hogendoorn PC, Egeler RM, Annels NE. No genomic aberrations in Langerhans cell histiocytosis as assessed by diverse molecular technologies. *Genes Chromosomes Cancer* 2009; 48: 239-249
- 23 Holter W, Ressmann G, Grois N, Lehner M, Parolini O, Gadner H. Normal monocyte-derived dendritic cell function in patients with Langerhans-cell-histiocytosis. *Med Pediatr Oncol* 2002; 39: 181-186
- 24 Yousem SA, Colby TV, Chen YY, Chen WG, Weiss LM. Pulmonary Langerhans' cell histiocytosis: molecular analysis of clonality. *Am J Surg Pathol* 2001; 25: 630-636
- 25 Windebank K, Nanduri V. Langerhans cell histiocytosis. *Arch Dis Child* 2009; 94: 904-908
- 26 Heyn RM, Hamoudi A, Newton WA Jr. Pretreatment liver biopsy in 20 children with histiocytosis X: a clinicopathologic correlation. *Med Pediatr Oncol* 1990; 18: 110-118
- 27 Guthery SL, Heubi JE. Liver involvement in childhood histiocytic syndromes. *Curr Opin Gastroenterol* 2001; 17: 474-478
- 28 Favara BE. Histopathology of the liver in histiocytosis syndromes. *Pediatr Pathol Lab Med* 1996; 16: 413-433
- 29 Schmidt S, Eich G, Hanquinet S, Tschäppeler H, Waibel P, Gudinchet F. Extra-osseous involvement of Langerhans' cell histiocytosis in children. *Pediatr Radiol* 2004; 34: 313-321
- 30 Kilborn TN, Teh J, Goodman TR. Paediatric manifestations of Langerhans cell histiocytosis: a review of the clinical and radiological findings. *Clin Radiol* 2003; 58: 269-278
- 31 Kim M, Lyu C, Jin Y, Yoo H. Langerhans' cell histiocytosis as a cause of periportal abnormal signal intensity on MRI. *Abdom Imaging* 1999; 24: 373-377
- 32 König CW, Pfannenberger C, Trübenbach J, Remy C, Böhmer GM, Ruck P, Claussen CD. MR cholangiography in the diagnosis of sclerosing cholangitis in Langerhans' cell histiocytosis. *Eur Radiol* 2001; 11: 2516-2520
- 33 Jaffe R. Liver involvement in the histiocytic disorders of childhood. *Pediatr Dev Pathol* 2004; 7: 214-225
- 34 Thompson HH, Pitt HA, Lewin KJ, Longmire WP Jr. Sclerosing cholangitis and histiocytosis X. *Gut* 1984; 25: 526-530
- 35 Caputo R, Marzano AV, Passoni E, Fassati LR, Agnelli F. Sclerosing cholangitis and liver transplantation in Langerhans cell histiocytosis: a 14-year follow-up. *Dermatology* 2004; 209: 335-337
- 36 Caruso S, Miraglia R, Maruzzelli L, Luca A, Gridelli B. Biliary wall calcification in Langerhans cell histiocytosis: report of two cases. *Pediatr Radiol* 2008; 38: 791-794
- 37 Sabri M, Davie J, Orlando S, Di Lorenzo C, Ranganathan S. Gastrointestinal presentation of Langerhans cell histiocytosis in a child with perianal skin tags: a case report. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2004; 39: 564-566
- 38 Kibria R, Gibbs PM, Novick DM. Adult Langerhans cell histiocytosis: a rare cause of colon polyp. *Endoscopy* 2009; 41 Suppl 2: E160-E161
- 39 Hait E, Liang M, Degar B, Glickman J, Fox VL. Gastrointestinal tract involvement in Langerhans cell histiocytosis: case report and literature review. *Pediatrics* 2006; 118: e1593-e1599
- 40 Satter EK, High WA. Langerhans cell histiocytosis: a review of the current recommendations of the Histiocyte Society. *Pediatr Dermatol* 2008; 25: 291-295
- 41 Bongiorno MR, Pistone G, de Giorgi V, Aricò M. Clinical and immunohistochemical evaluation of the vulvar Langerhans cell histiocytosis. *Dermatol Ther* 2008; 21 Suppl 3: S15-S20
- 42 Tamiolakis D, Barbagadaki S, Proimos E, Nikolaidou S, Chimona TS, Georgiou G, Perogamvrakis G, Papadakis CE. Touch imprint cytological diagnosis of nodal Langerhans cell histiocytosis. *B-ENT* 2009; 5: 115-118
- 43 Vassallo R, Ryu JH, Schroeder DR, Decker PA, Limper AH. Clinical outcomes of pulmonary Langerhans'-cell histiocytosis in adults. *N Engl J Med* 2002; 346: 484-490
- 44 Margo CE, Goldman DR. Langerhans cell

- histiocytosis. *Surv Ophthalmol* 2008; 53: 332-358
- 45 Mittal T, Davis MD, Lundell RB. Perianal Langerhans cell histiocytosis relieved by surgical excision. *Br J Dermatol* 2009; 160: 213-215
 - 46 Do JE, Lee JY, Kim YC. Successful treatment of cutaneous Langerhans' cell histiocytosis with targeted narrowband ultraviolet B phototherapy in an infant. *Clin Exp Dermatol* 2009; 34: e280-e281
 - 47 Akçay S, Eyüboğlu FO, Arıcan A, Demırhan B. Effect of pulse steroid therapy in a patient with Langerhans' cell histiocytosis. *Respirology* 2001; 6: 357-360
 - 48 Dewan M, Al-Ghamdi AA, Zahrani MB. Lessons to be learned--Langerhans' cell histiocytosis. *J R Soc Promot Health* 2008; 128: 41-46
 - 49 Giona F, Caruso R, Testi AM, Moleti ML, Malagnino F, Martelli M, Ruco L, Giannetti GP, Annibali S, Mandelli F. Langerhans' cell histiocytosis in adults: a clinical and therapeutic analysis of 11 patients from a single institution. *Cancer* 1997; 80: 1786-1791
 - 50 Campos MK, Viana MB, de Oliveira BM, Ribeiro DD, Silva CM. Langerhans cell histiocytosis: a 16-year experience. *J Pediatr (Rio J)* 2007; 83: 79-86
 - 51 Aricò M, Girschikofsky M, Gènéreau T, Klersy C, McClain K, Grois N, Emile JF, Lukina E, De Juli E, Danesino C. Langerhans cell histiocytosis in adults. Report from the International Registry of the Histiocyte Society. *Eur J Cancer* 2003; 39: 2341-2348
 - 52 Minkov M, Grois N, Heitger A, Pötschger U, Westermeier T, Gadner H. Treatment of multisystem Langerhans cell histiocytosis. Results of the DAL-HX 83 and DAL-HX 90 studies. DAL-HX Study Group. *Klin Padiatr* 2000; 212: 139-144
 - 53 Morimoto A, Ishida Y, Suzuki N, Ohga S, Shioda Y, Okimoto Y, Kudo K, Ishii E. Nationwide survey of single-system single site Langerhans cell histiocytosis in Japan. *Pediatr Blood Cancer* 2010; 54: 98-102
 - 54 Suzuki T, Izutsu K, Kako S, Ohta S, Hangaishi A, Kanda Y, Motokura T, Chiba S, Kurokawa M. A case of adult Langerhans cell histiocytosis showing successfully regenerated osseous tissue of the skull after chemotherapy. *Int J Hematol* 2008; 87: 284-288
 - 55 von Stebut E, Schadmand-Fischer S, Bräuninger W, Kreft A, Doberauer C, Steinbrink K. Successful treatment of adult multisystemic Langerhans cell histiocytosis with psoralen-UV-A, prednisolone, mercaptopurine, and vinblastine. *Arch Dermatol* 2008; 144: 649-653
 - 56 Histiocyte Society 2009. Langerhans cell histiocytosis evaluation and treatment guidelines. Histiocyte Society online, 2009, cited 2010-02. Available from: http://www.histiocytesociety.org/site/c.mqISL2PIJrH/b.4442715/k.A339/Treatment_Plans.htm
 - 57 Braier J, Ciocca M, Latella A, de Davila MG, Drajer M, Imventarza O. Cholestasis, sclerosing cholangitis, and liver transplantation in Langerhans cell Histiocytosis. *Med Pediatr Oncol* 2002; 38: 178-182
 - 58 Hadzic N, Pritchard J, Webb D, Portmann B, Heaton ND, Rela M, Dhawan A, Baker AJ, Mieli-Vergani G. Recurrence of Langerhans cell histiocytosis in the graft after pediatric liver transplantation. *Transplantation* 2000; 70: 815-819
 - 59 Newell KA, Alonso EM, Kelly SM, Rubin CM, Thistlethwaite JR Jr, Whittington PF. Association between liver transplantation for Langerhans cell histiocytosis, rejection, and development of posttransplant lymphoproliferative disease in children. *J Pediatr* 1997; 131: 98-104

编辑 李军亮 电编 何基才

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》按时完成2009年度出版任务

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

2010年,《世界华人消化杂志》将坚持开放获取(open access, OA)的出版模式,编辑出版高质量文章,努力实现编委、作者和读者利益的最大化,努力推进本学科的繁荣和发展,向专业化、特色化和品牌化方向迈进.(编辑部主任:李军亮 2010-01-08)

重组人生长激素对荷人胃癌细胞SGC-7901裸鼠移植瘤生长及VEGF表达的影响

程璐, 苏翔宇, 林岩, 李苏宜

■背景资料

重组人生长激素(rhGH)具有与人体内源生长激素同等的作用,能够刺激骨骼生长,促进全身蛋白质合成,调节脂肪代谢,增强免疫功能。但是由于生长激素(GH)具有促细胞有丝分裂效应,理论上存在潜在的促肿瘤生长风险,故其能否用于恶性肿瘤患者的代谢调理仍有争议。有报道认为, rhGH不仅可促进肿瘤细胞增殖,而且可能与肿瘤血管新生有关,但尚无明确的理论证据。

程璐, 苏翔宇, 李苏宜, 东南大学附属中大医院肿瘤科 江苏省南京市 210009

林岩, 南京医科大学第二附属医院肿瘤科 江苏省南京市 210011

程璐, 硕士, 主要从事恶性肿瘤的代谢支持及代谢调理治疗。

南京市医学科技发展项目基金资助项目, No. YKK07097

作者贡献分布: 此课题由李苏宜与林岩设计; 研究操作过程及数据整理分析由程璐与苏翔宇完成; 本论文写作由程璐完成。

通讯作者: 李苏宜, 教授, 210009, 江苏省南京市丁家桥87号, 东南大学附属中大医院肿瘤科。lisuyi@cscsco.org.cn

电话: 025-83272338

收稿日期: 2009-10-27 修回日期: 2010-01-11

接受日期: 2010-01-19 在线出版日期: 2010-02-28

Recombinant human growth hormone promotes tumor growth and VEGF expression in subcutaneous xenografts derived from human gastric carcinoma SGC-7901 cells in nude mice

Lu Cheng, Xiang-Yu Su, Yan Lin, Su-Yi Li

Lu Cheng, Xiang-Yu Su, Su-Yi Li, Department of Oncology, Zhongda Hospital, Southeast University, Nanjing 210009, Jiangsu Province, China

Yan Lin, Department of Oncology, the Second Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210011, Jiangsu Province, China

Supported by: the Medical Science and Technology Development Program of Nanjing, No. YKK07097

Correspondence to: Professor Su-Yi Li, Department of Oncology, Zhongda Hospital, Southeast University, 87 Dingjiaqiao, Nanjing 210009, Jiangsu Province, China. lisuyi@cscsco.org.cn

Received: 2009-10-27 Revised: 2010-01-11

Accepted: 2010-01-19 Published online: 2010-02-28

Abstract

AIM: To investigate the effects of recombinant human growth hormone (rhGH) on tumor growth and VEGF expression in subcutaneous xenografts derived from human gastric carcinoma SGC-7901 cells in nude mice.

METHODS: The expression of growth hormone receptor (GHR) in human gastric carcinoma cell line SGC-7901 was detected by immunocytochemistry. Thirty nude mice bearing sub-

cutaneous xenografts derived from carcinoma SGC-7901 cells were randomly divided into three groups: control group, low-dose rhGH group and high-dose rhGH group. The low- and high-dose rhGH groups were injected with rhGH at doses of 0.5 and 2.5 U/(kg·d) once a day for two weeks, respectively, while the control group was injected with equal volumes of normal saline for the same duration. The changes in body weight and tumor volume were recorded. The content of serum VEGF in peripheral blood was analyzed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The expression of VEGF mRNA and protein in tumor tissue was detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and immunohistochemistry, respectively.

RESULTS: GHR is highly expressed in SGC-7901 cells. After treatment with rhGH for three days, the tumor volume was significantly larger in the two rhGH groups than in the control group (both $P < 0.05$). High-dose rhGH revealed stronger tumor growth-promoting effect than low-dose one ($P < 0.05$). No significant difference was found in the body weight of nude mice among the three groups (all $P > 0.05$). The content of serum VEGF was elevated more obviously in the high-dose rhGH group than in the low-dose rhGH group and the control group. ($252.94 \text{ ng/L} \pm 15.32 \text{ ng/L}$ vs $167.60 \text{ ng/L} \pm 9.54 \text{ ng/L}$ and $49.94 \text{ ng/L} \pm 5.73 \text{ ng/L}$, respectively; both $P < 0.05$). The expression level of VEGF protein in tumor tissue was significantly higher in the two rhGH groups than in the control group. The relative expression level of VEGF mRNA was much higher in the high-dose rhGH group than in the low-dose rhGH group and the control group (0.647 ± 0.0447 vs 0.412 ± 0.0351 and 0.323 ± 0.0258 , respectively; both $P < 0.05$).

CONCLUSION: RhGH can promote tumor growth and VEGF expression in subcutaneous xenografts derived from human gastric carcinoma SGC-7901 cells in nude mice.

■同行评议者

王振宁, 教授, 中国医科大学附属第一医院肿瘤外科; 熊斌, 教授, 武汉大学中南医院肿瘤科

Key Words: Recombinant human growth hormone; Growth hormone receptor; Vascular endothelial growth factor; Gastric carcinoma

Cheng L, Su XY, Lin Y, Li SY. Recombinant human growth hormone promotes tumor growth and VEGF expression in subcutaneous xenografts derived from human gastric carcinoma SGC-7901 cells in nude mice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(6): 536-541

摘要

目的: 探讨重组人生长激素(rhGH)对荷人胃癌细胞株SGC-7901裸鼠移植瘤生长及VEGF表达的影响。

方法: 免疫细胞化学染色法鉴定SGC-7901细胞株GHR表达状态, 30只接种皮下移植瘤的裸鼠随机分为: 对照组(生理盐水0.2 mL/d), 低剂量rhGH组[0.5 U/(kg·d)], 高剂量rhGH组[2.5 U/(kg·d)], 连续给药14 d, 观察并记录裸鼠体质量和肿瘤体积, 酶联免疫吸附法测定血清VEGF含量, 免疫组织化学法检测胃癌组织中VEGF蛋白表达, RT-PCR检测VEGF mRNA表达。

结果: SGC-7901细胞株GHR呈强阳性表达。自rhGH给药第3天起, rhGH给药组与对照组肿瘤体积相差悬殊($P<0.05$), 且高剂量rhGH比低剂量rhGH促肿瘤生长效应更加明显($P<0.05$), 3组间裸鼠体质量差别不明显($P>0.05$)。裸鼠血清VEGF含量, 与对照组和低剂量rhGH组相比, 高剂量rhGH组血清中VEGF水平明显升高, 差别具有统计学意义($252.94 \text{ ng/L} \pm 15.32 \text{ ng/L}$ vs $49.94 \text{ ng/L} \pm 5.73 \text{ ng/L}$, $167.60 \text{ ng/L} \pm 9.54 \text{ ng/L}$, 均 $P<0.05$)。肿瘤组织VEGF蛋白的表达, 对照组VEGF表达呈中度阳性; 低剂量rhGH组和高剂量rhGH组VEGF表达量高, 呈强阳性。肿瘤组织VEGF mRNA表达水平, 高剂量rhGH组VEGF相对表达量明显高于对照组和低剂量rhGH组, 差别具有统计学意义(0.647 ± 0.0447 vs 0.323 ± 0.0258 , 0.412 ± 0.0351 , 均 $P<0.05$)。

结论: rhGH能促进GHR阳性表达的SGC-7901移植瘤生长, 并促进VEGF表达。

关键词: 重组人生长激素; 生长激素受体; 血管内皮生长因子; 胃癌

程璐, 苏翔宇, 林岩, 李苏宜. 重组人生长激素对荷人胃癌细胞SGC-7901裸鼠移植瘤生长及VEGF表达的影响. *世界华人消化杂志* 2010; 18(6): 536-541

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/536.asp>

www.wjgnet.com

0 引言

恶性肿瘤患者常并发严重营养不良, 特别是手术、放化疗后及晚期消化系统肿瘤患者, 以胃癌患者营养不良的发生率最为突出, 且恶病质一旦启动, 常规的营养支持治疗往往难以逆转, 直接影响了肿瘤患者的生活质量和生存时间。作为一种高效的促合成代谢因子, 重组人生长激素(recombinant human growth hormone, rhGH)在刺激骨骼生长加速, 纠正负氮平衡状态, 增强抗感染能力等方面疗效显著, 然而rhGH能否应用于胃癌患者, 在改善患者全身状况的同时, 是否会促进原有肿瘤的生长、浸润和转移复发, 仍需要深入评价。生长激素受体(growth hormone receptor, GHR)是生长激素(growth hormone, GH)发挥生物学效应的基础, 本研究通过建立GHR阳性表达的裸鼠胃癌皮下移植瘤模型, 给予不同剂量的rhGH干预, 于动物在体水平了解rhGH对胃癌组织生长及血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)表达的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 人低分化胃腺癌细胞株SGC-7901购自中国科学院上海细胞生物研究所。BALB/c, nu/nu, ♂裸鼠40只, 购自上海斯莱克实验动物有限公司, 周龄4-5 wk, 体质量14-16 g, 许可证号: SCXK(沪)2004-2005, 无特定病原体(SPF)条件下饲养。注射用rhGH(珍怡)为上海联合赛尔生物工程有限公司惠赠。兔抗人GHR多克隆抗体, 兔抗人VEGF多克隆抗体, 小鼠血管内皮细胞生长因子ELISA试剂盒, 浓缩型SABC免疫组织化学试剂盒均购自武汉博士德生物技术有限公司。TRIzol试剂和RT-PCR试剂盒分别为Invitrogen和TaKaRa公司产品。

1.2 方法

1.2.1 胃癌细胞GHR表达的检测: SGC-7901细胞培养液为含100 mL/L胎牛血清的RPMI 1640, 37 °C含50 mL/L CO₂的饱和湿度培养箱中培养。应用免疫细胞化学染色法鉴定SGC-7901的GHR表达情况。操作步骤按说明书进行。阳性细胞染为棕黄色或棕褐色, 胞膜、胞质着色。高倍镜下(×200)随机选择5个视野并分别计数100个细胞, 根据阳性细胞占计数细胞的百分比, 将免疫染色分级如下: 阴性(-), ≤5%; 弱阳性(+), 6%-25%; 中等阳性(++), 25%-50%; 强阳性(+++), ≥50%。

1.2.2 裸鼠胃癌皮下移植瘤模型的建立: 取处于对数生长期的胃癌细胞SGC-7901, 用2.5 g/L胰

■ 研发前沿

rhGH能否利用其促蛋白合成优势, 纠正恶性肿瘤患者的负氮平衡状态, 其肿瘤相关安全性问题需要进一步研究。

■相关报道

王鹰等研究发现 rhGH 能够促进生长激素受体 (GHR) 阳性表达的肝癌细胞株 Bel-7402 分泌更多的 VEGF, 促进与其共培养的血管内皮细胞生长, 参与肿瘤血管的生成; 而对于 GHR 阴性表达的肝癌细胞株 SMMC-7721, 虽有 VEGF 的分泌, 但不受 rhGH 干预的影响。

蛋白酶消化制成单细胞悬液, 台盼蓝拒染法计数活细胞数占95%以上。收集细胞, 调节浓度为 $2 \times 10^6/\text{mL}$, 随机选取5只裸鼠, 右前肢腋下接种 SGC-7901 细胞, 每只0.2 mL。7 d后接种部位可触及肿瘤组织, 14 d后可见直径1.5-2 cm的肿块。颈椎脱臼法处死裸鼠, 皮肤消毒, 无菌条件下, 于右前肢腋下取出瘤块, 置于有少许生理盐水的培养皿中, 去掉坏死组织, 称质量, 按瘤块质量, 每克肿瘤加入4 mL生理盐水, 于组织匀浆器中研磨, 配成混悬液, 浓度约为 $(1-2) \times 10^7$ 个/mL, 接种至35只实验裸鼠右前肢腋下, 每只0.2 mL, 7 d后见皮下移植瘤形成。

1.2.3 实验分组与观察指标: 剔除过大或过小的肿瘤, 选取肿瘤直径5-6 mm的30只裸鼠进入实验, 随机平均分为3组。对照组(C组): 生理盐水 0.2 mL/d; 低剂量GH组(L组): rhGH 0.5 U/(kg·d); 高剂量GH组(H组): rhGH 2.5 U/(kg·d); 腹壁皮下注射, 每天1次, 自肿瘤接种后第15天至第28天, 共14 d。每日观察裸鼠的行动、对外界刺激的反应、皮毛色泽及摄食情况。自第12至第30天, 每3 d监测裸鼠的体质量和皮下移植瘤的生长情况并记录, 测量肿瘤长径(A)和垂直直径(B), 按公式 $V = A \times B^2/2$ 计算肿瘤体积, 描绘肿瘤体积增长曲线。停药2 d后, 每只裸鼠摘除眼球取血约0.5 mL, 后脱臼法处死裸鼠, 取皮下移植瘤, 并仔细检查其他脏器有无转移。

1.2.4 血清VEGF含量检测: 肿瘤接种第30天, 摘除裸鼠眼球取血约0.5 mL, 并于室温下静置2 h, 待血液凝固后, 3 000 r/min离心10 min, 提取上层血清于-80 °C冻存备检。小鼠VEGF ELISA试剂盒检测各组血清中VEGF水平。

1.2.5 免疫组织化学法检测胃癌组织中VEGF蛋白表达: 肿瘤组织用10%中性甲醛固定, 石蜡包埋、切片, 以PBS替代一抗作为阴性对照。免疫特异性染色定位于细胞质。阳性判断标准以阳性细胞占计数细胞的百分比为准, 免疫分级标准同1.2.1。

1.2.6 RT-PCR检测胃癌组织中VEGF mRNA的表达: 取新鲜肿瘤组织, TRIzol提取总RNA, 使用随机引物合成cDNA。以人VEGF165为参照设计引物, VEGF-upper: 5'-GCACCCATGGCAGAAGGAGGAG-3', VEGF-lower 5'-TCACCGCCTCGGCTTGTCAC-3'; 以人H3(HH3)作为内参, 引物序列为HH3-upper: 5'-ATGGCTCGTACAAAGC-3', HH3-lower: 5'-TTAAGCACGTTCTCCACG-3', 以逆转录成的cDNA为模板, 进行PCR, 程序为:

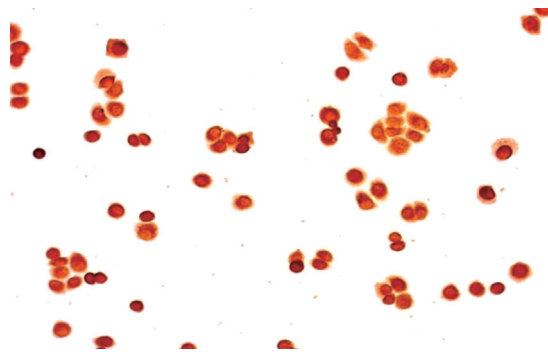


图1 SGC-7901免疫细胞化学染色。

94 °C变性3 min, 94 °C 30 s, 50 °C 45 s, 72 °C 40 s, 30个循环, 72 °C延伸5 min, 1.0%琼脂糖电泳检测扩增产物。Image Master VDS凝胶图像分析仪扫描凝胶图谱, 用LabImageVersion2.7.1分析系统对PCR产物半定量分析, 以DNA扩增量之比 ($N_{\text{VEGF}}/N_{\text{H3}}$)代表VEGF mRNA相对表达水平。

统计学处理 用SPSS13.0统计处理软件, 计量数据以mean±SD表示, 不同组间样本均数比较采用单因素方差分析, 配对设计的样本均数比较用两因素方差分析。以 $P<0.05$ 作为有统计学差异的标准。

2 结果

2.1 SGC-7901胃癌细胞株GHR的表达 SGC-7901细胞染为棕黄色, 主要为细胞膜、细胞质着色, 阳性细胞数约为83%, 说明GHR呈强阳性表达(图1)。

2.2 裸鼠体质量和肿瘤体积变化 实验开始, 肿瘤接种后第7天, 皮下可触及小瘤结节, 第10天较为明显。待肿瘤最长径长至0.5 cm左右, 约肿瘤接种后第12天, 开始每3天记录肿瘤大小和裸鼠体质量。第15天起予以rhGH药物干预。给药前3天, 3组裸鼠之间的体质量和肿瘤体积变化不明显($P>0.05$), 且rhGH实验组裸鼠活动状态和进食量好于对照组。至给药后第3天起(第18天), 低剂量rhGH组、高剂量rhGH组与对照组相比, 皮下移植瘤体积增加明显($P<0.05$), 且高、低rhGH剂量浓度组间亦有差别($P<0.05$); 而3组裸鼠体质量差别不具有统计学意义($P>0.05$)。随着肿瘤体积的增大, 给药的后半程, 各组裸鼠体质量增长速度均较前半程减缓(图2)。实验结束处死动物, 各组裸鼠肝脏、肺脏、胸腹腔均未见转移病灶。

2.3 SGC-7901裸鼠血清VEGF水平 与对照组和低剂量rhGH组相比, 高剂量rhGH组血清中VEGF水平明显升高, 差别具有统计学意义

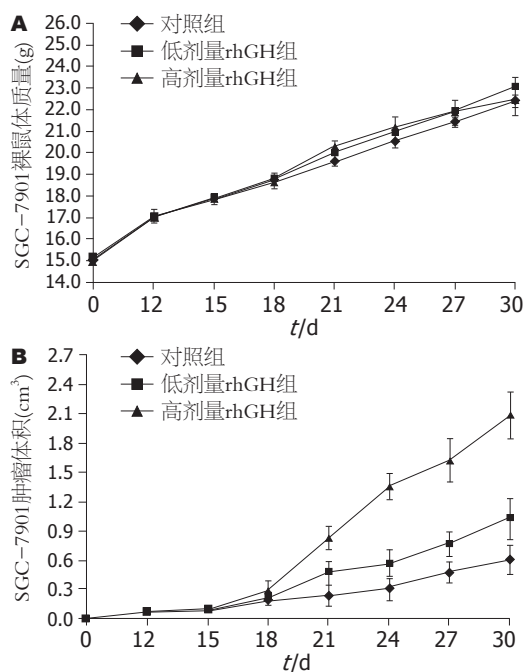


图2 SGC-7901裸鼠体重和肿瘤体积的变化. A: 体重; B: 肿瘤体积.

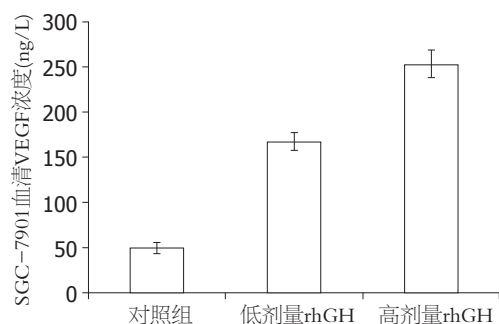


图3 SGC-7901裸鼠血清VEGF水平.

(252.94 ng/L \pm 15.32 ng/L vs 49.94 ng/L \pm 5.73 ng/L, 167.60 ng/L \pm 9.54 ng/L, 均 P <0.05, 图3).

2.4 肿瘤组织VEGF蛋白的表达 对照组VEGF为中度阳性, 阳性细胞数约计数细胞总数38%, 低剂量rhGH组和高剂量rhGH组VEGF表达量高, 呈强阳性, 阳性细胞比例均超过60%(图4).

2.5 肿瘤组织VEGF mRNA的表达 高剂量rhGH组VEGF相对表达量明显高于对照组和低剂量rhGH组, 差别具有统计学意义(0.647 ± 0.0447 vs 0.323 ± 0.0258 , 0.412 ± 0.0351 , 均 P <0.05, 图5). VEGF和H3扩增后电泳结果显示产物片段大小和预先设计一致.

3 讨论

rhGH具有直接的代谢调理作用, 已作为一种促合成代谢药物广泛应用于非肿瘤患者蛋白热卡

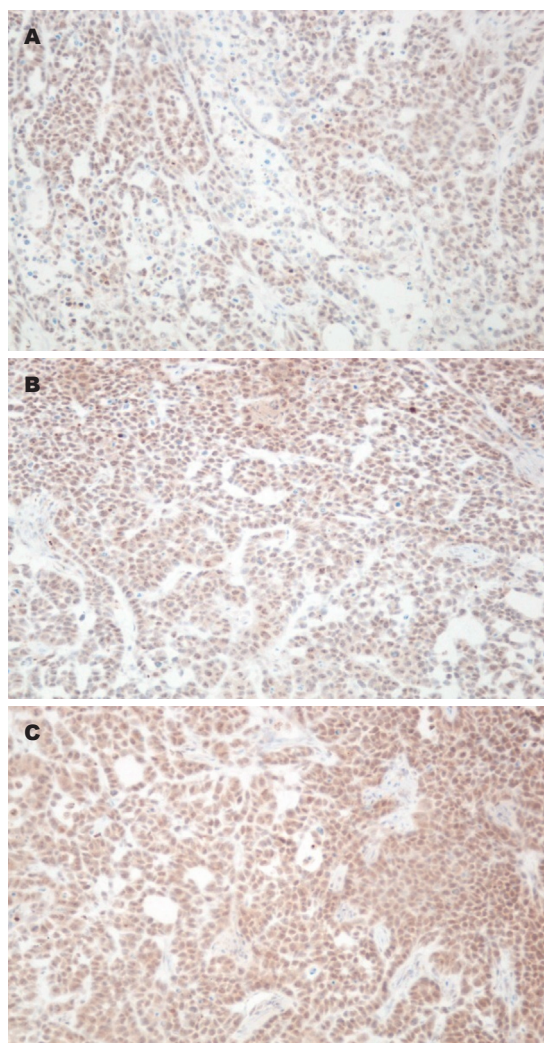


图4 免疫组织化学检测各组肿瘤组织中VEGF蛋白的表达($\times 200$). A: 对照组; B: 低剂量rhGH组; C: 高剂量rhGH组.

■创新盘点

肿瘤的血管生成是肿瘤生长、侵袭和转移的重要条件, 探讨rhGH与血管生成的关系有助于进一步评价其肿瘤相关安全性. 以rhGH作用的靶点GHR为切入点, 判断其表达状态, 更全面地研究rhGH生物学效应的发挥.

不足型营养不良的治疗. 胃癌患者由于术前不能正常进食, 肿瘤组织消耗大量能量, 手术创伤大, 且术后处于高分解代谢状态, 近90%患者发生体重丢失, 20%直接死于营养不良、恶病质^[1]. 给予单纯的肠内、肠外营养支持治疗并不能显著逆转恶性肿瘤患者的高分解代谢状态, 因此, 许多学者试图通过应用rhGH的代谢调理和免疫调节作用来纠正负氮平衡, 增强机体抵抗力, 从而提高抗肿瘤治疗疗效, 延长生存期. 有研究证实体内环境中上调鼠生长激素分泌量的生理学刺激不会促进小鼠所荷肿瘤的生长, 认为使用rhGH是一种治疗人类癌性恶病质的适合方法^[2]. 然而考虑到rhGH的间接促细胞生长增殖效应, 大剂量使用是否会促进原发肿瘤的生长, 是否增加了第二肿瘤的发生可能, 以及是否使原先非肿瘤患者的新发恶性肿瘤概率增加, 临床研究资料仍存在分歧^[3-7].

■同行评价

本研究设计合理,方法可靠,结果可信,文章层次清楚,其结论有一定的应用价值。

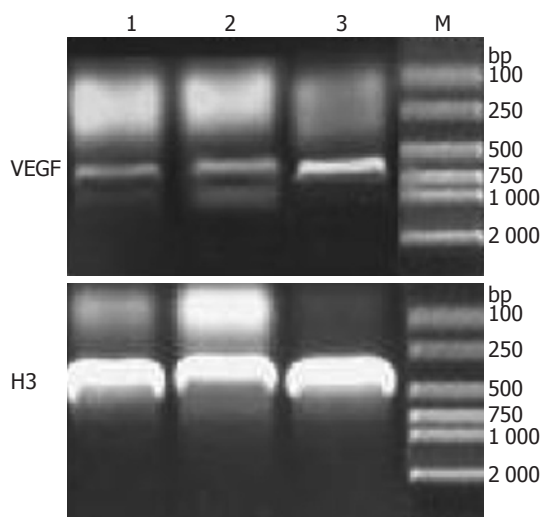


图5 SGC-7901肿瘤VEGF mRNA表达。M: Marker; 1: 对照组; 2: 低剂量rhGH组; 3: 高剂量rhGH组。

肿瘤血管生成是肿瘤生长、侵袭和转移的重要条件^[8]。肿瘤通过血管从宿主获得丰富的营养,并依赖其向宿主输出大量恶性细胞致肿瘤不断生长和转移,形成一个促血管生成循环。肿瘤的血管生成与多种生长因子的刺激有关,其中VEGF是最主要、最直接的促血管生长因子^[9]。临床研究亦发现在胃癌患者的血清及癌组织中VEGF的表达水平均异常增高,且与浸润深度及有无转移呈正相关,对疾病预后具有提示作用^[10]。故审视rhGH临床肿瘤患者应用的安全性,不可忽视其对VEGF表达的影响。

GH可以经生长介质介导,通过GH-胰岛素样生长因子-1(insulin-like growth factor-1, IGF-1)轴,促进胰腺癌细胞BXPC-3的增殖^[11]。但其与靶细胞表面GHR的结合则是GH发挥促生长效应更直接的途径^[12], GH和IGF-1能够促进人乳腺癌细胞株MCF7在无血清条件中生长,并且保护细胞免受多柔比星细胞毒效应的影响。运用IGF-1受体抗体阻断后仍然观察到GH的促增殖效应,而使用GHR受体拮抗剂培维索孟却使其促增殖效应消失,说明GH的这一效应是直接发挥作用,并没有经IGF-1介导^[13]。还有研究发现, rhGH能促进表达GHR的人肝癌细胞Bel-7402移植瘤的生长,其作用有随用药量增加而增强的趋势,两者之间存在一定相关性^[14]。本课题小组先前的研究结果也显示, rhGH对GHR阳性表达的肝癌细胞具有明显促增殖作用,但对于GHR阴性表达的肝癌细胞,由于缺少结合位点,故未发现rhGH有促其增殖的作用^[15,16],提示GHR极可能是影响rhGH发挥生物学效应的关键靶点。

本实验首先通过免疫细胞化学染色鉴定

SGC-7901胃癌细胞株GHR呈强阳性表达,在体水平观察rhGH对GHR阳性肿瘤生长、营养状况改善程度及VEGF表达的影响。给药初期, rhGH治疗组的所有裸鼠,活动状态及饮水进食量均较对照组为佳。说明rhGH确实能够在一定程度上改善机体代谢状态。给药3 d后, rhGH给药组的肿瘤生长速率开始明显快于对照组,肿瘤体积增大显著,说明rhGH对GHR阳性的肿瘤有较明显的促生长作用,且高剂量rhGH组的促生长效应更显著;但3组裸鼠体质量数值无显著差别,且在给药的后半程, rhGH治疗组的裸鼠体质量随着肿瘤体积的逐步增大,增长速度逐渐减缓,最后高剂量rhGH组裸鼠体质量甚至低于低剂量rhGH组,可能与肿瘤增长过快增加了机体的消耗有关。同时为了进一步评价rhGH与肿瘤血管生成的关系并结合体外研究的实验结果,提示rhGH能促GHR+肝癌细胞株Bel-7402分泌更多的VEGF,促进与其共培养的血管内皮细胞生长,参与肿瘤血管的生成^[17];本实验中采用动物皮下移植瘤模型,于体内水平研究rhGH对胃癌组织VEGF表达的影响,结果发现, rhGH给药组VEGF的阳性表达率明显高于对照组,且随着给药剂量增加, VEGF表达阳性程度越高;同时我们采用RT-PCR从基因转录水平检测VEGF mRNA的表达,可见各实验组均在495 bp处出现深浅不一的条带,结论符合蛋白水平检测结果。此外,肿瘤不断生长分泌的VEGF不仅仅局限于肿瘤组织本身,大量的VEGF释放入外周血,血浆中也可以检测到高水平的VEGF,且与组织中VEGF表达变化相一致。由此可见,对于GHR阳性表达的肿瘤,可能存在GH发挥促增殖作用的直接通路,故存在促进肿瘤生长的风险。同时随着rhGH干预浓度的升高, VEGF表达量也有增加,推测其也极可能促进了肿瘤的血管生成,有关其信号通路的具体机制仍需深入探索。

胃癌的治疗不仅包括抗肿瘤治疗本身,从代谢调理治疗的角度,以改善患者代谢状态,使总蛋白合成增加,有效恢复和维护脏器功能,提高化疗耐受性,从而延缓恶病质发生发展。rhGH在促蛋白合成方面存有独特的优势,但是应用于恶性肿瘤患者,仍需权衡利弊。GHR是其发挥作用的关键靶点之一, rhGH应用于GHR阳性表达的肿瘤,有促进肿瘤生长及肿瘤血管生成的风险,临床上使用应谨慎。

4 参考文献

- 1 Muscaritoli M, Bossola M, Aversa Z, Bellantone R,

- Rossi Fanelli F. Prevention and treatment of cancer cachexia: new insights into an old problem. *Eur J Cancer* 2006; 42: 31-41
- 2 Khan AS, Smith LC, Anscombe IW, Cummings KK, Pope MA, Draghia-Akli R. Growth hormone releasing hormone plasmid supplementation, a potential treatment for cancer cachexia, does not increase tumor growth in nude mice. *Cancer Gene Ther* 2005; 12: 54-60
- 3 Cao J, Luo SM, Liang L, Lai J. Effects of parenteral nutrition without and with growth hormone on growth hormone/insulin-like growth factor-1 axis after hepatectomy in hepatocellular carcinoma with liver cirrhosis. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2007; 31: 496-501
- 4 Renahan AG, Brennan BM. Acromegaly, growth hormone and cancer risk. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2008; 22: 639-657
- 5 Perry JK, Emerald BS, Mertani HC, Lobie PE. The oncogenic potential of growth hormone. *Growth Horm IGF Res* 2006; 16: 277-289
- 6 Tacke J, Bolder U, Herrmann A, Berger G, Jauch KW. Long-term risk of gastrointestinal tumor recurrence after postoperative treatment with recombinant human growth hormone. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2000; 24: 140-144
- 7 Liang DM, Chen JY, Zhang Y, Gan P, Lin J, Chen AB. Effects of recombinant human growth hormone on growth of human gastric carcinoma xenograft model in nude mice. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 3810-3813
- 8 Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000; 407: 249-257
- 9 Karamysheva AF. Mechanisms of angiogenesis. *Biochemistry (Mosc)* 2008; 73: 751-762
- 10 秦斌, 张筱茵. 胃癌分子免疫学研究进展. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 115-119
- 11 蔡辉华, 孙跃明, 白剑峰, 陆文熊, 石毅, 赵翰林, 苗毅. 生长激素对胰腺癌细胞株BXP-3增殖的作用及其机制. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 1157-1161
- 12 Brooks AJ, Wooh JW, Tunny KA, Waters MJ. Growth hormone receptor; mechanism of action. *Int J Biochem Cell Biol* 2008; 40: 1984-1989
- 13 Zatelli MC, Minoia M, Molè D, Cason V, Tagliati F, Margutti A, Bondanelli M, Ambrosio MR, degli Uberti E. Growth hormone excess promotes breast cancer chemoresistance. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94: 3931-3938
- 14 刘建平, 陈涛, 凌云彪, 陈小萱, 区庆嘉. 重组人生长激素对人肝癌细胞Bel-7402裸小鼠移植瘤生长的影响. *癌症* 2006; 25: 292-296
- 15 邵棋, 李苏宜. 重组人生长激素联合5-氟尿嘧啶对表达或不表达生长激素受体人肝癌细胞的体外干预. *中国临床营养杂志* 2008; 16: 89-93
- 16 陆颖芝, 李苏宜, 林岩, 杨芳, 谈华阳, 何向明. 重组人生长激素体外干预人肝癌细胞生长及受体表达. *中华临床营养杂志* 2009; 17: 224-230
- 17 王鹰, 李苏宜. 重组人生长激素促进肝癌血管新生的体外研究. *肠外与肠内营养* 2008; 15: 201-205

编辑 李瑞敏 电编 何基才

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

• 消息 •

WJG 成功通过评审被PMC收录

本刊讯 PubMed Central(PMC)是由美国国家医学图书馆(NLM)下属国家生物技术信息中心(NCBI)创立的开放存取(Open Access)的生物医学和生命科学全文数据库. 此数据库只收录采取国际同行评审制度评议的期刊, 并对收录期刊有较高的科学、编辑及数据文件质量要求.

截至目前, 我国只有两本期刊被PMC收录. 《浙江大学学报B》(英文版)(*Journal of Zhejiang University Science B*)是我国第一本通过PMC评审并于2006-03-15被收录的期刊. 《世界胃肠病学杂志》(英文版)(*World Journal of Gastroenterology, WJG*)第二本通过PMC评审并于2009-03-26被收录, 全文免费向公众开放, 见: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/tocrender.fcgi?journal=818&action=archive> (WJG编辑部主任: 程剑侠 2009-03-26)

芹菜素对肝癌细胞生长及基因表达的影响

蔡婧, 刘安文, 赵向丽, 张树辉

■背景资料

原发性肝癌绝大多数是肝细胞癌,素有“癌中之王”之称,现有的治疗手段效果不佳。近年,从膳食中获取癌症的有效预防和治疗制剂成为目前人们普遍关注的问题。芹菜素是天然存在的一种黄酮类化合物,广泛存在于多种水果、蔬菜(包括芹菜)、茶叶、小麦芽和一些调味品中,近年来,越来越多的研究表明芹菜素可以抑制肿瘤的发生、发展。

蔡婧, 刘安文, 南昌大学第二附属医院肿瘤科 江西省南昌市 330006

赵向丽, 张树辉, 上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院病理科 上海市 200437

蔡婧, 2007年南昌大学硕士, 主要从事中药治疗肿瘤的研究。

上海市科委自然科学基金资助项目, No. 08ZR1419600

上海市教委重点研究基金资助项目, No. 08ZZ123

作者贡献分布: 此课题由刘安文与张树辉设计; 研究过程由蔡婧与赵向丽操作完成; 数据分析由张树辉完成; 本论文写作由蔡婧与张树辉完成。

通讯作者: 刘安文, 副教授, 330006, 江西省南昌市, 南昌大学第二附属医院肿瘤科, awliu666@163.com

收稿日期: 2009-12-14 修回日期: 2010-01-15

接受日期: 2010-01-19 在线出版日期: 2010-02-28

Apigenin inhibits cell growth and alters expression of multiple genes in human hepatoma cell line Huh-7

Jing Cai, An-Wen Liu, Xiang-Li Zhao, Shu-Hui Zhang

Jing Cai, An-Wen Liu, Department of Oncology, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China

Xiang-Li Zhao, Shu-Hui Zhang, Department of Pathology, the Yueyang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200437, China

Supported by: the Shanghai Municipal Natural Science Foundation, No. 08ZR1419600; and the Key Research Foundation of Shanghai Municipal Education Commission, No. 08ZZ123

Correspondence to: Associate Professor An-Wen Liu, Department of Oncology, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China. awliu666@163.com

Received: 2009-12-14 Revised: 2010-01-15

Accepted: 2010-01-19 Published online: 2010-02-28

Abstract

AIM: To investigate the effects of apigenin on cell growth and gene expression in human hepatoma cell line Huh-7.

METHODS: After Huh-7 cells was cultured and treated with different concentrations of apigenin, cell proliferation was measured by colorimetric methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay; cell clonogenicity was detected by colony-forming assay; and cell cycle distribution and apoptosis were examined by flow cytometry. The impact of apigenin on the tumorigenicity of Huh-7 cells in nude mice was also detected. The

differential gene expression between cells treated and untreated with apigenin was detected by cDNA microarray and verified by quantitative real-time reverse transcription-polymerase chain reaction and Western blot.

RESULTS: Compared with untreated cells, cells treated with apigenin exhibited a marked growth inhibition. The half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) of apigenin on cell growth was approximately $10.5 \text{ mg/L} \pm 0.3 \text{ mg/L}$. Apigenin treatment could cause a cell cycle block at G_2/M phase, decrease the percentage of cells at G_0/G_1 phase, promote apoptosis, and inhibit the tumorigenicity of Huh-7 cells *in vivo*. Apigenin treatment could also dramatically alter the expression of 1764 functionally related genes in Huh-7 cells. Of these differentially expressed genes, the majority are involved in nucleic acid binding and transport, enzyme catalytic activity regulation, transcriptional regulation, cytoskeletal structure and/or adhesion, signal transduction, metabolism, apoptosis or the immune response. Of note, apigenin could significantly downregulate the expression of interleukin-4 receptor and ubiquitin-specific protease 18.

CONCLUSION: Apigenin partially inhibits Huh-7 cell growth *in vitro* and *in vivo* by blocking cell cycle at G_2/M phase and promoting apoptosis. Apigenin treatment alters the expression of multiple genes in Huh-7 cells.

Key Words: Apigenin; Huh-7 cell; Hepatoma cell; Interleukin-4 receptor; Ubiquitin-specific protease 18; cDNA microarray

Cai J, Liu AW, Zhao XL, Zhang SH. Apigenin inhibits cell growth and alters expression of multiple genes in human hepatoma cell line Huh-7. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(6): 542-549

摘要

目的: 探讨芹菜素(apigenin)对Huh-7肝癌细胞生长及基因表达的影响。

方法: 采用四甲基偶氮唑蓝(MTT)比色法、平板克隆形成实验、流式细胞术分别检测芹

■同行评议者

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

芹菜素对Huh-7细胞增殖、克隆形成、周期及凋亡的影响;通过动物模型观察芹菜素对裸鼠人肝癌Huh-7移植瘤肿瘤质量及体积的影响;采用基因芯片技术检测芹菜素作用前后Huh-7细胞全基因组序列,分析其基因表达差异;采用qRT-PCR、Western blot技术验证基因芯片结果。

结果:与对照组相比,不同浓度的芹菜素(5、10、20 mg/L)处理Huh-7细胞后,芹菜素对Huh-7细胞的生长有显著的抑制作用($IC_{50} = 10.5 \text{ mg/L} \pm 0.3 \text{ mg/L}$)。细胞周期阻滞于 G_2/M 期、降低 G_0-G_1 期细胞的比例、并促进细胞凋亡和抑制移植瘤的生长。全基因芯片发现芹菜素可改变Huh-7细胞中1 764个功能性基因的表达。在这些差异表达的基因中,大多数与核酸结合、转运、接触和酶调节活性、转录调节、细胞骨架结构和黏附、信号转导、代谢、凋亡以及免疫反应等有关。其中最重要的发现是芹菜素显著下调IL-4R和USP18基因表达,qRT-PCR、Western blot检测结果与芯片结果相符。

结论:芹菜素可能通过阻滞细胞周期于 G_2/M 期并诱导细胞凋亡从而抑制体内体外Huh-7细胞的生长,并影响多种基因的表达。

关键词: 芹菜素; Huh-7; 肝癌细胞; 白介素4受体; USP18; cDNA芯片

蔡婧, 刘安文, 赵向丽, 张树辉. 芹菜素对肝癌细胞生长及基因表达的影响. 世界华人消化杂志 2010; 18(6): 542-549
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/542.asp>

0 引言

近年来,膳食中提取的天然抗癌药物的研究主要集中在通过诱导凋亡而导致癌细胞选择性和持久性的清除。黄酮类化合物是一种具有多种生物活性的植物膳食成分,它具有预防多种癌症的潜能^[1,2]。芹菜素是天然存在的一种黄酮类化合物,广泛存在于多种水果、蔬菜(包括芹菜)、橘子、茶叶、小麦芽和一些调味品中,作为一种健康的食物成分被证明具有抗炎、抗癌和清除自由基的能力^[3,4]。近年,许多研究表明芹菜素通过P53依赖途径诱导细胞周期阻滞以及诱导凋亡而具有对多种人类癌细胞特有的毒性作用,包括乳腺癌、结肠癌、肺癌、皮肤癌和前列腺癌^[4-17]。研究证实,芹菜素通过诱导凋亡及诱导细胞周期阻滞于 G_2/M 期而抑制肝癌细胞的生长^[4,16,17]。芹菜素抗癌作用的分子

机制包括:增加Bax/Bcl-2的比例而诱导凋亡,或者通过其他分子机制包括上调DR5、调节IGF-1/IGF-1R信号、FAK/Src信号、 β -catenin信号、P38-MAPK、PI-3K/AKT和ERK信号途径等^[7,14,15,18-23]。然而,这种化合物对肝癌细胞抑制作用的具体分子机制至今仍未完全清楚。本研究验证芹菜素的抗肝癌活性,并进一步阐述其细胞毒性的分子机制。

1 材料和方法

1.1 材料 DMEM培养基、胰酶及胎牛血清(FBS)购自Gibco公司。芹菜素、二甲基亚砜(DMSO)、MTT、碘化丙啶(PI)、Rnase购自Sigma公司。细胞凋亡检测试剂盒购自北京凯基生物有限公司。IL-4R抗体及Western blot试剂盒购自Santa公司,USP18、SLC27A3、CCR2抗体分别购自LifeSpan、Novus和Abcam公司。实验前,芹菜素用DMSO溶解,培养基稀释,DMSO终浓度 $\leq 0.1\%$ 。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: Huh-7细胞购自上海中科院细胞研究所,细胞接种于DMEM培养基中(含100 mL/L FBS),置于37℃,饱和湿度,50 mL/L CO_2 培养箱中,2-3 d传代1次,取对数生长期细胞用于实验。

1.2.2 增殖抑制实验: Huh-7细胞接种于96孔板,每孔加入100 μ L(每孔接种细胞数约 8×10^3 个),待细胞贴壁后吸出培养液,加入终浓度为5、10、20 mg/L的芹菜素,阴性对照加0.1% DMSO,将接种并开始贴壁生长的当天设为0 d,连续观察6 d,每组设3个复孔,实验重复3次。加入MTT测光吸收值,绘制各组细胞生长曲线^[24]。细胞增殖抑制率(%) = $(1 - \text{实验组平均} A_{490} / \text{对照组平均} A_{490}) \times 100\%$ 。 IC_{50} 值代表能产生50%增殖抑制率时的药物浓度。

1.2.3 平板克隆形成实验: 终浓度为5、10、20 mg/L芹菜素处理的及对照组Huh-7细胞按每孔2 000个细胞接种于六孔板,每组3个复孔,培养10-15 d,甲醇固定后姬姆萨染液染色10-30 min,显微镜下计算克隆形成数(克隆形成率 = 克隆数/接种细胞数 $\times 100\%$),实验重复3次。

1.2.4 流式细胞术检测细胞周期分布: 终浓度为5、10、20 mg/L芹菜素作用48 h后收集细胞,离心,700 mL/L乙醇固定后PI染色,用流式细胞仪(FACSCAN, USA)测定细胞周期分布^[24],以0.1% DMSO为对照组,每组3个复孔,实验重复3次。

1.2.5 Annexin V-FITC/PI染色流式细胞仪检测细

■ 研究前沿

研究报告,芹菜素通过诱导凋亡及诱导细胞周期阻滞于 G_2/M 期而抑制肝癌细胞的生长。然而,这种化合物对肝癌细胞抑制作用的具体分子机制至今仍未完全清楚。

■相关报道

有关研究提出芹菜素抗癌作用的分子机制包括:增加Bax/Bcl-2的比例而诱导凋亡,或者通过其他分子机制包括上调DR5、调节IGF-1/IGF-1R信号、FAK/Src信号、 β -catenin信号、P38MAPK、PI-3K/AKT和ERK信号途径等。

表 1 芹菜素对Huh-7肝癌细胞周期和细胞凋亡的影响 ($n = 3$)

分组	细胞分布 (%)			凋亡指数
	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	
对照组	45.45 ± 5.11	32.45 ± 2.11	22.10 ± 3.07	4.42 ± 1.33
芹菜素(5 mg/L)	25.20 ± 3.76 ^b	33.51 ± 5.66	41.30 ± 1.90 ^b	11.92 ± 3.03 ^a
芹菜素(10 mg/L)	23.50 ± 2.53 ^b	28.68 ± 5.09	47.82 ± 2.58 ^b	16.50 ± 3.86 ^b
芹菜素(20 mg/L)	9.36 ± 3.35 ^b	29.17 ± 1.79	61.47 ± 5.10 ^b	22.34 ± 5.96 ^b

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 对照组.

胞凋亡: 终浓度为5、10、20 mg/L芹菜素作用48 h后收集细胞, 离心, Annexin V-FITC/PI染色后, 用流式细胞仪检测细胞凋亡率, 以0.1% DMSO为对照组, 每组3个复孔, 实验重复3次.

1.2.6 裸鼠移植瘤实验: BALB/c裸鼠购自上海实验动物中心, 经随机分组, 实验组和对照组各4只裸鼠. 在同一部位皮下注射 2×10^6 个培养的Huh-7细胞, 2 d后实验组裸鼠腹膜内给以芹菜素50 $\mu\text{g/d}$ ^[22], 对照组给以0.1% DMSO. 30 d后, 取出肿瘤比较质量及体积并在显微镜下观察其病理学变化.

1.2.7 cDNA基因芯片分析: 终浓度为10 mg/L芹菜素(实验组)及0.1% DMSO(对照组)作用48 h后, TRIzol法提取总RNA, 进行Agilent人全基因组芯片检测(Agilent人全基因组芯片含有41 000个基因, 操作步骤见文献[25]. 实验由上海康成生物科技有限公司协助完成, Ratio值为0.5-2.0的基因不存在显著的表达差异, 而在该范围之外的基因则被认为表达出现显著改变. 实验重复3次.

1.2.8 Real-time定量RT-PCR(qPCR): 将10 mg/L芹菜素作用48 h后及对照组的细胞TRIzol法抽提RNA, 然后逆转录成cDNA, 按SYBR-荧光定量检测试剂盒说明书配成反应体系进行PCR扩增, 用于qPCR的基因包括SLC27A3, FATP-3, OVOL1, CCR2, ECT2, IL4Ra, USP18, SLC10A2, HIP1R, NUP35, GAPDH作为内对照. 反应条件为: 95 °C预变性10 min, 然后95 °C变性5 s, 60 °C退火34 s, 共40个循环. 实验重复3次. 结果由厂家自带的应用软件系统进行分析.

1.2.9 Western blot检测^[26]: 终浓度为5、10、20 mg/L芹菜素作用Huh-7细胞后48 h后收集细胞, 将其溶解于含10 mmol/L Tris(pH7.4), 1% SDS, 1 mmol/L原钒酸钠及蛋白酶抑制剂的蛋白提取液中, 利用Klose法提取. 取50 μg 总蛋白上样, SDS-PAGE电泳分离, 转膜, 分别孵育一抗, IL4R α (sc-28361, 1 : 500), USP18(LS-B1182-50,

1 : 1 000), SLC27A3(H00011000-A01, 1 : 1 000), CCR2(ab32144, 1 : 500)及GAPDH (sc-47724, 1 : 2 000). 实验重复3次. 条带密度用Fluor-S MultiImager and Quantity-One软件分析.

统计学处理 采用SPSS13.0统计软件进行统计分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有显著性.

2 结果

2.1 芹菜素可显著抑制Huh-7细胞的生长 从生长曲线可以看出, 不同浓度的芹菜素(5、10、20 mg/L)处理Huh-7细胞后, 芹菜素对Huh-7细胞的生长有显著的抑制作用($\text{IC}_{50} = 10.5 \text{ mg/L} \pm 0.3 \text{ mg/L}$)(图1), 各组间差异具有统计学意义($P < 0.05$). 同样, 从平板克隆实验结果看出, 不同浓度芹菜素(5、10、20 mg/L)处理Huh-7细胞的克隆形成率分别为 $33.67\% \pm 6.51\%$, $24.33\% \pm 6.51\%$ 和 $17.33\% \pm 6.66\%$, 与对照组($72.33\% \pm 15.82\%$)相比差异具有显著性($P < 0.001$, 图2).

2.2 芹菜素阻滞细胞周期于G₂/M期并诱导细胞凋亡 与不加药组相比, 不同浓度芹菜素(5、10、20 mg/L)处理Huh-7细胞48 h后, 细胞周期的分布均发生改变, 主要表现在G₀/G₁期细胞减少, 细胞周期阻滞于G₂/M期, 各组间的差异具有显著性($P < 0.05$, 图3, 表1), 同时还可可见芹菜素处理Huh-7细胞后, 细胞周期分布出现明显的亚二倍体峰. 通过凋亡检测实验进一步证实芹菜素可诱导细胞凋亡, 各组间差异具有统计学意义($P < 0.05$, 图4, 表1).

2.3 芹菜素抑制Huh-7细胞在裸鼠中的致瘤性 芹菜素处理的裸鼠肿块体积明显较未用芹菜素处理的小($P < 0.05$, 图5A, B), HE染色, 显微镜下观察发现芹菜素未处理的裸鼠肿块组织中可见弥漫的小梁、显著的异型性及较强的核分裂(图5C), 而芹菜素处理组裸鼠肿块组织则可见明显的坏死(图5D).

2.4 基因芯片检测结果 全基因组芯片检测显示,

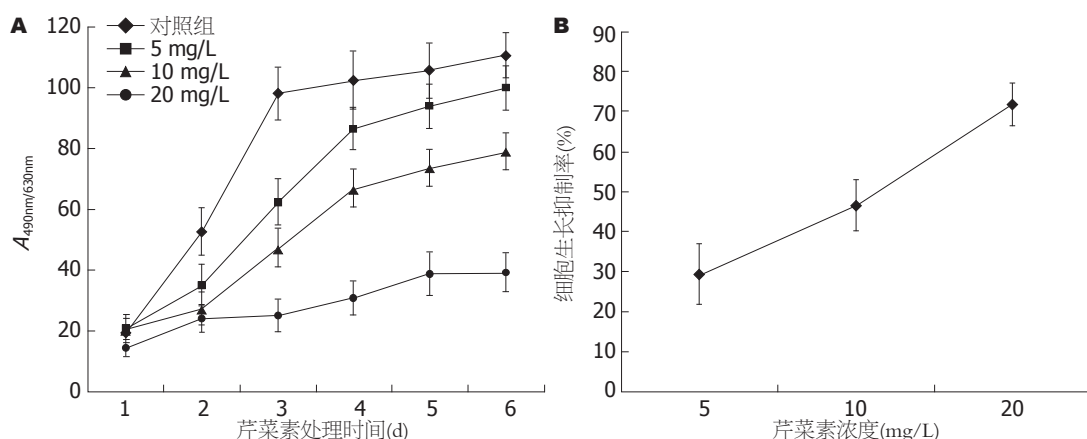


图1 不同浓度芹菜素对Huh-7细胞生长的影响. A: MTT法; B: IC₅₀值; $n = 3$.

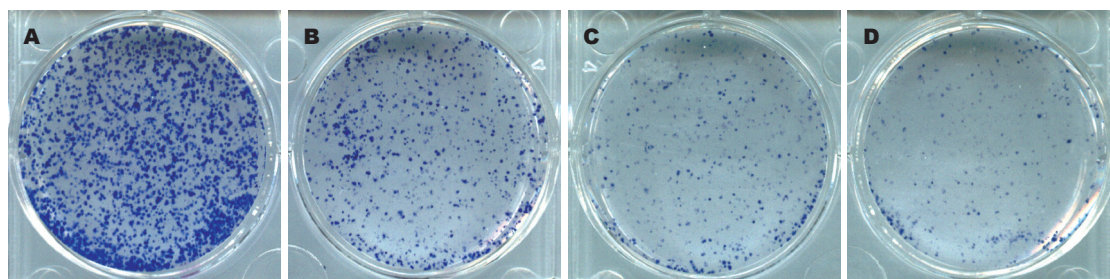


图2 不同浓度芹菜素对Huh-7细胞平板克隆形成的影响. A: 对照组(0.1% DMSO); B: 5 mg/L芹菜素; C: 10 mg/L芹菜素; D: 20 mg/L芹菜素.

在41 000个基因中, 1 764个基因的表达发生改变. 其中1 336基因显示上调(≥ 2 倍), 428个基因显示下调表达(≤ 0.5 倍). 在这些基因中大多数属于核酸结合、转运、接触反应或酶调节活性、转录调节、细胞骨架结构或黏附、信号转导、代谢、凋亡以及免疫反应相关基因. 此外, 我们意外地发现了免疫反应相关基因IL-4R下调了5.21倍, 以及与泛素依赖性蛋白分解代谢相关基因USP18下调了5.03倍. 本研究还发现了一些与代谢(SLC27A3, P4HB), 转录(OVOL1, OTP), 细胞信号转导(ECT2, MAPK1IP1L, BMPR1A, AMFR), 细胞运动(AMFR), 生物学过程(HIP1R), 转运(NUP35, SLC10A2), 炎症反应(CCR2), 肿瘤抑制(ZDHHC2), 糖分解代谢(GLDC)等相关的基因表达差异.

2.5 qPCR、Western blot验证 选择了10个显著差异的基因进行qPCR验证, 结果与基因芯片分析的结果是一致的, 其中IL4R, USP18, SLC27A3和CCR2的mRNA存在显著差异($P < 0.05$, 图6). 随后用Western blot对4个基因的蛋白表达也验证这一差异($P < 0.05$, 图7). 结果显示, 10 mg/L芹菜素处理后Huh-7细胞中IL4R, USP18, SLC27A3和CCR2基因mRNA及蛋白水平的表达较对照组

均有显著性差异($P < 0.05$, 图7).

3 讨论

在本研究中, 我们首先验证了芹菜素通过阻滞细胞周期于G₂/M期、降低G₀/G₁期细胞比例, 诱导细胞凋亡而抑制体内体外肿瘤细胞生长的作用. 同时, 我们还发现了芹菜素可显著改变Huh-7细胞中的多种基因的表达. 在这些基因中大多数属于核酸结合、转运、接触反应或酶调节活性、转录调节、细胞骨架结构或黏附、信号转导、代谢、凋亡以及免疫反应相关基因. 其中最重要发现是, 芹菜素处理后免疫反应相关基因IL-4R的表达下调了5.21倍, 泛素特异性蛋白酶USP18基因下调了5.03倍. 通过qPCR和Western blot检测, 进一步证实这2个基因在RNA及蛋白水平的表达与芯片检测结果一致.

目前已有研究表明IL-4R在多种肿瘤细胞中过度表达, 包括神经胶质瘤、肺癌、卵巢癌、结直肠癌和头颈部肿瘤. 并且研究证实了由IL-4和假单胞菌外毒素的突变形式融合构成的一种IL-4R靶向细胞毒素对脑部肿瘤、胆囊癌、卵巢癌、脑膜间皮瘤、鳞状细胞癌及乳腺癌的抑制作用^[27,28]. 在肿瘤的发生过程中, IL-4R可激

■创新盘点

目前国内外关于芹菜素影响肝癌细胞生长的研究较少. 本研究观察芹菜素对Huh-7肝癌细胞生长及基因表达的影响, 证实了芹菜素的抗肝癌活性, 并初步探究其细胞毒性的分子机制.

应用要点

本研究芹菜素抑制肝癌细胞生长的作用及其分子机制,为研发新的天然、高效的临床抗肝癌药物以及寻找新的抗肝癌分子靶点提供了一定的理论依据。

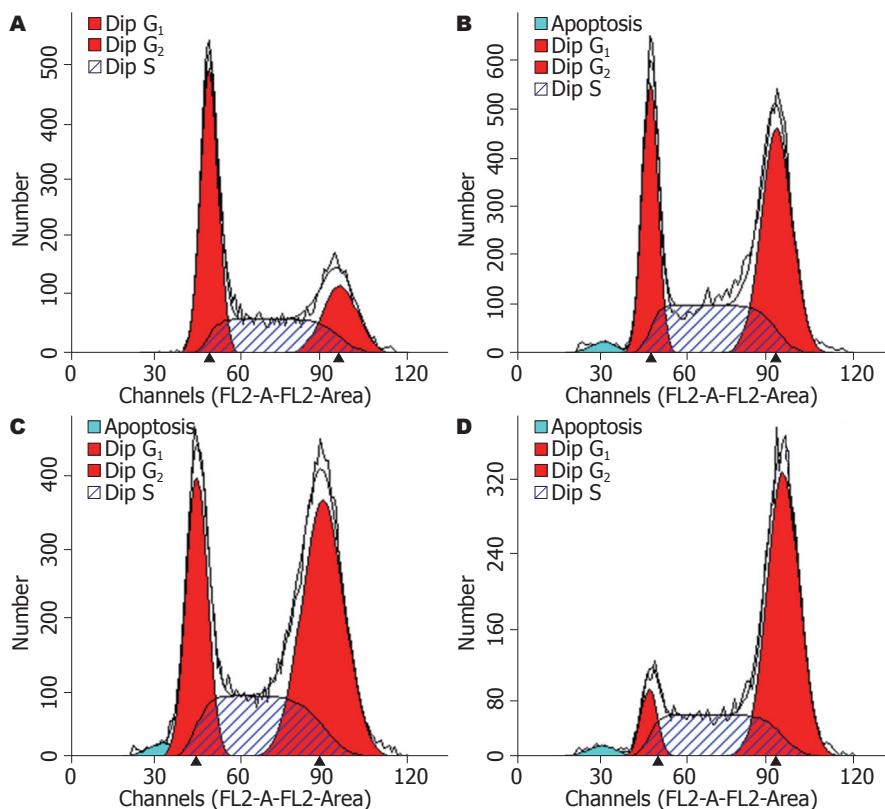


图 3 不同浓度芹菜素对Huh-7细胞周期分布的影响. A: 对照组(0.1% DMSO); B: 5 mg/L芹菜素; C: 10 mg/L芹菜素; D: 20 mg/L芹菜素。

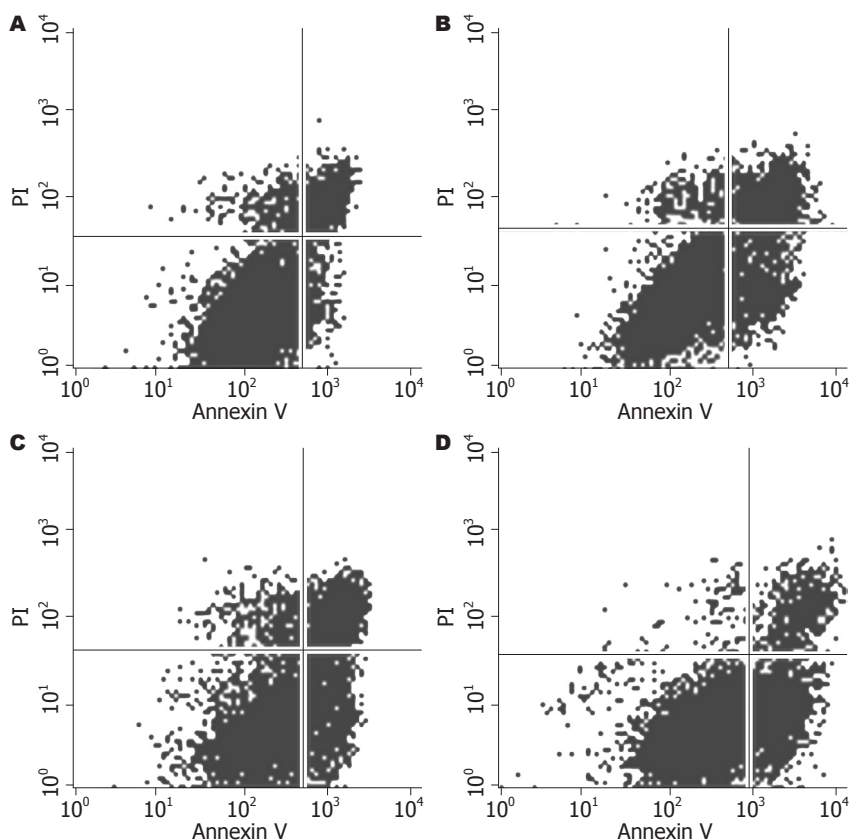


图 4 不同浓度芹菜素对Huh-7细胞凋亡的影响. A: 对照组(0.1% DMSO); B: 5 mg/L芹菜素; C: 10 mg/L芹菜素; D: 20 mg/L芹菜素。

活多种信号途径,包括P38MAPK、PI3K/AKT和JAK-STAT信号途径^[29]。而芹菜素被证明可通过多条信号途径抑制细胞增殖、诱导细胞凋亡^[7,14,15,20-23],这提示芹菜素可能通过IL-4R信号

途径抑制肝癌细胞的生长^[27,30]。

USP18基因编码一种泛素类蛋白酶UBP43,后者是一种I型干扰素诱导基因,他可通过JAK/STAT途径,在INF- β 处理的肿瘤细胞中上调而发

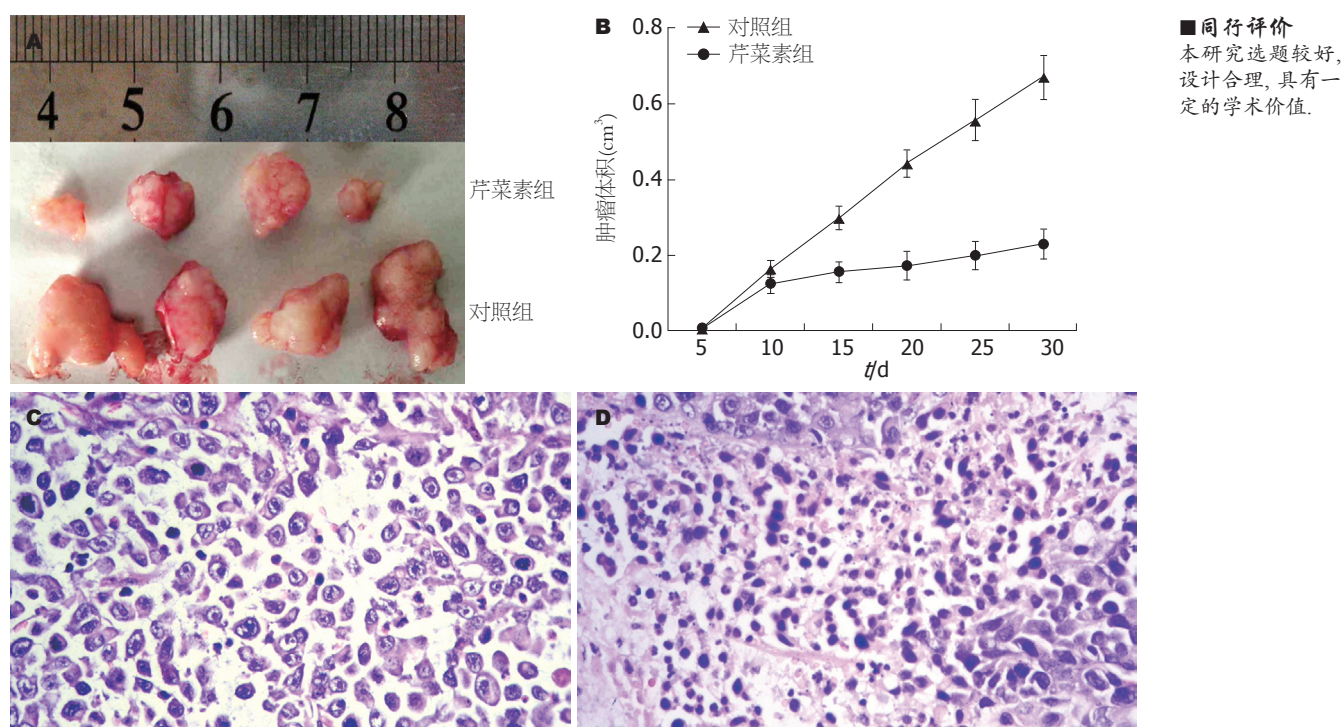


图 5 芹菜素(50 µg/d)对裸鼠人肝癌Huh-7移植瘤生长的影响. A: 移植瘤体积; B: 肿瘤生长曲线($n = 4$); C: 对照组(0.1% DMSO); D: 50 µg/d芹菜素组.

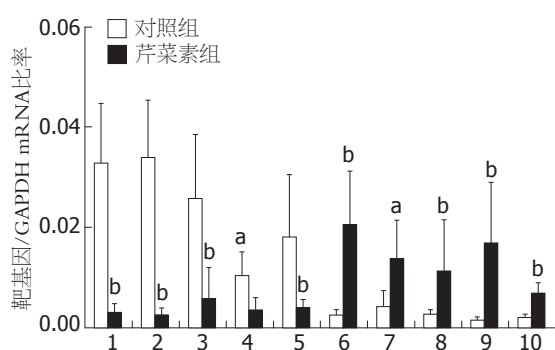


图 6 qRT-PCR检测基因RNA水平的表达. 1: IL4Ra; 2: USP18; 3: SLC10A2; 4: HIP1R; 5: NUP35; 6: SLC27A3; 7: FATP-3; 8: OVOL1; 9: ECT2; 10: CCR2; $n = 3$, $^aP < 0.05$, $^bP < 0.01$ vs 对照组.

挥抑制肿瘤细胞增殖及分化的作用^[31-33]. Duex等^[34]在鳞状上皮细胞癌的研究中发现USP18可通过上调EGFR的表达促进肿瘤的进展. 另有研究提出, UBP43表达的降低可增加机体清除HBV病毒的能力, 小鼠中UBP43基因的敲除可表现出抑制HBV、细菌感染及恶性转化的能力^[35]. 这些结果为芹菜素抗肿瘤及抗病毒的作用提出了新的证据.

除此之外, 芹菜素处理后, 一些代谢(SLC27A3, P4HB), 转录(OVOL1, OTP), 细胞信号转导(ECT2, MAPK1IP1L, BMPR1A, AMFR), 细胞运动(AMFR), 生物学过程(HIP1R), 转运

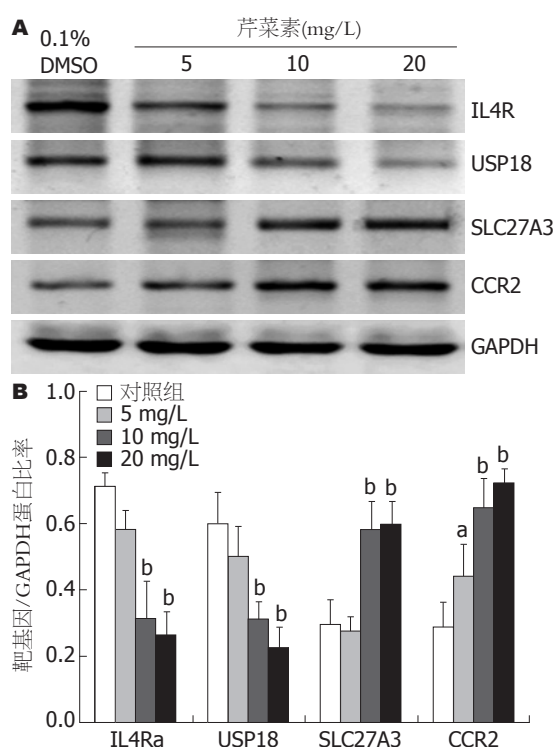


图 7 Western blot检测基因蛋白水平的表达. A: Western blot电泳; B: 电泳定量分析; $n = 3$, $^aP < 0.05$, $^bP < 0.01$ vs 对照组.

(NUP35, SLC10A2), 炎症反应(CCR2), 肿瘤抑制(ZDHHC2), 糖分解代谢(GLDC)等相关的基因表达也发生了显著的改变, 我们还发现了一个探针名称为A_32_P100452的基因上调了近6倍, 但

是他的功能目前还并不清楚. 对于以上这些基因在芹菜素抗肿瘤作用都有待进一步深入研究.

本研究表明芹菜素通过阻滞细胞周期于G₂/M期和增加细胞凋亡抑制Huh-7细胞的生长, 并调节多种基因的表达, 首次报道芹菜素可下调IL-4R以及USP18的表达. 本研究结果为芹菜素抑制肝癌细胞的机制提出了新的研究思路, 膳食中的黄酮类化合物可能成为预防及治疗肿瘤(例如肝癌)的一种有效药物.

4 参考文献

- Salmela AL, Pouwels J, Varis A, Kukkonen AM, Toivonen P, Halonen PK, Perälä M, Kallioniemi O, Gorbsky GJ, Kallio MJ. Dietary flavonoid fisetin induces a forced exit from mitosis by targeting the mitotic spindle checkpoint. *Carcinogenesis* 2009; 30: 1032-1040
- Khan N, Asim M, Afaq F, Abu Zaid M, Mukhtar H. A novel dietary flavonoid fisetin inhibits androgen receptor signaling and tumor growth in athymic nude mice. *Cancer Res* 2008; 68: 8555-8563
- Zheng PW, Chiang LC, Lin CC. Apigenin induced apoptosis through p53-dependent pathway in human cervical carcinoma cells. *Life Sci* 2005; 76: 1367-1379
- Khan TH, Sultana S. Apigenin induces apoptosis in Hep G2 cells: possible role of TNF-alpha and IFN-gamma. *Toxicology* 2006; 217: 206-212
- Siddique YH, Beg T, Afzal M. Antigenotoxic effect of apigenin against anti-cancerous drugs. *Toxicol In Vitro* 2008; 22: 625-631
- Karmakar S, Davis KA, Choudhury SR, Deconda A, Banik NL, Ray SK. Bcl-2 inhibitor and apigenin worked synergistically in human malignant neuroblastoma cell lines and increased apoptosis with activation of extrinsic and intrinsic pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 388: 705-710
- Lee WJ, Chen WK, Wang CJ, Lin WL, Tseng TH. Apigenin inhibits HGF-promoted invasive growth and metastasis involving blocking PI3K/Akt pathway and beta 4 integrin function in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 2008; 226: 178-191
- Choi EJ, Kim GH. Apigenin causes G₂/M arrest associated with the modulation of p21(Cip1) and Cdc2 and activates p53-dependent apoptosis pathway in human breast cancer SK-BR-3 cells. *J Nutr Biochem* 2009; 20: 285-290
- Zhang Q, Zhao XH, Wang ZJ. Cytotoxicity of flavones and flavonols to a human esophageal squamous cell carcinoma cell line (KYSE-510) by induction of G₂/M arrest and apoptosis. *Toxicol In Vitro* 2009; 23: 797-807
- Au A, Li B, Wang W, Roy H, Koehler K, Birt D. Effect of dietary apigenin on colonic ornithine decarboxylase activity, aberrant crypt foci formation, and tumorigenesis in different experimental models. *Nutr Cancer* 2006; 54: 243-251
- Chung CS, Jiang Y, Cheng D, Birt DF. Impact of adenomatous polyposis coli (APC) tumor suppressor gene in human colon cancer cell lines on cell cycle arrest by apigenin. *Mol Carcinog* 2007; 46: 773-782
- Kachadourian R, Day BJ. Flavonoid-induced glutathione depletion: potential implications for cancer treatment. *Free Radic Biol Med* 2006; 41: 65-76
- Liu LZ, Fang J, Zhou Q, Hu X, Shi X, Jiang BH. Apigenin inhibits expression of vascular endothelial growth factor and angiogenesis in human lung cancer cells: implication of chemoprevention of lung cancer. *Mol Pharmacol* 2005; 68: 635-643
- Franzen CA, Amargo E, Todorović V, Desai BV, Huda S, Mirzoeva S, Chiu K, Grzybowski BA, Chew TL, Green KJ, Pelling JC. The chemopreventive bioflavonoid apigenin inhibits prostate cancer cell motility through the focal adhesion kinase/Src signaling mechanism. *Cancer Prev Res (Phila Pa)* 2009; 2: 830-841
- Shukla S, Gupta S. Apigenin suppresses insulin-like growth factor I receptor signaling in human prostate cancer: an in vitro and in vivo study. *Mol Carcinog* 2009; 48: 243-252
- Chiang LC, Ng LT, Lin IC, Kuo PL, Lin CC. Anti-proliferative effect of apigenin and its apoptotic induction in human Hep G2 cells. *Cancer Lett* 2006; 237: 207-214
- Choi SI, Jeong CS, Cho SY, Lee YS. Mechanism of apoptosis induced by apigenin in HepG2 human hepatoma cells: involvement of reactive oxygen species generated by NADPH oxidase. *Arch Pharm Res* 2007; 30: 1328-1335
- Gupta S, Afaq F, Mukhtar H. Involvement of nuclear factor-kappa B, Bax and Bcl-2 in induction of cell cycle arrest and apoptosis by apigenin in human prostate carcinoma cells. *Oncogene* 2002; 21: 3727-3738
- Shukla S, Mishra A, Fu P, MacLennan GT, Resnick MI, Gupta S. Up-regulation of insulin-like growth factor binding protein-3 by apigenin leads to growth inhibition and apoptosis of 22Rv1 xenograft in athymic nude mice. *FASEB J* 2005; 19: 2042-2044
- Hu XW, Meng D, Fang J. Apigenin inhibited migration and invasion of human ovarian cancer A2780 cells through focal adhesion kinase. *Carcinogenesis* 2008; 29: 2369-2376
- Shukla S, MacLennan GT, Flask CA, Fu P, Mishra A, Resnick MI, Gupta S. Blockade of beta-catenin signaling by plant flavonoid apigenin suppresses prostate carcinogenesis in TRAMP mice. *Cancer Res* 2007; 67: 6925-6935
- Kaur P, Shukla S, Gupta S. Plant flavonoid apigenin inactivates Akt to trigger apoptosis in human prostate cancer: an in vitro and in vivo study. *Carcinogenesis* 2008; 29: 2210-2217
- Shukla S, Gupta S. Apigenin-induced cell cycle arrest is mediated by modulation of MAPK, PI3K-Akt, and loss of cyclin D1 associated retinoblastoma dephosphorylation in human prostate cancer cells. *Cell Cycle* 2007; 6: 1102-1114
- 张红燕, 李珊珊, 洋孙, 王新华, 阎爱华, 王小军. TGF-β1反义寡核苷酸对食管鳞癌细胞EC9706增殖及凋亡的影响. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 3480-3485
- Agilent technologies. SurePrint technology. Agilent Home, 2008-10, cited 2010-02. Available from: <http://www.chem.agilent.com/en-US/products/instruments/dnamicarrays/pages/gp557.aspx>
- 马俊芬, 江亚南, 赵继敏, 黄幼田, 赵明耀, 董子明. 曲古菌素A对食管癌EC1细胞增殖和细胞周期的影响及其分子机制. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 3534-3537
- Kioi M, Takahashi S, Kawakami M, Kawakami K, Kreitman RJ, Puri RK. Expression and targeting of interleukin-4 receptor for primary and advanced

- ovarian cancer therapy. *Cancer Res* 2005; 65: 8388-8396
- 28 Li Z, Jiang J, Wang Z, Zhang J, Xiao M, Wang C, Lu Y, Qin Z. Endogenous interleukin-4 promotes tumor development by increasing tumor cell resistance to apoptosis. *Cancer Res* 2008; 68: 8687-8694
- 29 Puri S, Puri S, Mahapatra AK, Hussain E, Sarkar C, Sinha S, Joshi BH. A review of studies on targeting interleukin 4 receptor for central nervous system malignancy. *Curr Mol Med* 2009; 9: 732-739
- 30 Todaro M, Lombardo Y, Francipane MG, Alea MP, Cammareri P, Iovino F, Di Stefano AB, Di Bernardo C, Agrusa A, Condorelli G, Walczak H, Stassi G. Apoptosis resistance in epithelial tumors is mediated by tumor-cell-derived interleukin-4. *Cell Death Differ* 2008; 15: 762-772
- 31 Zou W, Kim JH, Handidu A, Li X, Kim KI, Yan M, Li J, Zhang DE. Microarray analysis reveals that Type I interferon strongly increases the expression of immune-response related genes in Ubp43 (Usp18) deficient macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 356: 193-199
- 32 Sarasin-Filipowicz M, Wang X, Yan M, Duong FH, Poli V, Hilton DJ, Zhang DE, Heim MH. Alpha interferon induces long-lasting refractoriness of JAK-STAT signaling in the mouse liver through induction of USP18/UBP43. *Mol Cell Biol* 2009; 29: 4841-4851
- 33 Randall G, Chen L, Panis M, Fischer AK, Lindenbach BD, Sun J, Heathcote J, Rice CM, Edwards AM, McGilvray ID. Silencing of USP18 potentiates the antiviral activity of interferon against hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* 2006; 131: 1584-1591
- 34 Duex JE, Sorkin A. RNA interference screen identifies Usp18 as a regulator of epidermal growth factor receptor synthesis. *Mol Biol Cell* 2009; 20: 1833-1844
- 35 Kim JH, Luo JK, Zhang DE. The level of hepatitis B virus replication is not affected by protein ISG15 modification but is reduced by inhibition of UBP43 (USP18) expression. *J Immunol* 2008; 181: 6467-6472

编辑 李军亮 电编 何基才

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》入选《中国学术期刊评价研究报告—RCCSE 权威、核心期刊排行榜与指南》

本刊讯 《中国学术期刊评价研究报告-RCCSE权威、核心期刊排行榜与指南》由中国科学评价研究中心、武汉大学图书馆和信息管理学院联合研发,采用定量评价和定性分析相结合的方法,对我国万种期刊大致浏览、反复比较和分析研究,得出了65个学术期刊排行榜,其中《世界华人消化杂志》位居396种临床医学类期刊第45位。(编辑部主任:李军亮 2010-01-08)

硫氧还蛋白-1在急性坏死性胰腺炎大鼠肺组织中的表达及褪黑素干预的影响

牛桂军, 唐国都, 梁志海, 钟卫一, 黄文福

■背景资料

急性坏死性胰腺炎临床上又称之为重症急性胰腺炎, 病情发展快、病死率高, 急性胰腺炎相关性肺损伤是其胰外损伤中重要的并发症, 可出现ARDS和呼吸衰竭。氧化应激在该病发病中起着重要作用。

牛桂军, 唐国都, 梁志海, 钟卫一, 黄文福, 广西医科大学第一附属医院消化内科 广西壮族自治区南宁市 530021

牛桂军, 广西壮族自治区南溪山医院消化内科 广西壮族自治区桂林市 541002

牛桂军, 副主任医师, 副教授, 硕士, 主要从事消化内科和内镜临床工作。

广西自然科学基金资助项目, No. 桂科自0728107

作者贡献分布: 此课题由唐国都、梁志海及牛桂军设计; 研究过程由唐国都指导, 牛桂军、钟卫一及黄文福完成; 数据分析和论文写作由牛桂军与唐国都完成。

通讯作者: 唐国都, 主任医师, 教授, 博士生导师, 530021, 广西壮族自治区南宁市双拥路6号, 广西医科大学第一附属医院消化内科. tguodu02@yahoo.com.cn

电话: 0771-5356501 传真: 0771-5356501

收稿日期: 2009-11-20 修回日期: 2010-01-03

接受日期: 2010-01-11 在线出版日期: 2010-02-28

Effects of melatonin on Trx-1 expression in the lungs of rats with acute necrotizing pancreatitis

Gui-Jun Niu, Guo-Du Tang, Zhi-Hai Liang, Wei-Yi Zhong, Wen-Fu Huang

Gui-Jun Niu, Guo-Du Tang, Zhi-Hai Liang, Wei-Yi Zhong, Wen-Fu Huang, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Gui-Jun Niu, Department of Gastroenterology, Nanxishan Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Guilin 541002, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Supported by: the Natural Science Foundation of Guangxi, Gui Ke Zi No. 0728107

Correspondence to: Professor Guo-Du Tang, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, 6 Shuangyong Road, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. tguodu02@yahoo.com.cn

Received: 2009-11-20 Revised: 2010-01-03

Accepted: 2010-01-11 Published online: 2010-02-28

Abstract

AIM: To investigate the expression of thioredoxin-1 (Trx-1) in the lungs of rats with *L*-arginine (*L*-Arg)-induced acute necrotizing pancreatitis (ANP) and assess the effects of melatonin on Trx-1 expression.

METHODS: Seventy-two male Sprague-Dawley rats were randomly divided into three groups:

normal control group, model control group and melatonin intervention group. The ANP model group was intraperitoneally injected three times with 6% *L*-Arg at a dose of 25 mL/kg body weight at an interval of 1 h to induce ANP. The normal control group was intraperitoneally injected with equal volumes of normal saline. The melatonin intervention group was injected intraperitoneally with 0.25% melatonin at a dose of 20 mL/kg body weight half an hour before ANP induction. Rats were executed at 6, 12 and 24 hours after last *L*-Arg injection. The expression of Trx-1 in the lungs was detected by immunohistochemistry. The pathological changes in the pancreas and lungs were analyzed and scored according to Kussner's and Lei's criteria, respectively. The contents of serum Trx-1 and amylase were measured.

RESULTS: At 6, 12 and 24 hours after last *L*-Arg injection, the pathological changes in the pancreas and lungs in the model control group were more severe than those in the normal control group (all $P < 0.01$). However, the pathological changes in the pancreas and lungs in the melatonin intervention group were milder than those in the model control group ($P < 0.01$ or 0.05). At 24 hours, the content of serum amylase in the model control group was significantly higher than that in the normal control group ($4\,598\text{ U/L} \pm 2\,274\text{ U/L}$ vs $2\,033\text{ U/L} \pm 863\text{ U/L}$, $P < 0.01$). In contrast, the content of serum amylase in the melatonin intervention group was lower than that in the model control group ($3\,990\text{ U/L} \pm 1\,146\text{ U/L}$ vs $4\,598\text{ U/L} \pm 2\,274\text{ U/L}$, $P < 0.05$). Compared to the normal control group, serum Trx-1 contents in the model control group significantly decreased at 6 and 12 hours but significantly increased at 24 hours. The contents of serum Trx-1 in melatonin intervention group at 6 and 12 hours were significantly higher than those in the model control group.

CONCLUSION: Lung injury is closely related to pancreatic injury in ANP. The expression of Trx-1 in the lungs of rats with ANP increases

■同行评议者

陈其奎, 教授, 中山大学附属第二医院消化内科

significantly. Overexpression of Trx-1 in the lungs is closely associated with the development of ANP and acute pancreatitis-associated lung injury. Melatonin can, to a certain extent, alter the expression of Trx-1 and reduce pancreatic and pulmonary injury in ANP in rats.

Key Words: Acute necrotizing pancreatitis; Acute lung injury; Thioredoxin-1; Melatonin

Niu GJ, Tang GD, Liang ZH, Zhong WY, Huang WF. Effects of melatonin on Trx-1 expression in the lungs of rats with acute necrotizing pancreatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(6): 550-556

摘要

目的: 探讨内源性硫氧还蛋白-1(Trx-1)在急性坏死性胰腺炎(ANP)大鼠模型肺组织中的表达; 观察褪黑素对ANP胰和肺脏的保护作用和对肺组织Trx-1表达的影响。

方法: 将72只SD大鼠随机分成对照组(C组, $n = 24$)、急性胰腺炎组(A组, $n = 24$)、褪黑素前干预组(M组, $n = 24$)。A组用6%的左旋精氨酸(*L*-Arginine, *L*-Arg)腹腔内注射, 每次25 mL/kg体质量, 共3次, 注射间隔1 h, 诱导ANP模型, 在首次注射*L*-Arg前30 min腹腔注射生理盐水20 mL/kg体质量1次; C组同法注射相当于A组各次注射用量的等容积生理盐水; M组在诱导胰腺炎前30 min腹腔内注射0.25%褪黑素(20 mL/kg体质量)干预。在注射完*L*-Arg后的6、12、24 h三个时点分批处死大鼠, 应用免疫组织化学技术检测各组ANP肺组织Trx-1的表达, 并观察各组对应各时点胰腺、肺组织病理学和肺免疫组织化学的改变; 抽取动脉血测定Trx-1和淀粉酶。

结果: A组大鼠胰腺和肺组织病理损伤在6、12、24 h时点比C组明显加重(均 $P < 0.01$); M组胰腺和肺组织病理损伤在6、12、24 h时点较A组明显减轻($P < 0.01$ 或 0.05)。A组、M组肺组织表达Trx-1量在6、12、24 h时点较C组显著升高(均 $P < 0.01$)。在24 h, A组血清淀粉酶较C组显著升高($4\ 598\ \text{U/L} \pm 2\ 274\ \text{U/L}$ vs $2\ 033\ \text{U/L} \pm 863\ \text{U/L}$, $P < 0.01$); M组较A组低($3\ 990\ \text{U/L} \pm 1\ 146\ \text{U/L}$ vs $4\ 598\ \text{U/L} \pm 2\ 274\ \text{U/L}$, $P < 0.05$)。A组大鼠血清Trx-1含量在6、12 h时点显著降低, 24 h时点显著升高, 呈前低后高趋势; 与A组比较, M组血清Trx-1在6、12 h时点显著升高, 24 h时点显著降低, 量的峰值前移。

结论: Trx-1在ANP肺损伤组织中的过度表达与急性胰腺炎相关性肺损伤关系密切。褪黑素影响Trx-1表达, 并可能在一定程度上减轻

ANP的胰、肺组织损伤。

关键词: 急性坏死性胰腺炎; 急性肺损伤; 硫氧还蛋白-1; 褪黑素

牛桂军, 唐国都, 梁志海, 钟卫一, 黄文福. 硫氧还蛋白-1在急性坏死性胰腺炎大鼠肺组织中的表达及褪黑素干预的影响. *世界华人消化杂志* 2010; 18(6): 550-556
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/550.asp>

0 引言

急性坏死性胰腺炎(acute necrotizing pancreatitis ANP)临床上又称之为重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP), 病情发展快、病死率高。急性胰腺炎相关性肺损伤(acute pancreatitis-associated lung injury, APALI)是ANP胰外损伤中重要的并发症, 可出现急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)和呼吸衰竭^[1-3]。氧化应激在APALI中起着重要作用, 硫氧还蛋白-1(thioredoxin-1, Trx-1)作为组织细胞氧化应激的重要指标, 在该病的作用尚不清楚。ANP时, Trx-1在肺等组织的表达情况尚知之甚少; 其表达程度与肺组织损伤程度关系如何目前亦不清楚^[4,5]。褪黑素(melatonin, MT)因其强抗氧化活性近年来也受到关注^[6]。在大剂量左旋精氨酸(*L*-arginine, *L*-Arg)分次腹腔注射诱发的实验性ANP大鼠动物模型中, 肺组织在ANP发展过程中, 其Trx-1表达情况和组织病理炎症程度有无相关改变; 褪黑素对ANP肺组织Trx-1表达和胰脏组织的病理改变的影响国内外罕有报道。本实验拟用大剂量*L*-Arg腹腔注射制备ANP大鼠模型, 研究Trx-1在ANP大鼠模型中肺组织表达情况, 探讨Trx-1与氧化应激在ANP肺损伤的关系; 观察褪黑素对ANP及肺急性损伤的保护作用和对Trx-1表达的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 健康♂SD大鼠72只, 体质量180-250 g。由广西医科大学实验动物中心提供。*L*-Arg和褪黑素购于美国Sigma公司; 一抗: Thioredoxin-1 (C63C6) Rabbit mAb (Cell Signaling); 大鼠Trx-1 ELISA试剂盒由Adlitteram诊断实验室提供。 α -淀粉酶试剂盒(上海执诚生物技术有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 ANP动物模型的制备: 根据谭至柔等^[7]实验方法并加以改进制备ANP大鼠模型: SD大鼠按随机表法分成正常对照组(C组, $n = 24$)、ANP

■ 研发前沿

氧化应激在APALI中起着重要作用, 已经成为该病研究热点。硫氧还蛋白-1作为组织细胞氧化应激的重要指标, 在该病的作用尚不清楚, 在肺等组织的表达情况尚知之甚少; 其表达程度与肺组织损伤程度关系如何目前亦不清楚。褪黑素因其强抗氧化活性近年来也受到关注, 褪黑素对ANP肺组织Trx-1表达国内外罕有报道, 对胰脏组织的病理改变的影响研究有限, 有必要深入研究。

■相关报道

本课题组前期研究证实,在野生鼠实验性ANP中胰腺组织该蛋白表达上调,褪黑素干预可致其表达峰值提前。现进一步深入研究他们在APALI的作用。

组(A组, $n = 24$)、褪黑素前干预组(M组, $n = 24$)。所有大鼠实验前禁食12 h, 自由饮水。A组用6%的L-Arg腹腔内注射, 每次25 mL/kg体质量, 共3次, 注射间隔1 h, 诱导ANP模型。C组大鼠腹腔内注射等量生理盐水。干预组参考Szabolcs等^[6]方法: M组应用0.25%褪黑素(melatonin)(20 mL/kg体质量)在诱导ANP前30 min腹腔注射进行预处理。各组大鼠在末次注射L-Arg后, 于6、12和24 h 3个时点, 每组各处死8只大鼠。从腹主动脉取血在-80 °C保存并留取胰脏组织标本待测。

1.2.2 血清淀粉酶和Trx-1测定: 用EPS速率法, 在日立7170A大型全自动生化仪上检测。(校准品: 英国Randox公司)。Trx-1按ELISA试剂盒说明书操作检测。

1.2.3 提取肺和胰腺组织行组织病理学检查: 将右下肺和胰腺标本完全浸入10%中性甲醛液固定, 用石蜡包埋、切片及HE染色。采用单盲法由病理科医师对大鼠肺组织的病理改变, 在光镜下观察并分别按雷文章等^[8]结合Schmidt等^[9]评分标准进行综合评分; 胰腺组织按Kusser等^[10]评分法进行病理评分。光学显微镜下观察胰腺组织的病理学改变。在每例大鼠肺和胰腺组织中, 随机各取5个视野进行综合评分。

1.2.4 免疫组织化学技术检测肺组织Trx-1表达水平: 采用Elivison二步法检测Trx-1。兔抗鼠多克隆一抗(Thioredoxin 1 Babbit aMb, Cell Signaling公司)工作浓度为1:200, 生物素化抗兔二抗来源于即用型免疫组织化学Elivison plus广谱试剂盒。用PBS替代一抗作阴性对照, 用已知阳性肺癌切片作阳性对照。染色模式: 胞核和/或胞质。

肺组织免疫组织化学评分参照Lu等^[11]采用半定量积分法: 在全片上、下、左、右、中各随机选取一个400倍视野, 观察每个视野中阳性细胞的染色强度及该强度细胞占视野中所有肺细胞的百分率。分级: 按阳性细胞占总细胞数的百分率分4级, I级: 5%-25%; II级: 26%-50%; III级: 51%-75%; IV级: >75%。≥5%作为阳性标准。阳性细胞的染色强度分为4级: 1级: (±); 2级: (+); 3级: (++) ; 4级: (+++)。一个视野的免疫组织化学染色得分 = 该视野中的各种染色强度与该强度阳性细胞的百分率级别的乘积之和。该组织的免疫组织化学染色综合得分 = 5个视野的免疫组织化学染色得分之总和÷5。

统计学处理 采用SPSS13.0统计软件, 各组计量资料以mean±SD表示; 采用重复测量资料

的方差分析方法, 球形性检验, 对不同处理组、不同时间点之间各指标进行统计分析; 采用Spearman等级相关进行分析。检验水准为0.05。

2 结果

2.1 血清淀粉酶水平 A组大鼠血清淀粉酶水平比C组增高, 随着观察时间的延长, 血清淀粉酶含量呈逐渐增加趋势, 在24 h达到高峰。与A组相比, M组血清淀粉酶水平12 h下降。A组和M组24 h较6 h明显升高(表1, 图1C)。

2.2 血清Trx-1的水平 A组大鼠血清Trx-1含量在6、12 h时值显著降低, 24 h时值显著升高, 呈前低后高趋势; 与A组比较, M组血清Trx-1在6、12 h显著升高, 24 h时显著降低, 量的峰值前移(表2, 图1D)。

2.3 胰腺组织病理学改变 光镜下C组未见明显病理变化。A组在各时点均可见胰腺组织间质增宽, 小叶间隔及腺泡间隔扩张, 胰腺组织发生不同程度的组织水肿、炎症细胞浸润, 腺泡细胞出现空泡化、脱落及衰变, 部分胰腺组织可见腺泡细胞坏死、腺小叶结构消失等病理学改变。大片状出血少见。病变随时间延长而加重, 24 h达高峰。M组病变较A组明显减轻(表1, 图1A)。

2.4 肺组织病理学改变 C组无明显病理改变。A组镜下可见肺间质和肺泡水肿, 炎症细胞浸润, 间质增宽, 毛细血管淤血, 肺透明膜形成, 甚至灶性或片状肺不张。光镜下病变随着时间的延长加重, 尤以肺泡间隔增宽和炎症细胞大量浸润最为突出。A组评分明显高于C组。M组各时点病变明显较A组轻。(表1, 图1B, 图2)。

2.5 三组大鼠肺组织Trx-1表达 Trx-1主要在肺巨噬细胞、肺泡上皮细胞和小支气管上皮表达。C组大鼠肺组织Trx-1多呈弱表达或无表达, A组和M组均较C组表达显著增强。A组Trx-1的表达随时间延长而增强。M组较A组表达峰值前移, 呈现先高后低趋势(表2, 图1E, 图3)。

2.6 胰腺组织病理评分与其他指标的相关性分析 胰腺组织病理评分: 在M组, 同肺组织病理评分、肺免疫组织化学染色评分和血清淀粉酶呈正相关($r_s = 0.463, P = 0.023$; $r_s = 0.714, P = 0.000$; $r_s = 0.649, P = 0.001$; $P < 0.05, r_s > 0.04$); 在A组, 其评分与肺组织病理评分、肺免疫组织化学染色评分呈正相关($r_s = 0.452, P = 0.027$; $r_s = 0.500, P = 0.013$)。

3 讨论

ANP无论病因如何, 他的结局总是局部和全身

表 1 各组胰腺、肺组织病理评分值和血清淀粉酶检测值 ($n = 8$, mean \pm SD)

分组	胰腺病理评分(分)	肺组织病理评分(分)	血清淀粉酶(U/L)
对照组			
6 h	0.25 \pm 0.46	0.52 \pm 0.35	1 736 \pm 436
12 h	0.13 \pm 0.35	0.52 \pm 0.35	1 901 \pm 777
24 h	0.13 \pm 0.35	1.00 \pm 0.46	2 033 \pm 863
实验组			
6 h	4.50 \pm 1.20 ^b	4.00 \pm 1.52 ^b	2 129 \pm 760
12 h	5.75 \pm 1.49 ^b	7.00 \pm 2.98 ^b	3 012 \pm 1 425 ^a
24 h	8.25 \pm 1.40 ^{bh}	9.52 \pm 2.80 ^{bf}	4 598 \pm 2 274 ^{bh}
干预组			
6 h	1.88 \pm 0.84 ^{bd}	2.52 \pm 1.03 ^{bc}	1 824 \pm 334
12 h	2.38 \pm 1.19 ^{bdf}	4.00 \pm 1.07 ^{bd}	1 835 \pm 499 ^c
24 h	6.75 \pm 2.12 ^{bch}	7.52 \pm 3.76 ^{bch}	3 990 \pm 1 146 ^a

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs C组; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs A组; ^e $P < 0.01$ vs 6 h; ^f $P < 0.01$ vs 12 h.

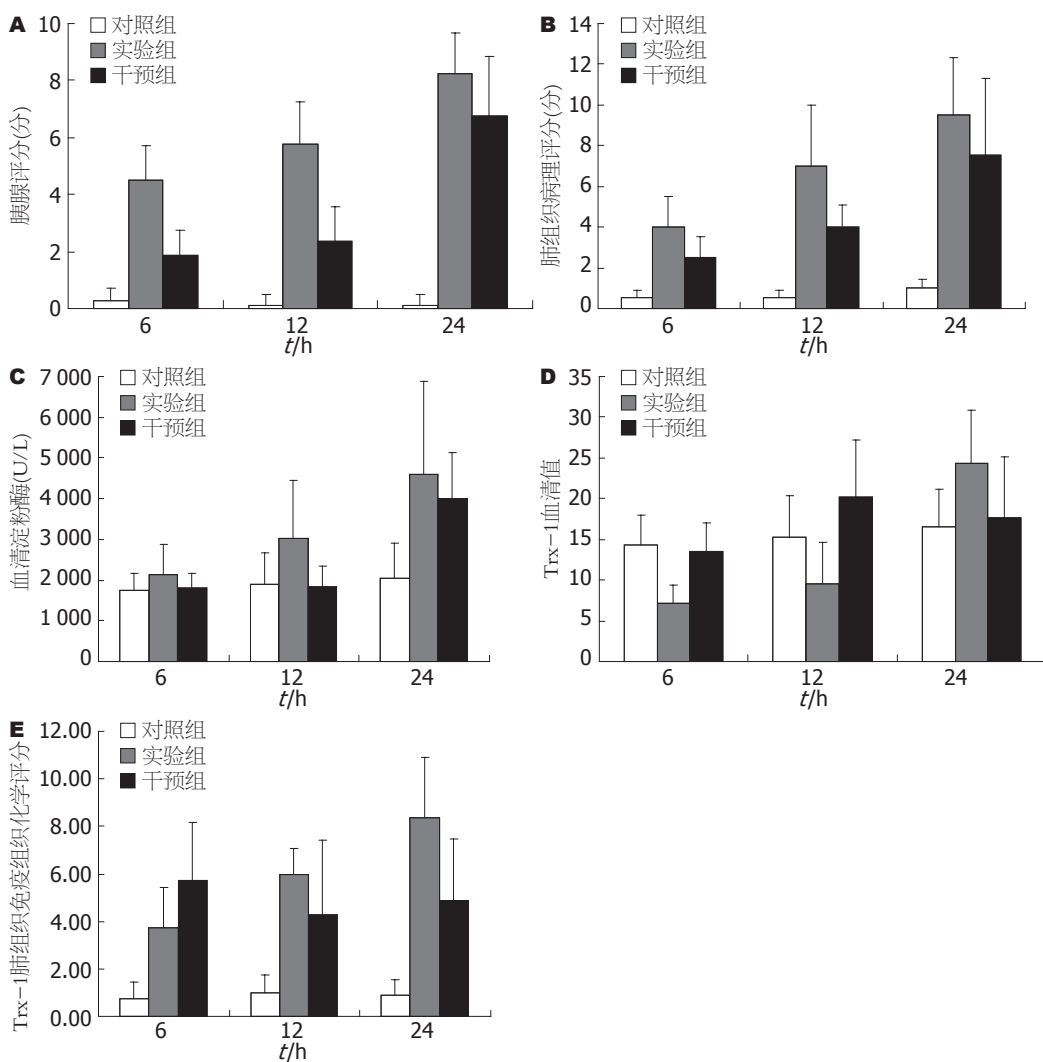


图 1 各组6、12、24 h观察指标. A: 胰腺组织病理评分; B: 肺组织病理评分; C: 淀粉酶评分; D: 血清Trx-1评分; E: 肺组织Trx-1免疫组织化学评分.

的炎症反应, 这与氧化应激和炎症介质的过度释放有关^[1,12,13]. 氧化应激和促炎因子协同, 激

应用要点

本研究有助于研发人工合成Trx-1、Trx-1的内源性调节剂和褪黑素诱导剂的研究; 有助于进一步筛选对涉及氧化应激的急慢性肺部疾病等炎症相关性疾病的有效治疗药物; 有助于将来临床应用. 随着研究的深入, 对炎症相关性疾病的防治有重大意义.

同行评价

本文内容丰富, 设计合理, 结果有很好的参考价值.

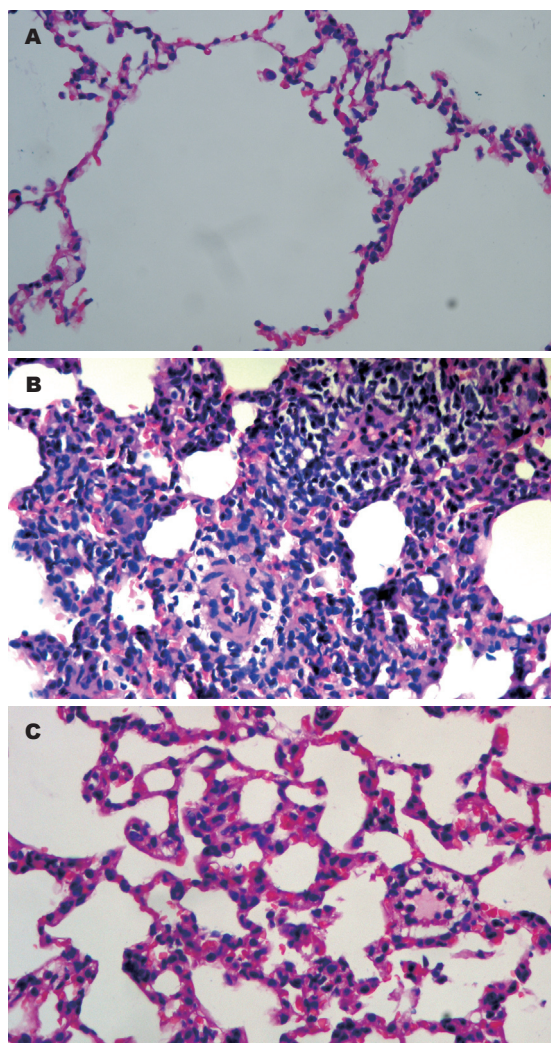


图 2 24 h肺组织病理变化(HE × 400). A: 对照组; B: ANP组; C: 褪黑素组.

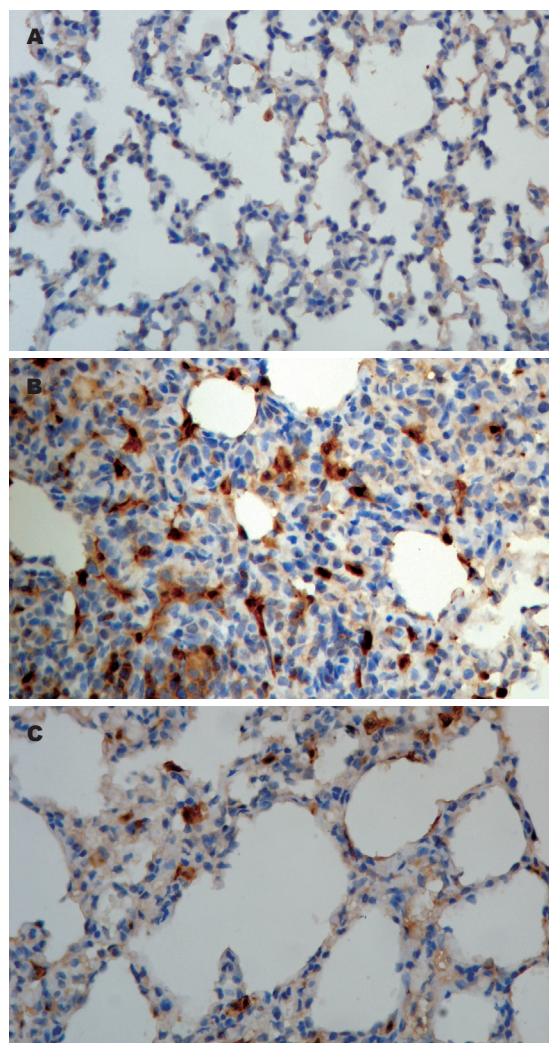


图 3 24 h肺组织免疫组织化学变化(DAB × 400). A: 对照组; B: ANP组; C: 褪黑素组.

活单核巨噬细胞系统产生大量活性氧及活性氮等致微循环障碍. 大量炎性介质进入体循环, 通过多条信号转导通路, 触发了炎症级联扩增的信号转导通道, 导致“二次打击”和全身炎症反应综合征、多器官功能障碍综合征及APALI发生^[2]. 同时, 机体有关细胞释放一系列介质和酶, 如胰蛋白酶、氧自由基(oxygen free radicals, OFR)等直接损伤肺泡上皮及肺血管内皮细胞. 其中II型肺泡上皮细胞在ARDS早期即受损, 致表面活性物质合成减少或功能降低, 导致肺泡表面张力增高和肺顺应性下降, 发生肺泡水肿^[3].

本实验显示应用大剂量L-Arg分次大鼠腹腔注射后, 出现血浆淀粉酶明显升高, 胰腺逐渐出现坏死等病理变化, 并伴发胰腺远隔器官肺的损害, 且随着胰腺损伤加重, 肺脏病理损伤改变相应加重. 光镜下可见肺组织间质水肿, 肺泡间隔增宽, 炎症细胞浸润, 肺泡内可见淡红色肺水

肿液体渗出. 与临床患者SAP病变过程相似, 证明了ANP和APALI模型的建立是成功的, 血清淀粉酶活性在注射L-Arg后12 h升高, 峰值约24 h^[6].

Trx-1是一种反应氧化应激水平的指标, 其在氧化应激和许多炎症相关性疾病表达上调. 急性胰腺炎患者血清中Trx-1增加表达, 并和病情严重程度呈正相关^[12,14]. Trx-1不仅在维持细胞氧化还原状况中起重要作用, 且其可通过抑制炎症部位的中性粒细胞发挥抗炎效应^[12]. 研究发现Trx-1过度表达, 通过抑制NF- κ B活性, 抑制iNOS表达^[15,16]. 高水平的Trx-1可保护胰腺和肺等组织或细胞减轻氧化损伤, 改善胰腺炎及APALI. Trx-1抑制细胞凋亡信号调节激酶-1(apoptosis signal-regulating kinase 1, ASK-1)是已知的抗凋亡效应的机制^[4,17]. 给予Trx-1减轻香烟诱导的肺炎症和大鼠的肺损伤^[18,19]. 研究报道Trx-1在间质性肺病和肺损伤患者肺泡巨噬细胞

表 2 各组Trx-1血清值和肺组织免疫组织化学评分值 ($n=8$, mean \pm SD)

分组	Trx-1 血清值	肺免疫组织化学评分
对照组		
6 h	14.298 \pm 3.645	0.75 \pm 0.71
12 h	15.258 \pm 5.178	1.00 \pm 0.76
24 h	16.622 \pm 4.607	0.88 \pm 0.64
实验组		
6 h	7.118 \pm 2.275 ^b	3.75 \pm 1.67 ^b
12 h	9.611 \pm 4.976	6.00 \pm 1.07 ^{bf}
24 h	24.277 \pm 6.646 ^a	8.38 \pm 2.50 ^{bfn}
干预组		
6 h	13.566 \pm 3.393 ^d	5.75 \pm 2.44 ^{bc}
12 h	20.268 \pm 6.868 ^d	4.28 \pm 3.16 ^b
24 h	17.672 \pm 7.407	4.88 \pm 2.59 ^{bc}

^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ vs C组; ^c $P<0.05$, ^d $P<0.01$ vs A组; ^f $P<0.01$ vs 6 h; ^b $P<0.01$ vs 12 h.

和II型肺泡上皮细胞表达增强^[20,21].

本研究进一步充实了我们前期的探索,在L-Arg诱导的非转基因大鼠的ANP模型中,ANP可诱导Trx-1表达^[22],血清Trx-1的含量呈现随时间延长先降低后升高的趋势,在24 h时达峰值;深入研究表明,A组随时间延长,肺组织的Trx-1蛋白表达均较对照组显著增高,体现了机体的自我保护机制.从相关性分析也可以看出,Trx-1表达与胰腺组织和肺损伤程度呈正相关.表明Trx-1表达与组织炎症反应相关,其表达强度与炎症反应亦有关,反映应激反应和伴随组织结构损伤,在其病理生理过程中发挥重要作用.可作为细胞再生和炎症的标志和反映ANP及相关性肺损伤一个较好指标.

本实验显示,A、M组Trx-1在肺组织不同程度的上调表达,主要定位在肺巨噬细胞和肺泡上皮细胞;肺损伤以肺泡隔增厚特别突出,导致肺泡腔塌陷.而从巨噬细胞和肺泡上皮细胞分泌的Trx-1可能阻断控制上皮细胞的凋亡信号^[17],由于肺泡II型上皮细胞和巨噬细胞对肺组织病理生理过程起关键性作用.因此,我们推测Trx-1在肺巨噬细胞和肺泡上皮细胞的过度表达可能参与了巨噬细胞和肺泡II型上皮细胞调控和活化,在APALI中发挥十分重要的作用.

MT因其强抗氧化活性近来也受到关注.MT可通过电子供体直接对多种氧自由基解毒,还可抑制一氧化氮合酶,使一氧化氮产生减少,并可通过阻断转录因子NF- κ B的活性而发挥抗炎作用^[6].本实验结果显示,ANP大鼠褪黑素前干

表 3 胰腺组织病理评分与其他指标的相关性分析

	A组		M组	
	r_s 值	P值	r_s 值	P值
肺组织病理评分	0.452	0.027	0.463	0.023
肺免疫组织化学评分	0.500	0.013	0.714	0.000
血清淀粉酶	0.374	0.072	0.649	0.001

r_s 值: <0.4低度相关, 0.4–0.7中度相关, >0.7高度相关; $P<0.05$ 有相关性.

预可显著提高血清Trx-1含量,使组织中Trx-1表达峰值提前,而Trx-1可减轻大鼠胰腺和肺的病理损伤.提示褪黑素可通过激活Trx-1的表达发挥抗氧化活性,减轻全身炎症反应,保护胰腺和肺等重要器官.M组24 h胰腺和肺组织Trx-1表达减低,可能与褪黑素半衰期短,腹腔单次注射的药物消耗有关.提示褪黑素对胰腺炎以及其相关性肺损伤有一定保护作用,持续或延长给药时间有望增强疗效.

总之,大剂量L-Arg分次腹腔注射,可以成功制造实验性大鼠ANP及APALI模型;肺损伤病变严重程度在24 h内随ANP病程的延长和胰损伤逐渐加重.Trx-1在ANP血液和肺组织表达上调,提示氧化应激参与了胰腺炎及相关性肺损伤;并可能对该病的发生发展发挥一定保护作用.褪黑素可一定程度影响Trx-1的表达,对减轻实验性ANP动物的胰肺等损伤有一定保护作用.

4 参考文献

- Bhatia M, Wong FL, Cao Y, Lau HY, Huang J, Puneet P, Chevali L. Pathophysiology of acute pancreatitis. *Pancreatol* 2005; 5: 132-144
- Pereda J, Sabater L, Aparisi L, Escobar J, Sandoval J, Viña J, López-Rodas G, Sastre J. Interaction between cytokines and oxidative stress in acute pancreatitis. *Curr Med Chem* 2006; 13: 2775-2787
- Pastor CM, Matthay MA, Frossard JL. Pancreatitis-associated acute lung injury: new insights. *Chest* 2003; 124: 2341-2351
- Powis G, Montfort WR. Properties and biological activities of thioredoxins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001; 41: 261-295
- Okamoto T, Asamitsu K, Tetsuka T. Thioredoxin and mechanism of inflammatory response. *Methods Enzymol* 2002; 347: 349-360
- Szabolcs A, Reiter RJ, Letoha T, Hegyi P, Papai G, Varga I, Jarmay K, Kaszaki J, Sari R, Rakonczay Z Jr, Lonovics J, Takacs T. Effect of melatonin on the severity of L-arginine-induced experimental acute pancreatitis in rats. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 251-258
- 谭至柔, 唐国都, 姜海行, 邓德海, 袁海峰. 抗氧化剂对急性胰腺炎大鼠核因子- κ B和一氧化氮合酶的影响

- 响. 世界华人消化杂志 2004; 12: 711-713
- 8 雷文章, 韦靖江, 沈文律, 金立人. 实验性坏死性胰腺炎多器官损害与内毒素血症的关系. 中华实验外科杂志 1995; 12: 131-132
- 9 Schmidt J, Lewandrowsi K, Warshaw AL, Compton CC, Rattner DW. Morphometric characteristics and homogeneity of a new model of acute pancreatitis in the rat. *Int J Pancreatol* 1992; 12: 41-51
- 10 Kusske AM, Rongione AJ, Ashley SW, McFadden DW, Reber HA. Interleukin-10 prevents death in lethal necrotizing pancreatitis in mice. *Surgery* 1996; 120: 284-288; discussion 289
- 11 Lu CD, Altieri DC, Tanigawa N. Expression of a novel antiapoptosis gene, survivin, correlated with tumor cell apoptosis and p53 accumulation in gastric carcinomas. *Cancer Res* 1998; 58: 1808-1812
- 12 Ohashi S, Nishio A, Nakamura H, Kido M, Ueno S, Uza N, Inoue S, Kitamura H, Kiriya K, Asada M, Tamaki H, Matsuura M, Kawasaki K, Fukui T, Watanabe N, Nakase H, Yodoi J, Okazaki K, Chiba T. Protective roles of redox-active protein thioredoxin-1 for severe acute pancreatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 290: G772-G781
- 13 DiMagno MJ, DiMagno EP. New advances in acute pancreatitis. *Curr Opin Gastroenterol* 2007; 23: 494-501
- 14 World CJ, Yamawaki H, Berk BC. Thioredoxin in the cardiovascular system. *J Mol Med* 2006; 84: 997-1003
- 15 Hoshino T, Nakamura H, Okamoto M, Kato S, Araya S, Nomiya K, Oizumi K, Young HA, Aizawa H, Yodoi J. Redox-active protein thioredoxin prevents proinflammatory cytokine- or bleomycin-induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 168: 1075-1083
- 16 Kondo N, Nakamura H, Masutani H, Yodoi J. Redox regulation of human thioredoxin network. *Antioxid Redox Signal* 2006; 8: 1881-1890
- 17 Hoshino Y, Nakamura T, Sato A, Mishima M, Yodoi J, Nakamura H. Neurotrophin demonstrates cytoprotective effects in lung cells through the induction of thioredoxin-1. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007; 37: 438-446
- 18 Sato A, Hara T, Nakamura H, Kato N, Hoshino Y, Kondo N, Mishima M, Yodoi J. Thioredoxin-1 suppresses systemic inflammatory responses against cigarette smoking. *Antioxid Redox Signal* 2006; 8: 1891-1896
- 19 Tipple TE, Welty SE, Rogers LK, Hansen TN, Choi YE, Kehrer JP, Smith CV. Thioredoxin-related mechanisms in hyperoxic lung injury in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007; 37: 405-413
- 20 Tiitto L, Kaarteenaho-Wiik R, Sormunen R, Holmgren A, Pääkkö P, Soini Y, Kinnula VL. Expression of the thioredoxin system in interstitial lung disease. *J Pathol* 2003; 201: 363-370
- 21 Callister ME, Burke-Gaffney A, Quinlan GJ, Nicholson AG, Florio R, Nakamura H, Yodoi J, Evans TW. Extracellular thioredoxin levels are increased in patients with acute lung injury. *Thorax* 2006; 61: 521-527
- 22 钟卫一, 唐国都, 梁志海, 黄文福, 梁金仙, 王珺平. 褪黑素对大鼠急性坏死性胰腺炎的干预作用及机制. 世界华人消化杂志 2009; 17: 2352-2356

编辑 李军亮 电编 何基才

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》入选北京大学图书馆 2008年版《中文核心期刊要目总览》

本刊讯 《中文核心期刊要目总览》(2008年版)采用了被索量、被摘量、被引量、他引量、被摘率、影响因子、获国家奖或被国内外重要检索工具收录、基金论文比、Web下载量等9个评价指标, 选作评价指标统计源的数据库及文摘刊物达80余种, 统计文献量达32400余万篇次(2003-2005年), 涉及期刊12400余种. 本版还加大了专家评审力度, 5500多位学科专家参加了核心期刊评审工作. 经过定量评价和定性评审, 从我国正在出版的中文期刊中评选出1980余种核心期刊, 分属七大编73个学科类目. 《世界华人消化杂志》入选本版核心期刊库(见R5内科学类核心期刊表, 第66页). (编辑部主任: 李军亮 2010-01-08)

VEGF的表达及其微血管密度在胃癌组织中的意义

龙辉, 吴清明, 李欢

龙辉, 吴清明, 李欢, 武汉科技大学附属天佑医院消化内科
湖北省武汉市 430064

龙辉, 副教授, 从事消化系疾病的研究.

作者贡献分布: 此课题由龙辉与吴清明设计; 样本采集及具体实验及统计分析由龙辉完成; 本论文由龙辉与李欢总结成文.

通讯作者: 龙辉, 副教授, 430064, 湖北省武汉市, 武汉科技大学附属天佑医院消化内科. whlongh@medmail.com.cn
电话: 027-62031282

收稿日期: 2009-11-07 修回日期: 2009-12-19

接受日期: 2009-12-21 在线出版日期: 2010-02-28

Significance of vascular endothelial growth factor expression and microvessel density in gastric cancer

Hui Long, Qing-Ming Wu, Huan Li

Hui Long, Qing-Ming Wu, Huan Li, Department of Gastroenterology, the Affiliated Tianyou Hospital of Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430064, Hubei Province, China

Correspondence to: Associate Professor Hui Long, Department of Gastroenterology, the Affiliated Tianyou Hospital of Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430064, Hubei Province, China. whlongh@medmail.com.cn
Received: 2009-11-07 Revised: 2009-12-19

Accepted: 2009-12-21 Published online: 2010-02-28

Abstract

AIM: To detect the correlations among vascular endothelial growth factor (VEGF) expression, microvessel density (MVD) and multiple pathological parameters in gastric cancer and analyze the significance of VEGF expression and MVD in patients with gastric cancer.

METHODS: A total of 169 patients with gastric cancer were retrospectively analyzed. The expression of VEGF and CD34 in gastric cancer specimens was detected by immunohistochemistry. The correlations among VEGF expression, MVD, and prognostic parameters were then analyzed.

RESULTS: A positive correlation was noted between VEGF expression and MVD in gastric carcinoma ($P = 0.0053$). Both VEGF expression and MVD were associated with tumor invasion, lymph node metastasis and TNM stage.

The five-year disease-free survival and overall survival were lower in patients with tumors positive for VEGF than in those with tumors negative for VEGF (38.8% vs 57.1% and 35.3% vs 54.8%, respectively; both $P < 0.01$). The five-year disease-free survival and overall survival were lower in patients with tumors having high MVD score (> 5) than in patients with tumors having low MVD score (35.3% vs 53.9% and 23.5% vs 49.3%, both $P < 0.05$).

CONCLUSION: VEGF expression is closely associated with tumor angiogenesis and progression in gastric cancer. VEGF expression, MDV and tumor site are valuable parameters for predicting the prognosis of gastric cancer.

Key Words: Vascular endothelial growth factor; Microvessel density; Prognosis; Gastric cancer

Long H, Wu QM, Li H. Significance of vascular endothelial growth factor expression and microvessel density in gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(6): 557-562

摘要

目的: 探讨血管内皮生长因子(VEGF)、CD34的表达与人胃癌多种临床病理因素的关系, 分析其在患者预后中的意义.

方法: 通过免疫组织化学方法回顾性检测169例不同分级分期胃癌组织VEGF的表达, 用CD34免疫染色法计数肿瘤微血管密度(MVD), 分析VEGF、MVD和胃癌的临床病理因素之间的相关性; 并就169例胃癌患者的预后及其相关因素进行统计分析.

结果: VEGF的阳性表达率为50.3%, VEGF和CD34为正相关($P = 0.0053$). VEGF的表达与肿瘤侵袭深度, 淋巴结转移, 静脉侵犯及TNM分期有关, MVD与原发肿瘤侵犯深度、淋巴结转移、肿瘤大小、静脉侵犯显著相关. VEGF阳性表达者5年无病生存率和总生存率较低(38.8% vs 57.1%, $P < 0.05$; 35.3% vs 54.8%, $P < 0.01$); MVD积分高者5年无病生存率和总生存率也较低(35.3% vs 53.9%, 23.5% vs 49.3%,

■背景资料

VEGF的表达预示增高的肿瘤转移风险和差的预后. 当前常用的定量评估血管生成过程的方法之一是检测CD34抗原的表达. CD34常用来检测肿瘤血管化内皮细胞, 并且通过微血管密度(MVD)定量测定其表达. 本研究是通过免疫组织化学SP法对169例胃癌组织中VEGF、CD34的表达及MVD的变化, 并对患者临床病理资料进行统计分析, 探讨了VEGF和CD34的表达与人胃癌多种临床病理因素的相互性, 分析其在患者生存和预后中的意义.

■同行评议者

张俊, 副教授, 上海交通大学医学院附属瑞金医院外科

■研究前沿

本文通过研究证实VEGF在胃癌的血管生成中起着重要作用,联合其他指标更能准确预测胃癌的预后,但是VEGF能否成为胃癌的治疗靶点仍有待进一步研究。

均 $P<0.05$).

结论: VEGF表达与血管生成和肿瘤演进相关, VEGF、MVD及肿瘤部位对胃癌患者是一个有价值的预后因素。

关键词: 血管内皮生长因子; 微血管密度; 预后; 胃癌

龙辉, 吴清明, 李欢. VEGF的表达及其微血管密度在胃癌组织中的意义. 世界华人消化杂志 2010; 18(6): 557-562
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/557.asp>

0 引言

胃癌是当今世界范围内最常见的恶性肿瘤之一^[1], 尽管近来胃癌早期检测技术和手术治疗方式有很大的改进, 他仍然是癌症的第二死因^[2], 因此, 寻找能够精确代表肿瘤生物特性、筛选高危早期胃癌患者且能预测预后的生物标志物非常重要, 这些标志物将会有助于更好地实施个体化治疗. 肿瘤血管生成在恶性肿瘤发生、发展过程中起重要作用. 迄今为止学者们已描述了多种促血管生成及抗血管生成因子, 其中最重要的是血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)^[3,4], 此种糖蛋白能刺激内皮细胞增殖、阻止新生血管退化、增加微血管通透性. 研究发现, 在食管癌、胃癌、结直肠癌、乳腺癌、卵巢癌、子宫内膜癌和非小细胞肺癌等肿瘤组织中^[5-10], VEGF的表达预示增高的肿瘤转移风险和差的预后. 当前常用的定量评估血管生成过程的方法之一是检测CD34抗原的表达. CD34是人类造血祖细胞表面的一种糖蛋白, 血管内皮细胞表面同样可以检测到他的表达. CD34常用来检测肿瘤血管化内皮细胞, 并且通过微血管密度(microvessel density, MVD)定量测定其表达^[11]. 本研究是通过免疫组织化学SP法对169例胃癌组织中VEGF、CD34的表达及MVD的变化, 并对患者临床病理资料进行统计分析, 探讨了VEGF和CD34的表达与人胃癌多种临床病理因素的相互性, 分析其在患者生存和预后中的意义。

1 材料和方法

1.1 材料 选取1992-01/2002-06本院住院手术治疗的169例患者胃癌标本, 收集患者的临床、病理及手术资料, 采用回顾性研究. 患者中年龄17-86(平均59.6)岁, 临床随访期1-144 mo, 平均56 mo. (2)VEGF多克隆抗体(1:50)、CD34单克

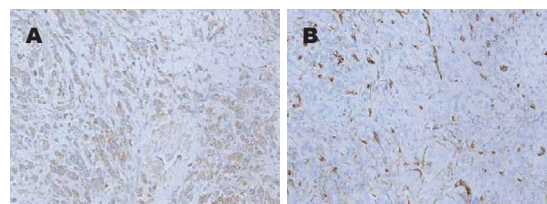


图1 患者胃癌标本染色. A: VEGF染色; B: CD34染色.

隆抗体(1:30)及SP检测试剂盒和DAB显色液均购自武汉博士德生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织学SP法检测胃癌组织VEGF、CD34表达: 根据病理报告从最具有侵袭力的部位行组织切片(3 μ m厚), 采用免疫组织化学SP方法检测胃癌组织VEGF、CD34表达, 按照试剂盒说明书所示步骤操作. PBS代替一抗作为阴性对照, 用VEGF阳性直肠癌组织切片及CD34阳性血管内皮组织切片作为阳性对照。

1.2.2 染色分析: 采用染色强度和染色细胞百分比的联合评分来评判VEGF^[12]. 染色强度评分为: 0(无), 1+(弱), 2+(中等), 3+(强). 阴性表达定义为: 各种强度且小于25%肿瘤细胞染色; 强度0、1或2且小于50%肿瘤细胞染色; 强度0、1且小于75%肿瘤细胞染色; 其余病例定义为VEGF阳性表达。

1.2.3 CD34染色法评估和胃癌组织新生血管数及MVD: 每例标本先在低倍镜下寻找3个以上的热点区域(hot spots), 然后在高倍镜下($\times 200$)观察. 计算此区域的微血管数和MVD. 所有标本分为2组(低和高)进行统计分析, CD34评分前10%者为高MVD^[13].

统计学处理 结果处理应用SPSS13.0软件. 采用 χ^2 检验和Fisher精确概率法评估VEGF和CD34的表达与其他变量的相互关系; Spearman秩相关分析评估等级数据; Kaplan-Meier法进行生存分析; Log rank检验进行多预后性变量比较; COX比例风险模型研究独立危险因素(经单变量分析中证实为有意义的独立危险因素). 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 VEGF和CD34在胃癌中的表达 VEGF染色: 85例阳性(表1). VEGF主要位于癌细胞胞质(图1). 所有标本的MVD平均值为 50 ± 22 . 17例标本定为高MVD(>86), 其他152例为低MVD。

2.2 VEGF和CD34的表达和临床病理因素的关系 169例患者中, VEGF阳性表达85例, CD34高表

■相关报道
Yoshida等认为VEGF起效后可促进肿瘤血管形成及瘤体生长, 本研究也认同这一观点。

表 1 胃癌组织VEGF染色细胞百分比

VEGF染色强度	0(0%)	1(1%-25%)	2(26%-50%)	3(51%-75%)	4(76%-100%)	总计
0(无)	13 ^a					13
1+(弱)		15 ^a	16 ^a	22 ^a	11	64
2+(中等)		8 ^a	10 ^a	21	38	77
3+(强)		0 ^a	0	3	12	15
总计n	13	23	26	46	61	169

^a阴性染色病例。

表 2 VEGF和CD34的表达和临床病理因素间的关系

观察指标	总计 (n = 169)	VEGF n(%)		P值	CD34 n(%)		P值
		阴性	阳性		低	高	
年龄(岁)							
<60	84	41(48.8)	43(51.2)	0.8171	75(89.3)	9(10.7)	0.7784
≥60	85	43(5.6)	42(49.4)		77(90.6)	8(9.4)	
性别							
男	122	58(47.5)	64(52.5)	0.3649	108(88.5)	14(11.5)	0.4834
女	47	26(55.3)	21(44.7)		44(93.6)	3(6.4)	
肿瘤部位(胃)							
前1/3	26	9(34.6)	17(65.4)	0.2380	24(92.3)	2(7.7)	0.8310
中1/3	69	37(53.6)	32(46.4)		61(88.4)	8(11.6)	
后1/3	74	38(51.4)	36(47.6)		67(90.5)	7(9.5)	
肿瘤大小(mm)							
<50	92	47(51.1)	45(48.9)	0.6943	84(91.3)	8(9.4)	0.0355
≥50	77	37(48.1)	40(51.9)		65(88.3)	8(11.7)	
组织学类型							
分化型	86	40(46.5)	46(53.5)	0.3981	80(91.4)	6(8.7)	0.1751
未分化型	83	44(53.0)	39(47.0)		72(91.7)	11(8.4)	
浸润深度							
黏膜	41	30(73.2)	11(26.8)	0.0001	41(100.0)	0(0.0)	0.0059
黏膜下	48	27(56.3)	21(43.7)		45(93.8)	3(6.2)	
肌层及更深	80	27(33.8)	53(66.2)		66(82.5)	14(17.5)	
淋巴结转移							
阴性	96	52(54.2)	44(45.8)	0.0086	87(90.6)	9(9.4)	0.0389
阳性	73	32(43.8)	41(56.2)		65(89.1)	8(10.9)	
静脉侵犯							
阴性	86	56(65.1)	30(34.9)	0.0001	84(97.7)	2(2.3)	0.0007
阳性	83	28(38.8)	55(66.3)		68(81.9)	15(18.1)	
肿瘤分期(TNM)							
I	24	11(45.8)	13(54.2)	0.0121	19(79.2)	5(20.8)	0.1180
II	24	5(20.8)	19(79.2)		20(83.3)	4(16.7)	
III	26	12(46.2)	14(53.8)		24(92.3)	2(7.7)	
IV	95	56(58.9)	39(41.1)		89(93.7)	6(6.3)	
化疗							
否	105	55(52.4)	50(47.6)	0.3721	97(92.4)	8(7.6)	0.1767
是	64	29(45.3)	35(54.7)		55(85.9)	9(14.1)	

达152例, 17例低表达. VEGF表达与肿瘤侵犯深度、淋巴结转移、静脉侵犯、TNM分期显著相关. MVD与原发性肿瘤侵犯深度、淋巴结转移、肿瘤大小、静脉侵犯显著相关(表2).

■应用要点

本研究的表明, VEGF是血管生成中的很重要的环节, 并且是胃癌患者预后的有价值的预测因子。

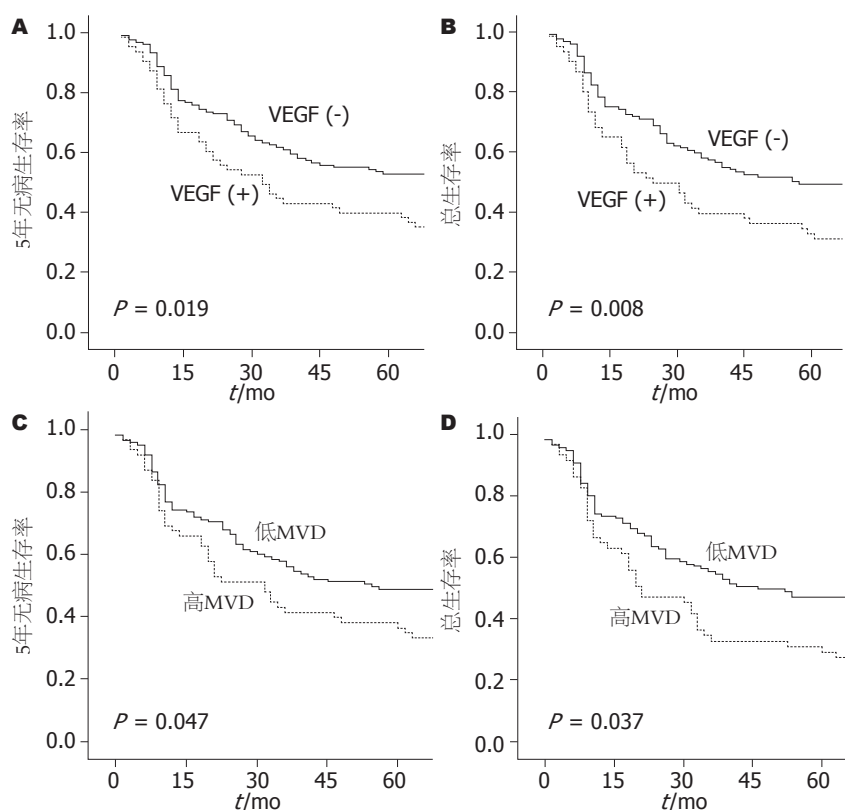


图2 VEGF表达及MVD与患者5年无病生存率和总生存率的关系. A, C: 5年无病生存率; B, D: 总生存率; A, B: VEGF; C, D: MVD.

2.3 MVD与VEGF的相互关系 MVD的表达与VEGF有显著相关性. VEGF阳性表达肿瘤MVD为 62.1 ± 24.8 , 高于阴性者(52.5 ± 19.4 , $P = 0.0087$).

2.4 VEGF表达及MVD与患者生存的效应 5年无病生存率和总生存率为40.6%. Kaplan-Meier生存率曲线表明: VEGF阳性表达者有着低的5年无病生存率和总生存率(38.8% vs 57.1%, $P < 0.05$; 35.3% vs 54.8%, $P < 0.01$); MVD积分高者有着低的5年无病生存率和总生存率(35.3% vs 53.9%, $P < 0.05$; 23.5% vs 49.3%, $P < 0.05$, 图2).

2.5 单变量和多变量分析胃癌患者预后 用单变量分析法评估了所有临床病理因素的预后. 表3表明: 肿瘤大小、部位、侵犯深度、淋巴结转移、静脉侵犯、VEGF评分、MVD和TNM分期可作为5年无病生存率和总生存率的独立预后因素; 用COX比例风险回归模型多变量分析表明: 仅肿瘤侵犯深度、淋巴结转移情况可作为无病生存和总体生存的独立预后因素. 肿瘤部位仍可作为无病生存的独立预后因素(表4).

3 讨论

对实体瘤来说, 如果没有血管生成其体积不会超过 $1-2 \text{ mm}^3$. 血管生成过程受精密的调节: 局部肿瘤及宿主细胞释放的促血管生成因子和抗血管生成因子(包括内皮细胞、周细胞及免疫细

胞). 本研究不仅阐明了VEGF表达与血管生成和肿瘤演进呈正相关, 同时其与淋巴结转移、肿瘤侵犯深度、血管侵犯相关, 进一步验证了VEGF是促癌因子这一假设, 提示了VEGF可能作为肿瘤侵袭性的一个有用的生物指标. 另外本研究证实VEGF阳性患者MVD比VEGF阴性者高, 这与以前的结果一致^[14]. VEGF阳性肿瘤新生血管化最显著这一发现提示增多的血管供应反映增高的转移能力. 肿瘤形成血管前, 肿瘤细胞很少进入全身血液循环, 新生的肿瘤血管有增加的长度、直径和不完整的内皮细胞层和基底膜, 其形状不规则且易于出血和或血栓形成, 进而使肿瘤细胞进入循环系统. 所谓的血管生成开关依赖于肿瘤正阳性和阴性血管生成物质的静平衡, 其中VEGF发挥着关键的阳性调节作用.

我们采用CD34免疫染色法可视化内皮细胞来检测微血管. 用微血管计数法来测定肿瘤新生血管性可能解释一些重要的假设, 然而此方法依赖于代表新生血管活性的肿瘤热点区域, 并且假设高的转移率与多的血管状态有关. 内皮标志物并不能区分新生血管和已存在的血管, 并且这两种血管的结构不同, 其肿瘤细胞进入微循环的能力也不同. 即使同一区域也可能存在血管不均一性, 肿瘤边缘也不一定总包含最多的血管. 这些瘤内的变异可能会解释一些文献

表 3 胃癌患者5年无病生存率和总体生存率的单变量分析

因素	n	无病生存率(%)	P值	总体生存率(%)	P值
年龄(岁)					
≤60	84	44.0	0.535	42.9	0.4898
>60	85	43.5		37.6	
性别					
男	122	42.6	0.374	41.8	0.4330
女	47	46.8		44.7	
肿瘤大小(mm)					
≤50	92	54.3	0.030	51.1	0.0200
>50	77	32.5		28.6	
肿瘤部位					
前1/3	26	30.8	0.107	26.9	0.0970
中1/3	69	47.8	0.488	44.9	0.5210
后1/3	74	44.6		39.2	
组织学类型					
分化型	86	47.7	0.235	41.9	0.3890
未分化型	83	41.0		38.6	
浸润深度					
黏膜	41	93.2	<0.0001	90.6	<0.0001
黏膜下	48	85.6		83.2	
更深	80	27.5		23.8	
淋巴结转移					
PN0	71	56.3	0.0001	52.1	<0.0001
PN1-3	98	28.6		24.5	
静脉侵犯					
阴性	86	55.8	<0.0001	53.5	<0.0001
阳性	83	31.3		26.5	
VEGF表达					
阴性	84	57.1	0.019	54.8	0.008
阳性	85	38.8		35.3	
MVD					
低	152	53.9	0.047	49.3	0.037
高	17	35.3		23.5	
TNM分期					
I	24	58.3		54.2	
II	24	45.8		37.5	
III	26	26.9		23.1	
IV	95	0.0	<0.0001	0.0	<0.0001

报道的相反的预后结果. 尽管MVD是一个有用的预后指标, 但其本身并不是血管功能或治疗效果的指示器, 也不应该用MVD来指导治疗试验患者的筛选^[11].

现在有理由考虑一些在恶性肿瘤进展中影响多条通路的治疗方案. Yoshida等^[15]认为VEGF起效后可促进肿瘤血管形成及瘤体生长, 本研究也认同这一观点.

Shi等研究表明对于一些类型的胃癌VEGF可作为一独立的预后因素^[6], 然而也有报道不

表 4 患者5年无病生存率和总体生存率的多变量分析

因素	相对危险度(95%CI)	χ ² 值	P值
无病生存率			
肿瘤部位			
前1/3	48.00(0.23-99.00)	3.99	0.458
其他			
浸润深度			
黏膜及黏膜下	11.03(1.15-105.93)	4.33	0.038
肌层及更深			
淋巴结转移			
PN0	3.34(1.30-8.59)	6.26	0.012
PN1-3			
总体生存率			
浸润深度			
黏膜及黏膜下	4.28(1.15-15.95)	4.70	0.030
肌层及更深			
淋巴结转移			
PN0	2.94(1.34-6.46)	7.20	0.007
PN1-3			

同意这种观点^[16]. 这些不同的报道可能由于采用的方法和患者的数量不同导致. 当前研究发现^[6]VEGF阳性患者5年生存率远低于VEGF阴性患者. 多变量分析结果显示, VEGF并不能作为独立的预后因素. 本研究表明VEGF联合其他临床病理因素可能作为筛选胃癌患者和提示预后有价值的工具.

总之, 本研究的表明, VEGF是血管生成中的很重要的环节, 并且是胃癌患者预后的有价值的预测因子. 目前还需要更多的前瞻性研究去确认VEGF是胃癌发生发展过程中起标志作用, 至于VEGF是否可作为治疗靶点, 患者是否从抗血管生成制剂中获得疗效且监测这些治疗方法的有效性还需进一步研究.

4 参考文献

- 1 Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55: 74-108
- 2 Lambert R, Guilloux A, Oshima A, Pompe-Kirn V, Bray F, Parkin M, Ajiki W, Tsukuma H. Incidence and mortality from stomach cancer in Japan, Slovenia and the USA. *Int J Cancer* 2002; 97: 811-818
- 3 Nagy JA, Vasile E, Feng D, Sundberg C, Brown LF, Detmar MJ, Lawitts JA, Benjamin L, Tan X, Manseau EJ, Dvorak AM, Dvorak HF. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor induces lymphangiogenesis as well as angiogenesis. *J Exp Med* 2002; 196: 1497-1506
- 4 Hoebe A, Landuyt B, Highley MS, Wildiers H, Van Oosterom AT, De Bruijn EA. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacol Rev* 2004; 56: 549-580
- 5 Kleespies A, Guba M, Jauch KW, Bruns CJ. Vascular

■同行评价

本文涉及胃癌的预后问题, 样本量大, 临床数据资料齐全, 随访时间长, 有一定的临床应用价值.

- endothelial growth factor in esophageal cancer. *J Surg Oncol* 2004; 87: 95-104
- 6 Shi H, Xu JM, Hu NZ, Xie HJ. Prognostic significance of expression of cyclooxygenase-2 and vascular endothelial growth factor in human gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 1421-1426
- 7 Zheng S, Han MY, Xiao ZX, Peng JP, Dong Q. Clinical significance of vascular endothelial growth factor expression and neovascularization in colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 1227-1230
- 8 Morabito A, Sarmiento R, Bonginelli P, Gasparini G. Antiangiogenic strategies, compounds, and early clinical results in breast cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 2004; 49: 91-107
- 9 Raspollini MR, Amunni G, Villanucci A, Baroni G, Boddi V, Taddei GL. Prognostic significance of microvessel density and vascular endothelial growth factor expression in advanced ovarian serous carcinoma. *Int J Gynecol Cancer* 2004; 14: 815-823
- 10 Bremnes RM, Camps C, Sirera R. Angiogenesis in non-small cell lung cancer: the prognostic impact of neoangiogenesis and the cytokines VEGF and bFGF in tumours and blood. *Lung Cancer* 2006; 51: 143-158
- 11 Hlatky L, Hahnfeldt P, Folkman J. Clinical application of antiangiogenic therapy: microvessel density, what it does and doesn't tell us. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94: 883-893
- 12 Soumaoro LT, Uetake H, Higuchi T, Takagi Y, Enomoto M, Sugihara K. Cyclooxygenase-2 expression: a significant prognostic indicator for patients with colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 8465-8471
- 13 Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB, Toi M, Martin L, McCulloch P, Pezzella F, Viale G, Weidner N, Harris AL, Dirix LY. Quantification of angiogenesis in solid human tumours: an international consensus on the methodology and criteria of evaluation. *Eur J Cancer* 1996; 32A: 2474-2484
- 14 Joo YE, Rew JS, Seo YH, Choi SK, Kim YJ, Park CS, Kim SJ. Cyclooxygenase-2 overexpression correlates with vascular endothelial growth factor expression and tumor angiogenesis in gastric cancer. *J Clin Gastroenterol* 2003; 37: 28-33
- 15 Yoshida S, Amano H, Hayashi I, Kitasato H, Kamata M, Inukai M, Yoshimura H, Majima M. COX-2/VEGF-dependent facilitation of tumor-associated angiogenesis and tumor growth in vivo. *Lab Invest* 2003; 83: 1385-1394
- 16 Tanigawa N, Amaya H, Matsumura M, Shimomatsuya T. Correlation between expression of vascular endothelial growth factor and tumor vascularity, and patient outcome in human gastric carcinoma. *J Clin Oncol* 1997; 15: 826-832

编辑 李瑞敏 电编 何基才

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

• 消息 •

汤姆森 - 路透公布 2008 年 WJG 影响因子 2.081

本刊讯 据汤姆森-路透科技信息集团2009-06-19发布《期刊引证报告》(*Journal Citation Reports*)的统计结果: *World Journal of Gastroenterology*(WJG)的总被引次数(TC): 10 822; 影响因子(IF): 2.081; 即年指数: 0.274; 论文数量: 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 2009-06-19)

MicroRNA与胆管癌研究进展

陈强, 李文岗

陈强, 李文岗, 福建医科大学附属厦门第一医院肝胆胰血管外科 福建省厦门市 316003

福建省自然科学基金资助项目, No. 2009D014

作者贡献分布: 本文综述由陈强完成; 李文岗审核。

通讯作者: 李文岗, 副教授, 361003, 福建省厦门市, 福建医科大学附属厦门第一医院肝胆胰血管外科。lwg11861@163.com

电话: 0592-2137280

收稿日期: 2009-09-16 修回日期: 2009-10-22

接受日期: 2009-10-26 在线出版日期: 2010-02-28

Advances in understanding the relationship between microRNAs and cholangiocarcinoma

Qiang Chen, Wen-Gang Li

Qiang Chen, Wen-Gang Li, Department of Hepato-Biliary-Pancreatic-Vascular Surgery, the First Hospital of Xiamen Affiliated to the Fujian Medical University, Xiamen 316003, Fujian Province, China

Supported by: the Natural Science Foundation of Fujian Province, No. 2009D014

Correspondence to: Associate Professor Wen-Gang Li, Department of Hepato-Biliary-Pancreatic-Vascular Surgery, the First Hospital of Xiamen Affiliated to the Fujian Medical University, Xiamen 361003, Fujian Province, China. lwg11861@163.com

Received: 2009-09-16 Revised: 2009-10-22

Accepted: 2009-10-26 Published online: 2010-02-28

Abstract

MicroRNAs (miRNAs) are a class of short non-coding RNAs widely distributed in plants and animals. They can inhibit the expression of protein-coding genes by binding to the 3' UTR of mRNAs and inducing either translational repression or mRNA degradation. It has been demonstrated that miRNAs play important roles in regulating cell proliferation, apoptosis and differentiation. In addition, miRNAs can function as oncogenes or tumor suppressor genes and are therefore closely associated with oncogenesis. This review will focus on the biogenesis, silencing mechanism, and biological function of miRNAs, and their roles in the development and progression of cholangiocarcinoma.

Key Words: MicroRNA; Oncogene; Tumor suppressor gene; Cholangiocarcinoma

Chen Q, Li WG. Advances in understanding the relationship between microRNAs and cholangiocarcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(6): 563-567

摘要

MicroRNA(miRNA)是一类新发现的、非编码的、大小约为22个核苷酸,参与转录后基因调控的RNA,广泛存在于动植物中。研究已经证实,miRNA在细胞的增殖、凋亡、分化、个体发育等方面发挥着巨大作用,另外miRNA与肿瘤的发生和发展密切相关,发挥着癌基因或抑癌基因的作用。本文主要介绍miRNA的产生、作用机制、生物功能以及在胆管癌的发生和发展中的作用。

关键词: MicroRNA; 癌基因; 抑癌基因; 胆管癌

陈强, 李文岗. MicroRNA与胆管癌研究进展. *世界华人消化杂志* 2010; 18(6): 563-567

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/563.asp>

0 引言

MicroRNA(miRNA)是一种长度约为22个核苷酸大小,参与转录后基因调控的非编码RNA,广泛的存在于真核生物中^[1]。1993年, Lee等从线虫(*Caenorhabditis elegans*)中发现了第一个miRNA lin-4, 他通过碱基配对的方式结合到靶mRNA lin-14的3'端非翻译区(3'UTR), 抑制lin-14的翻译, 从而影响线虫的形态发育; 2000年, Reinhart等在研究线虫的发育调控中又发现了另一个具有转录后调控功能的miRNA let-7, 从而拉开了miRNA的研究序幕^[2,3]。随后, 研究发现miRNA不仅对生物的发育周期具有调控作用, 而且在细胞的增殖、凋亡、分化、代谢等过程中发挥着重要作用^[4-6], 另外miRNA的异常表达与多种癌症的发生有着密切的关系^[7]。胆管癌是一种来源于肝内或肝外胆管上皮的恶性肿瘤, 过去曾被认为是少见病, 但近年来随着影像诊断技术的发展, 胆管癌的检出率不断增多, 在肝脏原发性肿瘤中, 胆管癌的发病率仅次于肝癌^[8]。胆管癌预后很差, 在全部癌症死者中占2.88%-4.65%^[9],

■背景资料

胆管癌是一种来源于肝内或肝外胆管上皮的恶性肿瘤, 过去曾被认为是少见病, 但近年来随着影像诊断技术的发展, 胆管癌的检出率不断增多, 在肝脏原发性肿瘤中, 胆管癌的发病率仅次于肝癌。胆管癌预后很差, 在全部癌症死者中占2.88%-4.65%, 并且已经成为肝内原发肿瘤导致患者死亡的第一位肿瘤。目前, 唯一治愈性治疗为手术切除或肝移植, 而靶向治疗目前仍处于研究中, 近些年的研究表明miRNA在胆管癌的发生及发展中起着重要作用。

■同行评议者

邵升, 副教授, 哈尔滨医科大学附属二院肝胆外科

■研发前沿

miRNA在胆管癌的发生发展中发挥着重要作用,随着越来越多的miRNA引起研究人员的关注,将会发现更多与胆管癌发生发展相关的miRNA,这些将为胆管癌的诊断提供新的思路,也为胆管癌的靶向治疗提供新的药物靶点。

并且已经成为肝内原发肿瘤导致患者死亡的第一位肿瘤^[8]。目前,唯一治愈性治疗为手术切除或肝移植,而靶向治疗目前仍处于研究中,近些年的研究表明miRNA在胆管癌的发生及发展中起着重要作用,因此本文就miRNA的产生、作用机制、功能及其与胆管癌的关系和目前的研究进展综述如下。

1 miRNA的研究概况

1.1 miRNA的产生 miRNA基因通常是由RNA聚合酶II转录,命名为pri-miRNA的初级转录物(具有5'端的帽子结构和3'端PolyA),在miRNA基因转录过程中一些转录因子可结合到miRNA基因上游的特异位点来影响miRNA基因的表达。随后, pri-miRNA通过两次剪切产生成熟的miRNA。动物pri-miRNA的第一次剪切位于细胞核内,经核酸酶RNase III Drosha和辅助因子DGCR8作用产生大小约70个核苷酸组成的一种不完全配对茎环结构的miRNA前体,称为pre-miRNA; pre-miRNA由Ran-GTP依赖性核浆转运蛋白Exportin5转移至细胞质内进行第2次剪切,由核酸酶RNaseIII Dicer及其协同因子TRBP及PACT将其茎环结构剪切成约22个核苷酸的双链RNA片段,即成熟的miRNA和其互补序列所组成的二聚体^[10,11]。

1.2 miRNA作用机制及生物功能 miRNA双体中成熟miRNA会选择性地整合入RNA诱导沉默复合体(RNA induced silencing complex, RISC)中识别靶基因,而另一条会快速降解。然后, miRISC复合体依据miRNA与其靶基因序列的互补性高低分为两种作用模式:植物的miRNA通常与其靶基因序列精密互补,可直接通过RNA干扰机制导致靶基因的降解^[12];而动物miRNA一般与靶基因互补性较差,他们主要是通过一种目前还不清楚的机制导致蛋白质合成受阻^[13],最终达到对靶基因表达负调控的功能。

miRNA的靶基因多种多样^[14],在机体的整个生理过程中都参与调控作用。动物模型研究已经表明miRNA的表达具有时间性和组织特异性,暗示他们在组织和器官的发育、功能发挥及维持等过程中存在重要的调控作用。如在线虫中最早发现的lin-4和let-7两个miRNA,他们通过调控lin-14、lin-28及lin-41等基因来影响线虫的幼体发育^[12,15,16];果蝇中的miRNA bantam可通过作用于hid基因来促进细胞的增殖、抑制细胞凋亡,从而调控机体的发育^[4];在哺乳动

物中miRNA对组织分化的调控也有重要的作用,研究表明miR-181可调节造血干细胞的分化^[17], miR-223对粒细胞生成具有调控作用^[18], miR-1及miR-133可促进成肌细胞的增殖和肌形成^[19], miR-143可调控脂肪细胞的分化^[20]。此外, miRNA在保持细胞体内平衡方面也具有调节作用,如miR-15a和miR-16通过作用于抗凋亡基因Bcl-2来诱导细胞的凋亡^[21], miR-21通过下调与凋亡相关基因的表达来抑制细胞的凋亡^[21,22]。最近研究还表明, miRNA在机体的免疫功能方面也有重要调控作用,如miR-155和miR-125b可调节脂多糖诱导的机体内毒素休克^[23], Akt1可通过调控miRNA的表达水平来影响巨噬细胞在脂多糖刺激下的炎症反应^[24]。

总之, miRNA具有广泛的生物学功能, miRNA的表达异常不仅影响着机体正常的生长发育,而且与机体多种癌症的发生密切相关^[7]。

1.3 miRNA与肿瘤 miRNA作为基因表达的负调控因子,其不仅可以下调抑癌基因的表达,同样可以抑制癌基因的表达,因此miRNA在机体平衡癌基因及抑癌基因的表达方面有着重要作用,当与抑癌基因相关的miRNA表达异常增多时或者与癌基因有关的miRNA表达明显下调时将会导致机体产生癌变。通过对结肠癌、肾癌、前列腺癌、膀胱癌、肺癌及乳腺癌等多种癌组织中的217个miRNA的表达情况进行研究表明,癌变组织中的多种miRNA表达异常下调^[25],此外Volinia等^[26]检测了乳腺癌、肺癌、胰腺癌、前列腺癌及胃癌等6种实体瘤的228个miRNA表达情况,发现26个miRNA的表达异常增多,而17个miRNA的表达明显减少。因此, miRNA对肿瘤的形成具有双重作用,一方面可作为癌基因发挥作用,如miR-21可通过抑制TPM1(Tropomyosin 1)来促进细胞的生长^[27], miR-20a及miR-106对RB1及TGFB2等抑癌基因的表达具有抑制作用^[26],研究表明这类miRNA在肿瘤组织中呈不同程度的高表达^[26,28];另一方面具有抑癌基因的作用,如miR-15a及miR-16可作用于抗凋亡基因Bcl-2来诱导细胞的凋亡^[21], Let-7可负调控癌基因RAS的表达来抑制细胞的增殖^[29,30],而这类miRNA在肿瘤组织中表达将被抑制^[29,31]。

2 miRNA在胆管癌发生发展中的作用

最近研究表明,多种miRNA在胆管癌细胞或组织中表达水平有不同程度的上调或下调(表1)^[32-35],但是癌组织样品与胆管癌细胞株中miRNA的表

表 1 肝内胆管癌或胆管癌细胞中异常表达的miRNA

	胆管癌组织 ^a	胆管癌细胞 ^b		
		Mz-ChA-1	TFK	KMCH
上调	miR-106a、miR-224、miR-374、miR-193、miR-15a、miR-21、miR-25、miR-130b、miR-17-5p、miR-331、miR-19a、miR-142-3p、miR-223、miR-324-5p、miR-20、miR-17-3p、miR-15b、miR-106b、miR-103、miR-107、miR-93、miR-27a	miR-200b、miR-21、miR-23a、miR-141、miR-27a		
下调	miR-198、miR-302b、miR-204、miR-337、miR-371、miR-302d、miR-200c、miR-184、miR-338、miR-185、miR-320、miR-373、miR-98、miR-214、miR-145、miR-222、miR-328、let-7b、miR-197、let-7a、miR-560、miR-370、miR-188、miR-662、miR-191、miR-512-3p、miR-520e、miR-513、miR-494	miR-125a、miR-31、miR-95、miR-29		

^a胆管癌组织与正常组织的比较; ^b三株胆管癌细胞与胆管细胞的比较。

达谱截然不同,这可能是由于样品的来源不同所致,通过这一现象可以揭示miRNA的异常表达与胆管癌的发生发展密切相关。下面介绍与胆管癌发生发展比较密切的几种miRNA。

2.1 miR-21 研究表明miR-21在多种恶性肿瘤中的表达异常^[28,34,36,37],进一步的研究揭示了多种抑癌基因是miR-21直接的靶基因,如TPM1, PDCD4(programmed cell death 4), maspin及PTEN(phosphatase and tensin homolog)等^[38],通过对这些基因表达的抑制不仅利于肿瘤的生长,而且对肿瘤的侵袭与转移也有重要的作用。另外,研究发现 miR-21对Bcl-2的表达也具有调控作用,当miR-21表达受到抑制时将降低细胞Bcl-2的表达,从而提高细胞凋亡^[39]。表1中显示了miR-21在胆管癌组织和三种胆管癌细胞中都有高表达,说明miR-21对胆管癌的发生可能存在密切联系。最近的研究表明了miRNA-21在胆管癌中的高表达将抑制PDCD4及TIMP3(Tissue inhibitor of metalloproteinases 3)等抑癌基因的表达^[34],另外也可有效地抑制PTEN的表达^[32],而当miR-21表达受抑制时将导致胆管癌细胞对抗肿瘤药物-吉西他滨(Gemcitabine)敏感度的提高^[32]。

2.2 miR-200 miR-200家族包括miR-200a、miR-200b、miR-200c、miR-141及miR-429等五个成员,研究认为miR-200家族可通过抑制ZEB1及ZEB2的表达来增强E-钙黏附蛋白(E-cadherin)的表达,从而在上皮细胞-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)过程中有着重要作用^[40],进一步研究表明高转移乳腺癌细胞株(4TO7)中的miR-200家族及E-cadherin低表达,

从而促进了细胞的转移和侵袭^[41]。然而,在胆管癌细胞中研究认为,miR-200家族中的miR-141及miR-200b存在过表达^[32]。miR-141的靶基因为CLOCK, CLOCK在调节机体生理节律中起着重要作用,另外也可以作为抑癌基因来抑制细胞分裂并促进细胞凋亡^[32],因此miR-141可能通过抑制CLOCK的表达来促进胆管癌细胞增殖;miR-200b的靶基因是PTPN12(protein tyrosine phosphatase, non receptor type 12), PTPN12能够通过抑制c-Abl及Src去磷酸化来抑制Ras通路从而达到抑癌作用,所以miR-200b表达的抑制将导致胆管癌细胞耐药性的降低^[32]。

2.3 let-7a 最初研究表明let-7在线虫的发育中起着重要调控作用^[3],随着研究的深入发现let-7在肺癌、结肠癌及胃癌等多种癌组织中表达降低^[42-44],表明let-7的功能抑制可能与肿瘤的发生、发展密切相关。通过表1可知,胆管癌组织中let-7a及let-7b的表达被下调,而研究认为癌基因HMGA2(high mobility group A2)是let-7的靶基因,let-7可通过下调HMGA2的表达而抑制肺癌细胞的增殖^[45],由此可推测let-7可能在胆管癌的发生过程中起到抑癌作用。然而, Meng等研究发现IL-6(interleukin-6)过表达的胆管癌细胞中let-7的表达被上调,进一步研究表明抑癌基因NF-2(neurofibromatosis 2)是let-7a的靶基因,由于NF-2是Stat-3的负调控子,因此let-7a通过下调NF-2的表达而提高Stat-3通路的活性,使IL-6过表达的胆管癌细胞抗药性增强^[46]。由此推测,let-7对不同状态下的胆管癌可能表现不同的调控作用,而let-7所表现出的这种双重作用的机制

■相关报道

近些年来的研究还发现,miR-29、miR-204、miR-320及miR-370在胆管癌的发生发展中也具有调控作用。

■同行评价

本文选题新颖,参考文献引用合理,具有较好的可读性。

可能是由于IL-6对DNA甲基化转移酶DNMT-1活性的调控所致^[47],但还需要进一步的研究。

2.4 其他miRNA 近些年来研究还发现,miR-29、miR-204、miR-320及miR-370在胆管癌的发生发展中也具有调控作用^[33,48,49]。miR-29及miR-320的表达在胆管癌细胞或组织中被抑制,进一步的研究表明,Bcl-2家族中抗凋亡基因Mcl-1是miR-29及miR-320的靶基因^[33,48],Mcl-1在胆管癌细胞的抗凋亡过程中起着重要作用^[50],胆管癌细胞中miR-29或miR-320的表达上调会降低Mcl-1的表达从而导致细胞耐药性的降低^[33,48]。miR-204在胆管癌组织的表达也被下调,研究发现miR-204可抑制Bcl-2的表达,从而提高细胞的抗药性^[33]。另外,研究还发现IL-6可降低胆管癌细胞中miR-370的表达,而miR-370对癌基因MAP3K8(mitogen-activated protein kinase kinase 8)具有负调控作用,因此这将有利的IL-6促进胆管癌细胞的生长^[49]。

3 结论

miRNA在胆管癌的发生发展中发挥着重要作用,随着越来越多的miRNA引起研究人员的关注,将会发现更多与胆管癌发生发展相关的miRNA,这些将为胆管癌的诊断提供新的思路,也为胆管癌的靶向治疗提供新的药物靶点。

4 参考文献

- Bushati N, Cohen SM. microRNA functions. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2007; 23: 175-205
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993; 75: 843-854
- Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G. The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 2000; 403: 901-906
- Brennecke J, Hipfner DR, Stark A, Russell RB, Cohen SM. bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene *hid* in *Drosophila*. *Cell* 2003; 113: 25-36
- Xu P, Vernooy SY, Guo M, Hay BA. The *Drosophila* microRNA *Mir-14* suppresses cell death and is required for normal fat metabolism. *Curr Biol* 2003; 13: 790-795
- Chen X. A microRNA as a translational repressor of *APETALA2* in *Arabidopsis* flower development. *Science* 2004; 303: 2022-2025
- Garzon R, Calin GA, Croce CM. MicroRNAs in Cancer. *Annu Rev Med* 2009; 60: 167-179
- Khan SA, Taylor-Robinson SD, Toledano MB, Beck A, Elliott P, Thomas HC. Changing international trends in mortality rates for liver, biliary and

- pancreatic tumours. *J Hepatol* 2002; 37: 806-813
- 郭仁宣. 胆道肿瘤外科学. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 2002: 258-259
- Gregory RI, Shiekhattar R. MicroRNA biogenesis and cancer. *Cancer Res* 2005; 65: 3509-3512
- 方福德. microRNA的研究方法与应用. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2008: 2-4
- Rhoades MW, Reinhart BJ, Lim LP, Burge CB, Bartel B, Bartel DP. Prediction of plant microRNA targets. *Cell* 2002; 110: 513-520
- Seggerson K, Tang L, Moss EG. Two genetic circuits repress the *Caenorhabditis elegans* heterochronic gene *lin-28* after translation initiation. *Dev Biol* 2002; 243: 215-225
- Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* 2003; 115: 787-798
- Moss EG, Lee RC, Ambros V. The cold shock domain protein LIN-28 controls developmental timing in *C. elegans* and is regulated by the *lin-4* RNA. *Cell* 1997; 88: 637-646
- Slack FJ, Basson M, Liu Z, Ambros V, Horvitz HR, Ruvkun G. The *lin-41* RBCC gene acts in the *C. elegans* heterochronic pathway between the *let-7* regulatory RNA and the LIN-29 transcription factor. *Mol Cell* 2000; 5: 659-669
- Chen CZ, Li L, Lodish HF, Bartel DP. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science* 2004; 303: 83-86
- Fazi F, Rosa A, Fatica A, Gelmetti V, De Marchis ML, Nervi C, Bozzoni I. A microcircuitry comprised of microRNA-223 and transcription factors NFI-A and C/EBPalpha regulates human granulopoiesis. *Cell* 2005; 123: 819-831
- Chen JF, Mandel EM, Thomson JM, Wu Q, Callis TE, Hammond SM, Conlon FL, Wang DZ. The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nat Genet* 2006; 38: 228-233
- Esau C, Kang X, Peralta E, Hanson E, Marcusson EG, Ravichandran LV, Sun Y, Koo S, Perera RJ, Jain R, Dean NM, Freier SM, Bennett CF, Lollo B, Griffey R. MicroRNA-143 regulates adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 2004; 279: 52361-52365
- Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M, Wojcik SE, Aqeilan RI, Zupo S, Dono M, Rassenti L, Alder H, Volinia S, Liu CG, Kipps TJ, Negrini M, Croce CM. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 13944-13949
- Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res* 2005; 65: 6029-6033
- Tili E, Michaille JJ, Cimino A, Costinean S, Dumitru CD, Adair B, Fabbri M, Alder H, Liu CG, Calin GA, Croce CM. Modulation of miR-155 and miR-125b levels following lipopolysaccharide/TNF-alpha stimulation and their possible roles in regulating the response to endotoxin shock. *J Immunol* 2007; 179: 5082-5089
- Androulidaki A, Iliopoulos D, Arranz A, Doxaki C, Schworer S, Zacharioudaki V, Margioris AN, Tsichlis PN, Tsatsanis C. The kinase Akt1 controls macrophage response to lipopolysaccharide by regulating microRNAs. *Immunity* 2009; 31: 220-231
- Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert BL, Mak RH, Ferrando AA, Downing JR, Jacks T, Horvitz HR,

- Golub TR. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 2005; 435: 834-838
- 26 Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, Visone R, Iorio M, Roldo C, Ferracin M, Prueitt RL, Yanaihara N, Lanza G, Scarpa A, Vecchione A, Negrini M, Harris CC, Croce CM. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 2257-2261
- 27 Zhu S, Si ML, Wu H, Mo YY. MicroRNA-21 targets the tumor suppressor gene tropomyosin 1 (TPM1). *J Biol Chem* 2007; 282: 14328-14336
- 28 Dillhoff M, Liu J, Frankel W, Croce C, Bloomston M. MicroRNA-21 is overexpressed in pancreatic cancer and a potential predictor of survival. *J Gastrointest Surg* 2008; 12: 2171-2176
- 29 Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, Labourier E, Reinert KL, Brown D, Slack FJ. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell* 2005; 120: 635-647
- 30 Johnson CD, Esquela-Kerscher A, Stefani G, Byrom M, Kelnar K, Ovcharenko D, Wilson M, Wang X, Shelton J, Shingara J, Chin L, Brown D, Slack FJ. The let-7 microRNA represses cell proliferation pathways in human cells. *Cancer Res* 2007; 67: 7713-7722
- 31 Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K, Rassenti L, Kipps T, Negrini M, Bullrich F, Croce CM. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 15524-15529
- 32 Meng F, Henson R, Lang M, Wehbe H, Maheshwari S, Mendell JT, Jiang J, Schmittgen TD, Patel T. Involvement of human micro-RNA in growth and response to chemotherapy in human cholangiocarcinoma cell lines. *Gastroenterology* 2006; 130: 2113-2129
- 33 Chen L, Yan HX, Yang W, Hu L, Yu LX, Liu Q, Li L, Huang DD, Ding J, Shen F, Zhou WP, Wu MC, Wang HY. The role of microRNA expression pattern in human intrahepatic cholangiocarcinoma. *J Hepatol* 2009; 50: 358-369
- 34 Selaru FM, Olaru AV, Kan T, David S, Cheng Y, Mori Y, Yang J, Paun B, Jin Z, Agarwal R, Hamilton JP, Abraham J, Georgiades C, Alvarez H, Vivekanandan P, Yu W, Maitra A, Torbenson M, Thuluvath PJ, Gores GJ, LaRusso NF, Hruban R, Meltzer SJ. MicroRNA-21 is overexpressed in human cholangiocarcinoma and regulates programmed cell death 4 and tissue inhibitor of metalloproteinase 3. *Hepatology* 2009; 49: 1595-1601
- 35 Kawahigashi Y, Mishima T, Mizuguchi Y, Arima Y, Yokomuro S, Kanda T, Ishibashi O, Yoshida H, Tajiri T, Takizawa T. MicroRNA profiling of human intrahepatic cholangiocarcinoma cell lines reveals biliary epithelial cell-specific microRNAs. *J Nippon Med Sch* 2009; 76: 188-197
- 36 Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, Magri E, Pedriali M, Fabbri M, Campiglio M, Ménard S, Palazzo JP, Rosenberg A, Musiani P, Volinia S, Nenci I, Calin GA, Querzoli P, Negrini M, Croce CM. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res* 2005; 65: 7065-7070
- 37 Meng F, Henson R, Wehbe-Janek H, Ghoshal K, Jacob ST, Patel T. MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology* 2007; 133: 647-658
- 38 Zhu S, Wu H, Wu F, Nie D, Sheng S, Mo YY. MicroRNA-21 targets tumor suppressor genes in invasion and metastasis. *Cell Res* 2008; 18: 350-359
- 39 Si ML, Zhu S, Wu H, Lu Z, Wu F, Mo YY. miR-21-mediated tumor growth. *Oncogene* 2007; 26: 2799-2803
- 40 Gregory PA, Bert AG, Paterson EL, Barry SC, Tsykin A, Farshid G, Vadas MA, Khew-Goodall Y, Goodall GJ. The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nat Cell Biol* 2008; 10: 593-601
- 41 Korpel M, Lee ES, Hu G, Kang Y. The miR-200 family inhibits epithelial-mesenchymal transition and cancer cell migration by direct targeting of E-cadherin transcriptional repressors ZEB1 and ZEB2. *J Biol Chem* 2008; 283: 14910-14914
- 42 Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, Tomida S, Osada H, Endoh H, Harano T, Yatabe Y, Nagino M, Nimura Y, Mitsudomi T, Takahashi T. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res* 2004; 64: 3753-3756
- 43 Akao Y, Nakagawa Y, Naoe T. let-7 microRNA functions as a potential growth suppressor in human colon cancer cells. *Biol Pharm Bull* 2006; 29: 903-906
- 44 Motoyama K, Inoue H, Nakamura Y, Uetake H, Sugihara K, Mori M. Clinical significance of high mobility group A2 in human gastric cancer and its relationship to let-7 microRNA family. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 2334-2340
- 45 Lee YS, Dutta A. The tumor suppressor microRNA let-7 represses the HMGA2 oncogene. *Genes Dev* 2007; 21: 1025-1030
- 46 Meng F, Henson R, Wehbe-Janek H, Smith H, Ueno Y, Patel T. The MicroRNA let-7a modulates interleukin-6-dependent STAT-3 survival signaling in malignant human cholangiocytes. *J Biol Chem* 2007; 282: 8256-8264
- 47 Hodge DR, Xiao W, Clausen PA, Heidecker G, Szyf M, Farrar WL. Interleukin-6 regulation of the human DNA methyltransferase (HDNMT) gene in human erythroleukemia cells. *J Biol Chem* 2001; 276: 39508-39511
- 48 Mott JL, Kobayashi S, Bronk SF, Gores GJ. mir-29 regulates Mcl-1 protein expression and apoptosis. *Oncogene* 2007; 26: 6133-6140
- 49 Meng F, Wehbe-Janek H, Henson R, Smith H, Patel T. Epigenetic regulation of microRNA-370 by interleukin-6 in malignant human cholangiocytes. *Oncogene* 2008; 27: 378-386
- 50 Kobayashi S, Werneburg NW, Bronk SF, Kaufmann SH, Gores GJ. Interleukin-6 contributes to Mcl-1 up-regulation and TRAIL resistance via an Akt-signaling pathway in cholangiocarcinoma cells. *Gastroenterology* 2005; 128: 2054-2065

编辑 李军亮 电编 何基才

MicroRNAs作为大肠癌生物标志物的研究进展

杨建军, 马延磊, 秦环龙

■背景资料

大肠癌(CRC)是临床最常见的恶性肿瘤之一,其发生是一个多因素、多阶段和多基因改变协同作用的过程。近年来研究发现miRNAs在CRC中的表达广泛失调。因此,利用CRC组织和血液中的miRNAs可较准确地诊断大肠癌的存在,并帮助判断CRC临床病理特征及预测疾病复发。而有关miRNAs如何参与肿瘤化疗的研究则为CRC的治疗提供了又一有力工具。

杨建军, 马延磊, 秦环龙, 上海交通大学附属第六人民医院外科上海市 200233

上海市科委基金资助项目, No. 07DZ19505

作者贡献分布: 本文综述由杨建军与马延磊完成; 秦环龙审校。

通讯作者: 秦环龙, 教授, 200233, 上海市宜山路600号, 上海交通大学附属第六人民医院普外科. huanlong_qin@live.cn

电话: 021-64361349 传真: 021-64368920

收稿日期: 2009-12-11 修回日期: 2010-01-12

接受日期: 2010-01-19 在线出版日期: 2010-02-28

MicroRNAs as biomarkers for colorectal cancer: recent advances

Jian-Jun Yang, Yan-Lei Ma, Huan-Long Qin

Jian-Jun Yang, Yan-Lei Ma, Huan-Long Qin, Department of Surgery, Shanghai Sixth People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200233, China
Supported by: the Science and Technology Program of Shanghai City, No. 07DZ19505

Correspondence to: Professor Huan-Long Qin, Department of Surgery, Shanghai Sixth People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200233, China. huanlong_qin@live.cn

Received: 2009-12-11 Revised: 2010-01-12

Accepted: 2010-01-19 Published online: 2010-02-28

Abstract

MicroRNAs (miRNAs) are a class of short non-coding RNAs (19-24 nucleotides in length). They can inhibit protein translation and induce degradation of target mRNAs, and thus play an important role in the regulation of gene expression. Recent studies have identified miRNAs in colorectal cancer (CRC) tissue and blood that may help accurately diagnose the presence of CRC, predict disease recurrence, and evaluate clinical and pathological features of CRC. Overexpression and silencing of specific miRNAs are associated with the development and progression of CRC. The differential expression of miRNAs in CRC tissue and blood offer the prospect for their use in early detection and screening of the disease. In addition, miRNAs may be important targets for gene therapy of CRC. In this paper, we will review the potential role of miRNAs as biomarkers for diagnosis and treatment of CRC.

■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; 颜宏利, 教授, 中国人民解放军第二军医大学遗传学教研室

Key Words: MicroRNA; Colorectal cancer; Biomarker

Yang JJ, Ma YL, Qin HL. MicroRNAs as biomarkers for colorectal cancer: recent advances. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(6): 568-575

摘要

MicroRNAs(miRNAs)是一种短链(19-24个核苷酸)非编码RNA,可抑制蛋白质翻译或其靶基因mRNAs的降解,因而在基因表达调控中发挥重要作用。最近的研究发现存在于大肠癌(colorectal cancer, CRC)组织和血液中的miRNAs可较准确地诊断大肠癌的存在,并帮助判断CRC临床病理特征及预测疾病复发。特异miRNAs的过表达和沉默与CRC的发生发展相关,且其在CRC组织和血液中的差异表达为早期筛选和诊断CRC提供了应用前景。另外,miRNAs可能成为CRC基因治疗的重要靶点。本文将就miRNAs作为生物标志物在CRC诊治中的潜在作用作一综述。

关键词: miRNAs; 大肠癌; 生物标志物

杨建军, 马延磊, 秦环龙. MicroRNAs作为大肠癌生物标志物的研究进展. *世界华人消化杂志* 2010; 18(6): 568-575
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/568.asp>

0 引言

大肠癌(colorectal cancer, CRC)是一个多基因、多阶段、长期形成的复杂的病变过程,早期诊断,及时监测肿瘤复发和有效治疗对CRC患者的预后意义重大。近年来已发现许多microRNAs(miRNAs)存在于CRC肿瘤组织和血液中,并在CRC的发病机制中起重要作用。这为提高CRC的早期筛查,早期诊断,治疗效果及准确判断预后提供了一个全新的视角。

1 miRNAs的生物学特征,生物合成及其作用机制

1.1 miRNAs的生物学特征 大量研究发现miRNAs具有许多共同的生物学特征^[1]: (1)具有高度保守性、时序性和组织特异性; (2)以单拷

贝、多拷贝或基因簇等多种形式存在于基因组中(但大多数为基因簇形式), 他们多以顺反子形式转录出前体转录产物, 且位于独立的转录单位中. 人类miRNAs基因分布于除Y之外的所有染色体中, 且绝大部分位于基因间隔区, 也有少数存在于已知基因内含子中; (3)广泛存在于真核生物中, 本身不具有开放阅读框, 是一组不编码蛋白质的短序列RNAs; (4)几乎均为单链结构, 而与其作用相似的成熟siRNA则是双链结构; (5)由核酸酶Dicer作用于前体双链生成含有3'羟基和5'磷酸的核苷酸片段, 这一特点使他与大多数寡核苷酸和功能性RNA的降解片段区别开来. 目前对miRNAs的研究还处于起步阶段, 更多生物学特性的进一步发现, 将有助于加深对miRNAs功能的认识.

1.2 miRNAs的生物合成和作用机制 miRNA在体内的形成最初始于RNA聚合酶的转录, 其产物为Pri-miRNA(primary miRNA)的前体分子. Pri-miRNA在核糖核酸酶Drosha的作用下, 剪切为具有茎环结构的约70个核苷酸长度的miRNA前体(Pre-miRNA). Pre-miRNA在Ran-GTP依赖的核质转运蛋白Exportin-5的作用下从核内运输到胞质中. 在Dicer酶的作用下, miRNAs前体被剪切成21-25个核苷酸长度的单链miRNA, 并结合到RNA诱导的基因沉默复合物(RNA-induced silencing complex, RISC)中, 形成非对称RISC复合物. 该复合物与靶mRNA相结合来发挥其基因调控作用^[2-4].

目前miRNAs确切的作用机制还不是很清楚. 研究表明miRNAs以不同方式下调基因表达, 若miRNAs与其靶mRNAs在开放阅读框中以完全互补的方式结合, mRNAs将发生特异性降解; 若miRNAs在mRNAs的3'端非翻译区(3'UTR)以部分互补的方式与mRNAs结合, 则仅抑制其翻译而不影响mRNAs稳定性^[5]. 通常一种miRNA可与多种mRNAs靶点相作用, 多种miRNAs也可以与一种mRNA相作用. mRNAs的3'UTR包含多个miRNAs的作用位点, 且和抑制翻译的程度有关, miRNAs结合的位点越多, 抑制的程度就越大. 由此形成复杂而又精确的调节网络, 调控着生物体的基因表达和生理功能, 一旦miRNAs的表达水平失调, 可导致包括肿瘤在内的多种疾病发生.

2 miRNAs在CRC细胞生长、凋亡、侵袭和转移中的作用

目前的研究证实miRNAs在肿瘤的发生发展中

发挥着非常重要的调节作用, 约半数miRNAs的上游基因位于染色体上与肿瘤相关的区域中. 根据miRNAs在肿瘤发病中作用的不同, 有人提出了“癌miRNAs(OncomiRs)与抑癌miRNAs(tumor suppressing)”的观点^[6-8], 即miRNAs在肿瘤的发生与发展过程中既可扮演癌基因也可扮演抑癌基因的角色. 在肿瘤组织中表达上调的miRNAs可能起到癌基因的作用, 表达下调的miRNAs可能起到抑癌基因的作用. 在CRC中也常存在特定miRNAs的过表达或表达沉默, 这些miRNAs表达的失调常与CRC肿瘤细胞生长、凋亡、侵袭和转移相关联.

最近, Borralho等^[9]在结肠癌细胞系HCT116中瞬时过表达miR-143导致细胞活力减少约60%, 而使用G418抗生素筛选的miR-143过表达细胞系暴露于5-氟尿嘧啶(5-FU)后, miR-143表达的增加与细胞活力减少及细胞凋亡增加相关联. 研究还证实以上改变与核碎裂及caspase-3、-8和-9活性的增加有关. 另外, miR-143可导致细胞外调节蛋白激酶5, NF- κ B和Bcl-2蛋白的表达下调, 而当暴露于5-FU后其表达下调更加明显. 这提示miR-143可能作为抑癌基因参与调节细胞生长, 细胞凋亡和某些化疗反应关键蛋白, 并增加结肠癌细胞系对5-FU的敏感性. Chen等^[10]也发现在转染了miR-143的结肠癌细胞系LoVo中, KRAS(miR-143的作用靶点)的表达显著降低, 而转染miR-143特异性抑制剂则增加LoVo细胞系中KRAS蛋白的表达水平. 使用miR-143抑制剂处理过的LoVo细胞系表现出更强的增殖能力. 这说明miR-143可通过抑制KRAS的翻译来抑制CRC细胞系生长. Guo等^[11]则报道了miR-126的缺失可促进结肠癌细胞系的生长.

miRNAs对调节细胞分化和维持干细胞可塑性状态极为重要. Monzo等^[12]评估了miRNAs在人类胚胎结肠组织, CRC及与其相匹配的正常结肠组织中的表达水平. 结果发现miR-17-92簇与其靶点E2F1在结肠组织生长及癌变中显示了相似的表达形式, 并均可促进细胞增殖. 提示miRNAs在胚胎发育和结肠上皮肿瘤转化中起重要作用.

抑癌基因表达下调与CpG岛启动子区甲基化紧密相关, 而miRNAs的表达也受到包括启动子区异常甲基化或组蛋白修饰等不同表观遗传机制的调控. hsa-miR-342的表达通常与其宿主基因EVL一致, 且EVL上游的CpG岛甲基化导致hsa-miR-342表达沉默. 进一步研究发现在86%

■研究前沿

利用miRNAs表达谱筛选并鉴定CRC的诊断标志物, 是当前CRC研究中的热点. 而以癌基因或抑癌基因身份参与CRC发病的miRNAs数量众多, 这就为随后的验证工作设置了较大障碍, 如何在大量的候选标志物中找到真正有效的诊断标志物, 还需研究者们进一步深入探究.

■相关报道

Huang等使用实时RT-PCR检测晚期大肠肿瘤(包括癌和晚期腺瘤)患者及健康对照组患者血清中12个miRNAs的表达水平,发现血清miR-29a和miR-92a对晚期肿瘤具有重要的诊断价值。

的大肠腺癌和67%的大肠腺瘤中存在EVL/hsa-miR-342位点的甲基化,提示EVL/hsa-miR-342的甲基化是CRC发生的早期事件。此外,CRC患者癌旁正常黏膜甲基化出现频率为56%,而在非CRC患者的正常黏膜中仅为12%。hsa-miR-342在CRC细胞系HT-29中的重组可诱导凋亡,提示他可作为促凋亡的抑癌基因起作用^[13,14]。位于CpG岛的miRNAs(hsa-miR-9, hsa-miR-124, hsa-miR-129, hsa-miR-137和hsa-miR-149)在CRC组织标本中表达下调。其中hsa-miR-9-1, hsa-miR-129-2和hsa-miR-137的CpG岛甲基化常仅存在于CRC细胞系和原发性CRC肿瘤中^[15]。Toyota等^[16]研究发现miR-34b和miR-34c在CRC中发生表观沉默,即miR-34b/c表达下调与邻近的CpG岛超甲基化相关。miR-34b/c CpG岛甲基化常存在于CRC细胞系(9/9, 100%)和原位CRC肿瘤(101/111, 90%)中,而不存在于正常结肠黏膜中。提示miR-34b/c是CRC中新的抑癌基因,且miR-34b/c CpG岛是CRC中表观沉默的重要靶点。

Schimanski等^[17]利用瞬时转染miR-196a的大肠癌细胞系SW480做体外不同功能和体内肺转移模型分析,发现miR-196a以剂量依赖和基因特异的形式抑制其靶点HoxA7, HoxB8, HoxC8和HoxD8表达。高表达水平的miR-196a不仅可活化AKT信号通路,还可促进癌细胞分离,迁移,侵袭并增强化疗敏感性,但不影响细胞增殖和凋亡。此外,miR-196a可增加CRC的肺转移。提示miR-196a在CRC中可作为癌基因而起作用。Asangani等^[18]将miR-21转染结肠癌细胞系Colo206f可显著抑制包含抑癌基因Pdc4-3'-UTR的荧光素酶报告基因,而转染抗miR-21的结肠癌细胞系RKO中的Pdc4蛋白表达增加且侵袭性降低。此外,这些细胞的血管内渗和肺转移均减少。相反,miR-21在Colo206f中的过表达显著减少Pdc4蛋白的表达并增加细胞侵袭性,而Pdc4 mRNA的表达未发生改变^[19]。提示miR-21可在转录后水平下调Pdc4并刺激CRC的侵袭,血管内渗和转移。另外,Hu等^[20]发现miR-141可通过调节Smad相互作用蛋白1的表达水平来抑制CRC细胞迁移和侵袭。

3 miRNAs在CRC组织中的表达

最近,许多基于CRC组织中miRNAs表达谱的研究试图明确其在CRC发生发展中的作用^[21-27](表1)。Diosdado等^[26]使用实时RT-PCR测定55个CRC和10个健康对照者组织中miR-17-92簇的

表达水平及48个肿瘤组织中c-Myc mRNA的表达水平。结果发现除了miR-17-92簇中的miR-18a外,其余5个(miR-17, miR-19a, miR-20a, miR-19b-1和miR-92a-1)均在CRC肿瘤组织中表达增加(相比于正常组织)。c-Myc和miR-17-92簇的表达显著正相关,提示c-Myc转录活性可影响miR-17-92簇的表达,从而间接促进CRC发展。Arndt等^[21]利用MirVana miRNA Bioarrays检测8个CRC细胞系模型,45个不同分期的CRC组织及其相匹配的正常结肠组织中的miRNAs表达谱。结果从中鉴定了37个差异表达的miRNAs,其中一些miRNAs表达改变(包括miR-133a表达缺失和miR-224表达增加)与CRC进展相关联。此外,还有11个差异表达miRNAs共存于CRC和正常结肠组织及CRC细胞系中。使用基因组富集分析鉴定与信号通路相关的差异表达miRNAs,并分析转移和非转移性同源细胞系的基因表达,发现参与细胞周期和神经调节蛋白通路的miR-145靶点在转移性细胞系中显著下调。这提示在不同阶段的CRC中,表达变化的miRNAs可作为CRC潜在的诊断和预后标志物。Ng等^[25]研究发现,miR-143在87.5%(35/40)的CRC组织中表达下调。恢复结肠癌细胞系中miR-143的表达水平可减少肿瘤细胞生长和软琼脂集落形成,并下调其靶点DNA甲基转移酶3A(DNA methyltransferase 3A, DNMT3A) mRNA和蛋白表达水平,提示miR-143在CRC中可通过调节DNMT3A来抑制肿瘤发生发展。Yamamichi等^[27]对39个CRC和34个大肠息肉组织标本鉴定发现,miR-21在CRC中的表达水平高于正常结肠黏膜,且其高表达也见于肿瘤相关间质成纤维细胞中。据此推测肿瘤分泌的细胞因子可诱导miR-21的表达。miR-21与其靶点PDCD4(肿瘤抑制蛋白)的表达负性相关。虽然miR-21表达上调常见于癌前腺瘤中,但其在腺瘤中的表达水平远高于非致瘤性息肉。在癌前腺瘤到晚期癌期间,miR-21的表达频率和程度显著增加。Motoyama等^[28]使用包含455个人类miRNAs探针的微阵列及实时RT-PCR测定CRC和癌旁正常组织中的miRNAs表达谱,发现共有21个miRNAs在CRC组织中过表达,其中miR-31, miR-183, miR-17-5p, miR-18a, miR-20a和miR-92在CRC组织中的表达水平高于癌旁正常组织($P<0.05$)。而miR-143和miR-145在CRC组织中的表达水平远远低于癌旁正常组织($P<0.05$)。Ba等^[29]在15对配对结肠癌

表 1 microRNA在CRC组织及癌旁正常组织中的差异表达

microRNA	表达水平(CRC中)	染色体定位	参考文献
miR-18a	上调	13q31.3	[21,23,10]
miR-29b	上调	1q32.2或7q32.3	[21,24,12]
miR-93	上调	7q22.1	[21,22,10]
miR-25	上调	7q22.1	[21,12,10]
miR-182	上调	7q32.2	[21,24,12]
miR-96	上调	1q32.2或7q32.2	[21,24,12]
miR-183	上调	7q32.2	[21,24,12]
miR-29a	上调	7q32.3	[21,24,12]
miR-135a	上调	3p21.1或12q23.1	[22,24,12]
miR-221	上调	Xp11.3	[23,12,10]
miR-200b	上调	1p36.33	[24,12,10]
miR-200c	上调	12p13.31	[24,12,10]
miR-155	上调	21q21.3	[24,12,10]
miR-19a	上调	13q31.3	[21,23,24,10]
miR-20a	上调	13q31.3	[21,22,3,10]
miR-17-5p	上调	13q31.3	[21,22,12,10]
miR-106b	上调	7q22.1	[21,22,23,10]
miR-31	上调	9p21.3	[21,24,12,10]
miR-224	上调	Xq28	[21,23,24,12]
miR-222	上调	Xp11	[22,23,12,10]
miR-210	上调	11p15.5	[21,24,12,10]
miR-223	上调	Xq22	[22,23,12,10]
miR-17-3p	上调	13q31.3	[23,24,12,10]
miR-203	上调	14q32.33	[21,22,24,12,10]
miR-21	上调	17q23	[21,22,24,12,10]
miR-34a	上调	1p36.22	[21,22,24,12,10]
miR-181b	上调	1q31.1或9q33.3	[21,22,24,12,10]
miR-95	上调	4p16.1	[21,22,23,24,12]
miR-92	上调	13q31.3或Xq26.2	[22,23,24,12,10]
miR-106a	上调	Xq26.2	[21,22,23,24,12,10]
miR-143	下调	5q32-33	[21,25,10]
miR-30c	下调	1p34.2或6q13	[21,24,12]
miR-1	下调	18q12.3或20q13.33	[21,22,10]
miR-195	下调	17p13	[21,12,10]
miR-204	下调	9q21.12	[24,12,25]
miR-214	下调	1q23	[24,12,10]
miR-137	下调	1p21.3	[24,12,25]
miR-149	下调	2q37.3	[24,12,10]
miR-100	下调	11q24.1	[24,12,10]
miR-26a	下调	3p22.2或12q14.1	[12,25,10]
miR-125b	下调	11q24.1或21q21.1	[12,25,10]
miR-30a-3p	下调	6q13	[21,22,24,12]
miR-125a	下调	19q13.41	[21,12,25,10]
miR-133a	下调	18q11.或20q13.33	[21,24,12,25]
miR-139	下调	11q13.4	[21,24,12,10]
miR-145	下调	5q32	[24,12,25,10]

■创新盘点

本文综述了miRNAs的生物学特征及作用机制,并重点介绍了其在CRC细胞生长、凋亡、侵袭和转移中的作用,在CRC组织及外周血中的表达,以及与CRC的临床病理特征、预后及复发、化疗反应性的关系,其他文献并未系统总结近年来miRNAs在CRC中的表达及明确其重要的临床意义。

和正常癌旁组织中筛选鉴定出200多个miRNAs,其中有132个同时表达于结肠癌和癌旁正常组织,而结肠癌组织中有47个miRNAs表达下调。

miRNAs在CRC中的差异表达,提示其与结肠癌的发生发展紧密联系,有可能成为诊断CRC的有希望的生物标志物。

■应用要点

特异miRNAs的过表达和沉默与CRC的发生发展相关,且其在CRC组织和血液中的差异表达为早期筛选和诊断CRC提供了应用前景,同时开辟了CRC治疗的新途径与新思路。

4 miRNAs与CRC临床病理特征之间的关系

近年来研究发现,miRNA的表达水平除了在肿瘤与正常组织之间的差别之外,在不同的肿瘤类型,肿瘤分期及其他临床相关变量下均有不同的特征。Wang等^[30]应用实时RT-PCR检测并分析了miR-31, miR-143和miR-145在98个原发性CRC及配对癌旁组织标本中的表达及其与临床病理特征之间的关系。结果显示miR-31在CRC中的表达水平高于正常结肠黏膜($P = 0.001$),且其表达与晚期TNM分期($P = 0.026$)和更深的肿瘤浸润程度正相关($P = 0.024$)。miR-145在结肠癌($P = 0.001$)和直肠癌($P = 0.012$)中表达均下调,而miR-143仅在结肠癌中表达下调($P = 0.023$)。除了miR-145的表达与肿瘤部位相关外($P = 0.03$),miR-143和miR-145与其他临床病理特征之间无关联($P > 0.05$)。Díaz等^[31]发现miR-17-5p和miR-106a的表达改变与CRC患者预后生存相关联。miR-106a表达下调预示了更短的无病生存期(disease-free survival, DFS)和总存活数(overall survival, OS)(分别为 $P = 0.03$ 和 $P = 0.04$)。在CRC早期阶段,miR-17-5p与DFS相关联。miR-17-5p和miR-106a的表达水平与其共同靶点E2F1的表达负相关(分别为 $P = 0.04$ 和 $P = 0.03$),而miR-126与其宿主基因EGFL7的表达无相关性。miR-106a的表达失调提示其可作为独立于肿瘤分期的DFS和OS标志物。Slaby等^[32]的研究则发现,肿瘤组织中(相比于癌旁正常组织)miR-21($P = 0.0001$)和miR-31($P = 0.0006$)表达上调,miR-143($P = 0.011$)和miR-145($P = 0.003$)表达下调。高表达的miR-21与CRC患者淋巴结阳性率($P = 0.025$)及远处转移($P = 0.009$)相关,且其表达水平与CRC临床分期相关($P = 0.032$)。而低表达的miR-143($P = 0.006$)和miR-145($P = 0.003$)常存在于最大直径 >50 mm的肿瘤中。另外,以上miRNAs与血清CEA的表达水平不相关。另有研究发现 miR-31的表达水平与CRC肿瘤分期相关^[23], hsa-miR-9-1的甲基化状态与淋巴结转移相关^[15],而miR-18a过表达的CRC患者比其低表达患者的临床预后更差($P = 0.07$)^[28]。

目前,40岁以下患者早发CRC的原因仍不清楚。最近,Yantiss等^[33]评估了24个 <40 岁的CRC患者(实验组)和45个 ≥ 40 岁的CRC患者(对照组)组织中miR-21, miR-20a, miR-183, miR-192, miR-145, miR-106a, miR-181b和miR-203的表达水平,发现miR-21, miR-20a, miR-145, miR-181b和miR-203的表达水平显著增加。提示miRNAs

对早发CRC的发生发展起促进作用。

5 miRNAs在CRC患者外周循环血中的表达

因miRNAs存在于体液(尤其是血清),所以有可能成为有用的临床标志物。最近的研究显示肿瘤源性miRNAs可以非常稳定地存在于人类血清中(因受内源性核糖核酸酶的保护),且其表达水平足以供临床检测使用^[34]。Huang等^[35]使用实时RT-PCR检测晚期大肠肿瘤(包括癌和晚期腺瘤)患者及健康对照组患者血清中12个miRNAs的表达水平,发现血清miR-29a和miR-92a对晚期肿瘤具有重要的诊断价值。两者在鉴别CRC和正常对照组时分别具有0.844和0.838的接受者操作特征曲线下面积(area under receiver operating characteristic curve, AUC)。更重要的是,这两个miRNAs在鉴别晚期腺瘤和正常对照组时也分别具有0.749和0.769的AUC。联合使用这两个miRNAs的受试者工作特征(receiver operating characteristic, ROC)鉴别CRC和晚期腺瘤时,AUC分别为0.883和0.773,且分别具有83.0%和73.0%的敏感性及84.7%和79.7%的特异性。这些数据提示血清miR-29a和miR-92a作为新的无创性生物标志物,在早期诊断CRC时具有巨大的潜力。Ng等^[24]发现CRC和健康对照组中有5个差异表达miRNAs(miR-135b, miR-95, miR-17-3p, miR-92, miR-222)在血清和组织中表达均上调,进一步验证发现miR-17-3p和miR-92在25个CRC患者和20个健康对照者血清中表达显著增加($P < 0.0005$),而在10个术后CRC患者血清中他们的表达显著降低($P < 0.05$)。另外,利用miR-92的不同表达水平可区分CRC患者与胃癌患者,炎性肠病患者和正常受试者,miR-92的AUC为88.5%。在临界值为240时,miR-92鉴别诊断CRC和对照组的敏感性和特异性分别为89%和70%。提示miR-92在CRC患者血清中显著增高,有可能成为CRC筛查诊断的生物标志物。Chajut等^[36]利用定量RT-PCR检测10个健康对照者和10个CRC患者血清中350多个miRNAs的表达水平,发现一些miRNAs在CRC患者和健康对照者血清中的表达水平显著不同。进一步对其中22个miRNAs在大样本人群(共118个CRC患者和健康对照者)中检测,结果提示循环血miRNAs有可能成为诊断CRC的有希望的标志物。

血浆和血清miRNAs的表达水平显著相关,提示他们均可用来研究miRNAs在外周血中的表达。现已在健康受试者血中鉴定出超过100个

miRNAs, 这个表达谱明显不同于含有肿瘤特异性miRNAs的CRC患者. Chen等^[37]发现相比于健康对照组, 有69种miRNAs仅存在于CRC患者血清中. 进一步鉴定发现14个仅存在于CRC(而非其他癌症组, 如肺癌等)患者血清中的miRNAs独特表达谱. 对产妇血清中胎盘miRNAs的检测发现其表达水平随着胎龄的增加而增加, 提示miRNAs可作为不同生理和病理环境中的生物标志物^[38]. 肿瘤特异性miRNAs的重叠性和差异性表达表明单个miRNA诊断CRC的敏感性较低, 若能针对年龄相匹配的正常人、有早期病变的患者(如腺瘤)及不同阶段CRC患者建立一组外周循环血中miRNAs的差异表达谱, 即有望实现对早期病变和不同阶段CRC的准确诊断与评估.

6 miRNAs对CRC预后及复发的影响

最近对miRNAs的研究显示, 一些miRNAs与CRC无复发生存率相关, 因此可作为CRC的预后及预测其复发的生物标志物. Schepeler等^[39]在10个正常黏膜组织和49个II期结肠癌组织中鉴定出315个差异表达的miRNAs, 其中miR-145在肿瘤组织中表达最低. 另外, 37个高表达miR-320或miR-498的II期结肠癌患者(中位生存期为75 mo)的无进展生存期显著不同于低表达miR-320或miR-498的患者. 对肿瘤进行年龄, 性别, 肿瘤分期, 分化和组织分级的分层分析发现, 这两个miRNAs是无复发生存率的独立预测因子. 联合17个miRNAs表达谱对31个CRC复发进行预测, 其结果为准确性81%, 特异性83%及敏感性77%. Xi等^[40]在24个CRC组织及其配对正常结肠黏膜标本中, 评估了10个miRNAs在CRC患者中的潜在的预后诊断价值, 发现肿瘤组织中的hsa-miR-15b, hsa-miR-181b, hsa-miR-191和hsa-miR-200c显著过表达(分别为 $P = 0.0278$, $P = 0.0002$, $P = 0.0264$ 和 $P = 0.0017$). Kaplan-Meier生存分析显示hsa-miR-200c与患者的生存显著相关($P = 0.0122$). 相对于9个低表达hsa-miR-200c的患者(中位生存期为38 mo), 高表达hsa-miR-200c的患者(中位生存期为26 mo)的生存时间更短. 序列分析显示hsa-miR-181b和hsa-miR-200c的表达与抑癌基因p53的突变状态显著相关(分别为 $P = 0.0098$ 和 $P = 0.0322$). 提示hsa-miR-200c可能是CRC的一个预后因素. Schetter等^[22]分析了84个结肠腺癌组织及其配对癌旁正常组织中的miRNAs表达谱, 并在113个CRC患者中评估了miRNAs与肿瘤状况, TNM分期, 生存预后及

对辅助化疗的反应. 结果鉴定了37个差异表达的miRNAs, 随后对miR-20a, miR-21, miR-106a, miR-181b和miR-203的验证发现, 他们均在肿瘤中过表达($P < 0.001$). miR-21的高表达存在于腺瘤($P = 0.006$)和较晚的TNM分期中. 原位杂交显示miR-21在结肠癌细胞中高表达, 且与较差的生存率和治疗结果相关, 而与TNM分期无关. 此研究提示miRNAs的表达谱在结肠腺癌中广泛改变, 而高表达的miR-21与较差的生存率和治疗结果相关.

7 miRNAs与CRC化疗的关系

化疗药物是CRC治疗的主要方法之一, 因此近来有关miRNAs如何参与CRC化疗反应的研究成为人们关注的热点. Tazawa等^[41]在CRC细胞系HCT116和PKO中, 观察到miR-34a有抑制肿瘤细胞增殖的作用. 使用阿霉素处理HCT116细胞系后, miR-34a的表达水平显著升高且呈时间依赖性, 即随着处理时间的延长其表达水平逐渐升高. 推测阿霉素可能是通过调节miR-34a的表达发挥抗癌作用. Nakagawa等^[42]在 α -mangostin(一种夹氧杂蒽酮)处理的大肠癌细胞系DLD-1中发现, miR-143表达上调, 而ERK5蛋白(可促进细胞生长增殖, 并受miR-143负性调节)表达下调, 表明 α -mangostin的抗癌作用可能通过上调miR-143表达水平来实现. 许多针对5-FU及卡培他滨与miRNAs的研究^[9,43-45]表明, 5-FU及卡培他滨可使CRC细胞系中诸多miRNAs表达失调, 推测这可能与他们作用于CRC细胞的不同靶点有关, 而miRNAs则是这些化疗药物发挥抗肿瘤作用的中间分子. 最近, Song等^[46]的研究部分阐明了miR-140参与肿瘤细胞耐药性的机制, 即miR-140通过对组蛋白脱乙酰基酶4的抑制介导了细胞周期G₁和G₂期的阻滞, 从而降低肿瘤细胞的增殖. 因此, miR-140可能是一个能够克服肿瘤细胞耐药性的治疗靶点, 针对他的进一步研究有可能为CRC治疗提供新的策略.

8 结论

miRNAs在CRC组织和血液中的表达谱表明其有可能作为CRC筛查、诊断和预测复发的生物标志物. 此外, 化疗药物能够影响CRC细胞中miRNAs表达水平, 提示miRNAs有可能成为CRC基因治疗的靶点. 但目前研究尚处于起始阶段, 除需继续寻找新的与CRC相关的miRNAs外, 原已发现的各种miRNAs的功能也有待进一

■同行评价

本文选题较好, 内容丰富, 参考文献引用合理, 可读性较好.

步深入研究. 总之, miRNAs在CRC发病机制中的研究为CRC诊治提供了新的途径与思路.

9 参考文献

- 杜秋丽. miRNA及其功能研究. 生物学通报 2004; 39: 13-15
- Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, Kim VN. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J* 2004; 23: 4051-4060
- Lin SL, Chang D, Wu DY, Ying SY. A novel RNA splicing-mediated gene silencing mechanism potential for genome evolution. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 310: 754-760
- Song JJ, Smith SK, Hannon GJ, Joshua-Tor L. Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science* 2004; 305: 1434-1437
- Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004; 116: 281-297
- Manikandan J, Aarthi JJ, Kumar SD, Pushparaj PN. Oncomirs: The potential role of non-coding microRNAs in understanding cancer. *Bioinformation* 2008; 2: 330-334
- Cho WC. OncomiRs: the discovery and progress of microRNAs in cancers. *Mol Cancer* 2007; 6: 60
- Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006; 6: 259-269
- Borralho PM, Kren BT, Castro RE, Moreira da Silva IB, Steer CJ, Rodrigues CM. MicroRNA-143 reduces viability and increases sensitivity to 5-fluorouracil in HCT116 human colorectal cancer cells. *FEBS J* 2009 Oct 16. [Epub ahead of print]
- Chen X, Guo X, Zhang H, Xiang Y, Chen J, Yin Y, Cai X, Wang K, Wang G, Ba Y, Zhu L, Wang J, Yang R, Zhang Y, Ren Z, Zen K, Zhang J, Zhang CY. Role of miR-143 targeting KRAS in colorectal tumorigenesis. *Oncogene* 2009; 28: 1385-1392
- Guo C, Sah JF, Beard L, Willson JK, Markowitz SD, Guda K. The noncoding RNA, miR-126, suppresses the growth of neoplastic cells by targeting phosphatidylinositol 3-kinase signaling and is frequently lost in colon cancers. *Genes Chromosomes Cancer* 2008; 47: 939-946
- Monzo M, Navarro A, Bandres E, Artells R, Moreno I, Gel B, Ibeas R, Moreno J, Martinez F, Diaz T, Martinez A, Balagué O, Garcia-Foncillas J. Overlapping expression of microRNAs in human embryonic colon and colorectal cancer. *Cell Res* 2008; 18: 823-833
- Esteller M. Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethylome. *Hum Mol Genet* 2007; 16 Spec No 1: R50-R59
- Grady WM, Parkin RK, Mitchell PS, Lee JH, Kim YH, Tsuchiya KD, Washington MK, Paraskeva C, Willson JK, Kaz AM, Kroh EM, Allen A, Fritz BR, Markowitz SD, Tewari M. Epigenetic silencing of the intronic microRNA hsa-miR-342 and its host gene EVL in colorectal cancer. *Oncogene* 2008; 27: 3880-3888
- Bandres E, Agirre X, Bitarte N, Ramirez N, Zarate R, Roman-Gomez J, Prosper F, Garcia-Foncillas J. Epigenetic regulation of microRNA expression in colorectal cancer. *Int J Cancer* 2009; 125: 2737-2743
- Toyota M, Suzuki H, Sasaki Y, Maruyama R, Imai K, Shinomura Y, Tokino T. Epigenetic silencing of microRNA-34b/c and B-cell translocation gene 4 is associated with CpG island methylation in colorectal cancer. *Cancer Res* 2008; 68: 4123-4132
- Schimanski CC, Frerichs K, Rahman F, Berger M, Lang H, Galle PR, Moehler M, Gockel I. High miR-196a levels promote the oncogenic phenotype of colorectal cancer cells. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 2089-2096
- Asangani IA, Rasheed SA, Nikolova DA, Leupold JH, Colburn NH, Post S, Allgayer H. MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pdc4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer. *Oncogene* 2008; 27: 2128-2136
- Allgayer H. Pdc4, a colon cancer prognostic that is regulated by a microRNA. *Crit Rev Oncol Hematol* 2009 Oct 15. [Epub ahead of print]
- Hu M, Xia M, Chen X, Lin Z, Xu Y, Ma Y, Su L. MicroRNA-141 Regulates Smad Interacting Protein 1 (SIP1) and Inhibits Migration and Invasion of Colorectal Cancer Cells. *Dig Dis Sci* 2009 Oct 15. [Epub ahead of print]
- Arndt GM, Dossey L, Cullen LM, Lai A, Druker R, Eisbacher M, Zhang C, Tran N, Fan H, Retzlaff K, Bittner A, Raponi M. Characterization of global microRNA expression reveals oncogenic potential of miR-145 in metastatic colorectal cancer. *BMC Cancer* 2009; 9: 374
- Schetter AJ, Leung SY, Sohn JJ, Zanetti KA, Bowman ED, Yanaihara N, Yuen ST, Chan TL, Kwong DL, Au GK, Liu CG, Calin GA, Croce CM, Harris CC. MicroRNA expression profiles associated with prognosis and therapeutic outcome in colon adenocarcinoma. *JAMA* 2008; 299: 425-436
- Bandrés E, Cubedo E, Agirre X, Malumbres R, Zárate R, Ramirez N, Abajo A, Navarro A, Moreno I, Monzó M, García-Foncillas J. Identification by Real-time PCR of 13 mature microRNAs differentially expressed in colorectal cancer and non-tumoral tissues. *Mol Cancer* 2006; 5: 29
- Ng EK, Chong WW, Jin H, Lam EK, Shin VY, Yu J, Poon TC, Ng SS, Sung JJ. Differential expression of microRNAs in plasma of patients with colorectal cancer: a potential marker for colorectal cancer screening. *Gut* 2009; 58: 1375-1381
- Ng EK, Tsang WP, Ng SS, Jin HC, Yu J, Li JJ, Röcken C, Ebert MP, Kwok TT, Sung JJ. MicroRNA-143 targets DNA methyltransferases 3A in colorectal cancer. *Br J Cancer* 2009; 101: 699-706
- Diosdado B, van de Wiel MA, Terhaar Sive Droste JS, Mongera S, Postma C, Meijerink WJ, Carvalho B, Meijer GA. MiR-17-92 cluster is associated with 13q gain and c-myc expression during colorectal adenoma to adenocarcinoma progression. *Br J Cancer* 2009; 101: 707-714
- Yamamichi N, Shimomura R, Inada K, Sakurai K, Haraguchi T, Ozaki Y, Fujita S, Mizutani T, Furukawa C, Fujishiro M, Ichinose M, Shioyama K, Tsutsumi Y, Omata M, Iba H. Locked nucleic acid in situ hybridization analysis of miR-21 expression during colorectal cancer development. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 4009-4016
- Motoyama K, Inoue H, Takatsuno Y, Tanaka F, Mimori K, Uetake H, Sugihara K, Mori M. Over- and under-expressed microRNAs in human colorectal cancer. *Int J Oncol* 2009; 34: 1069-1075
- Ba Y, Cai X, Chen X, Yin Y, Zhang Y, Zhang CY. [Down-regulative expression of microRNAs cluster in human colon tumorigenesis] *Zhonghua Yixue*

- Zazhi 2008; 88: 1683-1686
- 30 Wang CJ, Zhou ZG, Wang L, Yang L, Zhou B, Gu J, Chen HY, Sun XF. Clinicopathological significance of microRNA-31, -143 and -145 expression in colorectal cancer. *Dis Markers* 2009; 26: 27-34
 - 31 Díaz R, Silva J, García JM, Lorenzo Y, García V, Peña C, Rodríguez R, Muñoz C, García F, Bonilla F, Domínguez G. Deregulated expression of miR-106a predicts survival in human colon cancer patients. *Genes Chromosomes Cancer* 2008; 47: 794-802
 - 32 Slaby O, Svoboda M, Fabian P, Smerdova T, Knoflickova D, Bednarikova M, Nenutil R, Vyzula R. Altered expression of miR-21, miR-31, miR-143 and miR-145 is related to clinicopathologic features of colorectal cancer. *Oncology* 2007; 72: 397-402
 - 33 Yantiss RK, Goodarzi M, Zhou XK, Rennert H, Pirog EC, Banner BF, Chen YT. Clinical, pathologic, and molecular features of early-onset colorectal carcinoma. *Am J Surg Pathol* 2009; 33: 572-582
 - 34 Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, Peterson A, Noteboom J, O'Briant KC, Allen A, Lin DW, Urban N, Drescher CW, Knudsen BS, Stirewalt DL, Gentleman R, Vessella RL, Nelson PS, Martin DB, Tewari M. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 10513-10518
 - 35 Huang Z, Huang D, Ni S, Peng Z, Sheng W, Du X. Plasma microRNAs are promising novel biomarkers for early detection of colorectal cancer. *Int J Cancer* 2009 Oct 28. [Epub ahead of print]
 - 36 Chajut A, Benjamin S, Gilad S, Goren Y, Dan H, Zion O, Kushnir M, Kundel Y, Niv Y, Brenner B. Circulating microRNAs as potential blood-based biomarkers for detection of colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2009; 27: e15040
 - 37 Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, Guo J, Zhang Y, Chen J, Guo X, Li Q, Li X, Wang W, Zhang Y, Wang J, Jiang X, Xiang Y, Xu C, Zheng P, Zhang J, Li R, Zhang H, Shang X, Gong T, Ning G, Wang J, Zen K, Zhang J, Zhang CY. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res* 2008; 18: 997-1006
 - 38 Tang X, Tang G, Ozcan S. Role of microRNAs in diabetes. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1779: 697-701
 - 39 Schepeler T, Reinert JT, Ostenfeld MS, Christensen LL, Silahtaroglu AN, Dyrskjot L, Wiuf C, Sørensen FJ, Kruhøffer M, Laurberg S, Kauppinen S, Ørntoft TF, Andersen CL. Diagnostic and prognostic microRNAs in stage II colon cancer. *Cancer Res* 2008; 68: 6416-6424
 - 40 Xi Y, Formentini A, Chien M, Weir DB, Russo JJ, Ju J, Kornmann M, Ju J. Prognostic Values of microRNAs in Colorectal Cancer. *Biomark Insights* 2006; 2: 113-121
 - 41 Tazawa H, Tsuchiya N, Izumiya M, Nakagama H. Tumor-suppressive miR-34a induces senescence-like growth arrest through modulation of the E2F pathway in human colon cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 15472-15477
 - 42 Nakagawa Y, Iinuma M, Naoe T, Nozawa Y, Akao Y. Characterized mechanism of alpha-mangostin-induced cell death: caspase-independent apoptosis with release of endonuclease-G from mitochondria and increased miR-143 expression in human colorectal cancer DLD-1 cells. *Bioorg Med Chem* 2007; 15: 5620-5628
 - 43 Rossi L, Bonmassar E, Faraoni I. Modification of miR gene expression pattern in human colon cancer cells following exposure to 5-fluorouracil in vitro. *Pharmacol Res* 2007; 56: 248-253
 - 44 Svoboda M, Izakovicova Holla L, Seif R, Vrtkova I, Kocakova I, Tichy B, Dvorak J. Micro-RNAs miR125b and miR137 are frequently upregulated in response to capecitabine chemoradiotherapy of rectal cancer. *Int J Oncol* 2008; 33: 541-547
 - 45 Meng F, Henson R, Lang M, Wehbe H, Maheshwari S, Mendell JT, Jiang J, Schmittgen TD, Patel T. Involvement of human micro-RNA in growth and response to chemotherapy in human cholangiocarcinoma cell lines. *Gastroenterology* 2006; 130: 2113-2129
 - 46 Song B, Wang Y, Xi Y, Kudo K, Bruheim S, Botchkina GI, Gavin E, Wan Y, Formentini A, Kornmann M, Fodstad O, Ju J. Mechanism of chemoresistance mediated by miR-140 in human osteosarcoma and colon cancer cells. *Oncogene* 2009; 28: 4065-4074

编辑 李军亮 电编 何基才

甲胎蛋白及其临床应用研究进展

常彬霞, 辛绍杰

■背景资料

多年来甲胎蛋白主要用于胎儿缺陷和肿瘤的诊断方面, 但缺乏一定的特异性, 随着近年来对其的深入研究, 发现了多种与AFP相关且可用于肿瘤诊断的物质, 如: AFP的异质体AFP-L3, AFP mRNA等, 并开辟了其在肿瘤治疗中的新领域。

常彬霞, 中国人民解放军军医进修学院 北京市 100853
常彬霞, 辛绍杰, 中国人民解放军第302医院人工肝科 北京市 100039

作者贡献分布: 本文由常彬霞综述; 辛绍杰校审。

通讯作者: 辛绍杰, 教授, 100039, 北京市, 中国人民解放军第302医院人工肝科. xsj302@263.net

电话: 010-66933316

收稿日期: 2009-12-01 修回日期: 2010-01-05

接受日期: 2010-01-11 在线出版日期: 2010-02-28

Recent advances in research on alpha-fetoprotein and its clinical application

Bin-Xia Chang, Shao-Jie Xin

Bin-Xia Chang, Chinese PLA Postgraduate Medical School, Beijing 100853, China

Bin-Xia Chang, Shao-Jie Xin, Department of Artificial Liver Therapy, the 302nd Military Hospital of Chinese PLA, Beijing 100039, China

Correspondence to: Professor Shao-Jie Xin, Department of Artificial Liver Therapy, the 302nd Military Hospital of Chinese, Beijing, 100039, China. xsj302@263.net

Received: 2009-12-01 Revised: 2010-01-05

Accepted: 2010-01-11 Published online: 2010-02-28

Abstract

Alpha-fetoprotein (AFP) is an important marker for the diagnosis of fetal defects and tumors, especially hepatic carcinoma. However, AFP has a low specificity in the diagnosis of hepatic carcinoma. In recent years, advances in research on the mechanisms of AFP action not only lead to the discovery of many AFP-related molecules (such as AFP-L3 and AFP mRNA) that can also be used for the diagnosis of tumors, but also open up new applications of AFP in the treatment of tumors.

Key Words: Alpha-fetoprotein; Isoform; Function; Clinical application

Chang BX, Xin SJ. Recent advances in research on alpha-fetoprotein and its clinical application. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(6): 576-580

摘要

多年来甲胎蛋白在胎儿缺陷和肿瘤, 尤其是肝脏肿瘤的临床诊断中发挥着重要作用, 但其对

于肝脏肿瘤的诊断缺乏特异性。近年来随着对其作用机制和功能的深入研究, 发现了多种与AFP相关且可用于肿瘤诊断的物质, 如: AFP的异质体AFP-L3, AFP-mRNA等, 并开辟了其在肿瘤治疗中的新领域。

关键词: 甲胎蛋白; 异质体; 功能; 临床应用

常彬霞, 辛绍杰. 甲胎蛋白及其临床应用研究进展. 世界华人消化杂志 2010; 18(6): 576-580

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/576.asp>

0 引言

甲胎蛋白(AFP)是一种糖蛋白, 生理情况下低浓度存在于成人体内(<20 μg/L); 胚胎期浓度较高, 可通过脐带血进入母体血液中, 因此妊娠期孕妇体内AFP有所升高, 然而如显著异常则标志胚胎发育异常; 病理状态下, AFP与原发性肝癌、胃肿瘤、肺癌、胰腺和胆管癌、睾丸肿瘤等相关。AFP可以出现于许多临床情况, 因此其临床应用广泛。本文对近年来关于AFP的研究作一综述。

1 AFP的结构

AFP与维生素D结合蛋白、α-白蛋白和白蛋白同属类白蛋白家族, 相对分子质量约68 kDa, 半衰期5 d, 是一条由590个氨基酸残基构成的单多肽链。其编码基因位于4号染色体的q臂11-22区, 由15个外显子和14个内含子相隔形成3个区, 从5'端到3'端依次为5'端非编码区、信号肽编码区、3'端非编码区, 具有真核生物基因的典型结构。AFP的分子形状像英文字母U, 分子左臂电子云密度低的区域, 被称做铰链区, 可能是结构域之间多肽连接区, 使得结构域灵活摆动, 促使他结合或释放相应配体。AFP分子有3个结构域, 被称作结构域I、II、III, 每个结构域由195个氨基酸残基构成, 分别有4, 5, 6个二硫键, 因此决定了AFP的构象具有高度的稳定性。在这3个结构域中, 结构域III最为保守, 在哺乳动物中比结构域I、II展示出更大的氨基酸序列的相同性,

■同行评议者

唐世刚, 教授, 大连大学附属中山医院内科

结构域 I 最为不保守, 是人和其他动物AFP功能不同的主要部位. 试验证明, 结构域III含有一个主要的疏水结合位点和一个二聚化区域. 结构域 I 和 II 含有脂肪酸和胆红素的结合位点.

2 AFP的异质体

AFP是一种糖蛋白, 每个分子有一条单天冬酰胺连接的复合型碳水化合物链. 早在1970年Parves通过对原发性肝癌患者血清作淀粉凝胶电泳试验时, 发现AFP常有不同的移动度, 而胎儿及新生儿的血清AFP在电泳上移动度相同, 认为肝癌患者血清AFP电泳移动度不同为唾液酸含量不同所致, 从而提出AFP异质体这一概念. 随后的研究表明, AFP的糖链结构存在不同程度的变异, 而所谓的异质性主要是因为AFP所含的碳水化合物不同所致. AFP的糖链不是遗传编码的, 而是依赖于存在于宿主细胞的内质网和高尔基复合物中的整套糖化酶. 这些酶存在不同的组织分布, 因此卵黄囊来源的AFP和肝脏来源的AFP不同. 各种肿瘤中的AFP存在差异也表明每种肿瘤中糖化酶的质量和数量的差异.

不同器官和各种病理状态下细胞产生的AFP有相同的序列, 在免疫学上相同. 异质性可以通过AFP与不同凝集素和pH环境的反应展现出来, 表现为与各种凝集素结合(反应)或非结合(无反应). 最常用于AFP研究的凝集素是刀豆蛋白A(Con-A)和小扁豆凝集素(LCA). 凝集素不仅对糖残基有特异性, 而且对于整条碳水化合物分子具有特异性.

慢性肝炎和肝硬化的良性慢性肝病, 和原发性肝癌的AFP, 表现出与凝集素LCA不同的亲和力和. 在过去的10年中, 研究表明总AFP是由3种不同的异质体构成的异源糖蛋白的集合. 依据对LCA亲和电泳的反应性, 总AFP可以被分为3种异质体: L1、L2、L3. AFP-L1不与LCA反应, 存在于慢性肝炎和肝硬化中, 构成非恶性肝病中总AFP的主要部分. AFP-L3有LCA的结合活性, 看起来仅由肿瘤细胞产生. AFP-L2与LCA有中度亲和力, 主要来源于卵黄囊肿瘤, 在怀孕期间在母体的血清中也可以检测到^[1].

3 AFP的功能及其临床应用

AFP是一种肿瘤相关的胎儿蛋白, 临床长期被用作胎儿缺陷和肿瘤的血清标志物, 以诊断及监测疾病的进展. AFP有很多重要的生理功能, 包括: 运输功能、作为生长调节因子的双向调节功能等, 近年来其应用更加广泛.

3.1 AFP的运输功能 AFP能够结合和转运大量配体, 如: 胆红素、脂肪酸、类固醇、重金属、染料、各种药物, 以及明显影响人群的环境因子, 如: 类黄酮、二噁英、植物雌激素等. 一些高浓度的疏水配体, 如脂肪酸、雌激素等, 能诱导AFP三级结构的构象改变.

3.2 维持血浆胶体渗透压 由于AFP与成人血清白蛋白高度同源, 又是胎儿体内的主要蛋白质, 因此认为AFP在胎儿体内的作用犹如成人白蛋白, 具有维持血浆胶体渗透压和运输物质的作用^[2].

3.3 AFP作为生长调节因子 在大量体外细胞和体内动物模型中, 哺乳动物的AFP是一种最早和最重要的促进生长的胎儿肿瘤相关性蛋白. AFP从受精合子开始, 在囊胚、原肠胚、胚胎、胎儿和新生儿时期的每个阶段都能检测到, 因此很有可能这种胎儿蛋白在确保哺乳动物成功完成孕期中发挥重要作用. 在过去的10年中, 有报道证实AFP是一个能够增强和抑制生长的双向调节因子. AFP上调和下调生长和分化的功能具有剂量依赖性, 这已经在包括胎盘、卵巢、子宫、淋巴、表皮、内皮、睾丸、乳腺、肝脏和某些肿瘤细胞中得到证实^[3-7]. Dudich等用不同种类的肿瘤细胞和正常人胚胎成纤维细胞作为研究对象, 发现剂量大于100 mg/L的AFP作用于体外培养的各种细胞, 均有不同程度的生长抑制作用, 但若剂量小于100 mg/L时, 对细胞的生长有明显促进作用^[3]. AFP对细胞生长的调节作用可能包括凋亡调节、胞质信号调节和受体脱敏等, 通过细胞膜表面上的AFP受体介导细胞内吞AFP, 从而达到自我生长调节的自分泌机制^[8]. AFP具有免疫抑制的作用, 长期被认为是T细胞和B细胞的免疫调节剂^[9], 主要表现为抑制母体对胚胎发育的免疫应答以及肿瘤患者对肿瘤的免疫应答^[2,10].

3.4 AFP是原发性肝癌敏感的血清学标志物 自AFP用于临床后, 原发性肝癌生前确诊率明显提高. 日本肝炎的临床研究表明, AFP在原发性肝癌的检测中以20%为截点, 敏感性79%, 特异性78%. 在小肝癌中AFP的敏感性较低, 从33%至65%. 但是AFP轻度而有意义的升高(20-200 μg/L)在许多慢性肝病的患者中很常见. 据报道, 慢性肝炎中15%-58%, 肝硬化中11%-47%的患者血清AFP有所升高. 因此, 原发性肝癌和慢性肝病的患者血清AFP水平重叠很常见. 这就扰乱了慢性肝病患者AFP检测结果的解释. 因此, 对

■研发前沿

AFP-L3是HCC高度特异性和生物恶性的标志物, AFP mRNA应用于检测血液循环中肝癌细胞, 可作为原发性肝癌早期诊断和鉴别诊断的指标, 亦可作为复发或转移的标志. 依据AFP在肿瘤细胞中高效特异性表达, 以及肿瘤细胞表面AFP受体过表达等, 可将AFP应用于肿瘤的治疗等方面.

■相关报道

研究表明AFP-L3以15%为临界值,可取得较好的敏感性和特异性,且表达AFP-L3的肝癌细胞有早期血管侵袭和肝内转移的倾向.将外源治疗基因或细胞因子置于AFP特异性启动子或增强子的下游,实现目的基因的选择性表达,可克服原发性肝癌基因治疗有效性低、毒副作用大的弊端,且可将AFP与细胞毒性药物偶联,将药物特异性地送到靶细胞发挥作用.

于原发性肝癌来说,需要一种较高特异性的确定试验来完成相对低特异性的AFP检测.临床研究表明AFP-L3是HCC高度特异性的标志物.可以在近35%的小肝癌(<2 cm)患者血清中检测到.与影像学技术相比,对于原发性肝癌的早期诊断有9-12 mo的提前时间.对于血清AFP值介于100-200 $\mu\text{g/L}$ 的患者,AFP-L3>10%对HCC诊断的敏感度为71%,特异度为63%,而>35%敏感度降为35%,特异度可达100%.一般以15%为临界值,比10%为临界值更能确定肝癌的恶性特征,可取得较好的敏感性和特异性^[11].而且进一步的临床研究表明AFP-L3是原发性肝癌的一种生物恶性标志物.表达AFP-L3的肝癌细胞有早期血管侵袭和肝内转移的倾向.此外,AFP mRNA应用于检测血液循环中肝癌细胞,可作为原发性肝癌早期诊断和鉴别诊断的指标,亦可作为复发或转移的标志^[12-14].

3.5 AFP在其他肿瘤中的应用 各种源于内胚层的胃肠道肿瘤、内胚窦瘤(卵黄囊瘤)、生殖细胞瘤患者,AFP均可有不同程度的升高.胃癌患者中AFP阳性率可达5%-15%,是一组具有特殊病理特征的高度恶性肿瘤,更易发生肝转移和淋巴转移,具有明显的侵袭性和恶性生物学行为,多发于老年人,存活期少于1年,被认为是一种独立的预后因素,AFP越高肝转移的可能越早,因此早期发现对于选择手术方式和判断预后具有指导意义^[15].内胚窦瘤是卵黄囊发生的高度恶性生殖细胞瘤,病死率高,早期手术发现及手术治疗至关重要,AFP是早期诊断的指标,且与治疗效果相关,其上升与下降可反映内胚窦瘤的生长状况、病情进展与缓解^[16].

3.6 AFP在儿科疾病中的应用 AFP在胚胎发育期由胎儿卵黄囊和肝脏大量合成,至妊娠12 wk左右,卵黄囊退化,胎儿肝脏成为合成的主要场所.胎儿时,其血清浓度很高(1-10 g/L),出生后12-18 mo AFP浓度逐渐降至10 $\mu\text{g/L}$ 以下. AFP可用作筛查神经管缺陷、非整倍体的实验室标志物^[17-19].在神经管缺损、脊柱裂、无脑儿等病理情况下,AFP可由开放的神经管进入羊水,导致其在羊水中含量显著升高,此外先兆子痫、妇婴输血、宫内发育迟缓、胎儿死亡,AFP均有所升高^[20,21]. AFP水平下降表明存在染色体异常(非整倍体),如三体,以及Turner's综合征、脑积水、胎儿生长受限等^[22-24].此外,如果新生儿AFP明显升高,提示新生儿肝炎、先天性胆道闭锁或有能分泌AFP的胚胎性恶性肿瘤等.

3.7 作为判断急性肝功能衰竭患者预后的标志 重型肝炎患者在发生肝细胞炎症坏死后能否有效的再生,与其预后有关,AFP增高者,预后较好^[25].原因在于:(1)AFP能促进肝细胞生长因子受体表达,从而促进肝细胞增殖、分化、再生^[26,27];(2)AFP出现于有丝分裂旺盛的肝细胞和(或)幼稚肝细胞^[28,29].在急性病毒性肝炎、活动性慢性乙型肝炎和肝硬化时,AFP升高标志肝细胞再生活跃;(3)AFP具有促进细胞增殖的作用^[30].

3.8 AFP在肿瘤治疗中的应用 AFP在肿瘤细胞中高效特异性表达,因此将外源治疗基因或细胞因子置于AFP特异性启动子或增强子的下游,原发性肝癌中特异性的反式作用因子作用于该启动子,激活转录,实现目的基因的选择性表达,可克服原发性肝癌基因治疗有效性低、不良反应大的弊端^[31,32].此外,AFP可以作为抗癌药物结合物的载体.依据肿瘤细胞表面AFP受体过表达,将AFP与细胞毒性药物偶联,AFP通过受体介导的胞吞途径结合并选择性地进入肿瘤细胞,从而将结合的药物特异性地送到靶细胞发挥作用,且对于由于膜受体和/或转运体的高表达而引起耐药的人类肿瘤细胞具有较高的疗效^[33].Richardson等^[34]进行的病例对照研究和Melbye等^[35]进行的前瞻性调查研究表明,妊娠期间母体血中的高水平AFP与乳腺癌的低发病率有关.血清AFP水平升高,对母体乳腺组织中存在的肿瘤微灶生长具有抑制作用^[36].随后Bennett等进行的异种移植动物实验,Vakharia等^[37],以及Bennett等^[38]应用AFP合成肽进行的体内外试验均表明,AFP及其衍生肽不仅可用于肿瘤治疗,还可以用于对乳腺癌和其他肿瘤进行化学预防.以AFP为靶抗原进行基因免疫治疗.近年研究表明AFP阳性患者体内存在AFP特异性免疫应答^[39,40],AFP编码的蛋白及抗原表位肽能诱导特异性CTL,特异性地杀伤AFP阳性的肿瘤细胞.即使在高水平AFP环境下,AFP表位多肽仍能被T细胞受体识别,有效激发CTL反应^[41].

4 结论

过去对于AFP的研究仅局限于诊断方面,随着近年来研究的深入,在AFP的结构、功能以及作用机制等方面都取得了长足的进步,这就为其在肿瘤、胎儿及新生儿疾病的诊断,以及肿瘤的治疗领域等方面开拓了一片新天地.

5 参考文献

- 1 Taketa K. Alpha-fetoprotein: reevaluation in

- hepatology. *Hepatology* 1990; 12: 1420-1432
- 2 Gillespie JR, Uversky VN. Structure and function of alpha-fetoprotein: a biophysical overview. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1480: 41-56
- 3 Dudich E, Semenikova L, Gorbatoeva E, Dudich I, Khromykh L, Tatulov E, Grechko G, Sukhikh G. Growth-regulative activity of human alpha-fetoprotein for different types of tumor and normal cells. *Tumour Biol* 1998; 19: 30-40
- 4 Oertel M, Menthena A, Chen YQ, Shafritz DA. Properties of cryopreserved fetal liver stem/progenitor cells that exhibit long-term repopulation of the normal rat liver. *Stem Cells* 2006; 24: 2244-2251
- 5 Schnater JM, Bruder E, Bertschin S, Woodtli T, de Theije C, Pietsch T, Aronson DC, von Schweinitz D, Lamers WH, Köhler ES. Subcutaneous and intrahepatic growth of human hepatoblastoma in immunodeficient mice. *J Hepatol* 2006; 45: 377-386
- 6 Mizejewski GJ. Biological roles of alpha-fetoprotein during pregnancy and perinatal development. *Exp Biol Med* (Maywood) 2004; 229: 439-463
- 7 Dudich E, Semenikova L, Dudich I, Denesyuk A, Tatulov E, Korpela T. Alpha-fetoprotein antagonizes X-linked inhibitor of apoptosis protein anticaspase activity and disrupts XIAP-caspase interaction. *FEBS J* 2006; 273: 3837-3849
- 8 Li MS, Li PF, Yang FY, He SP, Du GG, Li G. The intracellular mechanism of alpha-fetoprotein promoting the proliferation of NIH 3T3 cells. *Cell Res* 2002; 12: 151-156
- 9 Ritter M, Ali MY, Grimm CF, Weth R, Mohr L, Bocher WO, Endrulat K, Wedemeyer H, Blum HE, Geissler M. Immunoregulation of dendritic and T cells by alpha-fetoprotein in patients with hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2004; 41: 999-1007
- 10 Li MS, Ma QL, Chen Q, Liu XH, Li PF, Du GG, Li G. Alpha-fetoprotein triggers hepatoma cells escaping from immune surveillance through altering the expression of Fas/FasL and tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand and its receptor of lymphocytes and liver cancer cells. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 2564-2569
- 11 Leerapun A, Suravarapu SV, Bida JP, Clark RJ, Sanders EL, Mettler TA, Stadheim LM, Aderca I, Moser CD, Nagorney DM, LaRusso NF, de Groen PC, Menon KV, Lazaridis KN, Gores GJ, Charlton MR, Roberts RO, Therneau TM, Katzmann JA, Roberts LR. The utility of Lens culinaris agglutinin-reactive alpha-fetoprotein in the diagnosis of hepatocellular carcinoma: evaluation in a United States referral population. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007; 5: 394-402; quiz 267
- 12 Montaser LM, Abbas OM, Saltah AM, Waked IA. Circulating AFP mRNA as a Possible Indicator of Hematogenous Spread of HCC Cells: A Possible Association with HBV Infection. *J Egypt Natl Canc Inst* 2007; 19: 48-60
- 13 石明, 张颖, 钟崇, 林小军, 张昌卿, 李锦清. 肝癌患者围手术期外周血甲胎蛋白mRNA表达与术后复发的关系. *癌症* 2008; 27: 83-87
- 14 Kamiyama T, Takahashi M, Nakagawa T, Nakanishi K, Kamachi H, Suzuki T, Shimamura T, Taniguchi M, Ozaki M, Matsushita M, Furukawa H, Todo S. AFP mRNA detected in bone marrow by real-time quantitative RT-PCR analysis predicts survival and recurrence after curative hepatectomy for hepatocellular carcinoma. *Ann Surg* 2006; 244: 451-463
- 15 宋玉环, 王运山, 胡安拉. AFP阳性胃癌的研究进展. *中华肿瘤预防杂志* 2006; 13: 552-555
- 16 何小梅, 李德钧, 单小庆, 陈毅男, 朱尤其, 陈大坤. AFP值在内胚窦瘤临床的标记意义. *华西医学* 1997; 12: 520-522
- 17 Mizejewski GJ. Levels of alpha-fetoprotein during pregnancy and early infancy in normal and disease states. *Obstet Gynecol Surv* 2003; 58: 804-826
- 18 Dashe JS, Twickler DM, Santos-Ramos R, McIntire DD, Ramus RM. Alpha-fetoprotein detection of neural tube defects and the impact of standard ultrasound. *Am J Obstet Gynecol* 2006; 195: 1623-1628
- 19 Rozenberg P, Bussi eres L, Chevret S, Bernard JP, Malagrida L, Cuckle H, Chabry C, Durand-Zaleski I, Bidat L, Lacroix I, Moulis M, Roger M, Jacquemot MC, Bault JP, Boukobza P, Boccaro P, Vialard F, Giudicelli Y, Ville Y. Screening for Down syndrome using first-trimester combined screening followed by second-trimester ultrasound examination in an unselected population. *Am J Obstet Gynecol* 2006; 195: 1379-1387
- 20 Odibo AO, Sehdev HM, Stamilio DM, Macones GA. Evaluating the thresholds of abnormal second trimester multiple marker screening tests associated with intra-uterine growth restriction. *Am J Perinatol* 2006; 23: 363-367
- 21 Wald NJ, Morris JK, Ibison J, Wu T, George LM. Screening in early pregnancy for pre-eclampsia using Down syndrome quadruple test markers. *Prenat Diagn* 2006; 26: 559-564
- 22 Cuckle H. Biochemical screening for Down syndrome. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2000; 92: 97-101
- 23 Rausch DN, Lambert-Messerlian GM, Canick JA. Participation in maternal serum screening for Down syndrome, neural tube defects, and trisomy 18 following screen-positive results in a previous pregnancy. *West J Med* 2000; 173: 180-183
- 24 Kiran TS, Bethel J, Bhal PS. Correlation of abnormal second trimester maternal serum alpha-fetoprotein (MSAFP) levels and adverse pregnancy outcome. *J Obstet Gynaecol* 2005; 25: 253-256
- 25 Butterfield LH. Recent advances in immunotherapy for hepatocellular cancer. *Swiss Med Wkly* 2007; 137: 83-90
- 26 Amemiya H, Kono K, Takahashi A, Kamei S, Sugai H, Ichihara F, Fujii H, Matsumoto Y. c-Met expression in a gastric cancer cell line producing alpha-fetoprotein. *Surg Today* 2004; 34: 115-122
- 27 Koide N, Nishio A, Igarashi J, Kajikawa S, Adachi W, Amano J. Alpha-fetoprotein-producing gastric cancer: histochemical analysis of cell proliferation, apoptosis, and angiogenesis. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 1658-1663
- 28 Yang SS, Cheng KS, Lai YC, Wu CH, Chen TK, Lee CL, Chen DS. Decreasing serum alpha-fetoprotein levels in predicting poor prognosis of acute hepatic failure in patients with chronic hepatitis B. *J Gastroenterol* 2002; 37: 626-632
- 29 谷强业, 闫庆福, 丁街林, 张光海. 慢性重型肝炎血清甲胎蛋白检测意义. *临床肝胆病杂志* 2007; 23: 131-132
- 30 李孟森, 李平风, 李刚. 甲胎蛋白对细胞增殖的调节作用. *国外医学·肿瘤学分册* 2000; 27: 286-288
- 31 Shi YJ, Gong JP, Liu CA, Li XH, Mei Y, Mi C, Huo YY. Construction of a targeting adenoviral vector carrying AFP promoter for expressing EGFP gene

■应用要点

对于血清AFP值为100-200 μg/L的患者, 可应用AFP-L3来区分良性及恶性肝病。AFP有很多重要的生理功能, 如: 运输功能、作为生长调节因子的双向调节功能等, 除肿瘤的诊断治疗等方面, 期待其能在许多领域得到应用。

■同行评价

本文比较全面地综述了AFP在各方面的表达和作用,文笔比较流畅,概括准确,用词简练,论述全面,比较完整地阐述了AFP及其异质体的近年应用进展。

- in AFP-producing hepatocarcinoma cell. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 186-189
- 32 Butterfield LH. Immunotherapeutic strategies for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2004; 127: S232-S241
- 33 Severin SE, Posypanova GA, Katukov VU, Shmyrev II, Luzhkov YuM, Gerasimova GK, Zhukova OS, Vorozhtsov GN, Kaliya OL, Lukyanets EA, Severin ES. Antitumor activity of conjugates of the oncofetal protein alpha-fetoprotein and phthalocyanines in vitro. *Biochem Mol Biol Int* 1997; 43: 873-881
- 34 Richardson BE, Hulka BS, Peck JL, Hughes CL, van den Berg BJ, Christianson RE, Calvin JA. Levels of maternal serum alpha-fetoprotein (AFP) in pregnant women and subsequent breast cancer risk. *Am J Epidemiol* 1998; 148: 719-727
- 35 Melbye M, Wohlfahrt J, Lei U, Nørgaard-Pedersen B, Mouridsen HT, Lambe M, Michels KB. alpha-fetoprotein levels in maternal serum during pregnancy and maternal breast cancer incidence. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 1001-1005
- 36 Bennett JA, Zhu S, Pagano-Mirarchi A, Kellom TA, Jacobson HI. Alpha-fetoprotein derived from a human hepatoma prevents growth of estrogen-dependent human breast cancer xenografts. *Clin Cancer Res* 1998; 4: 2877-2884
- 37 Vakharia D, Mizejewski GJ. Human alpha-fetoprotein peptides bind estrogen receptor and estradiol, and suppress breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2000; 63: 41-52
- 38 Bennett JA, Mesfin FB, Andersen TT, Gierthy JF, Jacobson HI. A peptide derived from alpha-fetoprotein prevents the growth of estrogen-dependent human breast cancers sensitive and resistant to tamoxifen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 2211-2215
- 39 Butterfield LH, Koh A, Meng W, Vollmer CM, Ribas A, Disette V, Lee E, Glaspy JA, McBride WH, Economou JS. Generation of human T-cell responses to an HLA-A2.1-restricted peptide epitope derived from alpha-fetoprotein. *Cancer Res* 1999; 59: 3134-3142
- 40 Bei R, Budillon A, Reale MG, Capuano G, Pomponi D, Budillon G, Frati L, Muraro R. Cryptic epitopes on alpha-fetoprotein induce spontaneous immune responses in hepatocellular carcinoma, liver cirrhosis, and chronic hepatitis patients. *Cancer Res* 1999; 59: 5471-5474
- 41 Butterfield LH, Ribas A, Meng WS, Disette VB, Amarnani S, Vu HT, Seja E, Todd K, Glaspy JA, McBride WH, Economou JS. T-cell responses to HLA-A*0201 immunodominant peptides derived from alpha-fetoprotein in patients with hepatocellular cancer. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 5902-5908

编辑 李军亮 电编 何基才

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

• 消息 •

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

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

不同时程慢性束缚水浸应激对大鼠胃窦Cajal间质细胞超微结构的影响

张丹, 夏志伟, 韩亚京

张丹, 夏志伟, 韩亚京, 北京大学第三医院消化科 北京市 100191

作者贡献分布: 此课题由夏志伟与张丹共同设计; 研究过程和数据分析由张丹完成; 实验技术选择和操作方法由韩亚京指导支持; 文章撰写由张丹与夏志伟共同完成。

通讯作者: 夏志伟, 副教授, 100191, 北京市, 北京大学第三医院消化科. xiazhiwei@medmail.com.cn

电话: 010-82266688-8768

收稿日期: 2009-09-20 修回日期: 2009-12-20

接受日期: 2009-12-29 在线出版日期: 2010-02-28

Ultrastructural changes in interstitial cells of Cajal in the gastric antrum of rats undergoing water immersion-restraint stress

Dan Zhang, Zhi-Wei Xia, Ya-Jing Han

Dan Zhang, Zhi-Wei Xia, Ya-Jing Han, Department of Digestive Diseases, Peking University Third Hospital, Beijing 100191, China

Correspondence to: Associate Professor Zhi-Wei Xia, Department of Digestive Diseases, Peking University Third Hospital, Beijing 100191, China. xiazhiwei@medmail.com.cn
Received: 2009-09-20 Revised: 2009-12-20

Accepted: 2009-12-29 Published online: 2010-02-28

Abstract

AIM: To investigate the impact of chronic water immersion-restraint stress on the ultrastructure of interstitial cells of Cajal (ICC) in the gastric antrum of rats.

METHODS: Forty-eight male Sprague-Dawley rats were randomly and equally divided into six groups: three experimental groups and three matched control groups. The three experimental groups underwent water immersion-restraint stress for one hour daily for 3, 7 and 14 days, respectively, while the three control groups were allowed free access to food and water. On days 4, 15 and 28, the rats in both the experimental and control groups were sacrificed. Two pieces of antrum tissues were taken from each rat and fixed in 3% glutaraldehyde for electron microscopic examination.

RESULTS: ICC were normal in all the control

groups but showed visible injuries in the three experimental groups. With the prolongation of the stress, the morphological damage became more evident in ICC, especially in intermuscular ICC (ICC-MY) and intramuscular ICC (ICC-IM). Major ultrastructural changes in ICC included reduced number of gap junctions and organelles.

CONCLUSION: Chronic water immersion-restraint stress can lead to ultrastructural damage in ICC in the gastric antrum of rats.

Key Words: Interstitial cells of Cajal; Chronic water immersion-restraint stress; Ultrastructure

Zhang D, Xia ZW, Han YJ. Ultrastructural changes in interstitial cells of Cajal in the gastric antrum of rats undergoing water immersion-restraint stress. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(6): 581-585

摘要

目的: 研究不同时程慢性束缚水浸应激大鼠胃窦Cajal间质细胞(ICC)的超微结构改变。

方法: ♂ SD大鼠48只随机分为6组, 即实验3、7、28 d组和对照3、7、28 d组, 每组8只。实验组每日束缚水浸1 h, 对照组自由摄食饮水; 于实验第4、8、29天晨禁食12 h后脱颈处死。取胃窦组织2块放入3%戊二醛中固定并电镜下观察ICC超微结构。

结果: 所有对照组ICC的超微结构均无异常改变, 试验3、7、28 d各组ICC的超微结构与同期对照组比较均有明显的损害, 主要表现为ICC的缝隙连接减少、细胞器减少等, 以肌内ICC(ICC-MY)和肌间ICC(ICC-IM)为主; 随着应激时间的延长, ICC的超微结构受损逐渐加重。

结论: 慢性束缚水浸应激可以损伤大鼠胃窦ICC的超微结构。

关键词: Cajal间质细胞; 慢性束缚水浸应激; 超微结构

■背景资料

以往的研究已经证明, 慢性束缚水浸应激可以导致大鼠胃排空功能的改变。影响胃动力的因素多种多样, ICC可能参与其中。以往的研究多集中在ICC数量上的改变方面, 且多数以急性应激刺激为主, 更多的研究着眼于糖尿病相关的ICC细胞损伤。本研究拟通过不同时程的慢性低强度应激刺激实验来观察大鼠胃窦ICC的超微结构改变, 探讨慢性应激损伤胃排空功能的可能机制。

■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; 魏睦新, 教授, 南京医科大学第一附属医院中西医结合科; 宋于刚, 教授, 南方医科大学南方医院消化内科研究所

■ 研究前沿

应激导致的消化动力的改变及其机制成为近年的研究热点,主要集中在探讨ICC在急性应激中发挥的作用方面。

张丹, 夏志伟, 韩亚京. 不同时程慢性束缚水浸应激对大鼠胃窦Cajal间质细胞超微结构的影响. 世界华人消化杂志 2010; 18(6): 581-585

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/581.asp>

0 引言

以往的研究已经证明,慢性束缚水浸应激可以导致大鼠胃排空功能的改变^[1-3].影响胃动力的因素多种多样,ICC可能参与其中.以往的研究多集中在ICC数量上的改变方面,且多数以急性应激刺激为主,更多的研究着眼于糖尿病相关的ICC细胞损伤^[4].本研究拟通过不同时程的慢性低强度应激刺激实验来观察大鼠胃窦ICC的超微结构改变,探讨慢性应激损伤胃排空功能的可能机制.

1 材料和方法

1.1 材料 SD健康♂大鼠,体质量150-160 g,购自北京大学医学部实验动物部,并按照SPF级别动物饲养要求饲养.本研究得到北京大学医学部动物保护委员会伦理批准.

1.2 方法

1.2.1 分组: 将18只大鼠随机分成实验组和对照组,对照组不接受任何刺激,自由摄食饮水;实验组每日上午于21℃水浴箱内束缚水浸1 h.于实验第3、7、28天20:00后禁食,次日8:00将实验组及同期对照组大鼠序贯脱颈处死.

1.2.2 取材: 全部大鼠剖腹后结扎贲门及幽门,在结扎部位远端0.5 cm处游离全胃,滤纸拭干称质量;注入2%甲醛5 mL进行内固定,20 min后沿胃大弯侧剪开,去离子水冲洗干净.即刻剪取腺胃幽门旁0.5 cm前壁大弯侧组织2块,大小为2 mm×1 mm,立即放入戊二醛(3%)固定液中固定,送北医病理电镜室.

1.2.3 电镜观察: 固定后的组织用0.2 mol/L蔗糖磷酸缓冲液漂洗,再用2%的四氧化锇后固定1 h,丙酮中梯度脱水,在1%醋酸双氧铀中停滞染色1 h,再通过环氧丙烷与环氧树脂.1 mm切片用亚甲蓝染色,在光镜下观察,确定黏膜层、环形肌层、纵行肌层.超薄切片用酒精醋酸双氧铀、再用柠檬酸盐后染色,保留纵行肌层、环形肌层、黏膜下层、部分黏膜层,用HITACHI H-600透射电镜观察、照相.

2 结果

2.1 对照组大鼠胃窦ICC特点

2.1.1 形态: 对照组大鼠胃的平滑肌细胞排列整

齐,肌细胞内细胞器丰富,线粒体的嵴较多.肌间丛神经元的胞核清晰,细胞器丰富,并有大量线粒体及粗面内质网,神经轴突和树突末梢处电子密度均匀,神经膨体内有较多的突触小泡.紧邻肌间丛神经元可见ICC. ICC多为细长形、纺锤形(图1A)、梭形(图1B)、椭圆形(图1C)星形或不规则形(图1D),细胞突起较多,突起较长,突起常放射状变平,在突起中有很多中间丝和细丝. ICC与其他的ICC之间、ICC与平滑肌细胞和神经细胞之间多见由紧密并置的质膜形成的缝隙连接(图1C).有丰富的沿细胞膜分布的膜下小空腔,有较完整的基膜,细胞核多不规则,细胞核大,占细胞大部分,胞质较少,异染色质较多见,沿核膜下分布,结构清晰,胞质和突起内线粒体非常丰富,常紧密排列在胞质里,游离核糖体与多聚核糖体多见,可见到发达的粗面内质网、滑面内质网、高尔基体(图1E、F).其胞质突起围绕神经束形成不完整的髓鞘样结构,壁内神经及ICC的突起相互连接形成网络,分布均匀.

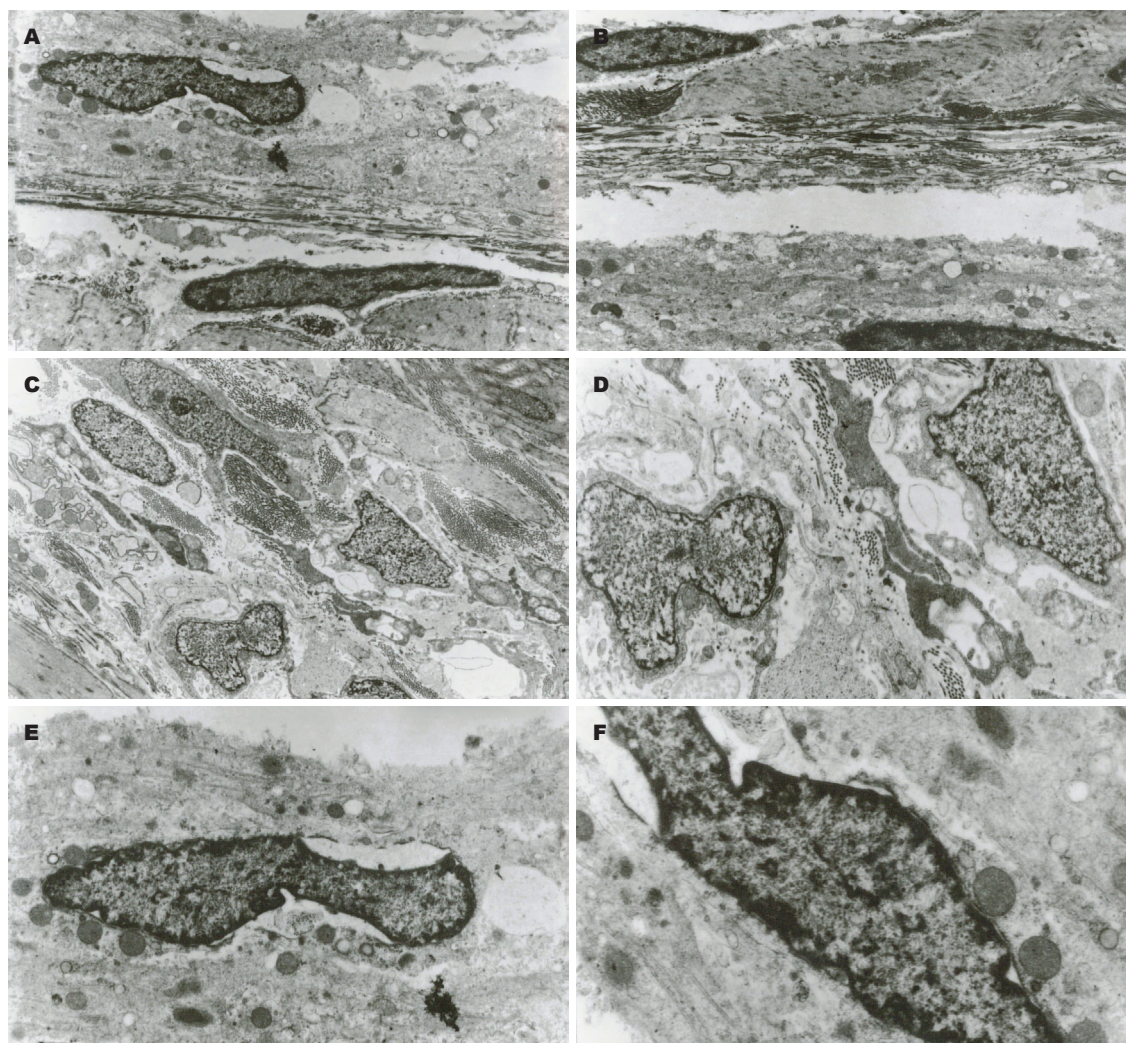
2.1.2 分布: ICC主要分布于环形肌细胞之间(ICC-IM)及环形肌层与纵行肌层之间(ICC-MY),而内外环形肌之间ICC(ICC-DMP)及环形肌层的内表面ICC(ICC-SM)则相对较少. ICC细胞往往与神经纤维末梢及神经束伴随存在,并由许多的缝隙连接紧密连接在一起.存在于肌细胞之间的ICC形状较圆,存在于环形肌层内的ICC形状则为细长形.

2.2 实验组大鼠胃窦 ICC 的变化

2.2.1 3 d组: (1)ICC与其他细胞之间的缝隙连接稍有减少,尚存的细胞连接结构较完整,连接较对照组松散(图2A); (2)ICC核周的细胞质无明显减少,但空泡样变增多,线粒体空泡样肿胀(图2B),胞质广泛溶解,胞质内可见自噬性空泡(图2A); (3)ICC基膜与细胞膜未分离,无空洞形成; (4)ICC内的细胞器数量较正常减少,核糖体减少,内质网轻度扩张(图2A); (5)核内染色质边集(图2C),可见少许凋亡小体.

2.2.2 7 d组: (1)缝隙连接减少较3d组显著,尚存的细胞连接结构也有所破坏,连接松散; (2)ICC核周的细胞质空泡样变加重,线粒体肿胀,部分嵴消失,胞质广泛溶解; (3)ICC基膜不完整,与细胞膜部分分离,可见空洞形成; (4)ICC内的细胞器数量较正常减少,核糖体减少,内质网轻度扩张,粗面内质网脱颗粒; (5)核固缩,核内异染色质明显,形成空网状结构,核内凋亡小体增多(图3).

2.2.3 28 d组: (1)缝隙连接显著减少,尚存的细胞

**■应用要点**

本文旨在研究不同时程的慢性应激对大鼠ICC超微结构的影响,探讨慢性应激后胃动力改变的可能机制。

图1 大鼠胃窦ICC的形态。A: 细长型ICC; B: 梭形ICC; C: 椭圆形ICC; D: 星形和不规则形ICC; E: 内质网; F: 高尔基体。

连接结构也有破坏, 结构不清, 连接松散; (2)ICC核周的细胞质明显减少, 线粒体肿胀, 胞质广泛溶解, 胞质内可见许多自噬性空泡; (3)ICC基膜与细胞膜部分分离, 形成空洞; (4)ICC内的细胞器数量较正常减少, 核糖体减少, 内质网扩张, 粗面内质网脱颗粒; (5)核固缩, 核内异染色质明显, 形成空网状结构, 核内凋亡小体多见(图4)。

3 讨论

本研究的透射电镜观察显示: 正常情况下ICC的主要分布区域在肌间和肌内, 这与文献报道一致^[5-6]。慢性束缚水浸应激后, 实验组ICC超微结构出现明显的损害, 其受损的主要表现为缝隙连接减少、细胞器减少等; 随着应激时间的延长, ICC超微结构受损情况逐渐加重, 而且以ICC-MY和ICC-IM为主。

缝隙连接也叫融合膜, 是细胞间隙内的窄缝。并列的细胞膜在这里不融合, 而是被一个宽

20-40 A的缝隙隔开, 示踪剂硝酸铜可以显示缝隙内的六角形排列的颗粒。融合膜是一个对传递生物电信号和代谢信息阻力特别低的细胞膜区域。大鼠的平滑肌细胞之间、平滑肌与神经细胞及ICC与平滑肌细胞、ICC与神经细胞间均可通过缝隙连接和牙样突起而互相连接, 周围细胞质特别富于微胞饮小泡, 而质膜的其余部分被基板、胶原和网状纤维包围着。缝隙连接和牙样突起共同保证了动作电位的传导以及同步收缩。广泛的缝隙连接成为ICC适应作为神经系统控制胃肠平滑肌运动的中介的结构基础^[7]; 慢性束缚水浸后细胞连接破坏, 导致缝隙连接减少, 神经系统对肌细胞的调节减弱。因而其作为胃肠运动起搏细胞和作为神经细胞控制肌细胞运动的中介功能显著下降, 可能引致胃肠道慢波节律减慢或紊乱, ICC的损伤很可能是慢性应激大鼠胃动力改变的原因之一。

对照组大鼠胃窦ICC超微结构显示, 线粒体

■同行评价

本研究设计合理,数据可靠,具有较好的学术价值.

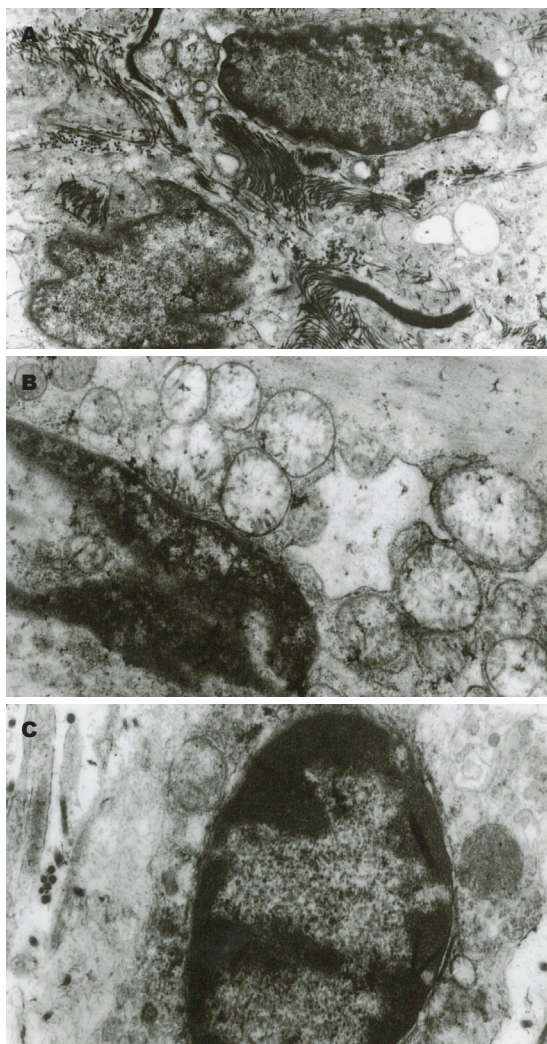


图 2 3 d组大鼠胃窦ICC超微结构改变. A: 缝隙连接减少、结构松散,胞质广泛溶解,可见自噬性空泡; B: 线粒体空泡样肿胀; C: 染色质边集、皱缩.

含量丰富,滑面内质网、粗面内质网和高尔基体丰富,说明其具有活跃的合成功能,这一特征支持ICC作为胃肠道慢波起搏细胞的需要.接受慢性应激刺激后,ICC的细胞器减少,突出表现在线粒体数量减少,随应激时间的延长改变更加显著,线粒体肿胀,甚至溶解.内质网也出现肿胀现象,粗面内质网脱颗粒,并逐渐出现基质溶解空泡化等.线粒体数目的减少及残存线粒体质量变差使其合成功能大大降低,从而使能量供应减少,这可能导致ICC细胞作为神经细胞兴奋的传导功能降低.在应激状况下,粗面内质网显著扩张,脱颗粒,其内容物的密度减低,并且向核周间隙的开口变宽,表现为肿胀;而这一系列的变化均导致其合成体内重要蛋白质的功能降低. ICC细胞器的变化必然会带来其细胞功能的异常.

先期的研究显示^[1],经低强度慢性束缚水浸

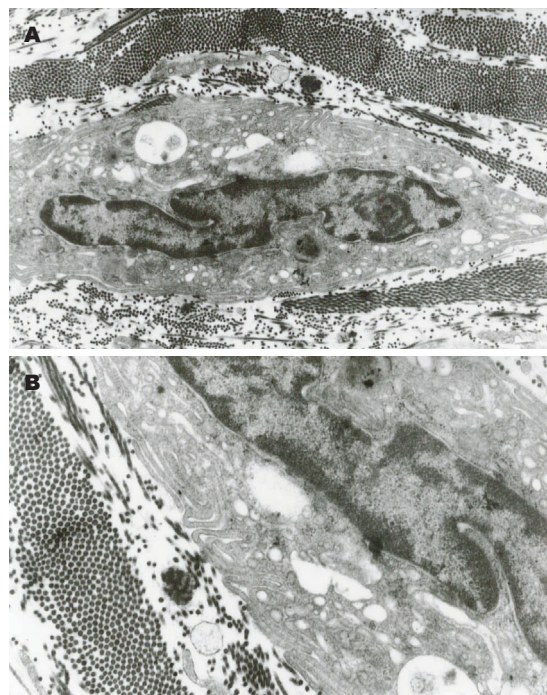


图 3 7 d组大鼠胃窦ICC超微结构改变. A: 核固缩; B: 核内异染色质明显.

刺激后,大鼠胃排空率改变,早期并不明显,而本文显示,此时ICC的超微结构已经出现损伤.至实验7 d时,实验组大鼠胃排空率较对照组增加,而ICC细胞超微结构的损伤改变进一步加重.至实验28 d时,实验组大鼠的胃排空较对照组减慢,此时的ICC损伤则进一步加重. ICC超微结构的损伤持续进行性加重,但大鼠的胃排空快慢于此并不平行,提示参与胃排空功能的调节因素是多方面的.应激刺激导致的ICC结构损伤只是机制之一.

从胃的生理角度讲,胃排空受胃蠕动的力量、频率和幽门对胃内容物流出阻力的双重影响,而胃蠕动的力量、频率又由激素机制、神经源性机制、肌源性机制(即起搏胃慢波的ICC机制)三种因素的共同作用结果决定.当给予动物机体应激刺激后,如上多种途径共同改变决定胃排空率的变化,也就是说,ICC起搏胃慢波的肌源性机制只是控制胃排空率的其中一种机制,在不同的阶段这几种机制所发挥的作用可能不同.短期内的应激虽然可以导致ICC超微结构的改变,一方面可能起功能仍未完全丧失,另一方面,参与调节胃排空的其他途径可能通过调节补偿了尚属细微的ICC功能变化.因此其胃排空功能在短期内尚可维持正常.这种复杂的在接受应激后的不同阶段内所发挥的作用可能存在一定得差异,应激时间越长,调节机制的补

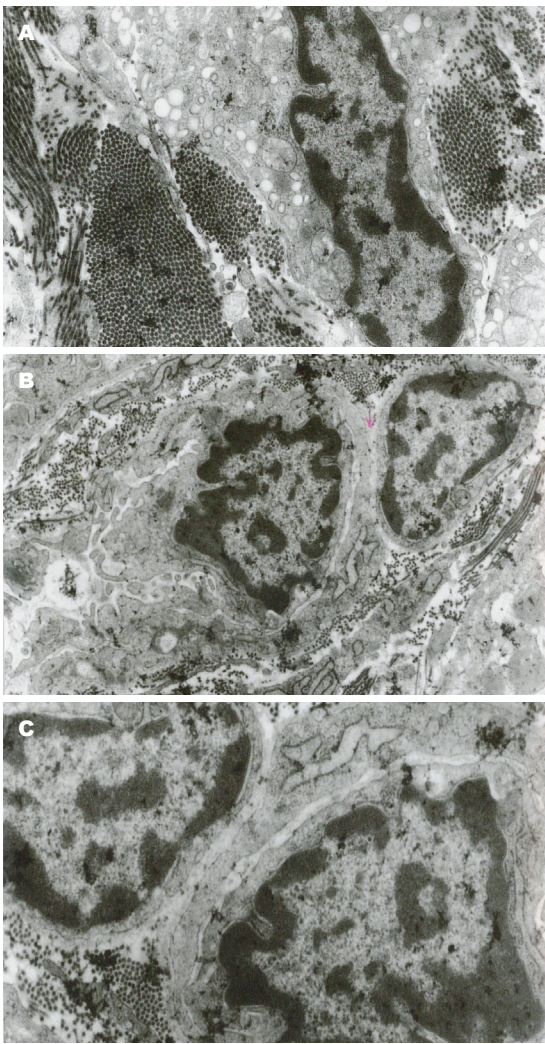


图 4 28 d组大鼠胃窦ICC超微结构改变. A: 核固缩, 核内异染色质明显; B: 异染色质形成网状, 可见凋亡小体; C: 异染色质形成网状, 可见凋亡小体.

偿作用越复杂. 随着ICC的超微结构破坏渐趋严重, 缝隙连接破坏不可逆, 细胞器、胞质、胞核固缩, 变形, 甚至细胞死亡, 包括ICC起搏胃慢波在内的正向调节机制彻底失利. ICC超微结构的改变只是其中的一个重要发病机制.

其他研究显示: 短期强烈的应激刺激可以导致大鼠胃窦ICC的超微机构改变^[8]. 而本研究结果表明, 低强度的慢性束缚水浸应激也可以损伤大鼠胃窦ICC的超微结构, 其损伤程度随应激时间延长而逐渐加重. 超微结构改变的同时胃排空功能出现异常, 但大鼠胃排空快慢的改变与其胃窦ICC细胞的损伤程度不平行, 说明应激后的胃功能改变有多种机制参与, ICC细胞的损伤可能参与应激性胃动力改变的过程.

4 参考文献

- 1 张丹, 夏至伟, 韩亚京. 不同时程慢性束缚水浸应激对大鼠胃排空的影响. 中国实验动物学报 2009; 17: 11-14
- 2 刘劲松, 杨菊, 侯晓华. 寒冷浸水应激对大鼠胃排空及肠肌间神经递质的影响. 中华消化杂志 2004; 24: 492-493
- 3 Nakae Y, Kagaya M, Takagi R, Matsutani Y, Horibe H, Kondo T. Cold pain prolongs gastric emptying of liquid but not solid meal: an electrical impedance tomography (EIT) study. *J Gastroenterol* 2000; 35: 593-597
- 4 He CL, Soffer EE, Ferris CD, Walsh RM, Szurszewski JH, Farrugia G. Loss of interstitial cells of cajal and inhibitory innervation in insulin-dependent diabetes. *Gastroenterology* 2001; 121: 427-434
- 5 Hagger R, Finlayson C, Jeffrey I, Kumar D. Role of the interstitial cells of Cajal in the control of gut motility. *Br J Surg* 1997; 84: 445-450
- 6 Kenny SE, Connell MG, Rintala RJ, Vaillant C, Edgar DH, Lloyd DA. Abnormal colonic interstitial cells of Cajal in children with anorectal malformations. *J Pediatr Surg* 1998; 33: 130-132
- 7 Ishikawa K, Komuro T, Hirota S, Kitamura Y. Ultrastructural identification of the c-kit-expressing interstitial cells in the rat stomach: a comparison of control and Ws/Ws mutant rats. *Cell Tissue Res* 1997; 289: 137-143
- 8 Kaszuba-Zwońska J, Gil K, Ziomber A, Zaraska W, Pawlicki R, Królczyk G, Matyja A, Thor PJ. Loss of interstitial cells of Cajal after pulsating electromagnetic field (PEMF) in gastrointestinal tract of the rats. *J Physiol Pharmacol* 2005; 56: 421-432

编辑 李军亮 电编 何基才

戊己丸不同配比方对大鼠体外CYP1A2酶活性的影响

翁小刚, 李玉洁, 杨庆, 梁日欣, 王怡薇, 刘晓霓, 韩晓, 张甘霖, 隋峰, 朱晓新

■背景资料

CYP1A2是参与药物代谢的CYP450酶中的重要同工酶之一, 代谢是中药(复方)起作用的重要环节, 戊己丸是临床治疗肠易激综合征(IRS)常用有效方剂, 不同配比戊己丸历代医家均有应用, 从“中药配伍-代谢”关系研究戊己丸配伍作用规律对于指导临床用药, 揭示中药复方用药奥秘具有现实意义。

翁小刚, 李玉洁, 杨庆, 梁日欣, 王怡薇, 刘晓霓, 韩晓, 隋峰, 朱晓新, 中国中医科学院中药研究所 北京市 100700
张甘霖, 北京中医药大学 北京市 100029
国家自然科学基金重点课题基金资助项目, No. 30930114, No. 90709017
国家科技支撑计划(十一五)项目子课题基金资助项目, No. 2006BAI08B04-4
国家中医药管理局中医药行业科研专项基金资助项目, No. 200807036
中国中医科学院自主选题基金资助项目, No. ZZ2006102
作者贡献分布: 本课题由朱晓新与翁小刚设计; 研究过程由翁小刚、李玉洁、杨庆、王怡薇、刘晓霓、韩晓及张甘霖操作完成; 数据分析和论文写作由翁小刚与隋峰完成, 朱晓新与梁日欣审核。
通讯作者: 朱晓新, 研究员, 100700, 北京市, 中国中医科学院中药研究所. zhuxiaoxin@mail.cintcm.ac.cn
电话: 010-64056154 传真: 010-64056154
收稿日期: 2009-11-06 修回日期: 2010-01-05
接受日期: 2010-01-11 在线出版日期: 2010-02-28

Effects of Wuji Pill with different compatibility on the activity of cytochrome P450 1A2 in rat liver microsomes *in vitro*

Xiao-Gang Weng, Yu-Jie Li, Qing Yang, Ri-Xin Liang, Yi-Wei Wang, Xiao-Ni Liu, Xiao Han, Gan-Lin Zhang, Feng Sui, Xiao-Xin Zhu

Xiao-Gang Weng, Yu-Jie Li, Qing Yang, Ri-Xin Liang, Yi-Wei Wang, Xiao-Ni Liu, Xiao Han, Feng Sui, Xiao-Xin Zhu, Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China
Gan-Lin Zhang, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

Supported by: the Key Project of the National Natural Science Foundation of China, Nos. 90709017 and 30930114; the National Key Technology R&D Program during the 11th Five-year Plan Period, No. 2006BAI08B04-4; the Research Fund of State Administration of TCM of People's Republic of China, No. 2008070036; and the Special Fund of China Academy of Chinese Medical Sciences, No. ZZ2006102

Correspondence to: Xiao-Xin Zhu, Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China. zhuxiaoxin@mail.cintcm.ac.cn
Received: 2009-11-06 Revised: 2010-01-05
Accepted: 2010-01-11 Published online: 2010-02-28

Abstract

AIM: To investigate the effects of Wuji Pill with different compatibility on the enzymatic activity of cytochrome P450 1A2 (CYP1A2) in rat liver microsomes *in vitro*.

METHODS: Using phenacetin as a substrate

probe, the effects of Wuji Pill with different compatibility (No.1-9) on the enzymatic activity of CYP1A2 were detected by high-performance liquid chromatography (HPLC).

RESULTS: The half maximal inhibitory concentrations (IC_{50}) of *Rhizoma Coptidis*, *Fructus Evodiae Rutaecarpae*, *Radix Paeoniae Alba* and Wuji Pill (No.1-9) on the enzymatic activity of CYP1A2 were 28.07, 989.69, 6633.28, 57.92, 104.38, 321.28, 32.17, 80.09, 71.47, 76.76, 40.41 and 29.45 mg/L, respectively. *Rhizoma Coptidis* and Wuji Pill (No.1-9) could significantly suppress the enzymatic activity of CYP1A2. The suppressive effects of *Rhizoma Coptidis* in Wuji Pill on the activity of CYP1A2 depend on the proportion of *Fructus Evodiae Rutaecarpae* and *Radix Paeoniae Alba* in Wuji Pill. With the increase in the proportion of *Rhizoma Coptidis* and *Fructus Evodiae Rutaecarpae* in Wuji Pill, the suppressive effects of Wuji Pill on the activity of CYP1A2 were strengthened. With the increase in the proportion of *Radix Paeoniae Alba* in Wuji Pill, the suppressive effects of Wuji Pill on the activity of CYP1A2 was weakened.

CONCLUSION: Wuji Pill with different compatibility shows different suppressive effects on the enzymatic activity of CYP1A2. This may explain why Wuji Pill with different compatibility has different pharmacodynamic and pharmacokinetic characteristics.

Key Words: Wuji Pill; CYP1A2; Phenacetin; High-performance liquid chromatography; Chinese medicine

Weng XG, Li YJ, Yang Q, Liang RX, Wang YW, Liu XN, Han X, Zhang GL, Sui F, Zhu XX. Effects of Wuji Pill with different compatibility on the activity of cytochrome P450 1A2 in rat liver microsomes *in vitro*. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(6): 586-591

摘要

目的: 探讨戊己丸不同配比方对大鼠体外肝微粒体CYP1A2酶活性的影响, 从“中药配伍-代谢”关系探讨中药配伍机制。

方法: 按 $L_9(3^4)$ 正交表, 戊己丸的配比设计为9

■同行评议者

李康, 副教授, 广东药学院药科学院药物分析教研室

个受试复方, 以非那西丁为探针药, HPLC检测戊己丸对大鼠体外肝微粒体CYP1A2酶活性的影响。

结果: 黄连、吴茱萸、白芍提取物及戊己丸方1-9抑制CYP1A2的生药 IC_{50} 分别为: 28.07、989.69、6633.28、57.92、104.38、321.28、32.17、80.09、71.47、76.76、40.41、29.45 mg/L; 黄连及戊己丸可以显著抑制CYP1A2酶活性, 不同配比戊己丸抑制CYP1A2酶活性作用不同, 有统计学差异; 随着黄连、吴茱萸两药在戊己丸中剂量水平的增高, 戊己丸组方抑制CYP1A2酶活性的能力增强, 随着白芍在戊己丸中剂量水平的增高可以减弱该组方抑制CYP1A2酶活性的能力, 且戊己丸组方中吴茱萸和白芍配比不同可以影响方中黄连抑制CYP1A2酶活性的程度。

结论: 戊己丸配比不同, 对CYP1A2酶活性的抑制作用不同, 这种差异可能是不同配比戊己丸药效学、药动学差异的原因所在。

关键词: 戊己丸; CYP1A2; 非那西丁; 高效液相色谱法; 中药

翁小刚, 李玉洁, 杨庆, 梁日欣, 王怡薇, 刘晓露, 韩晓, 张甘霖, 隋峰, 朱晓新. 戊己丸不同配比方对大鼠体外CYP1A2酶活性的影响. 世界华人消化杂志 2010; 18(6): 586-591
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/586.asp>

0 引言

戊己丸可疏泻肝之郁火、调和脾胃, 是临床治疗肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)常用有效方剂, 最早见于宋代刘昉《幼幼新书》卷二十六, 由黄连、吴茱萸、白芍各五两组成, 《医方考》将方中药物用量改为黄连十两、吴茱萸二两、白芍二两, 黄连、吴茱萸、白芍用药比例由1:1:1改为5:1:1, 而《中国药典》(2005年版)收载本方的比例为: 黄连300 g, 吴茱萸(制)50 g, 白芍(炒)300 g. 宫海民等^[1]比较了戊己丸中黄连、吴茱萸、白芍1:1:1和5:1:1两种配比的药效, 其中1:1:1配伍组长于镇痛, 而5:1:1配伍组长于抗炎, 提示戊己丸配比不同, 所产生的药效也不尽相同. 本课题组前期药理研究也表明, 戊己丸不同配比方有不同的药效特点^[2]。

复方用药是中医治病的主要形式, 也是辨证论治理论精髓具体表现. 中药成分复杂, 作用形式多样, 中药化学成分(原型药或代谢物)是其作用的物质基础, 因此, 中药复方的配伍变化体

现不同疗效与其化学成分代谢特征存在关联. 本课题组从“中药配伍-代谢”关系探讨复方配伍机制, 以戊己丸为范例, 研究戊己丸配伍(比)与机体主要肝药酶-CYP450之间的相互影响, 本文报道戊己丸不同配比方对大鼠体外CYP1A2酶活性的影响, CYP1A2主要在肝脏表达, 人类CYP1A2的含量约占肝脏CYP450总量的13%, 参与咖啡因(90%以上的咖啡因清除由该酶介导)、非那西丁、醋氨酚等20多种药物的代谢, 并且在十几种前致癌物的激活或灭活中发挥重要作用^[3,4]。

本实验以方剂对CYP1A2酶活性的影响为主效应, 以 IC_{50} 作为量化观察指标, 研究戊己丸配伍的数、量、相互比例与方剂主效应的关系, 为探讨中药复方配伍机制提供新的研究思路。

1 材料和方法

1.1 材料 Wistar大鼠, δ , 体质量200 g \pm 20 g, 北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 许可证编号: SCXK(京)2007-0001, SPF级; HPLC色谱仪(美国Waters 2695自动进样液相仪, Waters 2489-UV检测器, Empower数据处理系统), Kromasil-C18色谱柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m), 美国Avanti J-30I超高速离心机; 美国Sorvall super T21高速离心机; 日本MDF-U 50V超低温冰箱(-80 $^{\circ}$ C); 连续加样器; 国产BHW-2电热恒温水浴箱; 分析天平; 匀浆器. 非那西丁、对乙酰氨基酚、6-磷酸葡萄糖、 β -萘黄酮均购自Sigma公司; 氧化型辅酶II(北京纵横洋洲公司), 苯巴比妥钠注射液(天津金耀氨基酸有限公司), BCA试剂盒(北京赛驰生物科技有限公司), 精密pH试纸, 色谱纯乙腈(Tedia, 美国), 甲醇(色谱纯, 天津四友试剂公司), 高纯水, 氯化镁(分析纯), 氯化钾(分析纯), 氢氧化钾(分析纯), 磷酸. 黄连、制吴茱萸、炒白芍饮片均购自北京卫仁饮片厂; 黄连醇提物、制吴茱萸醇提物、炒白芍混合提取物(醇提加水提)由中日友好医院剂型室按优选工艺分别进行提取。

1.2 方法

1.2.1 戊己丸受试复方配比设计: 按照 $L_9(3^4)$ 正交表, 采用以下9个不同配比戊己丸, 其中方4为药典收录方. 方1-9中黄连、制吴茱萸、炒白芍的比例分别为: 3:1:3; 3:2:6; 3:6:12; 6:1:6; 6:2:12; 6:6:3; 12:1:12; 12:2:3; 12:6:6。

1.2.2 实验分组与药物配制: 实验分为12组: 戊己

■ 研发前沿

目前主要从亚细胞、细胞及整体水平研究药物对CYP450酶的影响作用, 如从肝微粒体、肝原代细胞培养或体内实验研究CYP450酶活性或基因、蛋白表达等. 中药与CYP450酶之间的关系研究难点在于中药(复方)成分多样, 对CYP450酶影响作用复杂, CYP450酶对不同中药成分代谢情况也同样复杂, 亟待研究的问题是如何采用有效研究模式及严密的数理统计分析, 从中药与代谢酶之间纷繁复杂的相互影响关系中探索两者之间的作用规律。

■相关报道

杜贵森报道其在临床运用戊己丸时,扩大该方剂运用范围,凡遇情志内伤、肝胃不和所致的多种疾病,每选用戊己丸作基础方、加味施治于临床,取得满意的疗效。王丹等认为中药对CYP450的作用,受多种内外因素的影响,中药不同来源,各种炮制加工、制剂等工艺过程均会对CYP450产生不同影响作用,如何排除各种非实验因素的影响,并合理进行实验设计,是当前中药对CYP450活性作用研究中的难点。

丸不同配比方1-9;黄连、制吴茱萸、炒白芍各单味药提取物;各组药物均采用500 mL/L甲醇溶液作为溶剂,取相应量的黄连醇提物、制吴茱萸醇提物与炒白芍提取物混合,按各自组方成分比例配制。

1.2.3 大鼠肝微粒体制备:参照文献[5]方法,大鼠经苯巴比妥钠与 β -萘黄酮诱导CYP450酶生成增加后,用高速离心法制备肝微粒体, -80 °C保存备用。以小牛血清白蛋白为标准品,采用BCA试剂盒测定微粒体蛋白含量,蛋白浓度为1.2 g/L。

1.2.4 肝微粒体混合酶系组成:为测定药物对CYP450同工酶的 IC_{50} 值,每一受试药设7个浓度及溶剂对照,8个受试条件,每1条件做平行3个孵育管,1个受试药每次需做24个孵育管,每次配制12 mL微粒体混合酶系溶液,其组成为:

1.2.3项下肝微粒体悬液1.2 mL, 0.4 mol/L $MgCl_2$ 溶液120 μ L, 1.65 mol/L KCl_2 溶液120 μ L, 6-磷酸葡萄糖15 mg, 氧化型辅酶II 20 mg, 纯净水4.56 mL, 0.2 mol/L磷酸盐缓冲液(pH7.4)6 mL, 震荡混匀;混合酶系配制在冰浴上进行,临用时现配。

1.2.5 CYP1A2酶代谢活性检测:每1孵育管加入5 μ L受试药溶液之后,吸取120 μ L浓度为100 μ mol/L的CYP1A2特征底物-非那西丁溶液,加入1.2.4项下的12 mL肝微粒体混合酶系溶液中,混匀,均匀加入24个孵育管内,每1孵育管添加0.5 mL,混匀。以上操作在冰浴上进行,之后将孵育管置37 °C水浴中孵育3 h后,加入0.5 mL冰冷甲醇终止反应,转入1.5 mL离心管,4 °C冰箱放置3 h沉淀蛋白后,18 000 r/min离心20 min,取上清液20 μ L, HPLC进样测定非那西丁代谢产物-对乙酰氨基酚浓度,对乙酰氨基酚的生成量与CYP1A2酶活性呈正相关^[6]。

1.2.6 HPLC检测方法学建立:(1)HPLC条件:Kromasil-C18色谱柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m);流动相A:5%乙腈、15%甲醇、80%水;流动相B:10%乙腈、60%甲醇、30%水;梯度洗脱程序:0 min(100% A), 8 min(80% A, 20% B), 12 min(60% A, 40% B), 20 min(100% A);运行时间:40 min;流速:1 mL/min;柱温:30 °C;检测波长:245 nm;进样量:20 μ L;(2)对照品储备液配制:精密称取非那西丁、对乙酰氨基酚一定量,配制10 mL的0.5 g/L非那西丁和10 mL的0.31 g/L对乙酰氨基酚储备液;(3)标准曲线测定:取一定量对乙酰氨基酚储备液,以50%肝微粒体混合酶系溶液:50%甲醇的混合溶液(与孵育体系最终溶液成分一致)稀释,配制0.375、0.185、0.09、

表 1 戊己丸提取物组方终浓度(未添加终止反应的冰冷甲醇前孵育管内受试药终浓度) [μ g(生药)/mL]

分组	黄连	制吴茱萸	炒白芍	总浓度
黄连提取物	672.24	—	—	672.24
制吴茱萸提取物	—	4 259.32	—	4 259.32
炒白芍提取物	—	—	35 870	35 870
方1	168	56	168	392
方2	168	112	336	616
方3	168	336	672	1 176
方4	336	56	336	728
方5	336	112	672	1 120
方6	336	336	168	840
方7	672	56	672	1 400
方8	672	112	168	952
方9	672	336	336	1 344

0.04、0.02、0.01 mg/L浓度对照品溶液,每1梯度浓度溶液进样20 μ L测定,重复进样2次,取平均值,以组分的峰面积(A)为纵坐标,组分浓度(c, mg/L)为横坐标,进行线性回归;(4)方法回收率:取适量对乙酰氨基酚对照品储备液,以50%肝微粒体混合酶系溶液:50%甲醇的混合溶液分别配制高、中、低3个浓度的对乙酰氨基酚混合溶液,3个浓度溶液分别进样20 μ L,按上述HPLC条件测定相应成分含量,以含量测定值比实际值计算方法回收率;(5)最低检测限:根据S/N(信噪比) ≥ 3 计算。

1.2.7 戊己丸不同配比方对大鼠CYP1A2酶活性的影响:本实验12个戊己丸提取物组方终浓度(特指CYP1A2酶代谢活性实验受试药的最高浓度,由终浓度依次往下对半稀释6个浓度,作为 IC_{50} 测定所需梯度浓度),详见表1。每1受试药的每1受试浓度(共8个受试浓度,包括溶剂对照)做3个平行孵育管,平行实验2次,按1.2.5项下步骤检测受试药对CYP1A2酶活性的影响。pH值对CYP450酶活性影响较大^[7], pH6-8为CYP450酶生理pH值范围,实验均需调定孵育管内pH值至7.0左右。

统计学处理 计算加与不加受试药物的情况下,非那西丁经CYP1A2代谢产生对乙酰氨基酚的量,按照以下公式计算不同浓度受试药对CYP1A2酶活性的抑制率:抑制率(%) = (不加受试药对乙酰氨基酚生成量-加受试药对乙酰氨基酚生成量)/不加受试药对乙酰氨基酚生成量 \times

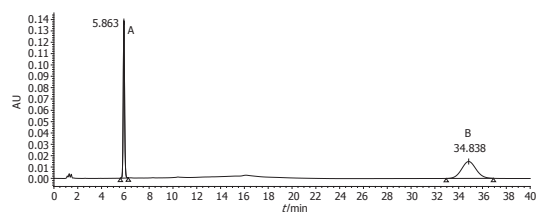


图1 对乙酰氨基酚、非那西丁对照品色谱图. A: 对乙酰氨基酚, $t_r = 5.863$; B: 非那西丁, $t_r = 34.838$.

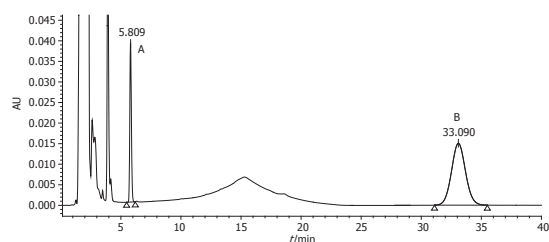


图2 戊己丸提取物组方中对乙酰氨基酚、非那西丁色谱图.

100%; 然后采用改良Bliss法计算 IC_{50} 值^[8]. 若某受试药 $IC_{50} > 50 \mu\text{mol/L}$, 说明药物抑制能力弱; 若 $IC_{50} < 50 \mu\text{mol/L}$, 说明该药物抑制能力强. 数据以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示, 采用SPSS11.5统计软件进行 t 检验, 单因素方差分析、多因素方差分析及正交 t 值法计算.

2 结果

2.1 HPLC方法学考察 对乙酰氨基酚回归方程: $A = 3397.3c - 2342.2$, ($n = 6$, $r = 0.9997$), 表明对乙酰氨基酚在 $0.01\text{--}0.375 \text{ mg/L}$ 浓度范围内具有良好的线性关系; 对乙酰氨基酚平均回收率为99.58%, 最低检测浓度为 0.01 mg/L . 相应图谱见图1, 图2.

2.2 戊己丸提取物组方终浓度对CYP1A2酶活性的影响 戊己丸不同配比方对CYP1A2的抑制影响存在较大差异(表2).

2.3 戊己丸组方中各单味药对CYP1A2酶活性影响的 IC_{50} 值 戊己丸组方中3味药单用均能对CYP1A2酶活性产生抑制作用, 黄连 IC_{50} 值非常低, 对CYP1A2的抑制作用显著, 是戊己丸方中抑制CYP1A2酶活性的主要物质, 制吴茱萸 IC_{50} 值较高, 对CYP1A2酶活性抑制不明显, 炒白芍 IC_{50} 值很高, 对CYP1A2酶活性抑制较弱; 不同配比情况下复方中的吴茱萸和炒白芍拆方 IC_{50} 值均较单味药 IC_{50} 值极显著降低. 方2、6、8中黄连拆方 IC_{50} 值与黄连单味药中 IC_{50} 值比较无显著差异, 方1、4、5、9中黄连拆方 IC_{50} 值比黄连单味药中 IC_{50} 值显著降低, 方3、7中黄连拆方 IC_{50}

表2 戊己丸提取物组方终浓度对CYP1A2酶活性的影响 ($\text{mean} \pm \text{SD}$, $n = 6$)

分组	孵育实验终浓度 [μg (生药)/mL]	终浓度下对乙酰氨基酚生成抑制率(%)
黄连提取物	672.24	97.91 ± 0.32
制吴茱萸提取物	4 259.32	87.19 ± 0.85
炒白芍提取物	35 870	80.53 ± 3.18
方1	392	82.68 ± 3.68
方2	616	90.04 ± 2.42
方3	1 176	89.09 ± 3.85
方4	728	96.83 ± 0.95
方5	1 120	96.25 ± 0.47
方6	840	96.79 ± 0.29
方7	1 400	97.39 ± 0.42
方8	952	95.05 ± 1.24
方9	1 344	98.58 ± 0.34

值比黄连单味药中 IC_{50} 值显著升高(表3).

2.4 戊己丸组方中的3味药对CYP1A2的作用 (1) 单因素方差分析: 方1-9的组间两两比较均有显著差异; (2) 多因素方差分析: 方1-9中, 黄连, 制吴茱萸, 炒白芍均有3个剂量水平, 随着黄连和制吴茱萸的剂量水平增加, 可以造成组方对CYP1A2酶活性抑制作用的加强, 而随着炒白芍剂量水平的增加, 可以造成组方对CYP1A2酶活性抑制作用的减弱; (3) 正交 t 值法计算: 见表4, 在戊己丸的3种因素(3味药)3水平(3味药在9个复方组合中均有小、中、大3个剂量水平配伍)正交设计实验中, 除炒白芍小、中剂量水平差别不会导致戊己丸组方对CYP1A2酶活性产生有统计学差异的影响外, 其余两药各剂量水平间比较及炒白芍中、大剂量水平间和小、大剂量水平间比较均能显著改变相应戊己丸组方对CYP1A2酶活性的影响.

3 讨论

戊己丸方含黄连、吴茱萸、白芍, 黄连属苦寒清热药, 入心、胃经可泻心火、清胃热, 吴茱萸属温阳散寒药, 归肝、脾、胃、肾经, 可温中止呕, 助阳止泻, 芍药性味苦、平, 入肝、脾经, “白芍药益脾”, 长于养血敛阴, 柔肝止痛^[9]; 由此可见, 戊己丸疏泻肝火、调和脾胃之功, 能治腹痛泻痢、呕吐吞酸等症, 乃方中3味药集结所长, 协同制衡而表现出的整体药效, 又因3味药性味、归经及功效各有不同侧重, 故从戊己丸方解亦能推测戊己丸不同配伍配比可造成其药

■创新盘点

本文以方剂对CYP1A2酶活性的影响为主效应, 以 IC_{50} 作为量化观察指标, 研究戊己丸配伍的数、量、相互比例与方剂主效应的关系, 为探讨中药复方配伍机制提供新的研究思路.

■应用要点

药物代谢性相互作用是导致患者发生不良反应乃至严重不良反应或死亡的重要原因,戊己丸及黄连均是现代临床常用中药(复方),从本实验结果看,临床使用戊己丸及黄连,尤其存在多药共用的情况下,务必要注意防范可能因戊己丸或黄连抑制CYP1A2酶活性而出现的不良药物代谢性相互作用。

表 3 戊己丸提取物组方对CYP1A2酶活性影响的 IC_{50} 值拆方 (mean \pm SD, $n = 6$)

分组	受试药拆方[μ g (生药)/mL]			提取物组方 IC_{50} [μ g(生药)/mL]
	黄连提取物	制吴茱萸提取物	炒白芍提取物	
黄连提取物	28.07 \pm 1.398	—	—	28.07 \pm 1.398
制吴茱萸提取物	—	989.69 \pm 110.953	—	989.69 \pm 110.953
炒白芍提取物	—	—	6 633.28 \pm 336.094	6 633.28 \pm 336.094
方1	24.82 \pm 1.850 ^a	8.27 \pm 0.617 ^f	24.82 \pm 1.851 ^h	57.92 \pm 4.319
方2	28.47 \pm 2.107	18.98 \pm 1.405 ^f	56.94 \pm 4.214 ^h	104.38 \pm 7.725
方3	45.90 \pm 2.784 ^d	91.79 \pm 5.568 ^f	183.59 \pm 11.136 ^h	321.28 \pm 19.488
方4	14.85 \pm 1.173 ^d	2.47 \pm 0.195 ^f	14.85 \pm 1.173 ^h	32.17 \pm 2.541
方5	24.03 \pm 1.396 ^a	8.01 \pm 0.465 ^f	48.06 \pm 2.791 ^h	80.09 \pm 4.652
方6	28.59 \pm 3.062	28.59 \pm 3.062 ^f	14.29 \pm 1.531 ^h	71.47 \pm 7.656
方7	36.84 \pm 2.988 ^b	3.07 \pm 0.249 ^f	36.84 \pm 2.988 ^h	76.76 \pm 6.224
方8	28.53 \pm 6.143	4.75 \pm 1.024 ^f	7.13 \pm 1.536 ^h	40.41 \pm 8.702
方9	14.72 \pm 2.499 ^d	7.36 \pm 1.249 ^f	7.36 \pm 1.249 ^h	29.45 \pm 4.997

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$, ^d $P < 0.001$ vs 黄连提取物组; ^f $P < 0.001$ vs 制吴茱萸提取物组; ^h $P < 0.001$ vs 炒白芍提取物组。

表 4 戊己丸提取物组方对CYP1A2酶活性影响的 $L_9(3^4)$ 正交 t 值法计算结果 (mean \pm SD, $n = 6$)

统计项	黄连	制吴茱萸	炒白芍	t 值
M_1	483.58	166.85	169.80	$t_{(0.05, 45)} = 2.0145$
M_2	183.73	224.88	166.00	$t_{(0.01, 45)} = 2.6910$
M_3	146.62	422.2	478.13	$t_{(0.001, 45)} = 3.5235$
D_{1-2}	299.85	-58.03	3.80	
D_{2-3}	37.11	-197.32	-312.13	
D_{1-3}	336.96	-255.35	-308.33	
t_{1-2}	28.0769	5.4337	0.3558	
t_{2-3}	3.4748	18.4763	29.2267	
t_{1-3}	31.5517	23.9101	28.8709	
P_{1-2}	$[t = 28.0769 > 3.5235]^d$	$[t = 5.4337 > 3.5235]^d$	$t = 0.3558 < 2.0145$	
P_{2-3}	$[t = 3.4748 > 2.6910]^b$	$[t = 18.4763 > 3.5235]^d$	$[t = 29.2267 > 3.5235]^d$	
P_{1-3}	$[t = 31.5517 > 3.5235]^d$	$[t = 23.9101 > 3.5235]^d$	$[t = 28.8709 > 3.5235]^d$	

M_1 、 M_2 、 M_3 : 分别是该列药物低、中、高剂量 IC_{50} 值之和; D_{1-2} 是 M_1 与 M_2 极差; D_{2-3} 是 M_2 与 M_3 极差; D_{1-3} 是 M_1 与 M_3 极差。 ^b $P < 0.01$, ^d $P < 0.001$ 。

效特点之差异,但其配伍机制尚需进行现代科学研究方可揭去复方用药奥秘之面纱。

中药复方应用是中医辨证论治的精髓,只有探明中药复方配伍机制才能更好地利用中医药这一民族瑰宝为人民的健康卫生服务。目前中药配伍研究虽已取得一定成就,但尚不能完全阐明复方配伍机制。配伍研究实验设计可采用析因设计、正交设计、均匀设计等,中药复方一般药味较多,如何分析主药,找出最佳组合及最优剂量,从而达到精简处方的目的,值得重视和研究。孙卫民和孙瑞元根据中药方剂研究特点,按正交设计原理及 F 值与 t 值的特定关系,

提出了正交 t 值法^[10],本法能较合理解释复方配伍各因素、水平间的相互作用。

我们以戊己丸为范例,采用黄连,制吴茱萸,炒白芍作为戊己丸组方用药,前期进行了一系列配伍相关研究,可以证明不同配比戊己丸药效上有不同侧重,不同配比戊己丸血药动力学参数各有不同,以及胃肠吸收、代谢也有明显差异,并且从Caco-2细胞, P-糖蛋白等层次初步分析了造成以上差异的机制^[11,12],课题组希望通过戊己丸配伍的范例研究,建立一种有效的中药复方配伍研究方法,即从配伍药效,配伍中药吸收、分布、代谢、排泄等环节,整体、细

胞、亚细胞等水平研究中药配伍, 综合分析、阐述中药配伍机制。

中药复方是由配伍中药一定的数(中药味数)、量(剂量水平)、比(各组成药味的数、量比例)构建起来的在主效应上有别于单味药的新个体(方剂), 方剂主效应的观察指标可以是药效、代谢或毒性方面的, 配伍药物数、量、比变化可以导致方剂整体效应发生量变甚至质变。本实验进行戊己丸不同配比方对大鼠CYP1A2酶活性的影响研究, 以戊己丸对CYP1A2酶活性的影响作为方剂主效应, 探讨戊己丸配伍数、量、比变化与方剂主效应差异的相关性, 从“药物配伍-代谢”关系阐述中药配伍机制。实验表明, 戊己丸可以显著抑制体外大鼠肝微粒体CYP1A2酶活性, 黄连是抑制CYP1A2酶活性的主要物质, 吴茱萸和白芍虽抑制CYP1A2酶活性作用较弱, 但不同配比情况下复方中的吴茱萸和白芍拆方 IC_{50} 值均较单味药 IC_{50} 值极显著降低, 这主要是因为各复方中加入了CYP1A2酶活性抑制极显著的黄连造成的, 吴茱萸、白芍两药在方中配比不同还可造成黄连抑制CYP1A2酶活性能力的改变, 并且按 $L_9(3^4)$ 正交设计的戊己丸方1-9在抑制CYP1A2酶活性作用上, 组间比较均有显著差异, 复方中黄连本身的不同比例和引入对CYP1A2酶活性影响不显著的不同配比吴茱萸和白芍后, 对CYP1A2酶活性造成了相互制衡或者相互促进的作用。

戊己丸方1-9中, 黄连、吴茱萸、白芍均有3个剂量水平, 随着黄连和吴茱萸的剂量水平增加, 可以造成组方对CYP1A2酶活性抑制作用的加强, 而随着白芍剂量水平的增加, 可以造成组方对CYP1A2酶活性抑制作用的减弱; 黄连、吴茱萸、白芍各自的3个剂量水平, 除白芍小、中剂量水平差别不会导致戊己丸组方对CYP1A2酶活性产生统计学差异的影响外, 其余2药各剂量水平间比较及白芍中、大剂量水平间和小、大剂量水平间比较均能显著改变相应戊己丸组方对CYP1A2酶活性的影响。

总之, 本实验揭示戊己丸配伍数、量、比不同与方剂主效应差异存在密切相关, 那么, 不同配比戊己丸在药效上的差异, 是否与不同配

比戊己丸进入机体后对肝微粒体CYP1A2造成了不同的抑制作用, 从而导致戊己丸本身在机体内被代谢的差异(药物被代谢差异可造成机体内药效物质的差异)有关? 以及戊己丸对肝微粒体其他CYP450同工酶是否有类似作用? 体外实验结果是否可被体内实验印证? 这有待进一步实验研究及分析阐述, 作者将另行撰文报道。

药物代谢性相互作用^[13,14]是导致患者发生不良反应乃至严重不良反应或死亡的重要原因, 戊己丸及黄连均是现代临床常用中药(复方), 从本实验结果看, 临床使用戊己丸及黄连, 尤其存在多药共用的情况下, 务必要注意防范可能因戊己丸或黄连抑制CYP1A2酶活性而出现的不良药物代谢性相互作用。

4 参考文献

- 1 宫海民, 王兆淦, 段文卓. 戊己丸镇痛、抗炎作用的实验研究. 中国中医药科技 1998; 5: 147-148
- 2 王娅杰, 董宇, 朱晓新. 戊己丸提取物不同配伍方对豚鼠离体结肠运动影响的实验研究. 中国中药杂志 2007; 32: 2161-2165
- 3 谭丽, 管小琴. 维生素E、硒对非酒精性脂肪肝大鼠肝细胞色素P4501A1及脂质过氧化的干预作用. 世界华人消化杂志 2007; 15: 2977-2982
- 4 徐巧玲, 李军, 郭瑞臣. 细胞色素P450与临床用药. 海峡药学 2009; 21: 74-76
- 5 王欢, 吴东媛, 杜智敏. 氨苄西林与双黄连注射液单用及配伍时对大鼠CYP2D6的影响. 医药导报 2008; 27: 491-494
- 6 Kokwaro GO, Glazier AP, Ward SA, Breckenridge AM, Edwards G. Effect of malaria infection and endotoxin-induced fever on phenacetin O-deethylation by rat liver microsomes. Biochem Pharmacol 1993; 45: 1235-1241
- 7 蔡瑜, 刘萱, 杨尧, 李平, 曹诚, 张部昌. 细胞色素氧化酶P450(CYP4F3A)的纯化及动力学研究. 军事医学科学院院刊 2009; 33: 234-236
- 8 杨贵忠, 袁野, 周岐新, 杨俊卿, 刘颖菊. 酮康唑对健康成人肝细胞微粒体细胞色素P450同工酶3A4、1A2活性的作用. 南方医科大学学报 2008; 28: 1634-1639
- 9 文彬, 黄秋凌, 龚艳青, 陈蔚文. 左金丸及其主要单体成分对大肠癌的干预作用. 世界华人消化杂志 2009; 17: 1936-1941
- 10 孙卫民, 孙瑞元. 中药方剂研究的正交 t 值法. 中药药理与临床 1992; 8: 41-44
- 11 鲍天冬. 戊己丸提取物不同配伍的药物动力学实验研究. 北京: 中国中医科学院, 2007: 1-175
- 12 董宇. 戊己丸不同配伍的肠吸收特征及与P-gp相互作用研究. 北京: 中国中医科学院, 2008: 1-124
- 13 高志伟, 施孝金, 钟明康. 细胞色素P450酶与药物相互作用研究进展. 中国临床药理学杂志 2006; 15: 395-398
- 14 彭文兴, 李焱德, 周宏瀛. 植物药及果蔬对药物代谢酶P450活性的影响. 中国临床药理学杂志 2003; 19: 145-148

■同行评价

本研究在中医药研究思路中有很大的创新性和探索性, 实验方法尚可, 结果具有一定借鉴意义。

编辑 李瑞敏 电编 何基才

17 β -雌二醇对去卵巢豚鼠结肠平滑肌的作用

张永顺, 余保平, 肖勇, 赵梦, 张丽静

■背景资料

肠易激综合征是功能性肠病中最常见的一种疾病。其发生机制迄今尚未完全明了, 性别、饮食、感染、精神因素等被认为与上述异常有关。鉴于女性较男性多发且女性腹痛常与月经有相关性, 本研究组考虑雌激素可能参与了疾病的发生。

张永顺, 余保平, 肖勇, 赵梦, 张丽静, 武汉大学人民医院消化内科 湖北省武汉市 430060

作者贡献分布: 张永顺与余保平对此文所作贡献均等; 此课题由张永顺、余保平、肖勇、赵梦及张丽静共同设计; 研究过程由余保平技术指导, 张永顺、肖勇及赵梦操作完成; 数据分析由张永顺、肖勇及张丽静完成; 本论文写作由张永顺完成。

通讯作者: 余保平, 教授, 430060, 湖北省武汉市, 武汉大学人民医院消化内科. yubp62@163.com

收稿日期: 2009-11-20 修回日期: 2009-12-30

接受日期: 2010-01-04 在线出版日期: 2010-02-28

17 β -estradiol enhances cholecystokinin-induced stimulation of colonic motility in ovariectomized guinea pigs

Yong-Shun Zhang, Bao-Ping Yu, Yong Xiao, Meng Zhao, Li-Jing Zhang

Yong-Shun Zhang, Bao-Ping Yu, Yong Xiao, Meng Zhao, Li-Jing Zhang, Department of Gastroenterology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei Province, China

Correspondence to: Professor Bao-Ping Yu, Department of Gastroenterology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei Province, China. yubp62@163.com

Received: 2009-11-20 Revised: 2009-12-30

Accepted: 2010-01-04 Published online: 2010-02-28

Abstract

AIM: To observe the effects of estradiol on the response of colonic smooth muscle stripes to cholecystokinin (CCK) in ovariectomized guinea pigs.

METHODS: Thirty guinea pigs were divided into three groups: A (ovariectomized guinea pigs), B (ovariectomized guinea pigs treated with estradiol for 3 days), and C (ovariectomized guinea pigs treated with estradiol for 7 days). The response of colonic smooth muscle stripes isolated from guinea pigs to CCK was recorded using a tension transducer.

RESULTS: After addition of CCK, the amplitude of the contraction of colonic smooth muscle stripes increased in all the three groups. Compared with group A, the increase in the amplitude of the contraction of colonic smooth muscle stripes was significantly higher in groups B and

C ($0.134 \text{ g} \pm 0.026 \text{ g}$ and $0.179 \text{ g} \pm 0.027 \text{ g}$ vs $0.096 \text{ g} \pm 0.015 \text{ g}$, respectively, both $P < 0.05$).

CONCLUSION: Estradiol can enhance the sensitivity of colonic smooth muscle to CCK in ovariectomized guinea pigs.

Key Words: Estradiol; Cholecystokinin; Colonic contraction

Zhang YS, Yu BP, Xiao Y, Zhao M, Zhang LJ. 17 β -estradiol enhances cholecystokinin-induced stimulation of colonic motility in ovariectomized guinea pigs. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(6): 592-595

摘要

目的: 观察17 β -雌二醇对去卵巢豚鼠结肠平滑肌的作用。

方法: 将豚鼠分为A组(去卵巢7 d)、B组(去卵巢+雌二醇3 d)、C组(去卵巢+雌二醇7 d)。利用张力换能器记录豚鼠离体结肠平滑肌肌条对胆囊收缩素(cholecystokinin, CCK)的反应。

结果: 加入CCK后, 三组平滑肌肌条收缩幅度均增加, 增加幅度分别为 $0.096 \text{ g} \pm 0.015 \text{ g}$ 、 $0.134 \text{ g} \pm 0.026 \text{ g}$ 、 $0.179 \text{ g} \pm 0.027 \text{ g}$ 。B、C两组增加幅度较A组更为明显($P < 0.05$), 差别有统计学意义。

结论: 雌二醇能增强结肠平滑肌对CCK的敏感性。

关键词: 雌二醇; 胆囊收缩素; 结肠收缩

张永顺, 余保平, 肖勇, 赵梦, 张丽静. 17 β -雌二醇对去卵巢豚鼠结肠平滑肌的作用. *世界华人消化杂志* 2010; 18(6): 592-595
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/592.asp>

0 引言

妇女在经前或经期时常出现各种胃肠道动力紊乱症状, 如腹痛、腹胀、早饱、腹泻或便秘^[1]。另外, 在以腹部不适和排便改变为主要表现的肠道功能疾病肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)的患者中2/3为女性^[2]。这些资料提示我们

■同行评议者

田宇彬, 教授, 青岛大学医学院附属医院消化内科

卵巢激素可能影响胃肠道的功能. 已有的研究表明雌二醇能够影响胃肠道和胆囊的运动^[3], 其确切机制不清, 但胆囊收缩素在其中发挥的作用正日益受到重视. 本实验通过建立去卵巢模型, 用雌二醇替代, 分析豚鼠结肠平滑肌肌条对CCK的反应.

1 材料和方法

1.1 材料 健康成年豚鼠30只, ♀, 体质量250-350 g, 由华中科技大学同济医学院动物中心提供. 实验用八肽胆囊收缩素(cholecystokinin-octapeptide, CCK-8)和17 β -雌二醇(17 β -estradiol)购自Sigma(Fisher Scientific)公司. 阿托品产自江苏盐城药业有限公司, 尼莫地平产自拜耳医药保健股份有限公司(北京), 河豚毒素(TTX)购自大连瑞芳公司. 张力换能器、RM6240多道生理信号采集处理系统购自成都仪器厂. Tyrode液成分包括: NaCl 147.0 mmol/L, KCl 4.0 mmol/L, CaCl₂ 2.0 mmol/L, MgCl₂ 1.05 mmol/L, NaH₂PO₄ 0.42 mmol/L, Na₂HPO₄ 1.81 mmol/L, 葡萄糖5.5 mmol/L, 用NaOH调pH值到7.35-7.45.

1.2 方法

1.2.1 分组: 将30只豚鼠随机分为3组, A组为去卵巢7 d组, B组为去卵巢7d后皮下注射17 β -雌二醇3 d组, C组为去卵巢7 d后皮下注射17 β -雌二醇7 d组. 三组体质量差别无统计学意义. 豚鼠水合氯醛2 mL/1 kg腹腔麻醉, 固定, 取背部两侧肋骨下缘1-2 cm处切口, 结扎输卵管后切除卵巢, 缝合肌层后双氧水消毒, 缝合皮肤关闭腹腔, 常规消毒, 待豚鼠清醒后送回动物房中. 饲养7 d后, 给予B、C两组豚鼠皮下注射17 β -雌二醇25 μ g/kg. 饲养环境: 温度20 $^{\circ}$ C-25 $^{\circ}$ C, 湿度40%-60%, 自由进食、进水, 每2 d补充1次青菜.

1.2.2 离体肌条制备: 各组豚鼠饲养时间到后, 击昏后颈动脉放血处死后迅速剖腹. 取长约3 cm的近端结肠, 去黏膜后沿纵轴将结肠制备成长约8 mm, 宽约3 mm的肌条, 将肌条与张力换能器相连, 浸没于37 $^{\circ}$ C Tyrode液中, 给肌条1.0 g的前负荷, 待肌条出现规律的自发性收缩并稳定1 h后记录机械收缩信号, 将1.0 g前负荷设定为0.

1.2.3 CCK的干预: 肌条收缩稳定后, 使用微量进样器添加各浓度CCK-8(1×10^{-9} 、 1×10^{-8} 、 1×10^{-7} mol/L)于A组, 观察豚鼠结肠平滑肌肌条对 1×10^{-9} 、 1×10^{-8} 、 1×10^{-7} mol/L各浓度CCK-8的反应, 以及各组豚鼠(A、B、C组)结肠平滑肌肌条对 1×10^{-8} mol/L CCK-8的反应; 滴加 1×10^{-5}

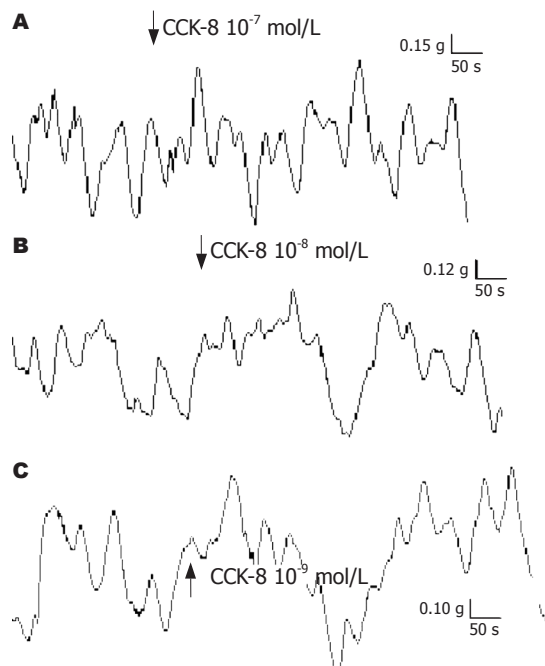


图1 不同浓度CCK-8作用后的结肠肌条收缩波形. A: 1×10^{-7} mol/L; B: 1×10^{-8} mol/L; C: 1×10^{-9} mol/L.

mol/L阿托品、尼莫地平 and TTX于A组观察三者对 1×10^{-8} mol/L CCK-8作用的影响. 每种药物作用后, Tyrode液冲洗肌条3次或更换肌条.

统计学处理 以给药前3 min胆囊肌条的张力作为对照值, 每次给药后3 min变化的最大值为效应值(药物作用前后的变化程度). 实验结果均以mean \pm SD表示, 对所得数据采用单因素方差分析, 多通道生物信号采集分析系统数据软件和统计软件SPSS13.0进行统计学分析. $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 不同浓度CCK对A组豚鼠结肠平滑肌的作用 加入 1×10^{-9} 、 1×10^{-8} 、 1×10^{-7} mol/L各浓度CCK-8后, 豚鼠离体结肠平滑肌肌条收缩振幅增加, 分别增加 $0.092 \text{ g} \pm 0.013 \text{ g}$ 、 $0.125 \text{ g} \pm 0.021 \text{ g}$ 、 $0.155 \text{ g} \pm 0.025 \text{ g}$, 呈浓度依赖性增加(图1, 2).

2.2 拮抗剂对A组 10^{-8} mol/L CCK作用的影响 阿托品、尼莫地平、河豚毒素等拮抗剂可以部分阻断CCK-8对离体结肠平滑肌肌条的作用, 效应值分别为同浓度CCK-8作用(以 1×10^{-8} mol/L CCK-8作用的效应值为1)的67.1%、54.1%、48.1%(图3).

2.3 1×10^{-8} mol/L CCK对三组豚鼠结肠平滑肌肌条的作用 去卵巢7 d组(A组), 去卵巢豚鼠雌二醇皮下注射3 d组(B组)以及去卵巢豚鼠雌二醇皮下注射7 d组(C组)加入 1×10^{-8} mol/L CCK-8

■ 研发前沿

对肠易激综合征的研究, 目前主要集中于探讨发病机制中的胃肠动力学异常和内脏感觉异常两个方面. 关于内脏敏感性增高的文章和报道有不少, 有学者认为精神因素是内脏高敏感的主要原因, 但至今仍然没有达成共识, 且具体机制不明. 而胃肠动力异常方面, 胆囊收缩素被认为在其中发挥着重要作用, 但研究结果并不统一.

■相关报道

自从流行病学提示性别因素在肠易激综合征起病中的作用后,对雌激素与肠易激综合征的研究就已展开.有学者通过研究得出结论,雌二醇可提高肠道对痛觉的敏感性,然而与此类似的结果并不多见,故可信度仍然不确定.韩炜等发现在肥大细胞表现有雌激素受体的表达,将性别和免疫因素联系起来,开拓了作者对肠易激综合征的视野,对今后继续研究免疫因素有指导意义.

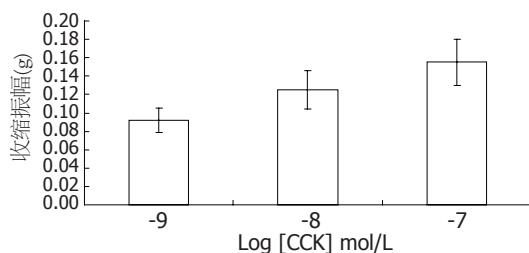


图2 不同浓度CCK-8对豚鼠结直肠平滑肌肌条的效应.

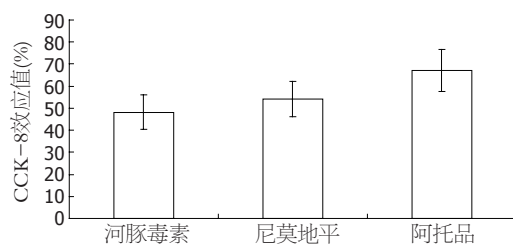


图3 拮抗剂加CCK-8对豚鼠结直肠平滑肌的影响.

后,离体结肠平滑肌肌条收缩振幅均增加,分别为 $0.096 \text{ g} \pm 0.015 \text{ g}$ 、 $0.134 \text{ g} \pm 0.026 \text{ g}$ 、 $0.179 \text{ g} \pm 0.027 \text{ g}$. B、C两组同A组相比,收缩幅度增加, B组收缩幅度小于C组,差异具有统计学意义($P < 0.05$,图4).

3 讨论

IBS是最常见的一种功能性肠道疾病,发病机制尚不清楚.目前,认为其可能与性别、精神因素、食物、神经性激素、感染、免疫等多种因素有关,其中性别被认为是重要因素之一^[4,5].流行病学研究显示女性是IBS患者中的主要人群.国外学者研究报道,经前期和经期女性更容易出现腹痛、稀便和其他一些消化系症状,这提示女性性激素的波动可能对IBS有影响,与胃肠道动力相关.

已经知道,雌二醇是雌激素中的主要物质,也是卵巢分泌的最重要的性激素.因此,普遍用雌二醇来反映雌激素的作用.研究发现,急性给予雌二醇对结肠平滑肌电压依赖性钾电流的密度没有影响,而肌注雌二醇7 d的小鼠结肠平滑肌电压依赖性钾电流密度受到抑制^[6].然而雌二醇对离体结肠平滑肌的直接作用并不显著^[7],故我们怀疑雌二醇可能通过其他途径影响结肠作用.

CCK是一种重要的胃肠激素,参与胃肠道动力的调节.研究发现,存在两种CCK受体,即CCK-AR和CCK-BR,前者存在于外周组织,而后者主要表达于中枢神经系统.已经清楚,CCK的效应包括刺激膳食后胆囊收缩、促进Oddi括

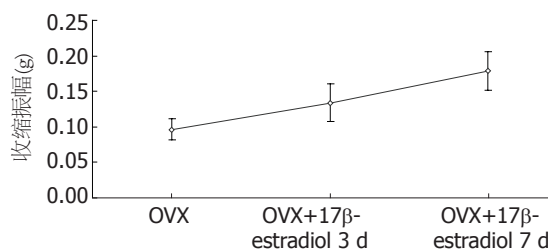


图4 各组豚鼠结直肠平滑肌肌条对 10^{-8} mol/L CCK-8的反应.

约肌舒张、抑制胃排空等功能.有研究报道,静脉注射CCK-8后结肠运动呈推进性增强及腹痛^[8],有人发现IBS患者血浆中CCK的含量明显高于正常对照组^[9].上述研究显示,CCK与IBS腹痛、腹泻症状可能存在联系.

本实验发现,向离体的豚鼠肌条滴加CCK-8后,肌条收缩力增加,且与CCK-8浓度呈正相关.有研究表明,CCK作用于肠壁神经元上受体,肠神经通过神经末梢释放乙酰胆碱作用于肌细胞表面受体,引起细胞去极化进而发挥对结肠平滑肌的作用^[10].在本实验中加入尼莫地平、阿托品和河豚毒素后,肌条收缩幅度缩小,证实了前面的观点.

在本实验中,将随机分组的豚鼠去卵巢后以雌二醇替代,制作结肠平滑肌离体肌条直观观察各组对CCK的反应.发现雌二醇替代后肌条收缩更明显,表明雌二醇可通过影响CCK受体表达发挥对结肠运动的影响.

有学者通过研究发现,肌注雌激素后,血浆中CCK水平升高^[11].本实验中,雌二醇肌注3 d和7 d组较去卵巢组豚鼠结直肠平滑肌肌条对CCK的敏感性增高,提示了雌二醇可提高CCK受体水平的表达.我们猜测雌二醇可能增强CCK受体的活性或升高其表达水平.而应用CCK受体拮抗剂后,这种雌激素引起的CCK水平升高现象消失^[12],表明雌二醇可能是通过CCK受体来调节CCK水平.

雌二醇影响结肠运动的途径可能尚不仅如此.有学者报道,雌激素能够通过诱导生长因子的表达使得肥大细胞数目增多,并使其释放组织胺的能力增强;而且,表达雌激素受体的细胞数与肥大细胞数目有很强的相关性,通过染色观察到表达雌激素受体的细胞与肥大细胞形态结构相似^[13,14],提示肥大细胞能够表达雌激素受体,雌激素可能会通过肥大细胞影响肠道功能从而引起各种消化系统症状.

总之,CCK-8及雌激素在IBS的发生发展中具有重要作用,其作用机制尚未完全明确,需要更

进一步的研究, 这些研究将为IBS的治疗策略提供新的方法和新的思路。

4 参考文献

- 1 Whitehead WE, Cheskin LJ, Heller BR, Robinson JC, Crowell MD, Benjamin C, Schuster MM. Evidence for exacerbation of irritable bowel syndrome during menses. *Gastroenterology* 1990; 98: 1485-1489
- 2 Lee OY, Mayer EA, Schmulson M, Chang L, Naliboff B. Gender-related differences in IBS symptoms. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 2184-2193
- 3 Eliakim R, Abulafia O, Sherer DM. Estrogen, progesterone and the gastrointestinal tract. *J Reprod Med* 2000; 45: 781-788
- 4 Cutolo M, Sulli A, Capellino S, Villaggio B, Montagna P, Seriolo B, Straub RH. Sex hormones influence on the immune system: basic and clinical aspects in autoimmunity. *Lupus* 2004; 13: 635-638
- 5 Müller-Lissner SA, Bollani S, Brummer RJ, Coremans G, Dapoigny M, Marshall JK, Muris JW, Oberndorff-Klein Wolthuis A, Pace F, Rodrigo L, Stockbrügger R, Vatn MH. Epidemiological aspects of irritable bowel syndrome in Europe and North America. *Digestion* 2001; 64: 200-204
- 6 Beckett EA, McCloskey C, O'Kane N, Sanders KM, Koh SD. Effects of female steroid hormones on A-type K⁺ currents in murine colon. *J Physiol* 2006; 573: 453-468
- 7 Harvey BJ, Alzamora R, Healy V, Renard C, Doolan CM. Rapid responses to steroid hormones: from frog skin to human colon. A homage to Hans Ussing. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1566: 116-128
- 8 Harvey RF, Read AE. Effect of cholecystokinin on colonic motility and symptoms in patients with the irritable-bowel syndrome. *Lancet* 1973; 1: 1-3
- 9 Zhang H, Yan Y, Shi R, Lin Z, Wang M, Lin L. Correlation of gut hormones with irritable bowel syndrome. *Digestion* 2008; 78: 72-76
- 10 Chey WY, Jin HO, Lee MH, Sun SW, Lee KY. Colonic motility abnormality in patients with irritable bowel syndrome exhibiting abdominal pain and diarrhea. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 1499-1506
- 11 Yang X, Liu R, Dong Y. Regulative effects of ovarian steroids on rat gastric motility and sensitivity. *Shengli Xuebao* 2006; 58: 275-280
- 12 Wu CL, Hung CR, Chang FY, Pau KY, Wang PS. Involvement of cholecystokinin receptor in the inhibition of gastrointestinal motility by estradiol in ovariectomized rats. *Scand J Gastroenterol* 2002; 37: 1133-1139
- 13 Lanlua P, Decorti F, Gangula PR, Chung K, Taglialatela G, Yallampalli C. Female steroid hormones modulate receptors for nerve growth factor in rat dorsal root ganglia. *Biol Reprod* 2001; 64: 331-338
- 14 韩伟, 陈建, 李君曼, 郭成浩, 袁孟彪, 李延青. 肥大细胞及其雌激素受体在肠易激综合征发病机制中的作用. *中华消化内镜杂志* 2003; 20: 100-103

■同行评价

本研究选题密切结合临床, 有潜在的实用价值, 对揭示IBS发病有一定意义。

编辑 李军亮 电编 何基才

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

• 消息 •

《2009年版中国科技期刊引证报告》(核心版)发布 《世界华人消化杂志》2008年影响因子 0.547

本刊讯 中国科学技术信息研究所发布2008年《世界华人消化杂志》的总被引频次为2 480, 位居1 868种中国科技论文统计源期刊的第100位, 41种内科学类期刊的第6位。2008年《世界华人消化杂志》的影响因子为0.547, 41种内科学类期刊的第17位。大家最为关注的是《2009年版中国科技期刊引证报告》(核心版)中新增一个综合评价指标, 即综合评价总分, 该指标根据科学计量学原理, 系统性地综合考虑被评价期刊的各影响力指标(总被引频次、影响因子、他引率、基金论文比、引文率等)在其所在学科中的相对位置, 并按照一定的权重系数将这些指标进行综合集成, 对期刊进行综合评价。《世界华人消化杂志》总分为49.5, 在41种内科学类期刊中排名第8位, 在1 868种中国科技期刊排名第341位。(编辑部主任: 李军亮 2010-01-08)

伊托必利、多潘立酮和甲氧氯普胺联合用药对FD患者胃肠功能和Ghrelin表达的影响

李娜, 徐璐

■背景资料

功能性消化不良是以餐后上腹不适或疼痛、早饱、恶心、呕吐、暖气等为主要表现的症候群。其发病率较高, 严重危害着人们生活质量, 是当今临床上亟待解决的问题之一。

李娜, 徐璐, 青岛大学医学院病理生理教研室 山东省青岛市 266021

国家自然科学基金资助项目, No. 30470642, No. 30670780

山东省科技攻关基金资助项目, No. 2008GG10002006

山东省卫生厅基金资助项目, No. 2007HZ026

青岛市科技局基金资助项目, No. 05-1-JC-93

作者贡献分布: 此实验由徐璐完成设计、技术指导并修改文章; 实验过程、统计分析及论文写作由李娜完成。

通讯作者: 徐璐, 教授, 266021, 山东省青岛市登州路38号, 青岛大学医学院病理生理教研室. xu.luo@163.com

电话: 0532-82991713

收稿日期: 2009-11-29 修回日期: 2009-12-16

接受日期: 2009-12-21 在线出版日期: 2010-02-28

Combined treatment with itopride, domperidone and metoclopramide improves gastrointestinal function and upregulates serum ghrelin level in patients with functional dyspepsia

Na Li, Luo Xu

Na Li, Luo Xu, Department of Pathophysiology, Qingdao University Medical College, Qingdao 266021, Shandong Province, China

Supported by: the National Natural Science Foundation of China, Nos. 30470642 and 30670780; the Key Science and Technology Program of Shandong Province, No. 2008GG10002006; the Foundation of the Health Department of Shandong Province, No. 2007HZ026; and the Foundation of Qingdao Municipal Science and Technology Commission, No. 05-1-JC-93

Correspondence to: Professor Luo Xu, Department of Pathophysiology, Qingdao University Medical College, 38 Dengzhou Road, Qingdao 266021, Shandong Province, China. xu.luo@163.com

Received: 2009-11-29 Revised: 2009-12-16

Accepted: 2009-12-21 Published online: 2010-02-28

Abstract

AIM: To investigate the effects of combined treatment with itopride, domperidone and metoclopramide on digestive function, gastrointestinal emptying and serum ghrelin level in patients with functional dyspepsia (FD).

METHODS: One hundred and twenty FD patients were divided into six groups according to

the Rome II criteria: those treated with itopride, domperidone and metoclopramide, alone or in double combination. The clinical symptoms, gastrointestinal emptying rate and serum ghrelin level were observed before and after treatment.

RESULTS: The symptoms of FD patients were significantly improved after each treatment. The symptomatic relief rates achieved in the combination groups were much better than those in single-drug groups (all $P < 0.01$). The gastric emptying rates achieved in the combination groups were also much better than those in single-drug groups ($54.26\% \pm 18.57\%$, $55.12\% \pm 18.22\%$ and $47.17\% \pm 15.21\%$ vs $36.23\% \pm 11.68\%$, $32.16\% \pm 10.08\%$ and $32.24\% \pm 10.12\%$, respectively; all $P < 0.01$). The intestinal emptying rates in the itopride plus domperidone group and the itopride plus metoclopramide group were much better than that in the domperidone plus metoclopramide group ($89.27\% \pm 11.36\%$ and $88.67\% \pm 13.25\%$ vs $69.16\% \pm 19.26\%$, respectively; both $P < 0.01$). The intestinal emptying rate in the itopride group was much better than those in the domperidone group and the metoclopramide group ($78.23\% \pm 12.56\%$ vs $58.96\% \pm 12.20\%$ and $58.33\% \pm 12.57\%$, respectively; both $P < 0.01$). The level of serum ghrelin in FD patients was significantly lower than that in normal controls ($P < 0.05$). After drug treatment, the level of serum ghrelin rose obviously. The levels of serum ghrelin in combination groups were higher than those in single-drug groups (all $P < 0.05$ or 0.01).

CONCLUSION: Treatment with itopride, domperidone and metoclopramide in double combination achieves better efficacy in FD patients than treatment with these drugs alone. Combination therapy significantly improves dyspepsia and gastric motility in FD patients perhaps by altering the level of serum ghrelin.

Key Words: Itopride; Domperidone; Metoclopramide; Functional dyspepsia; Gastrointestinal emptying; Ghrelin

Li N, Xu L. Combined treatment with itopride,

■同行评议者

刘正稳, 教授, 西安交通大学医学院第一附属医院

domperidone and metoclopramide improves gastrointestinal function and upregulates serum ghrelin level in patients with functional dyspepsia. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2010; 18(6): 596-600

摘要

目的: 研究伊托必利、多潘立酮和甲氧氯普胺联合应用对功能性消化不良(FD)患者胃肠功能和Ghrelin含量的影响。

方法: 以FD患者为研究对象,依据罗马Ⅱ标准,将符合纳入标准的患者120例随机分为6组,分别给予盐酸伊托必利,多潘立酮,甲氧氯普胺,以及联合用药给予盐酸伊托必利+多潘立酮,盐酸伊托必利+甲氧氯普胺和多潘立酮+甲氧氯普胺,观察用药前后各临床症状积分改善程度、胃肠排空率及血清Ghrelin的水平改变。

结果: 各组FD患者服药后消化不良等症均明显改善,在症状缓解率,联合用药组明显优于单独用药组($P<0.01$);在胃排空率,各联合用药组明显优于单独用药组($54.26\%\pm 18.57\%$, $55.12\%\pm 18.22\%$, $47.17\%\pm 15.21\%$ vs $36.23\%\pm 11.68\%$, $32.16\%\pm 10.08\%$, $32.24\%\pm 10.12\%$, 均 $P<0.01$);在肠排空率,联合用药组中伊托必利+多潘立酮组和伊托必利+甲氧氯普胺组明显优于多潘立酮+甲氧氯普胺组($89.27\%\pm 11.36\%$, $88.67\%\pm 13.25\%$ vs $69.16\%\pm 19.26\%$, 均 $P<0.01$);单独用药组中伊托必利明显优于多潘立酮或甲氧氯普胺($78.23\%\pm 12.56\%$ vs $58.96\%\pm 12.20\%$, $58.33\%\pm 12.57\%$, $P<0.01$);但伊托必利单独用药明显优于多潘立酮+甲氧氯普胺联合用药($P<0.05$)。FD患者血清Ghrelin水平明显降低($P<0.05$)。经药物治疗后Ghrelin水平明显回升,联合用药组明显高于单独用药组($P<0.05$ 或 0.01)。

结论: 伊托必利、多潘立酮和甲氧氯普胺联合用药比单独用药更有效,可显著改善FD患者的胃肠动力,该功能可能与血清ghrelin水平改变有关。

关键词: 伊托必利; 多潘立酮; 甲氧氯普胺; 功能性消化不良; 胃肠运动; Ghrelin

李娜, 徐璐. 伊托必利、多潘立酮和甲氧氯普胺联合用药对FD患者胃肠功能和Ghrelin表达的影响. 世界华人消化杂志 2010; 18(6): 596-600

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/596.asp>

0 引言

功能性消化不良(functional dyspepsia, FD)是

一种常见的临床疾病,占消化系疾病患者的20%-40%,一直是人们研究的热点。但目前FD发病机制尚未明确,可能涉及多种因素。近年来国内外研究表明,胃肠动力功能障碍是FD的主要发病机制,并且胃肠动力异常伴有胃肠激素变化与异常。Ghrelin是1999年Kojima等^[1]发现的由28个氨基酸组成的小分子多肽。其具有促进胃酸分泌、胃肠运动、促进摄食和调控能量代谢等功能。为明确胃动力药对FD的治疗效果,指导临床用药,本实验采用胃肠排空检测法和放射免疫法,结合临床观察探讨单用或联合应用伊托必利、多潘立酮和甲氧氯普胺对FD患者的胃肠运动和Ghrelin含量的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 按罗马Ⅱ标准诊断FD患者。选择以上腹胀、早饱、暖气、恶心和呕吐为主要表现,早饱和/或上腹胀的临床症状评分达2级或2级以上,年龄为18-60岁的动力障碍型FD患者为研究对象。实验前72 h停用抗胆碱药、解痉药、抑酸药及促动力药。入选FD患者120例,男66例,女54例。同期选择性别和年龄配对的健康志愿受试者10例(男6例,女4例)作为对照组。以上两组人群均征得本人同意,且符合以下条件: (1)排除妊娠或哺乳期妇女,伴有其他心、肝、肾、内分泌等疾病,或合并精神疾病; (2)排除不能表达主观不适症状,过敏体质,以及有腹部手术史者; (3)FD患者在入选时和药物治疗后分别记录上腹胀、早饱、暖气、恶心和呕吐等症状,并给以评分。症状评分标准按0-3级记录: 0级为无症状,记0分; 1级为有轻度感觉但不明显,记为1分; 2级为症状稍重,但不影响工作,记为2分; 3级为症状严重,难以坚持工作,记为3分

1.2 方法

1.2.1 分组及治疗: 将符合纳入标准的患者分为6组($n=20$),分别给予盐酸伊托必利50 mg, tid; 多潘立酮10 mg, tid; 甲氧氯普胺5 mg, tid; 盐酸伊托必利+多潘立酮(50 mg+10 mg), tid; 盐酸伊托必利+甲氧氯普胺(50 mg+5 mg), tid; 多潘立酮+甲氧氯普胺(10 mg+5 mg), tid。药物均在餐前30 min服用,疗程4 wk,并以10名健康志愿者作为对照组。

1.2.2 胃肠排空检测: 所有受试者均采用统一的标准试餐,包括50 g火腿肠和80 g油炸方便面,用500 mL白开水冲泡。要求受试者在10 min内吃完标准试餐。标准试餐的总能量为1 966 kJ,其中

■研究前沿

功能性消化不良是一常见的临床疾病,是当今研究的热点之一。其发病机制复杂,涉及多种因素,胃肠动力障碍和胃肠激素变化异常是发病的主要原因。

■相关报道

以往研究显示伊托必利、多潘立酮和甲氧氯普胺单独用药均有改善患者消化不良等临床症状。该症状的改善与消化不良患者胃肠激素分泌变化研究较少。

■创新盘点

以往研究主要焦点集中在单独选用一种药物疗效进行观察。本研究同时观察和比较了伊托必利、多潘立酮和甲氧氯普胺这三代药在症状改善、胃肠排空和血清Ghrelin水平改变,使医师对这些药物的临床应用有更加清楚的选择。

碳水化合物46%, 脂肪42%, 蛋白质12%。受试者空腹至少8 h以上。经期妇女应在月经周期的卵泡期(约为月经干净之后的2 wk内)进行检查,以减少激素对胃排空的影响。检查前至少3 d未使用可能影响胃排空功能的药物和其他措施(包括烟酒等)。受试者在进食标准试餐的10 min内分次均匀地口服下不透X光的钡条(长10 mm, 直径1 mm), 共计20根。注意应整吞服下钡条, 不可嚼碎。于餐后5 h, 72 h各透视并拍摄腹平片一张。5 h透视时同时口服20%稀钡溶液20 mL, 以确定胃内钡条排空情况。统计胃肠内不透X标记物残留数, 计算排空率。排空率 = (20-胃或肠内残留钡条数)/20 × 100%。检测用药前后胃排空率及肠排空率的大小, 并进行比较。

1.2.3 Ghrelin放射免疫测定: Ghrelin放射免疫分析试剂盒由北京科美东雅生物技术有限公司提供。灵敏度<50 ng/L, 批内差异<7.0%, 批间差异<15%。放免检测严格按说明书进行操作。即配制Ghrelin标准液, 1:8 000抗Ghrelin血清和¹²⁵I-Ghrelin液。各管加¹²⁵I-Ghrelin 100 μL, 抗Ghrelin血清100 μL。样品管加200 μL, 标准管加Ghrelin 100 μL, 最后以磷酸缓冲液补足总反应体积为500 μL; 4 °C冰箱内孵育24 h; 各管加1:3羊抗兔血清100 μL, 继续孵育24 h, 4 000 g离心20 min, 弃上清液, 测沉淀物的cpm, 根据同批测定管的Ghrelin竞争抑制曲线, 求取每升血清Ghrelin免疫反应阳性物的含量(ng/L)。

统计学处理 采用SPSS统计软件包处理。计量数据采用mean ± SD的形式, 两组间均数比较采用成组t检验, 缓解率的比较采用卡方检验, 多个样本均数间比较采用Newman-Keuls法。 $P < 0.05$ 定义为显著性差异, $P < 0.01$ 表示有极显著差异。

2 结果

2.1 治疗后临床症状积分变化比较 6组FD患者口服药物后各种症状均有减轻或缓解, 上腹痛、腹胀、早饱、嗝气、呕吐等临床症状较用药前均有统计学意义($P < 0.05-0.01$, 表1)。在症状缓解率, 联合用药组明显优于单独用药组($P < 0.01$); 单独用药组中伊托必利明显优于多潘立酮和甲氧氯普胺($P < 0.05$), 但多潘立酮与甲氧氯普胺组间无明显差异($P > 0.05$); 在联合用药组, 伊托必利+多潘立酮组和伊托必利+甲氧氯普胺组明显优于多潘立酮+甲氧氯普胺组($P < 0.05-0.01$), 而伊托必利+多潘立酮组与伊托

必利+甲氧氯普胺组无明显差异($P > 0.05$)。

2.2 促动力药对FD患者胃肠排空的影响 FD患者餐后钡条胃肠排空率明显低于健康正常对照组($P < 0.01$, 表2), 经伊托必利、多潘立酮或甲氧氯普胺单独或联合治疗后, 胃肠排空率明显改善, 且联合用药组优于单独用药组($P < 0.05-0.01$), 但胃排空率各单独用药组间和各联合用药组间无显著差异($P > 0.05$); 在肠排空率, 联合用药组中伊托必利+多潘立酮组和伊托必利+甲氧氯普胺组明显优于多潘立酮+甲氧氯普胺组($P < 0.01$), 而伊托必利+多潘立酮组与伊托必利+甲氧氯普胺组相比无明显差异($P > 0.05$); 单独用药组中伊托必利明显优于多潘立酮和甲氧氯普胺($P < 0.01$), 但多潘立酮与甲氧氯普胺组间无明显差异($P > 0.05$); 伊托必利单独用药优于多潘立酮+甲氧氯普胺联合用药($P < 0.05$)。伊托必利促肠排空作用明显优于多潘立酮和甲氧氯普胺。

2.3 促动力药对FD患者血清Ghrelin含量的影响 图1显示放射免疫研究结果。FD患者血清Ghrelin水平明显低于正常对照组($P < 0.01$), FD患者各组治疗后较治疗前Ghrelin含量显著增高($P < 0.05-0.01$); 联合用药各组则明显高于单独用药组($P < 0.05-0.01$)。

3 讨论

FD是以餐后上腹不适或疼痛、早饱、恶心、呕吐、嗝气等为主要表现的症候群。胃肠测压、胃排空、胃电图等研究表明, 空腹、餐后均存在着胃肠运动的异常及排空障碍, 空腹时胃窦、十二指肠运动减弱, 餐后胃窦、十二指肠动力低下, 胃固体、液体及混合餐排空延迟。

至今FD的病因及发病机制仍不清楚, 其症状的产生并非单一因素引起的疾病, 而是诸多因素经不同的机制所导致的一组症候群。目前认为FD发病机制^[2]可能其一是内脏感觉过敏。表现为近端胃对机械扩张的敏感性增加, 与患者餐后疼痛、打嗝及体质量下降有关。其二是30%-80% FD患者有消化运动异常。常见胃排空减慢, 近端胃容纳性舒张功能减弱, 胃窦移行性复合波(MMC)减少或缺如, 胃十二指肠协调运动减弱, 小肠MMC减少, 小肠消化间期无传导性暴发收缩活动增加等。其三是幽门螺杆菌感染。幽门螺杆菌是否为FD发病因素一直存在争议。其四是精神应激。应激可使中枢促皮质释放因子分泌增加, 引起胃排空减缓, 内脏感觉呈高敏状态。常规应用促动力药、黏膜保护剂、抑酸

表 1 FD患者药物治疗前后症状积分和缓解率比较

	疼痛	腹胀	早饱	反酸	暖气	恶心	呕吐	总分
伊托必利								
用药前	2.16 ± 0.61	2.05 ± 0.43	1.55 ± 0.36	0.96 ± 0.15	1.36 ± 0.37	0.32 ± 0.10	0.25 ± 0.08	8.65 ± 2.10
用药后	1.06 ± 0.23 ^b	0.93 ± 0.08 ^b	0.62 ± 0.12 ^b	0.38 ± 0.07 ^b	0.26 ± 0.07 ^b	0.25 ± 0.08 ^a	0.17 ± 0.05 ^b	3.61 ± 0.70
缓解率(%)	50.93	54.63	60.00	60.42	80.88	21.88	32.00	58.27 ^c
多潘立酮								
用药前	2.13 ± 0.69	2.21 ± 0.54	1.56 ± 0.51	1.06 ± 0.34	1.42 ± 0.39	0.22 ± 0.07	0.26 ± 0.08	8.86 ± 2.62
用药后	1.33 ± 0.43 ^b	1.37 ± 0.37 ^b	0.55 ± 0.17 ^b	0.97 ± 0.30	0.65 ± 0.17 ^b	0.16 ± 0.05 ^b	0.18 ± 0.05 ^b	5.21 ± 1.54
缓解率(%)	37.56	38.01	64.74	8.49	54.23	27.27	30.77	41.20
甲氧氯普胺								
用药前	2.17 ± 0.66	2.16 ± 0.57	1.65 ± 0.42	1.01 ± 0.33	1.38 ± 0.34	0.26 ± 0.08	0.24 ± 0.07	8.87 ± 2.47
用药后	1.26 ± 0.35 ^b	1.25 ± 0.32 ^b	0.74 ± 0.21 ^b	0.86 ± 0.27	0.77 ± 0.21 ^b	0.22 ± 0.07	0.16 ± 0.05 ^b	5.26 ± 1.48
缓解率(%)	41.94	42.13	55.15	14.85	44.20	15.38	33.33	40.70
伊托必利+多潘立酮								
用药前	2.16 ± 0.57	2.20 ± 0.49	1.64 ± 0.32	1.03 ± 0.27	1.39 ± 0.31	0.31 ± 0.08	0.25 ± 0.06	8.98 ± 2.10
用药后	0.17 ± 0.02 ^b	0.12 ± 0.03 ^b	0.15 ± 0.03 ^b	0.05 ± 0.01 ^b	0.08 ± 0.02 ^b	0.24 ± 0.07 ^b	0.15 ± 0.03 ^b	0.96 ± 0.21
缓解率(%)	92.13	94.55	90.85	95.15	94.24	22.58	40.00	89.31 ^f
伊托必利+甲氧氯普胺								
用药前	2.14 ± 0.67	2.16 ± 0.47	1.56 ± 0.28	0.98 ± 0.18	1.42 ± 0.32	0.32 ± 0.10	0.25 ± 0.07	8.83 ± 2.09
用药后	0.18 ± 0.05 ^b	0.12 ± 0.02 ^b	0.17 ± 0.03 ^b	0.07 ± 0.01 ^b	0.09 ± 0.02 ^b	0.25 ± 0.08 ^a	0.15 ± 0.03 ^b	1.03 ± 0.24
缓解率(%)	91.59	94.44	89.10	92.86	93.66	21.88	40.00	88.34 ^e
甲氧氯普胺+多潘立酮								
用药前	2.15 ± 0.56	2.17 ± 0.57	1.48 ± 0.21	1.01 ± 0.26	1.37 ± 0.31	0.33 ± 0.10	0.22 ± 0.07	8.73 ± 2.08
用药后	0.57 ± 0.14 ^b	0.48 ± 0.11 ^b	0.38 ± 0.07 ^b	0.25 ± 0.05 ^b	0.13 ± 0.02 ^b	0.25 ± 0.08 ^b	0.16 ± 0.05 ^b	2.22 ± 0.52
缓解率(%)	73.49	77.88	74.32	75.25	90.51	24.24	27.27	74.57

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 用药前; $\chi^2 = 0.02-6.48$, ^c $P < 0.05$ vs 单独用药各组间比较; $\chi^2 = 0.02-52.43$, ^e $P < 0.05$, ^f $P < 0.01$ vs 联合用药组及单独用药组各组间比较。

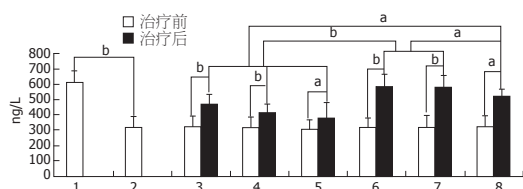


图 1 FD患者治疗前后血清Ghrelin含量改变(ng/L). 1: 对照组; 2: FD组; 3: 伊托必利组; 4: 多潘立酮组; 5: 甲氧氯普胺组; 6: 伊托必利+多潘立酮组; 7: 伊托必利+甲氧氯普胺组; 8: 多潘立酮+甲氧氯普胺组. ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$.

剂、抗幽门螺杆菌及中成药等治疗可使部分患者得到缓解. 但有不少患者经上述常规治疗后无明显疗效. 最近有文献报道, 胃动力障碍与脑-肠轴功能障碍有关, 特别是和多巴胺受体功能异常有着直接密切的联系. 本研究发现伊托必利、多潘立酮和甲氧氯普胺均可改善FD患者胃肠运动和消化不良症状, 且伊托必利促进胃肠运动和改善消化不良症状明显优于多潘立酮和甲氧氯普胺.

多巴胺受体分为D1和D2受体, 多巴胺可显

■应用要点

本研究通过对伊托必利、多潘立酮和甲氧氯普胺单独用药和联合用药比较, 可使临床医师对这些药物的临床应用做出更加准确的选择.

著抑制胃肠运动功能. 甲氧氯普胺可通过作用于D1和D2受体产生抗多巴胺的作用. 多潘立酮是一种合成的苯咪唑类衍生物, 为一种多巴胺受体拮抗剂, 通过拮抗胃肠道多巴胺受体, 特异性地作用于上消化道, 可显著增强胃蠕动, 促进胃排空, 增加胃窦收缩次数, 协调胃十二指肠运动, 恢复胃窦十二指肠协调性, 有效解除上消化系统动力障碍症状^[3,4]. 盐酸伊托必利为一种新型胃肠促动力药, 系甲基酰胺衍生物, 具有多巴胺D2受体阻断剂及乙酰胆碱酯酶抑制剂的双重作用, 通过刺激内源性乙酰胆碱释放并抑制乙酰胆碱水解, 可增加胃的内源性乙酰胆碱, 增强胃十二指肠的运动, 而解除消化系统动力障碍症状^[5].

虽然单独用药可减少多种药物的不良反应, 但长期单用一种药物, 机体对该药会产生耐受性^[6]且作用单一. 联合用药能增加疗效降低毒性, 例如中医传统用药, 自古至今擅长于配伍使用药物, 西医虽然不这样分, 但往往根据疾病的需要也常常使用多种药物配合治疗, 通过综合用

■同行评价

本文不仅比较了每种药物的单独作用,而且比较了他们的联合作用。因此,该研究结果对临床药物的联合应用具有一定参考意义。

表 2 FD患者药物治疗前后胃肠排空率比较 (%)

		胃排空率(5 h)	肠排空率(72 h)
对照组($n = 10$)	健康者	92.00 ± 9.28	94.00 ± 8.06
FD组($n = 120$)	治疗前	6.67 ± 2.12 ^b	56.38 ± 15.13 ^b
伊托必利组	治疗前	6.76 ± 2.17	56.33 ± 14.57
	治疗后	36.23 ± 11.68	78.23 ± 12.56
多潘立酮组	治疗前	6.58 ± 2.06	57.27 ± 15.21
	治疗后	32.16 ± 10.08	58.96 ± 12.20
甲氧氯普胺组	治疗前	6.64 ± 2.08	57.12 ± 18.33
	治疗后	32.24 ± 10.12	58.33 ± 12.57
伊托必利+	治疗前	6.72 ± 2.15	56.56 ± 14.37
多潘立酮组	治疗后	54.26 ± 18.57 ^e	89.27 ± 11.36 ^e
伊托必利+	治疗前	6.69 ± 2.17	57.28 ± 17.07
甲氧氯普胺组	治疗后	55.12 ± 18.22 ^e	88.67 ± 13.25 ^e
多潘立酮+	治疗前	6.54 ± 2.07	54.27 ± 16.92
甲氧氯普胺组	治疗后	47.17 ± 15.21 ^e	69.16 ± 19.26 ^{eg}

^b $P < 0.01$ vs 对照组; ^c $P < 0.05$ vs 伊托必利治疗后组; ^e $P < 0.05$ – 0.01 , $q = 0.02$ – 7.12 vs 单独用药治疗后组比较; ^g $P < 0.01$, $q = 0.18$ – 5.99 vs 联合用药治疗后组比较。

药发生综合治疗作用,有利于疾病的恢复。本研究发现联合应用伊托必利,多潘立酮组或甲氧氯普胺,患者消化不良临床症状的改善(如上腹痛、腹胀、早饱、暖气等)和胃肠排空率均显著优于其单独用药组。提示,联合用药更有利于临床消化不良患者功能恢复和改善。

胃肠激素是胃肠运动功能的重要调节因素。当今胃肠激素完全超出了单一的内分泌激素的范畴,而是一类具有多种来源的多种成分、多种作用方式和功能的激素。Ghrelin是一种具有生长激素释放活性的脑肠肽。随着研究的不断深入,发现他还与食欲调节、能量平衡和肥胖、心脏、胃肠功能及睡眠等有关^[7-11]。Masuda等研究发现,静脉注射Ghrelin能剂量依赖性地增强胃肠道活动,刺激胃酸分泌,此作用会被阿托品的前处理和双侧迷走神经切断术所消除^[12,13]。Ghrelin能促进大鼠胃的排空,减少大鼠手术后的胃梗阻^[14]。Sibilia等给小鼠脑室或腹膜注射Ghrelin,发现摄食后1 h、2 h胃食物残留量明显减少,提示胃排空率的增快^[15]。有文献报道,Ghrelin可促进糖尿病大鼠胃排空增快^[16],其作用机制可能通过促进乙酸胆碱释放所致。本研究发现,FD患者血清Ghrelin水平明显低于正常对照组;FD患者经治疗后,Ghrelin水平显著增高;本研究还发现,联合用药Ghrelin水平较单独用药显著增

高($P < 0.05$ – 0.01)。提示,这些促胃动力药物,可能通过Ghrelin水平改变,改善胃运动,但具体机制不清,尚有待于进一步研究。

4 参考文献

- Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 1999; 402: 656-660
- 侯晓华. 开展对功能性消化不良的病理生理研究. *中华消化杂志* 2003; 23: 69-70
- 上海多潘立酮多中心临床研究协作组. 多潘立酮片治疗功能性消化不良的临床研究. *中华消化杂志* 2003; 23: 220-222
- 郑丹, 夏冰, 施先艳, 宋敏, 吴杰, 王萍, 张姮. 多潘立酮联合复方消化酶治疗功能性消化不良84例. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 336-339
- 莫剑忠, 李定国, 姜晴寰, 蒋义斌, 王兴鹏, 龚自华, 曹芝君. 盐酸伊托必利治疗功能性消化不良的多中心临床研究. *中国新药杂志* 2003; 12: 467-469
- 罗文莹. 单独用药和联合用药浅谈. *右江民族医学院学报* 1984; 6: 55-56
- 王淑珍, 尚宏伟, 王兴翠, 李冰, 张斌, 丁惠国. 肝硬化患者Ghrelin、生长激素释放素的变化及其临床意义. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 3230-3233
- 李凌燕, 王青, 许琳. 原发性胆汁反流性胃炎胃黏膜ghrelin的表达. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 3993-3996
- Gasco V, Beccuti G, Marotta F, Benso A, Granata R, Broglio F, Ghigo E. Endocrine and Metabolic Actions of Ghrelin. *Endocr Dev* 2010; 17: 86-95
- Kitazawa T, Maeda Y, Kaiya H. Molecular cloning of growth hormone secretagogue-receptor and effect of quail ghrelin on gastrointestinal motility in Japanese quail. *Regul Pept* 2009; 158: 132-142
- Lee KJ, Cha DY, Cheon SJ, Yeo M, Cho SW. Plasma ghrelin levels and their relationship with gastric emptying in patients with dysmotility-like functional dyspepsia. *Digestion* 2009; 80: 58-63
- Masuda Y, Tanaka T, Inomata N, Ohnuma N, Tanaka S, Itoh Z, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K. Ghrelin stimulates gastric acid secretion and motility in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 276: 905-908
- Johnson AW, Canter R, Gallagher M, Holland PC. Assessing the role of the growth hormone secretagogue receptor in motivational learning and food intake. *Behav Neurosci* 2009; 123: 1058-1065
- Trudel L, Tomasetto C, Rio MC, Bouin M, Plourde V, Eberling P, Poitras P. Ghrelin/motilin-related peptide is a potent prokinetic to reverse gastric postoperative ileus in rat. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 282: G948-G952
- Sibilia V, Rindi G, Pagani F, Rapetti D, Locatelli V, Torsello A, Campanini N, Deghenghi R, Netti C. Ghrelin protects against ethanol-induced gastric ulcers in rats: studies on the mechanisms of action. *Endocrinology* 2003; 144: 353-359
- Qiu WC, Wang ZG, Wang WG, Yan J, Zheng Q. Therapeutic effects of ghrelin and growth hormone releasing peptide 6 on gastroparesis in streptozotocin-induced diabetic guinea pigs in vivo and in vitro. *Chin Med J (Engl)* 2008; 121: 1183-1188

编辑 李军亮 电编 何基才

慢性HBV感染者外周血V α 24 NKT细胞数量变化及其与肝脏损害程度的关系

黄晓刚, 苏毅, 林世德, 龙骏, 陈应华, 刘士荣

黄晓刚, 苏毅, 林世德, 龙骏, 陈应华, 刘士荣, 遵义医学院第一附属医院感染科 贵州省遵义市 563003

贵州省优秀教育科技人才省长基金资助项目, No. 黔省专合字2009[50]

作者贡献分布: 采集资料和起草文章由黄晓刚完成; 苏毅指导和设计实验; 设计实验审阅文章由林世德完成; 龙骏参与实验和分析数据。

通讯作者: 苏毅, 教授, 563003, 贵州省遵义市, 遵义医学院第一附属医院感染科. suyizmc@yahoo.com.cn

电话: 0852-8608144

收稿日期: 2009-12-09 修回日期: 2009-12-31

接受日期: 2010-01-04 在线出版日期: 2010-02-28

Correlation of peripheral blood V α 24 NK T cell count with the severity of hepatic injury in patients with chronic hepatitis B virus infection

Xiao-Gang Huang, Yi Su, Shi-De Lin, Jun Long, Ying-Hua Chen, Shi-Rong Liu

Xiao-Gang Huang, Yi Su, Shi-De Lin, Jun Long, Ying-Hua Chen, Shi-Rong Liu, Department of Infectious Diseases, the First Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi 563003, Guizhou Province, China

Supported by: the Special Fund of the Governor of Guizhou Province for Excellent Scientific, Technological and Educational Talents, Qian Sheng Zhuan He Zi No. 2009[50]

Correspondence to: Professor Yi Su, Department of Infectious Diseases, the First Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi 563003, Guizhou Province, China. suyizmc@yahoo.com.cn

Received: 2009-12-09 Revised: 2009-12-31

Accepted: 2010-01-04 Published online: 2010-02-28

Abstract

AIM: To investigate the changes in the number of V α 24 natural killer (NK) T cells in peripheral blood and its possible correlation with the severity of hepatic injury in patients with chronic hepatitis B virus (HBV) infection.

METHODS: Twenty-six patients with chronic hepatitis B (CHB), 9 patients with liver cirrhosis (LC), 8 patients with acute-on-chronic liver failure (ACLF), and 7 normal controls (NCs) were included in the study. The percentage of V α 24 NK T cells in total peripheral blood T lymphocytes was determined by flow cytometry.

RESULTS: The percentages of V α 24 NK T cells in patients with CHB and ACLF were significantly lower than that in NCs ($0.8012\% \pm 0.2979\%$ and $0.4638\% \pm 0.2244\%$ vs $1.1114\% \pm 0.3546\%$, respectively, both $P < 0.05$). The percentage of V α 24 NK T cells had a significant positive correlation with prothrombin time (PT) and a significant negative correlation with total bilirubin (TB), but had no significant correlations with serum alanine aminotransferase (ALT) and HBV DNA level.

CONCLUSION: The percentage of V α 24 NK T cells in peripheral blood decreases with the aggravation of hepatic injury in patients with chronic HBV infection, implying that V α 24 NK T cells play an important role in the pathogenesis of chronic hepatitis B.

Key Words: V alpha 24 natural killer T cell; Hepatitis B; Flow cytometry

Huang XG, Su Y, Lin SD, Long J, Chen YH, Liu SR. Correlation of peripheral blood V α 24 NK T cell count with the severity of hepatic injury in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(6): 601-605

摘要

目的: 探讨慢性HBV感染者外周血V α 24自然杀伤T细胞(NKT)数量变化及其与肝脏损伤程度的关系。

方法: 观察对象为慢性乙型肝炎(CHB)患者26例、乙型肝炎后肝硬化患者(LC)9例、慢加急性肝衰竭患者(ACLF)8例和7名正常对照组(NC), 入院后次日清晨取静脉全血2 mL, 裂解红细胞后, 采用流式细胞仪检测外周血V α 24 NKT细胞数量占外周血T淋巴细胞的比例, 同时检测肝功能、凝血功能判断肝脏损害程度。

结果: CHB, ACLF组患者外周血V α 24 NKT细胞数量分别为 $0.8012\% \pm 0.2979\%$ 、 $0.4638\% \pm 0.2244\%$, 明显低于正常对照组($1.1114\% \pm 0.3546\%$, $P < 0.05$); CHB中度及重度患者NKT

■背景资料

最近在动物模型中的研究提示NK细胞或NKT细胞参与多种病因引起的肝细胞损伤, 但对NK细胞或NKT细胞在慢性乙型肝炎病毒(HBV)感染者肝细胞损伤机制中的作用尚不清楚。

■同行评议者

姚希贤, 教授, 河北医科大学附属第二医院消化内科

■研究前沿

自然杀伤T(NKT)细胞是近年来新发现的一种新型免疫细胞。近年来的研究认为NKT细胞在机体免疫自稳、抗感染和抗肿瘤免疫等方面具有重要的作用。NKT细胞活化后能迅速产生高水平的IFN- γ , 且其细胞毒活性亦增强, 因此NKT细胞具有抗病毒的潜能。目前国内外尚无人体NKT细胞抗HBV的体内研究。

数($0.7344\% \pm 0.2441\%$, $0.6925\% \pm 0.3612\%$)明显低于正常对照组。NKT数与凝血酶原活动度(PTA)呈显著正相关, 与血清总胆红素(TB)呈显著负相关。

结论: 慢性HBV感染者外周血V α 24 NKT细胞数明显降低, 并随肝损害程度加重而减少, 提示V α 24 NKT细胞可能参与CHB患者肝细胞损伤。

关键词: V α 24自然杀伤T细胞; 乙型肝炎; 流式细胞术

黄晓刚, 苏毅, 林世德, 龙骏, 陈应华, 刘士荣. 慢性HBV感染者外周血V α 24 NKT细胞数量变化及其与肝脏损害程度的关系. 世界华人消化杂志 2010; 18(6): 601-605

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/601.asp>

0 引言

自然杀伤T细胞(natural killer T cells, NKT)是一个具有自然杀伤细胞(NK)受体及功能的T细胞亚群, 人类NKT细胞表面特异性的标记是TCRV α 24片段, 通常和V β 11片段结合^[1,2]。NKT活化时主要识别抗原提呈细胞表面分化抗原CD1d分子提呈的糖脂类抗原^[3], 并在活化后释放高水平性的 γ -干扰素(IFN- γ)和白介素(IL-4)等^[4], 对于免疫应答的方向起着重要调节作用。并且NKT在肝脏优势聚集, 占肝脏T淋巴细胞数的20%-30%^[5,6]。这种倾向性的分布说明NKT细胞在肝脏的局部免疫中有着重要地位。多数学者认为, NKT细胞以CD3⁺CD56⁺作为表面标志^[7], 但近年来研究认为CD3⁺CD56⁺细胞为细胞因子诱导的杀伤细胞(cytokine-induced killer cell, CIK细胞)主要的效应细胞, CIK细胞表面也同时表达T细胞和NK细胞的表面标志, 是一类NKT样细胞群^[8], 国内有些研究将NKT细胞完全等同于CD3⁺CD56⁺CIK细胞^[9,10]。最新文献证实, NKT细胞表面特异性标志是TCRV α 24^[11]。因此, 本试验选择抗-TCRV α 24单克隆抗体作为特异性标志物进行检测。最近在动物模型中的研究提示NK细胞或NKT细胞参与多种病因引起的肝细胞损伤, 但对NK细胞或NKT细胞在慢性HBV感染者肝细胞损伤机制中的作用尚不清楚。NKT细胞为固有免疫细胞, 对不同HBV感染患者的外周血V α 24 NKT细胞数量变化未见报道。本试验通过流式细胞术检测乙型肝炎患者外周血中的NKT细胞数, 并探讨其与肝脏损伤程度的关系, 初步探索NKT细胞在乙型肝炎患者发病机制中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料 2009-04/2009-08贵州省遵义医学院第一附属医院住院的慢性HBV感染患者43例及门诊体检者7例, 慢性HBV感染者及肝损伤分度参照2000年《病毒性肝炎防治方案》^[12]的诊断标准。各组分别为门诊健康体检者7例, 女2例, 男5例, 年龄22-38岁。HBV感染患者43例, 女16例, 男27例, 年龄11-70岁, 血清学抗HCV、HDV、HGV、HIV阴性; 并除外自身免疫性及酒精性肝病和肝占位性病变。

1.2 方法

1.2.1 标本采集: 健康对照组标本为门诊体检肝功能正常的早晨空腹外周静脉血, 慢性乙型肝炎病毒感染者均为入院后次日清晨取1 mL静脉全血肝素钠抗凝。

1.2.2 一般治疗: 所有患者住院前未接受正规治疗, 入院后予保肝降酶等对症治疗, 慢性乙型肝炎、乙型肝炎后肝硬化和慢加急性肝衰竭据病情予干扰素或核苷类似药物抗病毒治疗, 均未用糖皮质激素等特殊治疗。

1.2.3 流式细胞仪检测: 取肝素钠抗凝全血100 μ L, 加入荧光标志的单克隆抗体CD3-FITC 10 μ L、TCRV α 24-PE 20 μ L, 混匀, 4 $^{\circ}$ C避光孵育30 min, 加入2 mL红细胞裂解液, 迅速于混旋器上混匀, 室温放置8 min, 弃上清液, 加PBS 2 mL洗涤, 离心, 转速为1 000 r/min, 5 min, 弃上清液, 加220 μ L固定液混匀后, 立即上流式细胞仪检测。用美国BD公司FACSCalibur流式细胞仪, 启动FACSCom软件, 使仪器处于最佳工作状态。采用Cellquest软件检测及分析。测定时各荧光通道均以相应同型(isotype)IgG染色细胞作阴性对照。

统计学处理 研究数据按成组统计要求收集、整理, 用SPSS13.0软件进行数据统计分析。数值用mean \pm SD表示, 组间比较采用成组设计的t检验, 并进行直线相关分析。

2 结果

2.1 一般资料 各组间男女比例和年龄差别统计学无意义。血常规的白细胞(WBC)和血小板计数(PLT)在各组间统计学无意义。肝功、凝血功能和甲胎蛋白(AFP)统计学结果见表1。

2.2 各组HBV感染患者NKT细胞数 各组患者外周血NKT细胞数检测结果: CHB组($0.8012\% \pm 0.2979\%$)及ACLF组($0.4638\% \pm 0.2244\%$)患者外周血NKT细胞数明显低于正常对照组($1.1114\% \pm 0.3546\%$, $P < 0.05$), LC组($0.9856\% \pm 0.3926\%$)

表 1 各组患者入院时肝功、总胆红素、胆碱酯酶、凝血功能和AFP (mean ± SD)

项目	NC	CHB	LC	ACLF
ALT	23.4 ± 4.2	593.0 ± 507.1 ^a	175.6 ± 204.6	272.2 ± 428.7
TB	9.67 ± 2.32	88.4 ± 126.5 ^a	41.7 ± 45.3	334.2 ± 208.3 ^{ab}
CHE	—	5.9 ± 2.90	13.2 ± 30.0	2.06 ± 1.22 ^c
PTA	—	91.2 ± 14.3	66.3 ± 19.4 ^c	33.0 ± 5.5 ^{bc}
AFP	—	30.9 ± 73.5	88.7 ± 122.3	101.0 ± 106.2

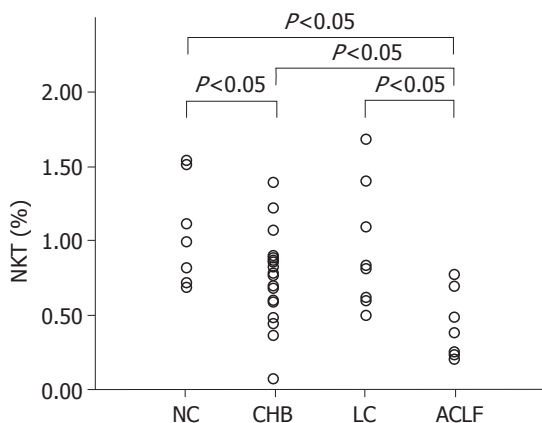
^a*P* < 0.05 vs NC; ^b*P* < 0.05 vs CHB; ^c*P* < 0.05 vs LC.

图 1 各组HBV感染患者外周血NKT细胞.

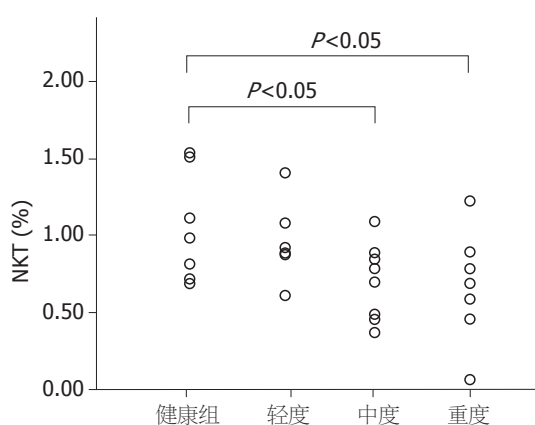


图 2 慢性乙型肝炎轻、中、重度患者外周血NKT细胞数.

与NC组(1.1114% ± 0.3546%)比较无显著差异. 从图1可以看出, ACLF患者组降低最为明显, 最高值为0.83%、最低值为0.26%. 而肝硬化患者外周血NKT细胞差异较大, 虽然多数患者在1.0%以下, 少数患者与正常对照组比较无明显降低.

2.3 慢性乙型肝炎轻、中、重度患者外周血NKT细胞数的变化 从图2可以看出慢性乙型肝炎患者随肝损害程度加重, NKT细胞明显降低. 慢性乙型肝炎轻度患者NKT细胞与正常对照比较无显著差异, 而中度及重度患者NKT细胞数显著低于正常对照组.

2.4 各组HBV感染者NKT细胞百分比与生化指标的相关性 NKT细胞数与凝血酶原活动度(PTA)呈显著正相关($r = 0.336$, $P < 0.05$), 与总胆红素(TB)呈显著负相关($r = -0.297$, $P < 0.05$). 和ALT、CHE、AFP、WBC及HBV DNA无明显相关性.

3 讨论

NKT细胞是一类特殊的T淋巴细胞, 他可识别非典型MHC- I 样的CD1d分子表面糖脂类抗原^[13,14]. NKT细胞强大的免疫调节功能及其自身

具有的细胞毒性, 并且可在肝脏内倾向性地大量聚集, 而肝细胞本身也表达NKT细胞的配体CD1d, 从而具有激活NKT细胞的能力, 提示着NKT细胞可能在肝脏局部免疫中起着重要作用.

NKT细胞有两种功能, 一方面他有较弱的抗病毒, 抗肿瘤的作用, 可通过Fas-FasL途径和分泌穿孔素等直接介导细胞毒作用. 更为重要的是其双向的免疫调节功能, 使机体TH1与TH2处于相对平衡的状态. 当HBV诱导肝脏免疫紊乱引起T细胞免疫耐受打破, 细胞毒性T细胞(CTL)可导致肝细胞的免疫性损伤. 因此, 外周血NKT细胞可发挥其弱的抗病毒的作用, 但由于NKT细胞数量及功能的低下, 其调节免疫的功能减弱, 促使调节TH0向TH2转化的能力下降, 肝脏炎症仍可进一步的加重.

激活后的NKT细胞产生大量的细胞因子, 在肝脏受损、纤维化和损伤修复过程中发挥抗病毒、预防肿瘤及免疫调节方面等重要的作用. NKT细胞在自身免疫性肝炎的作用已被证明^[15,16]. 故而, NKT细胞在天然免疫和特异性免疫之间起着重要的桥梁作用.

在CCl₄处置引起的慢性肝损伤模型中, 其NKT细胞枯竭与敲除Ja18基因野生型小鼠所产

■ 相关报道

Guidotti等研究发现急性感染HBV的黑猩猩体内确实存在发挥非细胞毒性作用的HBV DNA清除机制. 而且这种效应细胞分泌表达的IFN-γ细胞因子可能是由NKT或NKT活化的NK细胞产生.

■应用要点

本研究通过探讨HBV感染者外周血V α 24 NKT细胞与肝脏损害程度的相关性,以期阐明V α 24 NKT细胞在CHB免疫损伤机制中的作用及途径,为下一步开展以IFN- γ 及诱导NKT细胞为基础的免疫治疗慢性乙型肝炎提供理论依据,寻找出一种乙型肝炎的治疗新途径。

生的肝脏炎症和损伤是一致的^[17]。这表明在慢性的肝脏炎症与损伤中NKT细胞可能发挥有限的作用,可能是由于肝NKT细胞耗竭。最新的证据提示在许多的鼠类模型中,激活的NK/NKT细胞也促成了肝损伤的发展及进程^[18,19]。也从反面证实NKT在肝脏炎症损伤中所起的作用。另外, CXCR6及CXCL16在诱导肝脏NKT细胞募集中的重要作用也提供了明确的证据^[6,20]。

基于上述事实,我们的实验主要是通过探寻NKT细胞在不同肝炎组中其外周血的分布变化的规律,从而间接阐明NKT细胞在乙型肝炎发病机制中所起的作用。我们的实验结果显示,正常健康人组与HBV感染者组中(慢性中、重度组、肝衰竭组)外周血NKT细胞的数量分布有明显的统计学差异,随肝损害程度加重NKT细胞降低明显,并与PTA呈正相关,与TB呈负相关,提示NKT细胞数与乙型肝炎患者肝细胞损伤程度有关。另外,我们发现正常健康人组与肝硬化无明显的统计学差异,其原因可能与肝硬化化患者主要以肝脏的纤维化为主,而其肝脏炎症损伤不明显,提示慢性HBV感染者外周血NKT细胞数主要与肝脏炎症损害程度相关,与肝脏纤维化程度无明显相关。

乙型肝炎患者外周血NKT细胞降低的原因尚不清楚,可能与肝脏募集外周循环血液中的淋巴细胞有关,因为肝窦内皮细胞有孔窗并且缺乏基底膜,这种独特的解剖使得肝脏更有利于直接或间接引发的淋巴细胞富集^[21],调节免疫反应,以清除病原体感染的肝细胞;也可能是由于HBV直接作用于NKT细胞,使之发生损伤或凋亡而减少。因为既往的研究提示HBV既可感染肝细胞,又可以感染外周血单个核细胞^[22]。

慢性HBV感染者NKT细胞的总体水平均降低的意义尚不清楚。我们曾检测2例急性自限性乙型肝炎外周血NKT细胞含量(结果未报告),发现明显高于健康对照组和慢性感染组(分别为: 2.31%, 2.56%),考虑可能是急性HBV初次感染,激活了NKT细胞的活性,发挥抗HBV的作用。提示慢性肝炎患者外周血NKT细胞降低可能和HBV感染后病情的慢性化有关,NKT细胞在HBV感染慢性化中的作用还值得今后进一步探讨。

尽管肝脏NK/NKT细胞的作用在动物模型中已被广泛的研究,但他们在肝脏疾病中发挥的作用目前仍不清楚。进一步阐述肝脏NK/NKT细胞在肝脏疾病中的作用,可能对今后开展乙型肝炎的免疫治疗开创新的思路。考虑分离出

乙型肝炎患者体内的NKT细胞,在体外培养扩增,回输到患者体内;或者应用某种药物,例如NKT细胞的刺激物 α -GalCer,在乙型肝炎患者体内直接刺激NKT细胞使其活化、增殖以提高抗HBV的能力。因此,关于NKT细胞的作用机制及其在临床的应用价值仍有待进一步探讨。

4 参考文献

- 1 Dellabona P, Padovan E, Casorati G, Brockhaus M, Lanzavecchia A. An invariant V alpha 24-J alpha Q/V beta 11 T cell receptor is expressed in all individuals by clonally expanded CD4-8- T cells. *J Exp Med* 1994; 180: 1171-1176
- 2 Porcelli S, Gerdes D, Fertig AM, Balk SP. Human T cells expressing an invariant V alpha 24-J alpha Q TCR alpha are CD4- and heterogeneous with respect to TCR beta expression. *Hum Immunol* 1996; 48: 63-67
- 3 Nieda M, Nicol A, Koezuka Y, Kikuchi A, Takahashi T, Nakamura H, Furukawa H, Yabe T, Ishikawa Y, Tadokoro K, Juji T. Activation of human Valpha24NKT cells by alpha-glycosylceramide in a CD1d-restricted and Valpha24TCR-mediated manner. *Hum Immunol* 1999; 60: 10-19
- 4 Zhai WH, Huang Y, Wang M, Zhou Z, Zhai WJ, Zhang RL, Zhang P, Han MZ. [Expansion and cytokine secretion profile of human valpha24(+) NKT cells from different sources] *Zhongguo Shiyang Xueyexue Zazhi* 2009; 17: 633-636
- 5 Matsuda JL, Naidenko OV, Gapin L, Nakayama T, Taniguchi M, Wang CR, Koezuka Y, Kronenberg M. Tracking the response of natural killer T cells to a glycolipid antigen using CD1d tetramers. *J Exp Med* 2000; 192: 741-754
- 6 Geissmann F, Cameron TO, Sidobre S, Manlongat N, Kronenberg M, Briskin MJ, Dustin ML, Littman DR. Intravascular immune surveillance by CXCR6+ NKT cells patrolling liver sinusoids. *PLoS Biol* 2005; 3: e113
- 7 Schmidt-Wolf IG, Negrin RS, Kiem HP, Blume KG, Weissman IL. Use of a SCID mouse/human lymphoma model to evaluate cytokine-induced killer cells with potent antitumor cell activity. *J Exp Med* 1991; 174: 139-149
- 8 Alvarnas JC, Linn YC, Hope EG, Negrin RS. Expansion of cytotoxic CD3+ CD56+ cells from peripheral blood progenitor cells of patients undergoing autologous hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2001; 7: 216-222
- 9 冯伟华, 蔡蓓, 王兰兰, 陈捷. CD3+CD56+NKT细胞及CD3-CD56+NK细胞在恶性肿瘤患者的临床意义研究. *中国肺癌杂志* 2007; 10: 429-432
- 10 邱大鹏, 邱双健, 吴志全, 樊嘉, 叶胜龙, 余耀, 周俭, 蔡晓燕. NKT细胞在肝癌组织中的分布状况与肝癌局部免疫的研究. *中国临床医学* 2004; 11: 567-569
- 11 Prussin C, Foster B. TCR V alpha 24 and V beta 11 coexpression defines a human NK1 T cell analog containing a unique Th0 subpopulation. *J Immunol* 1997; 159: 5862-5870
- 12 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学会. 病毒性肝炎防治方案. *中华传染病杂志* 2001; 19: 56-62
- 13 Kronenberg M. Toward an understanding of NKT cell biology: progress and paradoxes. *Annu Rev*

- Immunol* 2005; 23: 877-900
- 14 Bendelac A, Savage PB, Teyton L. The biology of NKT cells. *Annu Rev Immunol* 2007; 25: 297-336
 - 15 Dennert G, Aswad F. The role of NKT cells in animal models of autoimmune hepatitis. *Crit Rev Immunol* 2006; 26: 453-473
 - 16 Mattner J, Savage PB, Leung P, Oertelt SS, Wang V, Trivedi O, Scanlon ST, Pendem K, Teyton L, Hart J, Ridgway WM, Wicker LS, Gershwin ME, Bendelac A. Liver autoimmunity triggered by microbial activation of natural killer T cells. *Cell Host Microbe* 2008; 3: 304-315
 - 17 Park O, Jeong WI, Wang L, Wang H, Lian ZX, Gershwin ME, Gao B. Diverse roles of invariant natural killer T cells in liver injury and fibrosis induced by carbon tetrachloride. *Hepatology* 2009; 49: 1683-1694
 - 18 Notas G, Kisseleva T, Brenner D. NK and NKT cells in liver injury and fibrosis. *Clin Immunol* 2009; 130: 16-26
 - 19 Dong Z, Wei H, Sun R, Tian Z. The roles of innate immune cells in liver injury and regeneration. *Cell Mol Immunol* 2007; 4: 241-252
 - 20 Germanov E, Veinotte L, Cullen R, Chamberlain E, Butcher EC, Johnston B. Critical role for the chemokine receptor CXCR6 in homeostasis and activation of CD1d-restricted NKT cells. *J Immunol* 2008; 181: 81-91
 - 21 Racanelli V, Rehmann B. The liver as an immunological organ. *Hepatology* 2006; 43: S54-S62
 - 22 Cabrerizo M, Bartolomé J, Carreño V. In vitro infection of human peripheral blood mononuclear cells by a defective hepatitis B virus with a deletion in the PreS1 region of the viral genome. *J Viral Hepat* 2002; 9: 265-271

■同行评价

本研究内容新颖, 分析论证合乎逻辑, 具有较好的学术价值。

编辑 李军亮 电编 何基才

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》计量单位标准

本刊讯 本刊计量单位采用国际单位制并遵照有关国家标准, GB3100-3102-93量和单位. 原来的“分子量”应改为物质的相对分子质量. 如30 kDa改为 M_r 30 000或30 kDa(M 大写斜体, r 小写正体, 下角标); “原子量”应改为相对原子质量, 即 A_r (A 大写斜体, r 小写正体, 下角标); 也可采用原子质量, 其单位是 u (小写正体). 计量单位在+、-及-后列出. 在±前后均要列出, 如 $37.6\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1.2\text{ }^{\circ}\text{C}$, $45.6\text{岁} \pm 24\text{岁}$, $56.4\text{ d} \pm 0.5\text{ d}$. $3.56 \pm 0.27\text{ pg/ml}$ 应为 $3.56\text{ ng/L} \pm 0.27\text{ ng/L}$. BP用kPa(mmHg), RBC数用 $\times 10^{12}/\text{L}$, WBC数用 $\times 10^9/\text{L}$, WBC构成比用0.00表示, Hb用g/L. M_r 明确的体内物质以mmol/L, nmol/L或mmol/L表示, 不明确者用g/L表示. 1 M硫酸, 改为1 mol/L硫酸, 1 N硫酸, 改为0.5 mol/L硫酸. 长10 cm, 宽6 cm, 高4 cm, 应写成 $10\text{ cm} \times 6\text{ cm} \times 4\text{ cm}$. 生化指标一律采用法定计量单位表示, 例如, 血液中的总蛋白、清蛋白、球蛋白、脂蛋白、血红蛋白、总脂用g/L, 免疫球蛋白用mg/L; 葡萄糖、钾、尿素、尿素氮、 CO_2 结合力、乳酸、磷酸、胆固醇、胆固醇酯、三酰甘油、钠、钙、镁、非蛋白氮、氯化物; 胆红素、蛋白结合碘、肌酸、肌酐、铁、铅、抗坏血酸、尿胆元、氨、维生素A、维生素E、维生素B₁、维生素B₂、维生素B₆、尿酸; 氢化可的松(皮质醇)、肾上腺素、汞、孕酮、甲状腺素、睾酮、叶酸用nmol/L; 胰岛素、雌二醇、促肾上腺皮质激素、维生素B₁₂用pmol/L. 年龄的单位有日龄、周龄、月龄和岁. 例如, 1秒, 1 s; 2分钟, 2 min; 3小时, 3 h; 4天, 4 d; 5周, 5 wk; 6月, 6 mo; 雌性♀, 雄性♂, 酶活性国际单位IU = 16.67 nkat, 对数log, 紫外uv, 百分比%, 升L, 尽量把 $1 \times 10^{-3}\text{ g}$ 与 $5 \times 10^{-7}\text{ g}$ 之类改成1 mg与0.5 μg, hr改成h, 重量γ改成mg, 长度m改成mm. 国际代号不用于无数值的文句中, 例如每天不写每d, 但每天8 mg可写8 mg/d. 在一个组合单位符号内不得有1条以上的斜线, 例如不能写成mg/kg/d, 而应写成mg/(kg•d), 且在整篇文章内应统一. 单位符号没有单、复数的区分, 例如, 2 min不是2 mins, 3 h不是3 hs, 4 d不是4 ds, 8 mg不是8 mgs. 半个月, 15 d; 15克, 15 g; 10%福尔马林, 40 g/L甲醛; 95%酒精, 950 mL/L酒精; 5% CO_2 , 50 mL/L CO_2 ; 1 : 1 000肾上腺素, 1 g/L肾上腺素; 胃黏膜含促胃液素36.8 pg/mg, 改为胃黏膜蛋白含促胃液素36.8 ng/g; 10%葡萄糖改为560 mmol/L或100 g/L葡萄糖; $45\text{ ppm} = 45 \times 10^{-6}$; 离心的旋转频率(原称转速)用r/min, 超速者用g; 药物剂量若按体质量计算, 一律以“/kg”表示.

错配修复基因hMSH2启动子甲基化与胃癌的关系

毛庆东, 刘希双, 杨堃

■背景资料

细胞错配修复功能缺陷, 不能及时修复DNA复制时的错误, 会导致肿瘤相关基因基因组DNA突变的累积, 最终可导致肿瘤发生。DNA错配修复基因系统中任何一种基因突变, 都会引起错配修复功能缺陷, 产生遗传不稳定性, 导致肿瘤易感。近来研究发现, 错配修复基因表达缺陷的原因不仅有基因突变, 基因启动子区的高甲基化也是其主要原因之一。

毛庆东, 刘希双, 青岛大学医学院附属医院内镜诊治科 山东省青岛市 266003

杨堃, 青岛大学医学院附属医院临床医学研究所 山东省青岛市 266003

作者贡献分布: 毛庆东、刘希双及杨堃对此文所作贡献均等; 此课题由毛庆东、刘希双及杨堃设计; 研究过程由毛庆东操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由刘希双提供; 数据分析由毛庆东与刘希双完成; 本论文写作由毛庆东、刘希双及杨堃完成。

通讯作者: 刘希双, 主任医师, 266003, 山东省青岛市江苏路16号, 青岛大学医学院附属医院内镜诊治科. liuxishuang1@sina.com

电话: 0532-82911525

收稿日期: 2009-10-19 修回日期: 2009-12-30

接受日期: 2010-01-11 在线出版日期: 2010-02-28

Relationship between mismatch repair gene hMSH2 promoter methylation and gastric carcinoma

Qing-Dong Mao, Xi-Shuang Liu, Kun Yang

Qing-Dong Mao, Xi-Shuang Liu, Department of Endoscopic Diagnostics and Therapeutics, the Affiliated Hospital of Medical College Qingdao University, Qingdao 266003, Shandong Province, China

Kun Yang, Institute of Clinical Medicine, the Affiliated Hospital of Medical College Qingdao University, Qingdao 266003, Shandong Province, China

Correspondence to: Xi-Shuang Liu, Department of Endoscopic Diagnostics and Therapeutics, the Affiliated Hospital of Medical College Qingdao University, 16 Jiangsu Road, Qingdao 266003, Shandong Province, China. liuxishuang1@sina.com

Received: 2009-10-19 Revised: 2009-12-30

Accepted: 2010-01-11 Published online: 2010-02-28

Abstract

AIM: To detect the role of methylation of the 5' CpG island located in the promoter region of the human mutS homolog-2 (hMSH2) gene in the pathogenesis of gastric carcinoma.

METHODS: The methylation of the hMSH2 promoter was examined by methylation-specific polymerase chain reaction (MSP) in 40 gastric carcinoma specimens, 40 matched cancer-adjacent mucosa specimens, 14 chronic atrophic gastritis (CAG) specimens, and 6 chronic superficial gastritis (CSG) specimens.

RESULTS: The methylation of the hMSH2 promoter was detected in 24 out of the 40 (60%)

gastric cancer specimens, 15 out of the 40 (37.5%) cancer-adjacent mucosa specimens, and 5 out of the 14 (35.7%) CAG specimens. No methylation was detected in 6 CSG specimens. The rate of hMSH2 promoter methylation was significantly higher in gastric cancer tissue than in non-carcinoma tissue ($P < 0.05$). No significant differences were detected in the rates of hMSH2 promoter methylation among cancer-adjacent mucosa specimens, CAG specimens and CSG specimens. The rate of hMSH2 promoter methylation is not correlated with the clinicopathological parameters of gastric cancer.

CONCLUSION: The hMSH2 promoter methylation may be a main mechanism responsible for mismatch repair (MMR) dysfunction that is involved in the development, but not the progression, of gastric cancer.

Key Words: Gastric carcinoma; Mismatch repair gene; Methylation; hMSH2

Mao QD, Liu XS, Yang K. Relationship between mismatch repair gene hMSH2 promoter methylation and gastric carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(6): 606-609

摘要

目的: 探讨hMSH2基因启动子区5'CpG岛高甲基化在胃癌发生过程中的作用。

方法: 应用甲基化特异性PCR(methylation specific PCR, MSP)方法检测胃癌及非癌组织中hMSH2基因启动子区甲基化状态。

结果: 40例胃癌中hMSH2基因启动子区高甲基化24例(60%), 其癌旁黏膜组织中有15例(37.5%)发生甲基化, 14例慢性萎缩性胃炎组织中有5例(35.7%)发生甲基化, 6例慢性浅表性胃炎组织中未见甲基化。四组甲基化水平相比, 差别有统计意义($P < 0.05$)。胃癌组甲基化水平高于癌旁组, 差别有统计意义($P < 0.05$)。癌旁组、慢性萎缩性胃炎组、慢性浅表性胃炎组三组甲基化水平相比, 差别无统计意义。胃癌各临床病理参数组之间相比差别无统计意义。

■同行评议者

陈卫昌, 教授, 苏州大学附属第一医院消化内科; 孙学英, 教授, 哈尔滨医科大学第一附属医院黑龙江省肝胆外科中心

结论: 胃癌组织中hMSH2基因启动子区高甲基化可能是导致其错配修复功能缺陷的重要原因之一; 而错配修复功能缺陷在胃癌的发生中起着重要作用, 但可能与其发展关系不大。

关键词: 胃癌; 错配修复基因; 甲基化; hMSH2

毛庆东, 刘希双, 杨堃. 错配修复基因hMSH2启动子甲基化与胃癌的关系. 世界华人消化杂志 2010; 18(6): 606-609
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/606.asp>

0 引言

胃癌是消化系最常见的恶性肿瘤, 其发生是一个多步骤, 多因素参与进行性发展的过程. 作为多基因相关性肿瘤, 目前认为多种基因在不同阶段参与了胃癌的发生, 已有研究发现, 肿瘤抑制基因启动子区甲基化与肿瘤的发生密切相关^[1,2]. 本研究采用甲基化特异性PCR(methylation specific PCR, MSP)方法, 检测40例胃癌组织及其癌旁黏膜组织和20例慢性胃炎组织中hMSH2基因启动子区的甲基化状态, 探讨hMSH2基因启动子区高甲基化与胃癌发生的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 2008-01/2008-08自青岛大学医学院附属医院普外科手术切除的胃癌组织40例, 男29例, 女11例, 年龄31-81(中位年龄57)岁, 男女比2.6:1, 经病理诊断低分化腺癌32例, 中分化腺癌6例, 印戒细胞癌2例. 患者术前均未接受放疗和免疫治疗, 每例均取相应癌旁组织, 即距离癌组织边缘5 cm的组织, 经病理诊断慢性浅表性胃炎13例, 慢性萎缩性胃炎伴肠上皮化生27例. 胃镜普通活检钳取20例慢性胃炎胃窦中部组织(慢性浅表性胃炎6例, 慢性萎缩性胃炎14例)4块, 男4例, 女16例, 年龄26-59(中位年龄47)岁. 组织取出立即置于液氮冻存, 迅速转移至-70℃超低温冰箱冻存备用. 组织DNA提取使用上海华舜生物有限公司的柱式小量组织/细胞基因组DNA抽提试剂盒(W6501). 甲基化修饰使用CHEMICON的CpGenome™ DNA Modification kit S7820. 引物序列参考文献[3], 由上海生工生物工程有限公司合成(表1).

1.2 方法 MSP检测hMSH2基因甲基化: 组织基因组DNA的提取按照DNA抽提试剂盒说明操作. 甲基化修饰严格按照试剂盒说明书进行. 处理后DNA样本保存于-70℃超低温冰箱备用. 然后用PCR仪扩增目的基因, 同一标本用甲基化

引物和非甲基化引物分别扩增, 引物序列、目的片段大小见表1. 25 μL PCR反应体系: TaKaRa Taq HS(5 U/μL)0.125 μL, 10×PCR Buffer(Mg²⁺ Plus)2.5 μL, dNTP Mixture(各2.5 mmol/L)2 μL, Forward Primer(6 μmol/L)1 μL, Reverse Primer(6 μmol/L)1 μL, 甲基化修饰后DNA 10 μL, dH₂O 8.375 μL. PCR扩增条件参考文献[4]并行梯度PCR找出最佳条件: 94℃预变性3 min, 94℃30 s, 60℃30 s, 72℃40 s, 共35个循环, 最后72℃延伸10 min. 取PCR产物5 μL, 与1 μL 6×Loading Buffer混合, 进行琼脂糖凝胶(浓度20 g/L)电泳, 紫外光凝胶成像系统观察结果. 若启动子区发生甲基化, 则甲基化特异性引物可扩增出相应条带; 若未发生甲基化, 则非甲基化特异性引物可扩增出相应大小目的条带。

统计学处理 采用SPSS13.0软件进行统计学分析. 甲基化频率的差异及其与肿瘤临床病理特征之间的关系采用 χ^2 检验. 以 $P<0.05$ 为差别有统计学意义。

2 结果

2.1 各组织中hMSH2甲基化状态 胃癌组、癌旁组、慢性萎缩性胃炎组、慢性浅表性胃炎组四组甲基化水平相比, 差别有统计意义($\chi^2 = 9.946$, $P = 0.019$); 胃癌组甲基化水平高于癌旁组, 差别有统计意义($\chi^2 = 4.053$, $P = 0.044$); 癌旁组、慢性萎缩性胃炎组、慢性浅表性胃炎组三组甲基化水平相比, 差别无统计意义($\chi^2 = 3.348$, $P = 0.187$); 慢性萎缩性胃炎组甲基化水平高于慢性浅表性胃炎组, 但差别无统计意义($P = 0.129$, 表2). 各组织基因组DNA甲基化修饰行MSP, 琼脂糖凝胶电泳结果见图1。

2.2 hMSH2基因启动子甲基化与胃癌临床病例参数之间的关系 hMSH2基因启动子区甲基化状态与胃癌患者的年龄、性别及肿瘤的部位、大小、TNM临床分期之间无明显联系(表3)。

3 讨论

错配修复基因(mismatch repair gene, MMR)是人体内一组高度保守的管家基因, 具有修复DNA碱基错配、增强DNA复制忠实性、维持基因组稳定性和降低自发性突变的功能^[5,6]. 目前人类的MMR系统含有9个错配修复基因. MMR发生异常, 则其错配修复功能发生缺陷无法修复DNA复制中出现的碱基错配, 产生遗传不稳定性, 导致肿瘤易感. 引起错配修复基因表达缺陷的原因除基因突变外, 基因启动子区的高甲基化

■ 研发前沿

DNA甲基化导致错配修复缺陷是胃癌发病机制中一个重要途径. 目前研究较多的是hMLH1基因, hMSH2基因也有一定研究, 但研究结果不一致, 有研究说胃癌组织中hMSH2的表达正常, 亦有报道其表达缺失或减少。

■ 相关报道

大部分的研究表明胃癌患者存在hMLH1启动子甲基化及其表达消失, 亦有学者对hMSH2的表达情况进行了检测. Leung等在对MSI-H胃癌患者研究中发现hMLH1表达消失, 而hMSH2的表达却正常. Halling等在对MSI胃癌中观察到hMSH2表达消失. Zhang等发现hMSH2 mRNA表达减少. Grogg等在对17例MSI检测中却发现hMSH2均正常表达。

■创新亮点

本文测定从慢性胃炎到胃癌发生过程中的几个重要阶段中的hMSH2启动子区甲基化水平,发现hMSH2启动子区甲基化水平有逐渐升高的趋势,推测hMSH2启动子区高甲基化与胃癌发生有一定的关系。

表 1 引物序列及扩增条件

hMSH2引物		引物序列(5'-3')	产物长度(bp)	温度(°C)
甲基化(M)	正义	TCGTGGTCGGACGTCGTTT	132	60
	反义	CAACGTCTCCTTCGACTACACCG		
非甲基化(U)	正义	GGTTGTTGTGGTTGGATGTTGTTT	137	60
	反义	CAACTACAACATCTCCTTCAACTACACCA		

表 2 各组织中hMSH2甲基化状态

分组	n	hMSH2甲基化n(%)
胃癌组	40	24(60.0)
癌旁组	40	15(37.5)
慢性萎缩性胃炎组	14	5(35.7)
慢性浅表性胃炎组	6	0(0)

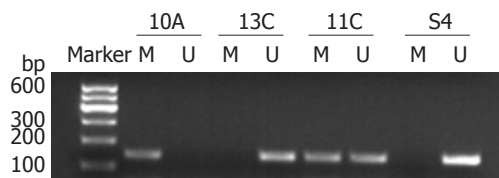


图 1 部分胃癌组织和相应癌旁组织及慢性胃炎组织中hMSH2启动子区MSP检测结果图。10A: 胃癌组织标本; 11C、13C: 胃癌癌旁组织标本; S4: 慢性浅表性胃炎组织标本。Marker: 100 bp DNA ladder; M: 甲基化引物扩增; U: 非甲基化引物扩增。

表 3 hMSH2基因启动子甲基化与胃癌临床病例参数之间的关系

病理参数	n	hMSH2甲基化n(%)	χ^2 值	P值
年龄(岁)				
≥60	18	11(61)	0.017	0.897
<60	22	13(59)		
性别				
男	29	17(59)	0.000	1.000
女	11	7(64)		
肿瘤部位				
胃窦	22	15(68)	1.364	0.243
胃体底	18	9(50)		
肿瘤大小(cm)				
≥5	23	11(48)	3.342	0.068
<5	17	13(76)		
临床分期				
I、II期	11	6(55)	0.188	0.665
III、IV期	29	18(62)		

也是其主要原因之一^[7]。肿瘤抑制基因CpG岛甲基化导致其转录失活,是肿瘤发生高度一致的特征^[8]。

hMSH2定位于染色体2p22-21或2p16-15,基因组DNA全长(不包括启动子)为73 kb,含16个外显子,cDNA全长为3 116 bp,其中开放阅读框架为2 727 bp,编码909个氨基酸序列,与966个氨基酸序列的酿酒酵母菌性MSH2蛋白有41%同源性,且高度保守片段的同源性达85%,位于密码子573-764处^[9,10]。hMSH2与hMSH6或hMSH3形成二聚体复合物,hMSH2与hMSH6形成的二聚体复合物与单个碱基或一个碱基的缺失/插入错配位置结合,hMSH2与hMSH3形成的二聚体复合物与2-4个碱基的缺失/插入错配位置结合。由此可见,与错配结合有关的hMSH2是必须的,而hMSH6和hMSH3则有一定的互补性。因此,研究了解hMSH2表达失活的机制及其与胃癌发生的关系有十分重要的临床意义。本实验应用MSP技术对胃癌组织,癌旁组织和慢性胃炎组织中的hMSH2启动子甲基化情况进行检测。

■应用要点

胃癌缺乏特异的诊断手段,大部分发现时已是晚期,因此早期诊断是治疗的前提。本文发现慢性萎缩性胃炎组织中hMSH2启动子区已出现一定水平的甲基化,胃癌组织则出现高水平的甲基化,推测慢性萎缩性胃炎有进一步发展至胃癌的可能,为胃癌的早期诊断提供一个思路。同时,推测对于已发生甲基化的DNA组织进行去甲基化治疗有可能阻断其向胃癌的发展,为基因治疗提供一定的帮助。

有研究发现,启动子甲基化是hMLH1和hMSH2表达下调的主要机制^[11]。本研究结果显示,40例胃癌组织中有24例(60%)hMSH2启动子区发生甲基化,甲基化的比例明显高于非癌组织,差别有统计学意义($P<0.05$)。支持hMSH2基因由于启动子区高甲基化导致其基因沉默,引起表达下调,不能发挥其应有错配修复功能,从而引起肿瘤易感发生的机制假设。亦有研究显示,hMLH1和hMSH2启动子高甲基化参与了口腔鳞状细胞癌和葡萄胎的发生^[12,13],同样也有研究发现原发性乳癌患者中有16% hMSH2启动子区高甲基化^[14]。上述事实可从另一方面补充说明由于启动子区甲基化导致肿瘤发生的机制。实验结果中,40例胃癌癌旁组织中,有15例(37.5%)hMSH2启动子区发生甲基化,低于胃癌组织启动子区甲基化水平,差别有统计学意义($P<0.05$)。癌旁组织细胞与癌细胞处于同一内外环境中,并具有相同的遗传物质,因此被认为是肿瘤的易发组织^[15]。本实验显示,癌旁组织启动子区hMSH2甲基化水平介于胃癌组和慢性浅表

性胃炎组之间, 说明癌旁组织处于胃癌组织与慢性浅表性胃炎组织之间的一种中间状态, 从而推断hMSH2甲基化程度逐渐累积至一定水平可导致基因表达的改变即基因沉默, 促使组织向肿瘤的转变。

癌旁组甲基化水平虽高于慢性萎缩性胃炎组, 但差别无统计意义。5例慢性萎缩性胃炎(35.7%)hMSH2启动子区发生甲基化, 慢性浅表性胃炎hMSH2启动子区未见甲基化, 前者甲基化水平高于后者, 但差别无统计意义。上述结果说明慢性萎缩性胃炎hMSH2启动子区甲基化水平已接近癌旁组水平, 两者在向胃癌的转化几率方面已无太大差别。慢性萎缩性胃炎组织中hMSH2启动子区出现低水平的甲基化, 从另一层面说明慢性萎缩性胃炎作为胃癌的癌前疾病, 其基因层面已经出现一定的改变, 但该结论尚需大样本研究资料证实。

总之, 慢性浅表性胃炎hMSH2启动子区尚未见甲基化, 慢性萎缩性胃炎(35.7%)和胃癌癌旁组织(37.5%)已出现一定水平的甲基化, 胃癌组织出现较高水平的甲基化(60%), 说明异常基因的积累最终导致肿瘤的发生, 因此检测hMSH2启动子区甲基化的水平对于胃癌的预防有一定的临床意义。但hMSH2启动子区甲基化水平与患者的年龄、性别以及肿瘤的部位、大小、临床分期无关, 提示hMSH2启动子区甲基化水平可能只与胃癌的发生有关, 而与其发展关系不大。

胃癌的发生是一个多因素, 多步骤, 多阶段发展的过程, 亦是一个多基因参与的复杂过程, 其中包括癌基因的激活、抑癌基因的失活、错配修复基因的表达异常。就错配修复基因发生启动区甲基化而言, 已涉及众多基因, 虽然其中研究较多较为透彻的有hMLH1基因, hMSH2基因也有一定研究, 但其具体作用机制十分复杂尚需进一步研究论证。同时亦需大样本研究证实其特异性和敏感性。

4 参考文献

- 1 Cai JC, Liu D, Zhang HP, Zhong S, Xia NS. [Frequent promoter hypermethylation of several tumor suppressor genes in gastric carcinoma and foveolar epithelium] *Zhonghua Zhongliu Zazhi* 2007; 29: 510-513
- 2 Yoshikawa H. [DNA methylation and cancer] *Gan To Kagaku Ryoho* 2007; 34: 145-149
- 3 Herman JG, Umar A, Polyak K, Graff JR, Ahuja N, Issa JP, Markowitz S, Willson JK, Hamilton

- SR, Kinzler KW, Kane MF, Kolodner RD, Vogelstein B, Kunkel TA, Baylin SB. Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 6870-6875
- 4 Mokarram P, Naghibalhossaini F, Saberi Firoozi M, Hosseini SV, Izadpanah A, Salahi H, Malek-Hosseini SA, Talei A, Mojallal M. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T genotype affects promoter methylation of tumor-specific genes in sporadic colorectal cancer through an interaction with folate/vitamin B12 status. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 3662-3671
- 5 Jacob S, Praz F. DNA mismatch repair defects: role in colorectal carcinogenesis. *Biochimie* 2002; 84: 27-47
- 6 Kulke MH, Thakore KS, Thomas G, Wang H, Loda M, Eng C, Odze RD. Microsatellite instability and hMLH1/hMSH2 expression in Barrett esophagus-associated adenocarcinoma. *Cancer* 2001; 91: 1451-1457
- 7 Wheeler JM, Beck NE, Kim HC, Tomlinson IP, Mortensen NJ, Bodmer WF. Mechanisms of inactivation of mismatch repair genes in human colorectal cancer cell lines: the predominant role of hMLH1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 10296-10301
- 8 Hong SH, Kim HG, Chung WB, Kim EY, Lee JY, Yoon SM, Kwon JG, Sohn YK, Kwak EK, Kim JW. DNA hypermethylation of tumor-related genes in gastric carcinoma. *J Korean Med Sci* 2005; 20: 236-241
- 9 Fishel R, Lescoe MK, Rao MR, Copeland NG, Jenkins NA, Garber J, Kane M, Kolodner R. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* 1993; 75: 1027-1038
- 10 Lynch HT, Watson P, Shaw TG, Lynch JF, Harty AE, Franklin BA, Kapler CR, Tinley ST, Liu B, Lerman C. Clinical impact of molecular genetic diagnosis, genetic counseling, and management of hereditary cancer. Part II: Hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma as a model. *Cancer* 1999; 86: 2457-2463
- 11 Hsu HS, Wen CK, Tang YA, Lin RK, Li WY, Hsu WH, Wang YC. Promoter hypermethylation is the predominant mechanism in hMLH1 and hMSH2 deregulation and is a poor prognostic factor in nonsmoking lung cancer. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 5410-5416
- 12 Czerninski R, Krichevsky S, Ashhab Y, Gazit D, Patel V, Ben-Yehuda D. Promoter hypermethylation of mismatch repair genes, hMLH1 and hMSH2 in oral squamous cell carcinoma. *Oral Dis* 2009; 15: 206-213
- 13 Chen H, Ye D, Xie X, Lu W, Zhu C, Chen X. Mismatch repair gene promoter methylation and expression in hydatidiform moles. *Arch Gynecol Obstet* 2005; 272: 35-39
- 14 Naqvi RA, Hussain A, Deo SS, Kukreti H, Chauhan M, Sarin R, Saxena A, Asim M, Shukla NK, Husain SA, Pasha ST, Basir SF. Hypermethylation analysis of mismatch repair genes (hmlh1 and hmsh2) in locally advanced breast cancers in Indian women. *Hum Pathol* 2008; 39: 672-680
- 15 Sipponen P. Atrophic gastritis as a premalignant condition. *Ann Med* 1989; 21: 287-290

■同行评价

本研究设计合理, 结果可靠, 有一定的可读性。

编辑 李军亮 电编 何基才

CD44v6在胃癌胃镜标本和术后标本中的表达及与胃癌生物学行为的关系

张大伟, 张锦红

■背景资料

胃癌是一种常见的消化系恶性肿瘤, 发病率和死亡率均较高, 我国胃癌在各种恶性肿瘤中居首位, 而胃癌转移是影响患者预后的主要因素, 因此, 探讨胃癌发生发展、转移的分子机制, 寻找与胃癌相关的肿瘤标记性指标, 一直是胃癌基础与临床研究的主题之一。

张大伟, 张锦红, 辽宁医学院附属第二医院普通外科 辽宁省锦州市 121001

作者贡献分布: 此课题由张大伟设计; 研究过程主要由张大伟完成, 张锦红参与部分操作工作; 研究所用试剂及分析工具由张大伟提供; 数据分析由张大伟完成; 本论文写作由张大伟完成。

通讯作者: 张大伟, 副主任医师, 121001, 辽宁省锦州市上海路2段49号, 辽宁医学院附属第二医院普通外科。

jz.13841677280@163.com

电话: 0416-2655213

收稿日期: 2009-10-30 修回日期: 2009-12-20

接受日期: 2009-12-29 在线出版日期: 2010-02-28

Relationship between CD44v6 expression and tumor biological behavior in gastric carcinoma

Da-Wei Zhang, Jin-Hong Zhang

Da-Wei Zhang, Jin-Hong Zhang, Department of General Surgery, the Second Affiliated Hospital of Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China

Correspondence to: Da-Wei Zhang, Department of General Surgery, the Second Affiliated Hospital of Liaoning Medical University, 2-49 Shanghai Road, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China. jz.13841677280@163.com

Received: 2009-10-30 Revised: 2009-12-20

Accepted: 2009-12-29 Published online: 2010-02-28

Abstract

AIM: To investigate the expression of CD44v6 in gastric cancer and analyze its relationship with tumor biological behavior.

METHODS: Fifty patients with gastric carcinoma, who were treated at the Second Affiliated Hospital of Liaoning Medical University between 2004 and 2009 and had detailed pathological data, were included in the study. The expression of CD44v6 in operative and gastroscopic samples collected from these patients was detected by immunohistochemistry using the streptavidin-peroxidase method.

RESULTS: The positive rates of CD44v6 expression in gastroscopic and operative samples and metastatic lymph node samples were 60.00%, 64.00% and 80.77%, respectively, significantly

higher than that in benign gastric mucosa lesions (all $P < 0.01$). The positive rate of CD44v6 expression in intestinal-type gastric carcinoma tissue was significantly higher than that in diffuse-type gastric tissue (75.86% vs 47.62%, $P < 0.05$). The expression of CD44v6 was significantly correlated with the depth of invasion, TNM stage and lymph node metastasis in gastroscopic and operative samples (all $P < 0.05$). There was no significant difference in the positive rate of CD44v6 expression between gastroscopic and operative samples ($P > 0.05$).

CONCLUSION: CD44v6 may be used as a new parameter for preoperative prediction of the development, progression and metastatic potential of gastric carcinoma.

Key Words: CD44v6; Gastric carcinoma; Biological behavior; Immunohistochemistry

Zhang DW, Zhang JH. Relationship between CD44v6 expression and tumor biological behavior in gastric carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(6): 610-615

摘要

目的: 研究CD44v6在胃癌胃镜标本和术后标本中的表达, 并分析其与胃癌生物学行为的关系。

方法: 随机选取辽宁医学院附属第二医院普通外科2004-2009年收治的有详细病例资料的胃癌患者50例, 应用免疫组织化学方法检测胃镜标本和术后标本胃组织中CD44v6的表达。

结果: CD44v6在胃癌胃镜标本、术后标本和转移淋巴结中的表达率分别为60.00%、64.00%、80.77%, 显著高于胃良性病变($P < 0.01$); CD44v6在肠型胃癌中的表达率显著高于弥漫型胃癌(75.86% vs 47.62%, $P < 0.05$)。胃癌胃镜和术后标本中CD44v6的表达与胃癌浸润深度, TNM分期和淋巴结转移均有关($P < 0.05$)。CD44v6在胃癌胃镜标本和术后标本

■同行评议者

于则利, 教授, 首都医科大学附属北京同仁医院外科

中的总体表达率无显著性差异($P>0.05$); 相同临床病理参数, CD44v6在胃癌胃镜标本和术后标本中的表达率无显著性差异($P>0.05$).

结论: CD44v6可作为术前预测胃癌的发生、病期进展和转移潜能的辅助生物学指标之一.

关键词: CD44v6; 胃癌; 生物学行为; 免疫组织化学

张大伟, 张锦红. CD44v6在胃癌胃镜标本和术后标本中的表达及与胃癌生物学行为的关系. 世界华人消化杂志 2010; 18(6): 610-615

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/610.asp>

0 引言

胃癌是一种常见的消化系恶性肿瘤, 发病率和死亡率均较高, 我国胃癌在各种恶性肿瘤中居首位, 年平均死亡率为25.53/10万, 而胃癌转移是影响患者预后的主要因素, 因此, 探讨胃癌发生发展、转移的分子机制, 寻找与胃癌相关的肿瘤标记性指标, 一直是胃癌基础与临床研究的主题之一. 其中, CD44v6作为变异型细胞表面黏附因子, 是近年来尤为关注的在肿瘤细胞的浸润和转移的过程中可能发挥重大作用的因子^[1-4], 但也有争议的结论. Higashikawa等^[5]和Müller等^[6]认为CD44v6的表达率与转移无显著相关性, 本次研究目的在于分析胃镜标本CD44v6的表达与胃癌临床病理特征的关系.

1 材料和方法

1.1 材料 随机选择我院普外科2004-2009年收治的有详细病理资料的胃癌患者50例, 年龄29-83(平均56.08)岁. 全部病例均按全国胃癌协作组制定的有关胃癌组织学分型、浸润深度分型和临床分期等规范对胃癌的术后标本进行系统的病理诊断. 按组织学分型: 肠型胃癌29例, 弥漫型胃癌21例. 按浸润深度分型: 早期胃癌10例, 进展期胃癌40例. 按TNM分期: I - II期胃癌20例, III期胃癌30例. 其中有淋巴结转移者26例, 无淋巴结转移者24例. 所有病例术前均未行任何化疗或放疗. 通过胃镜检查, 病理确诊的良性患者20例, 年龄28-67(平均50.55)岁. 鼠抗人单克隆抗体CD44v6, SP超敏试剂盒, DAB显色剂, 均购自福州市迈新生物技术开发公司.

1.2 方法

1.2.1 SP法免疫组织化学染色: 石蜡切片经二甲苯脱蜡、梯度酒精水化后, 放入枸橼酸盐抗原修复液中(0.01 mol/L, pH6.0), 高温高压抗原修

复80 s; 每张切片依次加入1滴过氧化物酶阻断液(A液)、非免疫动物血清(B液)、一抗、生物素标记的二抗(C液)、链霉素抗生物素-过氧化物酶溶液(D液), 期间均室温孵育, PBS冲洗. 最后加入2滴新鲜配制的DAB显色液, 复染、梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片. 用已知的CD44v6阳性标本作为阳性对照. PBS代替一抗作阴性对照. 切片结果用CIAS-1000细胞图像分析系统计数阳性细胞百分数.

1.2.2 结果判定标准: CD44v6表达强度根据阳性物质着色深浅和阳性细胞所占百分率来判断. 参照罗庆丰等^[7]的标准, 对染色结果进行评分. 以细胞膜出现黄染为阳性标记. 将阳性细胞的百分数和细胞的染色强度分别分为4级. 阳性细胞百分数 $\leq 5\%$ 、6%-25%、26%-50%、 $> 50\%$ 分别评为0、1、2、3分; 根据细胞内出现黄色的深浅将无显色、淡黄色、橘黄色、棕黄色分别评为0、1、2、3分, 将二者评分相加除以2, 作为该切片的最终评分, 将0-0.5、1、1.5-2、2.5-3分分别评为(-)、(+)、(++、+++), (-)定为阴性, (+)定为弱阳性, (++)、(+++)均定为强阳性.

统计学处理 采用SPSS10.0统计软件进行统计分析, 两样本率间的比较采用 χ^2 检验, 配对计数资料的差异性比较用四格表.

2 结果

2.1 CD44v6在胃良性病变、胃癌组织和转移淋巴结中的表达 胃癌胃镜标本中CD44v6阳性表达率为60.00%显著高于良性组($P<0.01$); 胃癌术后标本中CD44v6阳性表达率为64.00%, 显著高于良性组($P<0.01$); 转移淋巴结中CD44v6阳性表达率为80.77%, 显著高于良性组($P<0.05$, 表1).

2.2 CD44v6的表达与胃癌组织学分型(Lauren分型)的关系 在胃癌胃镜标本中, 肠型胃癌CD44v6阳性率为75.86%(22/29), 显著高于弥漫型胃癌CD44v6阳性率47.62%(10/21)($P<0.05$, 表2).

2.3 CD44v6的表达与胃癌临床病理特征的关系

2.3.1 胃癌胃镜标本中CD44v6的表达与胃癌临床病理参数的关系: 胃镜标本中, 进展期胃癌CD44v6阳性率为70.00%(28/40), 显著高于早期胃癌CD44v6阳性率20.00%(2/10)($P<0.05$); III期胃癌CD44v6阳性率为76.67%(23/30), 显著高于I - II期胃癌CD44v6阳性率35.00%(7/20)($P<0.05$); 有淋巴结转移者胃癌中CD44v6阳性率为80.77%(21/26), 显著高于无淋巴结转移者CD44v6阳性率37.50%(9/24)($P<0.05$, 表3).

■ 研发前沿

胃癌发生发展、转移的分子机制是目前研究的主要问题, 探讨与胃癌相关的肿瘤标记性指标与胃癌的生物学行为的关系, 一直是胃癌基础与临床研究的热点之一.

■相关报道

有学者研究CD44v6与癌前病变的关系,探讨其在胃癌中的表达与胃癌发生的关系,有学者同时研究几个肿瘤标志物与胃癌生物学行为的关系。其目的都是为了胃癌的早期诊断与治疗,提高患者的生存质量。

表 1 CD44v6在胃良性病变、胃癌组织和转移淋巴结中的表达

分组	n	CD44v6的表达			χ^2 值	P值
		阴性	阳性	阳性率(%)		
良性病变	20	17	3	15.00		
胃癌胃镜标本	50	20	30	60.00	11.61	<0.01
胃癌术后标本	50	18	32	64.00	13.72	<0.01
转移淋巴结	26	5	21	80.77	19.60	<0.01

表 2 CD44v6的表达与胃癌Lauren分型的关系

Lauren分型	n	CD44v6的表达			χ^2 值	P值
		阳性	阴性	阳性率(%)		
肠型胃癌	29	22	7	75.86	4.22	<0.05
弥漫型胃癌	21	10	11	47.62		

2.3.2 胃癌术后标本中CD44v6的表达与胃癌临床病理参数的关系: 术后标本中, 进展期胃癌CD44v6阳性率为72.50%(29/40), 显著高于早期胃癌CD44v6阳性率30.00%(3/10)($P<0.05$), III期胃癌CD44v6阳性率为76.67%(23/30), 显著高于I-II期胃癌CD44v6阳性率45.00%(9/20)($P<0.05$), 有淋巴结转移者胃癌中CD44v6阳性率为80.77%(21/26), 显著高于无淋巴结转移者CD44v6阳性率45.83%(11/24)($P<0.05$, 表4)。

2.4 CD44v6在胃癌胃镜标本和术后标本中表达的关系

2.4.1 CD44v6在胃癌胃镜标本和术后标本中总体表达率的关系: CD44v6在胃癌胃镜标本中的总体表达率为60.00%(30/50), 在术后标本中的总体表达率64.00%(32/50), 并且同一患者, 在两个标本中同时出现阳性的表达率为58.00%(29/50), CD44v6在两个标本中的总体表达率无显著性差异($\chi^2 = 0.25$, $P>0.05$)。

2.4.2 相同临床病理参数, CD44v6在胃癌胃镜标本和术后标本中表达的关系: (1)在早期胃癌中, CD44v6在胃镜标本中的表达率为20.00%(2/10), 在术后标本中的表达率30.00%(3/10), 并且同一患者, 在两个标本中同时出现阳性的表达率为20.00%(2/10), CD44v6在两个标本中的表达率无显著性差异($\chi^2 = 0$, $P>0.05$)。 (2)在进展期胃癌中, CD44v6在胃镜标本中的表达率为70.00%(28/40), 在术后标本中的表达率72.50%(29/40), 并且同一患者, 在两个标本中同时出现阳性的表达率为70.00%(28/40), CD44v6在两个标本中的表达率无显著性差异

表 3 胃癌胃镜标本中CD44v6的表达与胃癌临床病理特征的关系

临床病理参数	n	CD44v6的表达			χ^2 值	P值
		阳性	阴性	阳性率(%)		
浸润深度分型						
早期胃癌	10	2	8	20.00		
进展期胃癌	40	28	12	70.00	6.38	<0.05
TNM分期						
I-II期	20	7	13	35.00		
III期	30	23	7	76.67	8.68	<0.05
淋巴结转移						
阴性	24	9	15	37.50		
阳性	26	21	5	80.77	9.74	<0.05

表 4 胃癌术后标本中CD44v6的表达与胃癌临床病理特征的关系

临床病理参数	n	CD44v6的表达			χ^2 值	P值
		阳性	阴性	阳性率(%)		
浸润深度分型						
早期胃癌	10	3	7	30.00		
进展期胃癌	40	29	11	72.50	4.56	<0.05
TNM分期						
I-II期	20	9	11	45.00		
III期	30	23	7	76.67	5.22	<0.05
淋巴结转移						
阴性	24	11	13	45.83		
阳性	26	21	5	80.77	6.61	<0.05

($\chi^2 = 0$, $P>0.05$)。 (3)在I-II期胃癌中, CD44v6在胃镜标本中的表达率为35.00%(7/20), 在术后标本中的表达率45.00%(9/20), 并且同一患者, 在两个标本中同时出现阳性的表达率为35.00%(7/20), CD44v6在两个标本中的表达率无显著性差异($\chi^2 = 0.5$, $P>0.05$)。 (4)在III期胃癌中, CD44v6在胃镜标本和术后标本中的表达率均为76.67%(23/30), 并且同一患者, 在两个标本中同时出现阳性的表达率也为76.67%(23/30), CD44v6在胃镜标本和术后标本中的表达呈现一致性。 (5)在淋巴结转移阴性胃癌中, CD44v6在胃镜标本中的表达率为37.50%(9/24), 在术后标本中的表达率45.83%(11/24), 并且同一患者, 在两个标本中同时出现阳性的表达率为37.50%(9/24), CD44v6在两个标本中的表达率无显著性差异($\chi^2 = 0.5$, $P>0.05$)。 (6)在淋巴结转移阳性胃癌中, CD44v6在胃镜标本和术后标本中的表达率均为80.77%(21/26), 并且同一患者, 在两个标本及转移淋巴结中同时出现阳性的表达

率也为80.77%(21/26). CD44v6在胃镜标本、术后标本和转移淋巴结中的表达呈现一致性.

3 讨论

CD44作为细胞表面糖蛋白黏附分子, 广泛存在于机体之中, 国内外许多研究也均证实了这一点, 在正常胃黏膜组织中只表达CD44s蛋白, 而无拼接CD44v的表达^[8]. 在重度萎缩性胃炎、肠上皮化生、非典型增生的组织中不仅有CD44s的表达, 而且还测到微量的CD44v的表达^[9]. 本研究结果显示, 在胃良性病变中, 胃溃疡伴肠化和腺上皮不典型增生2例表达弱阳性, 主要分布于腺体的腔缘侧胞膜上, 表达率为15%. 而在胃癌中, 肿瘤细胞的各个侧面胞膜上均见强阳性表达, 胃镜标本中表达率为60%, 术后标本中表达率为64%, 两者与良性病变中的表达率有显著差异($P<0.01$), 与国内外的研究结果一致^[10-12]. 另外, 本研究还发现, CD44v6基因在胃溃疡伴肠化和腺上皮不典型增生2例中表达弱阳性, 主要分布于腺体的腔缘侧胞膜上, 而在胃癌中呈高表达, 且肿瘤细胞的各个侧面胞膜上均见强阳性表达, 这种分布极性的动态变化说明癌前病变时已有部分CD44v6表达, 呈现由量变积累到质变的发展过程, 但进展非常缓慢. 表明CD44v6基因可能参与胃黏膜的癌变过程, CD44v6基因的活化或过度表达可能改变胃黏膜上皮细胞上CD44v6分子的分布, 导致细胞黏附性的变化, 从而对胃黏膜癌变起着重要作用. 因此, 本研究认为CD44v6可能作为肿瘤发生的因子在胃癌的早期演变过程中起着重要作用, 与胃癌的发生密切相关, 但具体机制有待于进一步研究证实.

本研究还发现, 肠型胃癌CD44v6的表达率为75.86%, 明显高于弥漫型胃癌的表达率47.62%, 与国外研究结果相一致^[13,14]. 此结果提示: CD44v6可能与胃黏膜上皮细胞的恶性转化相关, 胃癌细胞可能从胃黏膜和肠化生黏膜两种上皮细胞转化而来. 而CD44v6的表达与肠型胃癌发生发展的关系可能较弥漫型更加密切, 两型胃癌中CD44v6的不同表达有可能使CD44v6的特异性抗体成为胃癌分型诊断的重要工具. 关于肠化生和肠型胃癌之间的分子病理学关系尚需做进一步研究探讨.

本研究结果显示, 均匀一致的CD44v6强阳性表达存在于进展期胃癌、III期胃癌和伴有淋巴结转移胃癌病例. 因此, 本研究认为, 随着胃癌的病期进展和浸润转移的出现, CD44v6在胃

癌中的表达呈现递增的趋势. 并且, 在淋巴结转移灶中均可检出CD44v6呈高表达的这一事实, 提示CD44v6在胃癌转移过程中起着极其重要的作用, 与胃癌进展及转移密切相关, 与徐胜军等^[15]和Okayama等^[16]的研究一致. Kerbel等^[17]报道, 具有转移潜能的亚克隆在原发癌发生的早期就具有生长优势, 这种生长优势是由于转移性亚克隆癌细胞群对局部细胞因子具有特殊反应而呈现的选择性生长所决定的. 本研究结果结合上述文献提示在早期胃癌中, CD44v6仅在转移性亚克隆癌细胞膜上表达, 随着肿瘤的进展, 表达CD44v6的亚克隆因其具有与周围细胞的间质有特殊的相互作用, 即转移潜能而在生长中逐渐占据优势. Ou等^[18]报道, 血管生成素-1转染到胃癌细胞株后, 能显著增加CD44v6的表达, 增加细胞的黏附性. 在细胞与细胞之间、细胞与细胞外间质之间出现黏附特性的异常, 这种黏附特性的异常导致肿瘤细胞具有从原发部位脱落并向周围正常组织侵袭的能力^[19,20]; 另一方面, CD44v6作为淋巴细胞的归巢受体, 可通过与远端血管及淋巴管内的配体集合, 使转移的癌细胞更获得稳定性结合, 集落式生长, 逃避人体免疫系统的识别和杀伤, 产生免疫逃逸, 形成转移瘤. 而正是这种侵袭能力的大小决定了肿瘤恶性程度的高低, 在肿瘤转移过程中起重要作用^[21-23]. 因而, 检测原发癌标本中分子标志物的平均水平有可能反映整个肿瘤的一般转移特性.

通过本研究发现, CD44v6在胃癌胃镜标本中的总体表达率为60.00%(30/50), 在胃癌术后标本中的总体表达率64.00%(32/50), 并且同一患者, 在两个标本中同时出现阳性的表达率为58.00%(29/50), CD44v6在两个标本中的总体表达率无显著性差异($P>0.05$). 本研究认为, CD44v6在胃癌胃镜标本中的总体表达率可以代表术后标本中的总体表达率. 那么, 通过术前检测CD44v6在胃镜标本中的表达水平, 将在胃癌的诊断上有一定的意义, 特别是在胃镜病理未明确诊断胃癌, 而CD44v6呈强阳性表达时, 可提示有胃癌发生的可能性. 对于此类患者可以定期复查胃镜, 进行CD44v6的检测, 动态观察其在胃癌组织中的极性变化和表达强度, 将在提高胃癌的早期诊断率上有一定的意义. 目前, 胃癌的治疗方法仍以手术治疗为主, 手术范围的大小主要依靠淋巴结转移的范围, 而确定肿瘤转移主要是依据术后常规病理切片的结果, 这

■应用要点

本研究表明CD44v6可作为术前预测胃癌的发生、病期进展和转移潜能的辅助生物学指标之一, 并在指导医生对手术范围的选择和对预后的估计上有一定的参考价值. 相信随着分子生物学技术的不断发展, 对于CD44v6在基因的功能、调控机制以及在肿瘤发生发展、侵袭转移方面作用机制的研究不断深入, 检测其在组织中或血液中的异常表达, 可望为胃癌的早期诊断、临床动态监测及预后判断提供可靠的理论依据.

同行评价

本研究实验设计合理, 数据统计及分析方法正确, 有一定的新意和临床应用价值。

就给术中判断肿瘤转移和选择手术范围的大小带来了一定困难。可能由于手术切除不彻底, 造成患者的复发转移。另外, 有些患者虽然进行了根治手术, 并且术后常规病理切片淋巴结无转移, 但随后患者仍然出现肿瘤转移, 这一现象表明单纯根据常规病理切片来判断胃癌的预后具有一定的局限性, 那么, 通过检测原发癌标本中能够反映整个肿瘤的一般转移特性的分子标志物的平均水平, 将会弥补常规病理切片的不足。通过本研究发现, 相同临床病理参数, CD44v6在胃癌胃镜标本和术后标本中的表达均无显著差异($P>0.05$)。并且, 70.00%的进展期胃癌, 76.67% III期胃癌, 80.77%伴有淋巴结转移的胃癌于胃镜标本和术后标本及淋巴结转移癌中同时检出CD44v6的阳性表达, 其表达呈现一致性。本研究认为, 胃镜标本中CD44v6的表达与临床病理参数之间的关系能够代表术后标本中二者的关系。那么通过术前检测胃镜标本中CD44v6的表达率就可以预测疾病进展和转移潜能, 并在指导医生对手术范围的选择和对预后的估计上有一定的参考价值。总体表明CD44v6可作为术前预测胃癌的发生、病期进展和转移潜能的辅助生物学指标之一。

致谢: 衷心的感谢秦书俭教授对课题设计给予的指导, 以及辽宁医学院免疫组织化学室包翠芬老师、辽宁医学院附属第二医院病理科钟平老师以及田志逢在整个实验过程中给予的指导和帮助。

参考文献

- Heider KH, Dämmrich J, Skroch-Angel P, Müller-Hermelink HK, Vollmers HP, Herrlich P, Ponta H. Differential expression of CD44 splice variants in intestinal- and diffuse-type human gastric carcinomas and normal gastric mucosa. *Cancer Res* 1993; 53: 4197-4203
- Miwa T, Watanabe A, Yamada Y, Shino Y, Yamada T, Yamashita J, Matsuda M, Nakano H. Progression in gastric carcinoma relative to the ratio of CD44 epithelial variant transcript to CD44 hematopoietic variant transcript. *Cancer* 1996; 77: 25-29
- Xin Y, Grace A, Gallagher MM, Curran BT, Leader MB, Kay EW. CD44V6 in gastric carcinoma: a marker of tumor progression. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2001; 9: 138-142
- Yamaguchi A, Goi T, Yu J, Hirono Y, Ishida M, Iida A, Kimura T, Takeuchi K, Katayama K, Hirose K. Expression of CD44v6 in advanced gastric cancer and its relationship to hematogenous metastasis and long-term prognosis. *J Surg Oncol* 2002; 79: 230-235
- Higashikawa K, Yokozaki H, Ue T, Taniyama K, Ishikawa T, Tarin D, Tahara E. Evaluation of CD44 transcription variants in human digestive tract carcinomas and normal tissues. *Int J Cancer* 1996; 66: 11-17
- Müller W, Schneiders A, Heider KH, Meier S, Hommel G, Gabbert HE. Expression and prognostic value of the CD44 splicing variants v5 and v6 in gastric cancer. *J Pathol* 1997; 183: 222-227
- 罗庆丰, 黄传生, 高玟. CD44v6和MMP-9蛋白表达与胃癌浸润和转移的关系. *实用癌症杂志* 2006; 21: 464-466
- 梁雨荣, 何尔斯泰. 转移相关基因CD44v6在胃癌中的表达意义. *中华肿瘤临床* 1999; 26: 33-36
- Mayer B, Jauch KW, Günthert U, Figdor CG, Schildberg FW, Funke I, Johnson JP. De-novo expression of CD44 and survival in gastric cancer. *Lancet* 1993; 342: 1019-1022
- 米建强, 张朝晖, 沈铭昌. 胃癌及癌前病变组织中CD44v6表达的意义. *世界华人消化杂志* 2000; 8: 156-158
- Mirecka J, Marx D, Schauer A. Immunohistochemical localization of CD44 variants 5 and 6 in human gastric mucosa and gastric cancer. *Anticancer Res* 1995; 15: 1459-1465
- Carvalho R, Milne AN, Polak M, Offerhaus GJ, Weterman MA. A novel region of amplification at 11p12-13 in gastric cancer, revealed by representational difference analysis, is associated with overexpression of CD44v6, especially in early-onset gastric carcinomas. *Genes Chromosomes Cancer* 2006; 45: 967-975
- Hong RL, Lee WJ, Shun CT, Chu JS, Chen YC. Expression of CD44 and its clinical implication in diffuse-type and intestinal-type gastric adenocarcinomas. *Oncology* 1995; 52: 334-339
- Dämmrich J, Vollmers HP, Heider KH, Müller-Hermelink HK. Importance of different CD44v6 expression in human gastric intestinal and diffuse type cancers for metastatic lymphogenic spreading. *J Mol Med* 1995; 73: 395-401
- 徐胜军, 胡炳奎, 凌志强, 赵挺. CD44v6在胃癌中的表达及其临床意义. *中国普外基础与临床* 2006; 13: 42-44
- Okayama H, Kumamoto K, Saitou K, Hayase S, Kofunato Y, Sato Y, Miyamoto K, Nakamura I, Ohki S, Sekikawa K, Takenoshita S. CD44v6, MMP-7 and nuclear Cdx2 are significant biomarkers for prediction of lymph node metastasis in primary gastric cancer. *Oncol Rep* 2009; 22: 745-755
- Kerbel RS. Growth dominance of the metastatic cancer cell: cellular and molecular aspects. *Adv Cancer Res* 1990; 55: 87-132
- Ou XL, Chen HJ, Sun WH, Hang C, Yang L, Guan YY, Yan F, Chen BA. Effects of angiopoietin-1 on attachment and metastasis of human gastric cancer cell line BGC-823. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 5432-5441
- Ajani JA, Mansfield PF, Janjan N, Morris J, Pisters PW, Lynch PM, Feig B, Myerson R, Nivers R, Cohen DS, Gunderson LL. Multi-institutional trial of preoperative chemoradiotherapy in patients with potentially resectable gastric carcinoma. *J Clin Oncol* 2004; 22: 2774-2780
- Yuspa SH, Epstein EH Jr. Cancer. An anchor for tumor cell invasion. *Science* 2005; 307: 1727-1728
- Gulmann C, Grace A, Leader M, Butler D, Patchett S, Kay E. CD44v6: a potential marker of malignant transformation in intestinal metaplasia of the

- stomach? An immunohistochemical study using tissue microarrays. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003; 15: 981-986
- 22 Joo M, Lee HK, Kang YK. Expression of E-cadherin, beta-catenin, CD44s and CD44v6 in gastric adenocarcinoma: relationship with lymph node metastasis. *Anticancer Res* 2003; 23: 1581-1588
- 23 Koyama S, Maruyama T, Adachi S. Expression of epidermal growth factor receptor and CD44 splicing variants sharing exons 6 and 9 on gastric and esophageal carcinomas: a two-color flow-cytometric analysis. *J Cancer Res Clin Oncol* 1999; 125: 47-54

编辑 李军亮 电编 何基才

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》修回稿须知

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

1 修回稿信件

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

2 稿件修改

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

3 版权

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

肠内免疫微生态营养对重症急性胰腺炎肝损害的影响

白黎智, 康利民, 路小光, 康新, 范治伟, 纪春阳

■背景资料

重症急性胰腺炎(SAP)常并发全身炎症反应综合征和多器官功能障碍综合征。肝脏是主要的受累的胰外器官之一, 肝损害与SAP病情发展和预后密切相关。有效防护SAP肝损害对降低胰外器官损害, 减轻SAP复杂化具有重要意义。

白黎智, 康利民, 路小光, 康新, 范治伟, 纪春阳, 大连大学附属中山医院急诊医学科 辽宁省大连市 116001

国家自然科学基金资助项目, No. 30672767

作者贡献分布: 白黎智与康利民对此文所作贡献均等; 此课题由白黎智、康利民及路小光共同设计; 临床资料及血液标本的采集由康新、范治伟及纪春阳完成; 实验所需试剂、仪器由路小光提供; 标本检测、数据分析及论文撰写由白黎智与康利民完成。

通讯作者: 路小光, 主任医师, 教授, 116001, 辽宁省大连市, 大连大学附属中山医院急诊医学科。dllxg@yahoo.com.cn
电话: 0411-62893126

收稿日期: 2009-11-29 修回日期: 2010-01-04

接受日期: 2010-01-04 在线出版日期: 2010-02-28

Enteral ecoimmunonutrition support alleviates hepatic injury in patients with severe acute pancreatitis

Li-Zhi Bai, Li-Min Kang, Xiao-Guang Lu, Xin Kang, Zhi-Wei Fan, Chun-Yang Ji

Li-Zhi Bai, Li-Min Kang, Xiao-Guang Lu, Xin Kang, Zhi-Wei Fan, Chun-Yang Ji, Department of Emergency Medicine, the Affiliated Zhongshan Hospital of Dalian University, Dalian 116001, Liaoning Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30672727

Correspondence to: Professor Xiao-Guang Lu, Department of Emergency Medicine, the Affiliated Zhongshan Hospital of Dalian University, Dalian 1165001, Liaoning Province, China. dllxg@yahoo.com.cn

Received: 2009-11-29 Revised: 2010-01-04

Accepted: 2010-01-04 Published online: 2010-02-28

Abstract

AIM: To explore the effects of different nutritional support regimens on hepatic injury in patients with severe acute pancreatitis (SAP).

METHODS: Eighty-six SAP patients with hepatic injury were randomly divided into three groups: parenteral nutrition (PN) group ($n = 28$), enteral nutrition (EN) group ($n = 29$) and ecoimmunonutrition (EIN) group ($n = 29$). All the patients received nutritional support for 14 days. The changes in plasma endotoxin and serum cytokine levels and hepatic function were determined.

RESULTS: The baseline levels of plasma endotoxin and serum tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) had no significant differ-

ences among the three groups. After 14 days of nutrition support, the levels of plasma endotoxin and serum TNF- α and IL-6 in the EIN group were $1.28 \text{ ng/L} \pm 0.17 \text{ ng/L}$, $30.13 \text{ ng/L} \pm 8.12 \text{ ng/L}$ and $36.43 \text{ ng/L} \pm 8.24 \text{ ng/L}$, respectively, all significantly lower than those in the PN group and EN group (all $P < 0.01$ or 0.05). The hepatic function in the EIN group returned to normal levels after 14 days of nutrition support. The improvement in hepatic function achieved in the EIN group was significantly better than that achieved in the EN group.

CONCLUSION: EIN can help recover the balance of normal flora in the gut, reduce bacterial translocation, modulate immunological function, and attenuate the level of plasma endotoxin and serum cytokines, thereby alleviating hepatic injury in patients with SAP.

Key Words: Severe acute pancreatitis; Hepatic injury; Parenteral nutrition; Enteral nutrition; Enteral ecoimmunonutrition

Bai LZ, Kang LM, Lu XG, Kang X, Fan ZW, Ji CY. Enteral ecoimmunonutrition support alleviates hepatic injury in patients with severe acute pancreatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(6): 616-620

摘要

目的: 探讨不同营养支持对重症急性胰腺炎肝损害的影响。

方法: 86例重症急性胰腺炎肝损害患者在入院48 h内随机分为3组, 即肠外营养(PN)组28例, 肠内营养(EN)组29例和免疫微生态肠内营养(EIN)组29例, 分别行PN, EN和EIN支持14 d. 检测其内毒素、细胞因子及肝功能的改变。

结果: 入院时EIN组内毒素、TNF- α 、IL-6及肝功能与PN组、EN组比较无显著差异。营养支持14 d后, EIN组内毒素、TNF- α 和IL-6分别为 $1.28 \text{ ng/L} \pm 0.17 \text{ ng/L}$, $30.13 \text{ ng/L} \pm 8.12 \text{ ng/L}$, $36.43 \text{ ng/L} \pm 8.24 \text{ ng/L}$, 上述指标均较PN组及EN组明显下降($P < 0.01$ 或 0.05)。EIN组14 d后肝功能各项指标均恢复正常, 与PN组、EN

■同行评议者

周国雄, 主任医师, 南通大学附属医院消化内科

组比较有统计学意义($P<0.01$ 或 0.05).

结论: 肠内免疫微生态营养, 可以补充肠道正常菌群, 减少细菌移位, 减少内毒素血症及炎症因子的发生, 从而减轻重症急性胰腺炎肝损害.

关键词: 重症急性胰腺炎; 肝损害; 肠外营养; 肠内营养; 肠道免疫微生态营养

白黎智, 康利民, 路小光, 康新, 范治伟, 纪春阳. 肠内免疫微生态营养对重症急性胰腺炎肝损害的影响. 世界华人消化杂志 2010; 18(6): 616-620

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/616.asp>

0 引言

重症急性胰腺炎(server acute pancreatitis, SAP)是临床常见的急危重症, 死亡率高达20%-40%. SAP主要死于全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS)导致的多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS), 其中肝损害是SAP最常见的并发症之一, 其损害可进一步加重SAP的病情, 因此保护肝脏功能并中断其损害非常重要. 动物实验表明^[1], 肠内免疫微生态营养可以补充肠道正常菌群, 维持肠道通透性, 减少细菌及内毒素移位. 本研究拟通过对SAP肝损害的患者应用肠内免疫微生态营养, 观察其对SAP肝损害时的治疗作用.

1 材料和方法

1.1 材料 2004-09/2009-09我院急诊外科收治SAP肝损害患者86例, 所有入选患者均符合2007年中华医学会外科学会胰腺学组重症急性胰腺炎诊断标准^[2], 同时入院时血清总胆红素(TB)水平 $\geq 34 \mu\text{mol/L}$, 谷丙转氨酶(ALT) ≥ 2 倍正常值且为第1次发病者. 同时凡需外科手术干预者、病情过重者(APACHE II 评分 >25 分)、有严重代谢性疾病者、胰腺恶性肿瘤、ERCP后急性胰腺炎、发病前肝功能不全或其他影响肝功能的慢性疾病、继发感染的患者均不在本研究之列. 采用随机数字法将所有患者随机分为3组, 即肠外营养组(parenteral nutrition, PN组, $n=28$), 其中男13例, 女15例, 平均年龄 62.0 ± 6.5 岁; 肠内营养组(enteral nutrition, EN组, $n=29$), 其中男18例, 女11例, 平均年龄 61.2 ± 4.9 岁; 免疫微生态肠内营养组(ecoimmunonutrition, EIN组, $n=29$), 其中男15例, 女14例, 平均年龄 60.4 ± 5.4

岁. 86例患者年龄、性别、APACHE II 评分、Balthazar CT评分等差异比较均无统计学意义.

1.2 方法

1.2.1 治疗: 所有患者均采取保守治疗, 使用抗生素, 胃肠减压, 禁食, 抑制胰腺分泌等综合治疗. 入院后48 h内, 对患者实施中心静脉置管, X线透视下置管或内镜下鼻-空肠营养管置管, 分别实施营养治疗2 wk. 本研究经医院伦理委员会批准, 实施前均签定知情同意书. (1)PN组: PN经中心静脉输注, 以10%、50%葡萄糖和20%脂肪乳(力能)提供能量, 供热量每日110-130 kcal/kg, 糖脂供能比1-2:1; 以8.5%乐凡命供氮, 供氮量为每日0.12-0.15 g/kg. 同时加入水溶性维生素(水乐维他), 微量元素(安达美)和 K^+ 、 Na^+ 等电解质; 按葡萄糖:胰岛素=4-5 g:1加入胰岛素, 所有营养混入3 L袋中, 营养液输入时间不少于12-14 h. (2)EN组: 80%能量和氮源由PN提供. 20%由EN提供, EN组采用百普素(每袋126 g)为主要能源. EN开始后第1-2天予百普素30-60 g/d, 逐量增加, 3 d后予百普素252 g/d. 热、氮不足部分由PN补充. (3)EIN组: 在EN基础上同时合并使用L-谷氨酰胺(L-Gln)、L-精氨酸(L-Arg)、三联活菌制剂(双歧杆菌、嗜酸乳杆菌及肠球菌, 上海信谊制药厂). 用前测定活菌量: $1 \times 10^9 \text{ CFU/mL}$. 使用剂量: L-Gln 0.4 g/(kg·d)、L-Arg 0.25 g/(kg·d)、三联活菌制剂100 mL/d, 将上述三药经空肠营养管每天3次(分别于8:00, 12:00, 20:00)注入.

1.2.2 指标观察: 入院时及治疗后7、14 d晨起空腹各抽静脉血2 mL, 离心取血清、血浆, -80°C 保存备用. 血浆内毒素检测严格按说明书操作(试剂盒和内毒素检测用水购自天津一端生物工程技术有限公司); 应用ELISA法检测血清肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素-6(IL-6)(试剂购自Sigma公司); 血清谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、谷胺酰转肽酶(GGT)、胆红素(TB、DB)采用日立7600全自动生化分析仪检测.

统计学处理 采用SPSS14.0进行分析, 计量资料用 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示, 并采用方差分析、 t 检验; 计数资料用 χ^2 检验; $P<0.05$ 有统计学差异.

2 结果

2.1 3组患者治疗前后血浆内毒素、TNF- α 、IL-6结果比较 入院时3组内毒素水平无明显差异, 7 d后, EIN组内毒素开始缓慢下降, 到14 d时EIN组与PN组比较, 统计学上有明显差异($P<0.01$), 与EN组比较, 亦有统计学差异

■ 研发前沿

近年来研究发现, 内毒素及炎症因子在SAP肝损害发生发展中发挥关键作用, 逐渐成为国内外学者研究的热点之一. 同时, SAP肝损害的营养支持方式及其对SAP肝损害的影响作用亦是学者感兴趣的话题之一.

■ 相关报道

徐桂芳等在2005年报道早期肠内免疫微生态营养, 能够补充犬的肠道正常菌群, 减少细菌移位, 从而减轻急性胰腺炎时的肝损害. 陈磊等研究显示肠内免疫微生态营养能够显著性的保护猪肠道屏障功能, 降低肠道的通透性, 减少细菌及内毒素的移位, 降低NF- κB 的活性及细胞因子浓度, 维持促抗炎反应平衡.

■创新盘点

本文通过检测SAP肝损害患者的内毒素及炎症因子TNF- β 、IL-6以及不同营养支持后的肝脏功能的改变,从临床角度上探讨了肠内免疫微生态营养对肝损害患者的治疗作用。

表 1 3组治疗前后血浆内毒素、TNF- α 、IL-6比较 (mean \pm SD, ng/L)

指标	分组	n	入院时	7 d	14 d
内毒素	PN组	28	2.77 \pm 0.37	3.25 \pm 0.32 ^b	2.43 \pm 0.21 ^b
	EN组	29	2.79 \pm 0.28	3.06 \pm 0.17 ^c	1.97 \pm 0.24 ^c
	EIN组	29	2.83 \pm 0.35	2.70 \pm 0.13	1.28 \pm 0.17
TNF- α	PN组	28	486.45 \pm 140.56	313.42 \pm 144.65 ^a	135.76 \pm 31.25 ^b
	EN组	29	483.34 \pm 143.71	245.39 \pm 90.39	97.46 \pm 39.95 ^d
	EIN组	29	471.59 \pm 128.52	116.46 \pm 47.34	30.13 \pm 8.12
IL-6	PN组	28	345.17 \pm 34.46	324.15 \pm 31.4	158.29 \pm 25.67 ^b
	EN组	29	339.43 \pm 29.83	284.49 \pm 20.75	93.97 \pm 18.64 ^d
	EIN组	29	356.26 \pm 34.68	286.32 \pm 18.39	36.43 \pm 8.24

^a P <0.05, ^b P <0.01 vs 同组入院时PN组; ^c P <0.05, ^d P <0.01 vs 同组入院时EN组。

表 2 3组治疗前后肝功能指标比较 (mean \pm SD)

指标	分组	n	入院时	7 d	14 d
ALT(U/L)	PN组	28	117.29 \pm 58.35	97.29 \pm 34.29 ^a	59.28 \pm 19.73 ^b
	EN组	29	116.47 \pm 64.32	63.47 \pm 19.68	40.59 \pm 11.75 ^c
	EIN组	29	125.58 \pm 69.20	61.32 \pm 14.57	34.27 \pm 11.38
AST(U/L)	PN组	28	152.29 \pm 31.62	115.29 \pm 35.28	82.49 \pm 28.18 ^b
	EN组	29	156.18 \pm 36.74	98.47 \pm 24.66	67.31 \pm 14.57 ^c
	EIN组	29	137.29 \pm 43.68	105.26 \pm 16.48	32.17 \pm 15.89
GGT(U/L)	PN组	28	325.28 \pm 38.19	235.68 \pm 15.29 ^a	59.26 \pm 11.16 ^b
	EN组	29	324.67 \pm 43.08	123.59 \pm 20.36	40.37 \pm 10.59 ^d
	EIN组	29	304.58 \pm 19.35	110.35 \pm 16.37	11.36 \pm 5.28
TB(μ mol/L)	PN组	28	89.36 \pm 16.38	63.73 \pm 15.29	18.21 \pm 10.37 ^b
	EN组	29	89.17 \pm 13.64	65.29 \pm 10.14	16.39 \pm 11.16 ^c
	EIN组	29	90.26 \pm 15.87	65.18 \pm 11.43	9.72 \pm 8.71
DB(μ mol/L)	PN组	28	72.69 \pm 18.36	53.83 \pm 15.38	22.75 \pm 9.73 ^b
	EN组	29	69.54 \pm 18.58	54.36 \pm 10.49	12.23 \pm 7.48
	EIN组	29	69.37 \pm 16.34	44.27 \pm 11.84	11.58 \pm 8.42

^a P <0.05, ^b P <0.01 vs 同组入院时PN组; ^c P <0.05, ^d P <0.01 vs 同组入院时EN组。

(P <0.05)。入院时3组细胞因子水平基本上一致,无明显差异;至营养后14 d, TNF- α 、IL-6浓度均呈下降趋势, EIN组TNF- α 、IL-6水平下降明显,与PN组及EN组比较有显著性差异(P <0.05或0.01,表1)。

2.2 3组治疗前后肝功能结果比较 入院时3组肝功能均处于异常状态;7 d后,3组肝功能均有一定程度的改善,然EIN组改善程度明显优于PN组(P <0.05);14 d后, EIN组肝功能均已恢复正常,与PN组及EN组比较均有显著性差异,有统计学意义(P <0.05或0.01,表2)。

3 讨论

SAP肝损害发生机制仍不是很清楚,目前研究

认为肠源性内毒素血症在SAP肝损害中发挥重要作用, SAP时肠道组织缺血,再灌注后产生大量氧自由基,使肠黏膜受损,加之SAP患者常采取静脉营养,肠道缺乏食物刺激,致肠黏膜萎缩,使肠道屏障功能减弱,肠道内的细菌和内毒素易位,造成内毒素血症,使SAP时远隔脏器功能受损^[3,4];同时研究表明炎症因子如NO、NF- κ B、IL等在SAP肝损害中亦发挥重要作用,这些细胞因子参与SIRS和继发的其他脏器功能损害^[5]。

SAP多伴有肠源性内毒素血症(intestinal endotoxemia, IETM),内毒素血症与SAP肝损害关系密切^[6]。在本试验中我们发现,所有的SAP肝损害患者都存在内毒素血症,且均有一个缓慢上升的过程,这与邓群等^[7]的动物

■应用要点

本研究阐述了内毒素及炎症因子TNF- α 、IL-6对SAP肝损害发病中的作用,并探讨了EIN与PN、EN治疗后的不同效果,为临床防治SAP肝损害提供了有意义的参考价值,对SAP肝损害新型营养制剂的研究开发具有一定的指导价值。

实验研究结果是一致的。同时我们发现, 使用EIN组的SAP肝损害患者内毒素下降速度明显快于PN及EN组, 显示EIN对肠道内毒素的移位有一定的抑制作用。TNF- α 是炎症细胞因子家族中的重要成员, 其为SAP最早升高的细胞因子, 可直接作用于血管内皮细胞, 导致组织出血坏死, 他还可作为始动因子在细胞核亚细胞水平上激发一系列的级联反应, 诱导IL-6、IL-8等及其自身因子的产生^[8]。此外, TNF- α 还是损伤远隔脏器的重要因子, 其水平与SAP的严重程度、病死率和预后呈明显正相关^[9]。IL-6主要由单核细胞在TNF- α 等诱导下产生, 其水平可反映SAP的严重程度, 其有强烈的致炎活性, 可直接作用于血管内皮细胞, 使其通透性增加, 导致大量炎性渗出, 亦可与TNF- α 等协同, 构成炎性介质网络, 促使炎症的扩散, SAP时大量的IL-6产生, 通过趋化、激活中性粒细胞, 表达ICAM-1等黏附因子, 释放蛋白水解酶解产生活性氧代谢产物而导致胰腺及外周器官的损害^[10]。在本研究中我们可以发现, SAP肝损害患者均存在炎症因子的过度表达, 然EIN组能够有效地减少及抑制炎症因子TNF- α 、IL-6的表达, 从而加快肝功能的恢复, 进一步验证了SAP肝损害的原因与炎症因子的表达密切相关^[5]。

SAP传统的治疗方式一般都得长期禁食和行PN, 以使胰腺得到充分的休息。然而, PN导致肠道黏膜屏障功能出现障碍, 诱发细菌移位, 导致内毒素血症的产生^[11], 从而对SAP的病情发展极为不利。故目前都主张早期行EN, 因为肠黏膜的新陈代谢能量主要来自肠道营养物质, EN能有效的保护肠黏膜屏障, 防止细菌和内毒素的移位^[12,13]。EIN可以增加肠黏膜和肝脏血流, 抑制肠道透性增加, 维持肠上皮细胞的完整性等, 防止肠道菌群失调, 减少内毒素移位的作用^[14]。EIN中的Gln是机体内最丰富的条件非必需氨基酸, 约占总游离氨基酸的60%, 是肠黏膜上皮细胞等的主要能源物质, 能下调肠黏膜上皮细胞的凋亡, 增加肠道SIgA的分泌, 抑制细菌和内毒素的移位起到保护肠道生理屏障^[15]; Arg可提高淋巴细胞对有丝分裂原的反应性, 刺激其增殖, 调节淋巴细胞和巨噬细胞分泌细胞因子; 促进NO的合成, 可扩张肠道血管, 改善肠道的缺血状态。Gln和Arg还能促进生长激素的合成和分泌, 通过刺激IL-2的同受体直接或间接上调免疫功能。三联活菌制剂能恢复肠道微生态平衡, 修

复肠道菌膜屏障, 抑制肠道致病菌生长, 减少内毒素的产生^[16]。

本研究采用谷氨酰胺和双歧杆菌、乳酸杆菌作为免疫微生态营养的主要成分, 结果显示EIN组内毒素及炎症因子水平明显低于PN组及EN组, 肝功能恢复正常明显快于PN组和EN组。故我们认为肠内免疫微生态营养可通过减轻肠道内毒素移位, 减轻全身炎症反应, 从而减轻肝脏功能的损害, 对SAP肝损害具有积极的保护作用, 其临床价值值得进一步的研究及应用。

4 参考文献

- 1 陈磊, 邹晓平, 田宽, 顾超. 肠内免疫微生态营养对急性坏死性胰腺炎全身炎症反应影响的研究. 中华胰腺病杂志 2008; 8: 115-118
- 2 张圣道, 雷若庆. 重症急性胰腺炎诊治指南. 中华外科杂志 2007; 45: 727-729
- 3 Kazantsev GB, Hecht DW, Rao R, Fedorak IJ, Gattuso P, Thompson K, Djuricin G, Prinz RA. Plasmid labeling confirms bacterial translocation in pancreatitis. *Am J Surg* 1994; 167: 201-206; discussion 206-207
- 4 韩德五. 肠源性内毒素血症在胰腺炎发病中的作用. 世界华人消化杂志 2006; 14: 2825-2829
- 5 Makhija R, Kingsnorth AN. Cytokine storm in acute pancreatitis. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2002; 9: 401-410
- 6 Windsor JA, Fearon KC, Ross JA, Barclay GR, Smyth E, Poxton I, Garden OJ, Carter DC. Role of serum endotoxin and antiendotoxin core antibody levels in predicting the development of multiple organ failure in acute pancreatitis. *Br J Surg* 1993; 80: 1042-1046
- 7 邓群, 黎洁良, 陆连荣, 梁延杰, 孙小庆. 急性坏死性胰腺炎时肠屏障损害及肠源性细菌和内毒素移位的实验研究. 中国普通外科杂志 2001; 10: 313-316
- 8 庄岩, 杨尹默, 王维民, 万远廉, 黄延庭. 急性胰腺炎鼠白细胞介素(IL)1 β 、IL-18、肿瘤坏死因子 α 、IL-1 β 转化酶的表达. 中华实验外科杂志 2005; 22: 71-71
- 9 Malleo G, Mazzon E, Siriwardena AK, Cuzzocrea S. TNF-alpha as a therapeutic target in acute pancreatitis--lessons from experimental models. *ScientificWorldJournal* 2007; 7: 431-448
- 10 王艳蕾, 张凤宇, 景友玲, 赵景霞, 赵春秀, 段国贤. 大鼠重症急性胰腺炎内毒素血症、细胞因子和一氧化氮的变化及善宁的治疗作用. 世界华人消化杂志 2006; 14: 1520-1523
- 11 张美荣, 谭桂军. 肠内和肠外营养对重症急性胰腺炎的治疗作用. 中国中西医结合急救杂志 2006; 13: 244-246
- 12 Wojtuś S, Gil J, Błaszczak A. [Dietary treatment in acute pancreatitis] *Pol Merkur Lekarski* 2007; 22: 469-473
- 13 Casas M, Mora J, Fort E, Aracil C, Busquets D, Galter S, Jáuregui CE, Ayala E, Cardona D, Gich I, Farré A. [Total enteral nutrition vs. total parenteral nutrition in patients with severe acute pancreatitis] *Rev Esp Enferm Dig* 2007; 99: 264-269
- 14 陈磊, 邹晓平, 田宽, 顾超. 肠内免疫微生态营养对重症急性胰腺炎模型猪肠道屏障功能的影响. 中华消化杂志 2008; 28: 163-166
- 15 De-Souza DA, Greene LJ. Intestinal permeability and systemic infections in critically ill patients: effect of

■同行评价

本文探讨了肠内免疫微生态营养对重症急性胰腺炎肝损害及细胞因子的影响, 选题科学, 方法成熟, 对临床有一定的应用价值。

- glutamine. *Crit Care Med* 2005; 33: 1125-1135
- 16 Oláh A, Belágyi T, Issekutz A, Gamal ME, Bengmark S. Randomized clinical trial of specific

lactobacillus and fibre supplement to early enteral nutrition in patients with acute pancreatitis. *Br J Surg* 2002; 89: 1103-1107

编辑 李军亮 电编 何基才

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

• 消息 •

2008 年内科学类期刊总被引频次和影响因子排序

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

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

Logistic回归分析对克罗恩病和肠结核鉴别指标的筛选

刘小伟, 李学锋, 邹益友, 周明欢, 欧阳春晖, 吴小平, 卢放根

刘小伟, 李学锋, 欧阳春晖, 吴小平, 卢放根, 中南大学湘雅二医院消化科 湖南省长沙市 410011

邹益友, 中南大学湘雅医院消化科 湖南省长沙市 410008

周明欢, 湘西自治州人民医院消化科 湖南省吉首市 416000

作者贡献分布: 刘小伟与李学锋对此文所作贡献均等; 此课题由卢放根设计并指导; 本论文资料收集及研究过程由卢放根、刘小伟、李学锋、邹益友、周明欢、吴小平及欧阳春晖完成; 数据分析由刘小伟和李学锋完成; 论文写作由卢放根、刘小伟及李学锋完成。

通讯作者: 卢放根, 教授, 410011, 湖南省长沙市, 中南大学湘雅二医院消化科. lufanggenyao@163.com

电话: 0731-84361022 传真: 0731-84807725

收稿日期: 2009-12-04 修回日期: 2010-01-04

接受日期: 2010-01-11 在线出版日期: 2010-02-28

Screening of clinical and endoscopic parameters for differentiating Crohn's disease from intestinal tuberculosis by logistic regression analysis

Xiao-Wei Liu, Xue-Feng Li, Yi-You Zou, Ming-Huan Zhou, Chun-Hui Ouyang, Xiao-Ping Wu, Fang-Gen Lu

Xiao-Wei Liu, Xue-Feng Li, Chun-Hui Ouyang, Xiao-Ping Wu, Fang-Gen Lu, Department of Digestive Diseases, the Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011, Hunan Province, China

Yi-You Zou, Department of Gastroenterology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, Hunan Province, China

Ming-Huan Zhou, Department of Gastroenterology, People's Hospital of Xiangxi Autonomous Prefecture, Jishou 41600, Hunan Province, China

Correspondence to: Professor Fang-Gen Lu, Department of Digestive Diseases, the Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011, Hunan Province, China. lufanggenyao@163.com

Received: 2009-12-04 Revised: 2010-01-04

Accepted: 2010-01-11 Published online: 2010-02-28

Abstract

AIM: To evaluate the value of clinical and endoscopic parameters for differential diagnosis of Crohn's disease (CD) from intestinal tuberculosis (ITB).

METHODS: The clinical and colonoscopic data from 130 CD patients and 122 ITB patients, who were treated from June 2003 to February 2009, were analyzed retrospectively. The parameters for differentiating CD from ITB were screened

by logistic regression analysis. The diagnostic efficacy of the screened parameters was analyzed using the regression equation and receiver operating characteristic (ROC) curve.

RESULTS: The clinical parameters helpful in differentiating CD from ITB include bloody stools, history of intestinal surgery, perianal diseases, history of pulmonary tuberculosis, ascites and positive PPD skin test. The sensitivity, specificity, accuracy, positive predictive value, and negative predictive value of regression mathematical model established using these clinical parameters are 90.3%, 76.8%, 83.8%, 80.7% and 88.0%, respectively. The endoscopic parameters helpful in differentiating CD from ITB include retcum involvement, longitudinal ulcer, cobblestoning, stuck open ileocecal valve, ring ulcer and rodent ulcer. The sensitivity, specificity, accuracy, positive predictive value and negative predictive value of regression mathematical model established using these endoscopic parameters are 82.9%, 82.0%, 82.5%, 82.9% and 82.0%, respectively.

CONCLUSION: The parameters screened may aid in distinguishing CD from ITB. The regression mathematical model established using clinical and endoscopic parameters can help improve the sensitivity and accuracy of differential diagnosis between CD and ITB.

Key Words: Crohn's disease; Intestinal tuberculosis; Differential diagnosis; Clinical feature; Endoscopic feature; Regression equation

Liu XW, Li XF, Zou YY, Zhou MH, Ouyang CH, Wu XP, Lu FG. Screening of clinical and endoscopic parameters for differentiating Crohn's disease from intestinal tuberculosis by logistic regression analysis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(6): 621-627

摘要

目的: 探讨对鉴别诊断克罗恩病(Crohn's disease, CD)和肠结核(intestinal tuberculosis, ITB)有价值的临床及内镜指标和方法。

方法: 回顾性分析2003-06/2009-02住院的CD

■背景资料

克罗恩病与肠结核的临床鉴别至今尚无既敏感又特异的指标。对两者的鉴别仍是临床工作的一大难题, 探讨鉴别两者的新方法和新指标仍是研究的热点。

■同行评议者

白爱平, 副教授, 南昌大学第一附属医院消化内科

■研究前沿

传统的鉴别研究常见于样本数较少的对比分析,得出的结果很难具有代表性。本研究应用Logistic回归方法对大样本数和对大量数据进行数学分析,有利于发掘新的特异而敏感的鉴别指标和方法。

患者130例、ITB患者122例的临床及内镜资料;采用Logistic回归分析的方法筛选鉴别CD和ITB的相关指标,并应用回归方程(数学模型)的方法和ROC曲线分析其诊断效能。

结果:对CD和ITB鉴别有价值的临床指标分别是:血便、肠道手术史、肛周疾病、肺结核、腹水、PPD阳性;有意义的临床指标的回归数学模型对CD和ITB鉴别诊断的敏感性、特异性、准确性、阳性预测值、阴性预测值分别为90.3%、76.8%、83.8%、80.7%、88.0%。对CD和ITB鉴别有价值的内镜指标是:直肠受累、纵行溃疡、鹅卵石征、受累回盲瓣固定开口、环形溃疡、鼠咬状溃疡;有意义的内镜指标的回归数学模型对CD和ITB鉴别诊断的敏感性、特异性、准确性、阳性预测值、阴性预测值分别为82.9%、82.0%、82.5%、82.9%、82.0%。

结论:筛选出的临床和内镜指标可能对CD和ITB的鉴别有用,应用临床指标、内镜指标回归数学模型的方法可提高诊断的敏感性和准确性。

关键词:克罗恩病;肠结核;鉴别诊断;临床特征;内镜表现;回归方程

刘小伟, 李学锋, 邹益友, 周明欢, 欧阳春晖, 吴小平, 卢放根. Logistic回归分析对克罗恩病和肠结核鉴别指标的筛选. 世界华人消化杂志 2010; 18(6): 621-627

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/621.asp>

0 引言

克罗恩病(Crohn's disease, CD)和肠结核(intestinal tuberculosis, ITB)在临床表现、内镜及组织学检查等方面存在许多相似之处,众多临床研究和病例报道均证实两者的鉴别十分困难,相互误诊率达50%-70%^[1-7]。当ITB误诊为CD使用激素或免疫抑制剂治疗可导致结核扩散,甚至死亡;当CD误诊为ITB而使患者承受不必要的抗结核药物的不良反应,延误CD的治疗^[8]。因为其发生机制及治疗方法不同,治疗前确立正确的诊断十分必要。

发展中国家是结核的高发区,ITB是常见的肺外结核病^[9]。而CD在北欧、北美等国家是常见的消化系统疾病^[10-13]。两者临床特征及肠镜下表现均以不同地区疾病加以描述并作为鉴别诊断的依据。随着工业化进程和环境改变,CD等炎症性肠病在中国等发展中国家发病率有升高趋势^[4,14-19]。为在同地区、同人种间总结两者资

料用以鉴别诊断成为可能。已有多个小样本CD和ITB的对比研究,发现了一些有鉴别价值的指标^[2,4,20]。并认识到CD存在着东西方差异^[21],但既敏感又特异的鉴别指标和方法仍尚未发现。本研究对中国南方地区同人种、相对大样本的130例CD、122例ITB进行研究,以期从临床和内镜特点中发现有价值的鉴别指标或指标组合供临床参考。

1 材料和方法

1.1 材料 2003-06/2009-02在湘雅二医院、湘雅医院、吉首大学附属医院病住院的CD和ITB患者(其中前者168例,后者156例)的资料。排除溃疡性结肠炎、不确定性肠炎、资料记录不全的CD和ITB患者。最后入选本研究的CD患者130例,其中男81例、女49例;ITB患者122例,其中男62例、女60例。

1.2 方法

1.2.1 诊断标准:CD诊断标准根据临床表现、影像学、内镜和组织学特点并符合文献标准^[22,23]。ITB诊断标准:(1)内镜活检标本抗酸染色阳性或结核杆菌培养阳性;(2)组织学检查发现有干酪样坏死;(3)临床表现、内镜及组织学检查高度怀疑结核,且抗结核治疗有效。

1.2.2 资料收集和分析:设计临床和内镜资料收集表,收集CD和ITB患者一般资料、临床特征、实验室检查等结果35项,内镜下表现特点20个指标,并对每个指标进行编码和赋值。

统计学处理 应用SPSS软件进行分析,资料分CD和ITB两组,单变量计量资料采用 t 检验,计数资料采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为有统计学意义,从众多单变量中找出有意义的指标。有意义的指标进行多变量二值Logistic回归分析,建立回归方程(数学模型),计算有价值指标的OR值和95%可信区间。以ROC曲线分析回归数学模型的诊断效能和确定预测诊断的诊断点。

2 结果

2.1 2组患者临床指标单因素分析 35个变量经单因素比较的 t 检验或 χ^2 检验发现,病程、腹泻、便秘、血便、发热、盗汗等21个指标有统计学意义,见表1。

2.2 2组临床指标多因素Logistic回归分析 将21个有意义的临床指标经多因素二值Logistic回归分析,发现:血便、肠道手术史、肛周疾病、肺结核、腹水、PPD阳性6个对鉴别CD和ITB有

表 1 两组患者临床指标单因素分析

指标	CD(<i>n</i> = 130)	ITB(<i>n</i> = 122)	<i>P</i> 值
性别(男/女)	81/49	62/60	0.066
年龄(岁)	35.54 ± 15.35	35.91 ± 15.56	0.844
病程(mo)	30.90 ± 17.63	15.91 ± 11.22	0.011
吸烟史(%)	10.3	7.8	0.619
饮酒史(%)	14.5	13.9	0.877
腹痛(%)	86.1	81.4	0.151
腹泻(%)	66.1	46.9	0.002
便秘(%)	3.6	13.3	0.008
血便(%)	32.1	7.1	0.000
发热(%)	29.7	43.4	0.027
盗汗(%)	19.6	30.8	0.029
贫血(%)	58.2	58.4	0.966
体质量下降(%)	71.5	76.1	0.397
肠道手术史(%)	32.7	10.6	0.000
阑尾切除史(%)	15.4	4.4	0.003
肛周疾病(%)	16.4	3.5	0.001
肠外表现(%)	10.9	1.8	0.003
肠梗阻(%)	28.5	9.7	0.000
腹腔脓肿(%)	10.4	4.4	0.045
肺结核(%)	1.2	31.9	0.000
腹水(%)	7.3	35.4	0.000
粪便隐血(%)	52.7	37.2	0.010
白细胞	8.49 ± 4.70	8.48 ± 5.44	0.988
血小板	323.03 ± 132.71	336.45 ± 138.04	0.416
血红蛋白	104.55 ± 22.49	107.04 ± 23.68	0.383
总蛋白	60.24 ± 8.90	63.33 ± 10.12	0.008
白蛋白	31.49 ± 7.09	31.13 ± 8.29	0.697
球蛋白	28.76 ± 5.85	31.95 ± 6.60	0.007
总胆红素	9.43 ± 7.81	9.89 ± 6.50	0.614
尿素氮	3.71 ± 1.53	3.83 ± 1.68	0.520
凝血机制障碍(%)	59.7	51.1	0.143
ESR升高(%)	71.3	83.0	0.034
CRP升高(%)	72.7	59.3	0.013
PPD阳性(%)	7.0	42.7	0.000
结核抗体阳性(%)	6.7	32.0	0.000

■ 相关报道

国内外研究发现了一些鉴别两者的指标和方法, Amarapurkar等报道应用各指标组合的方式有利于提高诊断的敏感性和特异性。

价值的指标, 其中对ITB有诊断价值的是肺结核($OR = 113.10$, 95%CI: 10.00-1 279.30)、PPD阳性($OR = 11.18$, 95%CI: 3.74-33.41)、腹水($OR = 7.90$, 95%CI: 2.72-22.94); 对CD有诊断价值的是肠道手术史($OR = 16.42$, 95%CI: 3.19-84.56)、肛周疾病($OR = 15.07$, 95%CI: 1.90-119.52)、血便($OR = 4.09$, 95%CI: 1.20-13.95), 见表2。建立预测诊断CD和ITB的临床指标Logistic回归方程(数学模型)为: $P = 1/[1 + e^{-(0.708 + 1.409X_1 + 2.9798X_2 + 2.713X_3 - 4.728X_4 - 2.066X_5 - 2.414X_6)}]$ (P 为预测值, e 为自然对数), 经 χ^2 检验, 证实方程有统计学意义($\chi^2 = 129.759$, $P = 0.000$)。应用ROC曲线求得数学模型诊断的敏

感性90.3%、特异性76.8%, 诊断点(预测界值)为0.327, 当预测值 $P \geq 0.327$ 时预测诊断为CD, 当预测值 $P < 0.327$ 时预测诊断为ITB(临床数学模型诊断的ROC曲线, 图1A)。

2.3 2组肠镜指标单因素分析 在单因素比较的 χ^2 检验中: 直肠受累、乙状结肠受累、升结肠受累、盲肠受累、回盲瓣受累、环形溃疡、纵行溃疡等12个指标有统计学意义, 见表3。

2.4 2组肠镜指标多因素分析 将12个有意义的肠镜指标经多因素二值Logistic回归分析, 发现: 直肠受累、鼠咬状溃疡(图2A); 环形溃疡(图2B); 受累回盲瓣固定开口(图2C); 纵行溃疡(图

■创新盘点

本研究应用Logistic回归方法对克罗恩病与肠结核的临床和内镜特征进行筛查,得出有价值的结果。

表 2 两组患者临床指标多因素Logistic回归分析

指标(变量名)	B	S.E.	χ^2 值	P值	OR值(95%CI)
血便(X1)	1.409	0.626	5.074	0.024	4.093(1.201-13.950)
肠道手术史(X2)	2.798	0.836	11.194	0.001	16.415(3.187-84.557)
肛周疾病(X3)	2.713	1.056	6.595	0.010	15.074(1.901-119.516)
肺结核(X4)	-4.728	1.238	14.592	0.000	113.098(9.999-1279.297)
腹水(X5)	-2.066	0.544	14.402	0.000	7.893(2.715-22.941)
PPD阳性(X6)	-2.414	0.559	18.668	0.000	11.176(3.739-33.406)
常数项	0.708	0.285	6.154	0.013	2.030

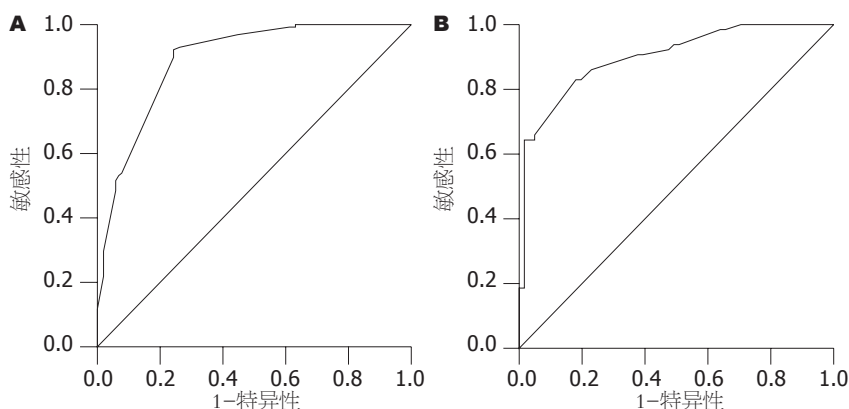


图 1 ROC曲线. A: 临床数学模型诊断; B: 内镜数学模型诊断。

表 3 两组患者肠镜指标单因素分析 (%)

指标	CD(n = 130)	ITB(n = 122)	P值
直肠受累	38.5	16.4	0.006
乙状结肠受累	44.6	23.0	0.001
降结肠受累	33.8	24.6	0.254
横结肠受累	40.0	32.8	0.401
升结肠受累	46.2	62.3	0.069
盲肠受累	43.1	57.4	0.023
回盲瓣受累	55.4	75.4	0.018
受累回盲瓣固定开口	12.3	50.8	0.000
受累回盲瓣开口闭塞	24.6	18.0	0.368
末端回肠受累	66.2	59.8	0.408
病变节段分布	73.8	63.1	0.164
环形溃疡	4.6	41.0	0.000
鼠咬状溃疡	1.6	19.7	0.000
纵行溃疡	54.7	8.2	0.000
网格状溃疡	16.9	1.6	0.000
阿弗他溃疡	53.8	44.3	0.282
鹅卵石征	27.7	1.6	0.000
结节样增生	48.5	32.8	0.000
息肉样增生	33.1	44.3	0.080
肠腔狭窄	29.2	23.0	0.423

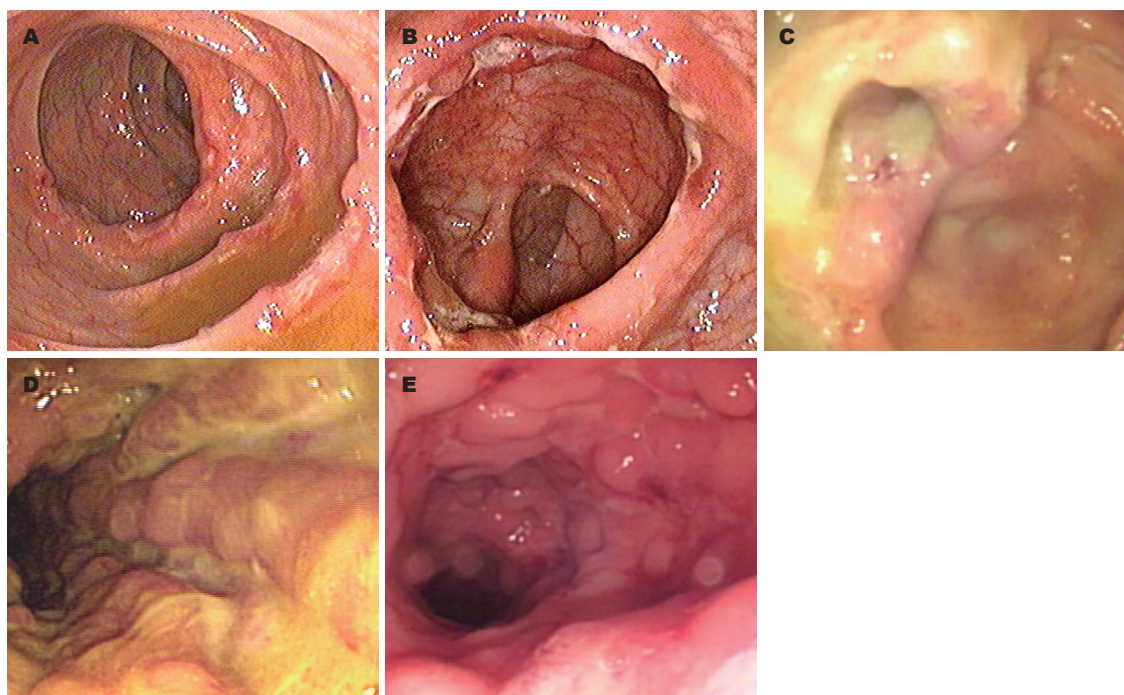
($OR = 10.80$, 95%CI: 3.47-33.62)、受累回盲瓣固定开口($OR = 4.19$, 95%CI: 1.91-9.17), 对CD有诊断价值的是鹅卵石征($OR = 16.24$, 95%CI: 2.64-99.77)、纵行溃疡($OR = 5.78$, 95%CI: 2.29-14.58)、直肠受累($OR = 4.48$, 95%CI: 1.70-11.81), 见表4. 建立预测诊断CD和ITB内镜指标的Logistic回归方程(数学模型): $P = 1/[1 + e^{-(0.283 + 1.499X1 + 1.753X2 + 2.787X3 - 1.432X4 - 2.379X5 - 3.343X6)}]$ (P 为预测值, e 为自然对数), 经 χ^2 检验方程有统计学意义($\chi^2 = 151.414$, $P = 0.000$). 应用ROC曲线求得数学模型诊断的敏感性82.9%、特异性82.0%, 诊断点为0.534, 当预测值 $P \geq 0.534$ 时预测诊断为CD, 当预测值 $P < 0.534$ 时预测诊断为ITB(内镜数学模型诊断的ROC曲线, 图1B).

2.5 有意义的单个指标和回归数学模型的诊断分析 每单一临床或内镜指标均显示特异性、阳性预测值高, 敏感性、正确率及阴性预测值低的特点. 而临床数学模型诊断的敏感性、特异性、准确性、阳性预测值及阴性预测值分别为90.3%、76.8%、83.8%、80.7%及88.0%, 内镜数学模型诊断的敏感性、特异性、准确性、阳性预测值及阴性预测值分别为82.9%、82.0%、82.5%、82.9%及82.0%(表5).

3 讨论

CD和ITB由于发患者群、地区和临床特征及内

2D); 鹅卵石征(图2E)6个肠镜指标对CD和ITB鉴别有价值. 其中对ITB有诊断价值的是鼠咬状溃疡($OR = 28.31$, 95%CI: 2.38-337.19)、环形溃疡



■应用要点

本研究在临床上指导克罗恩病与肠结核的诊断及鉴别有一定应用价值, 提供了可用于鉴别诊断的回归方程。

图 2 两组鉴别有意义的部分指标肠镜图. A: 鼠咬状溃疡; B: 环形溃疡; C: 受累回盲瓣固定开口; D: 纵行溃疡; E: 鹅卵石征。

表 4 两组患者内镜指标多因素Logistic回归分析

指标(变量名)	B	S.E.	χ^2 值	P值	OR值(95%CI)
直肠受累(X1)	1.499	0.495	9.169	0.002	4.477(1.697–11.811)
纵行溃疡(X2)	1.753	0.472	13.796	0.000	5.775(2.289–14.576)
鹅卵石征(X3)	2.787	0.926	9.054	0.003	16.238(2.643–99.774)
受累回盲瓣固定开口(X4)	-1.432	0.400	12.829	0.000	4.187(1.913–9.168)
环形溃疡(X5)	-2.379	0.580	16.851	0.000	10.795(3.467–33.615)
鼠咬状溃疡(X6)	-3.343	1.264	6.994	0.008	28.306(2.376–337.186)
常数项	0.283	0.375	2.690	0.309	1.327

镜表现等方面有许多相似和重叠, 目前发现的两者特异性诊断指标和方法的敏感性较低而实用性差^[1,21,24-28]。本研究对众多临床特征及内镜表现进行数学分析, 确立了一组有意义的指标, 用组合的方法对CD和ITB进行鉴别, 提高了诊断的敏感性和准确性, 不失为一可取的方法。

本研究对35项临床症状和体征及实验室检查结果进行Logistic回归分析, 发现: 血便、肠道手术史、肛周疾病、肺结核、腹水、PPD阳性6个指标具有鉴别意义, 得到的Logistic回归方程是: $P = 1/[1+e^{-(0.708+1.409X1+2.9798X2+2.713X3-4.728X4-2.066X5-2.414X6)}]$, 预测界值为0.327, 当预测值 $P \geq 0.327$ 时预测诊断为CD, 当预测值 $P < 0.327$ 时预测诊断为ITB, 预测诊断的敏感性、特异性、准确性分别90.3%、76.8%、83.8%。同时本研究发现一组内镜指标: 直肠受累、纵行溃疡、鹅卵石征、受

累回盲瓣固定开口、环形溃疡及鼠咬状溃疡对CD和ITB鉴别诊断有价值, 建立的回归方程: $P = 1/[1+e^{-(0.283+1.499X1+1.753X2+2.787X3-1.432X4-2.379X5-3.343X6)}]$, 预测界值为0.534, 当预测值 $P \geq 0.534$ 时预测诊断为CD, 当预测值 $P < 0.534$ 时预测诊断为ITB, 其敏感性、特异性、准确性分别82.9%、82.0%、82.5%。以上说明指标组合提供了有意义的鉴别诊断方式。南非的Kirsch等^[2]通过对25例CD和18例ITB的临床资料研究发现肺结核、肛瘘、肠外表现为鉴别两者的主要指标; 韩国的Lee等^[29]对CD和ITB各44例对比研究, 发现诊断CD的指标为肛门直肠病变、纵形溃疡、鹅卵石征, 诊断ITB的指标为环形溃疡、假息肉、病变少于4个节段、回盲瓣固定开口。国内罗中银等^[30]一组CD、ITB各30例对比分析认为, CD内镜下以铺路石改变、节段性分布、纵行溃疡为主, ITB

■同行评价

本文立意有一定的新颖性,结果可靠,结论有一定的参考价值.

表 5 临床和内镜指标及模型对CD和ITB的诊断分析

指标	敏感性(%)	特异性(%)	准确性(%)	阳性预测值	阴性预测值
预测诊断CD的指标					
血便	32.1	92.9	56.8	86.9	48.4
肠道手术史	32.7	89.4	56.1	81.8	47.6
肛周疾病	16.4	96.5	49.1	87.1	44.1
直肠受累	38.5	83.6	60.3	71.4	56.0
纵行溃疡	54.7	91.7	71.4	87.5	65.5
鹅卵石征	27.7	98.4	61.9	94.7	56.1
预测诊断ITB的指标					
肺结核	31.9	98.8	71.6	94.7	67.7
腹水	35.4	92.7	69.4	76.9	67.2
PPD阳性	42.7	93.0	70.6	83.0	66.9
受累回盲瓣固定开口	50.8	87.7	69.8	79.5	65.5
环形溃疡	41.7	95.4	69.0	89.3	63.3
鼠咬状溃疡	19.7	98.5	60.3	92.3	56.6
临床指标模型	90.3	76.8	83.8	80.7	88.0
内镜指标模型	82.9	82.0	82.5	82.9	82.0

内镜下以溃疡和假息肉为主. 顾清等^[20]一组33例CD、34例ITB对比研究结果也均与本研究发现的指标及数量存在一定差异,最可能的原因是样本数的不同所致,样本数越大发现的指标越多,指标也更反映真实情况,同时也可能是疾病的表现存在地域及人种差异^[21,31]. 也许扩大样本数,进行前瞻性多中心研究更能得到理想结果.

尽管本研究发现了6个临床指标和6个内镜指标对两者鉴别诊断具有特异性,但在这些有意义的指标中,临床上的发生率并不是全或无,而是发生概率不等,从发生率最低的肛周疾病(16.4%)到最高的纵行溃疡(54.7%),均存在不同程度的阴性表现. 当患者出现部分特异指标而又缺乏部分特异指标导致诊断困难时,可应用回归数学模型方法,将各指标结果带入方程计算出预测 P 值,根据 P 值与预测界值的比较作出预测性诊断. 如缺乏多个特异鉴别指标使回归方程难以应用或不可靠时,指标组合用于诊断不失为一选择. Amarapurkar等^[4]对CD和ITB各26例研究,发现:发热、血便、腹泻、长病程、肺结核、腹腔淋巴结等有鉴别价值,其中发热、血便、腹泻、长病程组合对CD诊断的敏感性80.7%、特异性88.4%、准确性84.6%;合并肺结核、腹腔淋巴结对ITB诊断的敏感性57.6%、特异性88.4%、准确性73.1%. 本研究中血便、肠道手术史、肛周疾病、直肠受累、纵行溃疡、鹅卵石征在CD出现较多,建议作为诊断CD的一组指标. 肺结核、腹水、PPD阳性、受累回盲瓣

固定开口、环形溃疡、鼠咬状溃疡在ITB患者多见,建议作为诊断ITB的一组指标. 根据患者表现及2组指标的多少进行综合判断,可能有助于临床鉴别.

总之,本研究通过对相对大样本病例的回顾性分析,提供了两步法的鉴别诊断思路:(1)CD和ITB相对特异指标的回归数学模型诊断法,将各指标检测值带入回归方程得出预测值,进行预测诊断;(2)指标组合法,对预测诊断CD和ITB的指标分别进行组合,得出倾向性诊断. 在临床工作中,鉴别CD和ITB的任务仍十分艰巨,寻找既敏感又特异的诊断指标和方法仍是今后努力的方向.

志谢: 本研究的数据处理和统计分析得到了中南大学公共卫生学院统计学教研室虞仁和副教授的大力帮助,在此深表感谢.

4 参考文献

- 1 Pulimood AB, Peter S, Ramakrishna B, Chacko A, Jeyamani R, Jeyaseelan L, Kurian G. Segmental colonoscopic biopsies in the differentiation of ileocolic tuberculosis from Crohn's disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2005; 20: 688-696
- 2 Kirsch R, Pentecost M, Hall Pde M, Epstein DP, Watermeyer G, Friederich PW. Role of colonoscopic biopsy in distinguishing between Crohn's disease and intestinal tuberculosis. *J Clin Pathol* 2006; 59: 840-844
- 3 Almadi MA, Ghosh S, Aljebreen AM. Differentiating intestinal tuberculosis from Crohn's disease: a diagnostic challenge. *Am J Gastroenterol*

- 2009; 104: 1003-1012
- 4 Amarapurkar DN, Patel ND, Rane PS. Diagnosis of Crohn's disease in India where tuberculosis is widely prevalent. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 741-746
- 5 Wong WM, Lai KC, Yiu WC, Wong BC, Chan FL, Lai CL. Intestinal tuberculosis mimicking fistulizing Crohn's disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22: 137-139
- 6 Ouyang Q, Tandon R, Goh KL, Pan GZ, Fock KM, Fiocchi C, Lam SK, Xiao SD. Management consensus of inflammatory bowel disease for the Asia-Pacific region. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21: 1772-1782
- 7 沈志坤. 中国大陆地区克罗恩病临床误诊的汇总分析. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 2460-2463
- 8 常玉英, 欧阳钦, 胡仁伟. 我国克罗恩病的漏诊误诊情况分析. *中华消化内镜杂志* 2005; 22: 372-375
- 9 Dye C. Global epidemiology of tuberculosis. *Lancet* 2006; 367: 938-940
- 10 Gasche C, Scholmerich J, Brynskov J, D'Haens G, Hanauer SB, Irvine EJ, Jewell DP, Rachmilewitz D, Sachar DB, Sandborn WJ, Sutherland LR. A simple classification of Crohn's disease: report of the Working Party for the World Congresses of Gastroenterology, Vienna 1998. *Inflamm Bowel Dis* 2000; 6: 8-15
- 11 Herrinton LJ, Liu L, Fireman B, Lewis JD, Allison JE, Flowers N, Hutfless S, Velayos FS, Abramson O, Altschuler A, Perry GS. Time trends in therapies and outcomes for adult inflammatory bowel disease, Northern California, 1998-2005. *Gastroenterology* 2009; 137: 502-511
- 12 Silverberg MS, Satsangi J, Ahmad T, Arnott ID, Bernstein CN, Brant SR, Caprilli R, Colombel JF, Gasche C, Geboes K, Jewell DP, Karban A, Loftus Jr EV, Peña AS, Riddell RH, Sachar DB, Schreiber S, Steinhart AH, Targan SR, Vermeire S, Warren BF. Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: Report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. *Can J Gastroenterol* 2005; 19 Suppl A: 5-36
- 13 Amre DK, Mack DR, Morgan K, Krupoves A, Costea I, Lambrette P, Grimard G, Dong J, Feguary H, Bucionis V, Deslandres C, Levy E, Seidman EG. Autophagy gene ATG16L1 but not IRGM is associated with Crohn's disease in Canadian children. *Inflamm Bowel Dis* 2009; 15: 501-507
- 14 江学良, 崔慧斐. 对我国炎症性肠病诊断治疗规范的共识意见的解析. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 1141-1143
- 15 Jiang XL, Cui HF. An analysis of 10218 ulcerative colitis cases in China. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 158-161
- 16 中国炎症性肠病协作组, 王玉芳, 欧阳钦. 3100例溃疡性结肠炎住院病例回顾分析. *中华消化杂志* 2006; 26: 368-372
- 17 Leong RW, Lau JY, Sung JJ. The epidemiology and phenotype of Crohn's disease in the Chinese population. *Inflamm Bowel Dis* 2004; 10: 646-651
- 18 Goh K, Xiao SD. Inflammatory bowel disease: a survey of the epidemiology in Asia. *J Dig Dis* 2009; 10: 1-6
- 19 Patel N, Amarapurkar D, Agal S, Baijal R, Kulshrestha P, Pramanik S, Gupte P. Gastrointestinal luminal tuberculosis: establishing the diagnosis. *J Gastroenterol Hepatol* 2004; 19: 1240-1246
- 20 顾清, 欧阳钦, 张文燕, 李甘地. 克罗恩病与肠结核临床及病理特征的对比研究. *中华内科杂志* 2009; 48: 291-294
- 21 Wang YF, Zhang H, Ouyang Q. Clinical manifestations of inflammatory bowel disease: East and West differences. *J Dig Dis* 2007; 8: 121-127
- 22 中华医学会消化病学分会. 对炎症性肠病诊断治疗规范的建议. *中华内科杂志* 2001; 40: 138-141
- 23 Carter MJ, Lobo AJ, Travis SP. Guidelines for the management of inflammatory bowel disease in adults. *Gut* 2004; 53 Suppl 5: V1-V16
- 24 甘华田, 欧阳钦, 步宏, 杨秀英. 结核杆菌DNA检测在肠结核与克罗恩病鉴别诊断中的价值. *中华消化杂志* 2001; 21: 215-218
- 25 Woods GL. The mycobacteriology laboratory and new diagnostic techniques. *Infect Dis Clin North Am* 2002; 16: 127-144
- 26 郑琴芳, 覃江, 农兵. 克罗恩病与肠结核临床及内镜表现的比较. *内科* 2007; 2: 519-520
- 27 邹宁, 刘晓红, 周旭东. 克罗恩病与肠结核的临床分析与比较. *临床内科杂志* 2005; 22: 827-830
- 28 Gan HT, Chen YQ, Ouyang Q, Bu H, Yang XY. Differentiation between intestinal tuberculosis and Crohn's disease in endoscopic biopsy specimens by polymerase chain reaction. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 1446-1451
- 29 Lee YJ, Yang SK, Byeon JS, Myung SJ, Chang HS, Hong SS, Kim KJ, Lee GH, Jung HY, Hong WS, Kim JH, Min YI, Chang SJ, Yu CS. Analysis of colonoscopic findings in the differential diagnosis between intestinal tuberculosis and Crohn's disease. *Endoscopy* 2006; 38: 592-597
- 30 周中银, 罗和生, 丁一娟. 克罗恩病与肠结核鉴别诊断方法的评价. *中国实用内科杂志* 2005; 25: 247-249
- 31 Caprilli R, Gassull MA, Escher JC, Moser G, Munkholm P, Forbes A, Hommes DW, Lochs H, Angelucci E, Cocco A, Vucelic B, Hildebrand H, Kolacek S, Riis L, Lukas M, de Franchis R, Hamilton M, Jantschek G, Michetti P, O'Morain C, Anwar MM, Freitas JL, Mouzas IA, Baert F, Mitchell R, Hawkey CJ. European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: special situations. *Gut* 2006; 55 Suppl 1: i36-i58

编辑 李瑞敏 电编 何基才

老年二期胰十二指肠切除4例及一期联合结肠癌根治术1例

徐新保, 张辉, 张洪义, 肖梅, 刘承利, 张宏义, 张希东, 冯志强, 赵刚

■背景资料

随着人类寿命的延长, 老年恶性低位胆道梗阻(壶腹周围恶性肿瘤)患者日益增多, 甚至有些老年人先后或者同时发现患有2种以上恶性肿瘤。由于老年人器官功能衰退, 手术耐受力和术后愈合能力均较差, 而胰十二指肠切除术需全部或者部分切除6个器官, 并进行胰肠、胆肠、胃肠等复杂的消化系重建, 是一个很复杂、高风险、并发症发生率和手术死亡率较高的大手术。

徐新保, 张辉, 张洪义, 肖梅, 刘承利, 张宏义, 张希东, 冯志强, 赵刚, 中国人民解放军空军总医院肝胆外科 北京市 100142

作者贡献分布: 徐新保具体负责文章的设计、临床资料收集整理及文章的撰写, 为本文主要贡献者; 张洪义负责指导、审核; 张辉、肖梅、刘承利、张宏义、张希东、冯志强及赵刚协助完成此文。

通讯作者: 张洪义, 主任医师, 100142, 北京市, 中国人民解放军空军总医院肝胆外科。zhhyiyi1487@163.com

收稿日期: 2009-12-18 修回日期: 2010-01-15

接受日期: 2010-01-19 在线出版日期: 2010-02-28

An analysis of four cases of second-stage pancreaticoduodenectomy and one case of combined first-stage pancreaticoduodenectomy and sigmoid cancer radical operation in aged patients

Xin-Bao Xu, Hui Zhang, Hong-Yi Zhang, Mei Xiao, Cheng-Li Liu, Hong-Yi Zhang, Xi-Dong Zhang, Zhi-Qiang Feng, Gang Zhao

Xin-Bao Xu, Hui Zhang, Hong-Yi Zhang, Mei Xiao, Cheng-Li Liu, Hong-Yi Zhang, Xi-Dong Zhang, Zhi-Qiang Feng, Gang Zhao, Department of Hepatobiliary Surgery, Air Force General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100142, China

Correspondence to: Hong-Yi Zhang, Department of Hepatobiliary Surgery, Air Force General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100142, China. zhhyiyi1487@163.com

Received: 2009-12-18 Revised: 2010-01-15

Accepted: 2010-01-19 Published online: 2010-02-28

Abstract

AIM: To evaluate the feasibility and operative characteristics of second-stage pancreaticoduodenectomy (PD) for initially unresectable perampullary cancer and for metastatic pancreatic carcinoma after radical excision of colon carcinoma in senile patients.

METHODS: A total of five senile patients were included in the study. Four patients had malignant obstructive jaundice, of which two underwent first-stage cholecystectomy, common bile duct exploration and T-tube drainage, and the other two underwent cholangiojejunostomy. After jaundice subsidence and liver function recovery, these patients underwent second-

stage PD. Another senile patient simultaneously underwent PD and radical resection of sigmoid colon due to cancer recurrence and metastatic pancreatic carcinoma 19 years after initial cancer radical resection.

RESULTS: One patient underwent first-stage T-tube drainage for two months and developed jaundice and cholangitis after T-tube withdrawal. Due to gradual exacerbation, he underwent second-stage PD but died of liver and renal failure 10 days after the operation. The other four patients recovered gradually after PD, underwent regular postoperative regular chemotherapy, and survived for 32, 41, 58 (still alive) and 79 months, respectively.

CONCLUSION: PD is indicated for aged patients with initially unresectable perampullary cancer or metastatic pancreatic carcinoma after radical excision of colon carcinoma, and can significantly prolong their life span and improve their life quality.

Key Words: Perampullary cancer; Second-stage pancreaticoduodenectomy; Chemotherapy; Radiotherapy; Metastatic pancreatic tumor; Combined first-stage pancreaticoduodenectomy and sigmoid cancer radical operation

Xu XB, Zhang H, Zhang HY, Xiao M, Liu CL, Zhang HY, Zhang XD, Feng ZQ, Zhao G. An analysis of four cases of second-stage pancreaticoduodenectomy and one case of combined first-stage pancreaticoduodenectomy and sigmoid cancer radical operation in aged patients. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(6): 628-633

摘要

目的: 探讨一期未能切除的老年壶腹周围恶性肿瘤患者和结肠癌根治切除术后胰头区转移癌患者行胰十二指肠切除术的可行性和手术特点。

方法: 4例恶性梗阻性黄疸患者中, 2例一期手术施行胆囊切除术、胆总管探查术、T型管引流术, 另2例一期手术施行胆管空肠吻合术, 待黄疸减退、肝功能好转后, 二期手术施行胰十二指肠切除术。1例结肠癌根治术后19年再

■同行评议者

王德盛, 副教授, 中国人民解放军第四军医大学西京医院肝胆外科

次发现乙状结肠癌及胰头区转移癌, 随后同时成功实施胰十二指肠切除术及乙状结肠癌根治术. 分析患者生存情况.

结果: 5例患者中, 有1例胆总管引流近2 mo后在外院拔除T管, 拔管后出现黄疸及胆管炎表现, 逐渐加重, 再次来我院就诊后很快实施了胰十二指肠切除术, 术后10 d死于肝肾功能衰竭. 其余4例术后逐渐康复, 术后定期化疗, 分别生存32、41、58、79 mo, 其中存活58 mo的1例患者目前仍健康存活.

结论: 一期未能切除的老年壶腹周围恶性肿瘤患者及结肠癌根治切除术后胰头区转移癌患者, 行胰十二指肠切除术仍能显著延长患者生命, 改善生活质量.

关键词: 壶腹周围肿瘤; 二期胰十二指肠切除术; 化学治疗; 放射治疗; 胰腺转移性肿瘤; 结肠癌联合胰十二指肠切除术

徐新保, 张辉, 张洪义, 肖梅, 刘承利, 张宏义, 张希东, 冯志强, 赵刚. 老年二期胰十二指肠切除4例及一期联合结肠癌根治术1例. 世界华人消化杂志 2010; 18(6): 628-633
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/628.asp>

0 引言

近年来, 关于老年患者胰十二指肠切除术屡有报道, 但是, 有些老年患者因梗阻性黄疸导致的肝功能损害、肿瘤较大、术中病情变化等原因, 往往不能施行一期胰十二指肠切除术, 可能需要分期手术. 还有一些老年患者, 在罹患壶腹周围恶性肿瘤的同时还罹患其他恶性肿瘤, 给外科治疗带来了极大的挑战. 国内外文献有关这方面的报道很少. 2003-2007年在我院行胰十二指肠切除术的65岁以上的患者中, 有4例壶腹周围肿瘤患者进行了分期手术, 第一期行胆道探查引流、胆肠吻合术, 待肝功能恢复、一般状况好转后再施行二期胰十二指肠切除术; 另有1例66岁患者在结肠癌根治术后19年再次发现乙状结肠癌及胰头区域转移癌, 随后同时成功施行了胰十二指肠切除术及乙状结肠癌根治术. 现报道分析如下.

1 材料和方法

1.1 材料 收集2003-2007年在我院行胰十二指肠切除术65岁以上壶腹周围肿瘤患者4例, 以及结肠癌根治术后19年再次发现乙状结肠癌及胰头区域转移癌, 并同时成功实施胰十二指肠切除

术及乙状结肠癌根治术的66岁患者1例.

1.2 方法

1.2.1 病例1: 男, 67岁, 因“间断性右上腹隐痛不适6 mo”入院, 查体未见异常. 患者1年前发现肝硬化, 6 mo前查出携带丙型肝炎病毒. 经全面检查及化验诊断为“胆囊息肉”、“胆囊结石伴慢性胆囊炎”、“胆总管结石”. 随后行“胆囊切除、胆管探查、T管引流术”, 术中见肝脏呈小结节状硬化, 胆总管直径约1.6 cm, 壁厚约0.3-0.4 cm, 胆总管下端狭窄, 经扩张后可勉强通过8号胆道探子. 术后病理: 慢性胆囊炎, 胆囊腺瘤样息肉. 术后13 d经T管造影结果: 肝内外胆管显示良好, 胆总管可见扩张, 未见充盈缺损, 胆总管末端狭窄, 十二指肠内可见造影剂排入. 术后14 d带T管出院, 出院时嘱患者胆管下端狭窄不能除外恶性病变, 勿拔除T管, 1 mo后返院复查. 但患者1 mo后在当地基层医院拔除T管, 随后出现发热、腹痛, 经抗感染治疗后痊愈. 术后7 mo余出现巩膜、皮肤黄染, 并逐渐加重. 术后8 mo再次入住我院. 化验静脉血标本显示CA19-9大于700 kU/L(我院检验科化验上限为700 kU/L), 谷丙转氨酶144 U/L, 谷草转氨酶158 U/L, 直接胆红素94.0 $\mu\text{mol/L}$, 总胆红素142.8 $\mu\text{mol/L}$, 白蛋白31 g/L, 总蛋白93 g/L, GGT 787 U/L, PT 17.7 s, 凝血酶原活动度53.479%. 腹部超声: 肝内外胆管扩张, 胰腺体积增大伴胰管扩张, 脾大. 腹部CT: 肝内外胆管扩张, 胰管扩张, 梗阻水平在钩突水平, 不能除外胰、钩突肿瘤. 随后施行胰十二指肠切除术, 术中见肿瘤位于十二指肠乳头, 约3 cm \times 3 cm, 以活检枪穿刺活检快速病理检查结果为腺癌. 手术较顺利, 术中出血2 000 mL, 输血2 000 mL.

1.2.2 病例2: 女, 65岁, 因“食欲不振、乏力伴皮肤巩膜黄染1 mo余”及“CT检查提示胆总管扩张、肝内胆管扩张, 胆囊结石”在当地基层医院施行“剖腹探查术”. 术中探查见胆囊增大, 内有结石, 胆总管扩张, 胆总管下端占位, 大小直径约3 cm, 术中病理检查提示胆总管下端绒毛管状腺瘤癌变. 该院技术条件无法施行胰十二指肠切除术, 遂行“胆囊切除、胆管探查、T管引流术”, 手术顺利, 术后恢复好, 黄疸减退, 肝功能好转, 随后转入我院, 化验血总胆红素28 $\mu\text{mol/L}$, 直接胆红素23.6 $\mu\text{mol/L}$, 谷丙转氨酶及谷草转氨酶正常, 术后15 d行胰十二指肠切除术, 手术顺利, 出血约400 mL, 输血400 mL.

1.2.3 病例3: 男, 66岁, 患者因“皮肤、巩膜黄

■ 研发前沿

对于壶腹周围恶性肿瘤导致的低位胆道梗阻患者, 是否在行胰十二指肠切除术之前首先减黄, 目前仍然存有争议.

■相关报道

近十几年来,国外散在报道的二期胰十二指肠切除方式为:一期施行胰十二指肠切除,并用外引流管与胰腺残端吻合,将胰液全部引流至体外,以防胰漏,3 mo后再施行二期胰腺残端与空肠吻合。

染,尿色深,大便灰白”在当地医院行腹部超声及CT检查考虑胆总管下段肿瘤,并于该院施行手术治疗,术中发现肿瘤难以切除,即行“胆囊切除、胆肠吻合术”,术后病理报告为胆管低分化腺癌。术后恢复顺利。2 mo后即来我院做 γ -刀放疗,1疗程后出院。于术后半年再次入住我院。既往有糖尿病6年,采用胰岛素皮下注射治疗。入院后化验肝功能及凝血功能均正常,HBsAg(+),CA19-9为275.24 kU/L。超声、CT及MRI检查显示:胆管癌,胆肠吻合术后,肝内胆管扩张,胰管轻度扩张,肝左叶可疑转移灶。随即施行胰十二指肠切除术,术中出血约300 mL,输血400 mL,手术顺利。

1.2.4 病例4:女,68岁,患者在某基层医院行腹部CT检查显示左肾肿瘤及壶腹部占位病变,随即在该院施行左肾切除术,壶腹部病变暂未处理。3 mo后出现上腹闷胀不适,随后出现皮肤巩膜黄染,尿色加深,大便色浅。在该院再次检查考虑为十二指肠乳头癌。于首次手术后4 mo仍在该基层医院手术治疗,术中打开十二指肠后发现肿瘤位于十二指肠乳头,活检为腺癌,未切除肿瘤,行胆囊切除、胆总管十二指肠吻合及胃空肠吻合术。术后7 d开始腹腔引流管引出较多胆汁性液体,每日约800 mL,考虑存在肠漏,经综合治疗效果不佳,术后2 wk转入我院继续治疗。经禁食水、胃肠减压、静脉高价营养、抑制消化液分泌、抗炎等治疗,腹腔引流液逐渐减少并停止,患者恢复进食,予以拔除腹腔引流管,住院31 d后出院休养。出院后一般状况较好,体质量增加,休养40 d后再次入住我院,入院查体无明显异常,化验肝功能及凝血功能均正常,于入院后第11天行胰十二指肠切除术,术中发现十二指肠乳头部肿瘤约2-3 cm大小,肝外胆管直径2.0 cm,手术顺利,术中出血600 mL,输血600 mL。

1.2.5 病例5:男,65岁,因“进行性黄疸20 d,上腹痛伴发热、寒战6 d”入我院。门诊腹部B超示:肝内外胆管扩张,结石性胆囊炎,胰头部实性占位,约4 cm \times 5 cm。患者19年前曾因右半结肠癌在当地医院行结肠癌根治术,术后一般状况良好。患糖尿病1年,一直服“优降糖”治疗(每天1片)。入院查体:皮肤巩膜中度黄染。腹部稍膨隆,可见正中切口瘢痕,长约25 cm。右上腹压痛,中腹部可扪及包块,约5 cm \times 5 cm,活动度差,质硬,无压痛,Murphy征阳性。化验空腹血糖8.8 mmol/L,餐后血糖13.6 mmol/L,ALT 76 U,AST 86 U,TB 146.4 μ mol/L,DB 92 μ mol/L,TP

67 g/L,ALB 35 g/L,AKP 884 U/L。腹部CT示:胰腺体积增大,胰头、钩突部可见一软组织肿块影,最大层面大小约3.7 cm \times 3.8 cm,肿块密度不均,可见囊变坏死区;增强扫描呈不均匀强化;胰管增宽,总胆管增宽,肝内胆管轻度增宽;胆囊壁增厚,胆囊内可见环形高密度影;肝、脾脏增大。钡灌肠示:乙状结肠癌。诊断为:胰头癌、乙状结肠癌、结肠癌根治术后、胆囊结石并慢性胆囊炎、糖尿病(II型)。入院后仍有发热(最高39 $^{\circ}$ C)、寒战,经抗感染、保肝、营养支持治疗2 wk,胆管炎得到控制,一般状况好转,化验WBC 9.1×10^9 /L,HB 122 g/L,HCT 0.333 L/L,PLT 478×10^9 /L,ALT 65 U,AST 89 U,TB 60.2 μ mol/L,DB 48.2 μ mol/L,TP 77 g/L,ALB 38 g/L,凝血功能正常。显示患者胆红素明显下降,肝功能好转。随后施行胰十二指肠切除术联合乙状结肠癌切除术。术中于胃十二指肠动脉内放置动脉化疗泵。手术顺利,术中出血约300 mL,输血约400 mL。

2 结果

病例1在二期胰十二指肠切除术后相继出现肺部感染、肝功能衰竭、消化系出血、肾功能衰竭、腹腔感染等并发症,术后6 d死亡。术后病理为十二指肠乳头低分化腺癌。病例2在二期胰十二指肠切除术后逐渐康复出院。术后病理:(胆总管)隆起型中分化乳头状腺癌(2.4 cm \times 1.8 cm \times 1.4 cm),浸润至浆膜层,未累及胰腺及十二指肠,小肠、胃及胰腺残端均未见癌,(胆管上缘)未见癌,胃周淋巴结、肝动脉淋巴结未见癌转移。术后返回当地医院定期化疗(具体不详),术后存活32 mo,因肿瘤复发转移死亡。病例3在二期胰十二指肠切除术后恢复顺利,术后19 d康复出院。术后病理:胆管下端低分化腺癌,十二指肠、胃及胰腺残端未见肿瘤,淋巴结未见转移。出院后在当地定期化疗,术后41 mo死于肿瘤复发转移。病例4在二期胰十二指肠切除术后曾出现应激性溃疡、胃潴留,经保守治疗逐渐痊愈,术后48 d出院。术后病理为十二指肠乳头上分化腺癌。术后在当地医院定期化疗,至今已存活58 mo,目前仍健康存活,未见肿瘤复发及转移。病例5在联合胰十二指肠切除和乙状结肠癌根治术后恢复良好。术后25 d化疗1次:表阿霉素30 mg、丝裂霉素8 mg、5-FU 0.5 g经动脉化疗泵注入。术后27 d痊愈出院。术后病理:(1)胰头转移性高分化腺癌;(2)结肠隆起型黏液腺癌,癌组织

侵及浆膜外脂肪组织; (3)术中送检(十二指肠韧带、胰头)淋巴结均示慢性炎; (4)手术切除之残端均未见癌, 淋巴结未见癌转移(0/11)。术后(指末次手术后, 下同)共计返回我院复查化疗14次; 术后5年内一般状况良好。术后63 mo时发现肿瘤腹腔转移扩散并有腹水, 给予腹腔化疗+热疗4次, 治疗包括噻啶、顺铂、金葡素、白细胞介素-II等, 腹水得到控制; 术后68 mo时发现肝转移, 加强化疗, 病情相对稳定; 术后78 mo时行超声引导下肝肿瘤穿刺活检+射频消融术, 活检病理为肝脏转移性腺癌。术后79 mo因肿瘤腹腔广泛扩散及全身衰竭死亡。

3 讨论

本组5例患者年龄均为65岁以上, 前4例均行二期胰十二指肠切除术, 病例1术后短期内死亡, 后3例患者术后逐渐康复, 并经化疗后存活时间较长, 目前仍有1例健康存活, 达到了延长生命、改善生活质量的目的, 手术总体疗效尚可。分析病例1患者死亡原因, 主要有以下几点: 高龄, 有慢性肝病, 黄疸较重, 肝功能较差, 凝血酶原时间明显延长, 凝血酶原活动度活动度显著降低, 首次减黄引流管拔除后没有行再次术前减黄, 术中出血量较大, 术后出现了肝功能衰竭, 并由此引起多器官功能衰竭。病例2在基层医院施行了减黄手术, 肝功能基本正常后在我院施行了二期胰十二指肠切除术并获得了成功。病例3首次手术时因肿瘤较大, 仅行减黄手术, 术后经放疗后肿瘤缩小, 最终成功施行了胰十二指肠切除术并逐渐康复。病例4发现同时罹患左肾癌和壶腹周围肿瘤, 首先行左肾切除术, 随后施行减黄手术, 待肝功能完全正常后施行胰十二指肠切除术, 术后定期化疗, 至今仍然健康存活。病例5患2次结肠癌, 并出现胰头区域转移, 尽管术前出现黄疸、发热、寒战等急性胆管炎, 经控制胆管炎发作后肝功能明显改善, 胆红素下降, 凝血机能正常, 同时行胰十二指肠切除术和乙状结肠癌根治术, 术后恢复较顺利, 配合术后化疗, 也获得了较长的生存期和较好的生活质量。

随着人类寿命的延长, 老年恶性低位胆道梗阻(壶腹周围恶性肿瘤)患者日益增多, 甚至有些老年人先后或者同时发现患有2种以上恶性肿瘤。由于老年人器官功能衰退, 手术耐受力 and 术后愈合能力均较差, 而胰十二指肠切除术需全部或者部分切除6个器官, 并需进行胰肠、

胆肠、胃肠等复杂的消化系重建, 是一个很复杂、高风险、并发症发生率和手术死亡率较高的大手术^[1-3], 因此对老年壶腹周围肿瘤患者是否施行胰十二指肠切除术应特别慎重。本组老年患者经胰十二指肠切除术后综合治疗, 除病例1因术前肝功能较差导致术后死亡外, 其余总体疗效相对满意, 结合文献报道, 我们认为只要老年患者主要器官功能尚可, 也可施行胰十二指肠切除术并获得满意疗效。

对于壶腹周围恶性肿瘤导致的低位胆道梗阻患者, 是否在行胰十二指肠切除术之前首先减黄, 目前仍然存在争议。由于梗阻性黄疸可以引起肝肾功能受损、凝血障碍、营养不良、消化吸收障碍等, 曾经许多外科学者认为总胆红素升高者, 尤其是重症黄疸者(总胆红素 $\geq 171 \mu\text{mol/L}$)均应先行减黄手术再行胰十二指肠切除, 这样可以改善肝功能^[4], 提高患者对胰十二指肠切除术的耐受能力, 明显降低术后的感染率和病死率^[5,6]。田伏洲等^[7]将血清总胆红素 $>220 \mu\text{mol/L}$ 的183例胰头癌患者随机分为减黄组(92例)和不减黄组(91例), 减黄组采取超声引导下PTCD或ENBD, 3 wk后进行手术; 不减黄组完成常规术前准备后于入院5 d内进行手术。结果显示, 减黄组的肿瘤切除率较高(48.7% vs 15.4%, $P<0.05$)、术后并发症发生率较低(2.6% vs 46.2%, $P<0.05$)、住院时间显著缩短($37.5 \text{ d} \pm 4.2 \text{ d}$ vs $49.1 \text{ d} \pm 8.4 \text{ d}$, $P<0.05$)。作者进一步指出, 减黄标准可参照: 年龄 $\times 3$ +血清总胆红素, 若该指标 >380 , 则术前减黄对患者治疗有益; <380 者可不减黄直接手术。但近年来由于对梗阻性黄疸的进一步认识以及围手术期治疗水平的提高, 尤其对可切除的恶性肿瘤患者, 本着尽可能缩短患者术前准备时间这一原则, 有学者对重症黄疸患者是否必须行术前减黄做了大量临床研究, 发现术前减黄并没有减少胰十二指肠切除术的并发症和死亡率, 也未能改善其远期疗效, 反而增加了住院时间及治疗费用, 甚至增加术后感染并发症^[8], 因此认为术前减黄对胰十二指肠切除术的作用不大^[9-13]。但老年患者(65岁以上)肝肾等重要器官功能脆弱, 结合我们的经验, 认为老年低位胆道恶性梗阻的患者应该有选择性地行术前减黄。具体讲, 我们认为恶性低位胆道梗阻的老年患者如果血清总胆红素水平达到 $150 \mu\text{mol/L}$ 以上, 满足以下条件之一的有必要进行术前减黄: (1)既往有长期慢性肝病史, 比如慢性乙型肝炎、丙型肝炎或者肝硬化; (2)肝脏

■应用要点

一期未能切除的老年壶腹周围恶性肿瘤患者及结肠癌根治切除术后胰头区转移癌患者, 行胰十二指肠切除术仍能显著延长患者生命, 改善生活质量。

■同行评价

本文内容详实, 具有很好的临床参考价值。

酶谱显著升高, 白蛋白及前白蛋白明显降低; (3) 凝血酶原时间明显延长, 凝血酶原活动度明显降低; (4) 难以控制的梗阻性胆管炎; (5) 肾功能受损; (6) 合并其他疾病或者其他原因导致等待手术时间较长者。至于术前减黄方式, 早在1966年Maki等根据胰十二指肠切除术治疗壶腹周围癌的临床经验, 提出梗阻性黄疸患者应行二期手术, 即在接受根治性手术前先行胆道外引流手术以改善患者的一般状态, 提高对手术的耐受性。20世纪70-80年代初期这一观点得到广泛认同。但随着医学技术的迅速发展, 壶腹周围肿瘤早期确诊率明显提高, 需要术前减黄的患者也较以前减少, 减黄手段趋向于微创化, 目前多采用PTCD、ENBD或者PTCD+胆道内支架置入等方式。但我国许多中下级医院不具备微创减黄的技术和设备, 许多低位胆道恶性梗阻的患者(尤其是农村患者)不能得到早期诊断, 也难以承受微创手段所需要的高质耗材价格, 因此, 手术(胆道外引流术、胆道与空肠引流管架桥术或者胆肠吻合术)减黄在我国的许多中下级医院仍有继续开展的必要, 并且减黄效果迅速确切, 价格低廉, 术中可以探查评估肿瘤分期, 即使对于大型医院, 有时开腹手术减黄也是一种不可或缺的有效减黄手段。我们的有限经验显示术前减黄最好同时行胆道内外引流, 尽管增加了操作的复杂性, 但可以防止单纯外引流术所致的胆道梗阻解除后胆汁分泌突然增加引起的大量体液丧失, 防止电解质紊乱, 因此, 内外同时引流减黄效果优于单一的外引流。尽管有学者认为胆道内支架通过肿瘤可能会造成肿瘤组织脱落种植, 但这种极端意外很少发生, 不足为虑。也有学者认为一期手术减黄可以增加二期切除术难度, 增加腹腔粘连, 但我们的4例二期手术显示虽有一定粘连, 但并不严重, 手术难度并不大。至于减黄时间, 有作者认为减黄2 wk为宜。本文报道的病例2患者术前减黄15 d, 病例3减黄6 mo余, 病例4减黄3 mo, 经过减黄, 3例患者术前血胆红素和转氨酶基本恢复正常, 手术均获成功, 病例2存活32 mo, 病例3存活41 mo, 病例4存活58 mo且目前依然健康无瘤存活; 病例5虽未进行术前减黄, 但经治疗后胆管炎得到控制, 血胆红素及转氨酶水平均显著下降, 肝功能、凝血功能正常, 手术也获得了成功, 术后存活79 mo。可见, 减黄时间长短并非决定手术成功与术后存活期的主要因素, 因此, 我们建议减黄时间以使肝功能和凝血功能基本恢复正常为宜, 而不应设置

具体的减黄时限。

近十几年来, 国外散在报道的二期胰十二指肠切除方式为: 一期施行胰十二指肠切除, 并用外引流管与胰腺残端吻合, 将胰液全部引流至体外, 以防胰漏, 3 mo后再施行二期胰腺残端与空肠吻合^[14-16]。认为可以显著降低术后的胰漏发生率。国内报道的二期胰十二指肠切除术很少^[17,18], 术式与目前国外的不同, 是一期行减黄手术, 二期行胰十二指肠切除术, 总体效果较好。我们认为, 有选择地开展后一种二期胰十二指肠切除术更适合目前中国的中下级医院的实际情况。结合国内有限的报道和我们的经验, 近远期疗效都比较满意。

结肠癌胰腺转移, 国外有散在报道, 假如结肠癌仅转移于胰腺, 可以施行一期联合胰腺部分切除术(如转移灶位于胰头则施行胰十二指肠切除术)和结肠癌根治术^[19-22]; 意大利报道了1例患者同时发现了乙状结肠癌和壶腹部恶性肿瘤, 一期行乙状结肠癌根治术, 45 d后二期行胰十二指肠切除术, 随访至术后33 mo患者仍然健康存活^[23]。国内也有2篇关于结肠癌联合胰十二指肠切除术的报道^[24,25]。国内外经验表明, 只要结肠癌转移局限于胰腺, 可以施行结肠癌联合胰腺部分切除或者胰十二指肠切除, 并不增加手术死亡率, 术后患者能够获得较长的存活期。这和我们的经验一致。

本组病例资料显示, 对于下级医院或者基层医院首次手术不能切除的壶腹周围肿瘤老年患者, 或者同时合并其他恶性肿瘤的老年患者, 决不能轻易放弃手术切除的机会, 最好转至三级甲等医院作进一步的诊治, 其中部分患者在技术条件较好的大医院仍能成功施行胰十二指肠切除术并逐渐康复。同时, 术后的化疗、放疗等手段也必不可少。通过成功的手术和术后放化疗等, 老年患者仍可显著改善生活质量, 延长生命, 甚至达到完全治愈而长期无复发转移。

4 参考文献

- 1 戴存才, 苗毅, 刘训良, 徐泽宽, 钱祝银, 将奎荣, 吴俊立, 奚春华. 80岁以上胰十二指肠切除术体会. 中华肝胆外科杂志 2006; 12: 83-85
- 2 马高祥, 王涌, 彭承宏, 王家骅, 刘颖斌, 吴育连, 彭淑牖. 胰十二指肠切除术治疗高龄壶腹周围肿瘤的临床分析(附34例报告). 实用肿瘤杂志 2004; 19: 511-512
- 3 Ouaissi M, Sielezneff I, Pirrò N, Merad A, Loundou A, Chaix JB, Dahan L, Ries P, Seitz JF, Payan MJ, Consentino B, Sastre B. Pancreatic cancer and pancreaticoduodenectomy in elderly patient: morbidity and mortality are increased. Is it the real

- life? *Hepatogastroenterology* 2008; 55: 2242-2246
- 4 陈东, 梁力建, 彭宝岗, 周奇, 李绍强, 汤地, 黄力, 黄洁夫. 术前减黄对恶性低位胆道梗阻患者行胰十二指肠切除术后肝功能变化的影响. *癌症* 2008; 27: 78-82
- 5 张静霞, 邹寿椿, 张成武. 胰十二指肠切除术前“减黄”的临床评价. *肝胆外科杂志* 1999; 11: 91-93
- 6 Smith RA, Dajani K, Dodd S, Whelan P, Raraty M, Sutton R, Campbell F, Neoptolemos JP, Ghaneh P. Preoperative resolution of jaundice following biliary stenting predicts more favourable early survival in resected pancreatic ductal adenocarcinoma. *Ann Surg Oncol* 2008; 15: 3138-3146
- 7 田伏洲, 石力, 汤礼军, 汪涛, 黎冬喧, 邹树, 罗皓. 胰头癌术前减黄指征的前瞻性研究. *中华外科杂志* 2006; 44: 1614-1616
- 8 Bhati CS, Kubal C, Sihag PK, Gupta AA, Jenav RK, Inston NG, Mehta JM. Effect of preoperative biliary drainage on outcome of classical pancreaticoduodenectomy. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 1240-1242
- 9 毕新宇, 邵永孚, 蔡建强, 赵平. 术前减黄对重症黄疸患者行胰十二指肠切除术的影响. *中国普通外科杂志* 2004; 13: 441-444
- 10 陈东, 梁力建, 何景彬, 崔景华. 术前减黄对低位胆道恶性梗阻性黄疸患者行胰十二指肠切除术的影响. *中华普通外科杂志* 2007; 22: 119-122
- 11 Coates JM, Beal SH, Russo JE, Vanderveen KA, Chen SL, Bold RJ, Canter RJ. Negligible effect of selective preoperative biliary drainage on perioperative resuscitation, morbidity, and mortality in patients undergoing pancreaticoduodenectomy. *Arch Surg* 2009; 144: 841-847
- 12 Li Z, Zhang Z, Hu W, Zeng Y, Liu X, Mai G, Zhang Y, Lu H, Tian B. Pancreaticoduodenectomy with preoperative obstructive jaundice: drainage or not. *Pancreas* 2009; 38: 379-386
- 13 Choi YM, Cho EH, Lee KY, Ahn SI, Choi SK, Kim SJ, Hur YS, Cho YU, Hong KC, Shin SH, Kim KR, Woo ZH. Effect of preoperative biliary drainage on surgical results after pancreaticoduodenectomy in patients with distal common bile duct cancer: focused on the rate of decrease in serum bilirubin. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 1102-1107
- 14 Hasegawa K, Kokudo N, Sano K, Seyama Y, Aoki T, Ikeda M, Hashimoto T, Beck Y, Imamura H, Sugawara Y, Makuuchi M. Two-stage pancreatojejunostomy in pancreaticoduodenectomy: a retrospective analysis of short-term results. *Am J Surg* 2008; 196: 3-10
- 15 Sakakima Y, Inoue S, Fujii T, Hatsuno T, Takeda S, Kaneko T, Nagasaka T, Nakao A. Emergency pylorus-preserving pancreatoduodenectomy followed by second-stage pancreatojejunostomy for a gastrointestinal stromal tumor of the duodenum with an intratumoral gas figure: report of a case. *Surg Today* 2004; 34: 701-705
- 16 Miyagawa S, Makuuchi M, Kawasaki S, Ogiwara M. Second-stage pancreatojejunostomy following pancreatoduodenectomy in high-risk patients. *Am J Surg* 1994; 168: 66-68
- 17 张彤, 孟兴凯, 陈敬龙. 二期胰十二指肠切除术的4例报告. *内蒙古医学杂志* 2008; 40: 232-233
- 18 胡国华, 郑列伟, 张轶斌. 壶腹部癌合并急性胆管炎的治疗选择. *中国普通外科杂志* 2004; 13: 764-766
- 19 Sperti C, Pasquali C, Berselli M, Frison L, Vicario G, Pedrazzoli S. Metastasis to the pancreas from colorectal cancer: is there a place for pancreatic resection? *Dis Colon Rectum* 2009; 52: 1154-1159
- 20 Costa SR, Henriques AC, Horta SH, Waisberg J, Speranzini MB. En-bloc pancreatoduodenectomy and right hemicolectomy for treating locally advanced right colon cancer (T4): a series of five patients. *Arq Gastroenterol* 2009; 46: 151-153
- 21 Nikfarjam M, Sehmbe M, Kimchi ET, Gusani NJ, Shereef S, Avella DM, Staveley-O'Carroll KF. Additional organ resection combined with pancreaticoduodenectomy does not increase postoperative morbidity and mortality. *J Gastrointest Surg* 2009; 13: 915-921
- 22 Reddy S, Edil BH, Cameron JL, Pawlik TM, Herman JM, Gilson MM, Campbell KA, Schulick RD, Ahuja N, Wolfgang CL. Pancreatic resection of isolated metastases from nonpancreatic primary cancers. *Ann Surg Oncol* 2008; 15: 3199-3206
- 23 Mirarchi M, De Raffe E, Lega S, Calculli L, Vaccari S, Cola B. [Synchronous adenocarcinoma of the sigmoid colon and multifocal intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas in an elderly patient] *Chir Ital* 2009; 61: 357-367
- 24 宋新明, 詹文华, 汪建平, 何裕隆, 吴小剑, 蔡观福, 周宏锋, 黄宝裕. 结肠癌联合胰十二指肠切除术. *中华胃肠外科杂志* 2004; 7: 35-37
- 25 尚海, 付庆才, 曹高武, 何喜林. 结肠癌联合胰十二指肠切除术3例报道. *现代康复* 1998; 2: 325

编辑 李军亮 电编 何基才