

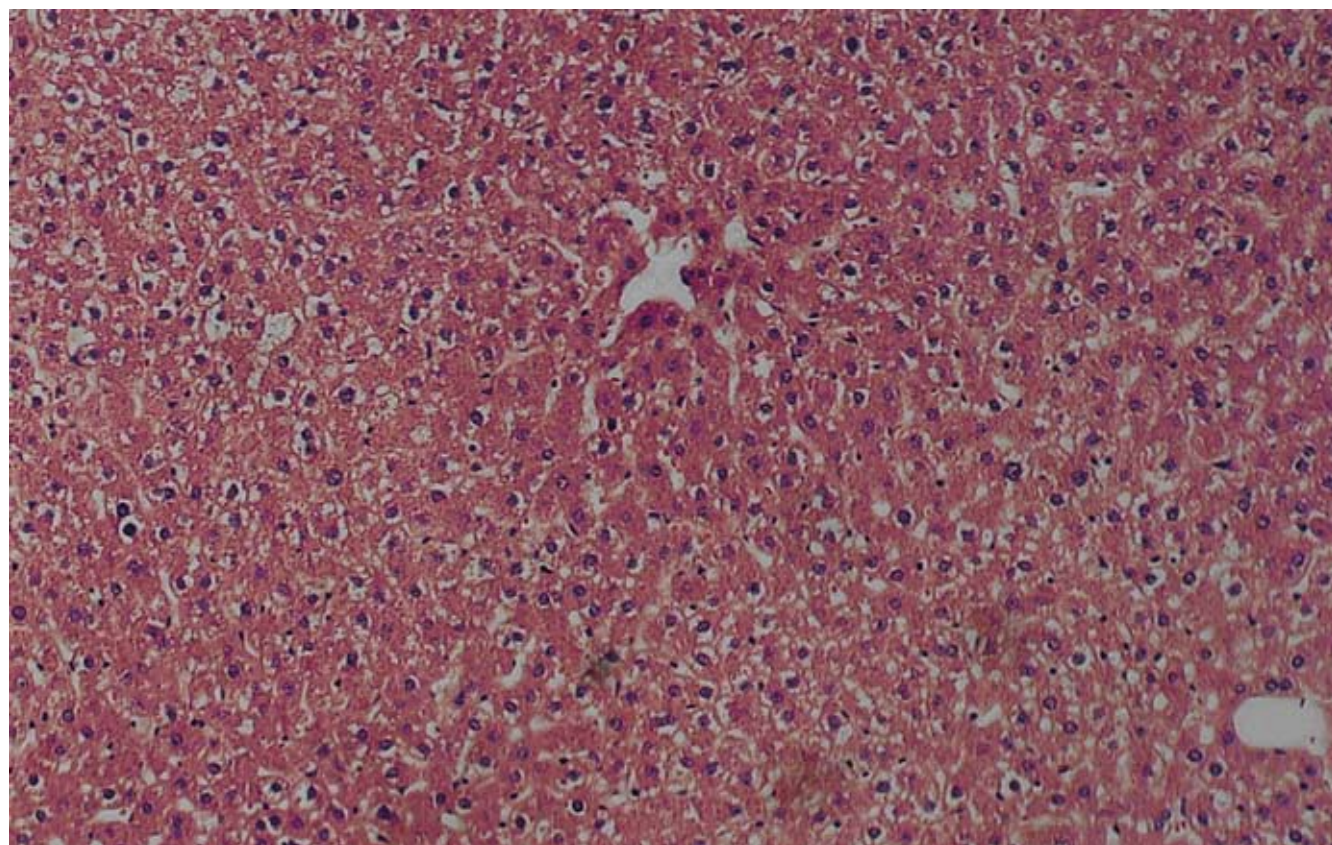
ISSN 1009-3079 (print)  
ISSN 2219-2859 (online)  
CN 14-1260/R

# 世界华人消化杂志®

**WORLD CHINESE  
JOURNAL OF DIGESTOLOGY**

**Shijie Huaren Xiaohua Zazhi**

**2012 年 5 月 28 日 第 20 卷 第 15 期 (Volume 20 Number 15)**



**15 / 2012**

ISSN 1009-3079



9 771009 307056

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

# 世界华人消化杂志®

## 编辑委员会

2012-01-01/2014-12-31

wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

### 总顾问

陈可冀教授  
黄志强教授  
纪小龙教授  
王宝恩教授  
王苑本教授  
杨春波教授  
杨思凤教授  
姚希贤教授  
张万岱教授  
周学文教授

### 名誉主编

潘伯荣教授

### 主编

程英升教授  
党双锁教授  
江学良教授  
刘连新教授  
刘占举教授  
吕宾教授  
马大烈教授  
王小众教授  
张宗明教授  
姚登福教授

### 编委

#### 消化内科学

白爱平副教授  
陈国忠主任医师  
陈洪副教授  
陈其奎教授  
陈卫昌教授  
陈贻胜教授  
程斌教授  
迟宝荣教授  
崔立红教授  
丁士刚教授  
董蕾教授  
杜雅菊主任医师  
杜奕奇副教授  
樊晓明教授  
房静远教授  
冯志杰主任医师  
傅春彬主任医师  
戈之铮教授  
关玉盘教授  
关晓辉主任医师  
郭晓钟教授  
郝建宇教授  
何松教授

洪天配教授  
黄培林教授  
黄晓东主任医师  
黄颖秋教授  
黄缘教授  
季国忠教授  
江米足教授  
姜春萌教授  
姜慧卿教授  
姜相君主任医师  
金瑞教授  
蓝宇教授  
李淑德教授  
李瑜元教授  
李玉民教授  
廖家智副主任医师

林志辉教授  
刘冰熔教授  
刘凤斌教授  
刘改芳主任医师  
刘海峰主任医师  
刘海林主任医师  
陆伦根教授  
马红主任医师  
马欣主任医师  
毛高平教授  
孟庆华教授  
倪润洲教授  
欧希龙副教授  
潘秀珍教授  
朴云峰教授  
秦成勇教授  
任粉玉教授  
任建林教授  
邵先玉教授  
沈琳主任医师  
沈薇教授  
施瑞华教授  
宋军副教授  
唐世刚教授  
田宇彬教授  
宛新建副教授  
王邦茂教授  
王炳元教授  
王承党教授  
王江滨教授  
王俊平教授  
王晓艳副教授  
夏冰教授  
夏时海副教授  
徐可树教授  
杨建民教授

姚树坤教授  
张国梁主任医师  
张军教授  
张小晋主任医师  
张筱茵副教授  
张志坚教授  
郑培永副教授  
郑鹏远教授  
郑素军副主任医师  
周国雄主任医师  
周宇教授  
邹晓平主任医师  
诸琦教授  
于珮主任医师

#### 消化外科学

白雪巍副主任医师  
蔡开琳副教授  
蔡三军主任医师  
曹杰主任医师  
陈光教授  
陈海龙教授  
陈积圣教授  
陈进宏副主任医师  
陈凇教授  
陈汝福教授  
陈亚军主任医师  
陈钟教授  
程爱国教授  
程树群副教授  
崔云南教授  
戴朝六教授  
戴冬秋教授  
丁义涛教授  
杜顺达副教授  
房林教授  
傅红副教授  
傅华群教授  
傅志仁主任医师  
高毅主任医师  
葛海燕教授  
巩鹏副教授  
谷俊朝主任医师  
顾国利副主任医师  
顾岩教授  
韩天权教授  
郝纯毅主任医师  
郝立强副教授  
何超教授  
何晓顺教授  
何裕隆教授  
黄志勇教授

季加孚教授  
莫卫东教授  
姜波健教授  
金山主任医师  
黎乐群教授  
李革副教授  
李国威教授  
李华副教授  
李华山主任医师  
李胜研究员  
李涛副主任医师  
李文岗教授  
李旭副教授  
李永翔教授  
李志霞教授  
李宗芳教授  
梁力建教授  
刘宝林教授  
刘超教授  
刘建教授  
刘颖斌主任医师  
陆云飞教授  
禄韶英副教授  
吕云福教授  
齐清会教授  
秦春宏副主任医师  
秦华东教授  
秦环龙教授  
秦建民主任医师  
邱伟华主任医师  
仇毓东教授  
单云峰副主任医师  
沈柏用副教授  
施宝民教授  
施诚仁教授  
施晓雷副主任医师  
石毓君副研究员  
宋振顺教授  
孙诚谊教授  
孙学英教授  
邵升副教授  
谭晓冬教授  
汤朝晖副主任医师  
汤绍涛教授  
唐南洪教授  
田晓峰教授  
汪波主任医师  
汪根树副教授  
王德盛副主任医师  
王凤山教授  
王健生教授  
王蒙副教授

王石林主任医师  
王文跃主任医师  
王悦华副主任医师  
王振宁教授  
王正康教授  
王志刚副主任医师  
王忠裕教授  
吴泰璜教授  
伍晓汀教授  
谢敏主任医师  
徐迅迪教授  
徐泱副副主任医师  
许戈良教授  
许剑民教授  
薛东波教授  
杨柏霖副主任医师  
杨桦教授  
杨家和主任医师  
杨银学教授  
殷正丰教授  
于聪慧教授  
于则利教授  
禹正杨副教授  
张必翔主任医师  
张宏伟教授  
张佳林教授  
张进祥副教授  
张俊副研究员  
张力为副教授  
赵刚副教授  
智绪亭教授  
周伟平教授  
邹小明教授

#### 消化感染病学

陈国凤主任医师  
陈红松研究员  
陈建杰教授  
陈志辉副主任医师  
丁惠国教授  
范建高教授  
范小玲主任医师  
范学工教授  
高润平教授  
高泽立副教授  
龚国忠教授  
管世鹤副教授  
胡国信主任医师  
靳雪源主任医师  
刘正稳教授  
钱林学主任医师



# 世界华人消化杂志®

## 编辑委员会

孙殿兴主任医师  
谭德明教授  
汤华研究员  
王凯教授  
王怡主任医师  
吴君主任医师  
宣世英教授  
杨江华副教授  
姚鹏副教授  
张明辉副主任医师  
张占卿主任医师  
赵桂鸣主任医师  
赵秀英副教授  
周霞秋教授  
朱传武教授  
庄林主任医师

### 消化中医药学

陈治水主任医师  
杜群副研究员  
黄恒青主任医师  
李军祥教授  
李康副教授  
李晓波教授  
李勇副教授  
李振华教授  
刘成海研究员

刘绍能主任医师  
南极星教授  
牛英才研究员  
王富春教授  
邢建峰副教授  
徐列明教授  
许玲教授  
徐庆教授  
袁红霞研究员  
张声生教授

### 消化肿瘤学

曹秀峰教授  
曹志成院士  
代智副研究员  
李璦教授  
刘宝瑞教授  
刘平教授  
刘云鹏教授  
沈克平主任医师  
王阁教授  
向德兵副教授  
肖文华主任医师  
谢丹教授  
张凤春教授

### 消化影像学

白彬主任医师

官泳松教授  
胡红杰主任医师  
李健丁教授  
龙学颖副主任医师  
倪才方教授  
魏经国教授  
肖恩华教授  
徐辉雄教授  
严惟力副教授  
赵卫主任医师

### 消化内镜及介入治疗学

郝俊鸣副主任医师  
茅爱武教授  
孙明军教授  
万军教授  
袁友红副教授

### 消化中西医结合学

唐文富副教授  
王学美研究员  
魏睦新教授  
杨钦河教授  
张春虎副教授

### 消化基础研究

曹洁副教授  
曹鹏副研究员

陈敬贤教授  
陈志龙教授  
崔莲花副教授  
樊红教授  
高国全教授  
高英堂研究员  
管冬元副教授  
何敏教授  
黄昆教授  
黄文林教授

黄园教授  
李刚教授  
李君文研究员  
李增山副教授  
刘克辛教授  
刘森副教授  
任超世研究员  
任浩副教授  
任晓峰副教授  
台桂香教授  
谭学瑞教授  
田文静副教授  
汪思应教授  
王钦红教授  
魏继福研究员  
吴道澄教授  
吴军研究员

吴俊华副教授  
徐宁志研究员  
许文燮教授  
阴赅宏研究员  
郁卫东副研究员  
喻荣彬教授  
周南进研究员  
周素芳教授  
周晓武副主任医师

### 消化病理学

杜祥教授  
季菊玲副教授  
李淳副教授  
李晟磊副主任医师  
刘丽江教授  
刘勇钢副主任医师  
门秀丽教授  
潘兴华副主任医师  
王鲁平主任医师  
王娅兰教授  
颜宏利副教授  
于颖彦教授  
余宏宇教授  
张锦生教授  
赵春玲副教授  
朱亮副教授

# 世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ● 2012年5月28日 第20卷 第15期 (总第383期)

## 基础 研究

- 1277 化学修饰的茯苓 $\beta$ -D-葡聚糖结构与抗胃腺癌活性的关系  
李云桥, 侯晓华, 王艺峰, 张俐娜
- 1284 依达拉奉对大鼠急性坏死性胰腺炎的保护作用  
张瑜红, 唐国都, 许志毅, 蔡莉
- 1290 金荞麦提取物对IBS大鼠脊髓镇痛的干预机制  
刘丽娜, 孙志广, 张雪梅, 周梁, 田超, 陈利, 邵铭, 史会连, 郭海燕

## 临 床 研 究

- 1296 HspB1在新疆哈萨克族食管癌组织中的表达  
张景萍, 李卉, 李秀梅, 姜孝芳, 李艳, 张秦忠, 陈艳, 王洪江, 庞作良, 谌宏鸣, 李惠武
- 1301 Livin和CyclinD1在慢性萎缩性胃炎伴肠化黏膜中的表达及意义  
陈吉, 崔宏, 高美丽, 崔琴

## 文 献 综 述

- 1307 急性胰腺炎腺泡细胞损伤机制的研究进展  
吴丽, 蔡宝昌
- 1312 非侵入性方法检测肠黏膜屏障功能的研究进展  
周淑萍, 路又可, 汪芳裕
- 1318 体外循环心脏术后消化系统并发症的防治进展  
秦春妮, 黑飞龙

## 研 究 快 报

- 1323 miR-451对食管癌EC9706细胞增殖、凋亡及侵袭能力的影响  
冷弘, 臧文巧, 王涛, 王媛媛, 马晶, 赵国强
- 1328 氢盐水对大鼠酒精性肝损伤的保护作用  
齐慧慧, 宋佳, 陈岳祥
- 1333 羊栖菜多糖对内毒素诱导的大鼠肝星状细胞增殖活化、氧化损伤及凋亡的影响  
张雪琴, 吴金明, 黄智铭, 吴建胜, 方红龙
- 1338 Toll样受体4在猪急性坏死性胰腺炎肠道组织中的表达及其意义  
林敏, 陈卫昌, 薛乐宁, 徐克群, 王晓勇, 谭勇
- 1342 米氮平早期干预对轻度胰腺癌恶液质模型进食和营养状况的影响  
吴建华, 贾林, 江舒曼

## 临 床 经 验

- 1346 心理护理干预在急诊胃镜止血中的应用及对患者焦虑紧张情绪的影响  
李桂英, 胡云鹤
- 1350 心脏外科围手术期急性药物性肝损伤12例  
王海永, 王伟, 杜振宗, 李安桂, 宋剑非
- 1354 内支架置入联合FOLFOX-4方案治疗肝癌并下腔静脉及右心房癌栓6例  
李斯锐, 吴宁, 林福煌
- 1359 实时定量PCR法分析2型糖尿病患者肠道乳酸杆菌菌种数量的改变  
刘婷婷, 蔡德鸿
- 1366 PGC-1 $\alpha$ 在炎症性肠病肠黏膜组织中的表达及临床意义  
陈腾飞, 邬瑞金, 刘嫦钦, 刘占举
- 1371 放大色素结肠镜观察FAS、Ki-67在直肠异常隐窝病灶中的表达  
张伟, 王芳军, 钱建忠, 徐洪明, 刘鹏飞, 徐娟

## 附 录

- 1376 《世界华人消化杂志》投稿须知

	1381 2012年国内国际会议预告
志 谢	1382 志谢世界华人消化杂志编委
消 息	<p>1283 《世界华人消化杂志》参考文献要求</p> <p>1300 WJG总被引频次排名位于第174名</p> <p>1306 百世登出版集团推出12种开放获取生物医学期刊全部被PubMed和PMC收录</p> <p>1311 《世界华人消化杂志》被评为中国精品科技期刊</p> <p>1317 中国科技信息研究所发布《世界华人消化杂志》影响因子0.694</p> <p>1327 《世界华人消化杂志》2011年开始不再收取审稿费</p> <p>1332 2011年度《世界华人消化杂志》发文情况</p> <p>1337 《世界华人消化杂志》外文字符标准</p> <p>1349 《世界华人消化杂志》入选《中国学术期刊评价研究报告-RCCSE权威、核心期刊排行榜与指南》</p> <p>1353 《世界华人消化杂志》再次入选《中文核心期刊要目总览》(2011年版)</p> <p>1358 《世界华人消化杂志》正文要求</p> <p>1365 WJG成功通过评审被PMC收录</p> <p>1370 《世界华人消化杂志》性质、刊登内容及目标</p> <p>1371 《世界华人消化杂志》栏目设置</p>
封面故事	<p>齐慧慧, 宋佳, 陈岳祥. 氢盐水对大鼠酒精性肝损伤的保护作用.</p> <p>世界华人消化杂志 2012; 20(15): 1328-1332</p> <p><a href="http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1328.asp">http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1328.asp</a></p>
本期责任人	<p>编务 周媛; 送审编辑 李军亮, 张姗姗; 组版编辑 鲁亚静; 英文编辑 王天奇; 责任编辑 张姗姗; 形式规范审核编辑部主任 李军亮; 最终清样审核总编辑 马连生</p>

<p><b>世界华人消化杂志</b></p> <p><b>Shijie Huaren Xiaohua Zazhi</b></p> <p>吴阶平 题写封面刊名 陈可冀 题写版权刊名 (旬刊)</p> <p>创 刊 1993-01-15 改 刊 1998-01-25 出 版 2012-05-28 原刊名 新消化病学杂志</p> <p>期 刊 名 称 世界华人消化杂志 主 管 单 位 山西省科学技术厅 主 办 单 位 太原消化病研治中心</p> <p>编 辑 世界华人消化杂志编辑委员会 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com <a href="http://www.wjgnet.com">http://www.wjgnet.com</a></p> <p>出 版 世界华人消化杂志编辑部 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com <a href="http://www.wjgnet.com">http://www.wjgnet.com</a></p>	<p>主 编 程英升, 教授, 200072, 上海市, 同济大学附属第十人民医院影像临床医学中心 党双锁, 教授, 710004, 陕西省西安市, 西安交通大学医学院第二附属医院感染科 江学良, 教授, 250031, 山东省济南市, 中国人民解放军济南军区总医院消化科 刘连新, 教授, 150001, 黑龙江省哈尔滨市, 哈尔滨医科大学第一临床医学院普外科 刘占举, 教授, 200072, 上海市, 同济大学附属第十人民医院消化内科 吕宾, 教授, 310006, 浙江省杭州市, 浙江中医药大学附属医院(浙江省中医院)消化科 马大烈, 教授, 200433, 上海市, 中国人民解放军第二军医大学附属长海医院病理科 王小众, 教授, 350001, 福建省福州市, 福建医科大学附属医院协和医院消化内科 姚登福, 教授, 226001, 江苏省南通市, 南通大学附属医院临床医学研究中心 张宗明, 教授, 100016, 北京市, 清华大学第一附属医院消化医学中心</p> <p>编 辑 部 主 任 李军亮</p>	<p>印刷 北京科信印刷厂 发 行 国内: 北京报刊发行局 国外: 中国国际图书贸易总公司 (100044, 北京市399信箱) 订 购 全国各地邮电局</p> <p>《世界华人消化杂志》是一份同行评议性的旬刊, 是一份被《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊.《世界华人消化杂志》的英文摘要被美国《化学文摘》, 荷兰《医学文摘库/医学文摘》和俄罗斯《文摘杂志》收录.</p> <p>《世界华人消化杂志》正式开通了在线办公系统(<a href="http://www.baishideng.com/wcjd/ch/index.aspx">http://www.baishideng.com/wcjd/ch/index.aspx</a>), 所有办公流程一律可以在线进行, 包括投稿、审稿、编辑、审读, 以及作者、读者、编者之间的信息反馈交流.</p> <p><b>特别声明</b> 本刊刊出的所有文章不代表本刊编辑部和本刊编委会的观点, 除非特别声明. 本刊如有印装质量问题, 请向本刊编辑部调换.</p> <p>2012年版权归世界华人消化杂志所有</p>
---	--	--

# World Chinese Journal of Digestology

## May 2012 Contents in Brief Volume 20 Number 15

<b>BASIC RESEARCH</b>	<p>1277 Correlation between structure and anti-gastric adenocarcinoma activity of <math>\beta</math>-D-glucan isolated from <i>Poria cocos</i> sclerotium <i>Li YQ, Hou XH, Wang YF, Zhang LN</i></p> <p>1284 Protective effects of edaravone against acute necrotizing pancreatitis in rats <i>Zhang YH, Tang GD, Xu ZY, Cai L</i></p> <p>1290 Analgesic mechanisms of <i>Fagopyrum cymosum</i> extracts in rats with irritable bowel syndrome <i>Liu LN, Sun ZG, Zhang XM, Zhou L, Tian C, Chen L, Shao M, Shi HL, Guo HY</i></p>
<b>CLINICAL RESEARCH</b>	<p>1296 Expression of HspB1 in esophageal cancer in Xinjiang Kazakh patients <i>Zhang JP, Li H, Li XM, Jiang XF, Li Y, Zhang QZ, Chen Y, Wang HJ, Pang ZL, Shen HM, Li HW</i></p> <p>1301 Clinical significance of expression of livin and cyclin D1 in chronic atrophic gastritis with intestinnal metaplasia <i>Chen J, Cui H, Gao ML, Cui Q</i></p>
<b>REVIEW</b>	<p>1307 Advances in understanding the pathogenesis of acute pancreatitis-associated acinar cell injury <i>Wu L, Cai BC</i></p> <p>1312 New advances in non-invasive assessment of intestinal epithelial barrier function <i>Zhou SP, Lu YK, Wang FY</i></p> <p>1318 Prevention and treatment of gastrointestinal complications following cardiac surgery with cardiopulmonary bypass <i>Qin CN, Hei FL</i></p>
<b>RAPID COMMUNICATION</b>	<p>1323 Overexpression of miR-451 inhibits cell proliferation and invasion and promotes apoptosis in human esophageal carcinoma cell line EC9706 <i>Leng H, Zang WQ, Wang T, Wang YY, Ma J, Zhao GQ</i></p> <p>1328 Protective effect of hydrogen-rich saline on alcohol-induced liver injury in rats <i>Qi HH, Song J, Chen YX</i></p> <p>1333 Effect of sargassum fusiforme polysaccharides on lipopolysaccharide-induced proliferation, activation, oxidative damage and apoptosis of rat hepatic stellate cells <i>Zhang XQ, Wu JM, Huang ZM, Wu JS, Fang HL</i></p> <p>1338 Significance of expression of Toll-like receptor 4 in the intestinal tract of pigs with acute necrotizing pancreatitis <i>Lin M, Chen WC, Xue LN, Xu KQ, Wang XY, Tan Y</i></p> <p>1342 Early treatment with mirtazapine improves food intake and nutritional status in a gemcitabine-induced mild cachexia mouse model with pancreatic cancer <i>Wu JH, Jia L, Jiang SM</i></p>
<b>CLINICAL PRACTICE</b>	<p>1346 Psychological nursing in patients during emergency gastroscopy: influence on patients' feelings of anxiety and stress <i>Li GY, Hu YH</i></p> <p>1350 Drug-induced liver injury in the perioperative period of cardiac surgery: An analysis of 12 cases <i>Wang HY, Wang W, Du ZZ, Li AG, Song JF</i></p> <p>1354 Stent placement combined with FOLFOX-4 regimen for primary liver cancer patients with inferior vena cava and right atrium tumor thrombus <i>Li SR, Wu N, Lin FH</i></p> <p>1359 Real-time quantitative PCR analysis of intestinal <i>Lactobacillus</i> species in type 2 diabetic patients <i>Liu TT, Cai DH</i></p>

	<p>1366 Clinical significance of expression of peroxisome proliferator-activated receptor <math>\gamma</math> coactivator 1<math>\alpha</math> in the inflamed mucosa of patients with inflammatory bowel disease <i>Chen TF, Wu RJ, Liu CQ, Liu ZJ</i></p> <p>1371 Overexpression of FAS and Ki-67 in aberrant crypt foci from patients with adenoma <i>Zhang W, Wang FJ, Qian JZ, Xu HM, Liu PF, Xu J</i></p>
<b>APPENDIX</b>	<p>1376 Instructions to authors of <i>World Chinese Journal of Digestology</i></p> <p>1381 Meeting events calendar in 2012</p>
<b>ACKNOWLEDGMENT</b>	<p>1382 Acknowledgments to reviewers of <i>World Chinese Journal of Digestology</i></p>
<b>COVER</b>	<p><i>Qi HH, Song J, Chen YX</i>. Protective effect of hydrogen-rich saline on alcohol-induced liver injury in rats. <i>Shijie Huaren Xiaohua Zazhi</i> 2012; 20(15): 1328-1332 <a href="http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1328.asp">http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1328.asp</a></p>
<b>RESPONSIBLE EDITORS FOR THIS ISSUE</b>	<p>Assistant Editor: <i>Yuan Zhou</i> Review Editor: <i>Jun-Liang Li, Shan-Shan Zhang</i> Electronic Page Editor: <i>Ya-Jing Lu</i> English Language Editor: <i>Tian-Qi Wang</i> Editor-in-Charge: <i>Shan-Shan Zhang</i> Proof Editor: <i>Jun-Liang Li</i> Layout Editor: <i>Lian-Sheng Ma</i></p>

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

## Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

**Founded** on January 15, 1993  
**Renamed** on January 25, 1998  
**Publication date** May 28, 2012

**NAME OF JOURNAL**  
*World Chinese Journal of Digestology*

**RESPONSIBLE INSTITUTION**  
Department of Science and Technology  
of Shanxi Province

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

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

**PRINTING**  
Beijing Kexin Printing House

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

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

## EDITOR-IN-CHIEF

**Ying-Sheng Cheng, Professor**, Medical Imaging Center, Shanghai Tenth People's Hospital, Tongji University, Shanghai 200072, China

**Shuang-Suo Dang, Professor**, Department of Infectious Diseases, the Second Affiliated Hospital of Medical School of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, Shaanxi Province, China

**Xue-Liang Jiang, Professor**, Department of Gastroenterology, General Hospital of Jinan Military Command of Chinese PLA, Jinan 250031, Shandong Province, China

**Lian-Xin Liu, Professor**, Department of General Surgery, the First Clinical Medical College of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China

**Zhan-Ju Liu, Professor**, Department of Gastroenterology, Shanghai Tenth People's Hospital, Tongji University, Shanghai 200072, China

**Bin Lv, Professor**, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310006, Zhejiang Province, China

**Da-Lie Ma, Professor**, Department of Pathology, Changhai Hospital, the Second Military Medical University of Chinese PLA, Shanghai 200433, China

**Xiao-Zhong Wang, Professor**, Department of Gastroenterology, Union Hospital, Fujian Medical University, Fuzhou 350001, Fujian Province, China

**Deng-Fu Yao, Professor**, Clinical Research Center, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China

**Zong-Ming Zhang, Professor**, Department of General Surgery, Digestive Medical Center, the First Affiliated Hospital, School of Medicine, Tsinghua University, Beijing 100016, China

## SCIENCE EDITORS

Director: Jun-Liang Li

## SUBSCRIPTION

RMB 68 Yuan for each issue  
RMB 2448 Yuan for one year

## CSSN

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)  
CN 14-1260/R

## COPYRIGHT

© 2012 Published by *World Chinese Journal of Digestology (WCJD)*. All rights reserved; no part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise without the prior permission of *WCJD*. Authors are required to grant *WCJD* an exclusive licence to publish.

## SPECIAL STATEMENT

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

## INSTRUCTIONS TO AUTHORS

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

**Copyright © 2012 by Editorial Department of *World Chinese Journal of Digestology***

# 化学修饰的茯苓 $\beta$ -D-葡聚糖结构与抗胃腺癌活性的关系

李云桥, 侯晓华, 王艺峰, 张俐娜

李云桥, 侯晓华, 华中科技大学同济医学院附属协和医院 湖北省武汉市 430022

王艺峰, 张俐娜, 武汉大学化学系 湖北省武汉市 430072

李云桥, 博士, 主治医师, 主要从事消化系统肿瘤的防治研究.

作者贡献分布: 此课题实验设计、实验操作及论文撰写由李云桥与王艺峰完成; 侯晓华与张俐娜参与实验指导和论文修改.

通讯作者: 侯晓华, 教授, 主任医师, 430022, 湖北省武汉市解放大道1277号, 华中科技大学同济医学院附属协和医院消化科. houxh@whuh.com

电话: 027-85726057

收稿日期: 2012-02-15 修回日期: 2012-03-28

接受日期: 2012-04-25 在线出版日期: 2012-05-28

## Correlation between structure and anti-gastric adenocarcinoma activity of $\beta$ -D-glucan isolated from *Poria cocos* sclerotium

Yun-Qiao Li, Xiao-Hua Hou, Yi-Feng Wang, Li-Na Zhang

Yun-Qiao Li, Xiao-Hua Hou, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China

Yi-Feng Wang, Li-Na Zhang, Department of Chemistry, Wuhan University, Wuhan 430072, Hubei Province, China

Correspondence to: Xiao-Hua Hou, Professor, Chief Physician, Department of Gastroenterology, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, 1277 Jiefang Road, Wuhan 430022, Hubei Province, China. houxh@whuh.com

Received: 2012-02-15 Revised: 2012-03-28

Accepted: 2012-04-25 Published online: 2012-05-28

## Abstract

**AIM:** To study the correlation between structure and anti-gastric adenocarcinoma activities of polysaccharides isolated from the sclerotium of *Poria cocos* and their derivatives.

**METHODS:** A water insoluble (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucan PCS3-II isolated from fresh sclerotium of *Poria cocos* was sulfated, carboxymethylated, methylated, hydroxyethylated or hydroxypropylated to prepare five water-soluble derivatives, coded as S-PCS3-II, C-PCS3-II, M-PCS3-II, HE-PCS3-II and HP-PCS3-II. Their weight-average molecular mass ( $M_w$ ), intrinsic viscosity ( $[\eta]$ ) and  $\langle s^2 \rangle_z^{1/2}$  were characterized by size exclusion chromatography (SEC) combined with laser

light scattering (LLS), LLS, and viscometry. The antitumor activities of PCS3-II and its derivatives were tested *in vitro* by MTT assay using gastric adenocarcinoma cell lines MKN-45, SGC-7901 and MKN-28.

**RESULTS:** The  $M_w$  values of the derivatives S-PCS3-II, C-PCS3-II, M-PCS3-II, HE-PCS3-II and HP-PCS3-II in PBS were determined to be  $3.8 \times 10^4$ ,  $18.9 \times 10^4$ ,  $16.0 \times 10^4$ ,  $76.8 \times 10^4$ , and  $224.3 \times 10^4$ , respectively. The native  $\beta$ -glucan did not show any anti-gastric adenocarcinoma activity, while the sulfated and carboxymethylated derivatives exhibited significant anti-gastric adenocarcinoma activity in MKN-45, SGC-7901 and MKN-28 cell lines.

**CONCLUSION:** The polysaccharides from fresh sclerotium of *Poria cocos* showed no anti-gastric adenocarcinoma activity *in vitro*. The introduction of carboxymethylated and sulfated groups to water insoluble polysaccharide PCS3-II increased their water-solubility, chain stiffness and anti-gastric adenocarcinoma activity. The sulfated derivatives showed obvious inhibitory effects on gastric adenocarcinoma cells.

**Key Words:** *Poria cocos* polysaccharide; Chemical structure; Molecular mass; Anti-gastric adenocarcinoma activity; MTT assay

Li YQ, Hou XH, Wang YF, Zhang LN. Correlation between structure and anti-gastric adenocarcinoma activity of  $\beta$ -D-glucan isolated from *Poria cocos* sclerotium. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(15): 1277-1283

## 摘要

**目的:** 探讨茯苓多糖及其衍生物的结构与抗胃腺癌活性之间的构效关系.

**方法:** 对从茯苓菌核中提取的(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-葡聚糖PCS3-II及其硫酸酯、羧甲基、羟乙基、羟丙基和甲基化衍生物, 用粘度法、激光光散射(LLS)及尺寸排除色谱和光散射仪联用(SEC-LLS)表征了他们在磷酸缓冲液(PBS)中37℃下的 $[\eta]$ 、 $M_w$ 及 $\langle s^2 \rangle_z^{1/2}$ 等分子参数. 然后用MTT法研究了PCS3-II和几种衍生物

## ■背景资料

茯苓(*Poria cocos*)是具有抗肿瘤作用的传统中药, 但是从茯苓菌核中提取的主要成分是一种(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-葡聚糖PCS3-II, 他不溶于水且基本上无抗胃腺癌活性, 因此通过化学改性方法对其进行结构修饰而提高水溶性和活性的工作具有重要意义.

## ■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



## ■研究前沿

临床已经应用多糖辅助治疗肿瘤患者,但通过化学修饰提高茯苓多糖抗肿瘤活性研究报道不多。

对不同分化程度的胃腺癌细胞株MKN-45、SGC-7901和MKN-28生长的抑制作用。

**结果:** S-PCS3-II、C-PCS3-II、M-PCS3-II、HE-PCS3-II和HP-PCS3-II衍生物在PBS溶液中 $M_w$ 值分别为 $3.8 \times 10^4$ 、 $18.9 \times 10^4$ 、 $16.0 \times 10^4$ 、 $76.8 \times 10^4$ 和 $224.3 \times 10^4$ ,未改性 $\beta$ -葡聚糖PCS3-II几乎无抗胃腺癌活性,而他的硫酸酯和羧甲基衍生物对细胞株MKN-45、SGC-7901和MKN-28却显示较高的抑制率。

**结论:** 天然茯苓菌核多糖体外没有抗胃腺癌活性;水不溶性多糖PCS3-II链上引入羧甲基和硫酸酯基后,其衍生物溶于水,且链刚性增大,同时其抗胃腺癌活性增强;良好的水溶性、较高的链刚性和适当大的分子量有利于茯苓多糖抗胃腺癌活性的提高。

**关键词:** 茯苓多糖; 化学结构; 分子量; 抗胃腺癌活性; MTT法

李云桥, 侯晓华, 王艺峰, 张俐娜. 化学修饰的茯苓 $\beta$ -D-葡聚糖结构与抗胃腺癌活性的关系. 世界华人消化杂志 2012; 20(15): 1277-1283

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1277.asp>

## 0 引言

多糖类物质所具有的生物活性,使其在功能性保健食品和天然新药等领域表现出极为重要的商业价值,近年来日益引起了人们的广泛关注<sup>[1-3]</sup>.大量药理研究表明,一些天然多糖具有显著抗肿瘤<sup>[4-6]</sup>及增强机体免疫活性<sup>[7-9]</sup>,而有些天然多糖几乎不具有生物活性<sup>[10]</sup>,特别是水不溶性的多糖,他们的基本活性或活性很低.此外,一些经硫酸酯化、羧甲基化改性的 $\alpha$ -D-葡聚糖和 $\beta$ -D-葡聚糖除具有了良好水溶性,且抗Sarcoma 180实体瘤活性也显著提高<sup>[11-14]</sup>.因此,化学改性已成为提高天然多糖生物活性的有效手段<sup>[15]</sup>.研究表明,引入合适的离子基团能够显著改善水溶性,同时通过改变多糖在水溶液中的链构象提高其活性<sup>[16,17]</sup>.而不同的取代基团、取代位置和取代度对多糖衍生物的活性有重要影响<sup>[18,19]</sup>.茯苓(*Poria cocos*)一直是最重要的传统中药之一,他所具有的保健功能和生理活性已引起医学界和化学界的广泛兴趣<sup>[20,21]</sup>.但是,从茯苓菌核中提取主要成分是一种(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-葡聚糖PCS3-II,他不溶于水且基本上无抗胃腺癌活性,因此通过化学改性方法对其进行结构修饰而提高水溶性和活性的工作具有重要意义<sup>[22-24]</sup>.

为了改善PCS3-II水溶性和生物活性,我们分别试用硫酸酯化(Sulfation)、羧甲基化(Carboxymethylation)、羟乙基化(Hydroxyethylation)、羟丙基化(Hydroxypropylation)及甲基化(Methylation)5种衍生化方法对其进行化学改性来探讨其衍生物和抗胃腺癌活性之间的关系.探讨不同的取代基团、取代度、水溶性、分子量和链构象与抗胃腺癌活性的关系.此外,尽管有关于多糖抗消化系肿瘤(胃癌、肝癌、食管癌)患者的报道<sup>[25-28]</sup>,但对于茯苓多糖尚未进行过此类研究,因此本研究还对茯苓多糖抗胃腺癌细胞株活性进行了探讨。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 样品由武汉大学化学系张俐娜院士课题组提供,样品的制备方法见文献[29,30].本研究样品包括从新鲜茯苓菌核的0.5 mol/L NaOH提取物(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-葡聚糖PCS3-II以及以PCS3-II为原料制备的硫酸酯化S-PCS3-II、羧甲基化C-PCS3-II、羟乙基化HE-PCS3-II、羟丙基化HP-PCS3-II及甲基化M-PCS3-II 5种多糖衍生物.成分组用红外光谱谱图测定;分子量由激光光散射法、粘度法、尺寸排除色谱和光散射仪联用法测定. MTT购自Sigma公司, RPMI 1640培养基购自武汉亚法生物公司;小牛血清购自北京中山生物技术有限公司;低分化胃腺癌细胞株MKN-45、中分化胃腺癌细胞株SGC7901、高分化胃腺癌细胞株MKN-28由协和医院中心实验室提供。

### 1.2 方法

**1.2.1 粘度测量:** 多糖衍生物的特性粘数 $[\eta]$ 用乌氏粘度计于37 $\pm$ 0.1 $^{\circ}$ C测量.样品溶剂为磷酸缓冲液PBS或无水Me<sub>2</sub>SO.用Huggins和Kraemer方程来计算特性粘数 $[\eta]$ .

$$\eta_{sp}/c = [\eta] + k'[\eta]^2c$$
$$(\ln \eta_r)/c = [\eta] - k''[\eta]^2c$$

**1.2.2 激光光散射(size exclusion chromatography, SEC):** 5种多糖衍生物在PBS溶液或无水Me<sub>2</sub>SO的光散射强度测试,采用配备有He-Ne激光源(激光波长 $\lambda = 633$  nm)的多角度激光光散射仪(DAWN<sup>®</sup>DSP, Wyatt Technology Co., USA),在37 $^{\circ}$ C下检测不同角度的散射光信号.所有的溶液和溶剂在测量前经光学纯化后直接注入散射池中进行测量. Astra软件用于数据采集和分析,重均分子量 $M_w$ 通过Zimm拟合法得到。

**1.2.3 尺寸排除色谱和光散射仪联用(size exclusion**

表 1 茯苓 $\beta$ -葡聚糖PCS3-II和5种衍生物的取代度以及在水和二甲基亚砜里的溶解度

样品	衍生化法	溶解度 <sup>1</sup>		取代度			
		水	二甲亚砜	C-6	C-4	C-2	取代度总和
PCS3-II	没有取代	-	+	没有取代	没有取代	没有取代	没有取代
S-PCS3-II	硫酸酯化	++	-	0.44	0.24	0.34	1.02
C-PCS3-II	羧甲基化	++	-	0.71	0.35	0.21	1.27
M-PCS3-II	甲基化	++	+	0.33	0.21	0.15	0.69
HE-PCS3-II	羟乙基化	+	+	0.25	0.24	*	0.49
HP-PCS3-II	羟丙基化	+	+	0.23	*	*	0.23

<sup>1</sup>裸眼目测; ++: 较好溶解; +: 可溶解; -: 不能溶解.

chromatography combined with laser light scattering, SEC-LLS): 尺寸排除色谱和光散射仪联用装置的光散射仪为上述DAWN<sup>®</sup>DSP多角度激光光散射仪, 尺寸排除色谱装置使用P100型泵和RI-150示差折光检测器. 色谱柱类型: 水体系为TSK-GEL PWXL G5000和G3000联用色谱柱, Me<sub>2</sub>SO体系为G4000-H6色谱柱. 测试温度为37℃, 流动相为PBS溶液或无水Me<sub>2</sub>SO, 在测量前经光学纯化处理, 进样量200  $\mu$ L, 流速1.0 cm<sup>3</sup>/min. Astra软件用于数据采集和分析.

1.2.4 细胞培养和抗肿瘤活性试验方法: (1)细胞复苏: 在液氮罐中取出冻存的不同分化程度的胃腺癌细胞株(MKN-45、SGC7901、MKN-28), 37℃水浴融化, 离心, 2 500 g $\times$ 5 min. 去上清, RPMI 1640培养液洗1次, 接种于25 mL的培养瓶中, 加8 mL含100 mL/L胎牛血清的RPMI 1640培养液, 37℃, 50 mL/L CO<sub>2</sub>培养, 次日换培养液1次; (2)细胞传代: 在显微镜下观察细胞生长情况, 如生长正常(细胞清亮、椭圆形、上清不浑浊)且基本长满瓶底时即可传代, 2-3 d传1次; (3)抗肿瘤活性试验: 体外抑瘤实验: 采用MTT法, 取对数生长期细胞, 用胰蛋白酶消化制成单细胞悬液, 调整细胞浓度为 $1\times 10^5$  cells/mL, 以每孔200  $\mu$ L( $5\times 10^3$ )接种于96孔培养板上培养24 h. 之后弃去原培养液, 再分别每孔加入新鲜培养液和多糖试样使其浓度分别为0.005、0.05、0.5、5 g/L 4组处理胃腺癌细胞和正常的胃腺细胞; 实验同时设空白(溶媒)对照组和阳性对照组(5-Fu), 每组处理设5个复孔. 放在37℃、50 mL/L CO<sub>2</sub>培养箱培养72 h, 收集各组细胞, 每孔加入终浓度为5 g/L的MTT液20  $\mu$ L, 继续培养4 h; 终止培养, 吸去上清液, 加二甲基亚砜150  $\mu$ L/孔, 充分震荡10 min后, 用酶标仪(Bio-Tek EX-800, USA)在570 nm波长比色测定每孔吸光

度(A)值. 按以下公式计算细胞抑制率: 细胞抑制率(%) = (1-实验组A值/对照组A值) $\times$ 100%, 每组实验数据重复3次.

统计学处理 数据用mean $\pm$ SD表示, 采用SPSS19.0统计软件分析. 多组之间用方差(one-way ANOVA)分析, 两组之间用t检验. 若 $P<0.05$ , 则差异有显著性意义; 若 $P<0.01$ , 则差异有极显著性意义; 若 $P>0.05$ , 则差异无显著性意义.

## 2 结果

2.1 化学结构 样品S-PCS3-II、C-PCS3-II和M-PCS3-II的取代主要发生在C-6位羟基, 其次在C-4和C-2位; 而HE-PCS3-II的取代发生在C-6和C-4位, HP-PCS3-II几乎全部在C-6位, 他们都属于非选择性取代. 5种衍生多糖取代度大小和取代难易程度的顺序为C-PCS3-II>S-PCS3-II>M-PCS3-II>HE-PCS3-II>HP-PCS3-II. 由<sup>13</sup>C NMR得到他们的取代度在0.23-1.27之间. 5种衍生物在水或二甲亚砜中的溶解情况显示, 所有衍生物都具有比原多糖PCS3-II更好的水溶性, 其水溶性大小顺序依次为S-PCS3-II>C-PCS3-II>M-PCS3-II>HE-PCS3-II>HP-PCS3-II, 与取代度顺序相似(表1). PCS3-II不溶于水, 是因为他存在强的分子间氢键而导致分子在水溶液中形成聚集. 无水Me<sub>2</sub>SO被证明是该 $\beta$ -葡聚糖的良溶剂, 他能打断分子间和分子内氢键, 将聚集体解离为单股链. 因此本实验中, 对水溶液中易聚集样品的分子量和粘度测量可用无水Me<sub>2</sub>SO作溶剂.

2.2 分子量和粘度S-PCS3-II、C-PCS3-II和M-PCS3-II 3样品在PBS溶液中37℃下的SEC-LLS谱图示于图1, 这3种衍生物的示差和光散射检测都只显示出单峰, 表明他们在水溶液中无聚集体形成<sup>[31]</sup>. 图2及图3显示出了样品HE-PCS3-II和HP-PCS3-II分别在PBS溶液及无水Me<sub>2</sub>SO中37℃下的SEC-LLS谱图, 这2种衍生

### ■创新盘点

本文用硫酸酯化、羧甲基化、羟乙基化、羟丙基化及甲基化5种衍生化方法对茯苓多糖进行化学改性来探讨其衍生物和抗不同分化程度的胃腺癌细胞株活性之间的关系.

### ■应用要点

天然茯苓菌核多糖体外没有抗胃腺癌活性, 水不溶性。茯苓多糖链上引入羧甲基和硫酸酯基后, 其衍生物溶于水, 且链刚性增大, 同时其抗胃腺癌活性增强。

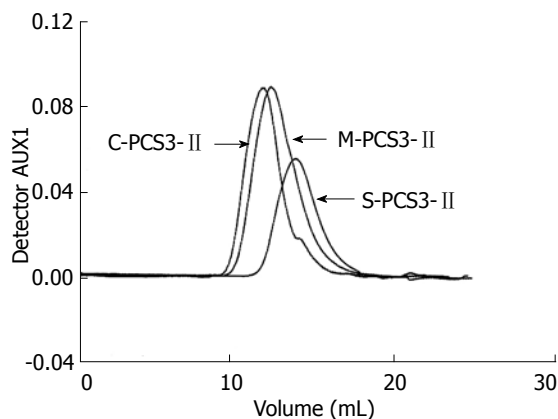


图1 S-PCS3-II、C-PCS3-II和M-PCS3-II在PBS溶液中37 °C下的SEC-LLS谱图。

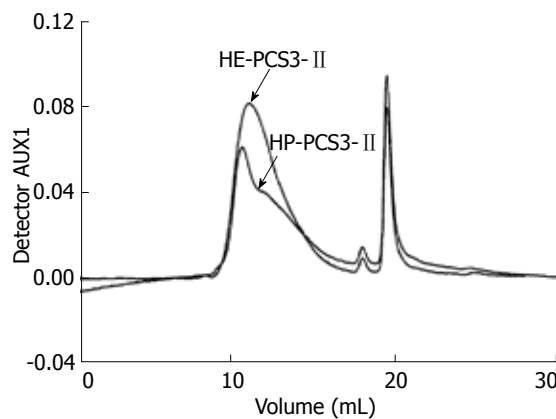


图2 HE-PCS3-II、HP-PCS3-II在PBS溶液中37 °C下的SEC-LLS谱图。

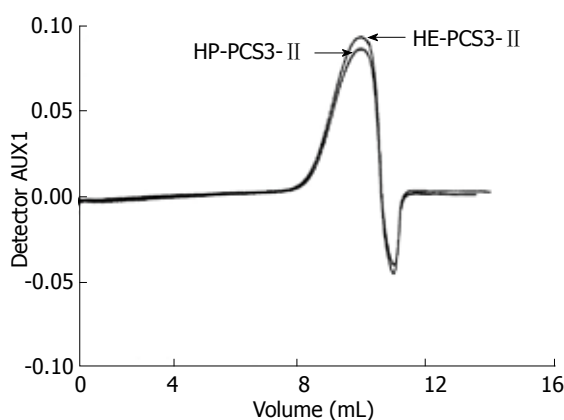


图3 HE-PCS3-II、HP-PCS3-II在无水 $\text{Me}_2\text{SO}$ 溶液中37 °C下的SEC-LLS谱图。

物样品在PBS溶液则显示出2个以上的峰, 而在 $\text{Me}_2\text{SO}$ 中只显示单峰, 说明他们在水溶液中存在聚集, 而在 $\text{Me}_2\text{SO}$ 解离为单股链。通过粘度法、LLS和SEC-LLS测得的各样品在PBS溶液或 $\text{Me}_2\text{SO}$ 中的特性粘数 $[\eta]$ 、 $M_w$ 、 $\langle s^2 \rangle^{1/2}$ 和多分散系数( $M_w/M_n$ )见表2。结果发现S-PCS3-II、C-PCS3-II和M-PCS3-II 3样品由LLS测得的 $M_w$ 值与SEC-LLS测得的结果基本一致, 与PCS3-II的 $M_w$ 值( $12.3 \times 10^4$ )相比, 硫酸酯衍生物S-PCS3-II的 $M_w$ 较低, 这是因为剧烈的反应条件导致了原多糖的降解。然而, C-PCS3-II和M-PCS3-II 2样品的 $M_w$ 值却比PCS3-II的更高, 这是因为在PCS3-II糖环羟基上引入了羧甲基和甲基基团, 且他们的降解较弱。有趣的是, HE-PCS3-II和HP-PCS3-II 2样品在PBS溶液中的 $M_w$ 值比其他样品高很多, 这是由于他们的取代度较低(0.2-0.5), 大量的-OH基团仍保留在衍生物糖环上, 导致在水溶液中分子间的聚集效应, 多糖在水溶液中的聚集行为也常给他们的分子量测量带来了不确定性, 因而2样品在无水 $\text{Me}_2\text{SO}$ 中测

得的 $M_w$ 值被认为是他们的真实分子量。

2.3 链构象 聚合物的 $[\eta]$ 和 $\langle s^2 \rangle^{1/2}$ 值通常反映出聚合物链刚性的情况, 相对高的 $[\eta]$ 和 $\langle s^2 \rangle^{1/2}$ 值反映出聚合物具有相对伸展的链构象。从表2中的数据可以看出, 样品C-PCS3-II在PBS溶液中具有比HE-PCS3-II和HP-PCS3-II更伸展的链构象。S-PCS3-II的 $M_w$ 值在5种衍生物样品中是最低的, 但是他的 $\langle s^2 \rangle^{1/2}$ 值却几乎与M-PCS3-II和C-PCS3-II 2样品的相等, 这说明S-PCS3-II在水溶液中表现为比其他样品更为伸展的链构象, 即具有更高的链刚性。

2.4 抗肿瘤活性 5-氟尿嘧啶(5-Fu)、PCS3-II和5种衍生物样品抗胃腺癌肿瘤细胞株MKN-45、SGC-7901、MKN-28的活性结果见图4-6。PCS3-II和5种衍生物样品对正常胃腺细胞无抑制作用。多糖PCS3-II几乎未观察到抗肿瘤活性, 说明他对胃腺癌细胞株增殖无抑制作用。然而5种样品均显示出比PCS3-II更高的抑制率, 而S-PCS3-II和C-PCS3-II 2样品在所有实验浓度都具有显著增强的抑制率, 特别是S-PCS3-II在5 g/L浓度时显示出所有样品中最高的抑制率(对MKN-45的抑制率为48.9%, 对SGC-7901抑制率为36.7%, MKN-28的抑制率为43.7%)。此外, S-PCS3-II和C-PCS3-II在所有实验浓度范围内都观察到抑制率的剂量依赖关系, 这说明他们对人体胃癌细胞株具有十分稳定的药效。

### 3 讨论

从以上体外抗胃腺癌实验结果可发现, 化学改性能显著提高茯苓菌核水不溶性 $\beta$ -D-葡聚糖的抗胃腺癌活性, 并且对正常胃腺细胞没有抑制作用。总的来说, 硫酸酯和羧甲基衍生化改性具有比其他几种衍生化更高的抗胃腺癌活性。5种

表 2 PCS3-Ⅱ和5种衍生物在PBS溶液及Me<sub>2</sub>SO中37℃下的LLS和SEC-LLS检测的实验数据表

样品	溶媒	$[\eta]$ (cm <sup>3</sup> /g)	$\langle s^2 \rangle^{1/2}$ (nm)	LLS	SEC-LLS	
				$M_w \times 10^{-4}$ (g/mol)	$M_w \times 10^{-4}$ (g/mol)	$M_w/M_n$
PCS3-Ⅱ	Me <sub>2</sub> SO	76.3	56.4 <sup>1</sup>	12.3	14.0	1.7
S-PCS3-Ⅱ	PBS	20.2	44.2 <sup>2</sup>	3.8	3.5	1.6
C-PCS3-Ⅱ	PBS	167.1	45.0 <sup>1</sup>	18.9	25.1	1.7
M-PCS3-Ⅱ	PBS	132.2	42.4 <sup>1</sup>	16.0	21.1	2.0
HE-PCS3-Ⅱ	PBS	122.5	39.9 <sup>2</sup>	76.8	62.8	18.0
HP-PCS3-Ⅱ	Me <sub>2</sub> SO	146.2	23.9 <sup>2</sup>	—	20.1	1.7
	PBS	156.5	48.3 <sup>2</sup>	224.3	297.0	2.3
	Me <sub>2</sub> SO	162.3	29.9 <sup>2</sup>	—	19.1	1.6

—: 数据没有测; <sup>1</sup>由LLS检测的实验数据; <sup>2</sup>由SEC-LLS检测的实验数据。

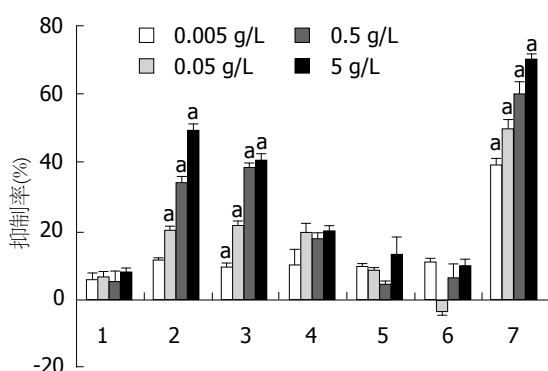


图 4 PCS3-Ⅱ和5种衍生物在体外不同浓度下对胃癌细胞株MKN-45的抑制率。1: PCS3-Ⅱ; 2: S-PCS3-Ⅱ; 3: C-PCS3-Ⅱ; 4: M-PCS3-Ⅱ; 5: HE-PCS3-Ⅱ; 6: HP-PCS3-Ⅱ; 7: 5-Fu; <sup>a</sup> $P < 0.05$  vs PCS3-Ⅱ。

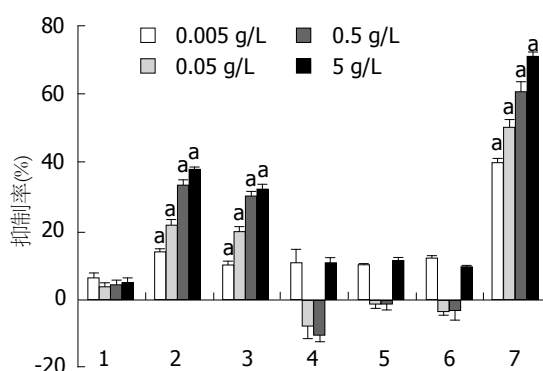


图 5 PCS3-Ⅱ和5种衍生物在体外不同浓度下对胃癌细胞株SGC-7901的抑制率。1: PCS3-Ⅱ; 2: S-PCS3-Ⅱ; 3: C-PCS3-Ⅱ; 4: M-PCS3-Ⅱ; 5: HE-PCS3-Ⅱ; 6: HP-PCS3-Ⅱ; 7: 5-Fu; <sup>a</sup> $P < 0.05$  vs PCS3-Ⅱ。

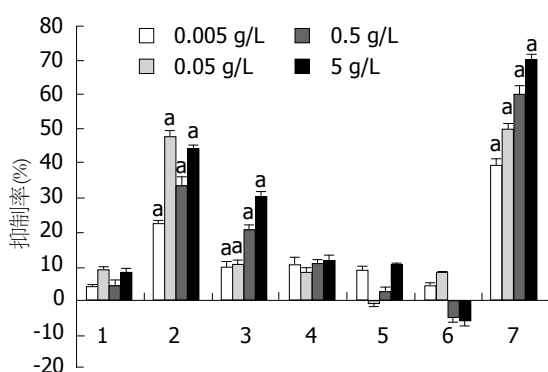


图 6 PCS3-Ⅱ和5种衍生物在体外不同浓度下对胃癌细胞株MKN-28的抑制率。1: PCS3-Ⅱ; 2: S-PCS3-Ⅱ; 3: C-PCS3-Ⅱ; 4: M-PCS3-Ⅱ; 5: HE-PCS3-Ⅱ; 6: HP-PCS3-Ⅱ; 7: 5-Fu; <sup>a</sup> $P < 0.05$  vs PCS3-Ⅱ。

衍生物样品的抗胃腺癌活性高低顺序与其水溶性大小顺序基本一致; 而原始 $\beta$ -D-葡聚糖不溶于水, 他也几乎不具抗胃腺癌活性; 因此, 提高多糖样品水溶性是提高其抗胃腺癌活性的关键因素。此外, 具有相对较高取代度的衍生物, 因为其水溶性较好, 因而抗胃腺癌活性也更高。

值得一提的是, S-PCS3-Ⅱ和C-PCS3-Ⅱ2样品在水溶液中的链刚性相对较高, 而他们的体外抗胃腺癌抑制率也比M-PCS3-Ⅱ、HE-PCS3-Ⅱ和HP-PCS3-Ⅱ更高; 虽然S-PCS3-Ⅱ和C-PCS3-Ⅱ的水溶性相差不大, 但S-PCS3-Ⅱ的抗胃腺癌抑制率总体上又比C-PCS3-Ⅱ高, 这与S-PCS3-Ⅱ样品在水溶液中具有比C-PCS3-Ⅱ更大的链刚性有关。Unursaikhan等<sup>[14]</sup>报道硫酸酯化香菇(lentinus edodes)多糖在水溶液中的链刚性对其抗艾氏腹水瘤(ehrlich ascites carcinoma)抑制率的影响具有不可忽视的作用。因此, S-PCS3-Ⅱ样品所具有的相对高的链刚性有助于提高他的抗胃腺癌活性。此外, HE-PCS3-Ⅱ和HP-PCS3-Ⅱ2样品在水溶液中的 $M_w$ 值比其他样品高, 而他们的抗胃腺癌活性却较低, 这也显示了分子量对这些样品抗胃腺癌活性的影响, 在水溶液中具有适中的分子量( $\leq 3 \times 10^5$ )的衍生物能够明显提高原始多糖抗胃腺癌活性。

总之, 根据实验结果我们可以知道茯苓菌

#### ■名词解释

化学修饰: 保持药物的基本结构, 仅在某些功能基上作一定的化学结构改变, 接上一些自己需要的功能基团。



# 同行评价

本文探讨了茯苓多糖及其衍生物的结构与抗胃腺癌活性之间的构效关系,具有一定的开发意义。

核中提取的(1→3)- $\beta$ -D-葡聚糖样品PCS3-II的硫酸酯、羧甲基、羟乙基、羟丙基及甲基化衍生物在PBS溶液中的 $M_w$ 值分别为 $3.8 \times 10^4$ 、 $18.9 \times 10^4$ 、 $16.0 \times 10^4$ 、 $76.8 \times 10^4$ 和 $224.3 \times 10^4$ 。几种衍生样品证明引入取代基团后样品的结构发生了变化,有序程度有所提高。未经过化学改性的 $\beta$ -葡聚糖几乎无任何体外抗胃腺癌活性,然而他的衍生物却具有较好的水溶性,在水溶液中具有相对伸展的柔顺链构象和明显的抗胃腺癌活性。此外,他的硫酸酯和羧甲基衍生物十分显著地改善了原多糖对人体胃癌细胞株的体外抗胃腺癌活性。从分子参数和抗胃腺癌活性的实验数据可以发现,具有良好水溶性,在水溶液中具有相对较高链刚性和适中分子量( $\leq 3 \times 10^5$ )的衍生物能够明显地提高原始多糖的抗胃腺癌活性。而且其活性的高低与引入的不同取代离子基团、取代度、取代位、水溶性、分子量和链的构象有关。

## 参考文献

- Li XT, Zhang YK, Kuang HX, Jin FX, Liu DW, Gao MB, Liu Z, Xin XJ. Mitochondrial Protection and Anti-aging Activity of Astragalus Polysaccharides and Their Potential Mechanism. *Int J Mol Sci* 2012; 13: 1747-1761
- Joseph MM, Aravind SR, Varghese S, Mini S, Sreelekha TT. Evaluation of antioxidant, antitumor and immunomodulatory properties of polysaccharide isolated from fruit rind of Punica granatum. *Mol Med Report* 2012; 5: 489-496
- Melo-Silveira RF, Fidelis GP, Costa MS, Telles CB, Dantas-Santos N, de Oliveira Elias S, Ribeiro VB, Barth AL, Macedo AJ, Leite EL, Rocha HA. In vitro antioxidant, anticoagulant and antimicrobial activity and in inhibition of cancer cell proliferation by xylan extracted from corn cobs. *Int J Mol Sci* 2012; 13: 409-426
- Tang YL, Luo Q, Ding W, Ding X, Yang ZR. [Antitumor activity of polysaccharides extracted from two wild amanitas]. *Sichuan Daxue Xuebao Yixueban* 2011; 42: 792-796
- Liu Y, Li Y, Yang W, Zhang L, Cao G. Anti-hepatoma activity in mice of a polysaccharide from the rhizome of Anemone raddeana. *Int J Biol Macromol* 2012; 50: 632-636
- Jeong SC, Koyyalamudi SR, Jeong YT, Song CH, Pang G. Macrophage immunomodulating and antitumor activities of polysaccharides isolated from Agaricus bisporus white button mushrooms. *J Med Food* 2012; 15: 58-65
- Skyberg JA, Rollins MF, Holderness JS, Marlenee NL, Schepetkin IA, Goodyear A, Dow SW, Jutila MA, Pascual DW. Nasal Acai polysaccharides potentiate innate immunity to protect against pulmonary Francisella tularensis and Burkholderia pseudomallei Infections. *PLoS Pathog* 2012; 8: e1002587
- Fontaine T, Delangle A, Simenel C, Coddeville B, van Vliet SJ, van Kooyk Y, Bozza S, Moretti S, Schwarz F, Trichot C, Aebi M, Delepierre M, Elbim C, Romani L, Latgé JP. Galactosaminogalactan, a new immunosuppressive polysaccharide of Aspergillus fumigatus. *PLoS Pathog* 2011; 7: e1002372
- Xu X, Pan C, Zhang L, Ashida H. Immunomodulatory beta-glucan from Lentinus edodes activates mitogen-activated protein kinases and nuclear factor-kappaB in murine RAW 264.7 macrophages. *J Biol Chem* 2011; 286: 31194-31198
- Kulkarni RV, Mutalik S, Mangond BS, Nayak UY. Novel interpenetrated polymer network microbeads of natural polysaccharides for modified release of water soluble drug: in-vitro and in-vivo evaluation. *J Pharm Pharmacol* 2012; 64: 530-540
- Chen X, Zhang L, Cheung PC. Immunopotential and anti-tumor activity of carboxymethylated-sulfated beta-(1→3)-d-glucan from Poria cocos. *Int Immunopharmacol* 2010; 10: 398-405
- Wang J, Zhang L, Yu Y, Cheung PC. Enhancement of antitumor activities in sulfated and carboxymethylated polysaccharides of Ganoderma lucidum. *J Agric Food Chem* 2009; 57: 10565-10572
- Wang X, Zhang L. Physicochemical properties and antitumor activities for sulfated derivatives of lentinan. *Carbohydr Res* 2009; 344: 2209-2216
- Unursaikhan S, Xu X, Zeng F, Zhang L. Antitumor activities of O-sulfonated derivatives of (1→3)-alpha-D-glucan from different Lentinus edodes. *Biosci Biotechnol Biochem* 2006; 70: 38-46
- Tao Y, Zhang Y, Zhang L. Chemical modification and antitumor activities of two polysaccharide-protein complexes from Pleurotus tuber-regium. *Int J Biol Macromol* 2009; 45: 109-115
- Kawashima T, Murakami K, Nishimura I, Nakano T, Obata A. A sulfated polysaccharide, fucoidan, enhances the immunomodulatory effects of lactic acid bacteria. *Int J Mol Med* 2012; 29: 447-453
- Vishchuk OS, Ermakova SP, Zvyagintseva TN. Sulfated polysaccharides from brown seaweeds Saccharina japonica and Undaria pinnatifida: isolation, structural characteristics, and antitumor activity. *Carbohydr Res* 2011; 346: 2769-2776
- You R, Wang K, Liu J, Liu M, Luo L, Zhang Y. A comparison study between different molecular weight polysaccharides derived from Lentinus edodes and their antioxidant activities in vivo. *Pharm Biol* 2011; 49: 1298-1305
- Gao Y, Li C, Yin J, Shen J, Wang H, Wu Y, Jin H. Fucoidan, a sulfated polysaccharide from brown algae, improves cognitive impairment induced by infusion of A $\beta$  peptide in rats. *Environ Toxicol Pharmacol* 2012; 33: 304-311
- Jang TR, Kao MF, Chen CH, Hsieh KC, Lai WY, Chen YY. Alleviating effects of dehydration under no hyperthermia on the immunomodulatory response to the polysaccharide fraction from fu-ling (Poria cocos) in male collegiate wrestlers. *Chin Med J (Engl)* 2011; 124: 530-536
- Ríos JL. Chemical constituents and pharmacological properties of Poria cocos. *Planta Med* 2011; 77: 681-691
- Wang Y, Xu W, Chen Y. Surface modification on polyurethanes by using bioactive carboxymethylated fungal glucan from Poria cocos. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2010; 81: 629-633
- Huang Q, Zhang L. Solution properties of (1→3)-alpha-D-glucan and its sulfated derivative from Poria cocos mycelia via fermentation tank. *Biopolymers* 2005; 79: 28-38

- 24 Wang Y, Yu Y, Mao J. Carboxymethylated beta-glucan derived from *Poria cocos* with biological activities. *J Agric Food Chem* 2009; 57: 10913-10915
- 25 伍海鹰, 陈一明, 林龙, 林友刚, 邱庆安, 刘宁. 体外香菇多糖对顺铂抑制胃癌细胞增殖的促进作用. *世界华人消化杂志* 2011; 19: 344-348
- 26 Ina K, Furuta R, Kataoka T, Kayukawa S, Yoshida T, Miwa T, Yamamura Y, Takeuchi Y. Lentinan prolonged survival in patients with gastric cancer receiving S-1-based chemotherapy. *World J Clin Oncol* 2011; 2: 339-343
- 27 刘芳, 刘靛雯, 蔡云, 王丽娟, 耿越. 马尾松花粉多糖硫酸酯对肝癌HepG2细胞的诱导分化. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 2990-2995
- 28 Wang JL, Bi Z, Zou JW, Gu XM. Combination therapy with lentinan improves outcomes in patients with esophageal carcinoma. *Mol Med Report* 2012; 5: 745-748
- 29 张俐娜, 王艺峰, 侯晓华, 李云桥. 抗肿瘤活性茯苓菌核葡聚糖硫酸酯及其制备方法和用途. 中国专利 200410013243. 2005-02-23
- 30 Wang Y, Zhang M, Ruan D, Shashkov AS, Kilcoyne M, Savage AV, Zhang L. Chemical components and molecular mass of six polysaccharides isolated from the sclerotium of *Poria cocos*. *Carbohydr Res* 2004; 339: 327-334
- 31 Huang Z, Ren H, Duan X, Zhang L. Chain conformation and bioactivity of water-soluble polysaccharide extracted from *Rhizoma Panacis Japonici*. *Biopolymers* 2010; 93: 383-390

编辑 张姗姗 电编 鲁亚静

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2012年版权归世界华人消化杂志

## • 消息 •

### 《世界华人消化杂志》参考文献要求

**本刊讯** 本刊采用“顺序编码制”的著录方法,即以文中出现顺序用阿拉伯数字编号排序.提倡对国内同行近年已发表的相关研究论文给予充分的反映,并在文内引用处右上角加方括号注明角码.文中如列作者姓名,则需在“Pang等”的右上角注角码号;若正文中仅引用某文献中的论述,则在该论述的句末右上角注角码号.如马连生<sup>[1]</sup>报告……,潘伯荣等<sup>[2-5]</sup>认为……;PCR方法敏感性高<sup>[6-7]</sup>.文献序号作正文叙述时,用与正文同号的数字并排,如本实验方法见文献[8].所参考文献必须以近2-3年SCIE, PubMed,《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊为准,通常应只引用与其观点或数据密切相关的国内外期刊中的最新文献,包括世界华人消化杂志(<http://www.wjgnet.com/1009-3079/index.jsp>)和*World Journal of Gastroenterology*(<http://www.wjgnet.com/1007-9327/index.jsp>).期刊:序号,作者(列出全体作者).文题,刊名,年,卷,起页-止页, PMID编号;书籍:序号,作者(列出全部),书名,卷次,版次,出版地,出版社,年,起页-止页.

# 依达拉奉对大鼠急性坏死性胰腺炎的保护作用

张瑜红, 唐国都, 许志毅, 蔡莉

## ■背景资料

氧化应激时产生大量的自由基可导致脂质、蛋白质和核酸过氧化, 细胞膜受损, 造成胰腺细胞的损伤, 是急性坏死性胰腺炎(SAP)发病的重要机制之一。这些提示清除胰腺炎时过量产生的氧自由基以及提高机体抗氧自由基能力可以减轻胰腺组织损伤, 改善病情。

张瑜红, 唐国都, 许志毅, 蔡莉, 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

张瑜红, 主治医师, 在读博士, 主要从事消化系统疾病研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 81060043

广西壮族自治区卫生厅重点课题基金资助项目, No. 重200918

作者贡献分布: 张瑜红与唐国都对此文所做贡献均等; 此课题由张瑜红与唐国都设计; 实验研究过程与数据分析由张瑜红、蔡莉及许志毅完成; 本论文写作由张瑜红完成。

通讯作者: 唐国都, 教授, 主任医师, 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

收稿日期: 2012-02-27 修回日期: 2012-04-30

接受日期: 2012-05-10 在线出版日期: 2012-05-28

## Protective effects of edaravone against acute necrotizing pancreatitis in rats

Yu-Hong Zhang, Guo-Du Tang, Zhi-Yi Xu, Li Cai

Yu-Hong Zhang, Guo-Du Tang, Zhi-Yi Xu, Li Cai, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Supported by: National Natural Science Foundation, No. 81060043; the Key Project of Guangxi Health Department, No. Zhong 200918

Correspondence to: Guo-Du Tang, Professor, 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: 2012-02-27 Revised: 2012-04-30

Accepted: 2012-05-10 Published online: 2012-05-28

## Abstract

**AIM:** To investigate whether edaravone has protective effects against acute necrotizing pancreatitis (ANP) in rats and to explore the possible mechanisms involved.

**METHODS:** Ninety male Sprague-Dawley rats were randomly and equally divided into sham operation group, ANP group and edaravone treatment group (EDA group). ANP was induced in rats of the ANP and EDA groups by retrograde injection of 1.5% deoxycholate. The EDA group was injected with edaravone (6 mg/kg) via the tail vein immediately after ANP induction. The rats were sacrificed 6, 12, and 24 h after the operation. Pathological changes

in the pancreas were observed and graded. Serum levels of amylase, tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), endothelin-1 (ET-1) and soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1), as well as malonic dialdehyde (MDA) content and superoxide dismutase (T-SOD) activity in pancreatic tissue were measured.

**RESULTS:** Compared to the sham operation group, pancreatic pathological scores, serum levels of amylase, TNF- $\alpha$ , ET-1 and sICAM-1, and the contents of MDA in pancreatic tissue were significantly increased, and T-SOD activity in pancreatic tissue was significantly decreased in the ANP group. Compared to the ANP group, pancreatic pathological scores, serum levels of TNF- $\alpha$  (6 h: 109.6 ng/L  $\pm$  49.0 ng/L *vs* 190.2 ng/L  $\pm$  46.6 ng/L, 12 h: 405.4 ng/L  $\pm$  116.3 ng/L *vs* 559.7 ng/L  $\pm$  203.9 ng/L, 24 h: 415.4 ng/L  $\pm$  164.6 ng/L *vs* 648.7 ng/L  $\pm$  222.1 ng/L, all *P* < 0.05), ET-1 (6 h: 45.6 ng/L  $\pm$  13.5 ng/L *vs* 66.0 ng/L  $\pm$  16.0 ng/L, 12 h: 83.5 ng/L  $\pm$  15.4 ng/L *vs* 96.8 ng/L  $\pm$  23.0 ng/L, 24 h: 85.1 ng/L  $\pm$  25.8 ng/L *vs* 103.9 ng/L  $\pm$  28.9 ng/L, all *P* < 0.05), and sICAM-1 (6 h: 0.58 ng/L  $\pm$  0.13 ng/L *vs* 0.78 ng/L  $\pm$  0.14 ng/L, 12 h: 0.78 ng/L  $\pm$  0.10 ng/L *vs* 0.94 ng/L  $\pm$  0.12 ng/L, 24 h: 0.96 ng/L  $\pm$  0.16 ng/L *vs* 1.24 ng/L  $\pm$  0.30 ng/L, all *P* < 0.05), and the contents of MDA in pancreatic tissue (6 h: 4.22 nmol/mg prot  $\pm$  0.40 nmol/mg prot *vs* 8.79 nmol/mg prot  $\pm$  0.80 nmol/mg prot, 12 h: 5.90 nmol/mg prot  $\pm$  1.02 nmol/mg prot, 24 h: 9.10 nmol/mg prot  $\pm$  0.84 nmol/mg prot *vs* 17.88 nmol/mg prot  $\pm$  1.43 nmol/mg prot, all *P* < 0.05) were reduced, and T-SOD activity was increased (6 h: 88.6 U/mg prot  $\pm$  7.1 U/mg prot *vs* 68.8 U/mg prot  $\pm$  10.5 U/mg prot, 12 h: 77.6 U/mg prot  $\pm$  6.8 U/mg prot *vs* 46.0 U/mg prot  $\pm$  8.9 U/mg prot, 24 h: 45.5 U/mg prot  $\pm$  5.3 U/mg prot *vs* 27.8 U/mg prot  $\pm$  4.3 U/mg prot, all *P* < 0.05) in the EDA group. No significant differences were observed in serum levels of amylase between the ANP and EDA groups.

**CONCLUSION:** Edaravone can eliminate the excessive generation of oxygen free radicals, down-regulate the expression of inflammatory

## ■同行评议者

王炳元, 教授, 中国医科大学附属第一医院消化内科; 黄恒青, 主任医师, 福建省第二人民医院消化内科

cytokines, and reduce tissue injury in rats with ANP.

**Key Words:** Pancreatitis; Oxidative stress; Edaravone

Zhang YH, Tang GD, Xu ZY, Cai L. Protective effects of edaravone against acute necrotizing pancreatitis in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(15): 1284-1289

## 摘要

**目的:** 探讨自由基清除剂依达拉奉对大鼠急性坏死性胰腺炎的保护作用及其机制。

**方法:** 90只♂SD大鼠随机分为假手术组(SHAM组)、坏死性胰腺炎组(ANP组)、依达拉奉治疗组(EDA组), 每组30只。SHAM组为开腹后只翻动十二指肠及胰腺后关腹; ANP组胰胆管内逆行输注1.5%脱氧胆酸钠制备急性坏死性胰腺炎模型; EDA组为ANP造模后立即尾静脉注射依达拉奉(6 mg/kg)。分别于术后6、12、24 h处死大鼠(每个时点10只), 观察胰腺病理形态改变并评分; 检测血清淀粉酶、TNF- $\alpha$ 、ET-1、sICAM-1含量; 检测胰腺组织中丙二醛(MDA)含量及总超氧化物歧化酶(T-SOD)活力。

**结果:** 与ANP组比较, EDA治疗组在胰腺病理改变、血清TNF- $\alpha$ 水平(6 h: 109.6 ng/L  $\pm$  49.0 ng/L vs 190.2 ng/L  $\pm$  46.6 ng/L, 12 h: 405.4 ng/L  $\pm$  116.3 ng/L vs 559.7 ng/L  $\pm$  203.9 ng/L, 24 h: 415.4 ng/L  $\pm$  164.6 ng/L vs 648.7 ng/L  $\pm$  222.1 ng/L, 均 $P < 0.05$ )、血清ET-1水平(6 h: 45.6 ng/L  $\pm$  13.5 ng/L vs 66.0 ng/L  $\pm$  16.0 ng/L, 12 h: 83.5 ng/L  $\pm$  15.4 ng/L vs 96.8 ng/L  $\pm$  23.0 ng/L, 24 h: 85.1 ng/L  $\pm$  25.8 ng/L vs 103.9 ng/L  $\pm$  28.9 ng/L), 血清sICAM-1水平(6 h: 0.58 ng/L  $\pm$  0.13 ng/L vs 0.78 ng/L  $\pm$  0.14 ng/L, 12 h: 0.78 ng/L  $\pm$  0.10 ng/L vs 0.94 ng/L  $\pm$  0.12 ng/L, 24 h: 0.96 ng/L  $\pm$  0.16 ng/L vs 1.24 ng/L  $\pm$  0.30 ng/L, 均 $P < 0.05$ )、胰腺组织MDA含量(6 h: 4.22 nmol/mg prot  $\pm$  0.40 nmol/mg prot vs 8.79 nmol/mg prot  $\pm$  0.80 nmol/mg prot, 12 h: 5.90 nmol/mg prot  $\pm$  0.51 nmol/mg prot vs 12.30 nmol/mg prot  $\pm$  1.02 nmol/mg prot, 24 h: 9.10 nmol/mg prot  $\pm$  0.84 nmol/mg prot vs 17.88 nmol/mg prot  $\pm$  1.43 nmol/mg prot)均有不同程度减轻(均 $P < 0.05$ )、T-SOD活力增强(6 h: 88.6 U/mg prot  $\pm$  7.1 U/mg prot vs 68.8 U/mg prot  $\pm$  10.5 U/mg prot, 12 h: 77.6 U/mg prot  $\pm$  6.8 U/mg prot vs 46.0 U/mg prot  $\pm$  8.9 U/mg prot, 24 h: 45.5 U/mg prot  $\pm$  5.3 U/mg prot vs 27.8 U/mg prot  $\pm$  4.3 U/mg prot, 均 $P < 0.05$ ); 血清淀粉酶变化

无显著差异。与SHAM组比较, ANP组胰腺组织病理评分、血清淀粉酶、TNF- $\alpha$ 、ET-1、sICAM-1明显升高, 胰腺组织MDA含量升高, T-SOD活力下降, 差异均有统计学意义。

**结论:** 依达拉奉可以清除坏死性胰腺炎体内过量生成的氧自由基并减少炎症因子的表达, 减轻胰腺组织损伤。

**关键词:** 胰腺炎; 氧化应激; 依达拉奉

张瑜红, 唐国都, 许志毅, 蔡莉. 依达拉奉对大鼠急性坏死性胰腺炎的保护作用. *世界华人消化杂志* 2012; 20(15): 1284-1289  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1284.asp>

## 0 引言

重型急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)发病急, 病情变化快, 可导致全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS)和多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS), 其死亡率高达16%-50%<sup>[1-3]</sup>。大量的研究表明在SAP的发病过程中, 炎症因子及氧自由基的过度释放起着重要的作用。因此, 控制炎症介质、氧自由基(oxygen free radicals, OFRs)的过度释放成为阻止轻症胰腺炎向重症胰腺炎发展的重要手段。依达拉奉(edaravone, EDA)是一种合成的自由基清除和抗氧化剂, 临床研究证实他可减轻缺血再灌注过程中脑细胞的损伤, 已在急性脑梗死患者中广泛应用<sup>[4,5]</sup>, 并在急性心肌梗死患者中取得较好的临床效果<sup>[6]</sup>。本研究通过EDA干预急性坏死性胰腺炎大鼠模型, 观察其在SAP中的作用, 为其临床应用提供依据。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 90只清洁级♂SD大鼠, 体质量300 g  $\pm$  20 g, 购自广西医科大学实验动物中心, 大鼠随机分为假手术组(SHAM组)、坏死性胰腺炎组(ANP组)、ANP+EDA治疗组, 每组30只。

### 1.2 方法

**1.2.1 造模及标本采集:** 大鼠术前12 h禁食, 不禁水。采用10%水合氯醛(0.3 mL/100 g)腹腔注射麻醉。SHAM组剖腹后只翻动十二指肠及胰腺后关腹。ANP组取上腹正中切口开腹, 沿十二指肠内侧找到胰胆管开口, 在开口对侧肠壁剪开一小孔, 用24号静脉留置针斜行从小孔进入肠管, 沿乳头方向探入胆胰管, 同时用无损伤血管夹分别夹住肝门部胆管和注射针, 按1 mL/kg

**■研究前沿**  
依达拉奉(EDA)除了减少氧自由基的生成, 还参与调节炎症反应、基质金属蛋白酶水平, 一氧化氮的产生, 细胞凋亡、细胞坏死等过程。



### ■相关报道

越来越多的研究表明炎性介质,包括氧自由基(OFRs)及细胞因子所介导的异常免疫反应及微循环障碍在SAP的发生及发展过程中起重要作用。

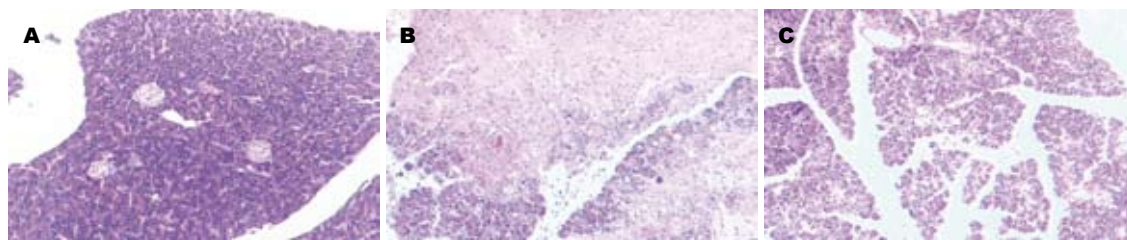


图1 各组大鼠胰腺组织病理学改变(中倍视野). A: SHAM组24 h胰腺组织切片; B: ANP组24 h胰腺组织切片; C: EDA组24 h胰腺组织切片。

表1 各组胰腺组织病理学评分 (mean  $\pm$  SD,  $n = 10$ )

分组	6 h	12 h	24 h
SHAM组	1.90 $\pm$ 0.74	1.70 $\pm$ 0.67	1.80 $\pm$ 0.79
ANP组	6.50 $\pm$ 1.08 <sup>b</sup>	10.80 $\pm$ 1.93 <sup>b</sup>	11.30 $\pm$ 1.57 <sup>b</sup>
EDA组	5.30 $\pm$ 0.95 <sup>bc</sup>	9.20 $\pm$ 1.32 <sup>bc</sup>	10.30 $\pm$ 1.34 <sup>bc</sup>

<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs SHAM组同一时点; <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs ANP组同一时点。

逆行注入1.5%脱氧胆酸钠溶液, 1 min注射完毕, 注射完后仍夹闭维持3 min, 拔出注射针, 松开血管夹, 确认腹腔无活动性出血后缝合肠壁及腹腔. EDA组为制备ANP后立即予EDA注射液(南京先声制药有限公司)6 mg/kg尾静脉注射. 动物模型建立后, 分别于术后6、12、24 h每组各取10只大鼠进行实验. 下腔静脉放血处死大鼠, 留取下腔静脉血4-5 mL保存. 取下腔静脉血, 4  $^{\circ}\text{C}$  3 000 r/min离心10 min, 分离血清保存于-20  $^{\circ}\text{C}$  备用; 剪取部分胰腺组织40 g/L多聚甲醛固定, 石蜡包埋, 切片及HE染色, 用于光镜观察组织病理改变; 取新鲜胰腺组织加入冰生理盐水制成组织匀浆用于检测总超氧化物歧化酶(total-superoxide dismutase, T-SOD)活力和丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量。

1.2.2 胰腺组织学检查及胰腺病理评分: 胰腺评分标准参照Kusske等<sup>[7]</sup>标准. 按胰腺水肿、出血、坏死及中性粒细胞浸润4项, 水肿: 无改变(0分)、小叶间灶性水肿(1分)、小叶间弥漫水肿(2分)、小叶广泛分隔(3分)、全小叶分隔(4分); 出血: 无改变(0分)、实质出血面积<25%(1分)、实质出血面积为25%-50%(2分)、实质出血面积为51%-70%(3分)、全小叶分隔(4分); 坏死: 无改变(0分)、导管周围坏死<5%(1分)、灶性坏死5%-20%(2分)、弥漫性实质坏死21%-50%(3分)、严重小叶丧失>50%(4分); 炎症细胞浸润: 无改变(0分)、局限导管内(1分)、实质内<50%(2分)、实质内51%-75%(3分)、形成脓肿(4分)。

1.2.3 血清淀粉酶(AMS)、TNF- $\alpha$ 、ET-1及sICAM-1测定: 采用全自动生化分析仪检测血清淀粉酶; 采用酶联-免疫双抗体夹心法测定血清TNF- $\alpha$ 、ET-1、sICAM-1含量。

1.2.4 胰腺组织T-SOD活力、MDA含量测定: 取新鲜胰腺组织制成组织匀浆, 用黄嘌呤氧化酶法检测T-SOD活力, 硫代巴比妥酸法测定MDA含量(试剂盒购自南京建成生物工程研究所). 全部操作均严格按照说明书进行。

**统计学处理** SPSS13.0统计学软件对实验的所有数据进行统计学分析, 各组数据用mean  $\pm$  SD表示, 组间采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 组织病理学改变及评分 SHAM组大鼠腹腔无积液, 腹腔脏器肉眼观无异常, 光镜下腺泡结构完整, 偶见水肿或少量炎性细胞浸润. ANP、EDA组可见不同程度血性或黄色腹水, 胰腺外观肿胀, 呈暗红或蓝黑色, 表面可见出血点, 光镜下胰腺小灶性坏死, 胰腺实质、间质内有炎症细胞浸润或伴局灶性出血, 符合ANP的病理改变. ANP组及EDA组胰腺病理评分显著高于SHAM组, EDA组病变较ANP减轻( $P < 0.05$ , 表1, 图1)。

2.2 血清淀粉酶、TNF- $\alpha$ 、ET-1及sICAM-1水平的变化 ANP、EDA组各时点血清淀粉酶、TNF- $\alpha$ 及sICAM-1均较SHAM组显著升高( $P < 0.01$ ); 血清AMS在ANP组与EDA组同一时点间差异无显著性; EDA组各时点与ANP组同一时点比较, TNF- $\alpha$ 、ET-1及sICAM-1水平则显著降低( $P < 0.05$ 或0.01, 表2)。

2.3 胰腺组织T-SOD、MDA测定 ANP组造模后各时点T-SOD活力较SHAM组显著下降( $P < 0.01$ ), EDA组T-SOD活力各时点高于ANP组( $P < 0.01$ 或 $P < 0.05$ ), 但低于SHAM组. MDA含量ANP组各时点显著高于SHAM组及EDA组( $P < 0.01$ ), EDA组

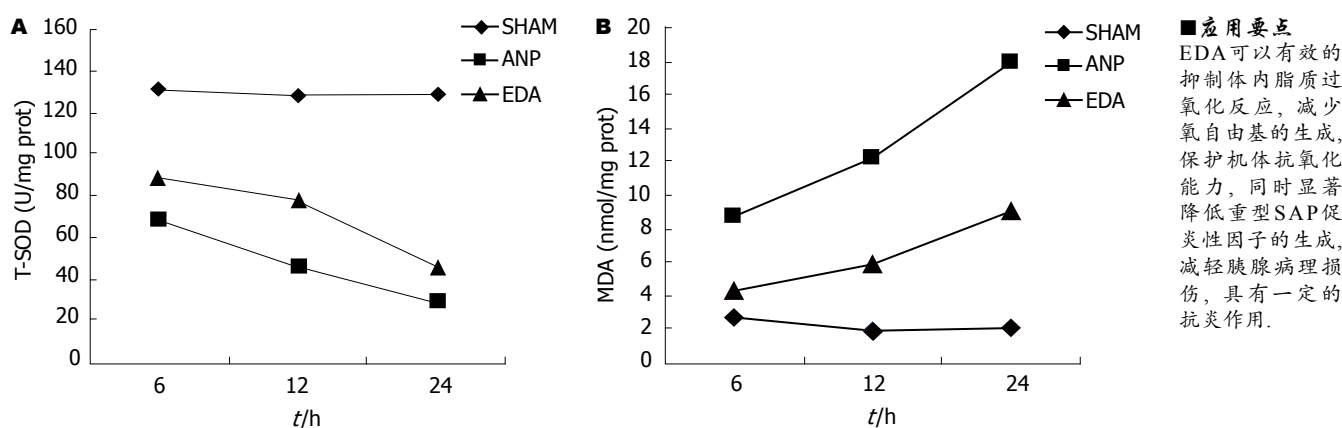


图2 各组胰腺组织T-SOD活性和MDA含量的变化。A: T-SOD活性; B: MDA含量。

表2 各组血清淀粉酶、TNF- $\alpha$ 、ET-1及sICAM-1含量 (mean  $\pm$  SD,  $n = 10$ )

分组	时点	AMS(U/L)	TNF- $\alpha$ (ng/L)	ET-1(ng/L)	sICAM-1(ng/L)
SHAM组	6	1556 $\pm$ 210	68.8 $\pm$ 39.2	31.0 $\pm$ 7.8	0.36 $\pm$ 0.04
	12	1554 $\pm$ 224	57.6 $\pm$ 37.8	29.9 $\pm$ 7.0	0.38 $\pm$ 0.06
	24	1609 $\pm$ 363	66.5 $\pm$ 39.7	32.1 $\pm$ 10.2	0.40 $\pm$ 0.07
ANP组	6	3899 $\pm$ 1020 <sup>b</sup>	190.2 $\pm$ 46.6 <sup>b</sup>	66.0 $\pm$ 16.0 <sup>a</sup>	0.78 $\pm$ 0.14 <sup>b</sup>
	12	5841 $\pm$ 1508 <sup>b</sup>	559.7 $\pm$ 203.9 <sup>b</sup>	96.8 $\pm$ 23.0 <sup>b</sup>	0.94 $\pm$ 0.12 <sup>b</sup>
	24	5770 $\pm$ 1706 <sup>b</sup>	648.7 $\pm$ 222.1 <sup>b</sup>	103.9 $\pm$ 28.9 <sup>b</sup>	1.24 $\pm$ 0.30 <sup>b</sup>
EDA组	6	3822 $\pm$ 1071 <sup>b</sup>	109.6 $\pm$ 49.0 <sup>bd</sup>	45.6 $\pm$ 13.5 <sup>a</sup>	0.58 $\pm$ 0.13 <sup>bc</sup>
	12	4660 $\pm$ 1304 <sup>b</sup>	405.4 $\pm$ 116.3 <sup>bc</sup>	83.5 $\pm$ 15.4 <sup>bd</sup>	0.78 $\pm$ 0.10 <sup>bd</sup>
	24	4415 $\pm$ 1366 <sup>b</sup>	415.4 $\pm$ 164.6 <sup>bc</sup>	85.1 $\pm$ 25.8 <sup>bd</sup>	0.96 $\pm$ 0.16 <sup>bc</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs SHAM组同一时点; <sup>c</sup> $P < 0.05$ , <sup>d</sup> $P < 0.01$  vs ANP组同一时点。表3 各组大鼠胰腺组织T-SOD活性、MDA含量 (mean  $\pm$  SD,  $n = 10$ )

分组	时点	T-SOD(U/mg prot)	MDA(nmol/mg prot)
SHAM组	6	131.0 $\pm$ 17.1	2.75 $\pm$ 0.48
	12	128.0 $\pm$ 16.8	1.88 $\pm$ 0.37
	24	127.7 $\pm$ 17.0	2.12 $\pm$ 0.42
ANP组	6	68.8 $\pm$ 10.5 <sup>b</sup>	8.79 $\pm$ 1.70 <sup>b</sup>
	12	46.0 $\pm$ 8.9 <sup>b</sup>	12.30 $\pm$ 2.02 <sup>b</sup>
	24	27.8 $\pm$ 4.3 <sup>b</sup>	17.88 $\pm$ 2.43 <sup>b</sup>
EDA组	6	88.6 $\pm$ 7.1 <sup>ac</sup>	4.22 $\pm$ 0.95 <sup>d</sup>
	12	77.6 $\pm$ 6.8 <sup>bd</sup>	5.90 $\pm$ 1.02 <sup>bd</sup>
	24	45.5 $\pm$ 5.3 <sup>bd</sup>	9.10 $\pm$ 1.54 <sup>ad</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs SHAM组同一时点; <sup>c</sup> $P < 0.05$ , <sup>d</sup> $P < 0.01$  vs ANP组同一时点。

6 h与SHAM组比较同一时点差异无显著性, 12 h及24 h组高于SHAM组( $P < 0.05$ , 表3, 图2)。

### 3 讨论

近年来, 越来越多的研究表明炎症介质, 包括

OFRs及细胞因子所介导的异常免疫反应及微循环障碍在SAP的发生及发展过程中起重要作用<sup>[8-11]</sup>。在生理情况下体内存在大量的自由基清除剂, 自由基在体内很快被清除, 因此, 自由基的产生和清除是平衡的。在病理情况下, 如缺血、缺氧及外伤, 炎症介质诱导的中性粒细胞活化会导致产生大量的OFRs, 造成广泛的破坏。

SAP时OFRs可能由以下途径产生: (1)糜蛋白酶原在游离脂肪酸及胰酶作用下, 激活为糜蛋白酶, 该酶使黄嘌呤脱氢酶(D型)转化为黄嘌呤氧化酶(O型)代谢, 其在催化次黄嘌呤反应中产生OFRs<sup>[12]</sup>; (2)SAP早期就存在胰腺组织灌注不足、不完全缺血<sup>[13]</sup>, 使得线粒体氧化磷酸化过程受阻, 维持细胞膜两侧离子浓度梯度的泵功能衰竭,  $\text{Ca}^{2+}$ 进入细胞内, 激活黄嘌呤氧化酶, 进而产生OFRs; (3)SAP时腺泡细胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 骤然升高可激活NADPH氧化酶亚单位(p47phox, p67phox)由胞浆向胞膜移位, 活化小G蛋白Rac产生OFRs<sup>[14]</sup>; (4)SAP时由于异常激活的胰酶、脂肪酶及胆汁酸使单核/巨噬细胞、中性粒细胞

## ■同行评价

本研究方法和实验对照设计合理, 科学结论明确, 能够为临床应用提供依据。

“呼吸爆发”, 在补体、白三烯或内毒素等的刺激下释放OFRs。氧自由基及其衍生物通过脂肪过氧化作用可直接造成类脂膜破坏及溶酶体膜破坏, 对胰腺损害起着重要作用。研究表明, 在SAP的早期阶段, 因为抗氧化系统耗尽, 过度OFRs释放可损害毛细血管内皮细胞, 增加毛细血管的通透性, 并提高ICAM-1所介导的白细胞-内皮细胞相互作用, 从而诱发胰腺微循环障碍, 加重胰腺损伤<sup>[15,16]</sup>。因此, OFRs的产生和清除过程的不平衡是导致胰腺损害加重的重要因素<sup>[17]</sup>。

在一些疾病和组织损伤的动物模型中, 证实了EDA除了减少氧自由基的生成, 还参与调节炎症反应、基质金属蛋白酶水平, 一氧化氮的产生, 细胞凋亡、细胞坏死等过程<sup>[18-20]</sup>。我们的研究表明, EDA可以有效的抑制体内脂质过氧化反应, 减少氧自由基的生成, 保护机体抗氧化能力, 同时显著降低SAP促炎性因子的生成, 减轻胰腺病理损伤, 具有一定的抗炎作用。

本实验中我们采用脱氧胆酸钠逆行注入胰胆管, 制备坏死性胰腺炎模型, 病理结果显示胰腺组织具备腺泡细胞颗粒样凝固性坏死等坏死性胰腺炎病理改变。在我们的实验中, EDA治疗组胰腺病理评分较ANP组显著降低( $P<0.05$ ), 病理切片中观察到EDA组胰腺的中性粒细胞的浸润明显减少, 胰腺损伤程度较ANP组有所减轻。

TNF- $\alpha$ 在SAP的发病机制中起始动作用, 可诱发IL-1、IL-6、IL-8等其他细胞因子的产生, 引起连锁和放大的“瀑布效应”, 致使全身炎症反应及组织损伤<sup>[8,21,22]</sup>。SAP时组织缺血、缺氧、感染等因素可导致内皮细胞损伤, ET-1大量表达并释放入血, 导致胰腺微血管持续痉挛, 微小动静脉收缩、加重胰腺缺血, 降低胰腺血流灌注<sup>[23]</sup>。sICAM-1可介导白细胞与血管内皮细胞的黏附及白细胞穿出血管壁, 从而对周围组织的炎症反应及损伤起重要作用。我们的研究表明ANP组血清TNF- $\alpha$ 、ET-1、sICAM-1在造模6 h后3者即显著高于假手术对照组, 并且随时间延长呈增高趋势或持续高水平表达, 说明炎症因子的过度释放、内皮功能的活化导致的微循环障碍及白细胞-内皮细胞的相互作用参与了ANP的发病过程, 国内外的研究也表明TNF- $\alpha$ 、ET-1、sICAM-1在胰腺炎的发病中起重要作用, 与胰腺炎的严重程度密切相关<sup>[24-26]</sup>。我们的实验观察到EDA治疗组血清ET-1、sICAM显著降低, 说明EDA可以使血管内皮功能受到保护, 减轻胰腺的缺血、缺氧程度。这与国外的研究结果

一致<sup>[27,28]</sup>。其可能机制为: (1)EDA可在mRNA水平下调前炎症因子TNF- $\alpha$ 表达<sup>[29]</sup>, 这在一定程度上遏制了炎症的级联反应, 减少了炎症因子的过度释放导致的胰腺损伤; (2)前列腺素I<sub>2</sub>(PGI<sub>2</sub>)是血管松弛剂, 可抑制血小板变形、黏附作用及白细胞激活, 保护溶酶体, 防止溶酶体向组织内释放造成胰腺损伤。而EDA可以刺激前列腺素类物质生成, 从而抑制血小板的聚集, 拮抗ET-1收缩血管作用, 减轻了胰腺微循环障碍; (3)EDA可以降低黏附分子的表达, 减少白细胞的黏附聚集及游出, 从而减轻组织损伤。

SOD是具有清除OFRs功能的一种酶, 可对抗与阻断OFRs对细胞造成的损害, 并及时修复受损细胞, 修复OFRs造成的细胞伤害, SOD活力的高低反应了机体清除OFRs的能力。MDA是氧自由基攻击生物膜中的多不饱和脂肪酸, 引发脂质过氧化作用的代谢产物, 其含量反应了体内脂质过氧化损伤的程度。通过SOD与MDA的结果分析可反应机体受OFRs攻击的严重程度。我们的实验结果显示ANP组MDA水平较SHAM组显著升高, SOD活力显著下降, 而EDA治疗组在发病早期就能使MDA含量显著降低, T-SOD活力明显提高( $P<0.05$ ), 说明EDA在急性坏死性胰腺炎中能明显减少氧自由基的产生, 提高机体清除氧自由基的能力。

EDA作为一种新型的氧自由基清除剂, 在大鼠坏死性胰腺炎模型中可有效减少机体氧自由基, 提高抗氧化能力, 同时降低促炎因子水平, 对胰腺的保护具有多效性。

## 4 参考文献

- 1 陈雨, 陈和平, 严茂林. 急性胰腺炎3061例临床特征分析. 中华胰腺病杂志 2010; 10: 444-445
- 2 Gullo L, Migliori M, Oláh A, Farkas G, Levy P, Arvanitakis C, Lankisch P, Beger H. Acute pancreatitis in five European countries: etiology and mortality. *Pancreas* 2002; 24: 223-227
- 3 Lankisch PG, Burchard-Reckert S, Petersen M, Lehnick D, Schirren CA, Köhler H, Stöckmann F, Peiper HJ, Creutzfeldt W. Morbidity and mortality in 602 patients with acute pancreatitis seen between the years 1980-1994. *Z Gastroenterol* 1996; 34: 371-377
- 4 Nakamura T, Kuroda Y, Yamashita S, Zhang X, Miyamoto O, Tamiya T, Nagao S, Xi G, Keep RF, Itano T. Edaravone attenuates brain edema and neurologic deficits in a rat model of acute intracerebral hemorrhage. *Stroke* 2008; 39: 463-469
- 5 张明, 徐丽君, 邓丽影, 卢洁, 任慧. 依达拉奉注射液治疗急性脑梗死疗效及安全性随机双盲多中心研究. 中国新药与临床杂志 2007; 26: 105-108
- 6 Tsujita K, Shimomura H, Kawano H, Hokamaki J, Fukuda M, Yamashita T, Hida S, Nakamura Y, Nagayoshi Y, Sakamoto T, Yoshimura M, Arai H, Ogawa H. Effects of edaravone on reperfusion in-

- jury in patients with acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 2004; 94: 481-484
- 7 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
- 8 Makhija R, Kingsnorth AN. Cytokine storm in acute pancreatitis. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2002; 9: 401-410
- 9 Bhatia M, Brady M, Shokuhi S, Christmas S, Neoptolemos JP, Slavin J. Inflammatory mediators in acute pancreatitis. *J Pathol* 2000; 190: 117-125
- 10 Cuthbertson CM, Christophi C. Disturbances of the microcirculation in acute pancreatitis. *Br J Surg* 2006; 93: 518-530
- 11 周新泽, 毛勤生, 陈玉泉, 沈洪熏. 大鼠急性胰腺炎病理学特征与氧自由基变化的关系. *世界华人消化杂志* 2000; 8: 108-109
- 12 高友兵, 汪训实, 张兆林, 陈玉石. 钙通道阻滞剂对重症急性胰腺炎大鼠氧自由基的影响. *世界华人消化杂志* 2002; 10: 1098-1099
- 13 Kusterer K, Enghofer M, Zendler S, Blöchle C, Usadel KH. Microcirculatory changes in sodium taurocholate-induced pancreatitis in rats. *Am J Physiol* 1991; 260: G346-G351
- 14 Kim H. Inhibitory mechanism of lycopene on cytokine expression in experimental pancreatitis. *Ann N Y Acad Sci* 2011; 1229: 99-102
- 15 Sunamura M, Yamauchi J, Shibuya K, Chen HM, Ding L, Takeda K, Kobari M, Matsuno S. Pancreatic microcirculation in acute pancreatitis. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 1998; 5: 62-68
- 16 Keck T, Werner J, Banafsche R, Stalman A, Schneider L, Gebhard MM, Herfarth C, Klar E. Oxygen radicals promote ICAM-1 expression and microcirculatory disturbances in experimental acute pancreatitis. *Pancreatology* 2003; 3: 156-163
- 17 Tadao M, Yuji O. [Role of free radicals in the development of severe acute pancreatitis]. *Nihon Rinsho* 2004; 62: 2015-2020
- 18 Kikuchi K, Uchikado H, Miyagi N, Morimoto Y, Ito T, Tancharoen S, Miura N, Miyata K, Sakamoto R, Kikuchi C, Iida N, Shiomi N, Kuramoto T, Kawahara K. Beyond neurological disease: new targets for edaravone (Review). *Int J Mol Med* 2011; 28: 899-906
- 19 Tamamura M, Saito M, Kinoshita Y, Shimizu S, Satoh I, Shomori K, Dimitriadis F, Satoh K. Protective effect of edaravone, a free-radical scavenger, on ischaemia-reperfusion injury in the rat testis. *BJU Int* 2010; 105: 870-876
- 20 李淞, 张逊娟, 贾小影, 姜波. 依达拉奉对局灶性脑缺血大鼠脑组织基质金属蛋白酶9(MMP-9)表达的影响. *中国实验诊断学* 2010; 12: 1883-1886
- 21 Malleo G, Mazzon E, Siriwardena AK, Cuzzocrea S. Role of tumor necrosis factor-alpha in acute pancreatitis: from biological basis to clinical evidence. *Shock* 2007; 28: 130-140
- 22 Giakoustidis A, Mudan SS, Giakoustidis D. Dissecting the stress activating signaling pathways in acute pancreatitis. *Hepatogastroenterology* 2010; 57: 653-656
- 23 Foitzik T, Eibl G, Hotz HG, Faulhaber J, Kirchengast M, Buhr HJ. Endothelin receptor blockade in severe acute pancreatitis leads to systemic enhancement of microcirculation, stabilization of capillary permeability, and improved survival rates. *Surgery* 2000; 128: 399-407
- 24 李春燕, 雍桂珍, 冯迎春, 贺国斌, 向军英, 明文. 急性胰腺炎患者sICAM-1、TNF- $\alpha$ 和D-二聚体水平与病情严重程度的关系. *世界华人消化杂志* 2010; 18: 3480-3484
- 25 Perejaslov A, Chooklin S, Bihalsky I. Implication of interleukin 18 and intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 in acute pancreatitis. *Hepatogastroenterology* 2008; 55: 1806-1813
- 26 Eibl G, Hotz HG, Faulhaber J, Kirchengast M, Buhr HJ, Foitzik T. Effect of endothelin and endothelin receptor blockade on capillary permeability in experimental pancreatitis. *Gut* 2000; 46: 390-394
- 27 Araki Y, Andoh A, Yokono T, Asano N, Yoshikawa K, Bamba S, Ishizuka I, Fujiyama Y. The free radical scavenger edaravone suppresses experimental closed duodenal loop-induced acute pancreatitis in rats. *Int J Mol Med* 2003; 12: 121-124
- 28 Yang T, Mao YF, Liu SQ, Hou J, Cai ZY, Hu JY, Ni X, Deng XM, Zhu XY. Protective effects of the free radical scavenger edaravone on acute pancreatitis-associated lung injury. *Eur J Pharmacol* 2010; 630: 152-157
- 29 陶坤, 张义胜, 张晓峰, 王明海, 金鑫, 韩光峰, 赵国海. 血栓素前列环素在大鼠轻症急性胰腺炎向重症急性胰腺炎转变中的变化和意义. *肝胆外科杂志* 2007; 15: 226-228

编辑 曹丽鸥 电编 鲁亚静



# 金荞麦提取物对IBS大鼠脊髓镇痛的干预机制

刘丽娜, 孙志广, 张雪梅, 周梁, 田超, 陈利, 邵铭, 史会连, 郭海燕

## ■背景资料

临床已发现金荞麦对肠易激综合征(IBS)患者的腹痛、腹泻及腹胀均有较好疗效, 且其重要成分原花青素多聚体、黄酮类物质均有研究发现有镇痛的作用。5-羟色胺(5-HT)及其受体广泛存在于中枢和肠道神经系统, 参与调解IBS的慢性痛觉过敏。

刘丽娜, 孙志广, 邵铭, 史会连, 郭海燕, 南京中医药大学第一临床医学院附属江苏省中医院 江苏省南京市 210029  
张雪梅, 上海市东方医院 同济大学附属东方医院肿瘤科 上海市 200120

周梁, 田超, 陈利, 南京中医药大学药学院临床药理实验室 江苏省南京市 210029

刘丽娜, 在读博士, 讲师, 主治医师, 主要从事功能性消化病及肝病方面的研究。

江苏省南京市科技局基金资助项目, No. 201001087

江苏省中医药局科技基金资助项目, No. LZ11202

江苏省2011年度普通高校研究生科研创新计划基金资助项目, No. CXZZ2011-0779

作者贡献分布: 本研究由刘丽娜与张雪梅进行试验设计, 邵铭进行指导; 周梁、田超及陈利负责试验操作; 史会连与郭海燕收集整理资料、数据统计; 论文写作由刘丽娜撰写完成, 孙志广审校。

通讯作者: 孙志广, 主任医师, 博士生导师, 210029, 江苏省南京市汉中门155号, 南京中医药大学附属江苏省中医院。pr\_zhiguangsun@163.com

电话: 025-83620504

收稿日期: 2012-02-18 修回日期: 2012-03-08

接受日期: 2012-04-25 在线出版日期: 2012-05-28

## Analgesic mechanisms of *Fagopyrum cymosum* extracts in rats with irritable bowel syndrome

Li-Na Liu, Zhi-Guang Sun, Xue-Mei Zhang, Liang Zhou, Chao Tian, Li Chen, Ming Shao, Hui-Lian Shi, Hai-Yan Guo

Li-Na Liu, Zhi-Guang Sun, Ming Shao, Hui-Lian Shi, Hai-Yan Guo, the First Clinical Medical College, Jiangsu Provincial Hospital of Chinese Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

Xue-Mei Zhang, Shanghai East Hospital; Department of Oncology, Medical School of Tongji University, Shanghai 200120, China

Liang Zhou, Chao Tian, Li Chen, Laboratory of Clinical Pharmacy, College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

Supported by: the Science and Technology Program of Nanjing, No. 201001087; the Traditional Chinese Medicine Project of Jiangsu Province, No. LZ11202; and the Graduate Research and Innovation Projects of Jiangsu Province, No. CXZZ2011-0779

Correspondence to: Zhi-Guang Sun, Chief Physician, the First Clinical Medical College, Jiangsu Provincial Hospital of Chinese Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, 155 Hanzhong Road, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China. pr\_zhiguangsun@163.com

Received: 2012-02-18 Revised: 2012-03-08

Accepted: 2012-04-25 Published online: 2012-05-28

## ■同行评议者

潘秀珍, 教授, 主任医师, 福建省立医院消化科

## Abstract

**AIM:** To observe the effect of *Fagopyrum cymo-*

*sum* extracts (Fag) on visceral hypersensitivity in rats with irritable bowel syndrome (IBS)-like colon irritation (CI) and to explore the possible mechanisms involved.

**METHODS:** IBS-like models were created using neonatal CI method. CI adult rats were given Fag intragastrically for 2 wk, and visceral sensitivity was then evaluated using abdominal withdrawal reflex (AWR) score. The expression of 5-hydroxytryptamine (5-HT) in the spinal cord was detected by immunohistochemistry and that of 5-HT1A receptor (5-HT1AR) and 5-HT3A receptor (5-HT3AR) was detected by Western blot.

**RESULTS:** Compared to control rats, AWR scores in CI rats were significantly increased (20 mmHg:  $0.625 \pm 0.518$  vs  $1.333 \pm 0.778$ ; 30 mmHg:  $0.750 \pm 0.463$  vs  $1.667 \pm 0.888$ ; 40 mmHg:  $1.125 \pm 0.641$  vs  $2.000 \pm 0.739$ ; 50 mmHg:  $1.500 \pm 0.926$  vs  $2.583 \pm 0.793$ ; 60 mmHg:  $2.125 \pm 0.991$  vs  $3.083 \pm 0.669$ ; all  $P < 0.05$ ). In the spinal cord, the expression of 5-HT and 5-HT3AR was enhanced and that of 5-HT1AR expression was reduced in CI rats compared to control rats (all  $P < 0.01$ ). Fag at a high dose could markedly reduce AWR scores (20 mmHg:  $0.250 \pm 0.002$ ; 30 mmHg:  $0.875 \pm 0.044$ ; 40 mmHg:  $1.250 \pm 0.036$ ; 50 mmHg:  $1.875 \pm 0.050$ ; 60 mmHg:  $2.625 \pm 0.037$ ; all  $P < 0.05$ ), down-regulate the expression of 5-HT and 5-HT3AR, and up-regulate the expression of 5-HT1AR (all  $P < 0.05$ ) in spinal cord ( $P < 0.05$ ) in CI rats. Fag at a low dose had no significant effect on CI rats.

**CONCLUSION:** Fag can exert an analgesic role in IBS-like CI rats by regulating 5-HT and its receptors in the spinal cord.

**Key Words:** *Fagopyrum cymosum* extracts; Irritable bowel syndrome; 5-hydroxytryptamine; 5-hydroxytryptamine 1A receptor; 5-hydroxytryptamine 3A receptor

Liu LN, Sun ZG, Zhang XM, Zhou L, Tian C, Chen L, Shao M, Shi HL, Guo HY. Analgesic mechanisms of *Fagopyrum cymosum* extracts in rats with irritable bowel syndrome. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(15): 1290-1295

## 摘要

**目的:** 观察金荞麦(*Fagopyrum cymosum*, Fag)提取物对肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)样结肠刺激(colon irritation, CI)模型内脏高敏感性的改善作用以及对动物脊髓背角内5-HT及其受体的影响。

**方法:** 采用结肠刺激新生期乳大鼠来制作IBS样CI模型。CI大鼠成年后给予口服Fag 2 wk, 并用腹壁撤退反射(AWR)评分来评价给药后CI大鼠内脏高敏感性的变化, 取大鼠脊髓用免疫组织化学法观察5-HT免疫染色, 用蛋白印迹法检测5-HT1A受体(5-HT1AR)、5-HT3A受体(5-HT3AR)表达。

**结果:** 和对照组比, CI组大鼠AWR评分明显增高(20 mmHg:  $0.625 \pm 0.518$  vs  $1.333 \pm 0.778$ ; 30 mmHg:  $0.750 \pm 0.463$  vs  $1.667 \pm 0.888$ ; 40 mmHg:  $1.125 \pm 0.641$  vs  $2.000 \pm 0.739$ ; 50 mmHg:  $1.500 \pm 0.926$  vs  $2.583 \pm 0.793$ ; 60 mmHg:  $2.125 \pm 0.991$  vs  $3.083 \pm 0.669$ ; 均 $P < 0.05$ ); 且脊髓内5-HT染色度增加( $11.250 \pm 4.833$  vs  $21.125 \pm 7.827$ ,  $P < 0.01$ ), 5-HT3A受体表达升高( $179.038 \pm 29.786$ ,  $P < 0.01$ ), 5-HT1A受体则表达降低( $64.523 \pm 16.873$ ,  $P < 0.01$ ); 高剂量Fag可降低CI大鼠AWR评分(20 mmHg:  $0.250 \pm 0.002$ ; 30 mmHg:  $0.875 \pm 0.044$ ; 40 mmHg:  $1.250 \pm 0.036$ ; 50 mmHg:  $1.875 \pm 0.050$ ; 60 mmHg:  $2.625 \pm 0.037$ ; 均 $P < 0.05$ ), 并下调脊髓内5-HT( $13.375 \pm 5.579$ ,  $P < 0.05$ )和5-HT3AR的表达( $114.200 \pm 20.983$ ,  $P < 0.05$ ), 上调5-HT1AR的表达( $93.008 \pm 13.523$ ,  $P < 0.05$ ); 低剂量Fag则对CI大鼠的影响不明显。

**结论:** Fag对IBS样CI大鼠有镇痛作用, 并通过调节其脊髓内5-HT及其受体来改善痛觉过敏。

**关键词:** 金荞麦提取物; 肠易激综合征; 5-羟色胺; 5-羟色胺1A受体; 5-羟色胺3A受体

刘丽娜, 孙志广, 张雪梅, 周梁, 田超, 陈利, 邵铭, 史会连, 郭海燕. 金荞麦提取物对IBS大鼠脊髓镇痛的干预机制. 世界华人消化杂志 2012; 20(15): 1290-1295

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1290.asp>

## 0 引言

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)的多种发病机制中, 内脏高敏感性(visceral hypersensitivity)即结肠对机械刺激出现内脏痛阈水平下降, 结直肠及躯体出现的痛觉过敏(hyperalgesia)是其最重要的特性<sup>[1]</sup>。5-羟色胺(5-hydroxytrypta-

mine, 5-HT)作为单胺类神经递质, 广泛存在于中枢和肠道神经系统, 他可作用于7种5-HT受体发挥不同效应。其中5-HT1A、5-HT2A、5-HT3、5-HT7受体均参与调节慢性痛<sup>[2]</sup>, 并与IBS的内脏高敏感性密切相关。目前针对IBS特异性5-HT3受体(5-HT3 receptor, 5-HT3R)拮抗剂如阿洛司琼(alosetron)、格拉司琼(granisetron)等, 虽可改善IBS患者痛阈, 减轻腹痛腹胀, 但其作用靶点单一, 并有严重的心血管不良反应, 因此限制了其在临床的推广应用。所以, 寻找对IBS敏化中枢有保护作用的多靶向天然药物越来越成为研究的热点。

金荞麦(*Fagopyrum cymosum*, Fag)具有清热解毒、解痉止痛、健脾利湿的作用。临床上主要用于治疗肺脓疡, 近年来也发现对痛经、腹痛有较好治疗作用<sup>[3]</sup>。孙志广教授通过临床实践, 发现金荞麦对IBS患者的腹痛、腹泻及腹胀均有较好疗效, 并有金荞麦治疗IBS专利1项<sup>[4]</sup>。金荞麦提取物的主要活性成分是原花色素类缩合鞣质及其前体混合物<sup>[5]</sup>, 还有黄酮类、多糖类成分。相关研究表明, 巴豆属树皮(croton celtidifolius bark)提取的原花青素二聚体和多聚体对化学、物理刺激产生的内脏痛和躯体痛都有镇痛作用<sup>[6]</sup>。而黑茶多酚提取物茶红素<sup>[7]</sup>对IBS有止泻作用, 并可能调节5-HT3R。而黄酮代表槲皮素(quercetin)<sup>[8]</sup>、芸香苷(rutin)<sup>[9]</sup>及金丝桃甙(hyperoside)<sup>[10]</sup>均有一定的炎性镇痛作用。且槲皮素能浓度依赖性地抑制爪蟾卵母细胞上5-HT3AR电流<sup>[11]</sup>。所以推测金荞麦可能通过5-HT相关受体对IBS有痛觉改善作用。本实验以结肠刺激(colon irritation, CI)IBS样大鼠为研究对象, 观察模型中痛觉通路脊髓上的5-HT及5-HT1AR、5-HT3AR的功能状态, 并用一定浓度Fag干预模型观察其变化, 初步探讨可能的机制。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 新生Sprague-Dawley大鼠, 体质量5-6 g。由上海斯莱克动物中心提供(生产许可证号: SCXK(沪)2011-0005)。为避免雌激素对痛觉敏感性的影响, 我们只选取♂大鼠。乳大鼠每8-10只与哺乳母鼠1笼。动物自由进食与饮水, 保持昼夜节律各12 h。金荞麦浸膏(50%乙醇提取, 主要有效成分为原矢车菊素B-2(procyanidin B2), 含量为598.02 μg/g, 南通精华制药股份有限公司提供), 匹维溴铵(pinaverium bromide, 苏威制药有限公司), DBA显色剂(北京博奥森公司), 兔抗鼠一抗5-HT(Proteintech Group公司, 美国)、兔抗

## ■研究前沿

研究表明, IBS患者肥大细胞活化, 引起多种组织胺、5-HT、P物质等释放, 作用于初级传入纤维上的受体, 如5-HT3R, 增强神经介导的胃肠道运动与分泌增加, 引起内脏痛觉刺激, 导致腹痛。

## ■创新盘点

本文初步研究发现IBS样CI模型大鼠的脊髓内5-HT的免疫表达,以及5-HT<sub>1A</sub>R和5-HT<sub>3A</sub>R的表达变化,并研究了Fag对模型动物脊髓内这些痛觉信号的影响。

鼠一抗5-HT<sub>1A</sub>R、兔抗鼠一抗5-HT<sub>3A</sub>R(Abcam公司,美国),羊抗兔二抗IgG(Santa Cruz公司,美国),IRDye800荧光标记的羊抗兔二抗IgG(Rockland公司,美国);GAPDH(Bioworld公司,美国),BCA™试剂盒(Pierce,上海玉博生物科技),血管成形术导管(Cordis公司,美国)、纤维素膜(Gelman Laboratory,美国,孔径0.22 μm)、显微镜(Nikon 80i,日本)、LI-COR Odyssey Infrared凝胶成像系统。

## 1.2 方法

1.2.1 CI模型的制备和实验流程: 新生期CI大鼠模型建立方法参照Al-chaer<sup>[12]</sup>: 在乳大鼠出生后8-21 d清醒状态下,将血管成形术导管(直径3 mm,长度20 mm)从肛门插入降结肠行结肠扩张(colorectal distension, CRD)术。留置1 min,间隔30 min再刺激1次。对照组乳大鼠只捉拿而不行结肠刺激。出生后第22天断奶,之后4 wk内不进行任何操作。直至第7-8周龄大鼠体质量达180 g后,给予各组动物生理盐水或药物2 wk,至10-11周龄先评价各组动物内脏敏感性的变化。最后取各组大鼠组织标本检测指标。

1.2.2 腹壁回撤反射评定: 目前国际公认用腹壁撤退反射(abdominal withdrawal reflex, AWR)来鉴定IBS模型或衡量模型动物的内脏敏感性。实验前禁食不禁水12-18 h。乙醚麻醉大鼠,将刺激球囊(乳胶手套制成,直径2.5 cm,长4.0 cm),自肛门植入降结肠内(气囊末端距肛门1 cm,另一端连接血压计),露出部分在大鼠尾根部固定,以防滑脱。待大鼠清醒后放透明有机玻璃笼(18 cm×5 cm×7 cm)内。待动物清醒30 min后开始球囊内注气并记录。分别给予20、30、40、50、60、70、80 mmHg压力,观察结肠扩张反应。每次扩张持续20 s,间歇2 min,每个强度重复3次,取平均值。AWR评分标准参照Al-chaer<sup>[12]</sup>: 无行为反应,0分;给予刺激后大鼠有动作停顿后并见头部有短暂的运动,1分;刺激期间见有腹部肌肉收缩,2分;如有腹部抬起行为,3分;身体拱起,并抬起盆腔和阴囊者,4分。

1.2.3 动物及分组: 造模结束后,将模型组大鼠随机分成4组: 即模型对照组、阳性对照药匹维溴铵组0.02 g/kg、Fag低剂量组6 g/kg和高剂量组24 g/kg。另取同窝大鼠作正常对照,每组8-10只。各组每天分别给予相应药物灌胃,灌胃容积10 mL/kg,每天1次,连续2 wk。正常组和模型CI组给予以等容量生理盐水。

1.2.4 免疫组织化学染色: 用戊巴比妥钠(40 mg/kg,

腹腔内注射)麻醉大鼠,开胸经左心室插管至升主动脉,先以4℃生理盐水冲净血液,再以4℃的4%多聚甲醛灌注固定1 h。取动物腰骶段脊髓(L5-S1)于灌注液中固定24 h。30%蔗糖沉底保存, OCT包埋。脊髓横行剖面切片,片厚4 μm。用SP法进行免疫组织化学染色。一抗、二抗均1:200稀释。各组随机取8张片子观察,选择腰骶段脊髓(L5-S1)背角高倍视野(×400)下,用Image J软件统计视野中阳性细胞数(选取3个不同视野计数后取平均值)。

1.2.5 Western blot: 大鼠脱颈致死后,快速取出腰骶段脊髓(L5-S1)于液氮中保存。用匀浆器将组织匀浆,每100 mg样本加500 μL裂解液,离心(12 500 r/min, 15 min, 4℃)后取上清。蛋白定量用BCA试剂盒检测。煮样5 min, 4℃保存。再取等分上清,含匹配50 μg蛋白量, SDS-PAGE中分离电泳。然后转膜、染色、剪膜、脱色、封闭、洗膜。1:1 000稀释一抗后孵育, 4℃震荡过夜; 1:5 000稀释二抗后, 37℃下振荡90 min。GAPDH按1:1 000稀释作为内参对照。

统计学处理 所获取数据用SPSS18.0 for windows软件统计处理,以mean±SD表示。方差齐性检验用方差分析(ANOVA), 两两比较采用 $t$ 检验。用GraphPad-InStat version 5.01软件画图。 $P<0.05$ 有统计学意义。

## 2 结果

2.1 Fag对CI大鼠内脏高敏感性的影响 同一CRD水平(20-60 mmHg)下的AWR评分,同周龄的对照组和模型组大鼠有显著性差异(20 mmHg:  $0.625\pm0.518$  vs  $1.333\pm0.778$ ; 30 mmHg:  $0.750\pm0.463$  vs  $1.667\pm0.888$ ; 40 mmHg:  $1.125\pm0.641$  vs  $2.000\pm0.739$ ; 50 mmHg:  $1.500\pm0.926$  vs  $2.583\pm0.793$ ; 60 mmHg:  $2.125\pm0.991$  vs  $3.083\pm0.669$ ; 均 $P<0.05$ , 图1)。证实CI大鼠存在内脏敏化,且不受盐水等灌胃因素的影响。与同周龄的模型大鼠比, Fag低剂量组的AWR评分仅在CRD 20 mmHg压力下显著下降(20 mmHg:  $0.500\pm0.534$ ;  $P<0.05$ ); 而Fag高剂量治疗组的AWR评分在CRD 20-60 mmHg压力下均有显著下降(20 mmHg:  $0.250\pm0.002$ ; 30 mmHg:  $0.875\pm0.044$ ; 40 mmHg:  $1.250\pm0.036$ ; 50 mmHg:  $1.875\pm0.050$ ; 60 mmHg:  $2.625\pm0.037$ ; 均 $P<0.05$ ); 而匹维溴铵组的AWR评分在CRD 20-70 mmHg压力下,也均显著下降,且差异更明显(20 mmHg:  $0.333\pm0.003$ ; 30 mmHg:  $0.556\pm0.006$ ; 40 mmHg:

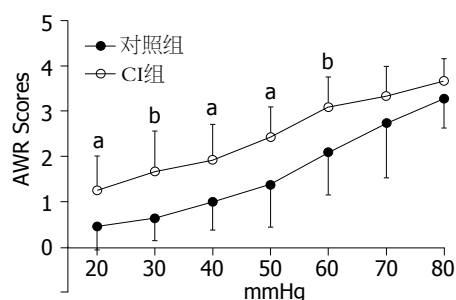


图1 造模后大鼠AWR评分。\* $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs CI组。

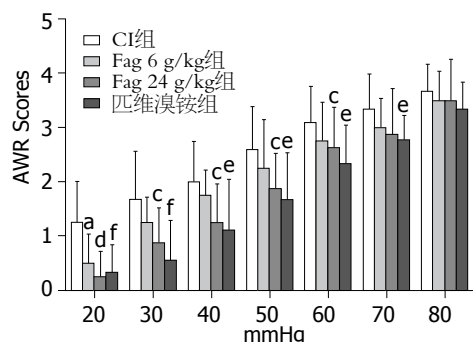


图2 药物干预后的AWR评分。\* $P < 0.05$ , Fag(6 g/kg)组 vs CI组; <sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$ , Fag(24 g/kg)组 vs CI组; <sup>c</sup> $P < 0.05$ , <sup>d</sup> $P < 0.01$ , 匹维溴铵组 vs CI组。

1.111 $\pm$ 0.024; 50 mmHg: 1.667 $\pm$ 0.021; 60 mmHg: 2.333 $\pm$ 0.023; 70 mmHg: 2.778 $\pm$ 0.040;  $P < 0.05$ , 图2)。

2.2 Fag下调CI大鼠脊髓背角5-HT免疫组织化学染色 5-HT阳性神经元细胞主要为胞质棕黄色染色(图3)。在对照组, 5-HT阳性细胞主要分布于脊髓背角的I、II、V、X区, 表达量较少且胞体较小; 而CI模型组脊髓背角5-HT阳性细胞数量增多、胞体增大、染色加深, 且阳性细胞数量与对照组比明显增加(11.250 $\pm$ 4.833 vs 21.125 $\pm$ 7.827,  $P < 0.01$ )。而与模型组比, Fag高剂量可明显下调5-HT阳性细胞数在脊髓背角的表达(13.375 $\pm$ 5.579,  $P < 0.05$ ); Fag低剂量可在一定程度上降低5-HT阳性细胞的染色度, 但其数量的改变无显著性差异(15.625 $\pm$ 5.951,  $P > 0.05$ ); 匹维溴铵可在一定程度上降低5-HT阳性细胞胞体大小, 但是对其阳性细胞的数量改变亦无显著性差异(19.750 $\pm$ 4.367,  $P > 0.05$ , 图4)。

2.3 Fag对CI大鼠脊髓背角5-HT1AR、5-HT3AR蛋白印迹表达的影响 与对照组相比, CI模型组脊髓背角5-HT1AR蛋白表达下降(64.523 $\pm$ 16.873 vs 100,  $P < 0.01$ ), 而5-HT3AR蛋白表达则明显升高(179.038 $\pm$ 29.786 vs 100,  $P < 0.01$ , 图5)。Fag表现出一定的调节作用, 与模型组比, Fag低剂量对5-HT1AR、5-HT3AR表达趋势影响不明显

(5-HT1AR: 65.678 $\pm$ 19.268; 5-HT3AR: 196.683 $\pm$ 21.020,  $P > 0.05$ ); 但Fag高剂量则可显著升高5-HT1AR表达(93.008 $\pm$ 13.523,  $P < 0.05$ ), 显著降低5-HT3AR的表达(114.200 $\pm$ 20.983,  $P < 0.05$ ), 使二者接近正常组( $P > 0.05$ , 图6)。

### 3 讨论

脊髓背角(spinal dorsal horn)是感觉信息整合的初级中枢, 他由初级感觉传入神经、中间神经元、脊髓投射神经元和脊髓下行纤维构成了神经网络<sup>[13]</sup>。而腰骶段脊髓的生化改变及受体功能异常是IBS产生的病理基础<sup>[14]</sup>。既往研究表明, IBS患者体内5-HT水平增高<sup>[15]</sup>, 而5-HT对痛觉信号的下行通路起双重调控作用: 电化学促进脊髓内5-HT释放并作用于脊髓内5-HT1A受体产生镇痛作用<sup>[16,17]</sup>。而机械性刺激或神经损伤导致神经可塑性变化, 5-HT作用于5-HT3受体, 发挥加强痛觉过敏的作用<sup>[18]</sup>。5-HT1A受体分自身受体(突触前膜受体)和突触后膜受体两种, 突触后的5-HT1A受体主要在脊髓丘脑束神经元浅层<sup>[19]</sup>、脊髓背角椎板深层X区<sup>[20]</sup>和脊髓GABA能中间神经元<sup>[21]</sup>。慢性痛觉过程主要由突触后膜5-HT1A受体激动产生镇痛效应, 而前膜受体已脱敏<sup>[22]</sup>。人脑成像亦表明, 5-HT1A受体高表达的受试者, 在冷压痛试验(a cold pressor pain test)中对痛觉强度的感受性较低<sup>[23]</sup>。所以众多研究表明激动5-HT1A受体有较强的镇痛效果<sup>[24,25]</sup>。而5-HT3受体在脊髓内主要分布在后角浅层的兴奋性中间神经元<sup>[26]</sup>和NK1投射神经元所在的I/III区域内<sup>[27]</sup>。他有1A、1B两种亚基, 在外周主要是加强伤害性刺激, 与Kawamata等<sup>[28]</sup>的研究结果不同, 更多实验阐明, 中枢性痛及慢性痛在传导机制中, 5-HT3受体激活起到敏化脊髓神经元和易化脊髓活性增强的作用<sup>[29]</sup>, 且不参与急性痛觉过程<sup>[30]</sup>。中枢性的5-HT3受体抑制剂昂丹司琼(Ondansetron)<sup>[31]</sup>、托烷司琼(tropisetron)<sup>[32]</sup>和多拉司琼(dolasetron)<sup>[33]</sup>均有抗神经性痛的作用。

本实验用Al-Chaer's法成功制造IBS样内脏高敏感CI模型, 且CI模型属于机械刺激的慢性痛觉模型, 在新生期使大鼠感觉神经发生可塑性变化, 导致痛觉过敏具有不随时间变化的稳定性<sup>[12]</sup>。且发现IBS样CI模型大鼠的脊髓内5-HT免疫染色较对照组显著增高, 和以往报道一致。Western blot又表明CI大鼠脊髓内5-HT3受体亚型中的5-HT3A蛋白表达升高, 而5-HT1A蛋白表达降低, 这与5-HT在脊髓下行通路中增强痛觉过敏的作

### ■应用要点

从动物模型验证了Fag对IBS有一定的治疗意义, 并且是通过脑肠轴的脊髓内痛觉相关信号起作用。为进一步研究金荞麦在脊髓内的镇痛机制打开思路, 为下一步金荞麦的临床应用奠定了理论基础。



### ■名词解释

金荞麦: 我国民间常用的一种中草药, 药用其根茎。性平、微凉、味苦、酸涩, 归肺、胃、脾经。具有清热解毒, 健脾止泻, 祛风活血祛瘀除湿、收敛止血、润肺补肾、软坚散结等功效。现代药理学研究证明, 金荞麦成分中的单宁类物质有较强的抗氧化、抗酶、免疫调节、抗炎、抗癌作用。

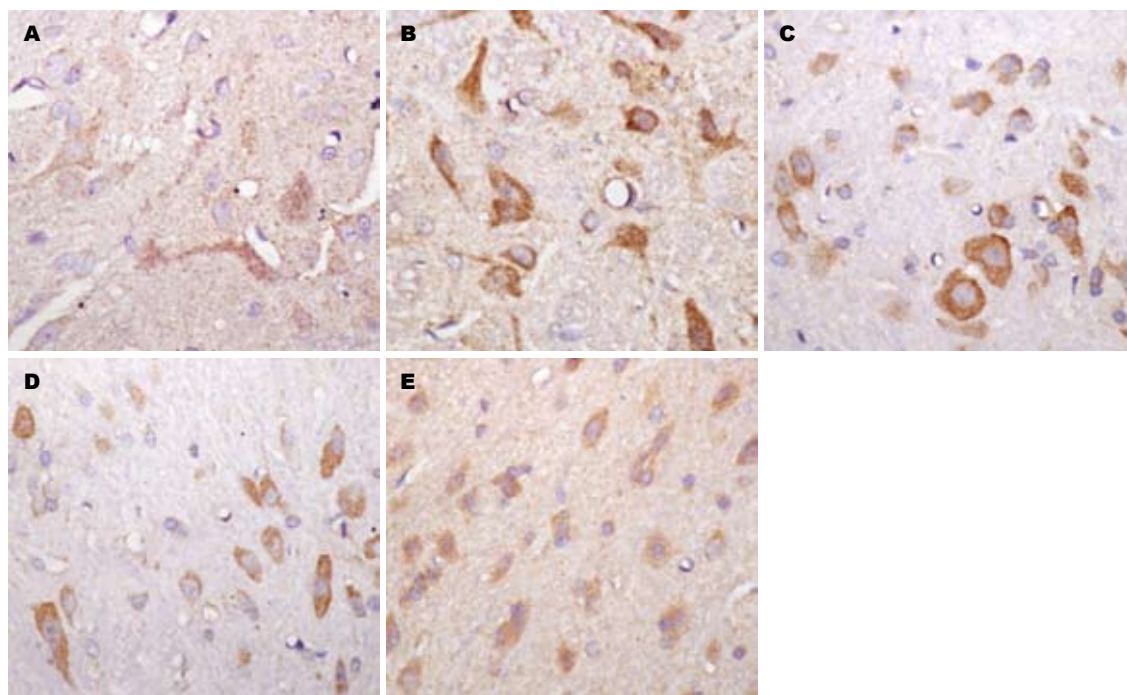


图3 Fag干预后大鼠脊髓5-HT阳性细胞的表达( $\times 400$ )。A: 正常组; B: CI模型组; C: Fag 6 g/kg组; D: Fag 24 g/kg组; E: 匹维溴铵组。

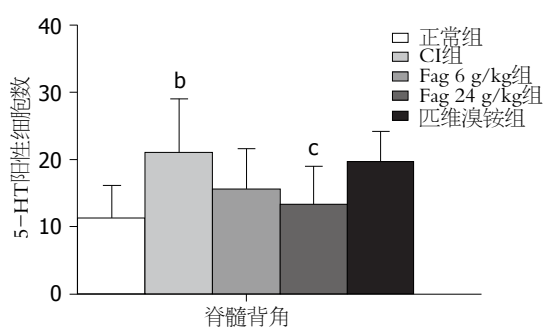


图4 5-HT阳性细胞数分析。<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs CI组; <sup>c</sup> $P < 0.05$ , Fag 24 g/kg组 vs CI组。

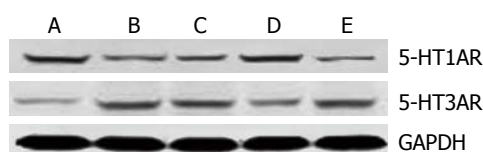


图5 大鼠脊髓背角5-HTR的Western blot表达。A: 正常组; B: CI模型组; C: Fag 6 g/kg组; D: Fag 24 g/kg组; E: 匹维溴铵组。

用相呼应。说明机械刺激产生了高水平5-HT, 后者与高水平的5-HT3受体作用产生的易化痛觉效应较强, 而与低表达的5-HT1A受体作用产生的抗痛效应较弱, 最终模型表现为内脏痛觉过敏。实验中用药物Fag干预后, 可缓解一定CRD压力下CI大鼠的痛觉过敏, 并呈现一定的剂量依赖性。首先Fag降低脊髓内升高的5-HT表达, 其次上调了模型中降低的5-HT1A受体蛋白表达, 最后

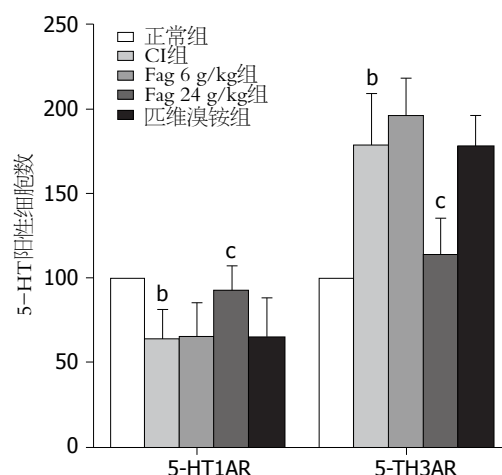


图6 5-HTR蛋白表达的相对灰度。<sup>b</sup> $P < 0.01$ , CI组 vs 对照组; <sup>c</sup> $P < 0.05$ , Fag 24 g/kg组 vs CI组。

又下调了模型中增高的5-HT3A受体表达。

总之, Fag中以单宁类成分原矢车菊素B-2为主的多物质可能通过抗炎、抗氧自由基保护神经细胞膜, 阻止神经递质5-HT产生和释放; 同时也可能通过上游信号通路, 一方面拮抗配体受体5-HT3A表达, 另一方面促进G蛋白偶联体超家族的5-HT1A受体表达, 在脊髓内从多个靶点、多个途径改善IBS模型的痛觉过敏, 起到镇痛治疗作用。但确切的机制还需进一步深入研究。

志谢 感谢孔悦与胡玉转同志在本实验中给予的大力帮助。

## 4 参考文献

- 1 Mayer EA, Gebhart GF. Basic and clinical aspects of visceral hyperalgesia. *Gastroenterology* 1994; 107: 271-293
- 2 Bardin L. The complex role of serotonin and 5-HT receptors in chronic pain. *Behav Pharmacol* 2011; 22: 390-404
- 3 闫继兰. 金荞麦的临床应用. 中国民族民间医药杂志 2003; 62: 182-183
- 4 孙志广, 周云中, 王兆龙. 金荞麦胶囊、片在制备治疗肠易激综合症的药物中的应用. 中国专利 200710022046.3. 2007-04-26
- 5 刘永隆, 房其年, 张秀琴. 金荞麦有效成分的研究. 药理学学报 1983; 18: 545-547
- 6 DalBó S, Jürgensen S, Horst H, Ruzza AA, Soethe DN, Santos AR, Pizzolatti MG, Ribeiro-do-Valle RM. Antinociceptive effect of proanthocyanidins from *Croton celtidifolius* bark. *J Pharm Pharmacol* 2005; 57: 765-771
- 7 Jafari K, Faghihi M, Gharibzadeh S. Black tea extract and its major polyphenolic pigment may ameliorate the gastrointestinal disorder in irritable bowel syndrome. *Med Hypotheses* 2006; 67: 419
- 8 Shaik YB, Castellani ML, Perrella A, Conti F, Salini V, Tete S, Madhappan B, Vecchiet J, De Lutiis MA, Caraffa A, Cerulli G. Role of quercetin (a natural herbal compound) in allergy and inflammation. *J Biol Regul Homeost Agents* 2006; 20: 47-52
- 9 宋必卫, 马传庚, 田薇. 芦丁的镇痛作用. 安徽医科大学学报 1995; 30: 177-179
- 10 Zhang XN, Li JM, Yang Q, Feng B, Liu SB, Xu ZH, Guo YY, Zhao MG. Anti-apoptotic effects of hyperoside via inhibition of NR2B-containing NMDA receptors. *Pharmacol Rep* 2010; 62: 949-955
- 11 Lee BH, Pyo MK, Lee JH, Choi SH, Shin TJ, Lee SM, Lim Y, Han YS, Paik HD, Cho SG, Yun-Choi HS, Rhim H, Nah SY. Differential regulations of quercetin and its glycosides on ligand-gated ion channels. *Biol Pharm Bull* 2008; 31: 611-617
- 12 Al-Chaer ED, Kawasaki M, Pasricha PJ. A new model of chronic visceral hypersensitivity in adult rats induced by colon irritation during postnatal development. *Gastroenterology* 2000; 119: 1276-1285
- 13 Cervero F, Iggo A. The substantia gelatinosa of the spinal cord: a critical review. *Brain* 1980; 103: 717-772
- 14 Jänig W, Morrison JF. Functional properties of spinal visceral afferents supplying abdominal and pelvic organs, with special emphasis on visceral nociception. *Prog Brain Res* 1986; 67: 87-114
- 15 Bearcroft CP, Perrett D, Farthing MJ. Postprandial plasma 5-hydroxytryptamine in diarrhoea predominant irritable bowel syndrome: a pilot study. *Gut* 1998; 42: 42-46
- 16 Millan MJ. Descending control of pain. *Prog Neurobiol* 2002; 66: 355-474
- 17 Viisanen H, Pertovaara A. Roles of the rostroventromedial medulla and the spinal 5-HT(1A) receptor in descending antinociception induced by motor cortex stimulation in the neuropathic rat. *Neurosci Lett* 2010; 476: 133-137
- 18 Ossipov MH, Dussor GO, Porreca F. Central modulation of pain. *J Clin Invest* 2010; 120: 3779-3787
- 19 Marlier L, Teilhac JR, Cerruti C, Privat A. Autoradiographic mapping of 5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub> and 5-HT<sub>2</sub> receptors in the rat spinal cord. *Brain Res* 1991; 550: 15-23
- 20 Laporte AM, Koscielniak T, Ponchant M, Vergé D, Hamon M, Gozlan H. Quantitative autoradiographic mapping of 5-HT<sub>3</sub> receptors in the rat CNS using [125I]iodo-zacopride and [3H]zacopride as radioligands. *Synapse* 1992; 10: 271-281
- 21 Wang YY, Wei YY, Huang J, Wang W, Tamamaki N, Li YQ, Wu SX. Expression patterns of 5-HT receptor subtypes 1A and 2A on GABAergic neurons within the spinal dorsal horn of GAD67-GFP knock-in mice. *J Chem Neuroanat* 2009; 38: 75-81
- 22 Colpaert FC, Deseure K, Stinus L, Adriaenssens H. High-efficacy 5-hydroxytryptamine 1A receptor activation counteracts opioid hyperalldodynia and affective conditioning. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 316: 892-899
- 23 Martikainen IK, Hirvonen J, Kajander J, Hagelberg N, Mansikka H, Någren K, Hietala J, Pertovaara A. Correlation of human cold pressor pain responses with 5-HT(1A) receptor binding in the brain. *Brain Res* 2007; 1172: 21-31
- 24 Rojas-Corralles MO, Ortega-Alvaro A, Gibert-Rahola J, Roca-Vinardell A, Micó JA. Pindolol, a beta-adrenoceptor blocker/5-hydroxytryptamine(1A/1B) antagonist, enhances the analgesic effect of tramadol. *Pain* 2000; 88: 119-124
- 25 Rojas-Corralles MO, Berrocoso E, Micó JA. Role of 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>1B</sub> receptors in the antinociceptive effect of tramadol. *Eur J Pharmacol* 2005; 511: 21-26
- 26 Kia HK, Miquel MC, McKernan RM, Laporte AM, Lombard MC, Bourgoin S, Hamon M, Vergé D. Localization of 5-HT<sub>3</sub> receptors in the rat spinal cord: immunohistochemistry and in situ hybridization. *Neuroreport* 1995; 6: 257-261
- 27 Maxwell DJ, Kerr R, Rashid S, Anderson E. Characterisation of axon terminals in the rat dorsal horn that are immunoreactive for serotonin 5-HT<sub>3A</sub> receptor subunits. *Exp Brain Res* 2003; 149: 114-124
- 28 Kawamata T, Omote K, Toriyabe M, Yamamoto H, Namiki A. The activation of 5-HT(3) receptors evokes GABA release in the spinal cord. *Brain Res* 2003; 978: 250-255
- 29 Kayser V, Elfassi IE, Aubel B, Melfort M, Julius D, Gingrich JA, Hamon M, Bourgoin S. Mechanical, thermal and formalin-induced nociception is differentially altered in 5-HT<sub>1A</sub>/-, 5-HT<sub>1B</sub>/-, 5-HT<sub>2A</sub>/-, 5-HT<sub>3A</sub>/- and 5-HTT/- knock-out male mice. *Pain* 2007; 130: 235-248
- 30 Zeitz KP, Guy N, Malmberg AB, Dirajlal S, Martin WJ, Sun L, Bonhaus DW, Stucky CL, Julius D, Basbaum AI. The 5-HT<sub>3</sub> subtype of serotonin receptor contributes to nociceptive processing via a novel subset of myelinated and unmyelinated nociceptors. *J Neurosci* 2002; 22: 1010-1019
- 31 McCleane GJ, Suzuki R, Dickenson AH. Does a single intravenous injection of the 5HT<sub>3</sub> receptor antagonist ondansetron have an analgesic effect in neuropathic pain? A double-blinded, placebo-controlled cross-over study. *Anesth Analg* 2003; 97: 1474-1478
- 32 Färber L, Stratz T, Brückle W, Späth M, Pongratz D, Lautenschläger J, Kötter I, Zöller B, Peter HH, Neeck G, Alten R, Müller W. Efficacy and tolerability of tropisetron in primary fibromyalgia—a highly selective and competitive 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonist. German Fibromyalgia Study Group. *Scand J Rheumatol Suppl* 2000; 113: 49-54
- 33 Vergne-Salle P, Dufaure-Lombard C, Bonnet C, Simon A, Trèves R, Bonnabau H, Bertin P. A randomised, double-blind, placebo-controlled trial of dolasetron, a 5-hydroxytryptamine 3 receptor antagonist, in patients with fibromyalgia. *Eur J Pain* 2011; 15: 509-514

## ■同行评价

本研究立题有依据, 方法先进, 动物模型规范, 对照组设计合理, 结果可信, 论点明确, 对临床IBS的研究和治疗有一定的参考意义。

# HspB1在新疆哈萨克族食管癌组织中的表达

张景萍, 李卉, 李秀梅, 姜孝芳, 李艳, 张秦忠, 陈艳, 王洪江, 庞作良, 谌宏鸣, 李惠武

## ■背景资料

食管癌是人类最常见的消化系统恶性肿瘤之一,我国是食管癌高发地区,5年生存率不到15%。新疆是我国食管癌高发区之一,尤其是哈萨克族居民的发病率最高,是新疆的民族特高疾病,其发病率高达155.9/10万,远高于同地区其他民族(22.3/10万)。

张景萍, 李卉, 李秀梅, 姜孝芳, 李艳, 张秦忠, 陈艳, 谌宏鸣, 李惠武, 新疆医科大学基础医学院 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830011

王洪江, 庞作良, 新疆医科大学附属肿瘤医院胸外科 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830011

张景萍, 硕士, 讲师, 主要从事肿瘤发病机制研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30950012

作者贡献分布: 此课题由李惠武、谌宏鸣及张景萍设计; 研究过程由张景萍、李卉、李秀梅、姜孝芳、李艳、张秦忠、陈艳、王洪江及庞作良操作完成; 数据分析由张景萍、李卉及李秀梅完成; 写作部分由张景萍、李卉及李惠武完成。

通讯作者: 李惠武, 教授, 830011, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市新医路393号, 新疆医科大学基础医学院。

huiwuli1234@163.com

电话: 0991-4366434

收稿日期: 2012-02-04 修回日期: 2012-03-27

接受日期: 2012-04-25 在线出版日期: 2012-05-28

## Expression of HspB1 in esophageal cancer in Xinjiang Kazakh patients

Jing-Ping Zhang, Hui Li, Xiu-Mei Li, Xiao-Fang Jiang, Yan Li, Qin-Zhong Zhang, Yan Chen, Hong-Jiang Wang, Zuo-Liang Pang, Hong-Ming Shen, Hui-Wu Li

Jing-Ping Zhang, Hui Li, Xiu-Mei Li, Xiao-Fang Jiang, Yan Li, Qin-Zhong Zhang, Yan Chen, Hong-Ming Shen, Hui-Wu Li, Basic Medical School of Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Hong-Jiang Wang, Zuo-Liang Pang, Department of Thoracic Surgery, the Affiliated Tumor Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30950012

Corresponding to: Hui-Wu Li, Professor, Basic Medical School of Xinjiang Medical University, 393 Xinyi Road, Urumqi 830011, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China. huiwuli1234@163.com

Received: 2012-02-04 Revised: 2012-03-27

Accepted: 2012-04-25 Published online: 2012-05-28

## Abstract

**AIM:** To obtain differentially expressed proteins in esophageal cancer in Xinjiang Kazakh patients by using a comparative proteomic method to provide clues to early diagnosis and therapy of this malignancy.

**METHODS:** Two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry

(MALDI-TOF-MS) were utilized for the identification of proteins differentially expressed between cancer and adjacent non-cancerous tissue. The differential expression of HspB1 was further verified by RT-PCR.

**RESULTS:** Overexpression of HspB1 protein was noted in esophageal cancer; however, its mRNA expression showed no significant difference between cancer tissue and normal tissue ( $2.18 \pm 3.98$  vs  $3.06 \pm 4.69$ ,  $P > 0.05$ ). HspB1 mRNA expression had no correlation with depth of invasion, clinical stage, or degree of differentiation (all  $P > 0.05$ ). The percentage of samples showing higher HspB1 expression in esophageal cancer than in normal tissue, in patients with T3 to T4 cancer than in those with T1 to T2 cancer, and in those with high-differentiation cancer than in those with low-differentiation cancer.

**CONCLUSION:** Our finding suggests that HspB1 expression may be regulated by several different mechanisms during the infiltration and differentiation of esophageal cancer.

**Key Words:** Heat shock 27 kDa protein 1; Comparative proteomics; Esophageal cancer

Zhang JP, Li H, Li XM, Jiang XF, Li Y, Zhang QZ, Chen Y, Wang HJ, Pang ZL, Shen HM, Li HW. Expression of HspB1 in esophageal cancer in Xinjiang Kazakh patients. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(15): 1296-1300

## 摘要

**目的:** 寻找与新疆哈萨克族食管癌发生、发展密切相关的基因, 为早期诊断和治疗提供依据。

**方法:** 利用二维凝胶电泳(2-DE)和基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)技术联用检测出新疆哈萨克族食管癌组织与远端正常组织的差异表达蛋白。对其中的HspB1基因进行RT-PCR验证。

**结果:** 2-DE结果显示新疆哈萨克族食管癌患者癌组织和远端正常组织在蛋白质水平有显著增高, 而其mRNA表达在癌组织中为 $2.18 \pm$

## ■同行评议者

黄缘, 教授, 南昌大学第二附属医院消化内科, 江西省分子医学重点实验室

3.98, 正常组织为 $3.06 \pm 4.69$ , 并无显著升高( $P>0.05$ ), 且与浸润深度、临床分期、分化程度无关( $P>0.05$ ), 但HspB1的表达量在浸润深度组, T1-T2期 $T>N$ 为7/11(63.6%), 而T3-T4期 $T>N$ 仅为14/37(37.8%); 在分化程度组, 低分化期 $T>N$ 为5/9(55.6%), 中高分化期 $T>N$ 仅为16/39(41%)。随着浸润深度和分化程度的逐步加深, 由 $T>N$ 向 $T<N$ 变化。

**结论:** 本研究提示HspB1的表达在哈萨克族食管癌的浸润、分化中可能受多种因素的调控, 也由此说明哈萨克族食管癌的发生发展有着特殊的机制。

**关键词:** 热休克蛋白B1; 比较蛋白质组学; 食管癌

张景萍, 李卉, 李秀梅, 姜孝芳, 李艳, 张秦忠, 陈艳, 王洪江, 庞作良, 谌宏鸣, 李惠武. HspB1在新疆哈萨克族食管癌组织中的表达. 世界华人消化杂志 2012; 20(15): 1296-1300  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1296.asp>

## 0 引言

食管癌是人类最常见的消化系恶性肿瘤之一, 我国是食管癌高发地区, 5年生存率不到15%<sup>[1]</sup>。新疆是我国食管癌高发区之一, 尤其是哈萨克族居民的发病率最高, 是新疆的民族特高发疾病, 其发病率高达155.9/10万, 远高于同地区其他民族(22.3/10万)<sup>[2]</sup>。蛋白质组学被认为是基因组时代一种高通量同时可研究疾病发生发展全过程中整体蛋白质变化的重要技术<sup>[3-7]</sup>。本研究目的是使用二维凝胶电泳(2-dimension electrophoresis, 2-DE)和基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS)技术联用检测新疆哈萨克族食管癌患者癌组织和远端正常组织, 获得差异表达基因, 扩大样本量进一步验证差异基因的表达水平, 为新疆哈萨克族食管癌的早期诊断和预防提供可用的分子标记。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 48对匹配的哈萨克族食管癌患者癌组织及相距6 cm以上的远端无癌正常组织, 取自新疆医科大学附属肿瘤医院2008-01/06收治的病例, 均为鳞癌, 其中男34例, 女14例, 年龄在35-67岁之间。提取的组织经冷PBS洗涤后放入液氮中保存备用。标本组织学分级: 组织高中分化39例, 低分化9例; 浸润深度T1+T2共11例, T3+T4共37例; TNM分期 I - II a期14例, II b-III期34例。

## 1.2 方法

**1.2.1 2-DE:** 按文献[8]的方法进行操作。

**1.2.2 MALDI-TOF鉴定单个蛋白质:** (1)胶内酶解及Ziptip脱盐: 每个胶粒切碎后放入Eppendorf管中, 每管加入200-400  $\mu$ L 100 mmol/L  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ /30%ACN脱色, 冻干后, 加入5  $\mu$ L 2.5-10  $\mu$ g/L测序级Trypsin(Promega)溶液(酶与被分析蛋白质质量比一般为1:20-1:100), 37  $^{\circ}\text{C}$ 反应过夜(20 h左右); 吸出酶解液, 转移至新EP管中, 原管加入100  $\mu$ L 60% ACN/0.1%TFA, 超声15 min, 合并前次溶液, 冻干; 若有盐, 则用Ziptip(millipore)进行脱盐; (2)质谱分析: 样品与5 g/L HCCA基质1:1混合后, 用4800串联飞行时间质谱仪(4800 Plus MALDI TOF/TOFTM Analyzer, Applied Biosystems, USA)进行质谱分析, 激光源为355 nm波长的Nd:YAG激光器, 加速电压为2 kV, 采用正离子模式和自动获取数据的模式采集数据, PMF质量扫描范围为800-4 000 Da, 选择信噪比>50的母离子进行二级质谱(MS/MS)分析, 每个样品点上选择8个母离子, 二级MS/MS激光激发2 500次, 碰撞能量2 kV, CID关闭; (3)数据库检索: 将肽质量指纹数据通过因特网在蛋白质序列库中进行搜索, 搜索软件为Mascot, 数据库选择为NCBI, 物种为人类(human), 以Mowse分值为基础的概率(P)评价数据库搜寻结果的质量, 分值大小表示鉴定蛋白属于随机匹配的可能性, >63表明具有显著性意义。

**1.2.3 RT-PCR:** 选取48对匹配的哈萨克族食管癌患者癌组织及正常组织。采用TRIzol试剂一步提取细胞总RNA, RNA提取物1  $\mu$ g, 逆转录为cDNA, 取以上样品cDNA 2  $\mu$ L, 加入2 $\times$ Buffer 10  $\mu$ L, 引物各1  $\mu$ L, 加去离子水至20  $\mu$ L, 以20  $\mu$ L体系进行PCR扩增。PCR扩增条件及引物序列及扩增条件见表1。GAPDH用于作内对照。取扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色, 紫外灯下观察结果。用凝胶成像系统进行半定量分析, 取目的基因条带和GAPDH条带强度的比值作为目的基因的相对值。

## 2 结果

**2.1 癌组织与正常组织差异表达2-DE图谱** 通过2-DE技术, 得到新疆哈萨克族食管癌癌组织和远端无癌组织的差异表达蛋白谱<sup>[9]</sup>。用IMAGE MASTERTM(GE)进行两组之间的t-test分析, 得到合乎统计学标准的蛋白质差异点。蛋白表达强度差异在1.5倍以上者被认为差异蛋白, 做进

### ■ 研发前沿

蛋白质组学被认为是基因组时代一种高通量同时可研究疾病发生发展全过程中整体蛋白质的变化的重要技术。随着蛋白质组学的发展, 从蛋白水平研究肿瘤的发病机制成为热点, 为寻找肿瘤分子标志物及新的治疗靶点提供了良好的技术平台。



## ■ 相关报道

Langer等人研究证实HspB1在食管腺癌中表达增加,且认为HspB1的过量表达与食管鳞癌细胞的分化有关。Kawanishi研究却表明HspB1在食管癌中低表达,并认为这种变化可以作为食管癌患者预后的一个重要标志物。

表 1 各基因的引物序列及PCR扩增相关条件

基因	序列	长度(bp)	PCR反应条件
HspB1	F5'-AGGATGGCGTGGTGGAGA-3' R5'-GAAGGTGACTGGGATGGTGA-3'	205	94 °C, 5 min; 94 °C, 30 s, 56 °C, 30 s, 72 °C, 30 s, 35 个循环; 72 °C, 7 min
GAPDH	F5'-CGCGGGCTCTCCAGAACATCAT-3' R5'-CCAGCCCCAGCGTCAAAGGTG-3'	298	95 °C, 5 min, 94 °C, 30 s, 58 °C, 30 s, 72 °C, 60 s, 35 个循环; 72 °C, 20 min

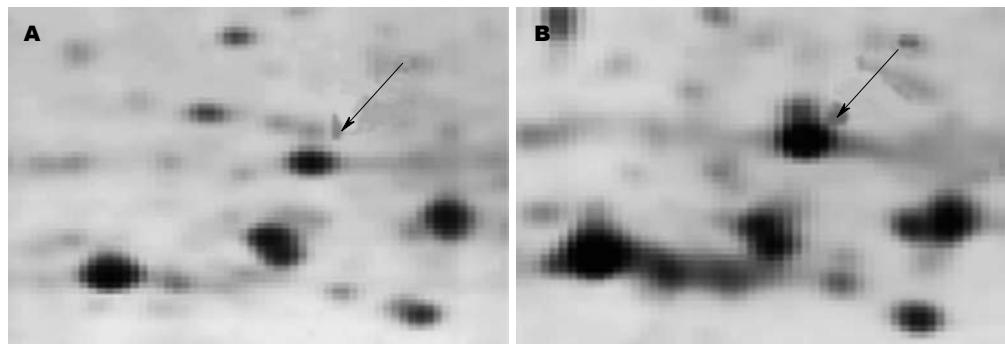


图 1 差异表达蛋白HspB1的局部放大图. A: 癌组织; B: 正常组织.

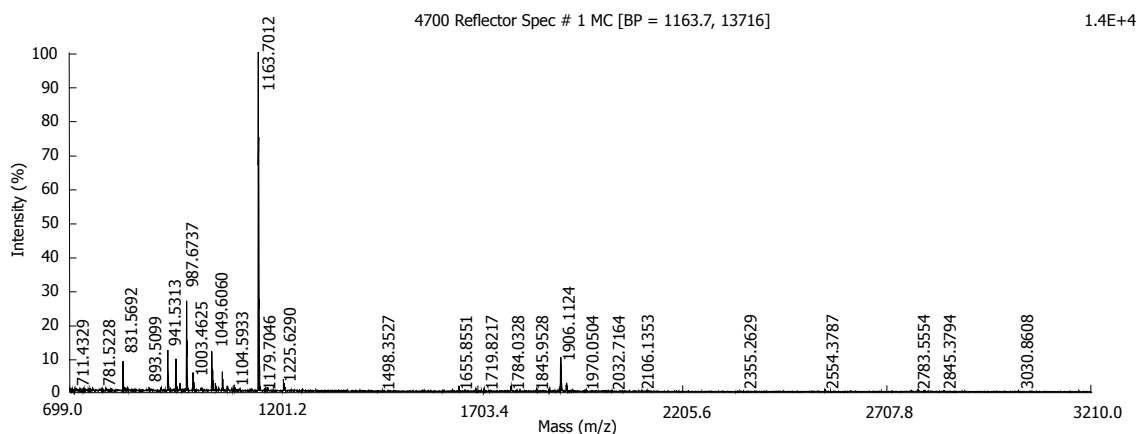


图 2 经质谱分析所得的肽指纹图谱(HspB1).

一步质谱分析. 本研究选择在癌组织中表达上调的HspB1进行下一步研究, 2-DE图谱中HspB1的局部放大如图1.

**2.2 差异蛋白的质谱鉴定** 选取图像分析得到的差异蛋白点, 切碎后放入Eppendorf管中, 做胶内酶解, 37 °C反应过夜, 20 h左右. 进行质谱分析, 获得蛋白点的相应肽质量指纹图谱, 将肽质量指纹数据通过因特网在蛋白质序列库中进行搜索, HspB1的质谱检测结果如图2.

**2.3 癌组织中HspB1的RT-PCR验证** 在48对样品中, T>N的病例占21例(43.75%). 癌组织中HspB1的相对表达量为 $2.18 \pm 3.98$ , 正常组织为 $3.06 \pm 4.69$  ( $P > 0.05$ , 图3). 说明HspB1 mRNA在癌组织与相应的正常组织表达量无增加.

**2.4 HspB1 mRNA的表达与哈萨克族食管癌临**

床病理因素的关系 将患者按照浸润深度、临床分期分组、分化程度的不同, 在每组内对癌组织及其对应的远端无癌正常组织HspB1基因的表达量进行t检验, 结果显示其表达量与浸润深度、临床分期、分化程度无关 ( $P > 0.05$ ). 进一步分析发现, 随着浸润深度和分化程度的逐步加深, HspB1的表达量发生变化, 在浸润深度组, T1至T2期T>N为7/11(63.6%), 而T3至T4期T>N仅为14/37(37.8%); 在分化程度组, 低分化期T>N为5/9(55.6%), 中高分化期T>N仅为16/39(41%, 表2).

### 3 讨论

食管癌是消化系统常见的肿瘤, 其发病率和死亡率近年呈上升趋势, 新疆哈萨克族是食管癌的高发民族, 而食管癌的早期诊断及复发的早期检测



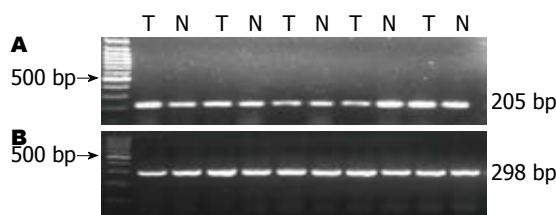


图3 HspB1和GAPDH的2%琼脂糖凝胶电泳图。A: HspB1; B: GAPDH; T: 癌组织; N: 正常组织。

是其有效治疗的关键<sup>[10]</sup>。对于肿瘤和正常组织, 比较蛋白组学能检测出候选差异蛋白分子, 有助于肿瘤的诊断、治疗等。本研究的目的旨在找寻这些分子, 为未来哈萨克族食管癌的发病机制、诊断及治疗奠定基础。本研究中, 通过蛋白组学技术, 我们建立了食管癌及远端无癌正常组织之间的差异表达蛋白谱, 发现多个差异表达蛋白, 进一步鉴定发现这些蛋白参与多种生物学过程, 包括细胞增殖、转化、凋亡、能量代谢、蛋白折叠、构建细胞骨架等功能。

HspB1(heat shock 27 kDa protein 1)是热休克蛋白家族中重要一员, 也称为Hsp25(小鼠)和Hsp27(人类), 是分布最广和研究最多的小热休克蛋白(small heat shock proteins, sHsp)<sup>[11,12]</sup>, 在各种正常和肿瘤组织中均有表达。HspB1的主要生物学功能涉及蛋白与蛋白的相互作用, 如蛋白的折叠、移位和阻止蛋白质的不正确聚合, 维持蛋白质的正常结构, 同时也可以保护细胞免受各种应激因素的损伤, 是重要的分子伴侣。

研究证实HspB1在多种肿瘤中出现异常表达<sup>[13]</sup>, 如大肠癌<sup>[14-16]</sup>、神经母细胞瘤<sup>[17]</sup>、肝癌<sup>[18-20]</sup>、胃癌<sup>[21-23]</sup>、乳腺癌<sup>[24,25]</sup>、前列腺癌<sup>[26]</sup>。HspB1在食管癌的致癌过程中所起的作用仍然不清, 研究证实HspB1在食管腺癌中表达增加<sup>[27-29]</sup>, 且认为HspB1的过量表达与食管鳞癌细胞的分化有关<sup>[30]</sup>。Kawanishi等<sup>[31]</sup>研究却表明HspB1在食管癌中低表达, 并且认为这种变化可以作为食管癌患者预后的一个重要标志物。而我们的研究结果显示通过2-DE方法检测HspB1在蛋白水平表达上调, 通过RT-PCR方法验证48例患者匹配的癌组织和远端无癌正常组织中表达没有显著的差异, 且与浸润深度、临床分期、分化程度无关。进一步分析后发现, HspB1的表达量随着浸润深度和分化程度的逐步加深, 由T>N向T<N变化。提示HspB1的表达在哈萨克族食管癌的浸润、分化中可能受多种因素的调控, 也说明哈萨克族食管癌的发生发展有着特殊的机制。

表2 食管鳞癌中HspB1 mRNA表达情况与病理特征之间的关系

临床特征	n	值	P值	T>N	T<N
浸润深度					
T1+T2	11	-1.294	0.218	7	4
T3+T4	37	-0.645	0.521	14	23
TNM分期					
I + II a	14	-0.630	0.534	6	8
II b + III	34	-0.752	0.455	15	19
分化程度					
低分化	9	-1.245	0.231	5	4
中-高分化	39	-0.512	0.610	16	23
合计	48		21	27	

#### 4 参考文献

- 赵凤娟, 云妙英, 张严, 徐羽. 新疆哈萨克族食管癌研究进展. 中央民族大学学报(自然科学版) 2009; 18: 85-90
- 张月明. 新疆食管癌的分布. 新疆医学院学报 1988; 11: 139-144
- Kavallaris M, Marshall GM. Proteomics and disease: opportunities and challenges. *Med J Aust* 2005; 182: 575-579
- Chambers G, Lawrie L, Cash P, Murray GI. Proteomics: a new approach to the study of disease. *J Pathol* 2000; 192: 280-288
- Müllner S, Neumann T, Lottspeich F. Proteomics—a new way for drug target discovery. *Arzneimittelforschung* 1998; 48: 93-95
- 吕秀平, 蒲红伟, 龚晓瑾, 苗娜, 陈晓. MALDI-TOF-MS分析新疆食管鳞状细胞癌的蛋白组学. 世界华人消化杂志 2011; 19: 3682-3686
- 丁莺, 吕宾, 沈雁. 蛋白质组学在消化系统肿瘤中的应用. 世界华人消化杂志 2009; 17: 2227-2230
- Rabilloud T. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: old, old fashioned, but it still climbs up the mountains. *Proteomics* 2002; 2: 3-10
- 张景萍, 李卉, 刘玲, 陈艳, 姜孝芳, 李惠武. 新疆哈萨克族食管癌双向凝胶电泳研究. 新疆医科大学学报 2010; 33: 749-751
- 黄潇, 戴益民. 食管癌早期诊断的分子生物学标志物. 世界华人消化杂志 2004; 12: 1168-1171
- Ferns G, Shams S, Shafi S. Heat shock protein 27: its potential role in vascular disease. *Int J Exp Pathol* 2006; 87: 253-274
- Mymrikov EV, Seit-Nebi AS, Gusev NB. Large potentials of small heat shock proteins. *Physiol Rev* 2011; 91: 1123-1159
- Ciocca DR, Calderwood SK. Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. *Cell Stress Chaperones* 2005; 10: 86-103
- Liu W, Ma Y, Huang L, Peng J, Zhang P, Zhang H, Chen J, Qin H. Identification of HSP27 as a potential tumor marker for colorectal cancer by the two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Mol Biol Rep* 2010; 37: 3207-3216
- Strzelczyk JK, Krakowczyk Ł, Kasperczyk J, Strzelczyk J, Zalewska-Ziob M, Wiczowski A. [The concentration of HSP 27 in tumour and adjacent distal mucosa in colorectal adenocarcinoma]. *Przegl Lek*

#### ■应用要点

本研究使用二维凝胶电泳(2-DE)和基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术联用检测新疆哈萨克族食管癌患者癌组织和远端正常组织, 获得差异表达基因, 扩大样本量进一步验证差异基因的表达水平, 为新疆哈萨克族食管癌的早期诊断和预防提供可用的分子标记。

## ■同行评价

该文选题好,立意新颖,与临床密切联系,有区域的代表性。

- 2011; 68: 263-268
- 16 Oya-Ito T, Naito Y, Takagi T, Handa O, Matsui H, Yamada M, Shima K, Yoshikawa T. Heat-shock protein 27 (Hsp27) as a target of methylglyoxal in gastrointestinal cancer. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1812: 769-781
  - 17 Zanini C, Pulerà F, Carta F, Giribaldi G, Mandili G, Maule MM, Forni M, Turrini F. Proteomic identification of heat shock protein 27 as a differentiation and prognostic marker in neuroblastoma but not in Ewing's sarcoma. *Virchows Arch* 2008; 452: 157-167
  - 18 Luk JM, Lam CT, Siu AF, Lam BY, Ng IO, Hu MY, Che CM, Fan ST. Proteomic profiling of hepatocellular carcinoma in Chinese cohort reveals heat-shock proteins (Hsp27, Hsp70, GRP78) up-regulation and their associated prognostic values. *Proteomics* 2006; 6: 1049-1057
  - 19 Chen XL, Zhou L, Yang J, Shen FK, Zhao SP, Wang YL. Hepatocellular carcinoma-associated protein markers investigated by MALDI-TOF MS. *Mol Med Report* 2010; 3: 589-596
  - 20 Guo K, Kang NX, Li Y, Sun L, Gan L, Cui FJ, Gao MD, Liu KY. Regulation of HSP27 on NF-kappaB pathway activation may be involved in metastatic hepatocellular carcinoma cells apoptosis. *BMC Cancer* 2009; 9: 100
  - 21 Yang YX, Sun XF, Cheng AL, Zhang GY, Yi H, Sun Y, Hu HD, Hu P, Ye F, Chen ZC, Xiao ZQ. Increased expression of HSP27 linked to vincristine resistance in human gastric cancer cell line. *J Cancer Res Clin Oncol* 2009; 135: 181-189
  - 22 Carrasco V, Canfrán S, Rodríguez-Franco F, Benito A, Sáinz A, Rodríguez-Bertos A. Canine gastric carcinoma: immunohistochemical expression of cell cycle proteins (p53, p21, and p16) and heat shock proteins (Hsp27 and Hsp70). *Vet Pathol* 2011; 48: 322-329
  - 23 Huang Q, Ye J, Huang Q, Chen W, Wang L, Lin W, Lin J, Lin X. Heat shock protein 27 is over-expressed in tumor tissues and increased in sera of patients with gastric adenocarcinoma. *Clin Chem Lab Med* 2010; 48: 263-269
  - 24 Liebhardt S, Ditsch N, Nieuwland R, Rank A, Jeschke U, Von Koch F, Friese K, Toth B. CEA-, Her2/neu-, BCRP- and Hsp27-positive microparticles in breast cancer patients. *Anticancer Res* 2010; 30: 1707-1712
  - 25 Kim LS, Kim JH. Heat shock protein as molecular targets for breast cancer therapeutics. *J Breast Cancer* 2011; 14: 167-174
  - 26 Larkin SE, Holmes S, Cree IA, Walker T, Basketter V, Bickers B, Harris S, Garbis SD, Townsend PA, Aukim-Hastie C. Identification of markers of prostate cancer progression using candidate gene expression. *Br J Cancer* 2012; 106: 157-165
  - 27 Langer R, Ott K, Specht K, Becker K, Lordick F, Burian M, Herrmann K, Schrattenholz A, Cahill MA, Schwaiger M, Hofler H, Wester HJ. Protein expression profiling in esophageal adenocarcinoma patients indicates association of heat-shock protein 27 expression and chemotherapy response. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 8279-8287
  - 28 夏书华, 胡海, 胡莉萍, 徐昕, 蔡岩, 韩亚玲, 陈宝生, 魏芳, 应万涛, 钱小红, 蔡有余, 沈岩, 吴旻, 王明荣. 食管鳞状上皮癌中表达失调蛋白的研究. *癌症* 2002; 21: 11-15
  - 29 Lambot MA, Peny MO, Fayt I, Haot J, Noël JC. Overexpression of 27-kDa heat shock protein relates to poor histological differentiation in human oesophageal squamous cell carcinoma. *Histopathology* 2000; 36: 326-330
  - 30 Chen JH, Chen LM, Xu LY, Wu MY, Shen ZY. [Expression and significance of heat shock proteins in esophageal squamous cell carcinoma]. *Zhonghua Zhongliu Zazhi* 2006; 28: 758-761
  - 31 Kawanishi K, Shiozaki H, Doki Y, Sakita I, Inoue M, Yano M, Tsujinaka T, Shamma A, Monden M. Prognostic significance of heat shock proteins 27 and 70 in patients with squamous cell carcinoma of the esophagus. *Cancer* 1999; 85: 1649-1657

编辑 张姗姗 电编 鲁亚静

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2012年版权归世界华人消化杂志

## ● 消息 ●

## WJG 总被引频次排名位于第 174 名

本刊讯 *World Journal of Gastroenterology (WJG)* 被 Science Citation Index Expanded (SCIE) 和 MEDLINE 等国际重要检索系统收录, 在国际上享有较高声誉和影响力。WJG 在 PubMed Central (PMC) 统计, 单月独立 IP 地址访问 58 257 次, 全文网络版 (HTML Full Text) 下载 94 888 次, 全文 PDF 下载 59 694 次。另外根据基本科学指标库 (essential science indicators) 统计, 2000-01-01/2010-12-31, SCIE 检索的临床医学 (clinical medicine) 期刊有 1 105 种, 总被引频次排名, WJG 位于第 174 名。 (2011-05-14 马连生 董事长/总编辑)

# Livin和CyclinD1在慢性萎缩性胃炎伴肠化黏膜中的表达及意义

陈吉, 崔宏, 高美丽, 崔琴

陈吉, 崔宏, 高美丽, 崔琴, 内蒙古医学院第三附属医院消化科 内蒙古自治区包头市 014010

陈吉, 博士, 主要从事消化科疾病诊治及内镜操作研究.

内蒙古省包头市卫生基金资助项目, No. WSJJ2011-033

作者贡献分布: 此课题由陈吉设计; 研究过程由陈吉、崔宏、高美丽及崔琴操作完成; 数据分析由崔琴完成; 论文写作由陈吉与崔琴完成.

通讯作者: 陈吉, 主任医师, 014010, 内蒙古自治区包头市, 内蒙古医学院第三附属医院消化科. chenji2847@163.com  
电话: 0472-5992847

收稿日期: 2012-02-16 修回日期: 2012-03-13

接受日期: 2012-04-19 在线出版日期: 2012-05-28

## Clinical significance of expression of livin and cyclin D1 in chronic atrophic gastritis with intestinal metaplasia

Ji Chen, Hong Cui, Mei-Li Gao, Qin Cui

Ji Chen, Hong Cui, Mei-Li Gao, Qin Cui, Department of Digestive Diseases, the Third Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical College, Baotou 014010, Inner Mongolia Autonomous Region, China

Supported by: the Health Fund of Baotou, No. WSJJ2011-033

Correspondence to: Ji Chen, Chief Physician, Department of Digestive Diseases, the Third Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical College, Baotou 014010, Inner Mongolia Autonomous Region, China. chenji2847@163.com

Received: 2012-02-16 Revised: 2012-03-13

Accepted: 2012-04-19 Published online: 2012-05-28

## Abstract

**AIM:** To investigate the expression of livin and cyclinD1 in chronic atrophic gastritis with intestinal metaplasia.

**METHODS:** Immunohistochemistry was used to examine the expression of livin and cyclin D1 in 30 cases of chronic superficial gastritis, 35 cases of atrophic gastritis without intestinal metaplasia, 35 cases of atrophic gastritis with intestinal metaplasia, and 30 cases of gastric carcinoma. We also explored the correlation between livin and cyclin D1 expression in chronic atrophic gastritis and gastric carcinoma.

**RESULTS:** The positive rates of livin expression in the specimens of chronic superficial gastritis,

atrophic gastritis without intestinal metaplasia, atrophic gastritis with intestinal metaplasia, and gastric carcinoma were 0%, 28.57%, 45.71% and 66.67%, respectively, and the corresponding rates for cyclin D1 expression were 10%, 14.29%, 37.14% and 53.33%. The positive rates of livin and cyclinD1 expression were significantly higher in atrophic gastritis with intestinal metaplasia than in chronic superficial gastritis (both  $P < 0.05$ ). The expression of cyclin D1 differed significantly between atrophic gastritis with and without intestinal metaplasia ( $P < 0.05$ ). The expression of livin has a positive correlation with that of cyclin D1 in atrophic gastritis with intestinal metaplasia and gastric carcinoma.

**CONCLUSION:** The positive rates of livin and cyclin D1 expression increase in atrophic gastritis with intestinal metaplasia and gastric carcinoma. No significant difference was observed for the expression of livin and cyclin D1 between atrophic gastritis with intestinal metaplasia and gastric carcinoma. Livin and cyclin D1 may play a very important role in the development of gastric carcinoma and be used as markers for early diagnosis of gastric carcinoma.

**Key Words:** Livin; CyclinD1; Chronic atrophic gastritis; Intestinal metaplasia

Chen J, Cui H, Gao ML, Cui Q. Clinical significance of expression of livin and cyclin D1 in chronic atrophic gastritis with intestinal metaplasia. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(15): 1301-1306

## 摘要

**目的:** 探讨凋亡抑制蛋白Livin和细胞周期蛋白D1(CyclinD1)在慢性萎缩性胃炎(chronic atrophic gastritis, CAG)伴肠化癌变过程中的表达及其相关性.

**方法:** 应用免疫组织化学染色S-P法检测Livin和CyclinD1在30例慢性浅表性胃炎(chronic superficial gastritis, CSG)、35例CAG非肠化、35例CAG伴肠化、30例胃癌组织中的表达,

## ■背景资料

大量研究表明, Livin、CyclinD1表达上调能促进肿瘤的发生, 但在癌前病变中同时检测这2个因子的表达及其相关性国内未见报道.

## ■同行评议者

高泽立, 副教授, 上海交大医学院九院周浦分院

## ■相关报道

大量报道, Livin、CyclinD1在食管癌、胃癌、肝癌等多种恶性肿瘤中高表达,但在胃癌癌前病变中的研究甚少,且二者在胃癌癌前病变中的表达存在争议,需进一步探讨、研究。

并同时研究二者在CAG伴肠化癌变中表达的相关性。

**结果:**在CSG、CAG非肠化、CAG伴肠化、胃癌中Livin、CyclinD1的阳性表达率分别为:0%、10%;28.57%、14.29%;45.71%、37.14%;66.67%、53.33%,二者在CAG(非肠化)和CSG对比均有统计学意义( $P<0.05$ );CAG(伴肠化)与CAG(非肠化)相比, CyclinD1的阳性表达率有统计学意义( $P<0.05$ ); Livin和CyclinD1在CAG伴肠化、胃癌组织中表达呈正相关。

**结论:**Livin、CyclinD1蛋白在CAG(伴肠化)和胃癌组织中表达呈上调状态,且CAG(伴肠化)和胃癌组织间无显著差异,二者表达一致,提示CAG(伴肠化)已具有癌变的分子生物学特征。二者在胃癌的发生、发展中起协同作用,对其进行联合检测将有助于胃癌的早期诊断。

**关键词:**Livin; CyclinD1; 慢性萎缩性胃炎; 肠上皮化生

陈吉, 崔宏, 高美丽, 崔琴. Livin和CyclinD1在慢性萎缩性胃炎伴肠化黏膜中的表达及意义. 世界华人消化杂志 2012; 20(15): 1301-1306

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1301.asp>

## 0 引言

慢性萎缩性胃炎(chronic atrophic gastritis, CAG)是消化系统常见病,在此基础上伴有的不完全型肠上皮化生和/或中重度不典型增生被视为癌前病变,1978年WHO将其列为胃癌癌前状态<sup>[1]</sup>。其中CAG(伴肠化)在人群中十分普遍,65岁以上老年患者肠化率达90%以上<sup>[2]</sup>,其癌变过程中往往涉及到细胞凋亡受抑制及多种癌基因的激活。Livin是凋亡抑制蛋白家族新成员<sup>[3]</sup>,因其抗凋亡活性最强,故已成为当今研究的热点<sup>[4,5]</sup>。细胞周期蛋白D1(CyclinD1)是细胞周期G<sub>1</sub>/S期转化的正向调节因子,其过度表达导致细胞增殖失控,从而形成癌变。大量研究表明, Livin、CyclinD1表达上调能促进肿瘤发生,但在癌前病变中同时检测这2个因子的表达及其相关性国内未见报道。本课题研究为了探讨Livin、CyclinD1二者在CAG伴肠化癌变过程中的作用及其相互关系,并为CAG伴肠化早期癌变的发病过程提供临床诊断依据。

## 1 材料和方法

1.1 材料 石蜡切片机(LEICA RM2025, 德国), 三

用恒温水浴箱(HHW21 Cu60, 上海), 电热恒温干燥箱(Limon公司, 上海), 光学显微镜(Olympus, 日本), 组织包埋机(BMJ-III, 常州), 北航图像中心Cmais真彩色病理图像分析系统。

### 1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学染色: 所有标本石蜡切片均经二甲苯脱蜡, 梯度乙醇水化, 抗原修复, 滴加过氧化物酶阻断液, 室温下孵育10 min, PBS冲洗, 滴加一抗, 室温下孵育60 min, PBS冲洗, 滴加聚合物增强剂, 室温下孵育10 min, 滴加酶标抗鼠/兔聚合物, 室温下孵育10 min, 二氨基联苯胺(DAB)显色, 苏木素复染, 脱水, 透明, 封片, 光镜下组织学观察并摄片。以PBS代替一抗作为阴性对照, 阳性对照以福州迈新生物技术开发有限公司所赠样片为准。

1.2.2 Livin、CyclinD1蛋白判定标准<sup>[6]</sup>: Livin免疫组织化学阳性产物呈棕黄色颗粒, 定位于细胞浆内。CyclinD1蛋白免疫组织化学阳性产物呈棕黄色颗粒, 定位于细胞核。采用半定量积分法判定结果, 每张切片随机选5个高倍视野观察, 计数100个细胞, 阳性细胞数 $\leq 5\%$ , 0分; 6%-25%, 1分; 26%-50%, 2分; 51%-75%, 3分;  $>75\%$ , 4分。根据免疫阳性细胞染色程度, 黄色为1分, 棕黄色为2分, 棕褐色为3分。综合评分由两类积分相乘, 0-1分为阴性(-), 2-6分为阳性(+), 8-12分为强阳性(++).

## 2 结果

2.1 Livin在CAG及胃癌组织中的表达 Livin定位于CAG(非肠化、伴肠化)、胃癌组织的细胞浆中, 其免疫阳性产物为棕黄色。CAG伴肠化组织中Livin表达较慢性浅表性胃炎组织明显增加, 差别有统计学意义( $\chi^2 = 20.741, P = 0.000$ ), 与CAG非肠化组比较无统计学意义( $\chi^2 = 2.203, P = 0.138$ ), 与胃癌组比较无统计学意义( $\chi^2 = 2.870, P = 0.090$ ); CAG非肠化组织中Livin表达与慢性浅表性胃炎比较有统计学意义( $\chi^2 = 10.130, P = 0.001$ ), 与胃癌比较有统计学意义( $\chi^2 = 9.433, P = 0.002$ , 表1, 图1)。

2.2 CyclinD1在CAG及胃癌组织中的表达 CyclinD1定位于CAG(非肠化、伴肠化)、胃癌组织的细胞核中, 其免疫阳性产物为棕黄色。CAG伴肠化组织中CyclinD1表达与慢性浅表性胃炎组相比有统计学意义( $\chi^2 = 6.414, P = 0.011$ ), 与CAG非肠化组比较有统计学意义( $\chi^2 = 4.786, P = 0.029$ ), 与胃癌组比较无统计学意义( $\chi^2 = 1.714$ ,

表 1 Livin在胃组织不同病变中的表达

分组	n	Livin表达强度				阳性率(%)
		-	+	++	+++	
CSG	30	30	0	0	0	0
CAG						
非肠化	35	25	6	3	1	28.57 <sup>d</sup>
伴肠化	35	19	10	4	2	45.71 <sup>b</sup>
胃癌	30	10	11	6	3	66.67

<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs CSG; <sup>d</sup> $P < 0.01$  vs CSG、GC组.

表 2 CyclinD1在胃组织不同病变中的表达

分组	n	CyclinD1表达强度				阳性率(%)
		-	+	++	+++	
CSG	30	27	2	1	2	10
CAG						
非肠化	35	30	3	2	0	14.29 <sup>d</sup>
伴肠化	35	22	8	4	1	37.14 <sup>a</sup>
胃癌	30	14	7	7	2	53.33

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs CSG、CAG(non-IM); <sup>d</sup> $P < 0.01$  vs GC.

表 3 Livin与CyclinD1在CAG伴肠化、胃癌中的相关性

分组	n	Livin表达强度		CyclinD1表达强度		
		+	-	+	-	
CAG						
伴肠化	35	16	19	22	13	$r_s = 0.60, P < 0.05$
胃癌	30	20	10	14	16	$r_s = 0.47, P < 0.05$

$P = 0.191$ ); CAG非肠化组织中CyclinD1表达与慢性浅表性胃炎组比较无统计学意义( $\chi^2 = 0.275, P = 0.600$ ), 与胃癌组比较有统计学意义( $\chi^2 = 11.262, P = 0.001$ , 表2, 图2).

**2.3 Livin与CyclinD1之间相关性** 16例Livin阳性CAG伴肠化组织中, CyclinD1阳性者11例(68.75%), 19例Livin阴性CAG伴肠化组织中, CyclinD1阳性者2例(10.53%), 两者之间有统计学意义, 并且呈正相关( $r_s = 0.60, P = 0.001$ ). 在20例Livin阳性胃癌组织中, CyclinD1阳性者14例(70%), 10例Livin阴性胃癌组织中, CyclinD1阳性者2例(20%), 两者之间有统计学意义, 并且呈正相关( $r_s = 0.47, P = 0.019$ , 表3).

### 3 讨论

CAG是我国常见的慢性胃黏膜病变, 其组织学特点表现为胃黏膜的慢性炎症和胃腺体细胞的

丢失. 目前普遍认为萎缩性胃炎与肠型胃癌关系密切, 越来越受到医疗界的重视, 为目前研究的热点<sup>[7]</sup>. WHO已将其定义为胃癌前疾病<sup>[1]</sup>, 特别是伴有肠上皮化生和不典型增生患者癌变的危险性更大<sup>[8]</sup>. 在CAG伴肠化癌变过程中, 涉及多种癌基因异常表达、抑癌基因的缺失、凋亡抑制蛋白的过度表达<sup>[9,10]</sup>. 胃癌仍然是目前世界上最常见的恶性肿瘤之一, 占据肿瘤死亡率的第2位<sup>[11]</sup>. 国内外均有学者提出<sup>[12]</sup>, I级预防胃癌的发生, 可在胃癌癌前阶段就予以干预逆转治疗. 因此深入了解胃癌癌前病变, 有可能为胃癌的I级预防提供科学依据.

近年的研究证实, 肿瘤不仅是增殖异常的疾病, 同时也是凋亡异常的疾病, 肿瘤的发生和失控性生长是肿瘤细胞增殖和细胞凋亡2个过程共同作用的结果, 细胞凋亡与肿瘤的关系已受到普遍关注<sup>[13]</sup>.

### ■应用要点

本研究发现, Livin和CyclinD1在胃癌的发生、发展中起协同作用, 对其进行联合检测将有助于胃癌的早期诊断, 有可能为胃癌的I级预防提供科学依据.



# ■名词解释

凋亡抑制因子(IAP): 是一类高度保守的内源性抗凋亡基因家族表达产物, 含特有的BIR结构域和RING结构域。

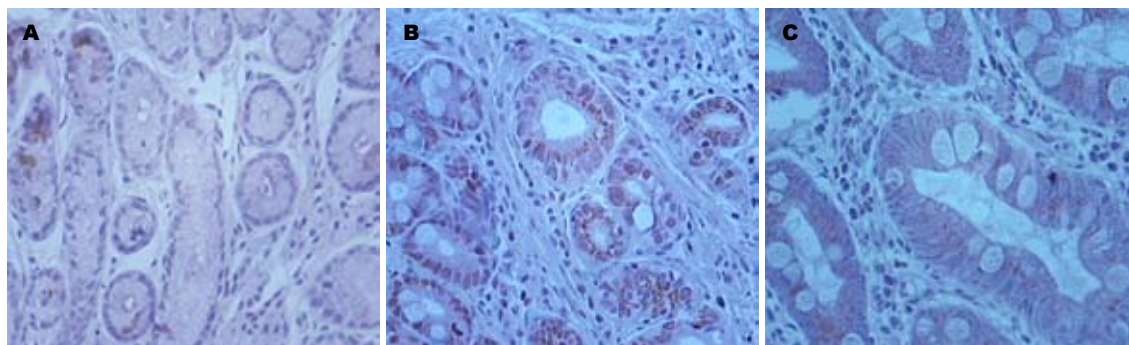


图 1 Livin在不同胃黏膜病变中的表达. A: Livin在CAG非肠化中的表达; B: Livin在CAG伴肠化中的表达; C: Livin在胃癌中的表达。

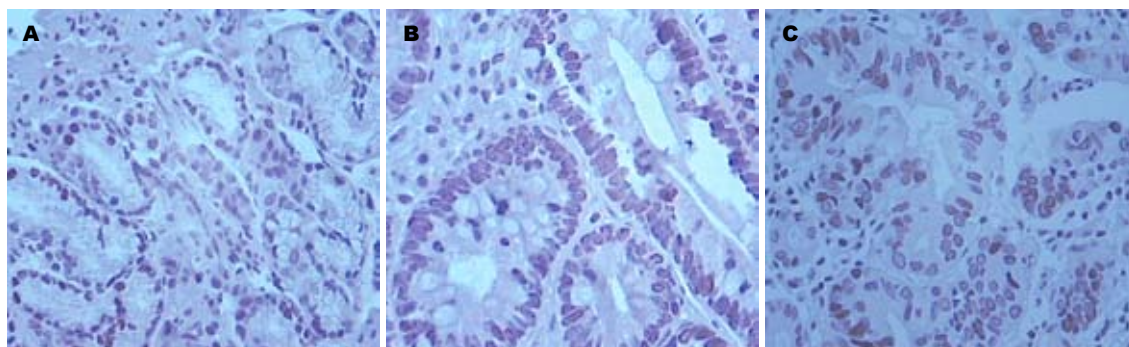


图 2 CyclinD1在不同胃黏膜病变中的表达. A: CyclinD1在CAG非肠化中的表达; B: CyclinD1在CAG伴肠化中的表达; C: CyclinD1在胃癌中的表达。

细胞凋亡参与肿瘤的起始过程, 并对肿瘤发生起负调控作用. 凋亡障碍是肿瘤发生的一个重要基础<sup>[14]</sup>, Livin是新近发现的人类凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis proteins, IAP)家族的新成员. 有研究结果显示, Livin蛋白在除胎盘外的正常成年人组织中低表达或不表达, 而在结肠癌、膀胱癌、非小细胞肺癌、胃癌、食管癌等恶性肿瘤中高表达<sup>[15-20]</sup>. 提示该基因可能在肿瘤的发生、发展中起重要的作用. 本研究发现Livin在不同的胃黏膜病变中表达不同, 随着胃黏膜病变加重, 其表达增加, 在CAG、胃癌中Livin阳性表达率依次递增, 但Livin在慢性浅表性胃炎组织中无表达, 与李梅的研究结果一致, 这表明在CSG逐渐演变到癌前病变, 最后到癌的这一过程中, 细胞凋亡受到抑制, 从而促进肿瘤细胞的增殖. 本研究结果提示CAG伴肠化中Livin蛋白表达增加, 如能在此阶段控制Livin蛋白的表达, 可阻止其向癌变方向发展. Livin蛋白在CAG(伴肠化)和胃癌组织中表达呈上调状态, 且CAG(伴肠化)和胃癌组织间无显著差异, 二者表达一致, 提示CAG(伴肠化)已具有癌变的分子生物学特征.

细胞周期失控是细胞异常增殖而导致癌变

的重要原因, 细胞周期的不同时期有不同的细胞蛋白控制, 原癌基因CyclinD1合成于G<sub>1</sub>早期, 是细胞增殖G<sub>1</sub>-S期的重要控件<sup>[21]</sup>. 其调控机制主要是通过对RB蛋白的灭活而释放E2F, 以启动S期相关基因的转录, 使其渡过G<sub>1</sub>-S调控点进入S期<sup>[22]</sup>.

有研究者认为<sup>[23,24]</sup>, CyclinD1与正常组织细胞的增殖密切相关, 还有资料表明, CyclinD1的扩增、过表达与人体多种肿瘤有关<sup>[25]</sup>. 1994年Hinds等<sup>[26]</sup>证实了CyclinD1有致癌作用. 国内外相继报道<sup>[27-29]</sup>, 在肺癌、乳腺癌、食管癌、肝癌、胃癌等多种恶性肿瘤中发现存在CyclinD1基因扩增、重排及过表达. 本实验结果提示, 各组样本中均有不同程度的CyclinD1蛋白表达, 在CAG伴肠化、胃癌组织中过度表达, 且在2组间表达一致, 与高绍芳<sup>[30]</sup>的报道一致, 并且CAG伴肠化组与非肠化组之间有显著性差异( $P<0.05$ ). 随着病变从CSG-CAG-肠化-癌的进展, CyclinD1阳性表达率逐渐升高, 与文献报道一致, 提示CyclinD1基因的扩增可能发生在胃黏膜上皮癌变的早期阶段, 是重要的胃癌促发因素, 这也意味着该基因可能作为一个潜在的胃癌早期诊断分子标志. 因此, CyclinD1可能是肿瘤形成的早

期分子事件, 是促进肿瘤生长的关键性控件之一. CyclinD1蛋白的检测可能对于CAG伴肠化及早期胃癌的诊断有参考价值.

总之, Livin和CyclinD1蛋白的高表达可能与胃癌的发生、发展密切相关, 2者的异常表达在胃癌的演进中可能发挥着不同的作用. 如果对Livin和CyclinD1蛋白在胃癌癌前病变中进行监测, 将有助于筛选出胃癌高危患者. 如能通过检测早期分子事件, 可提高胃癌的早期检出率, 同时还可作为胃癌的预防、预后评价以及治疗提供潜在的分子标志, 为将来胃癌在分子靶向治疗的应用提供了重要的理论依据. 对CAG伴肠化患者进行常规检测, 对其阳性的病例应密切随访, 必要时进行积极治疗, 有效预防胃癌发生.

#### 4 参考文献

- Genta RM. Atrophy and atrophic gastritis: one step beyond the Sydney system. *Ital J Gastroenterol Hepatol* 1998; 30 Suppl 3: S273-S275
- 郑青, 施尧. 萎缩性胃炎、肠化、黏膜上皮内瘤变和胃癌. *临床内科杂志* 2009; 26: 734-736
- 王世军, 姚雅芬, 张爱华, 范宗宪, 魏晓丽. 凋亡抑制因子Livin和细胞周期蛋白D1在外鼻基底细胞癌的表达及意义. *中国现代医学杂志* 2010; 20: 813-816
- Yagihashi A, Asanuma K, Kobayashi D, Tsuji N, Shijubo Y, Abe S, Hirohashi Y, Torigoe T, Sato N, Watanabe N. Detection of autoantibodies to livin and survivin in Sera from lung cancer patients. *Lung Cancer* 2005; 48: 217-221
- Gazzaniga P, Gradilone A, Giuliani L, Gandini O, Silvestri I, Nofroni I, Sacconi G, Frati L, Aglianò AM. Expression and prognostic significance of LIVIN, SURVIVIN and other apoptosis-related genes in the progression of superficial bladder cancer. *Ann Oncol* 2003; 14: 85-90
- Yagihashi A, Asanuma K, Tsuji N, Torigoe T, Sato N, Hirata K, Watanabe N. Detection of anti-livin antibody in gastrointestinal cancer patients. *Clin Chem* 2003; 49: 1206-1208
- 赵霞, 潘华峰, 刘静. 慢性萎缩性胃炎与细胞凋亡和增殖的研究进展. *江西中医学院学报* 2005; 17: 79-80
- 葛振华, 周凡, 谢冰颖, 王若愚, 陈娟, 李生强. 慢性胃炎肠化生CD44、CD44V6及Cyclin D1、CyclinE表达和意义. *中国组织化学与细胞化学杂志* 2007; 16: 649-653
- Fang DC, Luo YH, Yang SM, Li XA, Ling XL, Fang L. Mutation analysis of APC gene in gastric cancer with microsatellite instability. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 787-791
- Fang DC, Yang SM, Zhou XD, Wang DX, Luo YH. Telomere erosion is independent of microsatellite instability but related to loss of heterozygosity in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2001; 7: 522-526
- Shah MA, Schwartz GK. Treatment of metastatic esophagus and gastric cancer. *Semin Oncol* 2004; 31: 574-587
- Wenger NK, Lewis SJ, Welty FK, Herrington DM, Bittner V. Beneficial effects of aggressive low-density lipoprotein cholesterol lowering in women with stable coronary heart disease in the Treatment to New Targets (TNT) study. *Heart* 2008; 94: 434-439
- 侯毅鞠, 李艳, 袁忠海, 郭素红. 凋亡抑制蛋白Livin在胃癌及癌旁组织中的表达. *世界华人消化杂志* 2010; 18: 1196-1200
- 程平, 秦蓉, 张红, 吴继锋, 王道斌. 凋亡抑制因子Survivin和Livin在胃癌中的表达及意义. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 850-855
- Chen YS, Li HR, Lin M, Chen G, Xie BS, Xu NL, Lin LF. Livin abrogates apoptosis of SPC-A1 cell by regulating JNK1 signaling pathway. *Mol Biol Rep* 2010; 37: 2241-2247
- Kasof GM, Gomes BC. Livin, a novel inhibitor of apoptosis protein family member. *J Biol Chem* 2001; 276: 3238-3246
- Crook NE, Clem RJ, Miller LK. An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. *J Virol* 1993; 67: 2168-2174
- Wang TS, Ding QQ, Guo RH, Shen H, Sun J, Lu KH, You SH, Ge HM, Shu YQ, Liu P. Expression of livin in gastric cancer and induction of apoptosis in SGC-7901 cells by shRNA-mediated silencing of livin gene. *Biomed Pharmacother* 2010; 64: 333-338
- Lin JH, Deng G, Huang Q, Morser J. KIAP, a novel member of the inhibitor of apoptosis protein family. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 279: 820-831
- Hariu H, Hirohashi Y, Torigoe T, Asanuma H, Hariu M, Tamura Y, Aketa K, Nabeta C, Nakanishi K, Kamiguchi K, Mano Y, Kitamura H, Kobayashi J, Tsukahara T, Shijubo N, Sato N. Aberrant expression and potency as a cancer immunotherapy target of inhibitor of apoptosis protein family, Livin/ML-IAP in lung cancer. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 1000-1009
- 顾凤华. 细胞周期蛋白cyclinD1和p16在胃癌中的表达及其意义. *苏州大学学报(医学版)* 2005; 25: 471-473
- Sugimoto M, Martin N, Wilks DP, Tamai K, Huot TJ, Pantoja C, Okumura K, Serrano M, Hara E. Activation of cyclin D1-kinase in murine fibroblasts lacking both p21(Cip1) and p27(Kip1). *Oncogene* 2002; 21: 8067-8074
- Dong JS, Ni CR. Expression of survivin, PTEN, cyclinD1 and p53 gene in gastric carcinoma and their relationship. *J Clin Exp Pathol* 2003; 19: 396-400
- Moghaddam SJ, Haghighi EN, Samiee S, Shahid N, Keramati AR, Dadgar S, Zali MR. Immunohistochemical analysis of p53, cyclinD1, RB1, c-fos and N-ras gene expression in hepatocellular carcinoma in Iran. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 588-593
- Fountzilas G, Pectasides D, Kalogera-Fountzila A, Skarlos D, Kalofonos HP, Papadimitriou C, Bafaloukos D, Lambropoulos S, Papadopoulos S, Kourea H, Markopoulos C, Linardou H, Mavroudis D, Briassoulis E, Pavlidis N, Razis E, Kosmidis P, Gogas H. Paclitaxel and carboplatin as first-line chemotherapy combined with gefitinib (IRESSA) in patients with advanced breast cancer: a phase I/II study conducted by the Hellenic Cooperative Oncology Group. *Breast Cancer Res Treat* 2005; 92: 1-9
- Hinds PW, Dowdy SF, Eaton EN, Arnold A, Weinberg RA. Function of a human cyclin gene as an oncogene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 709-713
- Motokura T, Bloom T, Kim HG, Jüppner H, Ruderman JV, Kronenberg HM, Arnold A. A novel cyclin encoded by a bcl1-linked candidate oncogene. *Nature* 1991; 350: 512-515
- McKay JA, Douglas JJ, Ross VG, Curran S, Loane

#### 同行评价

本文选题确切, 统计方法得当, 结合当前常见病和多发病, 提出检测Livin、CyclinD1蛋白可能成为胃癌早期诊断的客观指标, 具有较好的临床参考价值.

- JF, Ahmed FY, Cassidy J, McLeod HL, Murray GI. Analysis of key cell-cycle checkpoint proteins in colorectal tumours. *J Pathol* 2002; 196: 386-393
- 29 汪泳, 曹先东, 刘弋. CyclinD1在胃癌组织中的表达及

其意义. 齐齐哈尔医学院学报 2003; 24: 609-610

高绍芳, 李佃贵, 崔建从, 郭敏, 张纨. Cyclin D1和 PTEN在胃黏膜癌变多阶段中的表达及相关性. 中国老年学杂志 2010; 30: 592-593

编辑 张姗姗 电编 鲁亚静

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2012年版权归世界华人消化杂志

## • 消息 •

# 百世登出版集团推出 12 种开放获取生物医学期刊全部被 PubMed 和 PMC 收录

**本刊讯** 由美国国立医学图书馆(U.S. National Library of Medicine, 简称NLM), 美国国立生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, 简称NCBI)和美国国立卫生研究院(National Institutes of Health, 简称NIH), 共同于2010-2011年, 收录了百世登出版集团有限公司(Baishideng Publishing Group Co., Limited, 简称BPG)出版的12种开放获取生物医学期刊. 12种期刊被NLM, NCBI和NIH共同主办的PubMed Central和PubMed平台, 公开面向全球发布, 读者免费阅读和下载全文. 12种期刊被收录的名称及网址如下:

- 1 World Journal of Biological Chemistry (世界生物化学杂志)  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/1495/>
- 2 World Journal of Cardiology (世界心脏病学杂志)  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/1320/>
- 3 World Journal of Clinical Oncology (世界临床肿瘤学杂志)  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/1494/>
- 4 World Journal of Diabetes (世界糖尿病杂志)  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/1498/>
- 5 World Journal of Gastrointestinal Endoscopy (世界胃肠内镜杂志)  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/1323/>
- 6 World Journal of Gastrointestinal Oncology (世界胃肠肿瘤学杂志)  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/1324/>
- 7 World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology (世界胃肠病理生理学杂志)  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/1496/>
- 8 World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics (世界胃肠药理学与治疗杂志)  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/1497/>
- 9 World Journal of Gastrointestinal Surgery (世界胃肠外科杂志)  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/1325/>
- 10 World Journal of Hepatology (世界肝病杂志)  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/1321/>
- 11 World Journal of Radiology (世界放射学杂志)  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/1322/>
- 12 World Journal of Stem Cells (世界干细胞杂志)  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/1470/>

(总编辑: 马连生2011-05-30)

# 急性胰腺炎腺泡细胞损伤机制的研究进展

吴丽, 蔡宝昌

吴丽, 蔡宝昌, 南京中医药大学药学院 江苏省南京市 210046  
吴丽, 讲师, 主要从事中药消化药理学研究。  
国家自然科学基金资助项目, No. 81073022  
江苏省中医药局科技基金资助项目, No. LZ11190  
南京中医药大学中药学一级学科开放课题基金资助项目, No. 2011ZYX4-006  
作者贡献分布: 本文综述由吴丽完成; 由蔡宝昌审校。  
通讯作者: 蔡宝昌, 教授, 博士生导师, 210046, 江苏省南京市栖霞区仙林大学城仙林大道138号, 南京中医药大学药学院。  
bccai@126.com  
电话: 025-86798281  
收稿日期: 2012-02-15 修回日期: 2012-03-22  
接受日期: 2012-04-19 在线出版日期: 2012-05-28

## Advances in understanding the pathogenesis of acute pancreatitis-associated acinar cell injury

Li Wu, Bao-Chang Cai

Li Wu, Bao-Chang Cai, College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, Jiangsu Province, China  
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 81073022; the Science and Technology Foundation of Jiangsu Traditional Chinese Medicine Administration, No. LZ11190; and the Open Fund of National First-Class Key Discipline for Traditional Chinese Medicine of Nanjing University of Chinese Medicine, No. 2011ZYX4-006  
Correspondence to: Bao-Chang Cai, Professor, College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, 138 Xianlin Road, Qixia District, Nanjing 210046, Jiangsu Province, China. bccai@126.com  
Received: 2012-02-15 Revised: 2012-03-22  
Accepted: 2012-04-19 Published online: 2012-05-28

## Abstract

Acute pancreatitis is a common severe disease involving a complicated cascade of events. The injury of pancreatic acinar cells is the trigger of local and systemic inflammation. Calcium overload, endoplasmic reticulum stress, mitochondrial injury are closely associated with the injury of pancreatic acinar cells. This review aims to elucidate the pathogenesis of acute pancreatitis-associated acinar cell injury.

**Key Words:** Pancreatic acinar cell; Calcium overload; Endoplasmic reticulum stress; Mitochondrial injury

Wu L, Cai BC. Advances in understanding the pathogenesis of acute pancreatitis-associated acinar cells injury. *Shijie*

*Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(15): 1307-1311

## 摘要

急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)是临床常见急腹症, 发病机制复杂, 其中, 胰腺腺泡细胞损伤、胰酶提前激活导致胰腺自身消化是胰腺炎的始发因素。因此, 探讨腺泡细胞损伤机制对阐明AP发病机制具有重要意义。近年来研究认为, 钙超载、内质网应激、线粒体损伤与胰腺腺泡细胞损伤关系密切, 本文就其研究进展作一综述。

**关键词:** 胰腺腺泡细胞; 钙超载; 内质网应激; 线粒体损伤

吴丽, 蔡宝昌. 急性胰腺炎腺泡细胞损伤机制的研究进展. *世界华人消化杂志* 2012; 20(15): 1307-1311  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1307.asp>

## 0 引言

急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)是临床常见急腹症, 大多数AP患者仅出现胰腺出血、水肿等病理改变<sup>[1]</sup>, 有25%的患者会发生重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP), 胰腺在出血、坏死的同时, 常伴发全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS)和多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS), 病死率可高达30%-40%<sup>[2,3]</sup>。AP发病机制复杂, 目前有“胰酶自身消化”<sup>[4]</sup>、“白细胞过度激活”<sup>[5]</sup>、“微循环障碍”<sup>[6]</sup>、“肠道细菌易位、内毒素血症及感染二次打击”<sup>[7,8]</sup>等多种机制理论。其中, 胰腺腺泡细胞损伤, 胰酶提前激活导致胰腺自身消化进而引发胰腺炎的理论得到普遍认可<sup>[9-11]</sup>。在疾病进展过程中, 酶的消化、组织坏死和炎症反应相互促进, 形成病理性交互式放大效应, 失去控制将发展为SIRS甚至MODS, 病情危笃。因此, 探讨腺泡细胞损伤机制对阐明AP发病机制具有重要意义。近年来, 随着细胞生物学及分子生物学等生命科学的迅速发展, 人们对腺泡细胞损

## ■背景资料

急性胰腺炎(AP)是胰酶提前激活引起胰腺自身消化导致的化学炎症性疾病。腺泡细胞损伤导致的胰酶提前激活是AP的始发因素, 而损伤腺泡细胞坏死触发明显的炎症级联反应, 是病情恶化的重要机制。探讨腺泡细胞损伤机制进而寻找保护腺泡细胞的有效途径一直是研究的热点。

## ■同行评议者

白雪巍, 副主任医师, 哈尔滨医科大学



## ■ 研发前沿

近年来,胰腺腺泡细胞损伤的细胞生物学机制取得较大进展,其中内质网应激、线粒体功能障碍等研究引起广泛关注。

伤机制的认识不断深入,本文就其研究进展作一综述。

## 1 钙超载

钙离子分布细胞浆、内质网、线粒体及细胞核内,线粒体、内质网(endoplasmic reticulum, ER)是细胞内钙库,与细胞浆不断进行 $\text{Ca}^{2+}$ 交换,使胞浆内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 呈局限性振荡,其浓度变化对维持和调节细胞收缩、分泌、凋亡等生理过程起重要作用<sup>[12]</sup>。腺泡细胞在静息状态下, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 稳定在150 nmol/L水平,在生理浓度的刺激剂作用下,钙库释放钙, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 可增加到280 nmol/L以上,此种钙振荡能够增加腺泡细胞ATP生成<sup>[13-15]</sup>,促使细胞内的微丝、微管收缩,向细胞膜运动,并融合与释放胰酶(原),随后, $\text{Ca}^{2+}$ 被细胞质膜、内质网、线粒体膜上的 $\text{Ca}^{2+}$ -ATP酶系统泵出细胞外或泵入钙库中储存,胞浆 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 很快恢复到刺激前水平。在反流胆汁酸、乙醇、超氧化物等异常刺激因素作用下,细胞内钙库释放 $\text{Ca}^{2+}$ 和细胞外 $\text{Ca}^{2+}$ 跨膜内流显著增加,聚集在细胞浆,导致细胞内钙超载<sup>[16-18]</sup>。

目前相关研究认为,AP时胰腺腺泡细胞内钙超载的主要发生机制包括:(1)细胞外促分泌因子(乙酰胆碱、CCK)激活细胞膜表面G蛋白耦联受体后,进而激活磷脂酶C(phospholipase C, PLC),催化膜表面的磷脂酰肌醇二磷酸(PIP2)生成三磷酸肌醇(IP3),IP3与内质网表面的IP3受体结合<sup>[19]</sup>,促进ER在释放 $\text{Ca}^{2+}$ 的同时,通过DG/PKC信号转导系统激活细胞膜上受体操纵的钙通道(receptor-operated calcium channel, ROCC)开放,胞外内流的 $\text{Ca}^{2+}$ 进一步激活ER膜上的受体,使钙库排钙,产生“以钙释钙”(calcium induced calcium release, CICR)效应<sup>[20,21]</sup>;(2)ER、线粒体、细胞核等膜性成分完整性破坏,其内贮存的 $\text{Ca}^{2+}$ 外溢入胞浆,造成胞浆钙超载<sup>[22]</sup>;(3)线粒体功能障碍,ATP生成减少,细胞膜和ER表面的 $\text{Ca}^{2+}$ -ATP酶活性下降,不能及时将细胞内过多的 $\text{Ca}^{2+}$ 泵入细胞内钙库或泵出细胞外,胞浆内 $\text{Ca}^{2+}$ 水平进一步增高。

胰腺腺泡细胞钙超载不仅是AP的发病环节之一,而且作为AP发病机制中的枢纽,通过影响其他诸多发病环节而促进AP病情进展:(1)胰酶提前激活<sup>[23]</sup>:在正常情况下,新合成的胰酶绝大多数是无活性的酶原颗粒,与细胞质隔离,被运输到小肠后激活发挥生理活性。腺泡细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 增高,与胰蛋白酶原结合形成大量的酶原

颗粒,积聚在细胞内的酶原颗粒可通过噬分泌作用与溶酶体融合,使溶酶体对胰蛋白酶原水解,导致胰酶于腺泡细胞内激活,引起胰腺自身消化<sup>[24,25]</sup>;(2)自由基生成增加:钙超载可使细胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 依赖性蛋白水解酶活性增加,促使黄嘌呤脱氢酶转变为黄嘌呤氧化酶,催化次黄嘌呤而使组织中的氧自由基产生增多;线粒体内 $\text{Ca}^{2+}$ 含量增加,使线粒体功能受损,细胞色素氧化酶系统功能失调,以致进入细胞内的氧经单电子还原而形成的氧自由基增多,造成细胞的氧化损伤<sup>[26-28]</sup>;(3)内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS):细胞质增高的 $\text{Ca}^{2+}$ 通过CICR机制,促使内质网释放大量的钙离子,导致钙库耗竭及内质网功能紊乱,内质网内未折叠蛋白或错误折叠蛋白堆积,诱发ERS<sup>[29]</sup>;(4)线粒体功能障碍:细胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 持续上升导致线粒体通透转换微孔开放,持续去极化,能量代谢障碍和超微结构的改变,并产生过多的氧自由基激发细胞氧化损伤,继而发生坏死,诱发AP甚至SAP<sup>[13,30]</sup>。

## 2 内质网应激

胰腺腺泡细胞具有丰富ER,以适应其合成消化酶的生理功能,各种新合成的消化酶被运送到ER,并与分子伴侣重链结合蛋白(heavy chain binding protein, BiP)结合,BiP具有ATP酶活性,借助其水解ATP的耗能过程促进蛋白质正确折叠、进行翻译后修饰,在高尔基体包装成酶原颗粒后分泌到细胞外。在异常促分泌因素(胆汁、缺氧、钙超载)作用下,细胞内蛋白质合成增加,导致蛋白质折叠需求与ER折叠能力失衡,蛋白质不能正确折叠、蛋白质糖基化形成障碍或蛋白质不能形成正常的二硫键,ER内未折叠蛋白或错误折叠蛋白堆积,引起ERS<sup>[31]</sup>,为了保护由ERS所引起的细胞损伤,BiP与蛋白激酶R样内质网激酶(protein kinase R-like ER kinase, PERK)、肌醇酶1(inositol requiring enzyme 1, IRE1)及活化转录因子6(the activating transcription factor 6, ATF6)等多种ER跨膜蛋白解离,与未折叠或折叠错误蛋白质结合。解离后的PERK、ATF6和IRE1活化并启动相应的信号传递,启动非折叠蛋白反应(unfolded protein response, UPR)<sup>[32]</sup>。减少蛋白质的合成,减轻未折叠蛋白的进一步积聚;诱导BiP表达,增加内质网蛋白质折叠的能力;激活泛素-蛋白酶体系统和自噬作用,加速非折叠蛋白的降解和清除。

总体来说,适当UPR是细胞一种适应性自



我保护机制,保护细胞抵抗应激,维持生存,但反应功能障碍或过度可引起细胞功能失常.近年来的研究已证实过度UPR参与了腺泡细胞的损伤及炎症反应,促进AP病情的发展. Kubisch等<sup>[33]</sup>首先报道了L-精氨酸诱导的AP大鼠在造模早期就出现了明显的ERS病例改变,与ERS相关的蛋白PERK、eIF2、ATF6、Xbp1、BiP、CHOP及caspase-12表达. Lugea等<sup>[34-37]</sup>考察了酒精对Xbp1<sup>+/-</sup>基因敲除小鼠胰腺炎的影响,结果发现,Xbp1<sup>+/-</sup>基因敲除小鼠较野生鼠对酒精诱导的ERS更为敏感,UPR通路显著激活,诱导生成ATF6、CHOP,并伴有胰腺炎的病理组织学改变:胰腺腺泡细胞内消化酶原颗粒减少,出现了大量的自噬体空泡,细胞死亡增加.这项结果进一步论证了UPR在酒精导致胰腺腺泡损伤、诱导AP中的作用.此外,UPR过程中可以通过多种机制促发炎症反应而影响细胞功能及疾病发展:(1)自由基生成增多:蛋白质折叠修饰是消耗能量的过程,伴随少量ROS的产生,当ER中折叠蛋白质增加同时必然伴随了ROS的产生和积聚,启动炎症反应;(2)核转录因子NF- $\kappa$ B活性增强:研究证实内质网蛋白质折叠负荷增加导致NF- $\kappa$ B的激活,目前认为,由于I $\kappa$ B的半衰期显著小于NF- $\kappa$ B,UPR过程中,细胞合成蛋白质过程被抑制,I $\kappa$ B被代谢后释放出“多余”的NF- $\kappa$ B入核,激活促炎细胞因子基因的转录,而促发炎症反应<sup>[38,39]</sup>.此外,UPR过程中,激活的IRE1 $\alpha$ 能够与接头蛋白分子TNF- $\alpha$ 受体相关因子2(TRAF2)结合,形成IRE1 $\alpha$ -TRAF2复合物,此复合物一方面募集活化蛋白激酶JNK,进而活化转录因子AP1,增加促炎症基因的表达<sup>[40]</sup>;另一方面募集I $\kappa$ B激酶,降解I $\kappa$ B,而激活NF- $\kappa$ B,参与炎症反应<sup>[41]</sup>.

### 3 线粒体损伤

线粒体是真核细胞进行氧化代谢和钙代谢的主要场所,AP时腺泡细胞线粒体出现结构和功能的变化,并通过影响腺泡细胞的钙稳态、能量代谢紊乱及产生活性氧等途径促进疾病发展<sup>[42]</sup>.最近的一项研究表明<sup>[43]</sup>,线粒体功能紊乱较胰蛋白酶激活及NF- $\kappa$ B升高更早出现,是L-精氨酸诱导的AP的早期事件,并直接影响细胞损伤的程度及病情的发展.

近年来,线粒体在诱导损伤细胞死亡方式中的作用引起科研工作者的广泛关注,在AP的病情发展过程中,损伤腺泡细胞凋亡可以减少胰酶释放,减轻炎症介质的瀑布样级联释放,被认

为是机体的保护机制,疾病将向轻症方向发展;反之,如果损伤细胞大量坏死,将触发明显的局部及全身性炎症反应,病情向重症化方向发展<sup>[44]</sup>.作为细胞凋亡的调控中心,在凋亡早期核染色体DNA还未改变之前,线粒体即已出现结构和功能变化,线粒体的渗透性转运孔(mitochondrion permeability transition pore, MPTP)打开,造成质子电化学梯度耗散,线粒体膜电位降低及膜通透性增加,促使细胞色素C大量释放到胞质中,启动caspase依赖或非caspase依赖的凋亡<sup>[45]</sup>.

与凋亡不同,坏死主要是由于细胞新陈代谢过程被破坏,ATP耗损而导致细胞被动性死亡,同样与线粒体关系密切<sup>[46]</sup>.目前研究认为,ROS积聚导致线粒体功能障碍、ATP生成受阻被认为是细胞坏死的直接原因<sup>[13]</sup>.线粒体是细胞内ATP的产生中心,正常情况下,通过电子传递链产生少量ROS以维持细胞氧化还原平衡,任何使电子传递过程效应下降的刺激均可增加ROS的生成,ROS通过诱发线粒体膜去极化和氧化磷酸化的解偶联,造成线粒体电子传递链功能障碍、三羧酸循环障碍、ATP生成不足、膜电位下降、MPTP开放和细胞色素C的释放,线粒体功能障碍;受损的线粒体进一步激发O<sup>2-</sup>、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>和OH<sup>-</sup>等ROS的产生,造成恶性循环.ROS与细胞膜结合,导致膜电位逆转,跨膜离子转运功能丧失,细胞肿胀、核溶解碎裂,同时伴有细胞浆酶和代谢产物泄漏,触发明显的炎症反应.

需要注意的是,AP病程进展过程中,往往同时存在上述两种细胞死亡模式,在各种不同刺激因素综合作用下,组织以何种死亡方式占据主导地位,仍然不明确<sup>[47]</sup>.虽然细胞坏死能促发炎症连锁反应,但也有研究表明,过度的细胞凋亡也会加重胰腺组织损伤及影响损伤后修复.有研究认为,两种细胞死亡模式在信号传导机制上存在一些共同点,他们的中心环节都是线粒体功能障碍;线粒体膜通透性改变,转运孔开放;线粒体膜间隙释出细胞死亡介质前物质.因此凋亡与坏死是同样的促发因素、同样的传导信号路径导致的不同结果,他们并不完全独立,凋亡与坏死以他们经典的形态特征代表着细胞死亡的两种极端表现<sup>[3]</sup>.在一定条件下,细胞凋亡可触发继发性细胞坏死、炎细胞浸润.但两者之间具体的调节机制仍不明确,有待深入研究.

### 4 结论

AP进展过程中,胰腺腺泡细胞损伤是一种由多

#### ■ 相关报道

AP发病机制复杂,目前有“胰酶自身消化”、“白细胞过度激活”、“微循环障碍”、“肠道细菌易位、内毒素血症及感染二次打击”等多种机制理论.

# 应用要点

深入研究胰腺腺泡细胞损伤病变发生发展中的启动因子和恶化因子以及他们之间的相互影响和制约关系,可为临床治疗AP开辟一条新的治疗途径。

因素介导的复杂生物学过程,最终导致细胞凋亡或坏死。随着研究的不断深入,胰腺腺泡细胞损伤的新机制不断被阐释,但由于目前仍缺少对腺泡细胞损伤机制的足够认识,对于该病的防治还缺乏特效方法和策略。目前临床治疗仍以补液、营养支持、抗生素、手术等综合治疗为主。因此,如能不断深入研究胰腺腺泡细胞损伤病变发生发展中的启动因子和恶化因子以及他们之间的相互影响和制约关系,从其发病机制着手寻找保护胰腺确切有效的方法,可为临床治疗AP开辟一条新的治疗途径,这对AP的治疗有着重要的现实意义。

## 参考文献

- Sah RP, Saluja A. Molecular mechanisms of pancreatic injury. *Curr Opin Gastroenterol* 2011; 27: 444-451
- Agapov MA, Khoreva MV, Gorski VA. [The systemic inflammatory response syndrome correction in acute destructive pancreatitis]. *Eksp Klin Gastroenterol* 2011; 18-23
- Gukovsky I, Pandol SJ, Gukovskaya AS. Organellar dysfunction in the pathogenesis of pancreatitis. *Antioxid Redox Signal* 2011; 15: 2699-2710
- 卢义展, 王湘英. 微循环障碍在重症急性胰腺炎发病机制中的地位. *中华胰腺病杂志* 2010; 10: 144-146
- Shrivastava P, Bhatia M. Essential role of monocytes and macrophages in the progression of acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 3995-4002
- Brisinda G, Vanella S, Crocco A, Mazzari A, Tomaiuolo P, Santullo F, Grossi U, Crucitti A. Severe acute pancreatitis: advances and insights in assessment of severity and management. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2011; 23: 541-551
- 卢世云, 潘秀珍. 重症急性胰腺炎发病机制研究现状. *世界华人消化杂志* 2011; 19: 2421-2425
- Gregoric P, Sijacki A, Stankovic S, Radenkovic D, Ivancevic N, Karamarkovic A, Popovic N, Karadzic B, Stijak L, Stefanovic B, Milosevic Z, Bajec D. SIRS score on admission and initial concentration of IL-6 as severe acute pancreatitis outcome predictors. *Hepatogastroenterology* 2010; 57: 349-353
- Hashimoto D, Ohmuraya M, Hirota M, Yamamoto A, Suyama K, Ida S, Okumura Y, Takahashi E, Kido H, Araki K, Baba H, Mizushima N, Yamamura K. Involvement of autophagy in trypsinogen activation within the pancreatic acinar cells. *J Cell Biol* 2008; 181: 1065-1072
- Low JT, Shukla A, Thorn P. Pancreatic acinar cell: new insights into the control of secretion. *Int J Biochem Cell Biol* 2010; 42: 1586-1589
- Nepomnyashchikh LM, Lushnikova EL, Viskunov VG, Protchenko SI, Molodykh OP, Koldysheva EV. Ultrastructure of acinar cell injuries in experimental acute pancreatitis created by common bile duct ligation. *Bull Exp Biol Med* 2011; 150: 747-752
- Petersen OH, Gerasimenko OV, Tepikin AV, Gerasimenko JV. Aberrant  $Ca^{2+}$  signalling through acidic calcium stores in pancreatic acinar cells. *Cell Calcium* 2011; 50: 193-199
- Voronina SG, Barrow SL, Simpson AW, Gerasimenko OV, da Silva Xavier G, Rutter GA, Petersen OH, Tepikin AV. Dynamic changes in cytosolic and mitochondrial ATP levels in pancreatic acinar cells. *Gastroenterology* 2010; 138: 1976-1987
- Petersen OH, Gerasimenko OV, Gerasimenko JV. Pathobiology of acute pancreatitis: focus on intracellular calcium and calmodulin. *F1000 Med Rep* 2011; 3: 15
- Booth DM, Mukherjee R, Sutton R, Criddle DN. Calcium and reactive oxygen species in acute pancreatitis: friend or foe? *Antioxid Redox Signal* 2011; 15: 2683-2698
- Voronina S, Sherwood M, Barrow S, Dolman N, Conant A, Tepikin A. Downstream from calcium signalling: mitochondria, vacuoles and pancreatic acinar cell damage. *Acta Physiol (Oxf)* 2009; 195: 161-169
- Cali T, Ottolini D, Brini M. Mitochondria, calcium, and endoplasmic reticulum stress in Parkinson's disease. *Biofactors* 2011; 37: 228-240
- Rieusset J. Mitochondria and endoplasmic reticulum: mitochondria-endoplasmic reticulum interplay in type 2 diabetes pathophysiology. *Int J Biochem Cell Biol* 2011; 43: 1257-1262
- Toker A. Phosphoinositide 3-kinases-a historical perspective. *Subcell Biochem* 2012; 58: 95-110
- Fischer L, Gukovskaya AS, Penninger JM, Mareninova OA, Friess H, Gukovsky I, Pandol SJ. Phosphatidylinositol 3-kinase facilitates bile acid-induced  $Ca^{2+}$  responses in pancreatic acinar cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; 292: G875-G886
- Gerasimenko JV, Lur G, Sherwood MW, Ebisui E, Tepikin AV, Mikoshiba K, Gerasimenko OV, Petersen OH. Pancreatic protease activation by alcohol metabolite depends on  $Ca^{2+}$  release via acid store IP3 receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106: 10758-10763
- Fedirko N, Gerasimenko JV, Tepikin AV, Gerasimenko OV. Regulation of early response genes in pancreatic acinar cells: external calcium and nuclear calcium signalling aspects. *Acta Physiol (Oxf)* 2009; 195: 51-60
- Dawra R, Sah RP, Dudeja V, Rishi L, Talukdar R, Garg P, Saluja AK. Intra-acinar trypsinogen activation mediates early stages of pancreatic injury but not inflammation in mice with acute pancreatitis. *Gastroenterology* 2011; 141: 2210-2217. e2
- Wittel UA, Wiech T, Chakraborty S, Boss B, Lauch R, Batra SK, Hopt UT. Taurocholate-induced pancreatitis: a model of severe necrotizing pancreatitis in mice. *Pancreas* 2008; 36: e9-e21
- Murphy JA, Criddle DN, Sherwood M, Chvanov M, Mukherjee R, McLaughlin E, Booth D, Gerasimenko JV, Raraty MG, Ghaneh P, Neoptolemos JP, Gerasimenko OV, Tepikin AV, Green GM, Reeve JR, Petersen OH, Sutton R. Direct activation of cytosolic  $Ca^{2+}$  signaling and enzyme secretion by cholecystokinin in human pancreatic acinar cells. *Gastroenterology* 2008; 135: 632-641
- McClave SA. Drivers of oxidative stress in acute pancreatitis: the role of nutrition therapy. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2012; 36: 24-35
- Baggaley EM, Elliott AC, Bruce JL. Oxidant-induced inhibition of the plasma membrane  $Ca^{2+}$ -ATPase in pancreatic acinar cells: role of the mitochondria. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008; 295: C1247-C1260
- Booth DM, Murphy JA, Mukherjee R, Awais M, Neoptolemos JP, Gerasimenko OV, Tepikin AV, Petersen OH, Sutton R, Criddle DN. Reactive oxygen species induced by bile acid induce apoptosis and protect against necrosis in pancreatic acinar cells.

- Gastroenterology* 2011; 140: 2116-2125
- 29 Chen X, Sans MD, Strahler JR, Karnovsky A, Ernst SA, Michailidis G, Andrews PC, Williams JA. Quantitative organellar proteomics analysis of rough endoplasmic reticulum from normal and acute pancreatitis rat pancreas. *J Proteome Res* 2010; 9: 885-896
- 30 Baumgartner HK, Gerasimenko JV, Thorne C, Ferdek P, Pozzan T, Tepikin AV, Petersen OH, Sutton R, Watson AJ, Gerasimenko OV. Calcium elevation in mitochondria is the main  $\text{Ca}^{2+}$  requirement for mitochondrial permeability transition pore (mPTP) opening. *J Biol Chem* 2009; 284: 20796-20803
- 31 Hetz C. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012; 13: 89-102
- 32 Hetz C, Martinon F, Rodriguez D, Glimcher LH. The unfolded protein response: integrating stress signals through the stress sensor IRE1 $\alpha$ . *Physiol Rev* 2011; 91: 1219-1243
- 33 Kubisch CH, Sans MD, Arumugam T, Ernst SA, Williams JA, Logsdon CD. Early activation of endoplasmic reticulum stress is associated with arginine-induced acute pancreatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 291: G238-G245
- 34 Lugea A, Tischler D, Nguyen J, Gong J, Gukovsky I, French SW, Gorelick FS, Pandol SJ. Adaptive unfolded protein response attenuates alcohol-induced pancreatic damage. *Gastroenterology* 2011; 140: 987-997
- 35 Lugea A, Waldron RT, French SW, Pandol SJ. Drinking and driving pancreatitis: links between endoplasmic reticulum stress and autophagy. *Autophagy* 2011; 7: 783-785
- 36 Pandol SJ, Gorelick FS, Lugea A. Environmental and genetic stressors and the unfolded protein response in exocrine pancreatic function - a hypothesis. *Front Physiol* 2011; 2: 8
- 37 Pandol SJ, Gorelick FS, Gerloff A, Lugea A. Alcohol abuse, endoplasmic reticulum stress and pancreatitis. *Dig Dis* 2010; 28: 776-782
- 38 裴红红, 秦兆寅, 杨正安, 封英群. 大鼠急性坏死性胰腺炎时核因子  $\kappa$  B 表达的意义. *中华普通外科杂志* 2002; 17: 752
- 39 Kitamura M. Biphasic, bidirectional regulation of NF-kappaB by endoplasmic reticulum stress. *Antioxid Redox Signal* 2009; 11: 2353-2364
- 40 Rakonczay Z, Hegyi P, Takács T, McCarroll J, Saluja AK. The role of NF-kappaB activation in the pathogenesis of acute pancreatitis. *Gut* 2008; 57: 259-267
- 41 Hetz C, Glimcher LH. Fine-tuning of the unfolded protein response: Assembling the IRE1alpha interactome. *Mol Cell* 2009; 35: 551-561
- 42 Mukherjee R, Criddle DN, Gukovskaya A, Pandol S, Petersen OH, Sutton R. Mitochondrial injury in pancreatitis. *Cell Calcium* 2008; 44: 14-23
- 43 Biczó G, Hegyi P, Dósa S, Shalbuyeva N, Berczi S, Sinervirta R, Hracskó Z, Siska A, Kukor Z, Jármy K, Venglovecz V, Varga IS, Iványi B, Alhonen L, Wittmann T, Gukovskaya A, Takács T, Rakonczay Z. The crucial role of early mitochondrial injury in L-lysine-induced acute pancreatitis. *Antioxid Redox Signal* 2011; 15: 2669-2681
- 44 Lemasters JJ. Dying a thousand deaths: redundant pathways from different organelles to apoptosis and necrosis. *Gastroenterology* 2005; 129: 351-360
- 45 Odinkova IV, Sung KF, Mareninova OA, Hermann K, Evtodienko Y, Andreyev A, Gukovsky I, Gukovskaya AS. Mechanisms regulating cytochrome c release in pancreatic mitochondria. *Gut* 2009; 58: 431-442
- 46 Gukovskaya AS, Gukovsky I. Which way to die: the regulation of acinar cell death in pancreatitis by mitochondria, calcium, and reactive oxygen species. *Gastroenterology* 2011; 140: 1876-1880
- 47 Mareninova OA, Sung KF, Hong P, Lugea A, Pandol SJ, Gukovsky I, Gukovskaya AS. Cell death in pancreatitis: caspases protect from necrotizing pancreatitis. *J Biol Chem* 2006; 281: 3370-3381

## ■同行评价

本文详细总结了AP腺泡细胞损伤机制中的钙离子超载、内质网应激、线粒体损伤等前沿机制, 具有较好的学术价值。

编辑 张姗姗 电编 鲁亚静

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2012年版权归世界华人消化杂志

## ● 消息 ●

## 《世界华人消化杂志》被评为中国精品科技期刊

本刊讯 2011-12-02, 中国科学技术信息研究所在北京发布2010年中国科技论文统计结果, 经过中国精品科技期刊遴选指标体系综合评价, 《世界华人消化杂志》被评为2011年度中国精品科技期刊。中国精品科技期刊以其整体的高质量示范作用, 带动我国科技期刊学术水平的提高。精品科技期刊的遴选周期为三年。(编辑部主任: 李军亮 2012-01-01)

# 非侵入性方法检测肠黏膜屏障功能的研究进展

周淑萍, 路又可, 汪芳裕

## ■背景资料

肠黏膜屏障是机体抵御肠腔内有害环境的第一道屏障, 对维持机体内环境的稳定具有重要作用。在疾病治疗的早期, 采取各种有效措施保护肠黏膜屏障功能, 有助于控制病情, 提高疗效。

周淑萍, 路又可, 汪芳裕, 南京大学医学院临床学院 中国人民解放军南京军区南京总医院消化内科 江苏省南京市 210002

周淑萍, 硕士, 医师, 主要从事消化系统疾病诊治的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 81070289

作者贡献分布: 本文综述由周淑萍完成; 路又可与汪芳裕负责审校。

通讯作者: 汪芳裕, 教授, 210002, 江苏省南京市中山东路305号, 中国人民解放军南京军区南京总医院消化内科。

shupingzhou2010@yahoo.cn

收稿日期: 2012-02-13 修回日期: 2012-03-22

接受日期: 2012-04-25 在线出版日期: 2012-05-28

## New advances in non-invasive assessment of intestinal epithelial barrier function

Shu-Ping Zhou, You-Ke Lu, Fang-Yu Wang

Shu-Ping Zhou, You-Ke Lu, Fang-Yu Wang, Department of Gastroenterology & Hepatology, Clinical School of Medical College of Nanjing University; Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command of Chinese PLA, Nanjing 210002, Jiangsu Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 81070289

Correspondence to: Fang-Yu Wang, Professor, Department of Gastroenterology & Hepatology, Clinical School of Medical College of Nanjing University; Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command of Chinese PLA, 305 Zhongshan East Road, Nanjing 210002, Jiangsu Province, China. shupingzhou2010@yahoo.cn

Received: 2012-02-13 Revised: 2012-03-22

Accepted: 2012-04-25 Published online: 2012-05-28

## Abstract

Abnormal intestinal permeability has been suggested to play an important role in many human diseases, including diabetes, inflammatory bowel disease, celiac disease, multiple sclerosis, food allergy and hypersensitivity, and irritable bowel syndrome. Emerging work in recent years has begun to provide evidence for an etiologic role of abnormal intestinal permeability in the pathogenesis of autoimmune disease. Insight into gut barrier integrity and function loss is important to improve our knowledge on disease etiology and pathophysiology and contributes to early detection and/or secondary prevention of disease. A variety of tests have been developed to assess intestinal epithelial cell damage, intestinal tight junction status and consequences of intestinal barrier integrity loss, i.e. increased intestinal

permeability. This review discusses currently available methods for evaluating human intestinal barrier function.

**Key Words:** Intestinal epithelial barrier; Intestinal permeability; Tight junction; Assessment

Zhou SP, Lu YK, Wang FY. New advances in non-invasive assessment of intestinal epithelial barrier function. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(15): 1312-1317

## 摘要

异常的肠道通透性在人类多种疾病中起着非常重要的作用, 包括糖尿病、炎症性肠病、乳糜泻、多发性硬化、食物变态反应过敏症、肠易激综合征等。近年大量的研究发现: 一些自身免疫性疾病伴有肠道通透性增加, 这种现象发生在疾病之前, 被认为与疾病的发病机制相关。研究肠黏膜屏障的功能与结构, 可以提高我们对疾病的病因及病理生理认识, 并且对于早期检测疾病以及对疾病进行二级预防有重要意义。目前有多种试验方法评估肠黏膜上皮细胞受损、紧密连接功能以及肠黏膜屏障的完整性。本篇综述主要探讨目前评估肠黏膜屏障功能的检测方法。

**关键词:** 肠黏膜屏障; 肠道通透性; 紧密连接; 检测

周淑萍, 路又可, 汪芳裕. 非侵入性方法检测肠黏膜屏障功能的研究进展. *世界华人消化杂志* 2012; 20(15): 1312-1317

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1312.asp>

## 0 引言

肠黏膜屏障是机体抵御肠腔内有害环境的第一道屏障, 对维持机体内环境的稳定具有重要作用, 包括减少病原体及其毒素侵袭黏膜与迅速修复肠道单层上皮损伤。肠黏膜屏障包括肠黏膜上皮、肠黏液、肠道菌群、分泌性免疫球蛋白、肠道相关淋巴组织、胆盐、激素和胃酸等。从机制上可将其归纳为3部分: (1)机械屏障, 即肠上皮; (2)生态屏障, 即正常肠道菌群; (3)免疫屏障, 即分泌性IgA、黏膜下和黏膜内各种免疫细胞。其中上皮屏障是肠黏膜屏障最重要的组

## ■同行评议者

白爱平, 副教授, 江西省南昌大学第一附属医院消化病研究所

表 1 评价肠道屏障完整性和肠道屏障功能受损的方法

检测指标	检测标本	目标胃肠道	评价功能
I-FABP	随机血液或尿液	空肠为主, 部分结肠	肠上皮细胞完整性
I-BABP	随机血液或尿液	回肠	肠上皮细胞完整性
L-FABP	随机血液或尿液	小肠	肠上皮细胞完整性
GST- $\alpha$	随机血液	肠道	肠上皮细胞完整性
Claudin 3	随机尿液	胃肠道	细胞间连接完整性
蔗糖	5 h尿液	胃	肠道屏障功能
乳果糖/甘露醇比率	5 h尿液	小肠	肠道屏障功能
三氯蔗糖	24 h尿液	大肠	肠道屏障功能
PEG	6 h尿液	小肠和大肠	肠道屏障功能
$^{51}\text{Cr}$ -EDTA	24 h尿液	小肠和大肠	肠道屏障功能
LAL检测	随机血液	小肠和大肠	肠道屏障功能
EndoCAb	随机血液	小肠和大肠	肠道屏障功能
D-乳酸	随机血液	结肠	肠道屏障功能

I-FABP: 肠型脂肪酸结合蛋白; I-BABP: 回肠胆汁酸结合蛋白; L-FABP: 肝型脂肪酸结合蛋白; GST: 谷胱甘肽S-转移酶; PEG: 聚乙二醇;  $^{51}\text{Cr}$ -EDTA: 铬标记的EDTA; LAL: 鲎变形细胞溶解物; EndoCAb: 内毒素核心抗体。

成部分, 他是由肠黏膜上皮细胞层、上皮细胞刷状缘严密的脂质双分子层以及细胞侧缘一连串的细胞连接(紧密连接、黏附连接)构成的。其在阻止肠腔内的有害物质进入体内起到了关键作用, 可防止肠腔内致病性物质(细菌、有毒物质、食物抗原、致癌物质等)侵入, 使机体内环境保持相对稳定, 维持机体的正常生命活动<sup>[1-4]</sup>。

相邻上皮细胞间的连接方式有多种, 如紧密连接、缝隙连接、黏附连接以及桥粒等。其中细胞连接中最重要的是紧密连接, 紧密连接是构成肠道黏膜机械屏障上皮细胞的重要结构, 可防止肠道有害物质侵入肠黏膜组织, 在维持肠壁通透性中作用最大<sup>[5-8]</sup>。他是由脂质和蛋白构成的巨大复合物: 由occludin、claudin两种跨膜蛋白组成原纤维, 与细胞内的肌动蛋白链相互作用, 穿过细胞膜和邻近细胞的蛋白相互作用<sup>[9]</sup>。紧密连接由多种紧密连接蛋白组成, occludin蛋白是紧密连接中最早发现的结构蛋白, 研究显示, occludin蛋白的胞外环型结构及跨膜结构主要参与肠壁通透性的调节<sup>[10]</sup>。claudins是最重要的紧密连接蛋白, 其表达数量和分布结构的变化直接影响紧密连接的结构和功能<sup>[11,12]</sup>。最近研究发现, claudin蛋白可以根据物质的大小、电荷调节通透性<sup>[10]</sup>。紧密连接调节通路中最重要的是zonulin通路, 许多实验证实, zonulin的增加可致肠壁通透性增加<sup>[5,13]</sup>。细菌及毒素、细胞因子和炎症介质、其他因素如生冷食物和多脂饮食, 均可影响紧密连接及肠壁通透性<sup>[12,14,15]</sup>。

## ■研究前沿

肠黏膜屏障功能的检测方法众多, 但尚缺乏一种能够完全、早期准确判断肠道通透性的方法。需进一步研究寻找一种非侵入性的、灵敏的、特异的, 而且标本处理过程简单、测定快速、临床应用方便、经济的检测肠黏膜屏障功能的方法。

肠黏膜屏障功能的维持有赖于肠黏膜上皮细胞层的完整性以及上皮细胞间的紧密连接。在Yamada等<sup>[13]</sup>的研究中已经证实这一重要观点: 通过简单破坏黏膜屏障功能, 在易感宿主会诱发局部或者全身性炎症反应。在疾病治疗的早期, 采取各种有效措施保护肠黏膜屏障功能, 有助于控制病情, 提高疗效。早期对肠黏膜屏障功能进行检测并正确判断对早期有效治疗疾病有重要意义<sup>[16,17]</sup>。评价肠黏膜通透性的检测方法有多种<sup>[18,19]</sup>, 其可相应地评价肠黏膜损伤部位及功能(表1)。因此本文将对肠黏膜屏障功能的各种检测方法、其优劣性及临床应用价值作一综述。

## 1 肠黏膜屏障完整性受损的非侵入性检测方法

正常情况下(肠上皮无损伤时), 肠黏膜屏障只允许小分子水溶性物质通过, 大分子物质如细菌、毒素则不能通过, 肠道通透性增高意味着肠黏膜屏障功能受损。评估肠黏膜屏障完整性受损可以通过肠上皮细胞的受损或紧密连接的丢失来实现。

### 1.1 肠上皮细胞受损的标志物

1.1.1 脂肪酸结合蛋白(fatty acid binding proteins, FABP): FABP是细胞质内的一种水溶性蛋白, 主要在小肠和大肠的成熟肠上皮细胞中。他们的生物学功能主要是将肠上皮细胞顶膜上的脂肪酸转运到内质网进行合成脂肪。肠道内存在3种亚型的FABP, 分别是肠型(I-FABP)、肝脏型(L-FABP)以及回肠的胆汁酸结合蛋白(I-BABP)。据



## ■相关报道

人类多种疾病中包括糖尿病、炎症性肠病、乳糜泻、多发性硬化、食物变态反应过敏症、肠易激综合征等的发病和肠道通透性的增加明显相关。

报道<sup>[20-22]</sup>, I-FABP主要在空肠表达, 在结肠仅少量表达; I-BABP主要在回肠部位表达, 并且两者仅在肠道中表达, 而L-FABP同时在肝脏及肾脏表达。由于FABP是小分子的可溶性细胞质蛋白, 他们能够从受损的肠上皮细胞膜中释放进入全身, 并被快速清除(半衰期约11 min)。因此, FABP能够较敏感地通过ELISA方法在血清及尿液中检测。基础水平的FABP反映肠上皮细胞生理的转换率。已有多个研究报道采用FABP作为肠上皮细胞受损的标志物, 并且在肠道缺血性疾病、全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS)和坏死性小肠结肠炎患者的血液及尿液中检测出FABP升高<sup>[23-26]</sup>; 肠系膜血栓及肠道血管手术导致的肠道缺血患者检测出FABP的水平更高<sup>[23,27,28]</sup>。因此, 急性肠道损伤时, 血清及尿液中FABP的水平可作为评价肠上皮细胞受损的指标。并且检测血清及尿液中的FABP水平是早期检测肠上皮细胞损伤的有效指标。由于FABP在胃肠道表达部位的不同, 检测特异亚型的FABP有望成为疾病定位的有用工具。

1.1.2 谷胱甘肽S-转移酶(glutathione S-transferases, GSTs): GSTs通过连接谷胱甘肽, 实现保护细胞、抗氧化、对毒素和外来复合物在细胞内进行解毒。GST家族由4个亚基组成, 分别是 $\alpha$ GST、 $\mu$ GST、 $\pi$ GST和 $\theta$ GST, 分别在不同的组织中表达。其中 $\mu$ GST、 $\pi$ GST和 $\theta$ GST可以在不同的器官中表达,  $\alpha$ GST主要在肝脏、肾脏和肠道中表达, 并被推荐为肠上皮细胞受损的标志之一。进行血液的 $\alpha$ GST检测有助于判断可疑的急性肠系膜缺血。McMonagle等<sup>[29]</sup>的研究发现心脏手术中夹闭主动脉, 随后出现肠道缺血, 并出现组织学的改变, 其血液中的 $\alpha$ GST亦相应的明显升高。需要说明的是, 血液或尿液中 $\alpha$ GST的升高能够提示肠道的损伤, 同时也可能是肝脏和肾脏损伤所致, 因为 $\alpha$ GST表达于上述器官的上皮细胞。因此, 仅仅在怀疑存在肠道损伤时进行 $\alpha$ GST检测可能才是有意义的。

1.2 细胞旁路屏障完整性受损的标志物-紧密连接蛋白 肠上皮细胞是通过细胞周围的紧密连接束连接在一起的。跨膜蛋白claudins在肠道屏障功能的完整性中起着主要的作用。这些claudins家族成员在正常的肠上皮细胞中大量存在。Zeissig等<sup>[30]</sup>的研究发现, Crohn病肠黏膜活检组织中屏障功能紊乱, 并伴有多个claudins蛋白如claudin-1, 3, 5, 7和8表达下调, 而起着孔道形成作用的claudin-2则上调。非侵入性地评价

claudins蛋白能够评估肠道上皮细胞旁屏障功能的完整性。由于具有分子量小、肠道内源性的大量表达和位于细胞旁等特性, claudin-3似乎非常适合作为早期检测肠道紧密连接完整性受损的候选标志物。最近的多项研究提示, 在失血性休克大鼠模型和IBD、坏死性小肠结肠炎以及外科大手术的患者中, 肠道紧密连接受损与尿液中的claudin-3水平密切相关<sup>[31-33]</sup>。因此, 尿液中的claudin-3可作为评估肠道紧密连接受损的非侵入性检测标志物。

由此可知, 检测尿液中的claudin-3水平对肠上皮细胞间屏障损伤的研究提供了可行性。并为早期诊断和随访肠道疾病患者、阐明肠道相关疾病的发病机制提供了新的方法。但是, 必须认清临床实际与实验研究的结果可能是不同的, 因为紧密连接不仅仅存在肠道中。应用其他紧密连接蛋白对肠道细胞旁通路的完整性进行非侵入性评价仍需更多的研究去证实。

1.3 肠道屏障受损的功能性评价 大量的研究报道肠道屏障受损的功能性评价方法。目前可用的方法主要是通过口服试剂直接检测肠上皮细胞旁的渗漏, 或间接检测肠道屏障功能受损后的物质, 如进入血液中的肠内容物。直接评价屏障功能受损是基于这样一种假说, 口服大分子探针不能通过肠道的细胞旁通路, 除非肠道屏障功能受损。在肠道屏障功能受损时, 探针通过肠黏膜屏障出现在血液中, 随后通过肾脏排泄到尿液中, 很容易在尿液中检测到。间接的评价屏障功能受损基于另外一个假说, 肠道渗漏的物质, 如内毒素、细菌性发酵产物, 在肠道屏障功能受损时转移到血液中, 检测血清中这些细菌的成分或产物可以反映肠道屏障功能的受损程度。

1.3.1 直接检测肠道屏障功能的方法: (1)糖吸收试验: 口服不同的糖分子探针能够通过受损的胃肠黏膜屏障入血, 随后经肾脏排泄到尿液中, 很容易在尿液中检测, 可作为评价肠黏膜屏障受损的指标<sup>[18]</sup>。蔗糖是检测胃、十二指肠通透性的有效指标, 在十二指肠远端蔗糖迅速地被蔗糖-异麦芽糖酶降解, 因此只能用来检测胃、十二指肠的通透性<sup>[34-36]</sup>。小肠通透性是用乳果糖/甘露醇的分级排泄比率来检测。由于小通道多聚集在绒毛顶端, 化合物通过这条通路的渗透速率形成了成熟小肠表面积粗略评价, 这在临床上已经得到确认。在那些存在成熟小肠表面积明显减少的疾病中(比如乳糜泻), 小分子探针甘

露醇的分级排泄明显减少, 同时大分子探针乳果糖的分级排泄增加, 结果乳果糖/甘露醇比率(L/M ratio)显著增加; 而在乳糜泻的治疗过程中则相反. 三氯蔗糖可以稳定地通过消化系, 在结肠停留24 h, 所以优先用于评价结肠通透性的特征<sup>[37,38]</sup>. 常用的检测方法包括比色法、酶学法、气相色谱法、高效液相色谱法<sup>[39,40]</sup>. 近来采用电化学高效液相色谱法, 有更高的灵敏度和特异性, 而且标本处理过程简单, 测定快速, 并可同时测定几种糖类, 临床应用较为方便. 但其检测费用较昂贵, 且不能用于禁食患者, 临床应用受到限制<sup>[41]</sup>; (2)聚乙二醇(PEG)探针: PEG分子量为400-4 000 Da, 大分子的PEG仅能够通过受损的肠黏膜屏障入血, 随后通过肾脏排泄到尿液中而检测到, 从而反映肠黏膜通透性的改变. 由于PEG没有生物学活性, 且不能被细菌降解, 因此24 h尿液中的含量能够提供Crohn病整个肠道以及肠道缺血再灌注损伤患者肠道通透性的研究<sup>[42,43]</sup>. 但由于PEG类兼有水溶性和一定的脂溶性, 在肠道吸收时, 易受渗透压浓度的影响, 静脉注射后, 回收率低, 因而临床实际应用意义不大; (3)核素探针法: 如以<sup>51</sup>Cr标记的乙二胺四乙酸(<sup>51</sup>Cr-EDTA)检测肠黏膜通透性. 该标记物的优点在于容易检测, 而且在结肠内不会被细菌分解, 因此可作为小肠和大肠通透性改变的研究, 已有研究证实IBD患者的<sup>51</sup>Cr-EDTA结直肠通透性升高<sup>[37]</sup>. 但其放射性对人体有一定损害, 这在很大程度上限制了其使用. 另外, 由于每次只能采用一种核素探针进行检测, 故其结果的准确性亦受到影响.

1.3.2 间接检测肠道屏障功能的方法: (1)鲎变形细胞溶解物(LAL)检测: 在健康状况下肠黏膜屏障能够阻止肠腔内的细菌移位, 但当肠黏膜屏障受损时肠道的细菌及其产物将进入血液, 因此检测血液中的细菌及其代谢产物能够进一步评价肠黏膜屏障的完整性<sup>[44]</sup>. 内毒素是G-细菌外膜的脂多糖, 它能够引起机体许多不良反应, 如发热、白细胞增多、血小板减少和凝血障碍. LAL是存在于鲎的阿米巴细胞中, 能够诱导血液凝集的因子, 进一步研究证实是G-细菌细胞壁中的脂多糖或称内毒素. LAL检测能够定量反映血浆内毒素的水平, 检测肠道细菌移位较血培养更为敏感, 且不受抗生素的影响, 检测迅速, 但此法只能间接推断肠道屏障功能的变化, 并且对设备与技术要求都很高, 故难以在临床推广; (2)内毒素核心抗体: 内毒素核心抗体(endo-

toxin core antibodies, EndoCAb)是针对内毒素活性成分LPS核心抗原的抗体, 在正常人血中少量存在. 研究表明手术患者EndoCAb水平的下降与患者术后内毒素感染减少有关<sup>[45]</sup>. 而且, 术前低水平的EndoCAb与腹主动脉瘤手术患者的不良预后密切相关<sup>[46,47]</sup>. EndoCAb的检测能够获得肠道内毒素移位的信息, 从而可以进一步评价肠道上皮细胞屏障功能的受损; (3)循环D-乳酸法: D-乳酸是细菌发酵的代谢产物, 肠道多种细菌均可产生, 但正常情况下很少被吸收, 并且哺乳动物不具备将其快速降解的酶系统. 肠黏膜受损、通透性增高时, 肠道中细菌产生的大量D-乳酸通过受损黏膜进入血液循环, 使血浆D-乳酸水平升高, 故检测血浆中D-乳酸水平可及时反映肠黏膜损害程度和通透性的变化<sup>[48,49]</sup>. 目前, D-乳酸的检测主要是酶法, 即利用D-乳酸脱氢酶将D-乳酸进行分解, 测定反应产物的吸光度来计算血D-乳酸含量. 循环D-乳酸可以作为临床检测肠黏膜通透性的较好指标, 而且标本采集方便, 具有较广阔的应用前景.

## 2 结论

评价肠黏膜通透性的检测方法有多种, 其可相应评价肠黏膜损伤的部位及功能. 针对不同的疾病、不同的病变部位选择相应的检测方法来评价肠黏膜屏障完整性及其功能将有利于早期诊断疾病、明确疾病病因、判断病情严重程度以及对疗效进行评价.

## 3 参考文献

- 1 吴瑛, 汪芳裕, 魏娟, 朱东海. 甘露糖结合凝集素在小鼠葡聚糖硫酸钠结肠炎发病中的机制研究. 医学研究生学报 2010; 23: 141-144
- 2 何新颖, 唐志鹏, 张亚利. 肠上皮屏障与炎症性肠病研究进展. 世界华人消化杂志 2008; 16: 3316-3320
- 3 Madara JL. Warner-Lambert/Parke-Davis Award lecture. Pathobiology of the intestinal epithelial barrier. *Am J Pathol* 1990; 137: 1273-1281
- 4 Barrett KE. New ways of thinking about (and teaching about) intestinal epithelial function. *Adv Physiol Educ* 2008; 32: 25-34
- 5 Schneeberger EE, Lynch RD. The tight junction: a multifunctional complex. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004; 286: C1213-C1228
- 6 Koval M. Claudins—key pieces in the tight junction puzzle. *Cell Commun Adhes* 2006; 13: 127-138
- 7 Smecuol E, Sugai E, Niveloni S, Vázquez H, Pedreira S, Mazure R, Moreno ML, Label M, Mauriño E, Fasano A, Meddings J, Bai JC. Permeability, zonulin production, and enteropathy in dermatitis herpetiformis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2005; 3: 335-341
- 8 韦志坤, 程爱国. 肠黏膜细胞的紧密连接与肠壁通透性的研究进展. 世界华人消化杂志 2011; 19: 394-399

## ■创新盘点

本文对肠黏膜屏障功能的各种检测方法、其优劣性及临床应用价值作了详细阐述.

## ■同行评价

本文对评估肠黏膜屏障功能的检测方法进行了综述,内容详实,临床应用价值较大。

- 9 Gupta IR, Ryan AK. Claudins: unlocking the code to tight junction function during embryogenesis and in disease. *Clin Genet* 2010; 77: 314-325
- 10 Wang W, Uzzau S, Goldblum SE, Fasano A. Human zonulin, a potential modulator of intestinal tight junctions. *J Cell Sci* 2000; 113 Pt 24: 4435-4440
- 11 施慧, 朱东海, 汪芳裕, 路又可. 紧密连接蛋白-8在实验性结肠炎中的表达及意义. *医学研究生学报* 2011; 24: 586-589
- 12 Förster C. Tight junctions and the modulation of barrier function in disease. *Histochem Cell Biol* 2008; 130: 55-70
- 13 Yamada T, Sartor RB, Marshall S, Specian RD, Grisham MB. Mucosal injury and inflammation in a model of chronic granulomatous colitis in rats. *Gastroenterology* 1993; 104: 759-771
- 14 Polimeno L, Loiacono M, Pesetti B, Mallamaci R, Mastrodonato M, Azzarone A, Annoscia E, Gatti F, Amoroso A, Ventura MT. Anisakiasis, an underestimated infection: effect on intestinal permeability of Anisakis simplex-sensitized patients. *Foodborne Pathog Dis* 2010; 7: 809-814
- 15 Suzuki T, Hara H. Dietary fat and bile juice, but not obesity, are responsible for the increase in small intestinal permeability induced through the suppression of tight junction protein expression in LETO and OLETF rats. *Nutr Metab (Lond)* 2010; 7: 19
- 16 王波, 宋怀宇, 杨建荣. 肠道屏障功能障碍的干预研究进展. *世界华人消化杂志* 2011; 19: 2251-2256
- 17 Melichar B, Zezulová M. The significance of altered gastrointestinal permeability in cancer patients. *Curr Opin Support Palliat Care* 2011; 5: 47-54
- 18 Grootjans J, Thuijls G, Verdam F, Derikx JP, Lenaerts K, Buurman WA. Non-invasive assessment of barrier integrity and function of the human gut. *World J Gastrointest Surg* 2010; 2: 61-69
- 19 Derikx JP, Luyer MD, Heineman E, Buurman WA. Non-invasive markers of gut wall integrity in health and disease. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 5272-5279
- 20 Pelsers MM, Hermens WT, Glatz JF. Fatty acid-binding proteins as plasma markers of tissue injury. *Clin Chim Acta* 2005; 352: 15-35
- 21 Pelsers MM, Namiot Z, Kisielewski W, Namiot A, Januszkiewicz M, Hermens WT, Glatz JF. Intestinal-type and liver-type fatty acid-binding protein in the intestine. Tissue distribution and clinical utility. *Clin Biochem* 2003; 36: 529-535
- 22 Derikx JP, Vreugdenhil AC, Van den Neucker AM, Grootjans J, van Bijnen AA, Damoiseaux JG, van Heurn LW, Heineman E, Buurman WA. A pilot study on the noninvasive evaluation of intestinal damage in celiac disease using I-FABP and L-FABP. *J Clin Gastroenterol* 2009; 43: 727-733
- 23 Kanda T, Fujii H, Tani T, Murakami H, Suda T, Sakai Y, Ono T, Hatakeyama K. Intestinal fatty acid-binding protein is a useful diagnostic marker for mesenteric infarction in humans. *Gastroenterology* 1996; 110: 339-343
- 24 Derikx JP, Evennett NJ, Degraeuwe PL, Mulder TL, van Bijnen AA, van Heurn LW, Buurman WA, Heineman E. Urine based detection of intestinal mucosal cell damage in neonates with suspected necrotizing enterocolitis. *Gut* 2007; 56: 1473-1475
- 25 Guthmann F, Borchers T, Wolfrum C, Wustrack T, Bartholomäus S, Spener F. Plasma concentration of intestinal- and liver-FABP in neonates suffering from necrotizing enterocolitis and in healthy pre-term neonates. *Mol Cell Biochem* 2002; 239: 227-234
- 26 Edelson MB, Sonnino RE, Bagwell CE, Lieberman JM, Marks WH, Rozyski HJ. Plasma intestinal fatty acid binding protein in neonates with necrotizing enterocolitis: a pilot study. *J Pediatr Surg* 1999; 34: 1453-1457
- 27 Holmes JH, Lieberman JM, Probert CB, Marks WH, Hill ME, Paull DL, Guyton SW, Sacchetti J, Hall RA. Elevated intestinal fatty acid binding protein and gastrointestinal complications following cardiopulmonary bypass: a preliminary analysis. *J Surg Res* 2001; 100: 192-196
- 28 Hanssen SJ, Derikx JP, Vermeulen Windsant IC, Heijmans JH, Koepfel TA, Schurink GW, Buurman WA, Jacobs MJ. Visceral injury and systemic inflammation in patients undergoing extracorporeal circulation during aortic surgery. *Ann Surg* 2008; 248: 117-125
- 29 McMonagle MP, Halpenny M, McCarthy A, Mortell A, Manning F, Kilty C, Mannion D, Wood AE, Corbally MT. Alpha glutathione S-transferase: a potential marker of ischemia-reperfusion injury of the intestine after cardiac surgery? *J Pediatr Surg* 2006; 41: 1526-1531
- 30 Zeissig S, Bürgel N, Günzel D, Richter J, Mankertz J, Wahnschaffe U, Kroesen AJ, Zeitz M, Fromm M, Schulzke JD. Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease. *Gut* 2007; 56: 61-72
- 31 Derikx JP, van Waardenburg DA, Thuijls G, Willigers HM, Koenraads M, van Bijnen AA, Heineman E, Poeze M, Ambergen T, van Ooij A, van Rhijn LW, Buurman WA. New Insight in Loss of Gut Barrier during Major Non-Abdominal Surgery. *PLoS One* 2008; 3: e3954
- 32 Thuijls G, de Haan JJ, Derikx JP, Daissormont I, Hadfoune M, Heineman E, Buurman WA. Intestinal cytoskeleton degradation precedes tight junction loss following hemorrhagic shock. *Shock* 2009; 31: 164-169
- 33 Thuijls G, Derikx JP, de Haan JJ, Grootjans J, de Bruïne A, Masclee AA, Heineman E, Buurman WA. Urine-based detection of intestinal tight junction loss. *J Clin Gastroenterol* 2010; 44: e14-e19
- 34 Farhadi A, Keshavarzian A, Kwasny MJ, Shaikh M, Fogg L, Lau C, Fields JZ, Forsyth CB. Effects of aspirin on gastroduodenal permeability in alcoholics and controls. *Alcohol* 2010; 44: 447-456
- 35 Meddings JB, Sutherland LR, Byles NI, Wallace JL. Sucrose: a novel permeability marker for gastroduodenal disease. *Gastroenterology* 1993; 104: 1619-1626
- 36 Sjöstedt Zsigmond C, Hannestad U, Franzén L, Söderholm JD, Borch K. Atrophic gastritis is associated with increased sucrose permeability related to chronic inflammation. *Digestion* 2005; 72: 201-206
- 37 Anderson AD, Jain PK, Fleming S, Poon P, Mitchell CJ, MacFie J. Evaluation of a triple sugar test of colonic permeability in humans. *Acta Physiol Scand* 2004; 182: 171-177
- 38 Haas V, Büning C, Buhner S, von Heymann C, Valentini L, Lochs H. Clinical relevance of measuring colonic permeability. *Eur J Clin Invest* 2009; 39: 139-144
- 39 Melichar B, Hyspler R, Kalábová H, Dvorák J, Tichá A, Zádák Z. Gastroduodenal, intestinal and colonic permeability during anticancer therapy. *Hepatogastroenterology* 2011; 58: 1193-1199

- 40 Corpeleijn WE, van Elburg RM, Kema IP, van Goudoever JB. Assessment of intestinal permeability in (premature) neonates by sugar absorption tests. *Methods Mol Biol* 2011; 763: 95-104
- 41 Kerckhoffs AP, Akkermans LM, de Smet MB, Besselink MG, Hietbrink F, Bartelink IH, Busschers WB, Samsom M, Renooij W. Intestinal permeability in irritable bowel syndrome patients: effects of NSAIDs. *Dig Dis Sci* 2010; 55: 716-723
- 42 Solligård E, Juel IS, Spigset O, Romundstad P, Grønbech JE, Aadahl P. Gut luminal lactate measured by microdialysis mirrors permeability of the intestinal mucosa after ischemia. *Shock* 2008; 29: 245-251
- 43 Jenkins RT, Ramage JK, Jones DB, Collins SM, Goodacre RL, Hunt RH. Small bowel and colonic permeability to 51Cr-EDTA in patients with active inflammatory bowel disease. *Clin Invest Med* 1988; 11: 151-155
- 44 Hurley JC. Endotoxemia: methods of detection and clinical correlates. *Clin Microbiol Rev* 1995; 8: 268-292
- 45 Mythen MG, Barclay GR, Purdy G, Hamilton-Davies C, Mackie IJ, Webb AR, Machin SJ. The role of endotoxin immunity, neutrophil degranulation and contact activation in the pathogenesis of post-operative organ dysfunction. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1993; 4: 999-1005
- 46 Bennett-Guerrero E, Panah MH, Barclay GR, Bodian CA, Winfree WJ, Andres LA, Reich DL, Mythen MG. Decreased endotoxin immunity is associated with greater mortality and/or prolonged hospitalization after surgery. *Anesthesiology* 2001; 94: 992-998
- 47 Braun JP, Buhner S, Kastrup M, Dietz E, Langer K, Dohmen PM, Lochs H, Spies C. Barrier function of the gut and multiple organ dysfunction after cardiac surgery. *J Int Med Res* 2007; 35: 72-83
- 48 Sun XQ, Fu XB, Zhang R, Lu Y, Deng Q, Jiang XG, Sheng ZY. Relationship between plasma D(-)-lactate and intestinal damage after severe injuries in rats. *World J Gastroenterol* 2001; 7: 555-558
- 49 Assadian A, Assadian O, Senekowitsch C, Rotter R, Bahrani S, Fürst W, Jaksch W, Hagmüller GW, Hübl W. Plasma D-lactate as a potential early marker for colon ischaemia after open aortic reconstruction. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2006; 31: 470-474

编辑 张姗姗 电编 鲁亚静

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2012年版权归世界华人消化杂志

## • 消息 •

### 中国科技信息研究所发布《世界华人消化杂志》 影响因子 0.694

**本刊讯** 2011-12-02, 一年一度的中国科技论文统计结果由中国科技信息研究所(简称中信所)在北京发布.《中国科技期刊引证报告(核心版)》统计显示, 2010年《世界华人消化杂志》总被引频次3458次, 影响因子0.694, 综合评价总分60.6分, 分别位居内科学类49种期刊的第5位、第7位、第6位, 分别位居1 998种中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)的第79位、第320位、第190位; 其他指标: 他引率0.83, 被引半衰期4.9, 来源文献量712, 文献选出率0.90, 参考文献量17963, 平均引文数25.23, 平均作者数4.35, 地区分布数29, 机构分布数349, 基金论文比0.45, 海外论文比0.01. (编辑部主任: 李军亮 2012-01-01)

# 体外循环心脏术后消化系统并发症的防治进展

秦春妮, 黑飞龙

## ■背景资料

体外循环期间多种因素导致消化系统血液供应减少、组织损伤、炎性介质大量释放,而引起包括胃肠道出血、消化性溃疡、缺血性肠炎、胰腺炎、胆管炎、肝衰竭等在内的消化系统并发症。

秦春妮, 黑飞龙, 北京协和医学院 中国医学科学院阜外心血管病医院体外循环科 北京市 100037

秦春妮, 在读硕士, 主要从事麻醉学体外循环研究。

作者贡献分布: 本文由秦春妮进行文献检索与写作; 由黑飞龙审校与指导。

通讯作者: 黑飞龙, 主任医师, 100037, 北京市西城区北礼士路167号, 北京协和医学院, 中国医学科学院阜外心血管病医院体外循环科。heifeilong@yahoo.com  
电话: 010-88398285

收稿日期: 2011-10-27 修回日期: 2012-04-17

接受日期: 2012-04-25 在线出版日期: 2012-05-28

## Prevention and treatment of gastrointestinal complications following cardiac surgery with cardiopulmonary bypass

Chun-Ni Qin, Fei-Long Hei

Chun-Ni Qin, Fei-Long Hei, Department of Cardiopulmonary Bypass, Cardiovascular Institute and Fuwai Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences; Peking Union Medical College, Beijing 100037, China

Correspondence to: Fei-Long Hei, Chief Physician, Department of Cardiopulmonary Bypass, Cardiovascular Institute and Fuwai Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences; Peking Union Medical College, 167 Beilishi Road, Xicheng District, Beijing 100037, China. heifeilong@yahoo.com

Received: 2011-10-27 Revised: 2012-04-17

Accepted: 2012-04-25 Published online: 2012-05-28

## Abstract

Acute gastrointestinal complications (GICs) following cardiac surgery with cardiopulmonary bypass (CPB) are rare but carry a high mortality rate. During CPB procedures, many factors cause a reduction of blood supply to the digestive system, tissue injury, and the release of many inflammatory mediators, which can lead to GICs such as gastrointestinal bleeding, peptic ulcers, ischemic enteritis, pancreatitis, cholecystitis, and liver failure. Close observation of clinical manifestations and early diagnosis will help timely manage these complications and improve prognosis. The purpose of this paper is to review the mechanism, risk factors, diagnosis and treatment of GICs after cardiac surgery with cardiopulmonary bypass.

Key Words: Gastrointestinal complications; Surgery; Bypass; Prevention

Qin CN, Hei FL. Prevention and treatment of gastrointestinal complications following cardiac surgery with cardiopulmonary bypass. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(15): 1318-1322

## 摘要

体外循环心脏术后消化系统并发症虽然发生率不高,但病死率却极高。体外循环期间多种因素导致消化系统血液供应减少、组织损伤、炎性介质大量释放,从而引起包括胃肠道出血、消化性溃疡、缺血性肠炎、胰腺炎、胆管炎、肝衰竭等在内的消化系统并发症。严密观察患者临床表现并早期诊断予以干预,对患者的预后具有重要帮助。本文就近年来体外循环心脏术后消化系统并发症的机制、危险因素及诊断治疗的进展予以综述。

关键词: 消化系统并发症; 心脏手术; 体外循环; 防治

秦春妮, 黑飞龙. 体外循环心脏术后消化系统并发症的防治进展. *世界华人消化杂志* 2012; 20(15): 1318-1322

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1318.asp>

## 0 引言

1957年, Berkowitz等<sup>[1]</sup>首次报道了体外循环心脏手术后发生急性消化系统并发症的病例,其中最常见的是溃疡合并出血。体外循环心脏手术后消化系统并发症的发生率约为0.5%-4.0%,但一旦发生病死率却高达26%-75%<sup>[2-5]</sup>。已报道的并发症主要有胃肠道出血、消化性溃疡、缺血性肠炎、胰腺炎、胆管炎、肝衰竭等。由于患者术中应用大量肌松剂、镇静剂,术后早期使用机械通气,消化系统并发症的早期症状和体征常常被掩盖,而导致错过最佳治疗时机,增加了病死率,因此,术前准确预测危险因素并给予有效干预措施,可降低发生率及死亡率。

## 1 体外循环心脏手术后消化系统并发症的发生机制

体外循环期间消化系统功能大多处于静息状态,其功能和结构的改变不易被临床所注意,体外循环对消化系统的影响及消化系统并发症发生

## ■同行评议者

秦环龙, 教授, 上海交通大学附属第六人民医院外科



机制尚未完全明确, 目前的研究认为病理生理机制包括以下几个方面:

1.1 消化系低血流灌注 Ohri等<sup>[6]</sup>研究发现, 体外循环期间尽管肠系膜上动脉的血流速度没有明显改变, 但空肠黏膜血流量减少40%, 浆膜血流量减少50%。引起这一效应的主要原因是体外循环期间的低温、血液稀释、大量血液引流至体外, 非搏动灌注引发的血流模式改变等导致低血压和血管阻力的增加; 血管阻力增加则与儿茶酚胺系统、肾素-血管紧张素-醛固酮系统的兴奋有关, 这些因素导致机体处于“人工休克”状态, 大脑等主要脏器血流基本不变, 而腹腔脏器的血流明显减少, 导致消化系上皮细胞能量供应不足, 不能产生足量的黏液和碳酸氢盐, 削弱了黏膜清除酸性物质的能力, 再加上氧自由基的激活也使肠黏膜发生缺血-再灌注损伤甚至细胞坏死<sup>[7]</sup>。

1.2 炎性介质的释放 胃肠道黏膜是全身代谢最活跃的器官之一, 肠道又是体内最大的储菌库和内毒素库, 当肠黏膜完整性和屏障保护功能被破坏后, 肠道内的细菌或内毒素向肠外组织移位, 引起肠道局部或全身性的炎症反应而过度释放炎性介质。体外循环中由于血液与塑料、玻璃和金属等人工材料接触以及组织非生理灌注, 会激活凝血系统、缓激肽和补体, 炎性介质大量释放, 这些介质可激活白细胞、增加血管的通透性, 引起消化系组织水肿, 在消化系并发症的产生中起到重要作用。此外, 体外循环期间组胺分泌增加, 并加速胃酸大量释放, 胃酸分泌过多也是上消化系溃疡重要因素之一<sup>[7,8]</sup>。

1.3 栓塞 在体外循环期间, 尽管在整个管路系统安装了多个功能各异的过滤器, 仍可在血液中发现一些栓子, 如组织碎片、气体、脂肪滴、血小板聚合物、人工材料脱落成分等物质, 这些异物随血流到达全身各脏器, 若到达并栓塞到肠系膜血管等为消化系供血的血管, 则使该血管支配的区域发生血供障碍。而且局部炎症反应进一步加重栓塞胃肠组织的缺血性损伤, 严重时可能出现局部消化系组织的坏死<sup>[8]</sup>。

1.4 其他 长期吸烟酗酒的患者, 消化系黏膜微静脉收缩、血流淤滞和黏膜缺血。糖尿病患者可因长期高血糖使胃肠运动减弱。高血压患者在体外循环低血压期间胃肠对缺血缺氧的耐受差, 易发生组织坏死。老年心血管病患者消化系统并发症较多见, 这可能与缺血代偿能力差有关<sup>[7]</sup>。

## 2 危险因素

体外循环心脏手术消化系统并发症的发生是由多个因素共同作用所致, 及早判断高危因素可进行有效地早期干预, 对降低并发症的发生率及死亡率有积极意义。

2.1 术前危险因素 多项研究<sup>[2-4,9]</sup>表明术前的主要危险因素包括患者年龄>70岁、低心排量、血肌酐>1.4 mg/dL, 既往有慢性肾衰、慢性阻塞性肺病、外周血管病、高血压、房颤、心肌梗塞、肝素诱发的血小板减少症等病史, 手术方式如急诊手术、联合手术、瓣膜手术、二次或多次手术也是高危因素。另外有研究显示, 心脏术后出现消化系统并发症需要开腹手术治疗的高危因素有术前肾衰竭、使用抗凝剂, 既往有冠脉搭桥史、经皮腔内冠状动脉成形术史, 瓣膜手术、搭桥联合瓣膜手术及应用主动脉内球囊反搏<sup>[10,11]</sup>。

2.2 术中危险因素 二次或多次手术和复杂心脏手术需要较长时间的体外循环支持, 较长的体外循环时间可导致体内大量乳酸堆积而形成消化系统并发症的前兆。急诊手术同时伴有急性心肌梗死、心律失常、应用主动脉内球囊反搏术等患者的消化系统并发症发生率较高。主动脉阻断时间过长、血管活性药物的用量较大、急性肾衰竭、机械通气>24 h、术中失血过多并输血等因素均使消化系统并发症发生率升高<sup>[3,12,13]</sup>。

2.3 术后危险因素 心脏术后危险因素包括术后出血手术止血、术后心律失常、低心排、脑血管栓塞或出血、急性肾功能衰竭都会不同程度的导致继发的消化系并发症出现。

## 3 消化系统并发症诊断及防治

消化系统并发症的出现将进一步加重心力衰竭和呼吸衰竭等其他心脏术后的并发症, 严重者甚至导致多脏器功能衰竭, 从而使心脏术后病死率显著增加, 延长了住院时间, 增加了患者的负担。因此, 如何有效降低心脏术后消化系统并发症发生的风险, 是降低手术死亡率的关键之一。

对存在高危因素的患者术前进行充分的准备工作, 改善心脏泵血功能及围术期氧供, 了解病情, 如既往有消化系溃疡病史的患者可在术前服用抗组胺药物, 这样可减轻体外循环中消化系黏膜的损伤。有研究发现术前预防性地滴注参附液, 可有效减轻或抑制体外循环中及主

### ■ 研发前沿

消化系统并发症的早期症状和体征常常被掩盖, 而错过最佳治疗时机, 增加了病死率。

## ■应用要点

体外循环心脏手术消化系统并发症的发生是由多个因素共同作用所致,及早判断高危因素可进行有效地早期干预,对降低并发症的发生率及死亡率有积极意义。

动脉开放后胃黏膜pH值的下降,改善肠道的灌注和氧合,保护肠黏膜屏障功能,降低内毒素血症及全身炎症反应<sup>[14]</sup>。刘瑞琳等<sup>[15]</sup>通过对大鼠肠缺血再灌注的研究发现术前静注大黄素可减轻肠黏膜损伤。术中要保持充分的灌注流量和灌注压以改善腹腔脏器在体外循环中的血流量。术中和术后使用无创胃肠张力监测仪连续测定胃肠黏膜的pH和CO<sub>2</sub>分压,可及时评估组织的循环灌注和对体外循环灌注进行合理调整,对评价患者预后有一定意义。有研究显示胃肠道黏膜的pH与胃肠道的损伤呈负相关,保持胃内pH>3.5可明显降低胃肠道损伤和消化系出血的发生率<sup>[16]</sup>。使用动态胃电图监测仪监测围术期胃电节律,可评估消化系统的运动功能,指导消化系统的护理及对消化系统并发症的出现起到预警作用<sup>[17]</sup>。术后及早胃肠道进食,服用对胃肠道有保护作用的活菌,可防治胃肠道菌群紊乱;口服麦滋林和静脉予谷氨酰胺可促进胃肠道内皮的迅速更新,维持肠黏膜屏障的完整性。通常在严重的消化系统并发症存在的情况下,患者需大约1-2 wk的短期鼻饲管给予营养物质<sup>[7]</sup>。

**3.1 上消化系出血** 体外循环应激性溃疡发生率很高,急性溃疡的主要表现是出血,应激所致的黏膜病变是造成术后出血的最常见原因。有研究表明上消化系出血发生率为0.9%,死亡率为35%<sup>[18]</sup>。出血的发生主要与体外循环期间抗凝剂的使用有关,胃肠黏膜pH增高、黏液分泌减少、交感神经兴奋、黏膜缺血、皮质激素大量分泌使肠组织修复功能受阻<sup>[7]</sup>。长时间体外循环、主动脉钳夹时间过长和通气时间过长也使出血压率升高<sup>[18]</sup>。上消化系出血一般表现为胃潜血阳性或呕血,便血较少见。治疗包括口服质子泵抑制剂、留置胃管减压,冲洗胃腔,清除血凝块,禁食水,通过内镜检查来确定出血点,在内镜下施行电凝、激光灼凝、注射或喷洒药物局部止血、钳夹出血的血管或注入血管硬化剂止血,也可借助3腔2囊管压迫出血部位。如内镜检查未能发现出血病因,则可行选择性腹腔动脉或肠系膜上动脉造影,对出血定位有帮助,同时经动脉导管注入血管加压素控制出血。如失血量较大患者各项生命指标不稳定则需输血,持续出血很难止血时需急诊手术止血。因此术前应了解病史,对既往有消化性溃疡病史患者术后预防性应用抗酸药,同时慎用阿司匹林。有研究显示在体外循环预充液中加入奥美拉唑可减轻胃酸对体外循环中受损胃黏膜的损伤作用,减轻全身炎症反

应而对胃黏膜产生保护作用<sup>[19,20]</sup>。

**3.2 消化系溃疡穿孔** 心脏手术后消化性溃疡的发生率约占消化系统并发症的6%左右,死亡率为36%。大部分患者是在术后常规拍摄腹部X线平片时发现上腹部的游离气体,或者患者有腹痛和腹胀的主诉。多数患者既往有溃疡病史,穿孔前溃疡病症状加剧,表现为骤起的上腹部刀割样剧痛,迅速波及全腹,腹肌紧张呈板样强直。诊断性腹腔穿刺可抽出含胆汁或食物残渣的液体。所有溃疡患者均需手术治疗,十二指肠溃疡出血的患者一般选择的术式为溃疡缝合、迷走神经切断术加幽门成形术,或者迷走神经切断术加胃窦切除术。如若患者生命指标不稳定,则仅行溃疡单纯缝合,根治性手术应推迟。胃溃疡出血患者需行胃组织活检、溃疡缝合、迷走神经切断术并幽门成形术,或者行远端胃切除术来根治。如患者生命体征不稳定则行溃疡单纯缝合术。

**3.3 下消化系出血** 心脏术后下消化系出血仅占消化系出血的9%,病死率为17.4%。其中10%的下消化系出血由上消化系病变引起<sup>[21]</sup>。体外循环过程中存在的低血压和低氧血症会导致结肠黏膜缺血并引起非梗阻性坏死,脾区部分的结肠更易发生这种情况,这是由于此处的结肠循环处于上下肠系膜间变得更纤细<sup>[8]</sup>。患者下消化系出血的最常见临床表现为腹痛和便血。如果患者血流动力学稳定,则可通过腹部追踪扫描99m 锝标记的红细胞来定位出血部位。肠系膜动脉造影检查可发现持续活动性出血灶,同时行靶血管栓塞治疗。结肠镜介入也可确定出血部位并止血。失血量或者低血容量导致的血流动力学不稳定的患者则需及时评估是否需要手术介入,如已查明出血部位,则需行部分结肠切除术。如一直未查明出血部位,可行结肠次全切并排空肠道,会对出血部位的定位有所帮助。有研究表明接受结肠次全切的患者比部分结肠切除的患者的病死率高,这就表明一旦发生出血,早发现早定位对治疗、预后及其关键<sup>[22,23]</sup>。

**3.4 缺血性肠炎** Mangi等<sup>[2]</sup>研究显示缺血性肠炎的发病率占总的消化系统并发症的67%,病死率为70%。高龄、急诊手术、围术期低血压和外周血管疾病都可引起肠缺血发生<sup>[24,25]</sup>。下消化系出血伴白细胞增多症、高钾血症、不明原因的乳酸酸中毒血症等症状提示肠缺血,但这些症状特异性不高,而且出现这些症状则预示着诊断延误且死亡率会大大增加<sup>[26]</sup>。当患者应用镇静剂

且机械通气时程延长, 患者同时并存其他腹部并发症时, 诊断难度亦显著增加。

缺血性肠炎分2种, 一种为灌注不足导致的非梗阻性肠系膜缺血, 这种较常见; 另一种为血管内血栓形成或栓塞导致的梗阻性肠系膜动脉疾病, 此种肠炎病情凶险, 恶化迅速。非梗阻性肠系膜缺血由于缺乏血管堵塞的表现而延误诊断, 常见于有低灌注症状或需应用升压药物的患者, 发病可能与低心排和广泛肠系膜血管收缩导致的肠组织缺氧或坏死有关<sup>[26,27]</sup>。肠系膜血管造影术和血管计算机断层扫描, 或紧急剖腹探查均可明确诊断, 其中血管造影为诊断金标准。非梗阻性肠系膜缺血的治疗包括增加心排量、最大限度的提高血流动力学以增加肠组织灌注、尽量避免肠血管痉挛和再灌注损伤、早期即应用广谱抗生素。梗阻性肠系膜动脉疾病早期诊断后, 可应用溶栓剂或血管内支架植入术予以治疗; 也可行开腹手术去除血栓、血管成形术, 开腹后可迅速探及病变肠段和血管, 应用荧光素和多普勒超声仪来评价肠灌注情况。

**3.5 胰腺炎** 心脏术后胰腺炎的发生率为0.13%左右, 临床表现为血流动力学不稳定, 腹部肌张力增高, 伴疼痛、恶心和呕吐。心脏手术后约30%-40%的患者血淀粉酶升高, 只有1%-3%会发展为有典型临床症状的胰腺炎。体外循环后胰腺损伤的危险因素有肾功能不全、瓣膜手术、转机时间过长、主动脉钳夹时间过长、血管活性药物的使用以及低心排量<sup>[28,29]</sup>。在体外循环期间血糖升高, 其原因是胰岛素分泌或利用障碍, 糖尿病或冠心病患者更为突出。由于有些患者没有典型的疼痛和淀粉酶升高表现, 所以诊断的关键是临床细致的观察。腹部B超检查是首选的影像学诊断方法, 可发现胰腺肿大和胰周液体积聚。腹部X线平片可见左侧膈肌抬高, 左侧胸腔积液等征象。腹部增强CT扫描或MRI为鉴别水肿性和出血坏死性胰腺炎提供依据。症状较轻者多保守治疗, 包括禁食、胃肠减压、补液防治休克、镇痛解痉、抑制胰腺分泌和早期抗感染治疗等。病情较重患者需及时施行坏死组织清除加引流术。

**3.6 急性胆囊炎** 心脏术后急性胆囊炎的发生率为0.11%, 发病机制包括内毒素血症、局部炎性介质的释放、内脏低灌注和胆汁黏滞度增加<sup>[30,31]</sup>。典型症状在心脏术后5-15 d出现, 而且症状不全是感染、发热、右上腹痛等经典症状, 而是出现急性炎症反应综合征或血流动力学不稳定的症

状, 早诊断是降低发病率和病死率的关键。有研究显示术前危险因素有外周血管疾病、全身氧运输量 $<430 \text{ mL/mm}^2$ , 转机时间过长; 术后危险因素包括心律失常、机械通气时程 $>3 \text{ d}$ 、菌血症和院内感染<sup>[30]</sup>。诊断方法包括白细胞计数、肝功能检查、超声检查、核素扫描等。治疗包括禁食水、静脉补液、抗感染和解痉止痛等。保守治疗无效或胆石症患者应行胆囊切除术, 危重症患者无法耐受手术时可行经皮胆囊造瘘, 病情稳定后再行胆囊切除术。

**3.7 肝衰竭** 据文献报道体外循环心脏术后高胆红素血症的发生率为25%, 死亡率为4.1%, 其中半数以上患者血胆红素在术后1 d达峰值, 33.5%在术后2 d达峰, 术后7 d达峰值的占10.3%, 且结合胆红素较游离胆红素升高更明显<sup>[32]</sup>。体外循环后发生肝功能衰竭的原因通常为低血压低氧血症、感染因素、全身性炎症反应、低温损害和药物/毒物作用。在低温体外循环下肝脏血流的自动调节被破坏, 在灌注流量降至 $2.2 \text{ L}/(\text{m}^2 \cdot \text{min})$ 以下时, 肝脏的耗氧量明显下降。全身炎性介质的释放可直接损害肝细胞, 中性粒细胞的活化可释放溶酶体酶而导致肝细胞破坏, 血栓素A2释放增加可加重肝组织的缺血性损害。导致术后肝细胞损伤和肝炎的最常见药物为氟烷, 虽然氟烷肝毒性作用发生率仅为0.1%。其他可能导致肝细胞坏死或胆汁瘀滞的药物有异烟肼、甲基多巴、苯妥英钠等。另外输血是导致患者感染的最重要原因, 而且库血中含有的枸橼酸盐也将加重肝脏的负担。肝细胞坏死的临床表现包括发热、黄疸、恶心呕吐及食欲减退, 凝血机制差, 严重的低血糖和肝性脑病, 腹水、术后转氨酶升高等<sup>[8]</sup>。诊断主要依靠临床症状体征、肝功能检查、超声检查, 腹部CT。治疗原则为增加肝脏灌注, 对症支持治疗, 停用肝毒性药物、治疗腹水等。

## 4 结论

心脏术后消化系统并发症的发生率较低, 但是一旦发生, 很难及早做出准确的诊断, 临床症状也没有显著特异性, 且病死率极高。因此, 细致的临床观察和高危因素的预测有助于及时的诊断和治疗, 对降低患者心脏术后的死亡率有重要意义。

## 5 参考文献

- 1 Berkowitz D, Wagner BM, Uricchio JF. Acute peptic

### ■同行评价

本文描述了体外循环心脏手术对消化系统并发症防治的进展, 有一定的临床参考价值。

- ulceration following cardiac surgery. *Ann Intern Med* 1957; 46: 1015-1023
- 2 Mangi AA, Christison-Lagay ER, Torchiana DF, Warshaw AL, Berger DL. Gastrointestinal complications in patients undergoing heart operation: an analysis of 8709 consecutive cardiac surgical patients. *Ann Surg* 2005; 241: 895-901; discussion 901-904
- 3 Andersson B, Nilsson J, Brandt J, Höglund P, Andersson R. Gastrointestinal complications after cardiac surgery. *Br J Surg* 2005; 92: 326-333
- 4 Vohra HA, Farid S, Bahrami T, Gaer JA. Predictors of survival after gastrointestinal complications in bypass grafting. *Asian Cardiovasc Thorac Ann* 2011; 19: 27-32
- 5 Raja SG, Haider Z, Ahmad M. Predictors of gastrointestinal complications after conventional and beating heart coronary surgery. *Surgeon* 2003; 1: 221-228
- 6 Ohri SK, Becket J, Brannan J, Keogh BE, Taylor KM. Effects of cardiopulmonary bypass on gut blood flow, oxygen utilization, and intramucosal pH. *Ann Thorac Surg* 1994; 57: 1193-1199
- 7 龙村. 体外循环学. 第1版. 北京: 人民军医出版社, 2004: 171-177
- 8 黑飞龙. 体外循环教程. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 204-213
- 9 Filsoofi F, Rahmanian PB, Castillo JG, Scurlock C, Legnani PE, Adams DH. Predictors and outcome of gastrointestinal complications in patients undergoing cardiac surgery. *Ann Surg* 2007; 246: 323-329
- 10 Movahedi N, Karimi A, Ahmadi H, Davoodi S, Marzban M, Abbasi K, Salehi Omran A, Shirzad M, Yazdanifard P. Laparotomy due to gastrointestinal complications after open heart surgery. *J Cardiovasc Surg (Torino)* 2011; 52: 111-116
- 11 Guler M, Yamak B, Erdogan M, Aydin U, Kul S, Asil R, Kisacikoglu B. Risk factors for gastrointestinal complications in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 2011; 25: 637-641
- 12 Velissaris T, Tang A, Murray M, El-Minshawy A, Hett D, Ohri S. A prospective randomized study to evaluate splanchnic hypoxia during beating-heart and conventional coronary revascularization. *Eur J Cardiothorac Surg* 2003; 23: 917-924; discussion 924
- 13 Rodriguez F, Nguyen TC, Galanko JA, Morton J. Gastrointestinal complications after coronary artery bypass grafting: a national study of morbidity and mortality predictors. *J Am Coll Surg* 2007; 205: 741-747
- 14 詹丽英, 夏中元, 夏芳, 刘先义. 参附注射液对体外循环期间胃肠灌注及氧合的影响. *中国现代医学杂志* 2005; 15: 2814-2816
- 15 刘瑞琳, 张嘉, 吴薇, 刘牧林. 大黄素对肠缺血/再灌注损害保护作用的实验研究. *中国中西医结合急救杂志* 2008; 15: 45-47
- 16 Cook DJ, Reeve BK, Guyatt GH, Heyland DK, Griffith LE, Buckingham L, Tryba M. Stress ulcer prophylaxis in critically ill patients. Resolving discordant meta-analyses. *JAMA* 1996; 275: 308-314
- 17 周嫣. 心脏直视手术围手术期胃电图检测及临床意义. *中华护理杂志* 2000; 35: 16-18
- 18 Halm U, Halm F, Thein D, Mohr FW, Mössner J. Helicobacter pylori infection: a risk factor for upper gastrointestinal bleeding after cardiac surgery? *Crit Care Med* 2000; 28: 110-113
- 19 董小超, 易定华, 刘金成, 崔勤, 魏旭峰. 体外循环心脏手术中奥美拉唑对胃肠道保护作用的临床观察. *中国急救医学* 2006; 26: 331-333
- 20 蔡明, 吴淑彩, 王颖. 奥美拉唑对心肺转流下心内直视术胃肠道保护的临床观察. *临床麻醉学杂志* 2007; 23: 928-929
- 21 Eisen GM, Dominitz JA, Faigel DO, Goldstein JL, Kalloo AN, Petersen BT, Raddawi HM, Ryan ME, Vargo JJ, Young HS, Fanelli RD, Hyman NH, Wheeler-Harbaugh J. An annotated algorithm for the evaluation of choledocholithiasis. *Gastrointest Endosc* 2001; 53: 864-866
- 22 Hoedema RE, Luchtefeld MA. The management of lower gastrointestinal hemorrhage. *Dis Colon Rectum* 2005; 48: 2010-2024
- 23 Green BT, Rockey DC. Acute gastrointestinal bleeding. *Semin Gastrointest Dis* 2003; 14: 44-65
- 24 Abboud B, Daher R, Boujaoude J. Acute mesenteric ischemia after cardio-pulmonary bypass surgery. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 5361-5370
- 25 Ghosh S, Roberts N, Firmin RK, Jameson J, Spyt TJ. Risk factors for intestinal ischaemia in cardiac surgical patients. *Eur J Cardiothorac Surg* 2002; 21: 411-416
- 26 Allen KB, Salam AA, Lumsden AB. Acute mesenteric ischemia after cardiopulmonary bypass. *J Vasc Surg* 1992; 16: 391-395; discussion 395-396
- 27 Moneta GL, Misbach GA, Ivey TD. Hypoperfusion as a possible factor in the development of gastrointestinal complications after cardiac surgery. *Am J Surg* 1985; 149: 648-650
- 28 Lefor AT, Vuocolo P, Parker FB, Sillin LF. Pancreatic complications following cardiopulmonary bypass. Factors influencing mortality. *Arch Surg* 1992; 127: 1225-1230; discussion 1231
- 29 Rattner DW, Gu ZY, Vlahakes GJ, Warshaw AL. Hyperamylasemia after cardiac surgery. Incidence, significance, and management. *Ann Surg* 1989; 209: 279-283
- 30 Rady MY, Kodavatiganti R, Ryan T. Perioperative predictors of acute cholecystitis after cardiovascular surgery. *Chest* 1998; 114: 76-84
- 31 Sakurai T, Ichimiya H, Miyazaki H, Nakayama F. Profiling of eicosanoids in inflamed gall bladder wall by gas chromatography with selected-ion monitoring. *J Chromatogr* 1991; 571: 1-18
- 32 An Y, Xiao YB, Zhong QJ. Hyperbilirubinemia after extracorporeal circulation surgery: a recent and prospective study. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 6722-6726

编辑 张姗姗 电编 鲁亚静

# miR-451对食管癌EC9706细胞增殖、凋亡及侵袭能力的影响

冷弘, 臧文巧, 王涛, 王媛媛, 马晶, 赵国强

冷弘, 洛阳职业技术学院免疫学与病原生物学教研室 河南省洛阳市 471000

臧文巧, 王媛媛, 马晶, 赵国强, 郑州大学基础医学院 河南省郑州市 450000

王涛, 河南中医学院第一附属医院血液肿瘤科 河南省郑州市 450000

冷弘, 高级讲师, 主要从事消化系统病原学方面的研究.

作者贡献分布: 此课题由赵国强设计; 冷弘、臧文巧、王涛、王媛媛及马晶操作完成; 数据分析由冷弘与臧文巧完成; 本文写作由冷弘与臧文巧完成.

通讯作者: 赵国强, 教授, 450001, 河南省郑州市, 郑州大学基础医学院微生物学与免疫学教研室. zhaogq@zzu.edu.cn  
电话: 0371-67781959

收稿日期: 2012-02-21 修回日期: 2012-03-13

接受日期: 2012-04-19 在线出版日期: 2012-05-28

## Overexpression of miR-451 inhibits cell proliferation and invasion and promotes apoptosis in human esophageal carcinoma cell line EC9706

Hong Leng, Wen-Qiao Zang, Tao Wang,  
Yuan-Yuan Wang, Jing Ma, Guo-Qiang Zhao

Hong Leng, Department of Immunology and Pathogen Biology, Luoyang Vocational & Technical College, Luoyang 471000, Henan Province, China

Wen-Qiao Zang, Yuan-Yuan Wang, Jing Ma, Guo-Qiang Zhao, Basic Medical College, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, Henan Province, China

Tao Wang, Department of Hemato-Oncology, the First Affiliated Hospital of Henan College of TCM, Zhengzhou 450000, Henan Province, China

Correspondence to: Guo-Qiang Zhao, Professor, Department of Microbiology and Immunology, Basic Medical College, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, Henan Province, China. zhaogq@zzu.edu.cn

Received: 2012-02-21 Revised: 2012-03-13

Accepted: 2012-04-19 Published online: 2012-05-28

## Abstract

**AIM:** To explore the effect of overexpression of miR-451 on cell proliferation, apoptosis and invasion in human esophageal carcinoma cell line EC9706.

**METHODS:** MiR-451 mimics were constructed and transfected into EC9706 cells using Lipofectamine™2000. EC9706 cells transfected with Scramble-miR, empty liposomes or negative

miR-451 were used as controls. Forty-eight hours after transfection, the expression of miR-451 was detected by RT-PCR, and the expression of Bcl-2, AKT and phosphorylated AKT proteins were detected by Western blot. Cell apoptosis, invasion and proliferation were assessed by flow cytometry, transwell assay and MTT assay, respectively.

**RESULTS:** Compared to control cells, the expression of miR-451 was significantly up-regulated ( $P < 0.01$ ,  $F = 69.26$ ); the expression of Bcl-2, AKT and phosphorylated AKT proteins was significantly down-regulated ( $P < 0.05$ ,  $F = 5.83$ ); cell apoptosis rate significantly increased ( $P < 0.01$ ,  $F = 26.72$ ); the average number of cells penetrating Matrigel membrane significantly decreased ( $P < 0.01$ ,  $F = 34.55$ ); and cell proliferation was significantly suppressed in a time-dependent manner ( $P < 0.05$ ,  $F = 5.95$ ) in EC9706 cells transfected with miR-451 mimics.

**CONCLUSION:** Over-expression of miR-451 induces apoptosis and suppresses cell proliferation and invasion in human esophageal carcinoma cell line EC9706.

**Key Words:** Esophageal cancer cells; MiR-451; Proliferation; Apoptosis; Invasion

Leng H, Zang WQ, Wang T, Wang YY, Ma J, Zhao GQ. Overexpression of miR-451 inhibits cell proliferation and invasion and promotes apoptosis in human esophageal carcinoma cell line EC9706. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(15): 1323-1327

## 摘要

**目的:** 探讨miR-451对食管癌EC9706细胞增殖、凋亡及侵袭能力的影响.

**方法:** 化学合成miR-451 mimics, 脂质体包裹转染EC9706细胞为miR-451组, 同时设立无关序列(Scramble-miR)对照组、脂质体对照组和空白对照组. 转染后48 h, 荧光定量RT-PCR检测miR-451表达量的变化, Western blot检测

## ■背景资料

miRNA对细胞的增殖、分化和凋亡有重要的调节作用, 他们在正常组织和肿瘤组织中的表达显著不同. 近期的研究发现, 一些miRNA在肿瘤细胞中表达明显减少, 提示着这些分子可能作为抑癌分子.

## ■同行评议者

刘云鹏, 教授, 中国医科大学附属第一医院肿瘤内科



## ■研究前沿

近期有研究显示, miR-451在食管癌中表达下调, 但miR-451在食管癌中的具体作用仍然不明确。

Bcl-2、AKT和磷酸化AKT蛋白表达水平, 流式细胞仪检测细胞凋亡情况, Transwell侵袭实验检测细胞侵袭能力的改变; MTT法检测转染后1、2、3、4、5、6 d各组细胞增殖率。

**结果:** miR-451组的miR-451表达水平显著上调( $P < 0.01$ ,  $F = 69.26$ ), 为空白对照组的15.84倍; miR-451组细胞Bcl-2、AKT和磷酸化AKT蛋白表达均显著下调( $P < 0.05$ ,  $F = 5.83$ ); miR-451组细胞凋亡率为 $12.07\% \pm 1.12\%$ , 与3个对照组比较显著升高( $P < 0.01$ ,  $F = 26.72$ ); miR-451组平均侵袭细胞数为 $47.4 \pm 7.4$ , 与3个对照组比较显著降低( $P < 0.01$ ,  $F = 34.55$ )。miR-451组细胞的生长在转染后2 d出现显著抑制( $P < 0.05$ ,  $F = 5.95$ ), 并且随着时间的延长而日益显著。

**结论:** 上调miR-451表达可抑制食管癌EC9706细胞增殖和侵袭, 促进细胞凋亡。

**关键词:** 食管癌细胞系; miR-451; 增殖; 凋亡; 侵袭

冷弘, 臧文巧, 王涛, 王媛媛, 马晶, 赵国强. miR-451对食管癌EC9706细胞增殖、凋亡及侵袭能力的影响. 世界华人消化杂志 2012; 20(15): 1323-1327

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1323.asp>

## 0 引言

肿瘤是目前对人类生命和健康危害最严重的疾病之一, 但其发生发展的确切机制仍未完全阐明。非蛋白质编码微小RNA(microRNA, miRNA)的发现为肿瘤研究提供了新的思路。miRNA是真核细胞内源性非编码的单链小分子, 由约22个核苷酸组成、参与转录后基因调控, 可特异性识别靶mRNA的3'UTR并与之结合, 引起靶mRNA的降解或翻译抑制, 从而对基因进行转录后表达调控, 参与调节细胞活动, 具有重要的生理及病理意义<sup>[1,2]</sup>。近期有研究显示, miR-451在食管癌中表达下调<sup>[3]</sup>, 但miR-451在食管癌中的具体作用仍然不明确。为此, 本研究利用合成的miR-451转染食管癌EC9706细胞, 探讨和分析miR-451对食管癌细胞增殖、凋亡、侵袭能力的影响。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 人食管癌细胞株EC9706由郑州大学基础医学院保存; RPMI 1640培养基、胎牛血清购自Gibco BRL公司; Lipofectamine<sup>TM</sup>2000、TRIzol购自Invitrogen公司; MIT购自Sigma公

司; Annexi V细胞凋亡检测试剂盒购自Abcam公司; Matrigel购自BD公司; Transwell板购自Corning公司; miR-451 qPCR Quantitation Kit购自上海吉玛制药技术有限公司; miR-451 mimics(5'-AAACCGUUACCAUACUGAGUU-3', 3'-CUCAGUAAUGGUAACGGUUUUU-5'), miRNA无关序列对照(5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3', 3'-TTAAGAGGCUUGCACAGUGCA-5'), 购自上海生工生物有限公司; Akt1、p27和GAPDH抗体购自Santa Cruz公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 实验分组和miR-451转染:** 将食管癌EC9706细胞用含100 mL/L胎牛血清的RPMI 1640培养基, 37 °C、50 mL/L CO<sub>2</sub>、饱和湿度条件培养。选用对数生长期细胞按照实验分组分别进行脂质体转染。(1)miR-451组, 加入miR-451 mimics 100 nmol/L和脂质体;(2)miRNA无关序列对照组, 加入miR scramble 100 nmol/L和脂质体;(3)脂质体对照组, 仅加入脂质体;(4)空白对照组, 无任何转染。转染后培养6 h, 换含100 mL/L胎牛血清的RPMI 1640完全培养基, 37 °C、50 mL/L CO<sub>2</sub>、饱和湿度条件培养48 h, 收集细胞进行各项检测。

**1.2.2 荧光定量RT-PCR检测:** 采用TRIzol试剂提取各组细胞总RNA, 使用miR-451 qPCR Quantitation Kit进行逆转录和PCR扩增, 该试剂盒内有茎环结构样的miR-451特异逆转录引物, 他能与miRNA的3'端结合并使逆转录, 避免miRNA前体的干扰, 反转录反应体系为: 5×RT buffer 4 μL, 4×dNTP 1 μL, miR-RT primer 1 μL, M-MLV 0.5 μL, 总RNA 1 μL, RNaseFree H<sub>2</sub>O补足20 μL。逆转录反应程序: 37 °C 60 min, 85 °C 10 min。PCR扩增体系为: 2×Real-time PCR buffer 20 μL, miR specific primer set 1 μL, miRNA逆转录产物1 μL, Taq酶0.2 μL, ddH<sub>2</sub>O补足40 μL。定量PCR反应程序: 95 °C 3 min预变性; 95 °C 15 s, 65 °C 45 s, 40个循环。所有反应均设3个复孔, 以U6作为内参, 记录Ct值, 各组间miR-451相对定量的倍数(relative fold, RF)用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 值表示。

**1.2.3 MTT检测细胞增殖:** 胰酶消化对数生长期的EC9706细胞, 按 $10^4$ 个细胞/孔接种于96孔培养板(200 μL/孔), 接种12 h后, 常规转染; 分别于接种后1、2、3、4、5、6 d, 每孔中加入MTT溶液20 μL(5 g/L), 37 °C条件下再培养4 h, 弃上清, 每孔加DMSO 200 μL, 振荡20 min; 570 nm波长下, 用紫外分光光度计测定各孔吸光度(A)值, 每组

表 1 各实验组miR-451表达相对值比较 (mean  $\pm$  SD)

分组	Ct miR-451	Ct U6	$\Delta$ Ct	$\Delta\Delta$ Ct	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
miR-451组	22.29 $\pm$ 0.69	13.01 $\pm$ 0.47	9.28 $\pm$ 0.24	-3.97 $\pm$ 0.29	15.84 $\pm$ 3.07 <sup>b</sup>
miRNA无关序列对照组	24.50 $\pm$ 0.39	11.43 $\pm$ 0.30	13.07 $\pm$ 0.14	-0.17 $\pm$ 0.08	1.13 $\pm$ 0.06
脂质体对照组	24.61 $\pm$ 0.40	11.51 $\pm$ 0.44	13.09 $\pm$ 0.12	-0.15 $\pm$ 0.05	1.11 $\pm$ 0.04
空白对照组	24.67 $\pm$ 0.31	11.42 $\pm$ 0.30	13.24 $\pm$ 0.07	0	1

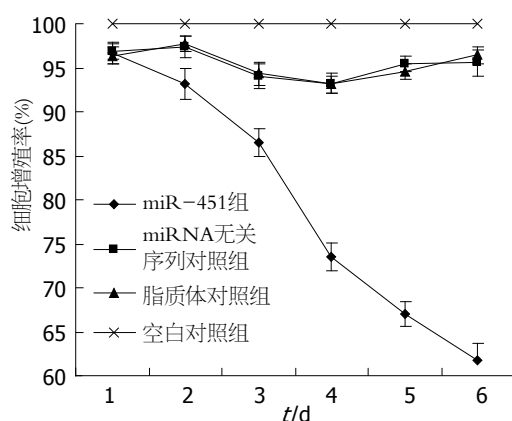
<sup>b</sup> $P < 0.05$  vs 空白组、脂质体对照组。

图 1 各组细胞增殖率。

设6个复孔; 计算各组细胞增殖率(细胞增殖率 = 转染细胞A值/空白对照细胞A值  $\times$  100%)

1.2.4 细胞凋亡检测: 将转染后48 h的各组细胞用胰酶充分消化成单细胞悬液, 4  $^{\circ}$ C 1 000 r/min离心5 min, 弃上清, PBS洗涤, 调整细胞密度为  $1 \times 10^6$ /mL。按照Annexin V/PI试剂盒说明书进行染色, 使用流式细胞仪检测细胞凋亡情况, 每组细胞重复检测3次。

1.2.5 Transwell实验: 按照Corning公司Transwell小室说明书操作, 制备细胞悬液, 加于Transwell小室(每孔200  $\mu$ L培养液,  $1 \times 10^5$ 细胞)。24孔板下室加入500  $\mu$ L含FBS或趋化因子的培养基。常规培养48 h, 结晶紫染色, 显微镜观察和拍照, 随机选5个视野, 计数取平均值。

1.2.6 Western blot检测蛋白表达: 收集各组细胞, 制备细胞总蛋白, SDS-PAGE凝胶电泳。电转移的方法将蛋白质转移到硝酸纤维素膜上, 以AKT蛋白抗体为一抗, 辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠IgG抗体为二抗检测AKT蛋白、磷酸化AKT、Bcl-2蛋白的表达, 以GAPDH为内参照。

**统计学处理** 实验数据使用SPSS17.0统计软件包, 多项指标间采用因素方差分析, 两指标间进一步比较采用LSD- $t$ 检验; 按照 $P < 0.05$ 作为检验水准。

## 2 结果

2.1 实时定量荧光PCR 各实验组实时定量荧光PCR检测数值见表1, 其中miR-451组的miR-451表达水平显著上调( $P < 0.01$ ), 为空白对照组的15.84倍; 而miRNA无关序列对照组和脂质体对照组的miR-451表达水平无显著改变( $P > 0.05$ )。

2.2 细胞增殖检测 与空白对照组比较, 转染后1、2、3、4、5、6 d, 脂质体对照组和miRNA无关序列对照组细胞的生长未受到显著抑制( $P > 0.05$ ), 而miR-451组细胞的生长在转染后2 d后出现显著抑制( $P < 0.05$ ), 并且随着时间的延长而日益显著(图1)。

2.3 凋亡检测 Annexin V/PI染色方法检测空白对照组、脂质体对照组和miRNA无关序列对照组细胞的凋亡率分别为4.81%  $\pm$  1.20%、4.33%  $\pm$  2.89%、4.60%  $\pm$  2.63%; miR-451组细胞凋亡率为12.07%  $\pm$  1.12%, 与空白对照组、脂质体对照组和miRNA无关序列对照组细胞的凋亡率比较显著升高, 差异均有显著性( $P < 0.05$ )。

2.4 Transwell实验 空白对照组、脂质体对照组和miRNA无关序列对照组视野平均侵袭细胞数分别为106.2  $\pm$  15.7、105.6  $\pm$  13.7和108.8  $\pm$  10.1; miR-451组视野平均侵袭细胞数为47.4  $\pm$  7.4, 与3个对照组比较显著降低, 差异有显著性( $P < 0.01$ )。

2.5 Western blot检测 空白对照组、脂质体对照组和miRNA无关序列对照组细胞Bcl-2、AKT和磷酸化AKT蛋白表达一致, 差异无显著性( $P < 0.05$ ); 而miR-451组与3个对照组比较均显著下调, 差异有显著性( $P < 0.05$ , 图2)。

## 3 讨论

miR-451是Altuvia等<sup>[4]</sup>在2005年利用生物信息学方法发现和命名, miR-451位于染色体17q11.2, 与miR-144相邻。目前认为miR-451的主要功能是参与造血系统分化、胚胎成熟、上皮细胞极性的形成和神经系统发育。新近研究发现,

## ■ 相关报道

新近研究发现, miR-451与多种肿瘤密切相关, 不仅在肿瘤组织中表达异常, 而且还显示其参与某些肿瘤的生物学行为和耐药基因的调控。

## ■创新盘点

本研究利用合成的miR-451转染入食管癌EC9706细胞,发现上调miR-451表达可抑制食管癌EC9706细胞增殖和侵袭、促进细胞凋亡。

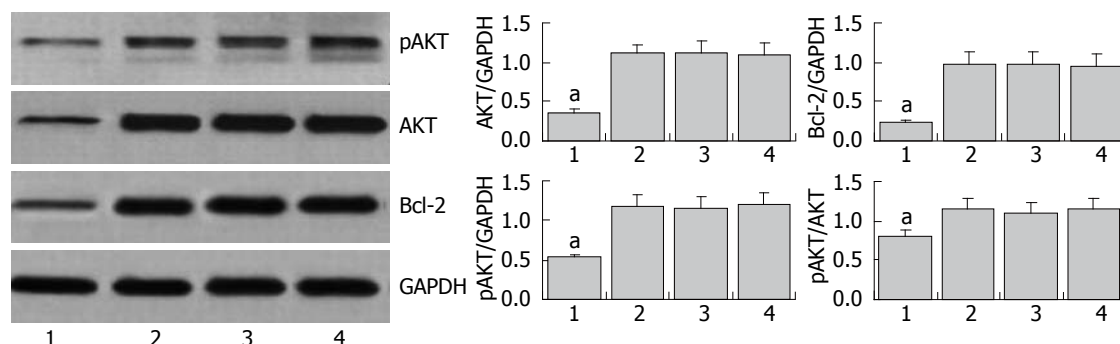


图2 Western blot检测Bcl-2、AKT和pAKT蛋白表达。1: miR-451组; 2: miRNA无关序列对照组; 3: 脂质体对照组; 4: 空白对照组。\* $P < 0.05$  vs miR-451组。

miR-451与多种肿瘤密切相关,不仅在肿瘤组织中表达异常,而且还显示其参与某些肿瘤的生物行为学和药耐基因的调控。

2009年, Bandres等<sup>[5]</sup>采用实时定量PCR方法检测21例胃癌组织中miRNAs表达,并分析其与临床病理的关系,结果显示胃癌和结肠癌上皮细胞的miR-451表达降低;分析发现miR-451与预后不良相关;胃癌细胞AGS和结肠癌上皮细胞DLD1转染miR-451能降低细胞增殖及增加放射敏感性。Hui等<sup>[6]</sup>采用实时定量PCR方法对51例头部和颈部鳞状细胞癌标本和3个头颈部鳞状细胞株进行miRNA表达谱检测,并分析临床病理相关性,发现miR-451是唯一显著高表达的miRNA,复发患者比未复发患者高4.7倍。Wang等<sup>[7]</sup>用miRNA芯片检测非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)组织miRNAs表达谱,发现miR-451下调最显著,在NSCLC中miR-451表达与肿瘤分化、病理分期及淋巴结转移相关;高表达miR-451可显著抑制NSCLC体外增殖、集落形成和裸鼠移植瘤生长。Heinzelmann等<sup>[8]</sup>研究证实肾透明细胞癌中miR-451表达显著降低。刘辉等<sup>[3]</sup>采用Agilent<sup>TM</sup>高通量的microRNA微阵列芯片对食管癌组织及其癌旁组织的miRNA表达的差异进行分析,结果显示包括miR-451在内的8个miRNA表达显著下调。Zhu等<sup>[9]</sup>研究显示,在多药耐药卵巢癌细胞系A2780DX5中miR-27a和miR-451表达上调。用miR-27a和miR-451的抑制剂antagomirs处理A2780DX5细胞后,可有效增加细胞对毒药物的敏感性。Bian等<sup>[10]</sup>研究发现NSCLC中miR-451过表达能显著抑制A549细胞的增殖并诱导凋亡,此外,miR-451能增加A549细胞对顺铂化疗的敏感性,提出顺铂联合miR-451可能是NSCLC治疗的潜在策略。

目前发表的文献资料显示,miR-451在胃癌、非小细胞肺癌、结肠癌、胶质瘤、肾透明

细胞癌、食管癌中表达下调,而在头部和颈部鳞状细胞癌、多药耐药卵巢癌中表达上调。由于1个miRNA可以调控多个基因,不同的miRNA分子也可以协同调控同1个基因;在机体内,miRNA与其靶标基因之间实际上是一个复杂的调控网络,控制细胞及个体的重要生命活动。因此,在不同类型肿瘤中miR-451的表达水平和作用也可能是不同的。本实验结果显示上调食管癌EC9706细胞中miR-451表达,可有效抑制食管癌EC9706细胞的增殖和侵袭能力,并且促进细胞的凋亡。该结果与Tian等<sup>[11]</sup>在恶性胶质瘤细胞系和吴春蓉等<sup>[12]</sup>在肠癌细胞系的实验结果一致。

PI3K/AKT是与细胞增殖和细胞凋亡关系最密切的信号传导通路之一<sup>[13,14]</sup>。生理状态下,AKT以低活性或失活状态存在于细胞浆;当暴露于各刺激因素时,AKT在PI3K调节作用下发生磷酸化而激活,激活的AKT与相应部位的底物蛋白作用,使底物蛋白磷酸化,导致细胞存活/增殖,并保护细胞逃避凋亡<sup>[15-18]</sup>。本实验Western blot证实上调miR-451表达的食管癌EC9706细胞中,Bcl-2、AKT和磷酸化AKT蛋白表达均降低,并且磷酸化AKT蛋白在总AKT蛋白中所占的比例亦降低。提示上调miR-451表达可抑制食管癌EC9706细胞增殖和侵袭、促进细胞凋亡,该作用可能是通过PI3K/Akt信号传导通路实现的,有待进一步研究证明。

#### 4 参考文献

- 1 Esteller M. Non-coding RNAs in human disease. *Nat Rev Genet* 2011; 12: 861-874
- 2 Tie J, Fan D. Big roles of microRNAs in tumorigenesis and tumor development. *Histol Histopathol* 2011; 26: 1353-1361
- 3 刘辉, 刘冉, 苏耀耀, 杨森, 浦跃朴, 尹立红, 王仪, 潘恩春, 郭伟, 尤振兵. 淮安食管鳞癌与癌旁组织中差异表达microRNAs的初步分析. *癌变畸变突变* 2011; 22: 418-422
- 4 Altuvia Y, Landgraf P, Lithwick G, Elefant N, Pfef-

- fer S, Aravin A, Brownstein MJ, Tuschl T, Margalit H. Clustering and conservation patterns of human microRNAs. *Nucleic Acids Res* 2005; 33: 2697-2706
- 5 Bandres E, Bitarte N, Arias F, Agorreta J, Fortes P, Agirre X, Zarate R, Diaz-Gonzalez JA, Ramirez N, Sola JJ, Jimenez P, Rodriguez J, Garcia-Foncillas J. microRNA-451 regulates macrophage migration inhibitory factor production and proliferation of gastrointestinal cancer cells. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 2281-2290
- 6 Hui AB, Lenarduzzi M, Krushel T, Waldron L, Pintilie M, Shi W, Perez-Ordóñez B, Jurisica I, O'Sullivan B, Waldron J, Gullane P, Cummings B, Liu FF. Comprehensive MicroRNA profiling for head and neck squamous cell carcinomas. *Clin Cancer Res* 2010; 16: 1129-1139
- 7 Wang R, Wang ZX, Yang JS, Pan X, De W, Chen LB. MicroRNA-451 functions as a tumor suppressor in human non-small cell lung cancer by targeting ras-related protein 14 (RAB14). *Oncogene* 2011; 30: 2644-2658
- 8 Heinzelmann J, Henning B, Sanjmyatav J, Posorski N, Steiner T, Wunderlich H, Gajda MR, Junker K. Specific miRNA signatures are associated with metastasis and poor prognosis in clear cell renal cell carcinoma. *World J Urol* 2011; 29: 367-373
- 9 Zhu H, Wu H, Liu X, Evans BR, Medina DJ, Liu CG, Yang JM. Role of MicroRNA miR-27a and miR-451 in the regulation of MDR1/P-glycoprotein expression in human cancer cells. *Biochem Pharmacol* 2008; 76: 582-588
- 10 Bian HB, Pan X, Yang JS, Wang ZX, De W. Upregulation of microRNA-451 increases cisplatin sensitivity of non-small cell lung cancer cell line (A549). *J Exp Clin Cancer Res* 2011; 30: 20
- 11 Tian Y, Nan Y, Han L, Zhang A, Wang G, Jia Z, Hao J, Pu P, Zhong Y, Kang C. MicroRNA miR-451 down-regulates the PI3K/AKT pathway through CAB39 in human glioma. *Int J Oncol* 2012; 40: 1105-1112
- 12 吴春蓉, 罗治彬, 陈伟. miR-451对结肠癌细胞系SW620生物学行为的影响. *解放军医学杂志* 2011; 36: 478-482
- 13 Zhang G, He B, Weber GF. Growth factor signaling induces metastasis genes in transformed cells: molecular connection between Akt kinase and osteopontin in breast cancer. *Mol Cell Biol* 2003; 23: 6507-6519
- 14 Skurk C, Maatz H, Rocnik E, Bialik A, Force T, Walsh K. Glycogen-Synthase Kinase3beta/beta-catenin axis promotes angiogenesis through activation of vascular endothelial growth factor signaling in endothelial cells. *Circ Res* 2005; 96: 308-318
- 15 Tokunaga E, Oki E, Egashira A, Sadanaga N, Morita M, Kakeji Y, Maehara Y. Deregulation of the Akt pathway in human cancer. *Curr Cancer Drug Targets* 2008; 8: 27-36
- 16 Duronio V. The life of a cell: apoptosis regulation by the PI3K/PKB pathway. *Biochem J* 2008; 415: 333-344
- 17 Ni L, Feng Y, Wan H, Ma Q, Fan L, Qian Y, Li Q, Xiang Y, Gao B. Angiotensin-(1-7) inhibits the migration and invasion of A549 human lung adenocarcinoma cells through inactivation of the PI3K/Akt and MAPK signaling pathways. *Oncol Rep* 2012; 27: 783-790
- 18 Engelman JA. Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nat Rev Cancer* 2009; 9: 550-562

**同行评价**

本文选题有一定的创新性, 为食管癌以及其他肿瘤的临床诊治提供了一定的参考。

编辑 张姗姗 电编 闫晋利

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2012年版权归世界华人消化杂志

**• 消息 •****《世界华人消化杂志》2011年开始不再收取审稿费**

**本刊讯** 为了方便作者来稿, 保证稿件尽快公平、公正的处理, 《世界华人消化杂志》编辑部研究决定, 从2011年开始对所有来稿不再收取审稿费。审稿周期及发表周期不变。(编辑部主任: 李军亮 2011-01-01)

# 氢盐水对大鼠酒精性肝损伤的保护作用

齐慧慧, 宋佳, 陈岳祥

## ■背景资料

酒精性肝病发病日益引起了人们的重视,但其发病机制尚不清楚。实验研究表明抑制自由基的产生或清除过多的自由基可减轻肝损伤。氢可有效清除自由基,而氢盐水(HS)对酒精性肝损伤是否有保护作用尚未报道。

齐慧慧, 宋佳, 陈岳祥, 中国人民解放军第二军医大学附属长征医院消化内科 上海市 200003

齐慧慧,在读硕士,主要从事消化系统疾病的研究。

作者贡献分布: 齐慧慧与宋佳对此文所作贡献均等;此课题由齐慧慧与陈岳祥设计;研究过程由齐慧慧与宋佳操作完成;研究所用新试剂及分析工具由陈岳祥提供;数据分析由齐慧慧完成;本论文写作由齐慧慧完成。

通讯作者: 陈岳祥,教授,主任医师,200003,上海市,中国人民解放军第二军医大学附属长征医院消化内科。chenyuex@sohu.com 电话: 021-81885343

收稿日期: 2012-02-20 修回日期: 2012-03-23

接受日期: 2012-04-19 在线出版日期: 2012-05-28

## Protective effect of hydrogen-rich saline on alcohol-induced liver injury in rats

Hui-Hui Qi, Jia Song, Yue-Xiang Chen

Hui-Hui Qi, Jia Song, Yue-Xiang Chen, Department of Gastroenterology, Affiliated Changzheng Hospital, the Second Military Medical University of Chinese PLA, Shanghai 200003, China

Correspondence to: Yue-Xiang Chen, Professor, Department of Gastroenterology, Affiliated Changzheng Hospital, the Second Military Medical University of Chinese PLA, Shanghai 200003, China. chenyuex@sohu.com

Received: 2012-02-20 Revised: 2012-03-23

Accepted: 2012-04-19 Published online: 2012-05-28

## Abstract

**AIM:** To investigate whether hydrogen-rich saline has a protective effect on alcohol-induced liver injury in rats.

**METHODS:** Male Sprague-Dawley rats ( $n = 40$ ) were divided randomly into four groups: control group, model group, low-dose (5 mL/kg, i.p.) and high-dose (10 mL/kg, i.p.) hydrogen-rich saline treatment groups. Rats received intra-gastric administration of ethanol or isocaloric/isovolumetric maltose-dextrin solution. After 12 wk, these rats were sacrificed to take serum samples for biochemical measurements and liver samples for HE staining.

**RESULTS:** At week 12, serum levels of ALT, AST, TG, TBIL ( $65.82 \pm 16.14$  vs  $36.43 \pm 4.92$ ,  $180.45 \pm 35.51$  vs  $110.53 \pm 18.43$ ,  $0.92 \pm 0.13$  vs  $0.35 \pm 0.07$ ,  $1.92 \pm 0.34$  vs  $0.74 \pm 0.12$ , all  $P < 0.01$ ) and MDA content ( $8.04 \pm 1.12$  vs  $3.25 \pm 0.83$ ,  $P < 0.01$ )

significantly increased, and liver GSH content and SOD activity significantly decreased ( $78.56 \pm 16.45$  vs  $135.43 \pm 19.81$ ,  $93.14 \pm 21.05$  vs  $181.53 \pm 30.13$ , both  $P < 0.01$ ) in the model group compared to the control group. In low and high-dose hydrogen-rich saline treatment groups, serum levels of ALT, AST, TG, TBIL decreased significantly ( $43.26 \pm 8.81$ ,  $41.15 \pm 8.89$  vs  $65.82 \pm 16.14$ ;  $130.42 \pm 11.64$ ,  $125.81 \pm 10.84$  vs  $180.45 \pm 35.51$ ;  $0.44 \pm 0.09$ ,  $0.38 \pm 0.08$  vs  $0.92 \pm 0.13$ ;  $1.03 \pm 0.21$ ,  $0.89 \pm 0.15$  vs  $1.92 \pm 0.34$ ; all  $P < 0.01$ ), and SOD and GSH activity ( $162.51 \pm 28.56$ ,  $164.24 \pm 30.07$  vs  $93.14 \pm 21.05$ ;  $105.42 \pm 17.32$ ,  $110.67 \pm 20.51$  vs  $78.56 \pm 16.45$ ;  $P < 0.01$ ) and MDA content ( $4.56 \pm 0.98$ ,  $4.21 \pm 1.05$  vs  $8.04 \pm 1.12$ ; both  $P < 0.01$ ) increased significantly compared to the model group. Moderate to severe liver cell degeneration, presence of large and small lipid droplets in the cytoplasm, swelling of the sinus endothelial cells, and portal area inflammatory cell infiltration were seen in the model group. In the two treatment groups, steatosis and inflammatory cell infiltration lessened.

**CONCLUSION:** Hydrogen-rich saline can resist oxidative stress and lipid peroxidation, improve liver function, and thereby reduce alcohol-induced chronic liver injury.

**Key Words:** Hydrogen-rich saline; Alcohol-induced liver injury; Alcohol; Oxidative stress; Lipid peroxidation

Qi HH, Song J, Chen YX. Protective effect of hydrogen-rich saline on alcohol-induced liver injury in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(15): 1328-1332

## 摘要

**目的:** 研究肝脏病理形态学、肝功能、氧化应激因子的变化,探讨氢盐水(hydrogen-rich saline, HS)对大鼠酒精性肝损伤的保护作用。

**方法:** 将40只SD大鼠随机分为空白对照组、模型组、低剂量HS治疗组、高剂量HS治疗组;采用梯度酒精灌胃方法建立大鼠慢性酒精性肝损伤模型,模型组及治疗组给予酒精灌胃12 wk,低剂量HS治疗组和高剂量HS治疗组同时分别给予HS 5 g/kg、10 g/kg体质量,腹

## ■同行评议者

迟宝荣,教授,吉林大学第一医院消化内科



腔注射; 空白对照组给予等热量、等体积的糖水灌胃. 12 wk后检测大鼠血清谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)、谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)、总胆红素(total bilirubin, TBIL)、甘油三酯(triglyceride, TG)、肝组织匀浆丙二醛(malonyldialdehyde, MDA)、还原型谷胱甘肽(reduced glutathione hormone, GSH)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)的含量, 肝组织HE染色观察肝组织形态学变化.

**结果:** 灌酒12 wk后模型组大鼠血清ALT、AST、TG、TBIL水平均明显上升( $65.82 \pm 16.14$  vs  $36.43 \pm 4.92$ ,  $180.45 \pm 35.51$  vs  $110.53 \pm 18.43$ ,  $0.92 \pm 0.13$  vs  $0.35 \pm 0.07$ ,  $1.92 \pm 0.34$  vs  $0.74 \pm 0.12$ ,  $P < 0.01$ ); 肝脏GSH含量、SOD活性下降( $78.56 \pm 16.45$  vs  $135.43 \pm 19.81$ ,  $93.14 \pm 21.05$  vs  $181.53 \pm 30.13$ ,  $P < 0.01$ ), 而MDA含量增加显著( $8.04 \pm 1.12$  vs  $3.25 \pm 0.83$ ,  $P < 0.01$ ); HS低剂量组和高剂量组大鼠血清ALT、AST、TG、TBIL下降显著( $43.26 \pm 8.81$ ,  $41.15 \pm 8.89$  vs  $65.82 \pm 16.14$ ;  $130.42 \pm 11.64$ ,  $125.81 \pm 10.84$  vs  $180.45 \pm 35.51$ ;  $0.44 \pm 0.09$ ,  $0.38 \pm 0.08$  vs  $0.92 \pm 0.13$ ;  $1.03 \pm 0.21$ ,  $0.89 \pm 0.15$  vs  $1.92 \pm 0.34$ ;  $P < 0.01$ ); SOD、GSH活性明显增加( $162.51 \pm 28.56$ ,  $164.24 \pm 30.07$  vs  $93.14 \pm 21.05$ ;  $105.42 \pm 17.32$ ,  $110.67 \pm 20.51$  vs  $78.56 \pm 16.45$ ;  $P < 0.01$ ), MDA含量明显上升( $4.56 \pm 0.98$ ,  $4.21 \pm 1.05$  vs  $8.04 \pm 1.12$ ;  $P < 0.01$ ). HE染色结果显示, 模型组大鼠肝组织可见中重度肝细胞变性, 胞质内见大小不一的脂滴空泡, 窦内皮细胞肿胀, 汇管区炎细胞浸润; HS低、高剂量组肝组织脂肪变性、炎细胞浸润程度减轻.

**结论:** HS可有效地抗氧化应激和脂质过氧化, 改善肝功能, 减轻酒精诱导的大鼠慢性肝损伤.

**关键词:** 氢盐水; 酒精性肝病; 乙醇; 氧化应激; 脂质过氧化

齐慧慧, 宋佳, 陈岳祥. 氢盐水对大鼠酒精性肝损伤的保护作用. 世界华人消化杂志 2012; 20(15): 1328-1332  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1328.asp>

## 0 引言

在西方国家, 酒精性肝病(alcoholic liver disease, ALD)及其并发症是导致死亡的重要病因之一<sup>[1]</sup>. 在欧美国家的嗜酒人群中, ALD的患病率高达84%, 其中20%-30%可进展为肝硬化<sup>[2]</sup>. 但关于ALD的发病机制尚不十分清楚, 目前认为氧化

应激、脂质过氧化在ALD早期发挥重要作用. 研究表明氢分子可选择性清除羟自由基和亚硝酸阴离子, 有较强的抗氧化作用. 但氢盐水(hydrogen-rich saline, HS)对慢性酒精性肝损伤是否有保护作用尚不清楚. 本文旨在通过建立大鼠慢性酒精性肝损伤模型, 并给予HS干预, 探讨HS的保护作用及相关机制.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 40只SPF级♂SD大鼠, 体质量220-250 g, 购自上海斯莱克实验动物有限公司. 实验动物饲养于中国人民解放军第二军医大学清洁级动物房, 12 h光照和黑夜循环, 标准饲料, 自由饮水, 温度 $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , 湿度50%-60%. HS由上海中国人民解放军第二军医大学潜水教研室制备; 大鼠SOD、MDA、GSH试剂盒购自南京建成公司; HE染色相关试剂购自美国Sigma公司.

### 1.2 方法

**1.2.1 分组及处置:** 40只SD大鼠适应性喂养1 wk后, 随机分为空白对照组、模型组、低剂量HS治疗组、高剂量HS治疗组; 采用梯度酒精灌胃方法建立大鼠慢性酒精性肝损伤模型. 模型组和治疗组给予500 mL/L的乙醇8 mL/(kg·d) 2 wk, 10 mL/(kg·d) 2 wk, 12 mL/(kg·d) 8 wk, 低剂量HS治疗组和高剂量HS治疗组同时分别给予HS 5 g/kg、10 g/kg体质量, 腹腔注射; 空白对照组给予等热量、等体积的糖水灌胃, 普通饲料、自由饮水. 12 wk后, 禁食12 h, 称重后麻醉, 留取血液标本, 肝脏称重后部分液氮冻存, 部分4%多聚甲醛固定, 进行生化、病理形态学等测定.

**1.2.2 生化指标检测:** 取血后静置30 min, 离心3 000 r/min×10 min, 常规分离血清, 运用自动生化分析仪检测血清谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)、谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)、总胆红素(total bilirubin, TBIL)、甘油三酯(triglyceride, TG). 取一定量的肝组织, 加10倍重量预冷现配的生理盐水, 在电动匀浆机内匀浆, 制成10%肝匀浆, 所有操作均在冰浴中进行. 3 000 r/min离心10-15 min, 取上清液-20℃待检, 肝匀浆每次操作前新鲜配置. 严格按照按试剂盒说明用TBA法检测肝组织匀浆中肝脏丙二醛(malonyldialdehyde, MDA)、还原型谷胱甘肽(reduced glutathione hormone, GSH)的含量; 用黄嘌呤氧化酶法检测肝组织匀浆中超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)含量.

**■ 研发前沿**  
研究表明呼吸2%的氢可治疗动物心肌及肝脏缺血再灌注损伤、小肠移植引起的炎症损伤和新生儿脑缺血缺氧损伤.

## ■相关报道

研究证实注射HS对脑、肠缺血再灌注损伤动物模型、结扎胆管造成的急性肝损伤及Galn/LPS、CCl<sub>4</sub>、DEN急性肝损伤小鼠模型中和CCl<sub>4</sub>导致的肝纤维化都有很好的保护作用。

表 1 各组大鼠血清肝功能变化 ( $n = 10$ , mean  $\pm$  SD)

分组	ALT(U/L)	AST(U/L)	TG(mmol/L)	TBIL( $\mu$ mol/L)
空白组	36.43 $\pm$ 4.92 <sup>b</sup>	110.53 $\pm$ 18.43 <sup>b</sup>	0.35 $\pm$ 0.07 <sup>b</sup>	0.74 $\pm$ 0.12 <sup>b</sup>
模型组	65.82 $\pm$ 16.14	180.45 $\pm$ 35.51	0.92 $\pm$ 0.13	1.92 $\pm$ 0.34
低HS组	43.26 $\pm$ 8.81 <sup>b</sup>	130.42 $\pm$ 11.64 <sup>b</sup>	0.44 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup>	1.03 $\pm$ 0.21 <sup>b</sup>
高HS组	41.15 $\pm$ 8.89 <sup>b</sup>	125.81 $\pm$ 10.84 <sup>b</sup>	0.38 $\pm$ 0.08 <sup>b</sup>	0.89 $\pm$ 0.15 <sup>b</sup>

<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 模型组.

表 2 各组大鼠肝脏MDA、SOD、GSH比较 ( $n = 10$ , mean  $\pm$  SD)

分组	MDA(nmol/mg prot)	SOD(U/mg prot)	GSH(nmol/mg prot)
空白组	3.25 $\pm$ 0.83 <sup>b</sup>	181.53 $\pm$ 30.13 <sup>b</sup>	135.43 $\pm$ 19.81 <sup>b</sup>
模型组	8.04 $\pm$ 1.12	93.14 $\pm$ 21.05	78.56 $\pm$ 16.45
低HS组	4.56 $\pm$ 0.98 <sup>b</sup>	162.51 $\pm$ 28.56 <sup>b</sup>	105.42 $\pm$ 17.32 <sup>b</sup>
高HS组	4.21 $\pm$ 1.05 <sup>b</sup>	164.24 $\pm$ 30.07 <sup>b</sup>	110.67 $\pm$ 20.51 <sup>b</sup>

<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 模型组.

1.2.3 肝组织病理形态学: 肝组织石蜡切片行常规HE染色, 光镜下观察组织切片的变化。

**统计学处理** 统计软件采用SPSS18.0统计软件包分析, 统计结果用mean  $\pm$  SD表示. 两组间比较先采用方差分析 $F$ 检验进行方差齐性检验, 方差齐的采用非配对 $t$ 检验, 不齐的采用非参方差分析.  $P < 0.05$ 有统计学意义。

## 2 结果

2.1 一般情况 空白组大鼠进食正常, 生长良好; 模型组大鼠造模后期进食较差; 但各组体质量变化无统计学差异。

2.2 血清ALT、AST、TG、TBIL 与空白组相比, 模型组大鼠血清ALT、AST、TG、TBIL水平均明显上升( $P < 0.01$ ); 与模型组相比, 低剂量HS治疗组、高剂量HS治疗组大鼠血清ALT、AST、TG、TBIL均下降( $P < 0.01$ ), 而高剂量组下降幅度稍大, 两治疗组间无明显差异(表1)。

2.3 肝脏MDA、SOD、GSH 模型组大鼠于灌酒12 wk后肝脏GSH含量、SOD活性下降, 与空白组比有显著统计学意义( $P < 0.01$ ), 而MDA含量增加显著( $P < 0.01$ ); HS低剂量组和高剂量组GSH含量、SOD活性均增加, MDA含量下降明显, 与模型组相比均具有统计学意义( $P < 0.01$ ), 两治疗组间差异不明显(表2)。

2.4 肝组织病理形态学检测 HE染色结果显示: 空白组大鼠肝组织形态结构均正常; 模型组大鼠肝组织可见中重度肝细胞变性, 胞质内见大

小不一的脂滴空泡, 窦内皮细胞肿胀, 汇管区炎细胞浸润(图1). HS低、高剂量组脂肪变性、炎细胞浸润程度减轻。

## 3 讨论

ALD的发病机制目前尚不明确, 但氧化应激和脂质过氧化被认为与ALD的发生发展密切相关. 乙醇进入体内后主要经肝细胞中乙醇脱氢酶(alcohol dehydrogenase, ADH)、乙醛脱氢酶(aldehyde dehydrogenase, ALDH)最终代谢为乙酸. 乙醇在被氧化的过程中产生大量的活性氧(reactive oxygen species, ROS), 而ROS是造成氧化损伤的主要原因, 可导致细胞膜脂质过氧化、细胞器功能异常、炎症反应、核氧化, 从而加重肝损伤. 而肝脏是合成多种抗氧化酶的主要器官, 当肝细胞受损后, 抗氧化酶合成减少, 进一步加重机体的氧化应激. SOD可催化超氧阴离子歧化反应的酶类, 保护细胞、对抗氧自由基的侵害; 谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)以GSH为底物, 与SOD、过氧化氢酶(catalase, CAT)共同清除机体ROS, 从而减轻和阻止氧化损伤. 同时肝库普弗细胞合成酶产生的一氧化氮(NO)、肝脏铁质沉积可加重酒精诱导的肝损伤<sup>[3,4]</sup>. MDA是多不饱和脂肪酸发生脂质氧化反应的最终产物. 本实验进一步证实酒精诱导的肝损伤SOD、GSH活性明显下降, MDA含量升高明显. 肝功能受损后表现为大鼠血清ALT、AST、TG、TBIL值较空白对

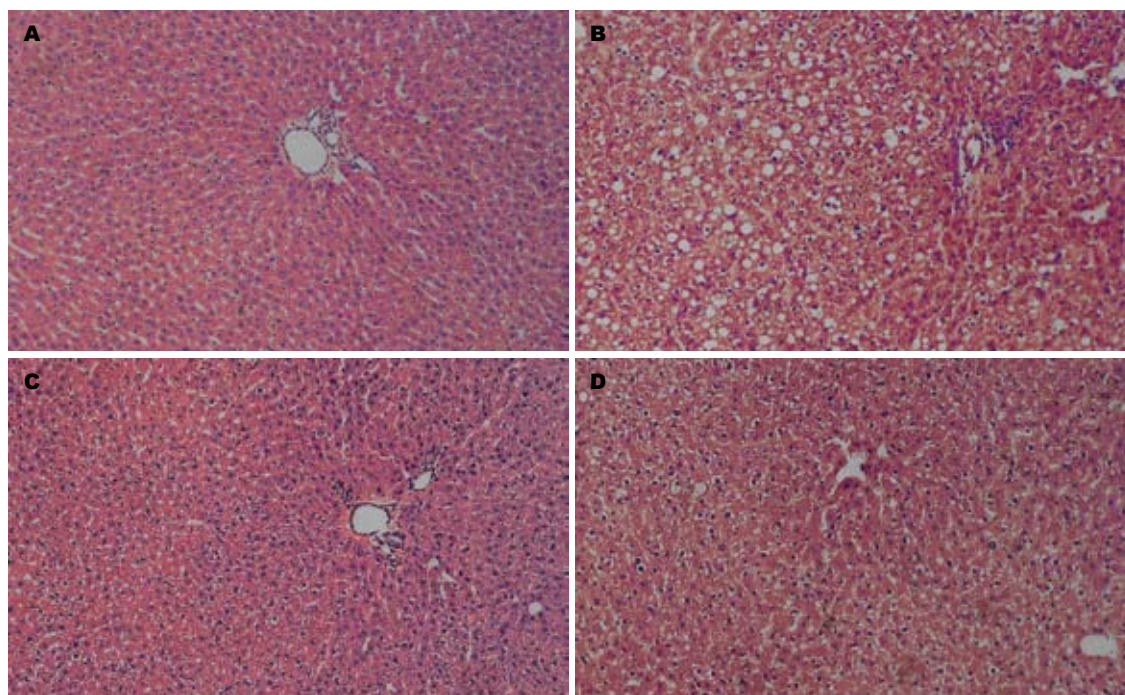


图 1 各组小鼠肝脏HE染色(×100). A: 空白组; B: 模型组; C: 低剂量HS组; D: 高剂量HS组.

#### ■创新盘点

该文通过研究肝脏病理形态学、肝功能、氧化应激因子的变化,探讨HS对大鼠酒精性肝损伤的保护作用.

照组明显上升.

实验证明动物呼吸2%的氢可有效清除自由基,显著改善脑缺血再灌注损伤<sup>[3]</sup>.随后有研究表明呼吸2%的氢可治疗动物心肌及肝脏缺血再灌注损伤、小肠移植引起的炎症损伤和新生儿脑缺血缺氧损伤<sup>[4,5]</sup>.采用饮用饱和氢气水可治疗应激引起的神经损伤、2型糖尿病,化疗药顺铂引起的肾损伤、帕金森病、小鼠基因缺陷慢性氧化应激损伤. HS是将氢气通过高压溶解于生理盐水中,研究表明腹腔注射HS能明显提高大鼠腹部脏器肝、肾组织内的氢浓度,腹腔注射HS对脑、肠缺血再灌注损伤动物模型、结扎胆管造成的肝损伤及GalN/LPS、CCl<sub>4</sub>、DEN肝损伤小鼠模型中和CCl<sub>4</sub>导致的肝纤维化都有很好的保护作用<sup>[4-20]</sup>.

本研究发现HS治疗组大鼠血清ALT、AST、TG、TBIL显著下降; SOD、GSH活性明显增加,脂质过氧化产物MDA含量明显上升. ALD早期损伤多为可逆的,如能及时有针对性的治疗可防止疾病向肝硬化、肝癌等不可逆病变发展.目前除戒酒和支持性治疗外,尚无令人满意的治疗药物.因此,寻找治疗ALD的药物具有重要的临床意义.目前临床上应用的药物包括:皮质激素、秋水仙碱、胰岛素、胰高血糖素、丙基硫氧嘧啶、抗氧化剂、抗内毒素剂等,但对疗效的报道不一. HS可有效清除多余自由基,抗氧化作用显著,并被证实在很多肝损

伤方面有治疗作用. 本研究发现HS可明显改善肝功能,拮抗氧化应激和脂质过氧化,提高肝脏抗氧化能力,从而有效保护肝脏. 下一步我们将深入研究HS对酒精性肝损伤对肝组织白介素-1 $\beta$ (interleukin 1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )的影响.

#### 4 参考文献

- 1 Tome S, Lucey MR. Review article: current management of alcoholic liver disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 19: 707-714
- 2 Tilg H, Day CP. Management strategies in alcoholic liver disease. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2007; 4: 24-34
- 3 Day CP. Treatment of alcoholic liver disease. *Liver Transpl* 2007; 13: S69-S75
- 4 Dey A, Cederbaum AI. Alcohol and oxidative liver injury. *Hepatology* 2006; 43: S63-S74
- 5 Betteridge DJ. What is oxidative stress? *Metabolism* 2000; 49: 3-8
- 6 Ohsawa I, Ishikawa M, Takahashi K, Watanabe M, Nishimaki K, Yamagata K, Katsura K, Katayama Y, Asoh S, Ohta S. Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic oxygen radicals. *Nat Med* 2007; 13: 688-694
- 7 Fukuda K, Asoh S, Ishikawa M, Yamamoto Y, Ohsawa I, Ohta S. Inhalation of hydrogen gas suppresses hepatic injury caused by ischemia/reperfusion through reducing oxidative stress. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 361: 670-674
- 8 Hayashida K, Sano M, Ohsawa I, Shinmura K, Tamaki K, Kimura K, Endo J, Katayama T, Kawamura A, Kohsaka S, Makino S, Ohta S, Ogawa S, Fukuda K. Inhalation of hydrogen gas reduces infarct size in the rat model of myocardial ischemia-reperfusion injury.

# ■同行评价

本研究设计科学合理, 文章结构清晰, 结果、结论较明确。文章的科学性、创新性和可读性能较好地反映我国该领域研究的先进水平。

- 9 Ohsawa I, Nishimaki K, Yamagata K, Ishikawa M, Ohta S. Consumption of hydrogen water prevents atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 377: 1195-1198
- 10 Kajiyama S, Hasegawa G, Asano M, Hosoda H, Fukui M, Nakamura N, Kitawaki J, Imai S, Nakano K, Ohta M, Adachi T, Obayashi H, Yoshikawa T. Supplementation of hydrogen-rich water improves lipid and glucose metabolism in patients with type 2 diabetes or impaired glucose tolerance. *Nutr Res* 2008; 28: 137-143
- 11 Zheng X, Mao Y, Cai J, Li Y, Liu W, Sun P, Zhang JH, Sun X, Yuan H. Hydrogen-rich saline protects against intestinal ischemia/reperfusion injury in rats. *Free Radic Res* 2009; 43: 478-484
- 12 Sato Y, Kajiyama S, Amano A, Kondo Y, Sasaki T, Handa S, Takahashi R, Fukui M, Hasegawa G, Nakamura N, Fujinawa H, Mori T, Ohta M, Obayashi H, Maruyama N, Ishigami A. Hydrogen-rich pure water prevents superoxide formation in brain slices of vitamin C-depleted SMP30/GNL knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 375: 346-350
- 13 Nagata K, Nakashima-Kamimura N, Mikami T, Ohsawa I, Ohta S. Consumption of molecular hydrogen prevents the stress-induced impairments in hippocampus-dependent learning tasks during chronic physical restraint in mice. *Neuropsychopharmacology* 2009; 34: 501-508
- 14 Nakashima-Kamimura N, Mori T, Ohsawa I, Asoh S, Ohta S. Molecular hydrogen alleviates nephrotoxicity induced by an anti-cancer drug cisplatin without compromising anti-tumor activity in mice. *Cancer Chemother Pharmacol* 2009; 64: 753-761
- 15 Fu Y, Ito M, Fujita Y, Ito M, Ichihara M, Masuda A, Suzuki Y, Maesawa S, Kajita Y, Hirayama M, Ohsawa I, Ohta S, Ohno K. Molecular hydrogen is protective against 6-hydroxydopamine-induced nigrostriatal degeneration in a rat model of Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 2009; 453: 81-85
- 16 Buchholz BM, Kaczorowski DJ, Sugimoto R, Yang R, Wang Y, Billiar TR, McCurry KR, Bauer AJ, Nakao A. Hydrogen inhalation ameliorates oxidative stress in transplantation induced intestinal graft injury. *Am J Transplant* 2008; 8: 2015-2024
- 17 Cai J, Kang Z, Liu WW, Luo X, Qiang S, Zhang JH, Ohta S, Sun X, Xu W, Tao H, Li R. Hydrogen therapy reduces apoptosis in neonatal hypoxia-ischemia rat model. *Neurosci Lett* 2008; 441: 167-172
- 18 Cai J, Kang Z, Liu K, Liu W, Li R, Zhang JH, Luo X, Sun X. Neuroprotective effects of hydrogen saline in neonatal hypoxia-ischemia rat model. *Brain Res* 2009; 1256: 129-137
- 19 Mao YF, Zheng XF, Cai JM, You XM, Deng XM, Zhang JH, Jiang L, Sun XJ. Hydrogen-rich saline reduces lung injury induced by intestinal ischemia/reperfusion in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 381: 602-605
- 20 Sun H, Chen L, Zhou W, Hu L, Li L, Tu Q, Chang Y, Liu Q, Sun X, Wu M, Wang H. The protective role of hydrogen-rich saline in experimental liver injury in mice. *J Hepatol* 2011; 54: 471-480

编辑 张姗姗 电编 闫晋利

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2012年版权归世界华人消化杂志

## • 消息 •

## 2011 年度《世界华人消化杂志》发文情况

本刊讯 2011-01-01/2011-12-31,《世界华人消化杂志》共收到稿件1576篇, 退稿932篇, 退稿率59.13%, 发表文章644篇, 所有文章均经过编委专家同行评议。其中, 发表述评35篇(5.43%), 基础研究135篇(20.96%), 临床研究71篇(11.02%), 焦点论坛17篇(2.64%), 文献综述111篇(17.24%), 研究快报58篇(9.01%), 临床经验189篇(29.35%), 病例报告24篇(3.73%); 文章作者分布遍及全国各地, 绝大多数来自高等院校及附属医院。在此, 特别感谢为《世界华人消化杂志》进行同行评议的各位编委专家, 你们的同行评价对文章发表质量做出了重要贡献; 也希望各位编委踊跃为《世界华人消化杂志》继续撰写高质量的评论性文章, 为科学知识的传播做出贡献! (编辑部主任: 李军亮 2012-01-01)



# 羊栖菜多糖对内毒素诱导的大鼠肝星状细胞增殖活化、氧化损伤及凋亡的影响

张雪琴, 吴金明, 黄智铭, 吴建胜, 方红龙

张雪琴, 吴金明, 黄智铭, 吴建胜, 方红龙, 温州医学院附属第一医院消化内科 浙江省温州市 325000

张雪琴, 硕士生, 主要从事肝纤维化方面的研究.

作者贡献分布: 本研究由吴金明、张雪琴共同设计; 黄智铭与吴建胜进行指导, 实验由张雪琴及方红龙完成; 最终数据分析与论文撰写由张雪琴完成; 吴金明审核.

通讯作者: 吴金明, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 325000, 浙江省温州市, 温州医学院附属第一医院消化内科.

phdwu0003@yahoo.com.cn

收稿日期: 2012-03-09 修回日期: 2012-05-11

接受日期: 2012-05-16 在线出版日期: 2012-05-28

## Effect of sargassum fusiforme polysaccharides on lipopolysaccharide-induced proliferation, activation, oxidative damage and apoptosis of rat hepatic stellate cells

Xue-Qin Zhang, Jin-Ming Wu, Zhi-Ming Huang, Jian-Sheng Wu, Hong-Long Fang

Xue-Qin Zhang, Jin-Ming Wu, Zhi-Ming Huang, Jian-Sheng Wu, Hong-Long Fang, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325000, Zhejiang Province, China  
Correspondence to: Jin-Ming Wu, Professor, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325000, Zhejiang Province, China. phdwu0003@yahoo.com.cn

Received: 2012-03-09 Revised: 2012-05-11

Accepted: 2012-05-16 Published online: 2012-05-28

## Abstract

**AIM:** To investigate the effect of sargassum fusiforme polysaccharides (SFPS) on the proliferation, activation, oxidative damage and apoptosis of lipopolysaccharide (LPS)-induced rat hepatic stellate cells (HSCs), and to evaluate the anti-fibrotic mechanism of SFPS.

**METHODS:** Cultured rat HSCs were divided into five groups: control group, LPS group, and three LPS plus SFPS groups (treated with LPS plus low-, medium- or high-dose SFPS). After 48 h, cell proliferation was assessed by MTT colorimetric assay. Apoptotic cells were detected by

annexin V-FITC/PI double labeling and flow cytometry. MDA/SOD contents were measured by colorimetry. The levels of type I collagen were measured by ELISA. Western blot were used to detect the expression of  $\alpha$ -smooth muscle actin.

**RESULTS:** LPS induced proliferation, increased the secretion of MDA and the expression of type I collagen and  $\alpha$ -smooth muscle actin, and reduced the secretion of SOD in HSCs (all  $P < 0.05$ ). Compared to the LPS group, treatment with different doses of SFPS inhibited proliferation, induced apoptosis, reduced secretion of MDA, decreased the expression of type I collagen and  $\alpha$ -SMA, and increased secretion of SOD (all  $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** These results suggest that SFPS can alleviate liver fibrosis by inducing apoptosis of HSCs and protecting against LPS-induced oxidative stress.

**Key Word:** Sargassum fusiforme polysaccharides; Hepatic stellate cells; Lipopolysaccharide; Apoptosis

Zhang YQ, Wu JM, Huang ZM, Wu JS, Fang HL. Effect of sargassum fusiforme polysaccharides on lipopolysaccharide-induced proliferation, activation, oxidative damage and apoptosis of rat hepatic stellate cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(15): 1333-1337

## 摘要

**目的:** 观察羊栖菜多糖(sargassum fusiforme polysaccharides, SFPS)对内毒素(lipopolysaccharide, LPS)诱导的肝星状细胞HSC-T6的增殖活化、氧化损伤及凋亡的影响, 并探讨其抗纤维化的机制.

**方法:** 将大鼠HSC-T6细胞株置DMEM培养液中, 37 °C 50 mL/L CO<sub>2</sub>条件下培养传代后分为空白对照组、LPS模型组、LPS+不同剂量SFPS组. 加药处理48 h后, MTT比色法检测细胞增殖; Annexin V-FITC标记法检测细胞的凋亡; 比色法检测MDA/SOD的含量; 采用ELISA法检测 I 型胶原蛋白的表达; Western blot法检测 $\alpha$ -SMA的表达.

## ■背景资料

肝星状细胞(HSCs)的活化和增殖是肝纤维化形成关键环节. 近有研究表明, 内毒素与肝纤维化的发生发展有着密切的关系. 各种治疗肝纤维化的方法中, 以诱导HSCs凋亡、保护受损的肝细胞成为目前的研究热点, 羊栖菜多糖(SFPS)经研究有抗氧化、促进肿瘤细胞凋亡作用, 但其机制尚不明确.

## ■同行评议者

牛英才, 研究员, 齐齐哈尔医学院医药科学研究所; 田宇彬, 教授, 山东省青岛市, 青岛大学医学院附属医院



## ■相关报道

羊栖菜在我国沿海广泛分布,多年来的研究表明羊栖菜多糖具有抗肿瘤、降血脂血糖及修复细胞氧化损伤等活性。

**结果:** LPS能明显诱导HSC-T6的增殖、提高MDA的分泌及I型胶原和 $\alpha$ -SMA的表达、降低SOD的分泌;与模型组相比, SFPS(25、50、100 mg/L)组可以不同程度抑制HSC-T6增殖并能诱导其凋亡、减少MDA分泌及I型胶原和 $\alpha$ -SMA的表达、增加SOD的分泌(均 $P<0.05$ )。

**结论:** SFPS可能具有一定的抗纤维化作用,其与诱导HSC-T6凋亡及保护LPS诱导的HSC-T6细胞氧化应激损伤有关。

**关键词:** 羊栖菜多糖; 肝星状细胞; 内毒素; 凋亡

张雪琴, 吴金明, 黄智铭, 吴建胜, 方红龙. 羊栖菜多糖对内毒素诱导的大鼠肝星状细胞增殖活化、氧化损伤及凋亡的影响. 世界华人消化杂志 2012; 20(15): 1333-1337  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1333.asp>

## 0 引言

肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSCs)的活化和增殖是肝纤维化形成过程中的关键环节<sup>[1]</sup>. 近来有研究表明, 内毒素与肝纤维化的发生发展有着密切的关系<sup>[2]</sup>. 在各种治疗肝纤维化的方法中, 诱导HSCs凋亡、保护受损的肝细胞成为目前的研究热点. 羊栖菜多糖(sargassum fusiforme polysaccharides, SFPS)提取自羊栖菜, 经研究发现具有抗氧化、促进肿瘤细胞凋亡的作用, 但其机制尚不明确. 本研究主要观察SFPS体外能否诱导活化的HSCs凋亡及其抗氧化作用, 为中药治疗肝纤维化提供新的途径。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 大鼠HSC-T6细胞株由本实验室保存. 羊栖菜(SFPS, 温州医学院陈晓明老师馈赠)、DMEM(高糖型)培养液和胎牛血清(美国GIBCO公司)、内毒素(LPS, 美国SIGMA公司)、0.25%胰蛋白酶(美国GIBCO公司)、四甲基偶氮唑盐(MTT, 北京索来宝生物公司)、Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒(Biovision公司)、丙二醛测定试剂盒(MDA, 南京建成生物工程研究所)、超氧化物歧化酶测定试剂盒(SOD, 南京建成生物工程研究所)、小鼠抗大鼠 $\alpha$ -肌动蛋白单克隆抗体及 $\beta$ -actin抗体(美国Santa Cruz公司)、山羊抗小鼠二抗(武汉博士得生物工程有限公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 HSC-T6细胞的培养与传代:** 细胞复苏后以 $5 \times 10^5$ /瓶接种于25 cm<sup>2</sup>细胞培养瓶(Corning公司),

以完全培养基(DMEM高糖培养基+100 mL/L胎牛血清)在37 °C、50 mL/L CO<sub>2</sub>培养箱培养, 隔天换液, 待细胞长至70%-80%密度时, 用0.25%胰蛋白酶进行消化, 按1:3比例传代。

**1.2.2 分组:** 本研究分为空白对照组(A组)、1.0  $\mu$ mol/L LPS组(B组)、1.0  $\mu$ mol/L LPS+25 mg/L SFPS组(C组)、1.0  $\mu$ mol/L LPS+50 mg/L SFPS组(D组)和1.0  $\mu$ mol/L LPS+100 mg/L SFPS组(E组)。

**1.2.3 MTT法检测细胞增殖活力:** 取对数生长期细胞, 按 $1 \times 10^4$ 个/孔接种于96孔板, 每组4个复孔, 培养24 h后, 用无血清培养基同步化处理24 h, 按分组处理, 终止培养前4 h每孔加入10  $\mu$ L MTT (5 g/L), 培养结束时小心吸除上清, 加100  $\mu$ L DMSO/孔, 振荡10 min溶解结晶物, 酶标仪570 nm波长测各组吸光度(A)值. 以正常对照组A值为对照, 计算各组细胞存活率. 细胞存活率(%) = (各组A值/正常对照组A值)

**1.2.4 Annexin V-FITC/PI标记法检测细胞凋亡:** 收集各组细胞, 用4 °C预冷的PBS洗涤2次. 500  $\mu$ L结合缓冲液重悬细胞, 调节其浓度为 $3 \times 10^5$ , 加入5  $\mu$ L Annexin V-FITC和10  $\mu$ L PI, 混匀后于室温避光孵育5 min, 流式细胞仪(Becton Dickinson, FACS Vantage SE)分析结果。

**1.2.5 比色法检测MDA/SOD:** 过氧化脂质降解产物中MDA可与硫代巴比妥酸(Thiobarbituric acid, TBA)缩合, 形成红色产物, 经过比色可测定MDA含量. 收集培养板上的细胞, 加入PBS液反复冻融后, 按试剂盒说明测定其中的MDA含量. 黄嘌呤氧化酶反应系统产生超氧阴离子自由基, 后者氧化羟胺形成亚硝酸盐, 在显色剂的作用下呈现紫红色, 当被测样品中含SOD时, 则抑制超氧阴离子自由基使亚硝酸盐形成减少. 收集培养板上的细胞培养液, 采用黄嘌呤氧化酶比色法测定SOD活性。

**1.2.6 ELISA法检测I型胶原的表达:** 收集做MTT时药物处理后的上清液. 按I型胶原ELISA试剂盒操作说明书操作. 酶标仪450 nm波长处测A值, 绘出标准曲线, 根据样品(A)值在曲线图上查出相应I型胶原含量。

**1.2.7 Western blot法检测 $\alpha$ -SMA(43 kDa)的表达:** 加入各组蛋白样品经聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后转移至PVDF膜, 封闭1 h后, 加入 $\alpha$ -肌动蛋白单克隆抗体(1:400)和内参照GAPDH抗体(1:500), 一抗过夜后加入辣根过氧化物酶标记的二抗(1:3 000)作用1 h, 电化学发光法检

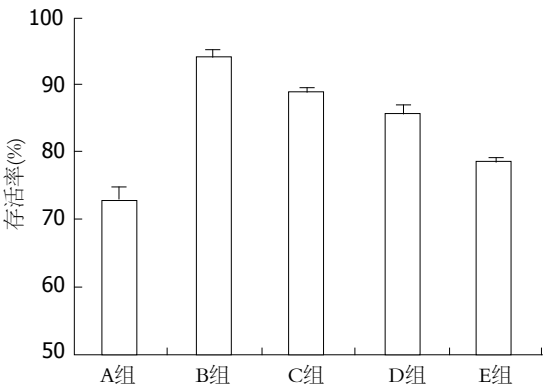


图 1 SFPS对LPS诱导的HSC-T6细胞的存活率的影响.

测, 在暗室中X光胶片曝光并冲洗显影, 用Bio-Sens SC810软件测定各条带的灰度值, 经内参照β-actin校正后得到蛋白的相对表达量.

**统计学处理** 数据用mean±SD表示, 采用SPSS17.0作One-way ANOVA分析, 两两比较用LSD检验,  $P<0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

**2.1 MTT法检测HSC-T6细胞增殖** 各组细胞的存活率A组为73.1%±3.4%、B组为94.7%±2.3%、C组为89.1%±1.5%、D组为86.1%±2.7%、E组为78.7%±1.3%, 差异有统计学意义( $P<0.05$ ). LSD法两两比较, B组>C组>D组>E组>A组, 均有统计学意义( $P<0.05$ ). 与空白组相比, LPS对HSCs的增殖有明显的促进作用( $P<0.01$ ), 与模型组相比, SFPS对LPS诱导的HSCs的增殖具有明显的抑制作用, 且随着SFPS浓度的增加细胞增殖下降, 呈剂量依赖性( $P<0.05$ , 图1).

**2.2 SFPS对LPS诱导的HSC-T6细胞凋亡率的影响** HSC-T6细胞凋亡率A组为7.4%±1.4%、B组为5.6%±2.1%、C组为9.8%±2.0%、D组为12.7%±1.7%、E组为15.3±3.6%, 差异有统计学意义( $P<0.05$ ). 与模型组相比, SFPS能明显促进肝星状细胞的凋亡, 并呈剂量依赖性( $P<0.05$ , 图2).

**2.3 SFPS对LPS所致氧化损伤的影响** 与模型组相比, SFPS(25、50、100 mg/L)组可以不同程度增加SOD的分泌及减少MDA分泌(均 $P<0.05$ , 表1).

**2.4 ELISA法检测 I 型胶原的表达** I 型胶原的表达各组表达量A组为90.51±2.23, B组为256.63±3.43, C组为206.32±5.49, D组为184.35±9.62, E组为139.28±4.81, 差异有统计学意义( $F = 19.06$ ,  $P<0.05$ ). LSD法两两比较, B组>C组>D组>E组>A组, 均有统计学意义( $P<0.05$ ). 与空白组对比, 内毒素能明显促进HSCs表达 I 型

表 1 SFPS对LPS所致氧化损伤的影响 ( $n = 5$ , mean ± SD)

分组	SOD活力(U/mL)	MDA含量(nmol/L)
A组	43.17 ± 1.34	1.50 ± 0.14
B组	27.31 ± 3.05 <sup>b</sup>	3.24 ± 0.13 <sup>b</sup>
C组	23.10 ± 3.08	2.45 ± 0.14 <sup>d</sup>
D组	30.84 ± 1.85 <sup>d</sup>	2.19 ± 0.12 <sup>d</sup>
E组	36.33 ± 2.39 <sup>d</sup>	1.79 ± 0.10 <sup>d</sup>

<sup>b</sup> $P<0.01$  vs A组; <sup>d</sup> $P<0.01$  vs B组.

胶原( $P<0.01$ ), 不同剂量SFPS作用后, 与模型组相比, I 型胶原表达受到抑制并呈剂量依赖性( $P<0.05$ ).

**2.5 Western blot法检测α-SMA的表达** 各组灰度比值A组为0.38±1.12, B组为0.87±2.05, C组为0.80±1.23, D组为0.73±0.84, E组为0.54 ±2.33, 差异有统计学意义( $F = 76.24$ ,  $P<0.01$ ). LSD法两两比较, B组>C组>D组>E组>A组, 均有统计学意义( $P<0.05$ ). LPS能明显促进HSCs表达α-SMA( $P<0.01$ ), 与模型组相比, 不同剂量SFPS作用后, LPS诱导的肝星状细胞分泌的α-SMA表达受到抑制并呈剂量依赖性( $P<0.05$ , 图3).

3 讨论

肝纤维化是慢性肝病的共同病理学基础, 是形成肝硬化的必经病理阶段<sup>[3]</sup>. 虽然肝纤维化的确切病因还未明确, 但是各种致病因素能造成肝细胞坏死, 激活库普弗细胞(Kupffer cell, KC), 分泌炎症因子, 如TNF-α、TGF-β、血小板衍生生长因子(platelet derived growth factor, PDGF)、白介素-1(interleukin-1, IL-1), 最终共同使静息HSCs激活、转化为肌成纤维细胞(myofibroblast, MFB)<sup>[4,5]</sup>. HSCs是位于Disse间隙的一种间质细胞, 正常情况下处于静息状态, 活化后表达α-SMA水平升高, 合成包括胶原在内的细胞外基质. 大量资料表明: HSCs的增殖和活化是肝纤维化发生的细胞学基础, 是各种病因致肝纤维化发生的共同中心环节<sup>[6]</sup>. 表达α-SMA是HSCs特异性的活化标志<sup>[7]</sup>. 氧化应激在HSCs活化、增殖中亦起重要作用<sup>[8]</sup>. 损伤的肝细胞、活化的KC以及嗜中性粒细胞等炎症细胞均可以产生H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>等活性氧(ROS), 这些ROS及其脂质过氧化物(LPO)降解产物, 可以通过旁分泌机制刺激HSCs活化, 进而分泌ECM增多促进肝纤维化的发生.

近年研究表明, 内毒素与肝纤维化的发生

■创新盘点

本文利用提取的海洋多糖体外刺激活化的肝星状细胞, 结果表明可以促进活化细胞凋亡, 减少胶原分泌等, 多方面说明其可能用于肝纤维化的治疗.

## ■应用要点

SFPS可诱导活化的HSCs凋亡及抗氧化作用,为中药治疗肝纤维化提供新的途径.

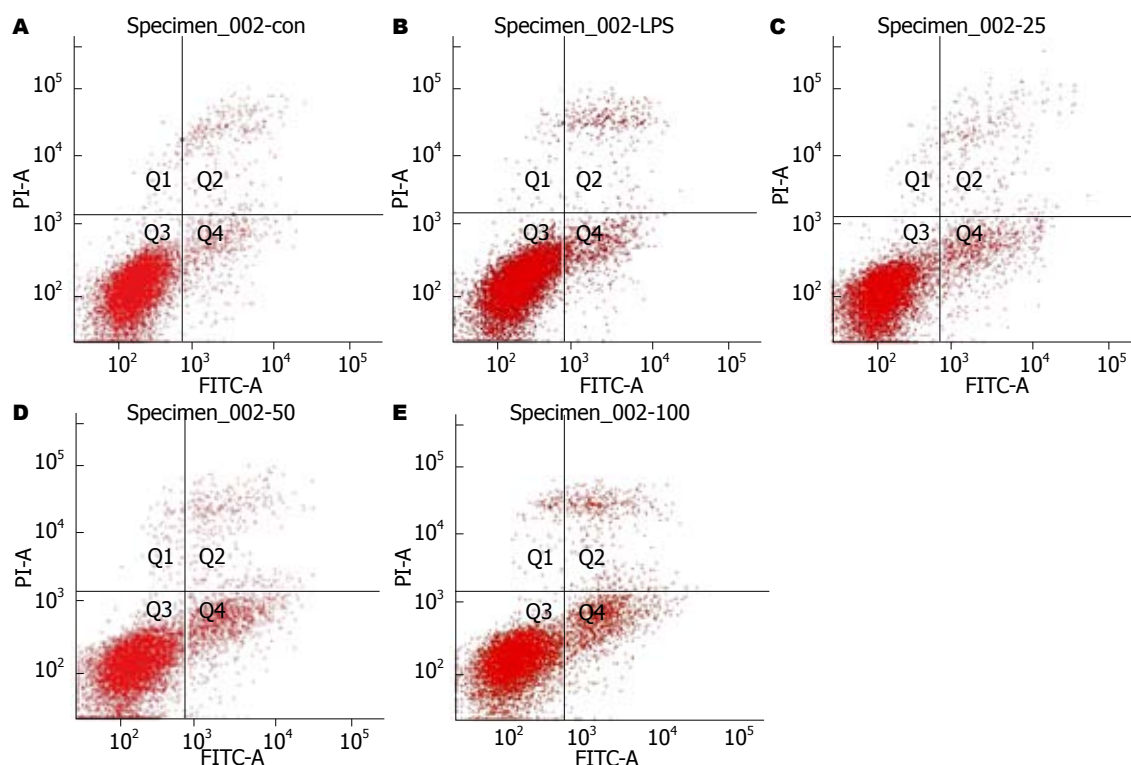


图2 流式细胞仪检测SFPS对LPS诱导的HSC细胞凋亡率的影响. A: 空白对照组; B: 1.0  $\mu\text{mol/L}$  LPS组; C: 1.0  $\mu\text{mol/L}$  LPS+25 mg/L SFPS组; D: 1.0  $\mu\text{mol/L}$  LPS+50 mg/L SFPS组; E: 1.0  $\mu\text{mol/L}$  LPS+100 mg/L SFPS组.

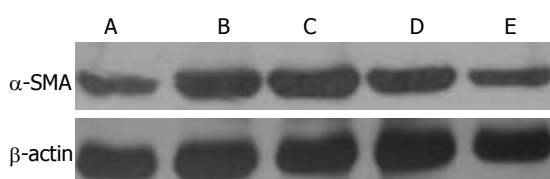


图3 Western blot检测 $\alpha$ -SMA的表达. A: 空白对照组; B: 1.0  $\mu\text{mol/L}$  LPS组; C: 1.0  $\mu\text{mol/L}$  LPS+25 mg/L SFPS组; D: 1.0  $\mu\text{mol/L}$  LPS+50 mg/L SFPS组; E: 1.0  $\mu\text{mol/L}$  LPS+100 mg/L SFPS组.

发展有着密切关系. 肝损伤状态下, 肝脏对内毒素排除作用减弱, 造成其在体内大量堆积, 而促进肝纤维化的发展. 以往多以TNF- $\alpha$ 、PDGF和TGF- $\beta$ 1刺激HSCs建立体外肝纤维化模型, 因为PDGF是HSCs最强大的趋化因子和促分裂原, 引起HSCs增殖, 但是胶原增加不明显, TGF- $\beta$ 1具有强大的促HSCs分泌胶原作用, 但是细胞增殖受抑制. LPS是革兰氏阴性细菌细胞壁的主要成分, 也称脂多糖, 是众多促进HSCs活化刺激物之一. 本实验通过适当浓度的刺激, 发现HSCs在一定范围内增殖较明显, 较高浓度时损伤占主导地位. Gandhi等<sup>[9]</sup>研究发现, LPS可上调在HSCs活化中具有重要意义的ET-1受体, 是通过NO依赖和非NO依赖机制实现的. 另外一定浓度的内毒素直接作用与HSCs能使其TGF- $\beta$ 1表达增加, 这可能是内毒素促进肝纤维化的途径

之一, PDTc是NF-KB抑制剂, 作用于HSCs可使TGF- $\beta$ 1表达降低<sup>[10]</sup>. 还有LPS价格较便宜, 比较经济, 这为以后构建体外肝纤维化模型提供了一个新的途径.

MDA是脂质过氧化产物, 他的水平间接反映了机体细胞受自由基攻击的严重程度, 而SOD的活力又间接反映机体清除自由基的能力, 他们是一对互相影响的指标.

临床研究发现肝纤维化在一定情况下可通过减少活化的HSCs来逆转, 可以通过以下方法实现: (1)活化HSCs转变为静止状态; (2)活化HSCs发生凋亡<sup>[6]</sup>. HSCs活化后其表型很难逆转, 而通过促进活化的HSCs凋亡可能是治疗肝纤维化的不错的选择. 本实验通过LPS刺激HSC-T6建立了体外肝纤维化模型, SFPS可以抑制活化的HSCs增殖并促进其凋亡, 使其活化标志物 $\alpha$ -SMA表达减少, 降低I型胶原的分泌, 降低HSCs培养液中异常升高MDA的含量, 同时提高SOD的活力而起到抗肝纤维化的作用<sup>[11]</sup>.

羊栖菜在我国沿海广泛分布, 多年来的研究表明羊栖菜多糖具有抗肿瘤、降血脂血糖及修复细胞氧化损伤等活性. 如: SFPS诱导HL-60细胞凋亡, 其机制可能与fas/fas1表达增多有关<sup>[12]</sup>, SFPS对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>所致人脐静脉内皮细胞损伤有保护及修复作用<sup>[13]</sup>, SFPS可对抗H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导的胰岛 $\beta$ 细

胞凋亡<sup>[14,15]</sup>。且该药具有取材方便, 价格低廉, 如果能用于预防或治疗肝纤维化将有重要的意义。

#### 4 参考文献

- 1 Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 2005; 115: 209-218
- 2 于海波, 宋为芸, 王林杰, 张月梅, 王东林. 慢性病毒性肝炎肝脏病理组织学改变与内毒素检测的关系. *中西医结合肝病杂志* 2003; 13: 107-108
- 3 Friedman SL. Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. The cellular basis of hepatic fibrosis. Mechanisms and treatment strategies. *N Engl J Med* 1993; 328: 1828-1835
- 4 Faouzi S, Le Bail B, Neaud V, Boussarie L, Saric J, Bioulac-Sage P, Balabaud C, Rosenbaum J. Myofibroblasts are responsible for collagen synthesis in the stroma of human hepatocellular carcinoma: an in vivo and in vitro study. *J Hepatol* 1999; 30: 275-284
- 5 Zhang L, Keane MP, Zhu LX, Sharma S, Rozengurt E, Strieter RM, Dubinett SM, Huang M. Interleukin-7 and transforming growth factor-beta play counter-regulatory roles in protein kinase C-delta-dependent control of fibroblast collagen synthesis in pulmonary fibrosis. *J Biol Chem* 2004; 279: 28315-28319
- 6 Robert K, Nehmé J, Bourdon E, Pivert G, Friguet B, Delcayre C, Delabar JM, Janel N. Cystathionine beta synthase deficiency promotes oxidative stress, fibrosis, and steatosis in mice liver. *Gastroenterology* 2005; 128: 1405-1415
- 7 Sugimoto R, Enjoji M, Kohjima M, Tsuruta S, Fukushima M, Iwao M, Sonta T, Kotoh K, Inoguchi T, Nakamuta M. High glucose stimulates hepatic stellate cells to proliferate and to produce collagen through free radical production and activation of mitogen-activated protein kinase. *Liver Int* 2005; 25: 1018-1026
- 8 Burt AD. C. L. Oakley Lecture (1993). Cellular and molecular aspects of hepatic fibrosis. *J Pathol* 1993; 170: 105-114
- 9 Gandhi CR, Stephenson K, Olson MS. Endothelin, a potent peptide agonist in the liver. *J Biol Chem* 1990; 265: 17432-17435
- 10 Saile B, Knittel T, Matthes N, Schott P, Ramadori G. CD95/CD95L-mediated apoptosis of the hepatic stellate cell. A mechanism terminating uncontrolled hepatic stellate cell proliferation during hepatic tissue repair. *Am J Pathol* 1997; 151: 1265-1272
- 11 张贺吉, 吴江锋, 柳长柏. 肝星状细胞的可塑性及其对肝纤维化的意义. *世界华人消化杂志* 2011; 19: 3415-3419
- 12 梁倩, 李继承, 张华芳. 羊栖菜多糖诱导HL-60细胞凋亡的研究. *实验生物学报* 2004; 37: 125-132
- 13 陈慧玲, 况伟, 史锋. 羊栖菜多糖对血管内皮细胞氧化损伤的保护和修复作用的实验研究. *中国药理学杂志* 2007; 42: 829-831
- 14 倪小芬, 郑超, 田吉来, 胡臻. 羊栖菜多糖对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导胰岛β细胞凋亡的保护作用及PI3K抑制剂的影响. *中华中医药学刊* 2009; 27: 1506-1508
- 15 李志, 漆红, 李昌平. 舒肝颗粒对大鼠肝星状细胞增殖及胶原分泌的影响. *世界华人消化杂志* 2010; 18: 169-172

编辑 曹丽鸥 电编 鲁亚静

#### ■同行评价

本研究设计尚合理, 有一定的科学意义和潜在的应用价值, 为中药治疗肝纤维化提供新的途径。

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2012年版权归世界华人消化杂志

#### • 消息 •

### 《世界华人消化杂志》外文字符标准

本刊讯 本刊论文出现的外文字符应注意大小写、正斜体与上下角标。静脉注射iv, 肌肉注射im, 腹腔注射ip, 皮下注射sc, 脑室注射icv, 动脉注射ia, 口服po, 灌胃ig. s(秒)不能写成S, kg不能写成Kg, mL不能写成ML, lcpm(应写为1/min)÷E%(仪器效率)÷60=Bq, pH不能写PH或P<sup>H</sup>, *H. pylori*不能写成HP, T<sub>1/2</sub>不能写成t<sub>1/2</sub>或T<sub>1/2</sub>, V<sub>max</sub>不能写Vmax, μ不写为英文u. 需排斜体的外文字, 用斜体表示。如生物学中拉丁学名的属名与种名, 包括亚属、亚种、变种。如幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*), *Ilex pubescens* Hook, et Arn.var.*glaber* Chang(命名者勿划横线); 常数K; 一些统计学符号(如样本数n, 均数mean, 标准差SD, F检验, t检验和概率P, 相关系数r); 化学名中标明取代位的元素、旋光性和构型符号(如N, O, P, S, d, l)如n-(normal, 正), N-(nitrogen, 氮), o-(ortho, 邻), O-(oxygen, 氧, 习惯不译), d-(dextro, 右旋), p-(para, 对), 例如n-butyl acetate(醋酸正丁酯), N-methylacetanilide(N-甲基乙酰胺), o-cresol(邻甲酚), 3-O-methyl-adrenaline(3-O-甲基肾上腺素), d-amphetamine(右旋苯丙胺), l-dopa(左旋多巴), p-aminosalicylic acid(对氨基水杨酸)。拉丁字及缩写in vitro, in vivo, in situ, Ibid, et al, po, vs; 用外文字母代表的物理量, 如m(质量), V(体积), F(力), p(压力), W(功), v(速度), Q(热量), E(电场强度), S(面积), t(时间), z(酶活性, kat), t(摄氏温度, °C), D(吸收剂量, Gy), A(放射性活度, Bq), ρ(密度, 体积质量, g/L), c(浓度, mol/L), φ(体积分数, mL/L), w(质量分数, mg/g), b(质量摩尔浓度, mol/g), l(长度), b(宽度), h(高度), d(厚度), R(半径), D(直径), T<sub>max</sub>, C<sub>max</sub>, Vd, T<sub>1/2</sub> CI等。基因符号通常用小写斜体, 如ras, c-myc; 基因产物用大写正体, 如P16蛋白。



# Toll样受体4在猪急性坏死性胰腺炎肠道组织中的表达及其意义

林 敏, 陈卫昌, 薛乐宁, 徐克群, 王晓勇, 谭 勇

## ■背景资料

Toll样受体4(TLR4)是天然免疫系统识别病原微生物的主要受体,在天然免疫反应中具有重要的作用。TLR4可特异性识别细菌脂多糖(LPS),在诱导细胞反应中具有关键作用。

林敏, 薛乐宁, 徐克群, 王晓勇, 谭勇, 常州市第二人民医院消化科 江苏省常州市 213000

陈卫昌, 苏州大学附属第一医院消化科 江苏省苏州市 215006

南京医科大学基金面上项目, No. 2011NJMU081

作者贡献分布: 此课题由林敏与陈卫昌设计; 动物模型制作由林敏、王晓勇及谭勇操作完成; 实验室分析由徐克群完成; 论文写作由林敏与薛乐宁完成。

通讯作者: 林敏, 主治医师, 213000, 江苏省常州市, 常州市第二人民医院消化科. tianya-liulang@sohu.com

电话: 0519-88119602

收稿日期: 2011-08-07 修回日期: 2012-03-28

接受日期: 2012-04-19 在线出版日期: 2012-05-28

## Significance of expression of Toll-like receptor 4 in the intestinal tract of pigs with acute necrotizing pancreatitis

Min Lin, Wei-Chang Chen, Le-Ning Xue, Ke-Qun Xu, Xiao-Yong Wang, Yong Tan

Min Lin, Le-Ning Xue, Ke-Qun Xu, Xiao-Yong Wang, Yong Tan, Department of Gastroenterology, the Second Hospital of Changzhou, Changzhou 213000, Jiangsu Province, China

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

Supported by: the Program of Nanjing Medical University, No. 2011NJMU081

Correspondence to: Min Lin, Attending Physician, Department of Gastroenterology, the Second Hospital of Changzhou, Changzhou 213000, Jiangsu Province, China. tianya-liulang@sohu.com

Received: 2011-08-07 Revised: 2012-03-28

Accepted: 2012-04-19 Published online: 2012-05-28

## Abstract

**AIM:** To detect the expression of Toll-like receptor 4 gene (TLR4) in the ileum of pigs with acute necrotizing pancreatitis (ANP).

**METHODS:** Eight pigs were randomized into ANP group and control group. ANP was induced by retrograde injection of sodium taurocholate. Blood levels of DAO were measured at various time points. Endotoxin concentration was determined using a commercial kit. The expression of tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), interleukin

(IL)-6 and Toll-like receptor (TLR) 4 mRNAs in the ileum was assayed by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR).

**RESULTS:** Compared to the control group, plasma endotoxin concentrations and serum DAO levels increased significantly (both  $P < 0.05$ ), DAO levels in the ileal tissue homogenate decreased ( $P < 0.05$ ), and expression of TLR4, TNF- $\alpha$ , and IL-6 mRNAs was significantly up-regulated (all  $P < 0.05$ ) in the ANP group. The expression levels of TLR4 mRNA were correlated with DAO levels in ileal tissue ( $r = -0.762$ ,  $P = 0.028$ ) and plasma endotoxin concentrations ( $r = 0.778$ ,  $P = 0.023$ ).

**CONCLUSION:** Expression of TLR4 mRNA increased in the ileum of ANP pigs, and TLR4 mRNA overexpression may correlate with intestinal mucosa injury and development of enterogenic infection.

**Key Words:** Acute necrotizing pancreatitis; Toll-like receptor 4; Intestinal mucosa injury

Lin M, Chen WC, Xue LN, Xu KQ, Wang XY, Tan Y. Significance of expression of Toll-like receptor 4 in the intestinal tract of pigs with acute necrotizing pancreatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(15): 1338-1341

## 摘要

**目的:** 探讨猪急性坏死性胰腺炎(acute necrotizing pancreatitis, ANP)回肠组织中Toll样受体4(Toll-like receptor 4, TLR4)的表达及其意义。

**方法:** 选择太湖梅山猪, 随机分成对照组(C,  $n = 4$ )、急性坏死性胰腺炎组(ANP,  $n = 4$ )。诱导制备ANP模型。用分光光度法检测血清及回肠组织匀浆中二胺氧化酶(DAO)活性; 动态比浊法检测血浆内毒素水平; RT-PCR检测回肠黏膜组织TLR4、TNF- $\alpha$ 及IL-6 mRNA表达。

**结果:** ANP组回肠组织DAO水平明显低于C组, 血清中DAO明显升高( $P < 0.05$ )。ANP组血浆内

## ■同行评议者

郝建宇, 教授, 首都医科大学附属北京朝阳医院消化内科; 白雪巍, 副主任医师, 哈尔滨医科大学



毒素水平较C组明显升高( $P < 0.05$ ); 回肠黏膜组织TLR4、TNF- $\alpha$ 、IL-6 mRNA在C组表达非常低, ANP组表达明显增加; TLR4 mRNA表达水平与肠黏膜DAO水平呈负相关( $r = -0.762, P = 0.028$ ), 与血浆内毒素呈正相关( $r = 0.778, P = 0.023$ ).

**结论:** ANP时回肠组织内TLR4 mRNA表达上调, 可能与ANP肠黏膜屏障功能障碍有关; 其可能机制与TLR4介导激活核转录因子NF- $\kappa$ B信号转导途径有关.

**关键词:** 急性坏死性胰腺炎; Toll样受体4; 肠黏膜屏障功能障碍

林敏, 陈卫昌, 薛乐宁, 徐克群, 王晓勇, 谭勇. Toll样受体4在猪急性坏死性胰腺炎肠道组织中的表达及其意义. 世界华人消化杂志 2012; 20(15): 1338-1341  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1338.asp>

## 0 引言

急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)是临床常见的急腹症之一, 近年来研究认为细菌易位(bacterial translocation, BT)感染, 是诱发和加重“二次打击”并引起全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS)及多器官功能衰竭综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)的重要因素<sup>[1]</sup>. 在AP早期, 肠道是SIRS的一个靶器官, 而肠屏障功能损害所致的肠道细菌或毒素易位是AP时细菌入侵的主要途径<sup>[2]</sup>. Toll样受体4(Toll-like receptor 4, TLR4)是天然免疫系统识别病原微生物的主要受体, 在天然免疫反应中具有重要的作用. TLR4可特异性识别细菌脂多糖(lipopolysaccharide, LPS), 在诱导细胞反应中具有关键作用<sup>[3]</sup>. TLR4的组织分布较广泛, 血管内皮细胞、单核细胞、中性粒细胞、树突状细胞、小肠上皮细胞<sup>[4]</sup>都有其表达. 本实验通过观察猪ANP时回肠组织TLR4的表达情况, 旨在探讨TLR4在ANP肠屏障损害中的作用.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 成年健康♂太湖梅山猪(苏州大学实验动物中心提供), 采用随机排列表法将猪分为急性坏死性胰腺炎组(ANP,  $n = 4$ )和对照组(C,  $n = 4$ ), 体质量 $12 \text{ kg} \pm 1.6 \text{ kg}$ . 使用许可证号: SYXK苏2007-0035. 采用逆行胰管穿刺注射5%牛黄胆酸钠溶液 $1 \text{ mL/kg}$ 体质量(压力 $100 \text{ mmHg}$ ), 诱导

制备ANP模型<sup>[5]</sup>. 对照组仅行胰管插管, 不注射药物. 术中静脉补液, 维持正常血容量. 电热毯维持动物体温.

### 1.2 方法

**1.2.1 标本取材:** 各组于模型诱导前30 min(Tn)、制模后0 h(T0)、6 h(T1)、24 h(T2)、48 h(T3)、72 h(T4)时间点采集静脉血2 mL加入无热源肝素抗凝管, 离心( $4^\circ\text{C}$ ,  $3\,500 \text{ r/min}$ )10 min分离血浆,  $-70^\circ\text{C}$ 保存, 待测内毒素浓度; 采集静脉血2 mL加入桔红色BD真空采血管中(内附纤维蛋白酶促凝剂), 置于 $37^\circ\text{C}$ 恒温水浴箱中, 水浴30 min后离心( $3\,500 \text{ r/min}$ )10 min分离血清后分装,  $-70^\circ\text{C}$ 保存, 待测DAO活性. 术后72 h处死猪, 立即提取回肠组织, 回肠选取距回盲部5 cm处回肠肠段5 cm, 纵行剖开, 生理盐水清洗肠内容物, 滤纸吸干, 组织修剪成 $2 \text{ cm} \times 1 \text{ cm} \times 0.5 \text{ cm}$ 大小, 液氮( $-196^\circ\text{C}$ )冻存.

**1.2.2 血浆内毒素定量检测:** 采用鲎试剂酶反应显色法(MB-80微生物快速动态检测系统)检测. 取血用试管经严格的去热源处理. 操作过程按检测系统的操作流程进行.

**1.2.3 分光光度法检测血清和回肠组织DAO活性:** 分别取血清、回肠组织匀浆 $80 \mu\text{L}$ , 加入试剂 $800 \mu\text{L}$ , 混匀, 倒入 $0.5 \text{ cm}$ 光径的石英比色皿中, 20 s时读取 $A_{1\,340}$ 值, 立即放入 $37^\circ\text{C}$ 水浴锅水浴10 min, 20 s后读取 $A_{2\,340}$ 值, 按照说明书计算DAO活力(U/mL).

**1.2.4 RT-PCR检测回肠黏膜组织TLR4、TNF- $\alpha$ 、IL-6 mRNA水平:** 从液氮中取出冻存的肠组织, 以TRIzol法提取总RNA, 以GAPDH作为内参, 用半定量RT-PCR进行扩增. 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳, 在 $254 \text{ nm}$ 紫外光透视下对结果进行观察、扫描, 并对凝胶图像使用UVISOFT软件进行数据处理, 用目的条带的平均灰度与内参条带的平均灰度之比来表示目的基因表达的相对含量. GAPDH引物设计基于(GenBank accession No. DQ845173): 正向引物5'-TTGT-GATGGGCGTGAACC-3'(nt169-186), 反向引物5'-TCCTCGCGTGCTCTTGCTG-3'(nt808-825); TLR4引物设计基于(GenBank accession No. NM001113039): 正向引物5'-GAT ACA CCA TCG GCT CTG-3'(nt1379-1396), 反向引物5'-ACATC-CACGTTGTCTTCC-3'(nt2236-2253); TNF- $\alpha$ 引物设计基于(GenBank accession No. X57321): 正向引物5'-TGCCCAGATTCAGCAAAGTC-CA-3'(nt273-294), 反向引物5'-GCCACCAC-

### ■研究前沿

SAP时肠道细胞易位(BT)和肠源性内毒素血症构成机体第二次打击, 导致胰腺组织继发感染和白细胞过度激活, 多种细胞因子释放, 导致炎症递质级联反应, 进一步诱发和加重SIRS及MODS等并发症. 因此研究SAP时肠屏障损伤的因素及防治措施尤为重要.

## ■创新盘点

本实验通过检测下游细胞因子TNF- $\alpha$ 、IL-6 mRNA的转录表达,从而间接探讨TLR4可能通过内毒素/TLR4/NF- $\kappa$ B信号传导途径致肠黏膜损伤。

表 1 各组不同时间点血浆内毒素变化 ( $n = 4$ , ng/L, mean  $\pm$  SD)

分组	术前	术后0 h	术后6 h	术后24 h	术后48 h	术后72 h
C组	<2.236	<2.236	<2.236	<2.236	3.271 $\pm$ 2.6	6.083 $\pm$ 4.80
ANP组	<2.236	23.68 $\pm$ 18.4	33.09 $\pm$ 22.2	67.99 $\pm$ 10.2	160.4 $\pm$ 46.6	69.40 $\pm$ 12.0

表 2 ANP组及C组制模前后血清DAO变化情况 (U/mL, mean  $\pm$  SD)

分组	术前	术后	术后6 h	术后24 h	术后48 h	术后72 h
C组	15.37 $\pm$ 0.08	13.97 $\pm$ 1.05	14.49 $\pm$ 3.07	20.25 $\pm$ 2.02	21.83 $\pm$ 0.37	24.62 $\pm$ 1.13
ANP组	27.59 $\pm$ 1.23	32.65 $\pm$ 3.67	42.6 $\pm$ 3.14	54.48 $\pm$ 2.09	69.67 $\pm$ 2.55	85.21 $\pm$ 3.32

两组血清DAO均数比较,  $P < 0.05$ ; 各时间点之间DAO均数比较,  $P < 0.05$ 。

表 3 回肠黏膜组织TNF- $\alpha$ 、IL-6因子及TLR4-mRNA检测值 ( $n = 4$ , mean  $\pm$  SD)

分组	TLR4	TNF- $\alpha$	IL-6
C组	0.092 $\pm$ 0.007	0.076 $\pm$ 0.006	0.030 $\pm$ 0.007
ANP组	0.817 $\pm$ 0.138 <sup>a</sup>	0.759 $\pm$ 0.039 <sup>a</sup>	0.750 $\pm$ 0.046 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs C组。

GCTCTTCTGCCTAC-3'(nt793-814); IL-6引物设计基于(GenBank accession No. NM214022): 正向引物5'-GCCACCACGCTCTTCTGCCTAC-3'(nt313-334), 反向引物5'-TGCCAGATTTCAGCAAAGTCCA-3'(nt833-854)。

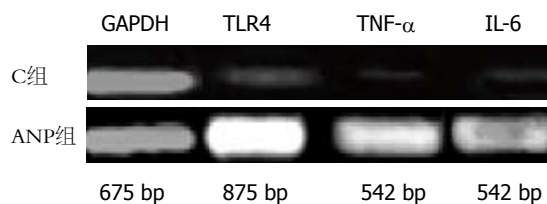
**统计学处理** 数据结果用mean  $\pm$  SD. 采用SASV8.0软件进行统计处理, 数值变量比较采用 $t$ 检验, 组织学评分采用Wilcoxon检验, 相关性分析用Spearman相关性分析法.  $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 血浆内毒素** 与C组相比, ANP组血浆内毒素水平明显升高( $P < 0.05$ , 表1)。

**2.2 二胺氧化酶活性** ANP组回肠组织DAO水平(37 U/L  $\pm$  2.7 U/L)明显低于C组(108 U/L  $\pm$  6.2 U/L,  $P < 0.05$ )。ANP动物模型诱导成功后血清中DAO逐渐升高( $P < 0.05$ )。造模后各时间点与C组比较均有显著差异( $P < 0.05$ , 表2)。

**2.3 回肠黏膜组织TNF- $\alpha$ 、IL-6因子及TLR4-mRNA表达** RT-PCR结果显示, C组回肠黏膜组织低表达TNF- $\alpha$ 、IL-6及TLR4-mRNA(图1), ANP组TNF- $\alpha$ 、IL-6及TLR4-mRNA的表达量明显增加, 同C组相比差异有统计学意义( $P < 0.05$ , 表3)。

图 1 回肠黏膜组织TNF- $\alpha$ 、IL-6因子及TLR4-mRNA表达的变化。

**2.4 ANP时TLR4的表达与肠黏膜损害的关系** 将所检测的TLR4 mRNA表达量分别与血浆内毒素及DAO水平进行相关性分析, TLR4的表达水平与肠黏膜DAO水平明显相关( $r = -0.762$ ,  $P = 0.028$ ), 也与血浆内毒素相关( $r = 0.778$ ,  $P = 0.023$ )。

## 3 讨论

近年来研究认为, 肠道是感染细菌的来源<sup>[6]</sup>。SAP时肠道BT和肠源性内毒素血症构成机体第二次打击, 导致胰腺组织继发感染和白细胞过度激活, 多种细胞因子释放, 导致炎症递质级联反应, 进一步诱发和加重SIRS及MODS等并发症<sup>[1]</sup>。因此研究SAP时肠屏障损伤的因素及防治措施尤为重要。

DAO存在于哺乳动物类动物的黏膜或绒毛上层, 其中大部分存在于回肠黏膜绒毛, 且主要位于肠绒毛顶端细胞内。坏死肠黏膜细胞脱落入肠腔, 使肠黏膜DAO活性降低; 当肠腔DAO进入肠细胞间隙淋巴管和血流, 血DAO水平则升高, 肠黏膜和血中DAO活性可反映肠上皮细胞完整性, 因此本实验通过检测肠黏膜和血中DAO变化反映肠道屏障功能状态<sup>[7]</sup>。

远端小肠和结肠有大量细菌, 而内毒素是存在于革兰氏阴性细菌细胞壁内, 在细菌死后细

胞壁崩解时释出,活菌亦可以出胞形式释出内毒素<sup>[8]</sup>。当肠屏障功能障碍时,对病原微生物的阻止作用下降,导致门静脉中内毒素大量增加,循环血中出现可检出的内毒素,称之为“内毒素血症(endotoxemia)”<sup>[9]</sup>。因此,血浆内毒素水平可作为评估肠黏膜通透性及肠屏障功能的客观指标。本实验采用鲎试剂酶反应显色法检测血浆内毒素浓度,结果发现,ANP组血浆内毒素水平明显高于C组。

肠道免疫屏障主要由肠道黏膜上皮的免疫相关组织(如Peyer结、MLN)、细胞(如树突状细胞、巨噬细胞、T细胞及B细胞等)和分子(抗原肽、免疫球蛋白、溶酶等)共同构成。免疫系统的激活受到肠道上皮细胞屏障功能的调节,以及由细胞因子所介导的肠道上皮细胞之间相互作用的调节<sup>[10]</sup>。SAP时肠上皮细胞屏障被破坏,需要一个快速的宿主反应,限制细菌及其产物到达黏膜,这主要依靠肠道天然免疫系统<sup>[11]</sup>。微生物引发一个宿主保护反应,是通过激活一个进化上高度保守、原始的模式识别系统。其中一类模式识别受体是病原体相关分子模式(pathogen-associated molecular pattern, PAMP),该结构只有微生物中的病原体所产生,非宿主所具有,如革兰氏阴性菌种的LPS分子<sup>[12]</sup>。

TLR属病原相关分子模式跨膜受体,中性粒细胞、单核-巨噬细胞、肝脏枯否氏细胞、肠上皮细胞等均有该受体的表达,他对病原体的识别、信号的传导、免疫反应激活中起重要作用<sup>[13]</sup>。在TLR诸多成员中,TLR4是介导内毒素信号跨膜传导主要受体。内毒素/TLR4/NF- $\kappa$ B信号传导途径是介导炎症反应重要的信号传导通路。内毒素与TLR4结合后在辅助分子CD14和MD-2等的介导下激活NF- $\kappa$ B,从而启动其下游细胞因子(如TNF- $\alpha$ 、IL-6等)基因的转录表达,介导炎症反应<sup>[14]</sup>。本实验通过检测下游细胞因子TNF- $\alpha$ 、IL-6-mRNA的转录表达,从而间接探讨TLR4可能通过内毒素/TLR4/NF- $\kappa$ B信号传导途径致肠黏膜损伤。

TLR4介导信号转导途径致肠黏膜损伤是一个复杂过程,牵涉多种信号分子和信号转导途径,而且不同种类的内毒素,不同的效应细胞机制都不尽相同,同样体内和离体实验的结果都会有差异。多种信号转导途径并不是孤立的,很可能存在许多未被发现的分子,使他们相互作

用、相互影响,而构成一个复杂的信号传递网络。因此,TLR4参与SAP肠屏障功能障碍的具体机制有待于进一步研究。

#### 4 参考文献

- 1 Rotstein OD. Pathogenesis of multiple organ dysfunction syndrome: gut origin, protection, and decontamination. *Surg Infect (Larchmt)* 2000; 1: 217-223; discussion 223-225
- 2 Fritz S, Hackert T, Hartwig W, Rossmanith F, Strobel O, Schneider L, Will-Schweiger K, Kommerell M, Büchler MW, Werner J. Bacterial translocation and infected pancreatic necrosis in acute necrotizing pancreatitis derives from small bowel rather than from colon. *Am J Surg* 2010; 200: 111-117
- 3 Buchholz BM, Bauer AJ. Membrane TLR signaling mechanisms in the gastrointestinal tract during sepsis. *Neurogastroenterol Motil* 2010; 22: 232-245
- 4 Moue M, Tohno M, Shimazu T, Kido T, Aso H, Saito T, Kitazawa H. Toll-like receptor 4 and cytokine expression involved in functional immune response in an originally established porcine intestinal epitheliocyte cell line. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1780: 134-144
- 5 Chan YC, Leung PS. Acute pancreatitis: animal models and recent advances in basic research. *Pancreas* 2007; 34: 1-14
- 6 Balzan S, de Almeida Quadros C, de Cleva R, Zilberstein B, Cecconello I. Bacterial translocation: overview of mechanisms and clinical impact. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22: 464-471
- 7 Goto T, Matsubara T, Yoshizawa Y, Sasaya S, Nemoto H, Sanada Y, Moriyama K, Kouchi Y. [Diamine oxidase as blood biomarker in rats and humans to GI tract toxicity of fluorouracil anti-cancer drugs]. *Gan To Kagaku Ryoho* 2011; 38: 765-769
- 8 冯永强, 王德昌, 王坤, 冷向锋, 肖虎, 郭丹凤. 淋巴途径在烫伤大鼠肠道细菌移位中的作用. *中华烧伤杂志* 2011; 27: 49-53
- 9 Sharma B, Srivastava S, Singh N, Sachdev V, Kapur S, Saraya A. Role of probiotics on gut permeability and endotoxemia in patients with acute pancreatitis: a double-blind randomized controlled trial. *J Clin Gastroenterol* 2011; 45: 442-448
- 10 Yuan Q, Walker WA. Innate immunity of the gut: mucosal defense in health and disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2004; 38: 463-473
- 11 Bailey M, Haverson K, Inman C, Harris C, Jones P, Corfield G, Miller B, Stokes C. The development of the mucosal immune system pre- and post-weaning: balancing regulatory and effector function. *Proc Nutr Soc* 2005; 64: 451-457
- 12 Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006; 124: 783-801
- 13 Alvarez B, Revilla C, Chamorro S, López-Fraga M, Alonso F, Domínguez J, Ezquerro A. Molecular cloning, characterization and tissue expression of porcine Toll-like receptor 4. *Dev Comp Immunol* 2006; 30: 345-355
- 14 Hooper LV, Gordon JI. Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science* 2001; 292: 1115-1118

#### ■同行评价

本研究采用大动物进行相关研究,具有一定的创新性,但例数较少,可能对结果产生影响,望继续增加例数进一步研究。

编辑 李军亮 电编 鲁亚静

# 米氮平早期干预对轻度胰腺癌恶液质模型进食和营养状况的影响

吴建华, 贾林, 江舒曼

## ■背景资料

约80%的胰腺癌患者在确诊时已出现恶液质(cachexia), 导致患者对化疗耐受性降低, 降低晚期肿瘤患者生活质量。

吴建华, 贾林, 江舒曼, 广州医学院附属广州市第一人民医院消化内科 广东省广州市 510180

吴建华, 在读硕士, 主要从事消化系统疾病的研究。

作者贡献分布: 此课题由贾林与吴建华设计; 动物模型制备、实验操作、数据整理统计、论文写作由吴建华完成; 论文校正由贾林与江舒曼完成。

通讯作者: 贾林, 教授, 主任医师, 510180, 广东省广州市, 广州医学院附属广州市第一人民医院消化内科。

jialin@medmail.com.cn

电话: 020-81628678

收稿日期: 2012-01-20 修回日期: 2012-03-15

接受日期: 2012-04-17 在线出版日期: 2012-05-28

## Early treatment with mirtazapine improves food intake and nutritional status in a gemcitabine-induced mild cachexia mouse model with pancreatic cancer

Jian-Hua Wu, Lin Jia, Shu-Man Jiang

Jian-Hua Wu, Lin Jia, Shu-Man Jiang, Department of Gastroenterology, the First People's Hospital Affiliated to Guangzhou Medical College, Guangzhou 510180, Guangdong Province, China

Correspondence to: Lin Jia, Professor, Chief Physician, Department of Gastroenterology, the First People's Hospital Affiliated to Guangzhou Medical College, Guangzhou 510180, Guangdong Province, China. jialin@medmail.com.cn

Received: 2012-01-20 Revised: 2012-03-15

Accepted: 2012-04-17 Published online: 2012-05-28

## Abstract

**AIM:** To investigate the effect of early treatment with mirtazapine on food intake and nutritional status in a gemcitabine-induced mild cachexia mouse model with pancreatic cancer.

**METHODS:** After a subcutaneous xenograft model of pancreatic cancer was established, 21 xenograft nude mice were randomly and equally divided into control group, early mirtazapine treatment group and late mirtazapine treatment group. The two treatment groups were given 10 mg/(kg·d) mirtazapine once daily by oral gavage from day 1 and day 10 after transplantation, respectively. All animals were given 50 mg/kg of gemcitabine i.

p. on days 10, 13 and 16 after transplantation. All mice were sacrificed on day 28. Body weight, food intake, tumor size, subcutaneous fat, arm circumference and the time-effect relationship were compared among the three groups.

**RESULTS:** There were no significant differences in tumor size, subcutaneous fat and arm circumference among the three groups (all  $P > 0.05$ ). At week 4, food intake was significantly higher in the early mirtazapine treatment group than in the other two groups (both  $P < 0.05$ ). The body weight ( $18.05 \text{ g} \pm 0.68 \text{ g}$ ) in the early mirtazapine treatment group was significantly higher than that in the control group ( $17.24 \text{ g} \pm 0.53 \text{ g}$ ,  $P < 0.05$ ), but had no significant difference with that in the late mirtazapine treatment group ( $17.65 \text{ g} \pm 0.60 \text{ g}$ ,  $P > 0.05$ ).

**CONCLUSION:** Early treatment with mirtazapine significantly improves food intake in the Gemcitabine-induced mild cachexia mouse model with pancreatic cancer, it can also postpone the processes of cachexia to some extent.

**Key Words:** Pancreatic neoplasms; Mild cachexia; Antidepressive agents; Mirtazapine; Gemcitabine

Wu JH, Jia L, Jiang SM. Early treatment with mirtazapine improves food intake and nutritional status in a gemcitabine-induced mild cachexia mouse model with pancreatic cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(15): 1342-1345

## 摘要

**目的:** 探讨抗抑郁药米氮平早期干预对轻度胰腺癌恶液质模型进食量和营养状况的影响。

**方法:** 21只胰腺癌裸鼠皮下移植瘤模型随机分为对照组(A组)、米氮平早期干预组(B组)、米氮平后期治疗组(C组), 每组7只。B、C组分别在术后第1天和第10天开始以米氮平10 mg/(kg·d), 灌胃, 术后第10、13、16天, 3组动物分别腹腔注射吉西他滨(50 mg/kg)。术后第28天处死裸鼠, 比较3组动物体重、进食

## ■同行评议者

陈其奎, 教授, 中山大学附属第二医院消化内科

量、肿瘤体积、皮下脂肪和臂围的变化。

**结果:** 3组胰腺癌移植瘤体积、皮下脂肪和臂围无明显差异( $P>0.05$ )。第4周B组进食量显著高于A组和C组( $P<0.05$ )；第25天B组体重(18.05 g $\pm$ 0.68 g)显著高于A组(17.24 g $\pm$ 0.53 g,  $P<0.05$ )，稍高于C组(17.65 g $\pm$ 0.60 g,  $P>0.05$ )。

**结论:** 米氮平早期干预能显著改善轻度胰腺癌相关恶液质模型的进食量，并能在一定程度上延缓恶液质进程。

**关键词:** 胰腺肿瘤；轻度恶液质；抗抑郁药；米氮平；吉西他滨

吴建华, 贾林, 江舒曼. 米氮平早期干预对轻度胰腺癌恶液质模型进食和营养状况的影响. 世界华人消化杂志 2012; 20(15): 1342-1345  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1342.asp>

## 0 引言

约80%的胰腺癌患者在确诊时已出现恶液质(cachexia)<sup>[1,2]</sup>，多表现为厌食、体质量减轻、脂肪和骨骼肌分解增加，厌食与体质量减轻是其最明显的临床表现，是导致恶性肿瘤患者晚期生活质量下降和死亡的直接原因<sup>[3]</sup>。有研究报道指出<sup>[4]</sup>，不管肿瘤恶性程度如何，患者体质量下降越多，其生存期越短，但迄今未见早期干预胰腺癌恶液质模型的治疗研究报道。抗抑郁药米氮平在一定程度上可改善胰腺癌模型的进食量和营养状况<sup>[5]</sup>。在成功建立轻度胰腺癌恶液质模型基础上，本文通过分析不同时期使用米氮平对轻度胰腺癌恶液质模型体质量、营养状况和进食量的影响及其时-效关系，旨在评价米氮平早期干预对轻度胰腺癌恶液质模型的疗效，为临床干预奠定实验基础。

## 1 材料和方法

1.1 材料 21只Balb/c裸小鼠，4-6周龄，20-22 g，SPF级，上海斯莱克实验动物有限公司提供，在中山大学动物实验中心饲养和实验。米氮平(Mirtazapine)由荷兰欧加农公司提供；吉西他滨购自美国礼来公司，高转移人胰腺癌细胞株SW1990由中山大学附属第二医院张世能教授惠赠。

### 1.2 方法

1.2.1 胰腺癌皮下移植瘤动物模型建立与分组：先将0.2 mL的SW1990细胞悬液( $2-3 \times 10^7$ /mL)接

种于裸小鼠右侧近前腋的背部皮下；待长至近1 cm<sup>3</sup>的实体瘤后，取出并剪成1 mm<sup>3</sup>的均匀组织块，转种于21只裸鼠右侧颈背部皮下，建立胰腺癌皮下移植瘤模型，并随机分为A组(对照组)、B组(米氮平早期干预组)和C组(米氮平后期治疗组)，每组7只。B组和C组动物在皮下移植瘤术后，分别从移植瘤第1天、第10天开始以米氮平10 mg/(kg·d)，灌胃。A组灌以等量生理盐水，每天1次；在皮下移植瘤术后第10、13、16天，3组动物以吉西他滨(50 mg/kg体质量)腹腔注射，共3次。术后28 d颈椎脱臼处死裸鼠，取出瘤体。

1.2.2 观察指标：(1)记录实验前及建模后每周1次的日均进食量(每组动物2只1笼，每周每笼食物消耗量分别为W1、W2、W3、W4，每笼每只日均进食量为 $1/7 \times 1/2 \times W1$ 、 $1/7 \times 1/2 \times W2$ 、 $1/7 \times 1/2 \times W3$ 、 $1/7 \times W4$ )；(2)测量实验前及建模后每隔3 d的体质量，实验结束时处死动物，称去瘤后鼠重；(3)每隔3 d用游标卡尺测量肿瘤的最大长径A和最小短径B，按公式 $V = 0.5 \times A \times B^2$ 计算肿瘤体积，实验结束时取出移植瘤，称瘤重；(4)每隔3 d用游标卡尺测量动物的腹部皮褶厚度，皮下脂肪 = 皮褶厚度 $\times 0.5$ ；(5)每隔3 d用游标卡尺测量前臂直径(d)，按公式 $C = d \times 3.14$ 计算前臂周径。

**统计学处理** 计量资料数据均采用mean $\pm$ SD表示。应用SPSS17.0统计软件，行单因素方差分析及组间两两比较的SNK检验， $P<0.05$ 表示有统计学差异。

## 2 结果

2.1 米氮平对轻度恶液质模型移植瘤体积和瘤重的影响及其时-效关系 裸鼠接种移植瘤后，肿瘤体积随着实验时间的延长不断增加。整个实验过程中3组动物移植瘤体积均无显著性差异( $P>0.05$ )。实验结束时处死动物，取出瘤体，A、B、C组瘤重分别为：0.42 g $\pm$ 0.09 g、0.37 g $\pm$ 0.11 g、0.40 g $\pm$ 0.10 g，但3组间无显著性差异( $P>0.05$ ，表1)。

2.2 米氮平对轻度恶液质模型日均进食量的影响及其时-效关系 各组裸鼠的基础进食量无显著差异。在注射吉西他滨后各组裸鼠进食量均有下降，其中A组下降最明显，其次为C组，B组下降幅度最小。在第3周，B组进食量(3.95 g $\pm$ 0.14 g)明显高于A组(3.54 g $\pm$ 0.10 g,  $P<0.05$ )，稍高于C组(3.72 g $\pm$ 0.15 g,  $P>0.05$ )；第4周，B组进食量明显高于A组和C组( $P<0.05$ ，表2)。

### ■研究前沿

许多研究发现，食欲刺激剂及营养支持可以改善恶液质患者脂肪的丢失，但如何逆转其已发生的肌肉分解仍是一个亟需解决的问题。



## ■相关报道

Klein等研究报道, 预防或逆转癌症患者体质量减轻可以延迟死亡, 癌症患者体质量减轻的速度是用来评价治疗恶液质是否有用的最简便方法.

表 1 米氮平对轻度胰腺癌恶液质模型体质量及营养指标的影响及时-效关系 ( $n = 7$ , mean  $\pm$  SD)

时间(d)	分组	体质量(g)	瘤体积(mm <sup>3</sup> )	皮下脂肪(mm)	臂围(mm)
0	A组	21.64 $\pm$ 0.96	0.00	0.74 $\pm$ 0.14	19.45 $\pm$ 1.21
	B组	21.75 $\pm$ 0.75	0.00	0.71 $\pm$ 0.12	19.52 $\pm$ 0.88
	C组	21.85 $\pm$ 0.69	0.00	0.74 $\pm$ 0.09	19.53 $\pm$ 1.06
5	A组	21.51 $\pm$ 0.89	37.67 $\pm$ 7.57	0.72 $\pm$ 0.14	19.03 $\pm$ 0.81
	B组	21.69 $\pm$ 0.79	37.12 $\pm$ 10.55	0.70 $\pm$ 0.11	19.20 $\pm$ 0.73
	C组	21.70 $\pm$ 0.64	37.28 $\pm$ 13.72	0.73 $\pm$ 0.10	19.04 $\pm$ 0.85
9	A组	21.20 $\pm$ 0.73	62.59 $\pm$ 24.06	0.70 $\pm$ 0.13	18.29 $\pm$ 0.88
	B组	21.59 $\pm$ 0.75	58.09 $\pm$ 26.00	0.70 $\pm$ 0.10	18.51 $\pm$ 0.65
	C组	21.46 $\pm$ 0.61	60.88 $\pm$ 27.10	0.71 $\pm$ 0.12	18.37 $\pm$ 0.85
13	A组	20.86 $\pm$ 0.71	105.39 $\pm$ 19.92	0.69 $\pm$ 0.09	17.24 $\pm$ 0.52
	B组	21.14 $\pm$ 0.52	100.21 $\pm$ 21.87	0.69 $\pm$ 0.10	17.58 $\pm$ 0.67
	C组	21.03 $\pm$ 0.65	101.46 $\pm$ 18.75	0.67 $\pm$ 0.13	17.56 $\pm$ 0.68
17	A组	20.15 $\pm$ 0.67	174.77 $\pm$ 15.16	0.66 $\pm$ 0.09	16.00 $\pm$ 0.62
	B组	20.50 $\pm$ 0.50	171.57 $\pm$ 16.94	0.68 $\pm$ 0.10	16.27 $\pm$ 0.67
	C组	20.38 $\pm$ 0.65	171.69 $\pm$ 18.32	0.67 $\pm$ 0.13	16.18 $\pm$ 0.74
21	A组	18.70 $\pm$ 0.58	258.54 $\pm$ 20.98	0.60 $\pm$ 0.10	15.13 $\pm$ 0.68
	B组	19.13 $\pm$ 0.55	246.88 $\pm$ 25.64	0.63 $\pm$ 0.10	15.31 $\pm$ 0.68
	C组	18.94 $\pm$ 0.59	252.70 $\pm$ 25.24	0.61 $\pm$ 0.10	15.24 $\pm$ 0.74
25	A组	17.24 $\pm$ 0.53	365.58 $\pm$ 17.63	0.50 $\pm$ 0.10	13.76 $\pm$ 0.65
	B组	18.05 $\pm$ 0.68 <sup>a</sup>	357.80 $\pm$ 15.75	0.52 $\pm$ 0.09	14.04 $\pm$ 0.54
	C组	17.65 $\pm$ 0.60	363.59 $\pm$ 18.40	0.51 $\pm$ 0.10	13.82 $\pm$ 0.76
28	A组	16.04 $\pm$ 0.66	472.62 $\pm$ 13.03	0.41 $\pm$ 0.07	13.06 $\pm$ 0.52
	B组	16.89 $\pm$ 0.73 <sup>a</sup>	466.95 $\pm$ 14.21	0.44 $\pm$ 0.08	13.25 $\pm$ 0.53
	C组	16.43 $\pm$ 0.58	471.32 $\pm$ 14.24	0.42 $\pm$ 0.08	13.07 $\pm$ 0.73

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs A组.

表 2 米氮平对轻度胰腺癌恶液质模型进食量的影响及时-效关系 ( $n = 7$ , g, mean  $\pm$  SD)

分组	基础值	7 d	14 d	21 d	28 d
A组	5.15 $\pm$ 0.12	5.13 $\pm$ 0.13	4.21 $\pm$ 0.10	3.54 $\pm$ 0.10	3.02 $\pm$ 0.16
B组	5.17 $\pm$ 0.15	5.19 $\pm$ 0.14	4.41 $\pm$ 0.16	3.95 $\pm$ 0.14 <sup>a</sup>	3.57 $\pm$ 0.11 <sup>c</sup>
C组	5.14 $\pm$ 0.17	5.13 $\pm$ 0.11	4.31 $\pm$ 0.12	3.72 $\pm$ 0.15	3.23 $\pm$ 0.15

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs A组; <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs C组.

2.3 米氮平对轻度恶液质模型体质量的影响及其时-效关系 各组裸鼠的基础体质量无显著差异. 在注射吉西他滨后各组裸鼠体质量均有下降, 其中A组下降最明显, 其次为C组, B组下降幅度最小. 在第17天, 3组动物体质量下降5%-7%, 从第25天起, B组体质量明显高于A组( $P < 0.05$ ), 稍高于C组( $P > 0.05$ ); 去瘤后, B组体质量(16.51 g  $\pm$  0.63 g)明显高于A组(15.61 g  $\pm$  0.59 g,  $P < 0.05$ ), 稍高于C组(16.01 g  $\pm$  0.60 g,  $P > 0.05$ , 表1).

2.4 米氮平对轻度恶液质模型皮下脂肪和臂围的影响及其时-效关系 各组裸鼠的皮下脂肪厚度在实验开始时无显著差异. 第17天, B组皮下脂肪

厚度(0.68 mm  $\pm$  0.10 mm)稍高于C组(0.67 mm  $\pm$  0.13 mm)和A组(0.66 mm  $\pm$  0.09 mm). 从21 d开始, 3组动物皮下脂肪厚度明显变薄. B组减少程度低于其他2组, 这种差异一直持续到实验结束, 但这种差异无统计学意义( $P > 0.05$ , 表1). 各组动物的臂围在实验开始时无显著差异. A组臂围在第17天后显著减小, C组臂围减小速度稍慢, 2组动物的臂围在不同时间点均小于B组, 但3组间无显著差异( $P > 0.05$ , 表1).

## 3 讨论

恶液质是由多因素引起的综合症状, 多发生于

肿瘤患者, 胰腺癌相关性恶液质的发病率可高达80%<sup>[3]</sup>. 恶液质除了降低癌症患者对放化疗的敏感性、使患者更易发生放化疗不良反应外, 还可降低手术切除率, 缩短患者生存期<sup>[6]</sup>. 对于晚期胰腺癌患者, WHO指出应该对患者早期就采用姑息治疗, 包括对躯体、心理和精神的统一治疗. 体质量下降与厌食是恶液质最常见的临床表现<sup>[7]</sup>. Uomo等<sup>[8]</sup>认为胰腺癌患者的体质量下降和厌食常与肿瘤本身引起的疼痛和化疗的不良反应有关, 加上胰腺癌相关抑郁症的发生率高达78.0%<sup>[9]</sup>, 可加速机体的体质量下降和厌食, 与恶液质形成了恶性循环. 因此, 改善恶液质患者的营养状况和维持其体质量成为了许多学者研究的重要课题.

对癌症恶液质进行早期干预与选择治疗肿瘤的方案同等重要<sup>[10]</sup>, Klein等<sup>[11]</sup>研究称, 预防或逆转癌症患者体质量减轻可以延迟死亡, 癌症患者体质量减轻的速度是用来评价治疗恶液质是否有效的最简便方法<sup>[10]</sup>; Bachmann等<sup>[12]</sup>临床研究发现体质量下降是影响胰腺癌患者预后的一个重要因素, 伴有恶液质的患者因发生远处转移而影响手术切除率(48.9%), 显著低于无恶液质患者(77.8%), 对于手术切除后的患者, 伴有体质量下降的患者的生存期短于无体质量下降的患者; Robinson等<sup>[6]</sup>研究称, 体质量下降<5%的患者其生存期较下降>5%的长.

Evans等<sup>[13]</sup>根据癌症患者体质量下降程度将恶液质分为轻(>5%)、中(>10%)、重(>15%)度. 米氮平作为去甲肾上腺素能和特异性5-羟色胺能抗抑郁剂(NaSSA)的代表, 通过阻断5-HT<sub>2</sub>、5-HT<sub>3</sub>受体和组织胺H<sub>1</sub>受体, 除了能改善抑郁症患者食欲、增加体质量, 还能有效缓解化疗引起的恶心、呕吐、食欲下降等并发症<sup>[14]</sup>, 结合我们前期实验研究结果, 米氮平对胰腺癌模型的进食量、体质量、营养状况和生物学行为有积极的改善作用<sup>[15]</sup>, 并能在一定程度上减轻大剂量(100 mg/kg)吉西他滨化疗的不良反应<sup>[16]</sup>, 本研究在建立起胰腺癌轻度恶液质模型的基础上, 采用米氮平对模型进行早期干预, 结果显示米氮平早期干预对轻度恶液质模型的进食量与体质量的下降速度有明显减缓作用, 对轻度胰腺癌恶液质模型的皮下脂肪和骨骼肌的分解速度也有减缓作用, 但米氮平未能逆转恶液质状态, 考虑与机体发生恶液质时体内能量代谢紊乱、多种细胞因子参与有关, 而米氮平不具备调节体内能量代谢及抑制细胞因子释放的作用. 本实

验证明, 对轻度癌症恶液质模型进行积极干预能取得一定的实验疗效, 至于临床应用前景, 尚需大样本、多中心的临床试验进一步验证.

#### 4 参考文献

- 1 Ryan DP, Grossbard ML. Pancreatic Cancer: Local Success and Distant Failure. *Oncologist* 1998; 3: 178-188
- 2 Splinter TA. Cachexia and cancer: a clinician's view. *Ann Oncol* 1992; 3 Suppl 3: 25-27
- 3 Fearon KC, Baracos VE. Cachexia in pancreatic cancer: new treatment options and measures of success. *HPB (Oxford)* 2010; 12: 323-324
- 4 Prado CM, Baracos VE, McCargar LJ, Reiman T, Mourtzakis M, Tonkin K, Mackey JR, Koski S, Pituskin E, Sawyer MB. Sarcopenia as a determinant of chemotherapy toxicity and time to tumor progression in metastatic breast cancer patients receiving capecitabine treatment. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 2920-2926
- 5 尚鸳鸯, 贾林. 抗抑郁药对胰腺癌移植瘤模型的进食及肿瘤生长的影响. *中华胰腺病杂志* 2008; 8: 227-229
- 6 Robinson DW, Eisenberg DF, Cella D, Zhao N, de Boer C, DeWitte M. The prognostic significance of patient-reported outcomes in pancreatic cancer cachexia. *J Support Oncol* 2008; 6: 283-290
- 7 Fearon KC. Cancer cachexia and fat-muscle physiology. *N Engl J Med* 2011; 365: 565-567
- 8 Uomo G, Gallucci F, Rabitti PG. Anorexia-cachexia syndrome in pancreatic cancer: recent development in research and management. *JOP* 2006; 7: 157-162
- 9 贾林, 尚鸳鸯, 江舒曼, 谢琦, 黄耀星, 谢德荣. 胰腺癌患者抑郁症状与生存质量的关系. *中华医学杂志* 2009; 89: 1847-1849
- 10 Coss CC, Bohl CE, Dalton JT. Cancer cachexia therapy: a key weapon in the fight against cancer. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2011; 14: 268-273
- 11 Klein S, Kinney J, Jeejeebhoy K, Alpers D, Hellerstein M, Murray M, Twomey P. Nutrition support in clinical practice: review of published data and recommendations for future research directions. Summary of a conference sponsored by the National Institutes of Health, American Society for Parenteral and Enteral Nutrition, and American Society for Clinical Nutrition. *Am J Clin Nutr* 1997; 66: 683-706
- 12 Bachmann J, Heiligensetzer M, Krakowski-Roosen H, Büchler MW, Friess H, Martignoni ME. Cachexia worsens prognosis in patients with resectable pancreatic cancer. *J Gastrointest Surg* 2008; 12: 1193-1201
- 13 Evans WJ, Morley JE, Argiles J, Bales C, Baracos V, Guttridge D, Jatoi A, Kalantar-Zadeh K, Lochs H, Mantovani G, Marks D, Mitch WE, Muscaritoli M, Najand A, Ponikowski P, Rossi Fanelli F, Schambelan M, Schols A, Schuster M, Thomas D, Wolfe R, Anker SD. Cachexia: a new definition. *Clin Nutr* 2008; 27: 793-799
- 14 Chochinov HM. Depression in cancer patients. *Lancet Oncol* 2001; 2: 499-505
- 15 Jia L, Shang YY, Li YY. Effect of antidepressants on body weight, ethology and tumor growth of human pancreatic carcinoma xenografts in nude mice. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 4377-4382
- 16 贾林, 尚鸳鸯. 抗抑郁药米氮平对吉西他滨治疗胰腺癌模型的辅助作用. *中华胰腺病杂志* 2009; 9: 380-382

#### ■同行评价

本文观察了抗抑郁药对胰腺癌肿瘤裸鼠营养状态的影响, 在肿瘤辅助治疗方面有一定的创意, 开拓了新思路, 有一定的临床参考价值.

# 心理护理干预在急诊胃镜止血中的应用及对患者焦虑紧张情绪的影响

李桂英, 胡云鹤

## ■背景资料

胃镜检查是一种可引起患者痛苦的手术, 整个检查又在患者意识清楚的状态下进行, 部分患者对胃镜检查过程不完全了解甚至误解, 术前术中容易产生紧张焦虑、恐惧的心理, 不愿意做胃镜检查, 导致不能很好地配合检查, 从而影响了疾病的早期诊断治疗, 以至延误病情, 错过最佳的治疗时机。

李桂英, 首都医科大学密云教学医院 北京市 101500  
胡云鹤, 中国医学科学院北京协和医学院肿瘤医院肿瘤研究所 北京市 100021  
通讯作者: 胡云鹤, 100021, 北京市朝阳区潘家园南里17号, 中国医学科学院北京协和医学院肿瘤医院肿瘤研究所。  
xiao\_he52@163.com  
电话: 010-87788759  
收稿日期: 2012-03-19 修回日期: 2012-04-25  
接受日期: 2012-05-07 在线出版日期: 2012-05-28

## Psychological nursing in patients during emergency gastroscopy: influence on patients' feelings of anxiety and stress

Gui-Ying Li, Yun-He Hu

Gui-Ying Li, Beijing Miyun County Hospital, Capital Medical University, Beijing 101500, China  
Yun-He Hu, Institute of Cancer Research, Tumor Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100021, China  
Correspondence to: Yun-He Hu, Institute of Cancer Research, Tumor Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100021, China. xiao\_he52@163.com  
Received: 2012-03-19 Revised: 2012-04-25  
Accepted: 2012-05-07 Published online: 2012-05-28

## Abstract

**AIM:** To investigate the efficacy of psychological nursing in patients receiving emergency gastroscopic examination, and to determine its influence on patients' feelings of anxiety and stress.

**METHODS:** A total of 152 patients receiving emergency gastroscopic examination were divided randomly into observation group ( $n = 76$ ) and control group ( $n = 76$ ). The observation group received psychological nursing before and during gastroscopy, while the control group received traditional methods of nursing care. The examination results including bleeding cause and hemostasis rates were compared between the two groups using the self-rating anxiety scale.

**RESULTS:** The detection rate of bleeding causes was not significantly different between the observation group and control group ( $P > 0.05$ ). The hemostasis rate in the observation group was significantly higher than that in the control group. The incidence of anxiety feeling before gastroscopic examination was 87%. Pre-gastroscopic examination anxiety was related to profession, personality, financial status and educational level. Anxiety and stress feelings improved significantly before and after psychological intervention in the observation group compared to the control group.

**CONCLUSION:** Psychological nursing can significantly improve anxiety and stress feelings of patients and help them receive gastroscopy smoothly during the procedure. Meanwhile, this effort can help obtain good hemostasis effect and improve the patient's satisfaction.

**Key Words:** Psychological nursing; Gastroscopy; Anxiety; Emergency nursing

Li GY, Hu YH. Psychological nursing in patients during emergency gastroscopy: influence on patients' feelings of anxiety and stress. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(15): 1346-1349

## 摘要

**目的:** 分析心理护理干预在急诊胃镜止血中的应用方法、效果及对患者焦虑紧张情绪的影响。

**方法:** 对需要行胃镜止血的152例急诊患者随机分为观察组76例和对照组76例, 观察组在治疗前及治疗过程中均给予心理护理干预, 对照组采用传统的胃镜检查护理方法。比较两组出血病因检出率及止血效果, 并用焦虑自评量表(SAS)进行评定。

**结果:** 观察组与对照组出血原因检出率比较无统计学差异( $P > 0.05$ ); 观察组止血率高于对照组( $P < 0.05$ ); 胃镜检查前患者的焦虑情绪发生率是87%, 术前情绪障碍与职业、性格、经

## ■同行评议者

何松, 教授, 重庆医科大学附属第二医院消化内科

济状况及受教育程度有关, 心理干预前后观察组自身及干预后的观察组与对照组比较, 焦虑紧张情绪改善显著( $P<0.01$ ).

**结论:** 急诊胃镜诊治过程中给予患者心理护理干预, 能明显改善胃镜检查患者的焦虑紧张情绪, 帮助患者克服心理障碍, 顺利进行检查, 同时获得良好的止血效果, 提高患者满意度.

**关键词:** 心理护理干预; 胃镜止血; 焦虑; 急诊护理

李桂英, 胡云鹤. 心理护理干预在急诊胃镜止血中的应用及对患者焦虑紧张情绪的影响. 世界华人消化杂志 2012; 20(15): 1346-1349  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1346.asp>

## 0 引言

消化系统疾病特别是上消化道出血是常见病多发病<sup>[1]</sup>, 随着胃镜技术的日趋完善和成熟, 胃镜止血已成为诊断、治疗上消化道出血的重要手段<sup>[2]</sup>. 但由于患者对这项技术不太了解, 术前极易产生焦虑紧张情绪, 以致影响检查的顺利进行和检查效果. 2010-01/2011-12, 我们对152例急诊胃镜止血患者进行了调查分析, 旨在了解胃镜止血患者术前的焦虑紧张状态及影响因素, 探讨术前心理护理干预对急诊胃镜止血患者效果及焦虑紧张情绪的影响.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 152例患者中, 男99例、女53例, 年龄17-76( $49.8\pm 21.4$ )岁, 病程0.5-25( $3.6\pm 2.4$ )年. 所有患者神志清楚, 均为24-48 h上消化道出血, 需行急诊胃镜诊断及止血治疗, 且符合胃镜止血适应证, 有主诊医生书写胃镜检查止血申请单. 术前均认真查体, 包括查肝功、乙肝五项、HIV抗体检测、出凝血时间、心电图. 所有患者无胃镜检查禁忌证, 有良好的语言沟通能力. 将152例受检患者随机分为观察组和对照组, 每组为76例. 两组患者在年龄、性别、文化程度、婚姻状况、经济状况、病情等一般资料无统计学差异( $P>0.05$ ), 具有可比性. 所有患者术前均签定胃镜检查知情同意书.

### 1.2 方法

**1.2.1 调查:** 应用自编患者一般情况调查问卷, 包括年龄、性别、职业、婚姻状况、经济状况、文化程度、性格、简要病史等, 焦虑紧张情绪评定用焦虑自评量表(SAS)<sup>[3]</sup>, 本量表为含20个项目的自评量表, 20个项目的正、反向记分相

加所得积分乘以1.25得标准分, 标准分50分为分界线, 既标准分 $\leq 50$ 分为无焦虑紧张,  $>51$ 分为有焦虑紧张. 入组后有责任护士完成患者一般情况调查问卷的填写, 所有入组患者在责任护士的指导下填写SAS, 对文化程度低不能完成SAS的患者, 由患者口述, 责任护士代其填写. 在完成护理干预后、胃镜检查止血前再进行一次SAS测评, 以评定心理干预的效果. 观察组除给予常规护理外, 主要给予心理护理干预; 对照组仅给予检查前的一般常规护理.

**1.2.2 心理护理干预:** 由经验丰富的主管护士进行, 心理护理干预贯穿于术前、术中. (1)建立良好的护患关系: 建立良好的护患关系是进行有效护理干预的基础, 包括认真倾听患者诉说病情, 关心体贴患者的痛苦, 耐心细致的解答患者及家属的疑问, 听取患者的意见和要求, 让患者了解病情, 解除其心理顾虑, 取得患者的高度信任; (2)认知干预: 向患者介绍有关疾病和胃镜检查止血的医学知识, 讲解胃镜检查止血的适应证、优越性及安全性, 让患者了解胃镜检查止血过程中可能出现的不适和反应, 检查过程中如何配合医生护士以最大限度地减轻这些不适和痛苦; (3)情绪干预: 给患者讲解情绪紧张对胃镜检查止血尤其对插管的不利影响, 给患者讲解其安全性, 缓解患者的紧张情绪; (4)放松训练<sup>[4]</sup>: 包括创造适宜的放松环境、呼吸放松、肌肉放松、想象放松等方法; (5)行为干预: 检查时责任护士守护在患者身边, 分散患者注意力使其全身放松, 护士及时指导、鼓励、帮助、引导患者配合检查, 如患者恶心时让其深呼吸、嘴角放低使胃内容物顺利排出并及时清除以避免发生呛咳, 增强患者的自信心, 使其处于最佳心理状态, 顺利的完成胃镜检查.

**1.2.3 止血判断标准:** 48 h内呕血及黑便停止者, 胃液无血, 血压、脉搏稳定者为显效; 48-72 h无继续出血现象, 血压、脉搏稳定者为有效; 72 h后继续出血者为无效. 总有效率 = 显效率 + 有效率.

**统计学处理** 采用SPSS13.0统计学软件对数据进行处理, 计数资料组比较采用 $\chi^2$ 检验, 计量资料组比较采用 $t$ 检验, 以 $P<0.05$ 为有统计学差异.

## 2 结果

**2.1 胃镜诊断检出率** 观察组患者胃镜诊断检出率86.8%, 对照组患者胃镜诊断检出率85.5%, 两组比较没有统计学差异( $P=0.453$ , 表1).

**2.2 胃镜止血效果** 观察组患者胃镜止血总有效

### ■应用要点

本次调查结果显示, 对胃镜检查患者实施积极的心理护理干预后, 患者发生躯体、心理应激的强度明显减轻, 检查时间也明显缩短, 止血效果显著, 提高了患者的满意度.

### ■ 同行评价

本文探讨在急诊胃镜止血中心理护理干预的作用, 有积极的临床指导意义。

表 1 2组胃镜诊断检出率比较结果 ( $n = 76$ )

分组	明确病因( $n$ )	病因不明( $n$ )	检出率(%)	$\chi^2$ 值	$P$ 值
观察组	66	10	86.8	0.562	0.453
对照组	65	11	85.5		

表 3 2组患者心理护理干预前后的SAS评分比较 ( $n = 76$ , mean  $\pm$  SD)

分组	干预前	干预后
观察组	50.3 $\pm$ 8.7	40.6 $\pm$ 8.2 <sup>b</sup>
对照组	51.1 $\pm$ 9.2	49.8 $\pm$ 7.8 <sup>d</sup>

<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 同组干预前; <sup>d</sup> $P < 0.01$  vs 观察组干预后。

率81.6%, 对照组患者胃镜止血总有效率67.1%, 两组比较有统计学差异( $P = 0.035$ , 表2)。

**2.3 SAS评分** 本调查对象胃镜检查患者的护理干预前焦虑发生率为87.0%。2组患者护理干预前后的SAS总分比较见表3。与术前焦虑紧张有关的因素分析表明, 脑力劳动者、内向性格者、公费或医保患者、受教育年限较长者术前产生焦虑紧张的比例较高。

### 3 讨论

随着医学模式由单一的生物学医学模式向生物-心理-行为-社会医学模式的转变<sup>[5]</sup>, 心理护理在临床中的应用愈来愈普及并受到重视。上消化系统疾病是受心理因素影响明显的疾病, 而胃镜检查是诊断治疗上消化系统疾病最准确可靠的先进方法。胃镜检查不仅可诊断而且可治疗上消化道内的病变, 可以钳取黏膜做病理诊断, 还可以在胃镜下通过连接微波治疗上消化系内的息肉、出血、狭窄等病变。并可以实时录像保存完整的资料。但是, 由于胃镜检查是一种可引起患者痛苦的手术, 整个检查又在患者意识清楚的状态下进行, 部分患者对胃镜检查过程不完全了解甚至误解, 术前术中容易产生紧张焦虑、恐惧的心理, 不愿意做胃镜检查, 导致不能很好地配合检查, 从而影响了疾病的早期诊断治疗, 以至延误病情, 错过最佳的治疗时机。所以, 对适合胃镜检查的患者进行心理护理干预, 使患者能早期及时的做胃镜检查是非常必要的。

本次调查结果显示, 对胃镜检查患者实施积极的心理护理干预后, 患者发生躯体、心理应激的强度明显减轻, 检查时间也明显缩短, 止血效果显著, 提高了患者的满意度。本研究中胃镜

表 2 2组胃镜止血效果比较 ( $n = 76$ , %)

分组	显效( $n$ )	有效( $n$ )	无效( $n$ )	总有效率	$\chi^2$ 值	$P$ 值
观察组	42(55.3)	20(26.3)	14(18.4)	81.6	6.648	0.035
对照组	23(30.3)	28(36.8)	25(32.9)	67.1		

检查患者都存在不同程度的焦虑紧张心理, 干预前达到焦虑标准的比例高达87%。尤其在脑力劳动者、性格内向、受教育年限较长患者中的比例较高, 与对疾病的过分关注和担忧以及对生理解剖和疾病知识、胃镜检查的先进性等一知半解考虑过多有关。心理护理干预能明显降低患者胃镜检查前的焦虑紧张程度。心理护理干预不仅能弥补患者胃镜检查知识的不足, 提高患者的认知水平, 有效地减轻患者的心理生理反应, 增强对检查的应激能力, 有利于消除焦虑紧张情绪对检查的影响。心理护理干预还有利于患者配合检查, 提高对检查的顺从性。心理护理干预还能在较短的时间内, 使患者掌握配合检查的方法, 使检查更顺利, 缩短了检查时间, 也减轻了患者的痛苦。随着医学模式的转变, 在诊断治疗疾病的过程中, 不能仅看到患者脏器局部的病理变化, 忽视患者的心理活动。只注意生理变化, 不注意心理变化, 这不仅影响医患关系的和谐, 更不利于疾病的康复。这种只见病不见人的传统的医学模式必须要改变。特别是在疾病的诊疗和护理过程中, 能及时了解患者的心理状态, 给予有效的心理护理干预, 对于疾病的康复具有重要的意义<sup>[6]</sup>。本次调查结果显示, 观察组患者行心理护理干预后, 焦虑紧张评分明显下降, 与干预前及对照组比较差异均有显著意义。而在对照组一般护理前后焦虑紧张评分差异无显著性。说明术前心理护理干预可使患者的心理状态得到明显改善。也进一步说明, 术前对患者实施以相关知识宣传和指导等为内容的心理护理干预, 确实能帮助患者建立对胃镜检查的心理应激能力, 消除顾虑, 降低其紧张焦虑程度<sup>[7-11]</sup>。

本次调查的结果进一步显示心理护理干预的重要性。护士通过与患者建立相互理解与信任的护患关系。利用关心理解交谈沟通等方式达到治疗和干预疾病的目的。由于患者长期忍受疾病的痛苦往往失去依靠自身能力接触病痛的信心, 他们来医院看病, 一方面抱有很大的希望, 另一方面对诊疗过程也有疑虑, 担心医生护士不能以诚相待, 不能理解他的痛苦, 从而使他



遭受双重痛苦,这就要求我们护理人员必须具有良好的医德、心理素质和护理业务水平,用自己的专业知识去疏导和抚慰患者,与患者建立和谐、理解信任的关系,最大限度地满足患者的需求,鼓励患者消除顾虑,使其获得勇气和信心。在具体的护理工作中,护理人员要利用一切与患者接触的时间,主动与患者及家属沟通,在了解患者躯体症状的同时,要深入了解患者的心理需求和对疾病的认识,鼓励患者倾诉内心的痛苦,耐心细致的解答疑问,取得患者及家属的信任,发现患者对疾病有不正确的认识和应对方式时,要及时的给予指导、纠正并安慰、鼓励和帮助。指导患者在胃镜检查过程中如何放松和配合检查<sup>[12-15]</sup>。所以,护士只有充分地了解和熟悉患者的心理状况,才能实施正确有效的心理护理,使患者处于最佳心理状态,愉快地接受胃镜检查,使急诊上消化系出血得到准确的诊断和治疗,提高患者生活质量。

#### 4 参考文献

- 1 叶任高, 陆再英. 内科学. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 363-399
- 2 陈文彬, 潘祥林. 诊断学. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 567-399
- 3 杨志寅, 苏中华, 王克勤. 行为医学的新认识和发展趋势. 中国行为医学科学 2007; 16: 769-772
- 4 崔东振, 耿军. 择期手术患者的心理应激及护理对策. 中华护理杂志 1996; 31: 692-695
- 5 薛岚, 梅志红, 刘扬, 杨玉萍. 心理干预对癌症病人生活质量的影响. 中华护理杂志 2002; 37: 787-788
- 6 Rudin D, Kiss A, Wetz RV, Sottile VM. Music in the endoscopy suite: a meta-analysis of randomized controlled studies. *Endoscopy* 2007; 39: 507-510
- 7 Aguilera IM, Patel D, Meakin GH, Masterson J. Perioperative anxiety and postoperative behavioural disturbances in children undergoing intravenous or inhalation induction of anaesthesia. *Paediatr Anaesth* 2003; 13: 501-507
- 8 潘茵, 张瑾, 郑颖, 刘占举. 新时期消化内镜中心护理工作模式思考. 世界华人消化杂志 2010; 18: 1961-1963
- 9 黄文花, 温素莲, 李静. 心理护理干预在急诊胃镜止血中的应用. 齐鲁护理杂志 2011; 17: 112
- 10 梁雅林. 老年患者行无痛电子胃镜诊疗术的护理. 中国医药导报 2010; 4: 120-121
- 11 黄琳, 刘燕君, 胡琳, 刘优凤, 周晓君. 无痛胃镜下食道静脉曲张套扎治疗的护理配合. 临床医学工程 2011; 18: 265-266
- 12 王丽君. 无痛胃镜护理配合. 中外医疗 2011; 30: 141-142
- 13 陈洪梅, 吕胜祥, 马兴刚, 王昌成. 高龄ERCP及EST术98例的术中配合和护理. 中国误诊学杂志 2011; 11: 8302-8303
- 14 左晓侠, 荣加. ERCP术80例的观察及护理. 中国误诊学杂志 2011; 11: 7289-7290
- 15 朱红, 荣加. 无痛胃镜和肠镜连续检查116例的护理. 中国误诊学杂志 2010; 10: 3408-3409

编辑 曹丽鸥 电编 鲁亚静

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2012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)

# 心脏外科围手术期急性药物性肝损伤12例

王海永, 王 玮, 杜振宗, 李安桂, 宋剑非

## ■背景资料

据世界卫生组织(WHO)统计, 药物性肝损伤已经成为全球的第5位死亡原因。近年来, 我国急性药物性肝损伤发病率有逐年增高趋势, 病死率较高, 需要引起重视与防范。

王海永, 王玮, 杜振宗, 李安桂, 宋剑非, 桂林医学院附属医院心胸外科 广西壮族自治区桂林市 541001

王海永, 博士, 副教授, 副主任医师, 主要从事心血管外科手术治疗及围术期处理研究。

作者贡献分布: 此课题由王海永、宋剑非、杜振宗、王玮及李安桂设计; 研究过程和随访由王海永与王玮操作完成; 本论文写作由王海永完成。

通讯作者: 宋剑非, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 541001, 广西壮族自治区桂林市乐群路15号, 桂林医学院附属医院心胸外科。guilinsjf@163.com

电话: 0773-2824363

收稿日期: 2012-02-04 修回日期: 2012-03-02

接受日期: 2012-04-25 在线出版日期: 2012-05-28

## Drug-induced liver injury in the perioperative period of cardiac surgery: An analysis of 12 cases

Hai-Yong Wang, Wei Wang, Zhen-Zong Du, An-Gui Li, Jian-Fei Song

Hai-Yong Wang, Wei Wang, Zhen-Zong Du, An-Gui Li, Jian-Fei Song, Department of Cardiothoracic Surgery, Affiliated Hospital of Guilin Medical College, Guilin 541001, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Correspondence to: Jian-Fei Song, Professor, Chief Physician, Department of Cardiothoracic Surgery, Affiliated Hospital of Guilin Medical College, 15 Lequn Road, Guilin 541001, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. guilinsjf@163.com

Received: 2012-02-04 Revised: 2012-03-02

Accepted: 2012-04-25 Published online: 2012-05-28

## Abstract

**AIM:** To explore the clinical characteristics and treatment of drug-induced liver injury in the perioperative period of cardiac surgery.

**METHODS:** The clinical data for 12 patients with drug-induced liver injury who were treated from 2009 to 2011 at the Affiliated Hospital of Guilin Medical College were collected. The clinical characteristics and treatment of drug-induced liver injury in the perioperative period of cardiac surgery were retrospectively analyzed.

**RESULTS:** The disease had clear causes in all patients. The main factors inducing drug-induced liver injury include antibiotics and anti-tuberculosis drugs. The clinical manifestations mainly include jaundice (9 cases) and increased

bilirubin and serum enzymes (3 cases). The disease categories comprised infective endocarditis (IE, 7 cases), constrictive pericarditis (CP, 2 cases), coronary heart disease (CHD, 2 cases) and rheumatic heart disease (RHD, 1 case). All patients were cured and discharged from hospital. No complications occurred in 10 patients evaluable at follow-up.

**CONCLUSION:** The patients with congestive heart failure may tend to develop drug-induced liver injury. Early and accurate diagnosis is important for the treatment and prognosis of drug-induced liver injury.

**Key Words:** Open heart surgery; Drug-induced liver injury; Perioperative period

Wang HY, Wang W, Du ZZ, Li AG, Song JF. Drug-induced liver injury in the perioperative period of cardiac surgery: An analysis of 12 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(15): 1350-1353

## 摘要

**目的:** 分析心脏外科围手术期发生12例急性药物性肝损伤的临床特点及治疗效果。

**方法:** 回顾分析2009-2011年桂林医学院附属医院围手术期发生急性药物性肝损伤的12例心脏外科患者的临床表现、治疗情况及预后。

**结果:** 引起药物性肝损害的药物主要是抗生素、抗结核药物。主要临床表现是黄疸9例(82%), 化验肝功能发现明显异常3例(18%)。心脏手术前出现9例, 手术后出现3例。其中2例为缩窄性心包炎, 7例为感染性心内膜炎, 冠状动脉粥样硬化性心脏病2例, 风湿性心脏病1例。12例患者均治愈出院。随访6-44 mo, 10例有随访应答, 复查肝功能正常, 无中期并发症。

**结论:** 心脏外科围手术期急性药物性肝损伤多发生于右心功能不全、营养差的患者。对心脏手术前药物致肝损伤的早期诊断和及时合理的治疗, 可以使患者的肝功能恢复正常, 帮助患者度过围手术期, 预后良好。

**关键词:** 心脏手术; 药物性肝损伤; 围手术期

## ■同行评议者

汪波, 主任医师, 北京大学第一医院急诊科

王海永, 王伟, 杜振宗, 李安桂, 宋剑非. 心脏外科围手术期急性药物性肝损伤12例. 世界华人消化杂志 2012; 20(15): 1350-1353  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1350.asp>

## 0 引言

药物性肝损伤(drug-induced liver injury)是指在治疗过程中, 由于药物或其代谢产物引起的肝细胞毒性损害, 或肝脏对药物及其代谢产物的过敏反应而导致肝损伤, 占整个药物不良反应的10%-15%<sup>[1]</sup>, 近年来呈不断上升的趋势. 药物性肝损伤一旦出现, 需及时处理, 否则可发生危及生命的暴发性或重症肝功能衰竭, 也是临床医生在执业过程中可能遇到的执业风险问题<sup>[2]</sup>. 现将我院2009-01/2011-06心脏外科围手术期出现肝功能损伤12例报道如下.

## 1 材料和方法

1.1 材料 收集桂林医学院附属医院2009-2011年心脏外科围手术期出现急性药物性肝损伤的12例患者的临床资料(男8例, 女4例, 年龄24-76岁). 患者均无原发肝脏疾病(病毒性肝炎等), 主要症状是皮肤黏膜出现明显黄染9例(75%), 化验肝功能发现明显异常3例(25%), 均伴有不同程度的乏力、食欲不振及腹胀等临床表现. 心脏手术前出现9例, 其中2例为结核性缩窄性心包炎, 7例为感染性心内膜炎. 3例为心脏手术后出现, 其中2例为冠脉搭桥术, 1例为二尖瓣置换+改良迷宫术. 引起药物性肝损伤的药物有抗生素(6例为感染性心内膜炎, 给予抗生素应用控制感染, 3例为围术期应用抗生素防治感染)、抗结核药物(2例均为结核性缩窄性心包炎), 盐酸胺碘酮(1例为房颤改良迷宫术后维持窦性心律). 3例患者伴有发热、瘙痒和皮疹等过敏症状. 10例患者血细胞分析均可见不同程度外周血嗜酸粒细胞和假性单核细胞增多.

1.2 方法 症状最早出现于用药后2 d, 最迟17 d. 所有患者均卧床休息, 及时停用引起肝功能损害的药物, 并根据病情选用还原型谷胱甘肽、甘草酸二胺、多烯磷脂酰胆碱注射液等, 复查肝功能, 观察临床症状恢复情况. 1例术后使用大剂量胺碘酮诱发急性肝功能衰竭, 行血浆置换2次、保肝治疗.

## 2 结果

患者临床资料见表1. 2例心包炎患者在全麻下行心包剥脱术, 7例感染性心内膜炎患者感染性心内膜炎. 患者分别接受主动脉瓣置换、二尖瓣置

换术、二尖瓣+主动脉瓣置换术. 手术过程顺利, 无术后并发症. 3例术后出现肝损害患者给予护肝治疗, 恢复顺利. 12例患者肝功能恢复的时间为6-23 d. 12例患者均治愈出院. 缩窄性心包炎在当地疾病预防控制中心继续接受抗结核治疗, 感染性心内膜炎患者接受抗生素治疗4 wk. 10例均有随访应答. 门诊随访复查肝功能, 均无异常. 随访6-44 mo, 无并发症.

## 3 讨论

药物性肝损伤是引起肝功能异常的常见原因, 也是常见的药物不良反应之一<sup>[3]</sup>. 导致肝细胞型损伤的作用机制可能与药物导致肝细胞坏死或肝细胞膜的通透性增加有关<sup>[4]</sup>. 目前认为造成肝损伤的机制主要包括: (1)药物本身的致病因素: 如以异烟肼、利福平和吡嗪酰胺联用的结核化疗方案, 这3种药对肝功能均有一定影响, 可导致药物性肝损伤, 甚至致命的急性肝坏死及肝功能衰竭. 以异烟肼为例, 具有药酶抑制作用, 使药物在体内半寿期延长, 代谢产物不能及时清除, 可引起肝实质细胞的变性和坏死<sup>[5]</sup>; (2)原发疾病的影响: 原有慢性肝脏疾病、免疫紊乱和营养不良、肾功能不全的患者均可增加机体对药物毒性的易感性<sup>[6]</sup>. 本组病例中, 慢性缩窄性心包炎、感染性心内膜炎患者共9例, 均为消耗性疾病, 患者营养状态较差, 再加上合并右心功能不全, 肝脏淤血, 均为诱发因素; (3)老年人易发生药物性肝损伤<sup>[7]</sup>, 其原因可能有: 肝脏肾脏功能减退, 对药物的代谢及排泄能力下降, 肾小球滤过作用减退导致药物的血药浓度增高等. 本组资料中, 2例高龄患者(>75岁)在非体外循环下行冠脉搭桥术后均出现药物性肝损害.

诱发药物性肝病的主要药物有抗结核药、抗生素和中药及中成药<sup>[8]</sup>. 本组病例9例为抗生素引起, 2例是由抗结核药引起, 另1例与胺碘酮有关. 药物性肝损伤有些患者可出现肝炎的表现, 常见乏力、食欲不振、厌油、恶心、呕吐、腹胀, 其次为黄疸、肝区不适或疼痛等, 发病初期可伴有发热、皮疹、瘙痒等过敏表现. 另一些患者则全无症状, 只是在肝功能检查时发现肝功能有明显异常<sup>[9]</sup>. 本组病例大多数患者由于明显黄疸而发现肝功能损害, 仅3例常规复查肝功能时发现异常.

2007年, 中华医学会消化病学分会肝胆疾病协作组制定《急性药物性肝损伤诊治建议(草案)》<sup>[12]</sup>. 按照此诊断标准, 药物所致肝炎的诊断

## ■创新盘点

本文探讨在心脏外科围手术期发生药物性肝损伤的临床特点, 旨在提高心脏外科医生对此症的认识, 早期诊断, 积极防治.

## ■应用要点

对心脏手术前药物致肝损伤的早期诊断和及时合理的治疗,可以使患者的肝功能恢复正常,帮助患者度过围手术期,预后良好。

表 1 12例心脏手术围手术期出现急性药物性肝损伤患者资料

患者	年龄(岁)	性别	原发疾病	心功能分级	使用药物	出现时间(d)	肝 功 能			肝功能恢复时间(d)
							TBIL(mmol/L)	AST(U/L)	ALT(U/L)	
1	43	男	CP	III	异烟肼	14	82	89	65	10
2	35	女	CP	II	异烟肼	7	98	143	121	12
3	40	男	IE	III	哌拉西林舒巴坦	10	63	74	94	6
4	39	男	IE	III	哌拉西林他唑巴坦	7	111	121	151	12
5	52	女	IE	II	头孢哌酮舒巴坦钠	6	67	68	83	7
6	27	男	IE	III	哌拉西林舒巴坦	7	110	93	119	14
7	18	男	IE	II	阿莫西林舒巴坦钠	10	72	92	89	7
8	24	男	IE	III	头孢唑肟	2	151	226	143	9
9	42	女	IE	II	头孢哌酮舒巴坦钠	2	103	71	89	8
10	46	男	RHD	II	盐酸胺碘酮	2	853	45	38	23
11	75	男	CAD	II	哌拉西林他唑巴坦	4	86	41	49	14
12	76	女	CAD	III	头孢唑肟	3	68	190	101	21

CAD: 冠心病; IE: 感染性心内膜炎; RHD: 风湿性心脏病; CP: 缩窄性心包炎。

依据有: (1)有与药物性肝损伤发病规律相一致的潜伏期; (2)停药后肝功能异常指标迅速恢复; (3)除外其他原因引起的肝病, 特别是病毒性肝炎; (4)再次用药反应阳性。符合前3项, 或前3项中有2项符合, 加上第(4)项, 均可确诊为急性药物性肝损伤。本组病例在排除梗阻性黄疸和病毒性肝炎后作出诊断, 符合上述诊断标准。治疗前原有肝功能正常或轻度损害, 使用药物后出现肝损伤; 且停用可能引起肝损害的药物后, 肝损伤减轻, 应考虑药物性肝损伤; 若有原发心脏疾病加重时, 且停用有关药物后肝损伤不减轻, 应考虑为原有心脏疾病伴发的肝淤血引起的肝功能受损。

本组病例出现药物性肝损害后, 均给予停药、药物保肝治疗。但感染性心内膜炎患者, 结合临床及药敏结果, 换用对肝脏影响小的抗生素。临床治疗中, 除立即停用引起肝损伤药物外给予支持治疗, 应用高蛋白(无肝性脑病先兆时)、高热量、高维生素及低脂饮食, 补充氨基酸, 必要时应用白蛋白、维持水、电解质平衡, 维持机体内环境稳定, 根据肝功能受损类型应用还原型谷胱甘肽、甘草酸二胺、多烯磷脂酰胆碱注射液等促进肝细胞修复。注意严密监测肝功能, 及早发现和防治感染、出血、肝性脑病、暴发性肝衰竭等并发症。心脏外科围手术期使用华法林抗凝治疗时, 如果出现肝功能损害, 注意严密监测凝血酶原时间, 及时调整华法林用量<sup>[10]</sup>。

心脏手术前肝功能正常的患者, 体外循环术后早期肝脏改变以胆红素升高为主, 转氨酶升

高程度不明显<sup>[11]</sup>。而且经过相应的治疗, 这些指标一般都能很快下降。但是患者术前就存在长期心功能不全, 特别是存在右心功能不全, 术前出现肝功能受损, 如黄疸、凝血机制障碍、低蛋白血症, 术后肝功能损害会明显加重, 表现为肝细胞急性坏死, 出现转氨酶明显升高及黄疸。如果不能及时纠正, 再加上手术的打击, 很快发展至多器官功能不全, 处理起来就会更加棘手, 死亡率明显升高<sup>[12]</sup>。因此, 术前患者出现急性药物性肝损伤, 肝功能的改善显得十分重要<sup>[13]</sup>。

体外循环是术后肝功能损害的一个重要因素<sup>[14]</sup>。体外循环过程是一种非生理状态的、人工控制的休克状态, 对全身脏器会产生重要影响。体外循环引起肝功能受损的主要原因<sup>[15]</sup>: (1)采用非搏动性血流, 会减少术中肝脏、肾脏等重要脏器的灌注; (2)体外循环期间全身血流重新分布, 腹腔脏器的血流明显减少, 从而导致肝脏的低灌注; (3)体外循环引起的全身炎症反应综合征使肝细胞受到损伤, 引起肝功能损害。但如果术前就长期存在右心功能不全引起肝淤血的话, 就会极大地削弱肝脏的缺血耐受性; 因此, 术后早期在使用药物不当时, 更易出现肝功能受损。本组病例有1例术后使用大剂量(2 000 mg)胺碘酮诱发急性肝功能衰竭, 经及时行血浆置换、保肝治疗而抢救成功, 应汲取深刻教训。

结合本组病例, 我们体会到在心脏外科围手术期, 对于右心功能不全者, 特别是营养不良者、老年患者应用抗生素、结核等药物时要重视可能引起的药物性肝损伤。药物性肝损伤重在早期预防, 以便早期发现、早期诊断、早期

治疗. 在药物治疗期间, 要严密监测肝功能, 必须强调1-2 wk复查1次肝功能, 对出现黄疸时更应提高警惕, 要及时停用或改用其他药物, 避免加重肝功能受损.

本组资料急性药物性肝损伤一般预后尚好, 经停药与积极护肝治疗后均好转出院. 但考虑到发生急性药物性肝损伤可导致严重肝功能衰竭, 心脏外科医师必须意识到抗生素、抗结核药等许多药物都可能因特异性反应而发生无法预测的肝损伤, 这也是避免发生严重药物性肝损伤的基础<sup>[16]</sup>.

#### 4 参考文献

- 1 曾玲玲, 周桂琴. 药物性肝损害诊断标准及其临床应用. *药物不良反应杂志* 2011; 13: 17-20
- 2 中华医会消化病学分会肝胆疾病协作组. 急性药物性肝损伤诊治建议(草案). *中华消化杂志* 2007; 27: 765-767
- 3 Lee WM. Drug-induced hepatotoxicity. *N Engl J Med* 2003; 349: 474-485
- 4 陈昶铭, 常冰, 张岱, 向国卿, 贺晓虎, 王炳元. 沈阳地区药物性肝损伤病因和损伤类型. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 2525-2528
- 5 Donald PR. Antituberculosis drug-induced hepatotoxicity in children. *Pediatr Rep* 2011; 3: e16
- 6 Stirnimann G, Kessebohm K, Lauterburg B. Liver injury caused by drugs: an update. *Swiss Med Wkly* 2010; 140: w13080
- 7 周丹, 孟祥伟, 徐长研, 迟保荣. 老年急性药物性肝损伤264例临床研究. *中国老年学杂志* 2006; 26: 1327-1329
- 8 伍百贺, 詹俊. 药物性肝病的诊断与治疗进展. *国际消化病杂志* 2008; 28: 413-415
- 9 厉有名. 药物性肝损害的临床类型及诊断策略. *中华肝脏病杂志* 2004; 12: 445-446
- 10 Nemati MH, Astaneh B, Zamirian M. Aortic valve replacement in a patient with liver cirrhosis and coagulopathy. *Gen Thorac Cardiovasc Surg* 2008; 56: 430-433
- 11 An Y, Xiao YB, Zhong QJ. Hyperbilirubinemia after extracorporeal circulation surgery: a recent and prospective study. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 6722-6726
- 12 Millwala F, Nguyen GC, Thuluvath PJ. Outcomes of patients with cirrhosis undergoing non-hepatic surgery: risk assessment and management. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 4056-4063
- 13 O'Leary JG, Yachinski PS, Friedman LS. Surgery in the patient with liver disease. *Clin Liver Dis* 2009; 13: 211-231
- 14 Hayashida N, Shoujima T, Teshima H, Yokokura Y, Takagi K, Tomoeda H, Aoyagi S. Clinical outcome after cardiac operations in patients with cirrhosis. *Ann Thorac Surg* 2004; 77: 500-505
- 15 张宝仁, 徐志云. 心脏瓣膜外科学. 北京: 人民卫生出版社, 2007: 321-322
- 16 林京玉, 丁日高. 抗菌药和药物性肝损伤. *国际药理学研究杂志* 2006; 33: 195-197, 230

编辑 张姗姗 电编 鲁亚静

#### ■同行评价

本文主要探讨心脏外科围手术期发生药物性肝损伤的临床特点, 具有一定的临床借鉴意义.

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2012年版权归世界华人消化杂志

#### • 消息 •

### 《世界华人消化杂志》再次入选《中文核心期刊要目总览》 (2011年版)

**本刊讯** 依据文献计量学的原理和方法, 经研究人员对相关文献的检索、计算和分析, 以及学科专家评审, 《世界华人消化杂志》再次入选《中文核心期刊要目总览》2011年版(即第六版)核心期刊.

对于核心期刊的评价仍采用定量评价和定性评审相结合的方法. 定量评价指标体系采用了被引量、被摘量、被引量、他引量、被摘率、影响因子、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到60余种, 统计到的文献数量共计221177余万篇次, 涉及期刊14400余种. 参加核心期刊评审的学科专家达8200多位. 经过定量筛选和专家定性评审, 从我国正在出版的中文期刊中评选出1982种核心期刊.

《世界华人消化杂志》在编委、作者和读者的支持下, 期刊学术水平稳步提升, 编校质量稳定, 再次被北京大学图书馆《中文核心期刊要目总览》(2011年版)收录. 在此, 向关心、支持《世界华人消化杂志》的编委、作者和读者, 表示衷心的感谢! (编辑部主任: 李军亮 2012-03-08).



# 内支架置入联合FOLFOX-4方案治疗肝癌并下腔静脉及右心房癌栓6例

李斯锐, 吴宁, 林福煌

## ■背景资料

原发性肝癌合并下腔静脉及右心房癌栓患者, 病情凶险, 预后极差. 由于大多患者失去手术切除机会, 以介入治疗为主的综合治疗成为主要治疗方法.

李斯锐, 吴宁, 林福煌, 海南省人民医院放射介入科 海南省海口市 570311

李斯锐, 主治医师, 主要从事肿瘤及血管相关疾病介入诊疗研究. 作者贡献分布: 吴宁与林福煌对此文所作贡献均等; 课题设计由李斯锐完成; 资料统计由李斯锐与林福煌共同完成; 数据分析与论文写作由李斯锐完成; 吴宁提供指导.

通讯作者: 李斯锐, 主治医师, 570311, 海南省海口市, 海南省人民医院介入放射科. siruili@yahoo.com.cn

电话: 0898-68642559

收稿日期: 2011-12-06 修回日期: 2012-01-06

接受日期: 2012-04-19 在线出版日期: 2012-05-28

## Stent placement combined with FOLFOX-4 regimen for primary liver cancer patients with inferior vena cava and right atrium tumor thrombus

Si-Rui Li, Ning Wu, Fu-Huang Lin

Si-Rui Li, Ning Wu, Fu-Huang Lin, Department of Interventional Radiology, Hainan Provincial People's Hospital, Haikou 570311, Hainan Province, China

Correspondence to: Si-Rui Li, Attending Physician, Department of Interventional Radiology, Hainan Provincial People's Hospital, Haikou 570311, Hainan Province, China. siruili@yahoo.com.cn

Received: 2011-12-06 Revised: 2012-01-06

Accepted: 2012-04-19 Published online: 2012-05-28

## Abstract

**AIM:** To evaluate the efficacy and safety of stent placement combined with FOLFOX-4 regimen for primary liver cancer patients with inferior vena cava and right atrium tumor thrombus.

**METHODS:** A retrospective study was performed on 6 primary liver cancer patients with inferior vena cava and right atrium tumor thrombus who underwent stent placement combined with FOLFOX-4 regimen.

**RESULTS:** Six stents were placed successfully in 6 patients. The pressure gradient across the stenotic segments of the inferior vena cava declined from 34 mmH<sub>2</sub>O to 18 mmH<sub>2</sub>O, and obstruction of the inferior vena cava was improved quickly. All patients were assessable for the objective ef-

iciency. Right atrium tumor thrombus served as a target lesion. Partial response (PR) was achieved in 5 cases, and stable disease (SD) in 1 case. Serum AFP levels decreased by more than 50% in 4 cases. Median overall survival (OS) was 8.2 mo, and median time to tumor progression (TTP) was 5 mo. During chemotherapy, there were 2 cases of leucopenia, 5 cases of nausea and vomiting, 1 cases of neurotoxicity, 3 cases of fatigue and 1 cases of fever, all of which were tolerable.

**CONCLUSION:** Stent placement, which could improve the symptoms of inferior vena cava obstruction, combined with FOLFOX-4 regimen therapy can prolong OS and TTP in primary liver cancer patients with inferior vena cava and right atrium tumor thrombus.

**Key Words:** Tumor thrombus; Inferior vena cava; Right atrium; Stent; FOLFOX-4 regimen

Li SR, Wu N, Lin FH. Stent placement combined with FOLFOX-4 regimen for primary liver cancer patients with inferior vena cava and right atrium tumor thrombus. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(15): 1354-1358

## 摘要

**目的:** 探讨血管内支架置入联合FOLFOX-4方案系统化治疗肝癌合并下腔静脉及右心房癌栓的疗效.

**方法:** 回顾性分析行血管内支架置入联合FOLFOX-4方案系统化治疗6例原发性肝癌并下腔静脉癌栓及右心房癌栓患者, 记录并发症发生情况及疗效, 随访生存期.

**结果:** 6例患者均一次性成功置入血管支架, 下腔静脉平均压力下降16 mmH<sub>2</sub>O, 患者下腔静脉梗阻症状均明显改善. 6例患者均可客观评价化疗疗效, 以右心房癌栓为靶病灶, PR 5例, SD 1例. 4例患者血清AFP下降超过50%. 至2011-10随访结束时, 接受治疗患者仍存活2例, 中位总存活时间(overall survival, OS)为8.2 mo, 中位肿瘤进展时间(tumor progression time,

## ■同行评议者

肖恩华, 教授, 中南大学湘雅二医院放射教研室

TTP)为5 mo. 全部患者未见因化疗不良反应终止化疗, 其中骨髓抑制(白细胞减少, I-II度)3例, 消化系反应(恶心、呕吐、纳差, I-II度)5例, 神经毒性(神经感觉异常 I-II度)1例, 乏力3例, 发热1例.

**结论:** 对于肝癌并下腔静脉及右心房癌栓患者, 血管内支架置入能即刻改善下腔静脉梗阻症状, 联合FOLFOX-4方案系统化疗, 使生存期延长.

**关键词:** 癌栓; 下腔静脉; 右心房; 支架; FOLFOX-4方案

李斯锐, 吴宁, 林福煌. 内支架置入联合FOLFOX-4方案治疗肝癌并下腔静脉及右心房癌栓6例. 世界华人消化杂志 2012; 20(15): 1354-1358  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1354.asp>

## 0 引言

原发性肝癌下腔静脉癌栓形成并右心房、右心室内生长病例较少见, 其病情凶险, 治疗难度大, 目前文献报道<sup>[1-4]</sup>主要以手术取栓治疗为主, 但手术风险大, 在临床实际中能够耐受手术者有限. 本研究利用血管内支架置入联合FOLFOX-4方案系统化疗治疗此类患者, 取得了满意的治疗效果, 现报道如下.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 2009-08/2011-01我科共收治的原发性肝癌伴下腔静脉、右心房癌栓患者6例, 均经AFP、影像学、病理证实或符合中国抗癌协会肝癌专业委员会修订的原发性肝癌诊断标准. 所有患者在肝癌综合治疗过程中出现不同程度下腔静脉综合征症状, 如腹胀、纳差、肝脾肿大、双下肢、下腹及阴囊水肿、腹壁静脉曲张及尿量减少等, 之后行影像学检查(包括造影及PET/CT检查)证实. 其中男4例, 女2例, 年龄41-63岁, ECOG体力状况评分: 3分4例, 4分2例, 4分为栓子脱落并存在部分肺段栓塞患者. 肝功能Child-Pugh分级: A级3例, B级3例, 3例患者同时存在肝内病灶, 3例患者通过既往的综合治疗肝内病灶已灭活.

### 1.2 方法

**1.2.1 血管内支架置入:** 患者取仰卧位, 心电监护下经皮穿刺右股静脉置管, 利用“猪尾导管”行下腔静脉造影并测压, 明确下腔静脉狭窄段或阻塞段部位、长度、内径以及两侧正常下腔静脉

内径, 了解侧支静脉开放情况, 根据上述结果选择合适的支架. 利用超滑导丝配合导管通过狭窄段或阻塞段下腔静脉, 换用超硬交换导丝, 扩张股静脉穿刺入口, 沿导丝引入12F输送器, 确认位置合适后释放支架, 使支架全部覆盖狭窄段. 之后重复造影并测压, 若支架膨胀不满意, 可再用球囊导管进行扩张, 观察至下腔静脉血流情况满意为止. 术后应用呋塞米, 预防心力衰竭. 根据肝功能及凝血功能给予抗凝治疗3-6 mo.

**1.2.2 化疗用法:** 患者知情同意, 均于内支架置入后下腔静脉综合征改善且无其他化疗禁忌的前提下, 按FOLFOX-4方案化疗, 即: 奥沙利铂(OXA)85 mg/m<sup>2</sup>, iv gtt, d1; 亚叶酸钙(CF)200 mg/m<sup>2</sup>, iv gtt, d1, d2; 5-氟尿嘧啶(5-Fu)400 mg/m<sup>2</sup>, iv Bolus, d1, d2; 5-Fu 600 mg/m<sup>2</sup>, civ 22h, d1, d2. 每2 wk重复, 每3个周期后评价疗效.

**1.2.3 观察、随访及疗效评价:** 记录术中并发症发生情况, 术后观察患者下腔静脉综合征症状及体力状态评分改善情况; 术后1 wk超声复查, 了解下腔静脉通畅程度; 术后每隔2 mo对患者行超声、CT或下腔静脉造影复查. 所有患者均经综合评估, 在耐受化疗的前提下, 按上述方案系统化疗, 记录甲胎蛋白(AFP)、肝功能变化情况, 化疗周期数目及并发症或不良反应发生情况, 化疗效果评价采用RECIST1.1版<sup>[5]</sup>标准: 肿瘤病灶消失, 维持4 wk为完全缓解(complete remission, CR); 所有靶病灶的长径总和缩小 $\geq 30\%$ , 并维持4 wk为部分缓解(partial remission, PR); 变化介于PR与PD之间稳定(SD); 靶病灶长径总和增加 $\geq 20\%$ 或有新病灶出现为进展(PD). 有效为CR+PR. 不良反应按照美国国立癌症研究所通用毒性标准(NCI-CTC)观察评价, 分为0-IV度. OS及TTP从支架植入时开始计算至患者死亡, 随诊结束时患者仍存活的, 以结束时间为准.

## 2 结果

6例患者均一次性成功置入血管支架, 共置入支架6枚(Z形支架4枚, 带膜网状支架1枚), 直径18-30 mm, 长度70-100 mm, 5例支架释放后进行球囊扩张. 术后再次造影见下腔静脉通畅, 原狭窄段或阻塞段远端侧支循环明显减少或消失. 术前下腔静脉狭窄段或阻塞段远端压力平均为34 mmH<sub>2</sub>O, 术后为18 mmH<sub>2</sub>O, 平均压力下降16 mmH<sub>2</sub>O. 术后患者下腔静脉综合征症状均明显改善. 全部患者未见危及生命的严重并发症发生.

6例患者共化疗29周期, 平均每例5周期. 治

### ■ 研发前沿

目前经皮腔内支架植入技术日趋成熟, 肝癌系统化疗近年来也屡见报道, 以癌栓为靶病灶, 并进行效果评价的报道尚少见.

### ■相关报道

沈杰等利用内支架置入治疗外压型和栓塞型下腔静脉梗阻,认为其对于外压型梗阻患者可显著改善症状,延长生存期,而对于栓塞型患者,再梗阻率高,不能延长生存期,仅作为一种有限的姑息性治疗手段.秦叔远等利用FOLFOX方案治疗晚期原发性肝癌,认为对国人疗效较好,安全性高.

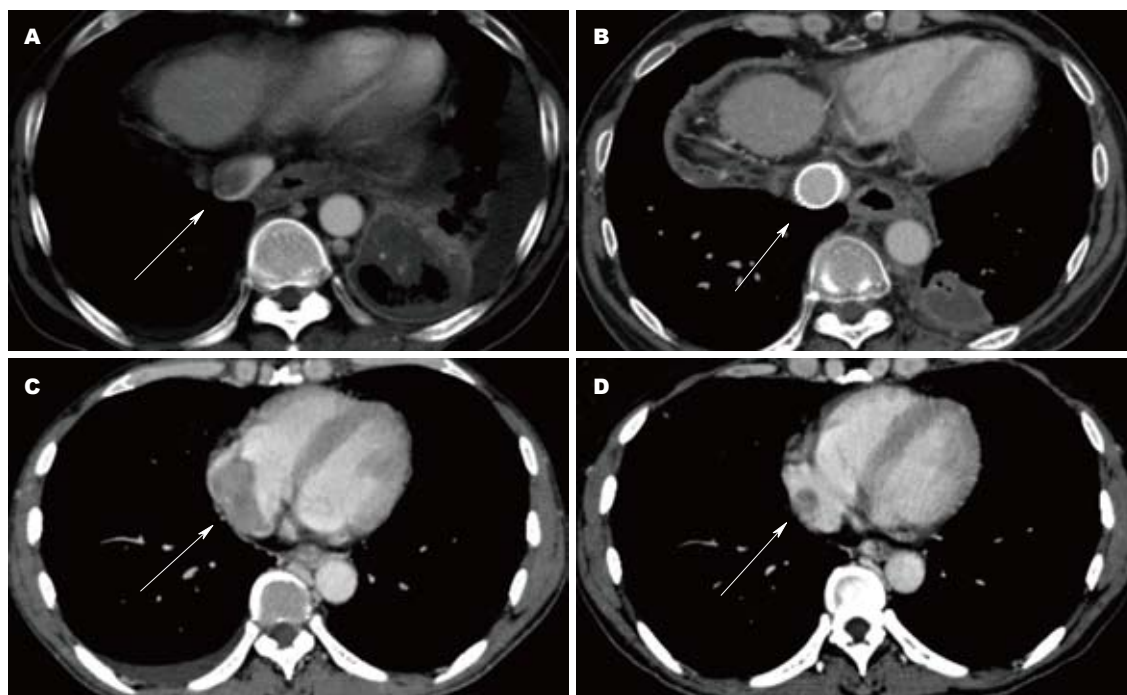


图1 血管内支架置入联合系统化疗治疗前后对比. A: 术前可见下腔静脉内癌栓占据管腔大部; B: 内支架置入后下腔静脉开通; C: 化疗前右房内癌栓; D: FOLFOX-4方案化疗2周期后病灶PR.

疗后体力状况评分均明显改善, 4例患者血清AFP下降超过50%. 以右心房和(或)右心室癌栓为靶病灶, PR 5例, SD 1例(图1). 肝内病灶(3例患者同时存在肝内癌灶)均为SD. 至2011-10随访结束时, 接受治疗患者仍存活2例, 中位OS为8.2 mo, 中位TTP为5 mo. 全部患者未见因化疗不良反应终止化疗, 其中骨髓抑制(白细胞减少, I-II度)3例, 共8人次, 给予生白及支持治疗后, 相应指标回升. 消化系反应(恶心、呕吐、纳差, I-II度)5例, 共26人次, 对症支持治疗后, 可耐受继续化疗. 神经毒性(神经感觉异常 I-II度)1例, 共3人次, 乏力3例, 12人次, 发热1例, 4人次.

### 3 讨论

原发性肝癌侵犯血管系统是影响患者预后的主要因素之一, 尤其伴下腔静脉及右心房癌栓形成者, 在非手术治疗过程中多数在短期内死于肺栓塞和右心室流入道阻塞造成的心力衰竭, 很难获得长期生存机会<sup>[6]</sup>. 一般认为下腔静脉及右心房癌栓的形成主要是由于肝静脉受肿瘤侵犯后, 肿瘤细胞在肝静脉内沿血流方向铸型生长所致. 国内外有手术许多手术治疗的报道<sup>[1-4]</sup>, 以往采取姑息性摘除癌栓的方法, 暂时解决肺栓塞及心衰问题, 但由于肝内残留肝癌病灶进展, 预后仍较差. 近年来有报道采取肝癌联合下腔静脉癌栓切除, 预后改善, 但由于手术创伤大,

且此类患者多为术后复发, 可以耐受手术者很有限. 本研究中均为失去手术机会或拒绝手术切除的患者.

目前经皮腔内支架植入技术日趋成熟, 其作为治疗下腔静脉梗阻手段之一, 已见于许多报道<sup>[7-10]</sup>, 均取得了良好的治疗效果. 在本研究中, 6例患者均为在肝癌综合治疗过程中出现下腔静脉综合征, 且进行性加重, 其中1例检查证实已存在肺段范围的肺栓塞. 由于病情危急, 我们采取支架置入开通下腔静脉, 患者症状5 d内基本消退, 与报道一致<sup>[9]</sup>. 由于支架置入仅为改善症状的姑息性治疗方法, 肿瘤病灶并未控制. 有文献报道<sup>[11-13]</sup>原发性肝癌下腔静脉癌栓及右心房癌栓同肝内病灶一样多为富动脉血供, 行TACE可同时控制肝内病灶及癌栓生长, 但在本研究中, 存在肝内病灶的患者行动脉造影时并未见到明确的动脉供血血管及癌栓肿瘤染色, 提示并非所有癌栓均为富动脉血供, 因此未能行癌栓的TACE治疗. 罗剑钧等<sup>[14]</sup>利用TACE治疗肝内病灶, 放射性粒子<sup>125</sup>I籽源条联合支架植入治疗下腔静脉癌栓, 取得了满意的近期治疗效果. 而对于心房癌栓尚无有效介入治疗方法. 季洪兵等<sup>[15]</sup>于内支架置入后行放射治疗治疗原发性肝癌所致的下腔静脉癌栓, 亦取得了良好的治疗效果. 可见, 支架植入后尚需联合其他治疗手段才能控制肿瘤. 因此, 血管内支架置入, 迅速

开通下腔静脉,使临床症状得以改善.由于心房癌栓的存在(部分尚同时有肝内病灶),继续生长仍可危及生命,所以进一步控制肿瘤是提高生存率的关键.

原发性肝癌的各种系统化疗药物一直被认为有效率不高,常用的顺铂、氟尿嘧啶和阿霉素有效率通常在20%以下.奥沙利铂作为第3代铂类细胞毒性化疗药,其较顺铂与瘤细胞DNA结合更迅速、牢固,有更强的细胞毒性,且与顺铂及卡铂无交叉耐药性.有文献报道<sup>[16,17]</sup>其对肝细胞癌治疗有效,2005年秦叔逵等<sup>[18]</sup>报道了奥沙利铂、5-氟尿嘧啶、亚叶酸钙组成的FOLFOX-4方案治疗10例晚期原发性肝癌,取得了满意的治疗效果,其并于2006年开始了此方案的一项开放性、多中心、随机对照研究<sup>[19]</sup>结果显示:肿瘤FOLFOX-4方案组的中位OS为6.47 mo,中位TTP为2.9 mo,优于单纯多柔比星化疗,且在不良反应方面此方案耐受性和安全性良好.因此本研究尝试利用此方案治疗肿瘤,结果显示:5例患者获得PR(以心房癌栓为靶病灶评价),中位OS达8.2 mo,中位TTP 5 mo,显著超过报道,考虑与本研究患者之前均接受过其他综合治疗有关.总之,本研究显示FOLFOX-4方案对于原发性肝癌并下腔静脉及右心房癌栓患者有效率较高.

在本研究中并发症主要分为2部分,一部分与支架置入术有关,比如急性右心衰竭,这主要由于下腔静脉开通后,回心血量突然增多引起.术后控制补液量,必要时强心、利尿处理,通常不会造成严重的并发症,在本研究中仅见1例术后心动过速,给予利尿处理后恢复.另外尚可有支架内血栓形成、支架移位、变形等并发症,但在本研究未见.第2部分与化疗有关,主要为周围神经毒性和血液系统毒性,本研究患者不良反应较轻,经对症治疗后短期内恢复,未见因化疗不良反应终止化疗者.通过观察,我们发现患者均可耐受血管内支架置入联合系统化疗,且未见并发症发生率的明显增加,所以认为二者联合是一种安全的治疗方法.

本研究尚有许多不足之处,比如病例数目少,在系统化疗之前患者曾行其他综合治疗等.但通过上述观察,我们初步认为对于肝癌并下腔静脉及右心房癌栓患者,内支架置入联合FOLFOX-4方案治疗的有效率及安全性均较高,值得临床扩大病例数进一步应用研究.

## 4 参考文献

- 1 Nonami T, Nakao A, Harada A, Kaneko T, Kurokawa T, Takagi H. Hepatic resection for hepatocellular carcinoma with a tumor thrombus extending to inferior vena cava. *Hepatogastroenterology* 1997; 44: 798-802
- 2 王义, 陈汉, 吴孟超, 孙延富, 林川, 姜小清, 尉公田. 肝细胞癌合并下腔静脉癌栓的手术治疗. *中华外科杂志* 2003; 41: 165-168
- 3 李爱军, 吴孟超, 周伟平, 杨甲梅. 侵犯下腔静脉的肝脏恶性肿瘤手术治疗. *中华医学杂志* 2006; 86: 1671-1674
- 4 彭淑牖, 洪德飞, 许斌, 蔡秀军, 牟一平, 刘颖斌, 王建伟, 李江涛, 薛建锋, 刘付宝, 钱浩然. 下腔静脉重建联合肝叶切除治疗肝癌的初步研究. *中华普通外科杂志* 2006; 21: 566-569
- 5 Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, Dancey J, Arbuck S, Gwyther S, Mooney M, Rubinstein L, Shankar L, Dodd L, Kaplan R, Lacombe D, Verweij J. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer* 2009; 45: 228-247
- 6 Ohwada S, Tanahashi Y, Kawashima Y, Satoh Y, Nakamura S, Kobayashi I, Ohya T, Ishikawa S, Ohtaki A, Iino Y. Surgery for tumor thrombi in the right atrium and inferior vena cava of patients with recurrent hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology* 1994; 41: 154-157
- 7 罗剑钧, 颜志平, 王建华, 王小林, 程洁敏, 钱晟, 龚高全, 刘清欣. 下腔静脉恶性梗阻的介入治疗. *中华放射学杂志* 2002; 36: 430-434
- 8 沈杰, 王成刚, 马爱英, 王良义. 内支架置入对不同类型下腔静脉恶性梗阻的临床价值. *介入放射学杂志* 2008; 17: 493-496
- 9 王朝加, 刘清欣, 罗剑钧, 王成刚, 刘红南. 原发性肝癌致下腔静脉梗阻的介入性开通治疗. *医学影像学杂志* 2009; 19: 703-705
- 10 吴育民, 周汝明, 梁惠民, 邱水波, 刘国华, 戴懿, 庄少有. 支架置入术治疗原发性肝癌并下腔静脉阻塞的近期疗效观察. *医学影像学杂志* 2011; 21: 72-75
- 11 曹刚, 张根山, 徐文杰, 王江涛, 陈希兵. 原发性肝癌并右心房癌栓的影像学表现及动脉化疗栓塞疗效观察. *临床放射学杂志* 2011; 30: 86-89
- 12 蒋国民, 赵进委, 田丰, 李绍钦, 王凯, 王云, 蒋利强, 贾中芝. 原发性肝癌合并下腔静脉及右心房癌栓12例的介入治疗. *中华临床医师杂志(电子版)* 2011; 5: 593-595
- 13 陈胜利, 田晔, 黄子诚, 陈国东, 钟红, 朱栋梁. 经肝动脉化疗栓塞治疗原发性肝癌肝静脉与下腔静脉癌栓的疗效观察. *实用放射学杂志* 2008; 24: 355-358
- 14 罗剑钧, 颜志平, 王建华, 刘清欣, 瞿旭东. 植入<sup>125</sup>I籽源条及金属内支架联合经动脉化疗栓塞治疗肝癌合并下腔静脉梗阻的初步经验. *介入放射学杂志* 2009; 18: 827-830
- 15 李洪兵, 吕光明. 内支架置入联合立体定向放疗治疗肝癌致下腔静脉癌栓临床研究. *中华实用诊断与治疗杂志* 2011; 25: 602-604
- 16 Yen Y, Lim DW, Chung V, Morgan RJ, Leong LA, Shibata SI, Wagman LD, Marx H, Chu PG, Longmate JA, Lenz HJ, Ramanathan RK, Belani CP, Gandara DR. Phase II study of oxaliplatin in patients with unresectable, metastatic, or recurrent hepatocellular cancer: a California Cancer Consortium Trial. *Am J Clin Oncol* 2008; 31: 317-322
- 17 Uhm JE, Park JO, Lee J, Park YS, Park SH, Yoo BC, Paik SW, Koh KC, Kang WK, Lim HY. A phase II study of oxaliplatin in combination with doxorubicin as first-line systemic chemotherapy in patients with inoperable hepatocellular carcinoma. *Cancer*

## ■应用要点

对于失去手术机会的原发性肝癌合并下腔静脉及右心房癌栓患者,经皮腔内支架植入联合FOLFOX-4方案系统化疗不但能短期内改善下腔静脉梗阻症状,而且能提高患者生存期.

## ■同行评价

本研究初步结果显示内支架置入联合FOLFOX-4方案治疗肝癌并下腔静脉及右心房癌栓患者有效且安全,对临床应用有一定借鉴作用。

*Chemother Pharmacol* 2009; 63: 929-935

- 18 秦叔逵, 曹梦苒, 钱军, 华海清, 王琳, 何泽明. 奥沙利铂为主的FOLFOX方案治疗晚期原发性肝癌. 临床肿瘤学杂志 2005; 10: 58-60

- 19 Qin S, Bai Y, Ye S, Fan J, Lim H, Cho JY, Thong-

prasert S, Chao Y, Rau K, Sun Y. Phase III study of oxaliplatin plus 5-fluorouracil/leucovorin (FOLF-  
OX4) versus doxorubicin as palliative systemic chemotherapy in advanced HCC in Asian patients. 2010  
ASCO Annual Meeting; 2010 Jun 4-8; Chicago, USA

编辑 张姗姗 电编 鲁亚静

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2012年版权归世界华人消化杂志

## • 消息 •

## 《世界华人消化杂志》正文要求

**本刊讯** 本刊正文标题层次为 0 引言; 1 材料和方法, 1.1 材料, 1.2 方法; 2 结果; 3 讨论; 4 参考文献. 序号一律左顶格写, 后空1格写标题; 2级标题后空1格接正文. 以下逐条陈述: (1)引言 应包括该研究的目的和该研究与其他相关研究的关系. (2)材料和方法 应尽量简短, 但应让其他有经验的研究者能够重复该实验. 对新的方法应该详细描述, 以前发表过的方法引用参考文献即可, 有关文献中或试剂手册中的方法的改进仅描述改进之处即可. (3)结果 实验结果应合理采用图表和文字表示, 在结果中应避免讨论. (4)讨论 要简明, 应集中对所得的结果做出解释而不是重复叙述, 也不应是大量文献的回顾. 图表的数量要精选. 表应有表序和表题, 并有足够具有自明性的信息, 使读者不查阅正文即可理解该表的内容. 表内每一栏均应有表头, 表内非公知通用缩写应在表注中说明, 表格一律使用三线表(不用竖线), 在正文中该出现的地方应注出. 图应有图序、图题和图注, 以使其容易被读者理解, 所有的图应在正文中该出现的地方注出. 同一个主题内容的彩色图、黑白图、线条图, 统一用一个注解分别叙述. 如: 图1 萎缩性胃炎治疗前后病理变化. A: ...; B: ...; C: ...; D: ...; E: ...; F: ...; G: ... 曲线图可按●、○、■、□、▲、△顺序使用标准的符号. 统计学显著性用: <sup>a</sup> $P<0.05$ , <sup>b</sup> $P<0.01$ ( $P>0.05$ 不注). 如同一表中另有一套 $P$ 值, 则<sup>c</sup> $P<0.05$ , <sup>d</sup> $P<0.01$ ; 第3套为<sup>e</sup> $P<0.05$ , <sup>f</sup> $P<0.01$ .  $P$ 值后注明何种检验及其具体数字, 如 $P<0.01$ ,  $t=4.56$  vs 对照组等, 注在表的左下方. 表内采用阿拉伯数字, 共同的计量单位符号应注在表的右上方, 表内个位数、小数点、±、-应上下对齐. “空白”表示无此项或未测, “-”代表阴性未发现, 不能用同左、同上等. 表图勿与正文内容重复. 表图的标目尽量用 $t/\text{min}$ ,  $c/(\text{mol/L})$ ,  $p/\text{kPa}$ ,  $V/\text{mL}$ ,  $t/^\circ\text{C}$ 表达. 黑白图请附黑白照片, 并拷入光盘内; 彩色图请提供冲洗的彩色照片, 请不要提供计算机打印的照片. 彩色图片大小 $7.5\text{ cm}\times 4.5\text{ cm}$ , 必须使用双面胶条粘贴在正文内, 不能使用浆糊粘贴. (5)志谢 后加冒号, 排在讨论后及参考文献前, 左齐.



# 实时定量PCR法分析2型糖尿病患者肠道乳酸杆菌菌种数量的改变

刘婷婷, 蔡德鸿

刘婷婷, 蔡德鸿, 南方医科大学附属珠江医院内分泌科 广东省广州市 510282

刘婷婷, 在读硕士, 主要从事内分泌与代谢病方面的研究.

作者贡献分布: 刘婷婷进行实验设计、实施、数据收集及文章撰写; 蔡德鸿负责实验评估、统计学审核、文章修改及拟定研究方向指导研究工作.

通讯作者: 蔡德鸿, 教授, 博士生导师, 510282, 广东省广州市工业路253号, 南方医科大学珠江医院内分泌科. cai\_de\_hong@126.com  
收稿日期: 2012-02-24 修回日期: 2012-03-30

接受日期: 2012-04-19 在线出版日期: 2012-05-28

## Real-time quantitative PCR analysis of intestinal *Lactobacillus* species in type 2 diabetic patients

Ting-Ting Liu, De-Hong Cai

Ting-Ting Liu, De-Hong Cai, Department of Endocrinology, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong Province, China

Correspondence to: De-Hong Cai, Professor, Department of Endocrinology, Zhujiang Hospital, 253 Gongye Road, Guangzhou 510282, Guangdong Province, China. cai\_de\_hong@126.com

Received: 2012-02-24 Revised: 2012-03-30

Accepted: 2012-04-19 Published online: 2012-05-28

## Abstract

**AIM:** To assess the differences in *Lactobacillus* species between patients with type 2 diabetes mellitus (T2DM) and healthy individuals, and to determine the association between metabolic parameters and *Lactobacillus* species in T2DM patients.

**METHODS:** This study included 50 T2DM patients and 30 healthy individuals of similar age, gender and BMI. Blood samples were collected from T2DM to measure metabolic parameters. Bacterial DNA was extracted from fecal samples to assess the quantities of bacteria using real-time quantitative PCR with primers specifically targeting V3 region of the 16s rRNA.

**RESULTS:** The quantities of *Lactobacillus* ( $P < 0.001$ ), *L. acidophilus* ( $P < 0.001$ ), *L. bugarius* ( $P < 0.001$ ), *L. cacei* ( $P = 0.008$ ) and *L. Rahnmosumand* ( $P < 0.001$ ) were significantly increased in the

T2DM group compared to the control group. The quantity of *Lactobacillus* was significantly negatively associated with LDL cholesterol levels ( $P = 0.04$ ).

**CONCLUSION:** T2DM patients are characterized by an increase in the quantity of *Lactobacillus* species in the guts compared to normal controls. *Lactobacillus* in the guts play a role in influencing cholesterol metabolism in T2DM patients. Modification of the gut microflora by dietary means may help control metabolic diseases such as dyslipidemia and diabetes.

**Key Words:** Real-time quantitative PCR; T2DM; *Lactobacillus*

Liu TT, Cai DH. Real-time quantitative PCR analysis of intestinal *Lactobacillus* species in type 2 diabetic patients. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(15): 1359-1365

## 摘要

**目的:** 明确2型糖尿病患者与正常对照人群比较是否存在总乳酸杆菌及其具体菌种嗜酸乳杆菌、保加利亚乳杆菌、干酪乳杆菌、植物乳杆菌、鼠李糖乳杆菌数目的差异, 以及探索乳酸杆菌与血糖、血脂等代谢指标是否相关.

**方法:** 选取2型糖尿病患者50人、正常对照者30人作为研究对象, 两组性别、年龄、BMI相匹配. 检测糖尿病患者空腹血糖、餐后2 h血糖、血脂、C反应蛋白等指标, 并收集糖尿病患者及对照者粪便提取细菌总DNA, 通过实时荧光定量PCR方法测定目标细菌的拷贝数.

**结果:** 2型糖尿病组肠道乳酸杆菌( $P < 0.001$ )及嗜酸乳杆菌( $P < 0.001$ )、保加利亚乳杆菌( $P < 0.001$ )、干酪乳杆菌( $P = 0.008$ )、鼠李糖乳杆菌( $P < 0.001$ )显著高于对照组, 且乳酸杆菌与低密度脂蛋白胆固醇显著负相关( $P = 0.04$ ).

**结论:** 2型糖尿病患者肠道总乳酸杆菌及其某些具体菌种数量增多, 乳酸杆菌数量的改变对

## ■背景资料

近年来研究发现, 2型糖尿病的发生机制除了与基因及饮食结构、体力活动等环境因素有关之外, 还与肠道菌群关系密切. 肠道菌群与代谢性疾病的发生发展密切相关, 已成为国内外研究的新热点.

## ■同行评议者

于珮, 主任医师, 天津医科大学代谢病医院

## ■ 研发前沿

研究表明, 2型糖尿病患者或动物模型与正常对照者相比肠道菌群构成发生了改变, 这可能是引起胰岛素抵抗及糖尿病的因素。也有动物实验发现, 通过改变饮食因素来调节肠道菌群结构能够引起肥胖, 进而增加糖尿病的风险。

血脂也存在影响。通过饮食调节肠道乳酸杆菌含量可能有助于改善糖尿病、高脂血症等代谢性疾病。

**关键词:** 实时定量PCR; 2型糖尿病; 乳酸杆菌

刘婷婷, 蔡德鸿. 实时定量PCR法分析2型糖尿病患者肠道乳酸杆菌菌种数量的改变. 世界华人消化杂志 2012; 20(15): 1359-1365

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1359.asp>

## 0 前言

人体消化系定植着相当复杂又相对稳定的肠道菌群, 在能量代谢、免疫防御、合成人体必需的微量元素及矿物质等方面发挥着不可替代的作用<sup>[1,2]</sup>。近年来研究发现, 2型糖尿病的发生机制除了与基因及饮食结构、体力活动等环境因素有关之外, 还与肠道菌群关系密切<sup>[3,4]</sup>。研究表明, 2型糖尿病患者或动物模型与正常对照者相比肠道菌群构成发生了改变, 这可能是引起胰岛素抵抗及糖尿病的因素<sup>[5,6]</sup>。也有动物实验发现, 通过改变饮食因素来调节肠道菌群结构能够引起肥胖, 进而增加糖尿病的风险<sup>[2,7]</sup>。肠道菌群与代谢性疾病的发生发展密切相关, 已成为国内外研究的新热点。目前肠道菌群与代谢性疾病关系的研究主要是通过动物实验, 而关于人体肠道菌群的研究数据较少, 且现有数据主要集中在“菌属”水平, 而对其中具体“菌种”在代谢中的作用研究尚存在空白。乳酸杆菌普遍存在于人类消化系中, 并且经常作为益生菌加入食品中<sup>[8,9]</sup>。乳酸杆菌属包含众多菌种, 如: 嗜酸乳杆菌、保加利亚乳杆菌、干酪乳杆菌、植物乳杆菌、鼠李糖乳杆菌等, 目前鲜有人体肠道乳酸杆菌具体菌种与代谢性疾病关系的研究数据。且目前乳酸杆菌与人类健康的相互作用仍存在分歧, 其影响人体代谢的机制仍不十分清楚。有实验发现, 服用乳酸杆菌能减轻大鼠的肥胖及胰岛素抵抗<sup>[10-13]</sup>。然而也有实验表明, 乳酸杆菌能引起炎症反应, 而炎症反应又与肥胖及2型糖尿病有关<sup>[14-19]</sup>。因此本研究选取乳酸杆菌及其具体菌种(嗜酸乳杆菌、保加利亚乳杆菌、干酪乳杆菌、植物乳杆菌、鼠李糖乳杆菌), 在“菌属”及具体“菌种”水平上, 应用荧光定量PCR技术, 比较我国2型糖尿病人群与血糖正常人群肠道上述菌数量的差异, 并且分析乳酸杆菌数量与血糖、血脂等代谢性指标的相关性, 从而为2型糖尿病的发病机制提供新线索,

为2型糖尿病的防治寻求新靶点。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 荧光定量PCR仪ABI7500 System(ABI公司), 紫外分光光度计SmartSpec™3000(美国Bio-rad), 凝胶成像仪(美国Bio-rad), Mastercycler梯度PCR仪(eppendorf公司), 水平式电泳仪(上海精益玻璃仪器厂), Himac CR22G高速冷冻离心机(日本日立公司), 台式离心机(eppendorf公司), rTaq DNA聚合酶、DL2000 DNA Marker、SYBR Premix Dimer Erase(Perfect Real Time)购自大连TaKaRa公司; 细菌基因组DNA提取试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒购自北京TIANGEN公司; 0.2 mL PCR8联管购自AXYGEN公司; 其他试剂皆为国产分析纯, 所用引物均参照GenBank提供的序列, 由上海英骏生物技术有限公司合成。选取2010-08/10在广东省某社区医院住院及门诊随诊的2型糖尿病患者50人。纳入标准: (1)符合诊断标准的2型糖尿病患者(根据WHO糖尿病分型及诊断标准); (2)无肿瘤及肝、肾等脏器严重损害, 无甲状腺等其他内分泌疾病; (3)近1 mo内未服用抗生素及微生态制剂; (4)近4 wk内无腹泻病或其他胃肠道疾病; (5)近3 mo内未服用任何降脂药治疗, 同时选取30名健康对照者。纳入标准: (1)无糖尿病; (2)无其他脏器严重损害, 无甲状腺等其他内分泌疾病; (3)近1 mo内未服用抗生素及微生态制剂; (4)近4 wk内无腹泻病或其他胃肠道疾病史。研究经由南方医科大学伦理委员会书面批准。

## 1.2 方法

**1.2.1 人体测量、粪便样品收集及血样品化验:** 对每个研究对象进行身高、体质量测量, 计算BMI。收集每个2型糖尿病患者空腹血样品, 进行空腹血糖(FBG)、糖化血红蛋白(HbA1C)、血脂(包括TC、LDL-C、HDL-C、TG)、C反应蛋白(CRP)浓度测定。进行OGTT试验, 收集2 h后血样品进行餐后2 h血糖(PBG)浓度测定。收集每个研究对象当日粪便样品, -70 °C保存。

## 1.2.2 粪便样品的预处理和细菌总DNA的提取:

(1)粪便中菌体的收集: 称取湿重粪便样品每份2 g于无菌离心管中, 加入20 mL灭菌PBS(0.01 mol/L, pH 7.4), 充分振荡, 3 000 r/min离心5 min, 收集上清(菌体), 重复洗涤3次。将收集的上清液12 000 r/min离心10 min, 收集沉淀(菌体)。收集的菌体用20 mL灭菌PBS(pH 7.4)悬浮, 12 000 r/min离心5 min, 重复洗涤3次, 得到的菌体沉淀保存

表 1 引物序列

目标细菌名称	F序列	R序列
乳酸杆菌	AGCAGTAGGGAATCTTCCA	CACCGCTACACATGGAG
嗜酸乳杆菌	GAAAGAGCCCAACCAAGTGATT	CTTCCCAGATAATTCAACTATCGCTTA
保加利亚乳杆菌	GGRTGATTGTTGGACGCTAG	GCCGCCTTCAAACCTGAATC
干酪乳杆菌	GCACCGAGATTCAACATGG	GGTTCTTGGATYTATGCGGTATTAG
植物乳杆菌	TGGATCACCTCCTTTCTAAGGAAT	TGTTCTCGGTTTCATTATGAAAAATA
鼠李糖乳杆菌	TGCTTGCATCTTGATTAAATTTG	GTCCATTGTGGAAGATTCCC

## ■ 相关报道

Larsen等研究发现, 糖尿病患者肠道乳酸杆菌含量升高, 这与本研究结果一致。

表 2 各标准品浓度

目标细菌	标准品原浓度(copies/mL)	标准品10倍系列稀释浓度(copies/mL)
乳酸杆菌	$3.21 \times 10^{13}$	$3.21 \times 10^4 - 3.21 \times 10^{11}$
嗜酸乳杆菌	$2.87 \times 10^{13}$	$2.87 \times 10^3 - 2.87 \times 10^{10}$
保加利亚乳杆菌	$3.76 \times 10^{13}$	$3.76 \times 10^3 - 3.76 \times 10^{10}$
干酪乳杆菌	$1.99 \times 10^{13}$	$1.99 \times 10^3 - 1.99 \times 10^{10}$
植物乳杆菌	$2.18 \times 10^{13}$	$2.18 \times 10^3 - 2.18 \times 10^{10}$
鼠李糖乳杆菌	$4.00 \times 10^{13}$	$4.00 \times 10^3 - 4.00 \times 10^{10}$

于-20℃, 或者直接用于DNA提取; (2)粪便细菌总DNA的提取: 用细菌基因组DNA提取试剂盒提取细菌总DNA, 具体步骤按操作说明进行, 并进行1.0%的琼脂糖凝胶电泳分析, 得到的DNA溶液放置于-20℃保存。

1.2.3 实时荧光定量PCR: (1)PCR引物设计: 根据16s rRNA基因序列, 应用引物设计软件Primer Premier 5.0设计特异性PCR引物。并在BLAST基因库内比对引物序列的相应种属特异性, 各引物序列见表1; (2)标准曲线制作: 以各标准菌株PCR产物经切胶、回收后所得的DNA片段作为荧光定量PCR的标准品, 用紫外分光光度计测定吸光度(A)值及浓度, 换算为各标准品1 mL的拷贝数, 用于制作标准曲线。将标准品做10倍系列稀释, 各做8个10倍稀释浓度, 如表2所示。根据系列稀释后的标准品反应时的荧光扩增信号, 采用ABI7500 System数据分析软件自动生成乳酸杆菌总属及其具体菌种的标准曲线; (3)粪便样品16s rRNA定量分析: 将待测粪便样品中提取的DNA分别进行乳酸杆菌总属及其具体菌种16s rRNA荧光定量PCR反应, 每次反应体系和反应条件均相同。反应体系20 μL: SYBR premix(2×) 10 μL, 10 μmol/L的上下游引物各0.6 μL, ROX Reference Dye(50×) 0.4 μL, ddH<sub>2</sub>O 6.4 μL, 待测DNA样品或标准品2 μL。反应条件: 95℃变性30 s; 循环40次: 95℃变性5 s→55℃退火30 s→72℃延伸34 s; 熔解95℃ 15 s→60℃ 1 min→

95℃ 15 s→冷却60℃ 15 s。将10倍系列稀释的标准品与粪便细菌DNA样品同时进行real-time PCR反应。每次实验同时设标准品及空白对照, 每个样品均同时做2个平行复孔。反应完毕后根据熔解曲线分析PCR产物的特异性, 根据Ct值及标准曲线计算每克粪便样品中待测细菌基因的拷贝数, 作为定量结果。

**统计学处理** 样品定量数据经lg转换后导入SPSS17.0统计软件进行分析。应用Mann-Whitney U检验比较组间差异。用线性回归分析总乳酸杆菌拷贝数与糖尿病患者脂代谢指标、糖代谢指标、炎症指标的相关性。以P<0.05为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 研究对象的基本信息及代谢指标统计 糖尿病组共50人(男:女=23:27), 对照组共30人(男:女=17:13)。两组基本信息(性别、年龄、BMI)统计结果见表3。两组年龄范围40-76岁, 两组性别、年龄、BMI无统计学差异, 具有良好可比性。糖尿病组脂代谢指标(TG、TC、LDL-C、HDL-C)、糖代谢指标(FBG、PBG、HbA1C)、炎症指标(CRP)统计结果见表4。

2.2 DNA的纯度检测 采用紫外分光光度法测定, DNA标准品在A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>的比值均在1.6-1.8, 说明作为标准品的DNA纯度较高, 无蛋白质污染。所提取的DNA样品进行1.0%的琼脂糖凝胶电泳可见清晰条带, 提示DNA样品完整性良好。

### ■创新盘点

本实验比较了2型糖尿病患者与正常对照人群总乳酸杆菌及其具体菌种嗜酸乳杆菌、保加利亚乳杆菌、干酪乳杆菌、植物乳杆菌、鼠李糖乳杆菌数目的差异,以及探索乳酸杆菌与血糖、血脂等代谢指标是否相关。

表 3 糖尿病组与对照组基本信息统计

	糖尿病组( $n = 50$ )	对照组( $n = 30$ )	$P$ 值
性别(男/女)	23/27	17/13	0.3
年龄(岁)	$60 \pm 8$	$61 \pm 9$	0.7
BMI( $\text{kg}/\text{m}^2$ )	$24.7 \pm 3.8$	$23.9 \pm 3.0$	0.5

表 4 糖尿病组代谢指标及炎症指标

指标	FBG (mmol/L)	餐后2 h PBG (mmol/L)	HbA1C (%)	TG (mmol/L)	TC (mmol/L)	LDL-C (mmol/L)	HDL-C (mmol/L)	CRP (mg/L)
糖尿病组	$7.9 \pm 2.2$	$13.9 \pm 4.4$	$7.9 \pm 1.8$	$2.1 \pm 1.2$	$5.3 \pm 1.4$	$2.9 \pm 0.9$	$1.4 \pm 0.2$	$2.5 \pm 2.9$
标准值	3.6–6.1	3.6–7.8	4.0–6.0	0.4–1.8	3.4–6.0	2.0–4.1	0.7–1.9	0–3.0

表 5 两组间乳酸杆菌属及具体菌种数量比较

	糖尿病组( $n = 50$ )		对照组( $n = 30$ )		$P$ 值
	中位数	平均秩次	中位数	平均秩次	
乳酸杆菌	7.7850	51.86	6.5750	21.57	$<0.001$
嗜酸乳杆菌	4.2650	48.63	2.7450	26.95	$<0.001$
保加利亚乳杆菌	5.0026	48.66	4.5782	26.90	$<0.001$
干酪乳杆菌	4.8432	45.78	4.3028	31.70	0.008
植物乳杆菌	4.4025	39.94	4.6255	41.43	0.786
鼠李糖乳杆菌	3.6017	50.92	2.6007	23.13	$<0.001$

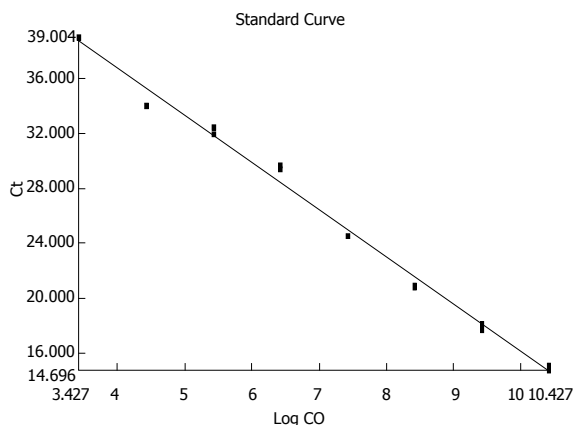


图 1 乳酸杆菌标准曲线.  $R^2=0.99$ .

**2.3 实时荧光定量PCR** 根据标准品反应时的荧光扩增信号,采用ABI7500 System数据分析软件自动生成乳酸杆菌及其具体菌种的标准曲线及扩增曲线,其中乳酸杆菌标准曲线如图1,扩增曲线如图2。

**2.4 糖尿病组与对照组乳酸杆菌属及具体菌种数量比较** 用Mann-Whitney  $U$ 检验对乳酸杆菌属及具体菌种real-time qPCR结果进行统计学分析,见表5,糖尿病组乳酸杆菌( $P<0.001$ )及嗜酸乳杆菌( $P<0.001$ )、干酪乳杆菌( $P = 0.008$ )、保加利

亚乳杆菌( $P<0.001$ )、鼠李糖乳杆菌( $P<0.001$ )含量显著高于对照组,糖尿病组植物乳杆菌含量低于健康对照组,但差异不具有显著性( $P = 0.786$ ,图3)。

**2.5 乳酸杆菌与糖尿病患者代谢指标、炎症指标的相关性** 回归分析结果显示乳酸杆菌与脂代谢指标显著相关,与糖代谢指标、炎症指标之间未发现明显相关性。总乳酸杆菌与LDL-C显著负相关( $P = 0.04$ ),与TC( $P = 0.07$ )、TG( $P = 0.13$ )、HDL-C( $P = 0.14$ )呈负相关,但相关性不具有统计学意义。

### 3 讨论

本研究利用16s rRNA保守区序列在所有菌种中具有高度一致性,而可变区序列在不同菌种中差异较大的特点,针对目标细菌16s rRNA V3区序列设计特异性引物,应用实时荧光定量PCR技术对样本进行检测,具有高度特异性。通过对乳酸杆菌属及其具体菌种的定量分析比较,可以初步认为:乳酸杆菌、嗜酸乳杆菌、保加利亚乳杆菌、干酪乳杆菌及鼠李糖乳杆菌在2型糖尿病人群和血糖正常人群中存在差异,2型糖尿病人群中上述菌种增多,并且与血脂水平呈显



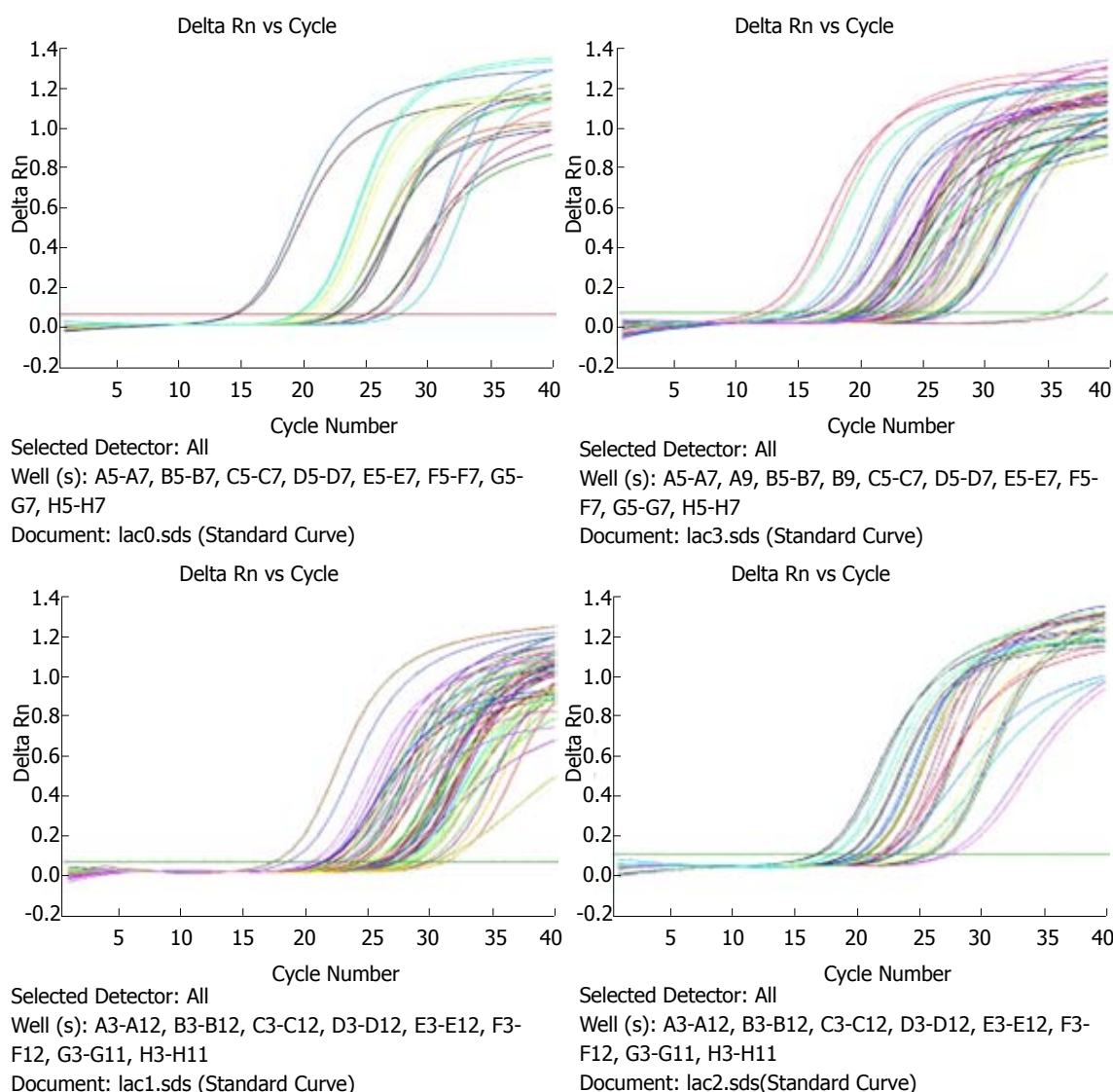


图 2 乳酸杆菌扩增曲线.

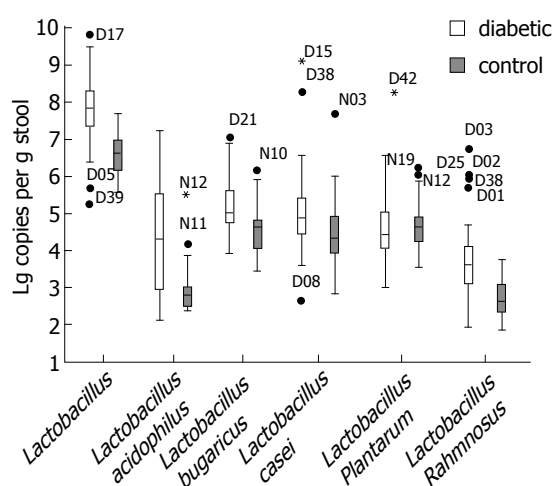


图 3 两组间乳酸杆菌属及具体菌种数量比较. 中心线对应中位数, 箱两端对应25与75分位数, 丝两端对应2.5与97.5分位数.

著负相关.

#### ■应用要点

本研究证实2型糖尿病患者肠道乳酸杆菌含量在“菌属”及“菌种”水平发生了特征性改变,这可能成为早期发现糖尿病高危人群的新途径,有助于改善糖尿病、高脂血症等代谢性疾病.

Larsen等<sup>[20]</sup>研究发现,糖尿病患者肠道乳酸杆菌含量升高,这与本研究结果一致.而且本研究进一步测定了乳酸杆菌具体菌种的含量,结果显示其中嗜酸乳杆菌、保加利亚乳杆菌、干酪乳杆菌、鼠李糖乳杆菌在2型糖尿病人群中含量增多.乳酸杆菌在代谢性疾病发生发展过程中的作用目前仍未被阐明.研究发现,饮食中添加乳酸杆菌可以改善胰岛素抵抗<sup>[10,21]</sup>.然而也有研究指出,乳酸杆菌具有促炎症作用<sup>[14]</sup>,可以推断,肠道乳酸杆菌数量改变可能通过慢性低度炎症反应引起肥胖、胰岛素抵抗及糖尿病<sup>[22]</sup>.然而,本实验通过测定CRP浓度未发现乳酸杆菌数量与炎症反应具有显著相关性,这可能是由于乳酸杆菌数量改变仅引起局部炎症反应,且低于系统检测水平.研究表明,饮食是肠道菌群构成的主要影响因素,高脂饮食可导致肠道菌群的改变<sup>[19]</sup>.糖尿病患者肠道乳酸杆菌数量增多



# 同行评价

本研究探讨肠道乳杆菌数量改变与糖代谢的相关性, 研究内容有一定新颖性, 全文语言比较流畅, 参考文献比较新颖。

可能是长期高脂饮食引起, 而高脂饮食可引起肥胖, 进一步促进胰岛素抵抗及糖尿病的发生。另外, 大量研究证实, 肠道菌群能够将不溶性蛋白质、糖类转化为可溶性物质, 将多糖转化为单糖, 将葡萄糖分解形成乳酸, 参与胆固醇代谢等, 为宿主提供能量<sup>[1,23,24]</sup>, 也许正是因为肠道菌群构成的改变, 造成消化系物质能量吸收、代谢的紊乱, 进而引发2型糖尿病等代谢性疾病, 其机制有待于进一步研究明确。

在所有代谢指标中, 只发现LDL-C与乳酸杆菌显著负相关。2型糖尿病常伴有血脂异常, 其特点是TC、TG、LDL-C升高和/或HDL-C降低。血脂异常的原因除了饮食、遗传因素之外可能也与肠道菌群存在一定联系<sup>[25]</sup>。有研究发现, 饮用含有嗜酸乳酸杆菌的酸奶能降低2型糖尿病患者血浆总TG和LDL-C浓度<sup>[26]</sup>, 因此可以推测, 肠道菌群对血脂代谢具有一定的调节作用, 但其具体机制仍未明确, 能否通过调节肠道菌群来改善血脂异常有待进一步研究。

遗憾的是, 本研究并未发现乳酸杆菌数量与FBG、PBG、HbA1C、C肽的明显相关性, 这可能是由于2型糖尿病代谢紊乱是与肠道菌群的整体失衡有关, 而与单一乳酸杆菌属改变关系不明显。因此, 需要进行更大规模的样本量以及更广泛范围的菌群分析来深入探索2型糖尿病代谢紊乱与肠道菌群失衡的具体相关性。

总之, 本研究证实2型糖尿病患者肠道乳酸杆菌含量在“菌属”及“菌种”水平发生了特征性改变, 这可能成为早期发现糖尿病高危人群的新途径。本研究还发现乳酸杆菌数量的改变对血脂也存在影响。通过饮食调节肠道乳酸杆菌含量可能有助于改善糖尿病、高脂血症等代谢性疾病。

**志谢:** 感谢南方医科大学生物治疗实验室的大力支持和帮助。

## 参考文献

- de Roos NM, Katan MB. Effects of probiotic bacteria on diarrhea, lipid metabolism, and carcinogenesis: a review of papers published between 1988 and 1998. *Am J Clin Nutr* 2000; 71: 405-411
- Bäckhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A, Semenkovich CF, Gordon JL. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 15718-15723
- Musso G, Gambino R, Cassader M. Interactions between gut microbiota and host metabolism predisposing to obesity and diabetes. *Annu Rev Med* 2011;

62: 361-380

- Wu X, Ma C, Han L, Nawaz M, Gao F, Zhang X, Yu P, Zhao C, Li L, Zhou A, Wang J, Moore JE, Millar BC, Xu J. Molecular characterisation of the faecal microbiota in patients with type II diabetes. *Curr Microbiol* 2010; 61: 69-78
- Delzenne NM, Cani PD. Gut microbiota and the pathogenesis of insulin resistance. *Curr Diab Rep* 2011; 11: 154-159
- Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, Waget A, Neyrinck AM, Delzenne NM, Burcelin R. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes* 2008; 57: 1470-1481
- Tremaroli V, Kovatcheva-Datchary P, Bäckhed F. A role for the gut microbiota in energy harvesting? *Gut* 2010; 59: 1589-1590
- Hove H, Nørgaard H, Mortensen PB. Lactic acid bacteria and the human gastrointestinal tract. *Eur J Clin Nutr* 1999; 53: 339-350
- Dunne C, Murphy L, Flynn S, O'Mahony L, O'Halloran S, Feeney M, Morrissey D, Thornton G, Fitzgerald G, Daly C, Kiely B, Quigley EM, O'Sullivan GC, Shanahan F, Collins JK. Probiotics: from myth to reality. Demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials. *Antonie Van Leeuwenhoek* 1999; 76: 279-292
- Naito E, Yoshida Y, Makino K, Kounoshi Y, Kunihiro S, Takahashi R, Matsuzaki T, Miyazaki K, Ishikawa F. Beneficial effect of oral administration of *Lactobacillus casei* strain Shirota on insulin resistance in diet-induced obesity mice. *J Appl Microbiol* 2011; 110: 650-657
- Matsuzaki T, Yamazaki R, Hashimoto S, Yokokura T. Antidiabetic effects of an oral administration of *Lactobacillus casei* in a non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM) model using KK-Ay mice. *Endocr J* 1997; 44: 357-365
- Matsuzaki T, Nagata Y, Kado S, Uchida K, Hashimoto S, Yokokura T. Effect of oral administration of *Lactobacillus casei* on alloxan-induced diabetes in mice. *APMIS* 1997; 105: 637-642
- Tabuchi M, Ozaki M, Tamura A, Yamada N, Ishida T, Hosoda M, Hosono A. Antidiabetic effect of *Lactobacillus GG* in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 2003; 67: 1421-1424
- Zeuthen LH, Christensen HR, Frøkiær H. Lactic acid bacteria inducing a weak interleukin-12 and tumor necrosis factor alpha response in human dendritic cells inhibit strongly stimulating lactic acid bacteria but act synergistically with gram-negative bacteria. *Clin Vaccine Immunol* 2006; 13: 365-375
- Santacruz A, Marcos A, Wärnberg J, Martí A, Martín-Matillas M, Campoy C, Moreno LA, Veiga O, Redondo-Figuero C, Garagorri JM, Azcona C, Delgado M, García-Fuentes M, Collado MC, Sanz Y. Interplay between weight loss and gut microbiota composition in overweight adolescents. *Obesity (Silver Spring)* 2009; 17: 1906-1915
- Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, Neyrinck AM, Fava F, Tuohy KM, Chabo C, Waget A, Delmée E, Cousin B, Sulpice T, Chamontin B, Ferrières J, Tanti JF, Gibson GR, Casteilla L, Delzenne NM, Alessi MC, Burcelin R. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 2007; 56: 1761-1772
- Cani PD, Delzenne NM, Amar J, Burcelin R. Role of gut microflora in the development of obesity and

- insulin resistance following high-fat diet feeding. *Pathol Biol (Paris)* 2008; 56: 305-309
- 18 Cani PD, Delzenne NM. Gut microflora as a target for energy and metabolic homeostasis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2007; 10: 729-734
- 19 Cani PD, Neyrinck AM, Fava F, Knauf C, Burcelin RG, Tuohy KM, Gibson GR, Delzenne NM. Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia. *Diabetologia* 2007; 50: 2374-2383
- 20 Larsen N, Vogensen FK, van den Berg FW, Nielsen DS, Andreasen AS, Pedersen BK, Al-Soud WA, Sørensen SJ, Hansen LH, Jakobsen M. Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults. *PLoS One* 2010; 5: e9085
- 21 Andreasen AS, Larsen N, Pedersen-Skovsgaard T, Berg RM, Møller K, Svendsen KD, Jakobsen M, Pedersen BK. Effects of *Lactobacillus acidophilus* NCFM on insulin sensitivity and the systemic inflammatory response in human subjects. *Br J Nutr* 2010; 104: 1831-1838
- 22 Wellen KE, Hotamisligil GS. Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest* 2005; 115: 1111-1119
- 23 Stappenbeck TS, Hooper LV, Gordon JI. Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via Paneth cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 15451-15455
- 24 Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 2006; 444: 1027-1031
- 25 Pereira DI, Gibson GR. Cholesterol assimilation by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from the human gut. *Appl Environ Microbiol* 2002; 68: 4689-4693
- 26 Lu YC, Yin LT, Chang WT, Huang JS. Effect of *Lactobacillus reuteri* GMNL-263 treatment on renal fibrosis in diabetic rats. *J Biosci Bioeng* 2010; 110: 709-715

编辑 曹丽鸥 电编 鲁亚静

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2012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)

# PGC-1 $\alpha$ 在炎症性肠病肠黏膜组织中的表达及临床意义

陈腾飞, 邬瑞金, 刘嫦钦, 刘占举

## ■背景资料

肠黏膜微生态环境的失衡, 尤其是肠黏膜组织内能量代谢失衡、抗氧化屏障减弱, 在炎症性肠病(IBD)的发生发展过程中的作用不可忽视。

陈腾飞, 邬瑞金, 刘嫦钦, 刘占举, 同济大学附属第十人民医院胃肠内科 上海市 200072

陈腾飞, 硕士, 主要从事炎症性肠病方向的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30971358, No. 81061120521  
作者贡献分布: 此课题由刘占举设计; 研究过程由陈腾飞、刘嫦钦及邬瑞金操作完成; 论文写作由陈腾飞与刘占举完成。

通讯作者: 刘占举, 教授, 200072, 上海市延长中路301号, 同济大学附属第十人民医院胃肠内科。zhanjuliu@yahoo.com

电话: 021-66301164

收稿日期: 2012-02-08 修回日期: 2012-03-13

接受日期: 2012-04-25 在线出版日期: 2012-05-28

## Clinical significance of expression of peroxisome proliferator-activated receptor $\gamma$ coactivator 1 $\alpha$ in the inflamed mucosa of patients with inflammatory bowel disease

Teng-Fei Chen, Rui-Jin Wu, Chang-Qin Liu, Zhan-Ju Liu

Teng-Fei Chen, Rui-Jin Wu, Chang-Qin Liu, Zhan-Ju Liu, Department of Gastroenterology, Shanghai Tenth People's Hospital, Tongji University, Shanghai 200072, China  
Supported by: National Natural Science Foundation of China, Nos. 30971358, 81061120521

Correspondence to: Zhan-Ju Liu, Professor, Department of Gastroenterology, Shanghai Tenth People's Hospital, Tongji University, 301 Yanchang Middle Road, Shanghai 200072, China. zhanjuliu@yahoo.com

Received: 2012-02-08 Revised: 2012-03-13

Accepted: 2012-04-25 Published online: 2012-05-28

## Abstract

**AIM:** To investigate the expression of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator (PGC) 1 $\alpha$  in the inflamed mucosa of patients with inflammatory bowel disease (IBD).

**METHODS:** Inflamed colonic mucosal biopsies were collected from 15 patients with ulcerative colitis (UC), 17 patients with Crohn's disease (CD) and 14 healthy subjects. Expression of PGC-1 $\alpha$  mRNA and protein in the intestinal mucosa was detected by real-time PCR and immunohistochemistry, respectively.

**RESULTS:** Immunohistochemical analysis revealed that PGC-1 $\alpha$  was mainly expressed in intestinal epithelial cells in healthy mucosa and lowly expressed in lamina propria mononuclear

cells. The positive rate of PGC-1 $\alpha$  protein expression in the intestinal mucosa of UC patients was significantly lower than that in healthy controls ( $P < 0.05$ ), but no significant difference was found between CD patients and healthy controls ( $P > 0.05$ ). Compared with healthy controls, the levels of PGC-1 $\alpha$  mRNA were significantly decreased in the inflamed mucosa of UC patients ( $0.48 \pm 0.15$  vs  $1.59 \pm 0.38$ ,  $P < 0.05$ ), but not in CD patients.

**CONCLUSION:** Aberrant expression of PGC-1 $\alpha$  may play an important role in the pathogenesis of UC. The induction of biological effect of PGC-1 $\alpha$  may have a therapeutic role in the treatment of UC.

**Key Words:** Inflammatory bowel disease; Ulcerative colitis; Crohn's disease; Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator 1 $\alpha$

Chen TF, Wu RJ, Liu CQ, Liu ZJ. Clinical significance of expression of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator 1 $\alpha$  in the inflamed mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(15): 1366-1370

## 摘要

**目的:** 检测过氧化物酶体增殖物激活受体 $\gamma$ 辅激活因子1 $\alpha$ (PGC-1 $\alpha$ )在炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)患者肠黏膜的表达水平, 探讨其在IBD患者肠黏膜组织中的作用。

**方法:** 收集15例溃疡性结肠炎(Ulcerative colitis, UC)患者、17例克罗恩病(Crohn's disease, CD)患者炎性肠黏膜活检标本及14例正常对照者内镜肠黏膜标本, 采用免疫组织化学染色技术分析PGC-1 $\alpha$ 蛋白在肠黏膜中的原位表达, 荧光定量PCR技术检测肠黏膜内PGC-1 $\alpha$  mRNA的表达水平。

**结果:** 免疫组织化学分析显示: PGC-1 $\alpha$ 蛋白在正常肠黏膜上皮细胞内表达较多, 黏膜固有层细胞内表达较少。与正常对照组相比, PGC-1 $\alpha$ 蛋白在UC患者肠黏膜上皮细胞内表达量明显减少, 而肠黏膜固有层细胞内表达增加, PGC-

## ■同行评议者

施瑞华, 教授, 南京医科大学第一附属医院消化科

1 $\alpha$ 蛋白在CD患者肠黏膜组织内表达量无明显差异。荧光定量PCR分析显示: UC患者炎症肠黏膜组织内PGC-1 $\alpha$  mRNA表达水平显著低于正常对照组( $0.48 \pm 0.15$  vs  $1.59 \pm 0.38$ ,  $P < 0.05$ ), CD患者炎症肠黏膜组织内PGC-1 $\alpha$  mRNA表达水平与正常对照组相比差异无统计学意义( $1.55 \pm 0.47$  vs  $1.59 \pm 0.38$ ,  $P > 0.05$ )。

**结论:** 与正常对照组相比, PGC-1 $\alpha$ 在UC炎症肠黏膜组织内表达水平降低, 而在CD炎症肠黏膜中表达无明显差异, 提示PGC-1 $\alpha$ 可能参与了UC发生发展过程。

**关键词:** 炎症性肠病; 溃疡性结肠炎; 克罗恩病; 过氧化物酶体增殖物激活受体 $\gamma$ 辅激活因子1 $\alpha$

陈腾飞, 邬瑞金, 刘嫦钦, 刘占举. PGC-1 $\alpha$ 在炎症性肠病肠黏膜组织中的表达及临床意义. 世界华人消化杂志 2012; 20(15): 1366-1370  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1366.asp>

## 0 引言

炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)是一组病因不明的肠道非特异性疾病, 包括克罗恩病(Crohn's disease, CD)和溃疡性结肠炎(Ulcerative colitis, UC)。目前大多数学者认为IBD的病因可能与遗传易感人群在持续肠道感染、肠黏膜屏障缺陷和环境改变等多因素作用下引起的肠道免疫系统异常反应有关<sup>[1,2]</sup>。肠黏膜微生态环境作为肠黏膜屏障的重要组成部分, 在IBD的发生发展过程中起着十分重要的作用。过氧化物酶体增殖物激活受体 $\gamma$ 辅激活因子1 $\alpha$ (peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator 1 $\alpha$ , PGC-1 $\alpha$ )是一种核受体家族转录辅助激活因子, 其特殊的氨基酸结构序列可与过氧化物酶体增殖物激活受体 $\gamma$ (peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ , PPAR $\gamma$ )、核呼吸因子(nuclear respiratory factor, NRF)、线粒体转录因子(mitochondrial DNA, mtTFA)、雌激素受体(estrogen receptor  $\alpha$ , ER $\alpha$ )等多种转录因子相互作用, 通过不同机制增强靶基因的转录效率, 广泛参与调节组织细胞的能量生成与利用过程<sup>[3]</sup>。目前PGC-1 $\alpha$ 在IBD的发病机制中的作用尚不清楚。本研究通过分析PGC-1 $\alpha$ 在IBD患者肠黏膜中的表达, 初步探讨其在IBD发病机制中的作用。

## 1 材料和方法

1.1 材料 结肠黏膜标本收集2011-03/10同济大学

附属第十人民医院胃肠内科行肠镜检查的29例活动期IBD患者, 其中UC 15例, 男7例, 女8例, 年龄23-63岁(平均39.27岁); CD 17例, 男7例, 女10例, 年龄19-45岁(平均35.48岁), 对照组为同期14例结肠镜检查无异常发现的健康体检者, 其中男7例, 女7例, 年龄25-59岁(平均41.2岁)。UC及CD患者性别、年龄组成与健康对照组间差异无统计学意义。所有患者及正常对照者标本留取前均签署知情同意书。入组患者诊断标准符合2007年中华医学会消化病学分会炎症性肠病协作组“对我国炎症性肠病诊断治疗规范的共识意见”<sup>[4]</sup>, 入组前1 mo均未使用水杨酸制剂、糖皮质激素、免疫抑制剂及生物制剂等。

兔抗人PGC-1 $\alpha$ 多克隆抗体购自Abcam公司; 羊抗兔IgG二抗购自武汉博士德生物工程有限公司; Real Envision二抗检测系统(广谱)购自上海基因科技有限公司; TRIzol Reagent购自美国Invitrogen公司; RT-reagent逆转录试剂盒和SYBR Premix Ex Taq荧光定量试剂购自大连TaKaRa公司; PGC-1 $\alpha$ 和内参 $\beta$ -actin引物为自行设计, 由上海捷瑞生物工程有限公司合成。PGC-1 $\alpha$ 上游: TCCTCACAGAGACACTAGACAG, 下游: CTGGTGCCAGTAAGAGCTTCT, 扩增长度为183 bp; 内参 $\beta$ -actin上游: GTGAAGGTGACAG-CAGTCGGT, 下游: AGAAGTGGGGTGGCTTT-TAGGA, 扩增长度为150 bp。

### 1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学染色: 根据参考文献[5,6]的方法, 每位IBD患者及对照者取内镜活检标本4块, 4%甲醛溶液固定、脱水、透明后石蜡包埋。全部石蜡标本行5  $\mu$ m连续切片, 常规脱蜡、水化, 室温下3%甲醇过氧化氢溶液孵育30 min抑制内源性过氧化物酶的活性, 0.2%Triton X-100破核, 高压热修复, 山羊血清封闭, 滴加兔抗人PGC-1 $\alpha$ 多克隆抗体(1:100)后4  $^{\circ}$ C过夜, 同时以PBS代替一抗做空白对照, 滴加羊抗兔IgG二抗(1:200)后于37  $^{\circ}$ C孵育30 min, DAB显色, 苏木素核复染, 中性树胶封片, 镜检, 胞质染色呈棕黄色为阳性细胞。

1.2.2 荧光定量PCR测定: 将收集的肠黏膜内镜标本放入-80  $^{\circ}$ C冰箱保存待检, 提取总RNA时将标本置入装有液氮的研钵内充分研磨。按照TRIzol reagent操作说明书提取总RNA, 并测定所提取RNA的浓度、纯度及完整性。按照TaKaRa公司RT-reagent逆转录试剂盒说明书进行逆转录反应, 反应条件: 37  $^{\circ}$ C 15 min, 85  $^{\circ}$ C 5 s。

### ■ 相关报道

D'Errico等研究发现PGC-1 $\alpha$ 在肠上皮细胞中, 通过增加活性氧促进线粒体介导的细胞凋亡, 进而抑制肿瘤的发生发展。

### ■创新盘点

PGC-1 $\alpha$ 通过多种机制广泛参与调节组织细胞的能量生成与利用过程,本研究初步探讨PGC-1 $\alpha$ 在IBD发病机制中的作用。

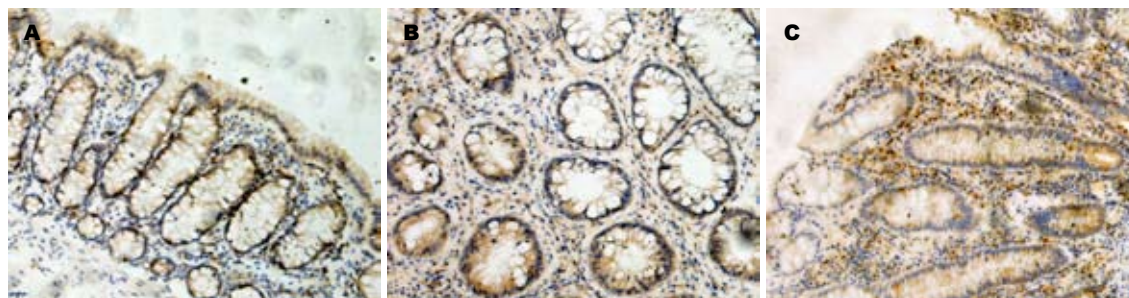


图1 PGC-1 $\alpha$ 在各组肠黏膜组织中的免疫组织化学染色( $\times 200$ ). A: 正常对照组; B: CD组; C: UC组。

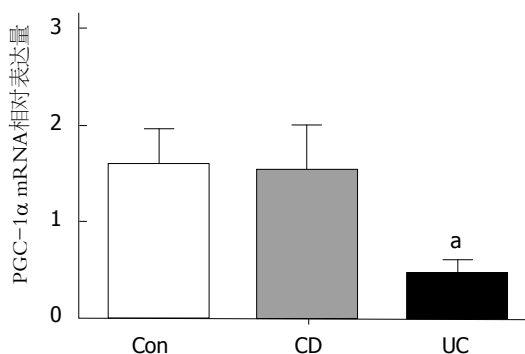


图2 PGC-1 $\alpha$  mRNA在各组肠黏膜组织中表达水平的比较。 $P < 0.05$  vs 对照组, CD组;

按TaKaRa公司SYBR Premix Ex Taq荧光定量试剂说明书进行荧光定量PCR反应,取1  $\mu$ L cDNA加入10  $\mu$ L反应体系进行扩增,扩增条件: 95  $^{\circ}$ C 1 min; 95  $^{\circ}$ C 15 s, 60  $^{\circ}$ C 30 s, 共40个循环。数据处理采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行相对定量分析,具体步骤参照既往文献[7,8]。

**统计学处理** 应用统计学软件SPSS17.0进行统计学分析,计量资料采用 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 的形式表示,两样本均数比较采用不配对 $t$ 检验,以 $P < 0.05$ 为具有统计学差异。

## 2 结果

**2.1 PGC-1 $\alpha$ 蛋白在结肠黏膜中的表达** 免疫组织化学染色显示,PGC-1 $\alpha$ 阳性细胞主要分布在正常肠黏膜上皮细胞内,胞内见棕黄色颗粒,黏膜固有层细胞内表达较少。与健康对照组相比,UC患者肠黏膜上皮PGC-1 $\alpha$ 蛋白表达量明显减少,肠黏膜固有层内表达增加,CD患者肠黏膜上皮中表达PGC-1 $\alpha$ 蛋白的细胞无明显差异(图1)。

**2.2 PGC-1 mRNA在结肠黏膜中的表达水平** 荧光定量PCR分析显示,IL-25 mRNA在UC、CD患者及对照者的结肠黏膜中均有表达,PGC-1 $\alpha$  mRNA在UC患者炎症肠黏膜组织中的相对表达量显著低于对照组( $0.48 \pm 0.15$  vs  $1.59 \pm 0.38$ ,  $P < 0.05$ ),PGC-1 $\alpha$  mRNA在CD患者炎症肠黏膜

组织中的相对表达量与对照组相比差异无统计学意义( $1.55 \pm 0.47$  vs  $1.59 \pm 0.38$ ,  $P > 0.05$ , 图2)。

## 3 讨论

炎症性肠病的发病机制至今仍不完全清楚,目前大多数学者认为:在众多外在、内在因素(肠道微生态环境及肠上皮细胞代谢紊乱等)的共同作用下,肠黏膜组织炎症因子、细胞因子、氧自由基等不断释放、堆积,最终导致肠道免疫功能失衡(包括细胞免疫、体液免疫及其他非特异性免疫)[1,2]。其中,肠黏膜微生态环境的失衡,尤其是肠黏膜组织内能量代谢失衡、抗氧化屏障减弱,在IBD的发生发展过程中的作用不可忽视。正常生理条件下,肠绒毛顶端的上皮细胞比肠黏膜隐窝细胞的增殖活力和能量代谢都较弱,因而暴露于肠腔外环境的上皮细胞更易发生凋亡[9]。IBD发病时,大量的肠黏膜上皮细胞发生凋亡,与凋亡细胞相邻的上皮细胞不能有效地封闭凋亡细胞所留下的空间,导致肠黏膜通透性增高,进而引起肠黏膜组织内免疫平衡紊乱。

PGC-1 $\alpha$ 是一种核受体家族转录辅助激活因子,属于PGC-1家族[3],PGC-1家族包括PGC-1 $\alpha$ 、PGC-1 $\beta$ 和PGC-1相关协同刺激因子(PRC)。人PGC-1 $\alpha$ 染色体定位于4p15.1,全长67 kD,包含13个外显子和12个内含子,编码一个具有798个氨基酸,分子量为91 kD的蛋白质。其蛋白多肽的N末端为含有LXXLL基序的转录激活域及1个双向核定位信号(bipartite nuclear localization signal),LXXLL基序(L为亮氨酸, X为其他氨基酸)可与某些核受体的特定区域结合,调控靶基因表达; C末端则为RNA加工域,包括1个RNA识别基序(RNA-binding motif, RMM)和富含丝氨酸/精氨酸的SR结构域(serine-arginine-rich domain),可与相关靶基因启动子结合,加工处理新转录的mRNA。PGC-1 $\alpha$ 作为一种核辅激活因子,以其特殊的氨基酸分子序列与DNA序列结合的



转录因子或其他的辅激活因子相互作用, 通过不同的机制间接增强靶基因的转录效率, 广泛参与多种代谢通路的调节活动, 如机体适应性产热、线粒体生物合成、肌肉中葡萄糖转运、脂肪酸 $\beta$ 氧化、骨骼肌纤维类型转换、肝糖异生代谢等生理活动<sup>[10,11]</sup>.

既往研究显示高表达的PGC-1 $\alpha$ 与PPAR $\gamma$ -RXR(nuclear receptors retinoic X receptor, RXR)协同诱导棕色脂肪细胞标志性蛋白的表达, 如肉碱脂酰转移酶(CPT-1)、甘油激酶、细胞色素C等基因的表达, 说明PGC-1 $\alpha$ 能够促进线粒体的生成, 增强脂肪酸 $\beta$ 氧化和细胞呼吸链作用<sup>[12]</sup>. D'Errico等<sup>[13]</sup>研究表明PGC-1 $\alpha$ 在肠上皮细胞的能量代谢中起重要作用, 而且PGC-1 $\alpha$ 通过增加活性氧促进线粒体介导的细胞凋亡, 从而抑制肿瘤的发生发展. Puigserver等<sup>[14]</sup>发现白介素(IL)-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、肿瘤坏死因子(TNF)- $\alpha$ 可通过p38分裂原活化蛋白激酶(p38 mitogen activated protein kinase, p38 MAPK)途径激活PGC-1 $\alpha$ , 进而调节细胞能量代谢. 最近研究<sup>[15]</sup>表明PGC-1 $\alpha$ 在肝细胞中高表达能促进IL-1受体的拮抗剂(interleukin 1 receptor antagonist, IL-1Rn)mRNA的高表达. 进一步研究显示: PGC-1 $\alpha$ 能够通过IL-1Rn与5'-磷酸腺苷激活蛋白激酶(AMPK)共同参与肝细胞能量代谢与炎症反应之间的平衡.

本研究通过免疫组织化学分析技术和荧光定量PCR技术初步探讨了IBD患者肠黏膜中PGC-1 $\alpha$ 的表达情况. 结果显示: 在正常肠黏膜组织中, PGC-1 $\alpha$ 主要在上皮细胞中表达, 在黏膜固有层中表达较少, 这与D'Errico等<sup>[13]</sup>的研究结果相符. 与正常对照组相比, PGC-1 $\alpha$ 在CD患者肠黏膜中的表达不论是空间分布还是数量上均无明显差异, 而在UC患者的肠黏膜上皮细胞中PGC-1 $\alpha$ 的表达量较少, 在炎症肠黏膜固有层细胞中表达量明显升高. 同时, 我们用荧光定量PCR分析显示, 与正常对照组相比, PGC-1 $\alpha$  mRNA在CD患者炎症肠黏膜中的表达量无统计学差异, 而在UC患者中PGC-1 $\alpha$  mRNA水平降低, 与对照组相比有统计学差异. D'Errico等<sup>[13]</sup>研究显示肠黏膜隐窝内的细胞和绒毛顶端上皮细胞的增殖活性与能量代谢能力均有差异, 与隐窝内的细胞相比, 绒毛顶端的上皮细胞中的抗氧化酶过氧化氢酶、超氧化物歧化酶表达较少, 因而绒毛顶端的上皮细胞易受氧自由基损伤, 易发生细胞凋亡. 在结肠癌组织中PGC-1 $\alpha$ 的高表达能够减少超氧化物歧化酶, 促进活性氧

的生成, 增强线粒体氧化呼吸, 从而抑制线粒体介导的细胞凋亡, 阻止癌组织的发生发展. 那么, 在IBD炎症肠黏膜组织中, PGC-1 $\alpha$ 是否参与调节肠上皮细胞线粒体能量代谢和氧化抗氧化过程需待进一步研究.

总之, 本次研究首次探讨了PGC-1 $\alpha$ 在CD和UC患者肠黏膜组织中表达不同, 提示CD和UC发病机制的差异, 而且PGC-1 $\alpha$ 在IBD患者肠黏膜微生态失调中发挥着重要作用. 通过对PGC-1 $\alpha$ 的深入研究, 有助于我们全面了解IBD的发生发展过程, 对指导临床治疗产生积极影响.

**致谢** 感谢同济大学附属第十人民医院胃肠内科、消化内镜中心各位老师在研究过程中给予帮助和支持.

## 4 参考文献

- 1 Kaser A, Zeissig S, Blumberg RS. Inflammatory bowel disease. *Annu Rev Immunol* 2010; 28: 573-621
- 2 Maloy KJ, Powrie F. Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease. *Nature* 2011; 474: 298-306
- 3 Puigserver P, Wu Z, Park CW, Graves R, Wright M, Spiegelman BM. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* 1998; 92: 829-839
- 4 中华医学会消化病学分会炎症性肠病协作组. 对我国炎症性肠病诊断治疗规范的共识意见(2007年, 济南). *中华消化杂志* 2007; 27: 545-550
- 5 苏婧玲, 刘占举. 白细胞介素-25在炎症性肠病患者中的表达及临床意义. *中华消化杂志* 2010; 30: 872-876
- 6 Liu Z, Feng BS, Yang SB, Chen X, Su J, Yang PC. Interleukin (IL)-23 suppresses IL-10 in inflammatory bowel disease. *J Biol Chem* 2012; 287: 3591-3597
- 7 Liu Z, Yang L, Cui Y, Wang X, Guo C, Huang Z, Kan Q, Liu Z, Liu Y. IL-21 enhances NK cell activation and cytolytic activity and induces Th17 cell differentiation in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2009; 15: 1133-1144
- 8 Liu Z, Yadav PK, Xu X, Su J, Chen C, Tang M, Lin H, Yu J, Qian J, Yang PC, Wang X. The increased expression of IL-23 in inflammatory bowel disease promotes intraepithelial and lamina propria lymphocyte inflammatory responses and cytotoxicity. *J Leukoc Biol* 2011; 89: 597-606
- 9 Clevers H. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* 2006; 127: 469-480
- 10 Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J* 2009; 417: 1-13
- 11 Luo B, Parker GJ, Cooksey RC, Soesanto Y, Evans M, Jones D, McClain DA. Chronic hexosamine flux stimulates fatty acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase in adipocytes. *J Biol Chem* 2007; 282: 7172-7180
- 12 Tiraby C, Langin D. Conversion from white to brown adipocytes: a strategy for the control of fat mass? *Trends Endocrinol Metab* 2003; 14: 439-441
- 13 D'Errico I, Salvatore L, Murzilli S, Lo Sasso G, Latorre D, Martelli N, Egorova AV, Polishuck R, Madeyski-Bengtson K, Lelliott C, Vidal-Puig AJ, Seibel P, Villani G, Moschetta A. Peroxisome proliferator-activated

## ■同行评价

本研究结果显示PGC-1 $\alpha$ 在溃疡性结肠炎(UC)中表达明显下降, 而在克罗恩病(CD)中无明显变化, 这一结论具有一定的临床研究价值.

- receptor-gamma coactivator 1-alpha (PGC1alpha) is a metabolic regulator of intestinal epithelial cell fate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108: 6603-6608
- 14 Puigserver P, Rhee J, Lin J, Wu Z, Yoon JC, Zhang CY, Krauss S, Mootha VK, Lowell BB, Spiegelman BM. Cytokine stimulation of energy expenditure through p38 MAP kinase activation of PPARgamma coactivator-1. *Mol Cell* 2001; 8: 971-982
- 15 Buler M, Aatsinki SM, Skoumal R, Komka Z, Tóth M, Kerkelä R, Georgiadi A, Kersten S, Hakkola J. Energy-sensing factors coactivator peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator 1- $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) and AMP-activated protein kinase control expression of inflammatory mediators in liver: induction of interleukin 1 receptor antagonist. *J Biol Chem* 2012; 287: 1847-1860

编辑 张姗姗 电编 鲁亚静

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2012年版权归世界华人消化杂志

## • 消息 •

### 《世界华人消化杂志》性质、刊登内容及目标

**本刊讯** 《世界华人消化杂志》[国际标准刊号ISSN 1009-3079 (print), ISSN 2219-2859 (online), 国内统一刊号CN 14-1260/R, Shijie Huaren Xiaohua Zazhi/*World Chinese Journal of Digestology*], 是一本由来自国内23个省、市、自治区、特别行政区的370位胃肠病学和肝病专家支持的开放存取的同行评议的旬刊杂志, 旨在推广国内各地的胃肠病学和肝病领域临床实践和基础研究相结合的最具有临床意义的原创性及各类评论性的文章, 使其成为一种公众资源, 同时科学家、医生、患者和学生可以通过这样一个不受限制的平台来免费获取全文, 了解其领域的所有的关键的进展, 更重要的是这些进展会为本领域的医务工作者和研究者服务, 为他们的患者及基础研究提供进一步的帮助。

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

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

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

# 放大色素结肠镜观察FAS、Ki-67在直肠异常隐窝病灶中的表达

张伟, 王芳军, 钱建忠, 徐洪明, 刘鹏飞, 徐娟

张伟, 王芳军, 钱建忠, 徐洪明, 刘鹏飞, 徐娟, 东南大学医学院附属江阴医院消化科 江苏省江阴市 214400

张伟, 副主任医师, 主要从事结肠肿瘤早期病变的研究。

作者贡献分布: 课题设计由张伟负责; 课题实施由张伟、王芳军及徐娟负责; 钱建忠提供技术及病理支持; 文章修改由张伟、王芳军及刘鹏飞完成。

通讯作者: 张伟, 副主任医师, 214400, 江苏省江阴市寿山路165号, 东南大学医学院附属江阴医院消化科. fenglai-fang@163.com  
电话: 0510-86879455

收稿日期: 2011-07-23 修回日期: 2012-04-20

接受日期: 2012-04-25 在线出版日期: 2012-05-28

## Overexpression of FAS and Ki-67 in aberrant crypt foci from patients with adenoma

Wei Zhang, Fang-Jun Wang, Jian-Zhong Qian, Hong-Ming Xu, Peng-Fei Liu, Juan Xu

Wei Zhang, Fang-Jun Wang, Jian-Zhong Qian, Hong-Ming Xu, Peng-Fei Liu, Juan Xu, Department of Gastroenterology, Jiangyin Hospital, Southeast University Medical College, Jiangyin 214400, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Wei Zhang, Associate Chief Physician, Jiangyin Hospital, Southeast University Medical College, Jiangyin 214400, Jiangsu Province, China. fenglai-fang@163.com

Received: 2011-07-23 Revised: 2012-04-20

Accepted: 2012-04-25 Published online: 2012-05-28

## Abstract

**AIM:** To detect the expression of fatty acid synthase (FAS) and Ki-67 in colonic adenoma and aberrant crypt foci to explore their significance in the formation of precancerous lesions.

**METHODS:** Aberrant crypt foci (ACF) in the rectum of 34 patients with adenoma were identified by magnification chromoendoscopy (MCE) after staining with 0.2% methylene blue solution. Specimens with ACF were biopsied to detect the expression of FAS and Ki-67 by immunohistochemistry.

**RESULTS:** A total of 166 ACF were found in 31 patients, of which 14 had atypical hyperplasia and 152 had no atypical hyperplasia. The expression of FAS and Ki-67 in colonic adenoma and ACF were significantly higher than that in normal tissue (all  $P < 0.01$ ). There was no significant

difference in the expression of FAS and Ki-67 between ACF with and without dysplasia.

**CONCLUSION:** The expression of FAS and Ki-67 is higher in colorectal precancerous lesions. FAS may be used as a target for preventing and treating colorectal cancer.

**Key Words:** Aberrant crypt foci; Fatty acid synthase; Ki-67; Magnification chromoscopy

Zhang W, Wang FJ, Qian JZ, Xu HM, Liu PF, Xu J. Overexpression of FAS and Ki-67 in aberrant crypt foci from patients with adenoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(15): 1371-1375

## 摘要

**目的:** 观察FAS、Ki-67在结肠腺瘤、异常隐窝病灶(aberrant crypt foci, ACF)中的表达, 探讨脂肪酸合成酶(fatty acid synthase, FAS)、增殖细胞核抗原(Ki-67)的异常表达在结直肠癌癌前病变形成中的意义。

**方法:** 对34例结肠镜确诊为腺瘤性息肉患者, 常规内镜检查结束时, 用0.2%的亚甲蓝溶液染色直肠黏膜, 然后使用放大结肠镜观察直肠寻找ACF。对结肠腺瘤性息肉、ACF及正常黏膜活检标本进行免疫组织化学分析其FAS和Ki-67的表达。

**结果:** 34例结肠腺瘤性息肉患者, 其中31例直肠发现ACF, 共发现并活检ACF 166处(其中伴异型增生14处, 不伴异型增生152处)。FAS、Ki-67在结肠腺瘤、ACF中呈异常高表达( $P < 0.01$ )。伴异型增生ACF中FAS、Ki-67表达较不伴异型增生ACF无明显上调。

**结论:** FAS、Ki-67在结直肠癌的癌前病变(腺瘤、ACF)呈异常高表达。结直肠癌的癌前病变存在细胞能量代谢异常及异常增殖, 在ACF阶段就已经异常增殖明显, 抑制FAS有望成为结直肠癌预防、治疗的靶点。

**关键词:** 异常隐窝病灶; 脂肪酸合成酶; Ki-67; 放大

## ■背景资料

自从1986年Bird在动物模型中发现异常隐窝病(ACF)后, 他成为了研究热点之一, 人们对他的组织学、基因的改变, 染色体的变化, 细胞动力学, 信号转导途径, 化学诱导及抑制剂, 流行病学特点以及内镜下的形态等做了一系列的探讨。

## ■同行评议者

陆伦根, 教授, 上海交通大学附属第一人民医院消化科

## ■ 研发前沿

结直肠ACF是目前结直肠癌发生过程中可在光镜下观察到的最小最早期的结直肠黏膜病变,现在普遍认为是结直肠癌癌前病变,了解结直肠癌癌前病变的分子生物学改变,以探索结直肠癌早期预防、治疗的靶点。

## 色素内镜

张伟, 王芳军, 钱建忠, 徐洪明, 刘鹏飞, 徐娟. 放大色素结肠镜观察FAS、Ki-67在直肠异常隐窝病灶中的表达. 世界华人消化杂志 2012; 20(15): 1371-1375

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1371.asp>

## 0 引言

既往结直肠癌癌前病变主要包括结直肠腺瘤、腺瘤病和炎性肠病相关异型增生,现在普遍认为结直肠异常隐窝病灶(aberrant crypt foci, ACF)是结直肠癌癌前病变。ACF是目前结直肠癌发生过程中可在光镜下观察到的最小最早期的结直肠黏膜病变<sup>[1]</sup>, ACF在组织病理学、分子遗传学、生物化学及免疫组织化学方面与结直肠癌存在类似的改变<sup>[2-4]</sup>, 在临床及抗肿瘤药物筛选等方面具有重要意义。2000年WHO为便于临床医师操作,根据是否伴有异型增生将ACF分为:具有增生性息肉形态特征的ACF和伴有异型增生的ACF<sup>[5]</sup>。FAS与Ki-67是肿瘤相关基因,与肿瘤异常增殖密切相关,多项研究发现他们在结肠癌的发生、发展过程中起着重要的作用<sup>[6-8]</sup>,结直肠ACF中FAS、Ki-67表达的相关研究较少,或为动物实验研究<sup>[9,10]</sup>。本研究采用免疫组织化学的方法,通过检测结肠腺瘤患者腺瘤、ACF中FAS、Ki-67表达,了解结直肠癌癌前病变的分子生物学改变,以探索结直肠癌早期预防、治疗的靶点。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 2010-09/2011-03,在本科室行肠镜检查患者,对34例常规肠镜检查发现息肉并经病理证实为腺瘤性息肉患者,常规内镜检查结束后,先用清水大力充分冲洗直肠黏膜,再用10%乙酰半胱氨酸溶液冲洗直肠黏膜以清除黏液,然后用新鲜配制的0.2%亚甲蓝溶液通过喷洒导管染色直肠黏膜,然后使用放大结肠镜观察直肠寻找ACF,所用内窥镜型号为Olympus CF-H260AZI。20例结肠镜检查正常者直肠黏膜为对照。对结肠腺瘤性息肉、ACF及正常黏膜活检标本进行免疫组织化学分析其FAS和Ki-67的表达。

### 1.2 方法

**1.2.1 免疫组织化学染色:**标本采用石蜡组织切片脱蜡、水化等处理后,分别用兔抗人FAS蛋白抗体、Ki-67蛋白抗体处理,试剂盒均为北京博奥森生物技术有限公司产品, DAB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>显微镜控制下显色,苏木素复染细胞核,常规脱水中性

表 1 FAS、Ki-67在结肠腺瘤、ACF中的表达

	<i>n</i>	FAS阳性率(%)	Ki-67阳性率(%)
正常黏膜	20	10.00(2/20)	5.00(1/20)
腺瘤	34	70.59(24/34) <sup>b</sup>	47.06(16/34) <sup>b</sup>
ACF	166	64.46(107/166) <sup>b</sup>	40.36(67/166) <sup>b</sup>

<sup>b</sup>*P*<0.01 vs 正常黏膜组。

树脂封片,观察目标蛋白的表达强度和分布。省去一抗作空白对照。

**1.2.2 免疫组织化学结果判断标准:** FAS表达阳性细胞的标准是胞浆出现棕色染色, Ki-67阳性是细胞核内出现棕黄色颗粒。随机计数每例切片10个高倍视野细胞中染色阳性的细胞百分率。(1)阴性为FAS或Ki-67无任何阳性细胞表达;(2)每张切片阳性细胞<25%为(+);(3)阳性细胞25%-50%为(++);(4)阳性细胞>50%为(+++)。(1)-(4)均视为阳性。所有病理切片均经2位高年资病理医师独立诊断,如意见不一致,则交由第3位高年资病理医师诊断,以多数人意见为准。

**统计学处理** 应用SPSS13.0统计学软件进行数据分析,率的比较采用 $\chi^2$ 检验,相关分析采用Spearman等级相关, *P*<0.05为有统计学意义。

## 2 结果

34例结肠腺瘤患者,其中31例直肠发现ACF,其中男21例,平均年龄58岁±17岁,女13例,平均年龄65岁±10岁,共发现ACF 166处,伴异型增生ACF 14处,不伴异型增生ACF 152处(图1, 2)。

与正常对照组相比, FAS、Ki-67在结肠腺瘤、ACF中均呈异常高表达(*P*<0.05, 表1),且常常同一病例同时存在FAS、Ki-67阳性, FAS的表达与Ki-67呈正相关(*P*<0.05, *r* = 0.72)。FAS、Ki-67在结肠腺瘤与ACF的表达未见统计学差异。

与正常对照组相比ACF的Ki-67、FAS呈高表达(表2, 图3)。伴异型增生ACF中Ki-67表达较不伴异型增生ACF比例增高,但差异无统计学意义,但不伴异型增生的ACF Ki-67染色阳性细胞多位于隐窝的下1/3至中1/3,伴异型增生ACF Ki-67呈弥漫性表达。而FAS在不同类型ACF中则表达类似,从隐窝底部到隐窝的顶部显示一个由高到低的渐变的表达,与ACF是否伴有异型增生无明显关系。

## 3 讨论

从正常结直肠上皮细胞到结直肠癌细胞的演变



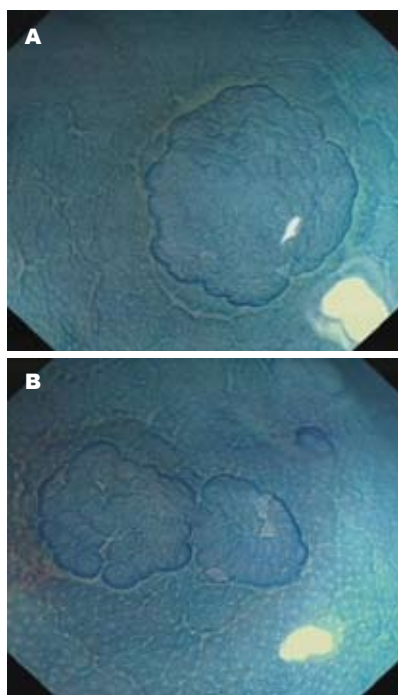


图 1 放大色素结肠镜观察ACF. A: 伴异型增生ACF; B: 不伴异型增生ACF.

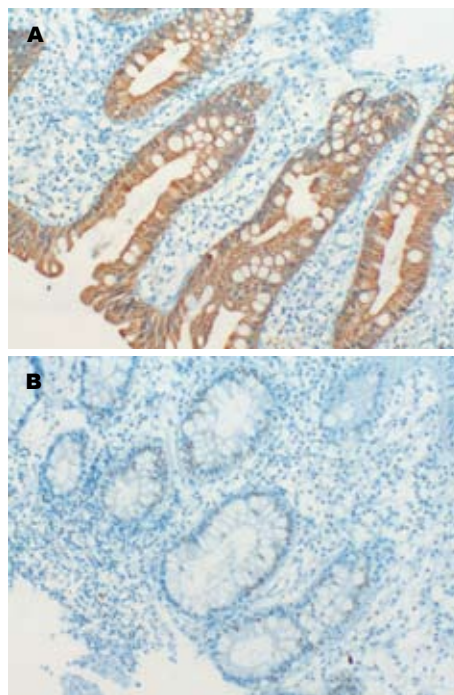


图 3 FAS和Ki-67在ACF中的阳性表达(免疫组织化学  $\times 200$ ). A: FAS; B: Ki-67.

#### ■创新盘点

本实验将对结直肠癌前病变的关注由通常的腺瘤提早到通过放大色素结肠镜在人体活体观察到的ACF, 应用免疫组织化学探索结直肠癌前病变的分子生物学改变的规律.

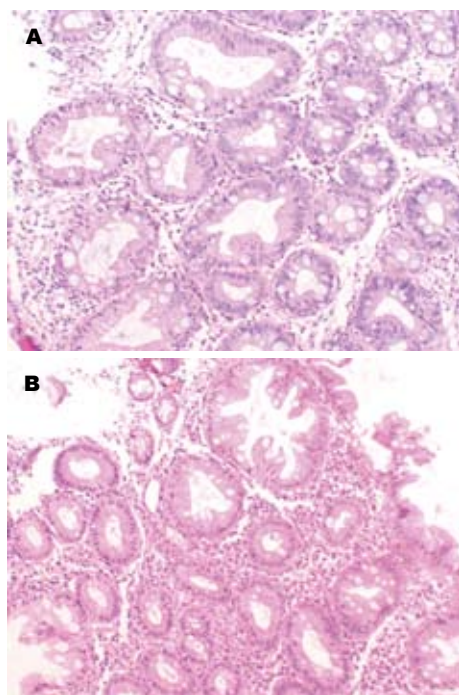


图 2 HE染色观察ACF( $\times 200$ ). A: 伴异型增生ACF, 增生的上皮呈锯齿状向腔内生长, 细胞核增大, 染色加深; B: 不伴异型增生ACF.

是多步骤、多基因改变的结果, 因此, 寻找结直肠癌的早期发现、早期治疗的靶点一直是研究的重点. ACF作为结直肠上皮性肿瘤的最早期形态学改变, 是目前结直肠癌发生过程中可在光镜下观察到的最小最早期的结直肠黏膜病

表 2 FAS、Ki-67在不同类型ACF中的表达

	正常黏膜(%)	ACF(%)	
		伴异型增生	不伴异型增生
FAS	10.00	64.29(9/14) <sup>b</sup>	64.47(98/152) <sup>b</sup>
Ki-67	5.00	57.14(8/14) <sup>b</sup>	38.82(59/152) <sup>b</sup>

<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 正常黏膜组.

变. 了解ACF的特征性变化及其与结直肠癌发生的关系, 对进一步认识和预防结直肠癌有重要意义. 现在普遍认为ACF是癌前病变, 并认为经ACF有两条途径发展为结直肠癌: (1)正常黏膜-ACF-腺瘤-癌途径; (2)正常上皮-ACF-癌变途径. 本研究重点观测正常黏膜-ACF-腺瘤-癌途径中, 由正常黏膜到ACF、腺瘤阶段的分子生物学改变.

依据文献报道的对手术标本的研究和内镜研究, ACF较常发现在左半结肠和直肠中<sup>[11,12]</sup>. 同时我们认为, 对大量患者进行结直肠大范围染色及放大结肠镜检查ACF, 在许多病例检查时间的延长会令人无法接受, 考虑到患者的耐受情况, 我们选择直肠的ACF为研究对象.

FAS是内源性脂肪酸合成的关键酶, 是哺乳动物唯一的能将较小的碳水化合物基质合成长链脂肪酸的酶. 其位于细胞浆内, 以小分子碳源



## ■应用要点

明确ACF形成中的各种变化,尤其是与结肠癌变相关联的特征改变,不仅有助于进一步认识结肠癌发生的机制,同时也为预防治疗结肠癌提供新思路。

为底物,合成内源性的脂肪酸。但是在大多数正常组织中由于细胞优先利用日常饮食中的循环脂肪酸而使FAS表现为低水平。在正常情况下除肝、胎儿肺脏及分泌期乳腺以外,在其他正常组织FAS,呈低表达状态<sup>[13-15]</sup>。FAS表达上升是对内源性脂肪酸合成和细胞增殖的适应。FAS的主要产物软脂酸既是细胞膜结构的主要成分,也是细胞能量代谢的重要底物。Kusakabe等<sup>[16]</sup>的研究表明,FAS较高表达基本上集中分布于脂质代谢,对激素敏感,处于增殖状态的细胞。在多种人类癌症中FAS高度表达,包括前列腺癌、结肠癌、子宫内膜癌、卵巢癌、胃癌、肺癌和乳房癌。这些癌症中的许多FAS的高表达水平与临床肿瘤侵袭性的增加相关<sup>[17]</sup>。恶性肿瘤中FAS过度表达提示细胞内酶转录加快,内源性脂肪酸合成活跃表明对能量物质和成膜脂质的需求旺盛。本研究检测20例正常结肠黏膜FAS呈低水平表达,与Rashid等<sup>[10]</sup>的研究结果一致。ACF中FAS呈异常高表达,提示ACF的发生伴随细胞能量代谢和细胞增殖异常,结肠腺瘤中存在类似表现,另外伴异型增生ACF较不伴异型增生的ACF中FAS表达无显著的差异,提示FAS在结肠癌发生前很早期就发挥了重要作用。

Ki-67是常用的反应细胞增殖水平的指标,其阳性表达部位在胞核。在正常组织向肿瘤组织的演变过程中其表达逐渐增加,处于增殖状态的细胞比例显著升高,Ki-67阳性表达的细胞比例也随之升高。本研究检测20例正常对照中Ki-67呈低水平表达,与郭学良等<sup>[18]</sup>的研究结果一致;ACF中Ki-67呈弥漫性高表达,表明ACF的增殖水平明显升高,与张耀朋等<sup>[19]</sup>的动物实验结果一致。结肠腺瘤中Ki-67呈弥漫性过表达,阳性表达比例及强度与ACF相比有升高,但未见统计学意义。Ki-67的表达与FAS存在正相关关系,进一步提示在ACF、腺瘤等结肠癌前病变的发生中,FAS在细胞异常增殖中起重要作用,抑制FAS活性,抑制细胞异常增殖有望成为结肠癌预防、治疗的靶点。

FAS在过去的15年中已成为治疗肿瘤的一个有吸引力的目标。RNAi技术敲除实验表明,乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌等多种肿瘤细胞株的增殖和生存依赖FAS。FAS抑制剂如浅蓝菌素、C75和奥利司特已被证实可诱导多种肿瘤细胞凋亡,并诱导多种异种移植肿瘤模型的肿瘤生长延迟。但发现浅蓝菌素和C75会造成试验小鼠食物摄入量减少和体质量下降<sup>[20]</sup>。奥利司特存在

细胞通透性低、溶解度低、缺乏选择性<sup>[21]</sup>以及口服生物利用度和代谢稳定性差等问题<sup>[22]</sup>,这些阻碍了他们在临床的使用。新近有默克、阿斯利康、葛兰素史克等公司关于新的FAS抑制剂研发的专利文献报道,希望在不久的将来能充分发挥FAS作为癌症治疗靶点的潜力。绿茶儿茶素、大豆蛋白等已被证明能够抑制FAS<sup>[23,24]</sup>,这或许将调整饮食来降低ACF的形成,成为预防结肠癌可能的手段。

总之,FAS、Ki-67在ACF、结肠腺瘤异常高表达,ACF作为一种癌前病变,存在细胞能量代谢异常及异常增殖,FAS在ACF等形成中起着重要作用,抑制FAS活性,抑制细胞异常增殖有望成为结肠癌预防、治疗的靶点。

## 4 参考文献

- 1 Siu IM, Robinson DR, Schwartz S, Kung HJ, Pretlow TG, Petersen RB, Pretlow TP. The identification of monoclonality in human aberrant crypt foci. *Cancer Res* 1999; 59: 63-66
- 2 Paulsen JE, Løberg EM, Olstørn HB, Knutsen H, Steffensen IL, Alexander J. Flat dysplastic aberrant crypt foci are related to tumorigenesis in the colon of azoxymethane-treated rat. *Cancer Res* 2005; 65: 121-129
- 3 Seike K, Koda K, Oda K, Kosugi C, Shimizu K, Nishimura M, Shioiri M, Takano S, Ishikura H, Miyazaki M. Assessment of rectal aberrant crypt foci by standard chromoscopy and its predictive value for colonic advanced neoplasms. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 1362-1369
- 4 Luo L, Shen GQ, Stiffler KA, Wang QK, Pretlow TG, Pretlow TP. Loss of heterozygosity in human aberrant crypt foci (ACF), a putative precursor of colon cancer. *Carcinogenesis* 2006; 27: 1153-1159
- 5 Hamilton SR, Aaltonen LA eds. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System. Lyon: IARC Press, 2000
- 6 曹俊, 花天放, 蔡文伟, 胡宏慧, 孙红成. 脂肪酸合成酶在大肠癌中的表达及临床意义. *医学临床研究* 2007; 24: 544-545
- 7 Suzuki H, Matsumoto K, Terabe M. Ki-67 antibody labeling index in colorectal carcinoma. *J Clin Gastroenterol* 1992; 15: 317-320
- 8 Kikuchi Y, Dinjens WN, Bosman FT. Proliferation and apoptosis in proliferative lesions of the colon and rectum. *Virchows Arch* 1997; 431: 111-117
- 9 Lau DS, Archer MC. Fatty acid synthase is over-expressed in large aberrant crypt foci in rats treated with azoxymethane. *Int J Cancer* 2009; 124: 2750-2753
- 10 Rashid A, Pizer ES, Moga M, Milgraum LZ, Zahurak M, Pasternack GR, Kuhajda FP, Hamilton SR. Elevated expression of fatty acid synthase and fatty acid synthetic activity in colorectal neoplasia. *Am J Pathol* 1997; 150: 201-208
- 11 Takayama T, Katsuki S, Takahashi Y, Ohi M, Nojiri S, Sakamaki S, Kato J, Kogawa K, Miyake H, Niitsu Y. Aberrant crypt foci of the colon as precursors of adenoma and cancer. *N Engl J Med* 1998; 339: 1277-1284

- 12 Adler DG, Gostout CJ, Sorbi D, Burgart LJ, Wang L, Harmsen WS. Endoscopic identification and quantification of aberrant crypt foci in the human colon. *Gastrointest Endosc* 2002; 56: 657-662
- 13 Kawamura T, Kanno R, Fujii H, Suzuki T. Expression of liver-type fatty-acid-binding protein, fatty acid synthase and vascular endothelial growth factor in human lung carcinoma. *Pathobiology* 2005; 72: 233-240
- 14 Menendez JA, Lupu R. Oncogenic properties of the endogenous fatty acid metabolism: molecular pathology of fatty acid synthase in cancer cells. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2006; 9: 346-357
- 15 Weiss L, Hoffmann GE, Schreiber R, Andres H, Fuchs E, Körber E, Kolb HJ. Fatty-acid biosynthesis in man, a pathway of minor importance. Purification, optimal assay conditions, and organ distribution of fatty-acid synthase. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1986; 367: 905-912
- 16 Kusakabe T, Maeda M, Hoshi N, Sugino T, Watanabe K, Fukuda T, Suzuki T. Fatty acid synthase is expressed mainly in adult hormone-sensitive cells or cells with high lipid metabolism and in proliferating fetal cells. *J Histochem Cytochem* 2000; 48: 613-622
- 17 Kuhajda FP. Fatty-acid synthase and human cancer: new perspectives on its role in tumor biology. *Nutrition* 2000; 16: 202-208
- 18 郭学良, 郭宗林, 主余华, 傅丽娜, 林庚金, 李开智. Ki-67在结肠良、恶性病变中的表达及其意义. 中华消化杂志 2001; 21: 313-314
- 19 张耀朋, 吕愈敏, 李军. ACF在结肠癌早期病变中的变化及其与PPAR- $\gamma$ 和 $\beta$ -catenin的关系. 世界华人消化杂志 2009; 17: 1732-1737
- 20 Loftus TM, Jaworsky DE, Frehywot GL, Townsend CA, Ronnett GV, Daniel Lane M, Kuhajda FP. Reduced food intake and bodyweight in mice treated with fatty acid synthase inhibitors. *Science* 2000; 288: 2379-2381
- 21 Hoover HS, Blankman JL, Niessen S, Cravatt BF. Selectivity of inhibitors of endocannabinoid biosynthesis evaluated by activity-based protein profiling. *Bioorg Med Chem Lett* 2008; 18: 5838-5841
- 22 Zhi J, Melia AT, Funk C, Viger-Chougnnet A, Hopfgartner G, Lausecker B, Wang K, Fulton JS, Gabriel L, Mulligan TE. Metabolic profiles of minimally absorbed orlistat in obese/overweight volunteers. *J Clin Pharmacol* 1996; 36: 1006-1011
- 23 Puig T, Relat J, Marrero PF, Haro D, Brunet J, Colomer R. Green tea catechin inhibits fatty acid synthase without stimulating carnitine palmitoyltransferase-1 or inducing weight loss in experimental animals. *Anticancer Res* 2008; 28: 3671-3676
- 24 Xiao R, Su Y, Simmen RC, Simmen FA. Dietary soy protein inhibits DNA damage and cell survival of colon epithelial cells through attenuated expression of fatty acid synthase. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008; 294: G868-G876

**■同行评价**

本文探讨了FAS, Ki-67的异常表达在结直肠癌癌前病变形成中的意义, 具有一定的科研价值。

编辑 曹丽鸥 电编 鲁亚静

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2012年版权归世界华人消化杂志

**• 消息 •****《世界华人消化杂志》栏目设置**

**本刊讯** 本刊栏目设置包括述评, 基础研究, 临床研究, 焦点论坛, 文献综述, 研究快报, 临床经验, 病例报告, 会议纪要. 文稿应具科学性、先进性、可读性及实用性, 重点突出, 文字简练, 数据可靠, 写作规范, 表达准确.

# 《世界华人消化杂志》投稿须知

《世界华人消化杂志》为保证期刊的学术质量, 对所有来稿均进行同行评议, 是一份被中国科技论文统计源核心期刊、中文核心期刊要目总览收录的学术类期刊。

## 1 投稿总则

1.1 性质 《世界华人消化杂志》[ISSN 1009-3079 (print), ISSN 2219-2859 (online), CN 14-1260/R]是一份同行评议性和开放获取(open access, OA)的旬刊。OA最大的优点是面向全国本领域专家及公众开放无需注册, 免费获取PDF等格式的全文, 切实破除了传统性期刊阻碍科学研究成果快速传播的障碍。OA是一项真正意义上的公益性科学传播工具, 编委、作者和读者利益的最大化的目标, 努力推进本学科的繁荣和发展。

《世界华人消化杂志》定价68.00元, 全年2448.00元, 邮发代号82-262, 由世界华人消化杂志编辑部出版。《世界华人消化杂志》主要报道胃肠病学、肝胆病学、胰腺病学、内镜介入与消化外科等多学科的评论及基础研究和临床实践等各类文章, 具体内容涉及: 食管疾病, 如反流性食管炎、Barret's食管、食管静脉曲张和食管癌等; 胃部疾病, 胃食管反流性疾病、胃炎、胃动力障碍、胃出血、胃癌和幽门螺杆菌感染等; 肠道疾病, 如肠道出血、肠穿孔、肠梗阻、肠道炎症(如IBD/CD等)、肠道感染、大肠癌和大肠腺瘤等; 肝胆部疾病如病毒性肝炎、肝硬化、脂肪肝、肝纤维化、肝衰竭、胆石病、胆汁郁积、梗阻性黄疸、肝癌、胆囊癌、胆管癌和门静脉高压等; 胰腺疾病, 如胰腺炎和胰腺癌等; 全身性疾病涉及消化系统, 如自身免疫性及瘀胆性疾病、腹腔疾病、消化不良和代谢性疾病等; 以及与以上疾病相关的基因及基因组学、微生物及分子生物学、病因学、流行病学、免疫学、临床内外科诊断与治疗(如影像、化疗、移植、营养等); 除以上外, 本刊也报道诊断与筛选、内窥镜检查法、影像及先进技术。

《世界华人消化杂志》被国际检索系统美国《化学文摘》(Chemical Abstracts, CA)、荷兰《医学文摘库/医学文摘(EMBase/Excerpta Medica, EM)》和俄罗斯《文摘杂志(Abstract Journal, AJ)》收录。国内为中国科技论文统计与分析期刊(科技部列选为中国科技论文统计源期刊)、《中文核心期刊要目总览》(2011年版)内科学类的核心期刊、《中国学术期刊评价研究报告-RCCS权威、核心期刊排行榜与指南》

和中国知识资源总库收录。《中国科技期刊引证报告(核心版)》统计显示, 2010年《世界华人消化杂志》总被引频次3 458次, 影响因子0.694, 综合评价总分60.6分, 分别位居内科学类49种期刊的第5位、第7位、第6位, 分别位居1 998种中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)的第79位、第320位、第190位; 其他指标: 他引率0.83, 被引半衰期4.9, 来源文献量712, 文献选出率0.90, 参考文献量17 963, 平均引文数25.23, 平均作者数4.35, 地区分布数29, 机构分布数349, 基金论文比0.45, 海外论文比0.01。

1.2 栏目 述评, 基础研究, 临床研究, 焦点论坛, 文献综述, 研究快报, 临床经验, 病例报告, 会议纪要。文稿应具科学性、先进性、可读性及实用性, 重点突出, 文字简练, 数据可靠, 写作规范, 表达准确。

## 2 撰稿要求

2.1 总体标准 文稿撰写应遵照国家标准GB7713科学技术报告、学位论文和学术论文的编写格式, GB6447文摘编写规则, GB7714文后参考文献著录规则, GB/T 3179科学技术期刊编排格式等要求; 同时遵照国际医学期刊编辑委员会(International Committee of Medical Journal Editors)制定的《生物医学期刊投稿的统一要求(第5版)》(Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals)。见: *Ann Intern Med* 1997; 126: 36-47。

2.2 名词术语 应标准化, 前后统一, 如原词过长且多次出现者, 可于首次出现时写出全称加括号内注简称, 以后直接用简称。医学名词以全国自然科学名词审定委员会公布的《生理学术名词》、《生物化学名词与生物物理学名词》、《化学名词》、《植物学名词》、《人体解剖学名词》、《细胞生物学名词》及《医学名词》系列为准, 药名以《中华人民共和国药典》和卫生部药典委员会编的《药名词汇》为准, 国家食品药品监督管理局批准的新药, 采用批准的药名; 创新性新药, 请参照我国药典委员会的“命名原则”, 新译名词应附外文。公认习用缩略语可直接应用(建议第一次也写出全称), 如ALT, AST, mAb, WBC, RBC, Hb, T, P, R, BP,

PU, GU, DU, ACTH, DNA, LD50, HBsAg, HCV RNA, AFP, CEA, ECG, IgG, IgA, IgM, TCM, RIA, ELISA, PCR, CT, MRI等. 为减少排印错误, 外文、阿拉伯数字、标点符号必须正确打印在A4纸上. 中医药名词英译要遵循以下原则: (1)有对等词者, 直接采用原有英语词, 如中风stroke, 发热fever; (2)有对应词者应根据上下文合理选用原英语词, 如八法eight principal methods; (3)英语中没有对等词或相应词者, 宜用汉语拼音, 如阴yin, 阳yang, 阴阳学说yinyangology, 人中renzhong, 气功qigong; 汉语拼音要以词为单位分写, 如weixibao nizhuanwan(胃细胞逆转丸), guizhitang(桂枝汤). 通常应小写.

2.3 外文字符 注意大小写正斜体与上下角标. 静脉注射iv, 肌肉注射im, 腹腔注射ip, 皮下注射sc, 脑室注射icv, 动脉注射ia, 口服po, 灌胃ig. s(秒)不能写成S, kg不能写成Kg, mL不能写成ML, lcpm(应写为1/min)÷E%(仪器效率)÷60 = Bq, pH不能写PH或P<sup>H</sup>, *H. pylori*不能写成HP,  $T_{1/2}$ 不能写成tl/2或 $T_{1/2}^1$ ,  $V_{max}$ 不能Vmax,  $\mu$ 不写为英文u. 需排斜体的外文字, 用斜体表示. 如生物学中拉丁学名的属名与种名, 包括亚属、亚种、变种. 如幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*), *Ilex pubescens* Hook, et Arn. var. *glaber* Chang(命名者勿划横线); 常数K; 一些统计学符号(如样本数n, 均数mean, 标准差SD, F检验, t检验和概率P, 相关系数r); 化学名中标明取代位的元素、旋光性和构型符号(如N, O, P, S, d, l)如n-(normal, 正), N-(nitrogen, 氮), o-(ortho, 邻), O-(oxygen, 氧, 习惯不译), d-(dextro, 右旋), p-(para, 对), 例如n-butyl acetate(醋酸正丁酯), N-methylacetanilide(N-甲基乙酰苯胺), o-cresol(邻甲酚), 3-O-methyl-adrenaline(3-O-甲基肾上腺素), d-amphetamine(右旋苯丙胺), l-dopa(左旋多巴), p-aminosalicylic acid(对氨基水杨酸). 拉丁字及缩写in vitro, in vivo, in situ; Ibid, et al, po, vs; 用外文字母代表的物理量, 如m(质量), V(体积), F(力), p(压力), W(功), v(速度), Q(热量), E(电场强度), S(面积), t(时间), z(酶活性, kat), t(摄氏温度, °C), D(吸收剂量, Gy), A(放射性活度, Bq),  $\rho$ (密度, 体积质量, g/L), c(浓度, mol/L),  $\phi$ (体积分数, mL/L), w(质量分数, mg/g), b(质量摩尔浓度, mol/g), l(长度), b(宽度), h(高度), d(厚度), R(半径), D(直径),  $T_{max}$ ,  $C_{max}$ , Vd,  $T_{1/2}$  CI等. 基因符号通常用小写斜体, 如ras, c-myc; 基因产物用大写正体, 如P16蛋白.

2.4 计量单位 采用国际单位制并遵照有关国家

标准, GB3100-3102-93量和单位. 原来的“分子量”应改为物质的相对分子质量. 如30 kD改为 $M_r$  30 000或30 kDa(M大写斜体, r小写正体, 下角标); “原子量”应改为相对原子质量, 即 $A_r$ (A大写斜体, r小写正体, 下角标); 也可采用原子质量, 其单位是u(小写正体). 计量单位在+、-及-后列出. 在±前后均要列出, 如37.6 °C ± 1.2 °C, 45.6岁 ± 24岁, 56.4 d ± 0.5 d. 3.56 ± 0.27 pg/ml应为3.56 ng/L ± 0.27 ng/L. BP用kPa(mmHg), RBC数用 $1 \times 10^{12}$ /L, WBC数用 $1 \times 10^9$ /L, WBC构成比用0.00表示, Hb用g/L.  $M_r$ 明确的体内物质以nmol/L或mmol/L表示, 不明确者用g/L表示. 1 M硫酸, 改为1 mol/L硫酸, 1 N硫酸, 改为0.5 mol/L硫酸. 长10 cm, 宽6 cm, 高4 cm, 应写成10 cm × 6 cm × 4 cm. 生化指标一律采用法定计量单位表示, 例如, 血液中的总蛋白、清蛋白、球蛋白、脂蛋白、血红蛋白、总脂用g/L, 免疫球蛋白用mg/L; 葡萄糖、钾、尿素、尿素氮、CO<sub>2</sub>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 $1 \times 10^{-3}$  g与 $5 \times 10^{-7}$  g之类改成1 mg与0.5 mg, hr改成h, 重量γ改成mg, 长度m改成mm. 国际代号不用于无数值的文句中, 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乙醇; 5% CO<sub>2</sub>, 50 mL/L CO<sub>2</sub>; 1 : 1 000肾上腺素, 1 g/L肾上腺素; 胃黏膜含促胃液素36.8 pg/mg, 改为胃黏膜蛋白含促胃液素36.8 ng/g; 10%葡萄糖改为560 mmol/L或100 g/L葡萄糖; 45 ppm =  $45 \times 10^{-6}$ ; 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.

2.5 统计学符号 (1)t检验用小写t; (2)F检验用英

《世界华人消化杂志》为中国科技论文统计源核心期刊(2010年)和中文核心期刊要目总览(北京大学图书馆, 2011年版)收录的学术期刊.

《世界华人消化杂志》编辑部, 100025, 北京市朝阳区, 东四环中路62号, 远洋国际中心D座903室, 电话: 010-5908-0035, 传真: 010-8538-1893, Email: wjcd@wjgnet.com; http://www.wjgnet.com

文大写字 $F$ ; (3)卡方检验用希文小写 $\chi^2$ ; (4)样本的相关系数用英文小写 $r$ ; (5)自由度用希文小写 $\nu$ ; (6)样本数用英文小写 $n$ ; (7)概率用英文斜体大写 $P$ . 在统计学处理中在文字叙述时平均数 $\pm$ 标准差表示为 $\text{mean} \pm \text{SD}$ , 平均数 $\pm$ 标准误为 $\text{mean} \pm \text{SE}$ . 统计学显著性用 $^aP < 0.05$ ,  $^bP < 0.01$  ( $P > 0.05$  不注). 如同一表中另有一套 $P$ 值, 则 $^cP < 0.05$ ,  $^dP < 0.01$ ; 第三套为 $^eP < 0.05$ ,  $^fP < 0.01$ 等.

2.6 数字用法 遵照国家标准GB/T 15835-1995出版物上数字用法的规定, 作为汉语词素者采用汉字数字, 如二氧化碳、十二指肠、三倍体、四联球菌、五四运动、星期六等. 统计学数字采用阿拉伯数字, 如1000-1500 kg, 3.5 mmol/L  $\pm$  0.5 mmol/L等. 测量的数据不能超过其测量仪器的精密度, 例如6347意指6000分之一的精密度. 任何一个数字, 只允许最后一位有误差, 前面的位数不应有误差. 在一组数字中的 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 应考虑到个体的变差, 一般以SD的1/3来定位数, 例如 $3614.5 \text{ g} \pm 420.8 \text{ g}$ , SD的1/3达一百多g, 平均数波动在百位数, 故应写成 $3.6 \text{ kg} \pm 0.4 \text{ kg}$ , 过多的位数并无意义. 又如 $8.4 \text{ cm} \pm 0.27 \text{ cm}$ , 其 $\text{SD}/3 = 0.09 \text{ cm}$ , 达小数点后第2位, 故平均数也应补到小数点后第2位. 有效位数以后的数字是无效的, 应该舍. 末尾数字, 小于5则舍, 大于5则进, 如恰等于5, 则前一位数逢奇则进, 逢偶(包括“0”)且5之后全为0则舍. 末尾时只可1次完成, 不得多次完成. 例如23.48, 若不要小数点, 则应成23, 而不应该 $23.48 \rightarrow 23.5 \rightarrow 24$ . 年月日采用全数字表达法, 请按国家标准GB/T 7408-94书写. 如1985年4月12日, 可写作1985-04-12; 1985年4月, 写作1985-04; 从1985年4月12日23时20分50秒起至1985年6月25日10时30分止, 写作1985-04-12 T23:20:50/1985-06-25 T10:30:00; 从1985年4月12日起至1985年6月15日止, 写作1985-04-12/06-16, 上午8时写作08:00, 下午4时半写作16:30. 百分数的有效位数根据分母来定: 分母 $\leq 100$ , 百分数到个位;  $101 \leq \text{分母} \leq 1000$ , 百分数到小数点后1位; 余类推. 小数点前后的阿拉伯数字, 每3位间空1/4阿拉伯数字距离, 如1486800.475 65. 完整的阿拉伯数字不移行!

2.7 标点符号 遵照国家标准GB/T 15834-1995标点符号用法的要求, 本刊论文中的句号都采用黑圆点; 数字间的起止号采用“-”字线, 并列的汉语词间用顿号分开, 而并列的外文词、阿拉伯数字、外文缩略词及汉语拼音字母拼写词间改用逗号分开, 参考文献中作者间一律用逗号分开; 表示终了的标点符号, 如句号、逗号、顿

号、分号、括号及书名号的后一半, 通常不用于一行之首; 而表示开头的标点符号, 如括号及书名号的前一半, 不宜用于一行之末. 标点符号通常占一格, 如顿号、逗号、分号、句号等; 破折号应占两格; 英文连字符只占一个英文字符的宽度, 不宜过长, 如5-FU. 外文字符下划一横线表示用斜体, 两横线表示用小写, 三横线表示用大写, 波纹线表示用黑体.

### 3 稿件格式

3.1 题名 简明确切地反映论文的特定内容, 鲜明而有特色, 阿拉伯数字不宜开头, 不用副题名, 一般20个字. 避免用“的研究”或“的观察”等非特定词.

3.2 作者 论文作者的署名, 按照国际医学杂志编辑委员会(ICMJE, International Committee of Medical Journal Editors)作者资格标准执行. 作者标准为: (1)对研究的理念和设计、数据的获得、分析和解读做出重大贡献; (2)起草文章, 并对文章的重要的知识内容进行批评性修改; (3)接受对准备发表文章的最后一稿. 作者应符合条件1, 2, 3, 对研究工作有贡献的其他人可放入志谢中. 作者署名的次序按贡献大小排列, 多作者时姓名间用逗号, 如是单名, 则在姓与名之间空1格(正文和参考文献中不空格). 《世界华人消化杂志》要求所有署名人写清楚自己对文章的贡献. 世界华人消化杂志不设置共同第一作者和共同通信作者.

3.3 单位 作者后写单位的全称空1格后再写省市及邮政编码. 格式如: 张旭晨, 梅立新, 承德医学院病理教研室 河北省承德市 067000

3.4 第一作者简介 格式如: 张旭晨, 1994年北京中医药大学硕士, 讲师. 主要从事消化系统疾病的病理研究.

3.5 作者贡献分布 格式如: 陈湘川与庞丽娟对此文所作贡献两均等; 此课题由陈湘川、庞丽娟、陈玲、杨兰、张金芳、齐妍及李洪安设计; 研究过程由陈玲、杨兰、张金芳、蒋金芳、杨磊、李锋及曹秀峰操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由曹秀峰提供; 数据分析由陈湘川、杨兰及庞丽娟完成; 本论文写作由陈湘川、庞丽娟及李洪安完成.

3.6 同行评议者 为了确保刊出文章的质量, 本刊即将开始实行接受稿件的同行评议公开策略, 将同行评议者姓名, 职称, 机构的名称与文章一同在脚注出版. 格式如: 房静远, 教授, 上海交通大学医学院附属医院仁济医院, 上海市消化疾



病研究所。

3.7 基金资助项目 格式如: 国家自然科学基金资助项目, No. 30224801

3.8 通讯作者 格式如: 通讯作者: 黄缘, 教授, 330006, 江西省南昌市民德路1号, 南昌大学第二附属医院消化内科, 江西省分子医学重点实验室. huang9815@yahoo.com

电话: 0351-4078656 传真: 0351-4086337

收稿日期: 修回日期:

3.9 英文摘要

题名 文章的题名应言简意赅, 方便检索, 英文题名以不超过10个实词为宜, 应与中文题名一致。

作者 作者姓名汉语拼音拼写法规定为: 先名, 后姓; 首字母大写, 双名之间用半字线“-”分开, 多作者时姓名间加逗号。格式如: “潘伯荣”的汉语拼写法为“Bo-Rong Pan”。

单位 先写作者, 后写单位的全称及省市邮政编码。例如: Xu-Chen Zhang, Li-Xin Mei, Department of Pathology, Chengde Medical College, Chengde 067000, Hebei Province, China

基金资助项目 格式如: Supported by National Natural Science Foundation of China, No.30224801

通讯作者 格式如: Correspondence to: Dr. Lian-Sheng Ma, Taiyuan Research and Treatment Center for Digestive Diseases, 77 Shuangta Xijie, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China. wcjd@wjgnet.com

收稿及修回日期 格式如: Received: Revised:

摘要 包括目的、方法、结果、结论, 书写要求与中文摘要一致。

3.10 中文摘要 必须在300字左右, 内容应包括目的(应阐明研究的背景和设想、目的), 方法(必须包括材料或对象, 应描述课题的基本设计, 双盲、单盲还是开放性, 使用什么方法, 如何进行分组和对照, 数据的精确程度。研究对象选择条件与标准是否遵循随机化、齐同化的原则, 对照组匹配的特征。如研究对象是患者, 应阐明其临床表现, 诊断标准。如何筛选分组, 有多少例进行过随访, 有多少例因出现不良反应而中途停止研究), 结果(应列出主要结果, 包括主要数据, 有什么新发现, 说明其价值和局限, 叙述要真实、准确、具体, 所列数据经用何种统计学方法处理; 应给出结果的置信区间和统计学显著性检验的确切值; 概率写 $P$ , 后应写出相应显著性检验值), 结论(全文总结, 准确无误的观点及价值)。

3.11 正文标题层次 0 引言; 1 材料和方法, 1.1 材料, 1.2 方法; 2 结果; 3 讨论; 4 参考文献。序号一

律左顶格写, 后空1格写标题; 2级标题后空1格接正文。正文内序号连排用(1), (2), (3)。以下逐条陈述。

0 引言 应包括该研究的目的和该研究与其他相关研究的关系。

1 材料和方法 应尽量简短, 但应让其他有经验的研究者能够重复该实验。对新的方法应该详细描述, 以前发表过的方法引用参考文献即可, 有关文献中或试剂手册中的方法的改进仅描述改进之处即可。

2 结果 实验结果应合理采用图表和文字表示, 在结果中应避免讨论。

3 讨论 要简明, 应集中对所得的结果做出解释而不是重复叙述, 也不应是大量文献的回顾。

图表的数量要精选。表应有表序和表题, 并有足够具有自明性的信息, 使读者不查阅正文即可理解该表的内容。表内每一栏均应有表头, 表内非公知通用缩写应在表注中说明, 表格一律使用三线表(不用竖线), 在正文中该出现的地方应注出。图应有图序、图题和图注, 以使其容易被读者理解, 所有的图应在正文中该出现的地方注出。同一个主题内容的彩色图、黑白图、线条图, 统一用一个注解分别叙述。如: 图1 萎缩性胃炎治疗前后病理变化。A: …; B: …; C: …; D: …; E: …; F: …; G: …。曲线图可按●、○、■、□、▲、△顺序使用标准的符号。统计学显著性用: <sup>a</sup> $P<0.05$ , <sup>b</sup> $P<0.01$ ( $P>0.05$ 不注)。如同一表中另有一套 $P$ 值, 则<sup>c</sup> $P<0.05$ , <sup>d</sup> $P<0.01$ ; 第3套为<sup>e</sup> $P<0.05$ , <sup>f</sup> $P<0.01$ 。 $P$ 值后注明何种检验及其具体数字, 如 $P<0.01$ ,  $t = 4.56$  vs 对照组等, 注在表的左下方。表内采用阿拉伯数字, 共同的计量单位符号应注在表的右上方, 表内个位数、小数点、±、-应上下对齐。“空白”表示无此项或未测, “-”代表阴性未发现, 不能用同左、同上等。表图勿与正文内容重复。表图的标目尽量用 $t/\text{min}$ ,  $c/(\text{mol/L})$ ,  $p/\text{kPa}$ ,  $V/\text{mL}$ ,  $t/^\circ\text{C}$ 表达。

志谢 后加冒号, 排在讨论后及参考文献前, 左齐。

4 参考文献 本刊采用“顺序编码制”的著录方法, 即以文中出现顺序用阿拉伯数字编号排序。提倡对国内同行近年已发表的相关研究论文给予充分的反映, 并在文内引用处右上角加方括号注明角码。文中如列作者姓名, 则需在“Pang等”的右上角注角码号; 若正文中仅引用某文献中的论述, 则在该论述的句末右上角注码号。如马连生<sup>[1]</sup>报告……, 潘伯荣等<sup>[2-5]</sup>认为……; PCR方法敏感性高<sup>[6-7]</sup>。文献序号作正

《世界华人消化杂志》自2006-01-01起改为旬刊发行, 每月8、18、28日出版。北京报刊发行局发行, 邮发代号: 82-262。

《世界华人消化杂志》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。

文叙述时, 用与正文同号的数字并排, 如本实验方法见文献[8]。所引参考文献必须以近2-3年SCIE, PubMed, 《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊为准, 通常应只引用与其观点或数据密切相关的国内外期刊中的最新文献。期刊: 序号, 作者(列出全体作者), 文题, 刊名, 年, 卷, 起页-止页, PMID和DOI编号; 书籍: 序号, 作者(列出全部), 书名, 卷次, 版次, 出版地, 出版社, 年, 起页-止页。

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

## 4 写作格式实例

### 4.1 述评写作格式实例

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

### 4.2 研究原著写作格式实例

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

### 4.3 焦点论坛写作格式实例

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

### 4.4 文献综述写作格式实例

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

### 4.5 研究快报写作格式实例

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

### 4.6 临床经验写作格式实例

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

### 4.7 病例报告写作格式实例

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

## 5 投稿方式

接受在线投稿, 不接受其他方式的投稿, 如E-mail、打印稿。在线投稿网址: <http://www.baishideng.com/wcjd/ch/index.aspx>。无法在线提交的通过[submission@wjgnet.com](mailto:submission@wjgnet.com), 电话: 010-8538-1892, 传真: 010-8538-1893寻求帮助。投稿须知下载网址<http://www.wjgnet.com/1009-3079/tgxz.pdf>。审稿过程平均时间需要14-28 d。所有的来

稿均经2-3位同行专家严格评审, 2位或以上通过为录用, 否则将退稿或修改后再审。接受后的稿件作者需缴纳稿件发表费, 文章发表后可获得1本样刊及10套单行本(稿酬)。

## 6 修回稿须知

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

6.2 稿件修改 来稿经同行专家审查后, 认为内容需要修改、补充或删除时, 本刊编辑部将把原稿连同审稿意见、编辑意见寄回给作者修改, 而作者必须于15 d内将单位介绍信、作者符合要点承诺书、版权转让信等书面材料寄回编辑部, 同时将修改后的电子稿件上传至在线办公系统; 逾期寄回, 所造成的问题由作者承担责任。

6.3 版权 本论文发表后作者享有非专有权, 文责由作者自负。作者可在本单位或本人著作集中汇编出版以及用于宣讲和交流, 但应注明发表于《世界华人消化杂志》××年; 卷(期): 起止页码。如有国内外其他单位和个人复制、翻译出版等商业活动, 须征得《世界华人消化杂志》编辑部书面同意, 其编辑版权属本刊所有。

### 《世界华人消化杂志》编辑部

北京百世登生物医学科技有限公司  
100025, 北京市朝阳区东四环中路62号  
远洋国际中心D座903室  
电话: 010-5908-0035  
传真: 010-8538-1893  
E-mail: [wcjd@wjgnet.com](mailto:wcjd@wjgnet.com)  
<http://www.wjgnet.com>

## 2012年国内国际会议预告

2012-05-26/31

2012年世界医学物理与生物医学工程大会

会议地点: 北京市

联系方式: info@wc2012.org

2012-06-01/03

2012中国北京超声医师学术大会

会议地点: 北京市

联系方式: zhumin301@163.com

2012-06-15/17

第一届糖尿病大会、第二届内分泌与代谢大会

会议地点: 北京市

联系方式: medical585@163.com

2012-06-15/17

第九届全国抗菌药物临床药理学术会议

会议地点: 北京市

联系方式: doctorzhengbo@163.com; liyun1907@sina.com

2012-06-29/07-01

第二十四次全国中西医结合消化学术会议

会议地点: 宁波市

联系方式: qgzxyjhxh@163.com

2012-06-30/07-01

中华医学会肝病与代谢学术研讨会

会议地点: 哈尔滨市

联系方式: lilyjia@163.com

2012-07-01/31

第一届全国普通外科青年医师学术论坛

会议地点: 北京市

联系方式: cmacjs@cma.org.cn

2012-07-01/31

第二届全国普通外科手术技术学术会议

会议地点: 青岛市

联系方式: lining@126.com

2012-07-27/29

第十届全国胃病学术大会

会议地点: 哈尔滨市

联系方式: xiaohuahuiyi2012@163.com

2012-08-08/10

第五届全国生物信息学与系统生物学学术大会暨国际生物信息学前沿研讨会

会议地点: 哈尔滨市

联系方式: bioinfo@hrbmu.edu.cn

2012-08-25/29

第八届世界华人药物化学研讨会暨第九届IUPAC化学生物学国际研讨会

会议地点: 北京市

联系方式: liangren@bjmu.edu.cn

2012-08-29/09-01

中华医学会第十一次全国内分泌学学术会议

会议地点: 广州市

联系方式: lilyjia@163.com

2012-09-01/30

中华医学会第三次全国肝纤维化、肝硬化学术会议

会议地点: 郑州市

联系方式: lijuyi@cma.org.cn

2012-09-01/30

第十五届全国中西医结合大肠肛门病学术交流会

会议地点: 济南市

联系方式: doclf@163.com

2012-09-14/16

中华医学会第十二次全国超声医学学术会议

会议地点: 青岛市

联系方式: lilyjia@163.com

2012-09-21/30

2012中华影像技术第20次全国学术大会暨国际影像技术论坛

会议地点: 长春市

联系方式: ting@dxyer.com

2012-09-23/27

第九届海峡两岸细胞生物学研讨会

会议地点: 丽江市

联系方式: cscb@sibs.ac.cn

2012-10-21/11-10

第十四次全国中医肛肠学术交流大会

会议地点: 长沙市

联系方式: gcfh2012@163.com

2012-10-25/28

第13届亚太临床微生物暨感染病会议(APCCMI)

会议地点: 北京市

联系方式: bianxiaoxue@mpco.cn

2012-12-21/23

2012生物医学工程生物信息学国际会议

会议地点: 昆明市

联系方式: beb2012@126.com

## 志谢世界华人消化杂志编委

本期文章审稿中(包括退稿), 我刊编委付出了宝贵的时间和大量的精力, 提高了《世界华人消化杂志》的学术质量, 在此表示衷心感谢!

蔡三军 主任医师

复旦大学附属肿瘤医院大肠外科

陈汝福 教授

中山大学孙逸仙纪念医院肝胆外科

陈卫昌 教授

苏州大学附属第一医院消化内科

程树群 副教授

中国人民解放军第二军医大学东方肝胆外科医院综合治疗三科

仇毓东 教授

南京大学医学院附属鼓楼医院肝胆外科

代智 副研究员

复旦大学附属中山医院肝癌研究所

杜群 副研究员

广州中医药大学脾胃研究所药理室

杜雅莉 主任医师

哈尔滨医科大学附属第二医院消化内科

杜奕奇 副教授

中国人民解放军第二军医大学长海医院消化内科

范学工 教授

中南大学湘雅医院感染病科

高英堂 研究员

天津市第三中心医院 天津市肝胆疾病研究所分子细胞室

巩鹏 教授

大连医科大学附属第一医院普外二科

韩天权 教授

上海交通大学医学院附属瑞金医院外科、上海消化外科研究所

郝建宇 教授

首都医科大学附属北京朝阳医院消化内科

黄晓东 主任医师

武汉市中心医院消化内科

黄颖秋 教授

本溪钢铁(集团)有限责任公司总医院消化内科

黄缘 教授

南昌大学第二附属医院消化内科 江西省分子医学重点实验室

季菊玲 副教授

南通大学医学院病理教研室

姜卫东 教授

安徽省立医院肝胆外科

李君文 研究员

中国人民解放军军事医学科学院卫生学环境医学研究所

李涛 副主任医师

北京大学人民医院肝胆外科

李永翔 主任医师

安徽医科大学第一附属医院普外科

李瑜元 教授

广州市第一人民医院内科

刘平 教授

南京医科大学第一附属医院(江苏省人民医院)肿瘤内科

刘颖斌 教授

上海交通大学医学院附属新华医院

刘正稳 教授

西安交通大学医学院第一附属医院传染科

孟庆华 教授

首都医科大学附属北京佑安医院肝病四科

朴云峰 教授

吉林大学第一临床医院消化科

沈薇 教授

重庆医科大学附属第二医院消化内科

孙诚谊 教授

贵阳医学院附属医院院长办