

胰腺癌治疗反应的影像学评估

龙学颖, 孙维佳, 邹益友, 李宜雄

龙学颖, 中南大学湘雅医院放射科 中南大学胰腺疾病研究所 湖南省长沙市 410008

孙维佳, 李宜雄, 中南大学湘雅医院普外科 中南大学胰腺疾病研究所 湖南省长沙市 410008

邹益友, 中南大学湘雅医院消化科 中南大学胰腺疾病研究所 湖南省长沙市 410008

龙学颖, 副主任医师, 研究生导师, 主要从事腹部脏器疾病的影像学诊断、影像学图像处理的基础与临床研究。

作者贡献分布: 本文综述由龙学颖完成; 孙维佳、邹益友及李宜雄审核。

通讯作者: 龙学颖, 副主任医师, 410008, 湖南省长沙市湘雅路87号, 中南大学湘雅医院放射科. longxueying@gmail.com
电话: 0731-89753819

收稿日期: 2011-01-23 修回日期: 2011-04-19

接受日期: 2011-04-26 在线出版日期: 2011-04-28

Imaging evaluation of therapeutic response in patients with pancreatic cancer: recent advances

Xue-Ying Long, Wei-Jia Sun, Yi-You Zou, Yi-Xiong Li

Xue-Ying Long, Department of Radiology, Xiangya Hospital, Central South University; Institute of Pancreatic Diseases, Central South University, Changsha 410008, Hunan Province, China

Wei-Jia Sun, Yi-Xiong Li, Department of General Surgery, Xiangya Hospital, Central South University; Institute of Pancreatic Diseases, Central South University, Changsha 410008, Hunan Province, China

Yi-You Zou, Department of Gastroenterology, Xiangya Hospital, Central South University; Institute of Pancreatic Diseases, Central South University, Changsha 410008, Hunan Province, China

Correspondence to: Xue-Ying Long, Department of Radiology, Xiangya Hospital, Central South University, 87 Xiangya Road, Changsha 410008, Hunan Province, China. longxueying@gmail.com

Received: 2011-01-23 Revised: 2011-04-19

Accepted: 2011-04-26 Published online: 2011-04-28

Abstract

Chemoradiotherapy is the primary choice of non-surgical treatment of advanced pancreatic cancer, and diagnostic imaging plays an important role in objectively assessing early therapeutic response. This article systematically reviews the criteria for evaluation of therapeutic response in solid tumors and their application in pancreatic cancer, highlighting some key contents in imaging evaluation of therapeutic response in patients with pancreatic cancer.

Key Words: Pancreatic cancer; Diagnostic imaging; Therapeutic response; Evaluation criteria

Long XY, Sun WJ, Zou YY, Li YX. Imaging evaluation of therapeutic response in patients with pancreatic cancer: recent advances. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(12): 1211-1218

摘要

以放化疗为主的非手术治疗是中晚期胰腺癌的主要治疗方法, 影像学在早期客观评估胰腺癌治疗反应及预测疗效上有重要作用. 本文对目前国际上的肿瘤治疗反应评估标准及其在胰腺癌评估中的应用现况进行评述, 对评估中的一些关键内容进行综述和分析.

关键词: 胰腺癌; 影像诊断; 治疗反应; 评估标准

龙学颖, 孙维佳, 邹益友, 李宜雄. 胰腺癌治疗反应的影像学评估. *世界华人消化杂志* 2011; 19(12): 1211-1218

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/1211.asp>

0 引言

疗效的准确评估是肿瘤学重要研究内容之一, 对 II / III 期临床试验而言, 这关系到一个新药或新方案能否获得批准应用于临床; 而临床上则是指导治疗的重要依据之一^[1]. 尽管肿瘤治疗有效性判断的最终证据是临床状况的改善和生存期的延长, 但通常影像学被用于更早期客观评估疗效^[2]. 临床试验中, 早期判断疗效意味着研究周期缩短和经费节省, 并减少受试者因可能无效治疗带来的不良反应; 临床实际中则有助于及时调整治疗方案. 由于胰腺癌病情进展快, 对放化疗敏感性较差, 晚期患者对治疗不良反应耐受性差, 因此更早期准确评价治疗反应尤为重要. 本文就胰腺癌治疗反应的影像学评估研究现况进行综述, 并对评估中的一些关键内容进行分析.

1 胰腺癌治疗的研究现况

胰腺癌是预后极差的高度恶性肿瘤, 也是目前最难治疗的肿瘤之一. 多数患者就诊时已属中

■背景资料

胰腺癌是一种病情进展快的高度恶性肿瘤, 非手术治疗是中晚期胰腺癌主要的治疗方法之一, 而胰腺癌对放化疗敏感性相对较差, 早期准确客观评价治疗反应非常重要.

■同行评议者

程英升, 教授, 同济大学附属第十人民医院影像临床医学中心

■ 研发前沿

近些年来,胰腺癌治疗的研究重点逐渐转向化疗、放疗、免疫治疗、生物治疗等非手术治疗方法单用、联用或作为术前后辅助应用。

晚期,仅约20%患者适合手术切除,但单纯扩大切除范围及扩大淋巴结清扫仍然不能显著延长患者生存期^[3]。近些年来,胰腺癌治疗的研究重点逐渐转向化疗、放疗、免疫治疗、生物治疗等非手术治疗方法单用、联用或作为术前后辅助应用^[3]。

验证各种新治疗方法或方式的有效性,需要通过临床试验客观、准确地评估。目前,胰腺癌治疗的临床试验研究较为活跃,据我们查询美国国家癌症研究所(national cancer institute, NCI)网站(<http://www.cancer.gov/clinicaltrials>),在NCI注册的胰腺癌治疗类临床试验多达九百多个,其中250个处在受试者招募期间。吉西他滨(gemcitabine)^[4]、埃罗替尼(erlotinib)^[5]已通过临床试验并相继被美国食品与药物管理局批准应用于胰腺癌临床治疗,其他一系列新药及新治疗组合则正在研发或临床试验中。

2 影像学在胰腺癌治疗反应评估中的价值

胰腺癌治疗的评估包含多个方面内容,其中疗效评估是最重要内容之一。疗效评估的主要依据是肿瘤对治疗的反应,影像学具有无创性实时评估,标准客观,可重复性好,准确性高并可实现定量评估等优点,成为胰腺癌治疗反应评估的重要内容。基线血清CA 19-9水平是生存期的独立性预后指标,可作为进展期胰腺癌临床治疗的深化指标,治疗过程中监测CA 19-9变化并和影像学结合,则可起互补作用^[6]。

3 常用的治疗反应评估标准及其在胰腺癌中的应用现状

治疗反应的影像学评估主要基于肿瘤负荷定量及治疗后肿瘤大小变化。临床试验中为使评估具有可操作性并能对不同研究中心的数据进行统一分析,使不同试验之间对比有可行性,需要采用一个广泛认可的统一评估标准,保证测量及评价方法上的一致性和科学性^[7]。

3.1 临床试验评估标准概述 国际上较为广泛采用的标准主要有:较早的是世界卫生组织(world health organisation, WHO)于1981年发布的评估标准^[8],WHO标准采用双径(最大径及其相应最大垂直径)乘积的总和作为判断标准,又称为二维法。2000年,欧洲、美国和加拿大的联合工作小组制订了新的实体瘤反应评估标准^[9],即实体瘤的疗效评价标准(response evaluation criteria in solid tumors, RECIST),RECIST采用靶病灶

最大径总和为判断标准,又称为一维法。2009年,RECIST工作小组又对先前的标准进行了修订,即RECIST 1.1^[10](先前版本则称为RECIST 1.0)。由于RECIST对一些特定肿瘤或特定治疗评估的不足,其他标准如基于PET的评估标准PERCIST(positron emission tomography response criteria in solid tumors)^[11]及基于CT上肿瘤大小和密度的标准(如Choi标准)^[12]等也被提出。而随着图像分析测量技术的提高,肿瘤容积测量也被提出^[13]。

3.2 各评估标准的综合评价及应用情况

3.2.1 WHO标准: WHO标准发布后的20余年未被广泛应用于肿瘤临床试验及日常临床工作,尤其是其规定的这种二维测量方法的影响深远。根据美国最近的一项调查^[14],多数肿瘤科医生仍然更倾向于接受二维测量而非一维测量。WHO标准尽管仍有价值,但毕竟年代久远,标准本身并未提及目前已广泛使用的螺旋CT、MRI,而各家在套用该标准时做法不统一,此外也存在一些问题,如:未对目标病灶进行明确规定,未规定应测量的最小病灶大小及应测量病灶数量,对疾病进展(progression of disease, PD)的定义也不明确,造成各研究之间疗效评价难以比较,故在RECIST出台后,临床试验中大多弃用了WHO标准。

3.2.2 RECIST: RECIST的指导方针在于采用一维测量来简化标准,以提高易用性和可重复性。RECIST 1.0发布以来就被广泛应用于以客观缓解率为主要观察终点的II期临床试验。RECIST 1.0在应用中也逐渐暴露一些问题,为此RECIST 1.1进行了修订,RECIST 1.1在1.0基础上减少了需测量的靶病灶数目,但强调了测量的精度和可靠性,增加了淋巴结评估方法,此外也考虑到了许多细节,如病灶融合或分裂的测量,基线未检查部位在治疗后发现的病灶归入新病灶,对于骨病变、囊性病变及先前有过放疗史的病灶的可测量性,太小而不能测量的病灶如何处理, PET发现的病灶如何处理等。新近的临床试验已开始采用RECIST 1.1。但在临床上,美国最近的调查结果表明^[14],56%肿瘤科医生表示尚不熟悉RECIST 1.1所做修改,这和RECIST 1.1发布较新有关,68%肿瘤科医生认为RECIST虽有不足但尚可使用。

3.2.3 PERCIST: 尽管RECIST 1.1已注意到PET等功能和代谢成像技术的潜在价值,但对PET的评估作用仍是持保守态度的。PERCIST则通过评估

肿瘤代谢活性,可在不依赖形态学改变情况下得以评价肿瘤治疗反应.研究表明,对于部分特定肿瘤(如淋巴瘤)或特定治疗方法(如分子靶向化疗),基于PET的评估标准已经体现出了其优势^[15].但PERCIST目前尚未完全成熟,该标准对胰腺癌的评估价值也有待验证.此外,PET/CT价格昂贵,目前尚未广泛普及,PET上单纯代谢改变尚不能取代CT或MRI等影像诊断方法在胰腺癌检出和评估上的作用,因此目前基于PET的评估标准尚未在胰腺癌的临床试验中广泛采用.

3.3 胰腺癌治疗反应评估标准的选择 RECIST与WHO标准之间最大不同是分别为一维与二维测量,虽然多数研究^[16]发现二者在治疗反应判断上的一致性很高,但对一些不规则生长的肿瘤或治疗后形态变化较大的肿瘤,二者间可能产生偏差^[17].对于胰腺癌,Ahn等^[18]的研究表明,WHO与RECIST判断上的不一致率达25%(3/12),不一致者主要见于病灶不均匀性生长或边缘模糊时,而此时采用WHO标准判断似乎更符合患者临床状况,但病例数少,这种存疑待进一步求证.

Rezai等^[19]对16例胰腺癌病例放化疗前后的多层螺旋CT资料进行分析,通过软件处理,获得肿瘤体积、RECIST长径、等体积球当量径(volume equivalent sphere diameter, VESD)、最大三维直径(maximum 3-dimensional diameter, M3DD)、伸展率等参数,结果表明,当肿块不呈球形时RECIST可能不能对胰腺癌进行准确评估,有必要采用肿瘤体积测量以更准确评估胰腺癌治疗反应.尽管体积测量可通过手工或软件支持下的半自动测量实现,但易用性受到影响,具体操作的规范化也尚有待完善,软件的科学性、测量的可行性及可重复性尚需大宗病例的证实.事实上,目前并无基于体积测量的国际公认的标准出台,故现阶段,RECIST 1.1作为可接受的国际标准仍将在胰腺癌临床试验中发挥主要作用.

4 胰腺癌影像学评估中的一些焦点问题

4.1 胰腺癌原发灶的可测量性 目前,是否将胰腺癌原发灶作为可测量靶病灶尚无统一做法和明确规定.从CT上测量的肿块大小与切除术后组织病理学确定的大小的相关性研究来看,增强CT显示的低密度肿块大小可在较大程度上反映癌灶大小,但相关系数并不高,约0.65-0.67^[20,21].当病灶沿胰腺实质、胰胆管浸润性生长或外侵以十二指肠受累为主时,CT常低估肿瘤大小;反

之,当肿瘤继发胰腺炎或囊变时CT则可能高估肿瘤大小.MRI研究也表明,MRI上(主要为T₁WI平扫及增强扫描)测量的低信号肿块多小于病理上确定的肿块(24 mm±6 mm vs 31 mm±1 mm, $P<0.001$)^[22].而对于行放化疗的胰腺癌而言,治疗导致的胃肠毒性常引起肠壁水肿及胰周炎性改变,也可能影响评估^[23].

多数胰腺癌临床试验中,可测量性原发灶被列为靶病灶^[24-26];但也有学者担心CT未必能准确反映真实肿瘤大小或真实治疗反应^[27],原发灶一律作为不可测量病灶,其疗效评价主要基于可测量性远处转移灶.然而,将原发灶排除在可测量病灶外的做法使病例入组上的困难增加,而且研究对象也限制在已有远处转移的晚期病例.

是否将胰腺癌原发灶作为可测量靶病灶也可能对评估结果产生一定影响.Ishii等^[28]研究了143例行化疗的胰腺癌病例,认为根据CT图像分析,约有83%(119/143)胰腺癌病例有可测量原发灶(即有明确边界并能准确测量者);当原发灶作为可测量病灶时,具有可测量病灶的病例为127例,判断的部分缓解(partial regression, PR)、疾病稳定(stable disease, SD)、PD比例分别为11%、74%、15%,而将原发灶均作为不可测量病灶时,具有可测量病灶的病例仅67例,判断的PR、SD、PD比例则分别为18%、52%、30%.在前者,主要是原发灶较大,可抵消相对小的转移灶缩小或增大效应,导致SD比例增加.

因此,胰腺癌临床试验研究方案设计时,在入组筛查中必须明确原发灶是否可作为靶病灶,在原发灶可测量性确定上推荐由独立专家委员会进行,对于不能准确测量者,基线检查时需注明.

4.2 影像学的选择与技术关键 要准确的进行测量,清晰显示病灶,包括原发灶及可能的淋巴结及远处转移灶(主要是肝转移)是必要的前提.无论采取何种影像学方法,保持成像技术参数的一致性则是测量值具有可比性的前提.

4.2.1 CT: CT是目前应用最广泛的胰腺癌影像学手段,也因其可重复性好、图像清晰、伪影少,是RECIST推荐的首选评估手段.因此,CT成为胰腺癌治疗反应评估的主要方法.在应用中,需注重一些关键技术内容使病灶得到良好显示.在扫描方案上,多期增强扫描成为目前胰腺癌CT扫描的常规^[29],通常采用双期扫描,即胰腺期+门脉期.由于胰腺癌乏血供而胰腺和肝脏实质则富血供,胰腺期,胰腺-肿瘤对比密度差最大,门脉期,肝脏-肿瘤对比密度差最大,从而提高病

■ 相关报道

Tochetto等对结肠癌肝转移患者^{90Y}放疗栓塞治疗后反应研究结果表明,CT上肝转移灶密度改变和^{18F}-FDG PET上代谢活性有很高的相关性,密度改变有可能成为其早期治疗反应判断指标.

■创新盘点

本文系统地总结了目前国际上肿瘤治疗反应评估标准及其在胰腺癌评估中的现况,并对评估中的一系列关键内容进行综述和分析。

灶的检出和显示.也有单位在此基础上增加动脉期,即三期扫描,动脉期的意义在于有利于动脉受侵的判断^[30].虽有学者认为延迟期扫描有利于少数胰腺期等密度胰腺癌的显示^[31],但这类胰腺癌毕竟少见,仅占全部胰腺癌5.4%(35/644)^[32],故绝大多数单位并未将延迟期列为常规.也有学者提出单期扫描方案以减少辐射量,此时推荐的扫描延迟时间为60 s^[33].对比剂注射方案和扫描延迟时间是影响增强CT扫描效果的重要因素.典型对比剂注射方案是流率4 mL/s、总量2 mL/kg体重,在该注射方案下,动脉最佳显示时间窗为30-35 s,胰腺35-45 s,肝脏在55 s以后^[34].采用固定注射持续时间和按体质量计算对比剂用量,可减少主动脉、门静脉、肝脏强化最佳强化时相的个体差异,便于精确把握延迟时间,也减少个体间体质量不同对强化的影响^[35,36],也有单位采用bolus-tracking技术获得个体化的扫描延迟时间^[37].此外,采用低电压高电流(如80 kVp、675 mA)曝光条件有助于提高胰腺及胰周血管强化效果并更好地显示肿瘤,同时可减少辐射量^[38].

4.2.2 MRI: MRI对胰腺癌有较高临床应用价值,尤其是随着软硬件的发展,图像质量明显提升,现代MRI甚至可实现胰腺癌从形态到功能的一站式评估^[39-43].和多层螺旋CT比较,通常认为MRI对胰腺癌检出和分期价值相当^[41-43],而对胆胰管显示和小病灶诊断有潜在优势^[42,43].胰腺癌MRI的序列较多,一般较为广泛采用的是平扫T₁WI+T₂WI及T₁WI动态增强扫描,推荐的具体成像序列可参见文献[44]的附录. MRI无电离辐射,适合多次复查,可能成为今后胰腺癌评估的重要角色,而对于碘剂过敏者, MRI更是可供选择的替代方法.目前尚缺乏多层螺旋CT与MRI用于胰腺癌治疗反应评估的对比研究文献报道, MRI对于病灶大小测量的准确性、可重复性及其与CT的对比,仍缺乏明确结论.胰腺癌治疗的动物实验中病灶测量多基于T₂WI上显示的高信号肿块^[45],而临床上,胰腺癌T₂WI多呈等信号,病灶测量仍主要依据T₁WI(尤其是脂肪抑制T₁WI)平扫及动态增强扫描显示的低信号肿块^[46].需进一步明确的是, MRI平扫与动态增强扫描不同时相上测量的病灶大小有无差异以及治疗反应评估最适合病灶测量的是何序列. MRI用于胰腺癌评估时另一需注意的问题是,影响MRI图像质量及病灶测量的因素更多^[47],如机器本身、线圈及成像序列选择、成像序列具体参数、对比剂种

类等,要使不同病例之间及不同研究中心的数据具可比性,制订一个统一的规范是必要的.

4.2.3 其他影像学方法: B超是临床上常用的胰腺影像学手段,但其敏感性、特异性稍差,一般只作为初筛,且因其操作者依赖性,限制了其在客观评估上的应用,通常对于B超发现的新病灶,仍需行CT或MRI确认.内镜超声对胰腺癌诊断、切除性评估、分期具有重要作用,在评估原发灶大小、范围及淋巴结受累上优于其他影像学,但对远处转移灶评估作用有限,由于属侵入性检查,并受操作者熟练程度影响,在评估中一般不作为常规使用^[48].尽管PET/CT对于胰腺癌的诊断分期有较高敏感性和特异性^[49,50],但价格昂贵,目前尚未广泛普及,因此PET仅在CT、MRI诊断困难的病例中选择性应用.目前缺乏PET对胰腺癌治疗反应评估的大宗病例文献报道,该方面研究值得进一步深入.

4.3 大小以外的信息对治疗反应评估作用 尽管RECIST推荐采用CT、MRI评估治疗反应,却主要注重大小方面信息. CT、MRI在提供肿瘤形态学信息的同时,也可获得肿瘤密度/信号的信息,而各种增强扫描如动态增强扫描、多时相增强扫描、灌注成像及造影检查可获得血供及血流动力学方面信息,一系列功能成像技术则可提示其他与肿瘤及治疗相关信息,挖掘并探讨这些信息可能有助于治疗反应评估,而如何将这些信息整合并应用于今后肿瘤治疗反应评估是值得关注的.

4.3.1 密度和强化: 一般的,治疗后尤其是局部治疗和靶向血管生成化疗后病灶出现坏死、液化、纤维化形成往往是治疗有效的一种表现,而其在影像学上则主要体现为密度和强化改变.对于胃肠道间质瘤对分子靶向化疗药物的治疗反应而言,密度与大小相结合的Chio标准^[12]可更好地进行评估,形态、密度、大小、结构相结合的MASS(morphology, attenuation, size and structure)标准则被认为能提高转移性肾癌靶向治疗的评估效能^[51].病灶强化水平的变化对肝细胞癌放疗疗效评估有重要作用^[52],而Tochetto等^[53]对结肠癌肝转移患者90Y放疗栓塞治疗后反应研究结果则表明, CT上肝转移灶密度改变和¹⁸F-FDG PET上代谢活性有很高相关性,密度改变有可能成为其早期治疗反应判断指标.然而,是否密度和强化改变也对胰腺癌肝转移治疗反应评估有相似的价值,目前尚无明确的文献报道.但根据相关研究^[54]推测,强化变化对胰

腺癌治疗反应评估而言, 情况可能相对复杂, 因为胰腺癌强化既和肿瘤血管生成有关, 又受到肿瘤内纤维化程度影响. 因此, 如要采用类似的密度或强化标准评估胰腺癌疗效, 仍需进一步明确其和治疗反应的关系.

4.3.2 功能影像学提供的信息: 目前已经应用于临床的功能成像手段主要有: (1)磁共振扩散加权成像(diffusion weighted magnetic resonance imaging, DWI): DWI能够在活体无创伤性定量测量组织内水分子扩散运动, 间接反映组织细胞内外间隙情况. 肿瘤治疗后可能出现肿瘤细胞、间质成分及二者比例的改变, 引起局部细胞内外间隙变化, 故DWI可能在形态学出现改变前提示可能的治疗反应信息^[55,56]; (2)灌注成像技术, 包括CT灌注成像(CT perfusion imaging, CTPI)、磁共振灌注成像(perfusion weighted magnetic resonance imaging, PWI)及超声造影: 灌注成像可无创伤性定量测量组织微循环相关参数, 在活体动态反映肿瘤血管生成状况, 从而可早期反映治疗(尤其是抗肿瘤血管生成药物治疗)的疗效^[57-59]. 该方面研究表明, 功能影像学提供的这些信息将对于准确评价治疗反应有极大帮助, 尤其是对一些新型治疗方式(如分子靶向化疗)而言, 可作为形态学评估的重要补充^[55-59], 但目前尚缺乏功能学方面评估标准, 积极地进行该方面探讨是今后的研究内容之一.

4.4 测量过程中偏差与计算机辅助的半自动测量及体积测量 为使治疗前后的测量值具有可比性, 除强调尽量采用相同的扫描方法及成像技术外, 在相同的图像显示条件下采用同一测量方法也是必要的. 然而, 即便如此, 也不可避免地会因主观原因产生测量间个体差异. 个体差异既包括同一测量者不同测量间的差异, 也包括不同测量者对同一测量的差异, 一般前者小于后者, 因此, 在临床试验中同一病例的测量尽量由同一研究者进行^[60]. 研究表明, 采用计算机辅助的半自动测量方法可明显降低这种和测量者有关的测量差异^[61]. 随着计算机图像自动识别、自动切割以及测量算法方面研究逐渐深入, 计算机辅助测量将不仅在一维、二维测量方面提高精度, 更在三维体积测量方面逐渐显示出良好的可重复性^[62], 这将为今后以肿瘤体积来定量测量肿瘤负荷, 并最终制订新的肿瘤治疗反应评估标准打下基础.

5 功能影像学在预测胰腺癌治疗反应上的作用 在临床实际工作中, 由于胰腺癌是一种对多种

放化疗敏感性较差的肿瘤^[63], 准确预测治疗反应有重要意义, 因为他可前瞻性地指导治疗方案选择, 减少因可能无效治疗导致的不良反应, 使患者最大程度地获益; 而对于临床试验, 则在选择合适的入组病例上起到重要作用. 血清CA 19-9水平虽和预后有关, 却并不能准确预测治疗反应^[64]. 尽管也已有一些分子生物学指标, 如脱氧胞苷激酶水平^[65]、基于ATP的肿瘤化疗敏感试验^[66]及血清REG4水平^[67]有助于预测放化疗疗效, 但影像学为在体无创伤性预测治疗反应提供了另一途径, 可作为胰腺癌放化疗敏感性预测体系中的重要组成部分.

灌注成像(包括CTPI及PWI)作为一种功能成像方法对预测胰腺癌治疗反应有帮助. Park等^[68]对30例胰腺癌患者吉西他滨同步放化疗前行多层螺旋CTPI, 计算出各种灌注参数并获得灌注图像, 结果表明, 治疗前 $K^{(trans)}$ 值高的肿瘤倾向于对放化疗有较好治疗反应, CT灌注成像可作为胰腺癌同步放化疗疗效的有效预测指标. Akisik等^[69]对局部进展期胰腺癌常规化疗+抗肿瘤血管生成联合治疗前后分别计算病灶各种磁共振灌注参数, 其中 $K^{(trans)}$ 值在治疗前后存在显著性差异, 而以治疗前 $K^{(trans)}$ 值 $>0.78 \text{ mL}/(\text{mL} \cdot \text{min})$ 为标准, 预测有治疗反应的敏感性100%, 特异性71%. Niwa等^[70]应用动态磁敏感性对比增强磁共振成像(dynamic susceptibility contrast magnetic resonance imaging, DSC-MRI)技术的研究结果表明, 治疗前胰腺癌癌灶 ΔR_2^* 较高者治疗后的疾病进展率更高, 提示DSC-MRI可能在预测胰腺癌化疗后早期进展方面有帮助. 此外, 其他功能成像(如DWI)也被成功应用于预测胰腺癌治疗反应. Niwa等^[71]进行了DWI预测化疗疗效的研究, 通过计算出不同 b 值下胰腺癌的表现扩散系数(apparent diffusion coefficient, ADC), 研究发现, 在采用高 b 值时, 具有低ADC值的胰腺癌患者化疗后更倾向于早期进展.

6 结论

治疗反应评估对胰腺癌临床试验及实际临床工作均非常重要, 影像学在早期准确客观评估治疗反应上发挥了重要作用, 但目前仍有许多难题需要解决. RECIST 1.1作为目前肿瘤治疗反应评估的主要标准尽管对胰腺癌评估尚有不足之处, 鉴于尚无其他更好的标准可供使用, RECIST 1.1仍将在一段时期内作为胰腺癌形态学评估的主要依据. 在形态学评估方面, 提高测量准确性

■应用要点

本文对胰腺癌治疗反应的影像学评估的现状 & 新进展进行综述 & 分析, 不仅提出目前该方面研究中存在的问题, 也提出可能的解决方法, 指明了下一步的研究方向.

■同行评价

本文内容较全面, 具有较好的科学性和可读性。

和可重复性是值得注意的, 计算机辅助测量及体积测量研究将成为重要研究内容. CT、MRI 在形态学评估方面起主导作用, 进一步提高并规范成像技术仍是必要的, 而积极探讨代谢成像(如PET)及功能成像(如DWI、各种灌注成像)对胰腺癌治疗反应评估的作用, 并最终制订整合了形态学、代谢及功能学信息的新型评估标准, 实现更准确地早期评估也是今后的重要研究内容。

7 参考文献

- Marrie TJ, MacDonald S, Clarke K, Haldane D. Nosocomial legionnaires' disease: lessons from a four-year prospective study. *Am J Infect Control* 1991; 19: 79-85
- Weber WA. Assessing tumor response to therapy. *J Nucl Med* 2009; 50 Suppl 1: 1S-10S
- Stathis A, Moore MJ. Advanced pancreatic carcinoma: current treatment and future challenges. *Nat Rev Clin Oncol* 2010; 7: 163-172
- Burris HA, Moore MJ, Andersen J, Green MR, Rothenberg ML, Modiano MR, Cripps MC, Portenoy RK, Storniolo AM, Tarassoff P, Nelson R, Dorr FA, Stephens CD, Von Hoff DD. Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. *J Clin Oncol* 1997; 15: 2403-2413
- Moore MJ, Goldstein D, Hamm J, Figer A, Hecht JR, Gallinger S, Au HJ, Murawa P, Walde D, Wolff RA, Campos D, Lim R, Ding K, Clark G, Voskoglou-Nomikos T, Ptasynski M, Parulekar W. Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J Clin Oncol* 2007; 25: 1960-1966
- Reni M, Cereda S, Balzano G, Passoni P, Rognone A, Fugazza C, Mazza E, Zerbi A, Di Carlo V, Villa E. Carbohydrate antigen 19-9 change during chemotherapy for advanced pancreatic adenocarcinoma. *Cancer* 2009; 115: 2630-2639
- Shanbhogue AK, Karnad AB, Prasad SR. Tumor response evaluation in oncology: current update. *J Comput Assist Tomogr* 2010; 34: 479-484
- Miller AB, Hoogstraten B, Staquet M, Winkler A. Reporting results of cancer treatment. *Cancer* 1981; 47: 207-214
- Therasse P, Arbuck SG, Eisenhauer EA, Wanders J, Kaplan RS, Rubinstein L, Verweij J, Van Glabbeke M, van Oosterom AT, Christian MC, Gwyther SG. New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 205-216
- 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
- Wahl RL, Jacene H, Kasamon Y, Lodge MA. From RECIST to PERCIST: Evolving Considerations for PET response criteria in solid tumors. *J Nucl Med* 2009; 50 Suppl 1: 122S-150S
- Choi H. Response evaluation of gastrointestinal stromal tumors. *Oncologist* 2008; 13 Suppl 2: 4-7
- Maitland ML. Volumes to learn: advancing therapeutics with innovative computed tomography image data analysis. *Clin Cancer Res* 2010; 16: 4493-4495
- Jaffe TA, Wickersham NW, Sullivan DC. Quantitative imaging in oncology patients: Part 2, oncologists' opinions and expectations at major U.S. cancer centers. *AJR Am J Roentgenol* 2010; 195: W19-W30
- Segall GM. Therapy response evaluation with positron emission tomography-computed tomography. *Semin Ultrasound CT MR* 2010; 31: 490-495
- Park JO, Lee SI, Song SY, Kim K, Kim WS, Jung CW, Park YS, Im YH, Kang WK, Lee MH, Lee KS, Park K. Measuring response in solid tumors: comparison of RECIST and WHO response criteria. *Jpn J Clin Oncol* 2003; 33: 533-537
- Mazumdar M, Smith A, Schwartz LH. A statistical simulation study finds discordance between WHO criteria and RECIST guideline. *J Clin Epidemiol* 2004; 57: 358-365
- Ahn SH, Garewal HS, Dragovich T. Discrepancy in the assessment of tumor response in patients with pancreatic cancer: WHO versus RECIST criteria. *J BUON* 2008; 13: 359-362
- Rezai P, Mulcahy MF, Tochetto SM, Berggruen S, Yaghamai V. Morphological analysis of pancreatic adenocarcinoma on multidetector row computed tomography: implications for treatment response evaluation. *Pancreas* 2009; 38: 799-803
- Aoki K, Okada S, Moriyama N, Ishii H, Nose H, Yoshimori M, Kosuge T, Ozaki H, Wakao F, Takayasu K. Accuracy of computed tomography in determining pancreatic cancer tumor size. *Jpn J Clin Oncol* 1994; 24: 85-87
- Furukawa H, Takayasu K, Mukai K, Inoue K, Kosuge T, Ushio K. Computed tomography of pancreatic adenocarcinoma: comparison of tumor size measured by dynamic computed tomography and histopathologic examination. *Pancreas* 1996; 13: 231-235
- Zhang XM, Mitchell DG, Byun JH, Verma SK, Bergin D, Witkiewicz A. MR imaging for predicting the recurrence of pancreatic carcinoma after surgical resection. *Eur J Radiol* 2010; 73: 572-578
- Kim YE, Park MS, Hong HS, Kang CM, Choi JY, Lim JS, Lee WJ, Kim MJ, Kim KW. Effects of neoadjuvant combined chemotherapy and radiation therapy on the CT evaluation of resectability and staging in patients with pancreatic head cancer. *Radiology* 2009; 250: 758-765
- Casper ES. Pancreatic cancer: how can we progress? *Eur J Cancer* 1993; 29A: 171-172
- Philip PA, Zalupski MM, Vaitkevicius VK, Arlauskas P, Chaplen R, Heilbrun LK, Adsay V, Weaver D, Shields AF. Phase II study of gemcitabine and cisplatin in the treatment of patients with advanced pancreatic carcinoma. *Cancer* 2001; 92: 569-577
- El-Rayes BF, Zalupski MM, Shields AF, Vaishampayan U, Heilbrun LK, Jain V, Adsay V, Day J, Philip PA. Phase II study of gemcitabine, cisplatin, and infusional fluorouracil in advanced pancreatic cancer. *J Clin Oncol* 2003; 21: 2920-2925

- 27 Arends JJ, Sleeboom HP, Leys MB, Ten Bokkel Huinink D, de Jong RS, Smit JM, Nortier JW, Tessaar ME. A phase II study of raltitrexed and gemcitabine in patients with advanced pancreatic carcinoma. *Br J Cancer* 2005; 92: 445-448
- 28 Ishii H, Furuse J, Nakachi K, Suzuki E, Yoshino M. Primary tumor of pancreatic cancer as a measurable target lesion in chemotherapy trials. *Jpn J Clin Oncol* 2005; 35: 601-606
- 29 Ichikawa T, Erturk SM, Sou H, Nakajima H, Tsukamoto T, Motosugi U, Araki T. MDCT of pancreatic adenocarcinoma: optimal imaging phases and multiphase reformatted imaging. *AJR Am J Roentgenol* 2006; 187: 1513-1520
- 30 Wong JC, Raman S. Surgical resectability of pancreatic adenocarcinoma: CTA. *Abdom Imaging* 2010; 35: 471-480
- 31 Ishigami K, Yoshimitsu K, Irie H, Tajima T, Asayama Y, Nishie A, Hirakawa M, Ushijima Y, Okamoto D, Nagata S, Nishihara Y, Yamaguchi K, Taketomi A, Honda H. Diagnostic value of the delayed phase image for iso-attenuating pancreatic carcinomas in the pancreatic parenchymal phase on multidetector computed tomography. *Eur J Radiol* 2009; 69: 139-146
- 32 Kim JH, Park SH, Yu ES, Kim MH, Kim J, Byun JH, Lee SS, Hwang HJ, Hwang JY, Lee SS, Lee MG. Visually isoattenuating pancreatic adenocarcinoma at dynamic-enhanced CT: frequency, clinical and pathologic characteristics, and diagnosis at imaging examinations. *Radiology* 2010; 257: 87-96
- 33 Imbriaco M, Megibow AJ, Ragozzino A, Liuzzi R, Mainenti P, Bortone S, Camera L, Salvatore M. Value of the single-phase technique in MDCT assessment of pancreatic tumors. *AJR Am J Roentgenol* 2005; 184: 1111-1117
- 34 Goshima S, Kanematsu M, Kondo H, Yokoyama R, Miyoshi T, Kato H, Tsuge Y, Shiratori Y, Hoshi H, Onozuka M, Moriyama N, Bae KT. Pancreas: optimal scan delay for contrast-enhanced multi-detector row CT. *Radiology* 2006; 241: 167-174
- 35 Ichikawa T, Erturk SM, Araki T. Multiphasic contrast-enhanced multidetector-row CT of liver: contrast-enhancement theory and practical scan protocol with a combination of fixed injection duration and patients' body-weight-tailored dose of contrast material. *Eur J Radiol* 2006; 58: 165-176
- 36 Yanaga Y, Awai K, Nakayama Y, Nakaura T, Tamura Y, Hatemura M, Yamashita Y. Pancreas: patient body weight tailored contrast material injection protocol versus fixed dose protocol at dynamic CT. *Radiology* 2007; 245: 475-482
- 37 Kondo H, Kanematsu M, Goshima S, Miyoshi T, Shiratori Y, Onozuka M, Moriyama N, Bae KT. MDCT of the pancreas: optimizing scanning delay with a bolus-tracking technique for pancreatic, peripancreatic vascular, and hepatic contrast enhancement. *AJR Am J Roentgenol* 2007; 188: 751-756
- 38 Marin D, Nelson RC, Barnhart H, Schindera ST, Ho LM, Jaffe TA, Yoshizumi TT, Youngblood R, Samei E. Detection of pancreatic tumors, image quality, and radiation dose during the pancreatic parenchymal phase: effect of a low-tube-voltage, high-tube-current CT technique--preliminary results. *Radiology* 2010; 256: 450-459
- 39 Schima W, Ba-Ssalamah A, Goetzinger P, Scharitzer M, Koelblinger C. State-of-the-art magnetic resonance imaging of pancreatic cancer. *Top Magn Reson Imaging* 2007; 18: 421-429
- 40 Uchida M, Sakoda J, Arikawa S, Kunou Y, Ishibashi M, Abe T, Hayabuchi N. Comparison of dynamic MRI at 3.0 T and MDCT of pancreatobiliary disease: evaluation with source, MPR, CPR, and MIP images for image quality and hepatic arterial and portal venous vessel conspicuity. *J Magn Reson Imaging* 2009; 29: 846-852
- 41 Mehmet Erturk S, Ichikawa T, Sou H, Saitou R, Tsukamoto T, Motosugi U, Araki T. Pancreatic adenocarcinoma: MDCT versus MRI in the detection and assessment of locoregional extension. *J Comput Assist Tomogr* 2006; 30: 583-590
- 42 Park HS, Lee JM, Choi HK, Hong SH, Han JK, Choi BI. Preoperative evaluation of pancreatic cancer: comparison of gadolinium-enhanced dynamic MRI with MR cholangiopancreatography versus MDCT. *J Magn Reson Imaging* 2009; 30: 586-595
- 43 Schima W, Függer R, Schober E, Oetl C, Wamser P, Grabenwöger F, Ryan JM, Novacek G. Diagnosis and staging of pancreatic cancer: comparison of mangafodipir trisodium-enhanced MR imaging and contrast-enhanced helical hydro-CT. *AJR Am J Roentgenol* 2002; 179: 717-724
- 44 Miller FH, Rini NJ, Keppke AL. MRI of adenocarcinoma of the pancreas. *AJR Am J Roentgenol* 2006; 187: W365-W374
- 45 Samkoe KS, Chen A, Rizvi I, O'Hara JA, Hoopes PJ, Pereira SP, Hasan T, Pogue BW. Imaging tumor variation in response to photodynamic therapy in pancreatic cancer xenograft models. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2010; 76: 251-259
- 46 Vachiranubhap B, Kim YH, Balci NC, Semelka RC. Magnetic resonance imaging of adenocarcinoma of the pancreas. *Top Magn Reson Imaging* 2009; 20: 3-9
- 47 Jackson EF, Barboriak DP, Bidaut LM, Meyer CR. Magnetic resonance assessment of response to therapy: tumor change measurement, truth data and error sources. *Transl Oncol* 2009; 2: 211-215
- 48 Helmstaedter L, Riemann JF. Pancreatic cancer-EUS and early diagnosis. *Langenbecks Arch Surg* 2008; 393: 923-927
- 49 Kauhanen SP, Komar G, Seppänen MP, Dean KI, Minn HR, Kajander SA, Rinta-Kiikka I, Alanen K, Borra RJ, Puolakkainen PA, Nuutila P, Ovaska JT. A prospective diagnostic accuracy study of 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography/computed tomography, multidetector row computed tomography, and magnetic resonance imaging in primary diagnosis and staging of pancreatic cancer. *Ann Surg* 2009; 250: 957-963
- 50 Casneuf V, Delrue L, Kelles A, Van Damme N, Van Huysse J, Berrevoet F, De Vos M, Duyck P, Peeters M. Is combined 18F-fluorodeoxyglucose-positron emission tomography/computed tomography superior to positron emission tomography or computed tomography alone for diagnosis, staging and restaging of pancreatic lesions? *Acta Gastroenterol Belg* 2007; 70: 331-338
- 51 Smith AD, Shah SN, Rini BI, Lieber ML, Remer EM. Morphology, Attenuation, Size, and Structure (MASS) criteria: assessing response and predicting clinical outcome in metastatic renal cell carcinoma on antiangiogenic targeted therapy. *AJR Am J Roentgenol* 2010; 194: 1470-1478
- 52 Kim EY, Choi D, Lim do H, Lee WJ, Yoo BC, Paik SW. Change in contrast enhancement of HCC on 1-month follow-up CT after local radiotherapy: an

- early predictor of final treatment response. *Eur J Radiol* 2009; 72: 440-446
- 53 Tochetto SM, Rezai P, Rezvani M, Nikolaidis P, Berggruen S, Atassi B, Salem R, Yaghmai V. Does multidetector CT attenuation change in colon cancer liver metastases treated with 90Y help predict metabolic activity at FDG PET? *Radiology* 2010; 255: 164-172
- 54 Hattori Y, Gabata T, Matsui O, Mochizuki K, Kitagawa H, Kayahara M, Ohta T, Nakanuma Y. Enhancement patterns of pancreatic adenocarcinoma on conventional dynamic multi-detector row CT: correlation with angiogenesis and fibrosis. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 3114-3121
- 55 Hamstra DA, Rehemtulla A, Ross BD. Diffusion magnetic resonance imaging: a biomarker for treatment response in oncology. *J Clin Oncol* 2007; 25: 4104-4109
- 56 Moffat BA, Chenevert TL, Meyer CR, McKeever PE, Hall DE, Hoff BA, Johnson TD, Rehemtulla A, Ross BD. The functional diffusion map: an imaging biomarker for the early prediction of cancer treatment outcome. *Neoplasia* 2006; 8: 259-267
- 57 Meijerink MR, van Crujisen H, Hoekman K, Kater M, van Schaik C, van Waesberghe JH, Giaccone G, Manoliu RA. The use of perfusion CT for the evaluation of therapy combining AZD2171 with gefitinib in cancer patients. *Eur Radiol* 2007; 17: 1700-1713
- 58 Nishida M, Koito K, Hirokawa N, Hori M, Satoh T, Hareyama M. Does contrast-enhanced ultrasound reveal tumor angiogenesis in pancreatic ductal carcinoma? A prospective study. *Ultrasound Med Biol* 2009; 35: 175-185
- 59 Abe H, Murakami T, Kubota M, Kim T, Hori M, Kudo M, Hashimoto K, Nakamori S, Dono K, Tomoda K, Monden M, Nakamura H. Quantitative tissue blood flow evaluation of pancreatic tumor: comparison between xenon CT technique and perfusion CT technique based on deconvolution analysis. *Radiat Med* 2005; 23: 364-370
- 60 Erasmus JJ, Gladish GW, Broemeling L, Sabloff BS, Truong MT, Herbst RS, Munden RF. Interobserver and intraobserver variability in measurement of non-small-cell carcinoma lung lesions: implications for assessment of tumor response. *J Clin Oncol* 2003; 21: 2574-2582
- 61 Schwartz LH, Ginsberg MS, DeCorato D, Rothenberg LN, Einstein S, Kijewski P, Panicek DM. Evaluation of tumor measurements in oncology: use of film-based and electronic techniques. *J Clin Oncol* 2000; 18: 2179-2184
- 62 Buerke B, Puesken M, Mütter S, Weckesser M, Gerss J, Heindel W, Wessling J. Measurement accuracy and reproducibility of semiautomated metric and volumetric lymph node analysis in MDCT. *AJR Am J Roentgenol* 2010; 195: 979-985
- 63 Kornmann M, Beger HG, Link KH. Chemosensitivity testing and test-directed chemotherapy in human pancreatic cancer. *Recent Results Cancer Res* 2003; 161: 180-195
- 64 Hammad N, Heilbrun LK, Philip PA, Shields AF, Zalupski MM, Venkatramanamoorthy R, El-Rayes BF. CA19-9 as a predictor of tumor response and survival in patients with advanced pancreatic cancer treated with gemcitabine based chemotherapy. *Asia Pac J Clin Oncol* 2010; 6: 98-105
- 65 Kroep JR, Loves WJ, van der Wilt CL, Alvarez E, Talianidis I, Boven E, Braakhuis BJ, van Groenigen CJ, Pinedo HM, Peters GJ. Pretreatment deoxycytidine kinase levels predict in vivo gemcitabine sensitivity. *Mol Cancer Ther* 2002; 1: 371-376
- 66 Michalski CW, Erkan M, Sauliunaite D, Giese T, Stratmann R, Sartori C, Giese NA, Friess H, Kleeff J. Ex vivo chemosensitivity testing and gene expression profiling predict response towards adjuvant gemcitabine treatment in pancreatic cancer. *Br J Cancer* 2008; 99: 760-767
- 67 Eguchi H, Ishikawa O, Ohigashi H, Takahashi H, Yano M, Nishiyama K, Tomita Y, Uehara R, Takehara A, Nakamura Y, Nakagawa H. Serum REG4 level is a predictive biomarker for the response to preoperative chemoradiotherapy in patients with pancreatic cancer. *Pancreas* 2009; 38: 791-798
- 68 Park MS, Klotz E, Kim MJ, Song SY, Park SW, Cha SW, Lim JS, Seong J, Chung JB, Kim KW. Perfusion CT: noninvasive surrogate marker for stratification of pancreatic cancer response to concurrent chemo- and radiation therapy. *Radiology* 2009; 250: 110-117
- 69 Akisik MF, Sandrasegaran K, Bu G, Lin C, Hutchins GD, Chiorean EG. Pancreatic cancer: utility of dynamic contrast-enhanced MR imaging in assessment of antiangiogenic therapy. *Radiology* 2010; 256: 441-449
- 70 Niwa T, Ueno M, Shinya N, Gotoh T, Kwee TC, Takahara T, Yoshida T, Ohkawa S, Doiuchi T, Inoue T. Dynamic susceptibility contrast MRI in advanced pancreatic cancer: semi-automated analysis to predict response to chemotherapy. *NMR Biomed* 2010; 23: 347-352
- 71 Niwa T, Ueno M, Ohkawa S, Yoshida T, Doiuchi T, Ito K, Inoue T. Advanced pancreatic cancer: the use of the apparent diffusion coefficient to predict response to chemotherapy. *Br J Radiol* 2009; 82: 28-34

编辑 李军亮 电编 何基才

胃癌SGC7901/OXA细胞耐药与侧群细胞比例及Mdr1、ERCC1基因表达的关系

陈刚, 王清睿, 邱红, 柯善栋, 向莹, 胡少明

陈刚, 王清睿, 邱红, 柯善栋, 向莹, 胡少明, 华中科技大学同济医学院附属同济医院 湖北省武汉市 430030
陈刚, 主治医师, 主要从事消化系统肿瘤耐药机制的研究.
湖北省卫生厅科研基金资助项目, No. JX3B13
作者贡献分布: 此课题由陈刚、邱红及胡少明设计; 研究过程由陈刚、王清睿、邱红、柯善栋及向莹操作完成; 数据分析由陈刚、王清睿及邱红完成; 本论文写作由陈刚完成.
通讯作者: 胡少明, 副教授, 430030, 湖北省武汉市解放大道1095号, 华中科技大学同济医学院附属同济医院.
smhu@tjh.tjmu.edu.cn
收稿日期: 2010-11-17 修回日期: 2011-03-12
接受日期: 2011-03-16 在线出版日期: 2011-04-28

Relationship of cellular drug resistance to proportion of side population cells and expression of Mdr1 and ERCC1 in human gastric cell line SGC7901/OXA

Gang Chen, Qing-Rui Wang, Hong Qiu, Shan-Dong Ke, Ying Xiang, Shao-Ming Hu

Gang Chen, Qing-Rui Wang, Hong Qiu, Shan-Dong Ke, Ying Xiang, Shao-Ming Hu, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science & Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China
Supported by: the Research Foundation of Hubei Provincial Health Bureau, No. JX3B13
Correspondence to: Associate Professor Shao-Ming Hu, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science & Technology, 1095 Jiefang Avenue, Wuhan 430030, Hubei Province, China. smhu@tjh.tjmu.edu.cn
Received: 2010-11-17 Revised: 2011-03-12
Accepted: 2011-03-16 Published online: 2011-04-28

Abstract

AIM: To investigate the mechanism of acquired drug resistance in human gastric cancer cell line SGC7901/OXA.

METHODS: SGC7901/OXA cell line was obtained by exposure of SGC7901 cells to increasing doses of oxaliplatin (OXA). The parental cell line SGC7901 was used as a control. The reduced rate of cell growth, half maximal inhibitory concentration (IC_{50}), and resistance index (RI) were measured by MTT assay and compared between the two groups of cells. The expression of multi-

drug resistance 1 (Mdr1) mRNA and excision repair cross-complementing group 1 (ERCC1) protein was detected by RT-PCR and Western blot, respectively. The proportion of side population (SP) cells was determined by flow cytometry.

RESULTS: The reduced rate of cell growth significantly decreased and IC_{50} increased ($38.23 \mu\text{mol/L}$ vs $7.12 \mu\text{mol/L}$) in SGC7901/OXA cells compared to parental SGC7901 cells. The RI was 5.37 in SGC7901/OXA cells. There was no significant difference in the relative expression level of Mdr1 mRNA (0.468 ± 0.147 vs 0.427 ± 0.136 , $P = 0.079$) between the two groups. ERCC1 protein level was significantly higher in SGC7901/OXA cells than in SGC7901 cells. The proportion of SP cells was also significantly higher in SGC7901/OXA cells than in SGC7901 cells (6.1% vs 1.8% , $P < 0.05$).

CONCLUSION: SGC7901/OXA cells were more significantly resistant to OXA than SGC7901. The mechanism of acquired resistance of SGC7901/OXA cells may be associated with changes in ERCC1 protein expression and proportion of SP cells.

Key Words: Gastric tumor; Drug resistance; Side population cells; Excision repair cross-complementing group 1; Multidrug resistance 1

Chen G, Wang QR, Qiu H, Ke SD, Xiang Y, Hu SM. Relationship of cellular drug resistance to proportion of side population cells and expression of Mdr1 and ERCC1 in human gastric cell line SGC7901/OXA. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(12): 1219-1224

摘要

目的: 探讨胃癌耐药细胞系SGC7901/OXA获得性耐药的发生机制。

方法: 利用间歇增加剂量方法诱导成功的SGC7901/OXA细胞株作为观察组, 亲代细胞株SGC7901为对照组, 采用MTT的方法观察OXA对两组的抑制率, 计算 IC_{50} 和耐药指数

■背景资料

草酸铂(OXA)作为目前胃癌临床运用广泛的药物之一, 其获得性耐药往往是治疗失败的主要原因之一, 目前有关胃癌铂类获得性耐药的机制大都从ABC转运蛋白及苷酸切除修复(NER)途径着手。

■同行评议者

刘冰熔, 教授, 黑龙江省哈尔滨医科大学附属第二临床医院消化内科; 黄颖秋, 教授, 本溪钢铁(集团)有限责任公司总医院消化内科

■研发前沿

由于胃癌早期诊断率较低,经确诊的胃癌患者绝大多数已属中晚期,化疗作为中晚期胃癌患者的主要治疗手段,由于耐药的原因,5年生存率极低。探讨其耐药的成因,积极寻找逆转耐药的药物是目前的研究热点。

(RI);采用RT-PCR和Western blot的方法分别检测两组多药耐药1(Mdr1) mRNA浓度和切除修复交叉互补基因组1(ERCC1)的蛋白浓度;采用流式细胞仪检测两组细胞中侧群(SP)细胞的比例。

结果:SGC7901/OXA细胞各浓度抑制率较SGC7901明显降低,两者 IC_{50} 分别为38.23 $\mu\text{mol/L}$ 和7.12 $\mu\text{mol/L}$, RI为5.37; Mdr1 mRNA与 β -actin mRNA光密度比值在两组中分别为 0.468 ± 0.147 和 0.427 ± 0.136 ($n = 5$), 两者差异无明显示统计学意义 ($P = 0.079$); ERCC1蛋白浓度在SGC7901/OXA细胞较SGC7901细胞中明显增加; SGC7901中SP细胞的比例为1.8%, SGC7901/OXA中SP细胞的比例达到了6.1%, 较SGC7901细胞明显升高 ($P < 0.05$)。

结论:SGC7901/OXA较SGC7901对OXA明显耐药,其获得性耐药的机制可能与ERCC1蛋白浓度以及SP细胞比例的变化有关,而Mdr1基因的作用不明显。

关键词:胃肿瘤; 耐药; 侧群细胞; 切除修复交叉互补基因组; 多药耐药1

陈刚, 王清春, 邱红, 柯善栋, 向莹, 胡少明. 胃癌SGC7901/OXA细胞耐药与侧群细胞比例及Mdr1、ERCC1基因表达的关系. 世界华人消化杂志 2011; 19(12): 1219-1224
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/1219.asp>

0 引言

胃癌是我国高发病率、高死亡率的恶性肿瘤之一^[1]。草酸铂作为目前胃癌临床运用广泛的药物之一,其获得性耐药往往是胃癌治疗失败的主要原因之一,其机制有待进一步明确。目前有关胃癌获得性耐药的机制大都从ATP结合盒(ATP binding cassette, ABC)转运蛋白^[2]及核苷酸切除修复(nucleotide excision repair, NER)途径^[3]着手。但有证据表明胃癌组织细胞中存在极少量瘤细胞,充当着干细胞的角色,通过自我更新维持着肿瘤的持续生长,虽然来源于正常的胃干细胞或者是骨髓来源的干细胞尚无定论^[4]。由于常规的治疗手段只能消灭处于增殖阶段的已分化的肿瘤细胞,肿瘤干细胞具有与成体干细胞相同的抗凋亡、耐药、免疫耐受等特点,并不能被清除而成为肿瘤继续生长、复发及转移的根源^[5]。侧群(side population, SP)细胞作为一类更具有外排Hoechst33342作用而使其低染从而用流式细胞仪得以分离的亚群细胞^[6],因为具有干细胞特性被广泛用来研究肿瘤干细胞的特性^[7]。本文试图

从胃癌耐药细胞株SGC7901/OXA SP细胞比例变化和多药耐药1(multidrug resistance 1, Mdr1)和切除修复交叉互补基因组1(excision repair cross-complementing group 1, ERCC1)基因表达方面着手探讨SGC7901/OXA耐药的发生机理。

1 材料和方法

1.1 材料 人胃癌细胞系SGC7901为本实验室保存。DMEM高糖细胞培养液、胎牛血清FBS购自杭州四季青公司, Hoechst33342、维拉帕米(verapamil)、草酸铂(oxaliplatin, OXA)购自Sigma公司, MTT检测试剂盒TRIZOL试剂购自武汉谷歌生物, Mdr1及 β -actin引物由上海生物工程技术有限公司合成。细胞在50 mL/L CO_2 , 37 °C培养条件下培养,培养液为含100 mL/L FBS的DMEM。

1.2 方法

1.2.1 胃癌耐药细胞株SGC7901/OXA的建立:采用间歇增加剂量方法诱导方法。取对数生长长期的SGC7901加入含起始剂量为0.5 $\mu\text{mol/L}$ 的OXA培养液培养24 h后, PBS清洗, 更换为正常培养基培养待其恢复生长后, 重复给予上述含OXA培养液, 待其耐受后逐步增加OXA浓度, 周而复始, 直至其能耐受10 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的OXA, 前后共6 mo, 定名为SGC7901/OXA细胞株, 并以1 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的持续培养保持其耐药性。实验前3 d更换为不含OXA的培养基。

1.2.2 耐药指数的检测:常规MTT法检测。收集对数期SGC7901细胞和SGC7901/OXA细胞, 调整细胞悬液浓度, 分于96孔板, 每孔150 μL , 4 000个/孔, 设置5个OXA组(细胞、培养基、OXA)、阴性对照孔(细胞、培养基)及空白调零孔(培养基), 每组设置5个复孔。置37 °C、50 mL/L CO_2 温箱培养24 h使细胞贴壁后, OXA组加入含药培养基, 其中OXA终浓度分别为0.5、1、5、10、20、50 $\mu\text{mol/L}$, 继续培养48 h。小心吸去上清, 按MTT试剂盒操作, 加入50 μL A溶液后37 °C孵育4 h, 再加入100 μL 工作液终止反应, 常温下静置20 min待紫色颗粒溶解后, 酶标仪上以580 nm波长测吸光度值(A)。计算抑制率 $= 1 - A_{\text{加药}}/A_{\text{对照}} \times 100\%$; IC_{50} 计算器软件计算50%细胞生长抑制时的药物浓度(IC_{50}); 耐药指数(resistance index, RI) $= IC_{50\text{SGC7901/OXA}}/IC_{50\text{SGC7901}}$ 。

1.2.3 RT-PCR检测Mdr1 mRNA:取对数生长的SGC7901及SGC7901/OXA细胞, 按TRIZOL试剂(武汉谷歌生物)说明书操作抽提总RNA, 分装后

■相关报道

Takaishi等利用人胃癌细胞表面分子标志物CD44从胃癌细胞株中分离出了CD44+细胞极少数量便能在NOD/SCID小鼠体内成瘤。

表 1 PCR引物序列和产物长度

引物名称	引物序列	引物长度(bp)
Mdr1	P1 5'-AGCAGAGGATCGCCATTGGACG-3'	428
	P2 5'-TTGGGCTTGTGATCCACGGACAC-3'	
β -actin	P1 5'-GTTGCGTTACACCCTTTCTTG-3'	157
	P2 5'-GACTGCTGTACCTTCACCGT-3'	

-70 °C 储存备用, 保证 A_{260}/A_{280} 的比值1.8-2.0进行RT-PCR实验. Mdr1及内参 β -actin引物(上海生物工程有限公司)见表1. 扩增条件为: 预变性94 °C, 5 min; 变性94 °C, 50 s; Mdr1、 β -actin退火温度分别为57 °C、54 °C, 90 s; 延伸72 °C, 共35个循环. 扩增产物在2%琼脂糖凝胶中电泳, 于凝胶电泳成像分析仪上进行吸光度扫描, 进行条带分析. 以目标条带比 β -actin的相对A值表示结果.

1.2.4 Western blot检测ERCC1蛋白表达: 收集对数生长的SGC7901及SGC7901/OXA细胞, 按总蛋白抽提试剂盒操作说明提取总蛋白, 考马斯亮蓝测蛋白浓度. 每泳道加入40 μ g蛋白, 100 V电压电泳后275 mA转膜, 脱脂奶粉封闭后加入ERCC1一抗, 4 °C孵育过夜, PBS清洗后加入荧光二抗, 奥德赛红外荧光成像仪进行扫描比较组间差异.

1.2.5 SP细胞的分选: 分别取经胰酶消化为单细胞悬液, 以 1×10^6 的密度重悬于37 °C预热过的含20 mL/L FBS的DMEM培养液中. 分装于1.5 mL的Eppendorf管中, 每管1 mL. 加入终浓度为2.5 mg/L的Hoechst33342, SP细胞的阻断对照组则在加入Hoechst33342前加入终浓度为100 μ mol/L的verapamil, 置于37 °C水浴中15 min后再加入Hoechst33342. 使Hoechst33342在细胞悬液中彻底混匀, 在37 °C水浴中染色90 min, 每隔20 min细胞悬液需要摇匀防止细胞沉降. 90 min染色结束后细胞在4 °C离心弃上清液重悬于400 μ L冰浴过的含20 mL/L FBS的PBS中; 流式细胞仪检测前, 在细胞悬液中加入终浓度为2 mg/L的PI以除去死细胞, 上流式细胞仪检测. 每组结果重复3次.

统计学处理 所有数据均采用SPSS11.5统计软件进行t检验分析, 实验结果以mean \pm SD表示, 以 $P < 0.05$ 具有统计学意义.

2 结果

2.1 SGC7901/OXA耐药细胞株耐药性鉴定 细胞

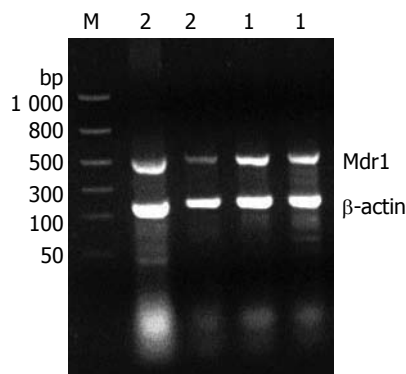


图 1 Mdr1 mRNA在SGC7901/OXA和SGC7901细胞中的表达.
1: SGC7901/OXA; 2: SGC7901; M: Maker.

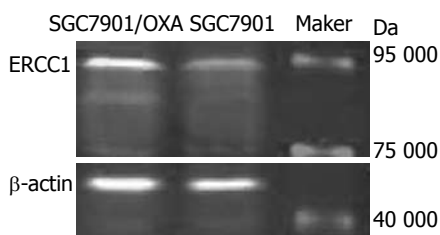


图 2 ERCC1蛋白在SGC7901/OXA和SGC7901细胞中的表达.

SGC7901/OXA细胞和SGC7901细胞48 h各浓度的抑制率较SGC7901明显降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 两者 IC_{50} 分别为38.23 μ mol/L和7.12 μ mol/L, RI为5.37(表2).

2.2 Mdr1 mRNA在SGC7901/OXA细胞和SGC7901细胞中的表达 Mdr1与 β -actin mRNA A比值分别为 0.468 ± 0.147 和 0.427 ± 0.136 ($n = 5$), 两者差异无明显统计学意义($P = 0.079$, 图1).

2.3 ERCC1在SGC7901/OXA细胞和SGC7901细胞中的表达 ERCC1蛋白浓度在SGC7901/OXA细胞较SGC7901细胞中明显增加(图2).

2.4 SGC7901/OXA及SGC7901细胞中SP细胞的比例 SGC7901中SP细胞的比例达到了1.8%, 加入verapamil后减少为0.1%, 说明该群细胞外排Hoechst33342的作用能被verapamil明显抑制, 证实该群细胞即为SP细胞; 而SGC7901/OXA中SP细胞的比例达到了6.1%, 较SGC7901细胞明显

■创新盘点

本文通过建立胃癌耐药细胞系SGC7901/OXA, 并从SP细胞比例及Mdr1、ERCC1基因表达方面来探讨其耐药机制, 立意新颖.

■应用要点

本研究结果表明 ERCC1 蛋白表达以及 SP 细胞比例的变化在 SGC7901/OXA 获得性耐药发生过程中扮演着重要角色, 为进一步探讨胃癌耐药的成因提供了有益的线索。

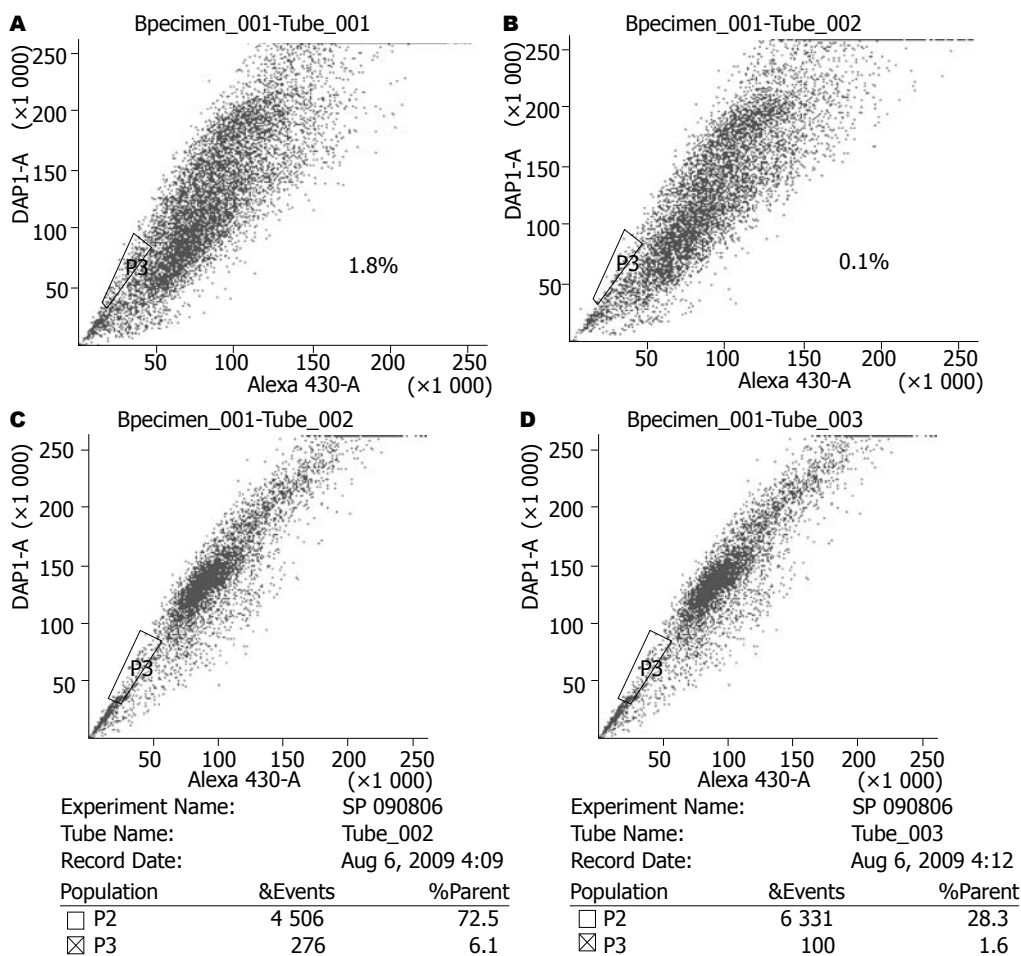


图 3 SGC7901及SGC7901/OXA中SP细胞的比例. A: SGC7901 verapamil(-); B: SGC7901 verapamil(+); C: SGC7901/OXA verapamil(-); D: SGC7901/OXA verapamil(+).

表 2 SGC7901/OXA细胞和SGC7901细胞抑制率、IC₅₀及RI

	0.5 μmol/L	1 μmol/L	5 μmol/L	10 μmol/L	25 μmol/L	50 μmol/L	IC ₅₀	RI
SGC7901/OXA	0.093 ± 0.018	0.113 ± 0.068	0.275 ± 0.107	0.328 ± 0.143	0.437 ± 0.162	0.531 ± 0.262	38.23	5.37
SGC7901	0.125 ± 0.076	0.255 ± 0.097	0.464 ± 0.129	0.557 ± 0.152	0.681 ± 0.189	0.796 ± 0.246	7.12	

升高(图3)。

3 讨论

由于胃癌早期诊断率较低, 经确诊的胃癌患者绝大多数已属中晚期, 化疗作为中晚期胃癌患者的主要治疗手段, 由于耐药的原因, 5年生存率极低^[8]。探讨其耐药的成因, 积极寻找逆转耐药的药物是目前的研究热点。

奥沙利铂在胃癌治疗中有较多应用, 建立耐OXA胃癌细胞株对研究胃癌耐药机制具有重要作用。本实验对建立的SGC7901/OXA细胞系与亲本细胞研究表明其对OXA明显耐药, 其IC₅₀分别为38.23 μmol/L和7.12 μmol/L, RI达到了

5.37。目前现有铂类耐药的相关研究认为, DNA损伤修复过程的改变是铂类等化疗药物耐药的主要可能机制^[9]。化疗药物造成的DNA损伤主要通过NER途径完成^[10]。ERCC1参与识别和切割DNA链损伤, 是ERCC家族的关键基因, 也是NER途径的关键基因之一^[11]。ERCC1编码产物参与形成蛋白质复合体, 通过协同修复核苷酸的化学变化和结构改变, 确保基因组的完整性^[12]。ERCC1过表达可使停滞在G2/M期的损伤DNA迅速修复, 尤其是ERCC1能使铂类诱导的DNA络合物清除增加, 导致耐药^[13]。在胃癌中, ERCC1高表达患者化疗有效率低, 生存期短^[14]。我们的研究结果表明SGC7901/OXA耐药细胞

系较亲本细胞ERCC1的蛋白浓度明显升高, 提示ERCC1在胃癌细胞对OXA获得性耐药过程中发挥了重要作用. Mdr1基因编码P-gp, 由MDR为ATP依赖性转运蛋白, 能将多种药物如蒽环霉素、植物生物碱、鬼臼霉素、紫杉类等化疗药物泵出细胞外, 从而减少细胞内化疗药物的蓄积产生耐药^[15]. 有研究表明在耐药细胞株SGC7901/VCR中存在Mdr1的高表达^[16], 而我们在SGC7901/OXA中并未发现Mdr1的高表达, 可能与诱导药物不同有关.

最新研究表明肿瘤是一种干细胞疾病. 肿瘤组织中存在极少量瘤细胞, 充当着干细胞的角色, 通过自我更新维持着肿瘤的持续生长^[17]. 常规的治疗手段只能消灭处于增殖阶段的已分化的肿瘤细胞, 而肿瘤干细胞具有与成体干细胞相同的抗凋亡、耐药、免疫耐受等特点, 并不能被清除而成为肿瘤继续生长、复发及转移的根源^[18]. 近年来越来越多的证据表明胃癌中存在一小部分细胞具有干细胞的特点^[19,20]. 2009年, Takaishi等^[21]利用人胃癌细胞表面分子标志物CD44从胃癌细胞株中分离出了的CD44+细胞极少数量便能在NOD/SCID小鼠体内成瘤. 但就其来源目前认为有两种可能, 一是来源于胃的成体干细胞^[22], 二是来源于骨髓的间充质干细胞^[23]. 目前, SP细胞分选作为肿瘤干细胞研究的重要手段, 在胃癌中得以应用并证实胃癌中确实存在小部分具有干细胞特性的SP细胞. Haraguchi等^[24]从16个胃肠道肿瘤细胞株中分离得到15株SP细胞, 占整个细胞比例0.3%-2.2%, 我们的研究结果表明在SGC7901中SP细胞的比例约为1.8%, 与之相似. 该类细胞有很强的自我更新繁殖能力, 与致瘤性高度相关, 而且这些SP细胞较非SP细胞对5-氟尿嘧啶、阿霉素、吉西他滨有更高的耐药性. 在SGC7901/OXA细胞中SP细胞比例增加了6.1%, 提示胃癌在获得性耐药发生的过程中, 具有干细胞特性的比例较前明显升高, 可能是胃癌复发、转移的原因. 这一现象与Liang等^[25]研究的发现一致, 这可能与肿瘤细胞基因不稳定有关.

本实验研究结果提示ERCC1蛋白浓度以及SP细胞比例的变化在SGC7901/OXA获得性耐药发生过程中扮演着重要角色, 而Mdr1基因表达在SGC7901/OXA细胞株中无明显变化. SP细胞比例变化的同时, 有关SP细胞对OXA耐药的具体机制有待进一步深入研究.

4 参考文献

- 1 杨玲, 李连弟, 陈育德. 中国2004年及2005年恶性肿瘤发病死亡的估计与预测. 中国卫生统计 2005; 22: 218-222
- 2 高福莲, 马开颜, 张钦宪. P-gp、MRP、LRP、GST π 和TOPO II在胃癌表达的趋势. 胃肠病学和肝病学杂志 2006; 15: 216-218
- 3 Zhang D, Fan D. Multidrug resistance in gastric cancer: recent research advances and ongoing therapeutic challenges. *Expert Rev Anticancer Ther* 2007; 7: 1369-1378
- 4 Saikawa Y, Fukuda K, Takahashi T, Nakamura R, Takeuchi H, Kitagawa Y. Gastric carcinogenesis and the cancer stem cell hypothesis. *Gastric Cancer* 2010; 13: 11-24
- 5 Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001; 414: 105-110
- 6 Feuring-Buske M, Hogge DE. Hoechst 33342 efflux identifies a subpopulation of cytogenetically normal CD34(+)CD38(-) progenitor cells from patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2001; 97: 3882-3889
- 7 Fukuda K, Saikawa Y, Ohashi M, Kumagai K, Kitajima M, Okano H, Matsuzaki Y, Kitagawa Y. Tumor initiating potential of side population cells in human gastric cancer. *Int J Oncol* 2009; 34: 1201-1207
- 8 王娜, 关泉林, 姜雷, 周欣, 高晨, 杨含腾, 奥沙利铂、顺铂联合5-FU/LV治疗晚期胃癌的系统评价. 世界华人消化杂志 2009; 17: 3148-3154
- 9 Martin LP, Hamilton TC, Schilder RJ. Platinum resistance: the role of DNA repair pathways. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 1291-1295
- 10 Dip R, Camenisch U, Naegeli H. Mechanisms of DNA damage recognition and strand discrimination in human nucleotide excision repair. *DNA Repair (Amst)* 2004; 3: 1409-1423
- 11 Park CJ, Choi BS. The protein shuffle. Sequential interactions among components of the human nucleotide excision repair pathway. *FEBS J* 2006; 273: 1600-1608
- 12 Tripsianes K, Folkers GE, Zheng C, Das D, Grinstead JS, Kaptein R, Boelens R. Analysis of the XPA and ssDNA-binding surfaces on the central domain of human ERCC1 reveals evidence for subfunctionalization. *Nucleic Acids Res* 2007; 35: 5789-5798
- 13 Altaf R, Liang X, Yu JJ, Reed E. Excision repair cross complementing-group 1: gene expression and platinum resistance. *Int J Mol Med* 2004; 14: 959-970
- 14 刘美荣, 王稚博. 胃癌组织与癌旁组织中ERCC1与AKT1的表达及临床意义. 山东大学学报(医学版) 2010; 48: 86-89
- 15 Li Y, Yuan H, Yang K, Xu W, Tang W, Li X. The structure and functions of P-glycoprotein. *Curr Med Chem* 2010; 17: 786-800
- 16 张敏, 李勇莉, 高建凯, 王国栋, 高福莲. 靶向mdr1不同位点的siRNA对两种耐药细胞MDR的逆转效果. 世界华人消化杂志 2009; 17: 3387-3393
- 17 Clevers H. The cancer stem cell: premises, promises and challenges. *Nat Med* 2011; 17: 313-319
- 18 Visvader JE. Cells of origin in cancer. *Nature* 2011; 469: 314-322
- 19 Ehata S, Johansson E, Katayama R, Koike S, Watanabe A, Hoshino Y, Katsuno Y, Komuro A, Koinuma D, Kano MR, Yashiro M, Hirakawa K, Aburatani H, Fujita N, Miyazono K. Transforming growth factor- β decreases the cancer-initiating cell population within diffuse-type gastric carcinoma cells. *Oncogene* 2011; 30: 1693-1705
- 20 Nishii T, Yashiro M, Shinto O, Sawada T, Ohira M, Hirakawa K. Cancer stem cell-like SP cells have a

■名词解释

侧群(SP)细胞: 是一类更具有外排Hoechst33342作用而使细胞低染从而用流式细胞仪得以分离的亚群细胞, 因为其具有干细胞特性被用来研究肿瘤干细胞的特性.

■同行评价

本文学术性较好,为进一步研究胃癌获得性耐药的发生机制提供了有价值的信息。

- high adhesion ability to the peritoneum in gastric carcinoma. *Cancer Sci* 2009; 100: 1397-1402
- 21 Takaishi S, Okumura T, Tu S, Wang SS, Shibata W, Vigneshwaran R, Gordon SA, Shimada Y, Wang TC. Identification of gastric cancer stem cells using the cell surface marker CD44. *Stem Cells* 2009; 27: 1006-1020
- 22 Tatematsu M, Tsukamoto T, Inada K. Stem cells and gastric cancer: role of gastric and intestinal mixed intestinal metaplasia. *Cancer Sci* 2003; 94: 135-141
- 23 Houghton J, Stoicov C, Nomura S, Rogers AB, Carlson J, Li H, Cai X, Fox JG, Goldenring JR, Wang TC. Gastric cancer originating from bone marrow-derived cells. *Science* 2004; 306: 1568-1571
- 24 Haraguchi N, Utsunomiya T, Inoue H, Tanaka F, Mimori K, Barnard GF, Mori M. Characterization of a side population of cancer cells from human gastrointestinal system. *Stem Cells* 2006; 24: 506-513
- 25 Liang Y, Zhong Z, Huang Y, Deng W, Cao J, Tsao G, Liu Q, Pei D, Kang T, Zeng YX. Stem-like cancer cells are inducible by increasing genomic instability in cancer cells. *J Biol Chem* 2010; 285: 4931-4940

编辑 李薇 电编 李薇

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》修回稿须知

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

1 修回稿信件

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

2 稿件修改

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

3 版权

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

表达HBVX基因的小鼠模型的建立及对肝细胞凋亡因子的影响

郭晨, 李丹, 林纳, 黄月红, 陈治新, 王小众

郭晨, 李丹, 林纳, 黄月红, 陈治新, 王小众, 福建医科大学附
属协和医院消化内科 福建省福州市 350001

郭晨, 主要从事消化系统疾病及肝病方向的研究。

作者贡献分布: 此课题由郭晨、李丹及林纳设计; 研究过程由郭晨操作完成; 研究所用试剂仪器由黄月红与陈治新提供; 数据分析由郭晨完成; 本论文写作由郭晨完成; 王小众进行批评性审阅。
通讯作者: 王小众, 教授, 主任医师, 350001, 福建省福州市鼓楼区新权路29号, 福建医科大学附属医院消化内科。

drwangxz@public6.fz.fj.cn

电话: 0591-83357896

收稿日期: 2011-02-25 修回日期: 2011-03-29

接受日期: 2011-04-11 在线出版日期: 2011-04-28

Establishment of a mouse model harboring the hepatitis B virus X gene and analysis of expression of apoptosis factors in liver cells of this mouse line

Chen Guo, Dan Li, Na Lin, Yue-Hong Huang,
Zhi-Xin Chen, Xiao-Zhong Wang

Chen Guo, Dan Li, Na Lin, Yue-Hong Huang, Zhi-Xin Chen, Xiao-Zhong Wang, Department of Gastroenterology, Union Hospital, Fujian Medical University, Fuzhou 350001, Fujian Province, China

Correspondence to: Professor Xiao-Zhong Wang, Department of Gastroenterology, Union Hospital, Fujian Medical University, 29 Xinquan Road, Gulou District, Fuzhou 350001, Fujian Province, China. drwangxz@public6.fz.fj.cn

Received: 2011-02-25 Revised: 2011-03-29

Accepted: 2011-04-11 Published online: 2011-04-28

Abstract

AIM: To investigate the impact of the hepatitis B virus X gene (HBVX) on the expression of apoptosis factors in liver cells.

METHODS: The eukaryotic expression vector PCDNA3.1-HBVX was injected into the caudal vein of mice to establish a mouse model expressing the HBVX gene. Mice injected with empty PCDNA3.1 vector or normal saline were used as controls. RT-PCR and Western blot were performed to detect the expression of HBVX in liver tissue 48 h after injection. Semi-quantitative RT-PCR was used to evaluate the expression of *bax*, *bcl-2*, and *c-myc* in liver cells of different groups

of mice.

RESULTS: HBX mRNA and protein were detected in liver tissue in mice injected with the PCDNA3.1-HBVX vector, but not in controls. Compared to controls, the expression of *bax*, *c-myc* and *bcl-2* was up-regulated in liver tissue in mice injected with the PCDNA3.1-HBVX vector (*bax*: 1.3127 ± 0.0900 vs 1.0023 ± 0.1670 , 0.9094 ± 0.1081 ; *c-myc*: 1.6294 ± 0.0672 vs 1.2869 ± 0.0880 , 0.9757 ± 0.0397 ; *bcl-2*: 1.5567 ± 0.1257 vs 0.6856 ± 0.1554 , 0.5488 ± 0.1278 , all $P < 0.05$).

CONCLUSION: A mouse model harboring the HBVX gene has been established successfully. Expression of the HBx gene can up-regulate the expression of Bax, c-Myc and Bcl-2 in liver cells.

Key Words: Hepatitis B virus X gene; Liver cells; Apoptosis; Mouse model

Guo C, Li D, Lin N, Huang YH, Chen ZX, Wang XZ. Establishment of a mouse model harboring the hepatitis B virus X gene and analysis of expression of apoptosis factors in liver cells of this mouse line. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(12): 1225-1230

摘要

目的: 探讨乙型肝炎病毒X(HBVX)基因及其产物对肝细胞凋亡相关基因表达的影响。

方法: 将实验用SPF级成年♂KM小鼠分为实验组、空质粒对照组、生理盐水对照组。实验组以构建好的PCDNA3.1-HBVX质粒, 空质粒对照组以PCDNA3.1质粒, 生理盐水对照组以生理盐水, 通过尾静脉高压注入动物体内, 在第48小时处死小鼠后, 取肝组织, 以RT-PCR, 凝胶回收测序及Western blot检测HBVX表达, 以RT-PCR半定量检测小鼠肝组织内*bax*、*c-myc*及*bcl-2*的表达。

结果: 实验组RT-PCR显示465 bp处有清楚条带, 肝组织内有HBVX mRNA的存在, 两对照组无HBVX mRNA存在, Western blot检测实验组有HBVX蛋白的表达; 两对照组则无HBVX

■背景资料

在HBV发生发展过程中, HBV DNA与宿主DNA的整合常发生于此区域。HBVX参与病毒的复制; 反式激活多种病毒和细胞基因; 并可通过影响正常的细胞周期, 干扰DNA的修复及调节肝细胞增殖、分化和凋亡等。

■同行评议者

陈洪, 主任医师, 东南大学附属中大医院消化科

■研究前沿

1989年Murakami报道通过HBVX基因片段的表达载体转染小鼠成纤维细胞系诱发其体外转化,经裸鼠移植可在裸鼠体内形成肿瘤,使人们对HBVX基因的致癌作用有了突破性的认识。自此,HBVX基因成了肝癌发病机制研究的热点。

蛋白表达。通过对小鼠肝组织凋亡相关因子的半定量RT-PCR,相对于空质粒对照组和生理盐水对照组,转染HBVX基因的小鼠肝组织***bax***、***c-myc***及***bcl-2***的mRNA相对表达量明显增高,差异有显著性意义(***bax***: 1.3127 ± 0.0900 vs 1.0023 ± 0.1670 , 0.9094 ± 0.1081 ; ***c-myc***: 1.6294 ± 0.0672 vs 1.2869 ± 0.0880 , 0.9757 ± 0.0397 ; ***bcl-2***: 1.5567 ± 0.1257 vs 0.6856 ± 0.1554 , 0.5488 ± 0.1278 , 均 $P < 0.05$)。

结论: 成功建立了表达HBVX的小鼠动物模型,并证明转染HBVX基因后小鼠肝脏组织内***bax***、***bcl-2***及***c-myc***的mRNA表达同时上调。

关键词: 乙型肝炎病毒X基因; 肝细胞; 凋亡; 小鼠模型

郭晨, 李丹, 林纳, 黄月红, 陈治新, 王小众. 表达HBVX基因的小鼠模型的建立及对肝细胞凋亡因子的影响. 世界华人消化杂志 2011; 19(12): 1225-1230

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/1225.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)是一种双链不完全闭合的DNA病毒,有4个开放读码框,分别编码S、C、X、P蛋白。其慢性感染是导致肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)的主要危险因素。随着HCC研究的进一步深入以及HBV基因序列的破解,人们发现HBV基因组中的X基因(hepatitis B virus X gene, HBVX)及其产物X蛋白与HCC的发生发展密切相关。X基因是HBV基因组最小的开放读码框,位于HBV基因组的1 374-1 838 bp处,全长435-462 bp,全长转录体编码的X蛋白含154个氨基酸,分子量约为16 500 Da。在HBV发生发展过程中,HBV DNA与宿主DNA的整合常发生于此区域。HBVX参与病毒的复制;反式激活多种病毒和细胞基因;并可通过影响正常的细胞周期,干扰DNA的修复及调节肝细胞增殖、分化和凋亡等。本实验以小鼠肝组织为研究对象,通过流体动力学体内高压质粒注射,在动物体内转染PCDNA3-HBVX质粒,建立表达HBVX基因的动物模型,以RT-PCR半定量检测转染后动物肝组织内HBVX及凋亡相关基因***bax***、***bcl-2***及***c-myc***的表达情况,进而了解X基因在活体组织内对细胞凋亡相关因子的作用。

1 材料和方法

1.1 材料 pCDNA3-HBVX载体由福建医科大学附

属协和医院消化研究所制备并保存,质粒大抽提试剂盒购自美国Qiagen公司,逆转录试剂盒购自美国Promega公司,RNA抽提试剂盒购自深圳生物晶美有限公司,DNA Marker购自Invitrogen公司,TransIT In Vivo Gene Delivery System试剂盒购自Mirus公司,鼠抗人HBVX单克隆抗体购自美国Chemicon公司;羊抗小鼠IgG二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司;蛋白印迹实验的ECL显色试剂购自中国中杉公司。超低温冰箱MDF-283型(苏州安泰空气技术有限公司)、PCR仪AB2720型(美国AB公司)、稳压稳流电泳仪(DYY-6c型)(北京六一仪器厂)、紫外透射分析仪(上海长明光电子仪器厂)、凝胶成像系统IS2000-200(Olympus公司生产)、蛋白电泳及转印设备(美国Bio-Rad公司)、电动匀浆器(Cole-Parmer公司)。SPF级成年♂KM小鼠9只,体质量 $20 \text{ g} \pm 2 \text{ g}$,由上海斯莱克实验动物有限公司提供[许可证号SCXK(沪)2007-0005]。

1.2 方法

1.2.1 分组: 9只小鼠随机分为实验组、空质粒对照组、生理盐水对照组,每组各3只。动物饲养在SPF级环境中,实验动物光照强度15 k,光照时间明暗各半。饲养室温度: $23 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3 \text{ }^{\circ}\text{C}$,湿度: 50%。动物饲喂全价颗粒料,自由采食和饮水。

1.2.2 各基因PCR引物的合成: 根据HBVX基因,β-actin、***bax***、***bcl-2***及***c-myc***基因序列自行设计引物,合成由上海英骏生物技术有限公司完成。

1.2.3 造模: 实验组小鼠按照TransIT In Vivo Gene Delivery System体内转染试剂盒的说明,先取浓度约为1.0 g/L的质粒pCDNA3.1-HBVX 10 μL与试剂In Vivo Polymer Solution 10 μL在无核酶EP管内混合,加生理盐水100 μL至总体积200 μL,充分混匀,室温静置5 min。将190 μL $10 \times$ In Vivo Delivery Solution用生理盐水稀释成1.9 mL $1 \times$ Delivery Solution,然后将其与第一步的混合物混合,使溶液总体积为2.1 mL。小鼠尾静脉4-6 s内匀速注射完毕。空质粒对照组以等量pCDNA3.1质粒,生理盐水对照组以等量生理盐水注射。48 h后处死小鼠,无菌取肝组织块, $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻存备用。

1.2.4 以RT-PCR检测小鼠肝组织中HBVX mRNA的表达: 取肝组织,加入细胞裂解液,匀浆后,按RNA抽提试剂盒说明进行总RNA的提取,再以RT反应获得cDNA,取cDNA 5 μL作为模板,扩增HBVX基因片段和内参β-actin。反应条件见表1,扩增产物在1.5%脂糖凝胶中电泳,观察结果。

表 1 各基因引物及反应条件

基因	片段长度(bp)	引物	反应条件
HBVX	465	上游: 5'-ATGCAAGCTTATGGCTGCTAGGCTGTACTG-3' 下游: 5'-TGCGAATTCTTAGGCAGAGGTGAAAAAGTT-3'	95 °C预变性5 min, 95 °C变性45 s, 60 °C退火30 s, 72 °C延伸1 min
β -actin	600	上游: 5'-GGCATCGTGATGGACTCCG-3' 下游: 5'-GCTGGAAGGTGGACAGCGA-3'	95 °C预变性5 min, 95 °C变性45 s, 60 °C退火30 s, 72 °C延伸1 min
<i>bax</i>	246	上游: 5'-TTTGCTTCAGGGTTTCATCC-3' 下游: 5'-CAGTTGAAGTTGCCGTCAGA-3'	94 °C预变性5 min, 94 °C变性45 s, 58 °C退火30 s, 72 °C延伸1 min, 30个循环
<i>bcl-2</i>	198	上游: 5'-GGCTGGGATACTTTGTGGA-3' 下游: 5'-ATGTGGTGGAGCAGAGAAGG-3'	94 °C预变性5 min, 94 °C变性45 s, 64 °C退火30 s, 72 °C延伸40 s, 25个循环
<i>c-myc</i>	203	上游: 5'-TTCGGGTAGTGAAAACAG-3' 下游: 5'-CAGCAGCTCGAATTTCTTCC-3'	94 °C预变性5 min, 94 °C变性45 s, 58 °C退火30 s, 72 °C延伸1 min, 30个循环

■ 相关报道

Henkler等认为HBVX蛋白在感染细胞中的定位依赖于HBVX基因的总表达水平, HBVX蛋白在低表达的细胞中大部分定位于细胞核内, 而过量表达的HBVX蛋白则分布于胞质中。

1.2.5 Western blot法检测小鼠肝组织中HBVX基因产物的表达: 肝组织匀浆破碎抽提蛋白, SDS-PAGE分离、转膜、封闭, 一抗、二抗孵育, ECL显色。拍照并保存。

1.2.6 半定量RT-PCR检测*bax*、*bcl-2*、*c-myc*的表达: 抽提肝组织总RNA, 逆转录为cDNA, 以cDNA为模板共扩增内参 β -actin及*bax*、*bcl-2*、*c-myc*基因片段, 反应条件见表1。扩增产物在1.5%脂糖凝胶中电泳, 并以凝胶灰度扫描系统扫描灰度值以各基因与内参基因的灰度比值为相对表达量, 比较各组的差别, 同样实验重复3次。

2 结果

2.1 RT-PCR鉴定HBVX基因的表达 实验组小鼠肝组织中大约460 bp处可见1条带(图1), 大小与HBVX基因相符, 内参 β -actin条带大小约为600 bp, 空质粒对照组与生理盐水组只可见内参 β -actin条带, 无HBVX基因mRNA表达, 表明HBVX基因成功转染至实验组小鼠肝组织内。

2.2 Western blot检测小鼠肝组织HBVX蛋白表达 显影后阳性条带大小约为17 000 Da, 与HBVX蛋白大小基本相符, 空质粒对照组与生理盐水对照组只可见内参 β -actin条带, 表明HBVX蛋白在实验组小鼠肝脏组织中有表达(图2)。

2.3 *bax*基因mRNA相对表达量的变化 转染HBVX的实验组小鼠肝脏组织*c-myc*基因的相对表达量较转染空质粒对照组和生理盐水对照组明显增高, 差异有显著性意义(均 $P<0.05$), 说明HBVX能上调*bax*的表达(表2, 图3)。

2.4 *c-myc*基因mRNA相对表达量的变化 转染HBVX的实验组小鼠肝脏组织*Bax*基因的相对表达量较转染空质粒对照组和生理盐水对照组明显增高, 差异有显著性意义(均 $P<0.05$), 说明

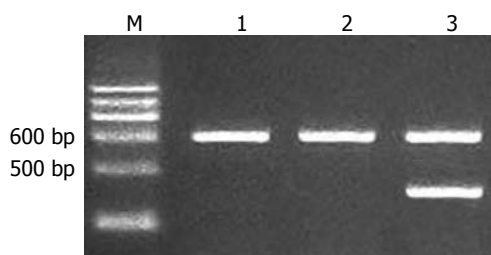


图 1 RT-PCR检测HBVX基因的表达. M: DNA Ladder; 1: 生理盐水对照组; 2: 空质粒对照组; 3: 实验组。

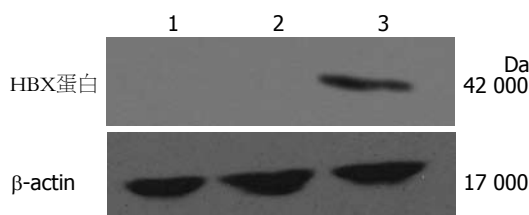


图 2 Western blot检测HBVX蛋白表达. 1: 生理盐水对照组; 2: 空质粒对照组; 3: 实验组。

HBVX能上调*c-myc*的表达(表2, 图4)。

2.5 *bcl-2*基因mRNA相对表达量的变化 转染HBVX的实验组小鼠肝脏组织*bcl-2*基因的相对表达量较转染空质粒对照组和生理盐水对照组明显增高, 差异有显著性意义(均 $P<0.05$), 说明HBVX能上调*Bcl-2*的表达(表2, 图5)。

3 讨论

HBVX基因及其编码的HBVX蛋白具有多种作用和多种功能。目前, HBVX的翻译产物HBVX蛋白的亚细胞定位尚存在争议。Henkler等^[1]认为HBVX蛋白在感染细胞中的定位依赖于HBVX基因的总表达水平, HBVX蛋白在低表达的细胞中大部分定位于细胞核内, 而过量表达的HBVX蛋白则分布于胞质中。另有学者观察到HBVX

■应用要点

本实验成功建立了表达HBVX的小鼠动物模型,并证明转染HBVX基因后小鼠肝脏组织内Bax、Bcl-2及c-Myc的mRNA表达同时上调。

表 2 各基因RT-PCR条带与 β -actin内参灰度比值

分组	<i>bax</i>	<i>bcl-2</i>	<i>c-myc</i>
实验组	1.3127 \pm 0.0900	1.5567 \pm 0.1257	1.6294 \pm 0.0672
空质粒对照组	1.0023 \pm 0.1670	0.6856 \pm 0.1554	1.2869 \pm 0.0880
生理盐水对照组	0.9094 \pm 0.1081	0.5488 \pm 0.1278	0.9757 \pm 0.0397

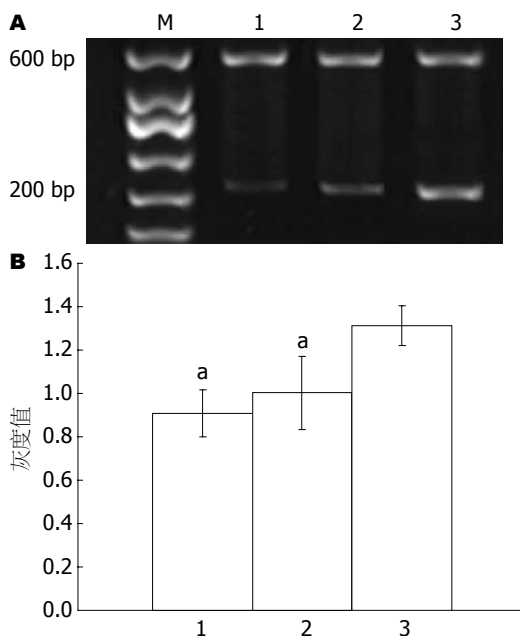


图 3 *bax*基因mRNA相对表达量的变化. A: RT-PCR; B: *bax*基因相对表达量. M: DNA Ladder; 1: 生理盐水对照组; 2: 空质粒对照组; 3: 实验组. $^aP < 0.05$ vs 实验组.

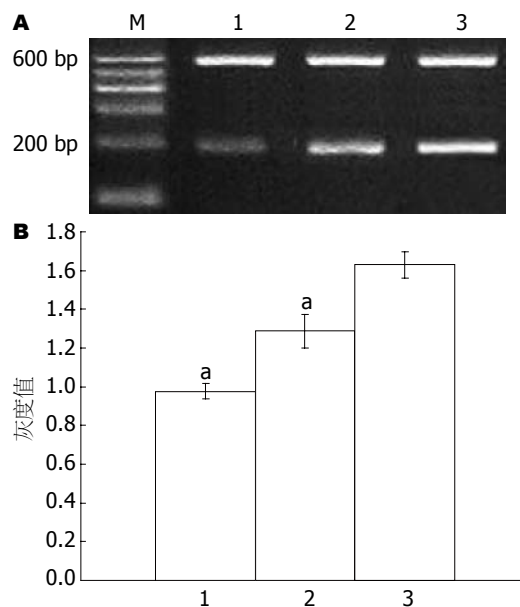


图 4 *c-myc*基因mRNA相对表达量的变化. A: RT-PCR; B: *c-myc*基因相对表达量. M: DNA Ladder; 1: 生理盐水对照组; 2: 空质粒对照组; 3: 实验组. $^aP < 0.05$ vs 实验组.

在细胞质内的水平高于细胞核,且细胞质中的HBVX主要分布于线粒体外膜上,并可作用于人电压依赖阴离子通道,导致跨膜电势的改变和线粒体功能变化,但其具体调节机制尚未阐明^[2]. 1989年Murakami^[3]报道通过HBVX基因片段的表达载体转染小鼠成纤维细胞系诱发其体外转化,经裸鼠移植可在裸鼠体内形成肿瘤,使人们对HBVX基因的致癌作用有了突破性的认识.自此,HBVX基因成了肝癌发病机制研究的热点.目前发现HBVX可直接或间接激活多种核转录因子,使细胞对凋亡信号敏感性增强^[4-6],细胞周期调定点失控^[1,7-10]以及调节细胞蛋白质分解途径^[11-14],最终引起肝细胞的转化^[15,16],如通过激活PI-3激酶途径拮抗TGF- β 的促凋亡作用^[17],以P53非依赖形式抑制凋亡^[18],抑制caspase-3活性^[19],上调FasL,诱导表达Fas的T淋巴细胞凋亡而逃避免疫监视^[20,21]等,而近几年的研究又发现,HBVX同样具有促进细胞凋亡的作用,HBVX蛋白促进IL-18 mRNA的转录、蛋白质表达,进

而促进Fas/FasL的表达而促进细胞凋亡^[22],拮抗Fas/FasL介导的凋亡抑制作用,使细胞对极低浓度的TNF- α 诱导的凋亡敏感^[23],还可引起引起caspase-9募集细胞凋亡蛋白酶活化因子1(apoptotic protease activating factor-1, APAF1),激活线粒体/CytC凋亡途径^[24].这些针对HBVX基因的研究主要基于转染肝癌细胞株及转基因动物模型,而转基因动物模型虽然能稳定地表达目的基因,但是由于其所携带的HBVX基因多以显微注射法等方法整合在宿主染色体上,没有经过病毒与靶细胞受体结合穿透的过程,所以与病毒在自然状态下感染机体的状态不甚相同,而且建立过程复杂,技术难度较大,所需资金及时间也长,本实验利用流体动力学体内转染法,将HBVX基因载体质粒短时间内大量注射入小鼠体内,使小鼠静脉系统及肝窦充血,以静脉压将质粒转入肝细胞,无大的创伤性操作,时间也较短,注射后小鼠均成活,状态良好,且小鼠肝组织可稳定表达HBVX基因及其产物.

Bcl-2家族在细胞凋亡的基因调控过程中起

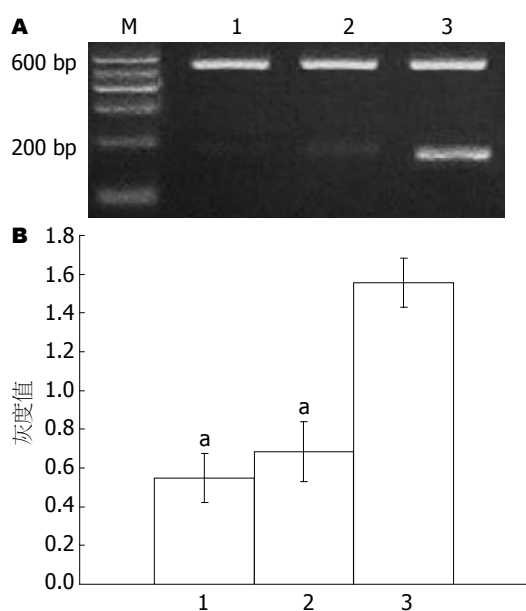


图5 *bcl-2*基因mRNA相对表达量的变化。A: RT-PCR; B: *bcl-2*基因相对表达量。M: DNA Ladder; 1: 生理盐水对照组; 2: 空质粒对照组; 3: 实验组。* $P < 0.05$ vs 实验组。

着至关重要的作用, Bcl-2家族可以分为2类: 一类是抗细胞凋亡基因, 代表基因是*bcl-2*基因; 另一类是促细胞凋亡基因, 代表基因是*bax*基因, 他们通过激活一系列下游基因发挥调节凋亡作用, 二者在细胞中的比例显著影响细胞对死亡信号的敏感性^[25-28]。本实验中半定量RT-PCR的结果表明HBVX基因转染后, 小鼠体内*bax*及*bcl-2*两者表达均升高, 表明HBVX基因在细胞凋亡途径的双向性。

*c-myc*是一种细胞癌基因, 可作为转录因子影响着细胞的生长、增殖、分化、凋亡和细胞周期的进行, 在肿瘤发生、转移、氧化应激等重要生理病理过程中起重要作用, 有研究表明HBVX和*c-myc*共表达使WT 3T3细胞对TNF- α 介导的凋亡敏感性增高约10倍, 且这种促凋亡作用超过了NF- κ B的抗凋亡作用而表现出细胞凋亡^[29]。本实验肝组织中转染HBVX基因后*c-myc*的表达明显升高。

本实验中我们运用流体动力学尾静脉注射体内转染法将HBVX基因转染入小鼠活体肝组织内, 成功构建了表达HBVX基因的小鼠活体动物模型, RT-PCR结果显示转染HBVX基因的小鼠肝组织中, 促凋亡基因*bax*、*c-myc*的表达均上升, 并且抑制凋亡的基因*bcl-2*表达也提高, 证明在肝组织中, HBVX参与了对*bax*、*bcl-2*和*c-myc*转录水平的调节, 并且其对凋亡因子的作用存在双向性, 哪一方面占主导取决于多种因素共

同的作用, 为下一步针对肝癌致病机制和基因治疗的进一步研究打下基础, 但是这其中的机制尚未阐明, 有待我们进一步研究。

4 参考文献

- Henkler F, Hoare J, Waseem N, Goldin RD, McGarvey MJ, Koshy R, King IA. Intracellular localization of the hepatitis B virus HBx protein. *J Gen Virol* 2001; 82: 871-882
- Huh KW, Siddiqui A. Characterization of the mitochondrial association of hepatitis B virus X protein, HBx. *Mitochondrion* 2002; 1: 349-359
- Murakami S. Hepatitis B virus X protein: a multifunctional viral regulator. *J Gastroenterol* 2001; 36: 651-660
- Diao J, Khine AA, Sarangi F, Hsu E, Iorio C, Tibbles LA, Woodgett JR, Penninger J, Richardson CD. X protein of hepatitis B virus inhibits Fas-mediated apoptosis and is associated with up-regulation of the SAPK/JNK pathway. *J Biol Chem* 2001; 276: 8328-8340
- Su F, Schneider RJ. Hepatitis B virus HBx protein activates transcription factor NF-kappaB by acting on multiple cytoplasmic inhibitors of rel-related proteins. *J Virol* 1996; 70: 4558-4566
- Chen GG, Lai PB, Chan PK, Chak EC, Yip JH, Ho RL, Leung BC, Lau WY. Decreased expression of Bid in human hepatocellular carcinoma is related to hepatitis B virus X protein. *Eur J Cancer* 2001; 37: 1695-1702
- Terradillos O, de La Coste A, Pollicino T, Neuveut C, Sitterlin D, Lecoeur H, Gougeon ML, Kahn A, Buendia MA. The hepatitis B virus X protein abrogates Bcl-2-mediated protection against Fas apoptosis in the liver. *Oncogene* 2002; 21: 377-386
- Leupin O, Bontron S, Schaeffer C, Strubin M. Hepatitis B virus X protein stimulates viral genome replication via a DDB1-dependent pathway distinct from that leading to cell death. *J Virol* 2005; 79: 4238-4245
- Melegari M, Wolf SK, Schneider RJ. Hepatitis B virus DNA replication is coordinated by core protein serine phosphorylation and HBx expression. *J Virol* 2005; 79: 9810-9820
- Zhang JL, Zhao WG, Wu KL, Wang K, Zhang X, Gu CF, Li Y, Zhu Y, Wu JG. Human hepatitis B virus X protein promotes cell proliferation and inhibits cell apoptosis through interacting with a serine protease Hepsin. *Arch Virol* 2005; 150: 721-741
- 陈红英, 唐南洪, 张生君, 陈治新, 王小众. 乙肝病毒X基因真核表达载体的构建及人肝细胞株HL-7702转染. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 614-617
- Lee SH, Park SG, Lim SO, Jung G. The hepatitis B virus X protein up-regulates lymphotoxin alpha expression in hepatocytes. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1741: 75-84
- Chung TW, Lee YC, Kim CH. Hepatitis B viral HBx induces matrix metalloproteinase-9 gene expression through activation of ERK and PI-3K/AKT pathways: involvement of invasive potential. *FASEB J* 2004; 18: 1123-1125
- Chan CF, Yau TO, Jin DY, Wong CM, Fan ST, Ng IO. Evaluation of nuclear factor-kappaB, urokinase-type plasminogen activator, and HBx and their clinicopathological significance in hepatocellular

同行评价

本文选题较好, 方法先进, 具有一定的临床参考价值。

- carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 4140-4149
- 15 Jin YM, Yun C, Park C, Wang HJ, Cho H. Expression of hepatitis B virus X protein is closely correlated with the high periportal inflammatory activity of liver diseases. *J Viral Hepat* 2001; 8: 322-330
- 16 Hu Z, Zhang Z, Kim JW, Huang Y, Liang TJ. Altered proteolysis and global gene expression in hepatitis B virus X transgenic mouse liver. *J Virol* 2006; 80: 1405-1413
- 17 Shih WL, Kuo ML, Chuang SE, Cheng AL, Doong SL. Hepatitis B virus X protein inhibits transforming growth factor-beta -induced apoptosis through the activation of phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J Biol Chem* 2000; 275: 25858-25864
- 18 Shintani Y, Yotsuyanagi H, Moriya K, Fujie H, Tsutsumi T, Kanegae Y, Kimura S, Saito I, Koike K. Induction of apoptosis after switch-on of the hepatitis B virus X gene mediated by the Cre/loxP recombination system. *J Gen Virol* 1999; 80 (Pt 12): 3257-3265
- 19 Gottlob K, Fulco M, Levrero M, Graessmann A. The hepatitis B virus HBx protein inhibits caspase 3 activity. *J Biol Chem* 1998; 273: 33347-33353
- 20 Lee MO, Kang HJ, Cho H, Shin EC, Park JH, Kim SJ. Hepatitis B virus X protein induced expression of the Nur77 gene. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 288: 1162-1168
- 21 Ou DP, Tao YM, Chang ZG, Tang FQ, Yang LY. Hepatocellular carcinoma cells containing hepatitis B virus X protein have enhanced invasive potential conditionally. *Dig Liver Dis* 2006; 38: 262-267
- 22 Lee MO, Choi YH, Shin EC, Kang HJ, Kim YM, Jeong SY, Seong JK, Yu DY, Cho H, Park JH, Kim SJ. Hepatitis B virus X protein induced expression of interleukin 18 (IL-18): a potential mechanism for liver injury caused by hepatitis B virus (HBV) infection. *J Hepatol* 2002; 37: 380-386
- 23 Korkolopoulou P, Goudopoulou A, Voutsinas G, Thomas-Tsagli E, Kapralos P, Patsouris E, Saitta AA. c-FLIP expression in bladder urothelial carcinomas: its role in resistance to Fas-mediated apoptosis and clinicopathologic correlations. *Urology* 2004; 63: 1198-1204
- 24 Zhang X, Dong N, Yin L, Cai N, Ma H, You J, Zhang H, Wang H, He R, Ye L. Hepatitis B virus X protein upregulates survivin expression in hepatoma tissues. *J Med Virol* 2005; 77: 374-381
- 25 Bouillet P, Strasser A. BH3-only proteins - evolutionarily conserved proapoptotic Bcl-2 family members essential for initiating programmed cell death. *J Cell Sci* 2002; 115: 1567-1574
- 26 Lee YH, Yun Y. HBx protein of hepatitis B virus activates Jak1-STAT signaling. *J Biol Chem* 1998; 273: 25510-25515
- 27 Capano M, Crompton M. Bax translocates to mitochondria of heart cells during simulated ischaemia: involvement of AMP-activated and p38 mitogen-activated protein kinases. *Biochem J* 2006; 395: 57-64
- 28 Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 1997; 91: 479-489
- 29 张生君, 王小众. HBx对肝细胞凋亡的双向调控及机制. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 2424-2428

编辑 李薇 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011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)

自噬相关基因LC3和Beclin1在大鼠急性坏死性胰腺炎中的表达和意义

杨淑丽, 陈卫昌, 孙 楹, 陈冯梅

杨淑丽, 陈卫昌, 孙楹, 苏州大学附属第一医院消化内科 江苏省苏州市 215006

杨淑丽, 陈冯梅, 苏州卫生职业技术学院 江苏省苏州市 215006

杨淑丽, 在读博士, 讲师, 主要从事消化系统疾病研究.

江苏省普通高校研究生科研创新计划基金资助项目, No. CX10B-0472

作者贡献分布: 此课题由杨淑丽与陈卫昌设计; 研究过程由杨淑丽与孙楹操作完成; 数据分析由陈冯梅完成; 本论文写作由杨淑丽完成; 陈卫昌进行批评性审阅.

通讯作者: 陈卫昌, 教授, 主任医师, 215006, 江苏省苏州市, 苏州大学附属第一医院消化内科. chenweichang1@hotmail.com
电话: 0512-67780527

收稿日期: 2011-03-01 修回日期: 2011-04-02

接受日期: 2011-04-11 在线出版日期: 2011-04-28

Significance of expression of autophagy-related proteins LC3 and Beclin-1 in acute necrotizing pancreatitis in rats

Shu-Li Yang, Wei-Chang Chen, Ying Sun, Feng-Mei Chen

Shu-Li Yang, Wei-Chang Chen, Ying Sun, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215006, Jiangsu Province, China

Shu-Li Yang, Feng-Mei Chen, Suzhou Health College, Suzhou 215006, Jiangsu Province, China

Supported by: the Jiangsu Provincial Graduate Innovation Research Foundation, No. CX10B-0472

Correspondence to: Professor Wei-Chang Chen, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215006, Jiangsu Province, China. chenweichang1@hotmail.com

Received: 2011-03-01 Revised: 2011-04-02

Accepted: 2011-04-11 Published online: 2011-04-28

Abstract

AIM: To examine the expression of microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) and Beclin-1 in acute necrotizing pancreatitis (ANP) in rats and to analyze their significance.

METHODS: Thirty-six Sprague-Dawley rats were randomized into sham operation (SO) group and ANP group. ANP was induced in rats by retrograde injection of 5% sodium taurocholate into the bili-pancreatic duct. Rats were killed at 3, 6, and 12 h after sodium taurocholate injection. Pancreatic histopathological changes

and serum levels of several inflammatory factors were measured. The expression of LC3 and Beclin-1 in ANP at different time points was detected by immunohistochemistry.

RESULTS: Pancreatic pathological changes were gradually exacerbated with time in the ANP group. Serum levels of amylase (AMY, U/L) and TNF- α ($\mu\text{g/L}$) were significantly higher in the ANP group than in the SO group at all time points (AMY: 3 h: $4\,936 \pm 1\,207$ vs $1\,447 \pm 355$; 6 h: $5\,464 \pm 768$ vs $1\,513 \pm 333$; 12 h: $6\,139 \pm 710$ vs $1\,539 \pm 231$; TNF- α : 3 h: 111.24 ± 21.86 vs 56.14 ± 7.69 ; 6 h: 107.55 ± 33.05 vs 57.13 ± 11.30 ; 12 h: 108.24 ± 24.83 vs 58.60 ± 9.54 , all $P < 0.05$). The expression levels of LC3 and Beclin-1 in the pancreas were maintained at a very low level in the SO group, but started to elevate at 3 h in the ANP group and showed strong expression at 6 and 12 h (all $P < 0.05$).

CONCLUSION: The expression levels of LC3 and Beclin-1 increased in ANP in rats, suggesting that up-regulation of autophagic activity may represent a response to injury in rats with ANP.

Key Words: Autophagy; Acute necrotizing pancreatitis; Microtubule-associated protein 1 light chain 3; Beclin-1

Yang SL, Chen WC, Sun Y, Chen FM. Significance of expression of autophagy-related proteins LC3 and Beclin-1 in acute necrotizing pancreatitis in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(12): 1231-1236

摘要

目的: 研究大鼠急性坏死性胰腺炎(ANP)胰腺组织LC3、Beclin1的表达, 并探讨其在ANP中的作用及意义.

方法: 36只SD大鼠随机分为假手术(SO)组和ANP组, ANP组采用胰胆管逆行注射5%牛磺胆酸钠诱导制作大鼠ANP模型, SO组开腹后翻动胰腺后关腹, 各组再分3、6和12 h 3个不同时间点. 观察各组大鼠血清炎症因子及胰腺的

■背景资料

自噬是细胞生长发育、成熟分化及死亡的重要调控机制, 又是细胞对不良环境的一种防御机制. Beclin1蛋白是自噬通路必须的磷脂酰肌醇3磷酸激酶(PI3K)复合物的组成部分. 微管相关蛋白1轻链3(LC3)是目前观察自噬现象是否存在、研究自噬活性较为可靠的生物学标志物.

■同行评议者

郭晓钟, 教授, 中国人民解放军沈阳军区总医院消化内科

■研究前沿

随着对细胞自噬的分子机制的深入研究,自噬在疾病中的作用引起了广泛的重视。最近的研究表明自噬活性的异常与AP关系密切,已成为目前探讨AP发生发展研究的新靶点。

病理改变,运用免疫组织化学法检测各组大鼠在不同时间点胰腺组织LC3和Beclin1的变化。

结果: ANP组血浆淀粉酶(U/L)、TNF- α (μ g/L)较SO组明显增加(血浆淀粉酶: 3 h: $4\,936 \pm 1\,207$ vs $1\,447 \pm 355$; 6 h: $5\,464 \pm 768$ vs $1\,513 \pm 333$; 12 h: $6\,139 \pm 710$ vs $1\,539 \pm 231$; TNF- α : 3 h: 111.24 ± 21.86 vs 56.14 ± 7.69 ; 6 h: 107.55 ± 33.05 vs 57.13 ± 11.30 ; 12 h: 108.24 ± 24.83 vs 58.60 ± 9.54 , 均 $P < 0.05$),且ANP组大鼠胰腺病理改变随着时间延长加重。正常大鼠胰腺腺泡细胞LC3、Beclin1低表达,大鼠ANP 3 h后胰腺细胞LC3、Beclin1表达开始增多,在6和12 h呈强表达。

结论: 大鼠ANP后胰腺组织Beclin1和LC3增多,表明ANP后胰腺自噬活性增强,其表达与炎症变化程度相关,细胞自噬增强是可能对损伤的反应。

关键词: 自噬; 急性坏死性胰腺炎; 微管相关蛋白1轻链3; Beclin1

杨淑丽, 陈卫昌, 孙楹, 陈冯梅. 自噬相关基因LC3和Beclin1在大鼠急性坏死性胰腺炎中的表达和意义. 世界华人消化杂志 2011; 19(12): 1231-1236

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/1231.asp>

0 引言

自噬(autophagy)是细胞利用溶酶体降解自身受损的细胞器和大分子物质的过程,是真核细胞特有的生命现象^[1],这一过程在细胞清除废物、重建结构以及生长发育中、维持内环境稳定中起重要作用,并与疾病的发生密切相关^[2,3]。现研究表明,自噬是细胞生长发育、成熟分化及死亡的重要调控机制,又是细胞对不良环境的一种防御机制。Beclin1蛋白是自噬通路必须的磷脂酰肌醇3磷酸激酶(phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K)复合物的组成部分^[4,5]。微管相关蛋白1轻链3(microtubule-associated protein 1 light chain 3, MAP1-LC3, LC3)是目前观察自噬现象是否存在、研究自噬活性较为可靠的生物学标志物^[6,7]。本文通过检测大鼠急性坏死性胰腺炎(acute necrotizing pancreatitis, ANP)后胰腺Beclin1和LC3表达的变化,了解ANP发生后胰腺细胞的自噬变化与炎症的关系,以进一步揭示急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)发生发展的机制。

1 材料和方法

1.1 材料 健康♂ Sprague-Dawley大鼠,体质量

200-250 g(由苏州大学动物实验中心提供)。牛磺胆酸钠购自Sigma公司, TNF- α 试剂盒购自上海西唐生物公司, LC3和Beclin1兔多克隆抗体购自Santa Cruz公司,辣根过氧化物酶标记羊抗兔IgG购自北京博奥森生物公司, SABC免疫组织化学试剂盒北京博奥森生物公司。

1.2 方法

1.2.1 分组: 将大鼠随机分成假手术(SO)组及ANP组,每18只。各组再分为术后3、6、12 h 3个亚组,每组6只。

1.2.2 造模及组织处理: ANP组,模型制备采用改良的Aho方法^[8],以0.1 mL/min的速度向胰胆管内逆行注入5%(1 mL/kg)牛磺胆酸钠建立大鼠ANP模型。SO组,开腹后仅翻动胰腺,即关腹。各组分别于术后3、6和12 h腹主动脉抽血,分离血浆保存于-20 °C中备测,将大鼠处死。留取胰腺和肺组织,40 g/L甲醛固定用于常规病理学检查和免疫组织化学检测。

1.2.3 观察指标和检测: (1)血淀粉酶(amyase, AMY): 采用全自动生化分析仪检测,血浆TNF- α 采用ELISA方法检测,严格按试剂盒说明进行操作; (2)胰腺病理学改变: 取固定的各组胰腺标本石蜡包埋,4 μ m连续切片,行常规HE染色,采用盲法由专科医师在光镜下阅片,每张切片随机选择5个高倍视野,观察胰腺组织病理变化; (3)免疫组织化学检测胰腺组织LC3和Beclin1的表达: 40 g/L甲醛固定的胰腺组织,常规脱水,石蜡包埋,制备成4 μ m厚连续切片,经二甲苯脱蜡及梯度乙醇水化后, PBS冲洗,正常山羊血清封闭背景,室温15 min; 加一抗LC3抗体和Beclin1(1:200), 4 °C过夜, PBS冲洗; 滴加生物素化二抗工作液, 37 °C孵育1-2 h, PBS洗冲; 加入辣根酶标记链霉卵白素1滴, 37 °C孵育, 30 min, PBS冲洗; 使用DAB显色试剂盒显色,自来水冲洗切片1-2 min; 切片苏木素复染、梯度酒精脱水、二甲苯透明、中性树脂胶封片,显微镜观察。以胞质出现棕黄色颗粒细胞为阳性细胞,随机观察5个高倍视野,根据其中阳性细胞的比率和染色深度分别进行评估,最后综合评定。(1)阳性细胞的比率评分: 0分为阳性细胞数占总细胞数<10%, 1分为阳性细胞数占总细胞数10%-25%, 2分为阳性细胞数占总细胞数26%-50%, 3分为阳性细胞数占总细胞数51%-75%, 4分为阳性细胞数占总细胞数>75%; (2)染色深度评分: 0分为无染色, 1分为淡黄色, 3分为黄色至棕黄色, 2分为染色强度介

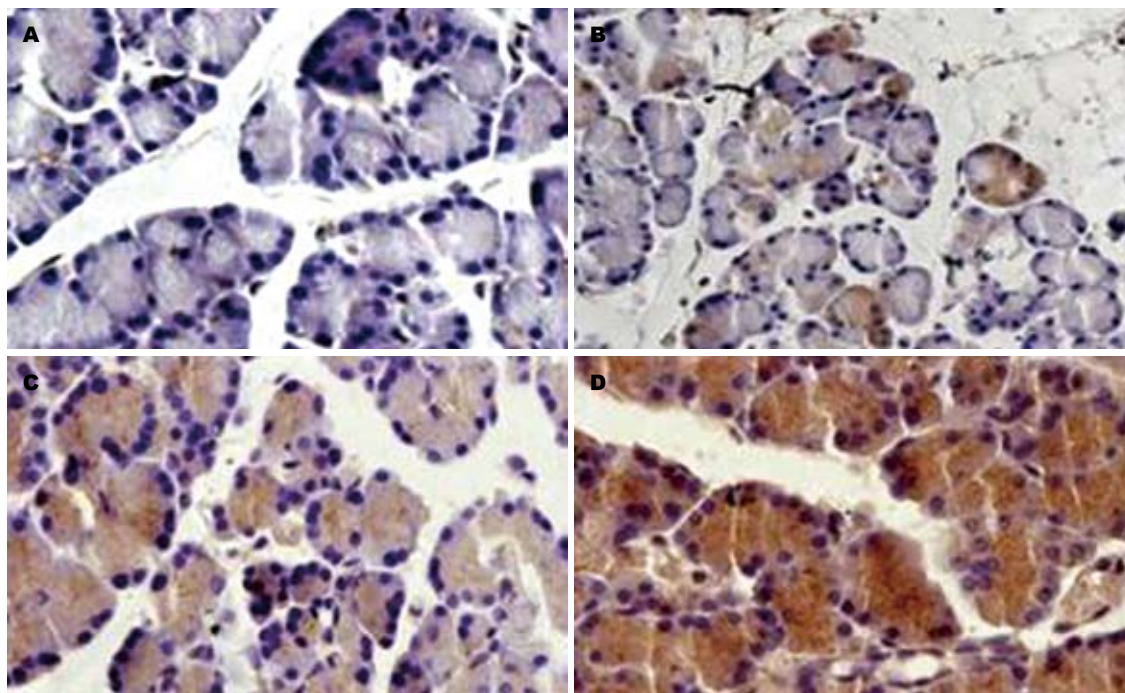


图1 SABC免疫组织化学检测大鼠胰腺组织不同时间点LC3的表达变化(×400)。A: SO组; B: ANP 3 h; C: ANP 6 h; D: ANP 12 h。

■相关报道

研究表明,在雨蛙肽诱导的AP中,胰腺组织中Beclin1的表达增加且与自噬空泡变化一致,提示自噬被激活且参与腺泡细胞的自噬空泡的形成。

于1分与3分之间;(3)总积分 = 阳性细胞比率评分+染色强度评分。

统计学处理 数据以mean±SD表示,使用SPSS15.0统计软件,多组间比较采用方差分析(ANOVA),实验组与对照组比较采用最小显著差法(LSD),实验组之间比较采用 t 检验,以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 AMY、TNF- α 表达水平 ANP组各时间点AMY及TNF- α 水平均较SO组显著升高($P<0.05$,表1)。

2.2 胰腺病理学改变 SO组光镜下大鼠胰腺组织基本正常,各亚组之间无明显差异性。ANP组可见胰腺腺泡水肿及腺泡结构破坏、消失,叶间隔、小叶间隔及腺泡间隔显著增宽,腺泡细胞呈不同程度变性坏死,周围出血,随着时间的延长,病变呈进行性加重。

2.3 LC3和Beclin1的表达 LC3阳性表达见于细胞质,细胞核中未见表达。SO组各时间点大鼠胰腺细胞胞质见少量LC3阳性细胞。在ANP组中,制模3 h后腺泡细胞胞质中LC3阳性细胞增多,并持续增高,在6、12 h呈强表达,胞质棕褐色,着色加深,胰岛细胞的表达多于腺泡细胞(图1)。SO组各时间点腺泡细胞内LC3阳性表达无明显差别,ANP组比SO组各相应时间点胰腺LC3阳性细胞

表1 各组大鼠不同时间点血浆AMY、TNF- α 表达水平

分组	AMY(U/L)	TNF- α (μ g/L)
SO		
3 h	1 447 ± 355	56.14 ± 7.69
6 h	1 513 ± 333	57.13 ± 11.30
12 h	1 539 ± 231	58.60 ± 9.54
ANP		
3 h	4 936 ± 1 207 ^a	111.24 ± 21.86 ^a
6 h	5 464 ± 768 ^{ac}	107.55 ± 33.05 ^{ac}
12 h	6 139 ± 710 ^{ac}	108.24 ± 24.83 ^{ac}

^a $P<0.05$ vs SO组; ^c $P<0.05$ vs ANP 3 h; ^e $P<0.05$ vs ANP 6 h。

表达增加,差异具有统计学意义($P<0.05$); ANP组各时间点比较,6 h组比3 h组胰腺LC3阳性细胞表达增加,12 h比6 h阳性细胞增多,差异具有统计学意义($P<0.05$,表2)。

Beclin1阳性表达主要见于细胞质,正常胰腺Beclin1阳性细胞低表达,在ANP各组胰腺腺泡细胞有阳性表达,其中,在ANP 12 h呈强表达(图2),ANP组与SO组比较,腺泡细胞LC3和Beclin1阳性在各时间点表达有明显增加,ANP组各时间点比较,Beclin1阳性细胞表达有明显差别,差异具有统计学意义($P<0.05$,表2)。

3 讨论

自噬是细胞利用溶酶体降解自身受损的细胞器

■应用要点

大鼠ANP后胰腺组织Beclin1和LC3增多,表明ANP后胰腺自噬活性增强,其表达与炎症变化程度相关,细胞自噬增强是可能对损伤的反应。

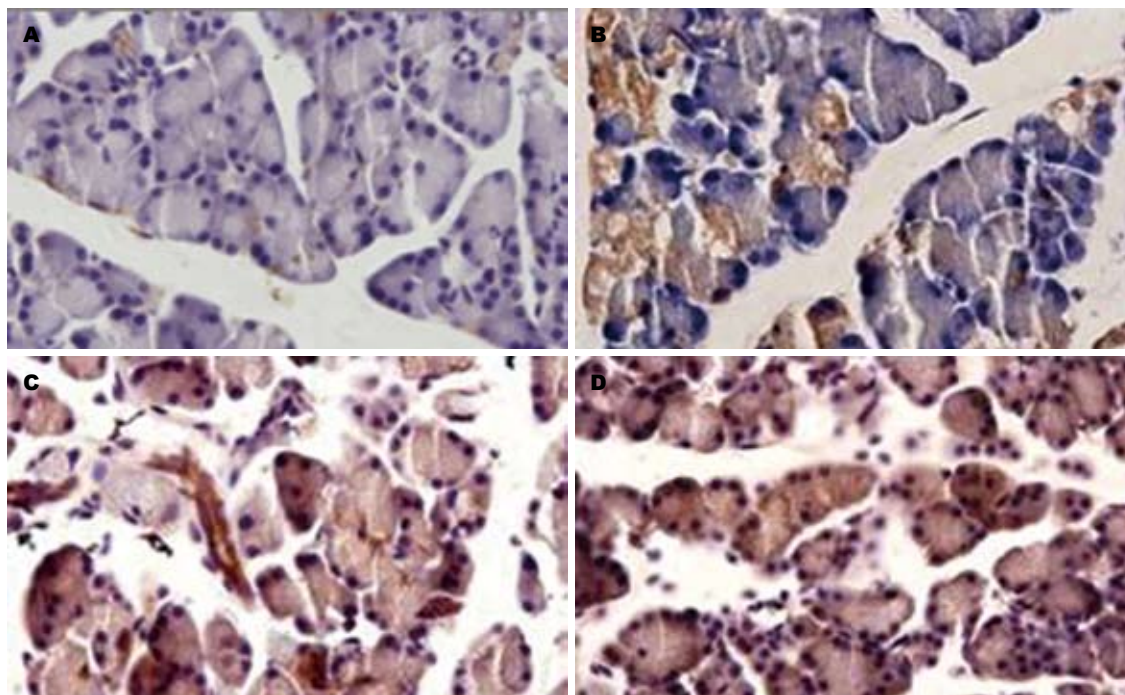


图2 SABC免疫组织化学检测大鼠胰腺组织不同时间点Beclin1的表达变化($\times 400$)。A: SO组; B: ANP 3 h; C: ANP 6 h; D: ANP 12 h。

和大分子物质的过程,是真核细胞特有的生命现象,主要通过对长寿命蛋白以及细胞器的降解和再利用,对细胞进行调节^[9]。现研究表明,自噬是细胞生长发育、成熟分化及死亡的重要调控机制,又是细胞对不良环境的一种防御机制^[10]。除此之外,自噬参与多种疾病的病理过程,如肿瘤、神经退行性病变、心脏疾病、病原体感染等密切相关^[11-16]。随着对细胞自噬的分子机制的深入研究,自噬在疾病中的作用引起了广泛的重视。

AP的发病率呈增加趋势。尽管近年来有关AP的发病机制和临床诊治有了一定的进展,但AP尤其是重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)依然是临床常见且严重危及患者生命的急性炎症性疾病。SAP可发展为全身炎症反应综合征、胰腺坏死进而并发多器官功能障碍,导致患者死亡^[17,18],然而目前针对SAP尚无确切有效的治疗方法。最近的研究表明自噬活性的异常与AP关系密切^[19-21],已成为目前探讨AP发生发展研究的新靶点。

LC3是哺乳动物细胞中酵母ATG8(Aut7/Apg8)基因的同源物,定位于前自噬泡和自噬泡膜表面,参与自噬体的形成。LC3有I型和II型之分。未发生自噬时,细胞内合成的LC3经过加工,成为胞质可溶性的I型LC3,常规表达。当自体吞噬发生时,I型LC3经泛素样加工修饰过程,与自噬膜表面的磷脂酰乙醇胺结合,形成II型

表2 不同时间点大鼠胰腺组织LC3和Beclin1评分

分组	LC3	Beclin1
SO		
3 h	0.80 ± 0.84	0.60 ± 0.89
6 h	1.20 ± 1.30	0.80 ± 0.84
12 h	0.60 ± 0.89	1.00 ± 0.71
ANP		
3 h	3.4 ± 0.55^a	3.20 ± 1.10^a
6 h	4.80 ± 0.84^{ac}	4.60 ± 1.14^{ac}
12 h	6.20 ± 0.84^{ace}	6.40 ± 0.55^{ace}

^a $P < 0.05$ vs SO组; ^c $P < 0.05$ vs ANP 3 h; ^e $P < 0.05$ vs ANP 6 h。

LC3。LC3-II结合并始终位于胞内自噬体的膜上,其含量的多少与自噬泡数量的多少成正比^[3,22]。因此LC3表达强度与自噬活性密切相关。最近研究提示,LC3-II在雨蛙肽、酒精等诱导的ANP时明显增加^[23-25]。本研究结果显示在SO组胰腺组织中LC3以低表达为主,在牛黄胆酸钠诱导的ANP组,LC3的表达在3 h增强且随时间延长表达增加,与前述报道相似。SO组胰腺LC3表达水平显著低于ANP组,提示在5%牛黄胆酸钠所致的ANP中,自噬被激活,胰腺组织中存在LC3表达增强,主要在细胞质中表达,且6-12 h达到高峰,表明在ANP时,自噬活性增强可能是腺泡细胞对损伤的一种反应。

Beclin1是酵母ATG6的同系物,也是哺乳动物参与自噬的特异性基因^[26],通过与ClassIII PI3K形成复合物参与自噬体的形成通过与Class IIIPI3K形成复合体,从而使磷脂酰肌醇磷酸化,产生PI3P,在自噬前体复合物的形成及自噬小体膜的来源中发挥重要作用^[27,28]。研究表明,在雨蛙肽诱导的AP中,胰腺组织中Beclin1的表达增加且与自噬空泡变化一致,提示自噬被激活且参与腺泡细胞的自噬空泡的形成^[24]。本研究发现,Beclin1在ANP发生后3 h增加,在6 h和12 h持续升高,与LC3的表达基本一致,提示自噬在ANP时被激活,可能与AP的发生发展有关。

然而,在哺乳动物中关于自噬发生的机制仍然不明确^[29],自噬相关基因Beclin1和LC3在ANP后上调在其发生中的具体作用亦尚不清楚,通过对Atg5基因敲除的老鼠注射雨蛙肽,建立AP模型,发现在Atg5基因敲除的老鼠,仅表现局部的轻微炎症,且胰蛋白酶原的激活有很大的减少,故认为在AP早期的胰腺腺泡细胞内,自噬通过在胰蛋白酶原激活为胰蛋白酶过程中可能扮演一个不好的作用^[23]。本次研究我们观察AP后自噬相关基因Beclin1和LC3表达均增加,而且LC3和Beclin1的表达同ANP发生时间呈一定程度的相关性,随着时间的延长,LC3和Beclin1的表达逐渐升高,推测激活的LC3和Beclin1可能参与AP的早期发生过程。另外,通过对AMY、TNF- α 和胰腺的病理学检测,我们发现,随着时间延长,胰腺的炎症程度和病理改变增加,与相关报道一致^[30]。另外,随着AP的炎症程度增加,LC3和Beclin1表达也进一步增加,故认为ANP后LC3和Beclin1的升高与AP的炎症程度相关,推测ANP早期自噬的激活参与腺泡细胞的炎症过程,但自噬激活如何引起炎症因子的变化有待于进一步研究。

总之,LC3与Beclin1在5%牛黄胆酸钠诱导的ANP胰腺组织中的表达上调,且升高的程度与ANP的炎症程度相一致,提示自噬在ANP早期被激活,参与到ANP发生发展过程。但自噬激活的具体机制目前尚未完全明确,随着对自噬研究的不断深入,进一步阐明AP后自噬激活的机制,明确其在AP发生发展中的作用,从而为寻新的治疗靶点提供重要的理论依据。

4 参考文献

- 1 Klionsky DJ, Emr SD. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science* 2000; 290: 1717-1721

- 2 Levine B, Klionsky DJ. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell* 2004; 6: 463-477
- 3 Shintani T, Klionsky DJ. Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science* 2004; 306: 990-995
- 4 Liang XH, Jackson S, Seaman M, Brown K, Kempkes B, Hibshoosh H, Levine B. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature* 1999; 402: 672-676
- 5 Kihara A, Kabeya Y, Ohsumi Y, Yoshimori T. Beclin-phosphatidylinositol 3-kinase complex functions at the trans-Golgi network. *EMBO Rep* 2001; 2: 330-335
- 6 Mizushima N. Methods for monitoring autophagy. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36: 2491-2502
- 7 Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, Kominami E, Ohsumi Y, Yoshimori T. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosomal membranes after processing. *EMBO J* 2000; 19: 5720-5728
- 8 张明钧, 姚玮艳, 乔敏敏, 诸琦, 袁耀宗. 肠壁穿刺逆行胰胆管注射牛黄胆酸钠重症急性胰腺炎造模. *上海交通大学学报(医学版)* 2006; 26: 488-490
- 9 Duprez L, Wirawan E, Vanden Berghe T, Vandenabeele P. Major cell death pathways at a glance. *Microbes Infect* 2009; 11: 1050-1062
- 10 Monastyrska I, Klionsky DJ. Autophagy in organelle homeostasis: peroxisome turnover. *Mol Aspects Med* 2006; 27: 483-494
- 11 Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* 2008; 451: 1069-1075
- 12 Hippert MM, O'Toole PS, Thorburn A. Autophagy in cancer: good, bad, or both? *Cancer Res* 2006; 66: 9349-9351
- 13 Levine B. Cell biology: autophagy and cancer. *Nature* 2007; 446: 745-747
- 14 Tannous P, Zhu H, Nemchenko A, Berry JM, Johnstone JL, Shelton JM, Miller FJ, Rothermel BA, Hill JA. Intracellular protein aggregation is a proximal trigger of cardiomyocyte autophagy. *Circulation* 2008; 117: 3070-3078
- 15 Yang Q, She H, Gearing M, Colla E, Lee M, Shacka JJ, Mao Z. Regulation of neuronal survival factor MEF2D by chaperone-mediated autophagy. *Science* 2009; 323: 124-127
- 16 Hara T, Nakamura K, Matsui M, Yamamoto A, Nakahara Y, Suzuki-Migishima R, Yokoyama M, Mishima K, Saito I, Okano H, Mizushima N. Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* 2006; 441: 885-889
- 17 张喜平, 吴承钧, 李志军. 重症急性胰腺炎并发肺损伤的研究进展. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 299-306
- 18 Kylänpää ML, Repo H, Puolakkainen PA. Inflammation and immunosuppression in severe acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 2867-2872
- 19 Vaccaro MI. Autophagy and pancreas disease. *Pancreatol* 2008; 8: 425-429
- 20 Ohmuraya M, Yamamura K. Autophagy and acute pancreatitis: a novel autophagy theory for trypsinogen activation. *Autophagy* 2008; 4: 1060-1062
- 21 Fortunato F, Kroemer G. Impaired autophagosome-lysosome fusion in the pathogenesis of pancreatitis. *Autophagy* 2009; 5: 850-853
- 22 Levine B, Yuan J. Autophagy in cell death: an innocent convict? *J Clin Invest* 2005; 115: 2679-2688

■同行评价

本文内容详实,具有一定的临床借鉴意义,但科学性创新性一般。

- 23 Mareninova OA, Hermann K, French SW, O'Konski MS, Pandolfi SJ, Webster P, Erickson AH, Katunuma N, Gorelick FS, Gukovsky I, Gukovskaya AS. Impaired autophagic flux mediates acinar cell vacuole formation and trypsinogen activation in rodent models of acute pancreatitis. *J Clin Invest* 2009; 119: 3340-3355
- 24 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
- 25 Fortunato F, Bürgers H, Bergmann F, Rieger P, Büchler MW, Kroemer G, Werner J. Impaired autolysosome formation correlates with Lamp-2 depletion: role of apoptosis, autophagy, and necrosis in pancreatitis. *Gastroenterology* 2009; 137: 350-360, 360.e1-e5
- 26 Meijer AJ, Codogno P. Regulation and role of autophagy in mammalian cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36: 2445-2462
- 27 Friedman LS, Ostermeyer EA, Lynch ED, Szabo CI, Anderson LA, Dowd P, Lee MK, Rowell SE, Boyd J, King MC. The search for BRCA1. *Cancer Res* 1994; 54: 6374-6382
- 28 Takahashi Y, Coppola D, Matsushita N, Cualing HD, Sun M, Sato Y, Liang C, Jung JU, Cheng JQ, Mulé JJ, Pledger WJ, Wang HG. Bif-1 interacts with Beclin 1 through UVRAG and regulates autophagy and tumorigenesis. *Nat Cell Biol* 2007; 9: 1142-1151
- 29 Reggiori F, Klionsky DJ. Autophagosomes: biogenesis from scratch? *Curr Opin Cell Biol* 2005; 17: 415-422
- 30 Long J, Song N, Liu XP, Guo KJ, Guo RX. Nuclear factor-kappaB activation on the reactive oxygen species in acute necrotizing pancreatitis rats. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4277-4280

编辑 李薇 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011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;若正文中仅引用某文献中的论述,则在该论述的句末右上角注角码。如马连生^[1]报告……,潘伯荣等^[2-5]认为……;PCR方法敏感性高^[6-7]。文献序号作正文叙述时,用与正文同号的数字并排,如本实验方法见文献[8]。所引参考文献必须以近2-3年SCIE, PubMed,《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊为准,通常应只引用与其观点或数据密切相关的国内外期刊中的最新文献,包括世界华人消化杂志(<http://www.wjgnet.com/1009-3079/index.jsp>)和World Journal of Gastroenterology(<http://www.wjgnet.com/1007-9327/index.jsp>)。期刊:序号,作者(列出全体作者),文题,刊名,年,卷,起页-止页, PMID编号;书籍:序号,作者(列出全部),书名,卷次,版次,出版地,出版社,年,起页-止页。

电针足三里穴对不完全性肠梗阻大鼠小肠肌电活动的影响

杨拯, 李昆, 袁梦郎, 王超, 柏玲, 邱有波, 彭梅芳, 朱晓艳, 张林

杨拯, 成都医学院实验技术教研室 四川省成都市 610081
李昆, 王超, 彭梅芳, 朱晓艳, 中国人民解放军成都军区总医院全军医学中心基础实验室 四川省成都市 610083
袁梦郎, 邱有波, 成都医学院临床医学 四川省成都市 610081
柏玲, 中国人民解放军成都军区总医院康复理疗科 四川省成都市 610083

张林, 中国人民解放军成都军区总医院全军普外中心 四川省成都市 610083

杨拯, 在读硕士, 实验师, 主要从事疾病的发病机制及药物治疗与评价研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30872737

作者贡献分布: 杨拯、袁梦郎及张林对此文所作贡献均等; 此课题由张林设计; 研究过程由杨拯、李昆、袁梦郎、王超、柏玲、邱有波、彭梅芳、朱晓艳及张林操作完成; 研究所用试剂及分析工具由张林提供; 数据分析由袁梦郎、杨拯及张林完成; 本论文写作由杨拯、袁梦郎及张林完成。

通讯作者: 张林, 副主任医师, 610083, 四川省成都市, 中国人民解放军成都军区总医院全军普外中心, flysky8026@yahoo.com.cn

收稿日期: 2011-03-01 修回日期: 2011-03-31

接受日期: 2011-04-11 在线出版日期: 2011-04-28

Effect of electroacupuncture at Tsusanli on intestinal myoelectric activity in rats with incomplete intestinal obstruction

Zheng Yang, Kun Li, Meng-Lang Yuan, Chao Wang, Ling Bo, You-Bo Qiu, Mei-Fang Peng, Xiao-Yan Zhu, Lin Zhang

Zheng Yang, Department of Experimental Technology, Chengdu Medical College, Chengdu 610081, Sichuan Province, China
Kun Li, Chao Wang, Mei-Fang Peng, Xiao-Yan Zhu, Basic Laboratory of Medical Center, General Hospital of Chendu Military Area of Chinese PLA, Chengdu 610083, Sichuan Province, China

Meng-Lang Yuan, You-Bo Qiu, Clinical Medical College, Chengdu Medical College, Chengdu 610081, Sichuan Province, China

Ling Bo, Department of Physical Medicine and Rehabilitation, General Hospital of Chendu Military Area of Chinese PLA, Chengdu 610083, Sichuan Province, China

Lin Zhang, Department of Gastrointestinal Surgery, Center for General Surgery, General Hospital of Chendu Military Area of Chinese PLA, Chengdu 610083, Sichuan Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30872737

Correspondence to: Lin Zhang, Department of Gastrointestinal Surgery, Center for General Surgery, General Hospital of Chendu Military Area of Chinese PLA, Chengdu 610083, Sichuan Province, China. flysky8026@yahoo.com.cn

Received: 2011-03-01 Revised: 2011-03-31

Accepted: 2011-04-11 Published online: 2011-04-28

Abstract

AIM: To investigate the effect of electroacupunc-

ture at Tsusanli on the regulation of gastrointestinal motility in rats with incomplete intestinal obstruction.

METHODS: The 1/2 terminal ileum of rats with intestinal obstruction was ligated to generate a model of incomplete intestinal obstruction. Rats were randomly divided into control group ($n = 10$), sham-operated group ($n = 10$), intestinal obstruction group (IO group, $n = 10$), and intestinal obstruction + electroacupuncture group (14 d IO + EA subgroup, $n = 10$, 21 d IO + EA subgroup, $n = 10$). At 2 hours after the last treatment, changes in body weight and myoelectric slow wave activity in the ileum were recorded, and ileal histomorphological changes were observed with the unaided eyes.

RESULTS: Compared to the control group, rats of the IO group showed significant weight loss ($P < 0.01$). However, the body weight increased obviously in the IO+EA group compared to the IO group ($P < 0.01$). The amplitude (mV) for the myoelectric slow wave in the IO group on day 14 was significantly lower than that in the control group (0.11 ± 0.03 vs 0.35 ± 0.06 , $P < 0.01$), and the coefficient of variation (CV) of the mean frequency (%) and amplitude (%) was significantly higher in the IO group than in the control and sham-operated groups (27.71 ± 10.54 vs 14.08 ± 4.22 , 22.00 ± 6.24 ; 75.54 ± 8.59 vs 15.84 ± 1.49 , 20.67 ± 7.57 , all $P < 0.01$). After 14 days of electroacupuncture, the mean frequency for the myoelectric slow wave in the ileum in the IO + EA group was significantly higher than that in the IO group (33.18 ± 2.56 vs 24.01 ± 0.92 , $P < 0.01$). Compared to the IO group, the mean amplitude (mV) in the IO + EA group remarkably increased on day 5 (0.25 ± 0.09 vs 0.11 ± 0.03 , $P < 0.05$). The CV of frequency (%) in the IO + EA group was significantly lower than that in the IO group (17.02 ± 3.62 vs 27.71 ± 10.54 , $P < 0.05$). The CV of amplitude (%) in the IO + EA group was significantly lower than that in the IO group (58.39 ± 9.56 vs 75.54 ± 8.59 , $P < 0.01$). After 21 days of electroacupuncture, the mean frequency in the ileum in the IO + EA group significantly increased compared to the IO group (40.55 ± 5.29

■背景资料

肠梗阻会导致肠道平滑肌运动紊乱, 动物实验及临床实践都已证实针刺穴位联合电刺激对胃肠运动功能具有调理作用, 但作用机制至今尚未完全阐明。

■同行评议者

刘凤斌, 教授, 广州中医药大学第一附属医院消化内科

■研究前沿

随着近年来肠神经系统及穴位研究的深入,对电针作用机制的研究已渗透到整个消化系统,探讨电针对胃肠道功能障碍的影响已成为一新的研究热点。

vs 33.18 ± 2.56 , $P < 0.01$). Compared to the IO group, the CV of amplitude (%) in the IO + EA group was significantly lower (44.00 ± 11.61 vs 58.39 ± 9.56 , $P < 0.05$).

CONCLUSION: A rat model of incomplete intestinal obstruction could be generated by ligating the 1/2 terminal ileum of rats with intestinal obstruction. Electroacupuncture at Tsusanli exerts a therapeutic effect against incomplete intestinal obstruction by regulating intestinal myoelectric activity.

Key Words: Electroacupuncture; Tsusanli; Incomplete intestinal obstruction; Intestinal myoelectric activity; Slow wave; Experimental treatment

Yang Z, Li K, Yuan ML, Wang C, Bo L, Qiu YB, Peng MF, Zhu XY, Zhang L. Effect of electroacupuncture at Tsusanli on intestinal myoelectric activity in rats with incomplete intestinal obstruction. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(12): 1237-1243

摘要

目的: 探讨电针足三里穴对肠梗阻大鼠小肠肌电活动的影响。

方法: 采用非贯穿肠管的方式,末端回肠套环建立不完全性肠梗阻大鼠模型,将大鼠随机分为:空白对照组($n = 10$)、假手术组($n = 10$)、肠梗阻组(IO组, $n = 10$)、肠梗阻+电针组(14 d IO+EA组, $n = 10$, 21 d IO+EA组, $n = 10$)。造模成功后空白对照组、假手术组、IO组均未给予电针治疗措施,IO+EA组连续给予电针14 d、21 d电针治疗措施。最后1次电针后2 h,分别测体质量后打开腹腔,肉眼观察回肠组织形态学的改变,BL-420F生物机能实验系统测定回肠肌电。

结果: IO组大鼠体质量较空白对照组和假手术组显著降低($P < 0.01$), IO+EA组大鼠体质量较IO组显著升高($P < 0.01$)。回肠肌电慢波活动改变情况: 14 d IO组振幅(mV)低于空白对照组(0.11 ± 0.03 vs 0.35 ± 0.06 , $P < 0.01$), 且频率(%)、振幅(%)变异系数均明显高于空白对照组和假手术组(27.71 ± 10.54 vs 14.08 ± 4.22 , 22.00 ± 6.24 ; 75.54 ± 8.59 vs 15.84 ± 1.49 , 20.67 ± 7.57 , 均 $P < 0.01$); 电针实验治疗IO+EA组大鼠14 d后,梗阻段平均频率(次/min)均较IO组增加(33.18 ± 2.56 vs 24.01 ± 0.92 , $P < 0.01$); 平均振幅(mV)增大(0.25 ± 0.09 vs 0.11 ± 0.03 , $P < 0.05$); 频率变异系数(%)减少(17.02 ± 3.62 vs 27.71 ± 10.54 , $P < 0.05$); 振幅变异系数(%)减少(58.39 ± 9.56 vs 75.54 ± 8.59 ,

$P < 0.01$); 电针实验治疗21 d后,梗阻段平均频率(次/min)均较IO组增加(40.55 ± 5.29 vs 33.18 ± 2.56 , $P < 0.01$), 振幅变异系数(%)减少(44.00 ± 11.61 vs 58.39 ± 9.56 , $P < 0.05$)。

结论: 采用非贯穿肠管的方式能有效建立不完全性小肠梗阻模型; 电针足三里穴通过调节肠肌电,对大鼠不完全性肠梗阻实验性治疗有一定的效果,在一定程度上对肠梗阻大鼠的胃肠动力有较好的调节作用。

关键词: 电针; 足三里; 不完全性肠梗阻; 小肠肌电活动; 慢波; 实验治疗

杨拯, 李昆, 袁梦郎, 王超, 柏玲, 邱有波, 彭梅芳, 朱晓艳, 张林. 电针足三里穴对不完全性肠梗阻大鼠小肠肌电活动的影响. *世界华人消化杂志* 2011; 19(12): 1237-1243

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/1237.asp>

0 引言

不完全性肠梗阻是肠内容物在肠道中通过而受阻的一种疾病,是临床常见的急腹症之一。近年来发病率逐年升高,其中部分发生在医疗诊治过程中,或是因某些医疗行为而加重。肠管发生梗阻,不仅可引起肠管本身结构和功能的改变,并可导致全身性生理功能紊乱,严重时甚至发生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)而危及生命^[1,2]。由于不完全性肠梗阻手术风险大、并发症多,特别在多次腹部手术以及肠排列手术后的患者,难免复发,故在非绞窄性肠梗阻治疗时以非手术方法为主^[3]。近年来,电针因其符合简便、快捷、高效、安全的要求,避免药物所致不良反应,减少消化系的负担等方面具有重要的调节作用而受到重视^[4-6],且在临床治疗胃肠动力紊乱已取得一定疗效^[7,8],但是其基础研究尤其是促胃肠动力机制研究仍显不足。由于目前缺乏对电针深入的基础研究,在临床胃肠动力障碍治疗上无大样本、可靠的、随机对照的试验报告。用针刺穴位联合电刺激对不完全性肠梗阻的非手术治疗方法,目前国内鲜见类似报道。因此,有必要对其促进胃肠动力作用的物质基础及作用机制进行深入研究。基于上述理论和设想,为了进一步探讨电针对大鼠不完全性肠梗阻肠功能的调节作用。本研究采用电针足三里对大鼠不完全性肠梗阻模型进行实验性治疗,对不同肠段回肠肌电进行分

析, 观察其对大鼠不完全性肠梗阻肠组织形态学的影响, 以探讨其治疗效果, 希望能为临床治疗肠梗阻提供新的思路和途径, 也为电针在胃肠动力方面的临床应用提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料 SPF级Sprague-Dawley大鼠, 雌雄不分, 体质量 180 ± 10 g, 由中国人民解放军第三军医大学大坪医院野战外科研究所医学实验动物中心提供, 许可证号: SCXK(渝)2007-0005。在诱发肠梗阻前1 wk大鼠一般情况及活动、进食、大便质地如常。饲料为消毒的标准颗粒, 饮水为自来水。9 g/L氯化钠注射液(NS), 安徽双鹤药业有限责任公司, 批号1001021E; 戊巴比妥钠(德国进口分装), 北京化学试剂公司, 批号090205; 注射用青霉素钠, 石药集团中诺药业(石家庄)有限公司产品, 批号09119209; BL-420F生物机能实验系统(成都泰盟科技有限公司); HANS-100A韩氏治疗仪(联创科技(集团)南京济生医疗科技有限公司); 自制银丝电极, 长5 mm, 直径0.1 mm; 剪取长度为1 cm的一次性使用乳胶胆管引流管(24型T管, 江苏南通安琪医疗用品有限公司, 批号20100904)作为套环。

1.2 方法

1.2.1 分组及造模: SD大鼠60只, 随机均分成正常组(空白对照组, $n = 12$)、假手术组($n = 12$)、肠梗阻组(IO组, $n = 12$)、肠梗阻+电针组(14 d IO+EA组, $n = 12$, 21 d IO+EA组, $n = 12$)。空白对照组不给予任何处理措施, 其余组动物实验前禁食24 h, 自由饮水, 以1.5%戊巴比妥钠按照2 mL/kg进行腹腔注射麻醉。麻醉后将大鼠仰卧固定于手术板上, 腹部剪毛, 经碘伏消毒皮肤, 铺无菌纱布。在大鼠尿道外口沿腹白线左侧1-2 mm向上2 cm处作长度为1 cm的无菌皮切口, 逐层解剖打开腹腔, 于回盲部5-7 cm处, 将回肠拉出。假手术组将肠拉出用1 cm套环穿过肠系膜套在回肠上后取下套环将回肠放回腹腔; IO组和IO+EA组于手术部位用1 cm套环穿过肠系膜套在回肠上, 并将套环缺口处缝合2针, 再将其放回腹腔, 其间为防止肠粘连可用棉签蘸取少量温生理盐水涂在肠管表面。术后用鼠笼单独清洁饲养, 前2 d禁食, 饮水少量, 每日注射1次青霉素(1 mL), 补充2次葡萄糖生理盐水(每次2.5 mL)。于第3天开始, 每日喂食5-10 g, 少量多次, 喂水足量, 28 d后打开腹腔, 取出套环, 开始干预治疗。

1.2.2 动物治疗: 大鼠造模成功后, IO组剩余10只

(中途死亡2只), 14 d IO+EA组剩余10只(中途死亡2只), 21 d IO+EA组剩余10只(中途死亡2只)。其后2 d禁食, 1 d禁水, 每日1次注射1 mL青霉素, 补充2次葡萄糖生理盐水(2.5 mL/次)。于清醒安静情况下, 用1寸毫针针刺IO+EA组双侧足三里穴位。足三里穴定位于大鼠后肢小腿背外侧上1/5折点处, 约于腓骨小头下0.3 cm胫骨嵴后0.1 cm, 直刺0.5 cm。将针柄分别连接至HANS-100A韩氏治疗仪的电极上, 以大鼠下肢肌肉轻微颤动为度, 每次治疗15 min。分别连续电针14、21 d。期间每天正常喂食喂水, 称体质量1次, 并持续观察动物一般情况及粪便性状。

1.2.3 在体回肠肌电测定: 分别于第42天、第49天, 最后1次电针后2 h以1.5%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉(2 mL/kg), 备皮、消毒后于造模开口部位打开腹腔, 分别在距回盲部10、6、2 cm回肠处平行安置一对银丝电极, 两电极相距约0.5 cm, 电极的一端固定于肠壁浆肌层内, 参考电极夹于皮下, 石蜡绝缘纱布覆盖腹腔, 另一端经导线引出经生物电放大器引入到BL-420F生物机能实验系统。10 min后开始记录慢波, 灵敏度选择: 扫描速度设为1.00 s/div, 电增益为2 mV, 时间常数3 s, 高频滤波20 Hz, 连续记录30 min。改良Tomita法^[9]将每只大鼠肌电的记录结果1 min作为1个时间段, 每个数据样本剪接基线平稳的波形, 随机截取10个时间段, 对所比较分析的波形取相同的下限, 分别计算每只大鼠肌电的频率和振幅的均值、标准差及变异系数, 再取各组均值、标准差及变异系数进行比较。慢波频率变异系数(%) = 慢波频率标准差/慢波频率均值 $\times 100\%$, 慢波振幅变异系数(%) = 慢波振幅标准差/慢波振幅均值 $\times 100\%$ 。

统计学处理 实验数据以mean \pm SD表示, 由SPSS17.0统计软件包分析处理数据, 各组间数据统计学差异进行单因素方差分析(One-way ANOVA), 先用Levene方法进行方差齐性检验, 若样本所来自总体符合方差齐性要求, 则对其进行方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义, $P < 0.01$ 为差异有显著性统计学意义。再用Student-Newman-Keuls(SNK)法对每组数据进行两两比较。若样本所来自总体的方差不齐, 采用非参数检验(Kruskal-Wallis检验), 若差别具有统计学意义, 则对数据进行秩变换分析, 进行各组间两两比较。

2 结果

2.1 大鼠体质量、粪便性状和肉眼组织形态学

■ 相关报道

Chang等研究表明回肠不完全性梗阻小鼠的梗阻近段肠慢波减少、振幅降低, 均提示慢波异常与肠运动功能障碍有关。

■创新盘点

本实验采用大鼠末端回肠套环,非贯穿肠管的方式成功建立不完全性小肠机械性梗阻模型后,给予足三里穴电针治疗,观察电针足三里穴促进不完全性肠梗阻大鼠在体回肠肌电恢复的作用,并对其作用机制进行了初步探讨。

表 1 电针足三里不同治疗时间对肠梗阻大鼠各段回肠肌电影响的测定 (mean \pm SD, $n = 10$)

分组	频率(次/min)	频率变异系数(%)	振幅(mV)	振幅变异系数(%)
梗阻上段				
空白对照组	30.75 \pm 3.30	8.54 \pm 2.23	0.26 \pm 0.02	8.54 \pm 3.62
假手术组	25.09 \pm 3.48	18.00 \pm 7.21 ^f	0.28 \pm 0.21	8.00 \pm 7.55
14 d IO组	24.95 \pm 1.76	41.99 \pm 3.55 ^{fh}	0.17 \pm 0.02	62.38 \pm 2.44 ^{fh}
14 d IO+EA组	32.76 \pm 3.23 ^{ag}	28.50 \pm 3.56 ^{bfn}	0.42 \pm 0.14 ^{be}	34.89 \pm 6.15 ^{bfn}
21 d IO+EA组	36.81 \pm 6.59 ^{eh}	19.14 \pm 4.13 ^{df}	0.38 \pm 0.08	24.21 \pm 8.17 ^{df}
梗阻段				
空白对照组	27.33 \pm 4.62	14.08 \pm 4.22	0.35 \pm 0.06	15.84 \pm 1.49
假手术组	19.90 \pm 2.56 ^e	22.00 \pm 6.24	0.21 \pm 0.02	20.67 \pm 7.57
14 d IO组	24.01 \pm 0.92	27.71 \pm 10.54 ^f	0.11 \pm 0.03 ^f	75.54 \pm 8.59 ^{fh}
14 d IO+EA组	33.18 \pm 2.56 ^{beh}	17.02 \pm 3.62 ^a	0.25 \pm 0.09 ^a	58.39 \pm 9.56 ^{bfn}
21 d IO+EA组	40.55 \pm 5.29 ^{dhn}	12.13 \pm 5.64 ^g	0.27 \pm 0.11	44.00 \pm 11.61 ^{chn}
梗阻下段				
空白对照组	24.00 \pm 1.73	7.96 \pm 1.79	0.28 \pm 0.10	36.84 \pm 2.56
假手术组	23.01 \pm 0.39	6.67 \pm 6.35	0.24 \pm 0.07	16.00 \pm 6.25 ^{fh}
14 d IO组	23.06 \pm 2.58	24.43 \pm 3.79 ^{fh}	0.14 \pm 0.02	60.46 \pm 3.10 ^{fh}
14 d IO+EA组	33.14 \pm 5.10 ^{ag}	24.52 \pm 2.84 ^{fh}	0.37 \pm 0.07 ^b	62.46 \pm 11.10 ^{fh}
21 d IO+EA组	44.21 \pm 8.83 ^{dhn}	21.35 \pm 5.90 ^{fh}	0.36 \pm 0.12	46.80 \pm 16.45 ^{ch}

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 14 d IO组; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs 14 d IO+EA组; ^e $P < 0.05$, ^f $P < 0.01$ vs 空白对照组; ^g $P < 0.05$, ^h $P < 0.01$ vs 假手术组。

的改变 在造模期间, IO组和IO+EA组大鼠活动减少, 大多数反应迟钝, 饮食量减少, 便秘甚至出现排便困难, 少部分精神萎靡。套环后第7天体质量下降明显, 较空白对照组和假手术组显著降低($P < 0.01$), 套环10 d后IO组、14 d IO+EA组和21 d IO+EA组分别死亡2只, 剖析死亡原因, 观察到大鼠胃潴留明显, 肠壁充血肿胀明显, 部分肠粘连, 肠系膜血管网充血明显。取下套环给予治疗措施后, 部分IO+EA组大鼠能正常饮食, 大部分大鼠精神恢复, 排稀便。各时间点打开大鼠腹腔, 肉眼观察到回肠梗阻部病变均有明显改善。IO+EA组大鼠在电针14 d后可见部分肠管扩张, 轻度胃潴留, 肠系膜血管网清晰, 肠腔内可见少量颗粒状粪便和部分黄色黏液样稀便, 21 d后上述症状明显改善。假手术组部分出现轻度肠粘连, 空白对照组无上述明显症状改变。

2.2 回肠肌电测定 分别测定每只大鼠造模的上、中、下三段的回肠肌电变化(表1)。发现14 d IO组(图1-3C)平均频率低于空白对照组(图1-3A, $P > 0.05$), 振幅明显低于空白对照组($P < 0.01$), 且变异系数均明显高于空白对照组和假手术组(图1-3B, $P < 0.01$)。用电针实验治疗IO+EA组大鼠14 d后, 梗阻段慢波出现少数切迹的正弦波样曲线(图2D), 平均频率、振幅较IO组(图2C)均明显增大($P < 0.01$), 频率、振幅变异系数均减少, 但

振幅变异更明显($P < 0.01$); 分别对其上、下段测定, 观察到上段肠段平均频率、振幅较IO组(图1C)均增大($P < 0.01$), 频率、振幅变异系数均减少($P < 0.01$); 下段肠段平均频率、振幅较IO组(图3C)也增大($P < 0.01$), 但频率、振幅变异系数均增加。治疗21 d后梗阻段平均频率、振幅较14 d IO+EA组均增大, 频率明显增加($P < 0.01$)、振幅变异系数明显减少($P < 0.01$), 且表现为规则的近似正弦波样曲线(图2E); 并对其上、下段进行测定, 观察到上段肠段(图1E)平均频率较IO组增加, 平均振幅较IO组略微减少($P > 0.05$), 频率、振幅变异系数均明显减少($P < 0.01$); 下段肠段(图3E)平均振幅较14 d IO+EA组无明显变化, 但平均频率明显增加($P < 0.01$), 振幅变异系数减少($P < 0.05$), 频率变异系数保持稳定($P > 0.05$)(快波的干扰较大, 因此未对其分析)。

3 讨论

既往建立不完全性肠梗阻动物模型常常采用肠壁部分缝合或丝线结扎肠管, 不仅不容易控制每次操作的结扎程度, 造成不同动物个体之间梗阻程度差异较大, 而且对肠壁造成直接创伤或丝线移位, 从而影响实验结果。因此我们采用大鼠末端回肠套环, 非贯穿肠管的方式建立不完全性小肠机械性梗阻模型, 防止造成肠壁过

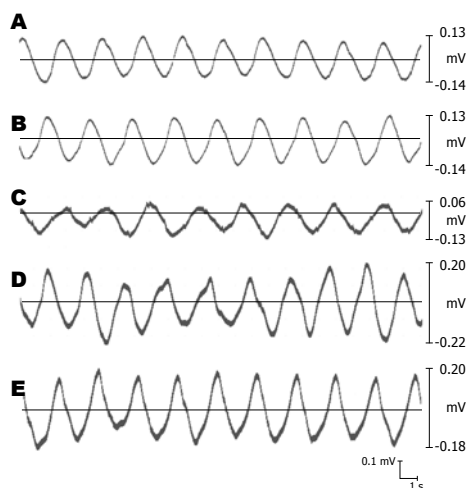


图 1 梗阻上段回肠平滑肌电活动情况. A: 空白对照组; B: 假手术组; C: 14 d IO组; D: 14 d IO+EA组; E: 21 d IO+EA组.

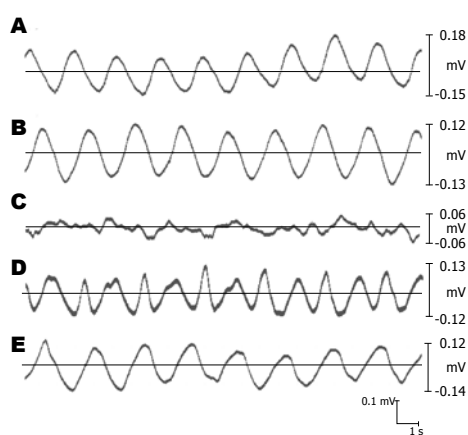


图 2 梗阻中段回肠平滑肌电活动情况. A: 空白对照组; B: 假手术组; C: 14 d IO组; D: 14 d IO+EA组; E: 21 d IO+EA组.

度损伤和机体不会出现对医用套环的过敏性. 经过上述方法处理后, 可以观察到肠梗阻后大鼠精神不振, 饮食量减少, 大便减少, 体质量减轻. 剖检后, 观察到大鼠梗阻部位以上胃潴留明显, 小肠肠腔扩张、瘀血, 蠕动减慢或消失, 颜色变暗, 梗阻部位以下肠管瘪陷、空虚或仅有少量内容物. 且对其进行肌电慢波的测定, 我们发现, 肠梗阻后回肠慢波频率和振幅均低于正常组, 且其变异系数均明显高于正常组, 说明该肠梗阻模型在一般情况、组织形态学和肠肌电等病理、生理方面满足不完全性肠梗阻的基本表现, 同Chang等^[10]的研究结果相同, 且与人类不完全机械性肠梗阻亦有相似之处, 可作为进一步研究不完全性肠梗阻的手段^[11].

小肠是维持人体正常生理活动的重要器官, 同时也是人体内最大的细菌及内毒素的储存库. 肠梗阻后, 由于受细菌移位、肠道机会性

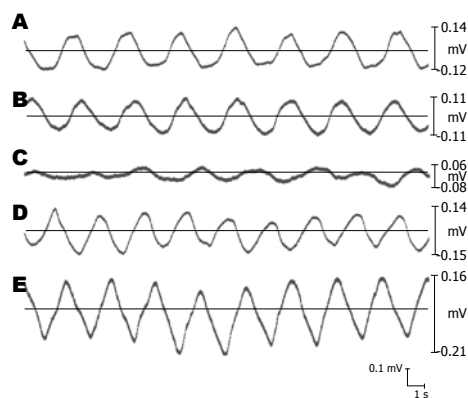


图 3 梗阻下段回肠平滑肌电活动情况. A: 空白对照组; B: 假手术组; C: 14 d IO组; D: 14 d IO+EA组; E: 21 d IO+EA组.

感染、肠动力性能改变等因素的影响^[12,13], 肠道的运动、吸收及分泌功能, 伴随肌电均发生改变. 近年来的研究认为, 肠肌电活动可作为反映肠功能的一项客观电生理指标, 主要表现为慢波和动作电位两种电活动^[14,15]. 动作电位产生于慢波之上, 与平滑肌收缩相一致, 是产生推进性收缩的主要始动因素^[16], 但动作电位易受肠神经系统、肠道激素及肽类物质调控等多种因素的影响, 受到的干扰较大, 因此我们对慢波进行了分析. 慢波是相对规律的一种周期性电活动, 是肠平滑肌动作电位的基础. Shafik等^[14]发现肠易激综合征患者肠慢波节律不规整, 变异性增加; Chang等^[10]研究表明回肠不完全性梗阻小鼠的梗阻近段肠慢波减少、振幅降低, 均提示慢波异常与肠运动功能障碍有关.

动物实验及临床实践都已证实, 针刺穴位联合电刺激对消化系的运动、分泌功能具有调理作用, 且其对胃肠道的调控是双相性的, 对正常状态下的小肠不明显而对于病理状态下的小肠更为明显, 但作用机制至今尚未完全阐明^[17-19]. 我们取下套环给予足三里穴电针治疗后, 部分梗阻组大鼠能正常饮食, 大部分大鼠精神恢复, 排稀便. 各时间点打开大鼠腹腔, 肉眼观察到回肠梗阻部病变均有明显改善, 对其进行肌电慢波的测定, 结果发现, 电针足三里穴可以在一定程度上良性改变回肠梗阻大鼠的慢波频率、振幅及变异系数. 治疗14 d后慢波呈双峰型, 部分有切迹, 且波形较不稳定, 但平均频率、振幅均有改善. 21 d后慢波表现为规则的近似正弦波样曲线, 平均频率、振幅均得到明显改善. 我们应用变异系数这一参数来反映同结段不同组别频率和振幅的差异, 用于衡量不同组别回肠慢波节律的稳定性, 结果发现经电针治疗后, IO+EA

应用要点

电针能改善肠梗阻后形态学异常的结构变化, 改善由于肠肌电紊乱的运动功能障碍, 治疗肠梗阻具有良好疗效. 本实验为电针治疗不完全性肠梗阻的研究提供新的思路和方法, 开拓新的研究领域, 为肠梗阻的治疗积累基础研究资料, 并将为临床应用提供证据.

■同行评价

本文创新性较好,初步阐明了针刺的部分机制,具有一定的临床实用意义。

组回肠慢波频率及振幅的变异系数均显著低于IO组,表明电针能逐渐改善梗阻大鼠的肠慢波节律紊乱。慢波频率、振幅异常可能是导致肠蠕动减慢的重要因素,电针可恢复肠梗阻大鼠异常的肠慢波频率和振幅,这可能是电针治疗肠梗阻的重要机制之一。

慢性不完全性肠道梗阻,还可能导致肠神经系统的损坏^[20,21],使得在慢波基础上产生的动作电位振幅和频率受到影响,阻碍了肠道平滑肌的收缩^[22]。针刺穴位联合电刺激通过生理、生化途径,调整肠梗阻后神经系统、内分泌系统的平衡,改善小肠平滑肌电生理状态,从而最终能调整小肠运动,达到治疗肠梗阻等一系列胃肠疾病^[23]。鉴于肠道神经支配及运动调节的特点,植物神经系统可能在调节小肠运动中发挥了重要作用^[24]。而本实验中电针效应出现较快也提示其通过神经途径发挥效应的可能性较大。随着近年来肠神经系统及穴位研究的深入,对电针作用机制的研究已渗透到整个消化系统,探讨电针对胃肠道功能障碍的影响已成为一新的研究热点,也对术后胃肠无力、胃瘫、术后早期炎性肠梗阻等适应证的治疗提供了基础^[25,26],并不断为电针的作用机制增添新的内容。针刺穴位联合电刺激具体怎样通过神经体液机制发挥对胃肠道的调控作用尚有待探索、研究。

总之,本实验成功建立了大鼠不完全性肠梗阻的动物模型,并对其进行实验性治疗,表明电针足三里穴能够改善肠梗阻时形态学异常的结构变化,并通过调节肠肌电,促进回肠功能恢复。以上提示电针能有效治疗大鼠不完全性肠梗阻后肠运动功能障碍,但是可能还有其他的生物学效应,未能在本实验中得到充分的验证,因此有待今后更加深入地研究来逐步阐明。相信随着对电针及穴位研究的不断深入和拓展,将有可能为肠梗阻等胃肠疾病的治疗开辟新途径。

4 参考文献

- 1 Tsumura H, Ichikawa T, Hiyama E, Murakami Y, Sueda T. Systemic inflammatory response syndrome (SIRS) as a predictor of strangulated small bowel obstruction. *Hepatogastroenterology* 2004; 51: 1393-1396
- 2 Shiomi H, Shimizu T, Endo Y, Murata S, Kurumi Y, Uji Y, Tani T. Relations among circulating monocytes, dendritic cells, and bacterial translocation in patients with intestinal obstruction. *World J Surg* 2007; 31: 1806-1812
- 3 Beevi SS, Narasu ML, Gowda BB. Polyphenolics profile, antioxidant and radical scavenging activity of leaves and stem of *Raphanus sativus* L. *Plant Foods Hum Nutr* 2010; 65: 8-17
- 4 Fukazawa Y, Maeda T, Kishioka S. The pharmacological mechanisms of electroacupuncture. *Curr Opin Investig Drugs* 2009; 10: 62-69
- 5 Yin J, Chen J, Chen JD. Ameliorating effects and mechanisms of electroacupuncture on gastric dysrhythmia, delayed emptying, and impaired accommodation in diabetic rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2010; 298: G563-G570
- 6 Luo D, Liu S, Xie X, Hou X. Electroacupuncture at acupoint ST-36 promotes contractility of distal colon via a cholinergic pathway in conscious rats. *Dig Dis Sci* 2008; 53: 689-693
- 7 Chang CS, Ko CW, Wu CY, Chen GH. Effect of electrical stimulation on acupuncture points in diabetic patients with gastric dysrhythmia: a pilot study. *Digestion* 2001; 64: 184-190
- 8 Shen LP, Guan J, Ding KY. [Clinical observation on electroacupuncture combined with acupoint injection for treatment of early postoperative inflammatory intestinal obstruction]. *Zhongguo Zhenjiu* 2010; 30: 27-30
- 9 Tomita R. Regulation of the peptidergic nerves (substance P and vasoactive intestinal peptide) in the colon of women patients with slow transit constipation: an in vitro study. *Hepatogastroenterology* 2008; 55: 500-507
- 10 Chang IY, Glasgow NJ, Takayama I, Horiguchi K, Sanders KM, Ward SM. Loss of interstitial cells of Cajal and development of electrical dysfunction in murine small bowel obstruction. *J Physiol* 2001; 536: 555-568
- 11 Zashikhin AL, Sehlin J, Barmina AO. [Reactive changes in the smooth muscle tissue of the rat small intestine during experimental intestinal obstruction]. *Morfologiya* 2010; 137: 48-53
- 12 Berg RD. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. *Adv Exp Med Biol* 1999; 473: 11-30
- 13 Liao D, Zhao J, Gregersen H. 3d Mechanical properties of the partially obstructed guinea pig small intestine. *J Biomech* 2010; 43: 2079-2086
- 14 Shafik A, El-Sibai O, Shafik AA, Ahmed I. Electric activity of the colon in irritable bowel syndrome: the 'tachyarrhythmic' electric pattern. *J Gastroenterol Hepatol* 2004; 19: 205-210
- 15 Seidl H, Gundling F, Pehl C, Kissler S, Schepp W, Schmidt T. Multiple intraluminal impedance measurement and manometry in the jejunum of healthy subjects: a new tool for diagnosis of small bowel motility. *Digestion* 2010; 81: 172-180
- 16 Seidel SA, Hegde SS, Bradshaw LA, Ladipo JK, Richards WO. Intestinal tachyarrhythmias during small bowel ischemia. *Am J Physiol* 1999; 277: G993-G999
- 17 Yin J, Chen JD. Gastrointestinal motility disorders and acupuncture. *Auton Neurosci* 2010; 157: 31-37
- 18 Dawidson I, Angmar-Månsson B, Blom M, Theodorsson E, Lundberg T. The influence of sensory stimulation (acupuncture) on the release of neuropeptides in the saliva of healthy subjects. *Life Sci* 1998; 63: 659-674
- 19 Li XP, Yan J, Yi SX, Chang XR, Lin YP, Yang ZB, Huang A, Hu R. Effect of electroacupuncture on gastric mucosal intestinal trefoil factor gene expression of stress-induced gastric mucosal injury in rats. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 1962-1965
- 20 Kapur RP. Neuropathology of paediatric chronic intestinal pseudo-obstruction and related animal models. *J Pathol* 2001; 194: 277-288

- 21 Di Nardo G, Stanghellini V, Cucchiara S, Barbara G, Pasquinelli G, Santini D, Felicani C, Grazi G, Pinna AD, Cogliandro R, Cremon C, Gori A, Corinaldesi R, Sanders KM, De Giorgio R. Enteric neuropathology of congenital intestinal obstruction: A case report. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 5229-5233
- 22 Ward SM, McLaren GJ, Sanders KM. Interstitial cells of Cajal in the deep muscular plexus mediate enteric motor neurotransmission in the mouse small intestine. *J Physiol* 2006; 573: 147-159
- 23 Liao JM, Lin CF, Ting H, Chang CC, Lin YJ, Lin TB. Electroacupuncture at Hoku elicits dual effect on autonomic nervous system in anesthetized rats. *Neurosci Res* 2002; 42: 15-20
- 24 Kuznetsov IA. [Long-term block of thoracic vegetative nerve trunks in combined treatment of acute intestinal obstruction]. *Khirurgiia* (Mosk) 2002; : 49-51
- 25 Ouyang H, Xing J, Chen J. Electroacupuncture restores impaired gastric accommodation in vagotomized dogs. *Dig Dis Sci* 2004; 49: 1418-1424
- 26 Chen J, Song GQ, Yin J, Koothan T, Chen JD. Electroacupuncture improves impaired gastric motility and slow waves induced by rectal distension in dogs. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008; 295: G614-G620

编辑 李薇 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011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496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。

吴茱萸碱联合CDK1抑制剂RO3306对鼠结肠癌CT26的协同杀伤作用

崔娟, 吴映雅, 谭宇蕙, 张广献, 杜标炎, 常金荣

■背景资料

吴茱萸碱是中药吴茱萸的有效成分之一, 近年研究发现, 吴茱萸碱对多种恶性肿瘤细胞具有较强的体外杀伤和诱导凋亡作用, 且起效浓度较低, 具有一定临床应用前景。

崔娟, 吴映雅, 谭宇蕙, 张广献, 广州中医药大学生化教研室 广东省广州市 510006

杜标炎, 广州中医药大学病理教研室 广东省广州市 510006
常金荣, 广州中医药大学中医基础公共实验室 广东省广州市 510006

崔娟, 在读硕士, 主要从事中西医结合肿瘤防治的基础研究。

国家自然科学基金面上资助项目, No. 30973811

作者贡献分布: 此课题由谭宇蕙设计; 本文所述内容的实验过程由崔娟操作; 吴映雅、谭宇蕙具体指导; 张广献与常金荣协助指导完成; 数据分析由崔娟、吴映雅及谭宇蕙共同完成; 本论文写作由崔娟与吴映雅执笔初稿; 谭宇蕙修改; 杜标炎审阅。

通讯作者: 谭宇蕙, 教授, 510006, 广东省广州市番禺区大学城外环东路232, 广州中医药大学生物化学教研室。

tyuhui@gzhtcm.edu.cn

电话: 020-39358005

收稿日期: 2011-02-16 修回日期: 2011-03-29

接受日期: 2011-04-11 在线出版日期: 2011-04-28

Synergistic killing effect of evodiamine combined with RO3306, a CDK1 inhibitor, on murine colon cancer CT26 cells

Juan Cui, Ying-Ya Wu, Yu-Hui Tan, Guang-Xian Zhang, Biao-Yan Du, Jin-Rong Chang

Juan Cui, Ying-Ya Wu, Yu-Hui Tan, Guang-Xian Zhang, Department of Biochemistry, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, Guangdong Province, China

Biao-Yan Du, Department of Pathology, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, Guangdong Province, China

Jin-Rong Chang, Public Laboratory Center of Basic Chinese Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, Guangdong Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30973811

Correspondence to: Professor Yu-Hui Tan, Department of Biochemistry, Guangzhou University of Chinese Medicine, 232 East Daxuecheng Waihuan Road, Panyu District, Guangzhou 510006, Guangdong Province, China. tyuhui@gzhtcm.edu.cn

Received: 2011-02-16 Revised: 2011-03-29

Accepted: 2011-04-11 Published online: 2011-04-28

Abstract

AIM: To explore whether there is a synergistic effect between evodiamine (EVO) and RO3306, a specific cyclin-dependent kinase 1 (CDK1) inhibitor, on the proliferation and apoptosis of

murine colon cancer CT26 cells.

METHODS: The inhibitory effect of EVO on the proliferation of CT26 cells was determined by MTT assay to calculate IC_{50} at 24 h and the time required for the induction of irreversible apoptosis. The inhibitory effect of combination treatment with EVO and RO3306 either in a simultaneous or sequential way (pretreatment with EVO for 24 h followed by addition of RO3306 for another 6 h) on cell proliferation was also detected. CT26 cells were divided into six groups: control group, 2 mg/L EVO group, 4 mg/L EVO group, 15 mg/L RO3306 group, 2 mg/L EVO + 15 mg/L RO3306 group, and 4 mg/L EVO + 15 mg/L RO3306 group. Colony-forming assay and flow cytometry (FCM) assay were used to detect the effect of these treatments on cell proliferation and apoptosis. q -value analysis was used to estimate the synergistic effect of evodiamine and RO3306. A q value of ≥ 1.15 indicates synergism.

RESULTS: Treatment with EVO alone for 24 h had a significant inhibitory effect on CT26 cell proliferation, and IC_{50} was around 10.8 mg/L. The time required for the induction of irreversible apoptosis was 24 h. Combination treatment with EVO and RO3306 in a sequential way resulted in the rates of reduced proliferation of $22.0 \pm 4.4\%$, $30.4 \pm 3.2\%$, $12.3 \pm 4.8\%$, $48.0 \pm 3.2\%$, and $62.2 \pm 2.2\%$ in each treatment group. The q values of the two sequential treatment groups were 1.52 and 1.60, while those of simultaneous treatment groups were 0.68 and 0.72, respectively. Colony-forming assay showed the reduced rates of colony formation were $9.7 \pm 5.8\%$, $38.9 \pm 3.8\%$, $10.8 \pm 3.7\%$, $29.8 \pm 10.7\%$, and $68.3 \pm 12.7\%$ in each treatment group. The q values of the two sequential treatment groups were 1.41 and 1.47. FCM assay showed that the apoptotic rates were $5.5 \pm 1.1\%$, $18.3 \pm 1.9\%$, $25.6 \pm 1.5\%$, $9.2 \pm 1.1\%$, $39.1 \pm 9.8\%$, and $54.6 \pm 1.2\%$ in each group ($q > 1.15$).

CONCLUSION: The time required for induction of irreversible apoptosis of CT26 cells by EVO is

■同行评议者

牛英才, 副研究员, 齐齐哈尔医学院医药科学研究所

around 24 h and the inhibitory effect was dose-dependent. EVO exhibited a significant synergistic inhibitory effect with RO3306 on CT26 cell proliferation in a sequential treatment regime but not in a simultaneous treatment manner.

Key Words: Evodiamine; CDK1 inhibitor; Apoptosis; Mitotic arrest; Mitotic slippage

Cui J, Wu YY, Tan YH, Zhang GX, Du BY, Chang JR. Synergistic killing effect of evodiamine combined with RO3306, a CDK1 inhibitor, on murine colon cancer CT26 cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(12): 1244-1250

摘要

目的: 探讨吴茱萸碱(EVO)联合CDK1的特异抑制剂RO3306对鼠结肠癌细胞CT26的生长抑制、诱导凋亡是否有协同增效作用。

方法: 采用MTT法求出EVO对CT26作用24 h的 IC_{50} 及诱导CT26细胞发生不可逆凋亡的时间点, 比较EVO和RO3306同时用药与序贯用药(EVO先作用24 h, 再加入RO3306共同作用6 h)对CT26细胞的抑制作用。采用金正均 q 值法检验其联合作用是否有协同性(q 为实际药效与理论药效比值, $q>1.15$ 为协同性)。同时用药实验与序贯用药实验的分组情况均为对照组、2 mg/L EVO组, 4 mg/L EVO组, 15 mg/L RO3306组(加药时间同相应联合组), 2 mg/L EVO+15 mg/L RO3306联合组, 4 mg/L EVO+15 mg/L RO3306联合组。采用克隆集落形成法检测药物单独和联合作用下对CT26细胞的抑制率。采用流式细胞术检测药物作用对CT26凋亡率的影响。

结果: MTT法结果显示EVO对结肠癌细胞CT26具有显著抑制作用, 其抑制作用有明显的浓度依赖性, 作用24 h的 IC_{50} 为10.8 mg/L; EVO诱导CT26细胞进入不可逆凋亡的时间点在24 h左右。MTT检测EVO和RO3306序贯用药的各组抑制率依次分别是22.0% \pm 4.4%、30.4% \pm 3.2%、12.3% \pm 4.8%、48.0% \pm 3.2%、62.2% \pm 2.2%(序贯用药联合组 $q=1.52, 1.60>1.15$, 同时加药联合组 $q=0.68, 0.72$)。克隆集落形成法显示相应各组的抑制率依次分别是9.7% \pm 5.8%、38.9% \pm 3.8%、10.8% \pm 3.7%、29.8% \pm 10.7%、68.3% \pm 12.7%($q>1.15$)。流式细胞术显示各组细胞凋亡率依次分别是5.5% \pm 1.1%、18.3% \pm 1.9%、25.6% \pm 1.5%、9.2% \pm 1.1%、39.1% \pm 9.8%、54.6% \pm 1.2%($q>1.15$)。

结论: EVO能抑制鼠结肠癌细胞CT26的生长,

其作用呈剂量依赖关系, EVO诱导CT26发生不可逆凋亡的时间点约在24 h左右; EVO联合CDK1抑制剂RO3306并序贯用药对CT26的抑制作用具有协同增效效应, 同时加药联合作用未显示协同性。

关键词: 吴茱萸碱; CDK1抑制剂; 细胞凋亡; M期阻滞; M期滑移

崔娟, 吴映雅, 谭宇慧, 张广献, 杜标炎, 常金荣. 吴茱萸碱联合CDK1抑制剂RO3306对鼠结肠癌CT26的协同杀伤作用. *世界华人消化杂志* 2011; 19(12): 1244-1250

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/1244.asp>

0 引言

结肠癌是消化系常见的恶性肿瘤之一, 随着生活水平的不提高, 结肠癌发病率有不断上升的趋势。结肠癌治疗目前仍以手术治疗为主, 但患者术后生活质量差, 复发和转移率高^[1-4]。大量的研究表明, 中医药或中西医结合能提高恶性肿瘤疗效, 同时能减轻放化疗的不良反应。中药的某些有效成分能有效地抑制肿瘤细胞生长^[5-8]。吴茱萸碱(evodiamine, EVO)为中药吴茱萸的一种有效成分^[9-13]。近年来不少研究发现, EVO对多种恶性肿瘤细胞具有较强的体外杀伤和诱导凋亡作用^[14-17], 且起效浓度较低, 具有一定临床应用前景^[18-20]。本研究组前期研究表明, EVO能使细胞阻滞于G₂/M期, 可能诱导M期阻滞(M-arrest)^[21-25]。最近有研究发现, 对药物诱导下已发生M期阻滞的细胞, 通过加入CDK1抑制剂以诱导其发生M期滑移(M-slippage), 可大大提高肿瘤细胞的凋亡率, 也就是说相继诱导M期阻滞与M期滑移的两种药物可能具有协同性诱导凋亡效应^[26-30]。RO3306, 喹啉噻唑啉酮(quinolinyl thiazolinone)的一种衍生物, 是CDK1的特异抑制剂^[31-33]。本研究把EVO和RO3306联合且序贯用药, 探讨其是否能协同诱导肿瘤细胞凋亡, 增强EVO对肿瘤细胞的杀伤力。

1 材料和方法

1.1 材料 小鼠结肠癌细胞株CT26购自ATCC; RPMI 1640和2.5 g/L含EDTA的胰酶购自Gibco公司; 小牛和胎牛血清购自PAA公司, 青、链霉素溶液购自杭州吉诺生物技术有限公司; MTT和二甲基亚砜(DMSO)均为Sigma公司产品; Giemsa购自北京鼎国生物技术公司; EVO(批号: 046K1230)和RO3306(批号: L24795)购自Sigma公司; 碘化丙啶(propidium iodide, PI, 批

■ 相关报道

Tao等最近研究发现, 对药物诱导下已发生M期阻滞的细胞, 通过加入CDK1抑制剂以诱导其发生M期滑移, 可大大提高肿瘤细胞的凋亡率, 也就是说相继诱导M期阻滞与M期滑移的两种药物可能具有协同性诱导凋亡效应。

■创新盘点

本文检测到吴茱萸碱(EVO)诱导凋亡的可逆时间约在24 h之后, EVO与RO3306联合序贯用药, 能够明显地提高EVO对结肠癌细胞CT26的抑制率, 获得协同效应, 但二者同时联合用药却无类似效应。

号: 6155K)购自MP Biomedicals. 荧光倒置显微镜产自Olympus公司; Bio-Rad 680型全自动酶标仪为美国Bio-Rad公司产品; 流式细胞仪为美国Becton Dickinson公司产品。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: 肿瘤细胞株按常规方法培养传代, 均培养于RPMI 1640(高糖), 另补充100 mL/L灭活胎牛血清, 2 μ mol/L谷氨酰胺, 1.5 g的碳酸氢钠, 1%的青、链霉素溶液。

1.2.2 MTT法检测EVO对CT26杀伤作用的量效关系及其诱导不可逆凋亡的时间转折点: 取对数生长期细胞, 按 5×10^3 个细胞/孔接种于96孔板培养, 置37 $^{\circ}$ C, 50 mL/L CO₂培养箱培养, 待细胞贴壁后, 加入不同浓度的EVO, 同时设阴性对照组、空白对照组, 每组均设8个复孔。培养24 h后, 每孔加100 μ L MTT(5 g/L无血清培养液, pH7.2), 再培养4 h, 弃上清, 每孔加入150 μ L DMSO, 振荡溶解, 酶标仪于570 nm处测光吸收值(A值), 细胞生长抑制率按下列公式进行计算: 抑制率(IR) = (1-实验组平均A值/对照组平均A值) \times 100%, 半数抑制浓度(IC₅₀)通过SPSS18.0统计软件包经Probit回归分析计算。

取对数生长期细胞, 按 5×10^3 个细胞/孔接种于96孔板培养, 细胞贴壁后加入终浓度为4 mg/L的EVO。按EVO作用不同时间(16、20、24、28 h)依次分为EVO 1组、EVO 2组、EVO 3组、EVO 4组, 每组再分别设立EVO撤药前及其相应对照组, EVO撤药再培养12 h(EVO作用不同时间后撤药再用完全培养基培养12 h)及其相应对照组。处理结束后MTT法测定细胞生长抑制率(方法同上)。

1.2.3 MTT法比较EVO和RO3306联合同时用药与序贯用药对CT26细胞的抑制作用: 将细胞接种于2个96孔培养板(5×10^3 个细胞/孔)。置37 $^{\circ}$ C, 50 mL/L CO₂培养箱培养, 待细胞贴壁后加药。两板均设立对照组、4 mg/L EVO组、2 mg/L EVO组、15 mg/L RO3306组、2 mg/L EVO组+15 mg/L RO3306联合组、4 mg/L EVO组+15 mg/L RO3306联合组。其中的一板联合组EVO和RO3306同时加药, 各组EVO和RO3306作用时间均为30 h; 另一板不同的是, 联合组EVO和RO3306序贯用药, 先加入EVO作用24 h后再加入RO3306共同作用6 h, 而RO3306组与联合组一样仅在细胞培养结束前6 h才加RO3306。处理结束后用MTT法检测细胞生长抑制率。

1.2.4 克隆集落形成法检测EVO和RO3306序贯

联合用药对CT26细胞集落形成的抑制率: 将细胞接种于6孔培养板, 1×10^3 个细胞/孔。待细胞贴壁后, 换为无血清培养基培养, 24 h后吸掉无血清培养基后加入完全培养基并进行药物作用。分组和药物作用方式同1.2.3的序贯用药。药物作用完毕吸弃培养基, 加入完全培养基继续培养, 共培养8 d。8 d后吸走上清, 用PBS洗1次, 加入固定液1 mL(甲醇: 乙酸 = 3: 1)室温固定15 min, 用PBS冲洗1次, 再加入500 μ L Giemsa溶液, 室温下染色15 min, 吸掉染液, 用去离子水洗2次。数码相机拍照并在倒置显微镜下观察计数细胞集落(细胞数>50/每个集落)。按下式计算集落形成抑制率。集落抑制率(%) = 1-集落数/对照组集落数 \times 100%。

1.2.5 流式细胞PI单染检测EVO和RO3306联合序贯用药对CT26细胞凋亡率的影响: 细胞以 2×10^5 个/孔的密度接种6孔板, 待细胞贴壁后进行药物作用, 分组和用药方式同上。作用完毕收集细胞, 用PBS洗1次, 将细胞固定于700 mL/L预冷乙醇中过夜, 第2天用PI染色, 4 $^{\circ}$ C避光30 min后进行流式细胞术检测。测定各组晚期凋亡率。

统计学处理 统计学处理采用SPSS18.0统计软件包进行统计学处理。计量资料以mean \pm SD表示。采用金正均q值法^[34]判断EVO和RO3306联合用药的协同性, 其中 q = 实际联合药效R'(A+B)/理论联合药效R(A+B), $R(A+B) = RA + RB - RA \times RB$, RA、RB为单独用药药效。 $q < 0.85$ 为拮抗, $0.85 \leq q < 1.15$ 为相加, $q \geq 1.15$ 为协同。

2 结果

2.1 EVO对CT26杀伤作用的量效关系 EVO作用于CT26 24 h后镜下观察, 细胞的形态明显改变, 细胞数目减少, MTT结果显示EVO以剂量依赖性方式抑制CT26细胞增殖, 在2.5、5、10 mg/L浓度下作用24 h, EVO对CT26的抑制率分别依次为12.8% \pm 7.7%, 32.1% \pm 5.8%, 46.1% \pm 2.9%, 各浓度组与对照组(0.0% \pm 3.7%)比较均有显著性差异($P < 0.01$, $n = 6$)。EVO作用24 h对CT26的IC₅₀为10.8 mg/L \pm 4.6 mg/L(图1)。

2.2 EVO诱导CT26细胞不可逆凋亡的时间点 在EVO作用20 h以前的各时间点, 撤药再培养12 h后细胞抑制率均明显比撤药前低, 推测在撤药后培养12 h的过程中有部分细胞经修复机制可恢复正常增殖, 因此可推断此时EVO的凋亡诱导作用是部分可逆的; 而在作用24 h时间点, EVO撤药再培养12 h后细胞抑制率却比撤药前

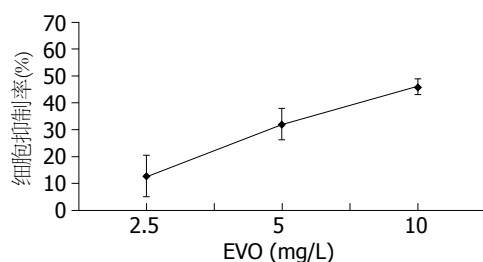


图1 EVO作用24 h对CT26增殖的影响。

表1 EVO作用不同时间及作用后撤药培养12 h对CT26细胞抑制率的影响 (mean \pm SD, $n = 6$)

分组	作用时间(h)	抑制率(%)	
		撤药前	撤药再培养12 h后
EVO 1组	16	42.2 \pm 4.1	35.0 \pm 2.2 ^b
EVO 2组	20	45.6 \pm 11.1	31.8 \pm 4.0 ^a
EVO 3组	24	47.6 \pm 5.1	58.9 \pm 1.5 ^b
EVO 4组	28	36.1 \pm 5.6	64.7 \pm 4.2 ^b

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 撤药前。

明显增加; 作用>24 h时, EVO撤药再培养12 h后比撤药前抑制率增加更显著($P < 0.01$), 推测此时EVO诱导的细胞凋亡已经进入不可逆阶段, 因此即使在撤药后再培养12 h, 细胞抑制率却增加了。EVO诱导不可逆凋亡的时间转折点可能在24 h左右(表1)。

2.3 EVO和RO3306联合同时用药与序贯用药对CT26细胞的抑制作用 EVO与RO3306序贯用药联合组的协同杀伤明显优于EVO与RO3306联合同时加药作用30 h的杀伤作用, 采用金正均 q 值法计算, 序贯用药的 q 值>1.15, 显示协同性增效作用, 而同时用药联合组的 q 值均<0.85(表2)。

2.4 EVO和RO3306序贯联合用药对CT26细胞集落形成的抑制率 EVO和RO3306各单药组对CT26细胞的集落形成均有抑制作用, EVO与RO3306序贯联合用药各组的细胞集落形成的抑制率大于两成分单独作用组(差异有统计学意义), 联合作用 $q > 1.15$, 为协同性作用(表3, 图2)。

2.5 EVO和RO3306联合并序贯用药对CT26细胞凋亡率的影响 EVO、RO3306各单药组的凋亡率均大于对照组, 差异具有统计学意义, EVO与RO3306序贯联合用药的各联合组的凋亡率均显著大于两成分单独作用组, 联合作用组 $q > 1.15$, 显示二者联合是协同性作用(表4, 图3)。

3 讨论

结肠癌是人类主要恶性肿瘤之一, 近年来其发

表2 EVO与RO3306分别序贯加药(EVO 24 h+RO3306 6 h)和同时加药对CT26细胞的协同杀伤作用 (mean \pm SD, $n = 8$)

分组	抑制率(%)		q 值	
	序贯	同时	序贯	同时
对照组	0.0 \pm 2.3	0.0 \pm 3.2		
2 mg/L EVO组	22.0 \pm 4.4 ^b	16.3 \pm 2.0 ^b		
4 mg/L EVO组	30.4 \pm 3.2 ^b	34.0 \pm 2.5 ^b		
15 mg/L RO3306组	12.3 \pm 4.8 ^b	30.9 \pm 2.0 ^b		
2 mg/L EVO+15 mg/L RO3306组	48.0 \pm 3.2 ^{bce}	34.7 \pm 2.6 ^{bce}	1.52	0.68
4 mg/L EVO+15 mg/L RO3306组	62.2 \pm 2.2 ^{bce}	40.5 \pm 4.8 ^{bce}	1.60	0.72

^b $P < 0.01$ vs 对照组; ^c $P < 0.05$ vs 相应浓度EVO组; ^e $P < 0.05$ vs 15 mg/L RO3306组。表3 EVO与RO3306序贯用药对CT26细胞集落形成的影响 (mean \pm SD, $n = 3$)

分组	抑制率(%)	q 值
对照组	0.0 \pm 0.0	
2 mg/L EVO组	9.7 \pm 5.8	
4 mg/L EVO组	38.9 \pm 3.8	
15 mg/L RO3306组	10.8 \pm 3.7	
2 mg/L EVO+15 mg/L RO3306组	29.8 \pm 10.7 ^{bc}	1.53
4 mg/L EVO+15 mg/L RO3306组	68.3 \pm 12.7 ^{ad}	1.50

^a $P < 0.05$ vs 相应浓度EVO组; ^b $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs 15 mg/L RO3306组。

病率呈逐年上升趋势。但随着科学技术的发展, 近年来其诊断和治疗水平也有了很大提高。但是中晚期患者目前仍缺少有效的治疗方法。因此, 寻找新的有效的治疗药物, 对提高结肠整体防治水平有重要意义。

Tao等^[26,27]对有丝分裂拮抗剂KSPI进行大量深入实验研究, 发现KSPI能激活纺锤体检验点, 使细胞阻滞于M期并维持一定时间后, 紧接着引发细胞的异常M期滑移, 即在未完全修复已损伤纺锤体的情况下, 细胞突破纺锤体检验点, “滑移”至下一细胞周期的G₁期, 形成4倍体的假G₁期细胞, 进而下调生存素(Survivin)的表达和激活Bax而诱发凋亡。进一步的研究发现KSPI诱导凋亡有赖于M期阻滞与异常M期滑移环节的偶联, 两者的相继发生对诱导凋亡是缺一不可的。此外, 在KSPI诱导细胞发生M期阻滞后, 如果加入另一诱发细胞发生M期滑移的药物, 如CDK1的抑制剂purv, 可协同性提高前者诱导的凋亡

■应用要点

中药成分用药方式的不同导致协同效应也不同, 提纯和强化主要成分作用的组分配方能否比中药复方制剂更增效, 本文为阐明中药复方药理探索研究方法, 为古方新用, 提高中药临床疗效和抗肿瘤新药开发提供科学依据和参考。

同行评价

本文选题新颖,设计合理,具有一定的理论和应用价值。

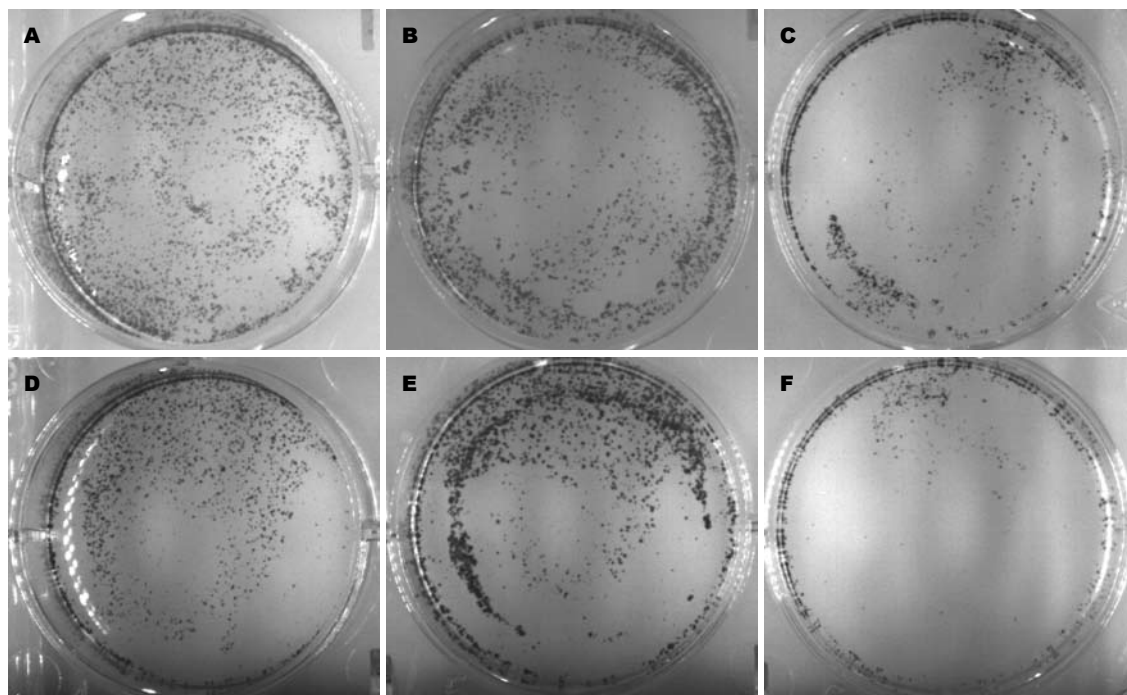


图2 EVO与RO3306序贯联合用药对CT26细胞克隆集落形成的影响。A: 对照组; B: 2 mg/L EVO组; C: 4 mg/L EVO组; D: 15 mg/L RO3306组; E: 2 mg/L EVO+15 mg/L RO3306联合组; F: 4 mg/L EVO+15 mg/L RO3306联合组。

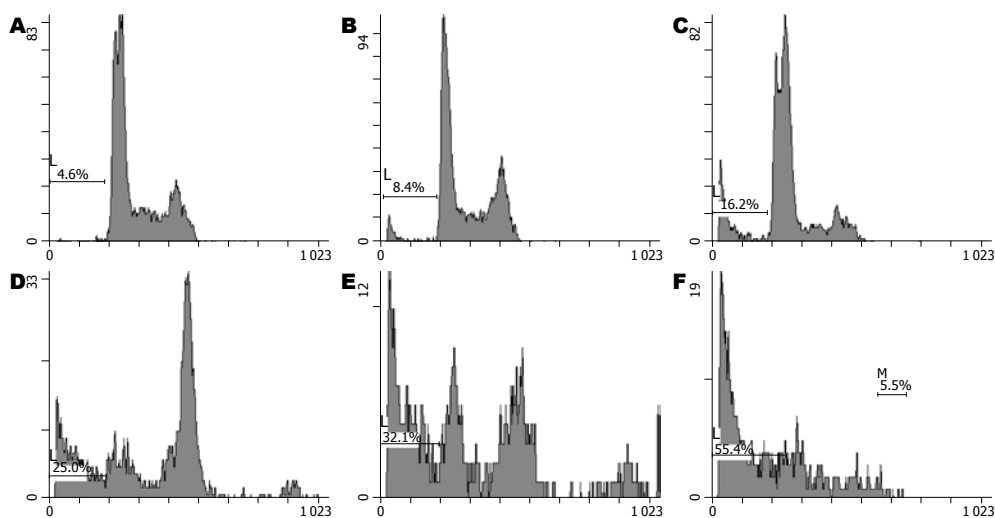


图3 EVO联合RO3306序贯用药对CT26凋亡率的影响(流式细胞术, PI单染)。A: 对照组; B: 15 mg/L RO3306组; C: 2 mg/L EVO组; D: 4 mg/L EVO组; E: 2 mg/L EVO+15 mg/L RO3306联合组; F: 4 mg/L EVO+15 mg/L RO3306联合组。

率。该研究结果提示,能诱导细胞M期阻滞的有丝分裂抑制剂和CDK1抑制剂联合使用诱导肿瘤细胞凋亡,很可能产生相互协同作用。

本研究组前期研究证明, EVO能使多种肿瘤细胞株(HepG2、人胃癌SGC7901、小鼠肝癌H22等)阻滞于G₂/M期,是细胞水平杀伤力较强的少数几种中药成分之一; EVO诱导的凋亡极有可能是M期凋亡^[21-25],药物作用后细胞染色体聚集于细胞赤道板浓聚成一字或人字形,是M期细胞形态特征。提示EVO很可能与KSPI类似,是

有丝分裂拮抗剂。

本研究对EVO作用的不同时间点进行MTT检测,检测到作用24 h后是EVO诱导CT26细胞凋亡的转折点,此点前如果撤药细胞将恢复周期运转和生长;而转折点后大量细胞出现凋亡形态,如果此时撤药细胞仍将进入不可逆凋亡途径,因此即使在撤药后培养12 h细胞的抑制率不减反增。

本研究通过MTT法、克隆集落形成法、流式细胞法研究EVO与CDK1特异性抑制剂

表 4 EVO联合RO3306对CT26凋亡率的影响 (mean ± SD)

分组	n	抑制率(%)	q值
对照组	4	5.5 ± 1.1	
2 mg/L EVO组	3	18.3 ± 1.9 ^b	
4 mg/L EVO组	4	25.6 ± 1.5 ^b	
15 mg/L RO3306组	2	9.2 ± 1.1 ^a	
2 mg/L EVO+15 mg/L RO3306组	2	39.0 ± 9.8 ^{bc}	2.1
4 mg/L EVO+15 mg/L RO3306组	2	54.6 ± 1.2 ^{bdf}	2.1

^a*P*<0.05, ^b*P*<0.01 vs 对照组; ^c*P*<0.05, ^d*P*<0.01 vs 相应浓度EVO组; ^f*P*<0.01 vs 15 mg/L RO3306组。

RO3306联合用药对结肠癌细胞CT26的效应, 结果表明: EVO与RO3306联合并序贯用药, 能够明显地提高EVO对CT26的抑制率, 获得协同效应, 但二者同时联合用药却无类似协同效应。流式细胞数检测也发现二者联合并序贯用药可显著提高EVO对结肠癌细胞的凋亡诱导作用。结果提示EVO诱导的细胞凋亡与KSPI类似, 可能不仅与M期阻滞事件相关, 还与异常M期转移事件的发生相关; EVO和RO3306联合且序贯用药的协同效应, 有可能是通过M期阻滞和M期转移机制实现。相关研究国内未见报道, 要明确该分子机制还需更多实验依据。

4 参考文献

- Gottschalk A, Ford JG, Regelin CC, You J, Mascha EJ, Sessler DI, Durieux ME, Nemergut EC. Association between epidural analgesia and cancer recurrence after colorectal cancer surgery. *Anesthesiology* 2010; 113: 27-34
- Yan DW, Li DW, Yang YX, Xia J, Wang XL, Zhou CZ, Fan JW, Wen YG, Sun HC, Wang Q, Qiu GQ, Tang HM, Peng ZH. Ubiquitin D is correlated with colon cancer progression and predicts recurrence for stage II-III disease after curative surgery. *Br J Cancer* 2010; 103: 961-969
- Woo HJ, Hwang SK, Park SH, Hwang JH, Hamm IS. Factors related to the local treatment failure of gamma knife surgery for metastatic brain tumors. *Acta Neurochir (Wien)* 2010; 152: 1909-1914
- Nishigori T, Matsumoto H, Nakano D, Yamaguchi T, Takahashi K, Iwasaki Y, Ohashi M, Nunobe S, Iwanaga T, Nemoto T, Funada N, Nakaya H, Ookura Y. [A case of submucosal invasive cancer of the sigmoid colon, recurring as multiple liver metastases one year after the surgery]. *Gan To Kagaku Ryoho* 2008; 35: 2144-2146
- 李鹏, 钟振国, 韦小青, 黄金兰. 中药抗肿瘤作用机制的研究进展. *世界中西医结合杂志* 2008; 3: 297-299
- 苏婉, 徐振晔. 肿瘤靶向治疗与中药多靶点效应的研究进展. *上海中医药杂志* 2007; 41: 87-88, 封三
- Li J, Sun GZ, Lin HS, Pei YX, Qi X, An C, Yu J, Hua BJ. The herb medicine formula "Yang Wei Kang Liu" improves the survival of late stage gastric cancer patients and induces the apoptosis of human gastric cancer cell line through Fas/Fas ligand and Bax/Bcl-2 pathways. *Int Immunopharmacol* 2008; 8: 1196-1206
- Zhao F, Liu PX. [Progress of study on action mechanisms of TCM in anti-tumor and preventing metastasis of tumor]. *Zhongguo Zhongxiyi Jiehe Zazhi* 2007; 27: 178-181
- Wang XN, Han X, Xu LN, Yin LH, Xu YW, Qi Y, Peng JY. Enhancement of apoptosis of human hepatocellular carcinoma SMMC-7721 cells through synergy of berberine and evodiamine. *Phytomedicine* 2008; 15: 1062-1068
- Yang J, Wu LJ, Tashiro S, Onodera S, Ikejima T. Nitric oxide activated by p38 and NF-kappaB facilitates apoptosis and cell cycle arrest under oxidative stress in evodiamine-treated human melanoma A375-S2 cells. *Free Radic Res* 2008; 42: 1-11
- Yang J, Wu LJ, Tashino S, Onodera S, Ikejima T. Reactive oxygen species and nitric oxide regulate mitochondria-dependent apoptosis and autophagy in evodiamine-treated human cervix carcinoma HeLa cells. *Free Radic Res* 2008; 42: 492-504
- Targeting apoptosis pathways in cancer by Chinese medicine. *Cancer Lett* 2010 Aug 2. [Epub ahead of print]
- Chen MC, Yu CH, Wang SW, Pu HF, Kan SF, Lin LC, Chi CW, Ho LL, Lee CH, Wang PS. Anti-proliferative effects of evodiamine on human thyroid cancer cell line ARO. *J Cell Biochem* 2010; 110: 1495-1503
- Zhang C, Fan X, Xu X, Yang X, Wang X, Liang HP. Evodiamine induces caspase-dependent apoptosis and S phase arrest in human colon lovo cells. *Anti-cancer Drugs* 2010; 21: 766-776
- Jiang J, Hu C. Evodiamine: a novel anti-cancer alkaloid from *Evodia rutaecarpa*. *Molecules* 2009; 14: 1852-1859
- 文彬, 黄秋凌, 龚艳青, 陈蔚文. 左金丸及其主要单体成分对大肠癌的干预作用. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 1936-1941
- Liao CH, Pan SL, Guh JH, Chang YL, Pai HC, Lin CH, Teng CM. Antitumor mechanism of evodiamine, a constituent from Chinese herb *Evodiae fructus*, in human multiple-drug resistant breast cancer NCI/ADR-RES cells in vitro and in vivo. *Carcinogenesis* 2005; 26: 968-975
- Yang ZG, Chen AQ, Liu B. Antiproliferation and apoptosis induced by evodiamine in human colorectal carcinoma cells (COLO-205). *Chem Biodivers* 2009; 6: 924-933
- Wang C, Li S, Wang MW. Evodiamine-induced human melanoma A375-S2 cell death was mediated by PI3K/Akt/caspase and Fas-L/NF-kappaB signaling pathways and augmented by ubiquitin-proteasome inhibition. *Toxicol In Vitro* 2010; 24: 898-904
- Kan SF, Yu CH, Pu HF, Hsu JM, Chen MJ, Wang PS. Anti-proliferative effects of evodiamine on human prostate cancer cell lines DU145 and PC3. *J Cell Biochem* 2007; 101: 44-56
- Huang DM, Guh JH, Huang YT, Chueh SC, Chiang PC, Teng CM. Induction of mitotic arrest and apoptosis in human prostate cancer pc-3 cells by evodiamine. *J Urol* 2005; 173: 256-261
- Huang YC, Guh JH, Teng CM. Induction of mitotic arrest and apoptosis by evodiamine in human leukemic T-lymphocytes. *Life Sci* 2004; 75: 35-49

- 23 谭宇蕙, 陈蔚文, 吴映雅, 陈蔚文, 陈冠林, 李茹柳, 小
巽碱、吴茱萸碱和靛玉红对人胃癌细胞的作用比较.
世界华人消化杂志 2005; 13: 472-476
- 24 谭宇蕙, 吴映雅, 钟富有, 胡岳山, 宁异真, 李杰芬. 吴
茱萸碱对小鼠肝癌细胞生长的抑制和诱导凋亡作用.
中国药理与临床 2006; 22: 33-35
- 25 朱丽琪, 刘晓东, 谭宇蕙, 李杰芬, 杜标炎, 吴映雅. 吴
茱萸碱对人肝癌细胞HepG2的生长抑制及诱导凋亡
作用. 中国药理学通报 2009; 25: 1261-1264
- 26 Tao W. The mitotic checkpoint in cancer therapy. *Cell Cycle* 2005; 4: 1495-1499
- 27 Tao W, South VJ, Zhang Y, Davide JP, Farrell L,
Kohl NE, Sepp-Lorenzino L, Lobell RB. Induction of
apoptosis by an inhibitor of the mitotic kinesin KSP
requires both activation of the spindle assembly
checkpoint and mitotic slippage. *Cancer Cell* 2005; 8:
49-59
- 28 Blagosklonny MV. Mitotic arrest and cell fate: why
and how mitotic inhibition of transcription drives
mutually exclusive events. *Cell Cycle* 2007; 6: 70-74
- 29 Chan YW, Ma HT, Wong W, Ho CC, On KF, Poon
RY. CDK1 inhibitors antagonize the immediate
apoptosis triggered by spindle disruption but
promote apoptosis following the subsequent rerep-
lication and abnormal mitosis. *Cell Cycle* 2008; 7:
1449-1461
- 30 Degenhardt Y, Greshock J, Laquerre S, Gilmartin
AG, Jing J, Richter M, Zhang X, Bleam M, Halsey W,
Hughes A, Moy C, Liu-Sullivan N, Powers S, Bach-
man K, Jackson J, Weber B, Wooster R. Sensitivity
of cancer cells to Plk1 inhibitor GSK461364A is as-
sociated with loss of p53 function and chromosome
instability. *Mol Cancer Ther* 2010; 9: 2079-2089
- 31 Kojima K, Shimanuki M, Shikami M, Andreeff M,
Nakakuma H. Cyclin-dependent kinase 1 inhibitor
RO-3306 enhances p53-mediated Bax activation and
mitochondrial apoptosis in AML. *Cancer Sci* 2009;
100: 1128-1136
- 32 Vassilev LT, Tovar C, Chen S, Knezevic D, Zhao
X, Sun H, Heimbrook DC, Chen L. Selective small-
molecule inhibitor reveals critical mitotic functions
of human CDK1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103:
10660-10665
- 33 Vassilev LT. Cell cycle synchronization at the G2/M
phase border by reversible inhibition of CDK1. *Cell
Cycle* 2006; 5: 2555-2556
- 34 戴体俊. 合并用药的定量分析. 中国药理学通报 1998;
14: 479-480

编辑 李薇 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

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

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

[Ala]¹⁶-aFGF(1-29)对慢传输型便秘小鼠的治疗作用

胡小丹, 李学良, 沙杰, 张爱青, 林琳

胡小丹, 李学良, 沙杰, 张爱青, 林琳, 南京医科大学第一附属医院消化科 江苏省南京市 210029

胡小丹, 主要从事胃肠动力及动力障碍性疾病的研究。

杨森科学基金资助项目, No. 2008

作者贡献分布: 胡小丹与李学良对此文所作贡献均等; 此课题由李学良、胡小丹、张爱青、沙杰及林琳共同设计; 研究过程由胡小丹、张爱青及沙杰操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由胡小丹提供; 数据分析由胡小丹与沙杰合作完成; 本论文写作由胡小丹与李学良完成。

通讯作者: 李学良, 主任医师, 210029, 江苏省南京市广州路300号, 南京医科大学第一附属医院消化科。

ligakur@yahoo.com.cn

电话: 025-83718836-6542 传真: 025-83780711

收稿日期: 2011-02-03 修回日期: 2011-03-27

接受日期: 2011-04-11 在线出版日期: 2011-04-28

Effect of subcutaneous injection of [Ala]¹⁶-aFGF(1-29) on slow transit constipation in mice

Xiao-Dan Hu, Xue-Liang Li, Jie Sha, Ai-Qing Zhang, Lin Lin

Xiao-Dan Hu, Xue-Liang Li, Jie Sha, Ai-Qing Zhang, Lin Lin, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

Supported by: the Janssen Research Council China Research Fund, No. 2008

Correspondence to: Xue-Liang Li, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, 300 Guangzhou Road, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China. ligakur@yahoo.com.cn

Received: 2011-02-03 Revised: 2011-03-27

Accepted: 2011-04-11 Published online: 2011-04-28

Abstract

AIM: To investigate the potential therapeutical effect of a new acidic fibroblast growth factor (aFGF) fragment - [Ala]¹⁶-aFGF(1-29) against slow transit constipation (STC) in mice and to explore possible mechanisms involved.

METHODS: Sixty ICR mice were divided randomly and equally into test group and control group. A mouse model of STC was established by subcutaneous injection (SC) of morphine [2.5 mg/(kg·d)] for 45 days. The control group was treated with normal saline for the same duration. The fecal character was observed according to the Bristol Stool Form Scale (BSFS), and only

mice producing stools conforming to BSFS 1 and 2 were used as STC models. On day 45, six mice were chosen randomly from each group and used to confirm if STC was successfully induced by charcoal propulsion test. The rest mice in each group were divided into test group 1, test group 2, control group 1, and control group 2 (n = 12 each). The test group 1 and control group 1 were treated with [Ala]¹⁶-aFGF(1-29) (300 µg/kg each time, SC) twice per week for 8 weeks, while the test group 2 and control group 2 were treated with the same volume of vehicle. Fecal character was observed in all mice. Eight weeks later, the intestinal propulsion rate (IPR) in mice of each group was measured and the expression of neuron-specific enolase (NSE, a neuronal maker) in the colon was detected by immunohistochemistry and Western blot.

RESULTS: On day 45, the feces in the test group was drier and harder (BSFS 1 and 2) than the control group (BSFS 4 and 5). Both the IPR and expression level of NSE in the test group were significantly lower than those in the control group (63.422% ± 1.791% vs 55.702% ± 1.806%, 1.18800 ± 0.03176 vs 0.88730 ± 0.03554, 0.90520 ± 0.02268 vs 0.71300 ± 0.01654, all *P* < 0.05 or 0.01). Eight weeks after treatment, the feces in the test group 1 gradually became as smooth and soft (BSFS 4 and 5) as that in the control groups 1 and 2; the IPR and expression level of NSE in colonic tissue in the test group 1 were obviously improved compared to the test group 2 (62.250% ± 5.283% vs 57.190% ± 4.291%, 0.6543 ± 0.0069 vs 0.4193 ± 0.0158, 0.5823 ± 0.019 vs 0.5171 ± 0.0124, all *P* < 0.05) but showed no significant difference with those in the control groups 1 and 2.

CONCLUSION: Treatment with [Ala]¹⁶-aFGF(1-29) improved constipation symptoms and IPR in STC mice at least partially by protection of the enteric nervous system.

Key Words: Slow transit constipation; Enteric nervous system; Acidic fibroblast growth factor; Morphine; Animal model

Hu XD, Li XL, Sha J, Zhang AQ, Lin L. Effect of subcu-

■背景资料

STC的具体病因及机制不明, 临床治疗不易, 严重影响现代人的生活质量. 近年来研究表明肠神经系统的病变是便秘发生的重要病理生理学基础, 因此保护肠神经系统功能从而改善便秘症状, 是探索临床治疗便秘的有效途径之一.

■同行评议者

刘宝林, 教授, 中国医科大学附属盛京医院普通外科

■相关报道

国内学者亦发现在吗啡诱导的STC小鼠肠道存在结肠Cajal间质细胞数量的减少、抑制性神经递质表达增加。

taneous injection of [Ala]¹⁶-aFGF(1-29) on slow transit constipation in mice. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2011; 19(12): 1251-1256

摘要

目的: 初步探讨皮下注射一种新的酸性成纤维细胞生长因子(acidic fibroblast growth factor, aFGF)片段-[Ala]¹⁶-aFGF(1-29)对慢传输型便秘(slow transit constipation, STC)模型小鼠便秘的治疗作用及其可能的作用途径。

方法: 60只ICR小鼠随机分为实验组($n = 30$)和对照组($n = 30$), 通过皮下注射盐酸吗啡[2.5 mg/(kg·d), 45 d]的方法建立肠道STC模型。成模后各组剩余小鼠再随机分为两组, 记为实验1组、实验2组、对照1组及对照2组(各组12只), 其中实验1组及对照1组小鼠予皮下注射[Ala]¹⁶-aFGF(1-29)(300 μg/kg, 每周2次, 共8 wk), 实验2组及对照2组则予等量的溶解液同样处理, 实验过程及结束后观察各组小鼠粪便性状变化并测定肠道推进率。处死后的小鼠取结肠组织, 以免疫组织化学染色及Western blot检测对照组及实验组药物干预前后结肠组织肌间丛神经元特异性烯醇化酶(neuron specific enolase, NSE)的表达。

结果: 实验第45天, 实验组小鼠粪便较对照组明显干硬; 且肠道推进率和NSE表达水平均较对照组明显减少($63.422\% \pm 1.791\%$ vs $55.702\% \pm 1.806\%$; NSE mRNA: 1.18800 ± 0.03176 vs 0.88730 ± 0.03554 ; NSE蛋白: 0.90520 ± 0.02268 vs 0.71300 ± 0.01654 , 均 $P < 0.05$ 或 0.01), 判定STC模型建立。药物干预8 wk后, 实验1组小鼠粪便渐变为类似于对照组的香肠样软便; 肠道推进率及结肠组织NSE的表达均较实验2组明显改善($62.250\% \pm 5.283\%$ vs $57.190\% \pm 4.291\%$; NSE mRNA: 0.6543 ± 0.0069 vs 0.4193 ± 0.0158 ; NSE蛋白: 0.5823 ± 0.0190 vs 0.5171 ± 0.0124 , 均 $P < 0.05$), 但与对照组之间无显著统计学差异。

结论: [Ala]¹⁶-aFGF(1-29)慢性皮下注射可明显改善STC小鼠的便秘症状及肠道推进率, 其对肠神经系统的修复保护作用可能是其作用机制之一。

关键词: 慢传输型便秘; 肠神经系统; 酸性成纤维细胞因子; 吗啡; 动物模型

胡小丹, 李学良, 沙杰, 张爱青, 林琳. [Ala]¹⁶-aFGF(1-29)对慢传输型便秘小鼠的治疗作用. 世界华人消化杂志 2011; 19(12): 1251-1256

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/1251.asp>

0 引言

慢传输型便秘(slow transit constipation, STC)是以结肠动力减弱为特征的顽固性便秘, 其病因复杂, 发病机制尚不清楚, 在治疗方面长期依赖各种泻剂的使用, 效果不佳^[1-3]。肠神经系统(enteric nervous system, ENS)病变与STC的形成及进展密切相关^[4-6]。酸性成纤维细胞生长因子(acidic fibroblast growth factor, aFGF)是一种由154个氨基酸组成的具有促进纤维细胞生长的活性多肽, 具有营养及促进神经修复的功能^[7,8], 研究亦发现其可能在结肠神经系统发挥着某些重要生理功能^[9-11]。因此, 我们推测该物质可能对STC的神经病变具有一定的治疗作用。[Ala]¹⁶-aFGF(1-29)是一种新的aFGF活性片段, 本课题组前期的实验结果显示他与aFGF大分子具有相同的生物活性^[12], 但其分子量小, 易于合成, 在给以生物体用药时更易被吸收利用, 并大大减少不良反应, 具有更实际的临床应用前景。本研究初步探讨了该物质对STC小鼠的治疗作用及其可能的作用途径。

1 材料和方法

1.1 材料 60只清洁级ICR小鼠购自上海斯莱克实验动物中心。盐酸吗啡购自沈阳第一制药厂。[Ala]¹⁶-aFGF(1-29)粉剂购自Peptide Institute Inc(Osaka Japan)。NSE兔抗小鼠多克隆抗体购自Abcam生物技术公司。辣根过氧化物酶标记的二抗购自晶美生物工程有限公司。

1.2 方法

1.2.1 分组及造模: 将60只清洁级ICR小鼠随机分为实验组和对照组($n = 30$), 实验组皮下注射盐酸吗啡2.5 mg/(kg·d), 共45 d, 建立STC模型^[13-15], 对照组以等量生理盐水同样处理。测定肠道推进率(每组随机取6只小鼠), 若实验组小鼠肠道推进率较对照组降低且有统计学差异, 则认为实验组小鼠肠道传输功能降低, 符合STC的临床诊断标准, 模型复制成功。剩余小鼠在各组内随机再分为2组, 即实验1组、实验2组、对照1组及对照2组(均 $n = 12$), 其中实验1组、对照1组皮下注射[Ala]¹⁶-aFGF(1-29) 300 μg/kg, 2次/wk, 共8 wk, 实验2组、对照2组给予等量的溶解液同样处理。

1.2.2 小鼠粪便性状评估: 依据Bristol粪便性状分级(BSFS)^[16], 分离的硬团状或团块状粪便(BSFS 1, 2), 符合STC的粪便性状改变标准; 香肠状或团块状光滑软便(BSFS 4, 5), 符合正常小

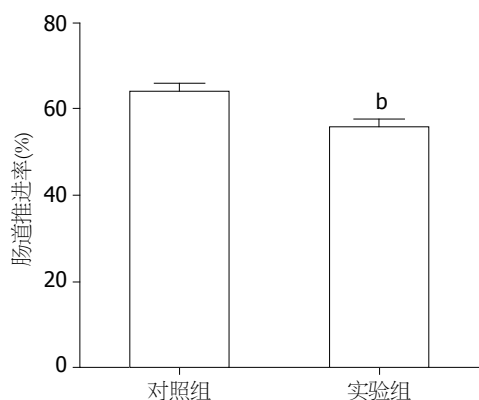


图1 两组小鼠肠道推进率。^b $P < 0.01$ vs 对照组。

鼠的粪便性状。

1.2.3 肠道推进率: 禁食24 h的小鼠经口灌入炭末混悬液0.5 mL, 30 min后颈椎脱臼法处死, 剖腹取出幽门到直肠末端全部肠道, 在无张力状态下测量肠道全长及炭末在肠道的推进距离, 计算炭末推进距离占肠道全长的百分比。肠道推进率 = 炭末推进距离/肠道全长 $\times 100\%$ 。

1.2.4 免疫组织化学检测肠道肌间丛神经元特异性烯醇化酶^[17,18]分布及表达量: 常规固定、包埋、切片、梯度脱蜡、染色。加一抗4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 苏木素复染胞核, PBS代替一抗作为阴性对照。显微镜下胞质染色呈棕黄色片状或颗粒状为阳性反应。每张切片选5个高倍视野($\times 400$ 倍), 应用IPP(Image-Pro Plus)图像分析系统进行分析, 以平均吸光度(A)值表示蛋白的相对表达量。

1.2.5 Western blot检测各组小鼠结肠组织中神经元特异性烯醇化酶的表达: 提取40 μg 蛋白样品, SDS-PAGE凝胶电泳分离, 250 mA电转膜, 蛋白转至PVDF膜, 50 g/L脱脂奶粉于室温封闭2 h, 加1:800稀释的神经元特异性烯醇化酶, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, TBST洗膜, 加1:4 000 HRP标记羊抗兔单克隆抗体, 室温孵育1 h, TBST洗膜, 化学发光剂曝光、显影。所获X光片扫描入计算机, 用天能GIS凝胶图像处理系统软件对目标条带及 β -actin条带进行A值分析。

统计学处理 实验数据采用mean \pm SD表示, 运用SPSS11.0统计软件进行统计分析, 各组间比较采用单因素方差分析、组内则应用两样本均数 t 检验, $P < 0.05$ 为有统计学差异。

2 结果

2.1 实验第45天模型小鼠粪便性状、肠道推进率 实验组小鼠粪便(BSFS 1, 2)较对照组(BSFS 4, 5)明显干硬; 实验组小鼠肠道推进率较对照组

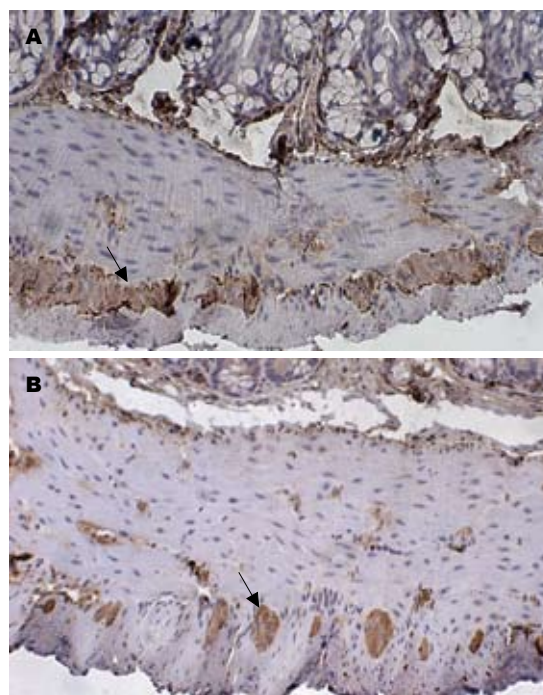


图2 两组小鼠肠道肌间丛NSE的表达(免疫组织化学 $\times 400$)。A: 对照组; B: 实验组。箭头示NSE表达阳性。

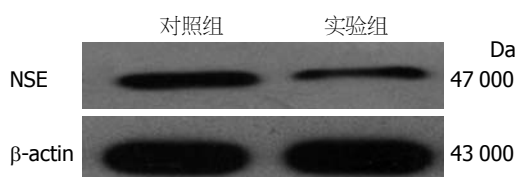


图3 Western blot检测两组小鼠结肠组织中NSE的表达。

减低且差异具有统计学意义($63.422\% \pm 1.791\%$ vs $55.702\% \pm 1.806\%$, $P < 0.01$, 图1)。STC动物模型成功建立。

2.2 实验第45天小鼠结肠组织中NSE的表达

2.2.1 免疫组织化学检测NSE的表达: 实验组及对照组小鼠肌间丛均可见棕色片状或颗粒状物, 实验组NSE的平均A值较对照组明显减低, 且差异具有统计学意义(1.188 ± 0.03176 vs 0.8873 ± 0.03554 , $P < 0.05$, 图2)。

2.2.2 Western blot检测NSE的表达: 实验组小鼠结肠组织中NSE的表达水平(A值)较对照组明显减低且差异具有统计学意义(0.9052 ± 0.02268 vs 0.7130 ± 0.01654 , $P < 0.05$, 图3)。

2.3 [Ala]¹⁶-aFGF(1-29)注射8 wk后各组小鼠粪便性状及肠道推进率 给予[Ala]¹⁶-aFGF(1-29)皮下注射8 wk后, 实验1组小鼠粪便性状渐变为光滑软便(BSFS 4, 5)且类似于对照组, 给予溶解液处理的实验2组小鼠粪便仍以干硬便为主(BSFS 1, 2); 实验1组肠道推进率较实验2组明显增加

■创新盘点

本研究首次应用[Ala]¹⁶-aFGF(1-29)治疗STC小鼠, 并观察到小鼠便秘症状及肠道神经元的表达量均较对照组有明显的改善。

■应用要点

本研究应用 [Ala]¹⁶-aFGF(1-29) 成功治疗STC模型动物, 为探索便秘的新疗法提供了动物实验依据。

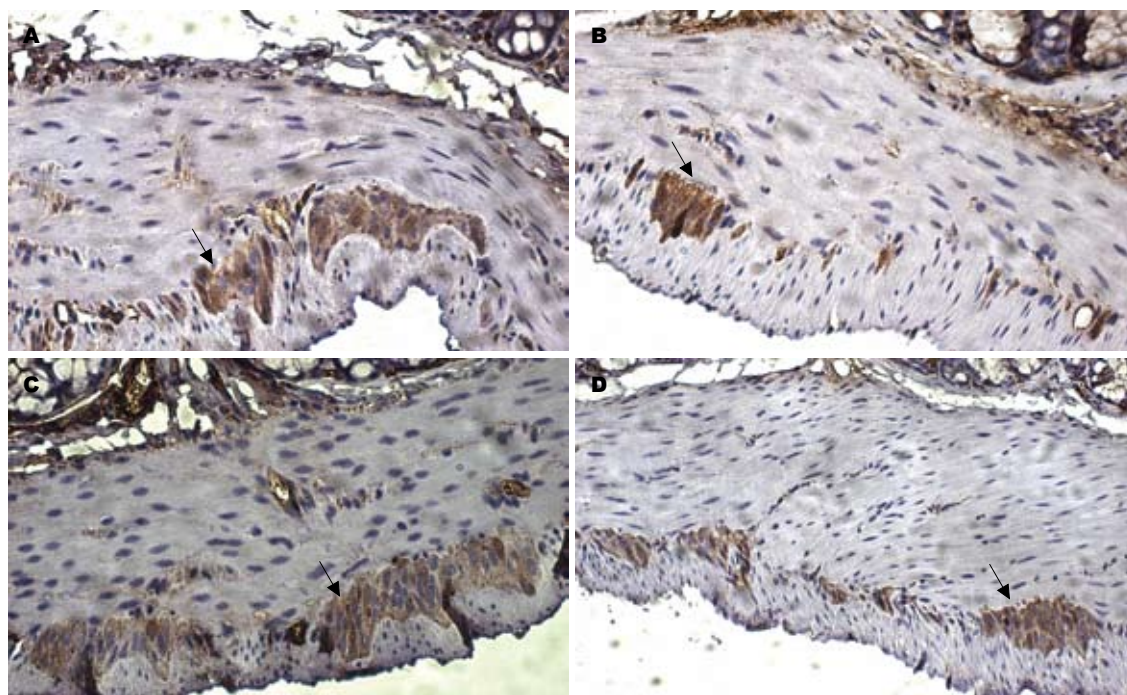


图4 [Ala]¹⁶-aFGF(1-29)干预后各组小鼠肠道肌间丛NSE的表达(免疫组织化学×400)。A: 实验1组; B: 实验2组; C: 对照1组; D: 对照2组。箭头表示NSE表达阳性。

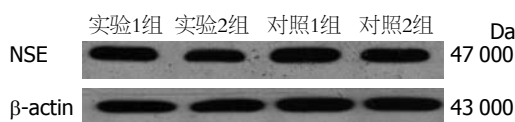


图5 [Ala]¹⁶-aFGF(1-29)干预后各组小鼠结肠组织中NSE的表达。

($62.25\% \pm 5.283\%$ vs $57.19\% \pm 4.291\%$, $P < 0.05$), 且与对照1、2组($60.74\% \pm 4.231\%$, $59.83\% \pm 4.977\%$)之间的差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.4 [Ala]¹⁶-aFGF(1-29)注射8 wk后小鼠结肠组织中NSE的表达

2.4.1 免疫组织化学检测NSE的表达: 实验1组小鼠结肠肌间丛的NSE表达量(平均A值为 0.6543 ± 0.0069)较实验2组(平均A值为 0.4193 ± 0.0158)明显增加($P < 0.05$), 且与对照1、2组(平均A值分别为 0.7960 ± 0.0132 , 0.7887 ± 0.0145)之间的差异无统计学意义(均 $P > 0.05$, 图4)。

2.4.2 Western blot检测NSE的表达: 实验1组小鼠结肠组织中NSE的表达水平(A值为 0.5823 ± 0.019)较实验2组(A值为 0.5171 ± 0.0124)明显升高($P < 0.05$), 且与对照1、2组(A值分别为 0.5772 ± 0.0225 , 0.5676 ± 0.0171)之间表达的差异无统计学意义($P > 0.05$, 图5)。

3 讨论

功能性便秘(functional constipation, FC)又称为

慢性便秘、特发性便秘, 是临床常见的消化系统症状, 与肠癌、乳腺癌、肝性脑病等疾病的形成与进展相关, 还是心脑血管疾病(心肌梗死、脑血管意外等)致残、致死的诱因之一^[19]。STC是FC的常见类型, 约占FC的45.5%^[20], 其主要临床特点是结肠传输运动减慢、肠内容物通过延迟, 无便意、排便次数减少, 结肠传输试验可明确诊断。目前临床上治疗便秘主要通过各种类型泻剂对症处理, 远期疗效不明显且长期用药易导致人体水、电解质紊乱, 并最终需要外科手术解决问题, 治疗比较棘手。

国内外学者观察到临床应用吗啡等阿片类镇痛药缓解癌症晚期疼痛常伴发严重、持久的便秘, 并成功建立了相关的便秘动物模型^[13-15]。本研究亦采用吗啡诱导建立小鼠结肠慢传输运动模型, 实验组小鼠粪便粪质变硬, 肠道推进率减低, 符合STC的临床特征, 成功复制动物模型。STC发病的病理生理学基础尚未明确, 但肠道动力异常是其中的重要环节, 大量的研究表明STC患者肠道组织中神经元及Cajal间质细胞数量较对照组显著减少^[21,22], 国内学者亦发现在吗啡诱导的STC小鼠肠道存在结肠Cajal间质细胞数量的减少、抑制性神经递质表达增加^[23,24], 本研究中免疫组织化学及Western blot结果均提示模型小鼠结肠组织中神经元的数量较对照组明显减少, 进一步证实STC时结肠存在神经元的改变。

aFGF是成纤维细胞因子家族中的一员,最初发现并分离自牛脑及脑垂体。aFGF可通过促分裂及非促分裂效应对来源于中胚层和神经外胚层的细胞如间充质细胞、内分泌细胞、神经细胞等产生广泛的生物学效应,如促进创伤愈合、组织修复、保护缺血再灌注引起的细胞损伤^[25-27]。在神经系统aFGF的作用主要表现为营养神经、促进损伤神经元的修复和再生,临床及动物实验研究均显示外周神经损伤后,手术修复的同时给予aFGF治疗可易化神经纤维的再生,疗效较对照组明显提高^[28,29]。Capetandes等研究证实大肠神经系统的肌间丛亦存在该物质^[16],这些研究结果提示aFGF可能在肠道神经系统有重要的作用。

aFGF作为人体的微量活性物质,难以在体液或组织中提取,主要通过生物工程方法人工合成获得,但aFGF含有154个氨基酸,其合成复杂、价格昂贵且易产生不良反应,临床应用受到了限制。用丙氨酸替换aFGF氨基端1-29片段中的第16位半胱氨酸残基得到的[Ala]¹⁶-aFGF(1-29),与大分子aFGF具有同样的生物活性^[12]。基于STC的病理生理改变及aFGF的广泛生理活性和神经保护作用,我们推测[Ala]¹⁶-aFGF(1-29)可能对STC有治疗作用。本研究在成功建立STC动物模型的基础上外源性给予[Ala]¹⁶-aFGF(1-29)治疗8 wk,发现治疗后的STC小鼠粪便性状趋向于BSFS 4, 5, 肠道推进率亦明显增加,免疫组织化学及Western blot结果均显示起结肠组织神经元的表达量较给予溶解液处理的STC小鼠明显增加。近年的研究认为aFGF可能通过以下机制促进神经损伤的修复:(1)抑制因损伤直接或间接诱导的神经元凋亡或坏死;(2)促进损伤近邻区域神经元的增殖,代偿性修复神经损伤;(3)诱导神经干细胞或外周多能干细胞分化成神经元和胶质神经细胞,从而修复神经损伤^[30-33]。本研究证实STC模型小鼠肠道组织神经元表达量减少,给予aFGF活性片段干预后其表达量明显增加,此效应是否通过前述机制中的一种或几种实现是下一步的研究方向。

总之,外源性给予[Ala]¹⁶-aFGF(1-29)治疗STC小鼠,可显著改善其便秘症状和肠道推进率;且根据治疗后STC小鼠肠道神经元表达量较给予溶解液的对照组增加,我们推测[Ala]¹⁶-aFGF(1-29)可能通过保护及修复ENS,从而改善STC小鼠便秘症状及肠道推进率。但该效应的具体途径不明,有待进一步研究。

4 参考文献

- 1 Müller-Lissner SA, Kamm MA, Scarpignato C, Wald A. Myths and misconceptions about chronic constipation. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 232-242
- 2 Wald A. Is chronic use of stimulant laxatives harmful to the colon? *J Clin Gastroenterol* 2003; 36: 386-389
- 3 O'Dea CJ, Brookes JH, Wattchow DA. The efficacy of treatment of patients with severe constipation or recurrent pseudo-obstruction with pyridostigmine. *Colorectal Dis* 2010; 12: 540-548
- 4 高峰, 张胜本, 张连阳, 蔡文琴, 童卫东, 李发智, 李文惠. 慢传输型便秘结肠肌间神经丛超微结构改变. *世界华人消化杂志* 1999; 7: 1049-1051
- 5 Rossi E, Villanacci V, Fisogni S, Morelli A, Salerni B, Grigolato P, Bassotti G. Chromosomal study of enteric glial cells and neurons by fluorescence in situ hybridization in slow transit constipation. *Neurogastroenterol Motil* 2007; 19: 578-584
- 6 Törnblom H, Lang B, Clover L, Knowles CH, Vincent A, Lindberg G. Autoantibodies in patients with gut motility disorders and enteric neuropathy. *Scand J Gastroenterol* 2007; 42: 1289-1293
- 7 Lee YS, Lin CY, Robertson RT, Yu J, Deng X, Hsiao I, Lin VW. Re-growth of catecholaminergic fibers and protection of cholinergic spinal cord neurons in spinal repaired rats. *Eur J Neurosci* 2006; 23: 693-702
- 8 Huang JY, Hong YT, Chuang JI. Fibroblast growth factor prevents MPP⁺-induced death of dopaminergic neurons and is involved in melatonin neuroprotection in vivo and in vitro. *J Neurochem* 2009; 109: 1400-1412
- 9 Capetandes A, Di Salvo J, Ronan JJ, Thomas KA. Acidic fibroblast growth factor is present in the enteric nervous system of the large intestine. *J Histochem Cytochem* 2000; 48: 407-414
- 10 Chen W, Fu XB, Ge SL, Sun TZ, Zhou G, Han B, Du YR, Li HH, Sheng ZY. Intravenous acid fibroblast growth factor protects intestinal mucosal cells against ischemia-reperfusion injury via regulating Bcl-2/Bax expression. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 3419-3425
- 11 Chen W, Fu XB, Ge SL, Sun TZ, Li WJ, Sheng ZY. Acid fibroblast growth factor reduces rat intestinal mucosal damage caused by ischemia-reperfusion insult. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 6477-6482
- 12 赵艳军, 李学良, 林琳, 栗生修司, 大村裕. 酸性成纤维细胞生长因子片段脑室内及皮下注射对大鼠夜间摄食的影响. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 259-264
- 13 Ise Y, Katayama S, Hirano M, Aoki T, Narita M, Suzuki T. Effects of fluvoxamine on morphine-induced inhibition of gastrointestinal transit, antinociception and hyperlocomotion in mice. *Neurosci Lett* 2001; 29: 29-32
- 14 Friedman JD, Dello Buono FA. Opioid antagonists in the treatment of opioid-induced constipation and pruritus. *Ann Pharmacother* 2001; 35: 85-91
- 15 林琳, 姜柳琴, 张红杰, 胡晔东, 林征, 王美峰, 黄峻. 结肠慢传输运动小鼠模型建立的初步探讨. *诊断学理论与实践* 2006; 5: 31-34
- 16 O'Donnell LJ, Virjee J, Heaton KW. Detection of pseudodiarrhoea by simple clinical assessment of intestinal transit rate. *BMJ* 1990; 300: 439-440
- 17 Bassotti G, Villanacci V. Slow transit constipation: a functional disorder becomes an enteric neuropathy. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 4609-4613
- 18 Bassotti G, Villanacci V, Maurer CA, Fisogni S, Di Fabio F, Cadei M, Morelli A, Panagiotis T, Catho-

■同行评价

本文设计合理, 方法科学, 数据可靠, 对传输性便秘的治疗奠定了实验基础。

- mas G, Salerni B. The role of glial cells and apoptosis of enteric neurones in the neuropathology of intractable slow transit constipation. *Gut* 2006; 55: 41-46
- 19 朱芬芬, 林征, 林琳. 功能性便秘患者生活质量的研究. *中华消化杂志* 2007; 27: 356-358
 - 20 罗金燕. 慢性便秘诊治的新概念. *中华内科杂志* 2003; 42: 75-76
 - 21 Geramizadeh B, Hayati K, Rahsaz M, Hosseini SV. Assessing the interstitial cells of Cajal, cells of enteric nervous system and neurotransmitters in slow transit constipation, using immunohistochemistry for CD117, PGP .5 and serotonin. *Hepatogastroenterology* 2009; 56: 1670-1674
 - 22 Lee JI, Park H, Kamm MA, Talbot IC. Decreased density of interstitial cells of Cajal and neuronal cells in patients with slow-transit constipation and acquired megacolon. *J Gastroenterol Hepatol* 2005; 20: 1292-1298
 - 23 许海尘, 林琳, 张红杰, 赵志泉. 慢传输型便秘模型的建立及其机制探讨. *医学研究生学报* 2004; 17: 502-504
 - 24 姜柳琴, 林琳, 张红杰, 胡哗东, 林征, 王美峰. 血红素氧合酶2在吗啡诱导的结肠慢传输型便秘小鼠结肠中的表达及意义. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 422-425
 - 25 Hidai C, Masako O, Ikeda H, Nagashima H, Matsuoaka R, Quertermous T, Kasanuki H, Kokubun S, Kawana M. FGF-1 enhanced cardiogenesis in differentiating embryonal carcinoma cell cultures, which was opposite to the effect of FGF-2. *J Mol Cell Cardiol* 2003; 35: 421-425
 - 26 Forough R, Wang X, Martinez-Lemus LA, Thomas D, Sun Z, Motamed K, Parker JL, Meininger GA. Cell-based and direct gene transfer-induced angiogenesis via a secreted chimeric fibroblast growth factor-1 (sp-FGF-1) in the chick chorioallantoic membrane (CAM). *Angiogenesis* 2003; 6: 47-54
 - 27 Angulo J, Ojeda R, de Paz JL, Lucas R, Nieto PM, Lozano RM, Redondo-Horcajo M, Giménez-Gallego G, Martín-Lomas M. The activation of fibroblast growth factors (FGFs) by glycosaminoglycans: influence of the sulfation pattern on the biological activity of FGF-1. *Chembiochem* 2004; 5: 55-61
 - 28 Tsai PY, Cheng H, Huang WC, Huang MC, Chiu FY, Chang YC, Chuang TY. Outcomes of common peroneal nerve lesions after surgical repair with acidic fibroblast growth factor. *J Trauma* 2009; 66: 1379-1384
 - 29 Tsai MC, Shen LF, Kuo HS, Cheng H, Chak KF. Involvement of acidic fibroblast growth factor in spinal cord injury repair processes revealed by a proteomics approach. *Mol Cell Proteomics* 2008; 7: 1668-1687
 - 30 Jin K, LaFevre-Bernt M, Sun Y, Chen S, Gafni J, Crippen D, Logvinova A, Ross CA, Greenberg DA, Ellerby LM. FGF-2 promotes neurogenesis and neuroprotection and prolongs survival in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 18189-18194
 - 31 La Spada AR. Huntington's disease and neurogenesis: FGF-2 to the rescue? *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 17889-17890
 - 32 Andrade MS, Mendonça LM, Chadi G. Treadmill running protects spinal cord contusion from secondary degeneration. *Brain Res* 2010; 1346: 266-278
 - 33 Fu XB, Li XK, Wang T, Cheng B, Sheng ZY. Enhanced anti-apoptosis and gut epithelium protection function of acidic fibroblast growth factor after cancelling of its mitogenic activity. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 3590-3596

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

WJC, WJGE, WJGO, WJGS, WJH, WJR 6 本期刊 被 PMC 收录

本刊讯 我们于2010-08-17收到PubMed Central(PMC)的通知, 经过美国国立医学图书馆机构咨询委员会The Literature Selection Technical Review Committee评定, 决定*WJC, WJGE, WJGO, WJGS, WJH, WJR* 6本期刊被PMC收录. PMC是一个提供生命科学期刊文献的全文数据库, 他是由隶属美国国立医学图书馆(National Library of Medicine)的国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information)所创建与管理的. (常务副总编辑: 张海宁 2010-08-17)

早期空肠内营养联合中药肠内滴注对重症急性胰腺炎患者肠麻痹的改善作用

卢杰夫, 黎波, 彭卓崙, 梁雪, 何慧, 陈国忠, 李桂贤

卢杰夫, 黎波, 彭卓崙, 梁雪, 何慧, 陈国忠, 李桂贤, 广西中医药大学第一附属医院消化内科 广西壮族自治区南宁市 530022

卢杰夫, 在读博士, 主要从事消化系统疾病的研究及消化内镜的诊疗。

广西科学研究与技术开发计划基金资助项目, No. 0999001
作者贡献分布: 卢杰夫与黎波对此文所作贡献均等; 此课题由卢杰夫设计; 研究过程由卢杰夫、黎波、彭卓崙、梁雪、何慧、陈国忠及李桂贤操作完成; 数据分析由卢杰夫与黎波完成; 本文写作由卢杰夫与黎波完成。

通讯作者: 卢杰夫, 530022, 广西壮族自治区南宁市, 广西中医药大学第一附属医院消化内科, jfl183@yahoo.com.cn

电话: 0771-5848705

收稿日期: 2011-02-14 修回日期: 2011-03-24

接受日期: 2011-04-11 在线出版日期: 2011-04-28

Early enteral nutrition combined with enteral infusion of traditional Chinese medicine improves intestinal paralysis in patients with severe acute pancreatitis

Jie-Fu Lu, Bo Li, Zhuo-Yu Peng, Xue Liang, Hui He, Guo-Zhong Chen, Gui-Xian Li

Jie-Fu Lu, Bo Li, Zhuo-Yu Peng, Xue Liang, Hui He, Guo-Zhong Chen, Gui-Xian Li, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Traditional Chinese Medical University, Nanning 530022, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Supported by: the Scientific Research and Technological Development Project of Guangxi Zhuang Autonomous Region, No. 0999001

Correspondence to: Jie-Fu Lu, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Traditional Chinese Medical University, Nanning 530022, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China, jfl183@yahoo.com.cn

Received: 2011-02-14 Revised: 2011-03-24

Accepted: 2011-04-11 Published online: 2011-04-28

Abstract

AIM: To evaluate whether early enteral nutrition (EN) combined with enteral infusion of traditional Chinese medicine JiaWei Dachengqi Granules improves intestinal paralysis in patients with severe acute pancreatitis.

METHODS: Thirty-nine patients with severe acute pancreatitis who received conventional therapy were randomly divided into three

groups to undergo total parenteral nutrition (PN), EN, EN plus enteral infusion of JiaWei Dachengqi Granules, respectively. The time required for relief of abdominal pain and distention and recovery of gastrointestinal function was measured, and dynamic monitoring of blood amylase, high-sensitivity C-reactive protein (CRP), and tumor necrosis factor- α (TNF- α) was performed.

RESULTS: In the EN and EN+TCM groups, abdominal pain and distention were relieved or disappeared, and gastrointestinal function returned to normal after treatment. The time (days) required for relief of abdominal pain and distention and recovery of gastrointestinal function were significantly shorter in the EN and EN+TCM groups than in the PN group (4.22 ± 0.94 , 3.02 ± 0.75 vs 5.72 ± 1.55 ; 4.66 ± 1.14 , 3.14 ± 0.62 vs 6.81 ± 1.81 ; 3.42 ± 0.82 , 3.21 ± 0.88 vs 6.04 ± 1.67 ; all $P < 0.05$). In contrast, in the PN group, abdominal distension and intestinal paralysis were still seen in two patients, and abdominal compartment syndrome with multiple organ failure in one patient. The concentrations of serum amylase (U/L), TNF- α ($\mu\text{g/L}$), and CRP (mg/L) in the EN+TCM group decreased significantly faster than in the other two groups after 5 days of treatment (serum amylase: 92.30 ± 19.43 vs 164.35 ± 32.10 , 242.35 ± 46.20 ; TNF- α : 1.88 ± 0.17 vs 1.92 ± 0.11 , 2.64 ± 0.21 ; CRP: 24.30 ± 12.53 vs 62.64 ± 28.55 , 42.10 ± 25.12).

CONCLUSION: Early enteral nutrition combined with enteral infusion of JiaWei Dachengqi Granules improves intestinal paralysis in patients with severe acute pancreatitis possibly by reducing blood levels of amylase, TNF- α and CRP, relieving abdominal pain and distension, and promoting recovery of gastrointestinal function.

Key Words: Early enteral nutrition; Jiawei Dachengqi Granules; Traditional Chinese medicine; Severe acute pancreatitis; Intestinal paralysis

Lu JF, Li B, Peng ZY, Liang X, He H, Chen GZ, Li GX.

■背景资料

重症急性胰腺炎(SAP)具有发病急、进展快、病情重等特点。SAP发病初期阶段,大多数以腹胀腹痛并重,胃肠麻痹及胃肠屏障功能障碍,肠道大量内毒素吸收,激活巨噬细胞,释放大炎症介质及细胞因子,引起全身炎症反应综合征(SIRS),诱发和加重MODS。

■同行评议者

沈克平, 主任医师, 上海龙华医院肿瘤五科

■研究前沿

中药在SAP的治疗上,近10年成为研究的热点.研究证明中药如大黄、丹参等对SAP有着显著的疗效.

Early enteral nutrition combined with enteral infusion of traditional Chinese medicine improves intestinal paralysis in patients with severe acute pancreatitis. Shijie Hua-ren Xiaohua Zazhi 2011; 19(12): 1257-1262

摘要

目的: 评价早期空肠内营养联合中药加味大承气颗粒肠内滴注治疗对改善重症急性胰腺炎患者肠麻痹的作用,探索重症急性胰腺炎的中西医结合治疗的新途径.

方法: 39例重症急性胰腺炎患者在常规治疗基础上,随机分成3组分别进行全胃肠外营养(PN组)、早期肠内营养(EN组)、肠内营养+中药大承气颗粒(EN+中药组)肠内滴注,观察患者腹痛腹胀缓解时间、胃肠道功能恢复(肠鸣音出现、肛门排气及排便)时间,并动态监测血淀粉酶、高敏C反应蛋白(CRP)、血浆肿瘤坏死因子- α (TNF- α).

结果: EN组、EN+中药组患者经治疗后腹痛腹胀症状均缓解或消失,胃肠道功能恢复正常. PN组12例中,有2例腹胀、肠麻痹持续加重,其中1例出现腹腔隔室综合征并发多脏器功能衰竭. EN组、EN+中药组在腹胀(d)、腹痛缓解时间(d)以及胃肠道功能恢复时间(d)均优于PN组(4.22 ± 0.94 , 3.02 ± 0.75 vs 5.72 ± 1.55 ; 4.66 ± 1.14 , 3.14 ± 0.62 vs 6.81 ± 1.81 ; 3.42 ± 0.82 , 3.21 ± 0.88 vs 6.04 ± 1.67 , 均 $P < 0.05$), 其中EN+中药组腹胀(d)、腹痛缓解时间(d)优于EN组(3.02 ± 0.75 vs 4.22 ± 0.94 ; 3.14 ± 0.62 vs 4.66 ± 1.14 , 均 $P < 0.05$), 胃肠道功能恢复时间EN组与中药组无明显差异. 治疗第5天后EN+中药组血清淀粉酶(U/L)较其他两组下降更加明显(92.30 ± 19.43 vs 164.35 ± 32.10 , 242.35 ± 46.20 , 均 $P < 0.05$); 三组患者TNF- α 、CRP水平均随时间而呈下降趋势, EN+中药组TNF- α ($\mu\text{g/L}$)在第5、9天下降与PN组有明显差异(1.88 ± 0.17 vs 2.64 ± 0.21 , 1.05 ± 0.12 vs 1.98 ± 0.16 , 均 $P < 0.05$), 但与EN组相比无明显差异. EN+中药组CRP(mg/L)在第5、9天下降与PN组、EN组均有明显差异(24.30 ± 12.53 vs 62.64 ± 28.55 , 42.10 ± 25.12 ; 10.24 ± 4.06 vs 24.98 ± 7.14 , 21.01 ± 6.46 , 均 $P < 0.05$).

结论: 早期肠内营养联合加味大承气颗粒经空肠内滴注治疗重症急性胰腺炎,能明显降低血淀粉酶及血浆TNF- α 、CRP水平,有效地缓解患者的腹痛腹胀症状,促进胃肠道功能恢复正常,减轻中毒性肠麻痹,防止肠道功能的衰竭,疗效显著.

关键词: 早期空肠内营养; 加味大承气颗粒; 中药; 重症急性胰腺炎; 肠麻痹

卢杰夫, 黎波, 彭卓瑜, 梁雪, 何慧, 陈国忠, 李桂贤. 早期空肠内营养联合中药肠内滴注对重症急性胰腺炎患者肠麻痹的改善作用. 世界华人消化杂志 2011; 19(12): 1257-1262

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/1257.asp>

0 引言

重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)是一种病情凶险、并发症多的严重疾病. 由于全身炎症反应、肠道缺血-再灌注损伤等,导致肠道屏障功能受损,出现中毒性麻痹、肠道黏膜萎缩、通透性增加,肠道菌群移位. 营养支持疗法是SAP综合治疗中的重要环节,近来研究表明,早期空肠内营养(enteral nutrition, EN)可改善肠道通透性、减少感染机会、防止多发性损伤后多脏器功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)^[1-3]. 中药在SAP的治疗上,近10年成为研究的热点. 研究证明中药如大黄、丹参等对SAP有着显著的疗效. 但是,目前国内研究主要以中药口服或大肠灌肠为主,少有中药与肠内营养联合进行肠内滴注. 本文就近年来收治的39例SAP患者采用早期肠内营养联合加味大承气颗粒经空肠内滴注疗法,获得良好的疗效. 现报道如下.

1 材料和方法

1.1 材料 病例来源: 2006-06/2010-12在广西医学院第一附属医院住院的病例资料完整的SAP患者,共39例. 其中男23例,女16例,年龄21-79(平均年龄 54.3 ± 10.1)岁. 入选标准: (1)39例患者均符合SAP的诊断标准^[4],即具备急性胰腺炎的临床症状、体征和生化改变,且具备下列条件之一者: 局部并发症(胰腺坏死,假性囊肿,胰腺脓肿); 器官衰竭; Ranson评分3; APACHE-II评分8; CT分级为D, E级,即D级: 单个胰外液体积聚; E级: 2个或更多个胰外液体积聚,伴或不伴胰腺坏死; (2)所选病例均为单一病因和部分病因不明患者,伴有肠麻痹主要临床表现,即不同程度的腹胀、腹痛、呕吐、厌食,肛门停止排便排气以及肠鸣音消失; 立位腹部平片示肠腔充气、扩张,蠕动减弱或消失,存在气液平面. 所有患者均于入院后48 h内行增强CT检查; (3)患者对治疗均知情同意; (4)年龄 < 80 岁; (5)入院后2 wk内暂不行外科手术. 排除标准: (1)入组后再发SAP者; (2)依从性差者;

表 1 3组患者腹部症状、体征的比较

分组	n	腹胀缓解时间(d)	腹痛缓解时间(d)	胃肠道功能恢复时间(d)
PN组	10	5.72 ± 1.55	6.81 ± 1.81	6.04 ± 1.67
EN组	14	4.22 ± 0.94 ^a	4.66 ± 1.14 ^a	3.42 ± 0.82 ^a
EN+中药组	13	3.02 ± 0.75 ^{ab}	3.14 ± 0.62 ^{ab}	3.21 ± 0.88 ^a

^a $P < 0.05$ vs PN组; ^b $P < 0.01$ vs EN组.

(3)恶性肿瘤者; (4)发病前有严重心、肺、肾脏功能不全等基础疾病者; (5)有慢性胰腺炎病史者; (6)妊娠及哺乳期妇女; 常规治疗: 禁食及胃肠减压、抗感染、抑制胃酸分泌、生长抑素等. 同时补足各种维生素及微量元素; EN的组成: 肠内营养乳剂(商品名: 瑞素, 由上海华瑞公司生产)、氨基酸(江苏正大丰海制药有限公司)、脂肪乳(广西百特侨光医疗用品有限公司); 加味大承气颗粒: 生大黄15 g, 枳实18 g, 芒硝20 g, 厚朴18 g, 赤芍40 g, 丹参40 g(江阴天江药业有限公司提供的新型浓缩颗粒剂). 使用时将中药加味大承气颗粒混合后, 用100 mL温开水调和成水剂, 经液囊空肠导管滴入, 滴入温度37℃-38℃; 液囊空肠导管由浙江省衢州市迅康医疗器械有限公司生产.

1.2 方法

1.2.1 分组: 本研究采用随机分组的方法, 将39例患者分为全胃肠外营养(parenteral nutrition, PN)组12例、EN组14例、EN+中药组13例, 分别于治疗开始后第1、5、9天同时检测患者外周血血清淀粉酶、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、高敏C反应蛋白(C-reactive protein, CRP)等指标.

1.2.2 实施方案: EN组、EN+中药组的实施: (1)肠内营养管的放置: 先从鼻腔内插入空肠营养管, 方法同胃管至胃腔, 然后在胃镜下将空肠营养管送达Treitz韧带以远, 行X线摄片以证实营养管确切位置; (2)EN组患者在呼吸、循环、水电解质、酸碱平衡稳定情况下, 发病后的48-72 h开始实施EN. 第1天先经过喂养管滴注温热生理盐水(37℃-38℃)500-1 000 mL/d. 若能耐受, 第2天始可选用肠内高能营养多聚合剂作为主要能源, 辅以氨基酸和脂肪乳. 营养液用EN输注泵持续滴注并控制滴速. 初起25 mL/h, 适应后逐渐增至100 mL/h, 根据患者情况随时调整剂量及滴速. 热量和氮量的不足部分由PN补充. 热量50%-60%由糖来提供, 15%-20%由蛋白质提供, 20%-30%由脂肪来提供. 每日供氮量: 0.2-0.3

g/kg, 糖脂比为3:2. EN+中药组与EN组EN给予方式、量及时机相同, 中药于置管后第2天滴注, 每次100 mL, 每天2次, 可根据患者情况随时调整剂量及滴速. 当复查血淀粉酶正常, 增强CT示胰周渗出液明显减少, 或局限性包裹趋势, 腹部无压痛和反跳痛, 可考虑拔管停止EN, 拔管前先口服少量流质, 如无不适应, 2-3 d后予拔管; PN组的实施: PN组成: PN组的营养支持在入院后24-72 h内开始实施, 提供的热卡量与EN组相似.

1.2.3 观察指标和检测方法: (1)观察患者腹痛腹胀缓解时间、胃肠道功能恢复(肠鸣音出现及肛门排气、排便)时间; (2)动态监测血常规、血淀粉酶、血糖、血脂、肝功能、肾功能、血电解质、血气分析以及CRP、血浆TNF- α ; (3)定期行腹部超声和(或)CT或MRI检查, 观察胰腺和腹腔病变情况.

统计学处理 采用PEMS3.1 For Windows软件进行统计分析, 观察指标以mean±SD表示, 组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 提示有显著性差异.

2 结果

2.1 腹部症状、体征比较 EN组、EN+中药组患者经治疗后腹痛腹胀症状均缓解或消失, 胃肠道功能恢复正常. PN组12例中, 有2例腹胀持续加重, 肠麻痹, 其中1例出现腹腔间室隔综合征并发多脏器功能衰竭. EN组、EN+中药组在腹胀、腹痛缓解时间以及胃肠道功能恢复时间均优于PN组($P < 0.05$), 其中腹胀、腹痛缓解时间EN+中药组优于EN组、PN组($P < 0.05$), 胃肠道功能恢复时间EN组与中药组无明显差异($P > 0.05$, 表1).

2.2 各组血清淀粉酶变化 EN、PN、EN+中药组在入院第1天时的血清淀粉酶相比均无显著性差异($P > 0.05$), 但第5天EN+中药组相比其他2组下降更加明显($P < 0.05$), 经治疗9 d后血清淀粉酶均恢复正常(表2).

2.3 3组患者TNF- α 、CRP水平 TNF- α 、CRP含量均随时间而呈下降趋势, EN+中药组TNF- α 在

■相关报道

郭莲怡等的研究结果提示, 大黄、丹参能抑制TNF- α 分泌, 上调IL-10水平, 调节细胞因子网络的平衡, 促使SAP的恢复.

■应用要点

早期肠内营养联合加味大承气颗粒经空肠内滴注治疗重症急性胰腺炎,能明显降低血淀粉酶及血浆TNF- α 、CRP水平,有效地缓解患者的腹痛腹胀症状,促进胃肠道功能恢复正常,减轻中毒性肠麻痹,防止肠道功能的衰竭,疗效显著。

表 2 3组患者血清淀粉酶变化 (U/L)

分组	1 d	5 d	9 d
PN组	1 042.35 \pm 326.22	242.35 \pm 46.20 ^a	84.31 \pm 29.20 ^a
EN组	991.65 \pm 306.47	164.35 \pm 32.10 ^{ae}	66.31 \pm 25.29 ^a
EN+中药组	1 076.13 \pm 376.60	92.30 \pm 19.43 ^{ace}	70.37 \pm 21.14 ^a

^a P <0.05 vs PN; ^e P <0.05 vs EN组; ^a P <0.05 vs 1 d.

表 3 3组患者血浆TNF- α 、CRP含量的比较

分组	TNF- α (μ g/L)			CRP(mg/L)		
	1 d	5 d	9 d	1 d	5 d	9 d
PN组	3.32 \pm 0.23	2.64 \pm 0.21	1.98 \pm 0.16	145.32 \pm 36.41	62.64 \pm 28.55	24.98 \pm 7.14
EN组	3.30 \pm 0.26	1.92 \pm 0.11 ^a	1.08 \pm 0.16 ^a	152.24 \pm 44.16	42.10 \pm 25.12 ^a	21.01 \pm 6.46 ^a
EN+中药组	3.37 \pm 0.28	1.88 \pm 0.17 ^{ae}	1.05 \pm 0.12 ^{ae}	149.86 \pm 38.20	24.30 \pm 12.53 ^{ace}	10.24 \pm 4.06 ^{ace}

^a P <0.05 vs PN; ^e P <0.05 vs EN组; ^a P <0.05 vs 1 d.

第5、第9天下降与PN组有明显差异(P <0.05),但与EN组相比无明显差异(P >0.05). EN+中药组CRP在第5、第9天下降与PN组、EN组均有明显差异(P <0.05,表3).

3 讨论

SAP具有发病急、进展快、病情重等特点. SAP发病初期阶段,大多数以腹胀腹痛并重,胃肠麻痹及胃肠屏障功能障碍,肠道大量内毒素吸收,激活巨噬细胞,释放大炎症介质及细胞因子,引起全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS),诱发和加重MODS^[5]. 王彩花等^[6]报道急性胰腺炎起病初期,血TNF浓度明显高于正常,而重症组又高于轻症组,提示TNF参与胰腺炎的急性炎症过程. TNF- α 作为始发因子诱导IL-1、IL-6和IL-8及其自身的基因表达引起级联反应造成炎症介质的失控性释放,炎症迅速扩展到全身,发生SIRS和MODS. 因此, TNF- α 与SAP的严重程度密切相关^[7]. CRP是肝脏合成的一种急性时相性蛋白,健康人血清中浓度很低. 他的升高是机体对感染和创伤的急性时相反应之一,对受损细胞有非特异性保护作用,组织受损时,巨噬细胞等产生的可溶性细胞刺激因子刺激肝细胞快速合成CRP. 当组织受伤6 h后,血中的CRP就已开始升高,24-48 h后达高峰,其升高的幅度高于其他任何急性时相反应蛋白,且不易受贫血、药物等因素影响,且CRP越高,全身炎症反应越重,其危险程度越高,

病情越重,故而常被人们作为机体发生各类炎症的监测指标之一. 近年来被临床广泛应用于急性胰腺炎病情的监控及预后判断^[8,9].

虽然SAP治疗取得了一定的进展,但近年来文献报道SAP的死亡率仍达10%-30%^[10-12]. 其主要原因为严重的全身性炎症反应、继发感染以及因长时间禁食而导致的营养不良和肠道功能衰竭. SAP治疗原则是使胰腺处于休息状态,以减少胰腺外分泌. 由于经口饮食有可能刺激胰腺分泌,加重胰腺炎症状,过去一直采用全胃肠外营养(total parenteral nutrition, TPN),但其有较多并发症,包括继发感染以及因长时间禁食而导致的营养不良和肠道功能衰竭^[13,14].

近年来,随着对EN在支持治疗SAP的研究表明,虽然SAP早期有腹膜炎、肠麻痹发生,但在急性炎症得到控制后,可迅速减轻或消退,为EN采用提供了条件,且通过鼻空肠或手术时空肠造瘘将导管插入屈氏韧带远端的空肠实施,能避免刺激胰腺的外分泌. 许春芳等^[15]将63例SAP患者随机分为EN组和TPN组,观察肠内与PN对SAP患者免疫功能的影响,认为SAP患者在病程早期存在免疫功能的下降;EN能有效改善机体免疫功能,TPN不利于机体免疫功能的恢复. 因此,EN以其循生理途径,直接向肠黏膜提供其代谢所需要营养物质,促进肠黏膜的血液循环,防止黏膜酸中毒和通透性增高,改善肠道和全身免疫功能,经济实惠等优势,正在逐步应用于临床^[16,17].

中医药参与急性胰腺炎的治疗越来越受到重视, 得到医学界的广泛认可。SAP在中医属“胁痛”、“腹痛”、“胃皖痛”等范畴。中医认为本病多由饮食不节, 或情志刺激, 或继发于胆石症、蛔虫等病之后, 中焦宣泄不利, 湿热邪毒塞积所致。临床表现腹痛、腹胀、呕吐、便秘等阳明腑实证。在疾病的发展演变过程中, 脏腑气滞血瘀、湿热蕴结是重要环节, 可进一步导致脏腑功能及阴阳失衡, 变证迭出, 治疗困难。因此, 治疗重在早期通腑泄下, 活血化瘀, 清热解毒, 及早阻断病变的发展。吴承堂等^[18]报道, 经中药清胰汤(大黄、柴胡、白芍、黄芩、胡黄连、元胡、木香、芒硝)治疗后, ANP犬的肠黏膜损害明显减轻, 肠黏膜绒毛宽度、高度和面积显著增加, 肠组织蛋白的含量增加, 肠通透性显著下降, 血中内毒素水平下降1-2倍, 脏器细菌移位率减少50%。

本组中药方加味大承气颗粒在《伤寒论》大承气汤基础上加味而成, 由生大黄、枳实、芒硝、厚朴、赤芍、丹参组成, 方中大黄、芒硝泻热导滞, 软坚通便; 柴胡入肝胆经, 疏泄肝胆气机; 厚朴、枳实行气导滞, 消痞除满, 黄芩苦寒, 清降泄热。共同达到通里攻下, 清利泄热的目的。临床研究表明大黄对急性胰腺炎患者的胃肠黏膜有很好的保护作用, 可有效地缓解中毒性肠麻痹, 促进胃肠蠕动和胃肠营养的恢复, 清除血浆内炎性递质, 对阻断病源性感染环节有重要作用, 大黄中的大黄酸、大黄素和芦荟大黄素对多种细菌有抑制作用, 可以抑制内毒素介导的单核-巨噬细胞产生的细胞因子TNF- α 、IL-1、IL-2、IL-8等, 减少这些细胞因子造成的“瀑布效应”, 大黄还可以减少胰周脓肿、败血症的发生率^[19,20]; 芒硝有清热泻下之功效, 有研究发现, 芒硝对肠黏膜有刺激作用, 可促进肠蠕动。而且芒硝能激活网状内皮系统, 具有消炎止痛作用, 能迅速缓解腹痛、腹胀及腹肌紧张, 改善胰腺局部的血液循环, 从而减轻腹内炎症及胰腺、肠壁水肿, 防止腹腔炎性包块和假性囊肿等并发症^[21]; 枳实具有理气、宽胸、止痛等功效。厚朴有兴奋胃肠平滑肌作用, 还具有明显抗炎镇痛作用, 尤其对大肠杆菌等革兰氏阴性菌有较强的抗菌作用^[22]。赤芍具有很强的抗内毒素作用, 对大肠杆菌脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)具有直接的破坏作用^[23]。丹参对SAP并发胃黏膜、肺脏、肾脏微循环障碍均有改善作用^[24,25]。郭莲怡等^[26]的研究结果提示:

大黄、丹参能抑制TNF- α 分泌, 上调IL-10水平, 调节细胞因子网络的平衡, 促使SAP的恢复。

本研究结果显示, 早期EN联合加味大承气颗粒空肠内滴注治疗SAP, 能明显降低血淀粉酶及血浆TNF- α 、CRP水平, 有效地缓解患者的腹痛腹胀症状, 促进胃肠道功能恢复正常, 减轻中毒性肠麻痹, 防止肠道功能的衰竭, 疗效显著。其机制可能是增加胃肠蠕动, 保护肠道黏膜屏障, 减轻内毒素血症, 抑制炎性细胞因子, 抗脂质过氧化, 清除自由基, 减轻胰腺炎症及组织器官损伤等。但是, 目前国内研究主要以中药口服或大肠灌肠为主, 我们采用加味大承气颗粒空肠内滴注, 使中药直接到达上段空肠, 既加快疗效、促进吸收, 又避免了直接经胃灌注导致的对胰腺分泌功能的刺激, 同时, 中药颗粒制剂与传统中药汤剂相比, 不仅浓度更高, 而且毒性低, 使用更方便, 为探索SAP的中西医结合治疗提供新的途径。

4 参考文献

- 1 Kompan L, Kremzar B, Gadzijev E, Prosek M. Effects of early enteral nutrition on intestinal permeability and the development of multiple organ failure after multiple injury. *Intensive Care Med* 1999; 25: 157-161
- 2 Kompan L, Vidmar G, Spindler-Vesel A, Pecar J. Is early enteral nutrition a risk factor for gastric intolerance and pneumonia? *Clin Nutr* 2004; 23: 527-532
- 3 程礼, 王兴鹏, 汪佩文, 靖大道, 徐敏, 陈洁. 保护肠屏障功能对加重急性胰腺炎患者预后的影响. *胃肠病学* 2005; 10: 24-26
- 4 中华医学会消化病学分会胰腺疾病学组. 中国急性胰腺炎诊治指南(草案). *中华消化杂志* 2004; 24: 190-192
- 5 Ammori BJ, Leeder PC, King RF, Barclay GR, Martin IG, Larvin M, McMahon MJ. Early increase in intestinal permeability in patients with severe acute pancreatitis: correlation with endotoxemia, organ failure, and mortality. *J Gastrointest Surg* 1999; 3: 252-262
- 6 王彩花, 钱可大, 朱永良, 唐训球. 急性胰腺炎患者TNF和IL-6变化的意义. *世界华人消化杂志* 2001; 9: 14-18
- 7 Pooran N, Indaram A, Singh P, Bank S. Cytokines (IL-6, IL-8, TNF): early and reliable predictors of severe acute pancreatitis. *J Clin Gastroenterol* 2003; 37: 263-266
- 8 Hogevis H, Olaison L, Andersson R, Alestig K. C-reactive protein is more sensitive than erythrocyte sedimentation rate for diagnosis of infective endocarditis. *Infection* 1997; 25: 82-85
- 9 Jiang CF, Shiao YC, Ng KW, Tan SW. Serum interleukin-6, tumor necrosis factor alpha and C-reactive protein in early prediction of severity of acute pancreatitis. *J Chin Med Assoc* 2004; 67: 442-446
- 10 章爱斌, 郑树森. 重症急性胰腺炎并发多器官功能障碍预后分析. *中国实用外科杂志* 2004; 24: 47-49
- 11 Ammori BJ. Role of the gut in the course of severe acute pancreatitis. *Pancreas* 2003; 26: 122-129
- 12 龚自华, 王兴鹏. 用循证医学的原理评价急性胰腺炎

■同行评价

本文选题恰当, 治疗方法简便易行, 具有很好的学术价值, 值得推广。

- 的预后和治疗. 胰腺病学 2002; 2: 116-119
- 13 Taylor SL, Morgan DL, Denson KD, Lane MM, Pennington LR. A comparison of the Ranson, Glasgow, and APACHE II scoring systems to a multiple organ system score in predicting patient outcome in pancreatitis. *Am J Surg* 2005; 189: 219-222
- 14 Steinberg WM. Diagnosis and management of acute pancreatitis. *Cleve Clin J Med* 1997; 64: 182-186
- 15 许春芳, 黄晓曦, 陈卫昌, 龚镭. 肠内与肠外营养对重症急性胰腺炎患者免疫功能的影响. 苏州大学学报(自然科学版) 2008; 28: 78-81
- 16 刘丕, 王兴鹏, 吕农华, 陈洁, 吴恺, 徐敏. 早期肠内营养联合肠道去污对犬急性坏死性胰腺炎肠屏障的影响. 中华肝胆外科杂志 2006; 12: 128-130
- 17 黄晓曦, 王兴鹏, 吴恺, 许春芳, 陈卫昌, 王亚东, 朱家沂, 龚镭, 胥明, 彭晓斌. 持续早期肠内营养联合肠黏膜保护对重症急性胰腺炎肠屏障功能影响的多中心随机对照临床试验. 中华消化杂志 2008; 28: 225-229
- 18 吴承堂, 黎洁良, 黄祥成, 张志凌. 中药清胰汤及双歧杆菌合剂对急性坏死性胰腺炎肠道细菌移位影响的比较研究. 世界华人消化杂志 1999; 7: 525-528
- 19 薄世宁, 张淑文, 王宝恩. 中药大黄对急性出血坏死性胰腺炎治疗作用的研究. 中国中西医结合急救杂志 2000; 7: 362-364
- 20 赵卫川, 崔乃强, 赵琪. 承气合剂对缺血再灌注肠管内毒素转运的影响. 中国中西医结合外科杂志 1998; 4: 83
- 21 解基良, 张志尧, 吴咸中. 承气方剂对肠屏障功能保护作用的实验研究. 中国中西医结合外科杂志 2002; 8: 189-191
- 22 李贞茂, 韩盛玺, 徐志鹏, 童荣生. 厚朴酚对大鼠坏死性胰腺炎肺损伤的保护作用. 世界华人消化杂志 2006; 14: 1167-1171
- 23 张艺平. 中药抗内毒素研究新进展. 中西医结合急救杂志 2001; 8: 122-124
- 24 沙建平, 祝彼得, 徐艳, 陈炫, 赵艳, 刘啸, 芦殿荣, 刘舟. 丹参对兔急性胰腺炎早期中性粒细胞与内皮细胞黏附抑制作用的实验研究. 中国中西医结合急救杂志 2003; 10: 279-281
- 25 张建新, 瞿建国, 李龙, 谢嵘, 程国祚. 急性坏死性胰腺炎并发肾损害的机制及对丹参的效应. 中华急诊医学杂志 2003; 12: 97-99, 102
- 26 郭逢怡, 卢艳云. 大黄丹参对重症急性胰腺炎患者血清TNF- α 、IL-10影响的临床研究. 中国现代医学杂志 2007; 17: 1612-1614

编辑 李薇 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

汤姆森-路透公布 2009 年 *WJG* 影响因子 2.092

本刊讯 根据2010-06-18汤姆森-路透发布的2009年度期刊引证报告, *World Journal of Gastroenterology*(*WJG*)(中文刊名《世界胃肠病学杂志》)影响因子为2.092, 论文总被引次数12 740次, 特征因子0.05832, 分别位于65种国际胃肠肝病学期刊的第33位, 8位和5位。

与2008年的影响因子(2.081), 总被引次数(10 822次), 特征因子(0.05006)相比, *WJG*在2009年国际胃肠肝病学期刊中的排名分别增加了7个百分点, 4个百分点和3个百分点。(*WJG*编辑部主任: 程剑侠 2010-06-18)

细胞免疫参数对结直肠癌的评估价值

李耀平, 宋东, 王艳峰, 田志华, 贾莉, 苏文

李耀平, 山西省肿瘤医院肛肠科 山西省太原市 030013
宋东, 王艳峰, 田志华, 贾莉, 苏文, 山西省肿瘤医院免疫室
山西省太原市 030013
李耀平, 主任医师, 主要从事肛肠系统肿瘤的治疗和研究。
山西省留学人员科研资助项目, No. 晋留管办发[2009]9
号-113
作者贡献分布: 李耀平与苏文对此文所作贡献均等; 此课题由李
耀平与苏文共同设计; 研究过程由宋东、王艳峰、田志华及贾
莉共同完成; 本论文写作由李耀平、宋东及苏文完成。
通讯作者: 苏文, 主任医师, 博士, 030013, 山西省太原市职工新街
3号, 山西省肿瘤医院肿瘤研究所免疫室, suwen30@yahoo.com
收稿日期: 2010-12-27 修回日期: 2011-03-24
接受日期: 2011-04-11 在线出版日期: 2011-04-28

Multiparameter analysis of cellular immunity in patients with colorectal cancer

Yao-Ping Li, Dong Song, Yan-Feng Wang,
Zhi-Hua Tian, Li Jia, Wen Su

Yao-Ping Li, Department of Colorectal Medicine, Shanxi
Provincial Cancer Hospital, Taiyuan 030013, Shanxi Prov-
ince, China
Dong Song, Yan-Feng Wang, Zhi-Hua Tian, Li Jia, Wen
Su, Department of Immunology, Shanxi Provincial Cancer
Hospital, Taiyuan 030013, Shanxi Province, China
Supported by: the Scientific Research Foundation for Re-
turned Overseas Scholars in Shanxi Province, No. Jin Liu
Guan Ban Fa [2009]9-113
Correspondence to: Wen Su, Department of Immunology,
Shanxi Provincial Cancer Hospital, 3 Zhigong Xin Avenue, Tai-
yuan 030013, Shanxi Province, China. suwen30@yahoo.com
Received: 2010-12-27 Revised: 2011-03-24
Accepted: 2011-04-11 Published online: 2011-04-28

Abstract

AIM: To compare the proportions of CD4⁺, CD8⁺ T cells, NK cells, B cells, and CD4⁺CD25^{High}CD127^{Low} Treg cells and Th/Treg ratio in the peripheral blood of patients with colorectal cancer and healthy controls to investigate the immune status in patients with colorectal cancer.

METHODS: Flow cytometry was used to analyze the proportions of CD4⁺, CD8⁺ T cells, NK cells, B cells, and CD4⁺CD25^{High}CD127^{Low} Treg cells and Th/Treg ratio in the peripheral blood from 100 patients with non-metastatic colorectal cancer, 100 patients with metastatic colorectal cancer, and 100 healthy controls. One-way ANOVA was used to study the changes in the above immunity parameters.

RESULTS: The proportion of CD4⁺CD25^{High}CD127^{Low} Treg cells was significantly higher in patients with metastatic colorectal cancer than in health controls and patients with non-metastatic colorectal cancer ($7.72\% \pm 2.20\%$ vs $6.08\% \pm 1.47\%$, $5.91\% \pm 1.55\%$, both $P < 0.05$), while that of CD4⁺ T cells was statistically lower in patients with metastatic colorectal cancer than in the other two groups of subjects ($34.04\% \pm 8.71\%$ vs $37.83\% \pm 7.62\%$, $37.68\% \pm 8.89\%$, both $P < 0.05$). The Th/Treg ratio was also significantly lower in patients with metastatic colorectal cancer than in health controls and patients with non-metastatic colorectal cancer (4.70 ± 1.72 vs 6.47 ± 2.54 , 6.81 ± 4.09 , both $P < 0.05$). There were no statistical differences in the proportions of CD8⁺ T cells, NK cells and B cells between patients with colorectal cancer and healthy controls.

CONCLUSION: Abnormal immune status was observed in patients with metastatic colorectal cancer.

Key Words: Colorectal cancer; Flow cytometry; Cellular immunity; Regulatory T cells

Li YP, Song D, Wang YF, Tian ZH, Jia L, Su W. Multiparameter analysis of cellular immunity in patients with colorectal cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(12): 1263-1268

摘要

目的: 评估结直肠癌患者抗肿瘤免疫状态。

方法: 应用流式细胞术检测100例未转移结直肠癌患者、100例伴有转移结直肠癌患者和100例健康志愿者外周血CD4⁺、CD8⁺、NK、B、CD4⁺CD25^{High}CD127^{Low} Treg、Th/Treg值, 采用单因素方差分析进行比较, 分析差异。

结果: 转移性结直肠癌患者组分别与正常对照组和非转移性结直肠癌患者组相比, CD4⁺CD25^{High}CD127^{Low} Treg细胞升高($7.72\% \pm 2.20\%$ vs $6.08\% \pm 1.47\%$, $5.91\% \pm 1.55\%$, 均 $P < 0.05$), CD4⁺ T细胞降低($34.04\% \pm 8.71\%$ vs $37.83\% \pm 7.62\%$, $37.68\% \pm 8.89\%$, 均 $P < 0.05$), Th/Treg值降低(4.70 ± 1.72 vs 6.47 ± 2.54 , 6.81

■背景资料

结直肠癌(CRC)是消化系统常见的恶性肿瘤, 在我国每年新发病例高达15万。目前, 对CRC的治疗仍以手术为主、辅以局部或全身放疗及化疗, 有提高疗效的作用, 特别是近年新辅助化疗在临床上的应用能使CRC体积缩小, 提高手术切除率和降低局部复发率。

■同行评议者

台桂香, 教授, 吉林大学白求恩医学院免疫教研室; 魏继福, 副研究员, 江苏省人民医院中心实验室

■相关报道

国内外一些研究也证实,在肺癌、肝癌、卵巢癌、胰腺癌、胃肠道肿瘤、乳腺癌等多种实体瘤患者的外周血和肿瘤局部Treg细胞比例明显增高。

±4.09, 均 $P<0.05$). 结直肠癌患者与正常对照组CD8⁺ T细胞、NK细胞、B细胞三组两两相比, 均无统计学意义。

结论: 转移性结直肠癌患者免疫功能紊乱, 主要表现为CD4⁺ T细胞、Th/Treg值降低, CD4⁺CD25^{High}CD127^{Low} Treg细胞升高。

关键词: 结直肠肿瘤; 流式细胞术; 细胞免疫; 调节性T淋巴细胞

李耀平, 宋东, 王艳峰, 田志华, 贾莉, 苏文. 细胞免疫参数对结直肠癌的评估价值. 世界华人消化杂志 2011; 19(12): 1263-1268
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/1263.asp>

0 引言

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是消化系统常见的恶性肿瘤, 据国际癌症研究机构IARC 2009年的一项统计数据研究资料显示全球范围内每年约有超过100万的新发病例, 5年生存率在50%左右^[1-3], 在我国每年新发病例高达15万. 目前, 对CRC的治疗仍是以手术为主、辅以局部或全身放疗及化疗, 有提高疗效的作用, 特别是近年新辅助放化疗在临床上的应用能使CRC体积缩小, 提高手术切除率和降低局部复发率, 因此, 进一步研究CRC术后新的辅助治疗十分重要, 而免疫治疗就是一种行之有效的辅助治疗方法, 肿瘤患者免疫状态评估对于选择合理的治疗方式、判断预后有着重要的临床意义, 但目前缺乏理想的免疫评价参数使其无法在临床常规开展. 本文通过分析CRC患者外周血CD4⁺、CD8⁺、NK、B、Treg、Th/Treg的变化, 探讨这几种免疫参数评估患者免疫状态的价值。

1 材料和方法

1.1 材料 本研究实验组外周血标本200例均为2009-07/2009-12山西省肿瘤医院住院CRC患者, 所有病例经组织病理学鉴定为腺癌, 男118例, 女82例, 年龄(58.3±13.9)岁, 其中伴有局部肠系膜淋巴结转移和远处转移100例, 无转移100例. 患者均未行化疗和放射治疗, 无免疫相关性疾病和其他肿瘤, 无使用激素类药物及免疫抑制剂史. 100例正常组为同期山西省肿瘤医院健康体检者, 且生化及免疫指标均正常的健康体检者, 其中男44例, 女66例, 年龄(56.0±9.8)岁. 流式细胞仪; 鼠抗人抗体: CD3 PerCP-Cy5.5、CD3 FITC、CD4 FITC、CD8 PE、CD19 PE、CD16+56 PE、CD25 APC、CD127 PE; 同型对

照为鼠抗人IgG1 PerCP-Cy5.5、IgG1 FITC、IgG1 PE、IgG1 APC; 红细胞裂解液; 流式上样管. 以上仪器和试剂均购自美国BD公司。

1.2 方法

1.2.1 标本采集: 患者与健康体检者签署知情同意书, 所有标本均在清晨受检者空腹下, 用一次性真空管采集静脉血2 mL, EDTA抗凝, 在标本采集后室温(15 °C-25 °C)保存, 6 h内处理。

1.2.2 检测: 取待检静脉全血100 μL, 加入上样管中, 采用双色和三色标记法根据检测项目的不同分别加入以下抗体组合: CD3 PerCP-Cy5.5、CD4 FITC; CD3 PerCP-Cy5.5、CD8 PE; CD3 FITC、CD16+56 PE; CD4 FITC、CD25 APC、CD127 PE; CD3 FITC、CD19 PE, 震荡混匀, 常温孵育20 min, 加红细胞裂解液850 μL裂解10 min, 1 500 r/min离心7 min, PBS冲洗1次, 加200 μL PBS悬浮细胞, 上机检测, 采用FACSDiva软件对数据结果进行分析。

统计学处理 采用SPSS18.0软件包进行统计分析, 所有正态分布数据均以mean±SD, 组间比较单因素方差分析(One-way ANOVA)比较, $P<0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CRC患者外周血CD4⁺细胞相对计数比较 健康体检者外周血和未转移性CRC患者CD4⁺ T淋巴细胞占有淋巴细胞比例分别为37.83%±7.62%和37.68%±8.89%, 两者相比较, 无统计学差异. 转移性CRC患者CD4⁺ T淋巴细胞为34.04%±8.71%, 同健康体检者和未转移患者相比, 差异有统计学意义($P<0.05$, 图1, 2)。

2.2 CRC患者外周血CD8⁺细胞相对计数 CD8⁺ T淋巴细胞占有淋巴细胞比例分别为26.64%±7.54%、26.61%±9.16%、25.75%±9.17%, 三者相比较, 均无统计学差异(图2, 3)。

2.3 CRC患者外周血NK细胞相对计数 健康体检者、非转移性和转移性CRC患者NK细胞占全部淋巴细胞的比值分别19.30%±8.07%、19.00%±10.60%、18.70%±10.62%, 三组相比较, 无统计学差异(图2, 4)。

2.4 CRC患者外周血CD4⁺CD25^{High}CD127^{Low} Treg细胞 健康体检者、未转移和转移性CRC患者CD4⁺CD25^{High}CD127^{Low} Treg细胞占CD4⁺ T淋巴细胞的比例分别为6.08%±1.47%、5.91%±1.55%、7.72%±2.20%, 转移患者与健康体检者和未转移患者相比较, 有统计学差异($P<0.05$),

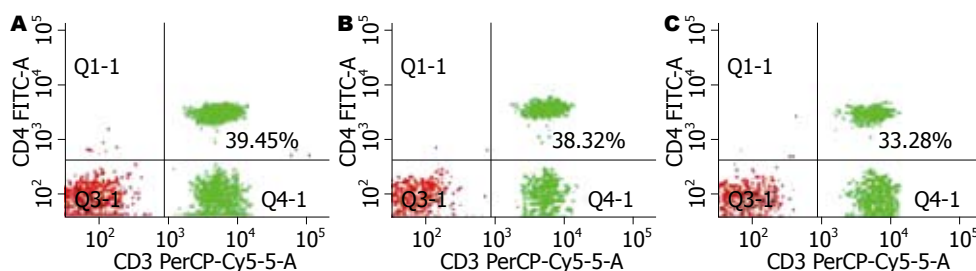


图 1 CD4⁺ T淋巴细胞. A: 正常组; B: 未转移患者组; C: 转移患者组.

而健康体检者和未转移患者相比较, 两者无统计学差异(图2, 5).

2.5 CRC患者外周血B细胞 健康体检者、未转移和转移性CRC患者B细胞占淋巴细胞的比例分别为 $9.80\% \pm 6.92\%$ 、 $9.40\% \pm 5.10\%$ 、 $8.96\% \pm 4.33\%$, 三者两两比较, 均无统计学差异(图2, 6).

2.6 CRC患者外周血Th/Treg比值 健康体检者、未转移和转移性CRC患者Th/Treg比值分别为 6.47 ± 2.54 、 6.81 ± 4.09 、 4.70 ± 1.72 , 转移性患者与健康体检者和未转移患者相比较, 有统计学差异($P < 0.05$), 而健康体检者和未转移患者相比较, 两者无统计学差异.

3 讨论

肿瘤是由机体自身细胞在各种内外致癌因素作用下发生恶变转化而成, 在此过程中, 机体的免疫异常与恶性肿瘤的发生、发展、转移及预后密切相关^[4-6]. 在机体抗肿瘤细胞免疫应答过程中, 淋巴细胞发挥重要的作用, 检测T淋巴细胞亚群, B淋巴细胞和自然杀伤细胞是目前临床上最常用的反映机体细胞免疫功能状态的指标, 在肿瘤免疫监测中起着重要的作用. 研究发现, 在不同的肿瘤中, 患者会出现不同的免疫功能异常^[7-9].

T淋巴细胞是具有多功能的细胞群体, 其中辅助性T淋巴细胞(Th, CD4⁺)、细胞毒性T淋巴细胞(Tc, CD8⁺)、调节性T淋巴细胞(Treg, CD4⁺CD25^{High}Foxp3⁺)是近年来研究与肿瘤免疫密切相关的亚型. 在肿瘤发生的早期CD4⁺ T淋巴细胞可以起到有效的免疫监视作用, CD4⁺ T淋巴细胞不仅可以分泌大量的细胞因子, 而且CD4⁺ T淋巴细胞在肿瘤免疫中具有免疫记忆功能, 因而在机体的抗癌免疫反应中起重要作用. CD8⁺ T淋巴细胞是一种高效杀伤肿瘤作用的分泌型细胞, 其溶酶体可以裂解蛋白, 特异性的识别靶细胞, 同时也可以分泌特异性抗肿瘤的细胞因子如IL-2、TNF- α 、IFN- γ 等. Treg

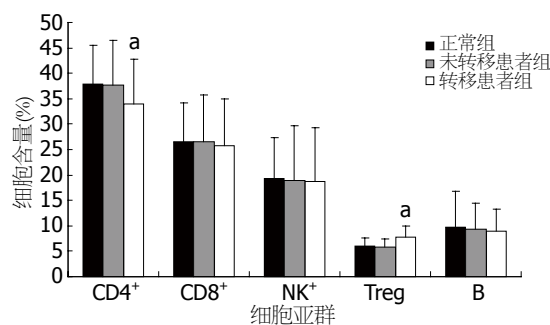


图 2 各组外周血免疫细胞参数比较. ^a $P < 0.05$ vs 正常组和未转移患者组.

细胞又称抑制性T淋巴细胞(suppressor T cells), CD4⁺分子表达阳性, CD25⁺高表达, 早期通过检测CD4⁺CD25⁺免疫表型来确定是否为Treg细胞, 但不具有特异性, 经研究发现细胞核内Foxp3特异性转录因子高表达于Treg细胞, 但检测需要破膜染色, 不利于临床检测, 在随后的多项相关性研究发现CD127低表达的细胞与Foxp3高表达同属一类细胞, 提示可以用CD127低表达来定量Treg^[10-12]. 近年对Treg细胞生物学功能研究发现, 他可以通过抑制其他免疫细胞的活化和增殖来抑制机体的免疫应答反应, 这类细胞在肿瘤的免疫逃逸机制中发挥了重要作用, 在肿瘤微环境或外周血中, 通过分泌IL-10、TGF- β 、IL-35等多种细胞因子抑制反应性T淋巴细胞功能, 对宿主免疫系统产生抑制作用, 以此给肿瘤提供逃避免疫识别和杀伤的机会, 促进肿瘤生长^[9,13,14]. 国内外一些研究也证实, 在肺癌、肝癌、卵巢癌、胰腺癌、胃肠道肿瘤、乳腺癌等多种实体瘤患者的外周血和肿瘤局部Treg细胞比例明显增高^[15-18].

本研究以CRC患者为研究对象, 经统计学分析我们发现, 与正常组相比较转移性CRC患者Treg细胞比例升高, 而CD4⁺ T淋巴细胞比例下降, 且差异具有显著性, 相比之下, 未转CRC患者与正常组CD4⁺ T淋巴细胞和Treg细胞, 无明显差别, 提示CRC患者肿瘤转移和CD4⁺ T淋巴细

■应用要点

转移性结直肠癌患者免疫功能紊乱, 主要表现为CD4⁺ T细胞、Th/Treg值降低, CD4⁺CD25^{High}CD127^{Low} Treg细胞升高.

同行评价

本文设计合理, 数据分析严谨, 结论可靠, 具有较好的学术价值.

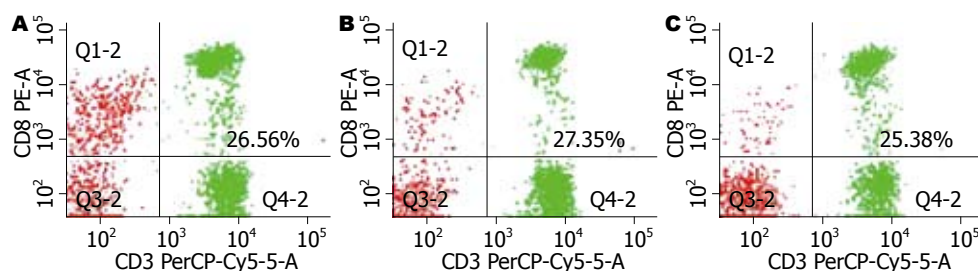


图3 CD8⁺T淋巴细胞. A: 正常组; B: 未转移患者组; C: 转移患者组.

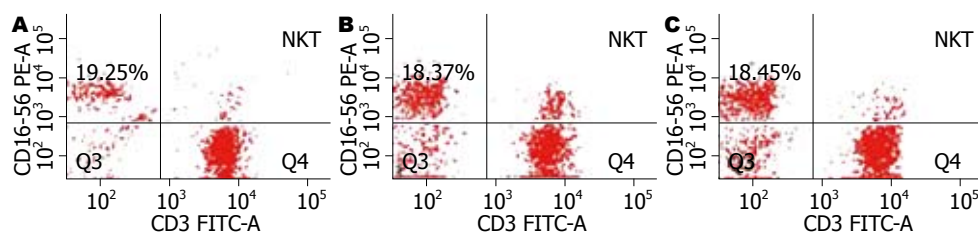


图4 NK细胞. A: 正常组; B: 未转移患者组; C: 转移患者组.

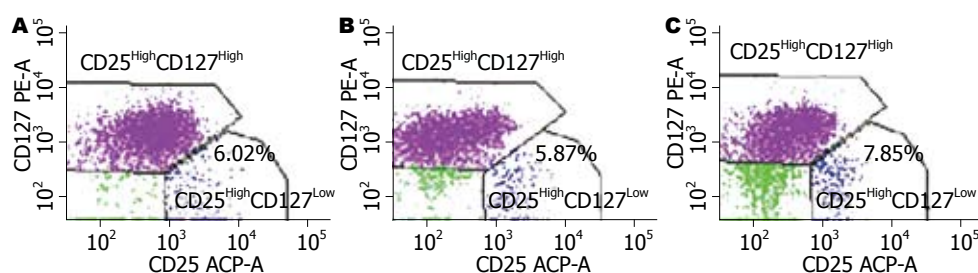


图5 CD4CD25⁺CD127^{Low}Treg细胞. A: 正常组; B: 未转移患者组; C: 转移患者组.

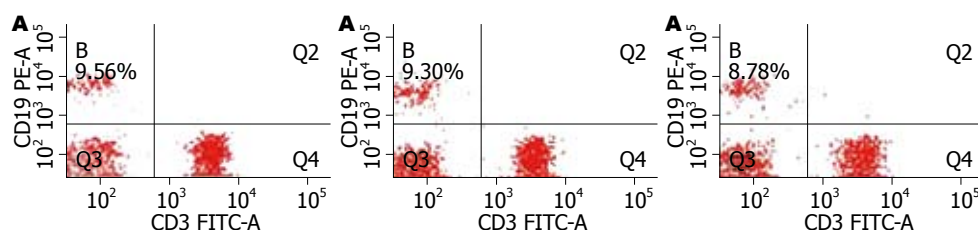


图6 B淋巴细胞. A: 正常组; B: 未转移患者组; C: 转移患者组.

胞和Treg细胞比例失调有相关性, 同时, 通过分析了另一项机体抗肿瘤参数Th/Treg值, 发现转移性CRC患者比正常组和未转移患者组相比较Th/Treg值有所降低, 且具有统计学意义, 提示进展期肿瘤微环境的免疫耐受状态明显加重, 并有利于癌细胞的转移播散, 预后不良. 我们分析由于Treg细胞对CD4⁺T和CD8⁺T淋巴细胞、NK细胞、B淋巴细胞、树突状细胞以及单核细胞/巨噬细胞的分化和效应具有抑制功能^[19-24], 因此, 我们对CRC患者的B淋巴细胞和NK细胞也做了检测分析, 结果显示转移性CRC患者B淋巴细胞和NK细胞较非转移组和正常组有所降低,

B淋巴细胞主要反映机体体液免疫功能状态, 本研究中转移性CRC患者B淋巴细胞降低, 推测可能与其Treg升高产生的免疫抑制有关, 其具体机制需进一步研究证实. NK细胞是机体最主要的抗肿瘤免疫屏障之一, 多数文献报道, 肿瘤患者体内NK细胞会有不同程度的降低^[25-28], 本研究通过较大样本研究发现CRC肿瘤患者NK细胞并未明显降低(通过统计学分析无明显差异), 我们分析仅检测肿瘤患者NK细胞含量并不能准确反映肿瘤患者机体的抗肿瘤活性, 可进一步检测其抑制性受体(NKG2A)和活化性受体(NKG2D)的表达来更准确反映肿瘤患者NK细胞抗肿瘤活

性^[29]. 因此, 未来我们可进一步研究NK细胞亚群如NKG2A和NKG2D之间的关系, 来进一步阐明CRC患者NK细胞抗肿瘤活性, 为探讨肿瘤患者免疫功能紊乱的免疫学机制和肿瘤免疫治疗提供参考.

总之, 本研究通过对CRC患者细胞免疫分析总结, 比较其变化规律, 发现CRC患者的免疫功能存在不同程度的紊乱, 尤其是转移性CRC患者, 为指导临床免疫治疗和了解患者的预后提供较为有意义的参考数据.

4 参考文献

- Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin* 2009; 59: 225-249
- Karlsson M, Marits P, Dahl K, Dagö T, Enerbäck S, Thörn M, Winqvist O. Pilot study of sentinel-node-based adoptive immunotherapy in advanced colorectal cancer. *Ann Surg Oncol* 2010; 17: 1747-1757
- El-Tawil AM. Colorectal cancer and pollution. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 3475-3477
- Finn OJ. Cancer immunology. *N Engl J Med* 2008; 358: 2704-2715
- Zitvogel L, Tesniere A, Kroemer G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat Rev Immunol* 2006; 6: 715-727
- Nagorsen D, Scheibenbogen C, Marincola FM, Letsch A, Keilholz U. Natural T cell immunity against cancer. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 4296-4303
- Croci DO, Zacarias Fluck MF, Rico MJ, Matar P, Rabinovich GA, Scharovsky OG. Dynamic cross-talk between tumor and immune cells in orchestrating the immunosuppressive network at the tumor microenvironment. *Cancer Immunol Immunother* 2007; 56: 1687-1700
- Clarke SL, Betts GJ, Plant A, Wright KL, El-Shanawany TM, Harrop R, Torkington J, Rees BI, Williams GT, Gallimore AM, Godkin AJ. CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells suppress anti-tumor immune responses in patients with colorectal cancer. *PLoS One* 2006; 1: e129
- Beyer M, Schultze JL. Regulatory T cells: major players in the tumor microenvironment. *Curr Pharm Des* 2009; 15: 1879-1892
- Hartigan-O'Connor DJ, Poon C, Sinclair E, McCune JM. Human CD4+ regulatory T cells express lower levels of the IL-7 receptor alpha chain (CD127), allowing consistent identification and sorting of live cells. *J Immunol Methods* 2007; 319: 41-52
- Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, Szot GL, Lee MR, Zhu S, Gottlieb PA, Kapranov P, Gingeras TR, Fazekas de St Groth B, Clayberger C, Soper DM, Ziegler SF, Bluestone JA. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *J Exp Med* 2006; 203: 1701-1711
- 荣守华, 贾莉婷, 泰淑红, 张展, 冯爱强, 王玉萍. CD4+CD25highCD127low调节性T细胞在乳腺癌患者外周血中的临床意义. *免疫学杂志* 2009; 26: 785-788
- Vignali DA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol* 2008; 8: 523-532
- Woo EY, Yeh H, Chu CS, Schlienger K, Carroll RG, Riley JL, Kaiser LR, June CH. Cutting edge: Regulatory T cells from lung cancer patients directly inhibit autologous T cell proliferation. *J Immunol* 2002; 168: 4272-4276
- Kono K, Kawaida H, Takahashi A, Sugai H, Mimura K, Miyagawa N, Omata H, Fujii H. CD4(+)CD25high regulatory T cells increase with tumor stage in patients with gastric and esophageal cancers. *Cancer Immunol Immunother* 2006; 55: 1064-1071
- Liyanage UK, Moore TT, Joo HG, Tanaka Y, Herrmann V, Doherty G, Drebin JA, Strasberg SM, Eberlein TJ, Goedegebuure PS, Linehan DC. Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *J Immunol* 2002; 169: 2756-2761
- Ichihara F, Kono K, Takahashi A, Kawaida H, Sugai H, Fujii H. Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood and tumor-infiltrating lymphocytes in patients with gastric and esophageal cancers. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 4404-4408
- Woo EY, Chu CS, Goletz TJ, Schlienger K, Yeh H, Coukos G, Rubin SC, Kaiser LR, June CH. Regulatory CD4(+)CD25(+) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer. *Cancer Res* 2001; 61: 4766-4772
- Wolf AM, Wolf D, Steurer M, Gastl G, Gunsilius E, Grubeck-Loebenstien B. Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of cancer patients. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 606-612
- Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, Evdemon-Hogan M, Conejo-Garcia JR, Zhang L, Burow M, Zhu Y, Wei S, Kryczek I, Daniel B, Gordon A, Myers L, Lackner A, Disis ML, Knutson KL, Chen L, Zou W. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* 2004; 10: 942-949
- 王芳, 吕洪敏, 韩涛, 王鹏, 王凤梅, 朱争艳, 向慧玲. 不同方法检测肝癌患者外周血中CD4+CD25hi-intTregs水平的关系及意义. *世界华人消化杂志* 2010; 18: 1384-1389
- Romagnani C, Della Chiesa M, Kohler S, Moewes B, Radbruch A, Moretta L, Moretta A, Thiel A. Activation of human NK cells by plasmacytoid dendritic cells and its modulation by CD4+ T helper cells and CD4+ CD25hi T regulatory cells. *Eur J Immunol* 2005; 35: 2452-2458
- Aluvihare VR, Kallikourdis M, Betz AG. Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nat Immunol* 2004; 5: 266-271
- Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 2008; 133: 775-787
- Waldhauer I, Steinle A. NK cells and cancer immunosurveillance. *Oncogene* 2008; 27: 5932-5943
- Ralainirina N, Poli A, Michel T, Poos L, Andrés E, Hentges F, Zimmer J. Control of NK cell functions by CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Leukoc Biol* 2007; 81: 144-153
- Albertsson PA, Basse PH, Hokland M, Goldfarb RH, Nagelkerke JF, Nannmark U, Kuppen PJ. NK cells and the tumour microenvironment: implica-

- tions for NK-cell function and anti-tumour activity. *Trends Immunol* 2003; 24: 603-609
- 28 Arnon TI, Markel G, Mandelboim O. Tumor and viral recognition by natural killer cells receptors.

- Semin Cancer Biol* 2006; 16: 348-358
- 29 程妮, 韩福才, 王艳峰, 麦美霞, 苏文. CD8+NKT细胞表面活化性受体NKG2D在肺癌患者外周血中的表达及临床意义. *中国肺癌杂志* 2010; 13: 962-967

编辑 李薇 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》出版流程

本刊讯 《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, 每月8、18、28号按时出版. 具体出版流程介绍如下:

第一步 作者提交稿件: 作者在线提交稿件(<http://www.baishideng.com/wcjd/ch/index.aspx>), 提交稿件中出现问题可以发送E-mail至submission@wjgnet.com咨询, 编务将在1个工作日内回复.

第二步 审稿: 送审编辑对所有来稿进行课题查新, 并进行学术不端检测, 对不能通过预审的稿件直接退稿, 通过预审的稿件送交同行评议专家进行评议. 编辑部主任每周一组织定稿会, 评估审稿人意见, 对评审意见较高, 文章达到本刊发表要求的稿件送交总编辑签发拟接受, 对不能达到本刊发表要求的稿件退稿.

第三步 编辑、修改稿件: 科学编辑严格根据编辑规范要求编辑文章, 包括全文格式、题目、摘要、图表科学性和参考文献; 同时给出退修意见送作者修改. 作者修改稿件中遇到问题可以发送E-mail至责任科学编辑, 责任科学编辑在1个工作日内回复. 为保证文章审稿意见公平公正, 本刊对每一篇文章均增加该篇文章的同行评议者和同行评论, 同时配有背景资料、研发前沿、相关报道、创新盘点、应用要点和名词解释, 供非专业人士阅读了解该领域的最新科研成果.

第四步 录用稿件: 作者将稿件修回后, 编辑部主任组织第2次定稿会, 评估作者修回稿件质量. 对修改不合格的稿件通知作者重修或退稿, 对修改合格的稿件送总编辑终审, 合格后发正式录用通知. 稿件正式录用后, 编务通知作者缴纳出版费, 出版费缴纳后编辑部安排生产, 并挂号将缴费发票寄出.

第五步 排版制作: 电子编辑对稿件基本情况进行核对, 核对无误后, 进行稿件排版及校对、图片制作及参考文献核对. 彩色图片保证放大400%依然清晰; 中文参考文献查找全文, 核对作者、题目、期刊名、卷期及页码, 英文参考文献根据本杂志社自主研发的“参考文献检测系统”进行检测, 确保作者、题目、期刊名、卷期及页码准确无误. 排版完成后, 电子编辑进行黑马校对, 消灭错别字及语句错误.

第六步 组版: 本期责任电子编辑负责组版, 对每篇稿件图片校对及进行质量控制, 校对封面、目次、正文页码和书眉, 修改作者的意见, 电子编辑进行三校. 责任科学编辑制作整期中英文摘要, 并将英文摘要送交英文编辑进一步润色. 责任电子编辑再将整期进行二次黑马校对. 责任科学编辑审读本期的内容包括封面、目次、正文、表格和图片, 并负责核对作者、语言编辑和语言审校编辑的清样, 负责本期科学新闻稿的编辑.

第七步 印刷、发行: 编辑部主任和主编审核清样, 责任电子编辑通知胶片厂制作胶片, 责任科学编辑、电子编辑核对胶片无误送交印刷厂进行印刷. 责任电子编辑制作ASP、PDF、XML等文件. 编务配合档案管理员邮寄杂志.

第八步 入库: 责任电子编辑入库, 责任科学编辑审核, 包括原始文章、原始清样、制作文件等.

《世界华人消化杂志》从收稿到发行每一步都经过严格审查, 保证每篇文章高质量出版, 是消化病学专业人士发表学术论文首选的学术期刊之一. 为保证作者研究成果及时公布, 《世界华人消化杂志》保证每篇文章16 wk内完成. (编辑部主任: 李军亮 2010-01-18)

丙型肝炎病毒感染实验模型的研究新进展

薛宏丽, 冯国和, 窦晓光

薛宏丽, 冯国和, 窦晓光, 中国医科大学附属盛京医院感染科 辽宁省沈阳市 110004

薛宏丽, 辽宁省人民医院感染科 辽宁省沈阳市 110016

“十一五”重大传染病防治基金资助项目, No. 2008ZX10002-013

作者贡献分布: 本文综述由薛宏丽与冯国和完成; 窦晓光审核。

通讯作者: 冯国和, 教授, 110004, 辽宁省沈阳市三好街36号, 中国医科大学附属盛京医院感染科. fenggh@sj-hospital.org
电话: 024-96615-62101

收稿日期: 2011-02-22 修回日期: 2011-03-22

接受日期: 2011-04-11 在线出版日期: 2011-04-28

New advances in the development of experimental models of hepatitis C virus infection

Hong-Li Xue, Guo-He Feng, Xiao-Guang Dou

Hong-Li Xue, Guo-He Feng, Xiao-Guang Dou, Department of Infectious Diseases, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China
Hong-Li Xue, Department of Infectious Diseases, People's Hospital of Liaoning Province, Shenyang 110016, Liaoning Province, China

Supported by: the National Science and Technology Major Project for Infectious Diseases Control, No. 2008ZX10002-013

Correspondence to: Professor Guo-He Feng, Department of Infectious Diseases, Shengjing Hospital of China Medical University, 36 Sanhao Avenue, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. fenggh@sj-hospital.org

Received: 2011-02-22 Revised: 2011-03-22

Accepted: 2011-04-11 Published online: 2011-04-28

Abstract

Hepatitis C virus (HCV) infection is another common cause of chronic hepatitis, liver cirrhosis, and hepatocellular carcinoma after hepatitis B virus. It is very difficult to study the variety and replication of HCV and interplay between HCV and the host and to develop new antiviral drugs and vaccines against HCV infection because of lack of susceptible hosts and stable and convenient experimental models of HCV infection. In this paper, we review recent advances in the development of experimental models of HCV infection.

Key Words: Animal infection models; Cell models; Hepatitis C virus

Xue HL, Feng GH, Dou XG, New advances in the devel-

opment of experimental models of hepatitis C virus infection. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2011; 19(12): 1269-1274

摘要

丙型肝炎病毒(HCV)感染是继乙型肝炎病毒之后引起慢性肝炎、肝硬化以及肝细胞癌的又一主要病因。HCV易感宿主选择有限, 至今尚不能建立稳定、易行的HCV感染细胞及动物模型系统, 使得病毒变异性、复制机制、与宿主蛋白相互作用以及新药与疫苗研发等相关研究受到极大限制。本文就近年来围绕持续稳定的HCV体外细胞或动物感染模型的研究新进展作一综述。

关键词: 动物感染模型; 细胞模型; 丙型肝炎病毒

薛宏丽, 冯国和, 窦晓光. 丙型肝炎病毒感染实验模型的研究新进展. 世界华人消化杂志 2011; 19(12): 1269-1274

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/1269.asp>

0 引言

自美国学者Choo于1989年完成了丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)基因克隆以来, 围绕HCV病原学、致病机制、病理特征、临床转归以及治疗干预等诸多研究广泛开展。由于至今尚不能建立合适的HCV感染实验模型, HCV持续感染机制、抗病毒治疗新药以及有效疫苗研发的深入研究受到限制。如何建立稳定的HCV体外细胞或动物感染模型, 为HCV变异性、复制机制、与宿主蛋白相互作用以及新药与疫苗研发提供研究平台, 一直是近20余年来丙型肝炎研究领域的热点。本文从HCV感染的细胞与动物两方面对模型建立特点作一综述。

1 HCV感染的细胞模型

1.1 HCV在肝细胞系复制 肝细胞是HCV天然易感细胞, 所以人们首先想到的就是能否直接用肝细胞进行体外HCV培养与增殖^[1]。已有研究表明HCV虽可体外感染肝细胞系, 此模型虽然有价格低廉、操作简便、与自然感染状态接近, 但是, 其缺点是细胞来源有一定困难, 细胞培养

■背景资料

丙型肝炎病毒(HCV)感染是继乙型肝炎病毒之后引起慢性肝炎、肝硬化以及肝细胞癌的又一主要病因。HCV易感宿主选择有限, 至今尚不能建立稳定、易行的HCV感染细胞及动物模型系统, 严重影响了HCV变异性、复制机制、与宿主蛋白相互作用以及新药与疫苗研发等相关内容的深入研究。积极开展HCV体外细胞或动物感染模型的研究对于上述内容的阐述等至关重要。

■同行评议者

范学工, 教授, 中南大学湘雅医院感染病科

■研发前沿

如何建立稳定的HCV体外细胞或动物感染模型,为HCV变异性、复制机制、与宿主蛋白相互作用以及新药与疫苗研发提供研究平台,一直是近20余年来丙型肝炎研究领域的热点。

时间短且正常传代难度大,因而该模型的稳定性与推广性研究值得商榷^[2]。

1.2 HCV在非肝细胞系的复制 早期研究认为HCV是一种严格的嗜肝病毒,不能在肝细胞以外的细胞中复制,而后续研究发现HCV还可体外感染单核细胞,淋巴细胞。先后用HCV体外感染的细胞株包括人单核细胞株(U937)、人T淋巴细胞株(Molt-4)、人胆囊细胞株(Kirlich)、猪肾细胞株(PK15)以及鼠睾丸细胞株(STE)等。虽然HCV在猪肾细胞株、鼠睾丸细胞株和人肝癌细胞(Hep3B)中能间接表达相关蛋白,但是在上述细胞中只能检测到HCV RNA的正链,却无法检测到HCV负链,即复制中间体,说明上述细胞的选择仍难阐述HCV复制环节。尽管证实了HCV能够感染非肝细胞并在其中复制,能够引起免疫应答,甚至推测HCV对人体非肝细胞系感染是构成HCV持续感染原因之一,然而同样基于HCV在淋巴细胞等非肝细胞内复制时间短的缘故,致使HCV体外感染非肝细胞如淋巴细胞等的研究仍存在一定争议,有人认为这些细胞不适合研究HCV生物特性或检测抗病毒药物^[3]。

1.3 HCV复制子、亚基因组复制子的建立 随着HCV基因的克隆成功,全长HCV基因组及1a、1b、2a亚基因组复制子模型也相应建立。虽然将HCV基因组复制子通过肝内接种黑猩猩,可导致HCV感染,但是该复制子在细胞培养中却不能自主复制,表达的病毒蛋白不能释放有感染性的病毒颗粒,限制了体外HCV基因组复制子模型的发展。1bHCV亚基因组复制子模型可进行体外培养,使得人们能够从细胞水平低,也不能产生有感染性的病毒颗粒。Wakita等^[4]从患有暴发性肝炎患者克隆来的HCV JFH1-2a型全基因组转染Huh-7细胞,发现可产生直径约55 nm的HCV病毒颗粒,该种病毒颗粒对Huh-7细胞具有感染性,病毒定量在 10^7 - 10^{10} copies/L,并可以被CD81特异抗体和来自慢性HCV感染患者的免疫球蛋白所中和。因此被认为是第1个可自主感染并产病毒颗粒的体外感染模型系统。在这一研究中,转染HCV JFH1-2a型全基因组的Huh-7细胞培养上清被稀释至 $1/10^4$ 注射给黑猩猩,6 wk内并没有产生感染迹象,但当同样细胞培养上清被稀释至 $1/10^3$ 后再次注射,2 wk后检测到HCV RNA,且持续到第5周。最近研究发现这种细胞模型在缺乏胆固醇的培养体系中产生的病毒丧失感染力,然而这种缺陷病毒在与外源胆固醇混合后,又恢复了其感染性^[5]。

Huh-7.5细胞是通过用 α -干扰素治愈含有HCV复制子的Huh-7细胞从而获得的一种Huh-7的突变细胞系,他的视黄酸诱导基因 I (retinoic acid induced gene I, RIG-I)发生点突变,降低了固有免疫反应,获得了对HCV的高易感性,与此同时, Lindenbach等^[6]构建了一种嵌合的HCV FL-J6/JFH1重组载体,即HCV JFH-1的NS3至NS5B蛋白基因与来自另外HCV 2a基因型的C至NS2蛋白基因融合构建的嵌合HCV全长基因组,转染Huh-7.5细胞后可获得感染性克隆,后者在48 h内可以产生约 10^8 copies/L感染性病毒颗粒,并可被干扰素及其他对HCV特异的抗病毒混合物所抑制,提示该复制子模型为HCV生物特性或抗病毒药物筛选研究奠定基础。不同基因型的HCV复制子转染细胞所产生的感染性病毒性颗粒数量也有差别。Yi等^[7]利用HCV1a基因型复制子转染突变的H77细胞,发现所产生的感染性的病毒颗粒数量比HCV 2a基因型复制子低400倍, Pietschmann等^[8]用不同基因型(1a、1b、2a、3a)的HCV C至NS2蛋白基因分别与HCV JFH-1的NS3至NS5B蛋白基因构建了一系列嵌合病毒重组载体,结果发现2a型的J6CF/JFH1复制子的感染性病毒颗粒数量最高。HCV亚基因组复制子模型已被证明对病毒复制机制以及新药研发等方面的研究具有重要价值。最近,人们将荧光素蛋白或荧光蛋白等基因嵌入HCV亚基因组复制子,同时对病毒复制的抑制剂进行高通量筛选。例如, Schaller等^[9]将绿色荧光蛋白插入HCV NS5A蛋白基因编码区域建立了单顺反子复制子,利用这一复制子,人们可以直接观察病毒在活体细胞内的复制而不需要干扰病毒复制过程。

1.4 HCV全长cDNA细胞感染模型 Sun等^[10]建立了一种以HepG2细胞为宿主的HCV全长cDNA复制模型系统,在该细胞内能检测到对 α -干扰素敏感的HCV负链RNA、C及NS5B蛋白,将受染HepG2细胞导入SCID小鼠后,发现有肿瘤的生成并且在小鼠血液检测到对干扰素敏感的HCV RNA。Heller等^[11]以pTRE2hyg⁺为载体构建了含有HCV1b基因型全长cDNA的真核表达重组子pTHr,同时在HCV RNA依赖的RNA聚合酶的活性区域引入一个突变位点(GDD→GND),将未引入突变位点的pTHr转染Huh-7细胞后,在细胞内可检测到HCV RNA正负链,其中正链RNA的水平比负链RNA高10倍,在培养上清中HCV RNA的拷贝数高达 1×10^{11} copies/L,而引

入突变位点的pTHr GND转染的Huh-7细胞内仅检测到少量HCV RNA正链, 未检测到负链RNA, 所产生的正链RNA量明显少于pTHr转染细胞内的正链RNA. 在pTHr转染后2 d, 细胞质内HCV C、E2以及NS5A蛋白表达最强, 4 d后明显降低. 为判断是否有病毒颗粒的产生, 对pTHr和pTHr GND转染细胞的培养上清进行蔗糖密度梯度离心, 取各组分别检测HCV C、E2蛋白及HCV RNA, 发现在pTHr转染细胞的培养上清中, HCV蛋白和RNA的峰值出现在密度为1.16 kg/L的组分中, 这与以往发现的游离HCV病毒体的密度一致. 通过电子显微镜观察到这些病毒颗粒直径约50 nm和100 nm, 以50 nm的为多, 呈双壳结构, 表面带有钉型突起. 另外, HCV RNA 5'端区域会发生G-A核苷酸置换, 3'端茎环区域带有U-A和A-U的碱基互换, 这种变化也见于HCV感染者体内的病毒RNA中. 由此可见, HCV全长cDNA细胞感染模型中HCV分子生物学特征既保证了与自然HCV的同源性, 又能够在体外大量合成, 是HCV实验模型研究的重大突破.

1.5 病毒伪颗粒 病毒伪颗粒(hepatitis C virus pseudo-particles, HCVpp)已用于病毒黏附、细胞侵袭等方面的研究. HCVpp是把HCV表面糖蛋白成分E1和E2与具有高感染性的逆转录病毒或慢病毒核心体装配在一起, 用以模拟HCV病毒体侵袭^[12]. 人们已经利用HCVpp确认了多个病毒侵袭受体, 具体包括黏多糖、低密度脂蛋白、树突状细胞特异性细胞间黏附分子-3结合的非整合素(dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin, DC-SIGN)、肝脏特异性细胞间黏附分子-3结合的非整合素(liver-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin, L-SIGN)、claudin-1、claudin-6和claudin-9等^[13]. 最近的研究证实occludin是HCV病毒侵袭体的关键因子^[14], 后者参与机制正是通过HCV病毒伪颗粒的研究首先提出, 并为后来的HCV感染细胞培养系统所验证.

2 HCV感染的动物模型

由于HCV所赖以依存的宿主有限, 传统的小动物对其不易感, 以致影响到病毒致病机制以及预防性疫苗等的深入研究. 近10余年的探索结果, 已经建立了几种HCV感染的动物模型.

2.1 黑猩猩模型 迄今为止, 黑猩猩是已知的除人类外唯一的对HCV的易感动物, Mizukoshi等^[15]

发现人类和黑猩猩的基因序列具有98%的同源性, 故此认为黑猩猩是研究HCV感染最理想的动物模型.

将含HCV基因组克隆受染细胞导入黑猩猩体内可致急性肝炎, 后者与直接注射HCV所致的感染过程没有明显区别^[16]. Major等^[17]发现, 黑猩猩感染HCV后, 一般在1 wk内出现病毒血症, 2 wk内病毒滴度迅速上升, 高峰可达 10^8 - 10^{10} copies/L, 以后上升速度明显下降, 一般8 wk后产生抗体. 尽管急性期表现为转氨酶升高, 活检可见肝细胞炎性坏死, 但是与人类急性丙型肝炎相比程度较轻. 将含HCV基因组克隆的受染的H77细胞导入10只黑猩猩, 发现有4只可完全清除病毒, 另6只则发展成慢性感染. 在持续感染82-216 wk的黑猩猩体内, HCV RNA定量可维持在 10^7 - 10^8 copies/L. 也有研究发现黑猩猩的慢性化比率还要增大^[18], 并推测这种差异与动物性别、年龄以及病毒株特性等有关. Thimme等^[19]发现相对于慢性感染的黑猩猩, 痊愈的黑猩猩在急性感染期肝内有更强的特异性CD8⁺ T淋巴细胞免疫应答反应, Shoukry等^[20]发现HCV的清除还与早期肝内CD4⁺ T淋巴细胞应答有关, 是上述2种T淋巴细胞的作用导致急性期病毒水平的下降, 但还不能完全清除病毒. 值得注意的是, 无论是急性感染后痊愈还是慢性化的黑猩猩, 其外周血T淋巴细胞应答反应并没有显著区别.

虽然人类和黑猩猩的基因序列具有较好同源性, 然而二者HLA-I、MHC-II类分子不完全相同, 黑猩猩体内无HLA-A2^[21]. 除此之外, 由于黑猩猩属于濒临灭绝的动物、体型大、实验和维护费用高, 尤其在许多国家基于伦理原因将黑猩猩作为实验动物是非法的, 这均限制了黑猩猩在HCV研究中的应用, 所以寻找合适的小动物模型就显得至关重要.

2.2 转基因小鼠模型 除了黑猩猩外, HCV转基因小鼠也是较为成熟的另一HCV感染的实验动物模型^[22]. 他是通过将编码HCV蛋白的基因用转基因技术整合到动物胚胎细胞内, 然后将整合有外源基因的胚胎细胞移植到代孕♀动物体内, 用PCR或Southern blot等分子生物学技术筛选子代转基因阳性动物后建立模型. 需要指出的是小鼠本身不能感染HCV, 不是真正意义上的动物模型, 转基因小鼠对HCV抗原耐受而不能出现特异的免疫反应, 不能用于对HCV生活周期以及病毒复制等方面的研究, 但是这种模型可用于探讨病毒与宿主蛋白相互作用, 阐述病毒致

■ 相关报道

Pietschmann等用不同基因型(1a、1b、2a、3a)的HCV C至NS2蛋白基因分别与HCV JFH-1的NS3至NS5B蛋白基因构建了一系列嵌合病毒重组载体, 结果发现2a型的J6CF/JFH1复制子的感染性病毒颗粒数量最高.

■创新盘点

本文从HCV感染的细胞与动物两个层面总结了体外感染模型的研究进展, 可为病毒变异性、复制机制、与宿主蛋白相互作用以及新药与疫苗研发提供有利条件, 也是今后HCV体外感染模型建立的研究方向。

病机制及研制新抗病毒策略与治疗方案。

在表达HCV C蛋白的转基因小鼠中可发现肝脏脂肪变性和肝细胞癌变特性, 这也是许多慢性HCV感染出现的共同现象^[23]。Moriishi等^[24]的研究证实在肝细胞表达的HCV C蛋白能够上调固醇调控因子结合蛋白-1c启动子的活性, 后者可导致脂肪再生酶类表达活跃, 使得三酰甘油在肝细胞内过度积累, 肝脏脂肪变性由此生成。HCV C蛋白转基因小鼠的T淋巴细胞免疫应答能力和淋巴细胞分泌干扰素、IL-2水平往往比正常小鼠明显降低, 并且伴有显著的肝内淋巴细胞浸润与转氨酶升高现象。这种对T淋巴细胞免疫应答功能的抑制可能是由于HCV感染增强了T淋巴细胞对Fas-介导的细胞凋亡的敏感性, HCV C蛋白可能是通过促进Fas-介导的T淋巴细胞凋亡以及肝脏的T淋巴细胞浸润而导致肝损伤, 这可能是HCV感染易导致疾病慢性化的原因之一。此外, HCV C蛋白所导致的肝细胞再生速度的提高也可能是增加肝细胞发生癌变机率的因素之一^[25]。通过对HCV非结构蛋白转基因小鼠的研究, 目前认为在转基因小鼠肝脏内表达的HCV NS3/4A蛋白自身不能引起肝脏病变, 却能改变肝脏内免疫细胞亚型; 不能阻止杀伤性T淋巴细胞对表达HCV NS3/4A蛋白的肝细胞的适应性免疫损害^[26], 却能防止源于肿瘤坏死因子- α 所产生的固有性免疫杀伤^[27]。转基因小鼠肝脏表达HCV NS5A蛋白是否产生系列病变目前尚存争议^[28], 一方面认为可引发肝硬化和肝细胞癌^[29]; 而另一方面认为不造成肝脏病变, 仅对肝脏内固有性和适应性免疫造成损害^[30]。

2.3 嵌合肝脏小鼠模型 正常小鼠对HCV感染不易感, 但是将人肝组织移植到小鼠体内, 再用HCV RNA阳性血清感染小鼠, 以此研究移肝组织病理改变、病毒致病的免疫发生机制, 即所谓嵌合人肝脏小鼠模型。依据移植人肝组织方式不同, 可将该类模型分类如下: (1)肝再生小鼠模型: 具体为将人肝细胞移植到uPA/SCID(B、T淋巴细胞缺陷)小鼠肝脏, 经定植形成组织结构瘤后再接种HCV阳性血清^[31]。此模型特点包括病毒滴度高及复制时间长, 病毒存在生理状态接近自然HCV特征, 是目前较为成功的HCV感染小鼠模型^[32], 但是由于小鼠免疫系统的缺失导致此模型不能用于研究病毒致病的免疫发生机制以及有效疫苗预防, 移植肝细胞的质量稳定性也是需要考虑的因素^[33]; (2)异位肝移植小鼠模型: 将人肝脏组织移植于免疫缺陷鼠肾囊

或耳廓后再接种HCV阳性血清。此模型特点包括在HCV感染期间便于对肝脏组织整体性病理改变的观察, 但是移植肝脏组织技术难度高, 而且HCV感染后病毒血症持续时间短, 较难进行HCV持续性感染机制的研究^[34]; (3)免疫耐受小鼠模型: 将人肝癌细胞接种受孕鼠的妊娠子宫, 子代鼠出生后, 对人肝癌细胞产生免疫耐受, 移植小鼠14周龄时人肝癌细胞能达到小鼠肝组织6%, 此后接种HCV阳性血清。此模型特点为移植鼠免疫功能健全, 在病毒血症期可以检测到肝脏酶学改变以及免疫介导的肝组织损害, 但是由于所产生病毒水平低, 而且人鼠组织相容性复合物有明显差异, 故不能应用于HCV抗原递呈环节以及针对HCV适应性免疫发生机制的研究^[35]。

2.4 其他转基因动物模型 Amali等^[36]建立了肝脏特异性表达HCV C蛋白的转基因斑马鱼。他们用硫代乙酰胺处理核心蛋白转基因斑马鱼和野生型斑马鱼, 研究发现斑马鱼出现了在病理上类似于鼠类的肝脏脂肪变性和纤维化, 3 mo可形成肝癌, 这比鼠类要快很多, 这无疑对HCV致肝癌机制的深入研究有帮助。

HCV感染者血清或细胞组织培养病毒接种到啮齿动物, 甚至包括免疫缺陷鼠, 都不会造成明显感染。与HCV侵袭密切相关的淋巴细胞CD81抗原的表达水平在鼠体内明显降低^[37], 提示病毒侵袭障碍影响了HCV对鼠的自然感染。另外, 现有模型中HCV RNA复制水平低也影响了动物模型的实际应用, 已经建立的HCV亚基因组复制子和HCV全长cDNA细胞感染模型, 在一定程度上可以解决HCV RNA复制问题, 但是后续子代病毒复制的问题仍然存在^[38,39]。

3 结论

HCVpp、复制子、HCV全长cDNA细胞感染模型以及感染动物模型为研究HCV的生活周期、HCV感染致病机制以及抗病毒新药研发提供了研究平台。但是目前研究中的宿主细胞主要局限于Huh-7肝癌细胞系, 体外产生的有感染性的HCV只限于JFH-1病毒株。未来对HCV感染的细胞与动物模型建立的要求是其更能准确地反映持续性感染条件下的HCV所表现出的基因型多样性以及宿主因素的复杂性, 包括进行HCV全基因组RNA干扰筛选实验和microRNA组学研究, 将有助于建立更合适的HCV感染的实验动物模型。在最近的研究中, 人们发现联合构建人

occludin蛋白和CD81抗原重组载体更易使HCV进入小鼠细胞^[40], 而表达肝脏特异性microRNA, miR-122重组载体可以促进病毒在非肝细胞中复制^[41]。这些研究成果代表了未来HCV感染模型研究的方向。

4 参考文献

- Pichard-Garcia L, Briolotti P, Larrey D, Sa-Cunha A, Suc B, Laporte S, Maurel P. Use of human hepatocytes to investigate HCV infection. *Methods Mol Biol* 2010; 640: 447-462
- Banaudha K, Orenstein JM, Korolnek T, St Laurent GC, Wakita T, Kumar A. Primary hepatocyte culture supports hepatitis C virus replication: a model for infection-associated hepatocarcinogenesis. *Hepatology* 2010; 51: 1922-1932
- Boonstra A, van der Laan LJ, Vanwolleghem T, Janssen HL. Experimental models for hepatitis C viral infection. *Hepatology* 2009; 50: 1646-1655
- Wakita T, Pietschmann T, Kato T, Date T, Miyamoto M, Zhao Z, Murthy K, Habermann A, Kräusslich HG, Mizokami M, Bartenschlager R, Liang TJ. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* 2005; 11: 791-796
- Aizaki H, Morikawa K, Fukasawa M, Hara H, Inoue Y, Tani H, Saito K, Nishijima M, Hanada K, Matsuura Y, Lai MM, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T. Critical role of virion-associated cholesterol and sphingolipid in hepatitis C virus infection. *J Virol* 2008; 82: 5715-5724
- Lindenbach BD, Evans MJ, Syder AJ, Wölk B, Tellinghuisen TL, Liu CC, Maruyama T, Hynes RO, Burton DR, McKeating JA, Rice CM. Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* 2005; 309: 623-626
- Yi M, Villanueva RA, Thomas DL, Wakita T, Lemon SM. Production of infectious genotype 1a hepatitis C virus (Hutchinson strain) in cultured human hepatoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 2310-2315
- Pietschmann T, Kaul A, Koutsoudakis G, Shavinskaya A, Kallis S, Steinmann E, Abid K, Negro F, Dreux M, Cosset FL, Bartenschlager R. Construction and characterization of infectious intragenotypic and intergenotypic hepatitis C virus chimeras. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 7408-7413
- Schaller T, Appel N, Koutsoudakis G, Kallis S, Lohmann V, Pietschmann T, Bartenschlager R. Analysis of hepatitis C virus superinfection exclusion by using novel fluorochrome gene-tagged viral genomes. *J Virol* 2007; 81: 4591-4603
- Sun BS, Pan J, Clayton MM, Liu J, Yan X, Matskevich AA, Strayer DS, Gerber M, Feitelson MA. Hepatitis C virus replication in stably transfected HepG2 cells promotes hepatocellular growth and tumorigenesis. *J Cell Physiol* 2004; 201: 447-458
- Heller T, Saito S, Auerbach J, Williams T, Moreen TR, Jazwinski A, Cruz B, Jeurkar N, Sapp R, Luo G, Liang TJ. An in vitro model of hepatitis C virion production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 2579-2583
- Bartosch B, Dubuisson J, Cosset FL. Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *J Exp Med* 2003; 197: 633-642
- von Hahn T, Rice CM. Hepatitis C virus entry. *J Biol Chem* 2008; 283: 3689-3693
- Ploss A, Evans MJ, Gaysinskaya VA, Panis M, You H, de Jong YP, Rice CM. Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells. *Nature* 2009; 457: 882-886
- Mizukoshi E, Nascimbeni M, Blaustein JB, Mihalik K, Rice CM, Liang TJ, Feinstone SM, Rehmann B. Molecular and immunological significance of chimpanzee major histocompatibility complex haplotypes for hepatitis C virus immune response and vaccination studies. *J Virol* 2002; 76: 6093-6103
- Bukh J. A critical role for the chimpanzee model in the study of hepatitis C. *Hepatology* 2004; 39: 1469-1475
- Major ME, Dahari H, Mihalik K, Puig M, Rice CM, Neumann AU, Feinstone SM. Hepatitis C virus kinetics and host responses associated with disease and outcome of infection in chimpanzees. *Hepatology* 2004; 39: 1709-1720
- Forns X, Bukh J, Purcell RH. The challenge of developing a vaccine against hepatitis C virus. *J Hepatol* 2002; 37: 684-695
- Thimme R, Bukh J, Spangenberg HC, Wieland S, Pemberton J, Steiger C, Govindarajan S, Purcell RH, Chisari FV. Viral and immunological determinants of hepatitis C virus clearance, persistence, and disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 15661-15668
- Shoukry NH, Sidney J, Sette A, Walker CM. Conserved hierarchy of helper T cell responses in a chimpanzee during primary and secondary hepatitis C virus infections. *J Immunol* 2004; 172: 483-492
- Meuleman P, Leroux-Roels G. The human liver-uPA-SCID mouse: a model for the evaluation of antiviral compounds against HBV and HCV. *Antiviral Res* 2008; 80: 231-238
- 焦健, 王江滨, 赵平. 丙型肝炎病毒蛋白在转基因模型中的作用机制研究进展. *世界华人消化杂志* 2010; 18: 1016-1020
- 李蕴铤, 凌伟, 陈凤新, 范小玲. 慢性丙型肝炎患者脂类代谢与丙型肝炎病毒复制以及肝脏病理的关系. *世界华人消化杂志* 2010; 18: 1820-1823
- Moriishi K, Mochizuki R, Moriya K, Miyamoto H, Mori Y, Abe T, Murata S, Tanaka K, Miyamura T, Suzuki T, Koike K, Matsuura Y. Critical role of PA-28gamma in hepatitis C virus-associated steatogenesis and hepatocarcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 1661-1666
- Kamegaya Y, Hiasa Y, Zukerberg L, Fowler N, Blackard JT, Lin W, Choe WH, Schmidt EV, Chung RT. Hepatitis C virus acts as a tumor accelerator by blocking apoptosis in a mouse model of hepatocarcinogenesis. *Hepatology* 2005; 41: 660-667
- Frelin L, Brenndörfer ED, Ahlén G, Weiland M, Hultgren C, Alheim M, Glaumann H, Rozell B, Milich DR, Bode JG, Sällberg M. The hepatitis C virus and immune evasion: non-structural 3/4A transgenic mice are resistant to lethal tumour necrosis factor alpha mediated liver disease. *Gut* 2006; 55: 1475-1483
- Ahlén G, Derk E, Weiland M, Jiao J, Rahbin N, Aleman S, Peterson DL, Pokrovskaja K, Grandér D, Frelin L, Sällberg M. Cleavage of the IPS-1/Cardif/MAVS/VISA does not inhibit T cell-mediated elimination of hepatitis C virus non-structural 3/4A-expressing hepatocytes. *Gut* 2009; 58: 560-569
- 张梁, 邓益斌. LNAzyme抑制HCV 5'端非编码区内

■应用要点

本文较全面地从HCV感染的细胞与动物两个层面阐述了新近HCV体外感染模型的研究现状, 对各类模型的研究特点作了科学评价, 可为HCV体外感染模型建立的后继研究提供理论指导。

■同行评价

本文可读性和新颖性较好,对丙型肝炎病毒感染实验模型的研究近况作了较全面的介绍,提供了理论价值。

- 29 Wang AG, Lee DS, Moon HB, Kim JM, Cho KH, Choi SH, Ha HL, Han YH, Kim DG, Hwang SB, Yu DY. Non-structural 5A protein of hepatitis C virus induces a range of liver pathology in transgenic mice. *J Pathol* 2009; 219: 253-262
- 30 Krieger M, Bürckstümmer T, Himmelsbach K, Bruns M, Frelin L, Ahlén G, Sällberg M, Hildt E. The hepatitis C virus non-structural NS5A protein impairs both the innate and adaptive hepatic immune response in vivo. *J Biol Chem* 2009; 284: 28343-28351
- 31 Walters KA, Joyce MA, Thompson JC, Smith MW, Yeh MM, Prohl S, Zhu LF, Gao TJ, Kneteman NM, Tyrrell DL, Katze MG. Host-specific response to HCV infection in the chimeric SCID-beige/Alb-uPA mouse model: role of the innate antiviral immune response. *PLoS Pathog* 2006; 2: e59
- 32 Turrini P, Sasso R, Germoni S, Marcucci I, Celluci A, Di Marco A, Marra E, Paonessa G, Eutropi A, Laufer R, Migliaccio G, Padron J. Development of humanized mice for the study of hepatitis C virus infection. *Transplant Proc* 2006; 38: 1181-1184
- 33 Vanwolleghem T, Bukh J, Meuleman P, Desombere I, Meunier JC, Alter H, Purcell RH, Leroux-Roels G. Polyclonal immunoglobulins from a chronic hepatitis C virus patient protect human liver-chimeric mice from infection with a homologous hepatitis C virus strain. *Hepatology* 2008; 47: 1846-1855
- 34 Maeda N, Watanabe M, Okamoto S, Kanai T, Yamada T, Hata J, Hozumi N, Katsume A, Nuriya H, Sandhu J, Ishii H, Kohara M, Hibi T. Hepatitis C virus infection in human liver tissue engrafted in mice with an infectious molecular clone. *Liver Int* 2004; 24: 259-267
- 35 Wu GY, Konishi M, Walton CM, Olive D, Hayashi K, Wu CH. A novel immunocompetent rat model of HCV infection and hepatitis. *Gastroenterology* 2005; 128: 1416-1423
- 36 Amali AA, Rekha RD, Lin CJ, Wang WL, Gong HY, Her GM, Wu JL. Thioacetamide induced liver damage in zebrafish embryo as a disease model for steatohepatitis. *J Biomed Sci* 2006; 13: 225-232
- 37 Flint M, von Hahn T, Zhang J, Farquhar M, Jones CT, Balfe P, Rice CM, McKeating JA. Diverse CD81 proteins support hepatitis C virus infection. *J Virol* 2006; 80: 11331-11342
- 38 Uprichard SL, Chung J, Chisari FV, Wakita T. Replication of a hepatitis C virus replicon clone in mouse cells. *Virol J* 2006; 3: 89
- 39 Chang KS, Cai Z, Zhang C, Sen GC, Williams BR, Luo G. Replication of hepatitis C virus (HCV) RNA in mouse embryonic fibroblasts: protein kinase R (PKR)-dependent and PKR-independent mechanisms for controlling HCV RNA replication and mediating interferon activities. *J Virol* 2006; 80: 7364-7374
- 40 Chang J, Guo JT, Jiang D, Guo H, Taylor JM, Block TM. Liver-specific microRNA miR-122 enhances the replication of hepatitis C virus in nonhepatic cells. *J Virol* 2008; 82: 8215-8223
- 41 张莹, 郑素军, 段钟平. microRNA-21在肝脏中的作用. 世界华人消化杂志 2010; 18: 2621-2625

编辑 李薇 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011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 0.625

本刊讯 一年一度的中国科技论文统计结果11月26日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,2009年《世界华人消化杂志》总被引频次3 009次,影响因子0.625,综合评价总分49.4分,分别位居内科学类48种期刊的第6位、第9位、第6位,分别位居1 946种中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)的第87位、第378位、第351位;其他指标:即年指标0.112,他引率0.79,引用刊数473种,扩散因子15.72,权威因子1 170.03,被引半衰期4.0,来源文献量752,文献选出率0.93,地区分布数30,机构分布数30,基金论文比0.39,海外论文比0.01。

经过多项学术指标综合评定及同行专家评议推荐,《世界华人消化杂志》再度被收录为“中国科技论文统计源期刊”(中国科技核心期刊)。(编辑部主任:李军亮 2010-11-28)

肝癌动物模型的研究进展

刘煌, 刘静

刘煌, 刘静, 中国人民解放军第175医院(厦门大学附属东南医院)普外科 福建省漳州市 363000

作者贡献分布: 刘煌与刘静对此文所作贡献均等; 本综述由刘煌撰写完成; 刘静审校。

通讯作者: 刘静, 副教授, 副主任医师, 博士, 硕士生导师, 363000, 福建省漳州市漳华中路269号, 中国人民解放军第175医院(厦门大学附属东南医院)普外科. liujdoctor@hotmail.com
电话: 0596-2975769

收稿日期: 2010-10-30 修回日期: 2011-04-13

接受日期: 2011-04-21 在线出版日期: 2011-04-28

Animal models of liver cancer: progress and prospects

Huang Liu, Jing Liu

Huang Liu, Jing Liu, Department of General Surgery, the 175th Hospital of Chinese PLA (Southeast Hospital Affiliated to Xiamen University), Zhangzhou 363000, Fujian Province, China

Correspondence to: Associate Professor Jing Liu, Department of General Surgery, the 175th Hospital of Chinese PLA (Southeast Hospital Affiliated to Xiamen University), 269 Zhanghua Zhong Road, Zhangzhou 363000, Fujian Province, China. liujdoctor@hotmail.com

Received: 2010-10-30 Revised: 2011-04-13

Accepted: 2011-04-21 Published online: 2011-04-28

Abstract

Primary liver cancer remains one of the most lethal malignancies worldwide. As this disease is lethal in most cases, research has to be done to improve our understanding of the disease and to offer insights for possible treatment options. Animal models have been widely used in the research of primary liver cancer. Here, we review the progress and prospects for the development of animal models of primary liver cancer, highlighting the best candidates for future preclinical investigations.

Key Words: Primary liver cancer; Mouse model; Genetically engineered mice

Liu H, Liu J. Animal models of liver cancer: progress and prospects. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(12): 1275-1278

摘要

原发性肝癌是最常见的恶性肿瘤之一。由于其死亡率高, 现已有很多研究为其临床的治疗提

供基础依据。在这些研究中, 肝癌动物模型的使用很广泛。以下我们回顾现今常用的肝癌动物模型, 并对未来肝癌动物模型的发展做一重点介绍。

关键词: 原发性肝癌; 小鼠模型; 基因工程小鼠

刘煌, 刘静. 肝癌动物模型的研究进展. *世界华人消化杂志* 2011; 19(12): 1275-1278

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/1275.asp>

0 引言

原发性肝癌(primary hepatic carcinoma, PHC)是居全球第6位的常见肿瘤, 并且在肿瘤相关性死亡中排第3位^[1]。我国是PHC的高发国, 每年有11万人死于肝癌, 占全世界肝癌年死亡总数的45%。因而明确PHC的发病机制、生物学特性及实现对肝癌的防治是我国医学工作者面临的非常迫切的课题。肝癌动物模型是肝癌基础与临床研究工作中的重要材料, 目前尚没有哪一种模型能够满足理想肝癌动物模型的所有标准, 因此对于特定的问题我们需要选择其最适合的模型。本文简要回顾现今常用的各种肝癌动物模型, 并对未来肝癌动物模型的发展做一重点介绍。

1 动物肝癌模型的分类

自20世纪初获得小鼠自发性肝癌动物模型以来, 人们对肝癌动物模型研究的不断深入, 用来建立模型的动物也各种各样, 主要有鼠、兔、猪、犬、树鼯等。目前进行各种肝癌实验最常用的动物是大、小鼠。主要的致癌方法有自发性肝癌模型、诱发性肝癌模型、移植型肝癌模型、转基因肝癌模型等。其中以诱发型和移植型应用最为广泛, 近年来转基因型肝癌模型在国内外发展很快, 成为动物实验研究的热点。

2 自发性肝癌模型

自发性肝癌模型是指实验动物未经任何有意识的人工处置, 在自然情况下所发生的肿瘤。该模型最大的优点是, 完全在自然条件下发生的疾

■背景资料

肝癌动物模型是肝癌基础与临床研究工作中的重要材料, 目前尚没有哪一种模型能够满足理想肝癌动物模型的所有标准, 因此对于特定的问题需要选择其最适合的模型。

■同行评议者

秦建民, 副教授, 上海中医药大学附属普陀医院肝胆外科

■ 研发前沿

近年来转基因型肝癌模型在国内发展很快,成为动物实验研究的热点。

病,排除了人为因素,肝癌的发生、发展与人类肝癌相似,主要是反映动物的肿瘤易感性、环境致癌物质和促癌物质的积聚程度,多发生在近交系小鼠,发生的时间与比例和品系、性别、环境、饲养有关。但是肿瘤发生率低且不稳定,发生时间较难预测且参差不齐,荷瘤动物个体在动物(性别、体质量、肿瘤发生时间等)和肿瘤(大小、数目、部位等)两方面差异较大。由于自发性肝癌模型的局限,现在该模型已少用,被其他肝癌模型所取代^[2]。

3 诱发性动物肝癌模型

诱发性肝癌模型是指用化学、物理或生物的致癌因素作用于动物而形成肝癌。其中化学药物诱导法最常用,可以用单一化学药物,也可用多种药物与不同的促癌剂、肝大部分切除等多种因素按不同的顺序组合成不同的综合诱发肝癌方案。很多种化学物能够诱发动物肝癌的形成,如亚硝胺类(diethylnitrosamine, DEN)、黄曲霉素类、氨基偶氮燃料类(3'-Me-DAB)、芳香胺类化合物(2-AAF)等^[3,4]。迄今为止,用得最多的是二乙基亚硝胺和苯巴比妥(phenobarbital, PB),虽然PB的效果还有待商榷^[5]。实验动物的选择以Wistar、SD和F344大鼠最常用,也有应用其他动物(小鼠、豚鼠、兔、旱獭、恒河猴)诱发肝癌的报道。Vesselinovitch等^[6]采用DEN(5 mg/kg体质量)注射到12-15 d B6C3F1 δ 小鼠腹腔,44 wk后其成瘤率达到100%。国内多选用敏感性较高的如Wistar、SD等纯系大鼠,其周龄不大于5-6 wk,体质量在150 g左右,每周用0.25% DEN水溶液灌胃1次,量为10 mg/kg体质量,而剩余6 d用0.25% DEN水溶液由其自由饮用,约4 mo可诱发出肝癌,5-6 mo诱癌率达80%以上,亦可用0.05% DEN饮水喂养8 mo诱发肝癌;Takeuchi等^[7]利用体质量200g的 δ Wistar大鼠按照200 mg/kg体质量一次性腹腔注射DEN,然后给予0.05%的DEN自由饮水,12 wk诱癌成功;Okubo等^[8]采用体质量200 g的 δ Wistar大鼠,给予100 mg/kg体质量的DEN水溶液任其自由饮用,16 wk诱癌成功。

诱发性动物肝癌模型的整个诱癌过程(启动肝细胞-肝细胞增生灶-肝细胞增生结节-肝细胞癌)接近人类肝癌的发病特点,多用于肝癌病因学、发生学、发病机制、遗传学方面的研究。但是由于其周期长(3-6 mo),成本高,成功率低,并且有肿瘤生长不稳定等缺点,研究人员应当根据研究目的以及客观条件选择^[9,10]。

4 移植型动物肝癌模型

移植型动物肝癌模型指把肝癌组织块(来源于动物或人)、肝癌细胞株或非肝脏来源的恶性肿瘤(乳腺癌,结直肠癌等)接种于实验动物体内所形成的荷肝癌动物模型。主要包括同种移植(模型动物之间)和异种移植(人和裸鼠之间)两种。最早使用的移植模型是同种移植模型,但是发展到今天,这种模型已经很少使用,因为人们发现同种移植肝癌模型的研究结果并不能对临床进行有效预测(如抗癌药物实验),其次是能获得的鼠肝癌细胞系也较少^[11]。现今,这种模型主要用来研究那些靠激活免疫系统而起作用的抗癌药物(如免疫治疗)^[11-13]。以下我们重点介绍现在使用的最多的异种移植肝癌模型。

异种移植肝癌模型是将人肝癌细胞株或肝癌组织块直接移植到免疫缺陷鼠而建立的模型。其中使用最广泛的是裸鼠。除此之外,也有使用重症联合免疫缺陷小鼠(severe combined immunodeficient mice, SCID)^[14]。自从1963年第1例人类肝细胞癌细胞系建立以来^[15],许多人类肝细胞癌细胞系相继报道,其中HepG2, Hep3B, SMMC-7721和HuH7被广泛应用。并从最初的皮下移植模型发展到腹腔内移植模型。(1)异位移植:即把肝癌细胞或组织块种植于皮下的方法。该法由于其成瘤时间短,劳动力需要少,相对来说不贵,非侵入性测量方便的优点主要用于抗癌药物的临床前评估^[12,13]。然而,近来的很多实验证明肿瘤细胞生物学行为与微环境之间关系非常密切(如:许多肿瘤细胞系当皮下移植时不发生转移,而当原位移植时发生转移),异位移植的方法忽略了微环境对肝癌发生发展的影响^[12-16]。因此,该模型所获得的治疗结果必须再通过原位移植的结果证明;(2)原位移植模型:他是一种模拟人类肝癌的更好的方法,主要通过手术或在B超的引导下把肝癌细胞或癌组织块种植于肝脏,他在形态学、微环境、转移潜力和对抗癌药物的反应上更加符合人类肝癌^[17,18]。其主要缺点在于原位移植需要更复杂和更昂贵的手术移植过程,肿瘤的生长和对药物的反应也不能很好的观察。

现已有实验证实异位或原位异种移植模型对药物抗肿瘤效果的预测并不满意,主要原因可能是注射的肿瘤细胞经常培养了很长时间,由于培养选择压力,这些肿瘤细胞不再持有原始患者肿瘤细胞的分子特性。现认为直接使用肝癌患者的肝癌组织能够更好的解决这个问题。

移植型动物肝癌模型被广泛地运用于抗癌药物的临床前评估,并已成为研究人类恶性肿瘤转移机制和抗转移治疗的重要实验方法。

5 转基因动物肝癌模型

转基因动物是指动物接受外源基因后,此基因在其染色体基因组内稳定整合并能遗传给后代的一类动物,是当今生物技术的研究热点。利用转基因技术建立的动物肝癌模型,为肝肿瘤的病因学研究开辟了一个新的领域。转基因动物模型主要用来研究特殊基因的功能和不同基因在肝细胞癌发展过程中的相互作用(例如:癌基因和抑癌基因),也可用于研究特殊基因与肝特异性致癌物之间的关系。

5.1 乙型肝炎病毒转基因肝癌模型 已有充分证据表明乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)是人类肝炎和肝癌发生的重要原因^[19],为了制作一个包含完整HBV基因组的转基因鼠来研究肝癌,学者们付出了很多的努力,但到目前为止并没有成功^[20,21]。如今用得最多的肝炎病毒转基因肝癌模型是Chisari等^[22]的HBsAg转基因小鼠模型和Kim等^[23]的HBx转基因小鼠模型。这些模型可以用来研究肝癌发生的机制;也可用于研究化学致癌物与HBV感染之间的关系;还可以用于双转基因小鼠模型(bitransgenic mouse models)[如敲入(knock-in)感兴趣基因(*c-myc*、*TGF- α*)的同时敲入HBsAg或者HBx,来研究他们之间的关系]^[24,25]。

5.2 猴病毒40转基因动物肝癌模型 自20世纪80年代末,对猴病毒40(sv40)转基因小鼠肝癌模型的研究开始兴起,sv40的基因组编码两个致癌蛋白(T-Ag和t-Ag),通过灭活宿主细胞抑癌基因(*p53*、*Rb*)致癌^[26,27]。不同启动子的sv40转基因动物可以发生不同部位的细胞,研究发现启动子/增强子抗凝血酶-III(antithrombin-III, AT-III)^[28]、白蛋白(albumin, Alb)^[29]、 α -1-抗胰蛋白酶(α -1-antitrypsin, AAT)可使sv40 T-Ag在小鼠肝脏特异性表达。Dubois等^[30]利用人AT-III基因和sv40抗原序列构建的外源DNA,建立了sv40转基因小鼠肝癌模型,研究发现在8 mo时小鼠生瘤率为100%,同时有10%的小鼠发生肺转移。

5.3 TGF转基因小鼠模型 Factor利用构建的猪Alb/TGF β 1基因建立了TGF β 1转基因小鼠模型,该模型肿瘤的平均潜伏期为16-18 mo,肿瘤发生率为59%。

这些模型对于研究特殊基因在肝癌形成过程中的作用和研究肝细胞癌发展的多步骤过程

非常有用,但其缺点在于转基因表达在所有的肝脏细胞,包括肿瘤微环境细胞。另外,这种基因突变在胚胎形成时已经存在,因此可能激活一些代偿的分子通路^[9]。其次,由于转基因动物肝癌模型制作技术要求极高,价格昂贵。所以虽然转基因动物肝癌模型可以诱导肝癌的发生,但其主要还是用于研究基因改变对肝癌形成的影响。目前转基因模型在国内的开展还比较少,但其为肝癌的基础理论和临床应用研究开辟了更理想的研究途径,具有广阔的前景,是肝癌动物模型未来发展的方向。

6 其他动物肝癌模型

兔肝癌动物模型是目前世界上最大的肝癌动物模型。该癌模型有以下优点:(1)为目前最大的动物可接种肝肿瘤模型;(2)为富血管肿瘤,其供血动脉主要为肝动脉;(3)病理上肿瘤为巨块型实体瘤,浸润性生长,血供丰富,类似于人巨块型肝癌;(4)模型制作简单,价格相对低廉,接种成功率高,实验周期短,一般为2-3 wk后,肿瘤生长即可达1-3 cm。适用于插管等局部治疗肝肿瘤影像学诊断及介入放射治疗的实验研究。目前多选用为体质量2.0-3.0 kg的新西兰或日本大白兔。主要为肝外-肝同种移植型的肝癌模型,采用的瘤源为VX2肿瘤细胞株(起源于Shope病毒诱发的兔乳头状瘤衍生的鳞癌,经过72次移植传代后正式建株)接种到兔的肾脏、肝脏等部位,制成原位肿瘤动物模型^[31,32]。其缺点在于:兔发生的是移植性肝癌,缺乏肝硬化背景,且VX2肿瘤极易转移和播散。除兔之外,也有应用其他动物(树鼯、旱獭、麻鸭、恒河猴等)制作肝癌模型的报道^[33,34]。

7 结论

理想的肝癌模型应符合以下条件:(1)肿瘤生长与血供特征与人类肝癌相似;(2)简单而易于复制;(3)价廉。上述各类动物模型均有其优缺点,每位研究者应根据各自研究的目的、实验室的条件等来建立合适的肝癌动物模型^[2]。寻找一种与人类近缘的体型小,易于实验室饲养的动物建立肝癌模型,使其诱癌过程类似于人原发性肝癌的发生过程,且诱癌率高,实验重复性好便于进行药物干预和疗效分析,是我们今后研究的方向。

8 参考文献

- 1 Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer

■ 相关报道

Okubo等采用体质量200 g的♂Wistar大鼠,给予100 mg/kg体质量的DEN水溶液任其自由饮用,16 wk诱癌成功。

■同行评价

本文内容全面、详实,具有一定的新颖性和学术参考价值.

- 2 statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55: 74-108
- 3 陈华, 赵德明. 肝癌动物模型. *实验动物科学与管理* 2005; 22: 32-35
- 4 Hann B, Balmain A. Building 'validated' mouse models of human cancer. *Curr Opin Cell Biol* 2001; 13: 778-784
- 5 Wogan GN. Impacts of chemicals on liver cancer risk. *Semin Cancer Biol* 2000; 10: 201-210
- 6 Lee GH. Paradoxical effects of phenobarbital on mouse hepatocarcinogenesis. *Toxicol Pathol* 2000; 28: 215-225
- 7 Vesselinovitch SD, Mihailovich N. Kinetics of diethylnitrosamine hepatocarcinogenesis in the infant mouse. *Cancer Res* 1983; 43: 4253-4259
- 8 Takeuchi Y, Sugimoto M, Ochiai K, Ito K. Expression of P-glycoprotein in rat hepatocarcinogenesis by diethylnitrosamine and the modulation by anti-cancer drugs. *Hepatol Res* 2002; 22: 107-118
- 9 Okubo H, Moriyama M, Tanaka N, Arakawa Y. Detection of serum and intrahepatic hepatocyte growth factor during DEN-induced carcinogenesis in the rat. *Hepatol Res* 2002; 24: 385-394
- 10 Leenders MW, Nijkamp MW, Borel Rinkes IH. Mouse models in liver cancer research: a review of current literature. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 6915-6923
- 11 李翠云, 段小嫻. 肝癌动物模型研究进展. *医学研究杂志* 2006; 35: 71-73
- 12 Troiani T, Schettino C, Martinelli E, Morgillo F, Tortora G, Ciardiello F. The use of xenograft models for the selection of cancer treatments with the EGFR as an example. *Crit Rev Oncol Hematol* 2008; 65: 200-211
- 13 Killion JJ, Radinsky R, Fidler IJ. Orthotopic models are necessary to predict therapy of transplantable tumors in mice. *Cancer Metastasis Rev* 1998; 17: 279-284
- 14 Heijstek MW, Kranenburg O, Borel Rinkes IH. Mouse models of colorectal cancer and liver metastases. *Dig Surg* 2005; 22: 16-25
- 15 Bankert RB, Egilmez NK, Hess SD. Human-SCID mouse chimeric models for the evaluation of anti-cancer therapies. *Trends Immunol* 2001; 22: 386-393
- 16 Tang ZY, Sun FX, Tian J, Ye SL, Liu YK, Liu KD, Xue Q, Chen J, Xia JL, Qin LX, Sun SL, Wang L, Zhou J, Li Y, Ma ZC, Zhou XD, Wu ZQ, Lin ZY, Yang BH. Metastatic human hepatocellular carcinoma models in nude mice and cell line with metastatic potential. *World J Gastroenterol* 2001; 7: 597-601
- 17 Jonkers J, Berns A. Conditional mouse models of sporadic cancer. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 251-265
- 18 Khanna C, Hunter K. Modeling metastasis in vivo. *Carcinogenesis* 2005; 26: 513-523
- 19 Bibby MC. Orthotopic models of cancer for preclinical drug evaluation: advantages and disadvantages. *Eur J Cancer* 2004; 40: 852-857
- 20 Parkin DM. The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int J Cancer* 2006; 118: 3030-3044
- 21 Bagis H, Arat S, Mercan HO, Aktoprakligil D, Caner M, Turanli ET, Baysal K, Turgut G, Sekmen S, Cirakoglu B. Stable transmission and expression of the hepatitis B virus total genome in hybrid transgenic mice until F10 generation. *J Exp Zool A Comp Exp Biol* 2006; 305: 420-427
- 22 Halverscheid L, Mannes NK, Weth R, Kleinschmidt M, Schultz U, Reifenberg K, Schirmbeck R, Nassal M, Blum HE, Reimann J, Geissler M. Transgenic mice replicating hepatitis B virus but lacking expression of the major HBsAg. *J Med Virol* 2008; 80: 583-590
- 23 Chisari FV, Klopchin K, Moriyama T, Pasquinelli C, Dunsford HA, Sell S, Pinkert CA, Brinster RL, Palmiter RD. Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma in hepatitis B virus transgenic mice. *Cell* 1989; 59: 1145-1156
- 24 Kim CM, Koike K, Saito I, Miyamura T, Jay G. HBx gene of hepatitis B virus induces liver cancer in transgenic mice. *Nature* 1991; 351: 317-320
- 25 Jakubczak JL, Chisari FV, Merlino G. Synergy between transforming growth factor alpha and hepatitis B virus surface antigen in hepatocellular proliferation and carcinogenesis. *Cancer Res* 1997; 57: 3606-3611
- 26 Terradillos O, Billet O, Renard CA, Levy R, Molina T, Briand P, Buendia MA. The hepatitis B virus X gene potentiates c-myc-induced liver oncogenesis in transgenic mice. *Oncogene* 1997; 14: 395-404
- 27 Ali SH, DeCaprio JA. Cellular transformation by SV40 large T antigen: interaction with host proteins. *Semin Cancer Biol* 2001; 11: 15-23
- 28 Ahuja D, Sáenz-Robles MT, Pipas JM. SV40 large T antigen targets multiple cellular pathways to elicit cellular transformation. *Oncogene* 2005; 24: 7729-7745
- 29 Kitagawa T, Hino O, Lee GH, Li H, Liu J, Nomura K, Ohtake K, Furuta Y, Aizawa S. Multistep hepatocarcinogenesis in transgenic mice harboring SV40 T-antigen gene. *Princess Takamatsu Symp* 1991; 22: 349-360
- 30 Sepulveda AR, Finegold MJ, Smith B, Slagle BL, DeMayo JL, Shen RF, Woo SL, Butel JS. Development of a transgenic mouse system for the analysis of stages in liver carcinogenesis using tissue-specific expression of SV40 large T-antigen controlled by regulatory elements of the human alpha-1-antitrypsin gene. *Cancer Res* 1989; 49: 6108-6117
- 31 Dubois N, Bennoun M, Allemand I, Molina T, Grimber G, Daudet-Monsac M, Abelanet R, Briand P. Time-course development of differentiated hepatocarcinoma and lung metastasis in transgenic mice. *J Hepatol* 1991; 13: 227-239
- 32 Lee KH, Liapi E, Buijs M, Vossen JA, Prieto-Ventura V, Syed LH, Geschwind JF. Percutaneous US-guided implantation of Vx-2 carcinoma into rabbit liver: a comparison with open surgical method. *J Surg Res* 2009; 155: 94-99
- 33 Cao W, Wan Y, Liang ZH, Duan YY, Liu X, Wang ZM, Liu YY, Zhu J, Liu XT, Zhang HX. Heated lipiodol as an embolization agent for transhepatic arterial embolization in VX2 rabbit liver cancer model. *Eur J Radiol* 2010; 73: 412-419
- 34 Park US, Su JJ, Ban KC, Qin L, Lee EH, Lee YI. Mutations in the p53 tumor suppressor gene in tree shrew hepatocellular carcinoma associated with hepatitis B virus infection and intake of aflatoxin B1. *Gene* 2000; 251: 73-80
- 35 Tennant BC, Toshkov IA, Peek SF, Jacob JR, Menne S, Hornbuckle WE, Schinazi RD, Korba BE, Cote PJ, Gerin JL. Hepatocellular carcinoma in the woodchuck model of hepatitis B virus infection. *Gastroenterology* 2004; 127: S283-S293

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

黏着斑激酶在结直肠癌中的研究进展

张丹华, 周建平

张丹华, 周建平, 中国医科大学附属第一医院普通外科教研室胃肠外科 辽宁省沈阳市 110001
辽宁省教育厅科技基金资助项目, No. 2008809
作者贡献分布: 本文综述由张丹华完成; 周建平审校。
通讯作者: 周建平, 副教授, 副主任医师, 110001, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学附属第一医院普通外科教研室胃肠外科。
zjphama@163.com
收稿日期: 2010-12-30 修回日期: 2011-03-02
接受日期: 2011-03-08 在线出版日期: 2011-04-28

Role of focal adhesion kinase in the pathogenesis of colorectal carcinoma

Dan-Hua Zhang, Jian-Ping Zhou

Dan-Hua Zhang, Jian-Ping Zhou, Department of General Surgery, the First Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China
Supported by: the Department of Education Technology Foud in Liaoning Province, No. 2008809
Correspondence to: Associate Professor Jian-Ping Zhou, Department of General Surgery, the First Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. zjphama@163.com
Received: 2010-12-30 Revised: 2011-03-02
Accepted: 2011-03-08 Published online: 2011-04-28

Abstract

Focal adhesion kinase (FAK) was initially identified as a nonreceptor protein tyrosine kinase localized to the focal contact protein clusters. This enzyme has been shown to facilitate generation of integrin-stimulated signals to downstream targets. It has been reported that activation of FAK leads to a number of processes, including cell attachment, migration, proliferation, and survival. The expression of FAK in colon carcinoma is significantly higher than that in matched cancer-adjacent normal tissue, suggesting that FAK may be an important target for the therapy of colon carcinoma. The inhibition of FAK activation can interrupt many signal pathways involved in colon carcinogenesis and may represent a new therapy strategy for colon carcinoma.

Key Words: Focal adhesion kinase; Colorectal carcinoma; Signal pathway

Zhang DH, Zhou JP. Role of focal adhesion kinase in the

pathogenesis of colorectal carcinoma. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2011; 19(12): 1279-1284

摘要

黏着斑激酶(focal adhesion kinase, FAK)是一种非受体酪氨酸激酶, 他作为整合素介导的信号传导过程中的中心分子与多个信号通路相交通, 参与细胞的生长、增殖、损伤修复及凋亡等多种生物学行为. FAK在结直肠癌中高表达, 在正常大肠组织中呈弱阳性或阴性. FAK可能成为结直肠癌治疗的一个重要靶点, 抑制FAK的功能可以阻断多条与肿瘤相关的信号通路.

关键词: 黏着斑激酶; 结直肠癌; 信号通路

张丹华, 周建平. 黏着斑激酶在结直肠癌中的研究进展. 世界华人消化杂志 2011; 19(12): 1279-1284
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/1279.asp>

0 引言

结直肠癌占肿瘤发病率的第4位, 肿瘤相关疾病死亡率的第2位^[1], 对人类的健康和生命有着严重危害. 结直肠癌的侵袭和转移是影响疗效、预后和导致死亡的重要因素. 黏着斑激酶(focal adhesion kinase, FAK)在结直肠癌中高表达, 而在正常结肠组织中呈弱阳性或阴性, 与结直肠癌细胞的发生、侵袭、转移和增殖等生物学行为密切相关^[2-5]. FAK可能成为结直肠癌治疗的一个重要靶点, 抑制FAK的功能可以阻断多条与肿瘤相关的信号通路.

1 FAK简介及基本结构

FAK是Schaller等^[6]1992年从v-Src转染的鸡胚成纤维细胞中克隆鉴定出来, 因与细胞黏附关系密切, 故命名为FAK. 编码人FAK的基因定位于8q24, cDNA全长4 285 bp, 编码1 052个氨基酸, 分子量为125 000 Da.

FAK有3个结构域: 带有FERM区的氨基端(N端)、由富含脯氨酸和黏着斑定位区(focal adhesion targeting, FAT)组成的羧基端(C端)和激

■背景资料

FAK由Schaller等在1992年发现, 与细胞黏附关系密切, 作为整合素介导的信号传导过程中的中心分子与多个信号通路相交通, 其在结直肠癌中高表达, 有可能成为结直肠癌治疗的一个重要靶点.

■同行评议者

杨柏霖, 副主任医师, 南京中医药大学附属医院结直肠外科

■相关报道

Chen等运用RNA干扰技术构建了抑制FAK表达的载体pGenesil-1-FAK,成功干扰了FAK及磷酸化FAK pY397的表达,增加了癌细胞对化疗药物5-氟尿嘧啶的敏感性,促进了结直肠癌细胞的凋亡,进而有效地逆转结直肠癌细胞对化疗药物的耐药性。

酶区^[7]。氨基端FERM同源区结构域与激酶区相结合并抑制后者作用,占据位于FERM和激酶结构域间的Src募集反应位点,阻止了Tyr397位点的自体磷酸化,使FAK处于休眠状态^[7,8]。激酶区是指411-686位氨基酸残基区域,具有蛋白质酪氨酸激酶共有的底物结合位点和催化位点^[9,10]。FAK羧基端又称为黏着斑非激酶区(FAK related non kinase, FRNK),是FAK的选择性剪切产物,在某些因素作用下,FRNK与FAK竞争结合共有的细胞内受体,或与FAK形成FRNK/FAK异二聚体减弱FAK活性,是FAK的内源性抑制剂,可特异性阻断FAK磷酸化及下游信号通路的活化^[11,12]。

FAK有6个酪氨酸磷酸化位点: Tyr397、Tyr407、Tyr576、Tyr577、Tyr861、Tyr925。Tyr397是主要的自主磷酸化部位,可与Src家族的SH2结构域结合,随后激活其他磷酸化位点,促进FAK下游信号通路的活化^[13]。Tyr576和Tyr577位于激酶结构域的活化环内,是Src家族激酶磷酸化的主要部位。Tyr861和Tyr925位于羧基端结构域, Tyr861位点磷酸化后连接 α v β 5整合素与FAK结合,调节p130CAS与FAK的黏合。Tyr925磷酸化时,可以与含SH2结构域的蛋白质如接头蛋白鸟苷酸受体结合蛋白(growth receptor bound protein 2, Grb2)相结合,促进肿瘤相关的血管再生^[14,15]。

2 FAK在肿瘤细胞生物学行为中的功能及机制

2.1 FAK介导肿瘤细胞的增殖与存活 Zouq等^[15]总结了10年来FAK在肿瘤细胞中的研究进展,发现FAK在细胞的生存与死亡上起着决定性作用。FAK在整合蛋白的介导下与细胞外基质(extracellular matrix, ECM)黏附是细胞生长、增殖的必要条件^[16,17]。FAK-Ras-丝裂酶原活化蛋白激酶(mitogen activated proteinase, MAPK)通路负责锚定机制。MAPK属于丝/苏氨酸蛋白激酶,在细胞周期调控中发挥重要作用^[18,19]。FAK的Tyr925磷酸化后,为Grb2提供了泊点,Grb2再通过结合鸟苷酸交换因子sos激活Ras蛋白,活化MAPK^[15,20]。另一方面,FAK/Src结合后,可以磷酸化Cas(Crk associated substrate)和桩蛋白(Paxillin)^[21,22],二者酪氨酸磷酸化后,除可以调节细胞骨架外,还产生其他含SH2结构域蛋白如Crk的结合部位与C3G结合, C3G是公认的Ras鸟苷酸交换因子,因此, Cas和桩蛋白酪氨酸磷酸化后可以通过Crk激活Ras/MAPK途径,进一步作用于DNA转录因子,启动细胞的增殖、转化和分化^[12,23]。

FAK-PI3K-Akt通路对肿瘤细胞的存活和增殖也有影响, Akt能通过磷酸化Bcl-2家族成员BAD和蛋白水解酶Caspase-9阻止细胞凋亡,促进细胞存活^[24]; Akt可磷酸化P53结合蛋白MDM2,磷酸化的MDM2转位到细胞核与P53结合,增加P53的泛素化而促进细胞的存活^[25-27]。

2.2 抑制肿瘤细胞的凋亡 在癌细胞中FAK的过度表达可以使细胞超越凋亡这种生长抑制机制,甚至在缺乏细胞黏附的条件下,转为非锚定生长,使癌细胞不断增生。Bcl-2蛋白家族在细胞的存活和凋亡中起主要作用^[28], FAK介导的PI3K/Akt和MEK/Erk通路都与多种Bcl-2同源染色体的表达和作用有关^[12,27,28]。磷脂酰肌醇3-激酶(phosphoinositide 3-kinase, PI3K)是一种脂类激酶,催化磷脂酰肌醇242磷酸和磷脂酰肌醇24, 52二磷酸的肌醇环D3位磷酸化,分别生成磷脂酰肌醇23, 42二磷酸和磷脂酰肌醇23, 4, 52三磷酸,这2种产物均与细胞骨架重组有关^[29,30]。FAK在Tyr397位点磷酸化后, PI3Kp85亚基的SH2结构域与其结合,在Ras的参与下, PI3K被激活,进而通过蛋白激酶B(protein kinase B, PKB)成员Akt磷酸化一系列下游分子如促凋亡蛋白Bad、核转录因子- κ B、cAMP反应元件结合蛋白、生存素(survivin)以及Forkhead转录因子家族成员FKHRL1等导致Bcl-2转录增强, FAK-PI3K-AKT通路通过增加Bcl-2的转录等方式抑制细胞凋亡^[2,31]。

2.3 介导肿瘤细胞的迁移和侵袭 FAK信号通路可促进细胞能动性的获得,剔除FAK的裸鼠细胞有能动力缺陷,重组野生型FAK可补救这一缺陷。细胞运动是复杂的过程,包括质膜伸出前突,形成黏着斑,稳定前缘,产生收缩力,黏着翻转,细胞后部的松解等。这些活动紧密协调,主要被调节肌动蛋白细胞骨架动力的Rho家族的GTP酶类控制。FAK/Src信号通路与Rac1和RhoA协调调控细胞的黏附和迁移。RhoA活化促进了有收缩能力的肌动蛋白-肌球蛋白丝的形成。Rho家族GTP酶类失去调节和缺乏FAK一样,都会引起成纤维细胞样细胞失去定向黏着^[14,28]。FAK/Src复合物主要通过两个下游底物调节Rac1活性: Cas和桩蛋白^[9,13,32],活化的Rac1主要作用是通过Arp2/3复合物激活肌动蛋白磷酸化,肌动蛋白可诱导质膜伸出前突,层形足板伸展。Crk可与DOCK180/ELMO相互作用,进而对Rac1起GEF活性作用。在黏着斑上, Crk/DOCK180/ELMO与Cas的募集反应对调控Rac1下游的质膜前突起重

要作用, 调节细胞骨架, 进而影响细胞迁移^[32,33].

FAK-Ras-MAPK信号通路可参与基质金属蛋白酶(matrix metallo proteinases, MMPs)表达的调节. MMPs能降解基底膜, 其活性与肿瘤的迁移侵袭密切相关^[34,35].

2.4 促进肿瘤血管的生成 肿瘤血管发生是肿瘤转移的一个重要基础. FAK与肿瘤细胞和胞外基质成分的黏附及其信号转导关系密切, VEGF可通过诱导FAK磷酸化介导内皮细胞迁移并抑制其凋亡而促进肿瘤血管生成及入侵转移^[29,30]. 侵袭性垂体腺瘤组织内FAK过度表达可激活VEGF/VEGFR而加速血管生成, 使瘤体内微血管密度(microvessel density, MVD)值显著增高, 进而促进垂体腺瘤侵袭性生长^[36].

3 FAK在结直肠癌中的研究进展

3.1 FAK与结直肠肿瘤相关基因间的关系 在结直肠癌中, 发现了多种基因包括结肠腺瘤性息肉(adenomatous polyposis coli, APC)、错配修复(mismatch repair, MMR)、受体型酪氨酸激酶磷酸酶R(protein-tyrosine phosphatase receptor type R, PTPRR)、*p53*等基因的改变^[37]. 这些基因相互作用, 产生多条信号通路致结直肠癌形成.

3.1.1 参与FAP向结肠癌的转化: 家族性腺瘤样息肉(familial adenomatous polyposis, FAP)是一种迟发的常染色体显性遗传病, 患者表现为大肠广泛而密集分布的腺瘤性息肉, 如不治疗, 患者在40岁前几乎无一例外的转化为结直肠癌^[38], FAP的致病基因是APC基因^[39], APC突变后, 造成APC蛋白功能失活, 活化FAK-Wnt- β -catenin信号通路, Wnt/ β -catenin连环蛋白功能增强, 结合微管能力下降, 影响细胞分裂和迁移, 引起细胞增殖和细胞分化之间的平衡失调, 细胞过度增殖, 导致结直肠癌发生^[40].

3.1.2 参与RAF突变致结肠癌发生的信号通路: RAF突变则可活化Src/FAK/Ras/Raf/ERK通路, 该通路活化后可增强*c-fos*, *c-jun*基因的表达, 进一步作用于DNA转录因子启动细胞增殖、转化和分化^[41,42]. Seon等研究发现, RAF的突变只在结肠癌中发现, 而Ras突变在直肠癌中明显比在结肠癌中少见, APC/Wnt和MMR/RAF致肿瘤形成及其交联作用在结肠癌中比在直肠癌中常见^[37]. 这些发现也许可以解释结肠和直肠在肿瘤形成中尚未经确认的差别.

3.1.3 促进P53的降解: FAK以一种非激酶依赖性形式, 通过提高MDM2依赖性的泛素化, 促进

P53降解, 具体机制为: 整合素黏着减少和有细胞外压力的情况下, FAK离开其黏着位点, 使细胞质中FAK增加, 也通过FAK-FERM介导的靶向作用增加FAK在细胞核中的含量, 核内FAK是P53-MDM2复合体的支架分子, 其FERM结构域作为提高依赖于MDM2的P53泛素化的平台, FERM结构域中F1亚结构域与P53相结合, FERM F2亚结构域将FAK定位于核内, FERM F3亚结构域与MDM2以及蛋白酶体降解相连接, 引起P53多聚泛素化, 随后P53被细胞质或细胞核内蛋白酶体降解. FAK和P53间的这种调节关系由FAK FERM结构域参与, 并不需要FAK激酶的活性作用^[25,27].

3.1.4 与促进结直肠癌发生的激素相关: 促胃泌素释放肽(gastrin releasing peptide, GRP)及其受体GRPR在正常大肠表皮细胞中不表达, 在结直肠癌细胞中异常表达. 通过调控细胞骨架重组中的细胞能动性, 增加细胞基质的黏附, 减少细胞侵袭, 降低肿瘤细胞的恶性程度, 使肿瘤细胞有更好的分化表型^[43], 对剔除GRPR基因的小鼠研究发现, GRPR对形态改变的调节作用是由FAK介导的. FAK与GRP的联系提示FAK在结直肠癌中所起的作用也许并非全部有害^[44,45]. 作为促胃泌素释放肽调控的下游激素, 胃泌素起着与之相反的作用, 胃泌素是一种肽类激素, 也是一种营养因子, 可调节胃酸分泌, 肿瘤发生时, 可促进肿瘤细胞的生长^[46-48]. 曹俊等发现胃泌素能够促进转染胃泌素受体(CCK-B受体)人结肠癌细胞株Colo320的FAK、桩蛋白和p130CAS酪氨酸磷酸化, 进而通过磷酸化FAK Tyr397, 激活FAK/Src-RAF-RAF-MEK-ERK1/2通路, 影响结肠癌中E-钙黏蛋白和 β -catenin分布, 促进结直肠癌细胞侵袭和转移^[47,49-51].

3.1.5 调控结直肠癌干细胞生物学行为: 结直肠癌干细胞引起肿瘤形成^[46], FAK/Wnt和转化生长因子 β (transforming growth factor, TGF- β)通路可调控干细胞的自我更新、增殖、分化^[45,46,52,53]. 结直肠癌干细胞在结直肠癌中的发病机制已阐明, 为结直肠癌的治疗提供了新的治疗靶点, 干细胞生物标记剂, 如CD44、CD45和Lgr5, 均以结直肠癌干细胞为靶点破坏相关信号通路, 有可能在不久的将来彻底治愈结直肠癌晚期患者^[54,55].

3.2 外科手术的影响 大部分结直肠癌患者都需要接受手术治疗^[56], 手术一方面可以切除肿瘤组织及周围淋巴结, 是较为彻底的肿瘤治疗方法, 但另一方面, 外科手术操作后, 残余的肿瘤细胞

■创新盘点

FAK自1992年发现以来, 对其进行了大量研究, 但多是针对其信号通路, 少有其与结直肠癌关系的详细论述, 笔者在阅读了大量文献后, 系统详尽地总结了FAK与结直肠癌基因, 相关激素以及手术、放疗和化疗间的关系.

■应用要点

本文简略介绍了FAK相关的多个信号通路及其作用,与结直肠癌细胞生物学行为、基因、相关激素及手术和放化疗的关系,增加了读者对FAK的了解,避免重复性研究,为FAK在结直肠癌中的研究提供思路 and 方向。

从淋巴系统和血管通过时,都会受到压力和切应力,术后脱落到腹腔的细胞也会受到术后腹腔内组织水肿增加的压力^[57-59]。Thamilselvam等的研究表明机械性刺激如增加的细胞外压和非层流切应力可激活经典的Src/FAK/PI3K/Akt信号通路,增加结直肠癌细胞对细胞外基质的黏附,促进结直肠癌细胞存活,抑制其凋亡^[1,60-62]。

3.3 与结直肠癌化疗的关系 术前化疗可使结直肠癌细胞FAK的表达下降,原因有两方面:(1)FAK的激活需要整合蛋白和ECM配体结合,整合蛋白的表达量影响着FAK的表达,化疗使肿瘤组织中整合蛋白 $\beta 1$ 的表达减少,从而使FAK的表达量减少;(2)化疗可以使部分肿瘤细胞缺血坏死、凋亡,肿瘤表达FAK减少。术前化疗可通过引起FAK表达的减少,降低术后肿瘤的侵袭转移,改善患者预后^[63]。

Chen等^[64]运用RNA干扰技术构建了抑制FAK表达的载体pGenesil-1-FAK,成功干扰了FAK及磷酸化FAK pY397的表达,增加了癌细胞对化疗药物5-氟尿嘧啶的敏感性,促进了结直肠癌细胞的凋亡,进而有效地逆转结直肠癌细胞对化疗药物的耐药性。

4 结论

FAK与结直肠癌基因、肿瘤形成相关激素以及手术治疗和化疗关系密切。FAK可通过多条信号通路促进结直肠癌发生。术前化疗可使FAK表达量下降。RNA干扰技术可抑制FAK表达,促进结直肠癌细胞的凋亡。FAK有望成为结直肠癌治疗的一种新的靶向分子,具有广阔的临床应用前景。

5 参考文献

- Goldberg RM, Meropol NJ, Tabernero J. Accomplishments in 2008 in the treatment of advanced metastatic colorectal cancer. *Gastrointest Cancer Res* 2009; 3: S23-S27
- Turecková J, Vojtechová M, Krausová M, Sloncová E, Korínek V. Focal adhesion kinase functions as an akt downstream target in migration of colorectal cancer cells. *Transl Oncol* 2009; 2: 281-290
- Gauthier R, Harnois C, Drolet JF, Reed JC, Vézina A, Vachon PH. Human intestinal epithelial cell survival: differentiation state-specific control mechanisms. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001; 280: C1540-C1554
- 杨红军, 丁彦青. FAK在大肠癌中的表达及其临床意义. *世界华人消化杂志* 2003; 11: 663-665
- Lei K, Ye L, Yang Y, Wang GJ, Jiang QY, Jiang Y, Wei YQ, Deng HX. RNA interference-mediated silencing of focal adhesion kinase inhibits growth of human colon carcinoma xenograft in nude mice. *J Biomed Nanotechnol* 2010; 6: 272-278
- Schaller MD, Borgman CA, Cobb BS, Vines RR, Reynolds AB, Parsons JT. pp125FAK a structurally

distinctive protein-tyrosine kinase associated with focal adhesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89: 5192-5196

- Lim ST, Mikolon D, Stupack DG, Schlaepfer DD. FERM control of FAK function: implications for cancer therapy. *Cell Cycle* 2008; 7: 2306-2314
- Lietha D, Cai X, Ceccarelli DF, Li Y, Schaller MD, Eck MJ. Structural basis for the autoinhibition of focal adhesion kinase. *Cell* 2007; 129: 1177-1187
- Schlaepfer DD, Mitra SK, Ilic D. Control of motile and invasive cell phenotypes by focal adhesion kinase. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1692: 77-102
- Schaller MD, Borgman CA, Parsons JT. Autonomous expression of a noncatalytic domain of the focal adhesion-associated protein tyrosine kinase pp125FAK. *Mol Cell Biol* 1993; 13: 785-791
- Koshman YE, Kim T, Chu M, Engman SJ, Iyengar R, Robia SL, Samarel AM. FRNK inhibition of focal adhesion kinase-dependent signaling and migration in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010; 30: 2226-2233
- Kornberg LJ, Grant MB. Adenoviruses increase endothelial cell proliferation, migration, and tube formation: partial reversal by the focal adhesion kinase inhibitor, FRNK. *Microvasc Res* 2007; 73: 157-162
- Sakurama K, Noma K, Takaoka M, Tomono Y, Watanabe N, Hatakeyama S, Ohmori O, Hirota S, Motoki T, Shirakawa Y, Yamatsuji T, Haisa M, Matsuo J, Tanaka N, Naomoto Y. Inhibition of focal adhesion kinase as a potential therapeutic strategy for imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumor. *Mol Cancer Ther* 2009; 8: 127-134
- Tomar A, Lim ST, Lim Y, Schlaepfer DD. A FAK-p120RasGAP-p190RhoGAP complex regulates polarity in migrating cells. *J Cell Sci* 2009; 122: 1852-1862
- Zouq NK, Keeble JA, Lindsay J, Valentijn AJ, Zhang L, Mills D, Turner CE, Streuli CH, Gilmore AP. FAK engages multiple pathways to maintain survival of fibroblasts and epithelia: differential roles for paxillin and p130Cas. *J Cell Sci* 2009; 122: 357-367
- Parsons JT. Focal adhesion kinase: the first ten years. *J Cell Sci* 2003; 116: 1409-1416
- Bolós V, Gasent JM, López-Tarruella S, Grande E. The dual kinase complex FAK-Src as a promising therapeutic target in cancer. *Oncotargets Ther* 2010; 3: 83-97
- Kholodenko BN, Birtwistle MR. Four-dimensional dynamics of MAPK information processing systems. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 2009; 1: 28-44
- Huang G, Shi LZ, Chi H. Regulation of JNK and p38 MAPK in the immune system: signal integration, propagation and termination. *Cytokine* 2009; 48: 161-169
- Hwangbo C, Kim J, Lee JJ, Lee JH. Activation of the integrin effector kinase focal adhesion kinase in cancer cells is regulated by crosstalk between protein kinase Calpha and the PDZ adapter protein mda-9/Syntenin. *Cancer Res* 2010; 70: 1645-1655
- Choi CK, Zareno J, Digman MA, Gratton E, Horwitz AR. Cross-correlated fluctuation analysis reveals phosphorylation-regulated paxillin-FAK complexes in nascent adhesions. *Biophys J* 2011; 100: 583-592
- Desgrosellier JS, Barnes LA, Shields DJ, Huang M, Lau SK, Prevost N, Tarin D, Shattil SJ, Cheresch DA. An integrin $\alpha(v)\beta(3)$ -c-Src oncogenic unit

- promotes anchorage-independence and tumor progression. *Nat Med* 2009; 15: 1163-1169
- 23 Malla R, Gopinath S, Alapati K, Gondi CS, Gujrati M, Dinh DH, Mohanam S, Rao JS. Downregulation of uPAR and cathepsin B induces apoptosis via regulation of Bcl-2 and Bax and inhibition of the PI3K/Akt pathway in gliomas. *PLoS One* 2010; 5: e13731
 - 24 Yang SY, Hoy M, Fuller B, Sales KM, Seifalian AM, Winslet MC. Pretreatment with insulin-like growth factor I protects skeletal muscle cells against oxidative damage via PI3K/Akt and ERK1/2 MAPK pathways. *Lab Invest* 2010; 90: 391-401
 - 25 Boosani CS, Nalabothula N, Munugalavada V, Cosgrove D, Keshamoun VG, Sheibani N, Sudhakar A. FAK and p38-MAP kinase-dependent activation of apoptosis and caspase-3 in retinal endothelial cells by alpha1(IV)NC1. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009; 50: 4567-4575
 - 26 Brábek J, Constancio SS, Siesser PF, Shin NY, Pozzi A, Hanks SK. Crk-associated substrate tyrosine phosphorylation sites are critical for invasion and metastasis of SRC-transformed cells. *Mol Cancer Res* 2005; 3: 307-315
 - 27 Lim ST, Chen XL, Lim Y, Hanson DA, Vo TT, Howerton K, Larocque N, Fisher SJ, Schlaepfer DD, Ilic D. Nuclear FAK promotes cell proliferation and survival through FERM-enhanced p53 degradation. *Mol Cell* 2008; 29: 9-22
 - 28 Kaczmarek E, Erb L, Koziak K, Jarzyna R, Wink MR, Guckelberger O, Blusztajn JK, Trinkaus-Randall V, Weisman GA, Robson SC. Modulation of endothelial cell migration by extracellular nucleotides: involvement of focal adhesion kinase and phosphatidylinositol 3-kinase-mediated pathways. *Thromb Haemost* 2005; 93: 735-742
 - 29 Sorenson CM, Sheibani N. Focal adhesion kinase, paxillin, and bcl-2: analysis of expression, phosphorylation, and association during morphogenesis. *Dev Dyn* 1999; 215: 371-382
 - 30 Sayers RL, Sundberg-Smith LJ, Rojas M, Hayasaka H, Parsons JT, Mack CP, Taylor JM. FRNK expression promotes smooth muscle cell maturation during vascular development and after vascular injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28: 2115-2122
 - 31 Pylyayeva Y, Gillen KM, Gerald W, Beggs HE, Reichardt LF, Giancotti FG. Ras- and PI3K-dependent breast tumorigenesis in mice and humans requires focal adhesion kinase signaling. *J Clin Invest* 2009; 119: 252-266
 - 32 Liu Z, Zhang HM, Yuan J, Lim T, Sall A, Taylor GA, Yang D. Focal adhesion kinase mediates the interferon-gamma-inducible GTPase-induced phosphatidylinositol 3-kinase/Akt survival pathway and further initiates a positive feedback loop of NF-kappaB activation. *Cell Microbiol* 2008; 10: 1787-1800
 - 33 Shan Y, Yu L, Li Y, Pan Y, Zhang Q, Wang F, Chen J, Zhu X. Nudel and FAK as antagonizing strength modulators of nascent adhesions through paxillin. *PLoS Biol* 2009; 7: e1000116
 - 34 Zaidel-Bar R, Kam Z, Geiger B. Polarized downregulation of the paxillin-p130CAS-Rac1 pathway induced by shear flow. *J Cell Sci* 2005; 118: 3997-4007
 - 35 Katoh H, Hiramoto K, Negishi M. Activation of Rac1 by RhoG regulates cell migration. *J Cell Sci* 2006; 119: 56-65
 - 36 Das A, Yaqoob U, Mehta D, Shah VH. FXR promotes endothelial cell motility through coordinated regulation of FAK and MMP-9. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009; 29: 562-570
 - 37 Oommen S, Gupta SK, Vlahakis NE. Vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) induces endothelial and cancer cell migration through direct binding to integrin {alpha}9{beta}1: identification of a specific {alpha}9{beta}1 binding site. *J Biol Chem* 2011; 286: 1083-1092
 - 38 Lee SH, Lee YJ, Song CH, Ahn YK, Han HJ. Role of FAK phosphorylation in hypoxia-induced hMSCS migration: involvement of VEGF as well as MAPKS and eNOS pathways. *Am J Physiol Cell Physiol* 2010; 298: C847-C856
 - 39 Roh SA, Choi EY, Cho DH, Jang SJ, Kim SY, Kim YS, Kim JC. Growth and invasion of sporadic colorectal adenocarcinomas in terms of genetic change. *J Korean Med Sci* 2010; 25: 353-360
 - 40 Iida M. [Clinical research of familial adenomatous polyposis: current status and issues]. *Fukuoka Igaku Zasshi* 2009; 100: 349-359
 - 41 Sheng JQ, Cui WJ, Fu L, Jin P, Han Y, Li SJ, Fan RY, Li AQ, Zhang MZ, Li SR. APC gene mutations in Chinese familial adenomatous polyposis patients. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 1522-1526
 - 42 Weyant MJ, Carothers AM, Dannenberg AJ, Bertagnolli MM. (+)-Catechin inhibits intestinal tumor formation and suppresses focal adhesion kinase activation in the min/+ mouse. *Cancer Res* 2001; 61: 118-125
 - 43 Hood JD, Frausto R, Kiosses WB, Schwartz MA, Cheresch DA. Differential alphav integrin-mediated Ras-ERK signaling during two pathways of angiogenesis. *J Cell Biol* 2003; 162: 933-943
 - 44 Benard O, Naor Z, Seger R. Role of dynamin, Src, and Ras in the protein kinase C-mediated activation of ERK by gonadotropin-releasing hormone. *J Biol Chem* 2001; 276: 4554-4563
 - 45 Glover S, Nathaniel R, Shakir L, Perrault C, Anderson RK, Tran-Son-Tay R, Benya RV. Transient upregulation of GRP and its receptor critically regulate colon cancer cell motility during remodeling. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 288: G1274-G1282
 - 46 Matkowskyj KA, Keller K, Glover S, Kornberg L, Tran-Son-Tay R, Benya RV. Expression of GRP and its receptor in well-differentiated colon cancer cells correlates with the presence of focal adhesion kinase phosphorylated at tyrosines 397 and 407. *J Histochem Cytochem* 2003; 51: 1041-1048
 - 47 Taglia L, Matusiak D, Matkowskyj KA, Benya RV. Gastrin-releasing peptide mediates its morphogenic properties in human colon cancer by upregulating intracellular adhesion protein-1 (ICAM-1) via focal adhesion kinase. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; 292: G182-G190
 - 48 Scott N, Millward E, Cartwright EJ, Preston SR, Coletta PL. Gastrin releasing peptide and gastrin releasing peptide receptor expression in gastrointestinal carcinoid tumours. *J Clin Pathol* 2004; 57: 189-192
 - 49 Carroll RE, Matkowskyj KA, Tretiakova MS, Battey JF, Benya RV. Gastrin-releasing peptide is a mitogen and a morphogen in murine colon cancer. *Cell Growth Differ* 2000; 11: 385-393
 - 50 Carroll RE, Ostrovskiy D, Lee S, Danilkovich A, Benya RV. Characterization of gastrin-releasing peptide and its receptor aberrantly expressed by human colon cancer cell lines. *Mol Pharmacol* 2000; 58: 601-607

同行评价

本文具有一定的科学性和学术价值, 对结直肠癌的研究提供了一定的价值。

- 51 Cao J, Yu JP, Liu CH, Zhou L, Yu HG. Effects of gastrin 17 on beta-catenin/Tcf-4 pathway in Colo320WT colon cancer cells. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 7482-7487
- 52 Fabrizi E, di Martino S, Pelacchi F, Ricci-Vitiani L. Therapeutic implications of colon cancer stem cells. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 3871-3877
- 53 Kanwar SS, Yu Y, Nautiyal J, Patel BB, Majumdar AP. The Wnt/beta-catenin pathway regulates growth and maintenance of colonospheres. *Mol Cancer* 2010; 9: 212
- 54 Crampton SP, Wu B, Park EJ, Kim JH, Solomon C, Waterman ML, Hughes CC. Integration of the beta-catenin-dependent Wnt pathway with integrin signaling through the adaptor molecule Grb2. *PLoS One* 2009; 4: e7841
- 55 Ou CY, Kim JH, Yang CK, Stallcup MR. Requirement of cell cycle and apoptosis regulator 1 for target gene activation by Wnt and beta-catenin and for anchorage-independent growth of human colon carcinoma cells. *J Biol Chem* 2009; 284: 20629-20637
- 56 Thenappan A, Li Y, Shetty K, Johnson L, Reddy EP, Mishra L. New Therapeutics Targeting Colon Cancer Stem Cells. *Curr Colorectal Cancer Rep* 2009; 5: 209
- 57 Yu Y, Kanwar SS, Patel BB, Nautiyal J, Sarkar FH, Majumdar AP. Elimination of Colon Cancer Stem-Like Cells by the Combination of Curcumin and FOLFOX. *Transl Oncol* 2009; 2: 321-328
- 58 Sylla P. Current experience and future directions of completely NOTES colorectal resection. *World J Gastrointest Surg* 2010; 2: 193-198
- 59 Wang Y, Flores L, Lu S, Miao H, Li YS, Chien S. Shear Stress Regulates the Flk-1/Cbl/PI3K/NF- κ B Pathway Via Actin and Tyrosine Kinases. *Cell Mol Bioeng* 2009; 2: 341-350
- 60 Thamilselvan V, Basson MD. The role of the cytoskeleton in differentially regulating pressure-mediated effects on malignant colonocyte focal adhesion signaling and cell adhesion. *Carcinogenesis* 2005; 26: 1687-1697
- 61 Shikata Y, Rios A, Kawkitinarong K, DePaola N, Garcia JG, Birukov KG. Differential effects of shear stress and cyclic stretch on focal adhesion remodeling, site-specific FAK phosphorylation, and small GTPases in human lung endothelial cells. *Exp Cell Res* 2005; 304: 40-49
- 62 Craig DH, Owen CR, Conway WC, Walsh MF, Downey C, Basson MD. Colchicine inhibits pressure-induced tumor cell implantation within surgical wounds and enhances tumor-free survival in mice. *J Clin Invest* 2008; 118: 3170-3180
- 63 王吉明, 程勇, 张伟, 李毅. 术前介入化疗对进展期结直肠癌FAK和 β -catenin表达的影响. *实用肿瘤杂志* 2008; 3: 515-518
- 64 Chen Y, Wang Z, Chang P, Xiang L, Pan F, Li J, Jiang J, Zou L, Yang L, Bian Z, Liang H. The effect of focal adhesion kinase gene silencing on 5-fluorouracil chemosensitivity involves an Akt/NF-kappaB signaling pathway in colorectal carcinomas. *Int J Cancer* 2010; 127: 195-206

编辑 曹丽鸥 电编 李薇

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011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)

急慢性大鼠梗阻性黄疸模型的建立

余水平, 李坚, 侯冰宗, 苏永辉, 李培平, 张百萌

余水平, 李坚, 侯冰宗, 苏永辉, 李培平, 张百萌, 中山大学附属第五医院普外三科 广东省珠海市 519000
珠海市科技局医药卫生重大基金资助项目, No. pb20081002
作者贡献分布: 此课题由余水平与张百萌设计; 动物模型制作由余水平、李坚及李培平操作完成; 胆总管直径和肝功能的检测由侯冰宗完成; 病理分析由苏永辉完成; 论文写作由余水平完成。
通讯作者: 张百萌, 教授, 博士生导师, 519000, 广东省珠海市, 中山大学第五医院普外科, baimengz@yahoo.com
收稿日期: 2010-12-29 修回日期: 2011-03-16
接受日期: 2011-04-11 在线出版日期: 2011-04-28

Evaluation of rat models of acute and chronic obstructive jaundice

Shui-Ping Yu, Jian Li, Bing-Zong Hou, Yong-Hui Su, Pei-Ping Li, Bai-Meng Zhang

Shui-Ping Yu, Jian Li, Bing-Zong Hou, Yong-Hui Su, Pei-Ping Li, Bai-Meng Zhang, Department of General Surgery (Division III), the Fifth Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Zhuhai 519000, Guangdong Province, China

Supported by: the Key Medical Program of Science and Technology Commission of Zhuhai City, No. pb20081002

Correspondence to: Professor Bai-Meng Zhang, Department of General Surgery (Division III), the Fifth Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Zhuhai 519000, Guangdong Province, China. baimengz@yahoo.com

Received: 2010-12-29 Revised: 2011-03-16

Accepted: 2011-04-11 Published online: 2011-04-28

Abstract

AIM: To develop rat models of acute and chronic obstructive jaundice and to evaluate the extent to which they mimic features of clinical diseases.

METHODS: Ninety Sprague-Dawley rats were randomly and equally divided into three groups: acute obstructive jaundice group, chronic obstructive jaundice group, and control group. Each group was further divided into five subgroups for testing at different time points. Liver function was determined and the diameter of the common bile duct was measured under a microscope at weeks 1, 2, 3, 4, and 5 after model induction. Pathological changes in liver tissue were also observed by microscope. Choledochoduodenostomy was performed at week 4.

RESULTS: Jaundice progressively worsened in

rats with acute obstructive jaundice, and TBIL increased from $84.86 \mu\text{mol/L} \pm 49.09 \mu\text{mol/L}$ at week 1 to $749.38 \mu\text{mol/L} \pm 38.99 \mu\text{mol/L}$ at week 4. Meanwhile, the diameter of the common bile duct diameter increased from $0.35 \text{ cm} \pm 0.15 \text{ cm}$ to $1.50 \text{ cm} \pm 0.30 \text{ cm}$, and obvious degeneration, necrosis and hyperplasia of liver cells were observed. Jaundice was obviously improved after choledochoduodenostomy (TBIL: $153.93 \mu\text{mol/L} \pm 57.36 \mu\text{mol/L}$; diameter of the common bile duct: $0.40 \text{ cm} \pm 0.20 \text{ cm}$). Jaundice was mild in rats with chronic obstructive jaundice, and TBIL decreased from $42.43 \mu\text{mol/L} \pm 23.56 \mu\text{mol/L}$ at week 1 to $36.52 \mu\text{mol/L} \pm 16.28 \mu\text{mol/L}$ at week 4. Meanwhile, the diameter of the common bile duct increased from $0.20 \text{ cm} \pm 0.15 \text{ cm}$ to $0.30 \text{ cm} \pm 0.10 \text{ cm}$, and obvious degeneration and hyperplasia of liver cells were noted. Jaundice slowly subsided after choledochoduodenostomy (TBIL: $32.15 \mu\text{mol/L} \pm 13.20 \mu\text{mol/L}$; diameter of the common bile duct: $0.15 \text{ cm} \pm 0.10 \text{ cm}$). Total bilirubin and the diameter of the common bile duct differed significantly at different time points between rats with acute and chronic obstructive jaundice (both $P < 0.05$).

CONCLUSION: Rat models of acute and chronic obstructive jaundice have been successfully established. There were significantly different manifestations between rats with chronic and acute obstructive jaundice.

Key Words: Rat; Obstructive jaundice; Model

Yu SP, Li J, Hou BZ, Su YH, Li PP, Zhang BM. Evaluation of rat models of acute and chronic obstructive jaundice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(12): 1285-1289

摘要

目的: 探讨急慢性SD大鼠梗阻性黄疸模型的建立, 评价其模拟临床梗阻性黄疸的价值, 提供一种新型的慢性梗阻性黄疸模型。

方法: SD大鼠随机分成3组, 每组每时段6只: 急性梗阻性黄疸模型组(A组), 慢性梗阻性黄疸模型组(B组), 对照组(C组)。造模后于第1、2、3、4、5周分别抽取大鼠静脉血检查肝功

■背景资料

慢性梗阻性黄疸是普外科常见的临床症状群, 严重危害机体的健康甚至生命, 近年来对梗阻性黄疸的研究多以胆总管结扎离断导致急性梗阻性黄疸, 与多数临床梗阻性黄疸的慢性表现不相符, 研究结论受到限制。

■同行评议者

徐迅迪, 教授, 中南大学湘雅二医院肝胆胰外科

■研究前沿

既往胆总管结扎离断难以模拟慢性梗阻性黄疸的病理过程。近年来国内外对慢性梗阻性黄疸模型进行了探索,如何制作与临床梗阻性黄疸发病相似的模型及控制模型的稳定性成为研究的热点。

能,显微镜下刻度目镜检测大鼠胆总管直径,光学显微镜观察肝组织的病理改变,其中第4周行胆总管十二指肠吻合再通。

结果: A组造模术后4 wk内黄疸进行性加重(TB: $749.38 \mu\text{mol/L} \pm 38.99 \mu\text{mol/L}$ vs $84.86 \mu\text{mol/L} \pm 49.09 \mu\text{mol/L}$, $P < 0.05$),胆总管直径扩张明显($1.50 \text{ cm} \pm 0.30 \text{ cm}$ vs $0.35 \text{ cm} \pm 0.15 \text{ cm}$, $P < 0.05$),肝细胞变性、坏死明显,伴有增生。第4周行胆总管与十二指肠端侧吻合后黄疸消退明显(TB: $153.93 \mu\text{mol/L} \pm 57.36 \mu\text{mol/L}$ vs $749.38 \mu\text{mol/L} \pm 38.99 \mu\text{mol/L}$)。B组造模术后黄疸呈现波动性,胆总管直径扩张($0.20 \text{ cm} \pm 0.15 \text{ cm}$ vs $0.30 \text{ cm} \pm 0.10 \text{ cm}$, $P < 0.05$),肝细胞以变性为主,并有纤维组织增生。第4周行胆总管与十二指肠端侧吻合再通后黄疸缓慢消退(TB: $32.15 \mu\text{mol/L} \pm 13.20 \mu\text{mol/L}$ vs $36.52 \mu\text{mol/L} \pm 16.28 \mu\text{mol/L}$, $P < 0.05$)。A组各时段的总胆红素及胆总管直径均存在明显不同。

结论: 慢性大鼠梗阻性黄疸的模型和急性大鼠梗阻性黄疸大鼠有明显不同的表现,可以提供一种理想的慢性梗阻性黄疸的动物模型。

关键词: 大鼠; 梗阻性黄疸; 模型

余水平, 李坚, 侯冰宗, 苏永辉, 李培平, 张百萌. 慢性大鼠梗阻性黄疸模型的建立. 世界华人消化杂志 2011; 19(12): 1285-1289

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/1285.asp>

0 引言

慢性梗阻性黄疸是普外科常见的临床症状群,可引起诸多组织、器官的损害,严重危害机体的健康甚至生命,近年来对梗阻性黄疸的研究较多^[1-6],多以胆总管结扎离断导致梗阻性黄疸,与多数临床梗阻性黄疸的慢性表现不相符^[7],研究结论受到限制。本实验旨在建立一种慢性梗阻性黄疸模型,评价其与急性梗阻性黄疸不同的临床应用价值。

1 材料和方法

1.1 材料 ♀SD大鼠90只,体质量在 $180 \text{ g} \pm 20 \text{ g}$,随机分3组:急性梗阻性黄疸模型(A组),慢性梗阻性黄疸模型(B组),对照组(C组),每组30只,平均分5个时段(1、2、3、4、5 wk),每时段6只,在标准饲养条件下进行饲养。以上动物均由中山大学北校区实验动物中心提供。

1.2 方法

1.2.1 慢性大鼠梗阻性黄疸模型的建立: 6-0 VIC-

RYL可吸收线经碘仿纱布术前处理备用。实验大鼠术前12 h禁食、禁水。乙醚吸入麻醉。剑突下正中切口进腹, SXP-1C显微镜下显露胆总管,距十二指肠上缘1 cm处纵行缝过胆总管,将碘仿纱布处理的6-0 VICRYL可吸收线贯通置于胆总管内,长度0.5 cm,固定。随后关腹,结束手术。对照组仅开腹手术。

1.2.2 急性大鼠梗阻性黄疸模型的建立: 显微镜显露胆总管后,距十二指肠上缘1 cm处6-0 VICRYL可吸收线双重结扎胆总管并离断,随后关腹,结束手术。

1.2.3 胆总管十二指肠端侧吻合: 模型建立后第4周。术前12 h禁食、禁水。乙醚吸入麻醉。剑突下正中切口进腹,显露胆总管及十二指肠降部, SXP-1C显微镜下用8-0 PROLENE线将胆总管与十二指肠降部端侧吻合。随后关腹结束手术。

1.2.4 标本采集: 造模后于第1、2、3、4、5周将各组大鼠分别乙醚麻醉后,心脏采血行肝功能检查。SXP-1C显微镜下刻度目镜检测胆总管直径。取出部分肝脏左叶组织行光镜检查。

统计学处理 实验数据以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示。均数用方差分析中的多个样本均数的两两检验。数据均用SPSS统计软件处理。 $P = 0.05$ 作为检验水准。

2 结果

2.1 肉眼观察 急性梗阻性黄疸大鼠术后2-3 d后大鼠出现尿液深黄,并逐渐加重。大鼠食欲减退,精神差,反应迟缓,活动减少,术后第3周后部分大鼠出现呕血、便血、腹水及切口疝等并发症,死亡大鼠2只,肝脏呈黄绿色甚至墨绿色,质地偏硬,呈弥漫性肿大。第4周胆总管十二指肠吻合再通后黄疸明显好转。慢性梗阻性黄疸大鼠术后3 d出现尿液黄染,1 wk后尿液黄染消失,至第2周尿液再次出现黄染,呈波动性,黄染逐渐加深,肝脏黄染肿胀。第4周胆总管十二指肠吻合再通后尿液黄染消失。

2.2 肝功能的检查 急性梗阻性黄疸大鼠AST、TB、DB进行性增高。慢性梗阻性黄疸大鼠AST、TB、DB波动性增高。急、慢性梗阻性黄疸大鼠与对照组间相比,除第2周慢性梗阻性黄疸大鼠外($P > 0.05$),差异均有统计学意义($P < 0.05$,表1)。

2.3 胆总管直径的检测 急性梗阻性黄疸大鼠术后胆总管进行性扩张,最大直径达1.8 cm,呈透明囊状,管壁菲薄。慢性梗阻性黄疸大鼠术后胆

■相关报道

陈文斌等报道将并行有16G注射器针头的胆总管用5%碘酒溶液浸泡处理的10号丝线捆扎后,抽除针头造成的梗阻性黄疸呈渐进性、慢性过程,耐受性好,重复性强。

表 1 各组和各时段血清肝功能检测结果的比较 (mean ± SD, $n = 6$, $\mu\text{mol/L}$)

分组	AST	ALB	DB	TB
1 wk				
C组	28.17 ± 4.02 ^{bc}	23.05 ± 1.28	9.54 ± 2.39 ^{bd}	13.74 ± 1.78 ^{bd}
A组	248.65 ± 64.91 ^d	21.37 ± 2.34	65.62 ± 54.30 ^d	84.86 ± 49.09 ^d
B组	72.67 ± 43.67	22.65 ± 2.27	33.93 ± 17.36	42.43 ± 23.56
2 wk				
C组	30.17 ± 3.98 ^b	21.69 ± 1.98	12.65 ± 2.69 ^b	14.72 ± 2.07 ^b
A组	446.67 ± 41.44 ^d	19.47 ± 2.35	147.84 ± 48.74 ^d	272.14 ± 24.32 ^d
B组	28.33 ± 9.58	19.65 ± 5.16	19.29 ± 9.41	24.87 ± 6.78
3 wk				
C组	31.67 ± 3.93 ^{bc}	19.30 ± 1.76	15.30 ± 3.24 ^{bc}	19.09 ± 2.24 ^{bc}
A组	593.34 ± 63.52 ^d	15.24 ± 2.56	593.56 ± 31.67 ^d	637.05 ± 70.35 ^d
B组	90.67 ± 43.14	18.64 ± 5.68	34.38 ± 38.99	48.53 ± 37.78
4 wk				
C组	28.34 ± 6.05 ^{bc}	21.13 ± 3.24	10.56 ± 2.88 ^{bc}	15.74 ± 3.76 ^{bc}
A组	348.65 ± 66.23 ^d	16.35 ± 4.34	656.60 ± 54.35 ^d	749.38 ± 38.99 ^d
B组	65.62 ± 42.68	20.60 ± 4.28	32.91 ± 17.56	36.52 ± 16.28
5 wk				
C组	30.62 ± 3.65 ^{bc}	18.30 ± 2.78	16.50 ± 4.25 ^{bc}	19.65 ± 3.25 ^{bc}
A组	193.36 ± 53.32 ^d	14.34 ± 5.50	93.56 ± 31.67 ^d	153.93 ± 57.36 ^d
B组	60.63 ± 41.25	18.70 ± 5.65	24.42 ± 18.15	32.15 ± 13.20

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs A组; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs B组.

表 2 各组和各时段胆总管直径检测结果 (mean ± SD, $n = 6$, cm)

分组	1 wk	2 wk	3 wk	4 wk	5 wk
C组	0.08 ± 0.10 ^{ac}	0.08 ± 0.05 ^b	0.09 ± 0.05 ^{bc}	0.08 ± 0.05 ^{bd}	0.09 ± 0.10 ^b
A组	0.35 ± 0.15 ^c	0.60 ± 0.10 ^d	1.20 ± 0.30 ^d	1.50 ± 0.30 ^d	0.40 ± 0.20 ^c
B组	0.20 ± 0.15 ^a	0.10 ± 0.05 ^b	0.25 ± 0.15 ^b	0.30 ± 0.10 ^b	0.15 ± 0.10 ^a

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs A组; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs B组.

总管波动性扩张, 最大直径0.5 cm. 急、慢性梗阻性黄疸大鼠与对照组间相比, 除第2周慢性梗阻性黄疸大鼠外($P > 0.05$), 差异均有统计学意义($P < 0.05$, 表2).

2.4 肝组织的光镜检查 急性梗阻性黄疸大鼠术后1 wk肝血管充血, 肝细胞肿胀, 水样变性, 少数出现点状坏死, 随着梗阻时间的延长逐渐出现肝内胆管扩张, 毛细血管及结缔组织增生, 炎性细胞浸润. 第3周后肝脏可见较多灶状坏死, 小胆管、纤维组织增生明显, 纤维间隔形成, 肝结构紊乱. 慢性梗阻性黄疸大鼠术后1 wk肝细胞见水样变性, 随后可见恢复, 第3周后肝细胞可见点状坏死, 肝小叶中央出现淤胆, 小胆管增生明显, 汇管区纤维化明显. 第5周胆总管再通后急性梗阻性黄疸肝脏仍表现明显不同(图1).

3 讨论

慢性梗阻性黄疸的病理生理变化不同于急性梗阻性黄疸, 壶腹部良恶性肿瘤及胆总管慢性炎症、胆总管结石多表现为慢性梗阻性黄疸, 黄疸表现为波动性, 甚至可自行完全缓解^[8]. 既往胆总管结扎离断多表现为急性梗阻性黄疸^[9,10], 难以模拟许多慢性梗阻性黄疸的病理过程^[11]. 本实验结果显示: 急性梗阻性黄疸大鼠术后总胆红素明显持续升高, 胆总管十二指肠吻合解除梗阻后, 黄疸消退明显. 慢性梗阻性黄疸大鼠术后黄疸呈现波动性升高, 胆总管十二指肠吻合解除梗阻后, 黄疸消退缓慢. 我们分析: 胆总管贯通缝合初期, 6-0 VICRYL可吸收线造成胆总管部分狭窄合并管壁的炎性水肿引起梗阻性黄疸, 3 d后随着管壁炎性水肿消退及胆总管代偿扩张

■创新盘点

本文通过运用碘仿处理的6-0 VICRYL可吸收线对胆总管黏膜的物理刺激不同于既往文献报道的对胆总管浆膜层的影响, 更符合临床慢性梗阻性黄疸的发病机制及病理过程, 如胆总管结石、壶腹周围癌等.

■应用要点

本实验观察慢性大鼠梗阻性模型与传统胆总管结扎断离所致的急性梗阻性黄疸明显不同, 呈现慢性、波动性发展的特征表现, 更加接近多数临床梗阻性黄疸病例表现, 为研究梗阻性黄疸病理改变及治疗提供一种更理想的动物模型。

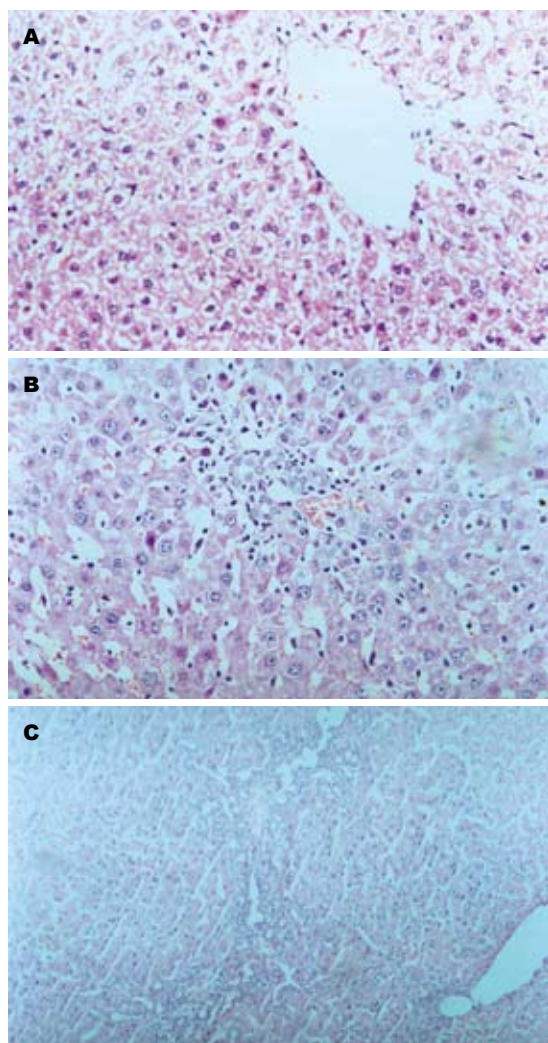


图1 急性梗阻性黄疸大鼠术后肝组织的光镜检查(HE × 200). A: 1 wk; B: 3 wk; C: 5 wk.

缓解了胆总管梗阻而使黄疸消退. 第2周后碘仿处理的6-0 VICRYL可吸收线的物理刺激作用使胆总管壁逐渐发生变性、坏死及增生, 引发胆总管组织慢性进行性纤维瘢痕狭窄再次造成慢性梗阻性黄疸. 急性慢性大鼠梗阻性黄疸各时段的表现均有明显不同, 各时段总胆红素、胆总管直径的比较差异有统计学意义($P < 0.05$). 因此, 我们认为本慢性大鼠梗阻性黄疸模型能更好地模仿临床常见的慢性梗阻性黄疸的病理过程, 是一种比较理想的动物模型。

本实验显示急性大鼠梗阻性黄疸模型在术后胆总管直径最大扩张达正常值近20倍, 大鼠仍能生存, 术后3 wk大鼠才出现呕血、便血、腹水及切口疝等并发症提示我们对于急性梗阻性黄疸达患者的手术时机选择, 特别对于心肺功能不良等基本情况差, 合并梗阻性黄疸的患者是否可以考虑在情况改善后再考虑手术解除梗阻提供一种参考. 慢性大鼠梗阻性黄疸的黄疸发

展趋势和既往文献[12,13]有所不同, 究其原因可能与实验方法不同有关, 我们通过运用碘仿处理的6-0 VICRYL可吸收线对胆总管黏膜的物理刺激不同于既往文献报道的对胆总管浆膜层的影响^[12-15], 更符合临床慢性梗阻性黄疸的发病机制. 在本组慢性大鼠梗阻性黄疸模型中, 黄疸的发展趋势渐进性不是很明显而呈现波动性, 甚至完全缓解的特点(TB: $42.43 \mu\text{L} \pm 23.56 \mu\text{L}$ 、 $24.87 \mu\text{L} \pm 6.78 \mu\text{L}$ 、 $48.53 \mu\text{L} \pm 37.78 \mu\text{L}$ 、 $36.52 \mu\text{L} \pm 16.28 \mu\text{L}$ 、 $32.15 \mu\text{L} \pm 13.20 \mu\text{L}$), 我们分析可能与6-0 VICRYL可吸收线的部分吸收缓解了胆总管的梗阻及胆总管炎症的消退相关, 如果用非吸收多股线来处理胆总管的梗阻可能到达更好的效果。

总之, 实验观察慢性大鼠梗阻性模型黄疸症状及肝功能变化表现与以往胆总管结扎断离所致的急性梗阻性黄疸明显不同, 呈现慢性、波动性发展的特征表现, 更加接近于多数临床梗阻性黄疸病例表现, 故其是研究梗阻性黄疸病理改变及治疗的一种理想实验模型。

4 参考文献

- Faropoulos K, Chroni E, Assimakopoulos SF, Mavrikakis A, Stamatiopoulou V, Touppekis C, Drainas D, Grintzalis K, Papapostolou I, Georgiou CD, Konstantinou D. Altered occludin expression in brain capillaries induced by obstructive jaundice in rats. *Brain Res* 2010; 1325: 121-127
- Grintzalis K, Papapostolou I, Assimakopoulos SF, Mavrikakis A, Faropoulos K, Karageorgos N, Georgiou C, Chroni E, Konstantinou D. Time-related alterations of superoxide radical levels in diverse organs of bile duct-ligated rats. *Free Radic Res* 2009; 43: 803-808
- 巩鹏, 许海波, 张嘉宁, 王忠裕. PPARs、NF- κ B及SOD在梗阻性黄疸大鼠肝脏损害中的作用. *中华普通外科杂志* 2010; 25: 506-507
- 毛盛名, 张百萌, 关晓东, 李坚, 潘海燕, 贾英斌. 热应激预处理对梗阻性黄疸大鼠T细胞亚群的影响. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 3035-3037
- Aydin S, Aytac E, Uzun H, Altug T, Mansur B, Saygili S, Buyukpinarbasili N, Sariyar M. Effects of *Ganoderma lucidum* on obstructive jaundice-induced oxidative stress. *Asian J Surg* 2010; 33: 173-180
- Assimakopoulos SF, Mavrikakis AG, Grintzalis K, Papapostolou I, Zervoudakis G, Konstantinou D, Chroni E, Vagianos CE, Georgiou C. Superoxide radical formation in diverse organs of rats with experimentally induced obstructive jaundice. *Redox Rep* 2008; 13: 179-184
- 黄洁夫, 陈孝平, 董家鸿, 赵玉沛. 肝胆胰外科学. 第4版. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 530
- 陈文斌, 黄志强, 陈永亮, 卢灿荣, 高丽杰. 小型猪渐进性梗阻性黄疸模型的建立. *中华实验外科杂志* 2007; 24: 879-880
- Bostanci EB, Yol S, Teke Z, Kayaalp C, Sakaogullari Z, Ozel Turkcu U, Bilgihan A, Akoglu M. Effects of car-

- bon dioxide pneumoperitoneum on hepatic function in obstructive jaundice: an experimental study in a rat model. *Langenbecks Arch Surg* 2010; 395: 667-676
- 10 陆培华, 时开网, 刘子君, 杨坤兴. 蛙皮素对梗阻性黄疸大鼠的肝脏保护性实验研究. *中华肝胆外科杂志* 2007; 13: 332-334
- 11 Assimakopoulos SF, Vagianos CE. Bile duct ligation in rats: a reliable model of hepatorenal syndrome? *World J Gastroenterol* 2009; 15: 121-123
- 12 夏荣龙, 刘青光, 姚英民, 张梅. 慢性渐进性梗阻性黄疸模型建立及评价. *西安医科大学学报* 2001; 22: 349-350
- 13 王天然, 周伟, 黄海, 胡小丽, 李继红, 曹祥元. 可逆型梗阻性黄疸动物模型探讨. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 1454-1456
- 14 Kirkland JG, Godfrey CB, Garrett R, Kakar S, Yeh BM, Corvera CU. Reversible surgical model of biliary inflammation and obstructive jaundice in mice. *J Surg Res* 2010; 164: 221-227
- 15 Oruç MT, Özmen MM, Han U. A new technique for inducing and releasing obstructive jaundice in rats. *Eur Surg Res* 2009; 43: 354-359

■同行评价

本文内容较新颖, 为急性梗阻性黄疸模型的建立奠定实验基础。

编辑 李薇 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011年版权归世界华人消化杂志

● 消息 ●

《世界华人消化杂志》正文要求

本刊讯 本刊正文标题层次为 0 引言; 1 材料和方法, 1.1 材料, 1.2 方法; 2 结果; 3 讨论; 4 参考文献。序号一律左顶格写, 后空 1 格写标题; 2 级标题后空 1 格接正文。以下逐条陈述: (1) 引言 应包括该研究的目的和该研究与其他相关研究的关系。(2) 材料和方法 应尽量简短, 但应让其他有经验的研究者能够重复该实验。对新的方法应该详细描述, 以前发表过的方法引用参考文献即可, 有关文献中或试剂手册中的方法的改进仅描述改进之处即可。(3) 结果 实验结果应合理采用图表和文字表示, 在结果中应避免讨论。(4) 讨论 要简明, 应集中对所得的结果做出解释而不是重复叙述, 也不应是大量文献的回顾。图表的数量要精选。表应有表序和表题, 并有足够具有自明性的信息, 使读者不查阅正文即可理解该表的内容。表内每一栏均应有表头, 表内非公知通用缩写应在表注中说明, 表格一律使用三线表(不用竖线), 在正文中该出现的地方应注出。图应有图序、图题和图注, 以使其容易被读者理解, 所有的图应在正文中该出现的地方注出。同一个主题内容的彩色图、黑白图、线条图, 统一用一个注解分别叙述。如: 图 1 萎缩性胃炎治疗前后病理变化。A: …; B: …; C: …; D: …; E: …; F: …; G: …。曲线图可按●、○、■、□、▲、△顺序使用标准的符号。统计学显著性用: ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ ($P > 0.05$ 不注)。如同一表中另有一套 P 值, 则 ¹ $P < 0.05$, ² $P < 0.01$; 第 3 套为 ³ $P < 0.05$, ⁴ $P < 0.01$ 。 P 值后注明何种检验及其具体数字, 如 $P < 0.01$, $t = 4.56$ vs 对照组等, 注在表的左下方。表内采用阿拉伯数字, 共同的计量单位符号应注在表的右上方, 表内个数、小数点、±、- 应上下对齐。“空白”表示无此项或未测, “-”代表阴性未发现, 不能用同左、同上等。表图勿与正文内容重复。表图的标目尽量用 t/min , $c/(\text{mol/L})$, p/kPa , V/mL , $t/^\circ\text{C}$ 表达。黑白图请附黑白照片, 并拷入光盘内; 彩色图请提供冲洗的彩色照片, 请不要提供计算机打印的照片。彩色图片大小 $7.5\text{ cm} \times 4.5\text{ cm}$, 必须使用双面胶条粘贴在正文内, 不能使用浆糊粘贴。(5) 致谢 后加冒号, 排在讨论后及参考文献前, 左齐。

复方青黛颗粒对溃疡性结肠炎大鼠NF- κ B P65、TNF- α 表达的影响

杜立阳, 陈铭诗, 刘清芳, 程晓磊, 李鲜明

■背景资料

复方青黛颗粒是中国医科大学附属第一医院中医科用于治疗溃疡性结肠炎(UC)的协定处方, 经30多年临床应用疗效显著。

杜立阳, 陈铭诗, 刘清芳, 程晓磊, 李鲜明, 中国医科大学附属第一医院中医科 辽宁省沈阳市 110001

辽宁省自然科学基金资助项目, No. 20092130

作者贡献分布: 此课题由杜立阳指导; 由陈铭诗设计; 整体动物实验部分由陈铭诗、刘清芳、程晓磊及李鲜明共同操作完成; 数据检测及分析部分由陈铭诗完成; 论文撰写由陈铭诗完成。

通讯作者: 杜立阳, 副教授, 110001, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学附属第一医院中医科. cmzyk@163.com

电话: 024-83282537

收稿日期: 2011-01-07 修回日期: 2011-03-01

接受日期: 2011-03-08 在线出版日期: 2011-04-28

Treatment with Compound Indigo Granules down-regulates NF- κ B P65 and TNF- α expression in ulcerative colitis in rats

Li-Yang Du, Ming-Shi Chen, Qing-Fang Liu, Xiao-Lei Cheng, Xian-Ming Li

Li-Yang Du, Ming-Shi Chen, Qing-Fang Liu, Xiao-Lei Cheng, Xian-Ming Li, Department of Traditional Chinese Medicine, the First Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Supported by: the National Natural Science Foundation of Liaoning Province, No. 20092130

Correspondence to: Associate Professor Li-Yang Du, Department of Traditional Chinese Medicine, the First Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. cmzyk@163.com

Received: 2011-01-07 Revised: 2011-03-01

Accepted: 2011-03-08 Published online: 2011-04-28

Abstract

AIM: To determine the mechanism underlying the therapeutic effects of Compound Indigo Granules (CIG) against ulcerative colitis by investigating the effect of treatment with CIG on the expression of nuclear factor- κ B P65 (NF- κ B P65) and tumor necrosis factor (TNF)- α in the colon of rats with experimental ulcerative colitis.

METHODS: Ulcerative colitis was induced in rats with trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS). Rats were divided into control group, model group, salazosulfapyridine (SASP) group, low-, medium-, and high-dose CIG groups. Except the control group, the other groups were intragastrically

given normal saline, SASP, and different doses of CIG from day 3 after model induction for 10 days, respectively. On day 14, all rats were killed to take colon and serum samples for measuring colonic NF- κ B P65 expression by immunohistochemistry and serum TNF- α levels by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

RESULTS: The levels of NF- κ B P65 protein expression in the colon and serum TNF- α were significantly higher in the model group than in the control group (0.138 ± 0.003 vs 0.276 ± 0.0081 ; 18.990 ± 3.964 vs 67.657 ± 3.580 , both $P < 0.05$) but were significantly lower in the high-dose CIG group than in the model group (0.217 ± 0.007 vs 0.276 ± 0.008 ; 27.783 ± 2.867 vs 67.657 ± 3.580 , both $P < 0.05$).

CONCLUSION: Treatment with CIG significantly decreased the levels of NF- κ B P65 protein expression in the colon and serum TNF- α in rats with ulcerative colitis. CIG exerts therapeutic effects against ulcerative colitis possibly via mechanisms associated with the NF- κ B signaling pathway and down-regulation of TNF- α .

Key Words: Compound Indigo Granules; Ulcerative colitis; NF- κ B P65; Tumor necrosis factor- α

Du LY, Chen MS, Liu QF, Cheng XL, Li XM. Treatment with Compound Indigo Granules down-regulates NF- κ B P65 and TNF- α expression in ulcerative colitis in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(12): 1290-1294

摘要

目的: 探讨复方青黛颗粒治疗溃疡性结肠炎(UC)大鼠的相关机制。

方法: 用三硝基苯磺酸(TNBS)法制备大鼠UC模型, 分为空白对照组、模型对照组、柳氮磺吡啶(SASP)组、复方青黛颗粒低、中、高剂量组。造模后第3天开始灌胃给药, 共给药10 d, 实验第14天, 处死大鼠。取大鼠结肠组织及血清, 用免疫组织化学SP法检测NF- κ B P65蛋白表达, ELISA测定血清中肿瘤坏死因子

■同行评议者

李晓波, 教授, 上海交通大学药学院

α (TNF- α)的含量。

结果: 空白对照组与模型对照组比较, 结肠组织中NF- κ B P65蛋白表达及血清中TNF- α 表达明显增高(0.276 ± 0.0081 vs 0.138 ± 0.003 ; 67.657 ± 3.580 vs 18.990 ± 3.964 , 均 $P < 0.05$), 复方青黛颗粒高剂量组与模型对照组相比, 结肠组织中NF- κ B P65蛋白表达及血清中TNF- α 表达显著降低(0.217 ± 0.007 vs 0.276 ± 0.008 ; 27.783 ± 2.867 vs 67.657 ± 3.580 , 均 $P < 0.05$)。

结论: 复方青黛颗粒对TNBS诱导的UC大鼠的治疗作用可能与通过NF- κ B信号传导通路, 调节TNF- α 含量有关。

关键词: 复方青黛颗粒; 溃疡性结肠炎模型大鼠; NF- κ B P65; 肿瘤坏死因子 α

杜立阳, 陈铭诗, 刘清芳, 程晓磊, 李鲜明. 复方青黛颗粒对溃疡性结肠炎大鼠NF- κ B P65、TNF- α 表达的影响. 世界华人消化杂志 2011; 19(12): 1290-1294
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/1290.asp>

0 引言

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)的病因及发病机制目前尚不清楚, 免疫系统异常是造成炎症和组织损伤的内在因素, 并与遗传、环境、微生物等因素密切相关。UC的治疗目前仍以氨基水杨酸类和糖皮质激素为主。复方青黛颗粒是中国医科大学附属第一医院中医科用于治疗UC的协定处方, 经30多年临床应用疗效显著。研究表明促炎症反应细胞因子及其他炎症介质包括TNF- α 和细胞间黏附分子1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)在炎症反应过程中起重要作用, 他们在肠黏膜中含量增加是UC发病的重要因素, 同时NF- κ B信号传导通路激活是慢性炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)的发病机制之一^[1]。在UC模型大鼠肠组织中NF- κ B表达水平与TNF- α 、ICAM-1阳性表达呈正相关^[2]。本实验通过复方青黛颗粒治疗TNBS诱导的UC大鼠模型, 检测结肠组织NF- κ B P65蛋白的表达、血清中TNF- α 含量, 进一步探讨复方青黛颗粒治疗UC的作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料 酶标定量测定仪、连续加样枪(日本Nichiryo公司)。复方青黛颗粒(NIGC, 中国医科大学), 柳氮磺吡啶(SASP, 批号040106, 上海三维制药有限公司), TNBS(批号: P2297, 美国Sigma

公司), 大鼠TNF- α ELISA试剂盒(96T, 批号: 300333, 美国ADL公司), NF- κ B P65鼠多克隆抗体(Santa Cruz公司); SP试剂盒、DAB显色试剂盒: 均购自北京中杉生物公司。

1.2 方法

1.2.1 TNBS法制备UC大鼠模型: TNBS法大鼠UC模型的制备方法参考文献[3-5]。SD大鼠, δ , 体质量 $250 \text{ g} \pm 20 \text{ g}$, 52只, 随机分为6组, 空白对照组, 模型对照组, 柳氮磺吡啶(0.5 g/kg , SASP组), 复方青黛颗粒低(0.6 g/kg)、中(0.9 g/kg)、高(1.2 g/kg)剂量组。灌胃药物剂量均按照大鼠与人之间药物剂量换算公式计算。各组动物于造模前禁食24 h, 以 0.9 g/kg 乌拉坦腹腔注射麻醉, 固定于平板上, 平板下部垫高使动物尾部与头部呈40度。将体积分数为5%的TNBS水溶液与500 mL/L乙醇以体积比1:1混匀。取一外径2.0 mm、长约12 cm的硅胶输液管(用石蜡油润滑), 插入大鼠肛门8 cm, 按剂量100 mg/kg缓慢灌注TNBS乙醇溶液, 1 min灌注完, 2 min后松开固定, 取其俯卧位自然苏醒。造模结束后第2天随机处死大鼠4只, 剖腹摘取直肠和结肠, 清洗后肉眼观察结肠充血水肿情况, 并取8 cm肠段(甲醛固定)做病理检查及组织切片确定造模成功。造模后第3天开始各组动物灌胃给药, 连续给药10 d。空白对照组和模型对照组动物按10 mL/kg体质量胃内给予蒸馏水, 每日记录动物体质量、体征及粪便状况。

1.2.2 标本处理: 连续给药10 d后处死大鼠, 立即沿腹中线剪开腹腔, 腹主动脉取血, 2 500 r/min离心10 min分离血清, 置于 -80°C 冰箱保存以备检测血清TNF- α 含量。分离结肠, 沿肠系膜剪开肠腔取病变结肠, 冷生理盐水冲洗干净, 肉眼进行大体形态观察, 拍摄大病理数码相片。取病变结肠组织 $1.0 \text{ cm} \times 1.0 \text{ cm}$ 放入EP管中, 置于 -80°C 冰箱保存备用。剩余部分用4%甲醛溶液固定, 石蜡包埋, $3 \mu\text{m}$ 连续切片, HE染色, 镜下评价炎症和溃疡情况。

1.2.3 血清TNF- α 含量测定: 根据TNF- α ELISA试剂盒方法检测血清样本, 后用酶标仪测定450 nm处吸光度值, 作标准曲线, 回归计算血清中TNF- α 含量。

1.2.4 NF- κ B P65蛋白表达测定: 根据免疫组织化学(SP)法, 对NF- κ B P65进行蛋白表达测定。DAB显色后, 以细胞质出现棕黄色颗粒为阳性。利用Image-pro plus 4.5显微图像分析系统对染色阳性物质进行吸光度测定。以高倍镜($\times 400$)在每

■ 相关报道

有研究显示, 作为可诱发的转录调节因子, NF- κ B结合位点可接受免疫刺激, 如TNF- α 、IL-1、LPS或T淋巴细胞激活。

■创新盘点

本文通过研究TNBS诱导的溃疡性结肠炎大鼠结肠组织NF- κ B P65及血清TNF- α 表达,来阐明复方青黛颗粒治疗溃疡性结肠炎的作用机制,并进行药物治疗疗效比较。

张切片上随机选取5个视野,测定阳性部位总吸光度值和总面积值,计算二者比值即阳性表达部位的平均光密度值,该值越大,表明蛋白含量越高。

统计学处理 采用SPSS13.0随机单位组设计资料的方差分析S-N-K统计方法分析数据,用 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示。

2 结果

2.1 对UC模型大鼠血清中TNF- α 含量的影响 空白对照组、模型对照组、SASP组、复方青黛颗粒低、中、高剂量组大鼠血清中TNF- α 含量分别为: 18.990 ± 3.964 、 67.657 ± 3.580 、 23.454 ± 3.500 、 42.053 ± 3.413 、 34.846 ± 4.091 、 27.783 ± 2.867 。模型对照组大鼠血清TNF- α 的含量与正常对照组比较显著升高($P < 0.05$)。经过复方青黛颗粒治疗后,高剂量组TNF- α 的含量显著低于模型对照组,具有统计学差异($P < 0.05$)。

2.2 对UC模型大鼠结肠组织中NF- κ B P65蛋白表达的影响 NF- κ B P65各组肠组织黏膜层可见中性粒细胞、淋巴细胞、浆细胞及嗜酸性粒细胞浸润,细胞质出现棕黄色颗粒为阳性(图1)。空白对照组、模型对照组、SASP组、复方青黛颗粒低、中、高剂量组大鼠结肠组织NF- κ B P65蛋白定量分析分别为: 0.138 ± 0.003 、 0.276 ± 0.008 、 0.223 ± 0.005 、 0.269 ± 0.008 、 0.251 ± 0.008 、 0.217 ± 0.007 。模型对照组大鼠结肠组织NF- κ B P65蛋白表达与正常对照组比较显著升高($P < 0.05$)。经复方青黛颗粒治疗后,高剂量组大鼠结肠组织NF- κ B P65蛋白表达减少,与模型对照组相比较具有统计学差异($P < 0.05$)。

3 讨论

UC属祖国医学“泄泻”、“久痢”、“休息痢”、“肠癖”、“肠风”等范畴。现代医学认为: UC是一种主要分布于结肠和直肠黏膜或黏膜下层的、边界不清楚的炎性反应,属于IBD的一种。临床表现为腹泻、黏液脓血便、腹痛。病情轻重不等,多呈反复发作的慢性病程。可伴有多种肠外表现,包括外周性关节炎、结节性红斑、坏疽性脓皮病、巩膜外层炎等。本病可发生在任何年龄,多见于20-40岁,亦可见于儿童或老年。

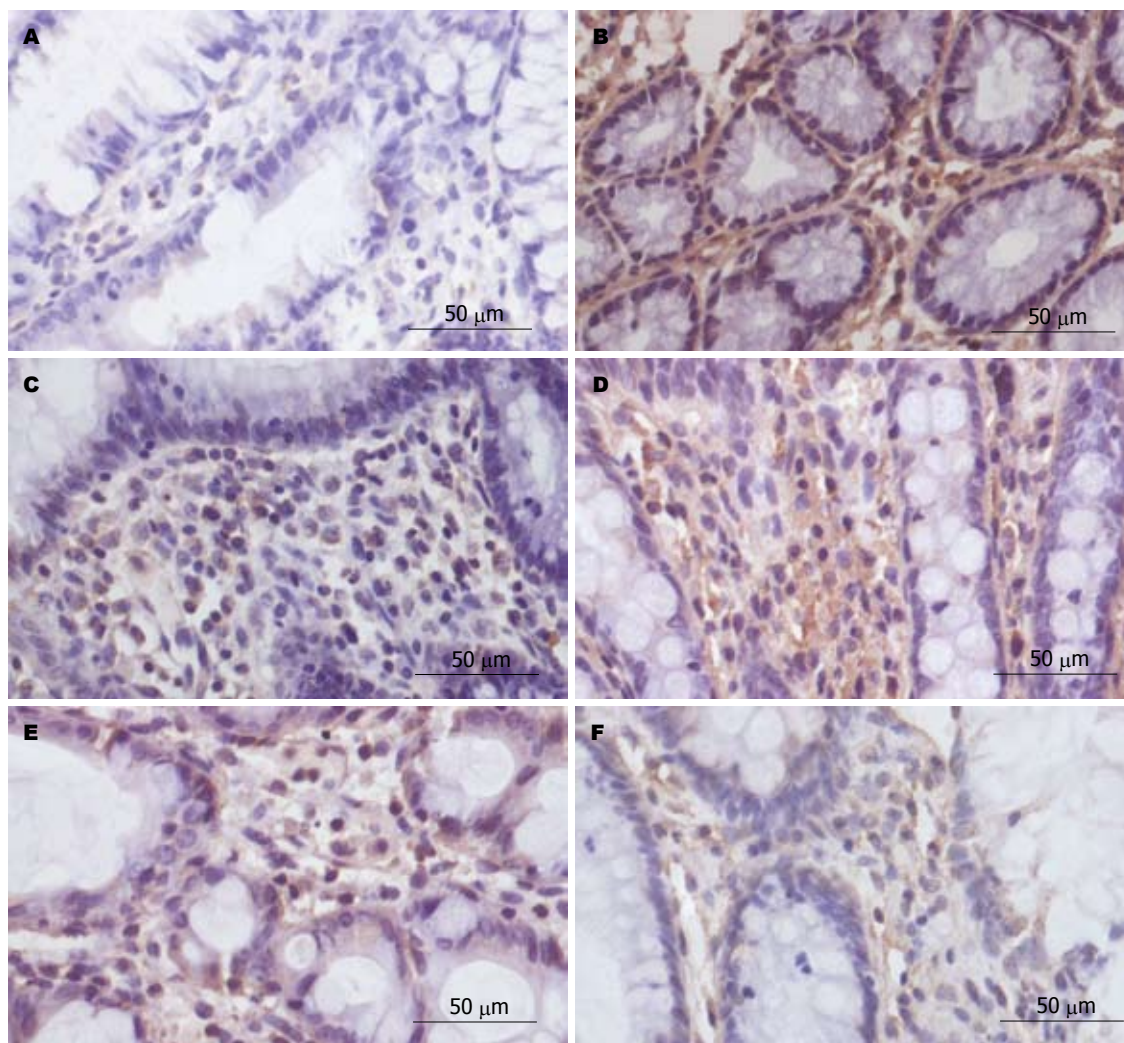
复方青黛颗粒由青黛、黄柏、儿茶、枯矾、珍珠等组成。组方中所含有效化学成分具有加强机体吞噬细胞的吞噬能力,抗病原微生物,

抑制肠黏膜分泌,抑制肠蠕动,促进盲肠逆蠕动,能和蛋白化合合成难溶于水的蛋白化合物而形成沉淀,用于局部出血,促进创口愈合和抑制实验性溃疡的作用^[6]。前期研究结果表明,复方青黛颗粒能显著减轻异种异体结肠致敏所致大鼠实验性UC模型的症状^[7],减少结肠组织中自由基的形成^[8],并有镇痛抗炎^[9],抑制肠蠕动的作用^[10],能下调CD54的过度表达和调节IL-1 β 、IL-4、MUC2、iNOS水平^[11]。

TNF- α 主要由活化的单核巨噬细胞所产生,是一种具有广泛生物活性的细胞因子,可使白细胞在炎症局部聚集,刺激单核细胞、血管内皮细胞等产生细胞因子,并诱导细胞因子合成及发生级联反应,最终导致组织的损伤,在UC中被公认为是一种促炎细胞因子。在UC活动期,TNF- α 的水平在血浆及粪便中升高,在肠道中能介导肠黏膜损伤作用^[12]。本实验中UC大鼠血清中存在TNF- α 水平异常增高,增高的TNF- α 与炎症细胞相互作用,加重局部肠黏膜的炎症损伤。经过复方青黛颗粒治疗,抑制TNF- α 的活化,减少TNF- α 与炎症细胞相互作用,减轻局部肠黏膜的炎症损伤,从而促进肠黏膜修复与溃疡愈合。

NF- κ B广泛存在于各种组织中,正常情况下存在于细胞质内,是一种具有多向转录调节作用的蛋白质,参与许多炎症性疾病的发病机制。哺乳动物的NF- κ B家族包括5种成员: NF- κ B1(P105/P50)、NF- κ B2(P100/P52、P65RelA)、C-rel和RelB。研究显示: NF- κ B可上调肠黏膜中致炎细胞因子IL-1、TNF- α 的表达,加重肠黏膜的炎症,引起上皮细胞的凋亡,且NF- κ B活化后可以增强TNF- α 和IL-1 β 的基因转录,使TNF- α 和IL-1 β 产生和释放增多^[13,14]。在鼠UC实验中发现,肠黏膜组织中活化的NF- κ B及促炎因子TNF- α 表达上调,而NF- κ B抑制物水平下降。肠道炎性细胞核提取物中NF- κ B P65水平明显升高^[15]。实验数据分析表明: UC模型大鼠结肠组织NF- κ B P65的含量明显高于空白对照组大鼠的含量,并且UC模型大鼠经复方青黛颗粒治疗后,大鼠结肠组织NF- κ B P65的含量显著降低,由此可以得出复方青黛颗粒治疗UC可能通过NF- κ B信号传导通路。

TNBS是一种半抗原物质,与大分子组织蛋白结合后成为一种抗原物质,引起机体免疫反应,诱导肠炎发生。该方法成熟,易操作,是较理想的造模途径^[16]。本实验通过TNBS制备UC大鼠模型,经过复方青黛颗粒治疗, NF- κ B P65及



■应用要点

复方青黛颗粒在治疗UC中,可能与通过NF- κ B信号传导通路,抑制TNF- α 的活化,减少TNF- α 与炎症细胞相互作用有关。

图1 各组大鼠结肠组织NF- κ B P65表达(SP \times 400). A: 空白对照组; B: 模型对照组; C: SASP组; D: 青黛颗粒低剂量组; E: 青黛颗粒中剂量组; F: 青黛颗粒高剂量组。

TNF- α 的表达明显减少. 从而可以得出复方青黛颗粒在治疗UC中可能通过NF- κ B信号传导通路,抑制TNF- α 的活化,减少TNF- α 与炎症细胞相互作用,降低各种炎症细胞的渗出及炎症细胞因子的含量,减轻局部肠黏膜的炎症损伤,从而促进肠黏膜修复与溃疡愈合。

4 参考文献

- 1 Li JH, Yu JP, Yu HG, Xu XM, Yu LL, Liu SQ. Expression and significance of nuclear factor kappaB p65 in colon tissues of rats with TNBS-induced colitis. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 1759-1763
- 2 李军华, 于皆平, 何小飞, 徐细明. 核因子- κ B在大鼠实验性溃疡性结肠炎肠组织的表达及其意义. *世界华人消化杂志* 2003; 11: 214-218
- 3 Morris GP, Beck PL, Herridge MS, Depew WT, Szewczuk MR, Wallace JL. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology* 1989; 96: 795-803
- 4 Shorter RG, Huizenga KA, Spencer RJ. A working hypothesis for the etiology and pathogenesis of nonspecific inflammatory bowel disease. *Am J Dig Dis* 1972; 17: 1024-1032
- 5 te Velde AA, Verstege MI, Hommes DW. Critical appraisal of the current practice in murine TNBS-induced colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2006; 12: 995-999
- 6 颜正华. 临床实用中医学. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 1984: 153-154
- 7 杜立阳, 宗士群, 刘悦, 李东安, 赵金明, 张艳玲. 复方青黛颗粒对大鼠溃疡性结肠炎模型的影响. *中国中西医结合消化杂志* 2002; 10: 135-137
- 8 杜立阳, 邹莉波, 宗士群, 刘悦. 青黛颗粒抗氧化作用的实验研究. *中国中西医结合杂志* 2003; 11: 144-145
- 9 杜立阳, 刘悦, 宗士群, 李东安, 赵金明, 张艳玲. 青黛颗粒抗炎、镇痛作用的实验研究. *中国医科大学学报* 2003; 32: 456-457
- 10 杜立阳, 宗士群, 刘悦, 刘艳, 李东安, 赵金明, 张艳玲. 青黛颗粒对小鼠小肠推进运动的影响. *中国中西医结合消化杂志* 2004; 12: 337-38
- 11 杜立阳, 刘清芳, 程晓磊, 陈铭诗, 李鲜明, 仇靖. 青黛颗粒对溃疡性结肠炎大鼠结肠黏膜MUC2和iNOS基因表达的影响. *世界华人消化杂志* 2010; 18: 937-941
- 12 林平, 伍杨, 黄华, 梅林. 细胞因子与溃疡性结肠炎. *湖北民族学院学报(医学版)* 2003; 20: 28-33
- 13 Woodford-Richens K, Bevan S, Churchman M, Dowling B, Jones D, Norbury CG, Hodgson SV, Desai D, Neale K, Phillips RK, Young J, Leggett B, Dunlop M, Rozen P, Eng C, Markie D, Rodriguez-

■同行评价

本文具有一定的理论价值和科学意义,对于阐明UC发病机制和复方青黛颗粒的作用机制具有一定贡献。

- Bigas MA, Sheridan E, Iwama T, Eccles D, Smith GT, Kim JC, Kim KM, Sampson JR, Evans G, Tejpar S, Bodmer WF, Tomlinson IP, Houlston RS. Analysis of genetic and phenotypic heterogeneity in juvenile polyposis. *Gut* 2000; 46: 656-660
- 14 黄晓丽, 谢冬梅, 甘华田. 肿瘤坏死因子 α 在溃疡性结肠炎中的作用. 华西医学 2006; 21: 399-400
- 15 Howe JR, Shellnut J, Wagner B, Ringold JC, Sayed MG, Ahmed AF, Lynch PM, Amos CI, Sistonen P, Aaltonen LA. Common deletion of SMAD4 in juvenile polyposis is a mutational hotspot. *Am J Hum Genet* 2002; 70: 1357-1362
- 16 姚惠芬, 陈务华, 周毅. 溃疡性结肠炎动物模型研究概况. 天津药学 2006; 18: 72-74

编辑 曹丽鸥 电编 李薇

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》外文字符标准

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

Sox2和Cdx2在胃黏膜肠化生中的表达及意义

牛海静, 陈鑫, 王邦茂

牛海静, 内蒙古医学院附属医院消化科 内蒙古自治区呼和浩特市 010050

陈鑫, 王邦茂, 天津医科大学总医院消化科 天津市 300052
作者贡献分布: 此课题由牛海静、陈鑫及王邦茂设计; 研究过程由牛海静与陈鑫完成; 研究场所及所用实验试剂由王邦茂提供; 数据分析及本论文写作由牛海静完成。

通讯作者: 王邦茂, 300052, 天津市, 天津医科大学总医院消化科. gi.tmuh@sohu.com

收稿日期: 2010-12-18 修回日期: 2011-04-11

接受日期: 2011-04-21 在线出版日期: 2011-04-28

Significance of expression of Sox2 and Cdx2 in gastric intestinal metaplasia

Hai-Jing Niu, Xin Chen, Bang-Mao Wang

Hai-Jing Niu, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical College, Huhhot 010050, Inner Mongolian Autonomous Region, China
Xin Chen, Bang-Mao Wang, Department of Gastroenterology, Tianjin Medical University General Hospital, Tianjin 300052, China

Correspondence to: Bang-Mao Wang, Department of Gastroenterology, Tianjin Medical University General Hospital, Tianjin 300052, China. gi.tmuh@sohu.com

Received: 2010-12-18 Revised: 2011-04-11

Accepted: 2011-04-21 Published online: 2011-04-28

Abstract

AIM: To investigate the significance of expression of sex determining region Y-box 2 (Sox2) and caudal type homeobox transcription factor 2 (Cdx2) in gastric intestinal metaplasia (IM).

METHODS: The expression of SOX2 and CDX2 proteins in 80 paraffin-embedded specimens of gastritis and mild/moderate/severe IM was detected by immunohistochemistry. The mRNA levels of Sox2 and Cdx2 in 40 endoscopic biopsy specimens of gastritis and mild/moderate/severe IM were quantified by real-time Q-PCR.

RESULTS: Both SOX2 and CDX2 proteins were located in the nuclei of normal gastric and normal intestinal epithelial cells. The positive rates of SOX2 and CDX2 protein expression in gastritis and mild/moderate/severe IM were 94.4% and 5.6%, 75.0% and 50.0%, 23.5% and 85.7%, and 9.5% and 90.5%, respectively (all $P < 0.05$). The relative expression levels of Sox2 and Cdx2

mRNAs in gastritis and mild/moderate/severe IM were 0.5778 ± 0.0778 and 0.0517 ± 0.0218 , 0.1496 ± 0.0384 and 0.1402 ± 0.0300 , and 0.1131 ± 0.0384 and 0.3453 ± 0.0537 , respectively (all $P < 0.05$). The levels of Sox2 transcripts decreased but those of Cdx2 transcripts increased with the progression of IM. There is an inverse correlation between the expression levels of Sox2 and Cdx2 ($r < 0$).

CONCLUSION: Down-regulation of Sox2 and ectopic expression of Cdx2 were found in the progression of gastric IM.

Key Words: Sex determining region Y-box 2; Caudal type homeobox transcription factor 2; Gastric intestinal metaplasia

Niu HJ, Chen X, Wang BM. Significance of expression of Sox2 and Cdx2 in gastric intestinal metaplasia. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(12): 1295-1299

摘要

目的: 探讨性别决定区Y框蛋白2(Sox2)和尾型同源盒转录因子2(Cdx2)在胃黏膜肠化生中的表达及意义。

方法: 免疫组织化学检测80例病理学诊断为胃炎、轻度胃黏膜肠化生(IM)、中度IM和重度IM的石蜡包埋胃黏膜标本中Sox2和Cdx2蛋白的表达; 荧光定量PCR检测40例病理学诊断为胃炎、轻度IM和中重度IM组的胃镜活检标本中Sox2和Cdx2 mRNA表达。

结果: Sox2和Cdx2蛋白分别定位于正常胃和肠上皮细胞胞核。胃炎、轻度IM组中Sox2蛋白阳性率显著高于Cdx2(94.4% vs 5.6%; 75.0% vs 50.0%, 均 $P < 0.05$), 而中度IM组和重度IM组中Sox2蛋白阳性率显著低于Cdx2(23.5% vs 85.7%; 9.5% vs 90.5%, 均 $P < 0.05$)。胃炎组、轻度IM组Sox2 mRNA水平显著高于Cdx2(0.5778 ± 0.0778 vs 0.0517 ± 0.0218 ; 0.1496 ± 0.0384 vs 0.1402 ± 0.0300 , 均 $P < 0.05$), 中重度IM组Sox2 mRNA水平显著低于Cdx2(0.1131 ± 0.0384 vs 0.3453 ± 0.0537 , $P < 0.05$)。随着IM进展, 有Sox2 mRNA逐渐减

■背景资料

胃黏膜肠上皮化生是肠型胃癌发病机制Correa's级联反应的一个中间步骤, 一般被认为是一种癌前病变。胃黏膜IM发生的机制还没有被详细阐明。如果想要预防肿瘤从这种病变中发生, 就有必要研究控制这个过程的转录因子。

■同行评议者

刘丽江, 教授, 江汉大学医学院病理学与病理生理学教研室

■创新盘点

胃表型向肠表型的转变可能是胃黏膜IM形成的重要机制。本实验选择了2个重要的消化系上皮转录因子Cdx2和Sox2,从转录和翻译水平较为详尽地研究了二者在胃黏膜IM中的表达改变。

少,而Cdx2逐渐被上调,二者呈负相关($r<0$)。

结论: 随着IM的进展,有Sox2的表达下调和Cdx2的异位表达。

关键词: 性别决定区Y框蛋白2; 尾型同源盒转录因子2; 胃黏膜肠化生

牛海静, 陈鑫, 王邦茂. Sox2和Cdx2在胃黏膜肠化生中的表达及意义. 世界华人消化杂志 2011; 19(12): 1295-1299
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/1295.asp>

0 引言

胃黏膜肠化生(intestinal metaplasia, IM)是胃上皮细胞转分化为肠表型,伴随着肠特异性基因(如Muc2, 蔗糖酶/异麦芽糖酶和肠碳酸苷酶 I 等)的表达。胃黏膜IM被认为是肠型胃癌的一种癌前病变^[1]。随着胚胎发育学的发展,人们发现在消化道上皮发育过程中很重要的一些转录因子可能参与了胃黏膜IM的发生^[2]。尾型同源盒转录因子2(caudal type homeobox transcription factor 2, Cdx2)仅在成体肠道中表达而在胃中不表达,是肠特异性转录因子,负责调控下消化道上皮细胞的发育^[3]。性别决定区Y框蛋白2(sex determining region Y-box 2, Sox2)是含有Sry样HMG盒的进化保守的转录因子家族的一个成员,成人Sox2主要表达在正常食管和胃上皮中以维持胃和食管正常上皮表型,而在肠道中不表达^[4]。为研究Cdx2和Sox2在胃黏膜IM中的表达情况及意义,我们从蛋白和mRNA水平检测了不同程度胃黏膜IM中Cdx2和Sox2在胃黏膜IM中的表达,以探讨Cdx2和Sox2在胃黏膜IM发生中可能起到的作用。

1 材料和方法

1.1 材料 免疫组织化学所使用的胃黏膜IM标本为2007-2008年天津医科大学总医院消化内镜中心胃镜活检标本于病理科存档蜡块。所选标本临床资料较为完备,患者平均年龄58(50-65)岁,男女比例为1:1.5。其HE染色切片经一个独立病理医师镜下诊断,分为胃炎组18例、轻度IM组20例、中度IM组21例、重度IM组21例(杯状细胞所占百分比<30%为轻度IM、30%-60%为中度IM、>60%为重度IM)。荧光定量PCR所使用胃黏膜IM标本为天津医科大学总医院消化内镜中心胃镜活检新鲜标本,经同一病理医师对HE切片重新评价后分为胃炎组12例、轻度IM组16例、中重度IM组12例。所选标本患者平均年龄56岁(45-65岁),男女比例为1:1.5。主要

试剂: 鼠抗人Cdx2单克隆抗体购自北京中山生物技术有限公司,兔抗人Sox2多克隆抗体购自北京博奥森生物公司,免疫组织化学相关试剂购自北京中山生物技术有限公司。SYBR[®] Green Master Mix(日本Toyobo), M-MLV逆转录酶及TRIzol(美国Invitrogen), Taq DNA聚合酶(美国NEB), DEPC(上海生工), DNase I (美国Sigma), 氯仿、异丙醇等荧光定量PCR相关试剂均为国产分析纯产品。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学: 石蜡切片常规二甲苯脱蜡,梯度乙醇脱苯,微波修复,3% H₂O₂溶液室温孵育,分别滴加Sox2抗体(1:300)或Cdx2抗体(工作液),滴加辣根酶标记的通用型二抗,滴加DAB显色,显微镜下适时终止反应,苏木素返蓝,脱水,透明,干燥中性树脂封片。Sox2和Cdx2染色以胞核呈现棕黄色为阳性标准,着色明显高于背景或背景不着色而细胞着色为阳性细胞。每张切片随机选择5个高倍视野($\times 400$),根据阳性细胞百分数的多少进行分级,阳性细胞百分比>10%为阳性。

1.2.2 荧光定量PCR: 新鲜标本TRIzol法提取总RNA,1%甲醛变性琼脂糖凝胶电泳鉴定总RNA完整性,逆转录合成cDNA第一链,Sox2和Cdx2 mRNA的相对定量检测,其中Sox2、Cdx2和GAPDH的引物由北京奥科生物技术公司负责合成。Sox2: 5'-CCCACCTACAGCATGCTCTAC-3'; 5'-GGAGTGGGAGGAAGAGGTAAC-3', 扩增片段长度: 122 bp。Cdx2: 5'-GAACCTGTGCGAGTGGATG-3'; 5'-CGGATGGTGTATGTAGCGAC-3', 扩增片段长度: 152 bp。GAPDH: 5'-GTCTGGAGTCAACGGATTG-3'; 5'-CCATGGGTGGAATCATATTG-3', 扩增片段长度: 146 bp。实时荧光定量PCR通过实时监测PCR产物的动态累积量,得到各管样品的扩增曲线,从而测得各管样品待测序列的Ct值,待测样品目的基因相对表达量为 $2^{-\Delta Ct}$ 。

统计学处理 使用SPSS11.5统计软件进行数据处理。免疫组织化学各组之间蛋白表达阳性率比较采用 χ^2 检验和Fisher确切概率法。荧光定量PCR各组之间Sox2和Cdx2 mRNA相对表达量使用方差分析, Pearson参数相关分析检验各组Sox2和Cdx2 mRNA表达的相关性。P<0.05认为有统计意义。

2 结果

2.1 CDX2和SOX2蛋白定性和定位 CDX2蛋白

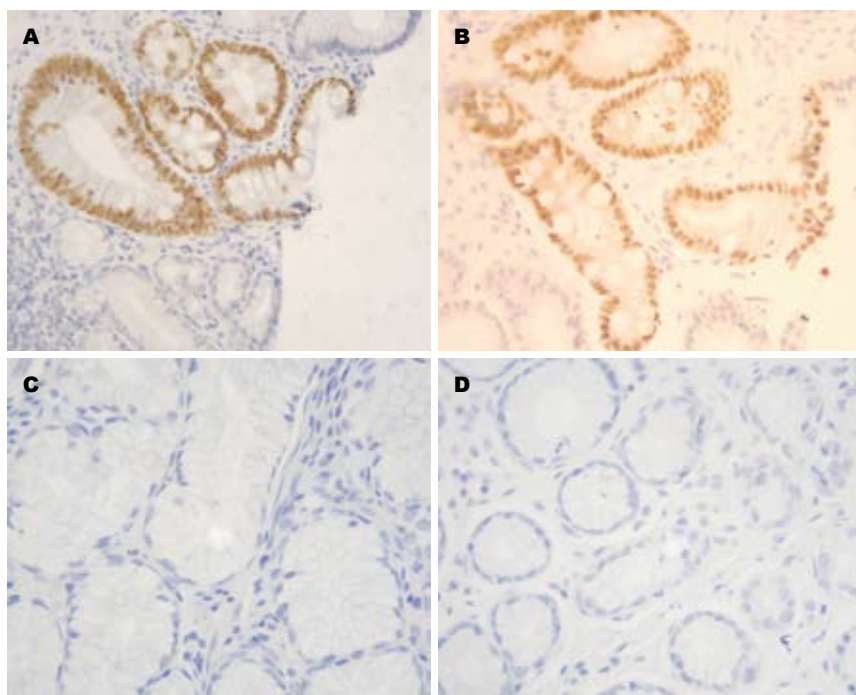


图 1 Cdx2免疫组织化学染色($\times 400$). A, B: 肠化生细胞核染成棕黄色; C, D: 正常胃上皮细胞无着色.

■应用要点

本文研究发现胃黏膜IM中胃转录因子Sox2表达下调而肠转录因子Cdx2表达上调. 如能逆转这些调节基因表达的改变, 很有可能有助于修复萎缩和化生黏膜, 这可作为未来一种新的治疗手段.

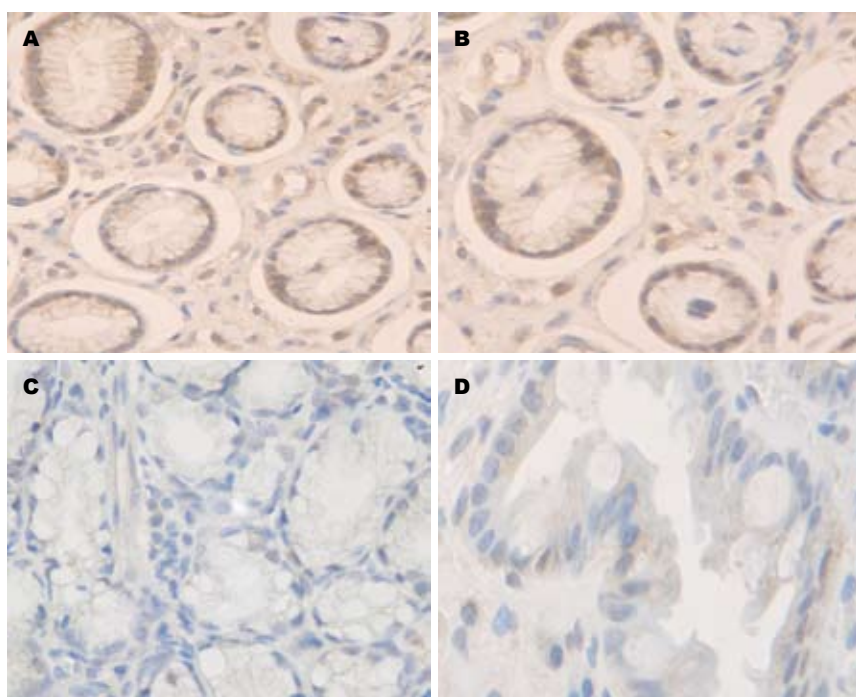


图 2 Sox2免疫组织化学染色($\times 400$). A, B: 正常胃黏膜细胞核及核周胞质染成棕黄色, 显著高于背景着色; C, D: 肠化生细胞无着色.

定位于轻、中、重度IM组杯状细胞和柱状上皮细胞的胞核, 呈棕黄色染色(图1A, B), 表达阳性率分别为50.0%、85.7%和90.5%, 正常胃上皮细胞基本无表达(图1C, D), 阳性率为5.6%, 各组之间表达有显著性差异($\chi^2 = 36.978, P < 0.001$, 表1). SOX2蛋白定位于正常胃黏膜上皮细胞核, 近核周的胞质区也有少量棕黄色着色(图2A, B), 表达阳性率为94.4%. 轻、中、重度IM中Sox2表达阳性率分别为75.0%、23.5%和9.5%, 表达逐渐减弱(图2C, D), 各组之间表达有显著性差异($\chi^2 =$

40.934, $P < 0.001$, 表2).

2.2 Sox2和Cdx2 mRNA表达水平 胃炎组Sox2 mRNA水平最高为 0.5778 ± 0.0778 , 随着IM程度加重其表达逐渐减低, 各组之间差异有显著性($P < 0.01$); Cdx2在胃炎组中有微弱表达, 随着IM程度加重表达逐渐增高, 在中重度IM组中表达最高为 0.3453 ± 0.0537 , 各组之间差异有显著性($P < 0.01$, 表3). 对各组Cdx2和Sox2 mRNA的相关性分析结果分别为胃炎组 $r = -0.799, P < 0.01$; 轻度IM组 $r = -0.825, P < 0.01$; 中重度IM组 $r = -0.714,$

■同行评价

本文科学性较好, 具有一定的研究价值和科学意义。

表 1 不同组织Cdx2的表达

分组	n	Cdx2		阳性率 (%)	χ^2 值	P值
		阴性	阳性			
胃炎	18	17	1	5.6	36.978	<0.001
轻度IM	20	10	10	50.0		
中度IM	21	3	18	85.7		
重度IM	21	2	19	90.5		

表 2 不同组织Sox2的表达

分组	n	Sox2		阳性率 (%)	χ^2 值	P值
		阴性	阳性			
胃炎	18	1	17	94.4	40.934	<0.001
轻度IM	20	5	15	75.0		
中度IM	21	17	4	23.5		
重度IM	21	19	2	9.5		

$P<0.01$; 总体 $r = -0.822$, $P<0.01$. 说明Cdx2和Sox2 mRNA在各组及总体中的表达均呈逆相关。

3 讨论

流行病学研究证实, 胃黏膜IM具有高致癌风险^[5]. 我国的一项包括3 000名患者的4-5年随访时间的队列研究中, 从IM进展为胃癌的OR值波动于17-29, 存在不典型增生个体的危险性尤其高. 日本利用胃癌风险指数评估胃癌前病变与胃癌的发生关系时得出结论, IM是肠型胃癌发生的重要条件, 从IM进展到肿瘤的相对危险性为6.4. 因此如果可以防治或逆转胃黏膜IM, 将可能降低肠型胃癌的发病率。

同源盒基因家族是消化道上皮发育相关的一些最重要的基因^[6], 脊椎动物中这些发育转录因子也许在控制IM发生中起了一定作用. 尾同源盒基因Cdx2在肠上皮发育和肠表型分化和维持中起重要作用^[7]. 为了分析胃向肠表型的转变, 人们还应该注意胃转录因子如Sox基因家族^[8]. 其家族成员的结构特点为均含有一个保守的、与HMG盒子DNA连接结构域同源的DNA序列特异的结构域^[9]. 在胚胎发育中起了关键作用的Sox基因家族, 除了能维持胚胎干细胞多能性之外, 在IM的发展中也许也发挥了重要作用。

正常情况下Cdx2仅在人类十二指肠以下的肠道中表达, 而在胃及以上的上消化道上皮细胞中不表达^[10]. 我们证明Cdx2在胃镜活检的胃炎标本中有微弱表达, 考虑原因可能有: (1)这些标本虽然还没有发生形态学可见的改变如杯

表 3 实时荧光定量PCR检测Sox2和Cdx2 mRNA表达水平 (mean \pm SD)

分组	Sox2	Cdx2
胃炎	0.5778 \pm 0.0778	0.0517 \pm 0.0218
轻度IM	0.1496 \pm 0.0384	0.1402 \pm 0.0300
中重度IM	0.1131 \pm 0.0384	0.3453 \pm 0.0537

状细胞的形成, 但已经有了肠化倾向. 而Cdx2作为转录因子应该在IM表型形成(即有杯状细胞出现)之前就表达. 另有研究表明GERD患者的食管炎性上皮中也可以检测到微弱的Cdx2表达^[11], 与我们的推测相一致; (2)这些标本可能是*H.pylori*相关性胃炎组织. 有研究表明*H.pylori*相关性胃炎中可以出现Cdx2的表达^[12]. 我们下一步应该确认是否我们实验中Cdx2阳性的标本中有*H.pylori*抗原的表达来验证这一观点. 流行病学证实*H.pylori*定位与胃黏膜IM的发生非常相关^[13]. *H.pylori*诱导的炎症后发生的组织退化过程及*H.pylori*感染相关蛋白包括SHP2磷酸酶和IL-1 β 能影响细胞内信号级联反应^[14]. 我们认为有可能*H.pylori*的某些毒力因素首先诱导了转录因子Cdx2的表达, 然后经过一段时间才会逐渐出现镜下可见的IM病灶. 我们还发现Cdx2随着IM程度加重表达逐渐增高, 可能与发生肠表型转化的细胞所占比率相关。

Sox2基因是胚胎干细胞标志物之一, 正常情况下表达在胚胎的全能干细胞和其他的早期多潜能细胞中, 是这些细胞功能维系所必需的, 如果表达缺失将在胚胎早期发生致命性的发育障碍^[15]. 我们证明Sox2在胃炎组织中强表达, 随着胃黏膜IM程度加重表达逐渐减低. 因为Sox2是胃特异性转录因子, 控制着胃表型的形成, IM形成就是肠表型替代胃表型的过程, 故随着IM程度加重会有胃表型的减少和Sox2表达的减少。

我们证明SOX2蛋白定位于正常胃上皮细胞的胞核, 而CDX2蛋白定位于IM细胞的胞核, 这可以用二者都是转录因子, 其主要的功能发挥位点应该是在细胞核内来解释. SOX2和CDX2蛋白在胃黏膜IM组织中的表达似乎呈现一定规律, 因此我们接着测定了二者mRNA水平来验证。

我们从蛋白和mRNA表达方面研究了人类胃炎和轻、中、重度IM病变中Sox2和Cdx2的表达情况. Sox2与Cdx2的表达模式呈逆相关, 除了Cdx2在转录和翻译水平的异位表达之外, Sox2的下调可能会是胃黏膜IM表型转变的另外一

个重要机制. 但仍需阐明胃黏膜IM中转录因子 Sox2和Cdx2表达改变的原因是什么; 这种表达改变是独立调节, 还是协同调节. 逆转调节基因表达的改变, 很有可能有助于修复萎缩和化生黏膜, 作为未来一种新的治疗手段.

4 参考文献

- 1 Giraud AS. Metaplasia as a premalignant pathology in the stomach. *Gastroenterology* 2007; 132: 2053-2056
- 2 Tsukamoto T, Mizoshita T, Tatematsu M. Gastric-and-intestinal mixed-type intestinal metaplasia: aberrant expression of transcription factors and stem cell intestinalization. *Gastric Cancer* 2006; 9: 156-166
- 3 Collepriest BJ, Farrant JM, Slack JM, Tosh D. The role of Cdx2 in Barrett's metaplasia. *Biochem Soc Trans* 2010; 38: 364-369
- 4 Tani Y, Akiyama Y, Fukumachi H, Yanagihara K, Yuasa Y. Transcription factor SOX2 up-regulates stomach-specific pepsinogen A gene expression. *J Cancer Res Clin Oncol* 2007; 133: 263-269
- 5 李凯, 唐志鹏, 郑丰杰, 洪原淑. 胃黏膜肠化生的逆转性问题. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 140-144
- 6 Richmond CA, Breault DT. Regulation of gene expression in the intestinal epithelium. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2010; 96: 207-229
- 7 Stringer EJ, Pritchard CA, Beck F. Cdx2 initiates histodifferentiation of the midgut endoderm. *FEBS Lett* 2008; 582: 2555-2560
- 8 Bowles J, Schepers G, Koopman P. Phylogeny of the SOX family of developmental transcription factors based on sequence and structural indicators. *Dev Biol* 2000; 227: 239-255
- 9 Gracz AD, Magness ST. Sry-box (Sox) transcription factors in gastrointestinal physiology and disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2011; 300: G503-G515
- 10 Barros R, Camilo V, Pereira B, Freund JN, David L, Almeida R. Pathophysiology of intestinal metaplasia of the stomach: emphasis on CDX2 regulation. *Biochem Soc Trans* 2010; 38: 358-363
- 11 Souza RF, Krishnan K, Spechler SJ. Acid, bile, and CDX: the ABCs of making Barrett's metaplasia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008; 295: G211-G218
- 12 Shiotani A, Iishi H, Uedo N, Ishihara R, Ishiguro S, Tatsuta M, Nakae Y, Kumamoto M, Hinoi T, Merchant JL. Helicobacter pylori-induced atrophic gastritis progressing to gastric cancer exhibits sonic hedgehog loss and aberrant CDX2 expression. *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 24 Suppl 4: 71-80
- 13 Kosunen TU, Pukkala E, Sarna S, Seppälä K, Aromaa A, Knekt P, Rautelin H. Gastric cancers in Finnish patients after cure of Helicobacter pylori infection: A cohort study. *Int J Cancer* 2011; 128: 433-439
- 14 Katoh M. Dysregulation of stem cell signaling network due to germline mutation, SNP, Helicobacter pylori infection, epigenetic change and genetic alteration in gastric cancer. *Cancer Biol Ther* 2007; 6: 832-839
- 15 Tziaferi V, Kelberman D, Dattani MT. The role of SOX2 in hypogonadotropic hypogonadism. *Sex Dev* 2008; 2: 194-199

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011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)

进展期近端胃癌淋巴结转移86例

邵永胜, 彭开勤, 张应天, 余阳, 冯燕, 朱岭, 刘文, 吴文良

■背景资料

关于进展期近端胃癌的手术方式存在两点争议。一是胃切除范围, 是行近端胃切除手术抑或全胃切除手术尚无定论; 二是关于近端胃癌手术是切脾还是保脾, 直到近年讨论仍在进行。此两点即使在美国NCCN指南中也无明确意见。

邵永胜, 彭开勤, 张应天, 余阳, 朱岭, 刘文, 吴文良, 江汉大学附属医院胃肠外科 江汉大学普通外科研究所 湖北省武汉市 430015

冯燕, 江汉大学附属医院病理科 湖北省武汉市 430015

作者贡献分布: 此课题由邵永胜、彭开勤及张应天设计; 研究过程由邵永胜、彭开勤、张应天、余阳、冯燕、朱岭、刘文及吴文良操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由冯燕与吴文良提供; 数据分析由邵永胜与吴文良完成; 本论文写作由邵永胜、彭开勤及张应天完成。

通讯作者: 邵永胜, 430015, 湖北省武汉市江岸区香港路168号, 江汉大学附属医院胃肠外科, 江汉大学普通外科研究所。

shaoyongsheng1211@medmail.com.cn

电话: 027-82440571 传真: 027-82426502

收稿日期: 2010-10-23 修回日期: 2011-04-13

接受日期: 2011-04-21 在线出版日期: 2011-04-28

Lymph node metastasis in advanced proximal gastric cancer: an analysis of 86 cases

Yong-Sheng Shao, Kai-Qin Peng, Ying-Tian Zhang, Yang Yu, Yan Feng, Ling Zhu, Wen Liu, Wen-Liang Wu

Yong-Sheng Shao, Kai-Qin Peng, Ying-Tian Zhang, Yang Yu, Ling Zhu, Wen Liu, Wen-Liang Wu, Department of Gastrointestinal Surgery, the Affiliated Hospital of Jiangnan University; Institute of General Surgery, Jiangnan University, Wuhan 430015, Hubei Province, China

Yan Feng, Department of Pathology, the Affiliated Hospital of Jiangnan University, Wuhan 430015, Hubei Province, China

Correspondence to: Yong-Sheng Shao, Department of Gastrointestinal Surgery, the Affiliated Hospital of Jiangnan University; Institute of General Surgery, Jiangnan University, 168 Xianggang Road, Jiang'an District, Wuhan 430015, Hubei Province, China. shaoyongsheng1211@medmail.com.cn

Received: 2010-10-23 Revised: 2011-04-13

Accepted: 2011-04-21 Published online: 2011-04-28

Abstract

AIM: To investigate the pattern of lymph node metastasis in advanced proximal gastric cancer to guide the extent of stomach resection (proximal or total gastrectomy) and to evaluate the necessity of splenectomy.

METHODS: The clinicopathological data for 86 patients with advanced proximal gastric cancer who underwent radical gastrectomy at our hospital from January 1989 to September 2010 were retrospectively analyzed. The number and size of detected lymph nodes were recorded. The

total and average number of detected lymph nodes, total rate of lymph node metastasis, and metastasis rates of Nos. 1-16 lymph nodes were calculated.

RESULTS: A total of 4 756 (30-157) lymph nodes were detected in the surgical specimens from 86 patients with advanced proximal gastric cancer, and the average number of detected lymph nodes was 55.30 ± 20.23 . Of 4 756 detected lymph nodes, 3 859 (81.14%) had a size of ≤ 5 mm. Seventy of 86 cases had lymph node metastasis, and the total rate of lymph node metastasis was 81.40%. Of 912 metastatic lymph nodes, 556 (60.96%) had a size of ≤ 5 mm. The metastasis rates of Nos. 1-4 and 7-9 lymph nodes (39.53%-80.23%) were higher than those of Nos. 12-15 (0.00%-2.33%). The metastasis rates of Nos 5, 6, 10, 11 and 16 lymph nodes were 22.09%, 15.12%, 33.72%, 18.60% and 15.12%, respectively.

CONCLUSION: Analysis of the pattern of lymph node metastasis in proximal advanced gastric cancer has an appreciable value in guiding lymphadenectomy. Total gastrectomy plus splenectomy is a feasible radical surgery for proximal advanced gastric cancer because of the requirement of resection of Nos. 5-6 and Nos. 10-11 lymph nodes.

Key Words: Proximal gastric cancer; Lymph node metastasis; Lymphadenectomy; Gastrectomy; Splenectomy

Shao YS, Peng KQ, Zhang YT, Yu Y, Feng Y, Zhu L, Liu W, Wu WL. Lymph node metastasis in advanced proximal gastric cancer: an analysis of 86 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(12): 1300-1306

摘要

目的: 分析进展期近端胃癌的淋巴结转移规律, 为进展期近端胃癌的胃切除范围以及是否需要联合切脾提供参考依据。

方法: 选择江汉大学附属医院1989-01/2010-09行根治性切除手术的进展期近端胃癌86例, 记录每例患者的淋巴结数目和大小, 计算淋巴结总数和平均值, 计算总体淋巴结转移率以及

■同行评议者

黄颖秋, 教授, 本溪钢铁(集团)有限责任公司总医院消化内科

No.1-16淋巴结转移率.

结果: 86例手术标本共检出淋巴结4 756枚(30-157枚), 平均 55.30 ± 20.23 枚/例. 其中 ≤ 5 mm的淋巴结占81.14%(3 859/4 756). 86例中70例有淋巴结转移, 淋巴结转移率81.40%. 有癌转移的淋巴结中, ≤ 5 mm的淋巴结占60.96%(556/912). 总体淋巴结转移率为81.40%. No.1-4和No.7-9淋巴结转移率较高(39.53%-80.23%), 而No.12-15淋巴结转移率极低(0.00%-2.33%), No.16淋巴结转移率为15.12%. No.5和No.6淋巴结转移率分别为22.09%和15.12%. No.10和No.11淋巴结转移率分别为33.2%和18.60%.

结论: 进展期近端胃癌的淋巴结转移规律有助于指导淋巴结切除术, 因为切除No.5-6和No.10-11淋巴结的需要, 进展期近端胃癌宜行全胃切除联合脾切除术.

关键词: 近端胃癌; 淋巴结转移; 淋巴结切除术; 胃切除术; 脾切除术

邵永胜, 彭开勤, 张应天, 余阳, 冯燕, 朱岭, 刘文, 吴文良. 进展期近端胃癌淋巴结转移86例. 世界华人消化杂志 2011; 19(12): 1300-1306

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/1300.asp>

0 引言

胃癌是临床最常见的恶性肿瘤之一, 其发病率和死亡率在我国居恶性肿瘤首位^[1]. 近年来, 胃癌的发病率没有明显增加, 但近端胃癌所占的比例有所提高^[2]. 手术一直是胃癌治疗的主要手段, 关于胃体癌和远端胃癌的胃切除范围已达成共识, 惟有近端胃癌, 是行近端胃切除术抑或全胃切除术仍存争议^[2-4]. 作为胃癌根治术的组成部分, 脾切除的目的是切除脾门(No.10)淋巴结和脾动脉干(No.11)淋巴结^[5,6]. 但随着对脾脏免疫功能的不断认识和手术病例的积累与总结, 脾切除在胃癌手术中的价值开始受到置疑^[7]. 直到近年, 关于近端胃癌手术是切脾还是保脾的讨论仍在进行^[8-10]. 鉴于此, 我们分析进展期近端胃癌的淋巴结转移特点, 以期对进展期近端胃癌的胃切除范围以及是否需要联合切脾提供参考依据.

1 材料和方法

1.1 材料 江汉大学附属医院胃肠外科1989-01/2010-09完整病理学检查资料的进展期近端胃癌86例, 均为根治性切除手术病例; 早期胃癌和非

R0切除病例皆除外. 其中男65例, 女21例; 年龄26-83(中位年龄59)岁.

1.2 方法

1.2.1 淋巴结切除范围: (1)幽门上区: 结扎胃十二指肠动脉、胃右动脉和胃右静脉, 于十二指肠球部以下断肠, 清除No.5淋巴结. 剥离肝十二指肠韧带上的神经淋巴板, 裸露胆总管、门静脉和肝固有动脉, 清除No.12淋巴结; (2)幽门下区: 结扎胃网膜右血管, 切除十二指肠球部, 裸露胰头, 清除No.6淋巴结. 剥离大网膜和横结肠系膜前叶, 裸露胰腺下缘肠系膜上血管, 清除No.14淋巴结; 裸露结肠中血管, 清除No.15淋巴结; (3)腹腔动脉区: 沿肝固有动脉向左剥离, 裸露肝总动脉, 去尽肝胰之间的后腹膜, 清除No.8淋巴结. 剥离裸露腹腔动脉, 清除No.9淋巴结; 于起始部结扎胃左动脉, 清除No.7淋巴结. 剥离左侧肾上腺前方Gerota筋膜, 裸露腹主动脉, 清除No.16淋巴结. 裸露腹腔动脉后, 于起始部结扎脾动脉, 为清除No.10和No.11淋巴结做准备; (4)贲门区: 切断肝左侧三角韧带和冠状韧带, 将肝脏左外侧叶向右侧翻开, 游离食管下段, 切断迷走神经干, 距离贲门6 cm切断食管, 剥离膈孔处腹膜和筋膜, 裸露双侧膈脚, 清除No.1、No.2和No.11淋巴结; (5)胰脾区: Kocher手法翻起胰头和十二指肠, 剥离胰头后结缔组织连至十二指肠球部, 清除No.13淋巴结. 游离脾脏, 将脾脏连同左半胰逆时针翻起, 结扎脾血管, 于肠系膜下血管前方切断胰腺, 切除脾脏和左半胰, 清除No.10和No.11淋巴结. 2002年以后, 按照JRS GC提出的方法保留胰腺, 在胰腺上缘结扎脾血管、切除脾脏, 清除No.10和No.11淋巴结. 最后, 胃小弯No.3淋巴结和胃大弯No.4淋巴结连同胃标本被一并去除.

1.2.2 胃切除范围: 2001年以前, 15例行近端胃切除术, 切除淋巴结1-3组、4 s组、7-16组, 常规切除脾、左半胰和食管下段6 cm, 行食管-残胃吻合; 14例因癌肿累及胃体行全胃切除术, 切除淋巴结为1-16组和110组^[12]. 2002年以后, 57例全部行全胃切除术, 切除淋巴结为1-16组和110组; 常规保留胰腺, 切除脾脏和食管下段6 cm, 行食管-空肠Roux-en-Y吻合.

1.2.3 淋巴结取材和检查: 采用淋巴结显示技术^[13], 将手术标本用40 g/L甲醛固定, 丙酮和无水乙醇脱水, 0.3%美蓝染色, 然后在透光下按解剖学位置逐组取出淋巴结. 所有淋巴结常规石蜡包埋切片, 测量淋巴结最大直径, 最大径 ≥ 5 mm淋巴

■研发前沿

国内外文献报道, No.5淋巴结转移率0.0%-10.3%, No.6淋巴结转移率0.0%-13.0%; No.10淋巴结转移率4.8%-55%, No.11淋巴结转移率3.4%-45%. 这些文献报道的胃癌根治手术切除淋巴结数目, 平均4.91-27.86枚/例不等, 而且每枚淋巴结作单张切片HE染色镜检, 因而不能准确反映胃癌淋巴结转移规律.

■相关报道

Shin等报道,进展期近端胃癌No.10淋巴结转移高危因素包括女性、BorrmannⅣ型、肿瘤>5 cm、低分化腺癌、印戒细胞癌、Laurén弥漫型、血管淋巴侵犯和神经侵犯;Kikuchi等研究发现, No.10淋巴结转移相关因素有肿瘤>40 mm、未分化癌和肿瘤分期。因此有学者提出,应该对No.10淋巴结转移高危病例选择性行联合脾切除术。

表 1 No.1-16淋巴结转移率(%)

淋巴结分组	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.6	No.7-9	No.10	No.11	No.12	No.13	No.14	No.15	No.16
本组转移率	39.53	45.34	80.23	67.44	22.09	15.12	55.81	33.72	18.60	2.33	1.16	0.00	0.00	15.12
Sakaguchi等 ^[13]	-	-	-	-	-	-	-	24.00	24.00	-	-	-	-	-
Mönig等 ^[14]	-	-	-	-	-	-	-	9.80	-	-	-	-	-	-
Kikuchi等 ^[15]	-	-	-	-	-	-	-	23.10	-	-	-	-	-	-
Koufujii等 ^[16]	-	-	-	-	-	-	-	17.00	25.00	-	-	-	-	-
Shin等 ^[10]	-	-	-	-	-	-	-	12.90	-	-	-	-	-	-
Sasada等 ^[17]	-	-	-	-	-	-	-	15.40	-	-	-	-	-	-
陈志新等 ^[18]	-	-	-	-	-	-	-	55.00	45.00	-	-	-	-	-
涂小煌等 ^[19]	73.47	61.22	65.31	8.16	4.08	0.00	65.31	8.16	8.16	4.08	0.00	4.08	0.00	16.33
曹其彬等 ^[20]	42.90	19.00	38.10	14.30	9.50	4.80	19.10	4.80	-	-	-	-	-	-
何铁汉等 ^[21]	41.50	19.50	38.10	15.30	4.20	4.70	21.80	10.20	7.80	5.10	3.30	4.20	-	-
王俊田等 ^[22]	31.80	13.60	40.10	13.60	0.00	4.50	36.40	22.70	27.30	0.00	9.00	9.00	9.00	9.00
王益民等 ^[23]	28.10	17.60	35.90	9.00	10.30	2.90	17.30	-	10.50	-	-	-	-	13.20
丁小兵等 ^[24]	44.50	18.70	49.10	16.30	5.30	6.10	18.30	8.50	3.40	0.00	0	0.00	0.00	0.00
胡祥等 ^[25]	47.00	46.00	49.00	27.00	7.00	13.00	46.00	33.00	34.00	19.00	6.00	0.00	0.00	23.00

结作长径3平面各2张切片,最大径<5 mm淋巴结作连续6张切片;淋巴结切片行HE染色和细胞角蛋白免疫组织化学染色,光镜下判断有无癌转移。

统计学处理 (1)记录每例患者的淋巴结数目和大小(最大直径),计算淋巴结总数和平均值(用mean±SD表示);(2)计算淋巴结转移率(淋巴结转移例数/总例数),分析有癌转移淋巴结的大小;(3)Gerota筋膜查找淋巴结:在历年的胃癌全胃切除手术中,发现左侧肾上腺前方Gerota筋膜中含有淋巴结,这些淋巴结即使在JRSGC 2010年公布的第14版胃癌处理规约中也未提及;故本研究将最后24例患者手术标本中的Gerota筋膜单独送病检,按照淋巴结显示技术查找淋巴结;(4)计算每组淋巴结转移率:本组86例中,仅1例病检找到No.110淋巴结且为阴性,故将No.110淋巴结去除,计算No.1-16淋巴结转移率;此外,因胃左动脉周围(No.7)淋巴结、肝总动脉周围(No.8)淋巴结和腹腔动脉周围(No.9)淋巴结在手术标本中难以区分开来,故将此3组淋巴结合为No.7-9一并计算淋巴结转移率;(5)No.10淋巴结转移相关因素分析:包括患者性别、肿瘤大小(直径)、侵犯深度(T分期)、分化程度和Laurén分型。所有统计学处理用SPSS11.5统计学软件完成,均数的比较用 t 检验,率的比较用 χ^2 检验, $P<0.05$ 被认为差异有显著性。

2 结果

2.1 淋巴结数目及大小 86例手术标本溶脂后共检出淋巴结4 756枚(30-157枚),平均(55.30±

20.23)枚/例。4 756枚淋巴结最大径1-22 mm,其中最大径≤5 mm的淋巴结占81.14%(3859/4 756)。

2.2 淋巴结转移率 本组86例中70例有淋巴结转移,淋巴结转移率81.40%。有癌转移的淋巴结共912枚,其中最大径≤5 mm的淋巴结占60.96%(556/912),最大径≥10 mm的淋巴结占11.95%(109/912)。

2.3 Gerota筋膜淋巴结 本组86例中,有24例将左侧肾上腺前方Gerota筋膜单独送检查找淋巴结,共检出淋巴结77枚(1-7枚),平均(3.21±1.86)枚/例。24例中13例(54.17%)共18枚淋巴结(23.38%)有癌转移。

2.4 胃周1-16组淋巴结转移率 结果见表1,并与国内外文献报道结果进行对比。

2.5 脾门(No.10)淋巴结相关因素分析 脾门(No.10)淋巴结转移相关因素为:性别、肿瘤大小、侵犯深度及Laurén分型(均 $P<0.01$,表2)。

3 讨论

胃癌手术结束时有肉眼可见的癌残留为R2切除,镜下发现癌残留为R1切除,无癌残留为R0切除。胃癌根治术只有做到R0切除方为治愈性手术,否则属姑息性治疗^[26]。Nazli等^[27]研究发现,手术方式、淋巴结转移状况和分期是影响胃癌术后生存时间的预后因素;其多变量分析结果表明,R0切除对延长术后生存时间有益,是胃癌独立的预后因素^[27]。可见,胃癌根治术的基本原则是R0切除。这就要求足够的胃切除范围和淋巴结切除范围,以及必要的邻近器官或组织的切除^[28]。

表 2 No.10淋巴结转移相关因素

因素	转移	无转移	P值	t值或 χ^2 值
性别				
男	13	52	<0.01	$\chi^2 = 8.27$
女	11	10		
肿瘤大小(cm)	5.38 ± 1.20	3.06 ± 0.70	<0.01	$t = 21.08$
侵犯深度				
T2	1	21	<0.01	$\chi^2 = 13.64$
T3	10	27		
T4	13	14		
肿瘤分化				
低	17	35	0.46	$\chi^2 = 1.55$
中	6	22		
高	1	5		
Laurén分型				
弥漫型	23	15	<0.01	$\chi^2 = 36.03$
肠型	1	39		
其他型	0	8		

肿瘤大小: 原发灶最大径; 侵犯深度: 肿瘤的T分期。

淋巴结转移状况是影响胃癌预后的重要因素之一, 淋巴结(N)分期则是判断胃癌预后的重要指标。早年, 国际抗癌联盟(union for international cancer control, UICC)的TNM分期系统按清除淋巴结距原发灶的距离进行N分期, JRS GC则是按照解剖学部位将胃周淋巴结分为1-3站^[29]。直到1997年, UICC公布的第5版胃癌TNM分期中, 规定以淋巴结转移数目进行术后N分期。此后, UICC的第6版以及2010年新公布的第7版TNM分期方案, 皆以淋巴结转移数目进行N分期。N分期从定性、定位到定量的质变, 能更准确反映胃癌淋巴结转移的程度, 因而在临床上得到广泛的推广和应用。显然, 只有达到一定的淋巴结检查数目, 才能得出较为准确的N分期。UICC第5版胃癌TNM分期明确提出, 胃癌手术要求检查淋巴结>15枚。美国NCCN网(The National Comprehensive Cancer Network)2010年版胃癌指南也要求, 胃癌手术切除/检查淋巴结数目最低不能少于15枚。Aurello等^[30]报道, 早期胃癌患者至少取得10枚, 进展期胃癌患者至少取得16枚淋巴结, 才能得出准确的N分期。Ichikura等^[31]报道, 为了确保胃癌手术后N分期的准确性, N0期病例要求至少切除10-15枚淋巴结送检, N1-3期病例要求送检 ≥ 20 枚淋巴结; 如果切除、送检淋巴结 ≥ 30 枚, 术后N分期可能会更准确。Yu等^[32]报道全胃联合脾切除检出淋巴结40(5-93)枚/例, Csendes等^[33]报道全胃联合脾切除检出淋巴结30(22-38)

枚/例。国内文献报道, 胃癌根治手术切除淋巴结数目平均(4.91-27.86)枚/例不等^[19,21,24,25,30-39]。本研究86例进展期近端胃癌手术检查淋巴结平均55.3枚/例, 明显高于国内外报道结果。此外, 淋巴结切片数目也很最重要。在胃癌TNM分期方案中, UICC只规定了淋巴结检查数目, 而对淋巴结切片数目没有具体要求。我们常规要求对每枚淋巴结作连续6张切片, 行HE染色和细胞角蛋白免疫组织化学染色检查^[11,12]; 因为单张切片HE染色镜检有9%-33%的漏诊率, 不能准确反映淋巴结转移状况^[40]。本研究采用淋巴结显示技术, 全数取出手术标本中的淋巴结, 平均每例检查淋巴结55.3枚, 每枚淋巴结作连续6张切片HE染色和细胞角蛋白免疫组织化学染色检查, 因而能够较准确反映进展期近端胃癌的淋巴结转移状况和N分期。

本组86例手术标本溶脂后共检出淋巴结4 756枚, 其中最大径 ≤ 5 mm的淋巴结占81.14%; 有癌转移的淋巴结共912枚, 其中最大径 ≤ 5 mm的淋巴结占60.96%。徐少杰等^[36]报道115例胃癌手术共取得淋巴结2 252枚, 其中10 mm以下淋巴结占80.7%; 有癌转移的556枚淋巴结中, 10 mm以下淋巴结占62.9%, 而1-5 mm和6-9 mm淋巴结转移率分别为12.3%和26.2%。丁莉利等^[37]报道30例胃癌根治手术平均取得淋巴结27.86枚/例, 直径 ≤ 5 mm的转移淋巴结占38.11%。可见, 小淋巴结不一定没有癌转移。同样, 肿大的淋巴结不一定有癌转移。刘省存等^[35]报道155例胃癌D2/D3手术, 共切除淋巴结3 305枚, 其中肿大淋巴结1 037枚, 转移占40.79%。上述结果是对胃癌手术中通过手感和目视判断淋巴结有无转移这一传统方法的否定, 应该引起临床外科医师的重视。手术医师如果根据手感和目视的判断结果任意缩小淋巴结切除范围, 势必可能导致肿瘤残留, 最终影响胃癌手术效果。因此, 惟有规范的淋巴结切除术, 才能保证胃癌根治性手术疗效。

2001年以前, 我们常规切除脾脏和左半胰, 以清除No.10和No.11淋巴结。2002年以后, 我们首先在起始点结扎脾动脉, 然后后采用Mattox法剥离左侧肾上腺前方Gerota筋膜, 将脾脏和胰尾翻起, 在胰腺上缘结扎脾血管, 将脾脏、脾血管连同No.10和No.11淋巴结一并切除。剥离Gerota筋膜, 翻起脾脏和胰尾, 还有助于裸露腹主动脉, 清除No.16淋巴结。在历年的胃癌全胃切除手术中, 我们发现Gerota筋膜中含有淋巴结, 这些淋巴结即使在JRS GC 2010年公布的第14版胃

■创新盘点

本研究采用淋巴结显示技术, 全数取出手术标本中的淋巴结, 平均每例检查淋巴结55.3枚, 每枚淋巴结作连续6张切片HE染色和细胞角蛋白免疫组织化学染色检查, 因而能够较准确反映进展期近端胃癌的淋巴结转移规律。此外, 本研究发现除了日本胃癌处理规约中有编号的淋巴结以外, 在左侧肾上腺前方Gerota筋膜中也存在淋巴结, 且转移率高达54.17%。

■应用要点

进展期近端胃癌的淋巴结转移规律有助于指导其手术切除范围,尤其是淋巴结切除范围。因为切除No.5-6和No.10-11淋巴结的需要,进展期近端胃癌宜行全胃切除联合脾切除术。

癌处理规约中也未提及。本研究将24例患者手术标本中的Gerota筋膜单独送病检,按照淋巴结显示技术共检出淋巴结77枚(1-7枚),平均(3.21±1.86)枚/例;此24例中13例(54.17%)共18枚淋巴结(23.38%)有癌转移。可见,除了日本胃癌处理规约中有编号的淋巴结以外,在左侧肾上腺前方Gerota筋膜中也存在淋巴结,且转移率高达54.17%。因此我们提出,进展期近端胃癌手术中应常规切除左侧肾上腺前方Gerota筋膜,以避免肿瘤残留、保证R0切除。

本研究结果发现, No.1-4和No.7-9淋巴结转移率较高(39.53%-80.23%), No.16淋巴结转移率为15.12%, 而No.12-15淋巴结转移率极低(0.00%-2.33%), 与文献报道结果相近^[21-27]。提示进展期近端胃癌手术时, 重点是清除No.1-4、No.7-9和No.16淋巴结, No.12-15淋巴结的切除可适当简化。值得注意的是, 本组病例No.5淋巴结转移率为22.09%, No.6淋巴结转移率为15.12%。文献报道No.5淋巴结转移率0.0%-10.3%, No.6淋巴结转移率0.0%-13.0%^[19-25]。可见, 进展期近端胃癌手术必须清除No.5和No.6淋巴结。因为只有结扎胃右血管和胃网膜右血管, 于十二指肠球部断肠, 才能清除No.5和No.6淋巴结, 故进展期近端胃癌需行全胃切除术。An等^[3]报道423例近端胃癌的对比研究, 结果发现近端胃切除组的淋巴结切除数目小于全胃切除组, 前者的并发症(吻合口狭窄和反流性食管炎)发生率明显高于后者。因为肿瘤复发率和反流性食管炎发生率较高, 使得近端胃切除术“声名狼藉”(a poor reputation)^[41]。因此, 无论是从No.5和No.6淋巴结切除的要求来考虑, 还是根据手术并发症发生率的比较结果来权衡, 进展期近端胃癌宜行全胃切除术。

D2淋巴结切除术是进展期胃癌的标准手术。按照日本胃癌处理规约规定, No.10和No.11淋巴结属近端胃癌的第二站淋巴结, 只有切除脾脏才能清除No.10和No.11淋巴结, 故标准的D2淋巴结切除术需联合切除脾脏。保留脾脏清除脾门淋巴结, 淋巴结残留率可达74.7%, 不可能达到R0切除目的^[42]。因此, 进展期近端胃癌被认为是联合脾切除术的适应证^[43]。本研究结果发现, No.10淋巴结转移率为33.72%, No.11淋巴结转移率为18.60%, 支持进展期近端胃癌手术时联合切除脾脏。文献报道No.10淋巴结转移率4.8%-55.0%^[10,13-25], No.11淋巴结转移率3.4%-45.0%^[13,13-25]。陈国林等^[44]在138具婴幼儿尸体的胃底注射20%普鲁士

兰氯仿溶液, 结果发现脾门淋巴结染色时序为第8位(依次为No.2-No.1-No.3-No.7-No.4s-No.9-No.16-No.10-No.4d-No.5-No.6-No.8-No.12-No.13-No.14), 染色率为91.3%。皆为进展期近端胃癌联合脾切除术提供了依据。进展期近端胃癌是否联合脾切除一直存在争议^[7-10]。支持者认为, 从胚胎学和解剖学方面考虑, 惟有区域性整块切除(包括脾脏和脾门、脾动脉干周围淋巴结)才能保证手术的彻底性, 脾切除可使脾门、脾动脉干淋巴结和周围组织暴露更清楚, 更利于淋巴结切除^[6]。反对者认为, 保留脾脏可以改善患者的全身免疫与自身调节功能, 进而提高生存率和生活质量^[8]。实际上, 脾脏在肿瘤免疫中具有双向调节作用, 即在肿瘤早期表现为正向调节, 进展期表现为负向调节。这种双向调节作用可能与脾脏中的辅助T淋巴细胞1/辅助T淋巴细胞2亚群失衡及脾脏中产生抑制性细胞(抑制性T淋巴细胞和抑制性巨噬细胞)有关, 荷瘤状态下出现以上情况会加重机体免疫功能的紊乱, 抑制免疫系统抗肿瘤的作用。因此, 可通过切除癌组织和脾脏以纠正辅助T淋巴细胞1/辅助T淋巴细胞2亚群偏移, 减少或消除癌来源的各种免疫抑制因子和抑制细胞; 切脾有利于改善进展期胃癌患者的免疫抑制状态。但是, 由于目前没有能准确反映脾功能的特异性量化指标, 切脾与否对进展期胃癌机体免疫功能的影响尚不明确^[43]。本研究还对No.10淋巴结转移的相关因素进行了分析, 结果发现No.10淋巴结转移与患者的性别、肿瘤大小、侵犯深度(T分期)和Laurén分型相关($P<0.01$), 与肿瘤分化程度无关($P=0.46$)。所剑^[45]的研究资料显示, 进展期近端胃癌No.10淋巴结转移率与肿瘤部位有关, 小弯侧近端胃癌No.10淋巴结转移率为11.23%, 大弯侧近端胃癌No.10淋巴结转移率为29.77%。Shin等^[10]报道119例近端胃癌病例行全胃切除联合脾切除术, 其中早期病例No.10淋巴结无转移, 进展期病例转移率为12.9%, 高危因素包括女性、BorrmannⅣ型、肿瘤>5 cm、低分化腺癌、印戒细胞癌、Laurén弥漫型、血管淋巴侵犯和神经侵犯。Kikuchi等^[15]研究发现, No.10淋巴结转移相关因素有肿瘤>40 mm、未分化癌和肿瘤分期。有学者提出, 应该对No.10淋巴结转移高危病例选择性行联合脾切除; 但多数学者认为, 进展期近端胃癌需常规联合切除脾脏, 以利清除No.10和No.11淋巴结, 因为淋巴结切除范围越大、切除淋巴结数目越多, 患者的预后越好^[46-49]。况且,

前瞻性随机对比研究证实, 全胃切除联合脾切除术与全胃切除术两组患者的平均手术时间、术后并发症发生率和平均住院时间的差异无统计学意义($P>0.05$)^[32,33]。

4 参考文献

- 1 刘宏斌, 盛贤能, 韩晓鹏, 朱万坤, 苏琳, 李新源. 观察 FOLFOX 新辅助化疗方案治疗不能切除的进展期胃癌的疗效. 国际外科学杂志 2010; 37: 174-176
- 2 Hou YM, Song JG, Juan S, Ullah S, Bin Y, Zang XQ, Ping F, Yang H, Liu ZJ. Investigation of the alterations in cellular electrophysiology underlying ventricular arrhythmia in dogs with the multiple organ dysfunction syndrome. *Cardiology* 2010; 115: 39-45
- 3 An JY, Youn HG, Choi MG, Noh JH, Sohn TS, Kim S. The difficult choice between total and proximal gastrectomy in proximal early gastric cancer. *Am J Surg* 2008; 196: 587-591
- 4 Ooki A, Yamashita K, Kikuchi S, Sakuramoto S, Katada N, Hutawatari N, Watanabe M. Clinical significance of total gastrectomy for proximal gastric cancer. *Anticancer Res* 2008; 28: 2875-2883
- 5 Okajima K, Isozaki H. Splenectomy for treatment of gastric cancer: Japanese experience. *World J Surg* 1995; 19: 537-540
- 6 Wanebo HJ, Kennedy BJ, Winchester DP, Stewart AK, Fremgen AM. Role of splenectomy in gastric cancer surgery: adverse effect of elective splenectomy on longterm survival. *J Am Coll Surg* 1997; 185: 177-184
- 7 Otsuji E, Yamaguchi T, Sawai K, Ohara M, Takahashi T. End results of simultaneous splenectomy in patients undergoing total gastrectomy for gastric carcinoma. *Surgery* 1996; 120: 40-44
- 8 李鹏, 何晓东, 田金徽, 杨克虎, 姜雷. 全胃联合脾切除治疗进展期胃癌的系统评价. 世界华人消化杂志 2009; 17: 1241-1246
- 9 Oh SJ, Hyung WJ, Li C, Song J, Kang W, Rha SY, Chung HC, Choi SH, Noh SH. The effect of spleen-preserving lymphadenectomy on surgical outcomes of locally advanced proximal gastric cancer. *J Surg Oncol* 2009; 99: 275-280
- 10 Shin SH, Jung H, Choi SH, An JY, Choi MG, Noh JH, Sohn TS, Bae JM, Kim S. Clinical significance of splenic hilar lymph node metastasis in proximal gastric cancer. *Ann Surg Oncol* 2009; 16: 1304-1309
- 11 刘文, 彭开勤, 龚少敏, 刘丽江, 张应天. 近端胃癌手术时淋巴结清扫范围、数目及转移的研究. 中华普通外科杂志 2003; 18: 714-716
- 12 彭开勤, 刘丽江, 张应天, 刘文, 龚少敏, 全卓勇, 邵永胜. 一种新的胃癌淋巴结分期方案. 中华外科杂志 2001; 39: 908-910
- 13 Sakaguchi T, Sawada H, Yamada Y, Fujimoto H, Emoto K, Takayama T, Ueno M, Nakajima Y. Indication of splenectomy for gastric carcinoma involving the proximal part of the stomach. *Hepatogastroenterology* 2001; 48: 603-605
- 14 Mönig SP, Collet PH, Baldus SE, Schmackpfeffer K, Schröder W, Thiele J, Dienes HP, Hölscher AH. Splenectomy in proximal gastric cancer: frequency of lymph node metastasis to the splenic hilus. *J Surg Oncol* 2001; 76: 89-92
- 15 Kikuchi S, Nemoto Y, Natsuya K, Sakuramoto S, Kobayashi N, Shimao H, Sakakibara Y, Kakita A. Which patients with advanced, proximal gastric cancer benefit from complete clearance of splenopancreatic lymph nodes? *Anticancer Res* 2002; 22: 3513-3517
- 16 Koufukuji K, Shirouzu K, Aoyagi K, Yano S, Miyagi M, Imaizumi T, Takeda J. Surgery and clinicopathological features of gastric adenocarcinoma involving the esophago-gastric junction. *Kurume Med J* 2005; 52: 73-79
- 17 Sasada S, Ninomiya M, Nishizaki M, Harano M, Ojima Y, Matsukawa H, Aoki H, Shiozaki S, Ohno S, Takakura N. Frequency of lymph node metastasis to the splenic hilus and effect of splenectomy in proximal gastric cancer. *Anticancer Res* 2009; 29: 3347-3351
- 18 陈志新, 胡建昆, 张波, 陈佳平, 周总光. 保留脾脏的脾动脉干及脾切除术在胃癌根治术中的意义. 世界华人消化杂志 2003; 11: 842-844
- 19 涂小煌, 王烈, 姚和祥, 宋京翔, 饶本强, 王瑜, 邹忠东, 陈少全. 进展期胃癌淋巴结转移的特点及临床意义. 中华胃肠外科杂志 2003; 6: 382-384
- 20 曹其彬, 陈士远. 胃癌淋巴结转移规律及其清扫范围探讨. 山东医药 2004; 44: 9-10
- 21 何铁汉, 李涛, 王云海, 张文斌, 陈兵. 进展期胃癌淋巴结转移与临床病理特征的关系. 新疆医科大学学报 2005; 28: 1025-1028
- 22 王俊田, 李钧, 高泽锋, 林海钧, 李丽君. 进展期胃癌淋巴结转移的临床分析. 肿瘤研究与临床 2005; 17: 266-267
- 23 王益民. 近端胃癌191例手术范围的探讨. 蚌埠医学院学报 2006; 31: 261-262
- 24 丁小兵, 贺咏宁, 李玉梅, 刘大全, 王梦龙. 进展期胃癌淋巴结转移规律的探讨. 重庆医学 2010; 39: 58-61
- 25 胡祥, 田大字, 曹亮. 残胃癌的淋巴结转移特点及外科治疗. 中华消化外科杂志 2010; 9: 203-206
- 26 Fatouros M, Roukos DH, Agnantis NJ, Kappas AM. Confirming hypothesis-driven surgical concept and comparing potential survival benefit expected by D2 surgery and adjuvant treatment. *Gastric Breast Cancer* 2003; 2: 33-41
- 27 Nazli O, Derici H, Tansug T, Yaman I, Bozdog AD, Isgüder AS, Bölükbaşı H. Survival analysis after surgical treatment of gastric cancer: review of 121 cases. *Hepatogastroenterology* 2007; 54: 625-629
- 28 Liakakos T, Fatouros M, Paviaki K, Arampatzis I, Karatzas G. Standards and Trends in the Surgical Treatment of Gastric Cancer. *Gastric Breast Cancer* 2004; 3: 47-53
- 29 Japanese Classification of Gastric Carcinoma - 2nd English Edition - *Gastric Cancer* 1998; 1: 10-24
- 30 Aurello P, D'Angelo F, Rossi S, Bellagamba R, Cicchini C, Nigri G, Ercolani G, De Angelis R, Ramacciato G. Classification of lymph node metastases from gastric cancer: comparison between N-site and N-number systems. Our experience and review of the literature. *Am Surg* 2007; 73: 359-366
- 31 Ichikura T, Ogawa T, Chochi K, Kawabata T, Sugawara H, Mochizuki H. Minimum number of lymph nodes that should be examined for the International Union Against Cancer/American Joint Committee on Cancer TNM classification of gastric carcinoma. *World J Surg* 2003; 27: 330-333
- 32 Yu W, Choi GS, Chung HY. Randomized clinical trial of splenectomy versus splenic preservation in patients with proximal gastric cancer. *Br J Surg* 2006; 93: 559-563
- 33 Csendes A, Burdiles P, Rojas J, Braghetto I, Diaz JC, Maluenda F. A prospective randomized study comparing D2 total gastrectomy versus D2 total

■同行评价

本文为进展期近端胃癌行全胃切除联合脾切除术提供了参考依据, 有一定的临床指导价值。

- gastrectomy plus splenectomy in 187 patients with gastric carcinoma. *Surgery* 2002; 131: 401-407
- 34 何裕隆, 张常华, 詹文华, 蔡世荣, 黄美近, 陈创奇, 吴晖, 彭建军. 胃癌淋巴结转移规律的探讨. *中华普通外科杂志* 2004; 19: 656-658
- 35 刘省存, 李昊, 梁启新, 刘弋. 胃癌根治术中肿大淋巴结的分析. *临床外科杂志* 2005; 13: 159-160
- 36 徐少杰, 黎庆荣, 龚伟, 纪建松. 胃癌淋巴结大小与转移的关系. *肿瘤学杂志* 2005; 11: 447-448
- 37 王浩, 周岩冰, 陈士远. 进展期胃癌淋巴结转移规律的Logistic回归分析. *青岛大学医学院学报* 2008; 44: 414-418
- 38 丁莉利, 陈明净, 杨丞, 黄幼生, 徐海霞, 翁阳. 溶脂法在胃癌淋巴结及腹膜转移检测中的意义. *海南医学院学报* 2009; 15: 411-416
- 39 黄昌明, 林建贤, 郑朝辉, 李平, 谢建伟, 林碧娟, 卢辉山. 淋巴结清扫数目对无淋巴结转移胃癌患者预后的影响. *中华外科杂志* 2010; 48: 753-757
- 40 McGrath S, Cross S, Pritchard SA. Histopathological assessment of lymph nodes in upper gastrointestinal cancer: does triple levelling detect significantly more metastases? *J Clin Pathol* 2007; 60: 1222-1225
- 41 Mackay S, Hayes T, Yeo A. Management of gastric cancer. *Aust Fam Physician* 2006; 35: 208-211
- 42 Maruyama K, Sasako M, Kinoshita T, Sano T, Katai H, Okajima K. Pancreas-preserving total gastrectomy for proximal gastric cancer. *World J Surg* 1995; 19: 532-536
- 43 林碧娟, 黄昌明. 进展期近端胃癌联合脾切除的现状与进展. *医学综述* 2008; 14: 680-682
- 44 陈国林, 薛英威, 王凤君, 张岂凡. 从胃淋巴流向动态规律看胃癌根治术时脾切除的意义. *实用肿瘤学杂志* 1999; 13: 40-41
- 45 所剑. 胃癌的淋巴结清扫及意义. *中国普外基础与临床杂志* 2010; 17: 5-7
- 46 Volpe CM, Driscoll DL, Douglass HO. Outcome of patients with proximal gastric cancer depends on extent of resection and number of resected lymph nodes. *Ann Surg Oncol* 2000; 7: 139-144
- 47 Schwarz RE, Smith DD. Clinical impact of lymphadenectomy extent in resectable gastric cancer of advanced stage. *Ann Surg Oncol* 2007; 14: 317-328
- 48 Sasagawa T, Solano H, Vega W, Mena F. The effectiveness of extended lymph node dissection for gastric cancer performed in Costa Rica under the supervision of a Japanese surgeon: a comparison with surgical results in Japan. *Am J Surg* 2008; 195: 53-60
- 49 Park JC, Lee YC, Kim JH, Kim YJ, Lee SK, Shin SK, Hyung WJ, Noh SH, Kim CB. Clinicopathological features and prognostic factors of proximal gastric carcinoma in a population with high *Helicobacter pylori* prevalence: a single-center, large-volume study in Korea. *Ann Surg Oncol* 2010; 17: 829-837

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011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.

进展期胆囊癌侵犯肝门胆管致梗阻性黄疸15例

李江, 侯宇, 高华斌, 刘斌

李江, 刘斌, 昆明医学院第一附属医院肝胆外科 云南省昆明市 650032

侯宇, 云南省肿瘤医院放疗科 云南省昆明市 650181

高华斌, 昆明医学院第一附属医院病案统计科 云南省昆明市 650032

作者贡献分布: 研究过程由李江与侯宇完成; 统计学分析由高华斌完成; 研究设计和结果审核由刘斌完成; 论文写作由李江完成。
通讯作者: 刘斌, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 650032, 云南省昆明市, 昆明医学院第一附属医院肝胆外科。

lijiangchina@yahoo.com.cn

收稿日期: 2010-11-17 修回日期: 2011-03-27

接受日期: 2011-04-11 在线出版日期: 2011-04-28

Advanced gallbladder cancer infiltrating the hilar bile duct: an analysis of 15 cases

Jiang Li, Yu Hou, Hua-Bin Gao, Bin Liu

Jiang Li, Bin Liu, Department of Hepatobiliary Surgery, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650032, Yunnan Province, China

Yu Hou, Department of Radiation Oncology, the Third Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650181, Yunnan Province, China

Hua-Bin Gao, Department of Medical Records and Statistics, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650032, Yunnan Province, China

Correspondence to: Professor Bin Liu, Department of Hepatobiliary Surgery, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650032, Yunnan Province, China. lijiangchina@yahoo.com.cn

Received: 2010-11-17 Revised: 2011-03-27

Accepted: 2011-04-11 Published online: 2011-04-28

Abstract

AIM: To discuss the value of surgery in the management of advanced gallbladder cancer infiltrating the hilar bile duct.

METHODS: The clinical data for 30 patients with advanced gallbladder cancer infiltrating the hilar bile duct who underwent surgery were analyzed retrospectively, and the survival of patients with and without surgical management was compared.

RESULTS: The median survival time for patients undergoing extended radical resection was longer than that for patients undergoing palliative resection, bile duct drainage or conservative treatment (16 mo \pm 6.1 mo vs 16 mo \pm 1.1

mo, 6 mo \pm 0.77 mo, 2 mo \pm 0.45 mo, all $P < 0.01$). Decline in bilirubin and improvement of nutrition were better in patients undergoing palliative resection than in those undergoing bile duct drainage.

CONCLUSION: Extended radical resection should be considered for patients with advanced gallbladder cancer infiltrating the hilar bile duct since it could offer a chance for prolonged survival. Palliative resection did not contribute to long-term survival but could better improve the quality of life of patients with advanced gallbladder cancer infiltrating the hilar bile duct than bile duct drainage.

Key Words: Gallbladder cancer; Jaundice; Surgical therapy

Li J, Hou Y, Gao HB, Liu B. Advanced gallbladder cancer infiltrating the hilar bile duct: an analysis of 15 cases. *Shi-jie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(12): 1307-1310

摘要

目的: 探讨进展期胆囊癌侵犯肝门胆管致梗阻性黄疸时的外科治疗价值。

方法: 回顾性分析15例进展期胆囊癌侵犯肝门胆管致梗阻性黄疸病例的外科治疗情况, 并与同期行胆道引流或支架治疗以及保守治疗的15例患者的生存情况进行比较。

结果: Kaplan-Meier生存分析显示扩大根治术组中位生存时间为16.0 mo \pm 6.1 mo, 癌灶切除胆肠吻合组中位生存时间为6.0 mo \pm 1.1 mo, 胆道引流组中位生存时间为6.00 mo \pm 0.77 mo, 保守治疗组中位生存时间为2.00 mo \pm 0.45 mo。Gehan比检验对各组生存时间比较, 发现扩大根治术组显著长于其余各组($P < 0.01$), 癌灶切除胆肠吻合组与介入胆道引流组无统计学差异($\mu = 0.015$, $P = 0.09$)。术后黄疸下降及营养改善, 癌灶切除胆肠吻合组显著优于胆道引流组, 但肝脏酶学的恢复两组间无差异。

结论: 扩大根治术能显著提高进展期胆囊癌侵犯肝门胆管致梗阻性黄疸患者的生存时间。

■背景资料

胆囊癌发病率约占全部肿瘤的1%, 但居胆道恶性肿瘤的首位。由于缺乏特异性诊断指标和临床表现, 加之恶性程度高, 极易侵犯肝脏和淋巴转移, 大多患者就诊时已是进展期, 预后极差。手术仍是胆囊癌目前唯一可能获得痊愈的治疗方法。

■同行评议者

金山, 副主任医师, 内蒙古医学院附属医院普外科

■研发前沿

进展期胆囊癌常累及肝脏、肝门部胆管、胰腺等,此时采用单纯根治术已无法达到根治要求,因此扩大根治术被许多学者推崇。但扩大手术也带来了创伤的增加,尤其是伴有梗阻性黄疸致肝功能损伤的患者,手术能否获益仍是争论的焦点。

胆囊及肝方叶癌灶切除胆肠吻合的姑息性手术对于严格选择的病例亦能达到提高生活质量和改善预后的目的。

关键词: 胆囊癌; 黄疸; 手术治疗

李江, 侯宇, 高华斌, 刘斌. 进展期胆囊癌侵犯肝门胆管致梗阻性黄疸15例. 世界华人消化杂志. 2011; 19(12): 1307-1310
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/1307.asp>

0 引言

胆囊癌恶性程度较高, 浸润转移快, 合并肝门胆管侵犯而导致的梗阻性黄疸以往认为是肿瘤终末期, 已无手术治疗价值, 仅能行经皮肝穿刺胆道引流(percutaneous transhepatic biliary drainage, PTBD)或内镜胆道支架置入治疗^[1,2]。然而, 近年来, 随着影像检查方法和外科观念、技术的改进, 加之, 受到肝门部胆管癌的扩大根治术能显著改善患者预后^[3]的启发, 我们选择性的对15例此类“终末期”胆囊癌实施了手术治疗, 并与同期行胆道引流或支架治疗以及保守治疗的患者进行比较, 取得了较好疗效, 报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料 2005-09/2009-04昆明医学院第一附属医院共收治无远隔转移的胆囊癌侵犯肝门胆管致梗阻性黄疸患者34例, 男7例, 女27例, 行扩大根治术10例, 胆囊及肝方叶癌灶切除胆肠吻合术5例, 胆道引流12例, 其中PTBD 4例; 经内镜胆道支架置入8例, 保守治疗7例。全部病例均经CT和MR提示胆囊壁不规则增厚或实变伴肝门区肿物及胆管梗阻, 肝内胆管扩张, 肝方叶浸润和/或肝转移灶。按国际抗癌联盟的TNM分期标准均为IV期(M0), Nevin分期均为V期。全部病例中有4例剔除, 未进行随访和统计, 其中2例行胆道引流时已出现恶液质表现, 2例就诊时已中到大量腹水而只能保守治疗。其余病例各组间年龄、就诊时的体质量下降、血AIB、TB、ALT及Cre无统计学差别(方差分析, SPSS13.0软件进行)。

1.2 方法 手术组15例患者均未行术前减黄, 术中证实胆囊肿物侵蚀肝方叶>2 cm, 胆囊三角及肝总管包绕于肿块中, 肝脏呈淤胆样改变, 术后病检中分化腺癌6例、低分化腺癌9例。其中3例因肝十二指肠韧带挛缩成团, 肝固有动脉及门静脉受侵; 2例腹腔干被肿瘤完全包裹同时腹主动脉旁块状融合淋巴结而行胆囊及肝方叶癌灶切

除、左右肝管及汇合部切开胆肠Roux-en-Y吻合术。其余10例均成功行扩大根治术, 切除范围包括胆囊及肝方叶切除+肝外胆道切除+肝十二指肠韧带及腹腔干骨络化、胰头后淋巴结清扫, Roux-en-Y胆肠吻合重建胆道, 胆管及肝切缘均病理证实阴性, 其中1例附加胰头十二指肠切除, 1例附加右半肝切除。全组无手术死亡, 无肝、肾功能衰竭等严重并发症, 2例胆漏经保守治愈, 11例出现腹水, 经营养支持治疗, 术后2-4(平均2.7) wk消失。另外, 行胆囊及肝方叶切除胆肠吻合的5例中2例进行了肝断面及区域淋巴结放疗(50 Gy/25F)。对生存时间, 癌灶切除组与胆道引流组术后1 mo及3 mo的肝功能及营养情况进行随访和比较。

统计学处理 采用SPSS13.0软件。Kaplan-Meier进行生存分析, Gehan比分检验进行组间比较, 两组间均数比较采用 t 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

全组30例获随访2-27 mo(未进入统计学比较的2例胆道引流和2例保守治疗者未进行随访)。10例接受扩大根治者9例术后生存6 mo, 7例生存1年, 2例生存2年, 最长生存时间27 mo; 5例胆囊及肝方叶癌灶切除胆肠吻合者3例生存6 mo, 2例存活1年(此两例均接受区域性放疗), 最长生存时间13 mo。10例PTCD或内镜胆道支架置入者中4例生存6 mo, 最长生存时间12 mo。5例保守治疗无存活>3 mo者。扩大根治的10例随访期内死亡7例, 6例死于局部复发、1例死于肺转移。癌灶切除组的5例及胆道引流和保守治疗的15例随访期内均死于局部肿瘤进展。行Kaplan-Meier生存分析显示扩大根治术组中位生存时间为16 mo \pm 6.1 mo, 癌灶切除胆肠吻合组中位生存时间为6 mo \pm 1.1 mo, 胆道引流组中位生存时间为6 mo \pm 0.77 mo, 保守治疗组中位生存时间为2 mo \pm 0.45 mo(图1)。由于病例数尚少故未计算生存率, 但采用Gehan比分检验对各组生存时间比较, 发现扩大根治术组显著长于其余3组($P<0.01$), 癌灶切除胆肠吻合组与介入胆道引流组无统计学差异($\mu = 0.015$, $P = 0.09$), 但均长于保守治疗组($P<0.01$)。对癌灶切除胆肠吻合组与胆道引流组进行比较发现, 术后1 mo胆红素浓度前者显著低于后者($P = 0.033$), 术后3 mo体质量增加及血白蛋白浓度前者显著高于后者($P = 0.016$; $P = 0.001$), 肝功恢复两组间无差异($P =$

■相关报道

Kohya等对84例胆囊癌的手术方式与预后比较, 显示即使T2期胆囊癌亦需要联合肝叶和肝外道切除淋巴结清扫, 才能明显延长患者的生存期。

表 1 癌灶切除胆肠吻合组与介入胆道引流组术后情况比较

分组	术后1 mo		术后3 mo	
	血TB($\mu\text{mol/L}$)	体质量增加(kg)	血AIB(g/L)	血ALT(U/L)
癌灶切除胆肠吻合组	54.9 \pm 27.7	1.2 \pm 0.5	41.2 \pm 4.4	86.3 \pm 12.5
介入胆道引流组	90.2 \pm 26.8	0.5 \pm 0.4	33.2 \pm 3.2	102.1 \pm 22.6
t值	2.39	2.772	4.024	1.438
P值	0.033	0.016	0.001	0.174

■应用要点

本文选择性的对15例进展期胆囊癌侵犯肝门胆管致梗阻性黄疸患者实施了手术治疗, 并与同期行PTBD或支架治疗以及保守治疗的患者进行比较, 发现手术仍能使此类患者获益。

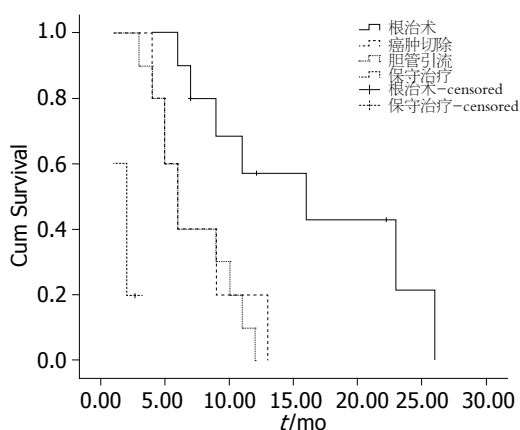


图 1 各组生存分析。

0.174, 表1)。

3 讨论

胆囊癌起病隐匿, 当癌肿穿过黏膜肌层后很快就可发生淋巴结转移和/或经IV、V肝段交通的静脉丛向肝转移, 就诊时>60%的患者已属晚期^[4-6]。目前根治或扩大根治术能提高进展期胆囊癌患者的生存率, 改善预后已是共识^[7-9], 但肝门部胆管受侵伴梗阻性黄疸时有无手术治疗的必要依然看法不一。如有学者回顾性分析了影像NevinIV期和V期胆囊癌预后的因素后提出对于进展期胆囊癌是否行扩大根治术并不能决定患者的预后, 对于肝门已有侵犯者扩大根治术并不能延长存活时间, 反而增加手术并发症^[10]。以PTCD或内镜置管为主的非手术减黄对相当一部分进展期胆囊癌患者起到了缓解胆道梗阻、改善肝肾功能及生活质量等作用, 但现阶段对于胆囊癌发病及侵蚀转移机制仍处于探索阶段, 药物、放疗等治疗还不能达到“根治”的目的^[11-14], 故非手术减黄并未完成确定性治疗。而且, 由于病灶依然存在并发展, 肿瘤负荷巨大, 辅助治疗难以控制病情进展。另外, 内置管堵塞是难以避免的, 如本组行胆管引流的10例中有5例在3 mo后即出现不同程度的堵管。近年来, 随着影像检查方法和外科观念、技术、

围手术期处理的改进, 国内外对进展期胆囊癌侵犯肝门胆管的患者实施手术治疗并取得较好效果的报道不断增多^[7,15,16]。例如, 华西医院对31例接受了扩大根治术的NevinIV、V期胆囊癌进行随访, 平均生存期17.6 mo, 69例姑息手术的平均生存期7.3 mo, 非手术治疗的45例平均生存期3.5 mo^[16]。与本组已伴肝门胆管侵犯导致梗阻性黄疸的患者接受了相对应治疗方法后的结果相近似(16 mo \pm 6.1 mo vs 6 mo \pm 1.1 mo vs 2 mo \pm 0.45 mo)。另外, 我们还发现本组随访期内死亡的26例, 除1例肺转移外均死于肿瘤的局部复发或进展, 因而我们对行姑息性癌灶切除后胆肠吻合的患者与行PTBD或经内镜支架胆管引流的患者进行比较, 发现虽然中位生存期两组无统计学差异, 但前者的减黄效果和对营养的改善则显著优于后者。而且2例姑息性癌灶切除胆肠吻合术后接受了区域性外照射放疗的患者存活超过了1年, 且经影像学证实肝十二指肠韧带、腹腔干及胰头后的残余肿瘤无进展分别为6 mo和9 mo。故而对于此类患者, 若一般情况良好, 左右二级肝管扩张且胆肠吻合实施后左右肝胆道均能得到通畅引流者仅行姑息性癌灶切除亦有望能提高生存质量, 使患者有信心和条件接受综合性辅助治疗, 但放化疗等辅助性治疗的确切价值尚未见报道, 需进一步收集病例和多中心研究来探讨。

总之, 我们认为是否存在肝门部胆管侵犯所致的梗阻性黄疸并不是进展期胆囊癌能否行手术治疗的决定因素, 对于病变局部条件和全身情况尚好的肝门胆管受侵伴梗阻性黄疸的患者行扩大根治术能改善其预后, 延长生存时间。对于严格选择的病例即使仅行胆囊及肝方叶癌灶切除胆肠吻合亦能较仅行胆道引流的患者在有限的生存期内较好的改善生活质量, 并为进一步综合治疗创造了条件。

4 参考文献

- 1 Kumar S, Masood N, Shaikh AJ, Valimhammad

■同行评价

本文具有一定的临床借鉴意义,但新颖性一般。

- AT, Haider G, Lal A, Niamatullah N. Clinical presentation and outcomes of patients with biliary malignancies: the Aga Khan University experience. *Asian Pac J Cancer Prev* 2009; 10: 463-466
- 2 Klebl F, Endlicher E, Kullmann F. [Palliative therapy in cholangio- and gallbladder carcinoma]. *Z Gastroenterol* 2006; 44: 587-598
- 3 李江, 刘斌, 侯宇, 高华斌, 蔡晓蓓. 肝门部胆管癌53例手术治疗分析. *中华外科杂志* 2009; 47: 1142-1144
- 4 Lin HT, Liu GJ, Wu D, Lou JY. Metastasis of primary gallbladder carcinoma in lymph node and liver. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 748-751
- 5 Xu LN, Zou SQ. A clinicopathological analysis in unsuspected gallbladder carcinoma: a report of 23 cases. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 1857-1860; discussion 1857-1860
- 6 You DD, Lee HG, Paik KY, Heo JS, Choi SH, Choi DW. What is an adequate extent of resection for T1 gallbladder cancers? *Ann Surg* 2008; 247: 835-838
- 7 Kohya N, Miyazaki K. Hepatectomy of segment 4a and 5 combined with extra-hepatic bile duct resection for T2 and T3 gallbladder carcinoma. *J Surg Oncol* 2008; 97: 498-502
- 8 Löhe F, Meimarakis G, Schauer C, Angele M, Jauch KW, Schauer RJ. The time of diagnosis impacts surgical management but not the outcome of patients with gallbladder carcinoma. *Eur J Med Res* 2009; 14: 345-351
- 9 Kohya N, Kitahara K, Miyazaki K. Rational therapeutic strategy for T2 gallbladder carcinoma based on tumor spread. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 3567-3572
- 10 Wakabayashi H, Ishimura K, Hashimoto N, Otani T, Kondo A, Maeta H. Analysis of prognostic factors after surgery for stage III and IV gallbladder cancer. *Eur J Surg Oncol* 2004; 30: 842-846
- 11 Qin TJ, Zhao XH, Yun J, Zhang LX, Ruan ZP, Pan BR. Efficacy and safety of gemcitabine-oxaliplatin combined with huachansu in patients with advanced gallbladder carcinoma. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 5210-5216
- 12 Nagahashi M, Ajioka Y, Lang I, Szentirmay Z, Kasler M, Nakadaira H, Yokoyama N, Watanabe G, Nishikura K, Wakai T, Shirai Y, Hatakeyama K, Yamamoto M. Genetic changes of p53, K-ras, and microsatellite instability in gallbladder carcinoma in high-incidence areas of Japan and Hungary. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 70-75
- 13 谈臻, 孟海萍, 吴斌全, 吴浩荣. RKIP在胆囊癌中的表达及临床意义. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 2518-2521
- 14 智迎辉, 宋茂民, 龙锦, 郭仁宣. P-gp、GST- π 和P53在胆囊癌中的表达及意义. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 3752-3755
- 15 Chan SY, Poon RT, Lo CM, Ng KK, Fan ST. Management of carcinoma of the gallbladder: a single-institution experience in 16 years. *J Surg Oncol* 2008; 97: 156-164
- 16 杨培, 庄文, 严律南, 李波, 智星, 姚辉华. 原发性胆囊癌的外科诊治(附182例分析). *华西医学* 2004; 19: 22-24

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011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)

妊娠期急性胰腺炎20例

赵连武, 于红刚, 沈磊

赵连武, 于红刚, 沈磊, 武汉大学人民医院消化内科 湖北省武汉市 430060

作者贡献分布: 文章撰写和分析主要由赵连武完成; 于红刚与沈磊审阅。

通讯作者: 于红刚, 教授, 430060, 湖北省武汉市解放路238号, 武汉大学人民医院消化内科. yuhonggang@yahoo.com

收稿日期: 2011-03-02 修回日期: 2011-03-30

接受日期: 2011-04-11 在线出版日期: 2011-04-28

Acute pancreatitis in pregnancy: an analysis of 20 cases

Lian-Wu Zhao, Hong-Gang Yu, Lei Shen

Lian-Wu Zhao, Hong-Gang Yu, Lei Shen, Department of Gastroenterology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei Province, China.

Correspondence to: Professor Hong-Gang Yu, Department of Gastroenterology, Renmin Hospital of Wuhan University, 238 Jiefang Road, Wuhan 430060, Hubei Province, China. yuhonggang@yahoo.com

Received: 2011-03-02 Revised: 2011-03-30

Accepted: 2011-04-11 Published online: 2011-04-28

Abstract

AIM: To explore the clinical features and management of acute pancreatitis in pregnancy (APIP).

METHODS: The clinical data for 20 patients with APIP who were treated at the People's Hospital of Wuhan University from April 2004 to January 2011 were retrospectively reviewed.

RESULTS: Of 20 patients with APIP, 2 were diagnosed in the second trimester, 17 in the third trimester, and 1 in the postpartum period; 3 (15%) received emergency operation, in which clearance of necrotic tissue in the pancreas and abdominal cavity drainage were performed after uterine-incision delivery; 11 (55%, all >33 weeks of pregnancy) received uterine-incision delivery; 5 (25%) were discharged in a stable condition; 19 (95%) recovered, and 1 (5%) died of multiple organ dysfunction syndrome (MODS); 14 (70%) terminated pregnancy, and 5 (25%) continued the pregnancy; 2 had pre-admission fetal death in utero.

CONCLUSION: APIP often occurs in the mid-

dle and late pregnancy. Conservative medical therapy is usually recommended first for APIP. Individualized therapy and termination of pregnancy may be beneficial to maternal and neonatal safety in some cases.

Key Words: Acute pancreatitis in pregnancy; Clinical feature; Treatment

Zhao LW, Yu HG, Shen L. Acute pancreatitis in pregnancy: an analysis of 20 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(12): 1311-1313

摘要

目的: 探讨妊娠期急性胰腺炎(acute pancreatitis in pregnancy, APIP)临床特征及治疗经验。

方法: 回顾性分析武汉大学人民医院于2004-04/2011-01收治20例APIP患者的临床资料。

结果: 20例APIP患者中, 2例发病于孕中期, 17例发病于孕晚期, 1例发病于分娩后。3例(15%)行急诊剖宫术加坏死胰腺清除、胰腺引流。11例(55%, 孕周均>33 wk)行剖宫产分娩。5例(25%)病情稳定后出院。孕妇治愈19例(95%), 死亡1例(5%), 死因为多器官功能障碍综合征。终止妊娠14例, 继续妊娠5例, 胎儿死亡共2例(10%), 均为入院时胎死宫内; 新生儿无死亡, 未见畸形。

结论: 妊娠中晚期容易诱发急性胰腺炎。治疗上以积极非手术治疗为主, 遵循个体化治疗原则, 适时终止妊娠(剖宫术为首选)有利于母婴的安全。

关键词: 妊娠期急性胰腺炎; 临床特征; 治疗

赵连武, 于红刚, 沈磊. 妊娠期急性胰腺炎20例. 世界华人消化杂志 2011; 19(12): 1311-1313

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/1311.asp>

0 引言

妊娠期急性胰腺炎(acute pancreatitis in pregnancy, APIP)是一种严重的妊娠合并症, 临床较少见, 其发病率约为1/1 000-1/5 000^[1], 且有逐年

■背景资料

妊娠期急性胰腺炎(APIP)是一种发病率较少的疾病, 如果存在胆道系统疾病及高三酰甘油血症可以增加其发病的几率。由于妊娠时孕妇解剖和生理改变, 加上胎儿因素的存在, 增加了诊疗的困难。并且未见明确的诊疗指南, 在临床中, 常因经验欠缺, 致母婴死亡。

■同行评议者

周国雄, 主任医师, 南通大学附属医院消化内科

■创新盘点

本文主要根据病例诊疗特点, 提出作者的观点, 根据母婴的一般情况当机立断行急诊手术治疗, 适时终止妊娠, 对于减少母婴死亡率有一定的意义。

增加的趋势。该病较为特殊, 如果诊治不及时, 可威胁母婴的生命。因此研究其临床特点及诊治具有重要的意义。

1 材料和方法

1.1 材料 2004-04/2011-01武汉大学人民医院共收治APIP患者20例。年龄(26.8 ± 5.34)岁。初产妇7例, 经产妇13例, 均为单胎妊娠。孕中期(孕周均为28 wk)2例, 孕晚期17例(孕周 $35.5 \text{ wk} \pm 2.2 \text{ wk}$), 分娩后1例。根据美国亚特兰大标准^[2], 其中轻症急性胰腺炎13例, 重症急性胰腺炎7例。胆源性11例, 高脂血症性7例, 不明原因2例。APACHE II评分 ≥ 8 分7例($11.4 \text{ 分} \pm 2.6 \text{ 分}$)。5例发病前进食油腻食物。3例肾功能不全。3例孕期发现胆囊结石, 其中2例孕期有胆囊结石诱发胆囊炎病史。1例于前次妊娠有急性轻症胆源性胰腺炎病史。20例患者中20例急性起病, 19例持续上腹痛, 8例疼痛向腰背部放射, 14例伴有恶心、呕吐, 3例伴有胸闷、呼吸困难, 5例伴有少尿, 4例发热, 1例体温下降(35.0°C), 20例上腹压痛, 2例有下腹压痛, 8例上腹反跳痛, 3例巩膜黄染。

1.2 方法

1.2.1 实验室检查: 20例血淀粉酶升高($1\,270.5 \text{ U/L} \pm 973.9 \text{ U/L}$)。16例血白细胞升高($14.6 \pm 5.7 \times 10^9/\text{L}$, 其中3例 $>20 \times 10^9/\text{L}$)。9例总胆红素升高($45.2 \text{ mmol/L} \pm 46.4 \text{ mmol/L}$), 其中4例 $>34.2 \text{ mmol/L}$; 11例肝酶升高, 其中谷丙转氨酶为 $110.5 \text{ U/L} \pm 76.1 \text{ U/L}$, 谷草转氨酶为 $89.3 \text{ U/L} \pm 59.0 \text{ U/L}$ 。10例血三酰甘油($9.72 \text{ mmol/L} \pm 5.89 \text{ mmol/L}$)、胆固醇($10.74 \text{ mmol/L} \pm 4.47 \text{ mmol/L}$)升高。10例血钙降低($1.97 \text{ mmol/L} \pm 0.16 \text{ mmol/L}$)。6例血糖升高($11.3 \text{ mmol/L} \pm 4.4 \text{ mmol/L}$); 1例血糖降低(2.9 mmol/L), 病情好转后血糖均恢复正常。

1.2.2 影像学检查: 入院后均行腹部B超检查, 发现17例胰腺体积增大, 其中7例胰腺边缘模糊、周围有积液。1例胰腺假性囊肿形成。4例胆囊结石, 其中1例合并胆总管结石。5例胆囊增大。5例胆汁淤积。5例腹腔积液, 其中2例合并胸腔积液。2例脂肪肝。5例行腹部CT平扫, 均征求患者同意, 5例胰腺均增大, 其中2例胰腺周围渗出较多, 1例胰腺假性囊肿。

1.2.3 治疗: 20例患者均给予禁食、抗感染、抑酸、补液纠正水电解质紊乱。对于呕吐剧烈的6例患者均给予胃肠减压; 对于病程较长病情较重的2例患者予鼻空肠管肠内营养。7例重症APIP中, 1例积极内科抢救; 3例行急诊剖宫术加

胰腺坏死组织清除并切开引流; 3例择期行剖宫术终止妊娠。13例轻症APIP中, 剖宫术终止妊娠7例。7例高脂血症患者均低脂摄入, 1例急诊手术, 5例终止妊娠, 3例予肝素、胰岛素(增加脂蛋白活性)治疗。11例胆源性APIP中, 1例急诊术后7 d, 行ERCP胆总管取石。

2 结果

7例重症APIP中, 1例并发多器官功能障碍综合征抢救无效当天死亡, 2例胎死宫内。13例轻症APIP中, 无孕妇死亡, 胎儿均成活(3例经新生儿病房监护), 5例(含2例病因未明患者)未在住院期间分娩, 病情稳定后出院, 出院前B超提示胎儿一般情况良好。7例高脂血症APIP中, 4例于终止妊娠后血脂下降较快。11例胆源性APIP中, 1例急诊手术后较快恢复, 3例明确为胆囊结石患者均于分娩后择期行腹腔镜胆囊切除术。

3 讨论

APIP可发生于妊娠的各期及产褥期, 但多见于妊娠中晚期^[3], 本组孕中期2例(10%), 孕晚期17例(85%), 分娩后1例(5%)。病因以胆源性(11例55%)和高脂血症(7例35%)为主。APIP较急性胰腺炎有其独特的因素: (1)血中孕酮增加可使胆管的张力减低, 胆囊收缩力减弱; (2)胆汁酸、胆固醇分泌亦增多; (3)中晚期, 增大的子宫压迫胆道系统, 胆管及胰管阻力随之增加, 胆汁淤积, 小的结石易形成。有报道指出, 胆泥和胆石形成与反复多次怀孕有密切关系^[3]; (4)为保证胎儿营养, 往往摄入过多的高脂、高蛋白食物, 且孕期雌激素、孕激素、胎盘催乳素等可使胆固醇、三酰甘油升高2-3倍^[4], 而高的三酰甘油血症可引起胰腺细胞的急性脂肪浸润, 同时胰腺的微循环障碍也可使脂肪栓塞形成而损伤胰腺^[5]。因此如合并有胆石症或平时血脂较高, 则出现胰腺炎的几率将更高。

APIP的临床表现不典型, 且X线、CT等的运用很慎重, 易误诊, 本组就有2例患者入院时因下腹压痛误诊为急性阑尾炎。B超、MRI、MRCP对于胆管的结石的诊断具有较高的敏感性, 且对胎儿无致畸作用。若B超或肝酶、胆红素等生化指标异常疑有胆管结石时, 超声内镜(endoscopic ultrasonography, EUS)可作为一种半侵入性的精确诊断手段^[6]。Lee等^[7]也认为EUS对于胆总管结石的预测性接近100%, 但EUS需静脉镇静, 可能影响胎儿。本组以临床表现, 血淀粉酶、脂肪酶, B超等为主要诊断手段, 对于2例

重症及3例不能明确诊断APIP的患者, 在患者允许下行CT检查以进一步明确病情。

APIP应遵循“个体化治疗”原则^[8], 根据病因、病期及母婴的一般情况制定治疗方案。APIP的保守治疗主要有禁食、补液、抑酸、抑酶、纠正水电解质紊乱、胃肠减压、器官功能维持等。对于24 h积极的非手术治疗病情缓解不明显、高热伴弥漫性腹膜炎白细胞较高($>20 \times 10^9/L$)、部分器官功能不全的患者可考虑行急诊手术^[9], 本组3例急诊手术患者, 无孕妇死亡, 娩出2例新生儿经新生儿病房监护后均成活。适时剖宫产终止妊娠对于母婴安全具有一定的意义: (1)APIP产生炎症因子等可通过胎盘屏障影响胎儿生长, 引起早产、宫内窘迫、胎死宫内等; (2)药物以及一些操作选择性更大; (3)去除胎儿对胆胰管的压迫, 减轻孕妇的负担, 有报道显示, 终止妊娠后, 胆囊及胆管的一些泥沙及细小的结石可能消失^[10,11]; (4)充分暴露胰腺视野, 可根据胰腺、胆道所见情况给予相应的外科处理; (5)较自然分娩产程短, 孕妇消耗小。本组行剖宫产终止妊娠具有如下特点: 孕周均 ≥ 33 wk(除1例胎死宫内伴肾功能不全为31 wk外); 胎儿宫内窘迫或胎死宫内; 胎儿足月; 存在胰腺假性囊肿等并发症。本组适时剖宫终止妊娠后, 母婴预后均良好。另外, Iskandar等^[12]主张用血液透析联合血浆置换治疗重症高脂血症APIP; 对于胆总管结石、胆管炎等诱发的APIP, 行ERCP治疗存在争议, 但有报道称, 在超声内镜或少量X线下行ERCP胆管引流及取石, 或胆管支架植入, 待分娩后再取出支架, 对于母婴是安全的^[13-15]。

总之, 对于有胆道系统疾病及高脂血症病史的妇女, 应于治愈或明显好转后妊娠, 减少APIP的发生。掌握APIP的临床特点, 早期诊断, 明确病因。治疗上以保证孕妇安全为首, 同时兼顾胎儿, 非手术治疗为主, 适时(剖宫术为首选)终止妊娠。对病情较重患者, 果断行手术治疗。

4 参考文献

1 Terzhumanov R, Uchikov A, Uchikova E, Milchev

- H, Dimov R, Stefanov Ch. [Acute pancreatitis and pregnancy--analysis of a 10 year period of time]. *Akush Ginekol (Sofia)* 2004; 43: 9-12
- 2 Bollen TL, van Santvoort HC, Besselink MG, van Leeuwen MS, Horvath KD, Freeny PC, Gooszen HG; Dutch Acute Pancreatitis Study Group. The Atlanta Classification of acute pancreatitis revisited. *Br J Surg* 2008; 95: 6-21
- 3 Pandey M, Shukla VK. Lifestyle, parity, menstrual and reproductive factors and risk of gallbladder cancer. *Eur J Cancer Prev* 2003; 12: 269-272
- 4 Athyros VG, Giouleme OI, Nikolaidis NL, Vasiliadis TV, Bouloukos VI, Kontopoulos AG, Eugenidis NP. Long-term follow-up of patients with acute hypertriglyceridemia-induced pancreatitis. *J Clin Gastroenterol* 2002; 34: 472-475
- 5 Ohmoto K, Neishi Y, Miyake I, Yamamoto S. Severe acute pancreatitis associated with hyperlipidemia: report of two cases and review of the literature in Japan. *Hepatogastroenterology* 1999; 46: 2986-2990
- 6 Yusuf TE, Bhutani MS. Role of endoscopic ultrasonography in diseases of the extrahepatic biliary system. *J Gastroenterol Hepatol* 2004; 19: 243-250
- 7 Lee YT, Chan FK, Leung WK, Chan HL, Wu JC, Yung MY, Ng EK, Lau JY, Sung JJ. Comparison of EUS and ERCP in the investigation with suspected biliary obstruction caused by choledocholithiasis: a randomized study. *Gastrointest Endosc* 2008; 67: 660-668
- 8 Ramin KD, Ramsey PS. Disease of the gallbladder and pancreas in pregnancy. *Obstet Gynecol Clin North Am* 2001; 28: 571-580
- 9 徐进, 卜献民, 戴显伟. 妊娠中晚期伴急性胰腺炎治疗23例. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 548-550
- 10 Burtin P, Taddio A, Ariburnu O, Einarson TR, Koren G. Safety of metronidazole in pregnancy: a meta-analysis. *Am J Obstet Gynecol* 1995; 172 (2 Pt 1): 525-529
- 11 Mayer AD, McMahon MJ, Benson EA, Axon AT. Operations upon the biliary tract in patients with acute pancreatitis: aims, indications and timing. *Ann R Coll Surg Engl* 1984; 66: 179-183
- 12 Iskandar SB, Olive KE. Plasmapheresis as an adjuvant therapy for hypertriglyceridemia-induced pancreatitis. *Am J Med Sci* 2004; 328: 290-294
- 13 Kahaleh M, Hartwell GD, Arseneau KO, Pajewski TN, Mullick T, Isin G, Agarwal S, Yeaton P. Safety and efficacy of ERCP in pregnancy. *Gastrointest Endosc* 2004; 60: 287-292
- 14 Tang SJ, Mayo MJ, Rodriguez-Frias E, Armstrong L, Tang L, Sreenarasimhaiah J, Lara LF, Rockey DC. Safety and utility of ERCP during pregnancy. *Gastrointest Endosc* 2009; 69 (3 Pt 1): 453-461
- 15 Farca A, Aguilar ME, Rodriguez G, de la Mora G, Arango L. Biliary stents as temporary treatment for choledocholithiasis in pregnant patients. *Gastrointest Endosc* 1997; 46: 99-101

■同行评价

本文对临床妊娠期急性胰腺炎的诊断与治疗有一定指导价值。

编辑 李薇 电编 何基才