

siRNA沉默Bmi-1基因对人肝癌细胞株MHCC97-H侵袭迁移能力的影响

李小磊, 宋文杰, 陈战, 陈亚峰, 李霄, 周亮, 张福琴, 窦科峰

李小磊, 宋文杰, 陈战, 陈亚峰, 李霄, 周亮, 张福琴, 窦科峰, 中国人民解放军第四军医大学西京医院肝胆胰脾外科 陕西省西安市 710032

李小磊, 在读硕士, 主要从事肝癌侵袭转移分子机制的研究。

作者贡献分布: 李小磊与宋文杰对此文所作贡献均等; 此课题由李小磊、宋文杰、窦科峰及张福琴设计; 研究过程由李小磊、陈战及陈亚峰操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由窦科峰提供; 数据分析由李小磊完成; 本论文写作由李小磊、李霄及周亮完成。通讯作者: 窦科峰, 教授, 主任医师, 710032, 陕西省西安市, 中国人民解放军第四军医大学西京医院肝胆胰脾外科。

gdwkgwx@fmmu.edu.cn

电话: 029-84775259

收稿日期: 2011-09-23 修回日期: 2011-10-28

接受日期: 2011-11-04 在线出版日期: 2011-12-28

SiRNA-mediated silencing of the Bmi-1 gene inhibits cell invasion and metastasis in human hepatocellular carcinoma cell line MHCC97-H

Xiao-Lei Li, Wen-Jie Song, Zhan Chen, Ya-Feng Chen, Xiao Li, Liang Zhou, Fu-Qin Zhang, Ke-Feng Dou

Xiao-Lei Li, Wen-Jie Song, Zhan Chen, Ya-Feng Chen, Xiao Li, Liang Zhou, Fu-Qin Zhang, Ke-Feng Dou, Department of Hepatobiliary, Pancreatic and Splenic Surgery, Xijing Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China

Correspondence to: Ke-Feng Dou, Professor, Department of Hepatobiliary, Pancreatic and Splenic Surgery, Xijing Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China. gdwkgwx@fmmu.edu.cn

Received: 2011-09-23 Revised: 2011-10-28

Accepted: 2011-11-04 Published online: 2011-12-28

Abstract

AIM: To investigate the effect of small interference RNA (siRNA)-mediated silencing of the Bmi-1 gene on cell invasion and metastasis in human hepatocellular carcinoma cell line MHCC97-H.

METHODS: Chemically synthesized siRNA duplex targeting the Bmi-1 gene (Bmi-1-siRNA) was transiently transfected into MHCC97-H cells, which have high metastatic potential, using Lipofectamine 2000. Transfection efficiency was evaluated by flow cytometry (FCM). Bmi-1 mRNA and protein expression was detected by

real-time RT-PCR and Western blot, respectively. The effect of Bmi-1 knockdown on cell invasion and migration was analyzed by Transwell chamber assays.

RESULTS: The transfection efficiency achieved using Bmi-1-siRNA was 91%. Compared to the blank group and control siRNA group, transfection with Bmi-1-siRNA effectively down-regulated the expression of Bmi-1 mRNA ($F = 56.199$, $P < 0.05$) and protein. Bmi-1-siRNA-transfected MHCC97-H cells had lower levels of invasion and migration capacity than cells in the blank group and control-siRNA group ($F = 186.66$, 12.746 , both $P < 0.05$).

CONCLUSION: SiRNA-mediated silencing of the Bmi-1 gene could significantly inhibit cell invasion and metastasis in human hepatocellular carcinoma cell line MHCC97-H.

Key Words: RNA interference; Liver neoplasms; Bmi-1; Invasion; Metastasis

Li XL, Song WJ, Chen Z, Chen YF, Li X, Zhou L, Zhang FQ, Dou KF. SiRNA-mediated silencing of the Bmi-1 gene inhibits cell invasion and metastasis in human hepatocellular carcinoma cell line MHCC97-H. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(36): 3643-3648

摘要

目的: 探讨RNA干扰技术沉默Bmi-1基因表达后, 对人肝癌细胞株MHCC97-H侵袭迁移能力的影响。

方法: 设计并合成针对Bmi-1基因序列特异性的双链小干扰RNA(Bmi-1-siRNA), 转染高转移性人肝癌细胞株MHCC97-H, 用流式细胞仪观察转染效率, 荧光实时定量PCR和Western blot检测Bmi-1基因的mRNA和蛋白表达水平; 通过体外Transwell小室基质侵袭和迁移实验, 观察Bmi-1表达沉默后对人肝癌细胞株MHCC97-H侵袭和迁移能力的影响。

结果: 将针对Bmi-1基因序列特异性的小干扰

■背景资料

肝癌的侵袭转移是肝癌患者术后死亡的重要原因之一。阐明肝癌侵袭转移的分子机制并发现重要的防治靶点具有重要的理论和实践意义。RNA干扰(RNAi)技术能针对目的基因表达进行高效、特异性的阻断, 因其简便、快速、经济, 目前已成为探寻肿瘤相关基因功能的一个重要方法。

■同行评议者

李淑德, 主任医师, 教授, 中国人民解放军第二军医大学长海医院消化内科

■研究前沿

RNAi最直接的应用就是利用其特异性降解靶基因mRNA的特点,从而进行基因表达缺失的功能研究。Bmi-1的高表达与乳腺癌、肺癌、胰腺癌等多种肿瘤的发生发展关系密切。

RNA(Bmi-1-siRNA)转染高转移性人肝癌细胞株MHCC97-H后,流式细胞仪显示,转染效率可达到91%。与空白组、对照siRNA组相比,实验组Bmi-1-siRNA能有效抑制MHCC97-H细胞中Bmi-1基因的mRNA($F = 56.199, P < 0.05$)和蛋白表达水平。通过Transwell小室基质侵袭和迁移实验,我们分析了不同组细胞的侵袭迁移能力。结果发现,与空白组、对照siRNA组相比,Bmi-1-siRNA转染的MHCC97-H细胞穿透能力明显降低($F = 186.66, 12.746, P < 0.05$)。

结论: 沉默Bmi-1基因表达可抑制肝癌细胞株MHCC97-H的侵袭迁移力。

关键词: RNA干扰; 肝肿瘤; Bmi-1; 侵袭; 转移

李小磊, 宋文杰, 陈战, 陈亚峰, 李霄, 周亮, 张福琴, 窦科峰. siRNA沉默Bmi-1基因对人肝癌细胞株MHCC97-H侵袭迁移能力的影响. 世界华人消化杂志 2011; 19(36): 3643-3648
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/3643.asp>

0 引言

Bmi-1基因(B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog, Bmi-1)是荷兰癌症中心1991年发现的原癌基因,他与*c-myc*基因协同导致小鼠淋巴瘤的发生^[1]。他是一种广泛表达的核蛋白,直接参与细胞生长、增殖和衰老的调节,其适量表达也是胚胎正常发育和多种成体干细胞自我更新所必需的^[2,3]。近来,大量研究证实Bmi-1的高表达与多种肿瘤的发生发展关系密切,如乳腺癌^[4]、肺癌^[5]、胰腺癌^[6]等。一些研究也表明Bmi-1在原发性肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)中高表达^[7-9],但其在肝癌发生发展中的作用却有较大的争议。Effendi等^[10]的研究表明Bmi-1主要表达在早期和高分化肝癌中,Bmi-1的表达与肝癌的恶性进展无关。而Sasaki等^[11]的研究表明Bmi-1主要表达在低分化肝癌中,Bmi-1的表达与肝癌的病理分级和肿瘤细胞增殖、血管侵犯行为密切相关。两者的研究结果相互矛盾。为了研究Bmi-1是否与肝癌的侵袭迁移行为相关,本研究采用RNA干扰技术抑制高转移性肝癌细胞株MHCC97-H中Bmi-1的表达,观察下调Bmi-1表达后,MHCC97-H细胞侵袭和迁移能力的变化,来探讨Bmi-1在肝癌侵袭迁移中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料 人肝癌细胞株MHCC97-H由本实验室保存。DMEM高糖培养基购自Gibco公司。

TRIzol、脂质体转染试剂LipofectamineTM2000购自美国Invitrogen公司。逆转录试剂盒及Real-Time PCR扩增试剂盒购自TaKaRa公司。Negative control、FAM-siRNA购自上海吉玛生物有限公司。Bmi-1和GAPDH引物由生工生物(上海)有限公司合成。小鼠抗人Bmi-1抗体购自Abcam公司,小鼠抗人GAPDH抗体购自Santa Cruz公司。Transwell小室购自Millipore公司,Matrigel胶购自美国BD公司。

1.2 方法

1.2.1 siRNA的合成: 上海吉玛生物有限公司化学合成3条针对Bmi-1序列的siRNA,我们从中筛选出一条有效的siRNA序列,正义链: 5'-CCAGACCACUACUGAAUAUTT-3',反义链: 5'-AUAUUCAGUAGUGGUCUGGTT-3'。干粉siRNA用Free-Rnase水稀释,浓度为20 $\mu\text{mol/L}$ 。

1.2.2 细胞培养及siRNA瞬时转染: 肝癌细胞株MHCC97-H在含100 mL/L胎牛血清的高糖DMEM培养基(含青霉素100 U/mL,链霉素100 $\mu\text{g/mL}$); 37 $^{\circ}\text{C}$ 、50 mL/L CO_2 、饱和湿度环境的条件下连续培养。转染前24 h,取对数生长期的细胞胰酶消化、计数,接种于6孔板,每孔细胞数为 1.5×10^5 个,使细胞密度达到60%。转染方法按照LipofectamineTM2000说明书进行操作。将细胞分3组: (1)空白组(只加LipofectamineTM2000); (2)阴性对照组(转染时加入非特异性siRNA/LipofectamineTM2000复合物); (3)实验组(转染时加入Bmi-1特异性siRNA/Lipofectamine 2000复合物)。

1.2.3 荧光实时定量PCR: 细胞转染24 h后收集细胞,按TRIzol说明书操作提取细胞总RNA,按逆转录试剂盒说明书进行逆转录反应,用于扩增人Bmi-1cDNA的引物序列上游为: 5'-GCTTCAA-GATGGCCGCTTG-3',下游引物序列: 5'-TTCTC-GTTGTTCGATGCATTTC-3',扩增片段长度144 bp; 以人GAPDH为内参照,上游引物序列为: 5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3',下游引物序列为: 5'-TGGTGAAGACGCCAGTGA-3',扩增片段长度138 bp。扩增条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性3 min,然后40个循环(95 $^{\circ}\text{C}$ 变性10 s, 59 $^{\circ}\text{C}$ 退火30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸30 s), 40个循环结束后建立熔解曲线。实验结果采用公式 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 计算。

1.2.4 Western blot: 转染后72 h,用RIPA和蛋白酶抑制剂PMSF提取各组细胞总蛋白。BCA法检测蛋白浓度。取40 μg /道蛋白质样品上样,经10% SDS-PAGE电泳后,蛋白从凝胶中转移到PVDF

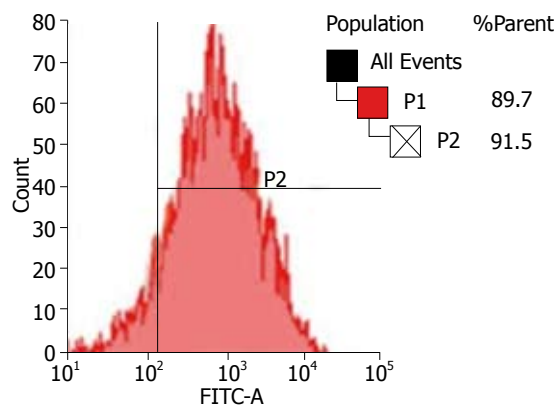
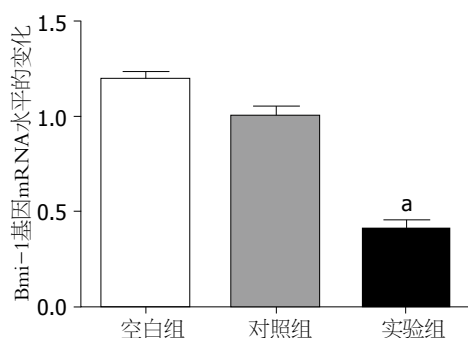


图1 siRNA转染对MHCC97-H细胞的转染效率.

图2 siRNA转染对MHCC97-H细胞Bmi-1基因mRNA的影响. $P < 0.05$ vs 空白组和对照组.

膜上, 含5%脱脂奶粉的TBST 封闭1 h. 加入小鼠抗人Bmi-1单克隆抗体(1:500稀释)和小鼠抗人GAPDH单克隆抗体(1:500稀释), 4℃孵育过夜, TBST漂洗3次, 每次10 min, 加入HRP标记的羊抗鼠二抗(1:5000稀释)室温孵育2 h, ECL显影检测.

1.2.5 细胞侵袭实验: 采用孔径为8 μm 的24孔millicell小室进行试验. 用无血清DMEM培养基稀释Matrigel胶(稀释比例8:1), 按50 μL /孔均匀地铺在millicell小室膜上. 37℃孵育1 h. 收集转染48 h后的各组细胞, 用无血清DMEM培养液调整密度为 $1 \times 10^5/\text{mL}$, 取其中200 μL 接种到上室中, 将小室置于加有600 μL 含20%胎牛血清DMEM培养液的24孔板内, 37℃、50 mL/L CO_2 , 孵育36 h后取出小室, 小心擦掉上室细胞, PBS洗3次, 950 mL/L乙醇固定, 结晶紫染色, 显微镜下计数5个视野穿过微孔的细胞数, 取其均值, 每组3个小室.

1.2.6 细胞迁移实验: 迁移实验不铺Matrigel胶, 孵育12 h后取出小室, 其余步骤同侵袭实验.

统计学处理 采用SPSS13.0统计软件分析, 计量资料以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示, 两组均数比较采用 t 检验, 多组均数比较采用单因素方差分析. 取

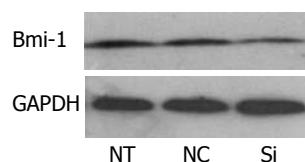
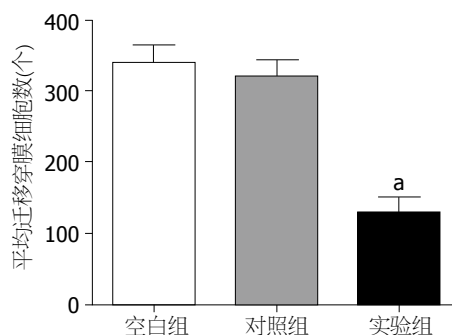


图3 siRNA转染对MHCC97-H细胞Bmi-1基因蛋白水平的影响. NT: 空白组; NC: 对照组; Si: 实验组.

图4 siRNA转染对MHCC97-H细胞迁移能力的影响. $^*P < 0.05$ vs 空白组和对照组.

$P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 siRNA转染细胞条件筛选及转染效率的评价 用FAM-siRNA转染MHCC97-H细胞, 在6孔板中选取细胞密度为40%-70%, siRNA浓度为100-200 pmol/L为初步预实验条件. 结果发现, 在细胞融合度达到60%, siRNA浓度为200 pmol/L时有最佳的转染效率. 流式细胞仪显示, 有绿色荧光的细胞达91%以上(图1).

2.2 siRNA转染MHCC97-H细胞后, Bmi-1 mRNA和蛋白水平的变化 与空白组、阴性对照组相比, 实验组Bmi-1基因的mRNA($F = 56.199$, $P < 0.05$)和蛋白明显下调, 而空白组、阴性对照组无明显差异($P = 0.055$, 图2, 3). 说明Bmi-1基因被沉默.

2.3 Bmi-1基因被干扰后, MHCC97-H细胞迁移能力的变化 转染48 h后, 计数实验组、阴性对照组、空白对照组穿过Transwell小室的细胞数, 并进行方差分析. 结果显示, 与空白组、阴性对照组相比, 实验组穿过Transwell小室的细胞数明显减少($F = 186.66$, $P < 0.05$), 而空白组、阴性对照组无明显差异($P = 0.47$). 说明Bmi-1基因被抑制后, 细胞运动迁移能力下降(图4, 5).

2.4 Bmi-1基因被干扰后, MHCC97-H细胞侵袭能力的变化 转染48 h后, 计数实验组、阴性对照组、空白对照组穿过人工基底膜的细胞数, 并进行方差分析. 结果显示, 与空白组、阴性对

■ 相关报道

Effendi等的研究表明Bmi-1主要表达在早期和高分化肝癌中, Bmi-1的表达与肝癌的恶性进展无关. 而Sasaki等的研究表明Bmi-1主要表达在低分化肝癌中, Bmi-1的表达与肝癌的病理分级和肿瘤细胞增殖、血管侵犯行为密切相关.

■创新盘点

本研究发现体外合成的siRNA可以有效降解肝癌细胞MHCC97-H中Bmi-1 mRNA和蛋白水平上的表达,为进一步研究Bmi-1在肝癌发生发展过程中的作用奠定了基础。

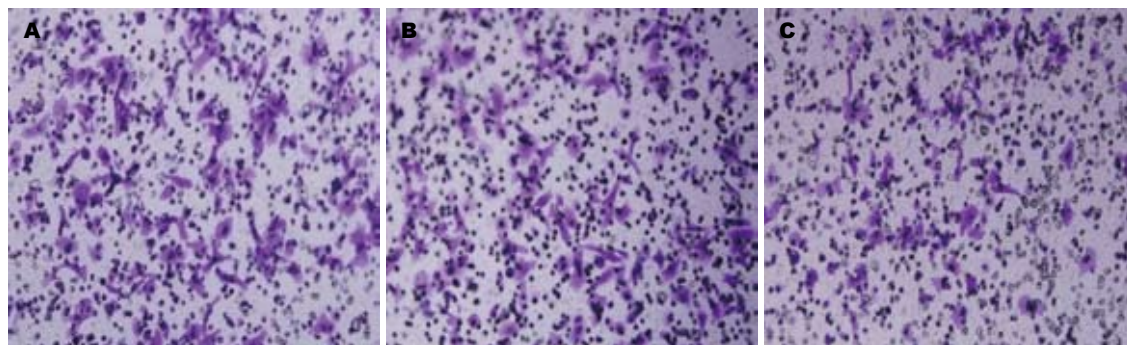


图5 siRNA转染对MHCC97-H细胞迁移能力的影响(结晶紫×200). A: 空白组; B: 对照组; C: 实验组.

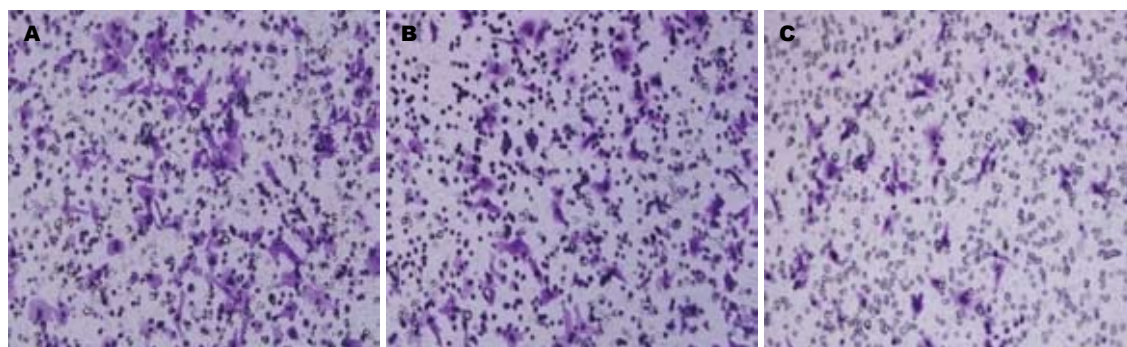


图6 siRNA转染对MHCC97-H细胞侵袭能力的影响(结晶紫×200). A: 空白组; B: 对照组; C: 实验组.

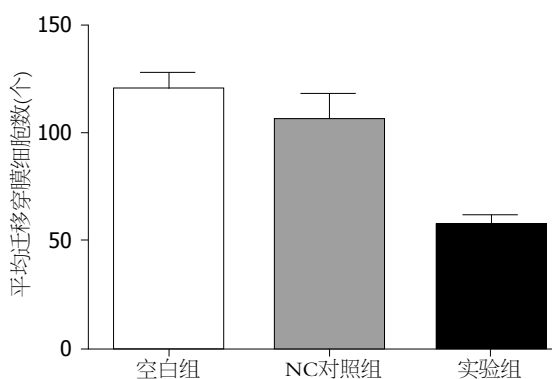


图7 siRNA转染对MHCC97-H细胞侵袭能力的影响。
* $P < 0.05$ vs 空白组和对照组.

照组性比, 实验组穿过的细胞数明显减少($F = 12.746$, $P < 0.05$), 而空白组、阴性对照组无明显差异($P = 0.124$). 说明Bmi-1基因被抑制后, 细胞运动侵袭能力下降(图6, 7).

3 讨论

肝癌是世界范围内发病率最高的恶性肿瘤之一, 每年新发病例约有100万人^[12]. 目前以手术切除为主的综合治疗是治疗原发性肝癌的主要方法, 但术后的5年复发率高达60%, 严重影响患者的长期生存. 虽然目前对肝癌的治疗有了很大的进步, 但对肝癌的复发转移的预防和治疗效果

仍十分有限, 原因在于我们对肝癌复发转移的分子机制不完全清楚, 因此研究肝癌复发转移的分子机制并采取有效的预防和治疗措施是目前医学界亟待解决的重大问题.

Bmi-1基因属于转录抑制因子多梳基因家族(polycomb group, PcG)成员之一, 位于染色体10p12的位置上, 通过形成多梳抑制复合体1(polycomb repressive complex 1, PRC1)对染色质进行修饰而抑制靶基因的表达. 正常情况下在胚胎和多种成体干细胞中均有表达, 在维持正常神经干细胞、造血干细胞、肠干细胞和乳腺干细胞的自我更新中具有决定性作用^[2,3], 其适量表达是个体发育所必需的.

研究证实, Bmi-1在多种肿瘤的恶性进展中发挥着重要作用, 如膀胱癌^[13]、前列腺癌^[14]、脑肿瘤^[15,16]、乳腺癌^[4]、肺癌^[5]和胰腺癌^[6]等是影响预后的重要因素. 众所周知, 肿瘤恶性进展是一个多因素、多步骤、多基因共同作用的综合病变结果, 涉及肿瘤细胞增殖、新生血管形成、细胞黏附、迁徙运动和凋亡等一系列过程. Bmi-1作为一个广泛表达的原癌基因是如何介导肿瘤的恶性进展? 目前研究表明: (1)Bmi-1直接或间接激活端粒末端转移酶活性, 使染色体端粒稳定维持在一定长度, 从而使细胞获得

凋亡抵抗并永生化, 导致细胞恶性转化^[17,18]; (2) 通过甲基化或乙酰化修饰染色质组蛋白H3上的9、27位赖氨酸, 稳定抑制抑癌基因CDKN2A (编码p16INK4a和p14ARF) 转录, 促进细胞周期进展, 导致肿瘤细胞无限扩增^[19]; (3) 介导多种肿瘤干细胞自我更新和扩增, 促进肿瘤的恶性进展^[3,20-22]; (4) 诱导上皮细胞发生间皮样表型转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT), 而EMT是恶性转化和肿瘤侵袭转移的早期重要标志^[23]; (5) 可以通过p16INK4a/p14ARF非依赖性途径, 如Akt、NF- κ B及Bcl-2等多个通路或分子, 直接或间接促进细胞恶性转化、凋亡抵抗、运动和新生血供生成, 利于肿瘤细胞的播散及在远端靶器官的增殖和生存^[24-28]。因此, Bmi-1通过直接或间接调控作用, 参与了细胞的永生、增殖、血管生成、运动及侵袭转移等和肿瘤恶性进展相关的诸多环节, 是阻断肿瘤恶性进展极具发展前景的重要分子靶点。

目前, 关于Bmi-1和肝癌发生发展关系的研究还不是很多, 但这些研究结果却存在较大的争议。Effendi等^[10]通过免疫组织化学方法检测Bmi-1蛋白在122例肝癌标本中的表达情况, 结果发现: Bmi-1蛋白在早期和高分化肝癌中高表达, 在晚期和低分化肝癌中低表达, 在癌旁组织中不表达。Bmi-1的表达与临床病理分级 (包括肿瘤大小、门静脉侵犯、肝外转移) 无关。对肝癌标本的实时定量PCR检测结果显示和上述结果相似。通过对5种肝癌细胞株进行实时定量PCR和Western blot分析发现, Bmi-1在这5种肝癌细胞株中高表达, 在分化程度最高的细胞株中表达最高。这些结果说明Bmi-1在早期肝癌发生中发挥着重要作用, 与肝癌恶性进展无关。而这些结果与Sasaki等^[11]的研究结果相矛盾。Sasaki等也采用免疫组织化学方法检测了Bmi-1蛋白在27例肝癌和14例癌前病变中表达情况, 结果发现, Bmi-1在低分化肝癌中高表达, 在高分化肝癌中低表达, 在癌前病变中未见表达。Bmi-1在伴有血管侵犯的肝癌中的表达明显高于无血管侵犯的肝癌中的表达。通过对肝癌标本中细胞周期蛋白A检测发现, Bmi-1与癌细胞的增殖能力相关。下调肝癌细胞株中Bmi-1的表达, 细胞的增殖能力下降。这些结果说明Bmi-1参与了癌前病变的恶性进展及肝癌细胞的增殖、血管侵犯等生物学行为。Glinsky等^[29]的研究表明Bmi-1的高表达与明显的转移倾向明显相关。

那么, Bmi-1是否与肝癌的侵袭转移等恶性

生物学行为相关呢? 为探讨这个问题, 本实验设计并合成了针对Bmi-1基因的siRNA, 将其转染入高转移能力的肝癌细胞株MHCC97-H中, 来研究下调Bmi-1的表达后是否可以减弱高转移性MHCC97-H的侵袭迁移能力。Transwell小室模型是研究肿瘤细胞侵袭迁移的经典体外实验方法, 他可以模拟肿瘤细胞降解局部细胞外基质和穿过基膜的侵袭迁移过程。荧光实时定量PCR和Western blot检测结果显示, Bmi-1在mRNA水平及蛋白水平被抑制, 说明通过siRNA转染可成功沉默Bmi-1。然后, 通过Transwell小室侵袭、迁移模型检验沉默Bmi-1后MHCC97-H细胞侵袭、迁移能力的变化, 结果发现, 与对照组相比, 下调Bmi-1基因后高转移的MHCC97-H细胞侵袭、迁移能力明显下降, 说明Bmi-1与肝癌的恶性生物学行为有关。

总之, 我们的研究说明Bmi-1在肝癌的侵袭迁移恶性生物学行为中有重要作用。下调Bmi-1的表达, 可以明显抑制肝癌细胞系MHCC97-H细胞的侵袭、迁移能力。但是, Bmi-1基因在肝癌中发生发展中的作用, 及其在侵袭迁移中的作用机制及调控网络尚需进一步的研究。我们相信这些研究将为临床治疗肝癌提供新的依据。

志谢 感谢兰海云、王黎硕士在本试验中给予的大力帮助。

4 参考文献

- 1 Haupt Y, Alexander WS, Barri G, Klinken SP, Adams JM. Novel zinc finger gene implicated as myc collaborator by retrovirally accelerated lymphomagenesis in E mu-myc transgenic mice. *Cell* 1991; 65: 753-763
- 2 Park IK, Morrison SJ, Clarke MF. Bmi1, stem cells, and senescence regulation. *J Clin Invest* 2004; 113: 175-179
- 3 Jiang L, Li J, Song L. Bmi-1, stem cells and cancer. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2009; 41: 527-534
- 4 Arnes JB, Collett K, Akslen LA. Independent prognostic value of the basal-like phenotype of breast cancer and associations with EGFR and candidate stem cell marker BMI-1. *Histopathology* 2008; 52: 370-380
- 5 Vrzalikova K, Skarda J, Ehrmann J, Murray PG, Fridman E, Kopolovic J, Knizetova P, Hajdich M, Klein J, Kolek V, Radova L, Kolar Z. Prognostic value of Bmi-1 oncoprotein expression in NSCLC patients: a tissue microarray study. *J Cancer Res Clin Oncol* 2008; 134: 1037-1042
- 6 Song W, Tao K, Li H, Jin C, Song Z, Li J, Shi H, Li X, Dang Z, Dou K. Bmi-1 is related to proliferation, survival and poor prognosis in pancreatic cancer. *Cancer Sci* 2010; 101: 1754-1760
- 7 Neo SY, Leow CK, Vega VB, Long PM, Islam AF, Lai PB, Liu ET, Ren EC. Identification of discrimina-

■应用要点

本研究发现体外合成的siRNA可以有效降解肝癌细胞MHCC97-H中Bmi-1 mRNA和蛋白水平上的表达, 可以降低肝癌细胞侵袭转移能力, 这为今后肝癌侵袭转移的治疗提供了新的靶点。

■同行评价

本文研究siRNA转染沉默Bmi-1基因对肝癌细胞侵袭转移能力的影响, 立题新颖, 所采用技术先进, 方法得当, 数据可信, 为肝癌的治疗提供了理论基础和指导意义。

- tors of hepatoma by gene expression profiling using a minimal dataset approach. *Hepatology* 2004; 39: 944-953
- 8 Ma S, Chan KW, Hu L, Lee TK, Wo JY, Ng IO, Zheng BJ, Guan XY. Identification and characterization of tumorigenic liver cancer stem/progenitor cells. *Gastroenterology* 2007; 132: 2542-2556
- 9 Wang H, Pan K, Zhang HK, Weng DS, Zhou J, Li JJ, Huang W, Song HF, Chen MS, Xia JC. Increased polycomb-group oncogene Bmi-1 expression correlates with poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2008; 134: 535-541
- 10 Effendi K, Mori T, Komuta M, Masugi Y, Du W, Sakamoto M. Bmi-1 gene is upregulated in early-stage hepatocellular carcinoma and correlates with ATP-binding cassette transporter B1 expression. *Cancer Sci* 2010; 101: 666-672
- 11 Sasaki M, Ikeda H, Itatsu K, Yamaguchi J, Sawada S, Minato H, Ohta T, Nakanuma Y. The overexpression of polycomb group proteins Bmi1 and EZH2 is associated with the progression and aggressive biological behavior of hepatocellular carcinoma. *Lab Invest* 2008; 88: 873-882
- 12 Ye QH, Qin LX, Forgues M, He P, Kim JW, Peng AC, Simon R, Li Y, Robles AI, Chen Y, Ma ZC, Wu ZQ, Ye SL, Liu YK, Tang ZY, Wang XW. Predicting hepatitis B virus-positive metastatic hepatocellular carcinomas using gene expression profiling and supervised machine learning. *Nat Med* 2003; 9: 416-423
- 13 Qin ZK, Yang JA, Ye YL, Zhang X, Xu LH, Zhou FJ, Han H, Liu ZW, Song LB, Zeng MS. Expression of Bmi-1 is a prognostic marker in bladder cancer. *BMC Cancer* 2009; 9: 61
- 14 Cooper CS, Foster CS. Concepts of epigenetics in prostate cancer development. *Br J Cancer* 2009; 100: 240-245
- 15 Häyry V, Tynninen O, Haapasalo HK, Wölfer J, Paulus W, Hasselblatt M, Sariola H, Paetau A, Sarna S, Niemelä M, Wartiovaara K, Nupponen NN. Stem cell protein Bmi-1 is an independent marker for poor prognosis in oligodendroglial tumours. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2008; 34: 555-563
- 16 Tirabosco R, De Maglio G, Skrap M, Falconieri G, Pizzolitto S. Expression of the Polycomb-Group protein BMI1 and correlation with p16 in astrocytomas: an immunohistochemical study on 80 cases. *Pathol Res Pract* 2008; 204: 625-631
- 17 Dimri GP, Martinez JL, Jacobs JJ, Keblusek P, Itahana K, Van Lohuizen M, Campisi J, Wazer DE, Band V. The Bmi-1 oncogene induces telomerase activity and immortalizes human mammary epithelial cells. *Cancer Res* 2002; 62: 4736-4745
- 18 Song LB, Zeng MS, Liao WT, Zhang L, Mo HY, Liu WL, Shao JY, Wu QL, Li MZ, Xia YF, Fu LW, Huang WL, Dimri GP, Band V, Zeng YX. Bmi-1 is a novel molecular marker of nasopharyngeal carcinoma progression and immortalizes primary human nasopharyngeal epithelial cells. *Cancer Res* 2006; 66: 6225-6232
- 19 Spemann A, van Lohuizen M. Polycomb silencers control cell fate, development and cancer. *Nat Rev Cancer* 2006; 6: 846-856
- 20 Liu S, Dontu G, Mantle ID, Patel S, Ahn NS, Jackson KW, Suri P, Wicha MS. Hedgehog signaling and Bmi-1 regulate self-renewal of normal and malignant human mammary stem cells. *Cancer Res* 2006; 66: 6063-6071
- 21 Chiba T, Zheng YW, Kita K, Yokosuka O, Saisho H, Onodera M, Miyoshi H, Nakano M, Zen Y, Nakanuma Y, Nakauchi H, Iwama A, Taniguchi H. Enhanced self-renewal capability in hepatic stem/progenitor cells drives cancer initiation. *Gastroenterology* 2007; 133: 937-950
- 22 Chiba T, Miyagi S, Saraya A, Aoki R, Seki A, Morita Y, Yonemitsu Y, Yokosuka O, Taniguchi H, Nakauchi H, Iwama A. The polycomb gene product BMI1 contributes to the maintenance of tumor-initiating side population cells in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2008; 68: 7742-7749
- 23 Song LB, Li J, Liao WT, Feng Y, Yu CP, Hu LJ, Kong QL, Xu LH, Zhang X, Liu WL, Li MZ, Zhang L, Kang TB, Fu LW, Huang WL, Xia YF, Tsao SW, Li M, Band V, Band H, Shi QH, Zeng YX, Zeng MS. The polycomb group protein Bmi-1 represses the tumor suppressor PTEN and induces epithelial-mesenchymal transition in human nasopharyngeal epithelial cells. *J Clin Invest* 2009; 119: 3626-3636
- 24 Xiao J, Deng C. Knockdown of Bmi-1 impairs growth and invasiveness of human gastric carcinoma cells. *Oncol Res* 2009; 17: 613-620
- 25 Hoenerhoff MJ, Chu I, Barkan D, Liu ZY, Datta S, Dimri GP, Green JE. BMI1 cooperates with H-RAS to induce an aggressive breast cancer phenotype with brain metastases. *Oncogene* 2009; 28: 3022-3032
- 26 Liu J, Cao L, Chen J, Song S, Lee IH, Quijano C, Liu H, Keyvanfar K, Chen H, Cao LY, Ahn BH, Kumar NG, Rovira II, Xu XL, van Lohuizen M, Motoyama N, Deng CX, Finkel T. Bmi1 regulates mitochondrial function and the DNA damage response pathway. *Nature* 2009; 459: 387-392
- 27 Qin L, Zhang X, Zhang L, Feng Y, Weng GX, Li MZ, Kong QL, Qian CN, Zeng YX, Zeng MS, Liao DF, Song LB. Downregulation of BMI-1 enhances 5-fluorouracil-induced apoptosis in nasopharyngeal carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 371: 531-535
- 28 Wang Q, Li WL, You P, Su J, Zhu MH, Xie DF, Zhu HY, He ZY, Li JX, Ding XY, Wang X, Hu YP. Onco-protein BMI-1 induces the malignant transformation of HaCaT cells. *J Cell Biochem* 2009; 106: 16-24
- 29 Glinsky GV, Berezovska O, Glinskii AB. Microarray analysis identifies a death-from-cancer signature predicting therapy failure in patients with multiple types of cancer. *J Clin Invest* 2005; 115: 1503-1521

编辑 曹丽鸥 电编 闫晋利

CD117阳性细胞亚群在肝癌细胞系HepG2中的分离及其特性

容雁, 王云霞, 孙立新, 张晓艳, 杨治华, 冉宇靓, 孙力超

容雁, 张晓艳, 杨治华, 孙力超, 广西医科大学附属肿瘤医院
广西壮族自治区南宁市 530021

王云霞, 孙立新, 冉宇靓, 中国医学科学院北京协和医学院
肿瘤医院分子肿瘤学国家重点实验室 北京市 100021

容雁, 广西医科大学附属肿瘤医院在读硕士, 主要从事肿瘤干细胞
的靶向治疗研究.

国家重点基础研究发展计划(973计划)基金资助项目, No. 20
09CB521804

国家科技重大专项基金资助项目, No. 2011ZX09102-010-02

作者贡献分布: 容雁、杨治华及孙力超对此文所作贡献均等; 此
课题由杨治华与孙力超设计; 研究过程由容雁、王云霞、孙立
新及张晓艳操作完成; 研究所用试剂由杨治华与冉宇靓提供; 数
据分析由容雁与王云霞完成, 本论文写作由容雁完成.

通讯作者: 孙力超, 助理研究员, 530021, 广西壮族自治区南
宁市, 广西医科大学附属肿瘤医院. sunlichao_1980@hotmail.com

收稿日期: 2011-10-19 修回日期: 2011-12-05

接受日期: 2011-12-18 在线出版日期: 2011-12-28

CD117-positive cells in human hepatocarcinoma cell line HepG2: isolation and evaluation of their stem cell properties

Yan Rong, Yun-Xia Wang, Li-Xin Sun, Xiao-Yan Zhang,
Zhi-Hua Yang, Yu-Liang Ran, Li-Chao Sun

Yan Rong, Xiao-Yan Zhang, Zhi-Hua Yang, Li-Chao
Sun, the Affiliated Tumor Hospital of Guangxi Medical
University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous
Region, China

Yun-Xia Wang, Li-Xin Sun, Yu-Liang Ran, State Key
Laboratory of Molecular Oncology, Cancer Institute, Chi-
nese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical
College, Beijing 100021, China

Supported by: the Major State Basic Research Develop-
ment Program of China (973 Program), No. 2009CB521804;
the National S&T Major Project, No. 2011ZX09102-010-02

Correspondence to: Li-Chao Sun, Research Assistant, the
Affiliated Tumor Hospital of Guangxi Medical University,
Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region,
China. sunlichao_1980@hotmail.com

Received: 2011-10-19 Revised: 2011-12-05

Accepted: 2011-12-18 Published online: 2011-12-28

Abstract

AIM: To isolate CD117⁺ cells from human hepa-
tocarcinoma cell line HepG2 and to observe their
biological behavior and stem cell properties.

METHODS: HepG2 cells were cultured in
serum-free medium. Flow cytometry was used

to detect the expression of CD117 in HepG2 cells
and sphere cells. CD117⁺ and CD117⁻ cells were
sorted by FACS and their ability of proliferation
and self-renewal was observed *in vitro*. Chemo-
sensitivity to cisplatin was determined by CCK-8
assay. The inhibitory rate of cells treated with cis-
platin, the half maximal inhibitory concentration
(IC₅₀) and resistance index (RI) were measured.

RESULTS: HepG2 cells could survive, prolifer-
ate and form sphere cells in serum-free medium.
The sphere-forming rate was 6.21% ± 2.03%. The
percentage of CD117⁺ cells population in sphere
cells increased by 9 folds compared to HepG2
cells. The sphere-forming ability and prolifera-
tion ability of CD117⁺ subpopulation in serum-
free medium were significantly higher than un-
sorted cells and CD117⁻ cells. The inhibitory rate
of CD117⁺ cells treated with cisplatin of different
concentrations was lower than un-sorted cells
and CD117⁻ cells. The IC₅₀ were 12.229 μmol/L
in CD117⁺ cells, 7.970 μmol/L in un-sorted cells,
and 7.345 μmol/L in CD117⁻ cells, and the RI of
CD117⁺ cells and un-sorted cells were 1.165 and
1.076, respectively.

CONCLUSION: CD117⁺ cells are a subpopulation
of HepG2 cells with stem cell properties. CD117
may be a candidate surface marker for liver can-
cer stem cells.

Key Words: Hepatocarcinoma; Cancer stem cells;
HepG2; CD117

Rong Y, Wang YX, Sun LX, Zhang XY, Yang ZH, Ran YL,
Sun LC. CD117-positive cells in human hepatocarcinoma
cell line HepG2: isolation and evaluation of their stem
properties. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(36):
3649-3655

摘要

目的: 观察从人肝癌细胞系HepG2中分离的
CD117⁺细胞生物学行为, 探讨肝癌中CD117⁺
细胞亚群的干细胞特性.

方法: 采用无血清悬浮培养法培养HepG2

■背景资料

自2006年以来已
有多家实验室应
用SP、CD133、
CD90、OV6、
EpCAM等干细胞
标志物从肝癌细
胞系中分离获得
肝癌干细胞, 但仍
需要鉴定出新的
肝癌干细胞的标
志物, 研究该标志
物阳性细胞的特
性, 从而进一步证
明肝癌的干细胞
假说.

■同行评议者

秦建民, 副主任
医师, 上海中医
药大学附属普陀
医院普外科

■ 研发前沿

目前肝癌干细胞的研究主要停留在分离和鉴定上,尚无公认的标志物。

细胞,流式细胞术检测HepG2及球体细胞中CD117的表达比例。用流式细胞分选技术从HepG2成球细胞中分离CD117⁺的肿瘤细胞,进行无血清悬浮培养,观察其成球能力。CCK-8法观察CD117⁺细胞的增殖能力和顺铂对CD117⁺细胞的抑制率,计算IC₅₀和耐药指数(RI)。

结果: HepG2细胞能在无血清培养基中存活、增殖并形成细胞球,成球率为6.21%±2.03%;流式细胞检测发现球体细胞中CD117⁺细胞的比例比HepG2细胞提升了9倍;CD117⁺细胞在无血清培养基中成球率和增殖能力均显著高于未分选细胞和CD117⁻细胞;CD117⁺细胞在各浓度的顺铂作用下抑制率均较未分选细胞和CD117⁻细胞明显降低,三者IC₅₀分别为12.229 μmol/L、7.970 μmol/L和7.345 μmol/L,CD117⁺细胞和未分选细胞耐药系数RI为1.165和1.076。

结论: 人肝癌细胞系HepG2中的CD117⁺细胞是具有肿瘤干细胞特性的细胞亚群,CD117可能是肝癌干细胞的候选表面分子标志物。

关键词: 肝癌;肿瘤干细胞;HepG2;CD117

容雁,王云霞,孙立新,张晓艳,杨治华,冉宇靓,孙力超. CD117阳性细胞亚群在肝癌细胞系HepG2中的分离及其特性. 世界华人消化杂志 2011; 19(36): 3649-3655
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/3649.asp>

0 引言

肝癌是常见的恶性肿瘤之一,其死亡率居所有恶性肿瘤中的第3位,近年来5年生生存率未见显著提高,耐药、复发、转移仍是中晚期肝癌病人死亡的重要原因。越来越多的证据表明,肿瘤干细胞与肿瘤的耐药、复发、转移密切相关^[1,2],其具有的自我更新、诱导分化、高致瘤性、抵抗放化疗能力,被认为是肿瘤发生、发展、转移、耐药、复发的根源^[3,4]。目前,对肝癌干细胞的研究尚处于探索阶段,有报道应用CD90^[5,6]从原代肝癌组织中分离获得肝癌干细胞,但其操作过程复杂、易污染等问题限制了他在研究工作中的广泛应用。肿瘤细胞系易获得、易保存的特点使其在肿瘤干细胞研究中存在一定优势。已有多家研究小组应用SP^[7,8]、CD133^[9,10]、OV6^[11]、EpCAM^[12,13]等标志物从肝癌细胞系中分离肝癌干细胞。因此,本研究以肝癌细胞系HepG2为研究对象,证明其中是否存在肝癌干细胞,分离其表面标志物,并鉴定其生物学行为,

为肝癌干细胞研究提供合适的细胞系模型。

1 材料和方法

1.1 材料 人肝癌细胞HepG2由中国医学科学院肿瘤医院分子肿瘤学国家重点实验室保存,DMEM、DMEM/F12(1:1)培养基(Hyclone),胎牛血清、人表皮生长因子(EGF)、人碱性成纤维生长因子(bFGF)、B27(Gibco)、白细胞抑制因子(LIF)、亲脂荧光染料PKH26(Sigma),抗CD117-PE(ebioscience),兔抗CD117多克隆抗体(ABcam),488标记山羊抗兔IgG(Jackson),Matrigel(BD),transwell小室购自Millipore公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及传代: HepG2细胞用含100 mL/L胎牛血清、100 U/mL青霉素和100 U/mL链霉素的DMEM培养基,在37℃、50 mL/L CO₂饱和湿度条件下培养;2.5 g/L胰蛋白酶进行消化、传代。

1.2.2 HepG2球体细胞的培养: 取对数生长期的HepG2细胞消化后,HBSS洗2次,精确计数,用含EGF(20 ng/mL)、bFGF(20 ng/mL)、B27(1:50)、LIF(10 ng/mL)、100 U/mL青霉素和100 U/mL链霉素的DMEM/F12(1:1)无血清培养基,以500个/孔接种于低黏附24孔板中,在37℃、50 mL/L CO₂孵箱中培养9 d,倒置显微镜下观察成球数。

1.2.3 PKH26染色: 已有的研究^[14]表明肿瘤干细胞能够在无血清培养基中成球生长,是肿瘤干细胞的标志之一。同时文献报道亲脂性染料PKH26能够被肿瘤干细胞长期保留可用于标记肿瘤干细胞^[15],因此我们对HepG2细胞进行PKH26染色后进行无血清悬浮培养。参照PKH26染料说明书进行。消化对数生长期的HepG2细胞,血清终止后用无血清培养基洗1次,用试剂盒中的C液稀释细胞至2×10⁷/mL,同时用C液将PKH26染料稀释为4×10⁻⁶ mol/L,迅速将上述二者以1:1体积混合,室温孵育5 min后用等量血清终止染色,再用含血清培养基洗2次,无血清培养基洗1次。用无血清培养基重悬至500个/mL,每孔1 mL种入低黏附24孔板中,在不同时间点观察染料在球体细胞中的分布情况。

1.2.4 流式细胞术检测HepG2细胞及球体细胞CD117的表达: 分别收集HepG2细胞和球体细胞,制备单细胞悬液并调整浓度至1×10⁶/mL,加入抗CD117-PE(1:20),室温避光孵育30 min,HBSS洗3次,流式细胞仪检测阳性细胞比例。

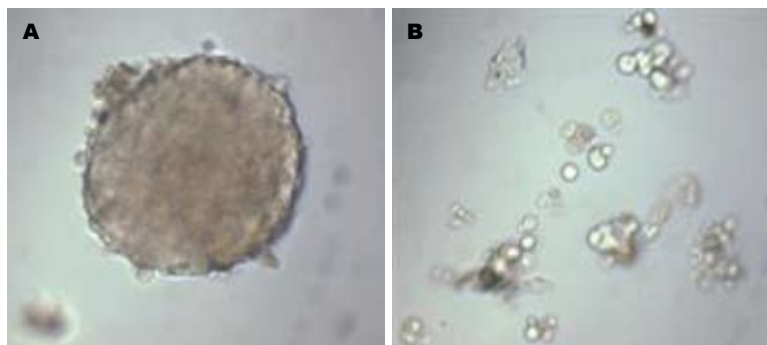


图1 HepG2细胞无血清培养(9 d, ×400). A: 球体细胞; B: 非球体细胞.

■相关报道
Ramadori等采用c-Kit受体的选择性酪氨酸激酶抑制剂伊马替尼成功治愈了一例酒精性肝硬化引起的肝癌患者.

1.2.5 CD117⁺和CD117⁻亚群细胞的分选: 消化球体细胞后用HBSS洗1次, 重悬至 $1 \times 10^7/\text{mL}$, 加入抗CD117-PE(1:20), 室温避光孵育30 min, HBSS洗2次, 用含1%BSA的PBS重悬细胞, 流式细胞仪分选.

1.2.6 自我更新能力比较: 分选获得的CD117⁺、CD117⁻和未分选细胞, 用含0.8%甲基纤维素的DMEM/F12(1:1)无血清培养基稀释细胞密度至500个/mL, 1 mL/孔接种至低黏附24孔培养板, 9 d后观察成球数.

1.2.7 体外增殖能力检测: 将分选获得的CD117⁺、CD117⁻、未分选细胞用无血清培养基稀释至 $1 \times 10^4/\text{mL}$, 每组设置3个平行孔, 200 μL /孔接种至96孔板, 在37 $^{\circ}\text{C}$ 、50 mL/L CO_2 孵箱中培养, 每2 d换液1次, 在2、4、6 d用CCK-8法测定细胞的增殖情况.

1.2.8 耐药能力比较: 将CD117⁺、CD117⁻和未分选细胞亚群, 以6 000细胞/孔接种至96孔板, 两组中每个药物浓度设置3个平行孔, 培养24 h待细胞完全贴壁后, 更换含顺铂的完全培养基, 药物浓度依次为0、3、6、9、12、15 $\mu\text{mol/L}$, 48 h更换1次含顺铂的完全培养基, 96 h采用CCK-8法检测 A_{450} 值, 计算抑制率、 IC_{50} 值及耐药系数RI. 抑制率(%) = $[1 - (A_x - A)/(A_0 - A)] \times 100\%$, 公式中 A_x 为加药孔 A_{450} 值, A 为对照孔 A_{450} 值, A_0 为不加药孔 A_{450} 值; 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 $\text{RI} = \text{IC}_{50}^{\text{CD117}^+} / \text{IC}_{50}^{\text{CD117}^-}$.

统计学处理 数据以mean \pm SD形式表示, 应用SPSS13.0统计软件包分析, 组间差异采用 t 检验, 以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义.

2 结果

2.1 HepG2无血清悬浮培养诱导球体细胞形成情况 将人肝癌细胞系HepG2在无血清培养基中培养72 h后, 少量细胞贴壁, 大部分细胞悬浮生长, 可见少量由3-5个细胞形成的球体细胞, 随时

间延长, 球体细胞逐渐增大, 细胞数目增多, 细胞间连接紧密(图1), 球体细胞形成率为 $6.21\% \pm 2.03\%$, 提示该细胞系中可能存在有干细胞特征的肿瘤细胞. 对HepG2细胞进行PKH26染色后进行无血清悬浮培养. 染色5 d时发现, 已有球体细胞形成, 荧光染料分布于2-3个细胞上(图2A, B); 13 d时, 可见球体细胞中仅有单个细胞着色(图2C, D), 无血清悬浮培养及PKH26染色实验证明了人肝癌细胞系HepG2中存在肿瘤干细胞.

2.2 流式细胞术检测结果 HepG2细胞中CD117⁺细胞比例约0.6%, 球体细胞中CD117⁺细胞比例约为5.4%, HepG2细胞经无血清悬浮培养后, CD117⁺细胞的比例提升了9倍, 提示CD117可能是HepG2细胞系中具有干细胞特性细胞的标志物(图3).

2.3 CD117⁺和CD117⁻亚群细胞的分选 受检细胞大小、形态、胞内颗粒度均一致, 在488 nm激发光下(图4), 左上方有一高荧光区域P1, 即CD117⁺亚群细胞, 比例为4.9%, 左下方为低荧光区域P2, 为CD117⁻亚群细胞, 比例为5.0%.

2.4 CD117⁺细胞成球实验 培养9 d后, CD117⁺、未分选和CD117⁻细胞在每500个细胞中成球数分别为 68.75 ± 21.85 、 35.75 ± 3.30 和 22.25 ± 6.40 , CD117⁺细胞较未分选和CD117⁻细胞成球能力明显增强, 差异有统计学意义($P < 0.01$, 图5).

2.5 CD117⁺细胞体外增殖能力检测 CCK-8法检测CD117⁺、CD117⁻和未分选细胞的增殖能力, 结果显示从第4天起, CD117⁺细胞增殖明显, 未分选细胞和CD117⁻细胞增殖缓慢, 至第6天, CCK-8法检测CD117⁺、未分选和CD117⁻细胞的 A 值分别为 0.722 ± 0.029 、 0.604 ± 0.022 和 0.486 ± 0.018 , CD117⁺细胞较后两者增殖明显, 差异有统计学意义($P < 0.01$, 图6).

2.6 CD117⁺、CD117⁻和未分选细胞的顺铂抵抗能力检测 耐药是肿瘤干细胞的一个共同的特性, 我们将分选获得的CD117⁺、CD117⁻和未分选细胞经不同浓度的顺铂作用96 h后, 三者的 IC_{50} 分别为12.229 $\mu\text{mol/L}$ 、7.345 $\mu\text{mol/L}$ 和

■创新盘点

采用流式细胞分选技术分选和分析肝癌细胞系HepG2中CD117⁺细胞亚群的生物学特性,研究其自我更新、增殖及耐药能力,证明其具有肿瘤干细胞的特征,获得了一个新的肝癌干细胞标志物。

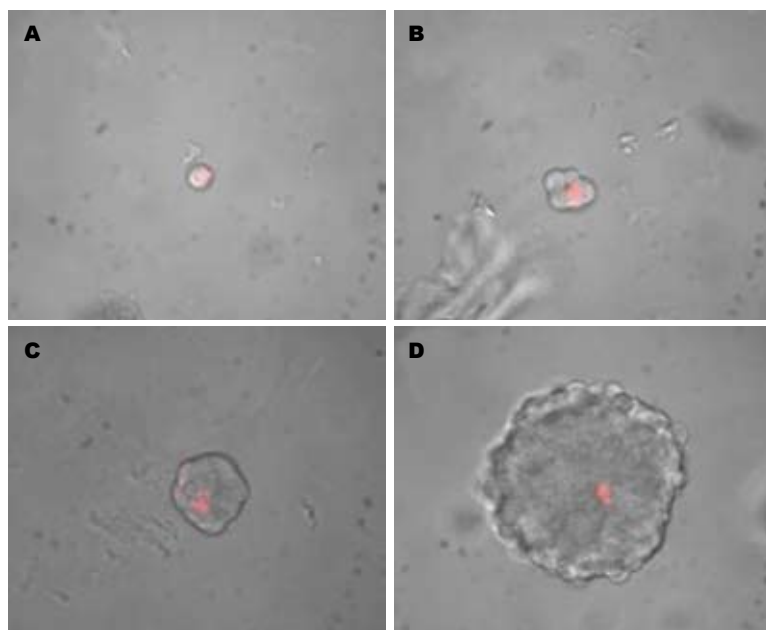


图 2 PKH26染料标记不同培养时间的球体细胞($\times 400$). A: 1 d; B: 5 d; C: 9 d; D: 13 d.

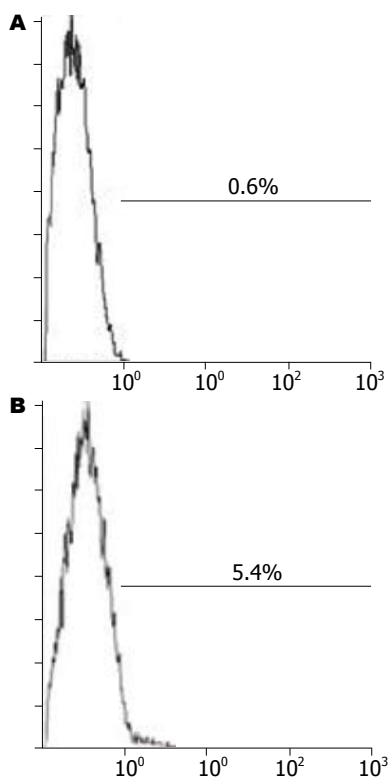


图 3 流式细胞术检测HepG2与球体细胞中CD117的表达. A: HepG2细胞; B: 球体细胞.

7.970 $\mu\text{mol/L}$, CD117⁺细胞和未分选细胞的耐药系数RI分别为1.665和1.076(表1).

3 讨论

肿瘤干细胞是目前肿瘤研究的热点. “肿瘤干细胞学说”认为, 肿瘤组织是由异质性的细胞群体组成, 肿瘤组织中存在的一小部分具有干细胞性质的细胞群体具有自我更新和无限增殖

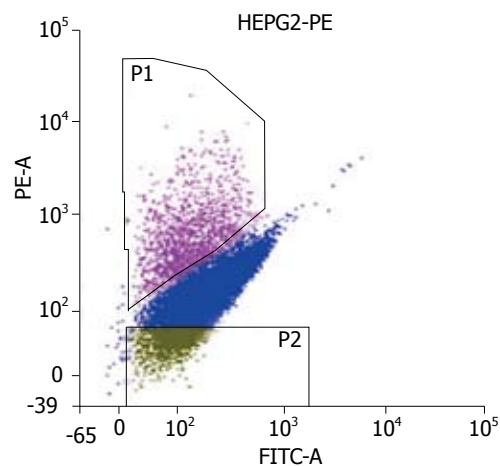


图 4 CD117⁺和CD117⁻细胞FACS分选散点图.

潜力, 是肿瘤产生的根源^[3]. 目前, 血液系统肿瘤^[16,17]、脑神经胶质瘤^[14]、乳腺癌^[18,19]、结肠癌^[20]、前列腺癌^[21]等的肿瘤干细胞均已成功得到分离. 通过这些研究, 肿瘤干细胞具有表达干细胞标志物、不对称分裂、被诱导分化、自我更新、无限增殖、高致瘤性、抵抗放化疗等生物学特征已被广泛证实和认可.

自我更新和无限增殖潜力是肿瘤干细胞的最主要特征. Collins等^[21]研究发现, 从前列腺癌组织中分离得到的CD44⁺/ $\alpha_2\beta_1^{\text{high}}$ /CD133⁺细胞, 可以在体外无血清培养基中悬浮生长并形成不同表型的细胞群体, 其克隆形成能力是CD44⁺/ $\alpha_2\beta_1^{\text{low}}$ /CD133⁺的30倍. Blair等^[22]研究发现, 白血病细胞体外悬浮培养6-8 wk后, 仅CD34⁺/CD38⁻的肿瘤干细胞集落仍然存活, CD34⁺/CD38⁺和CD34⁻的集落全部死亡. Kondo等^[23]报道在脑神

表 1 CD117⁺、CD117⁻和未分选细胞在顺铂作用下的抑制率(%、mean ± SD)、IC₅₀(μmol/L)、RI比较

	3 μmol/L	6 μmol/L	9 μmol/L	12 μmol/L	15 μmol/L	IC ₅₀	RI
CD117 ⁺ 细胞	5.052 ± 3.807	11.230 ± 1.280	36.945 ± 1.142	47.838 ± 1.945	64.407 ± 0.988	12.229	1.665
未分选细胞	32.785 ± 2.534	40.965 ± 6.278	46.897 ± 5.422	57.061 ± 7.457	69.768 ± 6.553	7.970	1.076
CD117 ⁻ 细胞	34.358 ± 0.551	43.264 ± 9.611	48.850 ± 7.779	58.561 ± 12.756	70.896 ± 4.413	7.345	

■应用要点

本研究证明了HepG2细胞系中的CD117⁺肿瘤细胞具有较强的自我更新能力、增殖能力及耐药能力,为肝癌干细胞研究提供了有价值的细胞系模型。

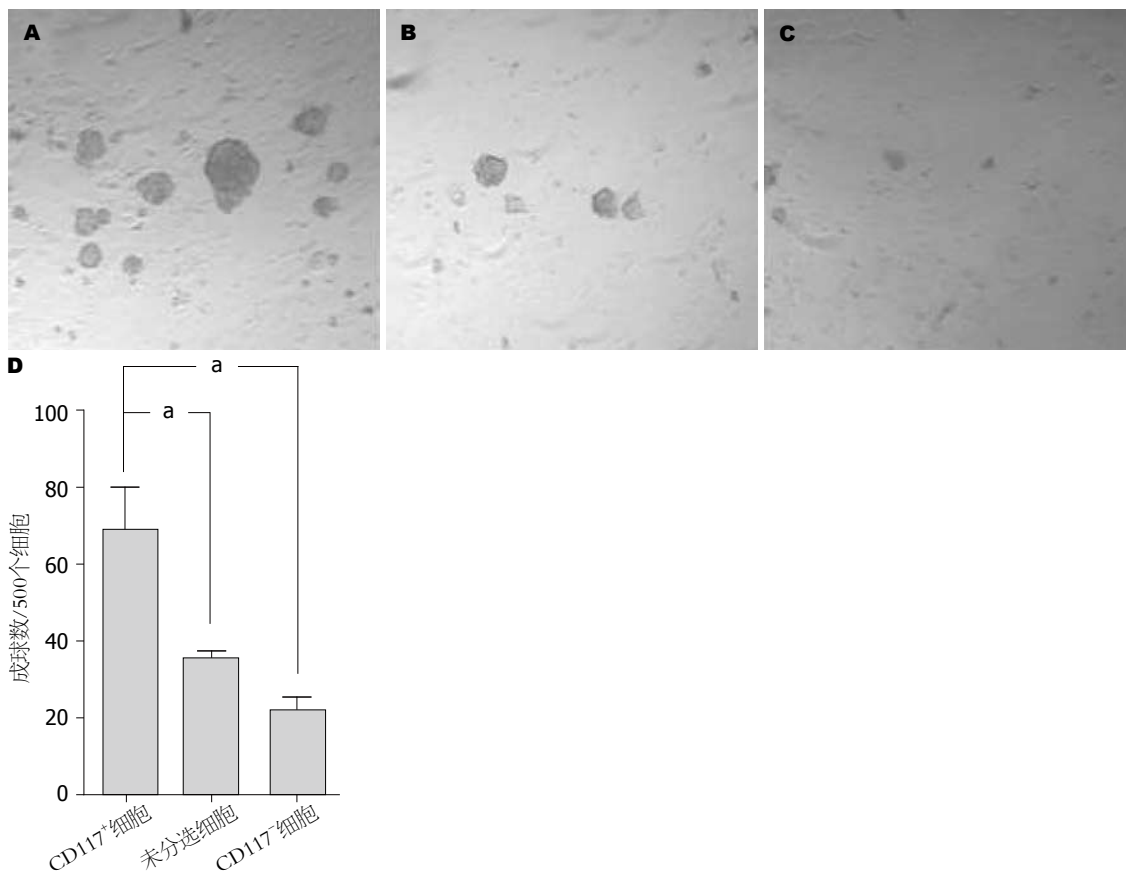


图 5 HepG2 CD117⁺、未分选和CD117⁻细胞体外成球数比较. A: CD117⁺细胞(×40); B: 未分选细胞(×40); C: CD117⁻细胞(×40); D: CD117⁺、未分选和CD117⁻细胞体外成球数. ^a*P* < 0.05 vs CD117⁺细胞.

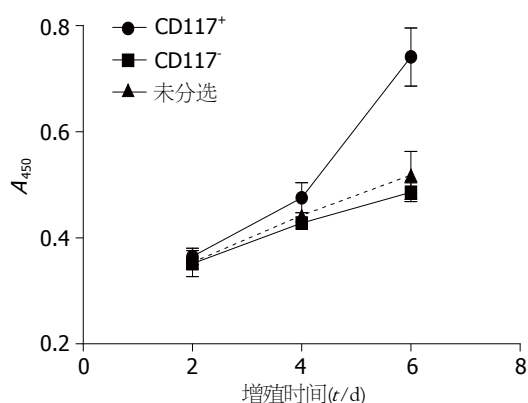


图 6 HepG2 CD117⁺、CD117⁻和未分选细胞增殖能力比较.

经胶质瘤细胞系C6中, SP细胞在可无血清培养基中存活并形成球体,而非SP细胞增殖缓慢,培养3 wk后全部死亡. 这些证据提示,并非所有的

肿瘤细胞均具有无限增殖能力,大多数肿瘤细胞的寿命是有限的,仅具有干细胞特性的一小部分肿瘤细胞通过自我更新维持着肿瘤的生长,与肿瘤的转移、复发密切相关.

肿瘤对放化疗的抵抗也被认为与肿瘤干细胞相关. Bao等^[24]研究发现,神经胶质瘤中的CD133⁺细胞在接受放疗时表现出更强的生存能力,其放射线诱导的凋亡比率也明显低于CD133⁻细胞. Guzman等^[25]研究发现,白血病干细胞对柔红霉素及阿糖胞苷的敏感性均低于普通白血病细胞. 以上结果提示肿瘤干细胞较普通肿瘤细胞对放化疗不敏感,可能为传统治疗后肿瘤复发的根源.

与其他实体瘤干细胞研究相比,目前对肝癌干细胞的研究尚处于探索阶段,主要停留在

■名词解释

PKH26染料: 是一种细胞膜标记染料, 可与细胞膜的脂质双分子层稳定结合, 且无明显的细胞毒性, 可标记的细胞范围广。肿瘤干细胞常处于G₀期, 标记后的肿瘤干细胞在分裂过程中能长期保留PKH26染料, 且生物活性不受影响, 可应用于肿瘤干细胞的示踪标记。

分离与鉴定的工作上, 尚没有公认的表面标志物。对于已报道的SP^[7]、CD133^[9]、CD90^[5]、OV6^[11]、EpCAM^[12]等标志物, 尚无研究发现这些标志物有明显的交叉现象。

CD117又称c-kit, 是造血干细胞和卵圆细胞的标志物之一, 其基因位于人染色体4q12-13, 属于原癌基因, 编码受体酪氨酸家族蛋白, 是干细胞因子受体^[26]。CD117是卵圆细胞一个重要的标志物, 研究发现, c-kit/SCF信号转导系统在卵圆细胞的增殖过程中扮演着重要作用^[27], 与肝脏的发生、分化、损伤后再生、及肿瘤的发生密切相关。已有研究表明, 大鼠在接受致癌物处理后, 表达CD117的卵圆细胞明显增多^[28]。Yan等^[29]研究发现, 人原发性肝癌组织中的CD117阳性细胞较阴性细胞在裸鼠体内成瘤能力显著增强。Ramadori等^[30]采用选择性酪氨酸激酶抑制剂STI571成功治愈了1例酒精性肝硬化引起的肝病患者。

本研究对人肝癌细胞系HepG2采用无血清悬浮培养技术证明了该细胞系中存在成球生长的肿瘤干细胞, 并用亲脂荧光染料PKH26染色证明该球体细胞是由单个肿瘤细胞增殖分化形成。进一步采用流式细胞术证明无血清悬浮培养富集了肿瘤干细胞, 无血清培养后CD117⁺细胞比例提升了9倍, 提示CD117可能是HepG2的肿瘤干细胞标志物之一。采用流式分选仪分选CD117⁺、CD117⁻两个细胞亚群, 体外成球实验发现CD117⁺细胞较未分选细胞和CD117⁻细胞有更强的自我更新能力; 增殖实验发现CD117⁺细胞在无血清培养基中的增殖能力较未分选细胞和CD117⁻细胞显著增强; 顺铂耐药实验证明了CD117⁺细胞较未分选细胞和CD117⁻细胞明显耐药。以上结果均表明, 人肝癌细胞系HepG2中的CD117⁺细胞是具有肿瘤干细胞特性的细胞亚群, CD117可能是肝癌干细胞的候选表面分子标志物。

本研究初步探讨了HepG2细胞系中CD117⁺肿瘤细胞的干细胞生物学特性, 证实了CD117⁺细胞具有更强的自我更新能力、增殖能力及抗药性, 为下一步进行肝癌干细胞的分子生物学研究奠定了基础。

4 参考文献

- Frank NY, Schatton T, Frank MH. The therapeutic promise of the cancer stem cell concept. *J Clin Invest* 2010; 120: 41-50
- Zhou BB, Zhang H, Damelin M, Geles KG, Grindley

- JC, Dirks PB. Tumour-initiating cells: challenges and opportunities for anticancer drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 2009; 8: 806-823
- Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001; 414: 105-111
- Couzin J. Medicine. Tracing the steps of metastasis, cancer's menacing ballet. *Science* 2003; 299: 1002-1006
- Yang ZF, Ho DW, Ng MN, Lau CK, Yu WC, Ngai P, Chu PW, Lam CT, Poon RT, Fan ST. Significance of CD90⁺ cancer stem cells in human liver cancer. *Cancer Cell* 2008; 13: 153-166
- Yang ZF, Ngai P, Ho DW, Yu WC, Ng MN, Lau CK, Li ML, Tam KH, Lam CT, Poon RT, Fan ST. Identification of local and circulating cancer stem cells in human liver cancer. *Hepatology* 2008; 47: 919-928
- Chiba T, Kita K, Zheng YW, Yokosuka O, Saisho H, Iwama A, Nakauchi H, Taniguchi H. Side population purified from hepatocellular carcinoma cells harbors cancer stem cell-like properties. *Hepatology* 2006; 44: 240-251
- 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
- Suetsugu A, Nagaki M, Aoki H, Motohashi T, Kunisada T, Moriwaki H. Characterization of CD133⁺ hepatocellular carcinoma cells as cancer stem/progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 351: 820-824
- Yin S, Li J, Hu C, Chen X, Yao M, Yan M, Jiang G, Ge C, Xie H, Wan D, Yang S, Zheng S, Gu J. CD133 positive hepatocellular carcinoma cells possess high capacity for tumorigenicity. *Int J Cancer* 2007; 120: 1444-1450
- Yang W, Yan HX, Chen L, Liu Q, He YQ, Yu LX, Zhang SH, Huang DD, Tang L, Kong XN, Chen C, Liu SQ, Wu MC, Wang HY. Wnt/beta-catenin signaling contributes to activation of normal and tumorigenic liver progenitor cells. *Cancer Res* 2008; 68: 4287-4295
- Yamashita T, Ji J, Budhu A, Forgues M, Yang W, Wang HY, Jia H, Ye Q, Qin LX, Wauthier E, Reid LM, Minato H, Honda M, Kaneko S, Tang ZY, Wang XW. EpCAM-positive hepatocellular carcinoma cells are tumor-initiating cells with stem/progenitor cell features. *Gastroenterology* 2009; 136: 1012-1024
- Yamashita T, Forgues M, Wang W, Kim JW, Ye Q, Jia H, Budhu A, Zanetti KA, Chen Y, Qin LX, Tang ZY, Wang XW. EpCAM and alpha-fetoprotein expression defines novel prognostic subtypes of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2008; 68: 1451-1461
- Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, Dirks PB. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* 2003; 63: 5821-5828
- Pece S, Tosoni D, Confalonieri S, Mazzarol G, Vecchi M, Ronzoni S, Bernard L, Viale G, Pelicci PG, Di Fiore PP. Biological and molecular heterogeneity of breast cancers correlates with their cancer stem cell content. *Cell* 2010; 140: 62-73
- Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, Minden M, Paterson B, Caligiuri MA, Dick JE. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 1994; 367: 645-648

- 17 Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 1997; 3: 730-737
- 18 Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 3983-3988
- 19 Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, Monville F, Dutcher J, Brown M, Jacquemier J, Viens P, Kleer CG, Liu S, Schott A, Hayes D, Birnbaum D, Wicha MS, Dontu G. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell* 2007; 1: 555-567
- 20 Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, Biffoni M, Todaro M, Peschle C, De Maria R. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* 2007; 445: 111-115
- 21 Collins AT, Berry PA, Hyde C, Stower MJ, Maitland NJ. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res* 2005; 65: 10946-10951
- 22 Blair A, Hogge DE, Ailles LE, Lansdorp PM, Sutherland HJ. Lack of expression of Thy-1 (CD90) on acute myeloid leukemia cells with long-term proliferative ability in vitro and in vivo. *Blood* 1997; 89: 3104-3112
- 23 Kondo T, Setoguchi T, Taga T. Persistence of a small subpopulation of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 781-786
- 24 Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, Dewhirst MW, Bigner DD, Rich JN. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* 2006; 444: 756-760
- 25 Guzman ML, Swiderski CF, Howard DS, Grimes BA, Rossi RM, Szilvassy SJ, Jordan CT. Preferential induction of apoptosis for primary human leukemic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 16220-16225
- 26 Broecker-Preuss M, Sheu SY, Worm K, Feldkamp J, Witte J, Scherbaum WA, Mann K, Schmid KW, Schott M. Expression and mutation analysis of the tyrosine kinase c-kit in poorly differentiated and anaplastic thyroid carcinoma. *Horm Metab Res* 2008; 40: 685-691
- 27 Matsusaka S, Tsujimura T, Toyosaka A, Nakasho K, Sugihara A, Okamoto E, Uematsu K, Terada N. Role of c-kit receptor tyrosine kinase in development of oval cells in the rat 2-acetylaminofluorene/partial hepatectomy model. *Hepatology* 1999; 29: 670-676
- 28 Fujio K, Evarts RP, Hu Z, Marsden ER, Thorngerson SS. Expression of stem cell factor and its receptor, c-kit, during liver regeneration from putative stem cells in adult rat. *Lab Invest* 1994; 70: 511-516
- 29 Yan Z, Fang CH, Gao P. [Preliminary research of hepatocarcinoma stem cell markers]. *Nanfang Yike Daxue Xuebao* 2006; 26: 1304-1306
- 30 Ramadori G, Füzesi L, Grabbe E, Pieler T, Armbrust T. Successful treatment of hepatocellular carcinoma with the tyrosine kinase inhibitor imatinib in a patient with liver cirrhosis. *Anticancer Drugs* 2004; 15: 405-409

■同行评价

本研究为深入研究肝癌干细胞的分子生物学特性、治疗奠定了重要的理论基础。研究设计合理,方法恰当,数据结果可靠,结论可信。

编辑 李军亮 电编 闫晋利

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。

C/EBP α 基因与PARs在肝星状细胞激活中的作用及关系

刘迎春, 顾小红

■背景资料

肝纤维化是严重威胁人类健康的重要疾病之一,迄今没有理想的治疗方法。研究表明肝星状细胞的激活是肝纤维化的关键,如何抑制肝星状细胞的激活,诱导其凋亡是目前肝纤维化研究的重点。

刘迎春, 顾小红, 中国人民解放军第三军医大学第三附属医院野战外科研究所高干科 重庆市 400042
重庆市自然科学基金资助项目, No. CSTC, 2010BB5165
作者贡献分布: 本文综述由刘迎春完成; 顾小红审校。
通讯作者: 顾小红, 副教授, 主任医师, 400042, 重庆市, 中国人民解放军第三军医大学第三附属医院野战外科研究所高干科。
guxiaohong@dpyytjzx.com
电话: 023-68757891
收稿日期: 2011-09-18 修回日期: 2011-10-28
接受日期: 2011-12-18 在线出版日期: 2011-12-28

Roles and relation between C/EBP α and PARs in the activation of hepatic stellate cells

Ying-Chun Liu, Xiao-Hong Gu

Ying-Chun Liu, Xiao-Hong Gu, Department of Geriatrics, Daping Hospital and Research Institute of Surgery, the Third Military Medical University of Chinese PLA, Chongqing 400042, China
Supported by: the Natural Science Foundation of Chongqing, No. CSTC, 2010BB5165
Correspondence to: Xiao-Hong Gu, Associate Professor, Department of Geriatrics, Daping Hospital and Research Institute of Surgery, the Third Military Medical University of Chinese PLA, Chongqing 400042, China. guxiaohong@dpyytjzx.com
Received: 2011-09-18 Revised: 2011-10-28
Accepted: 2011-12-18 Published online: 2011-12-28

Abstract

Protease activated receptors (PARs) are main components of the fibrotic cascade mediated by the trypsin and thrombin that amplifies liver inflammation and fibrosis. Gene transcription initiation induced by PARs plays an important role in the activation of hepatic stellate cells (HSCs). HSC activation can be inhibited by the expression of transcription factor CCAAT enhancer binding proteins α (C/EBP α). Further research of the relation between C/EBP α and PARs will contribute to the understanding of the pathogenesis of liver fibrosis and provide a theoretical basis for further exploration of anti-fibrotic strategies.

Key Words: CCAAT enhancer-binding protein α ; Protease-activated receptors; Liver fibrosis; Hepatic stellate cells

Liu YC, Gu XH. Roles and relation between C/EBP α

and PARs in the activation of hepatic stellate cells. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2011; 19(36): 3656-3660

摘要

蛋白酶活化受体家族(protease activated receptors, PARs)可通过MAPK/ERK信号通路激活细胞内部分转录因子,从而参与肝纤维化的形成,是肝纤维化自动放大循环过程中主要炎症和纤维化受体。肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSC)的活化是肝纤维化的关键, HSC活化的显著变化是细胞内维生素A和脂滴的减少和消失,而转录因子CCAAT增强子结合蛋白 α (C/EBP α)在维持脂肪细胞分化中起着重要作用,因此其对肝纤维化形成过程中肝星状细胞的活化具有负性调控作用,上调其表达可以抑制肝星状细胞增殖和活化,并诱导肝星状细胞的凋亡。深入研究PARs与C/EBP α 的关系,将有助于对肝纤维化发生机制的理解,从而为抗肝纤维化治疗提供新的理论依据。

关键词: CCAAT增强子结合蛋白 α ; 蛋白酶活化受体家族; 肝纤维化; 肝星状细胞

刘迎春, 顾小红. C/EBP α 基因与PARs在肝星状细胞激活中的作用及关系. 世界华人消化杂志 2011; 19(36): 3656-3660
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/3656.asp>

0 引言

肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSC)在组织炎症坏死区域由静止的贮存维生素A表型向活化的肌成纤维细胞转化并分泌细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的过程是肝纤维化的中心环节^[1-4]。蛋白酶活化受体家族(protease activated receptors, PARs)是凝血酶和胰蛋白酶介导的肝纤维化自动放大循环过程中主要的炎症和纤维化受体, HSC活化过程中, PARs介导的基因转录启动起着重要作用^[5-7]。已有研究证实转录因子CCAAT增强子结合蛋白 α (CCAAT enhancer binding proteins α , C/EBP α)的表达可以抑制HSC的活化、维持其静止状态^[8-11]。本文就HSC、C/EBP α 对PARs激活HSC促肝纤维化形成的影

■同行评议者

杜顺达, 副主任医师, 北京协和医院肝外科

响等方面作一综述, 为进一步研究抗肝纤维化治疗打下基础。

1 形成肝纤维化的细胞学基础

肝纤维化的本质是以胶原为主要成分的ECM合成和分泌增多, 降解相对减少, ECM过度沉积。ECM主要由I、III型胶原构成, 其中I型胶原是其主要成分^[1,11-13]。因此胶原蛋白的来源一直都是肝纤维化研究的重点。Ikegami等^[14,15]研究表明肝细胞和胆管上皮细胞的上皮-间质转型可以作为其来源之一; Forbes等^[16-18]证明骨髓来源的肌成纤维细胞也参与了肝纤维化中胶原蛋白的合成; 循环中的单核细胞亚群进入受损的肝组织后也可以向纤维细胞分化^[19,20]; 但是目前Friedman等^[21-23]研究一致认为HSC是正常及纤维化肝脏中产生ECM的主要细胞。

HSC最初由Kuffer等^[24,25]在1876年发现并命名为“星状细胞”, 直到1996年国际上才统一命名为肝星状细胞。生理情况下HSC约占肝内细胞总数的5%-8%, 主要位于肝索与肝窦壁之间的Disse间隙内, 主要功能为贮存维生素A(约贮存人体80%的维生素A)和脂肪^[26,27], 合成少量的ECM, 主要以IV型胶原为主。在肝脏损伤过程中, 静止的贮存维生素A和脂滴的HSC经过一系列表型转化向活化的缺乏维生素A和脂滴的肌成纤维细胞转变, 从而合成和分泌大量的ECM^[28,29]。 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)被认为是HSC激活的标志性蛋白, 合成和分泌I、III型胶原被认为是HSC活化的特征^[30-32]。HSC的激活可以分为3个阶段: (1)前炎症阶段: 各种损伤因素损伤肝细胞, 致使肝细胞分泌多种丝裂原样物质, 始动激活HSC转化为肌成纤维细胞(Myofibroblasts, MFB)(直接旁分泌通路); (2)炎症阶段: 肝细胞损伤, 活化肝内的巨噬细胞和血小板分泌大量的炎性介质, 进一步促进HSC激活为MFB(旁分泌活化通路); (3)炎症后阶段: 激活的HSC及MFB自身分泌一些炎性因子(自分泌活化通路), 使肝纤维化的过程即使在去除肝损伤因素后也得以持续^[33-35]。因此HSC的激活是肝纤维化的关键, 抑制HSC的激活对于肝纤维化的防治至关重要。

2 PARs及其在肝星状细胞激活中的作用

PARs属于G-蛋白偶联受体家族。通过分子克隆技术发现的PARs成员共有4个(PAR1-4), 其中PAR1、PAR3是凝血酶受体, PAR2为胰蛋白酶

受体, PAR4既可被凝血酶活化又可被胰蛋白酶活化, PAR3是PAR4的一个辅因子, 两者在活性上无明显差异^[36,37]。人体内几乎所有细胞均有不同类型的PARs的存在与表达, 其能调节细胞增殖、分化等而参与多种生理和病理过程^[38-40]。

研究表明: 无论是在急性还是慢性肝脏疾病中均可发现凝血酶和胰蛋白酶受体PARs的表达, 且随着肝脏受损程度的加重, 其表达含量逐渐升高^[41]。Fiorucci等^[38]研究证明: PARs家族的所有成员均可参与大鼠HSCs的激活和增殖。顾小红等^[42,43]研究也证实: 无论是肝纤维化大鼠肝组织还是正常大鼠肝脏分离和培养的HSC均表达PAR1、2, 且与HSC激活的标志性蛋白 α -SMA的表达呈一致性, 说明PARs是肝纤维化自动放大循环过程中的主要炎症和纤维化受体。研究PARs如何将细胞外信号传递到细胞内引起细胞核反应发现, PARs可以通过胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)/丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号通路将细胞外信号传递到细胞内引起细胞核反应从而使许多转录因子的某些氨基酸残基磷酸化而活化, 启动细胞的增殖和分化^[44-46]。

3 C/EBP α 蛋白在肝星状细胞激活中的作用

关于HSC如何被激活的机制研究很多^[47-49], 基因转录水平的调控几乎参与了真核细胞所有蛋白及因子的表达, 上百种不同转录因子参与了HSC由静止到激活过程的转变, 包括CCAAT增强子结合蛋白质超家族(C/EBPs)^[50,51]。C/EBPs属于bZIP(basic region/leucine zipper)DNA结合蛋白超家族, 主要在小肠、肺脏、肾上腺、胎盘, 尤其在肝脏和脂肪组织等脂类和胆固醇相关复合物代谢旺盛的组织中优先表达, 而在脑、肾、胸腺、睾丸和卵巢中表达含量非常低^[52,53]。C/EBPs可以结合并转录激活特定基因DNA增强子5'-RTTGCGYAAAY-3'(R = A或G, Y = C或T)重复序列或其变异体, 对基因的转录进行正负调控, 在细胞增殖、分化等过程中起重要的作用^[9,54,55]。

C/EBPs蛋白超家族最初被研究在脂肪细胞的转录调控中起重要的作用^[9,11,56]。肥胖的基因研究表明: 在脂肪细胞生成过程中, C/EBPs按一定的时序表达, 且每个成员都参与其特定的调控作用, 其中C/EBP α 的主要功能是促进脂肪细胞进入终末分化^[56,57]。研究基因敲除动物模型结

■研究前沿

蛋白酶活化受体(PARs)可以通过激活细胞内的部分转录因子而介导肝星状细胞的增殖和活化, 肝星状细胞活化的显著特点是细胞内脂滴和维生素A减少甚至消失, 而转录因子CCAAT增强子结合蛋白可以维持脂肪细胞的分化, 进而维持肝星状细胞处于静止状态。深入研究PARs与CCAAT增强子结合蛋白的关系将有助于更好的理解肝纤维化的机制。

■相关报道

对于CCAAT增强子结合蛋白如何维持肝星状细胞的静止, 诱导其凋亡, Wang等研究表明其可以通过PPAR γ 上调p53基因从而诱导HSC的凋亡。

构显示: 将C/EBP β 基因导入C/EBP α -/-小鼠内, 肝内所表达的C/EBP β 蛋白可以取代C/EBP α 蛋白发挥相应的作用, 但脂肪组织的形成有障碍, 说明C/EBP α 基因单独表达足以诱导前脂肪细胞3T3-L1向脂肪细胞分化^[58]。Mauser等^[59,60]研究表明, C/EBP α 过表达可以加速前脂肪细胞向成熟细胞的分化, 而反义C/EBP α RNA的表达则可以阻止前脂肪细胞的分化过程, C/EBP α 基因纯和缺失的动物中白色和棕色脂肪均减少, 这些研究均表明C/EBP α 在维持脂肪细胞分化成熟中起着重要的作用。

鉴于C/EBP α 转录因子与维持脂肪细胞分化的相关性和HSC激活过程中维生素A和脂滴的消失现象, 许多学者开始致力于HSC激活过程中C/EBP α 的表达情况及其与HSC激活、增殖关系的研究。结果发现: 静止的HSC中有C/EBP α , β 和 δ 的表达, 活化的HSC及纤维化的肝脏中C/EBP α 的表达下降^[61-63]。体外研究发现在活化的HSC中上调C/EBP α 基因可以抑制HSC的增殖、ECM的产生及 α -SMA的表达, 进而诱导脂滴的重新形成^[64,65]。体内研究也证实了这一点, CCL4诱导小鼠慢性肝纤维化形成12 wk的模型中, 干预的最初1-4 wk和最后9-12 wk均可测得C/EBP α 的高表达, C/EBP α 的高表达明显降低胶原蛋白及羟脯氨酸的表达^[58-66]。因此, C/EBP α 在受损的肝脏中对HSC的激活可能存在负性调控作用。但目前对于C/EBP α 如何影响HSC的机制尚未完全阐明。黄光存等^[8]研究表明: 过表达C/EBP α 可以通过PPAR γ 上调p53基因的表达, 进而上调Fas、肿瘤坏死相关因子凋亡诱导配体及DR5的表达, 从而诱导HSC的凋亡, 抑制肝纤维化。

4 结论

紧扣PARs可通过激活MAPK/ERK信号级联将细胞外信号传递到细胞内引起细胞核反应使许多转录因子活化, 进而介导肝纤维化自动放大循环过程, 受到C/EBP α 转录因子抑制HSC活化和增殖的启发, 我们认为: PARs通过MAPK/ERK信号通路将细胞外信号传递到细胞内, 引起细胞核反应, 使许多转录因子活化, 但C/EBP α 活化促使脂肪细胞分化维持HSC的静止作用难以抗衡PARs对HSC的激活作用, 如果采用外源C/EBP α 来增强细胞内C/EBP α 的表达, 并将其引入到PARs激活HSC中, 深入研究C/EBP α 与PARs在HSC激活中的相互关系, 以期能进一步了解HSC激活机制, 为临床肝纤维化防治寻求新靶点。

5 参考文献

- Pinzani M, Rosselli M, Zuckermann M. Liver cirrhosis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2011; 25: 281-290
- Friedman SL. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol Rev* 2008; 88: 125-172
- Kisseleva T, Brenner DA. Anti-fibrogenic strategies and the regression of fibrosis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2011; 25: 305-317
- Forbes SJ, Parola M. Liver fibrogenic cells. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2011; 25: 207-217
- 顾小红, 房殿春, 陈东风. PARs对肝纤维化大鼠HSC活化和增殖的调控作用. *胃肠病学和肝病学杂志* 2007; 16: 357-360
- Gaça MD, Zhou X, Benyon RC. Regulation of hepatic stellate cell proliferation and collagen synthesis by proteinase-activated receptors. *J Hepatol* 2002; 36: 362-369
- Martinelli A, Knapp S, Anstee Q, Worku M, Tommasi A, Zucoloto S, Goldin R, Thursz M. Effect of a thrombin receptor (protease-activated receptor 1, PAR-1) gene polymorphism in chronic hepatitis C liver fibrosis. *J Gastroenterol Hepatol* 2008; 23: 1403-1409
- Wang X, Huang G, Mei S, Qian J, Ji J, Zhang J. Over-expression of C/EBP-alpha induces apoptosis in cultured rat hepatic stellate cells depending on p53 and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 380: 286-291
- Guo W, Zhang KM, Tu K, Li YX, Zhu L, Xiao HS, Yang Y, Wu JR. Adipogenesis licensing and execution are disparately linked to cell proliferation. *Cell Res* 2009; 19: 216-223
- Sauvant P, Cansell M, Atgié C. Vitamin A and lipid metabolism: relationship between hepatic stellate cells (HSCs) and adipocytes. *J Physiol Biochem* 2011; 67: 487-496
- Dodig M, Ogunwale B, Dasarathy S, Li M, Wang B, McCullough AJ. Differences in regulation of type I collagen synthesis in primary and passaged hepatic stellate cell cultures: the role of alpha5beta1-integrin. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; 293: G154-G164
- Friedman SL. Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. The cellular basis of hepatic fibrosis. Mechanisms and treatment strategies. *N Engl J Med* 1993; 328: 1828-1835
- Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology* 2008; 134: 1655-1669
- Ikegami T, Zhang Y, Matsuzaki Y. Liver fibrosis: possible involvement of EMT. *Cells Tissues Organs* 2007; 185: 213-221
- Rygiel KA, Robertson H, Marshall HL, Pekalski M, Zhao L, Booth TA, Jones DE, Burt AD, Kirby JA. Epithelial-mesenchymal transition contributes to portal tract fibrogenesis during human chronic liver disease. *Lab Invest* 2008; 88: 112-123
- Forbes SJ, Russo FP, Rey V, Burra P, Rugge M, Wright NA, Alison MR. A significant proportion of myofibroblasts are of bone marrow origin in human liver fibrosis. *Gastroenterology* 2004; 126: 955-963
- Higashiyama R, Inagaki Y, Hong YY, Kushida M, Nakao S, Niioka M, Watanabe T, Okano H, Matsuzaki Y, Shiota G, Okazaki I. Bone marrow-derived cells express matrix metalloproteinases and contrib-

- ute to regression of liver fibrosis in mice. *Hepatology* 2007; 45: 213-222
- 18 Russo FP, Alison MR, Bigger BW, Amofah E, Florou A, Amin F, Bou-Gharios G, Jeffery R, Iredale JP, Forbes SJ. The bone marrow functionally contributes to liver fibrosis. *Gastroenterology* 2006; 130: 1807-1821
 - 19 Romagnani P, Lasagni L, Romagnani S. Peripheral blood as a source of stem cells for regenerative medicine. *Expert Opin Biol Ther* 2006; 6: 193-202
 - 20 Henderson NC, Forbes SJ. Hepatic fibrogenesis: from within and outwith. *Toxicology* 2008; 254: 130-135
 - 21 Friedman SL. Hepatic fibrosis -- overview. *Toxicology* 2008; 254: 120-129
 - 22 Atzori L, Poli G, Perra A. Hepatic stellate cell: a star cell in the liver. *Int J Biochem Cell Biol* 2009; 41: 1639-1642
 - 23 Henderson NC, Iredale JP. Liver fibrosis: cellular mechanisms of progression and resolution. *Clin Sci (Lond)* 2007; 112: 265-280
 - 24 Ahern M, Hall P, Halliday J. Hepatic stellate cell nomenclature. *Hepatology* 1996; 23: 193
 - 25 Jiao J, Friedman SL, Aloman C. Hepatic fibrosis. *Curr Opin Gastroenterol* 2009; 25: 223-229
 - 26 Blaner WS, O'Byrne SM, Wongsiriroj N, Kluwe J, D'Ambrosio DM, Jiang H, Schwabe RF, Hillman EM, Piantadosi R, Libien J. Hepatic stellate cell lipid droplets: a specialized lipid droplet for retinoid storage. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1791: 467-473
 - 27 Kluwe J, Wongsiriroj N, Troeger JS, Gwak GY, Dapito DH, Pradere JP, Jiang H, Siddiqi M, Piantadosi R, O'Byrne SM, Blaner WS, Schwabe RF. Absence of hepatic stellate cell retinoid lipid droplets does not enhance hepatic fibrosis but decreases hepatic carcinogenesis. *Gut* 2011; 60: 1260-1268
 - 28 Mansy SS, Elkhafif NA, Abelfatah AS, Yehia HA, Mostafa I. Hepatic stellate cells and fibrogenesis in hepatitis C virus infection: an ultrastructural insight. *Ultrastruct Pathol* 2010; 34: 62-67
 - 29 Plewka K, Szuster-Ciesielska A, Kandefer-Szerszeń M. [Role of stellate cells in alcoholic liver fibrosis]. *Postępy Hig Med Dosw (Online)* 2009; 63: 303-317
 - 30 Polyzos SA, Kountouras J, Zavos C, Tsiaousi E. The role of adiponectin in the pathogenesis and treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *Diabetes Obes Metab* 2010; 12: 365-383
 - 31 Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 2005; 115: 209-218
 - 32 邵祥强, 肖华胜. 肝纤维化发病机制与临床诊断的研究进展. *世界华人消化杂志* 2011; 19: 268-274
 - 33 Gressner OA, Rizk MS, Kovalenko E, Weiskirchen R, Gressner AM. Changing the pathogenetic roadmap of liver fibrosis? Where did it start; where will it go? *J Gastroenterol Hepatol* 2008; 23: 1024-1035
 - 34 Balabaud C, Bioulac-Sage P. Cirrhosis: what else? *Gastroenterol Clin Biol* 2010; 34: 252-254
 - 35 党双锁, 李亚萍. TGF- β 1在肝纤维化研究中的新进展. *世界华人消化杂志* 2010; 18: 1631-1636
 - 36 Masamune A, Kikuta K, Satoh M, Suzuki N, Shimosegawa T. Protease-activated receptor-2-mediated proliferation and collagen production of rat pancreatic stellate cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 312: 651-658
 - 37 Materazzi S, Pellerito S, Di Serio C, Paglierani M, Naldini A, Ardinghi C, Carraro F, Geppetti P, Cirino G, Santucci M, Tarantini F, Massi D. Analysis of protease-activated receptor-1 and -2 in human scar formation. *J Pathol* 2007; 212: 440-449
 - 38 Fiorucci S, Antonelli E, Distrutti E, Severino B, Fiorentina R, Baldoni M, Caliendo G, Santagada V, Morelli A, Cirino G. PAR1 antagonism protects against experimental liver fibrosis. Role of proteinase receptors in stellate cell activation. *Hepatology* 2004; 39: 365-375
 - 39 Calvaruso V, Maimone S, Gatt A, Tuddenham E, Thursz M, Pinzani M, Burroughs AK. Coagulation and fibrosis in chronic liver disease. *Gut* 2008; 57: 1722-1727
 - 40 Marra F, Grandaliano G, Valente AJ, Abboud HE. Thrombin stimulates proliferation of liver fat-storing cells and expression of monocyte chemotactic protein-1: potential role in liver injury. *Hepatology* 1995; 22: 780-787
 - 41 Rullier A, Senant N, Kisiel W, Bioulac-Sage P, Balabaud C, Le Bail B, Rosenbaum J. Expression of protease-activated receptors and tissue factor in human liver. *Virchows Arch* 2006; 448: 46-51
 - 42 顾小红, 张云东, 刘迎春. PARs调控大鼠HSC合成和分泌胶原蛋白的作用. *重庆医科大学学报* 2010; 35: 985-988
 - 43 顾小红, 张云东. 蛋白酶活化受体2对大鼠肝星状细胞分泌MCP21的诱导作用. *重庆医学* 2009; 38: 288-292
 - 44 Namkung W, Yoon JS, Kim KH, Lee MG. PAR2 exerts local protection against acute pancreatitis via modulation of MAP kinase and MAP kinase phosphatase signaling. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008; 295: G886-G894
 - 45 Rullier A, Gillibert-Duplantier J, Costet P, Cubel G, Haurie V, Petibois C, Taras D, Dugot-Senant N, Deleris G, Bioulac-Sage P, Rosenbaum J. Protease-activated receptor 1 knockout reduces experimentally induced liver fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008; 294: G226-G235
 - 46 McCoy KL, Traynelis SF, Hepler JR. PAR1 and PAR2 couple to overlapping and distinct sets of G proteins and linked signaling pathways to differentially regulate cell physiology. *Mol Pharmacol* 2010; 77: 1005-1015
 - 47 Mann DA, Marra F. Fibrogenic signalling in hepatic stellate cells. *J Hepatol* 2010; 52: 949-950
 - 48 Hernandez-Gea V, Friedman SL. Pathogenesis of liver fibrosis. *Annu Rev Pathol* 2011; 6: 425-456
 - 49 Friedman SL. Transcriptional regulation of stellate cell activation. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21 Suppl 3: S79-S83
 - 50 She H, Xiong S, Hazra S, Tsukamoto H. Adipogenic transcriptional regulation of hepatic stellate cells. *J Biol Chem* 2005; 280: 4959-4967
 - 51 Mir RA, Chauhan SS. Down regulation of a matrix degrading cysteine protease cathepsin L, by acetaldehyde: role of C/EBP α . *PLoS One* 2011; 6: e20768
 - 52 Nerlov C. The C/EBP family of transcription factors: a paradigm for interaction between gene expression and proliferation control. *Trends Cell Biol* 2007; 17: 318-324
 - 53 Kim N, Choi S, Lim C, Lee H, Oh J. Albumin mediates PPAR-gamma or C/EBP-alpha-induced phenotypic changes in pancreatic stellate cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 391: 640-644
 - 54 Lu GD, Leung CH, Yan B, Tan CM, Low SY, Aung MO, Salto-Tellez M, Lim SG, Hooi SC. C/EBP α is up-regulated in a subset of hepatocellular carcinomas and plays a role in cell growth and proliferation. *Gastroenterology* 2010; 139: 632-643, 643. e1-e4
 - 55 Shafiei MS, Shetty S, Scherer PE, Rockey DC. Adi-

■创新盘点

本文结合肝星状细胞激活的内外机制, 将蛋白酶活化受体与转录因子CCAAT增强子结合蛋白引入到激活的肝星状细胞中, 以期发现肝星状细胞激活的机制提供新的依据。

■同行评价

本文从细胞水平阐述了肝星状细胞在肝纤维化过程中的可能作用机制,从基因、蛋白水平推测了C/EBP α 基因与PARs在上述过程中的表达变化及作用,并提出了自己的观点及可能的研究方向,为肝纤维化的防治提供靶点。

- ponectin regulation of stellate cell activation via PPAR γ -dependent and -independent mechanisms. *Am J Pathol* 2011; 178: 2690-2699
- 56 Zhang JW, Tang QQ, Vinson C, Lane MD. Dominant-negative C/EBP disrupts mitotic clonal expansion and differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 43-47
- 57 Prusty D, Park BH, Davis K E, Farmer SR. Activation of MEK/ERK Signaling Promotes Adipogenesis by Enhancing Peroxisome Proliferator-activated Receptor (PPAR γ) and C/EBP α Gene Expression during the Differentiation of 3T3-L1 Preadipocytes. *J Biol Chem* 2002; 277: 46226-46232
- 58 Mei S, Wang X, Zhang J, Qian J, Ji J. In vivo transfection of C/EBP-alpha gene could ameliorate CCL(4)-induced hepatic fibrosis in mice. *Hepato Res* 2007; 37: 531-539
- 59 Mäuser W, Perwitz N, Meier B, Fasshauer M, Klein J. Direct adipotropic actions of atorvastatin: differentiation state-dependent induction of apoptosis, modulation of endocrine function, and inhibition of glucose uptake. *Eur J Pharmacol* 2007; 564: 37-46
- 60 Shen SM, Yu Y, Wu ZX, Zheng Y, Chen GQ, Wang LS. Apoptosis-inducing factor is a target gene of C/EBP α and participates in adipocyte differentiation. *FEBS Lett* 2011; 585: 2307-2312
- 61 Huang GC, Zhang JS, Tang QQ. Involvement of C/EBP-alpha gene in in vitro activation of rat hepatic stellate cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 324: 1309-1318
- 62 Geier A, Kim SK, Gerloff T, Dietrich CG, Lammert F, Karpen SJ, Stieger B, Meier PJ, Matern S, Gartung C. Hepatobiliary organic anion transporters are differentially regulated in acute toxic liver injury induced by carbon tetrachloride. *J Hepatol* 2002; 37: 198-205
- 63 Tsukamoto H, She H, Hazra S, Cheng J, Miyahara T. Anti-adipogenic regulation underlies hepatic stellate cell transdifferentiation. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21 Suppl 3: S102-S105
- 64 Guimarães EL, Franceschi MF, Andrade CM, Guaragna RM, Borojevic R, Margis R, Bernard EA, Guma FC. Hepatic stellate cell line modulates lipogenic transcription factors. *Liver Int* 2007; 27: 1255-1264
- 65 Mann J, Mann DA. Transcriptional regulation of hepatic stellate cells. *Adv Drug Deliv Rev* 2009; 61: 497-512
- 66 Iredale JP. Models of liver fibrosis: exploring the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ. *J Clin Invest* 2007; 117: 539-548

编辑 曹丽鸥 电编 闫晋利

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”的右上角注角码号;若正文中仅引用某文献中的论述,则在该论述的句末右上角注角码号。如马连生^[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。

丙型肝炎病毒感染相关睡眠障碍的研究进展

孙晓琦, 方南元, 张征波, 薛博瑜

孙晓琦, 方南元, 张征波, 薛博瑜, 南京中医药大学第一临床医学院 江苏省南京市 210000

艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治国家科技重大专项“慢性丙型肝炎证候规律及中西医结合治疗方案研究”, No. 2008ZX10005-009

作者贡献分布: 本文综述由孙晓琦、方南元及张征波完成; 薛博瑜审校。

通讯作者: 薛博瑜, 教授, 博士生导师, 210000, 江苏省南京市, 南京中医药大学第一临床医学院中医内科学教研室, 国家中医药管理局重点学科中医肝病学科。xueboyu9502@sina.com
电话: 025-85811626

收稿日期: 2011-08-14 修回日期: 2011-10-25

接受日期: 2011-11-04 在线出版日期: 2011-12-28

Advances in research of sleep disturbance in patients with hepatitis C virus infection

Xiao-Qi Sun, Nan-Yuan Fang, Zheng-Bo Zhang, Bo-Yu Xue

Xiao-Qi Sun, Nan-Yuan Fang, Zheng-Bo Zhang, Bo-Yu Xue, the First Clinical Medical College, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210000, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Bo-Yu Xue, Professor, Department of Chinese Internal Medicine, the First Clinical Medical College, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210000, Jiangsu Province, China. xueboyu9502@sina.com
Received: 2011-08-14 Revised: 2011-10-25
Accepted: 2011-11-04 Published online: 2011-12-28

Abstract

According to the WHO statistics, approximately 171 million people are infected by hepatitis C virus (HCV) worldwide. Chronic HCV infection is associated with physical and mental symptoms including fatigue, sleep disturbance, and depression that adversely affect quality of life. But sleep disturbance has received little attention in the literature, with the exception of sleep changes noted in patients with cirrhosis and end-stage liver disease. More studies focusing on the role of chronic hepatitis C (CHC) infection in the development of sleep disorders are needed. Increased knowledge about the mechanisms behind the pathogenesis of sleep disturbance in patients with CHC will help us develop appropriate treatments.

Key Words: Hepatitis C virus; Chronic hepatitis C;

Sleep disorders

Sun XQ, Fang NY, Zhang ZB, Xue BY. Advances in research of sleep disturbance in patients with hepatitis C virus infection. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(36): 3661-3665

摘要

据WHO的统计, 全球约有1.71亿人罹患丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)的感染^[1]。伴随HCV的感染, 患者常常会出现疲劳、睡眠障碍、抑郁等身心异常的状态。既往有文献报道丙肝患者存在睡眠的问题, 但往往淹没在众多肝纤维化及终末期肝病相关的睡眠障碍文献中, 鲜有人关注与HCV感染直接相关的睡眠障碍^[2]。近年来, 有少量的文献致力于慢性丙型肝炎睡眠障碍的探讨, 让人惊讶的是睡眠问题在慢性丙肝患者中存在着很大程度的普遍性, 有证据提示其可能独立于干扰素的治疗。对HCV感染相关睡眠障碍的研究可能会为慢性丙型肝炎的发生、发展及转归提供新的研究思路, 也有利于提高患者生活质量, 优化现有的治疗方案。

关键词: 丙型肝炎病毒; 慢性丙型肝炎; 睡眠障碍

孙晓琦, 方南元, 张征波, 薛博瑜. 丙型肝炎病毒感染相关睡眠障碍的研究进展. 世界华人消化杂志 2011; 19(36): 3661-3665
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/3661.asp>

0 引言

在慢性丙型肝炎(chronic hepatitis C, CHC)患者的诸多症状中, 倦怠是最明显的^[3]。事实上, 对CHC的研究显示超过97%的患者存在疲倦^[4,5], 同时可伴有社交能力、身体机能的减退以及明显的抑郁^[6]。疲倦和抑郁在丙肝患者的诸多症状中被得到重视, 但作为一项与疲倦密切相关的症状-睡眠障碍, 却很少受到关注^[7]。睡眠障碍分为原发性和继发性, 最新的定义将睡眠障碍分为8个主要类别: 失眠、睡眠相关性的呼吸障碍、中枢性嗜睡、周期性睡眠节律失调、异态睡眠、睡眠相关的动作失调、与睡眠障碍

■背景资料

在中国, 慢性丙型肝炎与艾滋病、慢性乙型肝炎等慢性传染性疾病成为了重大的公共卫生问题, 但现有的治疗方法较为单一, 且疗效并不显著。而在临床上很多慢性丙肝患者存在睡眠障碍, 这引发了我们思考丙肝发病机制的新思路。

■同行评议者

胡国信, 副教授, 南昌大学第一附属医院感染内科

■ 研究前沿

近年来从事相关研究主要集中在临床观察, 而从机制探讨的较少. 但HCV感染常伴随HIV感染或经干扰素治疗后, 会出现一定的睡眠问题, 这为相关研究增加了一定的困难.

相关性的综合征及其他睡眠障碍^[8]. 常见的有异态睡眠(主要包括夜惊、夜游及快速动眼期的动作失调)、失眠、睡眠相关性的呼吸障碍及睡眠相关的动作失调(主要表现为不宁腿综合征)等. 本文旨在探讨CHC患者存在的睡眠障碍问题, 包括经或不经干扰素 α (interferon α , IFN α)治疗, 以及这一症状产生的潜在机制.

1 未行抗病毒治疗相关的睡眠障碍

慢性丙型肝炎患者的疲劳症状相当常见, 其中一个重要的原因在于睡眠障碍. 有研究认为对于未进行治疗的CHC患者中, 大约有60%存在睡眠问题^[14]. 丙肝患者常由于静脉注射染病, 药物的毒副作用或戒断综合征等进而对睡眠产生影响. 情绪失调、抑郁症也常出现在CHC患者中, 这些因素均可导致睡眠障碍的产生^[9].

Carlson等^[10]研究了80例HCV感染患者的睡眠问题. 受试者完成了匹兹堡睡眠质量指数(Pittsburgh Sleep Quality Index, PSQI^[11])和疲惫严重积分(Fatigue Severity Scale, FSS^[12]), 并收集相关的精神病学和肝病阶段的信息. PSQI结果中, 大约63%的患者存在失眠, 而有56人(70%)达到显著疲倦的标准. 研究结果显示, PSQI与FSS之间存在显著联系. 进一步地分析揭示睡眠障碍与有无精神疾病没有明显相关性. 睡眠质量的下降与肝病在进展中所处的阶段无关, 提示了睡眠障碍不仅仅是终末期肝病的独有表现.

Clifford等^[13]对264名感染人类获得性免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)的患者的睡眠障碍问题进行了研究, 其中30名患者合并感染了HCV. 在排除了由于抑郁、焦虑及认知功能障碍所导致的睡眠障碍后, 他们采用了PSQI检测过去1 mo内的睡眠质量. 观察量表提供了包括: 睡眠质量、睡眠潜伏时间、睡眠持续时间、习惯性睡眠效率、睡眠惊扰次数, 使用安眠药物和白天的不适等相关指标. 相较于单纯HIV感染的患者, HCV和HIV合并感染的患者存在的睡眠问题更为严重, 主要表现为睡眠质量存在显著差异. 此外, 本研究结果亦显示: 与单纯HIV感染患者比较, 合并感染的患者更容易出现抑郁、身体反应速度及记忆力下降等临床表现.

Lang等^[14]在对188例未进行治疗的CHC患者的研究发现, 约有65%的患者存在睡眠问题, 睡眠问题是患者的十大最明显症状之一. 与抑郁、身体疲倦、精神倦怠及健忘等症状不同,

睡眠问题在不同性别中的发生率没有差异. 此外, 在对丙肝患者采用跨度为0-10的视觉模拟量表检查(越高的分值表示在过去3 mo中的症状越为严重). 结果显示接受检查的患者中, 睡眠问题的分值达到了8, 是出现的21个症状中分值最高的一项.

CHC发展至终末期肝病也会产生睡眠障碍^[15]. 巴西的一项研究观察了42名肝硬化患者与24名正常人的睡眠多导图, 结果显示肝硬化患者睡眠效率下降, 快速动眼期(REM)睡眠增加^[16]. 而一项主要针对丙肝后肝硬化患者的研究中, 入组患者在排除肝性脑病后, 其中50%患者自我陈述存在睡眠问题, 35%的患者睡眠动作电位图检测提示存在睡眠障碍, 较健康对照组高出4.5%^[17,18].

2 与抗病毒治疗相关的睡眠障碍

CHC患者接受干扰素治疗会增加睡眠障碍发生的风险^[19]. 大规模的临床试验显示, 常规干扰素治疗出现睡眠障碍的比率基本保持在22%-24%^[20,21]. 有将近25%-33%的患者在应用干扰素后会出现抑郁, 伴有睡眠障碍, 并且常常合并其他情绪障碍^[22,23], 因此干扰素导致的睡眠障碍的出现比率难以与干扰素导致的抑郁伴随的睡眠障碍相区分^[24]. 有证据显示, 包括睡眠障碍在内的植物神经功能紊乱是CHC患者干扰素治疗后出现抑郁的早期症状或罹患的危险因素^[25,26]. 一项对71例CHC患者进行的48 wk干扰素治疗的前瞻性研究显示, 睡眠障碍与抑郁及自杀倾向有显著的相关^[27,28]. 在进一步对其中46例^[29]干扰素治疗组的患者运用PSQI后显示, 失眠可能是干扰素治疗后抑郁的前驱症状, 而在治疗前改善睡眠障碍有助于减少由于干扰素所引发抑郁的潜在风险.

其他一些对病情早期睡眠障碍的研究主要侧重于与干扰素治疗相关的抑郁症间的关系. 研究者们运用PSQI对睡眠质量进行检测, 采用临床访视诊断抑郁症. 结果显示, 在干扰素治疗中, 睡眠质量与抑郁相关, 但是抑郁并不一定和睡眠质量的程度有关^[30]. 然而, CHC患者中有一种特殊基因型的患者睡眠问题相对不严重, 而恰恰这种基因型的患者也较少出现抑郁症, 这个结果揭示了在CHC患者中睡眠质量与抑郁症的潜在联系^[31].

Malaguarnera等^[32]观察96例行干扰素治疗的CHC患者, 发现与重组IFN α -2a相比, 接受重

组IFN α -2b的患者出现晚间失眠与持续性失眠的比率更高。这可能与IFN α -2b在体内快速吸收有关。此外,有学者认为聚乙二醇 α 干扰素在治疗CHC时可出现不宁腿综合征,而这一症状可在治疗结束后消失^[33]。

近年来许多学者对于干扰素治疗后产生的睡眠障碍的潜在机制进行了研究。这些研究主要集中在一些细胞因子及5-羟色胺(5-HT)代谢方面。目前越来越多的研究提示IL-6、IL-1、TNF参与对睡眠调控的影响^[34,35]。IL-6介导了与睡眠相关的细胞因子IL-1、TNF。有观察显示IL-6水平升高可以导致以白天嗜睡为表现的睡眠障碍,进一步揭示细胞因子水平的改变与睡眠障碍显著相关^[36,37]。IL-1能诱导睡眠,有初步证据显示IFN- α 可导致IL-1的分泌。这些细胞因子的异常或许可以解释IFN- α 导致的嗜睡^[38,39]。

IFN- α 导致的睡眠调节异常与5-羟色胺的代谢相关^[40,41]。IFN- α 增加了一种色氨酸分解代谢: 吲哚胺-2, 3-双加氧酶(IDO)的活性,还增加了犬尿氨酸的水平,并能导致5-HT及色氨酸水平的减少^[42]。正常情况下,在抑郁状态中色氨酸的急性衰竭导致了睡眠障碍,这样的睡眠障碍尤其表现为睡眠及快速动眼潜伏期的减少,增加REM的比例^[43],并且睡眠障碍的反复出现与情绪异常并无相关,他与低色氨酸及低5-HT水平有关^[44,45]。Wichers等^[46]详尽地描述了对IDO-IFN α 的假说,认为IFN α 导致的神经症状来源于增加IDO活性后产生的神经毒性,并检测到了喹啉酸(犬尿氨酸代谢中的一种神经毒性物质)水平的增加。此外,犬尿氨酸和色氨酸的水平在经过IFN α 治疗后可回到治疗前水平^[47]。实验结果显示IDO的激活在无抑郁而接受IFN α 治疗的CHC患者中与睡眠障碍的发生有密切关系。此外,目前尚有些研究认为IFN α 还可以导致发作性睡眠,其机制可能跟人类白细胞抗原DR2(HLA-DR2)相关^[48]。

3 结论

HCV感染相关的睡眠障碍,在临床上经常发生,较大地影响了患者的生活质量。虽然此症状出现频率不低,但临床关注程度并不高。截至目前,为数较少的文献均提示了HCV的感染与患者的睡眠障碍存在一定的联系。此外,除睡眠及精神症状外,近年来与HCV感染相关的周围及中枢神经症状的临床病例也时有报道^[49,50],从侧面提示了HCV产生失眠、抑郁等相关精神症状可能

存在的致病机制。然而,纵观现有的文献,首先有些研究缺少精神心理方面的测试,导致终末期肝病后的精神异常与干扰素治疗后的精神症状区分不明显。其次,研究病例样本偏少亦使得结果的代表性不够强。令人欣慰的是,对HCV感染相关睡眠障碍的研究为我们对丙型肝炎的进一步研究启示了新的思路和视角,对睡眠质量的诊断与治疗做进一步的深入探讨亦有利于在临床治疗中优化现有的治疗方案,提高患者生活质量。

4 参考文献

- 1 WHO. Hepatitis C: global prevalence. *Wkly Epidemiol Rec* 1997; 72: 341-344
- 2 Sockalingam S, Blank D, Al Jarad A, Alosaimi F, Hirschfield G, Abbey SE. A comparison of depression screening instruments in hepatitis C and the impact of depression on somatic symptoms. *Psychosomatics* 2011; 52: 433-440
- 3 Mucsi I, Molnar MZ, Ambrus C, Szeifert L, Kovacs AZ, Zoller R, Barótfi S, Rempert A, Novak M. Restless legs syndrome, insomnia and quality of life in patients on maintenance dialysis. *Nephrol Dial Transplant* 2005; 20: 571-577
- 4 Lee DH, Jamal H, Regenstien FG, Perrillo RP. Morbidity of chronic hepatitis C as seen in a tertiary care medical center. *Dig Dis Sci* 1997; 42: 186-191
- 5 Poynard T, Cacoub P, Ratziau V, Myers RP, Dezailles MH, Mercadier A, Ghillani P, Charlotte F, Piette JC, Moussalli J. Fatigue in patients with chronic hepatitis C. *J Viral Hepat* 2002; 9: 295-303
- 6 Hilsabeck RC, Hassanein TI, Perry W. Biopsychosocial predictors of fatigue in chronic hepatitis C. *J Psychosom Res* 2005; 58: 173-178
- 7 Kanwal F, Gralnek IM, Hays RD, Zeringue A, Durazo F, Han SB, Saab S, Bolus R, Spiegel BM. Health-related quality of life predicts mortality in patients with advanced chronic liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2009; 7: 793-799
- 8 American Academy of Sleep Medicine. The International Classification of Sleep Disorders, Diagnostic and Coding Manual 2nd ed. Westchester, IL: American Academy of Sleep Medicine, 2005
- 9 Carta MG, Hardoy MC, Garofalo A, Pisano E, Nonnoi V, Intilla G, Serra G, Balestrieri C, Chessa L, Cauli C, Lai ME, Farci P. Association of chronic hepatitis C with major depressive disorders: irrespective of interferon-alpha therapy. *Clin Pract Epidemiol Ment Health* 2007; 3: 22
- 10 Carlson MD, Hilsabeck RC, Barakat F, Perry W. Role of Sleep Disturbance in Chronic Hepatitis C Infection. *Curr Hepat Rep* 2010; 9: 25-29
- 11 Buysse DJ, Reynolds CF, Monk TH, Berman SR, Kupfer DJ. The Pittsburgh Sleep Quality Index: a new instrument for psychiatric practice and research. *Psychiatry Res* 1989; 28: 193-213
- 12 Krupp LB, LaRocca NG, Muir-Nash J, Steinberg AD. The fatigue severity scale. Application to patients with multiple sclerosis and systemic lupus erythematosus. *Arch Neurol* 1989; 46: 1121-1123
- 13 Clifford DB, Evans SR, Yang Y, Gulick RM. The neuropsychological and neurological impact of

■创新盘点

通过总结近年来对慢性丙肝患者相关睡眠障碍的文献,探讨潜在机制并有利于在临床治疗中优化现有的治疗方案,提高患者生活质量。

■名词解释

睡眠障碍: 睡眠量不正常以及睡眠中出现异常行为的表现, 也是睡眠和觉醒正常节律性交替紊乱的表现. 美国睡眠医学科学院最新的定义包括一下8类: 失眠、睡眠相关性的呼吸障碍、中枢性嗜睡、周期性睡眠节律失调、异态睡眠、睡眠相关的动作失调、与睡眠障碍相关性的综合征及其他睡眠障碍.

- hepatitis C virus co-infection in HIV-infected subjects. *AIDS* 2005; 19 Suppl 3: S64-S71
- 14 Lang CA, Conrad S, Garrett L, Battistutta D, Cooksley WG, Dunne MP, Macdonald GA. Symptom prevalence and clustering of symptoms in people living with chronic hepatitis C infection. *J Pain Symptom Manage* 2006; 31: 335-344
- 15 Mostacci B, Ferlisi M, Baldi Antognini A, Sama C, Morelli C, Mondini S, Cirignotta F. Sleep disturbance and daytime sleepiness in patients with cirrhosis: a case control study. *Neurol Sci* 2008; 29: 237-240
- 16 Crespo J, Cifrián J, Pinto JA, Jiménez-Gómez A, Pons-Romero F. Sleep apnea obstructive syndrome: a new complication previously undescribed in cirrhotic patients with ascites. *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 2815-2816
- 17 Córdoba J, Cabrera J, Lataif L, Penev P, Zee P, Blei AT. High prevalence of sleep disturbance in cirrhosis. *Hepatology* 1998; 27: 339-345
- 18 Morgenthaler T, Alessi C, Friedman L, Owens J, Kapur V, Boehlecke B, Brown T, Chesson A, Coleman J, Lee-Chiong T, Pancer J, Swick TJ. Practice parameters for the use of actigraphy in the assessment of sleep and sleep disorders: an update for 2007. *Sleep* 2007; 30: 519-529
- 19 Heathcote EJ, Shiffman ML, Cooksley WG, Dushenko GM, Lee SS, Balart L, Reindollar R, Reddy RK, Wright TL, Lin A, Hoffman J, De Pamphilis J. Peginterferon alfa-2a in patients with chronic hepatitis C and cirrhosis. *N Engl J Med* 2000; 343: 1673-1680
- 20 Zeuzem S, Feinman SV, Rasenack J, Heathcote EJ, Lai MY, Gane E, O'Grady J, Reichen J, Diago M, Lin A, Hoffman J, Brunda MJ. Peginterferon alfa-2a in patients with chronic hepatitis C. *N Engl J Med* 2000; 343: 1666-1672
- 21 Reddy KR, Wright TL, Pockros PJ, Shiffman M, Everson G, Reindollar R, Fried MW, Purdum PP, Jensen D, Smith C, Lee WM, Boyer TD, Lin A, Pedder S, DePamphilis J. Efficacy and safety of pegylated (40-kd) interferon alpha-2a compared with interferon alpha-2a in noncirrhotic patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2001; 33: 433-438
- 22 Tembl JJ, Ferrer JM, Sevilla MT, Lago A, Mayor-domo F, Vilchez JJ. Neurologic complications associated with hepatitis C virus infection. *Neurology* 1999; 53: 861-864
- 23 Bonaccorso S, Marino V, Biondi M, Grimaldi F, Ippoliti F, Maes M. Depression induced by treatment with interferon-alpha in patients affected by hepatitis C virus. *J Affect Disord* 2002; 72: 237-241
- 24 Diez-Quevedo C, Masnou H, Planas R, Castellví P, Giménez D, Morillas RM, Martín-Santos R, Navinés R, Solà R, Giner P, Ardèvol M, Costa J, Diago M, Pretel J. Prophylactic treatment with escitalopram of pegylated interferon alfa-2a-induced depression in hepatitis C: a 12-week, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Clin Psychiatry* 2011; 72: 522-528
- 25 Wichers MC, Koek GH, Robaey G, Praamstra AJ, Maes M. Early increase in vegetative symptoms predicts IFN-alpha-induced cognitive-depressive changes. *Psychol Med* 2005; 35: 433-441
- 26 Galvão-de Almeida A, Quarantini LC, Batista-Neves S, Lyra AC, Paraná R, de Oliveira IR, Miranda-Scippa A, Guindalini C. Is the interferon- α -triggered depressive episode a self-limited kind of depression? Four cases of persistent affective symptoms after antiviral treatment in HCV-infected individuals. *World J Biol Psychiatry* 2010; 11: 914-918
- 27 Gohier B, Goeb JL, Rannou-Dubas K, Fouchard I, Calès P, Garré JB. Hepatitis C, alpha interferon, anxiety and depression disorders: a prospective study of 71 patients. *World J Biol Psychiatry* 2003; 4: 115-118
- 28 Smith KJ, Norris S, O'Farrelly C, O'Mara SM. Risk factors for the development of depression in patients with hepatitis C taking interferon- α . *Neuropsychiatr Dis Treat* 2011; 7: 275-292
- 29 Franzen PL, Buysse DJ, Rabinovitz M, Pollock BG, Lotrich FE. Poor sleep quality predicts onset of either major depression or subsyndromal depression with irritability during interferon-alpha treatment. *Psychiatry Res* 2010; 177: 240-245
- 30 Prather AA, Rabinovitz M, Pollock BG, Lotrich FE. Cytokine-induced depression during IFN-alpha treatment: the role of IL-6 and sleep quality. *Brain Behav Immun* 2009; 23: 1109-1116
- 31 Lotrich FE, Ferrell RE, Rabinovitz M, Pollock BG. Risk for depression during interferon-alpha treatment is affected by the serotonin transporter polymorphism. *Biol Psychiatry* 2009; 65: 344-348
- 32 Malaguarnera M, Laurino A, Di Fazio I, Pistone G, Castorina M, Guccione N, Rampello L. Neuropsychiatric effects and type of IFN-alpha in chronic hepatitis C. *J Interferon Cytokine Res* 2001; 21: 273-278
- 33 LaRoche JS, Karp BI. Restless legs syndrome due to interferon-alpha. *Mov Disord* 2004; 19: 730-731
- 34 Krueger JM, Majde JA. Humoral links between sleep and the immune system: research issues. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 992: 9-20
- 35 Opp MR. Sleep and psychoneuroimmunology. *Immunol Allergy Clin North Am* 2009; 29: 295-307
- 36 Okun ML, Giese S, Lin L, Einen M, Mignot E, Cousons-Read ME. Exploring the cytokine and endocrine involvement in narcolepsy. *Brain Behav Immun* 2004; 18: 326-332
- 37 Vgontzas AN, Papanicolaou DA, Bixler EO, Litsikas A, Zachman K, Kales A, Prolo P, Wong ML, Licinio J, Gold PW, Hermida RC, Mastorakos G, Chrousos GP. Circadian interleukin-6 secretion and quantity and depth of sleep. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 2603-2607
- 38 Fontana A, Gast H, Reith W, Recher M, Birchler T, Bassetti CL. Narcolepsy: autoimmunity, effector T cell activation due to infection, or T cell independent, major histocompatibility complex class II induced neuronal loss? *Brain* 2010; 133: 1300-1311
- 39 Kapsimalis F, Basta M, Varouchakis G, Gourgoulialis K, Vgontzas A, Kryger M. Cytokines and pathological sleep. *Sleep Med* 2008; 9: 603-614
- 40 Landolt HP, Wehrle R. Antagonism of serotonergic 5-HT_{2A}/2C receptors: mutual improvement of sleep, cognition and mood? *Eur J Neurosci* 2009; 29: 1795-1809
- 41 Ruhé HG, Mason NS, Schene AH. Mood is indirectly related to serotonin, norepinephrine and dopamine levels in humans: a meta-analysis of monoamine depletion studies. *Mol Psychiatry* 2007; 12: 331-359
- 42 Bonaccorso S, Marino V, Puzella A, Pasquini M, Biondi M, Artini M, Almerighi C, Verkerk R, Meltzer H, Maes M. Increased depressive ratings in patients with hepatitis C receiving interferon-alpha-based immunotherapy are related to interferon-alpha-induced changes in the serotonergic system. *J*

- Clin Psychopharmacol* 2002; 22: 86-90
- 43 Haynes PL, McQuaid JR, Kelsoe J, Rapaport M, Gillin JC. Affective state and EEG sleep profile in response to rapid tryptophan depletion in recently recovered nonmedicated depressed individuals. *J Affect Disord* 2004; 83: 253-262
- 44 Landolt HP, Kelsoe JR, Rapaport MH, Gillin JC. Rapid tryptophan depletion reverses phenelzine-induced suppression of REM sleep. *J Sleep Res* 2003; 12: 13-18
- 45 Moore P, Gillin C, Bhatti T, DeModena A, Seifritz E, Clark C, Stahl S, Rapaport M, Kelsoe J. Rapid tryptophan depletion, sleep electroencephalogram, and mood in men with remitted depression on serotonin reuptake inhibitors. *Arch Gen Psychiatry* 1998; 55: 534-539
- 46 Wichers MC, Koek GH, Robaey G, Verkerk R, Scharpé S, Maes M. IDO and interferon-alpha-induced depressive symptoms: a shift in hypothesis from tryptophan depletion to neurotoxicity. *Mol Psychiatry* 2005; 10: 538-544
- 47 Zignego AL, Cozzi A, Carpenedo R, Giannini C, Rosselli M, Biagioli T, Aldinucci A, Laffi G, Moroni F. HCV patients, psychopathology and tryptophan metabolism: analysis of the effects of pegylated interferon plus ribavirin treatment. *Dig Liver Dis* 2007; 39 Suppl 1: S107-S111
- 48 Wiecek S, Dahmen N, Kasten M, Epplen JT, Gencik M. A rare form of narcolepsy (HLA-DR2-) shows possible association with (functionally relevant) alpha-interferon gene polymorphisms. *Psychiatr Genet* 2004; 14: 47-51
- 49 Clifford DB, Smurzynski M, Park LS, Yeh TM, Zhao Y, Blair L, Arens M, Evans SR. Effects of active HCV replication on neurologic status in HIV RNA virally suppressed patients. *Neurology* 2009; 73: 309-314
- 50 De Carli DM, Pannebeker J, Pedro FL, Hayger CJ, Hertz E, Beck Mde O. Transverse myelitis associated to HCV infection. *Braz J Infect Dis* 2009; 13: 147-152

■同行评价

本文从新的研究视角来探讨慢性丙型肝炎及其与睡眠障碍的关系,为丙型肝炎的诊治及发病机制的研究提供了新的思路。

编辑 曹丽鸥 电编 闫晋利

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}¹, V_{max}不能V_{max}, 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。

葡聚糖硫酸钠结肠炎模型影响因素的研究进展

温红珠, 郝微微, 李 佳, 唐志鹏

■背景资料

溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 动物模型以化学药物诱导结肠炎为主, 而葡聚糖硫酸钠 (dextran sulphate sodium, DSS) 结肠炎模型与人体 UC 表现最相似, 目前国内 UC 动物模型主要以 DSS 应用最广。

温红珠, 郝微微, 李佳, 唐志鹏, 上海中医药大学脾胃病研究所 上海市 200032

温红珠, 硕士研究生, 主要从事中医药防治胃肠疾病的研究。

上海市科研基金资助项目, No. 08cz017

国家自然科学基金资助项目, No. 30873261

作者贡献分布: 本文由郝微微指导完成; 资料搜集和分析由温红珠与李佳完成; 资料筛选由唐志鹏完成; 论文写作由温红珠完成。

通讯作者: 郝微微, 副主任医师, 200032, 上海市徐汇区宛平南路725号, 上海中医药大学附属龙华医院消化内科。

hao2364@hotmail.com

电话: 021-64385700-6423

收稿日期: 2011-08-27 修回日期: 2011-11-20

接受日期: 2011-12-18 在线出版日期: 2011-12-28

Factors influencing the development of animal models of dextran sulphate sodium-induced colitis

Hong-Zhu Wen, Wei-Wei Hao, Jia Li, Zhi-Peng Tang

Hong-Zhu Wen, Wei-Wei Hao, Jia Li, Zhi-Peng Tang, Digestive Disease Institute Affiliated to Shanghai University of TCM, Shanghai 200032, China

Supported by: the Scientific Research Foundation of Shanghai Municipal Education Commission, No. 08cz017; and National Natural Science Foundation of China, No. 30873261

Correspondence to: Wei-Wei Hao, Associate Chief Physician, Department of Gastroenterology, Longhua Hospital Affiliated to Shanghai University of TCM, Shanghai 200032, China. hao2364@hotmail.com

Received: 2011-08-27 Revised: 2011-11-20

Accepted: 2011-12-18 Published online: 2011-12-28

Abstract

The animal models of dextran sulphate sodium (DSS)-induced colitis have demonstrated several correlations with human ulcerative colitis (UC) since the first report of DSS-induced colitis in hamsters in 1985. These animal models have similarities to human UC in etiology, pathology, pathogenesis and therapeutic response, and are deemed suitable for investigating the pathogenesis and therapeutic options of UC and UC-related dysplasia-adenocarcinoma sequence. Although induction of colitis with DSS is relatively cheap and simple, the development of this model is influenced by many factors, such as DSS concentration, administration duration, DSS molecular weight and animal species. These factors are important for successful development of

DSS-induced colitis. In this paper we summarize factors influencing the development of animal models of DSS-induced colitis.

Key Words: Inflammatory bowel disease; Ulcerative colitis; Dextran sulphate sodium; Influencing factors

Wen HZ, Hao WW, Li J, Tang ZP. Factors influencing the development of animal models of dextran sulphate sodium-induced colitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(36): 3666-3671

摘要

自1985年首次报道采用葡聚糖硫酸钠(dextran sulphate sodium, DSS)制备出仓鼠溃疡性结肠炎模型以来, 已有大量研究证明DSS结肠炎模型与人类溃疡性结肠炎相似。该模型的病因、临床症状、病理改变及治疗应答均与人类UC相类似; 对于研究UC病因、发病机制及UC相关增生和肿瘤, 确定治疗手段有重要意义。虽然DSS模型制作简单; 但该过程受到多个因素的影响: DSS浓度、给药时间、DSS相对分子质量和动物种属等。如不能正确处理这些因素, 很难制造出成功的DSS结肠炎模型。本文主要针对DSS造模影响因素及尚需我们进一步研究和探讨的问题作综述如下。

关键词: 炎症性肠病; 溃疡性结肠炎; 葡聚糖硫酸钠; 影响因素

温红珠, 郝微微, 李佳, 唐志鹏. 葡聚糖硫酸钠结肠炎模型影响因素的研究进展. *世界华人消化杂志* 2011; 19(36): 3666-3671
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/3666.asp>

0 引言

葡聚糖硫酸钠(dextran sulphate sodium, DSS)结肠炎模型的组织学特点、临床表现、发病部位和细胞因子增殖情况都与人类溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)极为相似。该模型的造模条件和操作方法简单, 造价便宜, 重复性好, 便于掌握和推广; 可根据实验目的调整DSS浓度和给药时间, 建立急性、慢性和慢性交替性模型, 可模拟慢性UC及其易复发特性; 还可根据需要

■同行评议者

陈治水, 主任医师, 中国人民解放军第211医院中医科

建立UC相关直肠结肠肿瘤模型, 这些都是其他模型所无法比拟的. 但其造模成功与否与多种因素有关, 实验中如不能妥善把握这些因素, 则难以成功建立DSS模型. 影响DSS造模的因素主要包括DSS浓度、给药时间、DSS相对分子质量(molecular weight, MW)和动物种属. 基于这些影响因素在DSS造模中的重要地位, 我们主要针对DSS造模影响因素及尚需我们进一步研究和探讨的问题作综述如下.

1 DSS造模现状

炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)主要包括UC和克罗恩病(Crohn disease, CD); 该病常见于欧美国家, 近年来在我国的发病率也逐渐升高, 但其确切病因至今仍未阐明, 一般认为与现代生活方式、环境污染以及感染、遗传和免疫等多个因素有关, 这就增加了在人体中研究IBD的难度; 故目前一般采用动物模型研究IBD的病因、发病机制和临床治疗. 迄今为止, IBD的动物模型研究历史已有一百多年, 虽然近年来已经研发出了多种采用基因敲除和转基因技术制造的基因型IBD模型^[1-9]; 但因其造价昂贵、制作复杂, 较难推广. 故当前国内IBD研究仍以化学药物诱导结肠炎为主, 如三硝基苯磺酸(TNBS), 该模型炎症时间长, 慢性炎症表现突出, 组织学改变与人类CD尤其相似^[10,11], 目前在海外使用较广; 因TNBS模型与UC表现相差较远, 而国内以UC为主, 所以其在国内的适用性不强. 目前国内UC动物模型主要以DSS应用最广.

2 DSS造模机制、方法和表现

2.1 DSS DSS是一种由蔗糖合成的、有抗止血和抗凝血作用的肝素样硫酸多醣体, 分子式为 $(C_6H_7Na_3O_{14}S_3)_n$, MW 5 000-1 400 000不等, 含硫量一般为16%-20%. DSS为白色粉末状物, 室温保存, 极易溶于水(100 mg/mL). DSS结肠炎模型由日本学者Ohkusa^[12]于1985年首次制造成功. 随后Okayasu等^[13]于1990年在小鼠中成功建立了DSSUC模型. 而慢性仓鼠UC模型由Yamada等^[14]于1992年首次报道. 自此以后针对DSS动物结肠炎的研究如火如荼, 大部分研究者^[12-19]就DSS动物结肠炎模型的症状和肠道改变与人类UC相似这点基本达成共识; 还有研究者直接将DSS结肠炎模型称为DSSUC模型.

2.2 DSS诱导结肠炎的机制

自DSS结肠炎模型首次建立到现在, 已就DSS模

型发病机制开展了大量研究, 但其确切机制仍尚未明确. 目前的研究主要认为可能与DSS增加肠道通透性、破坏肠黏膜屏障、上调某些细胞因子、激活某些通路或肠道菌群失调等有关^[20-34]. Kitajima等^[20]的研究发现DSS可引起肠道通透性增加, 从而诱导炎症反应的发生; Verdu等^[21]及Poritz等^[22]的研究也支持这一观点. Ni等^[23]的研究则认为DSS通过对结肠黏膜细胞的直接毒性作用起效. Verdu等^[21]及Kokešová等^[28]的研究表明予DSS结肠炎小鼠正常肠道菌群可缓解动物的结肠炎症状; 但考虑到DSS结肠炎模型可在无菌动物(Germ Free, GF)中造模成功, 因此认为肠道菌群在DSS发病机制中的作用不是非常重要. 此外, 还有大量研究证实Th1细胞, NF- κ B通路和TRPV1通路, TNF- α 、IFN- γ 和IL-4等细胞因子在DSS诱导结肠炎中起着重要作用.

2.3 造模方法 通常采用在蒸馏水(纯水)中加入DSS制成DSS溶液给予动物自由饮用造模, 浓度采用W/V计算. 采用不同的DSS溶液浓度、给药时间和给药频率, 可制成急性和慢性两种结肠炎模型. 一般来说, 急性结肠炎模型常采用相对高浓度的DSS溶液、相对短的给药时间建立. 如予小鼠2%-5%DSS自由饮用4-7 d^[35-43]. 上海中医药大学脾胃病研究所采用予BALB/c小鼠5%DSS(MW为40000)自由饮用7 d, 成功制成了急性UC模型^[44]. 慢性结肠炎模型则可采用低浓度DSS建立, 但给药时间较长. 如予仓鼠1%DSS自由饮用100 d^[14]. 予大鼠1%DSS自由饮用6 mo^[45]. 此外, 还可采用相对高浓度的DSS周期给药建立. 如予小鼠2.5%DSS自由饮用7 d, 随后予水自由饮用7 d; 治疗2个周期建立慢性结肠炎模型^[46]. 予大鼠4%DSS自由饮用6 d, 随后予水自由饮用6 d; 治疗3个周期建立^[47]. 结肠炎相关结直肠肿瘤模型则可采用低浓度DSS周期给药建立, 但目前可用的相关报道较少. Darren等^[48]报道予小鼠0.7%DSS自由饮用7 d, 随后予水自由饮用10 d; 治疗12个周期制成结肠炎相关结直肠肿瘤模型. Chang^[49]和Cooper^[50]等则采用4%DSS给药4 d, 随后予水自由饮用17 d, 重复3-4个周期建立结肠炎相关肿瘤模型. Clapper等^[51]报道采用DSS和偶氮甲烷同时给药建立结肠肿瘤模型.

2.4 DSS结肠炎表现 DSS结肠炎的症状表现包括腹泻、黏液样便、粪便潜血阳性、肉眼血便、动物体质量下降、进食量减少、活动度减弱、毛色变差、贫血, 甚至死亡等. 这些症状与人类UC极为相似. 急性期最早出现的症状为粪便潜

■**研发前沿**
进一步明确DSS造模的影响因素(主要为DSS浓度、给药时间、DSS相对分子质量和动物种属)在UC模型建立中的重要作用, 对于UC实验研究有重要指导意义.

■相关报道

Shimizu等发现动物结肠黏膜隐窝损伤程度与DSS浓度和造模时间呈正相关, Kitajima等报道40000相对分子质量DSS的结肠炎最严重, 各种属动物造模情况不同。

血阳性和腹泻, 最早可见于造模第2-3天; 此后随着造模时间的延长而逐渐加重。慢性期为腹泻、血便逐渐停止、体质量增加并可恢复至发病前水平。急性期炎症反应一般局限在结肠部位, 肉眼改变包括结肠充血、水肿、变短, 变脆等。光镜下组织病理学改变主要为全结肠多灶性小溃疡, 主要侵及黏膜层, 也可侵至黏膜下层和黏膜肌层; 黏膜水肿、杯状细胞缺失、隐窝肿胀变形破坏; 黏膜和黏膜下层炎症细胞浸润, 包括中性粒细胞、巨噬细胞、浆细胞和部分淋巴细胞。慢性期则以上皮增生、黏膜纤维化和淋巴结肿大特征; 同时可见肉芽组织增生和肿瘤样改变^[13,52]。虽然可在DSS结肠炎模型中观察到回肠形态学改变, 但DSS一般对小肠无影响^[53]。

3 影响DSS造模的因素

已有多项研究证明DSS诱导的炎症发病和严重程度主要与DSS浓度、给药时间、MW和动物种属4个因素有关。以下将按照造模影响因素逐点选取有代表性的文献, 进行分析阐述。

3.1 DSS浓度 根据文献报道, 可采用0.5%-10%浓度的DSS造模^[13-16,35-42]。因为肠黏膜急性损伤的程度与DSS浓度呈正相关^[54], 所以增加给药浓度则应相应的缩短给药时间; 浓度过高时, 动物的死亡率也会增加。分析文献发现实验中以3%和5%两个浓度最常用。我们研究所一般采用5%浓度造模^[44]。Shimizu等^[54]予4周龄大鼠2%、3%和4%浓度的DSS液自由饮用, 结果发现大鼠的临床表现和结肠组织学变化随DSS浓度的增加(2%-4%)而加重。Egger等^[55]的研究也证明DSS诱导的黏膜损伤程度主要取决于DSS浓度, 而不是动物摄取的DSS总量。研究者将56只BALB/c小鼠分成4组, 分别予0%、2.5%、5%、7.5%的DSS液自由饮用7 d, 观察各组的黏膜隐窝损坏程度及促炎性细胞因子的表达情况, 结果发现结肠黏膜隐窝损伤评分随DSS浓度的增加而增加, 促炎性细胞因子的表达也增加。而Granger等^[56]的研究发现, 只要小鼠摄入的DSS量超过某一定值(30 mg/g体质量), 即可建立重复性和可靠性均较好的小鼠结肠炎模型。总之, DSS诱导结肠炎症的临床表现和黏膜损伤程度呈DSS浓度依赖性; 且小鼠摄入DSS总量 ≥ 30 mg/g体质量时, DSS总摄入量的差异不会影响造模结果。但尚未确定其他种属动物的关键总剂量。

3.2 给药时间 DSS结肠炎症随造模时间延长加重, 甚至可导致动物死亡。但目前尚无针对每种

DSS浓度的最长给药时间(造模成功且动物死亡率在可接受范围内)报道, 实验中一般根据预初实验结果及文献报道数据制定给药时间。如我们研究所根据反复试验摸索出5%造模浓度的最佳给药时间为5-7 d^[44]。已有大量文献报道DSS结肠炎症与造模时间呈正相关。如Iba等^[57]报道予4%DSS自由饮用, 大鼠的结肠损伤评分随时间延长升高。Gaudio等^[47]予SD大鼠自由饮用4%DSS溶液, 结果提示DSS结肠炎症进展呈时间依赖性。给药第3天时, 大鼠出现黏液血便, 组织病理学主要表现为基底部1/3的隐窝破坏; 第4天时, 隐窝进一步被破坏, 伴有轻度中性粒细胞浸润; 第5天时, 动物出现广泛的炎症反应, 结肠黏膜糜烂, 肠上皮细胞增生; 第6-7天时, 结肠黏膜出现多发性溃疡, 重度中性粒细胞、淋巴细胞和浆细胞浸润。

3.3 DSSMW 根据相关研究报道, 主要认为DSSMW与模型的病变严重程度及病变部位有关, 目前多采用MW在36000-50000间的DSS造模^[58-63]。但目前可用的DSSMW与造模情况的相关性研究较少, 且有些研究结果相矛盾, 仍需更多的研究进一步明确DSSMW与造模的关系。Kitajima等^[64]给予BALB/c小鼠5%DSS(MW分别为5000、40000和500000)自由饮用7 d造模, 结果发现结肠炎最严重的为40000造模组, 病变主要位于远端结肠; 其次为5000造模组, 病变主要位于近端结肠; 而500000造模组无结肠炎表现。但也有研究表明^[55]DSS结肠炎模型与DSS剂量无关。而Hirono等^[65]采用3种MW(9500、54000和520000)的2.5%浓度的DSS溶液予ACI大鼠自由饮用, 研究不同MW的DSS的致癌性, 结果表明54000的致癌活性最高, 而MW为520000和9500的DSS无显著致癌活性。

3.4 动物种属 DSS模型可采用小鼠、大鼠、仓鼠和豚鼠造模, 但各种属动物对DSS易感性、临床表现、炎症严重程度和病变部位不同。根据文献报道, 对DSS治疗最敏感的动物为豚鼠^[66]。仓鼠、豚鼠和WD大鼠的病变部位主要见于右半结肠^[66-68]。Fischer 344大鼠、BALB/c和CBA/J小鼠的病变部位主要见于左半结肠^[13,68]。Swiss-Webster小鼠的病变部位则主要见于中段结肠^[36]。这些差异可能与遗传差异有关, 但尚缺乏研究进一步证实以上观点。此外, 同一种属不同品系动物的易感性和病变部位也不同。例如: 最早用于建立小鼠DSS结肠炎模型的为BALB/c小鼠, 但2006年有研究^[59]发现C57BL/6小鼠结肠炎的

炎症严重程度甚于BALB/c小鼠. Sasaki等^[69]的研究也证实了该结论. Michael等^[70]研究了9种品系(C3H/HeJ、C3H/HeJBir、C57BL/6J、DBA/2J、NOD/LtJ、NOD-scid、129/SvPas、NON/LtJ和NON. NOD-H2g)的小鼠对DSS治疗的易感性. 结果发现C3H/HeJ、C3H/HeJBir、NOD/LtJ和NOD-scid小鼠对DSS治疗极为敏感, 而大部分NON/LtJ小鼠对DSS治疗不敏感. C3H/HeJBir、C3H/HeJ、NOD/LtJ和NOD-scid小鼠盲肠和结肠病变几率相似; 而C57BL/6J和129/SvPas的病变部位主要位于结肠. 因为不同种属小鼠饮用相同浓度的DSS溶液炎症情况不同, 研究者因此提出可能是先天性遗传决定了不同品系小鼠的抗炎损伤能力, 而发现小鼠的这些易感基因也许能找出相应的分类基因、指导人类IBD疾病的治疗方案.

3.5 其他 除了上述影响因素外, 动物年龄也是重要因素之一. 在造模动物年龄选择上, 一般多选择成年动物, 一方面是因为幼年动物处于生长期, 体质量增加可能掩盖DSS给药诱导的体质量下降; 另一方面是出于幼年期动物各系统尚未完全发育, 耐受能力较差考虑. 我们研究所总结多年经验认为建立小鼠DSS结肠炎模型时, 以 ≥ 18 g(6-8周龄)小鼠最佳.

4 结论

DSS结肠炎模型是目前最理想的UC模型, 其造模成功与否主要与DSS浓度、给药时间、MW和动物种属有关. 虽然已经有专家针对上述4个影响因素开展独立的研究, 但仍需更进一步阐明这些因素及其他因素与DSS造模间的确切关系; 如DSSMW与造模间的关系, DSS含硫量与造模间的关系等. 因此, 对于DSS造模因素的研究还有待我们进一步深入和探讨. 此外, 目前也尚未有对这4个因素开展的综合研究, 从而得出一个最佳动物种属、最佳DSS浓度和最佳给药时间的组合, 这不仅需要有一个良好的实验设计, 还需要有统计学家的积极参与; 此类研究具有一定的难度, 但克服困难进一步深入探讨DSS造模的影响因素具有很大价值和意义.

5 参考文献

- 1 Sohn KJ, Shah SA, Reid S, Choi M, Carrier J, Comiskey M, Terhorst C, Kim YI. Molecular genetics of ulcerative colitis-associated colon cancer in the interleukin 2- and beta(2)-microglobulin-deficient mouse. *Cancer Res* 2001; 61: 6912-6917
- 2 Cuadrado E, Alonso M, de Juan MD, Echaniz P,

- Arenas JI. Regulatory T cells in patients with inflammatory bowel diseases treated with adacolumn granulocytapheresis. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 1521-1527
- 3 Franke A, Balschun T, Karlsen TH, Sventoraityte J, Nikolaus S, Mayr G, Domingues FS, Albrecht M, Nothnagel M, Ellinghaus D, Sina C, Onnie CM, Weersma RK, Stokkers PC, Wijmenga C, Gazouli M, Strachan D, McArdle WL, Vermeire S, Rutgeerts P, Rosenstiel P, Krawczak M, Vatn MH, Mathew CG, Schreiber S. Sequence variants in IL10, ARPC2 and multiple other loci contribute to ulcerative colitis susceptibility. *Nat Genet* 2008; 40: 1319-1323
- 4 Ebert EC, Mehta V, Das KM. Activation antigens on colonic T cells in inflammatory bowel disease: effects of IL-10. *Clin Exp Immunol* 2005; 140: 157-165
- 5 Nikoopour E, Schwartz JA, Singh B. Therapeutic benefits of regulating inflammation in autoimmunity. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2008; 7: 203-210
- 6 Watanabe M, Yamazaki M, Kanai T. Mucosal T cells as a target for treatment of IBD. *J Gastroenterol* 2003; 38 Suppl 15: 48-50
- 7 Krawczenko A, Kieda C, Duś D. The biological role and potential therapeutic application of interleukin 7. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2005; 53: 518-525
- 8 Mudter J, Weigmann B, Bartsch B, Kiesslich R, Strand D, Galle PR, Lehr HA, Schmidt J, Neurath MF. Activation pattern of signal transducers and activators of transcription (STAT) factors in inflammatory bowel diseases. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 64-72
- 9 Milia AF, Manetti M, Generini S, Polidori L, Benelli G, Cinelli M, Messerini L, Ibba-Manneschi L, Matucci-Cerinic M. TNFalpha blockade prevents the development of inflammatory bowel disease in HLA-B27 transgenic rats. *J Cell Mol Med* 2009; 13: 164-176
- 10 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
- 11 Anthony D, Savage F, Sams V, Boulos P. The characterization of a rabbit model of inflammatory bowel disease. *Int J Exp Pathol* 1995; 76: 215-224
- 12 Ohkusa T. [Production of experimental ulcerative colitis in hamsters by dextran sulfate sodium and changes in intestinal microflora]. *Nihon Shokakibyo Gakkai Zasshi* 1985; 82: 1327-1336
- 13 Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, Ohkusa T, Inagaki Y, Nakaya R. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology* 1990; 98: 694-702
- 14 Yamada M, Ohkusa T, Okayasu I. Occurrence of dysplasia and adenocarcinoma after experimental chronic ulcerative colitis in hamsters induced by dextran sulphate sodium. *Gut* 1992; 33: 1521-1527
- 15 Ito R, Kita M, Shin-Ya M, Kishida T, Urano A, Takada R, Sakagami J, Imanishi J, Iwakura Y, Okanoue T, Yoshikawa T, Kataoka K, Mazda O. Involvement of IL-17A in the pathogenesis of DSS-induced colitis in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 377: 12-16
- 16 Herias MV, Koninkx JF, Vos JG, Huis in't Veld JH, van Dijk JE. Probiotic effects of Lactobacillus casei on DSS-induced ulcerative colitis in mice. *Int J Food Microbiol* 2005; 103: 143-155
- 17 Schicho R, Nazyrova A, Shaykhtudinov R, Duggan G, Vogel HJ, Storr M. Quantitative metabolomic

■创新盘点

本文系统综述了DSS UC造模中的影响因素, 重点介绍了DSS浓度、分子量、给药时间以及动物种属和品系对UC造模的影响, 并首次提出了含硫量可能对造模也存在影响的观点; 这类综述报告极少.

■应用要点

DSS结肠炎模型是目前最理想的UC模型,且因造模条件和操作方法简单,造价便宜,重复性好等优势,在实验中应用最广。

- profiling of serum and urine in DSS-induced ulcerative colitis of mice by (1)H NMR spectroscopy. *J Proteome Res* 2010; 9: 6265-6273
- 18 Yao J, Wang JY, Liu L, Li YX, Xun AY, Zeng WS, Jia CH, Wei XX, Feng JL, Zhao L, Wang LS. Antioxidant effects of resveratrol on mice with DSS-induced ulcerative colitis. *Arch Med Res* 2010; 41: 288-294
- 19 Andújar I, Recio MC, Giner RM, Cienfuegos-Jovellanos E, Laghi S, Muguerza B, Ríos JL. Inhibition of ulcerative colitis in mice after oral administration of a polyphenol-enriched cocoa extract is mediated by the inhibition of STAT1 and STAT3 phosphorylation in colon cells. *J Agric Food Chem* 2011; 59: 6474-6483
- 20 Kitajima S, Takuma S, Morimoto M. Changes in colonic mucosal permeability in mouse colitis induced with dextran sulfate sodium. *Exp Anim* 1999; 48: 137-143
- 21 Verdú EF, Bercik P, Cukrowska B, Farre-Castany MA, Bouzourene H, Saraga E, Blum AL, Corthésy-Theulaz I, Tlaskalova-Hogenova H, Michetti P. Oral administration of antigens from intestinal flora anaerobic bacteria reduces the severity of experimental acute colitis in BALB/c mice. *Clin Exp Immunol* 2000; 120: 46-50
- 22 Poritz LS, Garver KI, Green C, Fitzpatrick L, Ruggerio F, Koltun WA. Loss of the tight junction protein ZO-1 in dextran sulfate sodium induced colitis. *J Surg Res* 2007; 140: 12-19
- 23 Ni J, Chen SF, Hollander D. Effects of dextran sulphate sodium on intestinal epithelial cells and intestinal lymphocytes. *Gut* 1996; 39: 234-241
- 24 Dieleman LA, Palmén MJ, Akol H, Bloemena E, Peña AS, Meuwissen SG, Van Rees EP. Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS) is characterized by Th1 and Th2 cytokines. *Clin Exp Immunol* 1998; 114: 385-391
- 25 Marrero JA, Matkowskyj KA, Yung K, Hecht G, Benya RV. Dextran sulfate sodium-induced murine colitis activates NF-kappaB and increases galanin-1 receptor expression. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 278: G797-G804
- 26 Szitter I, Pozsgai G, Sandor K, Elekes K, Kemeny A, Perkecz A, Szolcsanyi J, Helyes Z, Pinter E. The role of transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) receptors in dextran sulfate-induced colitis in mice. *J Mol Neurosci* 2010; 42: 80-88
- 27 Kullmann F, Messmann H, Alt M, Gross V, Bocker T, Schölmerich J, Rüschhoff J. Clinical and histopathological features of dextran sulfate sodium induced acute and chronic colitis associated with dysplasia in rats. *Int J Colorectal Dis* 2001; 16: 238-246
- 28 Kokesová A, Frolová L, Kverka M, Sokol D, Rossmann P, Bártová J, Tlaskalová-Hogenová H. Oral administration of probiotic bacteria (*E. coli* Nissle, *E. coli* O83, *Lactobacillus casei*) influences the severity of dextran sodium sulfate-induced colitis in BALB/c mice. *Folia Microbiol (Praha)* 2006; 51: 478-484
- 29 Yang MS, Long YM, Cui SL. [Activation of nuclear factor-kappa B and its modulalorg effects on intercellular adhesion molecule-1 expression in mice with dextran sulphate sodium-induced rat colitis]. *Nanfang Yike Daxue Xuebao* 2008; 28: 600-602
- 30 Kihara N, de la Fuente SG, Fujino K, Takahashi T, Pappas TN, Mantyh CR. Vanilloid receptor-1 containing primary sensory neurones mediate dextran sulphate sodium induced colitis in rats. *Gut* 2003; 52: 713-719
- 31 Shah YM, Ma X, Morimura K, Kim I, Gonzalez FJ. Pregnane X receptor activation ameliorates DSS-induced inflammatory bowel disease via inhibition of NF-kappaB target gene expression. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; 292: G1114-G1122
- 32 Maaser C, Kannengiesser K, Specht C, Lügering A, Brzoska T, Luger TA, Domschke W, Kucharzik T. Crucial role of the melanocortin receptor MC1R in experimental colitis. *Gut* 2006; 55: 1415-1422
- 33 Yoshihara K, Yajima T, Kubo C, Yoshikai Y. Role of interleukin 15 in colitis induced by dextran sulphate sodium in mice. *Gut* 2006; 55: 334-341
- 34 Sivakumar PV, Westrich GM, Kanaly S, Garka K, Born TL, Derry JM, Viney JL. Interleukin 18 is a primary mediator of the inflammation associated with dextran sulphate sodium induced colitis: blocking interleukin 18 attenuates intestinal damage. *Gut* 2002; 50: 812-820
- 35 Jiang HR, Gilchrist DS, Popoff JF, Jamieson SE, Truscott M, White JK, Blackwell JM. Influence of Slc11a1 (formerly Nramp1) on DSS-induced colitis in mice. *J Leukoc Biol* 2009; 85: 703-710
- 36 Ishihara T, Tanaka K, Tasaka Y, Namba T, Suzuki J, Ishihara T, Okamoto S, Hibi T, Takenaga M, Igarashi R, Sato K, Mizushima Y, Mizushima T. Therapeutic effect of lecithinized superoxide dismutase against colitis. *J Pharmacol Exp Ther* 2009; 328: 152-164
- 37 Iwanaga T, Hoshi O, Han H, Fujita T. Morphological analysis of acute ulcerative colitis experimentally induced by dextran sulfate sodium in the guinea pig: some possible mechanisms of cecal ulceration. *J Gastroenterol* 1994; 29: 430-438
- 38 Breider MA, Eppinger M, Gough A. Intercellular adhesion molecule-1 expression in dextran sodium sulfate-induced colitis in rats. *Vet Pathol* 1997; 34: 598-604
- 39 Shea-Donohue T, Thomas K, Cody MJ, Aiping Zhao LJ, Kopydlowski KM, Fukata M, Lira SA, Vogel SN. Mice deficient in the CXCR2 ligand, CXCL1 (KC/GRO-alpha), exhibit increased susceptibility to dextran sodium sulfate (DSS)-induced colitis. *Innate Immun* 2008; 14: 117-124
- 40 Stillie R, Stadnyk AW. Role of TNF receptors, TNFR1 and TNFR2, in dextran sodium sulfate-induced colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2009; 15: 1515-1525
- 41 Kostadinova FI, Baba T, Ishida Y, Kondo T, Popivanova BK, Mukaida N. Crucial involvement of the CX3CR1-CX3CL1 axis in dextran sulfate sodium-mediated acute colitis in mice. *J Leukoc Biol* 2010; 88: 133-143
- 42 Peng XD, Wu XH, Chen LJ, Wang ZL, Hu XH, Song LF, He CM, Luo YF, Chen ZZ, Jin K, Lin HG, Li XL, Wang YS, Wei YQ. Inhibition of phosphoinositide 3-kinase ameliorates dextran sodium sulfate-induced colitis in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 2010; 332: 46-56
- 43 Reardon C, Lechmann M, Brüstle A, Gareau MG, Shuman N, Philpott D, Ziegler SF, Mak TW. Thymic stromal lymphopoietin-induced expression of the endogenous inhibitory enzyme SLPI mediates recovery from colonic inflammation. *Immunity* 2011; 35: 223-235
- 44 何新颖, 唐志鹏, 马贵同, 谢建群, 郝微微, 龚雨萍, 柳文, 张亚利, 戴彦成, 靛玉红. 对DSS诱导结肠炎小鼠紧密连接蛋白ZO-1表达的影响. *上海中医药大学杂志* 2010; 44: 7-10

- 45 Chiba T. [Cell kinetics of carcinoma originating from rat colitis induced by dextran sulphate sodium]. *Nihon Shokakibyo Gakkai Zasshi* 1993; 90: 774-781
- 46 Hudcovic T, Stepánková R, Kozákova H, Hrnčíř T, Tlaskalová-Hogenová H. Effects of monocolonization with *Escherichia coli* strains O6K13 and Nissle 1917 on the development of experimentally induced acute and chronic intestinal inflammation in germ-free immunocompetent and immunodeficient mice. *Folia Microbiol (Praha)* 2007; 52: 618-626
- 47 Gaudio E, Taddei G, Vetusch A, Sferra R, Frieri G, Ricciardi G, Caprilli R. Dextran sulfate sodium (DSS) colitis in rats: clinical, structural, and ultrastructural aspects. *Dig Dis Sci* 1999; 44: 1458-1475
- 48 Seril DN, Liao J, Ho KL, Yang CS, Yang GY. Inhibition of chronic ulcerative colitis-associated colorectal adenocarcinoma development in a murine model by N-acetylcysteine. *Carcinogenesis* 2002; 23: 993-1001
- 49 Chang WC, Coudry RA, Clapper ML, Zhang X, Williams KL, Spittle CS, Li T, Cooper HS. Loss of p53 enhances the induction of colitis-associated neoplasia by dextran sulfate sodium. *Carcinogenesis* 2007; 28: 2375-2381
- 50 Cooper HS, Murthy S, Kido K, Yoshitake H, Flanigan A. Dysplasia and cancer in the dextran sulfate sodium mouse colitis model. Relevance to colitis-associated neoplasia in the human: a study of histopathology, B-catenin and p53 expression and the role of inflammation. *Carcinogenesis* 2000; 21: 757-768
- 51 Clapper ML, Cooper HS, Chang WC. Dextran sulfate sodium-induced colitis-associated neoplasia: a promising model for the development of chemopreventive interventions. *Acta Pharmacol Sin* 2007; 28: 1450-1459
- 52 Cooper HS, Murthy SN, Shah RS, Sedergran DJ. Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Lab Invest* 1993; 69: 238-249
- 53 Geier MS, Smith CL, Butler RN, Howarth GS. Small-intestinal manifestations of dextran sulfate sodium consumption in rats and assessment of the effects of *Lactobacillus fermentum* BR11. *Dig Dis Sci* 2009; 54: 1222-1228
- 54 Shimizu T, Suzuki M, Fujimura J, Hisada K, Yoshikazu O, Obinata K, Yamashiro Y. The relationship between the concentration of dextran sodium sulfate and the degree of induced experimental colitis in weanling rats. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2003; 37: 481-486
- 55 Egger B, Bajaj-Elliott M, MacDonald TT, Inglin R, Eysselein VE, Büchler MW. Characterisation of acute murine dextran sodium sulphate colitis: cytokine profile and dose dependency. *Digestion* 2000; 62: 240-248
- 56 Vowinkel T, Kalogeris TJ, Mori M, Kriegelstein CF, Granger DN. Impact of dextran sulfate sodium load on the severity of inflammation in experimental colitis. *Dig Dis Sci* 2004; 49: 556-564
- 57 Iba Y, Sugimoto Y, Kamei C. Participation of mast cells in colitis inflammation induced by dextran sulfate sodium. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 2002; 24: 15-18
- 58 Vasina V, Broccoli M, Ursino MG, Canistro D, Valgimigli L, Soleti A, Paolini M, De Ponti F. Non-peptidyl low molecular weight radical scavenger IAC attenuates DSS-induced colitis in rats. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 3642-3650
- 59 Suzuki R, Kohno H, Sugie S, Nakagama H, Tanaka T. Strain differences in the susceptibility to azoxymethane and dextran sodium sulfate-induced colon carcinogenesis in mice. *Carcinogenesis* 2006; 27: 162-169
- 60 Miyamoto S, Yasui Y, Tanaka T, Ohigashi H, Murakami A. Suppressive effects of nobletin on hyperleptinemia and colitis-related colon carcinogenesis in male ICR mice. *Carcinogenesis* 2008; 29: 1057-1063
- 61 Eijkelkamp N, Heijnen CJ, Lucas A, Premont RT, Elsenbruch S, Schedlowski M, Kavelaars A. G protein-coupled receptor kinase 6 controls chronicity and severity of dextran sodium sulphate-induced colitis in mice. *Gut* 2007; 56: 847-854
- 62 Cluny NL, Keenan CM, Duncan M, Fox A, Lutz B, Sharkey KA. Naphthalen-1-yl-(4-pentyloxynaphthalen-1-yl)methanone (SAB378), a peripherally restricted cannabinoid CB1/CB2 receptor agonist, inhibits gastrointestinal motility but has no effect on experimental colitis in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 2010; 334: 973-980
- 63 Banerjee S, Jin G, Bradley SG, Matters GL, Gailey RD, Crisman JM, Bond JS. Balance of meprin A and B in mice affects the progression of experimental inflammatory bowel disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2011; 300: G273-G282
- 64 Kitajima S, Takuma S, Morimoto M. Histological analysis of murine colitis induced by dextran sulfate sodium of different molecular weights. *Exp Anim* 2000; 49: 9-15
- 65 Hirono I, Kuhara K, Yamaji T, Hosaka S, Golberg L. Carcinogenicity of dextran sulfate sodium in relation to its molecular weight. *Cancer Lett* 1983; 18: 29-34
- 66 Hoshi O, Iwanaga T, Fujino MA. Selective uptake of intraluminal dextran sulfate sodium and senna by macrophages in the cecal mucosa of the guinea pig. *J Gastroenterol* 1996; 31: 189-198
- 67 Karlsson A, Jägervall A, Pettersson M, Andersson AK, Gillberg PG, Melgar S. Dextran sulphate sodium induces acute colitis and alters hepatic function in hamsters. *Int Immunopharmacol* 2008; 8: 20-27
- 68 Tamaru T, Kobayashi H, Kishimoto S, Kajiyama G, Shimamoto F, Brown WR. Histochemical study of colonic cancer in experimental colitis of rats. *Dig Dis Sci* 1993; 38: 529-537
- 69 Sasaki S, Ishida Y, Nishio N, Ito S, Isobe K. Thymic involution correlates with severe ulcerative colitis induced by oral administration of dextran sulphate sodium in C57BL/6 mice but not in BALB/c mice. *Inflammation* 2008; 31: 319-328
- 70 Mähler M, Bristol IJ, Leiter EH, Workman AE, Birkenmeier EH, Elson CO, Sundberg JP. Differential susceptibility of inbred mouse strains to dextran sulfate sodium-induced colitis. *Am J Physiol* 1998; 274: G544-G551

■同行评价

文章选题新颖, 实用性强, 对指导UC实验研究工作有重要参考价值。

编辑 曹丽鸥 电编 闫晋利

盐酸戊乙奎醚对大鼠急性坏死性胰腺炎肺损伤MIF和AQP-5表达的影响

蔡丹磊

■背景资料

多种因素包括胆石、乙醇、缺血、高脂血症和高钙血症等均可形成急性坏死性胰腺炎(ANP),并促使炎症从胰腺局部迅速扩展到全身,发生全身炎症反应综合征和多器官衰竭,其中急性肺损伤(ALI)是SAP早期最常见的并发症。

蔡丹磊,南通大学附属医院急诊内科 江苏省南通市 226001
通讯作者: 蔡丹磊,主治医师,226001,江苏省南通市,南通大学附属医院急诊内科, goalcai@qq.com
收稿日期: 2011-08-26 修回日期: 2011-11-20
接受日期: 2011-12-18 在线出版日期: 2011-12-28

Treatment with penethyclidine hydrochloride reduces the levels of MIF in serum and AQP-5 in bronchoalveolar lavage fluid in rats with acute necrotizing pancreatitis and acute lung injury

Dan-Lei Cai

Dan-Lei Cai, Emergency Department of Emergency Medicine, the Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Dan-Lei Cai, Attending Physician, Department of Emergency Medicine, the Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China. goalcai@qq.com

Received: 2011-08-26 Revised: 2011-11-20

Accepted: 2011-12-18 Published online: 2011-12-28

Abstract

AIM: To investigate the influence of treatment with penethyclidine hydrochloride (PHCD) on the levels of macrophage migration inhibitor factor (MIF) in serum and aquaporin-5 (AQP-5) in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) in rats with acute necrotizing pancreatitis (ANP) and acute lung injury (ALI).

METHODS: ANP and ALI was induced in Sprague-Dawley rats by retrograde injection of 4% sodium taurocholate into the biliopancreatic duct. One hundred rats were randomly and equally divided into treatment group and non-treatment group. The treatment group received intraperitoneal injection of PHCD. Each group was further equally and randomly divided into five subgroups for testing at 6 h, 12 h, 24 h, 36 h, and 48 h. The concentrations of MIF in serum and AQP-5 in BALF were determined by

enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Pancreatic and pulmonary pathomorphology was recorded and compared between the two groups. The wet-to-dry weight ratio of the lung was measured and blood gas analysis was performed.

RESULTS: Compared to the non-treatment group, the treatment group had significantly decreased serum levels of MIF ($\chi^2 = 20.52$, $P = 0.042$), the wet-to-dry weight ratio of the lung ($\chi^2 = 21.04$, $P = 0.000$) and arterial PaCO_2 ($\chi^2 = 82.83$, $P = 0.000$), significantly increased BALF levels of AQP-5 ($\chi^2 = 17.22$, $P = 0.044$) and arterial PaO_2 ($\chi^2 = 503.48$, $P = 0.000$), and significantly mitigated pancreatic and lung histopathological changes.

CONCLUSION: PHCD intervention has an appreciable therapeutic effect on ANP and ALI in rats.

Key Words: Acute necrotizing pancreatitis; Acute lung injury; Penethyclidine hydrochloride; Macrophage migration inhibitor factor; Aquaporin-5

Cai DL. Treatment with penethyclidine hydrochloride reduces the levels of MIF in serum and AQP-5 in bronchoalveolar lavage fluid in rats with acute necrotizing pancreatitis-associated acute lung injury. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(36): 3672-3677

摘要

目的: 探讨盐酸戊乙奎醚对大鼠急性坏死性胰腺炎(acute necrotic pancreatitis, ANP)并发急性肺损伤(acute lung injury, ALI)血清巨噬细胞移动抑制因子(macrophage migration inhibitory factor, MIF)和肺泡灌洗液水通道蛋白-5(aquaporin-5, AQP-5)表达的影响。

方法: 采用经胰胆管内逆行注射4%牛磺胆酸钠构建大鼠ANP并发ALI模型, 100只SD大鼠以是否接受盐酸戊乙奎醚(penethyclidine hydrochloride, PHCD)腹腔注射干预治疗随机分为治疗组和非治疗组, 每组再以6 h、12 h、24 h、36 h、48 h五个取材时间点继续随机分组, 共10组, 每组10只动物。采用ELISA法测定

■同行评议者

黄恒青, 主任医师, 福建省第二人民医院消化内科; 冯志杰, 主任医师, 河北医科大学第二医院消化内科

血清中MIF的浓度和肺泡灌洗液中AQP-5的浓度, 同时进行胰腺和肺组织病理形态学观察, 肺组织湿/干重比检测, 动脉血气分析。

结果: 相同时间点PHCD治疗组与非治疗组比较显示, 血清MIF浓度降低($\chi^2 = 20.52, P = 0.042$), 肺泡灌洗液AQP-5浓度增高($\chi^2 = 17.22, P = 0.044$), 胰腺和肺组织病理学损伤减轻, 肺组织湿/干质量比值减小($\chi^2 = 21.04, P = 0.000$), 动脉血PaO₂上升($\chi^2 = 503.48, P = 0.000$), PaCO₂下降($\chi^2 = 82.83, P = 0.000$)。

结论: PHCD的适当干预对大鼠ANP并发ALI具有一定的治疗效果。

关键词: 急性坏死性胰腺炎; 急性肺损伤; 盐酸戊乙奎醚; 巨噬细胞移动抑制因子; 水通道蛋白-5

蔡丹磊. 盐酸戊乙奎醚对大鼠急性坏死性胰腺炎肺损伤MIF和AQP-5表达的影响. 世界华人消化杂志 2011; 19(36): 3672-3677
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/3672.asp>

0 引言

重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)是一种起病急、进展快、病情危重、并发症多、病死率高的急腹症^[1]。多种因素包括胆石、乙醇、缺血、高脂血症和高钙血症等均可激活胰腺细胞内的胰蛋白酶原和其他消化酶, 释放氧自由基; 激活的胰酶和氧自由基损伤腺泡细胞, 引起细胞因子和血管活性介质大量释放; 吸引炎症细胞, 活化血管内皮, 上调黏附分子表达, 引起胰腺微紊乱。这种所谓的“第二次攻击”可使胰腺病理改变由水肿进展为坏死, 形成急性坏死性胰腺炎(acute necrosis pancreatitis, ANP), 并促使炎症从胰腺局部迅速扩展到全身, 发生全身炎症反应综合征和多器官衰竭^[2], 其中急性肺损伤(acute lung injury, ALI)是SAP早期最常见的并发症。急性胰腺炎相关性肺损伤(acute pancreatitis-associated lung injury, APALI)的具体机制尚未完全清楚。近期有研究表明巨噬细胞移动抑制因子(macrophage migration inhibitory factor, MIF)高表达导致的过度炎症反应可能是大多数肺损伤的根本原因。水通道蛋白-5(aquaporin-5, AQP-5)的表达和功能下降可能与高浓度氧肺损伤中肺水肿的形成及体液异常转运有关^[3]。盐酸戊乙奎醚(penehyclidine hydrochloride, PHCD)是一类新型选择性抗胆碱药, 主要选择作用于亚型M₁和M₃受体, 对大多存在于心脏的

M₂受体无明显作用或作用较弱, 而肺的通气道主要分布M₃受体, 故该药具有持续作用时间长和心血管副作用小等特点。目前PHCD已成功应用于临床救治有机磷农药中毒^[4], 并推荐用于麻醉前给药, 近期有报道称其对创伤性和内毒性ALI有明显效果。本课题拟通过研究PHCD干预治疗对大鼠ANP并发ALI后重要因子MIF和AQP-5表达的影响, 为寻找治疗APALI的可行性方案提供新思路和新策略。

1 材料和方法

1.1 材料 牛磺胆酸钠(美国Sigma公司), 大鼠MIF和AQP-5 ELISA检测试剂盒(上海亚培生物科技有限公司), 长托宁PHCD(成都力思特制药股份有限公司), ELX800型酶标仪(美国BIO-TEK仪器公司), 血气分析仪(美国Roche公司), 全自动生化分析仪(美国Vitros公司), 光学显微镜(日本OLYMPUS公司), 石蜡切片机(德国LEICA公司), 全自动组织脱水机(德国LEICA公司), 组织包埋机(德国LEICA公司)。健康成年SPF级SD大鼠(180-240 g)100只, 雌雄各半, 由南通大学实验动物中心提供。

1.2 方法

1.2.1 大鼠ANP并发ALI模型构建与PHCD药物处理: 参照Lankisch等的方法, 大鼠腹腔注射10%水合氯醛[300 mg/(kg·bw)]麻醉后固定于手术台, 以0.1 mL/min速度向胰胆管内逆向注入4%牛磺胆酸钠[1 mL/(kg·bw)], 构建大鼠ANP并发ALI模型。按照是否采用PHCD药物干预随机分为治疗组和非治疗组, 治疗组大鼠在制模后30 min、12 h、24 h、36 h腹腔注射PHCD[0.2 mg/(kg·bw)], 非治疗组大鼠在各相应时间点注射等体积无菌生理盐水。每组分别于制模成功并药物处理后6 h、12 h、24 h、36 h、48 h五个时间点取材, 继续随机分组, 共10组。

1.2.2 标本采集: 每组分别于制模成功并药物处理后6 h、12 h、24 h、36 h、48 h五个时间点, 将大鼠麻醉(方法同前)后抽取腹主动脉新鲜动脉血(肝素抗凝)0.5 mL, 密封后送检; 心脏穿刺抽取血液2-3 mL, 室温下以3 000 r/min离心20 min, 取血清置-80℃冰箱保存待检; 放血致死取左肺, 生理盐水2 mL灌洗支气管肺泡2次, 取肺泡灌洗液2 mL, 室温下以2 500 r/min离心10 min, 取上清液置-80℃冰箱保存待检; 取右肺中叶组织, 滤纸吸干表面水分, 称质量待检; 同时快速切取胰腺和肺组织, 置40 g/L多聚甲醛中固定。

■ 相关报道

1980年Aho等经胆管穿刺, 向胰胆管内注射牛磺胆酸钠, 首次成功诱导了ANP模型。该模型出色的模拟了临床胰管梗阻、胆汁返流等导致的急性胰腺炎的发生和发展过程, 且操作比较方便, 现已被广泛接受与应用。

■应用要点

盐酸戊乙奎醚(PHCD)不仅可以改善APALI的肺损伤程度,甚至可能在一定程度上阻止ALI向ARDS进展,PHCD将有可能成为一种新的有效治疗APALI的可行性选择手段。

表 1 PHCD对大鼠ANP合并ALI血气的影响 (mmHg, mean \pm SD)

	PaO ₂					PaCO ₂				
	6 h	12 h	24 h	36 h	48 h	6 h	12 h	24 h	36 h	48 h
非治疗组	89.1 \pm 4.1	81.1 \pm 4.2	71.3 \pm 3.4	60.9 \pm 3.7	48.8 \pm 3.2	44.3 \pm 2.3	51.2 \pm 1.9	56.6 \pm 2.3	61.1 \pm 2.5	64.8 \pm 3.2
PHCD治疗组	94.1 \pm 2.2	85.9 \pm 2.9	80.4 \pm 1.6	73.0 \pm 2.7	66.8 \pm 4.7	42.5 \pm 2.6	49.5 \pm 2.5	50.2 \pm 1.1	53.7 \pm 2.9	60.0 \pm 1.5
χ^2 值	102.64	101.69	102.49	36.55	72.45	72.83	61.75	52.22	51.41	41.07
P值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001

表 2 PHCD对大鼠ANP合并ALI肺组织湿/干质量比的影响 (mean \pm SD)

	6 h	12 h	24 h	36 h	48 h
非治疗组	4.34 \pm 0.09	4.57 \pm 0.13	4.79 \pm 0.09	4.98 \pm 0.10	5.11 \pm 0.15
PHCD治疗组	4.35 \pm 0.08	4.54 \pm 0.07	4.42 \pm 0.07	4.56 \pm 0.08	4.69 \pm 0.17
χ^2 值	2.71	6.69	5.19	2.81	4.39
P值	0.025	0.009	0.023	0.043	0.036

1.2.3 血气分析: 将抽取的新鲜动脉血0.5 mL立即用Roche OPTICCA 型血气分析仪测定PaO₂和PaCO₂, 具体方法按操作规程。

1.2.4 肺组织湿/干质量比测定: 用滤纸吸干右肺中叶组织的表面水分, 用电子分析天平称湿质量(W), 然后置80 °C电热干燥箱内烘烤24 h左右, 待质量恒定后称干质量(D), 计算肺湿/干质量比值(W/D)。

1.2.5 胰腺和肺组织病理学检测: 胰腺和肺组织经固定、脱水、石蜡包埋、切片, 进行苏木精-伊红(HE)染色, 显微镜下观察。

1.2.6 血清MIF和肺泡灌洗液AQP-5测定: 采用ELISA法分别检测血清MIF和肺泡灌洗液AQP-5的浓度, 严格按照试剂盒说明书规范操作。

统计学处理 使用SPSS15.0统计分析软件, 采用具有一个重复测量因素的两因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠一般情况观察 非治疗组中6 h组大鼠活动减少; 12 h组大鼠开始呼吸急促, 同时有血性腹水; 24 h组可见大鼠耸毛, 口鼻周围紫绀, 睑缘和四肢肢端苍白, 喘息明显, 血性腹水增多, 腹围稍增加, 呼吸困难; 随着时间推移, 大鼠呈现越来越严重的呼吸窘迫表现; 36 h组出现1只大鼠死亡; 48 h组又有2只大鼠死亡。PHCD治疗组亦有厌食、竖毛、呼吸急促、活动减少等情况, 但与非治疗组各相应时间点比较明显轻微, 血

性腹水明显减少, 且48 h组仅死亡1只大鼠。

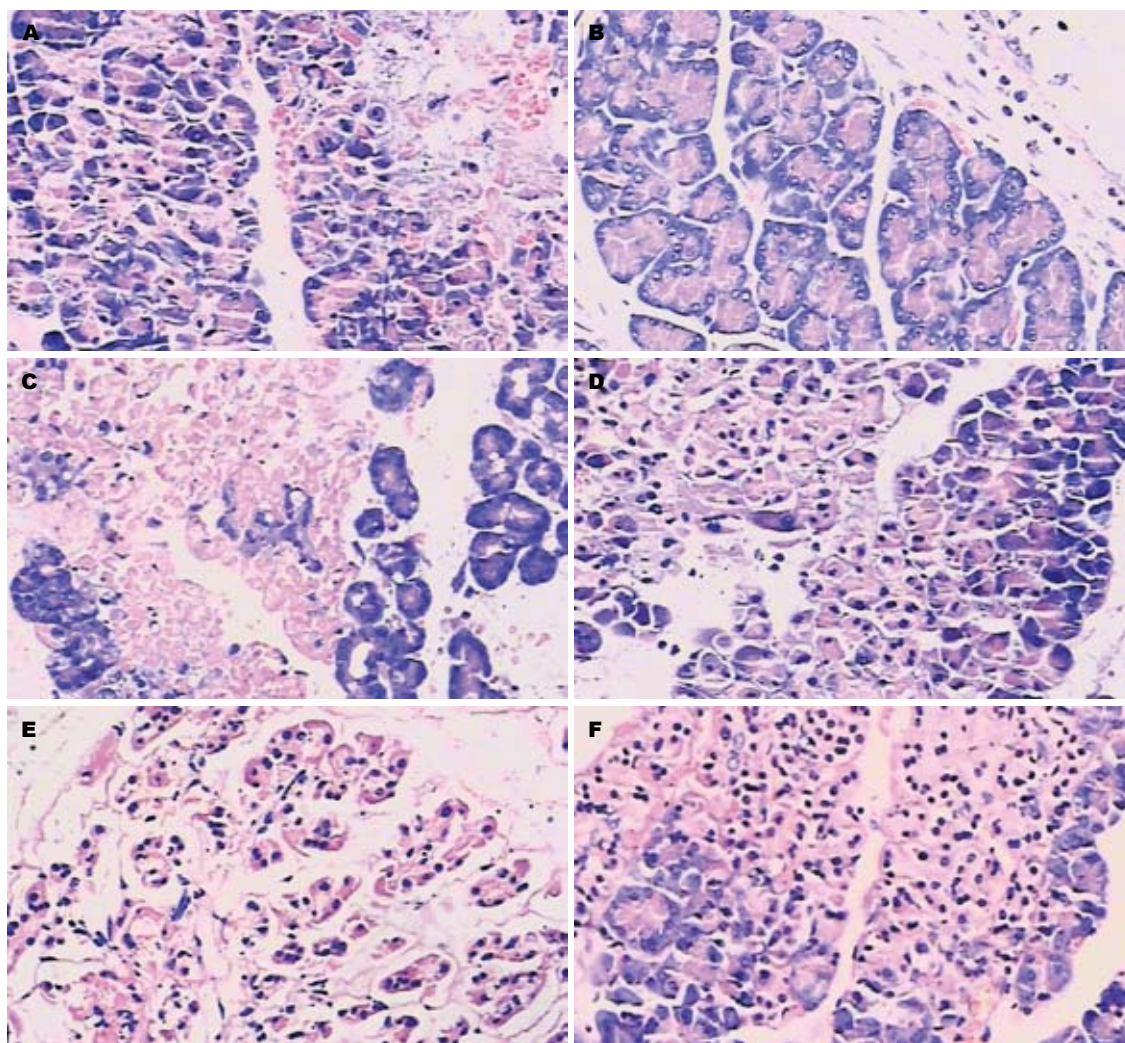
2.2 血气分析 PHCD治疗组与非治疗组各相应时间点比较, PaO₂上升有统计学差异($\chi^2 = 503.48$, $P = 0.000$), PaCO₂下降有统计学差异($\chi^2 = 82.83$, $P = 0.000$, 表1)。

2.3 肺组织湿/干质量比值 PHCD治疗组湿/干质量比值有逐渐增加趋势, 但与非治疗组各相应时间点比较明显下降, 有统计学差异($\chi^2 = 21.04$, $P = 0.000$, 表2)。

2.4 胰腺病理组织学改变

2.4.1 大体观察: 非治疗组注射完牛磺胆酸钠后胰腺组织随即出现明显的弥漫性出血, 6 h在穿刺点附近胰腺组织见明显的出血和肿胀, 局部有暗紫色斑, 腹腔内有少量血性腹水; 12 h胰腺组织出血、肿胀及坏死明显加重, 局部有皂化斑, 并见中等量血性腹水; 24-48 h点胰腺组织出血、肿胀及坏死进一步加重, 并可见多处皂化斑。PHCD治疗组胰腺组织出血和水肿均较非治疗组各相应时间点明显减轻。

2.4.2 镜下观察: 非治疗组6 h可见明显胰腺小叶间水肿, 片状出血, 炎性细胞浸润, 部分腺泡细胞变性; 12-48 h都可见大量炎性细胞浸润, 片状出血, 胰腺小叶结构破坏, 大量腺泡细胞坏死明显。PHCD治疗组6 h点虽可见胰腺部分细胞变性, 腺体呈空泡状, 但与相同时间点非治疗组比较明显减轻; 12-48 h虽可见胰腺小叶结构破坏、片状出血、炎症细胞浸润, 但与相同时间点非治疗组比较明显减轻(图1)。



■同行评价
本文为动物基础研究, 立题有据, 采用的技术路线可行, 观察指标较全、较新, 对重症急性胰腺炎的防治具有一定的理论意义。

图1 胰腺病理组织学改变(HE). A, C, E: 非治疗组; B, D, F: PHCD治疗组; A, B: 6 h; C, D: 24 h; E, F: 48 h.

表3 血清MIF浓度测定值 (ng/mL, mean \pm SD)

	6 h	12 h	24 h	36 h	48 h
SAP组	158.9 \pm 7.9	208.0 \pm 7.4	191.2 \pm 7.5	177.6 \pm 6.5	160.8 \pm 2.7
PHCD组	127.0 \pm 5.4	165.1 \pm 5.4	148.2 \pm 5.1	127.9 \pm 5.0	113.4 \pm 5.4
χ^2 值	10.60	9.71	11.28	9.48	8.56
P值	0.001	0.002	0.000	0.002	0.003

2.5 肺病理组织学改变 大体观察, 非治疗组6 h肉眼见肺水肿, 少量血性胸水; 12-48 h血性胸水逐渐增多, 肺水肿进行性加重; 暗红色肺表面12 h可见散在的出血点, 24-48 h出血点明显增多, 成大片状, 可见肺淤血. PHCD组各相应时间点肺水肿和淤血均明显较轻. 镜下观察, 非治疗组6 h可见肺间质水肿、充血、中性粒细胞浸润; 12-48 h肺病理组织学改变逐渐加重, 呈现不同程度的肺泡和间质水肿、出血、灶性或片状肺不张, 肺泡间隔增宽, 大量炎症细胞浸润, 肺组织结构紊乱等典型的ALI病理改变. PHCD治疗组肺间质

水肿、出血、炎症细胞浸润均明显减轻.

2.6 血清MIF的动态变化 各相同时间点PHCD治疗组血清MIF浓度明显低于非治疗组, 有统计学差异($\chi^2 = 20.52, P = 0.042$, 表3).

2.7 肺泡灌洗液AQP-5的动态变化 各相同时间点PHCD治疗组肺泡灌洗液AQP-5浓度明显高于非治疗组, 有统计学差异($\chi^2 = 17.22, P = 0.044$, 表4).

3 讨论

SAP是一种临床急重症, 病死率高, 预后较差^[5], 并发症多, APALI是SAP早期最常见的并发症,

表 4 肺泡灌洗液AQP-5浓度测定值 (ng/mL, mean \pm SD)

	6 h	12 h	24 h	36 h	48 h
SAP组	0.223 \pm 0.032	0.187 \pm 0.017	0.143 \pm 0.013	0.117 \pm 0.017	0.099 \pm 0.014
PHCD组	0.312 \pm 0.056	0.256 \pm 0.037	0.235 \pm 0.031	0.200 \pm 0.024	0.183 \pm 0.180
χ^2 值	7.58	9.87	5.44	5.76	8.11
P值	0.006	0.002	0.019	0.016	0.004

也是SAP早期最主要的死亡原因之一。临床表现主要为肺内弥漫性炎症细胞浸润、肺血循环障碍、肺毛细血管通透性增加及低氧血症。1980年Aho等^[5]经胆管穿刺,向胰胆管内注射牛磺胆酸钠,首次成功诱导了ANP模型。该模型出色地模拟了临床胰管梗阻、胆汁返流等导致的急性胰腺炎的发生和发展过程,且操作比较方便,现已被广泛接受与应用。研究发现通过改变牛磺胆酸钠的药物浓度、注射速度及注射持续时间可以产生轻重不同的急性胰腺炎。我们采用向大鼠胰胆管内逆行注射4%牛磺胆酸钠的方法出色的诱导了典型的ANP并发ALI,病理学检查显示所有实验动物的胰腺组织均出现不同程度的水肿、炎症细胞浸润、灶性或片状出血,胰腺及周围组织出现脂肪坏死及皂化斑,同时还伴有血性腹水,肺组织表现出弥漫性肺实质损伤和肺水肿,符合APALI的病理改变。因此,该模型构建方法本模型制作方法操作简单,重复性好,病变产生迅速,对研究胰腺炎的发生机制和防治效果具有一定的实用价值。

临床早期治疗APALI的重要手段之一就是药物干预,但目前治疗药物均存在疗效不满意或不良反应较大等特点,因此急需寻找更安全有效的APALI治疗药物。PHCD是一类中国原创的新型选择性长效抗胆碱药,与其他抗胆碱药不同的是,它具有选择性M₁、M₃和N₁、N₂受体拮抗作用,无论在外周和中枢均可发挥作用,且抗胆碱能作用更强。肺的通气道主要分布M₃受体,故PHCD具有持续作用时间长、心血管不良反应小等特点。近年来的研究表明PHCD可能对ALI具有治疗作用,他能改善肺部微循环、降低毛细血管壁的通透性、促使溶酶体释放减少。本次实验结果显示,PHCD可抑制分布于气道平滑肌上的M受体,松弛平滑肌,减少气管黏液分泌,改善肺部通气。

伴随着人们对SAP认识的深入,APALI中炎症介质的作用逐渐受到人们的关注,机体自身出现的多种炎症介质所形成的“瀑布效应”可

使炎症反应扩大甚至失控,最终导致以细胞自身破坏为特征的全身性炎症反应。TNF- α 和IL-6等细胞因子会不断在胰腺局部产生并大量进入血液中,形成强大的网络级联反应,继而导致远处器官内的单核细胞巨噬系统激活,释放出毒性介质,成为继发肺部严重炎症反应的始动因素。新的研究发现要反映急性胰腺炎的病变和预后,还有更加重要的细胞因子参与APALI的致死效应。目前MIF的特殊生物学功能及其在多种疾病中的作用使得其日益受到人们的关注。MIF是一种可溶性细胞因子,具有促炎性作用,在APALI中发挥了重要作用。MIF由活化的T淋巴细胞分泌,可抑制单核/巨噬细胞移动,促进巨噬细胞在炎症局部浸润、增生、激活,并分泌其他的促炎因子如IL-1 β 、IL-6和TNF- α 等,从而加剧炎症反应。我们通过实验发现PHCD治疗组与非治疗组比较血清MIF下降,提示PHCD可抑制致炎因子MIF的产生,减轻MIF引起的炎症“瀑布效应”。其机制可能是通过神经性胆碱能系统发挥作用,使细胞对缺血缺氧的耐受性提高,稳定细胞膜及溶酶体、线粒体等细胞器的膜结构,减少溶酶体的释放^[6],从而抑制和减少致炎细胞因子MIF的产生和聚集,抑制氧自由基生成、减轻肺泡上皮细胞损伤^[7,8],有效减轻肺泡的渗出,有利于减轻肺间质和肺泡内水肿^[9],并阻滞了肺部胆碱能受体有效解除血管平滑肌痉挛,降低肺血管阻力。因此,PHCD可减轻大鼠ANP并发ALI的肺部炎症反应。

水通道蛋白是一组小分子跨膜蛋白,负责渗透压驱动下水转运,有时也转运甘油。近年来的研究发现,这一家族蛋白在肿瘤的生长和转移、细胞形态、细胞凋亡、黏液的分泌等方面具有重要作用^[10,11]。水通道蛋白有13种,其中AQP-1、AQP-3、AQP-4和AQP-5这4种表达在肺及气道。在AQP-1、AQP-3、AQP-4和AQP-5基因敲除小鼠中,匹鲁卡品刺激后应用特殊显微镜直接观察小鼠上呼吸道,只有AQP-5基因敲除小鼠气道黏膜下腺的液体分泌减低,其他水

通道蛋白基因敲除小鼠的液体分泌并无明显改变. 收集AQP-5基因敲除小鼠上呼吸道分泌的液体进行检测, 毛果芸香碱激发AQP-5缺失小鼠呼吸道黏液分泌较野生型小鼠降低2倍, 而黏液中蛋白和Cl⁻明显升高, 同时免疫组化显示黏膜下腺的形态和密度无改变, 说明腺体高分泌并非腺体数量和形态改变, 而是AQP-5功能缺失所致. 以上结果提示在肺组织4种水通道蛋白中, AQP-5在肺和气道的重要生理功能如肺泡液体吸收或气道表面液体调节中具有重要作用. 我们通过实验证实PHCD能增加ANP并发ALI大鼠肺泡灌洗液中AQP-5的含量, 降低肺湿/干质量比值, 并有效改善肺气体交换功能. 表明PHCD能保护肺泡上皮细胞, 维持其合成与分泌AQP-5的功能, 从而保持良好的肺表面张力, 防止肺泡萎陷, 维持肺功能作用. 主要原因可能是: PHCD可以降低胆碱能神经的张力, 避免胆碱能神经反射的加强, 从而使呼吸道静态张力降低, 松弛呼吸道平滑肌, 减少黏液分泌及血管渗出, 改善气道通气功能^[12]; PHCD能够解除血管平滑肌痉挛, 调节微血管舒缩, 开放闭锁的微循环前后通路, 重新恢复灌流, 减轻对微血管内皮细胞骨架的影响, 调控胞浆内Ca²⁺的有效浓度等, 从而抑制肺微血管的通透性增加^[13]; PHCD能够通过抗M胆碱作用抑制胆碱能促炎效应的发生等.

总之, PHCD不仅可以改善APALI的肺损伤程度, 甚至可能在一定程度上阻止ALI向ARDS进展, PHCD将有可能成为一种新的有效治疗

APALI的可行性选择手段.

4 参考文献

- 1 罗丹, 雷诺庆. 重症急性胰腺炎手术适应症及手术时机选择. 中国实用外科杂志 2007; 27: 332-334
- 2 Lankisch PG, Ihse I. Bile-induced acute experimental pancreatitis. *Scand J Gastroenterol* 1987; 22: 257-260
- 3 谭利平, 许峰, 匡凤梧. 水通道蛋白5在高氧肺损伤中的表达及调解机制. 中国危重病急救医学 2006; 18: 462-465
- 4 赵大鹏. 盐酸戊乙奎醚与阿托品治疗急性有机磷农药中毒疗效比较研究. 中国现在药物应用 2010; 20: 134-135
- 5 Pezzilli R, Mancini F. Assessment of severity of acute pancreatitis: a comparison between old and most recent modalities used to evaluate this perennial problem. *World J Gastroenterol* 1999; 5: 283-285
- 6 杨国栋. 微循环障碍与莨菪碱类药物的应用. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 1989: 346-347
- 7 李娟, 李俊, 潘建辉, 方才, 陈昆洲. 盐酸戊乙奎醚预先给药对大鼠内毒素性急性肺损伤的影响. 中华麻醉学杂志 2007; 27: 70-74
- 8 沈伟锋, 吴洪海, 干建新, 杨波, 江观玉. 盐酸戊乙奎醚对内毒素致急性肺损伤的保护作用. 中华结核和呼吸杂志 2006; 29: 633-634
- 9 俞辰斌, 孙海晨. 盐酸戊乙奎醚在急性肺损伤防治中的应用前景. 创伤外科杂志 2007; 6: 44
- 10 Blanc L, Liu J, Vidal M, Chasis JA, An X, Mohandas N. The water channel aquaporin-1 partitions into exosomes during reticulocyte maturation: implication for the regulation of cell volume. *Blood* 2009; 114: 3928-3934
- 11 Verkman AS. Aquaporins: translating bench research to human disease. *J Exp Biol* 2009; 212: 1707-1715
- 12 Bone RC. Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS. *Crit Care Med* 1996; 24: 1125-1128
- 13 俞辰斌, 孙海晨, 聂时南, 邵旦兵, 许宝华, 唐文杰, 吴学豪. 盐酸戊乙奎醚对创伤性急性肺损伤的早期干预作用. 创伤外科杂志 2007; 9: 359-362

编辑 李军亮 电编 闫晋利

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)

LY294002联合吉西他滨对胰腺癌PANC-1细胞p-Akt和MRP表达的影响

柯晓煜, 王渝, 谢祚启, 刘志清, 赵秋

■背景资料

PI3K/Akt信号转导通路的异常活化在肿瘤发生发展中起重要作用, 并可能是导致肿瘤细胞对化疗药物敏感性低甚至耐药的一个重要原因。LY294002是能有效抑制PI3K/Akt信号转导通路, 吉西他滨是常见的胰腺癌化疗药物。但未能明确LY294002是否能促进化疗药物的化疗作用。

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

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

作者贡献分布: 此课题由柯晓煜、王渝及赵秋设计; 细胞培养由刘志清操作完成; PCR和Western blot检测分析由柯晓煜与谢祚启完成; 论文写作由柯晓煜与赵秋完成。

通讯作者: 赵秋, 主任医师, 430030, 湖北省武汉市汉口解放大道1095号, 华中科技大学同济医学院附属同济医院消化内科。tongji461@sina.com

电话: 027-83663611

收稿日期: 2011-10-01 修回日期: 2011-11-18

接受日期: 2011-12-18 在线出版日期: 2011-12-28

LY294002 combined with gemcitabine inhibits p-Akt and MRP expression in human pancreatic carcinoma PANC-1 cells

Xiao-Yu Ke, Yu Wang, Zuo-Qi Xie, Zhi-Qing Liu, Qiu Zhao

Xiao-Yu Ke, Zuo-Qi Xie, Zhi-Qing Liu, Qiu Zhao, Department of Gastroenterology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China

Yu Wang, Department of Pathology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China

Correspondence to: Qiu Zhao, Chief Physician, Department of Gastroenterology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China. tongji461@sina.com

Received: 2011-10-01 Revised: 2011-11-18

Accepted: 2011-12-18 Published online: 2011-12-28

Abstract

AIM: To investigate the effect of LY294002 (a PI3K inhibitor) combined with gemcitabine on p-Akt and multidrug resistance-associated protein (MRP) expression in human pancreatic carcinoma PANC-1 cells.

METHODS: After PANC-1 cells were treated with different concentrations of LY294002 and gemcitabine, the expression of MRP mRNA and p-Akt and MRP proteins was detected by semi-quantitative RT-PCR and Western blot, respectively.

RESULTS: Compared to untreated control cells,

treatment with LY294002 combined with gemcitabine significantly decreased the expression of MRP mRNA (1.47 ± 0.03 , 1.31 ± 0.05 , 1.02 ± 0.04 , 0.76 ± 0.06 , 0.37 ± 0.02 , $P < 0.05$) and p-Akt and MRP proteins (p-Akt: 0.80 ± 0.02 , 0.63 ± 0.01 , 0.52 ± 0.01 , 0.41 ± 0.02 , 0.35 ± 0.02 , $P < 0.05$; MRP: 0.93 ± 0.05 , 0.87 ± 0.03 , 0.81 ± 0.03 , 0.71 ± 0.02 , 0.40 ± 0.03 , both $P < 0.05$) in a concentration-dependent manner.

CONCLUSION: LY294002 could effectively strengthen the sensitivity of human pancreatic carcinoma PANC-1 cells to gemcitabine. LY294002 may down-regulate MRP transcription by inhibiting p-Akt expression and therefore reverse resistance of PANC-1 cells to gemcitabine.

Key Words: LY294002; Gemcitabine; PANC-1 cells; p-Akt; Multidrug resistance-associated protein

Ke XY, Wang Y, Xie ZQ, Liu ZQ, Zhao Q. LY294002 combined with gemcitabine inhibits p-Akt and MRP expression in human pancreatic carcinoma PANC-1 cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(36): 3678-3681

摘要

目的: 研究LY294002联合吉西他滨对体外培养的人胰腺癌PANC-1细胞内p-Akt和MRP表达的作用。

方法: 半定量RT-PCR和Western blot检测不同浓度的LY294002联合吉西他滨用药后PANC-1细胞内MRP mRNA以及p-Akt和MRP蛋白表达水平的变化。

结果: LY294002联合吉西他滨能显著抑制PANC-1细胞内MRP mRNA的表达(1.47 ± 0.03 , 1.31 ± 0.05 , 1.02 ± 0.04 , 0.76 ± 0.06 , 0.37 ± 0.02 , $P < 0.05$), 亦显著抑制p-Akt和MRP蛋白的表达, 并且这种抑制作用与药物浓度显著相关(p-Akt: 0.80 ± 0.02 , 0.63 ± 0.01 , 0.52 ± 0.01 , 0.41 ± 0.02 , 0.35 ± 0.02 , $P < 0.05$; MRP: 0.93 ± 0.05 , 0.87 ± 0.03 , 0.81 ± 0.03 , 0.71 ± 0.02 , 0.40 ± 0.03 , $P < 0.05$), 在其浓度最大组抑制效应达到最大。

■同行评议者

谷俊朝, 主任医师, 首都医科大学附属北京友谊医院普外科

结论: LY294002可能通过抑制PI3K/Akt信号途径抑制MRP mRNA和蛋白的表达, 逆转肿瘤的耐药。

关键词: LY294002; 吉西他滨; PANC-1细胞; p-Akt; MRP

柯晓煜, 王渝, 谢祚启, 刘志清, 赵秋. LY294002联合吉西他滨对胰腺癌PANC-1细胞p-Akt和MRP表达的影响. 世界华人消化杂志 2011; 19(36): 3678-3681

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/3678.asp>

0 引言

PI3K家族参与多种信号通路, 以PI3K/Akt信号转导通路尤为重要. PI3K/Akt信号转导通路的异常活化在肿瘤发生发展中起重要作用, 并可能是导致肿瘤细胞对化疗药物敏感性低甚至耐药的一个重要原因^[1,2]. LY294002是靶向PI3K催化亚基p110抑制剂, 能有效抑制PI3K/Akt信号转导通路^[3,4]. 本研究将通过给予不同浓度的LY294002联合吉西他滨干预人胰腺癌PANC-1细胞, 探讨LY294002是否可通过PI3K/Akt信号途径抑制p-Akt、MRP mRNA和蛋白的表达, 增强胰腺癌细胞对化疗药物治疗的敏感性。

1 材料和方法

1.1 材料 Trizol试剂购自上海生物工程技术服务有限公司; M-MLV逆转录酶购自美国Promega公司; Taq DNA聚合酶购自美国Fermentas公司; 兔抗人单克隆抗体和鼠抗人MRP单克隆抗体购自英国Abcam公司; 鼠抗人 β -actin多克隆抗体购自美国Sant Cruz公司; HRP标记的羊抗兔IgG抗体和HRP标记的羊抗鼠IgG抗体购自美国Fermentas公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞株及其培养: 人胰腺癌PANC-1细胞株购自上海细胞库. 用100 mL/L胎牛血清高糖DMEM培养液培养PANC-1细胞株, 均在37℃、50 mL/L CO₂、饱和湿度的普通CO₂培养箱内贴壁培养. 吉西他滨用生理盐水溶解, LY294002用DMSO溶解, 用DMEM培养基稀释成设计浓度(保证培养瓶中的DMSO \leq 1%). 细胞常氧培养24 h, 待贴壁生长融合至80%时, 将细胞随机分为5组: (1)对照组, 不添加任何药物; (2)20 μ mol/L吉西他滨处理组; (3)10 μ mol/L LY294002联合20 μ mol/L吉西他滨处理组; (4)25 μ mol/L LY294002联合20 μ mol/L吉西他滨处理组; (5)50 μ mol/L

LY294002联合20 μ mol/L吉西他滨处理组. 20 μ mol/L吉西他滨置于培养箱中持续培养24 h后, 加入LY294002置于培养箱中持续培养24 h.

1.2.2 RT-PCR检测MRP的mRNA表达: 收集经药物处理的胰腺癌PANC-1细胞, 采用Trizol试剂提取细胞总RNA, 逆转录合成cDNA. MRP上游引物: 5'-TGAAGGACTTCGTGT-CAGCC-3', 下游引物: 5'-GTCCATGATG-GTGTTGAGCC-3', 预扩增片断257 bp, 退火温度60℃; 以 β -actin作为内参, 引物序列为: 5'-GTGGACATCCGCAAAGAC-3', 5'-GCTGT-CACCTTCACCGTTTC-3', 预扩增片断438 bp, 退火温度59℃. 各条引物均由上海生工生物工程技术有限公司合成. 扩增产物用1.5% TAE琼脂糖凝胶在120 V电压下电泳30 min, 紫外线下凝胶置于成像系统下进行拍照, 各组条带净灰度值进行半定量分析, 与内参照的测定结果比较, 计算其比值。

1.2.3 Western blot检测p-Akt和MRP蛋白的表达: 收集经药物处理的胰腺癌PANC-1细胞, 采用细胞裂解液提取总蛋白, 加热变性后-20℃保存. 取50 μ g蛋白进行SDS-PAGE凝胶电泳, 将凝胶中的蛋白质用转移系统印转到硝酸纤维素膜上, 放入封闭液(TBS+5%脱脂奶粉+0.1% tween20)室温振荡封闭2 h. 分别加入兔抗人p-Akt单克隆抗体(1:500), 鼠抗人MRP单克隆抗体(1:250), 鼠抗人 β -actin多克隆抗体(1:100), 4℃孵育过夜. 分别按1:7 000加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔IgG或羊抗鼠IgG, 37℃孵育1 h. 采用化学发光法(ECL)曝光胶片, 采集图像及条带净灰度值, 并与内参照的测定结果比较, 计算其比值。

统计学处理 采用SPSS13.0进行统计学分析, 实验所得所有数据均以mean \pm SD表示. PCR和Western blot两组间比较采用S-N-K检验, 多组间比较采用方差分析. $P<0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 LY294002联合吉西他滨对MRP mRNA表达的影响 RT-PCR结果显示, MRP mRNA在吉西他滨处理组中的表达明显低于其在空白对照组中的表达, 两者间有显著性差异($P<0.05$), 不同浓度的LY294002联合吉西他滨处理组中, 随着LY294002作用浓度的增加, MRP mRNA的表达水平呈下降趋势, 并与药物浓度显著相关($P<0.05$, 图1)。

■研发前沿

LY294002在胰腺癌中的研究刚刚起步, 其具体的作用机制有待进一步研究。

■相关报道

研究资料表明, PI3K/Akt除了能促进肿瘤发生发展, 还促使肿瘤细胞多药耐药的发生, 而MRP可能是胰腺癌产生多药耐药的部分原因, 但未能进一步揭示其中的具体机制从而增强化疗效果。

■创新盘点

本研究首次检测LY294002联合吉西他滨对人胰腺癌PANC-1细胞内p-Akt、MRP基因表达的影响,探讨LY294002是否增强吉西他滨对胰腺癌细胞的敏感性。

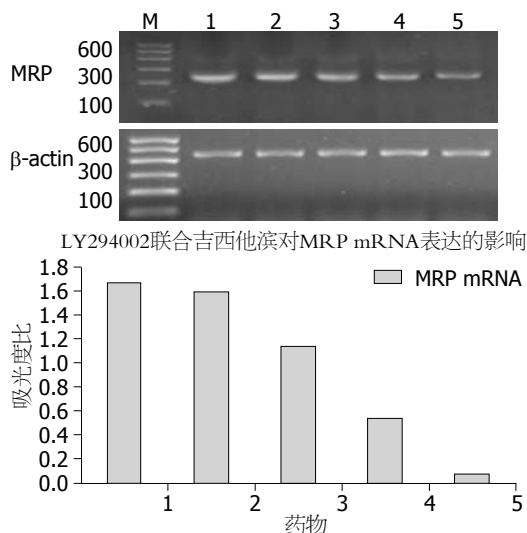


图1 LY294002联合吉西他滨对PANC-1细胞MRP mRNA表达的影响. M: DNA标记物; 1: 对照组; 2-5: 0、10、25、50 μmol/L LY294002联合20 μmol/L吉西他滨处理组。

2.2 LY294002联合吉西他滨对p-Akt和MRP蛋白表达的影响 Western blot结果显示, p-Akt蛋白在吉西他滨处理组细胞内的表达与空白对照组相比无明显差异; 而吉西他滨处理组细胞中MRP蛋白的表达量明显低于其在空白对照组中的表达量, 两组间存在显著性差异($P<0.05$)。在不同浓度的LY294002联合吉西他滨处理组, LY294002均可明显抑制PANC-1细胞内p-Akt、MRP蛋白的表达, 并且这种抑制作用与药物浓度显著相关($P<0.05$), 在药物浓度最大组三者抑制效应均达最大(图2)。

3 讨论

1984年发现的一类胞内特异性磷酸化肌醇磷脂3羟基的激酶PI3K是由p110催化亚基和p85调节亚基构成的异源二聚体, 称为PI3Ks家族, 以PI3K/Akt信号转导通路尤为重要^[5-7]。PI3K/Akt信号转导通路的异常激活则在刺激肿瘤细胞恶性增殖和血管形成、增强肿瘤细胞的侵袭转移能力中起着中枢作用, 而且可能导致肿瘤细胞对化疗药物敏感性低甚至耐药^[8,9]。Akt为蛋白激酶B(PKB), 是一种丝/苏氨酸蛋白激酶, 蛋白质产物与蛋白激酶A、蛋白激酶C有高度的同源性, 处于PI3K/Akt信号转导通路的核心部位。Akt只有催化结构域的Thr308位点和调节结构域的Ser473位点2个位点的磷酸化才能使Akt充分活化, 也就是只有磷酸化的Akt(p-Akt)才具有生物学活性。多种生长因子、激素等均可刺激Akt的活化, Akt的活化除了能促进肿瘤发生发展, 还促使肿瘤细胞多药耐药的发生, 所以特异性抑制

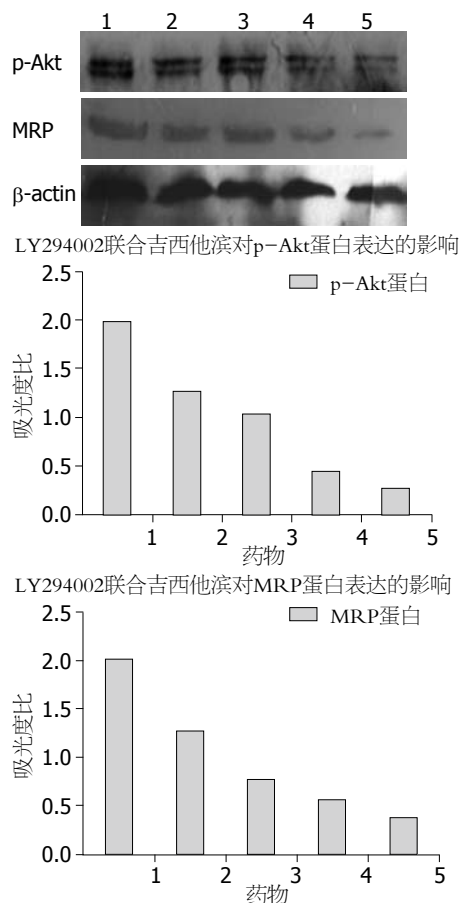


图2 LY294002联合吉西他滨对PANC-1细胞p-Akt和MRP蛋白表达的影响. M: DNA标志物; 1: 对照组; 2-5: 0、10、25、50 μmol/L LY294002联合20 μmol/L吉西他滨处理组。

Akt活性可能是治疗肿瘤并增强化疗效果的有效途径^[10-12]。Chen等^[13]在肝细胞癌的研究中发现, Bortezomib能抑制PI3K下调活化的Akt水平, 进而克服细胞对TRAIL的耐药, 这进一步证明p-Akt的活化可能是肿瘤多药耐药的产生机制之一。

肿瘤多药耐药的重要机制是ABC超家族的几个运载体介导的药物外流量加大, 特别是BCRP(ABCG2)、MDR1P-glycoprotein(ABCB1)和MRP(ABCC)家族成员在介导多药耐药中起着重要作用^[14,15]。其中MRP的表达能影响胰腺癌的生物行为, 并可能是胰腺癌产生多药耐药的部分原因, MRP的研究可能有助于预测胰腺癌患者的化疗效果^[16]。

PI3K-AKT信号转导通路是否通过上调多药耐药相关蛋白导致肿瘤细胞对化疗药物敏感性低甚至耐药尚在进一步研究中。LY294002是靶向PI3K催化亚基p110的抑制剂, 能有效抑制PI3K/Akt信号转导通路。有研究表明LY294002能够有效抑制体内外肿瘤细胞的生长, 这种抑瘤效果经证实与其对PI3K及其下游的抑制有关^[3]。

■应用要点

本研究为胰腺癌的基因治疗以及通过调控基因增强化疗药物对胰腺癌的治疗效果提供理论依据, 表明PI3K抑制剂与传统化疗药物的联用对治疗那些已对传统化疗药物产生耐药性的肿瘤患者提供更好的选择。

若LY294002与化疗药物联合使用能够更有效并降低毒性, 则表明PI3K抑制剂与传统化疗药物的联用为治疗那些已对传统化疗药物产生耐药性的肿瘤患者提供了更好地选择。

本研究通过给予不同浓度的LY294002联合吉西他滨干预人胰腺癌PANC-1细胞, RT-PCR检测不同浓度的LY294002联合吉西他滨对MRP mRNA表达的影响, Western blot检测不同浓度的LY294002联合吉西他滨对p-Akt和MRP蛋白表达的影响。该研究发现不同浓度的LY294002联合吉西他滨可显著抑制PANC-1细胞MRP mRNA的表达, 亦可显著抑制PANC-1细胞p-Akt和MRP蛋白的表达, 而且LY294002联合吉西他滨的抑制效应随着LY294002药物作用浓度的增高而增大。结果表明LY294002联合吉西他滨可通过PI3K/Akt信号途径抑制p-Akt和MRP的表达, 使药物抑制细胞恶性转化的能力增强。

总之, PI3K/Akt信号途径可诱导MRP的异常过表达, 其过表达在胰腺癌对化疗抵抗中起着很显著的作用。LY294002可能通过抑制PI3K/Akt信号途径抑制p-Akt和MRP的表达逆转耐药。

4 参考文献

- 1 夏曙, 于世英. PI3K/Akt信号转导通路在恶性肿瘤中的研究进展. *肿瘤* 2006; 26: 576-578
- 2 McCubrey JA, Steelman LS, Abrams SL, Lee JT, Chang F, Bertrand FE, Navolanic PM, Terrian DM, Franklin RA, D'Assoro AB, Salisbury JL, Mazzarino MC, Stivala F, Libra M. Roles of the RAF/MEK/ERK and PI3K/PTEN/AKT pathways in malignant transformation and drug resistance. *Adv Enzyme Regul* 2006; 46: 249-279
- 3 Semba S, Itoh N, Ito M, Harada M, Yamakawa M. The in vitro and in vivo effects of 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-chromone (LY294002), a specific inhibitor of phosphatidylinositol 3'-kinase, in human colon cancer cells. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 1957-1963
- 4 Lee CM, Fuhrman CB, Planelles V, Peltier MR, Gaffney DK, Soisson AP, Dodson MK, Tolley HD, Green CL, Zempolich KA. Phosphatidylinositol 3-kinase inhibition by LY294002 radiosensitizes human cervical cancer cell lines. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 250-256
- 5 West KA, Castillo SS, Dennis PA. Activation of the PI3K/Akt pathway and chemotherapeutic resistance. *Drug Resist Updat* 2002; 5: 234-248
- 6 Stoll V, Calleja V, Vassaux G, Downward J, Lemoine NR. Dominant negative inhibitors of signalling through the phosphoinositol 3-kinase pathway for gene therapy of pancreatic cancer. *Gut* 2005; 54: 109-116
- 7 Reichert M, Saur D, Hamacher R, Schmid RM, Schneider G. Phosphoinositide-3-kinase signaling controls S-phase kinase-associated protein 2 transcription via E2F1 in pancreatic ductal adenocarcinoma cells. *Cancer Res* 2007; 67: 4149-4156
- 8 Takeda A, Osaki M, Adachi K, Honjo S, Ito H. Role of the phosphatidylinositol 3'-kinase-Akt signal pathway in the proliferation of human pancreatic ductal carcinoma cell lines. *Pancreas* 2004; 28: 353-358
- 9 Chang F, Lee JT, Navolanic PM, Steelman LS, Shelton JG, Blalock WL, Franklin RA, McCubrey JA. Involvement of PI3K/Akt pathway in cell cycle progression, apoptosis, and neoplastic transformation: a target for cancer chemotherapy. *Leukemia* 2003; 17: 590-603
- 10 Matsumoto J, Kaneda M, Tada M, Hamada J, Okushiba S, Kondo S, Katoh H, Moriuchi T. Differential mechanisms of constitutive Akt/PKB activation and its influence on gene expression in pancreatic cancer cells. *Jpn J Cancer Res* 2002; 93: 1317-1326
- 11 Semba S, Moriya T, Kimura W, Yamakawa M. Phosphorylated Akt/PKB controls cell growth and apoptosis in intraductal papillary-mucinous tumor and invasive ductal adenocarcinoma of the pancreas. *Pancreas* 2003; 26: 250-257
- 12 Altomare DA, Tanno S, De Rienzo A, Klein-Szanto AJ, Tanno S, Skele KL, Hoffman JP, Testa JR. Frequent activation of AKT2 kinase in human pancreatic carcinomas. *J Cell Biochem* 2002; 87: 470-476
- 13 Chen KF, Yeh PY, Hsu C, Hsu CH, Lu YS, Hsieh HP, Chen PJ, Cheng AL. Bortezomib overcomes tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand resistance in hepatocellular carcinoma cells in part through the inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *J Biol Chem* 2009; 284: 11121-11133
- 14 O'Driscoll L, Walsh N, Larkin A, Ballot J, Ooi WS, Gullo G, O'Connor R, Clynes M, Crown J, Kennedy S. MDR1/P-glycoprotein and MRP-1 drug efflux pumps in pancreatic carcinoma. *Anticancer Res* 2007; 27: 2115-2120
- 15 König J, Hartel M, Nies AT, Martignoni ME, Guo J, Büchler MW, Friess H, Keppler D. Expression and localization of human multidrug resistance protein (ABCC) family members in pancreatic carcinoma. *Int J Cancer* 2005; 115: 359-367
- 16 Yao J, Feng FY, Lin C, Zhang XY, Fu M, Liang X, Yang Y. [The mechanism of resistance to 2', 2'-difluorodeoxycytidine (gemcitabine) in a pancreatic cancer cell line]. *Zhonghua Zhongliu Zazhi* 2005; 27: 721-726

■同行评价

本文对LY294002对吉西他滨在胰腺癌化疗增敏效应中的作用进行了探讨, 得出初步结论, 具有一定的科学性。

编辑 曹丽鸥 电编 闫晋利

MALDI-TOF-MS分析新疆食管鳞状细胞癌的蛋白组学

吕秀平, 蒲红伟, 龚晓瑾, 苗娜, 陈晓

■背景资料

我国每年大约有24万食管癌新发病例, 其5年生存率较低。我国新疆维吾尔自治区食管癌死亡率较高。从蛋白水平研究肿瘤的发病机制, 筛选特异性肿瘤分子标志物为食管鳞状细胞癌的早诊早治提供依据。

吕秀平, 蒲红伟, 陈晓, 新疆医科大学病理学教研室 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830011

龚晓瑾, 新疆医科大学第二附属医院病理科 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830063

苗娜, 新疆医科大学第一附属医院病理科 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830011

吕秀平, 在读硕士, 主要从事肿瘤分子生物学的研究。

新疆地方病分子生物学实验室开放基金资助项目, No. XJDX0208-2006-09

作者贡献分布: 此课题由陈晓与吕秀平设计; 研究过程由吕秀平、蒲红伟、龚晓瑾及苗娜操作完成; 数据分析由吕秀平与陈晓完成; 本论文写作由吕秀平与陈晓完成。

通讯作者: 陈晓, 教授, 830011, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市, 新疆医科大学基础医学院病理学教研室. xjchenxiao@sina.com
电话: 0991-4361759

收稿日期: 2011-10-20 修回日期: 2011-11-20

接受日期: 2011-12-18 在线出版日期: 2011-12-28

Proteomic analysis of differentially expressed proteins in esophageal squamous cell carcinoma by MALDI-TOF-MS

Xiu-Ping Lv, Hong-Wei Pu, Xiao-Jin Gong, Na Miao, Xiao Chen

Xiu-Ping Lv, Hong-Wei Pu, Xiao Chen, Department of Pathology, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Xiao-Jin Gong, Department of Pathology, the Second Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830063, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Na Miao, Department of Pathology, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Supported by: the Open Fund of Key Laboratory of Molecular Biology of Endemic Disease in Xinjiang, No. XJDX0208-2006-09

Correspondence to: Xiao Chen, Professor, Department of Pathology, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China. xjchenxiao@sina.com

Received: 2011-10-20 Revised: 2011-11-20

Accepted: 2011-12-18 Published online: 2011-12-28

Abstract

AIM: To analyze differentially expressed proteins between human normal esophageal epithelial cells (NEEC) and esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) cells.

METHODS: NEEC and ESCC cells were cut by laser capture microdissection (LCM), and total

proteins of the cells were separated by two-dimensional gel electrophoresis (2-DE). 2-DE images were analyzed using Imagemaster 2D software. Differential proteins between NEEC and ESCC cells were identified by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS).

RESULTS: A total of 43 protein spots were discovered and there were 17 differentially expressed proteins between NEEC and ESCC. Of them, 15 (such as Trangelin2, HSP27, S100A11 and GSTP) were up-regulated and two (such as SCCA1) down-regulated in ESCC.

CONCLUSION: The differentially expressed proteins identified in this study may play a role in the carcinogenesis and development of ESCC and represent potential molecular biomarkers for ESCC.

Key Words: Esophageal squamous cell carcinoma; Proteomics; Differentially proteins; Two-dimensional gel electrophoresis; Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry

Lv XP, Pu HW, Gong XJ, Miao N, Chen X. Proteomic analysis of differentially expressed proteins in esophageal squamous cell carcinoma by MALDI-TOF-MS. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(36): 3682-3686

摘要

目的: 分析新疆食管鳞状细胞癌和食管正常上皮细胞的差异表达蛋白。

方法: 运用激光捕获显微切割技术(LCM)分别获取食管鳞状癌细胞和食管正常上皮细胞, 应用二维凝胶电泳技术(2-DE)分离纯化细胞, Imagemaster 2D软件比较分析两者电泳图谱的差异, 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)鉴定分析两者表达的差异蛋白。

结果: 建立了食管鳞状癌细胞和食管正常上皮细胞的2-DE图谱, 获得43个差异蛋白点, 通过质谱鉴定出17种蛋白, 其中15种蛋白如Trangelin2、HSP27、S100A11、GSTP等在

■同行评议者

李晟磊, 副主任医师, 郑州大学医学院病理教研室, 河南省肿瘤病理重点实验室

食管鳞状癌细胞中表达明显增高, 2种蛋白如SCCA1, 在食管鳞状癌细胞中表达明显降低。

结论: 提示17种差异蛋白可能与食管鳞状细胞癌的发生和发展有关, 为筛选食管鳞状细胞癌的特异性分子标志物奠定基础。

关键词: 食管鳞状细胞癌; 蛋白组学; 差异表达蛋白; 二维凝胶电泳; 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱

吕秀平, 蒲红伟, 龚晓瑾, 苗娜, 陈晓. MALDI-TOF-MS分析新疆食管鳞状细胞癌蛋白组学. 世界华人消化杂志 2011; 19(36): 3682-3686
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/3682.asp>

0 引言

食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)是世界上常见的消化系统恶性肿瘤之一, 在我国每年大约有24万食管癌新发病例^[1], 据统计其5年生存率为3.5%-13.9%^[2]. 在新疆维吾尔自治区食管癌死亡率为13.05/10万, 其中哈族死亡率为68.88/10万, 严重威胁着人们的健康^[3]. 因此探讨食管癌的发生、发展机制, 寻找新的肿瘤标志物, 对食管癌的防治具有重要意义. 本研究采用激光捕获显微切割技术(laser capture microdissection, LCM)联合基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS), 分析食管鳞状癌细胞和食管正常上皮细胞的差异表达蛋白, 为筛选特异性肿瘤分子标志物奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料 选取新疆医科大学第一附属医院2011-03/06新鲜手术切除标本12例, 术前未进行放化疗, 经病理组织学证实所有标本均为食管鳞状细胞癌, 切缘黏膜均为食管正常黏膜组织, 用冰盐水清洗干净后, 立即置于液氮中速冻, 然后放置-80℃冰箱保存. IPG胶条(pH3-10)购自GE公司, 2-DE试剂购自Amresco公司, 琼脂糖、BSA购自Promega公司, TFA购自Sigma公司, ACN购自Baker公司, 其他试剂购自国药集团化学试剂北京有限公司; 冰冻切割机(德国Leica CM 1900), LCM仪(美国Arcturus公司), PowerWave XS2型酶标仪(美国BioTek公司), 5417R冷冻型台式离心机(德国Eppendorf公司), Ettan IPGphor II 固相PH梯度等电聚焦仪、Ettan

DALTwelve system垂直电泳仪、Image Scanner扫描仪(瑞士Amersham Biosciences公司), 冷冻干燥机(美国Labconco公司), autoflexTOF/TOF II质谱仪(德国Bruker公司)。

1.2 方法

1.2.1 冰冻切片的制备及激光捕获显微切割: 从-80℃冰箱取出待切冰冻组织后, 将其置于冰冻切片机中, 切片厚度10 μm, 冰冻切片用750 mL/L乙醇固定, 第一张切片用HE染色, 作为形态观察用, 以后每张切片只用苏木素染色. 用LCM分别切取食管鳞状癌细胞和食管正常上皮细胞。

1.2.2 样本制备: 将切下的细胞置于Eppendorf管中, 分别加入组织裂解缓冲液(7 mol/L尿素, 2 mol/L硫脲, 1%DTT, 4%CHAPS, 1 mmol/L EDTA·Na₂, 40 mmol/L Tris), 迅速混匀, 并冰浴震荡30 min(温度不可超过37℃), 4℃裂解, 静置2 h, 12 000 g离心5 min, 提取上清, 用Bradford法测定蛋白质浓度。

1.2.3 二维凝胶电泳: 将蛋白质样品加入DTT, IPG buffer后与重泡胀液补齐到450 μL, 混合均匀, 高速离心2 min待用. 将重泡胀液均匀地加入到泡胀盘的凹槽中, 胶面向下放入24 cm IPG胶条, 胶条表面滴加覆盖油, 放置于等电聚焦仪上, 重泡胀过夜. 等电聚焦结束后, 将IPG胶条分别于平衡A液(1.5 mol/L Tris pH8.8, 6 mmol/L尿素, 0.2%DTT, 2%SDS, 30%甘油, 溴酚蓝), 平衡B液(1.5 mol/L Tris pH8.8, 6 mmol/L尿素, 3%碘乙酰胺, 2%SDS, 30%甘油, 溴酚蓝)中各平衡15 min, 平衡后的IPG胶条转移至13%SDS-PAGE胶上端, 胶条端滴加低分子量的蛋白标志物, 将胶板转移到Ettan DALTwelve system垂直电泳仪上, 加琼脂糖封胶液封胶, 进行第二项垂直电泳. 电泳结束后, 对2-D胶进行考马斯亮蓝染色. 在相同的实验条件和参数设置的情况下, 实验重复3次。

1.2.4 凝胶图像分析: 应用Image scanner扫描仪获取2D凝胶图像, Imagemaster 2D Platinum 7.0软件比较分析两者的2-DE图像的差异, 选取表达水平(相对体积)相差2倍以上的蛋白质点进行质谱分析。

1.2.5 质谱鉴定: 用刀片切取胶上差异蛋白点, 放入Eppendorf管, 进行胶内酶解, Trypsin冰上吸胀45 min, 37℃酶解16 h, 水溶液(35%, 65%, 100%乙腈, 0.1%TFA)超声3次, 真空冷冻浓缩至10 μL, 取样品进行点靶上样. 借助互联网上的蛋白质数据库检索程序Mascot(<http://www.matrixscience.com>), 通过NCBI蛋白质序列数据库进行检索。

■研发前沿

随着蛋白组学的发展, 从蛋白水平研究肿瘤的发病机制成为热点, 为寻找肿瘤分子标志物及新的治疗靶点提供了良好的技术平台。

■相关报道

Xu等联合应用LCM和质谱技术, 鉴定出一些新的分子标志物, 结果显示, S100A8在人类结肠癌发展的不同阶段表达是上升的, 提出分子标志物的鉴定将有望为结肠癌的发病机理研究奠定基础, 从而提高结肠癌分子诊断的准确性。

■创新亮点

本研究应用蛋白组学技术对食管鳞状细胞癌发病机制进行研究,筛选特异性肿瘤分子标志,对食管鳞状细胞癌的早诊早治及预后具有指导意义。

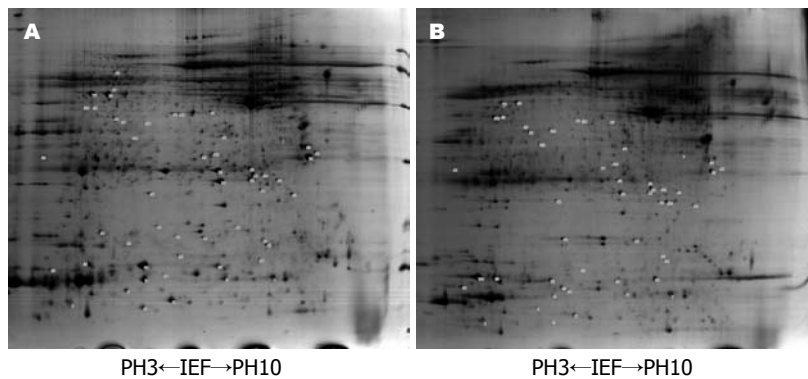


图1 食管鳞状癌细胞和食管正常上皮细胞的二维凝胶电泳图谱. A: 食管鳞状癌细胞; B: 食管正常上皮细胞。

表1 食管鳞状癌细胞和食管正常上皮细胞的差异表达蛋白

Index	NCBI no	Mw/PI	Protein	score
01	gil5032057	11847/6.56	↑ protein S100-A11	75
02	gil11935049	66198/8.16	↑ keratin 1	70
03	gil1869803	14878/6.29	↓ mammary-derived growth inhibitor	81
04	gil83754516	17268/6.18	↑ Chain B, crystal structure of the chip-ubc13-uev1a complex	111
05	gil55960374	21244/7.63	- transgelin 2	150
06	gil186629	39832/4.72	- keratin 10	93
07	gil179032	22632/8.78	↑ SM22	142
08	gil4507669	19697/4.84	↑ translationally-controlled tumor protein	84
09	gil47577	23250/5.02	↑ rho GDP-dissociation inhibitor 1 isoform a	96
10	gil4504183	23569/5.34	↑ glutathione S-transferase P	141
11	gil662841	22427/7.83	↑ heat shock protein 27	142
12	gil5454052	27871/4.68	↑ 14-3-3 protein sigma	198
13	gil2780871	16342/7.14	↑ Chain B, Proteasome Activator Reg(Alpha)	86
14	gi62738525	43071/5.72	↑ Chain A, The 2.8 A Structure Of A Tumour Suppressing Serpin	162
15	gil301030821	36874/6.17	↑ c-myc promoter-binding protein 1	203
16	gil239552	44564/6.35	↓ squamous cell carcinoma antigen	95
17	gil20150229	13159/5.71	↑ Chain A, Crystal Structure Of The Mrp14 Complexed With Chaps	91

“↑”表示在食管癌中表达上调的差异点,“↓”表示在食管癌中表达下调的差异点,“-”表示只在食管癌中表达的差异点。

2 结果

2.1 食管鳞状癌细胞和食管正常上皮细胞的2-DE图谱 将切割的食管鳞状癌细胞和食管正常上皮细胞测定蛋白浓度后以蛋白浓度最低的样本为标准,等体积混合,在相同实验条件和参数设置的情况下,试验重复3次,通过2-DE分离技术,创建了食管鳞状癌细胞和食管正常上皮细胞的二维凝胶电泳图谱(图1)。

2.2 食管鳞状癌细胞和食管正常上皮细胞差异蛋白点的表达及质谱鉴定 通过软件分析,我们获得43个差异蛋白点,应用质谱成功鉴定出17种差异蛋白(表1)。

3 讨论

近年来随着蛋白组学实验技术和计算机生物信息处理技术的迅速发展,以及激光捕获显微切

割技术所具有的优点,研究者们将其与蛋白组学研究技术相结合用于肿瘤发病机制的研究^[4]。本研究联合应用LCM和MALDI-TOF-MS对食管鳞状癌细胞和食管正常上皮细胞进行表达蛋白组学研究,建立了2-DE图谱,为筛选差异蛋白奠定基础。

Orimo等^[5]应用LCM联合MALDI-TOF-MS分析研究肝细胞肝癌,发现了EB-1蛋白,指出该蛋白与肝癌预后有关,对判定肝癌的预后和治疗有十分重要的意义。Cheng等^[6]应用LCM获得纯化的贲门癌上皮细胞和正常的贲门上皮细胞,比较二者的差异蛋白,获得27个差异蛋白点。这些蛋白涉及新陈代谢、分子伴侣、抗氧化、信号转导、凋亡、细胞增殖和分化等方面,提示一些蛋白有望成为临床早期诊断的分子标志物。Xu等^[7]联合应用LCM和质谱技术,鉴定出一

■应用要点

鉴定的差异蛋白可能与食管癌的发生发展有关,筛选的特异性肿瘤分子标志物可能成为指导临床早期诊断、治疗及判断预后的重要指标。

些新的分子标志物, 结果显示, S100A8在人类结直肠癌发展的不同阶段表达是上升的, 提出分子标志物的鉴定将有望为结直肠癌的发病机理研究奠定基础, 从而提高结直肠癌分子诊断的准确性. Mukherjee等^[8]对12例食管正常组织, 12例食管癌在进行激光捕获显微切割后联合应用明胶酶谱分析基质金属蛋白酶的表达水平, 发现基质金属蛋白酶-3和基质金属蛋白酶-10的mRNA在食管癌中的表达水平明显高于正常食管组织, 认为这些表达上调的基因产物有望成为临床中一种新的早期检测标志物. 汪斌等^[9]应用LCM技术分离食管鳞状癌细胞和食管正常上皮细胞, 并结合二维凝胶电泳技术对两者的蛋白表达图谱进行分析, 发现48个差异蛋白点, 通过质谱鉴定出20种有意义的蛋白. 本实验针对新疆地区食管癌研究, 获得43个差异蛋白点, 通过质谱鉴定出17种有意义的蛋白, 其中15种蛋白仅在食管癌表达或高表达, 而2种蛋白在食管癌中表达下调. 这与上述研究的部分结果相一致, 这些蛋白涉及肿瘤的细胞信号转导、凋亡以及侵袭和转移等, 为研究新疆地区食管癌的发病机制及筛选食管癌的分子标志物奠定了基础.

在鉴定的差异蛋白质中, 热休克蛋白27(HSP27)及14-3-3 protein ϵ 表达明显上调, 提示其对食管癌发生发展有重要的意义. HSP27是热休克蛋白家族中的低分子蛋白, 广泛存在与各种组织中, 近年来研究发现很多组织来源的肿瘤中存在着HSP27的持续高水平表达, 认为与肿瘤的发生、发展及肿瘤预后都有密切关系, 其机制可能与HSP27的抗凋亡有关^[10,11]. Foster等^[12]在对前列腺癌研究中发现HSP27可能通过促进上皮细胞的迁移, 参与肿瘤的侵袭转移过程而且认为HSP27可以作为一个独立的预后指标. Chen等^[13]研究表明, HSP27在食管鳞状细胞癌中表达为62%, 但在低分化食管癌中表达降低, 提示HSP27的表达水平可能和食管癌的分化程度有关. 在本组研究中, HSP27在食管癌中的表达明显上调, 提示HSP27在新疆地区食管癌的发病机制中可能发挥重要作用.

14-3-3 protein ϵ 是14-3-3蛋白家族中成员. 目前已经证实200多种蛋白与14-3-3家族成员之间存在相互作用, 14-3-3蛋白与其靶分子的相互作用有赖于14-3-3结合域的识别及14-3-3靶分子的丝氨酸/苏氨酸磷酸化^[14]. 该家族可以和许多信号蛋白, 包括激酶、磷酸酶和跨膜受体等结合, 在信号传导、细胞周期以及细胞凋亡的调控等

方面发挥重要作用. 在14-3-3蛋白的7个亚型中, 目前已知14-3-3 protein σ 和肿瘤的发生密切相关, 关于14-3-3 protein ϵ 在肿瘤中的作用机制, 目前国内外的报道尚不多, 但有研究表明, 在某些肿瘤中14-3-3 protein ϵ 基因有频繁的杂合子丢失^[15], 王斌等^[9]在研究中发现14-3-3protein ϵ 在食管癌组织中表达上调, 这与本实验结果相符. 但Harada等^[16]在对16例食管鳞状细胞癌进行蛋白组学的研究中发现14-3-3protein ϵ 在食管癌组织中表达下调, 这可能与实验样本数目不同或与个体差异有关, 因为同一类型的肿瘤在不同的个体中, 分子生物学特性有所不同.

本实验建立了食管鳞状癌细胞和正常食管上皮细胞的二维凝胶电泳图谱, 鉴定出17种蛋白. 他们可能参与食管癌的发生发展, 为筛选食管癌的分子标志物提供依据. 关于他们在食管癌发生发展过程中的作用我们将在后续实验中进一步研究.

4 参考文献

- 1 陈建国, 陆建华. 国内外癌症防制现状. 肿瘤 2007; 27: 755-759
- 2 陈建国, 朱健, 张永辉. 启东市1972-2000年主要恶性肿瘤生存分析. 中国肿瘤 2006; 15: 575-578
- 3 马红, 陈晓, 马海梅, 尼加提·热合木, 蒲红伟. E-cadherin、 β -catenin和CathepsinD在食管鳞状细胞癌中的表达及其意义. 世界华人消化杂志 2008; 16: 1757-1762
- 4 Zhang D, Koay ES. Analysis of laser capture microdissected cells by 2-dimensional gel electrophoresis. *Methods Mol Biol* 2008; 428: 77-91
- 5 Orimo T, Ojima H, Hiraoka N, Saito S, Kosuge T, Kakisaka T, Yokoo H, Nakanishi K, Kamiyama T, Todo S, Hirohashi S, Kondo T. Proteomic profiling reveals the prognostic value of adenomatous polyposis coli-end-binding protein 1 in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2008; 48: 1851-1863
- 6 Cheng Y, Zhang J, Li Y, Wang Y, Gong J. Proteome analysis of human gastric cardia adenocarcinoma by laser capture microdissection. *BMC Cancer* 2007; 7: 191
- 7 Xu BJ, Li J, Beauchamp RD, Shyr Y, Li M, Washington MK, Yeatman TJ, Whitehead RH, Coffey RJ, Caprioli RM. Identification of early intestinal neoplasia protein biomarkers using laser capture microdissection and MALDI MS. *Mol Cell Proteomics* 2009; 8: 936-945
- 8 Mukherjee S, Roth MJ, Dawsey SM, Yan W, Rodriguez-Canales J, Erickson HS, Hu N, Goldstein AM, Taylor PR, Richardson AM, Tangrea MA, Chuaqui RF, Emmert-Buck MR. Increased matrix metalloproteinase activation in esophageal squamous cell carcinoma. *J Transl Med* 2010; 8: 91
- 9 汪斌, 李俊材, 傅仲学, 董蒲江. 运用激光捕获显微切割对食管鳞状上皮癌蛋白质组学分析. 第三军医大学学报 2007; 29: 1869-1872
- 10 Lebre T, Watson RW, Molinié V, O'Neill A, Gabriel C, Fitzpatrick JM, Botto H. Heat shock proteins

■同行评价

本文利用蛋白组学的相关技术对正常食管上皮细胞和食管鳞状癌细胞的差异蛋白进行分析, 鉴定出的蛋白具有一定的意义.

- HSP27, HSP60, HSP70, and HSP90: expression in bladder carcinoma. *Cancer* 2003; 98: 970-977
- 11 Vanmuylder N, Evrard L, Daelemans P, Van Reck J, Dourov N. [Expression of heat shock proteins in salivary gland tumors. Immunohistochemical study of HSP27, HSP70, HSP90, and HSP110: apropos of 50 cases]. *Ann Pathol* 2000; 20: 190-195
- 12 Foster CS, Dodson AR, Ambroisine L, Fisher G, Møller H, Clark J, Attard G, De-Bono J, Scardino P, Reuter VE, Cooper CS, Berney DM, Cuzick J. Hsp-27 expression at diagnosis predicts poor clinical outcome in prostate cancer independent of ETS-gene rearrangement. *Br J Cancer* 2009; 101: 1137-1144
- 13 Chen JH, Chen LM, Xu LY, Wu MY, Shen ZY. [Expression and significance of heat shock proteins in esophageal squamous cell carcinoma]. *Zhonghua Zhongliu Zazhi* 2006; 28: 758-761
- 14 Uchida S, Kuma A, Ohtsubo M, Shimura M, Hirata M, Nakagama H, Matsunaga T, Ishizaka Y, Yamashita K. Binding of 14-3-3beta but not 14-3-3sigma controls the cytoplasmic localization of CDC25B: binding site preferences of 14-3-3 subtypes and the subcellular localization of CDC25B. *J Cell Sci* 2004; 117: 3011-3020
- 15 Fu H, Subramanian RR, Masters SC. 14-3-3 proteins: structure, function, and regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2000; 40: 617-647
- 16 Harada T, Kuramitsu Y, Makino A, Fujimoto M, Iizuka N, Hoshii Y, Takashima M, Tamesa M, Nishimura T, Takeda S, Abe T, Yoshino S, Oka M, Nakamura K. Expression of tropomyosin alpha 4 chain is increased in esophageal squamous cell carcinoma as evidenced by proteomic profiling by two-dimensional electrophoresis and liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry. *Proteomics Clin Appl* 2007; 1: 215-223

编辑 曹丽鸥 电编 闫晋利

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 •

招聘生物医学编辑部主任

本刊讯 百世登出版集团(Baishideng Publishing Group Co., Limited, BPG)已经为各位编辑部主任搭建好整体架构, 希望培养出对编辑与出版行业真正感兴趣甚至愿意将其作为终身事业的专业人才, 成为BPG的核心人物. 欢迎应届毕业生加盟BPG团队, 请将您的简历E-mail发至: j.l.li@wjgnet.com

■ 工作职责

- 1 贯彻执行员工手册、编辑手册、编委手册和作者手册.
- 2 根据作者指南及学科发展动向和读者的需求, 制订期刊的总体发展规划, 负责编辑、出版、发行和经营管理.
- 3 策划年度编委会成员的社论和专题亮点等栏目约稿, 并按照计划负责监督落实.
- 4 负责期刊同行评议和定稿会, 按期编排、加工, 发排稿件, 发排后参与校对或审核校样、核红、签字付印.
- 5 组织期刊印刷版或网络版出版后审读, 发现问题及时修改.

■ 职位要求

硕士及以上学历, 具有生物医学专业学科背景及丰富的写作和发表生物医学文章者优先录用.

■ 薪资待遇面议

■ 培训流程

第一步学习手册; 第二步编务; 第三步排版制作; 第四步编辑; 第五步投稿办公系统操作; 第六步期刊网络系统学习; 第七步期刊管理培训; 第八步BPG管理委员会考核; 第九步考核通过后正式签订劳动合同, 并颁发编辑部主任聘任书.

结合基因芯片表达谱研究miRNAs在食管鳞癌中的作用

吴耀松, 陈玉龙, 尹素改, 周发祥

吴耀松, 陈玉龙, 尹素改, 周发祥, 河南中医学院 河南省郑州市 450008

吴耀松, 讲师, 硕士研究生, 主要从事肿瘤分子生物学的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 81173177

河南省教育厅自然科学基金资助项目, No. 2010B360004

河南中医学院科技创新人才基金资助项目, No. 2010XCXR C02

作者贡献分布: 吴耀松与陈玉龙所作贡献均等; 课题由陈玉龙设计; 资料收集和分析由吴耀松、尹素改及周发祥完成; 论文撰写由陈玉龙与吴耀松完成。

通讯作者: 陈玉龙, 副教授, 450008, 河南省郑州市金水路1号, 河南中医学院分子生物实验中心。cyl72621@163.com

收稿日期: 2011-08-31 修回日期: 2011-10-18

接受日期: 2011-12-18 在线出版日期: 2011-12-28

Identification of differentially expressed miRNAs and mRNAs in esophageal squamous cell cancer by gene microarray

Yao-Song Wu, Yu-Long Chen, Su-Gai Yin, Fa-Xiang Zhou

Yao-Song Wu, Yu-Long Chen, Su-Gai Yin, Fa-Xiang Zhou, Laboratory of Molecular Biology, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, Henan Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 81173177; the Natural Science Foundation of the Education Department of Henan Province, No. 2010B3600 04; and the Science and Technology Innovation Talent Foundation of Henan University of Traditional Chinese Medicine, No. 2010XCXRC02

Correspondence to: Yu-Long Chen, Associate Professor, Laboratory of Molecular Biology, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, Henan Province, China. cyl72621@163.com

Received: 2011-08-31 Revised: 2011-10-18

Accepted: 2011-12-18 Published online: 2011-12-28

Abstract

AIM: To identify differentially expressed microRNAs (miRNAs) and mRNAs in esophageal squamous cell cancer (ESCC).

METHODS: Differentially expressed miRNAs and mRNAs between ESCC and normal esophageal mucosal tissue were identified by gene microarray. To study the functions of differentially expressed miRNAs, their target genes and genes regulated by these target genes were analyzed using online bioinformatic tools.

RESULTS: Eight differentially expressed miR-

NAs and 1 178 mRNAs were identified. Eight miRNAs had 142 target genes, and 117 genes were regulated by miRNA target genes. Of them, 53 genes relate to KEGG pathway and 14 genes are involved in BioCarta pathways; 137 genes were found to be closely interacted with each other, constituting 433 interaction nodes.

CONCLUSION: Dysregulation of miRNAs can cause abnormal gene expression, which relates to the pathogenesis of ESCC. The eight miRNAs identified in this study and the genes regulated by them or their target gene may play important roles in the pathogenesis of ESCC.

Key Words: Esophageal squamous cell cancer; Microarray; MicroRNAs

Wu YS, Chen YL, Yin SG, Zhou FX. Identification of differentially expressed miRNAs and mRNAs in esophageal squamous cell cancer in esophageal squamous cell cancer by gene microarray. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2011; 19(36): 3687-3691

摘要

目的: 探讨食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell cancer, ESCC)中miRNAs的作用。

方法: 利用基因芯片来分析ESCC和正常组织间的miRNAs和mRNA的表达差异; 为了研究差异miRNA功能, 参考基因mRNA表达数据来分析miRNA靶基因和调节基因。

结果: 得到了8个差异的miRNA和1 178个差异的mRNA。8个miRNA具有142个靶基因, 137个基因被miRNA具有转录因子活性的靶基因调节。其中, 53个基因参与KEGG信号通路, 14个基因与BioCarta通路相关, 137个基因发生相互作用, 构成433边的相互作用网络。

结论: miRNA的调节功能异常可能是导致ESCC基因表达失常的原因, 8个miRNA和受他们调节的基因组成一个相互调节网络, 并在ESCC中发挥重要作用。

关键词: 食管鳞癌; 芯片; miRNA

■背景资料

已有应用基因芯片技术研究miRNA和食管鳞癌的关系报道, 由于高通量技术很容易发生假阳性, 且miRNA靶基因预测是研究其功能的关键, 但目前对食管癌miRNA靶基因研究的文献较少。

■同行评议者

高国全, 教授, 中山大学中山医学院生物化学教研室

■研发前沿

miRNA的调控作用及与肿瘤的关系是近年来研究的热点,已有少量miRNA和ESCC关系的研究报道,但是尚未见参考基因表达谱芯片对食管癌相关miRNA的功能进行整体研究的报道。亟待通过实验证实miRNA及其靶基因在ESCC发生发展中的作用。

吴耀松, 陈玉龙, 尹素改, 周发祥. 结合基因芯片表达谱研究miRNAs在食管鳞癌中的作用. 世界华人消化杂志 2011; 19(36): 3687-3691

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/3687.asp>

0 引言

食管癌是一种最常见的恶性肿瘤之一。研究显示,食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell cancer, ESCC)占食管癌的95%,这些患者主要分布在亚洲国家,尤其在河南省发病率较高。食管癌患者中,5年生存率仍在30%以下^[1]。对肿瘤产生和发展分子机制的研究有助于肿瘤的预防与治疗。miRNA是一种细胞内高保守性的非基因编码的20-22 nt的小RNA,他们在翻译前水平上,通过结合mRNA的3'端的UTR来行使调节功能,使mRNA降解或阻止其翻译^[2]。miRNA参与了细胞的分化、增殖、凋亡、代谢等生理病理过程,这些miRNA可以起到致癌基因或抑癌基因作用。同时,作为高度组织特异性的生物标记物,对判断肿瘤分类和起因具有潜在的临床参考价值^[3]。寡聚核苷酸miRNA芯片和定量PCR广泛应用于miRNA的研究,已有应用基因芯片技术研究miRNA和食管鳞癌的关系的报道^[4,5],但是高通量的技术很容易发生假阳性。目前,只有很少几个与食管癌相关的差异miRNA通过定量PCR确认其重复性,miRNA靶基因也往往通过网络数据库进行预测,但是对这些靶基因很少进行检测^[4-7]。本文主要应用网络资源,通过挖掘不同研究组数据发现与ESCC相关的miRNA,并参考基因表达谱通过分析其靶基因和调节基因来研究其功能。

1 材料和方法

1.1 材料 GSE6188、GSE13937、GSE20347数据集从GEO数据库中下载, GSE6188和GSE13937包括了ESCC组织和配对正常组织中miRNA的表达数据。GSE6188包含了108个样品,芯片数据中有435人的miRNA(包括122个预测的miRNA序列)。GSE13937包括88个样品,芯片数据中有329个人的miRNA。GSE20347包含了34个ESCC组织和正常组织配对样品,为Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array平台,该平台包含47 000多个转录子和变异体,涵盖了38 500个已经定性清楚的人类基因。

1.2 方法 本研究主要应用BRB-ArrayTools 4.0软件进行数据挖掘。首先排除相对表达基因中

位数任一方向(高于、低于)大于1.5倍不到整个芯片数20%的基因数据,或缺失值超过50%的基因数据。肿瘤和正常组织间的差异miRNA必须满足以下3个条件: (1) $P < 0.01$; (2) $P < 0.01$ 且 $FDR < 0.05$; (3)正常组织和肿瘤组织表达的比率在1.5与0.67之间。正常/肿瘤组织 < 1 被认为是上调,正常/肿瘤组织 > 1 被认为是下调。差异miRNA在GSE6188和GSE13937数据集中的交集认为是ESCC中特异miRNA。

差异miRNA必须满足3个统计条件: (1) $P < 0.001$; (2) $P < 0.001$ 且 $FDR < 0.005$; (3)正常/肿瘤组织在0.5-2之间。

公共数据库TARGETSCAN用来预测miRNA的靶基因,由于miRNA主要能降解mRNA和阻滞翻译,所以miRNA的表达与靶基因应该呈负相关关系,利用TARGETSCAN预测的靶基因和具有相反表达方向的差异表达mRNA的交集,被认为是最有意义的miRNA靶基因。

应用<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>在线分析靶基因的本体功能和信号途径;用STRING和PSTING对靶基因进行相互作用分析<http://string.embl.de>, http://pstiing.licr.org/search/a_start_batch.jsp;用BRB-ArrayTools 4.0软件分析转录因子。

2 结果

2.1 正常组织和ESCC之间差异miRNA的数量和上下调趋势 在GSE6188中有50个差异的miRNA,其中24个上调,26个下调;在GSE13937中有26个不同的miRNA,其中13个上调,13个下调。这2个数据库中同时表达的差异miRNA有8个(ESCC特异miRNA),其中6个下调,分别是: hsa-miR-100, hsa-miR-1, hsa-miR-133a, hsa-miR-375, hsa-miR-203, hsa-miR-125b; 2个上调,分别是hsa-miR-181a, hsa-miR-146b。

2.2 正常组织和ESCC之间差异mRNA的数量和上下调趋势 满足条件的有1 547转录子,代表1 178个基因,其中536个上调,642个下调。上调基因参与了以下一些生物过程,如细胞周期、新陈代谢、翻译调控、DNA转录、细胞粘连、DNA降解的启动、细胞增殖、氧化损伤以及细胞骨架的形成。下调基因参与的生物过程包括氧化损伤、信号转导、脂类代谢、角质细胞的分化、氨基酸的磷酸化、蛋白质水解、炎症反应、离子转换、表皮生长和凋亡。

2.3 差异表达的miRNA的靶基因和最有意义靶

■相关报道

Guo等报道了利用miRNA表达谱研究了miRNA与食管鳞癌患者生存关系;Athe等报道了miRNA表达与食管癌鳞癌和腺癌的关系;Zhang等通过观察了食管癌鳞癌血清miRNA表达谱发现miRNA表达谱可以作为ESCC诊断的指纹图谱。

表 1 预测靶基因、最有意义靶基因、转录因子和被调节基因数目

miRNA	预测靶基因	最有意义靶基因	转录因子	被调节基因数目
miR-100	40	2	0	0
miR-1	584	31	ETS1, TAL1, ARB, SMAD4	82
miR-133a	502	27	RARB, sp1, sp3, sox4, HLF	84
miR-375	141	7	sp1	55
miR-203	558	25	sp1, ETS2, ESR1, SMAD3	69
miR-125b	604	24	ETS1, SMAD4, stat3, E2F2	47
miR-181a	892	57	ETS1, PPARA, ESR1, FLT1, CREB1, FOS, CEBPA, EGR1	36
miR-146b	114	4	ESR1	4

■创新盘点

通过生物信息学方法, 结合miRNA芯片和基因表达谱芯片数据, 挖掘ESCC相关miRNA及其靶基因和调节基因, 探讨了miRNA在ESCC中作用。

基因 预测到了3 435个靶基因和142个最有意义的靶基因(表1)。

2.4 靶基因中转录因子及调控基因 利用BRB-ArrayTools4.0软件分析差异mRNA的转录因子。只有既是差异基因转录因子又是miRNA预测靶基因才被考虑。被这些转录因子调节的基因可认为被差异miRNA间接调节的基因。有19个转录子和137个基因, 其中, 20个基因也是最有意义的靶基因, 结果见表1。

2.5 差异miRNA调控的基因本体和信号通路 通过DAVID工具在线分析受差异miRNA调控的142条最有意义靶基因和137个间接调控基因(20条相互重复)的本体功能和信号通路。生物过程主要有: 对损伤的反应、细胞增殖、组织缺氧、细胞运动、凋亡、翻译和生物合成过程。细胞组织主要包括: 细胞外基质、细胞膜围成的腔、细胞表面和细胞核。细胞功能主要包括: DNA连接、细胞外基质连接、酶抑制活性、转录子活性、结合生长因子、细胞骨架蛋白连接和钙离子联系。有53个基因参与KEGG通路中, 其中, 14个基因参与了ECM受体的相互作用, 25个基因参与肿瘤通路, 18个基因参与表面黏附, 9个基因与胞吞有关, 5个基因参与p53信号通路, 9个基因调控肌动蛋白骨架, 6个基因参与黏着连接, 5个基因和白细胞的穿血管转移有关, 5个基因参与TGF信号通路, 14个基因与凋亡信号通路相关, 14个基因参与了金属蛋白酶的固定, 6个基因通过过氧化物酶体与PPARa参与基因的调控, 3个基因参与纤维蛋白溶解途径。

2.6 不同基因相互作用的分析 在<http://string.embl.de>网站上输入了此259个基因, 选择物种为人类, 信任度大于0.70。发现137个基因相互作用密切, 构成433边的相互作用网络。其中24条基因参与了肿瘤信号通路, 14条基因参与了基质

受体相互作用, 18条基因参与了表面黏附, 5条基因参与了参与p53信号通路; 他们参与的生物过程主要为对氧化、激素的反应, 细胞迁移、黏附、基因转录等。

3 讨论

miRNA与肿瘤的发生、发展有密切关系, 他们在正常组织和癌组织之间存在差异表达。一些研究已经发现多个与ESCC相关的miRNA。Feber等^[8]研究表明miRNA-203和205在食管鳞癌和腺癌中的表达比在正常组织中低2-10倍。为了研究ESCC相关miRNA, 我们利用GEO网络数据库, 下载了与ESCC相关miRNA表达的GSE6188和GSE13937数据集, 挖掘出了正常组织和ESCC差异表达miRNA, 发现了8个不同的miRNA, 大部分(其中有6个)是下调的, 这与他人的研究结果一致, 如Lu等^[9]发现miRNA在癌组织中的表达比在正常组织中低, 这个结果表明大多数的miRNA可能作为抑癌基因。

已有研究发现, 这8条miRNA与肿瘤密切相关。在基因组处于同一簇中的miR-1和miR-133a在肿瘤中常常是共表达和下调, 可认为是抑癌基因^[10]。在OSCC组织和细胞株中, miR-100和miR-125b呈下调, 用外源性的miR-125b和miR-100细胞共转染可明显减少细胞增殖^[11]。在鼻咽癌和卵巢癌中, miR-100也被发现下调^[12]。有意思的是, 在ESCC血清样品中, miR-133a和miR-100发现也是下调的, 表明这2个miRNA可能成为ESCC中非创伤性的分子标记物^[13]。miR-203也是抑癌基因, 常常以肿瘤特有的方式高度甲基化而表现沉默^[14]。在胃癌和ESCC中, 发现miR-203低表达。在体内、外的研究中, miR-375的过表达明显地抑制了胃癌细胞的增值, 降低JAK2蛋白水平的表达^[15,16]。作为

■应用要点

所挖掘出的ESCC相关miRNA及其靶基因和调节基因,通过实验进一步验证后有望成为ESCC分子标志物,其功能对探讨ESCC分子机制有重要意义。

miR-181家族中的一员,miR-181a在不同的肿瘤中都是下调,但在我们关于ESCC的研究中高表达。除此之外,其他成员如miR-181b、miR-181c以及miR181d也显示表达有一定的增高(没有超过1.5倍)。通过和非肿瘤组织对比,在肾癌和甲状腺乳头癌中,miR-146b的表达水平也是增高的。同时,许多的研究表明,在体外试验中miRNA-146b能够减少神经胶质瘤的转移和浸润^[17,18]。这些研究表明miRNA-146b表达水平的降低和癌变有关。

尽管miRNA广泛在生长、平衡、各种疾病状态下发挥功能,但miRNA怎样调控这些特有的生物通路还不清楚^[19]。因为miRNA的生物作用主要通过他对目标蛋白表达的调控来实现,因此,对任何miRNA功能的研究来说,准确地预测miRNA的靶基因是非常必要的。很多的方法用来预测目标基因,如TargetScan、PITA、MiRecords、TarBase和PicTar等。但由于转录后调节的背景依赖性,这些方法不能确定在特有组织中的靶基因表达。综合分析miRNA和基因表达谱数据有助于提高对miRNA-mRNA的相互关系的功能阐释^[20]。因为如果miRNA序列和靶基因序列能够完美互补,则主要表现靶基因转录本的降解,因此miRNA的表达和靶基因的转录本之间的关系应该是负相关的。通过分析GSE20347数据集,我们发现在正常组织和ESCC之间有1 178个不同的mRNA, 142个差异miRNA最有意义的靶mRNA。这些基因主要参与了翻译调控、细胞粘连、凋亡和抗凋亡、免疫反应和信号转导。其中, 8个基因参与了集中粘连信号通路;在ECM受体通路中5个基因相互作用; 6个基因参与微管形成骨架的调控。

在本文中,我们发现许多miRNA的靶基因具有转录因子的作用。miRNA也能够通过他们的靶基因来调控癌基因的转录。为了研究在ESCC中差异miRNA靶基因转录调控作用,我们首先分析了不同mRNA的转录因子,然后寻找这些转录因子和不同的miRNA靶基因的交集部分,只有被交集中转录因子调节且和miRNA表达上下调趋势相反的基因才被考虑。我们发现19个转录因子和137个被调节基因。这137个被调控基因和142个最有意义靶基因通过不同的miRNA受到调节,他们参与许多很重要的生物过程。在这些基因中,发现137个基因之间相互作用非常紧密,这些基因相应蛋白分子,彼此之间要么物理结合、要么相互催化或抑制、要么相

互修饰,比如TIMP1受到转录因子STAT3和SP1的转录调节,同时TIMP1和MMP9、MMP2、MMP13、MMP3相互接触并抑制其活性^[21,22]。从他们参与信号通路和生物过程说明这些基因与肿瘤发生、发展密切相关,特别是和肿瘤的浸润、转移有关。非常有趣的是,其中有18条基因和激素(7条与雌激素)刺激反应有关,已有研究表明食管癌发生及预后和性激素密切相关^[23],这说明miRNA和其调控的基因参与了此过程。

总之,我们的研究表明, 8个miRNA和其所调控基因组成了一个相互调节网络,在ESCC中起着非常重要的作用。本研究从一个全新的角度理解ESCC的分子机制,有助于寻找新的药物治疗靶点。

4 参考文献

- 1 Enzinger PC, Mayer RJ. Esophageal cancer. *N Engl J Med* 2003; 349: 2241-2252
- 2 Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 2009; 136: 215-233
- 3 Ono K, Tako M, Hamaguchi K, Ogino K, Isoda Y. [A case report of aorto-carotid bypass with use of saphenous vein in advanced stage of aortitis syndrome (author's transl)]. *Kokyu To Junkan* 1975; 23: 1015-1019
- 4 Guo Y, Chen Z, Zhang L, Zhou F, Shi S, Feng X, Li B, Meng X, Ma X, Luo M, Shao K, Li N, Qiu B, Mitchelson K, Cheng J, He J. Distinctive microRNA profiles relating to patient survival in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2008; 68: 26-33
- 5 Mathé EA, Nguyen GH, Bowman ED, Zhao Y, Budhu A, Schetter AJ, Braun R, Reimers M, Kumamoto K, Hughes D, Altorki NK, Casson AG, Liu CG, Wang XW, Yanaihara N, Hagiwara N, Dannenberg AJ, Miyashita M, Croce CM, Harris CC. MicroRNA expression in squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the esophagus: associations with survival. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 6192-6200
- 6 Lin RJ, Xiao DW, Liao LD, Chen T, Xie ZF, Huang WZ, Wang WS, Jiang TF, Wu BL, Li EM, Xu LY. MiR-142-3p as a potential prognostic biomarker for esophageal squamous cell carcinoma. *J Surg Oncol* 2011 Aug 22 [Epub ahead of print]
- 7 Wu BL, Xu LY, Du ZP, Liao LD, Zhang HF, Huang Q, Fang GQ, Li EM. MiRNA profile in esophageal squamous cell carcinoma: downregulation of miR-143 and miR-145. *World J Gastroenterol* 2011; 17: 79-88
- 8 Feber A, Xi L, Luketich JD, Pennathur A, Landreneau RJ, Wu M, Swanson SJ, Godfrey TE, Little VR. MicroRNA expression profiles of esophageal cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2008; 135: 255-260; discussion 260
- 9 Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert BL, Mak RH, Ferrando AA, Downing JR, Jacks T, Horvitz HR, Golub TR. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 2005; 435: 834-838
- 10 Yoshino H, Chiyomaru T, Enokida H, Kawakami K, Tatarano S, Nishiyama K, Nohata N, Seki N, Nakagawa M. The tumour-suppressive function of

- miR-1 and miR-133a targeting TAGLN2 in bladder cancer. *Br J Cancer* 2011; 104: 808-818
- 11 Shi W, Alajez NM, Bastianutto C, Hui AB, Mocanu JD, Ito E, Busson P, Lo KW, Ng R, Waldron J, O'Sullivan B, Liu FF. Significance of Plk1 regulation by miR-100 in human nasopharyngeal cancer. *Int J Cancer* 2010; 126: 2036-2048
- 12 Zhang C, Wang C, Chen X, Yang C, Li K, Wang J, Dai J, Hu Z, Zhou X, Chen L, Zhang Y, Li Y, Qiu H, Xing J, Liang Z, Ren B, Yang C, Zen K, Zhang CY. Expression profile of microRNAs in serum: a fingerprint for esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Chem* 2010; 56: 1871-1879
- 13 Chim CS, Wong KY, Leung CY, Chung LP, Hui PK, Chan SY, Yu L. Epigenetic inactivation of the hsa-miR-203 in haematological malignancies. *J Cell Mol Med* 2011; 15: 2760-2767
- 14 Matsushima K, Isomoto H, Kohno S, Nakao K. MicroRNAs and esophageal squamous cell carcinoma. *Digestion* 2010; 82: 138-144
- 15 Zhang X, Yan Z, Zhang J, Gong L, Li W, Cui J, Liu Y, Gao Z, Li J, Shen L, Lu Y. Combination of hsa-miR-375 and hsa-miR-142-5p as a predictor for recurrence risk in gastric cancer patients following surgical resection. *Ann Oncol* 2011; 22: 2257-2266
- 16 Shin KH, Bae SD, Hong HS, Kim RH, Kang MK, Park NH. miR-181a shows tumor suppressive effect against oral squamous cell carcinoma cells by downregulating K-ras. *Biochem Biophys Res Commun* 2011; 404: 896-902
- 17 Chou CK, Chen RF, Chou FF, Chang HW, Chen YJ, Lee YF, Yang KD, Cheng JT, Huang CC, Liu RT. miR-146b is highly expressed in adult papillary thyroid carcinomas with high risk features including extrathyroidal invasion and the BRAF(V600E) mutation. *Thyroid* 2010; 20: 489-494
- 18 Xia H, Qi Y, Ng SS, Chen X, Li D, Chen S, Ge R, Jiang S, Li G, Chen Y, He ML, Kung HF, Lai L, Lin MC. microRNA-146b inhibits glioma cell migration and invasion by targeting MMPs. *Brain Res* 2009; 1269: 158-165
- 19 Nam S, Li M, Choi K, Balch C, Kim S, Nephew KP. MicroRNA and mRNA integrated analysis (MMIA): a web tool for examining biological functions of microRNA expression. *Nucleic Acids Res* 2009; 37: W356-W362
- 20 Identification of common microRNA-mRNA regulatory biomodules in human epithelial cancers. *Chin Sci Bull* 2010; 55: 3576-3589
- 21 Roderfeld M, Graf J, Giese B, Salguero-Palacios R, Tschuschner A, Müller-Newen G, Roeb E. Latent MMP-9 is bound to TIMP-1 before secretion. *Biol Chem* 2007; 388: 1227-1234
- 22 Nagase H, Meng Q, Malinovsky V, Huang W, Chung L, Bode W, Maskos K, Brew K. Engineering of selective TIMPs. *Ann N Y Acad Sci* 1999; 878: 1-11
- 23 Rashid F, Khan RN, Iftikhar SY. Probing the link between oestrogen receptors and oesophageal cancer. *World J Surg Oncol* 2010; 8: 9

■同行评价

本研究设计合理, 结果可靠, 具有一定的参考价值.

编辑 曹丽鸥 电编 闫晋利

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32 400余万篇次(2003-2005年), 涉及期刊12 400余种. 本版还加大了专家评审力度, 5 500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1 980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)

DEC205在幽门螺杆菌感染的胃黏膜中的表达

魏晓晴, 吕广艳, 金海威, 崔颖, 赵莹

■背景资料

*H. pylori*感染的胃组织可通过淋巴细胞和巨噬细胞的大量浸润进行免疫调节。表达于树突状细胞的DEC205是一种完整的膜糖蛋白,与抗原摄取、处理和提呈相关,能够诱导抗原特异性T细胞免疫。*H. pylori*感染与DEC205的关系目前尚不清楚。

魏晓晴, 崔颖, 赵莹, 辽宁省医学细胞分子生物学重点实验室 辽宁省大连市 116044

吕广艳, 大连医科大学中心实验室 辽宁省大连市 116044
金海威, 大连医科大学口腔医学院基础教研室 辽宁省大连市 116044

魏晓晴, 硕士, 主要从事幽门螺杆菌与胃疾病关系的研究。

辽宁省教育厅2009年度高等学校科研项目计划基金资助项目, No. 2009A195

作者贡献分布: 此课题由赵莹设计; 魏晓晴、吕广艳、金海威及崔颖操作完成; 数据分析由魏晓晴完成; 本论文写作由赵莹与魏晓晴完成。

通讯作者: 赵莹, 讲师, 116044, 辽宁省大连市, 辽宁省医学细胞分子生物学重点实验室. zhaoying2000@yahoo.com.cn

电话: 0411-86110291-606

收稿日期: 2011-07-22 修回日期: 2011-12-09

接受日期: 2011-12-18 在线出版日期: 2011-12-28

Expression of DEC205 in the gastric mucosa of *Helicobacter pylori*-infected patients

Xiao-Qing Wei, Guang-Yan Lv, Hai-Wei Jin, Ying Cui, Ying Zhao

Xiao-Qing Wei, Ying Cui, Ying Zhao, Liaoning Provincial Key Laboratory of Cell and Molecular Biology, Dalian 116044, Liaoning Province, China

Guang-Yan Lv, Central Laboratory, Dalian Medical University, Dalian 116044, Liaoning Province, China

Hai-Wei Jin, Department of Basic Sciences, School of Stomatology, Dalian Medical University, Dalian 116044, Liaoning Province, China

Correspondence to: Ying Zhao, Liaoning Provincial Key Laboratory of Cell and Molecular Biology, Dalian 116044, Liaoning Province, China. zhaoying2000@yahoo.com.cn

Received: 2011-07-22 Revised: 2011-12-09

Accepted: 2011-12-18 Published online: 2011-12-28

Abstract

AIM: To investigate the expression of DEC205 in the gastric mucosa of *Helicobacter pylori* (*H. pylori*)-infected patients.

METHODS: Thirteen *H. pylori*-positive patients with gastritis received eradication therapy. Gastroscopy was performed in all the 13 patients before eradication therapy and in 7 patients after treatment to take gastric mucosa samples, which were used to prepare frozen section to detect the expression of DEC205 and CD14 in human gastric mucosa by immunofluorescence.

RESULTS: Cells which were positive for both DEC205 and CD14 in the gastric mucosa significantly increased in *H. pylori*-infected patients. Furthermore, DEC205-positive macrophages invaded into gastric pits in the gastric mucosa of *H. pylori*-positive patients.

CONCLUSION: Macrophage expressing DEC205 in the gastric mucosa may play an immunological role in *H. pylori* infection.

Key Words: *Helicobacter pylori*; DEC205; Gastric mucosa

Wei XQ, Lv GY, Jin HW, Cui Y, Zhao Y. Expression of DEC205 in the gastric mucosa of *Helicobacter pylori*-infected patients. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(36): 3692-3695

摘要

目的: 探讨幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)感染的胃黏膜与DEC205的关系。

方法: 对13名*H. pylori*感染阳性患者的胃黏膜进行内窥镜活检,以及对这13例中7例被根除*H. pylori*的患者的胃黏膜进行二次内窥镜活检,活检标本行冰冻组织切片后,分别进行DEC205抗体的免疫组织化学染色,以及进行DEC205抗体和CD14抗体的免疫荧光染色。

结果: 对比除菌成功*H. pylori*阴性的患者,*H. pylori*阳性患者胃小凹处的胃黏膜上皮细胞间DEC205的表达明显增多。胃黏膜中,DEC205与CD14表达在同一个位置,而且DEC205与CD14的表达在*H. pylori*感染胃黏膜中明显高于除菌成功的*H. pylori*阴性的患者。

结论: 胞吞受体DEC205在*H. pylori*感染的胃黏膜巨噬细胞中呈高表达。

关键词: 幽门螺杆菌; DEC205; 胃黏膜

魏晓晴, 吕广艳, 金海威, 崔颖, 赵莹. DEC205在幽门螺杆菌感染的胃黏膜中的表达. 世界华人消化杂志 2011; 19(36): 3692-3695

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/3692.asp>

■同行评议者

白爱平, 副教授, 江西省南昌大学第一附属医院消化病研究所; 陈国忠, 副教授, 广西中医学院第一附属医院消化内科; 田文静, 副教授, 哈尔滨医科大学

0 引言

在幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)感染中, 巨噬细胞分泌的细胞因子产物明显升高^[1]. *H. pylori*感染的胃组织中会通过淋巴细胞和巨噬细胞的大量浸润来进行免疫调节^[2]. 然而, 胃黏膜中巨噬细胞和*H. pylori*的关系并不是十分清楚. DEC205属于甘露糖家族中C型凝集素超家族中的一个亚族, 与B细胞一样存在于巨噬、胸腺、肺及肠上皮细胞表面^[3]. DEC205作为树突状细胞表面的膜糖蛋白, 具有抗原提呈作用, 能够诱导抗原特异性T细胞免疫^[4]. 人类的DEC205是一个200 kDa的糖蛋白, 表达于胸腺、树突状细胞及少量T细胞中^[5]. 我们已经报道了*H. pylori*的刺激能够明显增强DEC205在单核细胞中的表达, 而*H. pylori*和*H. pylori*-HSP60的刺激能够明显增强DEC205在巨噬细胞中的表达^[6]. 这些数据表明了*H. pylori*感染与巨噬细胞表面的胞吞受体DEC205有着密切的关系. 然而, DEC205在胃黏膜的分布仍然不清楚. 本研究调查了胃黏膜中*H. pylori*感染与DEC205表达的关系.

1 材料和方法

1.1 材料 内窥镜的活检标本来源于日本Kokan Fukuyama医院, 用于实验前保存于-80 ℃. 其中包括13名*H. pylori*感染阳性的胃黏膜活检, 以及这13例中7例被根除*H. pylori*的患者的胃黏膜组织再次取样的活检标本. DEC205抗体购于BD公司; CD14抗体购于R&D公司; TRITC-IgG, FITC-IgG购于MP Biomedicals公司.

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学染色: 具体过程详见文献^[5], 冰冻切片室温放置30 min后, 入4 ℃丙酮固定10 min, PBS洗3次, 每次5 min. 用含有100 mL/L羊血清的PBS室温封闭30 min, PBS-Tween洗2次, 每次5 min. 加入鼠抗人的DEC205抗体4 ℃过夜孵育, PBS-Tween洗3次, 每次5 min. 加入羊抗鼠IgG 37 ℃孵育30 min, PBS-Tween洗3次, 每次5 min. DAB发色后, 进行核染色, 然后用梯度酒精脱水, 梯度二甲苯透明, 封片, 显微镜观察结果并拍照. 在每切片中随机选择5个视野计数阳性细胞数.

1.2.2 免疫荧光染色: 冰冻切片首先用4 ℃丙酮固定15 min, 置PBS中浸泡10 min后, 用含有10%羊血清的PBS室温封闭30 min. 然后分别加入鼠抗人的DEC205抗体和羊抗人的CD14抗体37 ℃

表 1 萎缩性胃炎*H. pylori* (+)患者阳性细胞数

病例	阳性细胞数	
	CD14	DEC205
1	19	14
2	20	15
3	8	10
4	4	0
5	8	9
6	8	7
7	13	12
8	2	20
9	5	12
10	8	5
11	14	13
12	12	29
13	6	10

表 2 *H. pylori* (-)患者阳性细胞数

病例	疾病	阳性细胞数	
		CD14	DEC205
1	除菌41 mo	1	1
2	除菌48 mo	6	4
3	除菌84 mo	0	2
4	除菌70 mo	2	1
5	除菌112 mo	1	0
6	除菌10 mo	0	0
7	除菌36 mo	6	5

下共同孵育1 h, PBS洗3次, 每次10 min, 加入TRITC标记的牛抗鼠的IgG和FITC标记的兔抗羊的IgG二抗室温下孵育1 h, PBS洗3次, 每次15 min. DAPI染色30 min后, PBS洗涤. 用抗荧光淬灭剂封片后, 荧光显微镜观察结果并拍照.

统计学处理 实验结果以mean±SD表示. 数据通过Student's *t*检验进行统计学处理, *P*<0.05为有显著性差异.

2 结果

2.1 DEC205蛋白在*H. pylori*感染的胃黏膜中的表达 分别对13例*H. pylori*阳性的萎缩性胃炎患者(表1)及7例除菌成功*H. pylori*阴性的患者(表2)进行内窥镜活检组织的免疫组织化学染色, 数据显示, 对比除菌成功*H. pylori*阴性的患者(图1A)(数据只显示了7个样本中的1个), *H. pylori*阳性患者胃小凹处的胃黏膜上皮细胞间DEC205的表达明显增多(图1B)(数据只显示了13个样本中的1个).

■创新盘点

本研究对*H. pylori*感染阳性患者的胃黏膜活检组织, 以及这13名中7名被根除*H. pylori*的患者的胃黏膜二次活检组织进行免疫组化染色分析*H. pylori*感染的胃黏膜中DEC205的变化, 揭示*H. pylori*的致病机制, 国内外尚未见相关报道.

■应用要点

本研究通过探讨胃疾病重要致病因子 *H. pylori* 与甘露糖受体家族成员之一的 DEC205 的关系, 揭示 *H. pylori* 感染所致胃炎中 DEC205 扮演的免疫调节角色, 为临床治疗提供新的靶点。

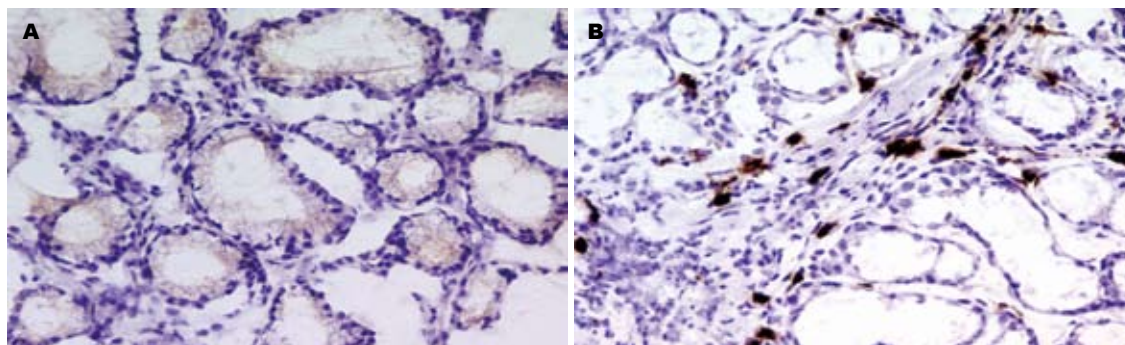


图 1 *H. pylori* 感染的胃黏膜中 DEC205 蛋白表达. A: 除菌成功, *H. pylori*(-); B: 萎缩性胃炎, *H. pylori*(+).

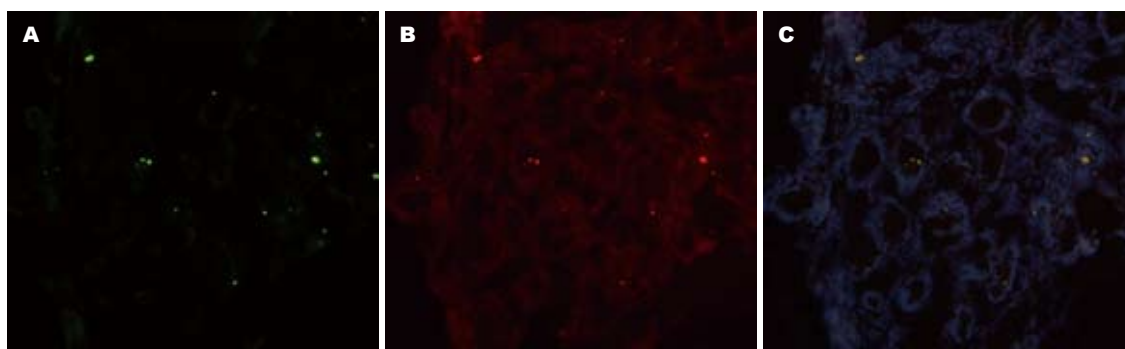


图 2 DEC205 和 CD14 共同表达于 *H. pylori* 感染的巨噬细胞中. A: CD14; B: DEC205; C: Merge.

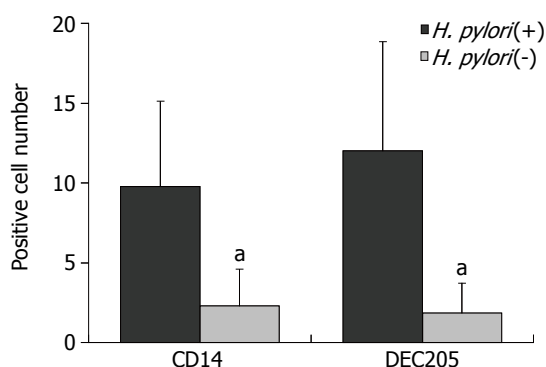


图 3 DEC205 和 CD14 表达于 *H. pylori* 感染的巨噬细胞的数量. ^a $P < 0.05$ vs *H. pylori*(+).

2.2 DEC205 蛋白在 *H. pylori* 感染的胃黏膜巨噬细胞中的表达 CD14 在巨噬细胞中高表达, 为了确定 DEC205 在胃黏膜细胞中的位置, 我们对样本进行了双重免疫荧光染色, 结果显示胃黏膜中, DEC205 与 CD14 表达在同一个位置(图2)(数据只显示了13个样本中的1个). 说明 DEC205 蛋白表达于胃黏膜中的巨噬细胞中. 而且 DEC205 与 CD14 的表达在 *H. pylori* 感染胃黏膜中明显高于除菌成功的 *H. pylori* 阴性的患者(数据未显示), 具体的细胞数量见表2, 统计学结果见图3.

3 讨论

H. pylori 的慢性感染是慢性活动性胃十二指肠

炎、胃十二指肠溃疡、胃 MALT 淋巴瘤以及胃癌发生发展的重要致病因子. 其中, MALT 淋巴瘤的患者, 经除菌治疗后, 6-7 成患者的淋巴瘤消失, 考虑是由于 *H. pylori* 感染刺激后引起胃淋巴瘤组织增生.

甘露糖受体(MR)家族广泛地分布于巨噬细胞或树突状细胞表面. MR 与白色念珠菌、卡氏肺囊虫、结核分支杆菌、克雷白(氏)杆菌属等的各种微生物结合后表达于巨噬细胞^[7-9].

此次研究, 我们显示了, 甘露糖受体(MR)家族其中成员之一的 DEC205, 因为 *H. pylori* 的感染使之表达于巨噬细胞表面. 表明 DEC205 表达阳性的巨噬细胞可能在 *H. pylori* 感染的胃黏膜上也有着重要的免疫作用. DEC205 的表达与 IL-4 受体的信号传导相关, 阻断 DEC205 可以减少 IL-4 从淋巴细胞中的分泌^[10]. 有研究曾报道胃 MALT 淋巴瘤患者的淋巴细胞中 IL-4 的分泌产物增多, 而胃炎的患者却没有增多, 此外, 胃 MALT 淋巴瘤中, 外周血单核细胞的 DEC205 表达明显减少. DEC205 可能与胃 MALT 淋巴瘤中 B 细胞增殖有关. 另一方面, 在肿瘤的发展中, DEC205 与 IL4 受体紧密相关^[11]. 在一些病例中, DEC205 表达缺失与乳腺和直肠浸润性癌有关^[12]. 此次研究我们只调查了胃炎的病例和 *H. pylori* 阴性的胃黏膜, 我们将会在今后的工作中

进一步调查胃癌和MALT淋巴瘤与DEC205的关系. 免疫系统如何认识胃中*H. pylori*早期感染以及其对菌体的反应, 目前还不是很清楚. 因为胃MALT淋巴瘤并不真正存在于胃中, 通常肠内淋巴组织免疫反应发生于回肠末端的肠道集合淋巴结内^[13]. 目前的研究表明DEC205表达于胃黏膜的巨噬细胞. DEC205通过网格蛋白介导的胞吞作用从细胞表面陷于细胞内, 他局限于细胞内到后来的内涵体/溶媒体包含MHC类II分子^[14]. 此外, DEC205为表达T淋巴细胞内含于MHC类II分子^[15].

因此, 通过抗原提呈细胞和T细胞的特殊的免疫反应可能占据于胃黏膜. *H. pylori*感染的胃黏膜中阳性的巨噬细胞数量也在增多. DEC205在免疫反应或癌症的发生发展中具有许多功能. 我们认为目前探讨DEC205在胃炎中的角色只是第一步, 在今后的研究中我们还将继续探讨更深更广的*H. pylori*病理过程.

4 参考文献

- Harris PR, Smythies LE, Smith PD, Dubois A. Inflammatory cytokine mRNA expression during early and persistent *Helicobacter pylori* infection in nonhuman primates. *J Infect Dis* 2000; 181: 783-786
- Suzuki T, Kato K, Ohara S, Noguchi K, Sekine H, Nagura H, Shimosegawa T. Localization of antigen-presenting cells in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosa. *Pathol Int* 2002; 52: 265-271
- East L, Isacke CM. The mannose receptor family. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1572: 364-386
- Heath WR, Belz GT, Behrens GM, Smith CM, Forehan SP, Parish IA, Davey GM, Wilson NS, Carbone FR, Villadangos JA. Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens. *Immunol Rev* 2004; 199: 9-26
- Shimizu K, Fujii S. An adjuvant role of in situ dendritic cells (DCs) in linking innate and adaptive immunity. *Front Biosci* 2008; 13: 6193-6201
- 赵莹, 魏晓晴, 崔颖, 高颖. 世界华人消化杂志 2009; 17: 2037-2041
- Zhao Y, Yokota K, Ayada K, Yamamoto Y, Okada T, Shen L, Oguma K. *Helicobacter pylori* heat-shock protein 60 induces interleukin-8 via a Toll-like receptor (TLR)2 and mitogen-activated protein (MAP) kinase pathway in human monocytes. *J Med Microbiol* 2007; 56: 154-164
- van de Veerdonk FL, Marijnissen RJ, Kullberg BJ, Koenen HJ, Cheng SC, Joosten I, van den Berg WB, Williams DL, van der Meer JW, Joosten LA, Netea MG. The macrophage mannose receptor induces IL-17 in response to *Candida albicans*. *Cell Host Microbe* 2009; 5: 329-340
- Swain SD, Lee SJ, Nussenzweig MC, Harmsen AG. Absence of the macrophage mannose receptor in mice does not increase susceptibility to *Pneumocystis carinii* infection in vivo. *Infect Immun* 2003; 71: 6213-6221
- McKay PF, Imami N, Johns M, Taylor-Fishwick DA, Sedibane LM, Totty NF, Hsuan JJ, Palmer DB, George AJ, Foxwell BM, Ritter MA. The gp200-MR6 molecule which is functionally associated with the IL-4 receptor modulates B cell phenotype and is a novel member of the human macrophage mannose receptor family. *Eur J Immunol* 1998; 28: 4071-4083
- Al-Tubuly AA, Spijker R, Pignatelli M, Kirkland SC, Ritter MA. Inhibition of growth and enhancement of differentiation of colorectal carcinoma cell lines by MAb MR6 and IL-4. *Int J Cancer* 1997; 71: 605-611
- Tunekar MF, Gatter KC, Ritter MA. Bladder carcinomas and normal urothelium universally express gp200-MR6, a molecule functionally associated with the interleukin 4 receptor (CD 124). *Br J Cancer* 1996; 73: 429-432
- Santacroce L, Cagiano R, Del Prete R, Bottalico L, Sabatini R, Carlaio RG, Prejbeanu R, Vermesan H, Dragulescu SI, Vermesan D, Motoc A, Losacco T. *Helicobacter pylori* infection and gastric MALTo-mas: an up-to-date and therapy highlight. *Clin Ter* 2008; 159: 457-462
- Mahnke K, Guo M, Lee S, Sepulveda H, Swain SL, Nussenzweig M, Steinman RM. The dendritic cell receptor for endocytosis, DEC-205, can recycle and enhance antigen presentation via major histocompatibility complex class II-positive lysosomal compartments. *J Cell Biol* 2000; 151: 673-684
- Jiang W, Swiggard WJ, Heufler C, Peng M, Mirza A, Steinman RM, Nussenzweig MC. The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. *Nature* 1995; 375: 151-155

同行评价

本文探讨了胞吞受体DEC205在*H. pylori*感染的胃黏膜巨噬细胞中的表达情况, 有一定的特色及研究价值.

编辑 李军亮 电编 闫晋利

慢性萎缩性胃炎中医治法分布及方剂运用规律

易平钰, 朱方石

■背景资料

近年来, 中医药治疗CAG显示了一定的优势和潜力, 但纵观文献及报道资料显示, 中医治法种类繁多而方剂庞杂, 缺乏主导方向的治则大法 and 统一、规范、标准的辨治方案。

易平钰, 南京中医药大学 江苏省南京市 210028
朱方石, 南京中医药大学附属中西医结合医院消化内科 江苏省南京市 210028
易平钰, 硕士研究生, 主要从事中西医结合治疗消化疾病的研究。国家“十一五”科技支撑计划基金资助项目, No. 2007BA120B093
作者贡献分布: 此课题由朱方石设计; 研究过程由易平钰与朱方石操作完成; 研究所用分析工具由易平钰提供; 数据分析由易平钰完成; 本论文写作由易平钰与朱方石完成。
通讯作者: 朱方石, 教授, 主任医师, 博士生导师, 210028, 江苏省南京市, 南京中医药大学附属中西医结合医院消化内科。zhufs@tom.com
电话: 025-85608666
收稿日期: 2011-08-29 修回日期: 2011-12-05
接受日期: 2011-12-18 在线出版日期: 2011-12-28

Treatment of chronic atrophic gastritis with Chinese medicine: approaches and prescriptions

Ping-Yu Yi, Fang-Shi Zhu

Ping-Yu Yi, Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210028, Jiangsu Province, China
Fang-Shi Zhu, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Integrated Chinese and Western Medicine, Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210028, Jiangsu Province, China
Supported by: the National Key Technology R&D Program during the 11th “Five-Year” Plan Period, No. 2007BA120B093
Correspondence to: Fang-Shi Zhu, Professor, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Integrated Chinese and Western Medicine, Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210028, Jiangsu Province, China. zhufs@tom.com
Received: 2011-08-29 Revised: 2011-12-05
Accepted: 2011-12-18 Published online: 2011-12-28

Abstract

AIM: To summarize the approaches and prescriptions for the treatment of chronic atrophic gastritis (CAG) with traditional Chinese medicine (TCM).

METHODS: The literature regarding TCM treatment of CAG was retrieved by searching the Network Database in nearly 10 years, and 206 papers which comprised detailed data and included 8 056 clinical cases were obtained. We then summarized information about TCM treatment approaches and prescriptions and ana-

lyzed them using statistical methods.

RESULTS: The most frequently used treatment approach for CAG was replenishing Qi and invigorating spleen, followed by soothing liver and harmonizing stomach, supplementing Qi and nourishing Yin, and clearing heat and eliminating dampness. The above four treatment approaches were used in more than 85% of cases. The most frequently used prescription in the four treatment approaches was XiangSha-LiuJunZi Decoction, followed by Chaihu Shugan Powder (CSP), Benefit Stomach Soup, and Banxia Xiexin Decoction.

CONCLUSION: Common TCM treatment approaches for CAG include replenishing Qi and invigorating spleen, soothing liver and harmonizing stomach, supplementing Qi and nourishing Yin, and clearing heat and eliminating dampness. Common prescriptions are XiangSha-LiuJunZi Decoction, CSP, Benefit Stomach Soup and Banxia Xiexin Decoction.

Key Words: Chronic atrophic gastritis; Chinese medicine; Prescription

Yi PY, Zhu FS. Treatment of chronic atrophic gastritis with Chinese medicine: approaches and prescriptions. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(36): 3696-3699

摘要

目的: 探讨慢性萎缩性胃炎中医治法分布及方剂运用规律, 为制定CAG规范化治疗方案提供依据。

方法: 通过网络数据库检索近10年中医药治疗CAG文献, 从2 300余篇文献中抽取了含有具体病例统计数据的文献206篇, 对确诊CAG病例8 056例进行归纳、整理和总结其相关中医治法分布及方剂运用信息, 然后进行统计学处理、分析。

结果: 中医治法排在首位的是: 健脾益气(构成比35.45%), 其余依次是疏肝和胃(构成比22.24%)、益气养阴和清热化湿(构成比分别为16.68%, 15.14%, 均 $P<0.01$), 上述4种治法构

■同行评议者

李军祥, 主任医师, 教授, 北京中医药大学附属东方医院消化内科

成比总和达85%以上。4种证型的治法使用方剂频次居首的分别是: 香砂六君子汤、柴胡疏肝散、益胃汤和半夏泻心汤(使用频率依次为: 25.23%, 60.87%, 34.67%, 26.76%; 均 $P<0.01$)。

结论: 健脾益气为CAG基本治法, 疏肝和胃、益气养阴和清热化湿为临床常见治法, 分别以香砂六君子汤、柴胡疏肝散、益胃汤、沙参麦冬汤和半夏泻心汤为各证型首选方剂。其结果对制定CAG规范化治疗方案具有参考价值。

关键词: 慢性萎缩性胃炎; 中医治法; 方剂

易平钰, 朱方石. 慢性萎缩性胃炎中医治法分布及方剂运用规律. 世界华人消化杂志 2011; 19(36): 3696-3699
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/3696.asp>

0 引言

慢性萎缩性胃炎(chronic atrophic gastritis, CAG)是以胃黏膜上皮和腺体萎缩, 黏膜变薄, 黏膜肌层增厚为特征的一种常见的消化系统疾病。其癌变率为2.55%-7.46%^[1], 目前较为公认的病理发展模式是由萎缩性胃炎→胃黏膜肠上皮化生→胃黏膜上皮内瘤变→胃癌的变化^[2], 因此, 积极防治CAG对防治早期胃癌的发生具有重要意义。现代医学对CAG的治疗尚无特效的方法和药物, 而中医药对此却显示了一定的优势, 国内外众多学者冀希于从中医中药领域寻求一定的突破。新近, 中医中药治疗本病取得较好的疗效, 见有不少报道^[3-12], 但治法多端, 方药各异, 各有特点。为了明确中医治疗CAG大法的主次, 归纳和筛选常用治疗方药, 以期制定规范的CAG中医治疗方案, 我们对近10年来的中医药辩证治疗CAG的文献进行归纳、整理, 就其常见治法分布和方剂选用频次进行了分析、总结, 现报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料 检索2000-01/2011-05中国知网全文期刊数据库(CNKI)、维普中文科技期刊数据库(VIP)、万方数据等收录的有关中医药治疗CAG文献共2 300余篇, 剔除合并西药治疗、针灸治疗、中药外治、中医单方、文献综述、治则观点研究、实验研究、个案报道、名医经验、中医护理等文献; 撷取文献中有明确治疗方法、方剂并有具体病例统计数据的论文206篇, 其中文献中明确诊断CAG病例8 056例。

1.2 方法

1.2.1 检索: 检索文献杂志符合2009年版《中国

表 1 CAG中医治法分布及构成比比较

治法	<i>n</i>	构成比(%)
健脾益气	2856	35.45
疏肝和胃	1792	22.24 ^b
益气养阴	1344	16.68 ^{bd}
清热化湿	1220	15.14 ^{bd}
其他治法	844	10.48

^b $P<0.01$ vs 健脾益气组; ^d $P<0.01$ vs 疏肝和胃组。

科技期刊引证报告》中1 723种中国科技论文统计源期刊, 杂志涉及中医、西医、中西医结合、中药、大学学报等120余种。

1.2.2 归纳: 将登载有具体病例统计数据的论文, 按同类和相近的辨治大法进行归纳, 将其治法单一的视为“独立治法”, 将混合或复合治法、兼见、偶见、少见治法视为“其他治法”, 统计分析治法的构成比。根据不同治法选用的方剂名称和频次依次进行排列、归纳。

统计学处理 采用SPSS17.0软件进行 χ^2 检验处理分析。

2 结果

2.1 治法分布及构成比情况 文献中登载CAG中医治法共有60余种之多, 将其按相同、相近和异名同类的治法进行归纳。由混合、复合、兼见、偶见、少见治法等多种总和的“其他治法”构成比为10.48%, 而符合“独立治法”的健脾益气、疏肝和胃、益气养阴和清热化湿法4者构成比总和却超过总构成比的85%。健脾益气法构成比居首, 为35.45%, 且与其他各治法比较具有显著性差异($P<0.01$); 疏肝和胃法次之, 但显著高于益气养阴和清热化湿法($P<0.01$); 而益气养阴和清热化湿法间比较无统计学意义($P>0.05$)。至于“其他治法”为多种复合或兼见、少见治法的总合, 与各“独立治法”不具备可比性(表1)。

2.2 4种治法常用方剂使用频次情况 文献中载录处方共有50余首, 其中以独立处方为基本方的有20首方剂(健脾益气法6首、疏肝和胃法6首、益气养阴4首、清热化湿法4首); 其他混合、加减、自拟的处方共有30余首(以下称为“其他方剂”, 因其为混合加减或自拟方, 与独立处方不具备可比性), 其处方名称及使用频次见表2, 3。

健脾益气法中, 方剂使用频次超过10%的由

■研发前沿

中医临床对CAG治法多端, 方药各异, 明确中医治疗CAG大法的主次, 归纳和筛选常用治疗方药, 以期制定规范的CAG中医治疗方案提供相关依据。

■相关报道

成华等通过总结122篇文献报道, CAG中医证候出现频率大小依次为脾胃虚弱、肝胃不和、脾胃湿热、胃阴不足、胃络瘀血证, 其前4种证型分布结果与本研究的4种治法大致吻合; 而对CAG治法及方剂的运用药规律的研究尚未见报道。

■创新盘点

本研究在归纳CAG中医治法结构的基础上,首次对CAG常用方剂构成、使用频次进行分析研究,揭示了CAG临床常用治法的主次结构及其方剂运用规律。

表 2 健脾益气 and 疏肝和胃法常用处方及使用频次比较

健脾益气法				疏肝和胃法			
分组	方剂名	<i>n</i>	使用频率(%)	分组	方剂名	<i>n</i>	使用频率(%)
1	香砂六君子汤	721	25.23	1	柴胡疏肝散	1091	60.87
2	黄芪建中汤	635	22.26	2	四逆散	276	15.47 ^b
3	四君子汤	381	13.35 ^{bd}	3	金铃子散	101	5.63 ^{bd}
4	补中益气汤	299	10.47 ^{bd}	4	枳术丸	58	3.26 ^{bd}
5	小建中汤	191	6.68 ^{bdf}	5	左金丸	42	2.32 ^{bd}
6	高良姜汤	98	3.43 ^{bdf}	6	化肝煎	40	2.23 ^{bd}
7	其他处方	531	18.58	7	其他处方	184	10.25

^b $P<0.01$ vs 第1组; ^d $P<0.01$ vs 第2组; ^f $P<0.01$ vs 第3组。

表 3 益气养阴和清热化湿法常用处方及使用频次比较

益气养阴法				清热化湿法			
分组	方剂名	<i>n</i>	使用频率(%)	分组	方剂名	<i>n</i>	使用频率(%)
1	益胃汤	466	34.67	1	半夏泻心汤	326	26.76
2	沙参麦冬汤	383	28.56	2	藿朴夏苓汤	248	20.34 ^b
3	一贯煎	275	20.45 ^b	3	平胃散	228	18.74 ^b
4	养胃汤	71	5.24 ^{bd}	4	三仁汤	192	15.68 ^b
5	其他处方	149	11.08	5	其他处方	226	18.48

^b $P<0.01$ vs 第1组; ^d $P<0.01$ vs 第3组。

高到低依次排列为以香砂六君子汤、黄芪建中汤、四君子汤和补中益气汤,而低于10%的分别为小建中汤和高良姜汤。各组比较,香砂六君子汤使用频率居首,除与黄芪建中汤比较两者间无显著差异外($P>0.05$),与其他各组比较均有显著性差异($P<0.01$),似乎说明香砂六君子汤、黄芪建中汤是健脾益气最常用方剂;而四君子汤和补中益气汤两者间比较无显著差异($P>0.05$),但该两方剂又均高于小建中汤和高良姜汤($P<0.01$)。在疏肝和胃法中,柴胡疏肝散使用频率占绝对优势,为68.87%,与其他各组比较均有显著性差异($P<0.01$);四逆散次之,其使用频次亦均显著高于其他各组($P<0.01$);而金铃子散、枳术丸、左金丸、化肝煎4组间比较均无显著差异($P>0.05$)。亦可以表明,柴胡疏肝散为最常用方剂,四逆散次之。

益气养阴法中,使用频次居高的为益胃汤(34.67%)和沙参麦冬汤(28.56%),该2组间比较无显著性差异($P>0.05$),但均高于一贯煎和养胃汤($P<0.01$);而一贯煎又显著高于养胃汤($P<0.01$)。似乎可以说明益胃汤和沙参麦冬汤是益气养阴法最常用方剂。在清热化湿法中,半夏泻心汤使用频次均高于其他各组($P<0.01$);而藿

朴夏苓汤、平胃散和三仁汤3组间比较无显著差异($P>0.05$)。亦说明半夏泻心汤为清热化湿法中最常用方剂。

3 讨论

本研究结果显示,CAG中医治法构成的高低排列依次为:健脾益气、疏肝和胃、益气养阴和清热化湿,这一结果与本课题组前期对CAG中医药治法分类研究^[13]得出的结论相符,亦与李国春等^[14]采用临床流行病学方法建立合适的结构方程模型总结得出的4种常见证型基本相应。从CAG中医病机学来看,CAG病本正虚,脾胃虚弱为发病的病理基础,由于饮食、情志、湿热等致病因素的影响,则根据病程长短及个体的差异和病理因素的偏颇,易表现为肝胃不和或湿热内蕴、气阴两虚等中医病理证候,同时也会出现胃热壅滞、或气滞血瘀、或脾阳不足等兼夹和少见证候。因此,我们认为,健脾益气为治疗CAG临床基本大法^[15],从本治法构成比的研究结果来看,健脾益气法排列居首,其治法使用的现状和频次亦佐证了脾胃虚弱为CAG的主要病理改变;而疏肝和胃、益气养阴和清热化湿则是根据CAG常见中医证型而选用的常见治法。

■应用要点

通过对CAG的治疗法则及主要使用方剂规律性的探讨,为进一步制定CAG规范化治疗方案提供了框架结构和参考依据。

众所周知, 中医治疗疾病的原则是“辨证施治”, 需在辨证立法的基础上依法选方, 故“方证相应”为其治病用药的原则. 本研究结果显示, 4种治法分别以香砂六君子汤、柴胡疏肝散、益胃汤、半夏泻心汤使用频次为最高, 从“以方测证”的演绎机制推理来看, 很大程度上说明CAG临床证型以脾胃虚弱、肝胃不和、湿热内蕴及气阴两虚为多见; 而上述4首方剂的使用频率现状, 亦进一步表明其方剂分别为各证型治疗CAG的代表方剂.

此外, 从黄芪建中汤、四逆散、沙参麦冬汤、藿朴夏苓汤等方剂使用频率来看, 其使用频率仅次于首选方剂, 这一结果似乎说明, 各证型虽有主要的病理因素和主要症候表现, 但临床上并非单一, 且病理变化程度亦有轻重. 如选黄芪建中汤则偏于和中, 选四逆散则侧重于理气, 选沙参麦冬汤则强调养阴, 选藿朴夏苓汤则注重化湿, 在主要中医证型病理所属的基础上, 其病理因素和病理变化及临床表现则有所偏颇. 因此, 我们认为, 上述4种方剂亦为CAG临床治疗所常选的主要方剂.

虽然CAG临床症状多端而轻重不一, 中医证候复杂而多变, 治法种类繁多而方剂庞杂, 但本研究表明, CAG的证型分类、治疗法则及主要使用方剂尚有一定的规律可循; 本研究结果为进一步制定CAG规范化治疗方案提供了一定的基础和参考依据. 我们认为, 临床辨治CAG, 应在一相对规范、统一的证型分类和辨证框架下, 按照治疗大法的主次, 依法进行选方用药; 然我们亦提示, 临床切不可拘泥而默守, 应根据证型的变化

和病理因素的改变, 随证变法, 灵活变通.

4 参考文献

- 1 赵霞, 潘华峰, 刘静. 慢性萎缩性胃炎与细胞凋亡和增殖的研究进展. 江西中医学院学报 2005; 17: 79-80
- 2 陆敏, 王德明. 王德明治疗慢性萎缩性胃炎伴肠上皮化生经验. 山东中医杂志 2010; 29: 791
- 3 代二庆, 赵占考, 袁红霞, 任万英, 李华. 善胃 I-III 号方治疗慢性萎缩性胃炎胃癌前病变的临床研究. 中医药学刊 2004; 22: 606-607
- 4 邵荣世, 季雁浩, 顾庆华, 宣建明, 明顺华. 胃宁茶袋泡剂治疗慢性萎缩性胃炎机理的实验研究. 江苏中医药 2005; 26: 56-58
- 5 徐升, 刘敏琪. 加减半夏泻心汤治疗慢性萎缩性胃炎癌前病变临床观察. 中医药临床杂志 2010; 22: 495-496
- 6 唐梅文, 邓嫦, 黄勇华, 陈国忠. 加味七方胃痛颗粒治疗慢性萎缩性胃炎临床疗效观察. 中国中医基础医学杂志 2010; 16: 337-338
- 7 曾勇. 六君子汤合四逆散治疗慢性萎缩性胃炎疗效观察. 辽宁中医药大学学报 2010; 12: 139-140
- 8 王长洪, 高文艳, 林一帆, 陈山泉, 陆宇平, 杨卓, 巩阳, 刘杨, 王立新. 仁术健胃颗粒治疗气虚血瘀热郁证慢性萎缩性胃炎. 中国中西医结合消化杂志 2010; 18: 86-88
- 9 王文慧, 赵洪波. 益胃汤治疗慢性萎缩性胃炎24例疗效观察. 新中医 2010; 42: 33-34
- 10 赵霞, 潘华峰, 鞠晓云, 范乃兵, 余绍源, 罗云坚. 胃痞消抑制慢性萎缩性胃炎脾虚大鼠胃黏膜上皮细胞凋亡及调控蛋白Caspase-3和P53表达. 中国新药杂志 2007; 16: 1018-1021
- 11 唐友明. 香砂六君子丸治疗脾胃虚寒型慢性萎缩性胃炎75例临床观察. 云南中医中药杂志 2010; 31: 48-49
- 12 李良. 消痞汤治疗慢性萎缩性胃炎160例. 中国中西医结合消化杂志 2010; 18: 55-56
- 13 王伟, 朱方石, 吴晓燕. 慢性萎缩性胃炎中医药治法分类研究. 世界华人消化杂志 2008; 16: 3692-3695
- 14 李国春, 李春婷, 黄蓝洋, 单兆伟, 陈启光. 结构方程模型在慢性萎缩性胃炎中医证候分型中应用. 中国卫生统计 2007; 24: 357-360
- 15 朱方石, 姒健敏, 王良静. 萎缩性胃炎临床证型分类研究. 世界华人消化杂志 2003; 11: 844-846

■同行评价

该论文设计合理, 方法正确, 结论可靠. 所研究的问题对临床有一定的参考价值.

编辑 张姗姗 电编 闫晋利

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)

进展期胃癌术后调强放疗加同期口服替吉奥胶囊化疗的临床疗效

钟琼, 肖震宇, 吴仁瑞, 钟豪, 邓江华, 曾爱群

■背景资料

对于进展期胃癌, 即使在胃癌根治术中采用更广泛的淋巴结清扫术也不能改善患者的生存率, 多数患者最终死于复发转移, 然而术后采取合适放化疗手段, 对改善患者生存状况有着积极的意义。我国胃癌术后同期放化疗刚刚起步, 一些随机试验的荟萃分析发现术后单纯化疗不能提高远期生存率, 进一步采用调强放疗已成为目前研究的热点。

钟琼, 肖震宇, 吴仁瑞, 钟豪, 邓江华, 曾爱群, 江西省赣州市人民医院 江西省赣州市 341000

钟琼, 主治医师, 主要从事肿瘤放疗、化疗的研究。

作者贡献分布: 此课题由钟琼完成课题设计、收治患者、临床病例分析、统计学处理及论文撰写; 肖震宇对整个设计提出修改意见; 吴仁瑞与钟豪完成收治患者、实施放化疗、数据收集整理工作; 邓江华与曾爱群实施放疗计划设计、质量控制等工作。

通讯作者: 钟琼, 主治医师, 341000, 江西省赣州市, 赣州市人民医院。zhongqiong8809@163.com

收稿日期: 2011-09-07 修回日期: 2011-12-05

接受日期: 2011-12-18 在线出版日期: 2011-12-28

Efficacy and safety of intensity-modulated radiation therapy combined with gimeracil and oteracil potassium capsules in patients with advanced gastric cancer after surgery: a controlled clinical study

Qiong Zhong, Zhen-Yu Xiao, Ren-Rui Wu, Hao Zhong, Jiang-Hua Deng, Ai-Qun Zeng

Qiong Zhong, Zhen-Yu Xiao, Ren-Rui Wu, Hao Zhong, Jiang-Hua Deng, Ai-Qun Zeng, People's Hospital of Ganzhou City, Ganzhou 341000, Jiangxi Province, China

Correspondence to: Qiong Zhong, Attending Physician, People's Hospital of Ganzhou City, Ganzhou 341000, Jiangxi Province, China. zhongqiong8809@163.com

Received: 2011-09-07 Revised: 2011-12-05

Accepted: 2011-12-18 Published online: 2011-12-28

Abstract

AIM: To evaluate the efficacy and safety of intensity-modulated radiation therapy combined with chemotherapy and herbal treatment versus conventional radiotherapy in patients with advanced gastric cancer after surgery.

METHODS: Sixty-eight patients with advanced gastric cancer were divided into two groups: observation group ($n = 35$) and control group ($n = 33$). The observation group received intensity-modulated radiation therapy (180 Cgy daily, five times a week, total dose of 45-55 GY) 4 weeks after surgery, while the control group was treated by conventional radiotherapy. Patients in both groups received two cycles of

treatment with gimeracil and oteracil potassium (Gio) capsules. Each 21-day cycle consisted of oral administration of 80 mg/(m²·d) twice daily for 14 d, followed by 1 week without treatment. During the chemotherapy period, herbal treatment was also given. Clinical efficacy and toxicity in the two groups were analyzed three months after treatment. The quality of life was evaluated using the Karnofsky score before treatment and 3, 6 and 12 months after treatment.

RESULTS: The total response rates were 51.43% and 30.30% in the observation group and control group, respectively, with no significant difference between the two groups ($P > 0.05$). Differed significantly of Karnofsky scores were not only between the observation group and control group before treatment and 3, 6, and 12 months after treatment (all $P < 0.01$ or 0.05), but also between before treatment and at various time points after treatment (all $P < 0.05$). The incidences of hematological toxicity, gastrointestinal toxicity and peripheral nerve toxicity were lower in the observation group than in the control group.

CONCLUSION: Intensity-modulated radiation therapy combined with oral Gio capsules and herbal treatment is a safe and effective treatment for patients with advanced gastric cancer after surgery.

Key Words: Advanced gastric cancer; Intensity-modulated radiation therapy; Gimeracil and oteracil potassium capsules; Herbal treatment

Zhong Q, Xiao ZY, Wu RR, Zhong H, Deng JH, Zeng AQ. Efficacy and safety of intensity-modulated radiation therapy combined with gimeracil and oteracil potassium capsules in patients with advanced gastric cancer after surgery: a controlled clinical study. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(36): 3700-3704

摘要

目的: 评价调强放疗加替吉奥胶囊配合中药

■同行评议者

张志坚, 教授, 福州总医院消化内科

调理胃肠道方案治疗进展期胃癌术后的临床疗效与不良反应。

方法: 68例进展期胃癌患者按先后入院顺序半随机分成观察组35例,术后4 wk开始行靶区调强放射治疗(每日180 Cgy,每周5次,总剂量45-55 GY),对照组33例行常规放疗。两组均加口服替吉奥胶囊80 mg/(m²·d),分2次口服,连服14 d、21 d为1周期,连用2个周期,放化疗期间给予中药调理胃肠道。治疗后进行两组临床疗效不良反应比较,治疗后3 mo分析疗效和不良反应,治疗前、治疗后3 mo、6 mo、12 mo随访进行Karnofsky生活质量评分。

结果: 两组临床疗效比较,观察组总有效率为51.43%,对照组为30.30%,两组临床疗效无统计学差异($P>0.05$)。Karnofsky评分结果表明,观察组与对照组分别治疗前与治疗3 mo、6 mo、12 mo比,有统计学差异($P<0.01$, $P<0.05$),治疗后3 mo、6 mo、12 mo观察组与对照组比,有统计学意义($P<0.02$, $P<0.05$)。两组血液学不良反应、胃肠道反应、周围神经不良反应比较,观察组比对照组小。

结论: 经过临床对照研究分析结果表明,进展期胃癌患者术后行调强放疗加口服替吉奥胶囊化疗,同时配合补益类中药的治疗方法是防治胃癌复发的一种安全、有效的方案。

关键词: 进展期胃癌; 调强放疗; 替吉奥胶囊; 中药调理

钟琼, 肖震宇, 吴仁瑞, 钟豪, 邓江华, 曾爱群. 进展期胃癌术后调强放疗加同期口服替吉奥胶囊化疗的临床疗效. 世界华人消化杂志 2011; 19(36): 3700-3704
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/3700.asp>

0 引言

胃癌发病率在全世界正呈逐年上升的趋势^[1,2]。目前手术仍是胃癌治疗最有效的方法,但局部复发成为手术治疗棘手及亟待解决的问题^[3]。一些研究显示,术后予以化疗及放疗等辅助治疗可提高患者生存率及患者不良反应的耐受性^[4,5]。我们于2009-06/2011-05对35例进展期胃癌术后患者行调强放射治疗(intensity modulated radiotherapy, IMRT)加同期口服替吉奥胶囊(S-1)化疗,配合中药调理,取得较好疗效,同时与33例进展期胃癌术后患者行常规放疗加同期口服S-1化疗,配合中药调理进行比较,其结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料 68例进展期胃癌(癌组织浸润到黏膜下层,进入肌层或已穿过肌层达浆膜者)患者,均采用胃全切或胃次全切除加淋巴结扩大清扫术,术后有阳性的区域淋巴结,其中男37例,女31例,年龄48-79岁,中位年龄56岁。治疗前均行腹、盆腔、胸部CT或X线检查排除局部复发和转移。肝肾功能、电解质、血常规(白细胞、血小板、红细胞)、AFP、CEA均正常,患者均无内科禁忌证,且Karnofsky评分70分以上。

1.2 方法

1.2.1 术中病理分期判断标准: (1)术中T分期。T₂: 术中可明显触及癌肿,癌灶周围胃壁僵硬,癌灶侵犯部位挛缩等外观改变。T₃: 肉眼可见胃壁浆膜明显受到癌肿浸润。T₄: 肝脏、胰腺、脾脏、十二直肠、横结肠、膈肌等周围组织受到癌肿直接浸润。(2)术中N分期。依据UICC^[6]对胃癌TNM分期(第五版)规定,1-6个为N₁,7-15个为N₂,16个以上为N₃(每个病例清扫淋巴结数目应不少于15枚)。(3)术中判定远处转移。术中观察到肝脏表面、小肠浆膜及其系膜表面、横结肠浆膜及其系膜表面、盆腔以及女性患者卵巢表面等处有散在或成簇的白色粟粒样硬结;术中未见明确转移灶,但存在腹水及脱落细胞学检查阳性;12、13、14、16组淋巴结高度怀疑转移;术中判定可疑转移淋巴结数目≥16枚。(4)病理分型。按WHO的分型标准^[7]。

1.2.2 随机分组: 68例进展期胃癌患者按先后入院顺序半随机分成观察组35例,对照组33例,2组资料的均匀性检验($P>0.05$),具有可比性。

1.2.3 治疗: 观察组采用调强放疗+化疗+辅助治疗,对照组采用常规放疗+化疗+辅助治疗。(1)调强放疗。采用东芝模拟定位机、VARIAN 23EX直线加速器、瓦里安Eclipse放疗计划系统。全部病例选用6MV-X线加速器调强适形放射治疗。定位当日上午8:30患者在空腹状态下饮800 mL造影剂,10 min后仰卧位,双手抱肘置于额头,激光灯摆位,体模固定患者体部,采用东芝4排双螺旋CT增强扫描,为保证与定位时状态一致,术后肿瘤临床靶区(CTV)定义为吻合口及淋巴引流区域,计划靶区PTV为外放0.5 cm的CTV,CT扫描结果传输到TPS治疗计划系统中。TPS计划设5-9个野,周围危及器官受量均在国际制定标准的剂量以下,术后4 wk开始放疗,每日180 Cgy,每周5次,总剂量45-55 GY。每次治疗时均空腹,口服定位时同样剂量的白开水。(2)化疗。放疗开

■研究前沿

补益中药可减轻放化疗不良反应,增强放化疗效果,这已经被多年临床证实,为广大医患所认同。补益中药不但可提高机体免疫力,减轻化疗后造血功能的抑制和造血微环境的破坏,同时还可增强替吉奥胶囊抗肿瘤活性。

■相关报道

国内文献报道替吉奥胶囊无论是单药还是与其他化疗药物联合应用于胃癌,其总有效率为33.3%-57.6%。国外临床试验表明,进展期胃癌患者经接受标准剂量方案的替吉奥胶囊口服治疗,结果经合并分析显现总有效率为31%,中位存活期是119 d。

表 1 术中所视肿瘤部位、大小、淋巴结、远处转移及病理分期 (%)

	<i>n</i>	肿瘤部位			肿瘤直径(cm)			术中淋巴结转移		远处转移		T分期			病理类型	
		上 1/3	中 1/3	下 1/3	≤4	4-8	>8	N ₀ +N ₁	N ₂ +N ₃	M ₀	M ₁	T ₂	T ₃	T ₄	高中分 化腺癌	低分化 腺癌
观察组	50	13	14	23	9	27	14	23	27	32	18	12	14	24	29	21
对照组	50	14	16	20	8	26	16	25	25	33	17	11	16	23	27	23
χ ² 值		0.420			0.732			0.160		0.044		0.10			0.162	
<i>P</i> 值		>0.05			>0.05			>0.05		>0.05		>0.05			>0.05	

表 2 两组临床疗效比较 (%)

	<i>n</i>	CR	PR	SD	PD	总有效率
观察组	35	6(17.14)	12(34.29)	9(25.71)	8(22.86)	51.43
对照组	33	4(12.12)	6(18.19)	8(24.24)	15(45.46)	30.30

表 3 两组Karnofsky评分比较 (mean ± SD)

	<i>n</i>	治疗前	治疗后3 mo	治疗后6 mo	治疗后12 mo	<i>F</i> 值	<i>P</i> 值
观察组	35	78.03 ± 7.29	71.43 ± 9.01	64.46 ± 16.85	48.89 ± 24.48	25.51	<0.01
对照组	33	78.12 ± 7.28	76.34 ± 7.02	71.89 ± 8.47	59.25 ± 17.14	21.68	<0.05
<i>t</i> 值		0.05	2.54	2.33	2.05		
<i>P</i> 值		>0.05	<0.02	<0.05	<0.05		

始的第1天给予S-1 80 mg/(m²·d),分早晚2次餐后服用。连用14 d。间隔7 d,21 d为1周期,共用2个周期。治疗后3 mo后评价疗效。(3)辅助治疗。放化疗期间给予中药调理,减少放化疗的毒副作用。中药处方:党参、红枣、枸杞、黄芪为主煎煮服用,2次/d。

1.2.4 观察指标:血常规、肝肾功能、心电图。完成2个周期后复查影像学,对肿瘤病灶进行评价,观察近期疗效和不良反应。全部病例采取门诊或电话随访,分别于治疗后3 mo、6 mo及12 mo各随访1次,询问患者肿瘤复发情况和病情,采用Karnofsky评价患者生活质量。

1.2.5 疗效评定:治疗3 mo后评价疗效,评价方法包括CT或MRI评估肿瘤大小,疗效评价参照世界卫生组织(WHO)标准^[8]:完全缓解(CR)、部分缓解(PR)、稳定(SD)、进展(PD),CR及PR均判为有效,两者之和百分比为总有效率(ORR),毒副反应评价采用NCI-CTCAE3.0;生活质量评定标准参照“体内状况计分标准(Karnofsky评分)”^[9]。

统计学处理 疗效采用计数资料χ²分析。计量资料以mean ± SD表示,观察组与对照组治疗前、治疗后3 mo,治疗后6 mo及治疗后12 mo Karnofsky评分的自身比较经过方差齐性检验后,

采用单因素方差分析,两组治疗后3 mo、6 mo、12 mo的Karnofsky评分采用配对*t*检验,α = 0.01。

2 结果

2.1 两组术中所视及病理分期 术中所视肿瘤部位、大小、淋巴结、远处转移及病理分期均无统计学差异(表1)。

2.2 两组临床疗效评价 两组临床疗效比较,观察组总有效率为51.43%,对照组为30.30%,统计学分析无差异(χ² = 4.53, *P* > 0.05, 表2)。

2.3 Karnofsky评分 Karnofsky评分结果表明,观察组与对照组分别治疗前与治疗3 mo、6 mo、12 mo自身对比,有统计学差异(*P* < 0.01, *P* < 0.05),治疗后3 mo、6 mo、12 mo观察组与对照组比,有统计学意义(表3)。

2.4 不良反应 血液学不良反应、胃肠道反应、周围神经反应,观察组比对照组小。两组患者均无严重心脏不良反应、无肺栓塞、深静脉血栓、高血压、胃穿孔、无治疗相关性死亡(表4)。

3 讨论

进展期胃癌尽管经过根治性手术后患者的生存率较低,但手术仍然是治疗的首选方法,因此经

表 4 两组治疗后不良反应比较

	Ⅰ度		Ⅱ度		Ⅲ度		Ⅳ度	
	观察组	对照组	观察组	对照组	观察组	对照组	观察组	对照组
血液学不良反应								
白细胞下降	4	3	2	4	1	2	0	1
贫血	2	4	1	2	0	1	0	1
血小板减少	1	2	1	2	0	1	0	0
非血液学不良反应								
恶心	3	7	1	4	1	3	0	2
腹泻	2	4	1	2	0	1	0	0
手足综合征	2	2	1	1	0	0	0	0
口腔黏膜炎	3	5	1	3	0	2	0	1
外周神经不良反应	3	2	4	1	0	1	0	0
肝功能损害	4	5	1	4	0	2	0	1

■应用要点

进展期胃癌术后同期调强放疗+替吉奥(S-1)化疗+补中益气中药的综合治疗有望成为进展期胃癌术后常规治疗手段。

过多种术后的辅助治疗提高患者生存率是值得探索的一条途径。

目前绝大多数治疗胃肠道肿瘤的规范方案中均包含5-氟尿嘧啶或其衍生物。S-1是以替加氟为主体,加入吉美嘧啶以阻止氟尿嘧啶活化物降解,增强抗癌作用,再加入奥替拉西钾保护胃肠黏膜,可减少消化道反应^[10]。替加氟口服给药后在体内缓慢转变5-氟尿嘧啶而发挥抗肿瘤作用,在临床上常用于胃癌、结肠直肠癌及头颈部肿瘤的治疗。作为替加氟的一种增效减不良反应改良制剂,S-1的抗肿瘤活性谱与氟尿嘧啶相似、尤其对进展期胃癌作用更强。国内文献报道S-1无论是单药还是与其他化疗药物联合应用于胃癌,其总有效率为33.3%-57.6%不等^[11-13]。国外临床试验表明,进展期胃癌患者经接受标准剂量方案的S-1口服治疗,结果经合并分析显现总有效率为31%,中位存活期是119 d^[14]。另有研究报道,S-1治疗患者的耐受性良好,主要不良反应仅为骨髓抑制和胃肠道不良反应,其严重程度及发生率均相对较低^[15,16]。我们的进展期胃癌术后调强放疗加同期口服S-1化疗加补中益气中药的临床疗效评价及不良反应分析结果显示,总有效率为51.43%,比国内外一些进展期胃癌患者术后接受标准剂量方案的S-1口服治疗的疗效高^[11,12,14],与国内曹桂侠的报道相近^[13]。我们的治疗方案不良反应非常小,与其他报道一致。本研究与常规放疗加同期口服S-1化疗加补中益气中药的对照研究结果也证明调强放疗加同期口服S-1化疗加补中益气中药临床疗效优于常规放疗加同期口服S-1化疗加补中益气中药有效率的30.30%。

本研究采用的IMRT是指在三维适形照射的

基础上对照射野截面内诸点输出剂量进行调整,经过旋转照射使射线剂量在体内空间分布与病变一致,形成高剂量区。并通过将射线分割成小野,且改变每个小野的剂量的方式,使得射线照射更精确,肿瘤靶区勾画更准确。剂量学^[17]已表明和三维适形治疗胃癌相比,调强放疗具有可行性和较高的收益效应,且对正常组织不良反应最低,临床调强放疗治疗胃癌的经验证实了此剂量学结论。胃癌术后局部复发转移的位置决定着术后放射治疗野的设定,准确的放疗范围和合适的放射剂量不仅对疗效有着重要影响,而且能最大程度地保护正常组织,减少放疗并发症。Macdonald等^[18,19]对INT-0116的报道,改变了胃癌术后的治疗标准并说明胃癌术后行放化疗的必要性,提示放化疗并未对机体长期的不良反应。Dahle等^[20]报道胃癌术后给予不同剂量的三维适形放射治疗,研究发现三维适形放射治疗能提供更好的剂量分布并减少肾脏和脊髓的照射剂量,降低治疗不良反应。Petra等^[21]研究结果表明,IMRT可以明显减少肾脏、肝脏及肺部的中位剂量,且IMRT则将左肾的受照剂量减少50%,右肾的受照剂量控制在8-10 Gy之间,但在脊髓的耐受范围内,未见明见的减少。胃癌术后行IMRT治疗可明显减少靶器官的受照剂量,同时潜在地改善患者生存质量。在我们的研究中,观察组通过调强放疗同期口服S-1化疗加补中益气中药治疗进展期术后胃癌患者,治疗前、治疗后3 mo、6 mo、12 mo随访的Karnofsky生活质量评分结果表明,1年患者的生活质量相对治疗前、治疗后3 mo、6 mo有明显的好转。对照组通过常规放疗加同期口服S-1化疗加补中益气中药,1年患者的生活质量相对治疗前、治

■名词解释

调强放疗:是指在三维适形照射的基础上对照射野截面内诸点输出剂量进行调整,经过旋转照射使射线剂量在体内空间分布与病变一致,形成高剂量区。并通过将射线分割成小野,且改变每个小野的剂量的方式,使得射线照射更精确,使肿瘤靶区的照射更准确。

同行评价

这是一篇有较多病例的临床研究,对临床医师有一定的参考价值。

疗后3 mo、6 mo也有好转,但明显不如观察组。

本研究采用调强放疗同期加口服S-1化疗加补中益气中药的方案治疗进展期胃癌术后患者,从不良反应来看,明显低于国内外某些相关报道^[22,23],同时也低于我们的对照组。这除了调强放疗优于常规放疗外,其中联合中药党参、红枣、枸杞、黄芪补中益气中药药物可以减少放疗及化疗药物引起的不良反应,增强放化疗效果。在我们的治疗方案中,加用党参、红枣有升红白细胞的作用,枸杞可抗辐射,与放疗合用能促进辐射所致的免疫功能损伤的恢复,并能减轻放射反应,防止骨髓抑制,保护受损的造血功能,降低并发症、后遗症。黄芪为临床上最常用的补气药,他不但可提高机体免疫力,减轻化疗后造血功能的抑制和造血微环境的破坏,同时还还可增强环磷酰胺的抗肿瘤活性。我们的初步临床观察表明,胃癌术后行调强放疗加口服S-1化疗,同时配合补中益气中药的治疗方案是防治胃癌复发的一种安全、有效的方案。

参考文献

- Dikshit RP, Mathur G, Mhatre S, Yeole BB. Epidemiological review of gastric cancer in India. *Indian J Med Paediatr Oncol* 2011; 32: 3-11
- Yang L. Incidence and mortality of gastric cancer in China. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 17-20
- Gunderson LL. Gastric cancer--patterns of relapse after surgical resection. *Semin Radiat Oncol* 2002; 12: 150-161
- Okita A, Miyade Y, Okano K. Effective management of an advanced gastric cancer patient by TS-1 combined chemotherapy using nasojejunal tube and successful transfer to home care after percutaneous transesophageal gastro-tubing (PTEG): a case report. *Acta Med Okayama* 2010; 64: 67-70
- Harada H, Omura K. Preoperative concurrent chemotherapy with S-1 and radiotherapy for locally advanced squamous cell carcinoma of the oral cavity: phase I trial. *J Exp Clin Cancer Res* 2010; 29: 33
- Sobin LH, Wittekind CH. International Union Against Cancer (UICC) TNM Classification of Malignant Tumors. 5th ed. New York: John Wiley and Sons, 1997
- Hamilton SR, Aaltonen LA. World Health Organization classification of tumours. Pathology and genetics of tumours of the digestive system. Lyon: IARC Press, 2000
- 姚云峰. 肿瘤分期与疗效评价. 中国医学前沿杂志(电子版) 2010; 2: 70-75
- Uyama I, Sugioka A, Fujita J, Komori Y, Matsui H, Hasumi A. Completely laparoscopic proximal gastrectomy with jejunal interposition and lymphadenectomy. *J Am Coll Surg* 2000; 191: 114-119
- 马培奇. 抗肿瘤新药替吉奥钾研究进展. 中国医药导刊 2007; 9: 499-502
- 关小倩, 高亚杰, 高平. 替吉奥胶囊治疗进展期胃癌临床研究. 大连医科大学学报 2009; 31 302-305
- 高源. 替吉奥治疗晚期胃癌临床观察及探讨. 中国老年保健医学 2010; 8: 43-44
- 曹桂侠, 程朝辉, 周冬梅. 替吉奥联合奥沙利铂治疗晚期胃癌的临床观察. 肿瘤基础与临床 2011; 24: 27-29
- Koizumi W, Tanabe S, Azuma M, Ishido K, Nishimura K, Sasaki T, Nakatani K, Higuchi K, Nakayama N, Katada C. Impacts of fluorouracil-metabolizing enzymes on the outcomes of patients treated with S-1 alone or S-1 plus cisplatin for first-line treatment of advanced gastric cancer. *Int J Cancer* 2010; 126: 162-170
- Kodera Y, Ito S, Mochizuki Y, Kondo K, Koshikawa K, Suzuki N, Kojima H, Kojima T, Matsui T, Takase T, Tsuboi K, Fujiwara M, Nakao A. A phase II study of radical surgery followed by postoperative chemotherapy with S-1 for gastric carcinoma with free cancer cells in the peritoneal cavity (CCOG0301 study). *Eur J Surg Oncol* 2009; 35: 1158-1163
- Sakata Y, Ohtsu A, Horikoshi N, Sugimachi K, Mitachi Y, Taguchi T. Late phase II study of novel oral fluoropyrimidine anticancer drug S-1 (1 M tegafur-0.4 M gimestat-1 M otastat potassium) in advanced gastric cancer patients. *Eur J Cancer* 1998; 34: 1715-1720
- Sakata Y, Ohtsu A, Horikoshi N, Sugimachi K, Mitachi Y, Taguchi T. Role of intensity-modulated radiation therapy in gastrointestinal cancer. *Expert Rev Anticancer Ther* 2000; 9: 637
- Macdonald JS, Smalley SR, Benedetti J, Hundahl SA, Estes NC, Stemmermann GN, Haller DG, Ajani JA, Gunderson LL, Jessup JM, Martenson JA. Chemoradiotherapy after surgery compared with surgery alone for adenocarcinoma of the stomach or gastroesophageal junction. *N Engl J Med* 2001; 345: 725-730
- Boku N, Ohtsu A, Nagashima F, Shirao K, Koizumi W. Relationship between expression of vascular endothelial growth factor in tumor tissue from gastric cancers and chemotherapy effects: comparison between S-1 alone and the combination of S-1 plus CDDP. *Jpn J Clin Oncol* 2007; 37: 509-514
- Dahele M, Skinner M, Schultz B, Cardoso M, Bell C, Ung YC. Adjuvant radiotherapy for gastric cancer: A dosimetric comparison of 3-dimensional conformal radiotherapy, tomotherapy and conventional intensity modulated radiotherapy treatment plans. *Med Dosim* 2010; 35: 115-121
- Wieland P, Dobler B, Mai S, Hermann B, Tiefenbacher U, Steil V, Wenz F, Lohr F. IMRT for postoperative treatment of gastric cancer: covering large target volumes in the upper abdomen: a comparison of a step-and-shoot and an arc therapy approach. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004; 59: 1236-1244
- 徐月红, 徐蓬英, 安文婷. 枸杞抗肿瘤药理作用研究概况. 时珍国医国药 2000; 11: 946-947
- 吴雪卿. 补益中药抗癌作用研究进展. 湖南中医药导报 1999; 5: 10-13

编辑 曹丽鸥 电编 闫晋利

大承气汤治疗急性重症胰腺炎效果的Meta分析

王学军, 曾宪涛, 韩斐, 尹玄, 倪绍洲, 肖敏

王学军, 肖敏, 湖北医药学院附属太和医院急诊科 湖北省十堰市 442000

曾宪涛, 湖北医药学院附属太和医院口腔科 湖北省十堰市 442000

韩斐, 十堰市中医医院普外科 湖北省十堰市 442000

尹玄, 湖北医药学院附属太和医院重症医学科 湖北省十堰市 442000

倪绍洲, 武汉大学中南医院急诊科 湖北省武汉市 430071

王学军, 副教授, 副主任医师, 肝胆外科硕士, 主要从事急诊科诊治方面的研究。

作者贡献分布: 此课题由王学军与曾宪涛共同设计; 文献检索由王学军与倪绍洲执行; 文献质量评价由曾宪涛与韩斐执行, 王学军负责审核; 资料提取由王学军与尹玄执行, 肖敏负责审核; 数据由尹玄录入软件, 王学军负责审核, 曾宪涛进行分析及结果的解读; 王学军与曾宪涛负责全文的撰写, 肖敏负责审核。

通讯作者: 肖敏, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 442000, 湖北省十堰市茅箭区人民南路32号, 湖北医药学院附属太和医院急诊科。wangyanyuzhuo@163.com

电话: 0719-8881999

收稿日期: 2011-08-23 修回日期: 2011-11-20

接受日期: 2011-12-18 在线出版日期: 2011-12-28

Efficacy of Dachengqi Decoction in the treatment of severe acute pancreatitis: a meta-analysis

Xue-Jun Wang, Xian-Tao Zeng, Fei Han, Xuan Yin, Shao-Zhou Ni, Min Xiao

Xue-Jun Wang, Min Xiao, Department of Emergency Medicine, Taihe Hospital, Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, Hubei Province, China

Xian-Tao Zeng, Department of Stomatology, Taihe Hospital, Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, Hubei Province, China

Fei Han, Department of General Surgery, Shiyan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shiyan 442000, Hubei Province, China

Xuan Yin, Department of ICU, Taihe Hospital, Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, Hubei Province, China

Shao-Zhou Ni, Department of Emergency Medicine, Zhongnan Hospital, Wuhan University, Wuhan 430071, Hubei Province, China

Correspondence to: Min Xiao, Professor, Chief Physician, Department of Emergency Medicine, Taihe Hospital, Hubei University of Medicine 442000, Hubei Province, China. wangyanyuzhuo@163.com

Received: 2011-08-23 Revised: 2011-11-20

Accepted: 2011-12-18 Published online: 2011-12-28

Abstract

AIM: To evaluate the efficacy of Dachengqi Decoction in the treatment of severe acute pancreatitis (SAP).

METHODS: We searched the Cochrane Controlled Center Register of Controlled Trials, PubMed, Embase, CBMdisc, VIP, CNKI and WANFANG for Random Controlled Trials to retrieve studies that evaluated the efficacy of Dachengqi Decoction in the treatment of SAP. A meta-analysis was performed using RevMan 5.1 software.

RESULTS: Sixteen studies involving 894 participants were included. The results showed that, compared to the control group, Dachengqi Decoction can help improve vital signs and physiological indexes, shorten the duration of hospitalization, decrease costs, and reduce the incidence rate of complications, mortality, and the number of cases of conversion to surgical treatment (all $P < 0.05$).

CONCLUSION: Convention treatment in combination with Dachengqi Decoction is superior to convention treatment alone in the treatment of SAP.

Key Words: Dachengqi Decoction; Treatment; Severe acute pancreatitis; Meta-analysis

Wang XJ, Zeng XT, Han F, Yin X, Ni SZ, Xiao M. Efficacy of Dachengqi Decoction in the treatment of severe acute pancreatitis: a meta-analysis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(36): 3705-3713

摘要

目的: 分析大承气汤治疗急性重症胰腺炎的效果。

方法: 计算机检索the Cochrane Central Register of Controlled Trials、PubMed、CBMdisc、VIP、CNKI和WANFANG数据库, 查找有关应用大承气汤治疗重症胰腺炎的文献, 采用Cochrane协作网RevMan5.1软件进行分析。

结果: 最终纳入16个研究, 共894例受试者。Meta分析结果显示, 大承气汤能有效促进各项生命体征和生理指标恢复, 能够缩短患者的住院时间、降低治疗费用, 能够有效降低并发症、病死率和转手术率, 其差异有统计学意义。

■背景资料

急性重症胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)临床症状和病理变化复杂, 起病急、变化快、并发症多、病死率高。在治疗上经历了从主张早期积极手术、规则性胰腺切除到个体化治疗, 但病死率无实质性的改善。循证医学证据表明中西医结合治疗SAP疗效显著。

■同行评议者

王承党, 教授, 福建医科大学附属第一医院 消化内科

■研究前沿

基于RCT的Meta分析被公认为目前最高级别的证据。循证医学证据表明中西医结合治疗SAP疗效显著,但因中医在临床治疗性研究中方法学应用不够规范,结论难以得到国外医学界承认,使中西医结合治疗SAP的方法难以得到推广应用。

结论: 加用大承气汤优于单独常规西医治疗,为当前急性重症胰腺炎的治疗提供了一种新的手段,在临床上具有良好的应用前景。

关键词: 大承气汤; 治疗; 急性重症胰腺炎; Meta分析

王学军, 曾宪涛, 韩斐, 尹玄, 倪绍洲, 肖敏. 大承气汤治疗急性重症胰腺炎效果的Meta分析. 世界华人消化杂志 2011; 19(36): 3705-3713

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/3705.asp>

0 引言

急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)是临床上较常见的急腹症,其发病率约为5.4/100 000-79.8/100 000,病死率为10%-15%,其中约20%可发展成急性重症胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)^[1-3]. SAP临床症状和病理变化十分复杂,具有起病急、变化快、并发症多、病死率高等特点,早期即可发生全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS)及多器官功能衰竭(multiple organ failure, MOF). 在治疗方面, SAP的治疗方式经历了不同的演变,从主张早期积极手术、规则性胰腺切除到个体化治疗的尝试, SAP的病死率并未得到实质性的改善,仍高达20%-30%^[4-6],仍未有特异性、有效的治疗方案. 中西医结合作为我国的特色优势医学,众多研究者做了有益的探索,循证医学研究^[7-9]表明中西医结合治疗SAP相对于单纯西医治疗具有相当优势. 但由于中医在临床治疗性研究中方法学应用不够规范,在一定程度上影响了研究结论的真实性和可重复性,研究结果难以得到国外医学界的承认,以致中西医结合治疗SAP的方法难以得到推广应用^[10]. 目前国内使用大承气汤治疗重症胰腺炎的文献较多,但结论各异,常规治疗的基础上加用大承气汤是否一定优于单独的常规治疗呢? 目前尚缺乏系统的评价. 本研究拟运用Meta分析的原理和方法综合目前发表研究的结果,以评价大承气汤治疗重症胰腺炎效果,以期为临床应用提供一个参考。

1 材料和方法

1.1 材料 以英文关键词“Da/Large chengqi decoction、severe acute pancreatitis (SAP)、Chinese Medicine、Traditional Chinese Medicine”计算机检索the Cochrane Central Register of Controlled Trials (issue 2, 2011)、PubMed(1966/2011-05)、Embase(1980/2011-05); 同时以中文关键词“大

承气汤、重症胰腺炎”计算机检索中国生物医学文献数据库(CBMdisc, 1978/2011-05)、中文科技期刊全文数据库(VIP, 1989/2011-05)、中国期刊全文数据库(CNKI, 1980/2011-05)和万方数据库(WANFANG, 1998/2011-05),中文/英文公开发表的随机对照试验文献. 最后初检出相关文献121篇(全部为中文).

1.2 方法

1.2.1 文献检索: (1)检索Cochrane图书馆相关的系统评价/Meta分析; (2)在PubMed、CBMdisc、CNKI等中、英文数据库中检索相关的原始论文,并对所获文献标题、摘要、所用的关键词以及主题词进行分析,以进一步确定文献检索的关键词; (3)运用所有相关的主题词和关键词进行数据库检索,如果摘要初步符合纳入标准,再进一步查找并阅读全文; (4)从已查阅文章所附参考文献中手检可能漏查的文献.

1.2.2 文献纳入和排除标准: (1)文献类型. 所有应用大承气汤治疗SPA的随机对照试验(RCT)和半随机对照试验; (2)研究对象. 不限、性别、种族、国籍,均符合纳入文献相应时期中华医学会胰腺病学组的诊断标准^[11-13],临床确诊为SPA的患者; 实验组和对照组的基线情况基本一致,具有可比性; 实验组仅加用大承气汤,未与其他药物联合治疗; 对照组为西医常规治疗; (3)干预措施. 实验组: 在常规治疗(包括: 禁食、补液、抑制胰液分泌和营养支持等)基础上,单纯加用大承气汤治疗; 对照组: 单纯采用常规治疗,未加用大承气汤或其他药物; (4)结局指标. 结局指标主要包括: 临床疗效: 痊愈: 症状、体征消失,实验室指标均恢复正常,无假性胰腺囊肿形成; 好转: 症状、体征明显改善或正常,实验室指标75%以上恢复正常. 有效: 症状、体征明显改善,实验室指标50%以上恢复正常; 无效: 症状、体征改善不明显,恶化或死亡. 总有效率 = 痊愈+显效+有效; 生命体征: 腹痛消失时间,腹胀消失时间,上腹压痛消失时间,白细胞(WBC)恢复正常时间,血、尿淀粉酶(AMS)恢复正常时间, C反应蛋白(CRP)恢复正常时间,腹膜炎体征消失时间; 体征相关指标: 血、尿AMS和CRP在治疗前后的变化情况; 平均住院时间,平均住院费用; 并发症、转手术率和病死率; (5)排除标准. 重要资料报告不全且联系作者未回复者; 仅能查阅摘要且联系作者未回复者; 同一个机构的2个研究报道了相似的随访区间及相同的目标结果时,纳入质量更好或信息更全面的报道.

1.2.3 文献质量评价: 每篇RCT质量的评价均由2位评价员按照Cochrane系统评价员手册5.1版质量评价标准^[14]进行独立评价, 不一致的地方通过第3位评价员介入并通过讨论达成一致。评价标准包括: 随机序列的产生, 分配隐藏方案, 对患者和医生实施盲法, 对结果评价实施盲法, 结果数据的完整性, 无选择性报告结果, 无其他偏倚来源; “是”表示低偏倚风险, “否”表示高偏倚风险, “不清楚”表示文献对偏倚评估未提供足够的或不确定的信息。

1.2.4 资料提取: 阅读全文后进行资料提取, 由2位评价员独立完成, 若遇争议则通过第3位评价员介入进行讨论。内容包括: 样本的入选标准和样本量, 分组的方法和过程, 研究对象的基本资料, 研究的场所, 干预的内容, 统计学方法, 结局指标中连续性指标的均数差和标准差, 二分类指标的百分比等。缺乏的资料通过电话或邮件与作者联系进行补充。如果原文中没有报道标准差, 则根据Cochrane Handbook^[14]的方法, 将所提供的可信区间和 t 值转化为标准差值。

统计学处理 采用RevMan5.0软件对资料进行Meta分析。首先通过 χ^2 对同类研究间的异质性进行评价, 若 $P \geq 0.1$, $I^2 \leq 50\%$, 说明研究间具有同质性, 使用固定效应模型进行Meta分析。若 $P < 0.1$, $I^2 > 50\%$, 说明研究间具有异质性, 则对其异质性来源进行分析, 根据可能出现的异质性因素进行亚组分析(如亚组只有一项研究仍采用与Meta分析相同的统计量); 必要时采用敏感性分析来分析检验结果的稳定性, 对因研究方法不同导致的异质性, 进行敏感性分析, 对其进行剔除以评价Meta分析结果的稳定性; 若异质性过大并不能判断其来源则放弃Meta分析改为描述性分析。计数资料采用相对危险度(RR)作为分析统计量, 对连续性资料(腹痛消失时间、炎症因子变化等), 如使用测量工具相同, 则采用加权均数差(WMD)进行分析; 若对相同变量使用不同测量工具, 则采用标准化均数差(SMD)进行分析; 所有分析均计算95%可信区间(CI)。同时采用漏斗图进行发表偏倚的分析(当 $n \geq 9$ 时)。

2 结果

2.1 纳入研究的一般情况 采用Endnote X3排出重复的文献29篇后, 经阅读文题和(或)摘要后剔除明显不符合纳入标准的51篇。然后查找全文, 进行全文阅读后, 进一步提出重复发表和交叉的及不符合纳入标准的文献25篇, 最终纳入16

篇RCT^[16-31], 共894例受试者。纳入研究的一般情况详见表1。

2.2 纳入研究的质量评价 根据Cochrane协助网推荐的偏倚风险评估标准, 纳入的12个研究基线具有可比性, 但均有不同水平的偏倚。(1)在随机分组方面, 11篇^[16,19-20,22-24,26,28-31]均提及“随机”, 但未描述具体的随机方法; 2篇^[18,21]按入院先后顺序随机分配, 1篇^[17]按就诊日期单双日随机分配, 此均为非充分随机; 2篇^[25,27]不清楚是否随机分配, 从文中亦无法判断; (2)所有研究均未描述分配隐藏方案, 从文中亦未能判断; (3)在盲法方面, 由于是急重症患者, 故很难做到患者、干预者的双盲法, 但能做到患者的单盲, 但所有研究均未进行报道, 从文中信息亦无法判断; (4)所有研究均完整的报道了研究结果, 均无选择性报道结果; (5)所有研究因文中描述信息不足, 均无法判断是否有其他来源偏倚(表2)。

2.3 Meta分析结果

2.3.1 临床疗效: 4个研究^[26,29-31]比较了临床疗效(总有效率), 各研究间同质性好($P = 0.38$, $I^2 = 3\%$), 故采用固定效应模型。Meta分析结果表明: 与常规治疗组相比, 加用大承气汤组能提高总有效率1.21倍且差异有统计学意义[RR = 1.21, 95%CI(1.06, 1.37), $P = 0.003$](图1)。

2.3.2 腹痛消失时间: 7个研究^[16,17,21,22,26,29,31]比较了腹痛消失时间(d), 各研究间存在异质性($P < 0.00001$, $I^2 = 85\%$), 探讨其来源可能为测量单位(天或消失)及测量工具的不同所致, 故选择SMD作为合并统计量, 采用随机效应模型合并分析。Meta分析结果表明: 大承气汤组的腹痛消失时间短于对照组[SMD = -1.62, 95%CI(-2.25, -0.99), $P < 0.00001$](图2)。敏感性分析发现分别剔除7项研究, 合并效应量仍都具有统计学意义且森林图结构均未发生改变。

2.3.3 腹胀消失时间: 4个研究^[16,21,29,30]比较了腹胀消失时间(d), 各研究间存在异质性($P < 0.00001$, $I^2 = 92\%$), 探讨其来源可能为测量单位(天或消失)及测量工具的不同所致, 故选择SMD作为合并统计量, 采用随机效应模型合并分析。Meta分析结果表明: 大承气汤组的腹痛消失时间短于对照组[SMD = -1.47, 95%CI(-2.58, -0.36), $P = 0.01$](图3)。敏感性分析发现分别剔除4项研究, 合并效应量仍都具有统计学意义且森林图结构均未发生改变。

2.3.4 白细胞恢复正常时间: 4个研究^[16,21,22,26]比较了白细胞恢复正常时间(d), 各研究间存在异

■相关报道

曲鹏飞等做了中西医结合治疗SAP的Meta分析及中药筛选; 胡石甫等行Meta分析中西医结合治疗SAP较单纯西医治疗有明显优势; 盛颖玥等行Meta分析对大黄治疗SAP较单纯西医治疗有明显优势。

■创新盘点

本文在全面检索和严格评价的基础上, 对大承气汤治疗SAP的RCT进行了Meta分析, 较全面评价了其治疗效果和安全性, 避免了各研究结果的不一致及样本量较小的缺陷, 为合理选用治疗SAP的药物提供循证医学证据。

表 1 纳入RCT的一般情况

纳入研究	n/n	平均年龄 (岁, T/C)	干预措施		测量指标
			T	C	
龙峻标等 ^[16]	34/68	均为51.8	常规治疗+大承气汤 胃管内注入	常规方法治疗	腹痛、腹胀消失时间, 肠鸣音、血白细胞、血AMS恢复正常时间, 大便通下时间; 并发症
彭少华等 ^[17]	24/52	均为39.5	常规治疗+大承气汤 胃管内注入	常规方法治疗	腹痛消失时间, 体征、血尿AMS恢复正常时间; 并发症, 病死率
尹燕华等 ^[18]	35/67	56.3 ± 11.2/ 59.7 ± 10.3	常规治疗+大承气汤 胃管内注入	常规方法治疗	治疗前后血、尿AMS, CRP值; 症状消失时间, 血AMS、血钙恢复正常时间; 住院时间和不良反应
马志杭等 ^[19]	50/86	47 ± 2.01/ 49 ± 2.84	常规治疗+大承气汤 加味胃管内注入	常规方法治疗	治疗前后症状、体征变化; 24 h、3 d、30 d血AMS的变化; 并发症, 病死率
李红玲等 ^[20]	30/60	均为48	常规治疗+大承气汤 加味胃管内注入	常规方法治疗	首次排便时间, 腹膜炎体征消失时间; 平均住院时间、平均医疗费用、手术率、死亡率
孙运萍等 ^[21]	16/32	51.6 ± 11.8/ 51.2 ± 10.9	常规治疗+大承气汤 胃管内注入	常规方法治疗	腹痛、腹胀、上腹压消失时间, 恢复进食时间; WBC、血AMS、尿AMS、CRP恢复正常时间; 并发症、转手术人数、病死及平均住院时间
刘爱云等 ^[22]	28/52	48.6/52.7	常规治疗+大承气汤 保留灌肠	常规方法治疗	腹痛、发热、恶心呕吐消失时间, 血AMS时间, WBC恢复正常时间; 并发症发生率
张立蓉等 ^[23]	47/90	52 ± 16/ 48 ± 14	常规治疗+大承气汤 加味行灌肠和胃管注入同时进行或只行灌肠	常规方法治疗	胃肠减压时间、血AMS恢复正常时间; 住院天数、并发症和病死率
阚存玲等 ^[24]	15/30	均为24-58岁	常规治疗+大承气汤 灌肠	常规方法治疗	住院时间, 并发症, 病死率, 转手术人数
胡国强等 ^[25]	15/30	48.5 ± 15.2/ 46.7 ± 17.3	常规治疗+大承气汤 胃管内注入	常规方法治疗	平均腹围减少量, 平均住院时间, 禁食时间, 肠鸣音恢复时间, 留置胃管时间
陈峭等 ^[26]	18/36	50.2/50.5	常规治疗+大承气汤 加味胃管内注入	常规方法治疗	临床疗效, 治疗前后血AMS、尿AMS、CRP值, 腹痛缓解、体温、血AMS和白细胞恢复正常时间, 不良反应
张文明等 ^[27]	28/60	均为49	常规治疗+大承气汤 胃管内注入	常规方法治疗	首次排便时间, 腹膜炎体征消失时间, 平均住院时间, 平均医疗费用, 转手术率, 死亡率
何梅雅等 ^[28]	25/48	均为37.5	常规治疗+大承气汤 经三腔胃管饲服	常规方法治疗	腹膜炎体征消失时间, 首次排便时间, 血尿AMS恢复正常时间、开始实施肠内营养时间, 住院时间, 住院费用
甘德春等 ^[29]	50/99	43.8 ± 2.94/ 44.5 ± 2.26	常规治疗+大承气汤 灌肠	常规方法治疗	临床疗效, 腹痛、腹胀、心率、呼吸和血AMS恢复正常的时间
孙蓓等 ^[30]	20/42	32-58/ 34-59	常规治疗+大承气汤 胃管鼻饲	常规方法治疗	临床疗效, 首次通便时间, 腹痛、腹胀消失时间, 住院天数, 住院费用
诸葛建成等 ^[31]	21/42	40.2 ± 8.51/ 41.81 ± 8.9	常规治疗+大承气汤 胃管内注入	常规方法治疗	临床疗效, 胃肠减压时间, 腹痛缓解时间, 血AMS恢复正常时间, 住院天数, 并发症及病死率

T: 试验组; C: 对照组.

质性($P < 0.00001$, $I^2 = 92\%$), 探讨其来源可能为测量工具的不同所致, 故选择SMD作为合并统计量, 采用随机效应模型合并分析. Meta分析结果表明: 大承气汤组的白细胞恢复正常时间短

于对照组[SMD = -1.21, 95%CI(-2.20,-0.22), $P = 0.02$](图4). 敏感性分析发现分别剔除4项研究, 合并效应量仍都具有统计学意义且森林图结构均未发生改变.

表 2 纳入研究的方法学质量评价

纳入研究	是否随机分组	分配隐藏	盲法	结果的完整性	无选择性报道结果	无其他偏倚
龙峻标等 ^[16]	提及随机	不清楚	否	是	是	不清楚
彭少华等 ^[17]	就诊日期单双日	不清楚	否	是	是	不清楚
尹燕华等 ^[18]	入院先后顺序	不清楚	否	是	是	不清楚
马志杭等 ^[19]	提及随机	不清楚	否	是	是	不清楚
李红玲等 ^[20]	提及随机	不清楚	否	是	是	不清楚
孙运萍等 ^[21]	入院先后顺序	不清楚	否	是	是	不清楚
刘爱云等 ^[22]	提及随机	不清楚	否	是	是	不清楚
张立蓉等 ^[23]	提及随机	不清楚	否	是	是	不清楚
阚存玲等 ^[24]	提及随机	不清楚	否	是	是	不清楚
胡国强等 ^[25]	不清楚	不清楚	否	是	是	不清楚
陈峤等 ^[26]	提及随机	不清楚	否	是	是	不清楚
张文明等 ^[27]	不清楚	不清楚	否	是	是	不清楚
何梅雅等 ^[28]	提及随机	不清楚	否	是	是	不清楚
甘德春等 ^[29]	提及随机	不清楚	否	是	是	不清楚
孙蓓等 ^[30]	提及随机	不清楚	否	是	是	不清楚
诸葛建成等 ^[31]	提及随机	不清楚	否	是	是	不清楚

■应用要点

本研究表明, 大承气汤结合西医治疗SAP能有效促进各项生命体征和生理指标恢复, 能够缩短患者的住院时间、降低治疗费用, 能够有效降低并发症、病死率和转手术率, 具有良好的应用前景。

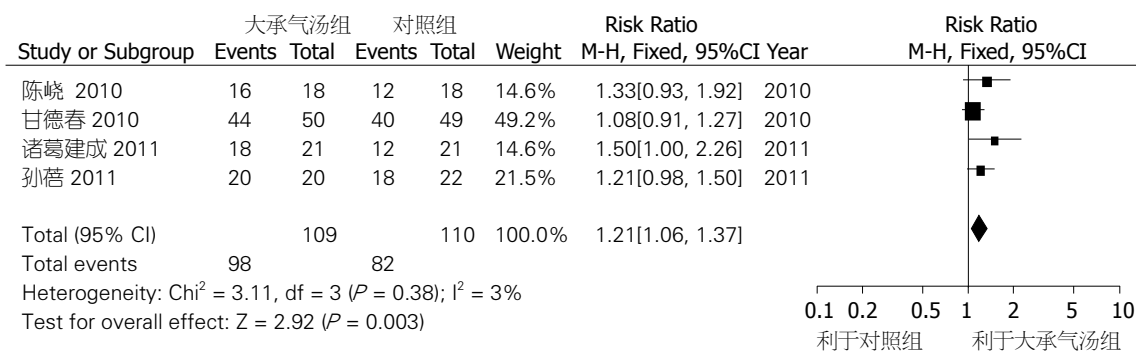


图 1 大承气汤对总有效率的影响。

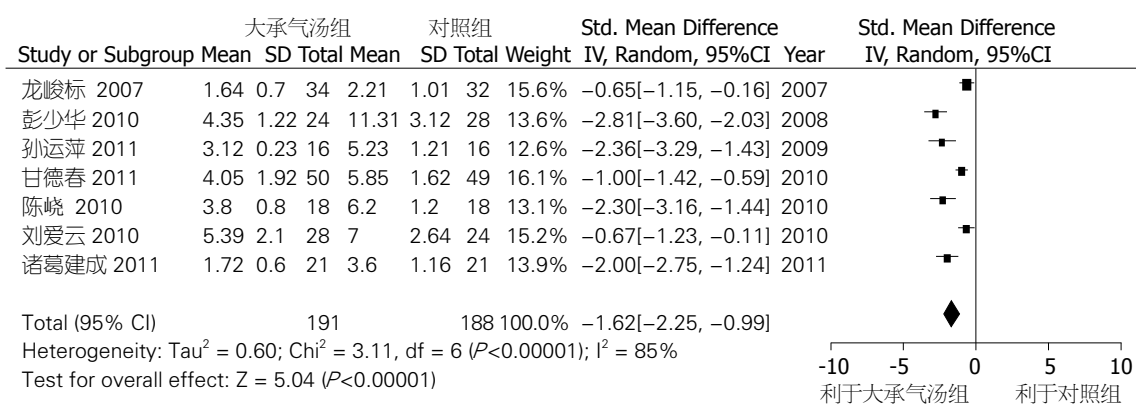


图 2 大承气汤对腹痛消失时间的影响。

2.3.5 血淀粉酶恢复正常时间: 10个研究^[16-18,21-23,26,29,31]

比较了血淀粉酶恢复正常时间(d), 各研究间存在异质性($P < 0.00001$, $I^2 = 92\%$), 探讨其来源可能为测量工具的不同所致, 故选择SMD作为合并统计量, 采用随机效应模型合并分析。Meta

分析结果表明: 大承气汤组的血淀粉酶恢复正常时间短于对照组[SMD = -1.40, 95%CI(-2.05, -0.75), $P < 0.00001$](图5)。漏斗图不对称, 提示有发表偏倚。敏感性分析发现分别剔除11项研究, 合并效应量仍都具有统计学意义且森林图结构

■同行评价

本文选题非常好,对结果的分析也比较客观,本文对临床实践和相关研究具有一定指导意义。

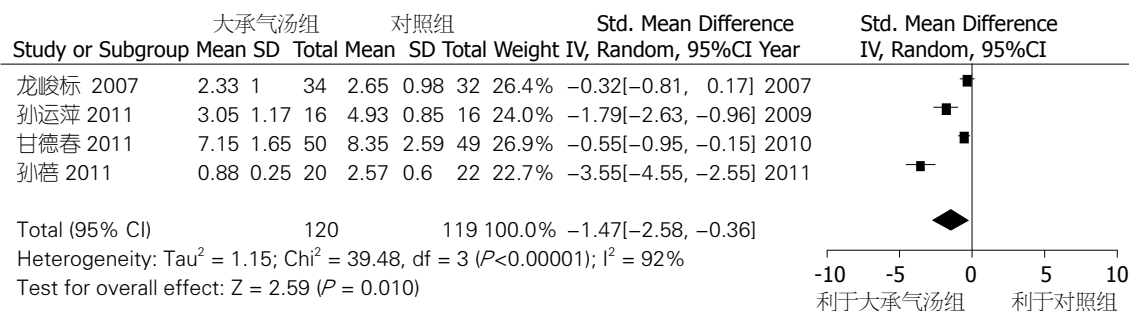


图3 大承气汤对腹胀消失时间的影响。

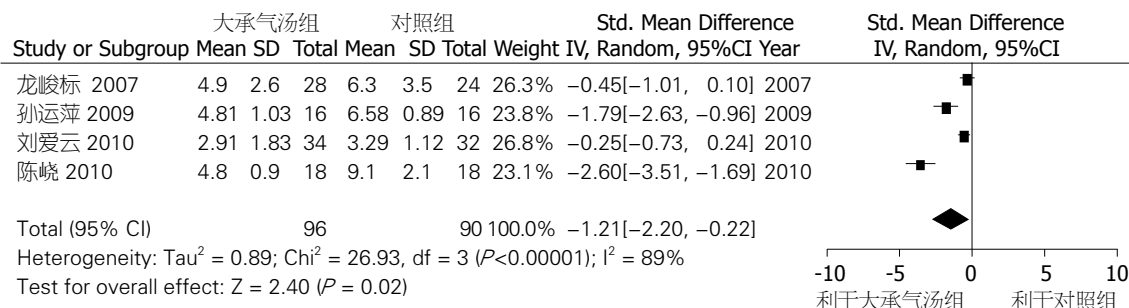


图4 大承气汤对白细胞恢复正常时间的影响。

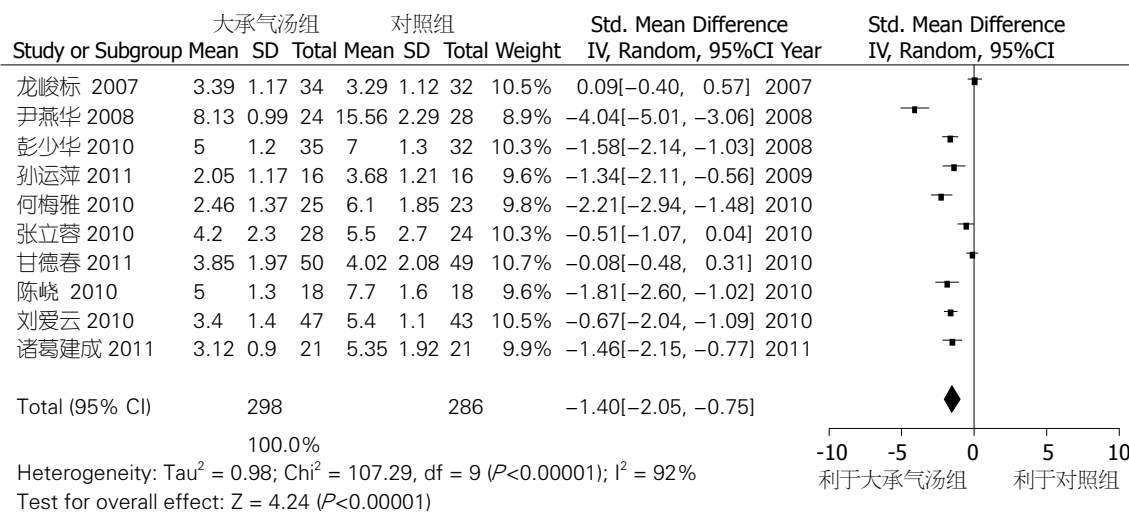


图5 大承气汤对血淀粉酶恢复正常时间的影响。

均未发生改变。

2.3.6 尿淀粉酶恢复正常时间: 3个研究^[17,21,28]比较了尿淀粉酶恢复正常时间(d), 各研究间存在异质性($P = 0.0005$, $I^2 = 87\%$); 剔除可能引起异质性的研究^[17]后, 异质性消失($P = 0.8$, $I^2 = 0\%$), 故采用固定效应模型。Meta分析结果表明: 大承气汤组的尿淀粉酶恢复正常时间明显短于对照组[SMD = -1.84, 95%CI(-2.37, -1.31), $P < 0.00001$](图6)。

2.3.7 腹膜炎体征消失时间: 4个研究^[18,20,27,28]比较了腹膜炎体征消失时间(d), 各研究间存在异

质性($P = 0.0004$, $I^2 = 84\%$); 剔除可能引起异质性的研究^[18]后, 异质性消失($P = 0.31$, $I^2 = 13\%$), 故采用固定效应模型。Meta分析结果表明: 大承气汤组的腹膜炎体征消失时间明显短于对照组[SMD = -1.82, 95%CI(-2.19, -1.46), $P < 0.00001$]。

2.3.8 肠鸣音恢复时间: 2个研究^[16,25]比较了肠鸣音时间(d), 各研究间同质性较好($P = 0.23$, $I^2 = 30\%$), 故采用固定效应模型。Meta分析结果表明: 大承气汤组的肠鸣音恢复时间明显短于对照组[SMD = -1.15, 95%CI(-1.58, -0.71), $P < 0.00001$]。

2.3.9 首次大便时间: 5个研究^[16,20,27,28,30]比较

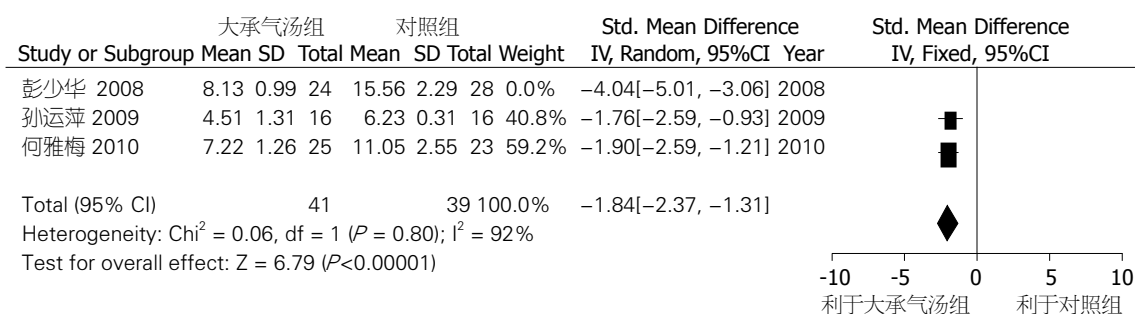


图6 大承气汤对尿淀粉酶恢复正常时间的影响。

了首次大便时间(d), 各研究间存在异质性($P < 0.00001$, $I^2 = 89\%$), 探讨其来源可能为测量工具的不同所致, 故选择SMD作为合并统计量, 采用随机效应模型合并分析。Meta分析结果表明: 大承气汤组的首次大便时间短于对照组[SMD = -2.82, 95%CI(-3.85, -1.79), $P < 0.00001$]. 敏感性分析发现分别剔除11项研究, 合并效应量仍都具有统计学意义且森林图结构均未发生改变。

2.3.10 住院时间: 9个研究^[20,21,23-25,27-28,30,31]比较了住院时间(d), 各研究间存在异质性($P = 0.008$, $I^2 = 62\%$), 探讨其来源可能为测量工具的不同所致, 故选择SMD作为合并统计量, 采用随机效应模型合并分析。Meta分析结果表明: 大承气汤组的腹膜炎体征消失时间明显短于对照组[SMD = -1.82, 95%CI(-2.19, -1.46), $P < 0.00001$]. 漏斗图不对称, 提示有发表偏倚。敏感性分析发现分别剔除9项研究, 合并效应量仍都具有统计学意义且森林图结构均未发生改变。

2.3.11 住院费用: 5个研究^[20,21,27,28,30]比较了住院费用(万元), 各研究间存在异质性($P = 0.07$, $I^2 = 53\%$); 剔除可能引起异质性的研究^[28]后, 异质性消失($P = 0.29$, $I^2 = 21\%$), 故采用固定效应模型。Meta分析结果表明: 大承气汤组的尿淀粉酶住院费用明显低于对照组[SMD = -1.36, 95%CI(-1.67, -1.04), $P < 0.00001$].

2.3.12 并发症: 4个研究^[16,17,21,22]比较了并发症的发生情况, 各研究间同质性好($P = 0.99$, $I^2 = 0\%$), 故采用固定效应模型。Meta分析结果表明: 与常规治疗组相比, 加用大承气汤组能降低52%并发症发生风险且差异有统计学意义[RR = 0.48, 95%CI(0.28, 0.81), $P = 0.006$].

2.3.13 病死率: 9个研究^[17-21,23,24,27,30]比较了病死率的发生情况, 各研究间同质性好($P = 0.94$, $I^2 = 0\%$), 故采用固定效应模型。Meta分析结果表明: 与常规治疗组相比, 加用大承气汤组能降低71%的病死率发生风险且差异有统计学意义

[RR = 0.29, 95%CI(0.15, 0.57), $P = 0.0003$]. 漏斗图不对称, 提示有发表偏倚。

2.3.14 转手术: 6个研究^[18,20,21,24,27,30]比较了转手术的情况, 各研究间同质性好($P = 0.90$, $I^2 = 0\%$), 故采用固定效应模型。Meta分析结果表明: 与常规治疗组相比, 加用大承气汤组能降低82%的转手术发生风险且差异有统计学意义[RR = 0.18, 95%CI(0.07, 0.43), $P = 0.0001$].

3 讨论

危重病患者的胃肠道功能在疾病的发展过程中起着重要的作用, 一旦发生胃肠功能障碍, 导致肠道菌群移位和肠源性内毒素血症, 发生全身炎症反应, 最后引起不可逆性器官功能衰竭^[32,33]。SAP常伴有肠麻痹等胃肠运动功能障碍, 给临床治疗带来很大困难。大承气汤出自张仲景的《伤寒杂病论》, 一般由大黄、芒硝、枳实和厚朴4味中药组成, 具有下瘀血、破坏症瘕积聚、荡涤肠胃、推陈致新等功效, 他不仅能够改善胃肠道缺血, 抑制菌群移位, 减少内毒素的吸收, 而且具有良好的免疫调理功能^[34]。目前应用大承气汤治疗SAP的文献较多, 但只有16篇符合本研究的纳入标准。

现有Meta分析/系统评价结果也显示, 中西医结合治疗SAP具有一定的优势, 能明显降低病死率^[7-9]。本Meta分析对16个RCT的结果显示, 在西医常规治疗的基础上, 加用大承气汤有利于促进生命体征、生理指标、炎症因子的恢复, 能够缩短患者的住院时间、降低治疗费用, 能够有效降低并发症、病死率和转手术率, 各项结局的Meta分析的结果均较稳定。

在14项结局指标中, 敏感性分析发现尿淀粉酶恢复正常时间、腹膜炎体征恢复正常时间和住院费用这3项的Meta分析结果不稳定; 分别剔除这几项结果中的偏倚风险高且权重大的研究后, 异质性消除。总有效率、肠鸣音恢复正常时

间、并发症、病死率和转手术例数这5项结局指标无异质性,不需要行敏感性分析。其他6项结局指标均具有异质性,且无法消除,但敏感性分析其Meta分析结果稳定。

所有纳入研究的方法学质量普遍不高。因是急重症患者很难做到患者、干预者的双盲法,所以在进行偏倚风险来源分析时,对患者和医生或治疗师实施盲法均选择为“否”。在随机分配序列的产生方面,除了3篇^[17-18,21]能够判断为假随机选择“否”外,其余均无法判定是否为真随机,故选择“不清楚”。分配隐藏均未报道,因假随机亦可分配隐藏,故均选择为“不清楚”。所有研究均完整报道了研究结果,均无选择性报道结果,故这两项均选择“是”。所有研究因文中描述信息不足以判断是否有其他来源偏倚,所以均选择为“不清楚”。

由于Meta分析为二次研究,其论证强度受到诸多因素的影响,因此存在一定的局限性:(1)16篇研究的质量普遍不高;(2)所有研究均为国内研究,影响了分析结果的外推性;(3)纳入研究均未提及治疗过程中大承气汤的不良反应,无法进行安全性分析;(4)纳入研究存在发表偏倚,且样本量较小;(5)尽管纳入研究均为重要结局指标,但均为主观指标,而无客观指标(如APARCH II评分等);(6)纳入研究对SAP的病因鲜有提及,故无法对不同病因进行亚组分析;(7)尽管各纳入研究的诊断标准均符合纳入文献相应时期中华医学会胰腺病学组的诊断标准^[11-13],但各个时期的标准有所差异。

加用大承气汤优于单独常规西医治疗,为当前SAP的治疗提供了一种新的手段,在临床上具有良好的应用前景。但由于本Meta分析纳入的研究均未报道治疗过程中的不良反应且质量不高,因此,对于大承气汤的不良反应及其中何种药物对SAP产生何种作用,尚待更高质量的临床研究进行深入研究,以便进行推广应用。

4 参考文献

- Toouli J, Brooke-Smith M, Bassi C, Carr-Locke D, Telford J, Freeny P, Imrie C, Tandon R. Guidelines for the management of acute pancreatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17 Suppl: S15-S39
- Beger HG, Rau BM. Severe acute pancreatitis: Clinical course and management. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 5043-5051
- Karakan T, Ergun M, Dogan I, Cindoruk M, Unal S. Comparison of early enteral nutrition in severe acute pancreatitis with prebiotic fiber supplementation versus standard enteral solution: a prospective randomized double-blind study. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 2733-2737
- Mitchell RM, Byrne MF, Baillie J. Pancreatitis. *Lancet* 2003; 361: 1447-1455
- Cavallini G, Frulloni L, Bassi C, Gabbriellini A, Castoldi L, Costamagna G, De Rai P, Di Carlo V, Falconi M, Pezzilli R, Uomo G. Prospective multicentre survey on acute pancreatitis in Italy (ProInf-AISP): results on 1005 patients. *Dig Liver Dis* 2004; 36: 205-211
- Swaroop VS, Chari ST, Clain JE. Severe acute pancreatitis. *JAMA* 2004; 291: 2865-2868
- 胡石甫, 陈凌, 崔乃强. 重症急性胰腺炎中西医结合与西医治疗效果荟萃分析. *中国现代普外科进展* 2008; 11: 24-28
- 曲鹏飞, 崔强. 中西医结合治疗重症急性胰腺炎病死率的Meta分析及中药筛选. *江苏中医药* 2008; 40: 76-77
- 盛颖玥, 邹晓平, 于成功. 中药大黄辅助治疗重症急性胰腺炎的系统评价. *世界华人消化杂志* 2010; 18: 730-735
- Tang JL, Zhan SY, Ernst E. Review of randomised controlled trials of traditional Chinese medicine. *BMJ* 1999; 319: 160-161
- 中华医学会外科学会胰腺外科学组. 急性胰腺炎的临床诊断及分级标准(1996年第二次方案). *中华肝胆外科杂志* 1997; 35: 773-775
- 中华医学会外科学会胰腺外科学组. 重症急性胰腺炎诊治草案. *中华外科杂志* 2002; 8: 110-111
- 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
- Higgins JPT, Green S (editors). *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions* Version 5.0.2 [updated September 2009]. The Cochrane Collaboration, 2009
- Egger M, Smith GD. Bias in location and selection of studies. *BMJ* 1998; 316: 61-66
- 龙峻标, 李爱芳, 于淑霞. 中西医结合治疗急性胰腺炎的临床观察. *北京医学* 2007; 29: 696
- 彭少华, 陈婷. 中西医结合治疗重症急性胰腺炎的临床观察. *时珍国医国药* 2008; 19: 696
- 尹燕华. 中西医结合治疗急性重症胰腺炎的疗效观察. *现代中西医结合杂志* 2008; 17: 3624-3625
- 马志杭. 中西医结合治疗重症急性胰腺炎50例. *浙江中医杂志* 2008; 43: 706-707
- 李红玲. 大承气汤治疗重症胰腺炎并发麻痹性肠梗阻30例. *陕西中医* 2008; 29: 1127-1128
- 孙运萍. 大承气汤对重症急性胰腺炎细胞因子TNF- α 、IL-6、IL-8、PAF的影响. *实用中西医结合临床* 2009; 9: 1-4
- 刘爱云. 大承气汤灌肠治疗急性重症胰腺炎的观察及护理. *中国实用神经疾病杂志* 2010; 13: 50-51
- 张立蓉, 庄肃. 大承气汤加味治疗急性重症胰腺炎的临床观察. *医学理论与实践* 2010; 23: 135-137
- 阙存玲, 周文华, 武彦荣. 大承气汤治疗重症急性胰腺炎15例. *现代中西医结合杂志* 2010; 19: 481
- 胡国强, 向阳. 大承气汤对急性重症胰腺炎胃肠功能的影响. *医药论坛杂志* 2010; 31: 105-107
- 陈晓, 吴立松, 张京岚. 大承气汤加味治疗急性重症胰腺炎36例. *中国实验方剂学杂志* 2010; 16: 212-214
- 张文明. 急性重症胰腺炎并发症治疗分析. *临床医学* 2010; 30: 52-53
- 何梅雅. 经三腔胃管饲服大承气汤在治疗重症胰腺炎中的作用. *浙江中医药大学学报* 2010; 34: 700-701
- 甘德春. 中药灌肠、鼻饲治疗重症急性胰腺炎150例疗效观察. *临床合理用药* 2010; 3: 14-15
- 孙蓓, 顾庆华. 中西医结合治疗急性重症胰腺炎20例. *中国中医急症* 2011; 20: 668
- 诸葛建成. 中西医结合治疗重症急性胰腺炎21例. 中

- 国中医急症 2011; 20: 671
- 32 Deitch EA. The role of intestinal barrier failure and bacterial translocation in the development of systemic infection and multiple organ failure. *Arch Surg* 1990; 125: 403-404
- 33 Nieuwenhuijs VB, Verheem A, van Duijvenbode-Beumer H, Visser MR, Verhoef J, Gooszen HG, Akkermans LM. The role of interdigestive small bowel motility in the regulation of gut microflora, bacterial overgrowth, and bacterial translocation in rats. *Ann Surg* 1998; 228: 188-193
- 34 崔克亮, 曹书华, 王今达. 大承气汤对多器官功能障碍综合征防治作用的临床研究. *中国中西医结合急救杂志* 2003; 10: 14

编辑 李军亮 电编 闫晋利

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审核, 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, 包括原创文章、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)

谷氨酰胺在腹部术后肠梗阻患者保守治疗中的意义

牛志军, 张谢夫, 赵春临, 刘涛, 翟二涛

■背景资料

肠梗阻是腹部外科手术后常见的并发症, 发病后由于较长时间禁食使机体内谷氨酰胺含量相对或绝对缺乏, 大量液体丢失致循环血量不足, 肠管扩张及肠壁水肿致肠黏膜缺血, 肠屏障功能遭到破坏, 继而引起一系列全身性病理生理改变。

牛志军, 张谢夫, 赵春临, 刘涛, 翟二涛, 郑州大学第一附属医院胃肠外科 河南省郑州市 450052

作者贡献分布: 此研究由牛志军、刘涛及张谢夫设计; 血样采集由牛志军与翟二涛操作完成; 数据整理分析及论文写作由牛志军、刘涛、赵春临及张谢夫完成。

通讯作者: 张谢夫, 教授, 450052, 河南省郑州市, 郑州大学第一附属医院胃肠外科. zhangxiefu@medmail.com.cn

收稿日期: 2011-09-27 修回日期: 2011-11-20

接受日期: 2011-12-18 在线出版日期: 2011-12-28

Value of glutamine in conservative treatment of patients with intestinal obstruction after abdominal operation

Zhi-Jun Niu, Xie-Fu Zhang, Chun-Lin Zhao, Tao Liu, Er-Tao Zhai

Zhi-Jun Niu, Xie-Fu Zhang, Chun-Lin Zhao, Tao Liu, Er-Tao Zhai, Department of Gastrointestinal Surgery, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China

Correspondence to: Xie-Fu Zhang, Professor, Department of Gastrointestinal Surgery, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China. zhangxiefu@medmail.com.cn

Received: 2011-09-27 Revised: 2011-11-20

Accepted: 2011-12-18 Published online: 2011-12-28

Abstract

AIM: To evaluate the value of glutamine in conservative treatment of patients with intestinal obstruction after abdominal operation.

METHODS: Fifty-eight patients with intestinal obstruction after abdominal operation were randomly divided into control group and treatment group. The control group received conventional treatment, including fasting, gastrointestinal decompression, maintenance of water electrolyte and acid-base balance, use of antibiotics, somatostatin, and total parenteral nutrition, while the treatment group received glutamine on the basis of conventional treatment. All patients' bowel function was evaluated using a scoring system. Peripheral blood samples were collected to measure the levels of D-lactic acid and intestinal fatty acid-binding protein (IFABP). The time to recovery of intestinal function was recorded.

■同行评议者

刘连新, 教授, 哈尔滨医科大学第一临床医学院

RESULTS: A positive correlation was found between D-lactic acid levels and gut dysfunction scores, and between IFABP levels and gut dysfunction scores ($r = 0.824$, $r = 0.891$, both $P < 0.001$). In both groups, blood levels of D-lactic acid and IFABP decreased significantly with the prolongation of treatment duration, which was more significant in the treatment group than in the control group. The time to recovery of intestinal function was significantly shorter in the treatment group than in the control group (6.83 ± 1.49 d vs 8.76 ± 1.53 d, $P < 0.001$).

CONCLUSION: Glutamine plays an important role in protecting gut barrier function, reducing the intestinal mucous membrane permeability, and promoting bowel function recovery in patients with intestinal obstruction after abdominal operation.

Key Words: Glutamine; Intestinal obstruction; Gut barrier; D-lactic acid; Intestinal fatty acid-binding protein

Niu ZJ, Zhang XF, Zhao CL, Liu T, Zhai ET. Value of glutamine in conservative treatment of patients with intestinal obstruction after abdominal operation. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(36): 3714-3718

摘要

目的: 探讨谷氨酰胺(Glutamine, Gln)在腹部术后肠梗阻患者保守治疗中保护肠黏膜屏障的作用。

方法: 将收治的58例有腹部手术史且临床诊断为肠梗阻的患者随机分为对照组与治疗组。对照组给予常规治疗: 禁食、持续胃肠减压、维持水电解质和酸碱平衡、应用抗生素、生长抑素和全胃肠外营养(TPN)等; 治疗组在上述常规治疗的基础上, 给予Gln强化的TPN。治疗前对所有患者进行胃肠功能障碍评分, 比较两组患者治疗前、治疗4 d、治疗8 d、治疗12 d后血清D-乳酸浓度、肠脂脂肪酸结合蛋白(IFABP)水平, 记录患者肠道功能恢复时间(d), 采用Pearson相关、重复测量资料的方差分析及

两独立样本均数比较 t 检验进行统计学分析。

结果: 肠梗阻患者外周血中D-乳酸浓度、IFABP水平与肠功能障碍评分值呈正相关($r = 0.824, r = 0.891$, 均 $P < 0.001$); 随治疗时间延长, 治疗组与对照组患者血清D-乳酸、IFABP水平均呈下降趋势, 治疗组下降趋势更明显; 治疗组肠道功能恢复时间短于对照组($6.83 \text{ d} \pm 1.49 \text{ d}$ vs $8.76 \text{ d} \pm 1.53 \text{ d}$), 差异有统计学意义($P < 0.001$)。

结论: 在腹部术后肠梗阻患者的常规治疗基础上应用Gln能保护肠黏膜屏障功能, 降低肠黏膜通透性, 促进肠道功能恢复。

关键词: 谷氨酰胺; 肠梗阻; 肠黏膜屏障; D-乳酸; 肠脂肪酸结合蛋白

牛志军, 张谢夫, 赵春临, 刘涛, 翟二涛. 谷氨酰胺在腹部术后肠梗阻患者保守治疗中的意义. 世界华人消化杂志 2011; 19(36): 3714-3718

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/3714.asp>

0 引言

谷氨酰胺在人体游离氨基酸池中含量极为丰富, 众多文献报道已证实谷氨酰胺的缺乏可使肠黏膜绒毛稀疏缩短, 肠屏障功能下降, 肠黏膜的通透性增加, 外周血中D-乳酸和肠脂肪酸结合蛋白(intestinal fatty acid binding protein, IFABP)水平增高。肠梗阻是腹部外科手术后常见的并发症, 发病后由于较长时间禁食使体内谷氨酰胺含量相对或绝对缺乏, 大量液体丢失致循环血量不足, 肠管扩张及肠壁水肿致肠黏膜缺血, 肠屏障功能遭到破坏, 继而引起一系列全身性病理生理改变。本研究旨在探讨补充外源性谷氨酰胺对肠梗阻患者肠黏膜屏障功能的影响, 为肠梗阻治疗中应用谷氨酰胺提供临床依据。

1 材料和方法

1.1 材料 以郑州大学第一附属医院胃肠外科2010-05/2011-10收治的有腹部手术史且临床诊断为肠梗阻的58例患者为研究对象, 患者年龄分布为32-75岁, 将其随机分成对照组和治疗组。对照组29例, 其中男性患者15例, 女性患者14例; 治疗组29例, 其中男性患者17例, 女性患者12例。58例肠梗阻患者中, 胃癌根治术后25例, 对照组中14例, 治疗组中11例; 结肠癌根治术后18例, 对照组中8例, 治疗组中10例; 直肠癌根治术后9例, 对照组4例, 治疗组5例; 小肠间质瘤术后3例,

表 1 肠梗阻患者肠功能评分表(分)

评分因素	评分	评分因素	评分
禁食水	2	肠鸣音消失	2
胃肠减压	1	腹痛	2
$\leq 400 \text{ ml}$	1	腹胀	2
$400 \text{ ml} - 800 \text{ ml}$	2	腹部X线平片	
$\geq 800 \text{ ml}$	3	液平面 ≤ 3 个	1
胆汁反流	2	液平面 > 3 个	2
肠鸣音减弱	1		

肠功能障碍分级: 0分为正常; 1-4分为轻度; 5-9分为中度; > 9 分为重度。

对照组中2例, 治疗组中1例; 胆囊切除术后2例, 入治疗组; 阑尾周围脓肿术后1例, 入对照组。本研究经我院道德伦理委员会批准, 所有参与者均知情同意。

1.2 方法

1.2.1 治疗: 对照组给予常规治疗, 包括禁食、持续胃肠减压、维持水电解质和酸碱平衡、应用抗生素、生长抑素和全胃肠外营养; 治疗组在常规治疗的基础上, 应用谷氨酰胺强化的全胃肠外营养。本研究采用的全胃肠外营养液制剂及配比: (1)非蛋白热量根据病情按25-30 kcal/(kg·d)供给, 由5%或10%葡萄糖和20%中长链脂肪乳(力能)提供, 糖脂供能比2:1; (2)氮量的提供按0.20-0.25 g/(kg·d)。对照组由8.5%乐凡命注射液提供; 治疗组由8.5%乐凡命+丙氨酰谷氨酰胺(力肽)提供, 其中力肽提供0.4 g/(kg·d)。

1.2.2 指标检测: 入院时对所有患者肠功能障碍进行评分(表1), 并进行肠功能障碍分级: 0分为正常; 1-4分为轻度; 5-9分为中度; > 9 分为重度。所有患者治疗前肠功能障碍评分值 8.57 ± 3.39 分。每天早晨07:00-07:30采集患者外周血标本, 分别于治疗前、治疗4 d、治疗8 d、治疗12 d检测患者外周血中D-乳酸(平均 $58.01 \text{ mg/L} \pm 12.40 \text{ mg/L}$)和IFABP水平(平均 $162.43 \text{ } \mu\text{g/L} \pm 14.21 \text{ } \mu\text{g/L}$), 血清中D-乳酸水平采用UV-2102C型紫外可见分光光度计检测, 血清中IFABP水平采用美国ADL公司的ELISA试剂盒测定; 记录两组患者肠功能恢复时间(d)。本研究中同时满足以下条件视为肠功能恢复: (1)听诊肠鸣音3-4次/分; (2)腹壁柔软, 腹胀、腹痛症状消失; (3)腹部立位平片证实液平消失; (4)24 h胃肠减压持续引流量 $\leq 200 \text{ mL}$, 胃液清亮, 不含胆汁。

统计学处理 应用SPSS15.0软件进行统计学分析, 数据采用 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示, 应用Pearson相

■ 研发前沿

血清D-乳酸、IFABP水平是反映肠缺血和肠道屏障功能较为敏感的指标, 近年来对D-乳酸、IFABP水平与肠功能障碍相关性研究越来越多, 但其特异性有待进一步研究。

■创新盘点

之前发表的文章多为单独研究D-乳酸或者IFABP, 本研究将2个指标同时检测, 比较2种指标与肠功能障碍的相关性大小, 且在统计方法上利用作图趋势分析, 结果比较直观, 一目了然。

表 2 两组患者血清中肠黏膜通透性指标的比较 (mean \pm SD)

血清学测量指标		治疗前	治疗4 d	治疗8 d	治疗12 d
D-乳酸(mg/L)	治疗组	55.67 \pm 12.24	47.42 \pm 11.28	38.04 \pm 9.71	25.05 \pm 6.46
	对照组	60.35 \pm 12.32	56.76 \pm 11.35	51.85 \pm 9.49	46.09 \pm 7.72
IFABP(μ g/L)	治疗组	156.63 \pm 13.27	137.68 \pm 14.34	112.91 \pm 12.11	85.31 \pm 10.09
	对照组	168.23 \pm 12.86	163.78 \pm 13.37	156.96 \pm 11.91	149.96 \pm 10.60

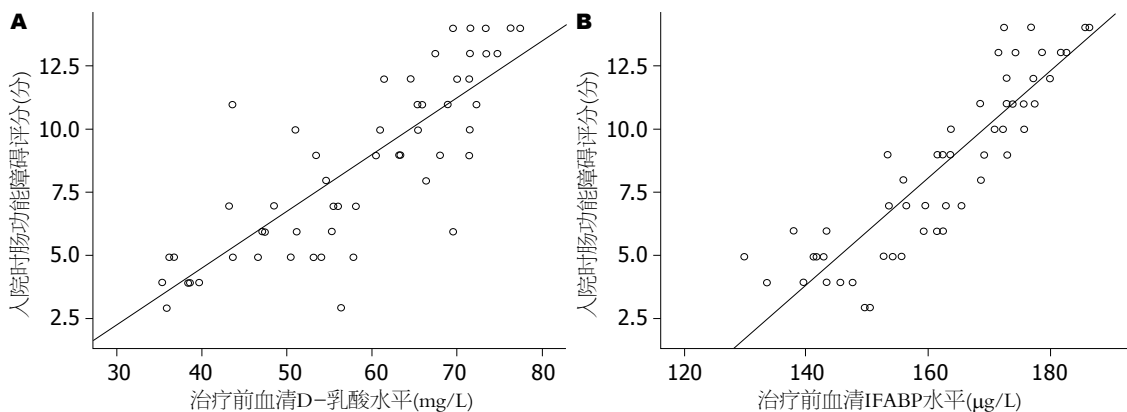


图 1 治疗前血清D-乳酸水平及IFABP水平与入院时肠功能障碍评分相关曲线. A: 血清D-乳酸水平; B: 血清IFABP水平.

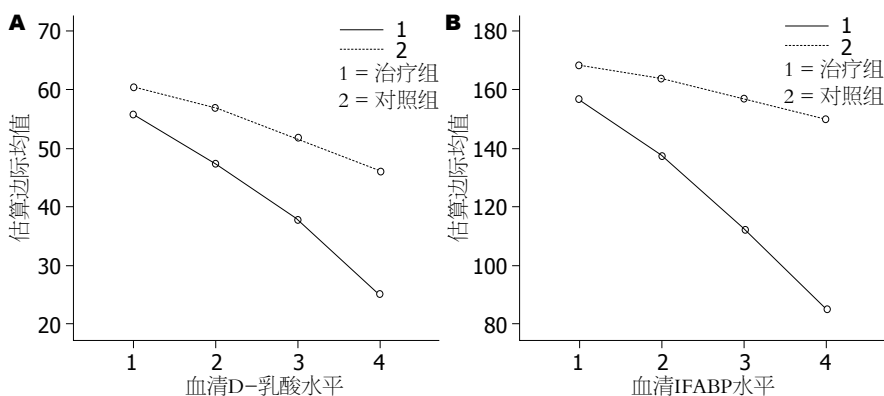


图 2 治疗组与对照组患者血清D-乳酸水平和IFABP水平的变化趋势图. A: 血清D-乳酸水平; B: 血清IFABP水平.

关、重复测量资料的方差分析及两独立样本均数比较 t 检验方法进行分析. $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 D-乳酸水平、IFABP水平与肠功能评分值的相关性 将治疗前所有患者血清中D-乳酸水平、IFABP水平与肠功能障碍评分值作相关性分析, 血清D-乳酸水平与肠功能障碍评分值呈正相关($r = 0.824$, $P < 0.001$, 图1A); 血清IFABP水平与肠功能障碍评分值亦呈正相关($r = 0.891$, $P < 0.001$, 图1B).

2.2 两组患者外周血中肠黏膜通透性指标的比较 该资料不满足重复测量资料方差分析的球形

检验, 且处理效应与时间效应存在交互作用, 本研究通过绘图作趋势分析进行统计推断(表2).

2.2.1 两组患者外周血中D-乳酸水平的比较: 治疗组与对照组患者外周血中D-乳酸水平随治疗时间的延长而下降($F = 275.35$, $P < 0.001$), 治疗组患者外周血中D-乳酸下降水平较同期对照组患者显著, 差异有统计学意义($F = 35.74$, $P < 0.001$, 图2A).

2.2.2 两组患者外周血中IFABP水平的比较: 治疗组与对照组患者外周血中IFABP水平随治疗时间的延长而下降($F = 614.52$, $P < 0.001$), 治疗组患者外周血中IFABP水平较同期对照组患者下降显著, 差异有统计学意义($F = 213.42$, $P < 0.001$, 图2B).

2.3 两组患者肠功能恢复时间的比较 治疗组患者肠功能恢复平均时间为 6.83 ± 1.49 d, 对照组患者肠功能恢复平均时间为 8.76 ± 1.53 d. 治疗组患者肠功能恢复平均时间短于对照组, 差异有统计学意义($t = 4.87, g = 56, P < 0.001$).

3 讨论

Gln在人体游离氨基酸池中含量丰富, 约占血浆游离氨基酸总量的50%, 供应肠道所需能量的70%以上, 而葡萄糖所供能量则不足20%. 众多文献报道证实Gln是肠黏膜上皮细胞代谢、更新的必须营养物质, 能改善各种病理状态下肠黏膜的生长修复, 保护和维持肠黏膜屏障功能, 降低肠黏膜通透性^[1,2], 促进肠功能恢复. Wischmeyer等^[3]通过双盲对照研究发现, 给予烧伤患者补充Gln后, 可明显减轻烧伤引起的肠通透性增加, 并减少革兰阴性杆菌菌血症的发生率. Gln减轻肠黏膜损伤的机制可能是: (1)Gln参与葡萄糖三羧酸循环氧化生成ATP功能, 并参与黏膜细胞核酸及蛋白质合成代谢, 促进肠黏膜细胞的更新和再生, 保持其超微结构的完整性; (2)可能刺激机体产生高血糖素, 增加萎缩肠黏膜中谷氨酰胺酶活性, 以改善自身组织结构^[4,5].

D-乳酸是L(+)乳酸的立体异构式, 他是肠道内多种细菌的酵解产物, 人体内不产生且缺乏其代谢酶, 肾脏对其清除率也很低, 故D-乳酸可以在机体内积聚. 当肠黏膜屏障遭到破坏, 其通透性增加, D-乳酸易于通过受损肠黏膜进入循环系统, 并在血液中蓄积, 通过检测外周血中D-乳酸水平可以间接评估肠黏膜损伤情况^[6,7], 我们观察了58例腹部术后肠梗阻的患者, 并检测了其外周血中D-乳酸水平变化, 发现患者外周血中D-乳酸水平随常规治疗时间延长而逐渐降低, 这在应用了谷氨酰胺的治疗组患者中表现更为明显, 我们还发现患者治疗前外周血中D-乳酸水平与入院时肠功能障碍评分值呈良好正相关性($r_{D-乳酸} = 0.824$), 与Sun等^[8]的研究结果相符合.

IFABP是一组低分子量(约15 kDa)胞液蛋白, 主要位于小肠黏膜微绒毛尖端, 由于肠绒毛处血流为逆流交换机制, 在肠缺血早期时, 顶端的氧分压明显下降, 导致肠绒毛顶端细胞的通透性增加, 胞内的IFABP外释经门静脉和乳糜管入血, 导致血液中IFABP水平明显增高, 故IFABP可以更直接反映肠黏膜的损伤情

况. 本研究中58例腹部术后肠梗阻患者的外周血中IFABP水平同样随常规治疗时间延长而逐渐降低, 应用谷氨酰胺的治疗组患者外周血IFABP水平下降更明显. 另外, 患者治疗前外周血IFABP水平与入院时肠功能障碍评分亦呈明显正相关($r_{IFABP} = 0.891$), 且 $r_{IFABP} > r_{D-乳酸}$, 这可能与IFABP更能直接反映肠黏膜细胞损伤有关^[7,9,10]. 另外也与D-乳酸容易受肠道感染、手术、应激等其他因素影响有关^[11]. 对照组患者外周血D-乳酸浓度和IFABP水平也有下降趋势可能是肠梗阻患者经常规治疗后肠黏膜血供改善, 肠屏障功能恢复, 肠黏膜通透性下降所致^[12].

我们还分别记录了治疗组与对照组患者肠功能恢复时间, 经统计发现治疗组患者的肠功能恢复平均时间明显短于对照组患者. 因此我们认为在腹部术后肠梗阻患者的保守治疗中, 补充外源性谷氨酰胺能够保护和维持肠黏膜屏障功能, 降低其通透性, 促进肠功能恢复.

4 参考文献

- 1 dos Santos RG, Viana ML, Generoso SV, Arantes RE, Davisson Correia MI, Cardoso VN. Glutamine supplementation decreases intestinal permeability and preserves gut mucosa integrity in an experimental mouse model. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2010; 34: 408-413
- 2 Wu GH, Wang H, Zhang YW, Wu ZH, Wu ZG. Glutamine supplemented parenteral nutrition prevents intestinal ischemia-reperfusion injury in rats. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2592-2594
- 3 Wischmeyer PE, Lynch J, Liedel J, Wolfson R, Riehm J, Gottlieb L, Kahana M. Glutamine administration reduces Gram-negative bacteremia in severely burned patients: a prospective, randomized, double-blind trial versus isonitrogenous control. *Crit Care Med* 2001; 29: 2075-2080
- 4 Zhang WB, Jiang HP. [Intestinal mucosal barrier dysfunction after abdominal operation and its clinical significance]. *Nanfang Yike Daxue Xuebao* 2009; 29: 246-249
- 5 沈通一, 秦环龙. 谷氨酰胺对肠屏障功能保护作用的研究进展. *肠外与肠内营养* 2003; 10: 177-180
- 6 Evennett NJ, Petrov MS, Mittal A, Windsor JA. Systematic review and pooled estimates for the diagnostic accuracy of serological markers for intestinal ischemia. *World J Surg* 2009; 33: 1374-1383
- 7 Block T, Nilsson TK, Björck M, Acosta S. Diagnostic accuracy of plasma biomarkers for intestinal ischaemia. *Scand J Clin Lab Invest* 2008; 68: 242-248
- 8 Sun XQ, Fu XB, Zhang R, Lu Y, Deng Q, Jiang XG, Sheng ZY. Relationship between plasma D(-)-lactate and intestinal damage after severe injuries in rats. *World J Gastroenterol* 2001; 7: 555-558
- 9 潘利雅, 王新颖, 李宁, 黎介寿. 肠脂肪酸结合蛋白在重症急性胰腺炎诊断中的应用. *肠外与肠内营养* 2010; 17: 134-137

■同行评价

该文章总体设计合理, 实验方法可靠, 统计方法应用正确, 实验结果可信, 有一定的实用性.

- 10 胡凯强, 李健, 崔彦北, 石正峰, 席红卫. 肠脂肪酸结合蛋白在小儿肠缺血疾病中的临床意义. 山西医药杂志 2010; 39: 418-419
- 11 柳勤龙, 田晓峰, 张雪梅. D-乳酸在急性肠缺血早期诊断中的价值. 中华实验外科杂志 2004; 21: 497
- 12 彭明生, 黄显凯, 聂海, 朱渝军. 严重多发伤患者血浆肠脂肪酸结合蛋白水平变化及其与胃肠功能障碍的关系. 中国急救医学 2007; 27: 878-880

编辑 曹丽鸥 电编 闫晋利

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 •

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

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

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

(总编辑: 马连生2011-05-30)

健康人群1 3681例行超声检查发现肝脏疾病2 846例

祖 洋, 孙志英

祖洋, 孙志英, 中国人民解放军第306医院超声影像科 北京市 100101

作者贡献分布: 祖洋负责资料的总结分析和论文撰写; 孙志英负责论文总体设计并指导论文撰写。

通讯作者: 祖洋, 100101, 北京市, 中国人民解放军第306医院超声影像科. zuyang1981@sohu.com

收稿日期: 2011-09-30 修回日期: 2011-12-15

接受日期: 2011-12-18 在线出版日期: 2011-12-28

Liver diseases revealed by ultrasonic examination: 2 846 cases in 13 681 healthy individuals

Yang Zu, Zhi-Ying Sun

Yang Zu, Zhi-Ying Sun, Department of Ultrasonic Diagnosis, the 306th Hospital of Chinese PLA, Beijing 100101, China
Correspondence to: Yang Zu, Department of Ultrasonic Diagnosis, the 306th Hospital of Chinese PLA, Beijing 100101, China. zuyang1981@sohu.com
Received: 2011-09-30 Revised: 2011-12-15
Accepted: 2011-12-18 Published online: 2011-12-28

Abstract

AIM: To investigate the incidence of liver diseases in a healthy population in order to enhance their awareness of health care.

METHODS: The ultrasonic images obtained during a physical examination for 13 681 persons over 35 years of age were retrospectively reviewed.

RESULTS: The incidences of main liver diseases found in this population were as follows: fatty liver (6.43%), gallbladder stone (6.27%), gallbladder polyps (3.78%), hepatic cyst (2.33%), liver cirrhosis (1.07%), hemangiomas (0.84%), liver cancer (0.07%), and other disease (8.80%).

CONCLUSION: Common liver diseases, even early-stage cancer, could be found by ultrasonic examination in a population for healthy examination. Ultrasound is easily performed and represents a non-invasive and fast procedure for screening of liver diseases.

Key Words: Ultrasound; Preventive intervention;

Liver disease

Zu Y, Sun ZY. Liver diseases revealed by ultrasonic examination: 2 846 cases in 13 681 healthy individuals. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(36): 3719-3721

摘要

目的: 探讨超声检查在健康人群体检中发现肝脏疾病的意义。

方法: 回顾性分析某单位35岁以上健康人群1 3681例在健康体检中肝脏超声检查结果。超声检查采用全身彩色多普勒超声诊断仪, 受检者应空腹8 h以上, 检查腹部(如肝脏、胆囊、胰腺); 取不同体位对各脏器进行多切面检查, 发现阳性所见, 停帧、测量、存图。

结果: 参检群体1 3681例发现肝脏疾病2 846例, 主要疾病患病率以脂肪肝疾病居首位(6.43%), 其次为胆囊结石(6.27%)、胆囊息肉(3.78%)、肝囊肿(2.33%)、肝硬化(1.07%)、肝血管瘤(0.84%)、肝癌(0.07%), 而其他疾病为1 204例、占8.80%。

结论: 健康人群超声检查可发现肝脏的一些常见病及隐匿性肝脏的恶性肿瘤, 为临床治疗提供最佳时机。超声检查具有简便、无创伤、快速及筛选等功能, 作为肝脏体检的必检项目有意义。

关键词: 超声; 健康体检; 肝脏疾病

祖洋, 孙志英. 健康人群1 3681例行超声检查发现肝脏疾病2 846例. *世界华人消化杂志* 2011; 19(36): 3719-3721
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/3719.asp>

0 引言

随着人民物质生活水平的提高, 健康体检逐渐成为门诊工作的重要内容^[1]。为了解中年以上健康人群身体状况, 增强普通人群的自我保健意识, 从而预防和减少疾病的发生, 提高生活质量, 本研究回顾性分析2009-01-01/2010-12-31在我院超声科进行超声检查的13 681例健康人群的

■背景资料

随着年龄的增大, 肝脏疾病发病率呈上升趋势, 这一现象符合年龄对疾病的影响。年龄越大, 暴露于危险因素的时间越长, 受不良生活方式因素作用的时间也越长, 相对危险度也增大。

■同行评议者

党双锁, 教授, 西安交通大学第二医院感染科

■研究前沿

钱林学等人的研究成果表明,只要按照超声检查操作规程进行,就能及时发现异常病例,如超声诊断胆囊结石,及早发现许多不被人们重视的常见病、多发病,为患者临床治疗和选择手术时机争得时间。

表 1 中老年1 3681例体检超声检出疾病的性别和年龄分布

检出疾病	n	检出率(%)	性别		年龄(岁)			
			男	女	35-40	41-60	61-80	>80
脂肪肝	880	6.43	561	319	86	418	302	74
肝囊肿	319	2.33	128	191	5	85	152	77
肝血管瘤	115	0.84	58	57	3	31	42	39
肝硬化	147	1.07	100	47	28	58	32	29
肝癌	10	0.07	9	1	0	2	5	3
胆囊结石	858	6.27	322	536	13	399	358	88
胆囊息肉	517	3.78	278	239	18	305	111	83
其他	1204	8.80	562	642	57	289	563	295

体检结果。

1 材料和方法

1.1 材料 2009-01-01/2010-12-31中国人民解放军第306医院超声科进行体检的中年以上健康人群1 3681例,其中男性7 760例,女性5921例;年龄35-92岁,平均58岁。35-40岁2 398例,占17.53%;41-60岁4709例,占34.42%;61-80岁5 993例,占43.81%;80岁以上581例,占4.25%。

1.2 方法 采用全身彩色多普勒超声诊断仪(PHILIPS-iU22型,飞利浦公司,荷兰),探头频率3.5-5.5 MHz。检查腹部(如肝脏、胆囊、胰腺)。受检者应空腹8 h以上;而检查泌尿、生殖系统时,饮水使膀胱适度充盈。取不同体位对各脏器进行多切面检查,发现阳性所见,停帧、测量、存图。

2 结果

健康体检人群1 3681例中超声检查发现有各种不同病变者4 050例,检出率为29.60%,其中,男性2 068例,占51.06%。女性1 982例,占48.94%。检出疾病如下:脂肪肝、肝癌、肝囊肿、肝血管瘤、胆囊结石、胆囊息肉、肾囊肿、肾结石等(表1)。

3 讨论

随着年龄的增大,肝脏疾病发病率呈上升趋势,这一现象符合年龄对疾病的影响^[2]。年龄越大,暴露于危险因素的时间越长,受不良生活方式因素作用的时间也越长,相对危险度也增大^[3]。另外随着年龄增大,机体器官功能逐渐老化,抗病能力减弱,故表现为随着年龄的增加慢性病患病率增高^[4]。而且在患病总人数上来看,有些疾病呈现十分明显的性别差异。此外,随着生活水平的提高,社会生活方式的变化,饮食结构的合理性等问题的存在,在中年人群中患脂肪肝、肝硬化等疾病有不断增多的现象,应该

引起我们的注意。

本组资料显示脂肪肝的检出率(6.43%)居榜首,脂肪肝多因过量饮酒、肥胖、蛋白质缺乏、慢性肝病、药物性作用等引起的肝细胞内脂肪堆积。脂肪肝发病率男性明显高于女性。胆囊结石检出率较高(6.27%),可能与人们生活水平提高,高蛋白、高胆固醇、高热量类饮食摄入较多有关^[5]。胆囊结石女性略高于男性,原因尚未明了,这可能与女性更易患胆道感染,加之长期高蛋白、高热量、高脂肪膳食使体内胆固醇增加或肝脏合成胆固醇量增多使胆汁中胆固醇过饱和,及早餐不能及时进食,使胆汁在胆囊中滞留时间过长有关。另外由于一般多无明显症状,仅于健康检查时偶然被发现,很可能被忽视,使有些需要治疗的患者错失最佳时机,这提醒我们,尤其是中年人,应定期做健康体检。同时注意饮食搭配,加强体育运动。肾结石检出率为3.06%,肾结石由饮食中摄入过多可形成结石的成分引起。目前超声检查仍是诊断胆、肾结石的首选方法。胆囊息肉检出率为3.78%,超声能对大多数胆囊息肉作出定性诊断,超声可清晰显示病变的大小、形态、部位,并能动态观察其变化。肝囊肿是一个良性病理化过程,超声显像诊断较容易,且优于其他的图像诊断法,超声对肾囊肿的检出在各种影像诊断方法中占领先地位^[6]。超声可动态观察肝、肾囊肿变化,当囊肿增大到50 mm以上,将会影响肾脏功能,可行超声引导下囊肿穿刺治疗术。超声检查也能早期发现无症状的恶性病变,本组检出原发性肝癌10例,位于肝右叶,大小约35 mm×32 mm,其周围可见声晕,彩色多普勒超声显像(color doppler flow imaging, CDFI)可见动脉血流信号。10例恶性肿瘤均经MRI、CT及手术后病理证实,由于早期发现,所以为患者治疗提供最佳时机。

■应用要点

进行超声检查能早期发现无症状的恶性病变,检出原发性肝癌,其周围可见声晕,彩色多普勒超声显像可见动脉血流信号,为临床治疗提供最佳时机。并具有简便、无创伤、快速及筛选等功能,且可及早发现,为患者治疗提供最佳时机。

使患者得到了及时的治疗. 由此可见B超作为健康查体的基本项目, 对于早期发现实质脏器的疾病具有重要临床诊断价值, 同时其具有简便、无创伤、快速及筛选等功能, 无不良反应^[7-9].

许多疾病如脂肪肝、前列腺增生、子宫肌瘤等, 疾病早期无症状, 只是在例行健康体检时偶然被发现的. 超声检查具有无痛苦、无创伤、方便、可以动态观察病情的特点, 只要严格按照操作规程进行, 就能及时发现异常病例, 如超声诊断胆囊结石, 一般诊断准确率可达95%左右, 及早发现许多不被人们重视的常见病、多发病, 从而为患者临床治疗和选择手术时机争得时间. 因此, 定期进行超声检查仍不失为一种行之有效的选择.

4 参考文献

- 1 范建高. 中国脂肪肝的研究. 世界华人消化杂志 2001; 9: 6-10
- 2 肖春华, 李久益, 金明华. 腹部超声在健康体检中的应用. 云南医药 2005; 26: 35-36
- 3 力晓容, 易易, 冯昌棋. 四川省城乡居民慢性病患病调查. 预防医学情报杂志 2005; 21: 139-142
- 4 王旭辉, 张元林, 谭龙. 743例老年人超声健康体检分析. 宁夏医学杂志 2009; 31: 1225
- 5 昌倩, 肖恩华. 高场磁共振在脂肪肝诊断和脂肪分级中的研究进展. 世界华人消化杂志 2010; 18: 3874-3880
- 6 胡向东, 钱林学. 肝脏疾病弹性成像研究进展. 世界华人消化杂志 2010; 18: 472-478
- 7 冯彦红, 钱林学, 胡向东. 肝纤维化及早期肝硬化的超声研究进展. 世界华人消化杂志 2010; 18: 454-461
- 8 杨钧, 靳二虎, 马大庆. 肝脏磁共振成像的临床应用现状. 世界华人消化杂志 2010; 18: 467-471
- 9 钱林学, 刘玉江, 丁惠国. 小肝癌的影像学诊断进展. 世界华人消化杂志 2010; 18: 479-486

■同行评价

本文报道超声在健康体检中的应用, 对同行有一定的参考价值.

编辑 李军亮 电编 闫晋利

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)所有作者均审读过该文并同意发表, 所有作者均符合作者条件, 所有作者均同意该文代表其真实研究成果, 保证文责自负; (4)列出通讯作者的姓名、地址、电话、传真和电子邮件; 通讯作者应负责与其他作者联系, 修改并最终审核复核稿; (5)列出作者贡献分布; (6)来稿应附有作者工作单位的推荐信, 保证无泄密, 如果是几个单位合作的论文, 则需要提供所有参与单位的推荐信; (7)愿将印刷版和电子版版权转让给本刊编辑部.

2 稿件修改

来稿经同行专家审查后, 认为内容需要修改、补充或删节时, 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.