

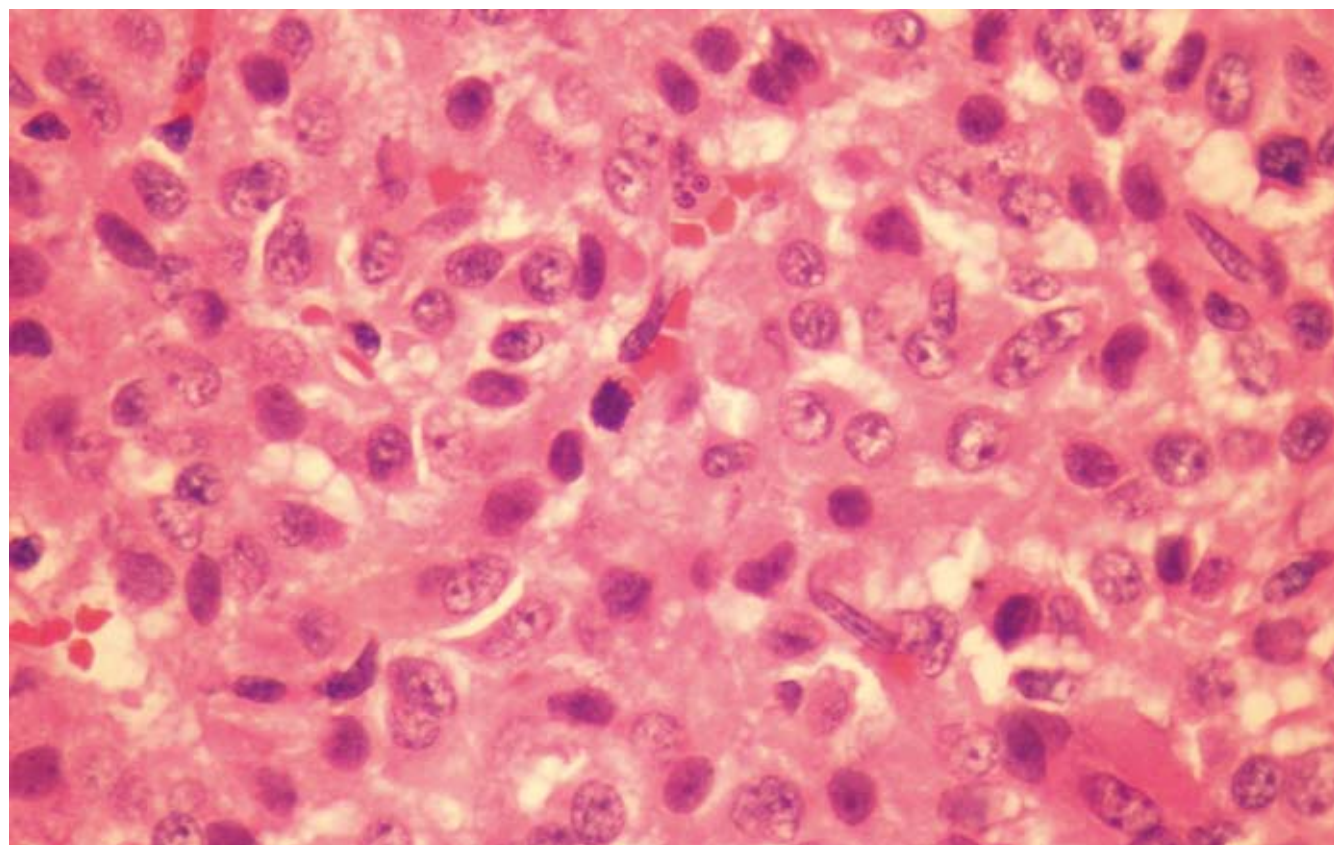
ISSN 1009-3079 (print)
ISSN 2219-2859 (online)
CN 14-1260/R

世界华人消化杂志®

**WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY**

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2011 年 9 月 18 日 第 19 卷 第 26 期 (Volume 19 Number 26)



26/2011

ISSN 1009-3079



9 771009 307056

名誉总编辑

潘伯荣

总编辑

马连生

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

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ● 2011年9月18日 第19卷 第26期 (总第358期)

述 评

2703 VEGF与消化系肿瘤关系的研究新进展

张芸, 赵晶, 杜雅莉

基 础 研 究

2709 食管鳞癌细胞KYSE-70的分化诱导对光动力学应答敏感性的抑制

孙蕾, 李懿, 石雨, 刘喜龙, 杨观瑞, 赵立群, 杨小静, 袁一兵, 张亚冰, 汲翔, 康巧珍, 汲振余

2717 瑞香狼毒药效组分对裸鼠肝癌移植瘤的抑制及其机制

潘国凤, 杨庆, 刘安, 朱晓新

2723 胆管疤痕相关因子在梗阻型胆管损伤后不同时间段的表达

黄强, 刘臣海, 王成, 胡元国, 邱陆军, 汤志刚, 王士堂, 林先盛, 王世杰, 谢放

2730 真核绿色荧光蛋白表达载体pEGFP-C1/PAK-1的构建及其在结直肠癌SW480细胞内的表达

武金宝, 党彤, 陈学清, 张振书, 张宏权, 宋于刚

临 床 研 究

2735 mTOR与JNK信号通路在人结肠癌HT-29细胞中的作用及相互关系

张志永, 张谢夫

文 献 综 述

2741 炎症免疫与功能性胃肠病

张丽, 陈明锴, 邓琴

2746 胃癌腹膜转移治疗的研究进展

赵璐, 赵爱光

2752 PD-1/PD-L1信号通路在乙型病毒性肝炎免疫调节作用的研究进展

周长彬, 李智伟

2760 细胞因子与肝纤维化及肝纤维化患者的营养支持治疗原则

靳雪源, 丛涛, 赵平

研 究 快 报

2768 胃旁路术对GK大鼠糖代谢影响及其与Ghrelin的关系

曹超, 曾荣, 张鹏, 周晓磊, 尤胜义

临 床 经 验

2772 食管癌放射治疗85例

刘文其, 康敏, 袁堃

2777 替比夫定治疗慢性乙型肝炎疗效的系统评价

杨声坪, 李婧媛, 张鹏, 袁金秋, 刘雅莉

2786 ERCP联合胆道微结石检测对明确特发性急性胰腺炎病因的价值

叶小峰, 张中平, 张丽霞, 刘鹏军, 丁红英

2790 胰岛素样生长因子对克罗恩病患者的临床意义

余强, 陆忠凯

2794 Carney三联征临床病理分析1例

王蔚, 赖日权, 陈晓东, 王卓才, 崔华娟, 陈敬文

附 录	2798 《世界华人消化杂志》投稿须知 2803 2011年国内国际会议预告
志 谢	2804 志谢世界华人消化杂志编委
消 息	2716 《世界华人消化杂志》出版流程 2722 《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》 2745 招聘生物医学编辑部主任 2751 《世界华人消化杂志》修回稿须知 2759 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 2767 中国科技信息研究所发布《世界华人消化杂志》影响因子0.625 2789 WJG总被引频次排名位于第174名 2793 WJG成功通过评审被PMC收录 2797 《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》
封面故事	王蔚, 赖日权, 陈晓东, 王卓才, 崔华娟, 陈敬文. Carney三联征临床病理分析1例. 世界华人消化杂志 2011; 19(26): 2794-2797 http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2794.asp
本期责任人	编务 周媛; 送审编辑 李军亮; 组版编辑 何基才; 英文编辑 王天奇; 责任编辑 李军亮; 审核编辑 李军亮; 形式规范 马连生

<p>世界华人消化杂志</p> <p>Shijie Huaren Xiaohua Zazhi</p> <p>吴阶平 题写封面刊名 陈可冀 题写版权刊名 (旬刊)</p> <p>创 刊 1993-01-15 改 刊 1998-01-25 出 版 2011-09-18 原刊名 新消化病学杂志</p> <p>名誉总编辑 潘伯荣 总 编 辑 马连生 编辑部主任 李军亮</p> <p>期 刊 名 称 世界华人消化杂志 主 管 单 位 山西省科学技术厅 主 办 单 位 太原消化病研治中心</p>	<p>编辑 世界华人消化杂志编辑委员会 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com</p> <p>出版 世界华人消化杂志编辑部 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com</p> <p>印刷 北京科信印刷厂</p> <p>发行 国内: 北京报刊发行局 国外: 中国国际图书贸易总公司 (100044, 北京市399信箱)</p> <p>订购 全国各地邮电局</p> <p>邮购 世界华人消化杂志编辑部 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com</p>	<p>世界华人消化杂志是一份同行评议性的旬刊, 是一份被《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊.《世界华人消化杂志》的英文摘要被美国《化学文摘》, 荷兰《医学文摘库/医学文摘》和俄罗斯《文摘杂志》收录.</p> <p>世界华人消化杂志正式开通了在线办公系统(http://www.baishideng.com/wcjd/ch/index.aspx), 所有办公流程一律可以在线进行, 包括投稿、审稿、编辑、审读, 以及作者、读者、编者之间的信息反馈交流.</p> <p>特别声明 本刊刊出的所有文章不代表本刊编辑部和本刊编委会的观点, 除非特别声明. 本刊如有印装质量问题, 请向本刊编辑部调换.</p> <p>2011年版权归世界华人消化杂志所有</p>
<p>中国标准连续出版物号 ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) 邮发代号 国外代号 国内定价 广告经营许可证 CN 14-1260/R 82-262 M 4481 每期56.00元 全年2016.00元 1401004000050</p> <p>www.wjgnet.com</p>		

World Chinese Journal of Digestology

September 2011 Contents in Brief Volume 19 Number 26

EDITORIAL	<p>2703 Progress in understanding the relationship between vascular endothelial growth factor and digestive tumors <i>Zhang Y, Zhao J, Du YJ</i></p>
BASIC RESEARCH	<p>2709 Photodynamic sensitivity of esophageal cancer KYSE-70 cells is attenuated by all-trans retinoic acid-induced differentiation <i>Sun L, Li Y, Shi Y, Liu XL, Yang GR, Zhao LQ, Yang XJ, Qiu YB, Zhang YB, Ji X, Kang QZ, Ji ZY</i></p> <p>2717 Antitumor activity of active components alignment isolated from <i>Stellera chamaejasme</i> L. in nude mice bearing subcutaneous BEL-7402 hepatoma <i>Pan GF, Yang Q, Liu A, Zhu XX</i></p> <p>2723 Temporal expression of scar formation-related factors in obstructive bile duct injury <i>Huang Q, Liu CH, Wang C, Hu YG, Qiu LJ, Tang ZG, Wang ST, Lin XS, Wang SJ, Xie F</i></p> <p>2730 Construction of a eukaryotic green fluorescent protein expression vector carrying the PAK-1 gene (pEGFP-C1/PAK1) and its expression in SW480 cells <i>Wu JB, Dang T, Chen XQ, Zhang ZS, Zhang HQ, Song YG</i></p>
CLINICAL RESEARCH	<p>2735 Interaction and relationship between mTOR and JNK signal pathways in human colon cancer cell line HT-29 <i>Zhang ZY, Zhang XF</i></p>
REVIEW	<p>2741 Inflammation, immunity and functional gastrointestinal disorders <i>Zhang L, Chen MK, Deng Q</i></p> <p>2746 Advances in the treatment of peritoneal metastasis of gastric cancer <i>Zhao L, Zhao AG</i></p> <p>2752 Progress in understanding the role of PD-1/PD-L1 signaling pathway in the immunoregulation of HBV infection <i>Zhou CB, Li ZW</i></p> <p>2760 Cytokines, liver fibrosis, and principles of nutritional support in patients with liver fibrosis <i>Jin XY, Cong T, Zhao P</i></p>
RAPID COMMUNICATION	<p>2768 Gastric bypass surgery improves glucose metabolism possibly by decreasing ghrelin levels in Goto-Kakizaki rats <i>Cao C, Zeng R, Zhang P, Zhou XL, You SY</i></p>
CLINICAL PRACTICE	<p>2772 Prognosis of patients with esophageal carcinoma after radiotherapy: an analysis of 85 cases <i>Liu WQ, Kang M, Yuan K</i></p> <p>2777 Efficacy of telbivudine for chronic hepatitis B: a systematic review <i>Yang SP, Li JY, Zhang P, Yuan JQ, Liu YL</i></p> <p>2786 ERCP combined with detection of biliary microlithiasis in the diagnosis of idiopathic acute pancreatitis <i>Ye XF, Zhang ZP, Zhang LX, Liu PJ, Ding HY</i></p> <p>2790 Clinical significance of peripheral blood levels of insulin-like growth factor in patients with Crohn's disease <i>Yu Q, Lu ZK</i></p>

	2794 Carney triad: a clinicopathological analysis of one case and review of the literature <i>Wang W, Lai RQ, Chen XD, Wang ZC, Cui HJ, Chen JW</i>
APPENDIX	2798 Instructions to authors of World Chinese Journal of Digestology 2803 Meeting events calendar in 2011
ACKNOWLEDGMENT	2804 Acknowledgments to reviewers of World Chinese Journal of Digestology
COVER	<i>Wang W, Lai RQ, Chen XD, Wang ZC, Cui HJ, Chen JW</i> . Carney triad: a clinicopathological analysis of one case and review of the literature. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2011; 19(26): 2794-2797 http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2794.asp
RESPONSIBLE EDITORS FOR THIS ISSUE	Assistant Editor: <i>Yuan Zhou</i> Review Editor: <i>Jun-Liang Li</i> Electronic Page Editor: <i>Ji-Cai He</i> English Language Editor: <i>Tian-Qi Wang</i> Editor-in-Charge: <i>Jun-Liang Li</i> Proof Editor: <i>Jun-Liang Li</i> Layout Editor: <i>Lian-Sheng Ma</i>

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

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

Founded on January 15, 1993
Renamed on January 25, 1998
Publication date September 18, 2011

NAME OF JOURNAL

World Chinese Journal of Digestology

RESPONSIBLE INSTITUTION

Department of Science and Technology
of Shanxi Province

SPONSOR

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

EDITING

Editorial Board of *World Chinese Journal of Digestology*, 77 Shuangta Xijie, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China
Telephone: +86-351-4078656
E-mail: wjgd@wjgnet.com

PRINTING

Beijing Kexin Printing House

PUBLISHING

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

OVERSEAS DISTRIBUTOR

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

HONORARY EDITOR-IN-CHIEF

Bo-Rong Pan

EDITOR-IN-CHIEF

Lian-Sheng Ma

SCIENCE EDITORS

Director: Jun-Liang Li

SUBSCRIPTION

RMB 56 Yuan for each issue
RMB 2016 Yuan for one year

CSSN

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

COPYRIGHT

© 2011 Published by *WCJD*. All rights reserved; no part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise without the prior permission of *WCJD*. Authors are required to grant *WCJD* an exclusive licence to publish.

SPECIAL STATEMENT

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

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

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

Copyright © 2011 by Editorial Department of *World Chinese Journal of Digestology*

VEGF与消化系肿瘤关系的研究新进展

张芸, 赵晶, 杜雅菊

张芸, 赵晶, 杜雅菊, 哈尔滨医科大学附属第二医院消化内科, 黑龙江省哈尔滨市 150086
杜雅菊, 教授, 医学博士, 主要从事消化系肿瘤的临床和基础研究。
黑龙江省卫生厅科研课题基金资助项目, No. 2009-115
作者贡献分布: 本文综述由张芸、赵晶完成; 杜雅菊审校。
通讯作者: 杜雅菊, 教授, 主任医师, 150086, 黑龙江省哈尔滨市南岗区保健路148号, 哈尔滨医科大学附属第二医院消化内科。
duyaju@medmail.com.cn
电话: 0451-86605143
收稿日期: 2011-04-27 修回日期: 2011-06-21
接受日期: 2011-06-28 在线出版日期: 2011-09-18

Progress in understanding the relationship between vascular endothelial growth factor and digestive tumors

Yun Zhang, Jing Zhao, Ya-Ju Du

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

Correspondence to: Ya-Ju Du, Professor, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, 148 BaoJian Road, Nangang District, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China. duyaju@medmail.com.cn

Received: 2011-04-27 Revised: 2011-06-21

Accepted: 2011-06-28 Published online: 2011-09-18

Abstract

Digestive tumors account for a large portion of human malignancies, and their incidence and mortality are on the rise. Neovascularization plays a critical role in the metastasis of tumors. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is one of the best characterized angiogenic regulators. There is close relationship between VEGF and tumor growth, invasion and metastasis. VEGF has become a research hot for diagnosis, targeted therapy and prognosis of tumors. The purpose of this review is to review the recent progress in understanding the relationship between VEGF and digestive tumors.

Key Words: Vascular endothelial growth factor; Digestive tumors; Invasion

Zhang Y, Zhao J, Du YJ. Progress in understanding the relationship between vascular endothelial growth factor

and digestive tumors. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(26): 2703-2708

摘要

消化系肿瘤在人类恶性肿瘤中占相当大的比例, 其发病率和死亡率呈逐年上升的趋势。新生血管形成很大程度上决定了肿瘤细胞能否转移, 血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是最具特征性的血管新生调节因子, 与肿瘤的生长、浸润、转移关系密切, 已成为肿瘤诊断、抗肿瘤血管生成靶向治疗以及预后判断的研究热点。本文就VEGF与消化系肿瘤关系研究新进展做一综述。

关键词: 血管内皮生长因子; 消化系肿瘤; 浸润

张芸, 赵晶, 杜雅菊. VEGF与消化系肿瘤关系的研究新进展. 世界华人消化杂志 2011; 19(26): 2703-2708
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2703.asp>

0 引言

血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是1989年初Ferrara等^[1]在体外培养牛垂体滤泡星状细胞时分离纯化出来的, 通过与血管内皮上的相应受体(vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR)结合促进内皮细胞增殖, 同时可增加血管通透性使内皮细胞迁移, 诱导肿瘤血管生成, 维持肿瘤的继续生长。VEGF是目前发现的活性和专属性最强的血管生成因子^[2]。

1 VEGF概述

1.1 VEGF特征 VEGF是由2条相同多肽链通过二硫键组成的二聚体蛋白, 相对分子质量为46 000 Da。人类VEGF基因由8个外显子和7个内含子构成, 可编码5种亚型: VEGF121、145、165、189、206, 人体内以VEGF165表达为主, 不同亚型在不同部位发挥不同的作用, 因为不同部位的微环境对他们有不同的影响^[3]。除VEGF外, 还发现一些与VEGF结构、功能相似的多肽, 包括VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、

■背景资料

消化系肿瘤在人类恶性肿瘤中占相当大的比例, 其发病率和死亡率呈逐年上升的趋势。新生血管形成很大程度上决定了肿瘤细胞能否转移, 血管内皮生长因子(VEGF)是最具特征性的血管新生调节因子, 与肿瘤的生长、浸润、转移关系密切, 已成为肿瘤诊断、抗肿瘤血管生成靶向治疗及预后判断的研究热点。

■同行评议者

李勇, 副教授, 上海中医药大学附属中医医院消化科; 马欣, 主任医师, 甘肃省人民医院消化科

■ 研发前沿

本文主要研究 VEGF 与消化系统肿瘤发生发展及治疗的关系,但是 VEGF 与其他血管形成相关的生长因子的关系及 VEGF 的具体信号传导通路尚不明确,亟待进一步研究。

VEGF-E 及胎盘生长因子(placenta growth factor, PIGF), 组成了 VEGF 家族, 其中 VEGF-C 被认为与淋巴结转移密切相关^[4]。

1.2 VEGF 受体 为受体型酪氨酸激酶, 包括 VEGFR-1(fms 样酪氨酸激酶, Flt-1), VEGFR-2、KDR/FIR-1(激酶结构域受体/胎肝激酶受体-1)、Flt-4 以及近年发现的内皮细胞表面球蛋白 NRP-1^[5]。VEGFR 主要存在于血管内皮细胞(vascular endothelial cells, VEC), 在造血干细胞、巨噬细胞、单核细胞、血小板、卵巢癌细胞和黑色素瘤细胞上也有表达, 这些细胞中只有 VEC 对 VEGF 反应强烈^[6]。Flt-1 主要存在于人胎盘和血管内皮细胞, KDR/FIR-1 可表达于所有内皮细胞, Flt-4 在成人仅表达于淋巴管内皮细胞膜, 其中以 KDR/FIR-1 为主传递增殖信号^[7]。VEGF 与定位于血管内皮细胞表面的特异性受体结合后, 促进内皮细胞增殖、游走、血管腔的形成及血管通透性的增加^[8]。

1.3 VEGF 功能

1.3.1 促进血管内皮细胞增殖: VEGF 作为特异性的血管内皮细胞分裂素, 能够刺激体外的血管内皮细胞发生有丝分裂和迁移, 以及体内血管的形成, 目前已经确定的能促进内皮细胞增殖的主要是 VEGF-A121 和 VEGF-A165。Moreira 等^[9]对结肠癌的研究过程中发现, VEGF 高水平表达, 并与其受体结合, 促进血管内皮细胞的有丝分裂, 从而促进肿瘤血管的新生。

1.3.2 增加血管通透性: VEGF 可以增加血管的通透性, 尤其是微小血管的通透性, 引起血浆蛋白渗漏到细胞外基质, 为肿瘤细胞的生长和新生毛细血管网的建立提供营养。

1.3.3 促进血管支持物的生成: VEGF 能诱导内皮细胞表达尿激酶型纤溶酶原激活因子(uPA)、组织型纤溶酶原激活因子(tPA)及尿激酶型纤溶酶原激活因子受体(u PAR)等, 从而促使渗透到血管外区域的血浆蛋白形成血浆蛋白凝块, 作为血管新生的支持物。

1.3.4 抑制肿瘤细胞凋亡: 有实验证明^[10] VEGF 阳性肿瘤细胞的增生与对照组差异无统计学意义, 但凋亡细胞的数目明显下降, 而且 NOS(一氧化氮合酶)活性也增强^[11]。

2 VEGF 与消化系统肿瘤

2.1 食管癌 中国是食管癌的高发国家, 食管癌具有早期浸润和转移的特点。Cavazzola 等^[12]用免疫组织化学法检测到食管腺癌标本 VEGF 阳性

率是 46.8%, Verbeke 等^[13]用相同的方法检测到食管鳞癌标本 VEGF 阳性率为 69%, Takala 等^[14]也证实食管腺癌和鳞癌中 VEGF 阳性表达率不同, 并证实 VEGF 与食管癌的浸润深度有关; Lu 等^[15]曾报道 VEGF 的表达情况与食管癌的分化程度、浸润深度及 TNM 分期有关; Yang 等^[16]研究发现 VEGF 高度表达导致 CD80 表达下降, 导致免疫系统功能障碍, 从而使食管癌细胞逃离免疫监视, 促进食管癌的进展; Nakatani 等^[17]用 RT-PCR 法测定食管梭形细胞癌 HN-Eso-1 细胞系 VEGF-A、VEGF-C、VEGF-D 和 VEGFR-1, VEGFR-2 的表达情况, 结果发现 VEGF-A、VEGF-C、VEGF-D 和 VEGFR-1, VEGFR-2 表达与细胞自分泌有关, 并且 VEGF 高度表达使食管癌细胞在抗肿瘤治疗中脱逃; 后一观点同样得到 Gholamin 等^[18]的证实; Naumnik 等^[19]用免疫组织化学法检测食管癌标本 VEGF-C、VEGF-D 的表达情况, 结果发现 VEGF-C 和 VEGF-D 高度表达与淋巴转移有关, 尤其 VEGF-C 表达水平可作为预测食管癌淋巴结转移独立的危险因子, 对局限性进展期食管癌患者, 即使曾行食管切除术, VEGF-C 和 VEGF-D 过表达也提示预后不良。有学者^[20]应用分子成像技术, 对胃镜检查提示为食管不典型增生者的表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、人表皮生长因子-2(human epidermal growth factor receptor 2, HER-2)和 VEGF 进行探查, 以评估不同患者的基因表达谱, 实时监控患者对治疗的反映性, 这种技术突破了目前检测手段的限制, 为食管癌的个性化治疗奠定了基础。

2.2 胃癌 胃癌是我国最常见的恶性肿瘤之一, 在癌症病死率中排列第 2 位, 如何通过检测胃癌患者某些体液因子的表达来早期诊断、评估预后并制订个体化治疗方案尤为重要。Lieto 等^[21]发现胃癌组织中 VEGF 阳性率为 48%, 且发现经手术治疗的患者 VEGF 的含量与患者生存时间高度相关, 比肿瘤 TNM 分级更能准确地反映患者预后; Yang 等^[22]研究结果表明处于 T3-T4 期、有血管浸润、淋巴结转移、肝脏和腹膜转移的胃癌患者 VEGF 阳性率显著高于 T1-T2 期、无血管浸润、淋巴结、肝脏和腹膜转移者, VEGF 高度表达者肿瘤血管形成更活跃, 5 年生存率更低, 同时提出 VEGF 可作为判断胃癌的预后生物学指标, 并可作为治疗胃癌的新靶点。Deguchi 等^[23]证实 VEGF-C 和 VEGF-D 在胃癌组织中阳性表达率分别是 88% 和 63%, VEGF-C 表达在淋巴结转移分期 Ly+N- 期显著高于 Ly-N+ 期, 并指出 VEGF-C

和VEGF-D在胃癌早期的淋巴道转移有重要作用, VEGF-D主要通过自分泌和旁分泌机制促进肿瘤血管、淋巴管的形成, 并促进肿瘤细胞增殖, 抑制肿瘤细胞凋亡^[25]; Han等^[24]也证实胃癌组织中VEGF-C表达高于正常组织, 阳性率是54.9%, 其中淋巴结转移患者VEGF-C表达显著高于无淋巴结转移者; Zhou等^[26]用PCR-PFLP法分析VEGF的基因多态性, (包括VEGF-634 G/C, VEGF+936 C/T和VEGF+1612 G/A), 发现在胃癌患者中VEGF+1612AA基因型表达显著高于对照组, 而贲门癌患者VEGF+1612AA基因型表达低于非贲门癌者, Laurens分型为弥漫型的胃癌者1612AA基因型表达显著高于肠型者, 而VEGF-634 G/C, VEGF+936 C/T基因多形性与胃癌的发生、发展无关, 从而证实VEGF +1612 G/A基因多形性可能是汉族中国人胃癌发生的高危因素, 并提出基因型的差异与地域和胃癌的Lauren's分型关系密切. 有学者^[27]证实抗血管内皮生长因子受体-2抗体“IMC-1121B”在胃癌治疗中将有广泛的前景, 还有研究指出^[28], VEGF-A在弥漫性胃癌中的促进血管形成作用更显著, 并提出以VEGF-A为靶点的治疗方法对弥漫性胃癌更有效, 而对局限性胃癌效果甚微.

2.3 肝癌 原发性肝癌是我国常见的恶性肿瘤之一, 其病死率在消化系统肿瘤中居第3位, 仅次于胃癌和食管癌, 近年来其发病率有上升趋势, 肝癌为血管丰富的肿瘤, 而VEGF在肿瘤血管生成中具有极其关键的作用, 因此VEGF在肝癌的研究中日益受到重视. Hu等^[29]研究发现在AFP阴性的肝癌组织中VEGF的阳性率是59.9%, VEGF对预测AFP阴性的肝癌根治术后的生存和复发有重要意义. Gadelhak等^[30]用ELISA法检测血清p53 Abs(p53抗体)和VEGF表达水平, 并研究他们与AFP的关系, 发现肝癌患者和肝硬化患者血清VEGF的表达显著高于健康人, 但肝癌和肝硬化患者之间VEGF的表达无明显差异, P53 Abs或VEGF与AFP浓度之间无任何相关性, 但是在AFP阳性病例中VEGF的表达率达85.3%, P53抗体的累积表达为83.3%. 此外, P53基因抗体阳性的患者VEGF表达水平高, 因此两者联合检测可用于肝癌患者的筛选. 还有学者^[31]认为, VEGF、缺氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)、基质金属蛋白酶-2(matrix metalloproteinase-2, MMP-2)是进展期肝癌淋巴结转移的3个独立危险因素, 三者联合检测可作为肝癌是否发生淋巴结转移的预测

因子; Kemik等^[8]发现肝癌患者血清VEGF-A及VEGFR-1表达显著高于健康人, VEGF-A阳性表达见于肝癌晚期或已发生转移者, VEGFR-1与肝癌转移、分化程度及分期有关, 提示VEGF-A及其受体VEGFR-1参与肝癌的进展、转移; Treska等^[32]用ELISA法检测经导管静脉化疗栓塞后肝癌患者血清中VEGF的浓度, 发现在接受化疗栓塞1-2 d后血清VEGF浓度呈短暂性升高, 且上升程度与肿瘤大小、分期及血管与淋巴的浸润能力高度相关, 说明VEGF短暂上升的程度越高, 远处转移可能性越大, 预后越差. 有研究表明^[33]VEGF基因多态性是肝癌预后不良的独立危险因素, 该研究用生物快照和Taq Man技术分析接受肝移植治疗的肝癌患者VEGF的7种基因型(rs699947, rs1570360, rs2010963, rs3024997, rs3025010, rs3025035, rs3025039)发现: rs3025030和肝移植后复发显著相关, 可作为预测肝移植复发的遗传标记. 在治疗上, 联合应用VEGF受体选择性抑制剂PTK/ZK和干扰素(interferon, IFN)以及5-氟尿嘧啶(5-FU)能显著地抑制体内肝癌细胞的生长, 并且PTK/ZK能促进IFN/5-FU诱导肝癌细胞凋亡, 从而使其的抗肿瘤效果增强^[34]; 有学者^[35]分析肝上皮样血管内皮瘤(epithelioid hemangioendothelioma, EHE)细胞中VEGF及其受体的表达发现, 抗VEGF的化疗药物能够减小肿瘤体积, 对不能切除和转移性肿瘤有效, 并可作为肝移植术后的辅助治疗.

2.4 胰腺癌 胰腺癌近年来发病率明显上升, 恶性程度高, 发展快, 早期诊断十分困难, 治疗效果不理想, 死亡率很高. Talar-Wojnarowska等^[36]指出, VEGF是胰腺癌微血管形成所必需的, 其在胰腺癌的生长和浸润中有重要作用, 胰腺癌患者血清中VEGF的浓度显著高于慢性胰腺炎者, 并且VEGF基因型+405C/C有致胰腺癌的作用, 但是血清VEGF浓度与VEGF基因多态性无关. Koch等^[37]证实了VEGF-D促进胰腺癌淋巴结转移; Chang等^[38]用ELISA法测定血清VEGF、可溶性血管内皮生长因子受体-1(sVEGFR-1), 发现胰腺癌患者血清VEGF和sVEGFR-1水平显著高于正常对照组, 且sVEGFR-1与胰腺癌分期有关, 并发现VEGF与sVEGFR-1的比值越高, 胰腺癌预后越不良; 对转移性胰腺癌患者VEGF高度表达者无进展生存率和总生存率低于低度表达者^[39]; 治疗上, Hotz等^[40]报道, 抗VEGF受体制剂如SLT-VEGF融合蛋白(由VEGF和志贺毒素A亚型组成)可以抑制胰腺癌生长和扩散, 提高14

■ 相关报道

Bendardaf等研究发现, VEGF在结直肠癌中阳性率达50%, 而在正常结直肠黏膜和腺瘤中几乎无表达, 还发现Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ期结直肠癌患者VEGF阳性率分别是47%、50%、70%, VEGF在左半结肠和直肠的表达率高于右半结肠, VEGF的阳性表达与结直肠癌的分化程度、浸润深度、淋巴结转移、Dukes分期、远处转移、淋巴/脉管肿瘤栓子形成有关.

■同行评价

本文立意新颖,思路清晰,语言表述流利,研究具有一定的科学价值.

周生存率,联合应用抗VEGF受体制剂与吉西他滨治疗胰腺癌比单用吉西他滨显著延长生存时间,提高治疗效果.

2.5 胆管癌 胆管癌是一种恶性程度高,难于早期诊断的恶性肿瘤,迄今为止,大多数胆管癌患者在确诊时肿块已经无法切除,其病程平均少于12 mo,5年生存率仅5%. Yoshikawa等^[41]用免疫组织化学法检测胆管癌标本中VEGF的表达水平,发现VEGF在肝内胆管癌的阳性率为53.8%,在肝外胆管癌的阳性率为59.2%,并发现VEGF过表达与胆管癌肝内转移和血行转移有关; Aishima等^[42]研究表明VEGF-C促进肝内胆管癌边缘淋巴管形成,与胆管癌淋巴道浸润关系密切,有淋巴结转移的胆管癌者VEGF-C阳性率是80%,因此VEGF-C表达可作为判断胆管癌预后的生物学指标;最近一项研究发现^[43],多激酶抑制剂“索拉菲尼”可以通过抑制RAF激酶、VEGF和血小板衍生生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)的活性而抑制胆管癌细胞增殖并诱导其凋亡,在胆管癌治疗中发挥了强大的抗肿瘤活性.

2.6 结直肠癌 结直肠癌包括结肠癌与直肠癌,易发生淋巴结转移和肝转移.近年来由于饮食结构和生活习惯的改变,其发病率和死亡率呈逐年增高的趋势. VEGF对结直肠癌的浸润和转移起极为重要的作用. Bendaraf等^[44]研究发现, VEGF在结直肠癌中阳性率达50%,而在正常结直肠黏膜和腺瘤中几乎无表达,还发现II、III、IV期结直肠癌患者VEGF阳性率分别是47%、50%、70%, VEGF在左半结肠和直肠的表达率高于右半结肠, VEGF的阳性表达与结直肠癌的分化程度、浸润深度、淋巴结转移、Dukes分期、远处转移、淋巴/脉管肿瘤栓子形成有关, Dukes分期愈晚者VEGF的阳性率愈高,这提示VEGF是一个有助于判断预后的指标,也表明对VEGF高度表达者应加强术后的辅助治疗^[45]; Toiyama等^[46]等研究也证实了分析直肠癌VEGF表达水平有助于判断直肠癌术后患者放化疗的疗效,预测全身性并发症的发生; Morales-Gutiérrez等^[47]用ELIAS法检测结直肠癌组织和结直肠癌周围组织VEGF的表达水平,发现癌组织VEGF的表达显著高于癌的周围组织,癌肿中心组织与癌肿周围组织VEGF含量的比值大于2的结直肠癌患者生存时间更长.有研究表明^[48], VEGF基因型+936C/T与结直肠癌发生部位有关,其杂合子10.7%位于近端结肠,35.2%

位于远端结肠,54.1%位于直肠,具有+936T/T基因型结直肠癌者生存率高,总生存率可达100%, VEGF的基因型可作为结直肠癌患者随访和治疗效果的监测指标. Huang等^[49]研究含有VEGF和组织因子(TF)的融合蛋白(rVEGF-TF)在结肠癌模型中抑制肿瘤生长能力中发现,注入rVEGF-TF的肿瘤组织能够形成血栓和坏死,并指出rVEGF-TF肿瘤血管闭塞是治疗肿瘤潜在的有效方法.

3 结论

异常活跃的血管生成是恶性肿瘤生长、增殖、转移及扩散的一个重要条件.近年来, VEGF及其家族成员被认为在调节肿瘤血管生成中起极其重要作用,在临床治疗中的应用亦受到越来越多的关注.检测肿瘤组织中VEGF含量不仅有利于了解肿瘤的生物行为,对评估手术时机及选择合理治疗方案判断预后都有重要意义. VEGF现已成为癌症治疗的新靶点,抗VEGF药物作为肿瘤治疗的一种重要的新手段,显示出了广阔的应用前景,将在肿瘤的综合治疗中发挥越来越重要的作用.但目前还有许多问题尚未解决,如VEGF家族是影响新生血管生成的主要因子但不是唯一因子,临床发现成纤维细胞生长因子、转化生长因子、肿瘤坏死因子等也与血管生成有关,而VEGF家族与其他生长因子的关系有待进一步的研究.另外, VEGF家族中的部分成员的特性,如作用机制、信号传导等仍然不十分清楚,在未来的一段时间, VEGF及其家族成员仍将是多个学科研究的热点问题之一.

4 参考文献

- 1 Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 161: 851-858
- 2 Hsueh C, Lin JD, Wu IC, Chao TC, Yu JS, Liou MJ, Yeh CJ. Vascular endothelial growth factors and angiopoietins in presentations and prognosis of papillary thyroid carcinoma. *J Surg Oncol* 2011; 103: 395-399
- 3 Artac RA, McFee RM, Smith RA, Baltes-Breitwisch MM, Clopton DT, Cupp AS. Neutralization of vascular endothelial growth factor antiangiogenic isoforms is more effective than treatment with pro-angiogenic isoforms in stimulating vascular development and follicle progression in the perinatal rat ovary. *Biol Reprod* 2009; 81: 978-988
- 4 Tanaka T, Ishiguro H, Kuwabara Y, Kimura M, Mitsui A, Katada T, Shiozaki M, Naganawa Y, Fujii Y, Takeyama H. Vascular endothelial growth factor C (VEGF-C) in esophageal cancer correlates with lymph node metastasis and poor patient prognosis.

- J Exp Clin Cancer Res* 2010; 29: 83
- 5 Ballmer-Hofer K, Andersson AE, Ratcliffe LE, Berger P. Neuropilin-1 promotes VEGFR-2 trafficking through Rab11 vesicles thereby specifying signal output. *Blood* 2011; 118: 816-826
- 6 Waldner MJ, Wirtz S, Jefremow A, Warntjen M, Neufert C, Atreya R, Becker C, Weigmann B, Vieth M, Rose-John S, Neurath MF. VEGF receptor signaling links inflammation and tumorigenesis in colitis-associated cancer. *J Exp Med* 2010; 207: 2855-2868
- 7 Smith NR, Baker D, James NH, Ratcliffe K, Jenkins M, Ashton SE, Sproat G, Swann R, Gray N, Ryan A, Jürgensmeier JM, Womack C. Vascular endothelial growth factor receptors VEGFR-2 and VEGFR-3 are localized primarily to the vasculature in human primary solid cancers. *Clin Cancer Res* 2010; 16: 3548-3561
- 8 Kemik O, Sumer A, Kemik SA, Purisa S, Tuzun S. Circulating levels of VEGF family and their receptors in hepatocellular carcinoma. *Bratisl Lek Listy* 2010; 111: 485-488
- 9 Moreira LR, Schenka AA, Latuf-Filho P, Penná AL, Lima CS, Soares FA, Trevisan MA, Vassallo J. Immunohistochemical analysis of vascular density and area in colorectal carcinoma using different markers and comparison with clinicopathologic prognostic factors. *Tumour Biol* 2011; 32: 527-534
- 10 Li Y, Fan LQ, Sun Y, Zhao Q, Tan BB, Liu Y. [Effect of antisurvivin oligodeoxynucleotides on proliferation and apoptosis in gastric cancer cell line BGC-823 and the molecular mechanism]. *Zhonghua Zhongliu Zazhi* 2011; 33: 265-269
- 11 Yan L, Chen WL, Zeng SG, Wang YJ, Bai ZB. Inhibition of VEGF expression in tongue squamous cancer cells via RNA interference silencing of iNOS gene. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2009; 38: 369-373
- 12 Cavazzola LT, Rosa AR, Schirmer CC, Gurski RR, Telles JP, Mielke F, Meurer L, Edelweiss MI, Kruel CD. Immunohistochemical evaluation for P53 and VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) is not prognostic for long term survival in end stage esophageal adenocarcinoma. *Rev Col Bras Cir* 2009; 36: 24-34
- 13 Verbeke H, De Hertogh G, Li S, Vandercappellen J, Noppen S, Schutyser E, El-Asrar AA, Opdenakker G, Van Damme J, Geboes K, Struyf S. Expression of angiostatic platelet factor-4var/CXCL4L1 counterbalances angiogenic impulses of vascular endothelial growth factor, interleukin-8/CXCL8, and stromal cell-derived factor 1/CXCL12 in esophageal and colorectal cancer. *Hum Pathol* 2010; 41: 990-1001
- 14 Takala H, Saarnio J, Wiik H, Ohtonen P, Soini Y. HIF-1 α and VEGF are associated with disease progression in esophageal carcinoma. *J Surg Res* 2011; 167: 41-48
- 15 Lu CL, Ji Y, Ge D, Guo J, Ding JY. The expression of CXCR4 and its relationship with matrix metalloproteinase-9/vascular endothelial growth factor in esophageal squamous cell cancer. *Dis Esophagus* 2011; 24: 283-290
- 16 Yang W, Zhang Y, Yu J, Li S. The low expression of CD80 correlated with the vascular endothelial growth factor in esophageal cancer tissue. *Eur J Surg Oncol* 2010; 36: 501-506
- 17 Nakatani H, Akimori T, Takezaki Y, Hanazaki K. Vascular endothelial growth factors and their receptors in the novel human cell line, HN-Eso-1, established from esophageal spindle cell carcinoma. *J Med Invest* 2010; 57: 232-236
- 18 Gholamin M, Moaven O, Memar B, Farshchian M, Naseh H, Malekzadeh R, Sotoudeh M, Rajabi-Mashhadi MT, Forghani MN, Farrokhi F, Abbaszadegan MR. Overexpression and interactions of interleukin-10, transforming growth factor beta, and vascular endothelial growth factor in esophageal squamous cell carcinoma. *World J Surg* 2009; 33: 1439-1445
- 19 Kozłowski M, Naumnik W, Niklinski J, Milewski R, Dziegielewski P, Laudanski J. Vascular endothelial growth factor C and D expression correlates with lymph node metastasis and poor prognosis in patients with resected esophageal cancer. *Neoplasma* 2011; 58: 311-319
- 20 Yentz S, Wang TD. Molecular imaging for guiding oncologic prognosis and therapy in esophageal adenocarcinoma. *Hosp Pract (Minneapolis)* 2011; 39: 97-106
- 21 Lieto E, Ferraraccio F, Orditura M, Castellano P, Mura AL, Pinto M, Zamboli A, De Vita F, Galizia G. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and epidermal growth factor receptor (EGFR) is an independent prognostic indicator of worse outcome in gastric cancer patients. *Ann Surg Oncol* 2008; 15: 69-79
- 22 Yang Q, Ye ZY, Zhang JX, Tao HQ, Li SG, Zhao ZS. Expression of matrix metalloproteinase-9 mRNA and vascular endothelial growth factor protein in gastric carcinoma and its relationship to its pathological features and prognosis. *Anat Rec (Hoboken)* 2010; 293: 2012-2019
- 23 Deguchi K, Ichikawa D, Soga K, Watanabe K, Kosuga T, Takeshita H, Konishi H, Morimura R, Tsujiura M, Komatsu S, Shiozaki A, Okamoto K, Fujiwara H, Otsuji E. Clinical significance of vascular endothelial growth factors C and D and chemokine receptor CCR7 in gastric cancer. *Anticancer Res* 2010; 30: 2361-2366
- 24 Han FH, Li HM, Zheng DH, He YL, Zhan WH. The effect of the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF)-C and VEGF receptor-3 on the clinical outcome in patients with gastric carcinoma. *Eur J Surg Oncol* 2010; 36: 1172-1179
- 25 Tanaka M, Kitadai Y, Kodama M, Shinagawa K, Sumida T, Tanaka S, Oue N, Yasui W, Chayama K. Potential role for vascular endothelial growth factor-D as an autocrine factor for human gastric carcinoma cells. *Cancer Sci* 2010; 101: 2121-2127
- 26 Zhou Y, Li N, Zhuang W, Wu X. Vascular endothelial growth factor (VEGF) gene polymorphisms and gastric cancer risk in a Chinese Han population. *Mol Carcinog* 2011; 50: 184-188
- 27 Franklin MC, Navarro EC, Wang Y, Patel S, Singh P, Zhang Y, Persaud K, Bari A, Griffith H, Shen L, Balderes P, Kussie P. The structural basis for the function of two anti-VEGF receptor 2 antibodies. *Structure* 2011; 19: 1097-1107
- 28 Suzuki S, Dobashi Y, Hatakeyama Y, Tajiri R, Fujimura T, Heldin CH, Ooi A. Clinicopathological significance of platelet-derived growth factor (PDGF)-B and vascular endothelial growth factor-A expression, PDGF receptor- β phosphorylation, and microvessel density in gastric cancer. *BMC Cancer* 2010; 10: 659
- 29 Hu J, Xu Y, Shen ZZ, Wang Z, Lu Q, Yang GH,

- Ding ZB, Fan J, Zhou J. High expressions of vascular endothelial growth factor and platelet-derived endothelial cell growth factor predict poor prognosis in alpha-fetoprotein-negative hepatocellular carcinoma patients after curative resection. *J Cancer Res Clin Oncol* 2009; 135: 1359-1367
- 30 Gadelhak NA, Gadelhak SA, El-Morsi DA, Abdelaziz MM, Abbas AT, El-Emshaty HM. Prognostic significance of three hepatitis markers (p53 antibodies, vascular endothelial growth factors and alpha fetoprotein) in patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology* 2009; 56: 1417-1424
- 31 Xiang ZL, Zeng ZC, Fan J, Tang ZY, Zeng HY, Gao DM. Gene expression profiling of fixed tissues identified hypoxia-inducible factor-1 α , VEGF, and matrix metalloproteinase-2 as biomarkers of lymph node metastasis in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2011; 17: 5463-5472
- 32 Treska V, Topolcan O, Vrzalova J, Skalicky T, Sutnar A, Liska V, Fichtl J, Narsanska A, Ferda J, Treskova I, Mirka H, Kreuzberg B. Predictive value of serum biomarkers in patients after portal vein embolization (PVE): a pilot study. *Anticancer Res* 2011; 31: 339-344
- 33 Wu LM, Xie HY, Zhou L, Yang Z, Zhang F, Zheng SS. A single nucleotide polymorphism in the vascular endothelial growth factor gene is associated with recurrence of hepatocellular carcinoma after transplantation. *Arch Med Res* 2009; 40: 565-570
- 34 Murakami M, Kobayashi S, Marubashi S, Tomimaru Y, Noda T, Wada H, Eguchi H, Takeda Y, Tanemura M, Umeshita K, Doki Y, Mori M, Nagano H. Tyrosine kinase inhibitor PTK/ZK enhances the antitumor effects of interferon- α /5-fluorouracil therapy for hepatocellular carcinoma cells. *Ann Surg Oncol* 2011; 18: 589-596
- 35 Emamaullee JA, Edgar R, Toso C, Thiesen A, Bain V, Bigam D, Kneteman N, Shapiro AM. Vascular endothelial growth factor expression in hepatic epithelioid hemangioendothelioma: Implications for treatment and surgical management. *Liver Transpl* 2010; 16: 191-197
- 36 Talar-Wojnarowska R, Gasiorowska A, Olakowski M, Lekstan A, Lampe P, Smolarz B, Romanowicz-Makowska H, Kulig A, Malecka-Panas E. Vascular endothelial growth factor (VEGF) genotype and serum concentration in patients with pancreatic adenocarcinoma and chronic pancreatitis. *J Physiol Pharmacol* 2010; 61: 711-716
- 37 Koch M, Dettori D, Van Nuffelen A, Souffreau J, Marconcini L, Wallays G, Moons L, Bruyère F, Olivier S, Noel A, Foidart JM, Carmeliet P, Dewerchin M. VEGF-D deficiency in mice does not affect embryonic or postnatal lymphangiogenesis but reduces lymphatic metastasis. *J Pathol* 2009; 219: 356-364
- 38 Chang YT, Chang MC, Wei SC, Tien YW, Hsu C, Liang PC, Tsao PN, Jan IS, Wong JM. Serum vascular endothelial growth factor/soluble vascular endothelial growth factor receptor 1 ratio is an independent prognostic marker in pancreatic cancer. *Pancreas* 2008; 37: 145-150
- 39 Tawada K, Ishihara T, Kobayashi A, Yamaguchi T, Tsuyuguchi T, Matsuyama M, Yokosuka O. Quantitative analysis of vascular endothelial growth factor in liver metastases from pancreatic carcinoma as a predictor of chemotherapeutic effect and prognosis. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 7438-7443
- 40 Hotz B, Backer MV, Backer JM, Buhr HJ, Hotz HG. Specific targeting of tumor endothelial cells by a shiga-like toxin-vascular endothelial growth factor fusion protein as a novel treatment strategy for pancreatic cancer. *Neoplasia* 2010; 12: 797-806
- 41 Yoshikawa D, Ojima H, Iwasaki M, Hiraoka N, Kosuge T, Kasai S, Hirohashi S, Shibata T. Clinicopathological and prognostic significance of EGFR, VEGF, and HER2 expression in cholangiocarcinoma. *Br J Cancer* 2008; 98: 418-425
- 42 Aishima S, Nishihara Y, Iguchi T, Taguchi K, Taketomi A, Maehara Y, Tsuneyoshi M. Lymphatic spread is related to VEGF-C expression and D2-40-positive myofibroblasts in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Mod Pathol* 2008; 21: 256-264
- 43 Sugiyama H, Onuki K, Ishige K, Baba N, Ueda T, Matsuda S, Takeuchi K, Onodera M, Nakanuma Y, Yamato M, Yamamoto M, Hyodo I, Shoda J. Potent in vitro and in vivo antitumor activity of sorafenib against human intrahepatic cholangiocarcinoma cells. *J Gastroenterol* 2011; 46: 779-789
- 44 Bendardaf R, Buhmeida A, Hilska M, Laato M, Syrjänen S, Syrjänen K, Collan Y, Pyrhönen S. VEGF-1 expression in colorectal cancer is associated with disease localization, stage, and long-term disease-specific survival. *Anticancer Res* 2008; 28: 3865-3870
- 45 Liu H, Wan D, Pan Z, Cao L, Wu X, Lu Z, Kang T. Expression and biological significance of leptin, leptin receptor, VEGF, and CD34 in colorectal carcinoma. *Cell Biochem Biophys* 2011; 60: 241-244
- 46 Toiyama Y, Inoue Y, Saigusa S, Okugawa Y, Yokoe T, Tanaka K, Miki C, Kusunoki M. Gene expression profiles of epidermal growth factor receptor, vascular endothelial growth factor and hypoxia-inducible factor-1 with special reference to local responsiveness to neoadjuvant chemoradiotherapy and disease recurrence after rectal cancer surgery. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 2010; 22: 272-280
- 47 Morales-Gutiérrez C, Abad-Barahona A, Moreno-González E, Enríquez de Salamanca R, Vegh I. Tumour VEGF/non tumour VEGF protein expression ratio as a biomarker for survival in colorectal cancer patients. *Eur J Surg Oncol* 2011; 37: 526-531
- 48 Vidaurreta M, Sánchez-Muñoz R, Véganzones S, Rafael S, Gutiérrez M, de-la-Orden V, Fernández C, Arroyo M, Cerdán FJ, Maestro de las Casas ML. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms in patients with colorectal cancer. *Rev Esp Enferm Dig* 2010; 102: 20-31
- 49 Huang FY, Li YN, Wang H, Huang YH, Lin YY, Tan GH. A fusion protein containing murine vascular endothelial growth factor and tissue factor induces thrombogenesis and suppression of tumor growth in a colon carcinoma model. *J Zhejiang Univ Sci B* 2008; 9: 602-609

编辑 李军亮 电编 何基才

食管鳞癌细胞KYSE-70的分化诱导对光动力学应答敏感性的抑制

孙蕾, 李懿, 石雨, 刘喜龙, 杨观瑞, 赵立群, 杨小静, 裴一兵, 张亚冰, 汲翔, 康巧珍, 汲振余

孙蕾, 李懿, 杨观瑞, 赵立群, 杨小静, 裴一兵, 张亚冰, 汲振余, 郑州大学医药科学研究院肿瘤室 河南省郑州市 450052
石雨, 刘喜龙, 康巧珍, 郑州大学生物工程系 河南省郑州市 450001

汲翔, 郑州大学基础医学院 河南省郑州市 450001

孙蕾, 硕士, 主要从事食管癌光动力学和早期癌变机制研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30873002, 30972707

作者贡献分布: 课题由汲振余、康巧珍、杨观瑞及赵立群设计; 研究内容由孙蕾、李懿、石雨、刘喜龙、汲翔、杨小静、裴一兵及张亚冰完成; 孙蕾与汲振余进行实验数据分析并完成写作。

通讯作者: 汲振余, 研究员, 450052, 河南省郑州市大学路40号, 郑州大学医药科学研究院肿瘤室。jizhenyu@zzu.edu.cn

电话: 0371-66658179

收稿日期: 2011-08-01 修回日期: 2011-08-25

接受日期: 2011-09-16 在线出版日期: 2011-09-18

Photodynamic sensitivity of esophageal cancer KYSE-70 cells is attenuated by all-trans retinoic acid-induced differentiation

Lei Sun, Yi Li, Yu Shi, Xi-Long Liu, Guan-Rui Yang, Li-Qun Zhao, Xiao-Jing Yang, Yi-Bing Qiu, Ya-Bing Zhang, Xiang Ji, Qiao-Zhen Kang, Zhen-Yu Ji

Lei Sun, Yi Li, Guan-Rui Yang, Li-Qun Zhao, Xiao-Jing Yang, Yi-Bing Qiu, Ya-Bing Zhang, Zhen-Yu Ji, Department of Oncology, Academy of Medical and Pharmaceutical Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China

Yu Shi, Xi-Long Liu, Qiao-Zhen Kang, Department of Bioengineering, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, Henan Province, China

Xiang Ji, School of Basic Medicine, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, Henan Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, Nos. 30873002 and 30972707

Correspondence to: Zhen-Yu Ji, Professor, Department of Oncology, Academy of Medical and Pharmaceutical Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China. jizhenyu@zzu.edu.cn

Received: 2011-08-01 Revised: 2011-08-25

Accepted: 2011-09-16 Published online: 2011-09-18

Abstract

AIM: To investigate the impact of all-trans retinoic acid (ATRA)-induced cell differentiation on photodynamic sensitivity of human esophageal cancer cell line KYSE-70.

METHODS: Both well and poorly differentiated KYSE-450 cell lines were used in this study. KYSE-70 differentiation was induced with 1 $\mu\text{mol/L}$ ATRA and evidenced by cell morphology and proliferation. Phototoxicity after photodynamic therapy (PDT, 450 nm) was detected by MTT assay. Apoptosis was measured by flow cytometry, and morphology of apoptotic cells was visualized after Hoechst 33342 staining.

RESULTS: Cells after ATRA treatment exhibited increased size, reduced cytoplasmic and nuclear density, and nuclear enlargement. Cell growth was inhibited compared to control cells. After PDT treatment, the survival of well differentiated KYSE-450 cells and ATRA-treated KYSE-70 cells were reduced compared to poorly differentiated KYSE-70 cells. Cell viability differed significantly between ATRA-treated and non-treated KYSE-70 cells after PDT treatment ($54.28\% \pm 3.64\%$ vs $36.23\% \pm 7.43\%$, $P < 0.001$). The percentage of apoptotic cells in ATRA-induced KYSE-70 cells was less than that in non-treated KYSE-70 cells (18.1% vs 33.3% , $P < 0.05$).

CONCLUSION: ATRA-induced cell differentiation decreases photodynamic sensitivity of esophageal cancer KYSE-70 cells possibly by inducing resistance to apoptosis.

Key Words: Esophageal cancer; Cell differentiation; Photodynamic therapy; ALA

Sun L, Li Y, Shi Y, Liu XL, Yang GR, Zhao LQ, Yang XJ, Qiu YB, Zhang YB, Ji X, Kang QZ, Ji ZY. Photodynamic sensitivity of esophageal cancer KYSE-70 cells is attenuated by all-trans retinoic acid induced differentiation. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(26): 2709-2716

摘要

目的: 研究全反式维甲酸(ATRA)对低分化食管鳞癌细胞系KYSE-70的分化诱导作用及对光动力学疗法(photodynamic therapy, PDT)的应答敏感程度。

■背景资料

食管癌是世界上六大常见的恶性肿瘤之一,目前仍是引起人类死亡的主要原因,所以寻求食管癌的综合治疗方法是治疗食管癌的方向之一。细胞分化疗法与PDT疗法相结合能否提高PDT疗效对临床具有重要的指导意义,因此食管癌细胞的分化诱导是否能影响光动力学效应的探究能对食管癌临床治疗提供理论指导。

■同行评议者

姜春萌, 教授, 大连医科大学附属第二医院消化科; 张军, 教授, 西安交通大学医学院第二附属医院消化内科

■ 研发前沿

目前此领域的研究热点、重点是有关PDT的作用机制和影响PDT疗效因素的研究,新型光敏剂的研发,PDT治疗与其他治疗方法的结合。

方法:以高分化食管鳞癌细胞KYSE-450和低分化食管鳞癌细胞KYSE-70为研究对象,用1 $\mu\text{mol/L}$ ATRA为诱导剂,诱导KYSE-70细胞从低分化状态向高分化状态分化,通过细胞形态学、增殖实验来验证;细胞以1 mmol/L ALA处理,不同剂量的450 nm蓝光照射,MTT法测定PDT对细胞的光毒性;流式细胞法测定PDT诱导的凋亡水平,Hoechst 33342染色后观察凋亡细胞的胞核形态。

结果:经ATRA处理后,诱导组与对照组相比,细胞变扁平、体积增大、胞质密度减低、核变大、核密度亦减低、细胞生长缓慢。高分化KYSE-450、分化诱导后的KYSE-70细胞和未诱导KYSE-70细胞用ALA处理后进行蓝光PDT,MTT结果显示高分化KYSE-450和分化诱导后KYSE-70的细胞存活率明显高于未诱导细胞,而高分化KYSE-450细胞敏感性略低于分化诱导后的KYSE-70细胞。当光剂量为225 mJ/cm^2 时,诱导前后细胞存活率分别为36.23% \pm 7.43%和54.28% \pm 3.64%,有极显著差异($P<0.001$);分化诱导后的KYSE-70细胞凋亡率(18.1%)亦低于未诱导的细胞(33.3%)。

结论:经分化诱导后的食管鳞癌细胞PDT敏感性明显差于未诱导的食管鳞癌细胞,提示细胞分化诱导疗法不仅不能增强PDT效应,反而降低疗效;细胞分化诱导对PDT效果的影响部分通过抑制凋亡而实现。

关键词:食管癌;细胞分化;光动力学疗法;ALA

孙蕾,李懿,石雨,刘喜龙,杨观瑞,赵立群,杨小静,裘一兵,张亚冰,汲翔,康巧珍,汲振余.食管鳞癌细胞KYSE-70的分化诱导对光动力学应答敏感性的抑制.世界华人消化杂志 2011; 19(26): 2709-2716

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2709.asp>

0 引言

光动力学疗法(Photodynamic therapy, PDT)是近20多年来应用于浅表肿瘤临床治疗的一种非手术替代疗法^[1].选择性存积于肿瘤细胞内的光敏剂经特定波长的光照射激发后,发生光物理化学反应,产生活性氧等^[1-3],导致肿瘤细胞凋亡或坏死^[4];或通过破坏肿瘤组织内的微血管循环系统,使肿瘤细胞缺氧或营养匮乏而衰竭。虽然以ALA为光敏剂的PDT(ALA-PDT)已经用于食管癌变的治疗^[5],但其具体杀伤机制还不十分清楚,而且许多因素能影响PDT的效果^[7-11]。我们前期实验初步发现食管癌不同分化状态具有不同细胞内光敏剂合成蓄积能力并呈现PDT敏感性的

差异^[6],为进一步验证食管癌细胞分化对PDT疗效的影响,本研究利用公认的分化诱导剂全反式维甲酸对低分化的食管鳞癌细胞KYSE-70进行分化诱导,并观察诱导分化后细胞对PDT处理的敏感性变化,以期临床提供理论指导。

1 材料和方法

1.1 材料 高分化食管鳞癌细胞KYSE-450和低分化食管鳞癌细胞KYSE-70由美国ATCC提供。5-ALA由PhotoCure ASA(挪威)提供。Bradford BCA蛋白质测定试剂盒购自Pierce公司。流式双染试剂盒购自Biovision公司,流式细胞仪为EP-ICS XL-MCL(Beckman Coulter公司,美国)。荧光显微镜为Nikon TS100。MTT为Promega产品,RPMI 1640培养液购自Solarbio,全反式维甲酸(ATRA)及其他试剂均购自Sigma。

1.2 方法

1.2.1 分化诱导的细胞增殖实验:生长至80%左右融合的KYSE-70细胞用胰蛋白酶-EDTA消化,按 1.6×10^4 个细胞/孔接种到96孔培养板,37 $^{\circ}\text{C}$ 50 mL/L CO_2 培养箱培养过夜,使细胞充分贴壁。次日用含0.1 $\mu\text{mol/L}$ 、1.0 $\mu\text{mol/L}$ 、10.0 $\mu\text{mol/L}$ 、50.0 $\mu\text{mol/L}$ ATRA的无血清RPMI 1640液孵育细胞,并设血清组和无ATRA空白对照,分别孵育24 h、48 h、72 h、96 h后,每孔加入20 μL MTT液,37 $^{\circ}\text{C}$ 4 h,测定490 nm处的光吸收值。所有试验均设5个平行孔,至少重复2次。以血清组对照孔设置为100%,其他试验孔以此为对照计算细胞存活率(%)。

1.2.2 分化形态学鉴定:生长至80%左右融合的KYSE-70细胞用胰蛋白酶-EDTA消化,接种 4×10^5 个细胞至6孔培养板,37 $^{\circ}\text{C}$ 50 mL/L CO_2 培养箱培养过夜,使细胞充分贴壁。次日用含1 $\mu\text{mol/L}$ ATRA的无血清RPMI 1640液孵育72 h,隔天换液,在倒置显微镜下仔细观察并拍照,记录细胞状态。之后利用Hoechst 33342染色,工作浓度4 $\mu\text{g/mL}$,染色时间10 min,收获细胞,PBS洗涤一次后荧光显微镜观察。以上操作须在弱光下进行,所有试验均设3个平行孔,至少2次重复试验。

1.2.3 PDT处理及细胞存活率测定:KYSE-70、KYSE-450细胞按 1.6×10^4 个细胞/孔接种到96孔培养板,次日用含1 $\mu\text{mol/L}$ ATRA的无血清RPMI 1640液孵育细胞72 h后,吸去ATRA诱导液,用含1 mmol/L ALA的无血清RPMI 1640液孵育4 h后,立即PDT处理。采用可见蓝光(波长450 nm)照射,光照剂量设定7.5 mJ/cm^2 , 75 mJ/cm^2 , 150 mJ/cm^2 ,

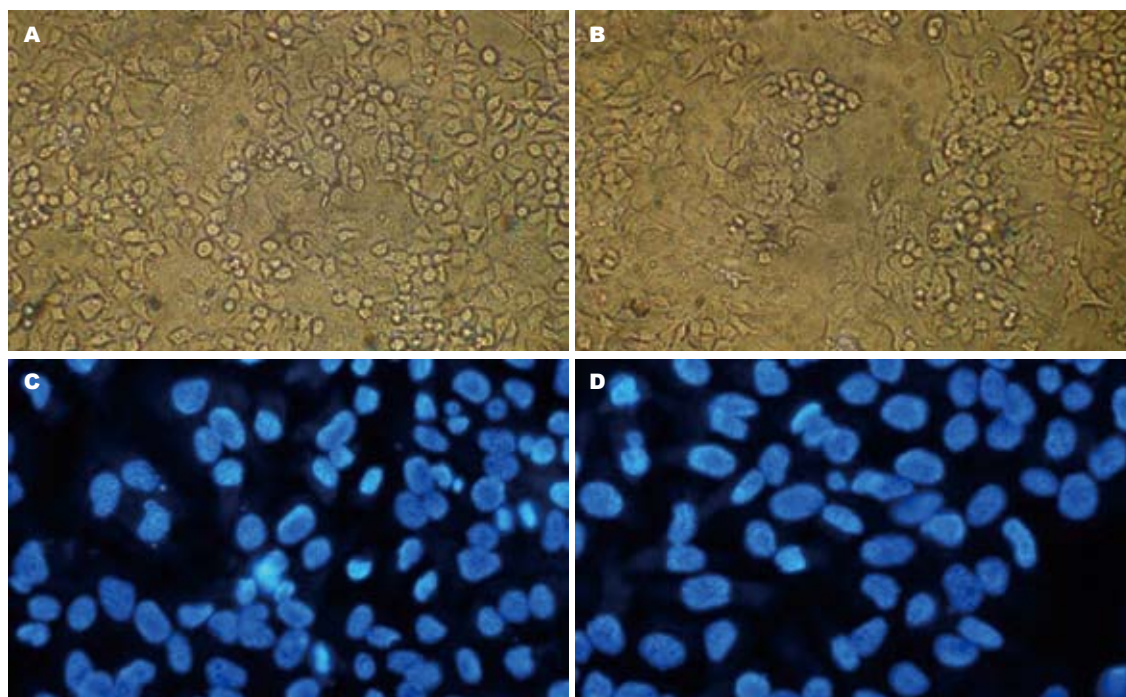


图1 KYSE-70 细胞ATRA诱导72h之后的镜检和Hoechst 33342染色结果. A: KYSE-70对照组; B: KYSE-70诱导组; C: KYSE-70对照染色组; D: KYSE-70诱导染色组.

■ 相关报道

本课题组曾以高分化食管鳞癌细胞KYSE-450和低分化食管鳞癌细胞KYSE-70为研究对象, 利用荧光分光光度法测定不同浓度ALA处理后细胞内PpIX的浓度, 分别使用不同剂量的红光和蓝光对细胞进行照射处理, MTS法测定PDT对细胞的光毒性; 发现高分化KYSE-450细胞比低分化KYSE-70细胞具有更强的PpIX合成或累积水平, 高分化细胞虽然PpIX产量高于低分化细胞, 但无论是红光PDT还是蓝光PDT, 其敏感性均明显差于低分化细胞.

225 mJ/cm², 300 mJ/cm², 并设无光照射和无ALA空白对照. 处理完毕立即更换新鲜含10%小牛血清的培养液, 37 °C 50 mL/L CO₂培养箱孵育24 h. 然后每孔加入20 μL MTT液, 37 °C 4 h, 测定490 nm处的光吸收值. 所有试验均设6个平行孔, 至少重复2次. 以无ALA但用相同光剂量处理的对照孔设置为100%, 其他试验孔以此为对照计算细胞存活率(%)并绘图.

1.2.4 细胞凋亡染色鉴定: 生长至80%左右融合的KYSE-70细胞用胰蛋白酶-EDTA消化, 接种4 × 10⁵个细胞至6孔培养板, 37 °C 50 mL/L CO₂培养箱培养过夜, 使细胞充分贴壁. 次日用含不同浓度ATRA的无血清RPMI 1640液孵育72 h, 隔天换液, 并设KYSE-70和KYSE-450对照组, 孵育72 h后用含1 mmol/L ALA的无血清RPMI 1640液孵育4 h后, 立即PDT处理. 采用可见蓝光(波长450 nm)照射, 光照剂量为225 mJ/cm²和270 mJ/cm²(细胞杀伤率均为75%), 倒置显微镜观察并拍照, 记录细胞状态. 之后利用Hoechst 33342染色, 工作浓度4 μg/mL, 染色时间10 min, 收获细胞, PBS洗涤1次后荧光显微镜观察并拍照. 以上操作须在弱光下进行, 所有试验均设3个平行孔, 至少2次重复试验.

1.2.5 细胞凋亡流式检测: AnnexinV-FITC/PI流式法检测细胞凋亡率. 接种4 × 10⁵个细胞至6孔

培养板, 1 μmol/L ATRA的无血清RPMI 1640液孵育细胞72 h后, 1 mmol/L ALA处理4 h, 蓝光照射, 光剂量分别为180 mJ/cm², 225 mJ/cm²和270 mJ/cm²(杀伤率均为75%的光剂量). 收获细胞, 加入500 μL的Binding Buffer悬浮细胞; 加入5 μL AnnexinV-FITC混匀后, 加入10 μL Propidium Iodide, 混匀, 室温避光反应10 min, 于1 h内流式细胞仪检测细胞凋亡率.

2 结果

2.1 食管鳞癌细胞KYSE-70分化诱导形态 ATRA诱导72 h后的细胞变扁平, 体积增大, 胞质密度减低, 核变大, 核密度亦减低, 细胞间隙加宽(图1).

2.2 细胞分化诱导后的增殖曲线 KYSE-70细胞用不同浓度的ATRA处理, 分别诱导24 h、48 h、72 h、96 h后测得的细胞存活率曲线见图2A, 各组的A值和抑制率相比差异分别有统计学意义($P < 0.05$), 药物浓度越高、作用时间越长, 其抑制作用越强. 1 μmol/L ATRA作用72 h时, 抑制率为 0.85 ± 0.05 , 利于后续实验的检测. 其后曲线趋于平缓, 1 μmol/L ATRA作用96 h后, 抑制率为 0.86 ± 0.07 , 与72 h时的抑制率基本一致, 抑制率达到最大. 以1 μmol/L的ATRA作用KYSE-70细胞后的MTT结果显示能显著抑制细胞增殖, 细胞生长缓慢(图2B). 后续实验均采用1 μmol/L的ATRA浓度, 作用时间为72 h.

■创新盘点

虽然以ALA为光敏剂的PDT已经用于食管癌及癌前病变的治疗,但其具体杀伤机制还不十分清楚,而且许多因素能影响PDT的效果。阐明影响食管癌PDT疗效的因素与机制,对于探讨提高PDT临床疗效的新方法和新思路,为临床上能够预测PDT疗效,针对不同肿瘤患者制定合理的个体化治疗方案,或通过干预癌组织的生物学性状而提高肿瘤患者临床PDT的疗效具有重要意义。本研究结果显示经分化诱导后的食管鳞癌细胞PDT敏感性明显差于未诱导的食管鳞癌细胞,提示细胞分化诱导疗法不仅不能增强PDT效应,反而降低疗效。结果对食管癌临床PDT治疗具有指导意义。

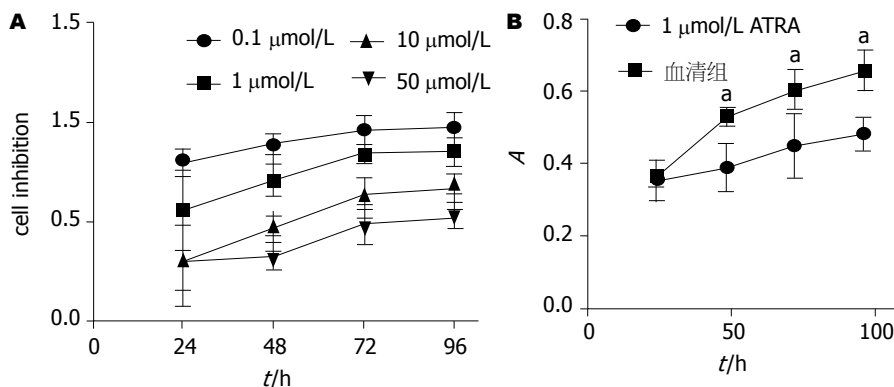


图2 细胞分化诱导后的增值曲线。A: 不同浓度ATRA对KYSE-70细胞生长的抑制率; B: 1 μmol/L ATRA对KYSE-70细胞增殖的影响。* $P < 0.05$ vs 血清组KYSE-70。

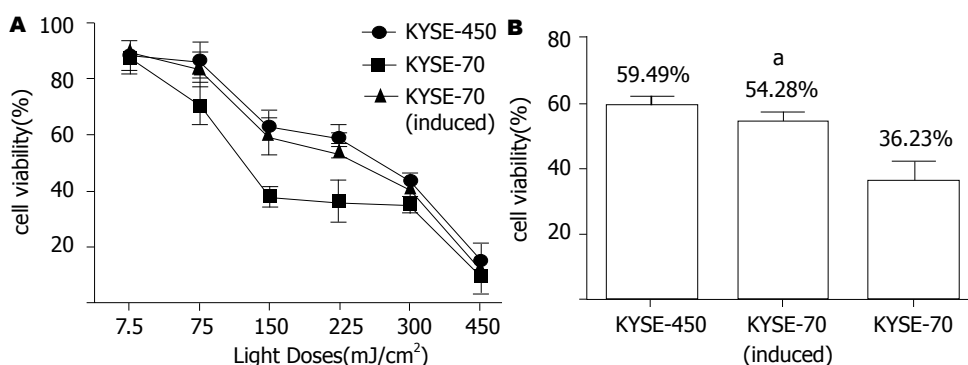


图3 PDT对肿瘤细胞的杀伤作用。A: 不同剂量蓝光PDT(450 nm)对KYSE-70、KYSE-450和ATRA诱导72 h后的KYSE-70细胞的光毒性; B: 光剂量为225 mJ/cm²时PDT后的细胞存活率。* $P < 0.05$ vs KYSE-70。

2.3 PDT的细胞光毒毒性 高分化KYSE450、分化诱导后的KYSE-70细胞和未诱导KYSE-70细胞用ALA处理后进行蓝光PDT, MTT结果显示高分化KYSE-450和分化诱导后KYSE-70的细胞存活率明显高于未诱导细胞(图3A), 而高分化KYSE-450细胞敏感性略微低于分化诱导后的KYSE-70细胞。当光剂量为225 mJ/cm²时, 诱导前后细胞存活率分别为36.23%±7.43%和54.28%±3.64%, 有极显著差异($P < 0.001$, 图3B)。结果显示肿瘤细胞的不同分化状态影响了PDT效果, 细胞分化诱导后增强了对PDT的抵御能力。

2.4 细胞凋亡的流式检测结果 为了解ALA-PDT对KYSE-450和诱导前后KYSE-70细胞的光毒性诱导的细胞凋亡状况, 使用流式细胞仪测定细胞凋亡率。KYSE-450、KYSE-70和分化诱导KYSE-70分别使用的光剂量为270 mJ/cm²、180 mJ/cm²和225 mJ/cm²光照强度, 在此光剂量下三者细胞死亡率均为75%左右。PDT后24 h KYSE-450细胞凋亡率为16.3%, 诱导前KYSE-70细胞凋亡率为33.3%, 诱导后则降至18.1%(图4), 提示抑制细胞凋亡是细胞分化增强对PDT抵御

能力的重要机制之一。

2.5 细胞凋亡形态学结果 为进一步验证PDT诱导的细胞凋亡, PDT处理后24 h的细胞用Hoechst 33342染色, 荧光显微镜观察, 结果见图5。非凋亡细胞核染色均一, 凋亡细胞核明显凝集变亮, 呈边缘化或裂解。显微镜下计数的细胞凋亡率基本与流式法结果相符。

3 讨论

许多因素能影响PDT临床疗效, 这些因素除了光敏剂、不同波长的光^[12]及氧分子^[13-15]以外, 还包括凋亡相关基因的表达状况及肿瘤细胞的分化状态等^[16-19]。阐明影响食管癌PDT疗效的因素与机制, 对于探讨提高PDT临床疗效的新方法和新思路, 为临床上能够预测PDT疗效, 针对不同肿瘤患者制定合理的个体化治疗方案, 或通过干预癌组织的生物学性状而提高肿瘤患者临床PDT的疗效具有重要意义。我们前期实验初步发现高分化食管鳞癌KYSE-450细胞比低分化KYSE-70细胞PDT敏感性差, 为进一步验证此结果, 我们利用ATRA对低分化KYSE-70细胞进行

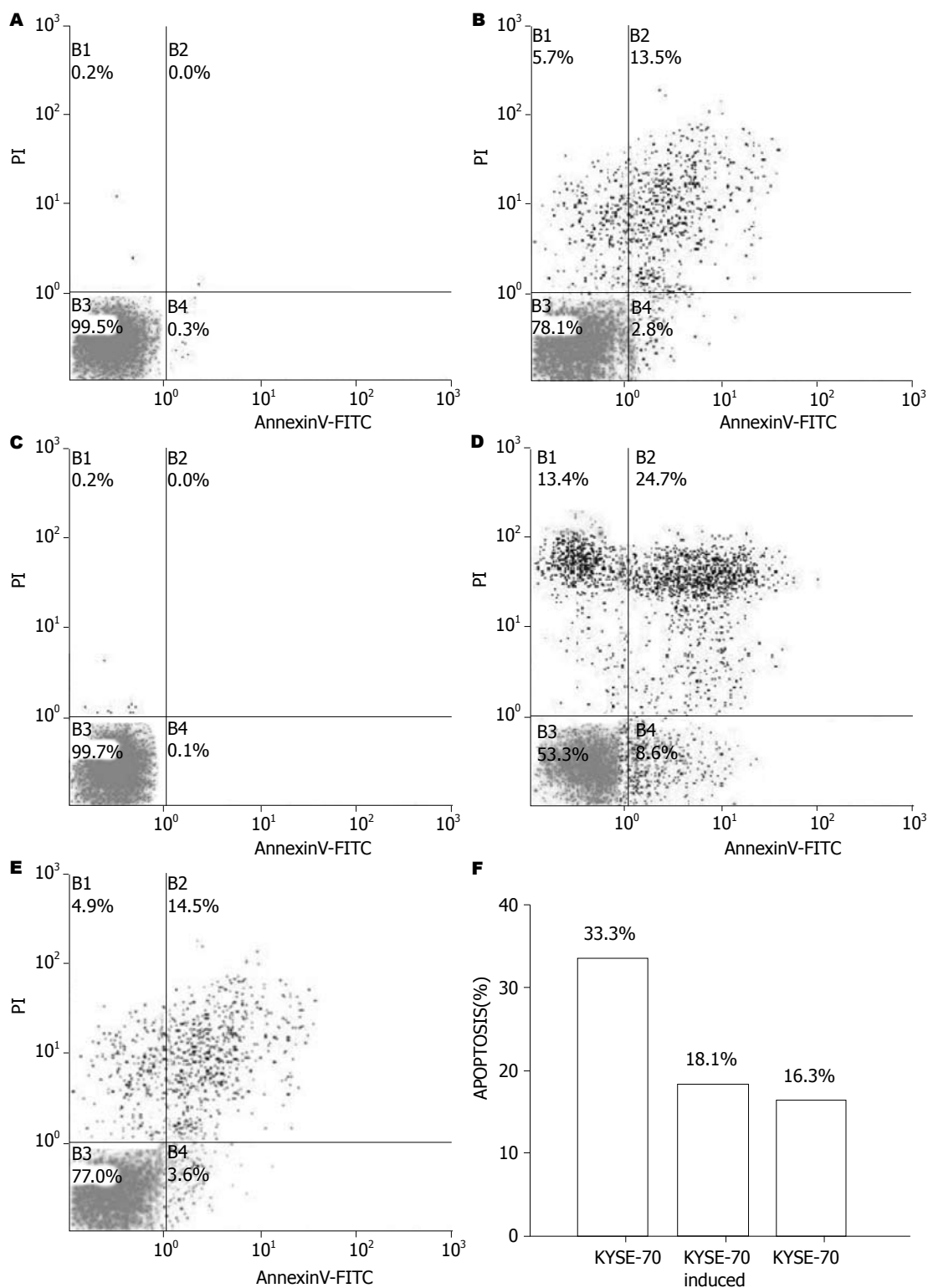


图 4 PDT诱导的细胞凋亡率. A: KYSE-450细胞阴性对照; B: KYSE-450细胞PDT后凋亡率; C: KYSE-70细胞阴性对照; D: 诱导前KYSE-70细胞PDT后凋亡率; E: ATRA诱导组KYSE-70细胞PDT后凋亡率; F: 各组细胞凋亡率对比。

分化诱导, 经ALA孵育后PDT处理, 发现分化诱导后的KYSE-70细胞具有较低的细胞PDT光毒毒性, 结果进一步显示食管鳞癌细胞的分化影响了PDT效果。

ALA是一种内源性光敏剂^[20], 之所以称为

内源性光敏剂是因为他是细胞合成血红蛋白的前体, ALA本身无光毒性, 而是通过他的代谢产物原卟啉IX(PpIXp)发挥作用^[21]。ALA在胞质中经过胆色素原、尿卟啉、粪卟啉、原卟啉原Ⅲ等途径, 进入线粒体内形成PpIX, 最后在亚铁原

■同行评价

本实验设计合理, 采用方法实用, 结果可靠, 结论客观, 对临床治疗有指导意义.

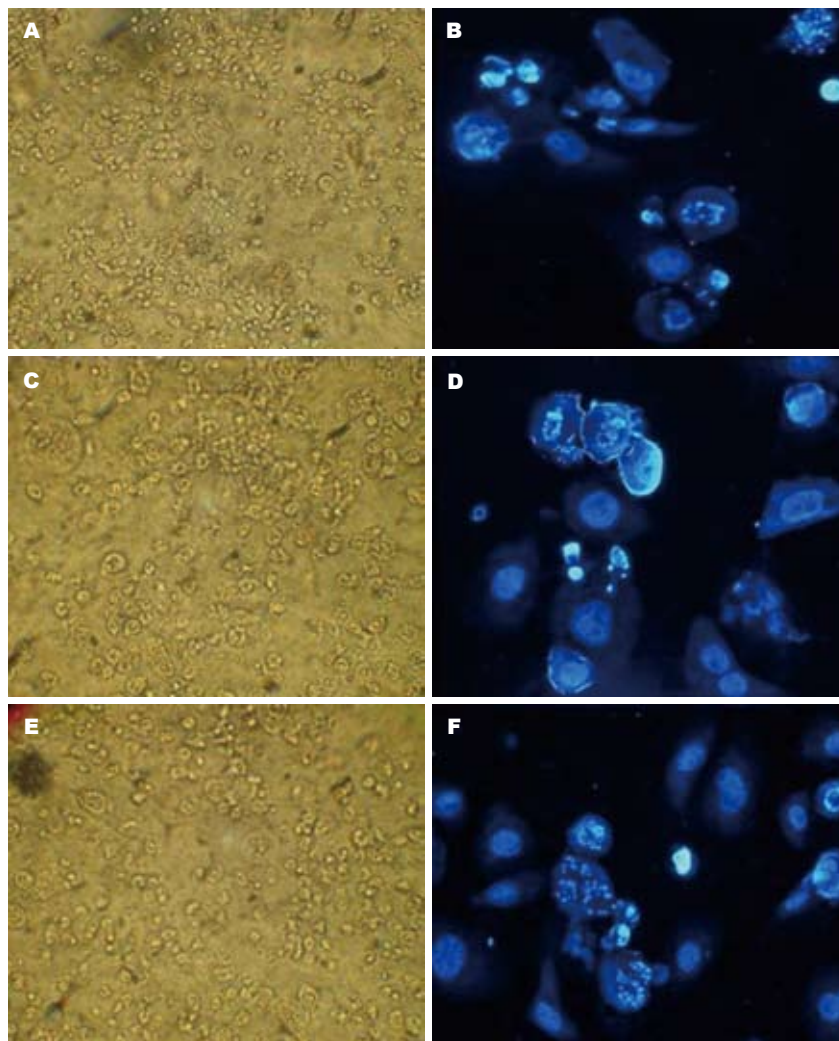


图 5 KYSE-450、KYSE-70和ATRA-KYSE-70细胞ALA-PDT处理后的Hoechst 33342染色结果. A: KYSE-450细胞; B: KYSE-450细胞Hoechst 33342染色; C: 诱导前KYSE-70; D: 诱导前KYSE-70 Hoechst 33342染色; E: ATRA诱导后KYSE-70细胞; F: ATRA诱导后KYSE-70 Hoechst 33342染色.

卟啉合成酶(Ferrochelatase)催化下成为血红素^[22,23]. 在此过程中ALA的产生受Heme的反馈抑制, 当有外源性ALA存在的情况下则解除了这种反馈抑制, 增强了PpIX的合成. 另外限速酶亚铁原卟啉合成酶亦有PpIX合成调控作用^[6,22]. 肿瘤细胞内这些代谢酶活性可存在差异, 结果造成PpIX在线粒体内的浓度有所不同, 这可以部分解释不同肿瘤细胞的PDT敏感性差异的结果. 但本实验分化诱导前后PDT结果表明, 分化诱导后肿瘤细胞PDT效果较差, 况且我们前期实验结果表明虽然高分化细胞含较高浓度的PpIX, 但具备一定的抵御PDT毒性作用, 结果进一步提示分化程度造成的不同PpIX积累能力并不是决定PDT效应的唯一因素, 食管癌细胞的分化过程可能形成了某一种机制, 增强了细胞对外界刺激的抵御能力.

全反式维甲酸是维生素A的一种重要衍生物^[24,25], 随着全反式维甲酸治疗急性早幼粒细胞性白血病的成功实践, 目前已广泛被作为分化

诱导剂应用于肿瘤治疗领域^[26-28]. 随着分子生物学的深入及对肿瘤多因素多阶段渐进发病机理的认识, 肿瘤的临床治疗趋向于多学科综合治疗. PDT亦能与肿瘤的其他疗法相结合, 如手术切除后结合使用PDT杀死残留的癌细胞^[29,31]. 然而本实验中分化诱导后的KYSE-70细胞和未诱导KYSE-70细胞用ALA处理后进行蓝光PDT, MTT显示经分化诱导后的食管鳞癌细胞PDT敏感性明显差于未诱导的低分化食管鳞癌细胞, 提示细胞分化诱导疗法不仅不能增强食管鳞癌细胞PDT效应, 反而降低疗效. PDT对肿瘤细胞的杀伤作用大多是通过诱导凋亡与坏死两种机制的结合, PDT后肿瘤细胞死亡是以凋亡为主还是以坏死为主与许多因素有关^[5,16]. 本研究发现ALA-PDT引起的分化诱导后的KYSE-70细胞凋亡率由诱导前的33.3%降至18.1%, Hoechst 33342染色后, 荧光显微镜下也可发现胞核凝集与裂解等典型的凋亡特征, 显微镜下计数的细胞凋亡率基本与流式法结果相符, 提示分化诱导后肿瘤细

胞对PDT的抵御作用部分通过抑制凋亡而实现。

4 参考文献

- 1 汲振余, 禹丽娜, 杨观瑞, 索振河, Nesland JM, 彭迁. 肿瘤光动力学疗法的机制. 世界华人消化杂志 2005; 13: 1879-1884
- 2 Usuda J, Ichinose S, Ishizumi T, Hayashi H, Ohtani K, Maehara S, Ono S, Honda H, Kajiwaru N, Uchida O, Tsutsui H, Ohira T, Kato H, Ikeda N. Outcome of photodynamic therapy using NPe6 for bronchogenic carcinomas in central airways > 1.0 cm in diameter. *Clin Cancer Res* 2010; 16: 2198-2204
- 3 Hilf R. Mitochondria are targets of photodynamic therapy. *J Bioenerg Biomembr* 2007; 39: 85-89
- 4 Barge J, Decréau R, Julliard M, Hubaud JC, Sabatier AS, Grob JJ, Verrando P. Killing efficacy of a new silicon phthalocyanine in human melanoma cells treated with photodynamic therapy by early activation of mitochondrion-mediated apoptosis. *Exp Dermatol* 2004; 13: 33-44
- 5 Wainwright M. Photodynamic therapy: the development of new photosensitisers. *Anticancer Agents Med Chem* 2008; 8: 280-291
- 6 汲振余, 赵立群, 杨观瑞, 薛乐勋, 索振河, Nesland JM, 彭迁. 食管鳞癌细胞分化状态对内源性光敏剂PpIX产量的影响及对PDT的应答. 世界华人消化杂志 2006; 14: 6-11
- 7 Jeong E, Hong JW, Min JA, Lee DW, Sohn MY, Lee WJ, Lee JY, Park YM. Topical ALA-Photodynamic Therapy for Acne Can Induce Apoptosis of Sebocytes and Down-regulate Their TLR-2 and TLR-4 Expression. *Ann Dermatol* 2011; 23: 23-32
- 8 Marrero A, Becker T, Sunar U, Morgan J, Bellnier D. Aminolevulinic acid-photodynamic therapy combined with topically applied vascular disrupting agent vadimezan leads to enhanced antitumor responses. *Photochem Photobiol* 2011; 87: 910-919
- 9 Robertson CA, Abrahamse H. The in vitro PDT efficacy of a novel metallophthalocyanine (MPC) derivative and established 5-ALA photosensitizing dyes against human metastatic melanoma cells. *Lasers Surg Med* 2010; 42: 766-776
- 10 Lin HP, Chen HM, Yu CH, Yang H, Wang YP, Chiang CP. Topical photodynamic therapy is very effective for oral verrucous hyperplasia and oral erythro-leukoplakia. *J Oral Pathol Med* 2010; 39: 624-630
- 11 Choi MS, Yun SJ, Beom HJ, Park HR, Lee JB. Comparative study of the bactericidal effects of 5-aminolevulinic acid with blue and red light on *Propionibacterium acnes*. *J Dermatol* 2011; 38: 661-666
- 12 Busch TM, Xing X, Yu G, Yodh A, Wileyto EP, Wang HW, Durduran T, Zhu TC, Wang KK. Fluence rate-dependent intratumor heterogeneity in physiologic and cytotoxic responses to Photofrin photodynamic therapy. *Photochem Photobiol Sci* 2009; 8: 1683-1693
- 13 Wang HW, Putt ME, Emanuele MJ, Shin DB, Glatstein E, Yodh AG, Busch TM. Treatment-induced changes in tumor oxygenation predict photodynamic therapy outcome. *Cancer Res* 2004; 64: 7553-7561
- 14 Mitra S, Cassar SE, Niles DJ, Puskas JA, Frelinger JG, Foster TH. Photodynamic therapy mediates the oxygen-independent activation of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Mol Cancer Ther* 2006; 5: 3268-3274
- 15 Hirata Y, Koga S, Fukui N, Yu A, Koshida S, Kosaka Y, Kurokawa T, Moriawaki S. 5-Aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy to superficial malignant skin tumors using Super Lizer. *J Dermatol* 2011; 38: 748-754
- 16 Juzeniene A, Peng Q, Moan J. Milestones in the development of photodynamic therapy and fluorescence diagnosis. *Photochem Photobiol Sci* 2007; 6: 1234-1245
- 17 Wu Y, Xing D, Chen WR. Single cell FRET imaging for determination of pathway of tumor cell apoptosis induced by photofrin-PDT. *Cell Cycle* 2006; 5: 729-734
- 18 Kinzler I, Haseroth E, Hauser C, Rück A. Role of mitochondria in cell death induced by Photofrin-PDT and ursodeoxycholic acid by means of SLIM. *Photochem Photobiol Sci* 2007; 6: 1332-1340
- 19 Juarranz A, Jaén P, Sanz-Rodríguez F, Cuevas J, González S. Photodynamic therapy of cancer. Basic principles and applications. *Clin Transl Oncol* 2008; 10: 148-154
- 20 李步红, 谢树森, HUANG Zheng, WILSON Brian C. 光动力学疗法剂量学的研究进展. 生物化学与生物物理进展 2009; 36: 676-683
- 21 Blake E, Curnow A. The hydroxypyridinone iron chelator CP94 can enhance PpIX-induced PDT of cultured human glioma cells. *Photochem Photobiol* 2010; 86: 1154-1160
- 22 汲振余, 范天黎, 赵立群, 杨小静, 袁一兵, 张聚真, 张亚冰, 孙予, 袁宋良, 杨观瑞. 光敏剂PpIX亚细胞分布方式对食管癌细胞光动力学效应的影响. 世界华人消化杂志 2009; 17: 1602-1608
- 23 Dögnitz N, Salomon D, Zellweger M, Ballini JP, Gabrecht T, Lange N, van den Bergh H, Wagnières G. Comparison of ALA- and ALA hexyl-ester-induced PpIX depth distribution in human skin carcinoma. *J Photochem Photobiol B* 2008; 93: 140-148
- 24 Park JH, Qiao B, Panageas KS, Schymura MJ, Jurcic JG, Rosenblatt TL, Altman JK, Douer D, Rowe JM, Tallman MS. Early death rate in acute promyelocytic leukemia remains high despite all-trans retinoic acid. *Blood* 2011; 118: 1248-1254
- 25 Park SH, Lim JS, Jang KL. All-trans retinoic acid induces cellular senescence via upregulation of p16, p21, and p27. *Cancer Lett* 2011; 310: 232-239
- 26 叶红, 但自立, 唐望先. 全反式维甲酸抗肿瘤作用的研究进展. 肿瘤防治研究 2005; 12: 800-803
- 27 Hong SD, Kim YK, Kim HN, Lee SR, Ahn JS, Yang DH, Lee JJ, Lee IK, Shin MG, Kim HJ. Treatment outcome of all-trans retinoic acid/anthracycline combination chemotherapy and the prognostic impact of FLT3/ITD mutation in acute promyelocytic leukemia patients. *Korean J Hematol* 2011; 46: 24-30
- 28 Uruno A, Noguchi N, Matsuda K, Nata K, Yoshikawa T, Chikamatsu Y, Kagechika H, Harigae H, Ito S, Okamoto H, Sugawara A. All-trans retinoic acid and a novel synthetic retinoid tamibarotene (Am80) differentially regulate CD38 expression in human leukemia HL-60 cells: possible involvement of protein kinase C-delta. *J Leukoc Biol* 2011; 90: 235-247
- 29 Separovic D, Bielawski J, Pierce JS, Merchant S, Tarca AL, Ogretmen B, Korbek M. Increased tumour dihydroceramide production after Photofrin-PDT alone and improved tumour response after the combination with the ceramide analogue LCL29. Evidence from mouse squamous cell carcinomas. *Br*

- 30 *J Cancer* 2009; 100: 626-632
Lechardeur D, Dougaparsad S, Nemes C, Lukacs GL. Oligomerization state of the DNA fragmentation factor in normal and apoptotic cells. *J Biol Chem* 2005; 280: 40216-40225

- 31 Chan A, Blumenkranz MS, Wu KH, Wang G, Berker N, Parast LM, Sanislo SR. Photodynamic therapy with and without adjunctive intravitreal triamcinolone acetonide: a retrospective comparative study. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging* 2009; 40: 561-569

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

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

• 消息 •

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

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

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

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

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

瑞香狼毒药效组分对裸鼠肝癌移植瘤的抑制及其机制

潘国凤, 杨庆, 刘安, 朱晓新

潘国凤, 首都医科大学附属北京世纪坛医院 北京市 100038
杨庆, 刘安, 朱晓新, 中国中医科学院中药研究所 北京市 100700

潘国凤, 医学博士, 主治医师, 主要从事肿瘤内科临床与中药药理学研究。

科技部国际科技合作计划基金资助项目, No. 2005DFA31000

作者贡献分布: 本研究在朱晓新指导下由潘国凤设计; 研究过程由潘国凤与杨庆主要参与; 受试药由刘安提供; 数据分析及论文写作由潘国凤完成。

通讯作者: 朱晓新, 博士, 研究员, 100700, 北京市东直门南小街16号, 中国中医科学院中药研究所. zhuxx59@yahoo.com.cn
电话: 010-64056154

收稿日期: 2011-04-27 修回日期: 2011-06-21

接受日期: 2011-06-28 在线出版日期: 2011-09-18

Antitumor activity of active components alignment isolated from *Stellera chamaejasme* L. in nude mice bearing subcutaneous BEL-7402 hepatoma

Guo-Feng Pan, Qing Yang, An Liu, Xiao-Xin Zhu

Guo-Feng Pan, Beijing Shijitan Hospital Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100038, China
Qing Yang, An Liu, Xiao-Xin Zhu, Institute of Chinese Materia Medica of China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China

Supported by: the International Science & Technology Cooperation Project, No. 2005DFA31000

Correspondence to: Xiao-Xin Zhu, Institute of Chinese Materia Medica of China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China. zhuxx59@yahoo.com.cn

Received: 2011-04-27 Revised: 2011-06-21

Accepted: 2011-06-28 Published online: 2011-09-18

Abstract

AIM: To assess the antitumor activity of the effective extracts of *S. chamaejasme* L. (ScL) in a murine model of hepatocellular carcinoma and to explore the possible mechanisms involved.

METHODS: A tumor transplantation model was generated in nude mice to study the antitumor activity of the active components alignment Zp1111 *in vivo*. Immunohistochemistry (IHC) was employed to investigate the expression of Bcl-2 and Bax in tumor tissue.

RESULTS: Zp1111 exhibited strong antitumor

activity in BEL7402-bearing nude mice, with the relative tumor proliferation rate (T/C) less than 60% at a dose of 187.5 or 250 mg/kg. Treatment with Zp1111 up-regulated Bax expression and slightly down-regulated Bcl-2 expression in tumor tissue.

CONCLUSION: The active components alignment of ScL significantly reduces BEL-7402 proliferation in a dose-dependent manner *in vivo* possibly by up-regulating Bax expression to induce cell apoptosis.

Key Words: Hepatocellular carcinoma; *Stellera chamaejasme* L.; Cell apoptosis; Bcl-2; Bax

Pan GF, Yang Q, Liu A, Zhu XX. Antitumor activity of active components alignment isolated from *Stellera chamaejasme* L. in nude mice bearing subcutaneous BEL-7402 hepatoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(26): 2717-2722

摘要

目的: 评价瑞香狼毒药效组分抑制人肝癌细胞株BEL-7402裸鼠皮下移植瘤作用的强度, 并探讨其机制。

方法: 建立人肝癌BEL-7402裸小鼠皮下移植瘤模型研究瑞香狼毒药效组分Zp1111抗肿瘤作用与对荷瘤裸鼠体质量与免疫器官的影响, 免疫组织化学法检测用药前后BEL-7402皮下移植瘤组织Bcl-2与Bax阳性表达的变化。

结果: Zp1111对裸小鼠皮下移植瘤BEL-7402具有较强的抑制作用, 187.5 mg/kg、250 mg/kg(折合成生药量)剂量时对移植瘤的相对肿瘤增殖率T/C小于60%; 该组分能显著上调BEL-7402移植瘤组织Bax基因的表达, 但对Bcl-2的表达影响较弱。

结论: 瑞香狼毒药效组分在体内对人肝癌细胞BEL-7402裸鼠移植瘤具有较强的抑制作用并呈现一定的剂量依赖关系, 该组分具有一定的诱导凋亡作用, 可能与上调Bax有关。

关键词: 肝肿瘤; 瑞香狼毒; 细胞凋亡; Bcl-2; Bax

■背景资料

瑞香狼毒具有“逐水祛痰散结”作用, 功能“破积聚饮食寒热水气”, 临床广泛用于治疗肝、肺、胃、肠、乳腺等肿瘤获得良效。现代医学研究亦发现该中药具有良好的抗肿瘤作用, 但目前尚无其对来源于裸鼠移植瘤抑制作用及其抗肿瘤机制的文献报道。

■同行评议者

李康, 副教授, 广东药学院药科学院药物分析教研室

■研究前沿

近年来,国内外对瑞香狼毒化学与药理学研究方兴未艾。瑞香狼毒主要含有二萜类、香豆素类、木脂素类及黄酮类化学成分,其中瑞香烷类化合物等萜类化合物是该中药特有的且具备较好的抗肿瘤生物活性,而其抗肿瘤机制是目前亟待研究的重要内容。

潘国凤, 杨庆, 刘安, 朱晓新. 瑞香狼毒药效组分对裸鼠肝癌移植瘤的抑制及其机制. 世界华人消化杂志 2011; 19(26): 2717-2722

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2717.asp>

0 引言

瑞香狼毒(*Stellera chamaejasme* L.)是狼毒的正品,始载于《神农本草经》,具有“逐水祛痰散结”的功能,现代临床多用于肝、肺、胃癌等恶性肿瘤的治疗。据文献报道,瑞香狼毒提取物能有效抑制小鼠移植瘤H22^[1]、S-180、HePS、Lewis^[2,3]与P388^[4]生长,但对人来源移植瘤抑制作用的观察却未见文献报道,其抗肿瘤机制有待进一步研究证实。目前,众多体外研究表明瑞香狼毒提取物具有诱导凋亡的作用^[5,6],故本研究旨在探讨瑞香狼毒药效组分Zp1111对人肝癌细胞株BEL-7402裸鼠皮下移植瘤的抑制作用及对移植瘤组织Bcl-2与Bax阳性表达的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 SPF级BALB/C裸小鼠,♀,日龄35-40 d,体质量18-22 g,由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供。合格证编号:沪动合证字122号。饲养在万级屏障系统(SPF级),室温25℃,相对湿度60%。人肝癌细胞BEL-7402,由中国药科大学新药筛选中心惠赠。药材瑞香狼毒,产于广西壮族自治区,经中国中医科学院中药所王孝涛教授鉴定,Zp1111是瑞香狼毒生药材无水乙醇提取,浓缩液(挥发至无醇味)上聚酰胺柱,依次用水、30%、60%、100%乙醇分别洗3个柱体积,60%乙醇洗脱部分干燥后得到的样品。受试药Zp1111以适量吐温-80溶解后用无菌生理盐水定容至所需浓度,吐温-80终浓度为0.5%;溶剂对照组为含0.5%吐温-80的生理盐水溶液。阳性药物氟尿嘧啶注射液,上海旭东海普药业有限公司生产,批号:080401,原包装浓度0.25 g/10 mL,用无菌生理盐水稀释至所需浓度。Mouse anti-Bcl-2批号H1208,Mouse anti-Bax批号E0608,均为Santa Cruz公司产品,免疫组化稀释浓度为1:200。

1.2 方法

1.2.1 处理:参考文献[7],取生长旺盛期的BEL-7402瘤组织剪切成1.5 mm³左右,在无菌条件下,接种于裸小鼠右侧腋窝皮下,待肿瘤生长至100-300 mm³后将动物体质量与肿瘤体积进行配对后随机分5组:溶剂对照组动物12只,阳性对照组(5-FU, 20 mg/kg)6只与Zp1111高剂量

表 1 免疫组织化学方法计分判定标准

阳性细胞		着色强度计分	
百分比(%)	计分	强度(颜色)	计分
0	0	无	0
25	1	弱(淡黄)	1
26-50	2	中(棕黄)	2
51-75	3	强(棕褐)	3
>75	4		

组(250 mg/kg,折合成生药量,下同)、中剂量组(187.5 mg/kg)、低剂量组(125 mg/kg)各6只;均为腹腔注射给药,每周给3次。用精密游标卡尺测量移植瘤直径,每周3次,按以下公式计算肿瘤体积、相对肿瘤体积及相对肿瘤增殖率:(1)肿瘤体积(tumor volume, TV),计算公式为: $TV = 1/2 \times a \times b^2$ (其中a、b分别表示长宽);(2)相对肿瘤体积(relative tumor volume, RTV),计算公式为: $RTV = TV_t / TV_0$ (其中TV₀为分笼给药时,即d₀肿瘤体积,TV_t为每1次测量时的肿瘤体积);(3)相对肿瘤增殖率T/C(%),计算公式为: $T/C(\%) = T_{RTV} / C_{RTV} \times 100$ (T_{RTV}:治疗组RTV; C_{RTV}:阴性对照组RTV),试验结果以相对肿瘤增殖率T/C(%)作为抗肿瘤活性的评价指标, T/C<60%为初步有效^[8]。给药第21天,解剖裸鼠,剥取肿瘤与脾脏,称质量,肿瘤标本用甲醛固定,免疫组织化学检测Bcl-2与Bax阳性表达。

1.2.2 结果判定:组织化学检测对照方法:阳性细胞为棕黄色至黄色表达于细胞质(Bax与Bcl-2染色部位主要在细胞质),阴性细胞核为蓝色。阳性对照采用已知的阳性切片,以PBS液作空白对照。在装有目镜网格测微尺的光镜高倍镜下观察,随机选择10个视野,观察每个视野中阳性细胞所占的百分比与着色强度。结果判定标准:染色结果参照Fromowitz等^[9]的综合计分法(表1)。两分相加,0分为阴性(-),2-3分为弱阳性(+),4-5分为中度阳性(++),6-7分为强阳性(+++)。

统计学处理 实验结果采用SPSS11.0统计软件进行分析。其中,计量资料用mean±SD表示,采用方差分析检验;小样本计数资料采用Fisher's精确检验。

2 结果

2.1 Zp1111对BEL-7402裸小鼠皮下移植瘤的抑制作用及对荷瘤裸鼠体质量与脾脏的影响 瑞香狼毒提取物Zp1111腹腔注射给药高、中剂量对人肝癌BEL-7402裸小鼠移植瘤有较强的生长抑

表 2 Zp1111用药前后人肝癌BEL-7402裸小鼠移植瘤相对增殖率变化

分组	剂量 (mg/kg)	<i>n</i>		体质量(g)		TV		RTV	T/C(%)
		开始	最后	d0	d21	d0	d21		
溶剂对照		12	12	18.84±0.84	22.52±0.69	201±79	1 596±491	8.54±2.28	
5-FU组	20.0	6	6	19.27±1.37	22.05±1.00	200±75	763±245 ^b	3.94±0.52 ^a	46.11
Zp1111高剂量组	250.0	6	6	18.75±1.35	18.60±1.10 ^b	201±76	885±297 ^a	4.50±1.08 ^a	52.65
Zp1111中剂量组	187.5	6	6	19.03±0.87	21.05±1.14 ^a	199±67	900±194 ^a	5.12±2.40	59.94
Zp1111低剂量组	125.0	6	6	18.95±0.95	21.48±0.41	199±67	1 147±286	6.12±1.34	71.60 ^d

d0: 分笼给药时间, d21: 给药第21天; ^a*P*<0.05, ^b*P*<0.01 vs 溶剂对照组; ^d*P*<0.01 vs 阳性对照(5-FU)组。

表 3 Zp1111对人肝癌BEL-7402裸小鼠移植瘤的抑制作用与脾脏指数的影响

分组	剂量mg/kg	体质量(g)	脾脏质量(g)	脾脏系数	瘤质量(g)	抑瘤率(%)
溶剂对照		22.52±0.69	0.2057±0.0302	0.0092±0.0012	0.90±0.15	
5-FU组	20.0	22.05±1.00	0.2324±0.1114	0.0104±0.0046	0.52±0.26 ^b	42.41
Zp1111高剂量组	250.0	18.60±1.10 ^b	0.1481±0.0206 ^b	0.0080±0.0010	0.56±0.22 ^a	38.18
Zp1111中剂量组	187.5	21.05±1.14 ^a	0.1701±0.0140 ^a	0.0081±0.0010	0.59±0.20 ^b	35.42
Zp1111低剂量组	125.0	21.48±0.41	0.1604±0.0196 ^a	0.0071±0.0012 ^a	0.77±0.18	15.00

^a*P*<0.05, ^b*P*<0.01 vs 溶剂对照组。

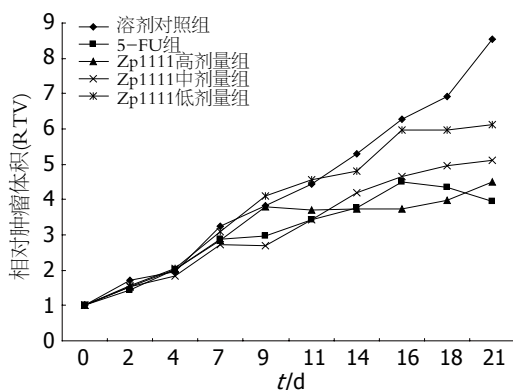


图 1 Zp1111对BEL-7402裸小鼠移植瘤生长的影响。

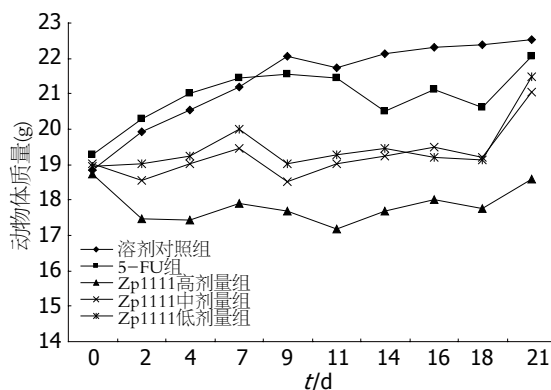


图 2 Zp1111对荷瘤小鼠体质量的影响。

制作用, T/C分别为52.65%、59.94%; 低剂量对人肝癌BEL-7402裸小鼠移植瘤抑制作用较弱, T/C为71.60%。阳性对照组5-FU腹腔注射给药20 mg/kg对人肝癌BEL-7402裸小鼠移植瘤有较强的生长抑制作用, T/C为46.11%。Zp1111对荷瘤裸小鼠的体质量影响很大, 高剂量组体质量下降非常明显, 第1次给药后体质量与溶剂对照组低2.5 g左右(平均体质量分别为17.47 g、19.94 g), 之后, 每次给药前称取的体质量均在17.5 g左右波动; 中、低剂量组在给药初期体质量也见明显降低, 之后略有回升, 一般在隔2 d给药时称质量发现体质量回升明显, 而连续两次隔天给药后小鼠体质量丢失现象又重现, 以致根据时间-体质量

对照A组
对照B组
5-FU 20 mg/kg组
Zp1111高剂量组
Zp1111中剂量组
Zp1111低剂量组



图 3 Zp1111对人肝癌BEL-7402裸小鼠移植瘤的实验治疗作用。

量绘制的曲线呈现波形变化趋势(表2, 3, 图1-3)。

■ 相关报道

黄费祥等的实验结果表明, 瑞香狼毒醇提部位对体外培养的肿瘤细胞系BEL-7402, SGC-7901和L-1210细胞系都具有显著的体外抗肿瘤作用, 且与剂量呈正相关。

■创新盘点

本研究通过建立人肝癌BEL-7402裸小鼠皮下移植瘤模型研究瑞香狼毒药效组分Zp1111抗肿瘤作用与对荷瘤裸鼠体质量与免疫器官的影响,并采用免疫组化法检测用药前后BEL-7402皮下移植瘤组织Bcl-2与Bax阳性表达的变化,是瑞香狼毒提取物首次在人来源裸鼠移植瘤模型上进行的探讨研究.

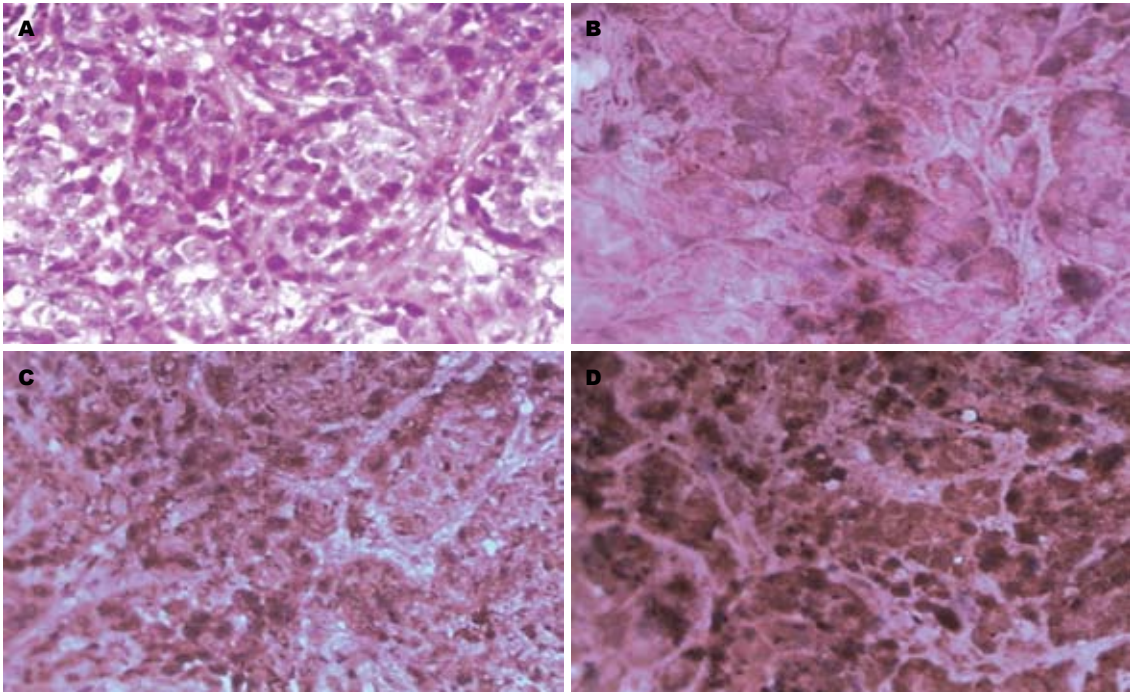


图 4 BEL-7402移植瘤组织Bax免疫组织化学(× 200). A: 阴性对照; B: Bax(+); C: Bax(++); D: Bax(+++).

表 4 Zp1111用药前后BEL-7402移植瘤组织Bax阳性表达的变化 (n = 6)

分组	剂量(mg/kg)	阴性表达(n)		阳性表达(n)		阳性表达合计(n)
		-	+	++	+++	
溶剂对照组	-	2	4	0	0	4
Zp1111低剂量组	125.0	1	2	2	1	5
Zp1111中剂量组	187.5	0	1	3	2	6
Zp1111高剂量组	250.0	0	1	2	3	6
5-FU组	20.0	0	0	2	4	6

表 5 Zp1111用药前后BEL-7402移植瘤组织Bcl-2阳性表达的变化 (n = 6)

分组	剂量(mg/kg)	阴性表达(n)		阳性表达(n)		阳性表达合计(n)
		-	+	++	+++	
溶剂对照组	-	1	1	4	0	5
Zp1111低剂量组	125.0	3	3	0	0	3
Zp1111中剂量组	187.5	4	2	0	0	2
Zp1111高剂量组	250.0	2	4	0	0	4
5-FU组	20.0	5	1	0	0	1

2.2 Zp1111对BEL-7402皮下移植瘤组织Bcl-2与Bax阳性表达的影响 溶剂对照组BEL-7402移植瘤组织内Bax的阳性表达分级在“(-)-(+)”之间,而Zp1111各剂量组均能提高Bax的阳性表达,中、高剂量组Bax的阳性表达分级均在“+”以上,并且大多在“++, +++”之间,可见Zp1111能显著提高肿瘤组织内Bax的阳性表达. 与之相对

的, 溶剂对照组BEL-7402移植瘤组织内Bcl-2的阳性表达分级在“+, ++”之间, 而Zp1111各剂量组均能下调Bcl-2的阳性表达, 各剂量组Bcl-2的阳性表达分级均在“(-)-(+)”之间(表4-6, 图4, 5).

3 讨论

瑞香狼毒始载于《神农本草经》, 谓其性味

表 6 Zp1111用药前后BEL-7402移植瘤组织Bax与Bcl-2阳性表达百分比及其比值

分组	Bax表达分级	Bax阳性表达 平均百分比(%)	Bcl-2表达分级	Bcl-2阳性表达 平均百分比(%)	Bax/Bcl-2
溶剂对照组	(-)-(+)	23 ± 7	(+)-(++)	53 ± 18	0.43
Zp1111低剂量组	++	57 ± 24 ^b	(-)-(+)	26 ± 10 ^a	2.19
Zp1111中剂量组	++/+++	71 ± 17 ^b	-	17 ± 7 ^b	4.18
Zp1111高剂量组	++/+++	73 ± 19 ^b	+	33 ± 13	2.21
5-FU组	++/+++	80 ± 14 ^b	-	13 ± 7 ^b	6.15

^a*P*<0.05, ^b*P*<0.01 vs 溶剂对照组.

■同行评价

本文探讨了瑞香狼毒药效组分Zp1111对人肝癌细胞株BEL-7402裸鼠皮下移植瘤的抑制作用及对移植瘤组织Bcl-2与Bax阳性表达的影响. 实验设计合理, 数据详实, 讨论合理.

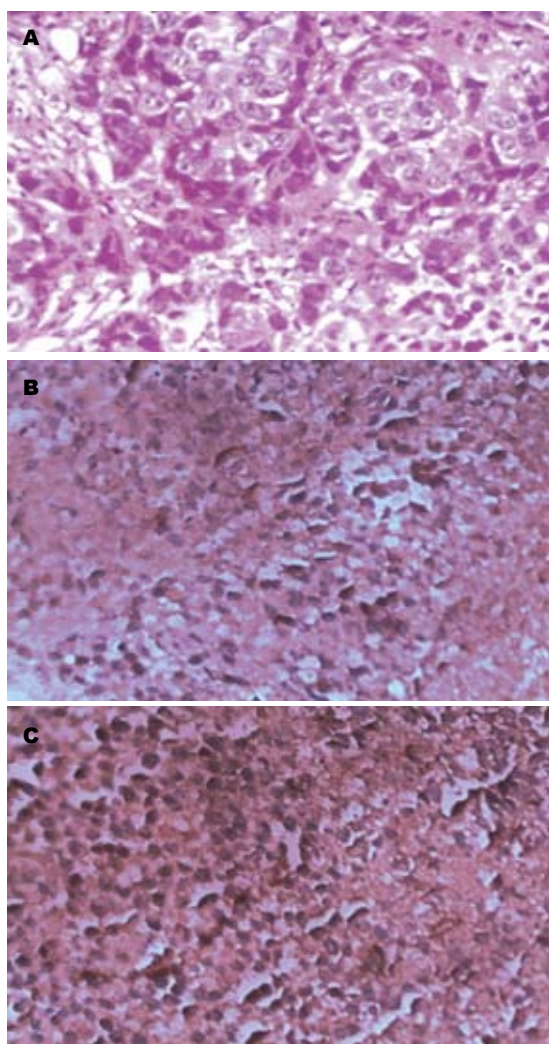


图 5 BEL-7402移植瘤组织Bcl-2免疫组织化学(×200). A: 阴性对照; B: Bcl-2(+); C: Bcl-2(++).

辛、苦、平, 有毒, 入肺、肝、脾经, 具有“逐水祛痰散结”的功能, 主治“积聚饮食, 寒热水气”. 现代研究表明该中药在抑制肿瘤细胞增殖、诱导细胞凋亡、调控细胞周期、调节机体免疫系统等方面具有突出的防治肿瘤的药用价值. 黄费祥等^[10]的实验结果表明, 瑞香狼毒醇提部位对体外培养的肿瘤细胞系BEL-7402,

SGC-7901和L-1210细胞系都具有显著的体外抗肿瘤作用, 且与剂量呈正相关. 本研究前期通过体外筛选结果发现瑞香狼毒醇提物Zp1111对人肝癌细胞株BEL-7402具有较好的抑制作用, 对昆明种小鼠肝癌H22皮下移植瘤的抑制率接近50%^[1], 故选用来源的肝癌细胞BEL-7402建立裸鼠上皮移植瘤模型. 本实验还通过前期预试基本确定了较为合理的药物剂量及给药频率, 正式实验的结果与预试具有较好的一致性. 试验中各组小鼠均未出现动物死亡事件. 由计算结果可知, Zp1111在250 mg/kg(折合成生药量)对裸小鼠移植瘤BEL-7402的相对肿瘤增殖率为52.65%, 故认为该剂量具有较好的体内抗人来源肿瘤的作用.

凋亡是多基因严格控制的过程. Bcl-2蛋白家族是细胞凋亡相关基因研究中研究得最多的一类蛋白质^[11]. Bcl-2蛋白家族成员, 如Bcl-w、Bcl-x、Bax、Bak、Bad、Bim等, 他们分别既有抗凋亡作用, 也有促凋亡的作用. 抗凋亡基因Bcl-2与诱导凋亡基因Bax之间的二聚体化是其功能实现或功能调节的重要形式: 当Bax同源二聚体形成, 使诱导细胞凋亡; 随着Bcl-2蛋白表达量上升, 越来越多的Bax二聚体分开, 与Bcl-2形成比Bax-Bax更稳定的Bax-Bcl-2异源二聚体, 从而中和了Bax-Bax诱导细胞凋亡的作用, 即Bcl-2与Bax的比例调节了凋亡的发生. 焦效兰等^[12]实验表明瑞香狼毒水提物能下调Bcl-2蛋白表达: SGC-7901细胞Bcl-2蛋白表达率从78.3%下降到32.9%. 本研究中, 通过免疫组化的方法检测了瑞香狼毒药效组分Zp1111对裸小鼠BEL-7402移植瘤细胞内的Bcl-2与Bax蛋白的阳性表达的影响结果可知, 凋亡基因Bax在用药后显著上升, 而抗凋亡基因没有明显下调的改变. 故推测该提取物可能通过提高肿瘤细胞内凋亡诱导基因Bax的含量, 而对Bcl-2有轻微下调的作用, 从而

增加肿瘤细胞内Bax-Bax二聚体的比例而诱导细胞凋亡并进而发挥药物抗肿瘤作用。Bcl-2下降不明显或无变化的情况下, Bax蛋白表达的增加有利于Bax-Bax二聚体的形成, 从而诱导细胞凋亡的发生。该药效组分诱导BEL-7402移植瘤的凋亡作用有待于进一步通过电镜等形态学观察验证; 若存在凋亡事件显著增加现象, 研究移植瘤Bax mRNA的表达将有助于量化Zp1111对凋亡基因Bax的影响。

总之, Bax蛋白表达的上调很有可能是Zp1111诱导BEL-7402移植瘤细胞凋亡的主要机制之一。

4 参考文献

- 1 潘国凤, 杨庆, 刘安, 温小刚, 李玉洁, 董宇, 朱晓新. 瑞香狼毒药效组分抑制小鼠皮下移植瘤H22的实验研究. 中华中医药杂志 2009; 24: 438-442
- 2 樊俊平, 贾正平, 谢景文, 刘志跃, 焦效兰. 瑞香狼毒水提物抗肿瘤作用. 内蒙古医学院学报 1996; 18: 67-70
- 3 樊俊杰, 贾正平, 谢景文, 周景熙. 瑞香狼毒对小鼠移植瘤生长的影响. 兰州医学院学报 1994; 20: 228-230
- 4 冯威健, 池川哲郎, 吉田光二. 瑞香狼毒提取物尼地吗啉的抗癌活性. 中华肿瘤杂志 1995; 17: 24-26
- 5 樊俊杰, 贾正平, 谢景文, 徐丽婷, 王荣, 谢华. 瑞香狼毒水提物小鼠药物血清诱导K562细胞凋亡. 西北国防医学杂志 2001; 22: 208-210
- 6 贾正平, 王彦广, 樊俊杰, 谢景文, 徐丽婷, 刘盛. 瑞香狼毒诱导HL-60细胞凋亡和调节SGC-7901细胞bcl-2蛋白表达. 中草药 2001; 32: 1097-1101
- 7 王兴旺, 胥彬. 抗肿瘤药物筛选模型和方法研究的新结果. 北京: 军事医学出版社, 1998: 110
- 8 国家食品药品监督管理局. 细胞毒类抗肿瘤药物非临床研究技术指导原则. 中国新药与临床杂志 2008; 27: 462-465
- 9 Fromowitz FB, Viola MV, Chao S, Oravez S, Mishriki Y, Finkel G, Grimson R, Lundy J. ras p21 expression in the progression of breast cancer. *Hum Pathol* 1987; 18: 1268-1275
- 10 黄费祥, 贾正平. 瑞香狼毒分子量小于一万的醇提部位小鼠药物血清体外抗肿瘤活性. 西北国防医学杂志 2002; 23: 177-179
- 11 Ishii HH, Gobe GC, Yoneyama J, Mukaide M, Ebihara Y. Role of p53, apoptosis, and cell proliferation in early stage Epstein-Barr virus positive and negative gastric carcinomas. *J Clin Pathol* 2004; 57: 1306-1311
- 12 焦效兰, 贾正平. 瑞香狼毒水提物小鼠药物血清对人胃腺癌SGC7901细胞增殖的影响. 中成药 2002; 24: 196-197

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

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

• 消息 •

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

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

胆管疤痕相关因子在梗阻型胆管损伤后不同时间段的表达

黄强, 刘臣海, 王成, 胡元国, 邱陆军, 汤志刚, 王士堂, 林先盛, 王世杰, 谢放

黄强, 刘臣海, 王成, 胡元国, 邱陆军, 汤志刚, 王士堂, 林先盛, 王世杰, 谢放, 安徽省立医院普外科胆胰病区 安徽省合肥市 230001

安徽省科技攻关计划面上基金资助项目, No. 08010302189
作者贡献分布: 此课题立项由黄强完成; 设计由黄强、王成及刘臣海完成; 研究过程由胡元国、邱陆军、汤志刚、王士堂、林先盛、王世杰及谢放完成; 实验指导及论文修改由黄强与刘臣海。

通讯作者: 黄强, 教授, 230001, 安徽省合肥市, 安徽省立医院普外科胆胰病区. liuchenhai001@163.com

收稿日期: 2010-10-31 修回日期: 2011-04-16

接受日期: 2011-04-26 在线出版日期: 2011-09-18

Temporal expression of scar formation-related factors in obstructive bile duct injury

Qiang Huang, Chen-Hai Liu, Cheng Wang, Yuan-Guo Hu, Lu-Jun Qiu, Zhi-Gang Tang, Shi-Tang Wang, Xian-Sheng Lin, Shi-Jie Wang, Fang Xie

Qiang Huang, Chen-Hai Liu, Cheng Wang, Yuan-Guo Hu, Lu-Jun Qiu, Zhi-Gang Tang, Shi-Tang Wang, Xian-Sheng Lin, Shi-Jie Wang, Fang Xie, Department of General Surgery, Anhui Provincial Hospital, Hefei 230001, Anhui Province, China

Supported by: the Key Scientific and Technological Program of Anhui Province, No. 08010302189

Correspondence to: Huang Qiang, Professor, Department of General Surgery, Anhui Provincial Hospital, Hefei 230001, Anhui Province, China. liuchenhai001@163.com

Received: 2010-10-31 Revised: 2011-04-16

Accepted: 2011-04-26 Published online: 2011-09-18

Abstract

AIM: To observe the temporal expression of scar formation-related factors in obstructive bile duct injury and to explore the effect of timing of surgery on the development of bile duct stricture after repair of obstructive bile duct injury.

METHODS: A canine model of obstructive bile duct injury was developed. HE staining and Masson staining were used to observe the structural changes and collagen proliferation of the bile duct. Immunohistochemistry was used to determine the expression of macrophages (MΦ), α-smooth muscle actin (α-SMA), and transforming growth factor-β1 (TGF-β1).

RESULTS: In the early stage of bile duct injury

(BDL5), mucosal edema and partial rupture of elastic fibers occurred. Prolonged obstruction led to mucosal thinning, continued proliferation of fibroblasts and collagen formation, and irregular fiber arrangement. With the prolongation of injury, the proliferation of collagen fibers was enhanced [28.47 ± 4.06 (BDL5) vs 59.92 ± 9.13 (BDL30)], and scar-related factors α-SMA, MΦ, and TGF-β1 were highly expressed [MΦ: 0.262 ± 0.031 (BDL0) vs 0.409 ± 0.034 (BDL5); α-SMA: 0.239 ± 0.035 (BDL0) vs 0.387 ± 0.018 (BDL5); TGF-β1: 0.245 ± 0.033 (BDL0) vs 0.386 ± 0.029 (BDL5), all $P < 0.05$]. With the further lengthening of injury time, the expression of the above factors was not enhanced [MΦ: 0.409 ± 0.034 (BDL5) vs 0.422 ± 0.023 (BDL30); α-SMA: 0.387 ± 0.018 (BDL5) vs 0.358 ± 0.029 (BDL30); TGF-β1: 0.386 ± 0.029 (BDL5) vs 0.389 ± 0.056 (BDL30), all $P > 0.05$].

CONCLUSION: The duration of bile duct injury has no significant correlation with excessive scar formation of the bile duct wall. The timing of repairing bile duct is not the main factor for the development of anastomotic stricture.

Key Words: Bile duct injury; Macrophages; Transforming growth factor-β1; Smooth muscle actin

Huang Q, Liu CH, Wang C, Hu YG, Qiu LJ, Tang ZG, Wang ST, Lin XS, Wang SJ, Xie F. Temporal expression of scar formation-related factors in obstructive bile duct injury. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(26): 2723-2729

摘要

目的: 探讨手术时机的选择对胆道修复后吻合口狭窄的影响。

方法: 运用家犬制作梗阻型胆管损伤的动物模型, 通过HE染色及Masson特染分析损伤后胆管壁的结构改变及胶原增生情况, 免疫组织化学法测定胆管梗阻损伤后不同时间段巨噬细胞MΦ、α-平滑肌肌动蛋白(α-smooth muscle actin, α-SMA)、转化生长因子-β1(transforming growth factor-β1, TGF-β1)表达情况。

■背景资料

胆道损伤只能减少不能避免, 故损伤后的处理极为重要, 然而胆管的特殊结构及作用, 使得修复极为困难, 特别是远期效果无法预知, 主要表现在修复后的胆道再狭窄, 因此, 研究胆道损伤后吻合口狭窄的机制及相关影响因素, 是胆道损伤处理的重要依据。

■同行评议者

陈进宏, 副主任医师, 复旦大学附属华山医院外科

■ 研发前沿

胆道损伤后吻合口的狭窄一直是胆道外科难以攻克的难题,究其原因发生机制及影响因素不明,目前通过病例的回顾性分析总结出一些因素可能具有相关性。

结果:胆管损伤后早期(BDL5)出现黏膜水肿,部分弹力纤维断裂,随着梗阻时间延长,黏膜层变薄,成纤维母细胞及胶原组织不断增生,纤维呈无规则排列,随着损伤时间的延长,胶原纤维增生不断增强[28.47 ± 4.06 (BDL5) *vs* 59.92 ± 9.13 (BDL30)],但是疤痕相关因子MΦ、α-SMA及TGF-β1在损伤后5 d即出现高表达[MΦ: 0.262 ± 0.031 (BDL0) *vs* 0.409 ± 0.034 (BDL5), α-SMA: 0.239 ± 0.035 (BDL0) *vs* 0.387 ± 0.018 (BDL5), TGF-β1: 0.245 ± 0.033 (BDL0) *vs* 0.386 ± 0.029 (BDL5), $P > 0.05$],而后随着损伤时间的延长,其表达并未出现增高[MΦ: 0.409 ± 0.034 (BDL5) *vs* 0.422 ± 0.023 (BDL30), α-SMA: 0.387 ± 0.018 (BDL5) *vs* 0.358 ± 0.029 (BDL30), TGF-β1: 0.386 ± 0.029 (BDL5) *vs* 0.389 ± 0.056 (BDL30), $P < 0.05$],两者无时效关系。

结论:胆管损伤后时间的长短与管壁疤痕是否过度形成无关,故胆管修复时间不是术后吻合口狭窄的主要因素。

关键词:胆道损伤;巨噬细胞;转化生长因子-β1;平滑肌肌动蛋白

黄强, 刘臣海, 王成, 胡元国, 邱陆军, 汤志刚, 王士堂, 林先盛, 王世杰, 谢放. 胆管疤痕相关因子在梗阻型胆管损伤后不同时间段的表达. 世界华人消化杂志 2011; 19(26): 2723-2729
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2723.asp>

0 引言

胆管损伤修复后吻合口狭窄是胆道外科医生处理胆道损伤后最为苦恼的并发症,他的发生不仅给患者带来严重伤害,而且也给胆道外科医生再处理制造难度,如何避免胆管手术后吻合口的狭窄已经被大家共同讨论和分析,但目前仍未获得确切的相关因素和相应的对策;同时吻合口的狭窄与疤痕过度增生直接相关,手术干预时机的选择是否对术后吻合口的狭窄相关目前仍未科学依据证实. 本实验通过动物实验,动态观察胆管损伤后损伤胆管壁内疤痕相关因子的表达情况,以求证明两者之间的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 选用本地健康家犬60只,雌雄不限,平均体质量12 kg,自行购买家犬,借用安徽医科大学动物实验室进行手术及饲养观察. 饲养条件为室温22℃-25℃,湿度40%-60%的圈养,自由进水和食物。

1.2 方法

1.2.1 分组:随机分成5个实验组,每组12头,分别为胆道梗阻5 d组(BDL5组),胆道梗阻10 d组(BDL10组),胆道梗阻15 d组(BDL15组)及胆道梗阻20 d组(BDL20组)和胆道梗阻30 d组(BDL30组),由于对照组(BDL0组)的取材不影响后期实验组,即将5 d组同时作为对照组使用。

1.2.2 造模:模拟临床梗阻型胆道损失的发生原理,分离出胆总管后再止血钳钳夹结扎进行制作,具体步骤为:实验动物术前禁食12 h,用3%戊巴比妥钠(1 mg/kg)静注麻醉,取仰卧位,固定于手术台上,备皮,碘酒、乙醇消毒手术野并铺巾,取右上腹腹直肌切口进腹,首先沿着肝脏面暴露出肝门部,找到胆总管,距十二指肠上缘0.5 cm处游离出胆总管,上下游离范围不超过1 cm,锐性分离、双重结扎胆总管,梗阻型胆道损伤模型建立完毕后,逐层关腹,术后肌注青霉素180万单位(2次/d)进行预防感染3 d,普通饲养。

1.2.3 标本收集及检测:采集标本为损伤处胆管,对照组标本于制作损伤模型中已获得,实验组分别留待胆道梗阻后第5、10、15、20和30天再次进腹手术,获得损伤胆管标本

1.2.4 所需观察指标:对所获得胆管标本进行HE染色及Masson特染,观察不同时间段胆管壁结构的改变及胶原纤维的表达情况,同时通过免疫组化检测疤痕相关因子α-SMA、MΦ及TGF-β1的表达情况,免疫组化基本原理为:一抗和组织切片中的抗原结合后,用生物素标记的二抗与一抗结合,再使用链霉素抗生物素蛋白—过氧化物酶放大系统产生低背景、高放大效果来测定组织细胞中的抗原. 具体步骤为:固定:PBS浸洗盖玻片2次,各1 min后用4%多聚甲醛浸泡30 min, PBS彻底浸洗盖玻片3次,各5 min,空气干燥10 min后PBS浸洗2 min,破膜:0.5% TritonX-100(PBS配制)孵育2次,各5 min, 3% H₂O₂去离子水孵育10 min,以消除内源性过氧化氢酶的活性,蒸馏水冲洗, PBS浸泡5 min, 封闭:正常山羊血清工作液封闭,室温置湿盒中孵育15 min,倾去,勿洗结合MΦ、α-SMA、TGF-β1一抗:滴加适当比例(1:50-1:200)稀释的一抗,置湿盒中37℃孵育3 h(用PBS缓冲液代替一抗作为阴性对照), PBS浸洗5 min, 各3次滴加生物素化二抗工作液,置湿盒中室温孵育10 min, PBS浸洗5 min, 各3次滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液,置湿盒中室温孵育10 min, PBS浸洗5 min, 各3次DAB显色:新鲜配制DAB-H₂O₂底物

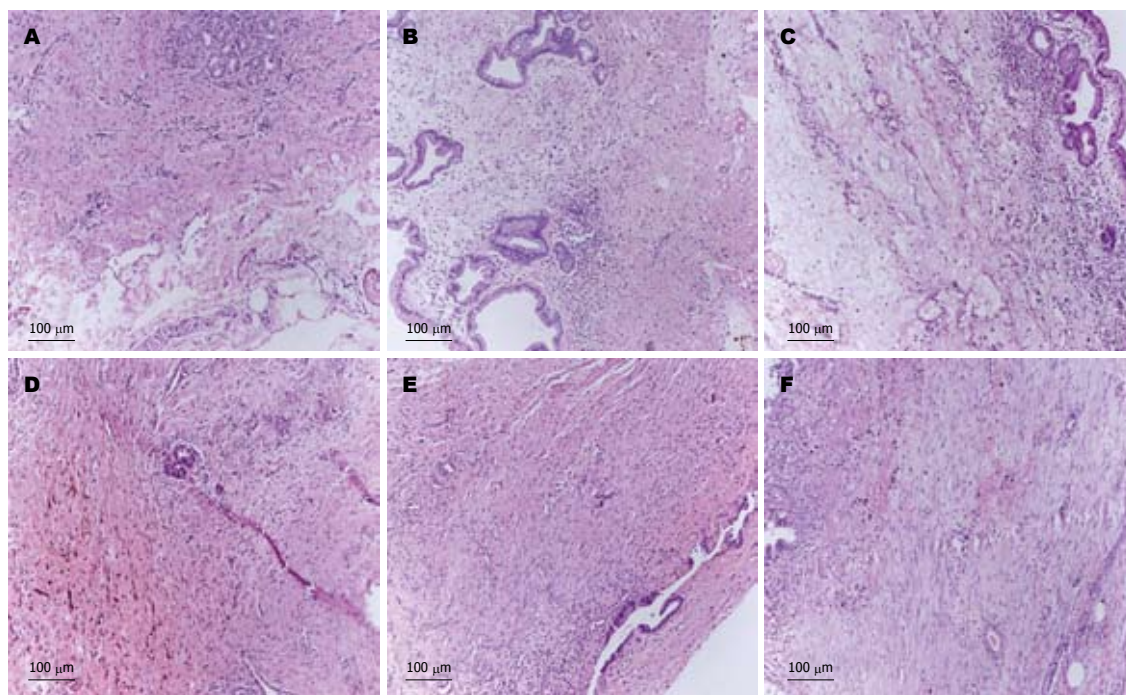


图1 不同时间段胆管梗阻损伤后受损胆管的HE染色($\times 100$). A: 对照组; B: BDL5组; C: BDL10组; D: BDL15组; E: BDL20组; F: BDL30组.

■ 相关报道

有研究发现TGF- $\beta 1$ 与胆道闭锁肝纤维化的发生、发展密切相关, 抑制TGF- $\beta 1$ 的表达有望阻止胆道闭锁患儿肝纤维化进程, 而且TGF- $\beta 1$ 能够使成纤维细胞DNA的合成明显增加.

缓冲液, 室温避光显色5-20 min(光镜下观察: 待细胞着棕色而背底色较淡时, 弃显色液), 蒸馏水冲洗充分, 清除残余显色剂, 复染: 苏木素复染30 s-1 min, 水冲洗, 脱水: 常规梯度乙醇(70%、80%、90%乙醇各浸泡5 min 1次, 95%乙醇, 浸泡5 min 2次、100%乙醇浸泡5 min 3次)二甲苯透明, 中性树胶封片同时运用CMIAS多功能图像分析系统定量测定胶原纤维、 α -SMA、M Φ 及TGF- $\beta 1$ 的表达情况.

统计学处理 采用SPSS13.0软件包进行统计学分析, 计量资料采用 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 损伤后不同时间段胆管壁的结构改变 HE染色后观察到正常组犬胆管内壁表面光滑, 镜下可见成高柱状上皮细胞, 纤维组织层中的胶原纤维及弹性纤维排列有序. 当胆管损伤后, 早期(BDL5、BDL10)管壁炎性细胞浸润增多, 黏膜水肿明显, 且出现部分黏膜断裂, 上皮细胞间隙增大, 细胞受损, 胶原纤维排列被破坏, 杂乱无章, 成纤维母细胞及胶原纤维增生, 至梗阻后期(BDL15、BDL20、BDL30)管壁增厚, 炎性细胞浸润减少水肿减轻, 成纤维母细胞增生及胶原组织增生广泛且伴玻璃样变性, 小血管增生, 黏

膜层变薄, 上皮细胞绒毛低平(图1).

2.2 损伤后不同时间胆管壁内胶原纤维的改变 我们运用特染-Masson染色观察胆管壁内胶原纤维的排列及增生情况, 通过Masson染色后, 胶原被染成亮绿色, 镜下观察可见正常胆管壁内胶原纤维排列整齐, 颜色较淡, 损伤后的胆管壁排列整齐的胶原纤维被破坏, 取而代之的是错中交错的排列, 且染色加深, 通过计算机图像处理系统半定量分析胶原含量显示, 在我们观察的30 d内, 损伤胆管壁内的胶原含量随着损伤时间的延长而不断增加, 未见有胶原纤维增生减弱的现象(图2, 3).

2.3 巨噬细胞(M Φ)在胆管损伤过程中的表达 M Φ 的阳性结果表达位于胆道黏膜固有层, 黏膜下层较少, 正常胆管表达较弱, 胆管损伤后5 d及出现高表达, 且之后一直维持在该水平, 光密度的半定量分析提示M Φ 在损伤早期即出现高表达, 随着损伤时间的延长, 表达强度无明显增强, 维持在高水平, 统计学分析损伤各组见无统计学意义(图4-7).

2.4 α -SMA在胆管损伤过程中的表达 α -SMA表达位于肌成纤维细胞(MFB)、平滑肌细胞胞质和细胞膜, 正常胆管壁平滑肌组织表达较弱, 胆管损伤后持续高表达, 对照组胆管 α -SMA表达较弱/+, 损伤胆管呈现高表达, 半定量分析 α -SMA的表达与损伤时间无关, 光密度值在损

■应用要点

该文集中讨论临床上争议的问题,该结论的确立将减少梗阻性胆道损伤患者因修复时间的选择带来的身心创伤,也进一步证实胆道修复后远期效果的获得主要靠手术的精细操作和修复方式决定,减少医师再处理胆道损伤上的自欺欺人及犹豫,减轻患者的痛苦。

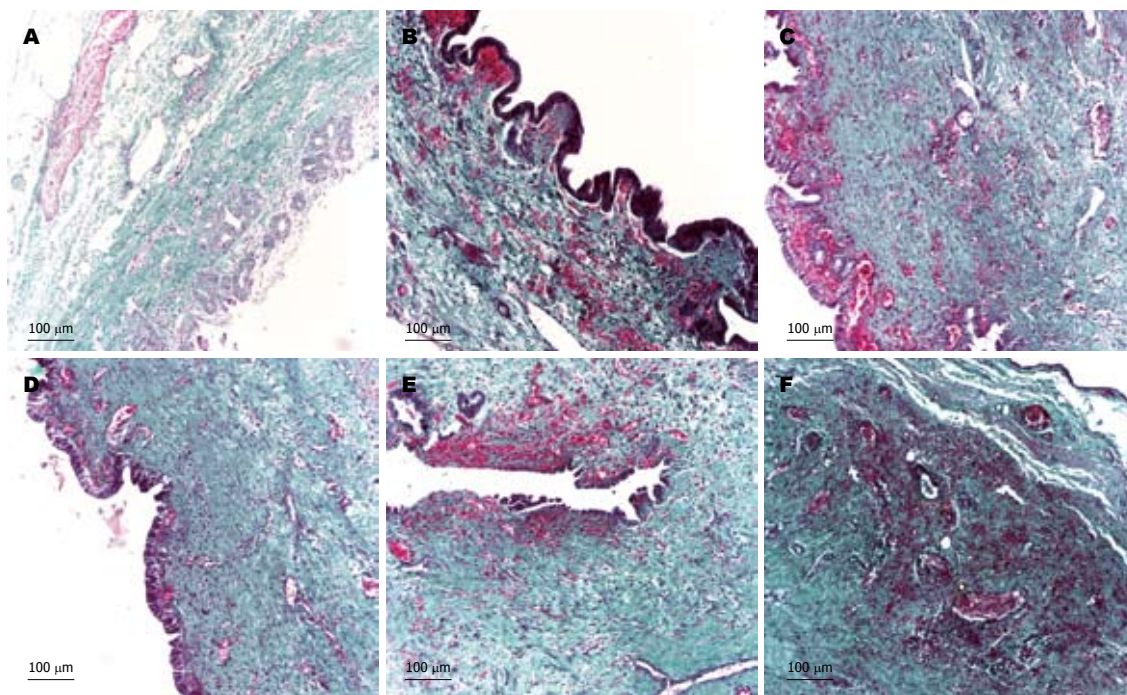


图2 胆管梗阻性损伤不同时期胆管中胶原纤维的变化(Masson染色 $\times 100$)。A: 对照组; B: BDL5组; C: BDL10组; D: BDL15组; E: BDL20组; F: BDL30组。

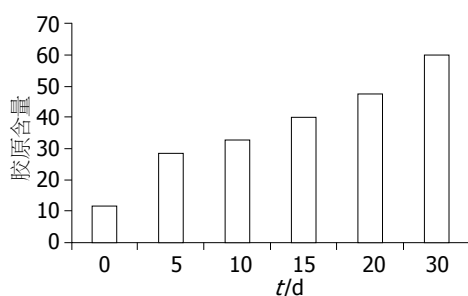


图3 损伤胆管后不同时期胆管壁中胶原含量的定量分析。

伤胆管组间无统计学意义(图5, 7)。

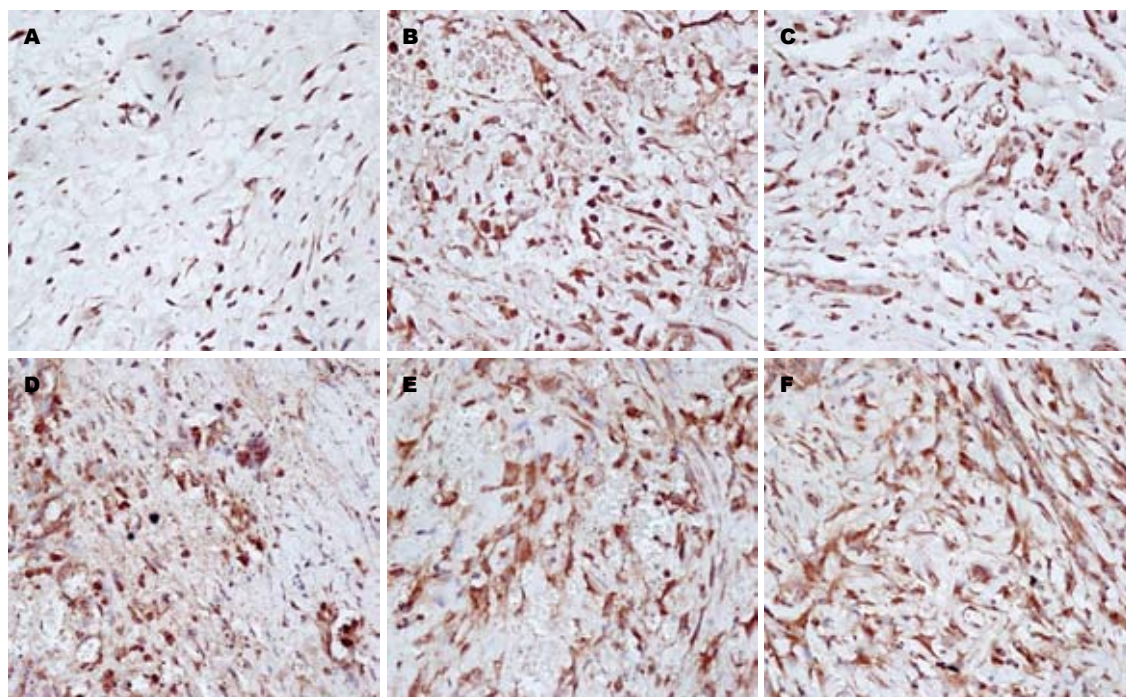
2.4 TGF- β 1在胆管损伤过程中的表达 TGF- β 1表达位于肉芽组织、成纤维细胞、巨噬细胞、及血管内皮细胞的胞质和细胞膜,正常胆管壁组织中表达弱,胆管损伤后持续高表达,对照组胆管TGF- β 1表达较弱,损伤胆管内持续高表达,定量分析TGF- β 1的表达与损伤时间无关,损伤胆管组中吸光度值无统计学差异(图6, 7)。

3 讨论

胆道损伤随着腹腔镜在基层的不断普及而有上升趋势^[1],他的发生一直是困扰胆道外科医生的一个难题,不仅其处理难度大,更重要的是其处理不当后导致严重后果,突出表现为修复后的胆道再狭窄,因此,如何才能获得修复后的良好远期效果一直是胆道外科医生努力的方向。目

前对于造成狭窄的相关因素的临床分析研究较多^[2-4],但目前没有科学的实验依据和数据佐证这些因素;同时目前研究发现疤痕形成是创伤性组织愈合的一个病理生理过程,胆肠吻合口也不例外^[5],而疤痕的形成离不开胶原及疤痕相关因子的增生和表达,目前的胆道损伤再狭窄的基础研究主要集中在组织细胞的凋亡上^[6],对于时机选择是否影响再狭窄未见报道。本实验通过观察损伤胆管壁不同时间段内胶原纤维及疤痕相关因子 α -SMA、M Φ 及TGF- β 1的表达情况,分析手术干预时机是否对术后吻合口狭窄产生影响。

正常胆管是一种纤维弹性薄壁管道,黏膜下主要为大量纤维组织,平滑肌成分较少,当胆管损伤后,黏膜下纤维成分断裂,愈合过程中大量纤维细胞转化为功能活跃的成纤维细胞,导致胶原大量合成,细胞外基质过度沉积,改建较差,最终容易导致疤痕过度增生,吻合口狭窄^[6]。同时胆汁中的胆盐透过破坏的黏膜层与胶原纤维接触可刺激胶原的持续合成,导致吻合口的纤维化。本实验观察到,随犬胆管梗阻时间的延长,胆管结构破坏持续加重,且成纤维细胞及胶原组织持续增生。由此可知,损伤因素的存在将持续刺激受损胆管壁的胶原纤维增生,故早期解除损伤因素是阻断胶原纤维过度增生的唯一办法,从此角度分析,胆管损伤后应该尽快处理。



■同行评价
本文设计合理, 结论可靠, 有一定的科学性以及临床指导意义.

图 4 胆管梗阻性损伤后不同时期胆管中MΦ的表达情况(阳性细胞染色为棕黄色, $\times 400$). A: 对照组; B: BDL5组; C: BDL10组; D: BDL15组; E: BDL20组; F: BDL30组.

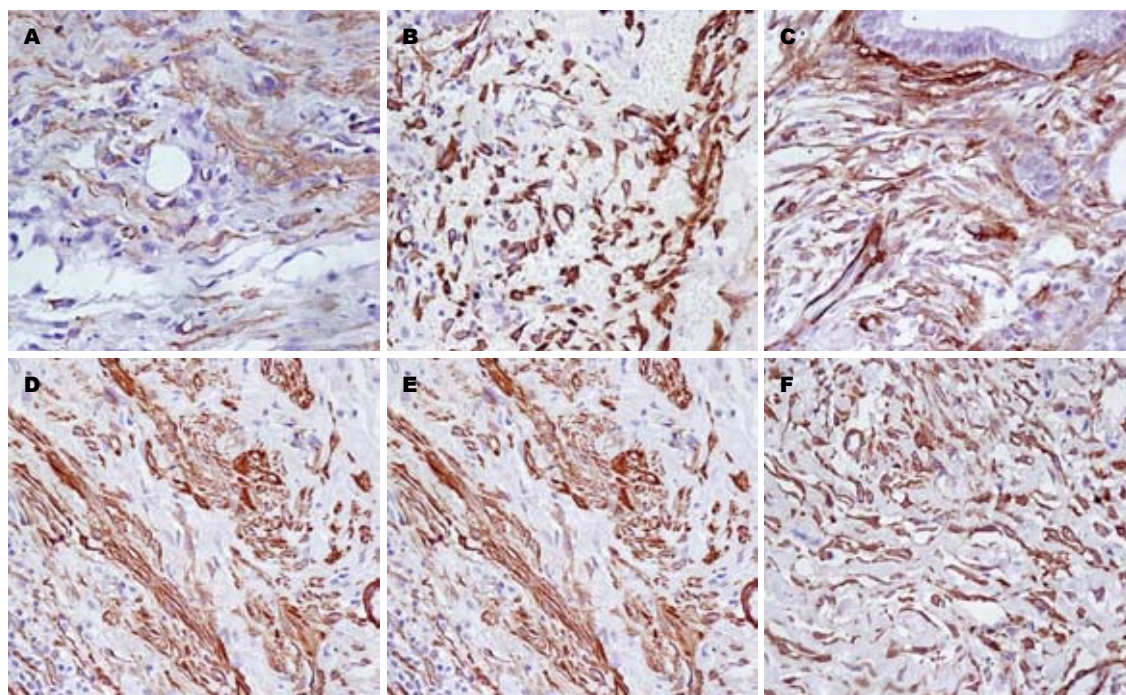


图 5 胆管梗阻性损伤后不同时期损伤胆管中 α -SMA的表达情况(阳性细胞染色为棕黄色, $\times 400$). A: 对照组; B: BDL5组; C: BDL10组; D: BDL15组; E: BDL20组; F: BDL30组.

然而瘢痕的形成不单单仅与胶原纤维的增生相关, 而且与一些疤痕相关因子有关, 其中MΦ(巨噬细胞)、TGF- β 1及 α -SMA是目前研究比较明确的与瘢痕形成相关的因子. 国内耿智敏^[7]就提出: (1)胆管愈合方式属于过度愈合; (2)肌成纤维细胞功能活跃, 持续存在, 是导致胆管

瘢痕性挛缩的重要原因; (3)MΦ(巨噬细胞)、TGF- β 1及 α -SMA高表达是造成胆管愈合过程中成纤维细胞增殖旺盛、细胞外基质过度沉积、胆管疤痕性挛缩的重要因素. 肌成纤维细胞(MFB)是一种在超微结构上兼有成纤维细胞和平滑肌细胞两者特征的非典型的成纤维细胞,

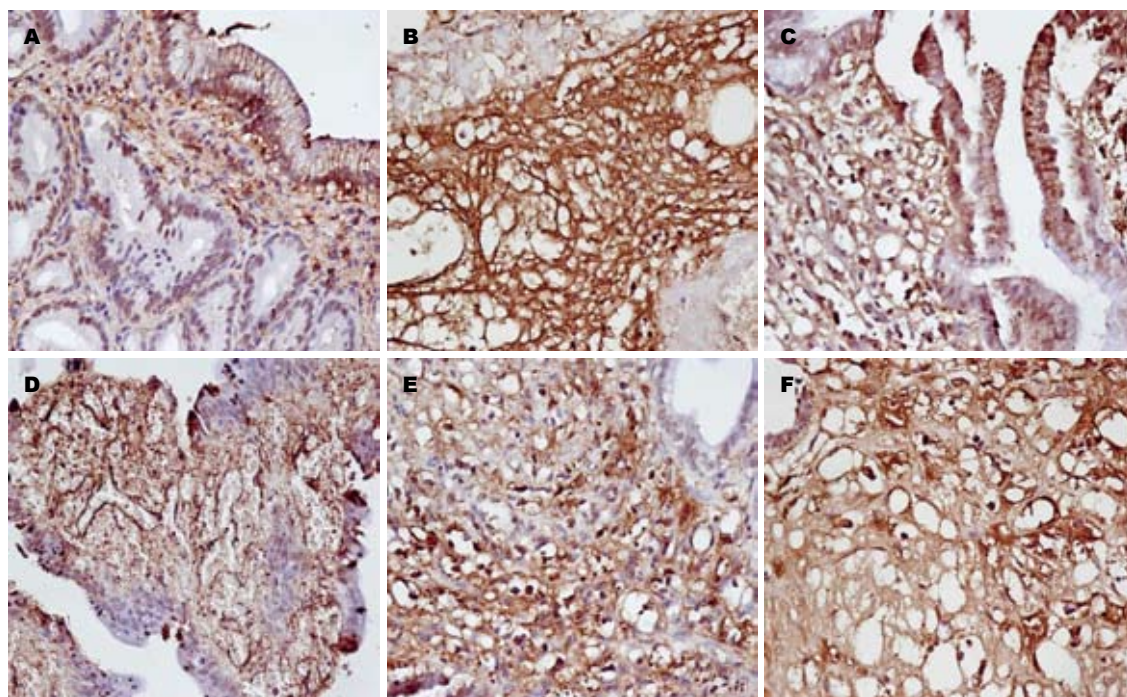


图 6 胆管梗阻性损伤后不同时期胆管中TGF- β 1的表达情况(阳性细胞染色为棕黄色, $\times 400$). A: 对照组; B: BDL5组; C: BDL10组; D: BDL15组; E: BDL20组; F: BDL30组.

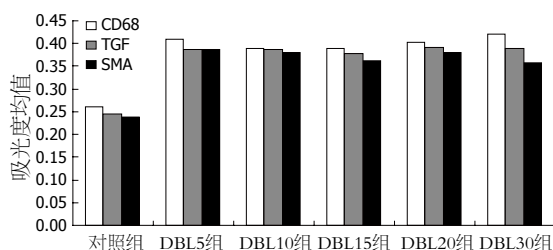


图 7 胆管梗阻性损伤后不同时期内损伤胆管中M Φ 、 α -SMA和TGF- β 1的吸光度值.

他与瘢痕挛缩关系密切^[8],从成纤维细胞到MFB,需要有 α -SMA的表达, α -SMA作为成纤维细胞向MFB分化的标志,实际上也就成MFB的重要标志^[9].TGF- β 1是一种强烈的促细胞分裂剂,对多种细胞的分裂、增殖和迁移起作用,并能增加血管化和趋化成纤维细胞、单核细胞及巨噬细胞到损伤部位,促进创伤部位纤维化^[10].同时有研究发现TGF- β 1与胆道闭锁肝纤维化的发生、发展密切相关,抑制TGF- β 1的表达有望阻止胆道闭锁患儿肝纤维化进程,而且TGF- β 1能够使成纤维细胞DNA的合成明显增加^[11,12].研究还发现TGF- β 3可能是通过调节瘢痕组织中成纤维细胞的增殖和/或凋亡水平,来实现对瘢痕形成的调节,因此TGF- β 3表达水平的失控可能是病理性瘢痕形成的重要诱因之一^[13],是目前已知与瘢痕形成关系最密切、最有代表性的生长因子,对多种细胞的分裂、增殖和迁移起作用,可

由多种细胞合成^[14].炎症细胞和修复细胞的一系列活是伤口愈合的基础,巨噬细胞(M Φ)作为主要的炎症和免疫细胞,除参与组织炎症及免疫反应外,更重要的是通过释放多种介质,直接或间接、单独或协同影响着组织的血管化和纤维化^[15].他可以释放多肽生长因子包括巨噬细胞源性生长因子(macrophage-derived growth factor, MDGF)、白介素-1(interleukin-1, IL-1)、TGF- β 、血小板源性生长因子(platelet derived growth factor, PDGF)、表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)及 γ -干扰素(γ -interferon, γ -IFN)等,酶类包括胶原酶、弹性蛋白酶、纤溶酶原激活物等^[16,17],其在伤口愈合过程中一方面参与对成纤维细胞增殖和胶原合成的调节,另一方面活化和低氧的M Φ 能产生伤口血管生成因子(WAF),以促进血管形成和肉芽组织增生.因此,愈合早期M Φ 聚集有利于伤口肉芽组织生长及修复,但伤口上皮愈合后局部M Φ 等免疫细胞仍大量聚集被认为是继发瘢痕增生的重要因素,在此过程中细胞因子可能是免疫细胞发挥作用的中间媒体^[18].本实验观察发现胆管损害后 α -SMA、M Φ 及TGF- β 1在胆管损伤后即表现为高表达,他们的表达并未因梗阻时间的延长而出现明显增加,半定量分析其表达量与损伤时间之间无统计学差异,由此分析胆管损伤后胆

管壁中的疤痕因子并未因损伤时间的延长而不断增强表达, 而是停留在某个高表达水平, 故修复时间的选择对疤痕因子的表达无意义, 理论上可以推断修复时间与术后胆管壁修复过程中疤痕的过度增生, 直至导致胆管狭窄无关。

从以上实验结果看, 胆管损伤后与疤痕修复相关的因子即出现高表达, 且持续维持在一个高水平, 这些因子的高表达, 导致胶原合成增加, 从而进行自我修复。故从理论上讲手术处理时机的选择与术后吻合口狭窄并无必然联系; 但是早期解除损伤因素, 即可避免胆管壁结构破坏的加重, 减轻修复后的塑形难度, 从而使修复的胆管恢复原有状态, 减少吻合口的狭窄。本实验告诉我们, 修复时间对损伤胆管壁的疤痕修复无重要意义, 由此排除手术时机的因素后, 我们认为手术技巧和使用正常胆管进行吻合是减少术后吻合口狭窄重要因素。

4 参考文献

- 1 Sváb J, Pesková M, Krška Z, Gürlich R, Kasalický M. [Prevention, diagnosis and treatment of iatrogenic lesions of biliary tract during laparoscopic cholecystectomy. Management of papilla injury after invasive endoscopy. Part 1. Prevention and diagnosis of bile duct injuries]. *Rozhl Chir* 2005; 84: 176-181
- 2 雷鹏, 赵国忠. 医源性胆管损伤诊治的临床研究. *宁夏医学杂志* 2007; 29: 223-225
- 3 樊晓静, 段绍斌, 杨东鹰. 医源性胆道损伤修复术120疗效分析. *新疆医科大学学报* 2009; 32: 1581-1582
- 4 李立波, 李君达, 蔡秀军, 魏琪, 蔡小燕. 影响腹腔镜胆囊切除术胆道损伤修复效果的因素. *中华普通外科杂志* 2003; 18: 263-265
- 5 刘凯, 王英超, 刘亚辉. 胆肠吻合口狭窄的临床研究进展. *中国老年学杂志* 2010; 30: 136-138
- 6 李可洲, 骆乐, 姚豫桐, 张晓, 闫洪涛. cFLIP和caspase-8在犬胆道良性损伤修复过程中的表达. *世界华人消化杂志* 2010; 18: 773-778
- 7 詹国清, 董家鸿, 王槐志, 杨占宇, 耿强. 损伤性胆管狭窄手术时机与胆管胶原含量变化的实验研究. *中华肝胆外科杂志* 2003; 9: 681-683
- 8 耿智敏, 徐军, 刘青光, 向国安, 刘效恭, 韩庆, 王康敏. 良性胆管狭窄形成机制的研究. *消化外科* 2002; 1: 321-323
- 9 Nedelec B, Ghahary A, Scott PG, Tredget EE. Control of wound contraction. Basic and clinical features. *Hand Clin* 2000; 16: 289-302
- 10 Badid C, Mounier N, Costa AM, Desmoulière A. Role of myofibroblasts during normal tissue repair and excessive scarring: interest of their assessment in nephropathies. *Histol Histopathol* 2000; 15: 269-280
- 11 Yaffe K, Kanaya A, Lindquist K, Simonsick EM, Harris T, Shorr RI, Tykavsky FA, Newman AB. The metabolic syndrome, inflammation, and risk of cognitive decline. *JAMA* 2004; 292: 2237-2242
- 12 谢举临, 利天增, 祁少海, 卞辉宁, 梁惠珍, 徐盈斌. 转化生长因子 $\beta 1$ 对培养的瘢痕成纤维细胞增殖的调控作用. *中国组织化学与细胞化学杂志* 2006; 15: 30-33
- 13 陈伟, 付小兵, 王海滨, 孙同柱, 周岗, 李海红, 盛志勇. 增生性瘢痕形成和成熟过程中转化生长因子 $\beta 1$ 及下游信号分子的基因表达变化. *中华实验外科杂志* 2005; 22: 740-742
- 14 肖刚, 谭敏, 胡少为, 王智园, 石灵春. TGF- $\beta 3$ 对病理性瘢痕中成纤维细胞增殖凋亡的影响. *中国医疗前沿* 2008; 3: 13-14
- 15 Rifai N, Ridker PM. Population distributions of C-reactive protein in apparently healthy men and women in the United States: implication for clinical interpretation. *Clin Chem* 2003; 49: 666-669
- 16 Browder W, Williams D, Lucore P, Pretus H, Jones E, McNamee R. Effect of enhanced macrophage function on early wound healing. *Surgery* 1988; 104: 224-230
- 17 Pierce GF, Mustoe TA. Pharmacologic enhancement of wound healing. *Annu Rev Med* 1995; 46: 467-481
- 18 Bruce DG, Harrington N, Davis WA, Davis TM. Dementia and its associations in type 2 diabetes mellitus: the Fremantle Diabetes Study. *Diabetes Res Clin Pract* 2001; 53: 165-172
- 19 Tervo S, Kivipelto M, Hänninen T, Vanhanen M, Hallikainen M, Mannermaa A, Soininen H. Incidence and risk factors for mild cognitive impairment: a population-based three-year follow-up study of cognitively healthy elderly subjects. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2004; 17: 196-203

编辑 李军亮 电编 何基才

真核绿色荧光蛋白表达载体pEGFP-C1/PAK-1的构建及其在结直肠癌SW480细胞内的表达

武金宝, 党彤, 陈学清, 张振书, 张宏权, 宋于刚

■背景资料

结直肠癌是西方国家常见的恶性肿瘤之一。近年随着我国经济的发展, 人民生活水平的提高和饮食习惯的改变, 结直肠癌发病率及死亡率在我国呈快速上升趋势, 因而研究结直肠癌的发生和发展机制, 寻找有效防治方法和途径, 是目前临床、科研所迫切需要解决的难题。

武金宝, 党彤, 包头医学院第二附属医院内蒙古消化病研究所 内蒙古自治区包头市 014030

陈学清, 广州医学院第一附属医院消化内科 广东省广州市 510510

张振书, 宋于刚, 南方医科大学南方医院消化研究所 广东省广州市 510515

张宏权, Karolinska Institute Department of Biosciences and Nutrition, Sweden Huddinge SE-141 57; 北京大学基础医学院分子细胞生物学与肿瘤生物学研究室 北京市 100191

武金宝, 副主任医师, 主要从事消化疾病的研究工作。

国家自然科学基金资助项目, No. 30570839

内蒙古自治区自然科学基金资助项目, No. 2010MS1101

内蒙古自治区高等学校科学研究基金资助项目, No. NJ10183

包头市社会发展科技支撑基金资助项目, No. 2008R2001-1

作者贡献分布: 此课题由武金宝、张宏权、宋于刚及党彤设计; 研究过程由武金宝、党彤、陈学清、张振书、张宏权及宋于刚操作完成; 研究所用试剂及分析工具由党彤与宋于刚提供; 数据分析由武金宝与张宏权完成; 本论文写作由武金宝、张宏权及宋于刚完成。

通讯作者: 宋于刚, 医学博士, 教授, 主任医师, 510515, 广东省广州市, 南方医科大学南方医院消化科。songyg@fimmu.com
电话: 020-6164381

收稿日期: 2011-04-27 修回日期: 2011-06-21

接受日期: 2011-06-28 在线出版日期: 2011-09-18

Construction of a eukaryotic green fluorescent protein expression vector carrying the PAK-1 gene (pEGFP-C1/PAK1) and its expression in SW480 cells

Jin-Bao Wu, Tong Dang, Xue-Qing Chen,
Zhen-Shu Zhang, Hong-Quan Zhang, Yu-Gang Song

Jin-Bao Wu, Tong Dang, Inner Mongolia Institute of Digestive Diseases, the Second Affiliated Hospital of Baotou Medical College, Baotou 014030, Inner Mongolian Autonomous Region, China

Xue-Qing Chen, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical College, Guangzhou 510120, Guangdong Province, China

Zhen-Shu Zhang, Yu-Gang Song, Institute of Digestive Diseases, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China

Hong-Quan Zhang, Department of Biosciences and Nutrition, Karolinska Institute, SE-141 57 Huddinge, Sweden; Department of Molecular Cell Biology and Tumor Biology, Basic Medical School of Peking University, Beijing 100083, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30570839; and the Natural Science Foundation of Inner Mongolian Autonomous Region, No. 2010MS1101; the Colleges and Universities Research Project of Inner

Mongolian Autonomous Region, No. NJ10183; and the Social Development Project of Baotou, No. 2008R2001-1

Correspondence to: Yu-Gang Song, Professor, Institute of Digestive Diseases, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China. songyg@fimmu.com

Received: 2011-04-27 Revised: 2011-06-21

Accepted: 2011-06-28 Published online: 2011-09-18

Abstract

AIM: To construct a recombinant eukaryotic fluorescent expression plasmid containing the coding region of p21-activated kinase-1 (PAK-1) gene and to detect its expression in SW480 cells.

METHODS: Total RNA was extracted from human colorectal carcinoma cell line SW620 and used to amplify the PAK1 gene fragment by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The resulting PCR product was inserted into the plasmid pEGFP-C1 after restriction endonuclease digestion and ligation. After verifying the correct insertion of the DNA fragment by endonuclease digestion and direct sequencing, the recombinant plasmid was transfected into SW480 cells to detect its expression *in vitro*.

RESULTS: The sequence of the recombinant plasmid was verified by restriction digestion and DNA sequence analysis, and the target protein expression was detected in the cell cytoplasm of SW480 cells.

CONCLUSION: A recombinant eukaryotic fluorescent expression vector carrying the PAK-1 gene (pEGFP-C1/PAK1) has been constructed successfully and provides a potent tool to investigate the role of PAK-1 in colorectal carcinoma.

Key Words: p21-activated kinase-1; Colorectal carcinoma; Eukaryotic expression; Green fluorescent protein; Gene cloning

Wu JB, Dang T, Chen XQ, Zhang ZS, Zhang HQ, Song YG. Construction of a eukaryotic green fluorescent protein expression vector carrying the PAK-1 gene (pEGFP-C1/PAK1) and its expression in SW480 cells.

■同行评议者

肖恩华, 教授, 中南大学湘雅二医院放射教研室; 杨柏霖, 副主任医师, 南京中医药大学附属医院结直肠外科

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2011; 19(26): 2730-2734

摘要

目的: 构建重组p21-activated kinase-1(PAK1)基因绿色荧光蛋白表达载体pEGFP-C1/PAK1, 并转染入结直肠癌细胞SW480中表达。

方法: 在南方医科大学附属南方医院消化研究所实验室, 从人类结直肠癌细胞株SW620细胞提取总RNA, 经逆转录聚合酶链式反应获得人PAK1 cDNA片段, 经过限制性内切酶进行酶切, T4连接酶进行连接, 将目的基因克隆至真核绿色荧光蛋白表达载体pEGFP-C1上, 然后转染结直肠癌细胞株SW480, 观察其在细胞中表达。

结果: 重组载体经限制性内切酶酶切鉴定和DNA序列分析验证, 显示插入载体的序列与目的基因一致, 而且该重组载体能够在SW480细胞中表达。

结论: 成功构建了真核绿色荧光蛋白表达载体pEGFP-C1/PAK1, 为研究PAK1在结直肠癌中的生物学功能奠定了基础。

关键词: p21-activated kinase-1; 结直肠癌; 真核表达; 绿色荧光蛋白; 基因克隆

武金宝, 党彤, 陈学清, 张振书, 张宏权, 宋于刚. 真核绿色荧光蛋白表达载体pEGFP-C1/PAK-1的构建及其在结直肠癌SW480细胞内的表达. 世界华人消化杂志 2011; 19(26): 2730-2734
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2730.asp>

0 引言

PAK1(p21-activated kinase1)是保守的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶之一, 为Rho家族小G蛋白三磷酸酶(Rho-GTPase) Cdc42和Rac下游重要的靶基因, 参与许多重要的细胞活动^[1-3]。近年研究发现, 在肿瘤发生发展过程中存在异常的PAK1信号转导途径, 尤其在乳腺癌、卵巢癌和膀胱癌等肿瘤的发展和转移过程中起着关键作用^[4-8]。国内外学者研究证实PAK1在胃肠道肿瘤中高表达, 而且可能与这些肿瘤的发生、转移密切相关^[9-12]。因此, 研究PAK1在结直肠癌发生发展中的作用机制, 为干预PAK1信号转导途径, 抑制结直肠癌细胞的增殖、浸润及转移, 具有重要的临床应用价值。本研究应用基因重组技术构建PAK1真核表达载体, 并将携带活细胞探针绿色

荧光蛋白(GFP)的外源性PAK1基因通过脂质体法转入人结直肠癌SW480细胞中, 观察PAK1在细胞内的表达和定位, 为进一步探索PAK1基因在结直肠癌细胞中的生物学特性及其研究其信号转导通路奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料 SW620和SW480细胞株引自美国典型培养物保藏中心(American type culture collection, ATCC, 编号分别为CCL-227和CCL-228), 由南方医院消化研究所实验室保存; 绿色荧光真核表达载体pEGFP-C1为BD Clontech公司产品, 由瑞典Karolinska研究所张宏权教授惠赠; 大肠杆菌DH5 α 菌株本实验室留存。限制性内切酶BamH I、HindIII、Pfu聚合酶、T4 DNA连接酶、DL2000 Marker购自大连TaKaRa公司; TRIzol试剂和Lipofectamine™ 2000转染试剂购自Invitrogen公司; M-MuLV Reverse Transcriptase系NEB公司产品, 胶回收试剂盒、质粒小提试剂盒购自安徽优品生物工程有限公司, 质粒大提试剂盒购自Qiagen公司, RPMI 1640培养基均为美国Gibco BRL公司产品, 胎牛血清为Hyclone公司产品, Tubulin和PAK1兔抗人多克隆抗体购自美国Abcam公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: 结直肠癌细胞用含100 mL/L胎牛血清的RPMI 1640培养基置于50 mL/L CO₂, 37 °C条件下培养传代, 细胞密度达到70%-80%时用于下一步实验。

1.2.2 引物设计: 根据基因克隆的原则, 在Genebank查找和分析人PAK1 mRNA和蛋白序列, 根据人PAK1 mRNA(GenBank No: NM_002576)的编码区(code sequence, CDS)序列特点和内切酶分布, 比对载体上多克隆位点的内切酶位点, 设计克隆PAK1 PCR引物如下: 引物F: 5'-cccg/aattcatgtcaataacggcctagac-3', 中间下划线部分为EcoR I 酶切位点; 引物R: 5'-acat-ggatc/cttagtgattgttcttggc-3', 下划线部分为BamH I 酶切位点, 引物由上海生工生物工程公司合成。

1.2.3 总RNA提取及cDNA合成: SW620细胞总RNA的提取按照TRIzol试剂盒说明书进行操作, 对所提取总RNA用紫外分光光度法进行测定。20 μ L逆转录反应体系包含总RNA 1.0 μ g, 0.5 g/L Oligo(dT)18 primer 1 μ L, DEPC处理的灭菌去离子水12 μ L, 70 °C加热5 min后立即冰浴, 加

■ 研究前沿

结直肠癌发病率逐年升高, 虽然发病机制至今尚未清楚, 但现在一般认为结直肠癌发生、发展、局部侵袭和远处转移是有序的生物学过程, 与结直肠癌细胞的微环境和上皮-间质转化(EMT)密切相关, 而这个过程涉及许多基因变化。近年来研究发现PAK1基因参与卵巢癌、乳腺癌等多种肿瘤的发生、发展过程, PAK1及其相关信号通路介导调控结直肠癌细胞侵袭转移有待进一步的研究。

■相关报道

PAK1是PAK家族最早克隆和鉴定成员,不仅参与许多重要的细胞生理活动,也是影响肿瘤转移及侵袭能力的重要因素,且其表达与肿瘤侵袭转移能力成明显正相关。

RNA酶抑制剂1 μL , $5\times\text{Buffer}$ 4 μL , 10 mmol/L dNTP 2 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育5 min, 再加入200 kU/L的M-MuLV逆转录酶1 μL , 42 $^{\circ}\text{C}$ 反应1 h, 70 $^{\circ}\text{C}$ 反应10 min。

1.2.3 PCR扩增及电泳结果判定: 以逆转录获得的cDNA为模板, 利用PCR技术对PAK1进行扩增。反应条件分别为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 3 min后, 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 3 min, 循环30次, 最后于72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸10 min。PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测, 与预期结果一致的片段切胶回收, 按凝胶回收试剂盒说明书回收和纯化PCR产物。

1.2.4 重组质粒pEGFP-C1/PAK1的构建: 用限制性内切酶EcoR I 和BamH I 对PAK1 PCR纯化产物和pEGFP-C1分别在37 $^{\circ}\text{C}$ 进行酶切, 目的产物纯化后以T4 DNA连接酶于16 $^{\circ}\text{C}$ 连接16 h。以标准热休克方法, 用50 mL E.coli DH5 α 感受态细胞转化5 μL 连接产物, 冰浴3 min后, 加新鲜LB培养基400 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 180 r/min复苏45 min; 取100 μL 产物涂布含卡那霉素的LB琼脂培养板, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养12 h。挑取典型的阳性菌落, 接种于5 mL含卡那霉素的LB液体培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min震荡培养12 h, 用质粒提取试剂盒按照说明书提取质粒。

1.2.5 重组质粒酶切鉴定及插入片段测序鉴定: 重组质粒酶切鉴定, 并将与预期结果一致的炎性克隆菌液送上海生工生物技术公司测序鉴定。

1.2.6 重组质粒pEGFP-C1/PAK1转染SW480细胞及在SW480的表达: 将重组质粒pEGFP-C1/PAK1和空质粒pEGFP-C1通过脂质体法导入人结直肠癌SW480细胞系中, 转染48 h后通过共聚焦激光显微镜观察PAK1 在细胞内的定位; 并以SW480细胞作为空白对照, pEGFP-C1转染组作为阴性对照, 用免疫印迹方法检测pEGFP-C1/PAK1转染组SW480细胞PAK1的表达。

2 结果

2.1 SW620细胞总RNA提取RT-PCR 按照TRIzol试剂盒说明书进行操作提取SW620细胞总RNA提取结果见图1, 经过紫外分光光度法进行测定, 其 A_{260}/A_{280} 为1.86, 说明提取的总RNA完整性较好, 符合实验要求。

2.2 重组质粒的酶切鉴定及测序 RT-PCR反应扩增目的基因的产物经1%琼脂糖凝胶电泳分析, 可见约1.7 kb大小的特异性片段(图2), 片段大小与预期的PAK1基因片段大小相同。将重组pEGFP-C1/PAK1质粒用EcoR I 联合BamH I

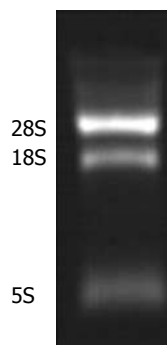


图1 SW620细胞提取的总RNA电泳结果。

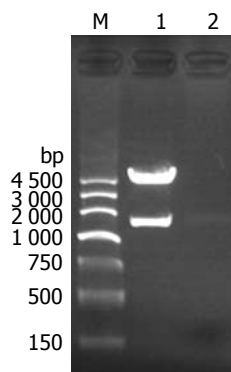


图2 重组质粒pEGFP-C1/PAK1双酶切鉴定的琼脂糖凝胶电泳结果。M: DNA Marker III; 1: pEGFP-C1/PAK1; 2: PCR product。

进行消化, 经1%琼脂糖凝胶检测可见分别约为4.7 kb和1.7 kb的两个片段, 长度与pEGFP载体和PAK1预期片段大小一致(图2), 重组质粒经序列测定证明, 重组PAK1基因与GenBank中PAK1编码区序列(GenBank No: NM_002576)比对, 结果完全一致, 提示重组质粒构建成功。

2.3 PAK1在结直肠癌细胞SW480内的定位及其表达 pEGFP-C1/PAK1真核表达载体通过脂质体法转入人结直肠癌细胞SW480中, 转染率大于70%。用共聚焦激光扫描显微镜方法观察PAK1在SW480细胞内的定位。镜下可观察到, 在pEGFP-C1空白质粒转染对照组中, 绿色荧光遍布整个SW480细胞, 且分布比较均匀(图3B); 而在pEGFP-C1/PAK1重组质粒转染组中, 绿色荧光布满细胞胞质, 但核内无绿色荧光图, 提示转入的重组质粒已在SW480细胞中表达出PAK1-C1-GFP融合蛋白, PAK1主要在胞质表达(图3A); 在SW480空白对照组中, 未激发出绿色荧光(图3C)。

2.4 Western blot分析SW480细胞转染后PAK1蛋白表达 Western blot分析显示: 与SW480空白对照组比较, pEGFP-C1空载体对照组PAK1蛋白表达未发生明显变化, pEGFP-C1/PAK1实验组PAK1蛋白表达明显增加(图4)。

3 讨论

绿色荧光真核表达载体pEGFP-C1的一个重要特点就是含有增强的绿色荧光蛋白GFP。绿色荧

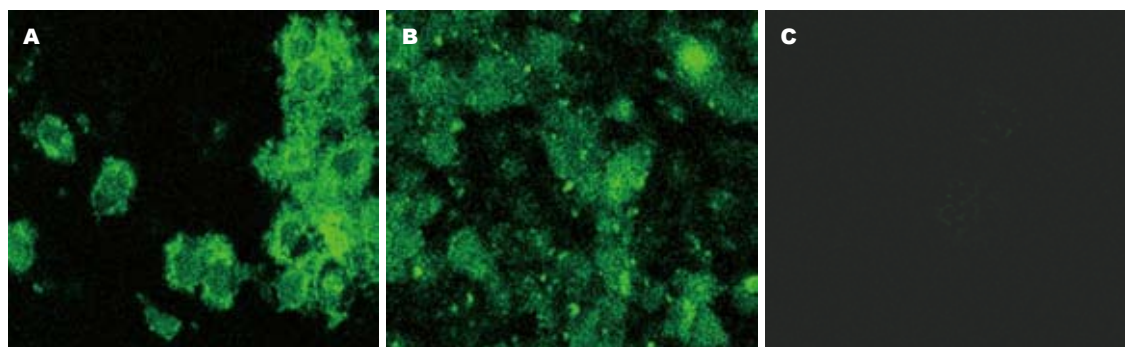


图 3 绿色荧光蛋白在SW480细胞中的表达. A: SW480 cells transfected with pEGFP-C1/PAK1 carrier; B: SW480 cells transfected with pEGFP-C1 empty carrier; C: SW480.

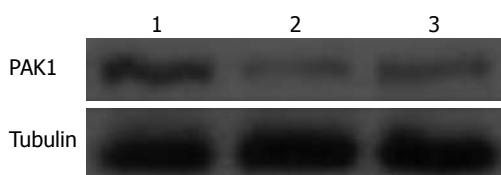


图 4 PAK1蛋白在SW480细胞中的表达. A: SW480 cells transfected with pEGFP-C1/PAK1 carrier; B: SW480 cells transfected with pEGFP-C1 empty carrier; C: SW480.

光蛋白(green fluorescent protein, GFP)来源于海洋生物水母, 是近年来在分子生物学中应用最广泛的标记性蛋白质之一^[13-15]. GFP的cDNA约740 bp, 他编码238个氨基酸残基. 在合适波长的激发光下, GFP肽链内部第65-67位的丝氨酸-酪氨酸-甘氨酸通过自身环化和氧化形成一个发色基团, 可以发射易于观察荧光. 而且GFP具有: (1)无需引入其他物质, 导入到活细胞内的GFP蛋白通过显微镜就能清晰地观察到所发的荧光; (2)分子量较小, 易与其他基因形成融合蛋白且不影响自身和目的基因产物的空间构象和功能; (3)GFP蛋白稳定, 能耐受甲醛固定、pH改变、65 °C 以下高温及一些酶作用而不改变其活性; (4)GFP对细胞无毒性. 目前作为标记基因应用较多的是GFP的两个突变体, S65T(即65位丝氨酸-苏氨酸)和_EGFP(即64位苯丙氨酸-亮氨酸), 他们的激发峰波长可偏移到488 nm, 发射出的荧光强度要比野生型大6倍以上. 这主要是突变型的蛋白表达量增加及有效的蛋白折叠, 使他能很快形成发色基团构型, pEGFP-C1载体含有后一种变体, 因而pEGFP-C1比野生型GFP的载体更易于观测和研究目的基因的表达、调控及其目的蛋白在生物体内定位和信号传导等^[15-19].

PAK1是最早被克隆的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 包含N末端调节区和C末端激酶区; N末端调节区含GTP酶结合域(GTPase binding domain,

GBD), 可介导PAK1与Rac和Cdc42的结合^[1,20,21].

最近许多研究显示, PAK1参与多种肿瘤细胞生长、侵袭和转移过程^[13,22-27], 国外学者近期研究提示PAK1可以通过ERK/AKT信号途径促进结肠癌细胞的生长、迁移和侵袭^[28,29], 本课题组早期研究提示, 具有高侵袭潜能的结肠癌细胞株细胞表达PAK1亦增强^[30], 因此在体外克隆和建立重组PAK1表达系统对了解PAK1在肿瘤细胞内定位和深入研究PAK1的生物学特性及功能有重要的科研和临床意义. 本实验成功构建了绿色荧光蛋白表达载体pEGFP-C1/PAK1, 并经脂质体转染结直肠癌细胞后, 通过对绿色荧光蛋白的检测证实了目的基因可以在结直肠癌细胞SW480细胞质中表达, 为观察目的基因转染结直肠癌细胞后, 对结直肠癌细胞生物学特性的影响奠定了实验基础.

4 参考文献

- 1 Webb BA, Zhou S, Eves R, Shen L, Jia L, Mak AS. Phosphorylation of cortactin by p21-activated kinase. *Arch Biochem Biophys* 2006; 456: 183-193
- 2 Ong CC, Jubb AM, Zhou W, Haverly PM, Harris AL, Belvin M, Friedman LS, Koeppe H, Hoeflich KP. p21-activated kinase 1: PAK'ed with potential. *Oncotarget* 2011; 2: 491-496
- 3 Akinmade D, Talukder AH, Zhang Y, Luo WM, Kumar R, Hamburger AW. Phosphorylation of the ErbB3 binding protein Ebp1 by p21-activated kinase 1 in breast cancer cells. *Br J Cancer* 2008; 98: 1132-1140
- 4 Neumann M, Foryst-Ludwig A, Klar S, Schweitzer K, Naumann M. The PAK1 autoregulatory domain is required for interaction with NIK in Helicobacter pylori-induced NF-kappaB activation. *Biol Chem* 2006; 387: 79-86
- 5 Rayala SK, Kumar R. Sliding p21-activated kinase 1 to nucleus impacts tamoxifen sensitivity. *Biomed Pharmacother* 2007; 61: 408-411
- 6 Li Q, Mullins SR, Sloane BF, Mattingly RR. p21-Activated kinase 1 coordinates aberrant cell survival and pericellular proteolysis in a three-dimensional culture model for premalignant progression of hu-

■应用要点

PAK1参与多条肿瘤信号通路, 可能是这些信号通路的节点, 因而PAK1有可能成为防治结直肠癌的基因靶点.

同行评价

本文立意新, 创新性佳, 研究设计的科学性严谨, 结果客观, 可信。

- 7 Ito M, Nishiyama H, Kawanishi H, Matsui S, Guilford P, Reeve A, Ogawa O. P21-activated kinase 1: a new molecular marker for intravesical recurrence after transurethral resection of bladder cancer. *J Urol* 2007; 178: 1073-1079
- 8 Ching YP, Leong VY, Lee MF, Xu HT, Jin DY, Ng IO. P21-activated protein kinase is overexpressed in hepatocellular carcinoma and enhances cancer metastasis involving c-Jun NH2-terminal kinase activation and paxillin phosphorylation. *Cancer Res* 2007; 67: 3601-3608
- 9 Carter JH, Douglass LE, Deddens JA, Colligan BM, Bhatt TR, Pemberton JO, Konicek S, Hom J, Marshall M, Graff JR. Pak-1 expression increases with progression of colorectal carcinomas to metastasis. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 3448-3456
- 10 Liu F, Li X, Wang C, Cai X, Du Z, Xu H, Li F. Down-regulation of p21-activated kinase-1 inhibits the growth of gastric cancer cells involving cyclin B1. *Int J Cancer* 2009; 125: 2511-2519
- 11 Zhang M, Siedow M, Saia G, Chakravarti A. Inhibition of p21-activated kinase 6 (PAK6) increases radiosensitivity of prostate cancer cells. *Prostate* 2010; 70: 807-816
- 12 Siu MK, Yeung MC, Zhang H, Kong DS, Ho JW, Ngan HY, Chan DC, Cheung AN. p21-Activated kinase-1 promotes aggressive phenotype, cell proliferation, and invasion in gestational trophoblastic disease. *Am J Pathol* 2010; 176: 3015-3022
- 13 Yin HY, Zhou X, Wu HF, Li B, Zhang YF. Baculovirus vector-mediated transfer of NIS gene into colon tumor cells for radionuclide therapy. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 5367-5374
- 14 Ou XL, Chen HJ, Sun WH, Hang C, Yang L, Guan YY, Yan F, Chen BA. Effects of angiotensin-1 on attachment and metastasis of human gastric cancer cell line BGC-823. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 5432-5441
- 15 Wang M, Boenicke L, Howard BD, Vogel I, Kalthoff H. Gene transfer and expression of enhanced green fluorescent protein in variant HT-29c cells. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 2083-2087
- 16 Close DM, Hahn RE, Patterson SS, Baek SJ, Ripp SA, Sayler GS. Comparison of human optimized bacterial luciferase, firefly luciferase, and green fluorescent protein for continuous imaging of cell culture and animal models. *J Biomed Opt* 2011; 16: 047003
- 17 Leroy M, Mernke D, Koppenhoefer D, Schneider P, Mosbach A, Doehlemann G, Hahn M. Living colors in the gray mold pathogen *Botrytis cinerea*: codon-optimized genes encoding green fluorescent protein and mCherry, which exhibit bright fluorescence. *Appl Environ Microbiol* 2011; 77: 2887-2897
- 18 Royant A, Noirclerc-Savoye M. Stabilizing role of glutamic acid 222 in the structure of Enhanced Green Fluorescent Protein. *J Struct Biol* 2011; 174: 385-390
- 19 Baldrige A, Samanta SR, Jayaraj N, Ramamurthy V, Tolbert LM. Steric and electronic effects in capsule-confined green fluorescent protein chromophores. *J Am Chem Soc* 2011; 133: 712-715
- 20 De la Mota-Peynado A, Chernoff J, Beeser A. Identification of the atypical MAPK Erk3 as a novel substrate for p21-activated kinase (Pak) activity. *J Biol Chem* 2011; 286: 13603-13611
- 21 Storchli TI, Viaud J, Rennefahrt UE, Anastassiadis T, Peterson JR. Phosphoinositides are essential co-activators for p21-activated kinase 1. *Mol Cell* 2010; 40: 493-500
- 22 Ong CC, Jubb AM, Haverty PM, Zhou W, Tran V, Truong T, Turley H, O'Brien T, Vucic D, Harris AL, Belvin M, Friedman LS, Blackwood EM, Koeppen H, Hoeflich KP. Targeting p21-activated kinase 1 (PAK1) to induce apoptosis of tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108: 7177-7182
- 23 Yuan L, Santi M, Rushing EJ, Cornelison R, MacDonald TJ. ERK activation of p21 activated kinase-1 (Pak1) is critical for medulloblastoma cell migration. *Clin Exp Metastasis* 2010; 27: 481-491
- 24 Heckman CA, Demuth JG, Deters D, Malwade SR, Cayer ML, Monfries C, Mamais A. Relationship of p21-activated kinase (PAK) and filopodia to persistence and oncogenic transformation. *J Cell Physiol* 2009; 220: 576-585
- 25 Nagel M, Luu O, Bisson N, Macanovic B, Moss T, Winklbauer R. Role of p21-activated kinase in cell polarity and directional mesendoderm migration in the *Xenopus* gastrula. *Dev Dyn* 2009; 238: 1709-1726
- 26 Zhou L, Yan C, Gieling RG, Kida Y, Garner W, Li W, Han YP. Tumor necrosis factor- α induced expression of matrix metalloproteinase-9 through p21-activated kinase-1. *BMC Immunol* 2009; 10: 15
- 27 Bostner J, Skoog L, Fornander T, Nordenskjöld B, Stål O. Estrogen receptor- α phosphorylation at serine 305, nuclear p21-activated kinase 1 expression, and response to tamoxifen in postmenopausal breast cancer. *Clin Cancer Res* 2010; 16: 1624-1633
- 28 Huynh N, Liu KH, Baldwin GS, He H. P21-activated kinase 1 stimulates colon cancer cell growth and migration/invasion via ERK- and AKT-dependent pathways. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1803: 1106-1113
- 29 Li LH, Zheng MH, Luo Q, Ye Q, Feng B, Lu AG, Wang ML, Chen XH, Su LP, Liu BY. P21-activated protein kinase 1 induces colorectal cancer metastasis involving ERK activation and phosphorylation of FAK at Ser-910. *Int J Oncol* 2010; 37: 951-962
- 30 武金宝, 南清振, 张绍荣, 张弟, 张振书, 宋于刚. p21活化激酶1基因在结肠癌细胞中的表达及意义. *山东医药* 2007; 47: 1-3

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

mTOR与JNK信号通路在人结肠癌HT-29细胞中的作用及相互关系

张志永, 张谢夫

张志永, 张谢夫, 郑州大学第一附属医院普通外科 河南省郑州市 450052

作者贡献分布: 此课题由张志永与张谢夫共同设计; 实验及论文写作由张志永完成; 张谢夫指导。

通讯作者: 张谢夫, 教授, 主任医师, 450052, 河南省郑州市, 郑州大学第一附属医院普通外科. zzuzzy@sina.com
电话: 0371-66292114

收稿日期: 2011-04-27 修回日期: 2011-06-21

接受日期: 2011-06-28 在线出版日期: 2011-09-18

Interaction and relationship between mTOR and JNK signal pathways in human colon cancer cell line HT-29

Zhi-Yong Zhang, Xie-Fu Zhang

Zhi-Yong Zhang, Xie-Fu Zhang, Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China

Correspondence to: Xie-Fu Zhang, Professor, Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China. zzuzzy@sina.com

Received: 2011-04-27 Revised: 2011-06-21

Accepted: 2011-06-28 Published online: 2011-09-18

Abstract

AIM: To investigate the possible interaction and relationship between mammalian target of rapamycin (mTOR) and c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling pathways in colon cancer.

MEHTODS: Immunohistochemical methods were applied to detect p-JNK and p-mTOR expression in colon cancer tissues. Human colon cancer cell line HT29 was cultured *in vitro*. The expression of mTOR protein was inhibited using specific siRNA, and JNK protein was inhibited with JNK inhibitor SP600125. The expression of p-JNK and p-mTOR proteins was determined by Western blot. Cell proliferation was detected by MTT assay, and apoptosis was detected by TUNEL assay.

RESULTS: The levels of p-mTOR and p-JNK were higher in colon cancer than in normal control tissue (both $P < 0.01$). High expression of

p-mTOR was correlated with that of p-JNK in human colon cancer tissues (0.275 ± 0.033 , 0.460 ± 0.376 vs 0.479 ± 0.012 , both $P < 0.01$). Compared to control cells, HT-29 cell proliferation was significantly decreased in cells transfected with siRNA targeting the mTOR gene and those treated with JNK inhibitor (12.330 ± 1.533 , 1.000 ± 0.147 vs 1.667 ± 0.577 , both $P < 0.01$), while apoptotic index was significantly increased in the two groups (both $P < 0.01$). The expression of p-JNK protein showed no significant difference between the mTOR siRNA transfection group and normal control group ($P = 0.364$). The expression of m-TOR protein in the JNK inhibitor group was significantly decreased compared to the normal control group ($P < 0.01$).

CONCLUSION: Inhibition of the mTOR or JNK signaling pathways suppresses proliferation and increases apoptosis of HT-29 cells. The JNK signaling pathway may activate the mTOR signaling pathway in HT-29 cells.

Key Words: Colon cancer; Mammalian target of rapamycin; C-Jun N-terminal kinase

Zhang ZY, Zhang XF. Interaction and relationship between mTOR and JNK signal pathways in human colon cancer cell line HT-29. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(26): 2735-2740

摘要

目的: 探讨mTOR和JNK信号通路在结肠癌中的作用及可能的相互作用关系。

方法: 免疫方法检测p-mTOR及p-JNK在结肠癌组织和正常结肠组织中的表达情况。体外培养人结肠癌细胞株HT-29细胞, 转染mTOR siRNA抑制mTOR表达, 使用JNK抑制剂SP600125抑制JNK表达。Western blot法分别检测抑制mTOR和JNK后HT-29细胞中p-JNK、p-mTOR蛋白的表达。

结果: 在人结肠癌组织中p-mTOR和p-JNK表

■背景资料

mTOR和JNK为哺乳动物细胞内广泛存在的蛋白激酶, 可调控细胞生长、细胞分化和细胞凋亡等重要的生理过程。近年许多研究证明, mTOR和JNK信号通路的异常和临床多种疾病的发生和发展相关。

■同行评议者

顾国利, 副主任医师, 中国人民解放军空军总医院普通外科; 李革, 副教授, 延边大学附属医院普外1科; 刘丽江, 教授, 江汉大学医学院病理学与病理生理学教研室

■ 研发前沿

肿瘤发生和发展与多种因素有关。细胞内信号传导通路的异常,导致癌基因激活或者抑癌基因失活是各种肿瘤研究的热点。现有的研究已经分别证明在结肠癌的发生发展过程中存在者mTOR和JNK信号通路的异常,但是这两个信号通路在结肠癌发生发展中有无相互作用,并未见到报道。

达阳性率分别为60%和56%,且两者阳性表达相关性分析存在正相关性($r = 0.480, P < 0.01$)。HT-29细胞株中抑制mTOR信号通路后mTOR siRNA转染组和空白对照组、Control siRNA组比较增殖(A值)明显降低,差异具有统计学意义($0.275 \pm 0.033, 0.460 \pm 0.376$ vs 0.479 ± 0.012 , 均 $P < 0.01$)。mTOR siRNA转染组凋亡指数明显高于空白对照组和Control siRNA组,差异具有统计学意义($12.330 \pm 1.533, 1.000 \pm 0.147$ vs 1.667 ± 0.577 , 均 $P < 0.01$)。抑制JNK信号通路后可见随着SP600125剂量的升高,A值整体变化呈下降趋势,两者呈负相关($r = -0.857, P < 0.01$)。细胞凋亡指数先是迅速上升,而在10 $\mu\text{mol/L}$ 至100 $\mu\text{mol/L}$ 则变化不大,各剂量组凋亡指数差别有统计学意义($F = 142.67, P < 0.01$)。mTOR siRNA转染抑制mTOR后的p-JNK蛋白表达无差异;SP600125抑制JNK后的p-mTOR表达减少($P < 0.01$)。

结论: 在结肠癌HT-29细胞中抑制mTOR信号通路及JNK信号通路均有抑制细胞增殖,促进细胞凋亡作用;JNK信号通路对mTOR信号通路存在促进作用。

关键词: 结肠癌; 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白; c-Jun氨基末端酶

张志永, 张谢夫. mTOR与JNK信号通路在人结肠癌HT-29细胞中的作用及相互关系. 世界华人消化杂志 2011; 19(26): 2735-2740

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2735.asp>

0 引言

哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)和c-Jun氨基末端酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)均为人体细胞内广泛存在的蛋白激酶,参与调控细胞生长,细胞分化和细胞凋亡等多个重要的生理过程。JNK属于促分裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)家族成员之一。近几年,mTOR信号通路与MAPK信号通路在肿瘤发病中的相互作用开始得到关注,目前的研究成果主要集中在mTOR与同属MAPK家族的细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)之间^[1,2]。JNK与ERK同属MAPK家族,mTOR与JNK信号通路在结肠癌的发生发展中有无相互作用尚不清楚。本研究以免疫组织化学方法检测p-mTOR和p-JNK在人结肠癌组织中的表达;体外培养人结肠癌细胞株HT-29,应用siRNA干扰

技术及JNK特异性抑制剂分别抑制mTOR信号通路和JNK信号通路,探讨他们在结肠癌中的作用及可能的相互关系。

1 材料和方法

1.1 材料 50例结肠癌标本来自郑州大学第一附属医院普通外科2009-10/2010-06手术治疗结肠癌病例,同时取非结肠癌手术病例切除结肠组织50例进行对照。DAKO ChemMate EnVision HRP试剂盒,购自广州基因公司。人结肠癌细胞株HT29来自中山大学医学院。胎牛血清、RPMI 1640购自美国Gibco公司。Lipofectamine 2000转染试剂盒购自美国Invitrogen公司。抗体p-mTOR购自Santa Cruz。p-JNK抗体购自北京博奥森公司。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学检测: 标本常规切片处理,p-mTOR和p-JNK浓度均为1:200,按照试剂盒说明操作,PBS代替一抗空白对照,试剂公司提供阳性对照切片。p-mTOR结果判定:以细胞质或者细胞核内出现棕黄色染色颗粒为标准判定阳性细胞,低倍镜下($\times 200$)选取典型病变视野10个/切片,每视野计数100个细胞,以阳性细胞 $\geq 10\%$ 为阳性,并记为+; $\geq 20\%$ 记为++; $\geq 40\%$ 记为+++; $\geq 80\%$ 记为++++。p-JNK结果判定:以细胞质或者细胞膜出现棕黄色染色颗粒为标准判定阳性细胞,低倍镜下($\times 200$)选取典型病变视野10个/切片,每视野计数100个细胞,以阳性细胞 $\geq 10\%$ 为阳性,并记为+; $\geq 20\%$ 记为++; $\geq 40\%$ 记为+++; $\geq 80\%$ 记为++++。

1.2.2 细胞培养: 将HT-29细胞冻存管从液氮罐中取出,迅速置于37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中,轻轻摇晃令其尽快融化;使用无菌吸管吸出细胞悬液,转移至无菌离心管中,滴加10 mL培养基,1 000 r/min离心5 min;将上清倒去后,加入培养基作适当稀释,制成单细胞悬液,再转入无菌培养瓶中37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养。细胞培养2-3 d后,更换1次培养液,待细胞长满至80%左右时,使用胰蛋白酶消化,使细胞至漂浮状态,终止消化后1:2分瓶传代。

1.2.3 细胞分组和处理: 将HT-29细胞分为空白对照组(不转染siRNA)、Control siRNA组(转染无效对照siRNA)、mTOR siRNA转染组、JNK抑制剂组。JNK抑制剂组处理前一天将对数生长长期细胞用胰蛋白酶消化后,接种于6孔板,保证每孔有 5×10^5 个细胞;用DMSO将JNK抑制剂SP600125稀释为不同浓度(5、10、20、40、60、80、100 $\mu\text{mol/L}$)后加入到细胞培养基中,

表 1 不同部位p-mTOR与p-JNK表达比较

指标	分组	表达情况 <i>n</i> (%)					<i>Z</i> 值	<i>P</i> 值
		-	+	++	+++	++++		
p-mTOR	实验组	20(40)	11(22)	8(16)	5(10)	6(12)	4.50	<0.001
	对照组	43(86)	4(8)	3(6)	0(0)	0(0)		
p-JNK	实验组	22(44)	5(10)	10(20)	8(16)	5(10)	4.40	<0.001
	对照组	43(86)	5(10)	2(4)	0(0)	0(0)		

■相关报道

Albert等报道在胶质母细胞瘤中mTOR抑制剂可激活与JNK同属MAPK家族的ERK1/2. Fujishita等发现在家族性息肉病小鼠模型中, JNK活化剂可以激活mTORc1.

培养24 h后收集细胞分组检测. mTOR siRNA转染组、Control siRNA组按1.2.4中的方法进行.

1.2.4 siRNA的体外合成及细胞转染: siRNA的体外合成参照根据广州市锐博生物科技有限公司的RNAi设计工具进行设计, 经实验摸索合成1段干扰效果好的特异性mTOR siRNA, 其详细序列为: Sense: 5'-GCCACAGUCUUCACUUGCAdTdT-3'; Asense: 3'-dTdT CGGUGUCAGAAGUGAACGU-5'. 同时体外转录合成1段无义对照siRNA. 转染前一天将对数生长期细胞用胰蛋白酶消化后, 接种于6孔板, 保证每孔有 5×10^5 个细胞; 转染前用Opti-MEM培养基分别将SiRNA和Lipofectamine2000脂质体稀释, SiRNA的稀释浓度为100 pmol组, 室温孵育5 min将两者混匀; 孵育20 min后, 将混合物加入到细胞培养基中, 培养24 h后收集细胞检测.

1.2.5 Western blot检测细胞p-JNK、p-mTOR蛋白的表达: 细胞用PBS清洗2遍; 加100 μ L的Total Protein Extraction到 1×10^6 的细胞中, 抽提细胞总蛋白; BSA法蛋白定量. 取等量蛋白样品到10% SDS-PAGE胶上样, 电压90 V, 恒压电泳120 min; 跑好的胶在转膜液中浸泡20 min; 从下至上分别放入滤纸、胶、PVDF膜、滤纸, 夹子夹好放入倒好转膜液的转膜槽中, 电压90 V, 恒压电泳120 min. 将膜取出, 加入5%脱脂奶粉的PBS室温封闭1 h. 分别加入一抗p-mTOR(1:200)、p-JNK(1:200)、 β -actin(1:1000)到5%脱脂牛奶中, 在室温下振荡孵化90 min, 然后洗膜4次: 1 \times PBS 15 min 1次; 5 min 3次; 分别加入二抗(1:3000)到5%脱脂牛奶中, 在室温孵化1 h, 洗膜4次: 1 \times PBS 15 min 1次; 5 min 3次; 以1:40比例混合显色基质B液和A液, 均匀滴加膜上, 静置2 min, 用保鲜膜将膜包好, 轻轻挤出多余显色基质, 放入暗盒, 曝光4 min后, 蛋白表达情况使用凝胶成像分析系统进行检测. 获得的图像用软件ImageTool 3.0测灰度值, 并与内参相比得其相

对值, 取4次重复实验结果的均值进行比较.

1.2.6 MTT法检测细胞增殖情况: 将HT-29细胞计数后, 以 2×10^4 的密度接种到96孔细胞培养板中; 细胞预处理后培养24 h, 显微镜下观察贴壁生长良好后每孔加入100 μ L的MTT试剂, 继续培养4 h; 除去培养液, 每孔加入150 μ L的无血清的DMSO, 振荡10 min充分融解结晶物; 选择570 nm波长, 在酶标仪上检测各孔光吸收值(*A*值). 每孔*A*值减去空白孔*A*值为测试孔*A*值. 活细胞数与*A*值成正比. 每组设4个复孔, 取其平均值.

1.2.7 TUNEL法检测细胞凋亡情况: 蒸馏水浸洗细胞爬片数次. 细胞爬片于PBS洗5 min \times 3次. 在细胞爬片上滴加TdT酶反应液, 37 $^{\circ}$ C孵育1h. 细胞爬片于PBS洗5 min \times 3次. 在细胞爬片上滴加streptavidin-HRP工作液, 37 $^{\circ}$ C孵育30 min. 细胞爬片于PBS洗5 min \times 3次. DAB显色, 水洗终止反应. 苏木素复染1 min, 自来水冲洗5 min. 脱水、晾干、中性树胶封片, 结果观察. 结果分析方法: 选择10个典型视野, 高倍镜下计数至少1000个肿瘤细胞, 凋亡指数(apoptosis index, AI) = TUNEL阳性肿瘤细胞数/肿瘤细胞数 \times 100%.

统计学处理 实验数据采用SPSS13.0统计软件分析, 两独立样本*t*检验, 数据以mean \pm SD表示. 两组配对资料的比较采用Friedman秩和检验, 多组定量资料的比较采用单因素方差分析或析因设计资料的方差分析, 方差齐时两两比较采用SNK法, 方差不齐时两两比较采用Dunnett's T3检验, 两变量的相关性分析采用Spearman秩相关分析, 以*P* < 0.05为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 p-mTOR和p-JNK在结肠癌组织中表达情况 结肠癌部位结肠黏膜组织的磷酸化雷帕霉素靶蛋白(p-mTOR)和磷酸化c-Jun氨基末端酶(p-JNK)表达程度均高于对照部位, 经Friedman秩和检验, 差别均有统计学意义(*P* < 0.05, 表1).

■创新盘点

研究从细胞信号通路相互作用的角度出发,探讨了mTOR和JNK信号通路在结肠癌组织及结肠癌HT-29细胞中的作用及其相互关系。初步证实了JNK信号通路在结肠癌中对mTOR信号通路存在影响。

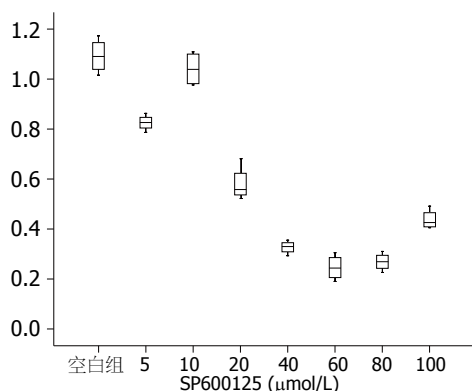


图1 不同剂量的SP600125抑制HT-29细胞后p-JNK的变化。

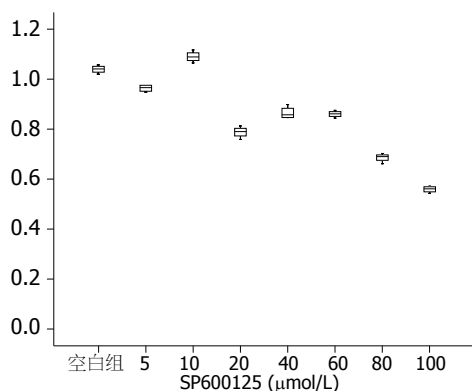


图2 不同剂量的SP600125作用下p-mTOR的变化。

2.2 p-mTOR阳性表达和p-JNK阳性表达关系
p-mTOR阳性表达和p-JNK的表达关系呈正相关($r = 0.480, P < 0.01$)。

2.3 p-mTOR和p-JNK在HT-29细胞中的表达情况

2.3.1 抑制mTOR后mTOR和JNK表达情况:
mTOR siRNA抑制mTOR表达后,空白对照组和Control siRNA组的灰度比值比较差别无统计学意义($P = 0.080$),但两组的灰度比值均大于mTOR siRNA转染组,差别有统计学意义($1.175 \pm 0.045, 1.460 \pm 0.094$ vs 0.389 ± 0.247 , 均 $P < 0.01$)。抑制mTOR表达后,空白对照组、Control siRNA组和mTOR siRNA转染组的JNK表达灰度比值差异无统计学意义。

2.3.2 抑制JNK后JNK和mTOR表达情况:
SP600125抑制JNK信号通路后,随着SP600125剂量的升高,JNK表达灰度比值整体变化呈下降趋势(图1),Spearman相关分析显示,两者呈负相关($r = -0.795, P < 0.01$)。SP600125抑制人结肠癌HT-29细胞后,可以见到随着SP600125剂量的升高,p-mTOR表达灰度比值整体变化呈下降趋势(图2),Spearman相关分析显示,两者呈负相关($r = -0.874, P < 0.01$)。

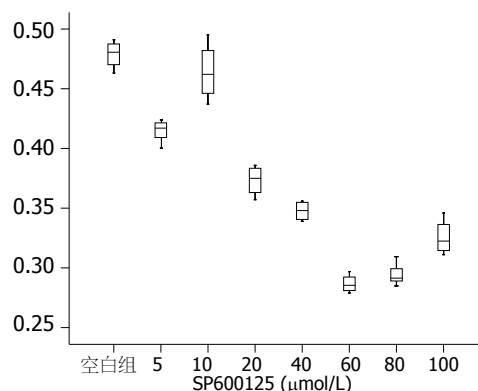


图3 不同剂量的SP600125作用24 h后HT-29细胞增殖4值变化。

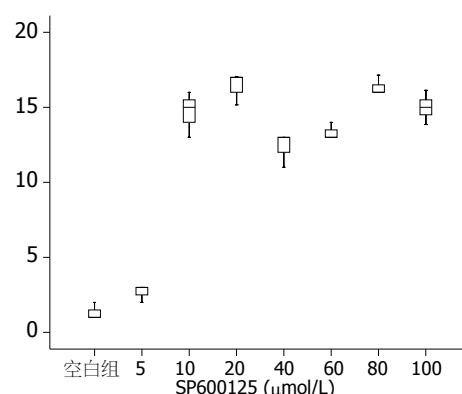


图4 不同剂量的SP600125作用下HT-29细胞凋亡指数的变化。

2.4 各组HT-29细胞增殖情况 mTOR siRNA转染组和空白对照组、Control siRNA组比较增殖(A值)明显降低,差异具有统计学意义($0.275 \pm 0.033, 0.460 \pm 0.376$ vs 0.479 ± 0.012 , 均 $P < 0.01$)。SP600125抑制人结肠癌HT-29细胞后,可见随着SP600125剂量的升高,A值整体变化呈下降趋势(图3),Spearman相关分析显示,两者呈负相关($r = -0.857, P < 0.01$)。

2.5 各组HT-29细胞凋亡情况 mTOR siRNA转染组凋亡指数明显高于空白对照组和Control siRNA组,差异具有统计学意义($12.330 \pm 1.533, 1.000 \pm 0.147$ vs 1.667 ± 0.577 , 均 $P < 0.01$)。在不同剂量的SP600125作用下,人结肠癌HT-29细胞凋亡指数随着SP600125剂量的升高,先是迅速上升,而在10-100 $\mu\text{mol/L}$ 则变化不大(图4),各剂量组凋亡指数差别有统计学意义($F = 142.67, P < 0.01$)。

3 讨论

mTOR是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶。其可被多种外界因素激活而参与基因转录、蛋白质翻

译、核糖体生物合成,并能调控能量代谢、细胞周期和细胞凋亡等多个重要的细胞生理功能^[3-5]。近来研究发现,多种肿瘤的发生发展过程中都伴有mTOR信号通路的异常^[6-9]。Slattery等^[10]研究指出,mTOR及其信号通路有关的因子发生遗传学变异显著加大了直肠或结肠癌的风险。本实验证实,mTOR在人结肠癌组织及HT-29细胞中存在高表达,应用mTOR siRNA特异性沉默mTOR基因表达后,mTOR蛋白表达显著降低,且伴随HT-29细胞增殖降低,凋亡率增加,表明mTOR蛋白在促进结肠癌HT-29细胞增殖、抑制细胞凋亡中发挥着重要作用。国内学者多个^[11,12]研究也证实mTOR在人结肠癌细胞株中高表达。mTOR信号通路有可能是结肠癌治疗中的一个重要靶点^[13,14]。

JNK属于MAPK家族4种成员之一,其余3种分别为ERK1/2、p38及ERK5。JNK信号途径可以调控细胞生长、癌基因转化、细胞分化和细胞凋亡等多种生命过程^[15-17],已经证实JNK信号途径的异常与多种类别的疾病发生有关^[18-21]。在对哺乳动物的JNK信号研究中也发现,JNK能够促进肿瘤形成^[22-24]。最近的研究发现大肠癌细胞JNK磷酸化可激活其下游成员使大肠癌基质金属蛋白酶的分泌增加,导致大肠癌细胞的运动和侵袭力增加,最终促进癌细胞的转移^[25]。Nateri等^[26]剔除JNK磷酸化的位点时,能使小鼠肠道肿瘤变小,肿瘤细胞减少,并且延长小鼠的寿命。在本实验研究中,JNK在人结肠癌组织及HT-29细胞中呈高表达,JNK抑制剂可显著抑制结肠癌HT-29细胞的增殖促进其细胞凋亡,表明JNK信号通路在结肠癌中扮演了重要角色,JNK的激活可能促进结肠癌的发生发展,阻断JNK信号通路对结肠癌具有的抑制作用。

mTOR信号通路和JNK信号通路都在细胞生长、细胞周期调节、细胞凋亡方面起着重要作用,两者的信号传递通路均含有多个原癌基因和抑癌基因,并存在复杂的调节网络,他们之间的相互作用目前并不清楚。如前言所述,多项研究表明了mTOR信号通路和MAPK信号通路有关。在一项有关亚历山大疾病的研究中发现,因神经胶质原纤维酸性蛋白质堆积激活的p38 MAPK,可以降低mTOR磷酸化水平,从而提高自噬能力,阻止疾病的进展^[27]。Chen等^[28]在研究重金属镉对细胞凋亡的影响时发现,阻断JNK能部分阻止细胞凋亡,阻断mTOR也能达到同样的效果,JNK和mTOR信号网络的激活和镉诱导

的细胞凋亡有关。Chiang等^[29]在一项关于乳腺癌的研究中发现,中药单体薯蓣皂甙配基能抑制Akt和mTOR磷酸化而加强JNK的磷酸化。这提示mTOR信号通路和JNK信号通路有可能在肿瘤的发生发展中存在着相互作用。本研究发现人结肠癌组织中,p-mTOR和p-JNK均存在高表达($P<0.01$),p-mTOR和p-JNK高表达之间存在正相关性($P<0.01$),说明在结肠癌发生发展中mTOR信号通路和JNK信号通路可能存在相互促进作用。

有限的资料从不同的侧面论述了这两个信号通路可能存在的联系。Fujishita等^[30]的一项关于家族性息肉病小鼠模型研究显示,在此模型中mTORC1信号通路是被激活的,mTORC1抑制剂RA001可以阻止肿瘤的形成,但确切机制尚不清楚,使用JNK抑制剂sp600125也可以明显抑制肿瘤的形成,同时研究还发现使用JNK活化剂Anisomycin可以激活mTORC1,这提示JNK和mTOR信号通路可能在肿瘤的形成中共同起作用。Benoit等^[31]的实验探讨了在使用JNK抑制剂抑制的人结肠癌细胞株LS174T或者JNK基因突变的LS174T细胞株中加入雷帕霉素后,雷帕霉素的抗增殖作用较正常的细胞株增强。实验结果表明,雷帕霉素诱导的JNK磷酸化降低了其阻滞mTOR信号通路所带来的抗肿瘤作用。这些文献结果显示JNK信号通路和mTOR信号通路之间的确存在着某种可能的关联,但对这种可能关系研究尚处于初期阶段。本实验研究探讨了mTOR和JNK信号通路在调控结肠癌的发生发展中的作用。研究显示,siRNA抑制mTOR表达后,p-JNK的表达没有明显的变化;JNK抑制剂抑制了JNK信号通路后,p-mTOR的表达降低。结果提示JNK信号通路下游位点可能对mTOR信号通路存在促进或者激活作用,这种相互作用关系的进一步明确对揭示结肠癌发生过程中复杂信号通路的变化,以及选择可能的治疗靶点有积极作用。

4 参考文献

- 1 Albert L, Karsy M, Murali R, Jhanwar-Uniyal M. Inhibition of mTOR Activates the MAPK Pathway in Glioblastoma Multiforme. *Cancer Genomics Proteomics* 2009; 6: 255-261
- 2 Auyeung KK, Mok NL, Wong CM, Cho CH, Ko JK. Astragalus saponins modulate mTOR and ERK signaling to promote apoptosis through the extrinsic pathway in HT-29 colon cancer cells. *Int J Mol Med* 2010; 26: 341-349
- 3 Bai X, Jiang Y. Key factors in mTOR regulation. *Cell*

■应用要点

实验证明mTOR信号通路和JNK信号通路均可再结肠癌的发生发展中起到作用,并且JNK信号通路对mTOR信号通路存在促进作用,这些信号通路的相互作用点对于结肠癌治疗药物靶点的选择具有一定指导意义。

■同行评价

本文立题新颖, 有创新性, 实验设计和技术路线合理, 思路清晰, 结论可信, 有一定的学术价值。

- 4 Shaw RJ, Cantley LC. Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth. *Nature* 2006; 441: 424-430
- 5 Guertin DA, Sabatini DM. Defining the role of mTOR in cancer. *Cancer Cell* 2007; 12: 9-22
- 6 Menon S, Manning BD. Common corruption of the mTOR signaling network in human tumors. *Oncogene* 2008; 27 Suppl 2: S43-S51
- 7 Kinkade CW, Castillo-Martin M, Puzio-Kuter A, Yan J, Foster TH, Gao H, Sun Y, Ouyang X, Gerald WL, Cordon-Cardo C, Abate-Shen C. Targeting AKT/mTOR and ERK MAPK signaling inhibits hormone-refractory prostate cancer in a preclinical mouse model. *J Clin Invest* 2008; 118: 3051-3064
- 8 Guertin DA, Sabatini DM. An expanding role for mTOR in cancer. *Trends Mol Med* 2005; 11: 353-361
- 9 Proud CG. Signalling to translation: how signal transduction pathways control the protein synthetic machinery. *Biochem J* 2007; 403: 217-234
- 10 Slattery ML, Herrick JS, Lundgreen A, Fitzpatrick FA, Curtin K, Wolff RK. Genetic variation in a metabolic signaling pathway and colon and rectal cancer risk: mTOR, PTEN, STK11, RPKAA1, PRKAG2, TSC1, TSC2, PI3K and Akt1. *Carcinogenesis* 2010; 31: 1604-1611
- 11 彭秋平, 梁后杰, 边志衡, 周进明, 周琪, 钟大平. mTOR信号通路调控HK-II 表达对结肠癌细胞增殖的影响. *现代肿瘤医学* 2007; 15: 760-762
- 12 李宝秀, 李春燕, 刘国龙, 张晓实. 雷帕霉素靶蛋白在ⅢB期结肠癌中的异常表达及其意义. *解放军医学杂志* 2010; 35: 68-72
- 13 Pencreach E, Guérin E, Nicolet C, Lelong-Rebel I, Voegeli AC, Oudet P, Larsen AK, Gaub MP, Gue-not D. Marked activity of irinotecan and rapamycin combination toward colon cancer cells in vivo and in vitro is mediated through cooperative modulation of the mammalian target of rapamycin/hypoxia-inducible factor-1alpha axis. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 1297-1307
- 14 Lee YK, Park SY, Kim YM, Kim DC, Lee WS, Surh YJ, Park OJ. Suppression of mTOR via Akt-dependent and -independent mechanisms in selenium-treated colon cancer cells: involvement of AMPKalpha1. *Carcinogenesis* 2010; 31: 1092-1099
- 15 Mori Y, Gotoh Y. [Role of the JNK signaling pathway]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* 2008; 53: 1252-1257
- 16 张志永, 张谢夫. 抑制JNK信号通路对结肠癌HT-29细胞增殖和凋亡的影响. *世界华人消化杂志* 2011; 19: 1830-1833
- 17 Johnson GL, Nakamura K. The c-jun kinase/stress-activated pathway: regulation, function and role in human disease. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1773: 1341-1348
- 18 Heasley LE, Han SY. JNK regulation of oncogenesis. *Mol Life Sci* 2010; 67: 239-253
- 19 Wagner EF, Nebreda AR. Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nat Rev Cancer* 2009; 9: 537-549
- 20 Major CD, Wolf BA. Interleukin-1beta stimulation of c-Jun NH(2)-terminal kinase activity in insulin-secreting cells: evidence for cytoplasmic restriction. *Diabetes* 2001; 50: 2721-2728
- 21 Eshraghi AA, Van de Water TR. Cochlear implantation trauma and noise-induced hearing loss: Apoptosis and therapeutic strategies. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 2006; 288: 473-481
- 22 Uhlirva M, Jasper H, Bohmann D. Non-cell-autonomous induction of tissue overgrowth by JNK/Ras cooperation in a Drosophila tumor model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 13123-13128
- 23 Antonyak MA, Kenyon LC, Godwin AK, James DC, Emlet DR, Okamoto I, Tnani M, Holgado-Madruga M, Moscatello DK, Wong AJ. Elevated JNK activation contributes to the pathogenesis of human brain tumors. *Oncogene* 2002; 21: 5038-5046
- 24 Sakurai T, Maeda S, Chang L, Karin M. Loss of hepatic NF-kappa B activity enhances chemical hepatocarcinogenesis through sustained c-Jun N-terminal kinase 1 activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 10544-10551
- 25 周燕红, 何小飞, 高卉, 王瑶芬. JNK信号通路在大肠癌侵袭和转移中的作用及机制. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 2142-2146
- 26 Nateri AS, Spencer-Dene B, Behrens A. Interaction of phosphorylated c-Jun with TCF4 regulates intestinal cancer development. *Nature* 2005; 437: 281-285
- 27 Tang G, Yue Z, Tallozy Z, Hagemann T, Cho W, Messing A, Sulzer DL, Goldman JE. Autophagy induced by Alexander disease-mutant GFAP accumulation is regulated by p38/MAPK and mTOR signaling pathways. *Hum Mol Genet* 2008; 17: 1540-1555
- 28 Chen L, Liu L, Luo Y, Huang S. MAPK and mTOR pathways are involved in cadmium-induced neuronal apoptosis. *J Neurochem* 2008; 105: 251-261
- 29 Chiang CT, Way TD, Tsai SJ, Lin JK. Diosgenin, a naturally occurring steroid, suppresses fatty acid synthase expression in HER2-overexpressing breast cancer cells through modulating Akt, mTOR and JNK phosphorylation. *FEBS Lett* 2007; 581: 5735-5742
- 30 Fujishita T, Aoki M, Taketo MM. JNK signaling promotes intestinal tumorigenesis through activation of mTOR complex 1 in Apc(delta716) mice. *Gastroenterology* 2011; 140: 1556-1563.e6
- 31 Benoit M, Dormond-Meuwly A, Demartines N, Dormond O. Targeting the JNK signaling pathway potentiates the antiproliferative efficacy of rapamycin in LS174T colon cancer cells. *J Surg Res* 2011; 167: e193-e198

编辑 李军亮 电编 何基才

炎症免疫与功能性胃肠病

张丽, 陈明锴, 邓琴

张丽, 陈明锴, 邓琴, 武汉大学人民医院消化内科 湖北省武汉市 430060

湖北省自然科学基金资助项目, No.2009CDB283

武汉大学优秀青年教师基金资助项目, No.3082018

作者贡献分布: 本文综述由张丽和邓琴完成; 陈明锴审校。

通讯作者: 陈明锴, 教授, 主任医师, 430060, 湖北省武汉市, 武汉大学人民医院消化内科. kaimingchen@163.com

收稿日期: 2011-04-27 修回日期: 2011-06-21

接受日期: 2011-06-28 在线出版日期: 2011-09-18

Inflammation, immunity and functional gastrointestinal disorders

Li Zhang, Ming-Kai Chen, Qin Deng

Li Zhang, Ming-Kai Chen, Qin Deng, Department of Gastroenterology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei Province, China

Supported by: the Natural Science Foundation of Hubei Province, No.2009CDB283; and the Research Award Fund for Outstanding Young Teachers in Wuhan University, No.3082018

Correspondence to: Ming-Kai Chen, Professor, Department of Gastroenterology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei Province, China. kaimingchen@163.com

Received: 2011-04-27 Revised: 2011-06-21

Accepted: 2011-06-28 Published online: 2011-09-18

Abstract

The pathogenesis of functional gastrointestinal disorders (FGIDs) is closely related to psychological factors. Mucosal immunity and inflammation are causes of gastrointestinal symptoms in patients with FGIDs. Inflammation factors not only play an important role in the development of depression but also have an impact on gastrointestinal motility. The role of immune mechanisms in the pathogenesis of FGIDs has also attracted wide attention. In this article, we will review the roles of inflammation and immunity in the pathogenesis of FGIDs.

Key Words: Inflammation; Immunity; Functional gastrointestinal disorders

Zhang L, Chen MK, Deng Q. Inflammation, immunity and functional gastrointestinal disorders. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(26): 2741-2745

摘要

功能性胃肠病(functional gastrointestinal disorders, FGIDs)与精神心理因素密切相关, 黏膜免疫和炎症是部分FGIDs患者胃肠道症状产生的基础。炎症因子在抑郁的发生发展中有重要作用, 其对胃肠动力的影响也越来越受到人们的重视。本文简要综述了炎症免疫在FGIDs中的作用及可能机制。

关键词: 免疫; 炎症; 功能性胃肠病

张丽, 陈明锴, 邓琴. 炎症免疫与功能性胃肠病. 世界华人消化杂志 2011; 19(26): 2741-2745

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2741.asp>

0 引言

功能性胃肠病(functional gastrointestinal disorders, FGIDs)是一组以胃肠道功能紊乱为特点的疾病, 目前研究最多的为肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)和功能性消化不良(functional dyspepsia, FD)。胃肠动力异常和内脏高敏感一直被认为是FGIDs主要的病理生理学基础。精神心理障碍引起的FGIDs受到社会的广泛重视。近年来, 许多研究发现炎症因子对胃肠动力有重要的影响, 其在FGIDs所起的作用越来越受到关注。本文拟就炎症免疫和FGIDs的发病关系作一综述。

1 FGIDs与精神心理障碍

FGIDs是一组以慢性或反复发作的消化道症状就诊, 但缺乏解剖、生化和病理学变化证据的临床症候群。其在人群中的患病率为10%-20%, 约占消化科专科门诊患者的40%-50%^[1]。对中国FGIDs回顾性调查显示, 肠道动力及神经机制障碍、内脏高敏感性、胃肠道黏膜炎性反应及免疫激活、脑肠轴异常以及遗传易感性是FGIDs发病的重要因素^[2]。随着生物-医学模式向生物-心理-社会模式的转变, 心理社会因素对胃肠道运动功能的影响及其在FGIDs发生发展中的作用越来越吸引人们的眼光。临床上FGIDs以IBS

■背景资料

功能性胃肠病是(FGID)一组慢性或反复发作的胃肠道症状的症候群。其病因包括肠道动力异常、内脏高敏感性、胃肠道黏膜炎性反应、脑肠轴异常、遗传易感性以及精神心理障碍等众多因素, 但其确切的病理生理学研究尚未明了。

■同行评议者

刘绍能, 主任医师, 中国中医科学院广安门医院消化科; 陈贻胜, 教授, 福建省立医院消化内科

■ 研发前沿

目前精神心理因素、炎症免疫等是FGID研究的热点,若能明确其与FGID的发病关系,将为感染后肠易激综合征发病机制的研究提供平台。

为典型代表,而IBS患者一生中出現精神心理障碍的比例就高达94%^[3],其中由广泛性焦虑症和严重抑郁症导致的IBS占到90%^[4]。

近些年研究趋向于认为抑郁症与免疫激活导致的炎症介质分泌增多有关,强调抑郁症是一种心理神经免疫紊乱障碍性疾病^[5]。细胞因子是免疫细胞分泌的生物活性蛋白,是炎症介质的的重要组成部分,在许多精神障碍疾病如精神分裂症、焦虑症、抑郁症和认知障碍等表达异常^[6]。细胞因子包括白介素(interleukin, IL)、干扰素(interferon, IFN)、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)、生长因子(growth factor, GF)、集落刺激因子(colony stimulating factor, CSF)、趋化性细胞因子(Chemokine)等几类。根据他们在炎症反应中的不同作用可分为致炎性细胞因子和抗炎性细胞因子。前者主要包括IL-1、IL-2、IL-6、IL-12、TNF- α 、TNF- γ 、TNF- β 等;后者包括IL-4、IL-10、IL-13等。国内学者曹晓沧^[7]提出抑郁症可能是一种慢性炎症性疾病。国外Blume等^[8]研究提示,抑郁患者体内既可以产生免疫抑制,如自然杀伤细胞(NKCC)减少;又可以发生免疫激进,如C-反应蛋白(CRP)、IL-6、TNF- α 和前列腺素E₂(PGE₂)增加。并且这种变化在女性体内更为明显,说明性激素与炎症介质产生相关。有学者认为免疫系统可以感受各种心理或躯体的刺激,导致包括IL-6在内的多种炎症性细胞因子分泌增加^[9]。国内外大量文献^[5,10-12]表明细胞因子IL-6与抑郁的发生相关。Howren等^[10]发现C-反应蛋白、IL-1和IL-6与抑郁症呈明显剂量-反应关系。心理社会应激可以激活中枢及外周的炎症反应,而抑郁症患者对心理社会应激的反应以IL-6改变异常突出^[11]。一系列研究表明体内IL-6水平是反应抑郁症患者病情严重程度的重要生物学标志物^[10-12]。IL-6等细胞因子可通过直接或间接作用于大脑、影响单胺类神经递质(5-羟色胺、儿茶酚胺)的释放、激活下丘脑-垂体-肾上腺(HPA)轴以及损伤情绪中枢的神经可塑性等途径导致抑郁的发生^[5]。其中HPA轴功能亢进是公认的抑郁症神经内分泌改变,而IL-6是促肾上腺皮质激素释放激素(CRH)强有力的调节因子^[9],CRH增多更加导致抑郁症的发生。IL-6和HPA轴之间存在正反馈通路,二者相互激活使得抑郁症状得以持续。

2 炎症免疫与FGIDs

2.1 炎症免疫与胃肠动力 近年来许多研究发现

炎症因子对胃肠动力有重要的影响。胃肠动力障碍与多种疾病相关,如急性肠炎、炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)、假性肠梗阻(intestinal pseudo-obstruction)和IBS。越来越多的研究证实炎症免疫与胃肠动力密切相关。消化道免疫细胞浸润是部分胃肠动力障碍性疾病的主要组织学改变,其释放的炎性介质可能介导胃肠动力的改变^[13]。在IBD及术后胃肠梗阻性疾病中均发现有IL-1 β 、TNF- α 、IL-6等炎性因子的增高。值得关注的是,在IBS患者胃肠道中,部分伴发动力障碍的区域,无病理学改变却伴有体内IL-6的增高^[14]。有学者对胃食管反流病研究发现,当食管黏膜上皮与胃液接触时,可产生大量细胞因子IL-1 β 和IL-6,继而抑制食管环状肌的收缩功能^[15]。旋毛虫感染后小鼠肠道发生的主要是Th2优势应答,其Th2相关细胞因子IL-4、IL-13在急性感染期显著增高。升高的IL-4、IL-13可促进T细胞生长,增强肠道平滑肌收缩功能,加速肠道排虫^[16]。

2.2 FGIDs与炎症免疫 研究表明IBS患者体内存在轻度炎症和免疫改变^[17]。持续存在的轻度炎症能破坏肠黏膜上皮屏障功能,激活肠黏膜免疫系统,导致包括肥大细胞、单核巨噬细胞、内分泌细胞在内的各种炎症及免疫细胞增加^[17-19]。他们释放的多种细胞因子及炎症介质如IL-1 β 、TNF- α 及IL-6等致炎性细胞因子在病变的发生发展中起重要作用^[20]。Cremon等^[21]研究显示,IBS患者肠壁免疫细胞浸润引起的腹部饱胀不适等消化不良症状有性别差异,炎症免疫更倾向于发生在女性体内。对IBS患者行直肠活组织检查发现IL-1 β 在基因水平上明显上升^[20]。另外,大多数IBS患者外周血液中可以检测到CD25⁺调节性T细胞^[20]。相反,Kindt等^[22]发现FGIDs患者体内呈现以IL-5、IL-13等Th2细胞因子为主的炎症反应,而Th1细胞免疫改变不明显。国外一项研究发现IBS和抑郁症患者体内都呈现炎症免疫异常的情况^[19],故推测,与抑郁症类似,FGIDs患者体内也可能同时出现免疫抑制和免疫亢进,这进一步说明了抑郁与FGIDs之间有着错综复杂的联系。

3 炎症介质导致FGIDs的发病机制

目前由炎症介质介导的FGIDs发病机制尚不明确。许多研究提示,尽管肠道免疫激活仅存在于肠黏膜,但巨噬细胞、肥大细胞等炎症细胞可通过释放大量炎症因子作用于肠道平滑肌、肠

神经系统和ICC细胞,影响肠道动力和感觉功能^[23,24]。

3.1 ICC与炎症免疫 Cajal间质细胞(interstitial cells of Cajal, ICC)是胃肠道运动的起搏细胞,是慢波活动的基础。近年来进行的一系列研究表明ICC在胃肠电活动及动力产生机制中有重要作用。而胃肠道炎症免疫导致ICC损伤日益受到重视,其中肥大细胞(MC)和巨噬细胞与ICC关系尤为紧密。研究^[25]显示MC可以合成多种细胞因子,其释放的白介素、干扰素、TNF可使MC与白细胞发生串联作用,从而引起局部炎性细胞浸润。炎症还可导致ICC的超微结构出现异常变化,并失去电活性的同步性^[23,26]。在旋毛虫诱导感染的小鼠空肠炎症模型中发现^[27], ICC突起部位有所破坏,与平滑肌和神经元细胞之间的联系中断、减少,随后淋巴细胞浸入肌层并与ICC形成紧密接触。我们前期实验结果显示^[28],慢性综合应激抑郁模型大鼠可出现ICC形态学改变,导致其与肠神经系统联系异常,并最终通过ICC的介导,引起道肠平滑肌收缩功能障碍。肠道ICC的改变可能参与FGIDs所致胃肠动力异常方面的病理生理变化。应激同时也会引起体内相关炎症因子升高,据此推测炎性细胞因子可能通过损害Cajal间质细胞的功能,最终导致胃肠功能性紊乱的发生。

3.2 胃肠平滑肌与炎症免疫 Wehner等^[29]研究显示,腹部外科手术可以引起肠道炎症免疫,导致术后肠梗阻的发生,而肠肌层的驻留型巨噬细胞可能是介导局部炎症的重要物质。他们的研究还证实炎症介质和黏附分子如IL-1 β 、IL-6、ICAM-1和MCP-1与肠道收缩、传导功能密切相关。最近有人提出^[30],术前给患者运用甘氨酸,可以有效降低术后肠梗阻的发生率,且体内IL-6、TNF- α 和肠壁巨噬细胞浸润较对照组显著减少。甘氨酸治疗最早是运用于预防缺血/再灌注的黏膜损害,通过抑制肝脏Kupffer细胞活性及减少其细胞因子释放的途径。甘氨酸预处理能减轻术后胃肠平滑肌收缩障碍主要是抑制肠肌层大量炎性介质的释放;此外,动物实验证明甘氨酸能降低小鼠肠肌层TNF- α mRNA的表达,同时减少IL-6 mRNA的表达及其蛋白合成,结果进一步表明,炎症介质对胃肠平滑肌的收缩功能起着重要作用。另外,甘氨酸还可能起到稳定肥大细胞的作用^[30]。

胃电描记法(electrogastrography, EGG)是一种通过在腹部放置体表电极来检测胃肠肌

电活动的非侵入性检查,特别适用于胃部检测。Maruna等^[31]分别对进行开腹胆囊切除术和腹腔镜胆囊切除术术后的患者进行胃电描记检查发现,胃肠动力受损与全身炎症反应相关;患者体内IL-6的浓度与胃肠动力障碍的程度呈正相关。随着体内IL-6水平降低,胃肠动力逐渐恢复。这些研究显示,术后早期胃肠功能不良与体内低度炎症关系密切。离体大鼠结肠平滑肌经IL-1 β 孵育后,对乙酰胆碱(acetylcholine, Ach)反应性明显降低。但这种效应并不是肌源性的,而是由肠肌间神经丛介导的^[32]。IL-6与IL-1 β 有协同作用,二者相互作用共同影响交感神经末梢去甲肾上腺素的释放^[32]。在体实验证明白介素(ILs)使胃肠平滑肌对神经递质(主要是胆碱能和速激肽类神经递质)的敏感性发生改变^[32]。但另一项研究^[33]显示IL-6对离体豚鼠近端结肠平滑肌的收缩活动具有兴奋性;其收缩振幅增加、频率加快并呈浓度依赖性(IL-6: 20, 40, 80 $\mu\text{g/L}$);同时证明IL-6对平滑肌的兴奋效应主要是通过肠神经元介导。产生不同结果的原因可能与IL-6作用于肠道平滑肌的浓度不同有关。随后, Dinan等^[19]对IBS患者、抑郁症患者和健康志愿者分别服用抗胆碱酯酶药吡斯的明,并检测他们体内相关细胞因子水平,发现IBS和抑郁症患者服用吡斯的明后体内IL-6明显升高。最后得出结论: IBS和抑郁症都具有炎症免疫异常的特性,但IBS患者体内促炎因子IL-6的升高与胆碱能系统毒蕈碱受体(M)介导相关。最近有学者^[13]发现,持续暴露于IL-1 β 的平滑肌组织对神经元的反应性和对Ca²⁺开放时间、振幅大小呈浓度依赖性改变。当离体平滑肌灌流槽的IL-1 β 浓度从10⁻⁹ mol/L升高到10⁻⁸ mol/L时, Ca²⁺的开放率从17.3%提高到24.7%;结果提示IL-1 β 可能直接作用于胃肠平滑肌细胞膜上的Ca²⁺通道,从而影响肠道运动功能。

3.3 内脏高敏感与炎症 有学者^[20]认为肥大细胞浸入到黏膜神经周围可以导致IBS患者产生疼痛感,随后的动物实验也证明肥大细胞可通过刺激内脏敏感神经元而产生相应症状。国内迟雁等^[34]近期研究了炎症与慢性内脏高敏感的联系,他们发现,内脏高敏感大鼠结肠IL-1 β 和TNF- α 的表达较正常对照组明显增高;而细胞因子可以致敏外周伤害感受器,因此其水平增高可能是导致内脏高敏感的重要因素之一。

4 结论

精神心理障碍所致的FGIDs越来越受到人们

■ 相关报道

Kindt等报道持续暴露于IL-1 β 的平滑肌组织对Ca²⁺开放时间、振幅大小呈浓度依赖性改变。IL-1 β 可能直接作用于胃肠平滑肌细胞膜上的Ca²⁺通道,影响肠道运动。

■创新盘点

本文通过对炎症免疫的论述以解释FGID的发病,主要从与抑郁症相关方面改变以及炎症因子变化来叙述其相关性。

的重视,而炎症免疫与FGIDs的发病关系密切。FGIDs患者存在胃肠道炎症细胞的浸润,通过其释放的大量炎症因子作用于胃肠平滑肌、肠神经系统和ICC细胞,最终影响消化道动力和感觉功能,其具体作用机制有待进一步研究。

5 参考文献

- 1 韩麦, 段丽萍. 功能性胃肠病与精神障碍共病的研究进展. *中华医学杂志* 2010; 90: 1580-1582
- 2 徐俊荣, 王深皓, 罗金燕. 中国功能性胃肠病研究20年回顾. *中华消化杂志* 2008; 28: 214-216
- 3 Lee S, Wu J, Ma YL, Tsang A, Guo WJ, Sung J. Irritable bowel syndrome is strongly associated with generalized anxiety disorder: a community study. *Aliment Pharmacol Ther* 2009; 30: 643-651
- 4 Friedrich M, Grady SE, Wall GC. Effects of antidepressants in patients with irritable bowel syndrome and comorbid depression. *Clin Ther* 2010; 32: 1221-1233
- 5 王东林, 林文娟. 细胞因子与抑郁症发病机制研究进展. *中国神经精神疾病杂志* 2007; 33: 572-574
- 6 Conti CM, Fulcheri M. Interrelationship between psychology and cytokines. *J Biol Regul Homeost Agents* 2010; 24: 485-490
- 7 曹晓沧. 抑郁症可能是一种慢性炎症性疾病. *中华医学杂志* 2010; 90: 1303-1303
- 8 Blume J, Douglas SD, Evans DL. Immune suppression and immune activation in depression. *Brain Behav Immun* 2011; 25: 221-229
- 9 Yildirim NC, Yurekli M. The effect of adrenomedullin and cold stress on interleukin-6 levels in some rat tissues. *Clin Exp Immunol* 2010; 161: 171-175
- 10 Howren MB, Lamkin DM, Suls J. Associations of depression with C-reactive protein, IL-1, and IL-6: a meta-analysis. *Psychosom Med* 2009; 71: 171-186
- 11 Miller AH, Maletic V, Raison CL. Inflammation and its discontents: the role of cytokines in the pathophysiology of major depression. *Biol Psychiatry* 2009; 65: 732-741
- 12 Pitychoutis PM, Papadopoulou-Daifoti Z. Of depression and immunity: does sex matter? *Int J Neuropsychopharmacol* 2010; 13: 675-689
- 13 Kindt S, Vanden Berghe P, Boesmans W, Roosen L, Tack J. Prolonged IL-1 β exposure alters neurotransmitter and electrically induced Ca(2+) responses in the myenteric plexus. *Neurogastroenterol Motil* 2010; 22: 321-e85
- 14 Dinan TG, Quigley EM, Ahmed SM, Scully P, O'Brien S, O'Mahony L, O'Mahony S, Shanahan F, Keeling PW. Hypothalamic-pituitary-gut axis dysregulation in irritable bowel syndrome: plasma cytokines as a potential biomarker? *Gastroenterology* 2006; 130: 304-311
- 15 Rieder F, Cheng L, Harnett KM, Chak A, Cooper GS, Isenberg G, Ray M, Katz JA, Catanzaro A, O'Shea R, Post AB, Wong R, Sivak MV, McCormick T, Phillips M, West GA, Willis JE, Biancani P, Fiocchi C. Gastroesophageal reflux disease-associated esophagitis induces endogenous cytokine production leading to motor abnormalities. *Gastroenterology* 2007; 132: 154-165
- 16 Khan WI, Collins SM. Gut motor function: immunological control in enteric infection and inflammation. *Clin Exp Immunol* 2006; 143: 389-397
- 17 De Giorgio R, Barbara G. Is irritable bowel syndrome an inflammatory disorder? *Curr Gastroenterol Rep* 2008; 10: 385-390
- 18 Spiller R, Garsed K. Postinfectious irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2009; 136: 1979-1988
- 19 Dinan TG, Clarke G, Quigley EM, Scott LV, Shanahan F, Cryan J, Cooney J, Keeling PW. Enhanced cholinergic-mediated increase in the pro-inflammatory cytokine IL-6 in irritable bowel syndrome: role of muscarinic receptors. *Am J Gastroenterol* 2008; 103: 2570-2576
- 20 Ohman L, Simrén M. Pathogenesis of IBS: role of inflammation, immunity and neuroimmune interactions. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2010; 7: 163-173
- 21 Cremon C, Gargano L, Morselli-Labate AM, Santini D, Cogliandro RF, De Giorgio R, Stanghellini V, Corinaldesi R, Barbara G. Mucosal immune activation in irritable bowel syndrome: gender-dependence and association with digestive symptoms. *Am J Gastroenterol* 2009; 104: 392-400
- 22 Kindt S, Van Oudenhove L, Broekaert D, Kasran A, Ceuppens JL, Bossuyt X, Fischler B, Tack J. Immune dysfunction in patients with functional gastrointestinal disorders. *Neurogastroenterol Motil* 2009; 21: 389-398
- 23 Wang XY, Vannucchi MG, Nieuwmeier F, Ye J, Faussone-Pellegrini MS, Huizinga JD. Changes in interstitial cells of Cajal at the deep muscular plexus are associated with loss of distention-induced burst-type muscle activity in mice infected by *Trichinella spiralis*. *Am J Pathol* 2005; 167: 437-453
- 24 Akiho H, Deng Y, Blennerhassett P, Kanbayashi H, Collins SM. Mechanisms underlying the maintenance of muscle hypercontractility in a model of postinfective gut dysfunction. *Gastroenterology* 2005; 129: 131-141
- 25 杨琰, 余跃. ICC与胃肠道炎症免疫. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 3715-3719
- 26 Der T, Bercik P, Donnelly G, Jackson T, Berezin I, Collins SM, Huizinga JD. Interstitial cells of Cajal and inflammation-induced motor dysfunction in the mouse small intestine. *Gastroenterology* 2000; 119: 1590-1599
- 27 Wang XY, Berezin I, Mikkelsen HB, Der T, Bercik P, Collins SM, Huizinga JD. Pathology of interstitial cells of Cajal in relation to inflammation revealed by ultrastructure but not immunohistochemistry. *Am J Pathol* 2002; 160: 1529-1540
- 28 周婷, 陈明锴, 张丽, 沈世强, 罗和生. 慢性综合应激对大鼠肠道Cajal间质细胞的影响. *中华实验外科杂志* 2011; 28: 42-44
- 29 Wehner S, Behrendt FF, Lyutenski BN, Lysson M, Bauer AJ, Hirner A, Kalff JC. Inhibition of macrophage function prevents intestinal inflammation and postoperative ileus in rodents. *Gut* 2007; 56: 176-185
- 30 Stoffels B, Türler A, Schmidt J, Nazir A, Tsukamoto T, Moore BA, Schnurr C, Kalff JC, Bauer AJ. Anti-inflammatory role of glycine in reducing rodent postoperative inflammatory ileus. *Neurogastroenterol Motil* 2011; 23: 76-87, e8
- 31 Maruna P, Frasko R, Lindner J. Disturbances of gastric electrical control activity after laparotomic cholecystectomy are related to interleukin-6 concentrations. *Eur Surg Res* 2009; 43: 317-324
- 32 Natale L, Piepoli AL, De Salvia MA, De Salvatore G, Mitolo CI, Marzullo A, Portincasa P, Moschetta A,

- Palasciano G, Mitolo-Chieppa D. Interleukins 1 beta and 6 induce functional alteration of rat colonic motility: an in vitro study. *Eur J Clin Invest* 2003; 33: 704-712
- 33 吕晓光, 余保平, 徐龙, 吴志轩. 白细胞介素6对豚鼠

离体近端结肠平滑肌收缩的影响. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 2205-2209

迟雁, 刘新光, 王化虹, 李懿璇. 内脏高敏感大鼠白细胞介素-1 β 、肿瘤坏死因子 α 与5-羟色胺转运体的表达. *中华内科杂志* 2010; 49: 781-783

■同行评价

本文综述了炎症免疫在FGID的作用及可能机制. 内容丰富, 条理清晰, 可读性强.

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

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

• 消息 •

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.

胃癌腹膜转移治疗的研究进展

赵璐, 赵爱光

■背景资料

腹膜转移是胃癌最主要的复发转移方式之一。由于早期腹膜转移肿瘤在临床上并无特殊表现,一旦患者出现肠道梗阻、腹水、恶液质时治疗困难,预后较差。

赵璐, 赵爱光, 上海中医药大学附属龙华医院肿瘤一科 上海市 200032

作者贡献分布: 本文综述由赵璐完成; 赵爱光审校。

通讯作者: 赵爱光, 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肿瘤一科。

aiguang@hotmail.com

电话: 021-64385700

收稿日期: 2011-04-27 修回日期: 2011-06-21

接受日期: 2011-06-28 在线出版日期: 2011-09-18

Advances in the treatment of peritoneal metastasis of gastric cancer

Lu Zhao, Ai-Guang Zhao

Lu Zhao, Ai-Guang Zhao, Department of Oncology (Division I), Longhua Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China

Correspondence to: Ai-Guang Zhao, Department of Oncology (Division I), Longhua Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, 725 North Wanping Road, Xuhui District, Shanghai 200032, China. aiguang@hotmail.com

Received: 2011-04-27 Revised: 2011-06-21

Accepted: 2011-06-28 Published online: 2011-09-18

Abstract

The clinical curative effect for patients suffering from peritoneal metastasis of gastric cancer is relatively poor. Early diagnosis and effective treatment are very important for improving the survival rate in these patients. In recent years, in the light of non-radical treatment of peritoneal metastasis, peritoneal resection has been adopted with a view to alleviating the tumor burden to the greatest extent, combined with intraperitoneal chemotherapy and whole-body intravenous chemotherapy during the entire surgical period. In the meantime, with the better understanding of the pathogenesis of peritoneal metastasis of gastric cancer, some experimental studies on immunotherapy and gene therapy have also provided new thoughts and methods for the treatment of this disease. In this paper, we review the recent advances in the treatment of peritoneal metastasis of gastric cancer.

Key Words: Gastric cancer; Peritoneal metastasis; Treatment; Literature review

Zhao L, Zhao AG. Advances in the treatment of peritoneal metastasis of gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(26): 2746-2751

摘要

胃癌腹膜转移患者的临床疗效差,因此,如何提高腹膜转移的早期诊断从而采取有效治疗是提高生存率的关键。近年来针对腹膜转移的非根治性治疗,采用腹膜切除以期最大程度减轻肿瘤负荷,并联合围手术期腹腔化疗及全身静脉化疗。同时随着腹膜转移机制的深入研究,免疫治疗、基因治疗等实验研究,也为临床治疗提供新的思路和方法。本文就胃癌腹膜转移的临床治疗及相关实验进展作一综述。

关键词: 胃癌; 腹膜转移; 治疗; 综述

赵璐, 赵爱光. 胃癌腹膜转移治疗的研究进展. 世界华人消化杂志 2011; 19(26): 2746-2751

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2746.asp>

0 引言

腹膜转移是胃癌最主要的复发转移方式之一。由于早期腹膜转移肿瘤在临床上并无特殊表现,一旦患者出现肠道梗阻、腹水、恶液质时治疗困难,预后较差。据日本胃癌协会统计分析1991年在日本顶级胃癌治疗中心治疗中行胃癌切除术的7395例患者的临床资料发现,其中合并腹膜转移患者529例,1、3、5年生存率分别为39.2%、10.6%和7.1%^[1]。因此对胃癌腹膜转移进行有效预防、早期诊断和及时治疗对提高患者的临床疗效和远期生存率、改善生活质量具有重要的意义。

1 危险因素及诊断

1.1 胃癌腹膜转移危险因素分析 Kurita等^[2]在腹腔镜下观察236例确诊为进展期胃癌患者的病灶大小、浸润范围、肉眼外观、淋巴结转移数及组织学类型。结果显示,当肿瘤最大直径>50 mm、侵及全层、转移淋巴结数>3枚、组织类型为未分化型癌时发生腹膜转移的可能性增

■同行评议者

程英升, 教授, 同济大学附属第十人民医院影像临床医学中心; 刘宝林, 教授, 中国医科大学附属盛京医院普通外科; 王志刚, 副主任医师, 上海市第六人民医院普外科

大, 多因素分析进一步显示病灶大小、浸润范围及淋巴结转移数是腹膜转移独立的危险因素。Fanelli等^[3]对162例胃癌患者进行回顾性分析, 其中34例(14.2%)出现腹膜转移, 多因素分析显示与腹膜转移发生的3个独立因素为印戒细胞癌($OR = 4.9$)、血管侵犯($OR = 4.8$)、内脏转移($OR = 5.1$)。Deng等^[4]观察分析308例胃癌根治术后患者的复发转移方式, 169例患者出现术后复发, 其中98例出现腹膜转移, 多因素分析显示腹膜转移发生与淋巴结分期相关($P < 0.001$)。Zhu等^[5]通过分析172例胃癌伴腹膜转移患者的临床资料, 发现阳性淋巴结达93%, 1年生存率19.3%, 中位生存期16 mo。单因素分析提示1年生存率与淋巴结转移、手术方式及化疗相关。淋巴结转移与手术为预后独立因素, 淋巴结转移及未行原位肿瘤切除患者的预后风险系数分别为1.671和1.402。可见, 胃癌腹膜转移的发生与病灶大小及浸润范围、转移淋巴结数目及病理学类型密切相关。

1.2 诊断 目前胃癌腹膜转移的诊断主要包括腹腔冲洗液细胞学检查、影像学诊断、手术直视或腹腔镜下取组织活检等方法。

早在1998年第13版日本《胃癌处理规约》就将腹腔冲洗液细胞学检查(peritoneal lavage-cytology, PLC)的检测列入胃癌分期的一项重要诊断标准^[6]。但应用传统PLC方法来检测胃癌腹腔中的脱落癌细胞, 但其敏感性低, 早期发现腹腔内脱落的游离肿瘤细胞较为困难, 有较高的漏诊率。近年来由于放射免疫分析法(radio-immunoassay, RIA)、单抗免疫细胞化学(immunocytochemical, ICC)染色法、酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)等技术的展开, 能更准确的检测出腹腔内游离癌细胞。

细胞学和病理检查作为胃癌腹膜转移诊断的金标准, 但作为创伤性检查限制了其在术前分期和术后随访中的应用。外周血和肿瘤标志物检查可能对于检查肿瘤复发转移有一定价值, 但无法明确复发的部位, 因此影像学证据相当重要。目前CT^[7]、MR^[8]、PET-CT^[9]等已广泛用于肿瘤腹膜转移的诊断。

王余椿等^[10]通过Meta分析评价CT、PET、PET-CT对恶性肿瘤腹膜转移的诊断效能。结果显示PET对腹膜转移诊断的汇总特异度最高, PET-CT的汇总灵敏度最高, PET、PET-CT和CT的AUC和 Q^* 分别为0.92、0.85、0.99、0.96、

0.91、0.84, PET-CT与CT的AUC值比较差异有统计学意义($Z = 2.33$, $P < 0.05$)。提示对诊断肿瘤腹膜转移, PET-CT是一种准确性较高的无创性检查方法。

近年来, 随着对胃癌腹膜机制的分子细胞学基础深入到基因角度转移的研究, 以期提高早期诊断、及时采取有效治疗方法。

2 外科治疗

2.1 腹膜切除 胃癌患者发生腹膜转移通常失去根治性手术切除机会。作为非根治性手术, 腹膜切除(peritonectomy)是近年来提出的针对胃癌腹膜转移外科治疗的概念, 指对腹膜的局限转移性病灶且无肝转移和远处淋巴结转移的患者实施区域性腹膜切除。腹膜切除可最大限度地减少肿瘤细胞的残留, 对胃癌患者的预后有较大疗效。Glehen等^[11]显示行腹膜切除术后肿瘤完全切除的患者与不完全切除患者的2年生存率分别为79.9%及44.7%。

2.2 细胞减量术联合围手术期化疗 2004年第四届国际腹膜表面肿瘤学会议^[12]提出了利用细胞减量术(cytoreductive surgery, CRS)完全切除腹腔内所有的肉眼病变, 联合围手术期腹腔化疗进一步消除显微镜下的残留的方案。细胞减量术包括原发病灶及区域淋巴结清除和受侵邻近脏器联合切除和腹膜病变切除, 根据腹膜转移肿瘤播散的范围, 包括壁层和脏层腹膜切除术、大网膜切除术、网膜次全切除术等。围手术期腹腔化疗包括术前腹腔化疗、术中加温腹腔化疗(hyperthermic intraperitoneal chemotherapy, HIPEC)和术后早期腹腔化疗(early postoperative intraperitoneal chemotherapy, EPIC)。Glehen等^[13]对49例胃癌伴腹膜转移患者采用细胞减量术联合围手术期腹腔化疗, 结果中位生存期21.3 mo, 49例中有4例存活5年以上。

3 内科治疗

3.1 腹腔化疗 高浓度而有效地腹腔内化疗一直以来受到人们的关注。由于“腹膜-血浆屏障”的存在, 腹腔内化疗使化疗药物可以在局部达到较高的药物浓度, 直接作用于定植在大网膜乳斑和腹膜的肿瘤细胞增殖灶, 同时也直接作用于腹腔内的游离癌细胞, 抑制其着床、增殖和发展。

目前腹腔内化疗的基础上发展起来的腹腔内温热化疗(hyperthermic intraperitoneal chemo-

■相关报道

Than等发现腹腔注射REIC/DKK-3腺病毒载体(Ad-REIC)能够抑制胃癌细胞的播散, 同时控制疾病进展。

■应用要点

该方法可有望获得高质量的肝细胞并建立冷冻肝细胞库,为药理学研究、生物人工肝及细胞治疗提供理想细胞材料。

therapy, HIPEC)、低渗透压腹腔内化疗(hypotonic intraperitoneal chemotherapy, HIC)、化学温热腹膜灌注疗法(chemo hyperthermic peritoneal perfusion, CHPP)已于临床广泛开展。

腹腔内温热化疗利用热对肿瘤细胞的杀伤作用同时,改变肿瘤细胞的渗透性,增加对抗癌药的吸收,增强化疗药物的抗癌效应和浸润深度,以到达更好的化疗效果。Li等^[14]分析128例胃癌伴腹膜转移患者的临床资料,结果显示行HIPEC的患者较未行HIPEC的患者有明显的生存获益($P = 0.025$),多因素分析显示HIPEC是胃癌伴腹膜转移患者的独立预后因素。

低渗透压腹腔内化疗利用低渗状态下增加抗癌药物进入细胞内浓度的特点对于腹腔内游离癌细胞的抗肿瘤效果比传统方法显著。陆巧^[15]等将88例患者分为术中低渗热化疗组、术中等渗热化疗组及对照组3组,结果显示3组5年生存率分别为64%、59%和32%。低渗热化疗组9例复发,复发时间(24.6 ± 9.7) mo;等渗热化疗组13例复发,复发时间(15.6 ± 8.7) mo;对照组15例复发,复发时间(10.2 ± 5.2) mo。提示低渗热化疗与等渗热化疗均能提高患者的生存率,而低渗热化疗在延缓肿瘤复发上优于等渗热化疗。

化学温热腹膜灌注疗法针对腹膜微小播种和腹腔内游离癌细胞为目标,将腹膜表层加温,利用抗癌药和温热疗法的共同效应。但对于CHHP对胃癌腹膜转移的防治作用,目前尚未达成一致。Shimomura等^[16]认为,CHPP对于腹膜转移的预防有一定疗效。但长期观察未发现其延长生命的效果。

3.2 全身化疗 Kimura等^[17]进行的OGSG0401研究中7例胃癌合并腹膜转移患者,于第1、第8天给予紫杉醇 50 mg/m^2 静脉注射联合S-1 40 mg/m^2 第1-14天口服,休息7 d。结果中位生存期310 d,反映率为80.0%(5/7),2例患者出现Ⅲ度不良反应。Ishigami等^[18]进行的一项Ⅱ期临床研究,共40例胃癌明确腹膜转移患者,于第1、8天分别给予紫杉醇 50 mg/m^2 静脉注射及 20 mg/m^2 腹腔注射,同时第1-14天予S-1 80 mg/m^2 口服,休息7 d,21 d为一疗程。主要研究终点为1年生存率,次要研究终点为反映率、疗效及安全性。结果1年生存率达78%,21例合并腹水患者中13例症状消失或减轻,常见的Ⅲ-Ⅳ度毒副反应包括中性粒细胞减少(38%)、白细胞减少(18%)及贫血(10%)。Imazawa等^[19]对31例晚期胃癌伴腹膜转移患者进行回顾性分析,所有患者给予MTX(100 mg/m^2)联

合5-Fu(600 mg/m^2)/LV(10 mg/m^2)方案化疗,结果中位生存期255 d,中位疾病进展期127 d。21例有可测病灶患者中4例PR,26例患者中14例腹水量明显减少。

Taomoto等^[20]对20例晚期胃癌患者行多西他赛(40 mg/m^2 ,第1天)联合S-1(80 mg/m^2 ,第1-14天)方案的新辅助化疗,接受化疗平均4.4周期,其中PR 17例,SD 3例。术后中位生存期达855d,2年及3年生存率分别为80%和54.9%。同时发现肝转移患者及腹膜转移患者的中位生存期分别为865 d及510 d。提示姑息手术切除对胃癌伴腹膜转移患者具有生存获益。Okabe等^[21]对腹腔镜下诊断为胃癌伴腹膜转移或微转移41例患者行S1联合顺铂方案化疗,结果93%(38/41)的患者完成2程化疗,46%(19/41)的患者腹膜转移病灶消失,化疗接受后78%(32/41)的患者接受手术治疗,其中R0切除22例。全组中位生存期20.4 mo, R0切除术患者43.2 mo。

Yonemura等^[22]对79例胃癌伴腹膜转移患者进行腹腔-全身新辅助化疗(NIPS),给予TS-1口服第1-14天,同时于第1、8、15天给予多西他赛 30 mg/m^2 联合顺铂 30 mg/m^2 通过腹腔植入药盒进行灌注。结果发现在行NIPS前82.2%(65/79)腹腔冲洗液细胞学检查结果阳性的患者,在行NIPS后41例转为阴性。阴性患者较阳性患者在生存期方面具有明显优势。且未发现NIPS治疗相关性死亡,仅2例患者出现Ⅳ-V度血液学不良反应。

4 实验研究

肿瘤的腹膜转移可能与机体免疫力下降,对肿瘤细胞的反应下降有关。同时,因为腹膜具有一定的抗原提呈和促淋巴细胞增殖等免疫活性,使免疫治疗成为腹膜转移治疗的新靶点。Pansons等^[23]研究表明腹腔免疫疗法可使腹膜转移及恶性腹水患者获得多达10 mo的额外生存期。Kosaka^[24]等利用CD80白介素2联合基因转染胃癌腹膜转移动物模型,结果其生存时间为46 d,单用CD80组37 d,单用白介素2组39 d,空白对照组29 d。

血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)作为诱导肿瘤血管生成过程中一个主要的调节因子,可选择性刺激内皮细胞分裂,并能增加微血管的通透性。Imaizumi等^[25]进行的一项体外研究显示,腹腔注射贝伐珠单抗组对人胃癌细胞株小鼠腹膜转移模型的腹

水量及病灶组织细胞分裂指数较空白组低,且生存获益较高,提示贝伐珠单抗能有效控制胃癌腹膜转移。Yagi等^[26]对高度腹膜转移的人胃癌OCUM-2MD3细胞株裸鼠模型的体外研究,在对分析I¹²⁵标记的贝伐珠单抗体内分布分析发现,腹腔注射贝伐珠单抗的腹膜清除率较低,在腹膜转移病灶中发现贝伐珠单抗不仅能抑制病灶增长同时能减少腹水量。而皮下注射时效果更为明显,并且联合腹腔注射紫杉醇时效果增加。

肿瘤细胞侵袭转移与细胞外基质及整合素密切相关,Takatsuki等^[27]认为整合素 $\alpha 3\beta 1$ 在脱落癌细胞黏附于腹膜上起着关键作用,利用抗 $\alpha 2$ 和抗 $\alpha 3$ 整联蛋白抗体对NUGC4胃癌腹膜转移小鼠模型进行治疗,结果显示其有显著的抑制腹膜转移的作用。由于核因子- κB 参与肿瘤细胞的转移过程,Mino等^[28]发现核因子- κB 抑制剂DHMEQ能明显降低核因子- κB 的生物学活性,阻断人胃癌细胞株NUGC-4及44As3Luc与细胞外基质的黏附作用,同时发现DHMEQ能抑制整合素 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ 及 $\beta 1$ 的表达水平。将经DHMEQ预处理的44As3Luc细胞株注射入小鼠腹腔并进行腹腔冲洗液细胞学检查及活体成像,结果发现预处理组的小鼠腹腔冲洗液中游离癌细胞较对照组明显降低,且生存时间较长。提示核因子- κB 抑制剂可抑制胃癌患者腹膜转移的发生。

Than等^[29]发现腹腔注射REIC/DKK-3腺病毒载体(Ad-REIC)能够抑制胃癌细胞的播散,同时控制疾病进展。Sony等^[30]将NDV病毒进行基因操纵形成NDV(F3aa)-GFR病毒株,体外研究证明NDV(F3aa)-GFR对人胃癌MKN-74细胞具有杀伤作用,并且发现杀伤作用与剂量和病毒复制相关。通过建立人胃癌MKN-74细胞株裸小鼠腹膜转移模型,对其进行腹腔注射NDV(F3aa)-GFR,结果发现半数以上小鼠未出现明显的不良反应,提示NDV(F3aa)-GFR能作为治疗胃癌腹膜转移新的方向。Kawaguchi等^[31]通过呼肠病毒血清3型感染人胃癌细胞株MKN45p、NUGC4、MKN7及KatoIII的,并设正常细胞株NIH3T3为对照组,发现四组人胃癌细胞株细胞株均发生细胞病变效用,且试验组中Ras蛋白表达水平较对照组明显增高。进一步建立人胃癌细胞株MKN45p腹膜转移裸鼠模型,于模型建立后第7、8、9天分别腹腔注射呼肠病毒血清3型(1×10^8 PFU),结果发现实验组裸鼠的平均腹水量、腹膜转移病灶的数量均较对照组低,提示腹腔注射呼肠病毒可能作为治疗胃

癌腹膜转移新的模式。

Kishi等^[32]通过采用不同剂量的他拉泊芬钠(2 J/cm^2 、 5 J/cm^2 和 10 J/cm^2)介导的光动力学疗法(PDT)对人胃癌MKN-45 EGFP细胞株裸鼠腹膜转移模型体外研究发现,腹膜转移病灶的荧光强度随着激光治疗和腹腔注射他拉泊芬钠间隔时间延长而下降,当间隔时间为2和4 h时组织病理学反应率分别为52.5%、43.2%、64.4%和20.8%、25.5%、26.2%。由于不良反应最终推荐间隔时间4 h,他拉泊芬钠 2 J/cm^2 方案,认为他拉泊芬钠介导的光动力学疗法对胃癌腹膜是一种有效的治疗措施。Kamei等^[33]通过对人胃癌细胞株MKN45腹膜转移裸鼠模型注射紫杉醇纳米粒子(PTX-30W),发现静脉注射24 h后紫杉醇在腹膜病灶周围血管聚集,而腹腔注射1 h后其在腹膜转移结节周围大量聚集且随时间延长聚集范围逐渐扩大,且48 h后紫杉醇浸润深度达1 mm,提出腹腔注射PTX-30W对治疗腹膜转移具有良好的可行性。

5 结论

目前治疗胃癌腹膜转移的方法虽然很多,但总体疗效不甚理想。因此提高胃癌腹膜转移的早期诊断率,积极展开术中、术后的局部及全身治疗,深入研究基因、免疫等生物疗法,以期最大程度改善患者预后。

6 参考文献

- 1 丸山圭一. 日本晚期胃癌外科治疗效果分析. 中国现代普通外科进展 2008; 11: 185-187
- 2 Kurita N, Shimada M, Utsunomiya T, Iwata T, Nishioka M, Yoshikawa K, Miyatani T, Higashijima J, Nakao T. Predictive factors of peritoneal metastasis in gastric cancer. *Hepatogastroenterology* 2010; 57: 980-983
- 3 Fanelli MF, de Paiva TF, Silva MJ, Benevides CF, Guimarães AP, Gímenes DL, Pinheiro ED, Rinck JA, Nicolau UR, Sanches SM, Mello CA, Dettino AL, Cruz MR, de Melo LM, Formiga MN, de Lima VC, Chinen LT. Predictors of peritoneal carcinomatosis in patients with gastric cancer treated at a single institution in Brazil. *J Surg Oncol* 2009; 100: 452-455
- 4 Deng J, Liang H, Wang D, Sun D, Pan Y, Liu Y. Investigation of the recurrence patterns of gastric cancer following a curative resection. *Surg Today* 2011; 41: 210-215
- 5 Zhu G, Zhang M, Zhang H, Gao H, Xue Y. Survival predictors of patients with gastric cancer with peritoneal metastasis. *Hepatogastroenterology* 2010; 57: 997-1000
- 6 陈峻青. 日本胃癌处理规约第十三版重要修改内容简介. 中华胃肠外科杂志 1999; 2: I-IV
- 7 董国礼, 刘兴华, 翟昭华, 杨林, 黄小华, 张小明, 唐显映, 罗开. 多层螺旋CT检查在腹膜转移瘤诊断中的价

同行评价

文章选题得当,文献参阅较全面,综述客观,评价合理,对临床及研究有指导意义。

- 值. 放射学实践 2009; 24: 763-766
- 8 Bozkurt M, Doganay S, Kantarci M, Yalcin A, Eren S, Atamanalp SS, Yuce I, Yildirgan MI. Comparison of peritoneal tumor imaging using conventional MR imaging and diffusion-weighted MR imaging with different b values. *Eur J Radiol* 2010 Jul 1. [Epub ahead of print]
- 9 Wang Z, Chen JQ. Imaging in assessing hepatic and peritoneal metastases of gastric cancer: a systematic review. *BMC Gastroenterol* 2011; 11: 19
- 10 王余椿, 刘晓晨, 许建荣. CT、PET、PET/CT对肿瘤腹膜转移诊断价值的Meta分析. 中国医学影像技术 2010; 26: 99-103
- 11 Glehen O, Mithieux F, Osinsky D, Beaujard AC, Freyer G, Guertsch P, Francois Y, Peyrat P, Panteix G, Vignal J, Gilly FN. Surgery combined with peritonectomy procedures and intraperitoneal chemotherapy in abdominal cancers with peritoneal carcinomatosis: a phase II study. *J Clin Oncol* 2003; 21: 799-806
- 12 González-Moreno S. Peritoneal Surface Oncology: A progress report. *Eur J Surg Oncol* 2006; 32: 593-596
- 13 Glehen O, Schreiber V, Cotte E, Sayag-Beaujard AC, Osinsky D, Freyer G, François Y, Vignal J, Gilly FN. Cytoreductive surgery and intraperitoneal chemotherapy for peritoneal carcinomatosis arising from gastric cancer. *Arch Surg* 2004; 139: 20-26
- 14 Li C, Yan M, Chen J, Xiang M, Zhu ZG, Yin HR, Lin YZ. Surgical resection with hyperthermic intraperitoneal chemotherapy for gastric cancer patients with peritoneal dissemination. *J Surg Oncol* 2010; 102: 361-365
- 15 陆巧, 黄学军, 罗燕帆, 杨东山, 陈超. 进展期胃癌患者术中低渗热灌注化疗临床疗效分析. 临床和实验医学杂志 2007; 6: 27-30
- 16 Shimomura K, Sakakura C, Takemura M, Takagi T, Fukuda K, Kin S, Nakase Y, Miyagawa K, Ohgaki M, Fujiyama J, Fujita Y, Nakanishi M, Hagiwara A, Shirane M, Okazaki Y, Hayashizaki Y, Yamagishi H. Combination of L-3-phosphoserine phosphatase and CEA using real-time RT-PCR improves accuracy in detection of peritoneal micrometastasis of gastric cancer. *Anticancer Res* 2004; 24: 1113-1120
- 17 Kimura Y, Machida H, Fujitani K, Yamamoto M, Tominaga K, Yano H, Shimokawa T, Takiuchi H, Tsujinaka T, Furukawa H. [Combination of S-1 and paclitaxel for advanced/recurrent gastric cancer patients with peritoneal metastasis, feasibility study (OGSG0401)]. *Gan To Kagaku Ryoho* 2010; 37: 151-155
- 18 Ishigami H, Kitayama J, Kaisaki S, Hidemura A, Kato M, Otani K, Kamei T, Soma D, Miyato H, Yamashita H, Nagawa H. Phase II study of weekly intravenous and intraperitoneal paclitaxel combined with S-1 for advanced gastric cancer with peritoneal metastasis. *Ann Oncol* 2010; 21: 67-70
- 19 Imazawa M, Kojima T, Boku N, Onozawa Y, Hironaka S, Fukutomi A, Yasui H, Yamazaki K, Taku K. Efficacy of sequential methotrexate and 5-fluorouracil (MTX/5FU) in improving oral intake in patients with advanced gastric cancer with severe peritoneal dissemination. *Gastric Cancer* 2009; 12: 153-157
- 20 Taomoto J, Tanabe K, Suzuki T, Hamai Y, Emi M, Hihara J, Yoshida K, Okada M. [Adjuvant surgery for advanced gastric cancer]. *Gan To Kagaku Ryoho* 2010; 37: 263-266
- 21 Okabe H, Ueda S, Obama K, Hosogi H, Sakai Y. Induction chemotherapy with S-1 plus cisplatin followed by surgery for treatment of gastric cancer with peritoneal dissemination. *Ann Surg Oncol* 2009; 16: 3227-3236
- 22 Yonemura Y, Endou Y, Shinbo M, Sasaki T, Hirano M, Mizumoto A, Matsuda T, Takao N, Ichinose M, Mizuno M, Miura M, Ikeda M, Ikeda S, Nakajima G, Yonemura J, Yuuba T, Masuda S, Kimura H, Matsuki N. Safety and efficacy of bidirectional chemotherapy for treatment of patients with peritoneal dissemination from gastric cancer: Selection for cytoreductive surgery. *J Surg Oncol* 2009; 100: 311-316
- 23 Parsons SL, Kutarska E, Koralewski P, Gore M, Wimberger P, Burges A, Stroehlein MA, Lahr A, Jaeger M, Heiss MM. Treatment of ovarian cancer patients with malignant ascites using the trifunctional antibody catumaxomab: Results of a phase II/III study. *J Clin Oncol* 2007 ASCO Annual Meeting Proceedings Part I, Vol 25, No. 18S (June 20 Supplement), 2007: 5520
- 24 Kosaka K, Yashiro M, Sakate Y, Hirakawa K. A synergistic antitumor effect of interleukin-2 addition with CD80 immunogene therapy for peritoneal metastasis of gastric carcinoma. *Dig Dis Sci* 2007; 52: 1946-1953
- 25 Imaizumi T, Aoyagi K, Miyagi M, Shirouzu K. Suppressive effect of bevacizumab on peritoneal dissemination from gastric cancer in a peritoneal metastasis model. *Surg Today* 2010; 40: 851-857
- 26 Yagi Y, Fushida S, Harada S, Tsukada T, Kinoshita J, Oyama K, Fujita H, Ninomiya I, Fujimura T, Kayahara M, Kinuya S, Yashiro M, Hirakawa K, Ohta T. Biodistribution of humanized anti-VEGF monoclonal antibody/bevacizumab on peritoneal metastatic models with subcutaneous xenograft of gastric cancer in mice. *Cancer Chemother Pharmacol* 2010; 66: 745-753
- 27 Takatsuki H, Komatsu S, Sano R, Takada Y, Tsuji T. Adhesion of gastric carcinoma cells to peritoneum mediated by alpha3beta1 integrin (VLA-3). *Cancer Res* 2004; 64: 6065-6070
- 28 Mino K, Ozaki M, Nakanishi K, Haga S, Sato M, Kina M, Takahashi M, Takahashi N, Kataoka A, Yanagihara K, Ochiya T, Kamiyama T, Umezawa K, Todo S. Inhibition of nuclear factor-kappaB suppresses peritoneal dissemination of gastric cancer by blocking cancer cell adhesion. *Cancer Sci* 2011; 102: 1052-1058
- 29 Than SS, Kataoka K, Sakaguchi M, Murata H, Abarzua F, Taketa C, Du G, Yashiro M, Yanagihara K, Nasu Y, Kumon H, Huh NH. Intraperitoneal administration of an adenovirus vector carrying REIC/Dkk-3 suppresses peritoneal dissemination of scirrhous gastric carcinoma. *Oncol Rep* 2011; 25: 989-995
- 30 Song KY, Wong J, Gonzalez L, Sheng G, Zamarin D, Fong Y. Antitumor efficacy of viral therapy using genetically engineered Newcastle disease virus [NDV(F3aa)-GFP] for peritoneally disseminated gastric cancer. *J Mol Med (Berl)* 2010; 88: 589-596
- 31 Kawaguchi K, Etoh T, Suzuki K, Mitui MT, Nishizono A, Shiraishi N, Kitano S. Efficacy of oncolytic reovirus against human gastric cancer with peritoneal metastasis in experimental animal model. *Int J Oncol* 2010; 37: 1433-1438
- 32 Kishi K, Yano M, Inoue M, Miyashiro I, Motoori M, Tanaka K, Goto K, Eguchi H, Noura S, Yamada T, Ohue M, Ohigashi H, Ishikawa O. Talaporfin-mediated photodynamic therapy for peritoneal me-

- tastasis of gastric cancer in an in vivo mouse model: drug distribution and efficacy studies. *Int J Oncol* 2010; 36: 313-320
- 33 Kamei T, Kitayama J, Yamaguchi H, Soma D, Emoto S, Konno T, Ishihara K, Ishigami H, Kaisaki S, Nagawa H. Spatial distribution of intraperitoneally administrated paclitaxel nanoparticles solubilized with poly (2-methacryloxyethyl phosphorylcholine-co n-butyl methacrylate) in peritoneal metastatic nodules. *Cancer Sci* 2011; 2: 200-205

编辑 李军亮 电编 何基才

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》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、补充或删除时, 本刊编辑部将把原稿连同审稿意见、编辑意见寄回给作者修改, 而作者必须于15 d内将单位介绍信、作者符合要点承诺书、版权转让信等书面材料寄回编辑部, 同时将修改后的电子稿件上传至在线办公系统; 逾期寄回的, 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.

PD-1/PD-L1信号通路在乙型病毒性肝炎免疫调节作用的研究进展

周长彬, 李智伟

■背景资料

PD-1及其主要配体是近年来发现的负性共刺激信号之一, 其高表达与T细胞免疫缺陷相关, 一个功能完整的T淋巴细胞免疫对于抵抗HBV持续感染是必须的, PD-1在病毒性肝炎的发病过程中发挥着“双刃剑”作用。

周长彬, 李智伟, 中国医科大学附属盛京医院感染科 辽宁省沈阳市 110004

作者贡献分布: 综述写作由周长彬完成, 李智伟审校。

通讯作者: 李智伟, 教授, 主任医师, 110004, 辽宁省沈阳市三好街36号, 中国医科大学附属盛京医院感染科。

lizw@sj-hospital.org

电话: 024-96615-62311

收稿日期: 2011-04-27 修回日期: 2011-06-21

接受日期: 2011-06-28 在线出版日期: 2011-09-18

Progress in understanding the role of PD-1/PD-L1 signaling pathway in the immunoregulation of HBV infection

Chang-Bin Zhou, Zhi-Wei Li

Chang-Bin Zhou, Zhi-Wei Li, Department of Infectious Diseases, the Affiliated Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China
Correspondence to: Zhi-Wei Li, Professor, Department of Infectious Diseases, the Affiliated Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. lizw@sj-hospital.org

Received: 2011-04-27 Revised: 2011-06-21

Accepted: 2011-06-28 Published online: 2011-09-18

Abstract

Programmed cell death-1 (PD-1) is an inhibitory co-stimulatory molecule belonging to the CD28 family. It plays an important role in the maintenance of immune tolerance through binding to its ligands. Recent studies showed that the PD-1/PD-L1 ligand 1 (PD-L1) pathway played an essential role in the development of chronic viral infection, autoimmune diseases and tumor immunity. Manipulating this pathway may have possible clinical applications to HBV treatment. This article will review the recent progress in understanding the role of PD-1/PD-L1 signaling pathway in the immunoregulation of HBV infection.

Key Words: Programmed death-1; Programmed death-1 ligand; Hepatitis B virus

Zhou CB, Li ZW. Progress in understanding the role of

PD-1/PD-L1 signaling pathway in the immunoregulation of HBV infection. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(26): 2752-2759

摘要

程序性死亡分子1(programmed death-1, PD-1)是由pdcd1基因编码的一个抑制性共刺激分子, 在维持外周耐受中起着关键性的作用, 并在慢性病毒感染、肿瘤免疫及自身免疫性疫病的发生过程中发挥重要的生物学作用, 受到广泛的关注. 本文主要综述PD-1/PD-L1信号通路在乙型病毒性肝炎免疫调节作用的研究进展。

关键词: 程序性死亡分子-1; 程序性死亡分子1主要配体; 乙型病毒性肝炎

周长彬, 李智伟. PD-1/PD-L1信号通路在乙型病毒性肝炎免疫调节作用的研究进展. *世界华人消化杂志* 2011; 19(26): 2752-2759

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2752.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)能够引起肝脏自限性和慢性感染. 有研究证明T淋巴细胞免疫在控制HBV的重要性^[1-3]. 病毒特异性T淋巴细胞在HBV持续感染患者体内数量很少, 而且往往功能受损. 相反, 自限性HBV感染的患者在外周血中几乎总是存在可以检测到的病毒特异性T淋巴细胞. 因此, 一个功能完整的T淋巴细胞免疫对于抵抗HBV持续感染是必需的. 程序性死亡分子-1(programmed death-1, PD-1)及其主要配体PD-L1是近年来发现的负性共刺激信号之一, 其高表达与T淋巴细胞免疫缺陷密切相关, 是导致病毒持续感染及肿瘤免疫逃逸的重要机制之一. PD-1在病毒性肝炎的发病过程中发挥着“双刃剑”作用, 其高表达可抑制T细胞活性, 调节免疫应答, 以免持续活化的免疫应答造成机体组织免疫病理损伤, 但是, 此抑制作用又使得CD8⁺ T淋巴细胞耗竭, 不利于病毒的

■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; 金瑞, 教授, 首都医科大学附属北京佑安医院消化科; 靳雪源, 副主任医师, 中国人民解放军第302医院消化内科

清除,造成持续的病毒感染.我们从不同角度的PD-1/PD-L1抑制性信号通路与HBV感染机体发生发展的相关机制进行综述.

1 PD-1/PD-L1信号通路在乙型肝炎患者肝组织免疫微环境的关键作用

PD-1/PD-L1信号通路对于抗病毒免疫效应具有重要性,并且能够影响病原体感染机体所致免疫病理损伤的严重程度.然而,PD-1/PD-L1信号通路在病原体感染人体特定组织的调节作用仍然知之甚少.

Dong等^[4]应用基因靶向治疗策略,敲除小鼠体内PD-L1蛋白编码基因,结果发现小鼠肝组织内富集大量特异性CD8⁺ T淋巴细胞,未见到CD4⁺ T淋巴细胞,相对于肺脏和肾脏,抗原激活的CD8⁺ T淋巴细胞更容易在肝脏中积累;PD-L1基因缺失小鼠容易发展为自身免疫性肝炎.此外,另有一些证据表明细胞表面高表达PD-L1能够诱导活化T细胞的凋亡,肝脏可能是活化T淋巴细胞凋亡的发生部位^[5].Iwai等^[6]利用腺病毒感染PD-1基因缺陷小鼠,对比研究野生型小鼠与PD-1基因缺陷小鼠的肝组织T细胞功能,结果证实PD-1基因缺陷小鼠能显著提高肝组织内抗原特异性T淋巴细胞的增值能力,并能快速清除病毒.Isogawa等^[7]也研究表明小鼠肝组织T淋巴细胞PD-1的表达与慢性HBV感染小鼠体内病毒的复制水平相关.这些研究提示,PD-1通路可能在肝脏的免疫微环境具有重要作用.

Muhlbauer等^[8]研究了肝组织内肝细胞、星状细胞和库普弗细胞表面抑制性受体PD-1的配体的表达水平,结果表明,肝组织内这些细胞借助病毒感染,活化的T细胞以及I型干扰素能够上调细胞表面PD-L1的表达水平.因此,PD-1/PD-L1信号通路在调控肝组织内免疫活性细胞、病原体与免疫应答相互作用方面发挥关键作用.

尽管体外实验已经证实干扰素- γ 能够上调淋巴细胞表面PD-L1以及巨噬细胞和树突状细胞表面PD-L2的表达水平^[9],然而这些抑制性配体在原代人体细胞,尤其是肝组织内的表达以及调控机制还没有完全阐明.Muhlbauer等^[8]从基因水平分析人原代肝细胞和肝实质细胞(如库普弗细胞,肝窦内皮细胞和肝星状细胞)PD-L1表达,揭示了PD-1信号通路在人体肝脏的潜在重要性.研究发现^[10]PD-L1在原代人肝细胞表面组成性低水平表达,经外源IFN- γ 和IFN α -2a刺

激,细胞表面PD-L1的表达上调.除此之外,活化的淋巴细胞和病毒的直接感染也可上调PD-L1 mRNA表达水平.为了进一步明确PD-L1升高是否影响T细胞的存活,Muhlbauer等^[8]研究了静息或干扰素激活的肝细胞体外诱导Jurkat细胞的凋亡水平.研究发现干扰素诱导的肝细胞增加了Jurkat细胞凋亡水平,应用PD-L1抗体能阻断Jurkat细胞凋亡.

这些研究结论可能有助于HBV感染的抗病毒免疫策略.因为HBV感染免疫学特点常常表现为肝组织内抗病毒CD8⁺ T淋巴细胞与持续性病毒复制共存.目前已有研究表明,这些抗病毒CD8⁺ T淋巴细胞缺乏细胞毒作用,不能够产生抗病毒细胞因子,处于一种“耗竭”状态^[11,12];嗜肝病毒感染可以增强PD-1/PD-L1共抑制信号通路^[8].因此,PD-L1的升高可能是HBV感染患者体内未能获得有效的T淋巴细胞免疫应答的原因.确切机制可能涉及通过PD-L1介导的T淋巴细胞功能失活或增强肝脏活化T细胞的凋亡.此外,IFN α -2a诱导的PD-L1上调可能对抗病毒药物的治疗方法包括聚乙二醇干扰素治疗慢性病毒性肝炎具有重要意义.上述研究为进一步确定肝组织PD-L1表达水平、抗病毒治疗、HBV感染结局三者相互作用的机制奠定了基础.

2 PD-1/PD-L1与乙型肝炎的临床分型

2.1 PD-1/PD-L1与急性乙型肝炎

HBV入侵机体后受到宿主免疫系统的防御反应,机体对病毒免疫应答的差异造成了HBV感染的不同转归.在急性HBV感染的患者和黑猩猩体内可以检测到强烈的、多表位特异性细胞毒性T淋巴细胞(cytotoxicity T lymphocyte, CTL)反应;而慢性感染时,HBV病毒特异性CTL应答的数量和质量均大为降低,这可能是造成感染慢性化的重要原因.Zhang等^[13]研究发现,在急性HBV感染早期,HBV特异性CD8⁺ T细胞PD-1的表达明显增加,在病毒清除期,随着HBV DNA的下降,PD-1表达降低,提示HBV的清除与PD-1表达降低有关.

体外阻断PD-1转导途径可增强HBV特异性CD8⁺ T细胞的增殖和炎症因子的产生,同时减少IL-10的产生和T细胞凋亡的发生;相反,HBV特异性CD8⁺ T细胞PD-1的延迟表达则与急性肝功能衰竭密切相关.Zhang等^[14]研究证实HBV感染急性期外周血HBV特异性CD8⁺ T细胞高表达PD-1,然而当患者进展为急性肝衰竭时,抗原特异性CD8⁺ T细胞PD-1的表达相对于没有进展到

■研究前沿

T细胞功能恢复和乙型肝炎特异性T细胞免疫功能重建,干扰这个信号通路应是一个科学合理并且有前景的治疗策略,PD-1/PD-L1通路的精确调控可能为慢性乙型肝炎的治疗提供新的线索和思路.

■相关报道

Barber等研究证实阻断PD-1/PD-L1信号途径可以使体内耗竭的T细胞恢复增殖、分泌细胞因子及杀伤靶细胞的能力,并使病毒载量降低。

急性肝衰竭的患者相对降低。因此,PD-1的上调可有效地减弱有害的CD8⁺ T应答及肝脏损伤,与急性HBV感染密切相关。

Jin等^[15]采集16例急性HBV患者外周血,通过流式细胞仪分析病毒特异性CTL细胞的频率及其表面PD-1的表达特点,发现HBV特异性CTL表面PD-1明显上调,而来自同一个体的巨细胞病毒(CMV)和流感病毒特异性CTL上PD-1保持在低水平表达,说明PD-1在急性HBV感染者CTL表面的高表达具有特异性,而且这种特异性的上调与ALT呈明显正相关,提示PD-1上调水平可作为肝脏损伤程度的标志之一;同时结果也显示,PD-1上调水平与病毒载量无明显相关性,可能是由于患者发病早期体内病毒已经被大量清除。据此推测,PD-1分子表达上调可能与病毒抗原和炎症因子的刺激有关。为进一步验证PD-1/PD-L1免疫抑制性信号通路在病毒急性感染中的作用,通过体外阻断PD-1/PD-L1相互作用,发现HBV特异性CTL分泌细胞因子IFN- γ 的能力明显恢复,结合发病早期PD-1分子与ALT呈明显正相关,推测在HBV急性感染早期,PD-1/PD-L1的高水平表达抑制了过强的免疫反应,避免急性乙型肝炎患者肝脏遭受严重免疫损伤。

2.2 PD-1/PD-L1与慢性乙型肝炎 PD-1在HBV感染慢性化的过程中有重要作用。慢性HBV感染时,仅低水平病毒血症的患者中可以检测到病毒特异性T细胞,而病毒载量高的患者体内CD8⁺ T淋巴细胞的含量极少,并且PD-1表达水平很高;阻断PD-1/PD-L1通路后,HBV特异性CD8⁺ T细胞的功能得到改善^[16]。将HBV特异性CTL移植入HBV转基因小鼠后,这些细胞迅速被诱导分泌IFN- γ ,但其分泌功能很快就被抑制,并伴随PD-1表达上调。利用mAb阻断PD-L1后,肝内特异性CTL数量增加,分泌IFN- γ 的时间延长^[17]。而对HBV急性感染的研究表明,感染清除的患者体内病毒特异性的CD8⁺记忆性T淋巴细胞PD-1和CD38的表达下调,开始表达CD127,同时血清转氨酶浓度降低,病毒被机体清除。因此,PD-1/PD-L1通路抑制了有效的免疫应答,导致病毒在体内持续存在。

目前认为,HBV慢性感染时病毒特异性细胞毒T淋巴细胞(CTL)处于功能耗竭状态,表现为细胞增殖能力下降、分泌细胞因子减少。PD-1在活化的T细胞中表达上调,并抑制活化T细胞的功能。Xie等^[18]检测了39例慢性乙型肝炎患者外周血HBV特异性CTL细胞PD-1的表达,

发现外周血HBV核心抗原18227特异性CTL绝大部分为PD-1阳性,且PD-1仅高表达于HBV特异性的CTL。因此我们认为,HBV特异性CTL高表达PD-1分子很可能是HBV慢性感染病程中持续高水平的HBV抗原刺激所致。长期暴露于高载量病毒抗原使T细胞PD-1表达上调是机体的一种保护性调节作用,其目的是下调免疫应答,以免持续活化的免疫应答造成机体组织免疫病理损伤,但反过来PD-1/PD-L1通路的抑制作用又使得T细胞功能低下,不利于病毒的清除,从而造成慢性持续的病毒感染。阻断PD-1/PD-L1通路,打破这种平衡,有利于病毒的清除,这就为慢性病毒性感染的治疗开辟了一条新途径。

慢性乙型肝炎患者体内存在针对HBV的免疫耐受,CTL处于耗竭状态,功能低下,难以彻底清除病毒。研究提示^[18],在慢性肝炎时,PD-L1与PD-1相互作用,诱导肝内的活化CD8⁺ T细胞耗竭,抑制CTL的抗病毒作用,这可能是慢性乙型肝炎发生免疫耐受的机制之一,同时也是HBV逃避免疫攻击的又一条途径,对此进行干预可能成为新的免疫治疗手段。Chen等^[19]研究了46例慢性乙型肝炎患者,发现慢性乙型肝炎患者免疫耐受和免疫活化患者外周血DCs上PD-L1阳性表达率明显高于健康对照组;DCs刺激异体T淋巴细胞增殖及产生细胞因子的能力明显降低,阻断PD-L1共刺激信号途径能够增强患者DCs对T细胞的协同刺激能力。因此,慢性乙型肝炎患者外周血DCs上PD-L1表达水平的升高,是导致DCs刺激T淋巴细胞能力下降的一个重要原因。

3 PD-1/PD-L1与HBV T细胞耗竭

在抗病毒免疫中,有效而强大的T细胞免疫应答是清除病毒的关键,病毒感染的持续和慢性化均是由于效应和记忆性T细胞的功能缺陷所致,而已有的研究^[20-21]显示PD-1/PD-L1信号与T效应细胞的功能密切相关。

Maier等^[17]首次研究证实PD-1/PD-L1信号通路对表达完整HBV病毒复制子的HBV转基因小鼠体内HBV特异性T细胞功能有抑制作用。在此模型中,过继转移乙肝病毒特异性T细胞识别肝脏组织内的病毒抗原后分泌IFN- γ 。进一步研究发现^[22],尽管病毒抗原持续存在,抗原特异性T细胞分泌IFN- γ 的水平能被迅速抑制,这种功能的丧失与细胞表面的PD-1的表达水平相一致。通过阻断PD-1/PD-L1途径,过继转移的HBV特异性T细胞功能抑制可能会延迟发生。更为重要

的是, 这种相关性在慢性HBV感染的患者也得到实验证实^[16]. 慢性HBV感染患者外周血中乙肝病毒特异性T细胞功能受损, 并且表达高水平PD-1, 而在患者感染控制后的特异性T细胞具有完好的功能活性, 大幅度降低了PD-1的表达. 类似于其他慢性感染[LCMV和人类免疫缺陷病毒(HIV)], 通过阻断PD-1/PD-L1途径能够部分恢复T细胞的耗竭状态. 然而直到最近, 关于PD-1/PD-L1信号通路在T细胞耗竭的相关性研究^[23,24]才从病理学角度转向肝脏及其周围区室. Fisticaro等^[25]就慢性HBV感染患者肝脏内HBV特异性T细胞进行了研究, 分析显示T细胞功能障碍与高水平表达PD-1存在相关性, 阻断PD-1/PD-L1通路能够改善HBV特异性T细胞的功能. 然而与CMV相比, 这种病毒特异性T细胞功能的改善缺乏特异性. 此外, PD-1的抑制效果也表现在急性自限性乙肝病毒感染患者, 在HBV感染急性期, PD-1高水平表达与T细胞功能降低密切相关^[26]. 因此, 这一系列研究表明PD-1与HBV感染T细胞功能障碍有关.

关于PD-1/PD-L1通路在T细胞耗竭机制中的重要性目前说法不一. 研究表明^[27], 肝组织内乙肝病毒特异性T细胞耗竭除了增加细胞表面PD-1的表达, 还表达低水平的CD127, 这使得病毒特异性T细胞耗竭更加严重, 究其原因可能与高负载肝脏组织中病毒抗原有关. 另一方面, 外周T细胞功能衰竭程度较轻, 细胞表面CD127表达水平较高^[28]. 进一步研究表明^[29], 尽管肝脏原位HBV和HCV特异性T细胞功能衰竭程度相似, 然而两者对PD-1/PD-L1途径阻断的反应截然不同. 相对于外周T细胞, 阻断PD-1/PD-L1信号通路对于肝原位乙肝病毒特异性T细胞功能恢复似乎更明显^[25]. 相反, 在慢性HCV感染患者体内, 阻断PD-1/PD-L1信号通路未能使浸润肝脏的HCV特异性T细胞功能恢复^[30]. 将这些不同观点仅仅归结于病毒之间的差异似乎是一个虽然可能但很简单的结论, Franceschini等^[31]研究显示慢性丙型肝炎患者肝组织中汇聚大量PD-1阳性调节性T细胞, 该类细胞功能被增强. 此外, 结果也表明, 疾病的不同感染阶段是影响病毒特异性T细胞功能的关键因素. Gehring等^[32]研究证实, HBV相关性肝癌患者体内病毒特异性T细胞出现全面和彻底的功能耗竭, 而在HBV感染较早阶段, 病毒特异性T细胞功能比较完整. 以上研究结果提示PD-1/PD-L1信号通路并非是T细胞功能衰竭的唯一机制, 其机制仍有待深入研究.

到目前为止, 尽管所有的研究证实慢性乙肝病毒感染伴有PD-1高水平的表达, 表达PD-1的病毒特异性T细胞表现为功能衰竭, 然而越来越多的证据已经质疑PD-1是否为T细胞功能耗竭的决定因素. 既往研究^[33]表明, 急性自限性乙型肝炎急性期患者PD-1表达水平升高, 在这一阶段利用抗PD-1抗体阻断此途径导致乙肝病毒特异性T细胞功能的改善. 然而, 随着病情趋于好转, 即便PD-1的表达水平仍然升高, 阻断PD-1途径恢复HBV特异性T细胞增殖效应逐渐下降^[13]. 另一方面, 随着疾病的进展, 尽管高表达PD-1, 病毒特异性T细胞能恢复分泌IFN- γ 的能力^[13]. 由此看来, HBV感染T细胞表面PD-1的表达与T细胞功能障碍没有相关性, 将T细胞衰竭的原因归咎于PD-1/PD-L1途径是不准确的. Kassel等^[32]研究表明, 原代培养肝细胞的免疫组织化学染色显示慢性HBV感染者表达PD-L1的肝细胞百分比高于健康对照组; 该项研究同时发现, 非病毒性肝炎肝组织内表达PD-L1的细胞百分比也升高. 因此, 很难确定肝细胞PD-L1的表达是否真正有助于T细胞耗竭的发展, 或许他仅仅是减轻炎症反应而维持体内平衡的一种保护机制. 然而, Rutebemberwa等^[35]的研究结果与上述相反, 该项研究证实丙型肝炎病毒感染早期PD-1的表达水平与丙型肝炎病毒感染慢性进展直接相关. 因此, PD-1作为反应T细胞衰竭的可靠性和重要性仍有待于深入研究.

4 PD-1/PD-L1与乙型肝炎的治疗

4.1 阻断PD-1/PD-L1途径的潜在治疗作用 体外研究^[36]表明阻断PD-1/PD-L1途径能恢复外周血和肝脏HBV特异性T细胞的功能, 提示该方法对慢性HBV感染是一种潜在的治疗手段. 最近的研究^[37]进展进一步肯定了这种方法的治疗潜力, 阻断PD-1/PD-L1途径已经作为与T细胞衰竭相关的慢性病毒感染治疗的一种选择方式. Velu等^[38,39]将抗PD-1抗体导入猿猴免疫缺陷病毒(SIV)慢性感染的巨噬细胞, 研究证实该方法耐受性良好, 没有任何自身免疫反应发生, 能导致功能主导的病毒特异性T细胞在SIV储存池血液和肠道大量扩增. 此外, 封闭PD-1途径也诱导记忆性B细胞增殖以及SIV包膜特异性抗体水平的升高, 最终导致血浆病毒载量下降以及慢性SIV感染猕猴的生存率改善. 目前, 抗病毒治疗在慢性乙型病毒性肝炎的治疗中占重要地位. Evans等^[40]研究了替比呋啉或拉米夫定抗病毒治疗

■创新盘点

本文详述PD-1/PD-L1抑制性信号通路与乙型肝炎病毒感染机体发生发展的相关机制, PD-1/PD-L1抑制通路可能与慢性乙型肝炎病毒感染T细胞功能障碍有关, 阻断PD-1/PD-L1途径的具有潜在治疗作用, 为免疫治疗病毒性肝炎提供新的思路.

■应用要点

目前HBV感染后慢性化的确切机制尚不清楚, D-1/PD-L1抑制通路可能与慢性乙型肝炎病毒感染T细胞功能障碍有关, 这对于认识HBV感染的慢性化机制有着重要意义。

的HBeAg(+)的18例患者, 应用流式细胞术和RT-PCR方法, 结果发现PD-1的表达与病毒血症的水平密切相关, 抗病毒治疗后, PD-1表达明显降低, HBeAg血清学转换的患者较未达到HBeAg血清学转换的患者PD-1的表达明显降低。因此, HBV感染病毒血症水平和HBeAg促进PD-1的表达, 并导致T细胞功能的损伤, 经抗病毒治疗后, HBV复制被抑制, 从而使PD-1表达减少。尽管阻断PD-1通路在各种慢性病毒感染体内和体外实验证明行之有效, 但是病毒特异性T细胞功能恢复程度通常很小。Fisicaro等^[25]借助重叠肽库应用抗PD-1抗体对HBV特异性T细胞进行体外扩增, 结果大幅度增加IFN- γ 阳性T细胞百分比。然而对于实际诱导产生的IFN- γ 阳性T细胞数量, 应用抗PD-1抗体组与对照组没有明显差异。Nakamoto等^[30]在对慢性丙型肝炎患者的研究也证实了这点。因此, 虽然阻断PD-1通路无疑能改善耗竭性T细胞的功能活性, 但是这种恢复部分生理功能的T细胞的免疫学效应仍值得商榷。深入了解PD-1通路与T细胞功能的相关性应是阻断PD-1信号通路可以成为一个可行治疗的先决条件。

4.2 如何增强阻断PD-1/PD-L1途径的效应 体外封闭PD-1通路不能完全恢复病毒特异性T细胞功能的可能原因之一是T细胞表面存在多重抑制性受体的协同作用。Blackburn等^[41]分析了慢性LCMV感染小鼠模型与PD-1表达最密切相关的基因, 研究表明好几个细胞表面抑制性受体编码基因(例如Lag-3, CD244, CD160, CTLA-4)与PD-1表达高度相关。流式细胞仪多参数分析在蛋白质水平进一步证实了上述研究发现, 并揭示T细胞衰竭的严重程度与各种抑制性受体的数量和多样性有关。此外, 研究者发现PD-1和Lag-3联合阻断协同增加了T细胞功能活性。这项研究表明, T细胞衰竭现象是由多种抑制受体共表达、协同作用组成的一个复杂的网络。最近一项关于HIV抑制性受体的研究也支持这个观点, 研究结果表明耗竭性T细胞表面表达抑制性受体Tim-3, 没有PD-1的表达, 再次显示了抑制受体的多样性^[42]。Golden-Mason等^[43]也研究发现丙型肝炎病毒特异性T细胞过度表达Tim-3, 提示Tim-3也参与了肝炎病毒感染。Nakamoto等^[44]将PD-1和CTLA-4信号通路同时阻断, 观察HCV特异性CD8 T细胞耗竭程度的变化, 研究发现, 同时阻断PD-1和CTLA-4途径能协同作用于肝内HCV特异性CD8 T细胞而使T细胞耗竭程度

减轻。据此推断, 单一阻断抑制性受体PD-1对于改善慢性HBV感染T细胞耗竭程度并不能获得理想的结果。相反, 针对多个已知的抑制性受体采用组合方式进行阻断将更为可取。

众多研究^[45]表明, 共刺激信号缺乏能影响PD-1的阻断效应。通过共刺激途径提供正性刺激信号, 可以增加细胞内肿瘤坏死因子受体(TNFR)相关因子(TRAF)的水平, 减少Bim介导的病毒特异性CD8 T细胞消除, 提高耗竭细胞的功能^[46-48]。众所周知, PD-1是属于共刺激分子B7家族的一种免疫抑制分子, T细胞表面CD28分子与配体B7连接能够招募PI3K, 后通过Akt激活下游信号, 然而PD-1分子能够抑制PI3K通路。这说明PD-1和CD28分子共同使用PI3K进行信号传导, 这就为CD28分子信号增强PD-1的阻断效应提供了可能。体外实验已经证实了这种观点, Freeman等^[49-51]将人T细胞与包被有抗CD3激活抗体的磁珠以及PD-L1 Ig融合蛋白共同培养, 结果导致T细胞功能减低, 进一步研究发现这种抑制效果可以通过激活CD28的单克隆抗体克服。因此, 共刺激受体CD28不仅是CD8 T细胞功能恢复的标志, 而且代表了增强PD-1阻断效应的一种可行的手段。更为值得注意的是, 当通过CD3信号传导不是最佳状态时, CD28的共刺激效应更加明显, 这对于病原体持续感染具有重要意义^[49]。在慢性HBV感染者体内, 持续高病毒载量提供一种选择压力, 这种压力只选择对病毒表位具有较低亲和力的T细胞, 而那些对病毒表位具有高亲和力的T细胞慢慢被剔除。这种选择压力最终导致病毒特异性T细胞不能获得最佳TCR信号, T细胞功能活性需要通过增强CD28信号传导效应来完成。

HBV特异性T细胞耗竭涉及PD-1在内的多个抑制性受体以及共刺激分子, 阻断这些抑制性受体途径或增强共刺激信号通路能大大恢复病毒特异性T细胞功能。

5 结论

目前HBV感染后慢性化的确切机制尚不清楚, 尚缺乏一种行之有效的抗病毒治疗方案。HBV作为嗜肝性DNA病毒, 本身对肝细胞并没有损害, 在清除病毒和造成肝细胞损伤中起关键作用的是细胞毒性T淋巴细胞。PD-1/PD-L1抑制通路可能与慢性HBV感染T细胞功能障碍有关, 这对于认识HBV感染的慢性化机制有着重要意义。对于T细胞功能恢复和乙肝病毒特异性T细胞免

免疫功能重建, 干扰这个信号通路应是一个科学合理并且有前景的治疗策略, PD-1/PD-L1通路的精确调控可能为慢性乙型肝炎的治疗提供新的线索和思路. 然而, T细胞功能耗竭现象是一个复杂网络, 其中涉及多个抑制受体参与, 共同刺激受体表达下调, 甚至可能包括许多尚未被发现的其他机制. 因此, 结合目前关于T细胞耗竭的认识, 同时调节抑制性受体和共刺激途径可能是增强阻断PD-1疗效的最佳策略.

6 参考文献

- Asabe S, Wieland SF, Chattopadhyay PK, Roederer M, Engle RE, Purcell RH, Chisari FV. The size of the viral inoculum contributes to the outcome of hepatitis B virus infection. *J Virol* 2009; 83: 9652-9662
- Bertoletti A, Gehring AJ. The immune response during hepatitis B virus infection. *J Gen Virol* 2006; 87: 1439-1449
- Tan AT, Loggi E, Boni C, Chia A, Gehring AJ, Sastry KS, Goh V, Fiscaro P, Andreone P, Brander C, Lim SG, Ferrari C, Bihl F, Bertoletti A. Host ethnicity and virus genotype shape the hepatitis B virus-specific T-cell repertoire. *J Virol* 2008; 82: 10986-10997
- Dong H, Zhu G, Tamada K, Flies DB, van Deursen JM, Chen L. B7-H1 determines accumulation and deletion of intrahepatic CD8(+) T lymphocytes. *Immunity* 2004; 20: 327-336
- Crispe IN. Hepatic T cells and liver tolerance. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 51-62
- Iwai Y, Terawaki S, Ikegawa M, Okazaki T, Honjo T. PD-1 inhibits antiviral immunity at the effector phase in the liver. *J Exp Med* 2003; 198: 39-50
- Isogawa M, Furuichi Y, Chisari FV. Oscillating CD8(+) T cell effector functions after antigen recognition in the liver. *Immunity* 2005; 23: 53-63
- Mühlbauer M, Fleck M, Schütz C, Weiss T, Froh M, Blank C, Schölmerich J, Hellerbrand C. PD-L1 is induced in hepatocytes by viral infection and by interferon-alpha and -gamma and mediates T cell apoptosis. *J Hepatol* 2006; 45: 520-528
- Yamazaki T, Akiba H, Iwai H, Matsuda H, Aoki M, Tanno Y, Shin T, Tsuchiya H, Pardoll DM, Okumura K, Azuma M, Yagita H. Expression of programmed death 1 ligands by murine T cells and APC. *J Immunol* 2002; 169: 5538-5545
- Brooks DG, Lee AM, Elsaesser H, McGavern DB, Oldstone MB. IL-10 blockade facilitates DNA vaccine-induced T cell responses and enhances clearance of persistent virus infection. *J Exp Med* 2008; 205: 533-541
- Rehermann B, Nascimbeni M. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nat Rev Immunol* 2005; 5: 215-229
- Boni C, Fiscaro P, Valdatta C, Amadei B, Di Vincenzo P, Giuberti T, Laccabue D, Zerbini A, Cavalli A, Missale G, Bertoletti A, Ferrari C. Characterization of hepatitis B virus (HBV)-specific T-cell dysfunction in chronic HBV infection. *J Virol* 2007; 81: 4215-4225
- Zhang Z, Jin B, Zhang JY, Xu B, Wang H, Shi M, Wherry EJ, Lau GK, Wang FS. Dynamic decrease in PD-1 expression correlates with HBV-specific memory CD8 T-cell development in acute self-limited hepatitis B patients. *J Hepatol* 2009; 50: 1163-1173
- Zhang Z, Zhang JY, Wherry EJ, Jin B, Xu B, Zou ZS, Zhang SY, Li BS, Wang HF, Wu H, Lau GK, Fu YX, Wang FS. Dynamic programmed death 1 expression by virus-specific CD8 T cells correlates with the outcome of acute hepatitis B. *Gastroenterology* 2008; 134: 1938-1949, 1949.e1-e3
- 金波, 张纪元, 张政, 王慧芬, 王福生. PD-1表达对急性乙型肝炎患者HBV特异性CD8+T细胞功能的影响. *肝脏* 2008; 13: 310-314
- Bowen DG, Walker CM. Adaptive immune responses in acute and chronic hepatitis C virus infection. *Nature* 2005; 436: 946-952
- Maier H, Isogawa M, Freeman GJ, Chisari FV. PD-1: PD-L1 interactions contribute to the functional suppression of virus-specific CD8+ T lymphocytes in the liver. *J Immunol* 2007; 178: 2714-2720
- Peng G, Li S, Wu W, Tan X, Chen Y, Chen Z. PD-1 upregulation is associated with HBV-specific T cell dysfunction in chronic hepatitis B patients. *Mol Immunol* 2008; 45: 963-970
- Chen J, Wang XM, Wu XJ, Wang Y, Zhao H, Shen B, Wang GQ. Intrahepatic levels of PD-1/PD-L correlate with liver inflammation in chronic hepatitis B. *Inflamm Res* 2011; 60: 47-53
- Xu D, Fu J, Jin L, Zhang H, Zhou C, Zou Z, Zhao JM, Zhang B, Shi M, Ding X, Tang Z, Fu YX, Wang FS. Circulating and liver resident CD4+CD25+ regulatory T cells actively influence the antiviral immune response and disease progression in patients with hepatitis B. *J Immunol* 2006; 177: 739-747
- Shevach EM. CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 389-400
- Kassel R, Cruise MW, Iezzoni JC, Taylor NA, Pruett TL, Hahn YS. Chronically inflamed livers up-regulate expression of inhibitory B7 family members. *Hepatology* 2009; 50: 1625-1637
- Mataki N, Kikuchi K, Kawai T, Higashiyama M, Okada Y, Kurihara C, Hokari R, Kawaguchi A, Nagao S, Kondo T, Itoh K, Miyakawa H, Miura S. Expression of PD-1, PD-L1, and PD-L2 in the liver in autoimmune liver diseases. *Am J Gastroenterol* 2007; 102: 302-312
- Wherry EJ, Ha SJ, Kaech SM, Haining WN, Sarkar S, Kalia V, Subramaniam S, Blattman JN, Barber DL, Ahmed R. Molecular signature of CD8+ T cell exhaustion during chronic viral infection. *Immunity* 2007; 27: 670-684
- Fiscaro P, Valdatta C, Massari M, Loggi E, Biasini E, Sacchelli L, Cavallo MC, Silini EM, Andreone P, Missale G, Ferrari C. Antiviral intrahepatic T-cell responses can be restored by blocking programmed death-1 pathway in chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 2010; 138: 682-93, 693.e1-e4
- Boettler T, Panther E, Bengsch B, Nazarov N, Spangenberg HC, Blum HE, Thimme R. Expression of the interleukin-7 receptor alpha chain (CD127) on virus-specific CD8+ T cells identifies functionally and phenotypically defined memory T cells during acute resolving hepatitis B virus infection. *J Virol* 2006; 80: 3532-3540
- Schott E, Witt H, Pascu M, van Boemmel F, Weich V, Bergk A, Halangk J, Müller T, Puhl G, Wiedenmann B, Berg T. Association of CTLA4 single nucleotide polymorphisms with viral but not autoimmune

■同行评价

本文具有较好的科学性, 创新性和可读性, 较好地反映了该领域的最新研究进展.

- liver disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2007; 19: 947-951
- 28 Radziewicz H, Ibegbu CC, Fernandez ML, Workowski KA, Obideen K, Wehbi M, Hanson HL, Steinberg JP, Masopust D, Wherry EJ, Altman JD, Rouse BT, Freeman GJ, Ahmed R, Grakoui A. Liver-infiltrating lymphocytes in chronic human hepatitis C virus infection display an exhausted phenotype with high levels of PD-1 and low levels of CD127 expression. *J Virol* 2007; 81: 2545-2553
 - 29 Das A, Hoare M, Davies N, Lopes AR, Dunn C, Kennedy PT, Alexander G, Finney H, Lawson A, Plunkett FJ, Bertolotti A, Akbar AN, Maini MK. Functional skewing of the global CD8 T cell population in chronic hepatitis B virus infection. *J Exp Med* 2008; 205: 2111-2124
 - 30 Nakamoto N, Kaplan DE, Coleclough J, Li Y, Valiga ME, Kaminski M, Shaked A, Olthoff K, Gostick E, Price DA, Freeman GJ, Wherry EJ, Chang KM. Functional restoration of HCV-specific CD8 T cells by PD-1 blockade is defined by PD-1 expression and compartmentalization. *Gastroenterology* 2008; 134: 1927-1937, 1937.e1-e2
 - 31 Franceschini D, Paroli M, Francavilla V, Videtta M, Morrone S, Labbadia G, Cerino A, Mondelli MU, Barnaba V. PD-L1 negatively regulates CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs by limiting STAT-5 phosphorylation in patients chronically infected with HCV. *J Clin Invest* 2009; 119: 551-564
 - 32 Gehring AJ, Ho ZZ, Tan AT, Aung MO, Lee KH, Tan KC, Lim SG, Bertolotti A. Profile of tumor antigen-specific CD8 T cells in patients with hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2009; 137: 682-690
 - 33 Kim HK, Guan H, Zu G, Li H, Wu L, Feng X, Elmetts C, Fu Y, Xu H. High-level expression of B7-H1 molecules by dendritic cells suppresses the function of activated T cells and desensitizes allergen-primed animals. *J Leukoc Biol* 2006; 79: 686-695
 - 34 Kassel R, Cruise MW, Iezzoni JC, Taylor NA, Pruett TL, Hahn YS. Chronically inflamed livers up-regulate expression of inhibitory B7 family members. *Hepatology* 2009; 50: 1625-1637
 - 35 Rutebemberwa A, Ray SC, Astemborski J, Levine J, Liu L, Dowd KA, Clute S, Wang C, Korman A, Sette A, Sidney J, Pardoll DM, Cox AL. High-programmed death-1 levels on hepatitis C virus-specific T cells during acute infection are associated with viral persistence and require preservation of cognate antigen during chronic infection. *J Immunol* 2008; 181: 8215-8225
 - 36 Golden-Mason L, Palmer B, Klarquist J, Mengshol JA, Castelblanco N, Rosen HR. Upregulation of PD-1 expression on circulating and intrahepatic hepatitis C virus-specific CD8⁺ T cells associated with reversible immune dysfunction. *J Virol* 2007; 81: 9249-9258
 - 37 Lok AS, McMahon BJ. Chronic hepatitis B. *Hepatology* 2007; 45: 507-539
 - 38 Velu V, Titanji K, Zhu B, Husain S, Pladevega A, Lai L, Vanderford TH, Chennareddi L, Silvestri G, Freeman GJ, Ahmed R, Amara RR. Enhancing SIV-specific immunity in vivo by PD-1 blockade. *Nature* 2009; 458: 206-210
 - 39 Limmer A, Ohl J, Kurts C, Ljunggren HG, Reiss Y, Groettrup M, Momburg F, Arnold B, Knolle PA. Efficient presentation of exogenous antigen by liver endothelial cells to CD8⁺ T cells results in antigen-specific T-cell tolerance. *Nat Med* 2000; 6: 1348-1354
 - 40 Evans A, Riva A, Cooksley H, Phillips S, Puranik S, Nathwani A, Brett S, Chokshi S, Naoumov NV. Programmed death 1 expression during antiviral treatment of chronic hepatitis B: Impact of hepatitis B e-antigen seroconversion. *Hepatology* 2008; 48: 759-769
 - 41 Blackburn SD, Shin H, Haining WN, Zou T, Workman CJ, Polley A, Betts MR, Freeman GJ, Vignali DA, Wherry EJ. Coregulation of CD8⁺ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nat Immunol* 2009; 10: 29-37
 - 42 Jones RB, Ndhlovu LC, Barbour JD, Sheth PM, Jha AR, Long BR, Wong JC, Satkunarajah M, Schwenker M, Chapman JM, Gyenes G, Vali B, Hyrcza MD, Yue FY, Kovacs C, Sassi A, Loutfy M, Halpenny R, Persad D, Spotts G, Hecht FM, Chun TW, McCune JM, Kaul R, Rini JM, Nixon DF, Ostrowski MA. Tim-3 expression defines a novel population of dysfunctional T cells with highly elevated frequencies in progressive HIV-1 infection. *J Exp Med* 2008; 205: 2763-2779
 - 43 Golden-Mason L, Palmer BE, Kassam N, Townshend-Bulson L, Livingston S, McMahon BJ, Castelblanco N, Kuchroo V, Gretch DR, Rosen HR. Negative immune regulator Tim-3 is overexpressed on T cells in hepatitis C virus infection and its blockade rescues dysfunctional CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *J Virol* 2009; 83: 9122-9130
 - 44 Nakamoto N, Cho H, Shaked A, Olthoff K, Valiga ME, Kaminski M, Gostick E, Price DA, Freeman GJ, Wherry EJ, Chang KM. Synergistic reversal of intrahepatic HCV-specific CD8 T cell exhaustion by combined PD-1/CTLA-4 blockade. *PLoS Pathog* 2009; 5: e1000313
 - 45 Barber DL, Wherry EJ, Masopust D, Zhu B, Allison JP, Sharpe AH, Freeman GJ, Ahmed R. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* 2006; 439: 682-687
 - 46 Sabbagh L, Srokowski CC, Pulle G, Snell LM, Sedgmen BJ, Liu Y, Tsitsikov EN, Watts TH. A critical role for TNF receptor-associated factor 1 and Bim down-regulation in CD8 memory T cell survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 18703-18708
 - 47 Wang C, Wen T, Routy JP, Bernard NF, Sekaly RP, Watts TH. 4-1BBL induces TNF receptor-associated factor 1-dependent Bim modulation in human T cells and is a critical component in the costimulation-dependent rescue of functionally impaired HIV-specific CD8 T cells. *J Immunol* 2007; 179: 8252-8263
 - 48 Penna A, Pilli M, Zerbini A, Orlandini A, Mezzadri S, Sacchelli L, Missale G, Ferrari C. Dysfunction and functional restoration of HCV-specific CD8 responses in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2007; 45: 588-601
 - 49 Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, Fitz LJ, Malenkovich N, Okazaki T, Byrne MC, Horton HF, Fouser L, Carter L, Ling V, Bowman MR, Carreno BM, Collins M, Wood CR, Honjo T. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med* 2000; 192: 1027-1034
 - 50 Kaplan DE, Sugimoto K, Newton K, Valiga ME, Ikeda F, Aytaman A, Nunes FA, Lucey MR, Vance

BA, Vonderheide RH, Reddy KR, McKeating JA, Chang KM. Discordant role of CD4 T-cell response relative to neutralizing antibody and CD8 T-cell responses in acute hepatitis C. *Gastroenterology* 2007; 132: 654-666

51 Urbani S, Amadei B, Fisicaro P, Tola D, Orlandini A, Sacchelli L, Mori C, Missale G, Ferrari C. Outcome of acute hepatitis C is related to virus-specific CD4 function and maturation of antiviral memory CD8 responses. *Hepatology* 2006; 44: 126-139

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

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

• 消息 •

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)

细胞因子与肝纤维化及肝纤维化患者的营养支持治疗原则

靳雪源, 丛涛, 赵平

■背景资料

肝纤维化是各种慢性肝病的共同病理途径, 肝纤维化可引起肝脏功能不同程度的受损。肝脏是营养物质代谢中心, 慢性肝病患者大多存在营养不良, 合理的营养支持是临床治疗和预后的关键点之一。

靳雪源, 赵平, 中国人民解放军第302医院国际肝病科 北京市 100039

丛涛, 中国人民解放军军事医学科学院环境卫生学研究所 天津市 300050

作者贡献分布: 本文由靳雪源与丛涛共同完成文献整理和综述工作; 由赵平负责审校。

通讯作者: 赵平, 主任医师, 100039, 北京市, 中国人民解放军第302医院国际肝病科. zhaop9262@sina.com

收稿日期: 2011-04-27 修回日期: 2011-06-21

接受日期: 2011-06-28 在线出版日期: 2011-09-18

Cytokines, liver fibrosis, and principles of nutritional support in patients with liver fibrosis

Xue-Yuan Jin, Tao Cong, Ping Zhao

Xue-Yuan Jin, Ping Zhao, Department of International Hepatic Diseases, 302 Military Hospital of Chinese PLA, Beijing 100039, China

Tao Cong, Institute of Hygiene and Environmental Medicine, Academy of Military Medical Science, Tianjin 300050, China

Correspondence to: Ping Zhao, Department of International Hepatic Diseases, 302 Military Hospital of Chinese PLA, Beijing 100039, China. zhaop9262@sina.com

Received: 2011-04-27 Revised: 2011-06-21

Accepted: 2011-06-28 Published online: 2011-09-18

Abstract

The rapid development of molecular biology has provided new paths for and led to great breakthroughs in the treatment of liver fibrosis. Now the research of targets for anti-fibrosis therapy mainly focuses on hepatic stellate cells (HSC) and cytokines related to HSC activation. Researchers are getting more concerned about the features of nutritional metabolism in patients with liver fibrosis and their relationship with prognosis because of special roles the liver plays in nutritional metabolism. Reasonable principles of nutritional support can help ameliorate symptoms, reduce complications and facilitate recovery in patients with liver fibrosis.

Key Words: Liver fibrosis; Cytokines; Nutritional metabolism; Nutritional support

Jin XY, Cong T, Zhao P. Cytokines, liver fibrosis, and principles of nutritional support in patients with liver

fibrosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(26): 2760-2767

摘要

分子生物学技术的飞速发展, 为肝纤维化的治疗提供了新的途径, 使肝纤维化防治取得了突破性进展。目前抗肝纤维化治疗的研究靶点主要集中在肝星状细胞及其活化相关的细胞因子。由于肝脏是营养物质代谢中心, 因此肝纤维化患者的营养代谢特点及其与预后的关系也受到越来越多的关注。合理的临床营养支持原则及适当的免疫营养素强化, 都有助于更快更好地改善临床症状, 减少并发症, 促进预后, 为肝纤维化的临床治疗提供重要的辅助治疗手段。

关键词: 肝纤维化; 细胞因子; 营养代谢; 营养支持

靳雪源, 丛涛, 赵平. 细胞因子与肝纤维化及肝纤维化患者的营养支持治疗原则. *世界华人消化杂志* 2011; 19(26): 2760-2767

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2760.asp>

0 引言

慢性肝病是一类危害极大的疾病, 肝硬化及其并发症已经成为全球发病与死亡的主要因素。而我国人群慢性肝病患者众多, 且呈逐年上升趋势。20%以上的慢性乙肝患者会发展为肝纤维化、肝硬化, 甚至肝癌。肝纤维化是机体对各种病因引起的慢性肝组织损伤的自我修复反应^[1], 是各种慢性肝病的共同病理学基础, 同时也是慢性肝病向肝硬化发展的必经途径。肝硬化是不可逆的, 而肝纤维化则是肝硬化的早期可逆阶段, 通过及时治疗是可以控制或者逆转的。近年来, 由于分子生物学和细胞内信号传递领域的飞速发展, 使纤维化的形成机制更加明确, 为肝纤维化的治疗和新药开发提供了新的途径和广阔前景, 因此肝纤维化的防治成为当今的研究热点, 并取得了突破性进展。

1 肝纤维化形成机制

传统观点认为, 肝纤维化是一种被动静止的过

■同行评议者

高泽立, 主任医师, 上海交通大学医学院附属第九人民医院周浦分院消化科; 党双锁, 教授, 西安交通大学第二医院感染科

程, 类似于皮肤损伤后疤痕的形成. 而现代研究发现, 肝纤维化的形成是一个不断变化的动态过程, 多种细胞因子和活性成分参与其中, 其中肝星状细胞的活化和细胞外基质的合成增多而降解不足是该病理生理变化的中心环节^[2]. 各种致病因子如肝炎病毒、血吸虫、毒性物质(酒精、CCl₄)、脂肪代谢产物、活化的巨噬细胞、炎性因子、活性氧自由基等侵害肝细胞, 使其发生损伤, 进而激活肝内库普弗细胞释放大量细胞因子, 使肝星状细胞活化, 转化为肌成纤维细胞, 肌成纤维细胞在细胞因子的作用下进一步活化, 刺激胶原增生, 使胞外基质合成增加, 降解减少, 大量沉积, 从而形成纤维化^[2].

2 肝纤维化的治疗靶点

狭义的抗肝纤维化治疗主要指抑制肝脏细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的生成与沉积, 促进其降解; 而广义的抗肝纤维化综合疗法, 包括治疗原发病或去除致病因素、抗肝脏炎症、控制星状细胞活化、抑制胶原纤维形成与促进胶原降解等多个方面^[3]. 致病因素的持续刺激是造成肝纤维化不断发展的关键因素, 因此去除病因是抗纤维化最有效的方法. 在疾病早期阶段, 尽可能采取措施去除致病因素可有效减轻肝纤维化程度, 甚至使其逆转、恢复正常结构. 针对病毒、代谢产物、药物、酒精和自身免疫性等原因, 进行抗肝炎病毒、戒酒、血吸虫患者驱虫治疗、停用肝毒性药物或毒物、代谢综合征患者减肥等相关治疗均可收到良好的治疗效果. 在有效去除病因的基础上, 还需要针对致病机制的不同环节采取相应措施, 包括控制炎症反应、抑制肝星状细胞(hepatic Stellate Cells, HSC)活化和增殖、抑制细胞外基质合成、促进细胞外基质降解、诱导活化HSC凋亡及促进肝细胞再生等. 其中各种细胞因子的作用使星状细胞的持续激活是肝纤维化发生发展过程中的关键环节, 因此调节细胞因子的表达是阻止纤维化进程的重要手段, 近年来逐渐成为抗纤维化治疗的重要靶点而备受关注^[4-8].

2.1 转化生长因子β1 转化生长因子β1(transforming growth factor-β1, TGF-β1)是目前已知作用最强的纤维化促进因子和肝星状细胞激活剂之一, 其主要作用表现在: (1)促进HSC合成Smad蛋白及ECM, 减少ECM降解; (2)上调成纤维细胞中强效促细胞有丝分裂原PDGF受体表达, 间接促进成纤维细胞增殖, 使ECM基因表达进一步强化;

(3)覆盖抑制胶原产生的肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor, TNF-α)在胶原等基因上的反应元件, 促进胶原的产生; (4)抑制基质金属蛋白酶(matrix metallo-proteinases, MMPs)和促进金属蛋白酶组织抑制物(Tissue Inhibitors of Metalloproteinase, TIMPs), 减少异常合成的ECM降解^[9-11]; (5)抑制淋巴细胞、单核细胞和NK细胞的功能^[12]. TGF-β及其受体拮抗剂、TGF-β中和抗体、可溶性TGF-β的I型受体(TGF-β receptor-I, TβRI)及针对TGF-β的RNA干扰(RNA interference, RNAi)等在动物实验中均可抑制肝星状细胞活化、降低肝脏胶原等细胞外基质含量、减轻肝纤维化程度. 研究表明, 通过抑制TβRI和TβRII, 可抑制肝组织内TGF-β1表达, 降低羟脯氨酸含量, 从而减少I、III型胶原的沉积, 并促进肝脏病理变化的改善^[12]. 目前越来越多的研究显示, 以TGF-β1作为靶目标, 通过消除纤维化发展过程中病变组织产生的过多TGF-β1来预防或阻断纤维化的发展已成为纤维化防治研究的最新热点^[13-15].

2.2 血小板衍生因子 血小板衍生因子(platelet-derived growth factor, PDGF)是已知最强的促细胞有丝分裂原性生长因子^[16]. 在HSCs激活过程中, PDGF是最重要的因子之一, 使HSCs迁移到炎症受损部位, 激活HSCs的细胞外信号调节激酶ERK1/2(extracellular regulated protein kinases)和FAK(focal adhesion kinase)-PI3K(phosphoinositide3-kinases)-Akt(即PKB, protein kinase B)通路, 引起HSC增殖并转化为肌成纤维细胞^[17-20]. 因此阻断PDGF的生物学效应可抑制肝星状细胞增殖. PDGF还可以通过上调TIMP-1, 抑制胶原酶的作用, 以减少ECM降解^[21]. PDGF必须与细胞膜上的相应受体结合后才能发挥其生物学效应. 研究表明, PDGF受体β亚单位(platelet-derived growth factor receptor-β, PDGFR-β)靶向小干扰RNA(small interfering RNA, siRNA)可抑制HSC增殖及合成胶原, 并诱导其凋亡, 从而减轻大鼠肝纤维化.

2.3 肝细胞生长因子 肝细胞生长因子(hematopoietic growth factor, HGF)是多效性生长因子, 具有促细胞分裂、促细胞运动和促形态形成等作用, 在促进肝组织再生方面发挥着重要作用, 临床主要用于肝功能衰竭的治疗. HGF在动物实验中显示出较强的抗纤维化作用, 其机制包含促进肝细胞再生和抑制TGF-β表达、促进胶原酶生成等方面^[22]. 联合应用尿激酶型纤溶酶原激

■ 研发前沿

目前慢性肝病患者营养物质代谢特点已基本清楚, 如何提供合理的营养支持是肝病治疗及临床营养学的研究热点. 营养干预的方式已从传统的静脉高营养向以肠内营养为主的方向转变, 提出了以免疫营养为代表的代谢调理营养治疗的新理论.

■相关报道

黎介寿等研究表明,免疫营养支持能促进蛋白质合成和酶表达,达到改善营养、免疫及生活质量的目的,肠内营养支持更有利于慢性肝病患者的治疗和恢复。Owen等研究指出,慢性肝病患者睡前进食一定量的碳水化合物,能够改善RQ值和能量代谢,促进肝细胞的修复。

活物(urokinase-type plasminogen activator, uPA)和HGF基因治疗实验性大鼠肝纤维化,可起到保护肝细胞和减少肝脏胶原沉积的作用^[24]。目前对于HGF的抗肝纤维化研究仍在继续,但都限于动物实验。将HGF基因导入胆管阻塞型肝纤维化大鼠(bile duct ligation, BDL),其具有明显的抗纤维化作用,可抑制BDL大鼠TGF- β 1的表达,并可以阻止肌成纤维样细胞活化。这表明HGF是通过阻止胆管上皮细胞向肌成纤维样细胞表型转化而发挥抗肝纤维化作用。多种肝纤维化模型(如非酒精性脂肪性肝硬化、二甲基亚硝胺致肝纤维化、BDL等)、多种载体和导入方法(如电穿孔、腺相关病毒、裸的质粒DNA等)均可成功将HGF基因导入动物体内,并发挥抗纤维化作用,说明HGF抗肝纤维化作用的稳定性,为其临床应用提供了实验依据^[23]。

2.4 肿瘤坏死因子- α 肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor, TNF- α)主要由被激活的巨噬细胞产生,他可由内毒素、免疫复合物和病毒等多种刺激物质诱导产生,不仅参与介导抗肿瘤、免疫调节、炎症反应和组织损伤等病理生理过程,也参与组织损伤的修复和结缔组织代谢的调节^[24]。研究发现, TNF- α 是胶原合成和组织纤维化的重要抑制物,能抑制胶原蛋白的合成,并可减少肝脏炎性细胞浸润及肝细胞变性,有效抑制肝内层乳蛋白的沉积,表明一定量的TNF- α 可以抑制肝纤维化的进程^[25]。然而亦有研究发现, TNF- α 不仅通过促进体外培养的大鼠肝星状细胞合成胶原蛋白和蛋白多糖,增加I、III、IV型前胶原mRNA的表达,而且能消除转化因子对大鼠肝星状细胞增生的抑制,促进肝星状细胞增生并分泌透明质酸(hyaluronic acid, HA)和层粘连蛋白(laminin, LN)基质,这表明在一定条件下TNF- α 还可以促进肝纤维化的进程^[26]。因此, TNF- α 在肝纤维化过程中是起促进作用,还是抑制作用,其所起作用是否与含量水平有关目前仍不明确。

2.5 干扰素 干扰素(interferon, IFN)是细胞受某些反应刺激而产生的一类蛋白质,按分子结构和抗原性可分 α 、 β 和 γ 型, IFN- α 主要由单核细胞和B细胞经病毒感染诱生,免疫活性弱而建立抗病毒状态快; IFN- β 主要由成纤维细胞和上皮细胞产生,在病毒感染反应中最早出现; IFN- γ 由自然杀伤(NK)细胞和致敏的T淋巴细胞产生,是可溶性细胞外信号蛋白,免疫活性强而建立抗病毒状态缓慢。三种类型的IFN都具有广泛的

抗病毒、抗肿瘤和免疫调节作用^[27]。目前研究认为, INF抗肝纤维化机制主要包括: (1)INF抗病毒作用与抗肝纤维化作用密切相关; (2)抑制肝星状细胞的活化和增殖; (3)诱导激活的HSC凋亡; (4)抑制ECM合成; (5)促进ECM降解^[28]。目前,对INF- α 的抗肝纤维化机制研究较为深入,而对INF- β 和INF- γ 的研究较少。

2.6 基质金属蛋白酶与基质金属蛋白酶组织抑制物 细胞外基质的降解主要依靠各种降解酶的作用,基质金属蛋白酶(matrix metal proteinase, MMPs)是一类钙离子依赖性的蛋白酶,是肝脏细胞外基质的主要降解酶,通过调节MMPs活性,有助于促进肝纤维化的逆转。I型胶原蛋白是纤维化肝脏中的主要胶原蛋白,而MMP-1是I型胶原蛋白的主要蛋白降解酶。HSC是MMP-2、MMP-9、MMP-13的主要来源^[29],同时处于静息状态的MMP-2的激活需要肝实质细胞的共同作用。有研究表明,免疫调节剂OK-432可促进MMP-9的合成,抑制肝纤维化的发展;氯化钆可特异性地作用于库普弗细胞,提高MMP-13的表达和活性,阻止肝纤维化的发生^[29]。

纤溶酶原系统在细胞外基质降解中也起重要作用。有研究显示,用siRNA干扰纤溶酶原激活物抑制物-1(plasminogen activator inhibitor type-1, PAI-1)的表达,可促进细胞外基质降解,减少胶原沉积;松弛肽可以抑制TGF- β 介导的胶原合成、促进MMP-1表达,从而预防并治疗早期小鼠肝纤维化^[30];运用分子生物学技术能够显著抑制活化的HSC和大鼠肝脏中基质金属蛋白酶组织抑制物-1(tissue inhibitors of metalloproteinase-1, TIMP-1)的表达,减少HSC中I、III型胶原含量。同时,通过释放肝组织间质胶原酶的活性,可减少羟脯氨酸含量,促进I、III型胶原的降解,改善肝脏病理形态,表明TIMP-1是可选择的有效抗纤维化的靶点之一^[31]。

近年来,以细胞因子及相关基因表达为靶点的抗肝纤维化治疗取得较大进展,还有许多细胞因子如白介素家族中的白介素-6(Interleukin-6, IL-6)、IL-1、IL-8、IL-10等都可以影响纤维化进程^[24,32]。

基于对肝纤维化分子机制的认识,目前的肝纤维化基因治疗一般从以下几方面入手: (1)以细胞因子(TGF、PDGF、TNF、丝裂原等)、HSC为靶位点,抑制HSC的激活,减少MFB的生成; (2)以MMP及TIMP为靶位点,促进异常堆积的细胞外介质的降解,重建肝小叶; (3)抑制炎症

反应, 保护肝细胞, 减少肝细胞的损害^[33]。

目前细胞因子和基因治疗存在的主要问题是基因导入的靶向性、表达效率、可调控性及安全性等尚未完全解决, 因此要将其真正应用于临床可能还需要一段过程^[34]。但是随着分子生物学的发展和人类基因组学的不断完善, 基因治疗的副作用将会减弱甚至消除, 其安全性将大大提高。在未来的十年内, 肝纤维化基因治疗将由单基因治疗向着多基因治疗方向发展, 治疗的最终目标是逆转纤维化、重建正常肝小叶, 恢复正常肝功能^[34]。

另外, 由于血管生成与肝纤维化形成密切相关, 近年来抗血管生成治疗也被认为是纤维化治疗中的重要途径^[35-38]。肝纤维化的发生是以肝窦毛细血管化为特征的肝脏微循环血管的改变, 实质就是肝脏血管生成的过程。研究发现^[39], 应用选择性环氧合酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)抑制剂罗非昔布进行抗肝纤维化治疗, 主要是从肝纤维化形成过程中肝窦毛细血管化的角度, 证明肝纤维化形成过程中的血管生成现象。研究证实^[40], 血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)是选择性COX-2抑制剂延缓肝硬化形成和改善肝窦毛细血管化的关键因素。

3 肝纤维化患者的营养代谢特点及营养支持原则

合理营养是防治疾病的物质基础, 患者的营养状况直接影响到疾病的转归。肝脏是机体内最大、最活跃的物质代谢器官, 参与体内糖类、蛋白质、脂肪的代谢, 任何原因引起的肝脏损害都会引起机体物质能量代谢障碍, 而漫长的病程会使物质能量代谢障碍呈渐进性蓄积, 增加腹水、肝性脑病、肝肾综合征、糖尿病等并发症的发生率, 引起肝功能进一步恶化。因此对慢性肝病患者来说, 合理的营养支持是辅助治疗和促进康复极其重要的手段和途径。

3.1 营养状况评价 虽然肝纤维化患者由于长期代谢障碍极易发生营养不良, 但并不是所有患者都需要进行同样的营养支持, 不能只是盲目地给予营养物质的补充, 而应该首先对患者的全身状况, 特别是营养状况进行评估, 通过营养风险筛查掌握患者营养不良的程度和类型, 从而制订出适合患者自身营养状况的合理的营养支持方案。

目前临床常用的营养评估方法主要有主观

综合营养评价法(subjective global assessment, SGA)^[41,42]、微型营养评价法(mini-nutritional assessment, MNA)^[42]、营养不良通用筛查工具(malnutrition universal screening tool, MUST)^[43]以及营养风险筛查工具(Nutrition Risk Index, NRS2002)等^[44,45]。与临床营养状况评价相关的检测指标主要有患者的基础营养状况, 包括体质质量、体质质量指数(body mass index, BMI)、静息能量代谢(rest energy expenditure, REE)、上臂肌围(arm muscle circumference, AMC)、三头肌皮褶厚度(triceps skinfold thickness, TSF)、握力等, 但在晚期肝病患者中应用有其局限性。肝硬化患者往往因腹水或水肿引起体质质量增加, 故BMI并不能反映患者真实的营养状态; TSF及AMC多在营养不良发生数月后出现变化, 敏感性较低^[46], 且同样易受水肿的影响。血清白蛋白浓度指标的测定是蛋白质营养状况评价中极为重要的方法之一, 最常用的测定指标包括血清白蛋白、前白蛋白(prealbumin, PA)、C反应蛋白、转铁蛋白、维生素A结合蛋白和铜蓝蛋白(ceruloplasmin, CER)等。其中PA和CER因其血浆生物半衰期短, 属急性时相蛋白, 相对来说更能准确反映肝脏合成蛋白质的能力^[47]。另外还需要有转氨酶和肝纤4项等与病程诊断相关的指标。

值得注意的是, REE是反应机体能量代谢状况的重要指标, 近年来逐渐得到推广和应用^[48]。新陈代谢是生命现象的基本特征, 生物在进行物质代谢的同时, 也进行能量代谢。肝脏是机体参与能量代谢的重要器官。当发生肝脏疾病时, 机体的能量代谢会受到影响。反之, 机体能量代谢的变化也会影响肝脏功能, 并直接影响患者的预后。慢性肝病由于其发病机制、组织病理学、临床病程长短轻重不一, 对代谢的影响程度也不同。合理的能量代谢调整对于改善肝功能, 防止并发症具有积极意义。

3.2 营养代谢特点 肝纤维化患者由于代谢障碍, 营养物质摄入减少而丢失过多, 营养代谢的主要特点是: 糖的储存和氧化降低; 脂肪酸和酮体的产生和利用障碍; 蛋白质合成能力降低, 而分解代谢增加, 体内氮量消耗明显。

Greco等^[49]报道, 慢性肝病患者不仅全身葡萄糖摄取率明显降低, 而且葡萄糖氧化率、贮存率也显著下降。由于肝硬化患者对葡萄糖的利用障碍, 引起其早期蛋白质分解代谢增加, 晚期脂肪氧化分解也增加; 其结果是蛋白质消耗增加, 脂肪贮备减少, 发生低蛋白血症及营养不

■应用要点

本文从肝脏的纤维化的形成、营养代谢特征入手较为详尽叙述了肝脏纤维化与营养代谢的研究, 对于指导临床肝纤维化患者的营养支持有一定参考价值。

■同行评价

文章紧密联系肝硬化变肝纤维化治疗热点,提出了肝纤维化的营养治疗原则,值得临床及基础研究者阅读。

良。如果这些异常代谢不及时纠正,最终导致患者能量产生减少,从而严重影响组织细胞、器官及免疫等功能。也有学者研究发现,肝硬化患者存在严重的生长激素抵抗状态,导致生长激素调节肝脏合成胰岛素样生长因子-1(insulin-like growth factor-1, IGF-1)及其结合蛋白发生障碍,肝脏葡萄糖的异生和糖原合成减少^[50]。尽管脂肪是人体内最大的能量贮备物质,但由于肝硬化患者葡萄糖的氧化、利用减少,通过机体代偿机制的作用,使肝硬化患者早期不得不过多地氧化、利用蛋白质,增加尿氮排出;晚期脂肪的动员、氧化也随着增加,临床上主要表现为消瘦及低蛋白血症^[51-53]。

另外,维生素、矿物质和微量元素的缺乏是肝病的特点。由于慢性肝病患者合成能力下降,可造成血清铁蛋白和铜蓝蛋白减低。由于摄入不足、吸收减少、肝储存不足、需要量增加等综合因素的影响,可导致体内锌、硒、钙、脂溶性维生素及叶酸等营养物质的缺乏。缺锌可促进肝纤维化,并诱发肝性脑病;缺硒可使谷胱甘肽过氧化物酶活性下降,影响其分解过氧化物、清除自由基,进而加重肝细胞的损伤和坏死;钙和维生素D的缺乏,则会使患者出现骨质疏松等并发症。肝病患者体内脂溶性维生素水平普遍偏低,而水溶性维生素缺乏却并不常见,但也可能出现^[51-53]。

3.3 营养支持原则 2000年欧洲营养协会提出慢性肝病患者的营养支持原则^[54]:(1)肝硬化患者处于高代谢状态,饮食中需要比正常人添加更多的蛋白质,才能维持其氮平衡;(2)大多数患者可耐受正常甚至更高的蛋白质摄入,而不产生肝性脑病;(3)可对肝硬化患者的饮食习惯进行调整,在平常几餐的基础上,有必要晚上加餐;(4)对重症营养不良患者,应考虑补充氨基酸,以满足蛋白质合成的需求;(5)对少数不能耐受蛋白质从胃肠道摄入的患者,如肝性脑病者,可考虑以支链氨基酸作为氮源。

目前的临床营养支持已不再局限于为患者提供足量、超量的营养底物,而是更加关注各种营养物质对机体组织器官代谢的影响及病理生理过程的影响,提倡按照患者的代谢需求与代谢能力提供适当的能量,危重患者可给予允许性低热卡摄入,营养干预的方式已从传统的静脉高营养向以肠内营养为主的方向转变,提出了以免疫营养为代表的代谢调理营养治疗的新理论^[55-60]。

免疫营养支持的概念近年来逐渐受到人们的重视,所谓免疫营养支持就是通过使用一些特异性免疫营养物质,不仅改善患者的营养,而且发挥改善免疫机制、调节机体炎性反应的作用。目前研究及应用较多的免疫营养物质有谷氨酰胺、精氨酸、核苷酸及n-3脂肪酸等。研究表明^[61],免疫营养支持能促进蛋白质合成和酶表达,激活粒细胞和肠上皮细胞的增殖,从而达到改善营养、免疫及生活质量的目的。目前免疫营养支持在临床主要应用于肿瘤患者以及肝病、肾病、糖尿病等病程较长的慢性疾病患者。

在营养干预方式上,肠内营养支持更有利于慢性肝病患者的治疗和恢复。黎介寿等^[62]研究显示,肠内营养有利于防止肠道黏膜萎缩,保护肠屏障功能,使营养物质首先经门静脉入肝,在肝内被解毒或被合成,不造成肝功能损害,抑制肠道产生炎性细胞因子,减轻创伤和应激后的全身炎性反应,提示肠内营养的摄入增加有利于肝脏能量代谢的好转。

对于慢性肝病患者,营养支持首先要补充蛋白质或氨基酸以纠正蛋白营养不良,主要以富含支链氨基酸而少含芳香族氨基酸的蛋白质或肽类为主,从而减轻肝脏负担,防止肝性脑病发生。同时功能性氨基酸如谷氨酰胺、甘氨酸、精氨酸等免疫营养素的适当强化对肝细胞的损伤修复也有积极作用。支链氨基酸(亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸)主要在肝外代谢,可供应人体30%的能量,而且具有抗氧化作用,不仅可改善低蛋白血症,还可通过抑制大脑中假性神经递质的形成,改善肝性脑病症状^[63]。国外有学者对50例慢性乙型病毒性肝炎和肝硬化患者采用口服支链氨基酸给药的研究,发现4 wk后患者的乏力、胃纳差、下肢水肿等症状即开始好转,生活质量得到改善,血清白蛋白和总蛋白水平明显提高,效果优于复方氨基酸^[64]。

能量物质的需要量,应根据患者能量的消耗确定,目前主要以Harris-Benedict公式计算患者REE。由Harris Benedict公式计算求得热量需求值为104.6-125.5 kJ(25-30 kcal)/kg^[65]。一般认为1200-2000 kcal/d可以满足大多数患者的需求。如果正常饮食不能满足需要,可建议夜间加餐、应用鼻饲或胃肠外营养支持^[66]。

葡萄糖是一种廉价供能物质,众多学者认为葡萄糖是肠外营养时主要的能量底物。研究表明应用葡萄糖时随着单位时间内氧气及二氧化碳量的变化,呼吸商(respiratory quotient, RQ

值)迅速大幅度上升,并维持在较高水平,提示脂肪、蛋白质氧化率的下降,表明葡萄糖的静脉应用可使机体营养底物氧化结构发生改变:在提高碳水化合物氧化率的同时,降低脂肪及蛋白质的氧化,即加强碳水化合物的利用,可节约脂肪及蛋白质的消耗^[67]。但也有报道称葡萄糖的应用增加 CO_2 的消耗,提示在葡萄糖的临床应用中要注意随之而来的代谢负反应^[53]。

传统观点认为肝病患者应给予低脂膳食,以减轻肝脏代谢的负担。然而近年有国外学者研究指出,脂肪是再生肝脏的优势能源,不应当在饮食中加以限制,认为给予包括脂肪乳剂在内的胃肠外营养,并未使其肝功能恶化^[68]。也有研究认为,脂肪乳剂的主要特点是等渗、热价高、富含必需脂肪酸,应激或创伤状态下机体对脂肪乳剂的利用明显加快,经静脉途径补充脂肪乳剂并不干扰糖类代谢,机体可很好地耐受脂肪,且有利于肝功能的改善及肝细胞再生和修复^[69]。目前临床应用的主要是中链脂肪酸(medium chain triglycerides, MCT)和长链脂肪酸的混合物,亦称结构型脂肪酸。

脂溶性维生素的缺乏在慢性肝病患者中也很常见。研究表明血清维生素A与血清白蛋白和肝功能评分之间有直接关系。因此有人提出监测血清维生素A、D的浓度可能是评价肝硬化治疗的一个指标。另外生长激素、胰岛素样生长因子、相关电解质等的补充,均有助于维持肝功能并且促进肝脏损害的修复,进而纠正营养不良状态^[70]。

对肝病患者营养支持的另一个原则是少吃多餐,如三餐的食量改为四餐吃,临睡前或夜间给予加餐。慢性肝病患者三大营养素氧化供能比例失调,机体呈高代谢和失平衡状态。Owen等^[71]研究报道指出,肝病患者禁食一夜的营养物质底物氧化率,与正常人禁食3d的营养物质底物氧化率相似,即以脂肪氧化为主,而夜间加餐可以降低脂肪蛋白质的氧化率,提高RQ值。因此,对于慢性肝病患者,睡前进食一定量的碳水化合物,能够改善RQ值和能量代谢,促进肝细胞的修复。

4 结论

在分子生物学和基因技术飞速发展的今天,借助优效的药物和先进的技术,通过对病因以及发病机制的各个环节的有效控制,肝纤维化的临床治疗已经取得重大进展,而合理的营养支

持在肝纤维化的临床治疗中同样占有非常重要的地位,提高机体的免疫力,改善肝功能,减少并发症,对患者的预后极为有利,是肝纤维化临床治疗中不可忽视的重要手段和途径。

5 参考文献

- 1 Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem* 2000; 275: 2247-2250
- 2 Sato M, Suzuki S, Senoo H. Hepatic stellate cells: unique characteristics in cell biology and phenotype. *Cell Struct Funct* 2003; 28: 105-112
- 3 陈乃玲. 肝纤维化诊疗进展及面临的问题. 胃肠病学和肝病杂志 2010; 19: 1-5
- 4 Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol* 2008; 214: 199-210
- 5 Friedman SL. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol Rev* 2008; 88: 125-172
- 6 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
- 7 Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 2005; 115: 209-218
- 8 Le Bousse-Kerdilès MC, Martyré MC, Samson M. Cellular and molecular mechanisms underlying bone marrow and liver fibrosis: a review. *Eur Cytokine Netw* 2008; 19: 69-80
- 9 Hemmann S, Graf J, Roderfeld M, Roeb E. Expression of MMPs and TIMPs in liver fibrosis - a systematic review with special emphasis on antifibrotic strategies. *J Hepatol* 2007; 46: 955-975
- 10 Brew K, Nagase H. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): an ancient family with structural and functional diversity. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1803: 55-71
- 11 Pan CH, Wen CH, Lin CS. Interplay of angiotensin II and angiotensin(1-7) in the regulation of matrix metalloproteinases of human cardiocytes. *Exp Physiol* 2008; 93: 599-612
- 12 Ghosh AK. Factors involved in the regulation of type I collagen gene expression: implication in fibrosis. *Exp Biol Med* (Maywood) 2002; 227: 301-314
- 13 Cheng K, Yang N, Mahato RI. TGF- β 1 gene silencing for treating liver fibrosis. *Mol Pharm* 2009; 6: 772-779
- 14 Xu W, Wang LW, Shi JZ, Gong ZJ. Effects of RNA interference targeting transforming growth factor- β 1 on immune hepatic fibrosis induced by Concanavalin A in mice. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2009; 8: 300-308
- 15 Tsukada S, Parsons CJ, Rippe RA. Mechanisms of liver fibrosis. *Clin Chim Acta* 2006; 364: 33-60
- 16 Gäbele E, Brenner DA, Rippe RA. Liver fibrosis: signals leading to the amplification of the fibrogenic hepatic stellate cell. *Front Biosci* 2003; 8: d69-d77
- 17 Inagaki Y, Okazaki I. Emerging insights into Transforming growth factor β Smad signal in hepatic fibrogenesis. *Gut* 2007; 56: 284-292
- 18 Borkham-Kamphorst E, van Roeyen CR, Ostendorf T, Floege J, Gressner AM, Weiskirchen R. Pro-fibrogenic potential of PDGF-D in liver fibrosis. *J Hepatol* 2007; 46: 1064-1074
- 19 Campbell JS, Hughes SD, Gilbertson DG, Palmer TE, Holdren MS, Haran AC, Odell MM, Bauer RL, Ren HP, Haugen HS, Yeh MM, Fausto N. Platelet-

- derived growth factor C induces liver fibrosis, steatosis, and hepatocellular carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 3389-3394
- 20 Borkham-Kamphorst E, Kovalenko E, van Roeyen CR, Gassler N, Bomble M, Ostendorf T, Floege J, Gressner AM, Weiskirchen R. Platelet-derived growth factor isoform expression in carbon tetrachloride-induced chronic liver injury. *Lab Invest* 2008; 88: 1090-1100
- 21 陈莲香, 舒建昌. PDGF与肝纤维化关系的研究新进展. *胃肠病学和肝病学杂志* 2011; 20: 95-98
- 22 成军, 李莉. 肝纤维化的基因治疗研究进展. *肝脏* 2002; 7: 186-188
- 23 夏景林, Dai Chunsun, Liu Youhua. 肝细胞生长因子基因治疗减轻胆管结扎肝纤维化的实验研究. *中国临床医学* 2005; 12: 606-608
- 24 Iraburu MJ, Domínguez-Rosales JA, Fontana L, Auster A, García-Trevijano ER, Covarrubias-Pinedo A, Rivas-Estilla AM, Greenwel P, Rojkind M. Tumor necrosis factor alpha down-regulates expression of the alpha1(I) collagen gene in rat hepatic stellate cells through a p20C/EBPbeta- and C/EBPdelta-dependent mechanism. *Hepatology* 2000; 31: 1086-1093
- 25 Chong LW, Hsu YC, Chiu YT, Yang KC, Huang YT. Anti-fibrotic effects of thalidomide on hepatic stellate cells and dimethylnitrosamine-intoxicated rats. *J Biomed Sci* 2006; 13: 403-418
- 26 邵国民, 潘水珍, 陈芝芸, 严茂祥. 肝纤维化大鼠血清肿瘤坏死因子和表皮生长因子的变化. *医学研究杂志* 2006; 35: 12-14
- 27 Laso FJ, Iglesias-Osma C, Ciudad J, López A, Pastor I, Orfao A. Chronic alcoholism is associated with an imbalanced production of Th-1/Th-2 cytokines by peripheral blood T cells. *Alcohol Clin Exp Res* 1999; 23: 1306-1311
- 28 胡静, 李智伟. 干扰素治疗肝纤维化机制的研究进展. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 2809-2813
- 29 Han YP. Matrix metalloproteinases, the pros and cons, in liver fibrosis. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21 Suppl 3: S88-S91
- 30 Yuantai W, Tiancai W, Qiu Z. PD98059 inhibits expression of pERK1 protein and collagen alpha1(I) mRNA in rat pancreatic stellate cells activated by platelet-derived growth factor. *Indian J Gastroenterol* 2005; 24: 100-103
- 31 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
- 32 Upham JW, Lundahl J, Liang H, Denburg JA, O'Byrne PM, Snider DP. Simplified quantitation of myeloid dendritic cells in peripheral blood using flow cytometry. *Cytometry* 2000; 40: 50-59
- 33 杨荣, 高静. 肝纤维化基因治疗的进展. *生理科学进展* 2004; 35: 30-34
- 34 刘萱, 贾继东. 肝纤维化的基因治疗. *中华肝脏病杂志* 2005; 13: 474-475
- 35 Medina J, Arroyo AG, Sánchez-Madrid F, Moreno-Otero R. Angiogenesis in chronic inflammatory liver disease. *Hepatology* 2004; 39: 1185-1195
- 36 Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* 2003; 9: 653-660
- 37 Medina J, Sanz-Cameno P, García-Buey L, Martín-Vílchez S, López-Cabrera M, Moreno-Otero R. Evidence of angiogenesis in primary biliary cirrhosis: an immunohistochemical descriptive study. *J Hepatol* 2005; 42: 124-131
- 38 Iníguez MA, Rodríguez A, Volpert OV, Fresno M, Redondo JM. Cyclooxygenase-2: a therapeutic target in angiogenesis. *Trends Mol Med* 2003; 9: 73-78
- 39 王贵微, 赵晓晏. 肝纤维化治疗现状的研究和展望. *现代医药卫生* 2010; 26: 71-73
- 40 涂传涛, 王吉耀, 郭津生. 选择性COX-2抑制剂、PGE1对肝硬化大鼠VEGF和CTGF表达的影响. *胃肠病学和肝病学杂志* 2009; 18: 69-72
- 41 Detsky AS, McLaughlin JR, Baker JP, Johnston N, Whittaker S, Mendelson RA, Jeejeebhoy KN. What is subjective global assessment of nutritional status? *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 1987; 11: 8-13
- 42 于康. 临床营养师速查手册. 北京: 科学技术文献出版社, 2001: 148-150
- 43 Stratton RJ, Hackston A, Longmore D, Dixon R, Price S, Stroud M, King C, Elia M. Malnutrition in hospital outpatients and inpatients: prevalence, concurrent validity and ease of use of the 'malnutrition universal screening tool' ('MUST') for adults. *Br J Nutr* 2004; 92: 799-808
- 44 Plauth M. Basics in Clinical Nutrition: Nutritional support in liver disease. e-SPEN, *Eur J Clin Nutr Meta* 2010; 5: 104-106
- 45 Kondrup J, Rasmussen HH, Hamberg O, Stanga Z. Nutritional risk screening (NRS 2002): a new method based on an analysis of controlled clinical trials. *Clin Nutr* 2003; 22: 321-336
- 46 叶青, 韩涛. 肝硬化患者的营养支持. *肝脏* 2009; 14: 503-504
- 47 Chang WT, Ker CG, Hung HC, Lee KT, Chen LS, Chiang HC, Huang MC. Albumin and prealbumin may predict retinol status in patients with liver cirrhosis. *Hepatogastroenterology* 2008; 55: 1681-1685
- 48 冯岩梅, 孟庆华. 静息能量消耗测定在慢性肝病中的应用. *中国临床营养杂志* 2007; 15: 107-110
- 49 Greco AV, Mingrone G, Benedetti G, Capristo E, Tataranni PA, Gasbarrini G. Daily energy and substrate metabolism in patients with cirrhosis. *Hepatology* 1998; 27: 346-350
- 50 Ockenga J, Bischoff SC, Tillmann HL, Rifai K, Wijdaja A, Böker KH, Manns MP, Brabant G. Elevated bound leptin correlates with energy expenditure in cirrhotics. *Gastroenterology* 2000; 119: 1656-1662
- 51 于淑清, 孟庆华. 慢性重型病毒性肝炎患者的营养状况分析及营养干预. *中国临床营养杂志* 2006; 14: 360-364
- 52 冯岩梅, 孟庆华, 于红卫, 李娟, 王金环, 王馨. 慢性重型肝炎患者碳水化合物、蛋白质、脂肪氧化代谢监测. *中国临床营养杂志* 2007; 15: 277-280
- 53 Sobotk L, 蔡威. 临床营养基础. 上海: 复旦大学出版社, 2002: 231
- 54 Marchesini G, Bianchi G, Rossi B, Brizi M, Melchionda N. Nutritional treatment with branched-chain amino acids in advanced liver cirrhosis. *J Gastroenterol* 2000; 35 Suppl 12: 7-12
- 55 孟庆华. 重症肝病患者营养治疗中的几点思考. *北京医学* 2010; 32: 409-411
- 56 Sugimoto R, Enjoji M, Nakamuta M, Ohta S, Kohjima M, Fukushima M, Kuniyoshi M, Arimura E, Morizono S, Kotoh K, Nawata H. Effect of IL-4 and IL-13 on collagen production in cultured LI90 human hepatic stellate cells. *Liver Int* 2005; 25: 420-428
- 57 Bansal MB, Kovalovich K, Gupta R, Li W, Agarwal A, Radbill B, Alvarez CE, Safadi R, Fiel MI, Friedman SL, Taub RA. Interleukin-6 protects hepatocytes from CCl4-mediated necrosis and apoptosis in mice by reducing MMP-2 expression. *J Hepatol* 2005; 42: 548-556

- 58 Lambert-Jensen P, Christensen NE, Brynnum J. Laryngeal mask and anaesthetic waste gas exposure. *Anaesthesia* 1992; 47: 697-700
- 59 Zheng WD, Zhang LJ, Shi MN, Chen ZX, Chen YX, Huang YH, Wang XZ. Expression of matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in hepatic stellate cells during rat hepatic fibrosis and its intervention by IL-10. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 1753-1758
- 60 宗蕾, 陆伦根. 免疫因素在肝纤维化过程中的作用的研究进展. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 205-210
- 61 黎介寿. 肿瘤营养学的兴起及临床应用. *中国临床营养杂志* 2004; 12: 221-222
- 62 黎介寿. 瞻望我国的临床营养支持. *肠外与肠内营养* 2008; 15: 1-3
- 63 Miwa Y, Moriawaki H. Nocturnal energy and BCAA supplementation in patients with liver cirrhosis. *Hepatol Res* 2004; 30S: 63-66
- 64 Kircheis G, Häussinger D. Management of hepatic encephalopathy. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17 Suppl 3: S260-S267
- 65 李为苏, 黎介寿. 肝硬化患者营养不良与围手术期营养支持. *实用临床医药杂志* 2004; 8: 26-28
- 66 Plank LD, Gane EJ, Peng S, Muthu C, Mathur S, Gillanders L, McIlroy K, Donaghy AJ, McCall JL. Nocturnal nutritional supplementation improves total body protein status of patients with liver cirrhosis: a randomized 12-month trial. *Hepatology* 2008; 48: 557-566
- 67 Yamanaka-Okumura H, Nakamura T, Takeuchi H, Miyake H, Katayama T, Arai H, Taketani Y, Fujii M, Shimada M, Takeda E. Effect of late evening snack with rice ball on energy metabolism in liver cirrhosis. *Eur J Clin Nutr* 2006; 60: 1067-1072
- 68 Tipoe GL, Lau TY, Nanji AA, Fung ML. Expression and functions of vasoactive substances regulated by hypoxia-inducible factor-1 in chronic hypoxemia. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem* 2006; 4: 199-218
- 69 黄祥成, 郑永波. 肝硬化患者的营养支持. *新医学* 2003; 34: 284-285
- 70 Tsiaousi ET, Hatzitolios AI, Trygonis SK, Savopoulos CG. Malnutrition in end stage liver disease: recommendations and nutritional support. *J Gastroenterol Hepatol* 2008; 23: 527-533
- 71 Owen OE, Reichle FA, Mozzoli MA, Kreulen T, Patel MS, Elfenbein IB, Golsorkhi M, Chang KH, Rao NS, Sue HS, Boden G. Hepatic, gut, and renal substrate flux rates in patients with hepatic cirrhosis. *J Clin Invest* 1981; 68: 240-252

编辑 李军亮 电编 何基才

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

• 消息 •

中国科技信息研究所发布《世界华人消化杂志》 影响因子 0.625

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

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

胃旁路术对GK大鼠糖代谢影响及其与Ghrelin的关系

曹超, 曾荣, 张鹏, 周晓磊, 尤胜义

■背景资料

目前2型糖尿病的治疗是世界性难题, 近年来发病率呈逐年上升趋势。国外学者意外发现胃旁路术等可以有效改善糖尿病患者糖代谢, 为外科治疗糖尿病开辟了新途径, 掀起了一股研究热潮。

曹超, 张鹏, 周晓磊, 尤胜义, 天津医科大学总医院普通外科天津市 300052

曾荣, 天津市南开医院 天津市 300100

作者贡献分布: 本文设计和指导由尤胜义与周晓磊完成; 研究过程及写作由曹超完成; 实验数据处理由曾荣完成; 实验指导由张鹏完成。

通讯作者: 尤胜义, 教授, 主任医师, 博士生导师, 300052, 天津市和平区鞍山道154号, 天津医科大学总医院普通外科。
shengyiyu@hotmail.com

电话: 022-60363962

收稿日期: 2011-06-28 修回日期: 2011-09-05

接受日期: 2011-09-15 在线出版日期: 2011-09-18

Gastric bypass surgery improves glucose metabolism possibly by decreasing ghrelin levels in Goto-Kakizaki rats

Chao Cao, Rong Zeng, Peng Zhang, Xiao-Lei Zhou, Sheng-Yi You

Chao Cao, Peng Zhang, Xiao-Lei Zhou, Sheng-Yi You, Department of General Surgery, Tianjin Medical University General Hospital, Tianjin 300052, China

Rong Zeng, Tianjin Nankai Hospital, Tianjin 300100, China

Correspondence to: Professor Sheng-Yi You, Department of General Surgery, Tianjin Medical University General Hospital, 154 Anshan Road, Heping District, Tianjin 300052, China. shengyiyu@hotmail.com

Received: 2011-06-28 Revised: 2011-09-05

Accepted: 2011-09-15 Published online: 2011-09-18

Abstract

AIM: To investigate the influence of gastric bypass (GBP) surgery on glucose metabolism in Goto-Kakizaki (GK) rats and to explore the possible mechanisms involved.

METHODS: Twenty male GK rats and 10 male Wistar rats were randomized into three groups: GK operation group, GK sham operation group and Wistar sham operation group. The GK operation group underwent gastric bypass surgery. The levels of fasting plasma glucose (FPG), glycosylated hemoglobin (HbA1c), serum insulin (INS) and ghrelin were monitored 1 week before surgery and 1, 2, 4, 8 and 12 weeks after surgery.

RESULTS: In the GK operation group, FPG level decreased from (11.36 ± 1.14) mmol/L be-

fore surgery to (8.36 ± 0.62) mmol/L 12 weeks after surgery, and HbA1c from $(8.91 \pm 0.36)\%$ to $(6.35 \pm 0.46)\%$. Serum INS increased from (32.70 ± 2.37) mIU/L before surgery to (55.14 ± 5.45) mIU/L 12 weeks after surgery, while serum ghrelin level decreased from (928.53 ± 58.66) pg/mL to (367.83 ± 27.78) pg/mL. All the above parameters differed significantly between before surgery and 12 weeks after surgery (all $P < 0.05$).

CONCLUSION: GBP can significantly improve glycometabolism in GK rats possibly by decreasing ghrelin levels and promoting insulin secretion.

Key Words: Type 2 diabetes mellitus; Gastric bypass; Goto-Kakizaki rats; Glucose metabolism; Ghrelin

Cao C, Zeng R, Zhang P, Zhou XL, You SY. Gastric bypass surgery improves glucose metabolism possibly by decreasing ghrelin levels in Goto-Kakizaki rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(26): 2768-2771

摘要

目的: 观察胃旁路术(gastric bypass, GBP)对非肥胖型2型糖尿病大鼠(Goto-Kakizaki rats; GK大鼠)血糖的影响, 并探讨其机制。

方法: GK大鼠20只, Wistar大鼠10只, 均为雄性。分为GK手术组、GK假手术组和Wistar假手术组, 每组10只。手术组行胃旁路术。测定术前1 wk及术后第1、2、4、8、12 wk各组大鼠的空腹血糖(FPG)、糖化血红蛋白(HbA1c)和血清胰岛素(INS), 并同期检测血清Ghrelin水平。

结果: 术后第12周, GK手术组大鼠FPG和HbA1c分别由术前的 $11.36 \text{ mmol/L} \pm 1.14 \text{ mmol/L}$ 和 $8.91\% \pm 0.36\%$ 下降到 $8.36 \pm 0.62 \text{ mmol/L}$ 和 $6.35\% \pm 0.46\%$, 血清INS由术前 $32.76 \text{ mIU/L} \pm 2.37 \text{ mIU/L}$ 上升到 $55.14 \text{ mIU/L} \pm 5.45 \text{ mIU/L}$, 而Ghrelin由术前 $928.53 \text{ ng/L} \pm 58.66 \text{ ng/L}$ 下降到 $367.83 \text{ ng/L} \pm 27.78 \text{ ng/L}$, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

结论: GBP可以明显改善GK大鼠的糖代谢, 其

■同行评议者

秦环龙, 教授, 上海交通大学附属第六人民医院外科

作用机制可能与降低Ghrelin水平,进而促进胰岛素分泌有关。

关键词: 2型糖尿病;胃旁路术;GK大鼠;糖代谢;Ghrelin

曹超, 曾荣, 张鹏, 周晓磊, 尤胜义. 胃旁路术对GK大鼠糖代谢影响及其与Ghrelin的关系. 世界华人消化杂志 2011; 19(26): 2768-2771

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2768.asp>

0 引言

近年来临床研究发现,胃旁路术(gastric bypass, GBP)对肥胖型2型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)具有一定的治疗作用^[1,2],但其机制尚不明确^[3-5],且对于非T2DM是否同样具有治疗作用还有待于进一步研究。GK大鼠是一种自发性非T2DM大鼠,是目前公认的T2DM模型之一,也是建立GBP模型的最佳动物。本研究拟通过对GK大鼠行GBP,观察这种术式对GK大鼠空腹血糖(fasting plasma glucose, FPG)、糖化血红蛋白(glycosylated hemoglobin, HbA1c)、胰岛素(insulin, INS)以及血清Ghrelin水平等的影响,并进一步探讨其可能的机制,为外科治疗非T2DM提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料 8周龄♂ GK大鼠20只,体质量220-240 g,购自上海斯莱克实验动物有限公司。8周龄♂ Wistar大鼠10只,体质量200-230 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号:SCXK(京)2007-0001。实验前适应环境2 wk,严格在无特殊致病菌的条件下饲养。强生One Touch Ultra型血糖仪(强生公司,美国),全自动生化分析仪(瑞士Roche公司,Modular P型)及配套试剂,大鼠INS ELISA试剂盒(北京友华志科科技有限公司),大鼠生长激素释放肽Ghrelin(GHRP-Ghrelin)定量检测试剂盒(ELISA)(北京友华志科科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 分组与手术: 2 wk后30只大鼠分成3组: GK手术组、GK假手术组和Wistar假手术组。所有大鼠均在10周龄行手术。术前各组大鼠禁食16 h,不禁水。采用硫喷妥钠(1.0 mL/kg)腹腔注射麻醉,待麻药生效后,取上腹正中长约4 cm的切口,切开腹腔,行远端胃大部切除,缝合十二指肠残端,在距Treitz韧带约8 cm处切断空肠,远端肠袢与胃残壁行端侧吻合,近端肠袢在距胃-空肠吻合

口以远12 cm处行空肠端侧吻合。假手术组开腹将胃肠道拉出体外后再放回,并保持手术时间与手术组一致。

1.2.2 FPG: 术前1 wk及术后第1、2、4、8、12周各组大鼠禁食12 h,清晨采集大鼠尾静脉血液,使用强生One Touch Ultra型血糖仪(强生公司,美国)测量FPG。

1.2.3 HbA1c: 术前1 wk及术后第1、2、4、8、12周内眦静脉取血,采用免疫抑制比浊法测定HbA1c,并计算其百分率。

1.2.4 血清INS和Ghrelin: 术前1 wk、术后第1、2、4、8、12周,禁食12 h后,清晨尾静脉取血2 mL,在4℃下以3 000 r/min离心10 min,分离血清,-70℃低温冰箱保存待测量。采用放射免疫法统一检测血清INS,应用双抗体夹心酶标免疫分析(ELISA)法测定血清标本中Ghrelin水平。

统计学处理 实验数据采用mean±SD表示,采用SPSS11.3统计软件做统计学处理。检验各组变量正态分布情况,不同组之间的同一时间点指标采用独立样本的t检验,单个指标手术前后的变化采用配对t检验,以 $P<0.05$ 为显著性差异标准。

2 结果

2.1 FPG 术前GK假手术组与GK手术组血糖均明显高于Wistar假手术组。术后GK手术组大鼠FPG水平降低,与GK假手术组同期FPG相比均降低,且12 wk时FPG($8.36 \text{ mmol/L} \pm 0.62 \text{ mmol/L}$)显著低于术前($11.36 \text{ mmol/L} \pm 1.14 \text{ mmol/L}$),差异有统计学意义($P<0.05$)。而GK假手术组与Wistar假手术组大鼠术前与术后差异均无统计学意义(图1A)。

2.2 HbA1c 术前GK假手术组与GK手术组HbA1c均高于Wistar假手术组。术后GK手术组较术前持续下降,12 wk时HbA1c水平($6.35\% \pm 0.46\%$)显著低于术前($8.91\% \pm 0.36\%$),差异有统计学意义($P<0.05$)。而GK假手术组与Wistar假手术组大鼠术前与术后差异均无统计学意义(图1B)。

2.3 血清INS 术前Wistar假手术组血清INS水平高于GK假手术组与GK手术组。术后GK手术组INS较术前显著上升,术后各观察点INS均高于GK假手术组同期水平,12 wk时($55.14 \text{ mIU/L} \pm 5.45 \text{ mIU/L}$)与术前比较($32.76 \text{ mIU/L} \pm 2.37 \text{ mIU/L}$)显著升高,具有统计学意义($P<0.05$)。GK假手术组术后1、2 wk也有小幅度上升,4、8、12 wk呈下降趋势。而Wistar假手术组INS亦有变化不显著(图1C)。

■ 研发前沿

GBP治疗2型糖尿病的机制仍不明确。近年来,国内外大多数学者认同肠-胰岛轴学说,即术后胃肠激素的变化影响了胰岛素的分泌,然而至今都没有确切的证据证明是什么因子作为介质,调节了胰岛细胞分泌胰岛素。

■ 相关报道

对于GBP可以降低血糖,已得到广泛认可。国内也有多篇相关报道,然而仍未有确切的作用机制。Nicholas等首次提出糖尿病患者接受GBP后血糖的改善可能与血清Ghrelin水平降低有关。

■创新盘点

目前,多数研究主要集中在GBP后GLP-1的变化降低了血糖。然而多篇国外文献发现GBP后Ghrelin在患者胃肠道和胰腺均有较高表达,而且本课题组前期体外实验表明Ghrelin能够显著抑制离体胰岛在葡萄糖刺激下的胰岛素释放,这些均提示Ghrelin可能在肠-胰岛轴学说中扮演重要角色。

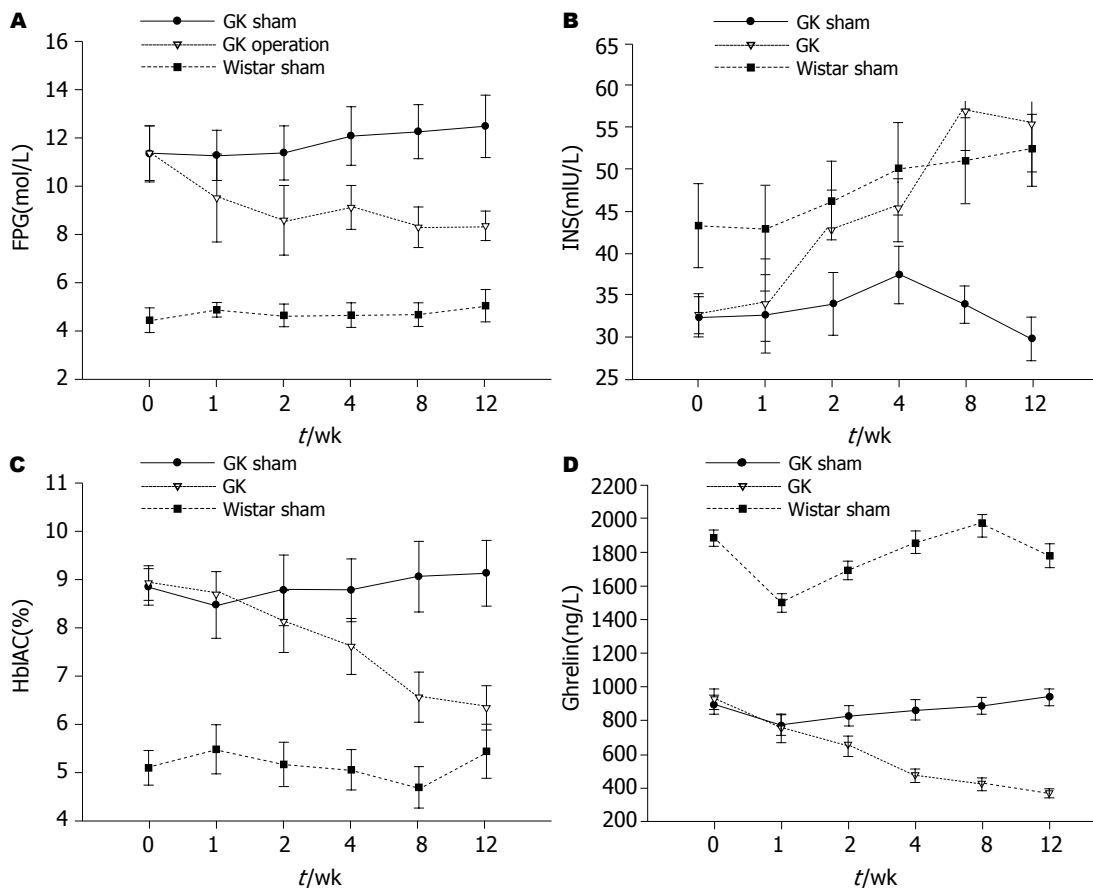


图1 各组大鼠FPG、HbA1c及血清INS和Ghrelin的变化比较。A: FPG; B: HbA1c; C: INS; D: Ghrelin。

2.4 血清Ghrelin 术前Wistar假手术组Ghrelin水平高于GK假手术组与GK手术组。术后GK手术组各时间点大鼠血清Ghrelin显著下降,至12 wk时Ghrelin水平($928.53 \text{ ng/L} \pm 58.66 \text{ ng/L}$)显著低于术前($367.83 \text{ ng/L} \pm 27.78 \text{ ng/L}$),具有统计学意义($P < 0.05$)。而GK假手术组大鼠术后各时间点与术前比较,差异无统计学意义。与Wistar假手术组比较, GK手术组Ghrelin均明显低于其同期Ghrelin水平,具有统计学意义($P < 0.05$, 图1D)。

3 讨论

近年来,糖尿病的发病率迅速增加,目前全球糖尿病患者愈1.7亿^[6],预计2025年世界糖尿病患者数将达3.33亿,其中T2DM约占90%以上,因此T2DM的治疗越来越受到人们的关注。GBP作为一种有效的减肥手术,临床对T2DM的治疗效果已得到肯定^[1,2],对于GBP该善糖代谢的治疗机制成为一个新的研究热点,多篇报道认为改良GBP术后血浆胰高血糖素样肽-1(glucagon-like peptide-1, GLP-1)升高,导致胰岛素分泌增多,从而达到降低血糖的作用^[7-9],但其论点仍未达成共识。大多数学者都以大鼠为模型进行研究,我

们选择的GK大鼠是一种自发性非T2DM大鼠,更接近于人类T2DM的糖代谢变化,血糖变化值较实验干预诱导的糖尿病模型稳定。本实验我们动态地观察了GBP对GK大鼠糖代谢的影响,GBP术后第1周GK手术组大鼠的FPG较术前下降,差异有统计学意义($P < 0.05$),随着观察周期的延长, GK手术组大鼠2、4、8、12周FPG始终显著低于术前水平,并且低于GK假手术组同期FPG,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。与此同时GK手术组术后HbA1c较术前也显著下降,说明GBP术后第1周开始就能显著改善GK大鼠FPG,降低HbA1c水平,持久稳定改善糖代谢障碍。

对于GBP治疗T2DM的机制目前尚无定论,相关研究已证实体质量减轻和饮食减少并不是血糖降低的主要因素^[5,10,11]。Ghrelin是日本学者Kojima等^[12]于1999年在大鼠胃黏膜细胞中发现的一种脑肠肽,是促生长激素分泌剂受体(growth hormone secretagogue receptor, GHS-R)的内源性配体。有研究表明Ghrelin对胰岛细胞分泌功能具有调节作用:在低浓度的葡萄糖浓度(3 mmol/L)时, Ghrelin不影响胰岛素的分泌;但在高浓度葡萄糖浓度(15 mmol/L)时, Ghrelin

■应用要点

GBP可以改善糖代谢为糖尿病的治疗提供了新的思路,治疗T2DM可能具有广阔前景。明确GBP治疗T2DM的确切机制,能够为临床开展外科手术治疗T2DM奠定理论基础。

可抑制胰岛素的分泌^[13]. 李琳等^[14]进一步研究证实, 小鼠胰腺β细胞株NIT-1细胞在DMEM培养基中, 拮抗Ghrelin至零的情况下, 25 mmol/L比5.6 mmol/L葡萄糖刺激后的NIT-1细胞分泌的胰岛素水平增加1倍以上. 胰岛素是维持血糖正常最重要的激素, 本实验我们选用的GK大鼠为高血糖状态, 而Wistar大鼠为血糖正常大鼠, 结果显示, GBP术后GK大鼠的INS水平明显升高, 同时也显著高于GK假手术组同期INS, 差异有统计学意义($P<0.05$), 接近于Wistar假手术组, 提示GBP改善GK大鼠糖代谢的治疗机制可能与提高胰岛素分泌有关. GK手术组大鼠术前Ghrelin普遍高于Wistar普通大鼠, 术后血清Ghrelin水平持续下降, 第12周(367.83 ± 27.78) ng/L与术前(928.53 ± 58.66) ng/L比较明显降低($P<0.05$), 与此同时血清INS第12周(55.14 ± 5.45) mIU/L与术前(32.76 ± 2.37) mIU/L相比显著升高($P<0.05$). 而GK假手术组与Wistar假手术组血清Ghrelin与INS术后与术前相比, 差异无统计学意义($P>0.05$). 上述实验结果提示, GBP可能是通过降低Ghrelin水平, 使胰岛素分泌增加, 从而改善GK大鼠糖代谢障碍的.

然而, GBP降低Ghrelin水平的机制仍然不清, 目前被多数学者接受的为“前肠假说”, 即GBP旷置了十二指肠和近端空肠, 使得营养素转运, 前肠被排除出肠-胰岛轴, 抑制了Ghrelin的分泌, 但是其具体信号机制仍然有待于进一步探讨.

4 参考文献

- 1 Buchwald H, Williams SE. Bariatric surgery worldwide 2003. *Obes Surg* 2004; 14: 1157-1164
- 2 Cummings DE, Flum DR. Gastrointestinal surgery as a treatment for diabetes. *JAMA* 2008; 299: 341-343
- 3 Wickremesekera K, Miller G, Naotunne TD, Knowles G, Stubbs RS. Loss of insulin resistance after Roux-en-Y gastric bypass surgery: a time course study. *Obes Surg* 2005; 15: 474-481
- 4 Rubino F, Marescaux J. Effect of duodenal-jejunal exclusion in a non-obese animal model of type 2 diabetes: a new perspective for an old disease. *Ann Surg* 2004; 239: 1-11
- 5 Alexandrides TK, Skroubis G, Kalfarentzos F. Resolution of diabetes mellitus and metabolic syndrome following Roux-en-Y gastric bypass and a variant of biliopancreatic diversion in patients with morbid obesity. *Obes Surg* 2007; 17: 176-184
- 6 Papadopoulos AA, Kontodimopoulos N, Frydas A, Ikonomakis E, Niakas D. Predictors of health-related quality of life in type II diabetic patients in Greece. *BMC Public Health* 2007; 7: 186
- 7 翁山耕, 张斌, 刘赵琪, 石铮. 改良胃旁路术对GK大鼠的降糖作用及其机制. *世界华人消化杂志* 2010; 18: 3778-3781
- 8 Liu Y, Zhou Y, Wang Y, Geng D, Liu J. Roux-en-Y gastric bypass-induced improvement of glucose tolerance and insulin resistance in type 2 diabetic rats are mediated by glucagon-like peptide-1. *Obes Surg* 2011; 21: 1424-1431
- 9 Laferrère B, Heshka S, Wang K, Khan Y, McGinty J, Teixeira J, Hart AB, Olivan B. Incretin levels and effect are markedly enhanced 1 month after Roux-en-Y gastric bypass surgery in obese patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2007; 30: 1709-1716
- 10 Rubino F, Forgione A, Cummings DE, Vix M, Gnuli D, Mingrone G, Castagneto M, Marescaux J. The mechanism of diabetes control after gastrointestinal bypass surgery reveals a role of the proximal small intestine in the pathophysiology of type 2 diabetes. *Ann Surg* 2006; 244: 741-749
- 11 Meneghini LF. Impact of bariatric surgery on type 2 diabetes. *Cell Biochem Biophys* 2007; 48: 97-102
- 12 Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 1999; 402: 656-660
- 13 Wierup N, Yang S, McEvilly RJ, Mulder H, Sundler F. Ghrelin is expressed in a novel endocrine cell type in developing rat islets and inhibits insulin secretion from INS-1 (832/13) cells. *J Histochem Cytochem* 2004; 52: 301-310
- 14 李琳, 邓正照, 洪天配, 邓正照. Ghrelin抑制胰岛β细胞胰岛素释放的机制探讨. *中国糖尿病杂志* 2006; 14: 452-454

■同行评价

本研究阐述了大鼠在接受胃旁路手术后糖代谢的影响, 具有一定代表性, 有一定的临床参考价值.

编辑 何基才 电编 何基才

食管癌放射治疗85例

刘文其, 康敏, 袁堃

■背景资料

过去单纯手术治疗中晚期食管癌患者的5年生存率只有10%-30%, 而采用常规技术的放疗5年生存率也一直在8%-16%的较低水平。近年来随着放射治疗技术的飞速发展, 三维适形放疗、调强放疗等先进技术广泛应用于食管癌的放疗, 较好地提高了肿瘤的剂量同时大大降低了周围正常组织器官的照射剂量, 一些文献已经显示对局部控制率和生存率均有明显提高。在放疗的同时加上同步化疗食管癌患者的5年生存率提高到20%-30%, 疗效能与手术的疗效相媲美。

■同行评议者

曹秀峰, 教授, 南京医科大学附属南京第一医院肿瘤中心

刘文其, 康敏, 袁堃, 广西医科大学第一附属医院放疗科 广西壮族自治区南宁市 530021

作者贡献分布: 本论文由刘文其, 康敏及袁堃共同完成; 康敏与袁堃的贡献均等。

通讯作者: 刘文其, 副教授, 530021, 广西壮族自治区南宁市双拥路6号, 广西医科大学第一附属医院放疗科。

liuwenqi999@yahoo.com.cn

收稿日期: 2011-06-02 修回日期: 2011-08-27

接受日期: 2011-08-27 在线出版日期: 2011-09-18

Prognosis of patients with esophageal carcinoma after radiotherapy: an analysis of 85 cases

Wen-Qi Liu, Min Kang, Kun Yuan

Wen-Qi Liu, Min Kang, Kun Yuan, Department of Radiation Oncology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Correspondence to: Wen-Qi Liu, Associate Professor, Department of Radiation Oncology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, 6 Shuangyong Road, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. liuwenqi999@yahoo.com.cn

Received: 2011-06-02 Revised: 2011-08-27

Accepted: 2011-08-27 Published online: 2011-09-18

Abstract

AIM: To investigate the efficacy of radiotherapy for esophageal carcinoma and to analyze prognostic factors for esophageal carcinoma after radiotherapy.

METHODS: Eighty-five patients with esophageal carcinoma who underwent comprehensive non-surgical treatment from April 2004 to April 2009 were enrolled in this study. Clinical factors influencing prognosis were evaluated. Survival was analyzed by Kaplan-Meier method. Univariate analysis was completed by using log-rank test (Log-rank test method), and multivariate analysis was performed using Cox proportional hazards regression model.

RESULTS: The follow-up rate was 100%. The 1- and 3-year survival rates were 65.9% and 29.4%, respectively. Univariate analysis showed that age, tumor site, lesion length, clinical stage,

treatment mode, radiation techniques, and short-term effect were prognostic factors for esophageal carcinoma. Multivariate Cox regression analysis revealed that treatment mode, clinical stage and short-term effect were independent prognostic factors.

CONCLUSION: The long-term survival of patients with esophageal carcinoma after radiotherapy is poor. Treatment mode, clinical stage and short-term effect are main factors affecting the prognosis of esophageal carcinoma.

Key Words: Esophageal carcinoma; Radiotherapy; Univariate analysis; Cox proportional hazards regression model; Prognostic analysis

Liu WQ, Kang M, Yuan K. Prognosis of patients with esophageal carcinoma after radiotherapy: an analysis of 85 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(26): 2772-2776

摘要

目的: 探讨食管癌放射治疗的疗效及其影响预后的相关因素。

方法: 收集2004-04/2009-04采用非手术综合治疗的食管癌患者85例进行预后分析, 探讨影响预后的临床因素。生存率采用Kaplan-Meier法进行计算, 并采用对数秩和检验(Log-rank test法)进行单因素分析, 采用Cox比例风险模型对可能影响其预后的因素进行多因素回归分析。

结果: 随访率100%, 1、3年生存率分别为65.9%、29.4%。单因素分析影响食管癌预后的因素有年龄、病变部位、病变长度、临床分期、治疗方式、放疗技术和近期疗效, 而性别、放疗剂量大小与预后无关。Cox比例风险回归模型进行多因素分析显示治疗方式、临床分期和近期疗效为影响预后的独立因素。

结论: 食管癌放疗后总体生存率仍然较低, 治疗方式、临床分期和近期疗效是影响食管癌预后的主要因素。

关键词: 食管肿瘤; 放射治疗; 单因素分析; Cox比

例风险回归模型; 预后分析

刘文其, 康敏, 袁堃. 食管癌放射治疗85例. 世界华人消化杂志 2011; 19(26): 2772-2776

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2772.asp>

0 引言

食管癌是常见的恶性肿瘤之一, 居世界癌症死因第7位, 中国癌症死因第4位. 食管癌的主要治疗方法有手术、放疗及化疗. 单纯手术5年生存率约15%-39%, 但大多数患者确诊时已是中晚期, 并且已经失去了手术时机. 而过去单纯放疗的5年生存率约为8%-16%, 临床疗效远不能令人满意. 近年来随着放射治疗技术的飞速发展, 三维适形放疗、调强放疗等先进技术广泛应用于食管癌的放疗, 因而能较好地提高了肿瘤的剂量同时大大降低了周围正常组织器官的照射剂量, 一些文献已经显示对局部控制率和生存率均有明显提高. 在此基础上再加入第三代化疗药进行同步化疗疗效是否能够得到进一步提高达到一个满意的效果呢? 目前这方面的报道还不多. 本研究回顾性分析了85例拒绝手术或不可手术的食管癌患者进行根治性放疗的疗效, 并进行单因素和多因素分析, 探讨影响食管癌放射治疗的预后因素.

1 材料和方法

1.1 材料 收集广西医科大学第一附属医院放疗科2004-04/2009-04拒绝手术或不可手术的食管癌根治性放疗的食管癌患者85例, 其中男性59例, 女性26例, 发病年龄40-84岁, 平均年龄60.3岁. 入组条件: (1)经消化内镜活检病理学确诊为食管鳞状细胞癌的II-IVa期患者; (2)年龄<85岁, 卡氏评分(KPS)>60分; (3)无心、肝、肾等主要脏器功能障碍; (4)所有病例无穿孔前征象; (5)患者拒绝手术或不宜进行手术的食管癌初治患者. 其中包括胸上段28例、胸中段42例、胸下段15例. 临床分期采用AJCC2009年第7版食管癌TNM分期标准, 其中IIa期15例、IIb期24例、III期33例、IVa期13例.

1.2 方法

1.2.1 治疗: 所有患者均采用根治性放射治疗, 放疗计划均能顺利完成. 放疗方案: 所有患者均采用瓦里安或西门子6MV的电子直线加速器分别进行常规放疗或三维适形放射治疗. 常规放疗: 根据食管钡餐X片和CT所示肿瘤实际侵犯范围

进行X线模拟定位设定放射野大小, 第一段采用前后对穿野进行照射, 放射野的上下界分别在病变边缘上下各扩4 cm, 宽6-7 cm, DT36-40 Gy. 第二段根据病变具体情况缩野避开脊髓, 改用右前、左后野进行放疗至根治量. 采用常规分割, 2.0 Gy/次, 5次/周, 总量DT56-74 Gy. 三维适形放射治疗: 先真空垫进行体位固定, CT模拟扫描后进行靶区勾画、三维放射治疗计划的设计, GTV为CT扫描所见的结合食管造影、食管镜检查所显示的原发肿瘤及区域肿大的淋巴结, CTV为GTV周围0.5-1.0 cm的区域, 包括GTV及其邻近的区域、相应的淋巴引流区、肿瘤上下外扩3.0 cm的正常食管, PTV为在CTV的基础上外扩0.5-1.0 cm. 处方剂量5400-7000 cGy, 中位处方剂量6475 cGy, 单次剂量200 cGy, 1次/d, 5次/wk, 要求参考剂量的95%等剂量曲线覆盖90%以上的PTV, 全肺V20≤30%, V30≤20%, 心脏平均剂量≤3000 cGy, 脊髓最大剂量<4500 cGy. 计划经副主任医师以上医师审核、优化、通过. 其中45例患者采用同步放化疗, 化疗方案: 顺铂(DDP) 80 mg/m², 分第1、2天, 5-Fu 500 mg/m², 第1-5天, 或紫杉醇135-175 mg/m², 第1天, 顺铂80 mg/m², 分第2、3天. 21天化疗为1周期, 化疗共2-3个周期.

1.2.2 随访: 随访截止于2010-12-31, 随访期>3年者68例, 随访内容包括症状、体征及辅助检查(食管造影、CT、B超等), 随访率为100%.

1.2.3 近期疗效评价: 在放疗结束后1-3 mo进行食管造影、CT扫描评价, 近期疗效评价采用万钧食管癌放疗后近期疗效评价标准分为甲级、乙级、丙级^[1].

统计学处理 应用SPSS17.0软件进行统计处理, 用Kaplan-Meier法计算生存率, 用对数秩和检验(Log-rank test法)进行单因素分析, 对可能影响预后的因素采用Cox比例风险模型进行多因素回归分析. 设计检验标准, 以 $P<0.05$ 有统计学意义.

2 结果

2.1 各组患者生存率 截至2010-05随访率100%, 全组1、3年生存率分别为65.9%、29.4%, 各组的生存情况详见表1.

2.2 单因素分析结果 单因素分析发现年龄、病变部位、病变长度、临床分期、治疗方式、放疗技术和近期疗效是影响食管癌预后的因素. 而性别、放疗剂量大小与预后无关(表1).

■ 研究前沿

近年来随着三维适形放疗、调强放疗等先进技术广泛应用于食管癌的放疗, 在此基础上再加入第三代化疗药进行同步化疗, 以及采取多学科联合进行食管癌的综合治疗, 食管癌的总生存率得到明显提高. 尽管如此长期生存率仍然达不到理想目标, 仍然处于一个较低的水平. 因而探索在新技术、新模式下影响食管癌治疗预后的因素自然成为研究热点和重点, 亟待寻找到一种能真正大幅度提高食管癌患者生存率的手段与方法, 达到一个满意的效果. 并对传统的手术、放疗、化疗这三大法宝提出挑战, 在食管癌综合治疗中引入分子靶向治疗将成为今后的研究热点, 期待进一步大幅度地提高长期生存率.

■创新亮点

本研究是在新的放疗技术、新的化疗药物以及多学科联合治疗模式下探索影响治疗食管癌放疗的预后因素。

表 1 85例食管癌患者的单因素分析结果

	<i>n</i>	生存率 n (%)		χ^2 值	<i>P</i> 值
		1年	3年		
性别				1.88	0.17
男	59	39(66.10)	19(32.20)		
女	26	17(65.38)	6(23.08)		
年龄(岁)				5.54	0.02
≤60	41	29(70.73)	17(41.46)		
>60	44	25(56.82)	8(18.18)		
肿瘤部位				8.06	0.02
胸上段	28	23(82.14)	11(39.29)		
胸中段	42	25(59.52)	11(26.19)		
胸下段	15	6(40.00)	3(20.00)		
病变长度(cm)				22.83	0.00
≤5	22	18(81.82)	14(63.64)		
5-7	38	24(63.16)	11(28.95)		
≥7	25	12(48.00)	0(0.00)		
临床分期				32.85	0.00
II a期	15	14(93.33)	11(73.33)		
II b期	24	20(83.33)	12(50.00)		
III 期	33	14(42.42)	1(3.03)		
VIa期	13	6(46.15)	1(7.69)		
放疗剂量(Gy)				1.81	0.61
54-60	12	8(66.66)	3(25.00)		
61-66	22	13(59.09)	5(22.72)		
67-70	44	29(65.91)	15(34.09)		
>70	7	3(42.86)	1(14.29)		
治疗方式				7.56	0.01
放化治疗组	45	33(73.33)	19(42.22)		
单纯放疗组	40	21(52.50)	6(15.00)		
放疗技术				4.93	0.03
常规放疗	36	18(50.00)	7(19.44)		
三维适形放疗	49	36(73.47)	18(36.73)		

表 2 食管癌患者预后的多因素分析

自变量	β (回归系数)	SE(标准误)	Wald值	<i>P</i> 值	Exp(B)
年龄	0.46	0.30	2.30	0.130	1.58
病变部位	0.47	0.22	2.91	0.150	1.44
病变长度	0.33	0.20	2.73	0.100	1.40
临床分期	0.51	0.16	9.89	0.000	1.67
治疗方式	0.33	0.28	1.41	0.240	1.40
放疗技术	-0.55	0.28	3.90	0.048	0.58
近期疗效	1.08	0.37	8.58	0.000	2.93

2.3 Cox回归模型的多因素分析结果 将单因素分析对食管癌预后影响的年龄、病变部位、病变长度、临床分期、治疗方式、放疗技术、近期疗效等因素采用Cox回归模型进行多因素分析,结果显示影响食管癌的独立预后因素为临

床分期、放疗技术、近期疗效(表2)。

3 讨论

对于可切除的食管癌患者来说,外科手术仍是首选治疗手段,但单纯手术治疗中晚期食管癌患者的5年生存率只有10%-20%^[2,3,17],疗效不佳。曹秀峰等^[3-6]的研究发现新辅助放化疗与单纯手术治疗食管癌相比,不仅对手术的完全切除率也有明显提高,而且能提高患者长期生存率,降低肿瘤局部区域复发率。

过去几十年来,食管癌在常规放疗技术下的非手术治疗生存率一直没有明显提高,常规放疗后的5年生存率在8%-16%的较低水平^[7]。研究认为局限期的食管癌约70%以上有广泛的淋巴结转移,50%以上有远地转移,这也是食管癌

单纯放疗导致长期生存率较低的主要原因. 针对食管癌早期易转移、单纯放疗易复发的特点, 在放疗的同时加上同步化疗5年生存率提高到20%-30%^[8-12], 疗效能与手术的疗效相媲美, 但仍然不能让人满意.

本研究单因素分析发现年龄、病变部位、病变长度、临床分期、放疗技术、是否联合化疗等都对食管癌治疗后的预后有明显的影响, 而性别、放疗剂量却没有影响. 病变长度、临床分期对食管癌的预后有影响, 这与文献报道一致^[8-12], 而且病变长度决定了临床分期, 并被中国非手术治疗食管癌临床分期专家小组当作T分期的标准. 本组食管癌病例中原发肿瘤的部位与预后有关, 预后好坏依次为胸上段、胸中段、胸下段, 可见上段的食管癌预后好于下段的, 与文献报道结果一致^[10], 可能是由于近端食管的淋巴引流没有远端那么广泛、丰富, 且中下段食管活动度大、邻近周围有重要的放射敏感器官. 本研究看出放疗技术的进步也提高了食管癌的放疗疗效, 显示食管癌采用三维适形放射治疗的预后明显优于常规放疗. 这是由于三维适形放射治疗采用CT扫描、进行靶区设计能准确地显示肿瘤的原发部位、肿瘤的浸润情况及淋巴结转移情况, 弥补常规模拟机透视下定位的不足, 较好地提高了肿瘤的剂量及治疗的处方剂量体积, 同时最大限度地降低了临近正常组织的受照射的剂量和体积, 较好地保护了肿瘤周围的正常组织, 提高放射治疗比, 从而提高局部控制率和生存率. 2004年肖泽芬等^[13]用计算机治疗计划系统评估食管癌常规放疗中肿瘤的剂量分布, 分析60 Gy所包含GTV、CTV的体积分别为38%、33%, 不能使肿瘤均匀地达到根治剂量, 肿瘤的漏照及局部的低剂量是造成复发的根源.

近年来改善了放疗技术基础上再加入同步化疗使得5年生存率有了明显提高, 2009年王澜等^[10]对100例食管癌患者进行了三维适形放射治疗研究, 结果显示1、3、5年生存率分别为78.3%、51.2%、37.1%, 与历史的常规放疗对照局部控制率和生存率均有明显提高. 2010年伊斯刊达尔等^[11]观察了三种放疗方法对食管癌的疗效, 结果发现调强放疗和三维适形放射治疗的近期疗效明显优于常规放疗.

本研究结果发现放疗剂量不是食管癌的预后影响因素, 说明食管癌的生存对放疗剂量没有依赖性, 这提示增加放疗剂量并不能有效增

加放疗后生存率, 相反过分追求高剂量, 反而会造成正常组织放射性损伤等副反应的增加而降低了生存质量、影响长期生存时间.

国内外也没有提高剂量能改善生存的循证医学证据. 陈尔成等^[12]研究发现放疗50-60 Gy、60.1-69.9 Gy与 ≥ 70 Gy者的局部复发率分别为69%、61%和52% ($P = 0.027$), 提示提高放疗剂量能提高局部控制率. 而RTOG94-05研究^[14]发现在接受64.8 Gy与50.4 Gy的两组同步放化疗患者, 两组的中位生存期、局部复发率以及2年生存率均无显著性差异. 国内赵快乐等^[15]研究亦发现超过70 Gy以上局部控制没能得到明显提高, 相反严重的放射性肺损伤和放射性食管炎的发生率大幅增加. 这可能是由于总体中位生存期较短, 提高剂量进行放疗虽然提高了一定程度的局部控制和生存期, 但对长期生存没有带来影响. 也就是说对于普通剂量放疗不能治愈的患者加量放疗也无法治愈, 加量放疗所能达到的生存率不加量同样基本能够达到. Moon等^[16]的研究食管癌患者术后放疗大于50 Gy的疗效都明显优于低于50 Gy的, 术后放疗剂量都应大于50 Gy, 那么作为根治性放疗也采用这个剂量能够达到根治的目的吗? 究竟多少剂量才是控制食管癌的最佳剂量还有待进一步深入研究.

本研究的Cox回归模型多因素分析结果显示: 纠正混杂因素后, 只有放疗技术、近期疗效和临床分期是食管癌的独立预后因素, 其余的因素均不是食管癌的独立预后因素. 在多变量Cox比例风险模型中分别比较在食管癌的放疗技术、临床分期及近期疗效对预后的影响程度, 结果临床分期和近期疗效对预后的影响作用最大. Morita等^[17]对手术治疗的1000例食管癌患者进行了多因素分析, 结果显示年龄、性别、手术方式、病理分期等是食管癌预后的独立影响因素. 同样Chao等^[18]也得出临床分期是食管癌患者5年生存期的独立影响因素. 本研究结果与文献报道情况基本一致. 可见, 食管癌治疗的预后与临床分期、放疗技术以及放疗后的反应性(即近期疗效)有关, 而联合化疗所能提高患者的生存也相当有限, 而对于改善放疗技术亦不能大幅提高患者生存率. 在食管癌的非手术综合治疗模式中对预后影响较大的因素为临床分期、治疗方式、放疗技术、近期疗效等, 尤其以临床分期影响最大, 这就是说分期早的采取什么方式、何种技术治疗预后都好, 而分期晚的无论采取何种治疗方式、何种放疗技术预后

■应用要点

文章通过研究食管癌根治性放疗的远期疗效, 进一步阐明目前食管癌放疗的疗效状况, 并分析了各亚组的疗效, 探索出了几个影响远期疗效的因素; 从一些层面发现目前制约食管癌治疗预后的问题所在, 并指出今后研究的方向.

同行评论

本文回顾性分析了食管癌根治性放疗的远期疗效,并分析了各亚组的疗效,提出了几个影响远期疗效的因素,是一篇较好的临床经验。

都不太满意。按照万钧提出的近期疗效评价标准^[1],放疗后食管造影及CT显示的近期疗效也是食管癌预后的独立因素,近期疗效好的患者预后明显好于近期疗效差的,这也与常规放疗结果基本一致。这可能提示放疗后近期疗效好的肿瘤对放射线敏感,因而预后较好;反之,近期疗效差的,可能肿瘤对放射线不敏感,放疗抗拒,因而预后也就比较差。如此看来影响食管癌预后的因素主要是由肿瘤患者的内在因素决定,即肿瘤的分期、肿瘤的放射敏感性,肿瘤的分期反映了肿瘤的能否治愈性,而肿瘤的放射敏感性则决定了放疗的效果及可行性,也就是说如果是放射抗拒的肿瘤采用放疗是很难将他治愈的。

虽然通过采用三维适形放射治疗、适形调强放疗等新技术进行食管癌放疗,以及采用了同步放化疗等联合治疗方式,食管癌患者的生存率又有了一些提高。但从目前的文献资料看,长期生存率仍然达不到理想目标,仍然处于一个较低的水平。可见即便采用了目前的标准综合治疗模式,放疗采用了三维适形放射治疗甚至适形调强放射治疗仍然不能到达满意的治疗疗效,这就对目前的标准治疗模式提出了挑战。很可能解决食管癌的治疗方法不在手术,也不在放疗、化疗。如何大幅度提高远期生存率,仍是今后研究努力的主要方向。近年来随着各种分子靶向药物应用于其他的肿瘤治疗,有些已经取得了非常好的疗效,因而食管癌综合治疗中引入分子靶向治疗将成为今后的研究热点,期待进一步大幅度地提高长期生存率。

参考文献

- 1 万均,肖爱勤,高淑珍,郭宝仲,王雅棣,周道安.食管癌放疗后近期疗效评价标准—附1000例分析.中国放射肿瘤学 1989; 3: 205-207
- 2 Mariette C, Balon JM, Piessen G, Fabre S, Van Seuning I, Triboulet JP. Pattern of recurrence following complete resection of esophageal carcinoma and factors predictive of recurrent disease. *Cancer* 2003; 97: 1616-1623
- 3 Fréchette E, Buck DA, Kaplan BJ, Chung TD, Shaw JE, Kachnic LA, Neifeld JP. Esophageal cancer: outcomes of surgery, neoadjuvant chemotherapy, and three-dimension conformal radiotherapy. *J Surg Oncol* 2004; 87: 68-74
- 4 曹秀峰.食管癌新辅助放化疗对手术及生存率的影响.

世界华人消化杂志 2010; 18: 2511-2514

- 5 Cao XF, He XT, Ji L, Xiao J, Lv J. Effects of neoadjuvant radiochemotherapy on pathological staging and prognosis for locally advanced esophageal squamous cell carcinoma. *Dis Esophagus* 2009; 22: 477-481
- 6 Lv J, Cao XF, Zhu B, Ji L, Tao L, Wang DD. Long-term efficacy of perioperative chemoradiotherapy on esophageal squamous cell carcinoma. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 1649-1654
- 7 Delcambre C, Jacob JH, Pottier D, Gignoux M, Ollivier JM, Vie B, Roussel A, Segol P. Localized squamous-cell cancer of the esophagus: retrospective analysis of three treatment schedules. *Radiother Oncol* 2001; 59: 195-201
- 8 刘俊,吕长兴,王家明.同步放化疗治疗不能手术的食管癌临床结果.中华放射肿瘤学杂志 2006; 15: 185-187
- 9 李巧巧,胡永红,刘孟中,刘慧,黄莹,何振宇,林焕新.放疗同期多西紫杉醇和顺铂化疗不能手术食管癌的疗效观察.中华放射治疗学杂志 2009; 18: 379-382
- 10 王澜,高超,李晓宁,韩春,王军,张辛.100例食管癌三维适形放疗疗效分析.中华放射肿瘤学杂志 2009; 18: 175-378
- 11 伊斯刊达尔·阿布力米提,谢姆孜牙·买买提热夏提.食管癌三种放疗方法的疗效分析.中华放射肿瘤学杂志 2010; 19: 216-217
- 12 陈尔成,刘孟忠,胡永红,李巧巧,刘慧,蔡玲,林焕新,黄莹,王汉渝,崔念基.不能手术切除行同期放化疗的食管癌患者预后的多因素分析.癌症 2005; 24: 731-734
- 13 肖泽芬,章众,张红志,戴建荣,梁军,韩伟.用三维治疗计划系统评估食管癌常规放射治疗中肿瘤剂量的分布.中华放射治疗学杂志 2004; 13: 273-277
- 14 Minsky BD, Pajak TF, Ginsberg RJ, Pisansky TM, Martenson J, Komaki R, Okawara G, Rosenthal SA, Kelsen DP. INT 0123 (Radiation Therapy Oncology Group 94-05) phase III trial of combined-modality therapy for esophageal cancer: high-dose versus standard-dose radiation therapy. *J Clin Oncol* 2002; 20: 1167-1174
- 15 赵快乐,施学辉,蒋国梁.提高食管癌的放射治疗剂量是否有益?——食管癌三维适形放疗临床 I / II 期剂量递增试验.中国癌症杂志 2008; 18: 354-357
- 16 Moon S, Kim H, Chie E, Kim J, Park C. Positive impact of radiation dose on disease free survival and locoregional control in postoperative radiotherapy for squamous cell carcinoma of esophagus. *Dis Esophagus* 2009; 22: 298-304
- 17 Morita M, Yoshida R, Ikeda K, Egashira A, Oki E, Sadanaga N, Kakeji Y, Yamanaka T, Maehara Y. Advances in esophageal cancer surgery in Japan: an analysis of 1000 consecutive patients treated at a single institute. *Surgery* 2008; 143: 499-508
- 18 Chao YK, Chan SC, Liu YH, Chen HW, Wan YL, Chang HK, Fan KH, Liu HP. Pretreatment T3-4 stage is an adverse prognostic factor in patients with esophageal squamous cell carcinoma who achieve pathological complete response following preoperative chemoradiotherapy. *Ann Surg* 2009; 249: 392-396

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

替比夫定治疗慢性乙型肝炎疗效的系统评价

杨声坪, 李婧媛, 张鹏, 袁金秋, 刘雅莉

杨声坪, 李婧媛, 张鹏, 袁金秋, 刘雅莉, 兰州大学循证医学中心 兰州大学基础医学院 甘肃省兰州市 730000
杨声坪, 张鹏, 袁金秋, 兰州大学第一临床医学院 甘肃省兰州市 730000
李婧媛, 平凉市人民医院 甘肃省平凉市 744000

作者贡献分布: 杨声坪与刘雅莉课题设计; 张鹏与袁金秋文献筛选; 杨声坪与李婧媛资料提取; 杨声坪与刘雅莉资料处理; 杨声坪与李婧媛论文写作。

通讯作者: 刘雅莉, 讲师, 730000, 甘肃省兰州市东岗西路199号, 兰州大学循证医学中心. lyj2010_06@126.com
电话: 0931-8915076

收稿日期: 2011-04-27 修回日期: 2011-06-21

接受日期: 2011-06-28 在线出版日期: 2011-09-18

Efficacy of telbivudine for chronic hepatitis B: a systematic review

Sheng-Ping Yang, Jing-Yuan Li, Peng Zhang,
Jin-Qiu Yuan, Ya-Li Liu

Sheng-Ping Yang, Jing-Yuan Li, Peng Zhang, Jin-Qiu Yuan, Ya-Li Liu, Center for Evidence-Based Medicine, School of Basic Medical Sciences, Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu Province, China

Sheng-Ping Yang, Peng Zhang, Jin-Qiu Yuan, the First Clinical Medical College of Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu Province, China

Jing-Yuan Li, Pingliang People's Hospital, Pingliang 744000, Gansu Province, China

Correspondence to: Ya-Li Liu, Center for Evidence-Based Medicine, School of Basic Medical Sciences, 199 Donggang West Road, Chengguan District, Lanzhou 730000, Gansu Province, China. lyj2010_06@126.com

Received: 2011-04-27 Revised: 2011-06-21

Accepted: 2011-06-28 Published online: 2011-09-18

Abstract

AIM: To evaluate the efficacy of telbivudine in the treatment of chronic hepatitis B.

METHODS: Based on the principles and methods for Cochrane systematic reviews, we searched the Cochrane Library, PubMed, EMBASE, Chinese Bio-medicine Database, China Journal Full-text Database, VIP database, as well as websites of clinical trial registries and search engine Google. Randomized controlled trials (RCTs) or cross-over trials of telbivudine for chronic hepatitis B were included. We assessed the quality of the included trials according to the Cochrane Handbook for Systematic Reviews of

Interventions Version. The Cochrane Collaboration's software RevMan 5.0 was used for meta-analysis.

RESULTS: Ten RCTs totaling 4 037 patients were included. Compared to HBeAg-positive patients treated with lamivudine, those treated with telbivudine had significantly higher rates of serum HBV DNA undetectable by PCR (RR = 1.50, 95%CI: 1.38, 1.64), ALT normalization (RR = 1.10, 95%CI: 1.05, 1.16), HBeAg loss (RR = 1.23, 95%CI: 1.08-1.40), and HBeAg seroconversion (RR = 1.17, 95%CI: 1.01-1.35). HBeAg-negative patients treated with lamivudine had a lower rate of serum HBV DNA undetectable by PCR (RR = 1.29, 95%CI: 1.12-1.40) than those treated with telbivudine.

CONCLUSION: Current evidence demonstrates that treatment with telbivudine can improve virological response, serological response and biochemical response in patients with chronic hepatitis B compared to lamivudine therapy.

Key Words: Telbivudine; Chronic hepatitis B; Systematic review

Yang SP, Li JY, Zhang P, Yuan JQ, Liu YL. Efficacy of telbivudine for chronic hepatitis B: a systematic review. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(26): 2777-2785

摘要

目的: 系统评价替比夫定(LDT)治疗慢性乙型肝炎(CHB)的治疗效果。

方法: 应用Cochrane系统评价方法计算机检索Cochrane Library(2009年第3期)、PubMed(1966-2009.9)、EMBASE(1974-2009.9)、中国生物医学数据库(CBM, 1978-2009.9)、中国期刊全文数据库(CNKI, 1979-2009.9)和维普数据库(VIP, 1989-2009.9), 同时在临床试验注册网站及Google搜索引擎进行检索, 并追查纳入研究参考文献, 收集以LDT治疗CHB的所有随机对照试验(RCT)和交叉试验。根据Cochrane协作网推荐的“风险

■背景资料

慢性乙型肝炎感染率日趋增高, 国内外公认有效的药物包括干扰素类和核苷(酸)类似物。近年来, 作为后者, 替比夫定已逐渐用于临床并取得一定效果。为了客观评价其疗效和安全性, 本课题从循证医学的角度进行了该研究。

■同行评议者

张占卿, 主任医师, 上海市公共卫生中心; 孙殿兴, 主任医师, 白求恩国际和平医院肝病科

■研究前沿

如何通过药物治疗慢性乙型肝炎,降低感染率和死亡率是临床亟待解决的重要问题。目前针对替比夫定治疗慢性乙肝已进行了大量临床试验研究,但众多临床研究较为零散,当前尚无相关系统评价对其有效性和安全性进行客观评价。

评估工具”进行风险偏倚评估,用RevMan 5.0软件进行统计学分析。

结果:最终纳入10个RCTs,共4 037例患者。7篇LDT对比拉米夫定(LAM)的研究结果显示,对于HBeAg阳性患者,LDT组较LAM组更有效提高血清HBV DNA检测不到率(RR = 1.50, 95%CI: 1.38-1.64)、ALT复常率(RR = 1.10, 95%CI: 1.05-1.16)、HBeAg转阴率(RR = 1.23, 95%CI: 1.08-1.40)和HBeAg血清转换率(RR = 1.17, 95%CI: 1.01-1.35);对于HBeAg阴性患者,LDT组较LAM组更有效提高血清HBV DNA检测不到率(RR = 1.29, 95%CI: 1.12-1.40),两组ALT复常率差异无统计学意义(RR = 1.08, 95%CI: 0.96-1.21)。2篇LDT对比阿德福韦酯以及1篇LDT对比治疗方案不详的常规内科治疗的研究结果均显示LDT组效果优于对照组。

结论:LDT相比其他药物治疗CHB对病毒学应答、血清学应答、生化学应答等方面指标有效,但对于不同疗程的总体效果还需要更为大量的高质量文献提供科学的证据。

关键词:替比夫定;慢性乙型肝炎;系统评价

杨声坪, 李婧媛, 张鹏, 袁金秋, 刘雅莉. 替比夫定治疗慢性乙型肝炎疗效的系统评价. 世界华人消化杂志 2011; 19(26): 2777-2785
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2777.asp>

0 引言

乙型病毒性肝炎(hepatitis B, HB)是由乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)引起的以肝脏损害为主的传染性疾病。全世界约有20亿人感染了该病毒,约有3.5亿人为慢性感染,估计每年有60万人死于急性或慢性乙型肝炎^[1]。据专家估计,目前我国有现患慢性乙肝患者2 000万人^[2]。急性乙型肝炎目前尚无特异治疗方法,对慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB),国内外公认有效的药物包括干扰素类和以拉米夫定(lamivudine, LAM)为代表的核苷(酸)类似物^[3],各种药物各有优缺点。替比夫定(telbivudine, LDT)于2006-10在美国上市,商品名为Tyzeka,并于2007-02以素比夫(Sebivo)为商品名在中国上市^[4]。目前针对LDT治疗CHB的疗效已进行了大量临床试验研究,但众多临床研究较零散,不便于临床应用,本研究通过系统评价相关临床试验,探讨LDT对CHB的治疗效果,以供临床医生参考。

1 材料和方法

1.1 材料以“Hepatitis B”、“HB”、“Telbivudine”、“Tyzeka”、“Sebivo”为主要检索词检索Cochrane Library(2009年第3期)、EMBASE(1974/2009-09)和PubMed(1966/2009-09),以“乙肝”、“乙型肝炎”、“替比夫定”、“素比夫”和“素比伏”为主要检索词检索中国生物医学数据库(CBM, 1978/2009-09)、中国期刊全文数据库(CNKI, 1979/2009-09)和维普数据库(VIP, 1989/2009-09),根据不同数据库特点采取相应主题词检索与自由词检索结合方式进行检索。同时在临床试验注册网站及Google搜索引擎进行检索,并追查纳入研究参考文献。文献检索无语种限制,收集LDT治疗CHB的所有随机对照试验(Randomized controlled trials, RCT)和交叉试验。

1.2 方法

1.2.1 纳入标准和排除标准:LDT治疗CHB的RCT或交叉试验。CHB患者,性别、年龄、种族不限。诊断标准^[3]:有乙型肝炎或HBsAg阳性史超过6 mo,现HBsAg和/或HBV DNA仍为阳性者。具有以下任意一条的患者将被排除:(1)合并或重复感染其他肝炎病毒和/或人类免疫缺陷病毒(HIV);(2)合并严重失代偿性肝病和/或肝细胞癌的患者;(3)其他原发、继发病因导致的肝脏疾病。

1.2.2 分组和干预措施:试验组为LDT,对照组分别为接受安慰剂、不治疗、非特异性保肝治疗或LAM、阿德福韦酯(adeфовir, ADV)、恩替卡韦等常规药物治疗。LDT+安慰剂对照常规药物+安慰剂的随机试验也被纳入。

1.2.3 结局测量指标:主要测量指标:血清HBV DNA检测不到率(PCR法)、ALT复常率。次要测量指标:HBeAg转阴率、血清HBeAg血清学转换率、血清HBV DNA自基线下降水平、不良反应。

1.2.4 方法学质量评价与资料提取:两名评价员独立完成文献筛选、资料提取和方法学质量评价并交叉核对,如遇分歧通过讨论或根据第三位研究人员的意见协商解决。遇信息不全研究通过电话或E-mail与作者联系予以补充。采用Cochrane协作网推荐的“风险评估工具”进行风险偏倚评估,其中RCT偏倚风险评估内容如下:(1)随机方法是否正确;(2)是否做到隐蔽分组、方法是否正确;(3)是否采用盲法;(4)有无失访或退出,如有失访或退出时,原因是否描述清楚,是否采用ITT分析法;(5)选择性报告研究结

表 1 纳入试验基本情况

研究者	n(试验组/对照组)		年龄(岁)				性别(男/女)				随访 干预措施 时间 (wk)		备注
			试验组		对照组		试验组		对照组				
	HBeAg	HBeAg	HBeAg	HBeAg	HBeAg	HBeAg	HBeAg	HBeAg	HBeAg	HBeAg			
	阳性	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性			
Liaw等 ^[5]	458/463	222/224	32	43	33	43	333/125	174/48	331/112	177/47	(1)	104	临床Ⅲ期
Lai等 ^[6]	458/463	222/224	32	43	33	43	333/125	174/48	351/112	177/47	(1)	52	试验 临床Ⅲ期
Lai等 ^[7]	44/19	—	22	—	34	—	35/9	—	15/4	—	(2)	52	试验 临床Ⅱ期
Hou等 ^[8]	147/143	20/22	28	38	29	36	118/29	17/3	107/36	19/3	(1)	52	
Safadi等 ^[9]	81/81	41/43	36		37		87/35		95/29		(1)	24	临床Ⅲ b 期试验
Chan等 ^[10]	24W:45/89	—	A:34, B:30,		—		A: 35/10, B:		—		(3)(4)	24/52	
	52W:43/42		C:33				40/4, C: 27/19						
钟旬华等 ^[11]	60/60	60/60	29 ±	41 ±	30 ±	42 ± 9.5	42/19(6)	38/22	40/20	34/26	(1)	52	
			8.2	10.1	8.5								
汤东澄等 ^[12]	56/52	29/27	—	—	—	—	—	—	—	—	(1)	48	
潘建华等 ^[13]	40/40	—	31 ±	—	33 ± 13	—	36/4	—	34/6	—	(3)	4/8/12/ 24/48	
			12										
邱绍勤等 ^[14]	21/9	20/10	41.45 ± 10.98				48/12				(5)	52	

(1)LDT常规剂量(600 mg/d)与LAM(100 mg/d) 的比较; (2)不同剂量LDT(400, 600 mg/d)与LAM(100 mg/d)的比较; (3)LDT常规剂量(600 mg/d)与ADV(10 mg/d)的对比; (4)试验分为ABC三组, 前24wk A组以LDT治疗, BC组以ADV治疗, 24wk以后, AB组维持原方案, C组改为LDT治疗; (5)LDT常规剂量(600 mg/d)对照传统内科治疗(具体方案不详); (6)原文报道有误, 其报道该组总人数60人, 男/女为42/19。

果; (6)是否存在其他潜在偏倚。每条标准依研究具体情况按“是”、“否”、“不清楚”进行评价。

统计学处理 采用Cochrane协作网提供的RevMan 5.0软件进行Meta分析, 计数资料用相对危险度(RR)作为疗效效应量, 计量资料采用均数差(MD)、标准均数差(SMD)作为疗效效应量, 二者均以95%CI表示。首先分析纳入研究的人群, 药物使用剂量等影响临床异质性因素, 按照临床同质性和方法学同质性对各研究进行亚组分析或敏感性分析; 然后采用 χ^2 检验分析亚组内的统计学异质性, 若亚组间无异质性($P>0.10$, $I^2\leq 50\%$)采用固定效应模型进行Meta分析; 若存在异质性($P\leq 0.10$, $I^2>50\%$), 则首先分析异质性原因, 确定是否能采用随机效应模型进行Meta分析。若研究间存在明显的临床异质性, 则不进行合并, 只对其进行描述性分析。

2 结果

2.1 文献检索 初检出151篇文献, 经阅读文题及摘要, 排除重复及非临床试验文献, 初筛纳入21篇, 进一步阅读全文, 排除干预措施、测量

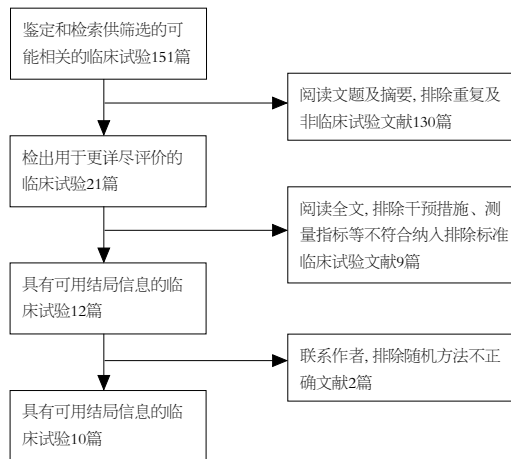


图 1 文献筛选流程图。

指标等不符合纳入排除标准临床试验文献, 初步纳入12篇^[5-16], 对信息报告不清楚者与作者联系予以补充。电话联系到两名作者^[15,16], 核实其随机方法不正确排除, 其他作者均未取得联系, 最终纳入10个RCTs, 未纳入交叉试验(图1)。其中英文6篇, 中文4篇(表1)。有两个研究^[9,10]通过临床试验注册平台进行注册(注册号分别为: NCT00115245、NCT00131742)。

■ 相关报道

近几年来国外的研究显示, 替比夫定治疗慢性乙型肝炎有较好的疗效, 显示出良好的应用前景。但也有研究表明替比夫定治疗方案成本效益低于其他药物。

■应用要点

本项目旨在系统评价替比夫定治疗慢性乙肝的有效性及安全性,为临床医师在治疗慢性乙肝的药物选择提供客观依据。

表 2 纳入研究方法学质量

研究者	随机方法	隐蔽分组	盲法	不完整资料	选择性报告偏倚	其他偏倚来源
Liaw等 ^[5]	是(中心电话随机系统)	是	是(双盲)	是	否	不清楚
Lai等 ^[6]	是(中心电话随机系统)	是	是(双盲)	是	否	不清楚
Lai等 ^[7]	不清楚	不清楚	是(双盲)	是	否	不清楚
Hou等 ^[8]	是(互动式语音应答系统)	是	是(双盲)	不清楚	否	不清楚
Safadi等 ^[9]	不清楚	不清楚	是(双盲)	不清楚	不清楚	不清楚
Chan等 ^[10]	是(中心电话随机系统)	是	是	是	否	不清楚
钟旬华等 ^[11]	不清楚	不清楚	不清楚	是	否	不清楚
汤东澄等 ^[12]	不清楚	不清楚	不清楚	不清楚	否	不清楚
潘建华等 ^[13]	不清楚	不清楚	不清楚	不清楚	否	不清楚
邱绍勤等 ^[14]	不清楚	不清楚	不清楚	不清楚	否	不清楚

是: 表示低度偏倚风险; 否: 表示高度偏倚风险; 不清楚: 表示偏倚风险判断不清楚。

表 3 LDT组与LAM组对比其HBV DNA检测不到率结果

HBeAg	疗程(wk)	纳入研究数	LDT组/LAM组(<i>n</i>)	<i>P</i> 值, <i>I</i> ² 值	DNA转阴率(LDT组/LAM组)	RR值(95%CI)
阳性	48	1个 ^[12]	56/52	—	60.71%/40.38%	1.50(1.02, 2.22)
	52	4个 ^[6-8,11]	709/685	0.45, 0%	62.34%/40.58%	1.54(1.38, 1.72)
	104	1个 ^[5]	458/463	—	55.60%/55.60%	1.45(1.26, 1.67)
	总疗程	6个	1 223/1 200	0.70, 0%	59.77%/39.75%	1.50(1.38, 1.64)
	敏感性分析	3个 ^[5,6,8]	1 063/1 069	0.36, 1%	59.08%/39.20%	1.51(1.38, 1.65)
阴性	48	1个 ^[12]	29/27	—	差异无统计学意义	0.99(0.66, 1.48)
	52	3个 ^[6,8,11]	302/306	0.59, 0%	86.09%/69.28%	1.24(1.14, 1.36)
	104	1个 ^[5]	222/224	—	82.00%/56.70%	1.45(1.27, 1.65)
	总疗程	5个	553/557	0.15, 41%	83.18%/63.91%	1.30(1.21, 1.40)
	敏感性分析	3个 ^[5,6,8]	464/470	0.08, 61%	85.13%/64.68% ¹	1.29(1.12, 1.48) ¹

¹随机效应模型。

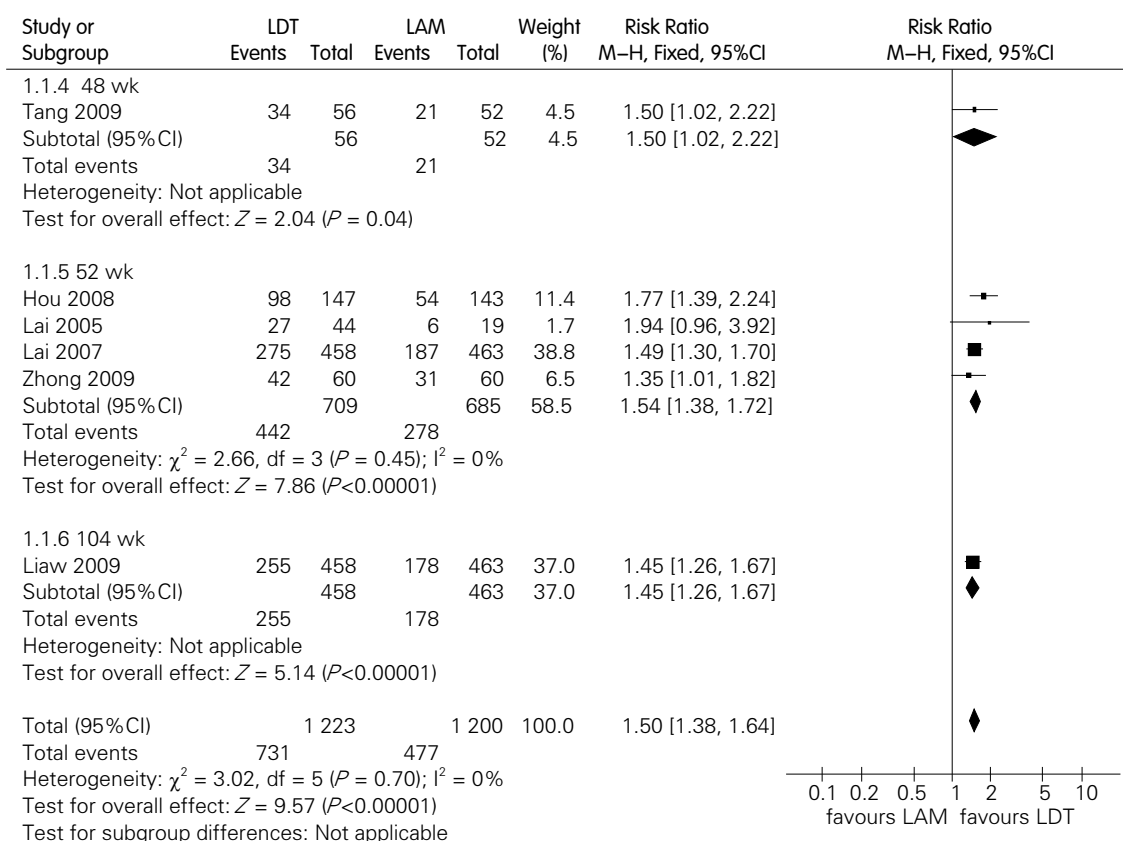
2.2 文献质量 本系统评价依据Cochrane handbook风险偏倚评估工具对纳入研究进行风险偏倚评估,纳入研究存在不同程度的偏倚风险。纳入研究中随机分组方法仅在4个研究中详尽报道,大部分研究未对隐蔽分组方法进行描述(表2)。

2.3 研究 纳入研究中,除一个研究^[14]为LDT与具体方案不详的传统内科治疗对照外,均为LDT与LAM或ADV效果比较,纳入研究中无LDT对比安慰剂、不治疗、非特异性保肝治疗或其他常规药物的效果比较。根据LDT对比不同药物、研究对象HBeAg情况以及不同结局测量指标对纳入的研究进行分析。共纳入7个LDT对比LAM的研究^[5-9,11,12]。

7个研究均报道了血清HBV DNA检测不到率,其中Safadi等^[9]未对HBeAg阳性和阴性分别报道,其对24 wk疗效研究结果显示两组差异无统计学意义(RR = 1.31, 95%CI: 0.93, 1.85); 6个

研究报道了HBeAg阳性患者结果; 5个研究报道了HBeAg阴性患者结果。各研究间无统计学异质性,合并后Mata分析结果显示对于HBeAg阳性患者和HBeAg阴性患者, LDT组的HBV DNA检测不到率均高于LAM组(图2, 3)。将方法学质量较低的研究排除^[7,11,12],进行敏感性分析,对3个质量较高的研究进行合并,合并后结果显示对于HBeAg阳性患者和HBeAg阴性患者, LDT组的HBV DNA检测不到率均高于LAM组(表3)。敏感性分析结果表明,纳入3个方法学质量较低的研究并未对结果产生较大影响。

6个研究报道了ALT复常率,其中6个研究报道了HBeAg阳性患者结果; 5个研究报道了HBeAg阴性患者结果。不同研究间无统计学异质性, Mata分析结果显示对于HBeAg阳性患者LDT组ALT复常率高于LAM组(图4),对于HBeAg阴性患者LDT组ALT复常率与LAM组相



■同行评价

替比夫定和拉米夫定是目前临床上常用的抗乙型肝炎病毒药物, 对已有的文献资料进行Meta分析很有意义, 本研究提供了有意义的信息, 研究具有新颖性。

图 2 LDT组与LAM组对比其HBV DNA检测不到率的Meta分析(HBeAg阳性患者)。

表 4 LDT组与LAM组对比其ALT复常率结果

HBeAg	疗程(wk)	纳入研究数	LDT组/LAM组(n)	P值, I ² 值	DNA转阴率(LDT组/LAM组)	RR值(95%CI)
阳性	48	1个 ^[12]	56/52	—	87.50%/71.15%	1.23, (1.01, 1.50)
	52	4个 ^[6-8,11]	709/685	0.14, 44%	80.67%/74.60%	1.08, (1.02, 1.14)
	104	1个 ^[5]	458/463	—	69.50%/61.70%	1.12, (1.02, 1.23)
	总疗程	6个	1 223/1 200	0.22, 30%	76.42%/69.60%	1.10, (1.05, 1.16)
阴性	48	1个 ^[12]	29/27	—	差异无统计学意义	1.03, (0.74, 1.43)
	52	3个 ^[6,8,11]	302/306	0.01, 77%	差异无统计学意义	1.09, (0.90, 1.33) ¹
	104	1个 ^[5]	222/224	—	差异无统计学意义	1.11, (1.00, 1.24)
	总疗程	5个	553/557	0.04, 60%	差异无统计学意义	1.08, (0.96, 1.21) ¹

¹随机效应模型。

当(图5, 表4)。

7个研究均报道了HBeAg转阴率。4个研究^[6-8,11]报道了52 wk疗效, 结果显示LDT组高于LAM组, 各有1个研究报道了24 wk^[9]、48 wk^[12]、104 wk疗效^[5], 结果均显示两组差异无统计学意义。研究试验间无统计学异质性($P = 0.58$, $I^2 = 0\%$), 合并后结果显示LDT组(31.23%)高于LAM组(25.33%), 差异有统计学意义($RR = 1.23$, $95\%CI: 1.08, 1.40$)。

6个研究报道了HBeAg血清转换率。1个研

究^[12]报道了48 wk疗效, 4个研究^[6-8,11]报道了52 wk疗效, 结果均显示两组差异无统计学意义; 1个研究^[5]报道了104 wk疗效, 结果显示LDT组高于LAM组。研究试验间无统计学异质性($P = 0.79$, $I^2 = 0\%$), 合并后结果显示LDT组(26.00%)高于LAM组(22.17%), 差异有统计学意义($RR = 1.17$, $95\%CI: 1.01, 1.35$)。

6个研究^[6-9,11,12]报道了血清HBV DNA自基线下降水平。结果均显示LDT组效果优于LAM组, 但除Safadi等^[9]同时报道MD和SMD外, 其他研究

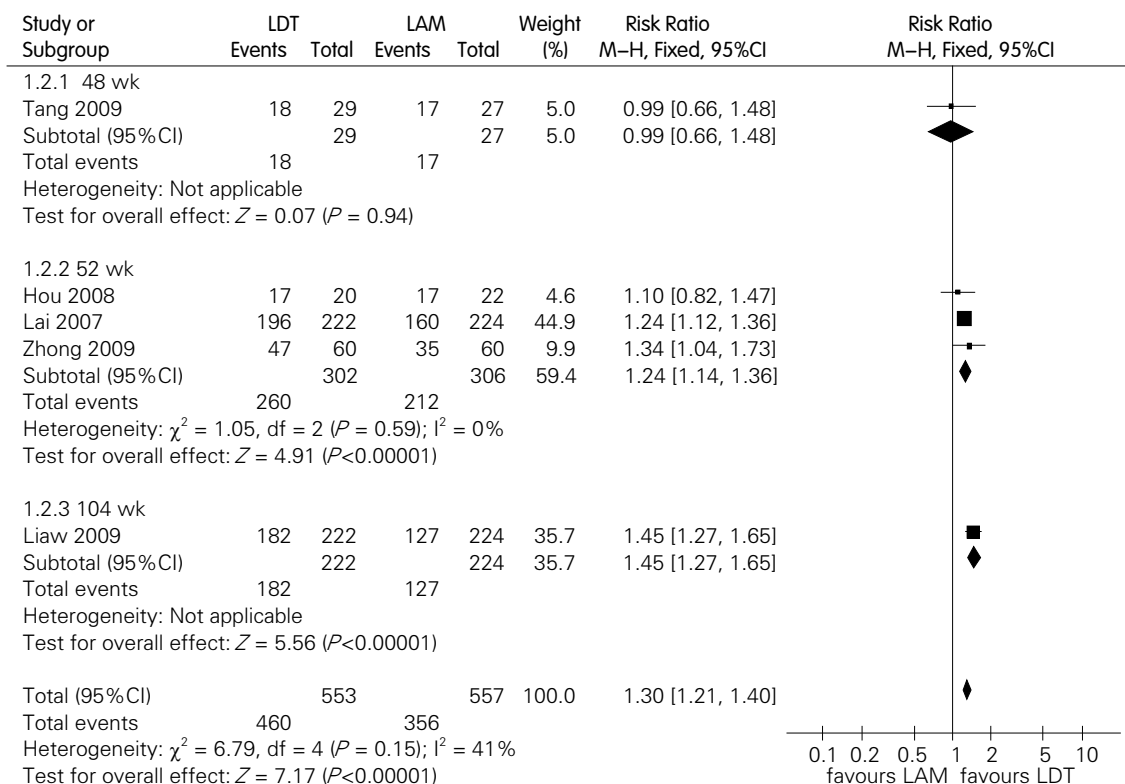


图 3 LDT组与LAM组对比其HBV DNA检测不到率的Meta分析(HBeAg阴性患者)。

表 5 LDT组与ADV组治疗效果比较

指标	时间(wk)	结果	RR值	95%CI	纳入研究
HBV DNA检测	4	=	2.00	0.19, 21.18	潘建华等 ^[13]
不到率(PCR法)	8	=	1.50	0.26, 8.50	潘建华等
	12	=	2.00	0.65, 6.11	潘建华等
	24	>	2.45	1.56, 3.85	潘建华等/ Henry等 ^[10]
		$P = 0.36, I^2 = 0\%$			
	48	>	1.59	1.04, 2.42	潘建华等
	52	=	1.49	0.96, 2.32	Henry等
ALT复常率	4	=	1.63	0.76, 3.49	潘建华等
	8	=	1.38	0.79, 2.43	潘建华等
	12	=	1.35	0.86, 2.12	潘建华等
	24	=	1.04	0.43, 1.29	潘建华等/ Henry等
		$P = 0.37, I^2 = 0\%$			
	48	=	1.14	0.89, 1.48	潘建华等
	52	=	0.92	0.76, 1.12	Henry等
HBeAg转阴率	4	=	3.00	0.13, 71.51	潘建华等
	8	=	1.67	0.43, 6.51	潘建华等
	12	=	2.00	0.65, 6.11	潘建华等
	24	=	1.55	0.85, 2.84	潘建华等/ Henry等
		$P = 0.73, I^2 = 0\%$			
	48	=	1.89	0.96, 3.72	潘建华等
	52	=	1.41	1.68, 2.94	Henry等
HBeAg血清转换率	24	=	0.76	0.31, 1.85	Henry等
	52	=	1.47	0.67, 3.22	Henry等

=: 两组差异无统计学意义; >: 试验组高于对照组; <: 试验组低于对照组。

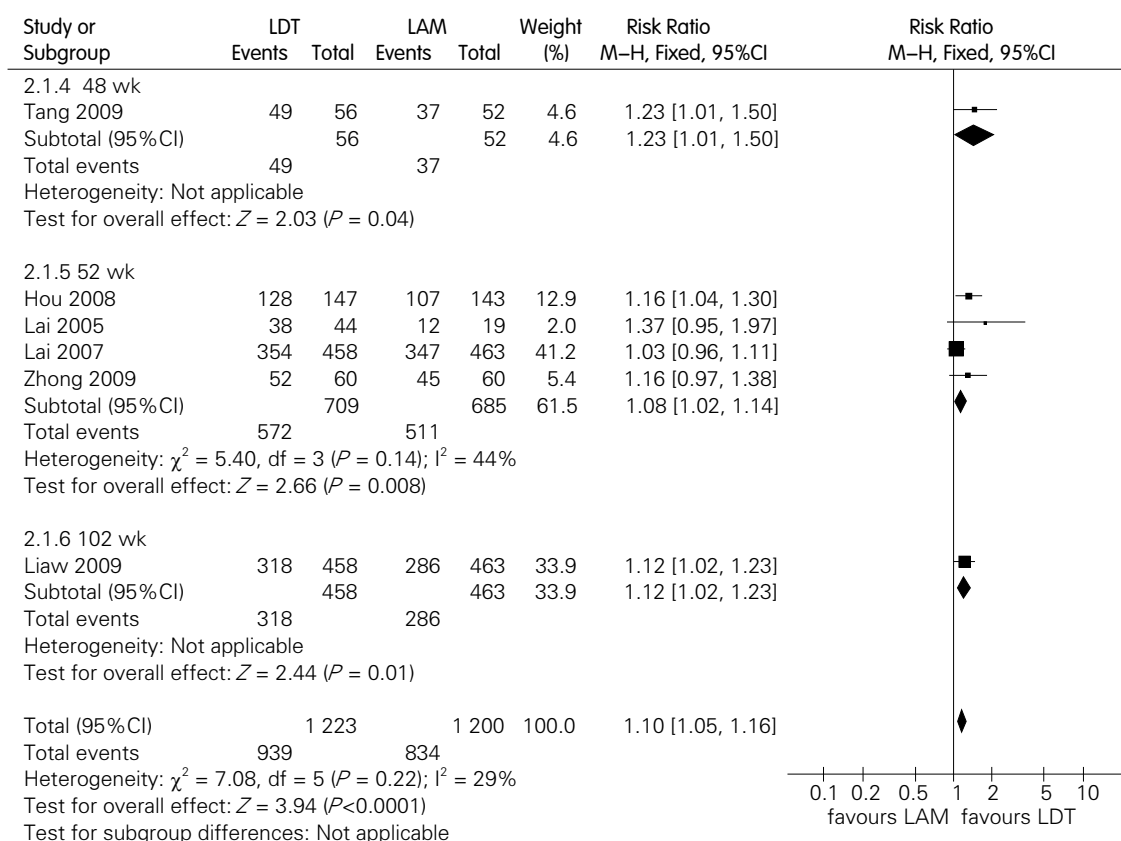


图 4 LDT组与LAM组对比其ALT复常率的Meta分析(HBeAg阳性患者).

表 6 LDT组与常规内科治疗组治疗效果比较

指标	时间(wk)	结果	RR值	95%CI
血清HBV DNA检测	2	>	19.00	1.16, 312.42
不到率(PCR法)	4	>	24.00	3.47, 166.23
	12	>	8.33	2.81, 24.67
HBeAg血清转换率	4	=	1.36	0.06, 30.64
	12	=	0.43	0.03, 312.42

=: 两组差异无统计学意义; >: 试验组高于对照组; <: 试验组低于对照组.

均只报道MD, 故本研究未对其进行Meta分析.

共纳入2个LDT对比ADV研究, 两研究均未纳入HBeAg阴性患者. Chan等^[10]同时报道了24 wk和52 wk的血清HBV DNA检测不到率(PCR法)、ALT复常率、HBeAg转阴率、HBeAg血清转换率和血清HBV DNA自基线下降水平等五个指标的疗效, 该试验分为ABC 3组, 前24 wk A组以LDT治疗, BC组以ADV治疗, 24 wk以后, AB组维持原方案, C组改为LDT治疗, 考虑24 wk后C组未经洗脱期就改用药物存在一定偏倚, 且该组LDT 28 wk的疗程于其他组用药52 wk疗程可比性较小, 故对于该试验C组, 只纳入第一阶段数据, 未对第二阶段数据纳入分析; 潘建华

等^[13]同时报道了4、8、12、24和48 wk的血清HBV DNA检测不到率(PCR法)、ALT复常率、HBeAg转阴率和血清HBV DNA自基线下降水平等4个指标的疗效.

Chan等^[10]报道了血清HBV DNA自基线下降水平24 wk的MD、SMD和52 wk的MD, 潘建华等^[13]报道了48 wk的MD, 其结果均显示LDT组效果优于ADV组, 本研究未对其进行Meta分析(表5).

纳入1个^[14] LDT对比常规内科治疗(具体治疗方案不详)研究, 其报道了2、4和12 wk的血清HBV DNA检测不到率(PCR法)和HBeAg血清转换率两个指标的疗效(表6).

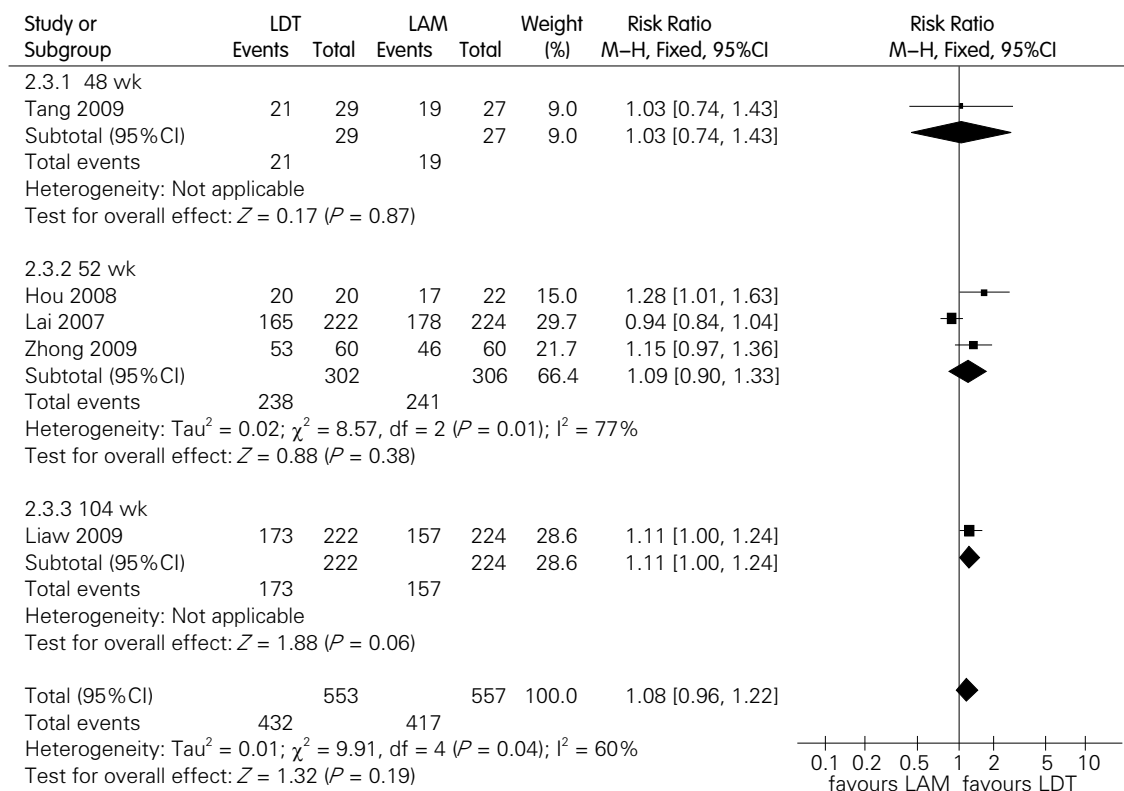


图5 LDT组与LAM组对比其ALT复常率的Meta分析(HBeAg阴性患者)。

2.4 安全性 所有研究均报道LDT的不良反应, 邱绍勤等^[11]的研究报道未发生不良反应, 其他研究均报道发生不良反应, 但各个研究不良反应的统计方法及结果差异较大, 故未能进行Meta分析。主要的不良反应为上呼吸道感染、咳嗽、疲劳、头痛头晕; 其他如鼻咽炎、背疼、流感、上腹部疼痛、腹泻、恶心、咽喉疼痛、关节痛、胃炎口腔溃疡、消化不良、皮疹、胃肠道不适等均较少发生, 实验室检查可见ALT、AST、CK、血淀粉酶、BUN等异常。此外, 欧盟人用药品委员会经过2年的临床试验, 认为LDT有引起外周神经病的危险^[17]。

3 讨论

本研究基于国内外RCT对LDT治疗CHB的有效性和安全性进行定量分析。LDT对比LAM的研究结果显示, 对于HBeAg阳性患者, LDT组的血清HBV DNA检测不到率、ALT复常率、HBeAg转阴率和HBeAg血清转换率均高于LAM组; 对于HBeAg阴性患者, 血清HBV DNA检测不到率高于LAM组, ALT复常率与LAM组差异无统计学意义。LDT对比ADV仅纳入2个研究, 且方法学质量偏低, 此外, 考虑对同一研究不同报道时间点疗效的合并可能导致重复计算样本量而影

响结果, 故未对其进行合并分析。

本研究共纳入10个研究, 大多数研究方法学存在局限性。其中, 4个研究^[5,6,9,10]为充分随机, 其他6个研究^[6,8,11-14]未描述随机分配方法。4个研究^[5,6,9,10]实施了正确的隐蔽分组, 6个研究^[6,8,11-14]隐蔽分组方法不清楚, 提示纳入试验存在选择性偏倚的可能。6个研究采用盲法^[5-10], 除Chan等^[9]等描述对观察者施盲外, 其余均只描述“双盲”, 未报告其施盲对象, 多认为可能是对患者和医生施盲; 4个研究^[11-14]未报道是否实施盲法, 纳入试验不能确定是否存在实施偏倚。5个研究^[5,7-9,11]报道失访并采取了ITT分析, 5个研究^[6,10,12-14]未报道失访情况, 不排除存在减员偏倚的可能。9个研究^[1,3-14]一个或多个测量指标报告不完整, 1个研究^[6]是否选择性报告研究结果不清楚。所有研究均不清楚是否存在其他偏倚。

本研究存在一定局限性: (1)本系统评价纳入研究多采用实验室检测指标, 未报告与患者生存质量密切相关的终点指标报道, 因此该治疗方法是否能改善患者生活质量尚需进一步研究; (2)纳入研究方法学质量一般, 尤其中文研究对随机方法、隐蔽分组描述多不清晰, 影响读者对其真实性的判断; (3)入选的治疗疗程尚未统一, 虽然进行亚组分析, 但仍可能存在不同程

度的偏倚和混杂因素,但由于纳入研究用药时间不同,因此,无法进行整体效果分析;(4)纳入研究中只纳入LDT对比LAM、ADV等药物治疗效果比较,无符合纳入标准的LDT对比其他药物的治疗效果比较研究。此外本研究未对各种治疗方案成本效益进行分析,有研究表明LAM治疗方案成本效益优于LDT^[18];(5)本研究未进行发表偏倚评估,不排除存在发表偏倚的可能。

今后的临床研究应该注意以下几点:(1)开展设计严格的长期随访的大样本RCT,以终点指标结合实验室检测指标进行临床疗效的评价;(2)注重LDT对CHB的短期和长期疗效的研究,并统一报道的疗程,建议报告12、52和104 wk的随访结果;(3)明确随机分配序列产生的原则和方法并严格执行,对随机方案做到有效的隐藏,提高试验方法学质量;(4)严格按照CONSORT声明2010版^[19]对RCT进行全面、客观报告,提高报告质量。

目前证据表明,LDT治疗CHB对病毒学应答、血清学应答、生化学应答有效,但对于不同疗程的总体效果还需要更为大量的高质量文献提供科学的证据。

4 参考文献

- 1 世界卫生组织. EB/OL. 2009-09. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/zh/index.html>
- 2 中华人民共和国卫生部. 2006年-2010年全国乙型肝炎病毒性肝炎防治规划. 中国实用乡村医生杂志 2006; 13: 1-4
- 3 中华医学会肝病学分会, 中华医学会感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南. 中华流行病学杂志 2006; 27: 79-88
- 4 刘晓东, 胡春. 替比夫定(telbivudine). 中国药物化学杂志 2007; 17: 335
- 5 Liaw YF, Gane E, Leung N, Zeuzem S, Wang Y, Lai CL, Heathcote EJ, Manns M, Bzowej N, Niu J, Han SH, Hwang SG, Cakaloglu Y, Tong MJ, Papatheodoridis G, Chen Y, Brown NA, Albanis E, Galil K, Naoumov NV. 2-Year GLOBE trial results: telbivudine is superior to lamivudine in patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 2009; 136: 486-495
- 6 Lai CL, Leung N, Teo EK, Tong M, Wong F, Hann HW, Han S, Poynard T, Myers M, Chao G, Lloyd D, Brown NA. A 1-year trial of telbivudine, lamivudine, and the combination in patients with hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 2005; 129: 528-536
- 7 Lai CL, Gane E, Liaw YF, Hsu CW, Thongsawat S, Wang Y, Chen Y, Heathcote EJ, Rasenack J, Bzowej N, Naoumov NV, Di Bisceglie AM, Zeuzem S, Moon YM, Goodman Z, Chao G, Constance BF, Brown NA. Telbivudine versus lamivudine in patients with chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2007; 357: 2576-2588
- 8 Hou J, Yin YK, Xu D, Tan D, Niu J, Zhou X, Wang Y, Zhu L, He Y, Ren H, Wan M, Chen C, Wu S, Chen Y, Xu J, Wang Q, Wei L, Chao G, Constance BF, Harb G, Brown NA, Jia J. Telbivudine versus lamivudine in Chinese patients with chronic hepatitis B: Results at 1 year of a randomized, double-blind trial. *Hepatology* 2008; 47: 447-454
- 9 Safadi R, Xie Q, Chen Y, Yin YK, Wei L, Hwang SG, Zuckerman E, Tia JD, Harb G, Brown NA. A randomized trial of switching to telbivudine versus continued lamivudine in adults with chronic hepatitis B: results of the primary analysis at week 24. *J Hepatol* 2007; 46: S196
- 10 Chan HL, Heathcote EJ, Marcellin P, Lai CL, Cho M, Moon YM, Chao YC, Myers RP, Minuk GY, Jeffers L, Sievert W, Bzowej N, Harb G, Kaiser R, Qiao XJ, Brown NA. Treatment of hepatitis B e antigen positive chronic hepatitis with telbivudine or adefovir: a randomized trial. *Ann Intern Med* 2007; 147: 745-754
- 11 钟旬华, 刘艳, 许诚, 徐六妹, 王敏, 李美忠. 替比夫定与拉米夫定治疗慢性乙型肝炎临床疗效比较研究. 中西医结合肝病杂志 2009; 19: 19-21
- 12 汤东澄, 谢冬梅, 徐娟娟, 何俊毅, 姚立红, 杨壮智, 李永丰. 替比夫定治疗慢性乙型肝炎的临床研究. 浙江中医药大学学报 2009; 33: 214-215
- 13 潘建华, 陈怡平. 替比夫定治疗HBeAg阳性慢性乙型肝炎患者40例. 中国医疗前沿 2008; 3: 22-23
- 14 邱绍勤, 李文勇, 彭秋萍, 钱宜丹, 王淑平, 明全, 黎春宇. 替比夫定治疗慢性乙型肝炎的近期疗效观察. 临床肝胆病杂志 2009; 25: 190-191
- 15 林丹, 尹德辉. 替比夫定治疗慢性乙型肝炎45例. 中西医结合肝病杂志 2009; 19: 113-114
- 16 张继红, 郭西萍, 刘祖明, 钟基大, 冯红平, 刘彦威, 王婉, 姜雪强. 替比夫定治疗慢性乙型肝炎近期疗效观察. 中西医结合肝病杂志 2008; 18: 246-247
- 17 国家食品药品监督管理局. 药物警戒快讯EB/OL. 2009-09. <http://www.sda.gov.cn/WS01/CL0389/29742.html>
- 18 杜佳梅, 刘畅. 优化慢性乙肝患者治疗-葛兰素史克公司2010 APASL会议卫星会报道. 中国医学论坛报 2010: D4
- 19 Schulz KF, Altman DG, Moher D. CONSORT 2010 statement: Updated guidelines for reporting parallel group randomised trials. *J Pharmacol Pharmacother* 2010; 1: 100-107

编辑 李军亮 电编 何基才

ERCP联合胆道微结石检测对明确特发性急性胰腺炎病因的价值

叶小峰, 张中平, 张丽霞, 刘鹏军, 丁红英

■背景资料

临床上约10%-30%的急性胰腺炎(AP)患者, 虽经临床和相关实验室及影像学检查仍不能明确病因, 常诊断为不明原因急性胰腺炎或特发性急性胰腺炎(IAP)。由于病因不明, 仅以对症治疗, 导致反复发作或延误病情。因此, 只有明确了IAP的病因, 才能进行合理治疗或达到根治病因, 预防复发效果。

叶小峰, 张中平, 张丽霞, 刘鹏军, 丁红英, 江苏大学附属武进人民医院消化内科 江苏省常州市 213000

作者贡献分布: 叶小峰与张中平提出课题设计; 研究过程由叶小峰、张丽霞、刘鹏军及丁红英操作完成; 数据分析由叶小峰与张丽霞完成; 写作由叶小峰完成。

通讯作者: 叶小峰, 213000, 江苏省常州市, 江苏大学附属武进人民医院消化内科, yxf_doc@126.com

收稿日期: 2011-04-27 修回日期: 2011-06-21

接受日期: 2011-06-28 在线出版日期: 2011-09-18

ERCP combined with detection of biliary microlithiasis in the diagnosis of idiopathic acute pancreatitis

Xiao-Feng Ye, Zhong-Ping Zhang, Li-Xia Zhang, Peng-Jun Liu, Hong-Ying Ding

Xiao-Feng Ye, Zhong-Ping Zhang, Li-Xia Zhang, Peng-Jun Liu, Hong-Ying Ding, Department of Gastroenterology, Changzhou Wujing Renming Hospital, School of Medicine, Jiangsu University, Changzhou 213000, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Xiao-Feng Ye, Department of Gastroenterology, Changzhou Wujing Renming Hospital, School of Medicine, Jiangsu University, Changzhou 213000, Jiangsu Province, China. yxf_doc@126.com

Received: 2011-04-27 Revised: 2011-06-21

Accepted: 2011-06-28 Published online: 2011-09-18

Abstract

AIM: To evaluate the diagnostic value of ERCP combined with detection of biliary microlithiasis for idiopathic acute pancreatitis (IAP).

METHODS: A total of 105 patients who were diagnosed with acute pancreatitis (AP) from January 2008 to January 2011 were included in this study. Forty-two patients with IAP, in whom no cause can be found after conventional imaging examinations, received diagnostic ERCP. For each patient, five milliliter of bile was collected and examined under a polarized light microscope immediately to detect biliary microlithiasis. Ninety AP patients were used as controls.

RESULTS: The diagnostic accuracy of conventional imaging examinations for the cause of

AP was 55.5% (50/90), while that of ERCP combined with biliary microlithiasis examination was 87.5% (93/105), with a significant difference between the two groups ($P < 0.05$). ERCP combined with detection of biliary microlithiasis had a higher accuracy in the diagnosis of IAP.

CONCLUSION: ERCP combined with detection of biliary microlithiasis can improve the accuracy of diagnosis of IAP.

Key Words: Idiopathic pancreatitis; Endoscopic retrograde cholangiopancreatography; Biliary microlithiasis

Ye XF, Zhang ZP, Zhang LX, Liu PJ, Ding HY. ERCP combined with detection of biliary microlithiasis in the diagnosis of idiopathic acute pancreatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(26): 2786-2789

摘要

目的: 探讨内镜逆行胰胆管造影(endoscopic retrograde cholangiopancreatography, ERCP)联合胆道微结石检测对特发性急性胰腺炎(idiopathic pancreatitis, IAP)病因的诊断价值。

方法: 以2008-01/2011-01急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)患者105例为研究对象, 选择影像学(CT、B超、MRCP)检查后不能明确病因的特发性急性胰腺炎患者42例进行诊断性ERCP检查, 同时收集胆汁5 mL行胆道微结石监测。以2005-01/2008-01 AP患者90例为对照组, 应用SPSS13.0统计软件统计, 取 $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

结果: 对照组对AP病因确诊率为55.5%(50/90), 联合检查组对AP的病因确诊率为87.5%(93/105), 差异有统计学意义($P < 0.05$), ERCP联合胆道微结石检测对IAP病因有较高的确诊率。

结论: ERCP联合胆道微结石检测对明确IAP病因有重要价值。

关键词: 特发性胰腺炎; 磁共振胆胰管成像; 内镜逆

■同行评议者

谭晓冬, 副教授, 中国医科大学盛京医院胰腺甲状腺外科; 王德盛, 副教授, 中国人民解放军第四军医大学西京医院肝胆外科

行胰胆管造影; 胆道微结石

叶小峰, 张中平, 张丽霞, 刘鹏军, 丁红英. ERCP联合胆道微结石检测对明确特发性急性胰腺炎病因的价值. 世界华人消化杂志 2011; 19(26): 2786–2789
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2786.asp>

0 引言

临床上约10%-30%的急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)患者, 虽经临床和相关实验室及影像学检查仍不能明确病因, 常诊断为不明原因急性胰腺炎或特发性急性胰腺炎(idiopathic acute pancreatitis, IAP)^[1]. 由于病因不明, 仅以对症治疗, 导致反复发作或延误病情. 因此, 只有明确了IAP的病因, 才能进行合理治疗或达到根治病因, 预防复发效果. 从2008-01开始我科对IAP患者行内镜逆行胰胆管造影(endoscopic retrograde cholangiopancreatography, ERCP)联合胆道微结石(bile microlithiasis, BML)检测, 以探讨ERCP联合BML检测对明确IAP病因的诊断价值.

1 材料和方法

1.1 材料 回顾性分析我院2005-01/2008-01常州市武进人民医院消化内科AP患者90例, 其中男57例, 女33例, 平均年龄(59.00±14.48)岁, 设定为常规检查组即对照组; 同时选自我院2008-01/2011-01常州市武进人民医院消化内科AP患者105例, 其中男60例, 女45例, 平均年龄(50.72±15.03)岁, 所有患者除行常规检查组相关项目外, 对不能明确病因即IAP均行ERCP及BML检测查找病因, 设定为联合检查组. TJF240十二指肠镜、鼻胆引流管、0.035 inch斑马导丝、长方(XP-200Z)偏振光显微镜为日本Olympus公司产品. 1000Ma-X光机为日本TOSHIBA公司产品. CL2离心机为美国IEC公司产品. GNP-9270隔水式恒温培养箱为上海新苗公司产品.

1.2 方法

1.2.1 入选标准: (1)AP临床诊断标准: 表现为上腹痛以及血淀粉酶和脂肪酶高于正常值3倍; (2)IAP临床诊断标准: 满足AP诊断标准, 同时满足一下排除标准. 排除标准为通过病史、临床、实验室和影像学检查(主要B超、CT、MRCP)明确胆疾病、乙醇、药物、毒素、高钙血症、高脂血症、感染、肿瘤等病因者及CP患者; (3)对于全身情况较差, 不能耐受ERCP检查的少数IAP患者放弃进一步检查.

1.2.2 检查: (1)MRCP和ERCP检查时间: MRCP检查在发病24 h内完成, ERCP检查在发病72 h内完成; (2)胆汁中BML: 先行胆汁观察以明确是否有明显BML, 如无明确结石者, 胆汁沉淀后涂片行偏正光显微镜下观察. 患者通过ENBD或ERCP收集胆汁: 通过无菌注射器抽吸, 根据导管位置以及吸取液的颜色来判否为胆汁. 取胆汁5 mL, 将所获标本均分为2份, 一份立即镜检, 另一份在37 °C温箱孵育24 h后检测. 检测前标本需经12 000 r/min离心10 min, 剔除上清液, 2份标本的沉淀物各制成3张玻片, 实验室温度控制在25 °C-30 °C, 用长方显微镜(普通光及偏振光)观察, 结晶的计数参Juniper和Burson所制定的标准^[2], 胆固醇单水化合物(cholesterol monohydrate crystals, CMC)在偏振光下呈双折射的长斜形, 胆红素钙颗粒(calcium bilirubinate granules, CBG)在镜下呈有聚集性的棕红色颗粒. CMC在每张玻片上多于1个晶体, 而CBG每张玻片多于25个晶体, 即是阳性.

统计学处理 使用SPSS13.0统计软件, 应用确切概率法计算 χ^2 , 检验水准取 $P<0.05$ 有统计学意义.

2 结果

对照组90例AP患者有50例明确病因, 其中胆总管结石30例, 酒精性胰腺炎10例, 高脂血症引起AP者5例, 壶腹部肿瘤3例, 胰腺癌2例, 占55.6%(50/90). 联合检查组105例患者经常规检查有63例明确病因, 其中胆总管结石39例. 其余42例IAP患者(除2例不能耐受ERCP检查外)均行ERCP及MBL检测, 其中30例患者明确了病因, 3例ERCP选择性插管未成功, 7例未提示任何异常, 确诊率为87.5%(93/105). 37例IAP患者ERCP检查确定的病因见表1. 对照组对AP病因确诊阳性率为55.6% (50/90), 联合检查组明确病因确诊率为87.5%(93/105). 两者比较有统计学意义($\chi^2=27.013, P<0.05$, 表1).

3 讨论

根据文献IAP常见病因^[3]为BML、SOD、胆胰管汇流异常小乳头、乳头旁憩室、胰腺肿瘤、先天性胆管囊肿及胰腺分裂症等. 以上疾病可通过ERCP明确诊断. 另外SOD也是IAP常见病因^[4], SOD多见于胆囊切除患者^[5], 也须通过ERCP结合Oddi括约肌测压得以明确^[6]. 其他如基因异常或自身免疫性胰腺炎等目前尚无法确诊.

■ 研发前沿

由于BML体积小, 胆汁与BML二者缺乏直观对比, B超、CT检查难以发现, 即使MRCP亦难诊断BML, EUS虽然对BML诊断率较高, 但由于应用尚不普遍, 限制了其临床运用.

■相关报道

贺克俭等研究了36例B超、CT未发现结石的患者,造影后有26例(72%)发现胆总管结石,在ERCP过程中吸取胆汁进行组织细胞学、细菌学研究的同时,用普通光及偏振光显微镜找到IAP公认的主要病因-微结石。

表 1 37例IAP患者经ERCP联合胆汁微结石检测确诊为胆源性胰腺炎的病因

病因	n(%)
单纯胆道结石	14(37.8)
胆胰管汇流异常合并胆道微结石	1(2.7)
胆胰管汇流异常	2(5.4)
憩室旁乳头合并胆道微结石	2(5.4)
憩室旁乳头	2(5.4)
SOD合并胆道微结石	2(5.4)
SOD	3(8.1)
慢性胰腺炎	2(5.4)
胰腺导管内乳头状瘤	2(5.4)
无异常	7(18.9)

目前明确IAP患者的病因有以下常见方法, (1)磁共振胰胆管成像(MR cholangiopancreatography, MRCP): MRCP不需造影剂即能全貌反映胆胰系统解剖关系和病理变化, 对于一些常见胆胰管病变, 如结石胆胰管占位等能初步的得出诊断, 且为无创, 检查比较方便, 患者易于接受^[7]. 但由于其水成像原理及图像重建的局限性与ERCP检查有如下缺点:不能动态显示胆胰管结构及解剖关系, 对于一些胆胰管前后重叠部分病变不能充分显示; 胆胰管下端及乳头周围病变不能显示; 一些由于狭窄或占位等病变导致胆胰管充盈不足部分不能充分显示; (2)超声内镜(endoscopic ultrasound, EUS): 但是EUS对操作者及设备要求较高, 且其价格昂贵, 普遍推广有一定难度; (3)ERCP: 美国胃肠病学杂志的一项研究结果显示, ERCP能发现大多数IAP与复发胰腺炎的根本病因^[8]. ERCP最大的优势在于他可同时进行SOM, 并在发现病变后及时进行介入治疗. 目前, 虽然ERCP在胆胰常见疾病的常规诊断方面的应用在逐渐由MRCP所替代下降, 但由于B超、CT对胆道疾病的检查有一定的局限性^[9], 而ERCP可提高所谓IAP的诊断率, 使AP的病因学诊断趋于严谨, 对常规检查难以发现病因的AP行ERCP检查仍是十分必要的. 贺克俭等^[10]研究了36例B超、CT未发现结石的患者, 造影后有26例(72%)发现胆总管结石, 在ERCP过程中吸取胆汁进行组织细胞学、细菌学研究的同时, 用普通光及偏振光显微镜找到IAP公认的主要病因-微结石. 同时ERCP对于乳头周围病变导致IAP病因能够轻易在内镜直视下明确, 本研究中IPMN、小乳头及乳头旁憩室在内镜下得到轻易明确, 但常规检查及MRCP却难以明确. 同时ERCP能够对胆胰管立体造影图像通过

改变体位等进行动态观察, 本研究中我们对一例反复发作的AP患者行MRCP检查未发现异常, 但在行ERCP检查中我们通过改变体位并进行动态造影成像, 明确其病因为胆胰管汇流异常, 通过行胆管括约肌切开随访9 mo未复发.

本研究结果表明, IAP患者行ERCP及BML检查明确BML的病因阳性率最高, 与文献一致^[11]. 通常认为, 胆管结石的大小与AP的发病率成负相关, 胆道微结石引起AP的机制较为复杂, 胰管开口部梗阻或可诱发十二指肠乳头括约肌痉挛为发病的主要原因^[12].

BML包括: (1)直径<2 mm 的结石; (2)胆囊中的胆泥(Sludge), CMC、CBG和碳酸钙微粒. 目前, 一致认为BML, 是胆结石形成重要的中间步骤^[13]. BML由于体积微小, 一般不引起临床症状, 但一定条件下, BML沉积于胆总管下段, 尤其合并十二指肠乳头炎性狭窄引起临床症状, 如急性胆管炎、AP等. 在本研究中, 30例IAP患者中, 有19例发现了胆管结石, 其中9例为单纯ERCP确诊; 10例IAP行ERCP检查无异常患者的胆汁中, 发现了BML, 提示在AP的发病中, BML可能发挥一定的作用. 研究发现80%的IAP由BML^[14]所致.

目前, BML的检测手段主要有腹部B超、上腹部CT、MRCP、EUS、ERCP和偏光显微镜下查找BML. 由于BML体积小, 胆汁与BML二者缺乏直观对比, B超、CT检查难以发现, 即使MRCP亦难诊断BML, EUS虽然对BML诊断率较高, 但由于应用尚不普遍, 限制了其临床运用; BML在ERCP上表现为胆管腔内移动的影像, 边缘模糊, 其阳性率与ERCP距发病时间长短有关, 因为结石在操作时或操作前可以排到十二指肠腔内, 即使造影正常, 但仍可能存在微小结石, 存在一定的假阴性. 本研究有3例在行ERCP造影未提示明显的结石, 仅见乳头充血水肿, 呈排石样破碎型乳头, 而其胆汁中发现BML. 有文献认为在发病48 h内检测胆汁中BML阳性率最高^[10]. 目前认为, 普通和偏光显微镜下查找胆盐结晶是诊断BML的“金标准”^[13], 镜下诊断BML阳性率几乎达到100%. 因此, 对于IAP患者行MRCP检查阴性患者应常规行ERCP检查, 如ERCP检查阴性可再行偏正光下胆道微结石检测, 二者联合能明确IAP最大病因即BML, 但最好在发病48-72 h内检查.

对于由于SOD的IAP患者, 由于未行Oddi括约肌测压(sphincter of Oddi manometry, SOM), 该

研究尚不能完全明确其病因, 但结合病史(胆囊切除史)症状、肝功能及血淀粉酶结果和ERCP造影研究中5例考虑病因为SOD。

在本研究中我们行ERCP检查明确了3例AJPBD患者, 该病也是IAP的常见病因^[15]。造影明确后术中均行一定程度的EST, 随访半年未复发。因此对于怀疑存在AJPBD的患者, 在常规MRCP检查后行必要的ERCP检查是必须的, 在术中进行体位变化能够发现细微的胆胰管的解剖异常。

本研究中有7例经ERCP检查后仍未明确病因, 不排除与某些病因导致胰管开口处一过性梗阻有关, 如微结石、SOD等, 相信随着我们ERCP诊治技术的提高和医疗硬件设施的改善, 如将来开展SOM、EUS等能快速得到病因的明确。

4 参考文献

- 1 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
- 2 Juniper K, Burson EN. Biliary tract studies. II. The significance of biliary crystals. *Gastroenterology* 1957; 32: 175-208; discussion, 208-211
- 3 王昆宁, 徐敏, 王兴鹏. 特发性胰腺炎. 胰腺病学 2007; 7: 54-55
- 4 Toouli J, Roberts-Thomson IC, Kellow J, Dowsett J, Saccone GT, Evans P, Jeans P, Cox M, Anderson P, Worthley C, Chan Y, Shanks N, Craig A. Manometry based randomised trial of endoscopic sphincterotomy for sphincter of Oddi dysfunction. *Gut* 2000; 46: 98-102
- 5 蔡秀军, 祝子逸. 胆囊切除术后Oddi括约肌功能紊乱的诊断与治疗. 中国实用外科杂志 2007; 27: 438-441
- 6 Fazel A, Geenen JE, MoezArdalan K, Catalano MF. Intrapaneatic ductal pressure in sphincter of Oddi dysfunction. *Pancreas* 2005; 30: 359-362
- 7 Arvanitakis M, Delhaye M, De Maertelaere V, Bali M, Winant C, Coppens E, Jeanmart J, Zalcmann M, Van Gansbeke D, Devière J, Matos C. Computed tomography and magnetic resonance imaging in the assessment of acute pancreatitis. *Gastroenterology* 2004; 126: 715-723
- 8 Kinney TP, Freeman ML. The role of endoscopic retrograde cholangiopancreatography and endoscopic ultrasound in diagnosis and treatment of acute pancreatitis. *Minerva Gastroenterol Dietol* 2005; 51: 265-288
- 9 Tandon M, Topazian M. Endoscopic ultrasound in idiopathic acute pancreatitis. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 705-709
- 10 贺克俭, 江捍平, 张厚德, 苏卓娃, 麦丽文. 胆道微结石在急性期不明原因胰腺炎的诊断价值. 中国内镜杂志 2004; 10: 89-91
- 11 Kohut M, Nowak A, Nowakowska-Dulawa E, Kaczor R, Marek T. The frequency of bile duct crystals in patients with presumed biliary pancreatitis. *Gastrointest Endosc* 2001; 54: 37-41
- 12 宋健, 钟慧闻, 尹成才, 姚萍, 曲晓静, 杨萍. ERCP在不明原因复发性急性胰腺炎诊治中的作用. 胰腺病学 2007; 7: 381-383
- 13 Ko CW, Sekijima JH, Lee SP. Biliary sludge. *Ann Intern Med* 1999; 130: 301-311
- 14 Saraswat VA, Sharma BC, Agarwal DK, Kumar R, Negi TS, Tandon RK. Biliary microlithiasis in patients with idiopathic acute pancreatitis and unexplained biliary pain: response to therapy. *J Gastroenterol Hepatol* 2004; 19: 1206-1211
- 15 陈凤, 汪健, 蒋晓飞, 徐卫燕, 蔡雷, 黄顺根. 急性胆源性胰腺炎和胰胆管合流异常的关系. 肝胆胰外科杂志 2009; 21: 98-100

■同行评价

本文研究结果对于无法开展EUS的医疗机构针对特发性急性胰腺炎病因诊断提供了重要的借鉴, 具有较好的科学价值。

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

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

• 消息 •

WJG 总被引频次排名位于第 174 名

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

胰岛素样生长因子对克罗恩病患者的临床意义

余强, 陆忠凯

■背景资料

克罗恩病存在肠黏膜代谢和免疫异常, 其发病机制尚不明确, 且诊断困难, 预后较差。胰岛素样生长因子具有促进细胞增殖、分化, 调节免疫及促进生长代谢等作用, 他与多种消化道疾病有关, 而他的这种调节细胞免疫、促进细胞增殖分化的作用与克罗恩病是否相关目前尚不明确。

余强, 陆忠凯, 南京医科大学附属苏州市立医院消化内科 江苏省苏州市 215002

作者贡献分布: 余强与陆忠凯对此文所作贡献均等; 此课题由余强与陆忠凯共同设计; 研究过程由余强与陆忠凯共同操作完成; 数据分析由余强与陆忠凯完成; 本论文写作由余强与陆忠凯完成。
通讯作者: 余强, 主治医师, 215002, 江苏省苏州市道前街26号, 南京医科大学附属苏州市立医院本部消化内科。

18912602331@189.cn

收稿日期: 2011-07-25 修回日期: 2011-08-30

接受日期: 2011-09-16 在线出版日期: 2011-09-18

Clinical significance of peripheral blood levels of insulin-like growth factor in patients with Crohn's disease

Qiang Yu, Zhong-Kai Lu

Qiang Yu, Zhong-Kai Lu, Department of Gastroenterology, Suzhou Municipal Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Suzhou 215002, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Qiang Yu, Department of Gastroenterology, Suzhou Municipal Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, 26 Daoqian Avenue, Suzhou 215002, Jiangsu Province, China. 18912602331@189.cn

Received: 2011-07-25 Revised: 2011-08-30

Accepted: 2011-09-16 Published online: 2011-09-18

Abstract

AIM: To analyze the clinical significance of peripheral blood levels of insulin-like growth factor (IGF) in patients with Crohn's disease (CD).

METHODS: Fifty-four patients with CD were collected and divided into mild, moderate, and severe groups according to the severity of the disease. Enzyme-labeled chemiluminescent immunometric assay was used to detect peripheral blood levels of IGF-I and insulin-like growth factor-binding protein 3 (IGFBP3) in patients before and after standard treatment to assess their association with the severity of CD and therapeutic efficacy. Fifty healthy people were enrolled as controls.

RESULTS: The levels of IGF-I and IGFBP3 were significantly lower in the moderate and severe groups than in the control group (all $P < 0.05$) and decreased with the increase in clinical sever-

ity ($P < 0.05$). No significant difference was noted in the levels of IGF-I and IGFBP3 between the mild group and control group. However, the levels of IGF-I and IGFBP3 were significantly higher in patients with moderate or severe CD after treatment than before treatment (all $P < 0.05$). No significant difference was noted in the levels of IGF-I and IGFBP3 in patients with mild CD between before and after treatment.

CONCLUSION: Peripheral blood levels of IGF-I and IGFBP3 are useful to evaluate disease severity and therapeutic efficacy in patients with CD.

Key Words: Insulin-like growth factor; Crohn's disease; Insulin-like growth factor-binding protein 3

Yu Q, Lu ZK. Clinical significance of peripheral blood levels of insulin-like growth factor in patients with Crohn's disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(26): 2790-2793

摘要

目的: 研究我国克罗恩病(CD)患者胰岛素样生长因子水平(IGF)的变化及临床意义。

方法: 收集54例CD患者的临床资料, 并根据临床严重程度分为轻(20例)、中(18例)、重(16例)3组。采用酶标化学发光免疫分析的方法分别检测轻、中、重各组CD患者规范性治疗前后的外周血IGF-I和胰岛素样生长因子结合蛋白-3(IGFBP3)的结果, 50例健康人群作为对照组, 分析外周血IGF-I和IGFBP3对CD的临床意义。

结果: (1)中重度CD患者外周血IGF-I值分别为 $104.78 \mu\text{g/L} \pm 16.28 \mu\text{g/L}$ 和 $77.50 \mu\text{g/L} \pm 12.46 \mu\text{g/L}$, IGFBP3值分别为 $2.83 \text{ mg/L} \pm 1.02 \text{ mg/L}$ 和 $1.93 \text{ mg/L} \pm 0.65 \text{ mg/L}$, 均较正常对照组明显减低, 并随着病情加重呈进行性下降(均 $P < 0.05$)。轻度组IGF-I及IGFBP3值较对照组也有所下降, 但无统计学差异; (2)中重度CD经治疗有效后IGF-I值分别为 $122.75 \mu\text{g/L} \pm 27.14 \mu\text{g/L}$ 和 $102.31 \mu\text{g/L} \pm 29.24 \mu\text{g/L}$, IGFBP3值分别为 $3.85 \text{ mg/L} \pm 0.92 \text{ mg/L}$ 和 $3.35 \text{ mg/L} \pm 1.35 \text{ mg/L}$, 均较治疗前明显升高($P < 0.05$)。轻度组

■同行评议者

张小晋, 主任医师, 北京积水潭医院消化内科; 白爱平, 副教授, 南昌大学第一附属医院消化内科

治疗有效后IGF-I及IGFBP3值较治疗前也有所升高, 但无统计学差异。

结论: IGF-I和IGFBP3有助于评估CD病情的严重程度及治疗效果, 并可能对CD急慢性病情的转换具有一定提示作用。

关键词: 胰岛素样生长因子; 克罗恩病; 胰岛素样生长因子结合蛋白-3

余强, 陆忠凯. 胰岛素样生长因子对克罗恩病患者的临床意义. 世界华人消化杂志 2011; 19(26): 2790-2793
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2790.asp>

0 引言

胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor, IGF)与多种消化系统疾病(如胃肠道疾病、肝硬化、肝癌、胰腺疾病等)有关^[1-3]。他可促进细胞增殖、分化, 调节免疫及促进生长代谢等作用^[4]。克罗恩病(Crohn's disease, CD)是以非特异性炎症反应为特征的炎症性肠病, 存在肠黏膜代谢和免疫异常。而IGF与CD的研究较少, 他们的相关性尚不明确, 本研究主要探讨CD患者IGF水平的变化及其临床意义。

1 材料和方法

1.1 材料 选取我院自2007-01/2010-12来我院住院或门诊确诊的CD患者共54例, 其中男29例, 女25例, 中位年龄32(17-61)岁。同时选取50名体检健康人作为对照组。根据CD病情严重程度分轻、中、重3个亚组(其中轻度20例、中度18例、重度16例), 经规范治疗后均得到临床缓解。诊断标准参考中华医学会消化病学分会对炎症性肠病诊治规范的共识意见^[5], 其中排除合并有其他自身免疫性疾病如哮喘、类风湿性关节炎及系统性红斑狼疮等患者, 病情严重程度分组参考简化的克罗恩病活动性指数(Harvey-Bradshaw指数, 简称H-B指数)^[6]。分析各组治疗前后IGF-I和IGFBP3的变化, 探讨其在CD临床诊治中的意义。

1.2 方法 采用酶标化学发光免疫分析的方法, 使用MMULITE/IMMULITE 1000 IGF-I/IGFBP3分析系统(西门子, 德国)检测。具体方法: 先分别抽取每个患者治疗前后外周血约5 mL, 凝固后给予快速离心备样, -80 °C保存待测。使用上述分析系统按系统说明检测并记录各组治疗前后及对照胰岛素样生长因子-I(insulin-like growth fac-

tor, IGF-I)和胰岛素样生长因子结合蛋白-3(insulin-like growth factor-binding protein 3, IGFBP3)的值, 同时分别收集其临床资料分析其临床特点, 探讨分析其与CD临床特征的相关性及临床意义。

统计学处理 所有数据均以mean±SD表示, 使用SPSS13.0软件进行统计分析, 组内资料比较采用两独立样本的*t*检验。组间资料比较采用方差分析(ANOVA), *P*<0.05为具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组CD治疗前后IGF-I的变化 50例对照组IGF-I为156.26 μg/L±18.62 μg/L。与对照组相比, CD患者中、重组IGF-I明显下降, 分别为104.78 μg/L±16.28 μg/L和77.50 μg/L±12.46 μg/L, 随着病情加重呈进行性降低趋势(*P*<0.05)。但轻症组与对照组相比无统计学意义。经治疗后中重度组IGF-I较治疗前明显增高, 分别为122.75 μg/L±27.14 μg/L和102.31 μg/L±29.24 μg/L, 有统计学差异(*P*<0.05)。轻症组治疗后IGF-I亦有所升高, 但无统计学差异(表1)。

2.2 各组CD治疗前后IGFBP3的变化 50名对照组IGFBP3为4.88 mg/L±0.65 mg/L。与对照组相比, CD患者中、重组IGFBP3明显下降, 分别为2.83 mg/L±1.02 mg/L和1.93 mg/L±0.65 mg/L, 随着病情加重呈进行性降低趋势(*P*<0.05)。但轻症组与对照组相比无统计学意义。经治疗后中重度组IGFBP3较治疗前明显增高, 分别为3.85 mg/L±0.92 mg/L和3.35 mg/L±1.35 mg/L, 有统计学差异(*P*<0.05)。轻症组治疗后IGFBP3亦有所升高, 但无统计学差异(表1)。

3 讨论

IGF与多种消化系疾病有关, 如胃肠道肿瘤、肝脏、胰腺疾病等。它具有促进细胞增殖、分化, 参与组织生长及合成代谢、调节免疫、抑制细胞凋亡等作用, 但与CD的相关性报道较少。CD是一种以肠道黏膜代谢及免疫异常为特征的炎症性肠病, 发病机制尚未完全明确。本研究探讨胰岛素样生长因子与CD的关系及其在CD临床诊治中的价值。

IGF-I是胰岛素样生长因子家族中研究较多的因子之一, 由70个氨基酸组成的单链多肽, 循环中的IGF-I主要来源于肝脏。Eivindson等^[7]研究了50例CD患者与IGF-I的相关性, 研究发现IGF-I与反映CD疾病特征的CRP及血浆白蛋白相关,

■研发前沿

国外有少量报道CD患者胰岛素样生长因子发生变化, 认为他与CD存在一定的相关性, 同时胰岛素样生长因子可促进原始骨髓细胞的增殖分化及巨噬细胞、中性粒细胞的活化, 抑制其凋亡的特性可能与CD免疫系统调节功能障碍有关, 这可能是CD今后研究的热点之一。

■相关报道

Eivindson等研究发现IGF-I与反映CD疾病特征的CRP及血浆白蛋白相关。Flynn等研究发现缩窄性CD平滑肌中IGF-I增高1.8-3.4倍, 内源性IGF-I能促进平滑肌细胞增生并减少凋亡。这表明胰岛素样生长因子与CD临床特征可能存在相关性, 但尚未明确。

■创新盘点

本研究对CD临床特征与胰岛素样生长因子的相关性进行研究,探讨一种新型的生物学指标与CD的关系,从而为临床诊治较为困难的CD提供一种新型的临床特征参考指标。

■应用要点

检测外周血IGF-I和IGFBP3水平对中重度克罗恩病的诊治提供了新的思路和理论依据。

表 1 CD患者治疗前后各组的IGF-I、IGFBP3变化情况 (mean ± SD)

检测项目		对照组(n = 50)	轻度(n = 20)	中度(n = 18)	重度(n = 16)
IGF-I(μg/L)	治疗前	156.26 ± 18.62	145.26 ± 27.55	104.78 ± 16.28 ^a	77.50 ± 12.46 ^b
	治疗后	156.26 ± 18.62	152.37 ± 30.25	122.75 ± 27.14 ^c	102.31 ± 29.24 ^c
IGFBP3(mg/L)	治疗前	4.88 ± 0.65	3.99 ± 1.15	2.83 ± 1.02 ^a	1.93 ± 0.65 ^b
	治疗后	4.88 ± 0.65	4.54 ± 1.42	3.85 ± 0.92 ^c	3.35 ± 1.35 ^c

^aP<0.05, ^bP<0.01 vs 对照组; ^cP<0.05 vs 治疗前。

IGFBP3也与血浆白蛋白相关。此外Akobeng等^[8]研究发现活动期CD患儿IGF-I明显下降,且经4 wk的肠内营养后IGF-I无明显升高,补充谷氨酰胺亦不能有效提高IGF-I。这表明IGF-I及IGFBP3可能与CD存在一定相关性,而其具体机制尚不明确。

本研究中发现,CD患者的血浆IGF-I值较正常对照组明显下降,其中中重度CD患者随着病情的加重呈进行性下降趋势,且有统计学差异,但轻度CD组与对照组相比无统计学差异。CD本质上是一种自身免疫性疾病,而IGF-I与免疫系统具有互相调节作用。IGF-I可以促进原始骨髓细胞的增殖分化及巨噬细胞、中性粒细胞的活化,抑制其凋亡,并促进B淋巴细胞的增殖分化及免疫球蛋白的表达^[9],IGF-I的表达异常可能与CD免疫系统调节功能障碍密切相关。Konstantinos等^[10]研究了10例CD患者,结果发现IGF-I和IGFBP3明显降低,提示机体炎症反应与继发性GH抵抗有关,有可能是由炎症因子如IL-6诱发。免疫系统可以通过IL-6及TNF-α影响IGF-I的水平,降低IGF-I的活性^[11]。TNF-α抑制了IGF-I受体活化后细胞内信号转导的级联反应,使细胞周期停止^[12]。这表明过度炎症反应导致的大量炎症因子释放可能是中重度CD患者IGF-I下降的主要原因,同时也可能是机体反馈抑制过度炎症反应的表达方式之一,而轻度CD患者的炎症反应可能尚不足以抑制IGF-I的表达。血清中IGFBP3能直接影响着IGF-I的生物学活性,它能够阻止IGF-I与其受体结合,延长IGF-I在血循环中的半衰期、调节IGF-I从血管内向血管外跨膜转运^[13]。本研究发现随着CD严重程度的加重IGFBP3下降越明显,但轻度CD的IGFBP3与对照组无统计学差异,由此看出,IGF-I和IGFBP3水平在一定程度上能反映出CD的严重程度,可作为临床参考。

IGF-I的促细胞增殖、抑制细胞凋亡的作

用对CD是否有治疗作用目前尚不明确。Howarth^[14]等曾使用IGF-I治疗结肠炎的动物模型,发现IGF-I治疗组结肠上皮杯状细胞增加76%,固有层分泌肿瘤坏死因子的细胞减少,因而认为IGF-I对结肠上皮具有修复作用,并可抑制黏膜及黏膜下层的炎症反应。宁月季等^[15]研究发现IGF-I可以通过作用于大鼠结肠平滑肌细胞的IGF-I受体从而刺激大鼠结肠平滑肌细胞内干细胞因子的表达,表明IGF-I介导结肠的代谢增生可能发生在干细胞水平。本研究中发现,经规范性治疗后症状缓解的CD患者IGF-I及IGFBP3均较治疗前明显升高,这也同样提示可能是对CD具有治疗作用的生长因子,活动期CD如果出现IGF-I及IGFBP3较前升高可能提示病情有所好转,并可作为临床评估CD治疗疗效的参考指标之一,同时也为CD的治疗提供了一个新的方向。但慢性持续性CD尤其是缩窄性CD亦可能与IGF-I的增高有关,研究表明^[16,17]缩窄性CD平滑肌中IGF-I增高1.8-3.4倍,内源性IGF-I能促进平滑肌细胞增生并减少凋亡。而内源性IGFBP3可使胶原蛋白过度表达从而导致纤维化和狭窄。故IGF-I及IGFBP3水平增高在活动期病情缓解或病情的迁延不愈中的意义还需进一步研究。

总之,IGF-I及IGFBP3可能有助于评估CD临床病情严重程度和治疗效果,并可能对CD急慢性病情的转换具有一定提示作用。由于IGF的调节是一个复杂的网络调节过程,同时本研究的样本量有限,IGF的临床价值还需进一步的研究。

4 参考文献

- Castilla-Cortazar I, Garcia M, Quiroga J, Diez N, Diez-Caballero F, Calvo A, Diaz M, Prieto J. Insulin-like growth factor-I reverts testicular atrophy in rats with advanced cirrhosis. *Hepatology* 2000; 31: 592-600
- Stuver SO, Kuper H, Tzonou A, Lagiou P, Spanos E, Hsieh CC, Mantzoros C, Trichopoulos D. Insulin-like growth factor 1 in hepatocellular carcinoma and metastatic liver cancer in men. *Int J Cancer* 2000; 87: 118-121

- 3 Nedić O, Malenković V, Nikolić JA, Baricević I. Insulin-like growth factor I (IGF-I) as a sensitive biomarker of catabolism in patients with gastrointestinal diseases. *J Clin Lab Anal* 2007; 21: 335-339
- 4 Frank SJ. Growth hormone, insulin-like growth factor I, and growth: local knowledge. *Endocrinology* 2007; 148: 1486-1488
- 5 中华医学会消化病学分会. 对我国炎症性肠病诊断治疗规范的共识意见. *中华消化杂志* 2007; 27: 545-550
- 6 Harvey RF, Bradshaw JM. A simple index of Crohn's-disease activity. *Lancet* 1980; 1: 514
- 7 Eivindson M, Grønbaek H, Skogstrand K, Thorsen P, Frystyk J, Flyvbjerg A, Dahlerup JF. The insulin-like growth factor (IGF) system and its relation to infliximab treatment in adult patients with Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol* 2007; 42: 464-470
- 8 Akobeng AI, Clayton PE, Miller V, Hall CM, Thomas AG. Low serum concentrations of insulin-like growth factor-I in children with active Crohn disease: effect of enteral nutritional support and glutamine supplementation. *Scand J Gastroenterol* 2002; 37: 1422-1427
- 9 French RA, Broussard SR, Meier WA, Minshall C, Arkins S, Zachary JF, Dantzer R, Kelley KW. Age-associated loss of bone marrow hematopoietic cells is reversed by GH and accompanies thymic reconstitution. *Endocrinology* 2002; 143: 690-699
- 10 Katsanos KH, Tsatsoulis A, Christodoulou D, Challa A, Katsaraki A, Tsianos EV. Reduced serum insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and IGF-binding protein-3 levels in adults with inflammatory bowel disease. *Growth Horm IGF Res* 2001; 11: 364-367
- 11 Pagani S, Meazza C, Travaglini P, Moretta A, Bozzola M. Effect of growth hormone therapy on the proinflammatory cytokine profile in growth hormone-deficient children. *Eur Cytokine Netw* 2005; 16: 65-69
- 12 Shen WH, Yin Y, Broussard SR, McCusker RH, Freund GG, Dantzer R, Kelley KW. Tumor necrosis factor alpha inhibits cyclin A expression and retinoblastoma hyperphosphorylation triggered by insulin-like growth factor-I induction of new E2F-1 synthesis. *J Biol Chem* 2004; 279: 7438-7446
- 13 Pollak MN, Schernhammer ES, Hankinson SE. Insulin-like growth factors and neoplasia. *Nat Rev Cancer* 2004; 4: 505-518
- 14 Howarth GS, Xian CJ, Read LC. Insulin-like growth factor-I partially attenuates colonic damage in rats with experimental colitis induced by oral dextran sulphate sodium. *Scand J Gastroenterol* 1998; 33: 180-190
- 15 宁月季, 张蔚, 成家飞, 李学良, 王美峰, 林琳. 胰岛素样生长因子I对大鼠结肠平滑肌细胞中干细胞因子表达的影响. *世界华人消化杂志* 2009; 34: 3502-3506
- 16 Flynn RS, Murthy KS, Grider JR, Kellum JM, Kuemmerle JF. Endogenous IGF-I and alphaVbeta3 integrin ligands regulate increased smooth muscle hyperplasia in stricturing Crohn's disease. *Gastroenterology* 2010; 138: 285-293
- 17 Flynn RS, Mahavadi S, Murthy KS, Grider JR, Kellum JM, Akbari H, Kuemmerle JF. Endogenous IGFBP-3 regulates excess collagen expression in intestinal smooth muscle cells of Crohn's disease strictures. *Inflamm Bowel Dis* 2011; 17: 193-201

■同行评价

本文设计较合理, 探讨了外周血IGF-I和IGFBP3水平与CD病情的严重程度及治疗效果, 结果显示IGF-I和IGFBP3水平与CD病情相关, 并可能对CD急性慢性病情的转换具有一定提示作用. 文章选题准确, 实验结果与结论具有一定的临床意义.

编辑 李军亮 电编 何基才

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

• 消息 •

WJG 成功通过评审被 PMC 收录

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

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

Carney三联征临床病理分析1例

王蔚, 赖日权, 陈晓东, 王卓才, 崔华娟, 陈敬文

■背景资料

Carney三联征好发于年轻女性, 包括胃肠道间质瘤、肺软骨瘤和肾上腺外副神经节瘤, 由于临床及病理医师对这一疾病认识不足, 常导致漏诊、误诊, 本文报道1例Carney三联征的诊疗经过并复习相关文献, 以提高对本病的认识。

王蔚, 赖日权, 陈晓东, 王卓才, 崔华娟, 陈敬文, 中国人民解放军广州军区广州总医院病理科 广东省广州市 510010

作者贡献分布: 论文写作由王蔚完成; 多次病理诊断由王蔚、王卓才及崔华娟共同完成; 赖日权与陈晓东进行修改指导, 石蜡切片及免疫组织化学检查由陈敬文完成。

通讯作者: 王蔚, 主治医师, 510010, 广东省广州市, 中国人民解放军广州军区广州总医院病理科. ricewang79@126.com

电话: 020-36223284 传真: 020-36654177

收稿日期: 2011-08-01 修回日期: 2011-08-25

接受日期: 2011-09-09 在线出版日期: 2011-09-18

Carney triad: a clinicopathological analysis of one case and review of the literature

Wei Wang, Ri-Quan Lai, Xiao-Dong Chen, Zhuo-Cai Wang, Hua-Juan Cui, Jing-Wen Chen

Wei Wang, Ri-Quan Lai, Xiao-Dong Chen, Zhuo-Cai Wang, Hua-Juan Cui, Jing-Wen Chen, Department of Pathology, General Hospital of Guangzhou Military Command of Chinese PLA, Guangzhou 510010, Guangdong Province, China

Correspondence to: Wei Wang, Department of Pathology, General Hospital of Guangzhou Military Command of Chinese PLA, Guangzhou 510010, Guangdong Province, China. ricewang79@126.com

Received: 2011-08-01 Revised: 2011-08-25

Accepted: 2011-09-09 Published online: 2011-09-18

Abstract

AIM: To investigate the clinical and pathological features, biological behavior and prognosis of Carney triad

METHODS: The clinical data for a patient with Carney triad was analyzed retrospectively and reviewed histologically and immunohistochemically. A literature review was performed to give a detailed description of the disease.

RESULTS: The patient was a young woman who presented with multifocal pulmonary chondroma and gastric stromal sarcoma subsequently. Microscopically, pulmonary chondroma was composed of well-circumscribed cartilage lobules that were separated by fibrovascular stroma. The gastric stromal sarcoma presented as submucosal nodes. Tumor cells were ar-

ranged in sheets or clusters and infiltrated into the stomach wall. The eosinophilic tumor cells were moderately heterogeneous and variable, polygonal or round in shape. Mitotic figures were visible. The tumor cells were immunohistochemically positive for CD34, CD117, vimentin and PDGFRA.

CONCLUSION: Carney triad is a rare syndrome which affects mostly young women and is characterized by having at least two out of three following neoplasms: pulmonary chondroma, gastrointestinal stromal tumor and extra-adrenal paraganglioma.

Key Words: Carney triad; Multifocal pulmonary chondroma; Gastric stromal sarcoma

Wang W, Lai RQ, Chen XD, Wang ZC, Cui HJ, Chen JW. Carney triad: a clinicopathological analysis of one case and review of the literature. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(26): 2794-2797

摘要

目的: 探讨Carney三联征的临床病理特征、生物学行为及预后。

方法: 收集1例Carney三联征临床资料, 光镜下观察其组织形态学特征并行免疫组织化学分析, 对相关文献资料进行回顾分析与总结。

结果: 患者年轻女性, 先后出现肺多发性软骨瘤及胃肠道间质瘤。镜下肺软骨瘤由境界清楚的软骨小叶构成, 小叶间被纤维血管分隔; 胃肠道间质瘤表现为胃黏膜下多发结节, 镜下肿瘤细胞呈巢团状在肌壁间浸润性生长, 瘤细胞呈上皮样, 圆形或多角形, 胞质丰富红染, 显中度异型性, 核分裂像易见; 免疫组织化学染色肿瘤细胞CD34、CD117、Vimentin和PDGFRA阳性。

结论: Carney三联征好发于年轻女性, 包括肺多发性软骨瘤、胃肠道间质瘤和肾上腺外副神经节瘤, 可同时出现, 也可仅存在二联征。

关键词: Carney三联征; 多发性软骨瘤; 胃肠道间质瘤

■同行评议者

刘丽江, 教授, 江汉大学医学院病理学与病理生理学教研室

王蔚, 赖日权, 陈晓东, 王卓才, 崔华娟, 陈敬文. Carney三联征临床病理分析1例. 世界华人消化杂志 2011; 19(26): 2794-2797

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2794.asp>

0 引言

Carney三联征包括胃肠道间质瘤、肺软骨瘤和肾上腺外副神经节瘤, 由Carney^[1]于1977年首次报道. 可三种肿瘤同时出现, 也可仅存在二联征, 以后者居多(称不完全Carney三联征). 至2009年底全球共收集到133例, 国内报道3例^[2,3]. 现本文报道1例不完全性Carney三联征的诊疗经过并复习相关文献, 以提高对本病的认识, 对类似疾病能够正确诊断、正确治疗.

1 材料和方法

1.1 材料 患者, 女性, 18岁, 因反复左侧胸痛3年余, 加重1 mo入院. 疼痛呈持续性, 放射于剑突下和后背部, 约1-2 mo发作1次, 发作间期无异常. CT示: 左肺上叶舌段、下叶基底段可见多个大小不一的类圆形结节, 边界清晰, 病灶内部密度不均匀, 边缘见钙化, 考虑为多发硬化性血管瘤. 遂行左肺肿瘤剔除术. 术后病理诊断为多发性软骨瘤. 为排除Carney综合征, 行胃镜及腹部CT检查. 胃镜示食管距门齿28 cm和胃体分别见直径约0.9 cm和大小5 cm×5 cm的息肉样隆起, 表面黏膜光滑, 考虑为胃肠道间质瘤. 腹部CT: 肝左外叶及胃小弯之间、肝胃韧带处不规则软组织肿块影, 考虑为间质瘤.

1.2 方法 标本经40 g/L中性甲醛固定, 常规石蜡包埋切片, 行HE染色及免疫组织化学标记. 免疫组织化学采用EnVision两步法, 所用抗体包括: 血管内皮细胞标记(CD34)、CD117(C-kit)、波形蛋白(Vimentin)、血小板源性生长因子受体α(Platelet-derived growth factor receptor alpha, PDGFRA)、细胞角蛋白(Cytokeratins, CK)、平滑肌动蛋白(Smooth muscle antigen, SMA)、结蛋白(desmin)、S-100蛋白、增殖核抗原Ki67等, 均购自丹麦Dako公司和泉晖公司. 用已知阳性切片作为阳性对照, 用PBS代替一抗作为阴性对照. 免疫组化标记阳性结果为棕黄色, 无背景染色.

2 结果

2.1 大体观察 肺切除标本: 灰白灰褐色结节4枚, 大小2.5 cm×2.0 cm×1.0 cm-7.5 cm×7.0 cm×7.0 cm, 切面灰白色有光泽, 实性质中到质硬; 胃

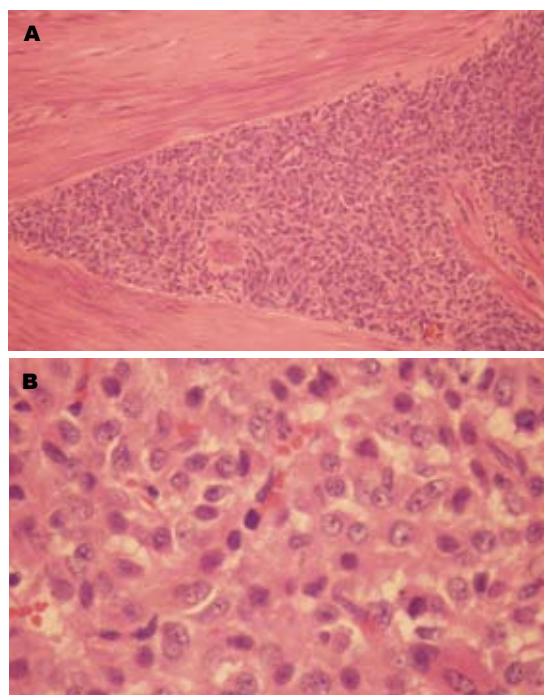


图1 胃肿瘤标本HE染色观察. A: 肿瘤细胞呈巢团状在肌壁间浸润生长($\times 100$); B: 肿瘤细胞呈上皮样, 胞质丰富红染, 核分裂像可见($\times 200$).

标本: 次全切除胃标本, 于胃小弯侧黏膜下见一结节型肿物, 大小6.0 cm×3.5 cm×3.0 cm, 表面黏膜光滑, 肿物切面灰黄灰红、质地中等. 浆膜面亦见多个隆起结节, 直径0.5-1.0 cm.

2.2 镜下观察 肺肿瘤标本: 病变由境界清楚的软骨小叶构成, 小叶间由纤维血管组织分隔, 小叶内见黏液变、钙化及骨化; 胃肿瘤标本: 肿瘤以上皮样细胞为主, 呈巢团状在肌壁间浸润性生长, 细胞圆形或多角形, 胞质丰富红染, 部分胞质空亮, 核分裂像易见(>5 个/50 HPF), 肿瘤细胞自胃壁浆膜面侵犯至黏膜下层, 黏膜面未受侵犯(图1); 浆膜面直径0.5-1 cm的隆起结节亦为肿瘤成分. 淋巴结17枚, 均未见肿瘤转移.

2.3 免疫表型 肺肿瘤细胞S-100阳性; 胃肿瘤细胞CD34(图2A)、CD117(图2B)、Vimentin、PDGFRA(图2C)阳性, CK、SMA、desmin、S-100等阴性, Ki67阳性率 $>10\%$.

2.4 病理诊断 (肺)多发性软骨瘤; (胃)胃肠道间质瘤, 依据Miettinen & Lasota标准, 高危险程度. 综合分析, 符合不完全性Carney三联征.

3 讨论

Carney三联征包括胃肠道间质瘤(gastrointestinal stromal tumor, GIST)、肺软骨瘤和肾上腺外副神经节瘤, 为一种原因不明, 主要侵害年轻女性

■研究前沿

Carney等报道Carney三联征以二联征多见, 其中又以胃GIST和肺软骨瘤相伴者最多, 其临床症状、组织学形态及免疫表型与散发病例相似, 但病程进展较散发病例缓慢, 预后较好.

■应用要点

Carney三联征临床罕见,国内少有报道.通过对1例Carney三联征的诊疗经过及病理特点进行总结,并探讨其治疗及预后,以加深临床及病理医师对该疾病的认识,做到正确诊断、正确治疗.

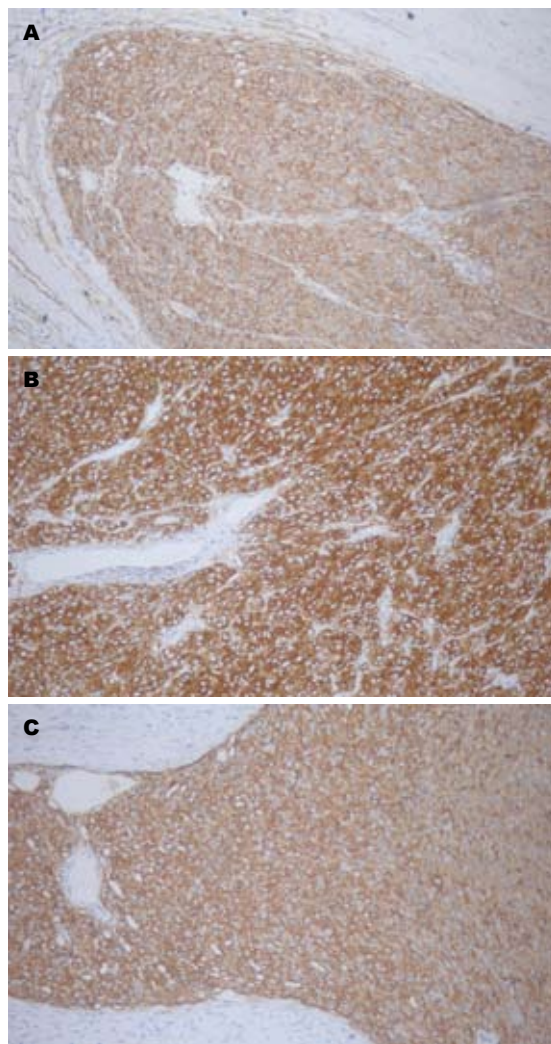


图2 胃肿瘤细胞CD34, CD117和PDGFRA的表达. A: 肿瘤细胞CD34阳性(SP × 100); B: 肿瘤细胞CD117弥漫强阳性(SP × 200); C: 肿瘤细胞PDGFRA弥漫阳性(SP × 200).

的罕见综合征. 1999年Carney^[4]收集全球79例中, 女性67例(85%), 男性12例(15%); 发病年龄7-48岁, 多30岁以前发病(85%); 以二联征多见(78%), 其中又以胃GIST和肺软骨瘤相伴者最多(占53%), 79例中只有17例三种肿瘤均出现, 且病变多是先后出现.

临床症状上Carney三联征表现为胃肠道间质瘤引起的胃部出血症状, 包括贫血、黑便、呕血及上腹痛等, 病灶往往多发, 常伴淋巴结和(或)肝转移及腹腔播散, 病程进展较普通散发GIST患者缓慢^[5]. 肺软骨瘤表现为反复胸痛或无症状肺部肿块, 生物学行为良性, 常多发并累及双肺, 手术可切除, 但易复发^[6]; 肾上腺外副神经节瘤累及主动脉肺动脉体、喉、甲状腺甚至肝脏等部位, 往往多灶性, 通常为良性, 半数出现高血压等儿茶酚胺增高的症状^[7]. χ 线、血管造影、CT等检查可发现病灶. 此外, Carney还指出,

虽然被习惯称为Carney三联征, 但患者还可伴有嗜铬细胞瘤、食管平滑肌瘤及肾上腺皮质腺瘤等^[4,5,8].

组织学形态上发生于Carney三联征的胃肠道间质瘤、肺软骨瘤及肾上腺外副神经节瘤同普通散发病例相似. 胃肠道间质瘤包括梭形细胞型、上皮细胞型及混合梭形/上皮型三种, 但以上皮型为主. 肿瘤细胞圆形、多角形或梭形, 形成巢团状或器官样结构在肌壁间浸润性生长, 瘤细胞胞质嗜酸或空亮, 细胞界限不清, 核梭形、圆形或卵圆形, 泡状核, 核仁小或不明显, 双核、多核巨细胞以及核分裂像可见. 免疫组化肿瘤细胞表达CD34和CD117, 也可表达平滑肌动蛋白Smooth Muscle Actin(SMA)、S-100蛋白及PDGFRA等^[9]. DOG1是新近发现的GIST诊断标志之一, 其敏感性及特异性甚至优于CD117^[10]. 虽然形态学和免疫表型Carney三联征与散发的胃肠道间质瘤相似, 但与后者不同的是, Carney三联征GIST几乎未发现C-kit和PDGFRA基因突变, 且琥珀酸脱氢酶B(SDHB)免疫组化表达阴性, 而散发病例不但C-kit和PDGFRA基因有较高的突变率, SDHB阳性率也高达97%^[11,12]. 肺软骨瘤由肿瘤性软骨组织形成界限清楚的软骨小叶, 小叶内可发生黏液变、钙化及骨化等; 肾上腺外副神经节瘤瘤细胞被纤维血管间质分隔呈巢团状或器官样结构, 细胞多角形, 胞质富含嗜酸性颗粒状胞质, 细胞边界不清, 细胞核卵圆形, 可出现程度不一的多形性. 形态上肺软骨瘤和肾上腺外副神经节瘤均比较单一, 且没有复杂的免疫表型及分子遗传学标记.

治疗均以手术切除为主. 胃肠道间质瘤局部切除者复发率占86%, 而全胃切除者复发率不到10%, 对于转移复发或不可切除的GIST可行甲磺酸伊马替尼(又称格列卫)靶向治疗^[4]. 而肺软骨瘤也因单纯肿瘤剔除术或肺叶切除术等手术方式不同而复发率有显著不同. 肾上腺外副神经节瘤手术治疗效果较好, 手术切除后不易复发. 本例患者行胃次全切除术及单纯肺肿瘤剔除术, 1年后肺软骨瘤复发, 胃部肿瘤未见复发. Carney三联征病程进展缓慢, 预后较一般恶性肿瘤稍好, 主要取决于胃GIST的生物学行为, 而胃肠道间质瘤的预后及危险度评价需要结合肿瘤部位、大小、核分裂计数以及肿瘤有无破裂等多个因素综合分析评价, 依据的标准有Miettinen & Lasota或NIH(美国国立卫生研究院)等制定的标准^[13-15]. 1999年Carney随访全球79例1-49年,

结果64例存活, 其中位生存时间为20年. Zhang等^[5]对104例Carney三联征患者的随访结果也表明患者术后10年和40年生存率分别为100%和73%. 因此, 我们在实际工作中遇到肺、胃等多处病变, 千万不要主观认定恶性肿瘤广泛转移而放弃手术机会, 而对于发生于年轻女性的胃肠道间质瘤或多发性肺软骨瘤, 也应进行全身排查. 因为Carney三联征的正确诊断可为患者提供正确的治疗及良好的预后.

4 参考文献

- 1 Carney JA, Sheps SG, Go VL, Gordon H. The triad of gastric leiomyosarcoma, functioning extra-adrenal paraganglioma and pulmonary chondroma. *N Engl J Med* 1977; 296: 1517-1518
- 2 徐采朴. Carney三联征1例31年随访报告及文献复习. 现代消化及介入诊疗2009; 14: 132-135
- 3 徐晨, 侯英勇, 戚伟栋, 卢韶华, 侯君, 谭云山, 秦净, 孙益红. 不完全性Carney三联征临床病理特征. 中华病理学杂志2010, 38: 626-627
- 4 Carney JA. Gastric stromal sarcoma, pulmonary chondroma, and extra-adrenal paraganglioma (Carney Triad): natural history, adrenocortical component, and possible familial occurrence. *Mayo Clin Proc* 1999; 74: 543-552
- 5 Zhang L, Smyrk TC, Young WF, Stratakis CA, Carney JA. Gastric stromal tumors in Carney triad are different clinically, pathologically, and behaviorally from sporadic gastric gastrointestinal stromal tumors: findings in 104 cases. *Am J Surg Pathol* 2010; 34: 53-64
- 6 Rodriguez FJ, Aubry MC, Tazelaar HD, Slezak J, Carney JA. Pulmonary chondroma: a tumor associated with Carney triad and different from pulmonary hamartoma. *Am J Surg Pathol* 2007; 31: 1844-1853
- 7 Valverde K, Henderson M, Smith CR, Tallett S, Chan HS. Typical and atypical Carney's triad presenting with malignant hypertension and papilledema. *J Pediatr Hematol Oncol* 2001; 23: 519-524
- 8 Scopsi L, Collini P, Muscolino G. A new observation of the Carney's triad with long follow-Up period and additional tumors. *Cancer Detect Prev* 1999; 23: 435-443
- 9 Stratakis CA, Carney JA. The triad of paragangliomas, gastric stromal tumours and pulmonary chondromas (Carney triad), and the dyad of paragangliomas and gastric stromal sarcomas (Carney-Stratakis syndrome): molecular genetics and clinical implications. *J Intern Med* 2009; 266: 43-52
- 10 Liegl B, Hornick JL, Corless CL, Fletcher CD. Monoclonal antibody DOG1.1 shows higher sensitivity than KIT in the diagnosis of gastrointestinal stromal tumors, including unusual subtypes. *Am J Surg Pathol* 2009; 33: 437-446
- 11 Gaal J, Stratakis CA, Carney JA, Ball ER, Korpershoek E, Lodish MB, Levy I, Xekouki P, van Nederveen FH, den Bakker MA, O'Sullivan M, Dinjens WN, de Krijger RR. SDHB immunohistochemistry: a useful tool in the diagnosis of Carney-Stratakis and Carney triad gastrointestinal stromal tumors. *Mod Pathol* 2011; 24: 147-151
- 12 Gill AJ, Chou A, Vilain R, Clarkson A, Lui M, Jin R, Tobias V, Samra J, Goldstein D, Smith C, Sioson L, Parker N, Smith RC, Sywak M, Sidhu SB, Wyatt JM, Robinson BG, Eckstein RP, Benn DE, Clifton-Bligh RJ. Immunohistochemistry for SDHB divides gastrointestinal stromal tumors (GISTs) into 2 distinct types. *Am J Surg Pathol* 2010; 34: 636-644
- 13 梁建芳, 郑绘霞, 肖虹, 武丽娜, 王宏坤. 胃肠道间质瘤病理诊断新进展. 世界华人消化杂志 2010; 18: 58-64
- 14 Miettinen M, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors: review on morphology, molecular pathology, prognosis, and differential diagnosis. *Arch Pathol Lab Med* 2006; 130: 1466-1478
- 15 Joensuu H. Risk stratification of patients diagnosed with gastrointestinal stromal tumor. *Hum Pathol* 2008; 39: 1411-1419

■同行评价

本文的选题较好, 有一定的临床意义和应用价值.

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

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

• 消息 •

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

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

《世界华人消化杂志》投稿须知

《世界华人消化杂志》为保证期刊的学术质量, 对所有来稿均进行同行评议, 是一份被中国科技论文统计源核心期刊、中文核心期刊要目总览收录的学术类期刊。

1 投稿总则

1.1 性质 《世界华人消化杂志》[ISSN 1009-3079 (print), ISSN 2219-2859 (online), CN 14-1260/R]是一份同行评议性和开放获取(open access, OA)的旬刊。OA最大的优点是面向全国本领域专家及公众开放无需注册, 免费获取PDF等格式的全文, 切实破除了传统性期刊阻碍科学研究成果快速传播的障碍。OA是一项真正意义上的公益性科学传播工具, 编委、作者和读者利益的最大化的目标, 努力推进本学科的繁荣和发展。

《世界华人消化杂志》定价56.00元, 全年2016.00元, 邮发代号82-262, 由世界华人消化杂志编辑部出版。《世界华人消化杂志》主要报道胃肠病学、肝胆病学、胰腺病学、内镜介入与消化外科等多学科的评论及基础研究和临床实践等各类文章, 具体内容涉及: 食管疾病, 如反流性食管炎、Barret's食管、食管静脉曲张和食管癌等; 胃部疾病, 胃食管反流性疾病、胃炎、胃动力障碍、胃出血、胃癌和幽门螺杆菌感染等; 肠道疾病, 如肠道出血、肠穿孔、肠梗阻、肠道炎症(如IBD/CD等)、肠道感染、大肠癌和大肠腺瘤等; 肝胆部疾病如病毒性肝炎、肝硬化、脂肪肝、肝纤维化、肝衰竭、胆石病、胆汁郁积、梗阻性黄疸、肝癌、胆囊癌、胆管癌和门静脉高压等; 胰腺疾病, 如胰腺炎和胰腺癌等; 全身性疾病涉及消化系统, 如自身免疫性及瘀胆性疾病、腹腔疾病、消化不良和代谢性疾病等; 以及与以上疾病相关的基因及基因组学、微生物及分子生物学、病因学、流行病学、免疫学、临床内外科诊断与治疗(如影像、化疗、移植、营养等); 除以上外, 本刊也报道诊断与筛选、内窥镜检查法、影像及先进技术。

《世界华人消化杂志》被国际检索系统美国《化学文摘》(Chemical Abstracts, CA)、荷兰《医学文摘库/医学文摘(EMBASE/Excerpta Medica, EM)》和俄罗斯《文摘杂志(Abstract Journal, AJ)》收录。国内为中国科技论文统计与分析期刊(科技部列选为中国科技论文统计源期刊)、《中文核心期刊要目总览》(2008年版)内科学类的核心期刊、《中国学术期刊评价研究报告-RCES权威、核心期刊排行榜与指南》和

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

1.2 栏目 述评, 基础研究, 临床研究, 焦点论坛, 文献综述, 研究快报, 临床经验, 病例报告, 会议纪要。文稿应具科学性、先进性、可读性及实用性, 重点突出, 文字简练, 数据可靠, 写作规范, 表达准确。

2 撰稿要求

2.1 总体标准 文稿撰写应遵照国家标准GB7713科学技术报告、学位论文和学术论文的编写格式, GB6447文摘编写规则, GB7714文后参考文献著录规则, GB/T 3179科学技术期刊编排格式等要求; 同时遵照国际医学期刊编辑委员会(International Committee of Medical Journal Editors)制定的《生物医学期刊投稿的统一要求(第5版)》(Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals). 见: *Ann Intern Med* 1997; 126: 36-47。

2.2 名词术语 应标准化, 前后统一, 如原词过长且多次出现者, 可于首次出现时写出全称加括号内注简称, 以后直接用简称。医学名词以全国自然科学名词审定委员会公布的《生理学名词》、《生物化学名词与生物物理学名词》、《化学名词》、《植物学名词》、《人体解剖学名词》、《细胞生物学名词》及《医学名词》系列为准, 药名以《中华人民共和国药典》和卫生部药典委员会编的《药名词汇》为准, 国家食品药品监督管理局批准的新药, 采用批准的药名; 创新性新药, 请参照我国药典委员会的“命名原则”, 新译名词应附外文。公认习用缩略语可直接应用(建议第一次也写出全称), 如ALT, AST, mAb, WBC, RBC, Hb, T, P, R, BP, PU, GU, DU, ACTH, DNA, LD50, HBsAg, HCV

RNA, AFP, CEA, ECG, IgG, IgA, IgM, TCM, RIA, ELISA, PCR, CT, MRI等. 为减少排印错误, 外文、阿拉伯数字、标点符号必须正确打印在A4纸上. 中医药名词英译要遵循以下原则: (1)有对等词者, 直接采用原有英语词, 如中风stroke, 发热fever; (2)有对应词者应根据上下文合理选用原英语词, 如八法eight principal methods; (3)英语中没有对等词或相应词者, 宜用汉语拼音, 如阴yin, 阳yang, 阴阳学说yinyangology, 人中renzhong, 气功qigong; 汉语拼音要以词为单位分写, 如weixibao nizhuanwan(胃细胞逆转丸), guizhitang(桂枝汤). 通常应小写.

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

2.4 计量单位 采用国际单位制并遵照有关国家

标准, GB3100-3102-93量和单位. 原来的“分子量”应改为物质的相对分子质量. 如30 kD改为 M_r 30 000或30 kDa(M大写斜体, r小写正体, 下角标); “原子量”应改为相对原子质量, 即 A_r (A大写斜体, r小写正体, 下角标); 也可采用原子质量, 其单位是u(小写正体). 计量单位在+、-及-后列出. 在±前后均要列出, 如37.6 °C ± 1.2 °C, 45.6岁 ± 24岁, 56.4 d ± 0.5 d. 3.56 ± 0.27 pg/ml应为3.56 ng/L ± 0.27 ng/L. BP用kPa(mmHg), RBC数用 1×10^{12} /L, WBC数用 1×10^9 /L, WBC构成比用0.00表示, Hb用g/L. M_r 明确的体内物质以nmol/L或mmol/L表示, 不明确者用g/L表示. 1 M硫酸, 改为1 mol/L硫酸, 1 N硫酸, 改为0.5 mol/L硫酸. 长10 cm, 宽6 cm, 高4 cm, 应写成10 cm × 6 cm × 4 cm. 生化指标一律采用法定计量单位表示, 例如, 血液中的总蛋白、清蛋白、球蛋白、脂蛋白、血红蛋白、总脂用g/L, 免疫球蛋白用mg/L; 葡萄糖、钾、尿素、尿素氮、CO₂结合力、乳酸、磷酸、胆固醇、胆固醇酯、三酰甘油、钠、钙、镁、非蛋白氮、氯化物; 胆红素、蛋白结合碘、肌酸、肌酐、铁、铅、抗坏血酸、尿胆元、氨、维生素A、维生素E、维生素B1、维生素B2、维生素B6、尿酸; 氢化可的松(皮质醇)、肾上腺素、汞、孕酮、甲状腺素、睾酮、叶酸用nmol/L; 胰岛素、雌二醇、促肾上腺皮质激素、维生素B12用pmol/L. 年龄的单位有日龄、周龄、月龄和岁. 例如, 1秒, 1 s; 2分钟, 2 min; 3小时, 3 h; 4天, 4 d; 5周, 5 wk; 6月, 6 mo; 雌性♀, 雄性♂, 酶活性国际单位IU = 16.67 nkat, 对数log, 紫外uv, 百分比%, 升L, 尽量把 1×10^{-3} g与 5×10^{-7} g之类改成1 mg与0.5 mg, hr改成h, 重量γ改成mg, 长度m改成mm. 国际代号不用于无数值的文句中, 例如每天不写每d, 但每天8 mg可写8 mg/d. 在一个组合单位符号内不得有1条以上的斜线, 例如不能写成mg/kg/d, 而应写成mg/(kg·d), 且在整篇文章内应统一. 单位符号没有单、复数的区分, 例如, 2 min不是2 mins, 3 h不是3 hs, 4 d不是4 ds, 8 mg不是8 mgs. 半个月, 15 d; 15克, 15 g; 10%福尔马林, 40 g/L甲醛; 95%酒精, 950 mL/L乙醇; 5% CO₂, 50 mL/L CO₂; 1 : 1 000肾上腺素, 1 g/L肾上腺素; 胃黏膜含促胃液素36.8 pg/mg, 改为胃黏膜蛋白含促胃液素36.8 ng/g; 10%葡萄糖改为560 mmol/L或100 g/L葡萄糖; 45 ppm = 45×10^{-6} ; 离心的旋转频率(原称转速)用r/min, 超速者用g; 药物剂量若按体质量计算, 一律以“/kg”表示.

《世界华人消化杂志》为中国科技论文统计源核心期刊(2010年)和中文核心期刊要目总览(北京大学图书馆, 2008年版)收录的学术期刊.

《世界华人消化杂志》编辑部, 100025, 北京市朝阳区, 东四环中路62号, 远洋国际中心D座903室, 电话: 010-5908-0035, 传真: 010-8538-1893, Email: wjcd@wjgnet.com; http://www.wjgnet.com

2.5 统计学符号 (1) t 检验用小写 t ; (2) F 检验用英文大写 F ; (3)卡方检验用希腊文小写 χ^2 ; (4)样本的相关系数用英文小写 r ; (5)自由度用希腊文小写 ν ; (6)样本数用英文小写 n ; (7)概率用英文斜体大写 P . 在统计学处理中在文字叙述时平均数 \pm 标准差表示为 $\text{mean} \pm \text{SD}$, 平均数 \pm 标准误为 $\text{mean} \pm \text{SE}$. 统计学显著性用 $^aP < 0.05$, $^bP < 0.01$ ($P > 0.05$ 不注). 如同一表中另有一套 P 值, 则 $^cP < 0.05$, $^dP < 0.01$; 第三套为 $^eP < 0.05$, $^fP < 0.01$ 等.

2.6 数字用法 遵照国家标准GB/T 15835-1995出版物上数字用法的规定, 作为汉语词素者采用汉字数字, 如二氧化碳、十二指肠、三倍体、四联球菌、五四运动、星期六等. 统计学数字采用阿拉伯数字, 如1000-1500 kg, 3.5 mmol/L \pm 0.5 mmol/L等. 测量的数据不能超过其测量仪器的精密度, 例如6347意指6000分之一的精密度. 任何一个数字, 只允许最后一位有误差, 前面的位数不应有误差. 在一组数字中的 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 应考虑到个体的变差, 一般以SD的1/3来定位数, 例如3614.5 g \pm 420.8 g, SD的1/3达一百多g, 平均数波动在百位数, 故应写成3.6 kg \pm 0.4 kg, 过多的位数并无意义. 又如8.4 cm \pm 0.27 cm, 其SD/3 = 0.09 cm, 达小数点后第2位, 故平均数也应补到小数点后第2位. 有效位数以后的数字是无效的, 应该舍. 末尾数字, 小于5则舍, 大于5则进, 如恰等于5, 则前一位数逢奇则进, 逢偶(包括“0”)且5之后全为0则舍. 末尾时只可1次完成, 不得多次完成. 例如23.48, 若不要小数点, 则应成23, 而不应该23.48 \rightarrow 23.5 \rightarrow 24. 年月日采用全数字表达法, 请按国家标准GB/T 7408-94书写. 如1985年4月12日, 可写作1985-04-12; 1985年4月, 写作1985-04; 从1985年4月12日23时20分50秒起至1985年6月25日10时30分止, 写作1985-04-12 T23:20:50/1985-06-25 T10:30:00; 从1985年4月12日起至1985年6月15日止, 写作1985-04-12/06-16, 上午8时写作08:00, 下午4时半写作16:30. 百分数的有效位数根据分母来定: 分母 ≤ 100 , 百分数到个位; $101 \leq$ 分母 ≤ 1000 , 百分数到小数点后1位; 余类推. 小数点前后的阿拉伯数字, 每3位间空1/4阿拉伯数字距离, 如1486800.475 65. 完整的阿拉伯数字不移行!

2.7 标点符号 遵照国家标准GB/T 15834-1995标点符号用法的要求, 本刊论文中的句号都采用黑圆点; 数字间的起止号采用“-”字线, 并列的汉语词间用顿号分开, 而并列的外文词、阿拉伯数字、外文缩略词及汉语拼音字母拼写词间改用逗号分开, 参考文献中作者间一律用逗号

分开; 表示终了的标点符号, 如句号、逗号、顿号、分号、括号及书名号的后一半, 通常不用于一行之首; 而表示开头的标点符号, 如括号及书名号的前一半, 不宜用于一行之末. 标点符号通常占一格, 如顿号、逗号、分号、句号等; 破折号应占两格; 英文连字符只占一个英文字符的宽度, 不宜过长, 如5-FU. 外文字符下划一横线表示用斜体, 两横线表示用小写, 三横线表示用大写, 波纹线表示用黑体.

3 稿件格式

3.1 题名 简明确切地反映论文的特定内容, 鲜明而有特色, 阿拉伯数字不宜开头, 不用副题名, 一般20个字. 避免用“的研究”或“的观察”等非特定词.

3.2 作者 论文作者的署名, 按照国际医学杂志编辑委员会(ICMJE, International Committee of Medical Journal Editors)作者资格标准执行. 作者标准为: (1)对研究的理念和设计、数据的获得、分析和解读做出重大贡献; (2)起草文章, 并对文章的重要的知识内容进行批评性修改; (3)接受对准备发表文章的最后一稿. 作者应符合条件1, 2, 3, 对研究工作有贡献的其他人可放入志谢中. 作者署名的次序按贡献大小排列, 多作者时姓名间用逗号, 如是单名, 则在姓与名之间空1格(正文和参考文献中不空格). 《世界华人消化杂志》要求所有署名人写清楚自己对文章的贡献. 世界华人消化杂志不设置共同第一作者和共同通信作者.

3.3 单位 作者后写单位的全称空1格后再写省市及邮政编码. 格式如: 张旭晨, 梅立新, 承德医学院病理教研室 河北省承德市 067000

3.4 第一作者简介 格式如: 张旭晨, 1994年北京中医药大学硕士, 讲师. 主要从事消化系统疾病的病理研究.

3.5 作者贡献分布 格式如: 陈湘川与庞丽娟对此文所作贡献两均等; 此课题由陈湘川、庞丽娟、陈玲、杨兰、张金芳、齐妍及李洪安设计; 研究过程由陈玲、杨兰、张金芳、蒋金芳、杨磊、李锋及曹秀峰操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由曹秀峰提供; 数据分析由陈湘川、杨兰及庞丽娟完成; 本论文写作由陈湘川、庞丽娟及李洪安完成.

3.6 同行评议者 为了确保刊出文章的质量, 本刊即将开始实行接受稿件的同行评议公开策略, 将同行评议者姓名, 职称, 机构的名称与文章一同在脚注出版. 格式如: 房静远, 教授, 上海交通

大学医学院附属医院仁济医院,上海市消化疾病研究所.

3.7 基金资助项目 格式如: 国家自然科学基金资助项目, No. 30224801

3.8 通讯作者 格式如: 通讯作者: 黄缘, 教授, 330006, 江西省南昌市民德路1号, 南昌大学第二附属医院消化内科, 江西省分子医学重点实验室. huang9815@yahoo.com

电话: 0351-4078656 传真: 0351-4086337

收稿日期: 修回日期:

3.9 英文摘要

题名 文章的题名应言简意赅, 方便检索, 英文题名以不超过10个实词为宜, 应与中文题名一致.

作者 作者姓名汉语拼音拼写法规定为: 先名, 后姓; 首字母大写, 双名之间用半字线“-”分开, 多作者时姓名间加逗号. 格式如: “潘伯荣”的汉语拼写法为“Bo-Rong Pan”.

单位 先写作者, 后写单位的全称及省市邮政编码. 例如: Xu-Chen Zhang, Li-Xin Mei, Department of Pathology, Chengde Medical College, Chengde 067000, Hebei Province, China

基金资助项目 格式如: Supported by National Natural Science Foundation of China, No.30224801

通讯作者 格式如: Correspondence to: Dr. Lian-Sheng Ma, Taiyuan Research and Treatment Center for Digestive Diseases, 77 Shuangta Xijie, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China. wcjd@wjgnet.com

收稿及修回日期 格式如: Received: Revised:

摘要 包括目的、方法、结果、结论, 书写要求与中文摘要一致.

3.10 中文摘要 必须在300字左右, 内容应包括目的(应阐明研究的背景和设想、目的), 方法(必须包括材料或对象. 应描述课题的基本设计, 双盲、单盲还是开放性, 使用什么方法, 如何进行分组和对照, 数据的精确程度. 研究对象选择条件与标准是否遵循随机化、齐同化的原则, 对照组匹配的特征. 如研究对象是患者, 应阐明其临床表现, 诊断标准. 如何筛选分组, 有多少例进行过随访, 有多少例因出现不良反应而中途停止研究), 结果(应列出主要结果, 包括主要数据, 有什么新发现, 说明其价值和局限, 叙述要真实、准确、具体, 所列数据经用何种统计学方法处理; 应给出结果的置信区间和统计学显著性检验的确切值; 概率写 P , 后应写出相应显著性检验值), 结论(全文总结, 准确无误的观点及价值).

3.11 正文标题层次 0 引言; 1 材料和方法, 1.1 材

料, 1.2 方法; 2 结果; 3 讨论; 4 参考文献. 序号一律左顶格写, 后空1格写标题; 2级标题后空1格接正文. 正文内序号连排用(1), (2), (3). 以下逐条陈述.

0 引言 应包括该研究的目的和该研究与其他相关研究的关系.

1 材料和方法 应尽量简短, 但应让其他有经验的研究者能够重复该实验. 对新的方法应该详细描述, 以前发表过的方法引用参考文献即可, 有关文献中或试剂手册中的方法的改进仅描述改进之处即可.

2 结果 实验结果应合理采用图表和文字表示, 在结果中应避免讨论.

3 讨论 要简明, 应集中对所得的结果做出解释而不是重复叙述, 也不应是大量文献的回顾.

图表的数量要精选. 表应有表序和表题, 并有足够具有自明性的信息, 使读者不查阅正文即可理解该表的内容. 表内每一栏均应有表头, 表内非公知通用缩写应在表注中说明, 表格一律使用三线表(不用竖线), 在正文中该出现的地方应注出. 图应有图序、图题和图注, 以使其容易被读者理解, 所有的图应在正文中该出现的地方注出. 同一个主题内容的彩色图、黑白图、线条图, 统一用一个注解分别叙述. 如: 图1 萎缩性胃炎治疗前后病理变化. A: ...; B: ...; C: ...; D: ...; E: ...; F: ...; G: ... 曲线图可按●、○、■、□、▲、△顺序使用标准的符号. 统计学显著性用: $^aP<0.05$, $^bP<0.01$ ($P>0.05$ 不注). 如同一表中另有一套 P 值, 则 $^cP<0.05$, $^dP<0.01$; 第3套为 $^eP<0.05$, $^fP<0.01$. P 值后注明何种检验及其具体数字, 如 $P<0.01$, $t = 4.56$ vs 对照组等, 注在表的左下方. 表内采用阿拉伯数字, 共同的计量单位符号应注在表的右上方, 表内个位数、小数点、±、-应上下对齐. “空白”表示无此项或未测, “-”代表阴性未发现, 不能用同左、同上等. 表图勿与正文内容重复. 表图的标目尽量用 t/min , $c/(\text{mol/L})$, p/kPa , V/mL , $t/^\circ\text{C}$ 表达.

志谢 后加冒号, 排在讨论后及参考文献前, 左齐.

4 参考文献 本刊采用“顺序编码制”的著录方法, 即以文中出现顺序用阿拉伯数字编号排序. 提倡对国内同行近年已发表的相关研究论文给予充分的反映, 并在文内引用处右上角加方括号注明角码. 文中如列作者姓名, 则需在“Pang等”的右上角注角码号; 若正文中仅引用某文献中的论述, 则在该论述的句末右上角注码号. 如马连生^[1]报告……, 潘伯荣等^[2-5]认

《世界华人消化杂志》自2006-01-01起改为旬刊发行, 每月8、18、28日出版. 北京报刊发行局发行, 邮发代号: 82-262.

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

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。期刊: 序号, 作者(列出全体作者), 文题, 刊名, 年, 卷, 起页-止页, PMID和DOI编号; 书籍: 序号, 作者(列出全部), 书名, 卷次, 版次, 出版地, 出版社, 年, 起页-止页。

5 网络版的发表前链接 本刊即将开始实行网络版的每篇文章上都有该文发表前纪录的链接, 包括首次提交的稿件, 同行评议人报告, 作者给审稿人回信和作者修回稿, 以PDF格式上传。读者可以针对论文、审稿意见和作者的修改情况发表意见, 指出问题与不足; 作者也可以随时修改完善自己发表的论文, 使文章的发表成为一个编者、同行评议者、读者、作者互动的动态过程。

4 写作格式实例

4.1 述评写作格式实例

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

4.2 研究原著写作格式实例

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

4.3 焦点论坛写作格式实例

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

4.4 文献综述写作格式实例

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

4.5 研究快报写作格式实例

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

4.6 临床经验写作格式实例

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

4.7 病例报告写作格式实例

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

5 投稿方式

接受在线投稿, 不接受其他方式的投稿, 如E-mail、打印稿。在线投稿网址: <http://www.baishideng.com/wcjd/ch/index.aspx>。无法在线提交的通过submission@wjgnet.com, 电话: 010-8538-1892, 传真: 010-8538-1893寻求帮助。投稿须知下载网址<http://www.wjgnet.com/1009-3079/tgxz.pdf>。审稿过程平均时间需要14-28 d。所有的来

稿均经2-3位同行专家严格评审, 2位或以上通过为录用, 否则将退稿或修改后再审。接受后的稿件作者需缴纳稿件发表费, 文章发表后可获得1本样刊及10套单行本(稿酬)。

6 修回稿须知

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

6.2 稿件修改 来稿经同行专家审查后, 认为内容需要修改、补充或删除时, 本刊编辑部将把原稿连同审稿意见、编辑意见寄回给作者修改, 而作者必须于15 d内将单位介绍信、作者符合要点承诺书、版权转让信等书面材料寄回编辑部, 同时将修改后的电子稿件上传至在线办公系统; 逾期寄回, 所造成的问题由作者承担责任。

6.3 版权 本论文发表后作者享有非专有权, 文责由作者自负。作者可在本单位或本人著作集中汇编出版以及用于宣讲和交流, 但应注明发表于《世界华人消化杂志》××年; 卷(期): 起止页码。如有国内外其他单位和个人复制、翻译出版等商业活动, 须征得《世界华人消化杂志》编辑部书面同意, 其编辑版权属本刊所有。

《世界华人消化杂志》编辑部

北京百世登生物医学科技有限公司
100025, 北京市朝阳区东四环中路62号
远洋国际中心D座903室
电话: 010-5908-0035
传真: 010-8538-1893
E-mail: wcjd@wjgnet.com
<http://www.wjgnet.com>

2011年国内国际会议预告

2011-08-20/22

第十五次全国中西医结合儿科学术会议

会议地点: 兰州市

联系方式: zxyek@sina.com

2011-08-26/27

第四届福瑞肝纤维化论坛

会议地点: 上海市

联系方式: bstract@cosoman.com

2011-08-31/09-02

腹腔间室综合征的护理进展

会议地点: 延吉市

联系方式: qiyan68@126.com

2011-09

中华医学会超声医学分会第十一次全国超声医学学术会议

会议地点: 青岛市

联系方式: <http://www.nccsum.org/>

2011-09-14/17

第六届全国疑难及重症肝病大会

会议地点: 兰州市

联系方式: office@cnsld.org

2011-09-14/18

第十四届全国临床肿瘤学大会暨2011年CSCO学术年会

会议地点: 福州市

联系方式: 010-67726451

2011-09-16/18

第七届全国消化系统中晚期恶性肿瘤学术年会

会议地点: 济南市

联系方式: xiaohuahuiyi@126.com

2011-09-24

2011中国消化病学大会

会议地点: 北京市

联系方式: 010-51292005-105

2011-09-25/26

2011北京消化内镜节

会议地点: 北京市

联系方式: 010-51292005-105

2011-10-07/09

第八届亚太肝病学会主题会议

会议地点: 北京市

联系方式: info@apaslstc.org

2011-10-13/16

2011年亚太地区国际肿瘤生物学和医学学术会议

会议地点: 上海市

联系方式: clinimmunchina@yahoo.com

2011-10-14/16

中华医学会第五次全国艾滋病、病毒性丙型肝炎暨全国

热带病学术会议

会议地点: 重庆市

联系方式: www.nccsid.org

2011-10-21/23

中华医学会病理学分会第十七次学术会议

会议地点: 杭州市

联系方式: leighdai@cma.org.cn

2011-10-22/26

第19届欧洲肠胃病学联合组织(UEG)会议周

会议地点: 斯德哥尔摩

联系方式: uegw2011@cpo-hanser.de

2011-10-28/11-02

2011美国胃肠病学会年度科学会议

会议地点: 华盛顿

联系方式: annualmeeting@acg.gi.org

2011-11-04/08

第62届美国肝病研究学会(AASLD)年会

会议地点: 旧金山

联系方式: medical_conference@263.net

2011-11-18/23

第十一届全国消化道恶性病变介入诊疗研讨会暨2011全

国内镜/介入/放疗新技术国际论坛

会议地点: 北京市

联系方式: doctor302@163.com

2011-11-25/27

2011年全国消化道静脉曲张及其伴发消化疾病内镜诊治研讨会

会议地点: 西安市

联系方式: 2011varices@sina.com

2011-12-08/11

第11次全国消化系疾病学术会议

会议地点: 杭州市

联系方式: csgdabstract@126.com

2011-12-09/11

江苏省第四次胃肠外科学术会议

会议地点: 南京市

联系方式: jswwk@yahoo.com.cn

志谢世界华人消化杂志编委

本期文章审稿中(包括退稿), 我刊编委付出了宝贵的时间和大量的精力, 提高了《世界华人消化杂志》的学术质量, 在此表示衷心感谢!

陈进宏 副主任医师
复旦大学附属华山医院外科

杜奕奇 副教授
中国人民解放军第二军医大学长海医院消化内科

樊红 教授
东南大学医学院发育与疾病相关基因教育部重点实验室

冯志杰 主任医师
河北医科大学第二医院消化内科

高润平 教授
吉林大学第一医院肝病科

葛海燕 教授
同济大学附属第十人民医院普通外科

何晓顺 教授
中山大学附属第一医院器官移植科

黄颖秋 教授
本溪钢铁(集团)有限责任公司总医院消化内科

江米足 教授
浙江大学医学院附属儿童医院儿科

姜春萌 教授
大连医科大学附属第二医院消化科

姜相君 主任医师
青岛市市立医院消化科

李军祥 教授
北京中医药大学附属东方医院消化内科

李康 副教授
广东药学院药科学院药物分析教研室

李淑德 主任医师
中国人民解放军第二军医大学长海医院消化内科

李勇 副教授
上海中医药大学附属市中医医院消化科

李瑜元 教授
广州市第一人民医院内科

刘改芳 主任医师
河北医科大学第三医院消化内科

刘海林 主任医师
上海交通大学医学院附属第九人民医院消化科

刘连新 教授
哈尔滨医科大学第一临床医学院普通外科

吕宾 教授
浙江中医学院附属医院消化科

马欣 主任医师
甘肃省人民医院消化科

牛英才 副研究员
齐齐哈尔医学院医药科学研究所

汪思应 教授
安徽医科大学实验动物中心

王娅兰 教授
重庆医科大学基础医学院病理教研室

王振宁 教授
中国医科大学附属第一医院肿瘤外科

肖恩华 教授
中南大学湘雅二医院放射教研室

杨柏霖 副主任医师
南京中医药大学附属医院结直肠外科

袁红霞 教授
天津中医药大学消化科

张必翔 主任医师
华中科技大学同济医学院附属同济医院肝脏外科

张军 教授
西安交通大学医学院第二附属医院消化内科