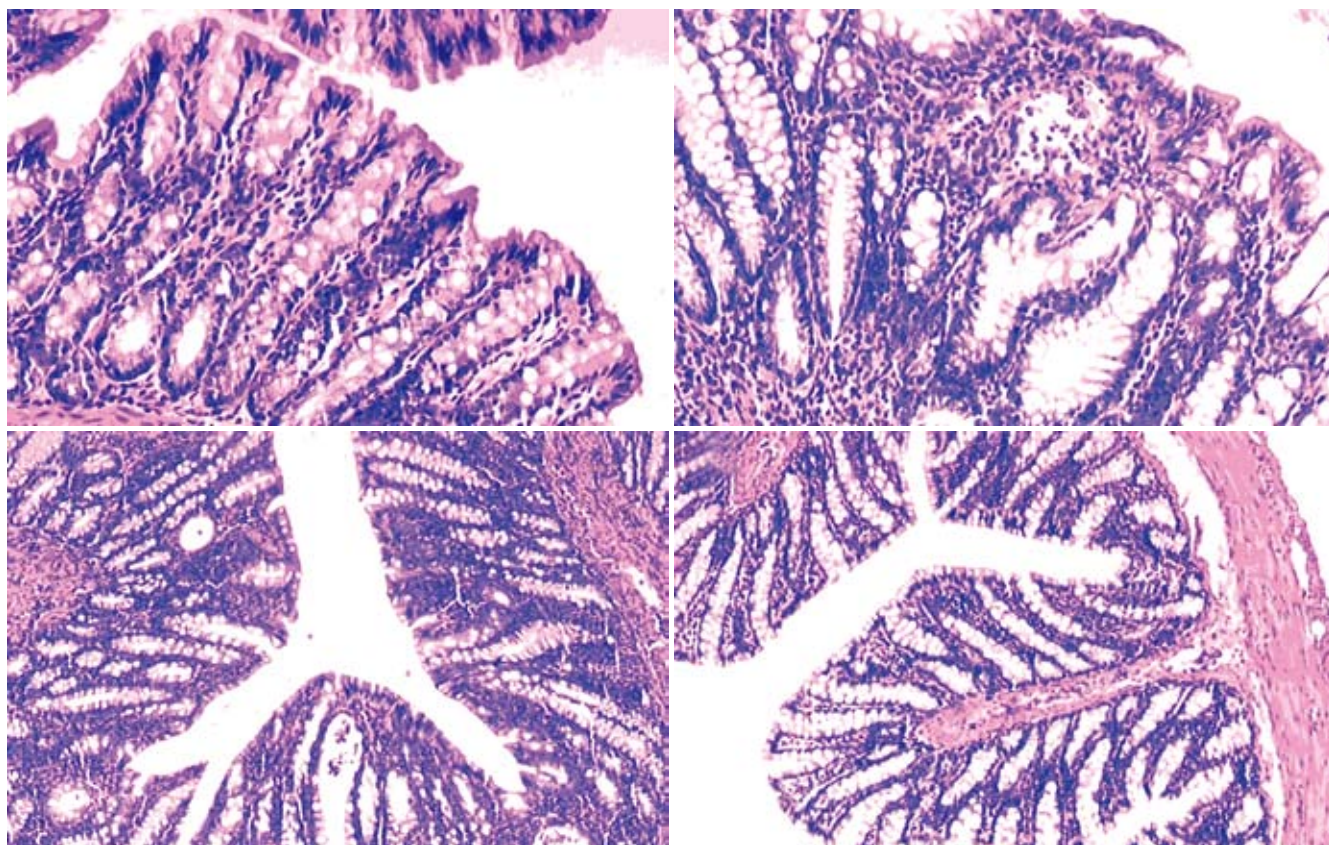


世界华人消化杂志®

WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2009 年 2 月 8 日 第 17 卷 第 4 期 (Volume 17 Number 4)



4 / 2009

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®

编辑委员会

2009-01-01/2011-12-31

wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

总顾问

陈可冀教授
黄象谦教授
黄志强教授
王宝恩教授
危北海研究员
吴孟超教授
杨春波教授
周殿元教授

名誉总编辑

潘伯荣教授

社长/总编辑

马连生教授

副总编辑

纪小龙教授
姜洪池教授
王苑本教授
吴云林教授
徐克成教授
杨思风教授
姚希贤教授
岳茂兴教授
张万岱教授
周学文教授

常务编委

程英升教授
范学工教授
高毅主任医师
江学良主任医师
李岩教授
刘连新教授
吕宾教授
罗和生教授
聂青和教授
王小众教授

编委

消化内科学

白爱平副教授
聂新明教授
陈洪副教授

陈其奎教授
陈卫昌教授
陈贻胜教授
程斌副教授
迟宝荣教授
崔立红副教授
邓长生教授
丁士刚主任医师
董蕾教授
杜雅菊主任医师
樊晓明主任医师
房静远教授
冯志杰主任医师
傅春彬主任医师
高峰副教授
戈之铮教授
关玉盘教授
郭晓钟教授
何松教授
洪天配教授
胡伏莲教授
胡和平主任医师
黄晓东副主任医师
黄颖秋教授
黄缘教授
季国忠副教授
江米足主任医师
姜春萌教授
姜慧卿教授
金瑞教授
蓝宇教授
李定国教授
李淑德教授
李瑜元教授
李玉民教授
李玉明教授
李祖国副教授
林志辉教授
刘冰熔教授
刘凤斌教授
刘改芳主任医师
刘海林主任医师
刘占举教授
陆伦根教授
马欣主任医师

倪润洲教授
欧希龙副教授
潘秀珍教授
朴云峰教授
秦成勇教授
任粉玉副教授
任建林教授
邵先玉教授
沈琳主任医师
沈守荣教授
沈薇教授
施瑞华教授
宋军副教授
宋于刚教授
唐世刚教授
王邦茂教授
王炳元教授
王承党副教授
王晓艳副教授
闻勤生教授
夏冰教授
夏时海副教授
徐可树教授
许乐主任医师
杨建民教授
姚树坤教授
叶红军主任医师
张春清教授
张国梁主任医师
张军教授
张小晋主任医师
张晓岚教授
张筱茵副教授
张志坚教授
郑培永副教授
郑鹏远教授
周国雄主任医师
朱春兰主任医师
邹晓平主任医师

消化外科学

别平教授
蔡开琳副教授
蔡三军主任医师
曹杰主任医师

陈光教授
陈海龙教授
陈积圣教授
陈进宏副主任医师
陈力教授
陈立波副教授
陈凜教授
陈强谱教授
陈汝福教授
陈亚军主任医师
陈钟教授
程爱国教授
程爱群主任医师
程树群副教授
仇毓东副教授
崔云甫教授
戴朝六教授
戴冬秋教授
单云峰副主任医师
丁义涛教授
董明教授
房林副教授
傅红副教授
傅华群教授
傅志仁主任医师
葛海燕教授
龚建平教授
巩鹏副教授
谷俊朝主任医师
顾岩教授
韩天权教授
郝纯毅主任医师
何超教授
何裕隆教授
黄志勇副教授
季加孚教授
英卫东副主任医师
蒋龙元副教授
李国威教授
李华副教授
李华山副主任医师
李靖副教授
李奇林教授
李胜研究员
李涛副主任医师

李文岗副教授
李旭副教授
梁力建教授
刘超副教授
刘建教授
刘作金副教授
卢实春教授
陆才德教授
禄韶英副主任医师
吕明德教授
吕云福教授
彭吉润主任医师
彭心宇教授
秦春宏副主任医师
秦华东教授
秦环龙教授
秦建民副主任医师
邱宝安主任医师
邱双健副教授
邱伟华副主任医师
裘正军教授
沈柏用副教授
沈世强教授
施诚仁教授
石毓君副研究员
宋振顺教授
孙诚谊教授
孙学英教授
孙延平副主任医师
邵升副教授
汤恢煊教授
田晓峰教授
汪波副主任医师
汪根树副教授
王春友教授
王德盛副主任医师
王凤山教授
王广义教授
王健生副教授
王鲁副教授
王蒙副教授
王石林主任医师
王文跃主任医师
王要军教授
王悦华副主任医师

世界华人消化杂志®

编辑委员会

王振宁教授
王正康教授
王志刚副主任医师
王忠裕教授
吴河水教授
吴健雄教授
吴金术教授
吴泰璜教授
吴志勇教授
谢敏主任医师
谢晓华副教授
邢光明教授
徐大华主任医师
徐迅迪副主任医师
徐泱副主任医师
许戈良教授
严律南教授
杨柏霖副主任医师
杨家和主任医师
杨秋蒙副主任医师
杨维良教授
伊力亚尔·夏合丁教授
殷正丰教授
于聪慧教授
于则利教授
郁宝铭教授
元云飞教授
张佳林教授
张进祥副教授
张俊副研究员
张群华教授
张水军教授
张宗明教授
周伟平教授
邹小明教授

消化感染病学

陈国凤主任医师
陈红松副研究员
陈建杰教授
陈仕珠主任医师
陈耀凯副教授
陈志辉副主任医师
党双锁教授
丁惠国教授
范建高教授
范小玲主任医师

高润平教授
高泽立副教授
龚国忠教授
管世鹤副教授
何生松教授
胡国信副主任医师
林菊生教授
刘杞教授
刘正稳教授
貌盼勇研究员
宁琴教授
钱林学主任医师
秦波教授
石统东副教授
孙殿兴主任医师
谭德明教授
汤华研究员
唐霓副研究员
唐晓鹏教授
王凯教授
王怡主任医师
魏来教授
吴建国教授
吴君主任医师
宣世英教授
杨江华副主任医师
杨林副研究员
姚鹏副教授
张继明教授
张明辉副主任医师
张绪清副教授
张占卿主任医师
赵桂鸣主任医师
赵连三教授
周霞秋教授
朱传武副主任医师
庄林主任医师

消化中医药学

蔡淦教授
陈治水主任医师
杜群副研究员
黄恒青主任医师
李军祥教授
李勇副教授
李振华教授
刘成海研究员

刘孟安教授
刘平教授
刘绍能主任医师
沈洪教授
唐志鹏研究员
王富春教授
王新月教授
谢鸣教授
徐列明教授
许玲副教授
张声生教授

消化肿瘤学

曹秀峰主任医师
曹志成院士
陈公琰主任医师
李璦教授
刘宝瑞教授
刘彬彬副研究员
刘云鹏教授
沈克平主任医师
肖文华主任医师
熊斌教授
张凤春教授

消化影像学

白彬主任医师
陈克敏教授
官泳松教授
韩新巍教授
李健丁教授
龙学颖副主任医师
倪才方教授
魏经国教授
肖恩华教授
徐爱民副教授
徐克教授
杨业发教授
杨建勇教授
赵卫主任医师

消化内镜及介入治疗学

丁佑铭教授
郝俊鸣副主任医师
潘林娜教授
孙明军教授
万军教授

吴硕东教授
袁友红副教授

消化中西医结合学

唐文富副教授
王学美研究员
张春虎副教授

消化基础研究

曹洁副教授
曹鹏副研究员
樊红副教授
高春芳研究员
高国全教授
高英堂研究员
管冬元副教授
胡旭初副教授
黄文林教授
李刚教授
李杰副教授
李永哲副研究员
李增山副教授
刘克辛教授
梅林教授
彭曦副研究员
钱睿哲教授
任超世研究员
任浩副教授
台桂香教授
谭学瑞教授
田颖刚副研究员
汪思应教授
吴军研究员
吴俊华副教授
徐宁志研究员
许文燮教授
姚登福教授
阴赅宏研究员
郁卫东副研究员
喻荣彬副教授
张青云研究员
张学教授
赵平副教授
周南进研究员
周士胜教授
周素芳教授
周晓东研究员

周晓武副主任医师

消化病理学

杜祥教授
李淳副教授
刘丽江教授
刘勇钢副主任医师
马大烈教授
潘兴华副主任医师
王鲁平主任医师
王娅兰教授
魏蕾教授
阎晓初副教授
颜宏利副教授
于颖彦教授
余宏宇教授
张锦生教授
赵景民教授
朱亮副教授

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ● 2009 年 2 月 8 日 第 17 卷 第 4 期 (总第264期)

述 评

- 343 2008年版NCCN结肠癌临床实践指南解读
步召德, 季加孚

基 础 研 究

- 347 氯膦酸二钠脂质体对大鼠腹腔巨噬细胞功能的影响
张建新, 尹江涛, 党胜春, 崔磊
- 352 肝脏血流阻断下兔VX2肝肿瘤射频消融的疗效观察
韩建波, 仇毓东, 张炜炜, 孔文韬, 邱君澜, 韩冰
- 357 表没食子儿茶素没食子酸酯对缺氧诱导的肝细胞癌HepG2细胞HIF-1 α 及VEGF蛋白表达的影响
王熙, 谢纪文, 刘礼

临 床 研 究

- 362 清肝利湿汤干预慢性乙型肝炎胆湿热证的蛋白质组学分析
戴姣, 戴幸平, 邢之华, 李萃, 李家邦, 蒋荣鑫
- 368 P53和Bcl-2家族蛋白在胰腺癌中的表达
吴幸, 崔海宁, 明松林, 王正文, 欧树安, 陈兴超, 余壮明
- 373 磁共振DWI技术在腹水病因诊断中的价值
靳瑞娟, 马强华, 杨晓萍, 叶建军, 陈纲, 罗樱

文 献 综 述

- 378 COX-2与胃癌关系的研究进展
王俊先, 张开光
- 384 CD8+CTL在乙型肝炎发病作用中的研究现状及进展
赵永晓, 冯丽英
- 389 Th17细胞在炎症性肠病发生过程中的免疫病理作用
杨丽, 刘占举

研 究 快 报

- 395 电针足三里在血容量失血大鼠口服补液时对胃排空率、血浆一氧化氮及胃动素的影响
张立俭, 胡森, 侯经元, 周国勇, 石现, 盛志勇
- 399 甘草酸二铵对溃疡性结肠炎大鼠的治疗作用
霍丽娟, 郭海荣

临 床 经 验

- 405 粪便抗原检测儿童及青少年幽门螺杆菌感染诊断试验的系统评价
张天哲, 张铁民, 韩健, 高静云
- 411 胃镜检出老年消化性溃疡124例
刘贝妮, 于皆平, 于红刚
- 414 高频电切联合氩离子凝固术在治疗胃多发息肉中的应用
黄骏, 吴小薇, 曾勇, 于皆平
- 417 Caveolin-2基因甲基化状态在胃癌组织中的检测
何欣, 刘斌, 邢传平, 哈小琴, 董亮, 钱震, 刘茗露, 苏勤军
- 421 趋化因子受体CXCR4在胃肠道肿瘤组织及细胞系中的异常表达
王佐周, 郭玉坤
- 425 恩替卡韦治疗慢性乙型肝炎30例
李金全, 耿长新, 吕志国

	<div>429 直肠癌前切除手术术后吻合口漏的风险因素分析 何楠, 曹家庆, 朱培谦, 王梦龙, 熊炳贤</div> <div>433 细胞核和线粒体微卫星不稳在大肠癌发生中的作用及两者的关系 崔海宏, 韩英, 王继恒, 曹建彪, 李恕军, 杨欣艳, 范如英</div> <div>437 腹腔脏器淋巴管瘤的诊断和治疗20例 施伟斌, 全志伟, 王雪峰</div>
致 谢	<div>440 致谢世界华人消化杂志编委</div>
消 息	<div>346 世界华人消化杂志修回稿须知</div> <div>361 世界华人消化杂志英文摘要要求</div> <div>388 世界华人消化杂志性质、刊登内容及目标</div> <div>394 世界华人消化杂志数字用法标准</div> <div>398 中国科技期刊引证报告(核心版)发布世界华人消化杂志2007年影响因子0.568</div> <div>404 世界华人消化杂志参考文献要求</div> <div>416 世界华人消化杂志标点符号用法</div> <div>420 <i>WJG</i>荣获2007年“中国百种杰出学术期刊”和2008年中国国际化精品科技期刊</div> <div>428 世界华人消化杂志名词术语标准</div> <div>432 世界华人消化杂志正文要求</div> <div>439 世界华人消化杂志外文字符标准</div>
封面故事	<div>霍丽娟, 郭海荣. 甘草酸二铵对溃疡性结肠炎大鼠的治疗作用.</div> <div>世界华人消化杂志 2009; 17(4): 399-404</div> <div>http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/399.asp</div>
本期责任人	<div>编务 刘晓芳; 送审编辑 李军亮, 史景红; 组版编辑 何基才; 责任编辑 李军亮; 英文编辑 张海宁, 张晓枚;</div> <div>审核编辑 张海宁; 形式规范 马连生</div>

<div><div>世界华人消化杂志</div><div>Shijie Huaren Xiaohua Zazhi</div><div>吴阶平 题写封面刊名 陈可冀 题写版权刊名 (旬刊)</div><div>创 刊 1993-01-15 改 刊 1998-01-25 出 版 2009-02-08 原刊名 新消化病学杂志</div></div> <div><div>名誉总编辑 潘伯荣</div><div>总 编 辑 马连生</div><div>常务副总编辑 张海宁</div><div>编辑部主任 张海宁</div><div>期 刊 名 称 世界华人消化杂志</div><div>主 管 单 位 山西省科学技术厅</div><div>主 办 单 位 太原消化病研治中心</div></div>	<div><div>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</div><div><div>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</div><div><div>印刷 北京科信印刷厂</div><div>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)</div><div><div>订购 全国各地邮电局</div><div>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</div></div></div></div></div>	<div><div>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.</div><div><div>世界华人消化杂志正式开通了在线办公系统(http://wcjd.wjgnet.com), 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.</div><div><div>特别声明</div><div>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.</div><div>2009年版权归世界华人消化杂志所有</div></div></div></div>
---	--	--

中国标准连续出版物号	ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R	邮发代号 82-262	国外代号 M 4481	国内定价 每期24.00元 全年864.00元	广告经营许可证 1401004000050
------------	--------------------------------	----------------	----------------	----------------------------	--------------------------

World Chinese Journal of Digestology

February 2009 Contents in Brief Volume 17 Number 4

EDITORIAL	343 Explanations of the NCCN clinical practice guidelines 2008 on colon cancer <i>Bu ZD, Ji JF</i>
BASIC RESEARCH	347 Influence of liposomal clodronate upon peritoneal macrophages in rats <i>Zhang JX, Yin JT, Dang SC, Cui L</i> 352 Effect of vascular occlusion on radiofrequency ablation of the liver in a rabbit VX2 tumor model <i>Han JB, Qiu YD, Zhang WW, Kong WT, Qiu JL, Han B</i> 357 Effect of (-)-epigallocatechin-3-gallate on hypoxia-induced expression of HIF-1 α and VEGF protein in HepG2 cells <i>Wang X, Xie JW, Liu L</i>
CLINICAL RESEARCH	362 Proteomic analysis on chronic hepatitis B of liver-gallbladder dampness-heat type treated with Qinggan Lishi decoction <i>Dai J, Dai XP, Xing ZH, Li C, Li JB, Jiang RX</i> 368 Expression of apoptosis-related Bcl-2-family and P53 in human adenocarcinoma of the pancreas <i>Wu X, Cui HN, Ming SL, Wang ZW, Ou SA, Chen XC, Yu ZM</i> 373 Value of MRI diffusion-weighted imaging in diagnosis of ascites <i>Jin RJ, Ma QH, Yang XP, Ye JJ, Chen G, Luo Y</i>
REVIEW	378 Advance in relationship between COX-2 and gastric cancer <i>Wang JX, Zhang KG</i> 384 Current status and advance of CD8+CTL in occurrence of hepatitis B <i>Zhao YX, Feng LY</i> 389 Immunopathological role of Th17 cells in development of inflammatory bowel disease <i>Yang L, Liu ZJ</i>
RAPID COMMUNICATION	395 Effect of electro-acupuncture at Zusanli points on gastric emptying and plasma contents of NO and MTL during oral fluid resuscitation of hemorrhagic shock in rats with blood volume loss <i>Zhang LJ, Hu S, Hou JY, Zhou GY, Shi X, Sheng ZY</i> 399 Effects of diammonium glycyrrhizinate on ulcerative colitis in rats <i>Huo LJ, Guo HR</i>
CLINICAL PRACTICE	405 Diagnosis of <i>H pylori</i> infection in children and teenagers by <i>H pylori</i> stool antigen test: a systematic review <i>Zhang TZ, Zhang TM, Han J, Gao JY</i> 411 Analysis of 124 cases with senile peptic ulcer detected by gastroscopy <i>Liu BN, Yu JP, Yu HG</i> 414 Treatment of gastric polypus with high-frequency electroresection combined with argon <i>Huang J, Wu XW, Zeng Y, Yu JP</i> 417 Detection of methylation status of Caveolin-2 gene in gastric carcinoma <i>He X, Liu B, Xing CP, Ha XQ, Dong L, Qian Z, Liu ML, Su QJ</i>

	<p>421 Aberrant expression of chemokine receptor CXCR4 in gastrointestinal cancer tissues and cancer cell lines <i>Wang ZZ, Guo YK</i></p> <p>425 Therapeutic efficacy of entecavir in chronic HBV-infected patients: an analysis of 30 cases <i>Li JJ, Geng CX, Lv ZG</i></p> <p>429 Risk factors for anastomotic leakage after anterior resection for rectal cancer: an analysis of 518 cases <i>He N, Cao JQ, Zhu PQ, Wang ML, Xiong BX</i></p> <p>433 Nuclear and mitochondrial microsatellite instability in colorectal cancer <i>Cui HH, Han Y, Wang JH, Cao JB, Li SJ, Yang XY, Fan RY</i></p> <p>437 Diagnosis and treatment for abdominal lymphangioma: an analysis of 20 cases <i>Shi WB, Quan ZW, Wang XF</i></p>
ACKNOWLEDGMENT	440 Acknowledgments to reviewers of World Chinese Journal of Digestology
COVER	<p><i>Huo LJ, Guo HR.</i> Effects of diammonium glycyrrhizinate on ulcerative colitis in rats. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2009; 17(4): 399-404 http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/399.asp</p>
RESPONSIBLE EDITORS FOR THIS ISSUE	<p>Assistant Editor: <i>Xiao-Fang Liu</i> Review Editor: <i>Jun-Liang Li, Jing-Hong Shi</i> Electronic Page Editor: <i>Ji-Cai He</i> Editor-in-Charge: <i>Jun-Liang Li</i> English Language Editor: <i>Hai-Ning Zhang, Xiao-Mei Zhang</i> Proof Editor: <i>Hai-Ning Zhang</i> Layout Editor: <i>Lian-Sheng Ma</i></p>

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

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

Founded on January 15, 1993
Renamed on January 25, 1998
Publication date February 8, 2009

NAME OF JOURNAL

World Chinese Journal of Digestology

RESPONSIBLE INSTITUTION

Department of Science and Technology
of Shanxi Province

SPONSOR

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

EDITING

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

PRINTING

Beijing Kexin Printing House

PUBLISHING

Editorial Department of *World Chinese Journal of Digestology*, 77 Shuangta Xijie, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China
Telephone: +86-351-4078656
E-mail: wjcd@wjgnet.com
<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: Hai-Ning Zhang

SUBSCRIPTION

RMB 24 Yuan for each issue
RMB 864 Yuan for one year

CSSN

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

COPYRIGHT

© 2009 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 © 2009 by Editorial Department of *World Chinese Journal of Digestology*

2008年版NCCN结肠癌临床实践指南解读

步召德, 季加孚

步召德, 季加孚, 北京肿瘤医院 北京大学临床肿瘤学院胃肠外科 北京市 100142

季加孚, 教授, 博士生导师, 主要从事消化系统肿瘤的基础和临床研究。

通讯作者: 季加孚, 100036, 北京市海淀区阜成路52号, 北京大学临床肿瘤学院, 北京肿瘤医院外科. jiafuj@hotmail.com

电话: 010-88196048

收稿日期: 2009-01-07 修回日期: 2009-01-29

接受日期: 2009-02-02 在线出版日期: 2009-02-08

Explanations of the NCCN clinical practice guidelines 2008 on colon cancer

Zhao-De Bu, Jia-Fu Ji

Zhao-De Bu, Jia-Fu Ji, Department of Gastroenterological Surgery, Beijing Cancer Hospital and School of Oncology Beijing University, Beijing 100142, China

Correspondence to: Jia-Fu Ji, Department of Gastroenterological Surgery, Beijing Cancer Hospital and School of Oncology Beijing University, Beijing 100142, China. jiafuj@hotmail.com

Received: 2009-01-07 Revised: 2009-01-29

Accepted: 2009-02-02 Published online: 2009-02-08

Abstract

Colon cancer is one of the most frequently diagnosed cancer all over the world. Standardized management improves outcome. Many associations have formulated guidelines for colon cancer, however, the National Comprehensive Cancer Network (NCCN) clinical guidelines has been the most widely accepted one. The guidelines are revised 3-4 versions each year. There are many modifications in 2008 version from their previous ones, for instance KRAS mutation test has been especially emphasized in 2008 version. In this paper we reviewed and explained NCCN clinical practice guidelines 2008 in colon cancer.

Key Words: National Comprehensive Cancer Network; Colon cancer; Guideline

Bu ZD, Ji JF. Explanations of the NCCN clinical practice guidelines 2008 on colon cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(4): 343-346

摘要

结肠癌是全球最常见的恶性肿瘤之一, 规范治

疗非常必要。全球很多组织推出了诊疗规范, 其中NCCN临床实践指南的被接收程度最高。该组织10余年前就开始制定和推广结肠癌规范, 每年更新3-4次。2008年的结肠癌临床实践指南做了比较大的更新, 特别是关于分子靶向药物的应用, 强调在用药前进行基因检测。本文将对2008年更新内容进行综述和解读。

关键词: 国家癌症综合治疗联盟; 结肠癌; 指南

步召德, 季加孚. 2008年版NCCN结肠癌临床实践指南解读. *世界华人消化杂志* 2009; 17(4): 343-346

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/343.asp>

0 引言

National Comprehensive Cancer Network(NCCN)由美国21家肿瘤机构联合组成的肿瘤协作网络。自1995年起NCCN每年发表各类肿瘤的临床诊治指南。该机构制定的肿瘤临床指南在全球范围内是最具权威性, 被广泛接受。为了便于中国医生参照, 自2006年开始该机构与国内专家合作, 推出了部分常见恶性肿瘤NCCN指南中文版。NCCN结肠癌临床实践指南中文版始于2007年, 总体说来, 中文版与英文原版对应很好, 阅读和参照都很方便。

1 NCCN治疗指南的特点

1.1 注重证据和共识 NCCN把临床诊疗指南的内容按推荐指数进行了分级: 1级表示该项推荐内容基于高水平的证据, 并且在NCCN指南制定成员中具有广泛共识, 建议值得信赖。2A级表示基于包括临床经验在内的较低水平证据, NCCN成员达成共识, 因此该建议也是可以信赖的。除特殊表明外, NCCN临床诊治指南中所有建议都为此级别。2B级表示该项推荐内容基于包括临床经验在内的较低水平证据, NCCN成员对于该建议的适宜性意见不一致, 但无较大分歧。3级表示NCCN专家存在较大分歧。只有高质量的多中心随机临床研究证据才是可信的, 因此NCCN临床指南鼓励患者参加临床试验。

1.2 内容非常严谨并具有可实施性 与其他恶性

■背景资料

结肠癌是常见恶性肿瘤, 规范治疗非常必要。全球很多组织推出了诊疗规范, 其中NCCN临床实践指南的被接收程度最高。NCCN由美国21家肿瘤机构联合组成的肿瘤协作网络。自1995年起NCCN每年发表各类肿瘤的临床诊治指南。该机构制定的肿瘤临床指南在全球范围内是最具权威性, 被广泛接受。

■同行评议者

王志刚, 副主任医师, 上海市第六人民医院普外科

■研发前沿

2008年的结肠癌临床实践指南做了比较大的更新,特别是关于分子靶向药物的应用,强调在用药前进行基因检测。本文对2008年更新内容进行综述和解读。

肿瘤的指南一样, NCCN结肠癌临床诊疗指南分为临床决策树、重点问题说明、文稿和参考文献四部分。临床决策树是诊疗指南的核心, 结肠癌诊疗指南在决策树中把结肠癌分成无转移结肠腺癌的检查和治疗、怀疑或确诊转移性大肠腺癌的检查和治疗、复发的检查和治疗, 前者又细分为有蒂息肉伴浸润性癌的分期与初始治疗、无蒂息肉伴浸润性癌的分期与初始治疗、适合手术切除的结肠癌的分期与初始治疗、病理分期与辅助治疗及监测。分别按照首诊检查、治疗前评估、治疗、治疗后评估、辅助治疗、随访的常规临床诊治过程进行, 使结肠癌诊治的决策过程十分清晰。重点问题说明则对病理评估原则、手术治疗原则、晚期或转移性结肠癌的化疗、II期结肠癌的评估原则、辅助治疗、放射治疗等重点问题进行说明, 提供了大量注释和说明, 简洁而明确。文稿部分是对前面两部分内容更加详细的解释和说明, 包括了证据的来源, 临床研究的具体数据等内容。参考文献标识了资料来源。治疗指南完整而详细地概括了结肠癌临床处理的各个环节, 并对各个环节进行了仔细说明, 内容严谨和可实施决定了其权威性。

1.3 更新及时, 体现最新进展 所有NCCN临床诊疗指南的更新都不是定期的, 而是根据最新的临床研究进展及时更新的。这种即时更新保证了指南的时效性。NCCN结肠癌临床诊疗指南每年更新3-4次, 体现了目前结肠癌诊治的最新进展和趋势。

2 2008版NCCN结肠癌治疗指南更新内容

2.1 西妥昔单抗的应用 这是2008年年度最重要的更新内容。越来越多的文献资料证实^[1-5], 针对EGFR治疗的敏感性与KRAS基因的状态密切相关。此基因12或13密码子突变者对抗EGFR治疗尤其不敏感。因此, 专家组强烈推荐对复发或转移的患者, 肿瘤组织(原发肿瘤组织或转移肿瘤组织)进行基因突变检测。对于存在以上部位突变的患者, 不推荐用西妥昔单抗进行治疗, 不论单用还是与化疗联合应用。因为西妥昔单抗的应用只是增加毒性, 并且导致很高的花费。应该强调, KRAS基因突变是结直肠癌形成的早期事件, 其突变状态与转移密切相关。因此, 此基因突变的检测可以用原发灶或转移灶都可以。

故此, 在2008年版的结肠癌诊疗指南中, 所有2007年对转移性结肠癌治疗中, 原来推荐使

用西妥昔单抗的部分, 全部更为根据基因突变检测结果决定, 使西妥昔单抗的使用更具有选择性和针对性。

在转移性结直肠癌的治疗中, 西妥昔单抗可以单独或联合应用。在57例伊立替康化疗耐药的患者中, 西妥昔单抗单药应用可使9%的患者达到PR^[6]。最近的研究显示, 与最佳支持治疗比较, 单药应用西妥昔单抗, 对于顽固性转移性结直肠癌患者, 可以显著延长PFS和总生存率^[7]。有研究显示, 对于应用伊立替康后进展的病例, 联合用西妥昔单抗较单独应用西妥昔单抗, 有效率提高近一倍, 22.9% vs 10.8%^[8]。另外的研究也证实联合西妥昔单抗后可以延长PFS和总生存率^[9]。对于不能耐受联合方案的患者, 可以单独应用西妥昔单抗或帕尼单抗。因此, 在晚期或转移性结肠癌的化疗中, 增加了单药使用这种给药方式。

2.2 肝转移的治疗 针对可切除的同时性转移灶, 与化疗联合的贝伐单抗的推荐由“+”改为“±”。因为在术前或术后贝伐单抗与联合FU为基础的化疗, 其安全性还没有充分评估, 贝伐单抗有可能影响伤口愈合。一般认为末次使用与手术的间隔应该在6 wk以上。对于65岁以上的患者, 发生卒中和其他动脉性血管事件的风险增加。新辅助化疗的优势包括: 早期治疗微小转移灶、评价化疗方案的疗效、可以避免对早期发生病情进展的患者采用局部治疗等。但是, 应该看到化疗潜在危害: 化疗可能是无效的、化疗可以导致肝损害、化疗后患者完全缓解无法确认手术范围。因此, 在肝转移的过程中, 增加在初始化疗开始8-10 wk内进行手术评估。

新版的指南强调, 在诊疗同时性单纯肝或肺转移患者时, 应由多学科团队对患者进行评估, 特别是转移病灶能否切除强调多学科合作判断。

2.3 对局部治疗的规范更加具体 2008版结肠癌临床实践指南对局部治疗作了更为具体的规范, 在手术治疗原则中新增条目, “达不到R0切除的减瘤手术不做推荐”。不可切除的病灶新辅助治疗后需重新评价切除可行性, 要求将转移瘤的所有原始部位切除。在所有已知病灶均适合消融的情况下, “可以”考虑使用消融技术^[10]。

针对同时性腹腔/腹膜转移, “积极的细胞减灭术和/或腹腔内化疗不推荐用于临床试验以外的情况”。结肠癌不同于卵巢癌, 化疗并不敏感, 需要按照晚期或转移性结肠癌进行化疗。目

前没有证据显示这种治疗能够使患者获益. 进行临床研究倒是可行的.

2.4 结肠腺瘤的处理 2008版指南增加了晚期腺瘤的定义, 指“绒毛状腺瘤, >1 cm的腺瘤, 或伴有高级别不典型增生”. 对手术后1年复查时, 发现晚期腺瘤的患者, 需要在3年内进行复查, 然后每5年一次肠镜检查.

在病理评估的原则中, 增加了对广基恶性息肉内镜下切除的处理意见. 说明指出对广基息肉的处理, 内镜下切除是有争论的, 与带蒂息肉比较, 不良事件发生率增加. 对于高分化、无脉管癌栓、切缘阴性的广基息肉, 内镜下切除是可行的^[11-13].

2.5 II期结肠癌的辅助化疗 对于本期的结肠癌是否进行化疗一直是存在争议的. 通常以是否存在危险因素进行分类治疗. 所谓危险因素包括: 肿瘤为T4、组织分化不良、有脉管侵犯、存在梗阻或穿孔、切缘不能确定或阳性、淋巴结检出数量不足12枚. 对于没有危险因素的II期结肠癌推荐患者参加临床试验, 或接受观察. 对于存在危险因素的患者, 则推荐进行辅助化疗^[14], 方案可以选用FOLFOX、5-FU/LV、卡培他滨单药. 来自于MOSAIC的研究^[15], 随访6年的资料显示, FOLFOX方案与5-FU/LV比较没有任何优势, 亚类分析显示, 对于高危患者显示出提高DFS的倾向. 即使进行化疗, 对这些患者而言, 化疗也不能使总生存率提高超过5%. 因此, 对于本期患者, 是否要进行辅助化疗, 应由医生和患者进行讨论, 充分交流预后、辅助化疗效果和毒性. 由患者自己决定是否进行化疗.

3 结论

NCCN临床诊治指南以其严谨权威的结论和及时更新的共识使其成为肿瘤临床诊治的重要参考, 但我国肿瘤专科医生在参考NCCN结肠癌临床诊治指南的同时, 为了方便国内临床医生了解和应用, 目前已经推出了中文版. 中文版的更新速度不及英文原版, 目前已经可以在NCCN的网站上直接进入中文版结直肠癌指南. 2008-10-28推出了2008年度的第3版, 但中文版是根据第1版制定的. 与第1版比较, 第2版更新了文稿, 第3版增加了四期疾病进行KRAS基因检测的注释, 强调应用必须进行基因突变检查方可使用.

4 参考文献

1 Baselga J, Rosen N. Determinants of RASistance to

- anti-epidermal growth factor receptor agents. *J Clin Oncol* 2008; 26: 1582-1584
- 2 Amado RG, Wolf M, Peeters M, Van Cutsem E, Siena S, Freeman DJ, Juan T, Sikorski R, Suggs S, Radinsky R, Patterson SD, Chang DD. Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008; 26: 1626-1634
- 3 De Roock W, Piessevaux H, De Schutter J, Janssens M, De Hertogh G, Personeni N, Biesmans B, Van Laethem JL, Peeters M, Humblet Y, Van Cutsem E, Tejpar S. KRAS wild-type state predicts survival and is associated to early radiological response in metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *Ann Oncol* 2008; 19: 508-515
- 4 Lièvre A, Bachet JB, Boige V, Cayre A, Le Corre D, Buc E, Ychou M, Bouché O, Landi B, Louvet C, André T, Bibeau F, Diebold MD, Rougier P, Ducreux M, Tomasic G, Emile JF, Penault-Llorca F, Laurent-Puig P. KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab. *J Clin Oncol* 2008; 26: 374-379
- 5 Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Tu D, Tebbutt NC, Simes RJ, Chalchal H, Shapiro JD, Robitaille S, Price TJ, Shepherd L, Au HJ, Langer C, Moore MJ, Zalcberg JR. K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *N Engl J Med* 2008; 359: 1757-1765
- 6 Saltz LB, Meropol NJ, Loehrer PJ Sr, Needle MN, Kopit J, Mayer RJ. Phase II trial of cetuximab in patients with refractory colorectal cancer that expresses the epidermal growth factor receptor. *J Clin Oncol* 2004; 22: 1201-1208
- 7 Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Karapetis CS, Zalcberg JR, Tu D, Au HJ, Berry SR, Krahn M, Price T, Simes RJ, Tebbutt NC, van Hazel G, Wierzbicki R, Langer C, Moore MJ. Cetuximab for the treatment of colorectal cancer. *N Engl J Med* 2007; 357: 2040-2048
- 8 Cunningham D, Humblet Y, Siena S, Khayat D, Bleiberg H, Santoro A, Bets D, Mueser M, Harstrick A, Verslype C, Chau I, Van Cutsem E. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004; 351: 337-345
- 9 Sobrero AF, Maurel J, Fehrenbacher L, Scheithauer W, Abubakr YA, Lutz MP, Vega-Villegas ME, Eng C, Steinhauer EU, Prausova J, Lenz HJ, Borg C, Middleton G, Kröning H, Luppi G, Kisker O, Zube A, Langer C, Kopit J, Burris HA 3rd. EPIC: phase III trial of cetuximab plus irinotecan after fluoropyrimidine and oxaliplatin failure in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008; 26: 2311-2319
- 10 Abdalla EK, Vauthey JN, Ellis LM, Ellis V, Pollock R, Broglio KR, Hess K, Curley SA. Recurrence and outcomes following hepatic resection, radiofrequency ablation, and combined resection/ablation for colorectal liver metastases. *Ann Surg* 2004; 239: 818-825; discussion 825-827
- 11 Morson BC, Whiteway JE, Jones EA, Macrae FA, Williams CB. Histopathology and prognosis of malignant colorectal polyps treated by endoscopic polypectomy. *Gut* 1984; 25: 437-444
- 12 Seitz U, Bohnacker S, Seewald S, Thonke F, Brand B, Bräutigam T, Soehendra N. Is endoscopic polypectomy an adequate therapy for malignant

■同行评价

本文作为治疗指南的解读, 条理清晰, 实用性强, 对临床工作具有明显地指导价值.

- colorectal adenomas? Presentation of 114 patients and review of the literature. *Dis Colon Rectum* 2004; 47: 1789-1796; discussion 1796-1797
- 13 Haggitt RC, Glotzbach RE, Soffer EE, Wruble LD. Prognostic factors in colorectal carcinomas arising in adenomas: implications for lesions removed by endoscopic polypectomy. *Gastroenterology* 1985; 89: 328-336
- 14 Benson AB 3rd, Schrag D, Somerfield MR, Cohen AM, Figueredo AT, Flynn PJ, Krzyzanowska MK, Maroun J, McAllister P, Van Cutsem E, Brouwers M, Charette M, Haller DG. American Society of Clinical Oncology recommendations on adjuvant chemotherapy for stage II colon cancer. *J Clin Oncol* 2004; 22: 3408-3419
- 15 André T, Boni C, Mounedji-Boudiaf L, Navarro M, Tabernero J, Hickish T, Topham C, Zaninelli M, Clingan P, Bridgewater J, Tabah-Fisch I, de Gramont A; Multicenter International Study of Oxaliplatin/5-Fluorouracil/Leucovorin in the Adjuvant Treatment of Colon Cancer (MOSAIC) Investigators. Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. *N Engl J Med* 2004; 350: 2343-2351

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009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内将修改后的稿件及光盘寄回编辑部,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,须经得《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.(常务副总编辑:张海宁 2009-02-08)

氯膦酸二钠脂质体对大鼠腹腔巨噬细胞功能的影响

张建新, 尹江涛, 党胜春, 崔磊

张建新, 尹江涛, 党胜春, 崔磊, 江苏大学附属医院普外科 江苏省镇江市 212001

张建新, 主任医师, 博士生导师, 复旦大学医学博士, 江苏大学附属医院副院长、普外一科主任、镇江市学术技术带头人。

国家自然科学基金资助项目, No. 30772117

江苏省自然科学基金资助项目, No. BK2007096

镇江市社会发展基金资助项目, No. SH2008036

作者贡献分布: 张建新与党胜春对此文所作贡献均等; 本课题由张建新与党胜春设计; 研究过程由尹江涛, 党胜春, 崔磊及张建新完成; 研究所用新试剂及分析工具由张建新与党胜春提供; 数据分析由尹江涛完成; 本论文写作由尹江涛与党胜春完成。

通讯作者: 张建新, 212001, 江苏省镇江市解放北路438号, 江苏大学附属医院普外科。dscgu@ujs.edu.cn

电话: 0511-85026310 传真: 0511-85038661

收稿日期: 2008-11-27 修回日期: 2009-01-06

接受日期: 2009-01-12 在线出版日期: 2009-02-08

Influence of liposomal clodronate upon peritoneal macrophages in rats

Jian-Xin Zhang, Jiang-Tao Yin, Sheng-Chun Dang, Lei Cui

Jian-Xin Zhang, Jiang-Tao Yin, Sheng-Chun Dang, Lei Cui, Department of General Surgery, the Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang 212001, Jiangsu Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30772117; the Natural Science Foundation of Jiangsu Province, No. BK2007096; and the Zhenjiang Science and Technology Committee, No. SH2008036

Correspondence to: Jian-Xin Zhang, Department of General Surgery, the Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang 212001, Jiangsu Province, China. dscgu@ujs.edu.cn

Received: 2008-11-27 Revised: 2009-01-06

Accepted: 2009-01-12 Published online: 2009-02-08

Abstract

AIM: To explore the way of preparing liposomal clodronate and to investigate its influence of liposomal clodronate, upon peritoneal macrophages in rats.

METHODS: Liposomal clodronate was prepared by means of thin film; the peritoneal macrophages were obtained from rats. After exposure to different concentrations of LC (50, 100, 150 $\mu\text{mol/L}$), contents of NO, O_2^- and H_2O_2 were determined by MTT and neutral red colorimetry to evaluate the function of peritoneal macrophages.

RESULTS: MTT colorimetry showed that the growth of peritoneal macrophages were markedly depressed with different concentrations of liposomal clodronate ($P < 0.01$), neutral red colorimetry indicated the function of phagocytosis was manifestly restrained, and the inhibition ratio were 17.4%, 25.8% and 38.0%, respectively. The ability of secreting NO and O_2^- by peritoneal macrophages was significantly inhibited (48.398 ± 0.667 , 27.664 ± 0.566 , 25.626 ± 0.184 vs 91.714 ± 1.726 ; 0.289 ± 0.017 , 0.256 ± 0.013 , 0.216 ± 0.003 vs 0.342 ± 0.022 , all $P < 0.05$). The ability of secreting H_2O_2 by peritoneal macrophages was inhibited obviously at 100 $\mu\text{mol/L}$ and 150 $\mu\text{mol/L}$ (0.261 ± 0.002 , 0.213 ± 0.015 vs 0.277 ± 0.003 , all $P < 0.05$).

CONCLUSION: Liposomal clodronate could inhibit the function of peritoneal macrophages in rats.

Key Words: Liposomal clodronate; Peritoneal macrophages; NO; O_2^- ; H_2O_2

Zhang JX, Yin JT, Dang SC, Cui L. Influence of liposomal clodronate upon peritoneal macrophages in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(4): 347-351

摘要

目的: 探讨氯膦酸二钠脂质体(liposomal clodronate, LC)的制备及对大鼠腹腔巨噬细胞(peritoneal macrophages, PM)功能的影响。

方法: 利用薄膜法制备LC; 分离培养大鼠PM, 用不同浓度的LC(50, 100, 150 $\mu\text{mol/L}$)分别作用于大鼠PM, 然后采用MTT比色法, 中性红比色法, 检测NO, O_2^- 和 H_2O_2 的含量来评估巨噬细胞功能。

结果: 在三种不同浓度LC的干预下, MTT结果显示巨噬细胞的生长受到明显抑制($P < 0.01$); 巨噬细胞吞噬中性红结果表明其吞噬功能受到明显抑制, 抑制率分别为17.4%, 25.8%和38.0%; 巨噬细胞分泌NO、 O_2^- 的能力也受到明显抑制, 与对照组相比差异具有显著性(48.398 ± 0.667 , 27.664 ± 0.566 , 25.626 ± 0.184)

■背景资料

重症急性胰腺炎、脓毒症等是临床上比较常见的疾病, 其发病机制复杂, 病情严重、进展较快、死亡率高。主要死亡原因为全身炎症反应综合征及多器官功能障碍综合征。目前尚缺乏有效的治疗手段, 巨噬细胞在其中发挥着重要作用, 其分泌多种细胞因子从而加速炎症反应的进程。本文利用脂质体包裹特异性巨噬细胞清除剂clodronate抑制巨噬细胞功能, 为临床治疗重症急性胰腺炎等提供理论依据。

■同行评议者

唐霓, 副研究员, 重庆医科大学病理性肝炎研究所国家级重点实验室

■研发前沿

目前国内外治疗重症急性胰腺炎、脓毒血症等大都为抗炎、抑制胰腺分泌等。本研究利用脂质体包裹特异性巨噬细胞清除剂clodronate进入巨噬细胞内发挥作用,在国内外均不多见。随着脂质体药物的面世越来越多,该领域的研究将被更大程度的关注。

■相关报道

Van Rooijen *et al* 报道,静脉内注射氯膦酸二钠脂质体可以选择性的清除体内巨噬细胞,巨噬细胞通过吞噬作用摄取脂质体,其磷脂酶破坏脂质体的磷脂双分子层,药物在细胞内释放从而诱导了巨噬细胞的凋亡。

vs 91.714 ± 1.726 ; 0.289 ± 0.017 , 0.256 ± 0.013 , 0.216 ± 0.003 vs 0.342 ± 0.022 , 均 $P < 0.05$);巨噬细胞产生 H_2O_2 的能力仅在 $100 \mu\text{mol/L}$ 与 $150 \mu\text{mol/L}$ 时受到明显抑制(0.261 ± 0.002 , 0.213 ± 0.015 vs 0.277 ± 0.003 , 均 $P < 0.05$)。

结论: LC对大鼠PM功能具有抑制作用。

关键词: 氯膦酸二钠脂质体; 腹腔巨噬细胞; NO ; O_2^- ; H_2O_2

张建新, 尹江涛, 党胜春, 崔磊. 氯膦酸二钠脂质体对大鼠腹腔巨噬细胞功能的影响. 世界华人消化杂志 2009; 17(4): 347-351
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/347.asp>

0 引言

腹腔中(胰腺周围, 大网膜, 腹膜)常驻巨噬细胞约占全身单核/巨噬细胞总数的8%, 对腹腔炎症反应和免疫防御功能有重要作用。氯膦酸二钠(clodronate disodium)是一种人工合成的双膦酸酯, 多用于治疗骨质疏松等引起的骨质改变, 其机制之一是形成具有毒性作用的ATP类似物, 从而导致细胞内能量代谢障碍, 引起破骨细胞凋亡, 进而减轻破骨细胞对骨质的吸收^[1]。自20世纪60年代开始, 脂质体就作为药物载体开始应用, 近年来随着生物技术的发展, 脂质体作为药物载体的研究越来越受到人们的重视^[2]。由于脂质体具有类似细胞膜的结构, 进入人体以后主要被内皮网状系统吞噬而激活机体的自身免疫功能, 并改变被包封药物的体内分布, 使药物主要在肝、脾、肺、骨骼等组织器官中蓄积^[3-4]。因此, 我们利用脂质体的该作用介导氯膦酸二钠进入大鼠体内PM中, 观测其对PM功能的影响, 为临床相关疾病治疗提供新的技术方法和试验理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料 Sprague-Dawley大鼠, 体质量200-250 g, 由江苏大学医学院实验动物中心提供。氯膦酸二钠购自上海伟进生物科技有限公司; 胎牛血清购自Gibco公司; 辣根过氧化物酶、细胞色素C、噻唑蓝购自Sigma公司; 酵母聚糖购自BBI公司。

1.2 方法

1.2.1 LC的制备使用: 采用van Rooijen *et al*的方法^[5]制备大直径多层脂质体并加以改进: 事先准备磷脂酰胆碱(phosphatidylcholine)的氯仿溶液, 浓度为 100 g/L , -20°C 避光保存备用。使用500

mL的梨形烧瓶, 将8 mg胆固醇(cholesterin)溶解在10 mL氯仿中。加入0.86 mL储备的磷脂酰胆碱溶液(含有磷脂酰胆碱86 mg 37°C 低真空(逐渐从200 mbar减少到150 mbar)旋转(150 r/min)蒸馏除去氯仿。最后在梨形瓶内壁形成稀薄均匀的乳白色磷脂膜。随后用 0.6 mol/L (2.5 g氯膦酸二钠溶解在10 mL磷酸缓冲液中)的氯膦酸二钠磷酸缓冲盐(PBS)溶液洗脱、扩散磷脂膜, 形成乳白色悬液。乳白色悬液在室温下通氮气保存2 h(防止磷脂膜的氧化), 在水浴声波震荡器中震荡3 min后再在室温下保存2 h, 使脂质体膨胀。使用无菌的PBS清洗脂质体2-3次, 除去未被包裹的氯膦酸二钠。最后沉淀的脂质体小块在4 mL的PBS中再次悬浮, 形成乳白色的胶体溶液, 这时候可供使用的LC就制成了。这种方法能使氯膦酸二钠溶液中大约1%的氯膦酸二钠被包裹到了脂质体中, 最后获得的LC悬液(4 mL)大约含有20 mg的氯膦酸二钠。

1.2.2 大鼠PM的分离和培养: 取大鼠, 消毒腹腔并注射5 mL无菌的液体石蜡。3 d后收集腹腔细胞。引颈处死大鼠, 将其浸入700 mL/L乙醇中5 min, 固定四肢, 剪开腹部皮肤, 沿腹中线注入50 mL冰中预冷的无菌PBS-H(含10 kU/L肝素和100 mL/L小牛血清的PBS)。轻轻按摩腹部5 min。剪开腹壁, 用吸管吸出渗出液, 再用同样容量的预冷PBS-H冲洗腹腔3次。合并渗出液于离心管中, 4°C 2500 r/min离心10 min, 去上清液。用预冷的RPMI 1640培养液洗涤细胞3次, 每次 4°C 2500 r/min离心10 min, 去上清液。用预冷的适量RPMI 1640培养液悬浮细胞。调整细胞浓度为 5×10^8 个/L, 接种至无菌6孔细胞培养板上, 在 37°C 、50 mL/L CO_2 孵箱孵育2 h, RPMI 1640培养液洗涤3次, 去非贴壁细胞, 经瑞氏染色法鉴定巨噬细胞纯度 $>90\%$; 台盼蓝染色, 细胞存活率 $>95\%$ 。

1.2.3 MTT比色法: 参照文献[6]接种细胞: 用含100 mL/L胎牛血清的培养液配成单个PM悬液, 以每孔 1×10^4 个细胞接种至96孔板, 每孔体积200 μL ; 培养细胞: 在 37°C 、50 mL/L CO_2 孵箱孵育2 h; 加药: 随后加入不同浓度的LC; 呈色: 分别培养12、24和36 h后, 每孔加MTT溶液(5 g/L, 用PBS配制, pH7.4)20 μL , 继续孵育4 h, 终止培养, 小心吸弃孔内培养上清液, 然后每孔加150 μL DMSO, 振荡10 min, 使结晶物充分融解; 比色: 选择490 nm波长, 在酶联免疫监测仪上测定各孔光吸收值, 记录结果。本实验重复3次。

1.2.4 吞噬功能测定: 取1 mL $2 \times 10^9/\text{L}$ PM加入

表 1 LC对大鼠PM的抑制作用 (mean \pm SD)

浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	12 h		24 h		36 h	
	A值	抑制率(%)	A值	抑制率(%)	A值	抑制率(%)
0	0.556 ± 0.06		0.530 ± 0.02		0.508 ± 0.07	
50	0.500 ± 0.02 ^d	10.0	0.452 ± 0.04 ^d	14.9	0.422 ± 0.07 ^d	16.9
100	0.483 ± 0.04 ^{bd}	13.1	0.428 ± 0.03 ^{bd}	19.3	0.387 ± 0.04 ^{bd}	23.9
150	0.451 ± 0.05 ^{bdf}	18.9	0.400 ± 0.02 ^{bdf}	24.6	0.352 ± 0.03 ^{bdf}	30.7

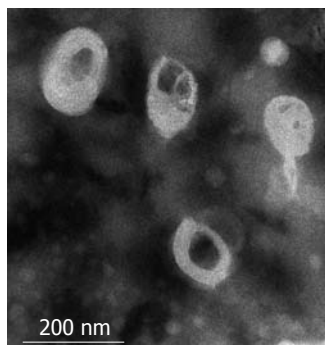
^b*P*<0.01 vs 50 μmol/L; ^d*P*<0.01 vs 0 μmol/L; ^f*P*<0.01 vs 100 μmol/L.

图 1 透射电镜下 LC 的形态正常、大小均匀, 直径约 200 nm ($\times 12\,000$).

表 2 不同浓度LC对大鼠PM吞噬功能的影响 (mean \pm SD)

脂质体浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	吸光度值	抑制率(%)
0	0.716 ± 0.076	
50	$0.591 \pm 0.031^{\text{d}}$	17.4
100	$0.531 \pm 0.084^{\text{bd}}$	25.8
150	$0.444 \pm 0.036^{\text{bdf}}$	38.0

^b*P*<0.01 vs 50 μmol/L; ^d*P*<0.01 vs 0 μmol/L; ^f*P*<0.01 vs 100 μmol/L.

24孔板内, 置37℃、50 mL/L CO₂条件下贴壁2 h, 加入不同浓度LC, 培养一定时间后取出弃上清, 漂洗, 再加入0.1%中性红盐水液1 mL, 置37℃、50 mL/L CO₂条件下培养20 min, 取出, 弃上清, 漂洗, 加入1 mL细胞溶解液(乙醇: 乙酸 = 1: 1), 充分溶解后于540 nm波长处比色. 本实验重复3次.

1.2.5 NO的诱导及测定: 取1 mL 2×10^9 /L PM加入24孔板内, 置37℃、50 mL/L CO₂条件下贴壁2 h, 加入不同浓度LC, 培养一定时间后取出弃上清, 漂洗后再每孔加入1 mL RPMI 1640培养液, 同时加入LPS, 使其终浓度为5 mg/L。置37℃、50 mL/L CO₂条件下培养24 h, 取出上清至试管内, 向试管内加入1 mL Greiss液(0.1% N-α-萘基乙二胺, 1%磺胺, 3% H₃PO₄, 显色10 min, 于540 nm波长处比色。

1.2.6 H₂O₂的测定: 取0.7 mL 1×10⁹/L大鼠PM置于24孔板内, 置37℃、50 mL/L CO₂条件下贴壁2 h, 加入不同浓度LC, 培养一定时间后取出, 加入0.15 mL(1 g/L)辣根过氧化物酶, 0.15 mL(1 g/L)酚红液, 0.1 mL(10 g/mL)经血清调理后的酵母聚糖, 于37℃水浴2 h, 取出置于冰浴中, 经2000 r/min离心10 min, 取上清加入PBS 2 mL, 再加入4 mol/L NaOH 40 μL, 于570 nm波长处比色。

1.2.7 O₂⁻的测定: 取1 mL 1×10⁹/L PM加入24孔板内, 加入不同浓度LC, 于37℃保温5 min, 加入0.1 mL(10 g/L)经血清调理后的酵母聚糖, 再加

入细胞色素C(终浓度为60 $\mu\text{mol/L}$). 于37℃水浴2 h, 取出, 置于冰浴中, 经2000 r/min离心10 min, 取上清加入PBS 1 mL, 于550 nm波长处比色。

统计学处理 采用SPSS11.5统计软件进行数据分析, 所有数据均用 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示, 采用ANOVA程序进行单因素方差分析、Univariate程序进行多因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异具有显著性。

2 结果

2.1 脂质体形态、大小及脂质体中氯膦酸二钠包裹率 所制备的脂质体平均直径约200 nm, 包裹率为5.8%。透射电镜检查见其大小均匀(图1)。

2.2 LC对大鼠PM生长的作用 在各时间段三种不同浓度的LC对PM的生长都具有明显的抑制作用($P<0.01$), 36 h组的各浓度抑制率均高于12 h与24 h组(表1); 同时, LC在同一浓度的不同时间段上对PM的生长亦具有明显的抑制作用, 150 $\mu\text{mol/L}$ 组的各时点抑制率均高于50 $\mu\text{mol/L}$ 与100 $\mu\text{mol/L}$ 组(表1). 该实验中, LC对大鼠PM的抑制作用随作用时间的延长而增高, 亦随LC浓度的升高而增高. 本实验重复3次, 所有数值均以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示($P<0.01$, 表1).

2.3 LC对大鼠PM吞噬功能的影响

不同浓度的LC对巨噬细胞的吞噬功能有不同程度的抑制、

■ 创新盘点

本研究通过脂质体包裹特异性巨噬细胞清除剂 clodronate 来抑制巨噬细胞功能,从细胞生长、吞噬功能及巨噬细胞分泌自由基等方面入手研究,以期为临床治疗重症寻急性胰腺炎等寻找新的途径并提供理论依据。

■应用要点

国外目前已有多种脂质体药物面世,应用价值之高,得到了业内人士较好的评价,如紫杉醇脂质体等。本研究从一个新的方面着手治疗重症急性胰腺炎、脓毒血症等,值得期待。

表 3 不同浓度LC对大鼠PMNO、H₂O₂和O₂⁻生成的影响 (mean ± SD)

脂质体浓度 (μmol/L)	NO含量(μmol/L)	O ₂ ⁻ (4值)	H ₂ O ₂ (4值)
0	91.714 ± 1.726	0.342 ± 0.022	0.277 ± 0.003
50	48.398 ± 0.667 ^a	0.289 ± 0.017 ^a	0.267 ± 0.009
100	27.664 ± 0.566 ^{ab}	0.256 ± 0.013 ^{ab}	0.261 ± 0.002 ^a
150	25.626 ± 0.184 ^{abc}	0.216 ± 0.003 ^{abc}	0.213 ± 0.015 ^{ab}

^aP<0.05 vs 0 μmol/L; ^bP<0.05 vs 100 μmol/L; ^cP<0.05 vs 50 μmol/L.

且随浓度增加,抑制率也逐渐增高,在LC浓度为150 μmol/L时,大鼠PM的吞噬功能受到最大程度的抑制,为38.0%。本实验重复3次,所有数值均以mean ± SD表示(表2)。

2.4 LC对大鼠PM NO、H₂O₂和O₂⁻生成的影响 3种浓度的LC对巨噬细胞生成NO、O₂⁻的能力都产生抑制,在LC浓度为150 μmol/L时,PM产生NO和O₂⁻的能力最低,与对照组相比差异均有显著性;100 μmol/L和150 μmol/L的LC对巨噬细胞产生的H₂O₂出现明显抑制,在LC浓度为150 μmol/L时,PM产生H₂O₂的能力达到最低,与对照组相比差异有显著性,而50 μmol/L的LC组未见明显抑制,但随着LC浓度的增高,H₂O₂产生的量逐渐减少(表3)。

3 讨论

腹腔巨噬细胞参与机体内的多种病理生理反应,对腹腔炎症反应和免疫防御功能有重要作用。Ma *et al*^[7]研究发现,使用白藜芦醇(resveratrol)后可以减少体外培养的PM的NF-kappa与iNOS的表达,减少培养基与血清TNF-α、IL-1与NO的水平,从而减轻炎症反应。活体实验也证实,干预巨噬细胞可以减轻胰腺炎的严重程度。PM可以通过分泌大量的TNF-α和IL-1β等细胞因子影响炎症的严重程度^[8]。

近年来脂质体作为药物载体被广泛应用,利用脂质体的天然靶向性将药物导入单核内皮网状系统,借助脂质体缓释作用可以延长药物的作用时间和提高体内药物的浓度,从而提高疗效^[9-10]。近年来越来越多的脂质体药物已上市,并在临床取得了明显的疗效,如阿霉素脂质体、紫杉醇脂质体等^[11-12]。Van Rooijen *et al*^[13]报道,静脉内注射LC可以选择性的清除体内巨噬细胞,巨噬细胞通过吞噬作用摄取脂质体,其磷脂酶破坏脂质体的磷脂双分子层,药物在细胞内释放从而诱导了巨噬细胞的凋亡,游离的氯

磷酸二钠本来是用于治疗骨质疏松等骨疾病的药物,没有明显的细胞毒性,而用于包埋的脂质体成分是卵磷脂和胆固醇,也没有毒性,有望成为临床治疗某些疾病的手段。目前,LC被广泛应用于巨噬细胞功能的研究^[14-15]和治疗某些免疫性疾病的实验研究^[16]。

MTT是一种有机盐染料,与细胞内具有活性的琥珀酸脱氢酶起反应,生成紫色(或蓝色)甲瓚颗粒,因琥珀酸脱氢酶只存在于活细胞线粒体内,故有较好的特异性,本实验发现,三种不同浓度的LC均对大鼠PM的生长具有明显的抑制作用,LC被巨噬细胞选择性的摄取后,溶酶体释放的磷脂酶分解脂质体使其被释放出来,导致巨噬细胞凋亡,从而减弱其非特异性防御能力。

中性红比色法主要是通过细胞的胞吞作用来检测细胞增殖功能和毒性作用,中性红属于一种弱阳离子染料,正常生长的细胞具有摄取中性红的能力,并且中性红可以稽留溶酶体内而不被细胞洗涤液洗脱,在一定条件下,活细胞摄入中性红的水平与活细胞的数量成正比。本实验中,我们发现在三种不同浓度的LC干预下,巨噬细胞吞噬中性红的能力受到明显抑制,巨噬细胞的吞噬在其非特异性免疫、抗原递呈等过程中起着重要作用,因此,LC对PM的非特异性免疫作用产生抑制,削弱了腹腔的抗菌能力,使腹腔防御能力下降。

在免疫系统中,巨噬细胞起着调节体内稳定的作用,是感染、肿瘤生长和创伤的效应细胞。巨噬细胞内NO是通过NOS途径合成,其合成能力与抗炎作用密切相关。研究中观察到,LC在三种浓度下均对大鼠PM生成NO的能力产生抑制,而巨噬细胞产生的NO作为一种非特异效应因子,可杀灭或抑制多种病原微生物的生长,尤其是杀灭细胞内病原体^[17]。我们还发现,在LC浓度为100 μmol/L和150 μmol/L时,巨噬细胞产生H₂O₂的能力受到明显的抑制,H₂O₂在巨噬细胞

杀灭入侵病原微生物方面起着重要作用^[18], 其机制有二, 其一是激活Ced23等死亡基因, 从而使细胞死亡; 另一种是先激活Ced23等死亡基因, 从而使细胞内H₂O₂水平升高, 由于H₂O₂的损伤作用而使细胞死亡。本实验中, 在LC作用下, 大鼠PM产生O₂⁻的能力亦受到抑制, O₂⁻在机体内具有多种作用: O₂⁻可攻击生物膜中多聚不饱和脂肪酸, 尤其是其中对自由基特别敏感的双键, 激发连锁反应, 导致自由基的扩增和膜脂质过氧化加深, 致使细胞凋亡, 可以直接进攻蛋白质中的氨基酸残基如甲硫氨酸和半胱氨酸等残基, 使蛋白质构象改变, 影响其活性^[19]。O₂⁻及其过氧化产物可直接或间接地攻击DNA, 引起碱基修饰、单或双链断裂、DNA链间以及DNA与蛋白质间的交叉连接和姐妹染色体交换等, 而以碱基修饰和链的断裂最为常见。O₂⁻通过对mtDNA的损伤可降低ATP酶活性, 抑制线粒体的氧化磷酸化, 使能量物质的生成减少, 加速高能磷酸化化合物的消耗, 致细胞死亡^[20-21]。

总之, LC具有抑制大鼠PM功能的作用, 对临床某些疾病的治疗具有一定的指导意义, 如胰腺炎, 脓毒血症等。

4 参考文献

- Frith JC, Mönkkönen J, Blackburn GM, Russell RG, Rogers MJ. Clodronate and liposome-encapsulated clodronate are metabolized to a toxic ATP analog, adenosine 5'-(beta, gamma-dichloromethylene) triphosphate, by mammalian cells in vitro. *J Bone Miner Res* 1997; 12: 1358-1367
- Batist G, Ramakrishnan G, Rao CS, Chandrasekharan A, Gutheil J, Guthrie T, Shah P, Khojasteh A, Nair MK, Hoelzer K, Tkaczuk K, Park YC, Lee LW. Reduced cardiotoxicity and preserved antitumor efficacy of liposome-encapsulated doxorubicin and cyclophosphamide compared with conventional doxorubicin and cyclophosphamide in a randomized, multicenter trial of metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2001; 19: 1444-1454
- Yamamoto T, Naito M, Moriyama H, Umezumi H, Matsuo H, Kiwada H, Arakawa M. Repopulation of murine Kupffer cells after intravenous administration of liposome-encapsulated dichloromethylene diphosphonate. *Am J Pathol* 1996; 149: 1271-1286
- 高建川, 柴家科, 尹会男, 刘强, 盛志勇. 脂质体包裹 Clodronate对单核/巨噬细胞选择性清除作用的研究. *解放军医学杂志* 2003; 28: 890-893
- van Rooijen N, van Kesteren-Hendrikx E. "In vivo" depletion of macrophages by liposome-mediated "suicide". *Methods Enzymol* 2003; 373: 3-16
- 麦玉洁, 邱录贵, 李增军, 李新, 于珍, 李长虹, 王亚非, 李茜. β -catenin特异的RNA干扰对Jurkat和K562细胞的作用. *中国医学科学院学报* 2008; 30: 290-295
- Ma ZH, Ma QY, Wang LC, Sha HC, Wu SL, Zhang M. Effect of resveratrol on peritoneal macrophages in rats with severe acute pancreatitis. *Inflamm Res* 2005; 54: 522-527
- 马振华, 马清浦, 沙焕臣, 王连才, 张梅. 腹腔巨噬细胞在大鼠重症急性胰腺炎发病机制中的作用. *西安交通大学学报(医学版)* 2006; 27: 590-592, 601
- Huwyler J, Drewe J, Krähenbühl S. Tumor targeting using liposomal antineoplastic drugs. *Int J Nanomedicine* 2008; 3: 21-29
- Schnyder A, Huwyler J. Drug transport to brain with targeted liposomes. *NeuroRx* 2005; 2: 99-107
- Straubinger RM, Arnold RD, Zhou R, Mazurchuk R, Slack JE. Antivascular and antitumor activities of liposome-associated drugs. *Anticancer Res* 2004; 24: 397-404
- Park JW. Liposome-based drug delivery in breast cancer treatment. *Breast Cancer Res* 2002; 4: 95-99
- van Rooijen N, Sanders A, van den Berg TK. Apoptosis of macrophages induced by liposome-mediated intracellular delivery of clodronate and propamidine. *J Immunol Methods* 1996; 193: 93-99
- Romberg B, Oussoren C, Snel CJ, Hennink WE, Storm G. Effect of liposome characteristics and dose on the pharmacokinetics of liposomes coated with poly(amino acid)s. *Pharm Res* 2007; 24: 2394-2401
- Immordino ML, Dosio F, Cattel L. Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential. *Int J Nanomedicine* 2006; 1: 297-315
- Mathes M, Jordan M, Dow S. Evaluation of liposomal clodronate in experimental spontaneous autoimmune hemolytic anemia in dogs. *Exp Hematol* 2006; 34: 1393-1402
- 黄涛, 付勤, 张铁峰, 王岩峰, 顾海伦, 沈涛. 不同退变程度腰椎间盘组织中一氧化氮和超氧化物歧化酶含量的变化及其意义. *中国医科大学学报* 2005; 34: 473-474
- 赖桂华, 邱小忠, 余磊, 焦培峰, 陆云涛, 欧阳钧. 氧化应激对C2C12成肌细胞增殖与凋亡的影响. *中国组织工程研究与临床康复* 2007; 11: 278-281
- 黄波, 邹国林, 金德龙, 李海成. 阿霉素及其铁配合物介导牛血清白蛋白氧化损伤. *生物化学与生物物理学报* 2003; 35: 301-305
- Sharp JS, Tomer KB. Analysis of the oxidative damage-induced conformational changes of apo- and holocalmodulin by dose-dependent protein oxidative surface mapping. *Biophys J* 2007; 92: 1682-1692
- Vladimirova O, O'Connor J, Cahill A, Alder H, Butunoi C, Kalman B. Oxidative damage to DNA in plaques of MS brains. *Mult Scler* 1998; 4: 413-418

■同行评价

本文拟探讨氯膦酸二钠脂质体的制备及对大鼠腹腔巨噬细胞功能的影响, 创新性较强, 总体实验设计合理, 数据详实可靠。

编辑 李军亮 电编 何基才

肝脏血流阻断下兔VX2肝肿瘤射频消融的疗效观察

韩建波, 仇毓东, 张炜炜, 孔文韬, 邱君澜, 韩冰

■背景资料

肝癌的治疗除了手术外还有射频等微创治疗。射频消融是一种局部热疗措施, 毁损体积的大小是射频成功的关键, 但由于热流失的影响, 局部热量被肝脏血流带走, 影响消融效果, 肝脏血流阻断可以减少热流失、扩大射频消融体积。以前的实验中动物射频术后立即处死, 难以评价射频消融灶进展期的变化及其肝损伤情况。

韩建波, 南京医科大学鼓楼临床医学院 江苏省南京市 210008
仇毓东, 韩冰, 南京市鼓楼医院肝胆外科 江苏省南京市 210008
张炜炜, 孔文韬, 邱君澜, 南京市鼓楼医院超声室 江苏省南京市 210008

韩建波, 硕士, 主要研究方向为肝脏肿瘤的微创和综合治疗。

作者贡献分布: 此课题由韩建波, 仇毓东, 张炜炜及孔文韬设计; 研究过程由韩建波, 孔文韬, 邱君澜及韩冰操作完成; 数据分析由韩建波, 仇毓东及孔文韬完成; 论文写作由韩建波, 仇毓东及孔文韬完成。

通讯作者: 仇毓东, 210008, 江苏省南京市中山路321号, 南京市鼓楼医院肝胆外科. yudongqiu510@163.com

电话: 025-83106666

收稿日期: 2008-12-03 修回日期: 2008-12-25

接受日期: 2008-12-29 在线出版日期: 2009-02-08

Effect of vascular occlusion on radiofrequency ablation of the liver in a rabbit VX2 tumor model

Jian-Bo Han, Yu-Dong Qiu, Wei-Wei Zhang,
Wen-Tao Kong, Jun-Lan Qiu, Bing Han

Jian-Bo Han, Drum Tower Clinical Medical College, Nanjing Medical University, Nanjing 210008, Jiangsu Province, China

Yu-Dong Qiu, Bing Han, Department of Hepatobiliary Surgery, Nanjing Drum Tower Hospital, Nanjing 210008, Jiangsu Province, China

Wei-Wei Zhang, Wen-Tao Kong, Jun-Lan Qiu, Department of Ultrasound, Nanjing Drum tower Hospital, Nanjing 210008, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Yu-Dong Qiu, Department of Hepatobiliary Surgery, Nanjing Drum tower Hospital, 321 Zhongshan Road, Nanjing 210008, Jiangsu Province, China. yudongqiu510@163.com

Received: 2008-12-03 Revised: 2008-12-25

Accepted: 2008-12-29 Published online: 2009-02-08

Abstract

AIM: To evaluate the effects of vascular occlusion of hepatic blood flow on radiofrequency lesion and liver injury in rabbit VX2 tumor model.

METHODS: Rabbit VX2 liver tumor models were successfully established, and then they were assigned to two groups: radiofrequency ablation alone group and radiofrequency ablation with hepatic blood flow occlusion (vascular-occluded RFA) group. Radiofrequency lesions were created *in vivo* using a cool-tip radiofrequency electrode (radiofrequency parameters were 8 min in time and 30 W in power). The hepatic blood flow occlusion was got by pringle

maneuver. Serum ALT, AST, AKP and GGT were detected before the operation and the 1st, 3rd, 7th day after the operation, and the adverse events were observed. The animals were sacrificed one week later. The size, volume of necrosis lesions in the two groups were then analyzed.

RESULTS: Volume and vertical diameter of the coagulated area were significantly greater with the pringle maneuver. The parallel diameter was larger than that coagulated by standard RFA, but there were no significantly differences between the groups. Serum ALT, GGT was higher in radiofrequency ablation combined with Pringle maneuver group than radiofrequency ablation alone group at each time after the operation ($P < 0.05$), and serum GGT lever was gradually increased postoperatively. Differences in serum AST, AKP between the two groups at each time postoperatively were not significant. One case of vascular-occluded RFA group was complicated with mild bile leakage, one case died on the 1st day for hemorrhage, and one case died for liver injury on the 4th day.

CONCLUSION: Radiofrequency ablation combined with occlusion of the hepatic artery and portal vein increases the volume of necrosis when compared with radiofrequency ablation alone, but much more serious liver injuries are found, careful attention should be paid when this technique is used in clinical practice.

Key Words: Radiofrequency ablation; Vascular occlusion; Liver neoplasm; VX2; Rabbit

Han JB, Qiu YD, Zhang WW, Kong WT, Qiu JL, Han B. Effect of vascular occlusion on radiofrequency ablation of the liver in a rabbit VX2 tumor model. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(4): 352-356

摘要

目的: 评价肝脏血流阻断联合射频后消融灶的变化及其对兔肝功能的影响。

方法: 兔VX2肝肿瘤接种成功后分为两组: 单独射频组、射频联合肝脏血流阻断组(联合射频组)。射频采用冷循环射频消融治疗(参数设

■同行评议者

肖恩华, 教授, 中南大学湘雅二医院放射教研室

定为30 W、8 min); 联合射频组肝脏血流阻断采用Pringle法. 两组分别于术前、术后1、3、7 d检测血清ALT、AST、AKP、GGT; 观察两组动物的并发症; 1wk后处死实验动物, 比较两组射频消融灶的大小及体积.

结果: 与单独射频组比较, 联合射频组消融灶的体积和垂直径显著增大, 且有统计学意义, 平行径虽有所增大, 但无统计学差异. 与单独射频组比较, 联合射频组动物术后1、3、7 d的血清ALT、GGT显著升高($P<0.05$), 联合射频组术后的血清GGT有明显升高的趋势. 两组之间AST、AKP在术后各时间点没有明显差异. 联合射频组1例发生胆漏, 1例因出血于术后第1天死亡, 1例因肝功能衰竭于术后第4天死亡.

结论: 射频联合肝动脉门静脉双重血流阻断可增大射频的毁损灶体积, 但对兔肝脏损伤较严重, 临床应用应持谨慎的态度.

关键词: 射频; 血流阻断; 肝肿瘤; VX2; 兔

韩建波, 仇毓东, 张炜炜, 孔文韬, 邱君澜, 韩冰. 肝脏血流阻断下兔VX2肝肿瘤射频消融的疗效观察. 世界华人消化杂志 2009; 17(4): 352-356
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/352.asp>

0 引言

射频消融是一种局部热疗措施, 毁损体积的大小是射频成功的关键, 但由于热流失的影响, 局部热量被肝脏血流带走, 影响消融效果, 肝脏血流阻断可以减少热流失^[1-4]、扩大射频消融体积. 以前的实验中动物射频术后立即处死, 难以评价射频消融灶进展期的变化及其肝损伤情况. 本研究目的是评价肝脏血流阻断联合射频后消融灶的变化及其对兔肝功能的影响.

1 材料和方法

1.1 材料 新西兰大白兔18只(由南京大学附属鼓楼医院动物中心提供), 雌雄不限, 体质量为2.6-3.2 kg. 荷瘤VX2种兔由东南大学附属中大医院放射科滕皋军教授惠赠. 射频装置采用Radionics公司的冷循环射频治疗仪.

1.2 方法

1.2.1 兔VX2肝肿瘤模型的建立: 氯胺酮: 氟哌利多(1:1)静脉麻醉荷瘤种兔, 无菌条件下取出VX2肿瘤, 于超净台剔除瘤周组织、肿瘤包膜和坏死组织, 选取靠近瘤体边缘的质嫩灰白色鱼肉样组织, 用眼科剪剪成约1.5 mm×1.5 mm×

1.5 mm大小的瘤块备用.

参照文献[5]中的方法, 略加改进. 氯胺酮: 氟哌利多(6 mL: 6 mL)加入500 mL生理盐水中静脉滴入维持麻醉, 麻醉成功后取仰卧位固定, 常规上腹部剪毛、备皮及消毒, 经腹白线正中切口进腹, 暴露肝脏左前叶, 轻压腹部将其挤出, 用盐水纱布拉出体外. 将2-3块备用瘤组织塞入16号针头, 后接1 mL注射器, 在距肝脏下缘约1.0-1.5 cm处斜向下插入约1.5 cm. 将瘤组织注入后拔出, 盐水纱布压迫至不再出血后用1号丝线两层关腹. 所有实验动物术前12 h禁食、不禁水. 术后连续3 d后肢肌肉注入青霉素40万单位、硫酸阿米卡星0.1 g预防感染.

1.2.2 实验分组和操作方法: 2 wk后种植VX2兔肝脏可形成直径约1.5 cm的单发肿瘤, 模型建立成功后随机分为2组: 单独射频组和射频联合肝脏血流阻断组(联合射频组).

术前准备及麻醉同上, 兔双后肢内侧备皮后贴电极板, 上腹部常规消毒、铺巾, 原切口进腹, 冷盐水纱布将荷瘤肝叶与周围的脏器分开. 射频采用射频针垂直插入肿瘤中心, 射频参数设定为30 W、8 min, 肝脏血流阻断采用Pringle法即绕扎肝十二指肠韧带阻断入肝血流. 确定无活动性出血及周围脏器损伤后关腹. 射频术后腹腔灌洗生理盐水50 mL补充丢失的水分. 术后抗生素应用同上.

术后1 wk所有实验动物静脉推注氯胺酮处死, 切取射频消融的肝叶, 沿RFA针道切开肝叶, 测量消融灶的平行径a[平行于针道的最大径(cm)]、垂直径b[垂直于针道的最大径(cm)], 消融灶体积 $V[V(\text{cm}^3) = 3.14 \times a \times b \times b/6]^{[6]}$.

1.2.3 肝功能检测: 术前及术后第1、3、7天抽取兔耳静脉血, 检测ALT、AST、AKP、GGT.

1.2.4 病理学检查: 术后1 wk处死动物, 切取荷瘤肝叶置于40 g/L甲醛中固定至少24 h, 常规病理切片行HE染色.

统计学处理 采用SPSS11.5统计软件, 计量资料均采用mean±SD表示, 采用t检验进行统计分析, $P<0.05$ 认为具有统计学意义.

2 结果

2.1 肿瘤模型建立及实验动物基本情况 18只大白兔第1次接种后, 1只因肿瘤肝内多发转移、1只因腹壁种植被剔除实验, 另有2只接种失败, 再次接种后成功, 建立模型成功率为89%(16/18). 随机编号分组后, 各组间动物体质量、肿瘤大小没有显著性差异, 联合射频组其

■ 研发前沿

该领域的研究重点是如何减少“热流失”, 扩大射频消融范围.

■相关报道

Wiersinga *et al*发现射频毁损灶的最终毁损面积将随着时间的推移而变化,应该将肝实质中引起的继发坏死(secondary heat-induced necrosis)计算在内。

表 1 射频毁损灶体积及直径 ($n=7$)

分组	体积 $V(\text{cm}^3)$	范围(cm^3)	平行径 $a(\text{cm})$	垂直径 $b(\text{cm})$
单独射频组	10.12 ± 5.94	3.42–20.30	1.39 ± 0.25	3.57 ± 0.81
联合射频组	24.82 ± 10.75	16.48–45.25	1.75 ± 0.72	5.20 ± 0.59

^a $P<0.05$, ^b $P>0.05$, ^c $P<0.001$ vs 单独射频组。



图 1 联合射频组其中1只术后1wk开腹见发生严重胆漏(箭头)。

中1只因腹腔出血于术后第1天死亡, 1只因肝损害于术后第4天死亡, 1只于术后1 wk开腹时发现发生严重的胆漏(图1)。

2.2 射频术后毁损灶体积、直径 血流阻断增大射频的毁损体积, 两组之间存在显著性的差异($P<0.05$)。联合射频组平行径 a 及垂直径 b 均大于单独射频组, 但是垂直径之间差异有统计学意义($P<0.001$), 平行径之间差异无统计学意义(表1)。

2.3 肝功能检测 术前两组ALT、AST、AKP、GGT之间差异没有统计学意义。术后第1天两组ALT、AST升高较明显, 之后逐渐降低, 至术后第7天射频组ALT、AST均恢复至术前水平, 但是联合射频组术后第7天ALT仍维持在较高水平。联合射频组ALT术后各时间点均较单独射频组高, 且都有统计学意义, 但其AST术后各时间点之间差异没有统计学意义。联合射频组术后GGT逐渐升高, 且术后1、3、7天均高于单独射频组, 并有统计学意义。两组术后第1天AKP均升高较明显, 之后逐渐下降, 两组之间AKP在术后各时间点差异没有统计学意义(图2)。

2.4 病理观察 大体观察毁损灶为灰白色区域, 与周围肝脏组织分界清楚, 毁损灶与正常肝脏组织之间有一宽约1 mm的边缘带, 镜下观察边缘带内可见纤维结缔组织, 被较多的炎症细胞浸润(图3)。单独射频组大体标本可见血管周围的毁损灶不规则, 血管周围毁损灶形成缺失(图4)。单独射频组的肝脏毁损灶仍然保持肝小叶基本结构, 少数肝细胞仍可见细胞轮廓、细胞核, 但

是血流阻断后射频的肝脏毁损灶, 肝小叶结构破坏, 肝细胞膜不完整, 少见细胞核, 细胞质嗜酸性, 一片红染(图5)。

3 讨论

肝癌是常见的恶性肿瘤之一, 手术切除虽仍然是肝癌的标准治疗措施, 但由于肿瘤位置、大小和患者合并症等等原因, 手术切除并不适用于所有的肝癌。事实上当肿瘤发现时, 仅仅有20%的患者有手术切除的机会^[7]。射频由于其微创、并发症少、可重复性、住院日短等优势, 在肝癌治疗中逐渐增多。

射频的机制是射频发生器发出的射频波使电极周围组织中的离子发生振荡, 摩擦生热, 导致组织细胞损伤, 肿瘤组织蛋白变性。但由于“热流失”的影响^[1-4], 肝脏血液流动将射频局部产生的热量带走, 靠近血管周围的肿瘤毁损不完全, 局部复发率增高。通过外科手段及药物影响肝脏血流及肿瘤的血液供应可减少“热流失”, 从而增大消融范围、降低局部复发率。药物包括血管加压素^[8]、三氧化二砷^[9]、索拉非尼^[10]等。外科血流阻断包括肝动脉和门静脉联合阻断、肝动脉阻断、门静脉阻断、肝静脉阻断等^[3-4]。肝动脉和门静脉联合阻断即Pringle法联合射频可通过腹腔镜^[11-12]进行, 减少开腹的损伤, 不违背微创的目的。

实验证实肝动脉和门静脉联合阻断较肝动脉、门静脉单独阻断射频消融范围大^[3-4]。这些实验中动物射频术后立即处死, 这只能评价射频直接损伤期(direct injury)^[13]的变化, 难以评价肝脏血流阻断射频进展损伤期(progressive injury)^[13]的变化及对肝损伤的影响, 肝脏血流阻断射频的有效性及安全性难以得到评估。本实验通过在兔VX2肝肿瘤模型上进行肝脏血流阻断联合射频, 术后检测肝功能、观察并发症, 1 wk后测量射频消融灶, 以此评价射频消融灶进展期的变化及血流阻断后射频对肝功能的影响。

Wiersinga *et al*^[2]发现射频毁损灶的最终毁损面积将随着时间的推移而变化, 应该将肝实

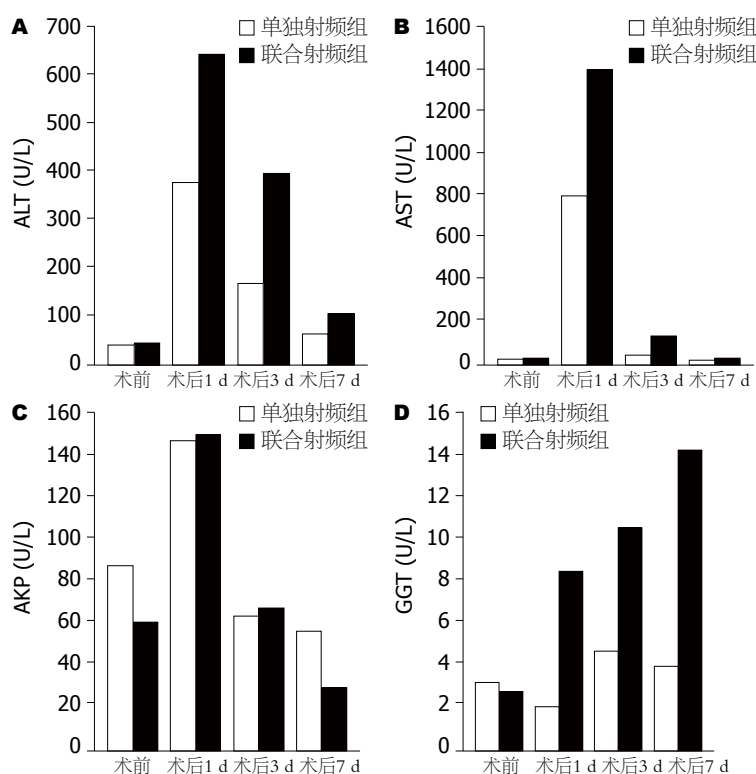


图 2 ALT、AST、AKP及GGT在术前的变化情况. A: ALT; B: AST; C: AKP; D: GGT.

应用要点
射频治疗联合肝动脉门静脉双重血流阻断可扩大射频消融范围, 但是肝损伤较重, 临床应合理选择手术适应证.

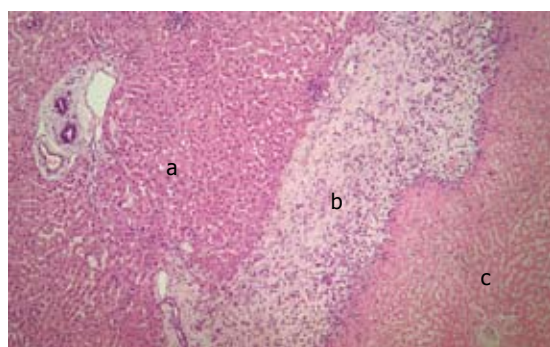


图 3 肝脏毁损灶与正常肝组织交界处镜下观察. 正常的肝脏组织(a)与毁损的肝脏组织(c)之间被边缘带(b)分开. 边缘带(b)内可见大量的纤维结缔组织, 被较多的炎症细胞浸润.

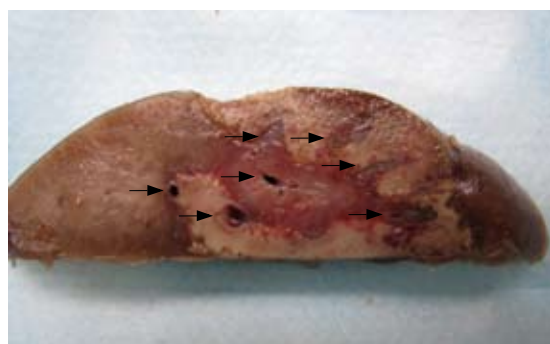


图 4 单独射频组毁损灶大体标本, 血管(箭头)周围的射频毁损灶不规则, 形成缺失.

质中引起的继发坏死(secondary heat-induced necrosis)计算在内. 以前的实验动物立即处死, 难以评价继发坏死的程度. 该实验射频术后1 wk

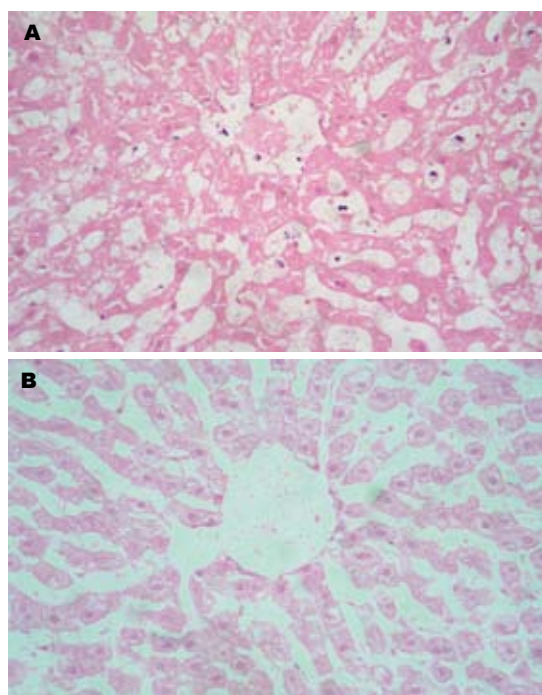


图 5 射频毁损灶内肝脏组织镜下观察. A: 联合射频组: 肝小叶结构破坏, 肝细胞膜不完整, 少见细胞核, 细胞质嗜酸性, 一片红染; B: 单独射频组: 仍然保持肝小叶基本结构, 少数肝细胞仍可见细胞轮廓、细胞核.

观察毁损灶, 联合射频组体积大于单独射频组 ($P < 0.05$), 同时其垂直径、平行径均大于单独射频组, 虽平行径之间没有统计学意义, 可能由于兔肝脏体积小同时较薄, 其有一定的局限性. 血流阻断后射频毁损范围增大, 肿瘤周边的肝脏

■同行评价

本研究对临床应用有一定参考价值, 学术价值较好。

组织毁损增多, 理想毁损面积是能够覆盖肿瘤周围1 cm的正常肝脏组织^[8], 这保证了肿瘤毁损后的安全边缘, 降低局部复发率。

本实验术后检测血清转氨酶评价肝损伤情况, 发现ALT在射频术后第1天升高较明显, 之后逐渐恢复, 单独射频组术后第7天恢复至术前水平, 但是联合射频组仍维持在较高的水平。同时术后各时间点ALT较单独射频组高且都是有统计学意义, 说明血流阻断后射频较单独射频对肝脏的肝功能影响较大, 这可能是由于阻断后射频对肝细胞的损伤有缺血和高热的共同影响。射频中血流阻断后的缺血损伤对射频的进展期损伤有一定的作用^[2]。缺血损伤使肝脏组织损伤较明显, 同时联合射频组有一只因肝损害于术后第4天死亡, 故临床应用血流阻断联合射频应合理选择手术适应证。

“热流失”的一个重要的潜在优势是保护大血管和胆道免于受热损伤的影响。入肝血流的阻断虽可减少热流失, 但将会导致大血管及胆管更加易于受到热损伤的影响^[14]。该实验术后检测血清AKP、GGT, 发现联合射频组术后1、3、7 d GGT逐渐升高, 且术后1、3、7 d均高于单独射频组, 并有统计学意义, 说明血流阻断后射频对胆管损伤较重, 并且其中一只发生严重的胆漏。Kim *et al*^[14]、Denys *et al*^[15]亦报道血流阻断后射频胆道损伤及并发症如胆道狭窄、胆道扩张等较单独射频增加。虽然胆道冷灌注联合射频可减少胆道并发症^[16], 但是这仍处于初步探索阶段, 临床应用血流阻断联合射频应谨慎。

射频联合肝动脉门静脉双重血流阻断1 wk后观察毁损灶体积较单独射频组大, 但是血流阻断联合射频对兔肝脏损伤较严重, 临床应用应持谨慎的态度, 合理选择适应证, 以防止血流阻断联合射频后并发症的发生。

本实验选择射频术后1 wk比较射频毁损灶大小和肝损伤情况, 但是对于射频1 wk后其变化情况没有进一步的研究。这正是本实验的局限性, 值得下一步的探索。

4 参考文献

- Rossi S, Garbagnati F, De Francesco I, Accocella F, Leonardi L, Quaretti P, Zangrandi A, Paties C, Lencioni R. Relationship between the shape and size of radiofrequency induced thermal lesions and hepatic vascularization. *Tumori* 1999; 85: 128-132
- Wiersinga WJ, Jansen MC, Straatsburg IH, Davids PH, Klaase JM, Gouma DJ, van Gulik TM. Lesion progression with time and the effect of vascular occlusion following radiofrequency ablation of the

- liver. *Br J Surg* 2003; 90: 306-312
- Chinn SB, Lee FT Jr, Kennedy GD, Chinn C, Johnson CD, Winter TC 3rd, Warner TF, Mahvi DM. Effect of vascular occlusion on radiofrequency ablation of the liver: results in a porcine model. *AJR Am J Roentgenol* 2001; 176: 789-795
- Chang CK, Hendy MP, Smith JM, Recht MH, Welling RE. Radiofrequency ablation of the porcine liver with complete hepatic vascular occlusion. *Ann Surg Oncol* 2002; 9: 594-598
- Chen JH, Lin YC, Huang YS, Chen TJ, Lin WY, Han KW. Induction of VX2 carcinoma in rabbit liver: comparison of two inoculation methods. *Lab Anim* 2004; 38: 79-84
- Zhang YJ, Chen MS, Li JQ, Zhang YQ, Zhong C, Liang HH. [Radiofrequency ablation combined with ethanol injection for liver cancer treatment--an experimental study] *Ai Zheng* 2006; 25: 1092-1096
- Wood TF, Rose DM, Chung M, Allegra DP, Foshag LJ, Bilchik AJ. Radiofrequency ablation of 231 unresectable hepatic tumors: indications, limitations, and complications. *Ann Surg Oncol* 2000; 7: 593-600
- Goldberg SN, Hahn PF, Halpern EF, Fogle RM, Gazelle GS. Radio-frequency tissue ablation: effect of pharmacologic modulation of blood flow on coagulation diameter. *Radiology* 1998; 209: 761-767
- Horkan C, Ahmed M, Liu Z, Gazelle GS, Solazzo SA, Kruskal JB, Goldberg SN. Radiofrequency ablation: Effect of pharmacologic modulation of hepatic and renal blood flow on coagulation diameter in a VX2 tumor model. *J Vasc Interv Radiol* 2004; 15: 269-274
- Hakimé A, Hines-Peralta A, Peddi H, Atkins MB, Sukhatme VP, Signoretti S, Regan M, Goldberg SN. Combination of radiofrequency ablation with antiangiogenic therapy for tumor ablation efficacy: study in mice. *Radiology* 2007; 244: 464-470
- Scott DJ, Fleming JB, Watumull LM, Lindberg G, Tesfay ST, Jones DB. The effect of hepatic inflow occlusion on laparoscopic radiofrequency ablation using simulated tumors. *Surg Endosc* 2002; 16: 1286-1291
- Shen P, Fleming S, Westcott C, Challa V. Laparoscopic radiofrequency ablation of the liver in proximity to major vasculature: effect of the Pringle maneuver. *J Surg Oncol* 2003; 83: 36-41
- Nikfarjam M, Malcontenti-Wilson C, Christophi C. Focal hyperthermia produces progressive tumor necrosis independent of the initial thermal effects. *J Gastrointest Surg* 2005; 9: 410-417
- Kim SK, Lim HK, Ryu JA, Choi D, Lee WJ, Lee JY, Lee JH, Sung YM, Cho EY, Hong SM, Kim JS. Radiofrequency ablation of rabbit liver in vivo: effect of the pringle maneuver on pathologic changes in liver surrounding the ablation zone. *Korean J Radiol* 2004; 5: 240-249
- Denys AL, De Baere T, Mahe C, Sabourin JC, Sa Cunha A, Germain S, Roche A. Radio-frequency tissue ablation of the liver: effects of vascular occlusion on lesion diameter and biliary and portal damages in a pig model. *Eur Radiol* 2001; 11: 2102-2108
- Ohnishi T, Yasuda I, Nishigaki Y, Hayashi H, Otsuji K, Mukai T, Enya M, Omar S, Soehendra N, Tomita E, Moriwaki H. Intraductal chilled saline perfusion to prevent bile duct injury during percutaneous radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2008; 23: e410-e415

表没食子儿茶素没食子酸酯对缺氧诱导的肝细胞癌HepG2细胞HIF-1 α 及VEGF蛋白表达的影响

王熙, 谢纪文, 刘礼

王熙, 谢纪文, 刘礼, 华中科技大学同济医学院附属协和医院中西医结合科 湖北省武汉市 430022

王熙, 2006级华中科技大学同济医学院附属协和医院中西医结合科硕士, 主要从事中西医结合肿瘤方向研究。

湖北省卫生厅中医药、中西医结合科研课题基金资助项目, No. 200389

作者贡献分布: 此课题由王熙和谢纪文设计; 研究过程由王熙与刘礼完成; 数据分析由王熙完成; 本论文写作由王熙完成。

通讯作者: 谢纪文, 430022, 湖北省武汉市解放大道1277号, 武汉市协和医院中西医结合科. xiejw@263.net

电话: 027-62364047

收稿日期: 2008-11-03 修回日期: 2009-01-07

接受日期: 2009-01-12 在线出版日期: 2009-02-08

Effect of (-)-epigallocatechin-3-gallate on hypoxia-induced expression of HIF-1 α and VEGF protein in HepG2 cells

Xi Wang, Ji-Wen Xie, Li Liu

Xi Wang, Ji-Wen Xie, Li Liu, Department of Integrated Traditional Chinese Medicine and Western Medicine, Xiehe Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China

Supported by: the Research Programs of Chinese Medicine and Integrated Traditional Chinese Medicine and Western Medicine of Health Department of Hubei Province, No. 200389

Correspondence to: Ji-Wen Xie, Department of Integrated Traditional Chinese Medicine and Western Medicine, Xiehe Hospital, 1277 Jiefang Road, Wuhan 430022, China. xiejw@263.net

Received: 2008-11-03 Revised: 2009-01-07

Accepted: 2009-01-12 Published online: 2009-02-08

Abstract

AIM: To explore the effect of (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) on hypoxia-induced expression of hypoxia inducible factor 1 alpha (HIF-1 α) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in human hepatoma line HepG2 cells.

METHODS: The human hepatoma line HepG2 cells were cultured under hypoxic conditions *in vitro*. The cultured cells were treated with different concentrations of EGCG for 16 h in the 6-well dish with coverslips. The expression of HIF-1 α and VEGF proteins were determined by immu-

nohistochemical staining. HepG2 cells were also cultured in normal oxygen condition as normal control group and in hypoxic condition without EGCG as hypoxia control group.

RESULTS: Under normal condition, there was almost no HIF-1 α protein expression and weak VEGF protein expression in HepG2 cells. Hypoxia significantly induced up-regulation of the expression of both HIF-1 α and VEGF ($t = 3.579, P < 0.01; t = 6.372, P < 0.01$, respectively). Compared with hypoxia control group, marked inhibitory effect on both HIF-1 α and VEGF expression in all hypoxia groups was observed by EGCG at a definite concentration (HIF: $F = 56.818, P < 0.05$; VEGF: $F = 10.016, P < 0.05$). The inhibition by EGCG on HIF-1 α and VEGF expression showed a dose-dependent relationship. Additionally, correlation analysis showed that HIF-1 α expression synchronized with VEGF expression ($r = 0.617, P < 0.05$).

CONCLUSION: EGCG has significant inhibitory effects on the protein expression of HIF-1 α and VEGF induced by hypoxia in a dose-dependent manner.

Key Words: Epigallocatechin-3-gallate; HepG2 cells; Hypoxia inducible factor 1 alpha; Vascular endothelial growth factor; Angiogenesis

Wang X, Xie JW, Liu L. Effect of (-)-epigallocatechin-3-gallate on hypoxia-induced expression of HIF-1 α and VEGF protein in HepG2 cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(4): 357-361

摘要

目的: 探讨表没食子儿茶素没食子酸酯[(-)-epigallocatechin-3-gallate, EGCG]对缺氧诱导的肝细胞癌HepG2细胞HIF-1 α 及VEGF表达的影响。

方法: 在缺氧条件体外培养肝细胞癌HepG2细胞16 h, 并以不同浓度EGCG处理, 即低剂量(10 $\mu\text{mol/L}$)、中剂量(50 $\mu\text{mol/L}$)、高剂量

■背景资料

血管新生是肿瘤生长转移的主要原因, 因此抗肿瘤血管生成逐渐成为抗肿瘤治疗的关键手段。血管内皮生长因子(VEGF)与肿瘤血管新生过程中发挥关键作用, 而HIF-1 α 在缺氧条件下是促进VEGF基因转录的重要调节因子。

■同行评议者

王学美, 研究员, 北京大学第一医院中西医结合研究室

■研究前沿

EGCG作为茶多酚生物活性的主要成分已有研究证实,通过抑制血管生成达到抑瘤效应,其机制是否与HIF-1 α -VEGF途径有关?本文通过体外实验探讨其作用机制。

(100 μ mol/L),制成细胞爬片以免疫组化SABC法检测HIF-1 α 及VEGF表达的变化,同时设常氧组及缺氧对照组进行比较。

结果:常氧状态下HepG2细胞中HIF-1 α 几乎无表达,VEGF有少量表达。缺氧对照组经16 h缺氧后HIF-1 α 表达明显上调,与常氧组相比有显著差异($t = 3.579, P < 0.01$); VEGF表达亦较常氧组明显上调,两者有明显差异($t = 6.372, P < 0.01$)。同浓度的EGCG对缺氧各组细胞HIF-1 α 及VEGF表达,与缺氧对照组相比均有不同明显抑制作用(HIF: $F = 56.818, P < 0.05$; VEGF: $F = 10.016, P < 0.05$),EGCG对HIF-1 α 及VEGF表达的抑制作用呈剂量依赖性,且相关分析显示, HIF-1 α 及VEGF蛋白表达同步化($r = 0.617, P < 0.05$)。

结论:EGCG可从蛋白水平下调缺氧诱导的HepG2细胞HIF-1 α 及VEGF的表达水平,从而有可能抑制肿瘤血管新生。

关键词:表没食子儿茶素没食子酸酯; HepG2细胞; 缺氧诱导因子1- α ; 血管内皮生长因子; 血管新生

王熙, 谢纪文, 刘礼. 表没食子儿茶素没食子酸酯对缺氧诱导的肝细胞癌HepG2细胞HIF-1 α 及VEGF蛋白表达的影响. 世界华人消化杂志 2009; 17(4): 357-361

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/357.asp>

0 引言

原发性肝癌是我国发病率最高的恶性肿瘤之一,并且有逐年增高的趋势,其中肝细胞肝癌占原发性肝癌的90%以上。实体肿瘤的生长和转移有赖于血管生成^[1],经典的血管生成理论认为,当瘤体直径大于2 mm时需要构建新生血管获取血供,否则肿瘤会因为缺血缺氧发生坏死,因此抗肿瘤血管生成逐渐成为抗肿瘤治疗的新手段。缺氧诱导因子(hypoxia inducible factor-1, HIF-1)是近年来发现的一个普遍存在于人和哺乳动物细胞内的缺氧应答调控因子,研究表明他与其下游靶基因血管内皮生长因子VEGF,在肿瘤缺氧状态下维持生长及转移起着关键作用^[2]。茶多酚是从绿茶中提取出来的最主要的对人体最有益成分,近来大量研究表明茶多酚尤其主要成分表没食子儿茶素没食子酸酯[(-)-epigallocatechin-3-gallate, EGCG]对肿瘤的生长有明显的抑制作用^[3],其机制是否与下调HIF-1 α 及VEGF表达有关可能成为EGCG抑制肿瘤转移的新靶点。本文拟在体外培养HepG2肝癌细胞并建立缺氧模型,通过给与不同浓度的

EGCG,观察对HepG2细胞中HIF-1 α 及VEGF表达的影响,以探讨EGCG是否能成为辅助治疗肝细胞癌的有效候选药物。

1 材料和方法

1.1 材料 HepG2细胞系由协和医院普外科实验室传代培养,为贴壁细胞。高糖DMEM培养基(武汉博士德生物工程有限公司);胎牛血清(杭州四季青公司);鼠抗mAb HIF-1 α 抗体、鼠抗mAb VEGF抗体(美国Santa Cruz公司),工作浓度均为1:40;SABC试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司);EGCG(美国Sigma公司)纯度>95%绿茶提取,以无血清DMEM培养基稀释成浓度为0.02 mol/L的储存液保存于-80℃冰箱备用,使用前以无血清DMEM培养基配成实验所需浓度;免疫组化分析软件系统:HMias-2000高清晰度彩色医学图文分析系统(华中科技大学同济医学院清屏影像公司)。

1.2 方法

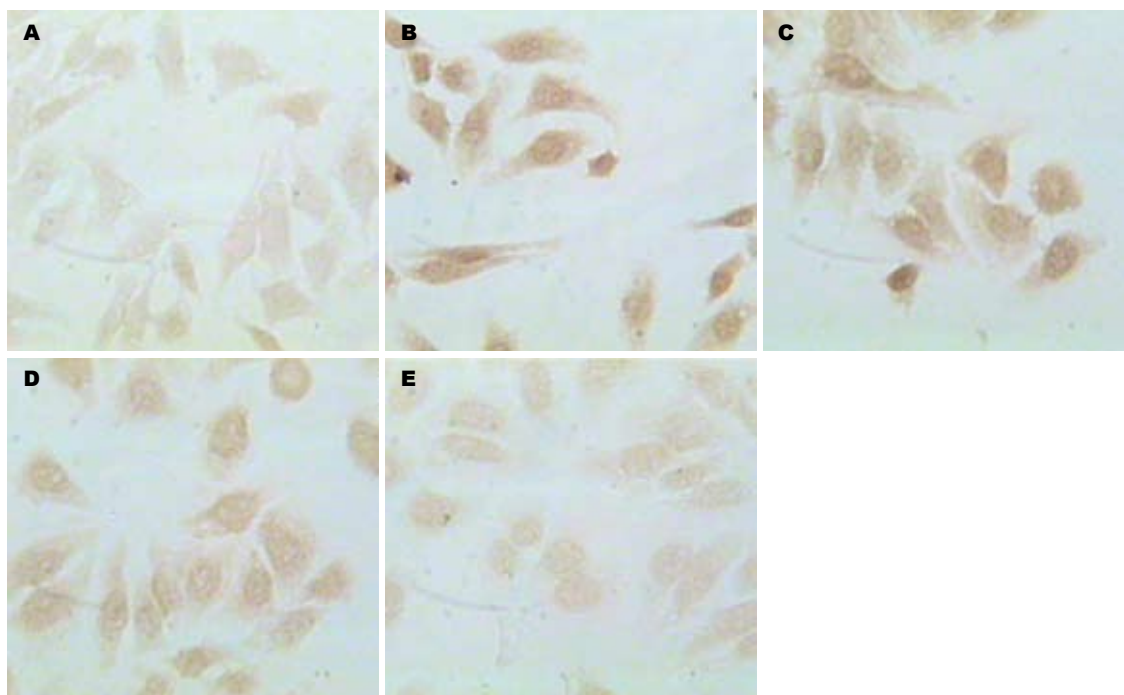
1.2.1 细胞培养: HepG2细胞生长于含100 mL/L胎牛血清DMEM培养基中,常氧组在50 mL/L CO₂, 210 mL/L O₂, 37℃饱和湿度培养箱内,缺氧组在50 mL/L CO₂, 10 mL/L O₂, 饱和湿度三气培养箱中培养。

1.2.2 爬片制作及分组:取对数生长期HepG2细胞以2.5 g/L胰酶消化成单细胞悬液反复吹打,并计数后种于含有多聚赖氨酸包被盖玻片(约1 mm×1 mm×3片)的六孔板内,每孔加入2 mL完全培养基,培养24 h待80%细胞贴壁后换液,根据下述分组要求加入不同体积培养基及药物。常氧组换液后仍每孔给予2 mL完全培养基培养,缺氧组以终浓度分别为10 μ mol/L, 50 μ mol/L, 100 μ mol/L即低剂量、中剂量、高剂量含药培养基2 mL,并设缺氧对照组(加等量无药培养基),预处理1 h后置缺氧环境继续培养16 h。

1.2.3 细胞固定及SABC免疫组化:处理后各组爬片弃去培养液→PBS漂洗3次(5 min/次)→40 g/L多聚甲醛固定30 min→PBS洗3次(5 min/次)→固定好的爬片以3 g/L H₂O₂甲醇液消除内源性过氧化物酶→羊血清封闭特异性抗体→加入HIF-1 α 及VEGF抗体→4℃孵育过夜→加入二抗和SABC(1:100)→DAB显色→常规脱水透明封片。

1.2.4 图像分析:在图像分析监视器上对染色强度作区域性测定,随机选取5个视野分别输入图像仪。染色强度用吸光度值(A)表示。每例共检测10个细胞,取其平均值代表阳性细胞A值。

统计学处理 所有实验数据均以mean±SD表示。采用SPSS13.0进行数据录入和统计分析。

**■ 相关报道**

Fassina *et al* 研究发现EGCG在子宫癌、前列腺癌肿瘤模型中, 可能通过抑制VEGF生成及其受体活性机制从而抑制血管生成达到抑瘤效应。

图 1 HepG2细胞中HIF-1 α 的表达水平($\times 200$)。A: 常氧对照组; B: 缺氧对照组; C: 缺氧低剂量组; D: 缺氧中剂量组; E: 缺氧高剂量组。

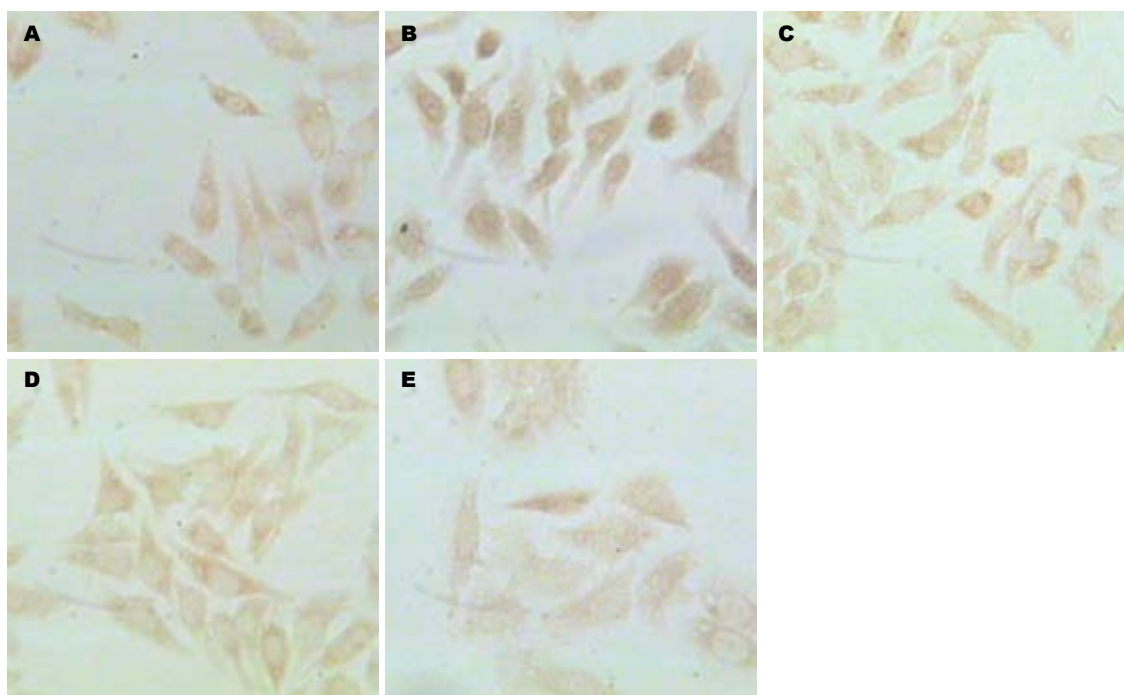


图 2 HepG2细胞中VEGF的表达水平($\times 200$)。A: 常氧对照组; B: 缺氧对照组; C: 缺氧低剂量组; D: 缺氧中剂量组; E: 缺氧高剂量组。

组内比较采用单因素方差分析LSD方法, 相关分析采用Pearson相关分析法。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 常氧和缺氧条件下HIF-1 α 及VEGF表达水平

变化 常氧状态下HepG2细胞中HIF-1 α 几乎无表达, VEGF有少量表达, 阳性表达为棕黄色, 主要分布于细胞质, 细胞核也可见。缺氧对照组经16 h缺氧后HIF-1 α 表达明显上调, 呈棕黄色, 主要位于细胞核, 与常氧组相比有显著差异($t = 3.579$, $P < 0.01$); VEGF表达亦较常氧组明显上调, 颜色

■创新盘点

本实验选取不同浓度的EGCG, 观察其对肝细胞癌细胞HepG2中HIF-1 α 及VEGF的影响, 分析了EGCG抗肿瘤血管生成的作用靶点。

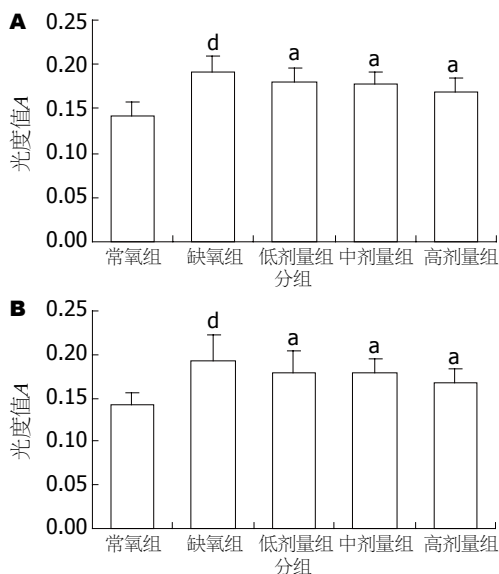


图3 EGCG对缺氧HepG2细胞中VEGF和HIF-1 α 的影响。A: VEGF; B: HIF-1 α 。* $P < 0.05$ vs 缺氧对照组; $^{\#}P < 0.01$ vs 常氧对照组。

加深, 两者有明显差异($t = 6.372$, $P < 0.01$, 图1-3)。

2.2 缺氧条件下不同浓度EGCG对HIF-1 α 及VEGF表达水平的影响及相关性 同浓度的EGCG对缺氧各组细胞HIF-1 α 及VEGF表达, 与缺氧对照组相比均有不同明显抑制作用(HIF: $F = 56.818$, $P < 0.05$; VEGF: $F = 10.016$, $P < 0.05$), EGCG对HIF-1 α 及VEGF表达的抑制作用呈剂量依赖性, 且相关分析显示, HIF-1 α 及VEGF蛋白表达同步化($r = 0.617$, $P < 0.05$, 表1)。

3 讨论

人体肿瘤大多为实体瘤, 由瘤细胞和间质构成。实体瘤间质主要包括血管、淋巴管、结缔组织、炎细胞和胞外基质等, 其中血管起营养肿瘤细胞的作用。由于肿瘤细胞不断恶性增殖导致局部血供不足, 血管比例失调, 瘤体组织出现缺氧状态。在缺氧条件下, 肿瘤细胞为了继续生长, 启动一系列缺氧适应性反应, 其中就包括缺氧诱导因子-1(HIF-1)。HIF-1由120 kDa的 α 亚单位(HIF-1 α)和91-94 kDa的 β 亚单位(HIF-1 β)组成的异源二聚体结构。研究表明, HIF-1 α 是唯一的氧调节亚单位, 他决定HIF-1的活性。而HIF-1 β 是许多bHLH蛋白的共同亚单位, 他可能与稳定HIF-1及其二聚化有关。常氧状态下, 细胞虽然不断地合成HIF-1 α , 但由于他受泛素蛋白酶体系统(ubiquitin-proteasomesystem)的作用迅速降解, 很难检测到^[4], 而在缺氧时则出现降解抑制^[5]。周围环境的氧浓度下降时, HIF-1 α 表达增加, 且表

表1 EGCG在缺氧条件下对HepG2细胞HIF-1 α 及VEGF表达水平的影响 ($n = 250$, mean \pm SD)

EGCG(μ mol/L)	VEGF	HIF-1 α
常氧对照组(0)	0.142 \pm 0.016	0.143 \pm 0.014
缺氧对照组(0)	0.184 \pm 0.018 ^d	0.202 \pm 0.030 ^d
低剂量组(10)	0.180 \pm 0.015 ^a	0.194 \pm 0.023 ^a
中剂量组(50)	0.179 \pm 0.012 ^a	0.178 \pm 0.015 ^a
高剂量组(100)	0.168 \pm 0.016 ^a	0.161 \pm 0.016 ^a

^a $P < 0.05$ vs 缺氧对照组; ^d $P < 0.01$ vs 常氧对照组。

达的增加表现为多个水平上。目前, 缺氧在哪个水平上影响HIF-1 α 仍有争论。在缺氧状态下HIF-1 α 大量表达并与缺氧反应元件HREs结合, 促进靶基因转录^[6], 血管内皮生长因子VEGF就是其中影响肿瘤生长重要的靶基因之一。VEGF是迄今认为重要的血管生成诱导因子, VEGF能强烈地刺激血管内皮细胞增生、迁移和形成新生血管。研究表明, 在许多实体肿瘤, 包括胃肠道肿瘤、子宫颈癌以及肺癌中都存在活跃的血管生成, 并发现其血管生成的活跃程度与这些肿瘤的预后相关^[7-8]。VEGF作为主要的促血管新生因子, 在缺氧状态下HIF-1 α 大量表达不仅使其表达上调而且能增加其转录活性^[9]。因此抑制HIF-1 α 及VEGF表达有可能通过抗血管生成途径作为抗肿瘤的新的治疗方法。

绿茶是一类普遍存在于自然界的黄酮类物质, 茶多酚是茶叶药效的主要活性成分, 占茶叶干质量20%-35%, 其主要组分为儿茶素, 占其总量的80%左右, 其中EGCG含量最高, 占儿茶素的50%左右。众多的研究表明, EGCG在肿瘤的防治中有重要作用, 其抑癌机制包括抑制肿瘤细胞增殖、诱导肿瘤细胞凋亡和抑制端粒酶的活性等。除此之外, 还有研究表明他能够在多种肿瘤模型包括子宫癌, 前列腺癌中^[10-11], 通过抑制血管生成达到抑瘤效应, 其机制有可能与抑制VEGF生成及其受体活性有关^[12], 但并不十分明确。另外也有研究表明EGCG通过抑制胰岛素样生长因子及其受体IGF/IGF-1R系统活化达到抗肝细胞肝癌的作用^[13], 由此证实, EGCG对肝细胞肝癌也有较强的抗肿瘤作用。本实验选取不同浓度的EGCG, 观察其对肝细胞癌细胞HepG2中HIF-1 α 及VEGF的影响, 结果发现正常氧分压下HIF-1 α 蛋白几乎无表达, VEGF有少量蛋白表达, 而缺氧状态下两者表达水平明显上调, 较小剂量(10 μ mol/L)EGCG对二者即有抑制

作用, 且其作用有明显剂量依赖性, 改变趋势亦成正相关, 说明EGCG作用方式与HIF-1 α -VEGF途径有关. 而即使是高剂量组(100 μ mol/L)药物水平干预下, 细胞形态并未出现明显改变, 说明其作用不会引起细胞损伤并影响实验结果, 此作用可能与阻止HIF-1 α 与缺氧反应元件HRE有关, 但究竟在何种时期及水平产生HIF-1 α 抑制作用有待进一步考究.

本实验研究提示, 绿茶茶多酚活性物质EGCG能够对缺氧诱导的HepG2细胞HIF-1 α 及VEGF基因表达产生明显下调作用, 可为抗血管生成抑癌靶向治疗提供新的依据, 但EGCG如何抑制HIF-1 α 机制有待进一步研究. 绿茶是人们所喜爱的传统保健饮料之一, EGCG作为绿茶茶多酚的一种, 来源广泛. 深入研究其抗肿瘤机制和药理效应, 对开发新的抗肿瘤药物有重要意义.

4 参考文献

- 1 王淑红, 张在人, 李萍, 赵德利. 胃癌组织中MVD和VEGF表达与影像学表现的关系. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 2004-2006
- 2 Ma J, Zhang L, Ru GQ, Zhao ZS, Xu WJ. Upregulation of hypoxia inducible factor 1 α mRNA is associated with elevated vascular endothelial growth factor expression and excessive angiogenesis and predicts a poor prognosis in gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 1680-1686
- 3 Ju J, Lu G, Lambert JD, Yang CS. Inhibition of carcinogenesis by tea constituents. *Semin Cancer Biol* 2007; 17: 395-402
- 4 Salceda S, Caro J. Hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J Biol Chem* 1997; 272: 22642-22647
- 5 Kallio PJ, Pongratz I, Gradin K, McGuire J, Poellinger L. Activation of hypoxia-inducible factor 1 α : posttranscriptional regulation and conformational change by recruitment of the Arnt transcription factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 5667-5672
- 6 Hägg M, Wennström S. Activation of hypoxia-induced transcription in normoxia. *Exp Cell Res* 2005; 306: 180-191
- 7 Duff SE, Jeziorska M, Kumar S, Haboubi N, Sherlock D, O'Dwyer ST, Jayson GC. Lymphatic vessel density, microvessel density and lymphangiogenic growth factor expression in colorectal cancer. *Colorectal Dis* 2007; 9: 793-800
- 8 Lee JJ, Chu E. An update on treatment advances for the first-line therapy of metastatic colorectal cancer. *Cancer J* 2007; 13: 276-281
- 9 Powis G, Kirkpatrick L. Hypoxia inducible factor-1 α as a cancer drug target. *Mol Cancer Ther* 2004; 3: 647-654
- 10 Fassina G, Venè R, Morini M, Minghelli S, Benelli R, Noonan DM, Albini A. Mechanisms of inhibition of tumor angiogenesis and vascular tumor growth by epigallocatechin-3-gallate. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 4865-4873
- 11 Adhami VM, Siddiqui IA, Ahmad N, Gupta S, Mukhtar H. Oral consumption of green tea polyphenols inhibits insulin-like growth factor-I-induced signaling in an autochthonous mouse model of prostate cancer. *Cancer Res* 2004; 64: 8715-8722
- 12 Lamy S, Gingras D, Béliveau R. Green tea catechins inhibit vascular endothelial growth factor receptor phosphorylation. *Cancer Res* 2002; 62: 381-385
- 13 Shimizu M, Shirakami Y, Sakai H, Tatebe H, Nakagawa T, Hara Y, Weinstein IB, Moriawaki H. EGCG inhibits activation of the insulin-like growth factor (IGF)/IGF-1 receptor axis in human hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Lett* 2007 Dec 28. [Epub ahead of print]

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志英文摘要要求

本刊讯 本刊英文摘要包括目的、方法、结果、结论, 书写要求与中文摘要一致. 具体格式要求如下: (1)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; (2)作者 署名一般不超过8人. 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”; (3)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; (4)基金资助项目 格式如: Supported by National Natural Science Foundation of China, No.30224801; (5)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; (6)收稿及修回日期 格式如: Received: Revised: . (常务副总编辑: 张海宁 2009-02-08)

清肝利湿汤干预慢性乙肝肝胆湿热证的蛋白质组学分析

戴 姣, 戴幸平, 邢之华, 李 萃, 李家邦, 蒋荣鑫

■背景资料

目前, 蛋白质组学在疾病的诊断和治疗、疾病相关的生物标记分子的鉴定、药物开发以及致病机制研究等方面得到广泛的应用。

戴姣, 戴幸平, 邢之华, 李家邦, 蒋荣鑫, 中南大学湘雅医院 中西医结合研究所 湖南省长沙市 410008

李萃, 中南大学湘雅医院 卫生部肿瘤蛋白质组学重点实验室 湖南省长沙市 410008

戴姣, 在读硕士生, 主要从事中西医结合治疗肝脏疾病研究。

湖南省科技计划基金资助项目, No. 06SK3028

中南大学理科技发展基金资助项目, No. 07SDF008

作者贡献分布: 戴姣与戴幸平对此文所作贡献均等; 此课题由戴幸平, 李家邦及蒋荣鑫设计; 研究过程由戴姣与戴幸平操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由戴幸平及邢之华提供; 数据分析由戴姣与戴幸平完成; 本论文写作由戴姣, 戴幸平及李萃完成。

通讯作者: 戴幸平, 410008, 湖南省长沙市, 中南大学湘雅医院 中西医结合研究所, dai_xingping@yahoo.com.cn

电话: 0731-4327031

收稿日期: 2008-11-13 修回日期: 2008-12-26

接受日期: 2009-01-05 在线出版日期: 2009-02-08

Proteomic analysis on chronic hepatitis B of liver-gallbladder dampness-heat type treated with Qinggan Lishi decoction

Jiao Dai, Xing-Ping Dai, Zhi-Hua Xing, Cui Li, Jia-Bang Li, Rong-Xin Jiang

Jiao Dai, Xing-Ping Dai, Zhi-Hua Xing, Jia-Bang Li, Rong-Xin Jiang, Institute of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Xiangya Hospital, Central-South University, Changsha 410008, Hunan Province, China
Cui Li, Key Laboratory Of Cancer Proteomics of Ministry of Public Health, Xiangya Hospital, Central-South University, Changsha 410078, Hunan Province, China

Supported by: the Foundation Project for Science and technology of Hunan, No. 06SK3028; and the Central South University Science Development Foundation, No. 07SDF008

Correspondence to: Xing-Ping Dai, Institute of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Xiangya Hospital, Central-South University, Changsha 410008, Hunan Province, China. dai_xingping@yahoo.com.cn

Received: 2008-11-13 Revised: 2008-12-26

Accepted: 2009-01-05 Published online: 2009-02-08

Abstract

AIM: To investigate the pharmacological mechanisms of qingganlishi decoction on patients with chronic hepatitis B (CHB) of liver dampness heat type using proteomic methods.

METHODS: The total proteins of peripheral blood mononuclear cells from 20 cases before and after treatment of the qingganlishi decoction were separated by two-dimensional electrophoresis (2-DE) individually, and the differentially

expressed protein spots between the two groups were identified by both matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) so as to measure peptide mass fingerprinting. MSDB and Swiss-Prot protein database were retrieved to identify differentially expressed protein.

RESULTS: Thirty eight spots were found to have marked changes on the quality and/or quantity. Among them, 9 proteins had been proved to be significantly up-regulated in the untreated CHB group but down-regulated after qingganlishi decoction treatment. They were listed as follows: Rho GDP-dissociation inhibitor 2, heat-shock 70 kDa protein, fibrinogen gamma-A chain precursor, F-actin capping protein alpha-1 subunit, fibrinogen beta chain precursor, XTP3TPA-transactivated protein 1, hypothetical protein, pyruvate kinase isozymes M1/M2, hypothetical protein fragment.

CONCLUSION: These differentially expressed proteins of the CHB can help people understand the pathomechanism of hepatitis B of liver dampness heat type and the working mechanism of qingganlishi decoction.

Key Words: Proteomic; Qingganlishi decoction; Chronic hepatitis B; Liver damp-heat; Peripheral blood mononuclear cells; Two-dimensional electrophoresis

Dai J, Dai XP, Xing ZH, Li C, Li JB, Jiang RX. Proteomic analysis on chronic hepatitis B of liver-gallbladder dampness-heat type treated with Qinggan Lishi decoction. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(4): 362-367

摘要

目的: 分析清肝利湿汤治疗慢性乙肝(CHB)肝胆湿热证外周血单个核细胞的蛋白质表达谱的差异, 为探讨清肝利湿汤的作用机制奠定基础。

方法: 利用双向凝胶电泳技术(2-DE)分离来源20例CHB肝胆湿热证患者用清肝利湿汤治疗前后的外周静脉血单个核细胞(peripheral

■同行评议者

张声生, 教授, 首都医科大学附属北京中医医院消化中心

blood mononuclear cells, PBMC). 用基质辅助激光解吸飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)对用清肝利湿汤治疗前后的差异蛋白质进行测定肽质量指纹谱. 检索MSDB和Swiss-Prot蛋白质数据库鉴定差异蛋白.

结果: 经过对比分析及质谱鉴定, 找到质和/或量有明显改变的38个点. 本研究鉴定了9个清肝利湿汤治疗前后的CHB患者的差异表达蛋白: Rho鸟苷酸解离抑制因子, 热休克蛋白70, 纤维蛋白gamma链前体, F肌动蛋白alpha链亚单位, 纤维蛋白beta链前体, XTP3TPA反式激活蛋白, 假想蛋白, 丙酮酸激酶同工酶M1/M2, 假想蛋白片段.

结论: 这些差异蛋白有助于了解CHB肝胆湿热证患者病理机制过程及清肝利湿汤的作用机制.

关键词: 蛋白质组学; 清肝利湿汤; 慢性乙型肝炎; 肝胆湿热证; 单个核细胞; 双向凝胶电泳技术

戴姣, 戴幸平, 邢之华, 李萃, 李家邦, 蒋荣鑫. 清肝利湿汤干预慢性乙型肝炎胆湿热证的蛋白质组学分析. 世界华人消化杂志 2009; 17(4): 362-367
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/362.asp>

0 引言

慢性乙型病毒性肝炎(chronic hepatitis B, CHB)是一种严重危害人类健康的常见病. 慢性乙型肝炎是我国发病率很高的疾病, 我国现有1.3亿乙肝病毒携带者, 慢性乙肝病毒感染的自然病程很长, 一般可持续30-50年, 并且部分患者发展为肝硬化, 终末期肝病和肝细胞癌^[1]. 且多在青壮年时期发病, 对人们身体健康和生命安全构成巨大的威胁. 肝胆湿热证是慢性乙型肝炎常见的证型之一, 病机为疏泄功能失常, 治疗上必须疏利肝胆与清利湿热之品相互为用^[2], 临床经验方清肝利湿汤疗效显著^[2]. 蛋白质组学是从整体、动态的角度, 对发病机制有关因素高通量的综合研究. 近年来, 蛋白质组学被广泛应用于人类疾病发病机制、治疗和药物筛选研究之中, 并取得了大量有意义的结果^[3-5]. 因此本研究从蛋白质组学这一全新技术入手, 从整体、动态水平这一角度来研究清肝利湿汤治疗CHB的作用机制, 以期发现抑制HBV病毒复制及病毒清除机制的有关线索.

1 材料和方法

1.1 材料 清肝利湿汤由柴胡10 g, 枳实10 g, 白芍

20 g, 茵陈20 g, 大黄5 g, 甘草5 g等六味中草药组成, 由中南大学湘雅医院中药房提供, 经专家鉴定为地道药材; 清肝利湿汤由湘雅医院制剂室煎制, 300 mL/剂. 2-D Quant Kit蛋白质定量试剂盒、固相PH梯度干胶条(IPGstrip ph3-10, 24 cm)、IPG缓冲液(ph3-10)、覆盖液均由Amersham Biosciences公司提供; 人淋巴细胞分离液购自北京鼎国生物公司; 二硫苏糖醇、碘乙酰胺、丙乙酰胺、甲叉双丙烯酰胺、尿素、甘氨酸、Tris、CHAPS、SDS、考马斯亮兰、琼脂糖、NP-40、PMSF、TritonX-100、EDTA均由Sigma公司提供; 低分子质量单向Marker由上海伯奥生物制品公司提供; 硫代硫酸钠、无水乙醇、甘油、冰醋酸、甲醛、琼脂糖、溴酚兰、TEMED为国产分析纯; 双蒸水、超纯水由湘雅医院医学中心实验室制备. 深低温冰箱(so-lou environment公司, USA)高速低温离心机(Beckman公司, USA); 小型离心机, Imagescanner扫描仪(Sigma公司); Ettan IPGphor II 等电聚焦仪, Ettan DALT II System垂直电泳槽(Amersham Pharmacia公司, USA); Applied Biosystems Voyager-DE STR Biospectrometry™ work station System 4307 MALDI-TOF-MS质谱仪(ABI公司提供). PDQuest7.0分析软件(Bio-Rad公司), Imagescanner扫描仪、Labscan扫描控制和分析前处理软件为Amersham Biosciences公司产品; Bio-Tek ELX800型自动酶标(Bio-Tek Instruments, Inc); WD-9405B型水平摇床(沃德生物医学仪器公司). YKH-III液体快速混合器(江西医疗器械厂). ML-902型定时恒温磁力搅拌器(上海浦江分析仪器厂); Typhoon9400多功能荧光扫描成像系统为Amersham Biosciences公司产品.

1.2 方法

1.2.1 临床资料: (1)一般资料: 20例慢性乙型肝炎患者标本来源于2007-04/2007-09湘雅医院中西医结合科门诊及病房, 并简要记录病史, 患者年龄18-64(中位年龄44)岁. (2)诊断标准: 西医诊断标准参照2000年西安全国病毒性肝炎会议的标准^[6]: 血清HBsAg、HBcAg、HBeAg阳性6 mo以上, 血清HBV DNA定量 1×10^8 copies/L, 血清ALT大于正常上限2倍而低于正常上限10倍. 中医肝胆湿热证参照中药新药临床研究指导原则^[7]的诊断标准: (主症)身目俱黄, 黄色鲜明, 胁肋疼痛, 脘闷腹胀, 烦热, 口干而苦, 小便黄赤, 舌质红, 苔黄腻. (次症)纳呆, 恶心呕吐, 困倦乏力, 皮肤瘙痒, 大便秘结或稀溏, 脉弦滑数. (3)排除标准: 均排除甲、丙、丁和戊型肝炎等

■ 研发前沿

证候是有规律的病理表现, 就必然有其物质基础支配机制. 目前认为所有疾病均存在基因表达的变化, 基因的表达式-蛋白质才是生理功能的执行者和体现者. 其为应用蛋白质组学研究技术进行中医辨证论治研究提供平台.

■相关报道

CHB之所以缠绵难愈,有学者认为免疫病理在其发病机制上起着重要的作用,宿主的免疫功能或免疫网络的异常、是CHB发病的根本原因。

病毒重叠感染以及其他原因(酒精、药物、自身免疫性肝病及肝癌等)引起的肝脏损害^[7]。(4)治疗方法:予以清肝利湿汤每日一剂(由湘雅医院制剂室提供),每次150 mL,2次/d,早晚空腹服用;2 wk为一疗程,直至症状消失,前后对照。前后时间以60 d内为限。服药期间停用其他药物。依从性差,中途退出的病例仍补足观察例数^[2]。

1.2.2 证候疗效判定标准 and 安全性观测:参照中药新药临床研究指导原则^[6]。包括治疗前后每2 wk观察并记录临床主要症状和体征的变化及一般体检项目检查。血、尿、便常规检查。心、肾功能检查。可能出现的不良反应及其相关检测指标。

1.2.3 样品制备和分离:清晨空腹取肘静脉血10 mL,加1支肝素(2 mL, 12 500 U)抗凝,常温下静置0.5-6 h,抽上层悬液(血浆),加入淋巴分离液(相对密度1.077,淋巴分离液:血浆=1:1-1:3),水平离心(1800 r/20 min),液体分4层由上至下分别为血浆,淋巴细胞,淋巴分离液,红细胞。抽取淋巴细胞转移至另一试管,加满生理盐水摇匀,水平离心(800 r/10 min),弃上清液,加满生理盐水摇匀,水平离心(1000 r/10 min),弃上清液,加约1 mL生理盐水混匀移至大EP管,低温水平高速离心(4℃, 12 000 r/10 min),弃上清液,清肝利湿汤治疗前后的单个核细胞标本分别标记分组,于-70℃冰箱干冻保存。

1.2.4 总蛋白的抽提:取出PBMC,每管加入改良细胞裂解液(8 mol/L urea, 2 mol/L thiourea, 1% NP240, 1% Triton X2100, 80 mmol/L DTT, 5 mmol/L PMSF, 4% CHAPS, 40 mmol/L Tris, 2% pharmalyte)200-300 μ L。室温下放置30min,间断漩涡震荡,1 mL注射器抽吸数次以剪切核酸,并采用超声波处理(冰浴间歇处理,即超声处理15 s,再放置15 s,如此反复进行约6次)。待细胞完全溶解成流动液体时,15 000 r/min, 4℃离心30 min取上清即为细胞总蛋白质。

1.2.5 总蛋白浓度测定:采用Amersham Biosciences公司专门针对蛋白质组学研究的蛋白质抽提设计的2-DE Quant Kit定量试剂盒,提取PBMC总蛋白抽提后,测定所抽提蛋白的浓度;测定各标准管及标本在波长490 nm处的吸光值,并求出标本浓度。

1.2.6 双向凝胶电泳:用双向凝胶电泳(2-DE)方法进行细胞蛋白质的分离,利用考马斯亮蓝染色方法进行电泳凝胶染色^[5]。

1.2.7 凝胶图像采集与分析:凝胶通过Imagescanncr

表 1 总蛋白浓度及吸光度值 (490 nm)

编号	浓度(mg/L)	吸光度值
标准管1	0	0.381
标准管2	10	0.333
标准管3	20	0.302
标准管4	30	0.298
标准管5	40	0.227
标准管6	50	0.209
待测管1	42.97059	0.230
待测管2	33.26471	0.263

扫描仪, LabScan扫描软件, PDQuest软件进行背景消减、匹配、量化比较等分析。在相同的实验条件和参数设置条件下,当HBV患者治疗前的PBMC凝胶中的蛋白点表达较治疗后PBMC凝胶明显增强或降低(校正后蛋白质点的表达量相差2倍以上),并在不少于50%的该组PBMC凝胶图谱中表达,视其为差异蛋白质点。

1.2.8 差异表达蛋白点的质谱鉴定:选取分辨率较好的蛋白质点,参照李茂玉 *et al*^[8]的方法进行蛋白质的原位酶解参照Li *et al*^[5]的方法利用MALDI-TOF-MS质谱仪进行质谱分析,获得肽质量指纹图谱。

1.2.9 差异点的标示:相应的鉴定出来的差异蛋白点标示在相应的分析胶上(考染2-DE图上),在CHB治疗前中高表达或特异性表达的蛋白点上标记。各差异点的顺序号为本工作发现的先后顺序。

统计学处理 实验数据以mean \pm SD表示,所有数据统计分析在Excel及SPSS11.0软件上进行。

2 结果

2.1 疗效观察 肝胆湿热型慢性乙肝患者的证候疗效以前述的判定标准为依据,临床痊愈、显效和有效视为有效。参加实验的患者,依从性差,中途退出的病例仍补足观察例数,本研究选取20位患者治疗有效的进入结果分析。治疗过程中患者均无不良反应。

2.2 总蛋白浓度 6个标准管的浓度分别为0, 10, 20, 30, 40及50 mg/L时,在波长490 nm处的吸光度值随浓度的增高而降低(表1),根据标准管的浓度和吸光度值绘出总蛋白定量标准曲线,求得直线回归方程 $y = -0.0034x + 0.3761$ (图1),将待测标本吸光度值代入方程,计算出其浓度(表1)。

2.3 标本2-DE图谱分析 本论文所研究的CHB患者的PBMC总蛋白质经双向凝胶电泳,考马斯亮

表 2 Mascot软件在MSDB和SWISS-PROT数据库中搜索到的差异表达蛋白质

蛋白斑点	匹配的肽段	数据库ID	蛋白质名称	等电点/分子质量	覆盖率(%)
P1	7/20	GDIS	Rho GDP-dissociation inhibitor 2	5.10/22900	61
P2	12/21	1HJOA	Heat-shock 70 kDa protein	6.69/41973	42
P3	9/23	Q96DE1	Hypothetical protein	5.20/17998	55
P4	12/66	FGHUG	Fibrinogen gamma-A chain precursor	5.7/50092	36
P5	11/20	Q8WVV5	Hypothetical protein (Fragment)	5.78/40477	40
P6	19/38	FGHUB	Fibrinogen beta chain precursor	8.54/56577	49
P7	12/47	KPYM	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	7.95/58339	23
P8	7/42	Q1KSF8	XTP3TPA-transactivated protein 1	6.42/23896	19
P9	10/19	G0263	F-actin capping protein α -1 subunit	5.45/33073	58

■ 名词解释

蛋白质组学 (Proteomics): 指从整体上研究和分析特定生理状态下蛋白质组成成分、表达水平和修饰状态, 以及蛋白质与蛋白质的相互作用和联系, 揭示蛋白质整体水平与疾病机制、细胞功能等方面的联系的学科。

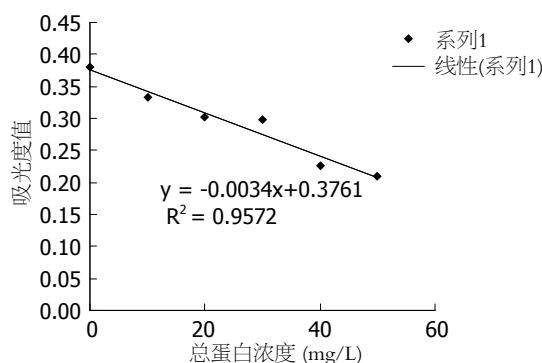


图 1 2-DE总蛋白定量标准曲线。

蓝染色后得到背景清晰、分辨率高、重复性好 2-DE图谱, 总蛋白上样量为0.8 mg时图象最佳。经PDQuest双向凝胶电泳图像分析软件及手工分析, 每块2-DE胶可分离近1100个左右蛋白点。等电点(isoelectric point, PI)4-9和分子质量(M_r)为14-63 kDa范围内; 同组2块胶的蛋白质点在对应有位置上有很好的重复性, 不同胶间蛋白质点在IEF方向及在SDS-PAGE方向上的偏差均较小, 本实验双向电泳3次重复实验的位置偏差在IEF方向的平均偏差为 1.12 ± 0.20 mm, SDS-PAGE方向的平均偏差为 1.18 ± 0.15 mm, 表明本实验获得了图像清晰、分辨率高和重复性好的2-DE电泳图谱(图2)。清肝利湿汤治疗前后的慢性乙型肝炎肝胆湿热型患者的PBMC的2-DE 图谱显示了极大的相似形, 其匹配率为82%-91%。同一份标本平行电泳的匹配率在87%以上, 并且各蛋白点的强度变化无显著性差异经比较发现, 清肝利湿汤组与慢性乙型肝炎肝胆湿热型治疗前组之间有38个差异点, 18个在清肝利湿汤组表达上调, 16个在清肝利湿汤组表达下调, 4个蛋白质点只在清肝利湿汤组表达。

2.4 差异表达点的质谱鉴定 对相应的差异表达的蛋白进行质谱鉴定, 结果表明, 大多数蛋白点

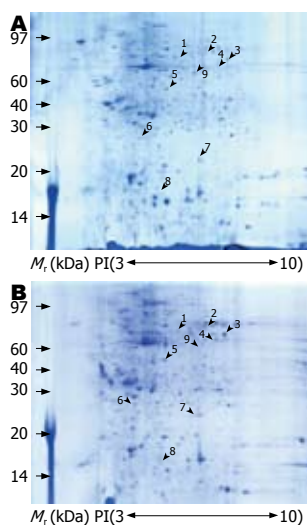


图 2 PBMCs双向电泳图谱(A和B)的差异蛋白质点。第一向固pH3-10NL梯度干胶条等电聚焦, 第二向SDS-PAGE垂直电泳, 凝胶采用考马斯亮蓝染色。A: CHB肝胆湿热证组; B: 清肝利湿汤组。

的出峰情况较好, 对同一个蛋白点用MALDI-TOF-MS鉴定, 数据库查询后为同一蛋白质。利用MALDI-TOF-MS成功的鉴定了9个差异表达蛋白点(图3), 在治疗前中特异性表达或治疗后高表达的蛋白的6个为: Rho鸟苷酸解离抑制因子(Rho GDP-dissociation inhibitor 2), 纤维蛋白gamma链前体(fibrinogen gamma-A chain precursor), 假想蛋白(Hypothetical protein), F肌动蛋白alpha链亚单位(F-actin capping protein alpha-1 subunit), 纤维蛋白beta链前体(fibrinogen beta chain precursor), XTP3TPA反式激活蛋白(XTP3TPA-transactivated protein 1); 在治疗后中特异性表达或较治疗前高表达的蛋白为3个: 热休克蛋白70(heat-shock 70 kDa protein), 丙酮酸激酶同工酶(Pyruvate kinase isozymes M1/M2), 假想蛋白片段(Hypothetical protein, Fragment); 相对应9个不同的蛋白质(蛋白点之间的强度差异为3-270倍, 均具有统计学意义, $P < 0.05$, 表2)。其中实验等电点和分子质量是根据蛋白点在双向电泳胶上的位置, 经图像分析软件分析后得到。

■同行评价

本文将蛋白组学引入慢性乙肝肝胆湿热证研究,从学术的角度来看,有一定的意义,但临床实际指导意义有限。

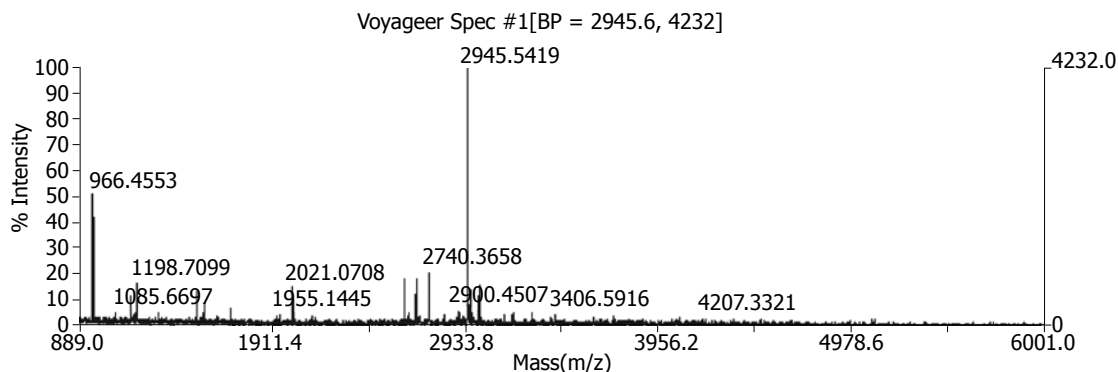


图3 MALDI-TOF-MS对P1点鉴定的PMF图。x轴: 质荷比(m/z), y轴: 相对强度; 峰旁标示的数字代表肽片断的单同位素峰[M+H]⁺的质量数。

3 讨论

CHB之所以缠绵难愈,有学者认为免疫病理在其发病机制上起着重要的作用,宿主的免疫功能或免疫网络的异常、是CHB发病的根本原因^[9]。机体的细胞免疫、体液免疫以及各种免疫因子间的相互促进、相互制约,构成了一个复杂的免疫网络。PBMC是机体质量要的免疫细胞,在多种疾病发生、发展、治疗及预后判断过程中发挥重要作用^[10-12]。对于慢性乙型肝炎的治疗,如何打破感染宿主的免疫耐受、清除细胞内病毒感染是关键所在,也是乙型肝炎特异性免疫治疗研究的重点和难点。随着乙型肝炎病毒免疫生物学和免疫病理学的飞速进展,保护性免疫的观念也发生了深刻变化。最近,对CHB的特异性治疗研究有了重大突破,有研究发现:基于多个表位的组合肽治疗有望打破宿主对表面抗原的免疫耐受^[13]。

通过比较慢性乙型肝炎肝胆湿热证患者用清肝利湿汤治疗前后PBMC之间蛋白质组的异同,可以发现一些与肝胆湿热证相关的特异性蛋白质,为进一步研究了解清肝利湿汤的作用机制提供可能;深入了解这些与CHB相关的特异性蛋白质的结构和功能,将极大地促进CHB发病机制、诊断、治疗和新药开发的研究。《亚太地区慢性乙型肝炎处理共识》中将“中医中药和其他草药在慢性乙型肝炎治疗中有何作用”作为“未解决和需进一步研究的问题”提出,认为需要进一步研究解决作用机制等问题^[14]。

中药新方清肝利湿汤,临床实验证明具有良好的抗炎、镇痛、抗氧自由基损伤的作用,清热利湿方中柴胡疏肝解郁,茵陈清利湿热,枳实破气消积,泻热除湿,大黄泻热化瘀,白芍柔肝止痛,主治肝胆湿热之证^[15]。

我们对CHB患者与正常人的血清单个核细胞的蛋白质表达谱进行了分析,鉴定了9个与HBV相关的蛋白质点,对于这些在2-DE图谱上经图像软件分析后有明显量变的蛋白斑点,MALDI-TOF-MS鉴定可作为一种较为灵敏的手段,为差异蛋白的鉴定提供了有价值的指标。

在本研究中,我们鉴定的9个差异蛋白质中包括细胞凋亡信号分子、凝血相关蛋白及能量代谢相关酶等,他们均与细胞信号传导、细胞周期等有关,对促进细胞分裂增殖起着重要作用。

热休克蛋白具有多种生物学功能,他不但在细胞内作为分子伴侣参与细胞内的多种蛋白转位组装,调节细胞的自我平衡和细胞凋亡等,是细胞凋亡的决定因子。HSP70在正常细胞中表达水平较低,而在应激状态下可显著性升高。彭明利等发现体外构建HSP70-HbsAg(戊)、HSP70-HbsAg(ADP)复合物和HSP70-HbsAg(戊)、HSP70-HbsAg(ADP)蛋白复合物均能够引起BALB/C小鼠的体液免疫和细胞免疫应答,诱导脾细胞的HbsAg特异性CTL效应,能够增强DC细胞的抗原呈递能力,促使其分泌大量细胞因子IL-6和TNF- α ,在体外激活产生HbsAg特异性CTL效应^[16]。肝炎肝胆湿热型患者经清肝利湿汤治疗后,Rho-GDI及F-肌动蛋白表达上调,HSP70表达下调,表明清肝利湿汤可能通过信号转导通路影响肝胆湿热证的应激状态,提高患者细胞免疫应答。

纤维蛋白原是由肝脏产生的一种黏附蛋白,可以被血小板 α 颗粒摄取并储存^[17]。纤维蛋白原通过其在血小板上的配体GPIIb/IIIa使血小板聚集及血小板与单核细胞的黏附,促进炎症和血栓形成。纤维蛋白原的另一重要功能是通过其r3序列结合到ICAM1并调整ICAM1依赖性黏附,作为内皮细胞和单核细胞间必需的桥连子而在免

疫炎症反应中起重要作用^[18]。乙型肝炎病毒所致各类型肝病在肝功能受损的同时, 出现Fbg含量与功能的下调, 但两者之间不成正比, 且当Fbg的功能异常时, 虽其含量达到正常水平, 仍可因纤维蛋白单体聚合反应减弱而导致止血功能的缺陷^[19]。纤维蛋白原在经清肝利湿汤治疗后表达上调, 这说明清肝利湿汤有促纤维蛋白单体聚合, 改善凝血功能, 并且可能存在抑制炎症反应的作用。

XTP3TPA-transactivated protein 1是乙型肝炎病毒(HBV)基因组中最小的开放读码框架(ORF)编码的x蛋白(HBxAg), 是一种具有反式激活作用的病毒蛋白, 在HBV感染肝细胞的恶性转化中具有十分重要的作用。HBxAg蛋白不仅可以上调HBV基因的复制能力, 还可以影响细胞转录、生长以及细胞凋亡^[20]。目前认为HBxAg蛋白广泛的激活作用是由于其具有双重作用途径。HBxAg蛋白在细胞内定位于细胞质和核内^[21], 对HBxAg反式激活途径目前研究认为存在两种方式, 即: 在胞质中通过信号传导途径, 在核内与TATA结合蛋白等相互作用而影响基因的表达。经清肝利湿汤治疗后表达下调, 这说明清肝利湿汤可能有抑制X蛋白反式激活作用, 达到下调HBV的复制作用。

总之, 我们通过比较蛋白质组学分析, 可以推测上述蛋白质可能参与了肝胆湿热证的形成发展; 清热利湿汤治疗肝胆湿热证的疗效机制可能包括对细胞凋亡信号分子、凝血相关蛋白、细胞免疫及能量代谢相关酶的影响等; 这些蛋白质可能是清热利湿汤治疗肝胆湿热证的作用靶点, 而这些蛋白质的具体作用机制还需进一步证实。

致谢: 感谢中南大学湘雅医院卫生部肿瘤蛋白质组学重点实验室对本文实验提供的支持和帮助。

4 参考文献

- 1 斯崇文. 慢性乙型肝炎的现状和问题. 临床药物治疗杂志 2006; 4: 1-2
- 2 戴幸平, 戴姣, 傅蕾, 李家邦. 清肝利湿汤治疗肝胆湿热型慢性乙肝的疗效观察. 实用预防医学 2007; 14: 1661-1662
- 3 Tyers M, Mann M. From genomics to proteomics. *Nature* 2003; 422: 193-197
- 4 Hanash S. Disease proteomics. *Nature* 2003; 422: 226-232
- 5 Li C, Zhan X, Li M, Wu X, Li F, Li J, Xiao Z, Chen Z, Feng X, Chen P, Xie J, Liang S. Proteomic comparison of two-dimensional gel electrophoresis profiles from human lung squamous carcinoma and normal bronchial epithelial tissues. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 2003; 1: 58-67
- 6 中华医学会感染病学与寄生虫学分会和肝病学会. 病毒性肝炎防治方案. 中华传染病学杂志 2001; 19: 56-62
- 7 郑晓冀. 中药新药临床研究指导原则. 第1版. 北京: 中国医药科技出版社, 2002: 147
- 8 李茂玉, 肖志强, 李萃, 吴晓英, 冯雪萍, 易红, 李建玲, 陈主初, 陈平, 梁宋平. 小细胞肺癌细胞系NCI-H446蛋白质表达谱的建立. 癌症 2004; 23: 1116-1121
- 9 张宜俊, 章谷生. 乙型肝炎生物治疗. 上海: 上海科学技术出版社, 2001: 65
- 10 邓平, 赵水平, 黄红光, 吴洁, 李江, 周宏年. 环氧化酶2在急性冠脉综合征患者外周血单核细胞中的表达及意义. 中南大学学报(医学版) 2005; 30: 403-406
- 11 Peng BG, Liang LJ, He Q, Huang JF, Lu MD. Expansion and activation of natural killer cells from PBMC for immunotherapy of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2119-2123
- 12 李宁, 范学工, 黄燕, 刘征波, 全俊, 汤参娥, 朱才. CpG-ODN对慢性乙型肝炎患者外周血单个核细胞T-bet表达的影响. 免疫学杂志 2005; 21: 216-218
- 13 Sette AD, Oseroff C, Sidney J, Alexander J, Chesnut RW, Kakimi K, Guidotti LG, Chisari FV. Overcoming T cell tolerance to the hepatitis B virus surface antigen in hepatitis B virus-transgenic mice. *J Immunol* 2001; 166: 1389-1397
- 14 于乐成, 陈成伟, 姚光弼. 慢性乙型肝炎亚太地区专家共识(2006年6月更新). 肝脏 2007; 12: 78-82
- 15 夏苏英, 李家邦. 清肝利湿汤治疗肝胆湿热证的临床研究. 湖南中医学院学报 2000; 20: 56-58
- 16 Peng M, Chen M, Ling N, Xu H, Qing Y, Ren H. Novel vaccines for the treatment of chronic HBV infection based on mycobacterial heat shock protein 70. *Vaccine* 2006; 24: 887-896
- 17 Hoffmeister HM, Heller W, Seipel L. [Blood coagulation and fibrinolysis in arteriosclerosis] *Z Kardiol* 1999; 88: 315-323
- 18 Seeger FH, Blessing E, Gu L, Bornhold R, Denger S, Kreuzer J. Fibrinogen induces chemotactic activity in endothelial cells. *Acta Physiol Scand* 2002; 176: 109-115
- 19 Naito M. [Effects of fibrinogen, fibrin and their degradation products on the behaviour of vascular smooth muscle cells] *Nippon Ronen Igakkai Zasshi* 2000; 37: 458-463
- 20 陆荫英, 李克, 成军, 王琳, 刘妍, 段惠娟, 张玲霞. 乙型肝炎病毒X基因酵母表达载体构建及表达. 世界华人消化杂志 2002; 10: 15-18
- 21 Henkler F, Hoare J, Waseem N, Goldin RD, McGarvey MJ, Koshy R, King IA. Intracellular localization of the hepatitis B virus HBx protein. *J Gen Virol* 2001; 82: 871-882

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

P53和Bcl-2家族蛋白在胰腺癌中的表达

吴幸, 崔海宁, 明松林, 王正文, 欧树安, 陈兴超, 余壮明

■背景资料

Bcl-2家族相关蛋白的抗凋亡和促凋亡成员协同作用, 在胰腺癌的凋亡调控中起着举足轻重的作用; P53是调节Bcl-2家族的主要蛋白, 但p53和bcl-2家族基因的关系目前还不清楚。

吴幸, 崔海宁, 明松林, 王正文, 欧树安, 陈兴超, 余壮明, 海南医学院附属医院普外科 海南省海口市 570102

吴幸, 副教授, 医学硕士, 主要从事外科生物材料研究。

作者贡献分布: 此课题由吴幸、崔海宁及明松林设计; 研究过程由吴幸与崔海宁操作完成; 数据分析由吴幸完成; 本论文写作由吴幸、崔海宁、明松林、王正文、欧树安、陈兴超及余壮明完成。

通讯作者: 吴幸, 570102, 海南省海口市龙华路, 海南医学院附属医院普外科. wohsien@yahoo.com.cn

收稿日期: 2008-11-12 修回日期: 2008-12-17

接受日期: 2008-12-22 在线出版日期: 2009-02-08

Expression of apoptosis-related Bcl-2-family and P53 in human adenocarcinoma of the pancreas

Xing Wu, Hai-Ning Cui, Song-Lin Ming, Zheng-Wen Wang, Shu-An Ou, Xing-Chao Chen, Zhuang-Ming Yu

Xing Wu, Hai-Ning Cui, Song-Lin Ming, Zheng-Wen Wang, Shu-An Ou, Xing-Chao Chen, Zhuang-Ming Yu, Department of General Surgery, Affiliated Hospital of Hainan Medical College, Haikou 570102, Hainan Province, China
Correspondence to: Xing Wu, Department of General Surgery, Affiliated Hospital of Hainan Medical College, Haikou 570102, Hainan Province, China. wohsien@yahoo.com.cn

Received: 2008-11-12 Revised: 2008-12-17

Accepted: 2008-12-22 Published online: 2009-02-08

Abstract

AIM: To investigate the relationships between P53 and Bcl-2 family (Bcl-2, Bax, Bcl-xL, Bcl-xS) expression and apoptosis in human pancreatic carcinoma (PC).

METHODS: The immunohistochemical method was used to detect the expression of P53 protein in a total of 35 patients with PC. The patients were divided into two groups, group 1 with immunonegative P53 (18 cases) and group 2 with immunopositive (17 cases). The expressions of P53, Bcl-2, Bax, Bcl-xL, and Bcl-xS in both groups were detected by Western blot. The apoptosis index (AI) of group 1 was determined by terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated UTP end-labeling (TUNEL).

RESULTS: Bcl-2 was remarkably up-regulated

in group 2 but down-regulated in group 1 ($P = 0.047$). Expressions of both Bax and Bcl-xL proteins were up-regulated in those two groups ($P = 0.274, 0.334$). Bcl-xS was remarkably down-regulated in group 2 but up-regulated in group 1 ($P = 0.01$). The AI of both groups were 12.1 ± 2.47 and 9.1 ± 1.48 , respectively ($P = 0.023$), no correlations were found between AI and expression of Bcl-2 family members, but marked correlations were noted between AI and the Bcl-2/Bax ratios ($P < 0.01$).

CONCLUSION: Bcl-2 family is a group of anti-apoptotic proteins, and Bcl-xS is a pro-apoptotic protein. Both of them are dependent on the regulation of P53 which modulates apoptosis mainly through modifying Bcl-2/Bax ratios.

Key Words: Pancreatic carcinoma; P53; Bcl-2; Bax; Bcl-xL; Bcl-xS; Western blot; Terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated UTP end-labeling

Wu X, Cui HN, Ming SL, Wang ZW, Ou SA, Chen XC, Yu ZM. Expression of apoptosis-related Bcl-2-family and P53 in human adenocarcinoma of the pancreas. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(4): 368-372

摘要

目的: 探讨胰腺癌组织(pancreatic carcinoma, PC)中P53和Bcl-2家族(Bcl-2, Bax, Bcl-xL, Bcl-xS)蛋白表达及与细胞凋亡的关系。

方法: 免疫组化法检测35例PC中P53蛋白表达, 将PC分为P53阴性表达组(第1组, $n = 18$)和P53阳性表达组(第2组, $n = 17$); Western blot检测两组PC中P53, Bcl-2, Bax, Bcl-xL和Bcl-xS蛋白表达, TUNEL法检测第1组中凋亡指数(AI)。

结果: Bcl-2蛋白在P53阳性PC表达上调, 而在P53阴性PC表达下调($P = 0.047$); Bax和Bcl-xL蛋白在两组PC中表达都明显上调($P = 0.274, 0.334$); Bcl-xS在P53阳性表达PC明显下调, 在P53阴性表达组明显上调($P = 0.01$); 在P53阴性和阳性表达PC, AI分别为 12.1 ± 2.47 和 9.1 ± 1.48 ($P = 0.023$); Bcl-2家族各成员表达与AI无

■同行评议者

李国威, 教授, 西安交通大学医学院第二附属医院普通外科

相关性, 而Bcl-2/Bax比率与AI有明显的相关性($P<0.01$).

结论: Bcl-2是依赖P53调节的抗凋亡蛋白, Bcl-xS是依赖P53调节的促凋亡蛋白, 而P53主要通过调节Bcl-2/Bax比率发挥凋亡调节作用.

关键词: 胰腺肿瘤; P53; Bcl-2; Bax; Bcl-xL; Bcl-xS; 蛋白免疫印迹法; 原位缺口末端标记法

吴幸, 崔海宁, 明松林, 王正文, 欧树安, 陈兴超, 余壮明. P53和Bcl-2家族蛋白在胰腺癌中的表达. 世界华人消化杂志 2009; 17(4): 368-372
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/368.asp>

0 引言

胰腺癌是预后最差的消化系统恶性肿瘤, 5年生存率不足1%-5%^[1]. 凋亡受阻是胰腺肿瘤(pancreatic carcinoma, PC)发生发展的重要因素, 而组成Bcl-2家族相关蛋白在PC的凋亡调节过程中占主要地位^[2-4]. Bcl-2家族包括凋亡抑制因子(Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Bfl-1, Bcl-11, Bcl-1, A1)和凋亡促进因子(Bax, Bak, Bcl-xS, Bad, Bid, Bik, Hrk), 两者的比率决定细胞是否能接受凋亡信号^[5]. 在一定程度上, 细胞凋亡或是凋亡抑制是通过两方面基因的调节实现的^[6-7]. P53是调节Bcl-2家族的主要蛋白, 而且P53对Bcl-2家族不同蛋白有着不同的调节方式, 由此影响着胰腺癌的生物学行为^[6,8-9]. 如, 野生型p53能激活Bcl-2家族的bax促凋亡基因, 抑制bcl-2抑凋亡基因. 但是, p53和bcl-2家族基因的关系目前还不清楚. 本试验旨在系统定量的研究Bcl-2家族成员蛋白表达与P53的关系.

1 材料和方法

1.1 材料 收集1998-05/2007-05海南医学院普外手术切除的PC组织35例(临床资料完整), 切除组织分为两部分: 一部分进行常规病理和免疫组织化学检测, 另一部分立即放入-70℃液氮中保存备用. 所有患者均为第1次手术, 术前未经任何放、化疗.

1.2 方法

1.2.1 P53免疫组化检测: 4 μm石蜡切片贴在涂有切片黏合剂的载玻片上, 58℃烤24 h, 常规脱蜡至水, 二甲苯 I, II, III, 无水乙醇, 950、850、750 mL/L乙醇, 各2 min, 水洗2 min; 30 g/L H₂O₂作用20 min以消除内源性过氧化物酶的活性. 蒸馏水洗涤, 将切片置于10 mmol/L pH6.0柠檬酸

缓冲液中, 120℃微波抗原修复10 min, 室温自然冷却20 min, BPS洗涤3次, 加入阻断血清在正常血清室温下封闭30 min(阻断非特异性结合位点), 擦干组织周围多余水分, 加适当稀释一抗P53(1:100即用型), 4℃过夜; 加入2抗, 室温30 min, PBS洗3 min×3, DBA染色8 min, 自来水洗3 min, 复染(苏木素衬染30 s, 水洗, 盐酸乙醇蓝化2S, 水洗, 微波蓝化), 常规树脂封片; 用已知阳性标本作阳性对照, 用PBS代替一抗, 结果应为阴性, 阳性为细胞核染色棕黄色或棕褐色, 并呈颗粒状, 背景呈紫蓝色. 阳性反应的强度分为阴性($\leq 20\%$), 阳性($>20\%$)^[10].

1.2.2 Western blot检测P53, Bcl-2, Bax, Bcl-xL和Bcl-xS蛋白表达: 将组织切块切成小片, 加入冰冷的裂解液200 μL, 细胞裂解30 min后, 14 000 r/min 4℃离心20 min, BCA进行蛋白定量. 每孔加入30 μg蛋白, 120 g/L SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 电转至硝酸纤维素膜, 4℃下脱脂奶封闭后过夜. 将膜在4℃ TBST中晃洗中振洗5 min, 2次, 分别加入不同的一抗和G3PDH, 密封, 温室2 h, 4℃ 3 h, 温室2 h. 含3 mL/L Tween-20的BPS洗涤3次, 加入二抗, 密封, 室温1.5 h, 用PBST液将PVDF膜洗3次, 每次5 min. 在暗室内压胶片曝光, 观察结果并照相. 用Bio-Rad/GS 700凝胶图像处理系统进行分析. 肿瘤组织不同蛋白表达水平用目的条带灰度与内参G3PDH条带的灰度比值定量表示.

1.2.3 细胞凋亡检测: 切片脱蜡脱水后加入20 mg/L蛋白激酶K室温孵育15 min, 37℃消化5 min, PBS洗涤1次. 双蒸水洗涤3次, 每次5 min. 加30 g/L H₂O₂ 50 μL/片, 室温下浸泡5 min. 双蒸水洗片3次, 每次5 min. 加上Permeabilisation 50 μL/片, 室温3 min. 双蒸水洗片3次, 每次5 min. 切片加入TdT(0.6 μL)和dUTP(1.4 μL), 37℃湿盒中标记60 min. PBS洗片3次, 每次3 min. 加Blocking Reagent 50 μL/片, 37℃, 30 min, 甩片. 加Avidin-HRP工作液50 μL/片, 37℃湿盒中标记60 min. PBS洗片3次, 每次3 min. DAB(现配)显色液50 μL/片, 显微镜下控制显色. PBS洗片终止显色. 苏木素复染, 常规封片. 显微镜下计数500个细胞, 以细胞内出现棕色颗粒着为凋亡阳性细胞, 计算凋亡指数(AI). AI = 凋亡细胞/总数细胞×100%^[10].

统计学处理 统计学数据采用mean±SD表示, 资料采用 χ^2 检验和t检验和Pearson相关性, $P<0.05$ 有统计学意义.

■ 研发前沿

凋亡受阻是胰腺癌发病的重要因素, 而P53及Bcl-2家族蛋白在胰腺癌凋亡过程中的相关性有待深入研究.

■相关报道

大多数作者研究了Bcl-2家族某些蛋白与胰腺癌之间的关系,但系统定量的研究Bcl-2家族成员蛋白表达与P53的关系少见。

表 1 胰腺癌组织中Bcl-2, Bax, Bcl-xL, Bcl-xS蛋白表达与P53的关系

分组	Ratio \geq 1	Ratio<1	P
Bcl-2			
第1组	5	12	0.047
第2组	15	3	
Bax			
第1组	15	3	0.274
第2组	15	2	
Bcl-2/Bax			
第1组	4	14	0.012
第2组	14	3	
Bcl-xL			
第1组	15	3	0.334
第2组	14	3	
Bcl-xS			
第1组	13	5	0.021
第2组	3	14	
Bcl-xL/Bcl-xS			
第1组	14	4	0.215
第2组	12	5	

表 2 Bcl-2, Bax, Bcl-xL, Bcl-xS蛋白表达与AI的关系

分组	n	AI	P
Bcl-2/G3PDH			
Ratio \geq 1	20	10.36 \pm 2.26	0.056
Ratio<1	15	11.54 \pm 2.54	
Bax/G3PDH			
Ratio \geq 1	30	11.39 \pm 3.82	0.364
Ratio<1	5	10.45 \pm 2.06	
Bcl-xL/G3PDH			
Ratio \geq 1	29	11.18 \pm 3.21	0.173
Ratio<1	6	10.45 \pm 1.36	
Bcl-xS/G3PDH			
Ratio \geq 1	16	12.83 \pm 2.66	0.069
Ratio<1	19	10.00 \pm 2.43	
Bcl-2/Bax			
Ratio \geq 1	18	9.19 \pm 1.87	0.012
Ratio<1	17	13.02 \pm 3.45	
Bcl-xL/Bcl-xS			
Ratio \geq 1	26	11.72 \pm 2.58	0.082
Ratio<1	9	12.51 \pm 3.19	

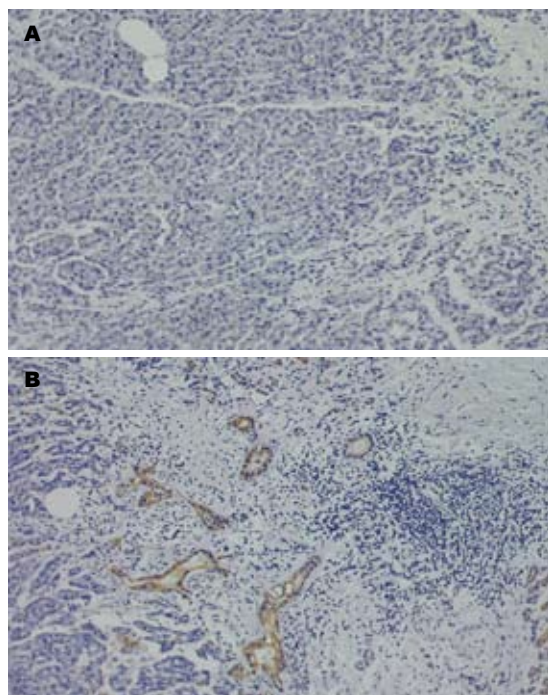


图 1 免疫组织化学法检测P53在胰腺癌组织中的表达。A: P53染色阴性($\times 100$); B: P53染色阳性($\times 200$)。

2 结果

2.1 蛋白表达 35例PC患者中, P53阴性表达18例(第1组), 阳性表达17例(第2组)(图1)。Bcl-2蛋白在第2组中表达上调, 而在第1组中表达下调($P = 0.047$), Bax蛋白在两组中表达都明显上调($P = 0.274$); Bcl-2/Bax比率在第2组(14/17)明显高

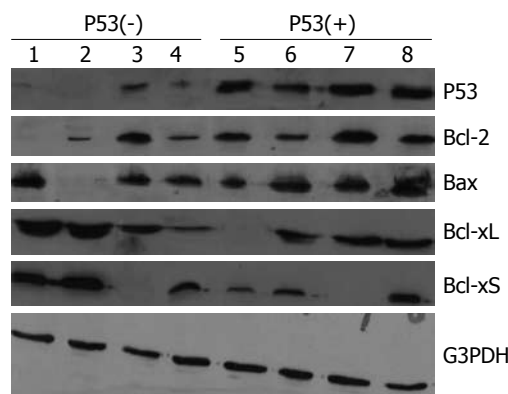


图 2 Western blot检测P53, Bcl-2, Bax, Bcl-xL和Bcl-xS蛋白表达。

于第1组(4/18)($P = 0.018$)。Bcl-xL蛋白在两组中表达也明显上调(分别15/17和14/18)($P > 0.05$), 而Bcl-xS在第1组表达上调(13/18), 在第2组表达下调(3/17)($P < 0.05$)。Bcl-xL/Bcl-xS在两组都表达上调($P > 0.05$)(图2, 表1)。

2.2 细胞凋亡 在P53阴性和阳性表达组的PC中, AI分别为12.1 \pm 2.47和9.1 \pm 1.48, 差异有显著性($P = 0.023$); 在Bcl-2, Bax, Bcl-xL和Bcl-xS高表达组(≥ 1), AI分别为10.36 \pm 2.26, 11.39 \pm 3.82, 11.18 \pm 3.21, 12.83 \pm 2.66, 在Bcl-2, Bax, Bcl-xL和Bcl-xS低表达组(< 1), AI分别为11.54 \pm 2.54, 10.45 \pm 2.06, 10.45 \pm 1.36, 10.00 \pm 2.43, 差异分别无统计学意义($P > 0.05$); 而在Bcl-2/Bax比率 ≥ 1 组, AI为9.19 \pm 1.87, Bcl-2/Bax比率 < 1 组, AI为

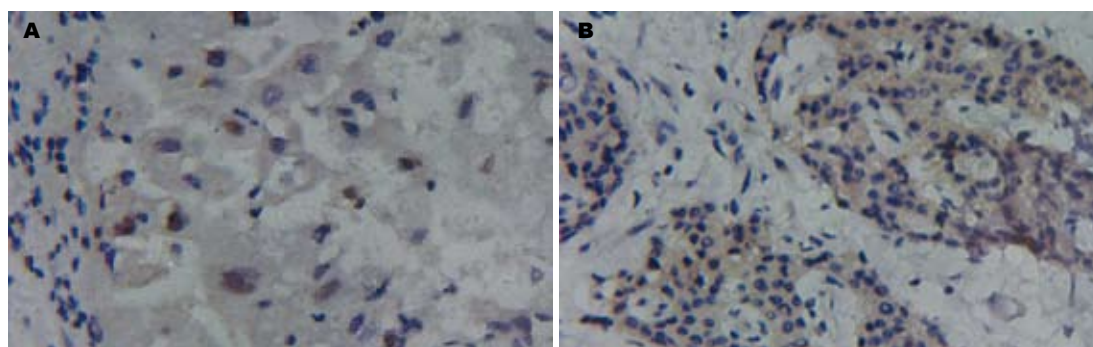


图3 胰腺癌组织中的细胞凋亡(TUNEL). A: P53表达阴性组($\times 400$); B: P53表达阳性组($\times 200$).

13.02 \pm 3.45, 差异有统计学意义($P = 0.012$); Bcl-xL/Bcl-xS比率与AI无相关性($P > 0.05$, 图3, 表2).

3 讨论

野生型p53(Wt-p53)是转录调节因子, 其在细胞DNA合成、DNA修复和凋亡调节过程中起重要作用^[11]. 由于Wt-P53蛋白的半衰期短并且含量低微, 因此, 通过免疫染色方法难以检测得到^[7]. 当p53突变后, 突变p53可与细胞中的某些蛋白结合而积聚在细胞中, 在这种情况下可通过免疫组化方法检测到高水平的突变p53表达^[7].

细胞凋亡是由基因调控的主动而有序的自我消亡过程, 大多数情况下, 细胞生死是通过p53依赖或非依赖两条途径进行调节的, 而高效的细胞凋亡必须通过p53途径^[12-13]. 在本实验中, PC组织中P53阳性表达率为48.6%, AI在P53阴性组明显高于P53阳性组, 说明PC中细胞凋亡是P53依赖性, 这与文献的研究结果相一致^[14-16].

P53的凋亡调节作用是通过上调Bax和下调Bcl-2或Bcl-xL等实现的, 通过他们的相互作用调节着细胞线粒体的通透性, 从而影响着下游的促凋亡基因的功能^[6-7, 17-20].

我们的研究表明, Bcl-2在P53阳性表达的PC中过度表达, 而在P53阴性表达的PC中明显低表达, 说明Bcl-2是P53依赖性调节, 即P53高表达者对Bcl-2的抑制作用减弱或消失, 而P53丧失者对Bcl-2的抑制作用加强. Bax在P53阴性和阳性组都表达上调, 但差别无统计学意义, 说明Bax是不依赖P53进行调节的. Bcl-xL在P53阳性和阴性表达的肿瘤组织中也都存在明显上调($P > 0.05$), 而Bcl-xS在P53阳性表达的肿瘤组织中下调, 在P53阴性表达肿瘤组织中明显上调($P < 0.05$), 提示Bcl-xS是P53依赖性调节. 研究Bcl-xL/Bcl-xS和Bcl-2/Bax比率发现, 后者在P53阳性和阴性表达组的差异有显著性($P < 0.05$), 说

明Bcl-2/Bax比率是依赖P53进行调节的. 但凋亡检测表明: Bax和Bcl-xL表达与AI无相关性, 尽管Bcl-2低表达组和Bcl-xS高表达组的AI高于Bcl-2高表达组和Bcl-xS低表达组, 差异无显著性. Bcl-xL/Bcl-xS比率在不同AI之间的差异也无统计学意义, 但AI在Bcl-2/Bax高比率组明显低于低比率组($P < 0.01$), 所以Bcl-2/Bax两蛋白之间的比例是决定对细胞凋亡抑制作用强弱的关键因素^[21-27]. 因此, 细胞凋亡不是由单一的凋亡相关蛋白决定的, 而是由许多蛋白共同作用的结果^[28-29].

总之, Bcl-2和Bcl-xS是受P53依赖性调节的抑凋亡蛋白和促凋亡蛋白, P53主要通过调节Bcl-2/Bax比率发挥凋亡调节作用的.

4 参考文献

- 1 Parker SL, Tong T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics, 1997. *CA Cancer J Clin* 1997; 47: 5-27
- 2 Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000; 407: 770-776
- 3 Lutz RJ. Role of the BH3 (Bcl-2 homology 3) domain in the regulation of apoptosis and Bcl-2-related proteins. *Biochem Soc Trans* 2000; 28: 51-56
- 4 Yip KW, Reed JC. Bcl-2 family proteins and cancer. *Oncogene* 2008; 27: 6398-6406
- 5 Krajewski S, Krajewska M, Shabaik A, Miyashita T, Wang HG, Reed JC. Immunohistochemical determination of in vivo distribution of Bax, a dominant inhibitor of Bcl-2. *Am J Pathol* 1994; 145: 1323-1336
- 6 Miyashita T, Krajewski S, Krajewska M, Wang HG, Lin HK, Liebermann DA, Hoffman B, Reed JC. Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene* 1994; 9: 1799-1805
- 7 Selvakumaran M, Lin HK, Miyashita T, Wang HG, Krajewski S, Reed JC, Hoffman B, Liebermann D. Immediate early up-regulation of bax expression by p53 but not TGF beta 1: a paradigm for distinct apoptotic pathways. *Oncogene* 1994; 9: 1791-1798
- 8 Ogura E, Senzaki H, Yamamoto D, Yoshida R, Takada H, Hioki K, Tsubura A. Prognostic significance of Bcl-2, Bcl-xL/S, Bax and Bak expressions in colorectal carcinomas. *Oncol Rep*

■应用要点

本文探讨了P53和Bcl-2家族成员蛋白之间表达的关系以及与细胞凋亡的关系, 为以凋亡为靶点的基因治疗提供理论依据.

■同行评价

本研究目的明确,设计技术路线合理,新颖性较好,研究结构有一定理论参考价值。

- 1999; 6: 365-369
- 9 袁荣文, 丁庆, 姜汉英, 覃修福, 邹声泉, 夏穗生. 胰腺癌Bcl-2, P53蛋白表达和细胞凋亡. 世界华人消化杂志 1999; 7: 851-854
- 10 张克君, 李德春, 朱东明. PUMA蛋白在胰腺癌中的表达及临床意义. 世界华人消化杂志 2008; 16: 488-492
- 11 张艳, 何凤田. p53基因在肿瘤基因治疗中的研究进展. 世界华人消化杂志 2007; 11: 1593-1996
- 12 Clarke AR, Purdie CA, Harrison DJ, Morris RG, Bird CC, Hooper ML, Wyllie AH. Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways. *Nature* 1993; 362: 849-852
- 13 Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 1993; 74: 609-619
- 14 Sato Y, Nio Y, Song MM, Sumi S, Hirahara N, Minari Y, Tamura K. p53 protein expression as prognostic factor in human pancreatic cancer. *Anticancer Res* 1997; 17: 2779-2788
- 15 Dergham ST, Dugan MC, Joshi US, Chen YC, Du W, Smith DW, Arlauskas P, Crissman JD, Vaitkevicius VK, Sarkar FH. The clinical significance of p21(WAF1/CIP-1) and p53 expression in pancreatic adenocarcinoma. *Cancer* 1997; 80: 372-381
- 16 Mäkinen K, Loimas S, Hakala T, Eskelinen M. Tumour suppressor protein (p53), apoptosis inhibiting protein (Bcl-2) and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expressions in a rat pancreatic tumour model. *Anticancer Res* 2007; 27: 23-26
- 17 Lee TL, Yeh J, Friedman J, Yan B, Yang X, Yeh NT, Van Waes C, Chen Z. A signal network involving coactivated NF-kappaB and STAT3 and altered p53 modulates BAX/BCL-XL expression and promotes cell survival of head and neck squamous cell carcinomas. *Int J Cancer* 2008; 122: 1987-1998
- 18 Wincewicz A, Sulkowska M, Koda M, Sulkowski S. Cumulative expression of HIF-1-alpha, Bax, Bcl-xL and P53 in human colorectal cancer. *Pathology* 2007; 39: 334-338
- 19 Baltaziak M, Duraj E, Koda M, Wincewicz A, Musiatowicz M, Kanczuga-Koda L, Szymanska M, Lesniewicz T, Musiatowicz B. Expression of Bcl-xL, Bax, and p53 in primary tumors and lymph node metastases in oral squamous cell carcinoma. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1090: 18-25
- 20 Han HS, Park YM, Hwang TS. Differential expression of Bcl-2, Bcl-XL and p53 in colorectal cancer. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21: 1108-1114
- 21 Shinoura N, Yoshida Y, Asai A, Kirino T, Hamada H. Relative level of expression of Bax and Bcl-XL determines the cellular fate of apoptosis/necrosis induced by the overexpression of Bax. *Oncogene* 1999; 18: 5703-5713
- 22 Shinoura N, Hamada H. Gene therapy using an adenovirus vector for apoptosis-related genes is a highly effective therapeutic modality for killing glioma cells. *Curr Gene Ther* 2003; 3: 147-153
- 23 Rezende AC, Vieira AS, Rogério F, Rezende LF, Boschero AC, Negro A, Langone F. Effects of systemic administration of ciliary neurotrophic factor on Bax and Bcl-2 proteins in the lumbar spinal cord of neonatal rats after sciatic nerve transection. *Braz J Med Biol Res* 2008; 41: 1024-1028
- 24 Gillardon F, Klimaschewski L, Wickert H, Krajewski S, Reed JC, Zimmermann M. Expression pattern of candidate cell death effector proteins Bax, Bcl-2, Bcl-X, and c-Jun in sensory and motor neurons following sciatic nerve transection in the rat. *Brain Res* 1996; 739: 244-250
- 25 Morissette MC, Vachon-Beaudoin G, Parent J, Chakir J, Milot J. Increased p53 level, Bax/Bcl-x(L) ratio, and TRAIL receptor expression in human emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 178: 240-247
- 26 Lee TL, Yeh J, Friedman J, Yan B, Yang X, Yeh NT, Van Waes C, Chen Z. A signal network involving coactivated NF-kappaB and STAT3 and altered p53 modulates BAX/BCL-XL expression and promotes cell survival of head and neck squamous cell carcinomas. *Int J Cancer* 2008; 122: 1987-1998
- 27 Sirzén F, Zhivotovsky B, Nilsson A, Bergh J, Lewensohn R. Higher spontaneous apoptotic index in small cell compared with non-small cell lung carcinoma cell lines; lack of correlation with Bcl-2/Bax. *Lung Cancer* 1998; 22: 1-13
- 28 Tang ZY, Wu YL, Gao SL, Shen HW. Effects of the proteasome inhibitor bortezomib on gene expression profiles of pancreatic cancer cells. *J Surg Res* 2008; 145: 111-123
- 29 Cao D, Ashfaq R, Goggins MG, Hruban RH, Kern SE, Iacobuzio-Donahue CA. Differential Expression of Multiple Genes in Association with MADH4/DPC4/SMAD4 Inactivation in Pancreatic Cancer. *Int J Clin Exp Pathol* 2008; 1: 510-517

编辑 李军亮 电编 何基才

磁共振DWI技术在腹水病因诊断中的价值

靳瑞娟, 马强华, 杨晓萍, 叶建军, 陈纲, 罗樱

靳瑞娟, 马强华, 杨晓萍, 叶建军, 陈纲, 罗樱, 中国人民解放军兰州军区兰州总医院影像诊断中心MR室 甘肃省兰州市 730050

靳瑞娟, 兰州大学第二临床学院 甘肃省兰州市 730000

靳瑞娟, 在读硕士, 主要从事腹部MR诊断。

作者贡献分布: 此课题由马强华设计; 研究过程主要由靳瑞娟操作完成; 杨晓萍与叶建军参与随访资料整理及数据分析; 陈纲与罗樱帮助论文撰写及修改。

通讯作者: 马强华, 730050, 甘肃省兰州市, 中国人民解放军兰州军区兰州总医院影像诊断中心MR室。

ma_qianghua1010@sohu.com

收稿日期: 2008-11-23 修回日期: 2008-12-16

接受日期: 2008-12-22 在线出版日期: 2009-02-08

Value of MRI diffusion-weighted imaging in diagnosis of ascites

Rui-Juan Jin, Qiang-Hua Ma, Xiao-Ping Yang, Jian-Jun Ye, Gang Chen, Ying Luo

Rui-Juan Jin, Qiang-Hua Ma, Xiao-Ping Yang, Jian-Jun Ye, Gang Chen, Ying Luo, Department of Imaging Diagnostic Center, Lanzhou General Hospital, Chinese PLA Lanzhou Command, Lanzhou 730050, Gansu Province, China
Rui-Juan Jin, the Second Medical College of Lanzhou University, Lanzhou 730050, Gansu Province, China

Correspondence to: Qiang-Hua Ma, Department of Imaging Diagnostic Center, Lanzhou General Hospital, Chinese PLA Lanzhou Command, Lanzhou 730050, Gansu Province, China. ma_qianghua1010@sohu.com

Received: 2008-11-23 Revised: 2008-12-16

Accepted: 2008-12-22 Published online: 2009-02-08

Abstract

AIM: To evaluate the value of diffusion-weighted imaging (DWI) in ascites diagnosis.

METHODS: Data including MR presentations, tumor indicators of 188 patients with ascites were analyzed for any difference in sensitivity and specificity between DWI and tumor indicators. Accuracy of tumor lesions staging determined either by WB-DWI (whole body-diffusion-weighted imaging) or by non- WB-DWI were also compared for difference, if any. DWI features were summarized.

RESULTS: The specificity of DWI was significantly higher than that of tumor indicators (92.0% vs 33.3%, $P < 0.05$). The accuracy of WB-DWI group was significantly higher than that of

non- WB-DWI group ($\chi^2 = 5.29$, $P = 0.021$). The conventional MRI and DWI, cystis contents and seroperitoneum (hematocele, empyema) were varied. DWI was of excellent differential diagnostic capacity.

CONCLUSION: DWI can discriminate the tumor from non-tumorous lesions, predict malignant ascites, judge the nature of the seroperitoneum and cystis contents in lesions exactly. It can be widely used for patients with ascites.

Key Words: Diffusion-weighted imaging; Ascites; Diagnosis

Jin RJ, Ma QH, Yang XP, Ye JJ, Chen G, Luo Y. Value of MRI diffusion-weighted imaging in diagnosis of ascites. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(4): 373-377

摘要

目的: 探讨磁共振扩散加权成像(DWI)成像在腹水病因诊断中的价值。

方法: 分析188例腹水患者MR表现、肿瘤指标及随访结果, 比较磁共振DWI技术与肿瘤指标法诊断的敏感性、特异性有无差别; 比较WB-DWI(Whole body-diffusion-weighted imaging)方法与非应用组术前分期准确性有无差别; 总结不同液体影像特征。

结果: 磁共振DWI技术较肿瘤指标法特异性高(92.0% vs 33.3%, $P < 0.05$); WB-DWI比非应用组术前分期准确性高, 两组具有统计学意义($\chi^2 = 5.29$, $P = 0.021$)。64例病灶囊内容物及腹腔积液(积血、积脓)的常规及DWI特征, 表现各有不同, DWI具有准确的鉴别诊断能力。

结论: DWI可以鉴别肿瘤与非肿瘤性病变, 预测恶性腹水, 而且可以准确判断腹腔积液和病变液性成分性质, 在腹水病因诊断中值得推广应用。

关键词: 扩散加权成像; 腹水; 诊断

靳瑞娟, 马强华, 杨晓萍, 叶建军, 陈纲, 罗樱. 磁共振DWI技术

■背景资料

腹水成因复杂, 临床需要综合问诊、体检诊断、实验室检查、影像及腔镜等多项结果综合分析, 造成参考价值不直观、诊疗成本增加、创伤甚至延误病情等弊端。MR-DWI在肿瘤病变的诊断中已得到广泛认可, 本研究将探讨这一技术在腹水病因诊断中的具体优势。

■同行评议者

韩新巍, 教授, 河南省郑州大学第一附属医院放射科

■ 研发前沿

分子影像是目前研究热点,这一功能成像技术在临床中的应用尚处于探索中,WB-DWI成像范围广,对肿瘤诊断敏感、准确,将会是日后肿瘤早期诊断、监测治疗不错的技术。

在腹水病因诊断中的价值. 世界华人消化杂志 2009; 17(4): 373-377

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/373.asp>

0 引言

由各种原因引起的腹腔内游离液体过量积聚称为腹水. 各种疾病一旦并发腹水,常提示疾病的严重性. 导致腹水的病因甚为复杂,临床最常见的3类疾病是: 门脉高压性腹水、恶性肿瘤腹膜转移、结核性腹膜炎^[1]. 恶性肿瘤侵袭或转移所致的腹水又称恶性腹水. MRI在诸多影像手段中,以其多方位、多参数成像、高性能的软组织分辨率在腹水病因诊断中较有优势. 扩散加权成像(diffusion-weighted imaging, DWI)技术为近年来出现的新技术,作为功能影像学诊断方法,将影像表现与组织病理成分、状态结合起来分析,相比以往的形态学诊断可获取更大的信息量,在肿瘤病变的诊断中已得到广泛应用^[2]. 本文旨在探讨这一技术在腹水病因诊断中的具体优势.

1 材料和方法

1.1 材料 回顾分析2006-06/2008-06我院腹水患者188例 MRI影像资料及随访结果. 均经超声确定腹腔积液进一步行MRI检查. 纳入标准所有患者均有肿瘤指标检测结果,一项超过正常值范围视为阳性组.

1.2 方法 采用Siemens AVANTO 1.5T磁共振扫描仪. 所有患者均先行腹部大范围T₂WI冠位平扫,发现病变直接或间接征象后确定重点扫描区域. 常规SET₁WI、SET₂WI、fs-T₂WI序列扫描,受检者取仰卧位,行轴位及冠状位、矢状位扫描. SET₁WI序列: TR 400 ms, TE 13 ms, 矩阵256×256, 层厚4.0 mm, 层间距1.0 mm. T₂WI冠状位扫描, TR 3000-5000 ms, TE 96-126 ms, 矩阵160×160, FOV 360-450 mm, 层厚3 mm, 无间隔扫描. DWI应用导航回波EPI-DWI技术,自由呼吸对病变区域进行扫描,轴位,必要时加冠状位及矢状位,取扩散敏感系数b值为50、400、800 s/mm²,其中50、400 s/mm²一次扫描完成,并自动生成ADC图. TR 3900 ms, TE 76 ms, 层厚4 mm, 层间隔0.4 mm, FOV 40 cm×40 cm, 矩阵128×128, 扫描时间分别为2.09 min、1.10 min. 共有54例临床高度怀疑肿瘤病变者行WB-DWI扫描,均经手术病理证实.

统计学处理 全部数据经SSPS10.0统计学软

表 1 MRI-DWI及肿瘤指标结果与随访结果比较 (n = 188)

	病理及随访结果		
	肿瘤	非肿瘤	合计
MR结果	108	80	188
肿瘤病变	102	6	108
非肿瘤病变	11	69	80
肿瘤指标	160	28	188
阳性	110	50	160
阴性	3	25	28

$$\chi^2 = 17.46, P = 0.00 < 0.005.$$

件处理. MR结果与病理及随访结果生成四格表,行 χ^2 检验, $P < 0.05$ 认为有统计学意义.

2 结果

2.1 MRI-DWI及MRI诊断 提示腹水伴随肿瘤性病变者108例: 30例肝硬化合并肝癌或胆管细胞癌; 23例为卵巢恶性肿瘤(原发和转移); 18例为胰腺癌或壶腹周围癌; 13例为胆管癌; 10例行全身扫描发现淋巴结、骨转移及其他脏器转移(图1A-B); 6例为胃、肠道肿瘤,其中1例为阑尾黏液癌破裂形成腹膜假黏液瘤(图1C); 腹膜转移瘤7例(图1G). MRI诊断为非肿瘤性病变者80例: 肝硬化(代偿期或失代偿期)53例; 以急腹症行MR检查, 8例为急性重症胰腺炎, 2例为卵巢黄体囊肿破裂(图1D-F), 2例为脾破裂, 1例为腹水合并盆腔脓肿(图1H-I). 其余14例MR检查为阴性结果. 随访结果: MRI-DWI组误诊6例,漏诊11例; 肿瘤指标法阳性者160例,误诊50例,漏诊3例.

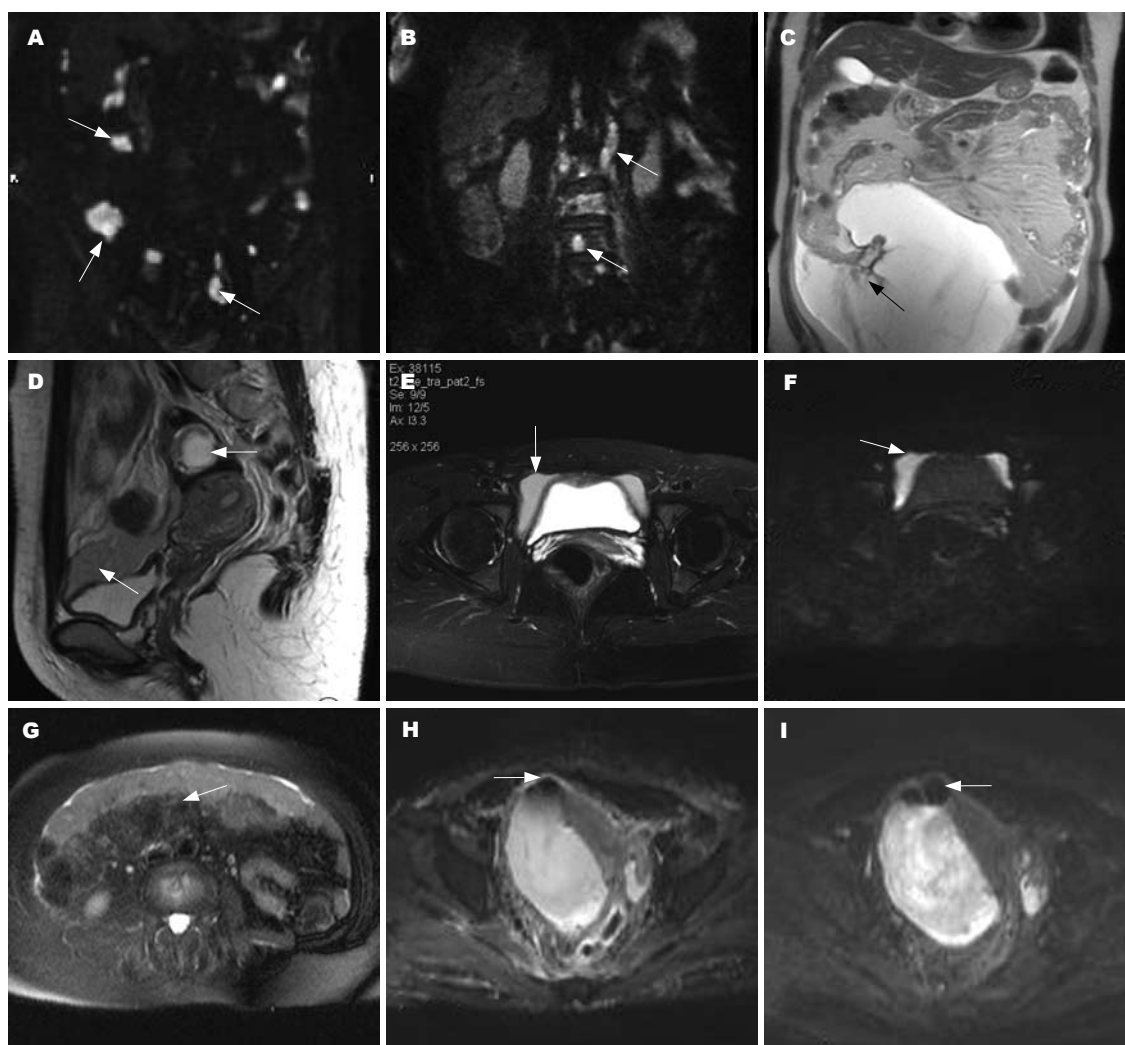
2.2 MRI-DWI方法与肿瘤指标法对比 MRI-DWI技术与肿瘤指标法的差别具有统计学意义($\chi^2 = 17.46, P < 0.05$, 表1). MRI-DWI技术与肿瘤指标法的敏感性接近(90.3% vs 97.4%), 特异性明显高于肿瘤指标法(92.0% vs 33.3%, 表2).

2.3 应用WB-DWI与非应用组临床分期准确性比较 应用WB-DWI临床分期准确性高于非应用组,两组具有统计学意义($\chi^2 = 5.29, P = 0.021 < 0.05$, 表3).

2.4 MRI-DWI方法用于腹腔积液及病灶内液性成分的鉴别 总结64例具有液性成分的病灶及腹腔积液(积血、积液)的常规及DWI特征,表现各有不同, DWI具有准确的鉴别诊断能力(表4).

3 讨论

DWI能反应组织中水分子无序扩散运动快慢的信息,水分子所在的组织不同,即所处的微环境



■ 相关报道

谭海波 *et al* 提出 (18)F-FDG PET/CT 对不明原因腹水的诊断符合率是45.5%。临床尚有采用蛋白芯片、DNA 倍体分析等方法用于良、恶性腹水的鉴别。

图 1 MRI-DWI及MRI诊断结果. A-B: 箭头所指WB-DWI大范围显示腹膜、骨、淋巴结多个转移灶与正常组织对比明显; C: 误诊为腹水患者, MR显示腹腔巨大囊性占位, 无包膜, 推移周边器官, 箭头所指为阑尾肿块, 术后证实阑尾黏液癌并腹膜假黏瘤; D: 临床怀疑脏器破裂患者, 子宫上方箭头所指卵巢黄体, 周边血肿包裹, 膀胱前方箭头所指病灶为腹腔积血; E: 同一患者压脂图, 白箭头所指膀胱前方积血信号低于尿液; F: 同一患者DWI, b值 = 800 s/mm²弥散图, 短箭头所指积血信号明显高于尿液; G: 腹膜转移形成网膜饼; H: 腹腔脓肿b = 50 s/mm²弥散图, 箭头所指病灶前方气-液平; I: 同一患者弥散图, b值 = 800 s/mm², 脓液呈明显高信号。

表 2 MRI-DWI结果与肿瘤指标法比较

两种方法	敏感性(%)	特异性(%)
肿瘤指标	97.4	33.3
DWI	90.3	92.0

不同其扩散能力也不同; 扩散能力间接与扩散障碍的数量成比例, 如细胞膜、紧密连接、纤维、大分子和细胞器等。在快速增长高能量循环的组织, 如恶性肿瘤组织一般表现为核大, 核浆比高, 细胞排列密集^[3], 肿瘤细胞之间接触抑制功能丧失, 单位面积内细胞数目异常增加, 扩散屏障的数量增加导致扩散受限, 两者呈正相关。另一方面, 细胞外间隙少, 水分子运动受限, 故在DWI图像上表现为高信号。DWI就是基于这种扩

表 3 应用WB-DWI对肿瘤术前分期的影响

WB-DWI	术前分期结果			
	符合	不符合	合计	符合(%)
应用	53	1	54	98.0
非应用	94	14	108	87.0
合计	147	15	162	90.7

$$\chi^2 = 5.29, P = 0.021 < 0.05.$$

散能力差异转化图像的灰度信号或其他参数值, 组织的扩散能力用ADC值来表示, 与DWI信号呈负相关, 即越是弥散受限的组织ADC值越低。

腹水常规检查、血清腹水白蛋白梯度(SAAG)、酶学、肿瘤标志物和其他生化检测可为腹水病因诊断提供线索, 其中肿瘤标记物简

■应用要点

肿瘤指标法简便,可用于肿瘤筛查,本研究提出DWI技术特异性明显高于肿瘤指标法,并且DWI技术有助于鉴别诊断,可以指导临床分析腹水与病灶之间的关系,避免误诊。

表 4 不同性质液体的影像特征鉴别表 ($n = 64$)

液体	n	T_1WI	T_2WI	$T_1压脂$	$T_2压脂$	DWI特征	$b = 800 s/mm^2$ 信号均值	ADC值 ($\times 10^{-3} mm^2/s$)
浆液	25	低	高	同 T_1WI	同 T_2WI	与尿液信号衰减改变相似	42.3 ± 4.28	2702.2 ± 117.07
黏液	9	稍高	高	同 T_1WI	同 T_2WI	稍高或高信号	85.8 ± 9.52	929–2641变异较大 ^a
脂液	6	高	稍高	信号减低	信号减低	脱屑组织团块明显高信号或稍高信号	169 ± 13.2	789 ± 57.3
脓液	8	低	高	同 T_1WI	同 T_2WI	明显高信号	157.5 ± 12.43	936 ± 182.23
血液	16	低或高	低或周围见铁环	相对增高	同 T_2WI	亚急性为高信号,陈旧性为高低混杂,铁环沉积部位见磁敏感伪影	132 ± 14.52	521.78 ± 94.52^b

^aADC值由于病灶内蛋白含量的不同测量值出现较大范围波动; ^b陈旧出血病变ADC值变异较大,本组纳入均为亚急性血肿。

便、重复性强成为肿瘤筛查较好的手段,但特异性差,文中对比结果充分说明了这一点。腹腔镜、消化系内镜,血管造影等有创检查方法直视病变、且可取组织行病理学检查,某种程度上较影像学诊断准确,但安全性及患者的耐受状况使其应用受到限制,况且须结合影像等辅助检查针对可疑病灶实施。超声为发现腹水的最简便手段,但对疾病鉴别诊断的准确性较差。CT与MRI相比有辐射损伤、擅长对肺、骨病变的诊断,软组织分辨较差。常规MRI软组织分辨率明显高于其他影像手段,但属于形态诊断,对小病灶、转移灶、淋巴结肿大性质定性非常困难,对液性病灶鉴别诊断能力有限,而DWI技术问世,这一功能影像技术从分子水平分析病变,其准确性目前已得到临床广泛认可。

DWI在腹水诊断中的优势及应用。(1)有助于鉴别良、恶性病变:当腹水患者发现占位病变则需要较准确判断良、恶性。DWI作为功能影像诊断较常规形态学诊断明显突出显示病灶。即肿瘤组织随着 b 值的增加信号衰减程度低于正常组织,因此,在正常组织信号衰减的背景中将肿瘤衬托出来呈现高信号。如肝脏占位病变中,以往MR鉴别诊断最可靠手段为增强扫描,势必增加经济负担、费时、造影剂不良反应难免。应用DWI技术,依据组织含水量的不同其ADC值具有显著差异这一理论进行病变的鉴别诊断。如囊肿内部主要由液体成分构成,含水量最大,和脑脊液一样,水分子扩散运动不受限,故ADC值最大。血管瘤主要由血管成分构成,同时夹杂纤维间隔、瘢痕,含水量相对较多。肝癌和转移瘤富含细胞成分,含水量较少,运动受到限制,因此,ADC值最低。同时由于肝癌富含

供、高灌注,使其ADC值又高于转移瘤^[4-5]。这一技术在其他部位病变诊断中的定性价值已得到临床广泛认可,然而,部分患者并不能检出肿瘤,只表现肿瘤的间接征象。脏器受累常表现为胆系梗阻、胰腺炎、肠梗阻、幽门梗阻、输卵管积液等肿瘤继发病变,为慢性腹水患者急性发病就诊的直接因素,也为临床进一步检查提供重要线索。随着DWI在体部不断的应用,MR以其优越的软组织分辨力清晰显示肿瘤病变的直接及间接征象,使肿瘤病变诊断显得相对容易,从而使癌性腹水的诊断简便、易行,明显优于肿瘤指标法。但是,减少影像学漏诊有赖于对病变的影像学表现的认识。DWI技术毕竟仍然处于探索阶段,需要我们不断随访,总结经验,提高诊断水平。(2)发现常规扫描易漏诊的病变:对于腹水合并肿瘤病变诊断,不仅是发现病变,指导临床分析病变与腹水的因果关系,更要确定有无转移、转移灶的多少、脏器、血管受累情况,这对手术切除的可行性评价、制定诊疗计划至关重要。发现腹膜后多发淋巴结肿大、网膜及骨转移灶更支持恶性腹水的诊断。但小淋巴结、腹膜及骨转移灶,与正常组织缺乏明显的信号对比,常规扫描易漏诊。全身DWI(WB-DWI)为近年出现的针对肿瘤特异性诊断的新技术,采用DWI结合STIR技术获得薄层DWI及其三维图像,显示范围广,一次扫描可全景显示多处骨、淋巴结、腹膜及其他部位转移,也称“类PET”技术。对肿瘤TNM分期比临床更准确,判断术后有无复发为无创、可信的检查手段^[6-7]。本文的研究结果充分说明了这一点。此外,腹腔脏器信号病变或小结节病灶,如肝硬化发育不良结节、肝腺瘤、局灶结节增生及小

肝癌. 目前认为肝腺瘤、局灶性结节增生ADC值居于中等, 低于肝囊肿、血管瘤, 而高于恶性肿瘤, 接近于正常肝实质. 但尚缺乏大规模的研究报道用ADC值来界定肝脏内良、恶性小结节病变, 能否应用DWI、增强扫描等诸多信息综合判断病变尚值得我们进一步探索^[8]. (3)有助于鉴别腹腔积液的性质及含液性成分病变的诊断: 腹腔积液实验室分为: 渗出液、漏出液、乳糜液. 妇科病变常合并腹水, 占位性病变中液性成分复杂多变成为诊断难点. MRI结合常规及DWI信号特征可将不同性质液体作出鉴别. 从文中研究结果中可以看出, DWI使浆液、脓液有明显区别, 而超声、CT无法准确分辨. 机制为脓液的高黏滞度和脓肿中的多细胞性, 与浆液相比黏滞度不同, 对水分子扩散的阻碍程度也不同, DWI表现及相应的ADC值就不同^[9]. 虽然黏液、亚急性血肿在常规序列及DWI不易鉴别, 血肿信号特征却处于动态变化中. 超急性期出血为氧合血红蛋白, 在DWI上呈高信号, ADC值降低或正常, 这表明在红细胞内水的运动相对受限. 亚急性晚期出血以细胞外正铁血红蛋白为主, 在DWI上呈高信号, ADC升高, 表明细胞外水分增加. 含有去氧血红蛋白、细胞内正铁血红蛋白和含铁血黄素的出血, 由于磁敏感效应在DWI上呈低信号^[10-11]. 熟知上述液体的影像特征对诊断很有帮助, 尤其在急腹症、临床症状与影像表现难以解释造成诊断困难的病例, 上述规律往往给我们提供有价值的线索.

总之, MRI-DWI技术在功能成像方面判断病变的良、恶性. 他依靠实性肿瘤的不同组织学特点来进行诊断与鉴别诊断, 基于囊性病变的内容物不同黏滞度来推断他们的性质. 在腹水病因诊断中, 不仅发现肿瘤病变及间接征象, 且可敏感显示常规平扫容易漏诊的病灶及转移灶、便于术后无创复查, 准确判断有无复发. 而WB-DWI成像范围广, 对肿瘤筛查敏感. 与PET相比, 不涉

及电离辐射, 成本较低, 术前TNM分期较其他影像方法较有优势, 对肿瘤疾病早期发现、监测治疗方面将有望成为优于PET-CT的影像手段. 因此, 腹水病因诊断中有很好的应用前景.

4 参考文献

- 1 谢鹏雁. 腹水鉴别的基本思路. 中国医刊 2006; 41: 2-3
- 2 张春燕, 王霄英, 蒋学祥. 扩散加权成像在全身肿瘤性病变中的应用. 中国医学影像技术 2006; 22: 1762-1766
- 3 Nasu K, Kuroki Y, Kuroki S, Murakami K, Nawano S, Moriyama N. Diffusion-weighted single shot echo planar imaging of colorectal cancer using a sensitivity-encoding technique. *Jpn J Clin Oncol* 2004; 34: 620-626
- 4 秦海燕, 任崧, 白人驹. 扩散加权成像在体部的应用. 国外医学·临床放射学分册 2006; 29: 136-140
- 5 Chan JH, Tsui EY, Luk SH, Fung AS, Yuen MK, Szeto ML, Cheung YK, Wong KP. Diffusion-weighted MR imaging of the liver: distinguishing hepatic abscess from cystic or necrotic tumor. *Abdom Imaging* 2001; 26: 161-165
- 6 Fujii S, Matsusue E, Kanasaki Y, Kanamori Y, Nakanishi J, Sugihara S, Kigawa J, Terakawa N, Ogawa T. Detection of peritoneal dissemination in gynecological malignancy: evaluation by diffusion-weighted MR imaging. *Eur Radiol* 2008; 18: 18-23
- 7 Schmidt GP, Kramer H, Reiser MF, Glaser C. Whole-body magnetic resonance imaging and positron emission tomography-computed tomography in oncology. *Top Magn Reson Imaging* 2007; 18: 193-202
- 8 Taouli B, Vilgrain V, Dumont E, Daire JL, Fan B, Menu Y. Evaluation of liver diffusion isotropy and characterization of focal hepatic lesions with two single-shot echo-planar MR imaging sequences: prospective study in 66 patients. *Radiology* 2003; 226: 71-78
- 9 Noguchi K, Watanabe N, Nagayoshi T, Kanazawa T, Toyoshima S, Shimizu M, Seto H. Role of diffusion-weighted echo-planar MRI in distinguishing between brain abscess and tumour: a preliminary report. *Neuroradiology* 1999; 41: 171-174
- 10 Atlas SW, DuBois P, Singer MB, Lu D. Diffusion measurements in intracranial hematomas: implications for MR imaging of acute stroke. *AJNR Am J Neuroradiol* 2000; 21: 1190-1194
- 11 Maldjian JA, Listerud J, Moonis G, Siddiqi F. Computing diffusion rates in T2-dark hematomas and areas of low T2 signal. *AJNR Am J Neuroradiol* 2001; 22: 112-118

■同行评价

本研究设计合理, 科学性强, 具有临床参考价值.

编辑 李军亮 电编 何基才

COX-2与胃癌关系的研究进展

王俊先, 张开光

■背景资料

环氧合酶是前列腺素系列因子合成的限速酶。其有两种同工酶: 环氧合酶-1与环氧合酶-2, 其中环氧合酶-2是一种诱导性酶, 与肿瘤的发生发展有密切的关系。选择性COX-2抑制剂有抗癌作用, 并已成功用于预防和治疗家族性腺瘤性息肉病等疾病的癌变。

王俊先, 张开光, 安徽医科大学附属安徽省立医院消化内科
安徽省合肥市 230001

作者贡献分布: 本文思路由张开光设计; 论文写作由王俊先与张开光共同完成; 两人对本文贡献均等。

通讯作者: 张开光, 230001, 安徽省合肥市庐江路17号, 安徽医科大学附属安徽省立医院消化内科。

zhangkaiguang@medmail.com.cn

电话: 0551-2283380

收稿日期: 2008-11-28 修回日期: 2008-12-25

接受日期: 2008-12-29 在线出版日期: 2009-02-08

Advance in relationship between COX-2 and gastric cancer

Jun-Xian Wang, Kai-Guang Zhang

Jun-Xian Wang, Kai-Guang Zhang, Department of Gastroenterology, Anhui Provincial Hospital Affiliated to Anhui Medical University, Hefei 230001, Anhui Province, China

Correspondence to: Kai-Guang Zhang, Department of Gastroenterology, Anhui Provincial Hospital Affiliated to Anhui Medical University, 17 Lujiang Road, Hefei 230001, Anhui Province, China. zhangkaiguang@medmail.com.cn

Received: 2008-11-28 Revised: 2008-12-25

Accepted: 2008-12-29 Published online: 2009-02-08

Abstract

COX-2 is an inducible enzyme which is over expressed in gastric cancer tissues and plays an important role in the incidence, development and prognosis of gastric cancer by regulating the formation of vessel, inducing mutations, immune suppression, suppression of apoptosis, changing the activity of adhesion molecule to promote tumor metastasis, and so on. COX selective inhibitors can be used as one of the basic anti-tumor drugs because of their tumor suppression function in the future.

Key Words: Cyclooxygenase-2; Gastric cancer; Cyclooxygenase

Wang JX, Zhang KG. Advance in relationship between COX-2 and gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(4): 378-383

摘要

环氧合酶2是诱导性酶, 在胃癌组织中高表达。主要参与胃癌的血管形成、诱导基因突变、

抑制肿瘤免疫、抑制凋亡、改变黏附因子活性, 促使肿瘤转移等, 对胃癌的发生、发展、预后均起重要的作用。选择性环氧合酶抑制剂具有抑癌作用, 有望成为胃癌治疗的基础药物之一。

关键词: 环氧合酶-2; 胃癌; 环氧合酶

王俊先, 张开光. COX-2与胃癌关系的研究进展. 世界华人消化杂志 2009; 17(4): 378-383

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/378.asp>

0 引言

胃癌是危害人类生命健康的常见恶性肿瘤, 其病死率在我国居第1位。早期准确诊断是决定胃癌成功治疗与预后的关键。诊断胃癌的技术方法众多, 对与胃癌相关的分子生物学标志物进行检测则是早期准确诊断重要手段之一。研究表明环氧合酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)作为前列腺素合成的限速酶, 与胃癌发病密切相关, 可以作为胃癌标志物^[1]。已有试验证实应用选择性COX-2抑制剂(cyclooxygenase-2 inhibitors, COXIBs)能有效地抑制胃癌增殖, 促进胃癌细胞凋亡^[2]。

1 环氧合酶

环氧合酶(cyclooxygenase, COX), 又称前列腺素过氧化物合成酶(prosta glandin hyperoxide synthase, PGHS), 是花生四烯酸(arachidonic acid, AA)合成前列腺素代谢的关键酶, 具有环氧合酶和过氧化物酶双重活性, 环氧合酶活性能催化AA转化为PGG₂(prostaglandin G₂), 过氧化物酶活性则使AA转化为PGH₂(prostaglandin H₂), PGH₂在各种组织中经特异性酶转化为其他的PGs, 发挥生理作用。目前已经证实的COX同工酶至少有两种, 即COX-1和COX-2, 二者氨基酸序列约有60%同源性, 而在活性结构域的氨基酸同源性则高达90%。

COX-1基因属于“管家基因”, 位于9号染色体q32-33.3, 由11个外显子和10个内含子组

■同行评议者

杜雅莉, 主任医师, 哈尔滨医科大学附属第二医院消化内科; 黄颖秋, 教授, 本溪钢铁(集团)有限责任公司总医院消化内科

成, 全长约22.5 kb, 无TATA盒和CAAT启动元件. COX-1又称结构性环氧化酶(constitutive COX), 由599-600个氨基酸残基组成, 在各组织中均有表达, 主要定位于细胞内质网, 其主要功能包括保护黏膜、调节凝血机制及内脏血流分布等.

COX-2基因在1号染色体上的定位是q25.2-25.3, 含有10个外显子和9个内含子, 全长约有8.3 kb, 其5'端有TATA盒、CAAT增强子结合蛋白(CCAAT/enhancer binding protein, C/EBP)反应元件、CRE(cAMP responsive element)反应元件、另外还含有可以与AP-2(activator protein-2)结合位点, 及核因子-kappa B(nuclear factor-kappa B, NF- κ B)结合位^[3], 多种因素(如: 致炎因子, 损伤, 致癌因子, 生长因子等)可诱导其迅速表达, 属诱导型快反应基因. COX-2由604个氨基酸组成, 在大多数组织没有表达脑、肾、妊娠后期胎盘、及输精(卵)管等有表达, 参与排卵, 排精, 及分娩等功能. COX-2生理情况下定位于细胞核膜, 在炎症等刺激后可以在相应组织的胞质和胞核表达, 参与炎症反应、促进损伤组织修复及机体的免疫功能.

2 COX-2在恶性肿瘤中的表达

COX-2在许多恶性肿瘤内存在着高表达, 如乳腺癌、肺癌、大肠癌和鼻咽癌等. COX-2高表达不仅是恶性肿瘤发生的早期事件, 而且与恶性肿瘤的浸润程度、淋巴结转移、TNM分期及患者的预后均有着直接的关系^[4-7].

3 胃癌与COX-2

3.1 COX-2在胃癌中的表达 在胃癌组织中也有COX-2的高表达^[1], 并且其表达与胃癌的血管密度(micro vessel density, MVD)、血管侵袭、低凋亡率及淋巴结的转移都有着一定的相关性^[8]. 研究发现从癌前病变恶变为胃癌的过程中, COX-2的表达是逐渐增加的^[9], 提示COX-2参与了胃癌的发病过程. 有学者发现在不同组织类型的癌细胞内COX-2的胞内定位略有不同^[10]. 除在胃癌细胞内高表达外, COX-2在胃癌组织的巨噬细胞和成纤维细胞也有表达^[11].

3.2 COX-2在胃癌组织中的表达机制 COX-2是诱导性表达的细胞因子, 多种因素可以诱导COX-2的表达: (1)幽门螺杆菌(*H pylori*): *H pylori*是胃炎、胃溃疡以及胃癌发病的罪魁祸首. 1994年, 世界卫生组织国际癌症研究机构正式将*H pylori*列为I类致癌原. 从*H pylori*感染到

胃癌的发生大致过程为: *H pylori*感染→单纯性胃炎→慢性萎缩性胃炎→肠上皮化生(以大肠型上皮化生更易癌变)→不典型增生→胃癌. 在这个过程中, COX-2的表达有逐渐增加的趋势, 并与*H pylori*感染有着正相关关系^[12]. 王海滨 *et al*^[13]用*H pylori*喂养小鼠可见胃黏膜COX-2显著增多, 而抗*H pylori*治疗后, COX-2表达则明显降低; 与*H pylori*共孵育的胃癌细胞内的COX-2的表达也明显增多^[14]. 目前, *H pylori*感染促进COX-2高表达的机制尚未阐明. 一般认为, *H pylori*感染可以诱发胃炎炎症反应, 产生许多炎症细胞因子可以使COX-2的表达上调^[15]; *H pylori*感染可使胃泌素的表达增加^[16], 后者可以促使COX-2的表达, 使COX-2的mRNA的半衰期延长^[17]. 用胃泌素释放肽(gastrin-releasing peptide, GRP)抑制剂可以降低癌组织的COX-2的表达^[18]. *H pylori*感染还可以作为其他诱导因子(如高盐饮食)诱导COX-2表达的一个基础. (2)抑癌基因突变: 肿瘤的发生与癌基因与抑癌基因的比例失衡有关, 抑癌基因突变可以引起癌症的发生, 最常见的如*p53*, 野生型*P53*蛋白可阻止COX-2基因的上游的TATA盒结合蛋白与启动子复合物的形成, 从而阻止了COX-2的表达, 突变的*p53*表达产物属于癌蛋白, 通过Ras/Raf/MAPK信号通路调节COX-2的表达, 而COX-2又可以反向诱导*p53*突变, 二者在癌组织中共表达^[19]. 突变型*p53*过度表达能促进胰腺癌中COX-2的过表达^[20], 另外, COX-2还可以抑制野生型*p53*的抑癌活性, 提高肝细胞对乙肝病毒致癌的易感性^[21]. (3)NF- κ B: 生理条件下NF- κ B以无活性的形式存在于细胞胞质内, 受到刺激后, 进入细胞胞核发挥作用. 在COX-2基因上游有NF- κ B的结合位点, NF- κ B与其结合后上调COX-2的表达. 采用硫酸软骨素阻断NF- κ B活性后可见COX-2的表达明显减少^[22]. 从慢性萎缩性胃炎→不典型增生→胃癌的渐变过程中, 二者表达平行增加^[23]. COX-2与NF- κ B共表达对胃癌组织的血管生成起重要作用, NF- κ B还可以上调血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的表达, 后者是启动血管生成的重要因子^[24]. 在NF- κ B⁺/COX-2⁺大肠癌中, MVD明显低于NF- κ B⁺/COX-2⁻组, 表明NF- κ B促进血管增生可能是通过促进COX-2起作用^[25]. (4)其他: 吸烟可以增加胃癌发生率, 尼古丁可以与黏膜上皮细胞的烟碱乙酰胆碱受体(nicotinic acetylcholine receptor, nAChR)结合, 上调COX-2的表达^[26]; 单核细胞

■研发前沿

一系列的实验证实COX-2可以促进胃癌细胞增殖, 抑制胃癌细胞凋亡, 是影响胃癌发生发展的重要因子, 目前围绕COX-2的促癌机制及以COX-2为靶点治疗胃癌成为研究的热点.

■相关报道

Li *et al*报道用选择性COX-2抑制剂可以促进胃癌细胞的凋亡。

趋化因子-1(monocyte chemoattractant protein 1, MCP-1)也可以上调COX-2的表达^[27]。

4 COX-2的对胃癌的影响机制

4.1 促进血管的形成和淋巴结转移 肿瘤浸润和转移与血管和淋巴管的增生有密切联系。多种细胞因子如VEGF、成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)等都可以促进血管和淋巴管增生。VEGF是决定胃癌患者不良预后的一个相对独立因素^[28]。COX-2的催化产物PGE-2通过EP(E prostanoind)受体激活Her2/neu酪氨酸激酶信号通路^[29]及活化剂蛋白(activator protein-1, AP-1)和转录激活因子(activating transcription factor-4, ATF-4)^[30]促进VEGF表达。在EP3基因敲除小鼠Lewis肺癌模型的肿瘤血管生成受到明显抑制,也证明COX-2是通过PGE途径促进血管增生^[31]。VEGF反过来又能促进COX-2的表达,其相互作用被某些因素(如炎症)激发后,即可加速恶性肿瘤的发生与发展^[32]。FGF-2促血管生成作用同样依赖COX-2,用COX-2抑制剂塞来昔布可阻断血管增生,抑制肿瘤的生长^[33]。FGF又可通过AKT信号通路促进COX-2的表达,二者对血管增生有协同作用^[34]。

4.2 免疫逃避 机体免疫是一个复杂的全身性反应过程。COX-2的催化产物PGE-2可抑制树突状细胞成熟,促进IL-10的表达,而抑制CD8⁺ T细胞的活性^[35],抑制人白细胞抗原(human leucocyte antigen, HLA) I 和 II 的表达,减少淋巴因子等活性细胞因子的产生,从而减少机体免疫系统对突变细胞的免疫监视作用^[36]。用COXIBs可以通过增加干扰素的表达^[37]和NK细胞的活性^[38]等途径增强肿瘤免疫反应。

4.3 COX-2改变端粒酶的活性 端粒(telomere)位于DNA分子末端,对于保持人染色体在DNA复制过程中的长度具有重要的作用。端粒酶(telomerase)是由蛋白质与RNA组成能维持端粒结构的核糖体蛋白。正常机体细胞在进行分裂和分化的过程中,端粒酶的活性逐渐降低,使细胞最终走向衰老和凋亡。端粒酶活性的持久表达可使细胞获得不死性,最终发展成为肿瘤。COX-2可以使端粒酶表达增加,用COXIBs可以降低端粒酶的活性^[39]和人端粒酶逆转录酶活性^[40]。

4.4 对黏附因子的作用 黏附分子(adhesion molecule, AM)是介导细胞与细胞、细胞与细胞外基质间黏附作用的膜表面糖蛋白。对于癌细胞浸润起抑制作用的黏附分子如E-钙黏素(E-

cadherin),可阻止癌细胞从癌组织解离。COX-2可使E-cadherin活性降低,增加肿瘤的侵袭力^[41]。抑制COX-2后E-cadherin表达增加^[42]。细胞外基质胶原成分可阻止癌细胞的扩散,而基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)可以降解胶原成分, MMP表达增高,则使局部组织胶原成分分解加速,有利于癌细胞扩散。在胃癌组织中COX-2的表达与MMP的表达有着相关性^[43],使用COXIBs能使MMP的表达下调^[44]。CD44作为透明质酸的膜受体在癌细胞转移过程中同样起重要作用,有黏附细胞基质,参与淋巴细胞的归巢和活化以及癌细胞扩散等作用。COX-2通过PGE-2上调CD44的表达^[45],用COXIBs则减少CD44分子的表达^[46]。CD44分子也可反向诱导COX和VEGF的表达,用CD44单抗封闭CD44后,COX-2的表达下调^[47]。尿激酶型纤溶酶原激活物(urokinase-type plasminogen activator, uPA)对降解细胞外基质,促进癌细胞转移也起重要作用。COX-2及PGE2可以上调胃癌组织的uPA表达^[15]。用COXIBs抑制COX-2的活性同时下调uPA的表达^[48]。

4.5 抑制细胞凋亡和促进细胞增殖 *bcl-2*基因是一个重要的抗凋亡基因。赵滢 *et al*^[49]认为COX-2可能是*bcl*基因的上游调节者。Lin *et al*^[50]也认为,COX-2是通过PI3K信号途径来上调凋亡抑制蛋白Bcl-2家族成员中的MCL-1表达,使癌细胞凋亡受抑。研究表明COX-2还通过诱导*p53*基因突变抑制细胞凋亡^[19]。使用COX-2抑制剂后发现死亡受体和凋亡信号通路的关键酶胱冬酶(Caspases)的表达增加,表明COX-2可能有抑制死亡受体表达的作用。COX-2的过表达可以使转化生长因子的抗细胞增殖活性减弱^[51]。COX-2还可以减弱抑癌基因Fas介导的细胞凋亡信号^[52]。

4.6 参与毒物代谢 COX-2具有氧化酶活性,可以使化学毒物(前致癌物质)氧化为致癌物质,如可使苯并芘氧化成为三氧苯并芘,后者致癌活性大大增强。这些化学物质有些又是COX-2表达的诱导剂,形成恶性循环,加速癌肿的发生。值得一提的是,COX-2的这种作用,不需要肝脏的P450系统的参与,直接在肝外就可以进行。COX-2的氧化酶活性还可以使机体产生氧自由基,同样诱导肿瘤的发生。

4.7 其他机制 COX-2尚可以通过PI3K/Akt(phosphatidylinositol 3-kinase/Akt)途径参与卵巢癌的发生^[53], PI3K/Akt是在癌症发生与发展中起重要作用的一条信号途径^[54]; COX-2还可以下调胃癌

组织中15-羟前列腺素脱氢酶(15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase, 15-PGDH)表达从而减少PGE2的降解^[55]。

4.8 COX-2抑制剂 COX抑制剂分非选择性(如阿斯匹林)和选择性COX-2抑制剂(如塞来昔布等)。二者作用差别与COX的分子结构有关, COX的分子立体结构有一狭长的沟, AA只有通过该沟才被催化为相应的产物。环氧合酶抑制剂与这条沟结构结合, 阻止AA的催化。COX-2分子中的第523位的Val被Ile所代替使其立体结构的沟宽增加, 产生侧袋, 选择性COX-2抑制剂可以与宽沟结合, 但不能与COX-1的窄沟结合。COXIBs已经证实具有抗胃癌和预防胃癌发生的作用^[37-40,42,44,46], COXIBs对胃癌细胞抑制作用比非选择性的COX抑制剂要强^[56], 但也也有学者报道二者作用相仿^[57]。COXIBs的抗癌机制尚未阐明, 可能有二个途径: (1)依赖COX-2途径: 主要是抑制COX-2的活性和PGE2的表达, 从而起到抑制细胞增殖和促进细胞凋亡^[1]、减少血管生成^[58]、增强免疫^[38]等作用。使用COXIBs, 会使其底物含量增加, 并且可以通过鞘磷脂转化为神经酰胺, 后者有诱导细胞凋亡的作用。(2)非依赖COX-2途径: 机制尚不清楚, 可能与促进死亡受体(death receptor, DR)的表达^[59]、逆转耐药发生, 增加胃癌细胞对化疗药的敏感性^[60-61]、抑制NF- κ B活性^[62]、下调过氧化物酶体增殖蛋白激活性受体- γ (peroxisome proliferators-activated receptor- γ , PPAR- γ)的表达^[63]、上调NAG-1(non-steroidal anti-inflammatory drug-activated gene-1)的表达^[64]、以及下调胃癌间质成纤维细胞表达角质细胞生长因子(keratinocyte growth factor, KGF)等作用有关^[11]。

COXIBs虽被证实具有抗癌作用, 但使用时存在增加心血管疾病的潜在风险^[65], 可以增加血管紧张素的升压作用, 增加全身循环阻力; 降低前列环素(prostacyclin, PGI抗内源性血栓形成的重要因子之一)的合成, 增加血管内皮细胞对切应力的反应性^[66]。

5 结论

COX-2是影响胃癌发生发展的重要因素, 深入研究COX-2能为揭示肿瘤的发病机制提供新的思路。选择性COX-2抑制剂早已被证实具有抗癌作用, 其应用前景广阔, 美国FDA已批准将COX-2抑制剂应用于家族性腺瘤性息肉病的治疗, 对预防其癌变起到很好效果。但COX-2抑制剂具有

使心血管疾病发病率增高等风险。在未来的研究中主要是进一步寻找诱导COX-2表达及促癌机制, 研制出高效、安全和抗肿瘤特异性强的选择性COX-2抑制剂, 为治疗和预防胃癌提供更好的方案。

6 参考文献

- 1 Samaka RM, Abdou AG, Abd El-Wahed MM, Kandil MA, El-Kady NM. Cyclooxygenase-2 expression in chronic gastritis and gastric carcinoma, correlation with prognostic parameters. *J Egypt Natl Canc Inst* 2006; 18: 363-374
- 2 Li JY, Wang XZ, Chen FL, Yu JP, Luo HS. Nimesulide inhibits proliferation via induction of apoptosis and cell cycle arrest in human gastric adenocarcinoma cell line. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 915-920
- 3 Appleby SB, Ristimäki A, Neilson K, Narko K, Hla T. Structure of the human cyclo-oxygenase-2 gene. *Biochem J* 1994; 302 (Pt 3): 723-727
- 4 蔡凤林, 周士福, 马兆生, 吴玉玉, 金琳芳. 乳腺浸润性导管癌中COX-2、MMP-2的表达及其相关性. *实用癌症杂志* 2008; 23: 44-47
- 5 谭明旗, 张秀娟, 周卓. Survivin、COX-2蛋白在肺癌中的表达及意义. *中国现代医学杂志* 2007; 17: 2924-2927
- 6 许小飞, 曹兴建, 刘雅洁, 张晓鹏. 环氧合酶-2在食管癌中表达及与血管生成关系. *南通大学学报(医学版)* 2007; 27: 83-86
- 7 Pan J, Kong L, Lin S, Chen G, Chen Q, Lu JJ. The clinical significance of coexpression of cyclooxygenases-2, vascular endothelial growth factors, and epidermal growth factor receptor in nasopharyngeal carcinoma. *Laryngoscope* 2008; 118: 1970-1975
- 8 Mao XY, Wang XG, Lv XJ, Xu L, Han CB. COX-2 expression in gastric cancer and its relationship with angiogenesis using tissue microarray. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 3466-3471
- 9 张梅, 王立东, 王俊宽, 郭涛, 冯笑山, 李寒冰, 李琮宇, 李吉林, 焦新英, 范宗民, 何欣, 樊慧, 申秋, 郭军辉, 罗平, 王能超, 吴爱群, 邢国兰. 贲门癌组织中环氧合酶-2蛋白的表达. *郑州大学学报(医学版)* 2007; 42: 417-418
- 10 Chen XL, Su BS, Sun RQ, Zhang J, Wang YL. Relationship between expression and distribution of cyclooxygenase-2 and bcl-2 in human gastric adenocarcinoma. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 1228-1231
- 11 Yashiro M, Nakazawa K, Tendo M, Kosaka K, Shinto O, Hirakawa K. Selective cyclooxygenase-2 inhibitor downregulates the paracrine epithelial-mesenchymal interactions of growth in scirrhous gastric carcinoma. *Int J Cancer* 2007; 120: 686-693
- 12 石巍, 姚育红, 廖爱军, 刘立玺, 胡光胜. 不同胃黏膜病变中幽门螺杆菌感染与环氧合酶表达相关性分析. *中华消化杂志* 2004; 24: 750-751
- 13 王海滨, 郝素珍, 刘蕾, 田锋. 幽门螺杆菌对Balb/c小鼠胃粘膜上皮细胞表达环氧合酶-2的影响. *热带医学杂志* 2007; 7: 415-417
- 14 Iwamoto J, Mizokami Y, Takahashi K, Matsuoka T, Matsuzaki Y. The effects of cyclooxygenase-2-prostaglandinE2 pathway on Helicobacter pylori-induced urokinase-type plasminogen activator system in the gastric cancer cells. *Helicobacter* 2008;

■创新盘点

本文简单介绍环氧合酶的基因结构及分子组成, 重点阐述COX-2在胃癌中的表达机制及其在胃癌发生、发展、浸润和转移过程中所起的作用, 并对COX-2抑制剂的抑癌机制等最新研究成果加以总结。

■应用要点

本文阐明了 COX-2 表达机制及其在胃癌的发生发展中的作用机制,为临床以 COX-2 为靶点治疗胃癌和研制新药提供理论依据。

- 13: 174-182
- 15 Konturek PC, Konturek SJ, Brzozowski T. Gastric cancer and Helicobacter pylori infection. *J Physiol Pharmacol* 2006; 57 Suppl 3: 51-65
- 16 林瑞新, 任辉, 张研, 房学东. Hp 阳性胃癌患者 PG 及胃泌素水平的研究. *中国实验诊断学* 2007; 11: 1250-1251
- 17 Subramaniam D, Ramalingam S, May R, Dieckgraefe BK, Berg DE, Pothoulakis C, Houchen CW, Wang TC, Anant S. Gastrin-mediated interleukin-8 and cyclooxygenase-2 gene expression: differential transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *Gastroenterology* 2008; 134: 1070-1082
- 18 Hohla F, Schally AV, Kanashiro CA, Buchholz S, Baker B, Kannadka C, Moder A, Aigner E, Datz C, Halmos G. Growth inhibition of non-small-cell lung carcinoma by BN/GRP antagonist is linked with suppression of K-Ras, COX-2, and pAkt. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 18671-18676
- 19 Han JA, Kim JI, Ongusaha PP, Hwang DH, Ballou LR, Mahale A, Aaronson SA, Lee SW. P53-mediated induction of Cox-2 counteracts p53- or genotoxic stress-induced apoptosis. *EMBO J* 2002; 21: 5635-5644
- 20 Hermanova M, Trna J, Nenutil R, Dite P, Kala Z. Expression of COX-2 is associated with accumulation of p53 in pancreatic cancer: analysis of COX-2 and p53 expression in premalignant and malignant ductal pancreatic lesions. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2008; 20: 732-739
- 21 Cheng AS, Yu J, Lai PB, Chan HL, Sung JJ. COX-2 mediates hepatitis B virus X protein abrogation of p53-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 374: 175-180
- 22 Xu CX, Jin H, Chung YS, Shin JY, Lee KH, Beck GR Jr, Palmos GN, Choi BD, Cho MH. Chondroitin sulfate extracted from ascidian tunic inhibits phorbol ester-induced expression of Inflammatory factors VCAM-1 and COX-2 by blocking NF-kappaB activation in mouse skin. *J Agric Food Chem* 2008; 56: 9667-9675
- 23 唐爱萍, 曲春雁, 曲延刚. 核因子-κB 和环氧合酶-2 在胃癌及癌前病变中的表达. *山西医药杂志* 2007; 36: 648-649
- 24 裴锋, 张克亮. 核因子-κB 和环氧合酶-2 在胃癌组织中的表达与肿瘤微血管形成的关系. *华中科技大学学报(医学版)* 2007; 36: 355-358
- 25 朱惠明, 王立生, 黄勋, 罗伟香, 师瑞月, 苏学劲, 王晓玫. 大肠癌核因子-κB 和环氧合酶 2 的表达及其与肿瘤血管形成的关系. *肿瘤研究与临床* 2004; 16: 367-369
- 26 Grozio A, Catassi A, Cavalieri Z, Paleari L, Cesario A, Russo P. Nicotine, lung and cancer. *Anticancer Agents Med Chem* 2007; 7: 461-466
- 27 Futagami S, Tatsuguchi A, Hiratsuka T, Shindo T, Horie A, Hamamoto T, Ueki N, Kusunoki M, Miyake K, Gudis K, Tsukui T, Sakamoto C. Monocyte chemoattractant protein 1 and CD40 ligation have a synergistic effect on vascular endothelial growth factor production through cyclooxygenase 2 upregulation in gastric cancer. *J Gastroenterol* 2008; 43: 216-224
- 28 Vidal O, Soriano-Izquierdo A, Pera M, Elizalde JL, Palacín A, Castells A, Piqué JM, Volant A, Metges JP. Positive VEGF immunostaining independently predicts poor prognosis in curatively resected gastric cancer patients: results of a study assessing a panel of angiogenic markers. *J Gastrointest Surg* 2008; 12: 1005-1014
- 29 Howe LR, Chang SH, Tolle KC, Dillon R, Young LJ, Cardiff RD, Newman RA, Yang P, Thaler HT, Muller WJ, Hudis C, Brown AM, Hla T, Subbaramaiah K, Dannenberg AJ. HER2/neu-induced mammary tumorigenesis and angiogenesis are reduced in cyclooxygenase-2 knockout mice. *Cancer Res* 2005; 65: 10113-10119
- 30 Jain S, Chakraborty G, Raja R, Kale S, Kundu GC. Prostaglandin E2 regulates tumor angiogenesis in prostate cancer. *Cancer Res* 2008; 68: 7750-7759
- 31 Amano H, Hayashi I, Endo H, Kitasato H, Yamashina S, Maruyama T, Kobayashi M, Satoh K, Narita M, Sugimoto Y, Murata T, Yoshimura H, Narumiya S, Majima M. Host prostaglandin E(2)-EP3 signaling regulates tumor-associated angiogenesis and tumor growth. *J Exp Med* 2003; 197: 221-232
- 32 Da MX, Wu XT, Wang J, Guo TK, Zhao ZG, Luo T, Zhang MM, Qian K. Expression of cyclooxygenase-2 and vascular endothelial growth factor-C correlates with lymphangiogenesis and lymphatic invasion in human gastric cancer. *Arch Med Res* 2008; 39: 92-99
- 33 Masferrer JL, Leahy KM, Koki AT, Zweifel BS, Settle SL, Woerner BM, Edwards DA, Flickinger AG, Moore RJ, Seibert K. Antiangiogenic and antitumor activities of cyclooxygenase-2 inhibitors. *Cancer Res* 2000; 60: 1306-1311
- 34 聂海祺, 孙黎光, 叶丽平. bFGF 经 Akt 信号转导通路诱导胃癌 BGC-823 中 COX-2 和 NF-κB 表达研究. *中国医科大学学报* 2007; 36: 116-118
- 35 Ahmadi M, Emery DC, Morgan DJ. Prevention of both direct and cross-priming of antitumor CD8+ T-cell responses following overproduction of prostaglandin E2 by tumor cells in vivo. *Cancer Res* 2008; 68: 7520-7529
- 36 Chen TH, Fukuhara K, Mandai M, Matsumura N, Kariya M, Takakura K, Fujii S. Increased cyclooxygenase-2 expression is correlated with suppressed antitumor immunity in cervical adenocarcinomas. *Int J Gynecol Cancer* 2006; 16: 772-779
- 37 Sharma S, Zhu L, Yang SC, Zhang L, Lin J, Hillinger S, Gardner B, Reckamp K, Strieter RM, Huang M, Batra RK, Dubinett SM. Cyclooxygenase 2 inhibition promotes IFN-gamma-dependent enhancement of antitumor responses. *J Immunol* 2005; 175: 813-819
- 38 Kundu N, Walser TC, Ma X, Fulton AM. Cyclooxygenase inhibitors modulate NK activities that control metastatic disease. *Cancer Immunol Immunother* 2005; 54: 981-987
- 39 亓玉琴, 司君利, 魏涛, 李文利, 贺远龙, 朱菊人. 选择性环氧合酶-2 抑制剂塞来昔布对胃癌治疗作用的体内实验研究. *临床消化病杂志* 2006; 18: 282-285
- 40 He H, Xia HH, Wang JD, Gu Q, Lin MC, Zou B, Lam SK, Chan AO, Yuen MF, Kung HF, Wong BC. Inhibition of human telomerase reverse transcriptase by nonsteroidal antiinflammatory drugs in colon carcinoma. *Cancer* 2006; 106: 1243-1249
- 41 Rao DS, Gui D, Koski ME, Popoviciu LM, Wang H, Reiter RE, Said JW. An inverse relation between COX-2 and E-cadherin expression correlates with aggressive histologic features in prostate cancer. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2006; 14: 375-383
- 42 Zhou Y, Ran J, Tang C, Wu J, Honghua L, Xingwen L, Ning C, Qiao L. Effect of celecoxib on E-cadherin, VEGF, Microvessel density and apoptosis in gastric

- cancer. *Cancer Biol Ther* 2007; 6: 269-275
- 43 李百文, 沈强. 胃癌组织中环氧合酶-2与基质金属蛋白酶的表达及与胃癌生物学特征的关系. *临床内科杂志* 2007; 24: 118-120
- 44 Zhao Y, Zhou S, Heng CK. Celecoxib inhibits serum amyloid a-induced matrix metalloproteinase-10 expression in human endothelial cells. *J Vasc Res* 2009; 46: 64-72
- 45 Dohadwala M, Batra RK, Luo J, Lin Y, Krysan K, Pold M, Sharma S, Dubinett SM. Autocrine/paracrine prostaglandin E2 production by non-small cell lung cancer cells regulates matrix metalloproteinase-2 and CD44 in cyclooxygenase-2-dependent invasion. *J Biol Chem* 2002; 277: 50828-50833
- 46 Jia XQ, Zhong N, Han LH, Wang JH, Yan M, Meng FL, Zhang SZ. Effect of NS-398 on colon cancer cells. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 353-356
- 47 Murphy JF, Lennon F, Steele C, Kelleher D, Fitzgerald D, Long AC. Engagement of CD44 modulates cyclooxygenase induction, VEGF generation, and proliferation in human vascular endothelial cells. *FASEB J* 2005; 19: 446-448
- 48 Shin VY, Wu WK, Chu KM, Wong HP, Lam EK, Tai EK, Koo MW, Cho CH. Nicotine induces cyclooxygenase-2 and vascular endothelial growth factor receptor-2 in association with tumor-associated invasion and angiogenesis in gastric cancer. *Mol Cancer Res* 2005; 3: 607-615
- 49 赵滢, 张天彪, 王强. 胃癌组织caspase-3, Bcl-X_L和Cox-2表达与临床病理行为的关系. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 711-715
- 50 Lin MT, Lee RC, Yang PC, Ho FM, Kuo ML. Cyclooxygenase-2 inducing Mcl-1-dependent survival mechanism in human lung adenocarcinoma CL1.0 cells. Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *J Biol Chem* 2001; 276: 48997-49002
- 51 Enders GA. Cyclooxygenase-2 overexpression abrogates the antiproliferative effects of TGF- β . *Br J Cancer* 2007; 97: 1388-1392
- 52 Casado M, Mollá B, Roy R, Fernández-Martínez A, Cucarella C, Mayoral R, Boscá L, Martín-Sanz P. Protection against Fas-induced liver apoptosis in transgenic mice expressing cyclooxygenase 2 in hepatocytes. *Hepatology* 2007; 45: 631-638
- 53 Gu P, Su Y, Guo S, Teng L, Xu Y, Qi J, Gong H, Cai Y. Over-expression of COX-2 induces human ovarian cancer cells (CAOV-3) viability, migration and proliferation in association with PI3-k/Akt activation. *Cancer Invest* 2008; 26: 822-829
- 54 孙晓杰, 黄常志. PI3K-Akt信号通路与肿瘤. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 306-311
- 55 Liu Z, Wang X, Lu Y, Han S, Zhang F, Zhai H, Lei T, Liang J, Wang J, Wu K, Fan D. Expression of 15-PGDH is downregulated by COX-2 in gastric cancer. *Carcinogenesis* 2008; 29: 1219-1227
- 56 Yu J, Tang BD, Leung WK, To KF, Bai AH, Zeng ZR, Ma PK, Go MY, Hu PJ, Sung JJ. Different cell kinetic changes in rat stomach cancer after treatment with celecoxib or indomethacin: implications on chemoprevention. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 41-45
- 57 Harris RE, Beebe-Donk J, Alshafie GA. Similar reductions in the risk of human colon cancer by selective and nonselective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors. *BMC Cancer* 2008; 8: 237
- 58 Zhu YM, Azahri NS, Yu DC, Woll PJ. Effects of COX-2 inhibition on expression of vascular endothelial growth factor and interleukin-8 in lung cancer cells. *BMC Cancer* 2008; 8: 218
- 59 He Q, Luo X, Jin W, Huang Y, Reddy MV, Reddy EP, Sheikh MS. Celecoxib and a novel COX-2 inhibitor ON09310 upregulate death receptor 5 expression via GADD153/CHOP. *Oncogene* 2008; 27: 2656-2560
- 60 朱风尚, 陈锡美, 王毅军, 张霞. 罗非昔布对胃癌细胞BGC-823内在耐药的逆转作用. *同济大学学报(医学版)* 2007; 28: 25-29
- 61 Senzaki M, Ishida S, Yada A, Hanai M, Fujiwara K, Inoue S, Kimura T, Kurakata S. CS-706, a novel cyclooxygenase-2 selective inhibitor, prolonged the survival of tumor-bearing mice when treated alone or in combination with anti-tumor chemotherapeutic agents. *Int J Cancer* 2008; 122: 1384-1390
- 62 盛传伦, 孙步彤. NSAIDs对胃癌移植瘤的抑制作用及对COX-2、VEGF、NF- κ B表达的影响. *中国实验诊断学* 2006; 10: 575-577
- 63 Wick M, Hurteau G, Dessev C, Chan D, Geraci MW, Winn RA, Heasley LE, Nemenoff RA. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ is a target of nonsteroidal anti-inflammatory drugs mediating cyclooxygenase-independent inhibition of lung cancer cell growth. *Mol Pharmacol* 2002; 62: 1207-1214
- 64 Pang RP, Zhou JG, Zeng ZR, Li XY, Chen W, Chen MH, Hu PJ. Celecoxib induces apoptosis in COX-2 deficient human gastric cancer cells through Akt/GSK3 β /NAG-1 pathway. *Cancer Lett* 2007; 251: 268-277
- 65 Farooq M, Haq I, Qureshi AS. Cardiovascular risks of COX inhibition: current perspectives. *Expert Opin Pharmacother* 2008; 9: 1311-1319
- 66 Grosser T. The pharmacology of selective inhibition of COX-2. *Thromb Haemost* 2006; 96: 393-400

■同行评价

本文较系统地综述了COX-2与胃癌的关系研究进展, 文章条理清晰, 参考文献引用恰当, 对胃癌的基础与临床研究有一定参考价值。

编辑 李军亮 电编 何基才

CD8+CTL在乙型肝炎发病作用中的研究现状及进展

赵永晓, 冯丽英

■背景资料

乙型肝炎的发病机制主要是机体清除HBV而引发的细胞免疫损伤。机体产生的针对HBV的CTL在病毒清除及肝细胞损伤方面均起关键作用。病毒感染短暂或持续、肝细胞损伤严重或轻微, 主要取决于CTL应答的广度和力度。

赵永晓, 冯丽英, 河北医科大学第二医院消化内科 河北省石家庄市 050000

作者贡献分布: 本综述由赵永晓书写完成, 冯丽英审校。

通讯作者: 冯丽英, 050000, 河北省石家庄市和平西路215号, 河北医科大学第二医院消化内科。hysfly888@163.com

电话: 0311-66002951

收稿日期: 2008-12-12 修回日期: 2009-01-08

接受日期: 2009-01-12 在线出版日期: 2009-02-08

Current status and advance of CD8+CTL in occurrence of hepatitis B

Yong-Xiao Zhao, Li-Ying Feng

Yong-Xiao Zhao, Li-Ying Feng, Department of Gastroenterology, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China

Correspondence to: Li-Ying Feng, Department of Gastroenterology, the Second Hospital of Hebei Medical University, 215 Heping West Road, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China. hysfly888@163.com

Received: 2008-12-12 Revised: 2009-01-08

Accepted: 2009-01-12 Published online: 2009-02-08

Abstract

The cellular immune response is thought to play a critical role in viral clearance and disease pathogenesis during HBV infection. Cytotoxic T-lymphocytes (CTLs) response to HBV plays a key role in the viral clearance and liver cell injuries. As a main subpopulation of CTL, CD8+CTL can eliminate viral through cytotoxic mechanism and non-cytotoxic mechanism. In acute hepatitis B, the CTL response is polyclonal and multispecific, which can eliminate the virus in time; but the CTL response is monoclonal and monospecific in chronic HBV infection, which causes persistent HBV infection. This may be concerned with the dysfunction and insufficiency of the CD8+CTL.

Key Words: Hepatitis B virus; CD8+CTL; Dysfunction

Zhao YX, Feng LY. Current status and advance of CD8+CTL in occurrence of hepatitis B. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2009; 17(4): 384-388

摘要

乙型肝炎的发病机制主要是机体清除乙肝病

毒(hepatitis B virus, HBV)而引发的细胞免疫损伤。机体产生的针对HBV的细胞毒性T细胞(cytotoxic T cell, CTL)在病毒清除及肝细胞损伤方面均起关键作用。CD8+CTL是CTL的主要功能亚群, 他们通过细胞毒机制和非细胞毒机制清除病毒。在急性自限性HBV感染时, CTL应答呈多克隆性和多特异性, 能够及时清除病毒; 而在慢性HBV感染时, CTL应答呈单克隆性和寡特异性, 导致HBV持续感染。慢性HBV感染可能与CD8+CTL数量不足及功能缺陷有关。

关键词: 乙型肝炎病毒; CD8+CTL; 功能缺陷

赵永晓, 冯丽英. CD8+CTL在乙型肝炎发病作用中的研究现状及进展. 世界华人消化杂志 2009; 17(4): 384-388

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/384.asp>

0 引言

乙型肝炎的发病机制尚不十分明确, 亦无特殊治疗方法, 抗病毒治疗只能抑制病毒复制, 不能彻底地清除病毒, 因此阐明乙型肝炎的发病机制尤为重要。目前认为, 乙型肝炎的发病机制主要是机体清除乙肝病毒(hepatitis B virus, HBV)而引发的细胞免疫损伤。机体产生的针对HBV的细胞毒性T细胞(cytotoxic T cell, CTL)在清除病毒中发挥关键作用。HBV特异性CTL对感染肝细胞的识别被认为是引起肝细胞损伤和清除病毒的中心环节。病毒感染短暂或持续、肝细胞损伤的严重或轻微, 主要取决于CTL应答的广度和力度^[1]。本文就CTL在乙型病毒性肝炎发病中作用的研究现状作一综述。

1 CTL的结构、分型

细胞免疫功能的执行者是T淋巴细胞, 而CD4+T细胞和CD8+T细胞代表两类主要的T细胞亚群。其中CD8+T细胞可分为幼稚型和效应/记忆型, CTL是其效应阶段, 也是CD8+T细胞的主要功能亚群。根据膜表面抗原分子及T细胞抗原受体(TCR)的不同将CTL分为3个亚群: (1)CD3+CD4-CD8+细胞, 即CD8+CTL, 他通过

■同行评议者

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

TCR $\alpha\beta$ 识别靶细胞特异性抗原和 I 类MHC分子; (2)CD3+CD4+CD8-细胞, 即CD4+CTL, 他通过TCR $\alpha\beta$ 识别靶细胞特异性抗原和 II 类MHC分子; (3)CD3+CD4-CD8-TCR $\gamma\delta$ +细胞, 即NKT细胞, 是MHC非限制性的T细胞; 其中CD8+CTL是机体细胞免疫的主要效应细胞^[2]. 静止的CTL以前体细胞形式存在, 在识别并结合靶细胞表面抗原多肽-MHC- I 类分子复合物后, 活化为抗原特异性的CTL效应细胞, 发挥特异性杀伤靶细胞的功能. CD8+CTL在细胞免疫中具有重要作用, 特别是在抗病毒、抗胞内感染的作用尤为明显.

2 CTL抗病毒的作用机制

CTL通过对病毒相关抗原表位的识别、活化后, 可以通过两种不同的机制清除病毒: (1)细胞毒机制: 经穿孔素、颗粒酶途径杀伤感染肝细胞, 或通过Fas/FasL途径启动靶细胞的凋亡, 在清除病毒的同时可造成感染肝细胞的损伤, 以上两种细胞毒途径可以独立存在, 也可以协同作用; (2)非细胞毒机制: 通过分泌细胞因子IFN- γ 、TNF- α 等清除细胞内病毒而不杀伤感染肝细胞.

2.1 细胞毒机制 人体被HBV感染后, MHC- I 类抗原限制的CD8+CTL可以通过2条细胞毒途径清除HBV: 一是通过穿孔素和颗粒酶途径, 使感染的肝细胞溶解破坏的同时清除HBV: CTL被激活后, 其细胞内的穿孔素以及其他介质以脱颗粒形式释放出来, 在Ca²⁺的作用和中性pH条件下, 以单聚体的形式与靶细胞膜结合, 在靶细胞膜上形成管状结构, 导致膜的完整性受损, 一些电解质和大分子物质流出胞外, 致使靶细胞因渗透压改变而溶解死亡^[3]. 颗粒酶是CTL胞内颗粒中的一类丝氨酸蛋白酶, 可经穿孔通道进入细胞而促进杀伤作用. 同时穿孔素还可以促发靶细胞对颗粒酶快速的内饮作用. 二者可独立或协同作用. 二是通过Fas途径介导靶细胞凋亡: CTL识别抗原时诱导自身表达FasL, 并与靶细胞表面Fas结合, 启动凋亡信号, 活化细胞死亡程序, 介导靶细胞凋亡而清除HBV. 后者在清除病毒时, 无细胞内容物(如溶酶体酶)外漏, 可保护正常组织细胞免遭损害, 并能激活内源性核酸内切酶可降解病毒DNA, 阻止靶细胞死亡所释放的病毒再度感染旁邻正常细胞, 在抗病毒感染中具有更重要的生物学意义.

CD8+CTL通过细胞毒机制清除HBV的作用特点是: (1)杀伤效应具有抗原特异性, 且受MHC- I 类分子限制; (2)可连续杀伤靶细胞, 杀伤效率高. 对靶细胞进行攻击后的CTL细胞与裂

解的靶细胞分离后, 又可继续攻击其他的靶细胞, 一个CTL细胞在几小时内可以杀伤数十个靶细胞.

2.2 非细胞毒机制 CTL效应功能除能以细胞毒性破坏感染细胞清除HBV外, 还能产生细胞因子通过非细胞毒效应抑制病毒基因的表达和复制^[1]而不引起细胞损伤. 免疫系统在识别病毒抗原后分泌抗病毒的细胞因子IFN- γ 、TNF- α 和IL-2等, 这些因子通过作用于肝细胞, 使肝细胞应答细胞因子诱导的信号和激活特定的细胞内信号转导途径发挥抗病毒作用, 并能增强抗原提呈及NK细胞、单核巨噬细胞对病毒的杀伤吞噬作用.

3 CTL在急性HBV感染中的作用

急性HBV感染时, HLA- I 分子限制的CTL对病毒外膜、衣壳和多聚酶蛋白的多个抗原表位有活跃的特异的CTL应答, 表现为多克隆性(指一株CTL能识别多个表位进行应答)和多特异性(指多个TCR能与一个MHC-抗原肽复合体相互作用), 在清除病毒同时伴随着肝细胞的损伤^[1].

由于HBV不能在体外组织培养中生长, 而黑猩猩是惟一能被感染的动物, 这些缺陷一直阻碍了HBV感染免疫病理的研究^[4]. 迄今的研究认为急性HBV感染时CD8+T细胞在病毒的清除和发病中均起主要作用. Thimme *et al*^[5]通过分别对CD4+T和CD8+T缺失的黑猩猩研究就证明了这一点. 急性乙型肝炎患者的体内可测到较高频率的CTL群体, 这部分细胞具有分泌穿孔素、颗粒酶及IFN- γ 的能力, 也说明当病毒侵入机体后, 特异性CTL可通过细胞毒途径和非细胞毒途径抑制病毒复制并清除病毒. 也有研究认为在急性HBV感染中非细胞毒机制更早于细胞毒机制发挥抗HBV作用. Guidotti *et al*^[6]对急性乙型肝炎黑猩猩模型进行研究, 通过对其进行每周采血和肝脏穿刺发现, 感染后约8 wk肝内的各种HBV DNA分子, 包括cccDNA达峰值, 此后迅速降低, 同时第8周出现IFN- γ mRNA, 并逐渐升高. 在病毒的降低过程中并无ALT升高或肝组织病变, 直至10-12 wk开始出现炎症, 表明肝内病毒清除与肝细胞损伤不是同时发生, HBV清除在肝损伤前开始, 但是病毒的清除与IFN- γ mRNA同时出现. 由此推测机体可能在感染病毒的早期存在一种有效的清除HBV而不引起肝细胞损伤的机制, 而这种机制可能与IFN- γ 有密切关系.

4 CTL在慢性HBV感染中的作用

慢性HBV感染时, 1个克隆的CTL只对病毒的单

■ 研发前沿

急性自限性乙型肝炎患者体内可以观察到强烈的多克隆、多特异性的CTL应答, 可以及时清除病毒; 而在慢性乙型肝炎患者体内CTL应答很弱或检测不到, 是单克隆性、寡特异性的, 导致病毒持续存在, 病程迁延. HBV特异性CTL功能缺陷, 应答的减弱是乙型肝炎病毒持续存在、感染慢性化的主要原因.

■相关报道

Lau *et al* 在临床研究发现, 进行骨髓移植或外周血干细胞移植时, 慢性乙型肝炎患者在接受了对HBV有免疫力的骨髓后, 可以清除体内的HBsAg, 有一部分甚至发生了HBsAg的血清学转换, 而且已经证实受者体内的T细胞来源于供者。

一或少数表位应答, 且应答性很弱, CTL应答呈单克隆性和寡特异性, 因此感染得以持续, 肝内炎症和肝细胞损伤也较轻微^[1]。在慢性HBV的感染过程中, CTL数量不足及功能缺陷影响了CTL的功能, 导致机体不能及时清除病毒。

4.1 CTL数量不足与慢性HBV感染 在对黑猩猩的研究中发现, 感染乙肝病毒之前去除体内的CD8+T细胞, 可以导致病毒的持续感染和病毒的高复制^[5]。这说明足够的CD8+T细胞在病毒的清除方面起着关键的作用。

既往研究表明急性自限性HBV感染患者体内出现强烈而多克隆的CTL反应, 同时伴随血清转氨酶升高及肝脏病理损害, 进而引起HBV的清除; 而在慢性乙肝患者体内CTL反应非常微弱甚至检测不到^[7]。Maini *et al*^[8]及Sobao *et al*^[9]研究发现, 在病毒载量高的患者外周血中, 表位特异性的CTL很低, 而且即使在病毒载量低、anti-HBe(+)的患者外周血中并不都能检测出表位特异性的CTL。可能的原因: (1)病毒特异性CTL优先隔室在肝内, 外周血中特异性CTL相对减少。(2)慢性肝炎病程长, 清除病毒过程中消耗了大量的特异性CTL, 致使特异性CTL处于耗竭状态。(3)特异性CTL的数量低于检测标准。(4)检测方法不敏感。然而病毒抗原特异性CTL的研究是揭示病毒性肝炎免疫发病机制的关键, 了解抗原特异性CTL的数量及功能变化有利于阐明病毒性肝炎的发病机制, 也有利于抗病毒治疗过程中机体免疫状态的检测^[10]。近年来MHC/肽四聚体复合物(tetramer)技术为检测表位特异性CTL提供了定量标准^[11], 也为进一步了解慢性HBV感染患者表位特异性CTL与病毒复制及肝脏损害之间的相关性提供了可能。

4.2 CTL功能缺陷与慢性HBV感染 通过tetramer技术结合胞内因子染色分析, 发现比单纯tetramer方法所得到的表位特异性CTL要多。在这些能被tetramer检测出的CTL中, 有的不具有分泌细胞因子或穿孔素的能力, 表明慢性乙肝患者外周血的CTL数量不能反映其功能, 体内存在的CTL数量并不能代表机体的免疫状态。在慢性乙肝患者体内, HBcAg18-27特异性CTL可以被检测到, 但这部分表位特异性的CTL存在着功能缺陷, 其产生穿孔素、颗粒酶及IFN- γ 的能力低下甚至缺失^[12]。Maini *et al*^[8]也报道, 病毒载量低、ALT正常的慢性乙肝患者, HBV特异性CD8+T细胞占循环中CD8+T细胞频度高, 表现为静止

性表型, 但在体外抗原刺激下, 体外增殖能力迅速增加、IFN- γ 的产生及细胞毒活性增强; 而病毒载量高、ALT升高的慢性乙肝患者, HBV特异性CD8+T细胞占循环中CD8+T细胞频度低, 而且在体外抗原刺激下, 增殖能力低下。这种病毒特异性CTL的功能缺陷在HIV、CMV中也有报道^[13-14]。

CTL功能缺陷可能的原因: (1)病毒的高复制状态。在感染LCMV(淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒)的动物模型中发现, 持续的高病毒复制可以导致T细胞功能的逐渐丧失^[15]。在临床试验中发现HBV特异性CTL的反应强度与血清的病毒载量呈负相关, 在低病毒载量时可以检测到较强的T细胞反应, 在较高病毒载量时, T细胞反应很弱, 甚至检测不到^[16]。You *et al*^[17]还报道T细胞的功能缺陷与血清病毒载量呈明显的直线相关, 高病毒载量在T细胞的低反应中起重要作用。(2)病毒变异影响CTL对病毒的识别。Webster *et al*^[18]在研究中发现HBcAg特异性CD8+T细胞的缺失可能是病毒变异引起来的。(3)CD4+T细胞不足, 因为CD8+T细胞功能的充分发挥需要CD4+T细胞的辅助。(4)抑制性受体的表达。程序性死亡受体-1(programmed death 1, PD-1)是CD28共刺激家族中的一种抑制性受体, 可以被T细胞表达^[19]。他的配体PD-L1表达在肝脏中的抗原提呈细胞, PD-L1与PD-1相互作用导致T细胞抗病毒功能的抑制和T细胞的凋亡^[20]。通过给LCMV感染的小鼠注射封闭PD-1或PD-L1的抗体可以恢复LCMV特异性CD8+T的分泌细胞因子的能力及细胞毒性, 也引起病毒载量的显著降低^[21]。在给HBV转基因小鼠注射PD-L1的封闭抗体后也发现肝脏中的CTL分泌IFN- γ 增多^[14, 22]。在临床研究中也发现阻断了PD-1与PD-L1的反应可以引起HBcAg特异性CD8+T细胞数量上的增加和扩增能力的增强。这说明PD-1与PD-L1的反应抑制了病毒特异性CTL的功能。(5)凋亡相关蛋白的高表达。Lopes *et al*^[23]研究发现凋亡前体蛋白Bim在慢性乙型肝炎患者中的HBV特异性CD8+T中的表达是上调的, 通过阻断Bim介导的细胞凋亡, 可以恢复HBV特异性CD8+T的功能。(6)T细胞功能缺陷与调节性T细胞(CD4+CD25+T)有一定关系^[24]。调节性T细胞在预防免疫病理损伤的同时也参与了病毒的持续感染。

5 结论

HBV感染后病毒的清除与宿主特异性的CTL应

答的强度及宽度密切相关. 急性自限性乙肝患者体内可以观察到强烈的多克隆、多特异性的CTL应答, 可以及时清除病毒; 而在慢性乙肝患者体内CTL应答很弱或检测不到, 是单克隆性、寡特异性的, 导致病毒持续存在, 病程迁延. HBV特异性CTL功能缺陷, 应答的减弱是乙肝病毒持续存在、感染慢性化的主要原因. 宿主的特异性细胞免疫状态决定了HBV感染后的临床转归. 通过一些免疫调节治疗可以恢复CTL的功能, 这为我们治疗慢性HBV感染提供了新的方向. 在临床研究发现, 进行骨髓移植或外周血干细胞移植时, 慢性乙型肝炎患者在接受了对HBV有免疫力的供者(Anti-HBs和/或Anti-HBc阳性)的骨髓后, 可以清除体内的HBsAg, 有一部分受者甚至发生了HBsAg的血清学转换, 产生乙肝表面抗体, 而且通过染色体检测, 已经证实受者体内的T细胞来源于供者^[25]. Luo *et al*^[26]在肝移植中也有类似发现. 这说明慢性乙型肝炎患者特异性的细胞免疫功能障碍, 一旦获得正常的细胞免疫功能, 就能及时清除病毒, 这为我们对乙肝患者进行特异性的免疫治疗提供了新的理论依据.

6 参考文献

- 1 骆抗先. 乙型肝炎基础和临床. 第3版. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 123-127
- 2 龚非力. 医学免疫学. 第2版. 北京: 科学出版社, 2004: 151-152
- 3 Keefe D, Shi L, Feske S, Massol R, Navarro F, Kirchhausen T, Lieberman J. Perforin triggers a plasma membrane-repair response that facilitates CTL induction of apoptosis. *Immunity* 2005; 23: 249-262
- 4 Wieland SF, Spangenberg HC, Thimme R, Purcell RH, Chisari FV. Expansion and contraction of the hepatitis B virus transcriptional template in infected chimpanzees. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 2129-2134
- 5 Thimme R, Wieland S, Steiger C, Ghayeb J, Reimann KA, Purcell RH, Chisari FV. CD8(+) T cells mediate viral clearance and disease pathogenesis during acute hepatitis B virus infection. *J Virol* 2003; 77: 68-76
- 6 Guidotti LG, Rochford R, Chung J, Shapiro M, Purcell R, Chisari FV. Viral clearance without destruction of infected cells during acute HBV infection. *Science* 1999; 284: 825-829
- 7 Jung MC, Pape GR. Immunology of hepatitis B infection. *Lancet Infect Dis* 2002; 2: 43-50
- 8 Maini MK, Boni C, Lee CK, Larrubia JR, Reignat S, Ogg GS, King AS, Herberg J, Gilson R, Alisa A, Williams R, Vergani D, Naoumov NV, Ferrari C, Bertolotti A. The role of virus-specific CD8(+) cells in liver damage and viral control during persistent hepatitis B virus infection. *J Exp Med* 2000; 191: 1269-1280
- 9 Sobao Y, Tomiyama H, Sugi K, Tokunaga M, Ueno T, Saito S, Fujiyama S, Morimoto M, Tanaka K, Takiguchi M. The role of hepatitis B virus-specific memory CD8 T cells in the control of viral replication. *J Hepatol* 2002; 36: 105-115
- 10 Boni C, Penna A, Ogg GS, Bertolotti A, Pilli M, Cavallo C, Cavalli A, Urbani S, Boehme R, Panebianco R, Fiaccadori F, Ferrari C. Lamivudine treatment can overcome cytotoxic T-cell hyporesponsiveness in chronic hepatitis B: new perspectives for immune therapy. *Hepatology* 2001; 33: 963-971
- 11 Tsai SL, Lee TH, Chien RN, Liao SK, Lin CL, Kuo GC, Liaw YF. A method to increase tetramer staining efficiency of CD8+ T cells with MHC-peptide complexes: therapeutic applications in monitoring cytotoxic T lymphocyte activity during hepatitis B and C treatment. *J Immunol Methods* 2004; 285: 71-87
- 12 张蓓, 付晓岚, 王靖雪, 韩俊峰, 吴玉章. 乙型肝炎患者HBcAg18-27表位特异性细胞毒性T细胞的研究. *免疫学杂志* 2007; 23: 319-330
- 13 Kakimi K, Isogawa M, Chung J, Sette A, Chisari FV. Immunogenicity and tolerogenicity of hepatitis B virus structural and nonstructural proteins: implications for immunotherapy of persistent viral infections. *J Virol* 2002; 76: 8609-8620
- 14 Yang PL, Althage A, Chung J, Chisari FV. Hydrodynamic injection of viral DNA: a mouse model of acute hepatitis B virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 13825-13830
- 15 Wherry EJ, Blattman JN, Murali-Krishna K, van der Most R, Ahmed R. Viral persistence alters CD8 T-cell immunodominance and tissue distribution and results in distinct stages of functional impairment. *J Virol* 2003; 77: 4911-4927
- 16 Boni C, Fiscaro P, Valdatta C, Amadei B, Di Vincenzo P, Giuberti T, Laccabue D, Zerbini A, Cavalli A, Missale G, Bertolotti A, Ferrari C. Characterization of hepatitis B virus (HBV)-specific T-cell dysfunction in chronic HBV infection. *J Virol* 2007; 81: 4215-4225
- 17 You J, Sriplung H, Geater A, Chongsuvivatwong V, Zhuang L, Chen HY, Yu L, Tang BZ, Huang JH. Effect of viral load on T-lymphocyte failure in patients with chronic hepatitis B. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 1112-1119
- 18 Webster GJ, Reignat S, Brown D, Ogg GS, Jones L, Seneviratne SL, Williams R, Dusheiko G, Bertolotti A. Longitudinal analysis of CD8+ T cells specific for structural and nonstructural hepatitis B virus proteins in patients with chronic hepatitis B: implications for immunotherapy. *J Virol* 2004; 78: 5707-5719
- 19 Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH. The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol* 2005; 23: 515-548
- 20 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
- 21 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
- 22 Maier H, Isogawa M, Freeman GJ, Chisari FV. PD-1: PD-L1 interactions contribute to the functional suppression of virus-specific CD8+ T lymphocytes

■创新盘点

本文着重介绍慢性乙型肝炎患者特异性细胞免疫状态, 特别是CTL的功能障碍, 进一步阐明了HBV持续感染的原因及机制.

■同行评价

本文对CTL在乙型病毒性肝炎免疫发病中的作用进行了综述,内容详实准确,提供了许多有意义的新信息。

- in the liver. *J Immunol* 2007; 178: 2714-2720
- 23 Lopes AR, Kellam P, Das A, Dunn C, Kwan A, Turner J, Peppas D, Gilson RJ, Gehring A, Bertoletti A, Maini MK. Bim-mediated deletion of antigen-specific CD8 T cells in patients unable to control HBV infection. *J Clin Invest* 2008; 118: 1835-1845
- 24 Stoop JN, van der Molen RG, Baan CC, van der Laan LJ, Kuipers EJ, Kusters JG, Janssen HL. Regulatory T cells contribute to the impaired immune response in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology* 2005; 41: 771-778
- 25 Lau GK, Suri D, Liang R, Rigopoulou EI, Thomas MG, Mullerova I, Nanji A, Yuen ST, Williams R, Naoumov NV. Resolution of chronic hepatitis B and anti-HBs seroconversion in humans by adoptive transfer of immunity to hepatitis B core antigen. *Gastroenterology* 2002; 122: 614-624
- 26 Luo Y, Lo CM, Cheung CK, Lau GK, Fan ST, Wong J. Identification of hepatitis B virus-specific lymphocytes in human liver grafts from HBV-immune donors. *Liver Transpl* 2007; 13: 71-79

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志性质、刊登内容及目标

本刊讯 《世界华人消化杂志(国际标准刊号ISSN 1009-3079, 国内统一刊号CN 14-1260/R, Shijie Huaren Xiaohua Zazhi/World Chinese Journal of Digestology)》, 是一本由来自国内23个省、市、自治区、特别行政区的496位胃肠病学和肝病专家支持的开放存取的同行评议的旬刊杂志, 旨在推广国内各地的胃肠病学和肝病领域临床实践和基础研究相结合的最具有临床意义的原创性及各类评论性的文章, 使其成为一种公众资源, 同时科学家、医生、患者和学生可以通过这样一个不受限制的平台来免费获取全文, 了解其领域的所有的关键的进展, 更重要的是这些进展会为本领域的医务工作者和研究者服务, 为他们的患者及基础研究提供进一步的帮助。

除了公开存取之外, 《世界华人消化杂志》的另一大特色是对普通读者的充分照顾, 即每篇论文都会附带有一组供非专业人士阅读的通俗易懂的介绍大纲, 包括背景资料、研发前沿、相关报道、创新盘点、应用要点、名词解释、同行评价。

《世界华人消化杂志》报道的内容包括食管、胃、肠、肝、胰肿瘤, 食管疾病、胃肠及十二指肠疾病、肝胆疾病、肝脏疾病、胰腺疾病、感染、内镜检查法、流行病学、遗传学、免疫学、微生物学, 以及胃肠道运动对神经的影响、传递、生长因素和受体、营养肥胖、成像及高科技技术。

《世界华人消化杂志》的目标是出版高质量的胃肠病学和肝病领域的专家评论及临床实践和基础研究相结合具有实践意义的文章, 为内科学、外科学、感染病学、中医药学、肿瘤学、中西医结合学、影像学、内镜学、介入治疗学、病理学、基础研究等医生和研究人员提供转换平台, 更新知识, 为患者康复服务。(常务副总编辑: 张海宁 2009-02-08)

Th17细胞在炎症性肠病发生过程中的免疫病理作用

杨丽, 刘占举

杨丽, 刘占举, 郑州大学第二附属医院消化内科 河南省郑州市 450014

杨丽, 郑州人民医院消化内科 河南省郑州市 450003

国家自然科学基金资助项目, No. 30770988

教育部新世纪优秀人才支持计划基金资助项目, No. NCET-05-0609

卫生部科学研究基金资助项目, No. WKJ2008-2-001

通讯作者: 刘占举, 450014, 河南省郑州市经八路2号, 郑州大学第二附属医院消化内科. zhanju@yeahoo.com

电话: 0371-63939084 传真: 0371-63934118

收稿日期: 2008-11-28 修回日期: 2009-01-09

接受日期: 2009-01-19 在线出版日期: 2009-02-08

Immunopathological role of Th17 cells in development of inflammatory bowel disease

Li Yang, Zhan-Ju Liu

Li Yang, Zhan-Ju Liu, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450014, Henan Province, China

Li Yang, Department of Gastroenterology, People's Hospital of Zhengzhou, Zhengzhou 450003, Henan Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30770988; and the New Century Talent Supporting Scheme Projects of the Ministry of Education, No. NCET-05-0609; and the Science Research Foundation of Ministry of Health, No. WKJ2008-2-001

Correspondence to: Prof. Zhan-Ju Liu, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Zhengzhou University, 2 Jingba Road, Zhengzhou 450014, Henan Province, China. zhanju@yeahoo.com

Received: 2008-11-28 Revised: 2009-01-09

Accepted: 2009-01-19 Published online: 2009-02-08

Abstract

Th17 cells are identified as a new subset of T helper cells unrelated to Th1 or Th2 cells, and several cytokines are involved in regulating their activation and differentiation. Th17 cells not only play an important role in host defense against extracellular pathogens, but also are associated with the development of autoimmunity and inflammatory response. Although the etiology of inflammatory bowel disease remains unclear, accumulating evidence suggests that the abnormality of innate and adaptive immunity responses plays an important role in intestinal inflammation. The identification of Th17 cells help us to explain some of the anomalies seen

in the Th1/Th2 axis and has broadened our understanding of the immunopathological effects of Th17 cells in the IBD development.

Key Words: Th17 cells; Inflammatory bowel disease; Immunopathological role

Yang L, Liu ZJ. Immunopathological role of Th17 cells in development of inflammatory bowel disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(4): 389-394

摘要

Th17细胞是最近发现的一种与Th1和Th2细胞亚群无关的新的辅助性T细胞亚群, 其分化调节与多种细胞因子有关, 可以清除特定的细胞外病原体起到保护作用, 对自身抗原的特异性又可导致炎症和自身免疫性疾病发生. 炎症性肠病的具体发病机制尚未阐明, 但研究发现先天性和获得性免疫反应在肠道炎症中起着重要作用, 而Th17细胞的发现有助于解释一些Th1/Th2轴中的异常现象, 更好的认识Th17细胞在炎症性肠病发生过程中的免疫病理作用.

关键词: Th17细胞; 炎症性肠病; 免疫病理作用

杨丽, 刘占举. Th17细胞在炎症性肠病发生过程中的免疫病理作用. *世界华人消化杂志* 2009; 17(4): 389-394

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/389.asp>

0 引言

CD4⁺ T细胞在辅助多种细胞启动发生免疫反应中起着重要作用, 当抗原刺激后, 原始CD4⁺ T细胞活化扩增并分化为可以产生干扰素γ(interferon gamma, IFN-γ)和淋巴毒素(lymphotoxin, LT), 增强细胞内病原体清除, 有效激活细胞介导的免疫反应的Th1细胞群; 同时还可以分泌IL-4和IL-13, 启动B细胞介导的免疫反应, 清除细胞外病原体的Th2细胞群^[1]. 近来对IL-17细胞因子家族和IL-23细胞因子的研究, 发现了一种新的Th细胞亚群, 即Th17细胞. 与Th1和Th2细胞亚群相似的是Th17细胞在转录分化过程中也需要特异性的细胞因子. 虽然对这类新的细胞亚群功能尚未完全了解, 但已有研究

■背景资料

Th17细胞是最近发现的一种与Th1和Th2细胞亚群无关的新的细胞辅助性T细胞亚群, 在防御胞外细菌感染的免疫应答、介导慢性炎症和自身免疫性疾病的发病机制中发挥重要作用. 炎症性肠病的发病机制目前仍未弄清, 但是大量研究已经证实先天性和获得性免疫反应在肠道炎症中起着重要作用, 而Th17细胞的发现有助于解释一些Th1/Th2轴中的异常现象, 更好的认识Th17细胞在炎症性肠病发生中的免疫病理作用.

■同行评议者

张小晋, 主任医师, 北京积水潭医院消化内科

■ 研发前沿

Th17细胞近来逐渐被认为是一个独立的辅助性T细胞亚群, Th17细胞的发现拓宽了对人类炎症疾病形成过程的认识, 有助于解释一些Th1/Th2轴中的异常现象, 更好的认识Th17细胞平衡在自身免疫性疾病介导组织损伤中的作用。

显示Th17细胞亚群可以对一些Th1和Th2型免疫不能清除的细胞外病原体有显著的宿主保护作用, 同时又在动物实验阶段证实Th17细胞也有显著的促炎作用, 对自身抗原的特异性亦可导致多种自身免疫性疾病的发生^[2], 本文重点讨论Th17细胞的免疫学特征及其在炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)发病机制中的免疫病理作用。

1 Th17细胞

最初认为Th17细胞和Th1细胞是相关的, 在不同的细胞因子作用下由共同的Th1前体细胞分化而来, 但是大量研究显示Th17细胞是与Th1和Th2细胞无关的一类独特亚群^[3-5]。Th17细胞主要产生IL-17A和IL-17F, 以及少量的TNF和IL-6, 其中IL-17A是Th17细胞发挥免疫调节作用的主要效应因子。IL-17是最近发现的一个新的细胞因子家族中的一员, 该细胞因子家族包括IL-17A、IL-17B、IL-17C、IL-17D、IL-17E(IL-25)和IL-17F。已经证实, IL-17在体内外均是强效的炎症因子, 具有多种生物学活性, 可以通过诱导促炎因子(如IL-6、TNF)、化学因子(如KC、MCP-1和MIP-2)以及基质金属蛋白酶等促进组织炎症发生^[3]。IL-17还涉及参与中性粒细胞的增生、成熟和趋化作用^[6]。体外研究显示IL-17受体(IL-17R)缺陷小鼠由于缺少中性粒细胞的募集作用而更容易导致肺部感染, 同样IL-17在肺组织内过度表达也可促进白细胞释放过多化学因子引起组织炎症^[7]。IL-17还可以刺激T细胞, 促进树突细胞成熟^[3,5]。虽然IL-17是在获得性免疫应答过程中产生, 但是与IL-1 β 、TNF或Toll-like受体(TLR)相似, 其通过诱导一些先天性免疫介质如IL-6、急性时相蛋白、G-CSF和前列腺素E2而发挥先天性免疫作用。因此, IL-17是通过获得性免疫与先天性免疫系统联合的方式来促进炎症的发生, 并且也像大多数炎症因子一样主要是在体外发挥作用。

2 Th17细胞的分化和调节

最初研究认为IL-23可以诱导Th17细胞分化^[2,8], IL-23是IL-12异二聚体细胞因子家族中的一员, 除与IL-12一样都拥有共同p40亚单元外还含有独特的p19亚单元。IL-23通过IL-12R β 1和IL-23R异二聚体受体复合物来发送信号^[9], 由于他和IL-12拥有共同的p40亚单元和IL-12R β 1, 因此推测与IL-12作用相似可以启动Th1反应, 但是p19

缺陷小鼠可以促进正常的Th1反应, 却不能促进产IL-17细胞生成^[2,10]。另有研究发现IL-23基因敲除的小鼠几乎没有Th17细胞, 并且即使在没有IL-23因子的情况下产生正常Th17细胞, 他们也无法扩增和生存。因此, IL-23并不能诱导原始T细胞分化为Th17细胞, 而且原始T细胞中并没有IL-23受体的表达亦进一步证实这种观点^[11]。虽然IL-23并不能诱导原始T细胞分化为Th17细胞, 但却可以诱导Th17细胞增殖, 并且体外试验也发现IL-23可以为已经分化的Th17细胞提供生存信号^[12]。既然IL-23不是Th17细胞分化的必须因子, 那么哪种因子在起作用? 研究显示TGF- β 和IL-6可以激活原始T细胞分泌大量的IL-17, 且只有TGF- β 和IL-6同时大量存在的情况下才可以诱导原始T细胞分化为Th17细胞, 而后IL-23才可以促进分化后的Th17细胞增殖。在炎症状态下, IL-6或TGF- β 和IL-6同时存在可以上调Th17细胞表达IL-23R, 进而促进IL-23维持并加强Th17细胞的表达^[13-14]。此外体外实验亦证实, TGF- β 和IL-6同时存在促进Th17细胞分化的作用可以被IL-1和TNF进一步增强。Th17细胞分化增殖受许多细胞因子的影响, 体外实验研究发现中和IFN- γ 和IFN促进IL-23刺激的Th17细胞增殖, 而Th1和Th2细胞效应因子IFN- γ 和IL-4可以抑制IL-23刺激的Th17细胞增殖^[13]。此外, Th1和Th2细胞亚群增殖分化过程中的重要细胞因子IL-2也可以长期的干预Th17细胞的扩增存活。因此, 可以看出Th1和Th2细胞均能干预IL-23诱导的IL-17表达, 并能够显著抑制Th17细胞增殖。此外体内试验发现阻断体内TNF效应可以显著抑制IL-23和IL-17的表达^[15]。但是IL-4和IFN- γ 却不能直接抑制TGF- β 和IL-6启动的Th17细胞增殖分化。TGF- β 可以通过间接效应(阻滞先天免疫系统细胞产生的IFN- γ 和IL-4)以及直接作用于原始T细胞前体来促进Th17细胞增殖。且其可不依赖IL-23而诱导IL-17的表达, 并且IFN- γ 非但不能抑制TGF- β 对Th17细胞促生成作用, 反而在IFN- γ 存在时TGF- β 诱导IL-17的表达作用更强。

IL-27是另外一个IL-12家族成员, 对Th17细胞的形成有负调节作用^[16]。T细胞活化后在IL-27作用下可以诱导T-bet形成, 而T-bet是原始CD4⁺T细胞分化过程中的关键的转录因子。但是IL-27R缺陷的小鼠由于效应T细胞调节反应异常可以形成严重的免疫病理损害。IL-27介导的信号传导可以加重炎症恶化, 增强炎症组织中Th17细胞的生成和表达IL-17的T细胞增殖。IL-27

可以不依赖IL-6和TGF- β 信号途径而抑制IL-6和TGF- β 启动诱导的Th17细胞分化。而IL-27对Th17细胞的抑制效应需要转录因子STAT1的参与。虽然T-bet和抑制蛋白SOCS3并不参与IL-27介导的Th17细胞抑制作用,但是STAT1的下游因子可能参与^[17-18]。

在缺乏Th1和Th2特异性转录因子STAT1、STAT4、T-bet或STAT6小鼠中,分离出的CD4⁺T细胞,在活化的IL-23作用下仍可分化为Th17细胞。此外在缺乏STAT4、STAT6或T-bet的小鼠中Th17细胞仍可正常分化,说明这些转录因子并非是Th17细胞分化过程中所必须的^[19]。此外,Th17细胞并不表达转录因子T-bet、Hlx或GATA-3提示他们有可能是一种特殊的T辅助细胞。近年来研究证实至少一种转录因子ROR γ t涉及Th17细胞增殖,ROR γ t主要在胚胎淋巴组织诱导的细胞中表达,这些细胞参与淋巴结和Peyer's淋巴结,肠道淋巴组织和未成熟胸腺细胞的形成^[20]。分化的Th17细胞及肠道固有层产IL-17的T细胞也表达ROR γ t。ROR γ t缺陷的小鼠中这些细胞群也会缺如。在原始T细胞中转入ROR γ t编码的逆转录酶可以诱导IL-17的产生。这些都证实ROR γ t在Th17细胞分化中的作用。IL-17A和IL-17F都共同表达于Th17细胞,基因编码的这些分子也在同一个位点,因此,ROR γ t可能作为一个染色体重建因子打开IL-17位点,是其他因子共同结合在IL-17启动子,因此在Th17分化过程中ROR γ t可能与其他转录因子共同作用^[21]。而最近文献报道^[22]证实了这一点,Th17细胞中还高度表达ROR α ,而ROR α 在IL-6和TGF- β 作用下也可以促进Th17细胞分化,而且高度表达的ROR α 还可在ROR γ 缺陷的细胞中促进Th17细胞分化。

但是也有报道发现小鼠和人体中Th17的生物学作用并不相同,最初在人体内的两项研究^[23-24]显示,IL-6和IL-1 β (由单核细胞和传统的树突细胞产生)是Th17反应的关键因子而TGF- β 则不是,其中Acosta-Rodriguez *et al*^[23]还发现TGF- β 抑制IL-17的产生的作用。但是最近也有研究显示TGF- β 、IL-1 β 和IL-6、IL-21或IL-23都可以在人类脐血细胞中分离出的原始CD4⁺T细胞诱导产生IL-17。TGF- β 抑制ROR γ t诱导的IL-17表达^[25],但是这种抑制作用可以被炎症因子减轻,另一项研究显示TGF- β 和IL-1 β 、IL-6、IL-23一起促进Th17分化,还有研究显示TGF- β 增强外周T细胞中IL-17的产生^[26],从这种观点

来看,IL-1 β 和IL-6促进记忆CD4⁺T细胞,产生IL-17,而TGF- β 等其他炎症细胞因子促进原始CD4⁺T细胞分化为Th17细胞。

3 Th17细胞在炎症性肠病中的作用

Th17细胞亚群的发现拓宽了我们对人类炎症疾病形成过程的认识,有助于解释一些Th1/Th2轴中的异常现象,更好的认识Th17细胞平衡在自身免疫性疾病和免疫介导的组织损伤中的作用。20多年来,Th1细胞一直被认为在许多慢性炎症性疾病中介导组织破坏,但是一些动物模型实验证实这些细胞并不是自身免疫、过敏和微生物免疫中维持并起决定性作用的细胞,而IL-17有可能在其中起着主要作用。目前已发现既往被称为Th1型的疾病如现在根据动物实验结果认为其实是Th17细胞相关的疾病。

IBD包括溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)和克罗恩病(Crohn's disease, CD),虽然其具体发病机制尚不清楚,但是最近的研究^[27]显示肠道炎症中先天性和获得性免疫反应起着重要作用。CD患者的肠道炎症主要特征是由促炎因子IL-12启动的Th1细胞对肠道菌群的异常反应;而UC患者,肠黏膜的促炎症细胞因子主要是IL-4和IL-13等升高。IBD动物模型中已证实了这种假设,肠道炎症能够通过针对IL-12p40亚单位的mAb来阻断^[28]。IL-12同源细胞因子家族还包括IL-23和IL-27。像IL-12一样,IL-23主要由接触病原微生物而激活的树突细胞产生^[29]。认识到抗IL-12p40抗体可以中和IL-12和IL-23可以使我们重新评估他们在IBD发病过程中的作用。IBD动物模型中研究显示IL-23在肠道的慢性炎症中起着重要作用。应用针对p19亚单位的mAb选择性的清除IL-23,抑制IL-10基因敲除小鼠中自发性结肠炎的形成^[30-31]。已有报道CD和UC患者中肠道黏膜组织炎症部位中IL-23p19 mRNA表达增高显著增高,但在用激素治疗后临床症状明显改善的患者肠黏膜组织中IL-23p19 mRNA明显降低。此外,CD患者LP巨噬细胞可以产生大量的IL-23,而UC则没有。活动性CD和UC患者病变肠黏膜中CD3⁺T细胞和CD68⁺单核细胞和巨噬细胞中可以观察到IL-17的表达。活动性CD患者中IL-17⁺细胞数是正常对照组的20倍,是非活动性CD患者的4倍;相对于正常人,CD和UC患者血清中的IL-17也明显增高,并比非活动性IBD患者血清中的IL-17也升高^[32]。重组IL-23可以增强UC患者中LP-CD4⁺细胞产生IL-17,但对CD这

■相关报道

大量的研究报道认为Th17细胞是不同于Th1和Th2细胞亚群的第三类辅助性T细胞亚群。过去的20年,Th1细胞一直被认为在许多慢性炎症性疾病中介导组织破坏作用,但最近的报道认为既往被称为Th1型的疾病根据现在的动物实验结果则被认为是Th17细胞相关疾病。

■应用要点

本文介绍Th17细胞的分化调节及其在炎症性肠病发生中的免疫病理作用,对炎症性肠病的发病机制有更进一步的认识。

种作用却很弱,这更证实了UC患者中Th17免疫的显著特征;IL-23p19、IFN- γ 和IL-12p35在CD中显著上调,IFN- γ 或IL-12实际上可以抑制人类LP-CD4⁺ T细胞产生IL-17,因此可以推测,尽管CD患者中黏膜中也发现有Th17细胞,CD患者中Th1细胞产生过多的IFN- γ 可能对Th17细胞产生IL-17有负性调节作用,这更证实了传统观点中CD是一种Th1疾病,Th1通路通过多种机制来拮抗Th17通路.因此根据Th1/Th17平衡观点,UC患者可能是一种Th17疾病,而CD患者仍是经典的Th1型疾病,而黏膜中IL-23的表达增强可以调节UC和CD中的差异。

有证据显示IL-23/IL-17轴在正常肠道组织微环境稳定中起着重要作用,例如,在正常健康的小鼠中,IL-23主要在回肠末端固有层树突细胞中表达,而Th17细胞在肠道固有层中出现的频率显著高于在周围淋巴组织中出现的频率^[33].尽管他在IBD的发病机制中起着重要作用,IL-23可能在肠组织中起着重要的免疫保护作用.因而IL-23缺陷小鼠在肠道病原体枸橼酸菌感染后表现有较强的易感性和致死性^[33].有趣的是枸橼酸菌感染IL-23缺陷小鼠仍然可以产生强有力的Th17反应,提示IL-23介导的保护反应不需要涉及IL-17^[13].虽然一些研究显示在各种IBD模型中IL-23诱导的肠道病理常伴随有IL-17产物的增多,但炎症组织还伴有其他大量的炎症因子,包括IL-1 β 、IL-6、IFN- γ 和TNF^[31].此外,在许多T细胞依赖的IBD模型中,Th1细胞在固有层炎症组织中明显的占有优势,最后,IL-23可以启动由先天免疫系统细胞介导的慢性结肠炎,与这种假说一致即IL-23介导的肠道炎症不需要涉及Th17细胞^[31,34].

IL-17和Th17细胞在肠道病理和稳定性中的作用尚不十分清楚,IL-17在上皮层可能有某些保护作用,体外研究显示IL-17可以促进上皮细胞之间紧密连接增强^[35],用抗IL-17中和抗体可以加重DSS诱导的结肠炎严重性^[36].相反,最近的研究通过比较Th1细胞和Th17细胞对于小鼠诱导的结肠炎发现Th17细胞更具有显著的致病性^[37].在IL-10基因敲除小鼠,单用特异性的IL-17抗体并不能影响炎症产生,除非再加入IL-6抗体协同起效,说明在肠道IL-17和其他的炎症介质有协同增强作用^[34].最近的研究显示Th17细胞群内的潜在异质成分可以分泌IL-10,一种抑制肠道炎症的因子^[38].因而Th17细胞作用随所在环境中其他因子的不同而发挥不同的

作用.在正常的肠道黏膜组织中,Th17细胞的基本功能可能在维持上皮屏障功能中起到放哨作用;然而在慢性肠道炎症中,高浓度的IL-23可以充分发挥致病性和抗菌功能。

4 结论

通过揭示IL-23在IBD动物模型中肠道慢性炎症中的作用以及证实IL-23R对CD易感性的影响,为将来IBD的治疗提供了新的治疗靶点,炎症部位IL-23的选择性表达,提示以IL-23通路为靶点的治疗可以有效的发挥全身免疫保护性作用,而不是抑制全身免疫反应.最近的研究^[39]显示IL-23是有效的肿瘤启动因子,人类结肠癌中也发现IL-23的表达增高,因此抑制IL-23可以对IBD患者炎症促进的结肠癌发生起到预防性治疗作用.但是也需警惕IL-23阻断后黏膜感染增加的危险.小鼠模型和人类IBD患者中仍需进一步弄清IL-17和Th17细胞肠道稳定中的作用,此外小鼠IBD模型中的发现提示小鼠模型中组织特异性的自身免疫性疾病中IL-23/IL-17轴的病理机制在肠道中并非同一模式^[40].IL-23的效应远不止简单的增加Th17/IL-17在肠道中的反应,而是刺激先天性和获得性免疫反应.还有证据显示IL-17和其他的Th17细胞因子具有环境依赖性,根据局部组织中的其他因子来发挥保护性或致病性反应.因此可以通过了解肠道正常和炎症部位中的细胞因子网络,来减轻肠道炎症或刺激保护性免疫反应。

5 参考文献

- 1 Castellino F, Germain RN. Cooperation between CD4⁺ and CD8⁺ T cells: when, where, and how. *Annu Rev Immunol* 2006; 24: 519-540
- 2 Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, McClanahan T, Kastelein RA, Cua DJ. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med* 2005; 201: 233-240
- 3 Kolls JK, Linden A. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity* 2004; 21: 467-476
- 4 Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, Weaver CT. Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 2005; 6: 1123-1132
- 5 Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang YH, Wang Y, Hood L, Zhu Z, Tian Q, Dong C. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* 2005; 6: 1133-1141
- 6 Fossiez F, Djossou O, Chomarat P, Flores-Romo L, Ait-Yahia S, Maat C, Pin JJ, Garrone P, Garcia E, Saeland S, Blanchard D, Gaillard C, Das Mahapatra B, Rouvier E, Golstein P, Banchereau J, Lebecque

- S. T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *J Exp Med* 1996; 183: 2593-2603
- 7 Ye P, Rodriguez FH, Kanaly S, Stocking KL, Schurr J, Schwarzenberger P, Oliver P, Huang W, Zhang P, Zhang J, Shellito JE, Bagby GJ, Nelson S, Charrier K, Peschon JJ, Kolls JK. Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXCL chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. *J Exp Med* 2001; 194: 519-527
- 8 Aggarwal S, Ghilardi N, Xie MH, de Sauvage FJ, Gurney AL. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J Biol Chem* 2003; 278: 1910-1914
- 9 Langrish CL, McKenzie BS, Wilson NJ, de Waal Malefyt R, Kastelein RA, Cua DJ. IL-12 and IL-23: master regulators of innate and adaptive immunity. *Immunol Rev* 2004; 202: 96-105
- 10 Cua DJ, Sherlock J, Chen Y, Murphy CA, Joyce B, Seymour B, Lucian L, To W, Kwan S, Churakova T, Zurawski S, Wiekowski M, Lira SA, Gorman D, Kastelein RA, Sedgwick JD. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* 2003; 421: 744-748
- 11 Parham C, Chirica M, Timans J, Vaisberg E, Travis M, Cheung J, Pflanz S, Zhang R, Singh KP, Vega F, To W, Wagner J, O'Farrell AM, McClanahan T, Zurawski S, Hannum C, Gorman D, Rennick DM, Kastelein RA, de Waal Malefyt R, Moore KW. A receptor for the heterodimeric cytokine IL-23 is composed of IL-12R β 1 and a novel cytokine receptor subunit, IL-23R. *J Immunol* 2002; 168: 5699-5708
- 12 Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGF β in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 2006; 24: 179-189
- 13 Mangan PR, Harrington LE, O'Quinn DB, Helms WS, Bullard DC, Elson CO, Hatton RD, Wahl SM, Schoeb TR, Weaver CT. Transforming growth factor- β induces development of the T(H)17 lineage. *Nature* 2006; 441: 231-234
- 14 Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, Weiner HL, Kuchroo VK. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 2006; 441: 235-238
- 15 Liu Z, Jiu J, Liu S, Fa X, Li F, Du Y. Blockage of tumor necrosis factor prevents intestinal mucosal inflammation through down-regulation of interleukin-23 secretion. *J Autoimmun* 2007; 29: 187-194
- 16 Hunter CA. New IL-12-family members: IL-23 and IL-27, cytokines with divergent functions. *Nat Rev Immunol* 2005; 5: 521-531
- 17 Batten M, Li J, Yi S, Kljavin NM, Danilenko DM, Lucas S, Lee J, de Sauvage FJ, Ghilardi N. Interleukin 27 limits autoimmune encephalomyelitis by suppressing the development of interleukin 17-producing T cells. *Nat Immunol* 2006; 7: 929-936
- 18 Stumhofer JS, Laurence A, Wilson EH, Huang E, Tato CM, Johnson LM, Villarino AV, Huang Q, Yoshimura A, Sehy D, Saris CJ, O'Shea JJ, Hennighausen L, Ernst M, Hunter CA. Interleukin 27 negatively regulates the development of interleukin 17-producing T helper cells during chronic inflammation of the central nervous system. *Nat Immunol* 2006; 7: 937-945
- 19 Rangachari M, Mauermann N, Marty RR, Dirnhofer S, Kurrer MO, Komnenovic V, Penninger JM, Eriksson U. T-bet negatively regulates autoimmune myocarditis by suppressing local production of interleukin 17. *J Exp Med* 2006; 203: 2009-2019
- 20 Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelletier A, Lafaille JJ, Cua DJ, Littman DR. The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* 2006; 126: 1121-1133
- 21 Eberl G, Littman DR. Thymic origin of intestinal $\alpha\beta$ T cells revealed by fate mapping of ROR γ cells. *Science* 2004; 305: 248-251
- 22 Yang XO, Pappu BP, Nurieva R, Akimzhanov A, Kang HS, Chung Y, Ma L, Shah B, Panopoulos AD, Schluns KS, Watowich SS, Tian Q, Jetten AM, Dong C. T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR α and ROR γ . *Immunity* 2008; 28: 29-39
- 23 Acosta-Rodriguez EV, Napolitani G, Lanzavecchia A, Sallusto F. Interleukins 1 β and 6 but not transforming growth factor- β are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat Immunol* 2007; 8: 942-949
- 24 Wilson NJ, Boniface K, Chan JR, McKenzie BS, Blumenschein WM, Mattson JD, Basham B, Smith K, Chen T, Morel F, Lecron JC, Kastelein RA, Cua DJ, McClanahan TK, Bowman EP, de Waal Malefyt R. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat Immunol* 2007; 8: 950-957
- 25 Yang L, Anderson DE, Baecher-Allan C, Hastings WD, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK, Hafler DA. IL-21 and TGF- β are required for differentiation of human T(H)17 cells. *Nature* 2008; 454: 350-352
- 26 Manel N, Unutmaz D, Littman DR. The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor- β and induction of the nuclear receptor ROR γ . *Nat Immunol* 2008; 9: 641-649
- 27 Bouma G, Strober W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 521-533
- 28 Mannon PJ, Fuss IJ, Mayer L, Elson CO, Sandborn WJ, Present D, Dolin B, Goodman N, Groden C, Hornung RL, Quezada M, Yang Z, Neurath MF, Salfeld J, Veldman GM, Schwertschlag U, Strober W. Anti-interleukin-12 antibody for active Crohn's disease. *N Engl J Med* 2004; 351: 2069-2079
- 29 Kastelein RA, Hunter CA, Cua DJ. Discovery and biology of IL-23 and IL-27: related but functionally distinct regulators of inflammation. *Annu Rev Immunol* 2007; 25: 221-242
- 30 Hue S, Ahern P, Buonocore S, Kullberg MC, Cua DJ, McKenzie BS, Powrie F, Maloy KJ. Interleukin-23 drives innate and T cell-mediated intestinal inflammation. *J Exp Med* 2006; 203: 2473-2483
- 31 Kullberg MC, Jankovic D, Feng CG, Hue S, Gorelick PL, McKenzie BS, Cua DJ, Powrie F, Cheever AW, Maloy KJ, Sher A. IL-23 plays a key role in Helicobacter hepaticus-induced T cell-dependent colitis. *J Exp Med* 2006; 203: 2485-2494
- 32 Kobayashi T, Okamoto S, Hisamatsu T, Kamada N, Chinen H, Saito R, Kitazume MT, Nakazawa

同行评价

本文思路清晰, 文笔流畅, 对认识炎症性肠病有一定作用。

- A, Sugita A, Koganei K, Isobe K, Hibi T. IL23 differentially regulates the Th1/Th17 balance in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut* 2008; 57: 1682-1689
- 33 Becker C, Wirtz S, Blessing M, Pirhonen J, Strand D, Bechthold O, Frick J, Galle PR, Autenrieth I, Neurath MF. Constitutive p40 promoter activation and IL-23 production in the terminal ileum mediated by dendritic cells. *J Clin Invest* 2003; 112: 693-706
- 34 Yen D, Cheung J, Scheerens H, Poulet F, McClanahan T, McKenzie B, Kleinschek MA, Owyang A, Mattson J, Blumenschein W, Murphy E, Sathe M, Cua DJ, Kastelein RA, Rennick D. IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. *J Clin Invest* 2006; 116: 1310-1316
- 35 Kinugasa T, Sakaguchi T, Gu X, Reinecker HC. Claudins regulate the intestinal barrier in response to immune mediators. *Gastroenterology* 2000; 118: 1001-1011
- 36 Ogawa A, Andoh A, Araki Y, Bamba T, Fujiyama Y. Neutralization of interleukin-17 aggravates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Clin Immunol* 2004; 110: 55-62
- 37 Elson CO, Cong Y, Weaver CT, Schoeb TR, McClanahan TK, Fick RB, Kastelein RA. Monoclonal anti-interleukin 23 reverses active colitis in a T cell-mediated model in mice. *Gastroenterology* 2007; 132: 2359-2370
- 38 McGeachy MJ, Bak-Jensen KS, Chen Y, Tato CM, Blumenschein W, McClanahan T, Cua DJ. TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology. *Nat Immunol* 2007; 8: 1390-1397
- 39 Langowski JL, Zhang X, Wu L, Mattson JD, Chen T, Smith K, Basham B, McClanahan T, Kastelein RA, Oft M. IL-23 promotes tumour incidence and growth. *Nature* 2006; 442: 461-465
- 40 Becker C, Dornhoff H, Neufert C, Fantini MC, Wirtz S, Huebner S, Nikolaev A, Lehr HA, Murphy AJ, Valenzuela DM, Yancopoulos GD, Galle PR, Karow M, Neurath MF. Cutting edge: IL-23 cross-regulates IL-12 production in T cell-dependent experimental colitis. *J Immunol* 2006; 177: 2760-2764

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志数字用法标准

本刊讯 遵照国家标准GB/T 15835-1995出版物上数字用法的规定, 本刊论文中数字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 ± 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6 347意指6 000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mean \pm SD应考虑到个体的变差, 一般以SD的1/3来定位数, 例如3 614.5 \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 \pm 0.4 kg, 过多的位数并无意义。又如8.4 \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 \leq 100, 百分数到个位; $101 \leq$ 分母 \leq 1 000, 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1 486 800.475 65。完整的阿位伯数字不移行! (常务副总编辑: 张海宁 2009-02-08)

电针足三里在血容量失血大鼠口服补液时对胃排空率、血浆一氧化氮及胃动素的影响

张立俭, 胡森, 侯经文, 周国勇, 石现, 盛志勇

张立俭, 胡森, 侯经文, 周国勇, 盛志勇, 中国人民解放军总医院第一附属医院烧伤研究所 北京市 100037
石现, 中国人民解放军总医院针灸科 北京市 100853
全军医学科研“十一五”专项课题, No. 06Z055
作者贡献分布: 此课题由胡森, 周国勇, 侯经文及张立俭设计; 研究过程由张立俭, 侯经文及周国勇操作完成; 研究所用试剂及分析工具由胡森提供; 数据分析由张立俭完成; 本论文写作由张立俭, 胡森, 石现及盛志勇完成。
通讯作者: 胡森, 100037, 北京市阜成路51号, 中国人民解放军总医院第一附属医院烧伤研究所休克与多器官功能障碍实验室. hs304@yahoo.com.cn
电话: 010-66867397 传真: 010-66989391
收稿日期: 2008-12-02 修回日期: 2008-12-22
接受日期: 2008-12-29 在线出版日期: 2009-02-08

Effect of electro-acupuncture at Zusanli points on gastric emptying and plasma contents of NO and MTL during oral fluid resuscitation of hemorrhagic shock in rats with blood volume loss

Li-Jian Zhang, Sen Hu, Jing-Yuan Hou,
Guo-Yong Zhou, Xian Shi, Zhi-Yong Sheng

Li-Jian Zhang, Sen Hu, Jing-Yuan Hou, Guo-Yong Zhou, Zhi-Yong Sheng, Burns Institute, the First Hospital Affiliated to the Chinese PLA General Hospital, Beijing 100037, China
Xian Shi, Department of Acupuncture and Moxibustion, the General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China
Supported by: the Special Foundation of the 11th Five-year Plan for Military Medical Project, No. 06Z055
Correspondence to: Sen Hu, Laboratory of Shock and Multiple Organ Dysfunction, Burns Institute, the First Hospital Affiliated to the Chinese PLA General Hospital, 51 Fucheng Road, Beijing 100037, China. hs304@yahoo.com.cn
Received: 2008-12-02 Revised: 2008-12-22
Accepted: 2008-12-29 Published online: 2009-02-08

Abstract

AIM: To investigate the effects of electro-acupuncture (EA) at Zusanli points (ST36) on gastric emptying, plasma contents of NO and MTL during oral fluid resuscitation of hemorrhagic shock in rats with 40% blood volume loss.

METHODS: Twenty-four SD rats were random-

ly divided into three groups: oral GES without hemorrhage (GES group, $n = 8$), hemorrhage resuscitated with oral GES+EA (H+GES/EA group, $n = 8$), and hemorrhage resuscitated with oral GES+sham-EA (H+GES/SEA group, $n = 8$). Hemorrhagic shock model was established by loss of 40% of total blood volume from carotid artery of rats. GES, at the dosage of two times of blood loss, was given twice intragastrically at a 30 min interval beginning from 30 min post bleeding. Bilateral Zusanli points (ST36) and sham points were electro-acupunctured with constant voltage (2-3 mA, 2-100 HZ) to animals with no anesthesia for 1 hour after a second intragastric administration. Rats were sacrificed 4 h after hemorrhage/operation and bloods were harvested for evaluation of plasma nitrogen monoxidum (NO) and motilin (MTL). Gastric emptying rates (GE) were determined by phenol red emptying.

RESULTS: Four hours after blood loss, gastric emptying rate of H+GES/EA group was 21.6% higher than H+GES/SEA group, but 17.6% lower than GES group ($P < 0.05$). The plasma contents of NO in H+GES/EA group were significantly lower than H+GES/SEA group (90.2 ± 8.3 vs 103.9 ± 12.5 , $P < 0.01$), and significantly higher than GES group (90.2 ± 8.3 vs 53.6 ± 6.9 , $P < 0.01$). The plasma contents of MTL were significantly in H+GES/EA than H+GES/SEA (101.3 ± 18.7 vs 73.7 ± 14.1 , $P < 0.01$), and significantly decreased than GES group (101.3 ± 18.7 vs 132.26 ± 24.1 , $P < 0.01$).

CONCLUSION: The results indicate that electro-acupuncture at Zusanli points have significant effects on promoting gastric emptying rate, inhibiting the contents of plasma NO and increasing the contents of plasma MTL after early oral fluid resuscitation of hemorrhagic shock in rats with 40% blood volume loss.

Key Words: Electro-acupuncture; Hemorrhage; Oral fluid resuscitation; Gastric emptying rate; Monoxidum; Motilin

■背景资料

口服液体复苏是战争、自然灾害和突发事件等特殊环境下产生的大批创伤伤员,由于液体供应受限和(或)救治条件恶劣等原因难以实施早期静脉复苏时进行的救治措施。休克时胃肠道处于严重缺血缺氧状态,口服补液在发挥快速复苏作用的同时,往往伴有胃排空及肠吸收功能的下降,严重影响了口服复苏的效果。足三里穴是足阳明胃经合穴,能有效促进和调节胃肠道动力。

■同行评议者

曹志成, 英国生物医学科学研究所院士, 伊利沙伯医院临床肿瘤科; 许玲, 副教授, 中国人民解放军第二军医大学长征医院中医科

■相关报道

国内外的研究表明,对于小于40%体表面积烧伤或小于40%血容量的失血引起的休克伤员早期口服补液能取得良好的复苏效果。但实践表明低血容量休克时由于胃肠道缺血常对口服补液不能耐受,表现为呕吐以及胃排空和肠吸收障碍。因此提高缺血状态下胃肠对口服液的耐受能力,将是提高口服复苏效果的关键。

Zhang LJ, Hu S, Hou JY, Zhou GY, Shi X, Sheng ZY. Effect of electro-acupuncture at Zusanli points on gastric emptying and plasma contents of NO and MTL during oral fluid resuscitation of hemorrhagic shock in rats with blood volume loss. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(4): 395-398

摘要

目的: 研究电针足三里对40%血容量失血大鼠早期口服葡萄糖-电解质液(GES)时胃排空率、血浆一氧化氮(NO)及胃动素(MTL)的影响。

方法: δ SD大鼠24只,随机分为假手术+口服GES组(GES组, $n = 8$)、失血+口服GES+电针足三里组(H+GES/EA, $n = 8$)、失血+口服GES+非经非穴组(H+GES/SEA, $n = 8$)。用氯胺酮-速眠新II肌注复合麻醉后,行右侧颈总动脉插管,按全身血容量的40%分两次间隔15 min放血制作失血性休克模型, GES组不予放血。于失血后0.5 h及1 h分两次灌胃给予总计2倍失血量的GES。H+GES/EA组和H+GES/SEA组大鼠用自制布袋固定,于第2次灌胃后在清醒状态下电针刺激足三里穴(频率2-100 Hz,强度2-3 mA,时间1 h)和非经非穴处皮肤(足三里外侧旁开0.5 cm,频率2-100 Hz,强度2-3 mA,时间1 h)。失血后4 h腹主动脉抽血处死动物,酚红法测定胃排空率,检测血浆NO和MTL水平。

结果: 失血后4 h, H+GES/EA组胃排空率比H+GES/SEA组提高了21.6%,比GES组降低了17.6% ($P < 0.05$)。H+GES/EA组血浆NO水平显著低于H+GES/SEA组 (90.2 ± 8.3 vs 103.9 ± 12.5 , $P < 0.05$),而显著高于GES组 (90.2 ± 8.3 vs 53.6 ± 6.9 , $P < 0.01$); MTL含量显著高于H+GES/SEA组 (101.3 ± 18.7 vs 73.7 ± 14.1 , $P < 0.01$),而显著低于GES组 (101.3 ± 18.7 vs 132.26 ± 24.1 , $P < 0.01$)。

结论: 电针足三里能显著降低血浆NO水平,提高MTL含量,改善40%血容量失血大鼠早期口服补液时胃排空率。

关键词: 电针; 失血; 口服补液; 一氧化氮; 胃动素; 胃排空率

张立俭, 胡森, 侯经元, 周国勇, 石现, 盛志勇. 电针足三里在血容量失血大鼠口服补液时对胃排空率、血浆一氧化氮及胃动素的影响. *世界华人消化杂志* 2009; 17(4): 395-398
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/395.asp>

0 引言

口服液体复苏是主要针对战争、自然灾害和突

发事故等特殊环境下产生的大批创伤伤员,由于液体供应受限和(或)救治条件恶劣等原因难以实施早期静脉复苏时进行的救治措施^[1-2]。但前期研究发现,休克时胃肠道处于严重缺血缺氧状态,口服补液在发挥快速复苏作用的同时,往往伴有胃排空及肠吸收功能的下降,严重影响了口服复苏的效果^[3]。足三里穴是足阳明胃经合穴,能有效促进和调节胃肠道动力。本文的目的在于研究电针足三里穴对40%血容量失血大鼠早期口服补液过程中胃排空率、血浆一氧化氮及胃动素水平的影响,以及针刺足三里穴后胃排空率与血浆NO、MTL的关系,初步探讨失血性休克早期口服复苏时电针促进胃排空功能的机制,为减轻失血性休克早期口服补液引起的胃肠道并发症治疗提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料 δ SD大鼠24只,50-60日龄,体质量210-230 g,购自军事医学科学院实验动物中心。葡萄糖-电解质溶液(GES)配方:每1 L水中溶解3.5 g NaCl、2.5 g NaHCO₃、1.5 g KCl和20 g葡萄糖,使用前置于37℃恒温水浴箱预热。电针刺激采用国产HANS电针仪。一氧化氮(NO)检测试剂盒由南京建成生物工程研究所提供,胃动素检测试剂盒由北京华英生物技术研究所提供。

1.2 方法

1.2.1 模型制备与分组: 大鼠购入后适应性喂养1 wk,术前禁食18-20 h,禁水2 h。按随机数字表法将动物分为假手术+葡萄糖-电解质溶液(GES)组(GES组, $n = 8$)、失血+口服GES+电针足三里组(H+GES/EA, $n = 8$)、失血+口服GES+非经非穴组(H+GES/SEA, $n = 8$)。大鼠称重后用氯胺酮-速眠新II肌注复合麻醉(0.5 mL/kg体质量)后,消毒颈部皮肤,取右侧切口打开,分离结扎右侧颈总动脉,于近端插管,按大鼠全身血量的40%(按65 mL/kg体质量)^[4]隔15 min分两次放血,每次于5 min内放完。放血完毕结扎动脉近端,缝合皮肤。放血完成后0.5 h及1 h在大鼠清醒状态下进行灌胃。GES组结扎右侧颈总动脉后不予放血;各组手术或放血后30 min及1 h用大鼠灌胃针对动物进行GES液口服补液,拟复苏总补液量为失血总量的3倍,本实验4 h过程中按2倍分两次给予。H+GES/EA组大鼠用自制布袋固定,于第2次灌胃后在清醒状态下常规消毒双下肢并备皮,取足三里穴(膝关节后外侧、腓骨小头下约5 mm处)直刺7 mm^[5],针刺后接电针仪(国产HANS,

LH202H, 频率2-100 Hz, 强度2-3 mA, 时间1 h). H+GES/SEA组口服GES后刺激非经穴(足三里外侧旁开0.5 cm, 频率2-100 Hz, 强度2-3 mA, 时间1 h).

1.2.2 血浆NO和MTL含量检测: 动物失血后4 h腹主动脉取血, 3000 r/min离心10 min取血浆-40℃冻存待测. 硝酸还原酶法检测NO含量; 放射免疫法检测胃动素含量, 严格按照试剂盒说明书操作.

1.2.3 胃排空率测定: 各组动物于伤后4 h处死, 以酚红为指示剂, 按Scarpignato *et al*^[6]的方法测定胃排空率.

统计学处理 数据以mean±SD表示, 实验数据采用SPSS11.0统计软件进行F检验及相关性分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 电针对血浆NO含量的影响 H+GES/EA组血浆NO水平($90.2 \pm 8.3 \mu\text{mol/L}$)显著低于H+GES/SEA组($103.9 \pm 12.5 \mu\text{mol/L}$)($n = 8$, $P<0.05$), 而显著高于GES组($53.6 \pm 6.9 \mu\text{mol/L}$)($n = 8$, $P<0.01$, 图1).

2.2 电针对血浆MTL含量的影响 H+GES/SEA组血浆MTL含量($101.3 \pm 18.7 \text{ pg/mL}$)显著低于GES组($132.3 \pm 24.1 \text{ pg/mL}$)($n = 8$, $P<0.01$), 而显著高于H+GES/SEA组($73.7 \pm 14.1 \text{ pg/mL}$)($n = 8$, $P<0.01$, 图2).

2.3 胃排空率(GE) 失血后4 h, H+GES/EA组胃排空率比H+GES/SEA组提高了21.6%, 比GES组降低了17.6%($P<0.05$). 相关与回归分析显示, 胃排空率与血浆NO含量呈负相关($r = -0.936$, $P<0.01$), 与血浆MTL含量呈正相关($r = 0.975$, $P<0.01$).

3 讨论

口服液体复苏是主要针对战争、自然灾害和突发事件等特殊环境下, 由于液体供应受限和(或)救治条件恶劣等原因难以实施早期静脉复苏时用于休克伤员的救治措施. 国内外的研究表明, 对于小于40%体表面积烧伤或小于40%血容量的失血引起的休克伤员早期口服补液能取得良好的复苏效果^[7-8]. 但实践表明低血容量休克时由于胃肠道缺血常对口服补液不能耐受, 表现为呕吐以及胃排空和肠吸收障碍. 因此提高缺血状态下胃肠对口服液的耐受能力, 将是提高口服复苏效果的关键.

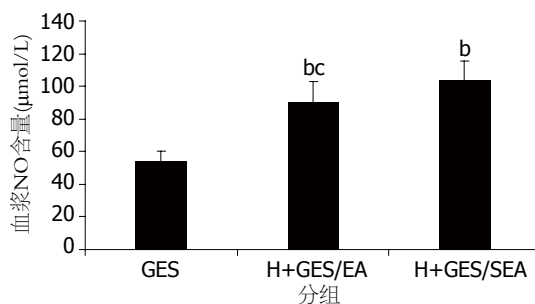


图1 40%血容量失血大鼠各组血浆NO含量变化. ^b $P<0.01$ vs GES组; ^c $P<0.05$ vs H+GES/SEA组.

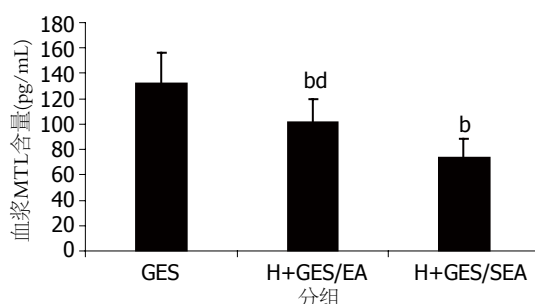


图2 40%血容量失血大鼠口服补液时血浆MTL含量的变化. ^b $P<0.01$ vs GES组; ^d $P<0.01$ vs H+GES/SEA组.

■应用要点

电针足三里穴能够降低血浆NO水平, 增加MTL含量, 显著改善40%血容量失血早期口服补液时胃排空率, 在提高野战条件下成批休克伤员口服液体复苏的效果方面具有潜在的运用价值.

国内外研究表明, 胃排空是口服液体复苏的主要限制性因素. 机体发生休克时, 胃肠等消化器官作为首先牺牲的器官, 其组织血流量显著降低. 其作用在于机体为满足重要生命脏器的血液供应, 血流发生重新分布, 胃肠道血流量减少、胃肠组织细胞缺血缺氧^[9]. 此时通过口服补充大量液体, 吸收后虽然能迅速恢复消化系统局部及全身灌流, 有效改善烧伤休克的脏器功能和循环指标; 但另一方面, 能造成消化器官局部的缺血-再灌注效应, 进一步加重了组织损伤, 从而导致胃肠道排空和消化功能障碍, 严重影响了口服补液的治疗效果. 本研究结果显示, 40%血容量失血大鼠口服补液后, 胃排空率显著降低.

NO是一种新型的神经递质, 对体内多个器官均有作用, 参与众多生理和病理过程^[10]. 其生理功能之一是作为胃肠道非肾上腺素能非胆碱能(NANC)神经的递质, 引起胃肠道平滑肌和括约肌的舒张. 有研究报道, 重度烫伤大鼠肠组织中NOS活力升高, NO产生增多, 对胃肠道动力产生抑制作用, 电针可降低重度烫伤大鼠NO含量和NOS活性^[11]. 本研究结果显示, 大鼠失血40%发生低血容量性休克时, 血浆NO含量显著升高, 电针足三里后NO含量明显降低, 且与胃排空率呈负相关.

■同行评价

本研究设计合理, 结果可靠, 具有一定的可读性、科学性和较好的学术价值。

MTL是重要的脑肠肽激素, 其生理功能是促进胃肠运动。Yang *et al*^[12]发现, 胃排空与血浆胃动素密切相关。MTL的不足导致胃肠平滑肌松弛、胃张力及蠕动减弱、胃排空时间延长、胃液潴留增加^[13]。有研究者认为MTL的释放亦受迷走神经张力和中枢神经系统的调节^[14]。本实验结果表明, 大鼠发生失血性休克时, 血浆MTL水平明显降低, 电针足三里后MTL水平显著升高, 且与胃排空率呈正相关。

祖国传统医学中, 足三里穴用来治疗胃肠道疾病由来已久, 故有“肚腹三里留”之说。足三里穴是足阳明胃经合穴(经气所汇为合), 胃经是十二经脉中多气多血之经, 与胃肠道关系最为密切。电针足三里不仅能够兴奋迷走神经中枢核团, 也能够兴奋外周迷走神经纤维。实验中我们发现, 40%血容量失血口服补液时给予电针足三里穴治疗后, 血浆NO含量减少, MTL含量增加, 胃排空率增高。这可能与电针足三里的针刺信息能够上传到中枢影响中枢迷走核团, 兴奋迷走神经, 从而抑制血浆NO和刺激MTL释放有关。

电针足三里与GES联用, 一方面可改善失血休克早期受抑的胃排空功能, 另一方面促进GES液排入小肠, 增加小肠对口服液的吸收, 能有效提高血容量, 增加心输出量和尿量。足三里穴是足阳明胃经合穴, 能有效促进和调节胃肠道动力。电针足三里穴能够降低血浆NO水平, 增加MTL含量, 显著改善40%血容量失血早期口服补液时胃排空率, 在提高野战条件下成批休克伤员口服液体复苏的效果方面具有潜在的运用价值。

4 参考文献

- 1 Thomas SJ, Kramer GC, Herndon DN. Burns: military options and tactical solutions. *J Trauma* 2003; 54: S207-S218
- 2 车晋伟, 胡森, 盛志勇. 烧(创)伤休克战地液体复苏研究进展. *解放军医学杂志* 2007; 32: 271-273
- 3 胡森, 郝波, 车晋伟, 耿世佳, 吴静, 杜颖, 盛志勇. 卡巴胆碱对大鼠烫伤休克早期口服补液时胃排空和胃血流量的影响. *解放军医学杂志* 2007; 32: 1252-1253
- 4 施新猷. *医学动物实验方法*. 北京: 人民卫生出版社, 1980: 408
- 5 李忠仁. *实验针灸学*. 北京: 中国中医药出版社, 2003: 327-328
- 6 Scarpignato C, Capovilla T, Bertaccini G. Action of caerulein on gastric emptying of the conscious rat. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1980; 246: 286-294
- 7 车晋伟, 胡森, 王国强, 杜颖, 耿世佳, 吴静, 盛志勇. 早期口服补液对35% TBSA烧伤犬血流动力学和后期脏器功能的影响. *解放军医学杂志* 2008; 33: 643-645
- 8 Grocott MP, McCorkell S, Cox ML. Resuscitation from hemorrhagic shock using rectally administered fluids in a wilderness environment. *Wilderness Environ Med* 2005; 16: 209-211
- 9 盛志勇, 胡森. 多器官功能障碍综合征. 北京: 科学出版社, 1999: 20-21
- 10 Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Annu Rev Biochem* 1994; 63: 175-195
- 11 王磊, 石现, 胡森, 宋琪, 车晋伟, 田易军, 耿世佳, 吴静. 电针足三里穴对大鼠烫伤早期胃和小肠黏膜血流量的影响. *感染·炎症·修复* 2008; 9: 18
- 12 Yang M, Fang DC, Li QW, Sun NX, Long QL, Sui JF, Gan L. Effects of gastric pacing on gastric emptying and plasma motilin. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 419-423
- 13 Siadati M, Sarr MG. Role of extrinsic innervation in release of motilin and patterns of upper gut canine motility. *J Gastrointest Surg* 1998; 2: 363-372
- 14 Karlsson S, Scheurink AJ, Ahrén B. Gender difference in the glucagon response to glucopenic stress in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2002; 282: R281-R288

编辑 史景红 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

中国科技期刊引证报告(核心版)发布世界华人消化杂志 2007 年影响因子 0.568

本刊讯 2007年世界华人消化杂志的总被引频次为2353, 位居全部1723种中国科技论文统计源期刊的第86位, 内科医学类28种期刊的第5位。2007年世界华人消化杂志的影响因子为0.568, 内科医学类28种期刊的第15位。即年指标0.082, 他引率0.69, 引用刊数372种, 扩散因子15.81, 学科影响指标0.54。(编辑: 程剑侠 2009-02-08)

甘草酸二铵对溃疡性结肠炎大鼠的治疗作用

霍丽娟, 郭海荣

霍丽娟, 郭海荣, 山西医科大学第一临床医学院消化内科 山西省太原市 030001

作者贡献分布: 此课题由霍丽娟与郭海荣共同设计; 在霍丽娟指导下, 实验操作与论文写作由霍丽娟和郭海荣共同完成。

通讯作者: 霍丽娟, 030001, 山西省太原市解放南路85号, 山西医科大学第一临床医学院消化内科. mymail5296@163.com

电话: 0351-4639796

收稿日期: 2008-12-22 修回日期: 2009-01-08

接受日期: 2009-01-12 在线出版日期: 2009-02-08

Effects of diammonium glycyrrhizinate on ulcerative colitis in rats

Li-Juan Huo, Hai-Rong Guo

Li-Juan Huo, Hai-Rong Guo, Department of Gastroenterology, the First Clinical Medical College, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China

Correspondence to: Li-Juan Huo, Department of Gastroenterology, the First Clinical Medical College of Shanxi Medical University, 85 Jiefang South Road, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China. mymail5296@163.com

Received: 2008-12-22 Revised: 2009-01-08

Accepted: 2009-01-12 Published online: 2009-02-08

Abstract

AIM: To investigate the effects of diammonium glycyrrhizinate (DG) on ulcerative colitis (UC) in rats and to probe into its underlying mechanism.

METHODS: Fifty male Wistar rats were randomly divided into 5 groups: normal control group, model group, 5-aminosalicylic acid (5-ASA) group, DG group, and combination of 5-ASA and DG group ($n = 10$ in each group). The rat colitis model was induced by 2, 4-dinitrochlorobenzene (DNCB) and acetic acid. Disease activity index (DAI), colonic histology, myeloperoxidase (MPO) activity and superoxide dismutase (SOD) activity were observed. The expression of nuclear factor (NF)- κ B and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in colonic mucosa were determined by immunohistochemistry.

RESULTS: Compared with model group, DAI (3.30 ± 1.34 , 3.20 ± 1.14 vs 7.80 ± 1.62 , both $P < 0.01$), lesions of colonic mucosa (1.88 ± 0.34 , 1.84 ± 0.21 vs 3.09 ± 0.22 , both $P < 0.01$), MPO activity (0.46 ± 0.07 , 0.47 ± 0.04 vs 0.61 ± 0.04 , both P

< 0.01), NF- κ B expression (0.373 ± 0.031 , 0.368 ± 0.028 vs 0.517 ± 0.028 , both $P < 0.01$) and iNOS expression (0.350 ± 0.015 , 0.365 ± 0.025 vs 0.487 ± 0.021 , both $P < 0.01$) in colonic mucosa in DG group and 5-ASA group were decreased significantly and SOD activity were significantly increased (19.83 ± 3.36 , 20.27 ± 2.44 vs 13.09 ± 3.24 , both $P < 0.01$). The above changes were even more significant in combination of 5-ASA and DG group (all $P < 0.01$), and there was no significant difference between normal control group and combination of 5-ASA and DG group, nor between 5-ASA group and DG group.

CONCLUSION: DG could treat experimental colitis in rats, which may be related to relieve colon tissue injury in colitis by suppressing the activity of NF- κ B, resisting oxygen free radicals, and exerting antioxidation effects. The combination treatment of DG and 5-ASA has a better effect than either of individual treatment alone.

Key Words: Diammonium glycyrrhizinate; Ulcerative colitis; Myeloperoxidase; Superoxide dismutase; Nuclear factor- κ B; Inducible nitric oxide synthase

Huo LJ, Guo HR. Effects of diammonium glycyrrhizinate on ulcerative colitis in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(4): 399-404

摘要

目的: 观察甘草酸二铵(DG)对溃疡性结肠炎(UC)大鼠的治疗作用并探讨其可能的作用机制。

方法: 50只♂清洁级健康Wistar大鼠分为正常对照组, 模型对照组, 5-氨基水杨酸(5-ASA)组, DG组, 5-ASA+DG组, 每组10只。用2,4-二硝基氯苯+乙酸联合建模法制备UC大鼠模型。观察疾病活动指数(DAI)、结肠黏膜组织学变化、髓过氧化物酶(MPO)及超氧化物歧化酶(SOD)活性, 免疫组织化学法检测核因子- κ B(NF- κ B)及诱生型一氧化氮合酶(iNOS)表达。

结果: 与模型对照组相比, DG组和5-ASA组

■背景资料

UC是一种病因不明的主要累及直肠、结肠黏膜的慢性非特异性炎症和溃疡性病变。虽然近年来, UC在感染、遗传、免疫等病因学方面的研究取得了一定的进展, 药物治疗方面也有了相应的进展, 并且他们已用于结肠炎的基础研究和临床治疗, 但因其不良反应发生率比较高、价格昂贵等问题影响了传统治疗药物在临床上的广泛应用。因此, 寻找不良反应小的药物用于治疗UC非常必要。

■同行评议者

刘占举, 教授, 郑州大学第二附属医院消化内科

■研究前沿

目前UC传统治疗药物存在疗效欠佳、复发率高、不良反应大和价格昂贵等问题,寻找疗效确切、安全、且来源广、价格便宜的治疗UC的药物成为当前国内外研究的热点。

大鼠的DAI(3.30 ± 1.34 , 3.20 ± 1.14 vs 7.80 ± 1.62 , 均 $P < 0.01$)、组织学损伤评分(1.88 ± 0.34 , 1.84 ± 0.21 vs 3.09 ± 0.22 , 均 $P < 0.01$)、MPO活性(0.46 ± 0.07 , 0.47 ± 0.04 vs 0.61 ± 0.04 , 均 $P < 0.01$)和结肠黏膜NF- κ B(0.373 ± 0.031 , 0.368 ± 0.028 vs 0.517 ± 0.028 , 均 $P < 0.01$)、iNOS(0.350 ± 0.015 , 0.365 ± 0.025 vs 0.487 ± 0.021 , 均 $P < 0.01$)表达显著降低, SOD活性(19.83 ± 3.36 , 20.27 ± 2.44 vs 13.09 ± 3.24 , 均 $P < 0.01$)显著增高; DG联合5-ASA治疗组以上指标改善更明显(均 $P < 0.01$), 且与正常对照组相比各指标间差异无统计学意义。DG组和5-ASA组相比上述各指标间差异也无统计学意义。

结论: DG可有效治疗UC, 其作用机制可能与抑制NF- κ B活化、清除氧自由基、抗氧化损伤等有关。与5-ASA联用其治疗效果优于两者单独用药。

关键词: 甘草酸二铵; 溃疡性结肠炎; 髓过氧化物酶; 超氧化物歧化酶; 核因子- κ B; 诱生型一氧化氮合酶

霍丽娟, 郭海荣. 甘草酸二铵对溃疡性结肠炎大鼠的治疗作用. 世界华人消化杂志 2009; 17(4): 399-404
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/399.asp>

0 引言

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)又称为非特异性溃疡性结肠炎, 病变主要累及结肠黏膜和黏膜下层, 病因和发病机制至今仍不明确, 目前认为主要与遗传、感染、环境、免疫等多因素有关。而其传统治疗药物有氨基水杨酸制剂、糖皮质激素以及免疫抑制剂等, 虽能控制大多数患者的症状, 但长期使用不良反应比较大^[1-2]。因此, 近年来人们一直在积极地寻找疗效确切、安全、价格便宜且不良反应小的药物来治疗UC。甘草酸二铵(DG)是甘草活性成分甘草次酸的左旋构型, 目前主要用于治疗肝炎等疾病, 该药不仅有与皮质类固醇类似的非特异性抗炎作用, 而且有镇痛、保护膜结构、抗脂质氧化、改善肝功能及调节免疫等生物活性^[3-4]。特点是疗效好, 不良反应小, 更主要的是无激素样的不良反应。目前, 国内外有关其治疗UC的报道很少, 且机制不明。本实验旨在明确DG对溃疡性结肠炎大鼠的治疗作用, 并通过观察其对UC大鼠结肠黏膜NF- κ B p65、iNOS表达和MPO、SOD活性的影响来探讨其可能的作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料 δ 清洁级健康Wistar大鼠50只, 体重 220 ± 10 g, 由山西医科大学实验动物中心提供。甘草酸二铵(商品名: 甘利欣, 胶囊, 批号070818)系江苏正大天晴药业股份有限公司生产; 5-氨基水杨酸(商品名: 艾迪莎, 进口注册证号H20040727)系法国爱的发制药集团生产; 2, 4-二硝基氯苯购于北京五洲元业生物工程有限公司; 髓过氧化物酶(MPO)检测试剂盒、超氧化物歧化酶(SOD)检测试剂盒、考马斯亮兰蛋白测定试剂盒购于南京建成生物工程研究所; iNOS免疫组化试剂盒购于武汉博士德生物有限公司; NF- κ B免疫组化试剂盒购于Santa Cruz工程有限公司; Novapath TM酶标仪(日本); Olympus BH-2显微照相系统(日本)。

1.2 方法

1.2.1 分组: 将大鼠50只随机分为5组, 每组10只, 分别为正常对照组、模型对照组、5-ASA组、DG组、5-ASA+DG组。

1.2.2 造模及给药: 模型对照组和各治疗组大鼠参照文献[5]采用2,4-二硝基氯苯和乙酸联合建模法制备UC模型。正常对照组和模型对照组大鼠每日给予生理盐水1 mL/200 g体重, 5-ASA组给予5-ASA溶液100 mg/(kg·d), DG组给予DG溶液40 mg/(kg·d), 5-ASA+DG组(联合用药组)给予5-ASA溶液100 mg/(kg·d)(08:00)、DG溶液40 mg/(kg·d)(16:00), 用直径3 mm的导尿管经肛门插入结肠深度约8 cm处给药, 药物均溶于蒸馏水, 其中5-ASA颗粒剂经研磨过滤后配置成混悬液, 按1 mL/200 g体重灌肠, 每日灌肠1次, 共7 d。每日观察各组大鼠腹泻、便血及体重改变, 评价疾病活动指数^[6]。

1.2.3 标本采集及处理: 用药7 d后, 大鼠称质量, 取距肛门约8 cm的结肠, 一部分甲醛固定、石蜡包埋、切片, HE染色观察结肠黏膜组织学改变并进行评分^[7], 另一部分置于-70℃冰箱备测。

1.2.4 结肠炎症评价及MPO、SOD活性测定: 采用疾病活动指数(DAI)、组织学损伤评分及MPO活性的测定来评价结肠炎症。化学比色法测定结肠组织MPO、SOD活性, 按试剂盒说明操作。

1.2.5 结肠黏膜NF- κ B p65、iNOS免疫组化染色: 结肠黏膜NF- κ B p65、iNOS的表达采用SABC免疫组织化学法检测(按试剂盒说明书操作)。封片后, 每张切片随机选取5个高倍视野, 进行阳性程度的测定, 用平均吸光度值表示其强弱, 若平

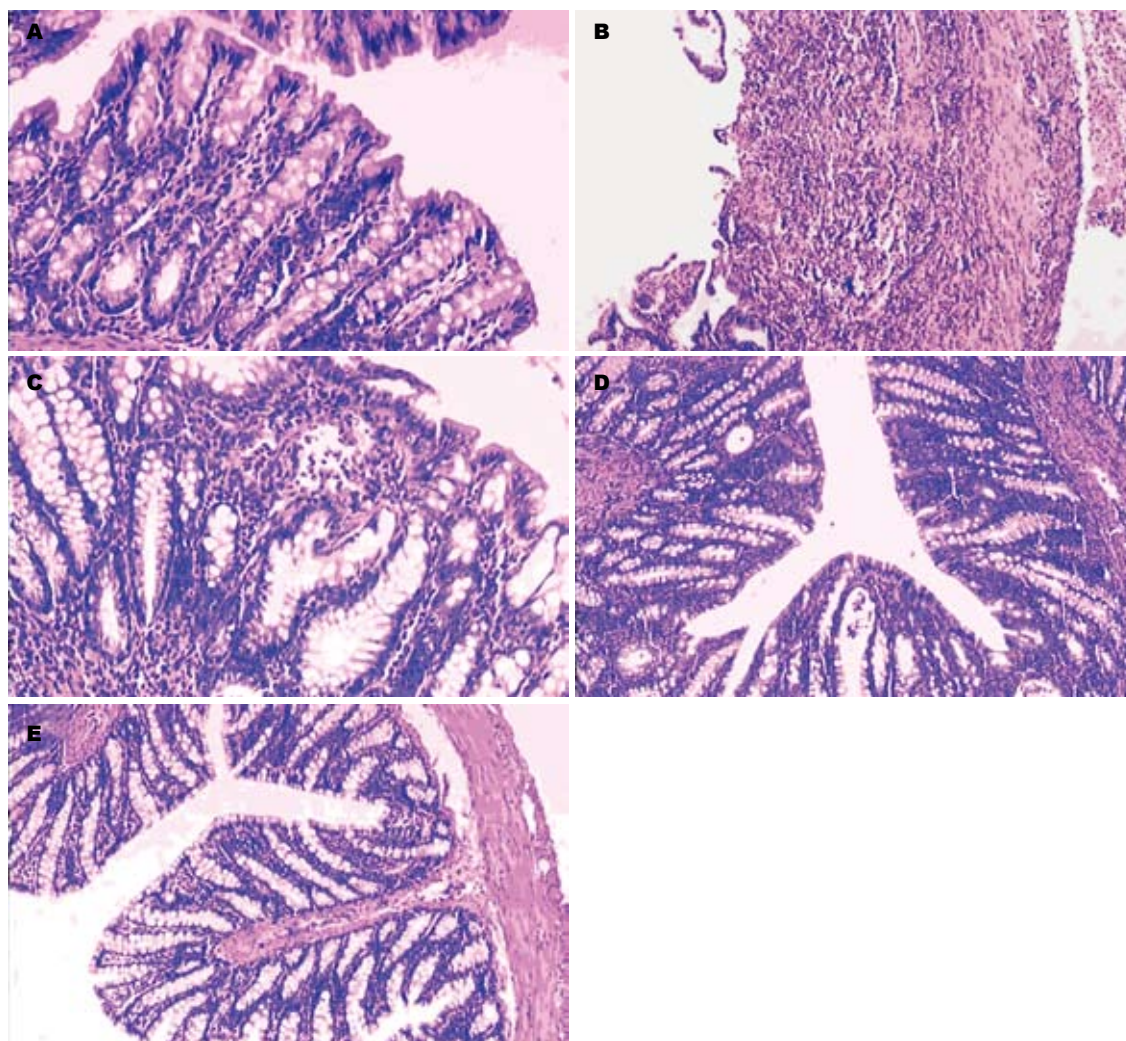


图1 大鼠结肠黏膜组织病理学改变(H&E染色, $\times 100$)。A: 正常对照组; B: 模型对照组; C: 5-ASA治疗组; D: DG治疗组; E: 联合用药组。

■相关报道

甘草酸二铵是中药甘草有效成分的第三代提取物, 具有较强的与皮质类固醇类似的非特异性的抗炎、抗生物氧化、保护膜结构及改善肝功能等生物活性。最近刘颖 *et al* 研究发现, 甘草酸二铵能有效改善UC大鼠的结肠炎症反应, 认为其作用机制与抗氧化、降低促炎性细胞因子水平等有关。

均吸光度值高则说明其表达强, 反之, 该值低则说明其表达弱。

统计学处理 所有数据以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示, 用SPSS13.0统计软件包进行处理, 计量资料多组间比较采用方差分析, 各组间两两比较采用LSD检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般状况及病理学改变 模型对照组大鼠从造模第1天起至2 wk左右时, 开始出现懒动、体质量渐减轻、黏液稀便及血便等症状; DG组和5-ASA组大鼠的一般状况随给药时间延长逐渐好转, 体质量增加, 无血便, 尤以联合用药组大鼠改善显著。肉眼观察, 模型对照组大鼠结肠黏膜充血水肿, 可见出血点、红斑和小溃疡; DG组和5-ASA组大鼠仅见小溃疡愈合后的痕迹; 联合用药组无异常发现。光镜下示模型对照组大鼠结肠黏膜上皮细胞坏死脱落, 有小溃疡及隐

窝脓肿形成, 腺体广泛破坏, 黏膜固有层内有中性粒细胞、淋巴细胞等炎性细胞浸润; DG组和5-ASA组示腺体排列尚整齐、少数腺腔有灶性上皮坏死, 固有层仅有少量淋巴细胞、个别中性粒细胞浸润; 联合用药组仅见结肠黏膜有少量淋巴细胞浸润(图1)。

2.2 DAI、组织学损伤评分及MPO活性 模型对照组DAI、组织学损伤评分及MPO活性较正常对照组显著增高($P < 0.01$); DG组和5-ASA组DAI、组织学损伤评分及MPO活性较模型对照组显著降低($P < 0.01$), 仍高于正常对照组, 两治疗组间比较差异无统计学意义; 联合用药组DAI、组织学损伤评分及MPO活性较两单独用药组显著降低($P < 0.01$), 与正常对照组相比差异无统计学意义(表1)。

2.3 结肠黏膜SOD活性的检测 模型对照组大鼠结肠黏膜SOD活性较正常对照组显著降低($P < 0.01$)。5-ASA组和DG组大鼠结肠黏膜SOD活

■创新盘点

本课题基于UC研究的最新进展,运用2, 4-二硝基氯苯和乙酸联合建模法制备大鼠UC模型,观察甘草酸二铵对实验性结肠炎大鼠的保护作用及其相关机制。

表 1 各组DAI、组织学损伤评分及MPO、SOD活性的测定结果(mean ± SD)

分组	DAI评分	组织学评分	MPO(u/g组织)	SOD(u/mg prot)
正常对照组	0.50 ± 0.85	0.21 ± 0.34	0.29 ± 0.07	27.69 ± 1.81
模型对照组	7.80 ± 1.62 ^d	3.09 ± 0.22 ^d	0.61 ± 0.04 ^d	13.09 ± 3.24 ^d
5-ASA组	3.20 ± 1.14 ^{dbf}	1.84 ± 0.21 ^{dbf}	0.47 ± 0.04 ^{dbf}	20.27 ± 2.44 ^{dbf}
DG组	3.30 ± 1.34 ^{dbf}	1.88 ± 0.34 ^{dbf}	0.46 ± 0.07 ^{dbf}	19.83 ± 3.36 ^{dbf}
5-ASA+DG组	1.50 ± 1.23 ^b	0.44 ± 0.21 ^b	0.34 ± 0.02 ^b	25.45 ± 2.65 ^b

^b*P*<0.01 vs 模型组; ^d*P*<0.01 vs 正常对照组; ^f*P*<0.01 vs 5-ASA+DG组。

表 2 各组结肠黏膜NF-κB p65、iNOS平均吸光度 (*n* = 10, mean ± SD)

分组	iNOS	NF-κB p65
正常对照组	0.234 ± 0.017	0.187 ± 0.019
模型对照组	0.487 ± 0.021 ^d	0.534 ± 0.028 ^d
5-ASA组	0.365 ± 0.025 ^{dbf}	0.368 ± 0.028 ^{dbf}
DG组	0.350 ± 0.015 ^{dbf}	0.373 ± 0.031 ^{dbf}
5-ASA+DG组	0.251 ± 0.017 ^b	0.210 ± 0.025 ^b

^b*P*<0.01 vs 模型组; ^d*P*<0.01 vs 正常对照组; ^f*P*<0.01 vs 5-ASA+DG组。

性较模型对照组显著升高(*P*<0.01),但仍低于正常对照组,两治疗组间比较无差异。联合用药组大鼠结肠黏膜SOD活性较两单独用药组显著升高(*P*<0.01),与正常对照组相比差异无统计学意义(表1)。

2.4 结肠黏膜NF-κB p65的表达 正常对照组大鼠结肠黏膜仅见少量NF-κB p65表达(表2)。模型对照组大鼠结肠黏膜NF-κB p65平均吸光度值显著高于正常对照组(*P*<0.01)。5-ASA组和DG组大鼠结肠黏膜NF-κB p65的平均吸光度值较模型对照组显著降低(*P*<0.01),但仍高于正常对照组,两治疗组间比较差异无统计学意义。联合用药组大鼠结肠黏膜NF-κB p65的平均吸光度值较两单独用药组明显降低(*P*<0.01),与正常对照组相比差异无统计学意义。

2.5 结肠黏膜iNOS的表达 正常对照组大鼠结肠黏膜仅见少量iNOS表达。模型对照组大鼠结肠黏膜iNOS平均吸光度值显著高于正常对照组(*P*<0.01)。5-ASA组和DG组大鼠结肠黏膜iNOS的平均吸光度值较模型对照组显著降低(*P*<0.01),但仍高于正常对照组,两治疗组间比较差异无统计学意义。联合用药组大鼠结肠黏膜iNOS的平均吸光度值较两单独用药组明显降低(*P*<0.01),与正常对照组相比,差异无统计学意义(表2)。

3 讨论

本实验采用2, 4-二硝基氯苯和乙酸联合建模法制备UC模型,该模型是免疫方法模型,病程长,病理变化更接近于人类UC,有急性发作和慢性发展过程,成功率高,重复性好,症状典型,而且简单易行,尤其适用于探索UC抗炎药物疗效的研究。MPO是主要存在于中性粒细胞中的一种酶,其活性是中性粒细胞浸润的重要指标,也是结肠炎严重程度的指标^[8-9]。MPO活性与DAI、组织学损伤评分三者较好地反映了结肠炎症状和组织学改变的特点和程度。本实验发现,模型对照组MPO活性与DAI、组织学损伤评分明显高于正常对照组;5-ASA治疗组和DG治疗组大鼠DAI、组织学损伤评分及MPO活性较模型对照组有所改善,而与正常对照组比较仍有统计学意义;联合用药组的DAI、组织学损伤评分及MPO活性较两单独用药组改善更明显,与正常对照组比较差异无统计学意义。说明5-ASA和DG均具有一定的抗炎作用,且联合用药效果更佳。

目前大多学者认为UC的发生是免疫、遗传、环境及肠道细菌等多种因素共同作用的结果。其中免疫因素是最重要的因素之一,细胞因子在调节肠道免疫中扮演重要角色,近年研究认为NF-κB的活化与细胞因子的调控关系密切。NF-κB家族由5个成员组成,其中p65具有显著的促炎特性,在调控靶基因的转录中起着关键性的作用。研究表明,NF-κB调控着UC患者细胞因子的释放,参与了UC肠道的炎症和免疫反应^[10-11]。有研究发现UC患者病变结肠黏膜组织NF-κB表达水平显著增高,认为NF-κB与UC关系密切,其表达水平可作为评价病情活动性和严重性的指标之一^[12]。还有研究发现NF-κB“诱饵”寡核苷酸对小鼠DSS结肠炎有较好的保护作用,认为NF-κB信号通路在DSS结肠炎中起着重要的作用,预示着该通路可以为UC的治疗提供一个有价值的靶标^[13]。因此,可以认为NF-κB的激活对

炎症的发展起着关键作用。

近年来, 自由基损伤已经成为UC发病的重要机制之一, 自由基包括氧自由基(oxygen free radicals, OFR)和NO自由基。氧自由基及其触发的脂质过氧化反应学说与UC的发病相关^[14]。OFR是一类具有高度化学反应活性的含氧基团, 其氧化作用强, 能够引起脂质过氧化而导致组织和细胞的损伤。SOD是存在于生物体内的重要的抗氧化酶系, 能有效地清除氧自由基, 抑制肠组织中的脂质过氧化反应, 并能稳定细胞膜, SOD活性是反映细胞膜功能和机体抗炎症反应的主要指标。陈香宇 *et al*^[15]采用SOD脂质体灌肠治疗大鼠实验性结肠炎, 使SOD能在炎症的结肠局部达到最高浓度, 直接作用于病灶, 结果取得理想疗效, 其作用机制可能与其减轻氧自由基(OFR)及其代谢产物(如ONOO-等)的损害, 保护肠黏膜有关。Segui *et al*^[16]报道, UC时SOD能显著减少脂质过氧化物, 吸收白细胞进入肠道炎症部位, 从而改善肠道的慢性炎症。NO作为一种新型信号分子, 具有调节内皮细胞、平滑肌细胞和神经功能, 参与机体炎症和组织损伤, 在消化系统病理生理中起着重要作用。

NO主要由一氧化氮合酶(NOS)催化L-精氨酸产生, 体内NOS有结构型NOS(cNOS)和诱生型NOS(iNOS)两种。cNOS先天性存在, 释放少量NO, 作为神经递质调节局部血流。iNOS在正常生理状态下基因不表达, 当受到某些细胞因子、病原微生物刺激后即被激活, 其持续释放大量的NO, 对肠黏膜有毒性损伤及促炎作用。研究表明, UC时结肠黏膜层主要以iNOS为主, 检测其表达对了解UC的病理学机制具有重要意义。陈香宇 *et al*^[17]采用DNFB诱发的大鼠实验性结肠炎模型, 应用动态观察的方法, 采取多个时间点的标本检测NOS的活性、NO的水平, 认为NO、NOS与大鼠实验性结肠炎有关, NO过量生成可能在UC发生、发展过程中起一定作用。因此, 抑制NOS可能是治疗UC的主要途径之一^[18]。Rumi *et al*^[19]研究发现, 选择性iNOS抑制剂氨基胍对DSS诱导的实验性结肠炎大鼠能够起到预防效果, 认为内生型NO在炎症过程中起着双重作用, 这取决于NOS的构型, cNOS产生的NO发挥着有益效应, iNOS产生的NO发挥着有害作用。

本实验发现, 5-ASA和DG治疗1 wk后大鼠结肠黏膜NF- κ B p65和iNOS表达较模型对照组显著降低, SOD活性显著增高, 但与正常对照组相比仍有统计学意义, 表明5-ASA和DG可能通过

抑制过度激活的NF- κ B、增加SOD活性及减少iNOS表达从而在一定程度上起到治疗UC大鼠的作用, 但还未能达到最佳的治疗效果, 两治疗组相比, 上述各指标差异无统计学意义。而联合用药组较两者单独用药时效果更佳, 结肠黏膜NF- κ B p65、iNOS表达显著降低, SOD活性显著增加, 且与正常对照组相比差异无统计学意义。

总之, DG可作为治疗大鼠UC的药物, 其作用机制可能是通过抑制NF- κ B活化从而减少炎症介质的释放, 增加SOD活性、减轻氧自由基和脂质过氧化作用对UC大鼠结肠组织的损伤、减少iNOS的表达, 而对UC大鼠起保护作用的, 其疗效与5-ASA相当, 且与5-ASA联合应用其治疗效果优于两者单独用药。由于DG价格便宜, 且长期应用无激素样不良反应, 因此有希望在临床上替代5-ASA。本实验结论为临床应用DG治疗UC提供了一定的理论依据, 但DG在临床上应用是否可达到同样的治疗效果还有待于进一步研究。

4 参考文献

- 1 夏冰, 程虹. 溃疡性结肠炎的生物治疗. 临床消化病杂志 2007; 19: 16-19
- 2 Martínez-Montiel MP, Munoz-Yagüe MT. Biologic therapies for chronic inflammatory bowel disease. *Rev Esp Enferm Dig* 2006; 98: 265-291
- 3 陈雄. 甘草酸二铵注射液对大鼠肾缺血/再灌注损伤的保护作用. 时珍国医国药 2007; 18: 2197-2198
- 4 杨丽蓉, 徐晓玉. 甘利欣的药理作用与临床应用. 中国医院用药评价与分析 2003; 3: 191-192
- 5 郭海荣, 霍丽娟. 甘草酸二铵对溃疡性结肠炎大鼠抗炎作用机制的研究. 山西医科大学学报 2008; 39: 849-852
- 6 Porter SN, Howarth GS, Butler RN. An orally administered growth factor extract derived from bovine whey suppresses breath ethane in colitic rats. *Scand J Gastroenterol* 1998; 33: 967-974
- 7 Dieleman LA, Palmen MJ, Akol H, Bloemena E, Peña AS, Meuwissen SG, Van Rees EP. Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS) is characterized by Th1 and Th2 cytokines. *Clin Exp Immunol* 1998; 114: 385-391
- 8 Tian L, Huang YX, Tian M, Gao W, Chang Q. Downregulation of electroacupuncture at ST36 on TNF- α in rats with ulcerative colitis. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 1028-1033
- 9 陈建国, 邓虹珠. 苦豆子总碱对大鼠实验性结肠炎SOD, MDA, NO, MPO表达的影响. 中国中药杂志 2006; 31: 323-324
- 10 甘华田, 欧阳钦, 贾道全, 夏庆杰. 溃疡性结肠炎患者核因子- κ B活化与细胞因子基因表达. 中华内科杂志 2002; 41: 252-255
- 11 李军华, 于皆平, 何小飞, 徐细明. 核因子- κ B在大鼠实验性溃疡性结肠炎肠组织的表达及其意义. 世界华人消化杂志 2003; 11: 214-218
- 12 刘一品, 李延青. 核因子- κ B的表达在溃疡性结肠炎发病机制中的意义. 胃肠病学 2006; 11: 103-106
- 13 吴礼国, 甘华田, 欧阳钦, 彭兰, 张蒙. 核因子- κ B“诱饵”寡核苷酸对小鼠葡聚糖硫酸钠结肠炎的影响. 中

■应用要点

本实验对甘草酸二铵治疗UC的疗效及相关作用机制进行了研究, 为临床应用其治疗UC提供了一定的理论依据。

■同行评价

本文探讨了甘草酸二胺治疗实验性结肠炎大鼠的药理作用机制,为临床上治疗溃疡性结肠炎患者提供了理论依据,具有一定的实用性。

- 14 Pavlick KP, Laroux FS, Fuseler J, Wolf RE, Gray L, Hoffman J, Grisham MB. Role of reactive metabolites of oxygen and nitrogen in inflammatory bowel disease. *Free Radic Biol Med* 2002; 33: 311-322
- 15 陈香宇, 段芳龄, 马军, 高天慧, 朱武凌, 白经修, 李建生. 超氧化物歧化酶脂质体治疗实验性结肠炎的研究. *山东医药* 2002; 42: 15-17
- 16 Segui J, Gil F, Gironella M, Alvarez M, Gimeno M, Coronel P, Closa D, Piqué JM, Panés J. Down-regulation of endothelial adhesion molecules and leukocyte adhesion by treatment with superoxide dismutase is beneficial in chronic immune experimental colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2005; 11: 872-882
- 17 陈香宇, 段芳龄, 李建生, 马军, 高天慧, 朱武凌, 白经修. NO、NOS在大鼠实验性结肠炎中的动态变化及意义. *胃肠病学和肝病杂志* 2002; 11: 120-123
- 18 Gobert AP, Cheng Y, Akhtar M, Mersey BD, Blumberg DR, Cross RK, Chaturvedi R, Drachenberg CB, Boucher JL, Hacker A, Casero RA Jr, Wilson KT. Protective role of arginase in a mouse model of colitis. *J Immunol* 2004; 173: 2109-2117
- 19 Rumi G, Tsubouchi R, Nishio H, Kato S, Mózsik G, Takeuchi K. Dual role of endogenous nitric oxide in development of dextran sodium sulfate-induced colitis in rats. *J Physiol Pharmacol* 2004; 55: 823-836

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志参考文献要求

本刊讯 本刊采用“顺序编码制”的著录方法,即以文中出现顺序用阿拉伯数字编号排序。提倡对国内同行近年已发表的相关研究论文给予充分的反映,并在文内引用处右上角加方括号注明角码。文中如列作者姓名,则需在“Pang *et al*”的右上角注角码号;若正文中仅引用某文献中的论述,则在该论述的句末右上角注角码号。如马连生^[1]报告……,潘伯荣 *et al*^[2-5]认为……;PCR方法敏感性高^[6-7]。文献序号作正文叙述时,用与正文同角的数字并排,如本实验方法见文献[8]。所引参考文献必须以近2-3年SCIE, PubMed,《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊为准,通常应只引用与其观点或数据密切相关的国内外期刊中的最新文献,包括世界华人消化杂志(<http://www.wjgnet.com/1009-3079/index.jsp>)和 *World Journal of Gastroenterology*(<http://www.wjgnet.com/1007-9327/index.jsp>)。期刊:序号,作者(列出全体作者)。文题,刊名,年,卷,起页-止页, PMID编号;书籍:序号,作者(列出全部),书名,卷次,版次,出版地,出版社,年,起页-止页。(常务副总编辑:张海宁 2009-02-08)

粪便抗原检测儿童及青少年幽门螺杆菌感染诊断试验的系统评价

张天哲, 张铁民, 韩 健, 高静云

张天哲, 华北煤炭医学院预防医学系流行病学与卫生统计学学科 河北省煤矿卫生与安全实验室 河北省唐山市 063000
张铁民, 唐山钢铁公司医院儿科 河北省唐山市 063000
韩 健, 华北煤炭医学院预防医学系流行病学与卫生统计学学科 河北省唐山市 063000
高静云, 唐山市妇幼保健院儿内科 河北省唐山市 063000
作者贡献分布: 此课题由张天哲与张铁民设计; 由韩健, 张铁民及高静云检索文献, 收集数据; 统计分析由张天哲与韩健完成; 本论文写作由张天哲, 张铁民及韩健完成; 高静云在研究中给予极大的工作支持。
通讯作者: 张天哲, 063000, 河北省唐山市建设南路57号, 华北煤炭医学院预防医学系流行病学与卫生统计学学科。
tianzhezhang@sina.com
电话: 0315-3725719 传真: 0351-3725713
收稿日期: 2008-10-28 修回日期: 2008-12-27
接受日期: 2008-12-29 在线出版日期: 2009-02-08

Diagnosis of *H pylori* infection in children and teenagers by *H pylori* stool antigen test: a systematic review

Tian-Zhe Zhang, Tie-Min Zhang, Jian Han, Jing-Yun Gao

Tian-Zhe Zhang, Division of Epidemiology and Health Statistics of Preventive Medicine Department, North China Coal Medical University; Laboratory of Occupational Health and Safety For Coal Industry of Hebei Province, Tangshan 063000, Hebei Province, China

Tie-Min Zhang, Department of Pediatrics, Hospital of Tangshan Steel Company, Tangshan 063000, Hebei Province, China

Jian Han, Division of Epidemiology and Health Statistics of Preventive Medicine Department, North China Coal Medical University, Tangshan 063000, Hebei Province, China

Jing-Yun Gao, Department of Pediatrics, Tangshan Women and Children Health, Tangshan 063000, Hebei Province, China

Correspondence to: Tian-Zhe Zhang, Division of Epidemiology and Health Statistics of Preventive Medicine Department, North China Coal Medical University, 57 Jianshe Southern Road, Tangshan 063000, Hebei Province, China. tianzhezhang@sina.com

Received: 2008-10-28 Revised: 2008-12-27

Accepted: 2008-12-29 Published online: 2009-02-08

Abstract

AIM: To systemically evaluate the accuracy of *H pylori* stool antigen (HpSA) test for diagnosing *H pylori* infection in children and teenagers through meta-analysis.

METHODS: Articles related to diagnosis of *H pylori* infection by HpSA test published from 1998-01 to 2008-05, were retrieved in CNKI and CBM. Related journals were also searched manually. Data analysis was conducted by software of Meta-Disc1.4. Indexes reflecting accuracy of HpSA test for diagnosing *H pylori* infection such as sensitivity, specificity, likelihood ratio, diagnostic odds ratio were pooled using fixed effect model. SROC (Summary receiver operating characteristic) curve was used to summarize overall diagnostic performance.

RESULTS: We included 17 studies which were homogeneous, including 1466 subjects among whom there were 737 people were positive and 729 were negative. Sensitivity of HpSA test for the diagnosis of *H pylori* infection was 92% (95%CI 90%-94%), specificity was 92% (95%CI 90%-94%), PLR(positive likelihood ratio) was 11.44 (95%CI 8.83-14.81), NLR (negative likelihood ratio) was 0.10 (95%CI 0.08-0.13), DOR (diagnostic odds ratio) was 126.14(95%CI 84.84-187.55). The area under SROC curve was 0.9696. Q index was 0.9193.

CONCLUSION: HpSA test as a non-invasive test is a highly accurate method to diagnose *H pylori* infection in children and teenagers.

Key Words: *Helicobacter pylori*; Diagnosis; Children and teenagers; *Helicobacter pylori* stool antigen; Systematic review

Zhang TZ, Zhang TM, Han J, Gao JY. Diagnosis of *H pylori* infection in children and teenagers by *H pylori* stool antigen test: a systematic review. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(4): 405-410

摘要

目的: 采用Meta分析的方法评价幽门螺杆菌粪便抗原(*H pylori* stool antigen, HpSA)诊断儿童*H pylori*感染的价值, 为临床应用提供依据。

方法: 以“幽门螺杆菌”、“儿童”“诊断性试验”、“粪便抗原”、“诊断准确性”

■背景资料

幽门螺杆菌粪便抗原检测是一种新的非侵入性检测*H pylori*的方法, 他不仅克服了血清抗*H pylori*抗体不能用于对近期根除效果判断的缺陷, 能反映现症感染情况, 而且没有¹³C尿素呼吸试验诸如受特殊设备限制、费用昂贵不易普遍推广、操作过程还需患儿配合及适当禁食的缺点, 检测标本易于获得、操作简便、省时, 不需要昂贵的仪器。

■同行评议者

沈薇, 教授, 重庆医科大学附属第二医院消化内科

■相关报道

国外学者也对国外粪便抗原检测 *H pylori* 的研究文献进行过系统评价, 论证了粪便抗原检测是一个较好的非侵入性试验, 我国学者对我国开展的此种方法的检测结果进行综合评价, 结果为灵敏度 94%-95.57%、特异度 93.17%-94%, 高于血清学检测的特异度(87.7%), 灵敏度与其相近; 但低于¹³C尿素呼气试验的灵敏度(95.49%)和特异度(94.76%)。

为检索词, 通过联机检索CNKI中国期刊全文数据库、CBM中国生物医学文献数据库, 文献追溯和手工检索的方法收集发表时间为1998-01/2008-05国内正式刊物上公开发表的有关评价粪便抗原检测 *H pylori* 感染准确性的相关研究文献。按确定的纳入、排除标准进行筛选, 采用QUADAS工具对纳入的文献进行质量评价, 应用MetaDisc1.4软件进行Meta分析, 综合评价灵敏度、特异度、似然比、诊断优势比和SROC曲线下面积、Q*指数等指标。

结果: 共17篇文献符合纳入标准, 各研究间具有同质性。共累计样本含量1466例, 由金标准确诊 *H pylori* 感染737例, 非感染729例。Meta分析结果显示各研究之间的一致性较高, 粪便抗原诊断 *H pylori* 感染的合并敏感度、特异度分别是92%(95%CI 90%-94%)和92%(95%CI 90%-94%); 合并阳性似然比、阴性似然比分别为11.44(95%CI 8.83-14.81)和0.10(95%CI 0.08-0.13)。合并诊断优势比DOR126.14(84.84-187.55)。绘制SROC曲线, 估计SROC曲线下面积AUC = 0.9696, Q* = 0.9193。

结论: 粪便抗原检测儿童及青少年 *H pylori* 感染的方法准确度较高。

关键词: 幽门螺杆菌; 儿童; 青少年; 诊断性试验; 粪便抗原; 系统评价

张天哲, 张铁民, 韩健, 高静云. 粪便抗原检测儿童及青少年幽门螺杆菌感染诊断试验的系统评价. 世界华人消化杂志 2009; 17(4): 405-410
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/405.asp>

0 引言

幽门螺旋杆菌(*H pylori*)的发现及其相关胃、十二指肠疾病的认识是近二十年来胃肠学领域中最大的研究进展之一, 对胃、十二指肠疾病以及其他相关疾病的防治产生了深远的影响。我国是 *H pylori* 高感染国家。近年来, 流行病学资料显示成人 *H pylori* 感染不少在儿童期获得, 儿童是 *H pylori* 感染的易感人群, *H pylori* 感染不仅是儿童胃炎、胃溃疡、再发性腹痛的病因之一, 而且与儿童生长发育及成年后消化性溃疡、胃癌的发生密切相关。因此, 在儿童期快速、准确地检测出 *H pylori* 具有重要意义。近年来粪便抗原检测 *H pylori* 感染的方法逐步广泛用于临床检测, 也有学者对这种非侵入性诊断方法进行综合评价^[1], 但仅是对多个研究灵敏度、特

异度、预测值、似然比的合并, 而诊断试验的性能不仅由灵敏度决定, 也由特异度决定, 即诊断试验的Meta分析需要同时考虑这两个指标, ROC曲线(接受试者工作特征曲线)才是评价试验准确性的综合指标。对于同一诊断试验的多个不同研究进行综合评价的方法, 有学者介绍了诊断试验Meta分析的方法^[2-3]: 综合接受者工作特征(summary receiver operation operating characteristic, SROC)曲线方法。本研究在考察灵敏度、特异度、似然比、诊断优势比等指标的同时, 结合SROC曲线法对国内10年来运用粪便抗原检测儿童 *H pylori* 感染的结果进行系统评价, 为临床应用提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料 以“幽门螺杆菌”、“诊断性试验”、“粪便抗原”、“准确性”为检索词, 通过计算机检索中国期刊全文数据库CNKI、中国生物医学文献数据库CBM, 文献追溯和手工检索的方法收集1998-01/2008-05国内正式刊物上发表的有关评价粪便抗原检测幽门螺杆菌感染准确性的相关文献。按确定的纳入、排除标准进行筛选。

1.2 方法

1.2.1 纳入与排除标准: 文献纳入标准: (1)研究类型: *H pylori* 粪便抗原检测儿童幽门螺杆菌感染的诊断试验研究的全文文献, 无论是否采用盲法; (2)检测方法为酶联免疫吸附法(ELISA); (3)各个临床试验明确说明采用什么检测作为“金标准”; (4)且要有完整的临床数据包括真阳性数(TP)、真阴性数(TN)、假阳性数(FP)、假阴性数(FN); (5)样本含量大于30例。(6)研究对象为有上消化道症状者, 年龄<18岁; (7)同一作者发表的内容相近的文章, 纳入样本量最大者。文献排除标准: (1)文摘、综述、讲座和述评类文献; (2)数据有误或数据不完整无法获得诊断四格表数据; (3)感染未经金标准证实; (4)重复发表的文献。

1.2.2 数据提取: 提取研究作者、发表时间、患儿年龄、病例类型、四格表数据、临界值、金标准、试剂盒生产公司等信息。

1.2.3 文献质量评价: 参考系统评价中评价诊断性研究质量的工具-QUADAS评价条目, 结合实际情况, 增加了是否说明诊断性试验所确定的临界值; 样本含量的大小几方面对纳入研究进行质量评价。

表 1 17篇纳入文献的基本特征

第一作者	金标准	临界值(A)	TP	FP	FN	TN	n	SEN	SEP	PLR	NLR	DOR
刘敏 <i>et al</i> ^[6]	联合试验	0.161	40	6	4	43	93	0.909	0.878	7.42	0.104	71.67
余幼民 <i>et al</i> ^[7]	联合试验	0.161	19	3	4	49	75	0.826	0.942	14.32	0.185	77.58
耿岚岚 <i>et al</i> ^[8]	联合试验	0.120	53	2	5	24	84	0.914	0.923	11.88	0.093	127.20
王东来 <i>et al</i> ^[9]	联合试验	0.161	36	4	2	40	82	0.947	0.909	10.42	0.058	180.00
金宗平 <i>et al</i> ^[10]	呼气试验	0.120	36	5	8	56	105	0.818	0.918	9.98	0.198	50.40
郭鹏涛 <i>et al</i> ^[11]	联合试验	0.161	101	3	2	16	122	0.981	0.842	6.21	0.023	269.33
曾至荣 <i>et al</i> ^[12]	联合试验	0.120	17	2	1	20	40	0.944	0.909	10.39	0.061	170.00
张艳玲 <i>et al</i> ^[13]	呼气试验	0.120	13	1	2	15	31	0.867	0.938	13.87	0.142	97.50
刘凤霖 <i>et al</i> ^[14]	联合试验	0.120	39	5	3	74	121	0.929	0.937	14.67	0.076	192.40
吴力力 <i>et al</i> ^[15]	联合试验	无	34	4	2	60	100	0.944	0.938	15.11	0.059	255.00
蒲秀红 <i>et al</i> ^[16]	呼气试验	0.120	68	3	7	104	182	0.907	0.972	32.34	0.096	336.76
陈宇翔 <i>et al</i> ^[17]	联合试验	0.120	51	3	2	20	76	0.962	0.870	7.38	0.043	170.00
关克涛 <i>et al</i> ^[18]	联合试验	0.120	29	1	4	20	54	0.879	0.952	18.46	0.127	145.00
张艳玲 <i>et al</i> ^[19]	呼气试验	0.120	4	4	1	22	31	0.800	0.846	5.20	0.236	22.00
张瑾 <i>et al</i> ^[20]	联合试验	无	32	2	5	33	72	0.865	0.943	15.14	0.143	105.60
刘光华 <i>et al</i> ^[21]	呼气试验	0.151	66	6	4	54	130	0.943	0.900	9.43	0.063	148.50
康红莊 <i>et al</i> ^[22]	联合试验	0.120	40	2	3	23	68	0.930	0.920	11.63	0.076	153.33

■创新盘点

本文通过Meta分析不仅综合定量描述了灵敏度、特异度、似然比等反映粪便抗原检测*H pylori*感染诊断试验真实性的指标,而且引入了总诊断优势比DOR这一反映了诊断效能、全面评价诊断试验准确性及判别能力的指标,同时采用综合接受者工作特征(SROC)曲线分析方法,通过曲线下的面积及Q指数(Q*)之大小进步显示了诊断试验准确度的高低,为临床应用提供科学依据。

1.2.4 数据分析: (1)分析指标: 利用MetaDsic1.4软件^[4]计算各研究的合并灵敏度(SEN)、合并特异度(SPE)、阳性似然比(PLR)、阴性似然比(NLR)、诊断优势(DOR)及其95%可信区间(concidence interval, CI). 并进行综合接受者工作特征(SROC)曲线分析, 估计SROC曲线下面积(area under curve, AUC)和Q*指数. (2)异质性检验: 对上述分析指标在综合分析前均作异质性检验, 如存在异质性, 则采用随机效应模型进行汇总处理, 反之则采用固定效应模型. 利用MetaDsic1.4软件^[4], 在各指标合并前分别采用 χ^2 检验、Cochran-Q检验进行异质性检验. I^2 指数也可大致反映异质性的严重程度, $I^2 < 25\%$ 则异质性较小, $25\% < I^2 < 50\%$ 则为中等度异质性, $I^2 > 50\%$ 则研究间的异质性较大^[5].

2 结果

2.1 纳入研究的基本特征 最初检索到121篇相关中文文献, 均已全文形式发表, 发表时间为1998-2008, 符合纳入标准的共17篇^[6-22], 患者年龄1.7-18岁, 共计1466名研究对象, 其中经金标准确定*H pylori*感染者737例, 非感染者729例. 未纳入的文献为没有说明具体实验数据、没有明确的金标准、重复发表、被研究者超过18岁. 各研究的基本特征见表1.

2.2 纳入研究的质量评价 对纳入17篇文献进行质量评价发现: 所有研究均有明确的金标准并

与其比较, 所有研究的研究对象都经金标准的检查, 即不存在证实偏倚; 12篇文献明确描述待评价试验的实验步骤、操作方法等, 使他人易在相同条件下重复; 多数研究(12篇)写明试验结果判读的临界值. 但在有些条目上还有欠缺, 表现在: 对金标准的试验操作过程没有足够清楚的描述, 只详细叙述待评价试验的操作过程, 试验重复性考虑得不全面; 仅有3篇提及结果观察采用盲法; 多数研究只笼统地将研究对象归为有上消化系统症状者, 不清楚疾病类型是否全面, 其中2篇为反复腹痛患儿, 4篇具体说明研究对象分别为慢性胃炎, 十二指肠球部溃疡, 十二指肠球炎, 浅表性胃炎, 结节性胃炎, 胃溃疡, 反流性食管炎, 出血性胃十二指肠炎症患儿; 研究的样本含量不足, 样本含量在31-182例之间, 普遍偏低, 多数没有达到诊断试验应有的样本含量, 从以上信息可见国内诊断性研究的质量、科学性还不是很高. QUADAS评价^[23]结果见表2.

2.3 粪便抗原检测Meta分析

2.3.1 异质性检验及各指标的Meta分析合并结果: 从 I^2 指数的大小上看, 各指标的 I^2 指数在0%-22.4%之间, $I^2 < 25\%$, 也表明异质性较小. 17项研究的合并SEN及SPE均为92%, 95%CI: 90%-94%(图1A-B), PLR为11.44, 95%CI: 8.83-14.81(图1C), NLR为0.10, 95%CI: 0.08-0.13(图1D), DOR为126.14, 95%CI: 84.84-187.55(图2), SROC曲线下面积(AUC)为

■应用要点

Meta分析结果显示粪便抗原检测 *H pylori* 感染诊断试验诊断效能较高, 是一无创、简便、经济的准确性较高的检测方法。

表 2 17篇纳入文献的QUADAS评价

QUADAS评价条目	文献数量		
	是	否	不清楚
病例谱是否包含了各种病例及易混淆的疾病病例	4	2	11
研究对象的选择标准是否明确	6	—	11
金标准是否能准确区分有病、无病状态	17	—	—
金标准和待评价试验检测的间隔时间是否足够短, 以避免出现疾病病情的变化	17	—	—
是否所有病例无论待评价试验的结果如何, 都接受了相同的金标准试验	17	—	—
金标准试验是否独立于待评价试验即待评价试验不包含在金标准中	17	—	—
待评价试验的操作是否描述的足够清楚且可进行重复	12	5	—
金标准试验的操作是否描述的足够清楚且可以进行重复	2	15	—
待评价试验的结果判读是否是在不知晓金标准试验结果的情况下进行的	3	—	14
金标准试验的结果判读是否是在不知晓待评价试验结果的情况下进行的	3	—	14
是否报告了难以解释中间试验结果	17	—	—
对退出研究的病例是否进行解释	17	—	—

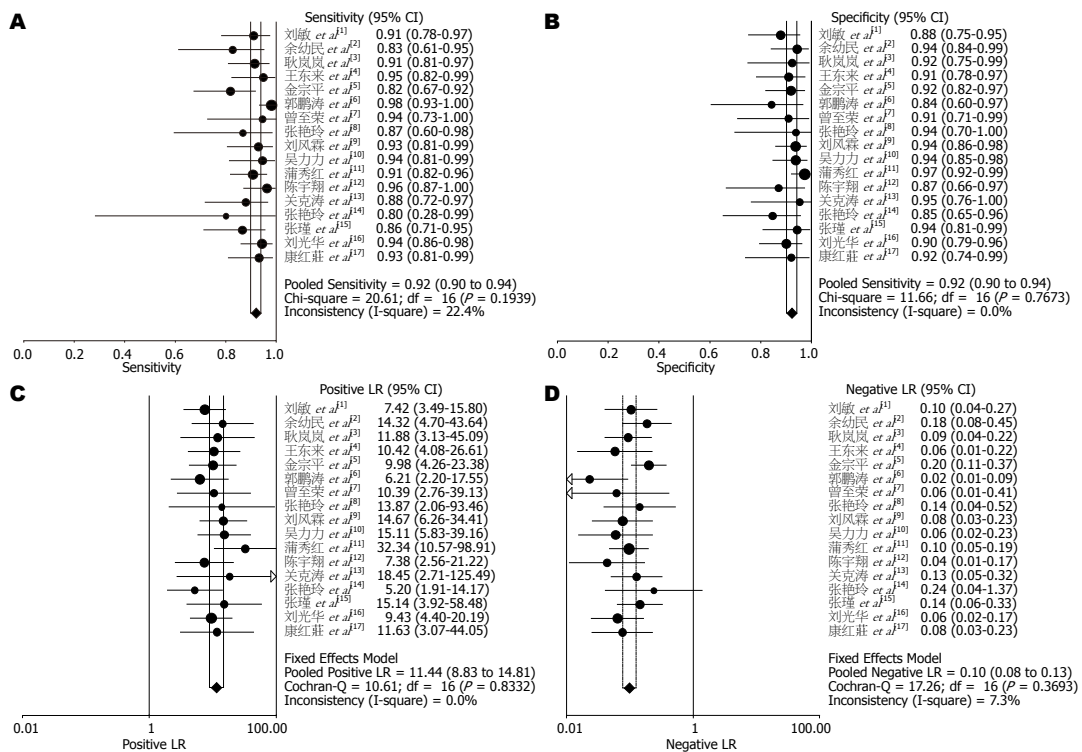


图 1 异质性检验及各指标的Meta分析合并森林图。A: 灵敏度; B: 特异度; C: 阳性似然比; D: 阴性似然比。

0.9696, $Q^* = 0.9193$ (图3)。

2.3.2.敏感性分析结果: 为了考察本次Meta分析结论的稳定性, 从四个角度进行敏感性分析: (1) 去除2个未注明临界值的研究; (2) 去除试剂生产厂家非协和药业的3个研究; (3) 去除金标准仅为单项试验(呼气试验)的5个研究; (4) 去除样本含量小于70例的5个研究。结果与原有纳入的17项研究相比结果一致, 由表3结果显示: 各评价指标均变化不大, 且可信区间大部分重叠。说明本次研究的结论可靠、稳定。

3 讨论

目前临床检测 *H pylori* 感染的方法较多, 主要包括侵入性和非侵入性检查两大类。前者是指通过内窥镜检查先取得胃黏膜标本, 再行组织学、快速尿素酶试验、细菌培养, 有一定的创伤性, 对于儿童及青少年这一群体, 不易被接受, 非侵入性检查相对更适宜这一人群, 在非侵入性的 *H pylori* 检测方法中, 除了已有的¹³C尿素呼吸试验和血清抗 *H pylori* 抗体的检测, 粪便HpSA检测是一新的非侵入性的检测方法, 其标

表 3 从四个角度进行敏感性分析的结果

分析角度	研究个数	SEN(95% CI)	SPE(95% CI)	PLR (95% CI)	NLR (95% CI)	DOR(95% CI)	AUC	Q*
原17项研究	17	0.92 (0.90, 0.94)	0.92 (0.90, 0.94)	11.44 (8.83, 14.81)	0.10 (0.08, 0.13)	126.14 (84.84, 187.55)	0.9696	0.9193
去除未注明临界值的研究	15	0.92 (0.90, 0.94)	0.92 (0.90, 0.94)	11.06 (8.41, 14.54)	0.10 (0.08, 0.13)	122.37 (80.39, 186.26)	0.9687	0.9178
去除试剂为非协和药业研究	14	0.91 (0.88, 0.93)	0.93 (0.91, 0.95)	12.49 (9.42, 16.57)	0.11 (0.08, 0.14)	119.62 (78.12, 183.16)	0.9684	0.9172
去除金标准为单项试验研究	12	0.93 (0.91, 0.95)	0.92 (0.89, 0.94)	10.67 (7.84, 14.52)	0.09 (0.07, 0.13)	139.73 (84.58, 230.85)	0.9707	0.9209
去除小样本研究	12	0.92 (0.90, 0.94)	0.93 (0.90, 0.95)	11.00 (8.34, 14.52)	0.10 (0.07, 0.13)	132.06 (84.90, 205.43)	0.9704	0.9205

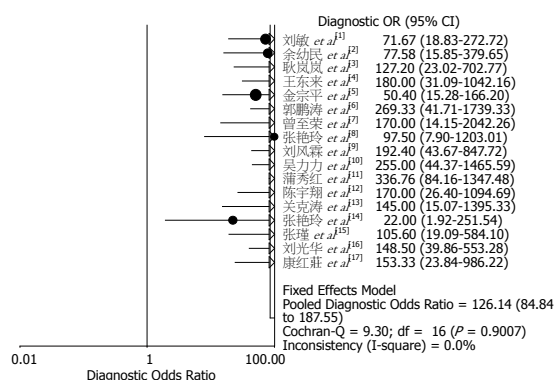


图 2 合并诊断比值比森林图

本易于获得、操作简便、省时, 不需要昂贵的仪器. 可反映现症感染情况, 适用于治疗后复查, 判断疗效. 我国近几年, 有关评价该方法诊断价值的研究也有许多报道, 但大多为小样本研究. 因此本研究采用Meta分析这种可对多个同类研究结果进行汇总定量分析的方法, 从统计学角度达到增大样本含量, 提高检验效能, 对我国近十年使用粪便抗原检测*H pylori*感染的诊断试验做一系统评价.

纳入的17个研究其灵敏度从80.0%-98.1%, 特异度从84.2%-97.2%不等, 但经异质性检验有较高的一致性, 这可能与各研究所设定的临界值较为相近有关, 另外其他影响试验结果的因素都比较一致, 如试验试剂盒多数为协和药业出品; 金标准多为联合试验, 且较为一致, 并对*H pylori*阳性或阴性的判断较为严格, 错分偏倚小.

17项粪便抗原检测*H pylori*感染的诊断研究的综合定量分析结果显示合并灵敏度和特异度较高, 均为92%(95%CI: 90%-94%), 似然比属于同时反映灵敏度和特异度的复合指标, 本研究PLR为11.44, 提示*H pylori*感染者经粪便抗原检测结果为阳性的机会是非感染者11.44倍; NLR

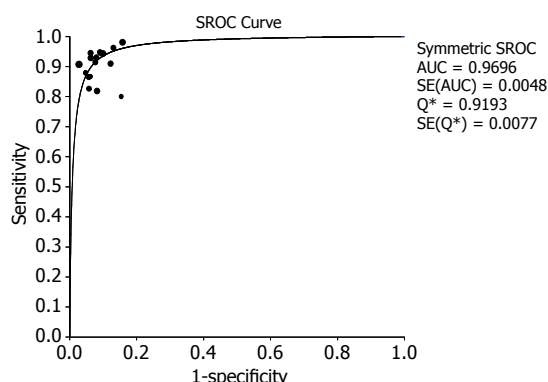


图 3 SROC曲线

为0.10, 提示粪便抗原检测试验错误判断阴性的机会是正确判断的10%. 一般来说如果似然比大于10或小于0.1, 使验前概率到验后概率发生决定性变化, 基本可以确定或排除诊断^[24]; 总诊断优势比为126.14, 远远大于1, 说明*H pylori*感染者比非感染者更有可能获得粪便抗原试验阳性结果, 前者是后者的126.14倍, 他反映了诊断效能, 能全面评价了诊断试验准确性及判别能力. SROC曲线分析通过曲线下的面积及Q*之大小进一步显示了诊断试验准确度的高低, AUC = 0.9696, Q* = 0.9193, 均接近1, 表明粪便抗原检测*H pylori*感染的准确度很高. 国外学者对国外粪便抗原检测*H pylori*的研究文献也进行过系统评价^[25], 论证了他是一个较好的非侵入性试验, 我国学者^[11,26-27]也对我国开展的粪便抗原检测*H pylori*感染的实验进行综合评价, 他们的结果为灵敏度94%-95.57%、特异度93.17%-94%. 与其他两种非侵入性检查Meta分析相比, 粪便抗原检测的特异度高于血清学检测的特异度(87.7%), 灵敏度与其相近; 但低于¹³C尿素呼气试验的灵敏度(95.49%)和特异度(94.76%). 在诊断优势比方面, 幽门螺杆菌粪便抗原检测方法

■名词解释

1 诊断优势比 DOR: 表示病例组中阳性结果的优势(真阳性率与假阴性率之比)与对照组中阳性结果的优势(假阳性率与真阴性率之比)的比值. 如果DOR>1说明由金标准确定的阳性组比阴性组更有可能获得诊断试验阳性结果.

2 Q*指数: 是SROC曲线与直线TPR+FPR = 1(在这条直线上灵敏度=特异度)相交处的灵敏度, 取值范围为0.5-1, 反映了SROC曲线与左上角接近的程度, 当SROC曲线接近于左上角时, 指标Q*接近于1. Q*指数越大, 表示诊断试验的准确度越高.

3 SROC曲线: 一种反映诊断试验准确度的图形, 由曲线方程可得到曲线下的面积, 可利用这一面积的估计值作为诊断试验准确度的综合指标, 取值范围为0.5-1, 值越大, 表示诊断试验的准确度越高.

■同行评价

儿童幽门螺杆菌粪便抗原检测价值的Meta分析未见相关报道,本文具有一定的学术价值。

的DOR均高于上述两种非侵入性方法^[28]。

本研究尚存在以下不足: (1)检索文献仅限于中文,存在语种偏倚; (2)虽然采取多种途径从多个数据库广泛检索正式发表文献,那些由于种种原因未能发表的文献不在研究之列,另外阳性结果的研究往往比阴性结果的研究更容易发表,所以不能排除潜在的发表偏倚。

虽然本研究存在上述不足,但我们还是利用中国近十年来使用HpSA检测儿童及青少年 *H pylori* 感染有关文献资源,从循证检验与诊断的角度得出了在儿童及青少年中,粪便抗原检测 *H pylori* 感染方法具有较高准确度。需要指出的是,鉴于发表文献的质量不高,希望将来能有更多的学者和儿科医生能更多的开展一些设计严谨、大样本量、甚至多个地区共同合作的诊断试验的研究,以获得可信度高的循证医学证据,更准确地为广大临床工作者和医疗卫生决策者服务。

4 参考文献

- 1 郭银燕, 张澎田, 彭晓霞, 詹思延. 幽门螺杆菌粪便抗原诊断方法的系统评价. 中华医学杂志 2005; 85: 1564-1567
- 2 方积乾, 陆盈. 现代医学统计学. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 182-195
- 3 刘关键, 吴泰相. 诊断性试验的Meta分析-SROC曲线法介绍. 中国循证医学杂志 2003; 3: 41-44
- 4 Zamora J, Abaira V, Muriel A, Khalid K, Coomarasamy A. Meta-DiSc: A software for meta-analysis of test accuracy data. *BMC Med Res Methodology* 2006; 6: 31
- 5 王家良, 王一龙. 循证医学. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 64
- 6 刘敏, 张艳玲, 贾立英, 刘春燕. 对儿童幽门螺杆菌粪便抗原检测方法的评价. 北京医学 2005; 27: 726-727
- 7 余幼民, 陈林, 凌如娟. 幽门螺杆菌粪便抗原检测的评价. 国际医药卫生导报 2006; 12: 80-81
- 8 耿岚岚, 丘小汕, 区文玟, 龚四堂, 潘瑞芳, 陈宝心. 儿童粪便幽门螺杆菌抗原检测的临床应用. 中国实用儿科杂志 2003; 18: 687-688
- 9 王东来, 李敬果. 儿童粪便幽门螺杆菌抗原检测的临床应用. 现代检验医学杂志 2004; 19: 36-37
- 10 金宗平, 刘玉华, 李黎, 杨爱君. 儿童幽门螺杆菌感

染临床检测方法评价. 实用儿科临床杂志 2007; 22: 1449-1450

- 11 郭鹏涛, 雷应权. 幽门螺杆菌粪便抗原检测对诊断儿童幽门螺杆菌感染的价值. 临床军医杂志 2006; 34: 708-709
- 12 曾至荣, 何瑶, 胡品津, 陈为. 幽门螺杆菌粪便抗原检测在儿童中的应用价值研究. 中国现代医学杂志 2002; 12: 38-40
- 13 张艳玲, 贾立英, 刘敏, 邓莉, 赵惠欣. 儿童幽门螺杆菌粪便抗原检测临床应用价值的评价. 中国实用儿科杂志 2003; 18: 226-227
- 14 刘凤霖, 牛余正, 宋华, 张金婷, 刘捷. 儿童幽门螺杆菌感染粪便抗原检测的临床研究. 中华儿科杂志 2002; 40: 557
- 15 吴力力, 章国忠, 潘建豹, 孙利敏, 郑超秀. 粪便Hp抗原检测对诊断儿童Hp感染的价值. 临床医学 2006; 26: 86
- 16 蒲秀红, 郭晓清, 石玉玲, 安涛, 邱萌, 袁晓霞, 李楠. 粪便幽门螺杆菌抗原检测对儿童复发性腹痛病因诊断的价值. 中国当代儿科杂志 2005; 7: 426-428
- 17 陈宇翔, 刘才旺. 两种非侵入性方法检测儿童幽门螺杆菌感染. 中国交通医学杂志 2005; 19: 520-521
- 18 关克涛, 徐文泉, 刘云峰, 卢铭江, 颜慕霞. 酶联免疫吸附测定检测儿童粪便幽门螺杆菌抗原. 广州医学院学报 2006; 34: 43-45
- 19 张艳玲, 贾立英, 刘敏. 幽门螺杆菌粪便抗原检测在幽门螺杆菌感染的应用. 实用儿科临床杂志 2005; 20: 206-207
- 20 张瑾, 陈美芸, 应淑芬, 胡大康. 儿童再发性腹痛中幽门螺杆菌不同检测方法. 中国微生态学杂志 2006; 18: 479-480
- 21 刘光华, 叶红, 陈卫芬. 小儿科幽门螺杆菌检测方法的研究. 齐齐哈尔医学院学报 2004; 25: 265
- 22 康红荏, 李冰冰, 陈丰华. 幽门螺杆菌粪便抗原检测的临床研究. 中华儿科杂志 2002; 40: 556
- 23 刁骧, 艾昌林. QUADAS的制定: 用于系统评价中评价诊断性研究质量的工具. 中国循证医学杂志 2007; 7: 296-306
- 24 王吉耀. 循证医学与临床实践. 第1版. 北京: 科学出版社, 2002: 131
- 25 Gisbert JP, Pajares JM. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection by stool antigen determination: a systematic review. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 2829-2838
- 26 张丽, 张建中. 中国检验幽门螺杆菌感染方法诊断效能的分析. 世界华人消化杂志 2007; 15: 649-654
- 27 姜建辉, 徐勇勇, 白玉祥. 幽门螺杆菌感染诊断效果的统计综合评价. 第四军医大学学报 2002; 23: 1029-1032
- 28 Jiang JH, Xu DZ, Yan YP, Ke M, Shao ZJ. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection: A meta-analysis. *J Med Coll PLA* 2007; 22: 246-249

编辑 史景红 电编 吴鹏朕

胃镜检出老年消化性溃疡124例

刘贝妮, 于皆平, 于红刚

刘贝妮, 于皆平, 于红刚, 武汉大学人民医院 湖北省武汉市 430060

作者贡献分布: 此课题由刘贝妮, 于皆平及于红刚设计; 研究过程由刘贝妮操作完成; 研究分析工具由于红刚提供; 数据分析由刘贝妮与于皆平完成; 本论文写作由刘贝妮完成。

通讯作者: 于红刚, 430060, 湖北省武汉市武昌区紫阳路99号, 武汉大学人民医院消化内科. yuhonggang@yahoo.com
电话: 027-88041911-2135 传真: 027-88042292

收稿日期: 2008-12-15 修回日期: 2009-01-10

接受日期: 2009-01-12 在线出版日期: 2009-02-08

Analysis of 124 cases with senile peptic ulcer detected by gastroscopy

Bei-Ni Liu, Jie-Ping Yu, Hong-Gang Yu

Bei-Ni Liu, Jie-Ping Yu, Hong-Gang Yu, Department of Gastroenterology, People's Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei Province, China

Correspondence to: Hong-Gang Yu, Department of Gastroenterology, People's Hospital of Wuhan University, 99 Ziyang Road, Wuchang District, Wuhan 430060, Hubei Province, China. yuhonggang@yahoo.com

Received: 2008-12-15 Revised: 2009-01-10

Accepted: 2009-01-12 Published online: 2009-02-08

Abstract

AIM: To analyze clinical characteristics of senile peptic ulcer.

METHODS: Patients with senile peptic ulcer confirmed by gastroscopy in our hospital from Jan 2007 to Oct 2008 were retrospectively analyzed and compared with those <60 years old with peptic ulcer detected contemporarily.

RESULTS: There were 124 peptic ulcer cases, including 61 cases of gastric ulcer, 51 cases of duodenal ulcer and 12 cases of complex ulcer in the aged group, and 100 peptic ulcer cases < 60 years old, including 29 cases of gastric ulcer, 64 cases of duodenal ulcer, and 7 cases of complex ulcer. Significant difference was detected between the two groups ($P < 0.01$). For senile gastric ulcer, gastric body ulcer was the dominant, accounting for 36.1%, $D > 2$ cm was 29.5%. Upper gastrointestinal hemorrhage was the most common complication, accounting for 43.5%.

CONCLUSION: Symptoms of senile peptic ulcer

are not typical. The incidence rate of superior position is higher. The morbidity of gastric ulcer is high, and the involved area is bigger for aged people. More and severe complications are seen.

Key Words: Peptic ulcer; Elderly; Clinical analysis

Liu BN, Yu JP, Yu HG. Analysis of 124 cases with senile peptic ulcer detected by gastroscopy. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(4): 411-413

摘要

目的: 探讨老年消化性溃疡的临床特点。

方法: 回顾性分析我院内镜中心2007-01/2008-10经胃镜检出的老年消化性溃疡患者, 并与同期行胃镜检查的60岁以下的消化性溃疡患者进行对比。

结果: 老年组124例, 胃溃疡61例, 十二指肠球部溃疡51例, 复合溃疡12例; 中青年组100例, 胃溃疡29例, 十二指肠球部溃疡64例, 复合溃疡7例。两组相比胃溃疡有显著差异($P < 0.01$)。老年组胃体溃疡占胃溃疡的36.1%, 直径 > 2 cm的溃疡占29.5%, 并发症以上消化道出血为主, 占43.5%, 均较中青年组有显著性差异($P < 0.05$)。

结论: 老年消化性溃疡症状不典型, 溃疡部位由幽门向贲门推移, 且胃溃疡比十二指肠球部溃疡多, 溃疡面积较大, 合并症多且较严重。

关键词: 消化性溃疡; 老年; 临床分析

刘贝妮, 于皆平, 于红刚. 胃镜检出老年消化性溃疡124例. *世界华人消化杂志* 2009; 17(4): 411-413

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/411.asp>

0 引言

消化性溃疡是一种常见病, 一般认为是胃黏膜攻击因子(主要是胃酸和胃蛋白酶)相对增强或防御因子(主要是胃黏液屏障、黏膜屏障和黏膜血流量等)相对减弱, 二者失衡所引起。老年消化性溃疡是指年龄60岁以上的人群发生的消化性

■背景资料

随着社会的发展, 老年性消化性溃疡日益增多。由于老年性溃疡病与中青年相比有许多不同的特点, 临床上极易漏诊、误诊。

■同行评议者

任建林, 教授, 厦门大学附属中山医院消化内科; 郑鹏远, 教授, 郑州大学第二附属医院消化科

■应用要点

本文总结老年性消化性溃疡特点,有助于临床医生进一步诊断和治疗该种疾病。

溃疡。2007-01/2008-10我院内镜中心经胃镜检查有上消化系症状的患者13 264例,检出消化性溃疡1638例,其中,老年消化性溃疡患者124例,占7.6%。本文对经胃镜诊断的老年消化性溃疡患者与同期行胃镜检查的60岁以下的消化性溃疡患者进行对比,总结分析如下。

1 材料和方法

1.1 材料 选取经胃镜诊断的老年性消化性溃疡患者124例,其中,男93例,女31例,年龄>60岁,平均年龄67.1岁;同时采用等比例抽样方法将确诊为消化性溃疡的中青年患者按年龄段分为:20岁以下,20-30岁,30-40岁,40-50岁,50-59岁5组,对每组采用简单抽样的方法抽取设计的样本个数,共抽取年龄在60岁以下的患者100例作为中青年组,其中,男69例,女31例,年龄18-59(平均年龄44.7)岁。

1.2 方法 所有患者均经Olympus-XQ260电子胃镜检查确诊,既往有胃癌病史,应激性溃疡,吻合口溃疡,肝硬化食管胃底静脉曲张破裂出血,消化系肿瘤出血及血液疾病所致出血的病例均排除在外^[1];比较两组的溃疡类型、溃疡部位、并发症等。

统计学处理 采用SPSS13.0统计软件,两组数据比较均采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 溃疡类型 老年组中,胃溃疡患者61例,十二指肠球部溃疡51例,复合溃疡12例;而中青年组中,胃溃疡29例,十二指肠球部溃疡64例,复合溃疡7例。两者相比,胃溃疡及十二指肠球部溃疡均有显著性差异($P<0.01$,表1)。

2.2 溃疡部位 老年组61例胃溃疡患者中,胃底溃疡5例,胃体22例,胃角15例,胃窦17例,幽门管2例;中青年组29例中,胃底溃疡1例,胃体4例,胃角10例,胃窦13例,幽门管1例。两组相比,胃体溃疡有显著性差异($P<0.01$,表2)。

2.3 溃疡面积 老年组61例胃溃疡患者中,溃疡直径<1.0 cm的24例,直径在1.0-2.0 cm之间的19例,>2.0 cm的18例;中青年组29例胃溃疡患者中,溃疡直径<1.0 cm的19例,直径在1.0-2.0 cm之间的7例,>2.0 cm的3例。两组相比,直径<1.0 cm和直径>2.0 cm的均有显著性差异($P<0.05$,表3)。

2.4 临床表现 老年组多以腹胀及上腹部不适就诊,其次为嗝气,食欲减退,黑便,呕吐,反酸,胸骨后疼痛等,另有少数患者无明显症状。中青年组最常见的症状为腹痛,其次为嗝气,反酸,食欲减退,呕吐,黑便等。

表 1 两组溃疡类型比较 $n(\%)$

分组	<i>n</i>	胃溃疡	十二指肠球部溃疡	复合溃疡
老年组	124	61(49.2) ^b	51(41.1) ^b	12(9.7)
中青年组	100	29(29)	64(64)	7(7)

^b $P<0.01$ vs 中青年组。

表 2 两组胃溃疡部位比较 $n(\%)$

分组	<i>n</i>	胃底	胃体	胃角	胃窦	幽门管
老年组	61	5(8.2)	22(36.1) ^a	15(24.6)	17(27.9)	2(3.3)
中青年组	29	1(3.4)	4(13.8)	10(34.5)	13(44.8)	1(3.4)

^a $P<0.05$ vs 中青年组。

表 3 两组胃溃疡大小对比 $n(\%)$

分组	<i>n</i>	直径(cm)		
		<1.0	1.0-2.0	>2.0
老年组	61	24(39.3) ^a	19(31.1)	18(29.5) ^a
中青年组	29	19(65.5)	7(24.1)	3(10.3)

^a $P<0.05$ vs 中青年组。

表 4 两组并发症的比较 $n(\%)$

分组	<i>n</i>	出血	穿孔	幽门梗阻	癌变
老年组	124	54(43.5) ^b	11(8.9)	8(6.5)	7(5.6)
中青年组	100	23(23)	6(6)	9(9)	1(1)

^b $P<0.01$ vs 中青年组。

2.5 并发症 老年组124例患者中,发生出血54例,穿孔11例,幽门梗阻8例,癌变7例;中青年组100例中,出血23例,穿孔6例,幽门梗阻9例,癌变1例。两组相比,发生出血的患者例数有显著性差异($P<0.01$,表4)。

3 讨论

溃疡病是老年人常见疾病。随着社会的发展,老年性消化性溃疡日益增多^[2-3]。本文资料显示,老年性溃疡病与中青年相比有许多不同的特点:(1)溃疡部位由幽门向胃窦推移,且胃溃疡比十二指肠球部溃疡多^[4-7]。124例老年溃疡病患者中,胃溃疡61例,占总数的49.2%;中青年组100例,胃溃疡29例,占29%,两组相比有显著差异。老年组61例胃溃疡患者中,胃体溃疡占36.1%,

明显高于中青年组. 这可能与老年人肠上皮化生、胃炎、胃窦胃体黏膜交界上移, 溃疡部位由下而上推进, 也与胃黏膜的退行性变等因素有关^[8], 故高位溃疡的发病率随着年龄的增高而增高^[9]. 由于高位溃疡靠近贲门和胃体, 患者常可出现吞咽困难、胸骨后疼痛, 因而易被误诊为食管疾病和心绞痛. (2)老年人的溃疡面积较大. 本组资料显示, 61例老年性胃溃疡患者中, 溃疡直径<1.0的患者24例, 占39.3%, 低于中青年组; 而溃疡直径>2.0的患者18例, 占29.5%, 明显高于中青年组. 这可能由于老年人胃黏膜防御能力减弱, 黏膜血运较差, 且老年人多有其他伴随疾病, 使得导致溃疡的因素增加, 因此胃溃疡较大而深. (3)老年人机体反应能力差, 往往缺乏周期性、规律性的上腹部疼痛, 多数患者仅有腹胀或上腹部不适, 食欲不振, 体重减轻, 贫血等; 少数患者甚至没有症状, 使得老年溃疡病常常起病隐匿, 症状不典型^[10]. 另外, 老年溃疡病患者, 常伴有高血压病、糖尿病、慢性支气管炎和心脑血管疾病, 从而影响溃疡病的检查、诊断和治疗. 这就要求临床医生提高警惕, 及时发现可疑症状, 尽早做胃镜检查, 以早诊断、早治疗. (4)老年溃疡病合并症多且较严重^[11]. 最常见的并发症是上消化系出血, 出血往往突然发生, 出血量大, 不易止血, 容易发生休克, 并可诱发脑血栓形成或心肌梗塞. 这是因为老年人溃疡深, 面积大, 且胃和十二指肠壁的血管硬化, 血管易破裂且不易收缩止血^[12]. 本文资料显示, 124例老年性溃疡病患者中, 54例发生出血, 占43.5%, 显著高于中青年组的23%. 老年溃疡病患者可发生多次出血, 病死率较高. 溃疡穿孔时症状较轻, 症状与体征不明显, 有资料显示25%-28%的病例腹部X线检查未见膈下游离气体^[13], 极易延误诊断与治疗. 溃疡穿孔自然闭合少, 需立即手术. 幽门梗阻也是溃疡病并发症之一, 主要是由于幽门附近溃疡愈合形成瘢痕或发生水肿和痉挛所造成的, 其较青年人发生率低, 但临床表现比中青年重, 可出现碱中毒、脱水、低血钾及全身衰竭等症状, 增加了治疗难度. 功能性梗阻可随病情好转而缓解, 如果是溃疡形成瘢痕致梗阻, 可行内镜下水囊扩张治疗, 亦可行外科手术治疗. 该组老年溃疡病患者有5.6%发生癌变. 癌变特点是上腹痛失去原来的特点和规律性, 变为持续性疼痛, 虽经服药治疗, 症状不改善, 反而逐渐加重, 同时伴有食欲减退、疲乏无力、

消瘦、贫血、大便潜血试验阳性. 当出现此类症状时, 应及时作X线钡餐检查或纤维胃镜检查, 以便早期确诊, 并作手术治疗^[14].

无并发症的老年消化性溃疡患者应首先进行内科治疗, 治疗原则和方法与一般溃疡患者大致相同, 但由于老年人胃黏膜有血管扭曲、血管壁增厚等退行性变, 导致胃黏膜供血减少, 损伤后修复能力减低; 且老年人胃黏液分泌减少, “黏液屏障”减弱, 胃黏膜易再次受损, 因此, 需提高老年消化性溃疡的愈合质量. 有学者提出低愈合质量与高愈合质量溃疡的鉴别^[15]: 两者普通内镜下均可见红色瘢痕, 低愈合质量溃疡色素内镜下为结节型, 超声内镜下黏膜肌层深部有低回声区, 病理组织显著异常: 瘢痕薄, 腺体少, 结构紊乱, 大量结缔组织充填; 而高愈合质量溃疡色素内镜下为平坦型, 超声内镜下黏膜肌层深部无低回声区, 病理组织接近正常. 前者较后者复发率高. 应针对老年消化性溃疡的特点, 进行及时、正规和彻底的治疗, 不断提高溃疡的愈合率, 减少溃疡的复发率.

4 参考文献

- 1 刘嘉眉, 李瑜元. 老年消化性溃疡发病的相关因素分析. 广州医学院学报 2006; 34: 14-17
- 2 Freston MS, Freston JW. Peptic ulcers in the elderly: unique features and management. *Geriatrics* 1990; 45: 39-42, 45
- 3 Ng TM, Fock KM, Chia SC, Chew CN, Chong YY, Chee EN, Yap CK. Peptic ulcer disease in the elderly in Singapore. *J Gastroenterol Hepatol* 1994; 9: 278-281
- 4 陈君, 郭永昌, 范崇军, 姜杰, 嵇连民. 老年性消化性溃疡217例临床分析. 基层医学论坛 2005; 9: 497-498
- 5 邝小枫, 蔡洁毅, 吴礼浩, 黄静薇. 164例老年消化性溃疡临床分析. 国际医药卫生导报 2006; 12: 16-18
- 6 周建南. 72例老年人消化性溃疡的临床分析. 临床和实验医学杂志 2007; 6: 115
- 7 郭彦萍, 许建青, 张晓辉. 老年消化性溃疡308例临床及内镜分析. 河南科技大学学报(医学版) 2006; 24: 196-197
- 8 袁晓英, 向明确, 常杭花, 贾丽萍. 老年与中青年消化性溃疡的差异. 中华消化杂志 2006; 26: 206-207
- 9 赵军, 张泰昌. 老年消化性溃疡的临床特点. 首都医科大学学报 2004; 25: 230-232
- 10 余勇. 老年性消化性溃疡的临床分析. 现代诊断与治疗 2000; 11: 123-124
- 11 黄海华, 谢劲龙, 余军毅. 老年复合溃疡临床分析及病因探讨. 青海医药杂志 2005; 35: 21-22
- 12 米雪勤. 老年溃疡病出血及合并症分析. 医学理论与实践 2004; 17: 907
- 13 曾德珍. 132例老年性消化性溃疡的临床分析. 实用中西医结合临床 2005; 5: 62
- 14 何剑琴. 老年性消化性溃疡的特征与治疗. 中国实用医药 2008; 3: 28-29
- 15 刘厚钰, 石虹. 老年消化性溃疡的治疗. 老年医学与保健 2007; 13: 5-7

■同行评价

本文对胃镜检出老年消化性溃疡124例进行分析, 临床资料完整, 对老年消化性溃疡的临床特点描述较为详细, 参考文献引用权威, 具有较好的临床意义.

编辑 史景红 电编 吴鹏朕

高频电切联合氩离子凝固术在治疗胃多发息肉中的应用

黄骏, 吴小微, 曾勇, 于皆平

■背景资料

APC是一种非接触式电凝固技术, 其原理是利用特殊装置将氩离子化, 传导高频电流至靶组织产生热效应, 从而达到治疗效果。因其具有凝固深度均匀、无炭化等特性, APC已成为目前最富创造精神的治疗手段之一。

黄骏, 吴小微, 曾勇, 武汉科技大学附属汉阳医院消化科 湖北省武汉市 430050

于皆平, 武汉大学人民医院消化科 湖北省武汉市 430060

作者贡献分布: 此课题由黄骏、吴小微及曾勇设计, 研究过程由于皆平与黄骏操作完成; 数据分析由黄骏、吴小微及曾勇完成; 本论文写作由黄骏完成。

通讯作者: 黄骏, 430050, 湖北省武汉市, 武汉科技大学附属汉阳医院消化科。hj-dd@163.com

电话: 027-84957400-7376

收稿日期: 2008-11-20 修回日期: 2008-12-28

接受日期: 2009-01-05 在线出版日期: 2009-02-08

Treatment of gastric polypus with high-frequency electroresection combined with argon

Jun Huang, Xiao-Wei Wu, Yong Zeng, Jie-Ping Yu

Jun Huang, Xiao-Wei Wu, Yong Zeng, Department of Gastroenterology, Hanyang Hospital Affiliated to Wuhan Science and Technology University, Wuhan 430050, Hubei Province, China

Jie-Ping Yu, Department of Gastroenterology, People's Hospital, Wuhan University, Wuhan 430050, Hubei Province, China

Correspondence to: Jun Huang, Department of Gastroenterology, Hanyang Hospital Affiliated to Wuhan Science and Technology University, Wuhan 430050, Hubei Province, China. hj-dd@163.com

Received: 2008-11-20 Revised: 2008-12-28

Accepted: 2009-01-05 Published online: 2009-02-08

Abstract

AIM: To discuss the practical value of high-frequency electricity combined with argon plasma coagulation in treatment of gastric polypus.

METHODS: A total of 70 patients with 356 gastric polypi were excised either with high-frequency electroresection combined with argon plasma coagulation or with high-frequency electroresection only.

RESULTS: One hundred eighty two polypi in 36 patients (group A), were excised with high-frequency electroresection combined with argon plasma coagulation without hemostasia, while 174 polypi in 34 patients (group B) were excised with high-frequency electroresection. For group

A, all polypi were excised successfully once. For group B, 145 polypi were removed successfully while 19 polypi needed hemostasia. The hemostatic effect was better in group B than in group A ($\chi^2 = 33.02$, $P < 0.01$).

CONCLUSION: High-frequency electroresection combined with argon plasma coagulation is a safe, simple, and promising way to treat gastric polypus.

Key Words: High-frequency electroresection; Argon plasma coagulation; High-frequency electrocoagulation

Huang J, Wu XW, Zeng Y, Yu JP. Treatment of gastric polypus with high-frequency electroresection combined with argon. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(4): 414-416

摘要

目的: 探讨经内镜高频电切联合氩离子凝固术(argon plasma coagulation, APC)治疗胃多发息肉的实用价值。

方法: 分别用高频电切联合氩离子凝固术(A组)与高频电切联合电凝(B组)治疗胃多发息肉70例患者。分析比较两组患者的基本资料及治疗效果。

结果: 70例患者共356枚息肉, 经高频电切联合氩离子凝固术36例(A组, 182枚, 其中山田 I - II 型151枚, 山田 III - IV 型31枚)均一次性顺利切(灼)除, 经内镜高频电切联合电凝34例(B组, 174枚, 其中山田 I - II 型146枚, 山田 III - IV 型28枚)其中25例(145枚)息肉一次性顺利切(灼)除, 另9例(29枚)出血需钛夹止血。A组治疗过程中止血效果明显优于B组($\chi^2 = 33.02$, $P < 0.01$)。

结论: 经内镜高频电切联合氩离子凝固术确切, 操作简便、安全性好、不良反应少, 耗时少, 优于高频电切联合电凝治疗, 有较高的临床推广价值。

关键词: 高频电切; 氩离子凝固术; 高频电凝

■同行评议者

王正康, 教授, 北京中日友好医院普外科

黄骏, 吴小微, 曾勇, 于皆平. 高频电切联合氩离子凝固术在治疗胃多发息肉中的应用. 世界华人消化杂志 2009; 17(4): 414-416

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/414.asp>

0 引言

消化系息肉是消化系统的常见病和多发病, 因其发展具有潜在恶变倾向, 应予以内镜下切除. 我科于2006-10起开展经内镜高频电切联合氩离子凝固术(argon plasma coagulation, APC)治疗胃多发息肉效果良好, 并与经内镜高频电切联合高频电凝治疗方法比较, 现报告结果如下.

1 材料和方法

1.1 材料 收集2006-10-08/2007-10-01我院胃多发息肉患者70例(356枚), 并进行了经内镜治疗. 按照采用氩离子凝固术治疗或高频电凝治疗方法不同分别分为A、B组. 仪器为AG9800氩气高频电刀并附氩离子束凝固导管及圈套器各一套(山东玉华电器有限公司提供), 所用内镜为奥林巴斯GIF V70电子胃镜.

1.2 方法

1.2.1 术前准备: 术前检查血常规、出凝血时间、心电图等. 术日前晚起禁食水. 术前20 min肌注地西洋10 mg、山莨菪碱注射液10 mg以减少胃肠蠕动的影响.

1.2.2 操作步骤: 高频电切时输出功率一般在30-80 W之间, 并切割与收圈同时进行. 过大的息肉用多次通电、减少每次踩踏电切档(黄色)通电时间的方法切除, 主要治疗山田III-IV型息肉.

1.2.3 内镜氩束凝治疗: 术前打开氩气瓶阀门, 注入氩气, 氩气流量1.0-1.5 L/s, 功率设定为35-45 W. 使用前先测试氩气刀效果, 将可屈式氩离子束凝固导管经内镜钳道伸出置于息肉上方0.3-0.5 cm处, 踩踏氩束凝档(蓝色)每次输出时间1-3 s. 主要治疗山田I-II型息肉, 也用于电切后有出血时止血.

1.2.4 高频电凝治疗: 输出功率35-50 W, 将圈套器收至只剩先端部分, 经内镜钳道伸出置于息肉上, 踩踏电凝档(灰色)通电灼除息肉, 主要治疗山田I-II型息肉, 也用于电切后有出血时止血.

1.2.5 术后处理: 常规禁食1 d, 卧床、严密观察72 h, 并药物治疗(奥美拉唑、维生素K1、止血芳酸等).

统计学处理 资料计算结果采用SPSS12.0统计软件包进行统计分析, 组间值得比较进行t检验,

率的显著性检验进行卡方检验, $P < 0.05$ 表示有统计学意义.

2 结果

两组基本资料及治疗效果比较: 70例患者共356枚息肉进行内镜下治疗. A组经高频电切联合氩离子凝固术36例(182枚)均一次性顺利切(灼)除, B组经高频电切联合电凝34例(174枚), 其中25例(145枚)息肉一次性顺利切(灼)除, 另9例(29枚)出血需改钛夹止血, 年龄分布没有统计学差异. 两组比较有显著性差异($\chi^2 = 33.02, P < 0.01$, 表1).

3 讨论

胃息肉可单发或多发, 胃息肉可分为真性和假性两种, 真性息肉又称息肉样腺瘤, 其病变性质属于肿瘤性增生, 可发生癌变^[2]. 假性息肉则为炎性黏膜增生而形成的息肉. 此病的发病年龄较大, 多伴有胃酸缺乏或胃酸低下, 因此常可出现上腹部轻微疼痛与不适, 恶心, 厌食, 消化不良等症状. 如息肉表面有糜烂, 溃疡, 可发生间歇性或持续性出血. 较大的息肉阻塞于幽门管或息肉样胃窦黏膜滑入十二指肠, 则可出现幽门梗阻症状, 因而必须积极治疗.

胃息肉的数量、形态、大小、在不同的患者中各异, 所以采用治疗方法也不相同. 山田I-II型息肉由于无蒂故不利于圈套器圈套, 故一般不用电切, 采用电凝或氩束凝灼除, 山田III-IV型息肉有蒂, 故有利于圈套器圈套行电切治疗, 但有些息肉有较大血管电切后出血, 需电凝或氩束凝止血. 对于多发息肉的患者上述两种方法一般都会用到, 就会存在高频电切联合氩离子凝固术与高频电切联合高频电凝术选择问题. A、B两组在电切方面无需比较, 主要是氩离子凝固术与高频电凝术有很大差异. APC是一种非接触式电凝固技术, 其原理是利用特殊装置将氩气离子化, 传导高频电流至靶组织产生热效应, 从而达到治疗效果. 因其具有凝固深度均匀、无炭化等特性, APC已成为目前最富创造精神的治疗手段之一^[3-4]. 德国Grund和Farin *et al*于1991年首先将APC技术引入内镜治疗领域^[5]. APC装置包括一台高频电能发生器、一台氩离子凝固器、一根远端陶瓷管口内装有钨丝电极的可屈式纤维Teflon管, 其中的氩气通过离子化传导由钨丝电极产生的高频电能, 继而能量传导至组织而产生凝固效应^[5-6]. APC治疗时, 只需将探头伸出内镜头端至息肉上方0.3-1.0 cm, 根

■应用要点

APC是一种新型内镜治疗胃息肉技术, 与常规的高频电凝方法相比, 具有多方面优势, 值得进一步推广.

■同行评价

本文选题较好, 研究内容对临床医生有一定的参考价值, 但学术价值一般。

表 1 两组患者的一般资料及治疗效果比较

分组	n(男/女)	年龄(岁)	息肉(枚)	山田 I - II 型	山田 III - IV 型	一次性顺利切(灼)除 枚(%)	钛夹止血 枚(%)
A组	22/14	42.8 ± 22.2	182	151	31	182(100.0)	0(0)
B组	23/11	44.3 ± 20.3	174	146	28	145(83.3)	29(16.7)

据息肉的大小适量施以氩离子凝固治疗, 凝固次数视息肉的大小、部位而定。一般以内镜下整个息肉灼除为止。由于氩气流是散发的, 因而可产生轴向及侧向的电流传导, 氩离子束几乎可到息肉的每一个角落, 对息肉的处理非常自如、简便, 有独特的优势^[7-9]。本组应用高频电切联合氩离子凝固术36例(182枚)均一次性顺利切(灼)除, 疗效确切。内镜下氩气刀治疗最大的优点是凝固深度的自限性, 在长时凝固的过程中, 组织炭化形成薄焦痂, 且由于氩气在电离过程中大量吸热, 因而组织炭化程度轻, 不会对组织造成延迟性损伤, 对组织的穿透一般不超过3 mm, 不会出现穿孔, 因而相对安全。而高频电凝深度不易掌握, 安全性不如氩气刀。高频电凝治疗时探头与组织接触, 治疗后会出现探头与组织粘连, 拉离探头时对组织亦有损伤、出血, 需反复处理, 耗时多, 此亦为穿孔的因素之一。B组有9例(29枚)出血需改钛夹止血, 可见A组应用高频电切联合氩离子凝固术与高频电切联合电凝相比, 前者无出血等并发症的发生, 更加安全有

效, 耗时少。

总之, APC是一种新型内镜治疗胃息肉技术, 与常规的高频电凝方法相比, 具有多方面优势, 值得进一步推广。

4 参考文献

- 1 林三仁. 消化系统电子内窥镜图谱. 北京: 北京大学医学出版社, 2003: 59-60
- 2 李强, 高善玲, 崔路佳, 李明琦. 胃不同类型胃息肉及胃癌中环氧化酶-2和P16蛋白的表达及相关性. 世界华人消化杂志 2005; 13: 2506-2509
- 3 陈东风, 刘重阳, 周世亮, 彭安国, 闫庆军, 李平, 张晓荣. 内镜下氩离子凝固术治疗胃息肉的临床价值. 第二军医大学学报 2003; 25: 532
- 4 张芸, 张晓荣. 氩离子凝固术治疗胃出血及息肉的疗效观察. 现代医药卫生 2003; 19: 1396
- 5 朱琦, 吴云林. 内镜下氩离子凝固术. 上海: 上海科技教育出版社, 2006: 1-2
- 6 刘运样, 黄留业. 实用消化内镜治疗学. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 52-53
- 7 吴云林, 冯莉, 孙波, 季圣昉, 季雁浩, 方文莉, 诸琦, 钟捷. 氩离子血浆凝固术治疗胃肠广基扁息肉与出血. 中华消化内镜杂志 2001; 18: 325
- 8 赵曙光, 王旭霞, 黄裕新, 闻勤生, 赵保民, 张少玲, 姜惠玲. 氩离子凝固术治疗胃息肉和疣状胃炎的疗效观察. 中国内镜杂志 2004; 10: 27-28, 32
- 9 高云飞, 高伟, 宋伟, 周长江. 氩气刀治疗消化道息肉的疗效观察. 中国误诊学杂志 2005; 5: 255-256

编辑 史景红 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志标点符号用法

本刊讯 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。(常务副总编辑: 张海宁 2009-02-08)

Caveolin-2基因甲基化状态在胃癌组织中的检测

何欣, 刘斌, 邢传平, 哈小琴, 董亮, 钱震, 刘茗露, 苏勤军

何欣, 刘斌, 邢传平, 哈小琴, 董亮, 钱震, 刘茗露, 苏勤军, 中国人民解放军兰州军区兰州总医院病理科 甘肃省兰州市 730050

全军医药卫生科研基金资助项目, No. 06MB102

甘肃省自然科学基金资助课题, No. 3ZS061-A25-094

作者贡献分布: 此课题由刘斌设计; 研究过程由何欣, 董亮及苏勤军操作完成; 数据分析由刘斌, 邢传平, 哈小琴, 钱震, 刘茗露及何欣完成; 本论文写作由何欣与刘斌完成。

通讯作者: 刘斌, 730050, 甘肃省兰州市, 中国人民解放军兰州军区兰州总医院病理科. liumb@public.lz.gs.cn

电话: 0931-8994566

收稿日期: 2008-12-25 修回日期: 2009-01-07

接受日期: 2009-01-12 在线出版日期: 2009-02-08

Detection of methylation status of Caveolin-2 gene in gastric carcinoma

Xin He, Bin Liu, Chuan-Ping Xing, Xiao-Qin Ha, Liang Dong, Zhen Qian, Ming-Lu Liu, Qin-Jun Su

Xin He, Bin Liu, Chuan-Ping Xing, Xiao-Qin Ha, Liang Dong, Zhen Qian, Ming-Lu Liu, Qin-Jun Su, Department of Pathology, General Hospital of Chinese PLA Lanzhou Military Command, Lanzhou 730050, Gansu Province, China

Supported by: the Military Medical and Health Research Foundation, No. 06MB102; and the Natural Science Foundation of Gansu Province, No. 3ZS061-A25-094

Correspondence to: Bin Liu, Department of Pathology, General Hospital of Chinese PLA Lanzhou Military Command, Lanzhou 730050, Gansu Province, China. liumb@public.lz.gs.cn

Received: 2008-12-25 Revised: 2009-01-07

Accepted: 2009-01-12 Published online: 2009-02-08

Abstract

AIM: To investigate the relationship between methylation of 5'CpG island in the promoter region of Caveolin-2 gene and development of gastric carcinoma.

METHODS: Using methylation-specific PCR technique, the methylation status of the 5'CpG island in the promoter region of Caveolin-2 gene was measured in 33 tissue samples of gastric carcinoma and 5 normal gastric tissue samples >5 cm apart from tumor.

RESULTS: Methylation of the 5'CpG island in the promoter region of Caveolin-2 gene in all 5 samples of normal gastric tissues was negative.

In 33 gastric cancerous tissue samples, the methylation positive rate of promoter region of Caveolin-2 gene was 87.9% (29/33), among which 20 cases (60.6%) complete methylation, 9 cases (27.3%) were partial methylation, and 4 samples were negative. Statistics showed the methylation rate of the promoter region of Caveolin-2 gene was obviously higher in gastric carcinoma than in normal gastric tissues.

CONCLUSION: The methylation positive rate of the 5'CpG island in the promoter region of Caveolin-2 gene in gastric carcinoma is high, indicating that its methylation may be related to genesis of gastric carcinoma.

Key Words: Gastric carcinoma; Caveolin-2 gene; Methylation; Methylation-specific PCR

He X, Liu B, Xing CP, Ha XQ, Dong L, Qian Z, Liu ML, Su QJ. Detection of methylation status of Caveolin-2 gene in gastric carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(4): 417-420

摘要

目的: 探讨Caveolin-2基因启动子区域5'CpG岛甲基化与胃癌发生发展的关系。

方法: 运用甲基化特异性PCR(MSP)技术检测33例胃癌组织及5例距肿瘤5 cm以上的癌旁正常胃组织中Caveolin-2基因启动子区域5'CpG岛甲基化状态。

结果: 5例正常胃组织Caveolin-2基因启动子区域5'CpG岛均为甲基化阴性。33例胃癌组织中29例甲基化阳性, 甲基化率为87.9%(29/33), 其中20例癌组织(60.6%)表现为完全甲基化, 9例癌组织(27.3%)表现为部分甲基化。4例癌组织(12.1%)表现为甲基化阴性。统计学结果显示癌组织中Caveolin-2基因启动子区域5'CpG岛甲基化率显著高于正常组织。

结论: 胃癌组织中存在较高的Caveolin-2基因启动子区域5'CpG岛甲基化率, 甲基化可能与胃癌的发生有关。

■背景资料

胃癌是常见的消化系统恶性肿瘤, 其发生发展是机体(内因)与环境(外因)相互作用的结果, 在其发生发展的各阶段都有遗传学改变。目前相关基因的异常甲基化已成为研究热点。

■同行评议者

于颖彦, 教授, 上海交通大学医学院附属瑞金医院消化外科研究所与器官移植中心

■研发前沿

目前已在胃癌中检测出多个抑癌基因CpG岛存在异常甲基化,如p16, RUNX3、E-cadherin、PTEN、及TSLC1等。

关键词: 胃癌; Caveolin-2基因; 甲基化; 甲基化特异性PCR

何欣, 刘斌, 邢传平, 哈小琴, 董亮, 钱震, 刘茗露, 苏勤军. Caveolin-2基因甲基化状态在胃癌组织中的检测. 世界华人消化杂志 2009; 17(4): 417-420

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/417.asp>

0 引言

Caveolae是细胞膜上特定的直径约50-100 nm的微小区域,由胆固醇、鞘脂及蛋白质组成. Caveolin是Caveolae的标记蛋白,参与胞吞和胞内运输作用、胆固醇运输、信号传导、血管生成等过程,与病原体感染、阿尔茨海默病、糖尿病、肌肉病变、肿瘤、心肺疾病等密切相关^[1-2]. Caveolin-2是Caveolins家族的一员. 本实验室先前采用免疫组织化学染色方法、原位杂交和甲基化特异性PCR(MSP)技术对Caveolin-1基因和Dnmt1的mRNA和蛋白在胃癌组织中的表达状况及Caveolin-1基因外显子1和2的启动子区域的CpG岛甲基化状况进行了初步研究,实验结果表明:在胃癌组织中Caveolin-1蛋白阳性表达率仅为28.2%^[3-4], Dnmt1蛋白阳性表达率为70%^[5], Spearman等级相关分析显示Dnmt1蛋白与Caveolin-1蛋白表达呈负相关,而Caveolin-1基因外显子1和2的启动子区域的CpG岛甲基化发生率为73.33%和90%,并推测Caveolin-1蛋白表达降低与其发生甲基化有关. 为了进一步研究Caveolin基因甲基化在胃癌发生发展中的作用,我们采用甲基化特异性PCR(MSP)技术进一步检测了胃癌组织中Caveolin-2基因启动子区域甲基化状态,以探讨Caveolin-2基因启动子区域甲基化与胃癌发生的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 33例胃癌组织及5例距肿瘤5 cm以上的癌旁正常胃组织同时取自中国人民解放军兰州军区兰州总医院2007-06/2008-04胃癌术后切除的胃组织标本,标本取后于-40℃保存. 33例胃癌组织均为腺癌,其中高中分化16例,低分化17例. 患者男28例,女5例,年龄32-83(平均61.36)岁. 所有标本均为新鲜标本,并经病理学检查确诊. 患者术前均未进行放疗和化疗. 基因组DNA修饰试剂盒(CpGenome DNA Modification Kit)购于美国Chemicon公司. Taq酶(DR100A), dNTP, DNA Marker, 均购于宝生物工程(大连)有限公司(TaKaRa). 琼脂糖粉(Agarose Regular)购于上海生

工生物工程有限公司.

1.2 方法

1.2.1 基因组DNA提取: 采用传统的酚-氯仿抽提法提取DNA^[6].

1.2.2 基因组DNA的亚硫酸氢盐修饰: 基因组DNA的修饰使用甲基化修饰试剂盒,操作步骤按试剂盒说明进行.

1.2.3 引物设计: 从GenBank中检索出Caveolin-2基因DNA序列(基因序列号: AJ242718, promoter位于1-1132 bp),依据该基因序列运用Primer Premier5.0引物设计软件针对启动子区域设计Caveolin-2基因的甲基化(M)及非甲基化(U)引物. 引物设计原理为: DNA经NaOH变性后成为单链,其胞嘧啶(C)可被亚硫酸氢盐脱氨基转变为尿嘧啶(U),继而以胸腺嘧啶(T)的形式被扩增;而甲基化的胞嘧啶(C)即5-甲基胞嘧啶(5-mC)则不能被修饰,仍保持为5-mC. 根据5-mC和非甲基化的C修饰后的不同,而设计引物,发生甲基化与未发生甲基化DNA的上游引物之间的差别为C变为T,下游引物的差别为鸟嘌呤(G)变为腺嘌呤(A). 引物序列及产物长度见表1. 引物由上海生工生物工程有限公司合成.

1.2.4 PCR: PCR采用25 μL反应体系. 每份经亚硫酸氢盐修饰后的标本都分别用甲基化与非甲基化引物扩增,由于DNA双链中总是存在非甲基化的胞嘧啶,使得修饰后的DNA双链不再完全配对,容易形成二级结构,PCR扩增时不易解链. 因而我们采用热启动法进行PCR扩增: 预变性之前,不加入Taq酶,在预变性之后再加入酶(温度保持在95.5℃). PCR反应体系均为: 模板12.5 μL, 10×PCR缓冲液(Mg²⁺ Plus)2.5 μL, dNTP混合物(各2.5 μmol/L)2.5 μL, TaKaRa Taq(5 U/μL)非甲基化引物扩增为0.5 μL, 甲基化引物扩增为0.3 μL,上游引物(10 μmol/L)1.5 μL, 下游引物(10 μmol/L)1.5 μL,灭菌去离子水甲基化引物扩增为4.2 μL, 非甲基化引物扩增为4.0 μL. 扩增参数为: 95.5℃预变性5 min后开始30个循环: 95.5℃变性30 s, 甲基化引物60℃退火45 s, 非甲基化引物50℃退火45 s, 72℃延伸45 s, 最后于72℃延伸7 min, 4℃保存. 由于一次扩增后电泳条带不清,可能是修饰过程中使一部分DNA丢失,扩增产量较低缘故,故取一次扩增产物8 μL,用相同的条件进行二次扩增.

1.2.5 结果判定: 取PCR扩增产物5 μL用20 g/L琼脂糖凝胶电泳,紫外灯下观察结果. 甲基化与非甲基化引物阳性目的条带均119 bp. 如果甲基化

■创新盘点

本研究运用MSP方法对胃癌及距肿瘤5 cm以上的癌旁正常胃组织中Caveolin-2基因甲基化状况进行了研究,提示Caveolin-2基因甲基化对人的胃癌的发生、发展可能有一定的促进作用。

表 1 Caveolin-2基因启动子区MSP所用引物

引物	引物序列	产物长度(bp)
甲基化(M)	5-CTGTGACTCGTGGGGACGGTTC-3	119
非甲基化(U)	5-TTCCCCTGTGGGCTCCAG-3	119
非甲基化(U)	5-TTGTGATTGTGGGGATGGTTT-3	119
非甲基化(U)	5-TTCCCCTATAAACTCCAA-3	

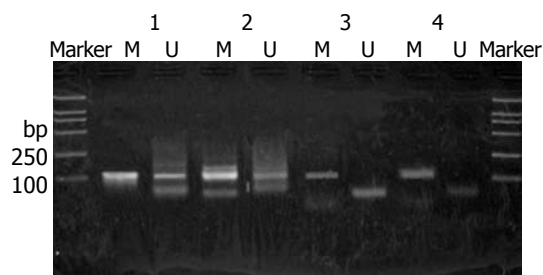


图 1 MSP法检测胃癌组织中Caveolin-2基因甲基化状态结果. Marker: DL2000; 1-4: 癌组织; M: 甲基化引物扩增产物; U: 非甲基化引物扩增产物.

引物扩增后出现大小为119 bp特异性条带, 则认为启动子区域存在甲基化, 若非甲基化引物扩增后出现大小为119 bp特异性条带, 则认为启动子区域存在非甲基化, 甲基化与非甲基化引物扩增后均出现大小为119 bp特异性条带为部分甲基化, 也认为启动子区域存在甲基化. 若两对引物均未扩增出特异性条带, 则认为实验失败, 需重复实验.

统计学处理 根据数据类型选择Fisher确切概率法, 使用SPSS10.0统计软件包进行统计学处理, 显著性水准为 $\alpha = 0.05$.

2 结果

2.1 胃癌组织中Caveolin-2基因启动子区域甲基化状态 5例正常胃组织Caveolin-2基因启动子区域均为甲基化阴性. 33例胃癌组织中29例甲基化阳性, 甲基化率为87.9%(29/33), 其中20例癌组织(60.6%)表现为完全甲基化, 9例癌组织(27.3%)表现为部分甲基化, 4例癌组织(12.1%)表现为甲基化阴性. 胃癌组织中Caveolin-2基因启动子区域甲基化率显著高于正常组织($P < 0.05$, 图1).

2.2 胃癌组织中Caveolin-2基因启动子区域甲基化与临床病理参数的关系 经Fisher确切概率法检验, 胃癌组织中Caveolin-2基因启动子区域甲基化状态与胃癌组织分化程度、患者年龄、性别、肿瘤大小、浸润深度、有无淋巴结转移及有无脉管侵犯等临床病理特征无关($P > 0.05$), 差

表 2 胃癌组织中Caveolin-2基因启动子区域甲基化与临床病理参数的关系 (n)

临床病理指标	n	甲基化		P
		阳性	阴性	
分化程度				
高中分化	16	15	1	0.601
低分化	17	14	3	
年龄(岁)				
<50	5	4	1	0.500
≥ 50	28	25	3	
性别				
男	28	25	3	0.500
女	5	4	1	
肿瘤大小(cm)				
<4	5	5	0	1.000
≥ 4	28	24	4	
浸润深度				
肌层	4	3	1	0.420
浆膜外	29	26	3	
淋巴结转移				
有	25	23	2	0.241
无	8	6	2	
脉管侵犯				
有	4	3	1	0.420
无	29	26	3	

异无统计学意义(表2).

3 讨论

胃癌的发生发展是机体(内因)与环境(外因)相互作用的结果, 其发生发展的各阶段都有遗传学改变. 在高等真核生物, DNA甲基化仅存在于位于5'端CpG岛的胞嘧啶, 这种修饰对基因的表达调控发挥重要的作用, 尤其是对于许多基因启动子区域的CpG岛. 正常未甲基化的CpG岛发生异常甲基化被证明在永生细胞和变异细胞是一个相对频繁的事件, 并且与人类癌症中已确定的抑癌基因的转录失活有关^[7]. 目前已在胃癌中检测出多个抑癌基因CpG岛存在异常甲基化, 如p16, RUNX3、E-cadherin、PTEN、及TSLC1等^[8]. Leal *et al*^[9]运用MSP方法检测了胃腺癌中CDH1, FHIT, MTAP 和 PLAGL1基因启动子区域的甲基化状态, 研究结果显示, 其甲基化率分别为98.7%, 53.9%, 23.1%和29.5%, 他们认为高甲基化与胃癌的发生有关.

Caveolae是细胞膜上的特殊囊泡状结构, 是细胞膜生物功能多样性的重要结构基础. Caveolin家族包括Caveolin-1、Caveolin-2和Caveolin-3. Caveolin-1是分子质量为21-24 kDa

应用要点

有可能通过检测Caveolin-2基因甲基化率对胃癌进行早期诊断. 同时, 可以考虑运用去甲基化药物对胃癌进行临床基因治疗.

■同行评价

本文内容新颖, 结果可信, 具有一定的学术价值.

的膜蛋白, 也是Caveolae的标志性蛋白, 其编码基因定位于7q31.1, 有3个外显子. Caveolin-2和Caveolin-3是近期发现的Caveolin家族成员, 其中Caveolin-2长162 aa, 其编码基因也定位于7q31.1, 有3个外显子, 其分布与Caveolin-1相似, 并与Caveolin-1形成异寡聚复合物, 细胞内转运Caveolin-1需Caveolin-2参与, 因而Caveolin-2可能是Caveolin-1的辅助蛋白^[10-11].

本次实验结果显示: 5例正常胃组织Caveolin-2基因启动子区域均为甲基化阴性. 33例胃癌组织中29例甲基化阳性, 甲基化率为87.9%(29/33), 其中20例癌组织(60.6%)表现为完全甲基化, 9例癌组织(27.3%)表现为部分甲基化, 4例癌组织(12.1%)表现为甲基化阴性. 统计学结果显示癌组织中Caveolin-2基因启动子区域甲基化率显著高于正常组织($P<0.05$). 提示Caveolin-2基因启动子区域甲基化对人的胃癌的发生、发展可能有一定的促进作用.

我们研究还发现, 胃癌组织中Caveolin-2基因启动子区域甲基化状态与胃癌组织分化程度、患者年龄、性别、肿瘤大小、浸润深度、有无淋巴结转移及有无脉管侵犯等临床病理特征均无明显的相关关系($P>0.05$).

目前, 对于Caveolin-2基因在胃癌组织中的具体作用机制还有待于进一步研究. 我们通过对Caveolin-1第1、2外显子及Caveolin-2启动子区域CpG岛甲基化状态的检测, 发现Caveolin-1第1、2外显子及Caveolin-2启动子区域CpG岛均存

在较高的甲基化率, 基因启动子区域的高甲基化可能会导致基因功能的失活或下降, 因而对人的胃癌的发生、发展可能有一定的促进作用.

4 参考文献

- 1 Williams TM, Lisanti MP. The caveolin proteins. *Genome Biol* 2004; 5: 214
- 2 江向红, 许国强. Caveolin的生物学功能及其在疾病中的作用. *国际内科学杂志* 2007; 34: 148-151
- 3 刘斌, 杨育生, 邢传平, 高自芳, 顾立萍, 钱震, 董亮, 苏勤军. Caveolin-1基因mRNA和蛋白在胃癌组织的表达. *第四军医大学学报* 2007; 28: 1868-1871
- 4 杨育生, 刘斌, 邢传平, 高自芳, 顾立萍, 钱震, 董亮, 苏勤军. 胃癌组织中Caveolin-1、nm23及MMP-2的表达及其意义. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 1725-1730
- 5 顾立萍, 刘斌, 邢传平, 高自芳, 苏勤军, 钱震, 董亮. 胃癌组织中Dnmt1的表达及其临床病理意义. *西北国防医学杂志* 2008; 29: 330-332
- 6 张维铭. 现代分子生物学实验手册. 第1版. 北京: 科学出版社, 2003: 80-86
- 7 Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 9821-9826
- 8 张琦, 胡世莲, 沈干, 胡冰. 抑癌基因甲基化与胃癌的研究新进展. *中国临床保健杂志* 2006; 9: 182-184
- 9 Leal MF, Lima EM, Silva PN, Assumpção PP, Calcagno DQ, Payão SL, Burbano RR, Smith MA. Promoter hypermethylation of CDH1, FHIT, MTAP and PLAGL1 in gastric adenocarcinoma in individuals from Northern Brazil. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 2568-2574
- 10 杨育生, 刘斌, 邢传平. Caveolin-1蛋白与肿瘤的侵袭和转移. *中国肿瘤临床与康复* 2006; 13: 184-186
- 11 Scherer PE, Lewis RY, Volonte D, Engelman JA, Galbiati F, Couet J, Kohtz DS, van Donselaar E, Peters P, Lisanti MP. Cell-type and tissue-specific expression of caveolin-2. Caveolins 1 and 2 co-localize and form a stable hetero-oligomeric complex in vivo. *J Biol Chem* 1997; 272: 29337-29346

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

WJG 荣获 2007 年“中国百种杰出学术期刊” 和 2008 年中国国际化精品科技期刊

本刊讯 由中国科学技术信息研究所主办的中国科技论文统计结果发布会于2008-12-09在北京国际会议中心召开, 世界胃肠病学主编马连生和编辑部主任程剑侠参加此项发布会. 本次会议介绍了中国精品科技期刊服务与保障系统, 中国科技论文研究项目进展及精品科技期刊遴选, 百篇最具影响学术论文评选, 世界科技产出趋势和利用科学计量学工具分析领域发展趋势以及发布了中国科技论文统计结果. 根据2007年度中国科技论文与引文数据库(CSTPCD2007)统计结果, WJG荣获2007年度“中国百种杰出学术期刊”称号, 同时被选入2008年中国国际化精品科技期刊, 中国精品科技期刊包括23种中国国际化精品期刊和301种中国精品科技期刊. (编辑: 程剑侠 2009-02-08)

趋化因子受体CXCR4在胃肠道肿瘤组织及细胞系中的异常表达

王佐周, 郭玉坤

王佐周, 中国医科大学基础医学院病理教研室 辽宁省沈阳市 110001

郭玉坤, 中国医科大学基础医学院组胚教研室 辽宁省沈阳市 110001

通讯作者: 王佐周, 110001, 辽宁省沈阳市和平区北二马路92号, 中国医科大学基础医学院病理教研室. zhong0099@yahoo.com.cn
电话: 024-23256666

收稿日期: 2008-11-03 修回日期: 2009-01-06

接受日期: 2009-01-12 在线出版日期: 2009-02-08

Aberrant expression of chemokine receptor CXCR4 in gastrointestinal cancer tissues and cancer cell lines

Zuo-Zhou Wang, Yu-Kun Guo

Zuo-Zhou Wang, Department of Pathology, China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Yu-Kun Guo, Department of Histology and Embryology, China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Correspondence to: Zuo-Zhou Wang, Department of Pathology, China Medical University, 92 Beiern Road, Heping District, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. zhong0099@yahoo.com.cn

Received: 2008-11-03 Revised: 2009-01-06

Accepted: 2009-01-12 Published online: 2009-02-08

Abstract

AIM: To determine the expression status of chemokine receptor CXCR4 in gastrointestinal cancer and to explore its role in gastrointestinal carcinogenesis.

METHODS: Real-time PCR was used to detect mRNA expression of CXCR4 in gastrointestinal cancer samples. Reverse-transcription PCR (RT-PCR) and Western blot were used to determine the expression of CXCR4 in gastrointestinal cancer cell lines.

RESULTS: Level of CXCR4 mRNA was significantly higher in 24 colorectal cancer samples than in matched normal tissues ($P < 0.001$). Level of CXCR4 mRNA was also significantly higher in 30 gastric cancer samples than in matched normal tissues ($P < 0.001$). Both CXCR4 mRNA

and CXCR4 protein were expressed strongly in colon cell lines HT-29 and SW-480, and gastric cell lines SGC-7901 and AGS. CXCR4 expression was correlated significantly with staging and lymph node metastasis in gastric cancers ($P = 0.01$ and $P = 0.02$, respectively).

CONCLUSION: CXCR4 is over-expressed in gastrointestinal cancers, and plays a role in gastrointestinal carcinogenesis.

Key Words: Gastrointestinal cancer; Chemokine receptor; CXCR4

Wang ZZ, Guo YK. Aberrant expression of chemokine receptor CXCR4 in gastrointestinal cancer tissues and cancer cell lines. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(4): 421-424

摘要

目的: 检测CXCR4在胃肠道肿瘤中的表达状态, 探讨CXCR4在胃肠道肿瘤发病中的作用。

方法: 采用即时定量PCR(Real-time PCR)检测胃肠道肿瘤标本中CXCR4的表达。采用逆转录PCR(RT-PCR)和Western blot检测CXCR4在胃肠道肿瘤细胞系中的表达。

结果: CXCR4 mRNA在24例结肠癌组织标本的表达水平显著高于其配对的癌旁正常组织($P < 0.001$)。CXCR4 mRNA在30例胃癌组织标本中的表达水平亦显著高于其配对的癌旁正常组织($P < 0.001$)。CXCR4 mRNA和蛋白质在结肠癌细胞系HT-29和SW-480及胃癌细胞系SGC-7901和AGS中均存在明显表达。CXCR4表达与胃癌患者分期及淋巴结转移状态具有相关性($P = 0.01, 0.02$)。

结论: CXCR4在胃肠道肿瘤中存在过度表达, 其参与了胃肠道肿瘤的发病过程。

关键词: 胃肠道肿瘤; 趋化因子受体; CXCR4

王佐周, 郭玉坤. 趋化因子受体CXCR4在胃肠道肿瘤组织及细胞

■背景资料

肿瘤细胞表面可表达趋化因子受体。这些肿瘤细胞在趋化物质的作用下, 亦可出现定向的趋化运动, 并导致肿瘤出现转移。

■同行评议者

钱睿哲, 教授, 复旦大学上海医学院生理与病理生理学系血管分子生物学实验室; 于颖彦, 教授, 上海交通大学医学院附属瑞金医院消化外科研究所与器官移植中心

■创新盘点

本文采用即时定量PCR技术对CXCR4在胃肠道肿瘤中的表达进行了定量检测,同时对部分胃肠道肿瘤细胞系也进行了研究,故而全面、准确地探讨了CXCR4在胃肠道肿瘤中的表达状况及其在胃肠道肿瘤发展过程中的作用。

系中的异常表达. 世界华人消化杂志 2009; 17(4): 421-424
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/421.asp>

0 引言

胃肠道肿瘤是人类常见的肿瘤之一,一直具有较高的发病率和致死率,而较早出现转移则是导致胃肠道肿瘤不良预后的重要原因. 研究显示趋化因子及趋化因子受体在胃肠道肿瘤的发生发展过程中具有重要作用. 趋化因子受体是七次跨膜受体,其家族根据氨基酸序列可分为四种类型,即CR, CCR, CXCR和CX3CR. 由于白细胞表面能够表达趋化因子受体,因此在趋化因子的作用下,白细胞可发生定向的趋化运动,参与炎症的发展过程.

近些年研究发现,肿瘤细胞表面亦可表达趋化因子受体. 这些肿瘤细胞在趋化物质的作用下,亦可出现定向的趋化运动,并导致肿瘤出现转移. 目前研究显示趋化因子受体CXCR4^[1-5]和CCR7^[6-10]在多种肿瘤中存在过度表达,表明这些趋化因子受体参与了肿瘤的发生发展过程. 本文将对胃肠道肿瘤中CXCR4的表达情况进行检测,以探讨CXCR4在胃肠道肿瘤发生发展中的作用.

1 材料和方法

1.1 材料 结直肠癌及相应的癌旁正常组织标本各24例,胃癌及相应的癌旁正常组织标本各30例,均来自于中国医科大学附属盛京医院. 标本获取后即冷冻于液氮之中,并保存在-80℃条件下备用. 采用HE染色确定肿瘤标本主要由肿瘤组织构成,癌旁正常组织没有肿瘤细胞浸润. 人类结肠癌细胞系HT-29和SW-480,胃癌细胞系SGC-7901和AGS购自于南京凯基(KeyGen)生物科技发展公司.

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: 细胞系HT-29、SW-480、SGC-7901和AGS培养于RPMI 1640培养基中,其中含有100 mL/L胎牛血清,青霉素(100 IU/mL)及链霉素(100 mg/L),于37℃下置于含有50 mL/L CO₂的培养箱中.

1.2.2 RNA提取和逆转录PCR反应: 采用TRIzol试剂(TaKaRa公司)进行RNA提取,具体步骤参照其说明书进行. 采用随机9引物和AMV逆转录酶进行逆转录反应. 反应体系共10 μL,逆转录反应条件: 30℃, 10 min; 42℃, 25 min; 99℃, 5 min; 5℃, 5 min, 共1个循环. PCR总反应体系40 μL,

反应条件为: 94℃, 2 min, 1个循环. 94℃, 30 s; 59℃, 30 s; 72℃, 2 min, 共30个循环. CXCR4基因引物序列参见文献[5]. 内参基因GADPH的引物序列为正义: 5'-GGGAACTGTGGCGTGAT-3'; 反义: 5'-AAAGGTGGAGGAGTGGGT-3'.

1.2.3 即时定量逆转录-RCR反应: 采用Light Cyclor system及LightCycler DNA Master SYBR Green I 试剂盒(Roche Diagnostics)进行即时定量逆转录PCR反应. 反应总体积为20 μL, 包括25 mmol/L MgCl₂, 10 μmol/L forward引物, 10 μmol/L reverse引物, 2 μL LightCycler DNA Master SYBR Green I 和2 μL cDNA. 采用比较CT值方法来定量基因表达,即通过比较靶基因的CT值与内参基因GAPDH的CT值计算相对表达量. CXCR4与GAPDH引物序列同上.

1.2.4 Western blot: 使用裂解液裂解细胞,收集样品蛋白. 取蛋白20 μg, 加入适量浓缩的SDS-PAGE蛋白上样缓冲液,沸水浴加热3-5 min,以充分变性蛋白. 冷却到室温后,把蛋白样品直接上样到SDS-PAGE胶加样孔内,进行凝胶电泳. 常规转膜. 将膜洗涤后,用真空泵吸净洗涤液. 加入封闭液,4℃过夜. 按1:1000稀释CXCR4多克隆抗体(武汉博士得公司). 用真空泵吸净封闭液,加入一抗. 4℃孵育过夜. 按1:1000稀释加辣根过氧化物酶标记兔抗羊II抗(武汉博士得公司). 吸净洗涤液以后,加入二抗,4℃孵育1 h.

统计学处理 统计分析采用SPSS13.0进行. 肿瘤组织与癌旁正常组织之间比较采用Mann-Whitney U-test. 采用Fisher's exact检验分析CXCR4表达与胃癌患者临床病理特征之间的相关性. $P<0.05$ 为有统计学意义.

2 结果

2.1 CXCR4在胃肠道肿瘤标本及其癌旁正常组织标本中的表达 采用Real-time PCR对CXCR4 mRNA在胃肠道肿瘤组织及癌旁正常组织中的表达状态进行检测. 结果显示CXCR4 mRNA在结直肠癌组织中表达显著高于癌旁正常组织,两者相差14.4倍($P<0.001$). CXCR4 mRNA在胃癌组织中表达亦显著高于癌旁正常组织,两者相差9.8倍($P<0.001$, 图1).

2.2 CXCR4在胃肠道肿瘤细胞系中的表达 采用RT-PCR技术对CXCR4 mRNA在胃肠道肿瘤细胞系HT-29、SW-480、SGC-7901和AGS中表达情况进行检测. 结果显示CXCR4在这些肿瘤细胞中均有明显表达(图2). 采用Western blot技

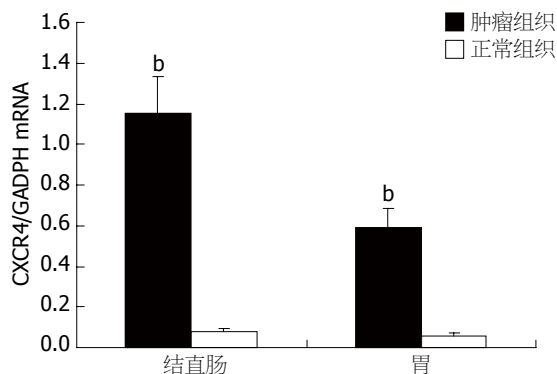


图1 CXCR4 mRNA在肿瘤组织和癌旁正常组织中的表达。^b $P < 0.001$ vs 正常组织。

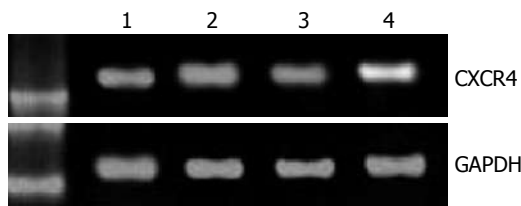


图2 CXCR4 mRNA在细胞系中表达。1: HT-29; 2: SW-480; 3: SGC-7901; AGS; 4: β -actin。

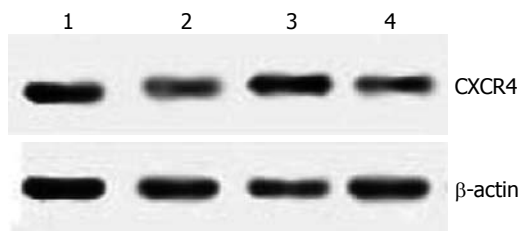


图3 CXCR4蛋白在细胞系中的表达。HT-29 1: HT-29; 2: SW-480; 3: SGC-7901; AGS; 4: β -actin。

术对CXCR4蛋白在胃肠道肿瘤细胞系HT-29、SW-480、SGC-7901和AGS中表达情况进行检测。结果显示CXCR4蛋白在这些肿瘤细胞中亦均有明显表达(图3)。

2.3 CXCR4表达与胃癌临床病理特征之间的相关性 肿瘤组织中CXCR4 mRNA表达水平为正常组织平均CXCR4 mRNA表达水平5倍以上时被定义为CXCR4表达阳性。采用Fisher's检验,我们对CXCR4表达与胃癌患者的临床病理特征之间的相关性进行分析。按诊断时年龄进行年龄分组, >50 为一组, ≤ 50 为一组;淋巴结转移状况按是否有转移进行分组;在肿瘤分期上,将T1和T2分为一组, T3和T4分为另一组;组织类型上肠型为一组,弥漫型为另一组。结果显示, CXCR4表达与胃癌患者年龄、性别及组织类型均无相关性,而与肿瘤分期($P = 0.01$)、淋巴结转移情况($P = 0.02$)具有相关性(表1)。

表1 胃癌患者CXCR4表达与临床病理特征相关性

因素	<i>n</i>	CXCR4(+)	<i>P</i>
性别			0.32
男	21	15	
女	9	6	
年龄(诊断时)			0.29
>50	18	12	
≤ 50	12	9	
分期			0.01
T1T2	12	5	
T3T4	18	16	
淋巴结转移情况			0.02
N0	13	6	
N1-N3	17	15	
组织类型			0.27
肠型	11	7	
弥漫型	19	14	

同行评价

本研究选题新颖,实验技术手段较为先进,结果具有一定的意义。

3 讨论

胃肠道肿瘤是人类常见的肿瘤之一,在我国一直具有较高的发病率和致死率。胃肠道恶性肿瘤发病的分子机制非常复杂,涉及到多重基因突变或表达改变,其中包括抑癌基因失活和原癌基因激活等。这些基因表达改变导致细胞增殖过度和凋亡减弱,从而导致细胞出现失控性生长。在临床上,部分胃肠道恶性肿瘤较早出现转移,进展迅速,增加了治疗难度,导致预后不良。研究发现,这些肿瘤细胞表面常常出现了部分趋化因子或趋化因子受体的过度表达,提示这些趋化因子及其受体参与了胃肠道肿瘤的发展过程。

趋化因子受体家族根据氨基酸序列可分为四种类型,即CR, CCR, CXCR和CX3CR。由于白细胞对某种特殊趋化因子的反应能力依赖于其细胞表面所表达的趋化因子受体。在趋化因子受体作用下,白细胞向趋化因子所在部位进行运动,参与炎症的发展过程。近些年研究发现,肿瘤细胞表面亦可表达趋化因子受体,这些受体包括CXCR4、CXCR3^[11-12]、CCR10^[13]、CCR9^[14-15]、CCR7、CCR4^[16]和CCR3^[17]等。其中CXCR4的研究最为广泛,其已被发现参与了多种肿瘤的发病过程。研究显示CCL21(一种CCR7配体)和CXCL12(一种CXCR4配体)在淋巴结、肺和肝脏等组织中高度表达,故表达CCR7和CXCR4的肿瘤常常转移到这些部位。

在本研究中,我们对CXCR4在胃肠道肿瘤中的表达情况进行了研究。我们采用即时定

量PCR对肿瘤组织及其配对的癌旁正常组织中CXCR4 mRNA进行了定量检测。结果显示CXCR4在结直肠癌组织标本及胃癌组织标本中均出现过表达,其表达量均显著高于其配对的癌旁正常组织。同时在对部分结肠癌及胃癌细胞系的研究中亦发现,CXCR4 mRNA和CXCR4蛋白在这些胃肠道肿瘤细胞系中均存在明显表达。在对CXCR4表达与胃癌患者临床病理特征之间的相关性分析中发现,CXCR4表达与胃癌患者分期及淋巴结转移中具有相关性。综合以上结果显示,CXCR4在胃肠道肿瘤中存在过度表达。结果提示CXCR4的过度表达,可能促进胃肠道肿瘤较早发生转移,从而加速了胃肠道肿瘤的进展过程。

4 参考文献

- 1 Kodama J, Hasengaowa, Seki N, Kusumoto T, Hiramatsu Y. Expression of the CXCR4 and CCR7 chemokine receptors in human endometrial cancer. *Eur J Gynaecol Oncol* 2007; 28: 370-375
- 2 Pan J, Mestas J, Burdick MD, Phillips RJ, Thomas GV, Reckamp K, Belperio JA, Strieter RM. Stromal derived factor-1 (SDF-1/CXCL12) and CXCR4 in renal cell carcinoma metastasis. *Mol Cancer* 2006; 5: 56
- 3 Engl T, Relja B, Marian D, Blumenberg C, Müller I, Beecken WD, Jones J, Ringel EM, Bereiter-Hahn J, Jonas D, Blaheta RA. CXCR4 chemokine receptor mediates prostate tumor cell adhesion through alpha5 and beta3 integrins. *Neoplasia* 2006; 8: 290-301
- 4 Salvucci O, Bouchard A, Baccarelli A, Deschênes J, Sauter G, Simon R, Bianchi R, Basik M. The role of CXCR4 receptor expression in breast cancer: a large tissue microarray study. *Breast Cancer Res Treat* 2006; 97: 275-283
- 5 Scala S, Ottaiano A, Ascierto PA, Cavalli M, Simeone E, Giuliano P, Napolitano M, Franco R, Botti G, Castello G. Expression of CXCR4 predicts poor prognosis in patients with malignant melanoma. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 1835-1841
- 6 Ishigami S, Natsugoe S, Nakajo A, Tokuda K, Uenosono Y, Arigami T, Matsumoto M, Okumura H, Hokita S, Aikou T. Prognostic value of CCR7 expression in gastric cancer. *Hepatogastroenterology* 2007; 54: 1025-1028
- 7 Mashino K, Sadanaga N, Yamaguchi H, Tanaka F, Ohta M, Shibuta K, Inoue H, Mori M. Expression of chemokine receptor CCR7 is associated with lymph node metastasis of gastric carcinoma. *Cancer Res* 2002; 62: 2937-2941
- 8 Wilson JL, Burchell J, Grimshaw MJ. Endothelins induce CCR7 expression by breast tumor cells via endothelin receptor A and hypoxia-inducible factor-1. *Cancer Res* 2006; 66: 11802-11807
- 9 Heresi GA, Wang J, Taichman R, Chirinos JA, Regalado JJ, Lichtstein DM, Rosenblatt JD. Expression of the chemokine receptor CCR7 in prostate cancer presenting with generalized lymphadenopathy: report of a case, review of the literature, and analysis of chemokine receptor expression. *Urol Oncol* 2005; 23: 261-267
- 10 Mori T, Kim J, Yamano T, Takeuchi H, Huang S, Umetani N, Koyanagi K, Hoon DS. Epigenetic up-regulation of C-C chemokine receptor 7 and C-X-C chemokine receptor 4 expression in melanoma cells. *Cancer Res* 2005; 65: 1800-1807
- 11 Kawada K, Hosogi H, Sonoshita M, Sakashita H, Manabe T, Shimahara Y, Sakai Y, Takabayashi A, Oshima M, Taketo MM. Chemokine receptor CXCR3 promotes colon cancer metastasis to lymph nodes. *Oncogene* 2007; 26: 4679-4688
- 12 Ocaña E, Delgado-Pérez L, Campos-Caro A, Muñoz J, Paz A, Franco R, Brieva JA. The prognostic role of CXCR3 expression by chronic lymphocytic leukemia B cells. *Haematologica* 2007; 92: 349-356
- 13 Notohamiprodjo M, Segerer S, Huss R, Hildebrandt B, Soler D, Djafarzadeh R, Buck W, Nelson PJ, von Luetichau I. CCR10 is expressed in cutaneous T-cell lymphoma. *Int J Cancer* 2005; 115: 641-647
- 14 Singh S, Singh UP, Stiles JK, Grizzle WE, Lillard JW Jr. Expression and functional role of CCR9 in prostate cancer cell migration and invasion. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 8743-8750
- 15 Letsch A, Keilholz U, Schadendorf D, Assfalg G, Asemissen AM, Thiel E, Scheibenbogen C. Functional CCR9 expression is associated with small intestinal metastasis. *J Invest Dermatol* 2004; 122: 685-690
- 16 Ishida T, Ishii T, Inagaki A, Yano H, Kusumoto S, Ri M, Komatsu H, Iida S, Inagaki H, Ueda R. The CCR4 as a novel-specific molecular target for immunotherapy in Hodgkin lymphoma. *Leukemia* 2006; 20: 2162-2168
- 17 Jöhrer K, Zelle-Rieser C, Perathoner A, Moser P, Hager M, Ramoner R, Gander H, Hörtl L, Bartsch G, Greil R, Thurnher M. Up-regulation of functional chemokine receptor CCR3 in human renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 2459-2465

编辑 李军亮 电编 何基才

恩替卡韦治疗慢性乙型肝炎30例

李金金, 耿长新, 吕志国

李金金, 耿长新, 青岛大学医学院附属市立医院科研科 山东省青岛市 266011

吕志国, 青岛市第六人民医院肝三区 山东省青岛市 266033
作者贡献分布: 此课题由耿长新与李金金设计; 研究过程由李金金与吕志国操作完成; 数据分析及写作由李金金与耿长新完成。

通讯作者: 耿长新, 266011, 山东省青岛市市南区胶州路1号, 青岛大学医学院附属市立医院科研科. changxin_geng@hotmail.com
电话: 0532-82789053

收稿日期: 2008-11-06 修回日期: 2008-12-23

接受日期: 2008-12-29 在线出版日期: 2009-02-08

Therapeutic efficacy of entecavir in chronic HBV-infected patients: an analysis of 30 cases

Jin-Jin Li, Chang-Xin Geng, Zhi-Guo Lv

Jin-Jin Li, Chang-Xin Geng, Department of Scientific Research, Qingdao Medical College Affiliated Municipal Hospital, Qingdao 266011, Shandong Province, China
Zhi-Guo Lv, the Sixth People's Hospital of Qingdao, Qingdao 266033, Shandong Province, China

Correspondence to: Chang-Xin Geng, Department of Scientific Research, Qingdao Medical College Affiliated Municipal Hospital, 1 Jiaozhou Road, Shinan District, Qingdao 266011, Shandong Province, China. changxin_geng@hotmail.com
Received: 2008-11-06 Revised: 2008-12-23

Accepted: 2008-12-29 Published online: 2009-02-08

Abstract

AIM: To explore the therapeutic efficacy of entecavir in chronic HBV-infected patients.

METHODS: A total of 30 chronic HBV-infected patients in our hospital were treated with 0.5mg per day. Levels of HBV DNA and ALT were measured before treatment and on 4, 12, 24 weeks after treatment. At the same time, hyaluronic acid (HA), laminin (LN), procollagen Type III (PCIII) and collagen type IV (CIV) were also determined.

RESULTS: HBV DNA was decreased significantly after treatment for 4, 12, 24 weeks ($F = 47.79, P < 0.05$). The recovery rate of ALT was also improved. Seroconversion occurred to 3 cases of 18 patients with HBsAg(+). Significant differences were observed in the levels of LN and HA after treatment, with remarkable dif-

ference at 12 weeks and 24 weeks after treatment ($F = 2.73, 2.79, \text{both } P < 0.05$). CIV was decreased significantly after treatment for 24 weeks. ($F = 3.03, P < 0.05$). The level of PCIII was decreased, but the difference was not statistically different.

CONCLUSION: Entecavir can effectively inhibit the HBV replication, improve liver function, decrease the levels of LN, HA, PCIII, CIV, and alleviate liver fibrosis.

Key Words: Entecavir; Chronic hepatitis B; Hyaluronic acid; Laminin; Procollagen type III; Collagen type IV

Li JJ, Geng CX, Lv ZG. Therapeutic efficacy of entecavir in chronic HBV-infected patients: an analysis of 30 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(4): 425-428

摘要

目的: 观察慢性乙型肝炎患者应用恩替卡韦治疗后的临床疗效。

方法: 2007-2008年来我院就诊的慢性乙型肝炎患者30例, 给予恩替卡韦0.5 mg/d, 观察治疗前及治疗后4、12、24 wk HBV DNA和ALT, 同时检测血清肝纤维化指标即透明质酸, 层粘连蛋白, 前胶原蛋白III, 胶原蛋白IV。

结果: 治疗后4、12、24 wk HBV DNA与治疗前相比明显下降($F = 47.79, P < 0.05$), 同时随着时间延长, HBV DNA逐渐下降, ALT复常率逐渐增加; 18例HBsAg(+)患者中3例发生血清学转换; 血清LN、HA、PCIII、CIV水平治疗后较治疗前下降, LN、HA于12、24 wk下降明显($F = 2.73, 2.79, \text{均 } P < 0.05$), CIV于治疗后24 wk下降明显($F = 3.03, P < 0.05$), 而PCIII在观察期间虽然下降, 但无统计学差异。

结论: 慢性乙型肝炎患者服用恩替卡韦后能有效抑制病毒复制, 改善肝功能, 降低血清LN、HA、PCIII、CIV水平, 减轻肝纤维化。

关键词: 恩替卡韦; 慢性乙型肝炎; 透明质酸; 层粘连蛋白; 前胶原蛋白III; 胶原蛋白IV

■背景资料

随着慢性乙型肝炎患者病情的进展, 可出现肝纤维化, 进而发展为肝硬化。目前抗病毒药物主要有干扰素和核苷类似物两大类, 而恩替卡韦是新一代的核苷类似物, 已在临床上得到广泛应用。

■同行评议者

董蕾, 教授, 西安交通大学第二附属医院消化内科

■研究前沿

肝纤维化的及时诊断和治疗对防治慢性乙型肝炎患者进展为肝硬化具有重要的意义。

李金金, 耿长新, 吕志国. 恩替卡韦治疗慢性乙型肝炎30例. 世界华人消化杂志 2009; 17(4): 425-428
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/425.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒感染是一个全球性的健康问题, 至2000年已有4亿或5%的世界人口现行慢性感染^[1], 随着慢性乙型肝炎患者病情的进展, 可出现肝纤维化, 进而发展为肝硬化. 目前抗病毒药物主要有干扰素和核苷类似物两大类, 而恩替卡韦是新一代的核苷类似物, 已在临床上得到广泛应用. 本文对恩替卡韦治疗的慢性乙型肝炎患者进行治疗前HBV DNA、ALT及血清肝纤维化指标的观察, 旨在探讨恩替卡韦对慢性乙型肝炎患者的临床疗效, 及对肝纤维化是否具有防治作用, 现报道如下.

1 材料和方法

1.1 材料 2007-2008年于我院就诊的慢性乙型肝炎患者30例, 诊断符合2000-09(西安)第十次全国病毒性肝炎与肝病学术会议修订的《病毒性肝炎防治方案》中慢性乙型肝炎的诊断标准, 其中男27例, 女3例, 年龄21-57岁. 所有病例在筛选前12 mo内未接受抗病毒治疗及免疫调节剂. 排除标准: 患有丙型肝炎、丁型肝炎或其他类型的肝脏疾病患者, 有酒精性、自身免疫性或胆汁淤积性肝病者, 近期(24 wk)内有胰腺炎, 胆囊结石病史者均予以排除.

1.2 方法 入选患者均给予恩替卡韦0.5 mg/d, 观察治疗前及治疗后4、12、24 wk HBV DNA和肝功, 同时检测血清LN、HA、PCIII、PCIV水平变化.

统计学处理 用SPSS11.5软件进行方差分析.

2 结果

2.1 治疗前后HBV DNA(log10 拷贝/mL, mean ± SD)比较 治疗后4、12、24 wk与治疗前相比均有统计学差异($F = 47.79, P < 0.05$), ALT复常率(%): 4、12、24 wk分别为16.67%、53.33%、86.67%. 治疗期间总体呈现随着治疗时间延长, HBV DNA下降, ALT得到改善(表1).

2.2 血清LN、HA、CIV、PCIII水平的变化 入选患者经治疗后血清LN、HA、CIV、PCIII水平与治疗前相比平均值均有下降, LN、HA于12、24 wk下降明显, 有显著统计学差异($F = 2.73, F = 2.79, P < 0.05$), PCIV则于24 wk下降明显, 有显著

统计学差异($F = 3.03, P < 0.05$), 而PCIII在观察期间虽然下降, 但无统计学差异($F = 0.831, P > 0.05$, 表2).

3 讨论

恩替卡韦是新一代的核苷类似物, 经口服吸收进入肝细胞后, 通过磷酸化作用成为二磷酸和三磷酸恩替卡韦, 以后者为主并且后者是恩替卡韦在肝细胞内抑制HBV DNA聚合酶的活性形式, 三磷酸恩替卡韦的半衰期为14-15 h, 作用较持久^[2], 与HBV多聚酶的天然底物三磷酸脱氧鸟嘌呤核苷竞争, 通过三个方面对HBV的复制进行抑制: 聚合酶的引发, 负链的逆转录及正链的DNA复制^[3]. 我们的结果显示, 治疗后HBV DNA(log10 拷贝/mL, mean ± SD)比治疗前明显下降, 在治疗期间18例HbeAg(+)患者有3例发生血清学转换, 且随着治疗时间延长, HBV DNA下降, ALT复常率增加, 这与姚光弼 *et al*^[4]研究结果一致. 同时我们对肝纤维化指标检测的结果显示: 治疗后LN、HA、CIV、PCIII水平较治疗前明显下降, LN、HA于12、24 wk有显著性统计学差异($P < 0.05$), CIV于24 wk有显著性统计学差异($P < 0.05$), PCIII在观察期间也不断下降, 但无统计学差异($P > 0.05$), 进一步相关分析发现HBV DNA与肝血清纤维化指标之间无相关性, 与报道^[5-6]不一致, 这可能与入选病例组织炎症分级、以及观察样本尚小和观察时间尚短有关可能与观察样本尚小或者观察时间有关.

慢性乙型肝炎是乙型肝炎病毒感染最重要的过程和结局之一, 肝脏纤维化是慢性乙型肝炎向肝硬化发展的前奏和必经环节^[7-8]. 因此肝纤维化的及时诊断和治疗对防治慢性乙型肝炎患者进展为肝硬化具有重要的意义. 传统的肝纤维化程度的诊断主要依赖于肝穿刺病理活检, 但因其创伤性大且难以动态观察而存在局限性. 在全国第十三次全国病毒性肝炎及肝病会议上, 无创性的肝纤维化诊断成为会议的焦点. 施光峰提到可以根据血清标志物来判断肝纤维化情况. 直接标志物来源于肝细胞质, 如透明质酸, 胶原蛋白IV, III型前胶原蛋白, IV前胶原蛋白C肽, IV前胶原蛋白N肽, 细胞质金属蛋白酶等, 现在常采用多个指标联合评价肝纤维化情况. 有作者认为慢性乙型肝炎患者血清中LN、HA、PCIII、CIV的水平可以反映肝纤维化程度. 血清肝纤维化标志物水平、肝组织纤维化程度及炎症反应活动度之间有良

表 1 治疗前后HBV DNA(log10 拷贝/mL, mean ± SD)和ALT复常率 (%)

	治疗前	治疗后(wk)		
		4	12	24
HBV DNA	6.68 ± 1.02	3.29 ± 2.12 ^a	1.60 ± 2.05 ^{ac}	0.90 ± 1.70 ^{ac}
ALT复常率		16.67	53.33	86.67

^aP<0.05 vs 治疗前; ^cP<0.05 vs 治疗后4 wk.

表 2 治疗前后HA、LN、PCⅢ、CIV水平 (μg/L, mean ± SD)

纤维化指标	治疗前	治疗后(wk)		
		4	12	24
HA	147.83 ± 123.48	118.89 ± 100.06	93.22 ± 89.15 ^a	76.75 ± 75.06 ^a
LN	131.99 ± 123.55	113.93 ± 84.87	87.91 ± 43.95 ^a	76.96 ± 38.37 ^a
CIV	139.14 ± 107.25	113.88 ± 71.73	101.65 ± 65.30	83.97 ± 63.71 ^a
PCⅢ	59.57 ± 94.78	45.32 ± 47.47	44.19 ± 46.31	35.25 ± 35.01

^aP<0.05 vs 治疗前.

好的相关性,与肝脏损害程度及肝组织纤维化发展的阶段性密切相关^[9],其中HA和LN不但反映肝脏纤维化和炎症性改变,亦能监测炎症和肝纤维化的进展^[10].因此,检测血清肝纤维化指标的含量可以客观地推测肝细胞损伤及纤维化程度.

肝纤维化是一个动态的过程,涉及细胞、细胞因子、细胞外基质之间的复杂变化^[11-13].HBV靶向损伤肝细胞,产生释放纤维性介质,并诱导炎症细胞入肝,损伤的肝细胞凋亡,刺激肝成纤维细胞产生纤维活性.炎症细胞激活肝星状细胞分泌胶原,因而炎症细胞和产生纤维的细胞相互刺激形成恶性循环,结果是肝脏的细胞外基质产生超过降解,从而使过多的细胞外基质沉积在肝脏组织中,导致肝脏正常结构的破坏与重建,形成肝纤维化^[14].因此患者血清HBV持续复制活跃和肝脏炎症坏死是慢性乙型肝炎进展至肝硬化的主要决定因素^[15].有临床试验表明:一些阻断肝纤维化的药物,目的为除去原发性的肝损伤,抑制肝星状细胞的激活或促使其死亡以及基质降解,最有效的治疗为除去病因^[16].通过有效抑制乙肝病毒复制或清除病毒后患者病情持续性缓解,即HBeAg血清学转换及HBV DNA<10⁴ copies/mL不仅可减缓肝纤维化的进展,还可降低肝纤维化的程度^[17].我们的结果提示恩替卡韦能有效抑制HBV复制,同时,通过减轻肝细胞的炎性坏死,从而间断阻断肝

纤维化形成,甚至可以防治乙肝病毒引起的肝硬化.

4 参考文献

- Maddrey WC. Hepatitis B--an important public health issue. *Clin Lab* 2001; 47: 51-55
- Levine S, Hernandez D, Yamanaka G, Zhang S, Rose R, Weinheimer S, Colonno RJ. Efficacies of entecavir against lamivudine-resistant hepatitis B virus replication and recombinant polymerases in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 2525-2532
- Tenney DJ, Levine SM, Rose RE, Walsh AW, Weinheimer SP, Discotto L, Plym M, Pokornowski K, Yu CF, Angus P, Ayres A, Bartholomeusz A, Sievert W, Thompson G, Warner N, Locarnini S, Colonno RJ. Clinical emergence of entecavir-resistant hepatitis B virus requires additional substitutions in virus already resistant to Lamivudine. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 3498-3507
- 姚光弼, 张定凤, 王宝恩, 徐道振, 周霞秋, 雷秉钧. 恩替卡韦抗乙型肝炎病毒剂量和疗效的研究. *中华肝脏病杂志* 2005; 13: 484-487
- 韩群英, 刘正稳, 张妮, 朱凤群. 拉米夫定对慢性乙型肝炎患者血清透明质酸水平的影响. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 1045-1047
- 张春兰, 石亚玲. 肝纤维化指标与病毒含量及病理的关系. *临床肝胆病杂志* 2000; 16: 220-221
- Liu J, Fan D. Hepatitis B in China. *Lancet* 2007; 369: 1582-1583
- Shah U, Memon I, Cheema HA, Ali S, Thobani S, Mirza R. Recommendations for the treatment of chronic hepatitis B infection in children. *J Pak Med Assoc* 2007; 57: 204-207
- 林少锐, 陈瑞烈, 郑晓丹. 慢性肝炎血清肝纤维化指标检测的临床意义. *世界感染杂志* 2006; 6: 225-226
- 陈杰, 陈新月. 肝纤维化诊断的研究进展. *国际流行病*

■同行评价

本研究立意有一定的新颖性,但设计缺乏关键指标,学术价值一般.

- 学传染病学杂志 2006; 33: 413
- 11 Friedman SL. Liver fibrosis -- from bench to bedside. *J Hepatol* 2003; 38 Suppl 1: S38-S53
- 12 王宝恩. 肝星状细胞与肝纤维化. 中华肝脏病杂志 2000; 8: 197
- 13 沈鼎明. 肝纤维化的发生机制. 中华肝脏病杂志 2000; 8: 241
- 14 Fattovich G. Natural history and prognosis of hepatitis B. *Semin Liver Dis* 2003; 23: 47-58
- 15 李成忠, 万漠彬, 曾民德, 茅益民, 范竹萍, 曹爱平, 李继强, 邱德凯, 苏炳华, 何清波, 陆伦根, 叶军, 蔡雄, 陈成伟, 王吉耀, 胡德昌, 张清波, 巫善明, 周霞秋, 朱金水, 张惠泉. 非创伤性诊断指标优势组合对肝纤维化诊断价值的初步研究. 中华肝脏病杂志 2001; 9: 261-263
- 16 Rockey DC. Currently available strategies to treat fibrosis. In: AASLD Postgraduate Course. Boston, 2003: 41-42
- 17 Hui CK, Leung N, Shek TW, Yao H, Lee WK, Lai JY, Lai ST, Wong WM, Lai LS, Poon RT, Lo CM, Fan ST, Lau GK. Sustained disease remission after spontaneous HBeAg seroconversion is associated with reduction in fibrosis progression in chronic hepatitis B Chinese patients. *Hepatology* 2007; 46: 690-698

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志名词术语标准

本刊讯 本刊名词术语一律标准化, 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. (常务副总编辑: 张海宁 2009-02-08)

直肠癌前切除手术术后吻合口漏的风险因素分析

何楠, 曹家庆, 朱培谦, 王梦龙, 熊炳贤

何楠, 曹家庆, 朱培谦, 王梦龙, 熊炳贤, 南昌大学第二附属医院胃肠外科 江西省南昌市 330006

作者贡献分布: 何楠与曹家庆对此文所作贡献均等; 此研究由何楠与曹家庆共同设计; 手术主要过程由曹家庆, 朱培谦, 王梦龙及熊炳贤等完成; 数据分析由何楠完成; 本论文写作由何楠与曹家庆完成。

通讯作者: 曹家庆, 330006, 江西省南昌市, 南昌大学第二附属医院胃肠外科, cao.jiaqing@163.com

电话: 0791-6298907

收稿日期: 2008-11-10 修回日期: 2008-12-09

接受日期: 2008-12-15 在线出版日期: 2009-02-08

Risk factors for anastomotic leakage after anterior resection for rectal cancer: an analysis of 518 cases

Nan He, Jia-Qing Cao, Pei-Qian Zhu, Meng-Long Wang, Bing-Xian Xiong

Nan He, Jia-Qing Cao, Pei-Qian Zhu, Meng-Long Wang, Bing-Xian Xiong, Department of Gastrointestinal Surgery, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China

Correspondence to: Jia-Qing Cao, Department of Gastrointestinal Surgery, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China. cao.jiaqing@163.com

Received: 2008-11-10 Revised: 2008-12-09

Accepted: 2008-12-15 Published online: 2009-02-08

Abstract

AIM: To evaluate the leakage rate and to identify risk factors after anterior resection for rectal cancer.

METHODS: During February 1998 and May 2007, 518 patients underwent anterior resection in our hospital. We performed a retrospective study to identify risk factors for anastomotic leakage.

RESULTS: In our patients, the anastomotic leak rate was 9.2% (48 of 518 patients). The risk factors for anastomotic leakage after anterior resection included age > 65 years old, albumin level less than 35 g/L, diabetes medical history, absence of a protective stoma and tumor diameter > 30 mm.

CONCLUSION: For patients with high risk fac-

tors for anastomotic leakage, a protective stoma significantly decreases the rate of clinical leaks and subsequent reoperation after low anterior resection.

Key Words: Anastomotic leakage; Anterior resection for rectal cancer; Risk factors

He N, Cao JQ, Zhu PQ, Wang ML, Xiong BX. Risk factors for anastomotic leakage after anterior resection for rectal cancer: an analysis of 518 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(4): 429-432

摘要

目的: 探讨直肠癌前切除手术术后吻合口漏的发生率和危险因素。

方法: 回顾性分析1998-02/2007-05我院行直肠癌前切除手术患者518例的病例资料, 探讨直肠癌前切除手术术后吻合口漏发生率的危险因素。

结果: 518例直肠癌前切除术后共发生吻合口漏48例, 发生率9.2%(48/518)。患者年龄>65岁、术前血清白蛋白<35 g/L、术前有糖尿病病史、术中无行保护性近端肠造瘘、肿瘤病灶直径>30 mm是患者术后发生吻合口漏的危险因素。

结论: 对于存在上述吻合口漏风险因素的患者, 行保护性近端肠造瘘能够减低了吻合口漏的发生率。

关键词: 吻合口漏; 直肠癌前切除术; 风险因素

何楠, 曹家庆, 朱培谦, 王梦龙, 熊炳贤. 直肠癌前切除手术术后吻合口漏的风险因素分析. *世界华人消化杂志* 2009; 17(4): 429-432

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/429.asp>

0 引言

吻合口漏是直肠癌低位前切除术的最严重的并发症之一, 随着直肠全系膜切除(total mesorectal excision, TME)作为直肠癌治疗的标准手术应用以及患者对保肛要求的增加使直肠癌前切除手

■背景资料

术后发生吻合口漏是影响手术效果的重要原因。本文通过分析引起术后吻合口漏的风险因素, 以采取相应的应对措施来降低其发生率。

■同行评议者

曹杰, 主任医师, 广州医学院附属广州市第一人民医院胃肠外科; 刘连新, 教授, 哈尔滨医科大学第一临床医学院普通外科

■相关报道

国内董新舒 *et al* 报道915例直肠癌前切除术后并发症,认为吻合口漏的发生有全身及局部两方面的因素。全身因素即性别、贫血、低蛋白;局部因素有术前肠道准备不充分、远近切端肠管血运不良、吻合口张力过大、吻合器使用不当。

术例数明显增多,但是术后吻合口漏的发生率保持在2.8%-15%左右^[1]成为影响手术效果的重要原因。本文回顾性分析了本院1998-02/2007-05 518例行直肠癌前切除手术的资料,旨在分析引起术后吻合口漏的风险因素,以采取相应的应对措施来降低其发生率。

1 材料和方法

1.1 材料 回顾性分析了自1998-02/2007-05在南昌大学第二附属医院胃肠外科手术的直肠癌病例资料。共有518例患者资料符合要求,入选病例必须同时满足下述条件:(1)肿瘤下端距肛缘5-14 cm。(2)施行了TME技术的直肠癌前切除术。(3)所有的病例均行术前肠镜检查并病理确诊为腺癌,均未发现术前远处转移,均未给予术前辅助化疗。

1.2 方法

1.2.1 手术:均由胃肠外科具有正高级职称以上的医师施行,经中下腹绕脐的正中切口进腹,根部结扎肠系膜下动脉,但保留左结肠动脉,游离降结肠、结肠脾曲以减少吻合张力,采用尖头电刀直视下分离,辨认和保留腹下神经,锐性分离骶前间隙,电刀切断两侧的直肠侧韧带,直肠前方在Denonvilliers筋膜前间隙内用电刀分离,将直肠一周均分离至提肛肌平面,直角钳夹闭肿瘤下方肠管后,经肛门用1000 mL生理盐水冲洗远端直肠腔。行低位结肠直肠或结肠肛管吻合,吻合方式包括吻合器吻合和手工缝合均按常规操作。术后于吻合口周围放置双套管引流7-15 d。

1.2.2 吻合口漏的诊断:吻合口漏多发生在术后10-13 d,患者出现发热、下腹痛,有腹膜炎、直肠阴道漏的表现,引流管引流液突然增多,且有气体、粪便或肠内容物排出,造影剂灌肠X线检查可帮助确诊。

1.2.3 危险因素的分析:危险因素包括临床因素(年龄、性别、术前血红蛋白浓度、术前白蛋白浓度、术前有无糖尿病病史、手工缝合或吻合器吻合、保护性近端肠造瘘)和肿瘤因素(肿瘤的分化程度、肿瘤下端距肛缘的距离、肿瘤的直径、肿瘤的T分级、肿瘤的淋巴结转移情况),对其进行分析。

统计学处理 采用SPSS11.5统计软件进行数据处理,用 χ^2 检验分析各组间发生率的差异, $P<0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 患者的临床因素对直肠癌前切除手术术后

表1 患者的临床因素对直肠癌前切除手术术后吻合口漏发生率的影响

临床因素	<i>n</i>	吻合口漏 <i>n</i> (%)	<i>P</i>
性别			
男	308	32(10.3)	0.286
女	210	16(7.6)	
年龄(岁)			
≤65	366	26(7.1)	0.008
>65	152	22(14.5)	
术前血清白蛋白(g/L)			
≥35	382	29(7.5)	0.028
<35	136	19(13.9)	
术前血清血红蛋白(g/L)			
≥100	343	27(7.8)	0.125
<100	175	21(12.0)	
术前有无糖尿病			
有	48	9(18.8)	0.017
无	470	39(8.2)	
吻合方式			
手工缝合	112	7(6.3)	0.214
吻合器吻合	406	41(10.1)	
保护性近端肠造瘘			
有	130	6(4.6)	0.035
无	388	42(10.8)	

吻合口漏发生率的影响 518例共发生吻合口漏者48例(9.2%, 48/518)。男308例中发生吻合口漏32例(10.3%, 32/308),女210例中发生吻合口漏16例(7.6%, 16/210),差异无统计学意义($P>0.05$,表1)。

年龄28-86(平均55.3)岁;其中>65岁152例,发生吻合口漏为22例(14.5%, 22/152);≤65岁366例,发生吻合口漏26例(7.1%, 26/366),差异有统计学意义($P<0.05$)。其他因素像术前有糖尿病、血清白蛋白浓度<35 g/L、术中无行保护性近端肠造瘘对术后吻合口漏发生率均有影响($P<0.05$)。术前血红蛋白浓度及肠吻合方式对吻合口漏的发生率没有影响($P>0.05$)。

2.2 患者的肿瘤因素对直肠癌前切除手术术后吻合口漏发生率的影响 高分化患者122例,发生吻合口漏11例(9.0%, 11/122);中分化患者311例,发生吻合口漏25例(8.0%, 25/311);低分化患者85例,发生吻合口漏12例(14.1%, 14/85),差异没有统计学意义($P>0.05$)。肿瘤病灶直径<30 mm 158例,发生吻合口漏8例(5.1%, 8/158);肿瘤病灶直径在30-50 mm之间210例,发生吻合口漏27例(12.8%, 27/210);肿瘤病灶直径≥50 mm 150例,发生吻合口漏13例(8.6%, 13/150),差异有统

表 2 患者的肿瘤因素对直肠癌前切除手术后吻合口漏发生率的影响

肿瘤因素	n	吻合口漏 n(%)	P
分化程度			
高	122	11(9.0)	0.229
中	311	25(8.0)	
低	85	12(14.1)	
肿瘤下端距肛缘距离(cm)			
<7	82	11(13.4)	0.350
7-10	236	21(8.9)	
≥10	200	16(8.0)	
肿瘤病灶直径(mm)			
<30	158	8(5.1)	0.037
30-50	210	27(12.8)	
≥50	150	13(8.6)	
肿瘤T分级			
T1、T2	190	18(9.4)	0.901
T3、T4	328	30(9.1)	
肿瘤淋巴结转移			
无	276	26(9.4)	0.897
有	242	22(9.1)	

计学意义($P<0.05$). 其他因素像肿瘤下端距肛缘的距离、肿瘤T分级及肿瘤淋巴结转移情况对术后吻合口漏的发生率均无影响($P>0.05$, 表2).

3 讨论

本文分析了可能影响直肠癌前切除手术后吻合口漏发生率的12个相关因素, 发现患者年龄 >65 岁、术前血清白蛋白 <35 g/L、术前有糖尿病病史、术中无行保护性近端肠造瘘、肿瘤病灶直径 >30 mm是患者术后发生吻合口漏的危险因素.

老年患者的重要器官功能常发生退行性变, 代偿能力和免疫功能下降, 生理储备功能不足, 对手术的耐受力下降. 血清白蛋白 <35 g/L是营养不良的重要标志, 直肠癌的患者术前经常存在着蛋白质-热量缺乏性营养不良, 其原因可能与肿瘤引起的消化系梗阻、胃肠道功能紊乱及肿瘤引起的神经内分泌紊乱、代谢紊乱导致的恶病质有关. 糖尿病影响蛋白质、脂肪、氨基酸代谢, 成纤维细胞功能下降, 影响术后吻合口生长. 在我们的研究中这些因素均使术后吻合口的发生率增高, 因此术前我们应采取相应的措施如改善老年患者的心肺功能, 调整血糖及血压水平, 纠正异常的生理指标, 对营养不良的患者给予营养支持治疗对防止术后吻合口漏有

积极的作用.

肿瘤因素中肿瘤病灶直径大者与术后吻合口漏发生率增高有相关性. Alves *et al*^[2]和Rullier *et al*^[3]认为巨大肿瘤切除手术操作困难是吻合口漏的主要风险因素. 这种情况尤其多见于合并有心血管病的老年患者. Moran和Heald^[4]认为吻合口漏的主要原因是难以达到合适的解剖位置和不良的血供带来的手术困难及巨大肿瘤的切除等. 我们分析认为可能是因为肿瘤直径大的患者病程长、全身情况差、加上肿瘤大手术剥离和切除组织多导致局部组织的张力增加和微循环血供不良等多方面原因造成了吻合口漏发生率增加. 另外中低位直肠癌的低位吻合会增加吻合口漏的发生率, Vignali *et al*^[5]报告吻合口距肛缘7 cm以上和以下者漏的发生率分别为1%和7.7%, 本文比较了距肛缘不同距离的直肠癌切除术后吻合口漏的发生率, 低位组(肿瘤下端距肛缘距离 <7 cm)吻合口漏的发生率明显高于中高位组. Law *et al*^[6]分析了吻合口漏的危险因素, 发现预防性肠造瘘和性别是吻合口漏的主要影响因素. 我们和赵广法 *et al*^[7]均未发现性别与吻合口漏的发生有相关性. 但是从我们的资料分析显示保护性近端肠造瘘能够减低吻合口漏的发生率, 并且已行保护性近端肠造瘘患者发生的吻合口漏病情也相对较轻. 另外Konishi *et al*^[8]和Law *et al*^[6]报道中也提到保护性近端肠造瘘患者的吻合口漏再次手术率和术后死亡率明显降低. 虽然保护性近端肠造瘘有上述的优点, 他是否应该常规使用却一直是争论的焦点. 因为保护性近端肠造瘘的患者的住院时间延长和住院费用增加^[9], 肠造瘘患者还面临着第2次手术, 行肠造瘘术和造瘘还纳时也有可能发生并发症甚至是导致死亡^[10]等等.

总之, 老年患者、低蛋白血症、糖尿病史和肿瘤病灶直径大是直肠癌前切除手术后发生吻合口漏的危险因素, 保护性近端肠造瘘能够有效减低吻合口漏的发生率和减轻症状, 但他也有风险及增加患者住院时间和费用. 所以外科医生在治疗时应综合考虑这些因素, 加强围手术期的营养支持, 提高对手术的耐受性, 对术前一般情况差、年纪大、有糖尿病病史和肿瘤直径大手术操作困难或合并低位吻合的患者可给予行保护性近端肠造瘘.

4 参考文献

- 1 Peeters KC, Tollenaar RA, Marijnen CA, Klein Kranenbarg E, Steup WH, Wiggers T, Rutten HJ,

■同行评价

本研究设计较科学, 数据可靠, 方法恰当, 样本量充足, 学术价值较好.

- van de Velde CJ. Risk factors for anastomotic failure after total mesorectal excision of rectal cancer. *Br J Surg* 2005; 92: 211-216
- 2 Alves A, Panis Y, Trancart D, Regimbeau JM, Pocard M, Valleur P. Factors associated with clinically significant anastomotic leakage after large bowel resection: multivariate analysis of 707 patients. *World J Surg* 2002; 26: 499-502
- 3 Rullier E, Laurent C, Garrelon JL, Michel P, Saric J, Parneix M. Risk factors for anastomotic leakage after resection of rectal cancer. *Br J Surg* 1998; 85: 355-358
- 4 Moran BJ, Heald RJ. Risk factors for, and management of anastomotic leakage in rectal surgery. *Colorectal Dis* 2001; 3: 135-137
- 5 Vignali A, Gianotti L, Braga M, Radaelli G, Malvezzi L, Di Carlo V. Altered microperfusion at the rectal stump is predictive for rectal anastomotic leak. *Dis Colon Rectum* 2000; 43: 76-82
- 6 Law WL, Chu KW, Ho JW, Chan CW. Risk factors for anastomotic leakage after low anterior resection with total mesorectal excision. *Am J Surg* 2000; 179: 92-96
- 7 赵广法, 师英强, 莫善斌. 直肠全系膜切除术后吻合口漏的危险因素分析和对策. *肿瘤* 2004; 24: 595-596
- 8 Konishi T, Watanabe T, Kishimoto J, Nagawa H. Risk factors for anastomotic leakage after surgery for colorectal cancer: results of prospective surveillance. *J Am Coll Surg* 2006; 202: 439-444
- 9 Koperna T. Cost-effectiveness of defunctioning stomas in low anterior resections for rectal cancer: a call for benchmarking. *Arch Surg* 2003; 138: 1334-1338; discussion 1339
- 10 Gooszen AW, Geelkerken RH, Hermans J, Lagaay MB, Gooszen HG. Temporary decompression after colorectal surgery: randomized comparison of loop ileostomy and loop colostomy. *Br J Surg* 1998; 85: 76-79

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志正文要求

本刊讯 本刊正文标题层次为 0 引言; 1 材料和方法, 1.1 材料, 1.2 方法; 2 结果; 3 讨论; 4 参考文献。序号一律左顶格写, 后空 1 格写标题; 2 级标题后空 1 格接正文。以下逐条陈述: (1) 引言 应包括该研究的目的和该研究与其他相关研究的关系。(2) 材料和方法 应尽量简短, 但应让其他有经验的研究者能够重复该实验。对新的方法应该详细描述, 以前发表过的方法引用参考文献即可, 有关文献中或试剂手册中的方法的改进仅描述改进之处即可。(3) 结果 实验结果应合理采用图表和文字表示, 在结果中应避免讨论。(4) 讨论 要简明, 应集中对所得的结果做出解释而不是重复叙述, 也不应是大量文献的回顾。图表的数量要精选。表应有表序和表题, 并有足够具有自明性的信息, 使读者不查阅正文即可理解该表的内容。表内每一栏均应有表头, 表内非公知通用缩写应在表注中说明, 表格一律使用三线表(不用竖线), 在正文中该出现的地方应注出。图应有图序、图题和图注, 以使其容易被读者理解, 所有的图应在正文中该出现的地方注出。同一个主题内容的彩色图、黑白图、线条图, 统一用一个注解分别叙述。如: 图 1 萎缩性胃炎治疗前后病理变化。A: …; B: …; C: …; D: …; E: …; F: …; G: …。曲线图可按●、○、■、□、▲、△顺序使用标准的符号。统计学显著性用: ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ ($P > 0.05$ 不注)。如同一表中另有一套 P 值, 则 ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$; 第 3 套为 ^e $P < 0.05$, ^f $P < 0.01$ 。 P 值后注明何种检验及其具体数字, 如 $P < 0.01$, $t = 4.56$ vs 对照组等, 注在表的左下方。表内采用阿拉伯数字, 共同的计量单位符号应注在表的右上方, 表内个位数、小数点、±、- 应上下对齐。“空白”表示无此项或未测, “-”代表阴性未发现, 不能用同左、同上等。表图勿与正文内容重复。表图的标目尽量用 t/min , $c/(\text{mol/L})$, p/kPa , V/mL , $t/^\circ\text{C}$ 表达。黑白图请附黑白照片, 并考入磁盘内; 彩色图请提供冲洗的彩色照片, 请不要提供计算机打印的照片。彩色图片大小 $7.5\text{ cm} \times 4.5\text{ cm}$, 必须使用双面胶条黏贴在正文内, 不能使用浆糊黏贴。(5) 致谢 后加冒号, 排在讨论后及参考文献前, 左齐。(常务副总编辑: 张海宁 2009-02-08)

细胞核和线粒体微卫星不稳在大肠癌发生中的作用及两者的关系

崔海宏, 韩英, 王继恒, 曹建彪, 李恕军, 杨欣艳, 范如英

崔海宏, 韩英, 王继恒, 曹建彪, 李恕军, 杨欣艳, 范如英, 中国人民解放军北京军区总医院消化科 北京市 100007
作者贡献分布: 崔海宏, 韩英, 王继恒及曹建彪对此文所作贡献均等; 此课题由崔海宏, 韩英, 王继恒, 曹建彪, 李恕军, 杨欣艳及范如英设计; 研究过程由崔海宏, 王继恒, 曹建彪及李恕军操作完成; 数据分析由崔海宏, 韩英及李恕军完成; 本论文写作由崔海宏与韩英完成。
通讯作者: 韩英, 100007, 北京市东城区, 中国人民解放军北京军区总医院消化内科。ying.han@lycos.com
电话: 010-66721629-8023 传真: 010-66721168
收稿日期: 2008-11-23 修回日期: 2008-12-23
接受日期: 2009-01-05 在线出版日期: 2009-02-08

Nuclear and mitochondrial microsatellite instability in colorectal cancer

Hai-Hong Cui, Ying Han, Ji-Heng Wang, Jian-Biao Cao, Shu-Jun Li, Xin-Yan Yang, Ru-Ying Fan

Hai-Hong Cui, Ying Han, Ji-Heng Wang, Jian-Biao Cao, Shu-Jun Li, Xin-Yan Yang, Ru-Ying Fan, Department of Gastroenterology, General Hospital of Chinese PLA Beijing Military Command, Beijing 100007, China
Correspondence to: Ying Han, Department of Gastroenterology, General Hospital of Chinese PLA Beijing Military Command, Beijing 100007, China. ying.han@lycos.com
Received: 2008-11-23 Revised: 2008-12-23
Accepted: 2009-01-05 Published online: 2009-02-08

Abstract

AIM: To explore the roles of nuclear microsatellite instability (nMSI) and mitochondrial microsatellite instability (mtMSI) in the pathogenesis of colorectal cancer and their relationship.

METHODS: mtMSI was detected by using direct sequencing analysis, and nMSI by microsatellite scan method. Relationship between the positive incidence of mtMSI and nMSI was analyzed.

RESULTS: Forty cases with colorectal cancers were studied for mtMSI and nMSI. The mtMSI in at least one locus was detected in 11 out of 40 (27.5%) cases. Out of the 11 cases with mtMSI, 9 showed mtMSI at one locus (17.5%) and 2 at 11 loci (5%), but none at more than three loci. The nMSI at BAT25, BAT26 were detected in 9 out of 40 (22.5%) cases. mtMSI was found not to be as-

sociated with sex, age, subsite or TNM stage ($P > 0.05$). mtMSI was significantly correlated with nMSI ($P < 0.05$).

CONCLUSION: mtMSI may be involved in the carcinogenesis of some colorectal cancer, and mtMSI is associated with nMSI.

Key Words: Colorectal cancer; Mitochondrial; Microsatellite instability

Cui HH, Han Y, Wang JH, Cao JB, Li SJ, Yang XY, Fan RY. Nuclear and mitochondrial microsatellite instability in colorectal cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(4): 433-436

摘要

目的: 探讨细胞核和线粒体DNA微卫星不稳在大肠癌发生中的作用及两者的关系。

方法: 直接测序法检测大肠癌线粒体控制区DNA微卫星不定位点(mitochondrial microsatellite instability, mtMSI); 微卫星扫描方法检测细胞核BAT25、BAT26微卫星位点不稳定性(nuclear microsatellite instability, nMSI)。分析大肠癌mtMSI发生率在性别、年龄、部位、分级各组间以及与nMSI的相关性。

结果: 40份大肠癌组织检出mtMSI 11例(27.5%), 其中仅1个微卫星位点mtMSI阳性者11份(17.5%), 有2个微卫星位点mtMSI阳性者2例(5%)。有9份于BAT25或BAT26位点检出nMSI, 阳性率为22.5%。大肠癌mtMSI发生率在性别、年龄、部位、分级各组间无显著性差异($P > 0.05$), 但与nMSI有显著相关性($P < 0.05$)。

结论: mtMSI在部分大肠癌的发生中起重要作用, 大肠癌mtMSI与nMSI有相关性。

关键词: 大肠癌; 线粒体; 微卫星不稳定

崔海宏, 韩英, 王继恒, 曹建彪, 李恕军, 杨欣艳, 范如英. 细胞核和线粒体微卫星不稳在大肠癌发生中的作用及两者的关系. *世界华人消化杂志* 2009; 17(4): 433-436
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/433.asp>

■背景资料

线粒体微卫星不稳定的产生可能导致整个基因组不稳定, 基因组随机突变率增高, 有可能增加某些靶基因编码区中重复序列的突变率, 导致肿瘤的发生。

■同行评议者

杜雅菊, 主任医师, 哈尔滨医科大学附属第二医院消化内科; 关玉盘, 教授, 首都医科大学附属北京朝阳医院消化科

■相关报道

研究发现,核基因不稳定是导致遗传性大肠癌的重要原因,核基因不稳定是由于错配修复基因的突变引起的,他可能也是导致线粒体基因微卫星不稳定的原因。

0 引言

线粒体是细胞独特而重要的细胞器,过去认为他只是人体的“能量供应站”。线粒体DNA(mitochondrial DNA, mtDNA)独立于细胞核DNA之外,能独立进行复制、转录和翻译。由于真核细胞线粒体DNA几乎均是小于20 kb的闭环分子,与核基因组相比,其分子质量小,缺乏组蛋白保护,易受致癌物攻击,且其缺乏损伤修复系统,因此是致癌物的重要靶点。此外,人体内90%以上的氧直接与线粒体的电子传递体系-呼吸链相联系。大量的自由基在有氧代谢过程中不断地产生,由于线粒体内氧浓度很高,易产生自由基及过氧化氢等物质,他本身又不能合成谷胱甘肽而将这些过氧化物有效地清除,因此线粒体及mtDNA易受氧化性损伤。线粒体受损以后可通过改变细胞能量产生,提高线粒体氧化压力,引起线粒体表达异常和/或调控凋亡失控等途径,影响细胞的生物学行为^[1]。关于线粒体DNA微卫星不稳定(mitochondrial microsatellite instability, mtMSI)在大肠癌(colorectal cancer, CRC)发生中的作用,以及他与核DNA微卫星不稳定(nuclear microsatellite instability, nMSI)的关系,尚缺乏深入研究。本研究采用直接测序及微卫星扫描的方法,检测了大肠癌组织mtMSI和nMSI,以期阐明其在CRC发生中的作用,从另一角度揭示大肠癌的发病机制。

1 材料和方法

1.1 材料 收集我院2008-01/2008-06手术切除的大肠癌组织40例,其中男26例,女14例,年龄27-84(平均56)岁。取材后部分标本用40 g/L甲醛固定,其余立即放置于-80℃超低温冰箱保存备用。将固定的大肠癌及距肿瘤1 cm以上正常黏膜连续冰冻切片20张(5 μm),HE染色,显微镜下观察,证实大肠癌组织中肿瘤细胞占70%以上。全部患者术前均未接受放射治疗和化学治疗。大肠癌及正常基因组DNA的提取采取酚/氯仿异戊醇提取法。

1.2 方法

1.2.1 mtMSI的检测: 采用PCR为基础的方法扩增mtDNA微卫星序列, D-环区的PCR扩增上游引物(nt 15791-15810): 5'-ATCATTGGACAAGTAGCATC-3', 下游引物(nt 725-706): 5'-GGTGAACTCACTGGAACGGG-3'。由上海英俊公司合成。PCR的反应体积是20 μL, 包括各1 μL的两种引物(20 pmol/μL), 5 μL的10×PCR缓冲液, 4 μL的dNTPs(2.5 mmol/L), Mg²⁺ 3 μL(25 mmol/L), 0.5

μL的LATAq DNA聚合酶(5 U/μL)和100 ng的组织, 其余用水补足。用PCR仪(Thermal cycle 2720, applied bio-systems美国)进行反应。起始变性温度94℃, 5 min, 以下过程进行35个循环, 变性温度94℃, 时间45 s; 复性温度56℃, 时间45 s; 延伸温度72℃, 时间90 s; 结束延伸温度72℃, 时间7 min。取2 μL的反应产物, 在10 g/L的琼脂糖凝胶上电泳, 确定D-环区成功扩增并拍照。设计3条测序引物: 5'-AAA ATA CTC AAA TGG GCC TGT C-3'; 5'-AGT CAA ATC CCT TCT CGT CC-3'; 5'-TTT GAT TCC TGC CTC ATT CT-3'。测序结果行序列拼接, 并采用ClustalW 1.83和BioEdit软件与人线粒体DNA文库中的序列进行比对。

1.2.2 nMSI的检测: 选择微卫星位点Bat-25 (FAM)Forward: 5'-TCG CCT CCA AGA ATG TAA GT-3', Reverse: 5'-TCT GCA TTT TAA CTA TGG CTC-3', 片段大小120 bp, 位点4q12/C-kit; Bat-26(FAM)Forward: 5'-TGA CTA CTT TTG ACT TCA GCC-3', Reverse: 5'-AAC CAT TCA ACA TTT TTA ACC C-3'片段大小116 bp, 位点: 2P16.3/hMSH2。引物序列参照[2], 由上海英俊公司合成。荧光PCR反应体积20 μL, 包括10×缓冲液, 1.5 mmol/L MgCl₂, 200 μmol/L dNTP, 上下游引物各0.5 μmol/L, 0.75 U Taq DNA多聚酶(大连宝生物公司)和100 ng基因组DNA。PCR反应条件为起始变性温度94℃, 5 min, 以下过程94℃1 min, 57℃1 min, 72℃1 min, 35个循环, 最后72℃延伸10 min。变性后产物经ABI PRISM 3730(Applied Biosystems)毛细管电泳45 min。Datacollection软件自动进行数据收集和处理, 并生成原始的样品数据文件。GeneMarker分析软件对配对产物数据自动分析检测nMSI阳性率。

统计学处理 采用软件SPSS16.0进行 χ^2 检验。

2 结果

2.1 mtMSI检测结果 将310、514、16 184三个微卫星位点综合分析, 40例样本中有11例(27.5%)表现为mtMSI。其中仅D310位点mtMSI阳性者11例, 有D310, D514位点mtMSI阳性者2例, D16184位点未检出阳性。310位点突变明显高于514及16 184位点。同质性突变3个, 异质性突变8个(图1)。

根据患者性别、年龄、统计结果显示, 大肠癌mtMSI发生率在性别、年龄、部位、分级各组间无显著性差异($P>0.05$), 但与nMSI有显著相关性($\chi^2 = 8.935, P = 0.003$, 表1)。

2.2 nMSI检测结果 通过PCR扩增BAT25、

■创新盘点

随着对线粒体与肿瘤关系的研究越来越深入, 近年来人们开始注意mtMSI与肿瘤的发生发展的相互关系。本研究利用直接测序及微卫星扫描的方法检测大肠癌患者细胞核与线粒体微卫星不稳定之间的关系, 从而探讨线粒体突变与大肠癌的关系。

表 1 mtMSI与临床指标的关系 (n)

	n	mtMSI阳性	mtMSI阴性	P
性别				0.500
男	26	8	18	
女	14	3	11	
年龄				0.890
≤30	2	1	1	
30-60	17	4	13	
≥60	21	6	15	
肿瘤部位				0.680
直肠	22	5	17	
右半结肠	7	3	4	
左半结肠	11	3	8	
TNM分期				0.140
I	2	2	0	
II	9	2	7	
III	13	4	9	
IV	16	3	13	
微卫星				0.003
MSI	9	6	3	
MSS	31	5	26	

BAT26位点, 40例大肠癌中有9例MSI, 阳性率为22.5%, 其中BAT25和BAT26同时阳性1例, 其余均为BAT26阳性。

3 讨论

在我国大肠癌发病率逐年上升, 随着对线粒体与肿瘤关系的研究越来越深入, 近年来人们开始注意mtMSI与肿瘤的发生发展的相互关系^[3-4]。很多疾病的发生均与线粒体结构和功能缺陷有关, 因此有人将这些疾病统称为线粒体疾病^[5-6]。基因不稳在肿瘤的发生中起重要作用, 包括核基因组不稳和线粒体微卫星不稳定性。滑行错配(slipped-strand misparing, SSM)、氧化物损伤和有限的自我修复能力是导致线粒体基因组不稳定性(mitochondrial genome instability, mtGI)发生的原因。线粒体MSI(mitochondrial microsatellite instability, mtMSI)被定义为线粒体基因组内短的碱基重复序列长度的变化。目前认为, mtMSI产生是由于复制时mtDNA链发生滑动错误导致重复修复所致, 表现为微卫星简单重复序列的增加或丢失, 广泛的MSI, 导致整个基因组不稳定, 基因组随机突变率增高, 有可能增加某些靶基因编码区中重复序列的突变率。目前已发现, 编码区微卫星改变能使基因发生移码突变产生截短蛋白, 导致靶基因的失活; 而非编码区微卫星现象致癌的机制尚不清楚。D-loop区是

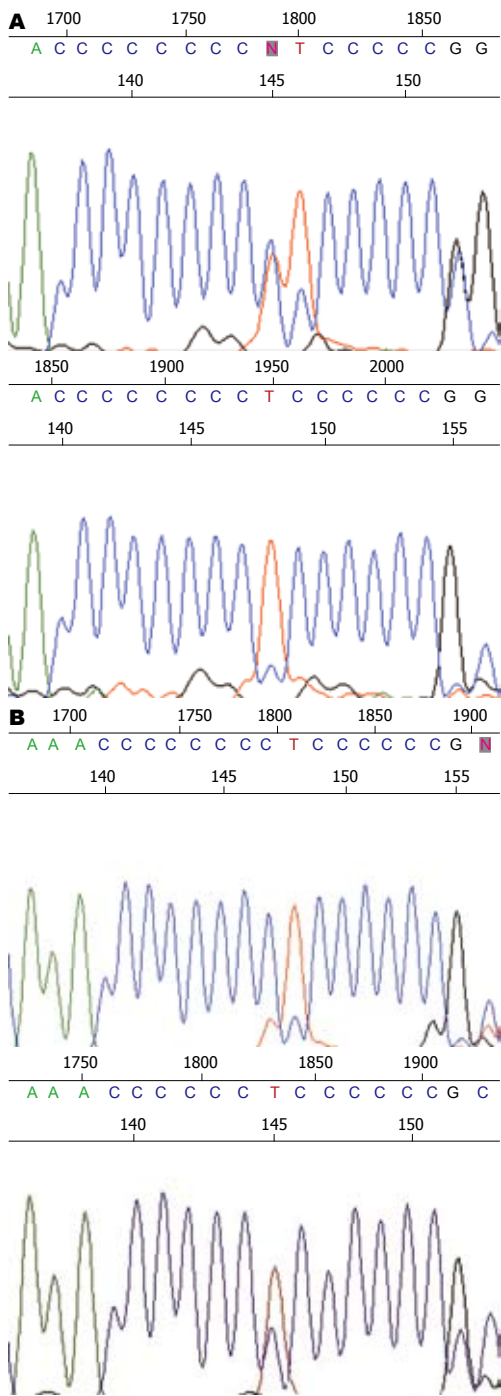


图 1 大肠癌组织mtDNA微卫星不稳定(mtMSI)。A: 异质性突变; B: 同质性突变。

mtDNA重链、轻链的复制起点, 为人类mtDNA的主要非编码区, 对mtDNA的转录和复制起调控作用。肿瘤细胞mtDNA结构改变主要发生在D-loop区。用来检测mtGI的最常用的位点为: D310, D514和D16184位点^[7]。D310区由12-18个胞嘧啶残基组成, 在310位有一个胸腺嘧啶(T)。不同的个体长度不同, 又由于其位于保守序列区II (conserved sequence block H, CSBZ), 与复制和转录相关, 因此mtDNA的D-loop区尤其是

应用要点

本研究为从线粒体基因不稳、突变方面进行深入研究, 为揭示大肠癌的发病机制奠定基础。

■同行评价

本论文所涉的研究具有一定的创新性,设计合理,结论可靠,分析条理清晰。

D310区成为肿瘤体细胞突变研究的热点。肿瘤细胞的mtDNA不仅在结构上发生改变,在数量上也会发生改变。D514为(CA)_n微卫星,多为4-10个(CA)重复。D16184为(PolyC)_n微卫星,重复多为8-14个。有研究表明,对食管癌、胃癌、肝癌等研究表明mtMSI是一种常见的现象,可能在这些肿瘤的发生过程中起重要作用^[8-10]。一些研究证明:核MSI与肿瘤细胞的生存优势有显著的相关性,而与肿瘤的转移能力呈负相关。部分研究发现,线粒体微卫星不稳定与线粒体基因突变有相关性。但也有人得出相反的研究结果^[9]。本研究检测了40例大肠癌3个最常见的mtDNA微卫星位点的mtMSI,11例检出mtMSI,阳性率为27.5%。其中仅1个位点mtMSI阳性者11例,2个位点mtMSI阳性者2例,未检测到3个或更多位点mtMSI阳性者。以上结果提示,mtMSI在大肠癌也比较常见,可能在部分大肠癌的发生中起重要作用。

错配修复基因突变在遗传性非息肉性大肠癌和部分散发性肿瘤的发生中起重要作用^[11-13]。Dietmaier *et al*^[14]研究了58个结肠癌患者的31个微卫星标志后发现,单碱基的重复序列发生率最高,其次为双碱基重复序列,3碱基以上的重复序列变异率较低。而且Poly“A”的重复序列发生变异率最高,在58例大肠癌标本中,c-kit基因内含子Poly“A”(BAT-25)与hMSH2基因第5内含子的Poly“A”检测到的变异分别为10/58和13/58。本研究在40例大肠癌中检测出nMSI 9例,其中6例同时合并mtMSI。证实大肠癌mtMSI与nMSI有相关关系。分析原因,错配修复基因的突变可能不仅影响核基因也同时影响线粒体基因的微卫星不稳定。另外由于310区域与D-环的复制密切相关,故此区域MSI的发生可能会影响mtDNA的复制,导致大量的重复序列小片段产生,在线粒体膜及核膜受损时进入核内整合到核DNA中,从而诱发细胞的癌变。由上述结果我们推测,mtDNA非编码D-环区的MSI与细胞癌变的过程密切关系,但其机制尚需深入研究证实。实验中我们还做了统计学分析,研究未发现线粒体微卫星不稳定与患者性别、年龄、肿瘤部位、肿瘤分期之间的关系。

下一步如能从线粒体基因不稳、突变方面进行深入研究,可能不仅有助于揭示大肠癌的发病机制,而且可能为其临床诊断、治疗和预防提供新的思路。

4 参考文献

- 1 Conley KE, Marcinek DJ, Villarin J. Mitochondrial dysfunction and age. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2007; 10: 688-692
- 2 Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, Meltzer SJ, Rodriguez-Bigas MA, Fodde R, Ranzani GN, Srivastava S. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998; 58: 5248-5257
- 3 Schwartz S Jr, Alazzouzi H, Perucho M. Mutational dynamics in human tumors confirm the neutral intrinsic instability of the mitochondrial D-loop poly-cytidine repeat. *Genes Chromosomes Cancer* 2006; 45: 770-780
- 4 Kose K, Hiyama T, Tanaka S, Yoshihara M, Yasui W, Chayama K. Nuclear and mitochondrial DNA microsatellite instability in gastrointestinal stromal tumors. *Pathobiology* 2006; 73: 93-97
- 5 Miceli MV, Jazwinski SM. Common and cell type-specific responses of human cells to mitochondrial dysfunction. *Exp Cell Res* 2005; 302: 270-280
- 6 Yamashita S, Nishino I, Nonaka I, Goto Y. Genotype and phenotype analyses in 136 patients with single large-scale mitochondrial DNA deletions. *J Hum Genet* 2008; 53: 598-606
- 7 Wang Y, Liu VW, Ngan HY, Nagley P. Frequent occurrence of mitochondrial microsatellite instability in the D-loop region of human cancers. *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1042: 123-129
- 8 Kumimoto H, Yamane Y, Nishimoto Y, Fukami H, Shinoda M, Hatooka S, Ishizaki K. Frequent somatic mutations of mitochondrial DNA in esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 2004; 108: 228-231
- 9 Fang DC, Fang L, Wang RQ, Yang SM. Nuclear and mitochondrial DNA microsatellite instability in hepatocellular carcinoma in Chinese. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 371-375
- 10 Habano W, Sugai T, Nakamura SI, Uesugi N, Yoshida T, Sasou S. Microsatellite instability and mutation of mitochondrial and nuclear DNA in gastric carcinoma. *Gastroenterology* 2000; 118: 835-841
- 11 Hampel H, Frankel WL, Martin E, Arnold M, Khanduja K, Kuebler P, Clendenning M, Sotamaa K, Prior T, Westman JA, Panescu J, Fix D, Lockman J, LaJeunesse J, Comeras I, de la Chapelle A. Feasibility of screening for Lynch syndrome among patients with colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008; 26: 5783-5788
- 12 Pal T, Permuth-Wey J, Sellers TA. A review of the clinical relevance of mismatch-repair deficiency in ovarian cancer. *Cancer* 2008; 113: 733-742
- 13 Jensen KC, Mariappan MR, Putcha GV, Husain A, Chun N, Ford JM, Schrijver I, Longacre TA. Microsatellite instability and mismatch repair protein defects in ovarian epithelial neoplasms in patients 50 years of age and younger. *Am J Surg Pathol* 2008; 32: 1029-1037
- 14 Dietmaier W, Wallinger S, Bocker T, Kullmann F, Fishel R, Rüschoff J. Diagnostic microsatellite instability: definition and correlation with mismatch repair protein expression. *Cancer Res* 1997; 57: 4749-4756

腹腔脏器淋巴管瘤的诊断和治疗20例

施伟斌, 全志伟, 王雪峰

施伟斌, 全志伟, 王雪峰, 上海交通大学医学院附属新华医院外科 上海市 200092

通讯作者: 王雪峰, 200092, 上海市, 上海交通大学医学院附属新华医院外科, wxxfd@online.sh.cn

电话: 021-65790000-7655 传真: 021-65795173

收稿日期: 2008-11-24 修回日期: 2008-12-21

接受日期: 2008-12-29 在线出版日期: 2009-02-08

Diagnosis and treatment for abdominal lymphangioma: an analysis of 20 cases

Wei-Bin Shi, Zhi-Wei Quan, Xue-Feng Wang

Wei-Bin Shi, Zhi-Wei Quan, Xue-Feng Wang, Department of Surgery, Xinhua Hospital Affiliated to the Medical School of Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200092, China

Correspondence to: Xue-Feng Wang, Department of Surgery, Xinhua Hospital Affiliated to the Medical School of Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200092, China. wxxfd@online.sh.cn

Received: 2008-11-24 Revised: 2008-12-21

Accepted: 2008-12-29 Published online: 2009-02-08

Abstract

AIM: To probe into the diagnosis and treatments for abdominal lymphangioma (LA).

METHODS: Clinical data of 20 patients with abdominal LA who received treatment in our hospital during 1995 and 2007 were retrospectively analyzed.

RESULTS: All patients with tumors ranging from 2 cm × 4 cm to 29 cm × 12 cm routinely underwent operation. Of 20 cases, 15 cases were found to be cystic, 1 case abscess, and 4 cases to have merged polypi; 5 cases were unilocular, and 15 multilocular. Pathological results showed that the tumor was composed of irregular and expanded lymphatic vessels. The patients had a mean follow-up of 210 mo ranging from 8 to 400 mo. Except for 1 case who survived 45 mo with tumor, all the rest experienced no recurrence of tumor.

CONCLUSION: Abdominal LA is a rare and special condition of lymphatic tissue maldevelopment with diffused involvement. Definite diagnosis depends on pathological examination.

The optimal treatment is complete surgical removal.

Key Words: Abdominal lymphangioma; Diagnosis; Treatment

Shi WB, Quan ZW, Wang XF. Diagnosis and treatment for abdominal lymphangioma: an analysis of 20 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(4): 437-439

摘要

目的: 探讨腹腔脏器淋巴管瘤(LA)的诊断和治疗。

方法: 回顾分析我院1995-01/2007-01诊治的腹腔脏器LA患者20例临床资料。

结果: 20例均行手术, 肿瘤最小为2 cm × 4 cm, 最大29 cm × 12 cm。其中15例呈囊性, 4例呈息肉融合成一片, 1例呈脓肿样; 单房性5例, 多房性15例。病理检查示肿瘤由形状不规则的、扩张的淋巴管构成。20例患者随访8-400(平均210) mo; 除行肿瘤活检术1例经随访45 mo尚带瘤生存外, 其他11例均未发现复发。

结论: 腹腔脏器LA是一种少见特殊类型的疾病, 一经诊断应积极手术治疗, 术中冰冻切片、术后病理检查, LA完整切除是关键。

关键词: 腹腔脏器淋巴管瘤; 诊断; 治疗

施伟斌, 全志伟, 王雪峰. 腹腔脏器淋巴管瘤的诊断和治疗20例. *世界华人消化杂志* 2009; 17(4): 437-439

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/437.asp>

0 引言

淋巴管瘤(lymphangioma, LA)按Harkine分类方法分为单纯性LA、囊性LA、海绵状LA三类, 其中以囊性LA为多见。但腹腔脏器LA是少见的腹部良性肿瘤, 现将我院1995-01/2007-01诊治的腹腔脏器LA患者20例报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料 我院1995-01/2007-01诊治的腹腔脏

■背景资料

淋巴管瘤(LA)按Harkine分类方法分为单纯性LA、囊性LA、海绵状LA三类, 其中以囊性LA为多见。但腹腔脏器LA是少见的腹部良性肿瘤。

■同行评议者

张国梁, 主任医师, 天津市第一中心医院消化内科

■研究前沿

由于LA为良性肿瘤, 尽管表现不一, 但至今手术治疗仍是最主要的选择。

器LA患者20例, 其中男9例, 女11例, 平均年龄32.1(13-75)岁。腹痛+呕吐+腹部包块12例(60%), 体检发现脾占位4例(20%)腹痛+腹部包块2例(10%), 频繁的便意+坠胀感阻塞感+肿物自肛门突出者2例(10%)。症状持续时间为12 h至50年, 平均350 mo。腹部立卧位X线片示肠梗阻或肠腔积气12例, 钡灌肠示直结肠管及膀胱受压2例; B超检查发现脾占位4例, CT检查均示腹内囊性肿物7例。术前诊断: 腹部包块14例, 肠梗阻12例, 腹部包块伴不全性肠梗阻12例, 脾占位4例。

1.2 方法 20例均行手术治疗, 手术方式为肿瘤切除+肠管部分切除吻合术14例(肿瘤位于小肠肠管12例, 结直肠肠管2例), 脾切除4例(肿瘤位于脾脏), 行肿瘤切除2例(肿瘤位于肠系膜, 位于小肠系膜1例合并大网膜多发性LA, 位于乙状结肠系膜1例), 行探腹+肿瘤活检术1例(肿瘤位于胰头)。

2 结果

20例均行手术, 肿瘤最小为2 cm×4 cm, 最大29 cm×12 cm。其中15例呈囊性, 4例呈息肉融合成一片, 1例呈脓肿样; 单房性5例, 多房性15例。病理检查示肿瘤由形状不规则的, 扩张的淋巴管构成。分布于脏器全层, 黏膜内呈毛细淋巴管、黏膜下至浆膜层为海绵状及囊状淋巴管, 壁薄厚不一, 内衬单层扁平内皮细胞。管腔内有粉染淋巴液和散在淋巴细胞。20例患者随访8-400(平均210) mo; 除行肿瘤活检术1例经随访45 mo尚带瘤生存外, 其他11例均未发现复发。

3 讨论

LA起源不明, 一般认为是胚胎发育过程中淋巴组织发育障碍、淋巴管增殖扩张所致^[1]; 是一种较为常见的先天性脉管畸形。在母亲怀孕时, 胎儿处于胚胎发育时期, 原始的淋巴囊应该与整个淋巴系统贯通而发育成正常的淋巴系统, 当某些部位的某些原始淋巴囊与淋巴系统隔绝, 未完成贯通, 就形成了淋巴管瘤。由于原始的淋巴系统来源于静脉系统或邻近间质的5组原始淋巴囊: 2组颈淋巴囊、1组腹膜后淋巴囊和2组后淋巴囊。所以淋巴管瘤也多发生于相关的部位, 常位于颈、腋窝, 亦见于纵隔、口腔(唇、舌)和腹腔等部位。发生在颈、腋窝部的淋巴管瘤常在出生时就存在, 但也有在成长过程中出现的。形成淋巴囊肿和淋巴管瘤组织。病理上主要表现为淋巴管的扩张、淋巴管组织增生和淋巴管组织结构紊乱, 可向周围组织浸润生长, 但

淋巴管瘤极少发生癌变。其发生率在性别上没有显著差别。按淋巴管的扩张程度可分为单纯性毛细管型淋巴管瘤, 海绵状淋巴管瘤和囊状淋巴管瘤, 后者也称囊状水瘤。病理组织学上LA表现为淋巴管壁内衬一层扁平上皮, 壁可含有淋巴样组织、小的淋巴间隙、平滑肌组织和泡沫状细胞^[2]。腹腔内LA最常见的临床表现为质地柔软的腹部囊性包块或脾占位, 通常生长比较缓慢, 有些患者可以毫无症状; 腹部包块常常在体检时或因其他疾病手术时才被发现。但是由于肿瘤压迫邻近脏器, 或发生感染、穿孔、扭转或破裂等并发症时, 患者可以有急腹症表现^[3-5]。淋巴管瘤易并发感染或瘤出血, 肿块突然增大, 出现剧痛及全身发热等症状。如瘤体压迫气管、食管等脏器, 还可引起窒息或进食吞咽困难。

本组12例患者术前或术中均证实存在肠梗阻, 占同期腹部LA的60%, 其中最常见的症状为腹痛和呕吐, 占60%; 体征为腹部包块, 占70%; 肿瘤侵犯肠管, 若阻塞肠腔可引起机械性肠梗阻。若肿瘤形状不规则, 尤其肠系膜两侧肿物呈哑铃状, 再加上肠袢及其系膜过长, 可因肠内容重量骤增, 肠管动力异常, 以及突然改变体位等诱发因素而引起肠扭转; 肠壁的肿瘤如位于回肠末段, 可致回盲部肠套叠。肿瘤内液体可为浆液性、乳糜性或血性, 合并感染或出血时可成脓性或血性。

本组患者术前均未能确诊为LA, 而拟诊为腹部包块或肠梗阻, 经X线检查可以发现肠梗阻征象, 但对判断梗阻的原因及性质比较困难。初步诊断为腹部包块的14例患者, 作腹部B超检查, 阳性率达100%。3例腹部包块伴肠梗阻者, CT检查均示腹内囊性肿物。若出现下列情况者应考虑腹腔内LA的可能性: (1)患者首次表现为腹痛、呕吐、腹胀等肠梗阻症状, 且腹部有一囊性包块且腹部B超或CT检查发现有囊性包块, 特别是囊肿为多房性或多发性者; (2)术中检查发现肠管受肿瘤压迫、移位, 且肿瘤为囊性包块, 瘤内多为浆液性或乳糜性液体者; (3)CT: 脾脏明显增大, 全脾布满大小不等低密影, 增强后自边缘向中心有明显强化。术中所见: 脾脏20 cm×20 cm×8 cm, 布满大小不等、淡黄色囊性病变。

由于LA为良性肿瘤, 尽管表现不一, 但至今手术治疗仍是最主要的选择。一般在结合考虑患者年龄、病灶大小和深度、对功能影响的程度上, 决定手术方案。海绵状淋巴管瘤与囊性淋

巴管瘤一般均选择切除。囊性淋巴管瘤因多发生于颈部, 除明显影响外观外, 对呼吸、吞咽等影响较大, 故应早期手术切除。淋巴管瘤切除手术有以下要点: (1)操作精细, 特别注意不要损伤邻近重要组织。(2)对于感染病例, 应先控制感染, 延期手术。(3)有的学者认为要安全彻底地切除, 避免遗留内膜组织, 导致术后复发; 对于有怀疑的区域, 可采用1%-2%的碘酒处理, 以破坏其活力, 可能会减少复发。腹腔内LA的治疗应首选肿瘤完整切除。若肿瘤不能完整切除, 术后可致复发^[6-10]。本组19例患者采用手术切除肿瘤, 术后随访无复发, 疗效满意。

4 参考文献

- Colovic RB, Grubor NM, Micev MT, Atkinson HD, Rankovic VI, Jagodic MM. Cystic lymphangioma of the pancreas. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 6873-6875
- Khan AO, Ghadhfan FE. Small cornea with anomalous anterior segment and retinal vasculature associated with lymphangioma. *J AAPOS* 2008 Nov 18. [Epub ahead of print]
- De Bast Y, Hossey D, Boon L, Duttman R, Theunis A, Chambers S, Nyst M, Mendes Da Costa P. Intra-abdominal lymphatic malformation. *Acta Gastroenterol Belg* 2006; 69: 209-212
- Crook DW, Knuesel PR, Froehlich JM, Eigenmann F, Unterweger M, Beer HJ, Kubik-Huch RA. Comparison of magnetic resonance enterography and video capsule endoscopy in evaluating small bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2009; 21: 54-65
- Barrier A, Lacaine F, Callard P, Huguier M. Lymphangiomatosis of the spleen and 2 accessory spleens. *Surgery* 2002; 131: 114-116
- Bader-Meunier B, Hussein K, Nouyrigat V, Pariente D. Partial splenic embolization in lymphangiomatosis. *J Pediatr* 2001; 138: 613-614
- Ryu WS, Kwak JM, Seo UH, Kim SH, Park SS, Kim CS, Lee CH, Mok YJ. Laparoscopic treatment of a huge cystic lymphangioma: partial aspiration technique with a spinal needle. *J Laparoendosc Adv Surg Tech A* 2008; 18: 603-605
- Wong CS, Chu TY. Clinical and radiological features of generalised lymphangiomatosis. *Hong Kong Med J* 2008; 14: 402-404
- Agarwal PP, Matzinger FR, Seely JM. Case 132: Lymphangiomatosis. *Radiology* 2008; 247: 288-290
- Goh BK, Tan YM, Ong HS, Chui CH, Ooi LL, Chow PK, Tan CE, Wong WK. Intra-abdominal and retroperitoneal lymphangiomas in pediatric and adult patients. *World J Surg* 2005; 29: 837-840

编辑 李军亮 电编 何基才

■同行评价

本研究临床资料较典型, 讨论充实, 对临床有很好的指导意义。

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志外文字符标准

本刊讯 本刊论文出现的外文字符应注意大小写、正斜体与上下角标。静脉注射iv, 肌肉注射im, 腹腔注射ip, 皮下注射sc, 脑室注射icv, 动脉注射ia, 口服po, 灌胃ig。s(秒)不能写成S, kg不能写成Kg, mL不能写成ML, lcpm(应写为1/min)÷E%(仪器效率)÷60=Bq, pH不能写PH或P^H, *H pylori*不能写成HP, T_{1/2}不能写成t_{1/2}或T_{1/2}, V_{max}不能V_{max}, μ不写为英文u。需排斜体的外文字, 用斜体表示。如生物学中拉丁学名的属名与种名, 包括亚属、亚种、变种。如幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H pylori*), *Ilex pubescens* Hook, et Arn.var.*glaber* Chang(命名者勿划横线); 常数K; 一些统计学符号(如样本数n, 均数mean, 标准差SD, F检验, t检验和概率P, 相关系数r); 化学名中标明取代位的元素、旋光性和构型符号(如N, O, P, S, d, l)如n-(normal, 正), N-(nitrogen, 氮), o-(ortho, 邻), O-(oxygen, 氧, 习惯不译), d-(dextro, 右旋), p-(para, 对), 例如n-butyl acetate(醋酸正丁酯), N-methylacetanilide(N-甲基乙酰胺), 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。(常务副总编辑: 张海宁 2009-02-08)

致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!

曹志成 英国生物医学科学研究所院士
香港伊利沙伯医院临床肿瘤科

陈国凤 主任医师
中国人民解放军第302医院感染七科

杜祥 教授
复旦大学附属肿瘤医院病理科

杜雅菊 主任医师
哈尔滨医科大学附属第二医院消化内科

樊晓明 主任医师
复旦大学附属金山医院消化科

高泽立 副教授
上海交通大学医学院附属第九人民医院周浦分院消化科

戈之铮 教授
上海交通大学医学院附属仁济医院消化科

葛海燕 教授
同济大学附属第十人民医院普通外科

韩新巍 教授
郑州大学第一附属医院放射科

黄颖秋 教授
本溪钢铁(集团)有限责任公司总医院消化内科

江学良 主任医师
中国人民解放军济南军区总医院消化科

李国威 教授
西安交通大学医学院第二附属医院普通外科

李涛 副主任医师
北京大学人民医院肝胆外科

刘占举 教授
郑州大学第二附属医院消化内科

倪润洲 教授
南通大学附属医院消化内科

孙殿兴 主任医师
白求恩国际和平医院肝病科

唐霓 副研究员
重庆医科大学病毒性肝炎研究所国家级重点实验室

唐文富 副主任医师
四川大学华西医院中西医结合科

万军 主任医师
中国人民解放军总医院南楼老年消化科

王晓艳 副教授
湖南长沙中南大学湘雅三医院消化内科

王学美 研究员
北京大学第一医院中西医结合研究室

王志刚 副主任医师
上海市第六人民医院普外科

吴泰璜 教授
山东省立医院肝胆外科

肖恩华 教授
中南大学湘雅二医院放射教研室

徐列明 教授
上海中医药大学附属曙光医院(东部)肝二科

许玲 副教授
中国人民解放军第二军医大学长征医院中医科

张国梁 主任医师
天津市第一中心医院消化内科

张声生 教授
首都医科大学附属北京中医医院消化中心

张小晋 主任医师
北京积水潭医院消化内科

张占卿 主任医师
上海市(复旦大学)公共卫生中心