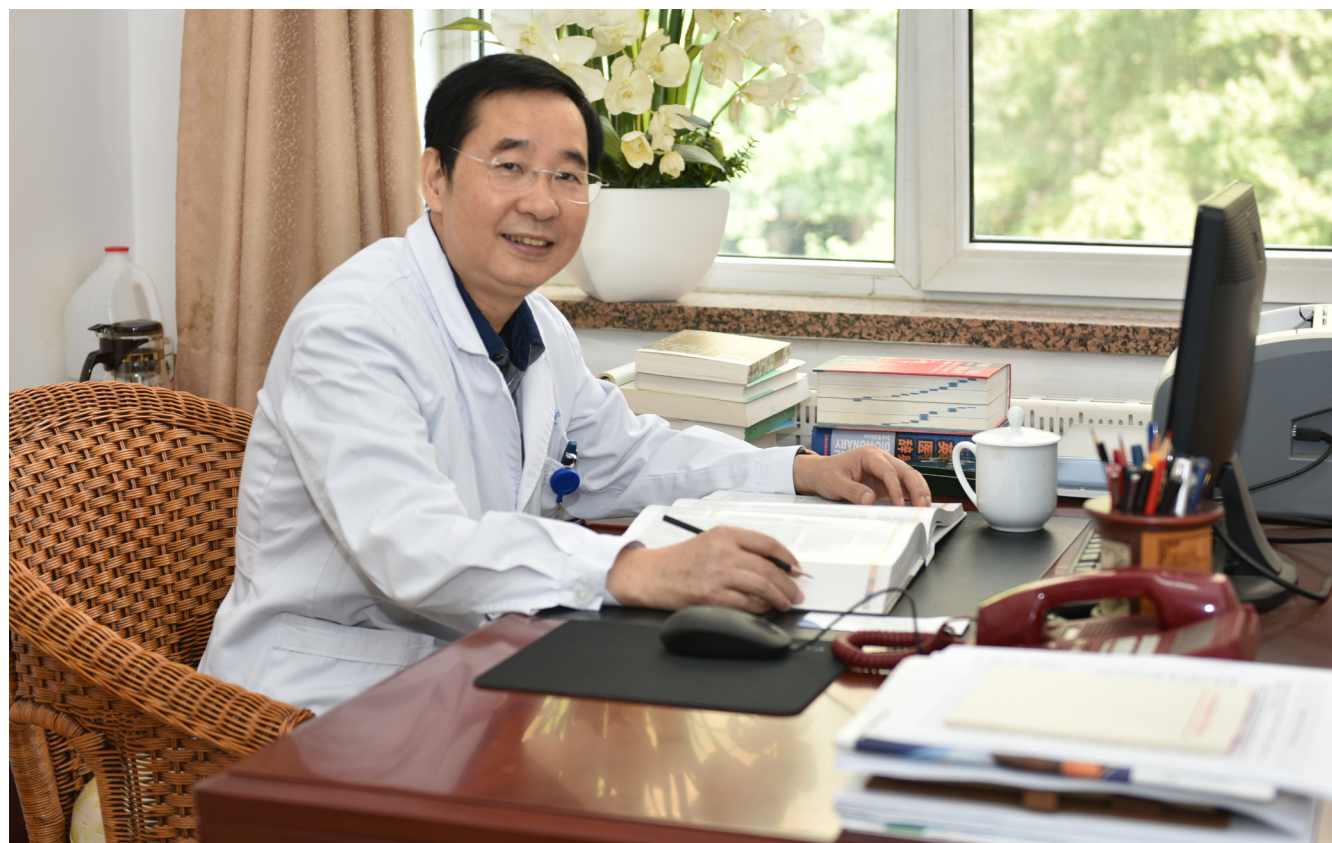


# 世界华人消化杂志®

**WORLD CHINESE  
JOURNAL OF DIGESTOLOGY**

**Shijie Huaren Xiaohua Zazhi**

**2015 年 10 月 18 日 第 23 卷 第 29 期 (Volume 23 Number 29)**



**29 / 2015**

ISSN 1009-3079



9 771009 307056

《世界华人消化杂志》是一本高质量的同行评议, 开放获取和在线出版的学术刊物. 本刊被中国知网《中国期刊全文数据库》, 美国《化学文摘 (Chemical Abstracts, CA)》, 荷兰《医学文摘库/医学文摘 (EMBASE/Excerpta Medica, EM)》和俄罗斯《文摘杂志 (Abstract Journal, AJ)》数据库收录.

## 编辑委员会

2015-01-01/2017-12-31

wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

《世界华人消化杂志》编辑委员会成员，由506位专家组成，分布在中国29个省市，自治区，特别行政区和美国。其中，上海市89位、北京市70位、广东省40位、江苏省31位、辽宁省29位、陕西省26位、黑龙江省24位、山东省20位、湖北省16位、吉林省15位、天津市13位、浙江省13位、福建省12位、贵州省11位、湖南省11位、四川省11位、河北省10位、新疆维吾尔自治区10位、广西壮族自治区8位、江西省8位、云南省8位、安徽省8位、重庆市6位、海南省4位、河南省4位、甘肃省3位、山西省3位、内蒙古自治区1位、香港特别行政区1位及美国1位。

### 总顾问

陈可冀教授  
纪小龙教授  
王苑本教授  
杨春波教授  
杨思凤教授

### 主编

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

### 编委

#### 消化内科学

白爱平副教授  
白岚教授  
柏愚副教授  
蔡全才副教授  
陈国忠主任医师  
陈洪副教授  
陈其奎教授  
陈卫昌教授  
陈卫刚教授  
陈贻胜教授  
程斌教授  
迟宝荣教授  
迟雁副教授  
崔立红教授  
戴菲副主任医师  
丁士刚教授

### 董蕾教授

杜雅菊主任医师  
杜奕奇副教授  
段志军教授  
樊冬梅副主任医师  
樊晓明教授  
冯志杰主任医师  
傅春彬主任医师  
甘华田教授  
高凌副教授  
戈之铮教授  
关晓辉主任医师  
郭晓钟教授  
郝建宇教授  
郝丽萍副教授  
何继满教授  
黄杰安主任医师  
黄晓东主任医师  
黄颖秋教授  
黄缘教授  
季国忠教授  
江米足教授  
姜春萌教授  
姜慧卿教授  
姜相君主任医师  
蓝宇教授  
李淑德教授  
李瑜元教授  
李兆申教授  
林志辉教授  
刘冰熔教授  
刘凤斌教授  
刘改芳主任医师  
刘海峰主任医师  
刘亮明副教授  
吕农华教授  
马欣主任医师  
毛恩强教授  
毛高平教授

### 孟庆华教授

缪应雷主任医师  
欧希龙副教授  
潘秀珍教授  
潘阳林副教授  
任粉玉教授  
邵先玉教授  
沈琳主任医师  
沈薇教授  
施瑞华教授  
宋军副教授  
唐世刚教授  
田宇彬教授  
度必光教授  
宛新建副教授  
王承党教授  
王良静研究员  
王蔚虹教授  
夏时海教授  
徐灿副教授  
徐可树教授  
杨建民教授  
姚定康教授  
于珮主任医师  
张国主任医师  
张庆瑜教授  
张小晋主任医师  
郑培永研究员  
郑鹏远教授  
郑素军主任医师  
郑敏副教授  
周国雄主任医师  
周力主任医师

### 消化外科学

白松主任医师  
白雪副主任医师  
白雪巍副主任医师  
白玉作教授

### 陈炳官教授

陈光教授  
陈海龙教授  
陈积圣教授  
陈进宏副主任医师  
陈凛教授  
陈龙奇主任医师  
陈汝福教授  
陈钟教授  
程树群副教授  
仇毓东教授  
崔清波副教授  
崔云甫教授  
戴朝六教授  
戴冬秋教授  
单云峰主任医师  
丁义涛教授  
杜顺达副教授  
傅红副教授  
傅晓辉副教授  
高毅主任医师  
葛海燕教授  
龚建平主任医师  
顾国利副主任医师  
顾晋教授  
顾岩教授  
韩天权教授  
郝纯毅主任医师  
何向辉教授  
胡安斌教授  
黄成副主任医师  
姜卫东教授  
姜波健教授  
金山主任医师  
康春博副主任医师  
孔静副教授  
兰平教授  
李富宇教授  
李革副教授

### 李华教授

李华山主任医师  
李胜研究员  
李涛副主任医师  
李小荣教授  
李旭副教授  
李汛教授  
李正荣副教授  
李宗芳教授  
梁力建教授  
刘宝林教授  
刘超教授  
刘宏鸣副教授  
刘金钢教授  
刘亮副主任医师  
禄韶英副教授  
吕云福教授  
麻勇副研究员  
齐清会教授  
秦华东教授  
秦建民主任医师  
邱伟华主任医师  
曲兴龙主任医师  
任宁主任医师  
施宝民教授  
施诚仁教授  
石毓君副研究员  
宋新明教授  
宋振顺教授  
孙诚谊教授  
孙星副教授  
孙学英教授  
谭晓东教授  
汤朝晖副主任医师  
唐南洪教授  
汪波主任医师  
王道荣主任医师  
王德盛副主任医师  
王凤山教授



王刚副研究员  
王健生教授  
王蒙副教授  
王晓锋副主任医师  
王永兵主任医师  
王悦华副主任医师  
王振军教授  
王征副主任医师  
王铮副研究员  
王忠裕教授  
吴文溪教授  
吴晓峰副主任医师  
肖卫东副教授  
谢敏主任医师  
徐迅迪教授  
徐泱副主任医师  
许剑民教授  
薛东波教授  
杨柏霖副主任医师  
杨家和主任医师  
殷正丰教授  
于则利教授  
禹正杨副教授  
喻春钊教授  
袁周副主任医师  
张进祥副教授  
张俊副研究员  
张力为副教授  
赵青川主任医师  
郑建勇副教授  
智绪亭教授  
周伟平教授  
周翔宇副主任医师  
周志祥教授  
朱建伟教授  
邹小明教授

#### 消化感染病学

白浪副教授  
陈国凤主任医师  
陈红松研究员  
陈建杰教授  
陈茂伟教授  
丁惠国教授  
范学工教授  
高润平教授  
高泽立副教授  
管世鹤教授  
郭永红副主任医师  
胡国信主任医师  
靳雪源主任医师  
兰英华副教授  
林潮双主任医师  
刘纯杰研究员  
刘正稳教授  
马丽娜主任医师  
毛德文教授  
彭亮副主任医师  
钱林学主任医师  
王凯教授  
王怡主任医师  
吴君主任医师  
谢仕斌主任医师  
宣世英教授  
杨贵波教授  
杨江华副教授  
姚鹏主任医师

张明辉主任医师  
张一教授  
赵秀英副教授  
周陶友副教授  
朱传武教授  
庄林主任医师

#### 消化中医药学

杜群研究员  
郭湘潭教授  
李军祥教授  
李康副教授  
李晓波教授  
李勇副教授  
刘成海研究员  
刘绍能主任医师  
鲁玉辉副教授  
马赞副教授  
南极星教授  
牛英才研究员  
司富春教授  
斯拉甫·艾白教授  
谭周进教授  
唐旭东主任医师  
王富春教授  
王来友副教授  
王笑民主任医师  
吴焕淦教授  
徐庆教授  
许玲教授  
袁红霞研究员

#### 消化肿瘤学

曹秀峰教授  
曹志成院士  
陈锦飞主任医师  
崔杰峰副研究员  
代智副研究员  
侯凤刚副教授  
江建新副主任医师  
姜义红教授  
蒋敬庭教授  
李杰主任医师  
李苏宜教授  
梁国刚教授  
刘宝瑞教授  
刘炳亚研究员  
刘云鹏教授  
卢宁副主任医师  
卢晓梅教授  
陆斌副教授  
朴龙镇副教授  
沈克平主任医师  
史颖弘副教授  
王阁教授  
肖文华主任医师  
肖秀英副主任医师  
徐建明主任医师  
杨秋蒙副主任医师  
伊力亚尔·夏合丁教授  
袁媛教授  
张凤春教授  
张佃主任医师  
郑丽端副教授  
周建奖教授  
朱永良副研究员

#### 消化影像学

白彬主任医师

管樑主任医师  
胡红杰主任医师  
李健丁教授  
龙学颖副主任医师  
肖恩华教授  
徐辉雄教授  
严惟力副教授  
杨薇副教授

#### 消化内镜及介入治疗学

李家平教授  
刘杰民主任医师  
茅爱武教授  
孙明军教授  
万军教授  
吴灵飞教授  
余日胜主任医师  
张火俊副教授  
钟良主任医师  
诸葛宇征主任医师

#### 消化中西医结合学

陈泽雄主任医师  
杜业勤主任医师  
唐文富教授  
王学美研究员  
袁建业副研究员  
张春虎副教授  
赵岩教授

#### 消化基础研究

曾柱教授  
陈敬贤教授  
崔莲花教授  
邓安梅教授  
邓庆副研究员  
董玉兰副教授  
段义农教授  
高国全教授  
高英堂研究员  
郭俊明教授  
郭长江研究员  
黄河副教授  
黄昆教授  
黄文林教授  
姜宏教授  
黎观红教授  
李东辉教授  
李瀚旻教授  
李君文研究员  
李孟森教授  
李文贵副教授  
李焱副研究员  
李增山副教授  
李铮教授  
刘克辛教授  
刘起胜副教授  
刘长征副教授  
宁钧宇副研究员  
彭宗根副研究员  
任浩副教授  
沈东炎副教授  
沈涛副教授  
台桂香教授  
谭学瑞教授  
汤静主管药师  
田文静副教授  
汪思应教授

王明荣研究员  
王钦红教授  
王书奎教授  
王秀伶教授  
魏继福研究员  
文彬研究员  
吴道澄教授  
吴江锋教授  
吴军研究员  
吴俊华副教授  
吴志强副教授  
夏敏教授  
杨金娥副教授  
阴赅宏研究员  
张红教授  
张淑坤副研究员  
赵铁建教授  
周南进研究员  
周晓武副主任医师  
朱益民教授  
朱争艳研究员

#### 消化病理学

陈云昭副教授  
樊祥山副主任医师  
郭炜教授  
季菊玲副教授  
李慧副教授  
林洁副教授  
刘芳芳副主任医师  
刘丽江教授  
门秀丽教授  
莫发荣副教授  
潘兴华副主任医师  
王娅兰教授  
颜宏利教授  
余宏宇教授  
张锦生教授  
赵春玲副教授  
郑建明教授  
朱亮副教授

#### 消化护理学

安力彬教授  
成杰副主任护师  
崔岩副主任护师  
单信芝副主任护师  
丁焕娟副主任护师  
房辉副教授  
高薇副主任护师  
葛淑芝副主任护师  
谷敏副主任护师  
郭会敏主管护师  
郭巧珍主管护师  
赫玲玲主任护师  
黄砚萍副主任护师  
惠娜主管护师  
吉建华副主任护师  
江丽萍副主任护师  
江萍主任护师  
金凤娟副主任护师  
金爽主任护师  
靳雁副主任护师  
孔德玲副主任护师  
李金娜主任护师  
李俊玲主任护师  
李卡副主任护师

李丽副主任护师  
李连红主任护师  
李琬主任护师  
李敏香副主任护师  
李雯副主任护师  
李秀芬副主任护师  
李淳副主任护师  
廖培娇副主任护师  
刘慧萍主任护师  
刘永宁副主任护师  
龙晓英主任护师  
卢根娣主任护师  
罗凝香副主任护师  
马久红副主任护师  
马燕兰主任护师  
孟志新副主任护师  
潘爱红副主任护师  
潘玉凤副主任护师  
齐向秀主管护师  
齐艳副主任护师  
乔晓斐副主任护师  
乔筱玲副主任护师  
任珍主任护师  
史铁英主任护师  
宋江美副主任护师  
宋艳燕副主任护师  
孙丽娟主任护师  
孙莉副主任护师  
孙晓美副主任护师  
唐碧云副主任护师  
陶然主管护师  
滕莉副主任护师  
田银娣主管护师  
王春英主任护师  
王红副主任护师  
王家香主任护师  
王晓春副主任护师  
王宇副主任护师  
王玉娟主任护师  
韦键主管护师  
席惠君副主任护师  
谢晓芬主管护师  
许璧瑜副主任护师  
薛海燕副主任护师  
薛素梅主任护师  
杨会副主任护师  
杨云英主任护师  
姚丽文副主任护师  
叶海丹副主任护师  
尹安春主任护师  
俞静娟主任护师  
袁晓青副主任护师  
张彩云主任护师  
张洁副主任护师  
张丽副主任护师  
张丽燕主管护师  
张琳琳副教授  
张敏副主任护师  
张善红副主任护师  
赵艳伟副主任护师  
郑粉善副主任护师  
郑思琳主任护师  
郑雪梅副主任护师  
周文琴副主任护师  
周霞霞副教授  
朱秀琴副主任护师  
朱颖副主任护师

## 目次

2015年10月18日 第23卷 第29期 (总第505期)

## 述评

- 4611 重视肝衰竭糖皮质激素的应用

孙丰凯, 王凯

- 4617 气囊辅助内镜在小肠疾病治疗中的应用进展

毛高平, 张亚飞, 梁树辉

- 4626 结直肠癌基因DNA甲基化标志物筛查的价值

薛猛, 王良静

## 基础研究

- 4636 Tribbles相关蛋白及CCAAT/增强子结合蛋白同源蛋白在非酒精性脂肪肝中的表达变化

王欢, 胡晓霞, 路华

## 临床研究

- 4643 YWHA E对结肠癌细胞增殖的影响及表达意义

解娜, 黄幼生, 罗志飞, 薛逢贵

## 文献综述

- 4652 转基因2型自身免疫性肝炎动物模型研究进展

化雨, 陆鹏, 季菊玲, 邵建国, 王陆军

- 4658 HBV DNA整合与慢性乙型肝炎、原发性肝癌关系研究进展

吴殿磊, 徐光华, 刘娜

- 4665 肝细胞肝癌诱导分化治疗研究进展

罗娅, 金海, 文国容, 度必光

- 4673 基因敲除技术在炎症性肠病肠上皮屏障机制研究中的应用

陈柳, 吴焕淦, 施茵

## 研究快报

- 4680 正加速度适应性训练对大鼠胃黏膜
- $\text{PGI}_2$
- 、
- $\text{TXA}_2$
- 含量及
- $\text{TXA}_2/\text{PGI}_2$
- 比值的影响

刘昊, 陈英, 徐珊, 杜斌, 唐合兰, 邱杰, 杨春敏

- 4687 CRISPRi在体抑制肝脏miR-122的表达

赵洪礼, 杨景玉, 李桂玲, 毛德华, 李洪运



4694 Ntcp在胆管癌大鼠胆管肿瘤组织中的表达状况

王洁萍, 张孟瑜, 李波, 夏先明

4700 DMBA对大鼠胰腺肿瘤发生的影响

任宇, 侯晓朴, 李丹, 李颖, 朱斌

## 临床经验

4706 内镜切除技术在胃固有肌层肿瘤中的临床应用

石磊, 赵伟, 周宇, 朱海杭, 王昊, 陈平

4713 基于不同引物的16S rRNA序列分析法对SBP腹水细菌的鉴定及抗感染疗效评价的意义

赵莹莹, 邢卉春

4720 双重血浆分子吸附治疗急性肝衰竭的临床应用

张斌, 杨永耿, 巩月英, 陈明迪, 邵琨, 任辉邦, 张玉红

4725 增强CT瘤内动脉鉴别肝内胆管细胞癌和低分化肝细胞癌的价值

杨翠翠, 杨慧, 郭沐洁, 李万湖, 吴玉芬

4733 急诊内镜治疗高龄急性胆管炎患者的疗效评价

董晓萌, 蔡旺, 张超, 李宁

4738 妊娠期急性胰腺炎的临床特点

汪洋, 荆雪, 田宇彬, 丁雪丽, 王小玮, 解曼

4745 连续性血液净化对重症急性胰腺炎患者早期诱导的肠黏膜屏障功能障碍的改善作用

张霞, 邵换璋

4750 饮食疗法、口服益生菌联合艾迪莎气药灌肠对溃疡性结肠炎的临床疗效

刘贵儒, 明兰, 朱维娜, 施文陆, 赵敏, 李睿璞, 陆金良, 张苏闽

4756 新型质子泵抑制剂联合生长抑素对急性胃肠道出血的治疗作用

张煜, 刘峰

## 病例报告

4760 结肠巨大息肉内镜黏膜切除术中出血1例

朱海丹, 何理, 赵秋, 田德安, 黎培员

4765 肉芽肿性血管炎致缺血性肠病1例

吴静, 牛俊坤, 缪应雷

## 附录

I - V 《世界华人消化杂志》投稿须知

I 2015年国内国际会议预告

## 志谢

I - II 志谢世界华人消化杂志编委

## 消 息

- 4625 《世界华人消化杂志》消化护理学领域征稿启事  
4642 《世界华人消化杂志》栏目设置  
4672 《世界华人消化杂志》性质、刊登内容及目标  
4712 《世界华人消化杂志》2013-2014年电子版合订本正式发布  
4732 《世界华人消化杂志》正文要求  
4737 《世界华人消化杂志》修回稿须知  
4749 《世界华人消化杂志》参考文献要求  
4755 《世界华人消化杂志》2011年开始不再收取审稿费  
4770 《世界华人消化杂志》外文字符标准

## 封面故事

《世界华人消化杂志》编委, 毛高平, 教授, 主任医师, 博士生导师, 100142, 北京市海淀区阜成路30号, 中国人民解放军空军总医院消化内科, 全军小肠疾病内镜诊疗中心。从事消化内科临床和基础研究30余年, 专业特长为炎症性肠病、小肠疾病和慢性肝病的临床诊治, 同时擅长消化内镜诊疗技术。20世纪90年代在意大利从事乙型肝炎病毒和肝癌相关性分子生物学研究3年, 理论基础扎实, 临床经验丰富。2003年开展双气囊小肠镜技术, 在不明原因消化系出血、小肠肿瘤、小肠克罗恩病和小肠血管性疾病的基础研究和临床诊治方面取得较好成绩。2008年带领专业团队创立全军小肠疾病内镜诊疗中心, 已完成小肠镜诊疗3000余例次, 在国内较早开展多项小肠镜治疗技术。承担全军、北京市多项科研课题, 近5年来发表论文30余篇。

## 本期责任人

编务 李香; 送审编辑 都珍珍, 闫晋利; 组版编辑 都珍珍; 英文编辑 王天奇; 责任编辑 于明茜; 形式规范审核编辑部主任 郭鹏; 最终清样审核总编辑 马连生

## 世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

吴阶平 题写封面刊名

陈可冀 题写版权刊名

(旬刊)

创 刊 1993-01-15

改 刊 1998-01-25

出 版 2015-10-18

原刊名 新消化病学杂志

期刊名称

世界华人消化杂志

国际标准连续出版物号

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

主编

程英升, 教授, 200233, 上海市, 上海交通大学附属第六人民医院放射科

党双锁, 教授, 710004, 陕西省西安市, 西安交通大学医学院第二附属医院感染科

江学良, 教授, 250031, 山东省济南市, 中国人民解放军济南军区总医院消化科

刘连新, 教授, 150001, 黑龙江省哈尔滨市, 哈尔滨医科大学第一临床医学院普外科

刘占举, 教授, 200072, 上海市, 同济大学附属第十人民医院消化内科

吕宾, 教授, 310006, 浙江省杭州市, 浙江中医药大学附属医院(浙江省中医院)消化科

马大烈, 教授, 200433, 上海市, 中国人民解放军第二军医大学附属长海医院病理科

王俊平, 教授, 030001, 山西省太原市, 山西省人民医院消化科

王小众, 教授, 350001, 福建省福州市, 福建医科大学附属医院消化内科

姚登福, 教授, 226001, 江苏省南通市, 南通大学附属医院临床医学研究中心

张宗明, 教授, 100073, 北京市, 首都医科大学北京电力医院普外科

编辑部

郭鹏, 主任

《世界华人消化杂志》编辑部

100025, 北京市朝阳区东四环中路62号, 远洋国际中心D座903室

电话: 010-59080035

手机: 13901166126

传真: 010-85381893

E-mail: wcjd@wjgnet.com

http://www.wjgnet.com

出版

百世登出版集团有限公司

Baishideng Publishing Group Inc

8226 Regency Drive, Pleasanton,

CA 94588, USA

Fax: +1-925-223-8242

Telephone: +1-925-223-8243

E-mail: bpgoffice@wjgnet.com

http://www.wjgnet.com

制作

北京百世登生物医学科技有限公司

100025, 北京市朝阳区东四环中路62号, 远洋国际中心D座903室

电话: 010-85381892

传真: 010-85381893

《世界华人消化杂志》是一本高质量的同行评议, 开放获取和在线出版的学术刊物。本刊被中国知网《中国期刊全文数据库》, 美国《化学文摘(Chemical Abstracts, CA)》, 荷兰《医学文摘/医学文摘(EMBASE/Excerpta Medica, EM)》和俄罗斯《文摘杂志(Abstract Journal, AJ)》数据库收录。

《世界华人消化杂志》正式开通了在线办公系统(<http://www.baishideng.com/wcjd/ch/index.aspx>), 所有办公流程一律可以在线进行, 包括投稿、审稿、编辑、审读, 以及作者、读者和编者之间的信息反馈交流。

特别声明

本刊刊出的所有文章不代表本刊编辑部和本刊编委会的观点, 除非特别声明。本刊如有印装质量问题, 请向本刊编辑部调换。

定价

每期90.67元 全年36期3264.00元

© 2015年版权归百世登出版集团有限公司所有

## Contents

Volume 23 Number 29 October 18, 2015

### EDITORIAL

- 4611 Application of glucocorticoids in liver failure

*Sun FK, Wang K*

- 4617 Application of balloon-assisted endoscopy in treatment of small intestinal diseases

*Mao GP, Zhang YF, Liang SH*

- 4626 Value of DNA methylation markers in colorectal cancer screening

*Xue M, Wang LJ*

### BASIC RESEARCH

- 4636 Changes of TRB3 and CHOP expression in nonalcoholic fatty liver disease in rats

*Wang H, Hu XX, Lu H*

### CLINICAL RESEARCH

- 4643 RNA interference based silencing of YWHAE suppresses proliferation of colon cancer cells

*Xie N, Huang YS, Luo ZF, Xue FG*

### REVIEW

- 4652 Transgenic animal models of type 2 autoimmune hepatitis

*Hua Y, Lu P, Ji JL, Shao JG, Wang LJ*

- 4658 Association of integration of HBV DNA into host genome with CHB and PLC

*Wu DL, Xu GH, Liu N*

- 4665 Advances in differentiation therapy of hepatocellular carcinoma

*Luo Y, Jin H, Wen GR, Tuo BG*

- 4673 Application of gene knockout technology in research of intestinal epithelial barrier mechanism in inflammatory bowel disease

*Chen L, Wu HG, Shi Y*

### RAPID COMMUNICATION

- 4680 Effect of positive acceleration adaptive training on PGI<sub>2</sub> and TXA<sub>2</sub> contents and TXA<sub>2</sub>/PGI<sub>2</sub> ratio in the gastric mucosa of rats

*Liu H, Chen Y, Xu S, Du B, Tang HL, Qiu J, Yang CM*



4687 *In vivo* inhibition of liver miR-122 expression by CRISPRi

*Zhao HL, Yang JY, Li GL, Mao DH, Li HY*

4694 Ntcp expression in bile duct cancer tissues in rats

*Wang JP, Zhang MY, Li B, Xia XM*

4700 DMBA induces pancreatic tumorigenesis in rats

*Ren Y, Hou XP, Li D, Li Y, Zhu B*

## **CLINICAL PRACTICE**

4706 Therapeutic value of endoscopic submucosal dissection for gastric muscularis propria tumors

*Shi L, Zhao W, Zhou Y, Zhu HH, Wang H, Chen P*

4713 Clinical application of 16S rRNA sequencing analysis for diagnosis of spontaneous bacterial peritonitis and evaluation of antibiotic efficacy

*Zhao YY, Xing HC*

4720 Clinical application of double plasma molecular adsorption system in treatment of acute liver failure

*Zhang B, Yang YG, Gong YY, Chen MD, Gao K, Ren HB, Zhang YH*

4725 Contrast-enhanced CT imaging in distinguishing intrahepatic cholangiocarcinoma from poorly differentiated hepatocellular carcinoma

*Yang CC, Yang H, Guo MJ, Li WH, Wu YF*

4733 Clinical efficacy of emergency endoscopy in elderly patients with acute cholangitis

*Dong XM, Cai W, Zhang C, Li N*

4738 Clinical characteristics of acute pancreatitis during pregnancy

*Wang Y, Jing X, Tian ZB, Ding XL, Wang XW, Xie M*

4745 Continuous blood purification improves intestinal mucosal barrier dysfunction in patients with severe acute pancreatitis

*Zhang X, Shao HZ*

4750 Clinical effects of diet therapy plus oral probiotics plus Etiasa gas enema in ulcerative colitis

*Liu GR, Ming L, Zhu WN, Shi WL, Zhao M, Li RY, Lu JL, Zhang SM*

4756 Clinical efficacy and safety of lansoprazole combined with somatostatin in treatment of acute upper gastrointestinal bleeding

*Zhang Y, Liu F*

## **CASE REPORT**

4760 A case of hemorrhage after endoscopic mucosal resection of a large colonic polyp

*Zhu HD, He L, Zhao Q, Tian DA, Li PY*

4765 Ischemic bowel disease associated with granulomatosis with polyangiitis: A case report

*Wu J, Niu JK, Miao YL*

## Contents

*World Chinese Journal of Digestology*  
Volume 23 Number 29 October 18, 2015

### APPENDIX

I – V Instructions to authors  
I Calendar of meetings and events in 2015

### ACKNOWLEDGMENT

I – II Acknowledgments to reviewers for the *World Chinese Journal of Digestology*

### COVER

Editorial Board Member of *World Chinese Journal of Digestology*, Gao-Ping Mao, Professor, Chief Physician, Department of Gastroenterology, General Hospital of Air Force, PLA; Small Intestinal Diseases Endoscopic Diagnose and Treatment Center of PLA, 30 Fucheng Road, Haidian District, Beijing 100142, China

### Indexed/Abstracted by

Chinese Journal Full-text Database, Chemical Abstracts, EMBASE/Excerpta Medica, and Abstract Journals.

### RESPONSIBLE EDITORS FOR THIS ISSUE

Assistant Editor: *Xiang Li* Review Editor: *Zhen-Zhen Du, Jin-Li Yan* Electronic Editor: *Zhen-Zhen Du*  
English Language Editor: *Tian-Qi Wang* Editor-in-Charge: *Ming-Xi Yu* Proof Editor: *Peng Guo* Layout Reviewer: *Lian-Sheng Ma*

### Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

**Founded** on January 15, 1993  
**Renamed** on January 25, 1998  
**Publication date** October 18, 2015

#### NAME OF JOURNAL

*World Chinese Journal of Digestology*

#### ISSN

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

#### EDITOR-IN-CHIEF

**Ying-Sheng Cheng, Professor**, Department of Radiology, Sixth People's Hospital of Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200233, China

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

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

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

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

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

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

**Jun-Ping Wang, Professor**, Department of Gastroenterology, People's Hospital of Shanxi, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China

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

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

**Zong-Ming Zhang, Professor**, Department of General Surgery, Beijing Electric Power Hospital, Capital Medical University, Beijing 100073, China

#### EDITORIAL OFFICE

Peng Guo, Director  
*World Chinese Journal of Digestology*  
Room 903, Building D, Ocean International Center, No. 62 Dongsihuan Zhonglu, Chaoyang District, Beijing 100025, China  
Telephone: +86-10-59080035 13901166126  
Fax: +86-10-85381893  
E-mail: [wjcd@wjgnet.com](mailto:wjcd@wjgnet.com)  
<http://www.wjgnet.com>

#### PUBLISHER

Baishideng Publishing Group Inc  
8226 Regency Drive, Pleasanton, CA 94588, USA  
Fax: +1-925-223-8242  
Telephone: +1-925-223-8243  
E-mail: [bpgoffice@wjgnet.com](mailto:bpgoffice@wjgnet.com)  
<http://www.wjgnet.com>

#### PRODUCTION CENTER

Beijing Baishideng BioMed Scientific Co., Limited Room 903, Building D, Ocean International Center, No. 62 Dongsihuan Zhonglu, Chaoyang District, Beijing 100025, China  
Telephone: +86-10-85381892  
Fax: +86-10-85381893

#### PRINT SUBSCRIPTION

RMB 90.67 Yuan for each issue  
RMB 3264 Yuan for one year

#### COPYRIGHT

© 2015 Baishideng Publishing Group Inc. Articles published by this open access journal are distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-commercial License, which permits use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non commercial and is otherwise in compliance with the license.

#### SPECIAL STATEMENT

All articles published in journals owned by the Baishideng Publishing Group (BPG) represent the views and opinions of their authors, but not the views, opinions or policies of the BPG, except where otherwise explicitly indicated.

#### INSTRUCTIONS TO AUTHORS

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

## 重视肝衰竭糖皮质激素的应用

孙丰凯, 王 凯

孙丰凯, 王凯, 山东大学齐鲁医院肝病科 山东省济南市 250012

王凯, 山东大学肝病研究所 山东省济南市 250012

王凯, 教授, 主任医师, 博士生导师, 主要从事各种肝病诊治相关的临床应用和基础研究。

科技部重大专项子课题基金资助项目,

No. 2012ZX10002007

国家自然科学基金资助项目, Nos. 81171579, 81371832

作者贡献分布: 本文由孙丰凯完成; 王凯审核。

通讯作者: 王凯, 教授, 主任医师, 250012, 山东省济南市文化西路107号, 山东大学齐鲁医院肝病科, 山东大学肝病研究所。  
wangdoc876@126.com

电话: 0531-82169596

收稿日期: 2015-04-23 修回日期: 2015-08-24

接受日期: 2015-09-08 在线出版日期: 2015-10-18

### Application of glucocorticoids in liver failure

Feng-Kai Sun, Kai Wang

Feng-Kai Sun, Kai Wang, Department of Hepatology, Qilu Hospital of Shandong University, Ji'nan 250012, Shandong Province, China

Kai Wang, Hepatology Institute of Shandong University, Ji'nan 250012, Shandong Province, China

Supported by: Key Project of Chinese Ministry of Science and Technology, No. 2012ZX10002007; National Natural Science Foundation of China, Nos. 81171579 and 81371832

Correspondence to: Kai Wang, Professor, Chief Physician, Department of Hepatology, Qilu Hospital of Shandong University; Hepatology Institute of Shandong University, 107 Wenhua Western Road, Ji'nan 250012, Shandong Province, China. wangdoc876@126.com

Received: 2015-04-23 Revised: 2015-08-24

Accepted: 2015-09-08 Published online: 2015-10-18

### Abstract

The pathogenesis of liver failure is complicated. Currently, there is a lack of effective measures for the treatment of liver failure. Immune-mediated

liver injury plays an important role in the early pathogenesis of liver failure. As an immune and inflammatory inhibitor, glucocorticoids can be considered one of the methods for the treatment of liver failure. However, the application of steroids in the treatment of liver failure in current clinical practice is controversial. This paper summarizes the progress in glucocorticoid use for the treatment of liver failure in recent years. Besides, the focus of controversy on glucocorticoids for treatment of liver failure is also discussed.

© 2015 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: Liver failure; Glucocorticoids; Immune; Hepatitis B virus

Sun FK, Wang K. Application of glucocorticoids in liver failure. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2015; 23(29): 4611-4616 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/23/4611.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v23.i29.4611>

### 摘要

肝衰竭发病机制复杂, 目前临床上缺乏有效的内科治疗手段。免疫介导的肝损伤在肝衰竭发病初期起重要作用, 糖皮质激素作为免疫和炎症抑制剂, 可作为治疗肝衰竭的方法之一, 但激素用于肝衰竭治疗目前在临床上还存在较大争议。本文综述了近年来糖皮质激素用于肝衰竭治疗的最新进展, 并对糖皮质激素用于肝衰竭治疗的争议焦点进行了讨论。

© 2015年版权归百世登出版集团有限公司所有。

### ■背景资料

免疫介导的肝损伤在肝衰竭发病初期起重要作用, 作为一种广谱免疫抑制剂, 糖皮质激素可以通过抑制细胞毒性T淋巴细胞的功能, 阻止或延缓过强的细胞免疫所致的原发性肝损伤, 此外还具有抗炎、抗毒素、稳定肝细胞膜、增加机体对有害刺激的应激能力等作用。

### ■同行评议者

彭亮, 副主任医师, 中山大学附属第三医院感染科; 郑素军, 副教授, 首都医科大学附属北京佑安医院人肝中心



## ■ 研发前沿

激素治疗肝衰竭是一把双刃剑, 正确掌握激素治疗的适应证、剂量及疗程, 合理应用激素治疗可挽救部分肝衰竭患者的生命。但是激素治疗的适应证、剂量及疗程的确定还需要更多临床资料的积累和多中心、大样本、随机对照临床试验研究进行验证。

**关键词:** 肝衰竭; 糖皮质激素; 免疫; 乙型肝炎病毒

**核心提示:** 免疫介导的肝损伤在肝衰竭发病初期起重要作用, 糖皮质激素作为免疫和炎症抑制剂用于肝衰竭治疗目前在临床上还存在较大争议。正确掌握激素治疗的适应证、剂量及疗程, 合理应用激素治疗可挽救部分肝衰竭患者的生命。

孙丰凯, 王凯. 重视肝衰竭糖皮质激素的应用. 世界华人消化杂志 2015; 23(29): 4611-4616 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/23/4611.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v23.i29.4611>

## 0 引言

肝衰竭具有起病急、进展迅速、病死率高的特点<sup>[1]</sup>。随着肝移植技术及人工肝支持治疗的开展, 肝衰竭的临床救治水平得到了很大提高, 但由于供肝缺乏、费用昂贵等限制, 内科综合支持治疗仍然是治疗肝衰竭的主要手段<sup>[2]</sup>。目前肝衰竭的内科治疗尚缺乏特效药物和手段, 原则上强调早期诊断、早期治疗, 针对不同病因采取相应的病因治疗及综合治疗措施, 及时进行病情评估, 并积极防治各种并发症。糖皮质激素作为免疫和炎症抑制剂, 是治疗肝衰竭的方法之一, 但激素治疗目前在临床上还存在较大争议<sup>[3-6]</sup>。我国《肝衰竭诊治指南》<sup>[7]</sup>指出: 目前对于肾上腺皮质激素在肝衰竭治疗中的应用尚存在不同意见。非病毒性肝衰竭, 如自身免疫性肝炎是其适应证, 可考虑使用泼尼松, 40-60 mg/d。其他原因所致肝衰竭前期或早期, 若病情发展迅速且无严重感染、出血等并发症者, 也可酌情使用。美国肝病研究学会(American Association for the Study of Liver Diseases, AASLD)2005年《急性肝衰竭指南》<sup>[8]</sup>关于自身免疫性肝炎所致的肝衰竭中提及可酌情使用糖皮质激素。2011年AASLD发布的《急性肝衰竭指南更新》<sup>[9]</sup>指出自身免疫性肝炎引起的凝血功能障碍和肝性脑病可酌情使用糖皮质激素。亚太肝脏研究学会(Asian-Pacific Association for the Study of the Liver, APASL)2009年《慢加急性肝衰竭共识》<sup>[10]</sup>中除了报道糖皮质激素治疗是乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)再激活的危险因素之外, 未提及使用糖皮质激素治疗的内容。2014年APASL发布的《慢加急性肝衰竭共识》<sup>[11]</sup>未再提及糖皮质激素治疗内容。

## 1 糖皮质激素治疗肝衰竭的作用机制

肝衰竭发病机制复杂, 至今仍不十分清楚<sup>[12]</sup>。国内学者提出的“三重打击学说”将肝衰竭的发生过程概括为免疫损伤、缺血缺氧和内毒素血症三重打击<sup>[13,14]</sup>。病毒、酒精、药物等病因可直接或通过诱发免疫介导的肝损伤间接导致肝细胞死亡并介导了局部炎症反应, 由此引起的微循环障碍可造成肝脏缺血缺氧性损伤, 从而导致肝细胞大量坏死或凋亡、肝脏解毒能力下降、肠道屏障功能障碍和菌群失调等, 进而促进了内毒素血症的发生。内毒素激活肝内外单核-吞噬细胞释放大量炎性细胞因子, 引起肝窦内皮损伤、血栓形成和肝内微循环障碍, 对肝脏产生继发性损伤, 促进与加重肝脏损害, 导致肝衰竭<sup>[13-16]</sup>。其中免疫介导的肝损伤在肝衰竭发病初期起主要作用, 而细胞毒性T淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)介导的细胞免疫是造成肝细胞凋亡或坏死的主要因素<sup>[17-19]</sup>。糖皮质激素治疗肝衰竭的机制有: (1)作为一种广谱免疫抑制剂, 糖皮质激素可以通过抑制CTL等淋巴细胞的功能, 阻止或延缓过强的细胞免疫所致的原发性肝损伤; (2)通过抑制肝细胞膜细胞间黏附分子-1(intercellular cell adhesion molecule-1, ICAM-1)的表达, 阻止CTL等淋巴细胞攻击HBV感染的肝细胞, 减轻肝细胞损伤; (3)具有强大的抗炎作用, 对感染性炎症和无菌性炎症均有抑制作用, 可诱导炎性细胞凋亡, 抑制肝内外单核-吞噬细胞释放肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白介素(interleukin, IL)-1、IL-2、IL-6和IL-8等多种炎性细胞因子, 阻止或延缓继发性肝内微循环障碍的发生, 缓解肝细胞缺血、缺氧及再灌注障碍, 减轻肝细胞损伤; (4)具有抗毒素作用, 可以提高机体对细菌内毒素的耐受力, 减少肝细胞损害, 为肝细胞再生提供稳定的内环境; (5)具有很强的稳定肝细胞膜的功能, 对溶酶体膜和线粒体也具有保护作用, 可直接阻止肝细胞进一步崩解坏死, 阻止肝功能进行性恶化, 为肝细胞再生和其他药物发挥疗效赢得宝贵时间; (6)增加机体对有害刺激的应激能力, 有助于减轻患者自觉症状、增进食欲, 促进机体补充所需营养物质, 为肝细胞再生提供了有利条件<sup>[15,20]</sup>。

## ■ 相关报道

聂青和采用糖皮质激素中剂量显著效后逐渐减量的长程疗法治疗亚急性、慢性肝衰竭患者78例, 发现糖皮质激素对改善肝衰竭早期患者的预后有一定疗效, 而对中晚期患者无明显治疗作用, 提出激素治疗肝衰竭强调早期应用, 并对激素治疗的适应证及常见问题的处理进行了总结。

此外, 肾上腺皮质功能不全与肝衰竭的关系近年来逐渐受到关注<sup>[21-24]</sup>。顾锡炳等<sup>[25]</sup>研究发现重型肝炎患者肾上腺皮质功能低下, 体内皮质醇浓度明显低于正常人, 对早、中、晚期重型肝炎患者的血清皮质醇浓度进行比较, 发现晚期患者<中期患者<早期患者, 并且皮质醇浓度减低在死亡组患者更明显。我们的研究<sup>[26]</sup>也发现慢加亚急性肝衰竭早期患者皮质醇浓度较健康对照组减低, 并且死亡组患者更低, 同时肝衰竭患者外周血簇分化抗原3(cluster of differentiation 3, CD3)<sup>+</sup> T淋巴细胞糖皮质激素受体的表达水平下降, 糖皮质激素受体表达水平与终末期肝病模型(model for end-stage liver disease, MELD)评分呈负相关, 病情越重, 糖皮质激素受体表达越低。为了保持适当水平的应激能力, 补充一定量的外源性激素是必要的。这些研究为糖皮质激素用于肝衰竭治疗提供了另一理论依据。

## 2 支持糖皮质激素治疗肝衰竭的研究证据

陈从新等<sup>[27]</sup>应用糖皮质激素阻断慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)肝衰竭发生的临床对照观察发现, 糖皮质激素治疗组患者肝衰竭的发生率及病死率均明显低于常规治疗组, 并且两组患者出血、感染等并发症的发生率无明显差异。慢性乙型肝炎重度[血清总胆红素(total bilirubin, TBil)>85.6 μmol/L、出现严重的消化系症状、有发展至慢性肝衰竭倾向]患者早期应用糖皮质激素可阻断肝衰竭发生, 已经发生肝衰竭的患者早期应用糖皮质激素可阻断肝细胞进一步坏死, 早期应用激素治疗能迅速改善患者症状, 促进黄疸消退, 降低肝衰竭发病率和病死率。

日本学者Fujiwara等<sup>[28]</sup>对42例诊断为严重急性发作CHB[凝血酶原活动度(prothrombin activity, PTA)<正常对照60%、TBil>51.3 μmol/L, 谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)>300 IU/L]患者应用糖皮质激素和核苷类似物治疗发现, 仅应用激素而未联合核苷类似物治疗的16例回顾性研究患者中4例(25%)痊愈, 应用激素联合或未联合核苷类似物治疗的26例前瞻性研究患者中17例(65%)痊愈, 其中15/17(88%)患者在诊断严重急性发作CHB的10 d内即开始激素治疗, 而在诊断10 d以后才开始激素治疗的5例患者无一例痊愈。2010年,

Fujiwara等<sup>[29]</sup>又报道了10例严重急性发作CHB患者应用糖皮质激素联合核苷类似物治疗的前瞻性研究, 7例痊愈患者中有6例在诊断严重急性发作CHB的10 d内即开始激素治疗。研究者提出, 早期(出现严重急性发作的10 d内)给予足量糖皮质激素联合核苷类似物可能是一种防止严重急性发作CHB病情进一步恶化的治疗方案。Matsumoto等<sup>[30]</sup>也报道了2例早期应用糖皮质激素联合核苷类似物治愈的严重急性发作CHB患者。Bockmann等<sup>[31]</sup>在3例HBV相关性肝衰竭患者中应用糖皮质激素联合核苷类似物治疗也取得了良好效果。

He等<sup>[32]</sup>对糖皮质激素治疗HBV相关性肝衰竭的疗效及并发症进行了荟萃分析, 纳入8个病例对照研究, 共597例肝衰竭患者。结果显示, HBV相关性肝衰竭早期患者采用糖皮质激素治疗可显著提高其生存率, 而继发感染及出血的发生率在激素治疗组和常规治疗组无明显差异, 这些发现提示, HBV相关性肝衰竭患者及早使用糖皮质激素治疗对于改善患者预后至关重要。汪萌等<sup>[33]</sup>对重型肝炎肝衰竭患者应用糖皮质激素治疗的疗效及并发症进行了荟萃分析, 纳入29个病例对照研究, 共1852例重型肝炎患者。分析结果显示, 接受激素治疗的患者病情好转率与生存率均明显高于对照组, 激素治疗患者的消化系症状消退时间、黄疸消退时间、凝血酶原时间与总胆红素水平均明显低于对照组, 而消化系出血、继发感染与肝肾综合征等并发症发生率也低于对照组。杨晓鲲等<sup>[34]</sup>对糖皮质激素治疗HBV相关性肝衰竭的疗效及其并发症进行了荟萃分析, 纳入24个病例对照研究, 共913例肝衰竭患者。结果显示, 与常规内科治疗组比较, 应用糖皮质激素可以显著降低肝衰竭患者的病死率、改善患者的凝血酶原时间和总胆红素水平, 而继发感染和出血等并发症的发生率未见明显升高。

## 3 反对糖皮质激素治疗肝衰竭的研究证据

国内多数学者并不支持使用糖皮质激素治疗肝衰竭, 认为糖皮质激素可抑制机体免疫功能, 增加感染的危险<sup>[35]</sup>。Tur-Kaspa等<sup>[36]</sup>也发现HBV基因组含有对糖皮质激素应答的序列, 激素治疗可导致病毒复制活跃, 进一步加重病情。此外, 大剂量使用激素还可能导致感染加重、应激性溃疡、骨坏死、血压血糖升高和低血钾

## ■ 创新盘点

本文综述了糖皮质激素用于肝衰竭治疗的作用机制及近年来临床研究的最新进展, 并介绍了本课题组应用激素治疗肝衰竭的经验, 可对临床工作中运用激素治疗肝衰竭提供一定的借鉴。

**应用要点**

本文可对临床工作中运用糖皮质激素治疗肝衰竭适应证、剂量及疗程的把握以及并发症和不良反应的防治提供一定的借鉴。

等不良反应<sup>[37,38]</sup>。Karkhanis等<sup>[39]</sup>对1998-2007年的自身免疫性、原因不明以及药物导致的361例急性肝衰竭患者进行了回顾性分析, 其中66例是自身免疫性肝病所致急性肝衰竭(25例用激素, 41例未用), 164例为原因不明的急性肝衰竭(21例用激素, 143例未用), 131例是药物导致的急性肝衰竭(16例用激素, 115例未用)。结果发现是否应用激素治疗与总体生存率无关, 与不同原因所致急性肝衰竭的生存改善也无关。激素的使用与终末期肝病评分最高的患者(MELD评分>40分)生存率降低有关。最终, 研究者认为激素不能改善药物、病因不明以及自身免疫所致急性肝衰竭患者的生存期, 并且在高MELD评分患者中应用激素治疗者生存率较低。

#### 4 糖皮质激素用于肝衰竭的争议焦点

我们认为, 肝衰竭并非应用糖皮质激素治疗的禁忌证, 关键在于: (1)如何掌握激素治疗的介入时机、剂量及疗程; (2)对激素治疗过程中并发症及不良反应的防治<sup>[38,40-44]</sup>。激素治疗是一把双刃剑, 正确掌握激素治疗的适应证、剂量及疗程, 合理应用激素治疗可挽救部分肝衰竭患者的生命。反之, 不仅无助于肝衰竭的治疗, 甚至可能加速其病情恶化和患者死亡。

##### 4.1 激素治疗的适应证、剂量及疗程

**4.1.1 适应证:** 糖皮质激素治疗肝衰竭应强调早期应用<sup>[28,29,45]</sup>。肝衰竭早期患者往往肝功损害严重, 黄疸迅速加深, 为了抑制强烈的免疫应答和炎性反应, 阻止病程向中晚期进展, 应考虑糖皮质激素治疗<sup>[15,20,44]</sup>。在肝衰竭病程中期若病情发展迅猛, 为了阻止肝衰竭病程向晚期发展, 临床上仍要考虑激素疗法, 失代偿期肝硬化出现肝衰竭可慎用糖皮质激素治疗。

**4.1.2 剂型及剂量:** 各类糖皮质激素类药物根据半衰期不同可分为短效类、中效类和长效类。氢化考的松和可的松的半衰期是8-12 h, 泼尼松、泼尼松龙、甲泼尼松和甲泼尼松龙的半衰期是12-36 h, 地塞米松的半衰期是36-54 h。治疗肝衰竭应选用中效类糖皮质激素药物, 如口服泼尼松或静脉应用甲基强的松龙。强的松或强的松龙主要适用于神志清醒者, 40-60 mg, 2次/d, 口服。甲基强的松龙主要适用于强的松疗效差或神志不清者, 40-80 mg, 2次/d, 静脉注射。

**4.1.3 疗程:** 国内学者主张糖皮质激素中剂量显效后逐渐减量的长程疗法<sup>[38]</sup>。我们认为, 糖皮质激素最佳剂量的选择和减量方法, 与疗效密切相关, 应根据胆红素检查结果和凝血酶原活动度及时调整剂量。糖皮质激素的用量不要骤减, 要逐渐减量至停药, 否则将可能导致黄疸反复, 甚至再次发生肝功能衰竭。糖皮质激素的分泌具有昼夜节律性, 每日上午8-10时为分泌高峰, 随后缓慢下降, 午夜12时降至最低水平, 减量时宜遵循机体激素分泌规律, 先减下午量, 后减上午量。甲状腺功能亢进时, 肝灭活皮质激素加速, 使肾上腺皮质激素类药物半衰期缩短, 因而甲亢患者出现肝衰竭时糖皮质激素用量宜大。

**4.2 激素治疗过程中并发症及不良反应的防治** 肝衰竭本身易出现多种并发症, 在应用糖皮质激素治疗时出现的感染、消化系出血等并发症是肝衰竭病情进展的固有表现还是糖皮质激素的不良反应, 目前尚无定论<sup>[38]</sup>。多篇荟萃分析显示, 激素治疗并不增加肝衰竭患者继发感染、消化系出血等并发症发生率<sup>[32-34]</sup>。激素治疗肝衰竭过程中可能出现以下并发症及不良反应。

**4.2.1 继发感染:** 包括细菌或真菌感染, 虽然肾上腺皮质激素类药物可在一定程度上降低机体的防御能力, 但如无明确感染的存在, 不必预防性应用抗菌素和抗真菌药物。肠道微生态制剂可防止菌群失调, 预防机体防御能力减弱引起的感染。有细菌感染存在者, 应避免长期使用广谱抗生素造成微生态失衡、耐药菌形成、二重感染。尽量避免注射后经胆汁、肠黏膜高浓度分泌的抗菌素。

**4.2.2 上消化道出血:** 糖皮质激素可刺激胃酸、胃蛋白酶分泌并抑制胃黏液分泌, 可诱发胃、十二指肠溃疡和上消化道出血, 因而在应用糖皮质激素的同时要应用抑制胃酸分泌药物保护胃黏膜, 防治消化性溃疡和上消化道出血, 可选用H<sub>2</sub>受体阻断剂、质子泵抑制剂。

**4.2.3 HBV复制活跃:** 长期应用糖皮质激素可使机体免疫功能受抑制, 导致HBV复制活跃<sup>[15]</sup>。核苷类似物抗病毒治疗可以阻止因糖皮质激素应用导致的HBV复制活跃, 防止糖皮质激素停用后受抑制的机体免疫功能反弹再次造成肝损害<sup>[46-48]</sup>。我们主张应用激素治疗的肝衰竭患者应尽早采用抗病毒治疗。多项研究<sup>[20,31,46-50]</sup>



显示肝衰竭患者在抗病毒的基础上应用激素治疗并未造成HBV复制活跃。

4.2.4 低蛋白血症: 大剂量糖皮质激素能抑制蛋白质合成, 在治疗过程中要检测血清白蛋白, 并及时纠正低蛋白血症。

## 5 结论

我们认为在肝衰竭治疗中糖皮质激素的应用是值得重视的, 正确掌握激素治疗的适应证、剂量及疗程, 合理应用激素治疗可挽救部分肝衰竭患者的生命。但是激素治疗的适应证、剂量及疗程的确定还需要更多临床资料的积累和多中心、大样本、随机对照临床试验研究进行验证, 才能获得更为科学、可信的结论。

## 6 参考文献

- Olson JC, Kamath PS. Acute-on-chronic liver failure: what are the implications? *Curr Gastroenterol Rep* 2012; 14: 63-66 [PMID: 22086408 DOI: 10.1007/s11894-011-0228-2]
- 段钟平, 陈煜. 肝衰竭诊疗: 进展与展望. *临床肝胆病杂志* 2012; 28: 721-725
- 王宇明, 朱鹏. 肝衰竭热点争议问题研究进展. *传染病信息* 2012; 25: 150-154
- 甘苏琴, 龙尧. 糖皮质激素治疗重型乙型肝炎的研究进展. *医学综述* 2011; 17: 1856-1858
- 李晶, 王鲁文, 龚作炯. 糖皮质激素治疗重型肝炎有效性及安全性的Meta分析. *实用肝脏病杂志* 2011; 14: 121-123
- 鱼康康, 李宁, 施光峰. 在争议中迈步向前: 慢加急性肝衰竭研究进展. *肝脏* 2014; 19: 208-210
- 中华医学会感染病学分会肝衰竭与人工肝学组, 中华医学会肝病学会重型肝病与人工肝学组. 肝衰竭诊治指南(2012年版). *实用肝脏病杂志* 2013; 16: 210-216
- Polson J, Lee WM. AASLD position paper: the management of acute liver failure. *Hepatology* 2005; 41: 1179-1197 [PMID: 15841455 DOI: 10.1002/hep.20703]
- Lee WM, Stravitz RT, Larson AM. Introduction to the revised American Association for the Study of Liver Diseases Position Paper on acute liver failure 2011. *Hepatology* 2012; 55: 965-967 [PMID: 22213561 DOI: 10.1002/hep.25551]
- Sarin SK, Kumar A, Almeida JA, Chawla YK, Fan ST, Garg H, de Silva HJ, Hamid SS, Jalan R, Komolmit P, Lau GK, Liu Q, Madan K, Mohamed R, Ning Q, Rahman S, Rastogi A, Riordan SM, Sakhuja P, Samuel D, Shah S, Sharma BC, Sharma P, Takikawa Y, Thapa BR, Wai CT, Yuen MF. Acute-on-chronic liver failure: consensus recommendations of the Asian Pacific Association for the study of the liver (APASL). *Hepatol Int* 2009; 3: 269-282 [PMID: 19669378 DOI: 10.1007/s12072-008-9106-x]
- Sarin SK, Kedarisetty CK, Abbas Z, Amarapurkar D, Bihari C, Chan AC, Chawla YK, Dokmeci AK, Garg H, Ghazinyan H, Hamid S, Kim DJ, Komolmit P, Lata S, Lee GH, Lesmana LA, Mahtab M, Maiwall R, Moreau R, Ning Q, Pamecha V, Payawal DA, Rastogi A, Rahman S, Rela M, Saraya A, Samuel D, Saraswat V, Shah S, Shiha G, Sharma BC, Sharma MK, Sharma K, Butt AS, Tan SS, Vashishtha C, Wani ZA, Yuen MF, Yokosuka O. Acute-on-chronic liver failure: consensus recommendations of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver (APASL) 2014. *Hepatol Int* 2014; 8: 453-471 [PMID: 26202751 DOI: 10.1007/s12072-014-9580-2]
- 李静, 孙剑勇. 肝衰竭免疫学发病机制研究进展. *肝脏* 2013; 18: 417-419
- 黄湛镛, 高志良. 肝衰竭的三重打击及治疗策略. *内科急危重症杂志* 2014; 20: 154-156
- 叶一农, 高志良. 乙型肝炎肝衰竭发生机制中的三重打击. *传染病信息* 2009; 22: 276-279
- 张绪清, 聂青和. 糖皮质激素在治疗重型肝炎中的应用及评价. *实用肝脏病杂志* 2004; 7: 70-72
- Chung RT, Stravitz RT, Fontana RJ, Schiodt FV, Mehal WZ, Reddy KR, Lee WM. Pathogenesis of liver injury in acute liver failure. *Gastroenterology* 2012; 143: e1-e7 [PMID: 22796239 DOI: 10.1053/j.gastro.2012.07.011]
- Wu Z, Han M, Chen T, Yan W, Ning Q. Acute liver failure: mechanisms of immune-mediated liver injury. *Liver Int* 2010; 30: 782-794 [PMID: 20492514 DOI: 10.1111/j.1478-3231.2010.02262.x]
- Dong X, Gong Y, Zeng H, Hao Y, Wang X, Hou J, Wang J, Li J, Zhu Y, Liu H, Han J, Zhou H, Shen L, Gao T, Zhou T, Yang S, Li S, Chen Y, Meng Q, Li H. Imbalance between circulating CD4<sup>+</sup> regulatory T and conventional T lymphocytes in patients with HBV-related acute-on-chronic liver failure. *Liver Int* 2013; 33: 1517-1526 [PMID: 23869954 DOI: 10.1111/liv.12248]
- 王晓晶, 张小平, 宁琴. 肝衰竭的免疫发病机制. *临床肝胆病杂志* 2014; 30: 984-991
- 吴锦瑜, 黎明, 张华. 糖皮质激素对早期肝衰竭患者转归的影响. *南方医科大学学报* 2011; 31: 554-556
- Harry R, Auzinger G, Wendon J. The clinical importance of adrenal insufficiency in acute hepatic dysfunction. *Hepatology* 2002; 36: 395-402 [PMID: 12143048 DOI: 10.1053/jhep.2002.34514]
- 李梦东, 聂青和. 糖皮质激素治疗重型肝炎的临床及实验研究. *实用肝脏病杂志* 2005; 8: 1-6
- O'Beirne J, Holmes M, Agarwal B, Bouloux P, Shaw S, Patch D, Burroughs A. Adrenal insufficiency in liver disease - what is the evidence? *J Hepatol* 2007; 47: 418-423 [PMID: 17629587 DOI: 10.1016/j.jhep.2007.06.008]
- 樊翠翠, 赵彩彦. 肝衰竭与肾上腺皮质功能不全. *中华肝脏病杂志* 2013; 21: 158-160
- 顾锡炳, 徐月琴. 重型肝炎血清皮质醇浓度与病情及预后的关系. *肝脏* 2006; 11: 212-213
- Gao L, Wang JF, Xiang M, Fan YC, Zhang ZG, Wang K. Expression of human glucocorticoid receptor in T lymphocytes in acute-on-chronic hepatitis B liver failure. *Dig Dis Sci* 2011; 56: 2605-2612 [PMID: 21380616 DOI: 10.1007/s10620-011-1656-4]
- 陈从新, 郭顺明, 刘波, 杨家宏, 徐宁, 刘克万. 糖皮质激素阻断慢性乙型肝炎肝衰竭发生的临床对照观察. *中华肝脏病杂志* 2003; 11: 37-40

## ■名词解释

糖皮质激素受体: 是激素核受体家族的主要成员之一, 也是糖皮质激素效应的执行者, 糖皮质激素作用的发挥必须与糖皮质激素受体结合。糖皮质激素受体不仅能参与机体应激反应, 而且具有抗炎和免疫调节作用。

# 同行评价

本文概括与述评了糖皮质激素在重型肝炎(肝衰竭)中应用的机制与临床最新进展,并介绍了本课题组应用激素治疗肝衰竭的经验,对临床工作有一定参考价值。

- 28 Fujiwara K, Yasui S, Yonemitsu Y, Fukai K, Arai M, Imazeki F, Suzuki A, Suzuki H, Sadahiro T, Oda S, Yokosuka O. Efficacy of combination therapy of antiviral and immunosuppressive drugs for the treatment of severe acute exacerbation of chronic hepatitis B. *J Gastroenterol* 2008; 43: 711-719 [PMID: 18807133 DOI: 10.1007/s00535-008-2222-5]
- 29 Fujiwara K, Yasui S, Okitsu K, Yonemitsu Y, Oda S, Yokosuka O. The requirement for a sufficient period of corticosteroid treatment in combination with nucleoside analogue for severe acute exacerbation of chronic hepatitis B. *J Gastroenterol* 2010; 45: 1255-1262 [PMID: 20614156 DOI: 10.1007/s00535-010-0280-y]
- 30 Matsumoto K, Miyake Y, Miyatake H, Takahara M, Imada T, Yagi S, Toyokawa T, Nakatsu M, Ando M, Hirohata M. A combination treatment of entecavir and early-phase corticosteroid in severe exacerbation of chronic hepatitis B. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 1650-1652 [PMID: 19340912]
- 31 Bockmann JH, Dandri M, Lüth S, Pannicke N, Lohse AW. Combined glucocorticoid and antiviral therapy of hepatitis B virus-related liver failure. *World J Gastroenterol* 2015; 21: 2214-2219 [PMID: 25717260 DOI: 10.3748/wjg.v21.i7.2214]
- 32 He B, Zhang Y, Lü MH, Cao YL, Fan YH, Deng JQ, Yang SM. Glucocorticoids can increase the survival rate of patients with severe viral hepatitis B: a meta-analysis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2013; 25: 926-934 [PMID: 23542450 DOI: 10.1097/MEG.0b013e32835f4cbd]
- 33 汪萌, 聂青和. 糖皮质激素治疗重型肝炎肝衰竭患者的疗效及并发症临床荟萃分析. *临床肝胆病杂志* 2012; 28: 764-770
- 34 杨晓鲲, 徐贵森. 糖皮质激素治疗乙型肝炎病毒相关性肝衰竭疗效的Meta分析. *解放军医学杂志* 2013; 38: 581-585
- 35 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: 702
- 36 Tur-Kaspa R, Burk RD, Shaul Y, Shafritz DA. Hepatitis B virus DNA contains a glucocorticoid-responsive element. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; 83: 1627-1631 [PMID: 3006059]
- 37 甄秀梅, 罗光汉. 糖皮质激素在乙型肝炎肝功能衰竭治疗中的应用. *中华临床感染病杂志* 2010; 3: 126-128
- 38 聂青和. 糖皮质激素在肝衰竭治疗中的地位. *中华肝脏病杂志* 2012; 20: 414-415
- 39 Karkhanis J, Verna EC, Chang MS, Stravitz RT, Schilsky M, Lee WM, Brown RS. Steroid use in acute liver failure. *Hepatology* 2014; 59: 612-621 [PMID: 23929808 DOI: 10.1002/hep.26678]
- 40 伍利军, 李海华, 刘锦华. 肾上腺皮质激素治疗肝衰竭的疗效观察. *医学综述* 2011; 17: 1110-1111
- 41 聂青和. 肝衰竭综合治疗进展. *实用肝脏病杂志* 2013; 16: 17-19
- 42 孟琳琳, 叶卫江. 糖皮质激素治疗乙型肝炎相关肝衰竭的研究进展. *国际流行病学传染病学杂志* 2013; 40: 204-207
- 43 王宇明, 于乐成. 肾上腺皮质激素在肝衰竭治疗中应用的新认识. *临床内科杂志* 2014; 31: 513-515
- 44 朱萍, 邓国炯, 陈建新. 糖皮质激素早期干预肝衰竭进展的时间节点分析. *肝脏* 2015; 20: 31-34
- 45 周超, 罗生强, 宫嫚, 杜宁, 孙永强, 刘虹红, 张宁, 景婧, 张帆. 糖皮质激素在常见肝病治疗中的应用. *胃肠病学和肝病学杂志* 2015; 24: 15-17
- 46 Yasui S, Fujiwara K, Nakamura M, Miyamura T, Yonemitsu Y, Mikata R, Arai M, Kanda T, Imazeki F, Oda S, Yokosuka O. Virological efficacy of combination therapy with corticosteroid and nucleoside analogue for severe acute exacerbation of chronic hepatitis B. *J Viral Hepat* 2015; 22: 94-102 [PMID: 24750410 DOI: 10.1111/jvh.12258]
- 47 周先珊, 万谟彬, 薛建亚, 张斌. 抗病毒基础上应用糖皮质激素治疗慢性重型乙型肝炎临床分析. *临床肝胆病杂志* 2008; 24: 101-103
- 48 汤伟亮, 谢青. 乙型肝炎相关肝衰竭抗病毒治疗研究进展. *中华肝脏病杂志* 2012; 20: 408-410
- 49 李惠珍, 杨生义, 李淑霞, 李维. 抗病毒联合糖皮质激素治疗肝衰竭临床观察. *临床消化病杂志* 2012; 24: 139-142
- 50 Jochum C, Gieseler RK, Gawlista I, Fiedler A, Manka P, Saner FH, Roggendorf M, Gerken G, Canbay A. Hepatitis B-associated acute liver failure: immediate treatment with entecavir inhibits hepatitis B virus replication and potentially its sequelae. *Digestion* 2009; 80: 235-240 [PMID: 19828954 DOI: 10.1159/000236009]

编辑: 于明茜 电编: 都珍珍



## 气囊辅助内镜在小肠疾病治疗中的应用进展

毛高平, 张亚飞, 梁树辉

毛高平, 张亚飞, 中国人民解放军空军总医院消化内科 全军小肠疾病内镜诊疗中心 北京市 100142

梁树辉, 中国人民解放军第四军医大学西京消化病医院内镜中心 陕西省西安市 710032

毛高平, 教授, 主任医师, 主要从事消化系统疾病的研究。

作者贡献分布: 毛高平立题构思、撰写; 张亚飞与梁树辉参与撰写、文献资料收集。

通讯作者: 毛高平, 教授, 主任医师, 100142, 北京市海淀区阜成路30号, 中国人民解放军空军总医院消化内科, 全军小肠疾病内镜诊疗中心。maogaoping@medmail.com.cn

电话: 010-66928233

收稿日期: 2015-04-27 修回日期: 2015-05-12

接受日期: 2015-05-15 在线出版日期: 2015-10-18

### Application of balloon-assisted endoscopy in treatment of small intestinal diseases

Gao-Ping Mao, Ya-Fei Zhang, Shu-Hui Liang

Gao-Ping Mao, Ya-Fei Zhang, Department of Gastroenterology, General Hospital of Air Force, PLA; Small Intestinal Disease Endoscopic Diagnosis and Treatment Center of PLA, Beijing 100142, China

Shu-Hui Liang, Endoscopy Center, Xijing Hospital of Digestive Diseases, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China

Correspondence to: Gao-Ping Mao, Professor, Chief Physician, Department of Gastroenterology, General Hospital of Air Force, PLA; Small Intestinal Disease Endoscopic Diagnosis and Treatment Center of PLA, 30 Fucheng Road, Haidian District, Beijing 100142, China. maogaoping@medmail.com.cn

Received: 2015-04-27 Revised: 2015-05-12

Accepted: 2015-05-15 Published online: 2015-10-18

### Abstract

For its special physiological structure, the small intestine had been regarded as an area inaccessible by digestive endoscopy for the detection and therapy. Recently,

the clinical application of balloon-assisted endoscopy (BAE) help realize the direct observation and endoscopic therapy for the total small intestine, which greatly improves the diagnosis and treatment of small intestinal diseases. In the current editorial, we provide several typical cases and give an overview of the application of BAE in the therapy of small intestinal diseases, which includes polypectomy for small intestinal polyps, dilatation and stenting for small intestinal strictures, endoscopic therapy for small intestinal bleeding and BAE assisted endoscopic retrograde cholangiopancreatography (ERCP).

© 2015 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: Small intestine; Balloon-assisted endoscopy; Therapy

Mao GP, Zhang YF, Liang SH. Application of balloon-assisted endoscopy in treatment of small intestinal diseases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2015; 23(29): 4617-4625 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/23/4617.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v23.i29.4617>

### 摘要

小肠由于其特殊的生理构造, 一直以来被视为消化系内镜检查及治疗的盲区。近年, 气囊辅助内镜(balloon-assisted endoscopy, BAE)的临床应用实现了对全小肠黏膜病变进行直接观察和镜下治疗, 因而其大大促进了小肠疾病的诊疗水平。本文将辅以典型病例的方式简单介绍目前BAE在小肠疾病治疗中的应用进展, 主要包括小肠息

### ■背景资料

小肠由于其特殊的解剖生理构造, 一直以来都被视为消化内镜检查及治疗的盲区。本世纪初胶囊内镜和气囊辅助内镜(balloon-assisted endoscopy, BAE)的问世, 大大提高了人们对小肠疾病的认识水平和诊断能力。近年来, 应用BAE对小肠疾病进行镜下治疗已在国内、外逐渐开展, 初步结果显示了在BAE直视下治疗小肠疾病的良好效果和发展前景。但是由于对小肠疾病的认识还有待深入, 小肠内镜操作技术本身的特点以及相关内镜辅助器具尚有待开发, 对小肠疾病的内镜下治疗还是一个有待深入研究 and 更多临床实践的课题。

### ■同行评议者

邱敏, 副教授, 中山大学附属第六医院



## ■ 研发前沿

本文主要通过典型病例结合文献复习, 介绍了应用BAE在小肠息肉切除、小肠狭窄扩张及支架置入、小肠出血性疾病的镜下治疗及胃肠改道术后BAE辅助经内镜逆行胰胆管造影术等的技术特点和方法, 有关的临床结果和有待进一步实践和研究的问题。

肉切除术、小肠狭窄扩张及支架置入术、小肠出血性疾病的BAE镜下治疗及BAE辅助下经内镜逆行胰胆管造影术(endoscopic retrograde cholangiopancreatography, ERCP)等。

© 2015年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词: 小肠; 气囊辅助内镜; 治疗

**核心提示:** 气囊辅助内镜(balloon assisted enteroscopy, BAE)的临床应用大大提高了小肠疾病的诊断水平, 而对小肠疾病在BAE直视下进行镜下治疗也有很大进展。本文以作者开展小肠疾病BAE镜下治疗典型病例的方式结合文献复习, 简要介绍了近年BAE在小肠疾病治疗中的应用进展。

毛高平, 张亚飞, 梁树辉. 气囊辅助内镜在小肠疾病治疗中的应用进展. 世界华人消化杂志 2015; 23(29): 4617-4625  
URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/23/4617.asp>  
DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v23.i29.4617>

## 0 引言

小肠是人体重要的消化器官, 其上接幽门, 下连盲肠, 全长约5-7 m, 位于腹腔内并被肠系膜束缚形成多发复合肠襻。由于小肠特殊的解剖生理构造, 其一直以来都被视为消化系内镜检查的盲区。2001年, 胶囊内镜(capsule endoscopy, CE)的问世, 为小肠疾病的诊断开创了崭新的时代<sup>[1,2]</sup>。CE借由胃肠自身的蠕动性, 可无痛苦地实现对全小肠黏膜的观察。因CE具有无创、易操作、安全无痛苦以及全小肠观察等特点, 使其迅速在小肠疾病的诊断中得到推广应用<sup>[3-5]</sup>。但由于CE不能对病变部位取材活检, 不能实施治疗, 也不能控制其在全小肠内的运行等原因, 因而一定程度上限制了CE在临床上的应用而使其仅能作为单纯性的诊断工具<sup>[6,7]</sup>。2001年, 日本学者Yamamoto等<sup>[8]</sup>首先报道应用双气囊小肠镜(double-balloon enteroscopy, DBE)进行小肠检查, 使小肠疾病的诊断和治疗技术迈上了新的台阶, 其开创性地利用附加于镜身和外套管的气囊固定肠壁, 并与外套管的取直作用结合, 克服了小肠镜推进时所遇到的结襻和成角等问题, 使得对全小肠黏膜病变进行直接观察和镜下治疗得以实现<sup>[9,10]</sup>。2006年, 奥林巴

斯公司推出了单气囊小肠镜(single-balloon enteroscopy, SBE)系统, 结构上的基本原理和DBE相似, 只是去掉了镜身前端的气囊, 仅保留外套管气囊, SBE镜端的可曲度及视角范围增加, 操作更为简便<sup>[11-13]</sup>。现在将双气囊小肠镜和单气囊小肠镜统称之为气囊辅助内镜(balloon-assisted enteroscopy, BAE)。近年来, 随着BAE诊断与治疗相关辅助器械的发展, BAE在小肠疾病中的治疗应用已在国内多家医院逐渐开展<sup>[14-18]</sup>。本文将辅以典型病例的方式, 简要介绍目前BAE在小肠疾病治疗中的应用进展。

## 1 小肠息肉切除术

小肠息肉的发生率远低于胃及结直肠息肉, 文献报道以位于十二指肠为主, 病理类型多为腺瘤或布氏腺瘤<sup>[19]</sup>。Peutz-Jeghers综合征(Peutz-Jeghers syndrome, PJS)主要表现为口唇、手指、足趾等部位黑/褐色素斑沉着和胃肠道多发错构瘤性息肉<sup>[20,21]</sup>。黑斑一般无需特殊治疗, 而胃肠道息肉则可发生继发出血、肠梗阻、肠套叠甚至恶变等多种并发症。对于PJS胃肠多发息肉的治疗, 外科手术存在创伤较大, 术后并发症较多, 对多发息肉常需要多次手术而使患者难以承受等缺陷。BAE的应用为PJS患者小肠息肉的治疗提供了一种新的有效手段, 可通过经口和经肛两种进镜途径实现全小肠对接检查, 并对小肠多发息肉进行镜下治疗<sup>[22-25]</sup>。由于小肠具有迂曲冗长、肠壁较薄和血运丰富等解剖特点, 以往认为BAE下切除小肠息肉尤其是小肠巨大息肉易并发出血、穿孔等并发症。May等<sup>[26]</sup>报道直径>3 cm的息肉, 如行息肉完整切除, 术后发生出血和穿孔等的并发症发生率较高。Ross等<sup>[27]</sup>建议对大息肉、有手术史且有肠黏膜者宜采用DBE联合腹腔镜治疗。中国人民解放军空军总医院消化内科自2005年以来, 对200余例PJS患者进行了超过500例次的小肠镜检查及治疗, 共切除小肠息肉3200余枚, 其中直径超过5 cm的巨大息肉350余枚, 术后出血及穿孔等严重并发症发生的几率均低于2%, 转外科行手术治疗的几率更是低于1%。因此, 对于PJS患者, BAE镜下息肉切除术是安全、有效、经济的诊疗手段。

对于有蒂的PJS息肉, 行小肠镜下高频电



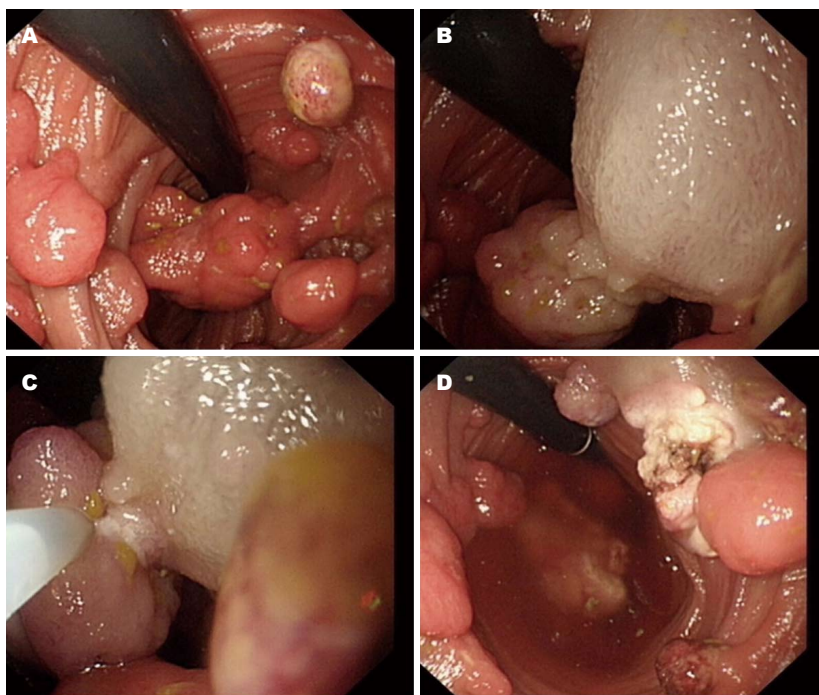


图1 小肠息肉切除术. 患者诊断为Peutz-Jeghers综合征, 在中国人民解放军空军总医院消化内科多次行小肠息肉切除术. A-D: 显示气囊辅助内镜下U型反转切除小肠息肉术中影像.

流圈套切除并不复杂. 但对于亚蒂或广基的PJS息肉, 或直径超过5 cm的巨大息肉, 应根据病灶的形态和大小实行完整或分块切除. 在实行小肠息肉圈套切除前, 可在息肉基底部注射肾上腺素生理盐水溶液, 使黏膜层抬起, 有利于避免圈套器勒除过深引起的穿孔, 也有助于防止息肉切除残根的出血. 此外, 由于小肠肠管的迂曲成攀, 使得部分小肠息肉的镜下切除操作甚为困难, 我们采用在小肠腔内U型反转镜身, 可达到充分暴露肠腔, 获得肠腔内息肉的良好视野, 从而大大提高了息肉切除的成功率. 图1为中国人民解放军空军总医院消化内科病例, 展示BAE下U型反转切除小肠息肉的术中影像.

## 2 小肠狭窄扩张及支架置入术

克罗恩病、非甾体抗炎药(non-steroidal anti-inflammatory drug, NSAID)药物以及腹部外科手术等因素所造成的小肠良性狭窄在临床上并非罕见. BAE辅助下的球囊扩张术对于这类疾病导致的小肠良性狭窄是一个全新的治疗选择. 国内已有报道<sup>[28,29]</sup>使用BAE配合多种常规内镜治疗的辅助器械以治疗小肠良性狭窄. 国外也有多项报道<sup>[30-32]</sup>显示利用BAE辅助下的球囊扩张术可以有效治疗克罗恩病所致的小

肠狭窄, 显著降低了外科手术的几率. Ohmiya等<sup>[33]</sup>、Despott等<sup>[34]</sup>的报道显示经球囊逐级扩张后小肠肠腔直径甚至可达到20 mm, 且相关并发症极低; 当狭窄再发生时, 再次BAE镜下治疗也往往有效. 对于BAE下小肠狭窄扩张的适应症目前尚无一致认识, 但对于狭窄长度>5 cm、有重度炎症或黏膜溃烂者一般认为是BAE扩张治疗的相对禁忌症. 中国人民解放军空军总医院消化内科对15例克罗恩病所致回肠末端狭窄患者进行小肠镜辅助下的球囊扩张术, 经验表明将肠腔扩张至直径10-15 mm是安全有效的.

目前临床上常用的BAE包括富士及奥林巴斯等公司的产品, 其工作孔道直径均为2.8 mm, 而多数市售支架如COOK等公司的产品所需的最小工作钳道直径为3.7 mm, 由此限制了BAE镜下金属支架置入术的开展. 目前针对小肠狭窄(主要是恶性肿瘤所致)行金属支架置入术多由常规胃镜或结肠镜完成, 但由于常规胃镜或结肠镜镜身长度的限制, 仅能完成十二指肠或者回肠末端狭窄的支架置入. 在新的较大工作孔径BAE进入临床应用之前, 有学者尝试了经外套管行支架置入术并取得了成功<sup>[35,36]</sup>. BAE下进行小肠良性狭窄扩张应选用直径较大的外套管, 先将导丝送入狭窄处, 作

## ■ 相关报道

查阅文献, 国外在BAE治疗应用方面主要为小肠血管畸形、息肉以及克罗恩病小肠狭窄的扩张治疗, 但多为单中心少量病例报告, 有关操作技术规范均尚未统一. 国内开展BAE治疗小肠疾病尚在发展中, 有关文献报道不多, 也多为临床经验式的少量病例总结报告. 中国人民解放军空军总医院消化科应用BAE在小肠息肉切除, 尤其对Peutz-Jeghers综合征患者小肠错构瘤性息肉的镜下切除已积累200余例病例资料, 发表相关文章10余篇, 开展小肠狭窄扩张、金属支架置入术100余例, 有独到体会, 对不同病因所致小肠出血的BAE下治疗也积累了较多的临床应用经验.

### 创新盘点

本文所列典型病例皆来源于作者的临床实践, 结合典型病例介绍了应用BAE直视下治疗小肠疾病的技术特点和作者的体会, 图文并示, 并对相关国内外研究进展做了相应介绍和述评, 有助于临床医师, 尤其消化内镜医师了解BAE在小肠疾病治疗中的应用进展, 有助于促进BAE治疗技术的发展。

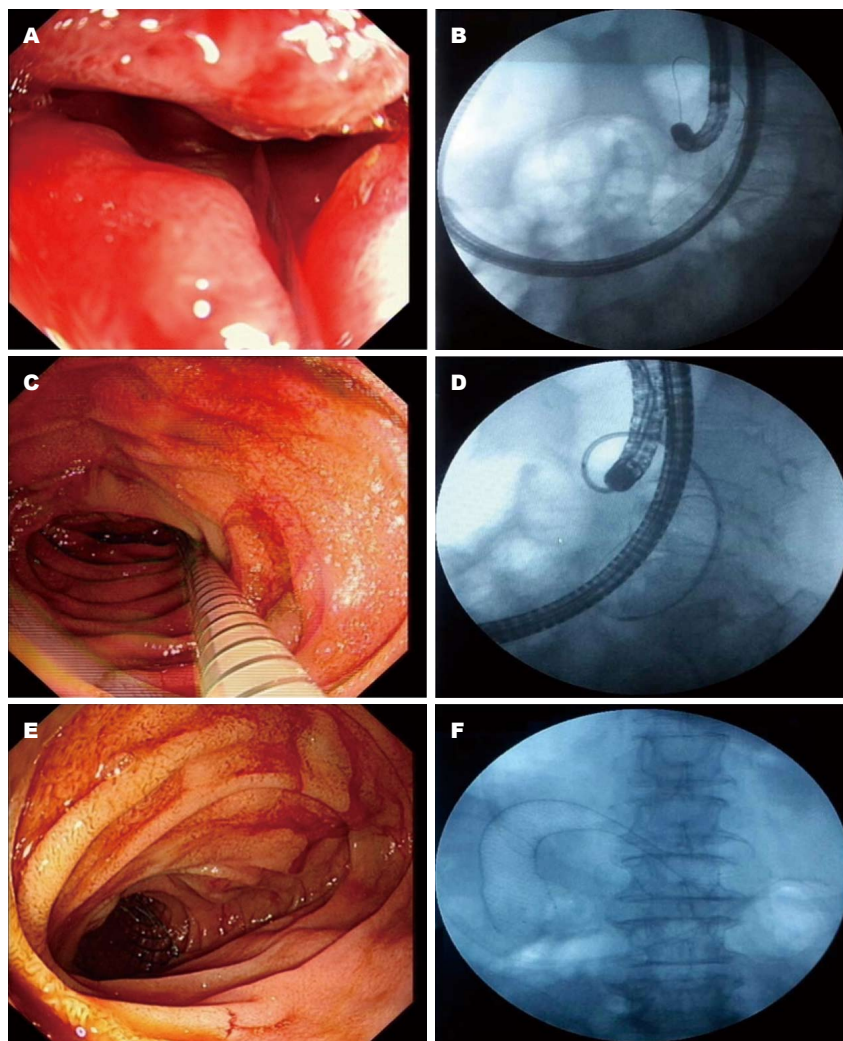


图2 小肠金属支架放置术。A: 患者经口BAE检查提示空肠上段恶性肿瘤伴梗阻, 行小肠金属支架置入术, BAE下导丝通过狭窄段; B: X线透视确认导丝通过狭窄段; C: 经结肠镜活检孔道送入金属支架; D: X线透视下打开金属支架; E: 释放后的金属支架; F: 金属支架置入成功后的X线影像。BAE: 气囊辅助内镜。

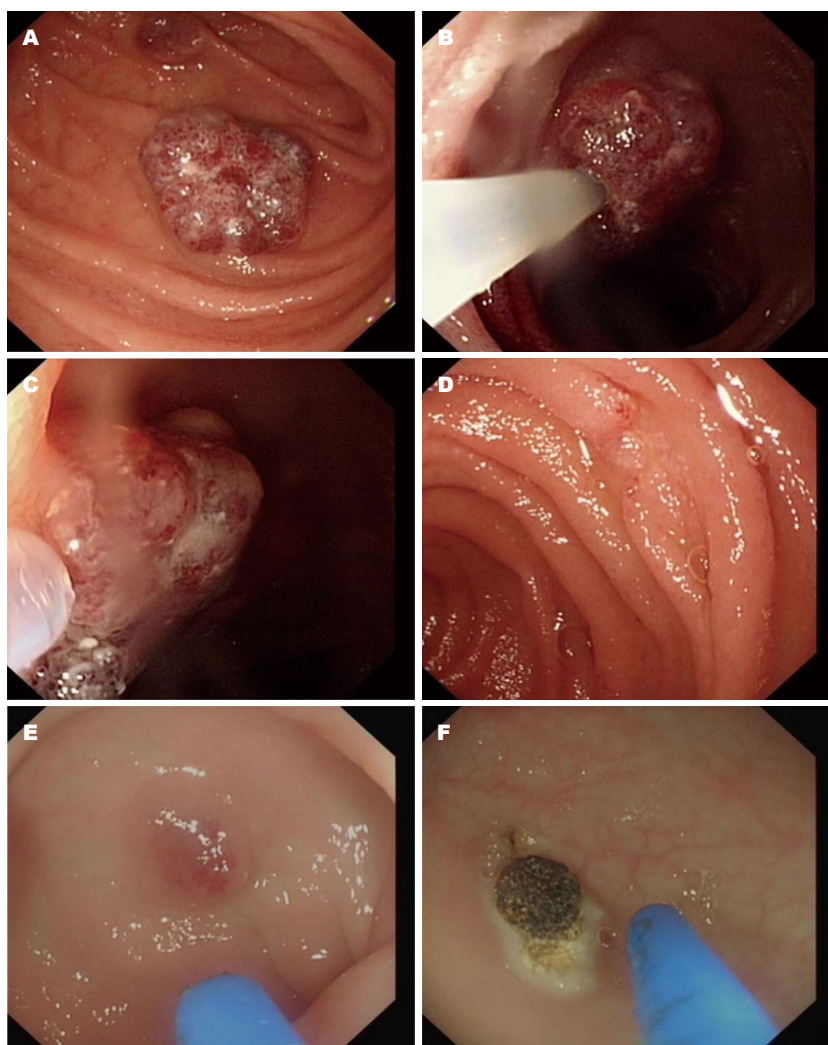
好标记后退出内镜, 沿导丝插入扩张球囊, 可在X线辅助定位下实行扩张, 或用大口径治疗内镜经钳道行直视下球囊扩张。中国人民解放军空军总医院消化内科也尝试了一种新的方法: 即在SBE引导下导入导丝并穿过狭窄部位, 然后利用结肠镜置入金属支架。我们尝试利用这种方法共为37例小肠恶性梗阻患者放置自膨式金属支架(self-expandable metal stent, SEMS)(图2显示SBE联合结肠镜行小肠支架置入术的一般程序, 为中国人民解放军空军总医院消化内科病例), 均为常规胃镜或结肠镜不能到达的较深部位小肠狭窄, 其中十二指肠22例, 近段空肠11例, 回肠远端3例。我们的经验显示利用这种方法行金属支架置入术的成功率为94%(34/36), 2例因导丝无法通过狭窄段未能放置成功; 成功置入支架者支架治疗的有

效率为88%(30/34), 2例支架未能有效撑开狭窄部, 2例支架放置术后形成角度过锐, 未能彻底解除梗阻。术后并发症多以一过性腹痛为主, 仅出现术后出血1例, 未见肠穿孔发生。

### 3 小肠出血性疾病的BAE镜下治疗

不明原因消化系出血是BAE检查最主要的适应症之一<sup>[37-39]</sup>。由于病因复杂, 主要包括血管发育不良或畸形、溃疡性病变、肿瘤、克罗恩病等。不明原因消化系出血的临床诊断和治疗均有一定困难。BAE的应用大大提高了不明原因消化系出血的诊断和治疗水平, 其不仅能够迅速明确出血原因及部位, 提高诊断准确性, 也能及时发现活动性出血灶并行内镜下止血治疗。文献报道不明原因消化系出血最常见原因是小肠血管性病变, 包括血





### 应用要点

通过典型病例展示的技术方法介绍, 不仅有助于消化内科医师对小肠疾病内镜诊断的认识, 更有助于提高消化内镜医师应用BAE治疗小肠疾病的技术水平, 使以往一些需行剖腹探查等外科手术治疗的的小肠疾病可应用BAE进行治疗, 在取得良好临床疗效的同时减少手术创伤和相关医疗费用。

图3 小肠出血性疾病的BAE镜下治疗。A: 患儿诊断为BRBNS, 在中国人民解放军空军总医院消化内科多次行BAE下治疗, BAE检查提示小肠内多发血管瘤; B: 行BAE下聚桂醇注射治疗; C: 聚桂醇注射后血管瘤发白并肿胀; D: 聚桂醇注射6 mo后血管瘤彻底消失并形成瘢痕; E、F: 对于微小血管瘤或聚桂醇注射后残留的微小血管瘤, 直接行APC凝固治疗。BRBNS: 蓝色橡皮疱痣综合征; BAE: 气囊辅助内镜。

管畸形、Dieulafoy溃疡等<sup>[40-43]</sup>。镜下治疗的方式包括APC、硬化剂注射、钛夹止血、热活钳钳热凝等。Hegde等<sup>[44]</sup>报道176例因小肠疾病患者共行216次BAE检查, 其中血管病变者占28.7%, 对这些患者实施BAE下治疗的总成功率为85.7%, 治疗后24和48 h内的并发症为0.9%, 无穿孔、胰腺炎或死亡病例。Cazzato等<sup>[45]</sup>对32例血管发育不良患者实行BAE下APC治疗获得成功止血。May等<sup>[46]</sup>对92例血管发育不良患者共行108次APC治疗, 其中4例联合肾上腺素注射治疗, 效果良好。2012年中国人民解放军空军总医院消化内科曾经收治1例诊断为蓝色橡皮疱痣综合征(blue rubber bleb nevus syndrome, BRBNS)的8岁患儿, 其胃肠道包括小肠遍布海绵状血

管瘤, 临床表现以反复的消化系出血为主<sup>[47]</sup>。我们应用BAE对该患儿实行多次小肠镜下海绵状血管瘤聚桂醇注射治疗, 一度有效控制了反复消化系出血的临床症状。但由于患儿体型较成人显著为小, 虽经多次检查均未能完成全小肠检查, 加之患儿年龄较小, 仍处于机体发育期, 其胃肠道内的血管瘤仍处于不断生长状态, 所以该患儿仍间断出现黑便等消化系出血症状。2014-05及2014-08, 患儿在中国人民解放军空军总医院消化内科分别两次接受BAE下治疗, 在这两次小肠镜治疗中, 我们对一些较小或聚桂醇注射治疗后残留的血管瘤加以APC烧灼, 结果显示其可有效毁损病灶且未见任何相关并发症发生(图3)。截止目前(2015-01), 该患儿未再出现黑便等症

## 名词解释

BAE: 双气囊小肠镜和单气囊小肠镜既可以诊治小肠疾病, 也可以诊治上消化道和结肠甚至胆胰器官的疾病, 因此在2006-08-05日本东京的第1届国际双气囊内镜会议上, 将双气囊小肠镜称之为双气囊内镜。以后, 将单气囊小肠镜又称作单气囊内镜。由于二者均有带气囊的外套管辅助进行操作, 故将其统称为“气囊辅助小肠镜”或“气囊辅助内镜”。其利用附加于镜身和外套管的气囊固定肠壁, 并与外套管的取直作用结合, 从而克服了小肠镜推进时所遇到的结襻和成角等问题, 使得对全小肠黏膜病变进行直接观察和镜下治疗得以实现。

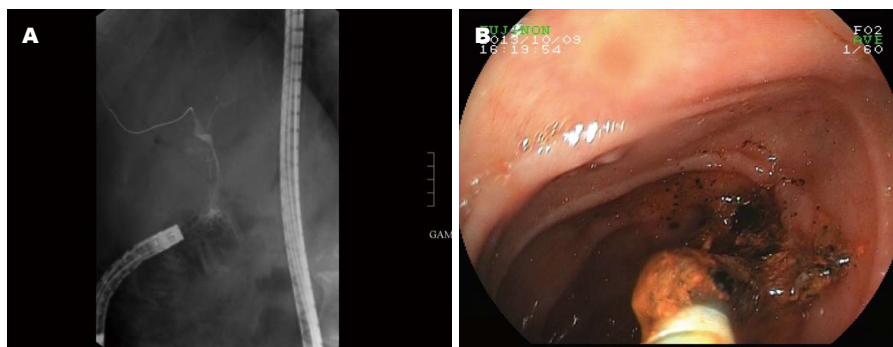


图4 BAE辅助下ERCP术。患者为Roux-en-Y胆肠吻合术后患者, 因胆道结石行BAE辅助下ERCP术, 术中给予球囊取石等治疗。A: 造影显示胆道结石; B: 行球囊取石治疗。BAE: 气囊辅助内镜; ERCP: 经内镜逆行胰胆管造影术。

状, 血红蛋白已恢复至正常水平, 本例治疗结果显示聚桂醇注射联合APC对于小肠血管瘤病变可能是一种更为有效而且安全的治疗方法。

## 4 BAE辅助下逆行胰胆管造影术

以十二指肠镜为基础的经内镜逆行胰胆管造影术(endoscopic retrograde cholangiopancreatography, ERCP)是目前诊治胆胰疾病的常规内镜技术。但是, 部分患者因胃肠道或胆管改道术后使其肠道解剖结构改变, 常规十二指肠镜下ERCP难以完成。BAE可插入小肠深部, 可在毕Ⅱ式手术、保留幽门的胰十二指肠切除术、肝移植合并胆管空肠Roux-en-Y吻合术、Whipple术联合Roux-en-Y重建等不同术后解剖结构中进行。通过BAE可直视或经胆管造影对十二指肠乳头、胆肠吻合口和胆系进行诊断, 也可实行球囊扩张、胆管支架置入、胆管取石和胰管病变的治疗。Koornstra等<sup>[48]</sup>综述了16项BAE下行ERCP的研究, 结果显示83%的患者可明确诊断, 其中35例行镜下治疗获得成功并且未发生严重并发症。国内李柯等<sup>[49]</sup>、金杭斌等<sup>[50]</sup>利用单气囊小肠镜插镜至病变部位后在保留外套管的同时退出小肠镜, 然后沿此外套管插入一条细径结肠镜到达病变部位, 通过该结肠镜的工作钳道成功完成胆道的插管、造影、吻合口切开及取石等。这一方法在用小肠插入后保留外套管, 在经由外套管插入常规结肠镜, 再利用常规ERCP附件完成手术, 具有简便易行等优点。但是, 由于结肠镜的长度及镜身前端角度等问题, 仍有部分消化系复杂手术后患者无法完成ERCP操作<sup>[51]</sup>。国内西京医院郭学刚教

授及梁树辉博士等也已完成了多例BAE辅助下ERCP术, 成功率100%, 且可进行内镜下取石、支架置入等治疗性干预, 无不良事件发生(图4为BAE辅助下ERCP术中图像, 由西京医院梁树辉博士提供)。目前BAE专用ERCP附件包括导管、扩张球囊等由于使用频次少, 价格昂贵且难以获得, 限制了BAE辅助下ERCP术的临床应用, 未来对BAE专用ERCP附件的开发和完善可能会进一步推动相关技术的发展及推广。

## 5 结论

经过十余年的临床应用, BAE已被证实为是一种安全、有效的小肠疾病诊疗手段, 其不仅实现了全小肠的直视性检查, 也可于镜下直接对病变进行干预治疗。但是, 目前开展BAE镜下治疗的医院还不多, 应用BAE治疗小肠相关疾病积累的病例数和实际经验也还不多, 对于BAE治疗小肠疾病的相关技术还有待于更多的临床实践和研究。

## 6 参考文献

- 1 Iddan G, Meron G, Glukhovskiy A, Swain P. Wireless capsule endoscopy. *Nature* 2000; 405: 417 [PMID: 10839527]
- 2 Meron GD. The development of the swallowable video capsule (M2A). *Gastrointest Endosc* 2000; 52: 817-819 [PMID: 11115933 DOI: 10.1067/mge.2000.110204]
- 3 Lewis BS, Swain P. Capsule endoscopy in the evaluation of patients with suspected small intestinal bleeding: Results of a pilot study. *Gastrointest Endosc* 2002; 56: 349-353 [PMID: 12196771 DOI: 10.1067/mge.2002.126906]
- 4 Mergener K, Ponchon T, Gralnek I, Pennazio M, Gay G, Selby W, Seidman EG, Cellier C, Murray J, de Franchis R, Rösch T, Lewis BS. Literature review and recommendations for clinical



- application of small-bowel capsule endoscopy, based on a panel discussion by international experts. Consensus statements for small-bowel capsule endoscopy, 2006/2007. *Endoscopy* 2007; 39: 895-909 [PMID: 17968807]
- 5 May A, Manner H, Schneider M, Ipsen A, Ell C. Prospective multicenter trial of capsule endoscopy in patients with chronic abdominal pain, diarrhea and other signs and symptoms (CEDAP-Plus Study). *Endoscopy* 2007; 39: 606-612 [PMID: 17611915 DOI: 10.1055/s-2007-966640]
  - 6 袁晋华, 辛磊, 廖专, 李兆申. 胶囊内镜全小肠检查的研究进展. *世界华人消化杂志* 2010; 18: 3662-3666
  - 7 Yamamoto H, Sekine Y, Sato Y, Higashizawa T, Miyata T, Iino S, Ido K, Sugano K. Total enteroscopy with a nonsurgical steerable double-balloon method. *Gastrointest Endosc* 2001; 53: 216-220 [PMID: 11174299 DOI: 10.1067/mge.2001.112181]
  - 8 Yamamoto H, Sugano K. A new method of enteroscopy--the double-balloon method. *Can J Gastroenterol* 2003; 17: 273-274 [PMID: 12704472]
  - 9 Yamamoto H, Kita H, Sunada K, Hayashi Y, Sato H, Yano T, Iwamoto M, Sekine Y, Miyata T, Kuno A, Ajibe H, Ido K, Sugano K. Clinical outcomes of double-balloon endoscopy for the diagnosis and treatment of small-intestinal diseases. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2004; 2: 1010-1016 [PMID: 15551254 DOI: 10.1016/S1542-3565(04)00453-7]
  - 10 May A, Nachbar L, Ell C. Double-balloon enteroscopy (push-and-pull enteroscopy) of the small bowel: feasibility and diagnostic and therapeutic yield in patients with suspected small bowel disease. *Gastrointest Endosc* 2005; 62: 62-70 [PMID: 15990821 DOI: 10.1016/S0016-5107(05)01586-5]
  - 11 Ramchandani M, Reddy DN, Gupta R, Lakhtakia S, Tandan M, Rao GV, Darisetty S. Diagnostic yield and therapeutic impact of single-balloon enteroscopy: series of 106 cases. *J Gastroenterol Hepatol* 2009; 24: 1631-1638 [PMID: 19686408 DOI: 10.1111/j.1440-1746.2009.05936.x]
  - 12 Takano N, Yamada A, Watabe H, Togo G, Yamaji Y, Yoshida H, Kawabe T, Omata M, Koike K. Single-balloon versus double-balloon endoscopy for achieving total enteroscopy: a randomized, controlled trial. *Gastrointest Endosc* 2011; 73: 734-739 [PMID: 21272875 DOI: 10.1016/j.gie.2010.10.047]
  - 13 May A, Färber M, Aschmoneit I, Pohl J, Manner H, Lotterer E, Möschler O, Kunz J, Gossner L, Mönkemüller K, Ell C. Prospective multicenter trial comparing push-and-pull enteroscopy with the single- and double-balloon techniques in patients with small-bowel disorders. *Am J Gastroenterol* 2010; 105: 575-581 [PMID: 20051942 DOI: 10.1038/ajg.2009.712]
  - 14 宁守斌, 毛高平, 唐杰, 金晓维, 银新. Peutz-Jeghers综合征患者小肠息肉的双气囊小肠镜治疗. *胃肠病学* 2009; 14: 465-468
  - 15 袁柏思, 汪芳裕. Peutz-Jeghers综合征小肠息肉的诊治现状和药物治疗进展. *胃肠病学和肝脏病学杂志* 2013; 22: 185-191
  - 16 尹合坤, 李联杰, 李启祥, 吴海恩. 经口双气囊小肠镜对不全性黏连性小肠梗阻的治疗价值. *广东医学* 2014; 35: 1373-1375
  - 17 汪芳裕, 刘炯, 路又可, 刘畅, 金鑫鑫, 万海军, 周淑萍, 袁柏思. Peutz-Jeghers综合征息肉的内镜下治疗及其病理特征分析. *中华消化内镜杂志* 2012; 29: 696-697
  - 18 组站飞, 毛高平, 张亚飞, 宁守斌. 气囊辅助小肠镜对Peutz-Jeghers综合征患者小肠息肉治疗的安全性评价. *世界华人消化杂志* 2014; 22: 2525-2531
  - 19 Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND, editor. WHO classification of tumors of the digestive system. 4ed. Lyon: IARC Press: 2010
  - 20 Beggs AD, Latchford AR, Vasen HF, Moslein G, Alonso A, Aretz S, Bertario L, Blanco I, Bülow S, Burn J, Capella G, Colas C, Friedl W, Möller P, Hes FJ, Järvinen H, Mecklin JP, Nagengast FM, Parc Y, Phillips RK, Hyer W, Ponz de Leon M, Renkonen-Sinisalo L, Sampson JR, Stormorken A, Tejpar S, Thomas HJ, Wijnen JT, Clark SK, Hodgson SV. Peutz-Jeghers syndrome: a systematic review and recommendations for management. *Gut* 2010; 59: 975-986 [PMID: 20581245 DOI: 10.1136/gut.2009.198499]
  - 21 Utsunomiya J, Gocho H, Miyanaga T, Hamaguchi E, Kashimura A. Peutz-Jeghers syndrome: its natural course and management. *Johns Hopkins Med J* 1975; 136: 71-82 [PMID: 1117595]
  - 22 Ohmiya N, Taguchi A, Shirai K, Mabuchi N, Arakawa D, Kanazawa H, Ozeki M, Yamada M, Nakamura M, Itoh A, Hirooka Y, Niwa Y, Nagasaka T, Ito M, Ohashi S, Okamura S, Goto H. Endoscopic resection of Peutz-Jeghers polyps throughout the small intestine at double-balloon enteroscopy without laparotomy. *Gastrointest Endosc* 2005; 61: 140-147 [PMID: 15672077]
  - 23 Gao H, van Lier MG, Poley JW, Kuipers EJ, van Leerdam ME, Mensink PB. Endoscopic therapy of small-bowel polyps by double-balloon enteroscopy in patients with Peutz-Jeghers syndrome. *Gastrointest Endosc* 2010; 71: 768-773 [PMID: 20188368 DOI: 10.1016/j.gie.2009.11.005]
  - 24 Ohmiya N, Nakamura M, Takenaka H, Morishima K, Yamamura T, Ishihara M, Miyahara R, Kawashima H, Itoh A, Hirooka Y, Watanabe O, Ando T, Goto H. Management of small-bowel polyps in Peutz-Jeghers syndrome by using enteroclysis, double-balloon enteroscopy, and videocapsule endoscopy. *Gastrointest Endosc* 2010; 72: 1209-1216 [PMID: 20970791 DOI: 10.1016/j.gie.2010.08.018]
  - 25 Sakamoto H, Yamamoto H, Hayashi Y, Yano T, Miyata T, Nishimura N, Shinhata H, Sato H, Sunada K, Sugano K. Nonsurgical management of small-bowel polyps in Peutz-Jeghers syndrome with extensive polypectomy by using double-balloon endoscopy. *Gastrointest Endosc* 2011; 74: 328-333 [PMID: 21704992 DOI: 10.1016/j.gie.2011.04.001]
  - 26 May A, Nachbar L, Pohl J, Ell C. Endoscopic interventions in the small bowel using double balloon enteroscopy: feasibility and limitations. *Am J Gastroenterol* 2007; 102: 527-535 [PMID: 17222315 DOI: 10.1111/j.1572-0241.2007.01063.

## 同行评价

本文就BAE在小肠疾病的治疗进行了相关的分析, 以典型病例的方式介绍目前BAE在小肠息肉切除、小肠狭窄扩张及支架置入术、小肠出血性疾病的BAE镜下治疗及BAE辅助下经内镜逆行胰胆管造影术等的治疗, 图文资料翔实可靠, 为小肠疾病相关的治疗拓宽了视野和思路, 有一定的创新性。

- x]
- 27 Ross AS, Dye C, Prachand VN. Laparoscopic-assisted double-balloon enteroscopy for small-bowel polyp surveillance and treatment in patients with Peutz-Jeghers syndrome. *Gastrointest Endosc* 2006; 64: 984-988 [PMID: 17140910]
- 28 赵杰, 宁守斌, 毛高平, 张静, 金晓维, 唐杰, 朱鸣, 曹传平. 双气囊小肠镜在不完全性肠梗阻中的诊疗作用. *世界华人消化杂志* 2012; 20: 524-527
- 29 杜奕奇, 王小璇, 陈洁, 徐灿, 苏曦, 席银珍, 吴仁培, 李兆申. 单气囊小肠镜下球囊扩张术治疗克罗恩病伴小肠狭窄初步临床研究. *中华消化杂志* 2012; 32: 379-383
- 30 Sabaté JM, Villarejo J, Bouhnik Y, Allez M, Gornet JM, Vahedi K, Modigliani R, Lémann M. Hydrostatic balloon dilatation of Crohn's strictures. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 18: 409-413 [PMID: 12940926 DOI: 10.1046/j.1365-2036.2003.01715.x]
- 31 Pasha SF, Leighton JA. Enteroscopy in the diagnosis and management of Crohn disease. *Gastrointest Endosc Clin N Am* 2009; 19: 427-444 [PMID: 19647650 DOI: 10.1016/j.giec.2009.04.004]
- 32 Sunada K, Yamamoto H, Kita H, Yano T, Sato H, Hayashi Y, Miyata T, Sekine Y, Kuno A, Iwamoto M, Ohnishi H, Ido K, Sugano K. Clinical outcomes of enteroscopy using the double-balloon method for strictures of the small intestine. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 1087-1089 [PMID: 15742422 DOI: 10.3748/wjg.v11.i7.1087]
- 33 Ohmiya N, Arakawa D, Nakamura M, Honda W, Shirai O, Taguchi A, Itoh A, Hirooka Y, Niwa Y, Maeda O, Ando T, Goto H. Small-bowel obstruction: diagnostic comparison between double-balloon endoscopy and fluoroscopic enteroclysis, and the outcome of enteroscopic treatment. *Gastrointest Endosc* 2009; 69: 84-93 [PMID: 19111689 DOI: 10.1016/j.gie.2008.04.067]
- 34 Despott EJ, Gupta A, Burling D, Tripoli E, Konieczko K, Hart A, Fraser C. Effective dilation of small-bowel strictures by double-balloon enteroscopy in patients with symptomatic Crohn's disease (with video). *Gastrointest Endosc* 2009; 70: 1030-1036 [PMID: 19640518 DOI: 10.1016/j.gie.2009.05.005]
- 35 Fukumoto A, Tanaka S, Yamamoto H, Yao T, Matsui T, Iida M, Goto H, Sakamoto C, Chiba T, Sugano K. Diagnosis and treatment of small-bowel stricture by double balloon endoscopy. *Gastrointest Endosc* 2007; 66: S108-S112 [PMID: 17709019 DOI: 10.1016/j.gie.2007.02.027]
- 36 Lee H, Park JC, Shin SK, Lee SK, Lee YC. Preliminary study of enteroscopy-guided, self-expandable metal stent placement for malignant small bowel obstruction. *J Gastroenterol Hepatol* 2012; 27: 1181-1186 [PMID: 22414138 DOI: 10.1111/j.1440-1746.2012.07113.x]
- 37 Suzuki T, Matsushima M, Okita I, Ito H, Gocho S, Tajima H, Tokiwa K, Teraoka H, Watanabe K, Shirai T, Mine T. Clinical utility of double-balloon enteroscopy for small intestinal bleeding. *Dig Dis Sci* 2007; 52: 1914-1918 [PMID: 17410439 DOI: 10.1007/s10620-007-9749-9]
- 38 Mönkemüller K, Fry LC, Neumann H, Rickes S, Malfertheiner P. [Diagnostic and therapeutic utility of double balloon endoscopy: experience with 225 procedures]. *Acta Gastroenterol Latinoam* 2007; 37: 216-223 [PMID: 18254259 DOI: 10.1016/j.Tgie.2007.12.007]
- 39 Nakase H, Matsuura M, Mikami S, Chiba T. Diagnosis and treatment of obscure GI bleeding with double balloon endoscopy. *Gastrointest Endosc* 2007; 66: S78-S81 [PMID: 17709040 DOI: 10.1016/j.gie.2007.05.041]
- 40 Raju GS, Gerson L, Das A, Lewis B. American Gastroenterological Association (AGA) Institute technical review on obscure gastrointestinal bleeding. *Gastroenterology* 2007; 133: 1697-1717 [PMID: 17983812 DOI: 10.1053/j.gastro.2007.06.007]
- 41 Carey EJ, Leighton JA, Heigh RI, Shiff AD, Sharma VK, Post JK, Fleischer DE. A single-center experience of 260 consecutive patients undergoing capsule endoscopy for obscure gastrointestinal bleeding. *Am J Gastroenterol* 2007; 102: 89-95 [PMID: 17100969 DOI: 10.1111/j.1572-0241.2006.00941.x]
- 42 毛旭燕, 张亚飞, 毛高平, 宁守斌. 气囊辅助内镜与胶囊内镜对不明原因消化系出血的不同诊断价值. *世界华人消化杂志* 2014; 22: 5360-5364
- 43 Teshima CW. Small bowel endoscopy for obscure GI bleeding. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2012; 26: 247-261 [PMID: 22704568 DOI: 10.1016/j.bpg.2012.01.020]
- 44 Hegde SR, Iffrig K, Li T, Downey S, Heller SJ, Tokar JL, Haluszka O. Double-balloon enteroscopy in the elderly: safety, findings, and diagnostic and therapeutic success. *Gastrointest Endosc* 2010; 71: 983-989 [PMID: 20189563 DOI: 10.1016/j.gie.2009.10.054]
- 45 Cazzato IA, Cammarota G, Nista EC, Cesaro P, Sparano L, Bonomo V, Gasbarrini GB, Gasbarrini A. Diagnostic and therapeutic impact of double-balloon enteroscopy (DBE) in a series of 100 patients with suspected small bowel diseases. *Dig Liver Dis* 2007; 39: 483-487 [PMID: 17379586 DOI: 10.1016/j.dld.2007.01.019]
- 46 May A, Manner H, Aschmoneit I, Ell C. Prospective, cross-over, single-center trial comparing oral double-balloon enteroscopy and oral spiral enteroscopy in patients with suspected small-bowel vascular malformations. *Endoscopy* 2011; 43: 477-483 [PMID: 21437852 DOI: 10.1055/s-0030-1256340]
- 47 Ning S, Zhang Y, Zu Z, Mao X, Mao G. Enteroscopic sclerotherapy in blue rubber bleb nevus syndrome. *Pak J Med Sci* 2015; 31: 226-228 [PMID: 25878650 DOI: 10.12669/pjms.311.5858]
- 48 Koornstra JJ, Fry L, Mönkemüller K. ERCP with the balloon-assisted enteroscopy technique: a systematic review. *Dig Dis* 2008; 26: 324-329 [PMID: 19188723 DOI: 10.1159/000177017]
- 49 李柯, 黄永辉, 姚炜, 常虹, 宋志强, 黄雪彪. 气囊辅助内镜技术诊治消化道复杂手术后胰胆疾病的初步探索. *中华消化内镜杂志* 2012; 29: 381-385
- 50 金杭斌, 张筱凤, 李舒丹, 杨建锋, 顾伟刚, 楼奇峰. 单气囊小肠镜辅助下经内镜逆行胰胆管造影术对胃

肠改道术后并发胆管梗阻的诊治价值. 中华消化内镜杂志 2013; 30: 499-502

51 Li K, Huang YH, Yao W, Chang H, Huang XB, Zhang YP, Song ZQ. Adult colonoscopy or single-

balloon enteroscopy-assisted ERCP in long-limb surgical bypass patients. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2014; 38: 513-519 [PMID: 24560303 DOI: 10.1016/j.clinre.2014.01.006]

编辑: 郭鹏 电编: 都珍珍



ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) DOI: 10.11569 2015年版权归百世登出版集团有限公司所有

## •消息•

### 《世界华人消化杂志》消化护理学领域征稿启事

**本刊讯** 为了促进消化护理学领域的事业发展,《世界华人消化杂志》已成立消化护理学编辑委员会. 将主要报道消化护理学的基础研究, 临床研究, 临床护理实践和护理管理等原始和综述性文章.

《世界华人消化杂志》成立消化护理学编辑委员会, 由周谊霞副教授([http://www.wjgnet.com/1009-3079/edboard\\_706.htm](http://www.wjgnet.com/1009-3079/edboard_706.htm))等77位专家组成, 分布在24个省市. 其中上海市11位, 陕西省8位, 山东省7位, 黑龙江省7位, 辽宁省6位, 北京市5位, 广东省5位, 河北省3位, 贵州省3位, 湖北省2位, 浙江省2位, 四川省2位, 福建省2位, 江苏省2位, 云南省2位, 新疆维吾尔自治区2位, 甘肃省1位, 海南省1位, 江西省1位, 山西省1位, 天津市1位, 安徽省1位, 河南省1位和吉林省1位. 均来自高等院校和附属医院, 其中主任护师16位, 教授1位, 副主任护师49位, 副教授4位, 主管护师7位.

《世界华人消化杂志》是一本高质量的同行评议, 开放获取和在线出版的一份学术刊物. 我们真心欢迎消化内科, 消化外科等领域从事护理学工作者积极宣传和踊跃投稿至《世界华人消化杂志》. 请在线投稿, 网址见: <http://www.baishideng.com/wcjd/ch/index.aspx>

《世界华人消化杂志》2014年收到自由投稿和约稿2192篇. 出版手稿937篇(42.7%), 退稿1220篇(55.7%). 邀请476位编委参与同行评议.

《世界华人消化杂志》被国际检索系统美国《化学文摘》(Chemical Abstracts, CA)、荷兰《医学文摘库/医学文摘(EMBASE/Excerpta Medica, EM)》和俄罗斯《文摘杂志(Abstract Journal, AJ)》收录.

《世界华人消化杂志》由百世登出版集团有限公司(Baishideng Publishing Group, BPG)编辑和出版. BPG主要从事43种国际性生物医学刊物的编辑和出版工作, 包括旗舰刊物《世界胃肠病学杂志(*World Journal of Gastroenterology*, WJG)》. (郭鹏)

## 结直肠癌基因DNA甲基化标志物筛查的价值

薛猛, 王良静

### ■背景资料

结直肠癌是消化系统最常见的恶性肿瘤之一, 给我国人民生活带来巨大的家庭和经济负担。甲基化是肿瘤发生发展中的早期事件, 近年来的临床研究在结直肠癌患者的血液、粪便等非侵入性检测可取得的标本中检测到一系列启动子高甲基化的基因。这些指标对结直肠癌诊断的敏感性和特异性均明显优于传统筛查指标如血癌胚抗原和粪便潜血等, 提示在结直肠癌筛查领域应用的诱人前景。

薛猛, 王良静, 浙江大学医学院附属第二医院消化内科 浙江大学胃肠病研究所 浙江省杭州市 310009  
王良静, 主任医师, 研究员, 博士生导师, 主要从事胃肠道肿瘤的早期诊断和干预的基础与临床研究。

国家自然科学基金资助项目, Nos. 81472214, 8130207, 81272678

浙江省科技创新团队基金资助项目, No. 2013TD13

作者贡献分布: 王良静负责述评结构设计和文章修改; 薛猛负责文献检索和文章写作。

通讯作者: 王良静, 主任医师, 研究员, 博士生导师, 310009, 浙江省杭州市解放路88号, 浙江大学医学院附属第二医院消化内科, 浙江大学胃肠病研究所. wanglj76@hotmail.com  
电话: 0571-86006788

收稿日期: 2015-04-28 修回日期: 2015-05-21

接受日期: 2015-06-01 在线出版日期: 2015-10-18

### Value of DNA methylation markers in colorectal cancer screening

Meng Xue, Liang-Jing Wang

Meng Xue, Liang-Jing Wang, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital, School of Medicine and Institute of Gastroenterology, Zhejiang University, Hangzhou 310009, Zhejiang Province, China  
Supported by: National Natural Science Foundation of China, Nos. 81472214, 8130207 and 81272678; Science and Technology Innovation Team of Zhejiang Province, No. 2013TD13

Correspondence to: Liang-Jing Wang, Chief Physician, Researcher, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital, School of Medicine and Institute of Gastroenterology, Zhejiang University, 88 Jiefang Road, Hangzhou 310009, Zhejiang Province, China. wanglj76@hotmail.com

Received: 2015-04-28 Revised: 2015-05-21

Accepted: 2015-06-01 Published online: 2015-10-18

### Abstract

Colorectal cancer (CRC) is one of the most common malignant tumors in the world. Recognizing CRC at an early stage by

population-based screening is crucial in the prevention and treatment of CRC. Numerous candidate genes, which play important roles in the development and progression of CRC, have been found to be hyper-methylated in the promoter regions in recent studies. The promoter fragments of those hyper-methylated genes in tumor tissues have also been detected in the blood and fecal specimens, with higher sensitivity and specificity than traditional markers in the screening of CRC, including carcino-embryonic antigen (CEA) and fecal occult blood test. Here, we will discuss what we have already known about the DNA methylation markers for CRC screening and the potential research direction in the future.

© 2015 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: Colorectal cancer; DNA methylation; Screening

Xue M, Wang LJ. Value of DNA methylation markers in colorectal cancer screening. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2015; 23(29): 4626-4635 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/23/4626.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v23.i29.4626>

### 摘要

结直肠癌是全球最常见的恶性肿瘤之一, 通过人群早期筛查和诊断结直肠癌是疾病防治的关键。近年来发现了一系列启动子高甲基化的相关基因, 在结直肠癌的发生发展中发挥着重要的作用。多数在肿瘤组织中发生高甲基化基因的启动子片段在血液、粪便标本中同样被检测到。这些高甲基化基因对结直肠癌诊断的敏感性和特异性均明显优

### ■同行评议者

邓安梅, 教授, 主任医师, 长海医院; 白雪, 副主任医师, 中国人民解放军北京军区总医院普外科



于传统筛查指标如血癌胚抗原和粪便潜血等. 本文将重点介绍目前结直肠癌基因DNA甲基化标志物筛查的研究进展以及将来可能的研究方向.

© 2015年版权归百世登出版集团有限公司所有.

关键词: 结直肠癌; DNA甲基化; 筛查

**核心提示:** 结直肠癌患者血液、粪便标本中包含细胞质分裂基因9(*Septin9*)、分泌型卷曲相关蛋白2(secreted frizzled related protein 2)在内多个基因甲基化的检出率明显高于健康对照者. 甚至早在TNM 1期或Duke A期结直肠癌患者中也能检测到高甲基化的DNA片段. 将不同基因的甲基化检测和突变、血红蛋白等指标结合起来综合分析可进一步提高检测的敏感性.

薛猛, 王良静. 结直肠癌基因DNA甲基化标志物筛查的价值. 世界华人消化杂志 2015; 23(29): 4626-4635 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/23/4626.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v23.i29.4626>

## 0 引言

结直肠癌是消化系最常见的恶性肿瘤之一, 50岁以下年轻人群出现结直肠癌的比例也有明显的增加<sup>[1]</sup>. 我国结直肠癌的发病率低于西方国家, 但在一些结直肠癌高发区域, 其发病率已接近胃癌和肝癌<sup>[2]</sup>. 然而多数患者在诊断时已进展到晚期, 部分患者丧失了手术根治的机会. 因此, 寻找和建立结直肠癌筛查和早期诊断的有效手段是研究热点.

粪便潜血、血清肿瘤标志物[如癌胚抗原(carcino embryonic antigen, CEA)]是目前结直肠癌非侵入性筛查的主要手段. 然而, 其诊断效率和准确性仍不甚令人满意<sup>[3]</sup>. 结直肠镜侵入性检查的准确性相对较高, 却因其检查前肠道准备和检查过程的不适感而难以在人群中大规模开展<sup>[4]</sup>. 基因DNA高甲基化是结直肠癌发生发展中的一个早期事件, 既往在结直肠癌肿瘤组织的研究已筛选到大量异常启动子区高甲基化的基因<sup>[5]</sup>. 然而, 由于肿瘤组织取材的不便而不适合用于人群中筛查. 近十年来, 随着DNA甲基化检测技术的不断改进, 血液、粪便、尿液等标本中均可检测到不同基因DNA高频率甲基化, 使其应用于结直肠癌筛查成为可能<sup>[6]</sup>. 本文将对近年来结直肠癌

DNA甲基化标志物的筛查方法和临床价值做一综述.

## 1 结直肠癌单基因甲基化检测

错配修复基因1(*mutl* homolog 1, *MLH1*)是结直肠癌中最早报道的异常血液基因DNA甲基化指标. 2001年的一项研究<sup>[7]</sup>对18例结直肠癌患者血清中提取的DNA进行甲基化特异性PCR检测, 有3例检测到高甲基化的*MLH1*. 此后, 在结直肠癌患者的血液样本中, 检测到不同基因启动子的异常甲基化<sup>[7-35]</sup>(表1), 如细胞周期蛋白依赖激酶抑制剂2A(cyclin-dependent kinase inhibitor 2A, *CDKN2A*)<sup>[10]</sup>、无芒相关同源盒基因4(*aristaless-like homeobox 4*, *ALX4*)<sup>[13]</sup>、Runt相关转录因子3(Runt-related transcription factor 3, *RUNX3*)<sup>[11]</sup>等, 其甲基化的频率均明显高于健康对照者. Epi proColon是最早商业化并进入临床试验, 以细胞质分裂基因9(*Septin9*)基因为基础开发的甲基化检测试剂盒. Tóth等<sup>[22]</sup>采用Epi proColon对结直肠癌和健康对照患者的血浆进行甲基化检测, 92例患者血浆中甲基化*Septin9*的阳性率高达95.7%(88/92), 而无肿瘤的对照者的阳性率仅为15.2%(14/92). 在随后两项类似的研究<sup>[24,25]</sup>中, 虽然结直肠癌患者血浆*Septin9*甲基化的比例低于这项研究, 但仍明显高于健康对照者.

全身各部位器官的恶性肿瘤均会引起血液中甲基化指标的异常. 因此, 血液中一些甲基化的指标并不能特异性地反映来源于结直肠癌. 此外, 在结直肠癌的早期阶段, 释放到血液循环中的异常甲基化片段含量过低而难以检测出来. 而在早期或晚期的结直肠癌中, 均有一定量的异常甲基化片段从癌肿病灶脱落到粪便中<sup>[21]</sup>. 因此, 粪便DNA甲基化的指标可能在结直肠癌的早期诊断中更有意义. Müller等<sup>[36]</sup>在2004年发表的研究结果最早对结直肠癌患者的粪便DNA甲基化指标进行了报道. 此研究采用了一种高通量的甲基化定量MethyLight检测方法, 对粪便中提取的DNA进行10个基因的甲基化检测, 发现结直肠癌患者中分泌型卷曲相关蛋白2(secreted frizzled related protein 2, *SFRP2*)、孕激素受体(progesterone receptor, *PGR*)和*SFRP5*基因的出现甲基化的比例明显高于正常对照人群. 此后, 其他研究在结直肠癌患者的粪便中鉴定了更

## ■ 研究前沿

当前在结直肠癌患者血液、粪便中有大量启动子高甲基化的基因被鉴定出来, 系统分析这些指标来综合预测评判结直肠癌风险的大小是未来可能的研究方向.

■ 相关报道

Zitt等详细总结了结直肠癌筛查工作中, 粪便血、结肠镜、甲基化等方法优缺点、推荐筛查频率等, Ganepola等则对各种方法的花费情况进行了总结。

表 1 结直肠癌筛查中血液为基础的甲基化指标

基因	作者, 年份	标本类型	检测方法	健康对照		结直肠癌		AUC 面积	P值
				总例数	甲基化n(%)	总例数	甲基化n(%)		
单基因									
MLH1	Grady, 2001	血清	MSP	N/A	N/A	18	3(16.7)	N/A	N/A
	Leung, 2005	血清	MethyLight	N/A	N/A(2.4)	N/A	N/A(42.9)	0.71	0.001
	Wallner, 2006	血清	MethyLight	20	0(0.0)	103	13(12.6)	N/A	0.090
CDKN2A	Zou, 2002	血清	MSP	10	0(0.0)	20	14(70.0)	N/A	0.001
	Tan, 2007	血浆	MSP	10	0(0.0)	17	12(70.6)	N/A	0.001
CDH4	Miotto, 2004	全血	MSP	17	0(0.0)	46	32(69.6)	N/A	0.001
HLTF	Leung, 2005	血清	MethyLight	N/A	N/A(7.3)	N/A	N/A(32.7)	0.63	0.015
	Wallner, 2006	血清	MethyLight	20	0(0.0)	103	31(30.1)	N/A	0.005
APC	Leung, 2005	血清	MethyLight	N/A	N/A(0.0)	N/A	N/A(6.1)	0.53	0.210
ALX4	Ebert, 2006	血清	qMSP	30	9(30.0)	20	25(83.3)	0.84	0.001
	Tänzer, 2010	血浆	MethyLight	22	13(59.1)	5	4(80.0)	N/A	0.289
	He, 2010	血浆	MethyLight	170	11(6.5)	182	87(47.8)	N/A	0.001
HPP1	Wallner, 2006	血清	MethyLight	20	0(0.0)	103	24(23.3)	N/A	0.016
RUNX3	Tan, 2007	血浆	MSP	10	0(0.0)	17	11(64.7)	N/A	0.001
RASSF1a	Tan, 2007	血浆	MSP	10	0(0.0)	17	4(23.5)	N/A	0.097
	Cassinotti, 2012	血浆	Methyl-microarray	30	17(56.7)	30	26(86.7)	N/A	0.010
CDH1	Tan, 2007	血浆	MSP	10	0(0.0)	17	3(17.6)	N/A	0.159
Septin9	Lofton-Day, 2008	血浆	qMSP	179	25(14.0)	133	92(69.2)	0.8	0.001
	Grützmann, 2008	血浆	qMSP	285	25(8.8)	378	193(51.1)	N/A	0.001
	deVos, 2009	血浆	qMSP	327	45(13.8)	187	138(73.8)	N/A	0.001
	Tänzer, 2010	血浆	MethyLight	34	4(11.8)	33	27(81.8)	N/A	0.001
	He, 2010	血浆	MethyLight	170	6(3.5)	182	136(74.7)	N/A	0.001
	Warren, 2011	血浆	qMSP	94	11(11.7)	50	45(90.0)	N/A	0.001
	Ahlquist, 2012	血浆	qMSP	48	13(27.1)	30	18(60.0)	N/A	0.004
	Tóth, 2012	血浆	Epi proColon	92	14(15.2)	92	88(95.7)	N/A	0.001
	Su, 2014	全血	MSP	62	4(6.5)	172	152(88.4)	N/A	0.001
	Church, 2014	血浆	Epi proColon	1457	126(8.6)	53	27(50.9)	N/A	0.001
	Potter, 2014	血浆	Epi proColon	444	97(21.8)	44	30(68.2)	N/A	0.001
TMEFF2	Lofton-Day, 2008	血浆	qMSP	179	55(30.7)	133	86(64.7)	0.72	0.001
	He, 2010	血浆	MethyLight	170	8(4.7)	182	129(70.9)	N/A	0.001
Vimentin	Li, 2009	血浆	Methyl-BEAMing	110	8(5.3)	81	48(40.9)	0.81	0.001
Wif-1	Lee, 2009	血浆	MSP	276	26(9.4)	243	89(36.6)	0.64	0.001
AKAP12	Liu, 2010	血清	MS-HRM	50	4(8.0)	100	48(48.0)	N/A	0.001
SFRP2	Tang, 2011	血浆	MSP	30	0(0.0)	169	113(66.9)	N/A	0.001
NeuroG1	Herbst, 2011	血清	MethyLight	45	9(20.0)	97	61(62.9)	0.73	0.001
TFPI2	Hibi, 2011	血清	qMSP	20	0(0.0)	215	39(18.1)	N/A	0.037
DLC1	Wu, 2011	血清	MSP	45	4(8.9)	85	36(42.4)	N/A	0.001
CYCD2	Cassinotti, 2012	血浆	Methyl-microarray	30	14(46.7)	30	28(93.3)	N/A	0.001
HIC1	Cassinotti, 2012	血浆	Methyl-microarray	30	2(6.7)	30	19(63.3)	N/A	0.001
PAX5	Cassinotti, 2012	血浆	Methyl-microarray	30	19(63.3)	30	29(96.7)	N/A	0.001
RB1	Cassinotti, 2012	血浆	Methyl-microarray	30	14(46.7)	30	27(90.0)	N/A	0.001
SRBC	Cassinotti, 2012	血浆	Methyl-microarray	30	2(6.7)	30	10(33.3)	N/A	0.01
SDC2	Oh, 2013	血清	qMSP	125	6(4.8)	131	114(87.0)	N/A	0.001
Rassf2	Lyu, 2014	血清	MSP	59	0(0.0)	59	16(27.1)	N/A	0.001
SFRP1	Lyu, 2014	血清	MSP	59	0(0.0)	59	18(30.5)	N/A	0.001
CHAM	Pedersen, 2014	血浆	qMSP	74	5(6.8)	73	40(54.8)	N/A	0.001

MSP: 甲基化特异性PCR; MethyLight: 荧光定量甲基化; qMSP: 定量MSP; Methyl-microarray: 甲基化微阵列; Epi proColon: 商业化的Septin9基因甲基化检测试剂盒; MS-HRM: 甲基化敏感的高分辨率溶解曲线; N/A: 无记录; AUC: 曲线下面积。

多DNA甲基化的指标(表2)<sup>[26,29,37-66]</sup>.

和在血液中的研究不同,粪便中很少有*Septin9*甲基化检测的研究,唯一的一项报道中,结直肠癌患者粪便中出现*Septin9*甲基化的比例仅为20%<sup>[66]</sup>. ColoSure是以粪便标本提取DNA样本,通过定量检测粪便中波形蛋白(*Vimentin*)基因高甲基化而开发的一个商业化结直肠癌筛选试剂盒. Li等<sup>[26]</sup>采用ColoSure进行的研究,发现结直肠癌患者粪便中*Vimentin*出现甲基化的比例为40.9%(9/22),明显高于健康对照者.

除了血液和粪便的标本,一些研究检测了其他非组织样本中DNA的异常甲基化. Song等<sup>[67]</sup>对从尿液中提取的DNA进行甲基化检测,发现20例结直肠癌患者中有75%均呈现出*Vimentin*基因启动子的高甲基化,而在健康对照者中,这一比例仅为10%(2/20). 另一项研究<sup>[68]</sup>检测了肠道灌洗液中15个基因的异常甲基化片段,发现其中miR-124-3、LOC386758和*SFRP1*基因甲基化诊断结直肠癌的敏感性分别为71.8%、79.5%和74.4%. 直肠毛刷是可以直接取到黏膜标本的微创检测方法, Reddy等<sup>[69]</sup>从结直肠癌患者的黏膜毛刷中提取DNA,以此为模板成功检测到了结肠腺瘤样息肉(adenomatosis polyposis coli, *APC*)和进行性色素沉着基因1(hyperpigmentation progressive 1, *HPPI*)基因的甲基化条带. 但上述标本来源的基因DNA甲基化检测,对结直肠癌的敏感性和特异性有待大样本的前瞻性研究证实.

## 2 结直肠癌联合多基因甲基化指标

不同结直肠癌患者存在不同的异常基因甲基化谱,以单一基因的甲基化检测结果来筛查结直肠癌可能存在敏感性和特异性不足的问题. 一些研究开始尝试联合检测不同基因的甲基化水平来综合筛查结直肠癌,取得了良好的效果.

Leung等<sup>[8]</sup>同时检测了结直肠癌患者血清中*MLH1*、解旋酶样转录因子(helicase-like transcription factor, *HLTF*)和*APC*的甲基化水平,发现单独标志物诊断结直肠癌的敏感性均不足50%,而三者联合检测敏感性提高到57%. Cassinotti等<sup>[16]</sup>采用甲基化小芯片检测结直肠癌患者血浆中一系列基因的甲基化,发现联合

D型细胞周期蛋白2(cyclin type D2, *CYCD2*)、癌中高甲基化基因1(hypermethylated in cancer 1, *HIC1*)、配对盒子基因5(paired box 5, *PAX5*)、Ras相关结构域家族基因1[Ras association(RalGDS/AF-6) domain family member 1, *Rassf1a*]、视网膜神经胶质瘤基因1(retinoblastoma, *RBI*)和CD2(CD2 molecule, *SRBC*)基因诊断结直肠癌的敏感性高达83.3%.

对于粪便标本,不仅可以不同基因的甲基化检测结果进行组合,还可以和*K-ras*突变、血红蛋白等的检测结果进行综合分析. Ahlquist等<sup>[70]</sup>综合分析粪便中的*Vimentin*甲基化和*K-ras*、*APC*突变,在19例结直肠癌患者中,有11例(57.9%)结果为阳性. 同一个研究中心在2012年的一项研究<sup>[21]</sup>中,采用甲基化定量检测方法QuARTS同时检测200余例结直肠癌患者和健康对照者粪便中*Vimentin*、N-myc下游调节基因4(N-myc downstream regulated gene 4, *NDRG4*)、骨形态形成蛋白3(bone morphogenetic protein3, *BMP3*)和组织因子通路抑制剂2(tissue factor pathway inhibitor 2, *TFPI2*)的甲基化,结合突变型*K-ras*、血红蛋白的检测,敏感性达84.9%,特异性为90.1%.

## 3 早期结直肠癌的基因异常甲基化检测

Duke分期和肿瘤-淋巴结-转移(tumor-node-metastasis, TNM)分期均是临床上常用的结直肠癌分期方法,早期Duke A期或TNM 1期的结直肠癌确诊无疑将大大提高患者根治的机会,其中部分患者还可通过创伤较小的内镜下黏膜切除术(endoscopic mucosal resection, ESD)完整切除肿瘤. 已有研究结果显示早期结直肠癌甲基化阳性检出率亦明显高于健康对照者. Grützmann等<sup>[18]</sup>研究发现85例TNM 1期结直肠癌患者血浆甲基化*Septin9*的阳性率为41.2%(35例),明显高于健康对照者的8.8%(25/285). Li等<sup>[26]</sup>报道了22例Duke A期结直肠癌和110例健康对照者中*Vimentin*出现甲基化的比例,前者亦明显高于后者(50.0% vs 5.3%). 在2013年的一项报道中,26例TNM 1期结直肠癌患者血清多配体蛋白聚糖(syndecan, *SDC*)甲基化出现的频率高达92.3%(24例),而对照组中这一比例仅为

### ■创新盘点

本文主要是在前人研究的基础上,对结直肠癌筛查中非侵入性甲基化指标进行总结提炼. 按单基因、组合基因、早期指标及和其他方法的比较4个方面对此领域的既往研究进行了全面系统的评述,并详细列举了每项研究的甲基化检测方法.

## ■应用要点

本文在总结既往研究的基础上, 提出了该领域未来研究的可能方向, 可能对未来相关研究方案的设计具有一定的指导意义。

表 2 结直肠癌筛查中粪便为基础的甲基化指标

基因	作者, 年份	检测方法	健康对照		结直肠癌		AUC 面积	P值
			总例数	甲基化n(%)	总例数	甲基化n(%)		
单基因								
<i>SFRP2</i>	Müller, 2004	MethyLight	13	3(23.1)	23	19(82.6)	N/A	0.001
	Huang, 2007	MSP	24	1(4.2)	52	49(94.2)	N/A	0.001
	Wang, 2008	MSP	30	2(6.7)	69	60(87.0)	N/A	0.001
	Nagasaka, 2009	COBRA	113	9(8.0)	84	53(63.1)	N/A	0.001
	Chang, 2010	MSP	31	0(0.0)	30	18(60.0)	N/A	0.001
	Tang, 2011	MSP	30	2(6.7)	169	142(84.0)	N/A	0.001
	Zhang, 2014	MSP	30	1(3.3)	48	29(60.4)	N/A	0.001
	Lu, 2014	MSP	40	4(10.0)	56	32(57.1)	N/A	0.001
<i>PGR</i>	Müller, 2004	MethyLight	26	8(30.8)	23	18(78.3)	N/A	0.001
<i>SFRP5</i>	Müller, 2004	MethyLight	26	9(34.6)	23	18(78.3)	N/A	0.002
<i>HIC1</i>	Lenhard, 2005	MSP	31	0(0.0)	26	11(42.3)	N/A	0.001
<i>Vimentin</i>	Chen, 2005	MSP	107	8(7.5)	94	43(45.7)	N/A	0.001
	Itzkowitz, 2007	MSP	122	16(13.1)	40	29(72.5)	N/A	0.001
	Itzkowitz, 2008	MSP	363	62(17.1)	82	63(76.8)	N/A	0.001
	Baek, 2009	MSP	37	0(0.0)	60	23(38.3)	N/A	0.001
	Li, 2009	Methyl-BEAMing	38	2(5.3)	22	9(40.9)	N/A	0.001
	Zhang, 2011	MSP	30	0(0.0)	60	32(53.3)	N/A	0.001
	Amiot, 2014	qMSP	157	0(0.0)	90	29(32.2)	N/A	0.001
	Kisiel, 2013	QuARTS	N/A	N/A(11.0)	N/A	N/A(89.0)	0.97	N/A
<i>HLTF</i>	Itzkowitz, 2007	MSP	122	9(7.4)	40	15(37.5)	N/A	0.001
<i>HPP1</i>	Huang, 2007	MSP	24	0(0.0)	52	37(71.2)	N/A	0.001
<i>MGMT</i>	Huang, 2007	MSP	24	0(0.0)	52	25(48.1)	N/A	0.001
	Baek, 2009	MSP	37	5(13.5)	60	31(51.7)	N/A	0.001
	Azuara, 2010	MSP & Melting curve	15	0(0.0)	28	9(32.1)	N/A	0.014
	Kang, 2011	MSP	26	1(3.8)	69	38(55.1)	N/A	0.001
<i>CDKN2A</i>	Abbaszadegan, 2007	MSP	20	0(0.0)	25	5(20.0)	N/A	0.034
	Chang, 2010	MSP	31	1(3.2)	30	12(40.0)	N/A	0.001
	Azuara, 2010	MSP & Melting curve	13	0(0.0)	30	9(30.0)	N/A	0.026
	Kang, 2011	MSP	26	0(0.0)	69	36(52.2)	N/A	0.001
<i>SFRP1</i>	Zhang, 2007	MSP	15	2(13.3)	29	18(62.1)	N/A	0.002
	Kim, 2009	qMSP	15	0(0.0)	20	11(55.0)	N/A	0.001
	Salehi, 2012	MSP	25	2(8.0)	25	13(52.0)	N/A	0.006
<i>EN1</i>	Mayor, 2009	Melting curve	30	1(3.3)	30	8(26.7)	N/A	0.011
<i>TFPI2</i>	Glöckner, 2009	qMSP	87	11(12.6)	84	67(79.8)	N/A	0.001
	Zhang, 2011	MSP	30	4(13.3)	60	45(75.0)	N/A	0.001
<i>GATA4</i>	Li, 2009	Methyl-BEAMing	110	8(5.3)	81	48(40.9)	0.81	0.001
<i>NDRG4</i>	Melotte, 2009	qMSP	75	3(4.0)	75	42(56.0)	N/A	0.001
	Lu, 2014	MSP	40	1(2.5)	56	16(28.6)	N/A	0.001
	Kisiel, 2013	QuARTS	N/A	N/A(11.0)	N/A	N/A(100.0)	0.85	N/A
<i>ITGA4</i>	Ausch, 2009	qMSP	28	6(21.4)	75	69(92.0)	N/A	0.001
	Chang, 2010	MSP	31	0(0.0)	30	11(36.7)	N/A	0.001
<i>B4GALT1</i>	Kim, 2009	qMSP	10	2(20.0)	16	9(56.3)	N/A	0.069
<i>OSMR</i>	Kim, 2009	qMSP	96	4(4.2)	89	35(39.3)	N/A	0.001
	Zhang, 2011	MSP	30	0(0.0)	60	41(68.3)	N/A	0.001
	Bosch, 2012	qMSP	101	7(6.9)	65	25(38.5)	N/A	0.001
<i>MLH1</i>	Baek, 2009	MSP	37	0(0.0)	60	18(30.0)	N/A	0.001
<i>RASSF2</i>	Nagasaka, 2009	COBRA	113	6(5.3)	84	38(45.2)	N/A	0.001
<i>ESR1</i>	Kato, 2009	nMSP	N/A	N/A	49	32(65.3)	N/A	N/A



<i>RARB2</i>	Azuara, 2010	MSP & Melting curve	13	0(0.0)	34	11(32.4)	N/A	0.019
<i>APC</i>	Azuara, 2010	MSP & Melting curve	15	0(0.0)	28	9(32.1)	N/A	0.014
<i>MAL</i>	Kang, 2011	MSP	26	1(3.8)	69	54(78.3)	N/A	0.001
<i>PHACTR3</i>	Bosch, 2012	qMSP	101	4(4.0)	65	40(61.5)	0.78–0.87	0.001
<i>SPG20</i>	Zhang, 2013	MSP	30	0(0.0)	96	77(80.2)	N/A	0.001
<i>SLIT2</i>	Azuara, 2013	Melting Curve	44	0(0.0)	16	4(25.0)	N/A	0.001
<i>Septin9</i>	Carmona, 2013	Pyrosequence	N/A	N/A	35	7(20.0)	N/A	N/A
<i>FBN1</i>	Guo, 2013	MSP	30	2(6.7)	75	54(72.0)	N/A	0.001
<i>p33<sup>ING1b</sup></i>	He, 2014	nMSP	20	1(5.0)	61	45(73.8)	N/A	0.001
<i>Wif1</i>	Zhang, 2014	MSP	30	0(0.0)	48	27(56.3)	N/A	0.001
	Amiot, 2014	qMSP	157	1(0.6)	90	17(18.9)	N/A	0.001
<i>ALX4</i>	Amiot, 2014	qMSP	157	2(1.3)	90	9(10.0)	N/A	0.001
<i>GATA5</i>	Lu, 2014	MSP	40	7(17.5)	56	47(83.9)	N/A	0.001
<i>VIM</i>	Lu, 2014	MSP	40	6(15.0)	56	23(41.1)	N/A	0.006
<i>BMP3</i>	Kisiel, 2013	QuARTS	N/A	N/A(11.0)	N/A	N/A(100.0)	0.97	N/A
<i>EYA4</i>	Kisiel, 2013	QuARTS	N/A	N/A(11.0)	N/A	N/A(100.0)	0.95	N/A

#### ■名词解释

甲基化: 是指从活性甲基化合物上将甲基催化转移到其他化合物的过程, 可发生在DNA的核酸和蛋白质的氨基酸上。

MethyLight: 荧光定量甲基化; MSP: 甲基化特异性PCR; COBRA: 重亚硫酸钠处理限制性酶切图谱分析; Methy-BEAMing: 磁珠乳液扩增法检测甲基化; qMSP: 定量MSP; QuARTS: 等位基因特异性实时定量目标和信号放大; Melting curve: 溶解曲线; nMSP: 巢式MSP; Pyrosequence: 焦磷酸测序法; N/A: 无记录; AUC: 曲线下面积。

4.8%(6/125)<sup>[33]</sup>。

#### 4 结直肠癌甲基化筛选指标和其他方法的比较

在Tóth等<sup>[22]</sup>的研究中, 作者对结直肠癌患者血浆*Septin9*的甲基化和其他筛查指标如血清CEA、粪便潜血进行了比较, 发现前者的敏感性(95.7%)明显高于血清CEA(51.8%)和粪便潜血(68.2%)。He等<sup>[65]</sup>比较了61例结肠癌患者的粪便*p33<sup>ING1b</sup>*甲基化和粪便潜血的阳性率, 发现45例(73.8%)患者*p33<sup>ING1b</sup>*出现了甲基化, 明显高于粪便潜血的阳性率(49.2%)。粪便免疫化学检测(FIT)以血红蛋白的特异性抗原抗体反应为基础, 对结直肠癌患者的检测敏感性优于粪便潜血试验<sup>[71]</sup>。2014年新英格兰医学杂志发表的一篇临床研究<sup>[72]</sup>纳入了65例结直肠癌患者, 同时进行了以甲基化指标为主的粪便多靶点检测(*NDRG4*和*BMP3*的甲基化+*K-ras*突变+血红蛋白检测)和FIT检测, 发现前者的敏感性为92.3%, 明显高于后者(73.8%)。此外, 本研究还纳入了2896例早期腺瘤和758例进展期癌前病变(进展期腺瘤和直径≥1 cm的锯齿状息肉), 粪便多靶点检测的阳性率分别为17.2%和42.3%, 明显高于FIT检测的7.6%和23.7%。

#### 5 结论

目前大便潜血和结直肠镜仍是临床上结直肠

癌筛查指南推荐的主要手段, 然而其中任何一种手段都难以在准确性、经济性和人群接受性上同时令人满意。一些非侵入性检查方法不断涌现, 如血循环miRNA、CEA、*N*-甲基转移酶等, 其中DNA高甲基是结直肠癌发生的早期事件, 为结直肠癌的筛查提供了新的选择。

既往研究在结直肠癌患者的血液和粪便中发现大量基因的启动子呈高甲基化状态, 且多数甲基化指标的敏感性和特异性要优于CEA和粪便潜血。目前已有多个商业化的试剂盒用于临床实践, 为血液、粪便的甲基化规范检测提供了参考。DNA甲基化、血红蛋白、突变型*K-ras*等的联合检测可以明显提高对于结直肠癌和早期腺瘤的检出率, 反映了其在临床应用中的巨大潜力。

由于结直肠癌的发生发展是一个多阶段的过程, 其中涉及一系列抑癌基因的高甲基化, 单一基因DNA甲基化检测的敏感性和特异性在不同人群中存在着较大的差别。在未来的临床实践中, 开展有金标准对照的大样本、多中心研究, 综合分析这些甲基化指标在结直肠癌筛查中的价值, 将会有力推动结直肠癌的早诊早治工作。

#### 6 参考文献

1 Bailey CE, Hu CY, You YN, Bednarski BK,

## ■同行评价

DNA甲基化作为结直肠癌早期筛选的分子标志物,是目前重要的研究方向之一。本文综述了该领域的最新研究进展,提供了充足的有意义的信息,具有一定的指导意义。

- 1 Rodriguez-Bigas MA, Skibber JM, Cantor SB, Chang GJ. Increasing disparities in the age-related incidences of colon and rectal cancers in the United States, 1975-2010. *JAMA Surg* 2015; 150: 17-22 [PMID: 25372703 DOI: 10.1001/jamasurg.2014.1756]
- 2 杜灵彬, 余传定, 汪祥辉, 牟瀚舟. 浙江省4个肿瘤登记地区2004年恶性肿瘤发病资料分析. *中国肿瘤* 2008; 17: 270-273
- 3 Imperiale TF, Ransohoff DF, Itzkowitz SH, Turnbull BA, Ross ME. Fecal DNA versus fecal occult blood for colorectal-cancer screening in an average-risk population. *N Engl J Med* 2004; 351: 2704-2714 [PMID: 15616205 DOI: 10.1056/NEJMoa033403]
- 4 Frazier AL, Colditz GA, Fuchs CS, Kuntz KM. Cost-effectiveness of screening for colorectal cancer in the general population. *JAMA* 2000; 284: 1954-1961 [PMID: 11035892 DOI: 10.1001/jama.284.15.1954]
- 5 Yagi K, Akagi K, Hayashi H, Nagae G, Tsuji S, Isagawa T, Midorikawa Y, Nishimura Y, Sakamoto H, Seto Y, Aburatani H, Kaneda A. Three DNA methylation epigenotypes in human colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2010; 16: 21-33 [PMID: 20028768 DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-09-2006]
- 6 Herbst A, Kolligs FT. Detection of DNA hypermethylation in remote media of patients with colorectal cancer: new biomarkers for colorectal carcinoma. *Tumour Biol* 2012; 33: 297-305 [PMID: 22362383 DOI: 10.1007/s13277-012-0346-y]
- 7 Grady WM, Rajput A, Lutterbaugh JD, Markowitz SD. Detection of aberrantly methylated hMLH1 promoter DNA in the serum of patients with microsatellite unstable colon cancer. *Cancer Res* 2001; 61: 900-902 [PMID: 11221878 DOI: 10.1016/s0016-5085(01)81443-8]
- 8 Leung WK, To KF, Man EP, Chan MW, Bai AH, Hui AJ, Chan FK, Sung JJ. Quantitative detection of promoter hypermethylation in multiple genes in the serum of patients with colorectal cancer. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 2274-2279 [PMID: 16181380 DOI: 10.1111/j.1572-0241.2005.50412.x]
- 9 Wallner M, Herbst A, Behrens A, Crispin A, Stieber P, Göke B, Lamerz R, Kolligs FT. Methylation of serum DNA is an independent prognostic marker in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 7347-7352 [PMID: 17189406 DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-06-1264]
- 10 Zou HZ, Yu BM, Wang ZW, Sun JY, Cang H, Gao F, Li DH, Zhao R, Feng GG, Yi J. Detection of aberrant p16 methylation in the serum of colorectal cancer patients. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 188-191 [PMID: 11801557]
- 11 Tan SH, Ida H, Lau QC, Goh BC, Chieng WS, Loh M, Ito Y. Detection of promoter hypermethylation in serum samples of cancer patients by methylation-specific polymerase chain reaction for tumour suppressor genes including RUNX3. *Oncol Rep* 2007; 18: 1225-1230 [PMID: 17914577 DOI: 10.3892/or.18.5.1225]
- 12 Miotto E, Sabbioni S, Veronese A, Calin GA, Gullini S, Liboni A, Gramantieri L, Bolondi L, Ferrazzi E, Gafà R, Lanza G, Negrini M. Frequent aberrant methylation of the CDH4 gene promoter in human colorectal and gastric cancer. *Cancer Res* 2004; 64: 8156-8159 [PMID: 15548679 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-3000]
- 13 Ebert MP, Model F, Mooney S, Hale K, Lograsso J, Tonnes-Priddy L, Hoffmann J, Csepregi A, Röcken C, Molnar B, Schulz HU, Malfertheiner P, Lofton-Day C. Aristaless-like homeobox-4 gene methylation is a potential marker for colorectal adenocarcinomas. *Gastroenterology* 2006; 131: 1418-1430 [PMID: 17101318 DOI: 10.1053/j.gastro.2006.08.034]
- 14 Tänzer M, Balluff B, Distler J, Hale K, Leodolter A, Röcken C, Molnar B, Schmid R, Lofton-Day C, Schuster T, Ebert MP. Performance of epigenetic markers SEPT9 and ALX4 in plasma for detection of colorectal precancerous lesions. *PLoS One* 2010; 5: e9061 [PMID: 20140221 DOI: 10.1371/journal.pone.0009061]
- 15 He Q, Chen HY, Bai EQ, Luo YX, Fu RJ, He YS, Jiang J, Wang HQ. Development of a multiplex MethyLight assay for the detection of multigene methylation in human colorectal cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 2010; 202: 1-10 [PMID: 20804913 DOI: 10.1016/j.cancergencyto.2010.05.018]
- 16 Cassinotti E, Melson J, Liggett T, Melnikov A, Yi Q, Replogle C, Mobarhan S, Boni L, Segato S, Levenson V. DNA methylation patterns in blood of patients with colorectal cancer and adenomatous colorectal polyps. *Int J Cancer* 2012; 131: 1153-1157 [PMID: 22020530 DOI: 10.1002/ijc.26484]
- 17 Lofton-Day C, Model F, Devos T, Tetzner R, Distler J, Schuster M, Song X, Lesche R, Liebenberg V, Ebert M, Molnar B, Grützmann R, Pilarsky C, Sledziewski A. DNA methylation biomarkers for blood-based colorectal cancer screening. *Clin Chem* 2008; 54: 414-423 [PMID: 18089654 DOI: 10.1373/clinchem.2007.095992]
- 18 Grützmann R, Molnar B, Pilarsky C, Habermann JK, Schlag PM, Saeger HD, Miehlke S, Stolz T, Model F, Roblick UJ, Bruch HP, Koch R, Liebenberg V, Devos T, Song X, Day RH, Sledziewski AZ, Lofton-Day C. Sensitive detection of colorectal cancer in peripheral blood by septin 9 DNA methylation assay. *PLoS One* 2008; 3: e3759 [PMID: 19018278 DOI: 10.1371/journal.pone.0003759]
- 19 deVos T, Tetzner R, Model F, Weiss G, Schuster M, Distler J, Steiger KV, Grützmann R, Pilarsky C, Habermann JK, Fleshner PR, Oubre BM, Day R, Sledziewski AZ, Lofton-Day C. Circulating methylated SEPT9 DNA in plasma is a biomarker for colorectal cancer. *Clin Chem* 2009; 55: 1337-1346 [PMID: 19406918 DOI: 10.1373/clinchem.2008.115808]
- 20 Warren JD, Xiong W, Bunker AM, Vaughn CP, Furtado LV, Roberts WL, Fang JC, Samowitz WS, Heichman KA. Septin 9 methylated DNA is a sensitive and specific blood test for colorectal cancer. *BMC Med* 2011; 9: 133 [PMID: 22168215 DOI: 10.1186/1741-7015-9-133]
- 21 Ahlquist DA, Taylor WR, Mahoney DW, Zou H, Domanico M, Thibodeau SN, Boardman LA,

- Berger BM, Lidgard GP. The stool DNA test is more accurate than the plasma septin 9 test in detecting colorectal neoplasia. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2012; 10: 272-277.e1 [PMID: 22019796 DOI: 10.1016/j.cgh.2011.10.008]
- 22 Tóth K, Sipos F, Kalmár A, Patai AV, Wichmann B, Stoehr R, Golcher H, Schellerer V, Tulassay Z, Molnár B. Detection of methylated SEPT9 in plasma is a reliable screening method for both left- and right-sided colon cancers. *PLoS One* 2012; 7: e46000 [PMID: 23049919 DOI: 10.1371/journal.pone.0046000]
  - 23 Su XL, Wang YF, Li SJ, Zhang F, Cui HW. High methylation of the SEPT9 gene in Chinese colorectal cancer patients. *Genet Mol Res* 2014; 13: 2513-2520 [PMID: 24535900 DOI: 10.4238/2014.January.17.5]
  - 24 Church TR, Wandell M, Lofton-Day C, Mongin SJ, Burger M, Payne SR, Castaños-Vélez E, Blumenstein BA, Rösch T, Osborn N, Snover D, Day RW, Ransohoff DF. Prospective evaluation of methylated SEPT9 in plasma for detection of asymptomatic colorectal cancer. *Gut* 2014; 63: 317-325 [PMID: 23408352 DOI: 10.1136/gutjnl-2012-304149]
  - 25 Potter NT, Hurban P, White MN, Whitlock KD, Lofton-Day CE, Tetzner R, Koenig T, Quigley NB, Weiss G. Validation of a real-time PCR-based qualitative assay for the detection of methylated SEPT9 DNA in human plasma. *Clin Chem* 2014; 60: 1183-1191 [PMID: 24938752 DOI: 10.1373/clinchem.2013.221044]
  - 26 Li M, Chen WD, Papadopoulos N, Goodman SN, Bjerregaard NC, Laurberg S, Levin B, Juhl H, Arber N, Moinova H, Durkee K, Schmidt K, He Y, Diehl F, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA, Kinzler KW, Markowitz SD, Vogelstein B. Sensitive digital quantification of DNA methylation in clinical samples. *Nat Biotechnol* 2009; 27: 858-863 [PMID: 19684580 DOI: 10.1038/nbt.1559]
  - 27 Lee BB, Lee EJ, Jung EH, Chun HK, Chang DK, Song SY, Park J, Kim DH. Aberrant methylation of APC, MGMT, RASSF2A, and Wif-1 genes in plasma as a biomarker for early detection of colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 6185-6191 [PMID: 19773381 DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-09-0111]
  - 28 Liu W, Guan M, Su B, Li J, Ma W, Liu C, Li M, Lin Y, Lu Y. Rapid determination of AKAP12 promoter methylation levels in peripheral blood using methylation-sensitive high resolution melting (MS-HRM) analysis: application in colorectal cancer. *Clin Chim Acta* 2010; 411: 940-946 [PMID: 20227403 DOI: 10.1016/j.cca.2010.03.003]
  - 29 Tang D, Liu J, Wang DR, Yu HF, Li YK, Zhang JQ. Diagnostic and prognostic value of the methylation status of secreted frizzled-related protein 2 in colorectal cancer. *Clin Invest Med* 2011; 34: E88-E95 [PMID: 21463549]
  - 30 Herbst A, Rahmig K, Stieber P, Philipp A, Jung A, Ofner A, Crispin A, Neumann J, Lamerz R, Kolligs FT. Methylation of NEUROG1 in serum is a sensitive marker for the detection of early colorectal cancer. *Am J Gastroenterol* 2011; 106: 1110-1118 [PMID: 21326223 DOI: 10.1038/ajg.2011.6]
  - 31 Hibi K, Goto T, Shirahata A, Saito M, Kigawa G, Nemoto H, Sanada Y. Detection of TFPI2 methylation in the serum of colorectal cancer patients. *Cancer Lett* 2011; 311: 96-100 [PMID: 21820798 DOI: 10.1016/j.canlet.2011.07.006]
  - 32 Wu PP, Zou JH, Tang RN, Yao Y, You CZ. Detection and Clinical Significance of DLC1 Gene Methylation in Serum DNA from Colorectal Cancer Patients. *Chin J Cancer Res* 2011; 23: 283-287 [PMID: 23359753 DOI: 10.1007/s11670-011-0283-0]
  - 33 Oh T, Kim N, Moon Y, Kim MS, Hoehn BD, Park CH, Kim TS, Kim NK, Chung HC, An S. Genome-wide identification and validation of a novel methylation biomarker, SDC2, for blood-based detection of colorectal cancer. *J Mol Diagn* 2013; 15: 498-507 [PMID: 23747112 DOI: 10.1016/j.jmoldx.2013.03.004]
  - 34 Lyu Z, Chen H, Jiang L, Zheng H, Hu J. [Detection of RASSF2 and sFRP1 promoter region methylation in sporadic colorectal cancer patients]. *Zhonghua Weichang Waikexue* 2014; 17: 41-44 [PMID: 24519048]
  - 35 Pedersen SK, Mitchell SM, Graham LD, McEvoy A, Thomas ML, Baker RT, Ross JP, Xu ZZ, Ho T, LaPointe LC, Young GP, Molloy PL. CAHM, a long non-coding RNA gene hypermethylated in colorectal neoplasia. *Epigenetics* 2014; 9: 1071-1082 [PMID: 24799664 DOI: 10.4161/epi.29046]
  - 36 Müller HM, Oberwalder M, Fiegl H, Morandell M, Goebel G, Zitt M, Mühlthaler M, Ofner D, Margreiter R, Widschwendner M. Methylation changes in faecal DNA: a marker for colorectal cancer screening? *Lancet* 2004; 363: 1283-1285 [PMID: 15094274 DOI: 10.1016/S0140-6736(04)16002-9]
  - 37 Huang ZH, Li LH, Yang F, Wang JF. Detection of aberrant methylation in fecal DNA as a molecular screening tool for colorectal cancer and precancerous lesions. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 950-954 [PMID: 17352030 DOI: 10.3748/wjg.v13.i6.950]
  - 38 Wang DR, Tang D. Hypermethylated SFRP2 gene in fecal DNA is a high potential biomarker for colorectal cancer noninvasive screening. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 524-531 [PMID: 18203283 DOI: 10.3748/wjg.14.524]
  - 39 Nagasaka T, Tanaka N, Cullings HM, Sun DS, Sasamoto H, Uchida T, Koi M, Nishida N, Naomoto Y, Boland CR, Matsubara N, Goel A. Analysis of fecal DNA methylation to detect gastrointestinal neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 2009; 101: 1244-1258 [PMID: 19700653 DOI: 10.1093/jnci/djp265]
  - 40 Chang E, Park DI, Kim YJ, Kim BK, Park JH, Kim HJ, Cho YK, Sohn CI, Jeon WK, Kim BI, Kim HD, Kim DH, Kim YH. Detection of colorectal neoplasm using promoter methylation of ITGA4, SFRP2, and p16 in stool samples: a preliminary report in Korean patients. *Hepatogastroenterology* 2010; 57: 720-727 [PMID: 21033217]
  - 41 Zhang H, Zhu YQ, Wu YQ, Zhang P, Qi J. Detection of promoter hypermethylation of Wnt antagonist genes in fecal samples for diagnosis of early colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2014; 20: 6329-6335 [PMID: 24876755 DOI: 10.3748/wjg.



- v20.i20.6329]
- 42 Lu H, Huang S, Zhang X, Wang D, Zhang X, Yuan X, Zhang Q, Huang Z. DNA methylation analysis of SFRP2, GATA4/5, NDRG4 and VIM for the detection of colorectal cancer in fecal DNA. *Oncol Lett* 2014; 8: 1751-1756 [PMID: 25202404 DOI: 10.3892/ol.2014.2413]
- 43 Lenhard K, Bommer GT, Asutay S, Schauer R, Brabletz T, Göke B, Lamerz R, Kolligs FT. Analysis of promoter methylation in stool: a novel method for the detection of colorectal cancer. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2005; 3: 142-149 [PMID: 15704048 DOI: 10.1016/S1542-3565(04)00624-X]
- 44 Chen WD, Han ZJ, Skoletsky J, Olson J, Sah J, Myeroff L, Platzer P, Lu S, Dawson D, Willis J, Pretlow TP, Lutterbaugh J, Kasturi L, Willson JK, Rao JS, Shuber A, Markowitz SD. Detection in fecal DNA of colon cancer-specific methylation of the nonexpressed vimentin gene. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97: 1124-1132 [PMID: 16077070 DOI: 10.1093/jnci/dji204]
- 45 Itzkowitz SH, Jandorf L, Brand R, Rabeneck L, Schroy PC, Sontag S, Johnson D, Skoletsky J, Durkee K, Markowitz S, Shuber A. Improved fecal DNA test for colorectal cancer screening. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007; 5: 111-117 [PMID: 17161655 DOI: 10.1016/j.cgh.2006.10.006]
- 46 Itzkowitz S, Brand R, Jandorf L, Durkee K, Millholland J, Rabeneck L, Schroy PC, Sontag S, Johnson D, Markowitz S, Paszat L, Berger BM. A simplified, noninvasive stool DNA test for colorectal cancer detection. *Am J Gastroenterol* 2008; 103: 2862-2870 [PMID: 18759824 DOI: 10.1111/j.1572-0241.2008.02088.x]
- 47 Baek YH, Chang E, Kim YJ, Kim BK, Sohn JH, Park DI. Stool methylation-specific polymerase chain reaction assay for the detection of colorectal neoplasia in Korean patients. *Dis Colon Rectum* 2009; 52: 1452-1459; discussion 1459-1463 [PMID: 19617759 DOI: 10.1007/DCR.0b013e3181a79533]
- 48 Zhang JP, Wang J, Gui YL, Zhu QQ, Xu ZW, Li JS. [Human stool vimentin, oncostatin M receptor and tissue factor pathway inhibitor 2 gene methylation analysis for the detection of colorectal neoplasms]. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2011; 91: 2482-2484 [PMID: 22321844]
- 49 Amiot A, Mansour H, Baumgaertner I, Delchier JC, Tournigand C, Furet JP, Carrau JP, Canoui-Poitrine F, Sobhani I. The detection of the methylated Wif-1 gene is more accurate than a fecal occult blood test for colorectal cancer screening. *PLoS One* 2014; 9: e99233 [PMID: 25025467 DOI: 10.1371/journal.pone.0099233]
- 50 Kisiel JB, Yab TC, Nazer Hussain FT, Taylor WR, Garrity-Park MM, Sandborn WJ, Loftus EV, Wolff BG, Smyrk TC, Itzkowitz SH, Rubin DT, Zou H, Mahoney DW, Ahlquist DA. Stool DNA testing for the detection of colorectal neoplasia in patients with inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2013; 37: 546-554 [PMID: 23347191 DOI: 10.1111/apt.12218]
- 51 Azuara D, Rodriguez-Moranta F, de Oca J, Soriano-Izquierdo A, Mora J, Guardiola J, Biondo S, Blanco I, Peinado MA, Moreno V, Esteller M, Capellá G. Novel methylation panel for the early detection of colorectal tumors in stool DNA. *Clin Colorectal Cancer* 2010; 9: 168-176 [PMID: 20643622 DOI: 10.3816/CCC.2010.n.023]
- 52 Kang YP, Cao FA, Chang WJ, Lou Z, Wang H, Wu LL, Fu CG, Cao GW. [Gene methylation in stool for the screening of colorectal cancer and pre-malignant lesions]. *Zhonghua Weichang Waike Zazhi* 2011; 14: 52-56 [PMID: 21271382]
- 53 Abbaszadegan MR, Tavasoli A, Velayati A, Sima HR, Vosooghnia H, Farzadnia M, Asadzadeh H, Gholamin M, Dadkhah E, Aarabi A. Stool-based DNA testing, a new noninvasive method for colorectal cancer screening, the first report from Iran. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 1528-1533 [PMID: 17461444 DOI: 10.3748/wjg.v13.i10.1528]
- 54 Zhang W, Bauer M, Croner RS, Pelz JO, Lodygin D, Hermeking H, Stürzl M, Hohenberger W, Matzel KE. DNA stool test for colorectal cancer: hypermethylation of the secreted frizzled-related protein-1 gene. *Dis Colon Rectum* 2007; 50: 1618-1626; discussion 1626-1627 [PMID: 17762966 DOI: 10.1007/s10350-007-0286-6]
- 55 Kim MS, Louwagie J, Carvalho B, Terhaar Sive Droste JS, Park HL, Chae YK, Yamashita K, Liu J, Ostrow KL, Ling S, Guerrero-Preston R, Demokan S, Yalniz Z, Dalay N, Meijer GA, Van Criekinge W, Sidransky D. Promoter DNA methylation of oncostatin m receptor-beta as a novel diagnostic and therapeutic marker in colon cancer. *PLoS One* 2009; 4: e6555 [PMID: 19662090 DOI: 10.1371/journal.pone.0006555]
- 56 Salehi R, Mohammadi M, Emami MH, Salehi AR. Methylation pattern of SFRP1 promoter in stool sample is a potential marker for early detection of colorectal cancer. *Adv Biomed Res* 2012; 1: 87 [PMID: 23946935 DOI: 10.4103/2277-9175.105169]
- 57 Mayor R, Casadomé L, Azuara D, Moreno V, Clark SJ, Capellá G, Peinado MA. Long-range epigenetic silencing at 2q14.2 affects most human colorectal cancers and may have application as a non-invasive biomarker of disease. *Br J Cancer* 2009; 100: 1534-1539 [PMID: 19384295 DOI: 10.1038/sj.bjc.6605045]
- 58 Glöckner SC, Dhir M, Yi JM, McGarvey KE, Van Neste L, Louwagie J, Chan TA, Kleeberger W, de Bruïne AP, Smits KM, Khalid-de Bakker CA, Jonkers DM, Stockbrügger RW, Meijer GA, Oort FA, Iacobuzio-Donahue C, Bierau K, Herman JG, Baylin SB, Van Engeland M, Schuebel KE, Ahuja N. Methylation of TFPI2 in stool DNA: a potential novel biomarker for the detection of colorectal cancer. *Cancer Res* 2009; 69: 4691-4699 [PMID: 19435926 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-0142]
- 59 Melotte V, Lentjes MH, van den Bosch SM, Hellebrekers DM, de Hoon JP, Wouters KA, Daenen KL, Partouns-Hendriks IE, Stessels F, Louwagie J, Smits KM, Weijenberg MP, Sanduleanu S, Khalid-de Bakker CA, Oort FA, Meijer GA, Jonkers DM, Herman JG, de Bruïne AP, van Engeland M. N-Myc downstream-regulated gene 4 (NDRG4): a candidate tumor suppressor gene and potential biomarker for colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst* 2009; 101: 916-927 [PMID: 19535783 DOI: 10.1093/jnci/djp131]

- 60 Ausch C, Kim YH, Tsuchiya KD, Dzieciatkowski S, Washington MK, Paraskeva C, Radich J, Grady WM. Comparative analysis of PCR-based biomarker assay methods for colorectal polyp detection from fecal DNA. *Clin Chem* 2009; 55: 1559-1563 [PMID: 19541867 DOI: 10.1373/clinchem.2008.122937]
- 61 Bosch LJ, Oort FA, Neerincx M, Khalid-de Bakker CA, Terhaar sive Droste JS, Melotte V, Jonkers DM, Masclee AA, Mongera S, Grootclaes M, Louwagie J, van Criekinge W, Coupé VM, Mulder CJ, van Engeland M, Carvalho B, Meijer GA. DNA methylation of phosphatase and actin regulator 3 detects colorectal cancer in stool and complements FIT. *Cancer Prev Res (Phila)* 2012; 5: 464-472 [PMID: 22135045 DOI: 10.1158/1940-6207.CAPR-11-0315]
- 62 Kato I, Badsha KZ, Land S, Nechvatal JM, Matherly LH, Tarca AL, Majumdar AP, Basson MD, Ram JL. DNA/RNA markers for colorectal cancer risk in preserved stool specimens: a pilot study. *Tumori* 2009; 95: 753-761 [PMID: 20210241]
- 63 Zhang H, Song YC, Dang CX. Detection of hypermethylated spastic paraplegia-20 in stool samples of patients with colorectal cancer. *Int J Med Sci* 2013; 10: 230-234 [PMID: 23372428 DOI: 10.7150/ijms.5278]
- 64 Guo Q, Song Y, Zhang H, Wu X, Xia P, Dang C. Detection of hypermethylated fibrillin-1 in the stool samples of colorectal cancer patients. *Med Oncol* 2013; 30: 695 [PMID: 23963856 DOI: 10.1007/s12032-013-0695-4]
- 65 He CG, Huang QY, Chen LS, Ling ZA, Wu HG, Deng HQ. p33(ING1b) methylation in fecal DNA as a molecular screening tool for colorectal cancer and precancerous lesions. *Oncol Lett* 2014; 7: 1639-1644 [PMID: 24765192 DOI: 10.3892/ol.2014.1923]
- 66 Carmona FJ, Azuara D, Berenguer-Llargo A, Fernández AF, Biondo S, de Oca J, Rodríguez-Moranta F, Salazar R, Villanueva A, Fraga MF, Guardiola J, Capellá G, Esteller M, Moreno V. DNA methylation biomarkers for noninvasive diagnosis of colorectal cancer. *Cancer Prev Res (Phila)* 2013; 6: 656-665 [PMID: 23694962 DOI: 10.1158/1940-6207.CAPR-12-0501]
- 67 Song BP, Jain S, Lin SY, Chen Q, Block TM, Song W, Brenner DE, Su YH. Detection of hypermethylated vimentin in urine of patients with colorectal cancer. *J Mol Diagn* 2012; 14: 112-119 [PMID: 22251609 DOI: 10.1016/j.jmoldx.2011.12.003]
- 68 Harada T, Yamamoto E, Yamano HO, Nojima M, Maruyama R, Kumegawa K, Ashida M, Yoshikawa K, Kimura T, Harada E, Takagi R, Tanaka Y, Aoki H, Nishizono M, Nakaoka M, Tsuyada A, Niinuma T, Kai M, Shimoda K, Shinomura Y, Sugai T, Imai K, Suzuki H. Analysis of DNA methylation in bowel lavage fluid for detection of colorectal cancer. *Cancer Prev Res (Phila)* 2014; 7: 1002-1010 [PMID: 25139296 DOI: 10.1158/1940-6207.CAPR-14-0162]
- 69 Reddy R, Kelly SB, Welfare M, Janssens L, Williams EA, Mathers JC. Detection of APC and HPP1 gene methylation using rectal brush biopsy as an alternate approach for bowel research. Proceedings of the XXXIX Congress of the European Society for Surgical Research, 2004: 133-135
- 70 Ahlquist DA, Sargent DJ, Loprinzi CL, Levin TR, Rex DK, Ahnen DJ, Knigge K, Lance MP, Burgart LJ, Hamilton SR, Allison JE, Lawson MJ, Devens ME, Harrington JJ, Hillman SL. Stool DNA and occult blood testing for screen detection of colorectal neoplasia. *Ann Intern Med* 2008; 149: 441-450, W81 [PMID: 18838724]
- 71 Lee JK, Liles EG, Bent S, Levin TR, Corley DA. Accuracy of fecal immunochemical tests for colorectal cancer: systematic review and meta-analysis. *Ann Intern Med* 2014; 160: 171 [PMID: 24658694 DOI: 10.7326/M13-1484]
- 72 Imperiale TF, Ransohoff DF, Itzkowitz SH. Multitarget stool DNA testing for colorectal-cancer screening. *N Engl J Med* 2014; 371: 187-188 [PMID: 25006736 DOI: 10.1056/NEJMc1405215]

编辑: 韦元涛 电编: 都珍珍



# Tribbles相关蛋白及CCAAT/增强子结合蛋白同源蛋白在非酒精性脂肪肝中的表达变化

王欢, 胡晓霞, 路华

## ■背景资料

在我国非酒精性脂肪肝 (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD) 的发病率呈明显上升趋势, 已成为我国慢性肝病的重要原因之一。因此进一步深入阐明NAFLD的发生机制, 为临床NAFLD的治疗提供新的药物靶点迫在眉睫。

王欢, 贵州医科大学电镜室 贵州省贵阳市 550025  
胡晓霞, 贵州医科大学生理学教研室 贵州省贵阳市 550025  
路华, 贵州医科大学第三附属医院消化科 贵州省都匀市 558000

王欢, 讲师, 主要从事消化系统疾病研究。

作者贡献分布: 本课题由王欢和胡晓霞共同设计; 实验操作由王欢、胡晓霞及路华共同完成; 实验试剂由王欢提供; 数据分析由胡晓霞和路华完成; 论文写作由王欢完成。

通讯作者: 路华, 副主任医师, 558000, 贵州省都匀市七星路7号, 贵州医科大学第三附属医院消化科。

gywanghuan@sina.com

收稿日期: 2015-08-05 修回日期: 2015-08-30

接受日期: 2015-09-21 在线出版日期: 2015-10-18

## Changes of TRB3 and CHOP expression in nonalcoholic fatty liver disease in rats

Huan Wang, Xiao-Xia Hu, Hua Lu

Huan Wang, Department of Electron Microscopy, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, Guizhou Province, China

Xiao-Xia Hu, Department of Physiology, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, Guizhou Province, China

Hua Lu, Department of Gastroenterology, the Third Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Duyun 558000, Guizhou Province, China

Correspondence to: Hua Lu, Associate Chief Physician, Department of Gastroenterology, the Third Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, 7 Qixing Road, Duyun 558000, Guizhou Province, China. gywanghuan@sina.com

Received: 2015-08-05 Revised: 2015-08-30

Accepted: 2015-09-21 Published online: 2015-10-18

## Abstract

**AIM:** To investigate the changes of Tribbles related protein 3 (TRB3) and CCAAT/enhancer-

binding protein homologous protein (CHOP) expression in nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) in rats.

**METHODS:** Thirty Wistar rats were randomly divided into a normal control group and an NAFLD group. The rats of the NAFLD group were given a high-fat, high-glucose diet for 16 weeks to induce NAFLD, while the normal control group was given an ordinary diet. The levels of total cholesterol (TC), triglyceride (TG), low-density lipoprotein (LDL) and high-density lipoprotein (HDL) were detected with an automatic biochemical analyzer. The expression of TRB3 and CHOP mRNAs in the liver was detected by real-time quantitative PCR. The expression of TRB3 and CHOP proteins in liver tissue was detected by immunohistochemistry. Cell apoptosis was detected by flow cytometry.

**RESULTS:** The levels of TC, TG, and LDL in the NAFLD group were significantly higher than those in the normal control group ( $P < 0.05$ ), while the level of HDL was lower than that in the normal control group ( $P < 0.05$ ). Compared with the normal group, levels of TRB3 and CHOP mRNAs and proteins in the NAFLD group were significantly increased (mRNA:  $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ; protein:  $P < 0.01$ ). Flow cytometry analysis showed that the apoptosis in the NAFLD group was higher than that in the normal control group.

**CONCLUSION:** The changes of TRB3 and CHOP expression may play important roles in

## ■同行评议者

朱传武, 教授, 主任医师, 苏州市第五人民医院肝病科



the development of NAFLD.

© 2015 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

**Key Words:** Nonalcoholic fatty liver disease; Tribbles related protein 3; CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein; Apoptosis

Wang H, Hu XX, Lu H. Changes of TRB3 and CHOP expression in nonalcoholic fatty liver disease in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2015; 23(29): 4636-4642 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/23/4636.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v23.i29.4636>

## 摘要

**目的:** 对Tribbles相关蛋白3(Tribbles related protein 3, TRB3)及CCAAT/增强子结合蛋白同源蛋白(CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein, CHOP)在高脂高糖饮食诱导的大鼠非酒精性脂肪肝(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)中的表达变化进行研究并探讨他们在NAFLD中的作用。

**方法:** 将30只Wistar大鼠随机分为正常组和NAFLD模型组, 每组各15只。模型组大鼠采用高脂高糖饮食诱导NAFLD, 正常组大鼠则给予普通饲料喂养, 造模时间总计为16 wk。血清中总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride, TG)、高密度脂蛋白(high-density lipoprotein, HDL)和低密度脂蛋白(low-density lipoprotein, LDL)的含量采用全自动生化分析仪进行检测; 应用PCR技术对肝脏中TRB3及CHOP mRNA水平的改变进行检测; 应用免疫组织化学技术对肝脏中TRB3及CHOP蛋白水平的改变进行检测; 采用流式细胞仪检测细胞凋亡改变。

**结果:** 模型组大鼠血清中TC、TG和LDL含量较正常组大鼠显著升高( $P<0.05$ ), 而HDL则明显低于正常组( $P<0.05$ ); 与正常组相比, 模型组大鼠肝脏中TRB3及CHOP mRNA水平均显著增加( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ); 免疫组织化学结果显示模型组大鼠肝脏中TRB3及CHOP蛋白表达水平较正常组大鼠显著升高( $P<0.01$ ); 此外流式细胞仪对大鼠肝细胞凋亡进行检测发现, 模型组大鼠肝细胞凋亡与正常组相比明显增多。

**结论:** TRB3和CHOP在基因及蛋白水平表达上调可能与高脂高糖诱导的NAFLD的发生发展有关。

© 2015年版权归百世登出版集团有限公司所有。

**关键词:** 非酒精性脂肪肝; Tribbles相关蛋白3; CCAAT/增强子结合蛋白同源蛋白; 细胞凋亡

**核心提示:** 课题组前期研究发现非酒精性脂肪肝(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)时存在持续的内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS), 但是ERS介导肝细胞损伤的具体机制尚不十分清楚。本次研究从ERS相关信号分子Tribbles相关蛋白3(Tribbles related protein 3, TRB3)和CCAAT/增强子结合蛋白同源蛋白(CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein, CHOP)的表达变化入手, 初步证实NAFLD过程中TRB3和CHOP表达上调可促进细胞凋亡, 从而介导肝细胞损伤的发生。

王欢, 胡晓霞, 路华. Tribbles相关蛋白及CCAAT/增强子结合蛋白同源蛋白在非酒精性脂肪肝中的表达变化. *世界华人消化杂志* 2015; 23(29): 4636-4642 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/23/4636.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v23.i29.4636>

## 0 引言

近年来随着人们饮食结构的改变及生活水平的提高, 非酒精性脂肪性肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)的患病率呈逐年上升趋势<sup>[1,2]</sup>。NAFLD对人体健康有严重危害, 可导致肝纤维化、肝硬化, 严重时甚至可导致肝功能衰竭的发生<sup>[3,4]</sup>。我们在前期研究<sup>[5]</sup>中发现高脂高糖饮食诱导NAFLD过程中大鼠肝组织中内质网应激标志蛋白葡萄糖调节蛋白78(glucose regulated protein 78, GRP78)表达显著升高, 说明NAFLD发生过程中存在明显的肝细胞内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)反应。此外, 研究中还发现NAFLD发生过程中肝细胞凋亡显著增加, 说明NAFLD时可能通过ERS反应促进细胞凋亡从而加重肝组织的损伤, 但是其具体的信号通路尚不十分清楚。本次研究从ERS相关信号分子TRB3和CHOP在NAFLD过程中的表达变化入手, 探讨他们在高脂高糖饮食诱导的NAFLD中的可能作用。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 健康清洁级Wistar大鼠30只, 雌雄不限, 体质量160-170 g(贵州医科大学实验动物中心, 许可证号SCXK-黔2002-0001); 蔗糖(成都金山化学试剂有限公司); 胆固醇

## ■ 研究前沿

NAFLD是代谢综合征在肝脏的表现, 近年来关于内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)与代谢综合征的研究十分广泛, 但是关于ERS在NAFLD发生机制中的作用报道较少, 尤其是NAFLD过程中ERS介导肝细胞凋亡的具体机制仍未完全阐明。

## ■ 相关报道

有研究发现 CCAAT/增强子结合蛋白同源蛋白(CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein, CHOP)基因敲除的小鼠能抵抗ERS诱导的肾小管上皮细胞凋亡, 而CHOP过表达则可促进细胞凋亡的发生。此外还有研究证实Tribbles相关蛋白3(Tribbles related protein 3, TRB3)表达水平上调与细胞凋亡程度呈正相关, 提示CHOP和TRB3可能在细胞凋亡过程中发挥重要作用。

(北京索莱宝科技有限公司); TRB3、CHOP一抗(Bioworld公司); 免疫组织化学二抗试剂盒及二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)显色剂(武汉博士德公司); 流式检测试剂盒(南京碧云天公司); 荧光染料SYBR Green及逆转录试剂(大连宝生物公司); 内参照TRB3、CHOP、 $\beta$ -actin引物(大连宝生物公司)。TRB3: 上游引物: 5'-TCAAGTTGCGTCGATTGTCTTC-3'; 下游引物: 5'-CAGTCATCACACAGGCATCCTC-3'。CHOP: 上游引物: 5'-CCTCGCTCTCCAGAT TCCA-3'; 下游引物: 5'-CTCATTTCTCCTGC TCCTTCTCC-3'。  $\beta$ -actin: 上游引物: 5'-TCCT CCTGAGCGCAAGTACTCT-3'; 下游引物: 5'-GCTCAGTAACAGTCCGCCTAGA-3'。

## 1.2 方法

1.2.1 NAFLD动物模型: 30只大鼠适应性喂养1 wk后随机分为正常对照组和NAFLD组, 每组各15只。正常对照组大鼠给予普通饲料喂养; NAFLD组大鼠给予高脂高糖饲料喂养, 饲料中含78%基础饲料、15%猪油、5%蔗糖及2%胆固醇, 造模时间为16 wk。16 wk末所有大鼠采用乙醚麻醉后股动脉放血处死, 采集大鼠血清及肝脏标本。

1.2.2 病理检查及血清生化检测: 肝组织病理切片采用HE染色后在光学显微镜下观察肝组织的病理形态学变化。采用Siemens全自动生化分析仪检测血清中总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride, TG)、高密度脂蛋白(high-density lipoprotein, HDL)和低密度脂蛋白(low-density lipoprotein, LDL)含量。

1.2.3 肝组织免疫组织化学检测: 肝组织石蜡切片经常规脱蜡水化后, 经3% $H_2O_2$ 封闭内源性过氧化物酶; 通过微波修复抗原后, 滴加封闭液室温放置20 min, 甩掉多余的封闭液后滴加兔抗大鼠TRB3、CHOP一抗(工作浓度为1:200), 置于4℃冰箱内孵育过夜。次日早上PBS洗3次后滴加二抗, 37℃孵育30 min后用PBS洗4次, DAB显色, 苏木素复染。阴性对照用PBS代替一抗。在显微镜高倍镜视野下观察肝细胞TRB3、CHOP阳性表达定位并计算阳性细胞百分率。

1.2.4 实时荧光定量PCR(real-time quantitative PCR, qRT-PCR)检测: 取0.1 g肝组织提取总RNA, 逆转录合成cDNA后进行qRT-PCR检测: cDNA模板2.0  $\mu$ L, 10  $\mu$ mol/L上游引物1.0  $\mu$ L,

10  $\mu$ mol/L下游引物1.0  $\mu$ L, 2 $\times$ SYBR Green I 12.5  $\mu$ L, DEPC  $H_2O$ 补足总体积至25.0  $\mu$ L。反应条件为95℃ 30 s, 95℃ 5 s, 60℃ 1 min, 最后2步重复40个循环。采用目的基因与 $\beta$ -actin基因循环值的比值代表该目的基因的相对表达水平。

1.2.5 细胞凋亡检测: 取1 g新鲜大鼠肝组织, 置于预冷的PBS中, 用剪刀剪碎, 多次PBS悬浮、洗涤后用400目滤网过滤, 得到悬浮肝细胞。取含 $1 \times 10^5$ ~ $5 \times 10^5$ 细胞的细胞悬液, 1000 r/min离心5 min, 弃上清, 加入195.0  $\mu$ L结合液轻轻重悬细胞。加入5.0  $\mu$ L Annexin V-FITC, 轻轻混匀; 再加入10.0  $\mu$ L碘化丙啶, 轻轻混匀。室温避光孵育15 min后采用流式细胞仪进行检测。

统计学处理 用SPSS17.0进行统计分析, 计量资料采用mean $\pm$ SD表示, 两两比较采用 $t$ 检验,  $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

## 2 结果

2.1 大鼠血清中TC、TG、HDL、LDL浓度 各实验组大鼠血清中TC、TG、HDL、LDL浓度如表1。从表1中可见, NAFLD组大鼠血清中TC、TG、LDL浓度较正常对照组大鼠均显著增加, 而HDL浓度则较正常对照组大鼠明显下降, 差异具有统计学意义。

2.2 大鼠肝脏组织形态学改变 正常大鼠肝组织经常规切片、HE染色后在显微镜下观察发现, 肝小叶结构完整, 肝细胞围绕中央静脉呈放射状排列, 肝窦排列整齐, 汇管区结构清晰, 未见肝细胞变性、坏死及炎症细胞的浸润。NAFLD组大鼠肝组织切片在显微镜下观察发现, 正常肝小叶结构遭到破坏, 肝细胞肿大, 肝细胞胞浆内有大量圆形脂滴, 肝细胞空泡样变性较为明显(图1)。

2.3 肝脏中TRB3和CHOP mRNA表达 经qRT-PCR检测发现, 高脂高糖饮食喂养大鼠16 wk后, NAFLD组大鼠肝脏内TRB3和CHOP在基因水平的表达较正常组大鼠增多, 差异具有显著性。肝脏中TRB3和CHOP mRNA的表达如表2。

2.4 肝脏中TRB3和CHOP蛋白表达 从图2中可见TRB3和CHOP在正常组大鼠肝脏中表达较少, 而NAFLD模型组大鼠肝脏内可见大量TRB3和CHOP阳性表达细胞, 表达量较正常组显著增加。各组大鼠肝脏中TRB3和CHOP表达

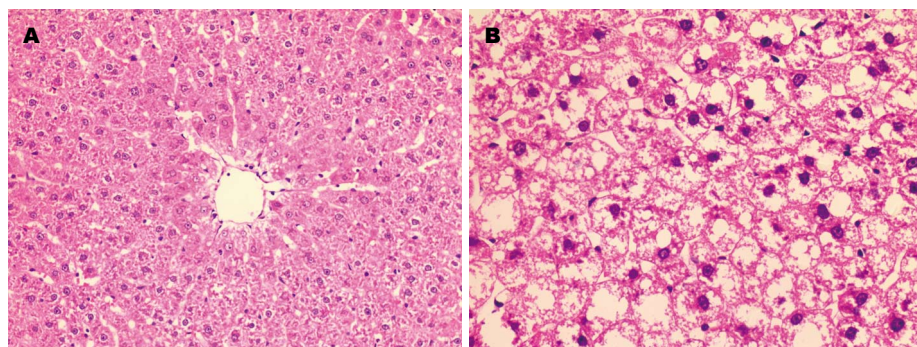


图 1 大鼠肝脏组织形态学改变(HE × 400). A: 正常对照组; B: NAFLD组. NAFLD: 非酒精性脂肪性肝病.

#### 创新盘点

本次研究证实NAFLD过程中CHOP和TRB3在基因及蛋白水平表达上调, 且与肝细胞凋亡趋势一致, 说明NAFLD过程中可能通过促进CHOP和TRB3的表达加速肝细胞凋亡, 从而介导肝细胞损伤的发生.

表 1 血清TC、TG、HDL、LDL浓度 ( $n = 15$ , mean  $\pm$  SD, mmol/L)

分组	TC	TG	HDL	LDL
正常组	1.76 $\pm$ 0.49	1.54 $\pm$ 0.42	0.68 $\pm$ 0.15	1.59 $\pm$ 0.27
NAFLD组	3.95 $\pm$ 0.26 <sup>a</sup>	4.08 $\pm$ 0.51 <sup>a</sup>	0.25 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	3.51 $\pm$ 0.69 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 正常组. NAFLD: 非酒精性脂肪肝; TC: 总胆固醇; TG: 甘油三酯; HDL: 高密度脂蛋白; LDL: 低密度脂蛋白.

表 2 肝脏中TRB3、CHOP基因及蛋白表达 ( $n = 15$ , mean  $\pm$  SD)

分组	TRB3 mRNA	TRB3蛋白(%)	CHOP mRNA	CHOP蛋白(%)
正常组	45.1 $\pm$ 13.7	1.3 $\pm$ 0.1	96.7 $\pm$ 20.9	1.5 $\pm$ 0.2
NAFLD组	265.3 $\pm$ 56.2 <sup>b</sup>	10.6 $\pm$ 2.4 <sup>b</sup>	208.3 $\pm$ 29.5 <sup>a</sup>	7.4 $\pm$ 1.6 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 正常组. TRB3: Tribbles相关蛋白; CHOP: CCAAT/增强子结合蛋白同源蛋白; NAFLD: 非酒精性脂肪性肝病.

情况如表2.

2.5 肝脏中细胞凋亡检测 如图3所示, 流式细胞仪检测大鼠肝脏内细胞凋亡发现, 经高脂高糖饮食诱导16 wk, NAFLD组大鼠肝组织中细胞凋亡率较正常组明显增多( $0.058 \pm 0.0130$  vs  $0.023 \pm 0.009$ ), 差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ).

### 3 讨论

NAFLD是代谢综合征在肝脏的表现, 其疾病谱包括非酒精性单纯性脂肪肝、非酒精性脂肪性肝炎及肝纤维化, 严重的患者甚至发展为肝硬化和肝癌<sup>[6-8]</sup>. 内质网是细胞内重要的膜性细胞器, 肝细胞含有丰富的内质网, 肝细胞的许多重要功能, 如脂质的代谢、蛋白质合成、糖代谢、毒物及药物代谢均在内质网进行, 因此内质网功能正常是肝细胞存活的必要条件<sup>[9-11]</sup>. 在缺氧、药物、病毒感染、自

由基损伤等病因的作用下, 可使内质网的正常功能被打乱并通过相应的信号通路引发细胞内一系列的反应, 称为ERS<sup>[12-14]</sup>. 课题组前期研究发现, 高脂高糖饮食喂养大鼠16 wk后, 大鼠肝脏内GRP78 mRNA及蛋白的表达均显著增多, 说明高脂高糖饮食可诱发肝细胞发生ERS反应<sup>[5]</sup>.

轻度的ERS可通过未折叠蛋白反应减轻有害因素对细胞的不良影响, 而持久或严重的ERS反应则通过不同的机制引起细胞凋亡<sup>[15-17]</sup>, 其中ATF6-CHOP信号通路是其中重要的一条信号通路<sup>[18-20]</sup>. 未发生ERS反应时, ATF6与内质网分子伴侣GRP78结合处于无活性状态; 发生ERS时, ATF6则与GRP78解离并活化, 活化的ATF6可移位至细胞核并与CHOP启动子上的ERS反应元件结合, 直接促进CHOP表达<sup>[21-23]</sup>. 研究<sup>[24,25]</sup>发现, CHOP表达



#### 应用要点

ERS是NAFLD发生机制中的一个重要环节, 减少ERS介导的细胞凋亡有望成为治疗NAFLD的有效途径. 因此针对ERS信号通路中关键信号分子来寻找新的药物治疗靶点成为可能.

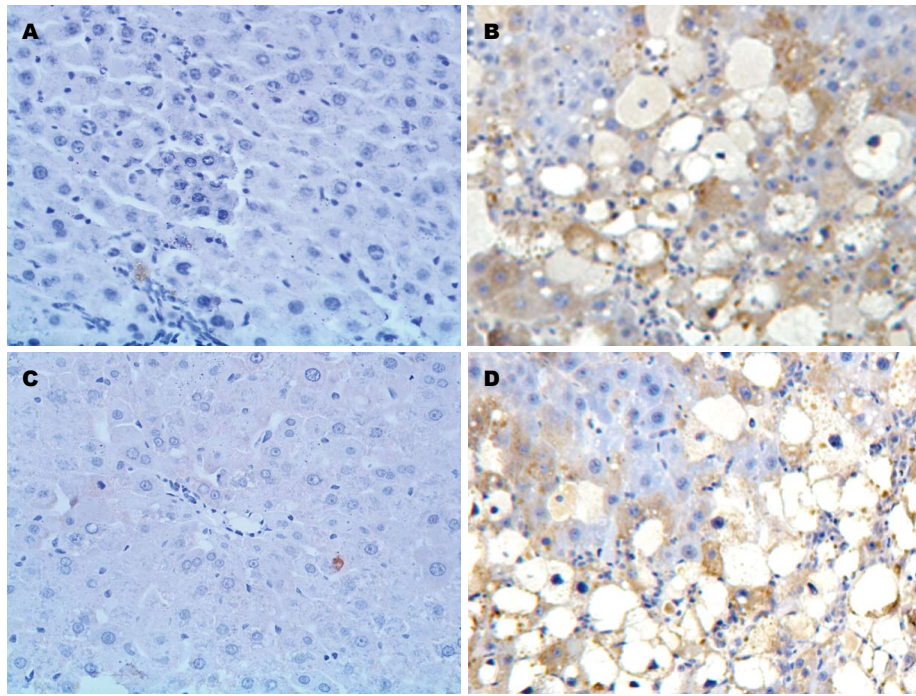


图 2 免疫组织化学技术检测肝脏内TRB3、CHOP蛋白表达( $\times 400$ ). A: 正常组TRB3蛋白表达; B: NAFLD组TRB3蛋白表达; C: 正常组CHOP蛋白表达; D: NAFLD组CHOP蛋白表达. TRB3: Tribbles相关蛋白; CHOP: CCAAT/增强子结合蛋白同源蛋白; NAFLD: 非酒精性脂肪性肝病.

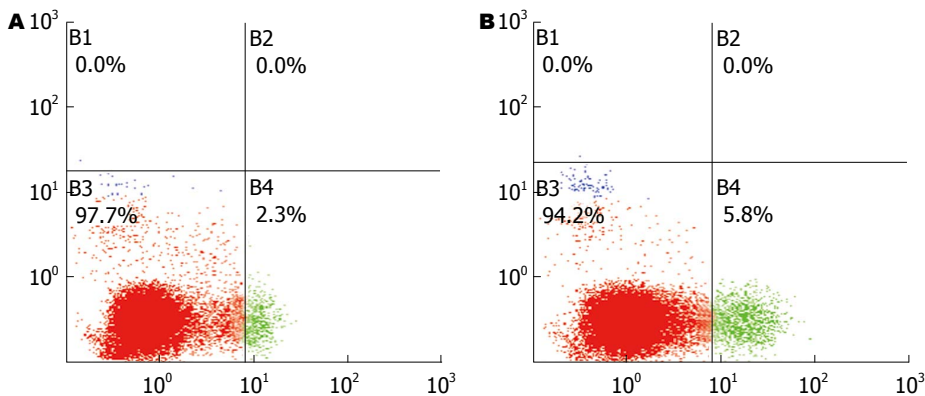


图 3 流式细胞仪检测大鼠肝脏内细胞凋亡. A: 正常对照组; B: NAFLD组. NAFLD: 非酒精性脂肪性肝病.

上调与ERS介导的细胞凋亡有关. 如CHOP基因敲除的小鼠能抵抗ERS诱导的肾小管上皮细胞凋亡; 而CHOP过表达则可促进细胞凋亡的发生. TRB3是果蝇Tribbles蛋白的哺乳动物同源蛋白, 在ERS通路中, *TRB3*属于下游基因<sup>[26,27]</sup>. ERS时表达上调的CHOP可以与*TRB3*启动子区域的一段33 bp重复序列结合, 从而促进*TRB3*基因的表达<sup>[28]</sup>. 近年来有研究<sup>[29-31]</sup>发现TRB3表达水平上调与细胞凋亡程度呈正相关, 相反利用RNA干扰技术抑制TRB3的表达, 则可以显著减少大麻素等诱导的细胞凋亡, 提示TRB3可能在CHOP介导的细胞凋

亡过程中发挥重要作用.

通过本次研究发现, 大鼠经高脂高糖饮食喂养16 wk后血清中TG、TC、LDL水平明显高于正常组, 而HDL水平则较正常组明显减少, 说明NAFLD组大鼠发生了明显的脂质代谢紊乱. 此外, 病理形态学检查发现NAFLD组大鼠肝脏出现单纯性脂肪肝改变, 表明我们成功制备了NAFLD动物模型. 此外, 高脂高糖饮食喂养16 wk后, 大鼠肝组织中CHOP和TRB3基因的表达水平显著增高, 同时, 免疫组织化学检测结果发现肝脏内CHOP和TRB3蛋白的表达也较正常大鼠明显增加. 进一步研究发

现, NAFLD组大鼠肝细胞凋亡率较正常组大鼠显著升高. 从上述结果中可以看出NAFLD过程中CHOP和TRB3 mRNA及蛋白表达趋势与肝细胞凋亡率一致, 因此我们推测高脂高糖饮食诱导NAFLD过程中可能通过上调CHOP和TRB3的表达促进肝细胞凋亡, 从而参与NAFLD的发生发展.

#### 4 参考文献

- 任哲, 任江南. 非酒精性脂肪肝患者血清肝型脂酸结合蛋白检测的临床意义. 齐齐哈尔医学院学报 2014; 35: 1566-1568
- Fan JG, Farrell GC. Epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease in China. *J Hepatol* 2009; 50: 204-210 [PMID: 19014878 DOI: 10.1016/j.jhep.2008.10.010]
- 白纪红, 梁志清, 赵日红, 刘艳华, 林秋香, 赵雪. 银杏黄酮对非酒精性脂肪肝小鼠肝脏Toll样受体-4和核因子-KB表达的影响. 实用医学杂志 2015; 31: 1091-1095
- 叶俊钊, 晁康, 吴艳琴, 钟碧慧. 非酒精性脂肪性肝病导致肝细胞癌发生的机制. 肝脏 2014; 19: 536-539
- 胡晓霞, 王艳, 王晋星. Calnexin及GRP78在大鼠非酒精性脂肪肝细胞凋亡中的作用. 世界华人消化杂志 2014; 19: 2740-2745
- Kim CH, Younossi ZM. Nonalcoholic fatty liver disease: a manifestation of the metabolic syndrome. *Cleve Clin J Med* 2008; 75: 721-728 [PMID: 18939388]
- 中华医学会肝病学分会脂肪肝和酒精性肝病组. 非酒精性脂肪性肝病诊疗指南. 临床肝胆病杂志 2010; 26: 120-124
- 吴涛, 季光. 非酒精性脂肪性肝病的代谢发病机制. 世界华人消化杂志 2009; 17: 2908-2914
- Hosoi T, Ozawa K. Endoplasmic reticulum stress in disease: mechanisms and therapeutic opportunities. *Clin Sci (Lond)* 2010; 118: 19-29 [PMID: 19780718 DOI: 10.1042/CS20080680]
- Malhi H, Kaufman RJ. Endoplasmic reticulum stress in liver disease. *J Hepatol* 2011; 54: 795-809 [PMID: 21145844 DOI: 10.1016/j.jhep.2010.11.005]
- Zhang N, Lu Y, Shen X, Bao Y, Cheng J, Chen L, Li B, Zhang Q. Fenofibrate treatment attenuated chronic endoplasmic reticulum stress in the liver of nonalcoholic fatty liver disease mice. *Pharmacology* 2015; 95: 173-180 [PMID: 25896720 DOI: 10.1159/000380952]
- 王洪岩, 刘晓璐, 杜雅菊, 赵磊. 内质网应激与肝脏疾病研究进展. 世界华人消化杂志 2012; 20: 451-459
- 周婷, 刘铁夫. 内质网应激与肝脏疾病. 现代生物医学进展 2012; 12: 5982-5984
- 马光斌, 陆伦根. 内质网应激在肝脏疾病中的研究进展. 胃肠病学 2012; 17: 433-435
- Liu Y, Wang J, Qi SY, Ru LS, Ding C, Wang HJ, Zhao JS, Li JJ, Li AY, Wang DM. Reduced endoplasmic reticulum stress might alter the course of heart failure via caspase-12 and JNK pathways. *Can J Cardiol* 2014; 30: 368-375 [PMID: 24565258 DOI: 10.1016/j.cjca.2013.11.001]
- Lakshmanan AP, Thandavarayan RA, Palaniyandi SS, Sari FR, Meilei H, Giridharan VV, Soetikno V, Suzuki K, Kodama M, Watanabe K. Modulation of AT-1R/CHOP-JNK-Caspase12 pathway by olmesartan treatment attenuates ER stress-induced renal apoptosis in streptozotocin-induced diabetic mice. *Eur J Pharm Sci* 2011; 44: 627-634 [PMID: 22033153 DOI: 10.1016/j.ejps.2011.10.009]
- Guo G, Meng Y, Tan W, Xia Y, Cheng C, Chen X, Gu Z. Induction of Apoptosis Coupled to Endoplasmic Reticulum Stress through Regulation of CHOP and JNK in Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells from Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *J Immunol Res* 2015; 2015: 183738 [PMID: 26090483 DOI: 10.1155/2015/183738]
- Hirsch I, Weiwad M, Prell E, Ferrari DM. ERp29 deficiency affects sensitivity to apoptosis via impairment of the ATF6-CHOP pathway of stress response. *Apoptosis* 2014; 19: 801-815 [PMID: 24370996 DOI: 10.1007/s10495-013-0961-0]
- Liu L, Liu C, Lu Y, Liu L, Jiang Y. ER stress related factor ATF6 and caspase-12 trigger apoptosis in neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Int J Clin Exp Pathol* 2015; 8: 6960-6966 [PMID: 26261584]
- Karali E, Bellou S, Stellas D, Klinakis A, Murphy C, Fotsis T. VEGF Signals through ATF6 and PERK to promote endothelial cell survival and angiogenesis in the absence of ER stress. *Mol Cell* 2014; 54: 559-572 [PMID: 24746698 DOI: 10.1016/j.molcel.2014.03.022]
- Guo FJ, Xiong Z, Lu X, Ye M, Han X, Jiang R. ATF6 upregulates XBP1S and inhibits ER stress-mediated apoptosis in osteoarthritis cartilage. *Cell Signal* 2014; 26: 332-342 [PMID: 24269637 DOI: 10.1016/j.cellsig.2013.11.018]
- Sano R, Reed JC. ER stress-induced cell death mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1833: 3460-3470 [PMID: 23850759 DOI: 10.1016/j.bbamcr.2013.06.028]
- Lee WS, Sung MS, Lee EG, Yoo HG, Cheon YH, Chae HJ, Yoo WH. A pathogenic role for ER stress-induced autophagy and ER chaperone GRP78/BiP in T lymphocyte systemic lupus erythematosus. *J Leukoc Biol* 2015; 97: 425-433 [PMID: 25516752 DOI: 10.1189/jlb.6A0214-097R]
- Yang X, Du T, Wang X, Zhang Y, Hu W, Du X, Miao L, Han C. IDH1, a CHOP and C/EBP $\beta$ -responsive gene under ER stress, sensitizes human melanoma cells to hypoxia-induced apoptosis. *Cancer Lett* 2015; 365: 201-210 [PMID: 26049021 DOI: 10.1016/j.canlet.2015.05.027]
- Nam DH, Han JH, Lee TJ, Shishido T, Lim JH, Kim GY, Woo CH. CHOP deficiency prevents methylglyoxal-induced myocyte apoptosis and cardiac dysfunction. *J Mol Cell Cardiol* 2015; 85: 168-177 [PMID: 26027784 DOI: 10.1016/j.yjmcc.2015.05]
- Yan Q, Zhu H, Wang FH, Feng JY, Wang WQ, Shi X, Zhou YP, Zhang X, Sun XD. Inhibition of TRB3 Protects Photoreceptors against Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Apoptosis after Experimental Retinal Detachment. *Curr Eye Res* 2015 Aug 19. [Epub ahead of print] [PMID: 25860695]

#### 同行评价

本研究发现, NAFLD模型组大鼠肝脏中TRB3和CHOP在基因转录和翻译水平上显著高于正常组大鼠, 并且发现其表达与肝细胞凋亡呈一致性关系. 研究结果对NAFLD的发病机制具有参考价值. 本研究进一步丰富了NAFLD的基础研究.

- 27 Rodrigues Bde A, Pauli LS, DE Souza CT, DA Silva AS, Cintra DE, Marinho R, DE Moura LP, Ropelle EC, Botezelli JD, Ropelle ER, Pauli JR. Acute Exercise Decreases Tribbles Homolog 3 Protein Levels in the Hypothalamus of Obese Rats. *Med Sci Sports Exerc* 2015; 47: 1613-1623 [PMID: 25412294]
- 28 杜锡潮, 韩冰, 谢汝佳, 邹河, 杨勤. 肝纤维化大鼠肝脏中内质网应激相关分子CHOP和TRB3的表达变化. *中国病理生理杂志* 2013; 29: 906-912
- 29 Wang W, Cheng J, Sun A, Lv S, Liu H, Liu X, Guan G, Liu G. TRB3 mediates renal tubular cell apoptosis associated with proteinuria. *Clin Exp Med* 2015; 15: 167-177 [PMID: 24925634 DOI: 10.1007/s10238-014-0287-4]
- 30 Yan W, Wang Y, Xiao Y, Wen J, Wu J, Du L, Cai W. Palmitate induces TRB3 expression and promotes apoptosis in human liver cells. *Cell Physiol Biochem* 2014; 33: 823-834 [PMID: 24685558 DOI: 10.1159/000358655]
- 31 Humphrey RK, Ray A, Gonuguntla S, Hao E, Jhala US. Loss of TRB3 alters dynamics of MLK3-JNK signaling and inhibits cytokine-activated pancreatic beta cell death. *J Biol Chem* 2014; 289: 29994-30004 [PMID: 25204656 DOI: 10.1074/jbc.M114]

编辑: 于明茜 电编: 都珍珍



ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) DOI: 10.11569 2015年版权归百世登出版集团有限公司所有

•消息•

## 《世界华人消化杂志》栏目设置

**本刊讯** 本刊栏目设置包括述评, 基础研究, 临床研究, 焦点论坛, 文献综述, 研究快报, 临床经验, 病例报告, 会议纪要. 文稿应具科学性、先进性、可读性及实用性, 重点突出, 文字简练, 数据可靠, 写作规范, 表达准确.



## YWHAE对结肠癌细胞增殖的影响及表达意义

解娜, 黄幼生, 罗志飞, 薛逢贵

解娜, 黄幼生, 罗志飞, 薛逢贵, 海南医学院附属医院病理科 海南医学院病理教研室 海南省海口市 571101

解娜, 讲师, 从事肿瘤病因与发病机制的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 81260321

海南省自然科学基金资助项目, No. 811206

作者贡献分布: 黄幼生与解娜对此文所作贡献均等; 课题设计与试剂提供由黄幼生完成; 数据分析、实验过程及论文写作由黄幼生与解娜共同完成; 罗志飞与薛逢贵负责免疫组织化学与标本收集工作。

通讯作者: 黄幼生, 副教授, 571101, 海南省海口市龙华区龙华路31号, 海南医学院附属医院病理科。

hys768811@163.com

电话: 0898-66723333

收稿日期: 2015-07-07 修回日期: 2015-09-15

接受日期: 2015-09-21 在线出版日期: 2015-10-18

### RNA interference based silencing of YWHAE suppresses proliferation of colon cancer cells

Na Xie, You-Sheng Huang, Zhi-Fei Luo, Feng-Gui Xue

Na Xie, You-Sheng Huang, Zhi-Fei Luo, Feng-Gui Xue, Department of Pathology, the Affiliated Hospital of Hainan Medical University, Haikou 571101, Hainan Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 81260321; the National Natural Science Foundation of Hainan Province, No. 811206

Correspondence to: You-Sheng Huang, Associate Professor, Department of Pathology, the Affiliated Hospital of Hainan Medical University, 31 Longhua Road, Longhua District, Haikou 571101, Hainan Province, China. hys768811@163.com

Received: 2015-07-07 Revised: 2015-09-15

Accepted: 2015-09-21 Published online: 2015-10-18

### Abstract

**AIM:** To investigate the correlation between YWHAE overexpression and colon cancer proliferation.

**METHODS:** We conducted immunohistochemical analysis of YWHAE overexpression in 87 colon carcinoma specimens and analyzed its relationship with clinical and pathological parameters. YWHAE expression was then silenced by RNA interference in colon cancer cell line HT-29, and the expression levels of YWHAE protein and mRNA were assayed by Western blot and reverse transcription-PCR, respectively. Cell proliferation was evaluated using the MTT method, and cell cycle and apoptosis were examined by flow cytometry. Colony formation assay was used to determine the growth properties of transfected cells.

**RESULTS:** YWHAE was highly expressed in colon carcinoma, and negative or low expression was observed in colon mucosal epithelial cells ( $P < 0.001$ ). The expression intensity of YWHAE was significantly higher in colon cancer with metastasis than in colon cancer without metastasis ( $P < 0.05$ ). The proliferation and colony formation ability of colon cancer cells were significantly reduced after silencing of YWHAE expression. Additional results showed that reduced YWHAE expression in colon cells led to an increased cell apoptosis rate and cell cycle  $G_1$  arrest.

**CONCLUSION:** YWHAE is overexpressed in colon cancer, which may be related to metastasis in colon carcinoma. Silencing of YWHAE inhibited the proliferation ability of colon cancer cells, which may be associated with cell apoptosis and cell cycle arrest.

© 2015 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

### 背景资料

结肠癌是我国常见的恶性肿瘤之一, 侵袭、转移、复发是患者常见的死亡原因。YWHAE基因被发现多种肿瘤中高表达, 与肿瘤转移、复发相关, 其在肿瘤组织中高表达被认为是患者预后不良的指标之一。

### 同行评议者

林洁, 副教授, 南方医科大学基础医学院病理学系; 周建奖, 教授, 贵阳医学院分子生物学重点实验室

## ■ 研究前沿

YWHAE在结肠癌细胞中高表达, 通过抑制YWHAE的表达或裂解YWHAE蛋白可促进癌细胞的凋亡、抑制癌细胞的增殖, 其机制可能与下调过氧化物酶体增殖物激活受体, 从而活化Bax和Bad相关。但YWHAE在结肠癌组织中的表达情况尚不清楚, 是否与肿瘤的转移复发, YWHAE促肿瘤增生、抑制肿瘤凋亡的分子机制等亟待进一步研究。

**Key Words:** *YWHAE*; Colon cancer; Proliferation; RNA interference; Apoptosis

Xie N, Huang YS, Luo ZF, Xue FG. RNA interference based silencing of YWHAE suppresses proliferation of colon cancer cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2015; 23(29): 4643-4651 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/23/4643.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v23.i29.4643>

## 摘要

**目的:** 探讨YWHAE基因表达与结肠癌细胞增殖的关系及其在结肠癌组织中表达的临床意义。

**方法:** 应用免疫组织化学探讨YWHAE过表达与结肠癌转移、分化及分期的关系; 慢病毒转染小RNA沉默结肠癌HT-29细胞YWHAE基因, RT-PCR、Western blot技术检测沉默效率; 四甲基偶氮唑盐微量酶反应比色法(methyl-thiazolyl-tetrazolium, MTT)技术观察转染前后细胞增殖变化; 流式细胞术检测转染前后细胞周期变化及凋亡情况; 细胞克隆实验检测转染前后细胞克隆形成情况。

**结果:** YWHAE在结肠癌组织中高表达, 在癌旁5 cm处黏膜正常腺体中低表达或表达缺失( $P<0.001$ ), 发生转移的结肠癌YWHAE表达要明显高于未转移的结肠癌组织( $P<0.05$ ); 高效转染、沉默YWHAE基因表达后, 结肠癌HT-29细胞长速度明显减慢( $P<0.01$ ), 细胞凋亡增加, 细胞周期阻滞于G<sub>1</sub>期, 细胞克隆形成率显著降低( $P<0.01$ )。

**结论:** 沉默YWHAE基因表达能抑制结肠癌细胞增殖, 可能与促进肿瘤细胞凋亡及细胞周期阻滞有关。

© 2015年版权归百世登出版集团有限公司所有。

**关键词:** YWHAE基因; 结肠癌; 细胞增殖; RNA干扰; 凋亡

**核心提示:** YWHAE在结肠癌组织中高表达, 与结肠癌的转移、分期相关; 沉默结肠癌细胞YWHAE基因表达后, 能捕获结肠癌细胞周期在G<sub>1</sub>期、促进结肠癌细胞凋亡, 抑制结肠癌细胞生长。

解娜, 黄幼生, 罗志飞, 薛逢贵. YWHAE对结肠癌细胞增殖的影响及表达意义. 世界华人消化杂志 2015;

23(29): 4643-4651 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/23/4643.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v23.i29.4643>

## 0 引言

结肠癌是我国第四常见的恶性肿瘤, 转移、复发是绝大多数结肠癌患者的首要死亡原因<sup>[1,2]</sup>. 手术治疗仍是结肠癌最常用的治疗措施, 然而对转移患者缺乏效率. 如何抑制结肠癌转移、复发及提高结肠癌转移患者的生存时间是目前亟需解决的问题. 探讨结肠癌转移机制、寻找结肠癌转移分子靶标对判断预后、设计靶点药物及提高治疗水平具有重要意义。

YWHAE基因编码的蛋白属于14-3-3家族中的一个亚型: 14-3-3ε<sup>[3]</sup>. 14-3-3蛋白是细胞中含量最丰富的蛋白之一. 在哺乳动物中, 14-3-3蛋白家族是一个由7个亚型(β、ε、η、γ、τ、ζ和σ)组成, 普遍存在又高度保守的酸性蛋白家族<sup>[3,4]</sup>. 14-3-3蛋白参与细胞多种生理活动. 近年研究<sup>[3-6]</sup>证实14-3-3蛋白在肿瘤的形成及发展过程中扮演着重要而复杂的角色. 目前研究<sup>[5,6]</sup>发现在肝癌和肾癌中YWHAE(14-3-3ε)高表达, 高表达的YWHAE可以促进癌细胞增殖、迁移和抑制凋亡, 其机制可能与抑制YWHAE基因可减少胞内线粒体、通过竞争性抑制剂破坏YWHAE蛋白配体关联等相关。

前期研究<sup>[7]</sup>发现, 用抑癌剂二烯丙基二硫(diallyl disulfide, DADS)处理结肠癌细胞HT-29后, YWHAE基因mRNA转录水平下调. 为了进一步研究YWHAE与结肠癌的关系, 本文在组织学水平上探讨YWHAE表达与结肠癌发生发展的关系; 应用RNA干扰(RNA interference, RNAi)技术沉默YWHAE基因表达, 观察YWHAE基因沉默前后结肠癌细胞功能学变化, 为阐明结肠癌发生发展的分子机制奠定基础。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 87例结肠癌及其配对癌旁5 cm处正常黏膜组织均来源于海南医学院附属医院病理科2008-2013年存档蜡块(其中28例含有新鲜结肠癌及其配对组织). 所有病例均是具有完整病史资料的手术切除标本(表1). 所选病例均经2名具有丰富病理诊断经验的病理医师复诊及分型、分级、分期. PV-9000免疫组织化学检测

试剂盒、DAB显色液购自福州迈新生物有限公司; YWHAE多克隆、GAPDH单抗及二抗抗体为Abcam公司产品. HT-29及293T细胞系购自上海吉凯生物技术有限公司. 靶向YWHAE基因序列(CTGAGTGAAGAAAGCTATA、TGACAGTTGAAGAAAGAAA)设计YWHAE-shRNA, GV248载体连接及慢病毒包装由上海吉凯生物技术有限公司完成; RT-PCR相关试剂盒购自北京天根生物有限公司. 蛋白裂解液及BCA蛋白定量试剂盒购自杭州碧云天.

## 1.2 方法

1.2.1 组织芯片制作: 组织芯片具体制作步骤按文献[8]进行. 显微镜下选择HE切片中适宜的样本位置, 并对应标记好石蜡标本, 每个标本取两点. 根据实验研究的需要, 受体蜡块设计为18×12点阵. 将各组样本按病理号及分期顺序排放, 阵列孔左上方第1排第1个孔设置为空白标记, 174个蜡块制作成2张组织芯片.

1.2.2 免疫组织化学(SP法): 具体操作步骤按文献[8]进行. 切片二甲苯脱蜡、逐步水化、30% $H_2O_2$ -甲醇封闭, 枸橼酸(pH 6.0)高压修复10 min, 一抗4℃过夜; 次日, 切片恢复室温后, 二抗37℃孵育20 min, DAB显色至阳性对照照片膜清晰着色, 苏木素衬染1 min. 免疫组织化学结果判定方法参考文献[6], 以癌细胞膜浆着色比例及着色深浅作为判读依据: 没有膜浆着色计0分; <10%的细胞膜浆着色计1分, 微弱着色计1分(4倍镜下不可见着色); ≥10%, <50%的肿瘤细胞膜浆着色计2分, 中等强度着色计2分(4倍镜下可见明确的膜浆着色); ≥50%肿瘤细胞膜浆着色计3分, 膜浆强着色, 呈棕黄色, 肉眼可见计3分. 为便于统计, 将得分分为4分及4分以下的归为低表达组, 高于4分的归为高表达组.

1.2.3 慢病毒包装: 接种293T细胞于6孔板中, 培养至80%融合度, 细胞处于对数生长期. 按吉凯基因慢病毒包装试剂说明书进行包装. 在1.5 mL灭菌EP管内加入1.5 μg包装混合质粒、0.5 μg目标质粒及250 μL的无血清Opti-MEM, 轻柔混匀. 另一支1.5 mL灭菌EP管中, 取9 μL脂质体2000溶于250 μL无血清Opti-MEM培养基中, 轻柔混匀. 室温放置5 min后, 将DNA溶液和脂质体溶液轻柔混匀, 室温孵育20 min. 在六孔板中每孔加入1 mL含血清的生长培养基, 再加入DNA-脂质体复合物. 37℃  $CO_2$ 孵箱中

孵育48-72 h收获含病毒的上清. 过滤去除沉淀, -80℃贮存待用.

1.2.4 转染人结肠癌细胞: 在37℃、50 mL/L  $CO_2$ 饱和湿度培养箱中培养结肠癌HT-29细胞, 培养基为含10%小牛血清的DMEM. 实验分为3组: 空白组(未转染的细胞)、绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)控制组(阴性转染控制组)、shRNA-YWHAE干扰组. 将细胞种于6孔板, 在细胞对数生长期30%满度时进行转染, 具体转染步骤按吉凯基因提供的说明书进行. 在1 mL无血清及抗生素的培养基中加入 $2 \times 10^6$  TU目标病毒、5 ng Polybrene, 分别转染入干扰组及控制组细胞, 2-3 d后在倒置荧光显微镜下观察细胞转染效率. 在感染效率超过90%, 细胞生长80%满度, 且细胞处于对数生长期时, 大约4 d后, 收集细胞, 进行下一步干扰抑制效率及功能试验检测.

1.2.5 RT-PCR检测: 利用Primer6.0软件设计YWHAE及GAPDH基因mRNA引物, YWHAE引物序列: 上游引物: 5'-TGTGTCGTCTCCG TGCCAGAT-3', 下游引物: 5'-AAGAGGTTG AGCGAGCGAAGGA-3'; 管家基因GAPDH上游引物: 5'-GCCAAAAGGGTCATCATCTC-3', 下游引物: 5'-GTAGAGGCAGGGATGATGT TC-3'. RT-PCR及图像分析参考应用文献[7]进行. 简而言之, 收集各组细胞, 提取总RNA, 总RNA提取参照TRIzol试剂盒说明书进行; 琼脂糖凝胶电泳及分光光度计检测RNA纯度及浓度; 稀释成同一浓度后进行逆转录及PCR, 25 μL PCR反应体系包括: 上下游引物各1 μL(20 μmol),  $2 \times$  Mix 12.5 μL(包括反应缓冲液、dNTP、 $MgCl_2$ 、Taq酶), 双蒸水9.5 μL, cDNA标本1 μL. 反应条件: 95℃预变性2 min, 94℃ 30 s, 56℃退火30 s, 72℃延伸45 s, 25次循环. 同时设置阴、阳性对照, 每个样本进行3次重复. 将所扩增的PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳、凝胶电泳成像仪成像并拍摄. 应用天根5500凝胶成像处理软件进行图像分析.

1.2.6 Western blot检测: 转染后, 收集裂解各组细胞并对其定量, 电泳分离, 转膜, 固定蛋白于PVDF膜上, 漂洗, 5%脱脂奶粉常温封闭2 h, 加入YWHAE(1:1000)、GAPDH兔抗人一抗(1:1000)4℃孵育过夜, 洗涤3遍, 加入羊抗兔二抗(1:4000)常温孵育1.5 h, 洗涤3遍, ECL底物显

## ■ 相关报道

在结肠癌组织中, YWHAE发生核表达的丢失或下降, 而胞浆表达的提高, 与结肠癌的预后不良有关. Smad4与YWHAE相互作用, 导致细胞质中YWHAE被隔离, 从而影响YWHAE的信号转导、周期调控以及凋亡等功能.



■ 创新盘点

前期报道结肠癌组织中存在YWHAE的表达增高,与结肠癌预后不良有关;YWHAE表达增高可抑制结肠癌细胞凋亡;药物抑制结肠癌细胞增生,发现有YWHAE的表达改变;YWHAE沉默诱导结肠癌细胞周期阻滞及凋亡涉及多种信号通路.本文系统地组织学、细胞学两方面探讨结肠癌转移、增殖与YWHAE表达的关系,初步探讨其内在联系.

表 1 YWHAE在结肠癌组织中的表达与临床病理特征的关系

分组	n	YWHAE表达情况		$\chi^2$ 值	P值
		高表达	低表达		
分化程度				0.520	0.727
高、中	69	51	18		
低	18	12	6		
年龄(岁)				0.530	1.000
<60	31	23	8		
≥60	56	40	16		
性别				0.321	0.759
男	53	41	12		
女	34	22	12		
转移情况				4.607	0.037
无	50	39	11		
有	37	35	2		
部位				0.092	1.000
右半结肠	61	60	11		
左半结肠	16	14	2		
TNM分期				4.607	0.037
I + II	50	39	11		
III+IV	37	35	2		

色,分析其光密度(GAPDH为内参).

1.2.7 四甲基偶氮唑盐微量酶反应比色法检测:将转染后各组结肠癌消化、吹打,调整细胞悬液浓度 $2 \times 10^3$ /mL,置37℃,50 mL/L CO<sub>2</sub>恒温箱中孵育,分别于贴壁后0、24、48、72、96 h每孔加入200 μL四甲基偶氮唑盐微量酶反应比色法(methyl-thiazolyl-tetrazolium, MTT)溶液(5 mg/mL),继续培养4 h,离心,小心吸掉上清液,每孔加入100 μL二甲基亚砷,置摇床上低速振荡15 min,使结晶物充分溶解.在酶联免疫检测仪OD570处测量各孔的吸光值.以时间为横坐标,OD值为纵坐标,绘制生长曲线.

1.2.8 细胞克隆实验:将转染后结肠癌细胞按每组500个细胞种植于6孔板中,每组3复孔,置37℃,50 mL/L CO<sub>2</sub>恒温箱中孵育,每隔3 d换液1次;培养至控制组大多数克隆细胞数>50时终止培养,PBS洗涤2次、多聚甲醛固定、GIEMSA染色、拍照、计克隆数.

1.2.9 细胞周期及凋亡检测:将转染后各组结肠癌消化、吹打、PBS清洗2遍,去上清,预备细胞周期检测的细胞重悬于700 mL/L乙醇中,4℃过夜,PI染色;预备细胞凋亡的细胞1×binding buffer洗涤细胞沉淀1次,1×staining buffer重悬细胞沉淀,采用Annexin V-APC染

色;FACSCalibur流式细胞仪检测细胞周期及凋亡.

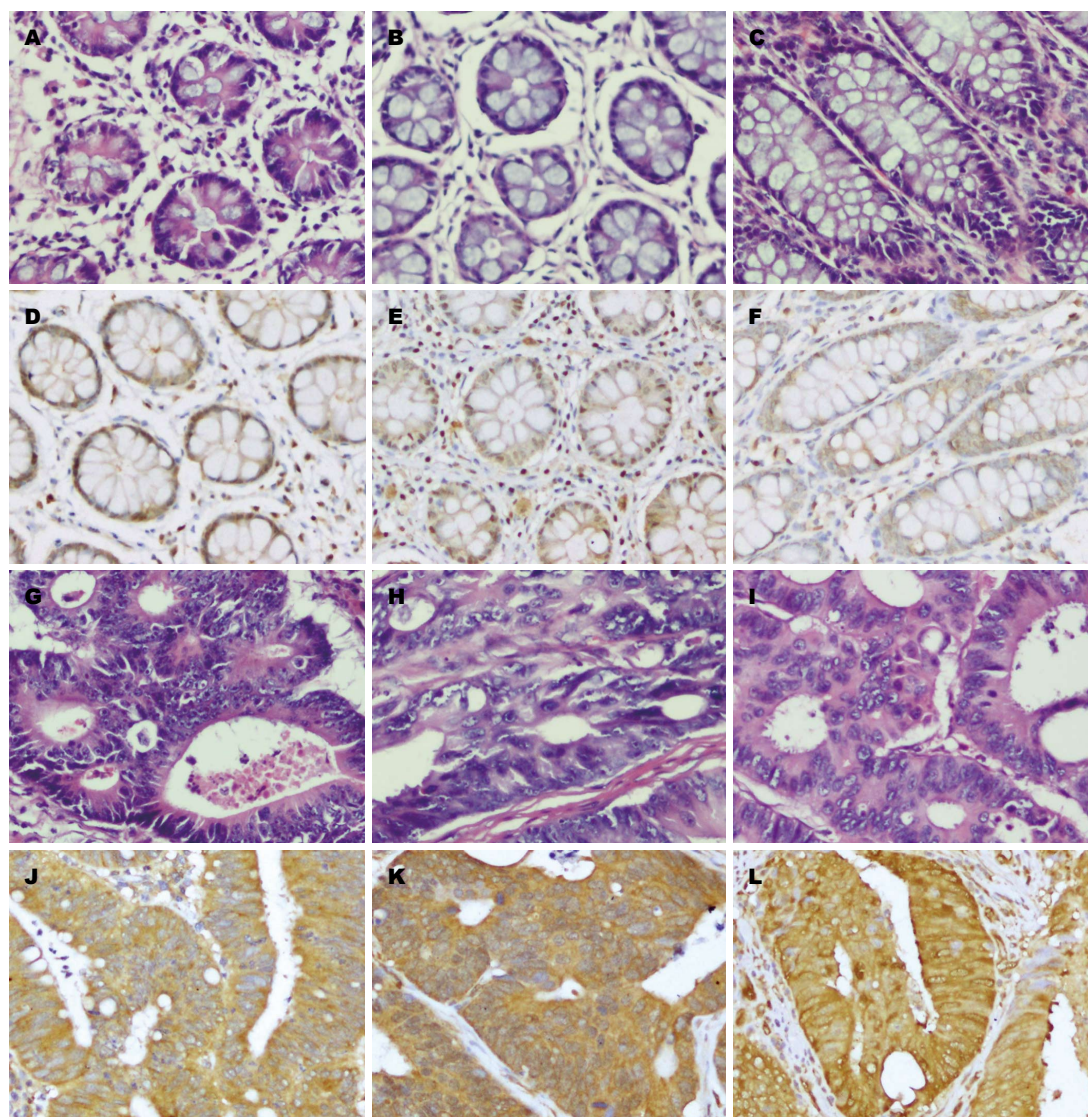
统计学处理 应用SPSS18.0软件进行统计学分析,免疫组织化学结果与临床病理参数间的比较采用四格表 $\chi^2$ 检验或Fisher确切概率计算;转染前后细胞功能学实验及基因表达变化等各因素相关关系,采用Spearman等级相关及配对t检测等分析.所有统计学分析均采用双侧检测, $P<0.05$ 差异有统计学意义.

2 结果

2.1 YWHAE在结肠癌组织中的表达 YWHAE在结肠癌及癌旁黏膜组织中核、浆、膜均有着色.免疫组织化学染色显示YWHAE在大部分癌旁结肠黏膜正常腺体中仅核内表达,胞浆表达缺失或局灶阳性表达,结肠癌组织YWHAE胞浆阳性表达(81/87),表达率及表达强度明显高于配对结肠黏膜组织(14/87, $P<0.01$ );转移组中YWHAE表达高于未转移组( $P=0.037$ ),三、四期的病例中YWHAE的表达要高于一、二期( $P=0.037$ ).YWHAE的表达与年龄、性别、分化、部位等没有明显的关系(表1,图1).

2.2 RNAi沉默YWHAE基因表达效率检测 YWHAE干扰质粒及GFP阴性控制质粒慢病毒包装转染结肠癌HT-29细胞3 d后,倒置荧光显微镜镜下观察,显示GFP阴性控制组及YWHAE干扰组细胞表面出现绿色荧光表达,10个高倍视野下仅个别细胞未有表达,感染效率在98%以上. RT-PCR及Western blot结果显示2个LV-shRNA-YWHAE干扰组均具有明显抑制YWHAE基因表达的效应,组1、2干扰效率分别为69.8%、71.6%( $P<0.01$ )(图2, 3). 因而,本研究选择LV-shYWHAE组2进行下一步实验.

2.3 YWHAE基因表达沉默前后HT-29细胞功能学变化 LV-shRNA-YWHAE验证具有显著抑制效率后,应用MTT检测转染前后HT-29细胞生长变化,结果显示YWHAE表达沉默组细胞生长速度明显低于对照组,24 h抑制效率为32%( $t=3.816$ ,  $P=0.032$ ). 细胞克隆形成实验同样显示, YWHAE表达抑制后,细胞克隆形成率明显降低,干扰组是GFP阴性控制组克隆形成率的20%( $t=15.578$ ,  $P=0.004$ ). 表明YWHAE高表达对结肠癌细胞的增殖具有促进作用,沉默



#### 应用要点

14-3-3蛋白家族具有重要的生物学功能, YWHAE是其一个重要的成员, 在多种肿瘤中高表达, 与肿瘤的转移复发相关, 在结肠癌组织中的高表达与结肠癌转移相关, 抑制YWHAE的表达促进了肿瘤细胞的凋亡, 捕获细胞周期阻滞, 抑制了肿瘤细胞增殖及克隆形成, 为阐明YWHAE的促肿瘤发展的分子机制奠定了基础。

图1 YWHAE在结肠癌组织中的表达( $\times 200$ )。A-C: 正常配对肠黏膜HE图; D-F: 正常配对肠黏膜YWHAE免疫标记图; G-I: 结肠癌组织HE图; J-L: 结肠癌组织YWHAE免疫标记图。

YWHAE的表达能降低细胞的生长速度及肿瘤克隆形成(图4)。

YWHAE基因表达沉默后, 流式细胞术检测显示, 干扰组细胞凋亡率为10.73%, 明显高于GFP阴性对照组5.54%( $t = 44.01$ ,  $P = 0.01$ ); 干扰组细胞周期G<sub>1</sub>占71.21%, 高于对照组61.91%( $t = 29.02$ ,  $P = 0.01$ ), 相比对照组, 干扰组细胞处于S期细胞数目减少(表2)。

### 3 讨论

14-3-3蛋白调控家族普遍存在于真核生物中, 参与了生命活动过程中大部分的生理反应。14-3-3蛋白是由7个亚基组成丝氨酸及苏氨酸结合蛋白。这些蛋白能结合多种活性物质, 包括受体, 组蛋白去乙酰化酶(HDAC), 激酶和磷

酸酶等, 参与多种细胞信号转导通路包括细胞周期调控, 细胞凋亡, 代谢调控及磷酸化依赖方式蛋白质转运过程等<sup>[3,4,9-11]</sup>, 通过Ras-Raf信号及蛋白激酶(protein kinase)/哺乳动物雷帕霉素靶向蛋白(mammalian target of rapamycin)等多条通路参与肿瘤的发生, 在肿瘤的形成及发展过程中扮演着复杂而重要的角色<sup>[3,4,9-13]</sup>。

14-3-3蛋白在结直肠癌组织中也存在广泛的高表达, 通过调节细胞周期、抑制细胞凋亡等促进肿瘤细胞的生长, 裂解14-3-3蛋白能抑制肿瘤细胞的生长<sup>[14-18]</sup>。YWHAE是14-3-3蛋白家族中的重要成员之一, 在包括胃癌<sup>[19]</sup>、肾癌<sup>[5]</sup>、肝癌<sup>[6]</sup>、食管癌<sup>[20]</sup>等在内的多种肿瘤中高表达, 促进癌细胞增殖、迁移和抑制凋亡。



名词解释

RNA干扰: 是指在进化过程中高度保守的、由双链RNA诱发的、同源mRNA高效特异性降解的现象。他是生物进化过程中遗留下来的一种在转录后通过RNA调控基因表达的机制。

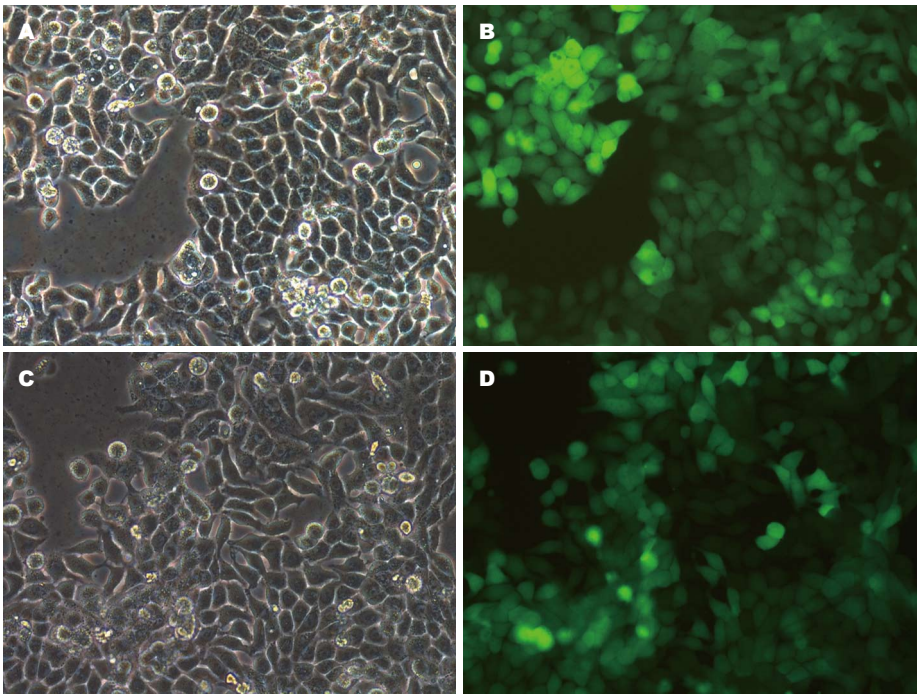


图 2 慢病毒转染后3 d后转染效率白光及荧光图(× 200)。A: YWHAE干扰组白光图; B: YWHAE干扰组荧光图; C: GFP阴性控制组白光图; D: GFP阴性控制组荧光图。GFP: 绿色荧光蛋白。

表 2 YWHAE基因表达沉默前后各组细胞周期变化分布表 (mean ± SE, %)

分组	G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M	AP
未转染控制组	60.06 ± 0.60	35.65 ± 0.66	4.29 ± 0.13	5.54 ± 0.32
GFP转染控制组	61.91 ± 0.62	28.46 ± 0.72	9.63 ± 0.40	5.27 ± 0.41
YWHAE干扰组	72.14 ± 0.44	20.68 ± 0.42	7.18 ± 0.16	10.73 ± 1.25

AP: 细胞凋亡比率; GFP: 绿色荧光蛋白。

Liang等<sup>[5]</sup>研究发现YWHAE在肾癌组织中表达上调,是正常对照肾组织的1.44倍,体外实验验证YWHAE可促进肾癌细胞的过度增殖。Ko等<sup>[6]</sup>对114例肝癌患者研究发现, YWHAE在正常肝组织中低表达或不表达,而肝癌组织中高表达, YWHAE的高表达与肿瘤的迁移有关;进一步的研究显示高表达的YWHAE与肝癌的侵袭转移相关,预后不良。张玉洁等<sup>[20]</sup>研究了食管鳞癌组织中14-3-3的表达意义,发现14-3-3在食管癌中表达上调,且其表达水平与淋巴结转移和预后不良呈正相关。Wang等<sup>[16]</sup>研究发现,在结直肠癌组织中, YWHAE发生核表达的丢失或下降,而胞浆表达提高,与结直肠癌的预后不良有关。我们前期研究<sup>[7]</sup>发现抑癌剂DADS处理结肠癌细胞HT-29后, YWHAE基因mRNA转录水平下调,本次进一步的实验结

果显示YWHAE在结肠癌组织中高表达,是癌旁配对组织的1.68倍,与肿瘤的淋巴结转移、分期明显相关,可能是肿瘤预后不良的危险因素之一。

YWHAE在肿瘤组织中发挥多种生物学效应,通过控制细胞的凋亡、复制、分化等,调节肿瘤的生长、浸润、转移<sup>[21-27]</sup>。Gong等<sup>[21]</sup>研究发现,沉默YWHAE的表达能影响胃癌细胞分化,降低细胞周期蛋白E和p27kip1蛋白的活性,从而诱导细胞周期捕获,起到抗肿瘤增生的作用。研究<sup>[22-23]</sup>发现, YWHAE在肝癌组织中高表达,与肝癌预后不良有关,高表达YWHAE能降低钙黏蛋白的表达,增加波形蛋白表达,诱导肝癌细胞上皮间质转化,促进肝癌细胞转移。但也有研究<sup>[25]</sup>显示在喉癌组织中YWHAE水平的降低可能与肿瘤的进展有关,细胞学实



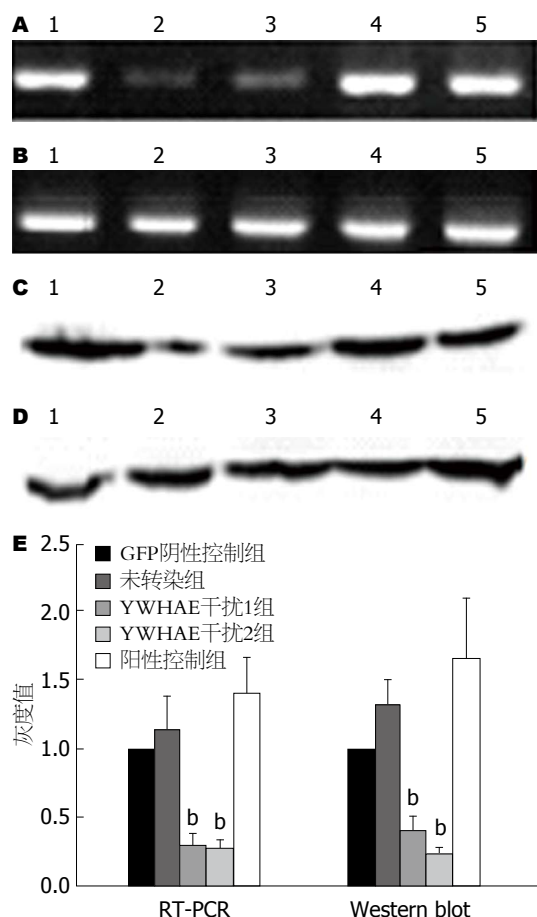


图3 各组细胞mRNA表达及Western blot图. A: YWHAE mRNA表达RT-PCR检测图; B: GAPDH mRNA表达RT-PCR检测图; C: YWHAE蛋白表达Western blot图; D: GAPDH蛋白表达Western blot图; E: RT-PCR、Western blot灰度扫描值(以GAPDH为内参). 1-5: 阳性控制组、YWHAE干扰2组、YWHAE干扰1组、未转染组、GFP阴性控制组. <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs GFP阴性控制组. GFP: 绿色荧光蛋白.

验显示消减YWHAE的表达, 降低了肿瘤细胞的凋亡率, 而增加YWHAE的表达则增加了细胞凋亡及导致细胞周期阻滞; 在肝癌<sup>[26]</sup>、卵巢癌<sup>[27]</sup>等组织中, 化疗后YWHAE的表达增加, 激活TAK1(MAP3K7)信号, 导致细胞损伤, 诱导凋亡. YWHAE在肿瘤组织中角色扮演的异同, 可能与个体的差异、实验方法的不用有关, 进一步的研究有助于揭示YWHAE的作用机制.

有限的报道<sup>[18,28-30]</sup>显示, YWHAE在结直肠癌细胞中高表达, 通过抑制YWHAE的表达或裂解YWHAE蛋白可促进癌细胞的凋亡、抑制结肠癌细胞的增生, 其机制可能与下调过氧化物酶体增生物激活受体, 从而活化Bax和Bad相关. Liou等<sup>[31]</sup>发现在HT-29细胞中稳定表达YWHAE可抑制细胞凋亡, 并发现了非甾体类抗炎药可通过PPAR $\delta$ /YWHAE途径诱导大肠

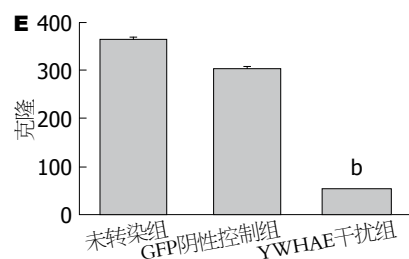
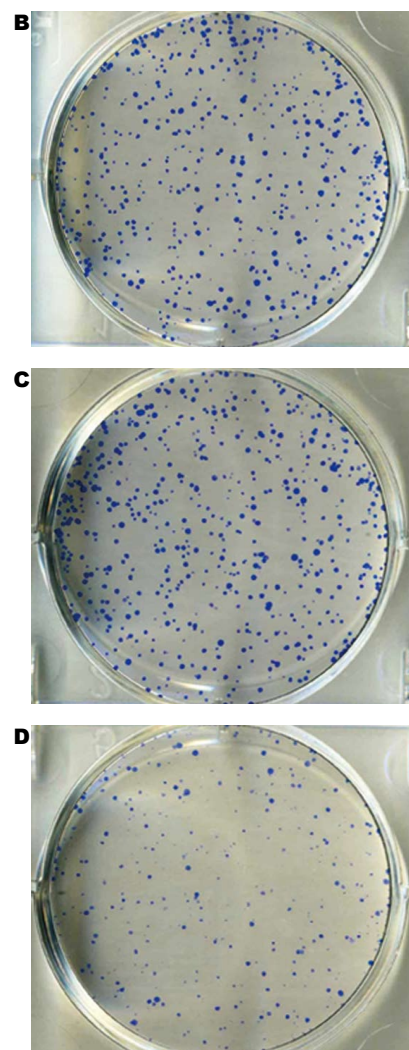
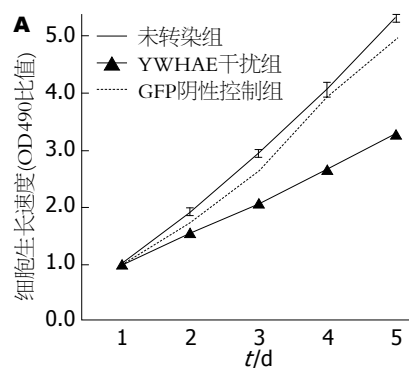


图4 YWHAE基因沉默前后细胞生长速度及克隆形成变化图. A: 转染前后各组细胞生长速度MTT法检测结果; B-D: 细胞克隆Giemsa染色图(B: 未转染组; C: GFP阴性控制组; D: YWHAE干扰组); E: 细胞克隆各组计数柱状图. <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs GFP阴性控制组. GFP: 绿色荧光蛋白.

#### 同行评价

该文通过检测结肠癌组织中YWHAE基因的表达, 分析此基因表达与结肠癌临床病理参数的关系, 并用RNA干扰技术沉默结肠癌细胞中YWHAE基因, 探讨此基因在结肠癌发生发展中的作用. 该文研究内容文献报道较少, 有一定的创新性和实用价值.

癌细胞凋亡的新机制. Liou等<sup>[32]</sup>发现减少细胞内线粒体、增加细胞凋亡与YWHAE的抑制关系密切. Liffers等<sup>[33]</sup>发现Smad4与YWHAE相互作用, 导致细胞质中YWHAE被隔离, 从而影响YWHAE的信号转导、周期调控以及凋亡等功能. 本研究发现抑制HT-29细胞YWHAE表达后, HT-29细胞生长速度明显降低, 细胞克隆形成数明显减少, 同时细胞周期阻滞在G<sub>1</sub>期, 细胞凋亡显著增加, 与文献<sup>[31,33]</sup>报道一致.

总之, 本研究表明, YWHAE在结肠癌组织存在高表达, 与结肠癌的发展、转移相关. 沉默结肠癌YWHAE的表达可抑制癌细胞的生长, 可能与诱导细胞周期阻滞及细胞凋亡相关.

#### 4 参考文献

- 1 陈琼, 刘志才, 程兰平, 宋国慧, 孙喜斌, 郑荣寿, 张思维, 陈万青. 2003-2007年中国结直肠癌发病与死亡分析. *中国肿瘤* 2012; 21: 179-182
- 2 Siegel R, Desantis C, Jemal A. Colorectal cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin* 2014; 64: 104-117 [PMID: 24639052 DOI: 10.3322/caac.21220]
- 3 Gardino AK, Yaffe MB. 14-3-3 proteins as signaling integration points for cell cycle control and apoptosis. *Semin Cell Dev Biol* 2011; 22: 688-695 [PMID: 21945648 DOI: 10.1016/j.semcdb.2011.09.008]
- 4 Mori M, Vignaroli G, Botta M. Small molecules modulation of 14-3-3 protein-protein interactions. *Drug Discov Today Technol* 2013; 10: e541-e547 [PMID: 24451646 DOI: 10.1016/j.ddtec.2012.10.001]
- 5 Liang S, Xu Y, Shen G, Liu Q, Zhao X, Xu Z, Xie X, Gong F, Li R, Wei Y. Quantitative protein expression profiling of 14-3-3 isoforms in human renal carcinoma shows 14-3-3 epsilon is involved in limitedly increasing renal cell proliferation. *Electrophoresis* 2009; 30: 4152-4162 [PMID: 19960480 DOI: 10.1002/elps.200900249]
- 6 Ko BS, Chang TC, Hsu C, Chen YC, Shen TL, Chen SC, Wang J, Wu KK, Jan YJ, Liou JY. Overexpression of 14-3-3ε predicts tumour metastasis and poor survival in hepatocellular carcinoma. *Histopathology* 2011; 58: 705-711 [PMID: 21401702 DOI: 10.1111/j.1365-2559.2011.03789.x]
- 7 Huang YS, Xie N, Su Q, Su J, Huang C, Liao QJ. Diallyl disulfide inhibits the proliferation of HT-29 human colon cancer cells by inducing differentially expressed genes. *Mol Med Rep* 2011; 4: 553-559 [PMID: 21468607 DOI: 10.3892/mmr.2011.453]
- 8 Wu YB, Huang YS, Xu YP, Sun YF, Yu DL, Zhang XQ, Long X, Zhu SQ, Zhou JL, Xu JJ. A high level of TM4SF5 is associated with human esophageal cancer progression and poor patient survival. *Dig Dis Sci* 2013; 58: 2623-2633 [PMID: 23633159 DOI: 10.1007/s10620-013-2690-1]
- 9 Aitken A. Post-translational modification of 14-3-3 isoforms and regulation of cellular function. *Semin Cell Dev Biol* 2011; 22: 673-680 [PMID: 21864699 DOI: 10.1016/j.semcdb.2011.08.003]
- 10 Yang X, Lee WH, Sobott F, Papagrigoriou E, Robinson CV, Grossmann JG, Sundström M, Doyle DA, Elkins JM. Structural basis for protein-protein interactions in the 14-3-3 protein family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 17237-17242 [PMID: 17085597 DOI: 10.1073/pnas.0605779103]
- 11 Tzivion G, Gupta VS, Kaplun L, Balan V. 14-3-3 proteins as potential oncogenes. *Semin Cancer Biol* 2006; 16: 203-213 [PMID: 16725345 DOI: 10.1016/j.semcancer.2006.03.004]
- 12 Morrison DK. The 14-3-3 proteins: integrators of diverse signaling cues that impact cell fate and cancer development. *Trends Cell Biol* 2009; 19: 16-23 [PMID: 19027299 DOI: 10.1016/j.tcb.2008.10.003]
- 13 Inoue T, Goi T, Hirono Y, Katayama K, Yamaguchi A. RIN1-Ras-ERK pathway plays an important role in carcinogenesis in colon cancer cell line LoVo. *Oncol Res* 2011; 19: 527-534 [PMID: 22812185 DOI: 10.3727/096504012X13340632812514]
- 14 O'Dwyer D, Ralton LD, O'Shea A, Murray GI. The proteomics of colorectal cancer: identification of a protein signature associated with prognosis. *PLoS One* 2011; 6: e27718 [PMID: 22125622 DOI: 10.1371/journal.pone.0027718]
- 15 Pei HP, Ge H, Jiang R, Zhu H. [Expression and clinical significance of 14-3-3 sigma and heat shock protein 27 in colorectal cancer]. *Zhonghua Weichang Waikie Zazhi* 2010; 13: 213-215 [PMID: 20336542]
- 16 Wang H, Huang H, Li W, Jin X, Zeng J, Liu Y, Gu Y, Sun X, Wen G, Ding Y, Zhao L. Nuclear localization of 14-3-3epsilon inversely correlates with poor long-term survival of patients with colorectal cancer. *J Surg Oncol* 2012; 106: 224-231 [PMID: 22105787 DOI: 10.1002/jso.22152]
- 17 Zou J, Mi L, Yu XF, Dong J. Interaction of 14-3-3σ with KCMF1 suppresses the proliferation and colony formation of human colon cancer stem cells. *World J Gastroenterol* 2013; 19: 3770-3780 [PMID: 23840115 DOI: 10.3748/wjg.v19.i24.3770]
- 18 Liu Y, Song F, Wu WK, He M, Zhao L, Sun X, Li H, Jiang Y, Yang Y, Peng K. Triptolide inhibits colon cancer cell proliferation and induces cleavage and translocation of 14-3-3 epsilon. *Cell Biochem Funct* 2012; 30: 271-278 [PMID: 22315045 DOI: 10.1002/cbf.2793]
- 19 Leal MF, Calcagno DQ, Demachki S, Assumpção PP, Chammas R, Burbano RR, Smith Mde A. Clinical implication of 14-3-3 epsilon expression in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2012; 18: 1531-1537 [PMID: 22509086 DOI: 10.3748/wjg.v18.i13.1531]
- 20 张玉洁, 杜强, 朱丽娟, 张艳, 李晓梅, 蒲红伟, 陈晓. 食管鳞状细胞癌组织中S100A11、14-3-3的表达及临床意义. *世界华人消化杂志* 2014; 22: 4609-4614
- 21 Gong X, Yan L, Gu H, Mu Y, Tong G, Zhang G. 14-3-3ε functions as an oncogene in SGC7901 gastric cancer cells through involvement of cyclin E and p27kip1. *Mol Med Rep* 2014; 10: 3145-3150 [PMID: 25310086 DOI: 10.3892/mmr.2014.2605]
- 22 Wu YJ, Jan YJ, Ko BS, Liang SM, Liou JY. Involvement of 14-3-3 Proteins in Regulating Tumor Progression of Hepatocellular Carcinoma. *Cancers*

- (Basel) 2015; 7: 1022-1036 [PMID: 26083935 DOI: 10.3390/cancers7020822]
- 23 Liu TA, Jan YJ, Ko BS, Liang SM, Chen SC, Wang J, Hsu C, Wu YM, Liou JY. 14-3-3 $\epsilon$  overexpression contributes to epithelial-mesenchymal transition of hepatocellular carcinoma. *PLoS One* 2013; 8: e57968 [PMID: 23483955 DOI: 10.1371/journal.pone.0057968]
  - 24 Oh D, Choi MR, Han DM, Chai YG, Choi J. Fluoxetine-induced regulation of heat shock protein 90 and 14-3-3 $\epsilon$  in human embryonic carcinoma cells. *Neuroreport* 2014; 25: 1399-1404 [PMID: 25353280 DOI: 10.1097/WNR.0000000000000284]
  - 25 Che XH, Chen H, Xu ZM, Shang C, Sun KL, Fu WN. 14-3-3epsilon contributes to tumour suppression in laryngeal carcinoma by affecting apoptosis and invasion. *BMC Cancer* 2010; 10: 306 [PMID: 20565895 DOI: 10.1186/1471-2407-10-306]
  - 26 Tang S, Bao H, Zhang Y, Yao J, Yang P, Chen X. 14-3-3 $\epsilon$  mediates the cell fate decision-making pathways in response of hepatocellular carcinoma to Bleomycin-induced DNA damage. *PLoS One* 2013; 8: e55268 [PMID: 23472066 DOI: 10.1371/journal.pone.0055268]
  - 27 Kim KO, Hsu AC, Lee HG, Patel N, Chandhanayingyong C, Hickernell T, Lee FY. Proteomic identification of 14-3-3 $\epsilon$  as a linker protein between pERK1/2 inhibition and BIM upregulation in human osteosarcoma cells. *J Orthop Res* 2014; 32: 848-854 [PMID: 24536031 DOI: 10.1002/jor.22598]
  - 28 Wu KK, Liou JY. Cyclooxygenase inhibitors induce colon cancer cell apoptosis Via PPARdelta --& gt; 14-3-3epsilon pathway. *Methods Mol Biol* 2009; 512: 295-307 [PMID: 19347284 DOI: 10.1007/978-1-60327-530-9\_16]
  - 29 Zuo S, Xue Y, Tang S, Yao J, Du R, Yang P, Chen X. 14-3-3 epsilon dynamically interacts with key components of mitogen-activated protein kinase signal module for selective modulation of the TNF-alpha-induced time course-dependent NF-kappaB activity. *J Proteome Res* 2010; 9: 3465-3478 [PMID: 20462248 DOI: 10.1021/pr9011377]
  - 30 Rishi AK, Parikh R, Wali A, Durko L, Zhang L, Yu Y, Majumdar AP. EGF receptor-related protein (ERRP) inhibits invasion of colon cancer cells and tubule formation by endothelial cells in vitro. *Anticancer Res* 2006; 26: 1029-1037 [PMID: 16619503]
  - 31 Liou JY, Ghelani D, Yeh S, Wu KK. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs induce colorectal cancer cell apoptosis by suppressing 14-3-3epsilon. *Cancer Res* 2007; 67: 3185-3191 [PMID: 17409426]
  - 32 Liou JY, Lee S, Ghelani D, Matijevic-Aleksic N, Wu KK. Protection of endothelial survival by peroxisome proliferator-activated receptor-delta mediated 14-3-3 upregulation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 1481-1487 [PMID: 16645156 DOI: 10.1161/01.ATV.0000223875.14120.93]
  - 33 Liffers ST, Maghnouj A, Munding JB, Jackstadt R, Herbrand U, Schulenberg T, Marcus K, Klein-Scory S, Schmiegell W, Schwarte-Waldhoff I, Meyer HE, Stühler K, Hahn SA. Keratin 23, a novel DPC4/Smad4 target gene which binds 14-3-3 $\epsilon$ . *BMC Cancer* 2011; 11: 137 [PMID: 21492476 DOI: 10.1186/1471-2407-11-137]

编辑: 于明茜 电编: 都珍珍





## 转基因2型自身免疫性肝炎动物模型研究进展

化雨, 陆鹏, 季菊玲, 邵建国, 王陆军

### 背景资料

目前国内对自身免疫性转基因小鼠动物模型应用尚不广泛, 在此介绍几种较为成熟的动物模型以提供新的思路。

化雨, 邵建国, 南通大学附属南通第三医院消化内科 江苏省南通市 226006

陆鹏, 季菊玲, 南通大学医学院病理教研室 江苏省南通市 226006

王陆军, 南通大学附属南通第三医院中西医结合肝病科 江苏省南通市 226006

化雨, 在读硕士, 主要从事自身免疫性肝炎的研究。

国家自然科学基金面上资助项目, No. 81370520

江苏省自然科学基金面上资助项目, No. BK2012653

作者贡献分布: 选题由邵建国与季菊玲完成; 资料查阅与撰写由化雨完成; 陆鹏与王陆军修改。

通讯作者: 邵建国, 副教授, 主任医师, 博士生导师, 226006, 江苏省南通市青年中路99号, 南通大学附属南通第三医院消化内科, [shaojianguo4144@163.com](mailto:shaojianguo4144@163.com)

电话: 0513-85116086

收稿日期: 2015-08-10 修回日期: 2015-09-16

接受日期: 2015-09-25 在线出版日期: 2015-10-18

liver disease putatively caused by loss of tolerance to hepatocyte specific autoantigens. It is currently divided into types 1 and 2, based on the expression of autoantibodies. Autoantigenic epitopes have been identified only for the less frequent type 2 AIH. Many type 2 AIH mouse models have been well developed in recent years. This review focuses on some kinds of well-established type 2 AIH mouse models.

© 2015 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: Autoimmune hepatitis; Transgenic; Animal Models

### Transgenic animal models of type 2 autoimmune hepatitis

Yu Hua, Peng Lu, Ju-Ling Ji, Jian-Guo Shao, Lu-Jun Wang

Yu Hua, Jian-Guo Shao, Department of Gastroenterology, the Third Hospital of Nantong University, Nantong 226006, Jiangsu Province, China

Peng Lu, Ju-Ling Ji, Department of Pathology, Medical College of Nantong University, Nantong 226006, Jiangsu Province, China

Lu-Jun Wang, Department of Integrated Western and Chinese Medicine, the Third Hospital of Nantong University, Nantong 226006, Jiangsu Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 81370520; Natural Science Foundation of Jiangsu Province, No. BK2012653

Correspondence to: Jian-Guo Shao, Associate Professor, Chief Physician, Department of Gastroenterology, the Third Hospital of Nantong University, 99 Qingnian Middle Road, Nantong 226006, Jiangsu Province, China. [shaojianguo4144@163.com](mailto:shaojianguo4144@163.com)

Received: 2015-08-10 Revised: 2015-09-16

Accepted: 2015-09-25 Published online: 2015-10-18

Hua Y, Lu P, Ji JL, Shao JG, Wang LJ. Transgenic animal models of type 2 autoimmune hepatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2015; 23(29): 4652-4657  
URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/23/4652.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v23.i29.4652>

### 摘要

自身免疫性肝炎(autoimmune hepatitis, AIH)是一种慢性肝损伤疾病, 目前认为多由自身肝细胞抗原诱发的免疫耐受丧失引起。目前按自身抗原类型主要分为1型和2型AIH, 而2型AIH的自身抗原比较特异。近年来, 针对2型AIH的小鼠模型日渐成熟, 特别是转基因模型的日趋完善, 为该疾病的研究提供了新的助力, 本文着重介绍近几年来几种较成功的小鼠AIH的模型。

© 2015年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词: 自身免疫性肝炎; 转基因; 动物模型

### 同行评议者

刘芳芳, 副主任医师, 北京大学人民医院病理科

### Abstract

Autoimmune hepatitis (AIH) is a chronic

**核心提示:** 我国自身免疫性肝炎(autoimmune hepatitis, AIH)的发现率逐年升高, 针对2型AIH的小鼠转基因模型日趋完善, 为该疾病的研究提供了新的助力, 本文着重介绍近几年来几种较成功的小鼠AIH的模型。

化雨, 陆鹏, 季菊玲, 邵建国, 王陆军. 转基因2型自身免疫性肝炎动物模型研究进展. 世界华人消化杂志 2015; 23(29): 4652-4657 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/23/4652.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v23.i29.4652>

## 0 引言

自身免疫性肝炎(autoimmune hepatitis, AIH)在所有种族和年龄段均可发病, 主要影响女性(女:男 = 4:1), 在北欧的发病率为170/1000000至239/1000000<sup>[1]</sup>, 亚洲地区发病率较低, 近年来随着免疫和生化等技术的不断进步, 我国AIH的发现率逐年升高<sup>[2]</sup>. 本病作为一种异常自身免疫反应为基础的疾病, 需长期免疫抑制剂治疗, 不经治疗则预后较差, 5年生存率50%, 10年生存率10%<sup>[3]</sup>. 即便经过治疗, 仍有10%-20%患者进展为肝硬化及终末期肝病<sup>[4]</sup>. 本病可以急性肝炎起病, 可慢性化致肝硬化、肝癌, 甚至需要肝移植才能挽救生命. 本病以血清转氨酶升高、循环中存在自身抗体、高 $\gamma$ -球蛋白血症、肝组织学特征性改变(界面性肝炎、汇管区淋巴浆细胞浸润和玫瑰花结样变)以及对免疫抑制治疗应答敏感为特点<sup>[2]</sup>. 根据血清中自身抗体的差异, 该病可分为1型AIH和2型AIH<sup>[5,6]</sup>. 其中2型AIH以1型抗肝肾微粒体抗体(anti-LKM1)和1型抗肝胞浆抗体(anti-LC1)为特征, anti-LKM1与anti-LC1靶基因分别为细胞色素P450 2D6(*CYP2D6*)及四氢叶酸环化脱氢酶(formiminotransferase cyclodeaminase, *FTCD*)<sup>[7-11]</sup>. 为了深入研究AIH的发病机制并寻找有效的治疗药物, 需要一个与人AIH相似的动物实验模型. 过去较经典的动物模型包括肝抗原、刀豆球蛋白(concanavalin A, ConA)、 $\alpha$ -半乳糖基神经酰胺( $\alpha$ -galactosylceramide,  $\alpha$ -GalCer)诱导的肝模型及转基因模型. 但存在诱导方法复杂, 肝损伤持续较短, 造模效果不理想等缺点<sup>[12,13]</sup>. 近年来, 关于2型AIH小鼠模型多以2者为靶抗原, 利用分子拟态及异种免疫机制制作转基因小鼠

模型, 以打破免疫耐受. 转基因模型较之前模型有较大进步.

## 1 经典动物模型在AIH研究中的应用

**1.1 肝抗原诱导的肝炎模型** 1983年, Kuriki以脂多糖为佐剂, 应用同种肝脏匀浆以肌肉注射的方式免疫SMA小鼠, 1次/mo, 共11次, 成功建立了实验性AIH(experimental autoimmune hepatitis, EAH)模型. 该模型肝内可见门管区中到重度淋巴细胞和浆细胞浸润, 并伴局灶性坏死, 且可见肝特异性抗体产生. 将肝损伤小鼠的脾细胞过继输入同种系小鼠可诱导肝炎, 提示了细胞免疫在实验性AIH中的作用<sup>[14-17]</sup>. 之后研究中发现C57BL/6小鼠对EAH的易感性, 提示基因背景在AIH中的重要作用<sup>[17]</sup>.

由于中心耐受存在, 此类模型操作复杂, 需要多次免疫才能获得一过性轻中度肝实质损伤, 且造模过程依赖免疫佐剂. 肝抗原特异性不足, 且产生的抗体非AIH特异性抗体.

**1.2 ConA诱导的肝炎模型** ConA作为植物凝集素, 非肝抗原, 能引起T细胞活化增殖, 诱导急性肝炎<sup>[13,18]</sup>. NMRI(naval medical research institute)小鼠静脉注射ConA造模, 成功建立肝炎模型. 该模型可见转氨酶明显升高, 细胞凋亡, 门管区和肝实质炎症浸润<sup>[19]</sup>. 在该模型基础上研究发现多种炎症因子[白介素(interleukin, IL)-2、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor  $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、 $\gamma$ -干扰素(interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ )、细胞CD4<sup>+</sup> T细胞、自然杀伤性T细胞、辅助杀伤性细胞17和肝巨噬细胞等]在小鼠肝炎发展中起重要作用<sup>[20-25]</sup>.

该模型只需单次注射, 操作简单可重复性强. ConA非肝自身抗原, 缺乏肝自身抗原特异性效应T细胞, 且为急性病程与AIH慢性迁延特点尚有差别<sup>[26]</sup>.

**1.3  $\alpha$ -GalCer** 该模型通过单次静脉注射 $\alpha$ -GalCer免疫C57BL/6J小鼠建立了AIH模型, 表现出淋巴细胞浸润和自身抗体产生, 并发现NKT细胞和TNF- $\alpha$ 在该模型诱导的肝损伤发展中起重要作用<sup>[27-29]</sup>. 并在随后研究中探讨了IFN- $\gamma$ 和IL-17在肝脏炎症中的可能的保护作用<sup>[30-36]</sup>.

该模型只需单次注射, 操作简单.  $\alpha$ -GalCer类似于天然自身抗原, 经抗原特异性T细胞受体呈递, 接近AIH发病机制, 但肝内炎

## 应用要点

自身免疫性转基因小鼠动物模型的应用将对AIH的研究产生新的助力.

## 同行评价

本文介绍了利用分子拟态及异种免疫机制制作转基因2型自身免疫性肝炎小鼠模型的4种方法及其优缺点, 提出转基因模型较过去的动物模型包括肝抗原、刀豆球蛋白、 $\alpha$ -半乳糖基神经酰胺诱导的肝模型等有较大进步, 该综述具有一定的意义。

症为急性炎症反应。

## 2 转基因动物模型在AIH研究中的应用

**2.1 慢病毒载体+双抗原模型** 该类模型利用慢病毒载体搭载CYP2D6及FTCD靶基因(pCMV-CYP2D6-FTCD), 通过前小腿肌肉注射的方式, 转染6到8周龄C57BL/6 $\mu$ 小鼠。同时, 编码IL-12的质粒也一起注入以获得更好的炎症反应效果。Lapierre等<sup>[37]</sup>于2004年介绍了该模型成功表现2型AIH的一系列特征: 显著升高的转氨酶水平, 丙氨酸转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)超过正常小鼠2倍标准差, 最高值在60-70 U/L特征性抗体anti-LC1及anti-LKM1产生, 汇管区浆细胞浸润以及界面性肝炎。该文章也探讨了IL-12在AIH中的作用, 其提高汇管及周围区浸润浆细胞数量, 升高血清中抗体水平并使其首次高峰提前到来(IL组为注射后第2月, 非IL组为注射后第3月), 促使转氨酶水平升高。但其并不影响浆细胞分布情况, 无IL影响转氨酶水平仍显著升高<sup>[25,38-41]</sup>。

随后在2006年的文章中, 在此模型基础上探讨了小鼠基因背景(易感性)在疾病发展中作用, 并比较了C57BL/6、BALB/c、129/Sv 3种小鼠在转氨酶、抗体、毒性T细胞、汇管区炎症和小叶炎症上的差异。C57BL/6小鼠在各水平上均表现优秀, 鉴于3种小鼠在MHC基因上的差异得出结论: MHC(H-2b)在疾病发生中起到必要但非充分条件, MHC基因与非MHC基因间复杂的相互作用与AIH的易感性有关<sup>[41]</sup>。2010年则验证, 探讨了AIH中性别和年龄差异的现象和机制, 排除了雌激素对女性易感的直接影响作用, 证实了调节性T细胞的数量差异对女性易感的影响作用以及外周耐受丧失对AIH发生发展的重要作用<sup>[42]</sup>。2013年尝试自体移植体外扩增的调节性T细胞诱导AIH小鼠恢复自身抗原的外周耐受并成功, 为该疾病的治疗提供了新思路<sup>[43]</sup>。2015年在小鼠身上验证了低剂量抗CD3抗体诱导疾病缓解<sup>[44]</sup>。

该模型炎症明显, 表现出汇管区浸润, 界面性肝炎, 转氨酶水平显著升高, 有2种特征性抗体anti-LC1及anti-LKM1产生。但无纤维化出现, 且其造模方法较复杂需反复多次注射, 需要额外注射IL-12, 此外其实验周期为8 mo, 耗时较长。

**2.2 腺病毒载体+双抗原模型** Piché等<sup>[45]</sup>于2011年利用腺病毒搭载FTCD及CYP2D6(RecAdV-CTLA4-2D6-FTCD)2种靶基因分别通过静脉(尾静脉)及肌肉(前小腿)注射2种方式成功诱发小鼠迟发型AIH。均表现出汇管及周围区浆细胞浸润, 持久的抗体反应, 转氨酶水平仅短暂升高且意义不大。二者炎症程度及持续时间明显差异, 且介于不同注射方式抗原表达部位不同(外周和肝脏)论证了肝脏炎症损伤在本疾病发展中并无必要作用, 实验中观察到抗原表达部位不同对B细胞反应产生的球蛋白种类影响较大。实验证实了自身免疫肝抗原可以通过分子拟态原理在相当长一段时间(8 mo)后诱发AIH, 从而支持了后效应作用假说。也提供了嗜肝或非嗜肝病毒在迟发型AIH病因学作用的研究思路。该模型无纤维化出现, 实验周期长达8 mo。

**2.3 腺病毒载体+CYP2D6单抗原模型** 2008年, Holdener等<sup>[46]</sup>使用腺病毒搭载CYP2D6(Ad-CYP2D6)通过一次性静注和腹腔注射感染 $\mu$ FVB小鼠造模2型AIH, 小鼠表现持续性肝炎, 出现白细胞浸润, 肝纤维化, 肝小叶结构混乱及坏死, 并检测到1型肝肾微粒体抗体的存在。这一造模方式简洁, 且肝炎表现持久并首次诱导了包膜下肝纤维化。2012年详细介绍了成熟的造模方法及技术细节<sup>[47]</sup>。2013-01证明不同感染路径对肝纤维化效果的影响<sup>[48]</sup>。腹腔注射腺病毒多表达于包膜附近, 而静脉注射则表达于整个肝小叶。腹腔注射时, 包膜处自然杀伤细胞(natural killer cell)细胞缺失, 致肝星形细胞逃脱杀伤是形成包膜下纤维化的主要原因。2013-02论证了相似性抗原较同源抗原更易打破宿主T细胞免疫耐受, 分子拟态而非同源性诱发了强劲的T细胞反应<sup>[49]</sup>。

该模型诱导出包膜下纤维化(腹腔注射), 但其与AIH自体产生的纤维化尚有出入<sup>[21]</sup>, 其转氨酶水平仅早期短暂升高且多为腺病毒而非抗原反应引起, 但其试验周期仅为8 wk, 且造模方式简单, 腺病毒只需注射1次。

**2.4 腺病毒载体+FTCD单抗原模型** 2013年, Hardtke-Wolenski等<sup>[50]</sup>的文章中提到另一种方法, 用腺病毒搭载FTCD(Ad-FTCD)感染NOD小鼠制作2型AIH模型, 并于注射后第12周出现汇管及周围区淋巴细胞浸润, 界面性肝炎, 小叶内微肉芽肿和点状坏死。转氨酶水平仅短暂



表 1 4种自身免疫性肝炎模型特点总结

造模方式	肝脏炎症	转氨酶水平	特征性抗体	纤维化	实验周期
慢病毒载体+双抗原	汇管区浸润, 界面性肝炎	显著升高	2种	包膜下纤维化	8 mo
腺病毒载体+双抗原	汇管及周围区浆细胞浸润	早期短暂升高	1种	无	8 mo
腺病毒载体+CYP2D6单抗原	白细胞浸润, 肝小叶结构混乱及坏死	早期短暂升高	1种	无	8 wk
腺病毒载体+FTCD单抗原	浆细胞浸润, 界面性肝炎, 肉芽肿, 点状坏死	早期短暂升高	1种	门脉至汇管周围桥接区纤维化	12 wk

升高且意义不大, 值得注意的是, 在试验中部分小鼠(4/8)出现门脉至汇管周围桥接区纤维化, 较为符合自免肝特征. 该试验周期为12 wk. 4种模型特点总结如表1.

3 结论

转基因模型在近几年取得长足的进步, 改善了多为急性肝炎且肝损伤短暂, 抗原特异性差, 无特征性抗体, 造模方法复杂等问题, 但仍存在一定程度免疫耐受, 且难以获得自发性免疫耐受模型. 理想的AIH动物模型应具备以下特点: (1)自发自身抗原免疫诱发; (2)组织学改变持续且可持续发展为肝纤维化及肝硬化(目前纤维化案例或不典型或不成熟); (3)自身抗体谱与人类相似; (4)慢性起病, 病情迁延. 虽然目前AIH动物模型尚不完善, 但随着动物科学, 免疫科学等学科的不断进步, 动物模型必将不断完善, 并在AIH的研究中发挥重要作用.

4 参考文献

1

Yang F, Wang Q, Bian Z, Ren LL, Jia J, Ma X. Autoimmune hepatitis: East meets west. *J Gastroenterol Hepatol* 2015; 30: 1230-1236 [PMID: 25765710 DOI: 10.1111/jgh.12952]

2

Manns MP, Czaja AJ, Gorham JD, Krawitt EL, Mieli-Vergani G, Vergani D, Vierling JM. Diagnosis and management of autoimmune hepatitis. *Hepatology* 2010; 51: 2193-2213 [PMID: 20513004 DOI: 10.1002/hep.23584]

3

Summerskill WH, Korman MG, Ammon HV, Baggenstoss AH. Prednisone for chronic active liver disease: dose titration, standard dose, and combination with azathioprine compared. *Gut* 1975; 16: 876-883 [PMID: 1104411]

4

Krawitt EL. Autoimmune hepatitis. *N Engl J Med* 2006; 354: 54-66 [PMID: 16394302 DOI: 10.1056/NEJMra050408]

5

Vergani D, Longhi MS, Bogdanos DP, Ma Y, Mieli-Vergani G. Autoimmune hepatitis. *Semin Immunopathol* 2009; 31: 421-435 [PMID: 19533129 DOI: 10.1007/s00281-009-0170-7]

6

Lenzi M, Manotti P, Muratori L, Cataleta M, Ballardini G, Cassani F, Bianchi FB. Liver cytosolic 1 antigen-antibody system in type 2 autoimmune hepatitis and hepatitis C virus infection. *Gut* 1995; 36: 749-754 [PMID: 7797126]

7

Homberg JC, Abuaf N, Bernard O, Islam S, Alvarez F, Khalil SH, Poupon R, Darnis F, Lévy VG, Gripon P. Chronic active hepatitis associated with antiliver/kidney microsome antibody type 1: a second type of "autoimmune" hepatitis. *Hepatology* 1987; 7: 1333-1339 [PMID: 3679093]

8

Maggiore G, Veber F, Bernard O, Hadchouel M, Homberg JC, Alvarez F, Hadchouel P, Alagille D. Autoimmune hepatitis associated with anti-actin antibodies in children and adolescents. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1993; 17: 376-381 [PMID: 8145091]

9

Maggiore G, Bernard O, Homberg JC, Hadchouel M, Alvarez F, Hadchouel P, Odièvre M, Alagille D. Liver disease associated with anti-liver-kidney microsome antibody in children. *J Pediatr* 1986; 108: 399-404 [PMID: 3950819]

10

Lapierre P, Hajoui O, Homberg JC, Alvarez F. Formiminotransferase cyclodeaminase is an organ-specific autoantigen recognized by sera of patients with autoimmune hepatitis. *Gastroenterology* 1999; 116: 643-649 [PMID: 10029623]

11

Gueguen M, Meunier-Rotival M, Bernard O, Alvarez F. Anti-liver kidney microsome antibody recognizes a cytochrome P450 from the IID subfamily. *J Exp Med* 1988; 168: 801-806 [PMID: 2842431]

12

Abdel-Ghaffar TY, Sira MM, Sira AM, Salem TA, El-Sharawy AA, El Naghi S. Serological markers of autoimmunity in children with hepatitis A: relation to acute and fulminant presentation. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2015; 27: 1161-1169 [PMID: 26062080 DOI: 10.1097/meg.0000000000000413]

13

Hardtke-Wolenski M, Jaeckel E. Mouse models for experimental autoimmune hepatitis: limits and chances. *Dig Dis* 2010; 28: 70-79 [PMID: 20460893 DOI: 10.1159/000282067]

14

Lohse AW, Manns M, Dienes HP, Meyer zum Büschenfelde KH, Cohen IR. Experimental autoimmune hepatitis: disease induction, time course and T-cell reactivity. *Hepatology* 1990; 11: 24-30 [PMID: 2271015]

15

Büschenfelde KH, Kössling FK, Miescher PA.

- Experimental chronic active hepatitis in rabbits following immunization with human liver proteins. *Clin Exp Immunol* 1972; 11: 99-108 [PMID: 4338952]
- 16 Kuriki J, Murakami H, Kakumu S, Sakamoto N, Yokochi T, Nakashima I, Kato N. Experimental autoimmune hepatitis in mice after immunization with syngeneic liver proteins together with the polysaccharide of *Klebsiella pneumoniae*. *Gastroenterology* 1983; 84: 596-603 [PMID: 6218007]
- 17 Mori Y, Mori T, Yoshida H, Ueda S, Iesato K, Wakashin Y, Wakashin M, Okuda K. Study of cellular immunity in experimental autoimmune hepatitis in mice. *Clin Exp Immunol* 1984; 57: 85-92 [PMID: 6430615]
- 18 Soares PA, Nascimento CO, Porto TS, Correia MT, Porto AL, Carneiro-da-Cunha MG. Purification of a lectin from *Canavalia ensiformis* using PEG-citrate aqueous two-phase system. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2011; 879: 457-460 [PMID: 21256095 DOI: 10.1016/j.jchromb.2010.12.030]
- 19 Tiegs G, Hentschel J, Wendel A. A T cell-dependent experimental liver injury in mice inducible by concanavalin A. *J Clin Invest* 1992; 90: 196-203 [PMID: 1634608 DOI: 10.1172/jci115836]
- 20 Küsters S, Gantner F, Künstle G, Tiegs G. Interferon gamma plays a critical role in T cell-dependent liver injury in mice initiated by concanavalin A. *Gastroenterology* 1996; 111: 462-471 [PMID: 8690213]
- 21 Gantner F, Leist M, Lohse AW, Germann PG, Tiegs G. Concanavalin A-induced T-cell-mediated hepatic injury in mice: the role of tumor necrosis factor. *Hepatology* 1995; 21: 190-198 [PMID: 7806154]
- 22 Takeda K, Hayakawa Y, Van Kaer L, Matsuda H, Yagita H, Okumura K. Critical contribution of liver natural killer T cells to a murine model of hepatitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 5498-5503 [PMID: 10792025 DOI: 10.1073/pnas.040566697]
- 23 Yüksel M, Laukens D, Heindryckx F, Van Vlierberghe H, Geerts A, Wong FS, Wen L, Colle I. Hepatitis mouse models: from acute-to-chronic autoimmune hepatitis. *Int J Exp Pathol* 2014; 95: 309-320 [PMID: 25112417 DOI: 10.1111/iep.12090]
- 24 Rossjohn J, Pellicci DG, Patel O, Gapin L, Godfrey DI. Recognition of CD1d-restricted antigens by natural killer T cells. *Nat Rev Immunol* 2012; 12: 845-857 [PMID: 23154222 DOI: 10.1038/nri3328]
- 25 O'Garra A. Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. *Immunity* 1998; 8: 275-283 [PMID: 9529145]
- 26 Wang HX, Liu M, Weng SY, Li JJ, Xie C, He HL, Guan W, Yuan YS, Gao J. Immune mechanisms of Concanavalin A model of autoimmune hepatitis. *World J Gastroenterol* 2012; 18: 119-125 [PMID: 22253517 DOI: 10.3748/wjg.v18.i2.119]
- 27 Fujii H, Seki S, Kobayashi S, Kitada T, Kawakita N, Adachi K, Tsutsui H, Nakanishi K, Fujiwara H, Ikarashi Y, Taniguchi M, Kronenberg M, Ikemoto M, Nakajima Y, Arakawa T, Kaneda K. A murine model of NKT cell-mediated liver injury induced by alpha-galactosylceramide/d-galactosamine. *Virchows Arch* 2005; 446: 663-673 [PMID: 15906084 DOI: 10.1007/s00428-005-1265-8]
- 28 Biburger M, Tiegs G. Alpha-galactosylceramide-induced liver injury in mice is mediated by TNF-alpha but independent of Kupffer cells. *J Immunol* 2005; 175: 1540-1550 [PMID: 16034092]
- 29 Matsumoto H, Kawamura T, Kobayashi T, Kanda Y, Kawamura H, Abo T. Coincidence of autoantibody production with the activation of natural killer T cells in alpha-galactosylceramide-mediated hepatic injury. *Immunology* 2011; 133: 21-28 [PMID: 21320121 DOI: 10.1111/j.1365-2567.2011.03405.x]
- 30 Wondimu Z, Santodomingo-Garzon T, Le T, Swain MG. Protective role of interleukin-17 in murine NKT cell-driven acute experimental hepatitis. *Am J Pathol* 2010; 177: 2334-2346 [PMID: 20847291 DOI: 10.2353/ajpath.2010.100028]
- 31 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 [PMID: 16200068 DOI: 10.1038/ni1261]
- 32 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 [PMID: 16200070 DOI: 10.1038/ni1254]
- 33 Komiyama Y, Nakae S, Matsuki T, Nambu A, Ishigame H, Kakuta S, Sudo K, Iwakura Y. IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2006; 177: 566-573 [PMID: 16785554]
- 34 Osman Y, Kawamura T, Naito T, Takeda K, Van Kaer L, Okumura K, Abo T. Activation of hepatic NKT cells and subsequent liver injury following administration of alpha-galactosylceramide. *Eur J Immunol* 2000; 30: 1919-1928 [PMID: 10940881]
- 35 Miossec P. IL-17 and Th17 cells in human inflammatory diseases. *Microbes Infect* 2009; 11: 625-630 [PMID: 19371791 DOI: 10.1016/j.micinf.2009.04.003]
- 36 Rachitskaya AV, Hansen AM, Horai R, Li Z, Villasmil R, Luger D, Nussenblatt RB, Caspi RR. Cutting edge: NKT cells constitutively express IL-23 receptor and RORgamma and rapidly produce IL-17 upon receptor ligation in an IL-6-independent fashion. *J Immunol* 2008; 180: 5167-5171 [PMID: 18390697]
- 37 Lapierre P, Djilali-Saiah I, Vitozzi S, Alvarez F. A murine model of type 2 autoimmune hepatitis: Xenoinmunization with human antigens. *Hepatology* 2004; 39: 1066-1074 [PMID: 15057911 DOI: 10.1002/hep.20109]
- 38 Djilali-Saiah I, Lapierre P, Vitozzi S, Alvarez F. DNA vaccination breaks tolerance for a neo-self antigen in liver: a transgenic murine model of autoimmune hepatitis. *J Immunol* 2002; 169: 4889-4896 [PMID: 12391200]
- 39 Song K, Chang Y, Prud'homme GJ. Regulation

- of T-helper-1 versus T-helper-2 activity and enhancement of tumor immunity by combined DNA-based vaccination and nonviral cytokine gene transfer. *Gene Ther* 2000; 7: 481-492 [PMID: 10757021 DOI: 10.1038/sj.gt.3301123]
- 40 Gherardi MM, Ramirez JC, Esteban M. Interleukin-12 (IL-12) enhancement of the cellular immune response against human immunodeficiency virus type 1 env antigen in a DNA prime/vaccinia virus boost vaccine regimen is time and dose dependent: suppressive effects of IL-12 boost are mediated by nitric oxide. *J Virol* 2000; 74: 6278-6286 [PMID: 10864637]
  - 41 Lapierre P, Béland K, Djilali-Saiah I, Alvarez F. Type 2 autoimmune hepatitis murine model: the influence of genetic background in disease development. *J Autoimmun* 2006; 26: 82-89 [PMID: 16380229 DOI: 10.1016/j.jaut.2005.11.001]
  - 42 Lapierre P, Béland K, Martin C, Alvarez F, Alvarez F. Forkhead box p3+ regulatory T cell underlies male resistance to experimental type 2 autoimmune hepatitis. *Hepatology* 2010; 51: 1789-1798 [PMID: 20232291 DOI: 10.1002/hep.23536]
  - 43 Lapierre P, Béland K, Yang R, Alvarez F. Adoptive transfer of ex vivo expanded regulatory T cells in an autoimmune hepatitis murine model restores peripheral tolerance. *Hepatology* 2013; 57: 217-227 [PMID: 22911361 DOI: 10.1002/hep.26023]
  - 44 Marceau G, Yang R, Lapierre P, Béland K, Alvarez F. Low-dose anti-CD3 antibody induces remission of active autoimmune hepatitis in xenoinmunized mice. *Liver Int* 2015; 35: 275-284 [PMID: 24517723 DOI: 10.1111/liv.12498]
  - 45 Piché C, Béland K, Lapierre P, Massie B, Alvarez F. Different sites of xenoantigen delivery lead to a virally induced late-onset hepatitis in mice through molecular mimicry. *Liver Int* 2011; 31: 1306-1314 [PMID: 22093453 DOI: 10.1111/j.1478-3231.2011.02600.x]
  - 46 Holdener M, Hintermann E, Bayer M, Rhode A, Rodrigo E, Hintereder G, Johnson EF, Gonzalez FJ, Pfeilschifter J, Manns MP, Herrath Mv, Christen U. Breaking tolerance to the natural human liver autoantigen cytochrome P450 2D6 by virus infection. *J Exp Med* 2008; 205: 1409-1422 [PMID: 18474629 DOI: 10.1084/jem.20071859]
  - 47 Hintermann E, Ehser J, Christen U. The CYP2D6 animal model: how to induce autoimmune hepatitis in mice. *J Vis Exp* 2012; (60): 3644 [PMID: 22331063 DOI: 10.3791/3644]
  - 48 Hintermann E, Ehser J, Bayer M, Pfeilschifter JM, Christen U. Mechanism of autoimmune hepatic fibrogenesis induced by an adenovirus encoding the human liver autoantigen cytochrome P450 2D6. *J Autoimmun* 2013; 44: 49-60 [PMID: 23809878 DOI: 10.1016/j.jaut.2013.05.001]
  - 49 Ehser J, Holdener M, Christen S, Bayer M, Pfeilschifter JM, Hintermann E, Bogdanos D, Christen U. Molecular mimicry rather than identity breaks T-cell tolerance in the CYP2D6 mouse model for human autoimmune hepatitis. *J Autoimmun* 2013; 42: 39-49 [PMID: 23200317 DOI: 10.1016/j.jaut.2012.11.001]
  - 50 Hardtke-Wolenski M, Fischer K, Noyan F, Schlue J, Falk CS, Stahlhut M, Woller N, Kuehnelt F, Taubert R, Manns MP, Jaeckel E. Genetic predisposition and environmental danger signals initiate chronic autoimmune hepatitis driven by CD4+ T cells. *Hepatology* 2013; 58: 718-728 [PMID: 23475565 DOI: 10.1002/hep.26380]

编辑: 于明茜 电编: 都珍珍





## 单 位 证 明

尊敬的世界华人杂志编辑部

由于贵刊于 2012 年申请注销了国内 CN 号,失去了再次获得中文北大核心期刊荣誉的机会。而我单位吴殿磊等在 2015 年下半年投稿贵刊时,并不知道这些信息。医院在职称评审以及科研奖励过程中不予认可无 CN 号的期刊,医院建议将 2015 年 10 月刊发于贵刊的这篇文章撤销,包括从知网撤销。拟撤销文章信息如下:

稿号: 1517018; 题目: HBV DNA 整合与慢性乙型肝炎、原发性肝癌关系研究进展; 作者: 吴殿磊, 徐光华, 刘娜; 刊发日期及卷期页码信息: 2015 年 10 月 18 日; 23(29): 4658-4664。

以上情况属实,特此证明。



# 撤 稿 申 请

尊敬的世界华人杂志编辑部

由于贵刊于 2012 年申请注销了国内 CN 号,失去了再次获得中文北大核心期刊荣誉的机会。而我们在 2015 年下半年投稿贵刊时,并不知道这些信息。

医院在职称评审以及科研奖励过程中不予认可无 CN 号的期刊,在医院的建议下经课题组商议,决定申请将 2015 年 10 月刊发于贵刊的一篇文章撤销,包括从知网撤销,我们会按照贵刊要求进行撤稿。拟撤销文章信息如下:

稿号: 1517018; 题目: HBV DNA 整合与慢性乙型肝炎、原发性肝癌关系研究进展; 作者: 吴殿磊, 徐光华, 刘娜; 刊发日期及卷期页码信息: 2015 年 10 月 18 日; 23(29): 4658-4664

申请人: 吴殿磊 徐光华 刘娜

2016 年 12 月 21 日

## 肝细胞肝癌诱导分化治疗研究进展

罗 娅, 金 海, 文国容, 虞必光

罗娅, 金海, 文国容, 虞必光, 遵义医学院附属医院消化内科 贵州省消化疾病研究所 贵州省遵义市 563003

罗娅, 在读硕士, 主要从事离子通道与肿瘤的研究.

国家自然科学基金资助项目, No. 81360311

作者贡献分布: 本文综述由罗娅完成; 金海与文国容参与资料整理; 虞必光修改审阅.

通讯作者: 虞必光, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 563003, 贵州省遵义市大连路 149号, 遵义医学院附属医院消化内科, 贵州省消化疾病研究所. [tuobiguang@aliyun.com](mailto:tuobiguang@aliyun.com)

电话: 0851-28609205

收稿日期: 2015-08-18 修回日期: 2015-09-21

接受日期: 2015-09-25 在线出版日期: 2015-10-18

### Advances in differentiation therapy of hepatocellular carcinoma

Ya Luo, Hai Jin, Guo-Rong Wen, Bi-Guang Tuo

Ya Luo, Hai Jin, Guo-Rong Wen, Bi-Guang Tuo, Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Zunyi Medical College; Digestive Disease Institute of Guizhou Province, Zunyi 563003, Guizhou Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 81360311

Correspondence to: Bi-Guang Tuo, Professor, Chief Physician, Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Zunyi Medical College; Digestive Disease Institute of Guizhou Province, 149 Dalian Road, Zunyi 563003, Guizhou Province, China. [tuobiguang@aliyun.com](mailto:tuobiguang@aliyun.com)

Received: 2015-08-18 Revised: 2015-09-21

Accepted: 2015-09-25 Published online: 2015-10-18

### Abstract

Hepatocellular carcinoma (HCC) is a malignancy of the digestive system, which shows obvious disorders of differentiation. Currently, its pathogenesis is still elusive. Therefore, to figure out the mechanism of disturbed differentiation in HCC is the key to finding out precise therapeutic targets

for differentiation therapy. Differentiation therapy of hepatocellular carcinoma refers to making hepatocellular carcinoma cells differentiate into mature hepatocytes, and rebuilding their normal phenotype and normal biological function through promoting HCC cell apoptosis and inhibiting their proliferation in the presence of specific differentiation-inducing agents or signals. In recent years, increasing research results about HCC differentiation therapy have been reported. This article reviews differentiation-inducing agents or targets, differentiation-related signaling pathways and microRNAs, with an aim to provide some clues for HCC differentiation therapy.

© 2015 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: Hepatocellular carcinoma; Differentiation therapy; Liver cancer stem cells; MicroRNAs

Luo Y, Jin H, Wen GR, Tuo BG. Advances in differentiation therapy of hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2015; 23(29): 4665-4672  
URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/23/4665.asp>  
DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v23.i29.4665>

### 摘要

肝细胞肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)诱导分化治疗是指在某种诱导分化剂或分化信号诱导下, 通过促进肝癌细胞凋亡和抑制增殖使HCC细胞向成熟肝细胞方向分化, 重建正常表型, 恢复正常生物学功能, 从而达到治愈HCC的目的. 细胞分化的观点认为分化障碍是HCC的一个重要生物学特征, 肝

### 背景资料

全反式维A酸治疗急性早幼粒细胞白血病是肿瘤分化治疗的经典范例, 极大地推动了诱导分化治疗相关研究的开展. 然而肝癌等恶性实体瘤的诱导分化治疗效果并不理想.

### 同行评议者

邓庆, 副研究员, 上海人类基因组研究中心功能基因组组; 任宁, 主任医师, 复旦大学附属中山医院



## ■ 研发前沿

肝细胞核因子(hepatocyte nuclear factor, HNF)4 $\alpha$ 作为调控肝脏分化的重要转录因子,在肝细胞肝癌的诱导分化治疗过程中具有一定的诱导分化作用已经有大量的研究证实,然而肝细胞肝癌诱导分化治疗仍未取得突破性进展,是因为缺乏对肝细胞肝癌分化机制的认识。因此,寻找新的诱导分化剂,深入了解肝细胞肝癌分化机制成为肝细胞肝癌等实体瘤治疗研究的新方向和热点。

细胞肝癌的发生是由于正常基因功能受控于错误的表达程序所致。HCC的恶性程度很高,预后极差,严重危及人类健康,然而肝细胞肝癌的具体发病机制尚不清楚,研究HCC细胞的分化特征以及寻找新的诱导分化剂不但能为HCC治疗提供合理的治疗对策,而且有助于人们对HCC发病机制的认识。本文从分化诱导剂和分化治疗靶点,分化相关信号通路和分化相关microRNA 3个方面综述了HCC诱导分化治疗的研究进展,为HCC的治疗提供依据和线索。

© 2015年版权归百世登出版集团有限公司所有。

**关键词:** 肝细胞肝癌; 诱导分化; 肝癌干细胞; MicroRNA

**核心提示:** 肿瘤干细胞理论的提出为肝细胞肝癌的诱导分化治疗提供了新的理论依据。寻找高效低毒的诱导分化剂和精确的诱导分化治疗靶点是诱导分化治疗的核心与关键。分化相关信号通路的异常活化和microRNA的表现遗传学调控参与了肝癌细胞的分化调控。

罗娅, 金海, 文国容, 虞必光. 肝细胞肝癌诱导分化治疗研究进展. 世界华人消化杂志 2015; 23(29): 4665-4672 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/23/4665.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v23.i29.4665>

## 0 引言

肝细胞肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是分化异常的恶性异质性肿瘤。随着肿瘤干细胞理论的提出和证实,认为肿瘤干细胞是指肿瘤中具有自我更新能力并能产生异质性肿瘤细胞的细胞。近年来,大量的研究认为肝癌的发生起源于肝癌干细胞,然而对于肝癌干细胞的来源目前尚存争议,一种观点认为肝癌干细胞来源于正常肝干细胞的转化,这些正常肝干细胞由于基因突变导致自我更新和分化的调节失控;另一种观点认为来源于去分化的成熟肝细胞。肝癌干细胞的存在被认为是肝癌发生、转移、进展、复发和耐药的“罪魁祸首”<sup>[1]</sup>。肿瘤干细胞理论的提出为肝癌诱导分化治疗提供了新的理论依据。因此,同时针对肝癌干细胞和肝癌细胞的诱导分化治疗成为新的HCC诱导分化治疗方向。全反式维A酸(all-trans retinoic acid, ATAR)治疗急性早幼粒细胞白血病(acute promyelocytic

leukemia, APL)是肿瘤分化治疗的经典范例,极大的推动了诱导分化治疗相关研究的开展。然而肝癌等恶性实体瘤的诱导分化治疗效果并不理想,寻找新的诱导分化剂,深入了解HCC分化机制成为肝细胞肝癌等实体瘤治疗研究的新方向和热点。

## 1 分化诱导剂和分化治疗靶点

在正常肝脏发育过程中,调控分化的转录因子主要有肝细胞核因子(hepatocyte nuclear factor, HNF)4 $\alpha$ , HNF1 $\alpha$ , HNF1 $\beta$ , C/EBP $\alpha$ 和C/EBP $\beta$ <sup>[2]</sup>。HNF4 $\alpha$ 是肝脏富有的细胞核激素受体家族的转录因子,位于肝细胞核内,处于转录因子网络调控上游,在分化成熟的肝细胞中高表达,可以和肝脏中近1/3的基因启动子结合,调控肝细胞分化表型,维护肝细胞生物学功能。Yin等<sup>[3]</sup>的研究表明通过AdHNF4 $\alpha$ 感染HepG2和Hep3B肝癌细胞株可使其在小鼠体内的成瘤性完全丧失。此外,上调HNF4 $\alpha$ 表达可以阻断原代培养肝星状细胞和肝细胞上皮间充质转换(epithelial-mesenchymal transition, EMT)现象,促使活化肝星状细胞向上皮细胞表型转换,显著减轻多种模型大鼠肝纤维化<sup>[4]</sup>。另外也有研究<sup>[5]</sup>发现HNF4 $\alpha$ 和E-cadherin在分化程度较高的Hep3B和Huh-7肝癌细胞株表达较高,在低分化的SK-Hep-1和Bel-7402肝癌细胞株表达较低,并且人为的促使SK-Hep-1的HNF4 $\alpha$ 的表达能引起E-cadherin表达的上调,最终促进间质上皮转换(mesenchymal-epithelial transition, MET)的发生,降低了HCC细胞的侵袭性。也有研究<sup>[6]</sup>进一步发现HNF4 $\alpha$ 能同时诱导HCC细胞和肝癌干细胞的分化,明显减轻肝纤维化,预防肝癌的发生。Zeng等<sup>[7]</sup>用携带HNF1 $\alpha$ 基因的腺病毒(AdHNF1 $\alpha$ )转染HCC细胞后能恢复某些正常肝脏基因的表达以及miR-192和miR-194水平,抑制CD133和上皮细胞黏附分子的表达以及雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR),同时也能抑制转化生长因子- $\beta$ (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ )通路的激活。抑瘤素M(oncostatin M, OSM)被证实不仅能通过信号转导子和转录激活子3(signal transducer and activator of transcription, STAT3)途径增加肝祖细胞分化程度,而且能通过OSMR途径诱导EpCAM阳

性肝癌干细胞分化, 使G<sub>0</sub>期肝癌干细胞进入细胞周期从而增加肝癌干细胞对化疗药物5-氟尿嘧啶的敏感性<sup>[8]</sup>。另外, Kong等<sup>[9]</sup>的研究表明OSM能使肝癌细胞株SMMC-7721的细胞周期停滞在G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期, 促进其凋亡, 诱导SMMC-7721向正常肝细胞表型分化。低浓度的三氧化二砷能降低HCC细胞CD133、CD90和甲胎蛋白(alpha-fetoprotein, AFP)等低分化标志物的表达, 促进HCC细胞重建正常表型, 重新分泌白蛋白和球蛋白, 同时增加HCC细胞对传统化疗药物的敏感性<sup>[10]</sup>。25-羟基胆固醇作用于肝癌AH136B腹水细胞能促进该细胞凋亡, 联合应用25-羟基胆固醇和低剂量的肿瘤坏死因子α(tumor necrosis factor α, TNF-α)具有协调抗癌作用<sup>[11]</sup>。聚乙二醇干扰素α不仅具有抗肝炎病毒作用也有阻止肝癌发生的作用, 有研究发现在肝脏慢性损伤的过程中用聚乙二醇干扰素α治疗, 能调控肝细胞凋亡、增殖和分化, 大幅减少肝卵圆细胞的数目<sup>[12]</sup>, 降低肝卵圆细胞转化为肝癌干细胞的可能性<sup>[13]</sup>。国内的HCC诱导分化相关研究还涉及一些传统的中草药, 如紫龙金<sup>[14]</sup>、白杨素<sup>[15]</sup>、小柴胡汤<sup>[16]</sup>和苦参碱<sup>[17]</sup>等。

有研究者发现性别决定基因(sex-determining region of the Y, SRY)和干细胞相关基因Oct4(octamer-binding transcription factor 4)是潜在的分化治疗靶点, SRY在人HCC组织中高表达, 并且SRY能通过OCT4基因启动子上的SRY结合位点直接调控OCT4基因表达从而维持HCC细胞的干细胞特性如自我更新能力、成瘤能力<sup>[18]</sup>。另外有研究<sup>[19]</sup>发现细胞表面趋化因子受体7(chemokine receptor, CXCR7)能活化细胞外信号调节激酶(extracellular regulated protein kinase, ERK)使HNF4α表达受抑制来调控HCC分化, 因此CXCR7-ERK-HNF4α有可能成为HCC分化治疗的另一靶点。Sun等<sup>[20]</sup>研究发现癌性锚蛋白重复蛋白(Gankyrin, Gen-Bank NM-002814)在HCC中过表达, 过表达的Gankyrin促进了正常肝细胞的去分化, 通过慢病毒转染实验沉默Gankyrin的表达能提高HCC细胞的分化程度, 降低HCC的恶性程度。研究<sup>[21]</sup>发现Yin Yang-1(YY1)作为锌指蛋白类转录因子GLI-Kruppel家族成员之一在HCC细胞株中高表达, 并且能直接下调调控肝细胞分化的重要转录因子CCAAT/增强子结

合蛋白α(CCAAT/enhancer-binding protein α, sCEBPA)发挥其致癌作用, 然而抑制YY1表达或者恢复CEBPA在HCC细胞中的表达能促使HCC细胞分化, 因此YY1有可能作为另一肝癌分化治疗靶点。

## 2 HCC分化相关信号通路

### 2.1 Wnt/β-catenin信号通路

Wnt/β-catenin信号通路是经典的Wnt通路, 在正常组织发育过程中调控细胞的增殖、分化和迁移, 其异常激活在许多肿瘤中被发现, 在HCC中同样存在Wnt/β-catenin信号通路的异常活化<sup>[22]</sup>。β-连环蛋白(β-catenin)作为转录助激活剂调控靶基因表达发挥作用。在没有Wnt刺激作用时, 细胞质内的β-catenin与GSK-3p、APC、Axin降解复合体结合, β-catenin被磷酸化, 磷酸化后的β-catenin被泛素化标记后降解, 从而使β-catenin处于基础含量水平。然而在Wnt刺激作用下, β-catenin磷酸化受抑制, 在细胞质内不断积累增多, 转运至细胞核内, 解除转录因子TCF/LEF与转录阻碍物结合后对靶基因转录抑制作用, 与转录因子TCF/LEF结合形成转录复合物, 激活靶基因转录。EMT是上皮来源的恶性肿瘤细胞获得迁移和侵袭能力的重要生物学过程, 在这个过程中正常上皮细胞受控于错误的程序转化为异常分化表型的间质细胞。大量的研究表明Wnt/β-catenin信号通路参与了许多肿瘤的EMT过程。有研究<sup>[23]</sup>表明, HNF4α和β-catenin通过和T细胞因子4(T cell factor 4, TCF-4)竞争性结合调控*Slug*和*snail*基因的转录, 从而在调控肝细胞肝癌发生发展过程中形成双向负反馈环, 相互抑制, 自我增强, 从而决定细胞的分化方向是EMT还是MET。另一项研究<sup>[24]</sup>表明, HNF4α通过调控Wnt/β-catenin信号通路调节肠道上皮细胞增殖和分化的平衡。从上述2项研究可以看出Wnt/β-catenin信号通路的活化在HCC去分化的过程中扮演着重要角色。

### 2.2 Notch信号通路

Notch信号通路是进化高度保守的信号通路, 广泛存在于多细胞生物体。他在细胞之间传递信息的过程中起着关键作用, 并且在胚胎发育和干细胞分化演变过程中参与调控细胞的分化发育<sup>[25]</sup>。研究<sup>[26]</sup>发现, 在神经胶质瘤中胞质多聚腺苷酸化成分结合蛋白4(cytoplasmic polyadenylation element-

## ■ 相关报道

HNF4α和β-catenin通过和T细胞因子4竞争性结合调控*Slug*和*snail*基因的转录, 从而在调控肝细胞肝癌发生发展过程中形成双向负反馈环, 相互抑制, 自我增强, 从而决定细胞的分化方向是上皮间充质转换(epithelial-mesenchymal transition, EMT)还是间质上皮转换(mesenchymal-epithelial transition, MET)。

## ■ 创新盘点

本文较为系统的归纳和总结了肝细胞肝癌诱导分化治疗的研究意义和近5年国内外研究成果。

binding protein 4)能下调HES1和SIRT1的表达从而调控神经胶质瘤干细胞的分化, 为神经胶质瘤的诱导分化治疗提供了可能的靶点和新的线索。另外有研究<sup>[27]</sup>发现在食管癌和胃癌中存在Notch-ATOH1通路活化, 用Notch通路抑制剂如 $\gamma$ -分泌酶抑制剂可以有效阻断该通路的活化, 从而达到一定的胃肠道肿瘤诱导分化治疗的效果。然而关于Notch信号通路在HCC中的作用仍然尚存争议。有2项研究<sup>[28,29]</sup>表明, Notch1的过表达促进了HCC细胞的细胞周期停滞和凋亡从而抑制HCC细胞的生长。Zhang等<sup>[30]</sup>研究发现Notch3在HCC患者组织中的表达水平和AFP的表达水平成正相关, 和分化程度成负相关, 并且Notch3能够通过使Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路失活从而发挥维持肿瘤细胞干性的作用。

**2.3 TGF- $\beta$ 信号通路** TGF- $\beta$ 超家族调控着细胞生长和分化, 其在肝细胞肝癌的发生发展过程中起着双重作用, 一方面在HCC初期可作为肿瘤抑制因子抑制细胞增殖、促进凋亡和分化。另一方面在HCC晚期失去增殖抑制作用, 刺激血管生成、参与免疫抑制、促进细胞外基质形成, 参与了肿瘤微环境的构建<sup>[31]</sup>。TGF- $\beta$ 信号通路成员[TGF- $\beta$ R2、SMAD3、SMAD4、胚肝血影蛋白(embryonic liver fodrin, ELF)]的功能紊乱可能导致肝干细胞的自我更新和分化的调节失控, 最终导致肝癌的形成。ELF是肝干细胞标志物, 在肝癌干细胞中缺失, 导致TGF- $\beta$ 信号通路中断, 使得肝干细胞分化调控过程异常, 出现异常分化表型, 最终转化为肝癌干细胞<sup>[32]</sup>。有研究<sup>[33]</sup>发现, TGF- $\beta$ 靶向作用于糖原合成酶激酶3 $\beta$ (glycogen synthase kinase 3 $\beta$ , GSK3 $\beta$ )使其失活从而使HNF4 $\alpha$ 发生转录后修饰丧失了DNA结合活性和肿瘤抑制作用。骨形态发生蛋白4(bone morphogenetic protein, BMP4)属于TGF- $\beta$ 超家族的一个分支。有研究者发现, 在小鼠模型中BMP4能诱导结肠癌干细胞分化增加其对化疗药物的敏感性<sup>[34]</sup>。此外, Zhang等<sup>[35]</sup>的研究表明外源性高剂量的BMP4能诱导CD133阳性的PLC/PRF/5和Huh7肝癌细胞株中的肝癌干细胞向正常表型分化。

**2.4 Hedgehog信号通路** Hedgehog(Hh)信号通路是进化保守的信号通路, 在胚胎时期调控细胞分化、组织和器官发育起着重要作

用。在正常成人肝组织中Hh信号通路处于失活状态, 然而在HCC中该信号通路处于异常激活状态。Hh信号通路包含了7个主要组件, 分别是Hedgehog(Hh)、patched(PTCH)、smoothened(Smo)、GLIs、kinesin-like protein costal 2(Cos 2)、fused(Fu)和suppressor of fused(SuFu)。Fu等<sup>[36]</sup>的研究发现Hh信号通路的配体PTCH的表达在分化程度高的肝细胞癌组织中表达率高, 在分化程度低的肝细胞癌组织中表达率低。细胞分化的过程常常伴随着细胞增殖与细胞凋亡, 细胞凋亡可以说是细胞的终末分化。Zhang等<sup>[37,38]</sup>研究发现沉默*Gli2*基因的表达能进一步下调凋亡抑制蛋白c-FLIP和*Bcl-2*基因的表达, 从而增加肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体[tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL]诱导的凋亡。Xu等<sup>[39]</sup>研究发现Gli1在肝癌组织中高表达, 并且其表达程度和肝癌的临床病理特征和分化程度密切相关。Zheng等<sup>[40]</sup>研究发现Gli1能直接上调TGF- $\beta$ 1通路靶基因*snail*的表达, 从而促进了HCC细胞EMT这一生物学过程的发生和肝癌细胞分化表型的改变。

### 3 MicroRNA

MicroRNA(miRNA)是一类由内源基因编码的长度约为22个核苷酸的非编码双链RNA分子, 他们在动植物中参与转录后基因表达调控。大多数miRNA基因以单拷贝、多拷贝或基因簇的形式存在于基因组中。成熟的miRNA和RNA诱导沉默复合体(RNA-induced silencing complex, RISC)结合对靶基因mRNA发挥裂解或遏制作用。miRNA表达模式具有分化的位相性和时序性, 因此miRNAs在细胞分化这一生物学过程中发挥着重要的调控作用并且和肿瘤的发生发展密切相关。研究<sup>[41]</sup>表明, 在化学致癌物质的作用下, 鼠肝卵圆细胞(hepatic oval cells, HOCs)转分化为HCC细胞, 有研究者检测了1210个miRNA在这个过程中表达的变化, 并且用相关软件预测了表达变化大的miRNA作用的靶基因, 发现这些基因的功能涉及血管生成, 转录后蛋白修饰, 小分子代谢等。Yin等<sup>[42]</sup>的研究表明, HNF4 $\alpha$ 能通过上调来源于miR-379-656簇的miR-134水平来逆转HCC的



分化表型。miR-148a在肝细胞成熟过程中发挥着重要作用, 他可以直接调控DNA甲基转移酶1基因(DNA methyltransferase, *DNMT1*)的转录后表达促进HCC细胞向正常肝细胞特有表型分化, 如白蛋白的分泌<sup>[43]</sup>。此外也有研究<sup>[44]</sup>表明, 促使具有高侵袭性的MHCC97H和MHCC97L肝癌细胞株过表达miR-148a能阻断EMT过程, 减弱肝癌干细胞标志物CD90和CD24的表达。在HCC中, Lin28B的表达越高肿瘤分期越高, 分化程度越低<sup>[45]</sup>。在正常发育过程中, RNA结合蛋白Lin28在干细胞中高表达使let-7 miRNA前体成熟受阻从而维持干细胞的自我更新能力。然而当干细胞启动分化程序时, Lin28表达逐渐降低, 成熟的let-7表达逐渐增加, 干细胞的自我更新能力受抑制从而沿着终末分化方向分化。Lin28/let-7的平衡在细胞分化和肿瘤发生的过程中扮演着方向盘的作用, 这种平衡一旦失衡能导致肝干细胞的恶性转化<sup>[46]</sup>。长期慢性的炎症刺激能导致正常细胞的恶性转化, 核因子- $\kappa$ B(nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B)、Lin28B、let-7和白介素(interleukin, IL)-6形成的正反馈环作为表观遗传学开关参与了正常细胞表型的转换<sup>[47]</sup>。miR-181家族成员在上皮细胞黏附分子(epithelial cell adhesion molecule, EpCAM)阳性和AFP阳性的HCC细胞中呈高水平表达, miR-181能直接作用于调控分化的肝细胞转录因子, 因此, 抑制miR-181的表达能诱导HCC细胞的分化和抑制HCC细胞的成瘤能力<sup>[48]</sup>。miR-122来源于*hcr*基因转录本, 在肝细胞中特异性高表达, 参与调节肝细胞分化代谢, 发挥一定的抗炎抗癌作用<sup>[49]</sup>。G $\alpha$ 12在HCC中过表达, 加速了HNF4 $\alpha$ 的泛素化降解, 减弱了HNF4 $\alpha$ 对miR-122的反式激活作用, 引起了癌基因*c-Met*表达的增加和ERK、STAT3和Akt/mTOR信号通路的激活<sup>[50]</sup>。

#### 4 结论

从细胞分化的观点分析肝细胞肝癌, 认为分化障碍是HCC细胞的一个重要生物学特性。大量证据表明, HCC细胞可能起源于一些未分化或微分化的干细胞, 是由于组织更新或损伤修复所产生的分化异常所致。也有证据表明, HCC细胞来源于正常肝细胞的去分化。同时越来越多的研究表明, 高效低毒的诱导分化剂能诱导

某些肿瘤细胞走向正常的终末分化, 然而针对HCC等恶性实体瘤的诱导分化治疗效果并不理想, 是由于对HCC细胞分化和去分化机制的认识以及不能找到明确的诱导分化靶点。因此, 从分化相关信号通路, miRNA的表观遗传学调控, 分化相关重要转录因子等多方面充分了解HCC分化异常机制, 有助于找到明确的分化治疗靶点和高效低毒的分化诱导剂, 为HCC提供合理的治疗对策。

#### 5 参考文献

- Oishi N, Yamashita T, Kaneko S. Molecular biology of liver cancer stem cells. *Liver Cancer* 2014; 3: 71-84 [PMID: 24944998 DOI: 10.1159/000343863]
- Costa RH, Kalinichenko VV, Holterman AX, Wang X. Transcription factors in liver development, differentiation, and regeneration. *Hepatology* 2003; 38: 1331-1347 [PMID: 14647040 DOI: 10.1016/j.hep.2003.09.034]
- Yin C, Lin Y, Zhang X, Chen YX, Zeng X, Yue HY, Hou JL, Deng X, Zhang JP, Han ZG, Xie WF. Differentiation therapy of hepatocellular carcinoma in mice with recombinant adenovirus carrying hepatocyte nuclear factor-4alpha gene. *Hepatology* 2008; 48: 1528-1539 [PMID: 18925631 DOI: 10.1002/hep.22510]
- Yue HY, Yin C, Hou JL, Zeng X, Chen YX, Zhong W, Hu PF, Deng X, Tan YX, Zhang JP, Ning BF, Shi J, Zhang X, Wang HY, Lin Y, Xie WF. Hepatocyte nuclear factor 4alpha attenuates hepatic fibrosis in rats. *Gut* 2010; 59: 236-246 [PMID: 19671543 DOI: 10.1136/gut.2008.174904]
- Yao D, Peng S, Dai C. The role of hepatocyte nuclear factor 4alpha in metastatic tumor formation of hepatocellular carcinoma and its close relationship with the mesenchymal-epithelial transition markers. *BMC Cancer* 2013; 13: 432 [PMID: 24059685 DOI: 10.1186/1471-2407-13-432]
- Ning BF, Ding J, Yin C, Zhong W, Wu K, Zeng X, Yang W, Chen YX, Zhang JP, Zhang X, Wang HY, Xie WF. Hepatocyte nuclear factor 4 alpha suppresses the development of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2010; 70: 7640-7651 [PMID: 20876809 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-0824]
- Zeng X, Lin Y, Yin C, Zhang X, Ning BF, Zhang Q, Zhang JP, Qiu L, Qin XR, Chen YX, Xie WF. Recombinant adenovirus carrying the hepatocyte nuclear factor-1alpha gene inhibits hepatocellular carcinoma xenograft growth in mice. *Hepatology* 2011; 54: 2036-2047 [PMID: 21898499 DOI: 10.1002/hep.24647]
- Yamashita T, Honda M, Nio K, Nakamoto Y, Yamashita T, Takamura H, Tani T, Zen Y, Kaneko S. Oncostatin m renders epithelial cell adhesion molecule-positive liver cancer stem cells sensitive to 5-Fluorouracil by inducing hepatocytic

#### 应用要点

本文总结了肝细胞肝癌诱导分化治疗的新方向和热点, 为肝细胞肝癌的诱导分化治疗提供新的理论依据和线索。

## ■ 名词解释

EMT: 是指上皮细胞通过特定程序转化为具有间质表型细胞的生物学过程。

- 9 Kong N, Zhang XM, Wang HT, Mu XP, Han HZ, Yan WQ. Inhibition of growth and induction of differentiation of SMMC-7721 human hepatocellular carcinoma cells by Oncostatin M. *Asian Pac J Cancer Prev* 2013; 14: 747-752 [PMID: 23621231]
- 10 Tomuleasa C, Soritau O, Fischer-Fodor E, Pop T, Susman S, Mosteanu O, Petrushev B, Aldea M, Acalovschi M, Irimie A, Kacso G. Arsenic trioxide plus cisplatin/interferon  $\alpha$ -2b/doxorubicin/capecitabine combination chemotherapy for unresectable hepatocellular carcinoma. *Hematol Oncol Stem Cell Ther* 2011; 4: 60-66 [PMID: 21727766]
- 11 Yokoyama S, Nozawa F, Tanaka S, Muneyuki S, Ogawa M. Anti-tumor effects of 25-hydroxycholesterol and low-dose recombinant tumor necrosis factor- $\alpha$  on rat liver tumorigenesis: modulated differentiation therapy for hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol* 2000; 16: 1029-1033 [PMID: 10762641]
- 12 Lim R, Knight B, Patel K, McHutchison JG, Yeoh GC, Olynyk JK. Antiproliferative effects of interferon alpha on hepatic progenitor cells in vitro and in vivo. *Hepatology* 2006; 43: 1074-1083 [PMID: 16628647 DOI: 10.1002/hep.21170]
- 13 Sell S, Leffert HL. Liver cancer stem cells. *J Clin Oncol* 2008; 26: 2800-2805 [PMID: 18539957 DOI: 10.1200/jco.2007.15.5945]
- 14 彭安, 申东兰, 徐颂周. 紫龙金诱导Bel-7402人肝癌细胞分化的实验研究. *实用癌症杂志* 2012; 27: 111-113
- 15 文红波, 曹运长, 虞佳, 王五洲. 白杨素对人肝癌HepG2细胞的诱导分化作用. *中国生化药物杂志* 2014; 34: 33-36
- 16 胡雅凌, 黄秀深. 小柴胡汤含药血清诱导SSMC-7721人肝癌细胞株分化研究. *辽宁中医药大学学报* 2013; 15: 37-39
- 17 王涌, 吴育连, 刘颖斌, 唐吉吉. 苦参碱体外诱导人肝癌细胞系Bel-7404分化及机制. *中华中医药杂志* 2009; 24: 955-958
- 18 Murakami S, Ninomiya W, Sakamoto E, Shibata T, Akiyama H, Tashiro F. SRY and OCT4 Are Required for the Acquisition of Cancer Stem Cell-Like Properties and Are Potential Differentiation Therapy Targets. *Stem Cells* 2015; 33: 2652-2663 [PMID: 26013162 DOI: 10.1002/stem.2059]
- 19 Xue TC, Jia QA, Bu Y, Chen RX, Cui JF, Tang ZY, Ye SL. CXCR7 correlates with the differentiation of hepatocellular carcinoma and suppresses HNF4 $\alpha$  expression through the ERK pathway. *Oncol Rep* 2014; 32: 2387-2396 [PMID: 25242412 DOI: 10.3892/or.2014.3501]
- 20 Sun W, Ding J, Wu K, Ning BF, Wen W, Sun HY, Han T, Huang L, Dong LW, Yang W, Deng X, Li Z, Wu MC, Feng GS, Xie WF, Wang HY. Gankyrin-mediated dedifferentiation facilitates the tumorigenicity of rat hepatocytes and hepatoma cells. *Hepatology* 2011; 54: 1259-1272 [PMID: 21735473 DOI: 10.1002/hep.24530]
- 21 Zhang S, Jiang T, Feng L, Sun J, Lu H, Wang Q, Pan M, Huang D, Wang X, Wang L, Jin H. Yin Yang-1 suppresses differentiation of hepatocellular carcinoma cells through the downregulation of CCAAT/enhancer-binding protein alpha. *J Mol Med (Berl)* 2012; 90: 1069-1077 [PMID: 22391813 DOI: 10.1007/s00109-012-0879-y]
- 22 Chen C, Wang G. Mechanisms of hepatocellular carcinoma and challenges and opportunities for molecular targeted therapy. *World J Hepatol* 2015; 7: 1964-1970 [PMID: 26244070 DOI: 10.4254/wjh.v7.i15.1964]
- 23 Yang M, Li SN, Anjum KM, Gui LX, Zhu SS, Liu J, Chen JK, Liu QF, Ye GD, Wang WJ, Wu JF, Cai WY, Sun GB, Liu YJ, Liu RF, Zhang ZM, Li BA. A double-negative feedback loop between Wnt- $\beta$ -catenin signaling and HNF4 $\alpha$  regulates epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. *J Cell Sci* 2013; 126: 5692-5703 [PMID: 24101726 DOI: 10.1242/jcs.135053]
- 24 Cattin AL, Le Beyec J, Barreau F, Saint-Just S, Houllier A, Gonzalez FJ, Robine S, Pinçon-Raymond M, Cardot P, Lacasa M, Ribeiro A. Hepatocyte nuclear factor 4alpha, a key factor for homeostasis, cell architecture, and barrier function of the adult intestinal epithelium. *Mol Cell Biol* 2009; 29: 6294-6308 [PMID: 19805521 DOI: 10.1128/mcb.00939-09]
- 25 Zaret KS. Genetic programming of liver and pancreas progenitors: lessons for stem-cell differentiation. *Nat Rev Genet* 2008; 9: 329-340 [PMID: 18398419 DOI: 10.1038/nrg2318]
- 26 Yin J, Park G, Lee JE, Park JY, Kim TH, Kim YJ, Lee SH, Yoo H, Kim JH, Park JB. CPEB1 modulates differentiation of glioma stem cells via downregulation of HES1 and SIRT1 expression. *Oncotarget* 2014; 5: 6756-6769 [PMID: 25216517]
- 27 Kazanjian A, Shroyer NF. NOTCH Signaling and ATOH1 in Colorectal Cancers. *Curr Colorectal Cancer Rep* 2011; 7: 121-127 [PMID: 21980310 DOI: 10.1007/s11888-011-0090-5]
- 28 Qi R, An H, Yu Y, Zhang M, Liu S, Xu H, Guo Z, Cheng T, Cao X. Notch1 signaling inhibits growth of human hepatocellular carcinoma through induction of cell cycle arrest and apoptosis. *Cancer Res* 2003; 63: 8323-8329 [PMID: 14678992]
- 29 Wang C, Qi R, Li N, Wang Z, An H, Zhang Q, Yu Y, Cao X. Notch1 signaling sensitizes tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells by inhibiting Akt/Hdm2-mediated p53 degradation and up-regulating p53-dependent DR5 expression. *J Biol Chem* 2009; 284: 16183-16190 [PMID: 19376776 DOI: 10.1074/jbc.M109.002105]
- 30 Zhang Q, Lu C, Fang T, Wang Y, Hu W, Qiao J, Liu B, Liu J, Chen N, Li M, Zhu R. Notch3 functions as a regulator of cell self-renewal by interacting with the  $\beta$ -catenin pathway in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* 2015; 6: 3669-3679 [PMID: 25668819]
- 31 Dong ZZ, Yao DF, Yao M, Qiu LW, Zong L, Wu W, Wu XH, Yao DB, Meng XY. Clinical impact

- of plasma TGF-beta1 and circulating TGF-beta1 mRNA in diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2008; 7: 288-295 [PMID: 18522884]
- 32 Baek HJ, Pishvaian MJ, Tang Y, Kim TH, Yang S, Zouhairi ME, Mendelson J, Shetty K, Kallakury B, Berry DL, Shin KH, Mishra B, Reddy EP, Kim SS, Mishra L. Transforming growth factor- $\beta$  adaptor,  $\beta$ 2-spectrin, modulates cyclin dependent kinase 4 to reduce development of hepatocellular cancer. *Hepatology* 2011; 53: 1676-1684 [PMID: 21520178 DOI: 10.1002/hep.24128]
  - 33 Cozzolino AM, Alonzi T, Santangelo L, Mancone C, Conti B, Steindler C, Musone M, Cicchini C, Tripodi M, Marchetti A. TGF $\beta$  overrides HNF4 $\alpha$  tumor suppressing activity through GSK3 $\beta$  inactivation: implication for hepatocellular carcinoma gene therapy. *J Hepatol* 2013; 58: 65-72 [PMID: 22960426 DOI: 10.1016/j.jhep.2012.08.023]
  - 34 Lombardo Y, Scopelliti A, Cammareri P, Todaro M, Iovino F, Ricci-Vitiani L, Gulotta G, Dieli F, de Maria R, Stassi G. Bone morphogenetic protein 4 induces differentiation of colorectal cancer stem cells and increases their response to chemotherapy in mice. *Gastroenterology* 2011; 140: 297-309 [PMID: 20951698 DOI: 10.1053/j.gastro.2010.10.005]
  - 35 Zhang L, Sun H, Zhao F, Lu P, Ge C, Li H, Hou H, Yan M, Chen T, Jiang G, Xie H, Cui Y, Huang X, Fan J, Yao M, Li J. BMP4 administration induces differentiation of CD133+ hepatic cancer stem cells, blocking their contributions to hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2012; 72: 4276-4285 [PMID: 22773665 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-12-1013]
  - 36 Fu X, Wang Q, Chen X, Huang X, Cao L, Tan H, Li W, Zhang L, Bi J, Su Q, Chen L. Expression patterns and polymorphisms of PTCH in Chinese hepatocellular carcinoma patients. *Exp Mol Pathol* 2008; 84: 195-199 [PMID: 18538319 DOI: 10.1016/j.yexmp.2008.04.002]
  - 37 Zhang D, Liu J, Wang Y, Chen J, Chen T. shRNA-mediated silencing of Gli2 gene inhibits proliferation and sensitizes human hepatocellular carcinoma cells towards TRAIL-induced apoptosis. *J Cell Biochem* 2011; 112: 3140-3150 [PMID: 21695716 DOI: 10.1002/jcb.23240]
  - 38 Zhang DW, Li HY, Lau WY, Cao LQ, Li Y, Jiang XF, Yang XW, Xue P. Gli2 silencing enhances TRAIL-induced apoptosis and reduces tumor growth in human hepatoma cells in vivo. *Cancer Biol Ther* 2014; 15: 1667-1676 [PMID: 25535898 DOI: 10.4161/15384047.2014.972286]
  - 39 Xu QR, Zheng X, Zan XF, Yao YM, Yang W, Liu QG. [Gli1 expression and its relationship with the expression of Shh, Vimentin and E-cadherin in human hepatocellular carcinoma]. *Xibao Yu Fenzi Mianyixue Zazhi* 2012; 28: 536-539 [PMID: 22558994]
  - 40 Zheng X, Vittar NB, Gai X, Fernandez-Barrena MG, Moser CD, Hu C, Almada LL, McCleary-Wheeler AL, Elswa SF, Vrabel AM, Shire AM, Comba A, Thorgeirsson SS, Kim Y, Liu Q, Fernandez-Zapico ME, Roberts LR. The transcription factor GLI1 mediates TGF $\beta$ 1 driven EMT in hepatocellular carcinoma via a SNAI1-dependent mechanism. *PLoS One* 2012; 7: e49581 [PMID: 23185371 DOI: 10.1371/journal.pone.0049581]
  - 41 Xu RH, Zheng LY, He DL, Meng J, Xia LP, Hao XB, Zhang ZZ. Profiling of differentially expressed microRNAs (miRNAs) during differentiation of rat hepatic oval cells (HOCs) into hepatocellular carcinoma (HCC) cells. *Clin Transl Oncol* 2015; 17: 230-237 [PMID: 25257837 DOI: 10.1007/s12094-014-1218-2]
  - 42 Yin C, Wang PQ, Xu WP, Yang Y, Zhang Q, Ning BF, Zhang PP, Zhou WP, Xie WF, Chen WS, Zhang X. Hepatocyte nuclear factor-4 $\alpha$  reverses malignancy of hepatocellular carcinoma through regulating miR-134 in the DLK1-DIO3 region. *Hepatology* 2013; 58: 1964-1976 [PMID: 23775631 DOI: 10.1002/hep.26573]
  - 43 Gailhouse L, Gomez-Santos L, Hagiwara K, Hatada I, Kitagawa N, Kawaharada K, Thirion M, Kosaka N, Takahashi RU, Shibata T, Miyajima A, Ochiya T. miR-148a plays a pivotal role in the liver by promoting the hepatospecific phenotype and suppressing the invasiveness of transformed cells. *Hepatology* 2013; 58: 1153-1165 [PMID: 23532995 DOI: 10.1002/hep.26422]
  - 44 Yan H, Dong X, Zhong X, Ye J, Zhou Y, Yang X, Shen J, Zhang J. Inhibitions of epithelial to mesenchymal transition and cancer stem cells-like properties are involved in miR-148a-mediated anti-metastasis of hepatocellular carcinoma. *Mol Carcinog* 2014; 53: 960-969 [PMID: 23861222 DOI: 10.1002/mc.22064]
  - 45 Viswanathan SR, Powers JT, Einhorn W, Hoshida Y, Ng TL, Toffanin S, O'Sullivan M, Lu J, Phillips LA, Lockhart VL, Shah SP, Tanwar PS, Mermel CH, Beroukhi R, Azam M, Teixeira J, Meyerson M, Hughes TP, Llovet JM, Radich J, Mullighan CG, Golub TR, Sorensen PH, Daley GQ. Lin28 promotes transformation and is associated with advanced human malignancies. *Nat Genet* 2009; 41: 843-848 [PMID: 19483683 DOI: 10.1038/ng.392]
  - 46 Oishi N, Wang XW. Novel therapeutic strategies for targeting liver cancer stem cells. *Int J Biol Sci* 2011; 7: 517-535 [PMID: 21552419]
  - 47 Iliopoulos D, Hirsch HA, Struhl K. An epigenetic switch involving NF-kappaB, Lin28, Let-7 MicroRNA, and IL6 links inflammation to cell transformation. *Cell* 2009; 139: 693-706 [PMID: 19878981 DOI: 10.1016/j.cell.2009.10.014]
  - 48 Ji J, Yamashita T, Budhu A, Forgues M, Jia HL, Li C, Deng C, Wauthier E, Reid LM, Ye QH, Qin LX, Yang W, Wang HY, Tang ZY, Croce CM, Wang XW. Identification of microRNA-181 by genome-wide screening as a critical player in EpCAM-positive hepatic cancer stem cells. *Hepatology* 2009; 50: 472-480 [PMID: 19585654 DOI: 10.1002/hep.22989]
  - 49 Hsu SH, Wang B, Kota J, Yu J, Costinean S, Kutay H, Yu L, Bai S, La Perle K, Chivukula RR, Mao H, Wei M, Clark KR, Mendell JR, Caligiuri MA, Jacob ST, Mendell JT, Ghoshal K. Essential metabolic, anti-inflammatory, and anti-

## 同行评价

该综述选题为目前研究的热点问题, 因而具有重要的理论意义和应用价值。文献综述部分对肝细胞肝癌诱导分化治疗的研究意义以及近5年国内外研究成果进行了较为系统的归纳和总结, 内容严谨, 归纳总结合情合理。



- tumorigenic functions of miR-122 in liver. *J Clin Invest* 2012; 122: 2871-2883 [PMID: 22820288]
- 50 Yang YM, Lee CG, Koo JH, Kim TH, Lee JM, An J, Kim KM, Kim SG. Ga12 overexpressed in

hepatocellular carcinoma reduces microRNA-122 expression via HNF4 $\alpha$  inactivation, which causes c-Met induction. *Oncotarget* 2015; 6: 19055-19069 [PMID: 25965999]

编辑: 于明茜 电编: 都珍珍



ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) DOI: 10.11569 2015年版权归百世登出版集团有限公司所有

## •消息•

### 《世界华人消化杂志》性质、刊登内容及目标

**本刊讯** 《世界华人消化杂志》[国际标准刊号ISSN 1009-3079 (print), ISSN 2219-2859 (online), DOI: 10.11569, *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi/World Chinese Journal of Digestology*], 是一本由来自国内29个省、市、自治区、特别行政区和美国的506位胃肠病学和肝病专家支持的开放存取的同行评议的旬刊杂志, 旨在推广国内各地的胃肠病学和肝病领域临床实践和基础研究相结合的最具有临床意义的原创性及各类评论性的文章, 使其成为一种公众资源, 同时科学家、医生、患者和学生可以通过这样一个不受限制的平台来免费获取全文, 了解其领域的所有的关键的进展, 更重要的是这些进展会为本领域的医务工作者和研究者服务, 为他们的患者及基础研究提供进一步的帮助。

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

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

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

## 基因敲除技术在炎症性肠病肠上皮屏障机制研究中的应用

陈柳, 吴焕淦, 施茵

陈柳, 上海中医药大学岳阳临床医学院 上海市 201203  
吴焕淦, 施茵, 上海市针灸经络研究所 上海市 200030  
陈柳, 在读硕士, 主要从事炎症性肠病的相关研究。  
国家自然科学基金资助项目, Nos. 81273844, 81473757  
国家重点基础研究发展计划(973计划)基金资助项目,  
No. 2015CB554500  
作者贡献分布: 本文综述由陈柳完成; 吴焕淦与施茵负责审校指导。  
通讯作者: 施茵, 主任医师, 博士, 200030, 上海市宛平南路  
650号, 上海市针灸经络研究所。flysy0636@163.com  
电话: 8621-64383910  
收稿日期: 2015-08-06 修回日期: 2015-08-21  
接受日期: 2015-09-07 在线出版日期: 2015-10-18

### Application of gene knockout technology in research of intestinal epithelial barrier mechanism in inflammatory bowel disease

Liu Chen, Huan-Gan Wu, Yin Shi

Liu Chen, Yueyang Clinical Medical School, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China  
Huan-Gan Wu, Yin Shi, Shanghai Institute of Acupuncture-Moxibustion and Meridian, Shanghai 200030, China  
Supported by: National Natural Science Foundation of China, Nos. 81273844 and 81473757; National Basic Research Program of China (973 Program), No. 2015CB554500  
Correspondence to: Yin Shi, Chief Physician, Shanghai Institute of Acupuncture-Moxibustion and Meridian, 630 Wanping South Road, Shanghai 200030, China. flysy0636@163.com  
Received: 2015-08-06 Revised: 2015-08-21  
Accepted: 2015-09-07 Published online: 2015-10-18

### Abstract

Intestinal epithelial barrier permeability

changes/increase caused by intestinal epithelial barrier damage play an important role in the pathogenesis of inflammatory bowel disease, and the maintenance of normal intestinal epithelial barrier permeability depends on the two aspects of the trans-epithelial cell pathway and the tight connection between the cells. In recent years, with the development of molecular biology technology and wide application of a variety of gene engineering technology, specific knocking out a particular gene through gene knockout technology to study the pathogenesis of the disease has become a hot research topic. In this paper, we review the application of gene knockout technology in the research of intestinal epithelial barrier trans-epithelial pathway and tight junction pathway in inflammatory bowel disease, in order to provide some ideas for further study of the pathogenesis of inflammatory bowel disease.

© 2015 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

**Key Words:** Gene knockout technology; Inflammatory bowel disease; Intestinal epithelial barrier; Review

Chen L, Wu HG, Shi Y. Application of gene knockout technology in research of intestinal epithelial barrier mechanism in inflammatory bowel disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2015; 23(29): 4673-4679 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/23/4673.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v23.i29.4673>

### 摘要

肠上皮屏障通透性改变/增加所致的肠上皮

### ■背景资料

肠上皮屏障是机体最重要的免疫防御屏障, 其中肠黏膜上皮细胞及其细胞间的紧密连接结构是肠道抵御外环境中有害物质或病原体入侵肠黏膜组织的关键, 是维持肠上皮的选择通透性及其屏障功能的基础。跨上皮途径和细胞旁紧密连接途径结构的改变, 可使肠黏膜通透性改变, 即肠上皮屏障出现损伤进而可导致炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)的发生。

### ■同行评议者

潘秀珍, 教授, 主任医师, 福建省立医院消化科

## ■ 研究前沿

基因敲除技术特异性敲除某一特定基因来研究疾病的发病机制成为热点。本文通过介绍基因敲除技术特异性敲除肠上皮屏障的跨上皮途径和紧密连接途径这两条途径中的任意靶点基因来造成其结构改变, 以此来研究IBD的发病机制; 并在此基础上寻找治疗IBD的新靶点, 这将对于开发治疗IBD的新药具有重大的潜在研究价值。

屏障损伤在炎症性肠病发病机制中起重要作用, 正常肠上皮屏障通透性的维持依赖于跨上皮细胞途径和细胞间紧密连接途径这两方面。近年来, 随着分子生物学技术的发展以及各种基因工程技术的广泛应用, 通过基因敲除技术特异性敲除某一特定基因来研究疾病的发病机制成为热点。本文综合了近年来国内外相关研究文献, 旨在对基因敲除技术在炎症性肠病肠上皮屏障的跨上皮途径和紧密连接途径这两方面研究中的应用进行简要概述, 试图对深入开展炎症性肠病的发病机制研究提供一些思路。

© 2015年版权归百世登出版集团有限公司所有。

**关键词:** 基因敲除技术; 炎症性肠病; 肠上皮屏障; 综述

**核心提示:** 肠上皮屏障通透性改变或通透性增加所致的肠上皮屏障损伤在炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)发病机制中发挥着重要作用, 本文通过阐述基因敲除技术在肠上皮屏障跨上皮途径中的应用和在肠上皮屏障紧密连接途径中的应用来研究肠上皮屏障结构或功能损伤在IBD中的影响作用。

陈柳, 吴煥淦, 施茵. 基因敲除技术在炎症性肠病肠上皮屏障机制研究中的应用. 世界华人消化杂志 2015; 23(29): 4673-4679 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/23/4673.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v23.i29.4673>

## 0 引言

炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)包括溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)和克罗恩病(Crohn's disease, CD), 由于其发病率逐年升高, 其病因和发病机制的研究也越来越受到重视。其中肠上皮屏障损伤机制的研究已成为IBD发病机制研究中的热点之一。随着分子生物学技术的发展以及各种基因工程技术的广泛应用, 从20世纪90年代起就有研究者<sup>[1-3]</sup>通过采用基因敲除技术特异性敲除某一特定基因来研究细胞因子、细胞因子受体、T细胞受体、抗原递呈细胞以及肠上皮细胞在IBD发病机制尤其是在其免疫发病机制中的作用。

基因敲除(gene knockout)技术是20世纪80年代发展起来的一门新技术。基因敲除动物模型的建立使许多与人类疾病相关的新基因的

功能得到阐明, 从而使现代生物学及医学研究领域取得了突破性进展。该技术应用DNA同源重组技术, 将灭活的基因导入小鼠胚胎干细胞以取代目的基因, 再筛选出已靶向灭活的细胞, 微注射入小鼠囊胚。该细胞参与胚胎发育形成嵌合型小鼠, 再进一步传代培育可得到纯合基因敲除小鼠。最新的基因敲除技术即可诱导区域性蛋白质敲除技术, 用这一技术构建的模式动物已成为目前功能基因组和功能蛋白质组研究最先进的工具之一<sup>[4]</sup>。基因敲除动物可用于研究动物在该基因缺陷时的生理病理过程。

肠上皮屏障是机体最重要的免疫防御屏障, 其中肠黏膜上皮细胞及其细胞间的紧密连接结构是肠道抵御外环境中有害物质或病原体入侵肠黏膜组织的关键, 是维持肠上皮的选择通透性及其屏障功能的结构基础。正常的肠上皮通透性主要依赖于两个途径, 即跨上皮途径和细胞旁途径(紧密连接), 在跨上皮途径中, 肠黏膜上皮细胞允许营养物质从肠腔吸收进入循环, 同时限制对人体有害的物质(如内毒素和炎症因子)通过<sup>[5,6]</sup>。细胞旁途径是一组复杂的结构, 主要由上皮细胞之间的紧密连接构成。细胞旁途径对大分子物质(如内毒素和细菌的其他产物)是否通过起到关键性调控作用<sup>[7]</sup>。研究<sup>[8]</sup>表明, 跨上皮途径和细胞旁紧密连接途径结构的改变, 可使肠黏膜通透性改变, 即肠上皮屏障出现损伤进而可导致IBD的发生。通过利用基因敲除技术特异性敲除这两条途径中的任意靶点基因来造成其结构改变, 由此来研究肠上皮屏障结构或功能损伤在IBD中的影响作用。本文旨在从肠上皮屏障的跨上皮途径和紧密连接途径研究基因敲除技术在这两条途径中的应用。

## 1 基因敲除技术在肠上皮屏障跨上皮途径中的应用

**1.1 肿瘤坏死因子 $\alpha$**  肿瘤坏死因子 $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )即经典TNF, 是一种主要由单核-巨噬细胞产生的促炎细胞因子, 主要参与炎症反应和免疫反应。他可诱导其他多种炎症介质的释放, 激活全身和肠道局部免疫反应, 引起免疫级联反应和恶性循环, 导致肠道持续炎症<sup>[9]</sup>。Fukumoto等<sup>[10]</sup>通过研究证实, 用



吡喹啉美辛诱导的小肠损伤模型中,  $\text{TNF-}\alpha^{-/-}$  的小鼠与野生型小鼠相比, 其肠上皮细胞凋亡含量和Caspase3蛋白的表达明显低于野生型小鼠,  $\text{Bcl-2}$  mRNA的表达水平高于野生型小鼠. 他们认为 $\text{TNF-}\alpha$ 在吡喹啉美辛诱导的小肠损伤模型发病机制中发挥着重大作用, 是通过其自身参与肠黏膜的中性粒细胞浸润和肠上皮细胞凋亡途径实现的.

**1.2 锌指蛋白A20** 锌指蛋白A20(zinc finger protein A20, A20), 他是由 $\text{TNF-}\alpha$ 诱导产生的 $\text{TNF-}\alpha$ 诱导蛋白3( $\text{TNF-}\alpha$  induced protein 3,  $\text{TNFAIP3}$ ), 是核因子- $\kappa\text{B}$ (nuclear factor- $\kappa\text{B}$ ,  $\text{NF-}\kappa\text{B}$ )的目标基因, 能够编码泛素化修饰酶, 除可负调控 $\text{TNF-}\alpha$ 介导的 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 激活, 还可抑制 $\text{TNF-}\alpha$ 介导的细胞凋亡<sup>[11]</sup>. Vereecke等<sup>[12]</sup>研究发现,  $\text{A20}^{-/-}$ 的小鼠没有出现自发的肠道炎症, 但是却显示出对实验性结肠炎的敏感性, 并且 $\text{A20}^{-/-}$ 的小鼠肠上皮细胞对 $\text{TNF-}\alpha$ 诱导的细胞凋亡具有高敏感性, 可导致肠上皮细胞凋亡以及肠上皮屏障破坏, 最终源于肠道共生菌的侵袭引起系统性炎症反应而导致死亡.

**1.3 Ras相关结构域蛋白1A** Ras相关结构域蛋白1A(Ras association domain family protein 1A, *RASSF1A*)是一个肿瘤抑制基因. 近年来研究<sup>[13-15]</sup>发现, *RASSF1A*是一种新的细胞调节因子, 他是Rassf/Salvador/Hippo通路的组成部分, 而Rassf通路能够调节细胞的死亡和增殖. Gordon等<sup>[16]</sup>通过实验证实, 特意敲除*RASSF1A*基因可导致肠上皮细胞凋亡增加. 他们通过实验观察到, *RASSF1A*与膜近端Toll样受体组件有密切关联. *RASSF1A*能够抑制Toll样受体诱导的 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 活化, 活化的 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 可以调节肠上皮细胞的增殖和诱导Hippo通路的靶蛋白YAP(Yes-associated protein)酪氨酸磷酸化, 而酪氨酸磷酸化的YAP可以上调促凋亡基因从而导致肠上皮细胞凋亡. 从果蝇的肠上皮细胞移除YAP或在YAP<sup>-/-</sup>的葡聚糖硫酸钠(dextran sodium sulfate, DSS)诱导产生的结肠炎小鼠中显示出肠上皮细胞的低存活率和细胞增殖减弱<sup>[17]</sup>.

**1.4 MicroRNA-21** MicroRNA-21(miR-21)是一个独特的miRNA, 能够在多种炎症性疾病中过量表达, 包括IBD<sup>[18-22]</sup>. miRNAs属于一种小核糖核酸分子, 他能够在后转录水平调节基因的表达. Shi等<sup>[23]</sup>研究证实, 在用DSS处理之前,

miR-21<sup>-/-</sup>小鼠和野生型小鼠的肠上皮通透性和肠上皮细胞凋亡率并没有明显差别, 而在用DSS诱导产生结肠炎模型之后, 野生型小鼠与miR-21<sup>-/-</sup>小鼠相比, 其肠上皮通透性和肠上皮细胞凋亡率明显增加. 因此, 认为特异性敲除miR-21可以提高DSS诱导的实验性结肠炎小鼠的存活率.

**1.5 白介素-6** 白介素-6(interleukin 6, IL-6)是一类具有多重生物学效应的细胞因子, 他参与各种细胞免疫应答和细胞凋亡与增殖, 对维持肠黏膜完整性有重要意义<sup>[24]</sup>. Grivennikov等<sup>[25]</sup>研究证实, 用DSS诱导产生的急性肠炎模型中, IL-6<sup>-/-</sup>小鼠与野生型小鼠相比, 其诱导的结肠炎更加严重, 体质量减轻也较野生型小鼠更为明显; IL-6<sup>-/-</sup>小鼠的肠上皮细胞凋亡率也显著增高. 认为IL-6可以提高肠上皮细胞的增殖, 增强肠上皮细胞对抗凋亡的能力.

**1.6 信号转导和转录激活5b** 信号转导和转录激活5b(signal transducer and activator of transcription 5b, STAT5b)是转录因子家族的成员之一, 他被多种细胞因子和激素活化来调节机体免疫、造血和新陈代谢. Han等<sup>[26]</sup>认为, 在CD患者受损的结肠组织中STAT5b的活化是减少的. 而用TNBS诱导产生的实验性结肠炎模型中, STAT5b<sup>-/-</sup>小鼠对实验性结肠炎表现出易感, 推测STAT5b对研究结肠屏障功能有重要意义. 他们进一步研究证实, 特异性敲除*STAT5b*基因, 导致结肠基因表达的凋亡模式的活化, 可增加肠黏膜的通透性和肠上皮细胞的凋亡<sup>[27]</sup>.

**1.7 肠三叶因子** 肠三叶因子(intestinal trefoil factor, ITF)是肠上皮修复的重要调控因子, 在肠黏膜损伤时有利于肠黏膜的连续性重建. 在结直肠癌和衍生的细胞系中ITF分泌会增多, 肠黏膜修复需要肠上皮细胞从基底脱离, 这将诱导细胞凋亡的发生. Taupin等<sup>[28]</sup>研究证实, 特异性敲除*ITF*基因的小鼠结肠上皮细胞凋亡明显增加, 并且不伴随有受体相关(TNFR/Fas)和应激相关(Bcl-family)的细胞凋亡调节因子表达的改变.

## ■ 相关报道

Marcon等认为特异性敲除缓激肽1受体基因的小鼠对实验性结肠炎易感是通过代偿性上调缓激肽2受体实现的, 而缓激肽2受体可以破坏肠上皮屏障的紧密连接途径, 进而使肠黏膜的通透性增加. 缓激肽2受体激动剂可减轻试验性结肠炎的症状, 可望成为一个重要的靶向治疗剂.

## 2 基因敲除技术在肠上皮屏障紧密连接途径中的应用

**2.1 缓激肽1受体和缓激肽2受体** 缓激肽受体(bradykinin receptor, BDKR)是G蛋白偶联受

## ■ 创新盘点

本文较全面的论述了基因敲除技术在IBD肠上皮屏障的跨上皮途径和紧密连接途径这两方面研究中的应用, 从方法学上对今后深入开展IBD肠上皮屏障损伤机制的研究具有重要参考价值。

体视紫红质亚家族的重要成员之一, 可参与调节血压、中枢痛觉调制、炎症发生和发展等众多病理生理过程。BDKR分为缓激肽1受体(bradykinin 1 receptor, B1R)和缓激肽2受体(bradykinin 2 receptor, B2R)两种受体亚型。BDKR的相应配体-缓激肽(bradykinin, BK)则是激肽释放酶-激肽系统(kallikrein-kinin system, KKS)的重要产物<sup>[29]</sup>。B2R在各种不同器官中都有表达, 能够介导多数已知激肽的生理活动; 而B1R在正常状态下表达量很少, 但是在创伤或是病理状态下能迅速表达<sup>[30-32]</sup>。研究<sup>[33]</sup>证实, BK作为B2R激动剂, 能够破坏紧密连接通路, 从而使肠黏膜通透性增加。Marcon等<sup>[34]</sup>研究证实, 特异性敲除B1R基因的小鼠对DSS诱导的结肠炎易感, 与DSS诱导的野生型小鼠相比, IL-1 $\beta$ 、IFN- $\gamma$ 、角质形成细胞趋化因子和巨噬细胞炎性蛋白2的表达明显增加; 而对野生型小鼠进行B1R拮抗剂治疗后, 对DSS诱导的结肠炎并没有明显影响; 用DSS诱导的B1R<sup>-/-</sup>小鼠, 其B2R mRNA的表达明显上调, 紧密连接相关蛋白occludin的基因表达减少; 但通过对DSS诱导的B1R<sup>-/-</sup>小鼠进行B2R拮抗剂治疗后, 其可以阻断结肠炎的恶化。因此, 认为基因敲除B1R的小鼠对实验性结肠炎易感可能与其代偿性上调B2R有关, 进而通过调节紧密连接来实现。

**2.2 蛋白C** 蛋白C(protein C, PC)是PC通路的成员之一, PC通路是连接炎症和凝血的一个主要桥梁。PC通路主要由血栓调节蛋白(thrombomodulin, TM)、内皮细胞蛋白C受体(endothelial cell PC receptor, EPCR)、PC、蛋白酶激活受体-1(protease-activated receptor-1, PAR-1)蛋白组成<sup>[35]</sup>。通常PC通路被认为主要具有抗凝作用, 有研究<sup>[36,37]</sup>证实, 他对炎症通路也起着重要作用, 其通路的每个组成部分都表现出极大的抗炎活性, 且其在肠上皮细胞中也有表达。PC作为一种抗凝和抗炎分子, 在IBD的患者中上皮细胞表达的PC和PC受体下调。Vetrano等<sup>[38]</sup>通过研究证实, 特异性敲除PC基因的小鼠会形成自发性结肠炎, 并对实验性结肠炎易感。PC<sup>-/-</sup>小鼠释放的炎症细胞因子和肠黏膜通透性都出现增加。而通过对肠上皮紧密连接结构分析发现, PC<sup>-/-</sup>小鼠的连接黏附分子A(junctional adhesion molecule A, JAM-A)和claudin-3表达减少, ZO-1表达模式改变。在体

内, 用活化的PC治疗PC<sup>-/-</sup>小鼠, 其肠黏膜损伤治愈和结肠炎症得到改善。由此推测, 肠上皮细胞的PC通路在调节肠上皮通透性和紧密连接完整性上发挥重要作用。

**2.3 叉头框转录因子4** 叉头框转录因子4(forkhead box transcription factor O4, FoxO4)是叉头框转录因子家族成员之一。FoxO蛋白参与多种细胞功能, 其中包括免疫应答的调节<sup>[39-44]</sup>。Zhou等<sup>[45]</sup>研究证实, 特异性敲除FoxO4基因的小鼠对TNBS诱导的结肠炎易感性增加; 与野生型小鼠相比, FoxO4<sup>-/-</sup>小鼠的上皮细胞内趋化因子CCL5、CD4<sup>+</sup>上皮内T细胞的招募和炎症细胞因子INF- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 的表达均显著增加。此外, FoxO4<sup>-/-</sup>小鼠的肠黏膜通透性增加, 相关的紧密连接蛋白ZO-1、claudin-1表达减少。

**2.4 JAM-A** JAM-A是紧密连接家族的成员之一。紧密连接分子家族的组成比较复杂, 主要由多种跨膜蛋白(transmembrane proteins)家族和JAM家族组成。研究<sup>[46]</sup>表明JAM-A能参与调节屏障功能和炎症应答, 其在很多类型的细胞中都有表达, 特别是在内皮细胞和上皮细胞中表达较多。Laukoetter等<sup>[47]</sup>研究发现, 与野生型小鼠相比, 特异性敲除JAM-A基因的小鼠对DSS诱导的结肠炎易感。此外, 在JAM-A<sup>-/-</sup>的小鼠中, 其结肠黏膜炎症和肠上皮细胞的通透性增加, 肠上皮细胞的增殖增加, 同时其紧密连接蛋白claudin-10、claudin-15的表达也上调。这些研究结果显示, JAM-A介导肠上皮屏障功能是通过调节跨膜蛋白的表达和肠上皮细胞的增殖来实现的, 进而调节肠黏膜炎症和肠上皮黏膜急性损伤的应答。

**2.5 IL-1 $\beta$**  IL-1 $\beta$ 是一种多功能细胞因子, 主要由活化的单核-巨噬细胞产生, 在IBD的发病机制中发挥重要作用。有研究<sup>[48,49]</sup>表明, IL-1 $\beta$ 可以导致生长的Caco-2细胞的肠上皮紧密连接通透性增加。临床研究<sup>[50-52]</sup>也发现, IBD患者体内IL-1 $\beta$ 水平的增加可导致肠黏膜通透性增加。Al-Sadi等<sup>[53]</sup>通过研究证实, IL-1 $\beta$ 可以导致小鼠肠上皮通透性增加, 且其可能是通过介导肌球蛋白轻链激酶(myosin light-chain kinase, MLCK)表达增加和/或活化实现的; 而在特异性敲除MLCK基因的小鼠中, IL-1 $\beta$ 没有导致肠上皮通透性的增加。由此提示MLCK在肠上皮屏障紧密连接途径中发挥着

重要的调节作用。

### 3 结论

肠黏膜上皮屏障是机体最重要的免疫防御屏障, 其损害程度与IBD的发生与发展密切相关; 肠黏膜上皮屏障一旦受损则可引起肠上皮通透性增加, 因此, 修复肠黏膜上皮屏障已经成为治疗IBD的新目标。基因敲除技术是在动物整体水平研究目的基因的生物学技术, 在新基因的功能鉴定及人类疾病的研究中展现出不可估量的应用前景, 本文通过查阅大量的国内外文献, 认为基因敲除技术在IBD的发病机制以及治疗策略上存在着很大的潜在应用价值。本文旨在对基因敲除技术在IBD肠上皮屏障的跨上皮途径和紧密连接途径这两方面研究中的应用进行简要概述, 以期对深入开展IBD的发病机制的研究和寻找新的治疗方法提供一些思路。

### 4 参考文献

- 1 Kulkarni AB, Karlsson S. Transforming growth factor-beta 1 knockout mice. A mutation in one cytokine gene causes a dramatic inflammatory disease. *Am J Pathol* 1993; 143: 3-9 [PMID: 8317552]
- 2 Yeung RS, Penninger J, Mak TW. T-cell development and function in gene-knockout mice. *Curr Opin Immunol* 1994; 6: 298-307 [PMID: 8011213]
- 3 Wang ZE, Reiner SL, Zheng S, Dalton DK, Locksley RM. CD4<sup>+</sup> effector cells default to the Th2 pathway in interferon gamma-deficient mice infected with *Leishmania major*. *J Exp Med* 1994; 179: 1367-1371 [PMID: 7908325]
- 4 Cui Z, Wang H, Tan Y, Zaia KA, Zhang S, Tsien JZ. Inducible and reversible NR1 knockout reveals crucial role of the NMDA receptor in preserving remote memories in the brain. *Neuron* 2004; 41: 781-793 [PMID: 15003177 DOI: 10.1016/S0896-6273(04)00072-8]
- 5 Madara JL. Warner-Lambert/Parke-Davis Award lecture. Pathobiology of the intestinal epithelial barrier. *Am J Pathol* 1990; 137: 1273-1281 [PMID: 2260620]
- 6 Barrett KE. New ways of thinking about (and teaching about) intestinal epithelial function. *Adv Physiol Educ* 2008; 32: 25-34 [PMID: 18334565 DOI: 10.1152/advan.00092.2007]
- 7 Turner JR. Molecular basis of epithelial barrier regulation: from basic mechanisms to clinical application. *Am J Pathol* 2006; 169: 1901-1909 [PMID: 17148655 DOI: 10.2353/ajpath.2006.060681]
- 8 Mankertz J, Schulzke JD. Altered permeability in inflammatory bowel disease: pathophysiology and clinical implications. *Curr Opin Gastroenterol* 2007; 23: 379-383 [PMID: 17545772]
- 9 Tracey KJ, Cerami A. Tumor necrosis factor: a pleiotropic cytokine and therapeutic target. *Annu Rev Med* 1994; 45: 491-503 [PMID: 8198398]
- 10 Fukumoto K, Naito Y, Takagi T, Yamada S, Horie R, Inoue K, Harusato A, Hirata I, Omatsu T, Mizushima K, Hirai Y, Yoshida N, Uchiyama K, Ishikawa T, Handa O, Konishi H, Wakabayashi N, Yagi N, Kokura S, Ichikawa H, Kita M, Yoshikawa T. Role of tumor necrosis factor- $\alpha$  in the pathogenesis of indomethacin-induced small intestinal injury in mice. *Int J Mol Med* 2011; 27: 353-359 [PMID: 21249312 DOI: 10.3892/ijmm.2011.602]
- 11 Vereecke L, Beyaert R, van Loo G. The ubiquitin-editing enzyme A20 (TNFAIP3) is a central regulator of immunopathology. *Trends Immunol* 2009; 30: 383-391 [PMID: 19643665 DOI: 10.1016/j.it.2009.05.007]
- 12 Vereecke L, Sze M, Mc Guire C, Rogiers B, Chu Y, Schmidt-Supprian M, Pasparakis M, Beyaert R, van Loo G. Enterocyte-specific A20 deficiency sensitizes to tumor necrosis factor-induced toxicity and experimental colitis. *J Exp Med* 2010; 207: 1513-1523 [PMID: 20530205 DOI: 10.1084/jem.20092474]
- 13 Halder G, Johnson RL. Hippo signaling: growth control and beyond. *Development* 2011; 138: 9-22 [PMID: 21138973 DOI: 10.1242/dev.045500]
- 14 Fausti F, Di Agostino S, Sacconi A, Strano S, Blandino G. Hippo and rassf1a Pathways: A Growing Affair. *Mol Biol Int* 2012; 2012: 307628 [PMID: 22830020 DOI: 10.1155/2012/307628]
- 15 Avruch J, Zhou D, Bardeesy N. YAP oncogene overexpression supercharges colon cancer proliferation. *Cell Cycle* 2012; 11: 1090-1096 [PMID: 22356765 DOI: 10.4161/cc.11.6.19453]
- 16 Gordon M, El-Kalla M, Zhao Y, Fiteih Y, Law J, Volodko N, Anwar-Mohamed A, El-Kadi AO, Liu L, Odenbach J, Thiesen A, Onyskiw C, Ghazaleh HA, Park J, Lee SB, Yu VC, Fernandez-Patron C, Alexander RT, Wine E, Baksh S. The tumor suppressor gene, RASSF1A, is essential for protection against inflammation-induced injury. *PLoS One* 2013; 8: e75483 [PMID: 24146755 DOI: 10.1371/journal.pone.0075483]
- 17 Avruch J, Zhou D, Fitamant J, Bardeesy N. Mst1/2 signalling to Yap: gatekeeper for liver size and tumour development. *Br J Cancer* 2011; 104: 24-32 [PMID: 21102585 DOI: 10.1038/sj.bjc.6606011]
- 18 Hatley ME, Patrick DM, Garcia MR, Richardson JA, Bassel-Duby R, van Rooij E, Olson EN. Modulation of K-Ras-dependent lung tumorigenesis by MicroRNA-21. *Cancer Cell* 2010; 18: 282-293 [PMID: 20832755 DOI: 10.1016/j.ccr.2010.08.013]
- 19 Medina PP, Nolde M, Slack FJ. OncomiR addiction in an in vivo model of microRNA-21-induced pre-B-cell lymphoma. *Nature* 2010; 467: 86-90 [PMID: 20693987 DOI: 10.1038/nature09284]
- 20 Thum T, Gross C, Fiedler J, Fischer T, Kissler S, Bussen M, Galuppo P, Just S, Rottbauer W, Frantz S, Castoldi M, Soutschek J, Koteliansky V, Rosenwald A, Basson MA, Licht JD, Pena JT, Rouhanifard SH, Muckenthaler MU,

### ■名词解释

基因敲除技术: 该技术应用DNA同源重组技术, 将灭活的基因导入小鼠胚胎干细胞以取代目的基因, 再筛选出已靶向灭活的细胞, 微注射入小鼠囊胚。该细胞参与胚胎发育形成嵌合型小鼠, 再进一步传代培育可得到纯合基因敲除小鼠。



# 同行评价

本文综述了基因敲除技术在IBD肠上皮屏障的跨上皮途径与紧密连接途径的应用, 对IBD的发病机制和临床诊疗有参考意义。

- Tuschl T, Martin GR, Bauersachs J, Engelhardt S. MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts. *Nature* 2008; 456: 980-984 [PMID: 19043405 DOI: 10.1038/nature07511]
- 21 Asangani IA, Rasheed SA, Nikolova DA, Leupold JH, Colburn NH, Post S, Allgayer H. MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pcd4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer. *Oncogene* 2008; 27: 2128-2136 [PMID: 17968323 DOI: 10.1038/sj.onc.1210856]
- 22 Zhu S, Wu H, Wu F, Nie D, Sheng S, Mo YY. MicroRNA-21 targets tumor suppressor genes in invasion and metastasis. *Cell Res* 2008; 18: 350-359 [PMID: 18270520 DOI: 10.1038/cr.2008.24]
- 23 Shi C, Liang Y, Yang J, Xia Y, Chen H, Han H, Yang Y, Wu W, Gao R, Qin H. MicroRNA-21 knockout improve the survival rate in DSS induced fatal colitis through protecting against inflammation and tissue injury. *PLoS One* 2013; 8: e66814 [PMID: 23826144 DOI: 10.1371/journal.pone.0066814]
- 24 Kishimoto T. Interleukin-6: from basic science to medicine--40 years in immunology. *Annu Rev Immunol* 2005; 23: 1-21 [PMID: 15771564 DOI: 10.1146/annurev.immunol.23.021704.115806]
- 25 Grivnenkov S, Karin E, Terzic J, Mucida D, Yu GY, Vallabhapurapu S, Scheller J, Rose-John S, Cheroutre H, Eckmann L, Karin M. IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer. *Cancer Cell* 2009; 15: 103-113 [PMID: 19185845 DOI: 10.1016/j.ccr.2009.01.001]
- 26 Han X, Osuntokun B, Benight N, Loesch K, Frank SJ, Denson LA. Signal transducer and activator of transcription 5b promotes mucosal tolerance in pediatric Crohn's disease and murine colitis. *Am J Pathol* 2006; 169: 1999-2013 [PMID: 17148664 DOI: 10.2353/ajpath.2006.060186]
- 27 Han X, Ren X, Jurickova I, Groschwitz K, Pasternak BA, Xu H, Wilson TA, Hogan SP, Denson LA. Regulation of intestinal barrier function by signal transducer and activator of transcription 5b. *Gut* 2009; 58: 49-58 [PMID: 18687707 DOI: 10.1136/gut.2007.145094]
- 28 Taupin DR, Kinoshita K, Podolsky DK. Intestinal trefoil factor confers colonic epithelial resistance to apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 799-804 [PMID: 10639160]
- 29 Brechter AB, Persson E, Lundgren I, Lerner UH. Kinin B1 and B2 receptor expression in osteoblasts and fibroblasts is enhanced by interleukin-1 and tumour necrosis factor-alpha. Effects dependent on activation of NF-kappaB and MAP kinases. *Bone* 2008; 43: 72-83 [PMID: 18467203 DOI: 10.1016/j.bone.2008.02.003]
- 30 McEachern AE, Shelton ER, Bhakta S, Obernolte R, Bach C, Zuppan P, Fujisaki J, Aldrich RW, Jarnagin K. Expression cloning of a rat B2 bradykinin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 7724-7728 [PMID: 1715575]
- 31 Menke JG, Borkowski JA, Bierilo KK, MacNeil T, Derrick AW, Schneck KA, Ransom RW, Strader CD, Linemeyer DL, Hess JF. Expression cloning of a human B1 bradykinin receptor. *J Biol Chem* 1994; 269: 21583-21586 [PMID: 8063797]
- 32 Calixto JB, Medeiros R, Fernandes ES, Ferreira J, Cabrini DA, Campos MM. Kinin B1 receptors: key G-protein-coupled receptors and their role in inflammatory and painful processes. *Br J Pharmacol* 2004; 143: 803-818 [PMID: 15520046 DOI: 10.1038/sj.bjp.0706012]
- 33 Liu LB, Xue YX, Liu YH, Wang YB. Bradykinin increases blood-tumor barrier permeability by down-regulating the expression levels of ZO-1, occludin, and claudin-5 and rearranging actin cytoskeleton. *J Neurosci Res* 2008; 86: 1153-1168 [PMID: 18183615 DOI: 10.1002/jnr.21558]
- 34 Marcon R, Claudino RF, Dutra RC, Bento AF, Schmidt EC, Bouzon ZL, Sordi R, Morais RL, Pesquero JB, Calixto JB. Exacerbation of DSS-induced colitis in mice lacking kinin B(1) receptors through compensatory up-regulation of kinin B(2) receptors: the role of tight junctions and intestinal homeostasis. *Br J Pharmacol* 2013; 168: 389-402 [PMID: 22889120 DOI: 10.1111/j.1476-5381.2012.02136.x]
- 35 Danese S, Vetrano S, Zhang L, Poplis VA, Castellino FJ. The protein C pathway in tissue inflammation and injury: pathogenic role and therapeutic implications. *Blood* 2010; 115: 1121-1130 [PMID: 20018912 DOI: 10.1182/blood-2009-09-201616]
- 36 Esmon CT. Interactions between the innate immune and blood coagulation systems. *Trends Immunol* 2004; 25: 536-542 [PMID: 15364056 DOI: 10.1016/j.it.2004.08.003]
- 37 Esmon CT, Fukudome K, Mather T, Bode W, Regan LM, Stearns-Kurosawa DJ, Kurosawa S. Inflammation, sepsis, and coagulation. *Haematologica* 1999; 84: 254-259 [PMID: 10189392]
- 38 Vetrano S, Ploplis VA, Sala E, Sandoval-Cooper M, Donahue DL, Correale C, Arena V, Spinelli A, Repici A, Malesci A, Castellino FJ, Danese S. Unexpected role of anticoagulant protein C in controlling epithelial barrier integrity and intestinal inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108: 19830-19835 [PMID: 22109555 DOI: 10.1073/pnas.1107140108]
- 39 Garçon L, Rivat C, James C, Lacout C, Camara-Clayette V, Ugo V, Lecluse Y, Bennaceur-Griscelli A, Vainchenker W. Constitutive activation of STAT5 and Bcl-xL overexpression can induce endogenous erythroid colony formation in human primary cells. *Blood* 2006; 108: 1551-1554 [PMID: 16684963]
- 40 Luo G, Yu-Lee L. Stat5b inhibits NFkappaB-mediated signaling. *Mol Endocrinol* 2000; 14: 114-123 [PMID: 10628751 DOI: 10.1210/mend.14.1.0399]
- 41 Hausmann M, Kiessling S, Mestermann S, Webb G, Spöttl T, Andus T, Schölmerich J, Herfarth H, Ray K, Falk W, Rogler G. Toll-like receptors 2 and 4 are up-regulated during intestinal inflammation. *Gastroenterology* 2002; 122: 1987-2000 [PMID: 12055604 DOI: 10.1053/gast.2002.33662]

- 42 Rakoff-Nahoum S, Hao L, Medzhitov R. Role of toll-like receptors in spontaneous commensal-dependent colitis. *Immunity* 2006; 25: 319-329 [PMID: 16879997 DOI: 10.1016/j.immuni.2006.06.010]
- 43 Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, Edberg S, Medzhitov R. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* 2004; 118: 229-241 [PMID: 15260992 DOI: 10.1016/j.cell.2004.07.002]
- 44 Yang Z, Fuss IJ, Watanabe T, Asano N, Davey MP, Rosenbaum JT, Strober W, Kitani A. NOD2 transgenic mice exhibit enhanced MDP-mediated down-regulation of TLR2 responses and resistance to colitis induction. *Gastroenterology* 2007; 133: 1510-1521 [PMID: 17915219 DOI: 10.1053/j.gastro.2007.07.025]
- 45 Zhou W, Cao Q, Peng Y, Zhang QJ, Castrillon DH, DePinho RA, Liu ZP. FoxO4 inhibits NF-kappaB and protects mice against colonic injury and inflammation. *Gastroenterology* 2009; 137: 1403-1414 [PMID: 19560465 DOI: 10.1053/j.gastro.2009.06.049]
- 46 Martín-Padura I, Lostaglio S, Schneemann M, Williams L, Romano M, Fruscella P, Panzeri C, Stoppacciaro A, Ruco L, Villa A, Simmons D, Dejana E. Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J Cell Biol* 1998; 142: 117-127 [PMID: 9660867]
- 47 Laukoetter MG, Nava P, Lee WY, Severson EA, Capaldo CT, Babbitt BA, Williams IR, Koval M, Peatman E, Campbell JA, Dermody TS, Nusrat A, Parkos CA. JAM-A regulates permeability and inflammation in the intestine in vivo. *J Exp Med* 2007; 204: 3067-3076 [PMID: 18039951 DOI: 10.1084/jem.20071416]
- 48 Al-Sadi RM, Ma TY. IL-1beta causes an increase in intestinal epithelial tight junction permeability. *J Immunol* 2007; 178: 4641-4649 [PMID: 17372023]
- 49 Al-Sadi R, Ye D, Dokladny K, Ma TY. Mechanism of IL-1beta-induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability. *J Immunol* 2008; 180: 5653-5661 [PMID: 18390750]
- 50 Hollander D, Vadheim CM, Brettholz E, Petersen GM, Delahunty T, Rotter JI. Increased intestinal permeability in patients with Crohn's disease and their relatives. A possible etiologic factor. *Ann Intern Med* 1986; 105: 883-885 [PMID: 3777713]
- 51 Miehsler W, Püspök A, Oberhuber T, Vogelsang H. Impact of different therapeutic regimens on the outcome of patients with Crohn's disease of the upper gastrointestinal tract. *Inflamm Bowel Dis* 2001; 7: 99-105 [PMID: 11383598]
- 52 Vavricka SR, Rogler G. New insights into the pathogenesis of Crohn's disease: are they relevant for therapeutic options? *Swiss Med Wkly* 2009; 139: 527-534 [PMID: 19838869]
- 53 Al-Sadi R, Guo S, Dokladny K, Smith MA, Ye D, Kaza A, Watterson DM, Ma TY. Mechanism of interleukin-1 $\beta$  induced-increase in mouse intestinal permeability in vivo. *J Interferon Cytokine Res* 2012; 32: 474-484 [PMID: 22817402 DOI: 10.1089/jir.2012.0031]

编辑: 郭鹏 电编: 都珍珍



## 正加速度适应性训练对大鼠胃黏膜PGI<sub>2</sub>、TXA<sub>2</sub>含量及TXA<sub>2</sub>/PGI<sub>2</sub>比值的影响

刘昊, 陈英, 徐珊, 杜斌, 唐合兰, 邱杰, 杨春敏

### ■背景资料

在航空航天医学领域中, 如何减轻正加速度(+Gz)对飞行员全身各系统器官造成的损伤一直以来就是研究的热点。已有相关研究报道预适应训练能够减轻+Gz暴露下大鼠胃黏膜的损伤, 但其具体作用机制此前尚未报道, 内源性前列腺素物质在这一过程中是否产生作用也尚未明了。

刘昊, 安徽医科大学研究生院 安徽省合肥市 230032  
陈英, 徐珊, 杜斌, 唐合兰, 邱杰, 杨春敏, 中国人民解放军空军总医院干部病房消化科 北京市 100142  
刘昊, 在读硕士, 主要从事消化系统疾病的研究。  
全军十二五后勤科研计划基金资助项目, No. AKJ11J004  
作者贡献分布: 刘昊与杨春敏对此文所做贡献均等; 此课题由刘昊与杨春敏提出和设计; 研究过程由刘昊与邱杰操作完成; 研究所用试剂和研究工具由陈英、徐珊、杜斌及唐合兰提供; 数据分析由刘昊与杨春敏完成; 本论文写作由刘昊完成。  
通讯作者: 杨春敏, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 100142, 北京市海淀区阜成路30号, 中国人民解放军空军总医院干部病房消化科. [chunmyang9816@163.com](mailto:chunmyang9816@163.com)  
电话: 010-66928118  
收稿日期: 2015-08-22 修回日期: 2015-09-15  
接受日期: 2015-09-18 在线出版日期: 2015-10-18

### Effect of positive acceleration adaptive training on PGI<sub>2</sub> and TXA<sub>2</sub> contents and TXA<sub>2</sub>/PGI<sub>2</sub> ratio in the gastric mucosa of rats

Hao Liu, Yin Chen, Shan Xu, Bin Du, He-Lan Tang, Jie Qiu, Chun-Min Yang

Hao Liu, Graduate School, Anhui Medical University, Hefei 230032, Anhui Province, China  
Yin Chen, Shan Xu, Bin Du, He-Lan Tang, Jie Qiu, Chun-Min Yang, Department of Gastroenterology, Cadre Ward, East Building, General Hospital of Air Force of Chinese PLA, Beijing 100142, China  
Supported by: The Military Scientific and Technological Project During the "Twelfth Five-year" Period, No. AKJ11J004  
Correspondence to: Chun-Min Yang, Professor, Chief Physician, Department of Gastroenterology, Cadre Ward, East Building, General Hospital of Air Force of Chinese PLA, 30 Fucheng Road, Haidian District, Beijing 100142, China. [chunmyang9816@163.com](mailto:chunmyang9816@163.com)  
Received: 2015-08-22 Revised: 2015-09-15  
Accepted: 2015-09-18 Published online: 2015-10-18

### ■同行评议者

迟雁, 副教授, 北京大学第一医院

### Abstract

**AIM:** To assess the effect of positive acceleration adaptive training on prostacyclin (PGI<sub>2</sub>) and thromboxane A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) contents and TXA<sub>2</sub>/PGI<sub>2</sub> ratio in the gastric mucosa of rats.

**METHODS:** Forty male SD rats were randomly divided into five groups: A, B, C, D and E. Group A did not undergo any treatment. Group B was exposed to +5 Gz for 5 min per day over 5 consecutive days. Group C was exposed to +10 Gz for 5 min per day over 5 consecutive days. Group D was exposed to +4 Gz for 3 min per day over 5 consecutive days and +5 Gz for 5 min per day over another 5 consecutive days. Group E was exposed to +4 Gz for 3 min per day over 5 consecutive days and +10 Gz for 5 min per day over another 5 consecutive days. The damage to the gastric mucosa was then observed grossly and under a microscope to calculate the damage index. The TXB<sub>2</sub> and 6-keto-prostaglandin F<sub>1α</sub> (6-K-PGF<sub>1α</sub>) contents in the gastric mucosa were detected by ELISA, and the TXB<sub>2</sub>/6-K-PGF<sub>1α</sub> ratio was calculated.

**RESULTS:** On unaided visual and microscopic observations, all groups developed mucosa damage, with the exception of group A. The damage to the gastric mucosa was less in group D than in group B, and in group E than in group C. The harm index was significantly lower in group D than in group B (0.875 ± 0.641 vs 1.750 ± 0.707, *P* < 0.05), and in group E than in group C (2.250 ± 1.035 vs 5.625 ± 1.767, *P* <



0.05). The content of TXB<sub>2</sub> was significantly lower in group D than in group B (159.588 pg/mL  $\pm$  36.216 pg/mL *vs* 251.018 pg/mL  $\pm$  50.845 pg/mL, *P* < 0.01), and in group E than in group C (150.476 pg/mL  $\pm$  48.589 pg/mL *vs* 331.538 pg/mL  $\pm$  79.102 pg/mL, *P* < 0.01). The content of 6-K-PGF<sub>1 $\alpha$</sub>  was significantly higher in group D than in group B (72.242 pg/mL  $\pm$  12.413 pg/mL *vs* 52.015 pg/mL  $\pm$  11.827 pg/mL, *P* < 0.01), and in group E than in group C (87.426 pg/mL  $\pm$  15.833 pg/mL *vs* 44.726 pg/mL  $\pm$  18.867 pg/mL, *P* < 0.01). The ratio of TXB<sub>2</sub>/6-K-PGF<sub>1 $\alpha$</sub>  was significantly lower in group D than in group B (2.283  $\pm$  0.705 *vs* 5.128  $\pm$  1.788, *P* < 0.01), and in group E than in group C (2.250  $\pm$  1.035 *vs* 8.599  $\pm$  4.157, *P* < 0.01).

**CONCLUSION:** Adaptive training can significantly reduce the gastric mucosal damage caused by high +Gz *via* mechanisms possibly related to the increase in PGI<sub>2</sub> content, decrease in TXA<sub>2</sub> content and reduction of the TXA<sub>2</sub>/PGI<sub>2</sub> ratio.

© 2015 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

**Key Words:** Adaptive training; +Gz; Gastric mucosa; Prostacyclin; Thromboxane A<sub>2</sub>

Liu H, Chen Y, Xu S, Du B, Tang HL, Qiu J, Yang CM. Effect of positive acceleration adaptive training on PGI<sub>2</sub> and TXA<sub>2</sub> contents and TXA<sub>2</sub>/PGI<sub>2</sub> ratio in the gastric mucosa of rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2015; 23(29): 4680-4686 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/23/4680.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v23.i29.4680>

## 摘要

**目的:** 研究正加速度(+Gz)适应性训练对大鼠胃黏膜前列环素(prostacyclin, PGI<sub>2</sub>)、血栓素A<sub>2</sub>(thromboxane A<sub>2</sub>, TXA<sub>2</sub>)含量及TXA<sub>2</sub>/PGI<sub>2</sub>比值变化的影响。

**方法:** 40只♂SD大鼠随机分为5组, 每组8只, 分别标记为A、B、C、D、E组。A组大鼠为空白对照, 不做处理, B组大鼠+5 Gz值暴露5 min, 1次/d, 连续暴露5 d, C组大鼠+10 Gz值暴露5 min, 1次/d, 连续暴露5 d, D组大鼠适应性训练(即+4 Gz值暴露3 min, 1次/d, 连续暴露5 d)后+5 Gz值暴露5 min, 1次/d, 连续暴露5 d, E组大鼠适应性训练(即+4 Gz值暴露3 min, 1次/d, 连续暴露5 d)后+10 Gz值暴露5 min, 1次/d, 连续暴露5 d。试验结束后肉眼和光学显微镜下观察胃黏膜损伤情况, 计

算损伤指数, ELISA法检测胃黏膜内TXB<sub>2</sub>、6-酮-前列腺素F<sub>1 $\alpha$</sub> (6-keto-prostaglandin F<sub>1 $\alpha$</sub> , 6-K-PGF<sub>1 $\alpha$</sub> )的含量, 并计算TXB<sub>2</sub>/6-K-PGF<sub>1 $\alpha$</sub> 的比值。

**结果:** 肉眼和光学显微镜下观察, 除A组外, 其余各组胃黏膜均有损伤, D组损伤轻于B组, E组损伤轻于C组。适应性训练后, D组损伤指数小于B组(0.875  $\pm$  0.641 *vs* 1.750  $\pm$  0.707, *P* < 0.05), E组损伤指数小于C组(2.250  $\pm$  1.035 *vs* 5.625  $\pm$  1.767, *P* < 0.05); D组TXB<sub>2</sub>低于B组(159.588 pg/mL  $\pm$  36.216 pg/mL *vs* 251.018 pg/mL  $\pm$  50.845 pg/mL, *P* < 0.01), E组TXB<sub>2</sub>低于C组(150.476 pg/mL  $\pm$  48.589 pg/mL *vs* 331.538 pg/mL  $\pm$  79.102 pg/mL, *P* < 0.01); D组6-K-PGF<sub>1 $\alpha$</sub> 高于B组(72.242 pg/mL  $\pm$  12.413 pg/mL *vs* 52.015 pg/mL  $\pm$  11.827 pg/mL, *P* < 0.01), E组6-K-PGF<sub>1 $\alpha$</sub> 高于C组(87.426 pg/mL  $\pm$  15.833 pg/mL *vs* 44.726 pg/mL  $\pm$  18.867 pg/mL, *P* < 0.01); D组TXB<sub>2</sub>/6-K-PGF<sub>1 $\alpha$</sub> 比值小于B组(2.283  $\pm$  0.705 *vs* 5.128  $\pm$  1.788, *P* < 0.01), E组TXB<sub>2</sub>/6-K-PGF<sub>1 $\alpha$</sub> 比值小于C组(2.250  $\pm$  1.035 *vs* 8.599  $\pm$  4.157, *P* < 0.01)。

**结论:** 适应性训练可明显减轻持续+Gz暴露带来的胃黏膜损伤, 其机制与PGI<sub>2</sub>含量升高、TXA<sub>2</sub>含量降低以及TXA<sub>2</sub>/PGI<sub>2</sub>比值降低有关。

© 2015年版权归百世登出版集团有限公司所有。

**关键词:** 适应性训练; +Gz; 胃黏膜; 前列环素; 血栓素A<sub>2</sub>

**核心提示:** 适应性训练可明显减轻正加速度(+Gz)值带来的胃黏膜损伤, 其机制与前列环素(prostacyclin, PGI<sub>2</sub>)含量升高、血栓素A<sub>2</sub>(thromboxane A<sub>2</sub>, TXA<sub>2</sub>)含量降低以及TXA<sub>2</sub>/PGI<sub>2</sub>比值降低有关, 从而为飞行员制定合理的体能训练计划, 减少飞行环境带来的胃肠道损伤提供坚实的理论基础。

刘昊, 陈英, 徐珊, 杜斌, 唐合兰, 邱杰, 杨春敏. 正加速度适应性训练对大鼠胃黏膜PGI<sub>2</sub>、TXA<sub>2</sub>含量及TXA<sub>2</sub>/PGI<sub>2</sub>比值的影响. *世界华人消化杂志* 2015; 23(29): 4680-4686 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/23/4680.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v23.i29.4680>

## 0 引言

适应性细胞保护在20世纪80年代由Robert等<sup>[1]</sup>

## ■研究前沿

飞行人员常处于持续+Gz暴露中, 其全身各器官均可造成一定损害, 而适应性训练可明显减轻+Gz带来的胃黏膜损伤, 胃黏膜中前列环素(prostacyclin, PGI<sub>2</sub>)、血栓素A<sub>2</sub>(thromboxane A<sub>2</sub>, TXA<sub>2</sub>)含量及TXA<sub>2</sub>/PGI<sub>2</sub>比值的变化可能与之相关, 此前尚未有相关文献报道其具体作用机制。

## ■ 相关报道

近年来相关研究报道不同+Gz暴露及实验性大鼠胃溃疡下胃黏膜血流量、生长因子(表皮生长因子、转化生长因子)、胃肠激素(胃泌素、生长抑素等)、前列腺素类物质、氧自由基(丙二醛、超氧化物歧化酶)等,但其与大鼠正加速度适应性训练的相关研究此前尚未见报道。

首次提出,他是指给予胃黏膜温和的低浓度或低剂量的弱刺激物后,随后能够抵抗较高浓度或高剂量的同类刺激物造成的胃黏膜损伤,从而发挥胃黏膜的“适应性细胞保护”。Robert等<sup>[1]</sup>和Wallace等<sup>[2]</sup>在随后的研究中分别指出,内源性前列腺素物质合成和释放在适应性细胞保护中占有重要地位。在航空航天医学领域中,如何减轻正加速度(+Gz)对飞行员全身各系统器官造成的损伤一直以来就是研究的热点。已有相关研究<sup>[3]</sup>报道预适应训练可能减轻+Gz暴露下大鼠胃黏膜的损伤,但其具体作用机制此前尚未报道,内源性前列腺素物质在这一过程中是否产生作用也尚未明了。因此,我们通过大鼠适应性训练试验来观察其胃黏膜损伤情况以及测定大鼠胃黏膜内血栓素 $\text{A}_2$ (thromboxane  $\text{A}_2$ ,  $\text{TXA}_2$ )、前列环素(prostacyclin,  $\text{PGI}_2$ )含量的变化,阐明适应性训练对胃黏膜保护作用的机制,从而为飞行员建立合理的体能训练计划,减少飞行环境中对胃肠道的损伤提供理论基础。由于 $\text{TXA}_2$ 和 $\text{PGI}_2$ 的生物半衰期( $T_{1/2}$ )均较短,故通常测定其稳定的代谢产物 $\text{TXB}_2$ 和6-酮-前列腺素 $\text{F}_{1\alpha}$ (6-keto-prostaglandin  $\text{F}_{1\alpha}$ , 6-K-PGF $_{1\alpha}$ )分别代表 $\text{TXA}_2$ 和 $\text{PGI}_2$ 的含量<sup>[4]</sup>。

## 1 材料和方法

1.1 材料 40只健康♂SD大鼠,SPF级,体质量 $180\text{ g}\pm 10\text{ g}$ ,购自中国军事医学科学院实验动物中心,许可证号:SCXK-(军)-2012-0004,食用由中国航空航天医学研究所提供的全营养颗粒饲料,并安排专人负责喂养,自由饮食及水。动物实验室室温由空调控制,维持在 $23\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。小动物离心机、小动物手术器械、游标卡尺、试验动物解剖操作台,由航空航天医学实验室提供;0.9%氯化钠注射液,华润双鹤药业股份有限公司,生产批号Y1502269;灭菌注射用水,华润双鹤药业股份有限公司,生产批号Y150227 10W;碘伏消毒液,北京四环卫生药械厂有限公司;医用消毒乙醇,北京宏志伟达工贸有限公司朝阳卫生用品分公司,生产批号10141103;超低温保存箱,海尔集团公司;戊巴比妥钠, Sigma公司提供;  $\text{TXB}_2$ 、6-K-PGF $_{1\alpha}$ 放射免疫分析盒由北京尚柏生物技术有限公司提供;病理组织切片机及光学显微镜由中国人民解放军空军总医院病理科提供。其

他仪器和设备均由航空航天医学实验室提供。

## 1.2 方法

1.2.1 动物分组: 40只♂SD大鼠随机分为5组,每组8只,分别为A组: 正常对照组, B组: +5 Gz值暴露组, C组: +10 Gz值暴露组, D组: 适应性训练后+5 Gz值暴露组, E组: 适应性训练后+10 Gz值暴露组。所有大鼠均适应性喂养7 d。

1.2.2 +Gz暴露及适应性训练: 采用小动物离心机模拟+Gz值暴露,离心机半径为1 m,利用特制的固定盒承载大鼠,每只大鼠专用一个固定盒,保证加速度作用的方向,大鼠头端均朝向离心机轴心,俯面固定于离心机转臂远端,采用梯形+Gz作用曲线,G值增长率为1 G/s,全程由计算机进行加速度程序控制。适应性训练及+Gz暴露方法参照赵洪礼等<sup>[3]</sup>、范勤等<sup>[5]</sup>及前期预实验结果具体如下: A组大鼠为空白对照,不做处理, B组大鼠+5 Gz值暴露5 min, 1次/d,连续暴露5 d, C组大鼠+10 Gz值暴露5 min, 1次/d,连续暴露5 d, D组大鼠适应性训练(即+4 Gz值暴露3 min, 1次/d,连续暴露5 d)后+5 Gz值暴露5 min, 1次/d,连续暴露5 d, E组大鼠适应性训练(即+4 Gz值暴露3 min, 1次/d,连续暴露5 d)后+10 Gz值暴露5 min, 1次/d,连续暴露5 d。

1.2.3 标本采集及观察: +Gz值暴露完毕下离心机后,用2%戊巴比妥钠(2.3 mL/kg)腹腔麻醉,腹部剪毛,碘伏消毒,打开腹腔后结扎贲门和幽门,将胃取出,沿着胃大弯侧剪开,冰生理盐水小心冲洗胃黏膜,平铺于纱布上,大头针固定,肉眼观察胃黏膜损伤情况。

1.2.4 胃黏膜损伤指数测定: 观察胃黏膜损伤程度,用游标卡纸测出损伤长度及宽度(单位为mm),按Guth等<sup>[6]</sup>标准积分: 点状出血计1分;线状出血,长度 $<1\text{ mm}$ 计2分;  $1\text{ mm}\leq$ 长度 $<2\text{ mm}$ 计3分;  $2\text{ mm}\leq$ 长度 $<3\text{ mm}$ 计4分;  $3\text{ mm}\leq$ 长度 $<4\text{ mm}$ 计4分,以此类推;宽度 $>1\text{ mm}$ 时分值加倍。

1.2.5 病理学观察: 取损伤最严重处胃黏膜组织( $10\text{ mm}\times 10\text{ mm}$ )一块,甲醛固定、脱水透明、浸蜡包埋、切片与贴片、脱蜡、苏木精-伊红(hematoxylin-eosin staining, HE)染色、脱水透明、封固,光学显微镜下观察胃黏膜损伤的形态学变化。

1.2.6 胃黏膜 $\text{TXB}_2$ 、6-K-PGF $_{1\alpha}$ 含量检测: 胃黏膜损伤指数测定及留取胃黏膜标本后,用小刀片轻轻刮取胃黏膜,置于EP管中,  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱

表 1 各组大鼠胃黏膜TXB<sub>2</sub>、6-K-PGF<sub>1α</sub>含量及TXB<sub>2</sub>/6-K-PGF<sub>1α</sub>比值变化(mean ± SD)

分组	TXB <sub>2</sub> (pg/mL)	6-K-PGF <sub>1α</sub> (pg/mL)	TXB <sub>2</sub> /6-K-PGF <sub>1α</sub>
A组	121.400 ± 41.629	106.322 ± 16.909	1.199 ± 0.545
B组	251.018 ± 50.845 <sup>a</sup>	52.015 ± 11.827 <sup>a</sup>	5.128 ± 1.788 <sup>a</sup>
C组	331.538 ± 79.102 <sup>ac</sup>	44.726 ± 18.867 <sup>a</sup>	8.599 ± 4.157 <sup>ac</sup>
D组	159.588 ± 36.216 <sup>d</sup>	72.242 ± 12.413 <sup>d</sup>	2.283 ± 0.705 <sup>d</sup>
E组	150.476 ± 48.589 <sup>f</sup>	87.426 ± 15.833 <sup>f</sup>	1.802 ± 0.715 <sup>f</sup>

<sup>a</sup>*P*<0.05 vs A组; <sup>c</sup>*P*<0.05, <sup>a</sup>*P*<0.01 vs B组; <sup>f</sup>*P*<0.01 vs C组. A组: 空白对照组; B组: +5 Gz值暴露组; C组: +10 Gz值暴露组; D组: 适应性训练后+5 Gz值暴露组; E组: 适应性训练后+10 Gz值暴露组. TXB<sub>2</sub>: 血栓素B<sub>2</sub>; 6-K-PGF<sub>1α</sub>: 6-酮-前列腺素F<sub>1α</sub>.

保存, 采用ELISA法检测TXB<sub>2</sub>、6-K-PGF<sub>1α</sub>的含量, 准确称取组织质量, 按照质量(g): 体积(mL) = 1:9的比例加入9倍体积生理盐水, 剪碎组织, 冰水浴制备匀浆, 2500-3000 r/min, 离心10 min, 取上清10%匀浆上清液, 其他具体操作方法分别严格参照TXB<sub>2</sub>、6-K-PGF<sub>1α</sub>试剂盒说明书进行操作, 以A值为纵坐标, 以标准品浓度为横坐标, 绘制标准曲线, 根据的样品的A值可在标准曲线上查出其浓度, 以pg/mL表示.

**统计学处理** 采用SPSS18.0软件对数据进行统计学分析, 首先对数据进行正态性检验和方差齐性分析, 计量资料使用mean±SD表示, 各组间均数比较采用*t*检验. *P*<0.05为差异具有统计学意义.

## 2 结果

**2.1 各组大鼠胃标本肉眼观** A组: 胃底、胃窦黏膜光滑, 呈淡红色, 胃黏膜组织完整, 无缺损, 无充血、坏死. B组: 胃黏膜潮红, 可见点状及线状出血, 无坏死、糜烂、水肿. C组: 可见数个长条线状及点状出血灶, 周围黏膜欠完整, 无坏死及糜烂形成. D组: 可见散在点状出血灶, 胃黏膜光滑、完整, 无明显水肿、坏死形成. E组: 可见少许线状及点状出血, 胃黏膜光滑呈淡红色, 黏膜皱襞完整, 无水肿及坏死(图1).

**2.2 各组大鼠胃标本组织病理学** A组: 胃黏膜组织形态正常, 结构完整, 胃小凹、胃底腺、黏膜下层、肌层、浆膜层组织完整. B组: 损伤局限于黏膜层及黏膜下层, 部分绒毛结构脱落, 黏膜层可见中性粒细胞浸润. C组: 损伤达肌层和浆膜层, 黏膜层及黏膜下层组织缺损,

腺体结构破坏严重, 细胞排列紊乱, 极不规则, 组织松散, 大量炎性细胞浸润. D组: 损伤限于黏膜层, 腺体破坏较轻, 部分绒毛破坏, 可见炎性细胞浸润. E组: 损伤达黏膜层, 部分损伤达黏膜下层, 部分腺体结构破坏, 有炎性细胞浸润(图2).

**2.3 各组大鼠胃黏膜损伤指数的变化** C组损伤指数明显大于B组(5.625±1.767 vs 1.750±0.707)(*P*<0.05); 适应性训练后, D组损伤指数(0.875±0.641)小于B组(*P*<0.05), E组损伤指数(2.250±1.035)小于C组(*P*<0.05).

**2.4 各组大鼠胃黏膜TXB<sub>2</sub>、6-K-PGF<sub>1α</sub>含量及TXB<sub>2</sub>/6-K-PGF<sub>1α</sub>比值变化** B、C组TXB<sub>2</sub>含量均高于A组(*P*<0.05); 适应性训练后, D组TXB<sub>2</sub>含量低于B组(*P*<0.01), E组TXB<sub>2</sub>含量低于C组(*P*<0.01). B、C组6-K-PGF<sub>1α</sub>含量均低于A组(*P*<0.05); 适应性训练后, D组6-K-PGF<sub>1α</sub>含量高于B组(*P*<0.01), E组6-K-PGF<sub>1α</sub>含量高于C组(*P*<0.01). B组、C组TXB<sub>2</sub>/6-K-PGF<sub>1α</sub>比值均大于A组(*P*<0.05); 适应性训练后, D组TXB<sub>2</sub>/6-K-PGF<sub>1α</sub>比值小于B组(*P*<0.01), E组TXB<sub>2</sub>/6-K-PGF<sub>1α</sub>比值小于C组(*P*<0.01)(表1).

## 3 讨论

在航空航天医学领域, 飞行员在飞行环境及平时训练中常处于+Gz环境暴露中, 其胃黏膜损伤的发生率较高, 如何减少+Gz带来的损伤是研究的重要课题, 适应性训练可在一定程度上减轻+Gz造成的胃黏膜损伤, 以往研究仅探讨不同+Gz暴露对胃黏膜的损伤, 而对正加速度适应性训练的研究较少, 内源性前列腺素类物质是否与其相关也尚未明了. 赵洪礼等<sup>[3]</sup>及范勤等<sup>[5]</sup>研究发现, 随着+Gz暴露值的增加, 大

## ■ 创新点

本研究采用小动物离心机模拟+Gz值暴露, 离心机半径为1 m, 利用特制的固定盒承载大鼠, 每只大鼠专用一个固定盒, 保证加速度作用的方向, 大鼠头端均朝向离心机轴心, 俯面固定于离心机转臂远端, 采用梯形+Gz作用曲线, G值增长率为1 G/s, 全程由计算机进行加速度程序控制. 通过不同+Gz值暴露研究正加速度适应性训练对大鼠胃黏膜PGI<sub>2</sub>、TXA<sub>2</sub>含量及TXA<sub>2</sub>/PGI<sub>2</sub>比值的影响.



# 应用要点

本研究表明, 适应性训练可明显减轻高+Gz值带来的胃黏膜损伤, 从而为飞行员制定合理的体能训练计划, 减少飞行环境带来的胃肠道损伤提供坚实的理论基础, 同时也为深入研究适应性训练对飞行员胃黏膜的保护作用提供科学依据。

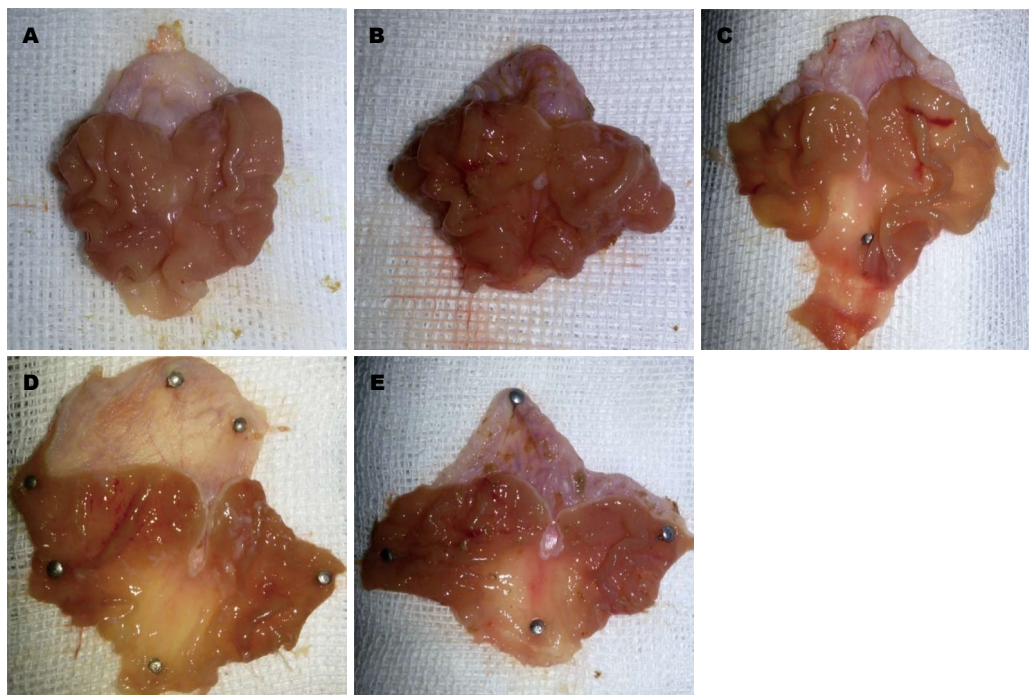


图 1 各组大鼠胃标本肉眼观. A: 空白对照组; B: +5 Gz值暴露组; C: +10 Gz值暴露组; D: 适应性训练后+5 Gz值暴露组; E: 适应性训练后+10 Gz值暴露组。

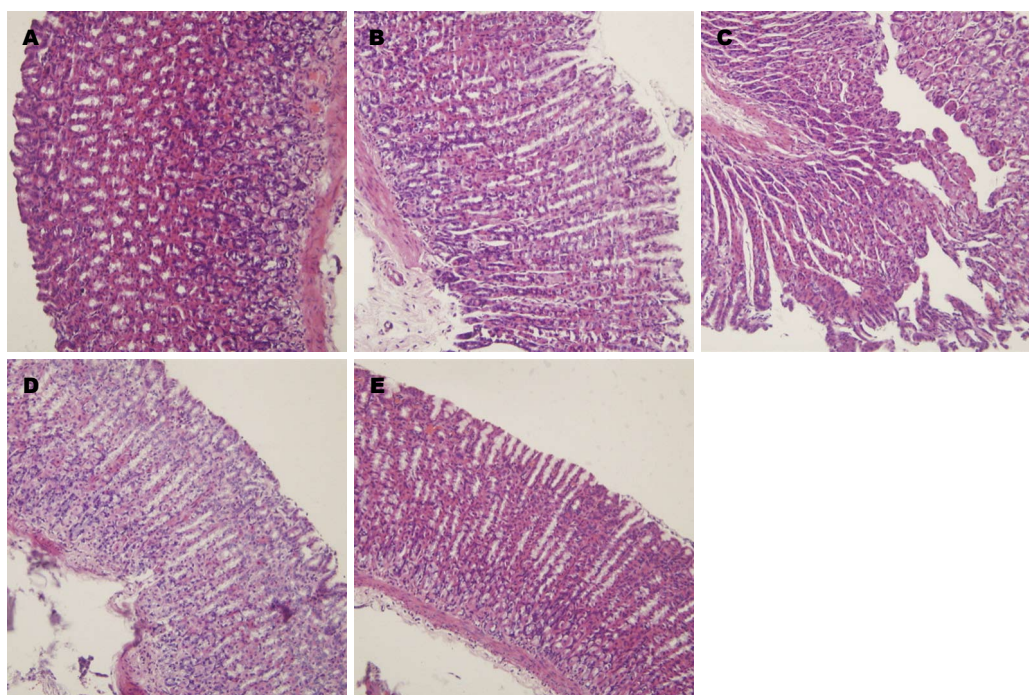


图 2 各组大鼠胃标本组织病理学观察( $\times 100$ ). A: 空白对照组; B: +5 Gz值暴露组; C: +10 Gz值暴露组; D: 适应性训练后+5 Gz值暴露组; E: 适应性训练后+10 Gz值暴露组。

鼠胃黏膜损伤逐渐加重。本试验研究结果显示, B组和C组损伤指数均明显高于A组, 且C组损伤指数高于B组, 差异均具有统计学意义( $P<0.05$ ), 这与以往研究结果一致<sup>[4,7,8]</sup>。大鼠适应性训练后, D组损伤指数低于B组; E组损伤

指数低于C组( $P<0.05$ ), 说明适应性训练能够明显减少胃黏膜损伤指数。胃黏膜组织肉眼观及光学显微镜下, 同样可以发现D组损伤轻于B组, E组损伤轻于C组。

前列腺素为广泛存在于人和动物体内的

一类不饱和脂肪酸, 具有多种生物活性. 环氧合酶(cyclooxygenase, COX)是合成前列腺素类物质的限速酶, 其催化花生四烯酸生成PGG<sub>2</sub>、PGH<sub>2</sub>, 再通过各种细胞专一性酶和异构酶, 生成前列腺素类物质, 包括PGD<sub>2</sub>、PGE<sub>2</sub>、PGF<sub>2α</sub>、PGI<sub>2</sub>和TXA<sub>2</sub><sup>[4]</sup>. 胃黏膜层中前列腺素类物质含量高于黏膜下层和肌层<sup>[9]</sup>. 其中, PGE<sub>2</sub>、PGI<sub>2</sub>和TXA<sub>2</sub>在胃黏膜适应性细胞保护中占有重要作用.

有报道<sup>[10,11]</sup>指出, TXA<sub>2</sub>和PGI<sub>2</sub>在急性胃黏膜损伤发生及胃黏膜保护作用中分别发挥不同的生理作用. TXA<sub>2</sub>主要由血小板合成, 是目前已知生物活性最强的血管收缩和血小板聚集物质<sup>[12]</sup>. TXA<sub>2</sub>在急性胃黏膜损伤中扮有重要的作用, 这种作用可能是由于其产生了各种坏死物质<sup>[13]</sup>. 体外实验表明, TXA<sub>2</sub>能够对兔胃黏膜直接产生细胞毒性, 抑制TXA<sub>2</sub>的合成能够减轻牛胆酸诱导的胃黏膜损伤. 研究人员还发现在溃疡组织中TXA<sub>2</sub>合成增多, 而在正常组织中并非如此. TXA<sub>2</sub>抑制剂能够加速胃溃疡的愈合. 增高的TXA<sub>2</sub>能够刺激胃酸的分泌, 对胃黏膜的再生产生抑制作用. 胃黏膜正常功能的维持很大程度上取决于黏膜内血流量, 胃黏膜血流可为黏膜细胞提供氧及营养物质, 带走细胞代谢产物, 从而使黏膜局部微环境保持相对稳定<sup>[14,15]</sup>. 而TXA<sub>2</sub>有可能通过减少胃黏膜血流来抑制溃疡的愈合, 其在一定程度上阻碍了溃疡边缘上皮细胞的增殖<sup>[16]</sup>. 李志军等<sup>[17]</sup>研究发现, 胃黏膜内TXA<sub>2</sub>的含量的升高使得胃黏膜下层广泛的微循环障碍, 是家兔应激性溃疡发病的重要机制. 而使用TXA<sub>2</sub>特异性抑制剂后, 黏膜下层微循环也得到了相应的改善, 从而证实TXA<sub>2</sub>的显著升高介导了胃黏膜下层微循环的障碍, 促进胃黏膜的损伤. 本实验研究结果同样说明了上述问题, 在+Gz暴露后, B组和C组的TXB<sub>2</sub>含量明显高于A组; 随着+Gz值的增加, C组的TXB<sub>2</sub>含量显著高于B组( $P<0.05$ ). 然而在适应性训练后, D组的TXB<sub>2</sub>含量低于B组, E组的TXB<sub>2</sub>含量明显低于C组( $P<0.05$ ), 说明适应性训练可显著降低胃黏膜内TXB<sub>2</sub>的含量, 具有抗胃黏膜损伤的作用.

PGI<sub>2</sub>由血管内皮细胞生成, 具有扩张血管、抑制血小板聚集的作用, 同时PGI<sub>2</sub>是大鼠胃黏膜中含量最丰富的一型前列腺素类物质, 且代谢旺盛, 生物活性强, 具有强烈的细

胞保护作用, 内源性含量降低则可造成黏膜损伤<sup>[18]</sup>. 林进乾等<sup>[19]</sup>研究表明, 胃黏膜损伤后, PGI<sub>2</sub>含量降低, 其保护作用减弱. 王国中等<sup>[20]</sup>发现PGI<sub>2</sub>能过增加胃黏膜血流量, 为黏膜细胞提供丰富的氧和营养物质, 带走有害物质, 使胃黏膜上皮细胞分泌黏液增多, 从而增强黏膜屏障和黏液屏障作用. 同样有研究人员发现PGI<sub>2</sub>可通过活化的PGIP受体刺激传入神经释放降钙素基因相关肽(calcitonin gene related peptide, CGRP), 而CGRP是迄今为止发现的最强的舒血管物质, 故PGI<sub>2</sub>可通过刺激CGRP的释放而发挥舒张胃黏膜血管、保护胃黏膜的作用. 本实验同样说明, 随着+Gz暴露值的增加, 胃黏膜损伤逐渐加重, PGI<sub>2</sub>含量逐渐降低, 保护作用减弱. 在适应性训练后, D组6-K-PGF<sub>1α</sub>含量高于B组, E组6-K-PGF<sub>1α</sub>含量明显高于C组, 且差异均具有统计学意义, 说明适应性训练后, PGI<sub>2</sub>合成增加, 胃黏膜保护作用加强.

在胃黏膜内, TXA<sub>2</sub>和PGI<sub>2</sub>为一对作用相反的物质, 互为拮抗剂. PGI<sub>2</sub>有细胞保护作用, 而TXA<sub>2</sub>具有黏膜损伤作用. 正常人胃黏膜内TXA<sub>2</sub>/PGI<sub>2</sub>处于动态平衡状态<sup>[21]</sup>. 严重创伤及应激可使TXA<sub>2</sub>和PGI<sub>2</sub>含量迅速发生改变, TXA<sub>2</sub>/PGI<sub>2</sub>动态平衡被破坏, 且TXA<sub>2</sub>/PGI<sub>2</sub>改变幅度与胃黏膜损伤程度呈正相关, 即TXA<sub>2</sub>/PGI<sub>2</sub>比值变化可反映胃黏膜损害情况, TXA<sub>2</sub>/PGI<sub>2</sub>比值增大, 表示胃的细胞保护作用减弱, 损伤因素增加<sup>[22-24]</sup>. 文国容等<sup>[12]</sup>研究发现, 胃乐散可能通过增加PGI<sub>2</sub>分泌, 纠正TXA<sub>2</sub>、PGI<sub>2</sub>的失衡来达到治疗溃疡的目的. 应激所造成的急性胃黏膜损伤直接表现为花生四烯酸代谢紊乱<sup>[25]</sup>. 本研究发现, C组TXB<sub>2</sub>/6-K-PGF<sub>1α</sub>比值明显高于B组, 差异具有统计学意义, 即胃黏膜损伤越重, TXA<sub>2</sub>/PGI<sub>2</sub>比值越大. 而适应性训练后, TXB<sub>2</sub>/6-K-PGF<sub>1α</sub>比值降低, 说明适应性训练能够抵抗胃黏膜损伤的发生, 有利于维持TXA<sub>2</sub>/PGI<sub>2</sub>的动态平衡.

本实验对正加速度适应性训练后胃黏膜损伤保护作用的机制进行了初步研究, 结果表明, 适应性训练可明显减轻高+Gz值带来的胃黏膜损伤, 其机制与PGI<sub>2</sub>含量升高、TXA<sub>2</sub>含量降低以及TXA<sub>2</sub>/PGI<sub>2</sub>比值降低有关. 从而为飞行员制定合理的体能训练计划, 减少飞行环境带来的胃肠道损伤提供坚实的理论基础, 同时

## ■名词解释

适应性细胞保护: 是指给予胃黏膜温和的低浓度或低剂量的弱刺激物后, 随后能够抵抗较高浓度或高剂量的同类刺激物造成的胃黏膜损伤, 从而发挥胃黏膜的“适应性细胞保护”.



# ■ 同行评价

本研究通过不同加速度及适应性训练对大鼠胃黏膜损伤程度及胃黏膜PGI<sub>2</sub>、TXA<sub>2</sub>含量及TXA<sub>2</sub>/PGI<sub>2</sub>比值影响, 阐述正加速度适应性训练后胃黏膜损伤保护作用的机制, 从而为减少飞行环境带来的胃肠道损伤提供理论基础。研究有一定的实际意义, 符合伦理, 研究目的清楚, 材料和方法叙述明确, 统计学方法选用合理。

也为深入研究适应性训练对飞行员胃黏膜的保护作用提供科学依据。

## 4 参考文献

- Robert A, Nezamis JE, Lancaster C, Davis JP, Field SO, Hanchar AJ. Mild irritants prevent gastric necrosis through "adaptive cytoprotection" mediated by prostaglandins. *Am J Physiol* 1983; 245: G113-G121 [PMID: 6869543]
- Wallace JL, Track NS, Cohen MM. Chronic mild restraint protects the rat gastric mucosa from injury by ethanol or cold restraint. *Gastroenterology* 1983; 85: 370-375 [PMID: 6862160]
- 赵洪礼, 吴战军, 孙跃, 谢艳娜. 高+Gz值暴露对胃黏膜损伤的防治性研究. *实用医药杂志* 2010; 27: 545-547
- Cathcart MC, O'Byrne KJ, Reynolds JV, O'Sullivan J, Pidgeon GP. COX-derived prostanoid pathways in gastrointestinal cancer development and progression: novel targets for prevention and intervention. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1825: 49-63 [PMID: 22015819 DOI: 10.1016/j.bbcan.2011.09.004]
- 范勤, 陈英, 杜斌, 唐合兰, 杨春敏. 大鼠胃黏膜SS、EGF、PGE<sub>2</sub>含量在模拟+Gz值暴露下的变化及机制. *胃肠病学和肝病学杂志* 2014; 23: 138-42.
- Guth PH, Aures D, Paulsen G. Topical aspirin plus HCl gastric lesions in the rat. Cytoprotective effect of prostaglandin, cimetidine, and probanthine. *Gastroenterology* 1979; 76: 88-93 [PMID: 361495]
- 邵颖铤, 李静, 陈英, 杨春敏, 唐合兰, 王建昌. 还原型谷胱甘肽对正加速度暴露下急性胃黏膜损伤大鼠血浆HSP70的影响. *中华医学杂志* 2013; 93: 3708-3710
- 陈璐, 陈英, 范勤, 韩全利, 唐合兰, 李静, 杨春敏. 持续正加速度对实验性大鼠胃溃疡愈合质量的影响. *世界华人消化杂志* 2013; 21: 1841-1846
- 常江, 邓长生, 沈佩弟. 前列腺素与胃黏膜保护. *国外医学(内科学分册)* 1992; 19: 169-172
- Claar D, Hartert TV, Peebles RS. The role of prostaglandins in allergic lung inflammation and asthma. *Expert Rev Respir Med* 2015; 9: 55-72 [PMID: 25541289 DOI: 10.1586/17476348.2015.992783]
- Caughey GE, Cleland LG, Penglis PS, Gamble JR, James MJ. Roles of cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 in prostanoid production by human endothelial cells: selective up-regulation of prostacyclin synthesis by COX-2. *J Immunol* 2001; 167: 2831-2838 [PMID: 11509629 DOI: 10.4049/jimmunol.167.5.2831]
- 文国容, 徐靖宇, 刘雪梅, 赵正兰, 江义霞, 谢睿. 胃乐散对大鼠溃疡组织TXA<sub>2</sub>、PGI<sub>2</sub>及COX-2含量的影响及意义. *山东医药* 2012; 52: 4-6
- Amagase K, Yoshida Y, Hara D, Murakami T, Takeuchi K. Prophylactic effect of egualen sodium, a stable azulene derivative, on gastrointestinal damage induced by ischemia/reperfusion, double antiplatelet therapy and loxoprofen in rats. *J Physiol Pharmacol* 2013; 64: 65-75 [PMID: 23568973]
- Sato N, Kawano S, Tsuji S, Ogihara T, Yamada S. Gastric blood flow in ulcer diseases. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1995; 208: 14-20 [PMID: 7777796 DOI: 10.3109/00365529509107756]
- 赵锐, 杨春敏, 陈英, 李静, 唐合兰. 正加速度对大鼠实验性胃溃疡愈合质量影响的研究进展. *世界华人消化杂志* 2014; 22: 1359-1364
- Takahashi S, Shigeta J, Ishikawa M, Kobayashi N, Okabe S. Role of thromboxane A<sub>2</sub> in healing of gastric ulcers in rats. *Jpn J Pharmacol* 1999; 79: 101-107 [PMID: 10082323 DOI: 10.1254/jjp.79.101]
- 李志军, 王家泰, 吴胜群, 宗育杉, 王玮, 王今达. 血栓素A<sub>2</sub>与微循环障碍在实验性应激性溃疡中的作用及其防治. *微循环学杂志* 1996; 6: 3-5
- Harada N, Okajima K, Murakami K, Isobe H, Liu W. Gastric prostacyclin (PGI<sub>2</sub>) prevents stress-induced gastric mucosal injury in rats primarily by inhibiting leukocyte activation. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 1999; 57: 291-303 [PMID: 10480484 DOI: 10.1016/S0090-6980(98)00077-X]
- 林进乾, 潘光才, 陈卫东, 许真, 陈定光. 应激性胃黏膜出血与血浆血栓素、前列腺素和胃泌素水平的关系. *胃肠病学和肝病学杂志* 1999; 8: 285-286
- 王国中, 陈志伟, 潘洪明, 李和泉. 丹参抗大鼠乙醇性胃黏膜损伤的作用及机制. *中国中西医结合消化杂志* 2002; 10: 340-341
- Haubro Andersen P, Jarløv N. Investigation of the possible role of endotoxin, TXA<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub> and PGE<sub>2</sub> in experimentally induced rumen acidosis in cattle. *Acta Vet Scand* 1990; 31: 27-38 [PMID: 2119094]
- Vane JR. Biomedicine. Back to an aspirin a day? *Science* 2002; 296: 474-475 [PMID: 11964462 DOI: 10.1126/science.1071702]
- 张海港, 李晓辉. 环氧酶亚型研究分析与展望. *中国药理学通报* 2004; 20: 11-15
- 胡伏莲. 消化性溃疡发病机制的现代理念. *中华消化杂志* 2005; 25: 189-190
- Stein TA, Keegan LM, Auguste LJ, Bailey B, Wise L. Stress-induced gastric lesions and the synthesis of prostaglandins and leukotrienes. *J Surg Res* 1991; 51: 368-371 [PMID: 1758169 DOI: 10.1016/0022-4804(91)90135-9]

编辑: 郭鹏 电编: 都珍珍





## CRISPRi在体抑制肝脏miR-122的表达

赵洪礼, 杨景玉, 李桂玲, 毛德华, 李洪运

赵洪礼, 杨景玉, 李桂玲, 毛德华, 山东省消化系统疾病防治中心, 山东省医学科学院第三附属医院消化内科 山东省济宁市 272033

李洪运, 济宁市第一人民医院消化内科 山东省济宁市 272033

赵洪礼, 在读博士, 主要从事消化系统疾病的防治性研究。

作者贡献分布: 主要试验、资料分析及文章撰写由赵洪礼完成; 数据统计由杨景玉、李桂玲及毛德华完成; 研究设计、文章修改及审阅由李洪运、赵洪礼及杨景玉完成。

通讯作者: 李洪运, 副主任医师, 272033, 山东省济宁市任城区健康路11号, 济宁市第一人民医院消化内科。

xhlhy2008@163.com

电话: 0537-2253700

收稿日期: 2015-08-04 修回日期: 2015-09-02

接受日期: 2015-09-11 在线出版日期: 2015-10-18

### *In vivo* inhibition of liver miR-122 expression by CRISPRi

Hong-Li Zhao, Jing-Yu Yang, Gui-Ling Li, De-Hua Mao, Hong-Yun Li

Hong-Li Zhao, Jing-Yu Yang, Gui-Ling Li, De-Hua Mao, Department of Gastroenterology, Shandong Control Center for Digestive Diseases; the Third Affiliated Hospital, Shandong Academy of Medical Sciences, Jining 272033, Shandong Province, China

Hong-Yun Li, Department of Gastroenterology, Jining First People's Hospital, Jining 272033, Shandong Province, China

Correspondence to: Hong-Yun Li, Associate Chief Physician, Department of Gastroenterology, Jining First People's Hospital, 11 Jiankang Road, Rencheng District, Jining 272033, Shandong Province, China. xhlhy2008@163.com

Received: 2015-08-04 Revised: 2015-09-02

Accepted: 2015-09-11 Published online: 2015-10-18

### Abstract

**AIM:** To investigate whether CRISPRi can repress miR-122 expression in the mouse liver *in vivo*.

**METHODS:** sgRNAs (sgT1 and sgT2) were designed, targeting the region of mmu-miR-122 promoter. sgRNAs (sgT1 or sgT2) and catalytically inactive dCas9-KRAB were delivered into 8-10-week-old mice by hydrodynamic tail-vein injection. The expression of mmu-miR-122 was detected at 1, 2 and 4 weeks after injection by quantitative real-time PCR (qRT-PCR) to determine the more effective sgRNA. Different concentrations of sgRNA were tested in order to address whether CRISPRi was concentration dependent *in vivo*. The expression of miR-122 downstream target genes *HOMX1* and *CyclinG1* was assessed by qRT-PCR and Western blot.

**RESULTS:** Compared to the control group, CRISPRi mediated by sgT1 could repress miR-122 expression by 23% ( $P < 0.05$ ) and 16% ( $P < 0.05$ ) in the mouse liver at 1 and 2 weeks after injection, respectively. The effect of CRISPRi was enhanced with increased concentrations of sgRNA. After mmu-miR-122 expression in the mouse liver was inhibited by CRISPRi *in vivo*, the expression of miR-122 downstream target genes *HMOX1* and *CyclinG1* was upregulated.

**CONCLUSION:** CRISPRi can specially repress miR-122 expression in the liver *in vivo*, which provides a novel therapeutic strategy against hepatitis C virus (HCV) infections.

© 2015 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

**Key Words:** CRISPRi; *In vivo* gene modification; miR-122; Liver

### 背景资料

丙型肝炎病毒 (hepatitis C virus, HCV) 可诱发丙型肝炎, 导致肝硬化和肝癌等疾病。然而到目前为止仍没有一种有效的治疗方式。微小RNA-122 (microRNA-122, miR-122) 作为 HCV 复制的必需元件, 有可能成为治疗丙型肝炎的新的抗病毒靶点。

### 同行评议者

毛高平, 教授, 中国人民解放军空军总医院

## ■ 研究前沿

miR-122是宿主细胞的内源性分子, 为HCV病毒复制的必需元件. 高效且特异抑制miR-122成为丙型肝炎治疗的关键.

Zhao HL, Yang JY, Li GL, Mao DH, Li HY. *In vivo* inhibition of liver miR-122 expression by CRISPRi. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2015; 23(29): 4687-4693 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/23/4687.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v23.i29.4687>

[com/1009-3079/23/4687.asp](http://www.wjgnet.com/1009-3079/23/4687.asp) DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v23.i29.4687>

## 摘要

**目的:** 探索CRISPR干扰(CRISPR interference, CRISPRi)能否实现在体抑制肝脏miR-122表达.

**方法:** 针对miR-122启动子区设计sgRNA(sgT1和sgT2), 并分别将其与无DNA切割活性仅保留识别活性的dCas9-KRAB载体通过尾静脉流体力学法注射到8-10 wk龄小鼠, 注射1、2、4 wk后通过实时荧光定量PCR(quantitative real-time PCR, qRT-PCR)方法检测肝脏mmu-miR-122的表达; 设计不同的sgRNA浓度梯度, 探索CRISPRi在体抑制肝脏miR-122表达是否存在剂量依赖性; 通过qRT-PCR及Western blot方法检测肝脏miR-122靶分子HMOX1和Cyclin G1的表达变化.

**结果:** 在注射1 wk和2 wk后, sgT1介导的CRISPRi在体抑制肝脏miR-122的表达水平分别为23%( $P<0.05$ )和16%( $P<0.05$ ); 随sgRNA的剂量升高, 肝脏miR-122表达降低, 当lentiGuide-Puro-sgT1质粒为120  $\mu$ g时, 可将miR-122的表达抑制约30%; CRISPRi在体抑制肝脏miR-122表达的同时, 上调了miR-122下游靶分子HMOX1和Cyclin G1的表达.

**结论:** 本研究利用CRISPRi实现了在体抑制肝脏miR-122的表达, 为抗丙型肝炎病毒(hepatitis C virus)的在体治疗提供了新的策略.

© 2015年版权归百世登出版集团有限公司所有.

**关键词:** CRISPRi; 在体基因修饰; miR-122; 肝脏

**核心提示:** 本研究利用CRISPRi在体特异性抑制肝脏miR-122的表达, 上调了下游靶分子HMOX1和Cyclin G1的表达, CRISPRi介导的在体基因修饰为抗丙型肝炎病毒(hepatitis C virus)提供了全新的策略.

赵洪礼, 杨景玉, 李桂玲, 毛德华, 李洪运. CRISPRi在体抑制肝脏miR-122的表达. *世界华人消化杂志* 2015; 23(29): 4687-4693 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/23/4687.asp>

## 0 引言

丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)引起的丙型肝炎是一种致命的血液传染病. HCV是RNA病毒, 其高变异性使其得以避免免疫系统, 尽管聚乙二醇化干扰素和利巴韦林这类抗病毒药物具有一定的疗效, 然而HCV的高变异性, 导致耐药性病毒突变体的产生<sup>[1-3]</sup>. 研究<sup>[4,5]</sup>发现, 肝脏特异性表达的微小RNA-122(microRNA-122, miR-122)与HCV病毒的生长和复制有关, 当miR-122失去活性时, HCV的RNA复制降低约80%. miR-122属于小片段非编码RNA, miR-122与HCV RNA的5'端非翻译区(5' untranslated region, 5'UTR)的两个靶位点结合, 形成miR-122-HCV复合体, 保护HCV RNA不被核酸内切酶水解或者不被宿主免疫反应清除<sup>[5,6]</sup>. miR-122与HCV RNA的结合位点高度保守, 这使得miR-122成为抗HCV病毒治疗的宿主靶点, 如果有效抑制肝脏内miR-122的表达, 将有助于降低HCV数量, 为丙型肝炎的治疗提供全新的策略.

CRISPR(clustered regularly interspaced short palindromic repeat sequences)/CRISPR相关基因(CRISPR-associated genes, Cas)系统是一种防御系统, 用以保护细菌和古细菌细胞不受病毒的侵害. 2012年, Jinek等<sup>[7]</sup>首先利用CRISPR/Cas9系统对外源DNA靶序列进行了精确切割, 从此CRISPR/Cas9系统成为最高效的基因编辑技术. RuvC1结构域及HNH结构域是Cas9的2种核酸酶结构域, HNH结构域切割与sgRNA互补的模板链, RuvC1结构域对另一条链进行切割<sup>[8]</sup>. Qi等<sup>[9]</sup>将CRISPR系统改造为特异性抑制靶分子表达的CRISPR干扰(CRISPR interference, CRISPRi)体系: 即将Cas9的核酸内切酶结构域突变(RuvC1, D10A; HNH, H841A), 产生dCas9, 只有DNA识别能力, 没有内切酶活性, 当dCas9与sgRNA共表达时, 形成识别特定定位点的DNA复合体, 该复合体可以特异性的干扰RNA聚合酶结合或者转录因子结合, 有效抑制靶分子的表达. 2014年, Yin等<sup>[10]</sup>首次利用CRISPR/Cas9系统实现了在体基因编辑, 该研究将CRISPR/Cas9系统各个组分经尾静脉高压注射到小鼠体内, 最终约1/250的肝细

表 1 sgRNA载体构建引物及实时荧光定量PCR引物列表

引物名称	序列
sgT1-F	5'-CACCGCCTAAAAGCCACAGATGCT-3'
sgT1-R	5'-AAACAGCATCTGTGGCTTTTAGGC-3'
sgT2-F	5'-CACCGTTTGTGCACTCTCCCTTTAT-3'
sgT2-R	5'-AAACATAAAGGGAGAGTGCACAAAC-3'
miR-122-F	5'-TGGAGTGTGACAATGGTGTGG-3'
miR-122-R	5'-GCGAGCACAGAATTAATACGAC-3'
5s rRNA-F	5'-CCGCCTGGGAATACCGGGTGCTGTAGGCTTT-3'
5s rRNA-R	5'-GCGAGCACAGAATTAATACGAC-3'
HOMX1-F	5'-CGGGCCAGCAACAAAGTG-3'
HOMX1-R	5'-AGTGAAGGACCCATCGGAGAA-3'
CCNG1-F	5'-TCCCTAGCTGTGAATTTACTGGA-3'
CCNG1-R	5'-CATCAGGTCTGAAACCGTGAA-3'
β-actin-F	5'-GGCTGTATCCCTCCATCG-3'
β-actin-R	5'-CCAGTTGGTAACAATGCCATGT-3'

■ 相关报道

Lanford等利用miR-122的反义锁核酸miravirsin(SPC3469)抑制HCV病毒的复制, 开启了靶向miR-122治疗丙型肝炎的先河。本课题组首次利用CRISPR干扰(CRISPR interference, CRISPRi)技术实现了对肝癌细胞HepG2内源性miR-122表达的抑制。

胞表达了野生型Fah蛋白, Fah阳性肝细胞恢复或者延缓了小鼠体质量的下降。同年, Xue等<sup>[11]</sup>利用CRISPR/Cas9系统对野生型小鼠进行在体基因编辑产生癌症模型, 即将表达Cas9的质粒以及靶向肿瘤抑制因子Pten和/或P53的sgRNA注射到小鼠肝脏, 最终产生了与Cre-Loxp系统产生的基因敲除小鼠表型相似的基因突变小鼠。上述两项研究为CRISPR/Cas9系统的在体基因治疗提供了全新的理念。本研究探索了CRISPRi在体特异性抑制肝脏miR-122的表达, CRISPRi介导的在体基因修饰为抗HCV病毒提供了全新的策略。

1 材料和方法

1.1 材料 lentiGuide-Puro质粒(#52963)、dCas9-KRAB质粒(#46911)购自Addgene; 载体构建用的BsmBI酶(NEB, R0580S)、碱性磷酸酶FastAP(#EF0651)、T4连接酶(NEB, M0202)、核酸纯化试剂盒(EasyPure Quick Gel Extraction Kit, EG101-01)、反转录试剂盒(EasyScript First-Strand cDNA Synthesis SuperMix, AE301-02)购自北京全式金生物公司; 引物由上海生工合成; polyA聚合酶(NEB, M0276S), TRIzol(Invitrogen, 15596-026), SYBR Premix Ex Tag试剂盒(TaKaRa, DRR041A), anti-Cyclin G1一抗(sc-7865, Santa Cruz), anti-HMOX1一抗(Abcam cat. ab137749); anti-β-actin一抗(Abcam cat. 6276), RIPA Buffer裂解液、考马斯亮蓝(R-250)购自碧云天生物; Western blot显色液

(SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate)购自Thermo公司。

1.2 方法

1.2.1 载体构建: 靶向mmu-miR-122启动子区sgRNA载体的构建: 采用BsmBI酶将lentiGuide-Puro载体线性化, 并通过碱性磷酸酶FastAP去磷酸化, 利用EasyPure Quick Gel Extraction Kit进行核酸纯化。将合成的sgT1及sgT2(sgT1-F和sgT1-R, sgT2-F和sgT2-R, 序列如表1)分别进行退火与磷酸化, 并与线性化的lentiGuide-Puro载体进行连接, 分别构建分别靶向mmu-miR-122启动子区的sgRNA载体lentiGuide-Puro-sgT1和lentiGuide-Puro-sgT2。

1.2.2 小鼠尾静脉流体力学法注射: 将混合质粒流体力学法注射入小鼠尾静脉(图1A), 即dCas9-KRAB(60 μg)与lentiGuide-Puro(空载体, 60 μg)或lentiGuide-Puro-sgT1(60 μg)或lentiGuide-Puro-sgT2(60 μg), 溶解于2 mL生理盐水, 4-7 s内注射入8-10 wk龄小鼠尾静脉, 1、2、4 wk后分别取小鼠肝脏, 用于检测肝脏miR-122的表达; 流体力学法注射混合质粒, 即dCas9-KRAB(60 μg)与lentiGuide-Puro(空载体)或不同剂量的lentiGuide-Puro-sgT1(30、60或120 μg), 1 wk后分别取小鼠肝脏, 用于检测肝脏miR-122的表达, 并检测高剂量(120 μg)组miR-122靶分子HMOX1、Cyclin G1 mRNA及蛋白表达。

1.2.3 总RNA提取及反转录: (1)总RNA提取: 用1 mL TRIzol裂解肝脏组织(约10 mg), 室温放



### ■ 创新点

CRISPRi技术因特异性强, 成本低, 易操作, 高效等特点, 成为极具前景的基因治疗方式. 本研究首次利用CRISPRi技术在体抑制了miR-122的表达, 为抗HCV病毒提供了新的思路, 因而具有广阔的应用前景.

置5 min, 加入0.2 mL氯仿, 盖紧管盖, 手动剧烈震荡15 s, 然后室温静置2-3 min, 4 °C 12000 g离心15 min, 小心吸取上层水相加入到新EP管中, 加入0.5 mL异丙醇颠倒混匀, 室温静置10 min, 4 °C, 12000 g离心10 min, 后弃上清, 加入1 mL 75%乙醇(DEPC H<sub>2</sub>O配制)润洗, 4 °C, 7000 g离心5 min, 弃上清, 将RNA沉淀溶解于适量的无RNase水中, 吸出少量测定浓度, RNA溶液可用于进一步实验, 或者-80 °C保存; (2) 反转录: 取1 µg RNA, 加入1 µL Oligo(dT)20, 无RNase水配成10 µL体系, 65 °C 5 min进行变性, 后立即置于冰上, 随后加入2 µL dNTP Mixture、1 µL RNase Inhibitor、1 µL反转录酶以及Buffer和水, 配成20 µL体系, 42 °C 1 h, 99 °C 5 min, 4 °C 5 min, 瞬时离心, -20 °C保存, 以备实时荧光定量PCR(quantitative real-time PCR, qRT-PCR)使用.

1.2.4 miRNA定量检测: 采用polyA聚合酶加A法<sup>[12,13]</sup>检测miR-122的表达. (1)加A反应: 取1 µg RNA, 加入1 µL ATP、1 µL PolyA polymerase以及Buffer和无RNase水, 配成10 µL体系, 37 °C 1 h, 65 °C 20 min, 4 °C 5 min; (2)反转录: 加A后, 加入1 µL RNase Inhibitor、1 µL反转录酶、0.5 µL Poly(T) adapter (10 µM)[序列为GCGAGCACAGAATTAATACGACTCACTATAGG(T)12VN]、2 µL dNTP Mixture以及Buffer和水, 配成20 µL体系, 42 °C 1 h, 99 °C 5 min, 4 °C 5 min; (3)qRT-PCR检测miR-122.

1.2.5 qRT-PCR: 使用SYBR Premix Ex Tag试剂盒, 引物序列如表1, 使用ABI 7500仪器, 采用两步法PCR反应程序, Stage1: 预变性, 95 °C 30 s; Stage2: PCR反应(40 cycles): 95 °C 5 s, 60 °C 34 s; Stage3(解离stage): 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 95 °C 15 s, 后进行数据分析.

1.2.6 Western blot: 利用RIPA Buffer裂解肝脏组织提取总蛋白, 考马斯亮蓝(R-250)测定蛋白浓度, 上样20 µg, 电泳, 转膜, 奶粉封闭, 一抗孵育4 °C过夜, 洗膜, 二抗孵育(HRP标记, 1:10000), 洗膜, 显色, 采集图像.

**统计学处理** 采用SPSS12.0统计学处理软件进行t检验分析, 各项检测结果以mean±SD记录. 以P<0.05为差异具有统计学意义.

## 2 结果

2.1 CRISPRi在体抑制肝脏miR-122的表达 本研究利用小鼠尾静脉流体力学法将表达dCas9

及靶向miR-122启动子区的sgRNA的质粒注射到小鼠体内, dCas9仅保留DNA识别能力而无内切酶活性, dCas9与KRAB(kruppel-associated box)转录抑制结构域融合, 利用CRISPRi原理特异性抑制miR-122的转录(图1A, B). 我们设计了2个靶向miR-122启动子区sgRNA, 命名为T1和T2(图1C). 研究结果显示, 注射1 wk和2 wk后, sgT1介导的CRISPRi显著性降低肝脏miR-122的表达, 但是, 注射4 wk后, 抑制效果下降, 与对照组没有显著性差异(图1D). 研究结果揭示, CRISPRi可以在体抑制肝脏miR-122的表达.

2.2 CRISPRi在体抑制作用依赖于sgRNA剂量在前期结果的基础上, 进一步探索了sgRNA剂量对miR-122抑制效果的影响. 我们将检测时间定为抑制效果较为明显的1 wk, 分别采用30、60和120 µg的质粒lentiGuide-Puro-sgT1. 研究表明, 随着sgRNA浓度的增加, CRISPRi对miR-122的抑制作用提高. 与对照组相比, 当lentiGuide-Puro-sgT1质粒为120 µg时, 可将miR-122的表达抑制约30%(图2). 因此, CRISPRi在体抑制肝脏miR-122表达依赖于sgRNA的剂量, sgRNA剂量越高, 抑制效果提高.

2.3 CRISPRi上调肝脏miR-122靶分子HMOX1和Cyclin G1的表达 HMOX1和Cyclin G1在HCV复制中发挥抑制作用, 而miR-122通过下调HMOX1和Cyclin G1的表达, 而间接促进HCV复制<sup>[14,15]</sup>. 为探索CRISPRi在体抑制肝脏miR-122表达的同时, 能否进一步实现对miR-122下游靶分子的表达调控, 本研究在共同注射dCas9-KRAB和lentiGuide-Puro-sgT1(120 µg)后, 检测了肝脏的HMOX1和Cyclin G1的mRNA及蛋白表达, 结果显示(图3), 注射1 wk后, 肝脏HMOX1 mRNA和Cyclin G1 mRNA水平均显著升高, 同时HMOX1和Cyclin G1蛋白水平也有明显升高. 因此, CRISPRi在体抑制肝脏miR-122表达的同时, 并上调肝脏miR-122下游靶分子HMOX1和Cyclin G1的表达.

## 3 讨论

本研究首次利用CRISPRi实现在体抑制肝脏miR-122表达, 并且上调miR-122下游靶分子HMOX1和Cyclin G1的表达, 为CRISPRi应用

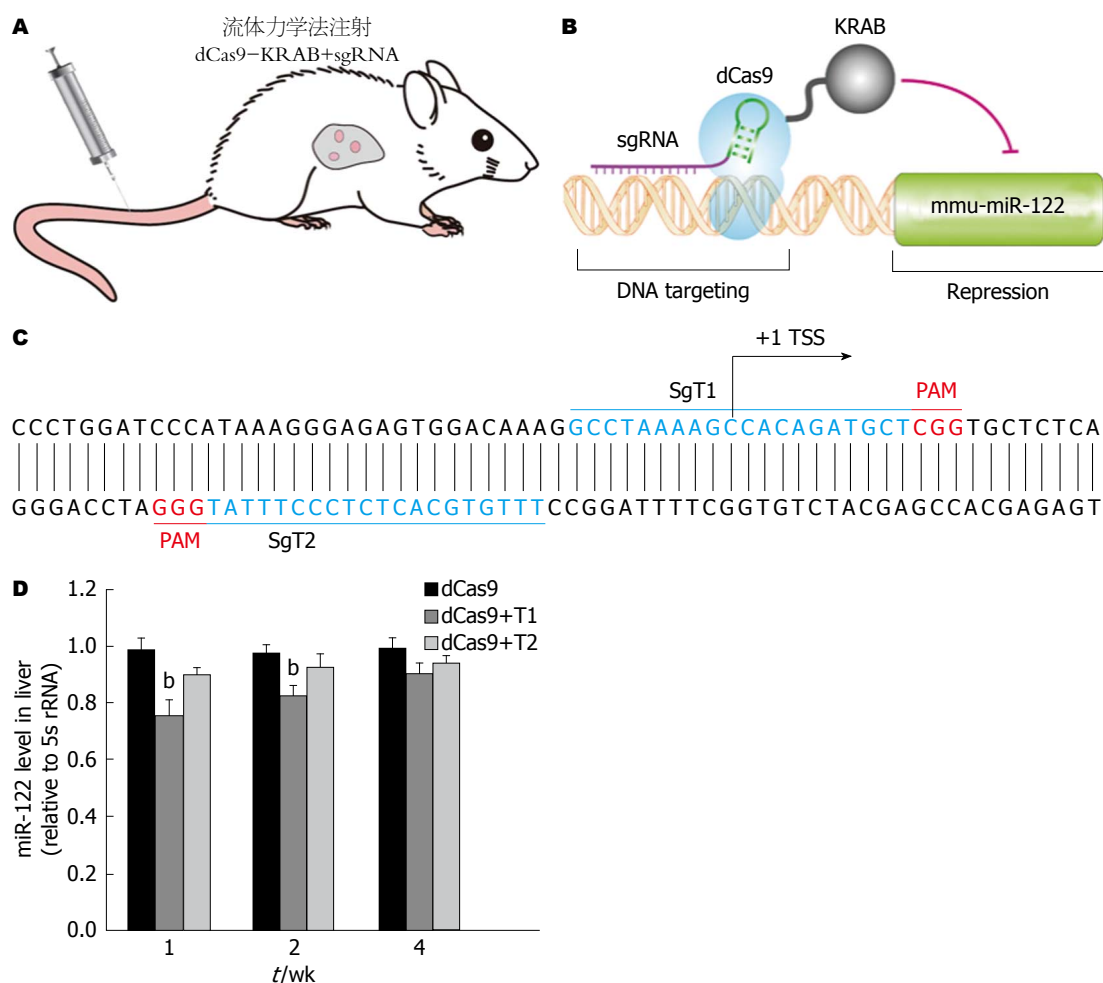


图1 CRISPRi在体抑制肝脏miR-122表达。A: 小鼠尾静脉流体力学注射模式图; B: CRISPRi抑制miR-122表达原理模式图; C: 在mmu-miR-122启动子区选择2个PAM位点, 并设计相应的sgRNA序列; D: CRISPRi在体抑制肝脏miR-122的表达。dCas9: 转染dCas9-KRAB和lentiGuide-Puro质粒组; dCas9+T1: 转染dCas9-KRAB和lentiGuide-Puro-sgT1质粒组; dCas9+T2: 转染dCas9-KRAB和lentiGuide-Puro-sgT2质粒组。<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 对照组。CRISPRi: CRISPR干扰; Cas: CRISPR相关基因。

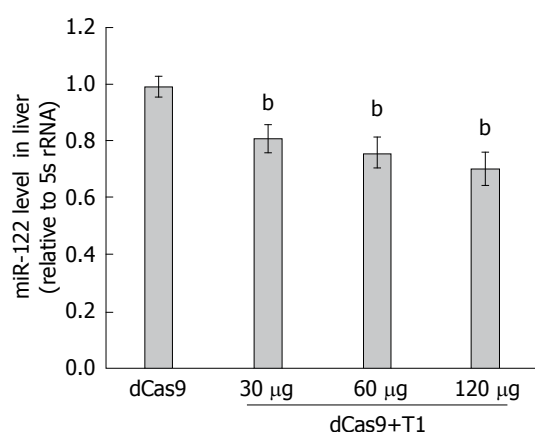


图2 CRISPRi在体抑制肝细胞miR-122表达依赖于sgRNA的剂量。各组转染dCas9-KRAB质粒为60 μg。<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 对照组。CRISPRi: CRISPR干扰; Cas: CRISPR相关基因。

于抗HCV病毒的在体治疗提供了理论依据。CRISPR/Cas系统广泛存在于细菌及古生菌中,

是机体长期进化中形成的RNA指导的适应性免疫系统, 用于降解入侵病毒或噬菌体DNA。2012年, Jinek等<sup>[7]</sup>首先利用CRISPR/Cas9系统对外源DNA靶序列进行了精确修饰, 开辟了RNA介导的基因编辑时代。目前, CRISPR/Cas9系统已被广泛应用于细胞及动物的基因编辑, 包括人细胞、小鼠、大鼠、斑马鱼及食蟹猴等。Qi等<sup>[9]</sup>将CRISPR/Cas9改造为CRISPRi体系, CRISPRi通过干扰DNA的转录实现对靶分子的表达抑制。Gilbert等<sup>[16]</sup>研究发现, CRISPRi可分别有效抑制人类细胞系及酵母靶分子的表达5-15倍及50倍。此外, Gilbert等还发现CRISPRi在高效抑制靶分子表达的同时, 脱靶率极低; 由于CRISPRi作用于DNA水平, CRISPRi可应用于非编码RNA、核定位的RNA、转录物的反义序列以及聚合酶III转录

### ■名词解释

CRISPRi: 天然CRISPR相关基因9(CRISPR-associated gene 9, Cas9)含有2种核酸酶结构域, RuvC1结构域及HNH结构域, HNH结构域切割与crRNA互补的模板链, RuvC1结构域切割非互补链。将Cas9的核酸内切酶结构域突变(RuvC1, D10A; HNH, H841A)产生dCas9, 仅保留DNA识别能力而无内切酶活性, 当dCas9与sgRNA共表达时, 形成识别特定位置的复合物, 该复合物可以特异性的干扰RNA聚合酶或者转录因子与DNA序列的结合, 有效抑制靶分子的表达, 将此过程称为CRISPRi。

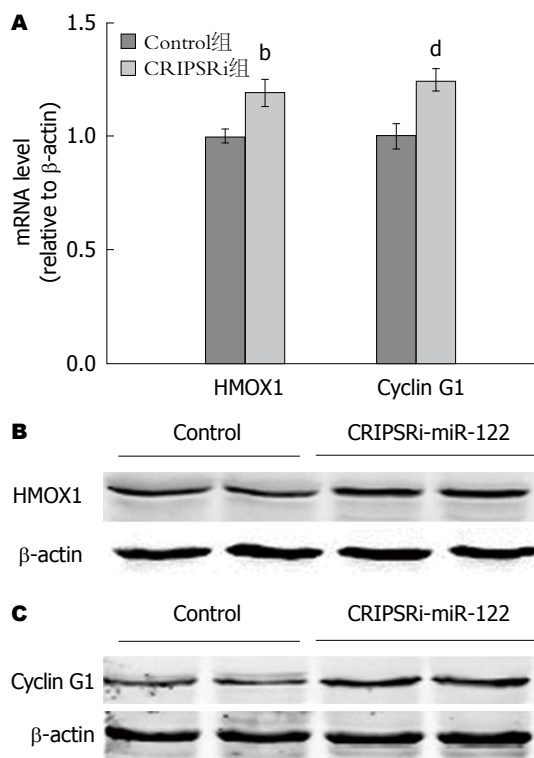


图3 在体CRISPRi上调肝脏miR-122靶分子HMOX1和Cyclin G1表达。A: CRISPRi显著上调肝脏miR-122靶分子HMOX1和Cyclin G1 mRNA水平; B: Western blot结果显示CRISPRi上调肝脏HMOX1蛋白表达; C: Western blot结果显示CRISPRi上调肝脏Cyclin G1蛋白表达。<sup>b</sup> $P<0.01$  vs HMOX1对照组; <sup>d</sup> $P<0.01$  vs Cyclin G1对照组。CRISPRi: CRISPR干扰。

产物<sup>[16]</sup>。RNAi是作用于RNA水平的基因转录抑制的方法<sup>[17]</sup>。RNAi和CRISPRi在许多研究中成为互补的研究方法, 然而CRISPRi更具有潜在的优势。锁核酸标记的miravirsin(SPC3469)作为新的抗HCV宿主靶向药物, 他具有较高的基因屏障、泛基因型的抗病毒活性, 将应用于丙型肝炎临床治疗。但是, 相对于锁核酸标记的寡核苷酸成本高、易降解的特点, 利用CRISPRi具有其自身的优势: 成本低、易操作、高效。本研究组前期利用CRISPRi实现了HepG2细胞内miR-122的特异性表达抑制。Yin等<sup>[10]</sup>利用CRISPR/Cas9系统实现了在体基因编辑, 该研究将CRISPR/Cas9系统各个组分经尾静脉流体力学注射到小鼠体内, 最终约1/250的肝细胞表达了野生型Fah蛋白, Fah阳性肝细胞恢复或者延缓了小鼠体质量的下降。Xue等<sup>[11]</sup>利用CRISPR/Cas9系统对野生型小鼠进行在体基因编辑进而产生癌症模型, 将表达Cas9的质粒以及靶向肿瘤抑制因子Pten的sgRNA(sgPten)注射到小鼠, 注射2 wk后, 检

测到肝脏Pten阴性细胞; 注射4 mo后, 肝细胞内出现明显的脂质积累, 以及AKT磷酸化水平提高, 这与Cre-Loxp系统产生的Pten基因敲除小鼠模型类似; 而同时靶向Pten和P53的sgRNA(sgPten和sgP53)诱导的肝脏肿瘤与Cre-Loxp系统介导的Pten和P53基因敲除表型类似; 肝脏和肿瘤组织的DNA测序结果显示, 肿瘤抑制基因Pten和P53存在插入和缺失突变, 同时包括肿瘤中Pten和P53的双等位基因突变。Xue等<sup>[11]</sup>还探索了CRISPR/Cas9系统直接介导在体获得性功能突变, 将Cas9质粒与靶向Ctnnb1(编码β-catenin)的sgRNA以及200bp的单链DNA(含4个点突变, 突变后的β-catenin将更加稳定, 并且定位于细胞核)供体共同注射野生型小鼠, 注射后7 d, 部分肝细胞出现核定位表达的β-catenin<sup>[11]</sup>。结合CRISPR/Cas9系统在体基因编辑功能以及前期研究基础, 我们探索发现CRISPRi可在体抑制肝脏miR-122表达, 同时, miR-122下游靶分子HMOX1和Cyclin G1均表达升高, 这为CRISPRi应用于抗HCV病毒的在体治疗提供了全新的策略。

## 4 参考文献

- Poordad F, McCone J, Bacon BR, Bruno S, Manns MP, Sulkowski MS, Jacobson IM, Reddy KR, Goodman ZD, Boparai N, DiNubile MJ, Sniukiene V, Brass CA, Albrecht JK, Bronowicki JP. Boceprevir for untreated chronic HCV genotype 1 infection. *N Engl J Med* 2011; 364: 1195-1206 [PMID: 21449783 DOI: 10.1056/NEJMoa1010494]
- Sherman KE, Flamm SL, Afdhal NH, Nelson DR, Sulkowski MS, Everson GT, Fried MW, Adler M, Reesink HW, Martin M, Sankoh AJ, Adda N, Kauffman RS, George S, Wright CI, Poordad F. Response-guided telaprevir combination treatment for hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2011; 365: 1014-1024 [PMID: 21916639 DOI: 10.1056/NEJMoa1014463]
- Bandiera S, Pfeffer S, Baumert TF, Zeisel MB. miR-122--a key factor and therapeutic target in liver disease. *J Hepatol* 2015; 62: 448-457 [PMID: 25308172 DOI: 10.1016/j.jhep.2014.10.004]
- Henke JL, Goergen D, Zheng J, Song Y, Schüttler CG, Fehr C, Jünemann C, Niepmann M. microRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA. *EMBO J* 2008; 27: 3300-3310 [PMID: 19020517 DOI: 10.1038/emboj.2008.244]
- Jopling CL, Yi M, Lancaster AM, Lemon SM, Sarnow P. Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science* 2005; 309: 1577-1581 [PMID: 16141076]
- Machlin ES, Sarnow P, Sagan SM. Masking the 5' terminal nucleotides of the hepatitis C virus genome by an unconventional microRNA-target



- RNA complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108: 3193-3198 [PMID: 21220300 DOI: 10.1073/pnas.1012464108]
- 7 Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 2012; 337: 816-821 [PMID: 22745249 DOI: 10.1126/science.1225829]
  - 8 Doudna JA, Charpentier E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* 2014; 346: 1258096 [PMID: 25430774 DOI: 10.1126/science.1258096]
  - 9 Qi LS, Larson MH, Gilbert LA, Doudna JA, Weissman JS, Arkin AP, Lim WA. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell* 2013; 152: 1173-1183 [PMID: 23452860 DOI: 10.1016/j.cell.2013.02.022]
  - 10 Yin H, Xue W, Chen S, Bogorad RL, Benedetti E, Grompe M, Koteliensky V, Sharp PA, Jacks T, Anderson DG. Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype. *Nat Biotechnol* 2014; 32: 551-553 [PMID: 24681508 DOI: 10.1038/nbt.2884]
  - 11 Xue W, Chen S, Yin H, Tammela T, Papagiannakopoulos T, Joshi NS, Cai W, Yang G, Bronson R, Crowley DG, Zhang F, Anderson DG, Sharp PA, Jacks T. CRISPR-mediated direct mutation of cancer genes in the mouse liver. *Nature* 2014; 514: 380-384 [PMID: 25119044 DOI: 10.1038/nature13589]
  - 12 Shi R, Chiang VL. Facile means for quantifying microRNA expression by real-time PCR. *Biotechniques* 2005; 39: 519-525 [PMID: 16235564]
  - 13 Carlsbecker A, Lee JY, Roberts CJ, Dettmer J, Lehesranta S, Zhou J, Lindgren O, Moreno-Risueno MA, Vatén A, Thitamadee S, Campilho A, Sebastian J, Bowman JL, Helariutta Y, Benfey PN. Cell signalling by microRNA165/6 directs gene dose-dependent root cell fate. *Nature* 2010; 465: 316-321 [PMID: 20410882 DOI: 10.1038/nature08977]
  - 14 Shan Y, Zheng J, Lambrecht RW, Bonkovsky HL. Reciprocal effects of micro-RNA-122 on expression of heme oxygenase-1 and hepatitis C virus genes in human hepatocytes. *Gastroenterology* 2007; 133: 1166-1174 [PMID: 17919492]
  - 15 Hou W, Bukong TN, Kodys K, Szabo G. Alcohol facilitates HCV RNA replication via up-regulation of miR-122 expression and inhibition of cyclin G1 in human hepatoma cells. *Alcohol Clin Exp Res* 2013; 37: 599-608 [PMID: 23126531 DOI: 10.1111/acer.12005]
  - 16 Gilbert LA, Larson MH, Morsut L, Liu Z, Brar GA, Torres SE, Stern-Ginossar N, Brandman O, Whitehead EH, Doudna JA, Lim WA, Weissman JS, Qi LS. CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell* 2013; 154: 442-451 [PMID: 23849981 DOI: 10.1016/j.cell.2013.06.044]
  - 17 Fellmann C, Zuber J, McJunkin K, Chang K, Malone CD, Dickins RA, Xu Q, Hengartner MO, Elledge SJ, Hannon GJ, Lowe SW. Functional identification of optimized RNAi triggers using a massively parallel sensor assay. *Mol Cell* 2011; 41: 733-746 [PMID: 21353615 DOI: 10.1016/j.molcel.2011.02.008]

#### 同行评价

本文选题较新, 设计合理, 实验方法先进, 结果有新意, 对于丙型肝炎的抗病毒治疗在理论和实践上均有参考价值。论文内容虽是临床医生较为生疏的基础实验室工作, 但结合临床, 文字表述较为清晰。

编辑: 于明茜 电编: 都珍珍



## Ntcp在胆管癌大鼠胆管肿瘤组织中的表达状况

王洁萍, 张孟瑜, 李波, 夏先明

### 背景资料

胆管癌的发生发展过程非常繁杂, 目前临床上现有的手术及非手术治疗手段有限, 且效果欠佳。

王洁萍, 四川省泸州医学院附属医院康复科 四川省泸州市 646000

张孟瑜, 李波, 夏先明, 四川省泸州医学院附属医院肝胆外科 四川省泸州市 646000

王洁萍, 硕士, 主要从事腹部疾病康复研究。

四川泸州医学院附属医院课题资助项目, No. 12284

作者贡献分布: 本课题由张孟瑜与夏先明设计; 研究过程和论文写作由王洁萍完成; 数据分析由张孟瑜完成; 试剂由李波提供。

通讯作者: 夏先明, 教授, 646000, 泸州市江阳区太平街25号, 泸州医学院附属医院肝胆外科. xxm6206@126.com

收稿日期: 2015-08-24 修回日期: 2015-09-17

接受日期: 2015-09-25 在线出版日期: 2015-10-18

### Ntcp expression in bile duct cancer tissues in rats

Jie-Ping Wang, Meng-Yu Zhang, Bo Li, Xian-Ming Xia

Jie-Ping Wang, Department of Rehabilitation, the Affiliated Hospital of Luzhou Medical College of Sichuan Province, Luzhou 646000, Sichuan Province, China

Meng-Yu Zhang, Bo Li, Xian-Ming Xia, Department of Hepatobiliary Surgery, the Affiliated Hospital of Luzhou Medical College of Sichuan Province, Luzhou 646000, Sichuan Province, China

Supported by: Project of the Affiliated Hospital of Luzhou Medical College of Sichuan Province, No. 12284

Correspondence to: Xian-Ming Xia, Professor, Department of Hepatobiliary Surgery, the Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, 25 Taiping Street, Jiangyang District, Luzhou 646000, Sichuan Province, China. xxm6206@126.com

Received: 2015-08-24 Revised: 2015-09-17

Accepted: 2015-09-25 Published online: 2015-10-18

### Abstract

**AIM:** To develop a rat model of bile duct cancer and detect sodium/taurocholate cotransporting polypeptide (Ntcp) expression in bile duct cancer tissues of this model, in order to provide a new method for the prevention and treatment of bile duct cancer.

**METHODS:** Seventy Wistar rats were randomly divided into either a control group or an experimental group, with 35 rats in each group. The control group was fed an ordinary diet, and the experimental group was fed a 3'-Me-DAB diet. After 20 wk, the bile duct cancer model was successfully established. Bile duct tissues were taken from rats of the control group and bile duct cancer tissues were taken from rats of the experimental group to detect the mRNA expression of Ntcp by real-time quantitative PCR (qRT-PCR), and protein expression by immunohistochemistry.

**RESULTS:** qRT-PCR analysis showed that in the bile duct tissues the Ntcp/GAPDH ratio was 12, but in the bile duct cancer tissues it was 39, which had an obvious difference. Immunohistochemistry showed that in the experimental group, the positive expression rate of Ntcp was 69.2%, significantly higher than 15.3% in the control group ( $\chi^2 = 10.28$ ,  $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** The expression of the Ntcp gene increases significantly in rats with bile duct cancer, which suggests that drugs targeting Ntcp may be a new therapeutic strategy for bile duct cancer.

© 2015 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

**Key Words:** Ntcp gene; Bile duct cancer; 3'-Me-DAB

Wang JP, Zhang MY, Li B, Xia XM. Ntcp expression in bile duct cancer tissues in rats. Shijie Huaren Xiaohua

### 同行评议者

刘金钢, 教授, 博士生导师, 中国医科大学附属盛京医院外科

Zazhi 2015; 23(29): 4694-4699 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/23/4694.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v23.i29.4694>

23(29): 4694-4699 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/23/4694.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v23.i29.4694>

## 摘要

**目的:** 本研究通过建立胆管癌大鼠模型, 以牛黄胆酸钠转运蛋白(sodium/taurocholate cotransporting polypeptide, Ntcp)为研究对象, 初步探讨Ntcp在胆管癌大鼠胆管肿瘤组织中的表达状况, 以期治疗胆管癌找到新的手段和方法。

**方法:** Wistar大鼠(♂、体质量160 g±8 g)70只, 随机分为2组, 每组35只。普通饮食对照组(简称对照组)予以普通饮食、3'-甲基-4-二甲基氨基偶氮苯(3'-Me-DAB)饮食实验组(简称实验组)予以含3'-Me-DAB饮食。经过20 wk, 建立胆管癌大鼠模型, 取对照组胆管组织和实验组胆管肿瘤组织: (1)实时定量PCR(real-time quantitative PCR, qRT-PCR)检测胆管组织和胆管肿瘤组织的Ntcp基因表达的强度; (2)石蜡切片后用免疫组织化学SP(streptavidin-peroxidase)法检测胆管组织和胆管肿瘤组织的Ntcp蛋白表达的强度。

**结果:** qRT-PCR结果显示: Ntcp/GAPDH比率在对照组胆管组织中为12、在实验组胆管肿瘤组织中为39, 2组间的表达产生了统计学差异; 免疫组织化学SP法结果显示, 对照组胆管组织Ntcp基因表达阳性率为15.3%, 实验组胆管肿瘤组织Ntcp基因表达阳性率为69.2%( $P<0.05$ )。

**结论:** 实验组大鼠胆管肿瘤组织的Ntcp基因的表达较对照组胆管组织增多, 提示我们在胆管癌的治疗中, Ntcp有成为新的治疗靶点的可能。

© 2015年版权归百世登出版集团有限公司所有。

**关键词:** Ntcp基因; 胆管癌; 3'-甲基-4-二甲基氨基偶氮苯

**核心提示:** 建立胆管癌大鼠模型, 以牛黄胆酸钠转运蛋白(sodium/taurocholate cotransporting polypeptide, Ntcp)为研究对象, 初步探讨Ntcp基因在胆管癌大鼠中的表达状况, 以期治疗胆管癌的找到新的手段和方法。

王洁萍, 张孟瑜, 李波, 夏先明. Ntcp在胆管癌大鼠胆管肿瘤组织中的表达状况. 世界华人消化杂志 2015;

## 0 引言

胆管癌是肝胆系统疾病中常见的恶性肿瘤之一, 治疗困难, 研究资料显示, 其发病率在近年有逐年升高的表现, 但目前各种治疗方法和手段想要达到良好的效果仍然存在较大的难度。胆管癌现阶段的治疗方法是首选手术切除, 但手术有适应症和禁忌症, 首先手术切除率处于一个较低的范围, 其次术后5年生存率也不高, 对合并身体多器官功能障碍, 肿瘤已发生浸润或转移者, 则失去了手术的条件, 但射频消融、介入栓塞等非手术治疗方法效果有限<sup>[1-3]</sup>。那么, 是否能寻求更为有效的方法呢? 而基因治疗是目前尚未广泛应用又极具前景的治疗方式, 所以, 我们尝试从相关基因入手, 牛黄胆酸钠转运蛋白(sodium/taurocholate cotransporting polypeptide, Ntcp)基因与胆汁酸的重吸收有关, 而胆汁酸如果重吸收增多出现淤积, 则可能形成结石, 进而可能导致胆管组织的恶变, 那么其在胆管癌组织中有无表达、表达情况又如何目前尚无明确的研究。因此, 本项目拟以Ntcp为研究对象, 研究在胆管癌大鼠胆管肿瘤细胞中Ntcp基因表达的状况, 尝试为胆管癌治疗提供新的思路。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 健康成年♂ Wistar大鼠70只, 体质量160 g±8 g, 由泸州医学院动物实验中心提供。实时定量PCR检测(real-time quantitative PCR, qRT-PCR)定量试剂盒(购自上海索莱宝生物科技有限公司, SR1100); Ntcp单克隆抗体等(购自CHEMICON公司, 美国); 免疫组织化学试剂盒(购自CHEMICON公司, 美国, XL2001)。ABI7500实时荧光定量PCR仪(ABI7500), 冰冻切片器(CM1950), HFsafe生物安全柜(1200A2), 显微摄像系统(PM-10A)等。

### 1.2 方法

**1.2.1 胆管癌大鼠模型制备:** ♂ Wistar大鼠随机分为2组, 每组35只: 普通饮食对照组(简称对照组)予以普通饮食、3'-甲基-4-二甲基氨基偶氮苯(3'-Me-DAB)饮食实验组(简称实验组)予以含3'-Me-DAB饮食。实验组饲以含3'-Me-DAB

## ■ 研究前沿

目前研究的热点和重点为新型的治疗胆管癌的方法和药物, 而基因治疗目前尚未广泛应用于临床, 但又极具治疗前景, 所以尝试从相关基因入手, 为胆管癌治疗提供新的思路。



#### 创新盘点

本文从胆管癌相关基因牛黄胆酸钠转运蛋白(sodium/taurocholate cotransporting polypeptide, *Ntcp*)入手,初步发现了*Ntcp*在胆管癌组织中的表达状况,为胆管癌治疗找寻新的方法。

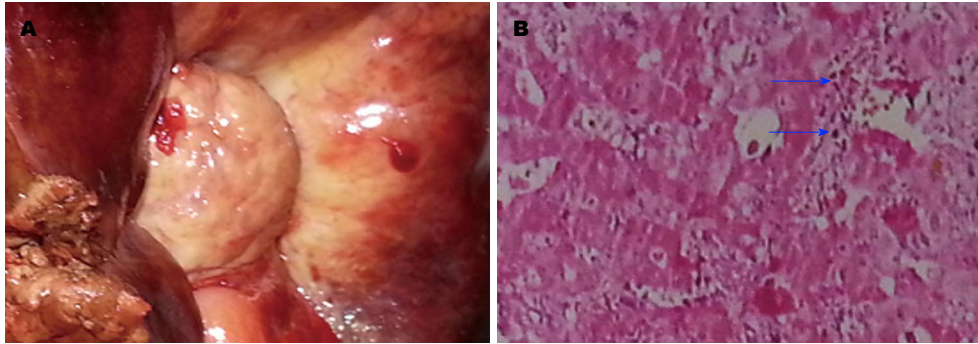


图1 病理检查证实胆管癌大鼠模型建立. A: 胆管癌组织的外观观察情况; B: 在胆管周围可见发生核分裂的肿瘤细胞( $\times 100$ , 蓝色箭头所指).

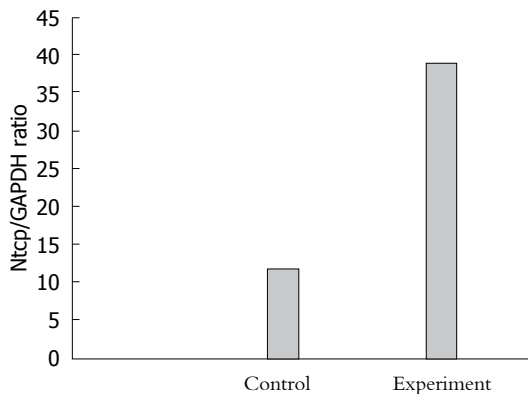


图2 qRT-PCR检测结果. qRT-PCR: 实时定量PCR检测。

饮食,连续20 wk后改为自由进食.对照组,自由饮水及进食.每天观察动物的精神状态、饮食状况及皮毛的变化等一般情况.于实验第8、16、20周,分别取出模型组动物各2、2、2只,剖腹观察胆管情况,记录胆管的形态质地等的变化,20 wk后经病理检查证实胆管癌大鼠模型建立成功。

**1.2.2 实验步骤:** 首先检测模型组及对照组胆管内胆汁酸各相关指标浓度.取对照组胆管组织和实验组胆管肿瘤组织:(1)qRT-PCR检测胆管组织和胆管肿瘤组织的*Ntcp*基因表达的强度.胆管组织和胆管肿瘤组织中RNA的提取参照TRIzol试剂说明书进行操作.序列扩增机器为ABI7500,以GAPDH为内参照.设计*Ntcp*的上游引物:5'-GATGGAGGTGCACAACGTAT-3',下游引物:3'-CTGTCTCAGTTCATGGCTCC-5';GAPDH的上游引物:5'-GATGGTGGGTATGGTTCAGAA-3',下游引物:3'-CTAGGAGCCAGGGCAGTAATC-5';(2)石蜡切片后用免疫组织化学SP(streptavidin-peroxidase)法检测

胆管组织和胆管肿瘤组织的*Ntcp*蛋白表达的强度。

**1.2.3 观察指标:** *Ntcp*在正常胆管组织及胆管肿瘤组织中表达情况。

**统计学处理** 采用SPSS19.0统计软件进行分析,统计学方法测得数据用mean $\pm$ SD表示,判断组间差异采用*t*检验及 $\chi^2$ 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

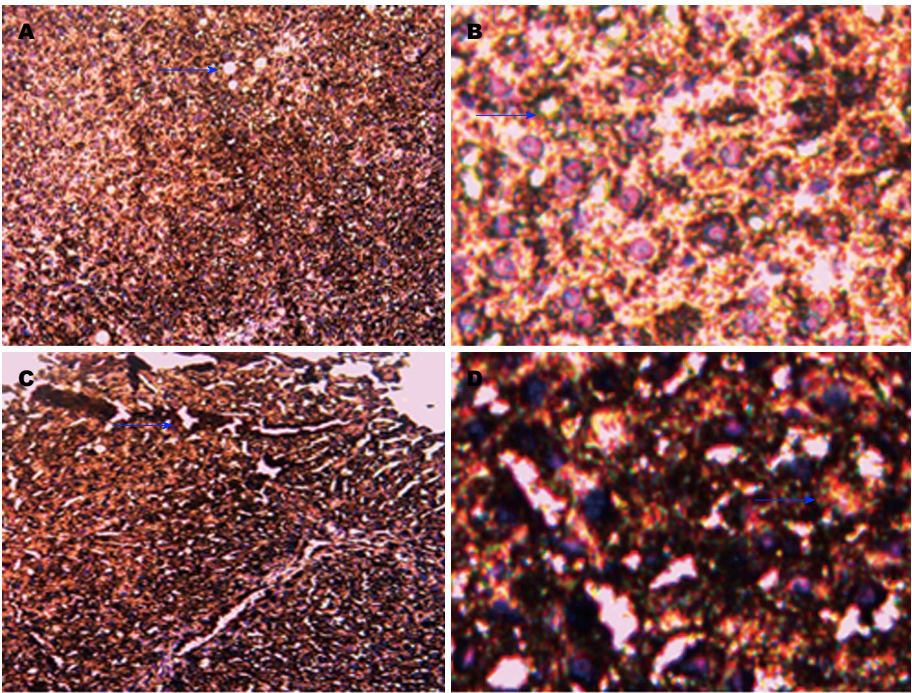
## 2 结果

实验组大鼠自第6周开始,进食量逐步开始下降,部分体质量与对照组相比明显偏低,喂食至20 wk后死亡3只.对照组大鼠饮食及生长较好,未出现死亡病例.在第8、16、20周剖腹观察过程中发现大鼠肝门部胆管逐渐增厚、变硬、至20 wk时,出现质硬包块.20 wk后经病理检查证实已建立胆管癌大鼠模型,除去死亡大鼠及建模过程中剖腹观察大鼠,模型建立成功率为92.6%,病理类型均为腺癌,未建模成功大鼠经镜下观察其部分胆管细胞也已成异形性改变.实验组大鼠胆管肿瘤组织主要集中在肝门部及右肝部分组织(图1)。

20 wk后处死所有大鼠,同时,提取建模成功大鼠胆管内胆汁及对照组大鼠胆管内胆汁,用自动生化仪检测与胆汁相关各项指标(表1)。

**2.1 qRT-PCR检测结果** 使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表达*Ntcp*扩增情况.所得结果如图2.经过8个循环后,使用*t*检验对组间差异进行分析,所得结果显示差异具有统计学意义( $t=2.318$ , $P<0.05$ )。

**2.2 免疫组织化学SP法染色结果** 光学高倍(100倍及200倍)物镜下:胆管组织和胆管肿瘤组织中*Ntcp*蛋白出现黄色染色颗粒为阳性细胞(蓝色箭头所指).每张切片随机选取6个视野,每



**应用要点**  
通过初步发现 Ntcp在胆管癌大鼠胆管组织中的表达状况, 为进一步寻找作用于 Ntcp基因的药物治疗打下基础, 从而改善胆管癌治疗的方法和措施。

图 3 免疫组织化学SP法染色结果. A, B: Ntcp蛋白实验组(A: ×100; B: ×200); C, D: Ntcp蛋白对照组(C: ×100; D: ×200). 箭头所指即为Ntcp蛋白。

表 1 胆管内胆汁相关指标检测结果 (n = 35)		
胆汁相关指标	对照组	实验组
TC(mmol/L)	2.32 ± 0.16	5.97 ± 0.18 <sup>a</sup>
TBA(μmol/L)	1.83 ± 0.05	4.65 ± 0.10 <sup>a</sup>
TBIL(μmol/L)	3.85 ± 0.07	3.92 ± 0.06
DBIL(μmol/L)	0.58 ± 0.02	1.53 ± 0.03 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>*P* < 0.05 vs 对照组. TC: 胆固醇; TBA: 总胆汁酸; TBIL: 总胆红素; DBIL: 直接胆红素。

个视野内观察80个细胞, 阳性细胞 ≥ 10% 为阳性, 否则为阴性。χ<sup>2</sup>检验显示: 实验组胆管肿瘤组织Ntcp蛋白表达阳性率为69.2%, 对照组胆管组织Ntcp蛋白表达阳性率为15.3%(χ<sup>2</sup> = 10.28, *P* < 0.05)(图3)。

### 3 讨论

胆管癌是胆道系统常见的恶性肿瘤之一, 目前其发病机制尚不完全清楚, 现认为其发病是各种因素综合作用的结果, 影响状况和条件较多。由于导致胆管癌产生的综合因素较多, 所以目前的治疗有各种困难存在<sup>[4-6]</sup>。就现阶段的治疗方法来讲, 早期的胆管癌可以行根治性的手术切除, 而一旦肿瘤发生浸润或转移, 手术则不能再作为首选的治疗手段, 而各种非手

术治疗方法效果有限, 即便是经过了上述的治疗, 胆管癌的复发率也较高, 其治疗方法有待发展和提高。所以, 我们反复思考, 能不能找到一种行之有效的办法。就目前而言, 基因治疗是一种尚未广泛应用于临床但又极具前景的治疗方案, 可能使胆管癌的治疗产生重大的变化, Ntcp基因与胆汁酸重吸收关系密切, 而胆汁酸如果重吸收增多出现淤积, 则可能形成结石, 进而导致胆管组织的恶变。因此, Ntcp基因进入了我们的思考范围并引导我们设计了上述对比试验, 以期能发现一些与胆管癌相关的变化<sup>[7-9]</sup>。

Ntcp是一种具有胆酸转运功能的多肽类物质, 在胆汁酸重吸收过程中, 其具备重要作用<sup>[10-12]</sup>。胆汁酸经过分泌进入肠道后, 结合胆汁酸在回肠通过小肠刷状缘钠盐依赖的胆汁酸转运体(apical sodium-dependent bile acid transport, ASBT), 胆汁酸结合蛋白和基侧膜的终末腔面钠盐依赖的胆汁酸转运体(terminal apical sodium-dependent bile acid transporter, tASBT)依次作为介质, 其中约80%的胆汁酸在Ntcp协助下被摄入肝细胞内并再次被分泌到胆汁中形成胆汁酸的肠肝循环<sup>[13-15]</sup>。而如果Ntcp功能紊乱导致胆汁酸重吸收出现紊乱, 则可能出现肝内胆汁淤积, 而由



## ■名词解释

Ntcp: 对胆汁酸盐浓度稳定的维持和胆汁酸盐的肠肝循环中胆汁酸重吸收等生理功能具有重要作用。

于胆汁淤积, 则可能出现胆固醇、胆色素等在胆管的沉积, 从而形成结石, 而胆管结石的长期存在, 反复刺激胆管及胆管周围组织产生炎症, 继而可引起胆管细胞的恶变; 而胆管结石正是我们目前了解的可能产生胆管癌的原因之一。因此, *Ntcp*基因的表达和变化情况是我们所关注的重点<sup>[16,17]</sup>。

我们在设计的试验中观察发现, 通过20 wk时间含3'-Me-DAB饮食的喂养, 模型组大鼠的饮食量及体质量均较对照组逐步降低, 除去死亡大鼠及建模过程中剖腹观察大鼠, 胆管癌大鼠模型建立成功率为92.6%, 病理类型均为腺癌, 大部分呈浸润性生长表现, 而其中1只大鼠出现了外生性生长的情况, 未建模成功大鼠经镜下观察其部分胆管细胞也已出现了异形性改变。肿瘤组织主要集中在肝门部, 约8%大鼠右肝部分组织也出现了肿瘤。除去死亡大鼠及建模过程中剖腹观察大鼠, 96.2%大鼠在胆管内发现了泥沙样结石。当建立模型成功后, 在试验中首先检测建模成功大鼠胆管内胆汁及对照组大鼠胆管内胆汁各相关指标, 发现总胆固醇(total cholesterol, TC)、血清总胆汁酸(total bile acids, TBA)、直接胆红素(direct bilirubin, DBIL)等指标在模型组中较对照组升高, 通过使用qRT-PCR对*Ntcp*基因表达进行检测、发现在模型组胆管肿瘤组织中*Ntcp*基因相对表达率约为对照组胆管组织中*Ntcp*基因相对表达率的3.25倍; 免疫组织化学对*Ntcp*蛋白表达进行检测, 发现在模型组胆管肿瘤组织中*Ntcp*蛋白阳性表达率约为对照组胆管组织中*Ntcp*蛋白阳性表达率的4.52倍。从而证实胆管癌大鼠的胆管肿瘤组织中*Ntcp*基因出现了明显变化的情况, 表达升高显著, 较对照组有明显的增多; 说明在胆管癌的胆管肿瘤组织中胆汁酸的重吸收开始紊乱, 随着*Ntcp*基因表达的增加, 胆汁酸重吸收出现了显而易见的增强<sup>[18,19]</sup>; 由此我们初步考虑正常生理状态时如果胆汁酸增加, 则会伴随*Ntcp*基因表达减弱, 从而加快胆汁酸的排泄, 降低胆管内胆汁酸的浓度, 避免过高浓度胆汁酸对胆管细胞及肝细胞的损害; 而胆管癌时则出现了胆汁酸的代谢障碍, 随着*Ntcp*基因表达的增强, 大量胆汁酸重吸收进入肝内, 胆固醇和胆色素的沉积刺激胆管上皮细胞, 出现胆管炎及胆管周围炎, 胆管细胞反复出现破坏及增生, 进一步可能导致

胆管细胞发生恶变。那么, 既然已经发现在胆管癌胆管肿瘤组织中*Ntcp*基因表达增强, 其是否会体现出新的治疗意义? 我们会在此实验模型基础上继续进行*Ntcp*基因敲除, 药物干预等实验, 了解进一步的变化情况。在目前所用治疗胆管癌的药物首先非常稀少, 其次普遍存在不同种类的问题, 可能无法完全达到治疗目的、需长期服用、胃肠道反应大, 患者可持续接受性差等缺点, 上述情况阻碍了其作为临床治疗药物的广泛应用, 但目前尚无可直接作用于胆管癌相关基因又可产生较好疗效在临床广泛应用的药物。在此, *Ntcp*基因表达变化的发现, 可能为基础研究和临床治疗胆管癌提供新的药物治疗靶点<sup>[20]</sup>, 找到一种新的治疗方向。

## 4 参考文献

- 1 Park JI. Primary hepatic tuberculosis mimicking intrahepatic cholangiocarcinoma: report of two cases. *Ann Surg Treat Res* 2015; 89: 98-101 [PMID: 26236700 DOI: 10.4174/astr.2015.89.2.98]
- 2 Cheng CT, Chu YY, Yeh CN, Huang SC, Chen MH, Wang SY, Tsai CY, Chiang KC, Chen YY, Ma MC, Liu CT, Chen TW, Yeh TS. Peritumoral SPARC expression and patient outcome with resectable intrahepatic cholangiocarcinoma. *Oncotargets Ther* 2015; 8: 1899-1907 [PMID: 26251613 DOI: 10.2147/OTT.S78728]
- 3 Schmeding M, Neumann UP. Liver Transplant for Cholangiocarcinoma: A Comeback? *Exp Clin Transplant* 2015; 13: 301-308 [PMID: 26295179]
- 4 Ruzzenente A, Conci S, Valdegamberi A, Pedrazzani C, Guglielmi A. Role of surgery in the treatment of intrahepatic cholangiocarcinoma. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2015; 19: 2892-2900 [PMID: 26241545]
- 5 Ignjatović II, Matić SV, Dugalić VD, Knežević DM, Micev MT, Marko D Bogdanović SM. A Case of Autoimmune Cholangitis Misdiagnosed for Cholangiocarcinoma: How to Avoid Unnecessary Surgical Intervention? *Srp Arh Celok Lek* 2015; 143: 337-340 [PMID: 26259410]
- 6 Ciresa M, De Gaetano AM, Pompili M, Saviano A, Infante A, Montagna M, Guerra A, Giuga M, Vellone M, Ardito F, De Rose A, Giulante F, Vecchio FM, Gasbarrini A, Bonomo L. Enhancement patterns of intrahepatic mass-forming cholangiocarcinoma at multiphasic computed tomography and magnetic resonance imaging and correlation with clinicopathologic features. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2015; 19: 2786-2797 [PMID: 26241531]
- 7 Veloso Alves Pereira I, Buchmann B, Sandmann L, Sprinzl K, Schlaphoff V, Döhner K, Vondran F, Sarrazin C, Manns MP, Pinto Marques Souza de Oliveira C, Sodeik B, Ciesek S, von Hahn T. Primary biliary acids inhibit hepatitis



- D virus (HDV) entry into human hepatoma cells expressing the sodium-taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP). *PLoS One* 2015; 10: e0117152 [PMID: 25646622 DOI: 10.1371/journal.pone.0117152]
- 8 Troeller A, Yan D, Marina O, Schulze D, Alber M, Parodi K, Belka C, Söhn M. Comparison and limitations of DVH-based NTCP models derived from 3D-CRT and IMRT data for prediction of gastrointestinal toxicities in prostate cancer patients by using propensity score matched pair analysis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2015; 91: 435-443 [PMID: 25636766 DOI: 10.1016/j.ijrobp.2014.09.046]
  - 9 Song P, Rockwell CE, Cui JY, Klaassen CD. Individual bile acids have differential effects on bile acid signaling in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 2015; 283: 57-64 [PMID: 25582706 DOI: 10.1016/j.taap.2014.12.005]
  - 10 Elinger S. HBV: Stowaway of NTCP. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2014; 38: 661-663 [PMID: 25178832 DOI: 10.1016/j.clinre.2014.07.009]
  - 11 Fattah S, Augustijns P, Annaert P. Age-dependent activity of the uptake transporters Ntcp and Oatp1b2 in male rat hepatocytes: from birth till adulthood. *Drug Metab Dispos* 2015; 43: 1-8 [PMID: 25305012 DOI: 10.1124/dmd.114.059212]
  - 12 Erlinger S. NTCP deficiency: a new inherited disease of bile acid transport. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2015; 39: 7-8 [PMID: 25193235 DOI: 10.1016/j.clinre.2014.07.011]
  - 13 Dong Z, Ekins S, Polli JE. Quantitative NTCP pharmacophore and lack of association between DILI and NTCP Inhibition. *Eur J Pharm Sci* 2014; 66C: 1-9 [PMID: 25220493 DOI: 10.1016/j.ejps.2014.09.005]
  - 14 Fu LL, Liu J, Chen Y, Wang FT, Wen X, Liu HQ, Wang MY, Ouyang L, Huang J, Bao JK, Wei YQ. In silico analysis and experimental validation of azelastine hydrochloride (N4) targeting sodium taurocholate co-transporting polypeptide (NTCP) in HBV therapy. *Cell Prolif* 2014; 47: 326-335 [PMID: 24965018 DOI: 10.1111/cpr.12117]
  - 15 Zhang G, Zhou Y, Rao Z, Qin H, Wei Y, Ren J, Zhou L, Wu X. Effect of Yin-Zhi-Huang on up-regulation of Oatp2, Ntcp, and Mrp2 proteins in estrogen-induced rat cholestasis. *Pharm Biol* 2015; 53: 319-325 [PMID: 25420584 DOI: 10.3109/13880209.2014.918156]
  - 16 Romero MR, Monte MJ, Marin JJ. Pathophysiological and pharmacological implications of elucidating the molecular bases of the interaction between HBV and the bile acid transporter NTCP. *Ann Hepatol* 2015; 14: 143-144 [PMID: 25536655]
  - 17 Benadjaoud MA, Blanchard P, Schwartz B, Champoudry J, Bouaita R, Lefkopoulos D, Deutsch E, Diallo I, Cardot H, de Vathaire F. Functional data analysis in NTCP modeling: a new method to explore the radiation dose-volume effects. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2014; 90: 654-663 [PMID: 25304951 DOI: 10.1016/j.ijrobp.2014.07.008]
  - 18 Vojtíšek R, Mužík J, Slampa P, Budíková M, Hejsek J, Smolák P, Ferda J, Fínek J. The impact of PET/CT scanning on the size of target volumes, radiation exposure of organs at risk, TCP and NTCP, in the radiotherapy planning of non-small cell lung cancer. *Rep Pract Oncol Radiother* 2014; 19: 182-190 [PMID: 24944819 DOI: 10.1016/j.rpor.2013.09.006]
  - 19 Tong S, Li J. Identification of NTCP as an HBV receptor: the beginning of the end or the end of the beginning? *Gastroenterology* 2014; 146: 902-905 [PMID: 24576732 DOI: 10.1053/j.gastro.2014.02.024]
  - 20 Wopken K, Bijl HP, van der Schaaf A, van der Laan HP, Chouvalova O, Steenbakkers RJ, Doornaert P, Slotman BJ, Oosting SF, Christianen ME, van der Laan BF, Roodenburg JL, Leemans CR, Verdonck-de Leeuw IM, Langendijk JA. Development of a multivariable normal tissue complication probability (NTCP) model for tube feeding dependence after curative radiotherapy/chemo-radiotherapy in head and neck cancer. *Radiother Oncol* 2014; 113: 95-101 [PMID: 25443500 DOI: 10.1016/j.radonc.2014.09.013]

# 同行评价

文章整体对临床研究有一定借鉴作用。

编辑: 于明茜 电编: 都珍珍



## DMBA对大鼠胰腺肿瘤发生的影响

任宇, 侯晓朴, 李丹, 李颖, 朱斌

### ■背景资料

胰腺癌是恶性程度高、预后差的肿瘤, 5年生存率极低, 因此对于胰腺癌及癌前病变的诊断是改善胰腺癌预后的关键, 为了实现胰腺癌早期诊断及治疗的目的, 建立一种理想的胰腺癌动物模型并找到合适的早期诊断方法是必要的。但本文未诱导胰腺癌, 只诱导平滑肌肉瘤。

任宇, 首都医科大学附属北京妇产医院乳腺外科 北京市 100006

侯晓朴, 首都医科大学附属北京地坛医院介入科 北京市 100015

李丹, 李颖, 朱斌, 首都医科大学附属北京世纪坛医院普通外科 北京大学第九临床医学院 北京市 100038

任宇, 硕士研究生, 主要从事胰腺疾病的研究。

铁道部科技研究开发课题基金资助项目, No. Z2011-013

作者贡献分布: 本研究由朱斌与任宇设计; 研究过程及实验操作由任宇、侯晓朴、李丹及李颖完成; 数据统计与分析由任宇与侯晓朴完成; 本论文写作由任宇与朱斌完成。

通讯作者: 朱斌, 教授, 主任医师, 100038, 北京市海淀区羊坊店铁医路10号, 首都医科大学附属北京世纪坛医院普通外科; 北京大学第九临床医学院, binbinzhu99@sohu.com

电话: 010-63926164

收稿日期: 2015-08-18 修回日期: 2015-09-07

接受日期: 2015-09-21 在线出版日期: 2015-10-18

### DMBA induces pancreatic tumorigenesis in rats

Yu Ren, Xiao-Pu Hou, Dan Li, Ying Li, Bin Zhu

Yu Ren, Department of Breast Surgery, Beijing Obstetrics and Gynecology Hospital, Capital Medical University, Beijing 100006, China

Xiao-Pu Hou, Department of Invasive Technology, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015, China

Dan Li, Ying Li, Bin Zhu, Department of General Surgery, Beijing Shijitan Hospital, Capital Medical University; Peking University Ninth School of Clinical Medicine, Beijing 100038, China

Supported by: Railway Ministry Science and Technology Research & Development Project, No. Z2011-013

Correspondence to: Bin Zhu, Professor, Chief Physician, Department of General Surgery, Beijing Shijitan Hospital, Capital Medical University; Peking University Ninth School of Clinical Medicine, 10 Tieyi Road, Yangfangdian Street, Haidian District, Beijing 100038, China. binbinzhu99@sohu.com

Received: 2015-08-18 Revised: 2015-09-07

Accepted: 2015-09-21 Published online: 2015-10-18

### Abstract

AIM: To explore the possibility of

pancreatic carcinogenesis induced by 7,12-dimethylbenzanthracene (DMBA) implantation in Sprague-Dawley (SD) rats.

**METHODS:** Eighty male SD rats were randomly divided into two groups: A and B. DMBA (4 mg/100 g body weight) was implanted into the parenchyma of the rat pancreas in group A ( $n = 70$ ), while no drugs were implanted into the parenchyma of the pancreas in group B ( $n = 10$ ). Rats were killed at 2, 4 and 6 mo after operation. The pancreatic tissue samples of rats were fixed in formalin for HE staining and immunohistochemical analysis.

**RESULTS:** The body weight of rats at 5 and 6 mo had significant differences between groups A and B ( $P = 0.00$ ). In group A, the incidence of leiomyosarcoma was 42.1% at 4 mo and 75% at 6 mo, and the rats were accompanied by cachexia, bloody ascites and metastasis. The incidence of leiomyosarcoma at 6 mo was higher than that at 4 mo ( $P = 0.037$ ). No pancreatic ductal cell carcinoma occurred.

**CONCLUSION:** DMBA (4 mg/100 g body weight) implantation into the parenchyma of the pancreas of SD rats induces the development of pancreatic leiomyosarcoma, and the incidence of leiomyosarcoma at 6 mo is higher than that at 4 mo. DMBA implantation does not induce pancreatic ductal cell carcinoma.

© 2015 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: Pancreatic tumor; Leiomyosarcoma;

### ■同行评议者

陈洪, 医学博士, 主任医师, 副教授, 硕士研究生导师, 东南大学附属中大医院消化科; 陈光, 教授, 吉林大学第一医院消化器官外科

## DMBA; Animal model

Ren Y, Hou XP, Li D, Li Y, Zhu B. DMBA induces pancreatic tumorigenesis in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2015; 23(29): 4700-4705 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/23/4700.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v23.i29.4700>

## 摘要

**目的:** 探讨7,12-二甲基苯并蒽(7,12-dimethylbenzanthracene, DMBA)对大鼠胰腺肿瘤发生的影响。

**方法:** 80只♂SD大鼠随机分成两组: A组(实验组)70只, 将DMBA按4 mg/100 g体重置入胰腺; B组(对照组)10只, 仅行胰腺被膜的切开, 不置入任何药物。2组分别在手术后每月观察体重变化; 并于手术后2、4、6 mo后取胰腺行病理组织学检查。

**结果:** A组大鼠术后5 mo及6 mo体重较B组明显下降。大鼠术后4 mo平滑肌肉瘤发生率为42.1%(8/19), 6 mo为75%(15/20), 6 mo大鼠肉瘤发生率高于4 mo大鼠肉瘤发生率( $P = 0.037$ ); 并伴有恶液质、血性腹水及腹腔胰腺外肿瘤, 但无胰腺导管细胞癌发生。

**结论:** 采用DMBA置入SD大鼠胰腺内的方法建立胰腺癌动物模型, 出现体重增长曲线下下降趋势, 病理学诊断显示为急、慢性胰腺炎、平滑肌肉瘤及肿瘤浸润食管、胃及肠道等脏器, 无胰腺上皮内瘤变和胰腺癌的出现。

© 2015年版权归百世登出版集团有限公司所有。

**关键词:** 胰腺肿瘤; 平滑肌肉瘤; DMBA; 动物模型

**核心提示:** 采用中等剂量7,12-二甲基苯并蒽(7,12-dimethylbenzanthracene)(4 mg/100 g体重)置入SD大鼠可诱导大鼠胰腺平滑肌肉瘤发生, 且平滑肌肉瘤发生率随诱导时间延长而增高, 易产生血性腹水及胃、肠等脏器受累, 但无胰腺导管细胞癌发生, 原因有待进一步研究。

任宇, 侯晓朴, 李丹, 李颖, 朱斌. DMBA对大鼠胰腺肿瘤发生的影响. *世界华人消化杂志* 2015; 23(29): 4700-4705 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/23/4700.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v23.i29.4700>

## 0 引言

胰腺肿瘤是源发于胰腺的恶性肿瘤, 特别是胰

腺癌, 恶性程度极高、容易发生转移且预后较差的肿瘤, 5年生存率低于5%, 其发病率和死亡率比约为1:0.99。据统计, 2012年美国新增胰腺癌患者45220例, 其中男性22740例, 女性22480例, 为癌症致死第4位<sup>[1]</sup>。近年来国内外学者对于胰腺癌前病变及早期癌的诊断做了大量研究, 取得了一些进展, 但总体仍没有取得实质性突破。因此急需建立合适的胰腺癌实验动物模型来深入探讨胰腺癌发生、发展、分子生物学特性、侵袭转移机制及新的治疗方法等。本实验拟将7,12-二甲基苯并蒽(7,12-dimethylbenzanthracene, DMBA)置入SD大鼠胰腺, 定期行大鼠胰腺病理学观察, 研究DMBA对大鼠胰腺肿瘤发生的影响, 探讨DMBA诱导大鼠胰腺肿瘤动物模型的可能性。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** ♂SD大鼠80只, 体重180-200 g, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供; DMBA(美国Sigma公司); 10%水合氯醛溶液; 40 g/L甲醛; 石蜡包埋机(德国徕卡仪器公司); 切片机(Leica公司)。

## 1.2 方法

**1.2.1 分组:** 为避免人为因素干扰, 应用随机数字表法将80只SD大鼠进行完全随机化分组, 根据术中是否置入药物随机分为A、B两组, 单笼喂养大鼠。A组: 手术切开大鼠胰腺被膜, 将DMBA按4 mg/100 g置入胰腺, 共70只; B组: 仅行胰腺被膜的切开, 不置入任何药物。各组大鼠术后每月称量体重, 术后2、4、6 mo处死, 并取材行病理学检查。

**1.2.2 造模:** SD大鼠术前24 h电子秤称量体重后禁食, 不禁水, 选用10%水合氯醛溶液(3 mL/kg)进行腹腔内注射麻醉, 麻醉成功后将大鼠仰卧位固定于动物手术板, 用纱布沾取生理盐水湿润腹部被毛并剔除干净, 碘伏消毒。

每只大鼠均经上腹正中偏左约0.5 cm处作一纵行切口, 长约2.0 cm, 手术刀切开皮肤, 剪刀剪开腹壁肌肉进入腹腔, 用棉签沾取生理盐水后翻转胃体及脾脏, 将胰腺充分暴露, 湿纱布保护其他器官。A组大鼠用显微镊轻轻提起胰腺体尾部, 于胰腺最厚处剪开被膜及部分胰腺实质, 深入胰腺实质约2 mm, 通过自制加药匙按4 mg/100 g剂量置入DMBA, 用6-0Prolene缝合线缝合胰腺被膜, 打结, 距线结

## ■ 研究前沿

近年来国内外出现的各种各样的胰腺癌动物模型建立方法, 包括致癌物质诱发胰腺癌模型、种植瘤模型和基因工程动物模型, 各有各的优点和局限性, 并不能完全复制出人类胰腺癌的发病过程、全部病理变化、生物学特性和转移潜能, 因此提高模型的成功率、可行性、准确性和可重复性, 是将来胰腺癌动物模型的发展方向。

## ■ 相关报道

国内外学者用7,12-二甲基苯并蒽诱导大鼠胰腺癌模型成功, 所用的剂量与时间各不相同, 成瘤率波动在17%-39%, 文献报道7,12-二甲基苯并蒽诱导大鼠产生胰腺癌的剂量从1 mg到10 mg不等, 时间需要1-9 mo, 但目前7,12-二甲基苯并蒽诱导大鼠胰腺肿瘤模型尚没有统一的剂量与时间。



### 创新亮点

本实验发现了7,12-二甲基苯并蒽置入胰腺诱导肉瘤这一与其他实验不一样的现象,但关于肉瘤起源及形成机制还需进一步研究。

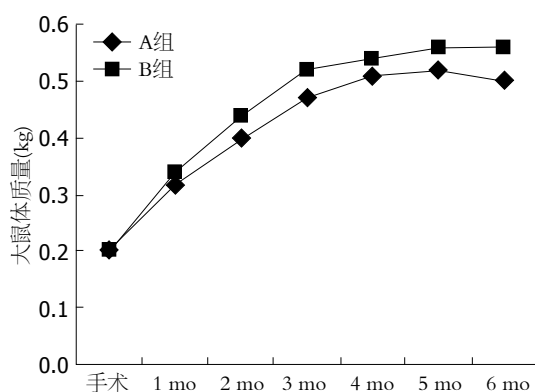


图1 两组大鼠体质量变化。

0.3 cm处剪断缝合线, 便于后期寻找药物包埋位置。B组仅作开腹及剪开胰腺被膜, 胰腺内不置入任何药物。用湿棉签复位腹腔各器官, 3-0缝线连续缝合腹壁肌肉及皮肤。术后大鼠继续饲养于普通级环境, 饮食同术前。整个手术过程细致轻柔, 注意不损伤其他组织、器官, 肉眼观察无DMBA晶体散落于腹腔。造模过程参考文献[2,3]。

**1.2.3 病理学及免疫组织化学检测:** 按照实验分组及计划, 观察大鼠精神及饮食状况, 每月称量体质量。用10%水合氯醛溶液(3 mL/kg)麻醉处死大鼠后, 解剖暴露腹腔内各器官, 寻找药物包埋时所留的线结标志, 取下药物包埋位置胰腺组织及周围胰腺组织, 所有组织标本均放入40 g/L甲醛溶液进行固定, 固定时间为24 h, 将固定好的胰腺组织进行取材, 所取组织尽量为药物包埋周围组织, 石蜡包埋时切面朝向下放置, 包埋过程迅速, 尽量避免组织块变凉、蜡液凝结或出现气泡。行切片、HE染色观察肿瘤组织特征, 采用SP法行免疫组织化学检查, 确定肿瘤来源。

**统计学处理** 所得数据经SPSS16.0软件数据包进行统计学处理, 比较A、B两组大鼠体质量增长变化差异采用独立样本 $t$ 检验; 比较大鼠成瘤率的变化差异采用 $\chi^2$ 检验,  $P < 0.05$ 时表明有显著性差异。

## 2 结果

**2.1 大鼠体质量变化** A组异常死亡12只, B组无异常死亡, 死亡大鼠剔除实验入组。A组术后2、4、6 mo分别有19、19、20只大鼠完成实验, B组分别有4、3、3只大鼠按计划完成实验。术后每月称量2组大鼠体质量, 数据显示A

组及B组大鼠术后体质量逐渐增加, A组大鼠术后5-6 mo体质量出现下降趋势。A组大鼠6 mo内体质量下降变化差异大于B组, 且差异具有统计学意义( $P = 0.00$ )(图1)。

### 2.2 大鼠体标本及病理学检查

**2.2.1 大鼠体标本:** A组大鼠解剖后可见血性腹水以及腹腔各器官黏连, 左上腹部最为严重, 不易分离, 胰腺及周围组织形态不规则, 置药标记处可见椭圆形占位, 质硬, 切面呈灰白色, 诊断肿瘤可能性大(图2A, B)。伴体质量下降, 贫血等, 部分有食管、胃、远端肠管等脏器及腹壁转移, 未见肺、肝脏部位明显转移灶。B组大鼠解剖后部分可见轻微黏连。

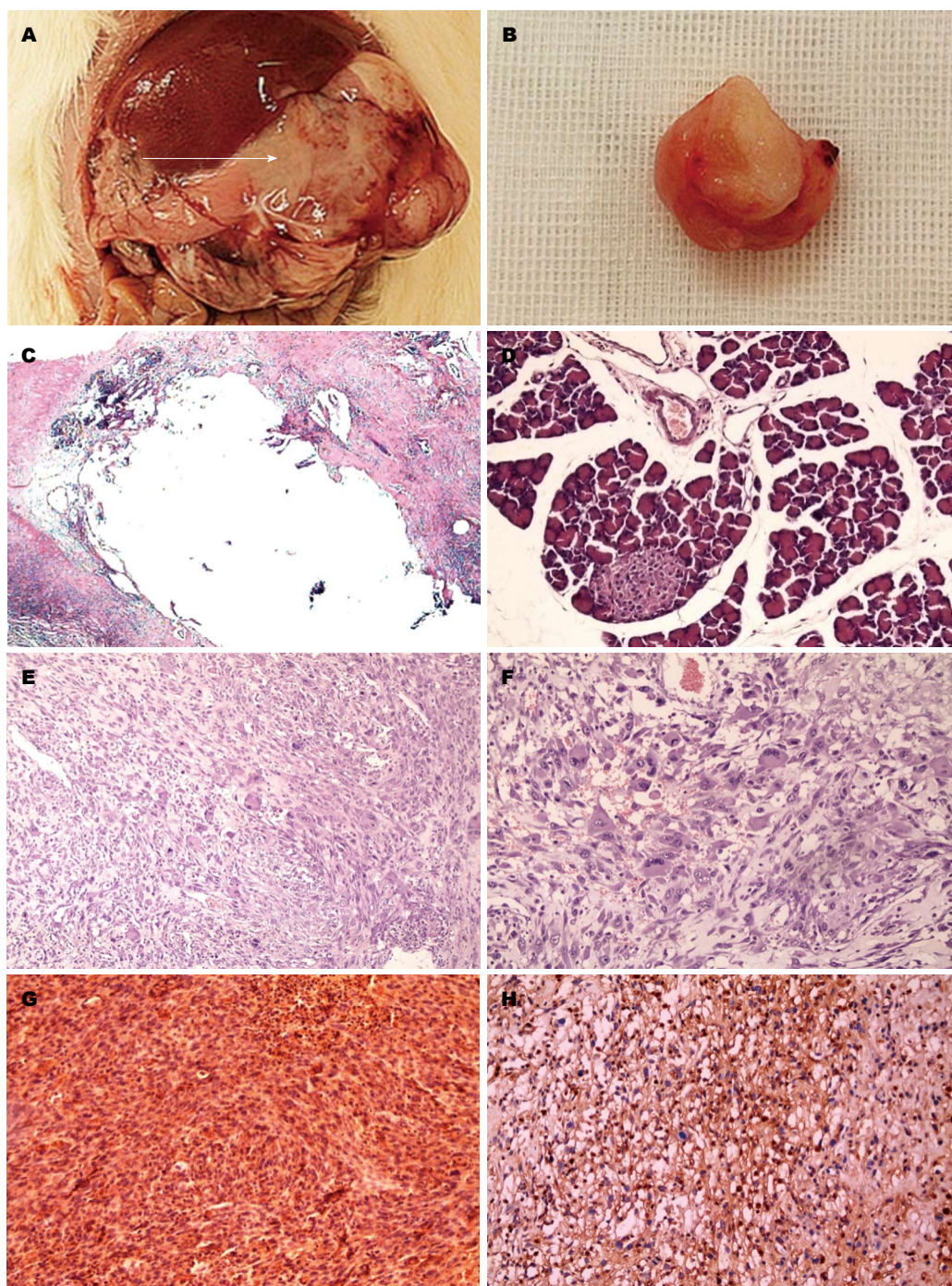
**2.2.2 病理学检查:** A组大鼠胰腺置入DMBA 2 mo后呈胰腺炎改变。镜下可见胰腺组织多灶性坏死、弥漫性纤维素样坏死伴纤维化、部分导管上皮修复性增生, 未见明显异形细胞(图2C)。B组大鼠术后镜下表现基本为正常胰腺组织学改变(图2D)。A组大鼠4 mo及6 mo后大鼠胰腺部分置药标记处发生肿瘤, 切面灰白色, 呈“鱼肉状”。胰腺肿瘤镜下可见细胞异形, 核分裂易见, 可见多核巨细胞, 诊断为肉瘤, 免疫组织化学提示CD117(个别+), Ki-67(10%+), Desmin(+), CD34(-), SMA(+), 考虑平滑肌肉瘤(图2E-H)。无胰腺导管细胞癌发生。大鼠术后4 mo平滑肌肉瘤发生率为42.1%(8/19), 6 mo为75.0%(15/20), 并伴有恶液质、血性腹水及腹腔胰腺外肿瘤。术后6 mo大鼠肉瘤发生率高于4 mo大鼠肉瘤发生率( $P = 0.037$ )。

## 3 讨论

胰腺癌因缺乏特征性的临床表现和有效的诊断方法, 大部分患者在确诊时已属晚期并经常伴有转移, 生存周期只有6-12 mo, 5年生存率为6%<sup>[4,5]</sup>。所以对于胰腺癌癌前病变及早期癌的诊断将是改善临床预后的关键。近年来国内外学者对此做了大量研究, 取得了一些进展, 但总体来讲仍没有取得实质性突破。因此急需建立合适的胰腺癌实验动物模型来深入探讨胰腺癌发生、发展、分子生物学特性、侵袭转移机制及新的治疗方法等<sup>[6]</sup>。目前胰腺癌的动物模型主要分为3种: 致癌药物诱发胰腺癌模型、种植瘤模型<sup>[7,8]</sup>和基因工程动物模型<sup>[9]</sup>。

化学诱导性胰腺癌动物模型最常用的药物是 $N$ -亚硝基双(2-氧丙基)胺[N-nitrosobis(2-





### 应用要点

通过建立采用7,12-二甲基苯并蒽诱导胰腺肿瘤动物模型,探讨7,12-二甲基苯并蒽合适的剂量和时间。此外,本实验发现了7,12-二甲基苯并蒽置入胰腺诱导出肉瘤这一现象,但原因有待进一步研究。

图2 大鼠标本解剖及病理学检查。A: A组大鼠解剖后胰腺部位肿瘤(箭头所示); B: 肿瘤剖开; C: 术后2 mo A组大鼠胰腺纤维样坏死伴纤维化(HE:  $\times 100$ ); D: B组大鼠正常胰腺(HE:  $\times 100$ ); E: 术后4 mo A组大鼠胰腺细胞异形、梭形及短梭形(HE:  $\times 100$ ); F: 术后4 mo A组大鼠胰腺细胞核分裂易见、可见多核巨细胞,部分间质黏液变性(HE:  $\times 200$ ); G: 肿瘤细胞SMA阳性表达( $\times 200$ ); H: 肿瘤细胞Desmin阳性表达( $\times 200$ )。

oxopropyl) amine]、DMBA、重氮丝氨酸等。DMBA及其他多环类芳香烃等有机物的致癌途径主要通过吸烟、空气污染、以及摄入被污染的水和食物等途径作用于人体导致肿瘤发生。DMBA在人体内通过代谢转化生成的物质可以与DNA共价结合,在胰腺组织形成DNA加合物,造成DNA损伤和染色体畸变,导

致癌基因和抑癌基因突变(特别是*k-ras*基因和*p53*抑癌基因突变),从而诱发肿瘤发生,DMBA本身并没有致癌作用<sup>[10]</sup>。

大量研究表明胰腺癌的发生是一个多阶段变化参与的过程,一些病理学家认为PanIN体现了胰腺癌多阶段发展的过程,根据组织学特点区分为1A、1B、2和3型。PanIN每一步进



## ■名词解释

7,12-二甲基苯并蒽:是多环芳香烃类化合物,本身不具有致癌作用,但是在小鼠或大鼠体内的代谢产物会引起*k-ras*基因突变,最终发展成为胰腺癌,这与人类胰腺癌的发展过程类似,并且7,12-二甲基苯并蒽一般也不引起其他组织器官的癌变。

展都包含上皮细胞和周围组织的改变,最主要的特点是纤维炎性基质的集聚,也就是促结缔组织增生反应,而在PanIN-1中主要为*k-ras2*基因第12位密码子的突变,而在PanIN-2为*p16/cdkn2a*基因突变, *smad4*, *tp53*, *brca2*等突变通常发生在PanIN-3,而端粒缩短引起染色体的异常集聚可发生在PanIN早期。DMBA诱导的胰腺癌模型有利于研究PanIN的进展过程。

在本研究中,我们采用DMBA置入SD大鼠胰腺内的方法试图建立胰腺癌动物模型, A组(4 mg/100 g)58只大鼠术后5 mo后出现体质量增长曲线下降趋势,病理学诊断显示为急、慢性胰腺炎、平滑肌肉瘤(39.7%, 23/58)及肿瘤浸润食管、胃及肠道等脏器,并无胰腺上皮内瘤变和胰腺癌的出现。我们系统的回顾了实验的经过,并且查阅了更多的相关文献,手术置入DMBA过程与国内外报道基本一致,但为什么只诱导出胰腺部位的平滑肌肉瘤而无胰腺导管细胞癌?

国内外学者用DMBA诱导大鼠胰腺癌模型成功,所用的剂量与时间各不相同。有文献[11]报道DMBA诱导大鼠产生胰腺癌需要1-9 mo,高脂肪高蛋白饮食是胰腺癌形成的一个促进因素,可能的原因是干扰胰腺的自我修复机制以及影响早期病变的形成过程。Pan等<sup>[12]</sup>用DMBA诱导大鼠建立胰腺癌模型,用时3-7 mo,认为腺泡细胞选择性增生、干细胞分化及腺泡向导管转分化对MTC的产生起重要作用。Khalailah等<sup>[10]</sup>按100 mg/mL剂量将DMBA溶解入苯试剂,抽取10 μL注入小鼠胰腺,3-4 wk出现PanIN, 5-6 mo出现胰腺导管腺癌,并发现磷酸化rp56参与胰腺癌的产生,当磷酸化rp56缺失,首先在腺泡细胞出现*k-ras*基因突变导致DNA损伤。Guo等<sup>[3]</sup>将5 mg的DMBA植入大鼠胰腺内,2 wk后可诱导PanIN产生,1 mo内胰腺癌发生率为80%。Wang等<sup>[13]</sup>则使用更大剂量(10 mg/100 g)的DMBA置入SD大鼠胰腺内,在1-2 mo内就诱导出PanIN和胰腺癌。

A组按4 mg/100 g剂量置入DMBA,死亡率17.1%(12/70),术后5-6 mo体质量呈现明显下降趋势,出现恶液质、血性腹水及其他脏器转移等症状,共有23只大鼠病理诊断为平滑肌肉瘤,肉瘤发生率为39.7%。平滑肌肉瘤最常发生于胃肠道、腹膜后和子宫,占肉瘤的2%-9%<sup>[14]</sup>。

有研究<sup>[15]</sup>显示非典型间叶细胞的集聚有可能是肉瘤发生早期的变化,例如非典型成纤维或间叶细胞增殖、毛细血管不规则增生、早期肉瘤细胞超微结构的出现等。间叶组织通常包含多能性间叶干细胞,具有分化成骨骼肌细胞、成纤维细胞和平滑肌细胞的能力,因此很难确定肉瘤的起源。Tan等<sup>[2]</sup>采用DMBA 9 mg置入SD大鼠胰腺,3-5 mo内胰腺肿瘤发生率为48.7%,包括17例胰腺导管腺癌和1例胰腺纤维肉瘤。Zhe-Yu等<sup>[16]</sup>将DMBA(1 mg/25 g)包埋于小鼠胰腺,2 mo后胰腺癌发生率为25%,其中,导管腺癌14例,胰腺纤维肉瘤1例。Taguchi等<sup>[17]</sup>分别在新生SD大鼠皮下注射100 μg和500 μg的DMBA溶液,肉瘤诱导成功率为62%和94%,说明越高剂量的DMBA诱导肉瘤成功率越高,而细胞周期、蛋白表达、原癌基因和肿瘤抑制基因,吞噬和代谢相关酶的活性,皮下组织的疏松程度均会影响癌基因的扩散。所以,本实验我们只发现DMBA置入胰腺诱导出平滑肌肉瘤这一现象,胰腺部位平滑肌肉瘤的来源及形成机制有待进一步研究。

志谢:感谢杨盈赤老师在制模过程中及昌红、石峰老师在病理诊断中给予的大力帮助。

## 4 参考文献

- 1 Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin* 2013; 63: 11-30 [PMID: 23335087 DOI: 10.3322/caac.21166]
- 2 Tan XG, Yang ZL, Yang LP, Miao XY. Expression of DNA-repair proteins and their significance in pancreatic cancer and non-cancerous pancreatic tissues of Sprague-Dawley rats. *World J Surg Oncol* 2014; 12: 32 [PMID: 24502441 DOI: 10.1186/1477-7819-12-32]
- 3 Guo JC, Li J, Yang YC, Zhou L, Zhang TP, Zhao YP. Oligonucleotide microarray identifies genes differentially expressed during tumorigenesis of DMBA-induced pancreatic cancer in rats. *PLoS One* 2013; 8: e82910 [PMID: 24376604 DOI: 10.1371/journal.pone.0082910]
- 4 Hsu CC, Herman JM, Corsini MM, Winter JM, Callister MD, Haddock MG, Cameron JL, Pawlik TM, Schulick RD, Wolfgang CL, Laheru DA, Farnell MB, Swartz MJ, Gunderson LL, Miller RC. Adjuvant chemoradiation for pancreatic adenocarcinoma: the Johns Hopkins Hospital-Mayo Clinic collaborative study. *Ann Surg Oncol* 2010; 17: 981-990 [PMID: 20087786 DOI: 10.1245/s10434-009-0743-7]
- 5 Zhu Z, Liu T, Han F, Zhan SD, Wang CY. Mutations in the p16 gene in DMBA-induced pancreatic intraepithelial neoplasia and pancreatic cancer in rats. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2015;



- 14: 208-214 [PMID: 25865695 DOI: 10.1016/S1499-3872(15)60331-9]
- 6 Ponz-Sarvis M, Tuveson DA, Yu KH. Mouse Models of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Hematol Oncol Clin North Am* 2015; 29: 609-617 [PMID: 26226900 DOI: 10.1016/j.hoc.2015.04.010]
- 7 Zhang Y, Chen L, Yang J, Fleming JB, Chiao PJ, Logsdon CD, Li M. Study human pancreatic cancer in mice: how close are they? *Biochim Biophys Acta* 2013; 1835: 110-118 [PMID: 23147198 DOI: 10.1016/j.bbcan.2012]
- 8 Herreros-Villanueva M, Hijona E, Cosme A, Bujanda L. Mouse models of pancreatic cancer. *World J Gastroenterol* 2012; 18: 1286-1294 [PMID: 22493542 DOI: 10.3748/wjg.v18.i12.1286]
- 9 Jang KM, Kim SH, Choi D, Lee SJ, Park MJ, Min K. Pathological correlation with diffusion restriction on diffusion-weighted imaging in patients with pathological complete response after neoadjuvant chemoradiation therapy for locally advanced rectal cancer: preliminary results. *Br J Radiol* 2012; 85: e566-e572 [PMID: 22422387 DOI: 10.1259/bjr/24557556]
- 10 Khalaileh A, Dreazen A, Khatib A, Apel R, Swisa A, Kidess-Bassir N, Maitra A, Meyuhas O, Dor Y, Zamir G. Phosphorylation of ribosomal protein S6 attenuates DNA damage and tumor suppression during development of pancreatic cancer. *Cancer Res* 2013; 73: 1811-1820 [PMID: 23361300 DOI: 10.1158/0008-5472]
- 11 Z'graggen K, Warshaw AL, Werner J, Graeme-Cook F, Jimenez RE, Fernández-Del Castillo C. Promoting effect of a high-fat/high-protein diet in DMBA-induced ductal pancreatic cancer in rats. *Ann Surg* 2001; 233: 688-695 [PMID: 11323507 DOI: 10.1097/00000658-200105000-00013]
- 12 Pan JJ, Oh SH, Lee WC, Petersen BE. Bone marrow-derived progenitor cells could modulate pancreatic cancer tumorigenesis via peritumoral microenvironment in a rat model. *Oncol Res* 2009; 17: 339-345 [PMID: 19544970 DOI: 10.3727/09650400]
- 13 Wang L, Liu HL, Li Y, Yuan P. Proteomic analysis of pancreatic intraepithelial neoplasia and pancreatic carcinoma in rat models. *World J Gastroenterol* 2011; 17: 1434-1441 [PMID: 21472101 DOI: 10.3748/wjg.v17.i11.1434]
- 14 董宇杰, 毛歆歆, 崔全才. 胰腺原发性平滑肌肉瘤临床病理观察. *诊断病理学杂志* 2012; 22: 288-290
- 15 Tholpady SS, Katz AJ, Ogle RC. Mesenchymal stem cells from rat visceral fat exhibit multipotential differentiation in vitro. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 2003; 272: 398-402 [PMID: 12704697 DOI: 10.1002/ar.a.10039]
- 16 Zhe-Yu N, Qiao-Fei L, Meng-Yi W, Li Z, Lu-Tian Y, Quan L, Yu-Pei Z. Changes in the Expression of Glucose-regulated Protein 78 in the Occurrence and Progression of Pancreatic Cancer in Mouse Models. *Zhongguo Yixue Kexueyuan Xuebao* 2015; 37: 259-263 [PMID: 26149133]
- 17 Taguchi S, Kuriwaki K, Souda M, Funato M, Ninomiya K, Umekita Y, Yoshida H. Induction of sarcomas by a single subcutaneous injection of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene into neonatal male Sprague-Dawley rats: histopathological and immunohistochemical analyses. *Toxicol Pathol* 2006; 34: 336-347 [PMID: 16844661 DOI: 10.1080/01926230600773966]

#### 同行评价

论文设计合理, 统计正确, 结论实事求是, 讨论合乎逻辑, 对胰腺肿瘤的动物实验研究有一定的指导价值。

编辑: 于明茜 电编: 都珍珍



## 内镜切除技术在胃固有肌层肿瘤中的临床应用

石磊, 赵伟, 周宇, 朱海杭, 王昊, 陈平

### ■背景资料

消化系统黏膜下肿瘤(submucosal tumor, SMT)是指一类消化道上皮以下组织起源的实体肿瘤, 常见的是胃肠道间质瘤, 以往外科手术切除是唯一的方法, 近年来随着内镜治疗技术不断发展, 出现了内镜黏膜下剥离术(endoscopic submucosal dissection, ESD)及其衍生技术内镜黏膜下挖除术(endoscopic submucosal excavation, ESE), 内镜全层切除术(endoscopic full-thickness resection, EFR)等。本文总结了内镜切除技术在治疗胃固有肌层肿瘤中的安全性和有效性。

### ■同行评议者

黄杰安, 主任医师, 广西医科大学第一附属医院

石磊, 赵伟, 周宇, 朱海杭, 王昊, 陈平, 江苏省苏北人民医院胃肠外科 江苏省扬州市 225001

石磊, 主治医师, 主要从事胃肠道肿瘤的微创治疗及研究。

作者贡献分布: 此课题由石磊与赵伟设计; 研究过程由石磊、赵伟、周宇、朱海杭、王昊及陈平等完成; 数据分析与临床资料整理由石磊与周宇完成; 论文写作由石磊完成。

通讯作者: 陈平, 主任医师, 硕士生导师, 225001, 江苏省扬州市南通西路98号, 江苏省苏北人民医院胃肠外科。

chen86ky@126.com

电话: 0514-87373282

收稿日期: 2015-07-13 修回日期: 2015-08-12

接受日期: 2015-08-20 在线出版日期: 2015-10-18

### Therapeutic value of endoscopic submucosal dissection for gastric muscularis propria tumors

Lei Shi, Wei Zhao, Yu Zhou, Hai-Hang Zhu, Hao Wang, Ping Chen

Lei Shi, Wei Zhao, Yu Zhou, Hai-Hang Zhu, Hao Wang, Ping Chen, Department of Gastrointestinal Surgery, Clinical Medical College of Yangzhou University (the Northern Jiangsu People's Hospital), Yangzhou 225001, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Ping Chen, Chief Physician, Department of Gastrointestinal Surgery, Clinical Medical College of Yangzhou University (the Northern Jiangsu People's Hospital), 98 Nantong West Road, Yangzhou 225001, Jiangsu Province, China. chen86ky@126.com

Received: 2015-07-13 Revised: 2015-08-12

Accepted: 2015-08-20 Published online: 2015-10-18

### Abstract

**AIM:** To evaluate the safety and efficacy of endoscopic submucosal dissection (ESD) for tumors originating from the gastric muscularis propria.

**METHODS:** Forty-two patients with tumors

originating from the gastric muscularis propria who underwent endoscopic therapy between January 2013 and January 2015 were included. The complications, clinicopathological data, and postoperative follow-up data were analyzed.

**RESULTS:** Of the 42 patients, 20 were managed by ESD, 15 by endoscopic submucosal excavation (ESE), and 7 by endoscopic full-thickness resection (EFR). Four cases underwent surgery for unsuccessful endoscopic resection, including three cases receiving laparoscopic surgery for difficulties in en bloc removal or perforation, and 1 case receiving open surgery because of uncontrolled bleeding, and the success rate was 90.48%. Delayed hemorrhage occurred in two patients and no delayed perforation occurred. All the complications were successfully managed by endoscopic intervention and conservational therapy. Seven cases of active perforation in the EFR group were all successfully managed by endoscopy. The post-operative follow-up period ranged from 6 to 28 mo. No local recurrence or distant metastasis occurred.

**CONCLUSION:** ESD is an effective procedure for tumors originating from the gastric muscularis propria, and laparoscopic intervention is necessary for en bloc resection in some cases.

© 2015 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: Stomach neoplasms; Endoscopic

submucosal dissection; Endoscopic submucosal excavation; Endoscopic full-thickness resection

Shi L, Zhao W, Zhou Y, Zhu HH, Wang H, Chen P. Therapeutic value of endoscopic submucosal dissection for gastric muscularis propria tumors. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2015; 23(29): 4706-4712 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/23/4706.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v23.i29.4706>

## 摘要

**目的:** 观察内镜黏膜下层剥离术(endoscopic submucosal dissection, ESD)为基础的内镜下切除术在胃固有肌层肿瘤治疗中的安全性及有效性。

**方法:** 收集江苏省苏北人民医院2013-01/2015-01接受内镜治疗的胃固有肌层肿瘤患者资料, 总结并分析其手术并发症、临床病理及术后随访资料。

**结果:** 42例患者, 20例接受ESD, 15例接受内镜黏膜下肿瘤挖除(endoscopic submucosal excavation, ESE), 7例接受内镜下胃壁全层切除术(endoscopic full-thickness resection, EFR)治疗。其中1例因较大穿孔、2例腔内外生长实施腹腔镜修补及辅助全层切除, 1例出现出血, 开腹止血修补, 成功率90.48%。术后迟发性出血2例, 通过保守治疗恢复, 无迟发性穿孔。EFR组实施胃壁全层切除, 主动穿孔, 并在内镜下完全缝合胃壁缺损。42例患者术后均接受6-28 mo的随访, 无局部复发及远处转移病例。

**结论:** 以ESD为基础的内镜切除技术治疗胃固有肌层肿瘤是一种有效的治疗手段, 部分呈腔内外生长的瘤体完整切除需要腹腔镜帮助。

© 2015年版权归百世登出版集团有限公司所有。

**关键词:** 胃肿瘤; 内镜下黏膜剥离术; 内镜下黏膜挖除术; 内镜下全层切除术

**核心提示:** 以内镜黏膜下层剥离术(endoscopic submucosal dissection)为基础的内镜下治疗起源于固有肌层的胃肿瘤是一种有效的治疗手段, 部分呈腔内外生长的瘤体的完整切除需要腹腔镜帮助。内镜治疗胃黏膜下肿瘤(submucosal tumor)存在创伤小, 恢复快, 不影响患者术后生活质量等优势。

石磊, 赵伟, 周宇, 朱海杭, 王昊, 陈平. 内镜切除技术在胃固有肌层肿瘤中的临床应用. *世界华人消化杂志* 2015; 23(29): 4706-4712 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/23/4706.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v23.i29.4706>

## 0 引言

消化系统黏膜下肿瘤(submucosal tumor, SMT)是指一类消化道上皮以下组织起源的实体肿瘤, 常在内镜检查中发现, 其中许多病变具有恶性潜能, 尤其是固有肌层起源的SMTs<sup>[1]</sup>, 常见的是胃肠道间质瘤, 即使是体积较小, 亦可能存在远处转移<sup>[2]</sup>。以往外科手术切除是唯一的方法, 近年来随着内镜治疗技术不断发展, 对于起源固有肌层的消化系统肿瘤的诊治水平有了显著提高, 出现了内镜黏膜下剥离术(endoscopic submucosal dissection, ESD)及其衍生技术, 如内镜黏膜下挖除术(endoscopic submucosal excavation, ESE), 内镜全层切除术(endoscopic full-thickness resection, EFR)等。本研究收集了江苏省苏北人民医院2013-01/2015-01 42例胃固有肌层肿瘤行内镜治疗的病例, 报道如下。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 收集自江苏省苏北人民医院2013-01/2015-01接受内镜下治疗的42例胃固有肌层肿瘤患者。其中男性13例, 女性29例, 年龄33-74岁, 平均年龄57.3岁。其中肿瘤位于贲门入口6例, 胃底18例, 胃体15例, 胃窦3例。治疗前均接受超声内镜及腹部计算机断层扫描(computed tomography, CT)检查, 20例行ESD, 15例行ESE, 7例行EFR治疗(表1)。器械包括: 日本Olympus GIF-H260单孔道胃镜, D-201-11802透明帽, KD-610 IT1刀、KD-611L IT2刀和KD-620LR Hook刀, FD-410LR热活检钳, NM-4L-1注射针, SD-9L-1圈套器, HX-610-90金属夹; 德国ERBE ICC-200高频电切装置。

### 1.2 方法

**1.2.1 内镜下治疗:** 按照文献[3-5]报道, 简述如下: (1)ESD: 应用针形切开刀在病灶基底边缘进行标记; 于病灶边缘标记点处进行多点黏膜下注射; 用针形切开刀切开病灶基底周围黏膜; 应用IT刀于病灶下方对黏膜下

## ■ 研究前沿

ESD及其衍生技术是微创治疗消化系统病变的一类新技术, 目前已经广泛应用切除胃黏膜下肿瘤方面。随着内镜技术的迅猛发展, 内镜下切除为胃黏膜下肿瘤的治疗提供了不同的方案。有些专家还提出了内镜与腔镜的联合治疗。



■ 相关报道

EFR 治疗胃固有肌层起源的 SMTs, 打破传统观念, 扩大了黏膜下肿瘤ESD切除的适应证. 对于一部分突向浆膜下生长与浆膜层紧密黏连的固有肌层肿瘤, 通过EFR技术“主动”穿孔, 达到内镜下完整切除目的.

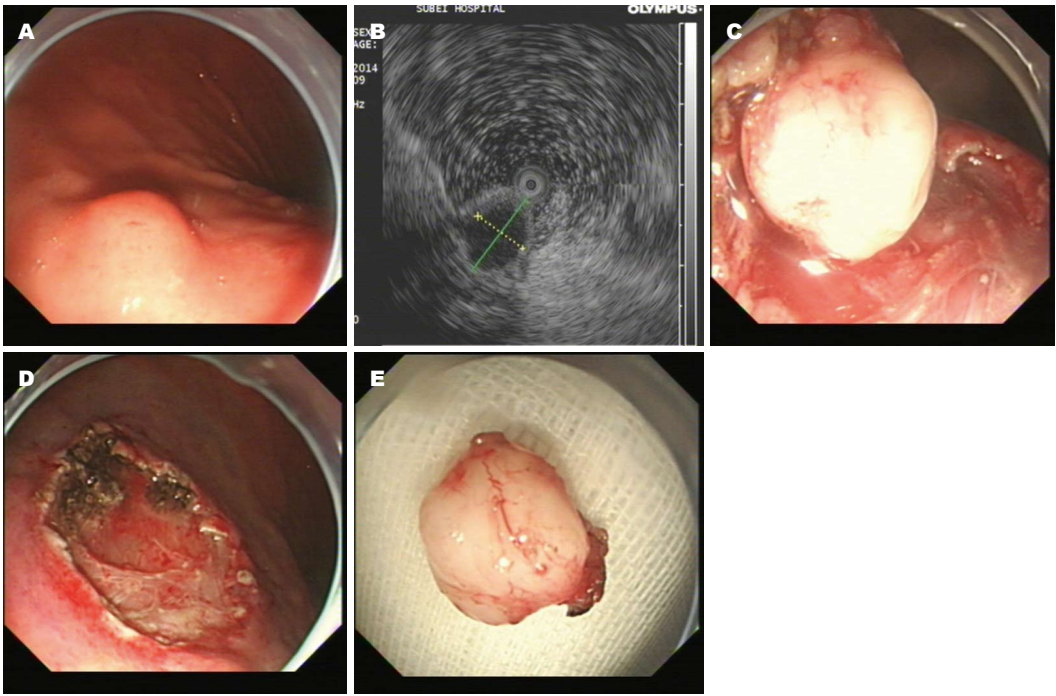


图 1 胃体平滑肌瘤超声检查、ESD手术情况. A: 胃镜示胃体黏膜下隆起性病变; B: 超声内镜示病变起源于固有肌层; C: 剥离瘤体; D: 剥离后的创面; E: 剥离后的瘤体. ESD: 内镜黏膜下剥离术.

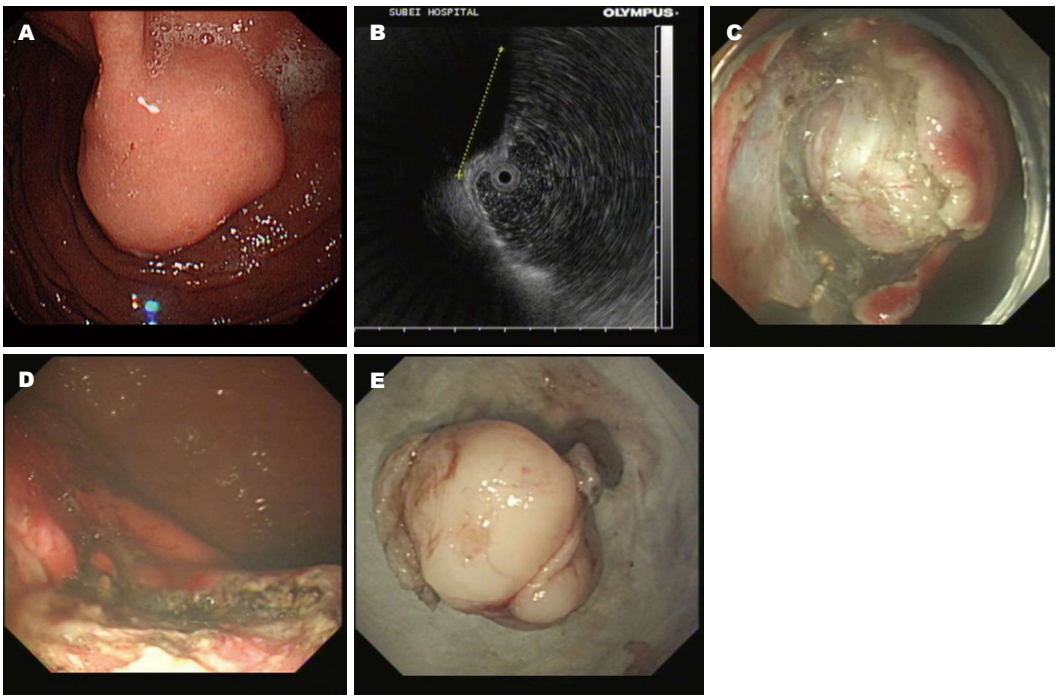
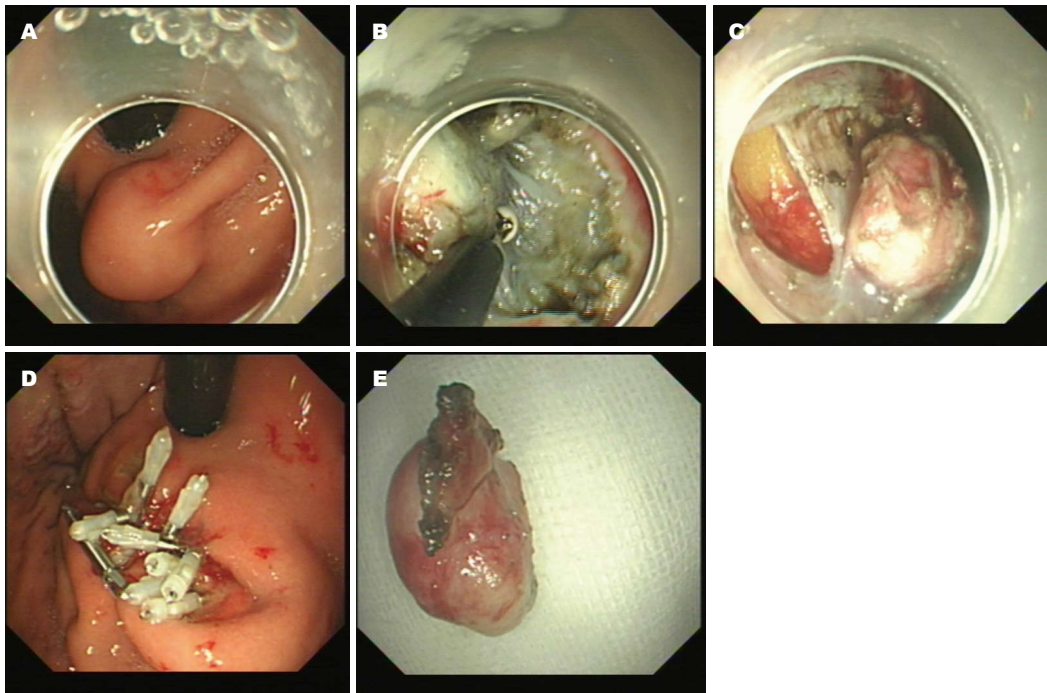


图 2 胃体嵴交界间质瘤超声检查、ESE手术情况. A: 胃镜示胃体嵴交界黏膜下隆起性病变; B: 超声内镜示病变起源于固有肌层; C: 剥离瘤体; D: 剥离后的创面; E: 切除后的瘤体. ESE: 内镜黏膜下肿瘤挖除.

层进行剥离, 完整剥离病灶<sup>[3]</sup>, 处理创面(图1); (2)ESE: 采用ESD技术预切开病变周围黏膜, 在瘤体基底部逐步剥离黏膜下层及部分固有肌层, 完整切除病变<sup>[4]</sup>, 处理创面(图2); (3)EFR: 采用ESD技术沿肿瘤周围分离直至浆

膜层, 直视下应用HOOK刀、IT刀或圈套器完整切除瘤体及部分浆膜, 应用金属夹封闭胃壁缺损(图3)<sup>[5]</sup>.

1.2.2 术后处理: 贲门、胃底、胃体病灶切除后半卧位, 胃窦病灶治疗后仰卧位, 抑酸, 补液、



### 创新亮点

本文着重列举了内镜治疗黏膜下肿瘤术式, 包括ESD及其衍生技术ESE、EFR. 对于初学阶段, 为减低治疗风险, 本文研究者尝试在内镜操作前置入腹腔镜穿刺鞘卡, 以达到降低并发症的目的.

图3 贲门入口下间质瘤EFR手术过程. A: 胃镜示贲门入口下黏膜下隆起性病变; B: 沿瘤体边缘全层切开胃壁; C: 术中全层切开过程中见胃壁外黄色网膜组织; D: 创面予钛夹封闭; E: 切除后的瘤体. EFR: 内镜全层切除术.

表1 42例胃消化道黏膜下肿瘤的一般资料集内镜治疗疗效

临床病理特征	ESD( <i>n</i> = 20)	ESE( <i>n</i> = 15)	EFR( <i>n</i> = 7)
年龄(岁)	56.2	56.9	59.1
部位			
贲门	5	1	0
胃底	8	3	7
胃体	7	8	0
胃窦	0	3	0
肿瘤直径(cm)	1.8 ± 1.1	2.1 ± 1.2	1.1 ± 0.5
中转原因			
术中穿孔	1	0	0
术中大出血	1	0	0
瘤体呈腔内外生长	0	2	0
术后并发症			
术后迟发性穿孔	0	0	0
术后迟发性出血	1	1	0
术后复发	0	0	0

SMT: 消化道黏膜下肿瘤; ESD: 内镜下黏膜剥离术; ESE: 内镜下黏膜挖除术; EFR: 内镜下全层切除术.

止血等治疗, 24 h后流质. 术中穿孔患者置入胃肠减压管及抗炎治疗, 48 h后如无腹痛出血可少量流质.

1.2.3 随访: 所有患者出院后口服质子泵抑制剂2 mo, 停药后复查胃镜, 至术后6 mo及1年再次复查胃镜, 观察手术部位愈合情况及有无复发.

以后1-2年复查胃镜, 及影像学检查了解有无复发或转移.

**统计学处理** 采用SPSS13.0版软件处理, 计量资料数据以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 示. 多样本均数比较采用单因素方差分析, 计数资料比较采用 $\chi^2$ 检验. 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义.



## 应用要点

内镜治疗为消化系黏膜下肿瘤的患者带来了福音, 在明确诊断及达到治疗目的的同时, 使得患者术后恢复快、疼痛轻、术后进食早, 住院时间短。但是微创技术治疗黏膜下肿瘤的报道仅限于个案报道或小样本量、单中心的回顾性分析。因此, 仍需要进一步研究证实以上微创技术治疗黏膜下肿瘤的可行性, 尤其在安全、完全切除方面予以重视。

## 2 结果

**2.1 术中及术后情况** 本组42例患者中, ESD治疗20例, ESE治疗15例; EFR治疗7例, 其中5例出现被动穿孔, 穿孔率达11.9%, 4例内镜下成功修补, 1例因较大穿孔实施腹腔镜修补术; 2例因瘤体已突破浆膜层实施内镜辅助的腹腔镜楔形切除; 各组患者术中均出现不同程度创面出血, 其中1例出血无法控制, 开腹止血并切除病变, 余予以内镜下氩离子凝固术、热活检钳等治疗后出血控制, 内镜治疗成功率90.48%。EFR组7例均起源于固有肌层, 且与浆膜层难以分离, 术中实施内镜下胃壁全层切除, 采取主动穿孔法, 并在无腹腔镜辅助内镜下完全缝合胃壁缺损。SMT直径为0.6-3.5 cm, 平均1.8 cm $\pm$ 1.1 cm。ESD组平均1.8 cm $\pm$ 1.1 cm, ESE组平均2.1 cm $\pm$ 1.2 cm, EFR组平均1.1 cm $\pm$ 0.5 cm。病变直径各组差异无统计学意义。术后ESD组及ESE组各有1例患者出现迟发性出血(分别于术后第2天和第15天), 均保守治疗后出血停止。术后无迟发性穿孔。

**2.2 术后病理诊断** 平滑肌瘤7例, 其中贲门入口2例、胃底1例、胃体4例; 神经鞘瘤2例, 均位于胃体; 间质瘤33例, 其中贲门入口4例、胃底17例、胃体9例, 胃窦3例, 按照美国国立卫生研究院2008年GIST危险程度分级标准, 2例属于低风险组, 31例属于极低风险组。

**2.3 随访** 42例患者住院时间为3-7 d, 平均5.8 d, 术后随访6-28 mo, 平均随访时间为12.2 mo, 所有患者术后2、6及12 mo后复查胃镜, 创面愈合好, 无1例复发, 无远处转移病例。

## 3 讨论

胃SMTs患者通常无特异性临床症状, 多数在胃镜检查时发现, 病理类型以胃间质瘤多见, 少数为平滑肌瘤<sup>[6]</sup>。国内外诊治指南指出胃来源的无症状小间质瘤(直径<2 cm), 通过超声内镜排除不良因素(边界不完整、溃疡、强回声和异质性)可以随访<sup>[7-9]</sup>。由于黏膜下肿瘤在内镜下活检不易取得肿瘤组织, 而穿刺活检可能引起肿瘤的破溃、出血和增加肿瘤播散的危险性<sup>[10]</sup>, 故不易获得明确的病理诊断, 无限期的定期随访和并不明确的诊断给部分患者造成了极大的心理负担<sup>[11]</sup>, 而传统手术治疗创伤大, 存在术后黏连, 反流性食管

炎等并发症, 且大多胃SMTs为良性病变, 发展缓慢。近年来, 以ESD为基础的多种内镜下切除技术(包括ESE、EFR、STER等)已被成功用于消化系SMT的治疗<sup>[12-14]</sup>, 且获得较好疗效。

ESD及其衍生技术在治疗胃SMT中虽然体现了微创手术的优势, 但出血和穿孔也是常见并发症, 也是内镜不能独立完成的主要原因。临床文献报道<sup>[15,16]</sup>ESD穿孔的发生率达0%-8%, 高位病变及ESD操作时间较长者, 穿孔机率明显增高。本组术中出现5例被动穿孔, 穿孔率达11.9%, 高于文献<sup>[17]</sup>的报道, 这可能与所选病变均起源于固有肌层以及术前超声内镜检查的准确率不高导致术前评估不到位有关, 并且对于有较高风险穿孔的肿瘤, 如肿瘤较大、广基或部分突出于腔外, 实施标准ESD术可能不适宜。对于这类肿瘤, 国内报道<sup>[5]</sup>采用无腹腔镜辅助的EFR技术治疗胃固有肌层起源的SMTs, 打破传统观念, 扩大了黏膜下肿瘤ESD切除的适应证。对于一部分突向浆膜下生长与浆膜层紧密黏连的固有肌层肿瘤, 通过EFR技术“主动”穿孔, 达到内镜下完整切除目的。但这需要具有良好的内镜操作基础和治疗经验, 需要有娴熟的内镜下闭合穿孔技术, 一旦术中穿孔, 导致腹压增加, 膈肌上抬, 影响呼吸, 同时胃腔无法撑开, 影响操作, 导致失败, 因此对于初学阶段, 尝试我们在内镜操作前先在脐部置入腹腔镜穿刺鞘卡, 其目的有: (1)起到穿刺排气作用, 当术中出现穿孔时, 腹腔游离气体可以从穿刺鞘卡口排出, 操作者可继续胃腔持续注气, 完成操作, 而不会因腹压增大或胃腔撑不开中转开腹; (2)部分病例, 若内镜下修补困难或修补不可靠需腹腔镜修补时, 不至于因腹腔及肠腔过度积气致穿刺鞘卡置入困难; (3)内镜操作完成后, 可通过穿刺鞘卡, 腹腔留置引流管作为术后观察; (4)可探查病变生长方式, 若见瘤体呈腔外生长, 可直接采取腹腔镜下胃楔形或部分切除。本组研究中, 11例在内镜操作前置入腹腔镜穿刺鞘卡, 1例因较大穿孔实施腹腔镜修补, 5例穿孔置入引流管, 2例术中见瘤体呈腔内外生长, 并已突破浆膜层实施内镜辅助的腹腔镜楔形切除, 3例仅作术中观察, 术后均平稳出院。当然, 为减少并发症的发生, 提高成功率, 这要求操作者术前超声内镜、CT检查评估病情、



术中出血点的随时处理、剥离过程中反复黏膜下的注射和内镜手术器械的改进, 均有助于预防“被动”穿孔的发生。对于初学者使用腹腔镜穿刺鞘卡, 可有效降低内镜操作难度, 减少严重并发症的发生风险, 提高内镜治疗的安全性。

相对于穿孔, 出血的预防和处理尤为重要。术中一旦发生出血, 止血过程不仅要耗费时间, 而且影响操作视野, 盲目止血易穿孔, 出血无法控制时, 往往不得不中止内镜操作<sup>[18]</sup>。本组研究中, 1例因术中出血无法控制, 中转开腹, 2例因术中盲目止血发生穿孔予钛夹夹闭; 2例迟发性出血, 1例为胃体病变实施ESD术后第3天, 胃管里突然出现新鲜血液200 mL, 考虑与当时术中创面渗血, 经止血成功术后血痂脱落有关, 另1例为胃窦病变实施ESE术后1 wk, 出现黑便300 mL, 考虑胃窦黏膜下血运丰富, 创面未钛夹封闭有关, 2例均通过药物保守成功。因此, 内镜手术中必须有意识地预防出血的发生: 术中反复黏膜下注射; 采取先凝后切方式; 较小黏膜下层血管, 切开刀头端直接电凝; 较粗黏膜下层血管, 热活检的合理使用<sup>[19]</sup>。一旦发生出血, 对创面进行冲洗或透明帽下压创面, 明确出血点后止血; 有时也采用钛夹夹闭出血点, 但这会影响随后的操作。

总之, 该项回顾性研究显示以ESD为基石的内镜下治疗起源于固有肌层的胃肿瘤是一种有效的治疗手段。穿孔及出血仍是内镜治疗常见并发症, 术前超声内镜的准确评估及术中的小心操作有助于并发症的减少。对于部分呈腔内外生长的瘤体的完整切除需要腹腔镜帮助。

#### 4 参考文献

- Sepe PS, Brugge WR. A guide for the diagnosis and management of gastrointestinal stromal cell tumors. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2009; 6: 363-371 [PMID: 19365407 DOI: 10.1038/nrgastro.2009.43]
- Grover S, Ashley SW, Raut CP. Small intestine gastrointestinal stromal tumors. *Curr Opin Gastroenterol* 2012; 28: 113-123 [PMID: 22157511 DOI: 10.1097/MOG.0b013e32834ec154]
- Hoteya S, Iizuka T, Kikuchi D, Yahagi N. Endoscopic submucosal dissection for gastric submucosal tumor, endoscopic sub-tumoral dissection. *Dig Endosc* 2009; 21: 266-269 [PMID: 19961528 DOI: 10.1111/j.1443-1661.2009.00905.

- x]
- 周平红, 姚礼庆, 徐美东, 陈巍峰, 钟芸诗. 消化道黏膜下肿瘤的内镜黏膜下挖除术治疗. *中国医疗器械信息* 2008; 14: 3-6
- Zhou PH, Yao LQ, Qin XY, Cai MY, Xu MD, Zhong YS, Chen WF, Zhang YQ, Qin WZ, Hu JW, Liu JZ. Endoscopic full-thickness resection without laparoscopic assistance for gastric submucosal tumors originated from the muscularis propria. *Surg Endosc* 2011; 25: 2926-2931 [PMID: 21424195 DOI: 10.1007/s00464-011-1644-y]
- Catalano F, Rodella L, Lombardo F, Silano M, Tomezzoli A, Fuini A, Di Cosmo MA, de Manzoni G, Trecca A. Endoscopic submucosal dissection in the treatment of gastric submucosal tumors: results from a retrospective cohort study. *Gastric Cancer* 2013; 16: 563-570 [PMID: 23271043 DOI: 10.1007/s10120-012-0225-7]
- CSCO胃肠间质瘤专家委员会. 中国胃肠间质瘤诊断治疗共识(2013年版). *临床肿瘤学杂志* 2013; 18: 1025-1032
- ESMO/European Sarcoma Network Working Group. Gastrointestinal stromal tumours: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2014; 25 Suppl 3: iii21-iii26 [PMID: 25210085 DOI: 10.1093/annonc/mdu255]
- Demetri GD, von Mehren M, Antonescu CR, DeMatteo RP, Ganjoo KN, Maki RG, Pisters PW, Raut CP, Riedel RF, Schuetze S, Sundar HM, Trent JC, Wayne JD. NCCN Task Force report: update on the management of patients with gastrointestinal stromal tumors. *J Natl Compr Canc Netw* 2010; 8 Suppl 2: S1-41; quiz S42-S44 [PMID: 20457867]
- 许秋泳, 陈俊杰, 赖亚栋, 蒲惠, 刘麒英, 林淑惠, 陈雪芬, 许向农. 内镜下切除胃底固有肌层肿瘤的临床价值研究. *中华消化内镜杂志* 2015; 32: 175-179
- Reddy P, Boci K, Charbonneau C. The epidemiologic, health-related quality of life, and economic burden of gastrointestinal stromal tumours. *J Clin Pharm Ther* 2007; 32: 557-565 [PMID: 18021332 DOI: 10.1111/j.1365-2710.2007.00852.x]
- Zhang Y, Zhou P, Xu M, Chen W, Li Q, Ji Y, Yao L. Endoscopic diagnosis and treatment of gastric glomus tumors. *Gastrointest Endosc* 2011; 73: 371-375 [PMID: 21295648 DOI: 10.1016/j.gie.2010.10.023]
- Shi Q, Zhong YS, Yao LQ, Zhou PH, Xu MD, Wang P. Endoscopic submucosal dissection for treatment of esophageal submucosal tumors originating from the muscularis propria layer. *Gastrointest Endosc* 2011; 74: 1194-1200 [PMID: 21963065 DOI: 10.1016/j.gie.2011.07.039]
- Xu MD, Cai MY, Zhou PH, Qin XY, Zhong YS, Chen WF, Hu JW, Zhang YQ, Ma LL, Qin WZ, Yao LQ. Submucosal tunneling endoscopic resection: a new technique for treating upper GI submucosal tumors originating from the muscularis propria layer (with videos). *Gastrointest Endosc* 2012; 75: 195-199 [PMID: 22056087 DOI: 10.1016/j.gie.2011.08.018]
- Tanaka S, Oka S, Kaneko I, Hirata M, Mouri R,

#### ■名词解释

ESD: 利用普通或一些特殊用途的内镜, 选择适宜的电刀, 通过高频电的作用将消化管病变部位的黏膜一整片从黏膜下层剥离下来的诊断和治疗方法, 一次性完整切除较大面积的表浅病变是ESD的独特优势。

#### ■同行评价

ESD及其衍生技术ESE、EFR作为一类内镜下治疗手段,具有高效及低并发症的特点,其并发症如出血及穿孔均可在内镜下成功处理,部分病例需要腹腔镜帮助.本文总结了不同内镜治疗方法治疗胃固有肌层肿瘤,内容全面丰富,对临床有一定的指导意义.

- Kanao H, Yoshida S, Chayama K. Endoscopic submucosal dissection for colorectal neoplasia: possibility of standardization. *Gastrointest Endosc* 2007; 66: 100-107 [PMID: 17591481 DOI: 10.1016/j.gie.2007.02.032]
- 16 Miyamoto S, Muto M, Hamamoto Y, Boku N, Ohtsu A, Baba S, Yoshida M, Ohkuwa M, Hosokawa K, Tajiri H, Yoshida S. A new technique for endoscopic mucosal resection with an insulated-tip electrosurgical knife improves the completeness of resection of intramucosal gastric neoplasms. *Gastrointest Endosc* 2002; 55: 576-581 [PMID: 11923778 DOI: 10.1067/mge.2002.122579]
- 17 Li QL, Yao LQ, Zhou PH, Xu MD, Chen SY, Zhong YS, Zhang YQ, Chen WF, Ma LL, Qin WZ. Submucosal tumors of the esophagogastric junction originating from the muscularis propria layer: a large study of endoscopic submucosal dissection (with video). *Gastrointest Endosc* 2012; 75: 1153-1158 [PMID: 22459663 DOI: 10.1016/j.gie.2012.01.037]
- 18 张其德, 韩树堂, 肖君, 史伟, 张小琴, 周玉宏. 内镜黏膜下剥离术治疗胃肠道黏膜下肿瘤18例. *中华消化内镜杂志* 2013; 30: 707-708
- 19 沈睿炜, 孙聪, 郑惠虹, 孙常波, 李江波, 魏冬梅, 朱红梅, 王贤君. ESD术治疗上消化道疾病50例. *世界华人消化杂志* 2014; 22: 730-734

编辑: 郭鹏 电编: 都珍珍



ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) DOI: 10.11569 2015年版权归百世登出版集团有限公司所有

#### ●消息●

### 《世界华人消化杂志》2013-2014年电子版合订本正式发布

本刊讯 《世界华人消化杂志》(*World Chinese Journal of Digestology, WCJD*, print ISSN 1009-3079, online ISSN 2219-2859, DOI: 10.11569) 2013-2014年电子版合订本在百世登出版集团有限公司(Baishideng Publishing Group Inc)网站已正式发布, 可以免费下载使用. 请作者和读者访问*WCJD*电子版合订本, 见: <http://www.wjgnet.com/bpg/e-boundjournals.htm> (郭鹏)

## 基于不同引物的16S rRNA序列分析法对SBP腹水细菌的鉴定及抗感染疗效评价的意义

赵莹莹, 邢卉春

赵莹莹, 邢卉春, 首都医科大学附属北京地坛医院肝病三科 北京市 100015

赵莹莹, 医师, 主要从事慢性病毒性肝炎及相关肝病发病机制及临床诊治研究。

首都医学发展科研基金资助项目, No. 2007-3054

国家自然科学基金资助项目, No. 81201160

国家科技重大专项课题资助项目, No. 2014ZX10005001

作者贡献分布: 赵莹莹与邢卉春对此文所作贡献均等; 此课题由邢卉春设计; 研究过程由赵莹莹操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由邢卉春提供; 数据分析由赵莹莹与邢卉春完成; 本论文写作由赵莹莹与邢卉春完成。

通讯作者: 邢卉春, 教授, 主任医师, 100015, 北京市朝阳区顺东街8号, 首都医科大学附属北京地坛医院肝病三科。  
[hchxing@sohu.com](mailto:hchxing@sohu.com)

电话: 010-84322291

收稿日期: 2015-08-09 修回日期: 2015-09-13

接受日期: 2015-09-21 在线出版日期: 2015-10-18

### Clinical application of 16S rRNA sequencing analysis for diagnosis of spontaneous bacterial peritonitis and evaluation of antibiotic efficacy

Ying-Ying Zhao, Hui-Chun Xing

Ying-Ying Zhao, Hui-Chun Xing, Center for Liver Diseases, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015, China

Supported by: Capital Medical Science Development Foundation, No. 2007-3054; National Natural Science Foundation of China, No. 81201160; National Science and Technology Major Project of China, No. 2014ZX10005001

Correspondence to: Hui-Chun Xing, Professor, Chief Physician, Center for Liver Diseases, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, 8 Jingshun East Road, Chaoyang District, Beijing 100015, China. [hchxing@sohu.com](mailto:hchxing@sohu.com)

Received: 2015-08-09 Revised: 2015-09-13

Accepted: 2015-09-21 Published online: 2015-10-18

### Abstract

**AIM:** To explore a new method of polymerase chain reaction (PCR) based on 16S rRNA gene of bacteria with two different pairs of primers (used alone or in combination) and alignment sequencing, to improve the detection rate of bacteria in ascitic fluid and evaluate its clinical value in bacterial species identification and evaluation of antibiotic efficacy.

**METHODS:** Blood and ascitic fluid samples were collected from 77 spontaneous bacterial peritonitis (SBP) ( $n = 61$ ) cirrhotic patients with ascites. Bacterial culture of ascitic fluid was conducted and the results were used as the gold standard in this study. Bacterial DNA in ascitic fluid was detected by PCR, based on the 16S rRNA gene, with two different pairs primers (MSQ-F/MSQ-R, 27F/1492R) and alignment sequencing assay. The results of bacterial species and positive rate between PCR method and bacterial culture of ascitic fluid were compared, and the results of bacterial species identified with different pair primers were also compared.

**RESULTS:** For products amplified with primers MSQ-F/MSQ-R, the coincidence rate of bacterial genus identification between PCR assay and ascitic fluid culture was 73.33% (11/15), and the coincidence rate of bacterial species identification was 66.67(10/15). For products amplified with primers 27F/1492R, the coincidence rate

### ■背景资料

自发性细菌性腹膜炎(spontaneous bacterial peritonitis, SBP)是失代偿期肝硬化合并腹水患者常见的并发症,病死率高,目前其确诊主要靠腹水细菌培养,但阳性率很低。近年许多研究利用细菌16S rRNA基因恒定区设计引物,对细菌进行分类鉴定。本实验室前期进行了16S rRNA基础上的PCR方法快速诊断SBP的相关研究,表明该方法可以应用于SBP的早期快速诊断,但检测效率及细菌鉴定能力还有待于提高。本研究结合前期工作,探讨联合应用2对不同引物的组合,能否改进腹水细菌鉴定方法,且观察其能否动态检测细菌。

### ■同行评议者

张进祥, 副教授, 华中科技大学同济医学院附属协和医院



## ■ 研究前沿

细菌16S rDNA通常有10个可变区,其间以恒定区相间隔。由于16S rDNA基因序列总长度适宜,结构完整,在细菌中含有多、有足够的信息量,故在细菌学研究中常被作为研究的靶分子。通常设计保守区引物,即所有细菌的共同引物进行PCR,可判断细菌的存在与否;通过对扩增产物序列的分析,可以对细菌进行种属鉴定和分类。

of bacterial genus identification between PCR assay and ascitic fluid culture was 80.00% (12/15), and the coincidence rate of bacterial species identification was 73.33% (11/15). For products amplified with primers MSQ-F/MSQ-R combined with primers 27F/1492R, the coincidence rate of bacterial genus identification between PCR assay and ascitic fluid culture was 86.67% (13/15), and the coincidence rate of bacterial species identification was 80.00% (12/15). In five patients with SBP whose ascitic fluid culture was negative, PCR reaction was positive, which was consistent with clinical characteristics.

**CONCLUSION:** The method combining the two different pairs of primers for identifying bacteria based on the 16S rRNA gene and alignment sequencing has better identification ability and can evaluate antibiotic efficacy dynamically.

© 2015 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

**Key Words:** Different pairs of primers; 16S rRNA gene and alignment sequencing; Spontaneous bacterial peritonitis; Bacterial identification; Antibiotic efficacy evaluation

Zhao YY, Xing HC. Clinical application of 16S rRNA sequencing analysis for diagnosis of spontaneous bacterial peritonitis and evaluation of antibiotic efficacy. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2015; 23(29): 4713-4719 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/23/4713.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v23.i29.4713>

## 摘要

**目的:** 探讨联合单独或联合应用2对不同引物的16S rRNA序列分析法,能否提高自发性细菌性腹膜炎(spontaneous bacterial peritonitis, SBP)腹水细菌检测的敏感性及准确性,并且通过其检测细菌的结果来评价抗感染治疗效果。

**方法:** 收集77例肝硬化失代偿期合并腹水的标本,其中SBP 61例,非SBP 16例,应用2对不同引物(MSQ-F/MSQ-R与27F/1492R)的组合,对腹水细菌分别进行16S rRNA序列分析,对腹水进行常规化验、细菌培养及生化方法鉴定细菌,分析单独或联合应用2对不同引物的16S rRNA序列分析法在鉴定SBP腹水细菌中的应用价值,并对腹水细菌状态进行动态评价。

**结果:** 与腹水细菌培养、生化鉴定的细菌结果相比,16S rRNA序列分析法鉴定细菌的结果与之的符合率:单用引物MSQ-F/MSQ-R:属的符合率73.33%(11/15),种的符合率66.67%(10/15);单用27F/1492R引物:属的符合率80.00%(12/15),种的符合率73.3%(11/15);引物MSQ-F/MSQ-R联合27F/1492R:属的符合率86.67%(13/15),种的鉴定的符合率80.00%(12/15),应用2对引物的组合进行16S rRNA序列分析鉴定细菌,可以得到更高的准确率。5例SBP患者(腹水细菌培养阳性组2例,临床感染组3例)经抗感染治疗后,腹水细菌培养阴性,但临床感染控制不理想的患者,16S rRNA序列分析法检测腹水细菌仍为阳性。

**结论:** 联合应用2对不同引物的16S rRNA序列分析法,可以提高SBP腹水细菌的鉴定能力,并且可以动态应用于临床进行抗感染疗效评价。

© 2015年版权归百世登出版集团有限公司所有。

**关键词:** 不同引物; 16S rRNA序列分析; 自发性细菌性腹膜炎; 细菌鉴定; 抗感染疗效评价

**核心提示:** 本研究中应用2对不同的16S rRNA基因通用引物的组合,对腹水细菌进行检测、鉴定,结果发现该方法可提高自发性细菌性腹膜炎(spontaneous bacterial peritonitis)腹水细菌的鉴定能力;可以检测抗生素治疗前后腹水的细菌,能动态检测抗感染的效果,评价抗感染治疗疗效。

赵莹莹, 邢开春. 基于不同引物的16S rRNA序列分析法对SBP腹水细菌的鉴定及抗感染疗效评价的意义. *世界华人消化杂志* 2015; 23(29): 4713-4719 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/23/4713.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v23.i29.4713>

## 0 引言

失代偿期肝硬化合并腹水患者常见的并发症之一就是自发性细菌性腹膜炎(spontaneous bacterial peritonitis, SBP),病死率高<sup>[1-5]</sup>,本实验室前期研究<sup>[6]</sup>采用16S rRNA基因序列分析方法,探讨了其在快速诊断SBP中的应用价值,结果显示该方法检测腹水细菌的灵敏度、特异度均为100%,鉴定细菌的结果与腹水细菌培养、生化鉴定结果的属符合率为73.33%

(11/15), 因此可以用于SBP的快速诊断, 结合序列测定可对检测阳性的细菌进行鉴定. 但单对引物对细菌鉴定的敏感性、准确性均有待进一步提高. 本研究结合前期工作, 选用2对不同的基于16S rRNA基因的引物形成组合后, 对腹水细菌进行PCR测序, 探讨单独或联合应用2对不同引物的16S rRNA序列分析法, 能否提高腹水细菌检测的敏感性、准确性, 并且观察该方法能否用于检测抗感染治疗过程中的细菌的动态变化, 从而进一步探讨其能否评价抗感染治疗效果.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 选取均来自首都医科大学附属北京地坛医院住院患者, 为2012-03/2013-04的77例肝硬化失代偿期伴腹水的住院患者, 同时收集这些患者在抗感染治疗前、抗感染治疗1 wk后这两个时间点的所有临床资料. LH755全自动血液分析仪、全自动H7600生化分析仪(日立, 日本), 微生物鉴定分析仪、厌氧/需氧血培养瓶、Phoenix Spec Nephelometer比浊仪、BD-Phoenix 100微生物鉴定分析仪(BD, 美国), 精巧型恒温混匀仪(Eppendorf Thermomixer compact, 德国), PCR仪(PTC-240 MJ Research, 美国), 凝胶成像分析仪(WD-9413B, 六一牌, 北京六一仪器厂). Wizard® Genomic DNA Purification Kit(Promega, USA), PCR上下游引物、GoTaq酶(生工生物工程, 上海), Nuclerase Free Water、1000 bp、500 bp DNA Ladder Marker、10×Loading Buffer(宝生物工程, 大连), Gold View核酸染料(北京泛博生物化学有限公司), BD-Phoenix AST指示剂(BD, 美国).

### 1.2 方法

**1.2.1 SBP诊断标准:** 排除腹腔脏器穿孔引起的继发性腹膜炎的情况下: (1)腹水中多形核白细胞计数(polymorphonuclear, PMN)  $\geq 0.25 \times 10^9$  cells/L的腹水<sup>[1]</sup>; (2)血性腹水(腹水中红细胞计数  $> 10.00 \times 10^3$  cells/L)情况下, 腹水PMN数要根据腹水中红细胞数进行校正计算, 即每250个红细胞计数要减去1个PMN计数<sup>[2]</sup>; (3)腹水细菌培养阴性, 但是PMN  $> 0.25 \times 10^9$  cells/L, 称为是变异性SBP<sup>[3]</sup>. 其中, 酒精性肝硬化腹水的患者, 出现发热、腹痛、腹水PMN升高就可以认为是SBP<sup>[1]</sup>. 有些腹水细菌培养结果为阴性,

但是血培养阳性, 且PMN升高, 也应可以诊断为SBP<sup>[2]</sup>.

**1.2.2 资料收集:** 患者基本信息包括: 生命体征、腹腔感染的症状与体征, 是否合并肝性脑病、感染性休克等严重并发症; 除此之外, 还需收集患者的血常规、C-反应蛋白(C reactive protein, CRP)、降钙素原、血氨、肝肾功能等的变化值. 同时腹水床旁接种于血培养瓶及肝素锂抗凝管, 用于腹水细菌培养、腹水生化、鲎试验等检测、另外50 mL腹水标本用于提取细菌DNA并进行16S rRNA序列分析法; 将所有患者按照临床资料分为3组: (1)A组(腹水细菌培养阳性组,  $n = 15$ ): 明确为腹腔感染<sup>[1]</sup>、腹水细菌培养阳性的SBP患者, 且排除继发性腹膜炎者; (2)B组(腹水细菌培养阴性且无临床感染组,  $n = 16$ ): 腹水细菌培养阴性、临床诊疗过程证实无腹腔感染的患者; (3)C组(腹水细菌培养阴性组,  $n = 46$ ): 腹水细菌培养阴性、有腹腔感染的局部或全身系统症状, 和/或腹部压痛、反跳痛等提示临床腹腔感染症状、体征, 部分患者细菌血培养结果为阳性, 经抗感染治疗后, 患者局部及全身体征消失, 腹水PMN及血中性粒细胞百分比降至正常. 本研究方案已通过伦理委员会的批准, 每位同意参加研究的患者都需要签署知情同意书.

**1.2.3 腹水细菌培养, 生化鉴定方法进行细菌鉴定:** 腹水20 mL, 床旁接种于血培养瓶, 然后置于BD-100微生物鉴定分析仪进行培养, 应用Phoenix Spec Nephelometer比浊仪及BD专利呈色反应(指示剂随细菌生长过程中的氧化还原反应而变色的反应)结合的双重检测, 进行细菌及药敏的鉴定. (指示剂为246003 AST Broth 4 0.00 DM、246009 AST-S Indicator 100.00 DM).

**1.2.4 基于16S rRNA基因的PCR反应:** (1)腹水细菌基因组DNA的提取: 按照试剂盒说明书提取; (2)PCR反应: 用于检测腹水的细菌基因组DNA. 参照相关文献[7-9], 以16S rRNA基因通用引物MSQ-F/MSQ-R、27F/1492R进行PCR反应, 前者的PCR产物大小约为500 bp, 后者的PCR产物长度约为1500 bp(表1); (3)PCR反应条件: MSQ-F/MSQ-R: 94 °C 预变性10 min、94 °C 变性45 s、56 °C 退火30 s、72 °C 延伸1 min、重复循环36次, 72 °C 10 min、4 °C 保存

## ■ 相关报道

Srinivasan等利用16S rRNA基因测序法鉴定细菌, 获得较高的属、种的符合率, 可鉴定革兰氏阴性杆菌、革兰氏阳性球菌及革兰氏阴性球菌. Teng等也证实应用16S rRNA基因测序法可以鉴定需氧革兰氏阴性杆菌. 潘红英等应用16S rRNA基因PCR及基因芯片检测了腹水细菌基因组DNA. Hardick等应用高分辨熔解分析技术联合16S PCR检测SBP的腹水细菌, 结果提示其有较高的敏感性、特异性及细菌种的鉴定符合率. 全敏等建立了SBP常见感染菌PCR-单链构象多态性图谱, 可以同时使用2对引物扩增标准菌DNA.

■ 创新亮点

本研究应用基于不同引物的16S rRNA序列分析法对SBP腹水细菌鉴定, 技术路线简便, 省时、可重复性强、费用低、安全性高, 整个实验过程中未应用明显放射性及毒性物质。应用2对不同的16S rRNA基因通用引物组合, 进行了腹水细菌的检测、鉴定, 尤其是对抗感染治疗前后的腹水细菌也进行了检测及鉴定, 这是不同于以往研究的创新之处; 除了得到更高的准确率、提高SBP腹水细菌的鉴定能力外, 还能动态检测抗感染的效果, 评价抗感染治疗疗效。

表 1 PCR扩增引物

引物	序列(方向5'-3')	位置(以 <i>E. coli</i> 为准)	备注	温度(°C)
MSQ-F	AGAGTTTGATCATGGCTCAG	7-26	针对多数细菌	58
MSQ-R	ACCGCGACTGCTGCTGGCAC	531-512	针对肠道细菌	68
27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	8-27	针对肠道相关细菌	57.8
1492R	GGYTACCTTGTTACGACTT-CTT	1512-1292	针对肠道大部分细菌	54.3

F: 正向引物, 与rRNA序列符合; R: 反向引物, 与rRNA序列互补; Y: 嘧啶碱基, 可以为C也可以为T。

(抗生素治疗前后)。27F/1492R: A组于抗生素治疗前后进行; 94 °C 预变性10 min、94 °C 变性45 s、52 °C 退火30 s、72 °C 延伸1.5 min, 重复循环36次, 72 °C 10 min、4 °C 保存。

1.2.5 PCR产物的进行序列测序及细菌鉴定: 将电泳验证结果为阳性的PCR产物的样本外送测序; 测序结果回报后均在网上用BLAST工具分析(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)与GenBank已知核酸序列(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>)比对分析, 进行细菌种、属的鉴定。并与腹水细菌培养的结果进行比较。

**统计学处理** 对计数资料进行分析, 计算16S rRNA序列分析法鉴定细菌的阳性率; 同时比较其与腹水细菌培养的生化方法鉴定的细菌种、属的符合率。

2 结果

2.1 16S rRNA序列分析法检测腹水细菌的阳性率 A组检测腹水细菌的阳性率为100%(15/15), C组检测腹水细菌的阳性率为76.09%(35/46)。B组患者的PCR检测及腹水培养均为阴性; C组的腹水PMN $\geq 0.25 \times 10^9$  cells/L的标本仅47.82%(22/46)。

2.2 分析腹水细菌培养、生化鉴定的结果 应用2对不同引物(16S rRNA与27F/1492R)进行基于16S rRNA基因的PCR反应后, 扩增产物进行序列测定, 经BLAST工具分析及GenBank已知核酸序比对后, 再将得到的细菌鉴定结果进行整理, 发现应用引物MSQ-F/MSQ-R进行16S rRNA序列分析与腹水细菌培养的生化鉴定方法相比, 二者菌属鉴定的符合率为73.33%(11/15), 菌种的符合率66.67%(10/15); 单用27F/1492R引物: 二者菌属鉴定符合率80.00%(12/15)菌种的符合率73.30%(11/15); 联合应用引物16S rRNA与27F/1492R组合: 二者

菌属的符合率86.67%(13/15), 菌种的鉴定符合率80.00%(12/15)(图1)。

2.3 不同引物进行的16S rRNA序列分析法鉴定细菌的准确性 通过比较腹水细菌培养的生化鉴定与16S rRNA序列分析检测方法, 结果发现与腹水培养的生化鉴定方法相比, 联合应用2对不同引物的组合进行16S rRNA序列分析法鉴定细菌(以MSQ-F/MSQ-R及27F/1492R为引物)的结果, 与腹水细菌培养、生化鉴定细菌的属的符合率更高, 可基本满足临床需要, 要高于单用一种引物对腹水细菌鉴定的方法(以MSQ-F/MSQ-R为引物的16S rRNA基因PCR扩增)。

2.4 抗感染治疗前后的腹水细菌的鉴定 抗生素的使用过程中, 在使用的第3、5、7天时均要对抗生素疗效进行评价。因此, 我们针对抗生素治疗前及治疗1 wk后的患者资料进行了分析。

A组(腹水细菌培养阳性组)的患者经治疗后, 腹水细菌培养及再次进行基于16S rRNA基因的PCR反应均呈阴性的结果有13例; 仍呈阳性的有2例。这2例在抗生素治疗前的腹水细菌培养结果分别为头状葡萄球菌、屎肠球菌; 应用抗生素后, 腹水细菌培养结果为阴性, 16S rRNA基因PCR的结果分别为克雷伯氏杆菌、大肠杆菌。C组(腹水细菌培养阴性组)的患者经治疗后, 用腹水再次进行基于16S rRNA基因的PCR反应, 有43例患者呈阴性结果; 而仍有3例患者呈阳性: 抗感染治疗前的细菌为克雷伯氏杆菌、大肠埃希氏菌、变形杆菌, 抗感染治疗后分别为克雷伯氏杆菌、大肠埃希氏菌、变形杆菌(图2)。

这5例患者PCR反应仍阳性的患者, 经临床分析认为, 其仍存在感染, 调整抗感染治疗后, 发热、腹痛、腹膜刺激征症状明显缓解; 提示该5例患者确实仍然存在腹腔感染。



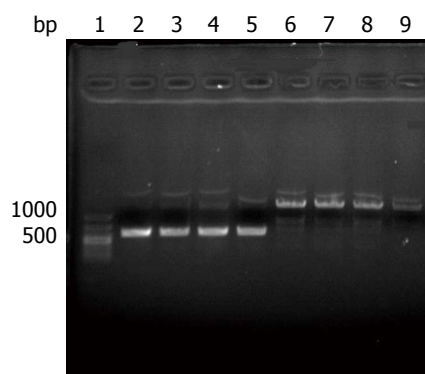


图 1 不同引物的电泳图。1: DNA ladder marker; 2-9: MSQ-F/MSQ-R扩增的DNA样本a-h的PCR产物。

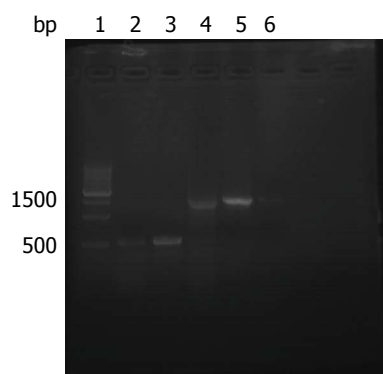


图 2 抗感染治疗前后腹水细菌均为阳性。1: DNA ladder marker; 2, 3: MSQ-F/MSQ-R扩增的DNA样本c的PCR产物; 4, 5: 27F/1492R扩增的DNA样本d的PCR产物; 6: 阴性对照。

#### 应用要点

16S rRNA基因序列分析法能用于鉴定所有病原细菌,其稳定性好、准确度高、适用面广、费用低、可重复性强等特点,无论是在属还是种的层次上,都有较高的准确率,因此该方法可用于SBP的快速诊断及提高腹水细菌的鉴定能力,同时还能检测抗感染过程中的细菌动态变化,对抗感染治疗效果进行评价。在SBP的诊断中,该方法具有较高的细菌检出阳性率、及菌属、种鉴定的符合率、费用低,有望改变目前SBP的腹水细菌培养阳性率不高、花费昂贵的现状。

### 3 讨论

SBP患者早期大多数中毒症状不明显,近半数患者无腹痛,腹膜刺激征轻微甚至缺如<sup>[1,2]</sup>。目前SBP的确诊主要依赖于腹水培养、腹水细菌学检查,但腹水细菌培养阳性率很低,即使腹水中PMN $\geq 0.25 \times 10^9$  cells/L的腹水,细菌培养阳性率也仅达65%<sup>[3-5]</sup>,临床对SBP的疗效评价主要依靠对患者生命体征状况、感染症状、体征及血常规、CRP、降钙素原、鲎试验、腹水细胞计数等综合评价<sup>[10-13]</sup>。近年来,随着分子生物学技术的发展,许多研究者利用细菌16S rRNA基因恒定区设计引物,可以对不同菌属、菌种的细菌进行分类鉴定<sup>[3,10,14,15]</sup>。Srinivasan等<sup>[14]</sup>利用16S rRNA基因测序法与传统的非16S rRNA基因相比,鉴定细菌的属的符合率及种的符合率为均较高;可鉴定临床的革兰氏阴性杆菌、革兰氏阳性球菌及革兰氏阴性球菌。Teng等<sup>[15]</sup>也证实应用16S rRNA基因测序法可以鉴定需氧革兰氏阴性杆菌。潘红英等<sup>[16]</sup>应用16S rRNA基因PCR及基因芯片检测了腹水细菌基因组DNA。Hardick等<sup>[17]</sup>应用高分辨熔解分析技术诊断SBP。全敏等<sup>[18]</sup>建立了SBP常见感染菌PCR-单链构象多态性(single-strand conformation polymorphism)图谱,同时使用2对引物(ER10/ER11与P11P/P13P)同时扩增标准菌DNA。本实验室前期研究,进行了基于16S rRNA基础上的PCR方法在快速诊断自发性细菌性腹膜炎中应用价值的相关研究<sup>[6]</sup>,结果表明基于16S rRNA基因的方法检测腹水细菌感染的特异性、灵敏度、阳性预测值、阴性预测值均较高,在快速诊断SBP中有一定的应用价值,可以从属、种的水平鉴定细菌,

这些结论与既往的研究结论一致<sup>[14,15]</sup>;但是测序结果与GenBank核酸数据库中的已知序列进行菌种鉴定时,有4份标本的菌种与腹水细菌培养得到的生化鉴定菌种不符合,为此我们设计了2对引物,以期能提高检测效率及细菌鉴定能力。

本研究通过比较腹水细菌培养的生化鉴定与16S rRNA序列分析检测方法,结果发现与腹水培养的生化鉴定方法相比,联合应用2对不同引物的组合进行16S rRNA序列分析法鉴定细菌的结果,与腹水细菌培养、生化鉴定细菌的属的符合率更高。当然,这也可能与2对引物自身的特点有关:从MSQ-F/MSQ-R及27F/1492R的扩增产物的靶序列位置来看,后者几乎覆盖16S rRNA细菌基因组DNA的全长,联合应用2对引物组合进行反应时,一旦其中1对引物基础上的16S rRNA序列分析法鉴定的结果与生化鉴定结果不一致时,可以参考另外1对引物的测序结果,有助于评定细菌的鉴定结果,指导临床。以细菌培养、生化鉴定结果为标准,用2对不同引物组合的进行16S rRNA序列分析,对细菌菌属鉴定的准确性较好。5例自发性细菌性腹膜炎患者(A组2例, C组3例)经抗感染治疗后,腹水细菌培养阴性,但临床感染控制不理想的患者,经PCR测序检测腹水细菌仍为阳性。这5例患者虽然发热、腹痛、腹膜刺激征较用药前明显缓解,腹水细菌培养阴性,但血中性粒细胞百分比或降钙素原或CRP较前无明显变化(数值仍超出正常参考值),用16S rRNA序列分析法检测获得了细菌阳性的结果,提示基于16S rRNA基因的PCR测序可

## ■名词解释

自发性细菌性腹膜炎: 是失代偿期肝硬化合并腹水患者常见的并发症之一, 病死率高, 是在腹腔和邻近器官无直接细菌感染来源的情况下发生于腹腔的感染; 多形核白细胞计数: 多形核白细胞主要是中性粒细胞, 也包括包括少量嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞和肥大细胞; 鲎试验: 是检测内毒素血症的一种试验, 在内毒素性休克、急性化脓性胆管炎、重症肝炎、腹膜炎、肝硬化等临床病例中阳性率较高。

更灵敏地检测到腹水的细菌感染。这可能因为16S rRNA基因序列分析法能检测的模板起始浓度低; 对标本的纯度要求不高, 可为未经任何处理的临床标本; 具有特异性强、灵敏度高特点: 只需针对靶序列设计一段通用16S rRNA基因保守区引物即可进行反应。但是由于不同的引物含有不同的GC含量、Tm值, 导致扩增的效率及产物会有所不同。

由此可见, 本研究与既往的应用16S rRNA基因恒定区设计引物, 来对不同菌属、菌种的细菌进行分类鉴定研究相比, 有以下几个优点: (1)简便的技术路线: 本研究只采用了普通实验室常用的PCR技术, 一般在2-4 h内完成扩增反应, 收集标本的当天便可以应用基于16S rRNA的PCR方法检测腹水是否有细菌感染, PCR方法阳性的再送去测序, 测序结果通常在次日即可回报; 操作更方便、简洁、省时、可重复性强; (2)费用低: 与高通量的深度测序或基因芯片相比, 本研究采用的方法在费用上更为大多数实验室能接受, 应用于临床则会使患者诊断费用大大降低; (3)安全性高: 整个实验过程中未应用明显放射性及毒性物质, 对环境及人体都不具有明显损害性。

本研究中应用的腹水细菌鉴定方法, 与其他方法相比, 有以下3个优点: (1)创新: 研究中应用2对不同的16S rRNA基因通用引物, 并将之进行组合应用于腹水细菌的检测、鉴定, 尤其是对抗感染治疗前后的腹水细菌也进行了检测及鉴定, 这是本研究不同于既往研究的创新之处; (2)准确率更高: 单独应用1对引物的研究方法, 检测腹水细菌的灵敏度、特异度均比较高, 鉴定细菌的结果与腹水细菌培养、生化鉴定的属符合率也可以满足临床的需要, 但是应用2对引物的组合进行16S rRNA基因序列分析鉴定细菌, 可以得到更高的准确率, 提高SBP腹水细菌的鉴定能力; (3)评价抗感染疗效: 通过检测抗生素治疗前后腹水的细菌, 能动态检测抗感染的效果, 评价抗感染治疗疗效。

16S rRNA基因序列分析法能用于鉴定所有病原细菌, 虽步骤相对多于传统的腹水细菌培养、生化鉴定方法, 但是其稳定性好、准确度高、适用面广、费用低、可重复性强等特点, 无论是在属还是种的层次上, 都有较高的准确率。正是这些特点, 使本研究中应用的, 通

过联合应用2对不同引物的16S rRNA基因序列分析法, 可以用于SBP的快速诊断及提高腹水细菌的鉴定能力, 同时可以通过其检测抗感染过程中的细菌, 来对SBP的抗感染治疗效果进行动态评价。在SBP的诊断中, 该方法具有较高的细菌阳性率、及菌属、种鉴定的符合率, 而且费用低, 有希望改变目前SBP的腹水细菌培养阳性率不高、花费昂贵的现状。

## 4 参考文献

- Runyon BA. Management of adult patients with ascites due to cirrhosis: an update. *Hepatology* 2009; 49: 2087-2107 [PMID: 19475696 DOI: 10.1002/hep.22853]
- Rimola A, García-Tsao G, Navasa M, Piddock LJ, Planas R, Bernard B, Inadomi JM. Diagnosis, treatment and prophylaxis of spontaneous bacterial peritonitis: a consensus document. International Ascites Club. *J Hepatol* 2000; 32: 142-153 [PMID: 10673079]
- Koulaouzidis A, Bhat S, Saeed AA. Spontaneous bacterial peritonitis. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 1042-1049 [PMID: 19266595]
- Shizuma T, Fukuyama N. Investigation into bacteremia and spontaneous bacterial peritonitis in patients with liver cirrhosis in Japan. *Turk J Gastroenterol* 2012; 23: 122-126 [PMID: 22706739]
- Wiest R, Krag A, Gerbes A. Spontaneous bacterial peritonitis: recent guidelines and beyond. *Gut* 2012; 61: 297-310 [PMID: 22147550 DOI: 10.1136/gutjnl-2011-300779]
- 赵莹莹, 全敏, 王琦, 程丹颖, 段英, 李贲, 杨松, 吴淑玲, 刘顺爱, 邢卉春, 成军. PCR方法在自发性腹膜炎快速诊断中的应用. *中华实验和临床感染病杂志(电子版)* 2013; 7: 19-22
- 袁春, 黄长形, 连建奇. PCR测肝硬化腹水中细菌DNA的研究. *透析与人工器官* 2007; 18: 20-24
- 焦振泉, 刘秀梅. 16S rRNA序列同源性分析与细菌系统分类鉴定. *国外医学卫生分册* 1998; 25: 12-16
- Isoun TT. The histopathology of experimental disease produced in mice infected with *Trypanosoma vivax*. *Acta Trop* 1975; 32: 267-272 [PMID: 1987]
- Hwang SM, Kim MS, Park KU, Song J, Kim EC. Tuf gene sequence analysis has greater discriminatory power than 16S rRNA sequence analysis in identification of clinical isolates of coagulase-negative staphylococci. *J Clin Microbiol* 2011; 49: 4142-4149 [PMID: 21998419 DOI: 10.1128/JCM.05213-1]
- 刘志娟, 蔡皓东, 张艳华. 血清降钙素原在肝硬化并自发腹膜炎患者诊治中的变化. *中华实验和临床感染病杂志* 2012; 6: 238-241
- 全敏, 邢卉春. 肝硬化合并自发性细菌性腹膜炎诊断的研究进展. *中华实验和临床感染病杂志* 2012; 6: 156-158
- Koulaouzidis A. Diagnosis of spontaneous bacterial peritonitis: an update on leucocyte esterase reagent strips. *World J Gastroenterol* 2011; 17: 1091-1094 [PMID: 21448413 DOI: 10.3748/wjg.v17.i9.1091]

- 14 Srinivasan R, Karaoz U, Volegova M, MacKichan J, Kato-Maeda M, Miller S, Nadarajan R, Brodie EL, Lynch SV. Use of 16S rRNA gene for identification of a broad range of clinically relevant bacterial pathogens. *PLoS One* 2015; 10: e0117617 [PMID: 25658760 DOI: 10.1371/journal.pone.0117617]
- 15 Teng JL, Yeung MY, Yue G, Au-Yeung RK, Yeung EY, Fung AM, Tse H, Yuen KY, Lau SK, Woo PC. In silico analysis of 16S rRNA gene sequencing based methods for identification of medically important aerobic Gram-negative bacteria. *J Med Microbiol* 2011; 60: 1281-1286 [PMID: 21498652 DOI: 10.1099/jmm.0.027805-0]
- 16 潘红英, 湛翠容, 尚志强, 孙洪运, 陈群伟, 徐晶, 叶荣夏, 娄国强, 卢德荣. 定量PCR联合基因芯片检测腹水细菌16S rRNA诊断自发性细菌性腹膜炎. *中华肝脏病杂志* 2011; 19: 297-300
- 17 Hardick J, Won H, Jeng K, Hsieh YH, Gaydos CA, Rothman RE, Yang S. Identification of bacterial pathogens in ascitic fluids from patients with suspected spontaneous bacterial peritonitis by use of broad-range PCR (16S PCR) coupled with high-resolution melt analysis. *J Clin Microbiol* 2012; 50: 2428-2432 [PMID: 22573594 DOI: 10.1128/JCM.00345-12]
- 18 全敏, 李伟, 王琦, 邢卉春, 成军. 自发性腹膜炎常见感染菌PCR-SSCP图谱的建立. *中华实验和临床感染病杂志* 2013; 7: 9-11

#### 同行评价

本文联合应用2对不同引物的16S rRNA序列分析法, 证明此方法可以提高SBP腹水细菌的鉴定能力, 并且可以动态应用于临床进行抗感染疗效评价。研究内容具有一定的重要性, 为诊断SBP提供了依据。本篇文章有足够的实用性。研究结果较准确, 实验证据较充分。讨论部分条理分明, 有系统的理论分析。文章具有可读性。

编辑: 于明茜 电编: 都珍珍





## 双重血浆分子吸附治疗急性肝衰竭的临床应用

张斌, 杨永耿, 巩月英, 陈明迪, 郜琨, 任辉邦, 张玉红

### ■背景资料

内科治疗、人工肝支持和肝脏移植是慢性肝衰竭的基本治疗方法。血浆置换是国内外应用最多的非生物性人工肝技术, 但由于血源紧张等限制了其应用。以吸附功能为主的人工肝技术目前在国内外迅速发展和普及, 单纯血液吸附及血浆吸附的疗效比较肯定, 但对非特异性炎症介质及特异性胆红素双重吸附的研究很少。

张斌, 巩月英, 陈明迪, 郜琨, 任辉邦, 张玉红, 青海省人民医院急诊ICU 青海省西宁市 810007

杨永耿, 青海省人民医院消化内科 青海省西宁市 810007  
 张斌, 副主任医师, 主要从事重症血液净化方面的临床与研究。

作者贡献分布: 此课题由张斌设计; 研究过程中由杨永耿提供大部分病例; 郜琨与任辉邦完成资料收集; 巩月英指导完成临床操作; 试剂由陈明迪提供; 数据分析由张玉红完成; 论文写作由张斌完成。

通讯作者: 张斌, 副主任医师, 810007, 青海省西宁市共和路2号, 青海省人民医院急诊ICU. zhangbinx69@126.com

收稿日期: 2015-09-11 修回日期: 2015-10-08

接受日期: 2015-10-09 在线出版日期: 2015-10-18

### Clinical application of double plasma molecular adsorption system in treatment of acute liver failure

Bin Zhang, Yong-Geng Yang, Yue-Ying Gong, Ming-Di Chen, Kun Gao, Hui-Bang Ren, Yu-Hong Zhang

Bin Zhang, Yue-Ying Gong, Ming-Di Chen, Kun Gao, Hui-Bang Ren, Yu-Hong Zhang, Department of Emergency Intensive Care Unit, Qinghai Provincial People's Hospital, Xining 810007, Qinghai Province, China

Yong-Geng Yang, Department of Gastroenterology, Qinghai Provincial People's Hospital, Xining 810007, Qinghai Province, China

Correspondence to: Bin Zhang, Associate Chief Physician, Department of Emergency Intensive Care Unit, Qinghai Provincial People's Hospital 810007, 2 Gonghe Road, Xining 810007, Qinghai Province, China. zhangbinx69@126.com

Received: 2015-09-11 Revised: 2015-10-08

Accepted: 2015-10-09 Published online: 2015-10-18

### Abstract

**AIM:** To evaluate the efficacy and safety of an artificial liver support system, double plasma molecular adsorption system (DPMAS), in the

treatment of acute liver failure.

**METHODS:** DPMAS was used to treat 19 cases of non-viral acute liver failure, who were hospitalized in emergency intensive care unit of Qinghai Provincial People's Hospital from November 2012 to June 2015. The changes of symptoms, physical signs, liver function, coagulation function, inflammatory factors and adverse reactions were detected to assess the efficacy and safety of the system.

**RESULTS:** Thirteen of 19 cases survived, with a survival rate of 68.4%. A total of 68 times of DPMAS treatment were administered (2 to 5 times per case, average 3.6 times). DPMAS treatment resulted in a remarkable improvement in clinical symptoms of nausea, vomiting, fatigue and abdominal swelling. There was a significant decrease in total bilirubin (TBIL), direct bilirubin (DBIL), blood ammonia (NH<sub>3</sub>), alanine aminotransferase (ALT) and interleukin-6 (IL-6) ( $P < 0.01$ ). The levels of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and total bile acid (TBA) were significantly decreased ( $P < 0.05$ ), while there was a significant increase in the level of prothrombin activity (TPA) ( $P < 0.01$ ). Of 68 times of DPMAS treatment administered, 62 were successfully completed, 2 were discontinued due to coagulation dysfunction, and 4 were discontinued due to circulatory failure. Infection, fever, bleeding and other adverse reactions did not occur in the treatment.

**CONCLUSION:** DPMAS treatment can significantly improve the clinical symptoms

### ■同行评议者

郑素军, 副教授, 主任医师, 首都医科大学附属北京佑安医院人工肝中心

and liver function in ALF patients and has good safety.

© 2015 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

**Key Words:** Acute liver failure; Artificial liver support system; Double plasma molecular adsorption system; Efficacy; Safety

Zhang B, Yang YG, Gong YY, Chen MD, Gao K, Ren HB, Zhang YH. Clinical application of double plasma molecular adsorption system in treatment of acute liver failure. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2015; 23(29): 4720-4724 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/23/4720.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v23.i29.4720>

## 摘要

**目的:** 观察人工肝技术-双重血浆分子吸附(double plasma molecular adsorption system, DPMAS)治疗急性肝衰竭(acute liver failure, ALF)患者的有效性及安全性。

**方法:** 本研究纳入青海省人民医院急诊ICU于2012-11/2015-06收住的非病毒性ALF患者19例, 观察治疗前后症状和体征改善情况; 监测肝功能、凝血、炎症因子指标以及不良反应等, 判断其疗效及安全性。

**结果:** 19例ALF患者生存13例, 死亡6例, 抢救成功率68.4%。DPMAS治疗共68次, 治疗次数2-5次, 平均3.6次。存活者治疗后恶心、呕吐、乏力、腹胀等症状明显缓解; 肝功能及炎症指标中, 血清总胆红素(total bilirubin)、直接胆红素(direct bilirubin)、血氨(blood ammonia)、谷丙转氨酶(alanine aminotransferase)、白介素-6(interleukin-6)等均明显下降, 统计学分析有显著性差异( $P<0.01$ ), 肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ )及总胆汁酸(total bile acid)下降有显著性差异( $P<0.05$ ); 凝血酶原活动度(prothrombin activity)升高有显著性差异( $P<0.01$ )。68例次治疗中顺利完成治疗62例次, 因管路凝血提前终止治疗2例次, 因循环功能衰竭提前终止治疗4例, 治疗过程中未出现感染、发热、大出血等明显不良反应。

**结论:** DPMAS可显著改善ALF患者的临床症状及肝功能, 同时安全性良好, 为提高ALF抢救成功率提供了新的人工肝模式。

© 2015年版权归百世登出版集团有限公司所有。

**关键词:** 急性肝功能衰竭; 人工肝; 双重血浆分子吸附; 疗效; 安全性

**核心提示:** 双重血浆分子吸附治疗系统可以在迅速改善症状的同时清除炎症介质及胆红素等有害物质, 改善肝功能, 提高了急性肝衰竭的抢救成功率, 改善患者预后, 同时治疗过程中未出现感染、发热、大出血等明显不良反应, 其安全性良好。

张斌, 杨永耿, 巩月英, 陈明迪, 邵琨, 任辉邦, 张玉红. 双重血浆分子吸附治疗急性肝衰竭的临床应用. *世界华人消化杂志* 2015; 23(29): 4720-4724 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/23/4720.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v23.i29.4720>

## 0 引言

急性肝衰竭(acute liver failure, ALF)临床并不少见<sup>[1]</sup>, 国内常见病因为病毒性肝炎所致, 但非病毒性因素如药物、毒物、感染、休克、自身免疫性疾病等导致的急性肝功能衰竭也在增多<sup>[2]</sup>。多种因素引起的其短期内肝细胞发生大块或亚大块坏死, 导致出现以黄疸、肝性脑病、出血倾向等主要表现的临床综合征, 治疗困难, 病死率高。近年来随着人工肝支持系统(artificial liver support system, ALSS)技术的发展, 为提高ALF的抢救成功率提供了重要途径。本文作者应用双重血浆分子吸附系统(double plasma molecular adsorption system, DPMAS)治疗非病毒性ALF患者19例, 取得较好疗效, 现报告如下。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 选取2012-11/2015-06在青海省人民医院急诊ICU收住的非病毒性ALF患者19例, 男性14例, 女性5例; 平均年龄43岁; 病因中急性药物中毒8例, 重症感染5例, 创伤失血性休克3例, 妊娠急性脂肪肝3例。均符合2012年版《肝衰竭诊疗指南》<sup>[3]</sup>的诊断标准。本研究得到了医院伦理委员会的批准, 获得了患者家属的充分知情和同意。设备及耗材: 可乐丽KM-8900 $\alpha$ 人工肝机, 旭化成PE-08膜型血浆分离器, 健帆一次性使用血浆胆红素吸附器BS330, 健帆一次性使用血液灌流器HA330-II, 川澄KPD-89PP体外循环血路, 柯惠13.5 Fr/Ch(4.5 mm)×24 cm单针双腔血液透析通路。

## ■ 研发前沿

从单一治疗模式向多种方法联合或序贯应用是今后人工肝技术发展的方向。国内外的研究都倾向于2种或2种以上血液净化模式的组合使用治疗肝衰竭。本研究病例数较少且病因均为非病毒性, 就国内主要病因为肝炎病毒导致的肝衰竭的双重血浆分子吸附(double plasma molecular adsorption system, DPMAS)治疗时机、与其他血液净化模式的组合方式以及疗效等仍需要临床上进一步研究。

## ■ 相关报道

陈佳佳等首先报道DPMAS能有效改善肝功能, 不造成凝血因子进一步的损失减少, 同时不影响小分子物质及氨基酸谱的代谢。苏春熊等对比分析了血浆置换和DPMAS治疗肝衰竭的疗效, 发现后者可以取得同样的疗效, 解决了血浆来源匮乏的瓶颈, 同时避免了传染疾病及血浆过敏的不良反应。

## ■创新亮点

创新性地联合应用两种吸附柱吸附胆红素及炎症介质治疗急性肝衰竭取得了较好的疗效, 相对于单一的吸附达到了标本兼治的效果。

## 1.2 方法

1.2.1 内科综合治疗: 严格的生命体征及器官功能监测, 维持水电及酸碱平衡, 保肝、退黄、降酶, 冰冻新鲜血浆、冷沉淀等血液制品输注, 避免使用导致肝损害的药物, 防治并发症。

1.2.2 DPMAS治疗: (1)操作方法: 采用seldinger法建立股静脉体外血液循环通路, 肝素盐水(0.9%盐水3000 mL+肝素100 mg)顺序预冲膜型血浆分离器、胆红素吸附器及血液灌流器。根据患者凝血功能调整抗凝剂肝素的使用剂量, 全身肝素化, 首剂按出血风险高(10-20 U/kg)、中(21-40 U/kg)、低(50-80 U/kg)静脉给予, 治疗中根据压力监测适度追加肝素, 静脉端鱼精蛋白中和。先进行血浆分离, 血液泵速度初始80-100 mL/min, 5-10 min后调血液流速为140-150 mL/min, 血浆泵速度30-50 mL/min, 分离后的血浆经BS330胆红素吸附器进行吸附后再经血液灌流器HA330-II吸附, 最后通过静脉端回输入患者体内。目标血浆处理量6 L, 平均治疗时间3 h, 3-5次为1疗程, 每日或隔日治疗1次; (2)监测指标: DPMAS治疗前后的血清总胆红素(total bilirubin, TBIL)、直接胆红素(direct bilirubin, DBIL)、总胆汁酸(total bile acid, TBA)、血氨(blood ammonia, NH<sub>3</sub>)、谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)、凝血酶原活动度(prothrombin activity, TPA)、白介素-6(interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α, TNF-α)等。

**统计学处理** 使用SPSS19.0统计软件分析, 计量数据以mean±SD表示, 采用 $t$ 检验,  $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 患者治疗情况 19例ALF患者生存13例, 死亡6例, 抢救成功率68.4%。DPMAS治疗共68次, 治疗次数1-5次, 平均3.6次。存活者治疗后乏力、腹胀、纳差等症状明显缓解, 黄疸及全身出血情况改善。

2.2 肝功能、炎症指标 TBIL、DBIL、NH<sub>3</sub>、ALT等均明显下降, 统计学分析有显著性差异( $P<0.01$ ), TBA下降有显著性差异( $P<0.05$ ); TPA升高有显著性差异( $P<0.01$ ); 治疗前后IL-6、TNF-α下降有显著性差异( $P<0.01$ ,  $P<0.05$ )(表1)。

2.3 不良反应 68例次治疗中顺利完成治疗62例

次, 因管路凝血提前终止治疗2例次, 因循环功能衰竭提前终止治疗4例次(均为最终病故患者), 治疗过程中未出现感染、发热、大出血等明显不良反应。

## 3 讨论

内科综合治疗、人工肝支持治疗和肝脏移植是重型肝炎及肝脏衰竭的3种基本治疗方法。肝脏移植至今仍然是国际公认治疗各种肝衰竭晚期的最有效的方法, 虽然在我国发展较快, 但由于肝源匮乏, 手术难度大, 费用昂贵, 尚难普及<sup>[4]</sup>。人工肝的作用原理基于肝脏损伤的可逆性及肝细胞的强大再生能力, 即通过人工肝辅助治疗, 期望在内环境改善情况下肝脏能够自发恢复或为肝脏移植和其他特效治疗进行准备, 目前人工肝主要有非生物型、生物型及混合型3种<sup>[5]</sup>。生物性人工肝<sup>[6]</sup>虽然在理论上能够较好替代肝脏的合成、代谢、解毒、分泌和生物转化功能, 但其技术复杂, 同时由于免疫原性及生物安全性问题, 在临床上远无非生物型人工肝普及。非生物性人工肝通过物理或者机械的方法进行治疗, 主要功能以解毒为主, 部分兼有补充体内物质以及调节机体内环境紊乱的作用, 现已成为人工肝治疗的主流技术。在国外应用较多的是分子吸附再循环系统(molecular adsorbent recirculating system, MARS)<sup>[7]</sup>、普罗米修斯系统, 也即部分血浆分离吸附(fractionated plasma separation and adsorption, FPSA)<sup>[8]</sup>等, 同样由于设备及耗材昂贵, 在国内并未普遍开展。血浆置换(plasma exchange, PE)是国内外应用最多的非生物性人工肝技术<sup>[9]</sup>, 但由于血源紧张, 可能感染传染性疾病, 过敏反应以及置换后血浆中非致病性有益物质的丢失等限制了其应用。找到一种克服上述弊端又能达到治疗效果的人工肝方法势在必行。以吸附功能为主的人工肝技术目前在国内外迅速发展和普及, 已经成为急性肝衰竭及其他相关肝病最重要和最常用的治疗方法之一。人工肝中的吸附疗法分为血液吸附(血液灌流)和血浆吸附两种, 前者是指吸附剂直接吸附全血中的致病物质, 后者则指通过各种方法将血浆和血细胞分开, 用吸附剂清除血浆中的致病因子。临床研究证实了血液灌流治疗肝衰竭的可靠疗效<sup>[10]</sup>。何群鹏等<sup>[11]</sup>对比研究发现国产BS330胆红素吸附柱与国际主流的

## ■应用要点

节省了有限的血浆资源, 而且吸附柱均为国产, 治疗费用比应用进口吸附柱低, 值得临床推广。国外尚未有此类人工肝模式的报道。



表 1 DPMAS治疗前后肝功能、炎症因子变化比较 (mean ± SD)

分组	治疗前	治疗后	t值	P值
TBIL(μmol/L)	383.63 ± 181.25	259.26 ± 126.57	3.010	0.005
DBIL(μmol/L)	290.46 ± 162.12	180.26 ± 113.09	2.967	0.006
TBA(μmol/L)	45.09 ± 33.32	30.29 ± 14.36	2.143	0.041
NH <sub>3</sub> (μmol/L)	210.19 ± 119.70	90.05 ± 40.70	2.121	0.000
ALT(U/L)	973.03 ± 254.84	734.68 ± 140.56	3.929	0.000
TPA(%)	32.70 ± 9.79	45.54 ± 22.72	-2.814	0.009
IL-6(pg/mL)	32.12 ± 16.81	19.93 ± 7.53	3.431	0.002
TNF-α(pg/mL)	40.36 ± 27.86	26.62 ± 14.72	2.245	0.033

TBIL: 血清总胆红素; DBIL: 直接胆红素; TBA: 总胆汁酸; NH<sub>3</sub>: 血氨; ALT: 谷丙转氨酶; TPA: 凝血酶原活动度; IL-6: 白介素-6; TNF-α: 肿瘤坏死因子-α; DPMAS: 双重血浆分子吸附系统。

#### 名词解释

DPMAS: 指采用中性大孔吸附树脂(HA330-II)和离子交换树脂(BS330)2种吸附剂联合进行血浆吸附治疗, 非特异性吸附肿瘤坏死因子-α、白介素-6等炎性介质及特异性吸附胆红素、胆汁酸。

BRS350胆红素吸附柱都能显著降低胆红素水平, 同时二者的疗效及安全性方面无明显差异, 国产的价格便宜, 值得在临床上推广。

本研究联合两种不同的吸附剂进行特异性及非特异性吸附治疗急性肝衰竭。DPMAS治疗模式采用中性大孔吸附树脂(HA330-II, 珠海健帆)和离子交换树脂(BS330, 珠海健帆)两种吸附剂联合进行血浆吸附治疗, 其中HA330-II血灌流器中的树脂是相对广谱性的吸附剂, 具有大孔结构和极大的比表面积, 依靠范德华力及骨架分子筛作用吸附中大分子毒素, 如炎性介质、TNF-α、IL-6等; BS330胆红素吸附柱内的树脂是针对胆红素的特异性吸附剂, 依靠静电作用力及亲脂结合性特异性吸附胆红素、胆汁酸。本研究观察到DPMAS治疗后恶心、呕吐、乏力、腹胀等症状明显缓解; 肝功能及炎症指标中, TBIL、DBIL、NH<sub>3</sub>、ALT、TBA、IL-6、TNF-α等均明显下降; TPA升高, 说明两种吸附剂结合的DPMAS治疗系统可以在迅速改善黄疸症状的同时清除炎性介质等有害物质, 改善肝功能, 提高了急性肝衰竭的抢救成功率, 改善患者预后, 同时治疗过程中未出现感染、发热、大出血等明显不良反应, 其安全性良好。

国外尚未有此类人工肝模式的报道, 国内报道也较少。Chen等<sup>[12]</sup>首先报道应用双重血浆分子吸附联合血浆置换治疗急、慢性重症肝炎的患者, 结果显示双重血浆分子吸附能有效改善肝功能, 不造成凝血因子进一步的损失减少, 同时不影响小分子物质及氨基酸谱的代谢。苏春熊等<sup>[13]</sup>对比分析了血浆置换和

DPMAS治疗肝衰竭的疗效, 发现DPMAS可以取得同样的疗效, 而且解决了血浆来源匮乏的瓶颈, 同时避免了传染疾病及血浆过敏的不良反应。

DPMAS仍然只是通过单一的吸附机制治疗肝衰竭, 从单一治疗模式向多种方法联合或序贯应用是今后人工肝技术发展的方向。目前, 国内外的研究都倾向于2种或2种以上血液净化模式的组合使用治疗肝衰竭<sup>[14,15]</sup>。本研究病例数较少, 而且急性肝衰竭病因均为非病毒性, 就国内主要病因为肝炎病毒导致的肝衰竭的DPMAS治疗的时机、与其他血液净化模式的组合方式以及疗效等仍需要临床上进一步研究。

#### 参考文献

- Lee WM. Acute liver failure. *Semin Respir Crit Care Med* 2012; 33: 36-45 [PMID: 22447259 DOI: 10.1055/s-0032-1301733]
- Hiramatsu A, Takahashi S, Aikata H, Azakami T, Katamura Y, Kawaoka T, Uka K, Yamashina K, Takaki S, Kodama H, Jeong SC, Imamura M, Kawakami Y, Chayama K. Etiology and outcome of acute liver failure: retrospective analysis of 50 patients treated at a single center. *J Gastroenterol Hepatol* 2008; 23: 1216-1222 [PMID: 18637059 DOI: 10.1111/j.1440-1746.2008.05402.x]
- 中华医学会感染病学分会肝衰竭与人工肝学组, 中华医学会肝病学会重型肝病与人工肝学组. 肝衰竭诊治指南. *中华肝脏病杂志* 2012; 21: 177-183
- 郑树森, 俞军, 张武. 肝移植在中国的发展现状. *临床肝胆病杂志* 2014; 30: 2-4
- 龙波, 雷学忠. 非生物型人工肝治疗肝衰竭的临床应用进展. *华西医学* 2007; 22: 454-455
- McKenzie TJ, Lillegard JB, Nyberg SL. Artificial and bioartificial liver support. *Semin Liver Dis* 2008; 28: 210-217 [PMID: 18452120 DOI: 10.1055/s-2008-1073120]

■同行评价

作者总结了自己单位行“双重血浆分子吸附治疗急性肝衰竭的临床应用”的经验, 对于血浆缺乏情况下肝衰竭的治疗有一定临床意义。

- 7 Bañares R, Nevens F, Larsen FS, Jalan R, Albillos A, Dollinger M, Saliba F, Sauerbruch T, Klammt S, Ockenga J, Pares A, Wendon J, Brünner T, Kramer L, Mathurin P, de la Mata M, Gasbarrini A, Müllhaupt B, Wilmer A, Laleman W, Eefsen M, Sen S, Zipprich A, Tenorio T, Pavesi M, Schmidt HH, Mitzner S, Williams R, Arroyo V. Extracorporeal albumin dialysis with the molecular adsorbent recirculating system in acute-on-chronic liver failure: the RELIEF trial. *Hepatology* 2013; 57: 1153-1162 [PMID: 23213075 DOI: 10.1002/hep.26185]
- 8 Grodzicki M, Kotulski M, Leonowicz D, Zieniewicz K, Krawczyk M. Results of treatment of acute liver failure patients with use of the prometheus FPSA system. *Transplant Proc* 2009; 41: 3079-3081 [PMID: 19857681]
- 9 Gan JH, Zhou XQ, Qin AL, Luo EP, Zhao WF, Yu H, Xu J. Hybrid artificial liver support system for treatment of severe liver failure. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 890-894 [PMID: 15682488]
- 10 丁丽敏, 许青田. 血液灌流治疗肝功能衰竭68例. *中国实用医刊* 2014; 41: 120-121
- 11 何群鹏, 龚德华, 邬步云, 陈海燕, 季大玺, 刘志红, 徐斌. 国产BS330胆红素吸附柱治疗高胆红素血症患者的临床观察. *肾脏病与透析肾移植杂志* 2014; 23: 229-234
- 12 Chen J, Huang J, Chen Y, Lu Y, Li L. A clinical study on the treatment of severe hepatitis by a combined artificial liver. *Hepatogastroenterology* 2012; 59: 2273-2275 [PMID: 22389295 DOI: 10.5754/hge12025]
- 13 苏春熊, 雷任国, 兰玲鲜, 程万里. 双重血浆分子吸附术治疗肝衰竭的疗效观察. *广西医科大学学报* 2014; 31: 818-820
- 14 谭又文, 叶云, 姜林仙, 潘腾莉, 葛国洪, 吴翠松, 孙丽, 周兴蓓, 甘建和. 血浆置换联合持续血液滤过对肝功能衰竭患者短期生存期的影响. *中华传染病杂志* 2014; 32: 243-246
- 15 Naruse K, Tang W, Makuuchi M. Artificial and bioartificial liver support: a review of perfusion treatment for hepatic failure patients. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 1516-1521 [PMID: 17461442]

编辑: 于明茜 电编: 都珍珍



# 增强CT瘤内动脉鉴别肝内胆管细胞癌和低分化肝细胞癌的价值

杨翠翠, 杨慧, 郭沐洁, 李万湖, 吴玉芬

杨翠翠, 吴玉芬, 山东省医学科学院附属医院CT室 山东省济南市 250031  
 杨翠翠, 济南大学 山东省医学科学院医学与生命科学学院 山东省济南市 250022  
 杨慧, 泰山医学院附属医院CT室 山东省泰安市 271000  
 郭沐洁, 济宁医学院附属医院CT室 山东省济宁市 272129  
 李万湖, 山东省肿瘤医院MR室 山东省济南市 250117  
 杨翠翠, 在读硕士, 主要从事影像医学与核医学的研究。  
 济宁市科技发展计划基金资助项目, No. 2014jnyyf03  
 山东省医学科学院面上基金资助项目, No. 2014-10  
 作者贡献分布: 杨翠翠负责收集病例、文献阅读、课题设计及论文写作; 杨慧负责数据分析与图像处理; 郭沐洁负责课题基金与数据处理; 李万湖负责图像分析与课题基金资助; 吴玉芬负责选题、课题思路分析、阅读指导及图像分析。  
 通讯作者: 吴玉芬, 研究员, 250031, 山东省济南市天桥区无影山路38号, 山东省医学科学院附属医院CT室。  
 wuyufen\_2008@126.com  
 电话: 13905316459  
 收稿日期: 2015-08-15 修回日期: 2015-09-15  
 接受日期: 2015-09-18 在线出版日期: 2015-10-18

## Contrast-enhanced CT imaging in distinguishing intrahepatic cholangiocarcinoma from poorly differentiated hepatocellular carcinoma

Cui-Cui Yang, Hui Yang, Mu-Jie Guo, Wan-Hu Li, Yu-Fen Wu

Cui-Cui Yang, Yu-Fen Wu, CT Division, Affiliated Hospital of Shandong Academy of Medical Science, Ji'nan 250031, Shandong Province, China  
 Cui-Cui Yang, School of Medicine and Life Sciences, Shandong Academy of Medical Sciences; University of Ji'nan, Ji'nan 250022, Shandong Province, China  
 Hui Yang, CT Division, Affiliated Hospital of Taishan Medical College, Taian 271000, Shandong Province, China  
 Mu-Jie Guo, CT Division, Affiliated Hospital of Jining

Medical College, Jining 272129, Shandong Province, China  
 Wan-Hu Li, MR Division, Shandong Tumor Hospital, Ji'nan 250117, Shandong Province, China  
 Supported by: Science and Technology Development Program of Jining, No. 2014jnyyf03; Shandong Academy of Medical Sciences Funded Project, No. 2014-10  
 Correspondence to: Yu-Fen Wu, Researcher, CT Division, Affiliated Hospital of Shandong Academy of Medical Science, 38 Wuyingshan Road, Tianqiao District, Ji'nan 250031, Shandong Province, China. wuyufen\_2008@126.com  
 Received: 2015-08-15 Revised: 2015-09-15  
 Accepted: 2015-09-18 Published online: 2015-10-18

## Abstract

**AIM:** To evaluate the contrast-enhanced computed tomography (CT) features in differentiating intrahepatic cholangiocarcinoma (ICC) from poorly differentiated hepatocellular carcinoma (p-HCC).

**METHODS:** Sixty-eight patients with pathologically confirmed ICC ( $n = 28$ ) or p-HCC ( $n = 40$ ) were enrolled. The clinical and imaging features were investigated retrospectively.

**RESULTS:** Univariate analysis showed that lobulated shape ( $P = 0.010$ ), bile duct dilation ( $P = 0.031$ ), intratumoral artery ( $P = 0.020$ ), rim enhancement ( $P = 0.002$ ), delayed enhancement ( $P = 0.021$ ) and quick washout ( $P < 0.001$ ) were associated with the differences between ICC and p-HCC. Multivariate logistic regression analysis revealed that intratumoral artery was a significant, independent predictive factor of ICC ( $P = 0.026$ ), with 13

## 背景资料

肝内胆管细胞癌(intrahepatic cholangiocarcinoma, ICC)及肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)发病率有上升趋势。但两者治疗方式不同,对影像学早期准确诊断提出了更高要求。根据典型的影像学特征,HCC与ICC的鉴别并不困难。然而,由于低分化肝细胞癌(poorly differentiated hepatocellular carcinoma, p-HCC)可表现为乏血供表现,在计算机断层扫描(computed tomography, CT)图像上与ICC鉴别困难。动态增强CT影像中,肿瘤内肝动脉显影是ICC常见的征象。然而,借此征象对ICC和HCC进行鉴别的报道却少见。

## 同行评议者

康春博, 副主任医师, 北京大学航天临床医院普通外科; 陈汝福, 教授, 中山大学第二附属医院肝胆胰外科



# ■ 研究前沿

本研究通过分析CT影像特点及增强方式来鉴别ICC与p-HCC. 同时评价肿瘤内动脉是否可以作为两者鉴别的独立预测因素. 本研究只分析了p-HCC的临床及影像资料, 而没有将高、中分化HCC包括在内; 收集的病例肿瘤体积相对较大, 没有关注小病灶.

(46.43%) ICCs showing this feature. Quick washout significantly favored p-HCC ( $P = 0.015$ ), and 25 p-HCCs (62.5%) showed this feature.

**CONCLUSION:** The presence of an intratumoral artery in the arterial phase on contrast-enhanced dynamic CT is an important factor for predicting ICC, while a quick washout is a predictable finding for p-HCC. Accurate imaging diagnosis between ICC and p-HCC can provide an objective basis for making reasonable, timely treatment.

© 2015 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

**Key Words:** Intrahepatic cholangiocarcinoma; Intratumoral artery; Hepatocellular carcinoma; Contrast-enhanced Computed tomography; Differential diagnosis

Yang CC, Yang H, Gao MJ, Li WH, Wu YF. Contrast-enhanced CT imaging in distinguishing intrahepatic cholangiocarcinoma from poorly differentiated hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2015; 23(29): 4725-4732 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/23/4725.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v23.i29.4725>

## 摘要

**目的:** 探讨动态增强计算机断层扫描(computed tomography, CT)的影像特征对肝内胆管细胞癌和低分化肝细胞癌的鉴别价值.

**方法:** 回顾性分析68例行动态增强CT扫描并经病理证实为肝内胆管细胞癌患者28例、低分化肝细胞癌患者40例的临床资料及影像学资料.

**结果:** 单因素分析显示分叶征( $P = 0.010$ )、肝内胆管扩张( $P = 0.031$ )、肿瘤内肝动脉( $P = 0.020$ )、环形强化( $P = 0.002$ )、延迟强化( $P = 0.021$ )、迅速廓清( $P < 0.001$ )征象在肝内胆管细胞癌组和低分化肝细胞癌组较差异有统计学意义( $P < 0.05$ ). Logistic回归多因素分析显示肿瘤内肝动脉征象是肝内胆管细胞癌重要的独立预测因素( $P = 0.026$ ), 13例(46.43%)病例显示此征象. 迅速廓清征象在低分化肝细胞癌的重要识别征象( $P = 0.015$ ), 25例(62.5%)病例显示此征象.

**结论:** 动态增强CT中瘤内动脉征象是肝内

胆管细胞癌的重要识别因素, 而迅速廓清则支持低分化肝细胞癌的诊断. 准确的影像学诊断为及时制定合理的治疗方案提供客观依据.

© 2015年版权归百世登出版集团有限公司所有.

**关键词:** 肝内胆管细胞癌; 瘤内动脉; 肝细胞癌; 增强CT; 鉴别诊断

**核心提示:** 瘤内动脉指包埋于肿瘤内的肝动脉及其分支, 而非新生肿瘤血管. 尽管此征象较常见, 但其在肝内胆管细胞癌(intrahepatic cholangiocarcinoma, ICC)和低分化肝细胞癌(poorly differentiated hepatocellular carcinoma, p-HCC)之间的差异性报道较少见. 通过分析动态增强计算机断层扫描(computed tomography, CT)影像特点对ICC与p-HCC进行鉴别, 得出瘤内动脉征象是增强CT中鉴别ICC和p-HCC的独立因素, 同时对比剂的迅速廓清是诊断p-HCC的重要征象.

杨翠翠, 杨慧, 郭沐洁, 李万湖, 吴玉芬. 增强CT瘤内动脉鉴别肝内胆管细胞癌和低分化肝细胞癌的价值. *世界华人消化杂志* 2015; 23(29): 4725-4732 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/23/4725.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v23.i29.4725>

## 0 引言

肝内胆管细胞癌(intrahepatic cholangiocarcinoma, ICC)起源于肝内胆管的上皮组织, 是第二常见的肝脏原发恶性肿瘤, 发病率仅次于肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC). 有报道显示, 近几年ICC和HCC发病率有上升趋势<sup>[1,2]</sup>. ICC缺乏有效的非手术治疗方法, 手术治疗预后效果较其他方法预后好, 而HCC合理的治疗包括手术、射频消融、肝动脉化疗栓塞等, 两者治疗方式的差异对影像学早期准确诊断提出了更高要求. 根据典型的影像学特征, HCC与ICC的鉴别并不困难<sup>[3-5]</sup>. 然而, 由于低分化肝细胞癌(poorly differentiated hepatocellular carcinoma, p-HCC)动脉血供降低, 可表现为乏血供表现, 在计算机断层扫描(computed tomography, CT)图像上与ICC鉴别困难<sup>[6]</sup>. 动态增强CT影像中, 肿瘤内肝动脉显影是ICC常见的征象. 然而, 借此征象对ICC和HCC进行鉴别的报道却少见. 本研究旨在通过分析CT影像特点及增强方式来鉴别ICC

表 1 ICC和p-HCC临床资料分析

资料	ICC( <i>n</i> = 28)	p-HCC( <i>n</i> = 40)	<i>P</i> 值
性别(男/女)	17/11	24/16	0.953
年龄(岁)	57.85(41-79)	57.35(37-72)	0.112
慢性病毒性肝炎(%)	8(28.57)	27(67.50)	0.002
AFP升高[>10 ng/mL, <i>n</i> (%)]	6(21.43)	29(72.50)	<0.001
总胆红素升高[>17.1 μmol/L, <i>n</i> (%)]	9(32.14)	10(25.00)	0.642
CEA升高[>5 ng/mL, <i>n</i> (%)]	16(57.14)	27(67.50)	0.109
CA19-9升高[>37 U/mL, <i>n</i> (%)]	20(71.43)	15(37.50)	0.018

ICC: 肝胆管细胞癌; p-HCC: 低分化肝细胞癌; AFP: 甲胎蛋白; CEA: 癌胚抗原; CA19-9: 糖链抗原19-9.

## 相关报道

Tsunematsu等认为, 动脉期瘤内肝动脉是鉴别ICC和p-HCC的可靠征象, 而迅速廓清征象在两者鉴别中差异无统计学意义. 赵一珺等研究显示p-HCC恶性程度较高, 是膨胀性和浸润性的混合型生长方式, 所以也可以出现肿瘤内动脉征象, 此征象在ICC和p-HCC间差异无统计学意义.

与p-HCC. 同时评价肿瘤内动脉是否可以作为两者鉴别的独立预测因素.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 收集2013-01/2015-06行动态增强CT腹部三期扫描且经病理证实为ICC患者28例、p-HCC患者40例的临床及影像学资料. 28例肝胆管细胞癌, 男17例, 女11例, 41-79岁, 平均年龄57.85岁, 中位年龄58岁. 40例低分化肝细胞癌, 男24例, 女16例, 37-72岁, 平均年龄57.35岁, 中位年龄57岁. 肿瘤确诊依据术后组织病理. 混合型肝癌除外.

### 1.2 方法

**1.2.1 扫描:** 应用Philips Brilliance 128层螺旋CT扫描. 扫描参数: 管电压120 kV, 管电流250 mA, 螺距1.015 mm, 矩阵512×512, 层厚5.0 mm, 重建层厚1.5 mm. 患者在扫描时取仰卧位, 平静呼吸, 扫描范围从膈顶到肝下极层面. 获得肝脏平扫及三期增强图像, 动脉期、门脉期及延迟期分别在注入造影剂(注射速率为2.5 mL/s)后30、50、180 s进行扫描. 两名高年资影像科医师在对患者病史、肿瘤标志物及病理结果不知晓的情况下对CT图像进行分析, 意见相左时经协调一致确定.

**1.2.2 临床及影像评价指标:** 慢性病毒性肝炎病史、血清甲胎蛋白( $\alpha$ -fetoprotein, AFP)、总胆红素(total bilirubin)、癌胚抗原(carcino-embryonic antigen, CEA)、糖链抗原19-9(carbohydrate antigen 19-9, CA19-9)被评价. 以下CT征象被评价: (1)部位: 以肿瘤最大截面所在叶为准分为左叶和右叶; (2)肿瘤大小: 最大直径; (3)边缘分叶; (4)肝叶萎缩; (5)

卫星灶; (6)肝包膜内陷; (7)肿瘤周围肝胆管扩张; (8)胆系结石; (9)动脉期强化; (10)动脉期环形强化; (11)动脉期肿瘤内动脉: 肝动脉进入肿瘤内并在其内延伸; (12)廓清迅速; (13)肿瘤内门静脉; (14)肿瘤内肝静脉; (15)门静脉栓子; (16)延迟强化; (17)淋巴结大小: 最大淋巴结短径.

**统计学处理** 运用SPSS17.0软件对统计数据进行分析. 计量资料采用独立样本 $t$ 检验或非参数Mann-Whitney检验, 计数资料采用 $\chi^2$ 检验. 将单因素分析差异有统计学意义的变量应用Logistic回归多因素分析进行检验, 得出有显著差异的因素. 检验水准 $\alpha = 0.05$ , 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义.

## 2 结果

**2.1 ICC和p-HCC临床资料分析** 因腹痛、胀痛就诊者23例, 无临床症状、体检无意发现者21例, 腹部不适、厌食、乏力、体质减轻14例, 皮肤、巩膜黄染、尿黄8例, 发热2例. ICC 28例, p-HCC 40例. 慢性病毒性肝炎、血清AFP、CA19-9在两组间比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 性别、年龄、总胆红素水平、血清CEA差异无统计学意义(表1).

**2.2 ICC和p-HCC影像资料分析** 单因素分析提示分叶征、肝胆管扩张、肿瘤内肝动脉、环形强化、延迟强化、廓清迅速在ICC和p-HCC间有显著差异. 分叶征在ICC显示较p-HCC更为常见(78.57% vs 47.57%,  $P = 0.01$ ). 肝胆管扩张在ICC的发生率较p-HCC高(71.43% vs 45.00%,  $P = 0.031$ ). 瘤内动脉征象在ICC较p-HCC多见(46.43% vs 20.00%,

■ 创新盘点

本研究通过对ICC和p-HCC的临床及影像资料进行对比性分析, 得出瘤内动脉及迅速廓清征象在两者的鉴别有重要价值.

表 2 ICC和p-HCC增强CT征象单因素分析

因素	ICC( <i>n</i> = 28)	p-HCC( <i>n</i> = 40)	<i>P</i> 值
肿瘤部位(左/右)	17/11	17/23	0.139
肿瘤平均大小(平均, 范围, cm)	5.77(2.4–10.7)	5.82(2.9–13.6)	0.321
分叶征 <i>n</i> (%)	22(78.57)	19(47.57)	0.010
肝叶萎缩 <i>n</i> (%)	15(53.57)	14(35.00)	0.128
卫星灶 <i>n</i> (%)	8(28.57)	10(25.00)	0.743
肝包膜内陷 <i>n</i> (%)	14(50.00)	17(42.50)	0.541
肝内胆管扩张 <i>n</i> (%)	20(71.43)	18(45.00)	0.031
胆管结石 <i>n</i> (%)	4(14.29)	3(7.50)	0.616
动脉期			
有强化 <i>n</i> (%)	10(35.71)	19(47.50)	0.333
环形强化 <i>n</i> (%)	16(57.14)	8(20.00)	0.002
肿瘤内肝动脉 <i>n</i> (%)	13(46.43)	8(20.00)	0.020
迅速廓清 <i>n</i> (%)	3(10.71)	25(62.50)	<0.001
肿瘤内门静脉 <i>n</i> (%)	3(10.71)	2(5.00)	0.677
肿瘤内肝静脉 <i>n</i> (%)	7(25.00)	4(10.00)	0.187
门静脉栓子 <i>n</i> (%)	1(3.57)	3(7.50)	0.878
延迟强化 <i>n</i> (%)	17(60.71)	13(32.50)	0.021
淋巴结大小(平均, 范围, cm)	1.07(0.0–2.3)	0.90(0.0–2.1)	0.168

ICC: 肝内胆管细胞癌; p-HCC: 低分化肝细胞癌.

表 3 ICC和p-HCC增强CT征象多因素分析 (*df* = 1)

观察指标	回归系数	标准误	Wald卡方值	<i>P</i> 值	OR值
分叶征	-0.357	1.046	0.117	0.733	0.700
肝内胆管扩张	1.653	1.034	2.556	0.110	5.224
肿瘤内肝动脉	2.182	0.980	4.962	0.026	8.864
延迟强化	0.522	1.109	0.222	0.637	1.686
环形强化	0.736	0.793	0.862	0.353	2.088
迅速廓清	-2.899	1.196	5.872	0.015	0.055

*P* = 0.02), 13例ICC影像中显示此征象. 环形强化及延迟强化在ICC中较多见(分别为 *P* = 0.021和 *P* = 0.002). 迅速廓清在p-HCC较ICC常见(62.50% *vs* 10.71%, *P* < 0.001), 25例p-HCC影像中显示此征象. 多因素分析中, 去除混杂因素, 瘤内动脉征象在ICC组与p-HCC组比较差异有统计学意义(*P* = 0.026, OR = 8.864), 是ICC影像学的独立预测因素. 迅速廓清征象在p-HCC组显示较ICC组常见, 差异有统计学意义(*P* = 0.015, OR = 0.055), 是识别p-HCC的重要征象. 而病灶位置、大小、肝叶萎缩、卫星灶、肝包膜内陷、胆系结石、肿瘤内门静脉及肝静脉及门静脉癌栓、淋巴结大小等征象在两组间比较差异均无统

计学意义(*P* > 0.05)(表2, 3, 图1, 2).

3 讨论

ICC在CT图像上为乏血供表现, 动脉期薄环状或厚带状强化、门脉或延迟期渐进向心性强化为常见影像特点, 或伴有肝内胆管扩张、肝包膜内陷、肝叶萎缩、卫星灶及淋巴结转移等征象. 动脉期显著强化及“快进快出”的强化模式是HCC较典型的表现<sup>[3-5,7,8]</sup>. 但是HCC强化程度随其分化程度降低而降低, 分化程度越低, 强化越不明显. 故p-HCC与ICC在CT图像上的表现有类似之处, 而两者的治疗方式却差别较大. HCC的合理治疗方法包括外科治疗(肝部分切除及肝移植术)、局部治疗(射频消



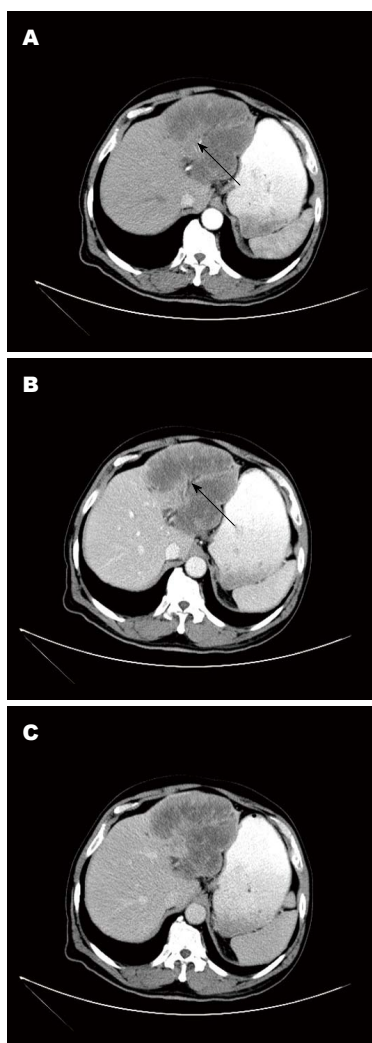


图 1 60岁男性ICC患者增强CT图像. A: 动脉期肿块边缘轻度强化, 内见肝动脉分支(黑色箭头所示); B: 边缘分叶, 肝叶萎缩, 肝包膜内陷及周围胆管扩张(黑色箭头所示); C: 延迟强化. ICC: 肝内胆管细胞癌; CT: 计算机断层扫描.

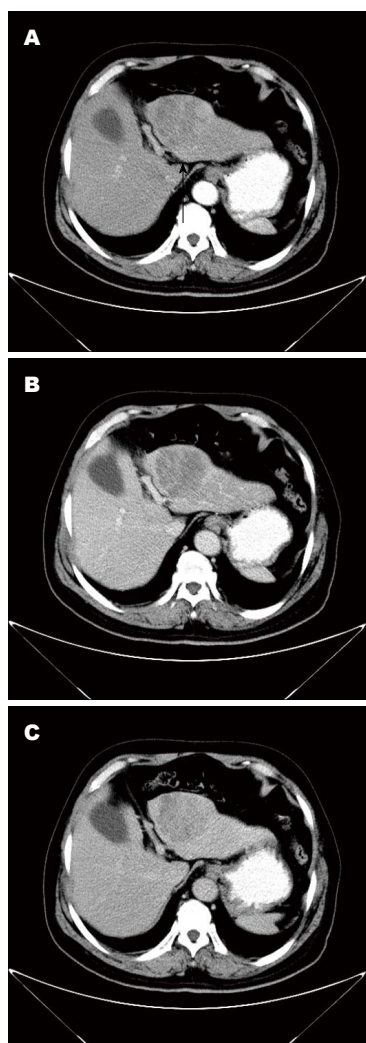


图 2 58岁男性p-HCC患者增强CT图像. A: 动脉期肿块轻度强化(黑色箭头所示); B、C: 肿块在门脉及延迟期相对廓清. p-HCC: 低分化肝细胞癌; CT: 计算机断层扫描.

#### 应用要点

ICC和p-HCC在治疗方式及预后方面差异较大, 影像学早期准确诊断显得尤为重要. 准确的鉴别诊断在及时制定出合适的治疗措施, 避免不恰当的治疗引起的创伤及并发症的发生, 提高疾病根治度及患者生存质量方面有重要价值.

融、肝动脉化疗栓塞)、全身治疗(全身系统化疗、动脉内化疗)等<sup>[9,10]</sup>. ICC有效的外科治疗方式通常为手术切除加淋巴结清扫<sup>[2,11]</sup>. 因此, 在选择适当治疗方式时影像诊断显得尤为重要.

本研究中分叶征在ICC较p-HCC更常见, 与以前的研究较一致<sup>[5,12-14]</sup>. ICC生长方式多为浸润性, 边缘较模糊, 易侵犯周围小门静脉分支并沿其累及周围组织, 形成卫星灶, 继而融合成分叶状的肿块<sup>[15]</sup>. 而HCC多为膨胀性生长, 周围反应性增生形成纤维包膜, 境界较清, CT扫描多为类圆形, 少有分叶<sup>[16]</sup>. 但有报道<sup>[17]</sup>称, p-HCC分化程度低, 恶性程度高, 侵袭性随之增加, 可为膨胀与侵袭性混合生长方式, 因

而CT表现可呈分叶状. 肝内胆管扩张在ICC组较p-HCC组更为常见(71.43% vs 45.00%), 差异有统计学意义. ICC肝内胆管扩张是由于肿瘤沿邻近胆管浸润生长致管壁增厚、管腔狭窄、胆管内癌栓形成, 远端胆管扩张明显. 而p-HCC呈膨胀性生长, 扩张胆管多位于肿瘤主体周围, 管壁较光滑<sup>[18]</sup>. 病灶位置、大小、肝叶萎缩、肝包膜内陷、胆系结石、瘤内门静脉、门脉瘤栓等在ICC和p-HCC组差异无统计学意义. ICC由于其侵袭性较HCC易发生淋巴结转移. 本研究中, 淋巴结大小在ICC组和p-HCC组差异无统计学意义( $P = 0.168$ ), 与Tsunematsu等<sup>[12]</sup>研究结果一致. 赵一珺等<sup>[13]</sup>对ICC组和p-HCC组淋巴结大小及强化程度做了对比研究, 结果显示ICC组淋巴结强化程度和

## ■名词解释

瘤内动脉: 指包埋于肿瘤内的肝动脉及其分支, 而非新生肿瘤血管, 在CT上表现为肝动脉进入肿瘤内并在其内延伸。

平均淋巴结大小明显高于或大于p-HCC组。研究<sup>[15,19,20]</sup>认为HCC增大淋巴结多为慢性肝炎、肝硬化等基础病变所致的反应性增生, 多非肿瘤转移。

本研究中Logistic回归多因素分析显示对比剂迅速廓清在ICC和p-HCC之间差异有统计学意义, 可作为ICC和p-HCC鉴别的重要影像征象。美国肝病研究协会(American Association for the Study of Liver Disease)指南表示对于肝硬化患者>1 cm的肝结节, 只有在CT和磁共振成像(magnetic resonance imaging, MRI)都表现为迅速廓清才可诊断为肝癌。肿瘤强化方式与其组织成分关系密切<sup>[21]</sup>。ICC外围多为肿瘤细胞, 中心富含纤维组织, 对比剂在肿瘤内滞留时间延长, 动脉期显著环形强化及延迟期强化。HCC由肝动脉供血, 动脉期强化迅速且显著, 瘤体内及周围门静脉小分支将造影剂快速排出至周围肝实质, 周边肝组织迅速强化, 瘤体在门脉期或延迟期密度相对减低, 形成典型的“快进快出”强化方式。p-HCC肝动脉血供随肿瘤分化程度降低而减少, 瘤体内易形成缺血坏死灶, 动脉期轻度强化且多不均匀, 但是门脉期廓清征象仍较高、中分化HCC更为常见<sup>[22-24]</sup>。

本研究中13(46.43%)例ICC在动脉期显示肿瘤内肝动脉征象, 差异有统计学意义。肿瘤内动脉指包埋于肿瘤内的肝动脉及分支, 而非新生肿瘤血管。尽管此征象较常见, 但其在ICC和p-HCC之间的差异性报道较少。本研究多因素分析中提示, 瘤内动脉征象是鉴别ICC和p-HCC的独立因素(OR = 8.864,  $P = 0.026$ )。动态增强CT中, 肿瘤内肝动脉征象在ICC较p-HCC更为多见(46.43% vs 20%)。Tsunematsu等<sup>[12]</sup>认为, 动脉期瘤内肝动脉是鉴别ICC和p-HCC的可靠征象。肿瘤内动脉表现不同与其肿瘤的生长方式密切相关。浸润生长为ICC固有生长方式, 在肿瘤生长过程中, 周围正常肝组织逐步被包埋入瘤体。由于动脉血管壁的弹性, 动脉仅被包埋而未受侵犯。HCC膨胀性生长推压血管于肿瘤外缘<sup>[2,16]</sup>。赵一珺等<sup>[13]</sup>研究显示肿瘤内动脉在ICC和p-HCC间差异无统计学意义。p-HCC恶性程度高, 是膨胀性和浸润性的混合型生长方式, 也可以出现肿瘤内动脉。周平安等<sup>[25]</sup>研究发现, 原发性肝癌供血动脉主要为肝动脉及肿瘤增生血管, 镜下

可分辨的动脉绝大多数分布于肿瘤边缘处, 而肿瘤内由于动脉分支细小或肿瘤液化坏死明显, 镜下无法分辨。提示肝癌供血动脉多被推压到肿瘤边缘, 瘤内动脉显示少见。目前尚缺乏关于肿瘤内肝动脉征象对ICC和p-HCC鉴别的研究报道, 所以对其进行深入研究具有较大的临床价值。

本研究血清肿瘤标志物AFP、CA19-9、慢性肝炎在ICC组与p-HCC组中存在差异。p-HCC血清AFP升高的比例、慢性肝炎比例高于ICC组, 而ICC组血清CA19-9升高的比例较p-HCC组更显著, 支持以往的研究<sup>[12,26]</sup>。而Tsunematsu等<sup>[12]</sup>研究结果显示血清中慢性病毒性肝炎表面抗体、血小板计数及AFP水平在ICC和p-HCC两组差异有统计学意义, 而血清肿瘤标志物CEA和CA199检测在两组差异无统计学意义。肿瘤标志物及慢性肝炎可作为辅助鉴别诊断的指标, 尤其肿瘤在增强CT上表现不典型时更有鉴别价值。

本研究尚有欠缺之处: (1)只回顾性分析了行动态增强CT扫描并行外科手术的p-HCC与ICC资料, 从而存在一定的入组偏倚; (2)只分析了p-HCC的资料, 而没有将高、中分化HCC包括在内; (3)收集的病例肿瘤体积相对较大, 分析结果没有关注小病灶。

总之, 肿瘤内肝动脉征象是增强CT中鉴别ICC和p-HCC的独立因素, 同时对比剂的迅速廓清是p-HCC的重要识别征象。准确的鉴别诊断在及时制定出合适的治疗措施, 避免不恰当的治疗引起的创伤及并发症的发生, 提高疾病根治度及患者生存质量方面有重要价值。

## 4 参考文献

- 1 Khan SA, Thomas HC, Davidson BR, Taylor-Robinson SD. Cholangiocarcinoma. *Lancet* 2005; 366: 1303-1314 [PMID: 16214602]
- 2 Singh P, Patel T. Advances in the diagnosis, evaluation and management of cholangiocarcinoma. *Curr Opin Gastroenterol* 2006; 22: 294-299 [PMID: 16550045]
- 3 Kim SA, Lee JM, Lee KB, Kim SH, Yoon SH, Han JK, Choi BI. Intrahepatic mass-forming cholangiocarcinomas: enhancement patterns at multiphasic CT, with special emphasis on arterial enhancement pattern--correlation with clinicopathologic findings. *Radiology* 2011; 260: 148-157 [PMID: 21474703]
- 4 Loyer EM, Chin H, DuBrow RA, David CL, Eftekhari F, Charnsangavej C. Hepatocellular carcinoma and intrahepatic peripheral

- cholangiocarcinoma: enhancement patterns with quadruple phase helical CT--a comparative study. *Radiology* 1999; 212: 866-875 [PMID: 10478259]
- 5 Valls C, Gumà A, Puig I, Sanchez A, Andía E, Serrano T, Figueras J. Intrahepatic peripheral cholangiocarcinoma: CT evaluation. *Abdom Imaging* 2000; 25: 490-496 [PMID: 10931983]
  - 6 Asayama Y, Yoshimitsu K, Nishihara Y, Irie H, Aishima S, Taketomi A, Honda H. Arterial blood supply of hepatocellular carcinoma and histologic grading: radiologic-pathologic correlation. *AJR Am J Roentgenol* 2008; 190: W28-W34 [PMID: 18094269]
  - 7 Han JK, Choi BI, Kim AY, An SK, Lee JW, Kim TK, Kim SW. Cholangiocarcinoma: pictorial essay of CT and cholangiographic findings. *Radiographics* 2002; 22: 173-187 [PMID: 11796906]
  - 8 Baheti AD, Tirumani SH, Rosenthal MH, Shinagare AB, Ramaiya NH. Diagnosis and management of intrahepatic cholangiocarcinoma: a comprehensive update for the radiologist. *Clin Radiol* 2014; 69: e463-e470 [PMID: 25240565 DOI: 10.1016/j.crad.2014.08.003]
  - 9 Bruix J, Sherman M, Llovet JM, Beaugrand M, Lencioni R, Burroughs AK, Christensen E, Pagliaro L, Colombo M, Rodés J. Clinical management of hepatocellular carcinoma. Conclusions of the Barcelona-2000 EASL conference. European Association for the Study of the Liver. *J Hepatol* 2001; 35: 421-430 [PMID: 11592607]
  - 10 Hertl M, Cosimi AB. Liver transplantation for malignancy. *Oncologist* 2005; 10: 269-281 [PMID: 15821247]
  - 11 Jarnagin WR, Shoup M. Surgical management of cholangiocarcinoma. *Semin Liver Dis* 2004; 24: 189-199 [PMID: 15192791]
  - 12 Tsunematsu S, Chuma M, Kamiyama T, Miyamoto N, Yabasaki S, Hatanaka K, Mitsunashi T, Kamachi H, Yokoo H, Kakisaka T, Tsuruga Y, Orimo T, Wakayama K, Ito J, Sato F, Terashita K, Nakai M, Tsukuda Y, Sho T, Suda G, Morikawa K, Natsuzaka M, Nakanishi M, Ogawa K, Taketomi A, Matsuno Y, Sakamoto N. Intratumoral artery on contrast-enhanced computed tomography imaging: differentiating intrahepatic cholangiocarcinoma from poorly differentiated hepatocellular carcinoma. *Abdom Imaging* 2015; 40: 1492-1499 [PMID: 25579172 DOI: 10.1007/s00261-015-0352-9]
  - 13 赵一珺, 郑丽荣, 杨帆, 张蔚, 陈卫霞. 肿块型肝内胆管细胞癌与低分化肝细胞癌的CT影像学特征分析. *中国普外基础与临床杂志* 2015; 22: 628-632
  - 14 Kim KJ, Hong SW, Lee YS, Kim BW, Lee SC, Chang HS, Park CS. Tumor margin histology predicts tumor aggressiveness in papillary thyroid carcinoma: a study of 514 consecutive patients. *J Korean Med Sci* 2011; 26: 346-351 [PMID: 21394301 DOI: 10.3346/jkms.2011.26.3.346]
  - 15 Ko YL, Sun CS, Chung KM, Lin YM, Feng IC, Sheu MJ, Koay LB, Lin CY, Ho CH, Kuo HT. Manifestations of perihepatic lymph nodes in acute flare of chronic hepatitis B: association with HBeAg status and with HBeAg seroconversion. *PLoS One* 2015; 10: e0117590 [PMID: 25689069 DOI: 10.1371/journal.pone.0117590]
  - 16 Kozaka K, Sasaki M, Fujii T, Harada K, Zen Y, Sato Y, Sawada S, Minato H, Matsui O, Nakanuma Y. A subgroup of intrahepatic cholangiocarcinoma with an infiltrating replacement growth pattern and a resemblance to reactive proliferating bile ductules: 'bile ductular carcinoma'. *Histopathology* 2007; 51: 390-400 [PMID: 17553067 DOI: 10.1111/j.1365-2559.2007.02735.x]
  - 17 Chong YS, Kim YK, Lee MW, Kim SH, Lee WJ, Rhim HC, Lee SJ. Differentiating mass-forming intrahepatic cholangiocarcinoma from atypical hepatocellular carcinoma using gadoxetic acid-enhanced MRI. *Clin Radiol* 2012; 67: 766-773 [PMID: 22425613 DOI: 10.1016/j.crad.2012.01.004]
  - 18 阳宁静, 宋彬, 吴苾, 徐隽, 赵黎明. 胆管细胞性肝癌与肝细胞性肝癌侵犯胆管的CT及MRI影像学特征分析. *四川大学学报: 医学版* 2009; 40: 525-528
  - 19 Sato M, Hikita H, Hagiwara S, Sato M, Soroida Y, Suzuki A, Gotoh H, Iwai T, Kojima S, Matsuura T, Yotsuyanagi H, Koike K, Yatomi Y, Ikeda H. Potential associations between perihepatic lymph node enlargement and liver fibrosis, hepatocellular injury or hepatocarcinogenesis in chronic hepatitis B virus infection. *Hepatol Res* 2015; 45: 397-404 [PMID: 24849617 DOI: 10.1111/hepr.12361]
  - 20 Soresi M, Bonfissuto G, Magliarisi C, Riili A, Terranova A, Di Giovanni G, Bascone F, Carroccio A, Tripi S, Montalto G. Ultrasound detection of abdominal lymph nodes in chronic liver diseases. A retrospective analysis. *Clin Radiol* 2003; 58: 372-377 [PMID: 12727165]
  - 21 Ros PR, Buck JL, Goodman ZD, Ros AM, Olmsted WW. Intrahepatic cholangiocarcinoma: radiologic-pathologic correlation. *Radiology* 1988; 167: 689-693 [PMID: 2834769]
  - 22 Lee JH, Lee JM, Kim SJ, Baek JH, Yun SH, Kim KW, Han JK, Choi BI. Enhancement patterns of hepatocellular carcinomas on multiphasic multidetector row CT: comparison with pathological differentiation. *Br J Radiol* 2012; 85: e573-e583 [PMID: 22919011 DOI: 10.1259/bjr/86767895]
  - 23 Nakachi K, Tamai H, Mori Y, Shingaki N, Moribata K, Deguchi H, Ueda K, Inoue I, Maekita T, Iguchi M, Kato J, Ichinose M. Prediction of poorly differentiated hepatocellular carcinoma using contrast computed tomography. *Cancer Imaging* 2014; 14: 7 [PMID: 25608454 DOI: 10.1186/1470-7330-14-7]
  - 24 Kawamura Y, Ikeda K, Hirakawa M, Yatsuji H, Sezaki H, Hosaka T, Akuta N, Kobayashi M, Saitoh S, Suzuki F, Suzuki Y, Arase Y, Kumada H. New classification of dynamic computed tomography images predictive of malignant characteristics of hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res* 2010; 40: 1006-1014 [PMID: 20887336]

■同行评价  
实用性较强, 具有较好地临床意义, 有助于指导手术方案的制定。



- DOI: 10.1111/j.1872-034X.2010.00703.x]
- 25 周平安, 林礼务, 薛恩生, 何以救, 高上达, 林晓东, 林学英. 原发性肝细胞癌超声造影峰值时间与肿瘤动脉密度相关性研究. 中国医学影像技术 2007; 23: 881-883.
- 26 Zhou XD, Tang ZY, Fan J, Zhou J, Wu ZQ, Qin

LX, Ma ZC, Sun HC, Qiu SJ, Yu Y, Ren N, Ye QH, Wang L, Ye SL. Intrahepatic cholangiocarcinoma: report of 272 patients compared with 5,829 patients with hepatocellular carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2009; 135: 1073-1080 [PMID: 19294418 DOI: 10.1007/s00432-009-0547-y]

编辑: 郭鹏 电编: 都珍珍



ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) DOI: 10.11569 2015年版权归百世登出版集团有限公司所有

## •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:  $^aP<0.05$ ,  $^bP<0.01$ ( $P>0.05$ 不注). 如同一表中另有一套 $P$ 值, 则 $^cP<0.05$ ,  $^dP<0.01$ ; 第3套为 $^eP<0.05$ ,  $^fP<0.01$ .  $P$ 值后注明何种检验及其具体数字, 如 $P<0.01$ ,  $t = 4.56$  vs 对照组等, 注在表的左下方. 表内采用阿拉伯数字, 共同的计量单位符号应注在表的右上方, 表内个位数、小数点、±、-应上下对齐. “空白”表示无此项或未测, “-”代表阴性未发现, 不能用同左、同上等. 表图勿与正文内容重复. 表图的标目尽量用 $t/\text{min}$ ,  $c/(\text{mol/L})$ ,  $p/\text{kPa}$ ,  $V/\text{mL}$ ,  $t/^\circ\text{C}$ 表达. 黑白图请附黑白照片, 并拷入光盘内; 彩色图请提供冲洗的彩色照片, 请不要提供计算机打印的照片. 彩色图片大小 $7.5\text{ cm} \times 4.5\text{ cm}$ , 必须使用双面胶条粘贴在正文内, 不能使用浆糊粘贴. (5)志谢 后加冒号, 排在讨论后及参考文献前, 左齐.

## 急诊内镜治疗高龄急性胆管炎患者的疗效评价

董晓萌, 蔡旺, 张超, 李宁

董晓萌, 天津中医药大学研究生院 天津市 300073  
蔡旺, 李宁, 天津中西医结合医院(南开医院)微创外科 天津市 300100

张超, 天津医科大学研究生院 天津市 300070  
董晓萌, 在读硕士, 主要从事消化内镜及肝胆胰疾病微创治疗的研究。

天津市卫生局科技基金资助项目, No. 2013KZ054  
作者贡献分布: 此课题有蔡旺与董晓萌设计; 张超与董晓萌收集整理数据并进行统计分析; 文章由董晓萌、蔡旺及李宁共同撰写。

通讯作者: 蔡旺, 副主任医师, 300100, 天津市南开区长江道6号, 天津南开医院微创外科。caiawangmd@163.com

电话: 022-27435268

收稿日期: 2015-08-24 修回日期: 2015-09-14

接受日期: 2015-09-18 在线出版日期: 2015-10-18

### Clinical efficacy of emergency endoscopy in elderly patients with acute cholangitis

Xiao-Meng Dong, Wang Cai, Chao Zhang, Ning Li

Xiao-Meng Dong, Graduate School, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300073, China  
Wang Cai, Ning Li, Department of Minimally Invasive Surgery, Tianjin Hospital of ITCWM (Nankai Hospital), Tianjin 300100, China

Chao Zhang, Graduate School, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

Supported by: Science and Technology Fund of Tianjin Municipal Health Bureau, No. 2013KZ054

Correspondence to: Wang Cai, Associate Chief Physician, Department of Minimally Invasive Surgery, Tianjin Hospital of ITCWM (Nankai Hospital), 6 Changjiang Street, Nankai District, Tianjin 300100, China. caiawangmd@163.com

Received: 2015-08-24 Revised: 2015-09-14

Accepted: 2015-09-18 Published online: 2015-10-18

### Abstract

**AIM:** To evaluate the clinical efficacy of emergency endoscopy in elderly patients with acute cholangitis (AC).

**METHODS:** Clinical data for 148 elderly patients with acute cholangitis who underwent emergency endoscopic retrograde cholangiopancreatography (ERCP) from March 2013 to July 2014 at Tianjin Nankai Hospital were retrospectively analyzed.

**RESULTS:** Of the 148 cases, 141 underwent successful emergency endoscopy, of whom 65 had stone removal in the first session, and 74 had significant relief of clinical symptoms after endoscopic nasobiliary drainage (ENBD). Two patients died. Of the 141 case who underwent successful ERCP, 7 developed bleeding, and 2 developed pancreatitis after ERCP.

**CONCLUSION:** Emergency endoscopy is a safe and effective method for the treatment of elderly patients with acute cholangitis. In experienced digestive endoscopy centers, emergency endoscopy can be used as a preferred treatment for elderly patients with acute cholangitis.

© 2015 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

**Key Words:** Emergency endoscopy; Elderly patients; Acute cholangitis

Dong XM, Cai W, Zhang C, Li N. Clinical efficacy of emergency endoscopy in elderly patients with acute cholangitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2015; 23(29): 4733-4737 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/23/4733.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v23.i29.4733>

### 摘要

**目的:** 评价急诊内镜在高龄急性胆管炎(acute

### 背景资料

急性胆管炎是胆道感染中的一种严重疾病, 具有发病急骤、病情凶险、并发症多、死亡率高等特点, 由于高龄患者具有体质差、合并症多、手术及麻醉风险高等特点, 故高龄成为急性胆管炎患者死亡的危险因素。

### 同行评议者

薛东波, 教授, 哈尔滨医科大学附属第一医院

## ■ 研发前沿

近些年随着急诊内镜应用于急性胆管炎的治疗, 急性胆管炎患者的死亡率明显下降, 急诊内镜也越来越广泛的应用于高龄急性胆管炎患者, 为高龄急性胆管炎患者的治疗提供了相对安全有效的方法。

aholangitis)患者中的有效性及安全性。

**方法:** 选取2013-03/2014-07于天津中西医结合医院行急诊内镜下逆行胰胆管造影术(endoscopic retrograde cholangiopancreatography, ERCP)的老年急性胆管炎患者, 回顾性的分析148例符合条件的患者临床资料。

**结果:** 148例患者中成功接受急诊内镜的为141例, 失败7例。其中成功接受急诊内镜的141例中, 65例一次性取出结石, 74例放置内镜下鼻胆管引流术(endoscopic nasobiliary drainage, ENBD)后临床症状缓解。择期行手术或内镜治疗, 2例患者死亡。141例患者中, 内镜后出血7例, 穿孔0例, 胰腺炎2例。

**结论:** 急诊内镜是治疗高龄急性胆管炎患者安全有效的方法。在经验丰富的消化内镜中心, 急诊内镜可以作为高龄急性胆管炎患者首选的治疗方法。

© 2015年版权归百世登出版集团有限公司所有。

**关键词:** 急诊内镜; 高龄; 急性胆管炎

**核心提示:** 本文回顾性的统计分析了行急诊内镜148例高龄急性胆管炎患者的临床资料, 及时并有效的急诊内镜可以控制高龄急性胆管炎患者的临床症状, 阻止感染的进一步发展, 急诊内镜的发展及应用, 为高龄患者急性胆管炎的治疗提供了安全有效的方法。

董晓萌, 蔡旺, 张超, 李宁. 急诊内镜治疗高龄急性胆管炎患者的疗效评价. 世界华人消化杂志 2015; 23(29): 4733-4737  
URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/23/4733.asp>  
DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v23.i29.4733>

## 0 引言

急性胆管炎是胆道感染中的一种严重疾病, 具有发病急骤、病情凶险、并发症多、死亡率高等特点<sup>[1]</sup>。由于高龄患者具有体质差、合并症多、手术及麻醉风险高等特点, 故高龄成为急性胆管炎患者死亡的危险因素<sup>[2]</sup>。近些年随着急诊内镜应用于急性胆管炎的治疗, 急性胆管炎患者的死亡率明显下降, 不及时的内镜治疗增加了患者重要脏器衰竭及死亡的风险, 延长了患者术后住院时间<sup>[3,4]</sup>。但Day等<sup>[5]</sup>的Meta分析指出>80岁高龄患者, 内

镜的死亡率、出血及心肺不利事件发生率明显高于65-80岁患者。为求进一步研究高龄急性胆管炎患者急诊内镜的安全及有效性。本研究对2013-03/2014-07于天津南开医院行急诊内镜的高龄急性胆管炎患者进行了回顾性的分析。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 收集2013-03/2014-07于天津南开医院行急诊内镜下逆行胰胆管造影术(endoscopic retrograde cholangiopancreatography, ERCP), 年龄>80岁的老年急性胆管炎患者148例。所有患者均符合东京指南2013年标准: A: (1)体温>38℃和/或寒战; (2)实验室反应炎症的指标异常; B: (1)黄疸; (2)肝功能异常; C: (1)胆道疾病病史; (2)发现胆管结石、狭窄或支架患者。符合A中1条+B中1条+C中1条<sup>[6]</sup>。仪器设备应用日本Fujinon公司生产的ED-250XL5电子十二指肠镜、美国COOK公司斑马导丝、乳头切开刀、针状乳头切开刀、取石网篮、三腔取石球囊、碎石网篮、鼻胆引流管。

## 1.2 方法

**1.2.1 术前准备:** 患者入院后予以抗感染、补液等对症治疗(休克患者包括抗休克治疗), 由于老年患者多伴有心肌缺血, 补液同时需控制输液速度并予以营养心肌药物。完善入院常规检查及腹部B超、计算机断层扫描(computed tomography, CT)等相关检查, 评估内镜风险, 积极予以ERCP治疗前准备。向患者及家属说明操作过程、操作风险及术中、术后并发症。让患者家属于知情同意书上签字。行碘过敏试验。准备造影剂(碘过敏阴性予以泛影葡胺, 碘过敏阳性予以碘铂醇)。术前30 min予以间苯三酚40 mg、哌替啶10 mg、地西洋10 mg肌注。术前予以利多卡因胶浆口咽部局麻。予以心电监护检测血压、心率以及血氧饱和度。

**1.2.2 操作过程:** 应用Fujinon十二指肠镜, 进镜后观察乳头形态, 若怀疑为肿瘤, 取活检; 若为乳头结石卡顿, 行电针开窗。插管困难者可行乳头括约肌切开(endoscopic sphincterotomy, EST), 十二指肠乳头插管成功后, 先抽取胆汁, 以降低胆道压力。应用造影剂和生理盐水按1:1稀释后进行造影, 明确结石数目、大小或胆管狭窄位置, 若结石数

## ■ 相关报道

Day等的Meta分析指出>80岁高龄患者, 内镜的死亡率、出血及心肺不利事件发生率明显高于65-80岁患者。Lee等认为对于急性胆管炎的患者, 不及时的内镜治疗会增加重要脏器衰竭以及死亡的风险。



表 1 治疗前后相关指标比较 (mean ± SD)

指标	术前	术后
WBC( $\times 10^9/L$ )	10.43 ± 5.45	7.32 ± 2.31 <sup>a</sup>
NEUT(%)	80.92 ± 14.41	74.35 ± 9.05 <sup>a</sup>
CRP(mg/L)	93.32 ± 76.84	49.65 ± 41.63 <sup>a</sup>
TBIL( $\mu\text{mol/L}$ )	56.87 ± 62.56	18.76 ± 9.46 <sup>a</sup>
DBIL( $\mu\text{mol/L}$ )	37.67 ± 41.17	13.17 ± 8.19 <sup>a</sup>
AST(U/L)	125.27 ± 235.63	107.91 ± 221.60 <sup>a</sup>
ALP(U/L)	228.56 ± 190.32	160.27 ± 155.06 <sup>a</sup>
GGT(U/L)	370.87 ± 323.29	252.23 ± 216.26 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 术前. WBC: 白细胞计数; NEUT: 中性粒细胞百分比; CRP: C反应蛋白; TBIL: 总胆红素; DBIL: 直接胆红素; AST: 谷草转氨酶; ALP: 碱性磷酸酶; GGT: 谷氨酰转氨酶。

目较少且结石较小, 可在短时间内完成操作且无EST禁忌症的可行EST+取石术; 若结石数目较多、较大或造影显示不清无法明确诊断的, 可行EST+内镜下鼻胆管引流术(endoscopic nasobiliary drainage, ENBD)或行ENBD术, 若患者凝血功能障碍可直接行ENBD术。若寻找乳头困难或插管困难, 操作时间>30 min时, 应及时终止内镜治疗。

1.2.3 内镜后处理: 术后常规予以禁食水, 予以抗感染、抑酸、抑酶以及补液等对症治疗, 予以心电监护检测生命体征。术后6 h以及24 h查尿淀粉酶, 以注意有无内镜后胰腺炎情况, 2次淀粉酶均正常者予以流质饮食。术中出血严重者、及时发现鼻胆管出血或胃引出血者予以止血药物, 止血药物应用后仍有活动性出血者, 予内镜下止血或数字减影血管造影(digital subtraction angiography, DSA)治疗。

**统计学处理** 采用SPSS17.0统计学软件进行统计学软件处理与分析。计量资料以mean ± SD表达, 计数资料以百分比表达。两组之间比较时, 符合正态分布采用独立样本 $t$ 检验, 非正态分布分布时采用非参数检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 一般情况及实验室检查 148例患者中男性69例, 女性79例, 平均年龄83.99岁 ± 3.46岁。148例患者中合并急性胰腺炎14例, 合并感染性休克(包括血压下降、心率增快、意识模糊等)5例, 其中伴有高血压66例(44.59%)、糖尿病35例(23.65%)、冠心病63例(42.57%)、脑血

管疾病23例(15.54%)。既往有胆囊手术史34例(22.97%)。既往行ERCP 40例(27.02%)。148例患者术前抽取血常规及C反应蛋白观察炎症指标, 抽取胆红素以及肝酶学指标观察肝功能情况。成功行内镜治疗的136例患者在术后3 d复查血常规、C反应蛋白以及肝功能。经过术前术后的对比, 炎症指标明显下降, 胆红素明显下降, 肝功能明显好转(表1)。

2.2 术中情况 术中造影提示胆总管结石患者136例(91.89%), 胆胰肿瘤患者12例(81.08%), 插管成功141例(95.27%), 一次性取石65例(43.92%), 行EST 101例(68.24%)。

2.3 术后情况 术后死亡2例(1.35%), 1例因感染性休克, 1例因呼吸衰竭。术后并发症18例(12.16%), 出血7例(4.72%), 6例予止血药物保守治疗后好转, 1例予止血、输血治疗后好转, 穿孔0例(0%), 术后胰腺炎2例(1.35%), 予保守治疗后好转, 呼吸道感染9例(6.08%), 予止咳化痰抗感染治疗后好转。术后恢复进食时间为2.18 d ± 1.73 d, 平均住院时间为14.82 d ± 10.06 d。

## 3 讨论

急性胆管炎是胆道感染中的一种严重疾病, 发病基础为胆道梗阻及细菌感染, 最常见于胆总管结石的患者, 少数见于胆道肿瘤、良性胆管狭窄及胆道寄生虫。急性胆管炎的临床症状为Charcot三联症, 即腹痛、寒战高热、黄疸, 此时患者体温往往高于38 °C, 且持续不退。实验室检查中, 白细胞计数异常, 部分患者可出现白蛋白降低、肝脏酶学异常, 肾功能异常<sup>[6]</sup>。当胆道梗阻不能及时解除或感染不能得到有效控制时, 可发展为急性梗阻性化脓性胆管炎(acute obstructive suppurative cholangitis, AOSC), 此时若再救治不及时, 可引起全身炎症反应(systemic inflammatory response syndrome, SIRS)、多脏功能衰竭(multiple organ dysfunction syndrome)以及弥漫性血管内凝血(disseminated or diffuse intravascular coagulation)。短时间内病情恶化引起死亡<sup>[7]</sup>。本研究中1例患者死于感染性休克, 虽及时的行急诊内镜引流治疗, 但仍无法控制感染, 最终死亡。

近些年随着人口老龄化, 急性胆管炎患者中的高龄患者越来越多, 而高龄为急性胆

## ■创新盘点

本文评估了80岁及以上高龄急性胆管炎患者内镜下逆行胰胆管造影术的安全性及有效性, 提出了相应的比较详细的治疗方法以及研究经验, 提出了对于高龄急性胆管炎的内镜治疗的3条经验。

# 应用要点

本文为高龄急性胆管炎患者的治疗提供了临床经验, 在经验丰富的消化内镜中心, 急诊内镜可以作为高龄急性胆管炎患者的首选治疗方式。

管炎死亡的危险因素之一。高龄患者的特征为以下3点: (1)高龄患者合并症多, 多数伴有慢性心肺肾等重要脏器疾患, 急性胆管炎引起的感染与原有的慢性疾病相互影响, 病情可进一步恶化<sup>[8]</sup>; (2)高龄患者内环境稳定性差, 代偿能力下降, 急性发病以及禁食水的情况下可引起机体脱水, 电解质紊乱以及肝肾功能受损<sup>[9]</sup>; (3)高龄患者不能耐受长时间麻醉和复杂的手术, 长时间麻醉及手术不利于改善低灌注, 并对高龄患者心肺肾功能较差的患者是严峻的考验, 部分患者存在手术禁忌症或麻醉风险高, 手术中长时间的牵张反射, 胆道刺激也使心率血压不断波动, 不利于休克及感染的治疗<sup>[10]</sup>。

因此高龄急性胆管炎的患者需快速引流脓性胆汁, 缓解胆道压力, 并同时纠正休克, 控制感染, 改善中毒症状, 纠正电解质紊乱, 稳定内环境<sup>[11]</sup>。在抗炎补液的基础上, 及早采取简单的操作引流胆汁使胆管减压。随着B超、CT技术的在经皮肝穿刺胆道引流(percutaneous transhepatic cholangial drainage, PTCD)中的应用及发展, PTCD的成功率有所提高, 效果优于急诊手术被应用于高龄急性胆管炎患者的急诊治疗。但PTCD的并发症多, 操作难度大且需要长期体外带管, 降低患者的生存质量<sup>[12]</sup>。相比于急诊手术及PTCD, 内镜治疗具有操作时间短、腹部无创口、机体损伤小、术后恢复快且无需麻醉等特点, 内镜治疗适用于高龄、心肺功能差、凝血异常的患者<sup>[13,14]</sup>。

对于高龄急性胆管炎的内镜治疗有如下经验: (1)高龄急性胆管炎的患者应及早行急诊内镜治疗, 由于高龄患者病情重并且耐受性差, 遂急诊内镜力求以快速、简单的操作引流胆汁降低胆道压力, 不求一次性解除病因, 待病情稳定后可择期行内镜取石、支架或手术治疗; (2)急诊内镜不宜时间过久, 当寻找乳头或插管困难时, 应及时停止操作, 避免继续盲目延长操作时间, 转行PTCD或手术治疗<sup>[15]</sup>; (3)术后应将BD管固定牢靠, 防止烦躁患者自行拔出BD管, 若患者仍无法配合, 可行ERBD引流胆汁。

对于高龄急性胆管炎的患者正确并及时的选用内镜治疗, 可以降低死亡率及并发症的发生率, 与外科手术及PTCD相比, ERCP在经验丰富的消化内镜中心可以作为危重高龄急

性胆管炎患者的治疗首选。

## 参考文献

- Kimura Y, Takada T, Strasberg SM, Pitt HA, Gouma DJ, Garden OJ, Büchler MW, Windsor JA, Mayumi T, Yoshida M, Miura F, Higuchi R, Gabata T, Hata J, Gomi H, Dervenis C, Lau WY, Belli G, Kim MH, Hilvano SC, Yamashita Y. TG13 current terminology, etiology, and epidemiology of acute cholangitis and cholecystitis. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 2013; 20: 8-23 [PMID: 23307004]
- 叶海燕, 唐瑾, 马少林. 老年急性化脓性胆管炎并感染性休克患者预后分析. *中国急救医学* 2013; 33: 28-30
- Lee F, Ohanian E, Rheem J, Laine L, Che K, Kim JJ. Delayed endoscopic retrograde cholangiopancreatography is associated with persistent organ failure in hospitalised patients with acute cholangitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2015; 42: 212-220 [PMID: 25997554 DOI: 10.1111/apt.13253]
- Khashab MA, Tariq A, Tariq U, Kim K, Ponor L, Lennon AM, Canto MI, Gurakar A, Yu Q, Dunbar K, Hutfless S, Kalloo AN, Singh VK. Delayed and unsuccessful endoscopic retrograde cholangiopancreatography are associated with worse outcomes in patients with acute cholangitis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2012; 10: 1157-1161 [PMID: 22507875 DOI: 10.1016/j.cgh.2012.03.029]
- Day LW, Lin L, Somsouk M. Adverse events in older patients undergoing ERCP: a systematic review and meta-analysis. *Endosc Int Open* 2014; 2: E28-E36 [PMID: 26134610 DOI: 10.1055/s-0034-1365281]
- Kiriyama S, Takada T, Strasberg SM, Solomkin JS, Mayumi T, Pitt HA, Gouma DJ, Garden OJ, Büchler MW, Yokoe M, Kimura Y, Tsuyuguchi T, Itoi T, Yoshida M, Miura F, Yamashita Y, Okamoto K, Gabata T, Hata J, Higuchi R, Windsor JA, Bornman PC, Fan ST, Singh H, de Santibanes E, Gomi H, Kusachi S, Murata A, Chen XP, Jagannath P, Lee S, Padbury R, Chen MF, Dervenis C, Chan AC, Supe AN, Liao KH, Kim MH, Kim SW. TG13 guidelines for diagnosis and severity grading of acute cholangitis (with videos). *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 2013; 20: 24-34 [PMID: 23307001 DOI: 10.1007/s00534-012-0561-3]
- 廖代祥, 罗成华, 李兵, 于军辉, 张展志, 王岩, 苗成利. 《东京指南》指导223例急性胆管炎诊治的回顾性分析. *中华临床医师杂志(电子版)* 2013; 7: 10637-10641
- 杨联国, 王羽. 老年急性重症胆管炎42例诊治体会. *中国临床研究* 2013; 26: 455
- 刘思义, 朱革非. 急性重症胆管炎致死因素分析. *中国现代医学杂志* 2015; 25: 93-96
- 江堤, 张莉, 苏剑东. 急诊ERCP治疗老年人急性化脓性胆管炎48例临床分析. *中国医药指南* 2012; 10: 455-456
- Nishino T, Hamano T, Mitsunaga Y, Shirato I, Shirato M, Tagata T, Shimada M, Yoshida S, Mitsunaga A. Clinical evaluation of the Tokyo

- Guidelines 2013 for severity assessment of acute cholangitis. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 2014; 21: 841-849 [PMID: 25410528 DOI: 10.1002/jhbp.189]
- 12 张尊祺, 章福彬. 微创化治疗急性化脓性胆管炎17例临床分析. *肝胆外科杂志* 2015; 23: 109-110
- 13 Yun DY, Han J, Oh JS, Park KW, Shin IH, Kim HG. Is endoscopic retrograde cholangiopancreatography safe in patients 90 years of age and older? *Gut Liver* 2014; 8: 552-556 [PMID: 25228977 DOI: 10.5009/gnl13310]
- 14 Park TY, Choi JS, Oh HC, Kim JW, Do JH, Jung YH. Assessment of safety of non-anesthesiologist-assisted endoscopic retrograde cholangiopancreatography based on performance status in elderly patients. *J Gastroenterol Hepatol* 2014; 29: 1943-1948 [PMID: 24730577 DOI: 10.1111/jgh.12608]
- 15 王蒙, 王广义, 杜晓宏, 吕国悦, 冯秋实. 老年患者治疗性ERCP的危险因素分析. *中国老年学杂志* 2012; 32: 3154-3156

#### ■同行评价

该研究研究方法比较客观公正, 诊断分类有理有据, 文笔流畅, 论证清楚, 对临床、尤其对内镜医师诊疗工作具有一定的指导意义。

编辑: 郭鹏 电编: 都珍珍



ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) DOI: 10.11569 2015年版权归百世登出版集团有限公司所有

## •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、补充或删节时, 本刊编辑部将把原稿连同审稿意见、编辑意见发给作者修改, 而作者必须于15天内将单位介绍信、作者复核要点承诺书、版权转让信等书面材料电子版发回编辑部, 同时将修改后的电子稿件上传至在线办公系统; 逾期发回的, 作重新投稿处理。

#### 3 版权

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



## 妊娠期急性胰腺炎的临床特点

汪 洋, 荆 雪, 田字彬, 丁雪丽, 王小玮, 解 曼

### 背景资料

妊娠期急性胰腺炎(acute pancreatitis during pregnancy, APP)近些年来发病率逐年升高,因其临床特点不典型,是一种严重威胁母婴健康的疾病;病因一般认为胆石症占主要,但现发现高脂血症占有比例增大,且不同病因在疾病发生、发展、预后方面存在差异。

汪洋, 荆雪, 田字彬, 丁雪丽, 王小玮, 解曼, 青岛大学附属医院消化内科 山东省青岛市 266003

汪洋,在读硕士,研究消化系统、胰腺疾病的研究。

作者贡献分布: 此课题由荆雪、汪洋及田字彬共同设计; 汪洋与荆雪贡献相同; 文献检索由汪洋完成; 临床资料的收集由汪洋、丁雪丽、王小玮及解曼共同完成; 资料分析与论文撰写由荆雪与汪洋共同完成; 田字彬与荆雪审核。

通讯作者: 田字彬, 教授, 266003, 山东省青岛市江苏路16号, 青岛大学附属医院消化内科。tianzb@qdumh.qd.sd.cn

电话: 0532-82911302

收稿日期: 2015-08-10 修回日期: 2015-09-22

接受日期: 2015-09-28 在线出版日期: 2015-10-18

### Clinical characteristics of acute pancreatitis during pregnancy

Yang Wang, Xue Jing, Zi-Bin Tian, Xue-Li Ding, Xiao-Wei Wang, Man Xie

Yang Wang, Xue Jing, Zi-Bin Tian, Xue-Li Ding, Xiao-Wei Wang, Man Xie, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266003, Shandong Province, China

Correspondence to: Zi-Bin Tian, Professor, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Qingdao University, 16 Jiangsu Road, Qingdao 266003, Shandong Province, China. tianzb@qdumh.qd.sd.cn

Received: 2015-08-10 Revised: 2015-09-22

Accepted: 2015-09-28 Published online: 2015-10-18

### Abstract

**AIM:** To describe the clinical characteristics and causes of acute pancreatitis during pregnancy (APP).

**METHODS:** A retrospective analysis of clinical data for 23 pregnant women with acute pancreatitis treated at the Affiliated Hospital of Qingdao University from January 1, 2000 to January 1, 2015, including age, body

mass index, gestational age, hospitalization time, hospitalization expenses and other numerical variables, as well as fetal sex and other classification variables.

**RESULTS:** Twenty (86.96%) cases occurred in late pregnancy. Seven (30.43%) cases were moderately severe pancreatitis, and 8 (34.78%) cases were severe pancreatitis. Thirteen (56.52%) cases were caused by hyperlipidemia, 4 (17.39%) cases were caused by gallstones and 6 (26.10%) cases were idiopathic. Maternal death occurred in 1 (4.35%) case, and the rate of fetal mortality was 13.63% (3/22). Compared with non-hyperlipidemic acute pancreatitis, cases caused by hyperlipidemia were more severe, however, the prognoses of both mothers and infants were good.

**CONCLUSION:** Acute pancreatitis occurs mostly in the third trimester of pregnancy, and is mostly caused by hyperlipidemia and gallstones. The rate of acute pancreatitis in patients with hyperlipidemia is increasing year by year, and it is associated with a high mortality rate of fetuses.

© 2015 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

**Key Words:** Pancreatitis; Pregnancy; Hyperlipidemia

Wang Y, Jing X, Tian ZB, Ding XL, Wang XW, Xie M. Clinical characteristics of acute pancreatitis during pregnancy. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2015; 23(29): 4738-4744 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/23/4738.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v23.i29.4738>

### 同行评议者

刘超, 教授, 主任医师, 中山大学孙逸仙纪念医院(附属第二医院)肝胆胰外科; 江建新, 教授, 主任医师, 湖北省肿瘤医院肝胆胰脾外科

## 摘要

**目的:** 总结妊娠期急性胰腺炎(acute pancreatitis during pregnancy, APP)的病因、临床特点和预后及15年的变迁, 并探讨其临床诊治要点。

**方法:** 回顾性分析近15年(2000-01-01/2015-01-01)青岛大学附属医院收治的23例APP患者的临床资料, 既包括患者年龄、体质量指数、孕周、住院时间、住院花费等数值变量, 还包括胎儿性别等分类变量。

**结果:** 23例APP中, 20例(86.96%)发生于妊娠晚期, 中度重症胰腺炎7例(30.43%), 重症胰腺炎8例(34.78%)。病因方面: 高脂血症性胰腺炎13例(56.52%), 胆源性4例(17.39%), 特发性胰腺炎6例(26.10%)。全组孕产妇病死率为4.35%(1/22); 胎儿死亡率为13.63%(3/22)。与非高脂血症性相比, 高脂血症性胰腺炎患者的病情严重, 但婴儿出生评分及预后未见明显差异。

**结论:** APP多数发生于孕晚期, 高脂血症和胆道疾病是其主要病因, 其中前者所占比例尤为突出, 高脂血症APP发病率逐年上升, 病情较后者严重, 并伴有较高的胎儿病死率。

© 2015年版权归百世登出版集团有限公司所有。

**关键词:** 胰腺炎; 妊娠; 高脂血症

**核心提示:** 本研究通过高脂血症组与非高脂血症组的对比, 总结出高脂血症妊娠急性胰腺炎发病率呈上升趋势, 且病情严重, 愈后差, 住院花费及住院天数有显著差异。

汪洋, 荆雪, 田宇彬, 丁雪丽, 王小玮, 解曼. 妊娠期急性胰腺炎的临床特点. 世界华人消化杂志 2015; 23(29): 4738-4744  
URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/23/4738.asp>  
DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v23.i29.4738>

## 0 引言

近些年来, 妊娠期急性胰腺炎(acute pancreatitis during pregnancy, APP)发病率呈逐年升高的趋势, 因其临床特点不典型, 是一种严重威胁母婴健康的疾病。APP的发生率文献报道不一, 一般认为发病率为1/10000-1/1000<sup>[1]</sup>, 有文

献报道为1:3333<sup>[2]</sup>, 其特点为妊娠中晚期患者多发<sup>[2]</sup>。关于该病的病因也存在争议, 有研究<sup>[3]</sup>表明, APP最常见的病因是胆石症, 其次是酗酒及高脂血症, 而高脂血症引起的APP因其发病率逐年升高, 症状重、母婴死亡率高、预后较差, 近些年来受到关注。本研究回顾性分析了APP发病率、人口学统计资料等同时分析研究该病高脂血症与非高脂血症在疾病转归、住院时间、住院花费等方面是否具有差异, 高脂血症与流产史、多胎妊娠史有无关联, 孕妇、胎儿预后, 治疗手段等差异, 总结其发病特征并探讨治疗方案, 减少误诊, 降低母婴死亡率。

## 1 材料和方法

**1.1 材料 病例来源及诊断标准:** 本研究是2000-01-01/2015-01-01的临床诊断为APP患者23例为研究对象。急性胰腺炎的诊断标准参照中华医学会消化病学胰腺病学组2013年制定的《急性胰腺炎诊治指南》<sup>[4]</sup>。APP定义为妊娠期开始至分娩结束整个过程中合并急性胰腺炎。根据孕龄将妊娠期分为三期: 早期为孕1-12 wk, 中期为孕13-28 wk, 晚期为孕29 wk至分娩。高脂血症定义为: 血脂>11.3 mmol/L, 或血脂介于5.6-11.3 mmol/L, 肉眼可见乳糜状脂血者。本研究的22例患者中, 1例患者就诊2次, 共23例, 23例中年龄中位数为28岁(22-36岁), 身高160 cm(154-168 cm), 体质量68 kg(50-97 kg), 孕周36 wk(12-40 wk), 第二次妊娠6例(26.09%), 第三次妊娠1例(4.35%), 第四次妊娠2例(8.70%)。上述患者中4例(17.39%)有1次流产经历, 1例(4.35%)有2次流产史, 1例(4.35%)有3次流产史。妊娠时期: 妊娠早期患者1例(1/23), 行引产治疗; 妊娠中期患者2例(2/23), 均行剖宫产; 其他20例(20/23)均为晚期妊娠。病因分布分类情况及严重程度评估: 本研究中, 高脂血症为13例(56.52%); 非高脂血症有10例(43.48%), 非高脂血症中包括4例(4/10)胆系梗阻及6例(6/10)特发性急性胰腺炎。病理分类中有10例为坏死性胰腺炎, 13例为水肿性胰腺炎。按照2013版急性胰腺炎分类: 亚特兰大国际共识的分类和定义的修订, 8例(34.78%)为轻症, 7例(30.43%)为中度重症, 8例(34.78%)为重度重症。5例(21.74%)患者胆红素升高, 4例(17.13%)患者转氨酶升高, 9例(39.13%)低氧血症。

## ■ 相关报道

肖炳华等不仅叙述近些年APP发病率情况, 还使用图片阐释了不同年份增长率的差别, 提示近些年高脂血症病比例升高。

### ■ 创新盘点

本文通过对高脂血症组与非高脂血症组相关数据比较, 阐述了高脂血症APP临床特点、住院花费、住院时间等与非高脂血症有显著差异, 并探讨了患者流产史、多胎妊娠史与该病是否有关联。

## 1.2 方法

**1.2.1 一般资料分析:** 进行评估的患者信息包括: 年龄、体质量指数、孕周、孕次/产次、流产史、发病诱因、入院检查[如: 血气分析、血清淀粉酶、血常规、转氨酶、C反应蛋白(C-reaction protein, CRP)、血脂、血钙、超声、计算机断层扫描(computed tomography, CT)等]、临床表现、体征、治疗[如: 血液滤过、经内镜逆行胰胆管造影(endoscopic retrograde cholangiopancreatography, ERCP)取石、鼻肠管置入等]、母婴治疗效果和预后[如: APGAR(Appearance Pulse Grimace Activity Respiration, APGAR)评分、新生儿出生体质量]、住院时间及住院花费。

**1.2.2 治疗措施:** 参照中华医学会消化病学会胰腺病学组2013年制定的《急性胰腺炎诊治指南》<sup>[4]</sup>, 治疗措施同指南; 若为高脂血症患者, 嘱每日服用可定或非诺贝特胶囊降低甘油三酯; 若药物无效, 可转入重症医学科行血浆置换或血液净化如连续肾脏替代(continuous renal replacement therapy, CRRT)治疗; 其他侵入性治疗还包括ERCP取石术, 胆囊摘除术等。

**统计学处理** 本研究使用SPSS19.0软件, 连续变量以中位数表示, 组间比较使用Mann-Whitney *U*检验, 分类变量使用频数(百分数)表示, 组间比较使用 $\chi^2$ 检验或Fisher精确检验双侧检验,  $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 高脂血症及非高脂血症的临床特征比较** 高脂血症与非高脂血症的临床特征比较如表1-6, 两组的年龄、体质量、发病孕周等无明显差异, 而高脂血症组在住院时间、住院费用、CT评分、体温、脉搏、血氧分压等有显著性差异, 但婴儿出生评分及预后未见明显差异。针对高脂血症组患者血液CRP行ROC曲线分析, 其值为71.14 mg/L时约登指数最高。

**2.2 高脂血症组入院当天血脂及血浆置换治疗结果** 入院当天总胆固醇最大值36.48 mmol/L, 最小值7.43 mmol/L, 甘油三酯最大值30.00 mmol/L, 最小值6.58 mmol/L。13例高脂血症中有7例行血液滤过治疗, 治疗后患者血脂均能有效回降, 其中1例患者治疗前血甘油三酯为25.16 mmol/L, 治疗后可达6.11 mmol/L。

**2.3 妊娠多胎妊娠、流产史及高脂血症与否关**

系 经过线性回归分析提示在该病中多胎妊娠史、流产史与高脂血症与否关系不成线性相关, 即不能证明妊娠急性胰腺炎高脂血症病因与多胎妊娠、流产史有相关线性关系, 但因样本比较少, 该病发病率比较低, 尚缺乏大样本试验来证明。

**2.4 预后** 本研究收集到的病例中, 1例患者分别在孕34 wk及孕37 wk两次入院, 在孕34 wk时保守治疗后症状好转, 孕37 wk时行剖宫产, 1例患者孕12 wk时流产, 1例患者症状较重胎死腹中行死胎引产, 1例患者病情危重, 经全力抢救但仍母婴均死亡, 其余患者均行剖宫产手术, 本研究中母亲的死亡率为1例(4.35%); 胎儿死亡率为3例(13.63%), 其余新生儿身高48 cm (38-52 cm), 体质量2650 g(1630-3425 g), 出生1 min评分为9分(6-10分), 出生5 min评分为10分(8-10分)(表6)。

## 3 讨论

既往认为APP发病率较低, 有研究表明发病率为1:3333<sup>[2]</sup>, 近几年仍有较大规模多中心临床回顾性研究<sup>[5]</sup>表明发病率为1:3021, 这与上述研究基本相符。本次研究的发病率为1:4844。较多文献指出该病较常发生于妊娠中晚期, 有一项研究<sup>[2]</sup>从147197妊娠妇女中寻找43例诊断为该病的患者, 妊娠早期占19%, 妊娠中期占26%, 妊娠晚期占53%。本研究中87%(20/23)的比例患者为晚期妊娠, 与之前文献记载APP多发生于妊娠晚期相符。

在APP中, 既往认为发病原因首先为胆道疾病尤其以胆石症多见, 有多中心临床研究表明63%的患者病因为胆石症, 其他病因中16.5%为特发性, 12.3%为酒精性<sup>[5]</sup>, 也有研究<sup>[6]</sup>认为胆道疾病高脂血症及酗酒是最常见的急性胰腺炎病因。本研究中以高脂血症的病例为主, 23例APP中有13(56.52%)为高脂血症, 高脂血症引起的APP的比例可能在增长, 尚缺乏较大规模研究去证实。在本研究中, 高脂血症组患者的住院时间、花费、疾病严重程度较非高脂血症组有显著差别, 并且, 本研究中8例重度重症急性胰腺炎均存在高脂血症, 2例母婴生命体征不平稳, 其中1例为胎死腹中, 母亲引产后疾病好转; 另有1例为妊娠35 wk时突发重度重症急性胰腺炎, 原因为高脂血症, 经抢救后无效母婴皆死亡。相比于高脂血症组, 非高



表 1 高脂血症与非高脂血症妊娠期急性胰腺炎一般资料的比较

资料	高脂血症组	非高脂血症组	P值
年龄(岁)	28(22-36)	29(26-36)	0.1430
身高(cm)	160.00(160.00-168.00)	158.00(154.00-165.00)	0.0140
体质量(kg)	70.00(57.50-87.00)	65.50(50.00-75.00)	0.3820
体质量指数(kg/m <sup>2</sup> )	30.630(20.280-47.310)	26.830(15.623-35.600)	0.5350
孕周	35(20-40)	36(12-39)	0.4930
妊娠次数	1(1-4)	2(1-4)	0.3600
流产史	0(0-2)	0(0-3)	0.7140

应用要点

本文着重研究APP的临床特点及高脂血症在此病的发生发展及预后的作用,提示高脂血症该病患者比例可能会上升,对临床有着较为重要的借鉴意义。

表 2 高脂血症与非高脂血症妊娠期急性胰腺炎生命体征比较

体征	高脂血症组	非高脂血症组	P值
体温(℃)	38.40(37.10-39.40)	37.90(36.00-38.50)	0.0190
呼吸(次/min)	20(15-35)	19(17-27)	0.9000
脉搏(次/min)	100(88-110)	87(70-150)	0.0230

表 3 高脂血症与非高脂血症妊娠期急性胰腺炎临床检验比较

临床指标	高脂血症组	非高脂血症组	P值
血淀粉酶(U/L)	284.00(53.00-2420.00)	1270.00(69.2-2584)	0.1530
尿淀粉酶(U/L)	1295.00(364.00-15300.00)	1881.00(189-49760)	0.4890
白细胞数( $\times 10^9$ )	15.60(11.84-30.06)	15.27(9.49-32.54)	0.4570
血糖(mmol/L)	11.16(3.64-17.6)	7.28(3.36-14.18)	0.1070
血钙(mmol/L)	1.87(1.15-2.41)	2.01(1.8-2.39)	0.1820
CRP(mg/L)	100.76(11.16-265.54)	19.85(1.84-173.00)	0.0830
LDH(U/L)	304.00(32.50-447.00)	179.50(137.00-1452.00)	0.2220
ALT(U/L)	14.00(10.00-90.00)	14.00(10.00-278.00)	0.7480
AST(U/L)	26.00(10.00-90.00)	21.00(15.00-275.00)	0.8030
血氧分压(mmHg)	70.070(37.00-100.00)	137.00(79.00-158.00)	0.0070
二氧化碳分压	34.00(24.00-45.00)	32.00(26.00-40.00)	0.5000
胆红素( $\mu$ mol/L)	12.64(3.38-231.37)	11.25(7.18-113.4)	0.8950
肌酐( $\mu$ mol/L)	63.50(32.00-103.80)	71.50(35.00-81.00)	0.1130
尿素氮(mmol/L)	4.63(0.87-9.16)	3.475(1.12-7.55)	0.4680
白蛋白(g/L)	26.09(15.43-34.60)	26.99(20.63-39.90)	0.5770

脂血症病例多为轻型,有3例胆源性胰腺炎经剖宫产后行ERCP取石术,手术较为顺利,术后恢复良好.但在本研究中,高脂血症组及非高脂血症组胎儿分娩后的APGAR评分无显著性差异.

高脂血症引起的急性胰腺炎之前就有报道<sup>[7,8]</sup>,有研究<sup>[9]</sup>表明血脂越高的患者患急性胰腺炎的概率越高,血脂每增加100 mg/dL,急性胰腺炎的发病可能性将增加4%<sup>[10]</sup>.应该询问患者是否有高脂血症家族史,以便区别是原发性高脂血症或后天获得性高脂血症.据报道,家族

性高脂血症引起的APP死亡率可达20%-30%<sup>[11]</sup>.本研究中通过回访及其他病历资料调查,得知13例高脂血症急性胰腺炎患者中有3例患者在妊娠前诊断为高脂血症,具体数值不明,其中1例患者经内分泌科诊断为家族性高脂血症.妊娠期妇女在孕激素及雌激素的作用下,极低密度脂蛋白(very low-density lipoprotein, VLDL)和甘油三酯(triglyceride, TG)会升高到妊娠前的2.5倍,低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein-cholesterol, LDL-C)升高1.6倍,到临产时血脂浓度最高<sup>[12]</sup>.妊娠期雌激素发生变化

■名词解释

脂蛋白脂酶：主要有肝外脂肪酶和HTGL都是细胞溶酶体中的一种水解酶，在血管内皮表面发生作用，二者结构相似，属甘油三酯酶，与胰脂肪酶有同源酶，参与体内脂肪代谢功能。

表 4 高脂血症与非高脂血症妊娠期急性胰腺炎严重程度、分型及评分的比较

项目	高脂血症组	非高脂血症组	Fisher	P值
严重程度			12.790	0.0010
轻型	1(0.08)	7(0.70)		
中度重症	4(0.30)	3(0.30)		
重度重症	8(0.69)	0(0.00)		
病理分型			8.069	0.0010
水肿型	4(0.31)	9(0.90)		
坏死型	9(0.69)	1(0.10)		
CT评分	8(3-13)	4(3-8)		0.0070
Ranson评分	1(0-3)	0(0-2)		0.0610
BISAP评分	2(0-3)	1(0-2)		0.1210

表 5 高脂血症与非高脂血症妊娠期急性胰腺炎患者住院比较

项目	高脂血症组	非高脂血症组	P值
住院时间(d)	19(8-40)	12.5(4-20)	0.0370
住院花费(元)	79087.37 (24238.59-288779.13)	22732.11 (9693.00-37207.42)	0.0010

表 6 高脂血症与非高脂血症妊娠期急性胰腺炎产儿预后比较

项目	高脂血症组	非高脂血症组	P值
胎儿身高(cm)	46.50 (38.00-51.00)	48.00 (40.00-52.00)	0.5830
胎儿体质量(kg)	2650.00 (19.00-3300.00)	3200.00 (1630.00-3425.00)	0.2830
出生后1 min Apgar评分	9(6-10)	10(8-10)	0.0540
出生后5 min Apgar评分	10(8-10)	10(9-10)	0.2980

导致脂蛋白脂酶(lipoprotein lipase, LPL)发生变化, 使VLDL-C的清除率大大下降, 这些变化加剧了之前存在的体内脂质代谢紊乱<sup>[13,14]</sup>。根据Havel等<sup>[15]</sup>提出的理论, 正常情况下过多的脂质可以有胰腺脂肪分解酶进行分解, 然而在游离脂肪酸形成并高度集中的情况下, 超过了机体蛋白负载结合力, 并形成微细结构, 进而对胰腺的腺泡及毛细血管, 造成组织缺血及酸中毒, 并加重了脂肪酸对机体的毒性<sup>[15-17]</sup>。有外文研究<sup>[18,19]</sup>证实, 血TG>1000 mg/dL为危险信号, 在妊娠期将血脂降至1000 mg/dL可有效预防APP的发生。

对于妊娠期高脂血症早期治疗至关重要, 主要的治疗手段有: (1)控制患者饮食、静脉注射的药物等, 并根据患者疾病严重程度给予不同处理, 最好24-48 h处理高脂血症; (2)肝素及胰岛素的注入可能是一直以来解决高脂血症

的办法, 肝素的注入可以将黏附在内皮细胞上的LPL释放, 并短暂降低血脂浓度, 但连续使用可能会使LPL耗尽; (3)使用血浆置换, 这种方法可以不进降低血液中的乳糜微粒, 还可以降低蛋白酶及炎症介质。有研究<sup>[20,21]</sup>证明, 血浆置换可以有效地将患者血脂降至1000 mg/dL, 并降低了乳糜微粒的聚集, 治疗性血浆置换因其可高效安全地移除血浆中的TG从而延缓疾病的进展, 在临床中得到广泛应用<sup>[22]</sup>; (4)血液滤过: 血液滤过是治疗高脂血症急性胰腺炎的有效手段<sup>[23]</sup>, 可清除和调整循环内的炎症介质, 同时血滤器又能吸附TG, 故用于重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)早期(起病72 h内), 本研究中高脂血症患者经过血液滤过治疗后, 多数患者的血脂可降至正常, 最高下降幅度可达87.88%。

另外, 通常认为急性胰腺炎主要的病因仍

为胆石症, 有研究<sup>[24]</sup>报道称在妊娠期孕妇体内性激素水平紊乱导致胆道平滑肌松弛, 加重了胆汁淤积, 胆道形成泥沙样的结石, 这些泥沙样的结石在壶腹部形成梗阻, 并形成了APP. 在治疗方面, 非妊娠期胆石症急性胰腺炎轻症者可选择ERCP取石术, 重度患者在则需先行保守治疗<sup>[25]</sup>. 但有文献报道<sup>[26]</sup>, 若单纯保守治疗, 再次妊娠形成胆石性急性胰腺炎的发病率为70%. 目前, 对于该病因患者的治疗仍无统一规定, 根据患者个体化及自身情况决定, 本研究中4例诊断为胆系梗阻, 2例中度重症, 2例轻症, 其中3例剖宫产后行ERCP术, 手术顺利, 术后未再并发急性胰腺炎.

本研究中统计了妊娠患者既往的流产史及多胎妊娠史, 通过统计学分析发现高脂血症与否与多胎妊娠及流产无统计学上线性相关, 但因为该病发病率低, 样本量小, 不排除外偏倚导致结果为阴性, 但仍有可能其间存在非线性或其他关系, 仍需大量临床回顾分析发现及证实.

另外值得注意的是, 在评价APP的轻重程度方面, 现有的评分比如BISAP评分中存在年龄的限制, 孕妇年龄多为20-40岁, 这对于急性胰腺炎的评分来说造成了一定的偏移, 现有的CT评分或磁共振成像(magnetic resonance imaging)不可或缺, 但需考虑妊娠期妇女这个独特的群体. 辐射可能对其造成一定损伤, 本研究的23例患者中有2例在妊娠期行B超检查, 其余为剖宫产后行CT检查. 值得一提的是, 在2012版《急性胰腺炎分类: 亚特兰大国际共识的分类和定义的修订》<sup>[27]</sup>中取消了APACHE评分及Ranson评分, 而以改良的Marshall评分系统作为评判急性胰腺炎轻重分级的标准, 这一点较好的符合了APP的诊断分级. 在本研究中23例患者有5例为难以逆转的呼吸衰竭, 均为重症急性胰腺炎, 这一定义很好地适用于育龄期妇女.

总之, APP虽然发病率低, 但危险性大, 病因以胆石症及高脂血症等为主, 因为妊娠妇女为特殊群体, 急性胰腺炎常表现为腹痛, 这一症状通常被误认为与妊娠有关, 发现该病较晚, 延误治疗时机. 本研究证实, 高脂血症APP与非高脂血症妊娠急性胰腺炎在疾病严重程度、住院时间、花费等方面存在显著差异, 虽然目前文献报道仍以胆石症病因为主, 但高脂血症引起的该病严重程度较前者大, 且随着人

们生活水平的提高, 高脂血症病因引起的APP发病率可能随上升趋势, 目前仍缺乏大规模多中心研究. 在治疗方面仍以个体化为主, 若现在基础上继续开展大规模多样本研究, 相信可能会极大提高我国APP的诊疗技术, 降低母婴死亡率, 改善预后.

#### 同行评价

本文研究了一种特殊人群的胰腺炎-孕妇急性胰腺炎的临床特点及高脂血症对其影响, 具有较好的临床指导意义.

#### 参考文献

- McKay AJ, O'Neill J, Imrie CW. Pancreatitis, pregnancy and gallstones. *Br J Obstet Gynaecol* 1980; 87: 47-50 [PMID: 7362789]
- Ramin KD, Ramin SM, Richey SD, Cunningham FG. Acute pancreatitis in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1995; 173: 187-191 [PMID: 7631678]
- Han DH, Moh IH, Kim DM, Ihm SH, Choi MG, Yoo HJ, Hong EG. Gestational hyperlipidemia and acute pancreatitis with underlying partial lipoprotein lipase deficiency and apolipoprotein E3/E2 genotype. *Korean J Intern Med* 2013; 28: 609-613 [PMID: 24009459 DOI: 10.3904/kjim.2013.28.5.609]
- 中华医学会消化病学分会胰腺疾病学组, 中华胰腺病杂志编辑委员会, 中华消化杂志编辑委员会. 中国急性胰腺炎诊治指南(2013年, 上海). *中华消化杂志* 2013; 33: 217-222
- Eddy JJ, Gideonsen MD, Song JY, Grobman WA, O'Halloran P. Pancreatitis in pregnancy. *Obstet Gynecol* 2008; 112: 1075-1081 [PMID: 18978108 DOI: 10.1097/AOG.0b013e318185a032]
- Papadakis EP, Sarigianni M, Mikhailidis DP, Mamopoulos A, Karagiannis V. Acute pancreatitis in pregnancy: an overview. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2011; 159: 261-266 [PMID: 21840110 DOI: 10.1016/j.ejogrb.2011.07.037]
- Loo CC, Tan JY. Decreasing the plasma triglyceride level in hypertriglyceridemia-induced pancreatitis in pregnancy: a case report. *Am J Obstet Gynecol* 2002; 187: 241-242 [PMID: 12114919]
- Bildirici I, Esinler I, Deren O, Durukan T, Kabay B, Onderoglu L. Hyperlipidemic pancreatitis during pregnancy. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2002; 81: 468-470 [PMID: 12027823]
- Sandhu S, Al-Sarraf A, Taraboanta C, Frohlich J, Francis GA. Incidence of pancreatitis, secondary causes, and treatment of patients referred to a specialty lipid clinic with severe hypertriglyceridemia: a retrospective cohort study. *Lipids Health Dis* 2011; 10: 157 [PMID: 21906399 DOI: 10.1186/1476-511X-10-157]
- Murphy MJ, Sheng X, MacDonald TM, Wei L. Hypertriglyceridemia and acute pancreatitis. *JAMA Intern Med* 2013; 173: 162-164 [PMID: 23183821 DOI: 10.1001/2013.jamainternmed.477]
- Kulkarni A, Downes E, Crook M. Successful outcome of pregnancy in a patient with familial hypertriglyceridaemia. *J Obstet Gynaecol* 2006; 26: 66-67 [PMID: 16390715]
- Abu Musa AA, Usta IM, Rechdan JB, Nassar AH. Recurrent hypertriglyceridemia-induced pancreatitis in pregnancy: a management dilemma. *Pancreas* 2006; 32: 227-228 [PMID: 16390715]



- 16552349]
- 13 Iverius PH, Brunzell JD. Relationship between lipoprotein lipase activity and plasma sex steroid level in obese women. *J Clin Invest* 1988; 82: 1106-1112 [PMID: 3417867]
- 14 Sorva R, Kuusi T, Dunkel L, Taskinen MR. Effects of endogenous sex steroids on serum lipoproteins and postheparin plasma lipolytic enzymes. *J Clin Endocrinol Metab* 1988; 66: 408-413 [PMID: 3339113]
- 15 Havel RJ. Pathogenesis, differentiation and management of hypertriglyceridemia. *Adv Intern Med* 1969; 15: 117-154 [PMID: 4908616]
- 16 Saharia P, Margolis S, Zuidema GD, Cameron JL. Acute pancreatitis with hyperlipemia: studies with an isolated perfused canine pancreas. *Surgery* 1977; 82: 60-67 [PMID: 877857]
- 17 Kimura W, Mössner J. Role of hypertriglyceridemia in the pathogenesis of experimental acute pancreatitis in rats. *Int J Pancreatol* 1996; 20: 177-184 [PMID: 9013278]
- 18 Okura Y, Hayashi K, Shingu T, Kajiyama G, Nakashima Y, Saku K. Diagnostic evaluation of acute pancreatitis in two patients with hypertriglyceridemia. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 3691-3695 [PMID: 15534935]
- 19 Athyros VG, Gioulema OI, Nikolaidis NL, Vasiliadis TV, Bouloukos VI, Kontopoulos AG, Eugenidis NP. Long-term follow-up of patients with acute hypertriglyceridemia-induced pancreatitis. *J Clin Gastroenterol* 2002; 34: 472-475 [PMID: 11907366]
- 20 Coca-Prieto I, Valdivielso P, Olivecrona G, Ariza MJ, Rioja J, Font-Ugalde P, García-Arias C, González-Santos P. Lipoprotein lipase activity and mass, apolipoprotein C-II mass and polymorphisms of apolipoproteins E and A5 in subjects with prior acute hypertriglyceridaemic pancreatitis. *BMC Gastroenterol* 2009; 9: 46 [PMID: 19534808 DOI: 10.1186/1471-230X-9-46]
- 21 Tsuang W, Navaneethan U, Ruiz L, Palascak JB, Gelrud A. Hypertriglyceridemic pancreatitis: presentation and management. *Am J Gastroenterol* 2009; 104: 984-991 [PMID: 19293788 DOI: 10.1038/ajg.2009.27]
- 22 Hang Y, Chen Y, Lu LX, Zhu CQ. Acute hyperlipidemic pancreatitis in a pregnant woman. *World J Emerg Med* 2013; 4: 311-313 [PMID: 25215139 DOI: 10.5847/wjem.j.1920-8642.2013.04.013]
- 23 Iskandar SB, Olive KE. Plasmapheresis as an adjuvant therapy for hypertriglyceridemia-induced pancreatitis. *Am J Med Sci* 2004; 328: 290-294 [PMID: 15545847]
- 24 Menees S, Elta G. Endoscopic retrograde cholangiopancreatography during pregnancy. *Gastrointest Endosc Clin N Am* 2006; 16: 41-57 [PMID: 16546022]
- 25 Wilson CT, de Moya MA. Cholecystectomy for acute gallstone pancreatitis: early vs delayed approach. *Scand J Surg* 2010; 99: 81-85 [PMID: 20679042]
- 26 Swisher SG, Hunt KK, Schmit PJ, Hiyama DT, Bennion RS, Thompson JE. Management of pancreatitis complicating pregnancy. *Am Surg* 1994; 60: 759-762 [PMID: 7944038]
- 27 Banks PA, Bollen TL, Dervenis C, Gooszen HG, Johnson CD, Sarr MG, Tsiotos GG, Vege SS. Classification of acute pancreatitis--2012: revision of the Atlanta classification and definitions by international consensus. *Gut* 2013; 62: 102-111 [PMID: 23100216 DOI: 10.1136/gutjnl-2012-302779]

编辑: 郭鹏 电编: 都珍珍



# 连续性血液净化对重症急性胰腺炎患者早期诱导的肠黏膜屏障功能障碍的改善作用

张霞, 邵换璋

张霞, 邵换璋, 河南省人民医院重症医学科 河南省郑州市 450000

张霞, 副主任医师, 主要从事重症消化的研究。

作者贡献分布: 本文由张霞写作; 邵换璋协助完成。

通讯作者: 张霞, 副主任医师, 450000, 河南省郑州市纬五路7号, 河南省人民医院重症医学科. [zxzhangxia@yeah.net](mailto:zxzhangxia@yeah.net)

收稿日期: 2015-07-01 修回日期: 2015-09-15

接受日期: 2015-09-18 在线出版日期: 2015-10-18

## Continuous blood purification improves intestinal mucosal barrier dysfunction in patients with severe acute pancreatitis

Xia Zhang, Huan-Zhang Shao

Xia Zhang, Huan-Zhang Shao, Department of ICU, He'nan Provincial People's Hospital, Zhengzhou 450000, He'nan Province, China

Correspondence to: Xia Zhang, Associate Chief Physician, Department of ICU, He'nan Provincial People's Hospital, 7 Weiwu Road, Zhengzhou 450000, He'nan Province, China. [zxzhangxia@yeah.net](mailto:zxzhangxia@yeah.net)

Received: 2015-07-01 Revised: 2015-09-15

Accepted: 2015-09-18 Published online: 2015-10-18

## Abstract

**AIM:** To evaluate the effect of continuous blood purification (CBP) on intestinal mucosal barrier dysfunction in patients with severe acute pancreatitis (SAP).

**METHODS:** Fifty-two patients with SAP treated by CBP were included into an experiment group, and 40 healthy volunteers were included into a control group. The score

of Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II (APACHE II), serum amylase, diamine oxidase, plasma D-lactate, endotoxin (ET), tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ), nitric oxide (NO), and urinary lactulose/mannitol (L/M) ratio were compared between the two groups.

**RESULTS:** APACHE II score and the level of serum amylase for the experiment after treatment were significantly lower group than before treatment ( $8.11 \pm 2.66$  vs  $14.59 \pm 4.67$ ,  $519.33 \text{ U/L} \pm 52.06 \text{ U/L}$  vs  $837.58 \text{ U/L} \pm 52.14 \text{ U/L}$ ,  $P < 0.05$ ); the levels of diamine oxidase, plasma D-lactate, ET, TNF- $\alpha$ , NO, and L/M ratio were also significantly lower after treatment than before treatment ( $5.83 \text{ U/L} \pm 1.33 \text{ U/L}$  vs  $7.99 \text{ U/L} \pm 1.03 \text{ U/L}$ ,  $0.91 \text{ mg/L} \pm 0.47 \text{ mg/L}$  vs  $1.63 \text{ mg/L} \pm 0.55 \text{ mg/L}$ ,  $0.20 \text{ EU/L} \pm 0.04 \text{ EU/L}$  vs  $0.38 \text{ EU/L} \pm 0.06 \text{ EU/L}$ ,  $0.97 \text{ ng/mL} \pm 0.31 \text{ ng/mL}$  vs  $1.97 \text{ ng/mL} \pm 0.35 \text{ ng/mL}$ ,  $87.26 \text{ } \mu\text{mol/mL} \pm 18.75 \text{ } \mu\text{mol/mL}$  vs  $140.02 \text{ } \mu\text{mol/mL} \pm 26.48 \text{ } \mu\text{mol/mL}$ ,  $0.04 \pm 0.02$  vs  $0.09 \pm 0.03$ ,  $P < 0.05$ ). The levels of diamine oxidase, plasma D-lactate, ET, TNF- $\alpha$ , NO, and L/M ratio for the experiment group after treatment were higher than those for the control group ( $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** CBP can improve the indexes of intestinal mucosal barrier dysfunction and the clinical symptoms of SAP, and is of important significance for protecting the intestinal mucosal barrier function.

## 背景资料

急性重症胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)是胰腺因胰蛋白酶的自身消化作用而引起的疾病,临床表现为腹痛、腹胀、恶心、呕吐、发热等症状。生活检验提示其血和尿中淀粉酶含量升高。一般情况下,胰液在其腺体组织中含有无活性的胰酶原。当机体发生病变后,造成胰酶原活化,排泄不畅,引起胰腺炎。

## 同行评议者

黄颖秋, 教授, 本溪钢铁(集团)总医院消化内科; 郭晓钟, 教授, 中国人民解放军沈阳军区总医院消化内科; 潘秀珍, 教授, 主任医师, 福建省立医院消化科

## ■ 研究前沿

近几年对SAP的研究较多,但依然会造成机体高的死亡率。当机体肠道黏膜屏障受到损伤的时候,经一系列的变化,会发生多器官功能障碍综合征。

© 2015 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

**Key Words:** Continuous blood purification; Severe acute pancreatitis; Intestinal mucosal barrier function

Zhang X, Shao HZ. Continuous blood purification improves intestinal mucosal barrier dysfunction in patients with severe acute pancreatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2015; 23(29): 4745-4749 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/23/4745.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v23.i29.4745>

## 摘要

**目的:** 探讨连续性血液净化(continuous blood purification, CBP)对急性重症胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)患者早期诱导的肠黏膜屏障功能障碍的改善作用。

**方法:** 比较河南省人民医院重症医学科收治的52例SAP患者(实验组)经CBP治疗前后急性生理学与慢性健康状况评分II(acute physiology and chronic health evaluation II, APACHE II)、血清淀粉酶、二胺氧化酶(diamine oxidase, DAO)、血浆D-乳酸、内毒素(endotoxin, ET)、血清肿瘤坏死因子 $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、一氧化氮(nitric oxide, NO)及尿乳果糖/甘露醇(urinary lactulose/mannitol, L/M)水平变化情况,并与40例健康志愿者(对照组)相关指标进行比较。

**结果:** 实验组患者治疗后APACHE II评分和血清淀粉酶水平与治疗前比较均明显下降(8.11分 $\pm$ 2.66分 vs 14.59分 $\pm$ 4.67分)、(519.33 U/L $\pm$ 52.06 U/L vs 837.58 U/L $\pm$ 52.14 U/L), 差异有统计学意义( $P<0.05$ ); 实验组患者治疗后DAO、D-乳酸、ET、TNF- $\alpha$ 、NO及L/M水平与治疗前比较均明显下降(5.83 U/L $\pm$ 1.33 U/L vs 7.99 U/L $\pm$ 1.03 U/L、0.91 mg/L $\pm$ 0.47 mg/L vs 1.63 mg/L $\pm$ 0.55 mg/L、0.20 EU/L $\pm$ 0.04 EU/L vs 0.38 EU/L $\pm$ 0.06 EU/L、0.97 ng/mL $\pm$ 0.31 ng/mL vs 1.97 ng/mL $\pm$ 0.35 ng/mL、87.26  $\mu$ mol/mL $\pm$ 18.75  $\mu$ mol/mL vs 140.02  $\mu$ mol/mL $\pm$ 26.48  $\mu$ mol/mL、0.04 $\pm$ 0.02 vs 0.09 $\pm$ 0.03), 差异有统计学意义( $P<0.05$ ); 实验组患者治疗后DAO、D-乳酸、ET、TNF- $\alpha$ 、NO及L/M水平均明显高于对照组( $P<0.05$ )。

**结论:** CBP能够有效改善肠黏膜屏障功能相

关指标、改善SAP临床症状,对保护肠黏膜屏障功能具有重要意义。

© 2015年版权归百世登出版集团有限公司所有。

**关键词:** 连续性血液净化; 急性重症胰腺炎; 肠黏膜屏障功能障碍

**核心提示:** 本研究结果显示,实验组患者治疗后急性生理学与慢性健康状况评分II(acute physiology and chronic health evaluation II)评分和血清淀粉酶水平均明显下降,提示连续性血液净化(continuous blood purification, CBP)在改善患者临床症状和血液淀粉酶方面有显著效果。治疗后二胺氧化酶(diamine oxidase)、血浆D-乳酸、血浆内毒素(endotoxin)、血清肿瘤坏死因子 $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ )、血清一氧化氮(nitric oxide)及尿乳果糖/甘露醇(urinary lactulose/mannitol)水平均明显下降,提示CBP对保护肠黏膜屏障功能具有重要意义。

张霞, 邵换璋. 连续性血液净化对重症急性胰腺炎患者早期诱导的肠黏膜屏障功能障碍的改善作用. *世界华人消化杂志* 2015; 23(29): 4745-4749 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/23/4745.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v23.i29.4745>

## 0 引言

急性重症胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)是胰腺因胰蛋白酶的自身消化作用而引起的疾病,临床表现为腹痛、腹胀、恶心、呕吐、发热等症状<sup>[1]</sup>。生活检验提示其血和尿中淀粉酶含量升高<sup>[2]</sup>。一般情况下,胰液在其腺体组织中含有无活性的胰酶原。当机体发生病变后,造成胰酶原活化,排泄不畅,引起胰腺炎<sup>[3]</sup>。近几年对SAP的研究较多,但依然会造成机体高的死亡率。当机体肠道黏膜屏障受到损伤的时候,经一系列的变化,会发生多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)<sup>[4]</sup>。连续性血液净化(continuous blood purification, CBP)是治疗SAP的有效手段。现将河南省人民医院在该方面的研究报道如下。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 收集2012-06/2015-05河南省人民医院重症医学科收治的SAP患者52例的临床资料,作为实验组。其中,男性患者28例,女性



患者24例,患者年龄为31-69岁,平均年龄为43.78岁±7.94岁;有弹道病史24例,暴饮暴食14例,饮酒10例,原因不明4例。随机选取同时期来河南省人民医院进行体检的健康志愿者40例为对照组。其中,男22例,女18例,年龄为30-68岁,平均年龄为42.15岁±6.33岁。两组的临床资料在性别分布、年龄分布、发病原因等资料方面比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ ),具有可比性。

## 1.2 方法

1.2.1 治疗:所有患者入院后,均禁食、补液、胃肠减压、清肠、营养支持等治疗。患者从发病到进行CBP治疗均未超过48 h。采取双腔二囊管在颈静脉位置建立血管通路,采取血液滤过机进行静脉血液滤过(continuous venovenous hemofiltration, CVVH)治疗,血流量设定为250-300 mL/min,置换液流量控制在4000 mL/h。同时使用低分子肝素抗凝,首剂量为2000-4000 U,维持剂量为200-400 U/h。24 h为1治疗周期,观察治疗1周期后临床效果。

1.2.2 检测指标:血浆D-乳酸检测:分别于治疗前、后抽取患者静脉血2-3 mL,去蛋白后应用酶联紫外分光光度法进行检测<sup>[5]</sup>。尿乳果糖/甘露醇(urinary lactulose/mannitol, L/M)测定:分别于治疗前、后抽取患者清晨口服10 mL乳果糖/甘露醇(乳果糖2 g、甘露醇1 g)后6 h内的全部尿液,混匀后取其中20 mL样本加入0.2 mg硫柳汞防腐后于-20℃保存,应用高效液相色谱法检测处理样本中的尿果糖和甘露醇的浓度<sup>[6]</sup>。血浆内毒素(endotoxin, ET):采用鲎试剂偶氮基质显色法进行定量检测。

分别于治疗前、后抽取患者静脉血5 mL在2000 r/min下离心10 min,分离血清采用硝酸还原酶法检测血清一氧化氮(nitric oxide, NO)、采用放免法检测血清肿瘤坏死因子 $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、采用比色法检测血清二胺氧化酶(diamine oxidase, DAO)<sup>[7]</sup>。

1.2.3 观察指标:比较实验组患者治疗前后慢性健康状况评分与血清淀粉酶水平变化情况,慢性健康状况评分参照急性生理学与慢性健康状况评分II(acute physiology and chronic health evaluation II, APACHE II)标准<sup>[8]</sup>。

**统计学处理** 采用SPSS19.0统计软件进行统计分析,计量资料结果用mean±SD表示,治

疗前后及组间比较用 $t$ 检验,计数资料以构成比表示,用 $\chi^2$ 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 实验组患者治疗前后APACHE II评分、血清淀粉酶水平对比 实验组患者治疗后APACHE II评分和血清淀粉酶水平较治疗前均明显下降(8.11分±2.66分 vs 14.59分±4.67分, 519.33 U/L±52.06 U/L vs 837.58 U/L±52.14 U/L)( $P<0.05$ )。

2.2 两组入选者肠黏膜屏障功能对比 实验组患者治疗后DAO、D-乳酸及ET水平均明显下降,与治疗前比较,差异有统计学意义( $P<0.05$ );但是这些指标均明显高于对照组( $P<0.05$ )(表1)。

2.3 两组入选者TNF- $\alpha$ 、NO及L/M水平对比 实验组患者治疗后TNF- $\alpha$ 、NO及L/M水平均明显下降,与治疗前比较,差异有统计学意义( $P<0.05$ );但是这些指标均明显高于对照组( $P<0.05$ )(表2)。

## 3 讨论

胃肠黏膜屏障功能障碍是造成肠内细菌及毒素易位,继发感染等的一个重要原因,是造成脓毒血症的主要原因<sup>[9]</sup>。临床及时采取CBP治疗,可有效减少脓毒血症的发生,挽救患者生命<sup>[10]</sup>。关于CBP对胃肠屏障功能的保护机制,研究较少。进一步研究其作用机制,对于更好的治疗SAP具有重要意义。

L/M是评价肠黏膜通透性的常用指标,其中甘露醇为单糖,分子小,可通过肠黏膜细胞膜上的水溶性微孔<sup>[11]</sup>;而尿乳果糖为双糖,分子较大,可通过肠黏膜细胞间隙达到透过细胞膜的目的,与细菌和内毒素通过肠黏膜的方式相同<sup>[12]</sup>。因此,L/M可准确反映肠黏膜的屏障功能。SAP患者发病后失液和感染导致患者血液重新排布、全身血容量下降,从而导致肠黏膜发生缺血和再灌注损伤<sup>[13]</sup>。同时肠道中细菌和内毒素的侵入引发了内毒素血症,而内毒素血症又进一步促进了细菌和内毒素的侵入,形成了恶性循环,而内毒素也促进了多种炎性介质(TNF- $\alpha$ 、NO等)的分泌<sup>[14]</sup>,因此血液中TNF- $\alpha$ 、NO和ET水平会出现异常升高。本研究中,本研究中实验组患者治疗前TNF- $\alpha$ 、NO和ET水平明显高于对照组,与上述研究相符。DAO大多存在于小肠黏膜上,有

## ■ 相关报道

关于连续性血液净化对胃肠屏障功能的保护机制研究较少,进一步研究其作用机制,对于更好的治疗SAP具有重要意义。

■ 创新盘点

本研究中实验组患者治疗后血清淀粉酶、二胺氧化酶、血浆D-乳酸、内毒素、血清肿瘤坏死因子α、一氧化氮及尿乳果糖/甘露醇水平仍明显高于对照组, 分析原因可能与治疗时间较短, 患者病情未完全缓解有关。

表 1 两组入选者肠黏膜屏障功能对比

分组	时间	DAO(U/L)	D-乳酸(mg/L)	ET(EU/L)
实验组	治疗前	7.99 ± 1.03	1.63 ± 0.55	0.38 ± 0.06
	治疗后	5.83 ± 1.33 <sup>ac</sup>	0.91 ± 0.47 <sup>ac</sup>	0.20 ± 0.04 <sup>ac</sup>
对照组	-	4.07 ± 1.01	0.79 ± 0.55	0.03 ± 0.01

<sup>a</sup>*P*<0.05 vs 治疗前; <sup>c</sup>*P*<0.05 vs 对照组。DAO: 血清二胺氧化酶; ET: 血浆内毒素。

表 2 两组入选者TNF-α、NO及L/M水平对比

分组	时间	TNF-α(ng/mL)	NO(μmol/mL)	L/M
实验组	治疗前	1.97 ± 0.35	140.02 ± 26.48	0.09 ± 0.03
	治疗后	0.97 ± 0.31 <sup>ac</sup>	87.26 ± 18.75 <sup>ac</sup>	0.04 ± 0.02 <sup>ac</sup>
对照组	-	0.77 ± 0.27	62.69 ± 15.38	0.02 ± 0.01

<sup>a</sup>*P*<0.05 vs 治疗前; <sup>c</sup>*P*<0.05 vs 对照组。TNF-α: 血清肿瘤坏死因子α; NO: 血清一氧化氮; L/M: 尿乳果糖/甘露醇。

高度活性的细胞内酶。当机体的小肠黏膜屏障功能受到损伤时, DAO就会表现为升高, DAO指标能够体现早期肠黏膜的通透性<sup>[15]</sup>。另外, 当机体肠道屏障功能受损, 也会出现D-乳酸水平的增高<sup>[16]</sup>。

本研究结果显示, 实验组患者治疗后APACHE II评分和血清淀粉酶水平均明显下降, 提示CBP在改善患者临床症状和血淀粉酶方面有显著效果。实验组患者治疗后DAO、D-乳酸、ET、TNF-α、NO及L/M水平均明显下降, 这和已有研究结果一致, 表明CBP能够促进机体内毒素代谢, 降低各种炎症因子指标水平, 对肠黏膜屏障功能有明显保护作用。但本研究中实验组患者治疗后DAO、D-乳酸、ET、TNF-α、NO及L/M水平仍明显高于对照组, 分析原因可能与治疗时间较短, 患者病情未完全缓解有关。

总之, CBP能够有效改善肠黏膜屏障功能相关指标、改善SAP临床症状, 对保护肠黏膜屏障功能具有重要意义。

4 参考文献

1 李凤舞, 王红. 急性胰腺炎伴胃肠功能障碍的中西医结合研究进展. 北京中医药 2015; 34: 253-256  
2 盛鹰, 谢晓洪, 金文静, 蔡金芳, 王志华, 高波, 朱念, 王静恩. 培菲康联合马来酸曲美布丁早期治疗对脓毒症患者肠黏膜屏障功能的影响. 疑难病杂志 2015; 14: 265-268  
3 马秀颖, 汤茂春, 赵严. 重症急性胰腺炎对肠黏膜

屏障功能损伤的研究进展. 同济大学学报(医学版) 2015; 36: 125-128  
4 温怡洪, 李国伟, 方海星. 早期肠内营养治疗对急性重症胰腺炎所致SIRS转归的影响. 中国普通外科杂志 2015; 24: 446-448  
5 Shabbir S, Jamal S, Khaliq T, Khan ZM. Comparison of BISAP Score with Ranson's Score in Determining the Severity of Acute Pancreatitis. J Coll Physicians Surg Pak 2015; 25: 328-331 [PMID: 26008656]  
6 刁永鹏, 陈宏, 李非. 重症急性胰腺炎肠屏障功能障碍的研究进展. 中国普外基础与临床杂志 2009; 18: 588-592  
7 Chen K, Zhou Z, Zhou B, Li Y. [Potential therapeutic effect of paracrine factors from bone marrow-derived mesenchyme stem cells in the treatment of severe acute pancreatitis]. Shengwu Yixue Gongchengxue Zazhi 2015; 32: 245-248 [PMID: 25997300]  
8 刘卫珍, 罗丽, 熊楚梅. 急性生理学及慢性健康状况评分系统 II 在重症监护病房护理中的应用. 护理研究 2010; 24: 9-11  
9 肖萍. 早期肠内营养护理对急性重症胰腺炎患者的影响. 深圳中西医结合杂志 2015; 25: 177-178  
10 Vinnik YS, Dunaevskaya SS, Antufrieva DA. [Diagnostic value of integral scoring systems in assessing the severity of acute pancreatitis and patient's condition]. Vestn Ross Akad Med Nauk 2015; (1): 90-94 [PMID: 26027276 DOI: 10.15690/vramn.v70i1.1236]  
11 程汝兰, 张洪福. 连续性血液净化对重症急性胰腺炎患者血清疾病相关指标的影响. 西部医学 2015; 27: 221-223  
12 瓦永禄. 早期肠内复方谷氨酰胺在重症急性胰腺炎治疗中的应用疗效. 世界华人消化杂志 2015; 23: 1484-1488  
13 张美华, 黄建伟, 温凌, 王巧瑜, 潘洁. 血必净联合血液净化对急性重症胰腺炎的疗效观察. 齐齐哈尔医学院学报 2015; 36: 1476-1478

- 14 李梦秋, 余红菊, 李良海. 连续性血液净化对重症急性胰腺炎患者肾素-血管紧张素-醛固酮系统及炎症因子的影响. 中国老年学杂志 2015, 35: 630-632
- 15 Wang HL, Yu KJ. Sequential blood purification therapy for critical patients with hyperlipidemic severe acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2015; 21: 6304-6309 [PMID: 26034366 DOI: 10.3748/wjg.v21.i20.6304]
- 16 朱妍, 王志勤, 林兆奋. 谷氨酰胺联合早期肠内营养对急性重症胰腺炎患者氨基酸代谢、细菌移位以及炎症反应的影响. 海南医学院学报 2015; 21: 347-349, 352

#### 同行评价

本文语言流畅, 写作规范, 有一定的参考价值.

编辑: 郭鹏 电编: 都珍珍



ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) DOI: 10.11569 2015年版权归百世登出版集团有限公司所有

#### •消息•

### 《世界华人消化杂志》参考文献要求

**本刊讯** 本刊采用“顺序编码制”的著录方法, 即以文中出现顺序用阿拉伯数字编号排序. 提倡对国内同行近年已发表的相关研究论文给予充分的反映, 并在文内引用处右上角加方括号注明角码. 文中如列作者姓名, 则需在“Pang等”的右上角注角码号; 若正文中仅引用某文献中的论述, 则在该论述的句末右上角注角码号. 如马连生<sup>[1]</sup>报告……, 研究<sup>[2-5]</sup>认为……; PCR方法敏感性高<sup>[6-7]</sup>. 文献序号作正文叙述时, 用与正文同号的数字并排, 如本实验方法见文献[8]. 所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.



## 饮食疗法、口服益生菌联合艾迪莎气药灌肠对溃疡性结肠炎的临床疗效

刘贵儒, 明 兰, 朱维娜, 施文陆, 赵 敏, 李睿瑛, 陆金良, 张苏闽

### ■背景资料

目前, 溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)的患病率逐年升高, 随着大样本的流行病学研究发现发达国家的患病率任高于发展中国家。随着“西方饮食”的涌入, 发展中国家的发病率也在逐年升高。现代研究发现营养学与炎症性肠病的发生发展有着密切的联系。

刘贵儒, 内蒙古自治区通辽市库伦旗中医院普外科 内蒙古自治区通辽市 028000  
明兰, 施文陆, 赵敏, 李睿瑛, 陆金良, 南京中医药大学第一临床医学院 江苏省南京市 210029  
朱维娜, 南京市中医院中心实验室 江苏省南京市 210001  
张苏闽, 南京市中医院全国肛肠医疗中心 江苏省南京市 210001  
刘贵儒, 主治医师, 主要从事肛肠类疾病的研究。  
江苏省中医药科技基金资助项目, No. LZ09088  
作者贡献分布: 本文实验研究过程由刘贵儒与明兰完成; 实验设计及论文编写由明兰完成; 数据分析由明兰、朱维娜、施文陆、赵敏、李睿瑛及陆金良完成; 明兰与张苏闽审校。  
通讯作者: 张苏闽, 教授, 主任医师, 210001, 江苏省南京市金陵路1号, 南京市中医院全国肛肠医疗中心。  
1269456020@qq.com  
收稿日期: 2015-07-24 修回日期: 2015-09-10  
接受日期: 2015-09-18 在线出版日期: 2015-10-18

Physician, Anorectal Center of Nanjing Hospital of Traditional Chinese Medicine, 1 Jinling Road, Nanjing 210001, Jiangsu Province, China. 1269456020@qq.com  
Received: 2015-07-24 Revised: 2015-09-10  
Accepted: 2015-09-18 Published online: 2015-10-18

### Abstract

**AIM:** To evaluate the clinical efficacy of diet therapy combined with basic therapy (oral probiotics and Etiasa gas enema) for ulcerative colitis (UC).

**METHODS:** Ninety patients with moderate or mild to moderate UC were randomly divided into an experimental group, a control group and a blank group. The experimental group and control group were given oral probiotics and Etiasa gas enema. The experimental group and blank group received diet therapy. Inflammatory indicators [leukocytes, erythrocyte sedimentation rate (ESR), and C-reactive protein] indicators were compared between different groups before and after treatments.

**RESULTS:** The remission rate in the experimental group was higher than those in the control group and blank group (90% vs 83.3%, 80.0%). Erythrocyte sedimentation rate and C-reactive protein were significantly different between before and after treatment in the three groups, and the experimental group was better than the control group and the blank group (ESR:  $F = 7.879$ ,  $P = 0.000 < 0.01$ ; C-reactive protein:  $F = 22.030$ ,  $P = 0.000 < 0.01$ ).

### Clinical effects of diet therapy plus oral probiotics plus Etiasa gas enema in ulcerative colitis

Gui-Ru Liu, Lan Ming, Wei-Na Zhu, Wen-Lu Shi, Min Zhao, Rui-Ying Li, Jin-Liang Lu, Su-Min Zhang

Gui-Ru Liu, Department of General Surgery, Kulun Chinese Medicine Hospital, Tongliao 028000, Inner Mongolia Autonomous Region, China  
Lan Ming, Wen-Lu Shi, Min Zhao, Rui-Ying Li, Jin-Liang Lu, the First Clinical Medical College of Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China  
Wei-Na Zhu, Central Laboratory, Nanjing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210001, Jiangsu Province, China  
Su-Min Zhang, Anorectal Center of Nanjing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210001, Jiangsu Province, China  
Supported by: Medical Science and Technology Bureau Foundation of Jiangsu Province, No. LZ09088  
Correspondence to: Su-Min Zhang, Professor, Chief

### ■同行评议者

马赞, 副教授, 副主任医师, 首都医科大学

**CONCLUSION:** Diet therapy combined with basic therapy is superior to either medical therapy or diet therapy alone in ulcerative colitis.

© 2015 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

**Key Words:** Ulcerative colitis; Diet treatment; Fatty acid; Polyunsaturated fatty acid

Liu GR, Ming L, Zhu WN, Shi WL, Zhao M, Li RY, Lu JL, Zhang SM. Clinical effects of diet therapy plus oral probiotics plus Etiasa gas enema in ulcerative colitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2015; 23(29): 4750-4755 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/23/4750.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v23.i29.4750>

## 摘要

**目的:** 研究饮食疗法联合基础治疗(口服益生菌、艾迪莎联合气药灌肠)对溃疡性结肠炎的临床疗效。

**方法:** 选取南京市中医院2014-01/2015-03收治的90例中度及中度以下的溃疡性结肠炎患者, 电脑随机分为实验组、对照组和空白组。实验组和对照组口服相同药物治疗的同时实验组严格控制饮食, 两组常规口服益生菌、艾迪莎联合气药灌肠。实验组和空白组同时严格遵守医生交代的饮食习惯。观察三组治疗前后的炎症指标变化[白细胞、红细胞沉降率(erythrocyte sedimentation rate, ESR)、C-反应蛋白(C-reaction protein, CRP)]。

**结果:** 实验组总缓解率大于对照组和空白组(实验组90%, 对照组83.3%, 空白组80.0%)。相关炎症治疗中, ESR和CRP治疗前后有统计学意义, 实验组优于对照组和空白组(3组ESR组间治疗前 $F = 1.796$ ,  $P = 0.172 > 0.05$ , 认为各组回归直线是平行的。进行协方差分析, 治疗前 $F = 688.305$ ,  $P = 0.000 < 0.01$ , 组间计量 $F = 7.879$ ,  $P = 0.000 < 0.01$ ; CRP:  $F = 11.087$ ,  $P = 0.367 > 0.05$ , 治疗前 $F = 1059.92$ ,  $P = 0.000 < 0.01$ , 组间统计量 $F = 22.030$ ,  $P = 0.000 < 0.01$ )。

**结论:** 饮食疗法联合药物治疗的治疗效果要优于单纯的药物治疗和单纯饮食疗法。

© 2015年版权归百世登出版集团有限公司所有。

**关键字:** 溃疡性结肠炎; 饮食疗法; 脂肪酸; 不饱和脂肪酸

**核心提示:** 溃疡性结肠炎的病因不明, 病机不清楚, 随着西方饮食的涌入, 溃疡性结肠炎的发生率逐年增加, 本文结合当下最热的营养学, 报道称 $\omega$ -3长链不饱和脂肪酸参与免疫炎症反应, 影响肠道菌群, 本实验进行临床观察, 探讨其与炎症性肠病之间的关系, 为进一步的临床研究做铺垫。

刘贵儒, 明兰, 朱维娜, 施文陆, 赵敏, 李睿瑛, 陆金良, 张苏闽. 饮食疗法、口服益生菌联合艾迪莎气药灌肠对溃疡性结肠炎的临床疗效. *世界华人消化杂志* 2015; 23(29): 4750-4755 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/23/4750.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v23.i29.4750>

## 0 引言

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是一种病因不明的肠道非特异性炎症疾病。随着经济的快速发展和现代人民生活方式的改变(如饮食习惯, 睡眠习惯等), UC的患病率逐年升高, 尤其在发展中国家发病率正在以3.14/10.00的速度增加<sup>[1,2]</sup>。由于其高复发率, 严重影响了患者的正常生活。同时认为他有癌变的风险<sup>[1,2]</sup>。其发病机制一直是临床研究的热点。现在认为他主要与遗传因素、环境因素、饮食因素及免疫因素有关<sup>[3]</sup>。随着大样本的流行病学研究发现发达国家的患病率高于发展中国家。随着“西方饮食”的涌入, 发展中国家的发病率也在逐年升高。同时更多研究<sup>[4]</sup>发现营养学与炎症性肠病的发生发展有着密切的联系。有研究<sup>[5,6]</sup>指出, 不饱和脂肪酸尤以 $\omega$ -3多不饱和脂肪酸摄入大大降低了UC的发病率。研究<sup>[7]</sup>显示鱼油、植物油、深海鱼油, 菜籽油, 各种鱼类中拥有丰富的 $\omega$ -3多不饱和脂肪酸。本文就严格的饮食疗法联合基础治疗对UC患者治疗前后的镜下黏膜愈合率、红细胞沉降率(erythrocyte sedimentation rate, ESR)以及C-反应蛋白(C-reaction protein, CRP)的变化和临床意义进行阐述。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料 选择南京市中医院2014-01/2015-03

## ■ 研究前沿

应用营养学, 肝-肠循环的观点, 研究UC的发生发展与饮食的关系, 通过临床的观察分析, 得出进一步的研究结果。

## ■ 相关报道

现代研究报道 $\omega$ -3长链不饱和脂肪酸参与免疫炎症反应。UC的发生发展与其密切相关, 通过严格的饮食习惯, 可以大大降低UC的发生率。

## ■ 创新盘点

本文结合当下最新热点, 严格食用含 $\omega$ -3长链不饱和脂肪酸的食物可以缓解UC的发生率, 这给大家临床治疗提供了一个很好的线索与希望。

表 1 3组镜下疗效比较 ( $n = 30$ )

分组	完全缓解	有效	无效	总有效率(%)
实验组	24	3	3	90.0
对照组	23	2	5	83.3
空白组	22	2	6	80.0

收治的90例中度UC患者。参照2012年中华医学会消化病学分会炎症性肠病协作组制订的《炎症性肠病诊断与治疗的共识意见》<sup>[8]</sup>改良Mayo评分中的中度患者。同时排除严重肝肾疾病、过敏体质、严重基础疾病、孕妇以及细菌引起的非特异性肠炎患者。近期使用过免疫抑制剂、生物制剂、激素的患者也排除在外。药物艾迪莎, 美沙拉嗪缓释颗粒, 法国爱的发制药集团生产, 规格: 0.5 g/袋, 进口药品注册证号: H20100062; 美常安, 500 mg, 3次/d, 国药准字S0030087, 北京韩美药品有限公司生产, 0.25 g/粒。灌肠仪器, 南京市中医院张苏闽教授发明的DGY-2型电脑灌肠治疗仪。实验组30例, 年龄20-24岁, 平均年龄39.73岁 $\pm$ 11.21岁; 对照组30例, 年龄22-56岁, 平均年龄38.63岁 $\pm$ 10.36岁。空白组30例, 平均年龄40.03岁 $\pm$ 11.50岁, 经统计分析, 3组患者在年龄不具有统计学意义( $P > 0.05$ ), 具有可比性。

## 1.2 方法

1.2.1 治疗: 治疗上口服艾迪莎(1 g, 3次/d)、美常安(500 mg, 3次/d), 运用气药灌肠联合南京市中医院本院制剂溃洁灌肠液。实验组和空白组控制患者的饮食, 根据2013修订版的中国居民膳食营养素参考摄入量中中国居民膳食蛋白质、碳水化合物、脂肪和脂肪酸的参考摄入量以及中国居民膳食宏量营养素的参考摄入量<sup>[7]</sup>。同时结合食物频率调查表的结果。根据食物中含有的相关不饱和脂肪酸的成分规定, 实验组患者家庭用油改为深海鱼油, 每日用量在25 g之内, 1 wk至少食用鱼类(如带鱼、目鱼、草鱼)700 g, 1 wk内至少食用豆类500 g, 同时1 mo外出饮食不超过3次。两组的疗程为8 wk。

1.2.2 观察指标: (1)临床症状及体征: 大便次数、便血情况、腹痛程度、肛门不适等情况、体温、脉搏; (2)治疗前和治疗后4 wk的肠

黏膜病变积分、ESR、CRP。

**统计学处理** 所有的数据采用SPSS19.0统计软件进行分析。计量资料以mean $\pm$ SD表示, 采用 $t$ 检验, 计数资料采用 $\chi^2$ 检验, 组间比较用方差分析, 以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

## 2 结果

2.1 镜下黏膜疗效 3组黏膜总有效率比较无明显性差异( $P > 0.05$ ), 黏膜疗效总有效实验组90%, 对照组83.3%, 空白组80.0%, 经比较无明显性差异( $P > 0.05$ )(表1)。

2.2 3组ESR、CRP治疗前后变化 3组治疗前后可进行统计学分析, 3组治疗后肠道症状、全身症状均得到了不同程度的缓解。治疗前3组ESR组间比较 $F = 1.796$ ,  $P = 0.172 > 0.05$ , 进行协方差分析, 治疗前 $F = 688.305$ ,  $P = 0.000 < 0.01$ , 可认为治疗前对治疗后的影响有统计学意义。组间统计量 $F = 7.879$ ,  $P = 0.000 < 0.01$ , 3组治疗后有统计学意义。通过治疗后的均数可知, 3组治疗前CRP组间比较 $F = 11.087$ ,  $P = 0.367 > 0.05$ , 进行协方差分析, 治疗前 $F = 1059.92$ ,  $P = 0.000 < 0.01$ , 可认为治疗前对治疗后的影响有统计学意义。组间统计量 $F = 22.030$ ,  $P = 0.000 < 0.01$ , 3组治疗后有统计学意义(表2)。

## 3 讨论

目前UC病因不明, 发病机制不明确, 病情反复, 严重影响患者的生活。现在认为UC是肠道非特异性炎症, 同时肠道菌群失调是其重要发病机制, 所以临床常用美沙拉嗪类, 肠道菌群调节剂以及结合中医灌肠治疗。但许多临床疗效不尽人意, 随着对疾病的深入研究, 免疫抑制剂、生物制剂的引入, 由于高风险、高费用等使得许多患者望而却步。当下“西方饮食”的涌入, UC的发病率逐年升高, 同时发现了营养学与炎症性肠病的发生发展有着极其重要的关系。有文献指出, 不饱和脂肪酸尤以 $\omega$ -3多不饱和脂肪酸摄入减少加剧了UC的发展。

有研究<sup>[9]</sup>认为 $\omega$ -3长链不饱和脂肪酸参与免疫炎症反应。目前较认可的是UC是非典型的Th2型免疫异常的学说<sup>[10]</sup>。UC患者肠道黏膜大量的炎性细胞及免疫淋巴细胞异常, 可以产生大量的炎性介质如促炎因子, 白介素等,



表 2 3组治疗前后的ESR、CRP比较 ( $n = 30$ , mean  $\pm$  SD)

分组	ESR(mm/h)		CRP(mg/L)	
	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
实验组	14.97 $\pm$ 5.78	11.87 $\pm$ 5.12	11.09 $\pm$ 4.93	8.28 $\pm$ 3.59
对照组	15.80 $\pm$ 5.49	14.03 $\pm$ 5.52	11.50 $\pm$ 4.79	10.29 $\pm$ 4.41
空白组	16.17 $\pm$ 5.36	14.60 $\pm$ 5.39	11.66 $\pm$ 4.50	10.52 $\pm$ 4.57

ESR治疗前 $F = 688.305$ ,  $P < 0.01$ ; CRP治疗前 $F = 1059.92$ ,  $P < 0.01$ . ESR: 红细胞沉降率; CRP: C-反应蛋白.

从而导致了UC的免疫反应异常,加重了肠道炎症反应<sup>[11]</sup>. 饮食中的 $\omega$ -3多不饱和脂肪酸的摄入量减少可以下调淋巴细胞增殖,抗原呈递和促炎细胞因子的表达以及增加抗炎细胞因子的表达,可以抑制机体的免疫功能. 所以 $\omega$ -3多不饱和脂肪酸是潜在有效的抗炎剂,他可以影响人体的脂质代谢. 合理的健康饮食可以获得足够的 $\omega$ -3多不饱和脂肪酸,人体大量的 $\omega$ -3多不饱和脂肪酸可以抑制花生四烯酸(arachidonic acid). 理论研究表明AA可以通过脂氧合酶等途径代谢产生大量的前列腺素(prostaglandins)、白三烯(leukotriene)、血栓素(thromboxane)<sup>[9]</sup>, 这些产物刺激了机体的炎症反应. 而通过 $\omega$ -3多不饱和脂肪酸,可以使体内的类二十碳烷酸化合物有所减少.  $\omega$ -3多不饱和脂肪酸中的DHA可以抑制膜上花生四烯酸的释放而减少生四烯酸合成类二十碳烷酸化合物.  $\omega$ -3多不饱和脂肪酸中的EPA与花生四烯酸竞争环加氧酶和脂氧合酶,产生具有弱生物活性PG3和LT5等,从而减轻机体的炎症反应<sup>[12]</sup>.

肠道菌群失调被认为是UC的另一大发病机制. 有关肠道菌群与UC发病机制之间关系的研究日益深入. 有研究<sup>[13]</sup>显示UC患者的微生物菌群和健康者存在差异. 与健康人相比, UC患者的结肠黏膜存在严重的细菌感染,在活动性期患者肠黏膜中有益的菌株诸如双歧杆菌和乳酸杆菌缺失,而大肠杆菌,变形梭杆菌,拟杆菌在黏膜中浓度增加<sup>[14]</sup>. 现代有研究<sup>[15]</sup>显示,随着西方饮食的涌入,人体的肠道菌群也在发生变化,尤以厚壁菌门等有害菌群增加. “西方”饮食喂养怀孕小鼠导致其后代继承了微生物群具有整体增加厚壁菌门的现象.  $\omega$ -3多不饱和脂肪酸的摄入,可以

使得厚壁菌门、大肠杆菌,变形梭杆菌以及拟杆菌有所减少<sup>[16-27]</sup>. 肠道系统与肝脏起源上生理上相互影响. 在人体发育时期,门静脉系统和胆道系统即使肝脏与肠道相联系的结果. 门静脉接受肠道的大部分血液及营养物质并将他传送给肝脏,激发并维持肝脏的生理功能. 肝脏通过其产生的胆汁影响肠道的机能<sup>[20,21]</sup>. 现代实验认为肠道菌群的主要产物短链脂肪酸可以调节胆固醇的分布和抑制肝脏脂肪合成酶的生物活性,从而使血清三酰甘油和胆固醇水平得以降低<sup>[23,24]</sup>. 其中以嗜酸乳杆菌和双歧杆菌为代表的益生菌已被研究证明具有缓和乳糖不耐受,优化肠道菌群,调节黏膜免疫,减轻炎症和过敏反应及竞争性拮抗致病菌,抗结肠癌等生物效应,甚至具有调节血脂的作用<sup>[25,26]</sup>,而UC患者肠道菌群的失调,导致肠道黏膜通透性的增加和细菌移位,肠源性内毒素血症的发生. 诱发机体免疫紊乱,从而导致一系列脂代谢的异常. 我们可通过使用以 $\omega$ -3多不饱和脂肪酸的食物,可以阻止肝脏中的甘油三酯的合成,减少内源性胆固醇的合成,增加胆固醇的排泄,减少血小板活性因子的聚齐,从而增加人体血液的流动性. 肝脏中的脂肪合成酶活性降低,血液与肝脏中的胆固醇得以重新分配调脂的功能. 同时可以增加高密度脂蛋白的合成以发挥抗动脉硬化的作用. 这些发现证实了 $\omega$ -3长链不饱和脂肪酸在日常生活饮食中的重要性<sup>[26,27]</sup>.

本文将中度UC纳入本次试验研究中,分为3组,实验组和对照组进行基础治疗,同时严格控制实验组的饮食,空白组进行饮食的调控. 通过治疗发现只有通过严格的饮食加上常规基础治疗才能很好的控制病情. 实验组的炎性

#### 应用要点

饮食中的 $\omega$ -3多不饱和脂肪酸的摄入量减少可以下调淋巴细胞增殖,抗原呈递和促炎细胞因子的表达以及增加抗炎细胞因子的表达,可以抑制机体的免疫功能. 所以 $\omega$ -3多不饱和脂肪酸是潜在有效的抗炎剂,可以通过饮食的干预和基础治疗降低UC的发生与发展,同时又为临床治疗指明了一个新的方向.

# 名词解释

**ω-3长链不饱和脂肪酸:** 是多不饱和酸的一种, 包括α-亚麻酸、二十碳五烯酸和二十二碳六烯酸等。ω-6系列主要包括亚油酸、γ-亚麻酸和花生四烯酸, 他是生长、生殖和保持正常皮肤所必需的。

指标在治疗后的改善也最为显著。发现联合饮食治疗患者在临床治愈率及炎症指标的恢复均有统计学差异, 从而很好的改善患者的临床症状, 增加了患者的就医信心。但本次样本量有限, 同时观察时间短, 我们需要再次进行大量的观察研究。

现在对UC的病因和发病机制不明确, 随着人们深入的研究, 发现饮食与炎症性肠病的发生发展密切相关。尤其以ω-3多不饱和脂肪酸为主。研究发现ω-3多不饱和脂肪酸在人体的增加与减少直接与肠道炎症反应、肠道菌群的平衡, 肠肝循环息息相关, 虽然还缺少一些临床试验数据研究, 但这为我们以后在临床诊断和治疗中提高了新的思路。我们除了合理使用药物治疗控制病情外, 同时还要严格指导患者的饮食习惯, 进一步的控制好病情。

## 4 参考文献

- 1 Zeng Z, Zhu Z, Yang Y, Ruan W, Peng X, Su Y, Peng L, Chen J, Yin Q, Zhao C, Zhou H, Yuan S, Hao Y, Qian J, Ng SC, Chen M, Hu P. Incidence and clinical characteristics of inflammatory bowel disease in a developed region of Guangdong Province, China: a prospective population-based study. *J Gastroenterol Hepatol* 2013; 28: 1148-1153 [PMID: 23432198 DOI: 10.1111/jgh.12164]
- 2 张苏闽, 明兰. 丁泽民治疗溃疡性结肠炎临证经验探析. *江苏中医药* 2015; 47: 1-4
- 3 余时间, 董卫国. 炎症性肠病发病机制的研究新进展. *胃肠病学和肝病学杂志* 2014; 23: 124-125
- 4 樊慧丽, 陈玉梅. 溃疡性结肠炎的发病机制和治疗进展. *中国新进展* 2012; 15: 228-230
- 5 Bernstein CN. New insights into IBD epidemiology: Are there any lessons for treatment? *Dig Dis* 2010; 28: 406-410 [PMID: 20926864 DOI: 10.1159/000320394]
- 6 田玉玲, 王化虹, 田雨, 张维, 滕贵根, 何群. 不同比例ω-3/ω-6多不饱和脂肪酸对DSS诱导大鼠急性结肠炎的影响. *世界华人消化杂志* 2014; 22: 2008-2015
- 7 肖会敏, 何悦, 王四旺. 椒目仁油与5种食用油中5种脂肪酸的含量比较. *中国药房* 2012; 23: 4488-4490
- 8 中华中医药学会脾胃病分会. 溃疡性结肠炎中医诊疗共识(2012). *中国中西医结合杂志* 2012; 30: 527-532
- 9 陈焰, 倪健敏. 炎症性肠病特殊营养素的补充. *世界胃肠病学杂志* 2005; 15: 1577-1580
- 10 程义勇. 中国居民膳食营养素参考摄入量2013修订版简介. *营养学报* 2014; 36: 313-316
- 11 彭小青, 李夏雨, 王玮, 李楠, 马健, 沈守荣. Th1/Th2细胞炎症因子在大鼠溃疡性结肠炎治疗模型中的表达. *中南大学学报* 2013; 38: 1020-1021
- 12 Ibrahim A, Mbodji K, Hassan A, Aziz M, Boukhetala N, Coëffier M, Savoye G, Déchelotte P, Marion-Letellier R. Anti-inflammatory

- and anti-angiogenic effect of long chain n-3 polyunsaturated fatty acids in intestinal microvascular endothelium. *Clin Nutr* 2011; 30: 678-687 [PMID: 21632157 DOI: 10.1016/j.clnu.2011.05.002]
- 13 石计朋, 黄丽密, 钱燕, 尚云. 脂肪乳剂对脂多糖诱导的急性肺损伤中细胞因子IL-1β和IL-6的影响. *临床儿科杂志* 2014; 32: 250
- 14 Walker AW, Sanderson JD, Churcher C, Parkes GC, Hudspeth BN, Rayment N, Brostoff J, Parkhill J, Dougan G, Petrovska L. High-throughput clone library analysis of the mucosa-associated microbiota reveals dysbiosis and differences between inflamed and non-inflamed regions of the intestine in inflammatory bowel disease. *BMC Microbiol* 2011; 11: 7 [PMID: 21219646 DOI: 10.1186/1471-2180-11-7]
- 15 任婷婷, 卢放根, 张允历, 程兆明, 徐珉. 高脂饮食对SD大鼠肠道菌群的影响. *世界华人消化杂志* 2010; 18: 2694-2697
- 16 Tamboli CP, Neut C, Desreumaux P, Colombel JF. Dysbiosis in inflammatory bowel disease. *Gut* 2004; 53: 1-4 [PMID: 14684564 DOI: 10.1136/gut.53.1.1]
- 17 Gibson DL, Gill SK, Brown K, Tasnim N, Ghosh S, Innis S, Jacobson K. Maternal exposure to fish oil primes offspring to harbor intestinal pathobionts associated with altered immune cell balance. *Gut Microbes* 2015; 6: 24-32 [PMID: 25559197 DOI: 10.1080/19490976.2014.997610]
- 18 Baker J, Brown K, Rajendiran E, Yip A, DeCoffe D, Dai C, Molcan E, Chittick SA, Ghosh S, Mahmoud S, Gibson DL. Medicinal lavender modulates the enteric microbiota to protect against *Citrobacter rodentium*-induced colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2012; 303: G825-G836 [PMID: 22821949 DOI: 10.1152/ajpgi.00327.2011]
- 19 Wopereis H, Oozeer R, Knipping K, Belzer C, Knol J. The first thousand days - intestinal microbiology of early life: establishing a symbiosis. *Pediatr Allergy Immunol* 2014; 25: 428-438 [PMID: 24899389 DOI: 10.1111/pai.12232]
- 20 Zaret KS. Regulatory phases of early liver development: paradigms of organogenesis. *Nat Rev Genet* 2002; 3: 499-512 [PMID: 12094228 DOI: 10.1038/nrg837]
- 21 Pereira DL, McCartney AL, Gibson GR. An in vitro study of the probiotic potential of a bile-salt-hydrolyzing *Lactobacillus fermentum* strain, and determination of its cholesterol-lowering properties. *Appl Environ Microbiol* 2003; 69: 4743-4752 [PMID: 12902267]
- 22 卢伟娜, 冯丽英. 肠道微生物在非酒精性脂肪性肝病发病中的作用. *世界华人消化杂志* 2014; 22: 340-344
- 23 Nakamura Y, Yabe K, Shimada K, Sasaki K, Han KH, Okada T, Sekikawa M, Ohba K, Ito N, Horiuchi K, Kawakami S, Fukushima M. Effect of fermented bean paste on serum lipids in rats fed a cholesterol-free diet. *Biosci Biotechnol Biochem* 2009; 73: 2506-2512 [PMID: 19897890 DOI: 10.1271/bbb.90536]
- 24 Larkin TA, Astheimer LB, Price WE. Dietary combination of soy with a probiotic or prebiotic

- food significantly reduces total and LDL cholesterol in mildly hypercholesterolaemic subjects. *Eur J Clin Nutr* 2009; 63: 238-245 [PMID: 17940545 DOI: 10.1038/sj.ejcn.1602910]
- 25 Tang ML. Probiotics and prebiotics: immunological and clinical effects in allergic disease. *Nestle Nutr Workshop Ser Pediatr Program* 2009; 64: 219-235; discussion 235-238, 251-257 [PMID: 19710525 DOI: 10.1159/000235793]
- 26 任婷婷, 卢放根. 从高脂血症大鼠模型大、小肠菌群改变探讨肠道菌群与高脂血症的关系. 长沙: 中南大学, 2007
- 27 丁兆坤, 张海柱, 许友卿. 二十二碳六烯酸和二十碳五烯酸研究的综述. *生物学通报* 2007; 42: 13-15

#### ■同行评价

本文结合营养学研究指出含有 $\omega$ -3长链不饱和脂肪酸的食物可以缓解UC的发生率, 具有一定的新颖性.

编辑: 郭鹏 电编: 都珍珍



ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) DOI: 10.11569 2015年版权归百世登出版集团有限公司所有

#### •消息•

### 《世界华人消化杂志》2011年开始不再收取审稿费

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



## 新型质子泵抑制剂联合生长抑素对急性胃肠道出血的治疗作用

张煜, 刘峰

### ■背景资料

急性上消化道出血治疗的重点在于快速止血, 并提高患者的生活质量。而药物治疗中以单一用药为主, 整体效果并不是很理想, 联合用药是该病治疗的新方向。

张煜, 刘峰, 余姚市第二人民医院消化内科 浙江省余姚市 315400

张煜, 住院医师, 主要从事消化内科的工作。

作者贡献分布: 此文主要由张煜完成; 此课题由张煜与刘峰设计; 研究过程由张煜操作完成; 数据分析由张煜和刘峰完成; 本论文写作由张煜与刘峰共同完成。

通讯作者: 张煜, 住院医师, 315400, 浙江省宁波余姚市学弄 49号, 余姚市第二人民医院消化内科。3290526266@qq.com  
电话: 0574-62723012

收稿日期: 2015-06-14 修回日期: 2015-08-31

接受日期: 2015-09-07 在线出版日期: 2015-10-18

### Clinical efficacy and safety of lansoprazole combined with somatostatin in treatment of acute upper gastrointestinal bleeding

Yu Zhang, Feng Liu

Yu Zhang, Feng Liu, Department of Gastroenterology, Yuyao Second People's Hospital, Yuyao 315400, Zhejiang Province, China

Correspondence to: Yu Zhang, Resident Physician, Department of Gastroenterology, Yuyao Second People's Hospital, 49 Xuenong, Yuyao 315400, Zhejiang Province, China. 3290526266@qq.com

Received: 2015-06-14 Revised: 2015-08-31

Accepted: 2015-09-07 Published online: 2015-10-18

### Abstract

**AIM:** To investigate the clinical effects of lansoprazole combined with somatostatin in the treatment of acute upper gastrointestinal bleeding.

**METHODS:** Eighty-six patients with acute upper gastrointestinal hemorrhage treated

from January 2011 to December 2013 in Yuyao Second People's Hospital were randomly divided into a combination treatment group and a control group. The control group was given lansoprazole alone, and the combination group was given lansoprazole combined with somatostatin. The total response rate, time to successful hemostasis, treatment duration and adverse reactions were compared between the two groups.

**RESULTS:** The total response rate was significantly higher in the combination group than in the control group (93.0% vs 72.9%,  $P < 0.05$ ). The time to successful hemostasis and treatment duration were significantly shorter in the combination group than in the control group ( $25.7 \text{ h} \pm 8.7 \text{ h}$  vs  $44.7 \text{ h} \pm 10.3 \text{ h}$ ,  $6.7 \text{ d} \pm 1.1 \text{ d}$  vs  $11.8 \text{ d} \pm 1.7 \text{ d}$ ,  $P < 0.05$ ). There was no adverse reaction in either group.

**CONCLUSION:** Lansoprazole combined with somatostatin in the treatment of acute upper gastrointestinal bleeding is associated with higher response rate, shorter bleeding time and treatment duration, and fewer adverse reactions compared with lansoprazole alone.

© 2015 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

**Key Words:** Acute; Upper gastrointestinal bleeding; Lansoprazole; Somatostatin; Clinical efficacy

Zhang Y, Liu F. Clinical efficacy and safety of

### ■同行评议者

诸葛宇征, 主任医师, 南京大学医学院附属鼓楼医院; 姚登福, 教授, 南通大学附属医院

lansoprazole combined with somatostatin in treatment of acute upper gastrointestinal bleeding. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2015; 23(29): 4756-4759 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/23/4756.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v23.i29.4756>

## 摘要

**目的:** 探讨兰索拉唑与生长抑素联合治疗急性上消化道出血的临床疗效与安全性。

**方法:** 选取2011-01/2013-12余姚市第二人民医院急性上消化道出血患者86例作为此次研究对象, 将其按照随机数字表法分为联合组与对照组, 均43例。对照组给予常规兰索拉唑治疗, 联合组给予兰索拉唑与生长抑素治疗, 观察两组患者的临床治疗总有效率、成功止血时间、接受治疗时间和不良反应。

**结果:** 联合组的有效率高于对照组总有效率(93.0% vs 72.1%)( $P<0.05$ )。联合组成功止血时间和接受治疗时间均短于对照组(25.7 h ± 8.7 h vs 44.7 h ± 10.3 h, 6.7 d ± 1.1 d vs 11.8 d ± 1.7 d)( $P<0.05$ )。联合组与对照组治疗过程中均未见有任何的不良反应。

**结论:** 临床中对于急性上消化道出血患者给予兰索拉唑与生长抑素联合治疗效果显著, 明显的缩短成功止血时间和接受治疗时间, 且不良反应少, 治疗安全性高, 值得临床中应用与推广。

© 2015年版权归百世登出版集团有限公司所有。

**关键词:** 急性; 上消化道出血; 兰索拉唑; 生长抑素; 临床疗效

**核心提示:** 急性上消化道出血采取兰索拉唑联合生长抑素治疗可以提高临床总有效率, 并且缩短止血时间、治疗时间。同时, 不良反应少, 安全性高, 应用价值高。

张煜, 刘峰. 新型质子泵抑制剂联合生长抑素对急性胃肠道出血的治疗作用. 世界华人消化杂志 2015; 23(29): 4756-4759 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/23/4756.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v23.i29.4756>

## 0 引言

上消化道出血是临床中比较常见的疾病, 由于病情比较急, 患者常常表现为失血性休克和多

器官的功能衰竭, 甚至出现死亡, 严重的影响患者的身体健康<sup>[1]</sup>。临床中常常给予手术治疗与药物治疗, 手术的创伤大, 应用受限。而药物治疗主要包括血管加压素和垂体后叶素等, 但是总体治疗效果并不是很理想<sup>[2]</sup>。因此, 如何有效的提高该病的治疗效果是临床医师们关注的重点。兰索拉唑与生长抑素均是临床中治疗消化系出血的常见药物, 且止血效果显著, 但是均以单独用药为主。本文结合作者多年的临床工作经验, 对急性上消化道出血患者实施兰索拉唑与生长抑素联合治疗, 并且取得了较好的临床治疗效果, 具体的分析如下。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 将选取2011-01/2013-12间86例胃镜检查诊断为急性上消化道出血患者为研究对象, 按照随机数字表法分为联合组与对照组, 均43例。联合组患者年龄23-77岁, 平均年龄42.4岁 ± 5.2岁。出血原因: 十二指肠溃疡患者16例、胃溃疡患者13例、急性胃黏膜病变患者9例、胃癌5例。对照组患者年龄24-79岁, 平均年龄43.6岁 ± 4.7岁。出血原因: 十二指肠溃疡患者17例, 胃溃疡患者12例, 急性胃黏膜病变患者8例, 胃癌6例。联合组与对照组的性别、年龄和出现原因等资料比较差异无统计学意义( $P>0.05$ ), 具有可比性。兰索拉唑, 国药准字H20130003, 上海新亚药业有限公司, 30 mg; 氯化钠注射液, 国药准字H20023446, 山东洁晶药业有限公司, 100 mL: 0.9 g; 生长抑素, 国药准字H20043837, 青岛国大生物制药股份有限公司, 3 mg。

### 1.2 方法

**1.2.1 治疗:** 此次研究的两组对象均给予常规治疗, 包括卧床休息和补充血容量以及低流量吸氧与补液等对症治疗<sup>[3]</sup>。对照组在此基础上给予静脉滴注30.0 mg兰索拉唑+0.9%氯化钠注射液100.0 mL, 2次/d<sup>[4]</sup>。联合组在对照组基础上采取静脉注射0.25 mg生长抑素+0.9%氯化钠注射液20.0 mL, 2次/d<sup>[5]</sup>。两组患者均连续用药72 h之后进行观察其临床治疗效果, 做好详细的记录。

**1.2.2 观察指标:** (1)临床治疗总有效率; (2)成功止血时间; (3)接受治疗时间。

**1.2.3 疗效评定标准:** 主要依据临床症状与体征改善情况进行综合评估<sup>[6]</sup>, 将其分为三个等级:

## ■ 研发前沿

此次研究重点探讨了联合用药方案在急性上消化道出血治疗中的临床疗效和可行性, 为以后该病的治疗提供参考。

## ■ 相关报道

临床中对于急性上消化道出血的治疗已经有相关报道, 均认为联合用药的效果明显的优于单一用药效果, 而此次的研究也进一步说明, 联合用药的优越性和可行性。

■ 创新亮点

本研究重点探讨了兰索拉唑与生长抑素联合用药的疗效与安全性, 且研究从主客观的角度进行分析, 更好的阐述其优越性.

表 1 联合组与对照组总有效率对比 [n = 43, n(%)]

分组	显效	有效	无效	总有效率
联合组	26(60.5)	14(32.5)	3(7.0)	40(93.0)
对照组	18(41.9)	13(30.2)	12(27.9)	31(72.1)
$\chi^2$ 值				6.384
P值				<0.05

(1)显效: 经过连续治疗24-48 h, 胃镜检查出血部位停止出血, 且心率和血压也稳定, 血红蛋白明显的改善, 肠鸣音恢复正常; (2)有效: 经过连续治疗48-72 h后, 胃镜检查出血部位停止出血, 且其他的临床症状也恢复正常; (3)无效: 患者连续治疗72 h后胃镜检查依然出血, 且临床上其他的症状也无改善. 临床治疗总有效率 = 显效%+有效%.

**统计学处理** 本次研究的数据资料均采取SPSS19.0统计学软件进行数据分析与处理, 计量资料采取mean±SD进行表示, 独立样本采取t进行检验, 计数资料采取 $\chi^2$ 进行检验,  $P<0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 两组临床治疗效果与不良反应观察 联合组总有效率93.0%, 对照组总有效率72.1%, 二者总有效率数据比较差异有统计学意义( $P<0.05$ )(表1). 联合组与对照组治疗过程中均未见有任何的不良反应.

2.2 两组成功止血时间和接受治疗时间对比 联合组成功止血时间和接受治疗时间均低于对照组(25.7 h±8.7 h vs 44.7 h±10.3 h, 6.7 d±1.1 d vs 11.8 d±1.7 d)( $t = 11.381, t = 4.716$ , 均 $P<0.05$ ).

3 讨论

上消化道出血是临床中常见的急症, 在临床中具有较高的发病率. 患者常常表现为失血性周围循环功能衰竭和呕血以及黑便等, 并且严重会导致死亡<sup>[7]</sup>. 因此, 临床中尽早控制出血和预防再次出血是临床治疗的关键. 相关资料显示, 上消化出血时, 胃酸可以有效地激活胃蛋白酶原, 并产生胃蛋白酶, 消化已经凝聚血块, 导致pH降低, 最终妨碍了血小板在出血部位的聚集, 并破坏胃黏膜的凝血作用机制<sup>[8]</sup>. 相关研究<sup>[9]</sup>显示, 提高胃内部的pH值, 可以达到

止血的效果. 因此, 临床中应积极的抑制胃酸的分泌, 并进一步提高胃内部的pH值, 从而达到止血的效果.

兰索拉唑是临床中一种新型的质子泵抑制剂, 主要是通过子啊胃壁细胞中的细胞内小管酸性作用下转化为活性较强的次磺酸, 并且阻断胃酸分泌, 进一步提高胃内的pH值, 达到止血的效果<sup>[10,11]</sup>. 生长抑素是临床中比较常见的一种人工合成化合物, 其半衰期比较长, 可以降低门静脉的压力, 并减少消化系血流<sup>[12]</sup>. 同时, 该药物还可以有效抑制胃蛋白酶和胃酸分泌, 降低了胃蛋白酶中的蛋白水解活性, 从而有效防止了出血部位血栓的溶解, 并快速促进胃黏膜修复, 达到止血的效果<sup>[13]</sup>. 经过此次的临床研究分析, 临床中对于急性上消化道出血患者在常规治疗基础上采取兰索拉唑与生长抑素联合治疗可以提高其临床治疗效果, 并快速止血, 缩短患者治疗时间. 数据显示, 联合组总有效率达到93.0%, 显著高于对照组的72.9%. 由此说明, 联合用药的效果明显的优于单一用药效果. 同时, 生素抑素和兰索拉唑止血的过程中可以达到协同的作用, 增强效果, 最终提高了整体疗效. 生素抑素除了协调兰索拉唑发挥作用之外, 还可以较好的通过收缩内脏的血管, 从而降低内脏血流量与奇静脉血流量, 达到止血的效果. 与此同时, 生长抑素可以抑制胃泌素与胃酸和胃蛋白酶的分泌作用, 从而增加胃液的pH值, 达到降低胃黏膜中的P物质和血管活性肠肽生成, 促进胃肠道黏膜的生成, 达到较强止血效果. 数据还显示, 联合组成功止血时间和接受治疗时间均明显的低于对照组, 差异有统计学意义. 主要是由于生长抑素可以有效减少胰液与胆汁的分泌, 从而抑制了胃肠道的运动, 并快速刺激胃黏膜修复, 达到快速止血的效果, 从而缩短了止血的时间, 更好的促进其痊愈<sup>[14,15]</sup>. 同时, 生长抑素治疗的过程中未见任何的不良反应, 治疗安全性高.

总之, 急性上消化道出血患者应用兰索拉唑与生长抑素联合治疗效果显著, 提高临床总有效率. 同时, 缩短止血时间和治疗时间, 且不良反应少, 安全性高, 值得临床中应用.

4 参考文献

1 詹海勇, 黄聪武. 不同剂量奥美拉唑治疗非静脉曲张

■ 应用要点

本研究对以后联合用药治疗上消化道出血提供了较好的指导意义, 且二者联合治疗方案在临床中的应用前景也比较广泛.



- 张上消化道出血的疗效比较. 广东医学 2012; 33: 127-128
- 2 邱教, 项时昊, 李访贤. 奥美拉唑联合奥曲肽治疗肝硬化上消化道出血82例. 中国药业 2013; 22: 106-107
- 3 李海东. 泮托拉唑联合生长抑素治疗急性上消化道出血的疗效及临床分析. 医学综述 2012; 18: 2719-2720
- 4 龚益清, 雷高, 邹雄飞. 兰索拉唑、奥曲肽、血凝酶联用治疗老年急性上消化道出血80例临床观察. 医学综述 2013; 19: 4568-4570
- 5 李文娟. 兰索拉唑联合生长抑素治疗急性上消化道大出血疗效观察. 中华全科医学 2014; 12: 1861-1862
- 6 杨兰艳, 郑盛. 泮托拉唑联合生长抑素治疗310例急性上消化道出血的临床观察. 中国医学创新 2011; 8: 23-24
- 7 吴惠慈, 何书为. 醋酸奥曲肽联合硝酸甘油治疗肝硬化继发上消化道出血疗效观察. 中国生化药物杂志 2012; 33: 652-653
- 8 白云磊. 消化性溃疡合并上消化道出血应用潘妥拉唑注射液治疗临床分析. 临床和实验医学杂志 2013; 12: 272-273, 276
- 9 胡倩, 陈昊, 孙秋虹. 老年上消化道出血97例病因与治疗效果分析. 中国老年学杂志 2012; 32: 3822-3823
- 10 刁依娜, 杨正兵, 蒋学华. 注射用兰索拉唑治疗65例十二指肠溃疡伴出血患者的疗效. 华西药学杂志 2014; 29: 611-612
- 11 张双. 兰索拉唑预防心肌梗死后应激性上消化道出血观察. 中国临床研究 2013; 26: 543-544
- 12 Bai L, Zhang X, Li X, Liu N, Lou F, Ma H, Luo X, Ren Y. Somatostatin prevents lipopolysaccharide-induced neurodegeneration in the rat substantia nigra by inhibiting the activation of microglia. *Mol Med Rep* 2015; 12: 1002-1008 [PMID: 25777539 DOI: 10.3892/mmr.2015.3494]
- 13 Wang C, Han J, Xiao L, Jin CE, Li DJ, Yang Z. Efficacy of vasopressin/terlipressin and somatostatin/octreotide for the prevention of early variceal rebleeding after the initial control of bleeding: a systematic review and meta-analysis. *Hepato Int* 2015; 9: 120-129 [PMID: 25788386 DOI: 10.1007/s12072-014-9594-9]
- 14 袁伟, 杨全德, 谭扬. 泮托拉唑联合生长抑素治疗上消化道出血临床疗效观察. 实用临床医药杂志 2012; 16: 81, 87
- 15 袁兴洪. 泮托拉唑钠治疗上消化道大出血的疗效观察. 现代预防医学 2012; 39: 2614-2615

#### 同行评价

该研究的临床实际应用价值高, 为以后临床中推广兰索拉唑联合生长抑素治疗消化道出血提供指导作用. 文章的观点鲜明, 观察指标可行, 可读性强, 值得推广.

编辑: 郭鹏 电编: 都珍珍



## 结肠巨大息肉内镜黏膜切除术术中出血1例

朱海丹, 何理, 赵秋, 田德安, 黎培员

### ■背景资料

结直肠巨大息肉(直径>2.0 cm)癌变几率较高, 目前, 其首选治疗为内镜下黏膜切除术(endoscopic mucosal resection, EMR)或内镜黏膜下剥离术(endoscopic submucosal dissection, ESD), 效果较好, 较安全。但是, 随着息肉直径的增大, 手术难度增大, 手术并发症亦增加, 特别是术中出血风险大大增加。所以, 探讨巨大息肉手术出血发生原因及处理方式对结肠巨大息肉的治疗以及结直肠癌的预防有重要意义。

### ■同行评议者

蔡全才, 副教授, 中国人民解放军第二军医大学附属长海医院临床流行病学与循证医学中心

朱海丹, 何理, 赵秋, 田德安, 黎培员, 华中科技大学同济医学院附属同济医院消化内科 湖北省武汉市 430030  
朱海丹, 在读硕士, 主要从事肝癌方向的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 81372663

作者贡献分布: 本文写作由朱海丹完成; 何理参与资料收集和整理; 赵秋、田德安及黎培员审核。

通讯作者: 黎培员, 副教授, 副主任医师, 430030, 湖北省武汉市解放大道1095号, 华中科技大学同济医学院附属同济医院消化内科, [pyli@tjh.tjmu.edu.cn](mailto:pyli@tjh.tjmu.edu.cn)

电话: 027-83663333 传真: 027-83663585

收稿日期: 2015-06-06 修回日期: 2015-08-27

接受日期: 2015-09-07 在线出版日期: 2015-10-18

### A case of hemorrhage after endoscopic mucosal resection of a large colonic polyp

Hai-Dan Zhu, Li He, Qiu Zhao, De-An Tian, Pei-Yuan Li

Hai-Dan Zhu, Li He, Qiu Zhao, De-An Tian, Pei-Yuan Li, Department of Gastroenterology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China  
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No.81372663

Correspondence to: Pei-Yuan Li, Associate Professor, Associate Chief Physician, Department of Gastroenterology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, 1095 Jiefang Avenue, Wuhan 430030, Hubei Province, China. [pyli@tjh.tjmu.edu.cn](mailto:pyli@tjh.tjmu.edu.cn)

Received: 2015-06-06 Revised: 2015-08-27

Accepted: 2015-09-07 Published online: 2015-10-18

### Abstract

Large colonic polyps (with a diameter larger than 2 cm) are associated with an increased risk of malignancy. Endoscopic resection is the first line treatment; however, there is a risk of bleeding. We reported a 56-year-old man with

a large pedunculated polyp (3.0 cm × 3.5 cm) located between the rectum and the sigmoid. After endoscopic mucosal resection, the patient suffered from continuous hemorrhage at the wound site. He was then treated by argon plasma coagulation (APC), bipolar coagulation and hemoclip hemostasis. Unfortunately, all these attempts ended in failure. Finally, an operation was performed and a segment of the colon was removed to save his life. From this case we can learn that we should use endoscopic nylon loop as much as possible when treating large pedunculated polyps. In addition, we should do our best to stop the bleeding at the same time.

© 2015 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: Large colonic polyps; Endoscopic mucosal resection; Hemorrhage

Zhu HD, He L, Zhao Q, Tian DA, Li PY. A case of hemorrhage after endoscopic mucosal resection of a large colonic polyp. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2015; 23(29): 4760-4764 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/23/4760.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v23.i29.4760>

### 摘要

结直肠巨大息肉(直径>2.0 cm)癌变几率较高, 内镜下微创切除是首选治疗, 但有并发出血风险。本文报告1例56岁男性患者, 降乙结肠交界处巨大带蒂息肉(3.0 cm×3.5 cm), 行内镜黏膜切除术(endoscopic mucosal resection, EMR)切除息肉后, 创面持续渗血, 氩离子凝固术(argon plasma coagulation, APC)处理后, 创面搏动性出血, 电凝止血钳

钳夹亦难以止血. 以钛夹封闭创面, 创面下方迅速形成血肿, 后送外科急诊手术切除病变肠段. 对类似病例, 应尽可能利用尼龙圈套扎, 术中充分电凝, 较大创面尽早使用钛夹止血和封闭.

© 2015年版权归百世登出版集团有限公司所有.

**关键词:** 结直肠巨大息肉; 内镜黏膜切除术; 出血

**核心提示:** 本文报告了1例降乙结肠交界处巨大带蒂息肉(3.0 cm×3.5 cm), 行内镜黏膜切除术(endoscopic mucosal resection)中并发出血的病例, 并分析其出血原因和后续处理方法, 最后讨论对类似结直肠短粗蒂巨大息肉内镜治疗病例的术中出血预防和处理方法.

朱海丹, 何理, 赵秋, 田德安, 黎培员. 结肠巨大息肉内镜黏膜切除术中出血1例. 世界华人消化杂志 2015; 23(29): 4760-4764 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/23/4760.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v23.i29.4760>

## 0 引言

结直肠息肉是生长自结直肠黏膜并隆起于黏膜表面的病变, 是消化系统一种常见病、多发病, 与结直肠癌有密切关系. 通常将直径>2.0 cm的息肉称为巨大息肉<sup>[1]</sup>, 而且, 巨大腺瘤性息肉癌变的危险性是小息肉(直径<2.0 cm)的4.6倍<sup>[2]</sup>. 因此, 积极发现并治疗结直肠巨大息肉对预防结直肠癌的发生甚为重要. 目前, 结直肠息肉首选治疗为内镜下黏膜切除术(endoscopic mucosal resection, EMR)或内镜黏膜下剥离术(endoscopic submucosal dissection, ESD), 效果好, 创伤小, 虽有出血、穿孔等并发症, 但发生率低. 本文报告1例结肠巨大息肉EMR术中出血, 并对其出血原因及处理方法进行分析.

## 1 病例报告

患者男性, 56岁, 因“排便不规律6 mo”于2014-03行肠镜检查发现结直肠多发息肉. 患者既往于2011-10因直肠癌行根治手术, 术后未化疗, 未复查肠镜; 有高血压病史4年, 最高170/110 mmHg, 口服硝苯地平缓释片血压控制满意. 入院后体格检查心率76次/min, 血压135/85 mmHg. 心肺听诊无特殊, 腹平软, 下腹见手术瘢痕, 无压痛, 未触及包块. 入院后完善

辅助检查, 血常规、出凝血时间、肝肾功能电解质血糖、肿瘤标志物、心电图、腹部超声等均无异常. 入院次晨以聚乙二醇电解质散行肠道准备, 下午行肠镜检查和治疗. 肠镜于距肛缘8 cm见直肠吻合口, 黏膜光滑. 横结肠见一大小约0.6 cm×0.8 cm小息肉, 表面光滑; 病变基底黏膜下注射肾上腺素美兰生理盐水, 充分抬举后, 圈套器电凝切除(EMR治疗), 创面清洁. 距肛缘约40 cm降乙结肠交界见一大小约3.0 cm×3.5 cm菜花样息肉, 有短粗蒂. 其蒂上另生长一大小约1.0 cm×1.2 cm分叶状息肉(图1A). 息肉基底黏膜下多点注射肾上腺素美兰盐水, 抬举良好. 先以圈套器电凝切除较小息肉, 创面清洁. 较大息肉电凝切除术后创面渗血(图1B), 以氩离子凝固术(argon plasma coagulation, APC)处理, 创面见搏动性出血(图1C), 电凝止血钳钳夹止血亦不成功, 出血较多, 且创面水肿, 视野不佳(图1D). 试以钛夹封闭局部创面, 于创面下方迅速形成血肿(图1E). 外科会诊后行急诊开腹手术, 切除病变肠段约5 cm, 剖开见一大小约0.6 cm×0.8 cm溃疡, 黏膜下血肿, 直径约3.5 cm, 未见明显活动性出血(图2). 术后病理切片示: 降乙结肠交界符合息肉状腺瘤(图3A, B); 病变肠段镜下见肠壁黏膜下层内广泛出血, 余未见特殊(图3C, D). 术后行止血肠外营养治疗, 一般情况好, 遂出院. 1年后随访, 患者排便好, 结肠镜未发现息肉.

## 2 讨论

自20世纪60年代末开展内镜下高频电凝切除消化道息肉以来, 至今已发展有多种内镜下息肉治疗方法, 包括APC、高频电息肉切除术、EMR、ESD以及尼龙绳套扎术等, 内镜下治疗结直肠息肉越来越安全, 巨大息肉也可在内镜下行微创电切除治疗<sup>[3]</sup>. 随之内镜下结直肠息肉切除术的并发症也逐渐增多, 主要为出血, 发生率为0.3%-10.2%<sup>[4,5]</sup>, 包括切除后立即出血和迟发型出血. 立即出血是指在术中息肉切除后, 残端或创面持续性出血<sup>[6]</sup>, 根据其出血程度分为三级<sup>[7]</sup>: 1级: 可自发停止的出血, 或者是持续渗血但逐渐减少; 2级: 持续性渗血需要内镜治疗; 3级: 活动性喷血. 迟发型出血是指内镜下息肉切除手术后到术后16 d内的出血<sup>[8]</sup>. 有学者认为<sup>[7,9]</sup>, 出血相关因素大致可分为3类: (1)患者

## ■ 相关报道

有关结直肠巨大息肉内镜下微创切除的报道以较多, 通常收集大样本该种病例, 对其不同息肉情况进行不同的内镜切除处理, 进而分析总结其切除效果, 归纳出结论.



■ 创新盘点

本文报道1例结肠巨大息肉内镜下微创切除术中出血病例, 详细介绍其基本情况, 息肉状态, 对其处理方法和过程, 以及出血后的治疗措施; 相比之多样本病例复习更加详细清晰, 可讨论性更强。

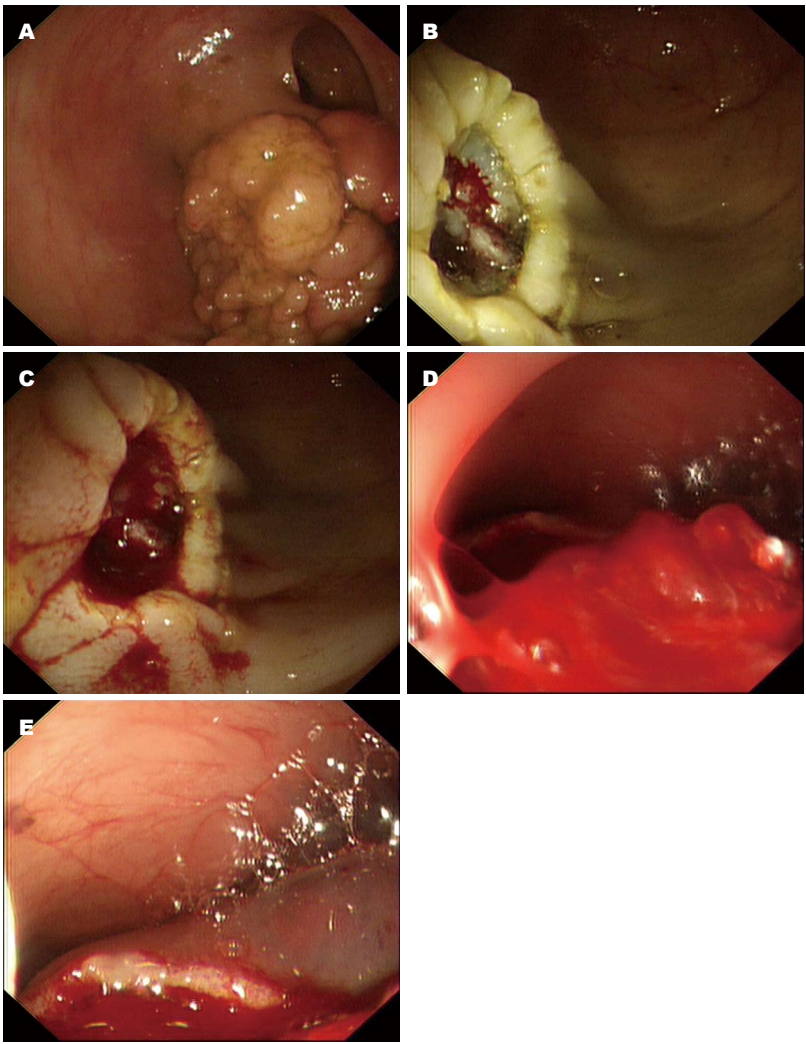


图 1 降乙结肠交界处巨大息肉切除出血。A: 降乙结肠交界处巨大息肉; B: 巨大息肉电凝切除完毕创面渗血; C: 创面APC处理后发生搏动性出血; D: 创面电凝止血钳钳夹后未能止血, 创面水肿; E: 局部创面钛夹封闭后黏膜下形成血肿。



图 2 外科手术切除病变肠段。创面处黏膜下水肿, 未见活动性出血。

的基本情况, 如年龄是否>65岁、是否患有高血压或凝血功能障碍等基础疾病, 是否使用抗凝药物; (2)与息肉形态(无蒂或是有蒂、蒂的粗细)、尤其是大小相关。有文献[10]报道, 息肉直径>1.0 cm切除术后出血概率为8%, 而直径

是否>1.4 cm为息肉切除后是否出血的重要预测指标; (3)术前肠道准备是否充分, 是否正确选择内镜下息肉切除方法以及操作者的技术水平与出血也密切相关。而内镜下结直肠息肉切除术后出血, 若不能自止, 根据创面情况不同, 有不同的处理方法: 如少量出血可喷洒1:10000去甲肾上腺素液<sup>[11]</sup>止血; 若出血量多, 冲洗明确出血点后, 可使用APC、电凝止血钳、金属夹或是尼龙圈套止血<sup>[12,13]</sup>。在息肉直径>2 cm时, 有作者推荐尼龙圈套止血较有效<sup>[14]</sup>。

本病例患者56岁, 有高血压病史, 血压控制尚满意, 未服用抗凝血药物且凝血功能正常, 肠道准备满意。但息肉巨大(3.0 cm×3.5 cm)、短粗蒂, 估计滋养血管较粗大丰富, 属于切除后出血风险较高者。患者EMR术后立即出血, 考虑术中圈套器收缩过快, 和/或电凝不充分, 导致创面出血。初步APC处理后, 息

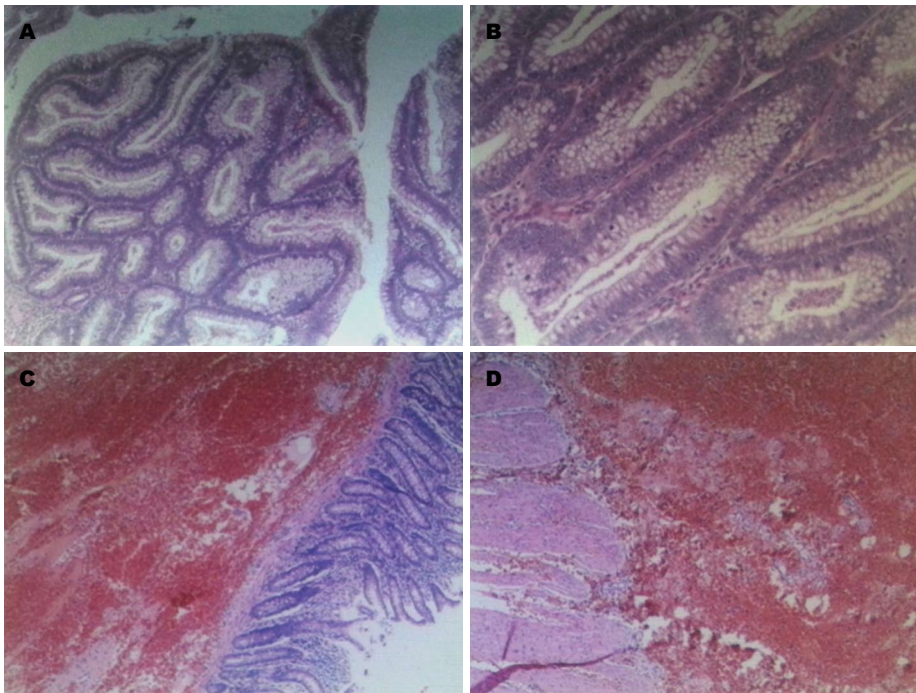


图3 降乙结肠交界处病理学变化。A, B: 息肉状腺瘤表现( $\times 40$ ); C, D: 肠段肠壁黏膜下层内广泛出血( $\times 100$ )。

#### 同行评价

该文分析了1例结肠巨大息肉EMR术中出血的原因及处理方法, 对于类似结直肠短粗蒂巨大息肉内镜治疗病例的术中出血预防和处置具有一定借鉴价值。

肉滋养动脉断面血痂脱落并收缩至黏膜下层或肌层, 形成搏动性出血。以电凝止血钳钳夹, 难以发现血痂下准确出血点, 反复操作后创面水肿, 视野不清晰。后钳夹难以对出血点进行准确夹闭, 局部封闭后, 创面形成黏膜下血肿。考虑到黏膜下血肿可能继续发展, 或后期形成肠壁压迫性坏死穿孔, 予以手术切除。术中未发现活动性出血, 或已产生压迫性止血效果。

对于类似结直肠短粗蒂巨大息肉内镜治疗病例, 防止术中术后创面出血是关键。综合前面分析, 以下几方面措施或可减少出血和利于术中止血: (1)术前患者准备, 调整血压, 注意血小板和出凝血时间, 充分清洁肠道; (2)有蒂者, 尽可能利用尼龙圈套扎息肉蒂部, 阻断血流; (3)和助手密切配合, 圈套器收紧不宜过快, 充分电凝; (4)较大创面尽早使用钛夹止血和封闭, 避免过多使用APC和电凝, 以免后期导致创面水肿后难以再行钛夹止血; (5)蒂部很宽大的情况下, 也可考虑ESD术。

#### 参考文献

- Church JM. Experience in the endoscopic management of large colonic polyps. *ANZ J Surg* 2003; 73: 988-995 [PMID: 14632888]
- 刘俊, 何怀纯, 王崇文. 多原发大肠癌的内镜诊断及其与腺瘤的关系. *中华消化内镜杂志* 1999; 16: 144-145
- Hogan RB, Hogan RB. Epinephrine volume reduction of giant colon polyps facilitates endoscopic assessment and removal. *Gastrointest Endosc* 2007; 66: 1018-1022 [PMID: 17892878 DOI: 10.1016/j.gie.2007.03.1078]
- Hui AJ, Wong RM, Ching JY, Hung LC, Chung SC, Sung JJ. Risk of colonoscopic polypectomy bleeding with anticoagulants and antiplatelet agents: analysis of 1657 cases. *Gastrointest Endosc* 2004; 59: 44-48 [PMID: 14722546]
- Heldwein W, Dollhopf M, Rösch T, Meining A, Schmidsdorff G, Hasford J, Hermanek P, Burlefinger R, Birkner B, Schmitt W. The Munich Polypectomy Study (MUPS): prospective analysis of complications and risk factors in 4000 colonic snare polypectomies. *Endoscopy* 2005; 37: 1116-1122 [PMID: 16281142 DOI: 10.1055/s-2005-870512]
- Kim HS, Kim TI, Kim WH, Kim YH, Kim HJ, Yang SK, Myung SJ, Byeon JS, Lee MS, Chung IK, Jung SA, Jeon YT, Choi JH, Choi KY, Choi H, Han DS, Song JS. Risk factors for immediate postpolypectomy bleeding of the colon: a multicenter study. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 1333-1341 [PMID: 16771958 DOI: 10.1111/j.1572-0241.2006.00638.x]
- Singh H, Penfold RB, DeCoster C, Kaita L, Proulx C, Taylor G, Bernstein CN, Moffatt M. Colonoscopy and its complications across a Canadian regional health authority. *Gastrointest Endosc* 2009; 69: 665-671 [PMID: 19251007 DOI: 10.1016/j.gie.2008.09.046]
- Watabe H, Yamaji Y, Okamoto M, Kondo S, Ohta M, Ikenoue T, Kato J, Togo G, Matsumura M, Yoshida H, Kawabe T, Omata M. Risk assessment for delayed hemorrhagic

- complication of colonic polypectomy: polyp-related factors and patient-related factors. *Gastrointest Endosc* 2006; 64: 73-78 [PMID: 16813806 DOI: 10.1016/j.gie.2006.02.054]
- 9 Gimeno-García AZ, de Ganzo ZA, Sosa AJ, Pérez DN, Quintero E. Incidence and predictors of postpolypectomy bleeding in colorectal polyps larger than 10 mm. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2012; 24: 520-526 [PMID: 22465971 DOI: 10.1097/MEG.0b013e328350fcdc]
- 10 Dobrowolski S, Dobosz M, Babicki A, Dymecki D, Hać S. Prophylactic submucosal saline-adrenaline injection in colonoscopic polypectomy: prospective randomized study. *Surg Endosc* 2004; 18: 990-993 [PMID: 15108107 DOI: 10.1007/s00464-003-9214-6]
- 11 Kouklakis G, Mpoumponaris A, Gatopoulou A, Efraimidou E, Manolas K, Lirantzopoulos N. Endoscopic resection of large pedunculated colonic polyps and risk of postpolypectomy bleeding with adrenaline injection versus endoloop and hemoclip: a prospective, randomized study. *Surg Endosc* 2009; 23: 2732-2737 [PMID: 19430833 DOI: 10.1007/s00464-009-0478-3]
- 12 Ji JS, Lee SW, Kim TH, Cho YS, Kim HK, Lee KM, Kim SW, Choi H. Comparison of prophylactic clip and endoloop application for the prevention of postpolypectomy bleeding in pedunculated colonic polyps: a prospective, randomized, multicenter study. *Endoscopy* 2014; 46: 598-604 [PMID: 24830400 DOI: 10.1055/s-0034-1365515]
- 13 Kapetanios D, Beltsis A, Chatzimavroudis G, Katsinelos P. Postpolypectomy bleeding: incidence, risk factors, prevention, and management. *Surg Laparosc Endosc Percutan Tech* 2012; 22: 102-107 [PMID: 22487620 DOI: 10.1097/SLE.0b013e318247c02e]
- 14 Luigiano C, Consolo P, Scaffidi MG, Strangio G, Giacobbe G, Alibrandi A, Pallio S, Tortora A, Melita G, Familiari L. Endoscopic mucosal resection for large and giant sessile and flat colorectal polyps: a single-center experience with long-term follow-up. *Endoscopy* 2009; 41: 829-835 [PMID: 19750448 DOI: 10.1055/s-0029-1215091]

编辑: 郭鹏 电编: 都珍珍





## 肉芽肿性血管炎致缺血性肠病1例

吴 静, 牛俊坤, 缪应雷

吴静, 牛俊坤, 缪应雷, 昆明医科大学第一附属医院消化内科 云南省消化疾病研究所 云南省昆明市 650032

吴静, 在读硕士, 主要从事炎症性肠病发病机制的研究。

国家自然科学基金资助项目, Nos. 81160055, 81260074

云南省科技厅昆明医学院联合专项基金资助项目,

Nos. 2011FB183, 2007C0010R

云南省卫生厅卫生系统学科带头人培养计划基金资助项目, No. D-201215

云南省社会发展科技计划基金资助项目, No. 2013CA021

作者贡献分布: 本文撰写由吴静完成; 牛俊坤参与文献检索及图片收集整理工作; 缪应雷审核。

通讯作者: 缪应雷, 主任医师, 博士导师, 650032, 云南省昆明市五华区西昌路295号, 昆明医科大学第一附属医院消化内科, myldu@sina.com

电话: 0871-5324888-2532

收稿日期: 2015-08-06 修回日期: 2015-08-23

接受日期: 2015-09-08 在线出版日期: 2015-10-18

### Ischemic bowel disease associated with granulomatosis with polyangiitis: A case report

Jing Wu, Jun-Kun Niu, Ying-Lei Miao

Jing Wu, Jun-Kun Niu, Ying-Lei Miao, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Yunnan Institute of Digestive Disease, Kunming 650032, Yunnan Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, Nos. 81160055 and 81260074; Confederative Special Foundation of Science & Technology Department of Yunnan Province and Kunming Medical College, Nos. 2011FB183 and 2007C0010R; Medical Academic Leader of Yunnan Provincial Bureau of Health, No. D-201215; Social Development Science and Technology Projects of Yunnan Province, No. 2013CA021

Correspondence to: Ying-Lei Miao, Chief Physician, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, 295 Xichang Road, Wuhua District, Kunming 650032, Yunnan Province, China, myldu@sina.com

Received: 2015-08-06 Revised: 2015-08-23

Accepted: 2015-09-08 Published online: 2015-10-18

### Abstract

Granulomatosis with polyangiitis (GPA) is a chronic multisystemic disorder of unknown etiology that leads to necrotising granulomatous vasculitis, commonly involving the respiratory system and the kidneys. Gastrointestinal involvement is a rare manifestation of this disease. Although uncommon, GPA may involve the small bowel or colon and exhibit symptoms of intestinal ischemia and secondary peritonitis, including abdominal pain, fever, diarrhea and gastrointestinal bleeding which are nonspecific. Here we report a case of ischemic bowel disease associated with granulomatosis with polyangiitis to improve the awareness by clinicians.

© 2015 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: Granulomatosis with polyangiitis; Wegener's granulomatosis; Ischemic bowel disease

Wu J, Niu JK, Miao YL. Ischemic bowel disease associated with granulomatosis with polyangiitis: A case report. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2015; 23(29): 4765-4770 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/23/4765.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v23.i29.4765>

### 摘要

肉芽肿性血管炎(既往称为韦格纳肉芽肿)是一种以坏死性肉芽肿性血管炎为病理特征的多系统受累的自身免疫性疾病, 主要累及上、下呼吸道和肾脏, 甚少出现胃肠道表现。病变累及小肠或结肠时出现肠缺

### ■背景资料

肉芽肿性血管炎 (granulomatosis with polyangiitis, GPA) 是一种以坏死性肉芽肿性血管炎为病理特征的多系统受累的自身免疫性疾病, 主要累及上、下呼吸道和肾脏, 甚少出现胃肠道表现。累及胃肠道时出现腹痛、腹泻等症状。目前肉芽肿性血管炎致缺血性肠病在国内外鲜有报道, 临床医师对其缺乏一定认识。

### ■同行评议者

黄缘, 教授, 南昌大学第二附属医院消化内科, 江西省分子医学重点实验室

## ■ 研发前沿

传统的GPA治疗药物包括激素与免疫抑制剂。虽然疗效显著,但存在不良反应严重、复发率高等问题。新近的生物制剂与血浆置换等治疗为GPA的治疗开拓了新的领域。

血和继发性腹膜炎症状,如腹痛、发热、腹泻、血便,但缺乏特异性,容易误诊。本文报告肉芽肿性血管炎致缺血性肠病1例,旨在提高临床医生对该病罕见临床表现的认识,早期诊断、早期治疗以延长患者生存期。

© 2015年版权归百世登出版集团有限公司所有。

**关键词:** 肉芽肿性血管炎; 韦格纳肉芽肿; 缺血性肠病

**核心提示:** 本文报道肉芽肿性血管炎致缺血性肠病1例,通过病史及实验室、影像学、内镜、病理检查等资料结合相关文献进行分析讨论,以提高对该病罕见临床表现的认识。

吴静, 牛俊坤, 缪应雷. 肉芽肿性血管炎致缺血性肠病1例. 世界华人消化杂志 2015; 23(29): 4765-4770 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/23/4765.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v23.i29.4765>

## 0 引言

肉芽肿性血管炎属于抗中性粒细胞胞浆抗体(anti-neutrophil cytoplasmic antibody, ANCA)相关性小血管炎,主要累及上、下呼吸道和肾脏,甚少出现胃肠道表现。现将昆明医科大学第一附属医院收治的1例肉芽肿性血管炎致缺血性肠病报道如下。

## 1 病例报告

患者男, 64岁,因解血便1 mo,腹痛2 wk入院。1 mo来无明显诱因解暗红色稀糊状血便, 2-6次/d, 10-50 g/次,解血便2 wk后出现上腹和右侧腹间断性隐痛,发热,最高体温38.5℃,血便8 d后至当地医院就诊,体格检查:轻度贫血貌,上腹部和右侧腹部轻度压痛,余无阳性体征,既往史无特殊。异常检查结果:红细胞计数(red cell count, RBC) $2.97 \times 10^{12}/L$ ,血红蛋白含量(hemoglobin content, Hb)89 g/L,血细胞比容(hematocrit, HCT)26.61%;尿蛋白+,尿潜血2+;大便潜血+、红细胞3+、白细胞+;结肠镜示升结肠、横结肠黏膜广泛充血、糜烂坏死、大片状融合,表面有脓苔、黏液附着、局部渗血;病检:肠黏膜上皮坏死脱落,表面见大量坏死组织及渗出物,黏膜内血管壁增生、水肿。胸腹部计算机断层扫描(computed

tomography, CT)示双肺上叶和右肺中叶多发性结节,边缘分叶、毛糙、形态不规则,右半结肠肠壁不均匀增厚,增强扫描强化,余未见异常(图1)。考虑为溃疡性结肠炎,肺部结节性质待查,于便血第13天予口服美沙拉嗪肠溶片1 g, Qid、静滴头孢西丁2 g, Bid及营养支持治疗,治疗1 wk后便血不缓解,并出现腹痛,于血便第30天转入昆明医科大学第一附属医院消化内科治疗。体格检查:轻度贫血貌,右侧腹部及脐周轻度压痛,余无阳性体征。检查示:RBC  $3.11 \times 10^{12}/L$ , Hb 88 g/L, HCT 25.6%, C反应蛋白(C-reactive protein, CRP)173.36 mg/L(<3.3 mg/L),降钙素原(procalcitonin, PCT)1.69 ng/mL(<0.5 ng/L),红细胞沉降率(erythrocyte sedimentation rate, ESR)59 mm(0-15 mm);尿蛋白+,尿潜血3+;大便潜血+、红细胞+、白细胞3+;抗中性粒细胞胞浆抗体C-ANCA(+),抗蛋白酶3 IgG(PR-3 IgG)157.4 μ/mL(0-5 μ/mL),ANA(-);大便培养未检出沙门氏菌和志贺菌, T-SPOT(-),人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)(-),血培养(-);结肠镜:升结肠至横结肠脾曲黏膜呈暗红色,弥漫性充血水肿、糜烂,表面有黏液附着,散在大小不等溃疡,病灶间黏膜正常,诊断为缺血性肠病并感染可能;病检示:上皮细胞脱落、水肿,炎症细胞浸润,血管壁增生,壁外区有中性粒细胞浸润,诊断为血管炎,缺血性肠病(图2)。胸腹部CT示:右肺上、中叶沿支气管血管束分布的多发渗出、结节影,边界毛糙,升结肠壁增厚,增强扫描强化,周围脂肪间隙欠清,肠系膜上下动静脉CT血管造影(CT angiography, CTA)未见栓塞(图3)。总结患者病例,有肺部血管炎、结节,肾脏损伤,肠黏膜血管炎, C-ANCA(+), PR-3 IgG升高,根据1990年美国风湿病学院韦格纳肉芽肿(Wegener's granulomatosis, WG)分类标准<sup>[1]</sup>,符合WG诊断,另外患者肠镜表现为缺血性肠病伴有感染,肠黏膜病检查以缺血性改变为主要特点,伴有血管炎,肠系膜血管检查无异常,感染指标升高,故诊断为WG致缺血性肠病并感染。依据WG和缺血性肠病处理原则并结合患者病情,给予肠内营养乳剂(TP, 瑞素)营养支持、丙胺酰谷氨酰胺促进肠黏膜修复,莫西沙星,甲硝唑抗感染治疗1 wk后,患者体温下



## ■ 相关报道

生物制剂的出现, 显著地改善了GPA的临床愈合, 其中以利妥昔单抗研究的最多, 现已被食品药品监督管理局批准用于重度及难治性GPA。

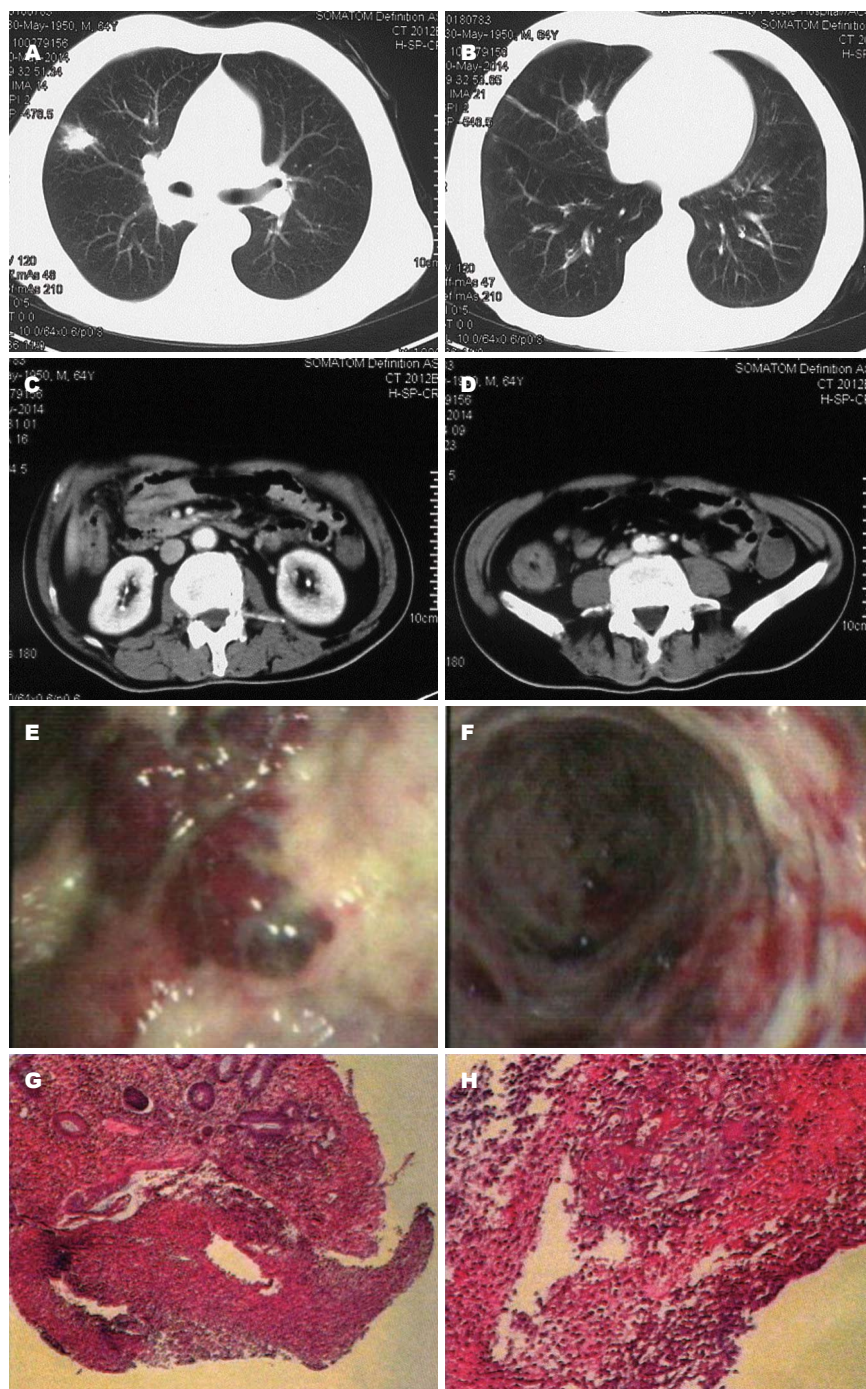


图1 首次就诊胸腹部CT、肠镜及病理结果. A: 右肺上叶结节, 边缘分叶、毛糙、形态不规则; B: 右肺中叶结节; C、D 右半结肠壁不均匀增厚; E: 升结肠黏膜充血、表面有脓苔、黏液附着; F: 横结肠糜烂、坏死、大片状融合, 局部渗血; G: 肠黏膜上皮坏死脱落, 大量坏死组织及渗出物; H: 黏膜内血管壁增生、水肿. CT: 计算机断层扫描.

降至正常, CRP, PCT下降, 随后加用环磷酰胺200 mg隔天1次静脉滴注, 甲泼尼龙琥珀酸钠1 g/d×3 d静脉滴注, 第4天改为口服醋酸泼尼松片60 mg/d, 诱导缓解, 治疗2 wk后患者腹痛减轻、大便成型, 1-2次/d, 带少量暗红色液, 遂调整用药, 改为口服环磷酰胺片100 mg/d, 醋酸泼尼松片50 mg/d, 口服3 d后患者拒绝继续

住院治疗, 自行出院, 嘱患者出院后继续服用环磷酰胺, 醋酸泼尼松片每周减量5 mg, 2 mo后复查肠镜示升结肠至横结肠黏膜节段性片状充血水肿、糜烂, 未见溃疡, 病灶间黏膜正常, 病损较前明显恢复(图4), C-ANCA转阴, PR-3 IgG 89  $\mu$ mL较前下降, 诱导缓解有效, 3 mo后患者拒绝返院随访, 失联。



# ■ 创新盘点

GPA 主要累及上、下呼吸道和肾脏, 甚少出现胃肠道表现。本文报告GPA致缺血性肠病1例, 提高临床医生对该病罕见临床表现的认识, 以利于早期诊断、早期治疗。

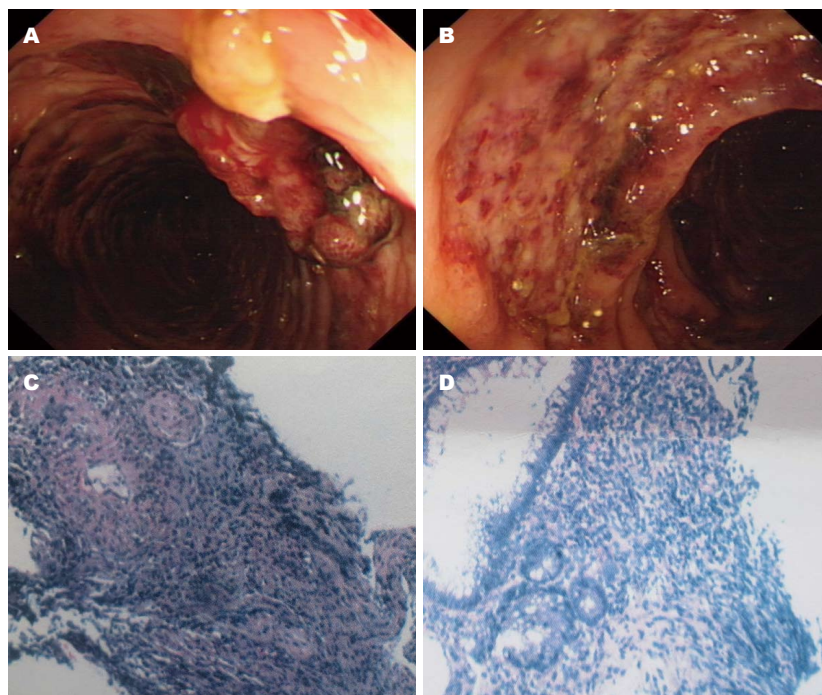


图 2 再次就诊肠镜与病理结果。A: 升结肠黏膜弥漫性充血水肿、糜烂, 息肉样增生; B: 横结肠散在大小不等溃疡; C: 上皮细胞脱落、水肿, 炎症细胞浸润; D: 血管壁增生, 壁外区有中性粒细胞浸润。

## 2 讨论

基于病因学命名法, 2011年将韦格纳肉芽肿更名为肉芽肿性血管炎(granulomatosis with polyangiitis, GPA), 属于ANCA相关性小血管炎, 是一种以坏死性肉芽肿性血管炎为病理特征的多系统受累的自身免疫性疾病, 可累及多个系统器官, 临床表现多样, 典型表现为鼻炎、鼻窦炎、肺病变和进行性肾功能衰竭, 甚少出现胃肠道表现, 病变累及小肠或结肠时出现肠缺血和继发性腹膜炎症状, 表现为腹痛、发热、腹泻、血便<sup>[2]</sup>。本例患者因病变累及肠系膜血管, 发生坏死性血管炎引起缺血性肠病并发肠道感染, 出现便血、发热和腹痛症状。

就GPA的诊断而言, C-ANCA和PR-3 IgG是其特异性抗体, 敏感性为98%, 特异性为88%, 可以作为诊断、指导治疗和监测病情活动的血清学指标<sup>[3]</sup>。在急性期, 炎症指标如ESR、CRP大多升高。胸部影像学表现为沿支气管血管束分布的多发性空洞、结节、浸润病灶。肾脏病变表现为新月体肾炎。累及胃肠道时腹部CT表现为多灶性或弥漫性肠壁增厚、肠系膜血管充血, 肠镜下为缺血性肠病黏膜改变。病理检查坏死性肉芽肿性血管炎是诊

断GPA的金标准<sup>[4]</sup>。根据1990年美国风湿病学院WG分类标准<sup>[1]</sup>: (1)鼻或口腔炎症(痛性或无痛性口腔溃疡, 脓性或血性鼻腔分泌物); (2)胸片异常(胸片示结节、固定浸润病灶或空洞); (3)尿沉渣异常(镜下血尿或出现红细胞管型); (4)病理性肉芽肿性炎症改变。符合2条或2条以上时可诊断为GPA, 诊断的敏感性和特异性分别为88.2%和92.0%, 本病例有肺部结节, 镜下血尿, 肠黏膜血管炎, C-ANCA(+), PR-3IgG升高, 符合WG诊断。

WG一经诊断, 需立刻进行个体化治疗。2004年我国风湿病学会推荐的诊断标准治疗包括3个阶段<sup>[5]</sup>: 诱导缓解、维持治疗和复发后治疗。环磷酰胺和糖皮质激素被推荐用于WG的诱导缓解, 3-6 mo缓解率可达到85%-90%, 但存在不良反应(感染、白细胞减少、生育受损等)和高复发率的问题, 5年内复发率为50%。本例患者予环磷酰胺、糖皮质激素治疗, 血便和腹痛症状好转, 2 mo复查肠镜示病损恢复, C-ANCA转阴, PR-3 IgG下降, 诱导缓解成功, 更进一步验证诊断。除环磷酰胺和糖皮质激素, 尚有利妥昔单抗、甲氨蝶呤用于诱导缓解。其中生物制剂可显著地提高WG的临床愈合。利妥昔单抗作为一种抗CD20的单克隆抗体, 已被批准用于重度WG及复发难治性WG, 其临

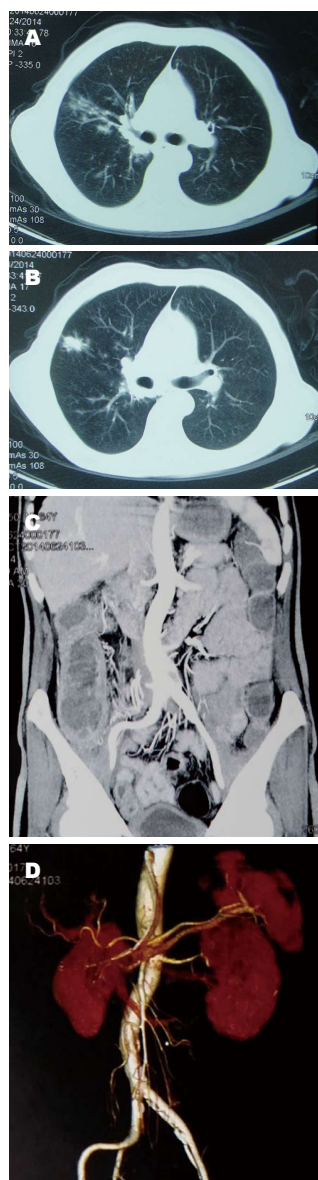


图 3 再次就诊胸腹部CT与肠系膜血管CTA结果. A: 右肺上叶沿支气管血管束分布的渗出、结节影, 边界毛糙; B: 右肺中叶结节, 边缘分叶, 形状不规则; C: 升结肠壁增厚; D: 肠系膜上下动静脉未见栓塞. CT: 计算机断层扫描; CTA: CT血管造影.

床完全缓解率为75%, 部分缓解率为23%. 此外, 尚可用贝利单抗(B细胞刺激因子抑制剂)诱导WG缓解, 已进入临床试验阶段<sup>[6,7]</sup>. 维持治疗对于降低复发率、防止器官功能进一步受损尤为重要, 时间不应少于12-18 mo, 常用药物包括硫唑嘌呤、甲氨蝶呤以及吗替麦考酚酯等免疫抑制剂. 疾病的随访对本病至关重要, 证据提示C-ANCA在大多数复发、残留病灶时呈阳性, 但联合C-ANCA、临床症状和炎症指标对监测复发更为有效<sup>[8]</sup>.

对于中老年缺血性肠病患者, 除考虑血管

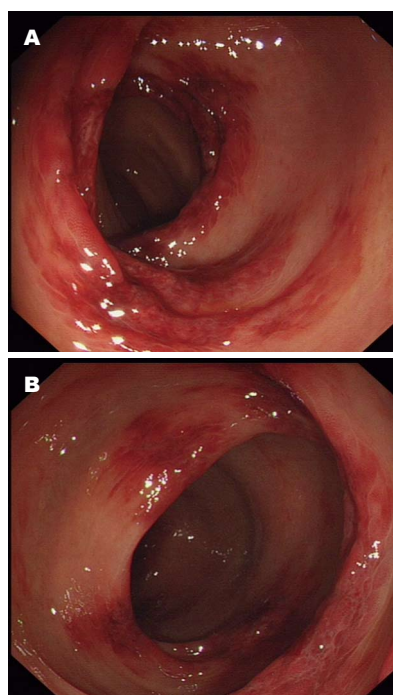


图 4 诱导缓解后复查肠镜结果. A: 升结肠黏膜节段性片状充血水肿、糜烂, 未见溃疡; B: 横结肠黏膜充血、病灶间黏膜正常.

栓塞, 循环灌注不足等常见病因外, 尚需注意ANCA相关性血管炎, 尤其是伴有明显全身炎症反应和多系统受累的患者, WG未治疗平均生存期为5 mo, 早期治疗可存活5年以上, 故早期诊断、早期治疗, 力争在肾功能损害之前给予积极治疗显得尤为重要.

### 3 参考文献

- Leavitt RY, Fauci AS, Bloch DA, Michel BA, Hunder GG, Arend WP, Calabrese LH, Fries JF, Lie JT, Lightfoot RW. The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of Wegener's granulomatosis. *Arthritis Rheum* 1990; 33: 1101-1107 [PMID: 2202308 DOI: 10.1002/art.1780330807]
- Tarzi RM, Pusey CD. Current and future prospects in the management of granulomatosis with polyangiitis (Wegener's granulomatosis). *Ther Clin Risk Manag* 2014; 10: 279-293 [PMID: 24790453 DOI: 10.2147/TCRM.S41598]
- Lutalo PM, D'Cruz DP. Diagnosis and classification of granulomatosis with polyangiitis (aka Wegener's granulomatosis). *J Autoimmun* 2014; 48-49: 94-98 [PMID: 24485158 DOI: 10.1016/j.jaut.2014.01.028]
- Comarmond C, Cacoub P. Granulomatosis with polyangiitis (Wegener): clinical aspects and treatment. *Autoimmun Rev* 2014; 13: 1121-1125 [PMID: 25149391 DOI: 10.1016/j.autrev.2014.08.017]
- 中华医学会风湿病学分会. 韦格纳肉芽肿病诊治指南(草案). *中华风湿病学杂志* 2004; 8

### 应用要点

对于中老年缺血性肠病患者, 除考虑常见病因外, 尚需注意抗中性粒细胞胞浆抗体相关性血管炎, 尤其是伴有明显全身炎症反应和多系统受累的患者, 结合实验室指标、影像学及病理检查可明确诊断, 早期治疗以延长患者的生存期.

# 同行评价

GPA致缺血性肠病的个案鲜有报道, 临床医师对其往往认识不足, 本病例完整的资料对提高临床医生认识GPA的罕见临床表现有一定的价值。

- 6 Lutalo PM, D'Cruz DP. Biological drugs in ANCA-associated vasculitis. *Int Immunopharmacol* 2015; 27: 209-212 [PMID: 25907243 DOI: 10.1016/j.intimp.2015.04.023]
- 7 Daikeler T, Kistler AD, Martin PY, Vogt B, Huynh-Do U. The role of rituximab in the treatment of ANCA-associated vasculitides (AAV). *Swiss Med Wkly* 2015; 145: w14103 [PMID:

- 25658140 DOI: 10.4414/smw.2015.14103]
- 8 Thai LH, Charles P, Resche-Rigon M, Desseaux K, Guillevin L. Are anti-proteinase-3 ANCA a useful marker of granulomatosis with polyangiitis (Wegener's) relapses? Results of a retrospective study on 126 patients. *Autoimmun Rev* 2014; 13: 313-318 [PMID: 24225075 DOI: 10.1016/j.autrev.2013.11.003]

编辑: 于明茜 电编: 都珍珍



ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) DOI: 10.11569 2015年版权归百世登出版集团有限公司所有

## •消息•

## 《世界华人消化杂志》外文字符标准

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



## 1 投稿总则

1.1 性质 《世界华人消化杂志(*World Chinese Journal of Digestology*, *WCJD*, ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online), DOI: 10.11569)》是一份同行评议和开放获取(open access, OA)期刊, 创始于1993-01-15, 旬刊, 每月8、18和28号出版。《世界华人消化杂志》编辑委员会成员, 由506位专家组成, 分布在中国29个省市、自治区及特别行政区和美国。

《世界华人消化杂志》的首要任务是出版胃肠病学, 肝病学, 消化系内镜学, 消化系外科学, 消化系肿瘤学, 消化系影像学, 消化系介入治疗, 消化系病理学, 消化系感染学, 消化系药理学, 消化系病理生理学, 消化系病理学, 消化系循证医学, 消化系管理学, 胰腺病学, 消化系检验医学, 消化系分子生物学, 消化系免疫学, 消化系微生物学, 消化系遗传学, 消化系转化医学, 消化系诊断学, 消化系治疗学和糖尿病等领域的原始创新性文章, 综述文章和评论性的文章。最终目的是出版高质量的文章, 提高期刊的学术质量, 使之成为指导本领域胃肠病学和肝病学实践的重要学术性期刊, 提高消化系疾病的诊断和治疗水平。

《世界华人消化杂志》由百世登出版集团有限公司(Baishideng Publishing Group Inc, BPG)主办和出版的一份印刷版, 电子版和网络版三种版本的学术类核心期刊, 由北京百世登生物医学科技有限公司生产制作, 所刊载的全部文章存储在《世界华人消化杂志》网站上。OA最大的优点是出版快捷, 一次性缴纳出版费, 不受版面和彩色图片限制, 作者文章在更大的空间内得到传播, 全球读者免费获取全文PDF版本, 网络版本和电子期刊。论文出版后, 作者可获得高质量PDF, 包括封面、编委会成员名单、目次、正文和封底, 作为稿酬, 样刊两本。BPG拥有专业的编辑团队, 涵盖科学编辑、语言编辑和电子编辑。目前编辑和出版43种临床医学OA期刊, 其中英文版42种, 具备国际一流的编辑与出版水平。

《世界华人消化杂志》是一本高质量的同行评议, 开放获取和在线出版的学术刊物。本刊被中国知网《中国期刊全文数据库》, 美国《化学文摘(Chemical Abstracts, CA)》, 荷兰《医学文摘库/医学文摘(EMBASE/Excerpta Medica, EM)》和俄罗斯《文摘杂志(Abstract Journal, AJ)》数据库收录。

1.2 栏目 述评, 基础研究, 临床研究, 焦点论坛, 文献综述, 研究快报, 临床经验, 循证医学, 病例报告, 会议纪要。文稿应具科学性、先进性、可读性及实用性, 重点突出, 文字简练, 数据可靠, 写作规范, 表达准确。

## 2 撰稿要求

2.1 总体标准 文稿撰写应遵照国家标准GB7713科学技术报告、学位论文和学术论文的编写格式, GB6447文摘编写规则, GB7714文后参考文献著录规则, GB/T 3179科学技术期刊编排格式等要求; 同时遵照国际医学期刊编辑委员会(International Committee of Medical Journal Editors)制定的《生物医学期刊投稿的统一要求(第5版)》(Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals)。见: *Ann Intern Med* 1997; 126: 36-47。

2.2 名词术语 应标准化, 前后统一, 如原词过长且多次出现者, 可于首次出现时写出全称加括号内注简称, 以后直接用简称。医学名词以全国自然科学名词审定委员会公布的《生理学名词》、《生物化学名词与生物物理学名词》、《化学名词》、《植物学名词》、《人体解剖学名词》、《细胞生物学名词》及《医学名词》系列为准, 药名以《中华人民共和国药典》和卫生部药典委员会编的《药名词汇》为准, 国家食品药品监督管理局批准的新药, 采用批准的药名; 创新性新药, 请参照我国药典委员会的“命名原则”, 新译名词应附外文。公认习用缩略语可直接应用(建议第一次也写出全称), 如ALT, AST, mAb, WBC, RBC, Hb, T, P, R, BP, PU, GU, DU, ACTH, DNA, LD50, HBsAg, HCV RNA, AFP, CEA,

■《世界华人消化杂志》为保证期刊的学术质量, 对所有来稿均进行同行评议。

■《世界华人消化杂志》是一本高质量的同行评议, 开放获取和在线出版的学术刊物. 本刊被中国知网《中国期刊全文数据库》, 美国《化学文摘(Chemical Abstracts, CA)》, 荷兰《医学文摘库/医学文摘(EMBASE/Excerpta Medica, EM)》和俄罗斯《文摘杂志(Abstract Journal, AJ)》数据库收录.

ECG, IgG, IgA, IgM, TCM, RIA, ELISA, PCR, CT, MRI等. 为减少排印错误, 外文、阿拉伯数字、标点符号必须正确打印在A4纸上. 中医药名词英译要遵循以下原则: (1)有对等词者, 直接采用原有英语词, 如中风stroke, 发热fever; (2)有对应词者应根据上下文合理选用原英语词, 如八法eight principal methods; (3)英语中没有对等词或相应词者, 宜用汉语拼音, 如阴yin, 阳yang, 阴阳学说yinyangology, 人中renzhong, 气功qigong; 汉语拼音要以词为单位分写, 如weixibao nizhuanwan(胃细胞逆转丸), guizhitang(桂枝汤). 通常应小写.

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

2.4 计量单位 采用国际单位制并遵照有关国家

标准, GB3100-3102-93量和单位. 原来的“分子量”应改为物质的相对分子质量. 如30 kD改为*M<sub>r</sub>* 30 000或30 kDa(*M*大写斜体, *r*小写正体, 下角标); “原子量”应改为相对原子质量, 即*A<sub>r</sub>*(*A*大写斜体, *r*小写正体, 下角标); 也可采用原子质量, 其单位是u(小写正体). 计量单位在+、-及-后列出. 在±前后均要列出, 如37.6 °C ± 1.2 °C, 45.6岁 ± 24岁, 56.4 d ± 0.5 d. 3.56 ± 0.27 pg/ml应为3.56 ng/L ± 0.27 ng/L. BP用kPa(mmHg), RBC数用1 × 10<sup>12</sup>/L, WBC数用1 × 10<sup>9</sup>/L, WBC构成比用0.00表示, Hb用g/L. *M<sub>r</sub>*明确的体内物质以nmol/L或mmol/L表示, 不明确者用g/L表示. 1 M硫酸, 改为1 mol/L硫酸, 1 N硫酸, 改为0.5 mol/L硫酸. 长10 cm, 宽6 cm, 高4 cm, 应写成10 cm × 6 cm × 4 cm. 生化指标一律采用法定计量单位表示, 例如, 血液中的总蛋白、清蛋白、球蛋白、脂蛋白、血红蛋白、总脂用g/L, 免疫球蛋白用mg/L; 葡萄糖、钾、尿素、尿素氮、CO<sub>2</sub>结合力、乳酸、磷酸、胆固醇、胆固醇酯、三酰甘油、钠、钙、镁、非蛋白氮、氯化物; 胆红素、蛋白结合碘、肌酸、肌酐、铁、铅、抗坏血酸、尿酸、胆元、氨、维生素A、维生素E、维生素B1、维生素B2、维生素B6、尿酸; 氢化可的松(皮质醇)、肾上腺素、汞、孕酮、甲状腺素、睾酮、叶酸用nmol/L; 胰岛素、雌二醇、促肾上腺皮质激素、维生素B12用pmol/L. 年龄的单位有日龄、周龄、月龄和岁. 例如, 1秒, 1 s; 2分钟, 2 min; 3小时, 3 h; 4天, 4 d; 5周, 5 wk; 6月, 6 mo; 雌性♀, 雄性♂, 酶活性国际单位IU = 16.67 nkat, 对数log, 紫外uv, 百分比%, 升L, 尽量把1 × 10<sup>-3</sup> g与5 × 10<sup>-7</sup> g之类改成1 mg与0.5 mg, hr改成h, 重量γ改成mg, 长度m改成mm. 国际代号不用于无数字的文句中, 例如每天不写每d, 但每天8 mg可写8 mg/d. 在一个组合单位符号内不得有1条以上的斜线, 例如不能写成mg/kg/d, 而应写成mg/(kg·d), 且在整篇文章内应统一. 单位符号没有单、复数的区分, 例如, 2 min不是2 mins, 3 h不是3 hs, 4 d不是4 ds, 8 mg不是8 mgs. 半个月, 15 d; 15克, 15 g; 10%福尔马林, 40 g/L甲醛; 95%酒精, 950 mL/L乙醇; 5% CO<sub>2</sub>, 50 mL/L CO<sub>2</sub>; 1 : 1 000肾上腺素, 1 g/L肾上腺素; 胃黏膜含促胃液素36.8 pg/mg, 改为胃黏膜蛋白含促胃液素36.8 ng/g; 10%葡萄糖改为560 mmol/L或100 g/L葡萄糖; 45 ppm = 45 × 10<sup>-6</sup>; 离心的旋转频率(原称转速)用r/min, 超速者用g; 药物剂量若按体质量计算, 一律以“/kg”表示.

2.5 统计学符号 (1) $t$ 检验用小写 $t$ ; (2) $F$ 检验用英文大写 $F$ ; (3)卡方检验用希文小写 $\chi^2$ ; (4)样本的相关系数用英文小写 $r$ ; (5)自由度用希文小写 $\nu$ ; (6)样本数用英文小写 $n$ ; (7)概率用英文斜体大写 $P$ . 在统计学处理中在文字叙述时平均数 $\pm$ 标准差表示为 $\text{mean} \pm \text{SD}$ , 平均数 $\pm$ 标准误为 $\text{mean} \pm \text{SE}$ . 统计学显著性用 $^aP < 0.05$ ,  $^bP < 0.01$  ( $P > 0.05$  不注). 如同一表中另有一套 $P$ 值, 则 $^cP < 0.05$ ,  $^dP < 0.01$ ; 第三套为 $^eP < 0.05$ ,  $^fP < 0.01$ 等.

2.6 数字用法 遵照国家标准GB/T 15835-1995出版物上数字用法的规定, 作为汉语词素者采用汉字数字, 如二氧化碳、十二指肠、三倍体、四联球菌、五四运动、星期六等. 统计学数字采用阿拉伯数字, 如1000-1500 kg, 3.5 mmol/L  $\pm$  0.5 mmol/L等. 测量的数据不能超过其测量仪器的精密度, 例如6347意指6000分之一的精密度. 任何一个数字, 只允许最后一位有误差, 前面的位数不应有误差. 在一组数字中的 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 应考虑到个体的变差, 一般以SD的1/3来定位数, 例如3614.5 g  $\pm$  420.8 g, SD的1/3达一百多g, 平均数波动在百位数, 故应写成3.6 kg  $\pm$  0.4 kg, 过多的位数并无意义. 又如8.4 cm  $\pm$  0.27 cm, 其SD/3 = 0.09 cm, 达小数点后第2位, 故平均数也应补到小数点后第2位. 有效位数以后的数字是无效的, 应该舍. 末尾数字, 小于5则舍, 大于5则进, 如恰等于5, 则前一位数逢奇则进, 逢偶(包括“0”)且5之后全为0则舍. 末尾时只可1次完成, 不得多次完成. 例如23.48, 若不要小数点, 则应成23, 而不应该23.48  $\rightarrow$  23.5  $\rightarrow$  24. 年月日采用全数字表达法, 请按国家标准GB/T 7408-94书写. 如1985年4月12日, 可写作1985-04-12; 1985年4月, 写作1985-04; 从1985年4月12日23时20分50秒起至1985年6月25日10时30分止, 写作1985-04-12 T23:20:50/1985-06-25 T10:30:00; 从1985年4月12日起至1985年6月15日止, 写作1985-04-12/06-16, 上午8时写作08:00, 下午4时半写作16:30. 百分数的有效位数根据分母来定: 分母 $\leq 100$ , 百分数到个位;  $101 \leq \text{分母} \leq 1000$ , 百分数到小数点后1位; 余类推. 小数点前后的阿拉伯数字, 每3位间空1/4阿拉伯数字距离, 如1486800.475 65. 完整的阿拉伯数字不移行!

2.7 标点符号 遵照国家标准GB/T 15834-1995标点符号用法的要求, 本刊论文中的句号都采用黑圆点; 数字间的起止号采用“-”字线, 并列的汉语词间用顿号分开, 而并列的外文词、阿拉伯数字、外文缩略词及汉语拼音字母拼写词间改用逗号分开, 参考文献中作者间一律

用逗号分开; 表示终了的标点符号, 如句号、逗号、顿号、分号、括号及书名号的后一半, 通常不用于一行之首; 而表示开头的标点符号, 如括号及书名号的前一半, 不宜用于一行之末. 标点符号通常占一格, 如顿号、逗号、分号、句号等; 破折号应占两格; 英文连字符只占一个英文字符的宽度, 不宜过长, 如5-FU. 外文字符下划一横线表示用斜体, 两横线表示用小写, 三横线表示用大写, 波纹线表示用黑体.

### 3 稿件格式

3.1 题名 简明确切地反映论文的特定内容, 鲜明而有特色, 阿拉伯数字不宜开头, 不用副题名, 一般20个字. 避免用“的研究”或“的观察”等非特定词.

3.2 作者 论文作者的署名, 按照国际医学杂志编辑委员会(ICMJE, International Committee of Medical Journal Editors)作者资格标准执行. 作者标准为: (1)对研究的理念和设计、数据的获得、分析和解读做出重大贡献; (2)起草文章, 并对文章的重要的知识内容进行批评性修改; (3)接受对准备发表文章的最后一稿. 作者应符合条件1, 2, 3, 对研究工作有贡献的其他人可放入志谢中. 作者署名的次序按贡献大小排列, 多作者时姓名间用逗号, 如是单名, 则在姓与名之间空1格(正文和参考文献中不空格). 《世界华人消化杂志》要求所有署名人写清楚自己对文章的贡献. 世界华人消化杂志不设置共同第一作者和共同通信作者.

3.3 单位 作者后写单位的全称空1格后再写省市及邮政编码. 格式如: 张旭晨, 梅立新, 承德医学院病理教研室 河北省承德市 067000

3.4 第一作者简介 格式如: 张旭晨, 1994年北京中医药大学硕士, 讲师. 主要从事消化系统疾病的病理研究.

3.5 作者贡献分布 格式如: 陈湘川与庞丽娟对此文所作贡献两均等; 此课题由陈湘川、庞丽娟、陈玲、杨兰、张金芳、齐妍及李洪安设计; 研究过程由陈玲、杨兰、张金芳、蒋金芳、杨磊、李锋及曹秀峰操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由曹秀峰提供; 数据分析由陈湘川、杨兰及庞丽娟完成; 本论文写作由陈湘川、庞丽娟及李洪安完成.

3.6 同行评议者 为了确保刊出文章的质量, 本刊即将开始实行接受稿件的同行评议公开策略, 将同行评议者姓名, 职称, 机构的名称与文章一同在脚注出版. 格式如: 房静远, 教授, 上



■ 《世界华人消化杂志》自2006-01-01起改为旬刊发行,每月8、18、28日出版。

上海交通大学医学院附属医院仁济医院,上海市消化疾病研究所。

3.7 基金资助项目 格式如: 国家自然科学基金资助项目, No. 30224801

3.8 通讯作者 格式如: 通讯作者: 黄缘, 教授, 330006, 江西省南昌市民德路1号, 南昌大学第二附属医院消化内科, 江西省分子医学重点实验室. huang9815@yahoo.com

电话: 0351-4078656 传真: 0351-4086337

收稿日期: 修回日期:

### 3.9 英文摘要

题名 文章的题名应言简意赅, 方便检索, 英文题名以不超过10个实词为宜, 应与中文题名一致。

作者 作者姓名汉语拼音拼写法规定为: 先名, 后姓; 首字母大写, 双名之间用半字线“-”分开, 多作者时姓名间加逗号。格式如: “马连生”的汉语拼写法为“Lian-Sheng Ma”。

单位 先写作者, 后写单位的全称及省市邮政编码。例如: Xu-Chen Zhang, Li-Xin Mei, Department of Pathology, Chengde Medical College, Chengde 067000, Hebei Province, China  
基金资助项目 格式如: Supported by National Natural Science Foundation of China, No.30224801

通讯作者 格式如: Correspondence to: Dr. Lian-Sheng Ma, Taiyuan Research and Treatment Center for Digestive Diseases, 77 Shuangta Xijie, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China. wcjd@wjgnet.com

收稿及修回日期 格式如: Received: Revised:

摘要 包括目的、方法、结果、结论, 书写要求与中文摘要一致。

3.10 中文摘要 必须在300字左右, 内容应包括目的(应阐明研究的背景和设想、目的), 方法(必须包括材料或对象, 应描述课题的基本设计, 双盲、单盲还是开放性, 使用什么方法, 如何进行分组和对照, 数据的精确程度, 研究对象选择条件与标准是否遵循随机化、齐同化的原则, 对照组匹配的特征, 如研究对象是患者, 应阐明其临床表现, 诊断标准, 如何筛选分组, 有多少例进行过随访, 有多少例因出现不良反应而中途停止研究), 结果(应列出主要结果, 包括主要数据, 有什么新发现, 说明其价值和局限, 叙述要真实、准确、具体, 所列数据经用何种统计学方法处理; 应给出结果的置信区间和统计学显著性检验的确切值; 概率写 $P$ ,

后应写出相应显著性检验值), 结论(全文总结, 准确无误的观点及价值)。

3.11 正文标题层次 0 引言; 1 材料和方法, 1.1 材料, 1.2 方法; 2 结果; 3 讨论; 4 参考文献。序号一律左顶格写, 后空1格写标题; 2级标题后空1格接正文。正文内序号连排用(1), (2), (3)。以下逐条陈述。

0 引言 应包括该研究的目的和该研究与其他相关研究的关系。

1 材料和方法 应尽量简短, 但应让其他有经验的研究者能够重复该实验。对新的方法应该详细描述, 以前发表过的方法引用参考文献即可, 有关文献中或试剂手册中的方法的改进仅描述改进之处即可。

2 结果 实验结果应合理采用图表和文字表示, 在结果中应避免讨论。

3 讨论 要简明, 应集中对所得的结果做出解释而不是重复叙述, 也不应是大量文献的回顾。

图表的数量要精选。表应有表序和表题, 并有足够具有自明性的信息, 使读者不查阅正文即可理解该表的内容。表内每一栏均应有表头, 表内非公知通用缩写应在表注中说明, 表格一律使用三线表(不用竖线), 在正文中该出现的地方应注出。图应有图序、图题和图注, 以使其容易被读者理解, 所有的图应在正文中该出现的地方注出。同一个主题内容的彩色图、黑白图、线条图, 统一用一个注解分别叙述。如: 图1 萎缩性胃炎治疗前后病理变化。A: ...; B: ...; C: ...; D: ...; E: ...; F: ...; G: ...。曲线图可按●、○、■、□、▲、△顺序使用标准的符号。统计学显著性用:  $^aP<0.05$ ,  $^bP<0.01$ ( $P>0.05$ 不注)。如同一表中另有一套 $P$ 值, 则 $^cP<0.05$ ,  $^dP<0.01$ ; 第3套为 $^eP<0.05$ ,  $^fP<0.01$ 。 $P$ 值后注明何种检验及其具体数字, 如 $P<0.01$ ,  $t = 4.56$  vs 对照组等, 注在表的左下方。表内采用阿拉伯数字, 共同的计量单位符号应注在表的右上方, 表内个位数、小数点、±、-应上下对齐。“空白”表示无此项或未测, “-”代表阴性未发现, 不能用同左、同上。表图勿与正文内容重复。表图的标目尽量用 $t/\text{min}$ ,  $c/(\text{mol/L})$ ,  $p/\text{kPa}$ ,  $V/\text{mL}$ ,  $t/^\circ\text{C}$ 表达。

志谢 后加冒号, 排在讨论后及参考文献前, 左齐。

4 参考文献 本刊采用“顺序编码制”的著录方法, 即以文中出现顺序用阿拉伯数字编号排序。提倡对国内同行近年已发表的相关研究论文给予充分的反映, 并在文内引用处右上角加

方括号注明角码。文中如列作者姓名,则需在“Pang等”的右上角注角码号;若正文中仅引用某文献中的论述,则在该论述的句末右上角注角码号。如马连生<sup>[1]</sup>报告……,研究<sup>[2-5]</sup>认为……;PCR方法敏感性高<sup>[6-7]</sup>。文献序号作正文叙述时,用与正文同号的数字并排,如本实验方法见文献[8]。所参考文献必须以近2-3年SCIE, PubMed,《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊为准,通常应只引用与其观点或数据密切相关的国内外期刊中的最新文献。期刊:序号,作者(列出全体作者),文题,刊名,年,卷,起页-止页, PMID和DOI编号;书籍:序号,作者(列出全部),书名,卷次,版次,出版地,出版社,年,起页-止页。

5 网络版的发表前链接 本刊即将开始实行网络版的每篇文章上都有该文发表前纪录的链接,包括首次提交的稿件,同行评议人报告,作者给审稿人回信和作者修回稿,以PDF格式上传。读者可以针对论文、审稿意见和作者的修改情况发表意见,指出问题与不足;作者也可以随时修改完善自己发表的论文,使文章的发表成为一个编者、同行评议者、读者、作者互动的动态过程。

## 4 写作格式实例

### 4.1 述评写作格式实例

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

### 4.2 研究原著写作格式实例

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

### 4.3 焦点论坛写作格式实例

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

### 4.4 文献综述写作格式实例

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

### 4.5 研究快报写作格式实例

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

### 4.6 临床经验写作格式实例

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

### 4.7 病例报告写作格式实例

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

## 5 投稿方式

接受在线投稿,不接受其他方式的投稿,如E-mail、打印稿。在线投稿网址: <http://www.baishideng.com/wcjd/ch/index.aspx>。无法在线

提交的通过[submission@wjgnet.com](mailto:submission@wjgnet.com), 电话: 010-8538-1892, 传真: 010-8538-1893寻求帮助。投稿须知下载网址<http://www.wjgnet.com/1009-3079/tgxz.pdf>。审稿过程平均时间需要14-28天。所有的来稿均经2-3位同行专家严格评审,2位或以上通过为录用,否则将退稿或修改后再审。

## 6 修回稿须知

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

6.2 稿件修改 来稿经同行专家审查后,认为内容需要修改、补充或删除时,本刊编辑部将把退修稿连同审稿意见、编辑意见发给作者修改,而作者必须于15天内将单位介绍信、作者符合要点承诺书、版权转让信等书面材料电子版发回编辑部,同时将修改后的电子稿件上传至在线办公系统;逾期寄回,所造成的问题由作者承担责任。

6.3 版权 本论文发表后作者享有非专有权,文责由作者自负。作者可在本单位或本人著作集中汇编出版以及用于宣讲和交流,但应注明发表于《世界华人消化杂志》××年;卷(期):起页-止页。如有国内外其他单位和个人复制、翻译出版等商业活动,须征得《世界华人消化杂志》编辑部书面同意,其编辑版权属本刊所有。

### 《世界华人消化杂志》编辑部

北京百世登生物医学科技有限公司  
100025, 北京市朝阳区东四环中路62号  
远洋国际中心D座903室  
电话: 010-5908-0035  
传真: 010-8538-1893  
E-mail: [wcjd@wjgnet.com](mailto:wcjd@wjgnet.com)  
<http://www.wjgnet.com>

■ 《世界华人消化杂志》坚持开放获取(open access, OA)的出版模式,编辑出版高质量文章,努力实现编委、作者和读者利益的最大化,努力推进本学科的繁荣和发展,向专业化、特色化和品牌化方向迈进。

2015-01-15/17  
 2015年胃肠道癌症研讨会(GCS)  
 会议地点: 美国  
 联系方式: <http://gicasymp.org/>

2015-02-05/07  
 欧洲癌症研究协会大会(EACR)  
 会议地点: 德国  
 联系方式: <http://www.eacr.org/radiationbiology2015/>

2015-03-12/15  
 2015年第24届亚太肝病研究协会肝病大会(APASL)  
 会议地点: 土耳其  
 联系方式: <http://apasl.info/about>

2015-03-11/13  
 2015年欧洲神经内分泌肿瘤学会第12届年度会议(ENETS)  
 活动地点: 西班牙  
 联系方式: <http://www.aihcc.com>

2015-03-18/21  
 2015年第5届亚太肝胆胰腺协会双年会(A-PHPBA)  
 会议地点: 新加坡  
 联系方式: <http://aphpba2015.com/>

2015-03-25/28  
 2015年第68届肿瘤外科学会年会(SSOACS)  
 会议地点: 美国  
 联系方式: <http://www.aihcc.com>

2015-04-17/19  
 2015中国超声医学学术大会(CCUM)  
 会议地点: 中国  
 联系方式: <http://www.cuda.org.cn>

2015-04-18/22  
 2015年美国癌症研究协会大会(AACR)  
 会议地点: 美国  
 联系方式: <http://www.aacr.org/Pages/Home.aspx>

2015-04-22/25  
 第6届欧洲肿瘤介入大会(ECIO)  
 会议地点: 法国  
 联系方式: <http://www.ecio.org/>

2015-04-22/26  
 2015年第50届欧洲肝病研究协年会(EASL)  
 会议地点: 奥地利  
 联系方式: <http://www.easl.eu/>

2015-05-06/09  
 2015年世界肿瘤介入大会(WCIO)  
 会议地点: 美国  
 联系方式: <http://www.io-central.org/>

2015-05-07/08  
 欧洲胃肠镜协会大会(ESGE)  
 会议地点: 荷兰  
 联系方式: <http://www.esge.com/>

2015-05-16/19  
 美国消化疾病周(DDW)  
 会议地点: 美国  
 联系方式: <http://www.ddw.org/>

2015-05-29/06-02  
 2015年美国临床肿瘤协会年会(ASCO)  
 会议地点: 美国  
 联系方式: <http://am.asco.org/>

2015-06-26/28  
 2015年世界病毒性肝炎峰会(ISVHLD)  
 会议地点: 德国  
 联系方式: <http://www.isvhld2015.org/>

2015-07-01/04  
 第17届世界胃肠癌大会(WGIC)  
 会议地点: 西班牙  
 联系方式: <http://worldgicancer.com>

2015-09-25/29  
 第18届欧洲癌症大会(ECCO)  
 会议地点: 奥地利  
 联系方式: <http://www.ecco-org.eu/>

2015-09-25/29  
 第40届欧洲临床肿瘤协会年会(ESMO)  
 会议地点: 奥地利  
 联系方式: <http://www.esmo.org/>

2015-09-28/10-02  
 世界胃肠病组织大会(AGW/WGO)  
 会议地点: 澳大利亚  
 联系方式: <http://www.worldgastroenterology.org/>

2015-10-18/21  
 第57届美国放射肿瘤协会大会(ASTRO)  
 会议地点: 美国  
 联系方式: <https://www.astro.org/>

2015-10-24/28  
 第23届欧洲联合胃肠病学周(UEG)  
 会议地点: 西班牙  
 联系方式: <http://www.ueg.eu/>

2015-12-03/06  
 亚太消化病周(APDW)  
 会议地点: 台湾  
 联系方式: <http://www.apdwcongress.org/>



陈光 教授  
吉林大学第一医院消化器官外科

陈洪 主任医师  
东南大学附属中大医院消化科

陈进宏 副主任医师  
复旦大学附属华山医院外科

陈茂伟 教授  
广西医科大学第一附属医院质量管理办公室

陈汝福 教授  
中山大学第二附属医院肝胆胰外科

陈汝福 教授  
中山大学第二附属医院肝胆胰外科

陈卫昌 教授  
苏州大学附属第一医院消化内科

陈泽雄 主任医师  
中山大学附属第一医院中医科

成杰 副主任护师  
华北理工大学附属医院

程英升 教授  
上海交通大学附属第六人民医院放射科

代智 副研究员  
复旦大学附属中山医院肝癌研究所

邓庆 副研究员  
上海人类基因组研究中心功能基因组部

董蕾 教授  
西安交通大学第二附属医院消化内科

杜雅菊 教授  
哈尔滨医科大学附属第二医院消化内科

傅晓辉 副教授 副主任医师  
东方肝胆外科医院

甘华田 教授  
四川大学华西医院老年消化内科

高泽立 副教授  
周浦医院消化科, 上海交大医学院九院周浦分院

顾岩 教授 主任医师  
上海交通大学医学院附属上海第九人民医院普外科

郭炜 教授  
河北医科大学第四医院河北省肿瘤研究所病理研究室

郭晓钟 教授  
中国人民解放军沈阳军区总医院消化内科

郭永红 副主任医师  
西安交通大学医学院第二附属医院感染科

荚卫东 教授  
安徽省立院肝脏外科

江建新 教授 主任医师  
贵阳医学院附属医院肝胆外科

姜相君 主任医师  
青岛市市立医院消化科

姜又红 教授 研究员  
中国医科大学附属第一医院

金山 主任医师  
内蒙古医学院附属医院普通外科

康春博 副主任医师  
北京大学航天临床医院普通外科

李华山 主任医师  
中国中医科学院广安门医院肛肠科

李健丁 教授  
山西医科大学第一医院放射科CT室

刘凤斌 教授  
广州中医药大学第一附属医院消化内科

刘杰民 主任医师  
贵州省人民医院消化内镜科

刘金钢 教授  
中国医科大学附属盛京医院外科

刘丽江 教授  
江汉大学医学院病理学与病理生理学教研室

刘亮明 教授  
上海交通大学附属第一人民医院松江分院肝病科

刘占举 教授  
同济大学附属上海市第十人民医院

卢根娣 教授  
上海长征医院

禄韶英 副教授  
西安交通大学医学院第一附属医院普外科

鲁玉辉 副教授  
福建中医药大学中医学院

陆斌 副教授  
中国人民解放军第二军医大学

麻勇 副研究员  
哈尔滨医科大学附属第一医院

马丽娜 主任医师  
首都医科大学附属北京佑安医院

牛英才 研究员  
齐齐哈尔医学院医药科学研究所

彭亮 副主任医师  
中山大学附属第三医院感染科

齐清会 教授  
大连医科大学附属第一医院

任宁 主任医师  
复旦大学附属中山医院

孙丽娟 副主任护师  
延边大学附属医院普外一科

孙星 副教授 副主任医师  
上海交通大学附属第一人民医院普外科

王承党 教授  
福建医科大学附属第一医院消化内科

王富春 教授  
长春中医药大学

王健生 教授  
西安交通大学医学院第一附属医院肿瘤外科

王小众 教授  
福建医科大学附属协和医院消化内科

王学美 研究员  
北京大学第一医院中西医结合研究室

肖文华 主任医师  
中国人民解放军总医院第一附属医院肿瘤科

徐庆 教授  
桂林医学院药理教研室

徐泱 副主任医师  
上海复旦大学附属中山医院

杨柏霖 副主任医师  
南京中医药大学附属医院

杨桦 教授  
中国人民解放军第三军医大学新桥医院

杨江华 副教授  
皖南医学院弋矶山医院感染科

杨薇 副教授 副主任医师  
北京大学肿瘤医院超声科

姚登福 教授  
南通大学附属医院分子医学中心

殷正丰 教授  
中国人民解放军第二军医大学东方肝胆外科医院

张进祥 副教授  
华中科技大学同济医学院附属协和医院

张力为 主任医师  
新疆医科大学第一附属医院胸外科

张佃 主任医师  
天津肿瘤医院肝胆科, 天津医科大学肿瘤医院

张宗明 教授  
首都医科大学北京电力医院普外科

郑素军 副教授 主任医师  
首都医科大学附属北京佑安医院人工肝中心



Published by **Baishideng Publishing Group Inc**  
8226 Regency Drive, Pleasanton,  
CA 94588, USA  
Fax: +1-925-223-8242  
Telephone: +1-925-223-8243  
E-mail: [bpgoffice@wjgnet.com](mailto:bpgoffice@wjgnet.com)  
<http://www.wjgnet.com>



ISSN 1009-3079

