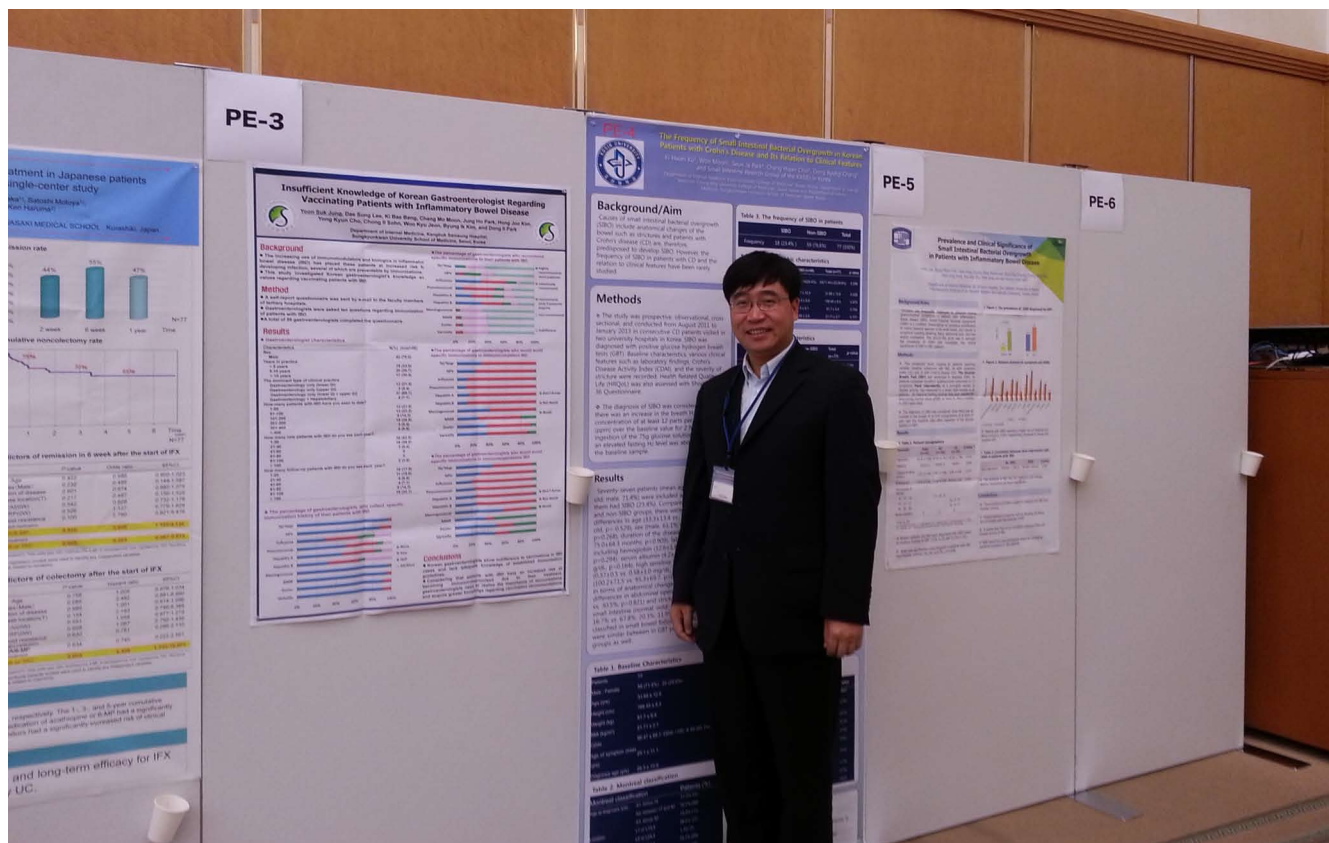


世界华人消化杂志®

WORLD CHINESE JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2013 年 12 月 18 日 第 21 卷 第 35 期 (Volume 21 Number 35)



35/2013

ISSN 1009-3079



9 771009 307056

35>

《世界华人消化杂志》是一份同行评议性的旬刊，是一份被《中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊。《世界华人消化杂志》的英文摘要被《Chemical Abstracts》，《EMBASE/Excerpta Medica》，《Abstracts Journals》和《Digital Object Identifier》收录。

世界华人消化杂志®

编辑委员会

2012-01-01/2014-12-31

wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

《世界华人消化杂志》编辑委员会成员,由485位专家组成,分布在30个省市,自治区,特别行政区。其中,上海市81位、北京市71位、广东省40位、江苏省39位、辽宁省24位、陕西省22位、黑龙江省20位、湖北省18位、天津市16位、吉林省15位、湖南省14位、福建省13位、山东省13位、广西壮族自治区11位、河北省10位、四川省10位、浙江省10位、重庆市9位、安徽省8位、江西省8位、贵州省7位、新疆维吾尔自治区6位、云南省6位、海南省2位、河南省3位、甘肃省2位、宁夏回族自治区2位、山西省2位、内蒙古自治区1位和香港特别行政区1位。

总顾问

陈可冀教授
黄志强教授
纪小龙教授
王宝恩教授
王苑本教授
杨春波教授
杨思风教授
姚希贤教授
张万岱教授
周学文教授

名誉主编

潘伯荣教授

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
卜平教授
陈国忠主任医师
陈洪副教授
陈其奎教授
陈卫昌教授
陈贻胜教授
程斌教授
迟宝荣教授
崔立红教授
邓鑫教授
丁士刚教授
董蕾教授
杜雅菊主任医师
杜奕奇副教授
樊冬梅副主任医师
樊晓明教授
房静远教授

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

关玉盘教授

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

何松教授

洪天配教授

黄培林教授

黄晓东主任医师

黄颖秋教授

黄缘教授

李国忠教授

江米足教授

姜春萌教授

姜慧卿教授

姜相君主任医师

金瑞教授

蓝宇教授

李淑德教授

李瑜元教授

李玉民教授

廖家智副主任医师

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

刘海林主任医师

刘亮明副教授

陆伦根教授

马红主任医师

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

倪润洲教授

欧希龙副教授

潘秀珍教授

潘阳林副教授

朴云峰教授

秦成勇教授

任粉玉教授

任建林教授

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

王邦茂教授

王炳元教授

王承党教授

王江滨教授

王俊平教授

王蔚虹教授

王晓艳副教授

夏冰教授

夏时海副教授

徐灿霞教授

徐可树教授

杨建民教授

张国主任医师

姚树坤教授

张国梁主任医师

张军教授

张庆瑜教授

张小晋主任医师

张筱茵副教授

张坚坚教授

郑培永教授

郑鹏远教授

郑素军副主任医师

郑勇教授

周国雄主任医师

周宇教授

邹晓平主任医师

诸琦教授

于珮主任医师

消化外科学

白雪副主任医师

白雪巍副主任医师

白玉作教授

蔡开琳副教授

蔡三军主任医师

曹杰主任医师

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

陈凇教授

陈汝福教授

陈亚军主任医师

陈钟教授

程爱国教授

程树群副教授

崔云甫教授

戴朝六教授

戴冬秋教授

丁义涛教授

杜顺达副教授

房林教授

傅红副教授

傅华群教授

傅思源副教授

傅晓辉副教授

傅志仁主任医师

高毅主任医师

葛海燕教授

巩鹏副教授

谷俊朝主任医师

顾国利副主任医师

顾岩教授

韩天权教授

郝纯毅主任医师

郝立强副教授

何超教授

何向辉教授

何晓顺教授

何裕隆教授

胡安斌副教授

黄志勇教授

季加孚教授

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

黎乐群教授

李革副教授

李国威教授

李华副教授

李华山主任医师

李升平教授

李胜研究员

李涛副主任医师

李文岗教授

李小荣教授

李旭副教授

李永翔教授

李正荣副教授

李志霞教授

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

刘建教授

刘亮副主任医师

刘颖斌主任医师

卢军华教授

陆云飞教授

禄韶英副教授

吕凌副教授

吕云福教授

麻勇副研究员

齐清会教授

秦春宏副主任医师

秦华东教授

秦环龙教授

秦建民主任医师

邱伟华主任医师

仇毓东教授

崔清波副教授

单云峰副主任医师

沈柏用副教授

施宝民教授

施诚仁教授

施晓雷副主任医师

石毓君副研究员

宋新明教授

宋振顺教授

孙诚谊教授

孙文兵教授

孙星副教授

孙学英教授

邵升副教授

谭晓冬教授

汤朝晖副主任医师

汤绍涛教授

唐南洪教授

田晓峰教授
汪波主任医师
汪根树副教授
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
王石林主任医师
王文跃主任医师
王悦华副主任医师
王振宁教授
王铮副研究员
王正康教授
王志刚副主任医师
王忠裕教授
吴泰璜教授
伍晓汀教授
谢敏主任医师
徐迅迪教授
徐泱副主任医师
许戈良教授
许剑民教授
薛东波教授
杨柏霖副主任医师
杨桦教授
杨家和主任医师
杨银学教授
殷正丰教授
于聪慧教授
俞继卫副主任医师
于则利教授
禹正杨副教授
喻春钊教授
张必翔主任医师
张宏伟教授
张佳林教授
张进祥副教授
张俊副研究员
张力为副教授
张伟辉主任医师
赵刚副教授
赵青川主任医师
智绪亭教授
周伟平教授
周翔宇副主任医师
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
陈志辉副主任医师

丁惠国教授
范建高教授
范小玲主任医师
范学工教授
方今女教授
高润平教授
高泽立副教授
龚国忠教授
管世鹤副教授
郭永红副主任医师
胡国信主任医师
靳雪源主任医师
林潮双副教授
刘正稳教授
彭亮副主任医师
钱林学主任医师
孙殿兴主任医师
谭德明教授
汤华研究员
王建明副教授
王凯教授
王怡主任医师
吴君主任医师
宣世英教授
杨江华副教授
姚鹏副教授
张明辉副主任医师
张占卿主任医师
赵桂鸣主任医师
赵秀英副教授
周陶友副教授
周霞秋教授
朱传武教授
庄林主任医师

消化中医药学

陈治水主任医师
杜群副研究员
扈晓宇主任医师
黄恒青主任医师
李军祥教授
李康副教授
李晓波教授
李勇副教授
李振华教授
刘成海研究员
刘绍能主任医师
鲁玉辉副教授
南极星教授
牛英才研究员
谭周进教授
王富春教授
王来友副教授
王笑民主任医师

邢建峰副教授
徐列明教授
许玲教授
徐庆教授
袁红霞研究员
张声生教授

消化肿瘤学

曹秀峰教授
曹志成院士
代智副研究员
侯风刚副教授
江建新副主任医师
蒋敬庭教授
李苏宜教授
李瑗教授
刘宝瑞教授
刘炳亚研究员
刘平教授
刘云鹏教授
卢宁副主任医师
卢晓梅教授
朴龙镇副教授
沈克平主任医师
王阁教授
王锐副主任医师
吴建兵教授
向德兵副教授
肖文华主任医师
肖秀英副主任医师
谢丹教授
张凤春教授

消化影像学

白彬主任医师
官泳松教授
胡红杰主任医师
李健丁教授
龙学颖副主任医师
倪才方教授
魏经国教授
肖恩华教授
徐辉雄教授
严惟力副教授
杨薇副教授
赵卫主任医师

消化内镜及介入治疗学

郝俊鸣副主任医师
李家平教授
刘杰民副主任医师
茅爱武教授
孙明军教授
万军教授

吴沛宏教授
余日胜主任医师
袁友红副教授
张火俊副教授

消化中西医结合学

范恒教授
唐文富副教授
王学美研究员
魏睦新教授
杨钦河教授
袁建业副研究员
张春虎副教授
朱西杰教授

消化基础研究

曹洁副教授
曹鹏副研究员
陈敬贤教授
陈志龙教授
崔莲花副教授
段义农教授
樊红教授
高国全教授
高英堂研究员
管冬元副教授
郭长江研究员
郭俊明教授
何红伟副研究员
何敏教授
黄昆教授
黄文林教授
黄园教授
洪艳教授
李刚教授
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
刘长征副教授
刘克辛教授
刘森副教授
宁钧宇副研究员
彭宗根副研究员
任超世研究员
任浩副教授
任晓峰副教授
邵华副主任药师
沈东炎副教授
沈涛副教授
斯坎德尔·白克力教授
台桂香教授
谭学瑞教授

汤静主管药师
滕旭副教授
田文静副教授
汪思应教授
王钦红教授
王书奎教授
魏继福研究员
文彬研究员
吴道澄教授
吴江锋副教授
吴军研究员
吴俊华副教授
吴志强副教授
夏敏教授
徐健副主任医师
徐宁志研究员
许文燮教授
杨晓明教授
阴赅宏研究员
郁卫东副研究员
喻荣彬教授
曾柱教授
张红教授
张淑坤副研究员
赵平教授
赵铁建教授
周南进研究员
周素芳教授
周晓武副主任医师
朱益民教授
竺亚斌研究员

消化病理学

陈云昭副教授
邓昊副教授
杜祥教授
樊祥山副主任医师
郭炜教授
季菊玲副教授
李淳副教授
李晟磊副主任医师
刘丽江教授
刘勇钢副主任医师
门秀丽教授
莫发荣副教授
潘兴华副主任医师
王鲁平主任医师
王娅兰教授
颜宏利副教授
于颖彦教授
余宏宇教授
张锦生教授
赵春玲副教授
朱亮副教授

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ● 2013年12月18日 第21卷 第35期 (总第439期)

述 评	3923 抗生素治疗克罗恩病的合理选择与应用 黄奇, 周丽峰, 缪应雷
基础研究	3932 异常凝血酶DCP基因克隆表达、纯化及单克隆抗体制备与鉴定 沈鹏, 司进, 李琦雯, 渠利利, 李璐蓉, 严晓璐, 季国忠 3940 辛伐他汀保护小鼠急性肝衰竭肝损伤 雷延昌, 罗盼, 李雯 3947 大黄治疗重症急性胰腺炎肠动力衰竭的机制 薛育政, 吴燕敏, 盛颖玥, 陆宇峰, 吴铁龙, 刘宗良, 俞宪民, 李兆申
文献综述	3954 <i>hMLH1</i> 甲基化、MSI与胃癌关系的研究进展 毛远天, 刘金禄, 王震, 陈业阳, 陈俊强 3961 胰岛素/胰岛素样生长因子与肝再生的关系 褚延魁, 王胜智, 刘育蕾, 康志龙 3965 Cajal间质细胞与肠易激综合征关系的研究进展 李泽培, 邱野, 彭燕 3971 大肠癌筛查前病变人群随访间隔的研究进展 杨黎明, 杨琛, 闫蓓, 陈涵一, 孙乔
研究快报	3977 薯蓣皂苷元通过MAPK通路对食管癌细胞Eca109的调控 林杰, 谈永飞, 马铁梁, 葛志军, 吴媛媛, 丁伟良, 冯加可, 蒋国军, 史国振, 唐志安 3983 飞机客舱中的气压变化对胆道动力的影响 周迈, 李天牧 3988 NAFLD家兔肠道菌群与肠黏膜Toll样受体4的关系 王海昆, 杨涛, 姚萍 3994 高渗透压法制备细菌外膜扫描电镜样品 牛小羽, 牛畅, 冯尔玲, 刘先凯, 朱力, 张玫
临床经验	3999 自身免疫性肝炎患者血清学指标与肝活检病理的关系 郑聪, 褚燕君, 张芳宾, 李娅, 孙静 4006 自身免疫性肝炎患者外周血淋巴细胞亚群的异常表达 肖锐, 陈楠, 方维丽, 周璐, 张洁, 李姝, 郑忠青, 王邦茂, 刘文天 4014 超声测量幽门管内径对诊断十二指肠反流的临床意义 汪惠鹏, 王学梅, 王云忠 4019 落新妇对缺血再灌注损伤肝脏HO-1表达的影响 慕宁, 江艺, 吕立志 4024 ZIC1和P130在胆管细胞癌中表达及其临床意义 邓昌林, 许辉, 谢明, 邹文俊, 周淑蓉 4030 补锌疗法对于婴幼儿轮状病毒肠炎的意义 金晓荔, 罗晓明 4034 原发性胃肠道非霍奇金淋巴瘤33例 张迎东, 许腾, 宋军, 徐为 4037 ETV1转录因子在胃肠间质瘤中的作用 李强, 徐龙, 刘先发 4043 苏南地区无症状人群结肠肿瘤发生风险评分系统的建立与验证 陈国昌, 毛伯能, 刘芊, 钱信, 刘雷 4050 <i>KLK10</i> 和 <i>HER-2/neu</i> 基因在结肠癌中的表达及临床意义 朱晓亮, 刘伟中, 饶雪峰, 袁晨 4056 内镜下支架置入联合新辅助化疗治疗结肠癌恶性梗阻 吴洁, 荣大庆, 柳青峰, 耿宣, 张志强, 董齐, 王燕庆 4060 胶囊内镜与双气囊小肠镜诊断不明原因消化系出血的Meta分析 王柏清, 孙光斌, 姜文辉, 南寿山, 张宝芹

病例报告	4066 肝内胆管腺瘤的超声造影表现1例 温艳婷, 敬基刚, 罗燕
附录	I-V 《世界华人消化杂志》投稿须知 I 2013年国内国际会议预告
志 谢	I 志谢世界华人消化杂志编委
消 息	3960 中国科技信息研究所发布《世界华人消化杂志》影响因子0.775 3970 《世界华人消化杂志》被评为中国精品科技期刊 3976 中国科技信息研究所发布《世界胃肠病学杂志(英文版)》影响因子0.873 3987 《世界华人消化杂志》于2012-12-26获得RCCSE中国权威学术期刊(A+)称号 4013 《世界华人消化杂志》正文要求 4018 《世界华人消化杂志》再次入选《中文核心期刊要目总览》(2011年版) 4029 《世界华人消化杂志》外文字符标准 4033 《世界华人消化杂志》2011年开始不再收取审稿费 4055 《世界华人消化杂志》栏目设置 4068 《世界华人消化杂志》性质、刊登内容及目标
封面故事	《世界华人消化杂志》编委, 缪应雷, 主任医师, 650032, 云南昆明西昌路295号, 昆明医科大学第一附属医院消化内科
本期责任人	编务 车新鑫; 送审编辑 鲁亚静, 闫晋利; 组版编辑 鲁亚静; 英文编辑 王天奇; 责任编辑 郭鹏; 形式规范 审核编辑部主任 田滢; 最终清样审核总编 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 2013-12-18

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, 200072, 上海市, 同济大学附属第十人民医院影像临床医学中心

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

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

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, 100016, 北京市, 清华大学第一附属医院消化医学中心

编辑部

田滢, 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

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 Co., Limited

Flat C, 23/F., Lucky Plaza, 315-321 Lockhart

Road, Wan Chai, Hong Kong, China

Fax: +852-3177-9906

Telephone: +852-6555-7188

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》被《中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)》, 《中文核心期刊要目总览(2011年版)》, 《Chemical Abstracts》, 《EMBASE/Excerpta Medica》, 《Abstracts Journals》和《Digital Object Identifier》收录。

《世界华人消化杂志》在中国科学技术信息研究所, 2012-12-07发布的2011年度《中国科技期刊引证报告(核心版)》统计显示, 总被引频次3871次(他引率0.82), 影响因子0.775, 综合评价总分65.5分, 分别位居内科学领域类52种期刊第5位、第7位和第5位, 并荣获2011年度中国精品科技期刊。

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

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68.00元 全年36期2448.00元

© 2013年版权归百世登出版集团有限公司所有

World Chinese Journal of Digestology

December 2013 Contents in Brief Volume 21 Number 35

EDITORIAL	3923 Reasonable selection and application of antibiotics in the treatment of Crohn's disease <i>Huang Q, Zhou LF, Miao YL</i>
BASIC RESEARCH	3932 Human des- γ -carboxy prothrombin: Cloning, expression and monoclonal antibody preparation <i>Shen P, Si J, Li QW, Qu LL, Li LR, Yan XL, Ji GZ</i> 3940 Administration of simvastatin protects against acute liver failure in mice <i>Lei YC, Luo P, Li W</i> 3947 Effect of Da-Huang on intestinal motility failure in rats with severe acute pancreatitis <i>Xue YZ, Wu YM, Sheng YY, Lu YF, Wu TL, Liu ZL, Yu XM, Li ZS</i>
REVIEW	3954 Relationship between <i>hMLH1</i> methylation, microsatellite instability and gastric cancer <i>Mao YT, Liu JL, Wang Z, Chen YY, Chen JQ</i> 3961 Relationship between insulin/insulin-like growth factor and liver regeneration <i>Chu YK, Wang SZ, Liu YL, Kang ZL</i> 3965 Relationship between interstitial cells of Cajal and irritable bowel syndrome <i>Li ZP, Qiu Y, Peng Y</i> 3971 Follow-up intervals for precancerous colorectal conditions <i>Yang LM, Yang C, Yan B, Chen HY, Sun Q</i>
RAPID COMMUNICATION	3977 Diosgenin regulates proliferation, apoptosis, migration and invasion of human esophageal cancer Eca109 cells via the MAPK signaling pathway <i>Lin J, Tan YF, Ma TL, Ge ZJ, Wu YY, Ding WL, Feng JK, Jiang GJ, Shi GZ, Tang ZA</i> 3983 Impact of airplane cabin pressure on biliary motility in rabbits <i>Zhou M, Li TM</i> 3988 Association between intestinal flora and Toll-like receptor 4 in rabbits with nonalcoholic fatty liver disease <i>Wang HK, Yang T, Yao P</i> 3994 Preparation of samples for electron microscopy by high osmotic pressure method <i>Niu XY, Niu C, Feng EL, Liu XK, Zhu L, Zhang M</i>
CLINICAL PRACTICE	3999 Correlation between serum indexes and hepatic biopsy histopathology in patients with autoimmune hepatitis <i>Zheng C, Chu YJ, Zhang FB, Li Y, Sun J</i> 4006 Abnormal peripheral blood lymphocyte subsets in patients with autoimmune hepatitis <i>Xiao R, Chen N, Fang WL, Zhou L, Zhang J, Li Z, Zheng ZQ, Wang BM, Liu WT</i> 4014 Significance of ultrasonic measurement of pyloric canal diameter in diagnosis of duodenogastric reflux <i>Wang HP, Wang XM, Wang YZ</i> 4019 Effect of astilbin on HO-1 expression in hepatic warm ischemia-reperfusion injury <i>Mu N, Jiang Y, Lv LZ</i> 4024 Clinical significance of expression of ZIC1 and P130 in cholangiocarcinoma <i>Deng CL, Xu H, Xie M, Zou WJ, Zhou SR</i> 4030 Significance of zinc supplementation in infants with rotavirus enteritis <i>Jin XL, Luo XM</i> 4034 Primary gastrointestinal non-Hodgkin's lymphoma: Analysis of 33 cases <i>Zhang YD, Xu T, Song J, Xu W</i> 4037 Role of ETV1 transcription factor in gastrointestinal stromal tumor cells <i>Li Q, Xu L, Xiu XF</i> 4043 Derivation and validation of a prediction rule for estimating colorectal neoplasm risk in asymptomatic individuals in southern Jiangsu province <i>Chen GC, Mao BN, Liu Q, Qian J, Liu L</i> 4050 Clinical significance of <i>KLK10</i> and <i>HER-2/neu</i> expression in colon cancer <i>Zhu XL, Liu WZ, Rao XF, Yuan S</i> 4056 Endoscopic stenting combined with neoadjuvant chemotherapy for treatment of malignant colorectal obstruction <i>Wu J, Rong DQ, Liu QF, Geng X, Zhang ZQ, Dong Q, Wang YQ</i> 4060 Double balloon enteroscopy vs capsule endoscopy for obscure gastrointestinal bleeding: A Meta-analysis <i>Wang BQ, Sun GB, Lou WH, Nan SS, Zhang BQ</i>

CASE REPORT	4066 Contrast-enhanced ultrasonographic characteristics of an intrahepatic bile duct adenoma <i>Wen YT, Jing JG, Luo Y</i>
APPENDIX	I – V Instructions to authors of <i>World Chinese Journal of Digestology</i> I Meeting events calendar in 2013
ACKNOWLEDGMENT	I Acknowledgments to reviewers of <i>World Chinese Journal of Digestology</i>
COVER	Editorial Board Member of <i>World Chinese Journal of Digestology</i> , Ying-Lei Miao, Professor, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, 295 Xichang Road, Kunming 650032, Yunnan Province, China
RESPONSIBLE EDITORS FOR THIS ISSUE	Assistant Editor: <i>Xin-Xin Che</i> Review Editor: <i>Ya-Jing Lu, Jin-Li Yan</i> Electronic Page Editor: <i>Ya-Jing Lu</i> English Language Editor: <i>Tian-Qi Wang</i> Editor-in-Charge: <i>Peng Guo</i> Proof Editor: <i>Ying Tian</i> Layout Editor: <i>Lian-Sheng Ma</i>

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

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

Founded on January 15, 1993

Renamed on January 25, 1998

Publication date December 18, 2013

NAME OF JOURNAL

World Chinese Journal of Digestology

ISSN

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

EDITOR-IN-CHIEF

Ying-Sheng Cheng, Professor, Medical Imaging Center, Shanghai Tenth People's Hospital, Tongji University, Shanghai 200072, 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, Hang-zhou 310006, Zhejiang Province, China

Da-Lie Ma, Professor, Department of Pathology,

Changhai Hospital, the Second Military Medical University of Chinese PLA, Shanghai 200433, 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, Digestive Medical Center, the First Affiliated Hospital, School of Medicine, Tsinghua University, Beijing 100016, China

EDITORIAL OFFICE

Ying Tian, 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

Fax: +86-10-85381893

E-mail: wjcd@wjgnet.com

<http://www.wjgnet.com>

PUBLISHER

Baishideng Publishing Group Co., Limited

Flat C, 23/F., Lucky Plaza,

315-321 Lockhart Road, Wan Chai,

Hong Kong, China

Fax: +852-3177-9906

Telephone: +852-6555-7188

E-mail: bpg@baishideng.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 68 Yuan for each issue

RMB 2448 Yuan for one year

COPYRIGHT

© 2013 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved. 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 this journal represent the viewpoints of the authors except where indicated otherwise.

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

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

抗生素治疗克罗恩病的合理选择与应用

黄奇, 周丽峰, 缪应雷

黄奇, 周丽峰, 缪应雷, 昆明医科大学第一附属医院消化内科 云南省昆明市 650032

缪应雷, 教授, 主要从事炎症性肠病的诊治。

作者贡献分布: 此课题由缪应雷设计; 资料整理、数据分析由黄奇与周丽峰完成; 文章修改和审阅由缪应雷完成。

通讯作者: 缪应雷, 教授, 博士生导师, 650032, 云南省昆明市西昌路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: 2013-08-19 修回日期: 2013-11-07

接受日期: 2013-11-19 在线出版日期: 2013-12-18

Reasonable selection and application of antibiotics in the treatment of Crohn's disease

Qi Huang, Li-Feng Zhou, Ying-Lei Miao

Qi Huang, Li-Feng Zhou, Ying-Lei Miao, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650032, Yunnan Province, China

Correspondence to: Ying-Lei Miao, Professor, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, 295 Xichang Road, Kunming 650032, Yunnan Province, China. myldu@sina.com

Received: 2013-08-19 Revised: 2013-11-07

Accepted: 2013-11-19 Published online: 2013-12-18

Abstract

Crohn's disease (CD) is one of the two major forms of inflammatory bowel disease (IBD). Although the etiology of CD is unclear, many experimental and clinical observations support the potential role for intestinal microflora in the pathogenesis of CD. Manipulation of the luminal content using antibiotics may therefore represent a potentially effective therapeutic option. Some randomized controlled trials have demonstrated the efficacy of these drugs in treating the perianal disease, inducing and maintaining of CD remission and decreasing CD recurrence rates in operated patients. However, the use of antibacterial therapy for CD is also controversial, even this approach is frequently and successfully adopted in clinical practice. Fairly narrow indications for antibiotics are suggested by current management guidelines. Large studies are required to better define the role of antibacterial agents and combination regimens in CD. Broad-

spectrum antibiotics, such as metronidazole, fluoroquinolones and rifaximin, are widely used to treat CD, and their effects have been recognized. Because of the lack of adequate theoretical support and adverse drug reactions, the reasonable application of antibiotics to treat CD is still a clinical problem.

© 2013 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

Key Words: Antibiotics; Crohn's disease; Gut microbiota; Metronidazole; Ciprofloxacin; Rifaximin

Huang Q, Zhou LF, Miao YL. Reasonable selection and application of antibiotics in the treatment of Crohn's disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(35): 3923-3931 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/3923.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i35.3923>

摘要

克罗恩病(Crohn's disease, CD)是一种慢性复发性肠道炎症性疾病, 其发病机制至今尚不明确。大量的研究表明肠道细菌参与CD的始动和持续。抗生素通过改变肠道菌群发挥作用, 单独或联合其他药物使用, 是治疗CD的合理策略。虽然已有研究证实抗生素对活动期CD、静止期CD、预防术后复发、肛周瘘管等都有疗效, 但抗生素目前仍只被推荐用于有感染并发症的CD患者。抗生素用于治疗CD仍需大样本、多中心循证医学证据。目前被大家广泛应用于CD治疗的抗生素有甲硝唑、喹诺酮类药物和利福昔明等, 尽管疗效得到大家的认可, 但缺乏足够的理论支撑, 且目前药物的不良反应, 使得合理规范的使用抗生素治疗CD仍是临床一大难题。

© 2013年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词: 抗生素; 克罗恩病; 肠道菌群; 甲硝唑; 环丙沙星; 利福昔明

核心提示: 研究证实抗生素对活动期克罗恩病(Crohn's disease, CD)、静止期CD、预防术后复发、肛周瘘管并发症等都有疗效, 但抗生素是否需要及种类、剂量、维持时间、是否需要与其

■背景资料

抗生素可用于治疗克罗恩病(Crohn's disease, CD)并发症, 亦可用于CD活动期、术后预防复发。目前广泛使用的治疗CD的抗生素有甲硝唑、喹诺酮类药物和利福昔明等。尽管疗效得到一定的认可, 但缺乏足够的理论支撑, 且药物可产生严重的不良反应, 使得合理规范的使用抗生素治疗CD仍是临床一大难题。

■同行评议者

江学良, 教授, 主任医师, 中国人民解放军济南军区总医院消化科

■ 研发前沿

目前的CD抗生素治疗属经验治疗,有肛周病变及感染并发症时抗生素的使用获得肯定,但其维持时间、最佳剂量、是否需要与其他治疗联用以及长期使用可能带来的不良影响及耐药性,仍需进一步探讨。

他治疗联用以及长期使用可能带来的不良反应,仍需更多循证医学证据。

黄奇, 周丽峰, 缪应雷. 抗生素治疗克罗恩病的合理选择与应用. 世界华人消化杂志 2013; 21(35): 3923-3931 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/3923.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i35.3923>

0 引言

克罗恩病(Crohn's disease, CD)是一种慢性复发性肠道炎症性疾病,其发病机制至今尚不明确。目前为大家接受的机制是:在环境因素作用下,肠道菌群及产物刺激肠道黏膜免疫系统,诱发具有遗传易感人群的肠道免疫系统功能紊乱,引起T细胞活化以及体液免疫的发生,导致CD发生^[1]。目前CD治疗常选用减轻炎症的氨基水杨酸制剂、糖皮质激素,抑制宿主对细菌的过度激活的免疫反应的免疫调节剂以及以炎症反应过程的不同环节为作用靶点的生物制剂。但这些药物临床治疗效果欠佳,不良反应较大,病情常反复。比起单纯的改善症状、抑制宿主的免疫反应及炎症过程的治疗,减少发病始因的治疗策略更有优势^[2]。

肠道细菌被认为是参与CD发病的始动和持续因素。虽然尚缺乏足够的证据证实存在特异的细菌与CD的发病相关,但结核分枝杆菌、假单胞菌、大肠杆菌、脆弱拟杆菌等被均报道过与CD密切相关^[3]。在无菌动物体内构建肠道炎症模型的失败;CD好发部位是肠道接触细菌最多的部位;广谱抗生素能改善慢性肠道炎症,对粪流(fecal stream)进行外科转移手术能预防CD病的复发;CD患者肠道拟杆菌等厌氧菌增多,而双歧杆菌、乳酸菌等益生菌的减少等这些发现都说明了肠道菌群对CD的发生发展有重要作用^[4,5]。抗生素通过改变肠道菌群发挥作用,单独或联合其他药物使用,是治疗CD的合理策略。

目前被大家广泛应用于CD治疗的抗生素有甲硝唑、喹诺酮类药物和利福昔明等。他们不仅用于治疗CD并发症(表1),亦用于CD活动期、术后预防复发的治疗。尽管疗效得到大家的认可,但缺乏足够的理论支撑,且目前药物的不良反应,使得合理规范的使用抗生素治疗CD仍是临床一大难题。

1 抗生素在CD治疗中的作用

1.1 抗结核药物 1913年, Dalziel等^[6]发现副结核分枝杆菌(*M. avium* subspecies *paratuberculosis*,

MAP)感染反刍动物后,能诱发慢性非干酪样坏死性肠炎,与人类CD的病理改变有很多相似之处,由此认为MAP感染可能是引起CD的病因。近100年来,大量研究集中在副结核分枝杆菌感染与CD发病的关系上,但两者之间的关系仍不明确。1980-1990年,有大量研究报道了在CD患者血液和肠黏膜组织中能分离出MAP,推测MAP是CD的病因^[7]。基于此,许多抗结核药物用于临床CD的治疗中。但2007年Selby等^[8]使用氯法齐明、克拉霉素、利福布丁3种抗结核药物对213例CD患者进行持续两年的观察治疗,结果发现仅在最初的联合布地奈德治疗的16 wk能观察到显著疗效,接下来的两年,在任何时间点都没发现抗结核药物组与对照组有显著的区别。将抗结核药物与激素联合也收效甚微。由此认为这3种抗结核药物并不能有效治疗CD。就此MAP与CD的关系遭到了质疑,但这结果并不能完全否定MAP在CD发病中的作用。此研究选取的联用的3种抗结核药物虽然对MAP有很好的治疗效应,但剂量选择相对较低,而对照组的美沙拉嗪或硫唑嘌呤也有潜在的抗结核活性,因此与对照组无区别并不能说明其无效。而现在被大家广为接受的CD治疗药物抗肿瘤坏死因子在对宿主抵抗结核分枝杆菌的过程中也发挥了重要作用。且一些临床研究也发现抗结核药物对CD有治疗作用。虽然不能排除这些抗结核药物具有的广谱抗菌活性(例如利福霉素及其衍生物利福昔明,能有效的抗拟杆菌、衣原体、李斯特菌等),但抗结核药物对CD的治疗作用不能忽视^[9,10]。

1.2 广谱抗菌药 MAP并不是被研究的引发CD的唯一病原体,耶尔森氏鼠疫、李斯特菌、衣原体等都被报道是CD的病因。且研究发现CD患者肠道致病菌增加,而益生菌减少是发病的重要原因^[11]。抗生素可能通过不同方式达到对CD起到治疗作用,例如通过降低患者肠腔内的有害细菌,促进益生菌生长达到减轻炎症、缓解病情、防止复发;通过减少肠腔内细菌对周围组织的侵犯,减少细菌迁移和系统播散以改善疼痛、腹泻等症状^[12]。尽管研究者们仍在探索细菌是CD的最初病因,抑或只是通过破损的肠道壁加重患者症状,还是通过各种途径引起免疫系统的过度激活,但临床上已经广泛使用抗生素治疗各个阶段的CD^[13]。

1.2.1 活动及静止期CD: 具有黏附侵袭性的大肠杆菌也在CD患者的肠黏膜组织中被发现,这

表 1 抗生素治疗CD的并发症

1 腹腔脓肿、蜂窝织炎
2 肛瘘、肛周脓肿、肛裂等肛周疾病
3 肠道狭窄伴细菌过度生长
4 回结肠等肠间瘘、肠-阴道瘘、肠-膀胱瘘等内瘘
5 术后感染
6 其他感染(如梭状菌感染)

种致病菌侵入巨噬细胞中,并在细胞内复制,从而导致肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)的大量释放,其在CD的发生发展中起重要作用^[14]。克拉霉素是一种广谱的大环内脂类抗生素,能渗入巨噬细胞,有效的杀灭致病菌,但现有的研究证实其对CD的治疗效果不佳,故不推荐临床使用^[15]。

CD治疗中最常用的两个抗生素是甲硝唑和环丙沙星。这两种抗生素均具有广谱抗菌活性和免疫调节作用,对肠杆菌等厌氧菌有很强的抗菌活性。他们被多项临床实验用于CD活动期的治疗,尽管结果存在争议,但能肯定其对结肠或回结肠活动期CD有很好的治疗作用^[16,17]。

抗生素要对CD达到治疗作用往往需要长期使用,但是不良反应的高发限制了其使用。口服不易吸收,在肠道浓度较高的广谱抗生素利福昔明在此方面显现了更大优势。由于其较少的副作用,能被患者长期耐受,近年来作为CD治疗药物被广泛研究。临床研究证实其能显著改善CD患者的症状,尤其是轻中度CD、激素抵抗或依赖的患者^[18,19]。虽然已有报道称使用利福昔明可导致难辨梭状芽孢杆菌(*clostridium difficile*, *Cd*)感染^[20],但其仍被学者们推荐用于对甲硝唑耐药患者的治疗。

1.2.2 预防术后复发: 肠道切除术后防止复发是CD手术患者预后好坏的关键,而抗生素的合理利用是重点。术后复发与细菌或其产物有密切关联是公认的。术后回盲瓣的缺失,使细菌定植于小肠,可能是复发的主要原因^[21]。术后复发的抗生素集中在甲硝唑、奥硝唑或者两者与其他药物的联合使用。预防术后复发通常需要长期服药,而此两种药物所带来的不良反应制约着临床应用^[22]。亦有研究建议使用甲硝唑3 mo后使用硫唑嘌呤维持治疗,以降低抗生素长期使用的不良反应^[23]。利福昔明因为其较少的不良反应,所以在预防治疗方面具有很大潜力。

1.2.3 肛周疾病及瘘管: CD患者常并发肛周病变,

肛瘘最常见,单一手术治疗疗效不佳,常出现术后复发,需积极予以药物治疗^[24]。甲硝唑和环丙沙星已被多项研究证实能有效地减少瘘管的流量,促进瘘管愈合^[25]。甲硝唑和环丙沙星是治疗非复杂性肛周瘘管的一线用药。通常在脓肿引流后,持续使用3 mo的甲硝唑[10-20 mg/(kg·d), *qd*]、环丙沙星(500 mg, *bid*)或两者联用,其效果显著。而对于难治性瘘管,联合硫唑嘌呤、英孚利单抗疗效更佳^[26]。维持治疗也应考虑上述抗生素。尽管大量研究证实抗生素对肛周疾病治疗有效,但多为非对照的小样本研究。这些研究中,甲硝唑及环丙沙星虽然能降低瘘管症状,但并不能显著促使瘘管的闭合。另外,一旦停药,容易复发,且抗生素的不良反应也限制了其在临床上的使用。但除口服外,使用10%甲硝唑软膏(0.7 g/次, *tid*)治疗肛周CD,患者肛周流脓和肛周疼痛明显好转,且有良好的耐受性和较少的不良反应,可作为CD肛周流脓和肛周疼痛的辅助性治疗手段^[27]。

1.3 现存的缺陷

1.3.1 作用部位: CD可发生于从口腔至肛门整个消化道黏膜,主要以回肠末端和升结肠部位为主。肠道细菌在不同个体、不同部位大有不同,不同抗生素对不同部位的治疗效果亦是不一样的^[50]。Sutherland等^[36]对99例活动期CD使用甲硝唑发其对病变位于结肠或回结肠病变者均有效,而对单独的小肠无效。而Leirper等^[15]对25例对美沙拉嗪、激素、硫唑嘌呤治疗无效的活动期患者予克拉霉素治疗,发现克拉霉素短期使用能减少哈佛-布拉德肖指数,但与病变部位无关。因此需要根据病变部位选择合适的抗生素。但现大部分研究并不严格对比不同部位的抗生素治疗效果,且这些研究样本较少,缺乏对照,要针对不同部位的CD选择不同药物提供依据,还需更大样本、随机对照试验。

1.3.2 疾病的进程及表现: CD患者处于活动期(轻、中、重)及术后,选用的抗生素是不一样的。各项指南均不提倡轻中度CD患者使用抗生素,但重度却意见不一。而目前的研究大部分并没有很好的区分活动期CD的活动度,仅泛泛而谈抗生素应该用于活动期还是静止期CD,因此具有很局限性。

术后的维持治疗多推荐使用免疫调节剂和生物制剂,但由于两类药物有较多的禁忌症,导致许多患者无法受益^[51]。而抗生素对CD术后预防复发的研究为这些患者提供了可选方案。已

■相关报道

国内外已有研究证实抗生素对活动期CD、静止期CD、预防术后复发、肛周瘘管并发症等都有疗效,但相关的指南仍只推荐用于有感染并发症CD患者。

■创新盘点

文章从CD治疗使用的抗生素的种类及其应用范围和现存的缺陷等方面综述了抗生素治疗CD时的选择及应用。尤其对近年来的新的研究成果进行了全面准确的概括,具有一定的临床参考价值。

表 2 抗生素治疗CD临床研究

研究者(年)	人数(n)	持续时间	分组(剂量)		伴随治疗	结果
			抗生素	对照		
活动期CD						
Blichfeldt等 ^[28] , 1978	22	2 mo	甲硝唑(250 mg <i>qid</i>)	-	泼尼松, 柳氮磺吡啶	结肠型CD有治疗效果, 其余与对照组无差别
Elliott等 ^[29] , 1982	51	12 mo	磺胺多辛(1500 mg/wk), 乙噻啶(75 mg/wk)	-	-	无效
Ursing等 ^[30,31] , 1982	78	4 mo	甲硝唑(800 mg)	柳氮磺吡啶(3 g)	-	两者都能有效的降低CDAI, 且甲硝唑能用于对柳氮磺吡啶耐药者
Shaffer等 ^[32] , 1984	27	12 mo	乙胺丁醇(15 mg/(kg•d)), 利福平(10 mg/(kg•d))	安慰剂	-	无效
Ambrose等 ^[33] , 1985	72	4 wk	甲硝唑(400 mg <i>bid</i>)+复方新诺明(960 mg <i>bid</i>)	安慰剂	-	抗菌药物对复发CD的症状改善作用微小
Basilisco等 ^[34] , 1989	15	6 mo	利福布丁(300 mg/d)	-	-	无效
Afdhal等 ^[35] , 1991	49	3 mo	氯法齐明(100 mg/d)	安慰剂	泼尼松	轻微有效
Sutherland等 ^[36] , 1991	105	16 wk	甲硝唑(20 mg/kg) 甲硝唑(10 mg/kg)	安慰剂	-	能有效降低患者CDAI, 尤其是20 mg组, 但抗生素组与对照组缓解率无显著区别
Swift等 ^[37] , 1994	78	24 mo	利福平(450、600 mg/d)+异烟(300 mg/d)+乙胺丁醇(15 mg/(kg•d))	-	-	效果不佳
Prantera等 ^[38] , 1994	40	2 mo	利福平(600 mg)+乙胺丁醇(15 mg/(kg•d))+氨苯砒(100 mg/d)每周使用6 d+氯法齐明(100 mg/2d)	安慰剂	甲基强的松龙	能改善CD复发
Prantera等 ^[39] , 1996	41	12 wk	甲硝唑(1 g/d)+环丙沙星(1 g/d)	甲泼尼松(0.7-1.0 mg/kg) 美沙拉嗪(2 g <i>bid</i>)	-	抗生素组与激素组缓解率差异无统计学意义
Colombel等 ^[40] , 1999	37	6 wk	环丙沙星(500 mg <i>bid</i>)	-	-	环丙沙星与美沙拉嗪治疗结果相当
Leiper等 ^[41] , 2000	25	4 wk	克拉霉素(250 <i>bid</i>)	-	美沙拉嗪、糖皮质激素、硫唑嘌呤	有效降低CD患者的HBI
Goodgame等 ^[42] , 2001	18	3 mo	乙胺丁醇(15 mg/(kg•d))+克拉霉素(1000 mg/d)	-	-	无效
Arnold等 ^[43] , 2002	47	6 mo	环丙沙星(500 mg <i>bid</i>)	安慰剂	-	环丙沙星对中重度活动期CD有很好的治疗效果
Steinhart等 ^[44] , 2002	134	8 wk	甲硝唑(500 mg <i>bid</i>)+环丙沙星(500 mg <i>bid</i>)	安慰剂	布地奈德	虽抗生素组与对照组之间无差异, 但对结肠型CD有很好疗效
Prantera等 ^[45] , 2006	83	12 wk	利福昔明(800 mg <i>qid</i>) 利福昔明(400 mg <i>bid</i>)	安慰剂	美沙拉嗪	对轻中度CD有治疗作用, 以800 mg <i>bid</i> 效果为佳
Selby等 ^[8] , 2007	213	24 mo	克拉霉素(750 mg/d)+利福布丁(450 mg/d)+氯法齐明(50 mg/d) 克拉霉素(1 g/d)	安慰剂	泼尼松	16 wk, 抗生素联合激素治疗, 疗效优于对照组, 撤出激素, 2年内无复发
Leiper等 ^[15] , 2008	41	12 wk	利福昔明-EIR(400 mg、800 mg、1.2 g <i>bid</i>)	安慰剂	齐多夫定, 羟氯喹, 止泻剂	4 wk时, 克拉霉素组治疗效果优于抗生素, 12 wk, 两组之间无差异
Prantera等 ^[46] , 2012	402	12 wk	利福昔明-EIR(400 mg、800 mg、1.2 g <i>bid</i>)	安慰剂	-	800 mg <i>bid</i> 组诱导缓解效果最佳

CD术后预防复发				
Rutgeerts等 ^[47] , 1995	60	3年	甲硝唑 (20 mg/kg)	安慰剂
Leiper等 ^[41] , 2000	25	12-60 wk	克拉霉素 (250 mg <i>bid</i>)	-
Rutgeerts等 ^[48] , 2005	80	1年	奥硝唑 (1 g/d)	安慰剂
静止期CD				
Afdhal等 ^[35] , 1991	49	12 mo	氯法齐明 (100 mg/d)	
	安慰剂	强的松	单独无效, 可联合其他药物发挥作用	
Prantera等 ^[38] , 1994	40	9 mo	利福平 (600 mg/d) + 乙胺丁醇 (15 mg/kg·d) + 氯苯酚 (100 mg/d每周使用6天) + 氯法齐明 (100 mg 每2周使用1次)	安慰剂
Selby等 ^[8] , 2007	213	52 wk	克拉霉素 (750 mg/d) + 利福布丁 (450 mg/d) + 氯法齐明 (50 mg/d)	安慰剂
瘘管				
West等 ^[49] , 2004	22	12 wk	环丙沙星 (500 mg <i>bid</i>)	安慰剂
Thia等 ^[25] , 2009	25	10 wk	甲硝唑 (500 mg <i>bid</i>), 环丙沙星 (500 mg <i>bid</i>)	安慰剂
Maeda等 ^[27] , 2010	74	10 wk	10% 甲硝唑油膏 (0.7 g <i>tid</i>)	安慰剂

证实甲硝唑与奥硝唑对减少CD术后复发有疗效。且使用甲硝唑3 mo后再使用硫唑嘌呤治疗1年的一项随机对照实验发现治疗组较安慰剂内镜复发率明显降低^[23]。这些药物治疗的有效性对CD患者术后复发提供了更多的选择。但术后维持往往需要长期用药, 抗生素的不良反应限制了其长期使用。仍需要进一步研究发掘新的药物, 或者几种药物联用减少不良反应, 从而获得最大的治疗效应。

1.3.3 早晚、剂量及时间长短: 目前公认术后复发与细菌或其产物是有密切关联的。术后回盲瓣的缺失, 导致细菌易定植小肠, 可能是复发的主要原因。体外再灌注实验发现术后8-10 d, 肠道炎症容易再次复发, 并且一旦出现狭窄、穿孔等并发症, 难以逆转治愈。因此, 提倡术后早期使用抗生素治疗。

抗结核药物治疗有效性的争议就存在于是是否应用了最佳剂量。广谱抗菌药在临床治疗时同样存在这个问题。Prantera等^[45]对83例CD活动期患者按利福昔明 (800 mg *qd*)、利福昔明 (400 mg *bid*) 及安慰剂分3组治疗, 结果发现3组缓解率分别为32%、52%、33%, 无效率为12%、4%、4%。利福昔明分次服用效果更佳。另一个多中心、随机、双盲的410例中度活性CD患者, 分为利福昔明-EIR (rifaximin extended intestinal release) 400、800、1200 mg, 两次/d, 与安慰剂组对比, 800 mg组明显高于安慰剂^[52]。可见同一抗生素不同剂量, 不同服用方法所达到的效果是不一样的。这也为后续筛选抗生素的有效剂量、给药途径、服用方法提供了启示。还有大量研究证实抗生素在诱导和维持CD缓解的时间为一年, 延长使用时间并不会使患者多获益。

■应用要点

本文综述了目前近几年抗生素治疗CD的最新进展, 包括CD治疗时抗生素使用的选择及应用范围, 发现目前关于抗生素治疗CD的研究仍属经验性研究, 需要多中心随机对照实验及针对最大限度发挥抗生素疗效而设计合理、精确的实验来证实其疗效。

■同行评价
本文有一定指导
意义。

1.3.4 联合使用: 由于各个药物的抗菌谱不一, 且目前尚未发现CD发病的特异细菌, 因此药物的不良反应使得临床治疗选择方案时需注意联合用药。在CD的治疗中, 无论是多种抗生素联合使用, 还是抗生素与一些经典的传统治疗手段联合应用, 其机制和安全性尚缺乏足够的多中心随机双盲临床对照试验证实。因此, 对于如何联用抗生素及其剂量和疗程等问题, 尚需进一步探讨和研究。

1.3.5 不良反应: 抗生素治疗失败最常见的原因是由于药物的不良反应导致患者不能很好的耐受。除甲硝唑能引发不可逆神经损伤, 环丙沙星可引起伪膜性肠炎等, 抗生素治疗CD最引人关注的是CD的感染, 最常见的是此细菌引起的相关性腹泻(*Clostridium difficile* associated diarrhea, CDAD)。近年来, 氟奎诺酮类药物已被证实是引发CDAD的主要原因。对美国1998-2004年所有炎症性肠病(*inflammatory bowel disease*, IBD)与非IBD人群中的CDAD进行比较的研究中, 发现IBD人群明显高于非IBD。2004年IBD患者中CDAD发病率为1.8%, 到2005年已上升至4.6%。CDAD是抗生素相关性腹泻的主要原因, 具有较高的住院率及死亡率, 还会增加CD的复发风险。因此, 使用抗生素的CD患者需警惕此并发症的发生。关于抗生素的各项研究虽然指出此类不良反应, 但都简单提及, 缺乏对CD患者抗生素治疗后引发的并发症的系统回顾及Meta分析。

1.3.6 我国现状: 我国现缺乏抗生素治疗CD的临床研究。原因可能由于CD的发病率较低, 临床医师缺乏对该病的正确认识。且由于其症状与感染性疾病、结核性肠炎相似, 临床诊断、治疗上常存在误诊误治, 使得CD临床资料较少。现我国来自多中心的大宗抗生素治疗CD的报道匮乏, 大多是单一中心的少量甚至个别的病例报道。而这些少量的案例也对因治疗CD的抗生素认识的缺乏, 不足以作为我国CD患者选用抗生素的循证医学证据。由于CD患者临床表现与感染性肠炎有相似之处, 且常并发脓肿等并发症, 因此我国治疗CD时多经验性的应用抗生素。

2 关于抗生素用于CD治疗的意见指南

2.1 欧洲克罗恩病和溃疡性结肠炎组织(*European Crohn's and Colitis Organisation*, ECCO)诊断和治疗CD意见(2010年) 轻中度回盲部CD由于不良反应不推荐使用抗生素。而重度CD使用时则要注意并发症。当影像学证实有脓肿, 或发

热, 腹部有压痛时可考虑使用抗生素。腹腔脓肿应予抗生素、穿刺引流; 若出现梗阻时需手术, 梗阻症状控制后, 建议使用抗生素治疗。由于缺乏证据, 并不推荐抗生素用于维持缓解治疗, 亦不推荐抗结核药物治疗CD^[53]。

2.2 英国胃肠病学会(*the british Society of Gastroenterology*, BSG)关于IBD药物治疗指南(2010年) 抗生素对CD并发症有重要作用, 例如脓肿和细菌过度生长, 也有部分证据证实环丙沙星、甲硝唑对CD预防复发, 治疗肛周疾病有作用。另外环丙沙星治疗活动期CD疗效与美沙拉嗪和糖皮质激素相似。但需警惕甲硝唑和环丙沙星的不不良反应。抗结核药物同ECCO^[54]。

2.3 世界胃肠病学组织(*World Gastroenterology Organization*)关于IBD诊断及治疗的实践指南(2010年) 甲硝唑和环丙沙星是CD最常用的抗生素, 可用于治疗CD并发症(肛周疾病、瘘管、炎性肿块、狭窄部位、细菌过度生长)。尚无随机对照实验证实两者对瘘管有效, 但两者(单独或联合)可作为一线治疗药物。若长期使用, 需警惕不良反应。两者可增加难辨梭状菌感染的风险, 当患者出现腹泻时需粪检细菌。由于甲硝唑价格低廉, 可在医疗资源匮乏时使用防止CD术后复发^[55]。

2.4 美国胃肠病学会炎症性肠病小组(*American College of Gastroenterology IBD Task Force*)年关于IBD药物治疗指南(2011) 活动期CD: 尽管有研究提出抗生素对活动性CD有治疗作用, 但是仍不推荐其作为一种常规治疗应用于CD活动期(推荐指数: 弱, 证据: 低)。肛周瘘管: 抗生素(主要是甲硝唑、环丙沙星)能有效地改善症状, 但由于缺乏循证医学证据, 仍不推荐使用(推荐指数: 弱, 证据: 低)。静止期CD预防复发: 现在的循证医学证据主要集中在抗结核药物, 临床研究虽然证实其能预防复发, 但样本过小, 缺乏与其他药物对照。现有证据不足以推荐其常规使用, 但可能对个别患者有用, 需注意抗生素耐药情况(推荐指数: 弱, 证据: 非常低)^[56]。

2.5 中华医学会消化病学分会炎症性肠病学组关于炎症性肠病诊断与治疗的共识意见(2012, 广州) 中度活动性CD: 环丙沙星及/或甲硝唑仅用于合并感染; 重度活动性CD: 合并感染者予广谱抗菌药或环丙沙星和/或甲硝唑; 有症状的单纯性肛瘘以及复杂性肛瘘者首选抗菌药物如环丙沙星和/或甲硝唑治疗, 并以AZA或6-MP维持治疗。肛瘘并发脓肿时可予抗菌药物治疗。术后复

发, 咪唑类抗菌药物有一定疗效; 甲硝唑有报道使用, 但长期服用患者多不能耐受^[57]。

3 现有的研究与指南推荐不一致

虽然已有研究证实抗生素对活动期CD、静止期CD、预防术后复发、肛周瘘管并发症等都有疗效, 但抗生素目前仍只被推荐用于有感染并发症的CD患者。由于现在的研究多为小样本、单中心、短时效的研究(表2), 结果充满争议, 很难将他们中的有利结果推广应用于临床, 是目前研究与指南不一样的原因。

4 结论

抗生素要发挥疗效需要涵括对致病菌的有效覆盖、正确的给药途径、正确的剂量、有效的联合以达到发挥治疗效果最优, 而不良反应最小。目前CD的关于抗生素的治疗研究仍属经验性的、单纯粗浅的研究。CD本身发病机制不清, 菌群与肠道免疫的相互作用在CD发病中的作用不明也限制了临床研究的开展。进一步的临床研究需要扩大样本量, 扩展多中心的随机对照实验, 还需要针对最大限度发挥抗生素疗效而设计合理、精确的实验。

目前的CD抗生素治疗尚属经验治疗。肛周疾病、感染并发症出现时抗生素的使用获得肯定。但维持时间、最佳剂量、是否需要与其他治疗联用以及长期使用可能带来的不良影响及耐药性, 仍需进一步探讨。而活动期CD、维持缓解、术后复发的预防这些方面, 抗生素是否需要及种类、剂量、时间的选择, 仍需更多的理论支撑及循证医学证据。因此临床应用抗生素治疗CD, 需谨慎合理, 强调个体化治疗。我国现缺乏CD患者的可靠的流行病学资料, CD抗生素治疗的报道更是缺乏。为合理使用药物治疗CD, 我们需要进一步完善CD资料, 增加对CD处理方式的报道, 并适当的开展一系列临床研究。

5 参考文献

- 1 Pranter C, Scribano ML. Antibiotics and probiotics in inflammatory bowel disease: why, when, and how. *Curr Opin Gastroenterol* 2009; 25: 329-333 [PMID: 19444096 DOI: 10.1097/MOG.0b013e32832b20bf]
- 2 Vermeire S, Ferrante M, Rutgeerts P. Recent advances: Personalised use of current Crohn's disease therapeutic options. *Gut* 2013; 62: 1511-1515 [PMID: 24037876 DOI: 10.1136/gutjnl-2012-303958]
- 3 Fava F, Danese S. Intestinal microbiota in inflammatory bowel disease: friend of foe? *World J Gastroenterol* 2011; 17: 557-566 [PMID: 21350704 DOI: 10.3748/wjg.v17.i5.557]

- 4 Macfarlane S, Steed H, Macfarlane GT. Intestinal bacteria and inflammatory bowel disease. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2009; 46: 25-54 [PMID: 19107650 DOI: 10.1080/10408360802485792]
- 5 De Hertogh G, Aerssens J, Geboes KP, Geboes K. Evidence for the involvement of infectious agents in the pathogenesis of Crohn's disease. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 845-852 [PMID: 18240341]
- 6 Dalziel T. Chronic interstitial enteritis. *BMJ* 1913; 2: 1068-1070
- 7 Mendoza JL, Lana R, Díaz-Rubio M. Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis and its relationship with Crohn's disease. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 417-422 [PMID: 19152445 DOI: 10.3748/wjg.15.417]
- 8 Selby W, Pavli P, Crotty B, Florin T, Radford-Smith G, Gibson P, Mitchell B, Connell W, Read R, Merrett M, Ee H, Hetzel D. Two-year combination antibiotic therapy with clarithromycin, rifabutin, and clofazimine for Crohn's disease. *Gastroenterology* 2007; 132: 2313-2319 [PMID: 17570206 DOI: 10.1053/j.gastro.2007.03.031]
- 9 Peyrin-Biroulet L, Neut C, Colombel JF. Anti-mycobacterial therapy in Crohn's disease: game over? *Gastroenterology* 2007; 132: 2594-2598 [PMID: 17570230 DOI: 10.1053/j.gastro.2007.04.027]
- 10 Borody TJ, Heifets LB. Severe recurrent Crohn's disease of ileocolonic anastomosis and antimicrobial (anti-mycobacterial) therapy. *Gut* 2006; 55: 1211 [PMID: 16849357]
- 11 Sartor RB. Microbial influences in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 2008; 134: 577-594 [PMID: 18242222 DOI: 10.1053/j.gastro.2007.11.059]
- 12 Kale-Pradhan PB, Zhao JJ, Palmer JR, Wilhelm SM. The role of antimicrobials in Crohn's disease. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2013; 7: 281-288 [PMID: 23445237 DOI: 10.1586/egh.13.6]
- 13 Khan KJ, Ullman TA, Ford AC, Abreu MT, Abadir A, Marshall JK, Talley NJ, Moayyedi P. Antibiotic therapy in inflammatory bowel disease: a systematic review and meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 2011; 106: 661-673 [PMID: 21407187 DOI: 10.1038/ajg.2011.72]
- 14 Small CL, Reid-Yu SA, McPhee JB, Coombes BK. Persistent infection with Crohn's disease-associated adherent-invasive Escherichia coli leads to chronic inflammation and intestinal fibrosis. *Nat Commun* 2013; 4: 1957 [PMID: 23748852 DOI: 10.1038/ncomms2957]
- 15 Leiper K, Martin K, Ellis A, Watson AJ, Morris AI, Rhodes JM. Clinical trial: randomized study of clarithromycin versus placebo in active Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2008; 27: 1233-1239 [PMID: 18315579 DOI: 10.1111/j.1365-2036.2008.03661.x]
- 16 Alfadhli AA, McDonald JW, Feagan BG. Methotrexate for induction of remission in refractory Crohn's disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2005; (1): CD003459 [PMID: 15674908]
- 17 Herfarth HH, Katz JA, Hanauer SB, Sandborn WJ, Loftus EV, Sands BE, Galanko JA, Walkup D, Isaacs KL, Martin CF, Sandler RS, Sartor RB. Ciprofloxacin for the prevention of postoperative recurrence in patients with Crohn's disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study. *Inflamm Bowel Dis* 2013; 19: 1073-1079 [PMID: 23511031 DOI: 10.1097/01.MIB.0000428910.36091.10]
- 18 Mattila E, Arkkila P, Mattila PS, Tarkka E, Tissari

- P, Anttila VJ. Rifaximin in the treatment of recurrent *Clostridium difficile* infection. *Aliment Pharmacol Ther* 2013; 37: 122-128 [PMID: 23095030 DOI: 10.1111/apt.12111]
- 19 Isaacs KL. Rifaximin in IBD: is it time to beat back the bugs as induction therapy in Crohn's disease? *Inflamm Bowel Dis* 2013; 19: 457-458 [PMID: 23314246 DOI: 10.1097/MIB.0b013e318280fcf5]
- 20 Zullo A, Ridola L, Hassan C. Rifaximin therapy and *Clostridium difficile* infection: a note of caution. *J Clin Gastroenterol* 2013; 47: 737 [PMID: 23507769 DOI: 10.1097/MCG.0b013e31828bea4b]
- 21 Mirow L, Hauenschild L, Hildebrand P, Kleemann M, Keller R, Franke C, Roblick UJ, Bruch HP, Kujath P. [Recurrence of Crohn's disease after surgery-causes and risks]. *Zentralbl Chir* 2008; 133: 182-187 [PMID: 18415909 DOI: 10.1055/s-2008-1004743]
- 22 Swoger JM, Regueiro M. Preventive therapy in postoperative Crohn's disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2010; 26: 337-343 [PMID: 20571386 DOI: 10.1097/MOG.0b013e328338f724]
- 23 D'Haens GR, Vermeire S, Van Assche G, Noman M, Aerden I, Van Olmen G, Rutgeerts P. Therapy of metronidazole with azathioprine to prevent postoperative recurrence of Crohn's disease: a controlled randomized trial. *Gastroenterology* 2008; 135: 1123-1129 [PMID: 18727929 DOI: 10.1053/j.gastro.2008.07.010]
- 24 Hvas CL, Dahlerup JF, Jacobsen BA, Ljungmann K, Qvist N, Staun M, Tøttrup A. Diagnosis and treatment of fistulising Crohn's disease. *Dan Med Bull* 2011; 58: C4338 [PMID: 21975159]
- 25 Thia KT, Mahadevan U, Feagan BG, Wong C, Cockeram A, Bitton A, Bernstein CN, Sandborn WJ. Ciprofloxacin or metronidazole for the treatment of perianal fistulas in patients with Crohn's disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study. *Inflamm Bowel Dis* 2009; 15: 17-24 [PMID: 18668682 DOI: 10.1002/ibd.20608]
- 26 Savoye-Collet C, Savoye G, Koning E, Dacher JN, Lerebours E. Fistulizing perianal Crohn's disease: contrast-enhanced magnetic resonance imaging assessment at 1 year on maintenance anti-TNF-alpha therapy. *Inflamm Bowel Dis* 2011; 17: 1751-1758 [PMID: 21744430 DOI: 10.1002/ibd.21568]
- 27 Maeda Y, Ng SC, Durdey P, Burt C, Torkington J, Rao PK, Mayberry J, Moshkovska T, Stone CD, Carapeti E, Vaizey CJ. Randomized clinical trial of metronidazole ointment versus placebo in perianal Crohn's disease. *Br J Surg* 2010; 97: 1340-1347 [PMID: 20632322 DOI: 10.1002/bjs.7121]
- 28 Blichfeldt P, Blomhoff JP, Myhre E, Gjone E. Metronidazole in Crohn's disease. A double blind cross-over clinical trial. *Scand J Gastroenterol* 1978; 13: 123-127 [PMID: 345410 DOI: 10.3109/00365527809179816]
- 29 Elliott PR, Burnham WR, Berghouse LM, Lennard-Jones JE, Langman MJ. Sulphadoxine-pyrimethamine therapy in Crohn's disease. *Digestion* 1982; 23: 132-134 [PMID: 7047267 DOI: 10.1159/000198703]
- 30 Ursing B, Alm T, Bárány F, Bergelin I, Ganrot-Norlin K, Hoevels J, Huitfeldt B, Järnerot G, Krause U, Krook A, Lindström B, Nordle O, Rosén A. A comparative study of metronidazole and sulfasalazine for active Crohn's disease: the cooperative Crohn's disease study in Sweden. II. Result. *Gastroenterology* 1982; 83: 550-562 [PMID: 6124474]
- 31 Rosén A, Ursing B, Alm T, Bárány F, Bergelin I, Ganrot-Norlin K, Hoevels J, Huitfeldt B, Järnerot G, Krause U, Krook A, Lindström B, Nordle O. A comparative study of metronidazole and sulfasalazine for active Crohn's disease: the cooperative Crohn's disease study in Sweden. I. Design and methodologic considerations. *Gastroenterology* 1982; 83: 541-549 [PMID: 6124473]
- 32 Shaffer JL, Hughes S, Linaker BD, Baker RD, Turnberg LA. Controlled trial of rifampicin and ethambutol in Crohn's disease. *Gut* 1984; 25: 203-205 [PMID: 6363219 DOI: 10.1136/gut.25.2.203]
- 33 Ambrose NS, Allan RN, Keighley MR, Burdon DW, Youngs D, Barnes P, Lennard-Jones JE. Antibiotic therapy for treatment in relapse of intestinal Crohn's disease. A prospective randomized study. *Dis Colon Rectum* 1985; 28: 81-85 [PMID: 3882364]
- 34 Basilisco G, Ranzi T, Campanini M, Piodi L, Bianchi P. Controlled trial of rifabutin in Crohn's disease. *Current Therapeutic Research* 1989; 46: 245-250
- 35 Afdhal NH, Long A, Lennon J, Crowe J, O'Donoghue DP. Controlled trial of antimycobacterial therapy in Crohn's disease. Clofazimine versus placebo. *Dig Dis Sci* 1991; 36: 449-453 [PMID: 2007362 DOI: 10.1007/BF01298873]
- 36 Sutherland L, Singleton J, Sessions J, Hanauer S, Krawitt E, Rankin G, Summers R, Mekhjian H, Greenberger N, Kelly M. Double blind, placebo controlled trial of metronidazole in Crohn's disease. *Gut* 1991; 32: 1071-1075 [PMID: 1916494 DOI: 10.1136/gut.32.9.1071]
- 37 Swift GL, Srivastava ED, Stone R, Pullan RD, Newcombe RG, Rhodes J, Wilkinson S, Rhodes P, Roberts G, Lawrie BW. Controlled trial of anti-tuberculous chemotherapy for two years in Crohn's disease. *Gut* 1994; 35: 363-368 [PMID: 8150348 DOI: 10.1136/gut.35.3.363]
- 38 Prantera C, Kohn A, Mangiarotti R, Andreoli A, Luzi C. Antimycobacterial therapy in Crohn's disease: results of a controlled, double-blind trial with a multiple antibiotic regimen. *Am J Gastroenterol* 1994; 89: 513-518 [PMID: 8147352]
- 39 Prantera C, Zannoni F, Scribano ML, Berto E, Andreoli A, Kohn A, Luzi C. An antibiotic regimen for the treatment of active Crohn's disease: a randomized, controlled clinical trial of metronidazole plus ciprofloxacin. *Am J Gastroenterol* 1996; 91: 328-332 [PMID: 8607501]
- 40 Colombel JF, Lémann M, Cassagnou M, Bouhnik Y, Duclos B, Dupas JL, Notteghem B, Mary JY. A controlled trial comparing ciprofloxacin with mesalazine for the treatment of active Crohn's disease. Groupe d'Etudes Thérapeutiques des Affections Inflammatoires Digestives (GETAID). *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 674-678 [PMID: 10086650]
- 41 Leiper K, Morris AI, Rhodes JM. Open label trial of oral clarithromycin in active Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2000; 14: 801-806 [PMID: 10848665 DOI: 10.1046/j.1365-2036.2000.00753.x]
- 42 Goodgame RW, Kimball K, Akram S, Ike E, Ou CN, Sutton F, Graham D. Randomized controlled trial of clarithromycin and ethambutol in the treatment of Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2001; 15: 1861-1866 [PMID: 11736715 DOI: 10.1046/j.1365-2036.2001.01099.x]
- 43 Arnold GL, Beaves MR, Pryjduin VO, Mook WJ. Preliminary study of ciprofloxacin in active Crohn's

- disease. *Inflamm Bowel Dis* 2002; 8: 10-15 [PMID: 11837933 DOI: 10.1097/00054725-200201000-00002]
- 44 Steinhart AH, Feagan BG, Wong CJ, Vandervoort M, Mikolainis S, Croitoru K, Seidman E, Leddin DJ, Bittan A, Drouin E, Cohen A, Greenberg GR. Combined budesonide and antibiotic therapy for active Crohn's disease: a randomized controlled trial. *Gastroenterology* 2002; 123: 33-40 [PMID: 12105831 DOI: 10.1053/gast.2002.34225]
 - 45 Prantera C, Lochs H, Campieri M, Scribano ML, Sturniolo GC, Castiglione F, Cottone M. Antibiotic treatment of Crohn's disease: results of a multicentre, double blind, randomized, placebo-controlled trial with rifaximin. *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 23: 1117-1125 [PMID: 16611272 DOI: 10.1111/j.1365-2036.2006.02879.x]
 - 46 Prantera C, Lochs H, Grimaldi M, Danese S, Scribano ML, Gionchetti P. Rifaximin-extended intestinal release induces remission in patients with moderately active Crohn's disease. *Gastroenterology* 2012; 142: 473-481.e4 [PMID: 22155172]
 - 47 Rutgeerts P, Hiele M, Geboes K, Peeters M, Penninckx F, Aerts R, Kerremans R. Controlled trial of metronidazole treatment for prevention of Crohn's recurrence after ileal resection. *Gastroenterology* 1995; 108: 1617-1621 [PMID: 7768364 DOI: 10.1016/0016-5085(95)90121-3]
 - 48 Rutgeerts P, Van Assche G, Vermeire S, D'Haens G, Baert F, Noman M, Aerden I, De Hertogh G, Geboes K, Hiele M, D'Hoore A, Penninckx F. Ornidazole for prophylaxis of postoperative Crohn's disease recurrence: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology* 2005; 128: 856-861 [PMID: 15825069 DOI: 10.1053/j.gastro.2005.01.010]
 - 49 West RL, van der Woude CJ, Hansen BE, Felt-Bersma RJ, van Tilburg AJ, Drapers JA, Kuipers EJ. Clinical and endosonographic effect of ciprofloxacin on the treatment of perianal fistulae in Crohn's disease with infliximab: a double-blind placebo-controlled study. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 20: 1329-1336 [PMID: 15606395 DOI: 10.1111/j.1365-2036.2004.02247.x]
 - 50 Bellavia M, Tomasello G, Romeo M, Damiani P, Lo Monte AI, Lozio L, Campanella C, Marino Gammazza A, Rappa F, Zummo G, Cocchi M, Conway de Macario E, Macario AJ, Cappello F. Gut microbiota imbalance and chaperoning system malfunction are central to ulcerative colitis pathogenesis and can be counteracted with specifically designed probiotics: a working hypothesis. *Med Microbiol Immunol* 2013; 202: 393-406 [PMID: 23864544 DOI: 10.1007/s00430-013-0305-2]
 - 51 Sorrentino D, Fogel S, Van den Bogaerde J. Surgery for Crohn's disease and anti-TNF agents: the changing scenario. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2013; 7: 689-700 [PMID: 24161133]
 - 52 Prantera C, Lochs H, Grimaldi M, Danese S, Scribano ML, Gionchetti P; Retic Study Group (Rifaximin-Extended Intestinal Release Induces Remission of Patients with Moderately Active Crohn's Disease). *Gastroenterology* 2012; 142: 473-481
 - 53 Dignass A, Van Assche G, Lindsay JO, Lémann M, Söderholm J, Colombel JF, Danese S, D'Hoore A, Gassull M, Gomollón F, Hommes DW, Michetti P, O'Morain C, Oresland T, Windsor A, Stange EF, Travis SP. The second European evidence-based Consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: Current management. *J Crohns Colitis* 2010; 4: 28-62 [PMID: 21122489 DOI: 10.1016/j.crohns.2009.12.002]
 - 54 Mowat C, Cole A, Windsor A, Ahmad T, Arnott I, Driscoll R, Mitton S, Orchard T, Rutter M, Younge L, Lees C, Ho GT, Satsangi J, Bloom S. Guidelines for the management of inflammatory bowel disease in adults. *Gut* 2011; 60: 571-607 [PMID: 21464096 DOI: 10.1136/gut.2010.224154]
 - 55 Bernstein CN, Fried M, Krabshuis JH, Cohen H, Eliakim R, Fedail S, Gearry R, Goh KL, Hamid S, Khan AG, LeMair AW, Malfertheiner Q, Rey JF, Sood A, Steinwurz F, Thomsen OO, Thomson A, Watermeyer G. World Gastroenterology Organization Practice Guidelines for the diagnosis and management of IBD in 2010. *Inflamm Bowel Dis* 2010; 16: 112-124 [PMID: 19653289 DOI: 10.1002/ibd.21048]
 - 56 Talley NJ, Abreu MT, Achkar JP, Bernstein CN, Dubinsky MC, Hanauer SB, Kane SV, Sandborn WJ, Ullman TA, Moayyedi P. An evidence-based systematic review on medical therapies for inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2011; 106 Suppl 1: S2-S25; quiz S26 [PMID: 21472012]
 - 57 冉志华. 炎症性肠病诊断与治疗的共识意见(2012年·广州)克罗恩病诊断的部分解读. *胃肠病学* 2012; 17: 721-723

编辑 田滢 电编 鲁亚静



异常凝血酶 DCP 基因克隆表达、纯化及单克隆抗体制备与鉴定

沈鹏, 司进, 李琦雯, 渠利利, 李璐蓉, 严晓璐, 季国忠

■背景资料

肝细胞性肝癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是一种常见的恶性肿瘤, 其死亡率很高。肝癌的早期诊断是治疗能否取得成功的关键, 而临床上甲胎蛋白 (α -fetoprotein, AFP) 诊断肝癌仍存在一定的不足, 所以寻找新的有助早期诊断 HCC 血清标志物一直是备受关注的研究热点。

沈鹏, 李璐蓉, 严晓璐, 季国忠, 南京医科大学第二附属医院消化医学中心 南京医科大学消化内镜研究所 江苏省南京市 210011

司进, 李琦雯, 渠利利, 南京医科大学第二附属医院检验科 江苏省南京市 210011

沈鹏, 在读硕士, 主要从事肝癌早期诊断多联快速胶体金试纸条的研制及性能评价。

南京市科技发展计划基金资助项目, No. 201104029

江苏省医学重点人才基金资助项目, No. RC2011081

南京市医学科技发展基金资助项目, No. ZKX11176

作者贡献分布: 沈鹏、司进及季国忠对此文所作贡献均等; 此课题由季国忠、沈鹏及司进设计; 研究过程由季国忠、沈鹏、司进、李琦雯、渠利利、李璐蓉及严晓璐操作完成; 研究所用试剂与分析工具由季国忠提供; 数据分析由沈鹏完成; 论文写作由沈鹏、司进及季国忠完成。

通讯作者: 季国忠, 教授, 主任医师, 博士生导师, 210011, 江苏省南京市下关区姜家园121号, 南京医科大学第二附属医院消化医学中心, 南京医科大学消化内镜研究所。jgzl@163.com
电话: 025-58509996

收稿日期: 2013-09-05 修回日期: 2013-10-21

接受日期: 2013-10-30 在线出版日期: 2013-12-18

Human des- γ -carboxy prothrombin: Cloning, expression and monoclonal antibody preparation

Peng Shen, Jin Si, Qi-Wen Li, Li-Li Qu, Lu-Rong Li, Xiao-Lu Yan, Guo-Zhong Ji

Peng Shen, Lu-Rong Li, Xiao-Lu Yan, Guo-Zhong Ji, Institute of Digestive Endoscopy and Medical Center for Digestive Diseases, the Second Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210011, Jiangsu Province, China

Jin Si, Qi-Wen Li, Li-Li Qu, Department of Laboratory Medicine, the Second Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210011, Jiangsu Province, China

Supported by: the Science and Technology Development Project of Nanjing, No. 201104029; the Medical Key Talent Foundation of Jiangsu Province, No. RC2011081; and the Medical Science and Technology Development Program of Nanjing, No. ZKX11176

Correspondence to: Guo-Zhong Ji, Professor, Chief Physician, Institute of Digestive Endoscopy and Medical Center for Digestive Diseases, the Second Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, 121 Jiangjiayuan, Xiguan District, Nanjing 210011, China. jgzl@163.com

Received: 2013-09-05 Revised: 2013-10-21

Accepted: 2013-10-30 Published online: 2013-12-18

Abstract

AIM: To clone and express human des- γ -carboxy

prothrombin (DCP), a valuable serum marker for hepatocellular carcinoma (HCC), and to prepare the monoclonal antibody (mAb) against DCP.

METHODS: The DCP gene was cloned into the prokaryotic expression vector pCold II. The recombinant construct was expressed in BL21 *Escherichia coli* strain, and the recombinant protein with an N-terminal 6-His tag was purified by nickel chelate-nitrilotriacetic-acid (Ni-NTA) affinity chromatography. The purified protein was used to immunize the Balb/c mice for mAb preparation. The sensitivity and specificity of the mAb were assessed by indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), Western blot and immunohistochemistry.

RESULTS: The recombinant DCP protein was successfully expressed and purified, and its molecular weight was approximately 23 kDa. One hybridoma cell line stably secreting anti-DCP monoclonal antibody named 3B5 was obtained. Western blot analysis and immunohistochemistry indicated that the DCP mAb showed specific combination with DCP. ELISA detection indicated that the titer of the mAb was $1:2.43 \times 10^5$. The immunoglobulin isotype of the mAb was identified as IgG2a.

CONCLUSION: The successful preparation of DCP mAb may lay a solid foundation for the research of the use of DCP in early diagnosis of HCC.

© 2013 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

Key Words: Des- γ -carboxy prothrombin; Monoclonal antibody; Hybridoma technique; Hepatocellular carcinoma; Tumor markers

Shen P, Si J, Li QW, Qu LL, Li LR, Yan XL, Ji GZ. Human des- γ -carboxy prothrombin: Cloning, expression and monoclonal antibody preparation. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(35): 3932-3939 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/3932.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i35.3932>

■同行评议者

高润平, 教授, 吉林大学第一医院肝胆胰内科

摘要

目的:通过克隆、表达一种有前景的肝癌肿瘤标志物人去羧基凝血素(Des- γ -carboxy prothrombin, DCP),制备抗DCP单克隆抗体并初步鉴定其特性。

方法:依据DCP基因序列,合成DCP全长基因,构建原核表达载体pCold II-DCP,转化至*Escherichia coli* BL21(DE3),IPTG诱导表达,以Ni²⁺亲和层析柱纯化带有His标签的DCP蛋白。纯化的蛋白免疫Balb/c小鼠,制备抗DCP单克隆抗体。以ELISA法检测抗体效价与亚型;Western blot和免疫组织化学染色鉴定抗体特异性。

结果:成功表达并获得DCP蛋白,其相对分子量约为23000;获得1株稳定分泌抗人DCP单克隆抗体杂交瘤细胞株3B5;Western blot和免疫组织化学结果显示抗人DCP单克隆抗体能与DCP发生特异性结合,且ELISA检测抗体的效价为1:2.43×10⁵,其亚类为IgG2a。

结论:成功制备了抗人DCP单克隆抗体,为进一步将该抗体应用于肝癌的早期诊断提供了重要工具。

© 2013年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词:异常凝血酶原;原核表达;杂交瘤技术;单克隆抗体;肝细胞肝癌;肿瘤标志物

核心提示:本文以pCold II原核表达载体诱导表达纯化6×His标签的人去羧基凝血素(Des- γ -carboxy prothrombin, DCP)重组蛋白,为今后规模化生产提供基础;并最终获得1株持续稳定分泌抗DCP mAb杂交瘤细胞株,成功制备了效价高、特异性好的鼠抗人DCP单克隆抗体,并检测了肝细胞肝癌中的DCP的表达。

沈鹏, 司进, 李琦雯, 渠利利, 李璐蓉, 严晓璐, 季国忠. 异常凝血酶DCP基因克隆表达、纯化及单克隆抗体制备与鉴定. 世界华人消化杂志 2013; 21(35): 3932-3939 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/3932.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v21.i35.3932>

0 引言

肝细胞性肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是一种常见的恶性肿瘤,其死亡率很高。在我国,肝癌的死亡率占恶性肿瘤的第2位,占全球肝癌死亡人数的53%^[1],肝癌的发生发展是一个涉及多阶段、多因素的复杂过程,除了依赖于肿瘤

细胞自身以外,肿瘤周围的局部微环境也起着重要的作用^[2]。在我国,HCC主要和乙型肝炎病毒感染、肝硬化相关。有典型临床症状的就诊患者,往往已届晚期,肝癌的早期诊断是治疗能否取得成功的关键,而每年一次的血清甲胎蛋白(α -fetoprotein, AFP)测定和B型超声检查是肝癌普查的基本措施^[3,4]。目前,AFP是临床上诊断HCC最常用的血清肿瘤标志物,但是AFP在一些良性肝病、部分生殖系统和胃肠道的恶性肿瘤中也会升高,诊断肝癌仍存在一定的缺陷^[5,6],所以寻找新的有助早期诊断HCC血清标志物一直是备受关注的研究热点。

Liebman等^[7]在1984年首次报道了人去羧基凝血素(Des- γ -carboxy prothrombin, DCP)水平升高存在于91%的肝癌患者血清中。DCP即异常凝血酶原,与正常凝血酶原区别在于其氨基酸特定位置上的谷氨酸残基未经羧基化。当肝细胞发生癌变时,内质网不能将DCP羧化成有活性的凝血酶原,从而使DCP含量升高。DCP在临床上是一个具有很好应用前景的肝癌血清标志物,如果作为AFP诊断HCC的补充指标,将能改善HCC的早期诊断。

关于DCP蛋白的生物学功能研究已经全面开展,亟需高质量的抗体。虽然DCP被发现时间较久,国外已有抗体,但是价格昂贵,而且目前国内对于抗DCP抗体制备的报道较少。因为DCP单克隆抗体的生产会受到如抗原的免疫原性低、复性困难的限制等原因,难以规模化扩大生产,不适合其推广使用。为此,本研究拟通过构建DCP原核表达载体,表达、纯化DCP重组蛋白,免疫小鼠,获得一株能稳定分泌抗人DCP单抗的杂交瘤细胞。经ELISA及Western blot等多种手段对所得的单克隆抗体进行生物学特性分析,制备出具有良好特异性和效价的抗DCP mAb,为进一步研究DCP在肝癌发生发展中的作用机制以及为后期肝癌早期诊断试剂条的开发奠定了良好的实验基础。

1 材料和方法

1.1 材料 质粒pCold II、菌株大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E. coli*)宿主菌DH5 α 和BL21(DE3)、小鼠骨髓瘤细胞株(Sp2/0)由本实验室保存;实验动物Balb/c小鼠(6-8周龄,♀,SPF清洁级)购自南京医科大学实验动物中心;胎牛血清购自美国Invitrogen公司;辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠IgG抗体购自北京中杉金桥生物技术有

■研究前沿

人去羧基凝血素(Des- γ -carboxy prothrombin, DCP)在临床上是一个具有很好应用前景的肝癌血清标志物。虽然DCP被发现时间较久,国外已有抗体,但是价格昂贵,而且DCP抗体的生产会受到如抗原的免疫原性低、复性困难的限制等原因,难以规模化扩大生产,不适合其推广使用。关于DCP蛋白的生物学功能研究已经全面开展,亟需高质量的抗体。

■相关报道

Gao等关于DCP的Meta分析中,可以看出DCP是一个可以与AFP相媲美的肝癌肿瘤标志物。

限公司;标准蛋白Marker、Taq DNA聚合酶、T4 DNA连接酶购自美国Fermentas公司、限制性内切酶*Nde* I 和*Hind* III购自TaKaRa公司;ECL试剂盒、Protein A琼脂糖亲和层析柱、Ni-NTA琼脂糖柱购自GE Healthcare公司;弗氏完全佐剂和不完全佐剂、免疫球蛋白标准亚类鉴定试剂盒、细胞培养基均为美国Sigma产品;BCA蛋白定量试剂盒购自凯基公司;引物由南京钟鼎生物有限责任公司合成。

1.2 方法

1.2.1 pCold II-DCP表达载体的构建:依据DCP基因序列,合成DCP基因后,经1.5%琼脂糖凝胶电泳检测,并对其用限制性内切酶*Nde* I 和*Hind* III双酶切的原核表达载体pCold II连接,转化至大肠杆菌*E. coli*. DH5 α 中扩增,再转入*E. coli*. BL21(DE3)感受态细胞,接种于LB固体培养基中,含氨苄青霉素(Amp)100 mg/L,抽取质粒,进行*Nde* I 和*Hind* III酶切鉴定和测序(测序由南京钟鼎生物有限责任公司完成)。

1.2.2 DCP融合蛋白的表达及纯化:挑取含重组质粒pCold II-DCP-BL21的菌落接种于10 mL LB培养基(Amp, 100 mg/L)中,220 r/min 37 °C摇菌过夜,按1:100比例接种于1000 mL的LB培养基(Amp, 100 mg/L)中,相同条件下培养3 h,待菌液达到A₆₀₀时加入IPTG至终浓度为0.5 mmol/L,15 °C、25 °C、37 °C分别振荡培养16 h,诱导培养结束后,收集菌体到50 mL无菌离心管,并分别对不同诱导时间样品行SDS-PAGE电泳,未诱导的工程菌做对照,分析不同诱导温度条件下目的蛋白表达情况,摸索最佳诱导温度。5000 r/min 4 °C离心10 min,弃上清,重悬于20 mL lysis buffer(20 mmol/L Tris-HCl包含1 mmol/L蛋白酶抑制剂混合物,pH 8.0)中,经细胞超声破碎仪破碎(超声2 s、冷却4 s、功率100 W),12000 r/min、4 °C离心15 min后分别收集沉淀和上清,SDS-PAGE分析目的蛋白的可溶情况。沉淀重悬于lysis buffer(含8 mol/L尿素),并经0.22 μ m滤膜过滤,过Ni-NTA层析柱进行纯化;10倍的柱体积lysis buffer(含8 mol/L尿素+20 mmol/L咪唑)洗涤;用buffer C(20 mmol/L Tris-HCl buffer,pH 8.0,含150 mmol/L NaCl,8 mol/L尿素,250 mmol/L咪唑)洗脱目的蛋白。将洗脱的蛋白,用含有一定浓度梯度的尿素(6、5、4、2、1 mol/L)进行复性,最终用PBS透析。透析完成后冻干浓缩蛋白,测定浓度为1.5 mg/mL,后进行SDS-PAGE分析。

1.2.3 动物免疫:取6只6-8周龄体重为18-20 g

的Balb/c小鼠,首次免疫时将纯化的DCP蛋白与等体积弗氏完全佐剂完全混合乳化,经左下腹注射,剂量为100 μ g/只,以后每隔2 wk取同等剂量的抗原和等体积的弗氏不完全佐剂加强免疫,共计4次。第4次加强免疫1 wk后眼眶采血,间接ELISA法检测小鼠外周血抗DCP抗体的效价。效价高者于融合前3 d用纯化的蛋白尾静脉冲击免疫一次,注射剂量同前。

1.2.4 mAb的制备、纯化与效价测定:(1)杂交瘤细胞的制备:将生长状态良好的Sp2/0骨髓瘤细胞与免疫小鼠脾细胞以1:10的比例混合,加入50%聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)进行融合,融合过程按常规方法进行^[8,9]。用DCP表达蛋白作为检测抗原,对有融合细胞孔的上清液进行间接ELISA检测,一抗为细胞培养上清,二抗为辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠IgG(1:2000稀释),TMB显色检测筛选阳性细胞克隆株。将筛选的阳性细胞克隆株用有限稀释法进行单克隆筛选,间接ELISA法检测,直至阳性率达100%,筛选出稳定分泌抗DCP抗体的杂交瘤细胞株进行扩大培养,并冻存于液氮中;(2)抗体的纯化及效价测定:选择Balb/c经产母鼠,每只腹腔注射灭菌液体石蜡0.5 mL,1 wk后,经腹腔接种杂交瘤细胞0.5 mL(1×10^6 细胞/只)。10-14 d后小鼠腹部明显肿胀收集腹水,12000 r/min离心10 min,去除上层的脂肪、液体石蜡和沉淀,吸取淡黄色腹水,将腹水经Protein A琼脂糖亲和层析柱获得纯化抗体,之后在PBS中进行4 °C透析过夜,隔日BCA法测定抗体浓度,ELISA法测定抗体效价,然后加入50%甘油混合,小量分装后-80 °C保存备用。

1.2.5 mAb的生物学特性分析和鉴定:(1)mAb的Ig亚类鉴定:取杂交瘤培养上清,采用ELISA方法进行亚型测定(参照Sigma公司小鼠单克隆抗体亚型检测试剂盒说明书进行);(2)mAb特异性鉴定:将上述表达的DCP蛋白用12%SDS-PAGE凝胶电泳,转移至硝酸纤维素膜,5%脱脂奶粉封闭2 h,应用上述制备的抗DCP mAb为一抗,1:1000稀释,4 °C孵育过夜,TBST洗涤4次,加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠IgG(1:8000稀释),37 °C孵育1 h,洗涤,最后凝胶成像仪进行显色,观察结果;(3)mAb效价的检测:将杂交瘤细胞的培养上清,按梯度稀释,经间接ELISA法测定mAb的效价(效价即样品A/空白A \geq 2.1的最高稀释度)。

1.2.6 免疫组织化学法检测及结果判断:取人正

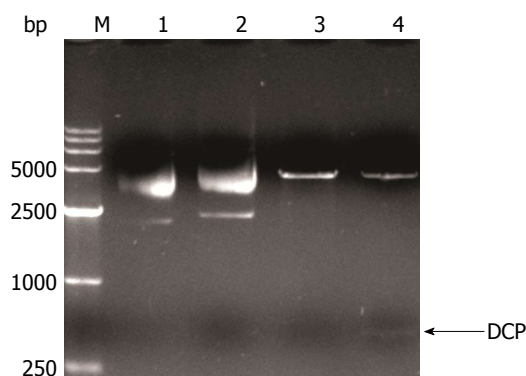


图1 pCold II和pCold II-DCP的酶切鉴定. M: DNA标准品; 1: pCold II质粒; 2: pCold II-DCP重组质粒; 3: 经*Nde* I与*Hind* III双酶切后的pCold II质粒; 4: 经*Nde* I与*Hind* III双酶切后的pCold II-DCP重组质粒. DCP: 去羟基凝血素.

常肝组织及肝癌石蜡组织, 制作4 μ m厚的组织切片进行二甲苯脱蜡, 用0.03% H_2O_2 室温处理切片20 min, 消除内源性过氧化酶的活性, 用血清封闭, DCP一抗(1:400)孵育1 h后, 加生物素标记的第二抗体, 孵育45 min, 加ABC复合物45 min, DAB显色, 观察、记录.

2 结果

2.1 重组质粒pCold II-DCP的构建和鉴定 重组质粒pCold II-DCP经5' *Nde* I 和3' *Hind* III进行双酶切, 出现两条特异性条带, 位置与pCold II和目的片段的大小一致(图1). 测序结果显示目标序列与NCBI(Accession number. NC_000011.9)相应序列相符, 证实表达载体pCold II-DCP构建成功.

2.2 DCP蛋白的诱导表达及纯化

2.2.1 摸索最佳诱导温度选择及DCP蛋白的可溶性分析: 温度对于目的蛋白的表达量以及表达形式有非常重要的影响. 0.5 mmol/L IPTG浓度、诱导16 h相同的条件下, 选取3个不同的温度梯度15 $^{\circ}$ C、25 $^{\circ}$ C和37 $^{\circ}$ C对pCold II-DCP-BL21大肠杆菌进行诱导表达. 诱导后SDS-PAGE(图2)电泳显示: 在15 $^{\circ}$ C、23 kDa处有DCP的表达, 且表达在沉淀中.

2.2.2 DCP蛋白的纯化及复性: 大量诱导经超声破碎, 取其沉淀, 经 Ni^{2+} 亲和层析柱纯化及复性(图3), 并BCA法测定蛋白浓度为1.5 mg/mL, 用BID-RAD quantity one软件分析显示DCP蛋白纯度>80%.

2.3 抗DCP mAb的制备与纯化 取血清抗体效价最高的免疫小鼠的脾细胞与Sp2/0骨髓瘤细胞融合, 采用ELISA法检测细胞培养上清中抗体的分泌情况, 结果初筛10株阳性克隆; 又进行3次单

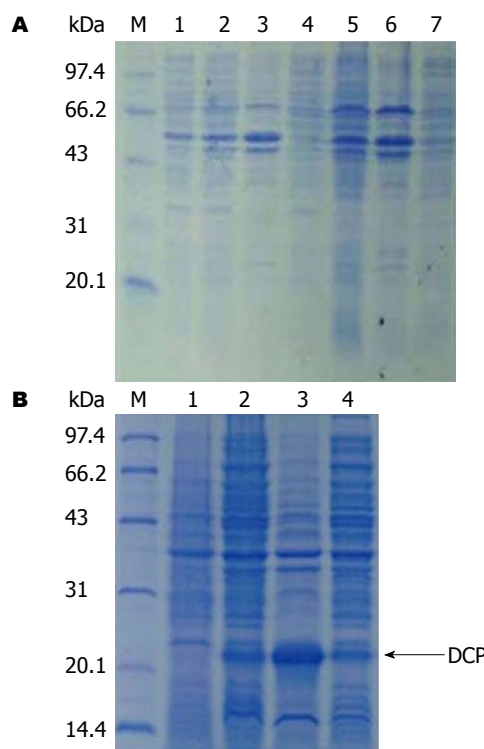


图2 SDS-PAGE分析DCP在37 $^{\circ}$ C、25 $^{\circ}$ C和15 $^{\circ}$ C的表达及可溶性分析. A: DCP在37 $^{\circ}$ C、25 $^{\circ}$ C表达及可溶性分析. M: 蛋白标准品; 1: 诱导前菌液; 2: 37 $^{\circ}$ C诱导后菌液; 3: 37 $^{\circ}$ C诱导超声后沉淀; 4: 37 $^{\circ}$ C诱导超声后上清; 5: 25 $^{\circ}$ C诱导后菌液; 6: 25 $^{\circ}$ C诱导超声后沉淀; 7: 25 $^{\circ}$ C诱导超声后上清; B: DCP在15 $^{\circ}$ C表达及可溶性分析. M: 蛋白标准品; 1: 诱导前菌液; 2: 15 $^{\circ}$ C诱导后菌液; 3: 15 $^{\circ}$ C诱导后菌液; 4: 15 $^{\circ}$ C诱导后上清. 箭头为目的蛋白.

克隆筛选, 直至所有克隆孔的阳性率达100%. 阳性克隆按有限稀释法进行克隆化培养, 筛选出1株稳定分泌特异性抗DCP mAb的杂交瘤细胞株, 命名为3B5, 通过Protein A亲和层析获得纯化的抗体, 电泳结果显示呈清晰的两条带, 分别为免疫球蛋白重链约55 kDa, 轻链约25 kDa(图4), 用BCA法测定纯化的抗体浓度为0.7 mg/mL; 经过3 mo以上代能良好生长, 并稳定分泌抗体.

2.4 抗体亚类、特异性鉴定及效价测定 (1)mAb的Ig亚类鉴定: 应用Sigma单克隆抗体亚类检测试剂盒进行抗体亚类鉴定, 按照说明书酶联免疫捕获法表明其免疫球蛋白亚类为IgG2a; (2)mAb特异性鉴定: 单克隆抗体的特异性通过免疫印迹实验进行验证. 用已获得的抗DCP mAb为一抗, 结果显示, 经诱导后与纯化后的DCP蛋白在23 kDa处各有一条特异的反应条带(图5), 而未经诱导的菌体蛋白没有条带, 证明此单抗特异性针对DCP重组蛋白; (3)mAb效价的检测: 经间接ELISA测定, 小鼠腹水DCP单克隆抗体的效价达1:243000以上(图6).

■创新盘点

本实验选择带有His标签的pCold II低温表达DCP, 蛋白结构稳定, 产量较高, 与天然蛋白相似, 可更好的作为抗原免疫制备高质量抗体.

■应用要点

为进一步研究DCP在肝癌发生发展中的作用机制以及为后期肝癌早期诊断试剂条的开发、ELISA方法或磁酶免疫方法的建立奠定了良好的实验基础。

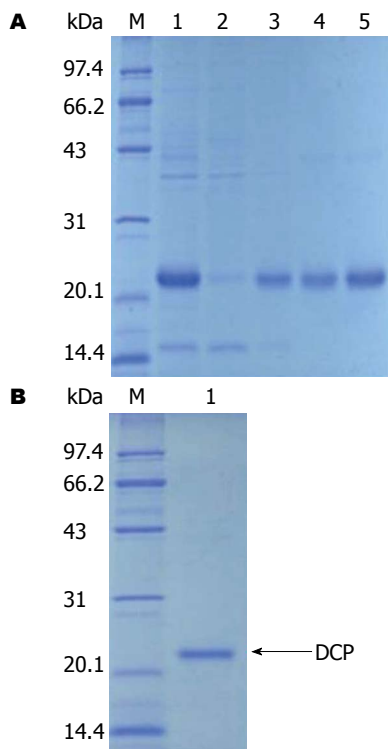


图3 SDS-PAGE分析DCP蛋白的纯化及脱盐。A: DCP蛋白的纯化。M: 蛋白标准品; 1: 超声后沉淀; 2: 流穿液; 3: 洗涤液; 4, 5: 洗涤液; B: 纯化后蛋白的脱盐。M: 蛋白标准品; 1: 透析后的DCP蛋白。DCP: 去羧基凝血素。

2.5 免疫组织化学法检测DCP在肝癌组织中的表达 以抗DCP mAb为一抗, 对正常肝组织及肝癌组织的石蜡切片进行免疫组织化学染色显示(图7), 正常肝组织呈阴性, 而肝癌组织呈阳性反应。

3 讨论

正常凝血酶原是在一种依赖维生素K的 γ 谷氨酰羧化酶的参与下, 将结构中的10个谷氨酸(Glu)残基羧化成 γ -羧基谷氨酸(Gla), 使之成为有活性的凝血酶原。如果上述任何位点的一个或多个Glu残基羧化不全, 都将可能形成异常的凝血酶原(DCP)。当VitK减少时, 无法使肝细胞内质网上的肽链N端的谷氨酸残基羧化成 γ -羧基谷氨酸(Gla), 形成有活性的凝血酶原即以去羧基凝血酶原形式释放入血^[10], 这种去羧基凝血酶原又常被称为VitK缺乏诱导蛋白或异常凝血酶原。当肝细胞发生癌变时, 内质网不能将DCP羧化成有活性的凝血酶原, 从而使血清中DCP含量升高。血清中的DCP水平明显升高除发生在HCC外, 还可见于阻塞性黄疸和肝内胆淤积引起的长期维生素K缺乏或服用维生素K拮抗剂患者。Bertino等^[11]在对肝癌患者用维生素K治疗后, 发现DCP水平降低, 但是AFP水平并不受影响, 提示

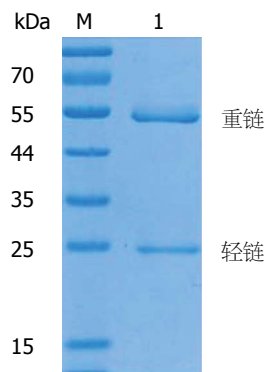


图4 SDS-PAGE分析腹水中抗DCP的单克隆抗体的纯化。M: 蛋白标准品; 1: 纯化的3B5抗体。

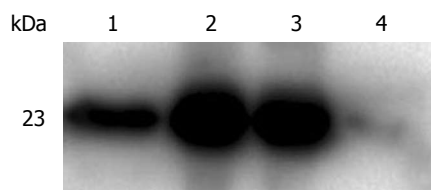


图5 DCP重组蛋白的Western blot鉴定。1: 纯化的DCP蛋白; 2, 3: pCold II-DCP BL21细菌诱导后; 4: pCold II-DCP BL21细菌诱导前。DCP: 去羧基凝血素。

维生素K缺乏可能是导致DCP水平升高一个因素。也有可能是 γ 谷氨酰羧化酶活性降低, 不能使谷氨酸残基羧化成 γ -羧基谷氨酸(Gla), 或者是凝血酶原前体产生过多, 但这些异常的情况可能并不是单独起作用, 而是共同引起DCP水平的升高^[12]。

目前, 临床上筛选早期HCC的肿瘤标志物仍以AFP为主, 但是对于AFP低浓度或阴性的患者容易造成漏诊。故目前急需寻找一种敏感性更高、特异性更强的肿瘤标志物, 建立高效、便捷的检测方法, 来提高HCC的早期诊断率。而DCP对于HCC的诊断是一个有用的肿瘤标志物。近来, 已经进行的几项大规模的病例研究中发现截断点为40 mAU/mL时, DCP诊断HCC的敏感性、特异性和诊断的精确性分别波动于55.9%-87.0%、85.0%-99.8%和59.0%-84.0%^[13]。在1031例样本丙型肝炎抗肝硬化治疗临床试验(hepatitis C antiviral long-term treatment against cirrhosis, HALT-C)队列研究中, 有学者比较了AFP与DCP在早期诊断肝癌的准确性, 在早期诊断的所有检测时间, 发现DCP有更高的敏感性与特异性, 联合检测可以达到更高的敏感性^[14]。这个结果也与Ertle等^[15]研究结果相符。最近的系统评价表明, DCP作为诊断HCC的血清标志物, 其灵敏度为67%(95%CI: 58%-74%), 特异性为92%(95%CI:

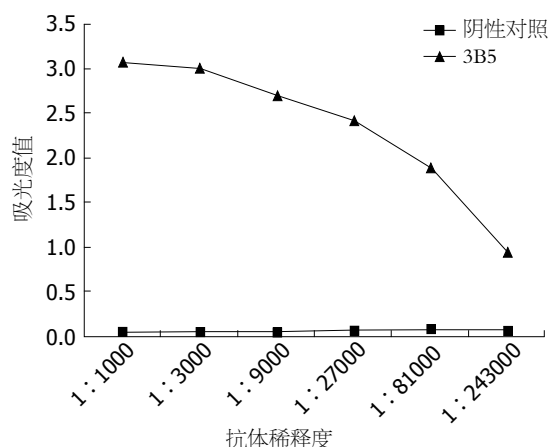
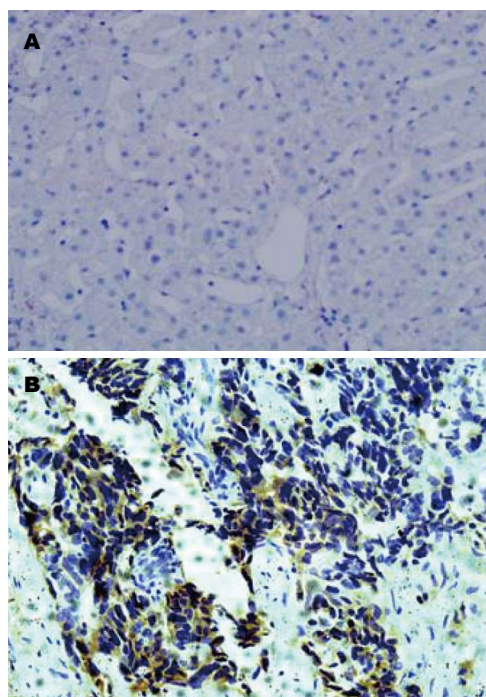


图 6 DCP mAb效价测定.

88%-94%)^[16]. DCP与肝癌细胞血管侵袭^[17]、肝脏肿瘤组织的大小密切相关,而与血清AFP水平无明显关联^[18]. Suzuki等^[19]研究发现,当HCC细胞经历轻微的表型变化时,会产生DCP.但是,当肝癌细胞向间质转化时,他们合成蛋白的能力会减弱,DCP产生会减少. DCP可能是一个独一无二的反映HCC细胞表型变化的肿瘤标志物. Yue等^[20]研究发现DCP结合细胞表面受体Met,导致Met磷酸化,进而激活EGFR.而且DCP可以增加基质金属蛋白酶-2(matrix metalloproteinases-2, MMP-2)和MMP-9的表达与分泌,通过激活细胞外调节蛋白激酶1/2-丝裂原活化蛋白激酶(extracellular regulated protein kinases-mitogen-activated protein kinase, ERK1/2-MAPK)信号通路来刺激肝癌的生长并促进其转移. DCP在预测HCC肿瘤行为起到关键作用.但是目前的基础机制并不是很明确,所以需要更多的研究.

DCP不仅可作为HCC的诊断指标,而且也可应用于监测治疗效果、预后的判断和随访及复发的治疗预后^[21], HCC患者AFP和DCP都增高的情况下其生存率是最低的,无1人存活时间超过3年,相反AFP和DCP均低的患者却有较好的预后^[22].在有乙型肝炎背景的HCC患者中,血清DCP水平较高的患者,肿瘤更具有侵袭的特征,并且这些患者的平均生存时间缩短^[23].对于小肝癌,术前DCP水平高会有肿瘤复发的可能性^[24]. Yamashita等^[25]研究发现在HCC>2 cm时,DCP水平高时(>100 mAU/mL)更容易发生微侵袭.因此,在这种患者,肝切除手术被推荐.而且DCP可以作为评估肿瘤对索拉非尼反应性的预测分子^[26],或者作为肝移植受体的参考标准^[12].

近年有关肝癌标志物的研究较多,一些新

图 7 免疫组织化学检测DCP在肝癌组织中的表达($\times 200$). A: 正常肝组织; B: 肝癌组织.

技术如基因芯片和蛋白质组学的应用已经筛选出了很多基因和蛋白,众多新的标志物被发现.但很多研究尚缺乏多中心和大样本资料的验证,使研究结果的说服力有限.而且由于实验的方法、筛选的临界值和研究的人群不同,导致研究结果很难比较.目前临床上标志物众多,但在血清检查中尚没有单一的高特异性和敏感性的肿瘤标志物可以检测出所有的肝癌患者.每一种肿瘤标志物在诊断上都有其独特的优势,但是也有他的局限性.因此,对肿瘤标志物的联合检测至关重要,可以增加诊断肝癌的敏感性^[27].如AFP、AFP-L3和DCP的应用^[28,29], AFP特异性不足,但是被广泛应用于治疗评估与预后预测. DCP是一个独一无二的标志物,与AFP值无关,可以预测微血管侵袭, AFP-L3有很高特异性而且是很强的预后预测分子, 3个标志物在HCC临床各个方面必不可少.而且AFP、AFP-L3、DCP的联合检测在小肝癌的诊断方面比早期传统的组后更优胜、更准确^[30].联合检测可以更好的早期诊断肝癌,提高诊断的效率,这也是近年来肿瘤早期血清学诊断发展的方向.联合检测项目越多,其诊断特异性越强,但是其敏感性并非越高,同时也会给患者在经济上带来不必要的负担.因此科学合理运用已知的肿瘤标志物来联合诊断HCC至关重要.

■同行评价

本文作者通过基因克隆技术成功制备了DCP融合蛋白,进而将其免疫小鼠,制备了抗DCP mAb的杂交瘤细胞株,成功制备了抗人DCP单克隆抗体,经免疫印迹和免疫组织化学初步验证其具有良好的特异结合活性.本研究为提高肝细胞癌的早期确诊率提供了理论基础和实验依据.

目前DCP蛋白的生物学功能研究已经全面开展,亟需高质量的抗体。但是关于DCP的单克隆抗体制备报道较少,免疫的抗原难以制备可能是其中的主要原因。本研究以大肠杆菌*E. coli* BL21(DE3)原核表达系统,其具有营养要求低、操作方便、周期短、蛋白表达量高、试验成本低等优点,是目前一种广泛应用的基因表达系统。本实验原核表达DCP产量较高,有一定的优势。本研究选择带有6×His标签的pCold II为原核表达载体,此载体可以在较低的温度及诱导剂浓度下诱导目的蛋白表达,有利于蛋白结构的稳定,并提高蛋白产量。His标签与其他标签相比有很多明显优势,是目前用于纯化的融合标签中使用最为广泛的一种。His因其分子量较小,免疫原性少,对目的蛋白的大小、构象和特性影响不大,纯化之后的重组蛋白不必除去标签;再者His不带电(pH 8.0),不会对蛋白质的表达、分泌、折叠、构象形成等产生显著影响,以前常用的GST标签,因其分子量较大,在纯化后需要切除标签后才能进行下一步的检测分析;而且与之前有研究用DEAE-Sephacel分离DCP蛋白相比^[31],更容易得到和天然蛋白相似的产物,更好的作为抗原免疫制备抗体。因为重组蛋白免疫原性较好,而且可大量诱导纯化,这也避免了基因免疫后抗体效价低,很难制备单克隆抗体的缺点。本研究研制的抗体识别DCP的条带仅有一条,且免疫组织化学结果阳性,表明抗体特异性较好,原核表达诱导小鼠产生的主要是针对非糖基化和线性化表位的抗体,所以本抗体可能与DCP非糖基化位点上出现特异性的结合,有待进一步研究确认。

总之,本研究的重要意义:(1)以pCold II原核表达载体诱导表达纯化6×His标签的DCP重组蛋白,为今后规模化生产提供基础;(2)最终获得1株持续稳定分泌抗DCP mAb杂交瘤细胞株,成功制备了效价高、特异性好的鼠抗人DCP单克隆抗体,并检测了肝细胞肝癌中的DCP的表达,为以后的DCP在肝癌发生发展中的功能研究及后期肝癌早期诊断试剂条的开发奠定了良好的检测工具。

4 参考文献

- 1 Poon D, Anderson BO, Chen LT, Tanaka K, Lau WY, Van Cutsem E, Singh H, Chow WC, Ooi LL, Chow P, Khin MW, Koo WH. Management of hepatocellular carcinoma in Asia: consensus statement from the Asian Oncology Summit 2009. *Lancet*

- Oncol* 2009; 10: 1111-1118 [PMID: 19880065 DOI: 10.1016/S1470-2045(09)70241-4]
- 2 Wu SD, Ma YS, Fang Y, Liu LL, Fu D, Shen XZ. Role of the microenvironment in hepatocellular carcinoma development and progression. *Cancer Treat Rev* 2012; 38: 218-225 [PMID: 21763074 DOI: 10.1016/j.ctrv.2011.06.010]
- 3 Altekruze SF, McGlynn KA, Dickie LA, Kleiner DE. Hepatocellular carcinoma confirmation, treatment, and survival in surveillance, epidemiology, and end results registries, 1992-2008. *Hepatology* 2012; 55: 476-482 [PMID: 21953588 DOI: 10.1002/hep.24710]
- 4 Trinchet JC, Chaffaut C, Bourcier V, Degos F, Henrion J, Fontaine H, Roulot D, Mallat A, Hillaire S, Cales P, Ollivier I, Vinel JP, Mathurin P, Bronowicki JP, Vilgrain V, N'Kontchou G, Beaugrand M, Chevret S. Ultrasonographic surveillance of hepatocellular carcinoma in cirrhosis: a randomized trial comparing 3- and 6-month periodicities. *Hepatology* 2011; 54: 1987-1997 [PMID: 22144108 DOI: 10.1002/hep.24545]
- 5 Gupta S, Bent S, Kohlwe J. Test characteristics of alpha-fetoprotein for detecting hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C. A systematic review and critical analysis. *Ann Intern Med* 2003; 139: 46-50 [PMID: 12834318]
- 6 Spangenberg HC, Thimme R, Blum HE. Serum markers of hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis* 2006; 26: 385-390 [PMID: 17051452 DOI: 10.1055/s-2006-951606]
- 7 Liebman HA, Furie BC, Tong MJ, Blanchard RA, Lo KJ, Lee SD, Coleman MS, Furie B. Des-gamma-carboxy (abnormal) prothrombin as a serum marker of primary hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 1984; 310: 1427-1431 [PMID: 6201741 DOI: 10.1056/NEJM198405313102204]
- 8 Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975; 256: 495-497 [PMID: 1172191 DOI: 10.1038/256495a0]
- 9 Kearney JF, Radbruch A, Liesegang B, Rajewsky K. A new mouse myeloma cell line that has lost immunoglobulin expression but permits the construction of antibody-secreting hybrid cell lines. *J Immunol* 1979; 123: 1548-1550 [PMID: 113458]
- 10 Furie B, Furie BC. Molecular basis of vitamin K-dependent gamma-carboxylation. *Blood* 1990; 75: 1753-1762 [PMID: 2184900]
- 11 Bertino G, Ardiri AM, Boemi PM, Ierna D, Interlandi D, Caruso L, Minona E, Trovato MA, Vicari S, Li Destri G, Puleo S. A study about mechanisms of des-gamma-carboxy prothrombin's production in hepatocellular carcinoma. *Panminerva Med* 2008; 50: 221-226 [PMID: 18927526]
- 12 Inagaki Y, Tang W, Makuuchi M, Hasegawa K, Sugawara Y, Kokudo N. Clinical and molecular insights into the hepatocellular carcinoma tumour marker des-γ-carboxyprothrombin. *Liver Int* 2011; 31: 22-35 [PMID: 20874725 DOI: 10.1111/j.1478-3231.2010.02348.x]
- 13 Omata M, Lesmana LA, Tateishi R, Chen PJ, Lin SM, Yoshida H, Kudo M, Lee JM, Choi BI, Poon RT, Shiina S, Cheng AL, Jia JD, Obi S, Han KH, Jafri W, Chow P, Lim SG, Chawla YK, Budihusodo U, Gani RA, Lesmana CR, Putranto TA, Liaw YF, Sarin SK. Asian Pacific Association for the Study of the Liver consensus recommendations on hepatocel-

- lular carcinoma. *Hepatol Int* 2010; 4: 439-474 [PMID: 20827404 DOI: 10.1007/s12072-010-9165-7]
- 14 Lok AS, Sterling RK, Everhart JE, Wright EC, Hoefs JC, Di Bisceglie AM, Morgan TR, Kim HY, Lee WM, Bonkovsky HL, Dienstag JL. Des-gamma-carboxy prothrombin and alpha-fetoprotein as biomarkers for the early detection of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2010; 138: 493-502 [PMID: 19852963 DOI: 10.1053/j.gastro.2009.10.031]
 - 15 Ertle JM, Heider D, Wichert M, Keller B, Kueper R, Hilgard P, Gerken G, Schlaak JF. A combination of α -fetoprotein and des- γ -carboxy prothrombin is superior in detection of hepatocellular carcinoma. *Digestion* 2013; 87: 121-131 [PMID: 23406785 DOI: 10.1159/000346080]
 - 16 Gao P, Li M, Tian QB, Liu DW. Diagnostic performance of des- γ -carboxy prothrombin (DCP) for hepatocellular carcinoma: a bivariate meta-analysis. *Neoplasma* 2012; 59: 150-159 [PMID: 22248272 DOI: 10.4149/neo_2012_020]
 - 17 Matsubara M, Shiraha H, Kataoka J, Iwamuro M, Horiguchi S, Nishina S, Takaoka N, Uemura M, Takaki A, Nakamura S, Kobayashi Y, Nouse K, Yamamoto K. Des- γ -carboxyl prothrombin is associated with tumor angiogenesis in hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2012; 27: 1602-1608 [PMID: 22554292 DOI: 10.1111/j.1440-1746.2012.07173.x]
 - 18 Takayasu K, Arai S, Sakamoto M, Matsuyama Y, Kudo M, Ichida T, Nakashima O, Matsui O, Izumi N, Ku Y, Kokudo N, Makuuchi M. Clinical implication of hypovascular hepatocellular carcinoma studied in 4,474 patients with solitary tumour equal or less than 3 cm. *Liver Int* 2013; 33: 762-770 [PMID: 23445409 DOI: 10.1111/liv.12130]
 - 19 Suzuki H, Murata K, Gotoh T, Kusano M, Okano H, Oyamada T, Yasuda Y, Imamura M, Kudo M, Mizokami M, Sakamoto A. Phenotype-dependent production of des- γ -carboxy prothrombin in hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol* 2011; 46: 1219-1229 [PMID: 21744129 DOI: 10.1007/s00535-011-0432-8]
 - 20 Yue P, Gao ZH, Xue X, Cui SX, Zhao CR, Yuan Y, Yin Z, Inagaki Y, Kokudo N, Tang W, Qu XJ. Des- γ -carboxyl prothrombin induces matrix metalloproteinase activity in hepatocellular carcinoma cells by involving the ERK1/2 MAPK signalling pathway. *Eur J Cancer* 2011; 47: 1115-1124 [PMID: 21349701 DOI: 10.1016/j.ejca.2011.01.017]
 - 21 Bertino G, Arditi AM, Calvagno GS, Bertino N, Boemi PM. Prognostic and diagnostic value of des- γ -carboxy prothrombin in liver cancer. *Drug News Perspect* 2010; 23: 498-508 [PMID: 21031166 DOI: 10.1358/dnp.2010.23.8.1444236]
 - 22 Chon YE, Choi GH, Lee MH, Kim SU, Kim do Y, Ahn SH, Kim KS, Choi JS, Han KH, Chon CY, Park JY. Combined measurement of preoperative α -fetoprotein and des- γ -carboxy prothrombin predicts recurrence after curative resection in patients with hepatitis-B-related hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 2012; 131: 2332-2341 [PMID: 22362471 DOI: 10.1002/ijc.27507]
 - 23 Kim HS, Park JW, Jang JS, Kim HJ, Shin WG, Kim KH, Lee JH, Kim HY, Jang MK. Prognostic values of alpha-fetoprotein and protein induced by vitamin K absence or antagonist-II in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma: a prospective study. *J Clin Gastroenterol* 2009; 43: 482-488 [PMID: 19197197 DOI: 10.1097/MCG.0b013e318182015a]
 - 24 Bae HM, Lee JH, Yoon JH, Kim YJ, Heo DS, Lee HS. Protein induced by vitamin K absence or antagonist-II production is a strong predictive marker for extrahepatic metastases in early hepatocellular carcinoma: a prospective evaluation. *BMC Cancer* 2011; 11: 435 [PMID: 21985636 DOI: 10.1186/1471-2407-11-435]
 - 25 Yamashita Y, Tsujita E, Takeishi K, Fujiwara M, Kira S, Mori M, Aishima S, Taketomi A, Shirabe K, Ishida T, Maehara Y. Predictors for microinvasion of small hepatocellular carcinoma ≤ 2 cm. *Ann Surg Oncol* 2012; 19: 2027-2034 [PMID: 22203184 DOI: 10.1245/s10434-011-2195-0]
 - 26 Ueshima K, Kudo M, Takita M, Nagai T, Tatsumi C, Ueda T, Kitai S, Ishikawa E, Yada N, Inoue T, Hagiwara S, Minami Y, Chung H, Sakurai T. Des- γ -carboxyprothrombin may be a promising biomarker to determine the therapeutic efficacy of sorafenib for hepatocellular carcinoma. *Dig Dis* 2011; 29: 321-325 [PMID: 21829024 DOI: 10.1159/000327570]
 - 27 Bertino G, Arditi A, Malaguarnera M, Malaguarnera G, Bertino N, Calvagno GS. Hepatocellular carcinoma serum markers. *Semin Oncol* 2012; 39: 410-433 [PMID: 22846859 DOI: 10.1053/j.seminoncol.2012.05.001]
 - 28 Marrero JA, Feng Z, Wang Y, Nguyen MH, Befeler AS, Roberts LR, Reddy KR, Harnois D, Llovet JM, Normolle D, Dalhgren J, Chia D, Lok AS, Wagner PD, Srivastava S, Schwartz M. Alpha-fetoprotein, des-gamma carboxyprothrombin, and lectin-bound alpha-fetoprotein in early hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2009; 137: 110-118 [PMID: 19362088 DOI: 10.1053/j.gastro.2009.04.005]
 - 29 Sterling RK, Jeffers L, Gordon F, Venook AP, Reddy KR, Satomura S, Kanke F, Schwartz ME, Sherman M. Utility of Lens culinaris agglutinin-reactive fraction of alpha-fetoprotein and des-gamma-carboxy prothrombin, alone or in combination, as biomarkers for hepatocellular carcinoma. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2009; 7: 104-113 [PMID: 18849011 DOI: 10.1016/j.cgh.2008.08.041]
 - 30 Clinical Practice Guidelines for Hepatocellular Carcinoma - The Japan Society of Hepatology 2009 update. *Hepatol Res* 2010; 40 Suppl 1: 2-144 [PMID: 20586808 DOI: 10.1111/j.1872-034X.2010.00650.x]
 - 31 Belle M, Brebant R, Guinet R, Leclercq M. Production of a new monoclonal antibody specific to human des-gamma-carboxyprothrombin in the presence of calcium ions. Application to the development of a sensitive ELISA-test. *J Immunoassay* 1995; 16: 213-229 [PMID: 7629279 DOI: 10.1080/15321819508013559]

编辑 郭鹏 电编 鲁亚静



辛伐他汀保护小鼠急性肝衰竭肝损伤

雷延昌, 罗盼, 李雯

■背景资料

内毒素血症和微循环障碍所继发的肝损伤在肝衰竭发病中十分重要。辛伐他汀改善败血症血管炎症反应和微循环障碍, 对肝移植后缺血再灌注损伤具有保护作用。然而, 辛伐他汀对肝衰竭的保护作用尚不清楚。

雷延昌, 罗盼, 李雯, 南昌大学附属感染病医院 江西省南昌市 330006

雷延昌, 主任医师, 主要从事病毒性肝炎肝衰竭的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 81160065

作者贡献分布: 课题设计由雷延昌主持; 研究过程由罗盼与李雯实施; 论文写作由雷延昌完成。

通讯作者: 雷延昌, 主任医师, 330006, 江西省南昌市洪都中大道167号, 南昌大学附属感染病医院。yclleihust@sina.com

电话: 0791-88499615

收稿日期: 2013-11-17 修回日期: 2013-11-28

接受日期: 2013-11-30 在线出版日期: 2013-12-18

Administration of simvastatin protects against acute live failure in mice

Yang-Chang Lei, Pan Luo, Wen Li

Yang-Chang Lei, Pan Luo, Wen Li, Infectious Diseases Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 81160065

Correspondence to: Yan-Chang Lei, Chief Physician, Infectious Diseases Hospital, Nanchang University, 167 Hongdu Middle Road, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China. yclleihust@sina.com

Received: 2013-11-17 Revised: 2013-11-28

Accepted: 2013-11-30 Published online: 2013-12-18

Abstract

AIM: To explore the effects of simvastatin on acute live failure in mice and the underlying mechanism.

METHODS: D-galactosamine (D-GaIN) and lipopolysaccharide (LPS) were used to induce acute liver failure in BALB/c mice. Male mice (6-8 wk) were randomly assigned to three groups ($n = 18$), a normal group, an acute liver failure group and a simvastatin treatment group. Kaplan-meier method was used for survival analysis. Serum ALT levels at different time point (6, 12, 24, 48 h) and hepatic superoxide level at 24 h were measured by biochemical methods. Hepatic morphological changes at 24 h were assessed by HE staining and hepatocyte HMGB1 cytoplasmic translocation was detected by immunohistochemistry. Serum levels of HMGB1, IL-1 β , TNF- α , IL-6 and IL-10 were detected by

ELISA. Expression of eNOS, P-eNOS and LC3 II in liver tissues was analyzed by Western blot.

RESULTS: The survival rate at one week was significantly higher in the simvastatin treatment group than in the acute liver failure group (83.3% vs 33.3%, $P < 0.01$). Simvastatin treatment significantly decreased ALT levels at 6, 12, 24, and 48 h compared with the acute liver failure group (all $P < 0.01$). Serum levels of HMGB1 at 6 and 12 h and IL-1 β at 12 h were also decreased significantly in the simvastatin group (all $P < 0.01$), and the inflammation or necrosis and hepatocyte HMGB1 cytoplasmic translocation in liver tissues were decreased in the simvastatin group. In simvastatin-treated mice, eNOS, P-eNOS and LC3 II expression in liver tissue was increased compared to the acute liver failure group. However, hepatic superoxide level at 24 h was decreased in the simvastatin group.

CONCLUSION: Simvastatin protects against acute live failure possibly by improving endothelial dysfunction, oxide stress and hepatocyte autophagy in mice.

© 2013 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

Key Words: Simvastatin; Endothelial dysfunction; Autophagy; Acute liver failure

Lei YC, Luo P, Li W. Administration of simvastatin protects against acute live failure in mice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(35): 3940-3946 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/3940.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i35.3940>

摘要

目的: 了解辛伐他汀对急性肝衰竭肝损伤的保护作用及其机制。

方法: D-氨基半乳糖(D galactosamine, D-GaIN)和细菌脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)腹腔注射建立小鼠急性肝衰竭模型。♂ 6-8周龄Balb/c随机分为正常组、肝衰竭对照组和辛伐他汀组, 每组18只。Kaplan-Meier法

■同行评议者

朴云峰, 教授, 吉林大学第一临床医院消化科; 宣世英, 教授, 青岛市立医院肝病内科

分析小鼠生存率, 生化检测6、12、24和48 h血清丙氨酸转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)和24 h肝脏超氧化物水平. HE染色分析24 h肝脏形态学变化, 免疫组织化学分析12 h肝脏高迁移率族蛋白1(high mobility group box-1 protein, HMGB1)表达. ELISA检测血清HMGB1、白介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β 、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、IL-6和IL-10水平, 免疫印迹分析内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)、磷酸化内皮型一氧化氮合酶(P-eNOS)和LC3 II表达.

结果: 辛伐他汀组1 wk生存率为83.3%显著高于肝衰竭对照组的33.3%($P<0.01$); 6、12、24和48 h血清ALT水平显著低于急性肝衰竭组($P<0.01$). 辛伐他汀组6和12 h的HMGB1水平以及24 h的IL-1 β 水平显著低于肝衰竭对照组($P<0.01$), 肝脏炎症坏死和HMGB1胞浆移位较对照明显减轻. 辛伐他汀增加急性肝衰竭动物肝脏eNOS、P-eNOS和LC3 II表达水平, 降低肝组织超氧化物水平.

结论: 辛伐他汀对急性肝衰竭具有保护作用, 其机制与改善内皮细胞功能障碍、氧化应激和促进肝细胞自噬有关.

© 2013年版权归归世登出版集团有限公司所有.

关键词: 辛伐他汀; 内皮细胞功能障碍; 自噬; 急性肝衰竭

核心提示: 辛伐他汀改善肝脏内皮细胞功能障碍、氧化应激和促进肝细胞自噬保护急性肝衰竭肝损伤.

雷延昌, 罗盼, 李雯. 辛伐他汀保护小鼠急性肝衰竭肝损伤. 世界华人消化杂志 2013; 21(35): 3940–3946 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/3940.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v21.i35.3940>

0 引言

革兰氏阴性菌脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)抑制肝窦内皮细胞NO产生, 增加肝脏血管阻力和降低乙酰胆碱的舒血管效应导致内皮细胞功能障碍^[1-3]. 最近研究发现, 辛伐他汀抑制LPS诱导的肝脏内皮细胞功能障碍, 保护内毒素血症引起的肝损伤^[4]. 慢性肝病和肝硬化内毒素血症导致肝窦内皮细胞功能障碍, 尤其在肝硬化肠道细菌移位时加重^[5-9], 辛伐他汀改善肝硬化门脉

高压患者肝窦内皮细胞功能障碍^[10-12]. 此外, 他汀类药物改善败血症血管炎症反应和微循环障碍^[13,14]. 最近研究发现, 辛伐他汀保护肝移植后缺血再灌注损伤, 在供体肝脏冷藏液中加入辛伐他汀可以维持肝脏血管内皮细胞KLF2表达发挥血管保护作用, 抑制肝损伤、炎症反应和氧化应激, 从而改善内皮细胞功能障碍^[15].

目前认为, 内毒素血症和微循环障碍导致的继发性肝损伤在肝衰竭的发生发展过程中发挥重要作用^[16]. 病毒、药物、酒精等直接或免疫损伤致肝细胞坏死和局部炎症反应, 炎症反应导致微循环障碍造成缺血缺氧进一步加重肝细胞死亡, 促进内毒素血症的发生, 最终加速肝细胞死亡和肝衰竭的发生和进展. 基于辛伐他汀保护内毒素血症和缺血再灌注引起的肝损伤, 改善微循环障碍和肝硬化肝窦内皮细胞功能障碍, 推测辛伐他汀具有改善微循环障碍对急性肝衰竭具有保护作用. 为验证上述假说进行本研究.

1 材料和方法

1.1 材料 δ 6-8周龄Balb/c小鼠, 体质量20 g \pm 0.5 g, 由南昌大学医学院动物实验中心提供(动物质量合格证编号2013091206), 动物饲养和处理严格按照美国国立卫生研究院实验动物饲养和使用指南. 主要试剂: 细菌脂多糖(Sigma公司, 美国), D-氨基半乳糖(Sigma公司, 美国); 辛伐他汀标准品购自中国药品生物制品检定所. 高迁移率族蛋白1(high mobility group box-1 protein, HMGB1)和白介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、IL-6和IL-10试剂盒(NEB公司, 美国), 超氧化物检测试剂盒(碧云天, 中国). 兔抗鼠HMGB1(ABGENT公司, 美国); 兔抗鼠LC3 II(Cell signaling公司, 美国); 兔抗鼠eNOS 和P-eNOS(Abcam公司, 英国).

1.2 方法

1.2.1 动物模型及分组: Balb/c小鼠 δ 实验前12 h禁食, 不禁水. 动物随机分为3组: 正常组、急性肝衰竭组和辛伐他汀组, 每组18只. 急性肝衰竭组给予D-GaIN(600 mg/kg)和LPS(10 μ g/kg)腹腔注射, 辛伐他汀治疗组在腹腔注射D-GaIN/LPS前3 d每日给予辛伐他汀(25 mg/kg)灌胃, 正常组和急性肝衰竭对照组在相应时间点等量PBS灌胃.

1.2.2 标本收集: 腹腔注射D-GaIN/LPS后6、12、24、48 h对存活动物眼眶采血分离血清置于-80 $^{\circ}$ C保存. 分别于12和24 h处死部分动物, 肝

■ 研发前沿

改善内毒素血症和微循环障碍减轻肝衰竭肝细胞炎症坏死, 糖皮质激素和目前的保肝抗炎药物可减轻炎症反应, 但糖皮质激素的不良反应和保护肝药物治疗肝衰竭的效果有限, 探索改善内毒素血症和微循环障碍的方法十分必要.

■ 相关报道

辛伐他汀保护内毒素血症和缺血再灌注引起的肝损伤,改善微循环障碍和肝硬化肝窦内皮细胞功能障碍,其机制是通过抑制炎症反应、氧化应激、改善微循环障碍和促进肝细胞自噬等。

表 1 辛伐他汀对急性衰竭小鼠血清谷丙转氨酶(U/L)水平的影响 (mean \pm SD, $n = 18$)

分组	6 h	12 h	24 h	48 h
正常组	60.00 \pm 14.25	60.67 \pm 9.14	57.17 \pm 9.47	58.07 \pm 10.57
辛伐他汀组	761.31 \pm 194.16 ^d	2355.86 \pm 1118.28 ^d	890.39 \pm 409.42 ^d	474.06 \pm 323.56 ^d
肝衰竭组	736.62 \pm 421.54 ^{bd}	7612.86 \pm 1979.75 ^{bd}	3741.43 \pm 1937.35 ^{bd}	204.95 \pm 45.29 ^{bd}

^b $P < 0.01$ vs 辛伐他汀治疗组; ^d $P < 0.01$ vs 正常组。

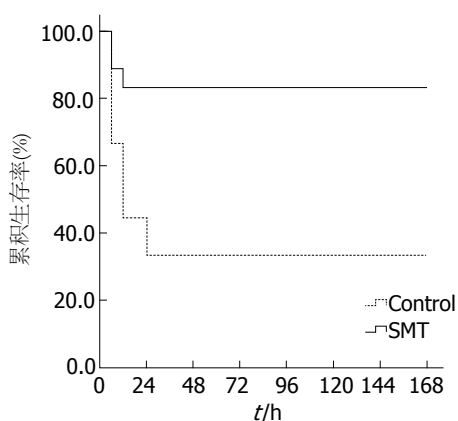


图 1 辛伐他汀治疗组和D-GalN/LPS急性肝衰竭对照组小鼠1 wk生存曲线。Balb/c小鼠腹腔注射D-GalN/LPS(600 mg/kg, 10 μ g/kg)诱导急性肝衰竭,腹腔注射前3 d, 1次/d给予辛伐他汀(25 mg/kg)灌胃。Kaplan-Meier生存率分析, $P < 0.01$ (Log rank test, $F = 8.661$, $P = 0.003$)。SMT: 辛伐他汀; Control: 急性肝衰竭对照组。

组织用40 g/L中性甲醛固定,进行免疫组织化学检测HMGB1表达和肝脏病理分析。

1.2.3 血清生化和细胞因子检测:全自动生化分析仪检测ALT,血清HMGB1和IL-1 β 、TNF- α 、IL-6和IL-10和超氧化物检测按照生产厂家说明书进行,根据标准品获得标准曲线计算结果。

1.2.4 免疫印迹及其分析:免疫印迹及其分析:取0.5 g肝组织研磨后加入1 mL含蛋白酶抑制剂混合物的双蒸水混匀-80 $^{\circ}$ C保存,取10 μ L样品加入90 μ L RIPA高效裂解液(碧云天,中国)充分裂解,6000 g离心30 s,加入50 μ L上样缓冲液,聚丙烯酰胺凝胶电泳后转移至硝酸纤维素膜上,10%的BSA在4 $^{\circ}$ C封闭过夜,一抗37 $^{\circ}$ C孵育2 h,1:10000辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG抗体37 $^{\circ}$ C孵育0.5 h,化学发光法检测结果,Quantity one分析软件进行灰度分析。

统计学处理 所有数据用SPSS18.0软件作统计学分析,数据资料以mean \pm SD表示,生存率比较采用Log-rank检验,重复测量设计资料分析采用方差分析,两组间比较应用独立样本 t 检验,两

个样本率的比较用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 辛伐他汀治疗提高D-GalN/LPS急性肝衰竭小鼠生存率和降低血清ALT水平 Kaplan-Meier生存分析显示, D-GalN/LPS腹腔注射小鼠1 wk生存率为33.3%,显著低于MSC-CM治疗组的83.3%($P < 0.01$,图1)。生化检测小鼠血清ALT水平可了解肝细胞损伤的程度,急性肝衰竭小鼠血清ALT在6 h开始升高,12 h达峰值,24 h维持在较高水平,48 h逐渐恢复。辛伐他汀治疗组6、12和24 h血清ALT水平显著低于急性肝衰竭组($P < 0.01$,表1)。

2.2 辛伐他汀降低急性肝衰竭小鼠IL-1 β 和HMGB1水平,对TNF- α 、IL-6和抗炎因子IL-10水平没有影响 在本研究中, D-GalN/LPS诱导急性肝衰竭小鼠血清12 h的ALT水平达峰值。前期研究显示,小鼠血清TNF- α 、IL-1 β 、IL-6和抗炎因子IL-10的峰值水平也出现在12 h。为了解辛伐他汀对急性肝衰竭炎症因子和抗炎因子水平的影响,ELISA检测结果显示,辛伐他汀治疗组TNF- α 、IL-6和抗炎因子IL-10与对照组无显著差异,而IL-1 β 显著低于对照组($P < 0.01$,图2A)。近年来发现HMGB1在急性肝衰竭炎症反应中发挥重要作用,研究者前期发现D-GalN/LPS诱导急性肝衰竭小鼠血清HMGB1在6 h已开始升高,12 h达高峰,24 h开始下降,48 h接近正常水平。为了解MSC-CM治疗对肝衰竭HMGB1的影响,比较6、12和24 h血清HMGB1水平,结果显示辛伐他汀治疗组在6和12 h的HMGB1水平显著低于肝衰竭对照组($P < 0.01$,图2B)。

2.3 辛伐他汀治疗减轻肝衰竭小鼠肝组织炎症坏死和HMGB1肝细胞移位 急性肝衰竭对照组肝细胞大片状坏死,坏死区大量炎症细胞浸润(图3C),肝脏 HMGB1不仅在胞核表达,大量肝

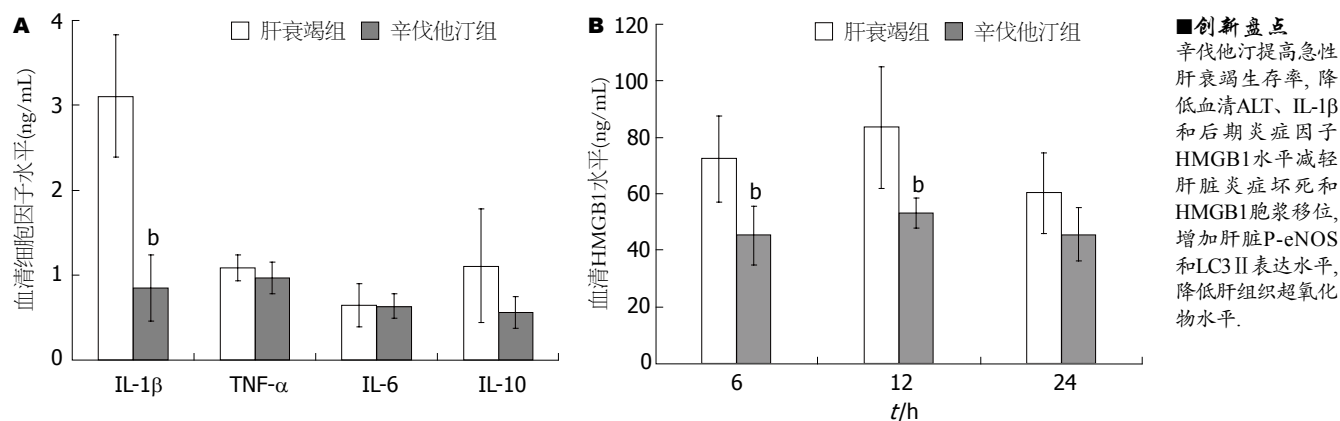


图2 辛伐他汀对肝衰竭小鼠血清炎症因子和抗炎因子水平的影响. 辛伐他汀治疗组($n = 18$)和肝衰竭组($n = 18$)血清细胞因子水平. A: 血清细胞因子水平, 辛伐他汀治疗组12 h的TNF- α 、IL-6和抗炎因子IL-10水平与肝衰竭组无差异, 两组IL-1 β 水平差异有显著性, $^bP < 0.01$ vs 肝衰竭组; B: 血清HMGB1水平, 辛伐他汀治疗组12和24 h血清HMGB1水平显著低于肝衰竭组, $^bP < 0.01$ vs 肝衰竭组, 而血清6 h的HMGB1水平无差异. IL: 白介素; TNF: 肿瘤坏死因子.

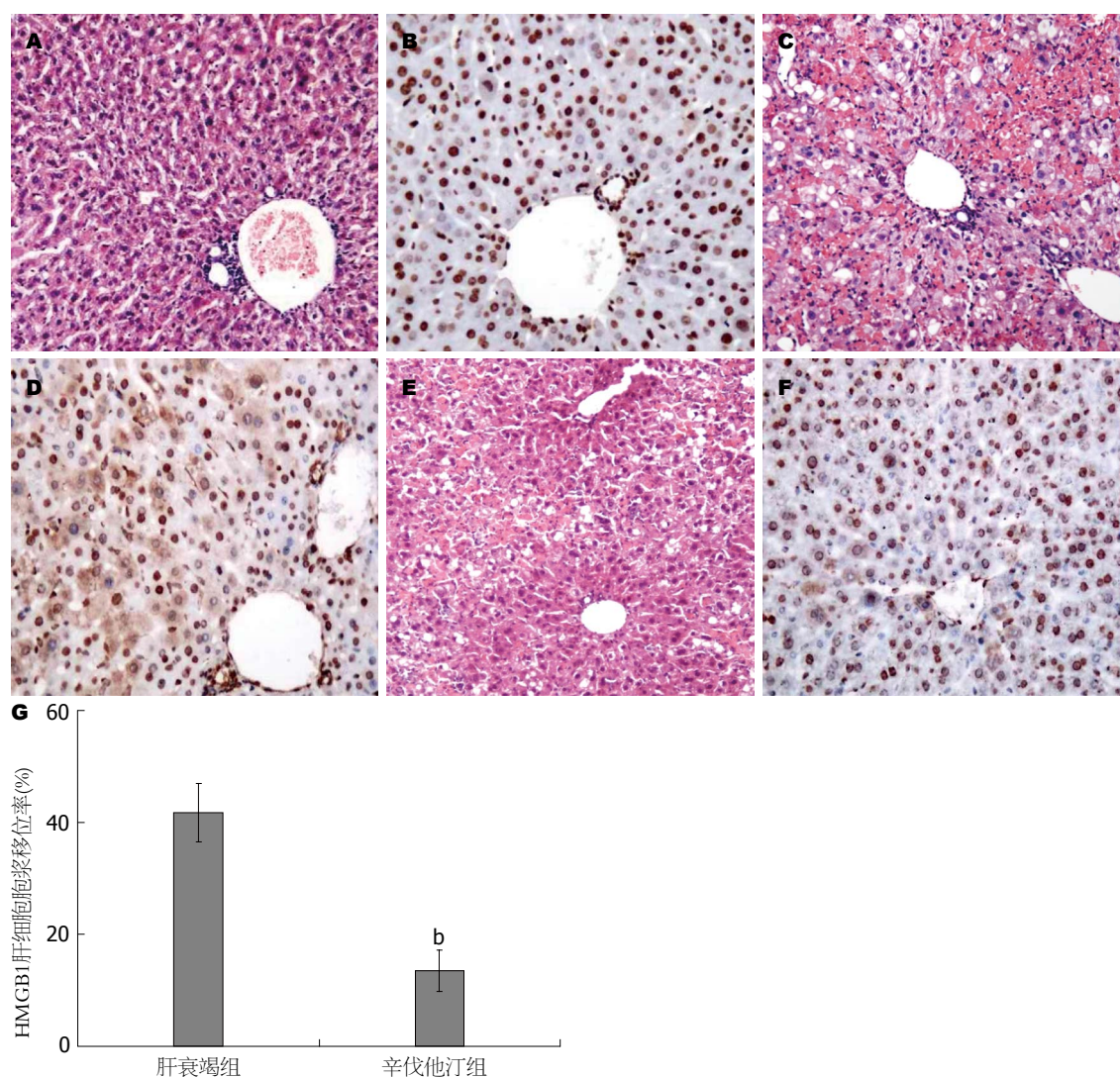


图3 辛伐他汀减轻肝衰竭小鼠肝组织炎症坏死($\times 200$). A: 正常小鼠肝组织HE染色; B: 正常小鼠肝脏细胞HMGB1表达在胞核; C: 急性肝衰竭组小鼠肝细胞片状坏死, 坏死区大量炎症细胞浸润; D: 急性肝衰竭组小鼠大量肝细胞胞浆表达HMGB1, 发生HMGB1胞浆移位; E: 辛伐他汀治疗组仅出现局灶性肝细胞坏死; F: 辛伐他汀治疗组仅发生少量HMGB1胞浆移位; G: 肝细胞HMGB1胞浆移位率. 辛伐他汀治疗组肝细胞HMGB1胞浆移位率显著低于肝衰竭组, $^bP < 0.01$ vs 肝衰竭组.

■应用要点

本研究显示辛伐他汀保护急性肝衰竭肝损伤,近年来发现,辛伐他汀与核苷类抗病毒药物联合增加抗病毒效应,辛伐他汀治疗慢性乙型肝炎肝衰竭值得进一步研究。

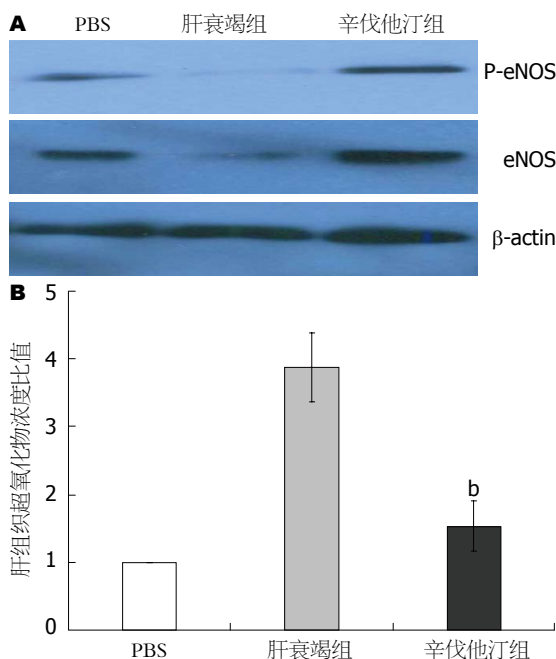


图4 辛伐他汀对内皮细胞氧化亚氮合成酶和肝脏过氧化物水平的影响。A: 免疫印迹检测不同处理组肝脏eNOS和P-eNOS表达; B: 各处理组肝脏过氧化物水平。^b $P < 0.01$, $t = 9.1$ vs 肝衰竭组。eNOS: 内皮型一氧化氮合酶; P-eNOS: 磷酸化内皮型一氧化氮合酶。

细胞胞浆有明显表达(图3D)。辛伐他汀治疗组肝小叶结构基本完整,局灶肝细胞嗜酸性变,无炎症细胞浸, HMGB1胞浆表达肝细胞较少(图3E, 3F)。图像分析对照组HMGB1肝细胞移位率显著高于辛伐他汀治疗组($P < 0.01$, 图3G)。

2.4 辛伐他汀增加内皮细胞氧化亚氮合成酶和降低肝脏过氧化物水平 为了解辛伐他汀对急性肝衰竭肝脏微循环障碍和氧化应激的影响,免疫印迹检测肝脏eNOS和P-eNOS水平显示,急性肝衰竭小鼠肝脏eNOS和P-eNOS较PBS对照组明显降低,辛伐他汀治疗增加其表达水平(图4A)。测定各处理组肝组织过氧化物水平显示,辛伐他汀治疗组肝组织超氧化物浓度比值显著低于肝衰竭对照组($P < 0.01$, 图4B)。

2.5 辛伐他汀促进急性肝衰竭小鼠肝细胞自噬 近年来的研究显示,诱导自噬保护多种诱因的急性肝细胞损伤。为了解辛伐他汀的肝脏保护作用与肝细胞自噬有关,免疫印迹检测不同治疗组肝脏LC3 II表达显示,辛伐他汀组肝脏LC3 II表达较急性肝衰竭组高(图5)。表明辛伐他汀促进急性肝衰竭肝细胞自噬。

3 讨论

D-GalN/LPS腹腔注射是目前比较成熟的小鼠急性肝衰竭模型,较好的模拟肝衰竭发病机制。⚡

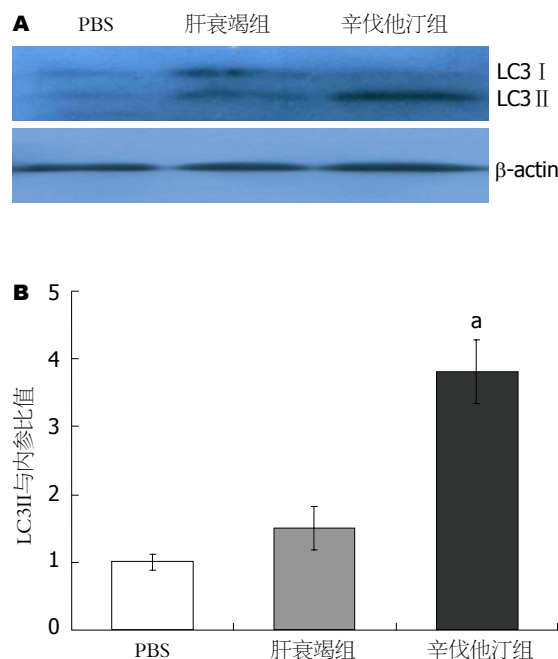


图5 辛伐他汀促进急性肝衰竭肝细胞自噬。A: 免疫印迹检测肝脏LC3 II表达; B: 以PBS组为1.0比较不同处理组肝脏LC3 II表达,辛伐他汀治疗组LC3 II表达较肝衰竭组增高,^a $P < 0.05$, $t = 3.11$ vs 肝衰竭组。

Balb/c小鼠腹腔注射D-GalN/LPS 1 wk生存率为33.3%,动物死亡发生在给药后12-24 h,与作者之前的研究一致^[17,18]。辛伐他汀治疗组小鼠1 wk生存率为83.3%显著高于肝衰竭对照组的33.3%。急性肝衰竭小鼠血清ALT水平在6 h开始升高,12 h达高峰,24 h开始下降并逐渐恢复正常,与国外的研究和作者近来的研究结果一致^[17,19,20]。辛伐他汀治疗组显著降低血清ALT水平和肝脏炎症减轻,显示其保护急性肝衰竭肝损伤保护作用。

内毒素血症和肝脏微循环障碍所继发的肝损伤在肝衰竭的发生发展过程中具有重要作用目前已得到共识^[16]。肝衰竭内毒素血症发生率可高达90%-100%,内毒素血症产生的LPS刺激巨噬细胞或枯否细胞释放大量炎症因子加重肝损伤。氯化钆部分清除肝脏枯否细胞,显著降低D-GalN/LPS诱导小鼠急性肝损伤,提高生存率^[21]。近年来发现,后期炎症因子HMGB1在急性肝衰竭发生和疾病的严重程度密切相关^[12],急性肝衰竭发生肝细胞HMGB1胞浆移位^[22]。HMGB1可通过LPS刺激巨噬细胞和血管内皮细胞等主动释放,亦可由坏死肝细胞被动释放^[23-26],HMGB1促进TNF- α 、IL-1 β 、IL-6和IL-8释放和外周单核细胞趋化因子释放,募集更多炎症细胞加剧炎症反应和组织损伤。本研究显示,与急性肝衰

竭对照组比较, 辛伐他汀组血清12 h的HMGB1和IL-1 β 水平显著降低, 而TNF- α 、IL-1 β 、IL-6以及抗炎因子IL-10的水平无差异。然而, 辛伐他汀治疗组肝脏炎症坏死和肝细胞HMGB1胞浆移位显著减轻。由于HMGB1既可通过巨噬细胞LPS刺激产生, 又可通过坏死肝细胞被动释放, 提示辛伐他汀对LPS刺激巨噬细胞或枯否细胞炎症因子释放的影响较小, 不是其保护肝衰竭肝细胞损伤的主要机制。

肝衰竭继发性肝损伤的另外一个重要因素是肝脏微循环障碍, 肝脏炎症反应导致微循环障碍, 造成了缺血缺氧性损伤, 缺血缺氧直接导致肝细胞死亡, 肝细胞大量死亡, 肝脏解毒能力降低、肠道屏障功能障碍、免疫抑制等, 促进内毒素血症的发生, 内毒素血症加速了肝细胞的死亡^[16]。

败血症和肝硬化内毒素血症导致肝窦内皮细胞功能障碍, LPS抑制肝窦内皮细胞NO产生, 增加肝脏血管阻力^[1-4]。近年来的研究发现, 辛伐他汀改善败血症和肝硬化门脉高压患者肝窦内皮细胞功能障碍, 减轻肝损伤^[4,10-12]。最近发现, 辛伐他汀保护肝移植缺血再灌注损伤, 其作用是通过改善内皮细胞功能障碍, 抑制炎症反应和氧化应激减少肝损伤^[15]。本研究发现辛伐他汀增加急性肝衰竭动物肝脏eNOS和P-eNOS, 降低肝组织超氧化物水平。肝脏eNOS和P-eNOS主要由肝脏血管内皮细胞产生, 因此, 辛伐他汀增加血管内皮细胞eNOS和P-eNOS表达, NO水平增加改善急性肝衰竭微循环障碍, 同时降低氧化应激反应, 保护微循环障碍继发性肝细胞损伤。

最近研究显示, 细胞自噬可以选择性清除损伤的线粒体, 保护线粒体损伤诱导的细胞死亡。促进肝细胞自噬可以保护对乙酰氨基酚、D-GalN/LPS以及酒精对小鼠的肝细胞毒性, 抑制肝细胞自噬增加TNF- α 和D-GalN诱导的肝细胞凋亡及损伤^[27-29]。虽然LPS可以促进肝细胞自噬, 但D-GalN抑制LPS诱导的肝细胞自噬^[29]。本研究发现辛伐他汀增加急性肝衰竭小鼠肝脏LC3B II表达水平, 促进肝细胞自噬, 是保护肝损伤的机制之一。

本研究显示辛伐他汀提高急性肝衰竭小鼠生存率, 降低血清ALT水平, 改善肝脏炎症坏死和HMGB1肝细胞胞浆移位, 增加急性肝衰竭动物肝脏eNOS、P-eNOS和LC3B II表达水平, 降低肝组织超氧化物水平, 但对LPS刺激巨噬细胞或枯否细胞炎症因子释放的影响较小。因此, 辛

伐他汀对急性肝衰竭具有保护作用与改善内皮细胞功能障碍、氧化应激和促进肝细胞自噬有关。该结果为辛伐他汀保护肝衰竭肝细胞损伤提供了新的理论基础, 具有重要的理论和应用价值。此外, 辛伐他汀与核苷类抗乙型肝炎病毒药物联合增加其病毒抑制作用^[30]。因我国肝衰竭大部分是慢性乙型肝炎引起效应, 应用辛伐他汀治疗慢性乙型肝炎肝衰竭值得进一步研究。

4 参考文献

- Bauer M, Bauer I, Sonin NV, Kresge N, Baveja R, Yokoyama Y, Harding D, Zhang JX, Clemens MG. Functional significance of endothelin B receptors in mediating sinusoidal and extrasinusoidal effects of endothelins in the intact rat liver. *Hepatology* 2000; 31: 937-947 [PMID: 10733551]
- Yokoyama Y, Baveja R, Kresge N, Sonin N, Nakaniishi K, Zhang JX, Gitzelmann CA, Clemens MG. Endothelin receptor remodeling induces the portal venous hyper-response to endothelin-1 following endotoxin pretreatment. *Shock* 2002; 17: 36-40 [PMID: 11795667]
- Kamoun WS, Karaa A, Kresge N, Merkel SM, Korneszcuk K, Clemens MG. LPS inhibits endothelin-1-induced endothelial NOS activation in hepatic sinusoidal cells through a negative feedback involving caveolin-1. *Hepatology* 2006; 43: 182-190 [PMID: 16374854]
- La Mura V, Pasarín M, Meireles CZ, Miquel R, Rodríguez-Vilarrupla A, Hide D, Gracia-Sancho J, García-Pagán JC, Bosch J, Abraldes JG. Effects of simvastatin administration on rodents with lipopolysaccharide-induced liver microvascular dysfunction. *Hepatology* 2013; 57: 1172-1181 [PMID: 23184571 DOI: 10.1002/hep.26127]
- Shah V, Toruner M, Haddad F, Cadelina G, Papapetropoulos A, Choo K, Sessa WC, Groszmann RJ. Impaired endothelial nitric oxide synthase activity associated with enhanced caveolin binding in experimental cirrhosis in the rat. *Gastroenterology* 1999; 117: 1222-1228 [PMID: 10535886]
- Bosch J, Abraldes JG, Fernández M, García-Pagán JC. Hepatic endothelial dysfunction and abnormal angiogenesis: new targets in the treatment of portal hypertension. *J Hepatol* 2010; 53: 558-567 [PMID: 20561700 DOI: 10.1016/j.jhep.2010.03.021]
- La Mura V, Reverter JC, Flores-Arroyo A, Raffa S, Reverter E, Seijo S, Abraldes JG, Bosch J, García-Pagán JC. Von Willebrand factor levels predict clinical outcome in patients with cirrhosis and portal hypertension. *Gut* 2011; 60: 1133-1138 [PMID: 21427197 DOI: 10.1136/gut.2010.235689]
- Iwakiri Y, Groszmann RJ. Vascular endothelial dysfunction in cirrhosis. *J Hepatol* 2007; 46: 927-934 [PMID: 17391799]
- Bellot P, García-Pagán JC, Francés R, Abraldes JG, Navasa M, Pérez-Mateo M, Such J, Bosch J. Bacterial DNA translocation is associated with systemic circulatory abnormalities and intrahepatic endothelial dysfunction in patients with cirrhosis. *Hepatology* 2010; 52: 2044-2052 [PMID: 20979050 DOI: 10.1002/hep.23918]
- Zafra C, Abraldes JG, Turnes J, Berzigotti A,

■同行评价

本文为辛伐他汀保护肝衰竭肝细胞损伤提供了新的理论基础, 具有重要的理论和应用价值。

- Fernández M, Garca-Pagán JC, Rodés J, Bosch J. Simvastatin enhances hepatic nitric oxide production and decreases the hepatic vascular tone in patients with cirrhosis. *Gastroenterology* 2004; 126: 749-755 [PMID: 14988829]
- 11 Abiralde JG, Rodríguez-Vilarrupla A, Graupera M, Zafra C, García-Calderó H, García-Pagán JC, Bosch J. Simvastatin treatment improves liver sinusoidal endothelial dysfunction in CCl4 cirrhotic rats. *J Hepatol* 2007; 46: 1040-1046 [PMID: 17335931]
 - 12 Abiralde JG, Albillos A, Bañares R, Turnes J, González R, García-Pagán JC, Bosch J. Simvastatin lowers portal pressure in patients with cirrhosis and portal hypertension: a randomized controlled trial. *Gastroenterology* 2009; 136: 1651-1658 [PMID: 19208350 DOI: 10.1053/j.gastro.2009.01.043]
 - 13 Terblanche M, Almog Y, Rosenson RS, Smith TS, Hackam DG. Statins and sepsis: multiple modifications at multiple levels. *Lancet Infect Dis* 2007; 7: 358-368 [PMID: 17448939]
 - 14 Janda S, Young A, Fitzgerald JM, Etminan M, Swiston J. The effect of statins on mortality from severe infections and sepsis: a systematic review and meta-analysis. *J Crit Care* 2010; 25: 656.e7-656.e22 [PMID: 20413251 DOI: 10.1016/j.jcrc.2010.02.013]
 - 15 Marrone G, Russo L, Rosado E, Hide D, García-Cardena G, García-Pagán JC, Bosch J, Gracia-Sancho J. The transcription factor KLF2 mediates hepatic endothelial protection and paracrine endothelial-stellate cell deactivation induced by statins. *J Hepatol* 2013; 58: 98-103 [PMID: 22989565 DOI: 10.1016/j.jhep.2012.08.026]
 - 16 叶一农, 高志良. 乙型肝炎肝衰竭发生机制中的三重打击. *中华肝病杂志* 2009; 21: 638-640
 - 17 雷延昌, 梁青, 罗盼, 肖影群. 骨髓间充质干细胞分泌因子抑制急性肝衰竭肝细胞HMGB1的胞浆移位. *世界华人消化杂志* 2013; 21: 2009-2015
 - 18 易珍, 孙水林, 刘翠云, 雷延昌. 同种异体骨髓间充质干细胞对急性肝衰竭HMGB1的影响. *世界华人消化杂志* 2012; 20: 1396-1401
 - 19 van Poll D, Parekkadan B, Cho CH, Berthiaume F, Nahmias Y, Tilles AW, Yarmush ML. Mesenchymal stem cell-derived molecules directly modulate hepatocellular death and regeneration in vitro and in vivo. *Hepatology* 2008; 47: 1634-1643 [PMID: 18395843 DOI: 10.1002/hep.22236]
 - 20 Parekkadan B, van Poll D, Suganuma K, Carter EA, Berthiaume F, Tilles AW, Yarmush ML. Mesenchymal stem cell-derived molecules reverse fulminant hepatic failure. *PLoS One* 2007; 2: e941 [PMID: 17895982]
 - 21 Zhang M, Xu S, Han Y, Cao X. Apoptotic cells attenuate fulminant hepatitis by priming Kupffer cells to produce interleukin-10 through membrane-bound TGF- β . *Hepatology* 2011; 53: 306-316 [PMID: 21140375 DOI: 10.1002/hep.24029]
 - 22 Zhou RR, Zhao SS, Zou MX, Zhang P, Zhang BX, Dai XH, Li N, Liu HB, Wang H, Fan XG. HMGB1 cytoplasmic translocation in patients with acute liver failure. *BMC Gastroenterol* 2011; 11: 21 [PMID: 21406085 DOI: 10.1186/1471-230X-11-21]
 - 23 Tsung A, Sahai R, Tanaka H, Nakao A, Fink MP, Lotze MT, Yang H, Li J, Tracey KJ, Geller DA, Billiar TR. The nuclear factor HMGB1 mediates hepatic injury after murine liver ischemia-reperfusion. *J Exp Med* 2005; 201: 1135-1143 [PMID: 15795240]
 - 24 Wang H, Bloom O, Zhang M, Vishnubhakat JM, Ombrellino M, Che J, Frazier A, Yang H, Ivanova S, Borovikova L, Manogue KR, Faist E, Abraham E, Andersson J, Andersson U, Molina PE, Abumrad NN, Sama A, Tracey KJ. HMGB-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science* 1999; 285: 248-251 [PMID: 10398600]
 - 25 Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* 2002; 418: 191-195 [PMID: 12110890]
 - 26 Bonaldi T, Talamo F, Scaffidi P, Ferrera D, Porto A, Bachi A, Rubartelli A, Agresti A, Bianchi ME. Monocytic cells hyperacetylate chromatin protein HMGB1 to redirect it towards secretion. *EMBO J* 2003; 22: 5551-5560 [PMID: 14532127]
 - 27 Lin CW, Zhang H, Li M, Xiong X, Chen X, Chen X, Dong XC, Yin XM. Pharmacological promotion of autophagy alleviates steatosis and injury in alcoholic and non-alcoholic fatty liver conditions in mice. *J Hepatol* 2013; 58: 993-999 [PMID: 23339953 DOI: 10.1016/j.jhep.2013.01.011]
 - 28 Ni HM, Bockus A, Boggess N, Jaeschke H, Ding WX. Activation of autophagy protects against acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Hepatology* 2012; 55: 222-232 [PMID: 21932416 DOI: 10.1002/hep.24690]
 - 29 Amir M, Zhao E, Fontana L, Rosenberg H, Tanaka K, Gao G, Czaja MJ. Inhibition of hepatocyte autophagy increases tumor necrosis factor-dependent liver injury by promoting caspase-8 activation. *Cell Death Differ* 2013; 20: 878-887 [PMID: 23519075 DOI: 10.1038/cdd.2013.21]
 - 30 Bader T, Korba B. Simvastatin potentiates the anti-hepatitis B virus activity of FDA-approved nucleoside analogue inhibitors in vitro. *Antiviral Res* 2010; 86: 241-245 [PMID: 20211652 DOI: 10.1016/j.antiviral.2010.02.325]

编辑 田滢 电编 鲁亚静



大黄治疗重症急性胰腺炎肠动力衰竭的机制

薛育政, 吴燕敏, 盛颖玥, 陆宇峰, 吴铁龙, 刘宗良, 俞宪民, 李兆申

薛育政, 吴燕敏, 盛颖玥, 陆宇峰, 吴铁龙, 刘宗良, 俞宪民, 李兆申, 中国人民解放军第二军医大学附属长海医院消化内科 上海市 200433

薛育政, 副主任医师, 主要从事消化系统疾病基础与临床研究。江苏省“333工程”科研基金资助项目, No. CAE01101-06 江苏省中医药局中医药科技基金资助项目, No. LZ11127 无锡市社会发展基金资助项目, No. CSZ00N1110

作者贡献分布: 薛育政与吴燕敏对此文所作贡献均等; 此课题由薛育政、吴燕敏、盛颖玥、刘宗良、俞宪民及李兆申设计; 研究过程由吴燕敏、盛颖玥、陆宇峰及吴铁龙操作完成; 研究所用试剂与分析工具由薛育政与吴燕敏提供; 数据分析由薛育政与吴燕敏完成; 本论文写作由薛育政与吴燕敏完成。

通讯作者: 薛育政, 副主任医师, 214041, 江苏省无锡市兴源北路585号, 无锡市第三人民医院消化内科。xueyz001@163.com 电话: 0510-81195152

收稿日期: 2013-09-02 修回日期: 2013-11-01

接受日期: 2013-11-19 在线出版日期: 2013-12-18

Effect of Da-Huang on intestinal motility failure in rats with severe acute pancreatitis

Yu-Zheng Xue, Yan-Min Wu, Ying-Yue Sheng, Yu-Feng Lu, Tie-Long Wu, Zong-Liang Liu, Xian-Ming Yu, Zhao-Shen Li

Yu-Zheng Xue, Yan-Min Wu, Ying-Yue Sheng, Yu-Feng Lu, Tie-Long Wu, Zong-Liang Liu, Xian-Ming Yu, Department of Gastroenterology, the Third People's Hospital of Wuxi, Wuxi 214041, Jiangsu Province, China Zhao-Shen Li, Department of Gastroenterology, Changhai Hospital of Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

Supported by: the “333 Project” Research Project of Jiangsu Province, No. CAE01101-06; the Jiangsu Chinese Medicine Scientific Research Project, No. LZ11127; and the Social Development Project of Wuxi City, No. CNZ00N1110

Correspondence to: Yu-Zheng Xue, Associate Chief Physician, Department of Gastroenterology, the Third People's Hospital of Wuxi, 585 Xingyuan North Road, Wuxi 214041, Jiangsu Province, China. xueyz001@163.com

Received: 2013-09-02 Revised: 2013-11-01

Accepted: 2013-11-19 Published online: 2013-12-18

Abstract

AIM: To investigate the effect of Da-Huang on intestinal motility failure in rats with severe acute pancreatitis (SAP) and the potential mechanism involved.

METHODS: Fifty-four SD rats were randomly

divided into a sham operation (SO) group, a SAP group and a Da-Huang treatment group, with 18 rats in each group. Gastrointestinal motility disturbance in rats with SAP was induced by retrograde injection of sodium taurocholate (0.1 mL/100 g) into the biliary pancreatic duct. Before modeling, the rats in the treatment group received 10% Da-Huang solution (2 mL/100 g), and the rats in other two groups received 0.9% NaCl solution. The rats were sacrificed at 3, 6 and 12 hours (6 rats at each time), and blood samples were taken for detecting the levels of amylase, lipase and the contents of 5-hydroxytryptamine (5-HT) by enzyme-linked immunosorbent assay. The jejunum, terminal ileum and sigmoid colon tissues 10 cm apart from the trans-ligament were collected at 6 h for examining the expressions of 5-HT₁ receptor (5-HT₁R) and 5-HT₂ receptor (5-HT₂R).

RESULTS: The levels of serum amylase, lipase and 5-HT at three time points in the SAP group (amylase: 9807 IU/L \pm 698 IU/L, 15442 IU/L \pm 952 IU/L, 18231 IU/L \pm 869 IU/L; lipase: 94 IU/L \pm 23 IU/L, 257 IU/L \pm 99 IU/L, 306 IU/L \pm 107 IU/L; 5-HT: 1192 ng/mL \pm 142 ng/mL, 1437 ng/mL \pm 114 ng/mL, 1646 ng/mL \pm 163 ng/mL) and treatment group (amylase: 2238 IU/L \pm 298 IU/L, 2313 IU/L \pm 302 IU/L, 2289 IU/L \pm 323 IU/L; lipase: 62 IU/L \pm 16 IU/L, 71 IU/L \pm 17 IU/L, 69 IU/L \pm 15 IU/L; 5-HT: 794 ng/mL \pm 86 ng/mL, 814 ng/mL \pm 83 ng/mL, 798 ng/mL \pm 81 ng/mL) were significantly higher than those in the SO group (amylase: 1853 IU/L \pm 272 IU/L, 1959 IU/L \pm 269 IU/L, 1897 IU/L \pm 293 IU/L; lipase: 46 IU/L \pm 9 IU/L, 54 IU/L \pm 11, 52 IU/L \pm 14 IU/L; 5-HT: 699 ng/mL \pm 64 ng/mL, 721 ng/mL \pm 76 ng/mL, 705 ng/mL \pm 72 ng/mL)(all $P < 0.01$), but they were lower in the treatment group than in the SAP group at each time point (all $P < 0.01$). The expression of 5-HT₁R and 5-HT₂R proteins was significantly decreased in the jejunum, terminal ileum and sigmoid colon in the SAP group compared with the SO group (all $P < 0.05$). The areas of 5-HT₁R and 5-HT₂R positive cells in the jejunum, terminal ileum and sigmoid colon in the SAP group (5-HT₁R posi-

■背景资料

重症急性胰腺炎 (severe acute pancreatitis, SAP) 具有病情重、并发症多、病死率高等特点, 肠动力衰竭是其最常见的并发症之一, 临床研究发现, 有效恢复SAP患者肠动力, 可显著降低并发症的发生率及死亡率, 提高抢救成功率及治愈率。

■同行评议者

刘改芳, 主任医师, 河北医科大学第三医院消化内科

■ 研发前沿

5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)广泛分布于人体胃肠道, 是体内最重要的胃肠动力调节剂之一, 故5-HT及其受体在SAP肠动力衰竭中的变化值得关注。

tive cells: $4.58 \times 10^4 \mu\text{m}^2 \pm 0.56 \times 10^4 \mu\text{m}^2$, $4.64 \times 10^4 \mu\text{m}^2 \pm 0.63 \times 10^4 \mu\text{m}^2$, $4.79 \times 10^4 \mu\text{m}^2 \pm 0.56 \times 10^4 \mu\text{m}^2$, 5-HT₂R positive cells: $4.89 \times 10^4 \mu\text{m}^2 \pm 0.61 \times 10^4 \mu\text{m}^2$, $4.76 \times 10^4 \mu\text{m}^2 \pm 0.51 \times 10^4 \mu\text{m}^2$, $5.03 \times 10^4 \mu\text{m}^2 \pm 0.73 \times 10^4 \mu\text{m}^2$) were significantly decreased compared with the SO group (5-HT₁R positive cells: $5.63 \times 10^4 \mu\text{m}^2 \pm 0.82 \times 10^4 \mu\text{m}^2$, $5.94 \times 10^4 \mu\text{m}^2 \pm 0.91 \times 10^4 \mu\text{m}^2$, $6.37 \times 10^4 \mu\text{m}^2 \pm 0.87 \times 10^4 \mu\text{m}^2$, 5-HT₂R positive cells: $6.02 \times 10^4 \mu\text{m}^2 \pm 0.78 \times 10^4 \mu\text{m}^2$, $5.98 \times 10^4 \mu\text{m}^2 \pm 0.66 \times 10^4 \mu\text{m}^2$, $6.49 \times 10^4 \mu\text{m}^2 \pm 0.85 \times 10^4 \mu\text{m}^2$). The expression of 5-HT₁R protein and the areas of 5-HT₁R positive cells in the jejunum, terminal ileum and sigmoid colon in the treatment group ($5.57 \times 10^4 \mu\text{m}^2 \pm 0.83 \times 10^4 \mu\text{m}^2$, $5.82 \times 10^4 \mu\text{m}^2 \pm 0.74 \times 10^4 \mu\text{m}^2$, $6.02 \times 10^4 \mu\text{m}^2 \pm 0.81 \times 10^4 \mu\text{m}^2$), but not the areas of 5-HT₂R positive cells ($4.94 \times 10^4 \mu\text{m}^2 \pm 0.59 \times 10^4 \mu\text{m}^2$, $4.81 \times 10^4 \mu\text{m}^2 \pm 0.63 \times 10^4 \mu\text{m}^2$, $5.16 \times 10^4 \mu\text{m}^2 \pm 0.79 \times 10^4 \mu\text{m}^2$), were increased in comparison with SAP group (all $P < 0.05$).

CONCLUSION: The level of 5-HT is significantly increased in SAP, but its receptors (5-HT₁R and 5-HT₂R) are decreased, which may induce intestinal motility failure. Da-Huang may improve enteric dynamic failure by activating 5-HT₁R or increasing the expression of 5-HT₁R, and may be a choice for treatment of SAP with intestinal motility failure.

© 2013 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

Key Words: Severe acute pancreatitis; 5-hydroxytryptamine; Intestinal motility failure; Dahuang

Xue YZ, Wu YM, Sheng YY, Lu YF, Wu TL, Liu ZL, Yu XM, Li ZS. Effect of Da-Huang on intestinal motility failure in rats with severe acute pancreatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(35): 3947-3953 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/3947.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i35.3947>

摘要

目的: 探讨大黄治疗大鼠重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)肠动力衰竭的可能机制。

方法: 将54只♂SD大鼠随机分为假手术组(SO组)、重症急性胰腺炎肠动力衰竭组(SAP组)和大黄治疗组, 每组18只。经胆胰管内加压注射3.5%牛磺胆酸钠0.1 mL/100 g体质量制备SAP肠动力衰竭模型, 治疗组在造模前给予10%的大黄汤剂(2 mL/100 g体质量)灌胃1次, SAP组和SO组则灌注等量0.9%氯化钠溶

液。每组于造模后3、6、12 h各处死6只大鼠并立即心脏取血, 检测血清淀粉酶、脂肪酶水平, 酶联免疫吸附试验检测血清5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)含量。同时检测6 h时间点各组大鼠距屈氏韧带10 cm空肠、末端回肠及乙状结肠组织中5-HT₁R、5-HT₂R的表达情况。

结果: 造模后SAP组(淀粉酶分别为9807 U/L \pm 698 U/L、15442 U/L \pm 952 U/L、18231 U/L \pm 869 U/L, 脂肪酶分别为94 U/L \pm 23 U/L、257 U/L \pm 99 U/L、306 U/L \pm 107 U/L, 5-HT分别为1192 ng/mL \pm 142 ng/mL、1437 ng/mL \pm 114 ng/mL、1646 ng/mL \pm 163 ng/mL)和治疗组(淀粉酶分别为2238 U/L \pm 298 U/L、2313 U/L \pm 302 U/L、2289 U/L \pm 323 U/L, 脂肪酶分别为62 U/L \pm 16 U/L、71 U/L \pm 17 U/L、69 U/L \pm 15 U/L, 5-HT分别为794 ng/mL \pm 86 ng/mL、814 ng/mL \pm 83 ng/mL、798 ng/mL \pm 81 ng/mL)血清淀粉酶、脂肪酶及5-HT水平均明显高于SO组(淀粉酶分别为1853 U/L \pm 272 U/L、1959 U/L \pm 269 U/L、1897 U/L \pm 293 U/L, 脂肪酶分别为46 U/L \pm 9 U/L、54 U/L \pm 11 U/L、52 U/L \pm 14 U/L, 5-HT分别为699 ng/mL \pm 64 ng/mL、721 ng/mL \pm 76 ng/mL、705 ng/mL \pm 72 ng/mL)($P < 0.01$), 且每个时间点治疗组均较SAP组显著降低($P < 0.01$)。与SO组相比, SAP组5-HT₁R、5-HT₂R蛋白及阳性细胞面积(SAP组空肠、末端回肠及乙状结肠5-HT₁R⁺细胞面积分别为4.58万 $\mu\text{m}^2 \pm 0.56$ 万 μm^2 、4.64万 $\mu\text{m}^2 \pm 0.63$ 万 μm^2 、4.79万 $\mu\text{m}^2 \pm 0.56$ 万 μm^2 , 5-HT₂R⁺细胞面积分别为4.89万 $\mu\text{m}^2 \pm 0.61$ 万 μm^2 、4.76万 $\mu\text{m}^2 \pm 0.51$ 万 μm^2 、5.03万 $\mu\text{m}^2 \pm 0.73$ 万 μm^2 ; SO组空肠、末端回肠及乙状结肠5-HT₁R⁺细胞面积分别为5.63万 $\mu\text{m}^2 \pm 0.82$ 万 μm^2 、5.94万 $\mu\text{m}^2 \pm 0.91$ 万 μm^2 、6.37万 $\mu\text{m}^2 \pm 0.87$ 万 μm^2 , 5-HT₂R⁺细胞面积分别为6.02万 $\mu\text{m}^2 \pm 0.78$ 万 μm^2 、5.98万 $\mu\text{m}^2 \pm 0.66$ 万 μm^2 、6.49万 $\mu\text{m}^2 \pm 0.85$ 万 μm^2)表达水平在空肠、末端回肠及乙状结肠均明显下降($P < 0.05$); 与SAP组比较, 治疗组各部位5-HT₁R蛋白及阳性细胞面积(空肠、末端回肠及乙状结肠5-HT₁R⁺细胞面积分别为5.57万 $\mu\text{m}^2 \pm 0.83$ 万 μm^2 、5.82万 $\mu\text{m}^2 \pm 0.74$ 万 μm^2 、6.02万 $\mu\text{m}^2 \pm 0.81$ 万 μm^2)表达均增高($P < 0.05$), 而5-HT₂R蛋白及阳性细胞(5-HT₂R⁺细胞面积分别为4.94万 $\mu\text{m}^2 \pm 0.59$ 万 μm^2 、4.81万 $\mu\text{m}^2 \pm 0.63$ 万 μm^2 、5.16万 $\mu\text{m}^2 \pm 0.79$ 万 μm^2)表达则未见增加。

结论: 血清5-HT升高及肠组织中受体降低可

能是SAP发生肠动力衰竭的原因之一, 而大黄则可能是通过激活肠组织中5-HT₁R, 或增加5-HT₁R的表达量来促进肠功能恢复.

© 2013年版权归百世登出版集团有限公司所有.

关键词: 重症急性胰腺炎; 5-羟色胺; 肠动力衰竭; 大黄

核心提示: 重症急性胰腺炎大鼠肠动力衰竭时血清5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)水平明显增加, 但其受体5-HT₁、5-HT₂的表达明显下降, 从而导致5-HT与其受体亲和力降低, 这可能是SAP发生肠动力衰竭的机制之一, 而大黄可能是通过激活5-HT₁R, 或增加5-HT₁R的表达量来改善肠动力衰竭.

薛育政, 吴燕敏, 盛颖玥, 陆宇峰, 吴铁龙, 刘宗良, 俞宪民, 李兆申. 大黄治疗重症急性胰腺炎肠动力衰竭的机制. 世界华人消化杂志 2013; 21(35): 3947-3953 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/3947.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v21.i35.3947>

0 引言

5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT), 又名血清素(serotonin), 广泛分布于人体中, 约90%存在于胃肠道, 是体内最重要的胃肠动力调节剂之一. 近来研究显示, 人体中存在多种5-HT受体(5-HT₁R-5-HT₇R), 这些受体又各自可分成若干亚型^[1], 而与胃肠道功能密切相关的主要有5-HT₁R、5-HT₂R、5-HT₃R、5-HT₄R及5-HT₇R^[2-9].

重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)常见的并发症主要是胃肠动力衰竭, 但目前对5-HT及其受体在SAP胃肠动力衰竭中的变化及作用机制鲜有报道, 本研究采用牛磺胆酸钠制备SAP大鼠肠动力衰竭模型, 观察大黄对SAP大鼠肠动力衰竭模型的血清淀粉酶、脂肪酶及5-HT含量, 并检测相应肠段黏膜中5-HT₁R、5-HT₂R的表达情况, 以探讨大黄治疗SAP胃肠动力衰竭的可能机制.

1 材料和方法

1.1 材料 SPF级♂SD大鼠54只, 体质量200 g±20 g, 由南通大学医学院实验动物中心提供, 许可证号: SYXK(苏)2002-0022, 实验期间所有动物置于同一室内, 在没有特定病原菌的环境中分笼饲养, 自由饮水, 室温21℃±4℃, 光照12 h, 黑暗12 h. 随机分为假手术组(SO)、SAP组及大黄治疗组, 每组18只. 实验过程中所有大鼠均没

有出现意外死亡.

1.2 方法

1.2.1 SAP肠动力衰竭模型的制备: 根据文献[10]的方法制备SAP肠动力衰竭模型: 大鼠术前禁食12 h, 禁水6 h, 10%水合氯醛(300 mg/kg)腹腔注射麻醉, 正中切口入腹, 胆胰管十二指肠开口处用无损伤金属夹夹闭, 注射器针头向十二指肠开口方向插入胆胰管, 以0.1 mL/min速度向胆胰管内注入3.5%牛磺胆酸钠 (0.1 mL/100 g体质量, Sigma公司), 10 min后关腹. SO组大鼠开腹后仅翻动十二指肠并触摸胰腺数次后关腹. 大黄治疗组造模15 min前经胃管一次注入10%的大黄汤剂(2 mL/100 g体质量, 成都大西南制药有限公司), 而SO组和SAP组则给予等量0.9%氯化钠溶液.

1.2.2 生化指标的测定: SO组、SAP组及大黄治疗组分别于3、6、12 h时间点各处死6只大鼠, 立即心脏取血, 置入肝素钠管内, 4000 r/min离心15 min, 取上层血清, -80℃保存. 用全自动生化分析仪检测血清淀粉酶、脂肪酶水平, ELISA法测定血清5-HT含量.

1.2.3 小肠推进率的测定: 各组造模2.5 h后(即3 h时间点处死的大鼠)分别给予含有苯酚红2 mg/mL的生理盐水1.0 mL灌胃, 30 min后快速剖腹分别取出小肠. 剪下幽门下端至阑尾上端的肠管, 将其铺在纸上, 不加任何拖曳牵引, 测小肠全长和苯酚红前沿至幽门下端的距离. 苯酚红前沿如果显示不清楚, 可在疑似处剪开小肠, 然后滴加0.1 mol/L的NaOH溶液确认(显示鲜亮的玫红色), 并需在其前和后各1 cm处再次剪断滴加NaOH溶液, 加以验证, 以保证数据的准确性. 小肠推进率的计算公式为苯酚红推进的小肠长度/小肠全长×100%.

1.2.4 免疫印迹法检测肠黏膜中5-HT₁R、5-HT₂R蛋白表达情况: 分别取3组6 h时间点大鼠距屈氏韧带10 cm的空肠、末端回肠及乙状结肠组织, 量约50 mg, 常规提取总蛋白, BCA法测定样本组织中蛋白浓度, 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白, 湿法转膜, 脱脂奶粉封闭, 分别加入兔抗大鼠5-HT₁R、5-HT₂R多克隆抗体50 μL(1:400), 4℃过夜, 加入羊抗兔IgG-HRP 50 μL(1:500), 室温反应2 h, ECL显色, 上述实验以β-actin作为内参.

1.2.5 免疫组织化学法检测5-HT₁R⁺、5-HT₂R⁺细胞面积: 分别取3组6 h时间点大鼠距屈氏韧带10 cm的空肠、末端回肠及乙状结肠组织, 约5 mm×5 mm, 常规固定、包埋、切片, 脱蜡至水、抗

■相关报道

Bertoni等对5-HT₂A受体进行了研究, 假手术组给予了5-HT₂A激活剂发现可引起肠系膜缺血-再灌注损伤, 从而导致了胃肠道传输功能的延迟; 手术组给予了5-HT₂A抑制剂, 胃肠道传输功能未见延迟, 保护了胃肠道对肠系膜缺血-再灌注损伤应激效应.

■ 创新盘点

目前国内外对5-羟色胺及其受体在重症急性胰腺炎肠动力衰竭中的变化及作用机制鲜有报道,本研究采用牛磺胆酸钠制备重症急性胰腺炎大鼠肠动力衰竭模型,观察大黄对其肠黏膜中5-HT₁R、5-HT₂R的表达情况,以探讨大黄治疗重症急性胰腺炎肠动力衰竭的可能机制属国内首创。

表 1 各组大鼠血清淀粉酶、脂肪酶含量比较 ($n=6$, mean \pm SD, IU/L)

	淀粉酶			脂肪酶		
	3 h	6 h	12 h	3 h	6 h	12 h
SO组	1853 \pm 272	1959 \pm 269	1897 \pm 293	46 \pm 9	54 \pm 11	52 \pm 14
SAP组	9807 \pm 698 ^b	15442 \pm 952 ^b	18231 \pm 869 ^b	94 \pm 23 ^b	257 \pm 99 ^b	306 \pm 107 ^b
大黄治疗组	2238 \pm 298 ^d	2313 \pm 302 ^d	2289 \pm 323 ^d	62 \pm 16 ^d	71 \pm 17 ^d	69 \pm 15 ^d

^b $P<0.01$ vs SO组; ^d $P<0.01$ vs SAP组。SO组: 假手术组; SAP组: 重症急性胰腺炎肠动力衰竭组。

表 2 各组大鼠血清5-羟色胺含量比较 ($n=6$, mean \pm SD, ng/mL)

	5-羟色胺		
	3 h	6 h	12 h
SO组	699 \pm 64	721 \pm 76	705 \pm 72
SAP组	1192 \pm 142 ^b	1437 \pm 114 ^b	1646 \pm 163 ^b
大黄治疗组	794 \pm 86 ^d	814 \pm 83 ^d	798 \pm 81 ^d

^b $P<0.01$ vs SO组; ^d $P<0.01$ vs SAP组。SO组: 假手术组; SAP组: 重症急性胰腺炎肠动力衰竭组。

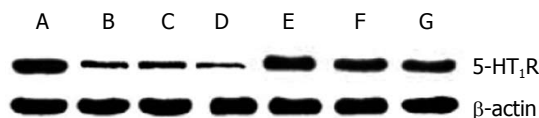


图 1 各组大鼠6 h点不同部位肠黏膜中5-HT₁R蛋白的表达。A: SO组; B: SAP组空肠; C: SAP组末端回肠; D: SAP组乙状结肠; E: 大黄治疗组空肠; F: 大黄治疗组末端回肠; G: 大黄治疗组乙状结肠。5-HT₁R: 5-羟色胺受体。

原修复, 分别加5-HT₁R、5-HT₂R一抗50 μ L(1:300), 37 $^{\circ}$ C孵育1 h后4 $^{\circ}$ C过夜, 加辣根过氧化物酶标记的二抗50 μ L, 室温孵育各20 min, DAB显色, 复染、脱水、封片。结果判断: 胞浆染色呈棕色者判定为阳性细胞。每张切片选择5个高倍镜视野(400 \times), 应用Leica RX250型图像分析系统进行定量灰度扫描, 以及Qwin软件分别进行分析, 并自动计算5-HT₁R⁺、5-HT₂R⁺细胞面积。

1.2.6 胰腺组织病理学诊断: 胰腺组织经HE染色后, 由两位专业的病理医师双盲阅片, 每组随机取3张切片, 每张切片随机选取10个高倍视野, 以水肿、感染、出血和坏死评价胰腺组织损伤的程度。

统计学处理 实验数据录入SPSS18.0统计软件包, 所有数据均以mean \pm SD表示, 组间以 t 检验进行统计学处理, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠血清淀粉酶及脂肪酶含量比较 与SO组比较, SAP组和大黄治疗组在造模后各时

间点血清淀粉酶明显升高, 其中SAP组与SO组比较差异有统计学意义($P<0.01$); 与SAP组比较, 大黄治疗组各时间点血清淀粉酶明显降低, 差异有统计学意义($P<0.01$); SAP组血清淀粉酶水平随观察时间的延长呈依赖性增加。各组大鼠血清脂肪酶变化与淀粉酶变化一致(表1)。

2.2 各组大鼠血清5-HT及IL-6含量比较 与SO组相比, SAP组、治疗组5-HT含量在造模后3、6、12 h明显升高, 其中SAP组与SO组比较差异有统计学意义($P<0.01$); 与SAP组比较, 大黄治疗组各时间点血清5-HT明显降低, 差异有统计学意义($P<0.01$); 且SAP组血清5-HT含量随观察时间的延长呈依赖性增加(表2)。

2.3 各组大鼠小肠推进率的比较 SAP组小肠推进率在3 h时间点为25.72% \pm 4.52%, 与SO组63.52% \pm 10.5%比较明显降低, 差异有统计学意义($P<0.01$); 治疗组小肠推进率在3 h时间点为61.45% \pm 9.11%, 与SAP组比较差异有统计学意义($P<0.01$), 而与SO组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.4 各组大鼠不同部位肠黏膜中5-HT₁R、5-HT₂R蛋白的表达 与SO组比较, SAP组于造模后6 h点5-HT₁R、5-HT₂R蛋白表达水平在空肠、末端回肠及乙状结肠处均明显减少; 与SAP组比较, 大黄治疗组上述部位5-HT₁R蛋白表达均增加, 但较SO组表达降低, 而5-HT₂R蛋白表达均未明显增加(图1)。

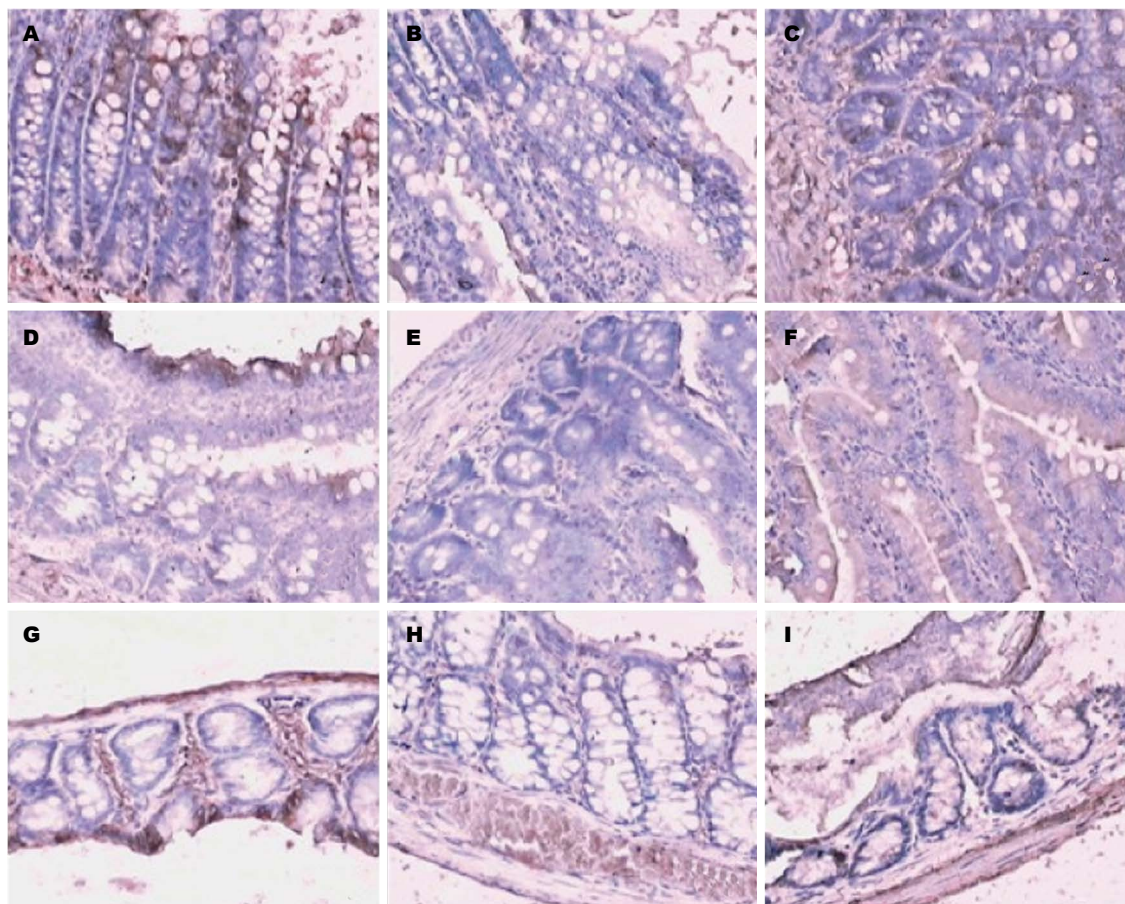
表 3 各组大鼠不同部位肠黏膜中5-HT₁R⁺及5-HT₂R⁺细胞面积比较 ($n=6$, mean \pm SD, $\times 10^4 \mu\text{m}^2$)

	5-HT ₁ R ⁺ 细胞面积			5-HT ₂ R ⁺ 细胞面积		
	空肠	末端回肠	乙状结肠	空肠	末端回肠	乙状结肠
SO组	5.63 \pm 0.82	5.94 \pm 0.91	6.37 \pm 0.87	6.02 \pm 0.78	5.98 \pm 0.66	6.49 \pm 0.85
SAP组	4.58 \pm 0.56 ^b	4.64 \pm 0.63 ^b	4.79 \pm 0.56 ^b	4.89 \pm 0.61 ^b	4.76 \pm 0.51 ^b	5.03 \pm 0.73 ^b
大黄治疗组	5.57 \pm 0.83 ^d	5.82 \pm 0.74 ^d	6.02 \pm 0.81 ^d	4.94 \pm 0.59	4.81 \pm 0.63	5.16 \pm 0.79

^b $P<0.01$ vs SO组; ^d $P<0.01$ vs SAP组.

■应用要点

中药大黄能有效改善重症急性胰腺炎患者肠动力衰竭, 且来源广泛、给药方便、价格便宜, 建议可将其作为重症急性胰腺炎肠动力衰竭的有效治疗方法。

图 2 各组大鼠不同部位肠黏膜中5-HT₁R⁺细胞面积. A: SO组空肠; B: SAP组空肠; C: 治疗组空肠; D: SO组末端回肠; E: SAP组末端回肠; F: 治疗组末端回肠; G: SO组乙状结肠; H: SAP组乙状结肠; I: 治疗组乙状结肠.

2.5 各组大鼠不同部位肠黏膜中5-HT₁R⁺、5-HT₂R⁺细胞面积 SAP组于造模后6 h点空肠、末端回肠及乙状结肠5-HT₁R⁺细胞面积分别与SO组比较明显减少, 差异有统计学意义(P 均 <0.05). 治疗组于造模后6 h点空肠、末端回肠及乙状结肠5-HT₁R⁺细胞面积分别与SAP组相同部位比较5-HT₁R⁺细胞面积明显增加, 差异有统计学意义(P 均 <0.05 , 图2, 表3). 与SO组比较, SAP组于造模后6 h点相同部位5-HT₂R⁺细胞面积明显减少, 差异有统计学意义(P 均 <0.05); 但治疗组上述部位5-HT₂R⁺细胞面积较SAP组比

较, 均未见明显增加(P 均 >0.05 , 表3).

2.6 SO组及SAP组大鼠胰腺组织病理学改变 SO组大鼠各时间点胰腺组织病理学改变基本相同, 可见胰腺部分间质水肿, 少量炎性细胞浸润, 偶可见点状出血, 极少量腺泡细胞坏死. SAP组大鼠胰腺组织病理学改变随着造模时间延长, 改变越明显: 造模后3 h可见明显的小叶间水肿, 散在片状出血, 较多炎性细胞浸润, 部分腺泡细胞变性坏死; 造模后6、12 h可见大量炎性细胞浸润, 片状出血显著, 胰腺小叶结构被破坏, 大量腺泡细胞坏死(图3). 结合本实验3 h时间点SAP

■同行评价

本文选题新颖、科学,方法正确,资料齐全,研究结果可靠,值得临床应用。

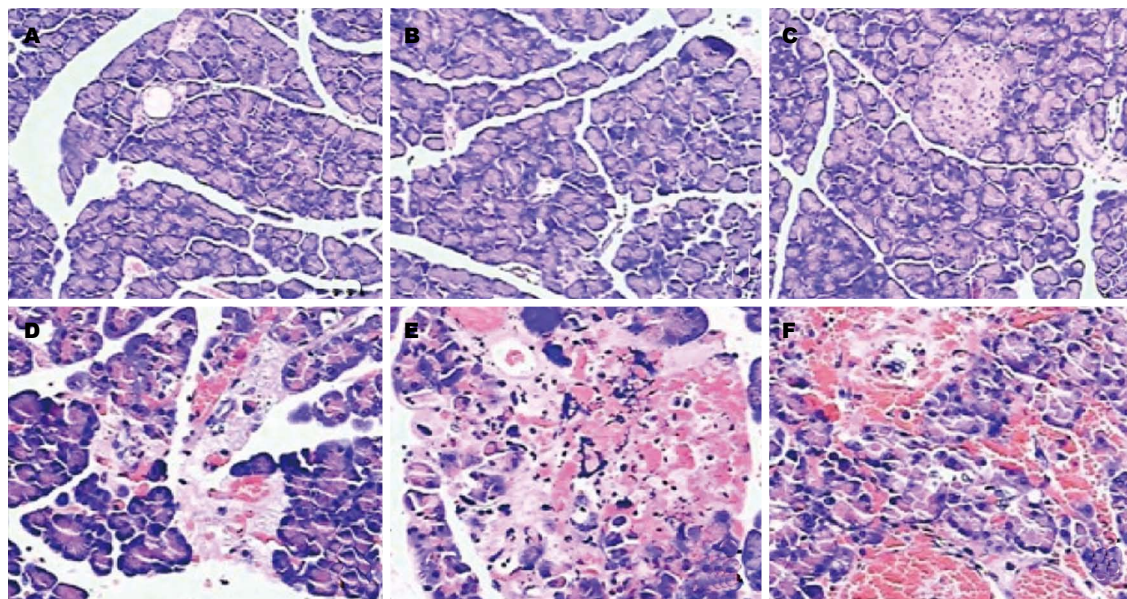


图3 两组大鼠胰腺组织病理学改变(HE染色 $\times 400$)。A: SO组胰腺组织3 h; B: SO组胰腺组织6 h; C: SO组胰腺组织12 h; D: SAP组胰腺组织3 h; E: SAP组胰腺组织6 h; F: SAP组胰腺组织12 h。

组小肠推进率与SO组比较明显降低,提示本研究采用牛磺胆酸钠制备SAP大鼠肠动力衰竭模型成功。

3 讨论

SAP具有病情重、并发症多等特点,病死率高达30%-50%^[11,12]。近年来,随着人们生活水平的提高,生活方式和饮食习惯的改变,SAP的发病率呈逐年增高的趋势^[13]。胃肠动力衰竭是SAP最常见的并发症之一,其可导致肠黏膜的屏障功能减弱甚至丧失、肠道内菌群及内毒素移位,进而引起肠源性感染甚至多脏器功能衰竭^[14],最终导致SAP患者死亡率增加。大量研究表明,SAP患者早期恢复胃肠动力,可显著降低其他并发症的发生率及死亡率,提高抢救成功率及治愈率。

传统医学认为SAP早期发病机制的中心环节在于气机不畅,腑气不通,气机升降失司,气滞血瘀,故通里攻下、活血化瘀是中医早期治疗该病的主要方法。大黄性寒味苦,具有攻积滞、清湿热、泻火、凉血、祛瘀、解毒等功效,是通里攻下的代表中药。有研究表明,大黄可通过以下两方面治疗急性胰腺炎:一是大黄对与急性胰腺炎直接有关的几种酶如胰蛋白酶、胰弹性蛋白酶、胰糜蛋白酶、胰激肽释放酶和胰脂肪酶具有明显的抑制作用^[15],本研究结果显示大黄治疗组与SAP组相比,血清淀粉酶及脂肪酶水平明显下降,与严鸣等^[16]研究结果基本一

致;本研究对血清5-HT含量进行了测定,结果显示:与SO组相比,SAP组、大黄治疗组5-HT含量在造模后各时间点均明显升高;而大黄治疗组各时间点血清5-HT含量较SAP组同时点均明显降低。另外,本研究还检测了各组大鼠距屈氏韧带10 cm的空肠、末端回肠及乙状结肠组织中5-HT₁R、5-HT₂R蛋白表达水平的变化及肠黏膜中5-HT₁R⁺、5-HT₂R⁺细胞面积的变化,结果表明,SAP组每个部位各时间点5-HT₁R、5-HT₂R蛋白、5-HT₁R⁺及5-HT₂R⁺细胞面积较SO组均显著下降,但血清中5-HT含量明显增加,由此推测,5-HT与其受体不能有效地结合可能是导致SAP肠动力衰竭的机制之一^[17]。与SAP组相比,大黄治疗组每个部位各时间点5-HT₁R及5-HT₁R⁺细胞面积显著增加,血清5-HT相同时间点含量显著下降,而5-HT₂R及5-HT₂R⁺细胞面积未见明显增加,此结果提示大黄有效恢复SAP大鼠肠动力的机制可能是:大黄自身作为5-HT₁R激动剂或其直接增加5-HT₁R的表达,从而有效恢复5-HT与5-HT₁R的亲和力,消耗血清5-HT,进而使SAP肠动力得以恢复。

总之,本研究表明SAP大鼠肠动力衰竭时血清5-HT水平明显增加,但其受体5-HT₁、5-HT₂的表达明显下降,从而导致5-HT与其受体亲和力降低,这可能是SAP发生肠动力衰竭的机制之一,而大黄可能是通过激活5-HT₁R,或增加5-HT₁R的表达量来改善肠动力衰竭。中药大黄来源广泛、给药方便、价格便宜,建议可将其

作为SAP肠动力衰竭的有效治疗方法.

4 参考文献

- 1 Hannon J, Hoyer D. Molecular biology of 5-HT receptors. *Behav Brain Res* 2008; 195: 198-213 [PMID: 18571247 DOI: 10.1016/j.bbr.2008.03.020]
- 2 Delesalle C, van Acker N, Claes P, Deprez P, de Smet I, Dewulf J, Lefebvre RA. Contractile effects of 5-hydroxytryptamine (5-HT) in the equine jejunum circular muscle: functional and immunohistochemical identification of a 5-HT1A-like receptor. *Equine Vet J* 2008; 40: 313-320 [PMID: 18267888 DOI: 10.2746/042516408X278193]
- 3 Moro E, Crema F, De Ponti F, Frigo G. Triptans and gastric accommodation: pharmacological and therapeutic aspects. *Dig Liver Dis* 2004; 36: 85-92 [PMID: 14971822 DOI: 10.1016/j.dld.2003.09.012]
- 4 Bertoni S, Ghizzardi P, Cattaruzza F, Ballabeni V, Impicciatore M, Tognolini M, Lagrasta CA, Barocelli E. Evidence for the involvement of 5-HT2A receptors in mild mesenteric ischemia/reperfusion dysfunctions in mice. *Pharmacol Res* 2007; 56: 550-555 [PMID: 18024056 DOI: 10.1016/j.phrs.2007.10.004]
- 5 Wouters MM, Gibbons SJ, Roeder JL, Distad M, Ou Y, Strege PR, Szurszewski JH, Farrugia G. Exogenous serotonin regulates proliferation of interstitial cells of Cajal in mouse jejunum through 5-HT2B receptors. *Gastroenterology* 2007; 133: 897-906 [PMID: 17854596 DOI: 10.1053/j.gastro.2007.06.017]
- 6 Chetty N, Irving HR, Coupar IM. Activation of 5-HT3 receptors in the rat and mouse intestinal tract: a comparative study. *Br J Pharmacol* 2006; 148: 1012-1021 [PMID: 16770318 DOI: 10.1038/sj.bjp.0706802]
- 7 朱晓蕾, 李运红, 徐肇敏, 陈隆典, 邹小平, 陈蕾蕾. 腹泻型肠易激综合征结肠黏膜5-HT3受体的研究. *南京医科大学学报(自然科学版)* 2006; 26: 563-566
- 8 Liu M, Geddis MS, Wen Y, Setlik W, Gershon MD. Expression and function of 5-HT4 receptors in the mouse enteric nervous system. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 289: G1148-G1163 [PMID: 16037544 DOI: 10.1152/ajpgi.00245.2005]
- 9 Gershon MD, Liu MT. Serotonin and neuroprotection in functional bowel disorders. *Neurogastroenterol Motil* 2007; 19 Suppl 2: 19-24 [PMID: 17620084 DOI: 10.1111/j.1365-2982.2007.00962.x]
- 10 Lankisch PG, Ihse I. Bile-induced acute experimental pancreatitis. *Scand J Gastroenterol* 1987; 22: 257-260 [PMID: 3589495 DOI: 10.3109/00365528709078588]
- 11 Frossard JL, Steer ML, Pastor CM. Acute pancreatitis. *Lancet* 2008; 371: 143-152 [PMID: 18191686 DOI: 10.1016/S0140-6736(08)60107-5]
- 12 Cappell MS. Acute pancreatitis: etiology, clinical presentation, diagnosis, and therapy. *Med Clin North Am* 2008; 92: 889-923, ix-x [PMID: 18570947 DOI: 10.1016/j.mcna.2008.04.013]
- 13 Swaroop VS, Chari ST, Clain JE. Severe acute pancreatitis. *JAMA* 2004; 291: 2865-2868 [PMID: 15199038 DOI: 10.1001/jama.291.23.2865]
- 14 刘晓臣, 彭燕. 肠屏障功能障碍与重症急性胰腺炎. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 3131-3135
- 15 陈晓理, 冉瑞图. 大黄治疗坏死性胰腺炎的机理探讨. *华西医科大学学报* 1996; 27: 418-421
- 16 严鸣, 杨兴易, 陈德昌, 许永华, 郭昌星. 大黄对重症急性胰腺炎并发急性呼吸窘迫综合征的治疗作用. *胃肠病学* 2001; 6: 94-96
- 17 薛育政, 吴燕敏, 盛颖玥, 余利华, 俞宪民, 林琳, 施瑞华, 李兆申. 5-羟色胺及其受体在大鼠重症急性胰腺炎肠动力障碍中的表达. *中华消化杂志* 2013; 33: 538-543

编辑 田滢 电编 鲁亚静



*hMLH1*甲基化、MSI与胃癌关系的研究进展

毛远天, 刘金禄, 王震, 陈业阳, 陈俊强

■背景资料

胃癌的形成是一个多基因参与、多步骤的复杂过程,其确切发病机制尚不清楚。*hMLH1*是一个重要的错配修复基因,对维持基因组的稳定具有重要作用。该基因发生甲基化可导致其表达减少或缺失,常表现为微卫星不稳定(microsatellite instability, MSI)。研究表明,*hMLH1*甲基化、MSI与胃癌的发生发展关系密切。因此,明确其在胃癌中的作用机制及其相互关系将为胃癌的诊疗提供新的方向。

毛远天, 刘金禄, 王震, 陈业阳, 陈俊强, 广西医科大学第一附属医院胃肠腺体外科 广西壮族自治区南宁市 530021
毛远天, 在读硕士, 主要从事胃肠肿瘤方面的研究。
国家自然科学基金资助项目, No. 81360370
广西自然科学基金资助项目, No. 2012GXNSFDA239001
广西医疗卫生重点科研课题基金资助项目, No. 重2012067
广西教育厅科研基金资助项目, No. 201012MS062
作者贡献分布: 本文综述由毛远天完成; 刘金禄、王震及陈业阳修改; 陈俊强审校。
通讯作者: 陈俊强, 教授, 主任医师, 530021, 广西壮族自治区南宁市青秀区双拥路22号, 广西医科大学第一附属医院胃肠腺体外科. gxmufh@163.com
电话: 0771-5351990
收稿日期: 2013-08-20 修回日期: 2013-09-17
接受日期: 2013-11-06 在线出版日期: 2013-12-18

Relationship between *hMLH1* methylation, microsatellite instability and gastric cancer

Yuan-Tian Mao, Jin-Lu Liu, Zhen Wang, Ye-Yang Chen, Jun-Qiang Chen

Yuan-Tian Mao, Jin-Lu Liu, Zhen Wang, Ye-Yang Chen, Jun-Qiang Chen, Department of Gastrointestinal Gland Surgery, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 81360370; the Natural Science Foundation of Guangxi, No. 2012GXNSFDA239001; the Key Research Project of Guangxi Health Bureau, No. 2012067; and the Research Project of Guangxi Education Department, No. 201012MS062
Correspondence to: Jun-Qiang Chen, Professor, Chief Physician, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, 22 Shuangyong Road, Qingxiu District, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. gxmufh@163.com
Received: 2013-08-20 Revised: 2013-09-17
Accepted: 2013-11-06 Published online: 2013-12-18

Abstract

Gastric cancer is one of the most common malignant tumors, and its development is a very complicated process. Although great progress has been made in the understanding of gastric cancer, its exact mechanism is still unclear. The human mutL homolog 1 (*hMLH1*), a main member of the mismatch repair system, participates in mismatch repair during DNA replication, and plays an important role in maintaining genome stability. The reduction or loss of *hMLH1*

expression, which often shows as microsatellite instability (MSI), is closely related to the development, treatment and prognosis of gastric cancer, and the main reason is *hMLH1* promoter methylation. In this paper, we will review the recent progress in understanding the relationship between *hMLH1* methylation, MSI and development, treatment and prognosis of gastric cancer.

© 2013 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

Key Words: *hMLH1* methylation; Microsatellite instability; Gastric cancer

Mao YT, Liu JL, Wang Z, Chen YY, Chen JQ. Relationship between *hMLH1* methylation, microsatellite instability and gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(35): 3954-3960 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/3954.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i35.3954>

摘要

胃癌是最常见的恶性肿瘤之一,其发生、发展是一个复杂的过程。虽然人们对胃癌的认识已经有了很大的进步,但其确切的发生机制尚不清楚。Human mutL homolog 1(*hMLH1*)是错配修复系统中的主要成员之一,在DNA复制时参与错配修复功能,对维持基因组的稳定具有重要作用。*hMLH1*表达的减少或缺失与胃癌的发生发展、治疗及预后密切相关,其主要原因是*hMLH1*发生甲基化,常表现为微卫星不稳定(microsatellite instability, MSI)。本文就*hMLH1*甲基化、MSI与胃癌的发生发展、治疗及预后关系的研究现状作一综述。

© 2013年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词: *hMLH1*甲基化; 微卫星不稳定; 胃癌

核心提示: *hMLH1*表达的减少或缺失可导致DNA错配修复功能降低,这与胃癌的发生发展、治疗及预后密切相关,其主要原因是*hMLH1*发生甲基化,常表现为微卫星不稳定。

毛远天, 刘金禄, 王震, 陈业阳, 陈俊强. *hMLH1*甲基化、MSI与胃

■同行评议者
王蔚虹, 教授, 主任医师, 北京大学第一医院消化内科

癌关系的研究进展. 世界华人消化杂志 2013; 21(35): 3954-3960
URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/3954.asp> DOI:
<http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v21.i35.3954>

0 引言

胃癌是最常见的恶性肿瘤之一, 在全球癌症死亡相关因素中, 胃癌排在第2位, 仅次于肺癌^[1]. 胃癌的发生发展过程复杂, 至少经过了6个发展阶段: 浅表性胃炎、慢性萎缩性胃炎、肠上皮化生、胃腺瘤、胃不典型增生和胃癌^[2], 他与许多遗传学和表观遗传学的改变有关, 如生长因子/受体、血管生成因子、细胞周期调节因子和DNA错配修复(mismatch repair, *MMR*)基因等多种因素的异常^[3]. *MMR*基因是一组保守基因, 具有修复DNA错配、维持基因组稳定和降低自发性突变的功能^[4,5]. DNA错配修复系统的功能降低或丧失, 主要表现为MSI^[6]. *hMLH1*基因是MMR系统中的重要成员之一, 该基因发生甲基化可导致其表达减少或缺失, 常表现为MSI. *hMLH1*甲基化、MSI与胃癌的发生发展、治疗及预后关系密切. 近几年来, 学者们对此有了一些新的认识, 也提出了一些新的问题, 现综述如下.

1 *hMLH1*、DNA甲基化和MSI简介

*hMLH1*基因是1994年在研究遗传性非息肉性结直肠癌的过程中由Bronner等^[7]首先发现的, 位于染色体3p21.3-23, 基因组全长约58 kb, 含19个外显子, 含2268 bp的开放阅读框(open reading frame, ORF), 编码一种由756个氨基酸残基组成的蛋白质, 与酵母的*hMLH1*蛋白有41%的同源性, 保守区同源性51%^[8,9].

DNA甲基化是常见的表观遗传学改变方式之一, 也是目前唯一已知的DNA天然修饰方式, 其发生过程主要是以S-腺苷蛋氨酸为甲基供体, 在DNA甲基转移酶(DNA methyltransferase, DNMT)的催化下, 将胞嘧啶(C)变为5-甲基胞嘧啶(5-mC), 而后者本身并不稳定, 能自发脱氨基形成胸腺嘧啶, 从而影响基因的正确表达. DNA甲基化主要发生在基因启动子或第一外显子处, 该处CpG二核苷酸的胞嘧啶高度聚集, 也称为CpG岛. 正常生理条件下绝大部分CpG岛处于非甲基化状态, 在肿瘤组织中则常处于过甲基化状态, 导致基因沉默而失活. 第一个DNA错配修复基因*hMLH1*和*hMSH2*甲基化于1999年在胃癌中得到确认^[10].

微卫星(microsatellite, MS)是广泛分布于原

核和真核生物基因组中具有高度多态性的简单短串联核苷酸的重复序列, 重复序列中的重复单位相同, 其重复单位在1-10 bp, 一般为2-6 bp重复. 微卫星DNA序列定位于基因的内含子、基因编码区、启动子、内含子与外显子的交界区, 通过改变DNA的结构或通过特异的蛋白结合而发挥基因调控作用, 是多态信息含量极高的分子标志. MSI首先在遗传性非息肉性大肠癌中发现^[11], 是指具有高度多态性的简单串联重复序列的改变, 多由于DNA错配修复系统改变, 无法修复DNA在复制过程中发生的错误引起. 产生MSI可能的机制是DNA复制过程中滑动或修复时滑动链与互补链碱基错配, 导致一个或几个重复单位的插入或缺失, 由于重复拷贝数发生大的变化而使某些重要功能的基因发生功能改变, 其中涉及到的重要基因是错配修复基因(如*hMLH1*、*hMSH2*、*hMSH6*等)^[12,13], 其准确机制尚有待进一步研究. 目前肿瘤组织MSI的诊断尚无统一标准, 参照1997年美国国立癌症研究所的标准, 推荐首选的5个MS位点, 即BAT25、BAT26、D5S346、D2S123和D17S250. 有2个或2个以上阳性位点为高度MSI(MSI-H), 如有1个阳性位点为低度MSI(MSI-L), 如无阳性位点为MS稳定(MSS).

2 *hMLH1*在胃癌中的表达

*hMLH1*作为主要的错配修复基因之一, 在DNA的复制过程中扮演着重要的错配修复功能, 其表达减少或缺失都会削弱DNA错配修复的能力. 在许多肿瘤中, 都出现*hMLH1*表达的减少或缺失. Baek等^[8]对胃癌的研究中发现, 在8%的MSI阳性腺瘤与88%的癌中可见*hMLH1*表达缺失或减少. 夏颀等^[14]研究表明, *hMLH1*基因在癌组织中的表达明显少于癌旁及胃炎组织, 而癌旁组织和胃炎的*hMLH1*表达差别没有统计学意义. 引起*hMLH1*表达减少的原因主要有2个: 基因突变和甲基化. 在胃癌中, DNA甲基化比基因突变更常见^[15], *hMLH1*发生甲基化是导致*hMLH1*表达失活的主要原因. 尽管许多研究表明肿瘤中*hMLH1*表达减少或缺失, 但另一些研究者却持完全相反的观点. Li等^[16]研究了191例胃癌组织、133例癌旁组织和42例非胃癌患者的正常胃黏膜组织, 发现其*hMLH1*表达分别为80.1%(153/191)、60.2%(80/133)和31.0%(13/42), 三者之间差别均有统计学意义, 癌组织*hMLH1*表达明显高于癌旁组织和非胃癌患者的正常胃

■研究前沿

*hMLH1*甲基化、MSI在胃癌中的研究目前主要集中在其与胃癌的发生发展及预后的关系、作用机制及胃癌中*hMLH1*发生甲基化的相关因素等方面, 而其在胃癌耐药方面的研究尚未见相关报道.

■相关报道

Alves等研究发现, *hMLH1* 甲基化与胃癌的类型、部位有关, 在肠型非贲门癌中发生率较高; 但其与胃癌患者的性别和肿瘤分期无关。该研究认为在贲门部弥漫型和非贲门部肠型胃癌中可能存在着两种截然不同的发生机制, 前者为CDKN2A 甲基化使其表达失活途径, 后者为*hMLH1* 甲基化致其表达失活途径。

黏膜组织。在其他一些恶性肿瘤如胶质母细胞瘤^[17]、支气管肺泡细胞癌^[18]、膀胱癌^[19]也发现了*hMLH1*或*hMSH2*表达增加。出现这种现象可能的机制是在正常生理状态下, *hMLH1*、*hPMS2* 基因处于低转录状态, 肿瘤细胞过度增殖时会伴有DNA碱基错配增多, 从而引起错配修复蛋白代偿性表达增多; 另一种可能的原因*hMLH1*、*hPMS2*基因可能存在突变产生不全蛋白, 导致错配基因不能被修复, 从而形成恶性循环, 导致*hMLH1*、*hPMS2*蛋白不断积累, 含量增加。

3 胃癌中*hMLH1*发生甲基化的相关因素

*hMLH1*发生甲基化与饮食、年龄、感染等诸多因素有关。印度克什米尔人群有饮热咸茶的习惯, 胃癌发生率较高, 有研究者对该地区胃癌患者做了相关研究, 发现31-60岁和61-90岁这两组胃癌患者与*hMLH1*、*E-cadherin*和*p16*异常甲基化都明显相关, 因此该研究者认为这3个基因异常甲基化与当地饮热咸茶的习惯有关, 这种茶能诱导基因异常甲基化, 从而使肿瘤抑制基因表达失活, 导致胃癌的发生^[20]。Wani等^[21]对该地区胃癌人群又做了进一步研究, 结果显示频繁摄入晒干蔬菜(>1次/wk)、热咸茶(>6杯/d, 250 mL/杯)和过少摄入新鲜水果(<4次/wk)*hMLH1*甲基化发生率明显高于对照组, 分别为81.82% vs 18.18%, 86.48% vs 13.51%和100% vs 0%, 这又进一步证实了饮食习惯与*hMLH1*甲基化存在密切关系, 说明*hMLH1*甲基化可能在一定程度上促进了胃癌的形成。许多肿瘤的发生与年龄相关, 随着年龄的增长, 机体内许多功能也随之发生改变。Kim等^[22]根据年龄把胃癌患者分为两组, 发现老年胃癌患者的*hMLH1*、*hMSH2*甲基化发生率(26%和24%)明显高于年轻胃癌患者(14%和15%), 提示年龄因素在*hMLH1*发生甲基化过程中起着重要的作用。Nakajima等^[23]也做了这方面的研究, 发现*hMLH1*异常表达和*hMLH1*甲基化的频率随着年龄的增长而增加, 81岁以上的胃癌患者*hMLH1*异常表达和*hMLH1*甲基化的频率分别为27.3%和18.2%, 而60岁以下的胃癌患者的发生频率分别为4.2%和0%, 这表明胃癌患者中*hMLH1*甲基化存在明显的年龄相关性。类似的现象在其他研究中也报道^[24-26]。幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)是被国际癌症机构确认的致癌原, 在胃癌的形成过程中发挥着重要作用^[27], 但是其致癌机制仍不明确。有报道称*H. pylori*可以通过环氧化物酶-2-前列腺素2途

径参与胃癌发生^[28], *K-ras*基因突变也可能是*H. pylori*致癌机制之一^[29]。*H. pylori*感染是否能促进DNA甲基化仍存在争议。有研究表明, DNA甲基化与*H. pylori*感染有关^[30-32], 而另一些研究者则持相反观点^[33-35]。为此, Alves等^[36]做了进一步的研究, 他们对*H. pylori*感染阳性的胃癌样本经过*H. pylori*基因分型后发现*H. pylori vacA s1*亚型与*hMLH1*甲基化明显相关, 而其他基因型则无此相关性。因此, *H. pylori*感染是否与*hMLH1*甲基化有关可能取决于*H. pylori*的基因型, 这在一定程度上可以解释这一问题存在的争议, 提示*hMLH1*甲基化也可能是*H. pylori*感染导致胃癌发生的机制之一。此外, EBV感染^[35]、吸烟^[21]等也可使DNA发生甲基化。

4 *hMLH1*甲基化、MSI与胃癌的临床病理关系

基因甲基化异常、基因突变和染色体异常都能使肿瘤相关基因永久失活。在胃癌中基因甲基化较后两者更为常见。有研究发现, 胃癌相关基因*MLF1*、*MGMT*、*p16*、*RASSF2*、*hMLH1*、*HAND1*、*HRASLS*、*TM*和*FLNc*等频繁发生甲基化, 发生率为8%-51%^[37-41]。Wani等^[21]研究表明, 胃癌组织的*hMLH1*甲基化发生率(72.9%)明显高于非胃癌组织(20%), 这说明*hMLH1*甲基化与胃癌的发生发展有关。进一步研究发现, *hMLH1*甲基化与胃癌的分化呈负相关^[41]。此外, Alves等^[36]发现*hMLH1*甲基化与胃癌的类型、部位有关, 在肠型非贲门部胃癌中发生率明显增高, 但与胃癌患者的性别和肿瘤分期无关。该研究认为在贲门部弥漫型和非贲门部肠型胃癌中可能存在着两种截然不同的发生机制, 前者为CDKN2A 甲基化使其表达失活途径, 后者为*hMLH1*甲基化致其表达失活途径。

*hMLH1*表达减少或缺失会发生MSI, 这与胃肠道等多种肿瘤的形成关系密切。有学者研究发现MSI在胃癌中的发生率为15%-20%, 其可能的机制为*hMLH1*甲基化^[42,43]。更进一步的研究表明, *hMLH1*甲基化与MSI分型有关, 在MSI-H型胃癌中有较高的发生率^[44,45]。因此, 有学者认为, 在基因型和表型中是否有MSI-H可能是相同肿瘤具有不同生物学特征和临床特性的原因之一^[6]。针对MSI-H型胃癌, Seo等^[46]做了有关临床病理特征的研究, 结果MSI-H与患者的年龄、肿瘤的位置、大小和类型有关, 在老年胃癌(>70岁)、远端胃癌、大直径肿瘤及肠型胃癌中具有较高的发生率, 而与淋巴结转移、pTNM分期和生存

率无关. 然而, 有学者的研究结果与之并不完全一致, 他们发现MSI-H不仅与患者的年龄、肿瘤的位置、大小和类型有关, 还与淋巴结转移、pTNM分期和预后关系密切, 其认为MSI-H型胃癌患者具有淋巴结转移率低、分期早、预后好的特点^[44,47,48]. 从上面的研究结果我们可以推测, MSI-H可能是早期胃癌的一种生物学标志. 但最近学者在研究早期胃癌的进展过程中发现MSI-H是由于DNA甲基化逐渐积累而从MSI-L或MSS发展而来的. 这与先前研究发现的MSI-L及MSS多出现在晚期胃癌中的结果不一致. 因此, 要阐明MSI在胃癌中的确切作用机制仍需进一步的研究.

5 *hMLH1*甲基化的治疗

表观遗传学的修饰具有可逆性, 因此在肿瘤或癌前病变中可通过去甲基化或乙酰化的方法恢复相关抑癌基因的表达, 从而达到预防或治疗肿瘤的目的. 目前去甲基化作用的药物有DNMTs抑制剂, 如5-氮杂胞嘧啶核苷(5-Azacytidine, 5-Aza-CR)及其脱氧类似物5-氮杂脱氧胞嘧啶核苷(5-aza-2'-deoxycytidine, 5-Aza-CdR), 他们都是有效的DNMTs抑制剂, 可通过DNA复制过程中取代胞嘧啶或与DNMTs形成共价键抑制DNMTs活性, 从而达到抑制DNA甲基化的效果^[49]. 但是这两种药物在水溶液中不稳定且有毒性, 因此在临床应用中存在局限性. Zebularine[1-(beta-D-ribofuranosyl)-1,2-dihydropyrimidin-2-one]是另一种抑制DNA甲基化的药物, 其具有化学稳定性和细胞毒性低的特点, 对肿瘤细胞具有高选择性生长抑制作用, 而对正常细胞影响小^[50]. Zebularine可全部消除DNMT1, 但只能部分消除DNMT3a和DNMT3b, 因此与其余两种酶的抑制剂联合使用才能达到更好的作用效果^[51]. Cheng等^[52]研究发现, 在使用5-Aza-CdR后相继使用Zebularine, 将有效地诱导并稳定*p16*基因的表达, 因此这两种药物的组合使用将具有广阔的应用前景.

6 *hMLH1*甲基化、MSI与胃癌的预后

肿瘤的预后是临床医生和患者都十分关注的问题, 他与诸多因素有关, 表观遗传学改变为其中因素之一. Shi等^[41]研究发现, *hMLH1*甲基化可明显增加胃癌患者的死亡风险(OR = 3.16, 95%CI: 1.04-9.64, $P < 0.05$), 降低其生存率($P = 0.03$), 经过进一步分析发现, 与晚期胃癌患者相比, *hMLH1*

甲基化与早期胃癌患者差的预后关系更加密切. 而Greddert等^[53]的研究发现, *hMLH1*、*hMSH2*和*hMSH6*表达缺失的肿瘤患者通常具有良好的预后, 但肿瘤患者在辅以5-FU化疗后, MMR缺失者比未缺失者生存率更低. Falchetti等^[54]对159例MSI胃癌患者进行单因素统计分析发现MSI-H型胃癌的7年生存率($48.2\% \pm 9.6\%$)明显高于MSS/MSI-L($28.0\% \pm 3.4\%$), 差别有统计学意义($P = 0.03$); 他们以MSI和pN状态绘制第15年的生存曲线, 采用Kaplan-Meier分析发现胃癌MSI-H型与长期生存明显相关($P = 0.0001$), MSI-H/pN0生存率最高(70.0%). 然而, Ribic等^[55]研究发现辅以5-FU化疗只对MSS型结直肠癌患者预后的改善有利. 因此, 目前*hMLH1*甲基化、MSI-H对胃肠肿瘤患者预后的影响尚有争议, 要明确其相关性, 仍需要更多的研究证据.

7 结论

*hMLH1*甲基化、MSI与胃癌的发生、发展及预后密切相关, 但其具体作用仍存有争议. 他们能否作为胃癌发生发展的生物学标志物以及指导临床治疗和判断预后的指标, 有待进一步的研究. 随着对其了解地深入, 人们将逐渐步阐明*hMLH1*、MSI在胃癌中的确切致病机制及其相互关系, 这将为胃癌的诊断、治疗和预后的判断提供新的思路和方法.

8 参考文献

- 1 Jemal A, Tiwari RC, Murray T, Ghafoor A, Samuels A, Ward E, Feuer EJ, Thun MJ. Cancer statistics, 2004. *CA Cancer J Clin* 2004; 54: 8-29 [PMID: 14974761 DOI: 10.3322/canjclin.54.1.8]
- 2 Correa P. International cancer epidemiology meetings. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1992; 1: 245-247 [PMID: 1363968]
- 3 Xiao XQ, Gong WD, Wang SZ, Zhang ZD, Rui XP, Wu GZ, Ren F. Polymorphisms of mismatch repair gene *hMLH1* and *hMSH2* and risk of gastric cancer in a Chinese population. *Oncol Lett* 2012; 3: 591-598 [PMID: 22740958]
- 4 Jacob S, Praz F. DNA mismatch repair defects: role in colorectal carcinogenesis. *Biochimie* 2002; 84: 27-47 [PMID: 11900875 DOI: 10.1016/S0300-9084(01)01362-1]
- 5 Kulke MH, Thakore KS, Thomas G, Wang H, Loda M, Eng C, Odze RD. Microsatellite instability and *hMLH1*/*hMSH2* expression in Barrett esophagus-associated adenocarcinoma. *Cancer* 2001; 91: 1451-1457 [PMID: 11301392 DOI: 10.1002/1097-0142(20010415)91:8<1451::AID-CNCR1152>3.0.CO;2-Z]
- 6 Imai K, Yamamoto H. Carcinogenesis and microsatellite instability: the interrelationship between genetics and epigenetics. *Carcinogenesis* 2008; 29: 673-680 [PMID: 17942460 DOI: 10.1093/carcin/

■创新盘点

本文阐述*hMLH1*甲基化、MSI与胃癌临床病理特征、生物学特性及预后关系的新进展, 并概括胃癌中引起*hMLH1*甲基化的相关因素, 同时也对目前该领域仍存在的一些争议作了总结.

■应用要点

- 现有研究表明, *hMLH1* 甲基化、MSI与胃癌关系密切, 进一步阐明其确切的作用机制将可能为胃癌的临床诊疗及预后判断提供新的方法。文中也对胃癌中引起*hMLH1* 甲基化的相关因素作了总结, 这对胃癌的预防具有一定的参考价值。
- 7 Bronner CE, Baker SM, Morrison PT, Warren G, Smith LG, Lescoe MK, Kane M, Earabino C, Lipford J, Lindblom A. Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue *hMLH1* is associated with hereditary non-polyposis colon cancer. *Nature* 1994; 368: 258-261 [PMID: 8145827 DOI: 10.1038/368258a0]
 - 8 Baek MJ, Kang H, Kim SE, Park JH, Lee JS, Paik YK, Kim H. Expression of *hMLH1* is inactivated in the gastric adenomas with enhanced microsatellite instability. *Br J Cancer* 2001; 85: 1147-1152 [PMID: 11710827 DOI: 10.1054/bjoc.2001.2051]
 - 9 Peltomäki P. DNA mismatch repair and cancer. *Mutat Res* 2001; 488: 77-85 [PMID: 11223406 DOI: 10.1016/S1383-5742(00)00058-2]
 - 10 Fleisher AS, Esteller M, Wang S, Tamura G, Suzuki H, Yin J, Zou TT, Abraham JM, Kong D, Smolinski KN, Shi YQ, Rhyu MG, Powell SM, James SP, Wilson KT, Herman JG, Meltzer SJ. Hypermethylation of the *hMLH1* gene promoter in human gastric cancers with microsatellite instability. *Cancer Res* 1999; 59: 1090-1095 [PMID: 10070967]
 - 11 Aaltonen LA, Peltomäki P, Leach FS, Sistonen P, Pylkkänen L, Mecklin JP, Järvinen H, Powell SM, Jen J, Hamilton SR. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science* 1993; 260: 812-816 [PMID: 8484121 DOI: 10.1126/science.8484121]
 - 12 Lynch HT, de la Chapelle A. Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med* 2003; 348: 919-932 [PMID: 12621137 DOI: 10.1056/NEJMra012242]
 - 13 Solomon CH, Pho LN, Burt RW. Current status of genetic testing for colorectal cancer susceptibility. *Oncology (Williston Park)* 2002; 16: 161-171; discussion 176, 179-180 [PMID: 11866134]
 - 14 夏岷, 刘希双, 杨堃, 隋爱华. 错配修复基因*hMLH1*和*hMSH2*在胃癌组织中的表达及意义. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 3446-3450
 - 15 Ushijima T, Sasako M. Focus on gastric cancer. *Cancer Cell* 2004; 5: 121-125 [PMID: 14998488 DOI: 10.1016/S1535-6108(04)00033-9]
 - 16 Li M, Liu L, Wang Z, Wang L, Liu Z, Xu G, Lu S. Overexpression of *hMSH2* and *hMLH1* protein in certain gastric cancers and their surrounding mucosae. *Oncol Rep* 2008; 19: 401-406 [PMID: 18202787]
 - 17 Srivastava T, Chattopadhyay P, Mahapatra AK, Sarkar C, Sinha S. Increased *hMSH2* protein expression in glioblastoma multiforme. *J Neurooncol* 2004; 66: 51-57 [PMID: 15015769 DOI: 10.1023/B:NEON.0000013482.99032.b0]
 - 18 Aubry MC, Halling KC, Myers JL, Tazelaar HD, Yang P, Thibodeau SN. DNA mismatch repair genes *hMLH1*, *hMSH2*, and *hMSH6* are not inactivated in bronchioloalveolar carcinomas of the lung. *Cancer* 2001; 92: 2898-2901 [PMID: 11753964 DOI: 10.1002/1097-0142(20011201)92:11<2898::AID-CNCR10104>3.0.CO;2-Q]
 - 19 Leach FS, Hsieh JT, Molberg K, Saboorian MH, McConnell JD, Sagalowsky AI. Expression of the human mismatch repair gene *hMSH2*: a potential marker for urothelial malignancy. *Cancer* 2000; 88: 2333-2341 [PMID: 10820356 DOI: 10.1002/(SICI)1097-0142(20000515)88:10<2333::AID-CNCR18>3.0.CO;2-Y]
 - 20 Mir MR, Shabir N, Wani KA, Shaff S, Hussain I, Banday MA, Chikan NA, Bilal S, Aeja S. Association between p16, *hMLH1* and E-cadherin promoter hypermethylation and intake of local hot salted tea and sun-dried foods in Kashmiris with gastric tumors. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012; 13: 181-186 [PMID: 22502664 DOI: 10.7314/APJCP.2012.13.1.181]
 - 21 Wani M, Afroz D, Makhdoom M, Hamid I, Wani B, Bhat G, Wani R, Wani K. Promoter methylation status of DNA repair gene (*hMLH1*) in gastric carcinoma patients of the Kashmir valley. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012; 13: 4177-4181 [PMID: 23098428 DOI: 10.7314/APJCP.2012.13.8.4177]
 - 22 Kim HG, Lee S, Kim DY, Ryu SY, Joo JK, Kim JC, Lee KH, Lee JH. Aberrant methylation of DNA mismatch repair genes in elderly patients with sporadic gastric carcinoma: A comparison with younger patients. *J Surg Oncol* 2010; 101: 28-35 [PMID: 19894224 DOI: 10.1002/jso.21432]
 - 23 Nakajima T, Akiyama Y, Shiraishi J, Arai T, Yanagisawa Y, Ara M, Fukuda Y, Sawabe M, Saitoh K, Kamiyama R, Hirokawa K, Yuasa Y. Age-related hypermethylation of the *hMLH1* promoter in gastric cancers. *Int J Cancer* 2001; 94: 208-211 [PMID: 11668499]
 - 24 Arai T, Takubo K. Clinicopathological and molecular characteristics of gastric and colorectal carcinomas in the elderly. *Pathol Int* 2007; 57: 303-314 [PMID: 17539960 DOI: 10.1111/j.1440-1827.2007.02101.x]
 - 25 Baylin SB, Herman JG. DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. *Trends Genet* 2000; 16: 168-174 [PMID: 10729832 DOI: 10.1016/S0168-9525(99)01971-X]
 - 26 Arai T, Kasahara I, Sawabe M, Honma N, Aida J, Tabubo K. Role of methylation of the *hMLH1* gene promoter in the development of gastric and colorectal carcinoma in the elderly. *Geriatr Gerontol Int* 2010; 10 Suppl 1: S207-S212 [PMID: 20590835 DOI: 10.1111/j.1447-0594.2010.00590.x]
 - 27 Konturek JW. Discovery by Jaworski of *Helicobacter pylori* and its pathogenetic role in peptic ulcer, gastritis and gastric cancer. *J Physiol Pharmacol* 2003; 54 Suppl 3: 23-41 [PMID: 15075463]
 - 28 Konturek PC, Brzozowski T, Konturek SJ, Kwiecień S, Pajdo R, Drozdowicz D, Stachura J, Karczewska E, Hahn EG. Functional and morphological aspects of *Helicobacter pylori*-induced gastric cancer in Mongolian gerbils. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003; 15: 745-754 [PMID: 12811305 DOI: 10.1097/01.meg.0000059155.68845.9d]
 - 29 Watari J, Tanaka A, Tanabe H, Sato R, Moriichi K, Zaky A, Okamoto K, Maemoto A, Fujiya M, Ashida T, Das KM, Kohgo Y. K-ras mutations and cell kinetics in *Helicobacter pylori* associated gastric intestinal metaplasia: a comparison before and after eradication in patients with chronic gastritis and gastric cancer. *J Clin Pathol* 2007; 60: 921-926 [PMID: 16997920 DOI: 10.1136/jcp.2006.041939]
 - 30 Maekita T, Nakazawa K, Mihara M, Nakajima T, Yanaoka K, Iguchi M, Arii K, Kaneda A, Tsukamoto T, Tatematsu M, Tamura G, Saito D, Sugimura T, Ichinose M, Ushijima T. High levels of aberrant DNA methylation in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosae and its possible association with gastric cancer risk. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 989-995 [PMID: 16467114 DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-05-2096]
 - 31 Tahara T, Arisawa T, Shibata T, Nakamura M, Yoshioka D, Okubo M, Maruyama N, Kamano T, Ka-

- miya Y, Fujita H, Nakagawa Y, Nagasaka M, Iwata M, Takahama K, Watanabe M, Yamashita H, Hirata I. Increased number of methylated CpG islands correlates with *Helicobacter pylori* infection, histological and serological severity of chronic gastritis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2009; 21: 613-619 [PMID: 19307977 DOI: 10.1097/MEG.0b013e32830e28b2]
- 32 Katayama Y, Takahashi M, Kuwayama H. *Helicobacter pylori* causes runx3 gene methylation and its loss of expression in gastric epithelial cells, which is mediated by nitric oxide produced by macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 388: 496-500 [PMID: 19665002 DOI: 10.1016/j.bbrc.2009.08.003]
- 33 Kim JJ, Tao H, Carloni E, Leung WK, Graham DY, Sepulveda AR. *Helicobacter pylori* impairs DNA mismatch repair in gastric epithelial cells. *Gastroenterology* 2002; 123: 542-553 [PMID: 12145807]
- 34 Kang GH, Lee HJ, Hwang KS, Lee S, Kim JH, Kim JS. Aberrant CpG island hypermethylation of chronic gastritis, in relation to aging, gender, intestinal metaplasia, and chronic inflammation. *Am J Pathol* 2003; 163: 1551-1556 [PMID: 14507661 DOI: 10.1016/S0002-9440(10)63511-0]
- 35 Gedder H, Zur Hausen A, Gabbert HE, Sarbia M. EBV-infection in cardiac and non-cardiac gastric adenocarcinomas is associated with promoter methylation of p16, p14 and APC, but not *hMLH1*. *Anal Cell Pathol (Amst)* 2010; 33: 143-149 [PMID: 20978327 DOI: 10.1007/s13402-011-0028-6]
- 36 Alves MK, Ferrasi AC, Lima VP, Ferreira MV, de Moura Campos Pardini MI, Rabenhorst SH. Inactivation of COX-2, *hMLH1* and CDKN2A gene by promoter methylation in gastric cancer: relationship with histological subtype, tumor location and *Helicobacter pylori* genotype. *Pathobiology* 2011; 78: 266-276 [PMID: 21849808 DOI: 10.1159/000329475]
- 37 Kaneda A, Kaminishi M, Yanagihara K, Sugimura T, Ushijima T. Identification of silencing of nine genes in human gastric cancers. *Cancer Res* 2002; 62: 6645-6650 [PMID: 12438262]
- 38 Endoh M, Tamura G, Honda T, Homma N, Terashima M, Nishizuka S, Motoyama T. RASSF2, a potential tumour suppressor, is silenced by CpG island hypermethylation in gastric cancer. *Br J Cancer* 2005; 93: 1395-1399 [PMID: 16265349 DOI: 10.1038/sj.bjc.6602854]
- 39 Oue N, Mitani Y, Motoshita J, Matsumura S, Yoshida K, Kuniyasu H, Nakayama H, Yasui W. Accumulation of DNA methylation is associated with tumor stage in gastric cancer. *Cancer* 2006; 106: 1250-1259 [PMID: 16475210 DOI: 10.1002/cncr.21754]
- 40 Watanabe Y, Kim HS, Castoro RJ, Chung W, Estecio MR, Kondo K, Guo Y, Ahmed SS, Toyota M, Itoh F, Suk KT, Cho MY, Shen L, Jelinek J, Issa JP. Sensitive and specific detection of early gastric cancer with DNA methylation analysis of gastric washes. *Gastroenterology* 2009; 136: 2149-2158 [PMID: 19375421 DOI: 10.1053/j.gastro.2009.02.085]
- 41 Shi J, Zhang G, Yao D, Liu W, Wang N, Ji M, He N, Shi B, Hou P. Prognostic significance of aberrant gene methylation in gastric cancer. *Am J Cancer Res* 2012; 2: 116-129 [PMID: 22206050]
- 42 Carneiro F, Oliveira C, Leite M, Seruca R. Molecular targets and biological modifiers in gastric cancer. *Semin Diagn Pathol* 2008; 25: 274-287 [PMID: 19013893 DOI: 10.1053/j.semdp.2008.07.004]
- 43 Milne AN, Carneiro F, O'Morain C, Offerhaus GJ. Nature meets nurture: molecular genetics of gastric cancer. *Hum Genet* 2009; 126: 615-628 [PMID: 19657673 DOI: 10.1007/s00439-009-0722-x]
- 44 Huang YQ, Yuan Y, Ge WT, Hu HG, Zhang SZ, Zheng S. Comparative features of colorectal and gastric cancers with microsatellite instability in Chinese patients. *J Zhejiang Univ Sci B* 2010; 11: 647-653 [PMID: 20803768 DOI: 10.1631/jzus.B1000198]
- 45 Wu CW, Chen GD, Jiang KC, Li AF, Chi CW, Lo SS, Chen JY. A genome-wide study of microsatellite instability in advanced gastric carcinoma. *Cancer* 2001; 92: 92-101 [PMID: 11443614 DOI: 10.1002/1097-0142(20010701)92:]
- 46 Seo HM, Chang YS, Joo SH, Kim YW, Park YK, Hong SW, Lee SH. Clinicopathologic characteristics and outcomes of gastric cancers with the MSI-H phenotype. *J Surg Oncol* 2009; 99: 143-147 [PMID: 19117018 DOI: 10.1002/jso.21220]
- 47 Beghelli S, de Manzoni G, Barbi S, Tomezzoli A, Roviello F, Di Gregorio C, Vindigni C, Bortesi L, Parisi A, Saragoni L, Scarpa A, Moore PS. Microsatellite instability in gastric cancer is associated with better prognosis in only stage II cancers. *Surgery* 2006; 139: 347-356 [PMID: 16546499 DOI: 10.1016/j.surg.2005.08.021]
- 48 Lee HS, Choi SI, Lee HK, Kim HS, Yang HK, Kang GH, Kim YI, Lee BL, Kim WH. Distinct clinical features and outcomes of gastric cancers with microsatellite instability. *Mod Pathol* 2002; 15: 632-640 [PMID: 12065777 DOI: 10.1038/modpathol.3880578]
- 49 Wolff EM, Byun HM, Han HF, Sharma S, Nichols PW, Siegmund KD, Yang AS, Jones PA, Liang G. Hypomethylation of a LINE-1 promoter activates an alternate transcript of the MET oncogene in bladders with cancer. *PLoS Genet* 2010; 6: e1000917 [PMID: 20421991 DOI: 10.1371/journal.pgen.1000917]
- 50 Cheng JC, Yoo CB, Weisenberger DJ, Chuang J, Wozniak C, Liang G, Marquez VE, Greer S, Orntoft TF, Thykjaer T, Jones PA. Preferential response of cancer cells to zebularine. *Cancer Cell* 2004; 6: 151-158 [PMID: 15324698 DOI: 10.1016/j.ccr.2004.06.023]
- 51 Stresemann C, Brueckner B, Musch T, Stopper H, Lyko F. Functional diversity of DNA methyltransferase inhibitors in human cancer cell lines. *Cancer Res* 2006; 66: 2794-2800 [PMID: 16510601 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-2821]
- 52 Cheng JC, Weisenberger DJ, Gonzales FA, Liang G, Xu GL, Hu YG, Marquez VE, Jones PA. Continuous zebularine treatment effectively sustains demethylation in human bladder cancer cells. *Mol Cell Biol* 2004; 24: 1270-1278 [PMID: 14729971 DOI: 10.1128/MCB.24.3.1270-1278.2004]
- 53 Valeri N, Gasparini P, Fabbri M, Braconi C, Veronese A, Lovat F, Adair B, Vannini I, Fanini F, Bottoni A, Costinean S, Sandhu SK, Nuovo GJ, Alder H, Gafa R, Calore F, Ferracin M, Lanza G, Volinia S, Negrini M, McIlhatton MA, Amadori D, Fishel R, Croce CM. Modulation of mismatch repair and genomic stability by miR-155. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 6982-6987 [PMID: 20351277 DOI: 10.1073/pnas.1002472107]
- 54 Falchetti M, Saieva C, Lupi R, Masala G, Rizzolo P, Zanna I, Ceccarelli K, Sera F, Mariani-Costantini R, Nesi G, Palli D, Ottini L. Gastric cancer with high-

同行评价

本文对 *hMLH1* 甲基化、MSI 在胃癌中的表达、与胃癌病理类型的关系、预后及 *hMLH1* 甲基化的治疗研究现状进行了全面的综述, 有较好的参考价值。

- level microsatellite instability: target gene mutations, clinicopathologic features, and long-term survival. *Hum Pathol* 2008; 39: 925-932 [PMID: 18440592 DOI: 10.1016/j.humpath.2007.10.024]
- 55 Ribic CM, Sargent DJ, Moore MJ, Thibodeau SN, French AJ, Goldberg RM, Hamilton SR, Laurent-

Puig P, Gryfe R, Shepherd LE, Tu D, Redston M, Gallinger S. Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med* 2003; 349: 247-257 [PMID: 12867608 DOI: 10.1056/NEJMoa022289]

编辑 田滢 电编 鲁亚静



ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) DOI: 10.11569 2013年版权归Baishideng所有

• 消息 •

中国科技信息研究所发布《世界华人消化杂志》 影响因子 0.775

本刊讯 一年一度的中国科技论文统计结果2012-12-07由中国科技信息研究所(简称中信所)在北京发布。《中国科技期刊引证报告(核心版)》统计显示, 2011年《世界华人消化杂志》总被引频次3871次, 影响因子0.775, 综合评价总分65.5分, 分别位居内科学类52种期刊的第5位、第7位、第5位, 分别位居1998种中国科技核心期刊(中国科技论文统计源期刊)的第65位、第238位、第138位; 其他指标: 即年指标0.081, 他引率0.82, 引用刊数526种, 扩散因子13.59, 权威因子1260.02, 被引半衰期4.3, 来源文献量642, 文献选出率0.93, 地区分布数29, 机构分布数302, 基金论文比0.45, 海外论文比0.01。

经过多项学术指标综合评定及同行专家评议推荐,《世界华人消化杂志》再度被收录为“中国科技核心期刊”(《世界华人消化杂志》编辑部)。

胰岛素/胰岛素样生长因子与肝再生的关系

褚延魁, 王胜智, 刘育蕾, 康志龙

褚延魁, 王胜智, 刘育蕾, 康志龙, 中国人民解放军第302医院普通外科 北京市100039

褚延魁, 副主任医师, 主要从事肝胆外科与腹腔镜微创外科的研究。

作者贡献分布: 褚延魁、王胜智、刘育蕾及康志龙对此文所做贡献均等; 设计方案由褚延魁提供; 文献检索由王胜智与刘育蕾共同完成; 此论文写作由褚延魁与康志龙完成。

通讯作者: 康志龙, 100039, 北京市西四环中路100号, 中国人民解放军第302医院普通外科, bjjoan008@126.com

收稿日期: 2013-08-23 修回日期: 2013-09-30

接受日期: 2013-11-19 在线出版日期: 2013-12-18

Relationship between insulin/insulin-like growth factor and liver regeneration

Yan-Kui Chu, Sheng-Zhi Wang, Yu-Lei Liu, Zhi-Long Kang

Yan-Kui Chu, Sheng-Zhi Wang, Yu-Lei Liu, Zhi-Long Kang, Department of General Surgery, 302nd Hospital of the Chinese People's Liberation Army, Beijing 100039, China
Correspondence to: Zhi-Long Kang, Department of General Surgery, 302nd Hospital of the Chinese People's Liberation Army, 100 Xisihuan Middle Road, Beijing 100039, China. bjjoan008@126.com

Received: 2013-08-23 Revised: 2013-09-30

Accepted: 2013-11-19 Published online: 2013-12-18

Abstract

Hepatocellular carcinoma is one of the most common cancers, and the main treatments include intervention, radiofrequency ablation, surgical resection and liver transplantation. Metastasis and recurrence contribute greatly to the high mortality rate of hepatocellular carcinoma. Currently, many efforts have been taken to find the ways to promote liver regeneration after liver resection. This article will discuss the relationship between liver regeneration and insulin/insulin-like growth factor.

© 2013 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

Key Words: Insulin; Insulin-like growth factor; Liver regeneration

Chu YK, Wang SZ, Liu YL, Kang ZL. Relationship between insulin/insulin-like growth factor and liver regeneration. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(35): 3961-3964 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/3961.asp> DOI:

<http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i35.3961>

摘要

原发性肝癌(hepatocellular carcinoma)是目前最常见的癌症之一, 其主要治疗方法包括介入、射频消融、手术切除、肝移植等, 但是复发转移快, 病死率高是个不容忽视的问题。因此寻找肝切除术后剩余肝脏的再生方法逐渐引起了大家的广泛关注。本文将就肝再生与胰岛素及胰岛素生长因子之间的关系进行阐述。

© 2013年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词: 胰岛素; 胰岛素样生长因子; 肝再生

核心提示: 胰岛素家族的研究不仅是肝再生研究的新方向, 也是肝癌机制深入研究的一个切入点。

褚延魁, 王胜智, 刘育蕾, 康志龙. 胰岛素/胰岛素样生长因子与肝再生的关系. *世界华人消化杂志* 2013; 21(35): 3961-3964
URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/3961.asp>
DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i35.3961>

0 引言

原发性肝癌(hepatocellular carcinoma)在我国发病率极高, 目前治疗肝癌的方法很多, 虽然手术切除部分肝脏后, 机体释放的促进肝脏再生的因子, 能改善患者肝功能, 提高其生活质量, 但是大量肝癌术后患者由于肝脏损伤严重, 肝细胞坏死能力远远超过肝再生的能力。

1 肝再生的意义

众所周知肝移植是治疗肝脏衰竭最终解决途径^[1,2], 但是在我国由于肝源短缺, 受体供体配型、找到适合受体的肝脏供体需要等待的时间长, 许多患者往往没有等到供体肝脏时, 病情就已经恶化, 导致死亡。另外, 移植手术后长期应用免疫抑制剂带来的不良反应使其应用也受到了限制。

于是肝干细胞的研究逐渐成为了热点, 肝干细胞是具有无限增殖能力和多向分化潜能的细

■背景资料

原发性肝癌是目前最常见的癌症之一, 其复发转移快, 病死率高已成为不容忽视的问题, 因此寻找肝切除术后剩余肝脏的再生方法逐渐引起了大家的广泛关注。

■同行评议者

刘宝林, 教授, 中国医科大学附属盛京医院

■ 研发前沿

肝再生是一个复杂的过程,其发生机制至今也未阐明,肝再生的研究对于探讨肝癌的发病机制有重要意义。

胞^[3,4]。体内有许多细胞都符合肝干细胞的特征,如肝脏胚胎发育过程中的胎肝干细胞及成肝细胞、成年肝内存在的兼性肝干细胞及其子代细胞卵圆细胞,表达CD133的肝星状细胞等,此外,骨髓间充质干细胞、胰腺干细胞等可能也参与了肝再生^[5-7]。肝干细胞目前在移植领域、遗传性及慢性肝病治疗、肝肿瘤预防和肝病药物筛选等方面应用广泛^[8-10]。

目前寻求除了肝脏器官及肝干细胞移植以外的促进肝再生的方法逐渐成为了研究的热点,近年来肝再生的研究已经有了十分重大的成果,但其分子机制尚未达成共识^[11]。肝脏损伤或部分肝叶切除后,其他肝细胞可快速从G₀期进入S期,实现肝细胞的再生,并且这种肝细胞完成2-3次细胞分裂,刺激机体分泌一系列促进肝再生的细胞因子,从而激发一系列的生物效应,最终达到肝再生的目的^[12]。

因此,肝再生的研究意义十分重大,这将会大大提高肝癌患者肝切除术后的生存质量,延长患者寿命,除此之外,肝再生的研究对于探讨肝癌的发病机制有重要意义。

2 肝再生与胰岛素及胰岛素生长因子

肝脏的再生的启动及快速增值阶段主要是通过成熟肝细胞的有丝分裂或当肝组织巨大损伤后激活肝干/祖细胞来实现^[13]。近年来的研究表明,除了上皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、胰岛素、肾上腺素等因素外,肝特异性的生长因子(augmenter of liver regeneration, ALR)和抑素也参与了肝组织生长和再生的调节^[14]。1994年, Hagiya等从乳鼠肝脏中分离出一种促进肝脏再生的物质,并成功克隆了他的cDNA,即肝再生增强因子(augmenter of liver regeneration, ALR)^[15-17]。Takahashi等^[18]最近的研究表明:血小板对于抑制肝脏纤维化及肝损害有着很重要的作用,主要是通过3种途径来实现,直接作用于肝细胞、与肝窦状内皮细胞的协同作用及与Kupffer细胞的系统效应。因此,输注血小板及促血小板生成素将是除了肝脏移植外治疗肝脏疾病的新方向。

有研究表明,在人肝癌组织中,胰岛素生长因子-1(insulin-like growth factor-1, IGF-1)的mRNAs的表达较正常组织低^[19-21]。在动物模型和人肝癌中,胰岛素生长因子-2(insulin-like growth factor-2, IGF-2)已经有报道是高表达的^[22,23]。Zhou等^[24]用了多种肝癌细胞系进行检

测,包括(PLC、HCC细胞系)全部测得IGF-1R mRNA的表达低于正常对照,而IGF-2的表达却高于对照组。且在正常人、肝硬化患者及肝癌患者3组中,肝癌患者肝组织的IGFBP-3 mRNA水平显著降低。肝癌患者血清中IGFBP-2的水平显著增加,该研究小组首次采用了抗体芯片对25对肝癌与正常组织进行高通量检测,结果提示IGF-2R和IGFBP-2蛋白在肝癌组织中提高^[25,26]。这也提示了IGF家族蛋白也将成为今后肝脏疾病研究的热点。

部分肝切除术后,迅速进入了增殖阶段,当其增殖乏力时即进入肝再生终止阶段。在肝再生末期,肝重相对精确地被调整以与原肝重相适应;同时,通过TUNEL标记分析发现在小鼠肝再生的末期会出现一小部分肝细胞凋亡^[27,28]。

有报道发现肝再生终止阶段与转换生长因子-1(transforming growth factor, TGF-1)、激活素A(activin A)、整合素连接激酶(integrin-linked kinase, ILK)、磷脂酰肌醇3(glypican-3)、白介素1(interleukin-1, IL-1)等因子有关。可能是通过再生的肝细胞对TGF-1的分子进行分解,来发挥其抑制肝细胞增殖的作用^[29-32]。

研究人员通过*Nrf2*基因敲除小鼠的体外和体内的实验发现,部分肝脏切除后,胰岛素/胰岛生长因子氧化应激^[33-35],从而致使p38激酶和AKT激酶通路下游的靶点因子激活受损,进一步抑制了肝脏再生^[36-38]。由此说明,胰岛素/胰岛素生长因子系统对于肝脏的再生的终止也发挥了非常重要的作用^[39]。

IGFs的蛋白质序列与胰岛素有极高的相似性,IGFs家族主要由两种低分子多肽(IGF-I、IGF-II)、两类特异性表面受体(IGF1R和IGF2R)组成^[40-44]。除此以外,还包含高亲和性IGF结合蛋白(IGFBP-1至IGFBP-6)以及相关IGFBP降解酶。IGF是一类细胞增殖调控因子,在细胞的增殖、分化及个体的生长发育过程中具有重要的促进作用^[45]。

IGF-I通过与IGF-I受体结合发挥生物学效应,然而IGF-II却具有双重结合力,不仅能与IGF-I受体结合,还能与IGF-II受体结合而起作用^[46]。IGF-I、IGF-II及其受体在肝细胞癌变过程中发挥重要作用,肝癌的发生发展与IGF-I、IGF-I R、IGF-II、IGF-II R的协同作用有密切相关性,IGF-I受体及IGF-II在HCC进展过程中过量表达,IGF-I受体通过与IGF-II结合导致自身酪氨酸激酶磷酸化,从而激活下游信号通路,

使肝细胞恶性分化能力增强^[47,48]。

IGF-2在肝癌的发生过程中具有极为重要的意义, 他不仅通过内分泌参与机体代谢过程中, 而且还通过自分泌/旁分泌的途径促进了肝癌细胞的增殖和分化^[49,50], 由于HCC中肿瘤细胞生长迅速导致局部缺氧, 大大增加人肝癌血管内皮因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)mRNA和蛋白水平^[51], VEGF通过与窦状内皮细胞表面表达的受体Flt-1、Flk-1的结合, 在体内和体外均可促进内皮细胞的增殖分化, 从而进一步诱导IGF-2基因的表达。

3 结论

肝再生的过程是一个复杂的过程, 主要包括再生启动、快速增值及再生终止3个阶段, 其机制至今也尚未阐明, 许多的细胞因子都参与了这一过程, 除了胰岛素/胰岛素生长因子家族外, 肝再生增强因子, 上皮生长因子、肾上腺素、转化因子等也参与了肝再生的调节, 本文不再赘述。我们认为, 胰岛素生长因子家族的研究不仅是肝再生研究的新方向, 也是肝癌机制深入研究的一个切入点。

4 参考文献

- 1 Dhawan A, Strom SC, Sokal E, Fox IJ. Human hepatocyte transplantation. *Methods Mol Biol* 2010; 640: 525-534 [PMID: 20645072 DOI: 10.1007/978-1-60761-688-7_29]
- 2 Sharma R, Greenhough S, Medine CN, Hay DC. Three-dimensional culture of human embryonic stem cell derived hepatic endoderm and its role in bioartificial liver construction. *J Biomed Biotechnol* 2010; 2010: 236147 [PMID: 20169088 DOI: 10.1155/2010/236147]
- 3 路国勇, 寸向农, 杨开明. 肝干细胞微环境在肝再生中的介导作用. *四川解剖学杂志* 2012; 20: 58-60
- 4 Fausto N. Liver regeneration and repair: hepatocytes, progenitor cells, and stem cells. *Hepatology* 2004; 39: 1477-1487 [PMID: 15185286 DOI: 10.1002/hep.20214]
- 5 Shen CN, Tosh D. Transdifferentiation of pancreatic cells to hepatocytes. *Methods Mol Biol* 2010; 640: 273-280 [PMID: 20645057 DOI: 10.1007/978-1-60761-688-7_14]
- 6 Kordes C, Sawitz A, Müller-Marbach A, Ale-Agha N, Keitel V, Klonowski-Stumpe H, Häussinger D. CD133+ hepatic stellate cells are progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 352: 410-417 [PMID: 17118341 DOI: 10.1016/j.bbrc.2006.11.029]
- 7 石毓君. 肝再生研究中的热点问题. *世界华人消化杂志* 2010; 18: 3611-3615
- 8 Suzuki A, Zheng YW, Kondo R, et al. Flow-cytometric separation and enrichment of hepatic progenitor cells in the developing mouse liver. *Hepatology* 2001; 32: 1230-1239 [PMID: 11093729 DOI: 10.1053/jhep.2000.20349]
- 9 于伟燕, 赵彩彦. 肝干细胞移植的基础研究进展. *实用肝脏病杂志* 2012; 15: 371-373
- 10 孙航, 余慧峰, 吴传新, 管小琴, 刘杞. 肝再生增强因子在肝癌细胞中的表达及意义. *中华肝脏病杂志* 2005; 13: 205-208
- 11 Riehle KJ, Dan YY, Campbell JS, Fausto N. New concepts in liver regeneration. *J Gastroenterol Hepatol* 2011; 26 Suppl 1: 203-212 [PMID: 21199532 DOI: 10.1111/j.1440-1746.2010.06539.x]
- 12 魏春山, 唐海鸿, 童光东, 陈孝银. 不同来源肝干细胞的定向分化潜能. *中国组织工程研究* 2012; 16: 8530-8534
- 13 Nissim O, Melis M, Diaz G, Kleiner DE, Tice A, Fantola G, Zamboni F, Mishra L, Farci P. Liver regeneration signature in hepatitis B virus (HBV)-associated acute liver failure identified by gene expression profiling. *PLoS One* 2012; 7: e49611 [PMID: 23185381 DOI: 10.1371/journal.pone.0049611]
- 14 Hagiya M, Francavilla A, Polimeno L, Ihara I, Sakai H, Seki T, Shimonishi M, Porter KA, Starzl TE. Cloning and sequence analysis of the rat augments of liver regeneration (ALR) gene: expression of biologically active recombinant ALR and demonstration of tissue distribution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 8142-8146 [PMID: 8058770 DOI: 10.1073/pnas.91.17.8142]
- 15 LaBrecque DR, Pesch LA. Preparation and partial characterization of hepatic regenerative stimulator substance (SS) from rat liver. *J Physiol* 1975; 248: 273-284 [PMID: 1151784]
- 16 Giorda R, Hagiya M, Seki T, Shimonishi M, Sakai H, Michaelson J, Francavilla A, Starzl TE, Trucco M. Analysis of the structure and expression of the augments of liver regeneration (ALR) gene. *Mol Med* 1996; 2: 97-108 [PMID: 8900538]
- 17 Francavilla A, Hagiya M, Porter KA, Polimeno L, Ihara I, Starzl TE. Augments of liver regeneration: its place in the universe of hepatic growth factors. *Hepatology* 1994; 20: 747-757 [PMID: 8076931 DOI: 10.1002/hep.1840200328]
- 18 Takahashi K, Murata S, Ohkohchi N. Novel therapy for liver regeneration by increasing the number of platelets. *Surg Today* 2013; 43: 1081-1087 [PMID: 23180116 DOI: 10.1007/s00595-012-0418-z]
- 19 严晓娣, 董志珍, 姚登福. 胰岛素样生长因子-I受体异常激活与肝癌靶向治疗. *临床肝胆病杂志* 2013; 6: 473-476
- 20 Fuchs BC, Fujii T, Dorfman JD, Goodwin JM, Zhu AX, Lanuti M, Tanabe KK. Epithelial-to-mesenchymal transition and integrin-linked kinase mediate sensitivity to epidermal growth factor receptor inhibition in human hepatoma cells. *Cancer Res* 2008; 68: 2391-2399 [PMID: 18381447 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-07-2460]
- 21 Stuver SO, Kuper H, Tzonou A, Lagiou P, Spanos E, Hsieh CC, Mantzoros C, Trichopoulos D. Insulin-like growth factor 1 in hepatocellular carcinoma and metastatic liver cancer in men. *Int J Cancer* 2000; 87: 118-121 [PMID: 10861461]
- 22 董志珍, 姚敏, 钱静, 严晓娣, 陈洁, 严美娟, 姚宁华, 姚登福. 肝癌组织中胰岛素样生长因子-II异常表达及mRNA转录干预对HepG2细胞凋亡的影响. *中华医学杂志* 2013; 93: 892-896
- 23 Yu H, Rohan T. Role of the insulin-like growth factor family in cancer development and progression. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 1472-1489 [PMID: 10995803 DOI: 10.1093/jnci/92.18.1472]
- 24 Zhou Q, Mao YQ, Jiang WD, Chen YR, Huang RY, Zhou XB, Wang YF, Shi Z, Wang ZS, Huang RP. Development of IGF signaling antibody arrays for the identification of hepatocellular carcinoma biomarkers. *PLoS One* 2012; 7: e46851 [PMID: 23071652 DOI: 10.1371/journal.pone.0046851]

■相关报道

相关报道提示患者血清中IGF-1R及IGF-2的表达与原发肝癌的发生密切相关。

■同行评价

本文结合临床,文献合理,结论客观可信,具有一定指导意义。

- 25 Weng CJ, Hsieh YH, Tsai CM, Chu YH, Ueng KC, Liu YF, Yeh YH, Su SC, Chen YC, Chen MK, Yang SF. Relationship of insulin-like growth factors system gene polymorphisms with the susceptibility and pathological development of hepatocellular carcinoma. *Ann Surg Oncol* 2010; 17: 1808-1815 [PMID: 20119675 DOI: 10.1245/s10434-009-0904-8.]
- 26 Price JA, Kovach SJ, Johnson T, Koniaris LG, Cahill PA, Sitzmann JV, McKillop IH. Insulin-like growth factor I is a comitogen for hepatocyte growth factor in a rat model of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2002; 36: 1089-1097 [PMID: 12395318 DOI: 10.1053/jhep.2002.36158]
- 27 Apte U, Gkretsi V, Bowen WC, Mars WM, Luo JH, Donthamsetty S, Orr A, Monga SP, Wu C, Michalopoulos GK. Enhanced liver regeneration following changes induced by hepatocyte-specific genetic ablation of integrin-linked kinase. *Hepatology* 2009; 50: 844-851 [PMID: 19575460 DOI: 10.1002/hep.23059]
- 28 Sakamoto T, Liu Z, Murase N, Ezure T, Yokomuro S, Poli V, Demetris AJ. Mitosis and apoptosis in the liver of interleukin-6-deficient mice after partial hepatectomy. *Hepatology* 1999; 29: 403-411 [PMID: 9918916 DOI: 10.1002/hep.510290244]
- 29 Michalopoulos GK, DeFrances M. Liver regeneration. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2005; 93: 101-134 [PMID: 15791946 DOI: 10.1007/b99968]
- 30 Michalopoulos GK. Liver regeneration after partial hepatectomy: critical analysis of mechanistic dilemmas. *Am J Pathol* 2010; 176: 2-13 [PMID: 20019184 DOI: 10.2353/ajpath.2010.090675]
- 31 LaMarre J, Hayes MA, Wollenberg GK, Hussaini I, Hall SW, Gonias SL. An alpha 2-macroglobulin receptor-dependent mechanism for the plasma clearance of transforming growth factor-beta 1 in mice. *J Clin Invest* 1991; 87: 39-44 [PMID: 1702100 DOI: 10.1172/JCI114998]
- 32 安永, 别平. 细胞因子与肝再生. 世界华人消化杂志 2001; 9: 575-578
- 33 Zhou BP, Liao Y, Xia W, Zou Y, Spohn B, Hung MC. HER-2/neu induces p53 ubiquitination via Akt-mediated MDM2 phosphorylation. *Nat Cell Biol* 2001; 3: 973-982 [PMID: 11715018 DOI: 10.1038/ncb1101-973]
- 34 Bader AG, Kang S, Zhao L, Vogt PK. Oncogenic PI3K deregulates transcription and translation. *Nat Rev Cancer* 2005; 5: 921-929 [PMID: 16341083 DOI: 10.1038/nrc1753]
- 35 Shaw RJ, Cantley LC. Ras, PI(3)K and mTOR signaling controls tumour cell growth. *Nature* 2006; 441: 424-430 [PMID: 16724053 DOI: 10.1038/nature04869]
- 36 Beyrer TA, Xu W, Teupser D, auf dem Keller U, Bugnon P, Hildt E, Thierry J, Kan YW, Werner S. Impaired liver regeneration in Nrf2 knockout mice: role of ROS-mediated insulin/IGF-1 resistance. *EMBO J* 2008; 27: 212-223 [PMID: 18059474 DOI: 10.1038/sj.emboj.7601950]
- 37 Desbois-Mouthon C, Baron A, Blivet-Van Eggelpoël MJ, Fartoux L, Venot C, Bladt F, Housset C, Rosmorduc O. Insulin-like growth factor-1 receptor inhibition induces a resistance mechanism via the epidermal growth factor receptor/HER3/AKT signaling pathway: rational basis for cotargeting insulin-like growth factor-1 receptor and epidermal growth factor receptor in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 5445-5456 [PMID: 19706799 DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-08-2980]
- 38 Cohen BD, Baker DA, Soderstrom C, Tkalecivic G, Rossi AM, Miller PE, Tengowski MW, Wang F, Gualberto A, Beebe JS, Moyer JD. Combination therapy enhances the inhibition of tumor growth with the fully human anti-type 1 insulin-like growth factor receptor monoclonal antibody CP-751, 871. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 2063-2073 [PMID: 15756033 DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-04-1070]
- 39 陆克, 薛斌. 肝再生终止阶段的研究进展. 世界华人消化杂志 2012; 20: 837-845
- 40 Nielsen FC, Christiansen J. Posttranscriptional regulation of insulin-like growth factor II mRNA. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 1995; 220: 37-46 [PMID: 7652480]
- 41 Honda S, Arai Y, Haruta M, Sasaki F, Ohira M, Yamaoka H, Horie H, Nakagawara A, Hiyama E, Todo S, Kaneko Y. Loss of imprinting of IGF2 correlates with hypermethylation of the H19 differentially methylated region in hepatoblastoma. *Br J Cancer* 2008; 99: 1891-1899 [PMID: 19034281 DOI: 10.1038/sj.bjc.6604754]
- 42 Baserga R, Peruzzi F, Reiss K. The IGF-1 receptor in cancer biology. *Int J Cancer* 2003; 107: 873-877 [PMID: 14601044 DOI: 10.1002/ijc.11487]
- 43 Brown J, Jones EY, Forbes BE. Interactions of IGF-II with the IGF2R/cation-independent mannose-6-phosphate receptor mechanism and biological outcomes. *Vitam Horm* 2009; 80: 699-719 [PMID: 19251056 DOI: 10.1016/S0083-6729(08)00625-0]
- 44 Clemmons DR. Insulin-like growth factor binding proteins and their role in controlling IGF actions. *Cytokine Growth Factor Rev* 1997; 8: 45-62 [PMID: 9174662 DOI: 10.1016/S1359-6101(96)00053-6]
- 45 Maki RG. Small is beautiful: insulin-like growth factors and their role in growth, development, and cancer. *J Clin Oncol* 2010; 28: 4985-4995 [PMID: 20975071 DOI: 10.1200/JCO.2009.27.5040]
- 46 O'Dell SD, Day IN. Insulin-like growth factor II (IGF-II). *Int J Biochem Cell Biol* 1998; 30: 767-771 [PMID: 9722981 DOI: 10.1016/S1357-2725(98)00048-X]
- 47 孙芳, 付汉江, 铁轶, 郑晓飞. 类胰岛素生长因子与肝癌. 世界华人消化杂志 2011; 19: 2473-2479
- 48 Kawate S, Takenoshita S, Ohwada S, Mogi A, Fukusato T, Makita F, Kuwano H, Morishita Y. Mutation analysis of transforming growth factor beta type II receptor, Smad2, and Smad4 in hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol* 1999; 14: 127-131 [PMID: 9863018]
- 49 Ryan PD, Goss PE. The emerging role of the insulin-like growth factor pathway as a therapeutic target in cancer. *Oncologist* 2008; 13: 16-24 [PMID: 18245009 DOI: 10.1634/theoncologist.2007-0199.]
- 50 Prakash J, Beljaars L, Harapanahalli AK, Zeinstra-Smith M, de Jager-Krikken A, Hessing M, Steen H, Poelstra K. Tumor-targeted intracellular delivery of anticancer drugs through the mannose-6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor. *Int J Cancer* 2010; 126: 1966-1981 [PMID: 19795464 DOI: 10.1002/ijc.24914]
- 51 王梦龙, 李朝龙. 胰岛素生长因子-2与肝癌的关系. 现代临床普通外科 1998; 3: 242-244

编辑 田滢 电编 鲁亚静



Cajal间质细胞与肠易激综合征关系的研究进展

李泽培, 邱野, 彭燕

李泽培, 邱野, 彭燕, 泸州医学院附属医院消化内科 四川省泸州市 646000

李泽培, 硕士研究生, 主要从事胃肠动力方面的研究

作者贡献分布: 本综述由李泽培完成; 文献资料由邱野收集; 彭燕审核。

通讯作者: 彭燕, 教授, 主任医师, 646000, 四川省泸州市太平街25号, 泸州医学院附属医院消化内科. 1806857826@qq.com
电话: 0830-3165331

收稿日期: 2013-08-15 修回日期: 2013-10-13

接受日期: 2013-10-30 在线出版日期: 2013-12-18

Relationship between interstitial cells of Cajal and irritable bowel syndrome

Ze-Pei Li, Ye Qiu, Yan Peng

Ze-Pei Li, Ye Qiu, Yan Peng, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000, Sichuan Province, China

Correspondence to: Yan Peng, Professor, Chief Physician, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, 25 Taiping Road, Luzhou 646000, Sichuan Province, China. 1806857826@qq.com

Received: 2013-08-15 Revised: 2013-10-13

Accepted: 2013-10-30 Published online: 2013-12-18

Abstract

Interstitial cells of Cajal are the pacemaker of gastrointestinal tract, which can generate electrical signals, conduct slow waves and regulate neurotransmitters. Irritable bowel syndrome (IBS) is a common gastrointestinal disease whose pathogenesis is very complicated, involving gastrointestinal motility disorders, visceral hypersensitivity, infection and abnormal secretion of gastrointestinal hormones. In recent years, it has been found that there are associations between interstitial cells of Cajal and gastrointestinal motility disorders, visceral hypersensitivity and abnormal secretion of gastrointestinal hormones. In this paper, we will review the recent progress in understanding the relationship between interstitial cells of Cajal and IBS.

© 2013 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

Key Words: Interstitial cells of Cajal; Irritable bowel syndrome; Gastrointestinal motility; Visceral hyper-

sensitivity; Gastrointestinal hormone

Li ZP, Qiu Y, Peng Y. Relationship between interstitial cells of Cajal and irritable bowel syndrome. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(35): 3965-3970 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/3965.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i35.3965>

摘要

Cajal间质细胞(interstitial cells of Cajal, ICC)是胃肠慢波的起搏细胞,具有产生自发电信号、传导慢波电位、调节神经递质等功能,是调节胃肠动力的重要环节。肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)是临床上常见的一种消化系统疾病,其发病机制十分复杂,目前主要认为与胃肠运动异常、内脏高敏感、感染、胃肠激素分泌异常等多种因素有关。近年来越来越多的研究表明,IBS存在ICC的形态和数量的异常,ICC与胃肠动力异常、内脏高敏感、感染后IBS以及胃肠激素分泌异常等的发生有一定联系,ICC可能参与IBS的发病过程,本文就二者的关系作一综述。

© 2013年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词: Cajal间质细胞; 肠易激综合征; 胃肠动力; 内脏高敏感; 胃肠激素

核心提示: Cajal间质细胞(interstitial cells of Cajal, ICC)是胃肠慢波的起搏细胞,具有产生自发电信号、传导慢波电位、调节神经递质等功能,是调节胃肠动力的重要环节。近年来研究认为肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)存在ICC的形态和数量的异常,ICC与胃肠动力异常、内脏高敏感、感染后IBS以及胃肠激素分泌异常等的发生有一定联系,本文综述二者的关系。

李泽培, 邱野, 彭燕. Cajal间质细胞与肠易激综合征关系的研究进展. *世界华人消化杂志* 2013; 21(35): 3965-3970 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/3965.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i35.3965>

0 引言

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)是

■背景资料

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)是临床上常见的一种消化系统疾病,其病因和发病机制目前仍不十分明确。近年来研究认为Cajal间质细胞(interstitial cells of Cajal, ICC)与IBS的发病有一定联系,ICC在IBS发病中的作用逐渐受到重视。

■同行评议者

黄恒青, 主任医师, 福建省第二人民医院消化内科

■ 研发前沿

ICC与IBS发病的关系,探索IBS的发病机制,进而提高IBS的诊疗效果。

一种以腹痛、腹部不适伴排便习惯改变为特征的功能性胃肠病,其发病率较高,且病因和发病机制尚不十分清楚。目前认为IBS的发病主要与胃肠运动异常、内脏高敏感、感染、胃肠激素分泌异常等多种因素有关。Cajal间质细胞(interstitial cells of Cajal, ICC)是胃肠慢波的起搏细胞,具有产生自发电信号、传导慢波电位、调节神经递质等功能,是调节胃肠动力的重要环节。近年来越来越多的研究发现,IBS存在ICC的形态和数量的异常^[1-3],且ICC与胃肠动力异常、内脏高敏感、感染后IBS的发病以及胃肠激素分泌异常等有一定联系,ICC可能参与IBS的发病过程。深入研究ICC与IBS的关系可能为IBS的病理研究及治疗提供新的认识。

1 ICC

1893年,西班牙神经解剖学家Cajal利用甲基蓝及嗜银染色法发现消化系存在一种特殊间质细胞,主要分布在消化系统自主神经末梢与平滑肌细胞之间,称为ICC。其后学者进行大量研究证实ICC是胃肠道的起搏细胞,具有产生自发电信号、传导慢波电位、调节神经递质等功能。ICC在维持正常胃肠动力方面发挥着重要作用,多种胃肠动力障碍性疾病也存在ICC结构与数量的异常。ICC基因表达产物c-kit的发现对ICC的研究具有重要意义。c-kit是原癌基因,编码kit受体(酪氨酸激酶受体),几乎所有的ICC都表达c-kit受体^[4]。在胃肠道中仅有ICC和肥大细胞表达c-kit,ICC用甲苯胺蓝染色后不呈现异染性,而肥大细胞被染色后呈红紫色,借此可区别二者。c-kit受体的标志物及c-kit mRNA已成为研究ICC的有效工具,特别是c-kit免疫组织化学染色技术的运用加深了人们对ICC的认识。最近研究发现Anol(anoctamin1)也可用于ICC的标记,Anol在消化系统ICC所有亚型上均有表达,且其特异性较高^[5]。干细胞生长因子(stem cell factor, SCF)是c-kit受体的自然配体,近年来研究发现c-kit/SCF途径对ICC的发生、发育及表型的维持具有重要作用。SCF与其受体c-kit结合可将细胞外信号转到细胞内部,引发某些基因的特异性表达,从而精确地调控ICC的分化与增殖。

1.1 ICC的分类与分布 根据细胞形态、分布位置及与神经丛、平滑肌的空间关系可将ICC分为如下种类^[6]:(1)肌间ICC(myenteric ICC, IC-MY),分别位于胃体、胃窦、小肠、结肠的环形肌与纵行肌之间的间隙中;(2)黏膜下ICC(submucosal

ICC, IC-SM),沿着结肠环形肌束表面的黏膜下层分布;(3)深肌层ICC(deep muscular ICC, IC-DMP),多分布于小肠,位于环肌内薄层与外厚层之间;(4)肌内ICC(intramuscular ICC, IC-IM),分别位于食管、胃底、胃体、结肠的肌层内。前两者主要参与胃肠起搏,后两者主要参与肠神经信号的传导^[7]。

ICC广泛分布于胃肠道各肌层,如食管下括约肌^[8]、胃底、胃体及胃窦^[9,10]、小肠^[11]、结肠^[12]、胰腺^[13]、胆囊^[14]。此外,ICC在胃肠外亦有分布,如上输尿管^[15]、尿道^[16]、子宫肌层^[17]、门静脉^[18]、肠系膜动脉^[19]、心肌细胞^[20]、输卵管及胎盘^[21]等。

1.2 功能 ICC具有产生慢波,调节胃肠平滑肌收缩,传导肠道活动的电信号,调节神经递质等功能。

1.2.1 胃肠起搏:近年来的研究证明,ICC产生慢波,是胃肠道的起搏细胞。慢波决定着平滑肌细胞的收缩节律,调控胃肠道运动发生的时间、地点、频率和方向。ICC的发育及功能维持需要c-kit的表达。自发性c-kit突变W/W^v小鼠小肠ICC的发育受损,其小肠不能产生慢波^[22,23]。有关ICC产生慢波的机制目前尚无定论。有学者认为,慢波的产生是由于氯通道的开放使ICC膜电位去极化,但氯通道缺乏特异的阻滞剂,不能被特异性阻断进行研究。最近研究发现Anol蛋白(钙激活氯通道蛋白)参与慢波的产生,为氯通道产生慢波的假说提供了支持^[24]。也有学者认为慢波的产生是由于ICC产生了Ca²⁺调节的、电压依赖的非选择性钙离子电流,依据是研究发现采用钙通道抑制剂后,未对ICC的电活动产生明显影响,细胞外Ca²⁺浓度的变化可以改变ICC的电活动^[25]。

1.2.2 传导慢波电位:ICC是慢波电位的传播者,其中ICC-IM、ICC-DMP是慢波电位传导系统的主要参与者。ICC的长突起与肌纤维平行走行,而从长突起发出的细小突起则与肌纤维及其他ICC相联系,细胞间的连接为缝隙连接,为电信号传递提供了途径。起源于ICC-MY的慢波沿着ICC-IM、ICC-DMP形成的神经样网络传导,最终通过缝隙连接将慢波信号传导至胃肠道平滑肌系统。

1.2.3 介导神经信号传导:ICC是肠神经系统中传递神经递质的中介。ICC与平滑肌及神经间距仅为20 nm左右,远小于神经和平滑肌之间的距离,ICC与神经轴突接触非常紧密,通过突触前后膜的特殊连接,形成神经元与ICC的密切关

系^[26]. ICC细胞膜上有多种神经递质受体, 包括P物质、一氧化氮(NO)、血管活性肠肽(vasoactive intestinal peptide, VIP)等, 是胃肠活动电信号传递至平滑肌的介质^[27]. 胃肠道神经元释放递质, 与ICC表面受体结合, ICC通过缝隙连接介导神经信号传递至胃肠道平滑肌细胞, 使之去极化或超极化, 从而产生兴奋或抑制效果.

2 ICC与IBS

研究发现, IBS存在ICC的形态和数量的异常. Jee等^[1]报道感染后IBS模型大鼠小肠细菌过生长与ICC-DMP的减少有关. 刘书中等^[2]报道感染后IBS模型组ICC出现超微结构损伤, 与周围细胞缝隙连接减少. 韩真等^[3]报道IBS模型大鼠小肠、结肠组织的c-kit表达显著增强, 并认为ICC可能在腹泻型IBS发病中有重要意义.

2.1 ICC与IBS胃肠动力异常 肠道运动异常是IBS的常见临床表现, 而肠道运动异常与ICC结构功能的损伤密切相关^[28]. ICC是胃肠慢波的起搏细胞, 是调节胃肠动力的重要环节^[29]. ICC损伤或缺失均有可能导致胃肠动力障碍, 而动力异常是IBS症状产生的病理生理基础之一. 贾后军等^[30]报道IBS中腹痛腹泻等胃肠动力改变可能与ICC的结构与功能损伤相关. 众多研究表明IBS患者存在全胃肠道动力紊乱. 周婷等^[31]报道慢性综合应激使大鼠肠道ICC超微结构发生改变、数量减少, 与周围平滑肌和神经末梢之间的缝隙连接显著减少, 进而认为ICC形态结构改变可能是应激所致功能性胃肠病动物模型胃肠运动异常的重要环节.

2.1.1 ICC与慢波: ICC产生慢波, 是胃肠道的起搏细胞. 其中胃和小肠的慢波由ICC-MP、ICC-IM产生, 而结肠的慢波主要由ICC-SMP产生^[32]. 慢波决定着平滑肌细胞的收缩节律, 调控胃肠道运动发生的时间、地点、频率和方向. 有研究认为IBS患者胃肠道存在异常慢波. Shafic等^[33]报道IBS患者出现类似快速心律失常波形的异常慢波. Wang等^[34]用旋毛虫诱导IBS动物模型, 发现ICC出现电活动异常, 并失去电活动同步性, 出现多个异位起搏点, 造成电失偶联的发生和局部慢波频率紊乱. IBS患者胃肠道的异常慢波可能与ICC的异常有关.

2.1.2 ICC与消化间期移行性复合运动: 消化间期移行性复合运(migrating motor complex, MMC) III期对清除消化间期末消化的残食具有重要意义, 并能防止小肠淤滞, 从而防止肠道细菌过度

生长. 郝筱倩等^[35]报道腹泻型IBS患者的症状与小肠消化间期MMC周期缩短、III相波幅升高、时程延长、传导速度加快有关, 便秘型IBS患者的MMC则与之相反. NO对MMC有一定影响, 内源性NO可使MMC周期缩短, 而抑制NO的合成可使MMC周期延长^[36]. ICC上存在NO受体, 能合成NO, 对氮能神经递质的作用起放大效应^[37]. 推测ICC可通过影响NO的合成参与MMC的调节.

2.1.3 ICC与高幅收缩波: 正常人体结肠收缩时收缩压力>50 mmHg且传播距离超过10 cm时称为高幅收缩波(high amplitude propagating contractions, HAPCs)^[38], 这种收缩可引起痉挛性排便. 近年来研究认为HAPCs与IBS患者腹痛的发生有一定关系. Chey等^[38]报道便秘型IBS患者HAPCs减少, 而腹泻型IBS患者则与之相反. ICC参与HAPCs的产生过程, Plujà等^[39]报道分布在结肠肌间神经丛的ICC-MP参与HAPCs的产生. 因此, ICC可能通过产生HAPCs参与IBS的发病过程.

2.2 ICC与IBS内脏高敏感 内脏高敏感是IBS的重要病理生理指标之一, 是产生疼痛的主要因素. IBS的内脏高敏感表现为对生理性刺激出现的不适感, 对伤害性刺激呈现的强烈反应^[40]. 丁瑞峰等^[41]报道内脏高敏感大鼠结肠ICC细胞数较对照组明显增加, 并认为ICC增多可能是内脏高敏感的发生机制之一. 研究发现, IBS存在着胃肠道黏膜局部炎症反应, 而ICC基因表达产物c-kit的配体-SCF可分泌大量c-kit激酶, 该激酶可导致肥大细胞、单核细胞活化增殖进而引发肥大细胞、单核细胞在肠道大量浸润^[22,42,43]. 同时, ICC的存活与发育需要c-kit/SCF信号途径调控. SCF的过度激活可能在内脏高敏感的发生中起重要作用. 张静瑜等^[44]用旋毛虫感染大鼠复制IBS模型, 当给予IBS大鼠结肠扩张刺激时, 其ICC活化程度、腹直肌肌电变化及支配左半结肠运动的骶髓后连合核放电频率显著增强, 当给予SCF/c-kit特异性阻断剂甲磺酸伊马替尼后, IBS大鼠因扩张刺激所产生的内脏痛反应、c-kit表达及骶髓后连合核放电频率均显著降低, 提示SCF活化在IBS内脏高敏感中起重要作用. 内脏高敏感的发生机制仍不十分清楚, 目前认为肠神经系统及多种神经递质在外周、脊髓及中枢参与内脏高敏感的调控. ICC与神经轴突接触非常紧密, 通过突触前后膜的特殊连接, 形成神经元与ICC的密切关系^[26], ICC具有接受、传递兴奋与抑制性神经递质的作用. ICC细胞膜上

■ 相关报道

近年来研究发现, IBS存在ICC形态和数量的异常. IBS动物模型存在ICC的破坏, ICC与肠神经元、平滑肌细胞之间的联系中断, 功能上ICC出现电活动异常, 失去电活动同步性.

■创新盘点

本文阐述ICC的分布及功能, ICC与IBS发病的关系, ICC与IBS胃肠动力异常、内脏高敏感、胃肠激素分泌异常及感染后IBS的关系。

存在多种受体如毒蕈碱M2、M3受体、神经激肽受体、VIP受体和五羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)受体, 并可观察到ICC对乙酰胆碱、NO、VIP、P物质等神经递质均有反应^[37]。因此, ICC可能通过介导ENS神经信号的传导参与内脏高敏感的形成过程。

2.3 ICC与感染后IBS 临床上部分被肠道病毒、细菌或寄生虫感染者, 在病原体已清除及黏膜炎症消退后, 仍可发生IBS样症状, 对此称为感染后IBS^[45]。研究发现感染后IBS动物模型存在ICC数量及形态异常。Jee等^[1]报道感染后IBS模型大鼠小肠细菌过生长与ICC-DMP的减少有关。刘书中等^[2]报道感染后IBS模型组ICC出现超微结构损伤, 与周围细胞缝隙连接减少。有研究认为炎症可以导致ICC损伤, 从而引起胃肠动力紊乱。Lu等^[46]报道肠道炎症模型狗慢波波幅缩小, 且波幅的缩小与环形肌ICC的损伤有关。因此, ICC形态及数量的异常可能与感染后IBS的发病有关。

2.4 ICC与IBS胃肠激素异常 目前研究认为胃肠激素的异常是IBS的发病机制之一, 众多研究也发现IBS患者存在胃肠激素表达异常^[47,48]。ICC上存在多种胃肠激素受体, ICC可能通过介导胃肠激素参与IBS的发病过程。

2.4.1 ICC与五羟色胺(5-hydroxy tryptamine, 5-HT): IBS患者胃肠道存在5-HT表达的异常^[47,49,50]。Dunlop等^[47]报道便秘型IBS患者血浆5-HT水平降低, 而腹泻型IBS患者血浆5-HT水平升高。5-HT是一种旁分泌信使, 其作为感觉换能器, 刺激内源性和外源性初级传入神经元, 分别引起蠕动和分泌反射并将信号传送到中枢神经系统。研究发现ICC细胞膜上表达五羟色胺(5-HT)受体^[37], ICC可能通过中介5-HT引起IBS症状的产生。同时, 5-HT对ICC亦有一定影响, Wouters等^[51]报道5-HT_{2B}受体通过激活蛋白激酶C- γ 介导ICC增值。

2.4.2 ICC与缩胆囊素及神经激肽: 近年研究发现某些肽类激素如缩胆囊素、神经激肽等可能与IBS症状有关, 这有助于解释胃肠动力异常、内脏高敏感及精神因素之间的内在联系。Zhang等^[48]报道IBS患者血浆和肠组织缩胆囊素水平较正常人明显升高, 而神经肽Y水平降低, 且腹泻型IBS患者较便秘型IBS患者降低更明显。ICC表达缩胆囊素受体、神经激肽受体, 并可观察到ICC对缩胆囊素、神经激肽均有反应^[37,52]。因此, ICC可能通过中介缩胆囊素、神经激肽等递质参与IBS的发病过程。

3 结论

ICC与IBS有一定关系, ICC可能参与IBS的发病过程。但ICC在IBS发病中的确切机制尚不明, 有待于进一步研究。随着对ICC生理功能及病理改变研究的深入, 人们对于IBS的认识和诊治水平可能会得到提高。深入开展ICC与IBS关系的研究将可能为IBS的病理研究及治疗提供新的认识。

4 参考文献

- 1 Jee SR, Morales W, Low K, Chang C, Zhu A, Pokkunuri V, Chatterjee S, Soffer E, Conklin JL, Pimentel M. ICC density predicts bacterial overgrowth in a rat model of post-infectious IBS. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 3680-3686 [PMID: 20677340 DOI: 10.3748/wjg.v16.i29.3680]
- 2 刘书中, 陈明锴, 郑双英, 沈世强. 跨膜蛋白16A介导感染后肠易激综合征中白细胞介素-4对Cajal细胞损伤的机制 *中华实验外科杂志* 2013; 30: 958-960
- 3 韩真, 王运东. 腹泻型肠易激综合征模型大鼠肠道Cajal间质细胞的变化及意义. *中国病理生理杂志* 2008; 24: 2263-2264, 2271
- 4 Vannucchi MG. Receptors in interstitial cells of Cajal: identification and possible physiological roles. *Microsc Res Tech* 1999; 47: 325-335 [PMID: 10602292 DOI: 10.1002/(SICI)1097-0029(19991201)47]
- 5 Sanders KM, Zhu MH, Britton F, Koh SD, Ward SM. Anoctamins and gastrointestinal smooth muscle excitability. *Exp Physiol* 2012; 97: 200-206 [PMID: 22002868 DOI: 10.1113/expphysiol.2011.058248]
- 6 Sanders KM. A case for interstitial cells of Cajal as pacemakers and mediators of neurotransmission in the gastrointestinal tract. *Gastroenterology* 1996; 111: 492-515 [PMID: 8690216 DOI: 10.1053/gast.1996.v111.pm8690216]
- 7 Ward SM, Sanders KM, Hirst GD. Role of interstitial cells of Cajal in neural control of gastrointestinal smooth muscles. *Neurogastroenterol Motil* 2004; 16 Suppl 1: 112-117 [PMID: 15066015 DOI: 10.1111/j.1743-3150.2004.00485.x]
- 8 Torihashi S, Horisawa M, Watanabe Y. c-Kit immunoreactive interstitial cells in the human gastrointestinal tract. *J Auton Nerv Syst* 1999; 75: 38-50 [PMID: 9935268 DOI: 10.1016/S0165-1838(98)00174-X]
- 9 Hirst GD, Beckett EA, Sanders KM, Ward SM. Regional variation in contribution of myenteric and intramuscular interstitial cells of Cajal to generation of slow waves in mouse gastric antrum. *J Physiol* 2002; 540: 1003-1012 [PMID: 11986385 DOI: 10.1111/j.1469-7793.2002.t01-1-01003.x]
- 10 Mazet B, Raynier C. Interstitial cells of Cajal in the guinea pig gastric antrum: distribution and regional density. *Cell Tissue Res* 2004; 316: 23-34 [PMID: 14986098 DOI: 10.1007/s00441-003-0835-9]
- 11 Rømer P, Mikkelsen HB. c-kit immunoreactive interstitial cells of Cajal in the human small and large intestine. *Histochem Cell Biol* 1998; 109: 195-202 [PMID: 9541467]
- 12 Mazzia C, Porcher C, Julé Y, Christen MO, Henry M. Ultrastructural study of relationships between c-kit immunoreactive interstitial cells and other cellular elements in the human colon. *Histochem Cell Biol*

- 2000; 113: 401-411 [PMID: 10883399]
- 13 Popescu LM, Hinescu ME, Ionescu N, Ciontea SM, Cretoiu D, Ardelean C. Interstitial cells of Cajal in pancreas. *J Cell Mol Med* 2005; 9: 169-190 [PMID: 15784175 DOI: 10.1111/j.1582-4934.2005.tb00347.x]
 - 14 Xu D, Yu BP, Luo HS, Chen LD. Control of gallbladder contractions by cholecystokinin through cholecystokinin-A receptors on gallbladder interstitial cells of Cajal. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 2882-2887 [PMID: 18473415 DOI: 10.3748/wjg.14.2882]
 - 15 Lang RJ, Klemm MF. Interstitial cell of Cajal-like cells in the upper urinary tract. *J Cell Mol Med* 2005; 9: 543-556 [PMID: 16202204 DOI: 10.1111/j.1582-4934.2005.tb00487.x]
 - 16 Sergeant GP, Hollywood MA, McHale NG, Thornbury KD. Ca²⁺ signalling in urethral interstitial cells of Cajal. *J Physiol* 2006; 576: 715-720 [PMID: 16916912 DOI: 10.1113/jphysiol.2006.115956]
 - 17 Ciontea SM, Radu E, Regalia T, Ceafalan L, Cretoiu D, Gherghiceanu M, Braga RI, Malincenco M, Zagrean L, Hinescu ME, Popescu LM. C-kit immunopositive interstitial cells (Cajal-type) in human myometrium. *J Cell Mol Med* 2005; 9: 407-420 [PMID: 15963260 DOI: 10.1111/j.1582-4934.2005.tb00366.x]
 - 18 Harhun MI, Gordienko DV, Povstyan OV, Moss RF, Bolton TB. Function of interstitial cells of Cajal in the rabbit portal vein. *Circ Res* 2004; 95: 619-626 [PMID: 15331453 DOI: 10.1161/01.RES.0000143014.04535.a3]
 - 19 Pucovsky V, Moss RF, Bolton TB. Non-contractile cells with thin processes resembling interstitial cells of Cajal found in the wall of guinea-pig mesenteric arteries. *J Physiol* 2003; 552: 119-133 [PMID: 12897177 DOI: 10.1113/jphysiol.2003.046243]
 - 20 Popescu LM, Gherghiceanu M, Hinescu ME, Cretoiu D, Ceafalan L, Regalia T, Popescu AC, Ardeleanu C, Mandache E. Insights into the interstitium of ventricular myocardium: interstitial Cajal-like cells (ICLC). *J Cell Mol Med* 2006; 10: 429-458 [PMID: 16796810 DOI: 10.1111/j.1582-4934.2006.tb00410.x]
 - 21 Suciu L, Popescu LM, Gherghiceanu M. Human placenta: de visu demonstration of interstitial Cajal-like cells. *J Cell Mol Med* 2007; 11: 590-597 [PMID: 17635651 DOI: 10.1111/j.1582-4934.2007.00058.x]
 - 22 Huizinga JD, Thuneberg L, Klüppel M, Malysz J, Mikkelsen HB, Bernstein A. W/kit gene required for interstitial cells of Cajal and for intestinal pacemaker activity. *Nature* 1995; 373: 347-349 [PMID: 7530333]
 - 23 Ward SM, Burns AJ, Torihashi S, Sanders KM. Mutation of the proto-oncogene c-kit blocks development of interstitial cells and electrical rhythmicity in murine intestine. *J Physiol* 1994; 480 (Pt 1): 91-97 [PMID: 7853230]
 - 24 Stanich JE, Gibbons SJ, Eisenman ST, Bardsley MR, Rock JR, Harfe BD, Ordog T, Farrugia G. Anol as a regulator of proliferation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2011; 301: G1044-G1051 [PMID: 21940901 DOI: 10.1152/ajpgi.00196.2011]
 - 25 Perrino BA. Regulation of gastrointestinal motility by Ca²⁺/calmodulin-stimulated protein kinase II. *Arch Biochem Biophys* 2011; 510: 174-181 [PMID: 21443856 DOI: 10.1016/j.abb.2011.03.009]
 - 26 Ward SM, Beckett EA, Wang X, Baker F, Khoyi M, Sanders KM. Interstitial cells of Cajal mediate cholinergic neurotransmission from enteric motor neurons. *J Neurosci* 2000; 20: 1393-1403 [PMID: 10662830]
 - 27 Iino S, Horiguchi K. Interstitial cells of cajal are involved in neurotransmission in the gastrointestinal tract. *Acta Histochem Cytochem* 2006; 39: 145-153 [PMID: 17327901 DOI: 10.1267/ahc.06023]
 - 28 Spiller R, Garsed K. Postinfectious irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2009; 136: 1979-1988 [PMID: 19457422 DOI: 10.1053/j.gastro.2009.02.074]
 - 29 Gibbons SJ, De Giorgio R, Faussone Pellegrini MS, Garrity-Park MM, Miller SM, Schmalz PF, Young-Fadok TM, Larson DW, Dozois EJ, Camilleri M, Stanghellini V, Szurszewski JH, Farrugia G. Apoptotic cell death of human interstitial cells of Cajal. *Neurogastroenterol Motil* 2009; 21: 85-93 [PMID: 18798796 DOI: 10.1111/j.1365-2982.2008.01185.x]
 - 30 贾后军, 童卫东, 刘宝华. 干细胞因子促进Cajal间质细胞恢复的研究. *中华实验外科杂志* 2012; 29: 888-890
 - 31 周婷, 陈明镭, 张丽, 沈世强, 罗和生. 慢性综合应激对大鼠肠道Cajal间质细胞的影响. *中华实验外科杂志* 2011; 28: 42-44
 - 32 Lammers WJ, Stephen B. Origin and propagation of individual slow waves along the intact feline small intestine. *Exp Physiol* 2008; 93: 334-346 [PMID: 18156170 DOI: 10.1113/expphysiol.2007.039180]
 - 33 Shafik A, El-Sibai O, Shafik AA, Ahmed I. Electric activity of the colon in irritable bowel syndrome: the 'tachyarrhythmic' electric pattern. *J Gastroenterol Hepatol* 2004; 19: 205-210 [PMID: 14731132 DOI: 10.1111/j.1440-1746.2004.03279.x]
 - 34 Wang XY, Vannucchi MG, Nieuwmeier F, Ye J, Faussone-Pellegrini MS, Huizinga JD. Changes in interstitial cells of Cajal at the deep muscular plexus are associated with loss of distention-induced burst-type muscle activity in mice infected by *Trichinella spiralis*. *Am J Pathol* 2005; 167: 437-453 [PMID: 16049330 DOI: 10.1016/S0002-9440(10)62988-4]
 - 35 郝筱倩, 赵董. 多种胃肠激素对肠易激综合征患者小肠运动功能的研究. *南方医科大学学报* 2007; 27: 1492-1495
 - 36 Powell AK, Bywater RA. Murine intestinal migrating motor complexes: longitudinal components. *Neurogastroenterol Motil* 2003; 15: 245-256 [PMID: 12787334 DOI: 10.1046/j.1365-2982.2003.00405.x]
 - 37 Koh SD, Kim TW, Jun JY, Glasgow NJ, Ward SM, Sanders KM. Regulation of pacemaker currents in interstitial cells of Cajal from murine small intestine by cyclic nucleotides. *J Physiol* 2000; 527 Pt 1: 149-162 [PMID: 10944178]
 - 38 Chey WY, Jin HO, Lee MH, Sun SW, Lee KY. Colonic motility abnormality in patients with irritable bowel syndrome exhibiting abdominal pain and diarrhea. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 1499-1506 [PMID: 11374689 DOI: 10.1016/S0002-9270(01)02367-X]
 - 39 Plujà L, Albertí E, Fernández E, Mikkelsen HB, Thuneberg L, Jiménez M. Evidence supporting presence of two pacemakers in rat colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 281: G255-G266 [PMID: 11408279]
 - 40 柯美云. 功能性胃肠病并非单纯功能病. *中国实用内科杂志: 临床前沿版* 2006; 26: 721-722
 - 41 丁瑞峰, 王爱鱼, 王宏杰, 郭元虎, 赵鹏程. 内脏高敏感大鼠结肠Cajal间质细胞C-KIT表达增加. *基础医学与临床* 2012; 32: 566-569
 - 42 Ohman L, Simrén M. Pathogenesis of IBS: role of inflammation, immunity and neuroimmune interactions. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2010; 7: 163-173 [PMID: 20101257 DOI: 10.1038/nrgastro.2010.4]

■应用要点

深入研究ICC与IBS发病的关系, 有助于提高人们对于IBS的了解, 可能会为IBS的病理研究及治疗提供新的认识。

■同行评价

本文阐述ICC的分布、功能以及与IBS的关系,有助于对IBS的发病机制最新进展的了解。

- 43 Barbara G, De Giorgio R, Stanghellini V, Cremon C, Corinaldesi R. A role for inflammation in irritable bowel syndrome? *Gut* 2002; 51 Suppl 1: i41-i44 [PMID: 12077063 DOI: 10.1136/gut.51.suppl_1.i41]
- 44 张静瑜, 黄裕新, 秦明, 王景杰. SCF/c-kit过度激活在肠易激综合征内脏敏化中的作用. *山西医科大学学报* 2012; 43: 177-181
- 45 Rubin G, De Wit N, Meineche-Schmidt V, Seifert B, Hall N, Hungin P. The diagnosis of IBS in primary care: consensus development using nominal group technique. *Fam Pract* 2006; 23: 687-692 [PMID: 17062586 DOI: 10.1093/fampra/cml050]
- 46 Lu G, Qian X, Berezin I, Telford GL, Huizinga JD, Sarna SK. Inflammation modulates in vitro colonic myoelectric and contractile activity and interstitial cells of Cajal. *Am J Physiol* 1997; 273: G1233-G1245 [PMID: 9435548]
- 47 Dunlop SP, Coleman NS, Blackshaw E, Perkins AC, Singh G, Marsden CA, Spiller RC. Abnormalities of 5-hydroxytryptamine metabolism in irritable bowel syndrome. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2005; 3: 349-357 [PMID: 15822040 DOI: 10.1016/S1542-3565(04)00726-8]
- 48 Zhang H, Yan Y, Shi R, Lin Z, Wang M, Lin L. Correlation of gut hormones with irritable bowel syndrome. *Digestion* 2008; 78: 72-76 [PMID: 18948690 DOI: 10.1159/000165352]
- 49 李兆申, 詹丽杏, 邹多武, 许国铭, 满晓华, 叶熙亭. 肠易激综合征患者分泌5-羟色胺的肠嗜铬细胞形态及功能的改变. *中华消化杂志* 2004; 24: 94-97
- 50 朱良如, 谢小平, 钱伟, 侯晓华. 5-羟色胺在胃机械感觉过敏中的作用. *中华消化杂志* 2005; 25: 166-168
- 51 Wouters MM, Roeder JL, Tharayil VS, Stanich JE, Strega PR, Lei S, Bardsley MR, Ordog T, Gibbons SJ, Farrugia G. Protein kinase C[gamma] mediates regulation of proliferation by the serotonin 5-hydroxytryptamine receptor 2B. *J Biol Chem* 2009; 284: 21177-21184 [PMID: 19531484 DOI: 10.1074/jbc.M109.015859]
- 52 Patterson LM, Zheng H, Ward SM, Berthoud HR. Immunohistochemical identification of cholecystokinin A receptors on interstitial cells of Cajal, smooth muscle, and enteric neurons in rat pylorus. *Cell Tissue Res* 2001; 305: 11-23 [PMID: 11512662 DOI: 10.1007/s004410100402]

编辑 郭鹏 电编 鲁亚静



ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) DOI: 10.11569 2013年版权归Baishideng所有

• 消息 •

《世界华人消化杂志》被评为中国精品科技期刊

本刊讯 2011-12-02, 中国科学技术信息研究所在北京发布2010年中国科技论文统计结果, 经过中国精品科技期刊遴选指标体系综合评价, 《世界华人消化杂志》被评为2011年度中国精品科技期刊. 中国精品科技期刊以其整体的高质量示范作用, 带动我国科技期刊学术水平的提高. 精品科技期刊的遴选周期为三年. (《世界华人消化杂志》编辑部)

大肠癌筛查癌前病变人群随访问隔的研究进展

杨黎明, 杨琛, 闫蓓, 陈涵一, 孙乔

杨黎明, 孙乔, 上海市浦东新区疾病预防控制中心主任室 上海市 200136

杨琛, 闫蓓, 陈涵一, 上海市浦东新区疾病预防控制中心肿瘤、伤害防治与生命统计科 上海市 200136

杨黎明, 副主任医师, 主要从事肿瘤流行病学与慢性病防控策略研究。

上海市卫生局科研课题计划基金资助项目, No. 20134128

作者贡献分布: 杨黎明确立综述主题和研究方向; 陈涵一负责搜集文献; 杨黎明、杨琛、闫蓓及陈涵一共同完成综述的撰写与修改; 孙乔审核。

通讯作者: 孙乔, 主任医师, 200136, 上海市浦东新区张杨路3039号, 上海市浦东新区疾病预防控制中心主任办公室。

qsun@pdcdc.sh.cn

电话: 021-50352884

收稿日期: 2013-09-09 修回日期: 2013-11-05

接受日期: 2013-11-11 在线出版日期: 2013-12-18

Follow-up intervals for precancerous colorectal conditions

Li-Ming Yang, Chen Yang, Bei Yan, Han-Yi Chen, Qiao Sun

Li-Ming Yang, Qiao Sun, Office of Chief Director, Pudong New Area Center for Disease Control and Prevention, Shanghai 200136, China

Chen Yang, Bei Yan, Han-Yi Chen, Department of Cancer, Injury Prevention and Vital Statistics, Pudong New Area Center for Disease Control and Prevention, Shanghai 200136, China

Supported by: the Shanghai Municipal Health Bureau Fund, No. 20134128

Correspondence to: Qiao Sun, Chief Physician, Office of Chief Director, Pudong New Area Center for Disease Control and Prevention, 3039 Zhangyang Road, Pudong New Area, Shanghai 200136, China. qsun@pdcdc.sh.cn

Received: 2013-09-09 Revised: 2013-11-05

Accepted: 2013-11-11 Published online: 2013-12-18

Abstract

Colorectal cancer screening is useful not only in detecting colorectal cancer at an early stage, but also in finding people with precancerous conditions. Proper interference in precancerous patients is good for reducing the occurrence of cancer. The precancerous conditions vary from patient to patient, so is the risk of malignant transformation. However, the lack of clear definition and classification for precancerous colorectal conditions in China makes standard treatment and follow-up management of these people difficult. This review summarizes basic

definition and classification for precancerous colorectal conditions, clarifies different risks among people, and introduces the latest progress in follow-up intervals worldwide.

© 2013 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

Key Words: Colorectal cancer screening; Precancerous conditions; Follow-up interval; Colonoscopy

Yang LM, Yang C, Yan B, Chen HY, Sun Q. Follow-up intervals for precancerous colorectal conditions. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(35): 3971-3976 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/3971.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v21.i35.3971>

摘要

“大肠癌筛查”不仅有助于发现结直肠早癌患者, 还能及早识别结直肠癌前病变患者。合理干预结直肠癌前病变患者, 降低患者癌变可能, 有助于早期阻断结直肠癌发展进程。不同癌前病变患者其病变形式不同, 癌变风险也不一样。然而, 目前国内开展的“大肠癌筛查”工作缺乏针对癌前病变患者相应的诊疗和随访管理规范。本文就结直肠癌前病变的定义与分类、不同风险癌前病变患者及其诊疗和随访问隔的研究进展作一综述。

© 2013年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词: 大肠癌筛查; 癌前病变; 随访问隔; 结肠镜

核心提示: 本文就结直肠癌前病变的定义与分类、不同风险癌前病变患者及其诊疗和随访问隔的研究进展作综述。对于大肠癌癌前病变筛查及随访具有重要的现实意义。

杨黎明, 杨琛, 闫蓓, 陈涵一, 孙乔. 大肠癌筛查癌前病变人群随访问隔的研究进展. *世界华人消化杂志* 2013; 21(35): 3971-3976 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/3971.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v21.i35.3971>

0 引言

大肠癌又称结直肠癌, 是发生于结肠或直肠的

■背景资料

近年来我国结直肠癌发病率、死亡率逐年上升, 实现结直肠癌的“三早”预防意义重大。目前全国多地已相继开展“大肠癌筛查”工作。不同癌前病变的患者恶变差异大, 应当采取不同的诊治和随访策略。合理干预结直肠癌前病变患者, 有助于早期阻断结直肠癌发展过程。

■同行评议者

程英升, 教授, 同济大学附属第十人民医院影像临床医学中心

■ 研发前沿

国内开展的“大肠癌筛查”项目主要以危险度评估量表和粪便隐血试验作为初筛,初筛阳性者再通过结肠镜进一步筛查以判断确诊。但对结肠直肠癌前病变界定不一、疏于管理,缺乏相应的诊疗和随访规范指南。

恶性上皮性肿瘤^[1]。据全球恶性肿瘤统计数据显示,男性结直肠癌发病率、死亡率分列恶性肿瘤第3和第4位;女性则为第2和第3位^[2]。在我国,尤其是城市,结直肠癌发病率呈持续上升趋势,已成为最常见的恶性肿瘤之一^[3]。结直肠癌是可防可控的,早期发现患者5年存活率可达90%以上^[4]。筛查不仅有助于发现结直肠癌患者,特别是无症状早癌患者,还能识别息肉、不典型增生等癌前病变患者^[5]。因此,“大肠癌筛查”被认为是一项有益于公众健康的重大公共卫生服务项目。

一般认为,普通人群50岁以后应当进行大肠癌筛查^[6],初次全结肠镜筛查阴性者,建议间隔10年进行复查^[7];筛查确诊为结直肠癌患者,可依据我国卫生部《结直肠癌诊疗规范》进行治疗^[8]。然而,对于全结肠镜筛查为癌前病变患者,国内尚无相应的治疗、随访规范指南。研究显示,未经干预的癌前病变患者未来发展为结直肠癌的风险极高^[9-11];不同癌前病变患者恶变差异极大^[12]。合理干预结直肠癌前病变患者,针对不同风险癌前病变患者采取不同诊治和随访策略,既能提高患者依从性,又可避免不必要的医疗资源浪费^[13-15]。本文就不同风险结直肠癌前病变人群诊疗策略、随访复查间隔作综述。

1 定义与分类

结直肠癌前病变本身不是恶性肿瘤。息肉、不典型增生、炎性肠病等有可能发展为结直肠癌的病变被普遍归为癌前病变^[16]。2013年我国卫生部试行的《结肠癌规范化诊疗指南》根据组织学分类,将腺瘤、锯齿状病变、错构瘤、特殊息肉(Cowden相关性息肉、幼年性息肉、Peutz-Jeghers息肉)纳入癌前病变范畴^[17]。国外不少研究则根据形态学分类,将结直肠癌前病变分为息肉样病变和非息肉样病变。息肉样病变包括带蒂息肉和无蒂息肉;而非息肉样病变可分为扁平型、隆起型、凹陷型^[18-20]。

2 癌前病变与结直肠癌高危人群

2.1 遗传性高危人群 通常认为,5%-10%结直肠癌是由遗传因素所引起^[21]。因此,一些特殊的息肉样/非息肉样病变患者及其一级亲属是罹患结直肠癌的高风险人群,需要特别关注^[22,23]。(1)家族性腺瘤性息肉病(familial adenomatous polyposis, FAP):家族性腺瘤性息肉病是一种由腺瘤性息肉病基因(adenomatous polyposis coli, APC)突变所致的常染色体显性遗传病,该病息肉属腺瘤,多发于远端结肠,腺瘤数目超过100枚,癌变的概率几乎为100%,几乎所有患者均会在40岁前罹患结直肠癌^[24]。衰减型家族性腺瘤性息肉病(attenuated familial adenomatous polyposis, AFAP)遗传学基础与FAP相同,但呈轻度病程,其结直肠腺瘤数目为10-99枚,结直肠癌平均发生年龄晚于FAP^[25];(2) MUTYH相关性息肉病(MUTYH associated polyposis, MAP):MUTYH相关性息肉病是由于MUTYH基因突变引起的,结直肠癌发病风险高。其临床表现与FAP、Lynch综合征等相似^[26];(3) PJ综合征(Peutz-Jeghers syndrome, PJS):PJ综合征又称黑色素斑-胃肠息肉综合征,为单基因常染色体显性遗传病。息肉可发生于胃、小肠和结肠,息肉性质常为错构瘤^[27];(4) SPS综合征:锯齿状息肉综合征(serrated polyposis syndrome, SPS)是指满足以下任一条件的息肉样病变:乙状结肠附近至少有5个锯齿状息肉,其中2个直径超过1 cm;一级亲属患锯齿状息肉综合征,且自身乙状结肠附近发现锯齿状息肉;全结肠范围出现20个以上锯齿状息肉。目前普遍认为锯齿状息肉综合征是一种遗传性疾病,但具体遗传机制尚不清楚。SPS患者罹患结肠癌的风险明显增高,平均发病年龄在50-60岁^[28,29];(5) Lynch综合征: Lynch综合征患者罹患各类肿瘤,尤其是结直肠癌的风险高,故又称遗传性非息肉性大肠癌(hereditary nonpolyposis colorectal cancer, HNPCC),是一种常染色体显性遗传性疾病,占整个遗传性大肠癌发病率的10%-15%,其外显率为50%-60%^[30]。

2.2 非遗传性高危人群 除上述遗传性高危人群外,更多的癌前病变患者属于非遗传性人群。根据其癌前病变情况又可分为癌变低风险和癌变高风险两大类人群^[31]。腺瘤癌变风险主要与其大小、形态、数量、组织学类型和增生程度有关。多项研究显示^[32,33],超过1 cm的腺瘤未来癌变累积风险更高;绒毛状腺瘤癌变率较管状腺瘤和管状绒毛状腺瘤高;腺瘤的异型增生程度越高,癌变的危险越大。因此,普遍将结肠息肉数≥3个、或息肉直径≥1 cm、或具有绒毛状结构、或重度异型增生癌变可能大的癌前病变患者归为癌变高风险人群^[34]。此外,锯齿状息肉和扁平型息肉也日渐受到国内外专家关注。锯齿状息肉形态学复杂,可以分为不典型增生、无蒂锯齿状息肉/腺瘤和典型锯齿状腺瘤,后者具有更高的癌变可能^[35,36]。扁平型息肉是指息肉高度

低于其周边黏膜层2倍高度的息肉. 其体积虽小, 但重度异型增生率很高. 约20%-30%结直肠癌早期患者体内曾发现扁平型息肉, 因而也被认为是重要的癌前病变^[37].

2.3 其他高危人群 炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)又称肠炎, 主要分为溃疡性结肠炎和克罗恩病两类. 上述两种炎症性肠病都有癌变可能, 癌变几率与病程长短、累及范围、是否出血或伴随其他症状有关^[38]. (1)溃疡性结肠炎患者. 溃疡性结肠炎好发于直肠和结肠, 发病年龄多见于20-40岁. 癌变率与病程密切相关, 发病8-10年癌变风险逐年上升, 病程20年和30年以上者, 癌变率分别为5%-10%和12%-20%, 病程超过35年者其癌变率可达30%^[39,40]; 累及全结肠的比仅累及左结肠的癌变率更高^[41]. 此外, 结直肠有出血性溃疡、假息肉、瘢痕或管腔狭窄者恶变危险性更大; (2)克罗恩病患者. 克罗恩病是一种炎性肉芽肿性疾病, 多见于末段回肠和邻近结肠, 发病年龄多在15-30岁. 克罗恩病患者结直肠癌变机会较少, 但癌变发生率仍比普通人群高^[42]. 此外, 丹麦新近一项研究发现, 克罗恩病患者有肿瘤超额危险, 并指出超额危险与肿瘤亚型有关^[43]. 由于绝大多数IBD患者癌变是经上皮内瘤变发展而来的, 因此上皮内瘤变的分类对于判断IBD患者癌变风险有重要意义^[44]. 从形态学角度上皮内瘤变主要分为异型增生伴随病变或肿块(dysplasia-associated lesion or mass, DALM)和腺瘤样肿块(adenoma-like mass, ALM). DALM通常发生于IBD长期患者. 表现为扁平或凸起型病变/肿块, 与黏膜边缘不清, 须经组织学鉴定才能判断是否发生癌变. ALM是散发的腺瘤, 其形态与非IBD患者体内腺瘤相似. 通常建议DALM患者预防性肠切除, 而对于ALM患者, 普通息肉切除术即可^[45]. 两者的区分对于患者进一步采取何种诊治措施有重要意义.

3 癌前病变人群的诊治策略及随访问隔

目前推荐的大肠癌筛查方法主要是粪便隐血试验、乙状结肠镜和全结肠镜检查^[46]. 上述3种筛查方式中, 粪便隐血试验发现的阳性患者仍需进行全结肠镜检查以判断是假阳性还是结直肠癌或癌前病变患者. 其余两种方式筛查结果皆可直接作为判定依据, 但全结肠镜检是唯一被推荐作为息肉切除术后患者随访所用^[7]. 确诊为癌前病变患者后, 需根据其病变情况进行风险

分级. 低风险癌前病变患者包括不典型增生、息肉<1 cm以及仅有1-2个<1 cm管状腺瘤患者; 而高风险癌前病变患者其腺瘤数目往往 ≥ 3 个、或是绒毛状腺瘤、或息肉直径 ≥ 1 cm、或存在高级别不典型增生. 此外, IBD长期患者作为特殊的高风险人群也纳入讨论, 以下列述不同风险癌前病变患者的诊治策略和随访问隔^[34,47].

3.1 低风险癌前病变患者 (1)不典型增生或息肉<1 cm患者. 这类患者一般不需要临床干预, 根据患者病变部位有如下结直肠镜随访建议: 若病变位于患者左侧结肠(左侧结肠包括脾曲、降结肠、乙状结肠和直肠), 建议10年后行结肠镜复查; 若病变位于右侧结肠(包括盲肠、升结肠和横结肠), 建议5年后行结肠镜复查; (2)有1-2个管状腺瘤且都<1 cm的患者. 这类患者一般也不需要临床干预, 建议5年内行结肠镜复查, 若未再查出新发息肉或其他病变, 则今后每10年行结肠镜检查.

3.2 高风险癌前病变患者 (1)有3-10个腺瘤患者、或形态复杂、或腺瘤 ≥ 1 cm. 建议患者行息肉切除术后如怀疑未切除干净; 或是锯齿状腺瘤, 腺瘤本身较大, 术后2-6 mo先进行结肠镜复查, 如果没有新情况, 原来的息肉也已切除干净, 则3年内再行结肠镜复查. 若仍未再查出息肉, 可延长至5年后行结肠镜复查; (2)IBD患者. 美国国家综合癌症网络(National Comprehensive Cancer Network, NCCN)建议8-10年且累及全结肠的IBD患者, 或仅累及左侧结肠但病程超过12年的IBD患者每1-2年进行结肠镜检, 并在临床静息期每隔10 cm行4象限活检, 最好取30块以上组织标本. 根据组织形态学判断是否存在异型增生、上皮内瘤变或腺瘤并确定是否进行相应手术. 英国胃肠病学会(British Society of Gastroenterology, BSG)则认为IBD患者应当根据病情分级采取不同随访策略, 比如, 建议克罗恩病患者肠黏膜累及少于50%者, 结直肠镜随访问隔为5年; 结肠广泛炎症并处于轻度炎症或非炎症息肉者建议每3年随访一次; 异型增生5年、结肠广泛炎症并处于中/重度炎症建议每年结直肠镜随访^[48].

3.3 极高风险癌前病变患者 NCCN将腺瘤数超过10个的癌前病变患者归为极高风险癌变患者, 认为此类患者都有基因检测的必要^[34], 应根据其病理特征, 结合临床表现、既往史和家族史(含一、二、三级亲属), 进行相应的结直肠癌遗传性基因检测, 确定是否具有遗传性及其归属,

■相关报道

2013年美国国家综合癌症网络(NCCN)发布了《结直肠癌筛查临床规范》, 详细列述了不同人群(包括癌前病变人群)临床诊疗及建议随访时间, 但对部分癌前病变患者建议的随访问隔及随访方式与英国胃肠病学会(BSG)的随访指南不相同.

■创新盘点

目前国内开展的“大肠癌筛查”工作缺乏针对癌前病变患者相应的诊疗和随访管理规范。本文重点阐述了不同风险癌前病变患者诊疗和随访间隔的研究进展,对于完善目前国内“大肠癌筛查”项目实施方案,特别是针对大肠癌癌前病变患者的诊疗及随访流程具有极为重要的价值。

并采取以下诊治随访策略: (1)若为FAP患者,应行肠切除术/预防性肠切除术; (2)若为AFAP患者,根据腺瘤数量、腺瘤大小开展相应手术。若腺瘤数 ≤ 20 个,且大小均 < 1 cm,则每1-2年应进行结肠镜检;若为严重的多发性息肉,建议行回直肠吻合术(ileo-rectal anastomoses, IRA),且每6-12 mo行内镜检查; (3)若为MAP患者,则每1-2年应进行结肠镜检或必要的肠切除术; (4)若为SPS患者,则所有 ≥ 5 mm锯齿状息肉应全部切除,随后依据患者病情每1-3年进行结肠镜检; (5)若为Lynch综合征患者,腺瘤切除术后,建议每1-2年行结肠镜检。

4 现状与问题

国内开展的“大肠癌筛查”项目主要是以危险度评估量表和粪便隐血试验作为初筛,初筛阳性者再通过结直肠镜进一步筛查以判断确诊^[49]。然而,目前的筛查项目普遍缺乏针对结直肠癌前病变患者诊疗和随访的规范^[50]。不同大肠癌筛查定点医疗机构对癌前病变也存在界定不一,疏于管理的现象。另外,国内对于结直肠癌高危人群的相关遗传基因检测尚不重视,普遍缺乏基因检测的意识。

2013年美国国家综合癌症网络(NCCN)发布了《结直肠癌筛查临床规范》,详细列述了不同人群(包括癌前病变人群)临床诊疗及建议随访时间。但对部分癌前病变患者建议的随访间隔及随访方式与英国胃肠病学会(BSG)的随访指南不相同^[48]。我国学者提出的随访建议时间为:非肿瘤性息肉摘除后每隔3-5年结直肠镜检查;高级别腺瘤切除术后每年进行结直肠镜随访;低级别者每年进行便隐血试验、每隔3年进行结直肠镜随访^[51],这与NCCN指南也不全一致。

5 结论

目前国内尚缺乏针对不同风险癌前病变患者诊疗和随访的规范指南。寻找适合我国“大肠癌筛查”结直肠癌前病变患者的诊疗、随访方案,针对不同风险癌前病变患者制订相应的规范指南,提高宣传及推广力度,具有重要的现实意义。

6 参考文献

- Stanley R, Hamilton, Lauri A, Aaltonen. Pathology and genetics of tumors of the digestive system. Lyon: IARC press, 2000: 103-104
- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*

2011; 61: 69-90 [PMID: 21296855 DOI: 10.3322/caac.20107]

- 郑荣寿, 张思维, 吴良有, 李光琳, 赵平, 赫捷, 陈万青. 中国肿瘤登记地区2008年恶性肿瘤发病和死亡分析. *中国肿瘤* 2012; 21: 1-12
- 王继恒, 李世荣. 我国结直肠癌筛查和早期诊断十年回顾: 1994-2005. *胃肠病学* 2006; 11: 245-250
- 张苏展. 我国开展结直肠癌筛查工作的必要性和可行性. *中华胃肠外科杂志* 2011; 14: 16-18
- Rex DK, Johnson DA, Anderson JC, Schoenfeld PS, Burke CA, Inadomi JM. American College of Gastroenterology guidelines for colorectal cancer screening 2009 [corrected]. *Am J Gastroenterol* 2009; 104: 739-750 [PMID: 19240699 DOI: 10.1038/ajg.2009.104]
- British Columbia Medical Association. BC Guidelines: colorectal screening for cancer prevention in asymptomatic patients. Available from: URL: http://www.bcguidelines.ca/pdf/colorectal_screening.pdf
- 中华人民共和国卫生部医政司. 结直肠癌诊疗规范(2010年版). *中华胃肠外科杂志* 2010; 13: 865-875
- Lieberman DA, Rex DK, Winawer SJ, Giardiello FM, Johnson DA, Levin TR. Guidelines for colonoscopy surveillance after screening and polypectomy: a consensus update by the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer. *Gastroenterology* 2012; 143: 844-857 [PMID: 22763141 DOI: 10.1053/j.gastro.2012.06.001]
- Avidan B, Sonnenberg A, Schnell TG, Leya J, Metz A, Sontag SJ. New occurrence and recurrence of neoplasms within 5 years of a screening colonoscopy. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 1524-1529 [PMID: 12094877]
- Stryker SJ, Wolff BG, Culp CE, Libbe SD, Ilstrup DM, MacCarty RL. Natural history of untreated colonic polyps. *Gastroenterology* 1987; 93: 1009-1013 [PMID: 3653628]
- Naini BV, Odze RD. Advanced precancerous lesions (APL) in the colonic mucosa. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2013; 27: 235-256 [PMID: 23809243 DOI: 10.1016/j.bpg.2013.03.012]
- Goodwin JS, Singh A, Reddy N, Riall TS, Kuo YF. Overuse of screening colonoscopy in the Medicare population. *Arch Intern Med* 2011; 171: 1335-1343 [PMID: 21555653 DOI: 10.1001/archinternmed.2011.212]
- Elsadani NN, East JE, Walters JR. New 2010 British Society of Gastroenterology colitis surveillance guidelines: costs and surveillance intervals. *Gut* 2011; 60: 282-283 [PMID: 20966028 DOI: 10.1136/gut.2010.225466]
- 马新源, 李其龙, 马万里. 大肠癌筛查的成本测算及成本控制. *中国肿瘤* 2011; 20: 422-424
- Sandouk F, Al Jerf F, Al-Halabi MH. Precancerous lesions in colorectal cancer. *Gastroenterol Res Pract* 2013; 2013: 457901 [PMID: 23737765 DOI: 10.1155/2013/457901]
- 中华人民共和国卫生部. 结肠癌规范化诊疗指南(试行). URL: <http://www.chinagp.net/news/?794.html>, 2013
- Vormbrock K, Mönkemüller K. Difficult colon polypectomy. *World J Gastrointest Endosc* 2012; 4: 269-280 [PMID: 22816006 DOI: 10.4253/wjge.v4.i7.269]
- Sung JJ, Lau JY, Young GP, Sano Y, Chiu HM, Byeon JS, Yeoh KG, Goh KL, Sollano J, Rerknimitr

- R, Matsuda T, Wu KC, Ng S, Leung SY, Makharia G, Chong VH, Ho KY, Brooks D, Lieberman DA, Chan FK. Asia Pacific consensus recommendations for colorectal cancer screening. *Gut* 2008; 57: 1166-1176 [PMID: 18628378 DOI: 10.1136/gut.2007.146316]
- 20 Konishi F. Runme Shaw Memorial Lecture 2002. Modern management of colorectal polyps: Are they all premalignant? *Ann Acad Med Singapore* 2003; 32: 263-268 [PMID: 12772533]
- 21 Lynch HT, de la Chapelle A. Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med* 2003; 348: 919-932 [PMID: 12621137 DOI: 10.1056/NEJMra012242]
- 22 Conteduca V, Sansonno D, Russi S, Dammacco F. Precancerous colorectal lesions (Review). *Int J Oncol* 2013; 43: 973-984 [PMID: 23900573 DOI: 10.3892/ijo.2013.2041]
- 23 Patel SG, Ahnen DJ. Familial colon cancer syndromes: an update of a rapidly evolving field. *Curr Gastroenterol Rep* 2012; 14: 428-438 [PMID: 22864806 DOI: 10.1007/s11894-012-0280-6]
- 24 Scott RJ, Meldrum C, Crooks R, Spigelman AD, Kirk J, Tucker K, Koorey D. Familial adenomatous polyposis: more evidence for disease diversity and genetic heterogeneity. *Gut* 2001; 48: 508-514 [PMID: 11247895 DOI: 10.1136/gut.48.4.508]
- 25 苏芳, 王涛, 王邦茂. 衰减型家族性腺瘤性息肉病. *中国消化内镜* 2008; 8: 20-26
- 26 De Schepper HU, Fierens H, Steger PH, Colemont L. MUTYH associated polyposis coli: one common and one rare mutation. *Dig Dis Sci* 2012; 57: 1968-1970 [PMID: 22402879 DOI: 10.1007/s10620-012-2107-6]
- 27 Aretz S, Stienen D, Uhlhaas S, Loff S, Back W, Pagenstecher C, McLeod DR, Graham GE, Mangold E, Santer R, Propping P, Friedl W. High proportion of large genomic STK11 deletions in Peutz-Jeghers syndrome. *Hum Mutat* 2005; 26: 513-519 [PMID: 16287113 DOI: 10.1002/humu.20253]
- 28 Guarinos C, Sánchez-Fortún C, Rodríguez-Soler M, Alenda C, Payá A, Jover R. Serrated polyposis syndrome: molecular, pathological and clinical aspects. *World J Gastroenterol* 2012; 18: 2452-2461 [PMID: 22654442 DOI: 10.3748/wjg.v18.i20.2452]
- 29 Aust DE, Baretton GB. Serrated polyps of the colon and rectum (hyperplastic polyps, sessile serrated adenomas, traditional serrated adenomas, and mixed polyps)-proposal for diagnostic criteria. *Virchows Arch* 2010; 457: 291-297 [PMID: 20617338 DOI: 10.1007/s00428-010-0945-1]
- 30 Hendriks YM, de Jong AE, Morreau H, Tops CM, Vasen HF, Wijnen JT, Breuning MH, Bröcker-Vriends AH. Diagnostic approach and management of Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma): a guide for clinicians. *CA Cancer J Clin* 2006; 56: 213-225 [PMID: 16870997 DOI: 10.3322/canjclin.56.4.213]
- 31 Saini SD, Kim HM, Schoenfeld P. Incidence of advanced adenomas at surveillance colonoscopy in patients with a personal history of colon adenomas: a meta-analysis and systematic review. *Gastrointest Endosc* 2006; 64: 614-626 [PMID: 16996358 DOI: 10.1016/j.gie.2006.06.057]
- 32 李建国. 结直肠腺瘤性息肉电切术后复发危险因素分析及随访策略探讨. 中南大学, 2011
- 33 郑树, 黄彦钦, 董琦. 我国结直肠癌筛查的历程与展望. *实用肿瘤杂志* 2013; 28: 227-228
- 34 Burt RW, Barthel JS, Dunn KB, David DS, Drelichman E, Ford JM, Giardiello FM, Gruber SB, Halverson AL, Hamilton SR, Ismail MK, Jasperson K, Lazenby AJ, Lynch PM, Martin EW, Mayer RJ, Ness RM, Provenzale D, Rao MS, Shike M, Steinbach G, Terdiman JP, Weinberg D. NCCN clinical practice guidelines in oncology. Colorectal cancer screening. *J Natl Compr Canc Netw* 2010; 8: 8-61 [PMID: 20064289]
- 35 Tadros M, Anderson JC. Serrated polyps: clinical implications and future directions. *Curr Gastroenterol Rep* 2013; 15: 342 [PMID: 23934652 DOI: 10.1007/s11894-013-0342-4]
- 36 Álvarez C, Andreu M, Castells A, Quintero E, Bu-janda L, Cubiella J, Salas D, Lanás A, Carballo F, Morillas JD, Hernández C, Jover R, Sarasqueta C, Enríquez-Navascués JM, Hernández V, Estévez P, Macenlle R, Sala T, Balaguer F, Pellisé M, Moreira L, Gil I, Peris A, González-Rubio F, Ferrández A, Poves C, Ponce M, Grau J, Serradesanferm A, Ono A, Cruzado J, Pérez-Riquelme F, Alonso-Abreu I, Carrillo-Palau M, Santander C, Díaz Tasende J, Her-reros A, Cacho G, Barranco LE, Bessa X. Relationship of colonoscopy-detected serrated polyps with synchronous advanced neoplasia in average-risk individuals. *Gastrointest Endosc* 2013; 78: 333-341. e1 [PMID: 23623039 DOI: 10.1016/j.gie.2013.03.003]
- 37 Raju GS, Vadyala V, Slack R, Krishna SG, Ross WA, Lynch PM, Bresalier RS, Hawk E, Strohlein JR. Adenoma detection in patients undergoing a comprehensive colonoscopy screening. *Cancer Med* 2013; 2: 391-402 [PMID: 23930215 DOI: 10.1002/cam4.73]
- 38 Cairns SR, Scholefield JH, Steele RJ, Dunlop MG, Thomas HJ, Evans GD, Eaden JA, Rutter MD, Atkin WP, Saunders BP, Lucassen A, Jenkins P, Fairclough PD, Woodhouse CR. Guidelines for colorectal cancer screening and surveillance in moderate and high risk groups (update from 2002). *Gut* 2010; 59: 666-689 [PMID: 20427401 DOI: 10.1136/gut.2009.179804]
- 39 Rogler G. Chronic ulcerative colitis and colorectal cancer. *Cancer Lett* 2013 Aug 11. [Epub ahead of print] [PMID: 23941831 DOI: 10.1016/j.canlet.2013.07.032]
- 40 Arthurs EA, Burley K, Gholkar B, Williams L, Lockett M. Colorectal cancer surveillance in inflammatory bowel disease: a primary care perspective. *Gut* 2011; 60: A130 [DOI: 10.1136/gut.2011.239301.275]
- 41 Julka M, Cherukuri M, Lamah R. Screening for cancerous and precancerous conditions of the colon. *Prim Care* 2011; 38: 449-468; viii [PMID: 21872091 DOI: 10.1016/j.pop.2011.05.009]
- 42 Scaringi S, Di Martino C, Zamboni D, Fazi M, Canonico G, Leo F, Ficari F, Tonelli F. Colorectal cancer and Crohn's colitis: clinical implications from 313 surgical patients. *World J Surg* 2013; 37: 902-910 [PMID: 23381673 DOI: 10.1007/s00268-013-1922-z]
- 43 Jess T, Horváth-Puhó E, Fallingborg J, Rasmussen HH, Jacobsen BA. Cancer Risk in Inflammatory Bowel Disease According to Patient Phenotype and Treatment: A Danish Population-Based Cohort Study. *Am J Gastroenterol* 2013 Aug 27. [Epub ahead of print] [PMID: 23978954 DOI: 10.1038/ajg.2013.249]
- 44 Neumann H, Vieth M, Langner C, Neurath MF, Mudter J. Cancer risk in IBD: how to diagnose and how to manage DALM and ALM. *World J Gastroenterol* 2011; 17: 3184-3191 [PMID: 21912466 DOI: 10.3748/wjg.v17.i27.3184]
- 45 Loddenkemper C. Diagnostic standards in the pathology of inflammatory bowel disease. *Dig Dis* 2009; 27: 576-583 [PMID: 19897978 DOI:

■应用要点

本文重点阐述了不同风险癌前病变患者诊疗和随访问隔的研究进展, 对于完善目前国内“大肠癌筛查”项目实施方案, 特别是针对大肠癌癌前病变患者的诊疗及随访流程具有极为重要的价值。

■同行评价

本文覆盖大肠癌前病变各种随访流程,有一定临床价值,对于大肠癌前病变筛查非常有价值,对其随访则更有意义。

- 10.1159/000233301]
- 46 邓尚新,蔡全才,李兆申. 大肠癌筛查方法的研究进展. 胃肠病学和肝病学杂志 2010; 19: 99-102
- 47 Baron TH, Smyrk TC, Rex DK. Recommended intervals between screening and surveillance colonoscopies. *Mayo Clin Proc* 2013; 88: 854-858 [PMID: 23910411 DOI: 10.1016/j.mayocp]
- 48 Guagnozzi D, Lucendo AJ. Colorectal cancer surveillance in patients with inflammatory bowel disease: What is new? *World J Gastrointest Endosc* 2012; 4: 108-116 [PMID: 22523611 DOI: 10.4253/wjge.v4.i4.108]
- 49 李其龙,马新源,俞玲玲,姚开颜,马万里,薛峰. 大肠癌优化序贯筛查方案的应用研究. 浙江大学学报(医学版) 2011; 40: 272-275
- 50 Leung WK, Lau JY, Suen BY, Wong GL, Chow DK, Lai LH, To KF, Yim CK, Lee ES, Tsoi KK, Ng SS, Sung JJ. Repeat-screening colonoscopy 5 years after normal baseline-screening colonoscopy in average-risk Chinese: a prospective study. *Am J Gastroenterol* 2009; 104: 2028-2034 [PMID: 19455125 DOI: 10.1038/ajg.2009.202]
- 51 陈坤,金明娟. 结直肠癌人群筛查策略. 浙江大学学报(医学版) 2011; 40: 233-236

编辑 郭鹏 电编 鲁亚静



ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) DOI: 10.11569 2013年版权归Baishideng所有

• 消息 •

中国科技信息研究所发布《世界胃肠病学杂志(英文版)》 影响因子 0.873

本刊讯 一年一度的中国科技论文统计结果2012-12-07由中国科技信息研究所(简称中信所)在北京发布。《中国科技期刊引证报告(核心版)》统计显示, 2011年《世界胃肠病学杂志(英文版)》总被引频次6 979次, 影响因子0.873, 综合评价总分88.5分, 分别位居内科学类52种期刊的第1位、第3位、第1位, 分别位居1998种中国科技核心期刊(中国科技论文统计源期刊)的第11位、第156位、第18位; 其他指标: 即年指标0.219, 他引率0.89, 引用刊数619种, 扩散因子8.84, 权威因子2 144.57, 被引半衰期4.7, 来源文献量758, 文献选出率0.94, 地区分布数26, 机构分布数1, 基金论文比0.45, 海外论文比0.71。

经过多项学术指标综合评定及同行专家评议推荐,《世界胃肠病学杂志(英文版)》再度被收录为“中国科技核心期刊”(中国科技论文统计源期刊)。根据2011年度中国科技论文与引文数据库(CSTPCD 2011)统计结果,《世界胃肠病学杂志(英文版)》荣获2011年“百种中国杰出学术期刊”称号。

薯蓣皂苷元通过MAPK通路对食管癌细胞Eca109的调控

林杰, 谈永飞, 马铁梁, 葛志军, 吴媛媛, 丁伟良, 冯加可, 蒋国军, 史国振, 唐志安

林杰, 谈永飞, 蒋国军, 史国振, 江苏大学附属宜兴医院心胸外科 江苏省宜兴市 214200

马铁梁, 丁伟良, 吴媛媛, 冯加可, 江苏大学附属宜兴医院中心实验室 江苏省宜兴市 214200

葛志军, 江苏大学附属宜兴医院重症医学科 江苏省宜兴市 214200

唐志安, 江苏大学附属宜兴医院中医科 江苏省宜兴市 214200

林杰, 江苏大学在读硕士, 主要从事心胸外科肿瘤方向的研究。

江苏省自然科学基金资助项目, No. BK2012563

江苏省卫生厅医学科研基金资助项目, No. Z201218

作者贡献分布: 林杰与谈永飞对此文所作贡献均等; 此课题由谈永飞与林杰设计; 实验过程由林杰、马铁梁、丁伟良、吴媛媛及冯加可操作完成; 研究所用试剂和分析工具有谈永飞、葛志军、蒋国军、史国振及唐志安提供; 本论文写作由林杰与谈永飞完成。

通讯作者: 谈永飞, 教授, 主任医师, 214200, 江苏省宜兴市通贞观路75号, 江苏大学附属宜兴医院心胸外科。

yongfeitian@sina.com

电话: 0510-87330725

收稿日期: 2013-09-10 修回日期: 2013-10-22

接受日期: 2013-10-31 在线出版日期: 2013-12-18

Diosgenin regulates proliferation, apoptosis, migration and invasion of human esophageal cancer Eca109 cells via the MAPK signaling pathway

Jie Lin, Yong-Fei Tan, Tie-Liang Ma, Zhi-Jun Ge, Yuan-Yuan Wu, Wei-Liang Ding, Jia-Ke Feng, Guo-Jun Jiang, Guo-Zhen Shi, Zhi-An Tang

Jie Lin, Yong-Fei Tan, Guo-Jun Jiang, Guo-Zhen Shi, Department of Cardiac & Thoracic Surgery, the Affiliated Yixing Hospital of Jiangsu University, Yixing 214200, Jiangsu Province, China

Tie-Liang Ma, Wei-Liang Ding, Yuan-Yuan Wu, Jia-Ke Feng, Central Laboratory, the Affiliated Yixing Hospital of Jiangsu University, Yixing 214200, Jiangsu Province, China

Zhi-Jun Ge, Department of Critical Care Medicine, the Affiliated Yixing Hospital of Jiangsu University, Yixing 214200, Jiangsu Province, China

Zhi-An Tang, Department of Traditional Chinese Medicine, the Affiliated Yixing Hospital of Jiangsu University, Yixing 214200, Jiangsu Province, China

Supported by: the Natural Science Foundation of Jiangsu Province, No. BK2012563; and the Medical Research Project of Health Department of Jiangsu Province, No. Z201218

Correspondence to: Yong-Fei Tan, Professor, Chief Physician, Department of Cardiac & Thoracic Surgery, the Affiliated Yixing Hospital of Jiangsu University, 75 Tongzhenguan Road, Yixing 214200, Jiangsu Province, China. yongfeitian@sina.com

Received: 2013-09-10 Revised: 2013-10-22

Accepted: 2013-10-31 Published online: 2013-12-18

Abstract

AIM: To investigate the effects of diosgenin on the proliferation, apoptosis, migration and invasion of human esophageal Eca109 cells and to explore the underlying mechanisms.

METHODS: MTT and transwell experiments were executed to detect the effects of diosgenin on the proliferation, migration and invasion of Eca109 cells. Western blot was applied to detect the expression of c-Jun N-terminal of stress-activated protein kinase (JNK), extracellular signal-regulated kinase (Erk1/2) and the p38 kinase of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway.

RESULTS: Compared with the control group, Eca109 cells treated with 50 µg/mL of diosgenin for 48 h showed significantly decreased proliferation, migration (16.54 vs 34.12, $P < 0.05$) and invasion (9.42 vs 26.99, $P < 0.05$) but increased apoptosis (0.24 vs 0.64, $P < 0.05$). Moreover, diosgenin treatment significantly decreased the expression of p-p38 protein (1.66 vs 0.23, $P < 0.05$) but had no significant effect on the expression of JNK, Erk1/2, p38, p-JNK, or p-Erk1/2.

CONCLUSION: Diosgenin regulates the proliferation, apoptosis, migration and invasion of Eca109 cells possibly via the p-p38 pathway.

© 2013 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

Key Words: Diosgenin; Human esophageal cells; Eca109; Mitogen-activated protein kinase

Lin J, Tan YF, Ma TL, Ge ZJ, Wu YY, Ding WL, Feng JK, Jiang GJ, Shi GZ, Tang ZA. Diosgenin regulates proliferation, apoptosis, migration and invasion of human esophageal cancer Eca109 cells via the MAPK signaling pathway. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(35): 3977-3982 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/3977.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i35.3977>

摘要

目的: 探讨薯蓣皂苷元(diosgenin, Dio)对人食

■背景资料

食管癌是常见的消化系统恶性肿瘤, 常规的治疗方法有手术切除, 化疗及放疗, 这些方法有一定的不良反应和化疗耐药性。因此, 寻找一种高效低毒的天然植物药物对食管癌治疗具有重要临床意义。

■同行评议者

张志坚, 教授, 福州总医院消化内科

■ 研发前沿

薯蓣皂苷元是从我国特有的穿龙薯蓣中分离得到的一种植物甾体化合物。具有降血脂, 降血糖, 抗风湿, 抗心肌缺血, 抗肿瘤等重要作用。研究表明, 薯蓣皂苷元对胃癌, 结肠癌, 非小细胞肺癌等多种癌症具有抑制作用。

管癌Eca109细胞的增殖、凋亡、迁移和侵袭的影响以及其作用机制。

方法: MTT和Transwell实验检测薯蓣皂苷元对肿瘤细胞的增殖、凋亡、迁移和侵袭的影响。Western blot检测薯蓣皂苷元处理后的Eca109细胞丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号通路中c-jun氨基末端应激活化蛋白激酶(c-Jun N-terminal of stress-activated protein kinase, JNK), 细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, Erk1/2)和p38丝裂原活化蛋白激酶(p38 mitogen-activated protein kinase, p38)的蛋白表达水平。

结果: 食管癌Eca109细胞经过50 $\mu\text{g/mL}$ 的薯蓣皂苷元处理48 h后, 与未经药物处理的对照组相比, 细胞的增殖、迁移(16.54 vs 34.12, $P<0.05$)和侵袭(9.42 vs 26.99, $P<0.05$)效应显著下降, 细胞的凋亡效应明显增加(0.24 vs 0.64, $P<0.05$)。Eca109细胞中p-p38蛋白的表达水平明显降低(1.66 vs 0.23, $P<0.05$), 而JNK、Erk1/2、p38、p-JNK、p-Erk1/2蛋白表达水平的差异并不显著。

结论: 薯蓣皂苷元可能通过p-p38途径调控人食管癌细胞的增殖、凋亡、迁移和侵袭。

© 2013年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词: 薯蓣皂苷元; 食管癌细胞Eca109; MAPK

核心提示: 薯蓣皂苷元可显著抑制食管癌Eca109细胞的增殖、迁移并诱导其凋亡, 下调磷酸化的p38蛋白的表达可能是其诱导细胞凋亡的重要机制。

林杰, 谈永飞, 马铁梁, 葛志军, 吴媛媛, 丁伟良, 冯加可, 蒋国军, 史国振, 唐志安. 薯蓣皂苷元通过MAPK通路对食管癌细胞Eca109的调控. 世界华人消化杂志 2013; 21(35): 3977-3982
URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/3977.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v21.i35.3977>

0 引言

食管癌是我国高发肿瘤, 位居肿瘤死亡的第4位。其发生发展和多种细胞信号转导通路密切相关^[1]。手术和化疗为其主要治疗手段, 临床使用的化疗药物主要通过诱导肿瘤细胞凋亡而发生抗癌效果, 但同时其非选择性杀伤正常细胞也给肿瘤患者带来很多不良反应。虽然目前化疗药物为数不少, 但是大多其有效率低, 因此临床上急需找到高效, 低毒的食管癌治疗方法。

薯蓣皂苷元(diosgenin, Dio)是一种植物甾体化合物, 其抗肿瘤作用机制仍不明。薯蓣皂苷元能诱导多种肿瘤细胞的凋亡, 抑制其迁移和侵袭效应^[2-5]。但目前尚无文献报告薯蓣皂苷元对人食管癌细胞Eca109的效应以及其作用机制。

丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)调控细胞的增殖、侵袭、迁移和分化, 对研究肿瘤的发生、发展有重要的临床意义。主要包括3条信号通路: c-jun氨基末端应激活化蛋白激酶(c-Jun N-terminal of stress-activated protein kinase, JNK), 细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, Erk1/2)和p38丝裂原活化蛋白激酶(p38 mitogen-activated protein kinase, p38)^[6]。MAPK通路可在多种不同的信号转导通路中充当一种共同的信号转导成份, 且在细胞周期调控中发挥重要的作用。本文主要研究薯蓣皂苷元应用于Eca109细胞后, 探索其作用效果及相关机制, 为食管癌的治疗提供新策略。

1 材料和方法

1.1 材料 人食管癌细胞Eca109株购自美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection, ATCC)细胞库, 培养于体积10%胎牛血清、100 $\mu\text{g/mL}$ 的链霉素、100 U/mL的青霉素的RPMI 1640的培养液中, 置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数为50 mL/L CO_2 、饱和湿度的二氧化碳培养箱中培养。JNK(兔抗人)、p-JNK(兔抗人)、Erk1/2(兔抗人)、p-Erk1/2(兔抗人)、p38(兔抗人)、p-p38(兔抗人)抗体购自美国Cell Signaling公司; Bcl-2相关X蛋白(Bcl2-associated X protein, BAX)(兔抗人)和B细胞白血病/淋巴瘤相关蛋白(B cell leukemia/lymphoma 2, Bcl-2)(兔抗人)抗体购自Abcam公司; 甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)抗体购自碧云天公司; 薯蓣皂苷元购自Sigma-Aldrich公司(货号: S8534-25MG)。

1.2 方法

1.2.1 显微镜观察细胞形态: 显微镜观察取对数生长期Eca109细胞株 $4 \times 10^4/\text{mL}$ 接种到24孔板内, 1 mL/孔。加入不含血清的RPMI 1640培养液, 培养24 h后, 加入含不同浓度薯蓣皂苷元的RPMI 1640培养液(6.25、12.5、25、50、100 $\mu\text{g/mL}$), 阴性对照组中加无薯蓣皂苷元的RPMI 1640培养液。药物分别作用24、48、72 h后, 在倒置显微镜下观察细胞形态变化。

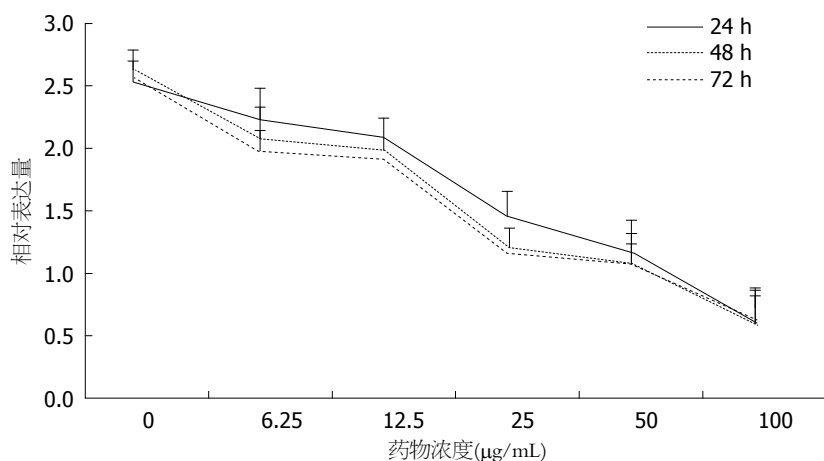


图 1 薯蓣皂苷元处理后 Eca109细胞活性.

■ 相关报道

MAPK属于一种蛋白激酶,可在多种不同的信号转导途径中充当一种共同的信号转导成份,且在细胞周期调控中发挥重要的作用.其中Erk1/2信号转导通路调控细胞生长和分化,JNK和p38信号转导通路在炎症与细胞凋亡中发挥重要作用.

1.2.2 MTT实验: 取对数生长期的Eca109细胞,用0.25%胰蛋白酶消化,以 1×10^5 /孔的密度接种于96孔板,每孔设5个复孔,并设阴性对照组.贴壁后,加入含不同浓度薯蓣皂苷元的RPMI 1640培养液.分别在培养24、48、72 h后,用酶标仪测570 nm处的吸光度(A_{570})值.

1.2.3 Transwell实验: 用于检测不同浓度(6.25、12.5、25、50、100 µg/mL)的薯蓣皂苷元对Eca109细胞株迁移(无基底膜组)、侵袭(有基底膜组)效应,实验采用孔径为8 µm的24孔Borden小室,上室中加入 2×10^5 个细胞,下室加入600 µL含体积分数为10%胎牛血清的RPMI 1640培养基.分别在培养24、48、72 h后, Giemsa染色,于200倍光镜下随机选择9个视野计数穿膜细胞数,取其平均值,作为穿过人工基底膜的细胞数量.

1.2.4 Western blot检测: 取对数生长期Eca109细胞,胰酶消化后调整细胞数为 5×10^5 /mL,以1 mL/孔接种于6孔板.待细胞贴壁后,加入最适浓度薯蓣皂苷元作用48 h,同时设置未加药物的阴性对照组,提取各组细胞总蛋白,经PAGE电泳后转膜,脱脂奶粉封闭,使用一抗,4 °C孵育过夜,加二抗,室温孵育2 h后洗二抗, ECL显影,观察及摄片.用Gel-Pro Analyzer4.0软件比较条带的积分光密度.

统计学处理 应用SPSS16.0统计软件对数据进行统计学处理.对计量资料,所得数据用mean ± SD表示,样本均数比较采用t检验或单因素方差分析(one way ANOVA). $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 薯蓣皂苷元对Eca109细胞形态的影响 未加薯蓣皂苷元的对照组Eca109细胞呈圆形贴壁生长.不同浓度的薯蓣皂苷元处理后,细胞形态发

生明显变化: 大小不一,轮廓不规则.在50 µg/mL浓度组中细胞表现为整体萎缩,变形,细胞折光减弱等经典细胞凋亡性状.在100 µg/mL浓度组中,细胞的增殖活性最低,细胞大量凋亡.

2.2 薯蓣皂苷元抑制Eca109细胞增殖 MTT比色法结果显示,不同浓度的薯蓣皂苷元处理Eca109细胞后,能明显抑制Eca109细胞的增殖,呈浓度依赖性.与阴性对照组相比,差异皆有统计学意义($P < 0.05$).其中,我们发现薯蓣皂苷元作用48 h和72 h组的生长抑制率要明显高于24 h(图1).

2.3 薯蓣皂苷元使得Eca109细胞凋亡下降 选取50 µg/mL浓度组中,薯蓣皂苷元处理Eca109细胞48 h后,用Western blot检测了凋亡相关的蛋白BAX和凋亡抑制蛋白Bcl-2.结果表明Bcl-2的表达随之下调,而BAX的表达显著升高,与对照组相比,具有统计学差异($P < 0.05$)(图2).

2.4 薯蓣皂苷元抑制Eca109细胞的迁移和侵袭 Transwell实验测定了薯蓣皂苷元对Eca109细胞的迁移和侵袭的影响.在薯蓣皂苷元处理组中,Eca109细胞的迁移以及侵袭能力明显减弱,穿膜细胞数明显减少,呈浓度依赖性,与阴性对照组比较,差异均具有统计学意义($P < 0.05$,图3).

2.5 薯蓣皂苷元对Eca109细胞MAPK信号通路蛋白表达的影响 取薯蓣皂苷元的最适浓度50 µg/mL作用48 h后, Western blot检测MAPK信号通路下游蛋白,实验结果表明, p-p38的蛋白含量显著降低,而p-JNK、JNK、p- Erk1/2、Erk1/2及p38变化都不明显(图4).

3 讨论

近年来的研究表明,中药抑制肿瘤生长的机理可能为以下几方面: 抑制肿瘤细胞的增殖,促进肿瘤细胞的凋亡,诱导肿瘤细胞的分化,抑制肿

■创新盘点

本文从MAPK信号通路中JNK、Erk1/2和p38磷酸化和非磷酸化蛋白含量的表达的变化,观察薯蓣皂苷元抑制食管癌Eca109细胞增殖及诱导其凋亡的作用,探讨其可能的分子机制。

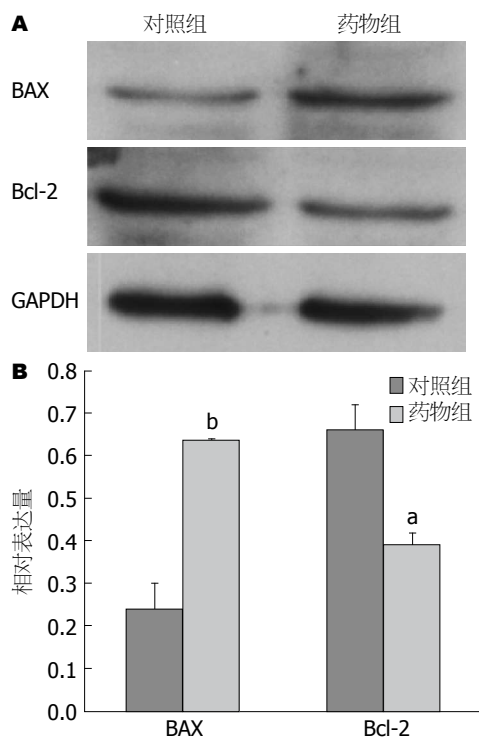


图2 薯蓣皂苷元处理后Eca109细胞后对BAX和Bcl-2凋亡蛋白表达的影响。A: 50 $\mu\text{g/mL}$ 薯蓣皂苷元作用于Eca109细胞48 h BAX、Bcl-2及GAPDH的蛋白表达量; B: 蛋白相对表达量。^a $P < 0.05$ vs 对照组; ^b $P < 0.01$ vs 对照组。BAX: Bcl-2相关X蛋白; Bcl-2: B细胞白血病/淋巴瘤相关蛋白; GAPDH: 甘油醛-3-磷酸脱氢酶。

瘤细胞信号转导, 逆转多药耐药, 通过细胞自噬机制等^[7,8]。由于缺乏对中药作用规律的科学研究, 其抗肿瘤疗效势必受到影响。

薯蓣皂苷元是从天热中草薯蓣科植物中提取的有效成分, 具有抗肿瘤活性^[3-6]。据先前研究表明, 薯蓣皂苷元诱导人胃黏液腺癌MGC-823细胞的凋亡依赖Caspase3^[9]; 诱导人黑色素瘤A375-S2细胞, 人白血病细胞HL-60细胞, 人胃癌细胞SGC-7901细胞的增殖、分化和凋亡^[10-12]。我们的结果显示不同浓度的薯蓣皂苷元处理Eca109细胞后, 能明显抑制Eca109细胞的增殖活性, 并且呈剂量依赖性, 与先前研究结论一致。我们选取50 $\mu\text{g/mL}$ 组作为后续实验的研究对象。

BAX和Bcl-2蛋白与调控细胞凋亡相关。过度表达的Bcl-2抑制细胞的凋亡, BAX过度表达可以促进细胞的凋亡, 以阻止正常细胞的恶性转化^[13,14]。而且, BAX的低表达和Bcl-2的过度表达对细胞的凋亡可以产生协调作用^[15]。我们发现食管癌细胞Eca109经过薯蓣皂苷元处理48 h后, 用Western blot检测发现凋亡相关的蛋白BAX表达与对照组相比显著升高, 凋亡抑制蛋白Bcl-2表达明显降低。

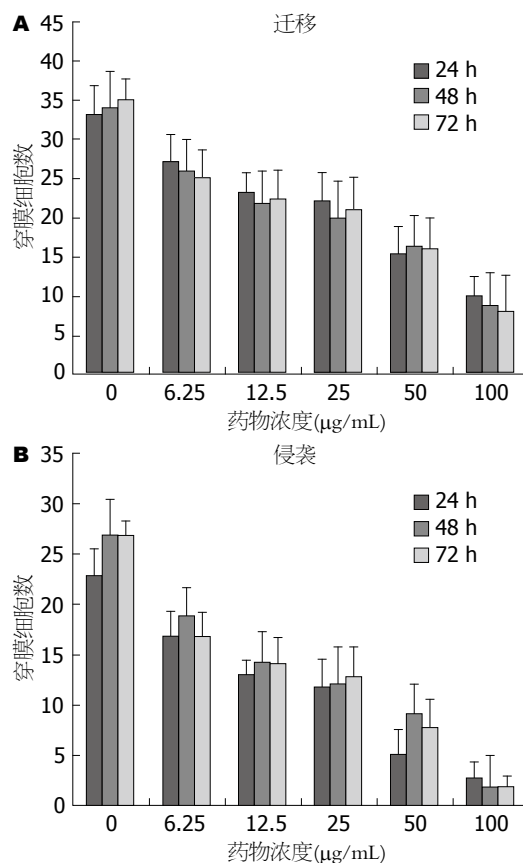


图3 薯蓣皂苷元处理后Eca109细胞迁移和侵袭的影响。A: 迁移; B: 侵袭。

凌博凡等^[16]研究发现薯蓣皂苷元明显抑制人结肠癌细胞LoVo的迁移和侵袭。我们通过Transwell实验观察薯蓣皂苷元对Eca109细胞的迁移和侵袭效应的影响。实验结果表明薯蓣皂苷元可以显著抑制Eca109细胞的迁移和侵袭, 并且呈浓度依赖性。

药物诱导细胞凋亡、增殖、分化和迁移等, 其分子机制十分复杂。很多基因的变化都参与调控细胞的凋亡、增殖、迁移效应。其中, MAPK信号通路最为经典。据文献报告, 薯蓣皂苷元通过抑制核因子- κ 轻链增强子(nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, NF- κ B)信号通路和p38 MAPK的激活, 可引起K562细胞的基因片段化^[17,18]; 薯蓣皂苷元在HEL细胞中, 破坏钙离子平衡, 激活p53, 调节Caspase3的活性, 诱导肿瘤细胞的凋亡^[19]。在Bcap37细胞和HT-29细胞中, 薯蓣皂苷元抑制环氧合酶-2(cyclooxygenase, COX-2)的表达, 促进其凋亡^[20,21]。相关研究表明, 在结肠癌细胞系HCT-116和HT-29中, 薯蓣皂苷元可以增加p38的激活, 但对JNK和Erk1/2的激活没有影响^[22]。在非小细胞肺癌A549细胞中, 薯蓣皂

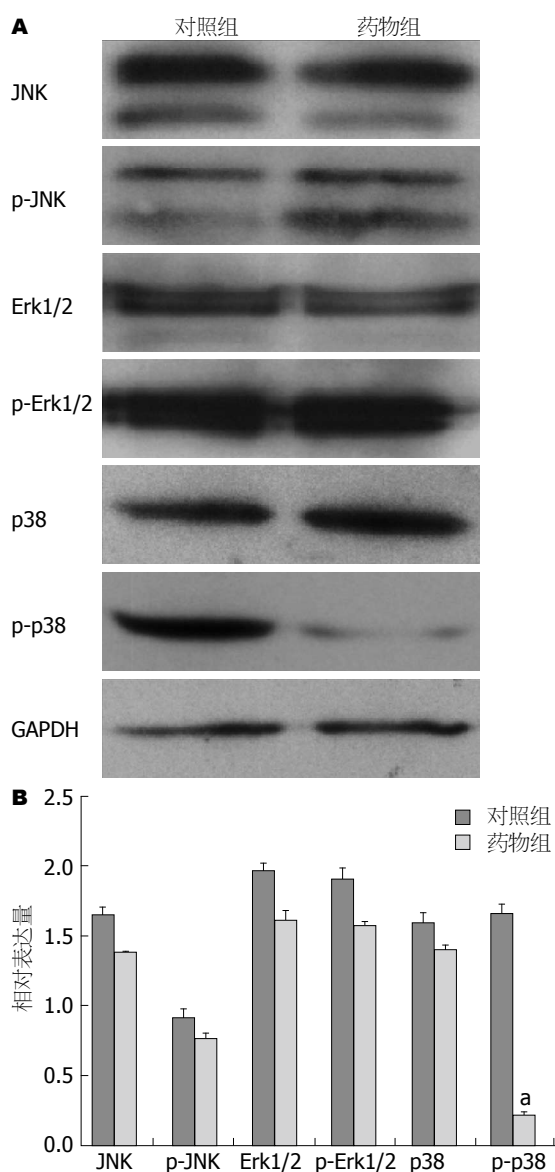


图4 薯蓣皂苷元处理后Eca109细胞中MAPK信号通路蛋白水平。A: 50 $\mu\text{g/mL}$ 薯蓣皂苷元作用于Eca109细胞48 h后, JNK、Erk1/2、p38、GAPDH及相应磷酸化p-JNK、p-Erk1/2、p-p38的蛋白表达量; B: 蛋白相对表达量。* $P < 0.05$ vs 对照组。JNK: c-jun氨基末端应激活化蛋白激酶; Erk1/2: 细胞外信号调节激酶; p38: p38丝裂原激活蛋白激酶; GAPDH: 甘油醛-3-磷酸脱氢酶。

昔元和TRAIL两药合用导致MAPK信号途径中的JNK、Erk1/2、p38明显激活^[23]。为进一步探讨薯蓣皂苷元诱导Eca109细胞凋亡, 抑制其迁移和侵袭的作用机制。我们检测了MAPK信号转导通路中的3条主要通路蛋白, 实验结果表明, 磷酸化的p-p38蛋白水平含量在薯蓣皂苷元药物组中较阴性对照组明显降低, 非磷酸化的JNK、Erk1/2、p38差异不明显。另外, 磷酸化的p-JNK、p-Erk1/2在药物组和阴性对照组中差异亦不显著。相关研究表明, p38信号通路是MAPK

通路的一个重要分支, 在人肝细胞癌HepG2细胞中, p38可通过调节肿瘤抑制蛋白p53、BAX及凋亡相关蛋白Caspase9等因子启动抗增殖及凋亡作用^[24]。在肝癌细胞Hepal-6及HepG2中, p38 MAPK可以通过调节p53、前凋亡分子CHOP-1和激活转录因子-2(activating transcription factor-2, ATF-2)介导肿瘤细胞的凋亡过程^[25]。总之, 我们认为, 在食管癌Eca109细胞中, 导致薯蓣皂苷元药物组中细胞的侵袭、迁移效应增强的原因是, 薯蓣皂苷元通过抑制p38蛋白的活性, 从而抑制了细胞的迁移和侵袭。

总之, 我们推测, 在食管癌细胞中, 薯蓣皂苷元可能通过p38通路对Eca109细胞的增殖、迁移、侵袭等起着调控作用, 而与JNK和Erk1/2通路关系并不密切。在一定程度上揭示了薯蓣皂苷元对MAPK信号转导通路的影响的潜在可能, 为临床上食管癌的治疗提供一定的线索。

4 参考文献

- 1 沐雨, 李苏宜. 肿瘤干细胞相关信号通路与食管鳞癌的研究进展. 世界华人消化杂志 2013; 21: 373-380
- 2 Raju J, Mehta R. Cancer chemopreventive and therapeutic effects of diosgenin, a food saponin. *Nutr Cancer* 2009; 61: 27-35 [PMID: 19116873 DOI: 10.1080/01635580802357352]
- 3 Das S, Dey KK, Dey G, Pal I, Majumder A, Maiti-Choudhury S, Kundu SC, Mandal M. Antineoplastic and apoptotic potential of traditional medicines thymoquinone and diosgenin in squamous cell carcinoma. *PLoS One* 2012; 7: e46641 [PMID: 23077516 DOI: 10.1371/journal.pone.0046641]
- 4 He Z, Tian Y, Zhang X, Bing B, Zhang L, Wang H, Zhao W. Anti-tumour and immunomodulating activities of diosgenin, a naturally occurring steroidal saponin. *Nat Prod Res* 2012; 26: 2243-2246 [PMID: 22235932 DOI: 10.1080/14786419.2011.648192]
- 5 Wang Z, Cheng Y, Wang N, Wang DM, Li YW, Han F, Shen JG, Yang de P, Guan XY, Chen JP. Dioscin induces cancer cell apoptosis through elevated oxidative stress mediated by downregulation of peroxiredoxins. *Cancer Biol Ther* 2012; 13: 138-147 [PMID: 22231406 DOI: 10.4161/cbt.13.3.18693]
- 6 Yang SH, Sharrocks AD, Whitmarsh AJ. MAP kinase signalling cascades and transcriptional regulation. *Gene* 2013; 513: 1-13 [PMID: 23123731 DOI: 10.1016/j.gene.2012.10.033]
- 7 马向华, 马超英. 中药诱导肿瘤细胞凋亡的研究进展. 时珍国医国药 2012; 23: 732-733
- 8 李鹏, 钟振国, 韦小青, 黄金兰. 中药抗肿瘤作用机制的研究进展. 世界中西医结合杂志 2008; 3: 297-298, 301
- 9 何忠梅, 张显涛, 王铁成. 薯蓣皂苷元诱导人胃低分化粘液腺癌MGC-803细胞凋亡依赖caspase3途径. 中国实验诊断学 2011; 15: 1813-1815
- 10 霍锐, 周秋丽, 王本祥, 王敏伟, 田代真一, 小野寺敏, 池岛乔. 薯蓣皂苷元诱导人黑素瘤细胞A375-S2凋亡依赖半胱天冬酶和MAPK途径. 中国药理学与毒理学杂志

■应用要点

下调p38的磷酸化水平, 可能是薯蓣皂苷元抑制食管癌Eca109细胞增殖、迁移并诱导其凋亡的机制之一, 本研究为进一步研究薯蓣皂苷元抗肿瘤的作用机制提供依据。

■同行评价

本文研究的有关食管癌与薯蓣皂苷元关系的研究目前国内外报道甚少,研究具有重要的临床意义。有一定的创新性。观察指标选择恰当,技术路线清晰结果可靠,结论客观。讨论部分条理分明,有系统的理论分析和有价值的结论。

- 11 李晶华, 历艳志, 张沐新, 宋宇, 王本祥, 周秋丽. 薯蓣皂苷元对HL-60细胞增殖及细胞周期的影响. 吉林农业大学学报 2003; 25: 533-535
- 12 Gao LL, Li FR, Jiao P, Yang MF, Zhou XJ, Si YH, Jiang WJ, Zheng TT. Paris chinensis dioscin induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis in human gastric cancer SGC-7901 cells. *World J Gastroenterol* 2011; 17: 4389-4395 [PMID: 22110264 DOI: 10.3748/wjg.v17.i39.4389]
- 13 Kang MH, Reynolds CP. Bcl-2 inhibitors: targeting mitochondrial apoptotic pathways in cancer therapy. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 1126-1132 [PMID: 19228717 DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-08-0144]
- 14 Reed JC. Proapoptotic multidomain Bcl-2/Bax-family proteins: mechanisms, physiological roles, and therapeutic opportunities. *Cell Death Differ* 2006; 13: 1378-1386 [PMID: 16729025 DOI: 10.1038/sj.cdd.4401975]
- 15 Adams JM, Cory S. Bcl-2-regulated apoptosis: mechanism and therapeutic potential. *Curr Opin Immunol* 2007; 19: 488-496 [PMID: 17629468 DOI: 10.1016/j.coi.2007.05.004]
- 16 凌博凡, 王瑞平, 邹玺. 菝葜皂苷元对结肠癌细胞Lovo黏附和侵袭能力的影响. 辽宁中医药大学学报 2012; 2: 90-92
- 17 Gao M, Chen L, Yu H, Sun Q, Kou J, Yu B. Diosgenin down-regulates NF- κ B p65/p50 and p38MAPK pathways and attenuates acute lung injury induced by lipopolysaccharide in mice. *Int Immunopharmacol* 2013; 15: 240-245 [PMID: 23246979 DOI: 10.1016/j.intimp.2012.11.019]
- 18 Wang L, Meng Q, Wang C, Liu Q, Peng J, Huo X, Sun H, Ma X, Liu K. Dioscin restores the activity of the anticancer agent adriamycin in multidrug-resistant human leukemia K562/adriamycin cells by down-regulating MDR1 via a mechanism involving NF- κ B signaling inhibition. *J Nat Prod* 2013; 76: 909-914 [PMID: 23621869 DOI: 10.1021/np400071c]
- 19 Caillieau C, Micallef L, Lepage C, Cardot PJ, Beneytout JL, Liagre B, Battu S. Investigating the relationship between cell cycle stage and diosgenin-induced megakaryocytic differentiation of HEL cells using sedimentation field-flow fractionation. *Anal Bioanal Chem* 2010; 398: 1273-1283 [PMID: 20714892 DOI: 10.1007/s00216-010-4062-4]
- 20 Ghezali L, Leger DY, Limami Y, Cook-Moreau J, Beneytout JL, Liagre B. Cyclopamine and jervine induce COX-2 overexpression in human erythroleukemia cells but only cyclopamine has a pro-apoptotic effect. *Exp Cell Res* 2013; 319: 1043-1053 [PMID: 23357584 DOI: 10.1016/j.yexcr.2013.01.014]
- 21 Lepage C, Liagre B, Cook-Moreau J, Pinon A, Beneytout JL. Cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase pathways in diosgenin-induced apoptosis in HT-29 and HCT-116 colon cancer cells. *Int J Oncol* 2010; 36: 1183-1191 [PMID: 20372792 DOI: 10.3892/ijo.00000601]
- 22 Lepage C, Léger DY, Bertrand J, Martin F, Beneytout JL, Liagre B. Diosgenin induces death receptor-5 through activation of p38 pathway and promotes TRAIL-induced apoptosis in colon cancer cells. *Cancer Lett* 2011; 301: 193-202 [PMID: 21195543 DOI: 10.1016/j.canlet.2010.12.003]
- 23 何焱, 王继双, 张鹏, 张文静, 黄启来, 华子春. 薯蓣皂苷元联合TRAIL对非小细胞肺癌A549细胞的协同作用及其中效原理评价. 药理学报 2013; 48: 45-51
- 24 Kim BJ, Ryu SW, Song BJ. JNK- and p38 kinase-mediated phosphorylation of Bax leads to its activation and mitochondrial translocation and to apoptosis of human hepatoma HepG2 cells. *J Biol Chem* 2006; 281: 21256-21265 [PMID: 16709574 DOI: 10.1074/jbc.M510644200]
- 25 邱建武, 郭薇, 申丽娟. p38MAPK在肝细胞癌中的研究进展. 世界华人消化杂志 2008; 16: 503-509

编辑 郭鹏 电编 鲁亚静



飞机客舱中的气压变化对胆道动力的影响

周 迈, 李天牧

周迈, 李天牧, 民航总医院普外科 北京市 100123
周迈, 副主任医师, 主要从事肝胆疾病的临床研究.
作者贡献分布: 课题的设计、研究过程、数据分析及论文写作
由周迈完成; 李天牧协助完成研究过程与数据分析工作.
通讯作者: 周迈, 副主任医师, 100123, 北京市朝阳区朝外高井
甲1号, 民航总医院普外科. zhoumai109@sina.cn
电话: 010-8576224-2382
收稿日期: 2013-09-03 修回日期: 2013-10-17
接受日期: 2013-10-30 在线出版日期: 2013-12-18

Impact of airplane cabin pressure on biliary motility in rabbits

Mai Zhou, Tian-Mu Li

Mai Zhou, Tian-Mu Li, Department of General Surgery,
General Hospital of Civil Aviation Administration of China,
Beijing 100123, China
Correspondence to: Mai Zhou, Associate Chief Physician,
Department of General Surgery, General Hospital of Civil
Aviation Administration of China, 1 Gaojingjia Chaowai,
Chaoyang District, Beijing 100123,
China. zhoumai109@sina.cn
Received: 2013-09-03 Revised: 2013-10-17
Accepted: 2013-10-30 Published online: 2013-12-18

Abstract

AIM: To observe the effect of the change in barometric pressure on biliary motility by using a hypobaric chamber to simulate a civil aircraft in flight.

METHODS: Forty-two rabbits were randomly divided into a control group ($n = 14$), a Ta group ($n = 14$, hypobaric exposure in a hypobaric chamber 3 times in 3 d) and a Tb group ($n = 14$, hypobaric exposure in a hypobaric chamber 7 times in 7 d). The level of cholecystokinin 8 (CCK8) was measured in the duodenal tissue and plasma. The expression of CCK-A receptor (CCK-AR) mRNA in gallbladder tissues was detected by RT-PCR. Quantitative analysis of ^{99m}Tc -EHIDA hepatobiliary dynamic imaging was made in each group.

RESULTS: Compared to the control group, the Ta group had lower levels of CCK8 both in duodenal tissue and plasma (Ta group *vs* C

group, $5.24 \text{ pg/mL} \pm 0.56 \text{ pg/mL}$ *vs* $6.25 \text{ pg/mL} \pm 0.53 \text{ pg/mL}$ in duodenal tissue, $P < 0.05$; $3.59 \text{ pg/mL} \pm 0.20 \text{ pg/mL}$ *vs* $4.61 \text{ pg/mL} \pm 0.10 \text{ pg/mL}$ in plasma, $P < 0.05$) and a significant delay in duodenal appearance time (Ta group *vs* C group, $114.73 \text{ s} \pm 13.34 \text{ s}$ *vs* $79.52 \text{ s} \pm 10.83 \text{ s}$, $P < 0.05$). Besides a delay in DAT and lower level of CCK8, decreased expression of CCK-A receptor mRNA was found in gallbladder tissues in the Tb group compared to the control group and Ta group (CCK-AR/ β -actin: Tb group *vs* C group: 0.56 ± 0.21 *vs* 0.82 ± 0.16 , $P < 0.05$; Tb group *vs* Ta group: 0.56 ± 0.21 *vs* 0.75 ± 0.29 , $P < 0.05$).

CONCLUSION: Barometric pressure change in a civil aircraft in flight shows some inhibitory effects on biliary motility.

© 2013 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

Key Words: Biliary motility; Hypobaric circumstance; Radionuclide imaging

Zhou M, Li TM. Impact of airplane cabin pressure on biliary motility in rabbits. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(35): 3983-3987 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/3983.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v21.i35.3983>

摘要

目的: 通过低压舱模拟民航客机飞行中的气压变化, 并观察其对家兔胆道动力的影响。

方法: 将家兔42只随机分为对照组(C组, $n = 14$)、Ta组($n = 14$, 低气压暴露1次/d, 连续3 d)、Tb组($n = 14$, 低气压暴露1次/d, 连续7 d)。分别观察家兔十二指肠组织、血清中胆囊收缩素8(cholecystokinin 8, CCK8)水平变化及胆囊组织中胆囊收缩素A受体(cholecystokinin A receptor, CCK-AR)表达的变化; 并进行 ^{99m}Tc -二乙基丁酰苯胺基亚氨二醋酸(^{99m}Tc -dimethyliminodiacetic acid, ^{99m}Tc -EHIDA)肝胆动态功能显像定量分析。

结果: 与C组相比, Ta组十二指肠显影时间

■背景资料

研究表明低压、低氧环境可以对胃肠道功能产生一定的抑制作用, 民航客机高空飞行时, 客舱中的通常维持于海拔1800-2400 m低气压水平, 本研究是想观察这种低气压环境是否会对机体的胆道系统产生影响。

■同行评议者

汤朝晖, 副主任医师, 上海交大医学院附属新华医院普外科

■研究前沿

航空航天是一特殊领域,各种飞行因素如低压、低氧、失重等对飞行员及空乘人员的生理、心理产生影响。而该领域目前主要集中于研究急性低压低氧对机体神经系统、心血管系统以及视力、听力的影响,而对消化系统,特别是胆道系统关注较少。

(duodenal appearance time, DAT)延长(Ta组 vs C组: 114.73 ± 13.34 s vs 79.52 ± 10.83 s, $P < 0.05$),十二指肠组织、血清中CCK水平下降(Ta组 vs C组: 十二指肠组织: $5.24 \text{ pg/mL} \pm 0.56 \text{ pg/mL}$ vs $6.25 \text{ pg/mL} \pm 0.53 \text{ pg/mL}$, $P < 0.05$; 血清: $3.59 \text{ pg/mL} \pm 0.20 \text{ pg/mL}$ vs $4.61 \text{ pg/mL} \pm 0.10 \text{ pg/mL}$, $P < 0.05$); Tb组除上述两项变化外,发现胆囊组织中CCK-AR的表达下降(CCK-AR/ β -actin: Tb组 vs C组: 0.56 ± 0.21 vs 0.82 ± 0.16 , $P < 0.05$; Tb组 vs Ta组: 0.56 ± 0.21 vs 0.75 ± 0.29 , $P < 0.05$)。

结论: 飞机客舱飞行中的气压变化对家兔的胆道动力有一定的抑制作用。

© 2013年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词: 胆道动力; 低气压; 核素显像

核心提示: 通过模拟民航客机飞行中的气压变化,本研究发现家兔在这种环境中出现胆道排泄时间延长;十二指肠组织及血清中胆囊收缩素(cholecystokinin 8)水平降低;随着低气压暴露时间延长至7 d时,家兔胆囊组织中胆囊收缩素A受体(cholecystokinin A receptor)表达的下降,从而提示这种不伴有缺氧的低气压变化,可能会对胆道系统产生一定的抑制作用,但其长期影响尚需进一步观察。

周迈, 李天牧. 飞机客舱中的气压变化对胆道动力的影响. 世界华人消化杂志 2013; 21(35): 3983-3987 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/3983.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i35.3983>

0 引言

民航客机经常在高空飞行,尽管经过加压处理,但由于气压相差过大,仍然无法在飞行中使客舱内保持地面气压水平,舱内通常保持海拔1800-2400 m的气压水平。这种骤然的气压变化可能给人体造成一些不适,如胃肠胀气、耳膜疼痛、甚至诱发龋齿疼痛等。那么这种变化是否会给胆道系统造成影响?而目前尚缺乏相关的研究报道^[1,2]。本实验以家兔为模型观察这种突然的、轻度的低气压变化是否会对胆道动力学造成影响,并对其机制进行初步地探讨。

1 材料和方法

1.1 材料 健康成年家兔42只,体质量1.9-2.5 kg, 3-4月龄,雌雄不拘,由北京大学医学部实验动物中心提供。⁹⁹m钼-二乙基丁酰苯胺基亚氨二

醋酸(⁹⁹mTc-dimethyliminodiacetic acid, ⁹⁹mTc-EHIDA): 上海医药试剂公司;单光子发射型计算机断层显像(single photon emission computed tomography, SPECT): 美国GE公司Millennium MPR型;CBK248M型低压舱;兔胆囊收缩素8(cholecystokinin 8, CCK8) ELISA试剂盒: 武汉伊艾博科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 动物模型与分组: 所有动物随机分为3组,每组14只,所有动物20:00后不再投食喂水,以保证每日上午实验、取样时禁食12 h。对照组(C组): 禁食12 h后直接行肝胆动态显像、取样; Ta组: 低气压暴露每天一次,连续3 d后取样; Tb组: 低气压暴露每天一次,连续7 d后取样。

1.2.2 低气压暴露: 将实验家兔置入低压舱中,缓慢上升(20 m/s)至2000 m,停留1 h,然后以相同速度降至地面。

1.2.3 肝胆动态核素显像^[3-5]: SPECT仪探头配以低能高分辨率准直器,能峰140 keV,窗宽20%,矩阵128×128,放大系数2.0。家兔侧卧固定于兔台架上,经耳缘静脉注入⁹⁹mTc-EHIDA 37 MBq(1 mCi)后,将其置于探头视野中心下方,采集图像每3 s 1帧,连续采集40 min。应用感兴趣区(region of interest, ROI)技术对试餐前后的图像进行处理,画出胆囊区和十二指肠区为感兴趣区ROI,获得相应的放射性计数,计算出十二指肠显影时间(duodenal appearance time, DAT)、胆囊高峰摄取时间(the peak time, T_{\max})及半排时间(1/2 excretory time, $T_{1/2}$)。

1.2.4 标本采集: 家兔以3%戊巴比妥钠(30 mg/kg)麻醉后剖腹,(1)心脏穿刺采血,6-8 mL/只;(2)切取胆囊;(3)切取十二指肠(约2 cm),0 °C PBS洗净,再加入PBS 5 mL,研磨成匀浆,离心5000 r/min×10 min,取上清2 mL。所有标本均-80 °C冷冻保存待测。

1.2.5 十二指肠组织、血清中CCK8、胆囊组织中胆囊收缩素A受体(cholecystokinin A receptor, CCK-AR)表达的检测: CCK8检测按ELISA试剂盒说明进行。CCK-AR表达的半定量RT-PCR:(1)样品RNA的抽提:按照试剂盒操作流程进行,TRIzol法提取总RNA;(2)引物序列:上游引物: 5'-CCATCATGACTCCGTACCCCA-3',下游引物: 5'-TGGCGCTGAAGATGGGCA-3';(3)逆转录样品cDNA合成:按照试剂盒操作流程进行,得到cDNA溶液,保存于-80 °C待用;(4)PCR反

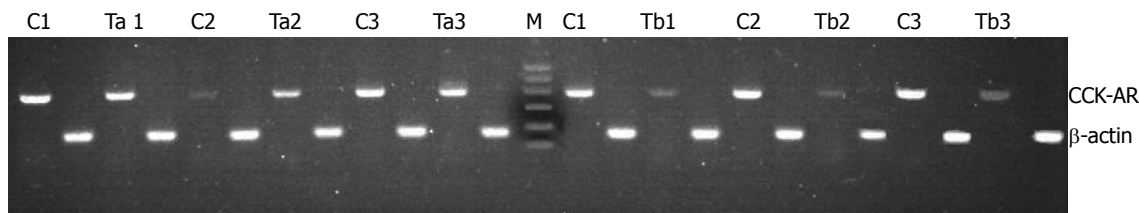


图1 CCK-AR表达的半定量RT-PCR. C: C组样本; Ta: Ta组样本; Tb: Tb组样本; β -actin: 内参照; CCK-AR: 胆囊收缩素A受体.

表1 各组的胆道动态核素显像数据 (mean \pm SD)

分组	DAT(s)	T _{max} (min)	T _{1/2} (min)
C组	79.52 \pm 10.83	4.18 \pm 0.77	10.18 \pm 0.75
Ta组	114.73 \pm 13.34 ^a	4.21 \pm 0.87	10.71 \pm 0.87
Tb组	99.44 \pm 11.12 ^c	4.04 \pm 1.06	10.57 \pm 1.07

^a $P < 0.05$ vs C组; ^c $P < 0.05$ vs C组. DAT: 十二指肠显影时间; T_{max}: 胆囊高峰摄取时间; T_{1/2}: 胆囊半排时间.

应: 反应体系为25 μ L, 反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 5 min, 然后95 $^{\circ}$ C 30 s, 58 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 共40个循环, 72 $^{\circ}$ C 10 min, 4 $^{\circ}$ C Forever; (5)运用Tanon Gis软件进行吸光度扫描, 将 β -actin条带标准值设为1, 计算出各样品中CCK-AR条带的相对值.

统计学处理 数据均用mean \pm SD表示, 用统计软件SPSS10.0, 各组间数据进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义.

2 结果

2.1 各组的胆道动态核素显像 十二指肠显影时间(DAT): Ta组、Tb组显著高于对照组(C组), Ta显著高于Tb组 (Ta组 vs C组: 114.73 s \pm 13.34 s vs 79.52 s \pm 10.83 s, $P = 0.000$; Tb组 vs C组: 99.44 s \pm 11.12 s vs 79.52 s \pm 10.83 s, $P = 0.000$; Ta组 vs Tb组: 114.73 s \pm 13.34 s vs 99.44 s \pm 11.12 s, $P = 0.041$); 胆囊高峰摄取时间(T_{max}): 各组间未见明显差异($P = 0.773$); 胆囊半排时间(T_{1/2}): 各组间未见明显差异($P = 0.260$)(表1).

2.2 兔十二指肠组织、血清胆囊收缩素(CCK8) ELISA检测结果及CCK-AR表达的半定量RT-PCR结果: 血清胆囊收缩素(CCK8): Ta组、Tb组显著低于对照组(C组), Ta低于Tb组(Ta组 vs C组: 5.24 pg/mL \pm 0.56 pg/mL vs 5.24 pg/mL \pm 0.56 pg/mL, $P = 0.000$; Tb组 vs C组: 5.81 pg/mL \pm 0.45 pg/mL vs 6.25 pg/mL \pm 0.53 pg/mL, $P = 0.000$; Ta组 vs Tb组: 5.24 pg/mL \pm 0.56 pg/mL vs 5.81 pg/mL \pm 0.45 pg/mL, $P = 0.001$); 十二指肠组织

中CCK8: Ta组显著低于C组, Ta低于Tb组, Tb组与C组相比差别不明显(Ta组 vs C组: 3.59 \pm 0.20 pg/mL vs 3.59 \pm 0.20 pg/mL, $P = 0.000$; Ta组 vs Tb组: 3.59 pg/mL \pm 0.20 pg/mL vs 3.82 pg/mL \pm 0.16 pg/mL, $P = 0.019$; Tb组 vs C组: 3.82 pg/mL \pm 0.16 pg/mL vs 4.61 pg/mL \pm 0.10 pg/mL, $P = 0.080$); CCK-AR半定量表达: Tb组CCK-AR表达显著低于Ta组、对照组(C组)(Tb组 vs C组: 0.56 \pm 0.21 vs 0.82 \pm 0.16, $P = 0.000$; Tb组 vs Ta组: 0.56 \pm 0.21 vs 0.75 \pm 0.29, $P = 0.000$; C组 vs Ta组: 0.82 \pm 0.16 vs 0.75 \pm 0.29, $P = 0.203$)(表2). CCK-AR表达电泳结果如图1.

3 讨论

航空航天是一特殊领域, 各种飞行因素如低压、低氧、失重等对飞行员及空乘人员的身体健康影响受到密切的关注. 人们进入高原或高空飞行时, 经常会出现腹胀、恶心、食欲不振等消化系症状. 已有研究发现低压、低氧(约海拔5000 m)环境可以抑制胃的排空和肠道推进运动, 减少肠系膜上动脉的血供, 导致血浆及肠道中胃动素、NO、生长抑素等激素水平发生改变, 甚至有研究表明急性低压、低氧会导致Oddi括约肌功能障碍, 而这些生理变化常与缺氧对中枢刺激导致交感系统兴奋有关^[7-10]. 民航客机高空飞行时, 客舱中的气压通常维持于1800-2400 m水平, 一般不会出现明显的缺氧. 这样环境是否会对胆道系统功能造成影响, 目前尚未见报道.

本实验观察到两组家兔在低气压暴露后, 都出现了十二指肠显影时间(DAT)延长、十二指肠组织及血清中CCK8水平下降, 说明客舱中的低气压对胆道动力有抑制作用. 而胆囊高峰摄取时间(T_{max})和胆囊半排时间(T_{1/2})各组间未见明显差异, 可能是由于这两项数据由机器自动记录生成, 最小单位为min, 故敏感度较差, 需大量样本进行观测.

■ 相关报道

已有研究发现低压、低氧(约海拔5000 m)环境可以抑制胃的排空和肠道推进运动, 减少肠系膜上动脉的血供, 导致血浆及肠道中胃动素、NO、生长抑素等激素水平发生改变, 甚至有研究表明急性低压、低氧会导致Oddi括约肌功能障碍, 而这些生理变化常与缺氧对中枢刺激导致交感系统兴奋有关. 民航客机高空飞行时, 客舱中的气压通常维持于1800-2400 m水平, 一般不会出现明显的缺氧. 这样环境是否会对胆道系统功能造成影响, 目前尚未见报道.

■创新盘点

民航客机飞行平稳, 升降压较为缓和, 与战斗机飞行员急速拉高或下降时所处的剧烈变化的飞行环境不同, 一般不会出现急性低血压低氧状态。在这样轻度低气压变化的环境中观察机体胆道系统的变化, 将有助于了解民航客机飞行状态对人体的影响。

表 2 CCK8检测结果及CCK-AR表达 (mean ± SD)

分组	十二指肠组织CCK8(pg/mL)	血清CCK8(pg/mL)	CCK-AR/ β -actin
C组	6.25 ± 0.53	4.61 ± 0.10	0.82 ± 0.16
Ta组	5.24 ± 0.56 ^a	3.59 ± 0.20 ^a	0.75 ± 0.29
Tb组	5.81 ± 0.45 ^c	3.82 ± 0.16 ^{ac}	0.56 ± 0.21 ^{ac}

^a $P < 0.05$ vs C组; ^c $P < 0.05$ vs Ta组。CCK8: 胆囊收缩素; CCK-AR/ β -actin: 胆囊收缩素A受体DNA条带吸光度与 β -actin DNA条带吸光度的比值。

但这种抑制作用机制不明。胆道运动调节是多种因素共同作用的, 与胃肠道机能密切相关^[3,11-14]。胆囊收缩素(cholecystokinin, CCK)是一种广泛分布在消化系统、中枢及外周神经系统的脑肠肽, 其能促进胆囊收缩、Oddi括约肌松弛, 对胃肠、胆道运动具有重要影响^[3,15]。天然CCK有多种分子形式, 以羟基端酰胺化的CCK8和CCK58为主要形式。CCK可能通过4种不同途径发挥作用: (1)外周内分泌作用, 肠道中CCK分泌至血液中作用于组织细胞; (2)外周旁分泌作用, 肠道中CCK作用于局部组织/器官发挥作用; (3)中枢神经内分泌作用, 脑内CCK作用于脑内受体发挥作用; (4)外周神经内分泌作用, CCK作用于外周神经系统发挥作用。餐后特别是脂肪餐后可明显升高血浆中CCK水平。本实验观察到两实验组家兔在低气压暴露后, 出现十二指肠组织及血清中CCK8水平的同步下降, 故推测应当是肠道CCK8生成减少, 导致进入血液的CCK8下降。从海平面上升到2000 m左右, 气体大约会膨胀20%, 胃肠道内含有大量的气体, 这样的膨胀会对胃肠道管壁产生一定张力, 从而产生一系列抑制反射, 导致肠道CCK释放减少, 胆道系统收缩减弱, 胆汁排出变慢, DAT延长。

随着低气压暴露时间的延长, Tb组出现胆囊组织中CCK-AR表达的下降, 这也意味着CCK受体合成减少, 胆囊对CCK敏感性降低, 胆囊收缩减弱。许多研究显示, 胆囊运动功能的损害可导致胆囊结石的发生^[16]。那么, 本实验结果是否提示经常乘坐飞机会增加胆囊结石形成的风险? 但有趣的是本实验还发现低气压暴露7 d后的家兔(Tb组)与低气压暴露3 d后的家兔(Ta组)相比十二指肠显影时间有所缩短($P = 0.041$), 血清及十二指肠组织中CCK8水平有所增加(Ta组 vs Tb组, 血清 $P = 0.000$, 十二指肠组织 $P = 0.019$), 可能提示随着时间的延长, 胆道系统对这种轻度低气压的影响开始适应, 胆道动力功能有所恢

复。随着生活节奏加快, 交通设施的完善, 乘坐飞机已经成为人们一种经常性的选择。因此, 进一步观察这种不伴有缺氧的低气压环境对胆道系统的长期影响是很有意义的。

4 参考文献

- Levett DZ, Martin DS, Wilson MH, Mitchell K, Dhilon S, Rigat F, Montgomery HE, Mythen MG, Grocott MP. Design and conduct of Caudwell Xtreme Everest: an observational cohort study of variation in human adaptation to progressive environmental hypoxia. *BMC Med Res Methodol* 2010; 10: 98 [PMID: 20964858 DOI: 10.1186/1471-2288-10-98]
- Chen YC, Lin FC, Shiao GM, Chang SC. Effect of rapid ascent to high altitude on autonomic cardiovascular modulation. *Am J Med Sci* 2008; 336: 248-253 [PMID: 18794620 DOI: 10.1097/MAJ.0b013e3181629a32]
- Vassiliou MC, Laycock WS. Biliary dyskinesia. *Surg Clin North Am* 2008; 88: 1253-1272, 1253-1272 [PMID: 18992594 DOI: 10.1016/j.suc.2008.07.004]
- Cerçi SS, Ozbek FM, Cerçi C, Baykal B, Eroğlu HE, Baykal Z, Yıldız M, Sağlam S, Yeşilbaş A. Gallbladder function and dynamics of bile flow in asymptomatic gallstone disease. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 2763-2767 [PMID: 19522027 DOI: 10.3748/wjg.15.2763]
- Cakir M, Kayacetin E, Toy H, Bozkurt S. Gallbladder motor function in patients with different thyroid hormone status. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2009; 117: 395-399 [PMID: 19373757 DOI: 10.1055/s-0029-1202850]
- 周迈, 郭晏同, 焦岗军, 钟朝晖. 山莨菪碱和加贝酯对胆总管结石术后胆道动力的影响. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 2748-2751
- Lu YZ, Wu CC, Huang YC, Huang CY, Yang CY, Lee TC, Chen CF, Yu LC. Neutrophil priming by hypoxic preconditioning protects against epithelial barrier damage and enteric bacterial translocation in intestinal ischemia/reperfusion. *Lab Invest* 2012; 92: 783-796 [PMID: 22370946 DOI: 10.1038/labinvest.2012.11]
- Nikitina AA, Egorova VV, Dmitrieva JV, Bagaeva TR. Immediate and delayed effects of hypobaric hypoxia during early postnatal period on the functioning of digestive enzymes. *Bull Exp Biol Med* 2011; 152: 35-37 [PMID: 22803034 DOI: 10.1007/s10517-011-1447-0]
- Zhou QQ, Yang DZ, Luo YJ, Li SZ, Liu FY, Wang GS. Over-starvation aggravates intestinal injury

- and promotes bacterial and endotoxin translocation under high-altitude hypoxic environment. *World J Gastroenterol* 2011; 17: 1584-1593 [PMID: 21472125 DOI: 10.3748/wjg.v17.i12.1584]
- 10 Fisher EM, Sun X, Erokwu BO, LaManna JC. Hypobaric hypoxia reduces GLUT2 transporter content in rat jejunum more than in ileum. *Adv Exp Med Biol* 2008; 614: 345-352 [PMID: 18290345 DOI: 10.1007/978-0-387-74911-2_38]
- 11 Bastouly M, Arasaki CH, Ferreira JB, Zanoto A, Borges FG, Del Grande JC. Early changes in postprandial gallbladder emptying in morbidly obese patients undergoing Roux-en-Y gastric bypass: correlation with the occurrence of biliary sludge and gallstones. *Obes Surg* 2009; 19: 22-28 [PMID: 18696168 DOI: 10.1007/s11695-008-9648-y]
- 12 Said K, Edsberg N, Albiin N, Bergquist A. Gallbladder emptying in patients with primary sclerosing cholangitis. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 3498-3503 [PMID: 19630104 DOI: 10.3748/wjg.15.3498]
- 13 Hansel SL, DiBaise JK. Functional gallbladder disorder: gallbladder dyskinesia. *Gastroenterol Clin North Am* 2010; 39: 369-379, x [PMID: 20478492 DOI: 10.1016/j.gtc.2010.02.002]
- 14 Gründel D, Jüngst C, Straub G, Althaus R, Schneider B, Spelsberg FW, Hüttl TP, del Pozo R, Jüngst D, Neubrand M. Relation of gallbladder motility to viscosity and composition of gallbladder bile in patients with cholesterol gallstones. *Digestion* 2009; 79: 229-234 [PMID: 19390195 DOI: 10.1159/000213828]
- 15 Purhonen AK, Herzig KH, Gabius HJ, André S, Ketterer S, Matzinger D, Beglinger C, Hildebrand P. Duodenal phytohaemagglutinin (red kidney bean lectin) stimulates gallbladder contraction in humans. *Acta Physiol (Oxf)* 2008; 193: 241-247 [PMID: 18248661 DOI: 10.1111/j.1748-1716.2008.01839.x]
- 16 文霞初, 刘晓富, 刘亮. 胆囊结石成因的研究进展. *局解手术学杂志* 2009; 18: 56-57
- 17 张继红, 杨可桢, 韩本立. 胆囊结石形成的动力学机制. *中华普通外科杂志* 2001; 16: 424-426

■同行评价

本文的观点新颖、实验设计、数据统计较严谨, 有进一步的讨论的意义。

编辑 郭鹏 电编 鲁亚静



ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) DOI: 10.11569 2013年版权归Baishideng所有

●消息●

《世界华人消化杂志》于 2012-12-26 获得 RCCSE 中国权威学术期刊 (A+) 称号

本刊讯 《世界华人消化杂志》在第三届中国学术期刊评价中被武汉大学中国科学评价研究中心(RCCSE)评为“RCCSE中国权威学术期刊(A+)”。本次共有6 448种中文学术期刊参与评价, 计算出各刊的最终得分, 并将期刊最终得分按照从高到低依次排列, 按照期刊在学科领域中的得分划分到A+、A、A-、B+、B、C级6个排名等级范围。其中A+(权威期刊)取前5%; A(核心期刊)取前5%-20%; A-(扩展核心期刊)取前20%-30%; B+(准核心期刊)取前30%-50%; B(一般期刊)取前50%-80%; C(较差期刊)为80%-100%。

NAFLD家兔肠道菌群与肠黏膜Toll样受体4的关系

王海昆, 杨涛, 姚萍

■背景资料

非酒精性脂肪性肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)是一种获得性代谢性应激相关的肝脏疾病,是目前世界上最为普遍的肝脏疾病之一,国内外发病率呈明显上升趋势。NAFLD临床上包括单纯性脂肪肝、非酒精性脂肪性肝炎(nonalcoholic steatohepatitis)和脂肪性肝硬化3种类型,其发生机制尚不明确。

王海昆, 杨涛, 姚萍, 新疆医科大学第一附属医院消化科 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830054

王海昆, 新疆医科大学在读硕士, 主要从事消化系统疾病的研究。
作者贡献分布: 此课题由姚萍指导、设计; 研究经费由姚萍提供; 研究过程由杨涛与王海昆完成; 数据分析与论文写作由王海昆完成。

通讯作者: 姚萍, 教授, 主任医师, 830054, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市鲤鱼山南路137号, 新疆医科大学第一附属医院消化科。pingyaozh@sina.com

电话: 0991-4361523

收稿日期: 2013-09-11 修回日期: 2013-10-17

接受日期: 2013-10-30 在线出版日期: 2013-12-18

Association between intestinal flora and Toll-like receptor 4 in rabbits with nonalcoholic fatty liver disease

Hai-Kun Wang, Tao Yang, Ping Yao

Hai-Kun Wang, Tao Yang, Ping Yao, Department of Digestive Medicine, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Correspondence to: Ping Yao, Professor, Chief Physician, Department of Digestive Medicine, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, 137 Liyushan Road, Urumqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China. pingyaozh@sina.com

Received: 2013-09-11 Revised: 2013-10-17

Accepted: 2013-10-30 Published online: 2013-12-18

Abstract

AIM: To explore the alterations in intestinal flora and analyze the association of intestinal flora with intestinal mucosa Toll-like receptor 4 (TLR4) in rabbits with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD).

METHODS: Fourteen male New Zealand rabbits were randomly divided into two groups: a control group and a NAFLD group. The control group was given a normal diet while the NAFLD group was given a high fat diet. The rabbits were sacrificed 12 weeks later. Immunohistochemical staining was performed to observe the location and expression of TLR4 in ileal tissue. Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction was used to detect the number of *Escherichia coli* (*E. coli*), *bifidobacteria*,

and *lactobacilli* in the ileum. Stepwise multiple linear regression was performed to analyze the relationship between intestinal flora and TLR4.

RESULTS: Compared with the control group, the number of *E. coli* in the NAFLD group increased significantly ($t = -3.492$, $P = 0.008$), but the number of *bifidobacteria* ($t = -1.059$, $P = 0.311$) and *lactobacilli* ($t = -1.848$, $P = 0.089$) had no significant differences between the two groups. The expression of TLR4 was significantly increased ($t = -4.089$, $P < 0.01$) in the NAFLD group. Regression analysis revealed that *E. coli* and *bifidobacteria* were closely related to TLR4 expression ($R^2 = 0.598$, $F = 8.167$, $P = 0.007$). Although the number of *E. coli* had a positive correlation with TLR4 expression (standardized beta = 0.554) and that of *bifidobacteria* had a negative correlation with TLR4 expression (standardized beta = -0.475), the number of *lactobacilli* had no significant correlation with TLR4 expression.

CONCLUSION: Intestinal flora imbalance was observed in rabbits with NAFLD, and it had an obvious influence on the expression of TLR4.

© 2013 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

Key Words: Nonalcoholic fatty liver disease; Toll-like receptor 4; *Bifidobacterium*; *Lactobacillus*; *Escherichia coli*

Wang HK, Yang T, Yao P. Association between intestinal flora and Toll-like receptor 4 in rabbits with nonalcoholic fatty liver disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(35): 3988-3993 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/3988.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i35.3988>

摘要

目的: 研究非酒精性脂肪肝(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)家兔肠道菌群的变化, 并分析菌群与肠黏膜Toll样受体4(Toll-like receptor 4, TLR4)间的关系。

方法: 14只♂新西兰家兔随机分成对照组及

■同行评议者
度必光, 教授, 遵义医学院附属医院消化科

模型组, 对照组给以普通饲料, 模型组给以高脂饲料, 喂养12 wk后处死。取肝脏组织行HE染色观察肝脏, 取回肠组织行免疫组织化学观察肠黏膜TLR4的定位及表达, 取肠内容物行实时荧光定量-聚合酶链反应(RT-PCR)检测肠内容物中大肠杆菌、乳酸杆菌、双歧杆菌拷贝数的变化。用多元线性回归分析肠道菌群的改变对肠黏膜TLR4表达的影响。

结果: 与对照组相比, 模型组家兔肠腔中大肠杆菌数量增多($t = -3.492, P = 0.008$), 而乳酸杆菌($t = -1.848, P = 0.089$)、双歧杆菌($t = -1.059, P = 0.311$)数量无明显改变, 肠黏膜TLR4表达升高($t = -4.089, P = 0.002$), 回归分析显示大肠杆菌、双歧杆菌对肠黏膜TLR4表达有明显影响($R^2 = 0.598, F = 8.167, P = 0.007$); 双歧杆菌与TLR4呈负相关(标准化 $\beta = -0.475$), 大肠杆菌与TLR4呈正相关(标准化 $\beta = 0.554$)。而乳酸杆菌与TLR4无明显相关性。

结论: NAFLD家兔存在肠道菌群失调, 且对肠道TLR4的表达有显著影响。

© 2013年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词: 非酒精性脂肪性肝病; Toll样受体4; 大肠杆菌; 乳酸杆菌; 双歧杆菌

核心提示: 非酒精性脂肪肝(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)家兔存在肠道菌群失调, 这与肠黏膜Toll样受体4(Toll-like receptor 4)表达上调有密切关系, 可能对NAFLD发病及进展有一定作用。

王海昆, 杨涛, 姚萍. NAFLD家兔肠道菌群与肠黏膜Toll样受体4的关系. 世界华人消化杂志 2013; 21(35): 3988-3993 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/3988.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i35.3988>

0 引言

非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)是指除外酒精和其他明确肝脏损伤因素所致的, 以弥漫性肝细胞大泡性脂肪变性为病理特征的临床综合征。其疾病谱包括单纯性脂肪肝、非酒精性脂肪性肝炎(non-alcoholic steatohepatitis, NASH)及与之相关的肝硬化、肝细胞癌^[1]。该病目前在西方人群中患病率约20%-30%, 亚太地区患病率接近12%-24%^[2], 是目前重要的公共健康问题之一。许多研究均指出肠道菌群失调与NAFLD发病有密切的关

系, 肠道中革兰阴性菌代谢产物脂多糖可诱发肠源性内毒素血症, 进而导致胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)。多项动物实验已证实, 脂多糖-Toll样受体4(Toll-like receptor 4, TLR4)-CD14通路参与了IR的形成过程^[3], 而IR在NAFLD发病中的作用已被证实, 本文通过分析NAFLD家兔肠道菌群改变与TLR4之间的关系以探讨肠道菌群对肠道免疫的影响, 进而为研究NAFLD的防治提供一定思路。

1 材料和方法

1.1 材料 体质量1.7-2.0 kg的纯种♂新西兰兔14只(购自新疆医科大学实验动物中心)。普通饲料(新疆维吾尔自治区实验动物中心)、高脂饲料配制方法为基础饲料85%(新疆维吾尔自治区实验动物中心), 猪油8%(市售板油自制), 胆固醇2%(Amresco进口分装), 蛋黄粉5%(Amresco进口分装), QIAamp DNA Stool Mini Kit(QIAamp Germany)试剂盒, 细菌基因组DNA快速提取试剂盒(TIANGEN公司), 琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒(离心柱型)(TIANGEN公司), 2×Taq PCR Master Mix(Biomed公司), 即用型兔抗TLR4多克隆抗体BA1717(武汉博士德), PV6001兔二步法免疫组织化学试剂盒(北京中杉金桥), 标准菌株[大肠埃希菌(*Escherichia coli*, *E. coli*), 1.356]、嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*, 1.1878)、双歧杆菌(*Bifidobacteria longum*, 1.2186)由中国科学院微生物研究所普通微生物菌种保藏管理中心购买的冻干粉, 并在6℃-10℃冰箱保存备用。

1.2 方法

1.2.1 动物模型建立及取材: 将14只♂新西兰兔适应性喂养2 wk, 观察无异常后随机分为2组, 模型组及正常对照组各7只, 对照组用普通饲料喂养, 模型组用高脂饲料喂养, 整个实验期间均饲养于新疆医科大学动物实验中心兔饲养室, 以笼卡标记, 单笼饲养, 模拟自然光照, 饮水不限, 饲养12 wk后处死。于肝右叶中部切取小块组织, 以10%多聚甲醛固定, 准备行HE染色。取回盲部上端10 cm左右处回肠组织, 10%多聚甲醛固定, 石蜡包埋并切片准备行免疫组织化学, 提取该处肠内粪便3 g置于2 mL无菌离心管内, 用于检测各菌群含量。

1.2.2 观察指标及方法: (1)肝脏组织HE染色: 以40g/L甲醛固定肝脏组织后, 经石蜡包埋、切片, HE染色, 在光镜下观察肝脏病理学改变, 以平均每个肝小叶内脂肪变性的肝细胞所占比例

■ 研发前沿

目前许多研究均证实内毒素在NAFLD的发生、进展过程中发挥了不可忽视的作用, 而肠道菌群是LPS最主要的来源, TLR4作为内毒素的受体在这一过程中亦有重要作用, 研究肠道菌群改变与TLR4的关系将对研究NAFLD发病及治疗有一定的贡献。

■ 相关报道

Abu-Shanab等研究发现NASH组小肠污染综合征的患病率(77.78%)显著高于对照组(31.25%)。有研究显示LPS能明显上调内皮细胞TLR4的表达,并且其作用呈一定的时间和剂量依赖性。Nomura等发现TLR4表达的下调导致LPS耐受性的产生,且LPS耐受程度与TLR4表达下调量之间呈正相关。

表 1 大肠埃希菌基因PCR引物序列

细菌	目的基因	PCR扩增片段长度(bp)	引物序列(5'→3')
大肠埃希菌	16SrDNA	340	F: 5'-GTTAATACCTTTGCTCATTG-3' R: 5'-ACCAGGGTATCTTAATCCTGTT-3'
乳酸杆菌	16SrDNA	341	F: 5'-AGCAGTAGGGAATCTTCCA-3' R: 5'-CACCGCTACACATGGA-3'
双歧杆菌	16SrDNA	243	F: 5'-TCGCGTCCGGTGTGAAAG-3' R: 5'-CCACATCCAGCATCCAC-3'

表示肝脏脂肪变性程度;(2)免疫组织化学测肠黏膜TLR4: 回肠组织石蜡切片常规脱蜡水化, 3% H_2O_2 孵育10 min, PBS冲洗, 0.01 mol/L枸橼酸抗原修复液, 微波修复(92 °C-98 °C)10 min, PBS冲洗, 兔抗兔多克隆TLR4抗体4 °C过夜, PBS冲洗, 二抗37 °C 30 min, PBS冲洗, DAB显色, 镜下控制显色时间(3-5 min), PBS代替一抗做空白对照。显微镜下观察, 每张切片取5个视野采集图像, 用Image-Pro Plus 6.0软件分析各图像特异性着色区域累计光密度(integral optical density, IA)值;(3)实时荧光定量PCR检测粪便中菌群: 将收集的粪便标本按QIAamp DNA Stool Mini Kit试剂盒的操作说明提取细菌基因组DNA, 置于-20 °C冰箱保存。复活标准菌株(LBS培养基, 37 °C, 3-5 d)并提取标准菌基因组DNA, 根据16SrDNA V3可变区基因序列设计3种菌群特异性引物(由上海生工生物工程技术有限公司合成, 引物序列如表1), 用3种菌群标准菌株基因组DNA与正常对照组粪便细菌基因组DNA进行常规PCR反应以检测引物特异性(反应条件: 94 °C预变性3 min, 94 °C变性30 s, 49.3 °C退火30 s, 72 °C延伸1 min, 共35个循环, 72 °C复性5 min。2.0%琼脂糖凝胶电泳, 110 V 35 min; 反应体系: 20 μ L: 2 \times Taq PCR Master Mix 10 μ L, 上、下游引物10 μ mol/L各0.5 μ L, DNA模板2.0 μ L, ddH₂O 7 μ L), 以3种菌群标准菌株基因组DNA行常规PCR反应(反应体系及条件同上)测定标准菌株基因组DNA浓度及A值作为实时荧光定量PCR反应的标准品, 10倍系列稀释纯化产物, 行SYBR Green I 实时荧光定量PCR反应以获得标注曲线(反应条件95 °C预变性3 min, 95 °C变性10 s, 49.3 °C退火30 s, 65 °C延伸1 min, 共40个循环; 反应体系: 20 μ L: 2 \times SYBR[®] Premix Ex TaqTM 10 μ L, 上下游引物各0.5 μ L, DNA模板2.0 μ L, ddH₂O 7 μ L)。反应完成后以0.5 °C为间隔, 从60 °C加热至95 °C, 每一间隔保持10 s, 获取融解

曲线。将粪便样品中提取的3中菌群DNA行实时荧光定量PCR反应(反应体系与条件同上), 所有样品均做2个平行复孔, 每次实验均设标准品校正和ddH₂O代替DNA样本的阴性对照, 完毕后根据融解曲线分析PCR产物特异性, 系统软件分析结果, 结果以每克湿便的细菌拷贝数的对数(以10为底数)表示。

统计学处理 免疫组织化学及电镜图像采用Image-Pro Plus 6.0软件进行分析, 用SPSS19.0统计软件分析所得数据, 计量资料用mean \pm SD表示, 采用多元线性回归分析大肠杆菌、乳酸杆菌、双歧杆菌与TLR4之间的关系, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肝脏病理学评估 根据中华医学会肝脏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(2010年修订版)中的组织学诊断标准^[4]评估肝脏病理改变, 正常对照组肝细胞形态正常(图1A)。而NAFLD模型组肝细胞可见广泛脂肪变性及大量气球样改变(图1B)。

2.2 肠道菌群的改变 正常对照组与NASH组家兔肠道大肠杆菌、乳酸杆菌、双歧杆菌及肠黏膜TLR4分析结果如表2。

2.3 肠黏膜TLR4受体表达的变化 模型组阳性染色明显增强, 呈棕褐色信号, 在肠黏膜上皮细胞膜顶端及胞浆均有表达, 呈线性连续性分布(图2A)。而对照组TLR4表达量极低, 主要在肠黏膜上皮细胞膜的顶端间断分布, 呈淡黄色信号(图2B), 而PBS代替一抗的阴性对照组显示非特异性染色主要分布于肠绒毛的血管中(图2C)。

2.4 逐步多元线性回归 以TLR4为应变量, 大肠杆菌(X1)、乳酸杆菌(X2)及双歧杆菌(X3)为自变量, 进入概率为 $\alpha\leq 0.10$, 移出概率为 $\alpha\geq 0.15$ 进行多元线性逐步回归分析, 最终大肠杆菌及双歧杆菌进入回归方程, 所构建的回归方程为Y

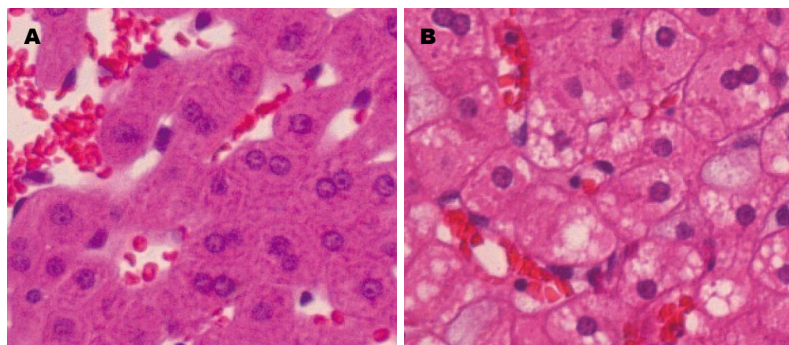


图 1 2组家兔肝脏HE染色图片($\times 400$). A: 对照组; B: 模型组.

■创新盘点
本研究在于探讨NAFLD家兔肠道各菌群的变化对肠黏膜TLR4的影响, 既往尚无相同的报道.

表 2 两组家兔大肠杆菌、乳酸杆菌、双歧杆菌及TLR4的变化 (mean \pm SD)

	正常对照组	NASH组	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
双歧杆菌(拷贝数/克湿便)	5933.030 \pm 4400.412	8982.414 \pm 6222.880	-1.059	0.311
乳酸杆菌(拷贝数/克湿便)	2.240 \pm 1.601	5.643 \pm 4.601	1.848	0.089
大肠杆菌(拷贝数/克湿便)	14.299 \pm 11.400	54.767 \pm 28.467	3.492	0.008
TLR4	0.015 \pm 0.010	0.042 \pm 0.014	-4.089	0.002

TLR4: Toll样受体4.

表 3 大肠杆菌、乳酸杆菌、双歧杆菌与TLR4的多元线性回归分析结果

自变量	回归系数 β	标准化 β	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值	95.0%CI
常量	0.029		3.761	0.03	0.12-0.45
大肠杆菌	3.443×10^{-4}	0.554	2.871	0.015	8.034×10^{-5} - 6.082×10^{-4}
双歧杆菌	-1.613×10^{-6}	-0.475	-2.462	0.032	-3.055×10^{-6} - -1.709×10^{-7}

TLR4为应变量. $\alpha \leq 0.10$ 进入, $\alpha \geq 0.15$ 移出. TLR4: Toll样受体4.

$= 0.029 + 3.443 \times 10^{-4} \times X_1 - 1.613 \times 10^{-6} \times X_3$, 方程统计检验结果显示: $F = 8.167$, $P = 0.007$; 回归方程有意义. $R^2 = 0.598$, 提示TLR4的变化中有59.8%与大肠杆菌及双歧杆菌有关. 通过分析各自变量的回归系数显示: 大肠杆菌与TLR4呈正相关(标准化 $\beta = 0.554$), 双歧杆菌与TLR4呈负相关(标准化 $\beta = -0.475$)(表3).

3 讨论

人体肠道中存在着数量庞大的菌群, 菌种多达500-1000余种^[5], 大量肠道细菌主要位居于结肠和远端小肠, 在回肠中以厌氧菌如类杆菌属、双歧杆菌、梭杆菌属和消化链球菌属等占主导地位, 含量达到 1×10^9 /g; 而需氧菌和兼性厌氧菌包括肠杆菌、乳酸杆菌数量相对较少, 约有 1×10^6 - 1×10^8 /g^[6]. 当结肠内菌群因各种原因移位至小肠引起小肠内厌氧菌过度增生就会造成小肠污染综合征, Shanab等^[7]的研究发现NASH

组小肠污染综合征的患病率(77.78%)显著高于对照组(31.25%), 给NASH大鼠口服乳果糖或庆大霉素, 其血清转氨酶和肝组织炎症坏死程度可显著减轻^[8,9], 杨林辉等研究发现NAFLD患者存在肠道菌群失调、革兰阴性杆菌过度生长的现象^[10], 这些均提示肠道菌群数量及结构改变与NAFLD发病有密切关系. 我们的研究发现NAFLD家兔肠道内大肠杆菌较正常家兔明显增多, 而双歧杆菌及乳酸杆菌数量无明显改变, 与既往研究结果类似, 说明NAFLD家兔肠道内存在菌群失调及革兰阴性杆菌过度生长.

TLR4是内毒素识别受体, 主要表达于肠黏膜上皮细胞、树突状细胞、巨噬细胞等细胞膜上, 介导固有免疫, 他与内毒素结合后, 通过激活白介素受体相关激酶(interleukin 1 receptor associated kinase, IRAK)、核因子- κ B(nuclear factor kappa B, NF- κ B)等通路上调肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白介素(in-

■应用要点

本研究NAFLD家兔肠道内大肠杆菌明显增多,而双歧杆菌及乳酸杆菌等无明显改变. 大肠杆菌数与肠黏膜TLR4呈正相关,双歧杆菌与肠黏膜TLR4呈负相关,提示NAFLD家兔存在肠道菌群失调且与TLR4改变关系密切,大肠杆菌等格兰阴性菌增多可能引起肠道内毒素负荷增加,使TLR4表达上调并激活一系列炎症因子促进NAFLD的发生及发展.

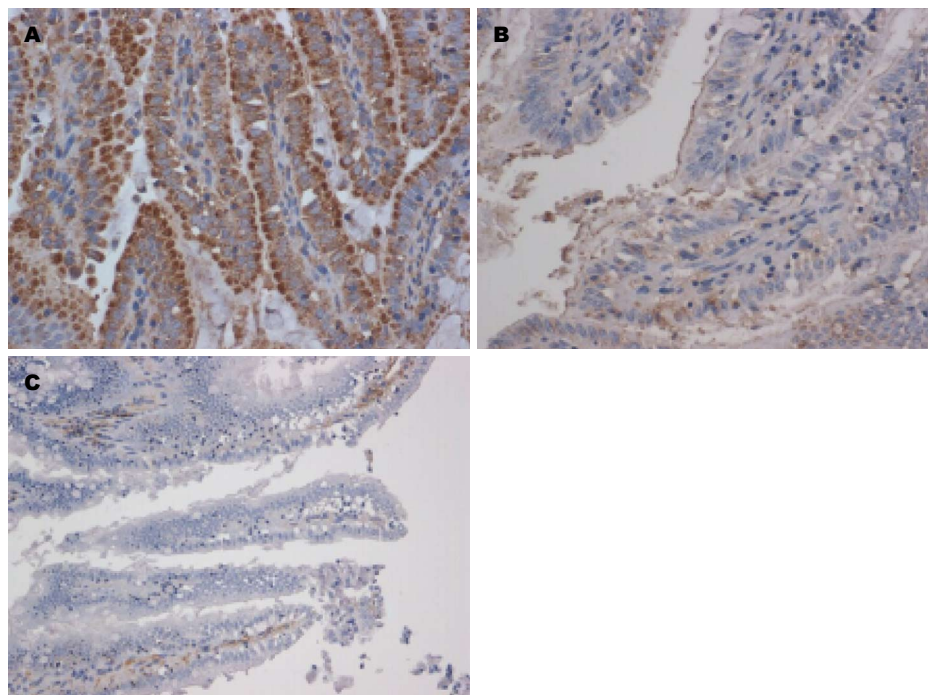


图2 2组家兔肠黏膜TLR-4受体免疫组织化学染色($\times 400$). A: 模型组; B: 对照组; C: PBS代替一抗的阴性对照.

terleukin, IL)-1、IL-6、IL-8、IL-12等细胞因子的表达而引起炎症的发生,与肝脏脂质沉积、炎症损伤及纤维化修复等密切相关. 有研究报道TLR4/MyD88信号通道在高脂饮食相关脂肪性肝病发病早期起关键作用^[11], Tadanobu等^[12]的研究显示NAFLD患者肝脏库普弗细胞TLR4高表达,且与病情进展程度一致. Rivera等^[13]发现TLR4沉默小鼠比野生型小鼠肝脏损害程度减轻,脂质沉积减少,说明TLR4与NAFLD的发病有着密切的关系. 正常人体肠道黏膜TLR4表达水平很低^[14],从而监视着正常状态下的肠道菌群并使得肠道即使存在一定量的内毒素也不会引起疾病,即人体对内毒素的免疫耐受. Nomura等^[15]发现TLR4表达的下调导致LPS耐受性的产生,且LPS耐受程度与TLR4表达下调量之间呈正相关,证明TLR4低表达是产生LPS耐受的关键环节. 我们研究也发现NAFLD组家兔小肠黏膜TLR4表达明显升高,说明NAFLD家兔对内毒素的免疫耐受机制已被破坏.

我们看到NAFLD家兔同时存在着肠道菌群失调及TLR4表达上调,而进一步分析这两者之间的关系,我们发现大肠杆菌与TLR4表达呈正相关,大肠杆菌增多时TLR4表达上调,而双歧杆菌与TLR4表达的关系则相反,我们推测这一现象与内毒素有关. 内毒素是革兰阴性菌细胞壁外膜上的一种脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)与

微量蛋白质的复合物,许多研究证实肝病时会出现肠道菌群微生态失调,革兰阴性菌大量增殖使肠道内毒素明显增加,而大肠杆菌是肠道革兰阴性菌中的优势菌群,其数量增多必然引起肠道中的内毒素增加,而双歧杆菌及乳酸杆菌均为肠道益生菌的代表,他们的存在可以抑制大肠杆菌等菌群的生长、促进肠道内有害物质排出,从而抑制肠道中内毒素增加. TLR4是内毒素的受体,有研究显示LPS能明显上调内皮细胞TLR4的表达,并且其作用呈一定的时间和剂量依赖性^[16],故肠道大肠杆菌增多引起肠道中内毒素增加的同时也使得TLR4的表达表达上调,相反,由于双歧杆菌等益生菌增加则使得TLR4的表达表达下调,这较为合理的解释了我们的研究结果.

但我们同时发现,乳酸杆菌与双歧杆菌同为肠道益生菌,有类似的作用,同样应与TLR4成负相关,而我们的研究中乳酸杆菌与TLR4并未表现出现这样的关系,我们认为这一现象可能是由于实验样本量较少而未能完全反映出他们之间存在的关系,需在以后的研究中增加样本量以进一步研究.

通过该研究,我们发现NAFLD家兔肠道内大肠杆菌数量与TLR4表达呈正相关,而双歧杆菌及乳酸杆菌等益生菌的作用则相反,从统计学角度,可以认为大肠杆菌增加会使TLR4表达

上调, 而益生菌则抑制其表达上调, 这为应用抗生素及益生菌治疗NAFLD提供了一定的理论依据, 但这一结论需要建立肠道菌群失调的模型以进一步研究, 也为今后关于NAFLD发病机制的研究提供了一定的思路。

4 参考文献

- 1 Farrell GC, Larter CZ. Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis. *Hepatology* 2006; 43: S99-S112 [PMID: 16447287 DOI: 10.1002/hep.20973]
- 2 Farrell GC, Chitturi S, Lau GK, Sollano JD. Guidelines for the assessment and management of non-alcoholic fatty liver disease in the Asia-Pacific region: executive summary. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22: 775-777 [PMID: 17565629 DOI: 10.1111/j.1440-1746.2007.05002.x]
- 3 Holland WL, Bikman BT, Wang LP, Yuguang G, Sargent KM, Bulchand S, Knotts TA, Shui G, Clegg DJ, Wenk MR, Pagliassotti MJ, Scherer PE, Summers SA. Lipid-induced insulin resistance mediated by the proinflammatory receptor TLR4 requires saturated fatty acid-induced ceramide biosynthesis in mice. *J Clin Invest* 2011; 121: 1858-1870 [PMID: 21490391 DOI: 10.1172/JCI43378]
- 4 范建高. 非酒精性脂肪性肝病诊疗指南(2010年修订版). 胃肠病学和肝病杂志 2010; 19: 483-487
- 5 Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, Nielsen T, Pons N, Levenez F, Yamada T, Mende DR, Li J, Xu J, Li S, Li D, Cao J, Wang B, Liang H, Zheng H, Xie Y, Tap J, Lepage P, Bertalan M, Batto JM, Hansen T, Le Paslier D, Linneberg A, Nielsen HB, Pelletier E, Renault P, Sicheritz-Ponten T, Turner K, Zhu H, Yu C, Li S, Jian M, Zhou Y, Li Y, Zhang X, Li S, Qin N, Yang H, Wang J, Brunak S, Doré J, Guarner F, Kristiansen K, Pedersen O, Parkhill J, Weissenbach J, Bork P, Ehrlich SD, Wang J. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 2010; 464: 59-65 [PMID: 20203603 DOI: 10.1038/nature08821]
- 6 Macpherson AJ, Harris NL. Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nat Rev Immunol* 2004; 4: 478-485 [PMID: 15173836 DOI: 10.1038/nri1373]
- 7 Shanab AA, Scully P, Crosbie O, Buckley M, O'Mahony L, Shanahan F, Gazareen S, Murphy E, Quigley EM. Small intestinal bacterial overgrowth in nonalcoholic steatohepatitis: association with toll-like receptor 4 expression and plasma levels of interleukin 8. *Dig Dis Sci* 2011; 56: 1524-1534 [PMID: 21046243 DOI: 10.1007/s10620-010-1447-3]
- 8 Fan JG, Xu ZJ, Wang GL. Effect of lactulose on establishment of a rat non-alcoholic steatohepatitis model. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 5053-5056 [PMID: 16124065]
- 9 Wu WC, Zhao W, Li S. Small intestinal bacteria overgrowth decreases small intestinal motility in the NASH rats. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 313-317 [PMID: 18186574 DOI: 10.3748/wjg.14.313]
- 10 杨林辉, 蔡俊, 陈东风. 非酒精性脂肪性肝炎患者肠道菌群的变化及意义. 临床肝胆病杂志 2012; 28: 124-126
- 11 Li L, Chen L, Hu L, Liu Y, Sun HY, Tang J, Hou YJ, Chang YX, Tu QQ, Feng GS, Shen F, Wu MC, Wang HY. Nuclear factor high-mobility group box1 mediating the activation of Toll-like receptor 4 signaling in hepatocytes in the early stage of nonalcoholic fatty liver disease in mice. *Hepatology* 2011; 54: 1620-1630 [PMID: 21809356 DOI: 10.1002/hep.24552]
- 12 Tadanobu N, Naoki T, Takefumi K, Michiharu K, Eiji T. Enhanced expression of toll-like receptor 4 and myd88 is associated with disease progression in human nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2011; 140: s978 [DOI: 10.1016/S0016-5085(11)64050-X]
- 13 Rivera CA, Adegboyega P, van Rooijen N, Tagalicud A, Allman M, Wallace M. Toll-like receptor-4 signaling and Kupffer cells play pivotal roles in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* 2007; 47: 571-579 [PMID: 17644211 DOI: 10.1016/j.jhep.2007.04.019]
- 14 Abreu MT, Vora P, Faure E, Thomas LS, Arnold ET, Arditi M. Decreased expression of Toll-like receptor-4 and MD-2 correlates with intestinal epithelial cell protection against dysregulated proinflammatory gene expression in response to bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol* 2001; 167: 1609-1616 [PMID: 11466383]
- 15 Nomura F, Akashi S, Sakao Y, Sato S, Kawai T, Matsumoto M, Nakanishi K, Kimoto M, Miyake K, Takeda K, Akira S. Cutting edge: endotoxin tolerance in mouse peritoneal macrophages correlates with down-regulation of surface toll-like receptor 4 expression. *J Immunol* 2000; 164: 3476-3479 [PMID: 10725699]
- 16 杨清武, 朱佩芳, 王正国, 蒋建新. Toll样受体4介导内毒素对内皮细胞NF- κ B的激活. 生物化学与生物物理进展 2002; 29: 407-410

■同行评价

本文通过建立家兔高脂肪饮食导致的脂肪肝模型, 研究肠黏膜的Toll4受体和肠道一些细菌的变化, 设计合理, 图片翔实, 具有一定学术意义。

编辑 郭鹏 电编 鲁亚静



高渗透压法制备细菌外膜扫描电镜样品

牛小羽, 牛畅, 冯尔玲, 刘先凯, 朱力, 张玫

■背景资料

由细菌、病毒或寄生虫病原体引起的腹泻性疾病是主要的公共健康问题。据世界卫生组织(WHO)统计, 2002年全世界有4.5亿例患腹泻性疾病, 共造成180万例死亡。卫生条件差和污染的饮用水促进了肠道疾病的传播, 营养不良和缺乏适当的医疗条件造成了高死亡率。志贺氏菌属是最常见的引起腹泻的病原菌, 其死亡率高且患者多为5岁以下儿童。不断出现的多重耐药菌株和持续的高发病率意味着志贺氏菌病仍是一个尚未解决的全球性健康问题。

牛小羽, 张玫, 首都医科大学附属宣武医院消化科 北京市 100053

牛畅, 首都师范大学生命科学学院 北京市 100037

牛畅, 冯尔玲, 刘先凯, 朱力, 军事医学科学院生物工程研究所病原微生物生物安全国家重点实验室 北京市 100071

牛小羽, 主治医师, 主要从事消化系统疾病的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 81171531

国家“973”基金资助项目, No. 2011CB504901

作者贡献分布: 本文研究过程与数据分析由牛小羽、牛畅及冯尔玲完成; 课题设计由刘先凯完成; 朱力与张玫负责审校。

通讯作者: 张玫, 主任医师, 100053, 北京市宣武区长椿街45号, 北京市首都医科大学附属宣武医院消化科。

zhang2955@sina.com

电话: 010-83198348

收稿日期: 2013-08-12 修回日期: 2013-10-04

接受日期: 2013-11-11 在线出版日期: 2013-12-18

Preparation of samples for electron microscopy by high osmotic pressure method

Xiao-Yu Niu, Chang Niu, Er-Ling Feng, Xian-Kai Liu, Li Zhu, Mei Zhang

Xiao-Yu Niu, Mei Zhang, Department of Gastroenterology, Xuanwu Hospital, Capital Medical University, Beijing 100053, China

Chang Niu, College of Life Sciences, Capital Normal University, Beijing 100037, China

Chang Niu, Er-Ling Feng, Xian-Kai Liu, Li Zhu, State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Beijing Institute of Biotechnology, Beijing 100071, China

Supported by: National Natural Foundation Science of China, No. 81171531; and the State Key Development Program of Basic Research of China, No. 2011CB504901

Correspondence to: Mei Zhang, Chief Physician, Department of Gastroenterology, Xuanwu Hospital, Capital Medical University, 45 Changchun Road, Xuanwu District, Beijing 100053, China. zhang2955@sina.com

Received: 2013-08-12 Revised: 2013-10-04

Accepted: 2013-11-11 Published online: 2013-12-18

Abstract

AIM: To compare different methods for preparation of samples for electron microscopic observation of *Shigella flexneri* surface structures.

METHODS: Three *Shigella flexneri* strains were cultured and used to prepare samples for electron microscopy. Samples were prepared in different osmotic environments. The obtained electron micrographs were compared to obtain the optimal sample preparation conditions.

RESULTS: Hyperosmotic environment in sample preparation often makes cytoplasmic shrinkage occur, which is beneficial for cell surface ultrastructure observation. By comparing the electron microscopic pictures of the three strains of *Shigella flexneri*, we found that the abundance of bacterial lipopolysaccharides (LPS) was less at 37 °C than that at 30 °C.

CONCLUSION: High osmotic pressure sample preparation is better than common methods in observing bacterial cell surface ultrastructures. Using this sample preparation method, electron microscopy analysis revealed that the relative density of LPS of *Shigella flexneri* varied among different culture temperatures.

© 2013 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

Key Words: Biological electron microscopy; *Shigella flexneri*; Lipopolysaccharides

Niu XY, Niu C, Feng EL, Liu XK, Zhu L, Zhang M. Preparation of samples for electron microscopy by high osmotic pressure method. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(35): 3994-3998 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/3994.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i35.3994>

摘要

目的: 近年来, 电子显微技术在生物学领域得到了广泛的应用。本文利用生物电镜技术对福氏志贺氏菌外膜结构进行了研究, 并对不同制样方法对电镜照片的影响。

方法: 将各志贺氏菌分别在30 °C和37 °C的环境中培养, PCR检测毒力大质粒是否在传代中丢失。培养至稳定期后, 收集菌液, 分别用非高渗和高渗固定液固定, 制备切片, 使用电子显微镜观察细菌外膜结构。

结果: 在高渗透压环境下制样能使细胞质发生皱缩, 有利于对细胞表面超微结构的观察。通过电镜图片对比, 发现在37 °C时, 三株福氏志贺氏菌外膜脂多糖丰度均少于30 °C。

■同行评议者
谭周进, 教授, 湖南中医药大学

结论: 高渗透压方法比普通制样方法更有利于对细菌表面超微结构进行观察. 通过对电镜照片的观察, 可以认为福氏志贺氏菌在不同培养温度下脂多糖的相对密度有所差异.

© 2013年版权归百世登出版集团有限公司所有.

关键词: 生物电镜; 福氏志贺氏菌; 脂多糖

核心提示: 在高渗透压环境下制样能使细胞质发生皱缩, 比普通制样方法更有利于对细菌表面超微结构进行观察. 通过电镜图片对比, 发现在37℃时, 三株福氏志贺氏菌外膜脂多糖丰度均少于30℃. 可以认为福氏志贺氏菌在不同培养温度下脂多糖的相对密度有所差异.

牛小羽, 牛畅, 冯尔玲, 刘先凯, 朱力, 张玫. 高渗透压法制备细菌外膜扫描电镜样品. 世界华人消化杂志 2013; 21(35): 3994-3998
URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/3994.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v21.i35.3994>

0 引言

由于当前大部分的分子生物学研究是在体外进行的, 而真正的生物学现象发生在个体和细胞内部. 因此, 利用生物电镜技术在细胞水平对生物形态、结构以及功能进行研究, 促进了生物科学研究的发展, 也为电子显微技术开辟了新的天地. 目前, 生物电镜技术已在细胞病理诊断、免疫抗原定位以及胞内基因及其产物定位等方面开展了研究.

志贺氏菌属(*Shigella Spp.*)是人类细菌性痢疾最为常见的病原菌, 通过III型系统分泌蛋白于人类细胞中, 导致炎症应答. 痢疾持续的高发病率和不断出现的多重耐药菌株意味着志贺氏菌病仍是一个尚未解决的全球性健康问题^[1], 已有研究将生物电镜技术应用于志贺氏菌表面脂多糖(lipopolysaccharides, LPS)抗原定位^[2]以及III型分泌系统(type three secretion system, T3SS)的形态结构分析^[3]. LPS是革兰氏阴性菌外膜的重要组成部分, 是细菌的一层保护性屏障, 防御外界环境中的不利因素对细菌的杀伤作用^[4]. 志贺氏菌LPS的结构从内到外依次为脂质A(lipid A)、内核(core oligosaccharide)和暴露在细菌表面的O-抗原(O-antigen)多糖链三部分. 其中O-抗原由多个拷贝的寡糖重复单位(repeat unit, RU)聚合而成, 构成了病原菌的一个重要的致病因子^[5-7]. O-抗原连接酶由位于核心寡糖core合成

途径中的相关基因组成的*waa*基因簇中的基因*waaL*编码, 他负责将O-PS连接到脂质A-核心寡糖上形成LPS^[8-10]. 因此, 在志贺氏菌中*waaL*基因的缺失, 会导致LPS合成失败.

本实验室的前期工作揭示了一种全新的福氏志贺氏菌LPS合成的调控机制, 即不同培养温度下LPS合成的相对密度有所差异. 但研究对象仅涉及一株福氏志贺氏菌, 为了验证这一现象是否在不同菌株间存在共性, 本研究利用高渗透压方法对三株福氏志贺氏菌外膜LPS进行了分析.

1 材料和方法

1.1 材料 福氏2a型志贺氏菌2457T、福氏2a型志贺氏菌301、福氏5a型志贺氏菌M90T以及301Δ*waaI*均由本实验室保存. 胰酪胨大豆琼脂(tryptose soya agar, TSA)固体培养基: 4%TSA、0.01%刚果红. LB(Luria-Bertani)培养基: 1%NaCl、1%胰蛋白胨、0.5%酵母提取物. NaI抗生素溶液(30 mg/mL). 固定液A(用于制备非高渗透压样品): 10 mL 40%戊二醛, 用0.1 mol/L PBS缓冲液(pH 7.2)稀释至100 mL. 固定液B(用于制备高渗透压样品): 10 mL 40%戊二醛, 用1 mol/L PBS缓冲液(pH 7.2)稀释至100 mL.

1.2 方法

1.2.1 细菌培养: 将各菌株分别在含有0.01%刚果红的TSA平板上划线30℃培养箱培养24 h, 挑取单克隆接入按照1:1000加入抗生素的5 mL新鲜LB培养基中, 30℃ 220 r/min摇床振荡培养12 h, 转接2次, 并分别用*IpaA*、*IpgB*、*MixD*、*VirG* 4个毒力相关基因的引物进行PCR, 检测毒力大质粒是否在传代中丢失. 验证正确后按1/100的接种量接种于5 mL新鲜LB培养基中, 37℃ 220 r/min摇床振荡培养至稳定期.

1.2.2 样品制备: 收集在不同温度下培养至稳定期的菌液1 mL, 3000 g离心5 min, 0.1 mol/L的PBS缓冲液(pH 7.2)洗1次, 同一温度培养的菌株分别在固定液A或固定液B中室温固定1 h. 固定后样品用0.1 mol/L PBS缓冲液清洗5次, 1%(W/V)的四氧化锇再次固定2 h, 0.1 mol/L PBS缓冲液清洗5次. 样品通过不同浓度梯度酒精(500、750、850及950 mL/L)脱水, 每个浓度15 min, 然后在无水乙醇中洗3次, 每次15 min. 样品包埋在树脂中, 切片后用乙酸双氧铀和枸橼酸铅染色.

1.2.3 电镜观察: 样品在电子显微镜80 kV下观察.

■ 研发前沿

LPS和T3SS功能间的关系就像剑和盾一样, 二者对于志贺氏菌毒力的发挥都是必不可少的. 因此要调整好LPS糖链对病原菌逃避宿主胃部极酸环境和免疫系统伤害的保护作用(盾)与T3SS针状结构的侵袭功能(剑)之间的平衡关系. 近年来, 电子显微技术得到了广泛的应用. 已有研究利用释放细胞内溶物的制样方法, 观察志贺氏菌细胞表面的T3SS以及LPS.

■相关报道

志贺氏菌通过糖基化改变LPS的结构调节T3SS针状结构暴露于膜外的长度,从而促进对靶细胞的侵袭能力,同时若LPS分子太短又无法发挥自身防御的功能,因此LPS的合成受到复杂而精密的调控。O-抗原的长度、分布以及糖基化都与肠道菌抗酸性相关,同时pH值也会影响LPS的长度。已有研究将生物电镜技术应用于志贺氏菌表面LPS抗原定位以及T3SS的形态结构分析。

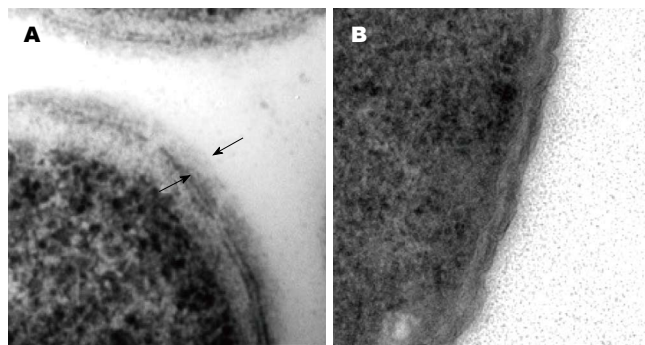


图1 福氏志贺氏菌细胞表面LPS的合成情况。A: 301野生株的LPS合成, 两个箭头间即为菌株LPS层; B: 301 Δ waaI缺失株的LPS合成。LPS: 脂多糖。

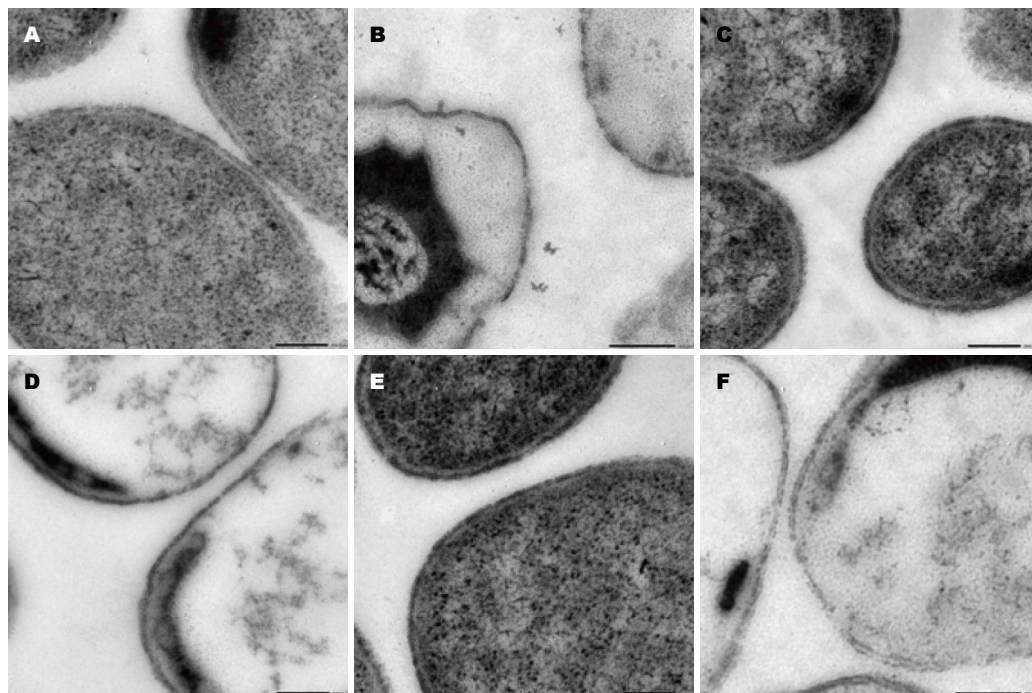


图2 福氏志贺氏菌野生株在非高渗透压和高渗透压环境下制样的区别。A: 2457T菌株在非高渗透压环境下制样的透射电镜图片; B: 2457T菌株在高渗透压环境下制样的透射电镜图片; C: 301菌株在非高渗透压环境下制样的透射电镜图片; D: 301菌株在高渗透压环境下制样的透射电镜图片; E: M90T菌株在非高渗透压环境下制样的透射电镜图片; F: M90T菌株在高渗透压环境下制样的透射电镜图片。

2 结果

2.1 细菌细胞壁表面LPS形态 前面已经介绍缺失waaI基因后301菌株无法合成LPS, 因此我们首先在电镜下观察了301 Δ waaI以及相应的301野生株细胞表面LPS的合成情况。结果与我们预期的一致301 Δ waaI菌株细胞外膜表面是裸露的, 而301野生株细胞壁表面覆盖了绒毛状的一层, 两个箭头间即为菌株LPS层(图1)。

2.2 高渗透压环境下细菌细胞电镜图片 由于LPS和T3SS都位于细胞表面, 为了更清晰的观察细胞表面的超微结构, 我们对生物电镜制样方法进行了改进, 首次在高渗透压环境中制样。我们采用了1 mol/L的PB缓冲液配制戊二醛固定液, 从而形成高渗透压的环境, 使细胞质发生皱缩,

与细胞壁分离开来。同时也用0.1 mol/L的PB缓冲液制备了正常环境条件下的细胞样品作为对照, 观察高渗透压环境是否会对细胞表面结构产生影响。结果如图2所示, 在高渗透压环境下细胞质与细胞壁分离, 更便于观察细胞表面结构。而在非高渗透压环境下细胞质与细胞壁连接在一起, 不能够清晰的辨识细胞表面超微结构, 同时高渗透压环境并未对细胞表面结构产生影响。

2.3 不同培养温度志贺氏菌细胞表面结构变化 已有文献报道, 志贺氏菌在37℃时具有完整的侵袭能力, 而在30℃时不能够侵袭上皮细胞^[1]。从图3高渗透压环境制样照片中可以看出, 30℃培养时, 细胞表面LPS更容易看到。

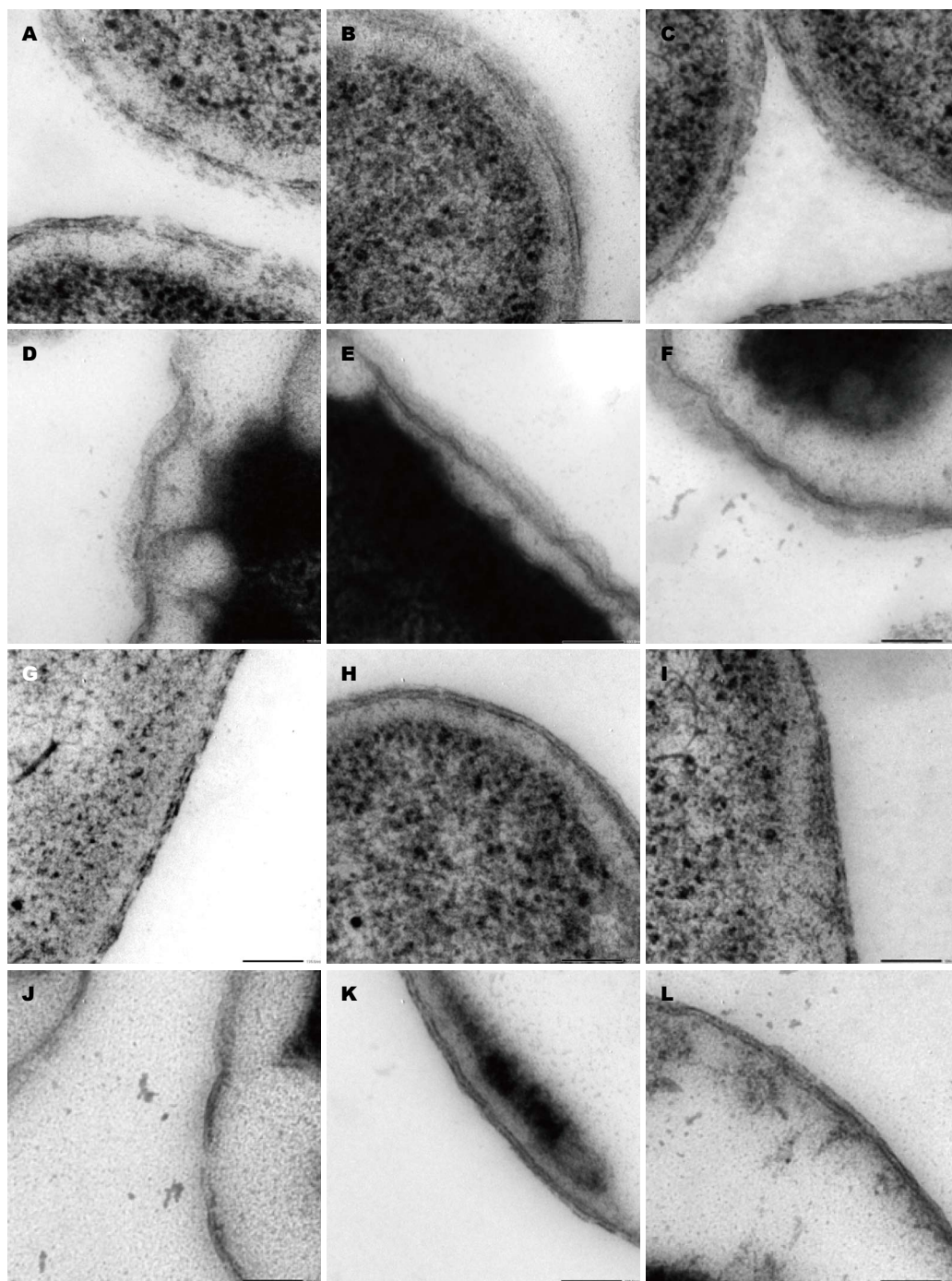


图 3 三株福氏志贺氏菌30 °C和37 °C条件下的LPS结构变化. A: 30 °C培养的2457T菌株在非高渗透压环境下制样的透射电镜图片; B: 30 °C培养的301菌株在非高渗透压环境下制样的透射电镜图片; C: 30 °C培养的M90T菌株在非高渗透压环境下制样的透射电镜图片; D: 30 °C培养的2457T菌株在高渗透压环境下制样的透射电镜图片; E: 30 °C培养的301菌株在高渗透压环境下制样的透射电镜图片; F: 30 °C培养的M90T菌株在高渗透压环境下制样的透射电镜图片; G: 37 °C培养的2457T菌株在非高渗透压环境下制样的透射电镜图片; H: 37 °C培养的301菌株在非高渗透压环境下制样的透射电镜图片; I: 37 °C培养的M90T菌株在非高渗透压环境下制样的透射电镜图片; J: 37 °C培养的2457T菌株在高渗透压环境下制样的透射电镜图片; K: 37 °C培养的301菌株在高渗透压环境下制样的透射电镜图片; L: 37 °C培养的M90T菌株在高渗透压环境下制样的透射电镜图片.

3 讨论

为了便于观察志贺氏菌细胞表面的T3SS, 2005年Kenjale等^[3]就采用了释放细胞内容物的方法进行制样. 我们在本文中采用的高渗透压使胞

质皱缩的制样方法与释放内容物的制样方法有异曲同工之妙, 而且省去了释放内容物方法的繁琐步骤, 更为简化有效.

本实验室成功构建的*waaI*缺失突变株银染

■创新盘点

我们的研究揭示了一种全新的细菌LPS合成的调控机制, 即不同培养温度下LPS合成的相对密度有所差异. 同时我们对生物电镜制样方法进行了改进, 首次在高渗透压环境中制样, 使细胞质发生皱缩与细胞壁分离开来, 更便于观察细胞表面结构.

■同行评价

本文对高渗透压法制备扫描电镜样品与普通方法制备扫描电镜样品的优越性进行了比较,为细菌外膜的电镜观察提供了一种实用的好制样方法,实验设计正确,分析透彻,书写流畅。

后没有一长串的阶梯状条带,而且缺失突变株不能引起豚鼠角膜炎症反应,表明了LPS的缺失的确影响了志贺氏菌的侵袭能力^[12]。West等^[13]的研究发现,志贺氏菌通过糖基化改变LPS的结构调节T3SS针状结构暴露在膜外的长度,从而促进对靶细胞的侵袭能力,同时若LPS分子太短又无法发挥自身防御的功能,因此LPS的合成受到复杂而精密的调控。Martinić等^[14]也证实了O-抗原的长度、分布以及糖基化都与肠道菌抗酸性相关,同时pH值也会影响LPS的长度。LPS和T3SS功能间的关系就像剑和盾一样,要调整好LPS糖链对病原菌逃避宿主胃部极酸环境和免疫系统伤害的保护作用(盾)与T3SS针状结构的侵袭功能(剑)之间的平衡关系,因为二者对于志贺氏菌毒力的发挥都是必不可少的^[15]。我们的研究揭示了一种全新的细菌LPS合成的调控机制,即不同培养温度下LPS合成的相对密度有所差异。这一现象的一种可能解释是:37℃时T3SS针筒的组装占据了细胞壁上很多空间,因此降低了LPS的表达。同时,通过对普通扫描电镜制样方法的简单改进,我们发现在高渗透压环境下制备样品,细胞质发生皱缩,从而更便于观察细菌细胞表面的LPS。

4 参考文献

- Sansonetti PJ. Shigellosis: an old disease in new clothes? *PLoS Med* 2006; 3: e354 [PMID: 16968125 DOI: 10.1371/journal.pmed.0030354]
- Robinson EN, McGee ZA, Kaplan J, Hammond ME, Larson JK, Buchanan TM, Schoolnik GK. Ultrastructural localization of specific gonococcal macromolecules with antibody-gold sphere immunological probes. *Infect Immun* 1984; 46: 361-366 [PMID: 6150005]
- Kenjale R, Wilson J, Zenk SF, Saurya S, Picking WL, Picking WD, Blocker A. The needle component of the type III secretion of *Shigella* regulates the activity of the secretion apparatus. *J Biol Chem* 2005; 280: 42929-42937 [PMID: 16227202 DOI: 10.1074/jbc.M508377200]
- Trent MS, Stead CM, Tran AX, Hankins JV. Diversity of endotoxin and its impact on pathogenesis. *J Endotoxin Res* 2006; 12: 205-223 [PMID: 16953973 DOI: 10.1179/096805106X118825]
- Freudenberg MA, Tchaptchet S, Keck S, Fejer G, Huber M, Schütze N, Beutler B, Galanos C. Lipopolysaccharide sensing an important factor in the innate immune response to Gram-negative bacterial infections: benefits and hazards of LPS hypersensitivity. *Immunobiology* 2008; 213: 193-203 [PMID: 18406367 DOI: 10.1016/j.imbio.2007.11.008]
- Beutler B. LPS in microbial pathogenesis: promise and fulfilment. *J Endotoxin Res* 2002; 8: 329-335 [PMID: 12537691 DOI: 10.1179/096805102125000650]
- Hug I, Feldman MF. Analogies and homologies in lipopolysaccharide and glycoprotein biosynthesis in bacteria. *Glycobiology* 2011; 21: 138-151 [PMID: 20871101 DOI: 10.1093/glycob/cwq148]
- Feldman MF, Wacker M, Hernandez M, Hitchen PG, Marolda CL, Kowarik M, Morris HR, Dell A, Valvano MA, Aebi M. Engineering N-linked protein glycosylation with diverse O antigen lipopolysaccharide structures in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 3016-3021 [PMID: 15703289 DOI: 10.1073/pnas.0500044102]
- Wacker M, Feldman MF, Calleeaert N, Kowarik M, Clarke BR, Pohl NL, Hernandez M, Vines ED, Valvano MA, Whitfield C, Aebi M. Substrate specificity of bacterial oligosaccharyltransferase suggests a common transfer mechanism for the bacterial and eukaryotic systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 7088-7093 [PMID: 16641107 DOI: 10.1073/pnas.0509207103]
- Whitfield C, Amor PA, Köplin R. Modulation of the surface architecture of gram-negative bacteria by the action of surface polymer: lipid A-core ligase and by determinants of polymer chain length. *Mol Microbiol* 1997; 23: 629-638 [PMID: 9157235]
- Zhu L, Zhao G, Stein R, Zheng X, Hu W, Shang N, Bu X, Liu X, Wang J, Feng E, Wang B, Zhang X, Ye Q, Huang P, Zeng M, Wang H. The proteome of *Shigella flexneri* 2a 2457T grown at 30 and 37 degrees C. *Mol Cell Proteomics* 2010; 9: 1209-1220 [PMID: 20164057 DOI: 10.1074/mcp.M900446-MCP200]
- 宋丽. 福氏2a志贺氏菌waaI和rfbA基因功能的研究. 南昌大学, 2012
- West NP, Sansonetti P, Mounier J, Exley RM, Parsot C, Guadagnini S, Prévost MC, Prochnicka-Chalufour A, Delepierre M, Tanguy M, Tang CM. Optimization of virulence functions through glucosylation of *Shigella* LPS. *Science* 2005; 307: 1313-1317 [PMID: 15731456 DOI: 10.1126/science.1108472]
- Martinić M, Hoare A, Contreras I, Alvarez SA. Contribution of the lipopolysaccharide to resistance of *Shigella flexneri* 2a to extreme acidity. *PLoS One* 2011; 6: e25557 [PMID: 21984920 DOI: 10.1371/journal.pone.0025557]
- Martinez-Argudo I, Blocker AJ. The *Shigella* T3SS needle transmits a signal for MxiC release, which controls secretion of effectors. *Mol Microbiol* 2010; 78: 1365-1378 [PMID: 21143311 DOI: 10.1111/journal.1365-2958.2010.07413.x]

编辑 郭鹏 电编 鲁亚静



自身免疫性肝炎患者血清学指标与肝活检病理的关系

郑 聪, 褚燕君, 张芳宾, 李 娅, 孙 静

郑聪, 褚燕君, 张芳宾, 李娅, 孙静, 郑州大学第一附属医院
消化内科 河南省郑州市 450052

郑聪, 在读硕士, 主要从事消化系统疾病的研究。

作者贡献分布: 此课题由褚燕君与郑聪设计; 病例收集过程由郑聪与孙静共同完成; 数据分析与处理由郑聪、张芳宾及李娅共同完成; 本论文写作由褚燕君、郑聪、张芳宾、李娅及孙静共同完成。

通讯作者: 褚燕君, 教授, 主任医师, 450052, 河南省郑州市建设东路1号, 郑州大学第一附属医院消化内科。

1054900885@qq.com

电话: 0371-66862082

收稿日期: 2013-08-29 修回日期: 2013-10-12

接受日期: 2013-10-31 在线出版日期: 2013-12-18

Correlation between serum indexes and hepatic biopsy histopathology in patients with autoimmune hepatitis

Cong Zheng, Yan-Jun Chu, Fang-Bin Zhang, Ya Li, Jing Sun

Cong Zheng, Yan-Jun Chu, Fang-Bin Zhang, Ya Li, Jing Sun, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China

Correspondence to: Yan-Jun Chu, Professor, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, 1 Jianshe West Road, Zhengzhou 450052, Henan Province, China. 1054900885@qq.com

Received: 2013-08-29 Revised: 2013-10-12

Accepted: 2013-10-31 Published online: 2013-12-18

Abstract

AIM: To explore the correlation of serum indexes with the degree of hepatic inflammation and fibrosis in patients with autoimmune hepatitis (AIH).

METHODS: Routine pathological examination of liver biopsies was performed in 146 patients with AIH) from 2003 to 2013, and serum liver function and coagulation function indexes were also recorded in these patients. The correlations between serum indexes and hepatic biopsy histopathology were assessed.

RESULTS: Serum alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, gamma-glutamyl transpeptidase, alkaline phosphatase, direct bili-

rubin and activated partial thromboplastin time were positively correlated with inflammatory grade [correlation coefficient (r) = 0.232, 0.245, 0.204, 0.255, 0.241 and 0.236, all $P < 0.05$], and serum albumin and albumin-globulin ratio were negatively correlated with inflammatory grade (r = -0.245 and -0.187, both $P < 0.05$). Serum alkaline phosphatase, total bilirubin, globulin, direct bilirubin, prothrombin time and activated partial thromboplastin time were positively correlated with fibrosis stage (r = 0.224, 0.184, 0.419, 0.197, 0.290 and 0.382, all $P < 0.05$), and serum albumin and albumin-globulin ratio were negatively correlated with fibrosis stage (r = -0.387 and -0.526, both $P < 0.05$). The receiver operating characteristic (ROC) curve was drawn between the above indicators and inflammation grade and fibrosis stage in patients with AIH. The area under the curve (AUC) of serum albumin and albumin-globulin ratio in S0 stage disease were 0.75 and 0.809, and the remaining indications had an AUC value < 0.7 .

CONCLUSION: Serum indexes have limited but appreciated value in estimating inflammatory grade and fibrosis stage in patients with AIH.

© 2013 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

Key Words: Autoimmune hepatitis; Serum indexes; Liver biopsy

Zheng C, Chu YJ, Zhang FB, Li Y, Sun J. Correlation between serum indexes and hepatic biopsy histopathology in patients with autoimmune hepatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(35): 3999-4005 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/3999.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i35.3999>

摘要

目的: 探讨自身免疫性肝炎(autoimmune hepatitis, AIH)患者肝组织炎症分级和纤维化分期相关的血清学指标。

方法: 收集2003-04/2013-03在我院行肝穿刺活检的146例AIH患者的血清学指标与肝组织活

■背景资料

自身免疫性肝炎(autoimmune hepatitis, AIH)临床表现及诊断复杂, 肝活检在临床应用较局限, 作者试图通过本研究找到有助于判定肝脏组织病理分级分期的血清学指标。

■同行评议者

胡国信, 主任医师, 副教授, 南昌大学第一附属医院传染科

■ 研发前沿

目前国内外很多专家学者正致力于无创性肝纤维化诊断模型的研究,并已建立多个肝纤维化非创伤性综合指标诊断模型,而对AIH患者血清学指标与肝组织炎症及纤维化程度关系的分析的研究尚未见报道。

检病理资料,分析其血清学指标与肝组织分期分级的相关性。

结果:血清谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)、谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)、谷氨酰转肽酶(gamma-glutamyl transpeptidase, γ -GT)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)、直接胆红素(direct bilirubin, DBIL)和部分凝血活酶时间(activated partial thromboplastin time, APTT)随肝脏炎症程度的加重而增高[相关系数(r)分别为0.232、0.245、0.204、0.255、0.241和0.236, P 均 <0.05],血清白蛋白(albumin, ALB)与白蛋白/球蛋白(albumin-globulin ratio, A/G)随肝脏炎症程度的加重而降低(r 分别为-0.245和-0.187, P 均 <0.05)。血清碱性磷酸酶、总蛋白、球蛋白、DBIL、凝血酶原时间、部分凝血活酶时间随肝脏纤维化程度加重而增高(r 分别为0.224、0.184、0.419、0.197、0.290和0.382, P 均 <0.05), ALB和A/G随肝脏纤维化程度的加重而降低(r 分别为-0.387和-0.526, P 均 <0.05)。分别将上述指标与AIH患者肝脏炎症分级和纤维化分期绘制ROC曲线, ALB和A/G在S0期受试者工作特征曲线(receiver operating characteristic curve, ROC)曲线下面积(area under curve, AUC)分别为0.755和0.809, 其余各项指标与肝脏炎症分级和纤维化分期绘制的AUC均 <0.7 。

结论:血清学指标有助于判定AIH患者肝脏组织病理的分期和分级,但存在较大局限性。

© 2013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; 血清学指标; 肝活检

核心提示: 本研究发现,对自身免疫性肝炎(autoimmune hepatitis, AIH)患者在无法行肝穿刺病理时,密切监测血清学指标在一定程度上有助于判断疾病的进展,但要确诊AIH患者肝组织炎症分级及纤维化分期,从而选择合理的治疗方案,肝活检是必不可少的。

郑璐, 褚燕君, 张芳宾, 李娅, 孙静. 自身免疫性肝炎患者血清学指标与肝活检病理的关系. 世界华人消化杂志 2013; 21(35): 3999-4005 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/3999.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i35.3999>

0 引言

自身免疫性肝炎(autoimmune hepatitis, AIH)是一种由自身免疫反应介导的慢性进行性肝脏炎症

性疾病,女性易患,以不同程度的血清转氨酶升高、高 γ -球蛋白、自身抗体阳性、肝组织学特征性改变和对免疫抑制治疗应答为特点。本研究通过分析146例AIH患者肝功能、凝血功能各项指标与肝脏组织炎症分级和纤维化分期的关系,以期找到有助于判定肝脏组织炎症分级和纤维化分期的血清学指标。

1 材料和方法

1.1 材料 收集2003-04/2013-03郑州大学第一附属医院确诊为AIH并接受肝穿刺活检患者,诊断标准依据国际自身免疫性肝炎小组(International Autoimmune Hepatitis Group, IAIHG)传统评分系统进行积分诊断^[1],总分在治疗前超过15分、治疗后超过17分为确定诊断的AIH,治疗前10-15分、治疗后12-17分为可能的AIH。剔除标准: (1)合并有大量饮酒(男 >40 g/d, 女 >20 g/d); (2)高血脂; (3)服用可引起肝功能损伤药物者; (4)合并遗传性代谢性肝病者; (5)肝炎病毒标记物阳性; (6)合并其他自身免疫性疾病者; (7)临床资料不全者。

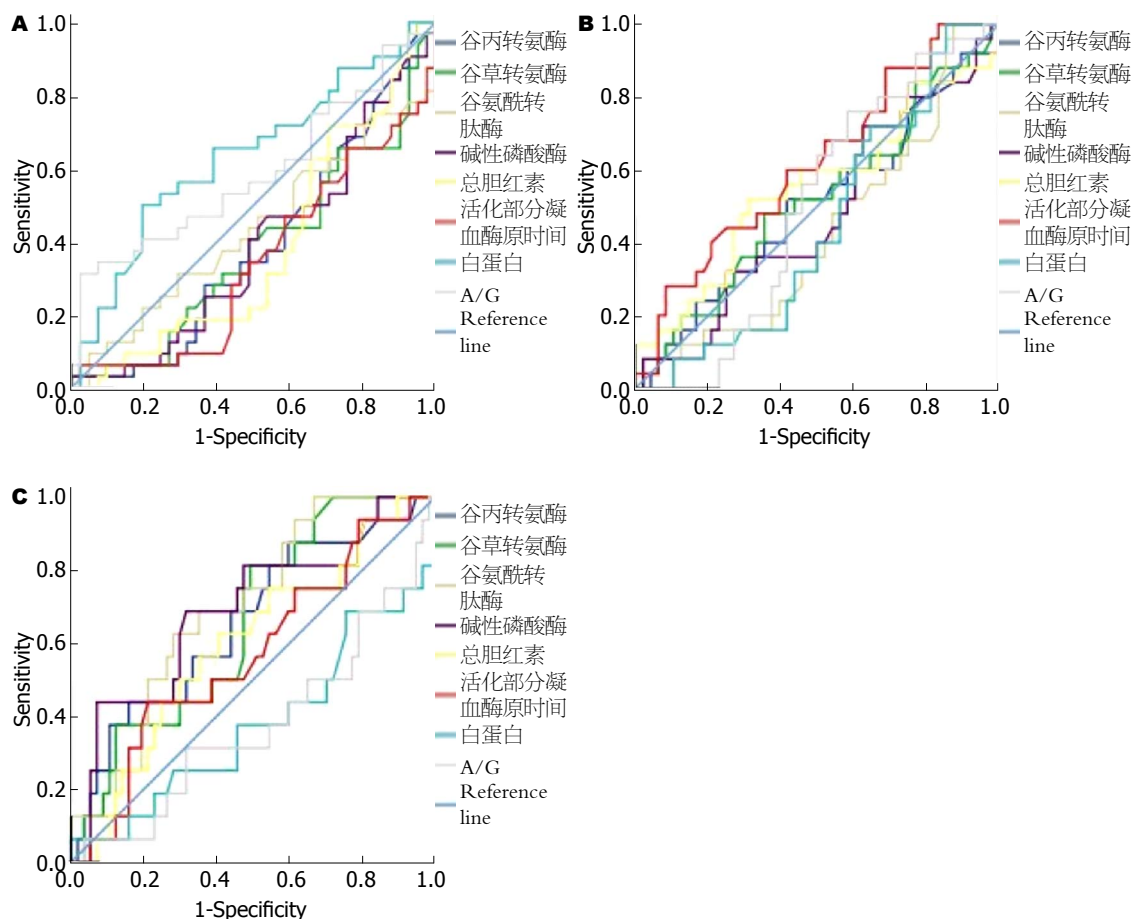
1.2 方法 登记患者性别、年龄、肝穿刺同期肝功能及凝血功能相关指标。分别由本院2位病理科医师对患者病理切片进行复片,按照慢性肝炎分期分级标准将标本分为G0-G4级和S0-S4期^[2]。

统计学处理 采用SPSS17.0软件对数据进行统计分析,符合正态分布的变量以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示,非正态分布变量以中位数(最低值-最高值)表示,等级资料间的比较采用Spearman秩相关分析,多组均数间的比较采用方差分析,非正态分布数据转换为正态分布后行方差分析、无法转换为正态分布时行非参数检验,同时对各有意义指标在各分期分级行ROC曲线(receiver operating characteristic curve)分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 研究对象 共有收集351例AIH患者,146例接受了肝穿刺活检。其中,男性27例,女性119例,年龄12-75岁,平均年龄 47.48 ± 15.75 岁。

2.2 血清学指标与肝组织病理炎症分级 血清谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)、谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)、谷氨酰转肽酶(gamma-glutamyl transpeptidase, γ -GT)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)、直接胆红素(direct bilirubin, DBIL)和部



■ 相关报道

目前国内外很多专家已建立多个肝纤维化非创伤性综合指标诊断模型, 如Imbert-Bismut等的FT和AT指标, Wai等的PRI模型, Patel等的FibroSpect II模型等。

图1 血清学相关指标对AIH患者肝脏炎症各级诊断的ROC曲线。A: G0+1期; B: G2期; C: G3+4期。ROC曲线下面积(area under curve, AUC)<0.5时, 对AIH诊断无意义; AUC为0.5~0.7时, 诊断准确性较低; AUC为0.7~0.9时, 诊断准确性中等; AUC>0.9时, 表示诊断准确性高。

分凝血活酶时间(activated partial thromboplastin time, APTT)随肝脏炎症程度的加重而增高[相关系数(r)分别为0.232、0.245、0.204、0.255、0.241和0.236, P 值分别为0.005、0.003、0.013、0.002、0.003和0.004], 血清白蛋白(albumin, ALB)与白蛋白/球蛋白(albumin-globulin ratio, A/G)随肝脏炎症程度的加重而降低(r 分别为-0.245和-0.187, P 值分别为0.003和0.024)。而血清总胆红素(total bilirubin, TBIL)、间接胆红素(indirect bilirubin, IDBL)、总蛋白(total protein, TP)、球蛋白(globulin, GLB)、凝血酶原时间(prothrombin time, PT)、凝血酶原活动度(prothrombin activity, PTA)和纤维蛋白原(fibrinogen, FIB)与肝脏炎症程度无显著相关性(表1)。

进一步分析显示血清ALT、AST、 γ -GT、ALP、DBIL和APTT在肝脏组织炎症分级为G3+4组患者的中位值均显著高于G0+1组(P 分别为0.003、0.003、0.002、0.002、0.007和0.020); 血清ALT、 γ -GT和ALP在G3+4组患者中的中

位值均显著高于G2组(P 分别为0.040、0.003和0.026); DBIL和APTT在G2组患者中的中位值均显著高于G0+1组(P 分别为0.019和0.003)。而ALB与A/G在G3+4组患者中的中位值显著低于G0+1组患者(P 值分别为0.033和0.040)(表1)。

分别将上述指标与AIH患者肝脏各级炎症绘制ROC曲线, 曲线下面积(AUC)均<0.7(图1)。

2.3 自身免疫性肝炎血清学指标与肝组织病理纤维化分期的关系 血清ALP、TP、GLB、DBIL、PT和APTT随肝脏纤维化程度加重而增高(r 分别为0.224、0.184、0.419、0.197、0.290和0.382, P 分别为0.006、0.026、0.000、0.017、0.000和0.000), 血清ALB、A/G随肝脏纤维化程度加重而降低(r 分别为-0.387和-0.526, P 分别为0.000和0.000)。而血清ALT、AST、 γ -GT、TBIL、IBIL、PTA和FIB与肝脏纤维化程度无显著相关性(表2)。

进一步分析显示, 血清ALP、TP、DBIL、PT和APTT在肝脏纤维化分期为S2、S3和S4期

■ 创新盘点

本文对AIH患者血清学指标与肝组织炎症及纤维化程度关系的研究,以期通过临床最常见的血清学指标评价AIH患者肝脏炎症及纤维化程度。

表1 血清学指标与肝脏炎症分级的结果比较

分级	n	ALT(U/L)	AST(U/L)	γ-GT(U/L)	ALP(U/L)	TP(g/L)	ALB(g/L)	GLB(g/L)	A/G	TBIL(μmol/L)	DBIL(μmol/L)	IBIL(μmol/L)	PT(s)	PTA(%)	APTT(s)	FB(g/L)
G0+1	64	59.5 (9.0-1585.0)	63.0 (16.0-1317.0)	78.0 (8.0-670.0)	108.0 (44.0-903.0)	76.3 (57.0-110.4)	40.5 (27.8-47.5)	37.5 (23.4-82.4)	1.13±0.39	13.6 (6.3-193.3)	5.5 (2.0-108.0)	9.0 (3.4-35.0)	13.3 (10.1-17.7)	94.0 (60.0-150.0)	37.2 (22.5-58.5)	2.8 (1.5-6.1)
G2	50	91.0 (6.0-806.0)	94.0 (17.0-760.0)	88.0 (19.0-538.0)	114.0 (45.0-616.0)	73.9 (56.9-106.1)	37.1 (29.7-45.6)	34.7 (25.8-70.4)	1.02±0.20	24.2 (4.0-390.4)	8.5 (1.2-270.9) ^a	14.4 (1.9-119.5)	13.1 (10.6-16.0)	91.2 (65.8-150.0)	38.5 (28.4-59.1) ^a	2.7 (1.7-5.5)
G3+4	32	116.5 (10.0-1051.0) ^{bc}	91.0 (34.0-600.0) ^a	166.5 (42.0-911.0) ^{bc}	151.5 (68.0-400.0) ^{bc}	76.2 (61.6-89.7)	34.9 (23.1-51.4) ^a	38.4 (27.6-56.5)	0.94±0.33 ^a	25.1 (7.4-173.8)	8.8 (2.2-137.0) ^a	12.8 (2.5-39.4)	13.3 (11.7-20.1)	97.0 (48.0-129.0)	38.7 (25.6-52.2) ^a	2.8 (1.3-4.0)
F值		4.48	4.678	8.3	5.178	0.61	3.565	1.481	3.356	2.356	4.785	-	-	-	-	-
P值		0.013	0.011	0.001	0.007	0.545	0.033	0.233	0.04	0.099	0.01	0.075	0.262	0.965	0.005	0.55

^aP<0.05 vs G0+1组; ^bP<0.05 vs G2组; 因G0、G4 组例数少, 将G0与G1合并, G4 与G3 合并; 行非参数分析时无F值以-表示。ALT: 血清谷丙转氨酶; AST: 谷草转氨酶; γ-GT: 谷氨酰转氨酶; ALP: 碱性磷酸酶; IBIL: 间接胆红素; TP: 总蛋白; ALB: 白蛋白; GLB: 球蛋白; A/G: 白蛋白/球蛋白; TBIL: 血清总胆红素; DBIL: 直接胆红素; PT: 凝血酶原时间; PTA: 凝血酶原活动度; APTT: 部分凝血活酶时间; FB: 纤维蛋白原。

的患者中的中位值均显著高于纤维化分期S0和S1期(P 均<0.05); 血清ALB在纤维化分期S2、S3和S4期患者中的中位值均显著低于S0和S1期患者(P 均<0.000); 血清GLB在肝脏纤维化分期为S1、S2、S3和S4期的患者中的中位值均显著高于纤维化分期S0期(P 分别为0.003、0.001、0.000和0.000), 在纤维化分期为S4期患者中位值显著高于S1期($P = 0.003$); 血清A/G在肝脏纤维化分期为S1、S2、S3和S4期的患者的中位值均显著低于纤维化分期S0期($P = 0.000$ 、0.046、0.000和0.000), 在纤维化分期为S4期患者中位值显著低于S1期($P = 0.010$)(表2)。

分别将上述指标与AIH患者肝脏纤维化分期绘制ROC曲线, ALB和A/G在S0期AUC分别为0.755和0.809(P 均<0.000)。95%置信区间分别为(0.665-0.845)和(0.733-0.884), 提示ALB和A/G对S0期AIH患者诊断价值较高。根据ROC曲线得出ALB和A/G分别为40.05和1.27 g/L时Youden指数最高, 可作为S0期的诊断指标, 判定S0期的敏感度分别为71.4%和57.1%, 特异度分别为76.9%和94.2%。其余各项指标与肝脏纤维化分期绘制的ROC下面积均<0.7(图2)。

3 讨论

肝纤维化是肝脏在对损伤慢性修复过程中细胞外基质过度增生与异常沉积所致肝脏结构和肝功能异常改变的一种病理过程。反复的肝组织炎症活动导致并加重肝纤维化的形成。

AIH临床表现及诊断复杂, 有时因难以判断病情而延误治疗。肝组织病理学检查是诊断AIH的必备条件^[3,4], 但由于肝活检创伤性较大、患者依从性差以及取样误差等问题, 其临床应用受到限制^[5]。鉴于肝活检在临床上推广与应用的局限性, 目前国内外很多专家学者正致力于无创性肝纤维化诊断模型的研究, 并已建立多个肝

表 2 血清学指标与肝脏纤维化分期的结果比较

分期	n	ALT(U/L)	AST(U/L)	γ-GT(U/L)	ALP(U/L)	IBIL(μmol/L)	TP(g/L)	ALB(g/L)	GLB(g/L)	A/G	TBL(μmol/L)	DBIL(μmol/L)	PT(s)	PTA(%)	APTT(s)	FIB(g/L)
S0	42	66.0 (9.0-1585.0)	63.0 (16.0-474.0)	74.0 (8.0-670.0)	103.0 (44.0-903.0)	9.0 (1.9-119.5)	74.6 (59.1-85.9)	41.3 (30.9-47.5)	30.1 (23.4-45.6)	1.31 ± 0.33	13.0 (4.7-390.4)	4.3 (2.2-270.9)	12.6 (11.1-14.8)	94.7 (76.0-150.0)	37.2 (22.5-41.2)	2.8 (1.4-6.1)
S1	50	91.0 (6.0-806.0)	84.0 (20.0-1317.0)	113.0 (10.0-771.0)	112.0 (58.0-616.0)	11.0 (2.1-33)	72.7 (60.6-90.7)	38.1 (29.3-41.7)	36.3 (26.2-51.9) ^a	1.00 ± 0.19 ^a	17.1 (4.0-233.4)	6.9 (1.9-217.7)	13.3 (10.1-17.7)	94.0 (60.0-150.0)	37.2 (25.5-58.5)	2.7 (1.5-5.5)
S2	20	90.5 (8.0-215.0)	101.5 (17.0-298.0)	115.5 (19.0-290.0)	120.5 (45.0-175.0) ^{ab}	7.0 (2.5-35)	78.5 (56.9-95.2) ^{ac}	37.6 (23.1-45.6) ^{ac}	40.1 (25.8-56.5) ^a	0.94 ± 0.24 ^a	12.3 (6.8-193.3)	6.0 (1.2-108.8) ^{ac}	13.3 (11.9-16.0) ^{ac}	87.5 (69.0-123.0)	43.5 (26.5-48.3) ^{ac}	2.2 (2.0-4.6)
S3	16	103.0 (25.0-1051.0)	87.5 (32.0-600.0)	104.0 (35.0-297.0)	169.5 (61.0-344.0) ^{ab}	16.0 (5.0-39.4)	76.2 (72.9-106.1) ^{ac}	37.4 (26.8-51.4) ^{ac}	38.0 (29.4-70.4) ^a	0.96 ± 0.42 ^a	26.5 (9.0-120.9)	10.3 (2.2-81.5) ^{ac}	14.1 (12.0-17.5) ^{ac}	86.5 (57.0-124.0)	41.2 (33.6-52.2) ^{ac}	2.8 (1.3-3.7)
S4	18	66.0 (26.0-283.0)	84.0 (33.0-361.0)	138.0 (60.0-911.0)	205.0 (72.0-336.0) ^{ab}	9.0 (2.7-37.0)	78.5 (61.6-110.4) ^{ac}	34.5 (24.4-41.6) ^{ac}	43.3 (32.9-82.4) ^{ac}	0.77 ± 0.24 ^{ac}	16.9 (6.3-173.8)	6.4 (2.9-137) ^{ac}	13.8 (11.7-20.1) ^{ac}	94.0 (48.0-129.0)	41.7 (34.7-59.1) ^{ac}	3.2 (1.4-4.8)
F值		1.04	2.352	2.349	-	-	-	-	8.518	13.105	-	-	5.375	1.536	-	-
P值		0.389	0.057	0.065	0.009	0.376	0.029	0	0	0	0.112	0.016	0.001	0.195	0	0.653

*P<0.05 vs S0组; ^aP<0.05 vs S1组; 行非参数分析时无F值以-表示。ALT: 血清谷丙转氨酶; AST: 谷草转氨酶; γ-GT: 谷氨酰转酞酶; ALP: 碱性磷酸酶; IBIL: 间接胆红素; TP: 总蛋白; ALB: 白蛋白; GLB: 球蛋白; A/G: 白蛋白/球蛋白; TBL: 总胆红素; 血清总胆红素; DBIL: 直接胆红素; PT: 凝血酶原时间; PTA: 凝血酶原活动度; APTT: 部分凝血活酶时间; FIB: 纤维蛋白原。

纤维化非创伤性综合指标诊断模型,主要的预测模型有FT和AT指标^[6],PRI模型^[7],FibroSpect II模型^[8]、欧洲肝纤维化组(European Liver Fibrosis Group, ELFG)模型^[9]、上海肝纤维化组(SLFG)模型^[10]、FibroIndex模型^[11]等,上述模型对于AIH患者诊断的准确率、灵敏度和特异度还有待于深入研究。而对AIH患者血清学指标与肝组织炎症及纤维化程度关系的分析的研究尚未见报道。作者试图通过本研究找到有助于判定肝组织病理分期的血清学指标,作为AIH患者肝脏炎症及纤维化的早期预测、判断疾病进展及评估疗效的参考。

本研究结果显示,在血清学的各项指标中,ALT、AST、γ-GT、ALP、A/G和APTT有助于判断AIH患者肝脏炎症程度,ALP、TP、ALB、GLB、A/G、DBIL、PT和APTT对纤维化进展有评估作用,同时对于AIH患者,当ALB<40.05 g/L和A/G<1.27时应注意早期肝硬化化的发生,需及时行抗纤维化治疗,延缓和阻断肝硬化进程。本研究也发现上述指标对炎症分级及纤维化分期谱的两极辨别作用较好,而对中等程度的炎症及纤维化鉴别能力欠佳,并不能进行精确的分级和分期,这与Bissell的对肝纤维化的研究一致^[12]。同时,通过对肝组织病理分期ROC曲线分析可见,只有ALB和A/G对S0期AIH患者诊断价值较高(AUC>0.7),其余各指标对分期分级的诊断价值较低(AUC<0.7)。基于此,我们认为上述血清学指标对AIH患者肝组织炎症分级及纤维化分期的评估有一定的意义,但仍存在较大局限性。这与一些学者对慢性乙型肝炎的研究一致^[13-15]。

应用要点
监测血清学指标在一定程度上有助于判断AIH患者疾病的进展,但肝活检仍是必不可少的。

■同行评价

本文对临床有一定的指导意义, 是一篇较好论文。

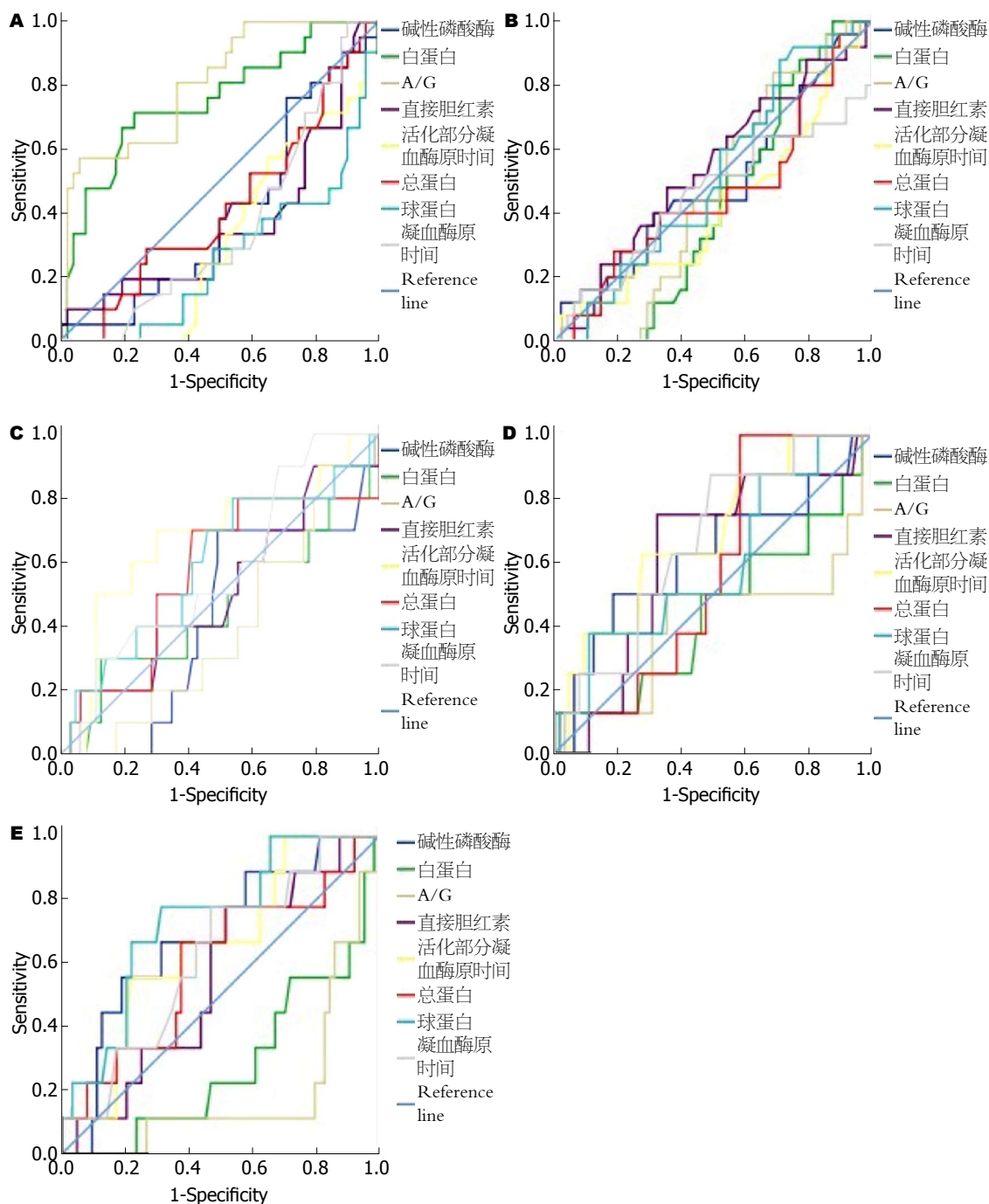


图2 血清学相关指标对AIH患者肝脏纤维化各期诊断的ROC曲线。A: S0期; B: S1期; C: S2期; D: S3期; E: S4期。ROC曲线下面积(AUC)<0.5时, 对AIH诊断无意义; AUC为0.5~0.7时, 诊断准确性较低; AUC为0.7~0.9时, 诊断准确性中等; AUC>0.9时, 表示诊断准确性高。

总之, 我们认为, 对AIH患者在无法行肝穿病理时, 密切监测血清学指标在一定程度上有助于判断疾病的进展, 但要确诊AIH患者肝组织炎症分级及纤维化分期, 从而选择合理的治疗方案, 肝活检是必不可少的。

4 参考文献

- Alvarez F, Berg PA, Bianchi FB, Bianchi L, Burroughs AK, Cancado EL, Chapman RW, Cooksley

WG, Czaja AJ, Desmet VJ, Donaldson PT, Edleston AL, Fainboim L, Heathcote J, Homberg JC, Hoofnagle JH, Kakumu S, Krawitt EL, Mackay IR, MacSween RN, Maddrey WC, Manns MP, McFarlane IG, Meyer zum Büschenfelde KH, Zeniya M. International Autoimmune Hepatitis Group Report: review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 1999; 31: 929-938 [PMID: 10580593 DOI: 10.1016/S0168-8278(99)80297-9]

- 中华医学会传染病与寄生虫病分会、肝病学会. 病毒性肝炎防治方案. *中华传染病杂志* 2001; 19: 56-62
- Johnson PJ, McFarlane IG. Meeting report: Inter-

- national Autoimmune Hepatitis Group. *Hepatology* 1993; 18: 998-1005 [PMID: 8406375 DOI: 10.1002/hep.1840180435]
- 4 Czaja AJ. The variant forms of autoimmune hepatitis. *Ann Intern Med* 1996; 125: 588-598 [PMID: 8815758 DOI: 10.7326/0003-4819-125-7-199610010-00009]
 - 5 赵洪昌. 慢乙肝患者血清学标志物与肝纤维化的关系. *中国实验诊断学* 2010; 14: 2021-2022
 - 6 Imbert-Bismut F, Ratziu V, Pieroni L, Charlotte F, Benhamou Y, Poynard T. Biochemical markers of liver fibrosis in patients with hepatitis C virus infection: a prospective study. *Lancet* 2001; 357: 1069-1075 [PMID: 11297957 DOI: 10.1016/S0140-6736(00)04258-6]
 - 7 Wai CT, Greenson JK, Fontana RJ, Kalbfleisch JD, Marrero JA, Conjeevaram HS, Lok AS. A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003; 38: 518-526 [PMID: 12883497 DOI: 10.1053/jhep.2003.50346]
 - 8 Patel K, Gordon SC, Jacobson I, Hézode C, Oh E, Smith KM, Pawlotsky JM, McHutchison JG. Evaluation of a panel of non-invasive serum markers to differentiate mild from moderate-to-advanced liver fibrosis in chronic hepatitis C patients. *J Hepatol* 2004; 41: 935-942 [PMID: 15582126 DOI: 10.1016/j.jhep.2004.08.008]
 - 9 Rosenberg WM, Voelker M, Thiel R, Becka M, Burt A, Schuppan D, Hubscher S, Roskams T, Pinzani M, Arthur MJ. Serum markers detect the presence of liver fibrosis: a cohort study. *Gastroenterology* 2004; 127: 1704-1713 [PMID: 15578508]
 - 10 Zeng MD, Lu LG, Mao YM, Qiu DK, Li JQ, Wan MB, Chen CW, Wang JY, Cai X, Gao CF, Zhou XQ. Prediction of significant fibrosis in HBeAg-positive patients with chronic hepatitis B by a noninvasive model. *Hepatology* 2005; 42: 1437-1445 [PMID: 16317674 DOI: 10.1002/hep.20960]
 - 11 Koda M, Matunaga Y, Kawakami M, Kishimoto Y, Suou T, Murawaki Y. FibroIndex, a practical index for predicting significant fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2007; 45: 297-306 [PMID: 17256741 DOI: 10.1002/hep.21520]
 - 12 Bissell DM. Assessing fibrosis without a liver biopsy: are we there yet? *Gastroenterology* 2004; 127: 1847-1849 [PMID: 15578524]
 - 13 何伶俐, 雷学忠, 陈竹, 陈恩强, 徐辉. 慢性乙型肝炎患者肝穿病理与临床指标的关系. *华西医学* 2010; 25: 474-478
 - 14 Lai M, Hyatt BJ, Nasser I, Curry M, Afdhal NH. The clinical significance of persistently normal ALT in chronic hepatitis B infection. *J Hepatol* 2007; 47: 760-767 [PMID: 17928090 DOI: 10.1016/j.jhep.2007.07.022]
 - 15 马科, 丁红方, 黄加权, 宁琴. 慢性乙型肝炎患者肝组织病理研究. *内科急危重症杂志* 2012; 18: 156-158

编辑 郭鹏 电编 鲁亚静



自身免疫性肝炎患者外周血淋巴细胞亚群的异常表达

肖锐, 陈楠, 方维丽, 周璐, 张洁, 李姝, 郑忠青, 王邦茂, 刘文天

■背景资料

自身免疫性肝炎(autoimmune hepatitis, AIH)的病因及发病机制复杂。细胞免疫和体液免疫共同参与了AIH的肝损伤, 迄今为止已经发现了多种T、B淋巴细胞亚群, 他们在AIH的发生、发展及肝损伤过程中所起的作用各不相同。

肖锐, 陈楠, 方维丽, 周璐, 张洁, 李姝, 郑忠青, 王邦茂, 刘文天, 天津医科大学总医院消化科 天津市 300052

肖锐, 天津医科大学内科学(消化系统疾病)硕士, 主要从事消化系统疾病的研究。

作者贡献分布: 肖锐与刘文天对本文所作贡献均等; 此课题由肖锐、陈楠及刘文天设计; 临床病例资料由方维丽、周璐、张洁、李姝、郑忠青及王邦茂提供; 研究、实验操作及数据分析由肖锐与陈楠完成; 论文写作由肖锐、陈楠及刘文天完成。

通讯作者: 刘文天, 教授, 主任医师, 300052, 天津市和平区鞍山道154号, 天津医科大学总医院消化科。

wentianliu160@gmail.com

电话: 022-60363800

收稿日期: 2013-09-10 修回日期: 2013-10-23

接受日期: 2013-11-06 在线出版日期: 2013-12-18

Abnormal peripheral blood lymphocyte subsets in patients with autoimmune hepatitis

Rui Xiao, Nan Chen, Wei-Li Fang, Lu Zhou, Jie Zhang, Shu Li, Zhong-Qing Zheng, Bang-Mao Wang, Wen-Tian Liu

Rui Xiao, Nan Chen, Wei-Li Fang, Lu Zhou, Jie Zhang, Shu Li, Zhong-Qing Zheng, Bang-Mao Wang, Wen-Tian Liu, Department of Gastroenterology, Tianjin Medical University General Hospital, Tianjin 300052, China

Correspondence to: Wen-Tian Liu, Professor, Chief Physician, Department of Gastroenterology, Tianjin Medical University General Hospital, 154 Anshan Road, Heping District, Tianjin 300052, China. wentianliu160@gmail.com

Received: 2013-09-10 Revised: 2013-10-23

Accepted: 2013-11-06 Published online: 2013-12-18

Abstract

AIM: To investigate the abnormal changes in peripheral blood lymphocyte subsets in patients with autoimmune hepatitis and to analyze their correlations with liver dysfunction, immunoglobulin (Ig) and hepatitis activity index (HAI) to explore the significance of abnormal lymphocyte subsets in the diagnosis and treatment of autoimmune hepatitis (AIH).

METHODS: Thirty-six patients who were diagnosed with AIH and did not accept prior immunosuppressive therapy were included. Thirty-six healthy subjects were used as controls. Patients in both groups received tests of liver function and immune function. Liver biopsy and histopathological examination were carried out to

evaluate HAI score for AIH patients. The subsets of T lymphocytes, B lymphocytes and regulatory T cells (Tregs) were detected by flow cytometry (FCM). Correlations between the percentages of lymphocyte subgroups and liver function, Ig and HAI score were evaluated.

RESULTS: The percentages of CD3⁺CD4⁺ T, CD3⁺CD8⁺ T, CD19⁺ B, CD5⁺CD19⁺ B and the ratios of CD3⁺CD4⁺ T/CD3⁺CD8⁺ T and CD5⁺CD19⁺ B/CD19⁺ B cells were all significantly higher in AIH patients than in controls (all $P < 0.05$). However, there was no statistical significance in the percentage of CD4⁺CD25⁺CD127dim Tregs between the two groups. The percentages of CD3⁺CD4⁺ T, CD3⁺CD8⁺ T, and CD5⁺CD19⁺ B cells had a positive correlation with serum levels of alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase and HAI score. The percentage of CD5⁺CD19⁺ B cells was positively related to IgG ($r = 0.482, P < 0.01$).

CONCLUSION: In AIH patients, abnormal peripheral blood T and B lymphocyte subsets may lead to the aggravation of liver injury. Cellular immunity mediated by T lymphocyte subsets may be more closely related to liver injury and hepatic inflammatory activity. Immuno-regulatory effect of regulatory T cells may not be obvious in AIH patients.

© 2013 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

Key Words: Autoimmune hepatitis; Lymphocyte subgroup; Indicator of liver function; Immunoglobulin; Hepatitis activity index

Xiao R, Chen N, Fang WL, Zhou L, Zhang J, Li S, Zheng ZQ, Wang BM, Liu WT. Abnormal peripheral blood lymphocyte subsets in patients with autoimmune hepatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(35): 4006-4013 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/4006.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v21.i35.4006>

摘要

目的: 研究自身免疫性肝炎(autoimmune hepatitis, AIH)患者外周血淋巴细胞亚群的表

■同行评议者

陈积圣, 教授, 中山大学孙逸仙纪念医院肝胆外科

达及与肝功能、免疫球蛋白和肝脏炎症活动指数(hepatitis activity index, HAI)的相关性,探讨在AIH诊断及治疗中的意义。

方法: 选择确诊且未经治疗的AIH患者36例,为AIH组;36例健康者为对照组。分别检测肝功能、免疫球蛋白, AIH组行肝穿刺检查,评价肝脏炎症活动性。流式细胞术检测外周血淋巴细胞亚群的比率,并与肝功能、免疫球蛋白及HAI评分进行相关性分析。

结果: AIH组外周血CD3⁺CD4⁺ T, CD3⁺CD8⁺ T, CD19⁺ B, CD5⁺CD19⁺ B比率及CD3⁺CD4⁺ T/CD3⁺CD8⁺ T, CD5⁺CD19⁺ B/CD19⁺ B比值明显高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);CD4⁺CD25⁺CD127dim T比率较对照组,差异无统计学意义。AIH组CD3⁺CD4⁺ T, CD3⁺CD8⁺ T, CD5⁺CD19⁺ B比率分别与丙氨酸氨基转移酶、天冬氨酸氨基转移酶及HAI评分呈正相关;CD5⁺CD19⁺ B比率与免疫球蛋白G呈正相关($r=0.482, P<0.01$)。

结论: 淋巴细胞亚群的异常表达是导致肝脏炎症损伤加重的直接因素,细胞免疫与肝脏炎症损伤的关系更为密切;调节性T细胞在AIH中的免疫抑制作用或许不明显。

© 2013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;淋巴细胞亚群;肝功能指标;免疫球蛋白;肝炎活动指数

核心提示: 既往研究认为具有免疫负调节作用的调节性T细胞(regulatory T cells, Tregs)在自身免疫性肝炎(autoimmune hepatitis, AIH)患者体内的低表达进一步加重肝脏炎症损伤。而本研究发现AIH患者外周血Tregs的表达并无明显下调,这可能是由于免疫微环境的改变,又或者是Tregs参与了机体的抗炎反应,而非免疫抑制作用。

肖锐, 陈楠, 方维丽, 周璐, 张洁, 李姝, 郑忠青, 王邦茂, 刘文天. 自身免疫性肝炎患者外周血淋巴细胞亚群的异常表达. 世界华人消化杂志 2013; 21(35): 4006-4013 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/4006.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v21.i35.4006>

0 引言

自身免疫性肝炎(autoimmune hepatitis, AIH)是一种病因不明、病理机制复杂的慢性炎症性疾病,主要表现为肝功能异常、免疫球蛋白升高、多种自身抗体阳性和特异性的肝组织病理学异常

改变^[1,2],其主要发病机制与遗传易感性、环境促发因素、抗原交叉反应及免疫功能异常密切相关。目前研究认为,导致AIH肝损伤的免疫调节过程复杂,可能由细胞免疫和体液免疫共同介导^[3],而淋巴细胞亚群的表达可能在其中发挥着重要的作用,然而,淋巴细胞亚群的异常表达如何参与AIH发病的机制尚无定论。另外,具有免疫抑制功能的调节性T细胞(regulatory T cells, Tregs)在肝损伤过程中如何发挥作用目前还不明确。因此,本研究就AIH患者外周血T、B淋巴细胞亚群的表达进行检测,并与肝功能指标、免疫球蛋白以及肝脏炎症活动性指数(hepatitis activity index, HAI)进行相关性分析,以探讨T、B淋巴细胞亚群及Tregs是如何参与肝细胞的自身免疫损伤,为今后AIH的临床诊断及治疗提供新的依据。

1 材料与方法

1.1 材料 选择2011-04/2012-12在本院就诊的AIH患者36例,为AIH组,女性31例,男性5例,平均年龄61岁±10.5岁,其诊断参照2002年美国肝病学会修订发表的AIH诊断标准及评分标准(Czaja and Freese, 2002)^[4]。选择健康志愿者36例为正常对照组,女性28例,男性8例,平均年龄44.3岁±13.6岁。两组间年龄、性别比较无差异。分别采集两组研究对象清晨空腹时的外周静脉血,进行肝功能、免疫球蛋白和淋巴细胞亚群检测。AIH组肝穿刺活检以进行病理学检查,参照Knodell评分系统^[5]进行肝脏炎症活动性评价。实验器材及试剂准备:实验采用全自动生物化学分析仪(Olympus AU5400系统)检测肝功能指标:丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT),天冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST),γ-谷氨酰转氨酶(γ-glutamyltransferase, γ-GT),碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP),总胆红素(total bilirubin, TBiL),直接胆红素(direct bilirubin, DBiL);罗氏(Roche)E170电化学发光法检测免疫球蛋白A(immunoglobulin A, IgA), IgG和IgM; FACSCA型流式细胞仪(Becton, Dickinson and Company, New York, USA)检测T、B淋巴细胞亚群;所用试剂包括:PERCP-CD3/FITC-CD4/PE-CD8试剂盒、APC-CD19抗体、FITC-CD5抗体、PE-CD4抗体、FITC-CD25抗体、APC-CD127抗体和溶血素,均购自美国BD公司(Becton, Dickinson and

■研究前沿

T、B淋巴细胞与AIH的免疫炎症反应具有密切关系。目前研究发现T、B淋巴细胞具有多种不同功能的亚群,各亚群对AIH发生和发展的影响越来越受到重视,而调节性T细胞在AIH中的免疫调节作用还有待深入研究。

■ 相关报道

目前研究认为AIH的免疫炎症反应是由细胞免疫和体液免疫共同介导的,细胞免疫与肝损伤的关系更为密切。近年来,调节性T细胞在AIH中的作用备受关注。淋巴细胞亚群参与AIH免疫损伤的认识不断得到巩固和更新,为AIH的临床诊疗也提供了新的依据。

表 1 AIH组与对照组外周血T、B淋巴细胞亚群比率的比较 ($n = 36$, mean \pm SD, %)

	AIH组	对照组	t 值	P 值
CD3 ⁺ T	61.820 \pm 11.935	64.739 \pm 7.615	-1.237	0.220
CD3 ⁺ CD4 ⁺ T	46.952 \pm 21.107	35.322 \pm 3.408	3.264	0.002 ^a
CD3 ⁺ CD8 ⁺ T	33.288 \pm 11.308	25.245 \pm 3.076	4.118	0.000 ^a
CD3 ⁺ CD4 ⁺ T/CD3 ⁺ CD8 ⁺ T	1.592 \pm 0.356	1.421 \pm 0.178	2.572	0.012 ^a
CD19 ⁺ B	13.510 \pm 5.536	9.940 \pm 1.207	3.780	0.000 ^a
CD5 ⁺ CD19 ⁺ B	8.448 \pm 6.089	2.840 \pm 0.915	4.073	0.000 ^a
CD5 ⁺ CD19 ⁺ B/CD19 ⁺ B	0.776 \pm 0.652	0.294 \pm 0.100	3.262	0.000 ^a
CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127dim T	5.586 \pm 2.170	6.094 \pm 1.363	-0.886	0.382

^a $P < 0.05$ vs 对照组. AIH: 自身免疫性肝炎.

Company, New York, USA).

1.2 方法 采用流式细胞术检测T、B淋巴细胞亚群,应用Cell-Quest软件分析其表达情况.分别采集AIH组与对照组的外周血约2 mL,加入肝素抗凝,备用.(1)T淋巴细胞亚群检测:取外周血100 μ L,加入CD3、CD4、CD8抗体20 μ L,置室温避光孵育20 min,加入溶血素400 μ L,混匀,上机分析;(2)B淋巴细胞亚群检测:取外周血100 μ L,分别加入CD19、CD5抗体各20 μ L,置室温避光孵育15 min,溶血素1 mL,1500 r/min离心5 min,弃上清液,加入1 mL PBS混匀,1500 r/min,离心5 min,弃上清液,加入300 μ L PBS,混匀,上机分析;(3)调节性T细胞检测:取外周血100 μ L,分别加入CD4、CD25、CD127抗体各20 μ L,室温避光孵育15 min,加入溶血素1 mL,1500 r/min离心5 min,弃上清液,加入1 mL PBS混匀,1500 r/min,离心5 min,弃上清液,加入300 μ L PBS,混匀,上机分析.

统计学处理 采用SPSS19.0统计学软件进行数据分析,所获计量资料均经正态性及方差齐性检验,采用两个独立样本均数的 t 检验,相关性分析采用Bivariate Correlations分析; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 外周血T、B淋巴细胞亚群改变 AIH组外周血CD3⁺CD4⁺ T, CD3⁺CD8⁺ T, CD19⁺ B, CD5⁺CD19⁺ B比率以及CD3⁺CD4⁺ T/CD3⁺CD8⁺ T, CD5⁺CD19⁺ B/CD19⁺ B比值均明显高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$); AIH组外周血CD3⁺ T, CD4⁺CD25⁺CD127dim T比率与对照组相比,差异无统计学意义(表1,图1A-F).

2.2 肝功能、免疫球蛋白及HAI评分 AIH组肝功

能中ALT、AST、 γ -GT、TBiL和DBiL与对照组相比明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$),免疫球蛋白检测结果示IgG明显高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),而ALP、IgM、IgA两组相比差异无统计学意义(表2); AIH患者行肝穿病理学检查,分别从汇管区坏死、小叶内炎症、门静脉炎症以及肝纤维化四个方面评价肝组织炎症活动程度,以HAI评分(0-22分)表示(图2).

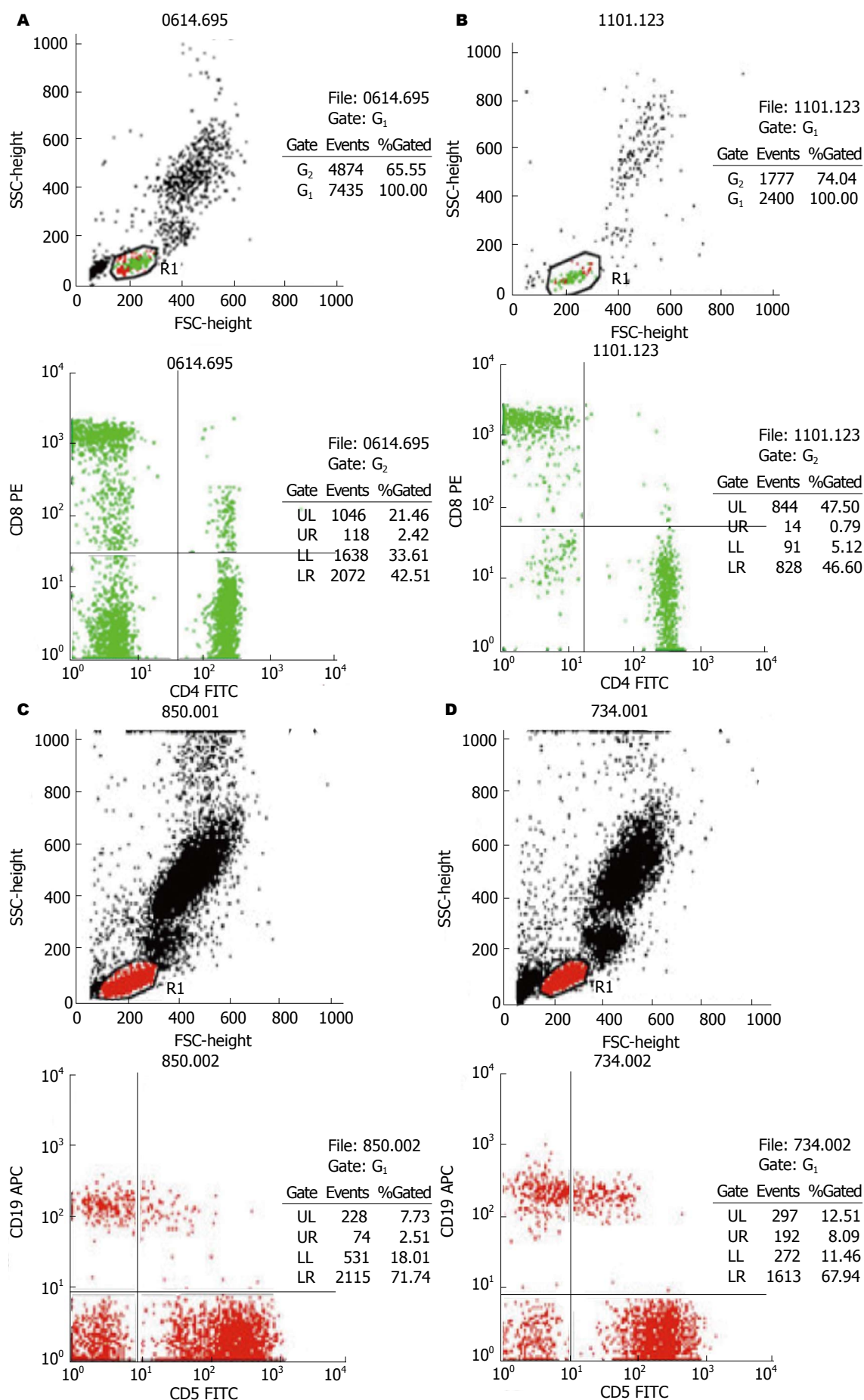
2.3 淋巴细胞亚群改变与肝功能、免疫球蛋白及HAI评分的相关性分析

2.3.1 T细胞亚群改变与肝功能、免疫球蛋白及HAI评分的相关性分析: AIH患者的T细胞亚群CD3⁺CD4⁺ T比率分别与肝功能指标ALT、AST呈正相关(r 分别为0.860, 0.826, $P < 0.01$), CD3⁺CD8⁺ T比率分别与ALT、AST呈正相关(r 分别为0.884, 0.863, $P < 0.01$); 并且CD3⁺CD4⁺ T, CD3⁺CD8⁺ T比率与HAI评分呈正相关(r 分别为0.738, 0.769, $P < 0.01$). 而CD3⁺CD4⁺ T、CD3⁺CD8⁺ T比率与ALP、 γ -GT、TBiL、DBiL则无相关性.

2.3.2 B细胞亚群改变与肝功能、免疫球蛋白及HAI评分的相关性分析: AIH患者的B细胞亚群CD5⁺CD19⁺ B比率分别与肝功能指标中的ALT、AST呈正相关(r 分别为0.577, 0.642, $P < 0.05$),与ALP、 γ -GT、TBiL、DBiL无相关性; 与HAI评分也呈正相关($r = 0.334$, $P < 0.05$); 与血清IgG呈正相关($r = 0.482$, $P < 0.01$),但与IgM、IgA则无相关性.

3 讨论

Liberal等^[6]在综述了近年来有关AIH发病相关免疫机制的研究后发现,肝脏受损伤的可能途径



■应用要点

通过本文可了解 AIH 患者外周血 T、B 淋巴细胞亚群的异常表达情况, 并结合异常的临床指标及肝组织病理学改变, 进一步明确肝损伤的机制, 为今后 AIH 的临床诊断及治疗提供新的思路。

■同行评价

本文选题较先进, 技术路线设计合理, 具有一定的学术价值。

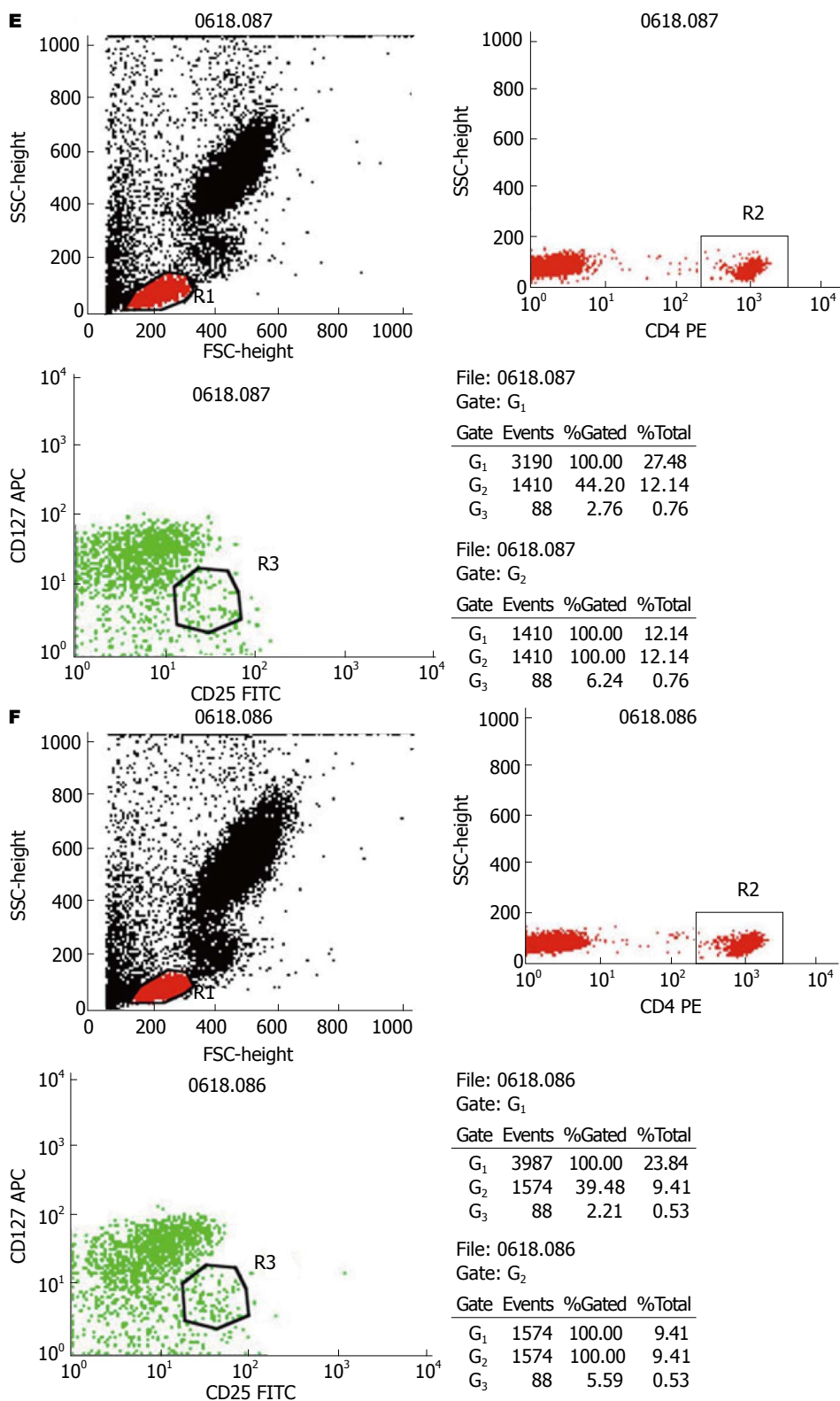


图1 流式细胞仪检测AIH患者及正常对照组的T、B淋巴细胞亚群改变。A: 正常对照组T淋巴亚群CD3⁺CD4⁺ T、CD3⁺CD8⁺ T; B: AIH组T淋巴亚群CD3⁺CD4⁺ T、CD3⁺CD8⁺ T; C: 正常对照组B淋巴亚群CD19⁺ B、CD5⁺CD19⁺ B; D: AIH组B淋巴亚群CD19⁺ B、CD5⁺CD19⁺ B; E: 正常对照组调节性T细胞CD4⁺CD25⁺CD127dim Tregs; F: AIH组调节性T细胞CD4⁺CD25⁺CD127dim Tregs。AIH: 自身免疫性肝炎。

为: 肝细胞表达的人类白细胞抗原 II (human leukocyte antigen- II, HLA- II) 类分子与自身抗原形成复合物, 由抗原递呈细胞递呈至辅助性T细胞

(T-helper, Th)Th0, 经诱导分化为Th1、Th2。Th1分泌细胞因子增强HLA- I 类分子的表达, 刺激细胞毒性T细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)

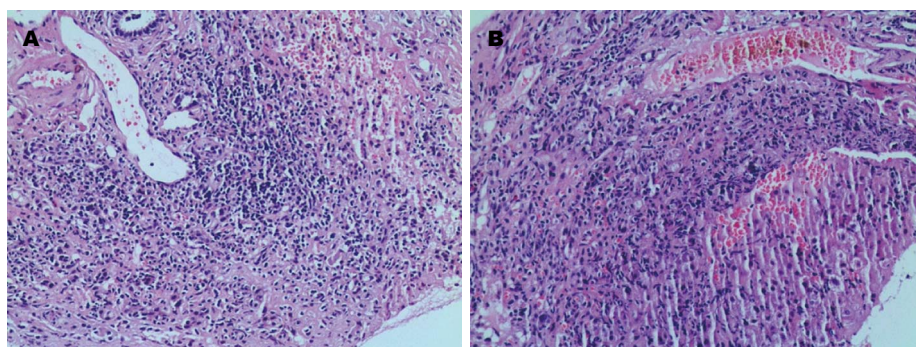


图 2 AIH患者肝组织不同程度的病理学改变(H&E × 100). A: AIH患者肝组织汇管区大量淋巴细胞、浆细胞浸润; B: AIH患者肝细胞中-重度碎屑样坏死. AIH: 自身免疫性肝炎.

表 2 AIH组与对照组肝功能、免疫球蛋白的比较及HAi评分 ($n = 36$, mean \pm SD)

	AIH组	对照组	t 值	P 值
丙氨酸氨基转移酶(U/L)	180.917 \pm 175.525	26.111 \pm 10.959	5.281	0.000 ^a
天冬氨酸氨基转移酶(U/L)	169.861 \pm 171.128	22.889 \pm 8.905	5.146	0.000 ^a
碱性磷酸酶(U/L)	189.300 \pm 38.097	90.850 \pm 35.513	8.454	0.754
γ -谷氨酰转氨酶(U/L)	148.000 \pm 39.618	31.600 \pm 16.291	12.152	0.000 ^a
总胆红素(μ mol/L)	87.880 \pm 114.881	13.900 \pm 10.897	2.867	0.007 ^a
直接胆红素(μ mol/L)	59.965 \pm 83.909	5.585 \pm 4.157	2.895	0.006 ^a
免疫球蛋白G(mg/dl)	1740.278 \pm 652.731	1154.639 \pm 309.144	4.865	0.000 ^a
免疫球蛋白M(mg/dl)	141.125 \pm 63.042	165.200 \pm 90.233	-0.978	0.334
免疫球蛋白A(mg/dl)	284.100 \pm 176.027	229.000 \pm 119.162	1.158	0.254
炎症活动指数(F)	5.222 \pm 2.030			

^a $P < 0.05$ vs 对照组. AIH: 自身免疫性肝炎.

增殖并分化, 发挥细胞毒作用杀伤肝细胞. Th2分泌细胞因子诱导B细胞增殖分化为浆细胞产生自身抗体, 加重肝细胞损伤. 本研究发现AIH患者外周血T、B淋巴细胞亚群CD3⁺CD4⁺ T、CD3⁺CD8⁺ T、CD19⁺ B、CD5⁺CD19⁺ B的表达较正常人明显增多, 他们分别反映了初始Th0、CTL、初始B细胞和浆细胞活化增殖水平的相应提高. 活化后的CD3⁺CD4⁺ T经诱导分化为Th1和Th2, Th1刺激CD3⁺CD8⁺ T发挥细胞毒作用杀伤肝细胞, 主要参与细胞免疫和炎症反应; Th2诱导CD19⁺ B增殖分化为CD5⁺CD19⁺ B, 后者分泌自身抗体参与肝脏自身免疫反应. 这一研究结果与上述文献的观点一致, AIH患者外周血T、B淋巴细胞亚群的表达增多, 其介导的细胞免疫和体液免疫应答也相应增强, 因而淋巴细胞亚群的异常表达在AIH发病及肝损伤过程中可能发挥重要作用.

Tregs是一类具有独立功能的T细胞亚群, 主要通过抑制CD4⁺ T、CD8⁺ T的活化与增殖, 发挥免疫负调节作用. 有报道患者体内Tregs

数量的减少和/或功能的减低可能导致免疫应答的紊乱, 与AIH发病有关^[7,8]. 而本研究发现AIH患者外周血CD4⁺CD25⁺CD127dim Tregs比率较正常人无明显减低. 近年研究发现^[9-12], 在某些自身免疫性疾病中, Tregs的数量及功能并未减少或缺失, 甚至随着组织器官炎症程度的增加呈增高趋势. 一方面可能由于特定的免疫微环境阻止了Tregs的免疫抑制功能^[13], 另一方面可能由于Tregs随血液循环迁移到炎症部位后大量增殖, 以对抗炎症反应, 而非参与免疫负调节^[11]. 而在AIH患者体内是否也存在类似的机制则有待进一步的证实.

临床评价肝功能的指标主要有ALT、AST、ALP、 γ -GT、TbIL和DbIL, 他们能较敏感的提示肝细胞损伤的严重程度. AIH主要以血清ALT, AST升高为主, ALP、 γ -GT、TbIL和DbIL可轻度升高, 诊断AIH时ALP/AST(或ALT)<1.5对确诊更有意义^[14]. 本研究将AIH组淋巴细胞亚群分别与异常的肝功能指标进行相关性分析, CD3⁺CD4⁺ T、CD3⁺CD8⁺ T、

CD5⁺CD19⁺ B比率分别与ALT、AST呈正相关,其中CD3⁺CD4⁺ T、CD3⁺CD8⁺ T与ALT、AST的相关性更好,进一步提示T淋巴细胞亚群的异常活化可能与肝细胞损伤及坏死有关,因而导致血清肝功能指标ALT、AST升高明显.相关性分析还发现,CD5⁺CD19⁺ B比率与IgG呈正相关,与IgM和IgA无相关性,这表明异常活化的CD5⁺CD19⁺ B能够分泌以IgG为主的单反应性、高亲和力的自身抗体^[14],从而介导体内持续的免疫应答.另外, HAI评分作为衡量AIH肝组织病理学改变的指标,从汇管区坏死、小叶内炎症、门静脉炎症以及肝纤维化4个方面针对肝组织炎症活动程度进行评价,分数越高,肝脏炎症反应程度越重. AIH患者淋巴细胞亚群CD3⁺CD4⁺ T、CD3⁺CD8⁺ T、CD5⁺CD19⁺ B比率与HAI评分呈正相关,并且CD3⁺CD4⁺ T、CD3⁺CD8⁺ T与HAI评分相关性更好.因此,这一研究结果提示T淋巴细胞亚群介导的细胞免疫可能与AIH肝脏炎症活动性的关系更为密切.

总之, AIH的发病及肝损伤是由细胞免疫和体液免疫共同参与的.目前针对AIH的诊断,仍缺乏敏感性及特异性高的实验室指标,本研究通过测定AIH患者外周血T、B淋巴细胞亚群的表达,并结合异常的临床指标进行相关性研究后发现,淋巴细胞亚群的异常活化是导致肝脏炎症损伤加重的直接因素,其中T淋巴细胞亚群介导的细胞免疫与肝损伤及炎症活动性的关系更加密切,但具有免疫抑制功能的调节性T细胞在AIH中的作用或许不明显.因此,对于诊断及治疗困难的AIH患者,可以通过细胞免疫检测手段,例如检测其淋巴细胞亚群的表达情况,从而提高AIH的诊断效能,并采用药物或细胞制剂诱导相关亚群表达下调^[15,16],从而抑制肝脏免疫炎症反应.随着免疫学及分子生物学的发展, AIH的病因及发病机制将会得到深入了解,相应的治疗学也会更加丰富与完善.

4 参考文献

- Malekzadeh Z, Haghazali S, Sepanlou SG, Vahedi H, Merat S, Sotoudeh M, Nasser-Moghaddam S, Malekzadeh R. Clinical features and long term outcome of 102 treated autoimmune hepatitis patients. *Hepat Mon* 2012; 12: 92-99 [PMID: 22509185 DOI: 10.5812/hepatmon.]
- Zachou K, Muratori P, Koukoulis GK, Granito A, Gatselis N, Fabbri A, Dalekos GN, Muratori L. Review article: autoimmune hepatitis -- current management and challenges. *Aliment Pharmacol Ther* 2013; 38: 887-913 [PMID: 24010812 DOI: 10.1111/

- apt.12470]
- Manns MP, Vogel A. Autoimmune hepatitis, from mechanisms to therapy. *Hepatology* 2006; 43: S132-S144 [PMID: 16447290 DOI: 10.1002/hep.21059]
- Czaja AJ, Freese DK. Diagnosis and treatment of autoimmune hepatitis. *Hepatology* 2002; 36: 479-497 [PMID: 12143059 DOI: 10.1053/jhep.2002.34944]
- Knodel RG, Ishak KG, Black WC, Chen TS, Craig R, Kaplowitz N, Kiernan TW, Wollman J. Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. *Hepatology* 1981; 1: 431-435 [PMID: 7308988 DOI: 10.1002/hep.1840010511]
- Liberal R, Longhi MS, Mieli-Vergani G, Vergani D. Pathogenesis of autoimmune hepatitis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2011; 25: 653-664 [PMID: 22117632 DOI: 10.1016/j.bpg.2011.09.009]
- Longhi MS, Liberal R, Holder B, Robson SC, Ma Y, Mieli-Vergani G, Vergani D. Inhibition of interleukin-17 promotes differentiation of CD25 cells into stable T regulatory cells in patients with autoimmune hepatitis. *Gastroenterology* 2012; 142: 1526-35.e6 [PMID: 22387392 DOI: 10.1053/j.gastro.2012.02.041]
- Longhi MS, Mitry RR, Samyn M, Scalori A, Hussain MJ, Quaglia A, Mieli-Vergani G, Ma Y, Vergani D. Vigorous activation of monocytes in juvenile autoimmune liver disease escapes the control of regulatory T-cells. *Hepatology* 2009; 50: 130-142 [PMID: 19437492 DOI: 10.1002/hep.22914]
- Buckner JH. Mechanisms of impaired regulation by CD4(+)CD25(+)FOXP3(+) regulatory T cells in human autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol* 2010; 10: 849-859 [PMID: 21107346]
- Sasaki M, Ikeda H, Sawada S, Sato Y, Nakanuma Y. Naturally-occurring regulatory T cells are increased in inflamed portal tracts with cholangiopathy in primary biliary cirrhosis. *J Clin Pathol* 2007; 60: 1102-1107 [PMID: 17158635 DOI: 10.1136/jcp.2006.044776]
- Peiseler M, Sebode M, Franke B, Wortmann F, Schwinge D, Quaas A, Baron U, Olek S, Wiegand C, Lohse AW, Weiler-Normann C, Schramm C, Herkel J. FOXP3+ regulatory T cells in autoimmune hepatitis are fully functional and not reduced in frequency. *J Hepatol* 2012; 57: 125-132 [PMID: 22425700 DOI: 10.1016/j.jhep.2012.02.029]
- Sakaki M, Hiroishi K, Baba T, Ito T, Hirayama Y, Saito K, Tonoike T, Kushima M, Imawari M. Intrahepatic status of regulatory T cells in autoimmune liver diseases and chronic viral hepatitis. *Hepatol Res* 2008; 38: 354-361 [PMID: 18021223 DOI: 10.1111/j.1872-034X.2007.00284.x]
- Wiegand C, Frenzel C, Herkel J, Kallen KJ, Schmitt E, Lohse AW. Murine liver antigen presenting cells control suppressor activity of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Hepatology* 2005; 42: 193-199 [PMID: 15962311 DOI: 10.1002/hep.20756]
- Burastero SE, Casali P, Wilder RL, Notkins AL. Monoreactive high affinity and polyreactive low affinity rheumatoid factors are produced by CD5+ B cells from patients with rheumatoid arthritis. *J Exp Med* 1988; 168: 1979-1992 [PMID: 3264319 DOI: 10.1084/jem.168.6.1979]
- Czaja AJ. Challenges in the diagnosis and manage-

ment of autoimmune hepatitis. *Can J Gastroenterol* 2013; 27: 531-539 [PMID: 24078938]
16 Czaja AJ. Promising pharmacological, molecular

and cellular treatments of autoimmune hepatitis. *Curr Pharm Des* 2011; 17: 3120-3140 [PMID: 21902661 DOI: 10.2174/138161211798157568]

编辑 田滢 电编 鲁亚静



ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) DOI: 10.11569 2013年版权归Baishideng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: ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ ($P > 0.05$ 不注). 如同一表中另有一套 P 值, 则 ¹ $P < 0.05$, ² $P < 0.01$; 第 3 套为 ³ $P < 0.05$, ⁴ $P < 0.01$. P 值后注明何种检验及其具体数字, 如 $P < 0.01$, $t = 4.56$ vs 对照组等, 注在表的左下方. 表内采用阿拉伯数字, 共同的计量单位符号应注在表的右上方, 表内个位数、小数点、±、- 应上下对齐. “空白”表示无此项或未测, “-”代表阴性未发现, 不能用同左、同上等. 表图勿与正文内容重复. 表图的标目尽量用 t/min , $c/(\text{mol/L})$, p/kPa , V/mL , $t/^\circ\text{C}$ 表达. 黑白图请附黑白照片, 并拷入光盘内; 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.

超声测量幽门管内径对诊断十二指肠胃反流的临床意义

汪惠鹏, 王学梅, 王云忠

■背景资料

十二指肠胃反流(duodenogastric reflux, DGR)是消化系统常见的一种病理生理现象,临床上其诊断方法较多,但多为有创性。胃超声造影检查是近年来兴起的一项检查技术,具有方便、廉价、无创伤等优势,易于为患者接受。本技术对DGR的应用尚处于探索阶段,有待于更多的临床与基础研究。

汪惠鹏, 王学梅, 王云忠, 中国医科大学附属第一医院超声科 辽宁省沈阳市110001

汪惠鹏,在读硕士,主要从事腹部脏器及甲状腺的超声诊断。

作者贡献分布: 课题设计由汪惠鹏与王学梅完成; 研究过程由汪惠鹏与王云忠完成; 数据分析与论文撰写由汪惠鹏完成; 王学梅指导。

通讯作者: 王学梅, 教授, 主任医师, 110001, 辽宁省沈阳市和平区南京北街155号, 中国医科大学附属第一医院超声科。

wxmlmt@163.com

电话: 024-83282442

收稿日期: 2013-09-09 修回日期: 2013-10-24

接受日期: 2013-11-06 在线出版日期: 2013-12-18

Significance of ultrasonic measurement of pyloric canal diameter in diagnosis of duodenogastric reflux

Hui-Peng Wang, Xue-Mei Wang, Yun-Zhong Wang

Hui-Peng Wang, Xue-Mei Wang, Yun-Zhong Wang, Department of Ultrasound, the First Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Correspondence to: Xue-Mei Wang, Professor, Chief Physician, Department of Ultrasound, the First Hospital of China Medical University, 155 Nanjing North Street, Heping District, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. wxmlmt@163.com

Received: 2013-09-09 Revised: 2013-10-24

Accepted: 2013-11-06 Published online: 2013-12-18

Abstract

AIM: To investigate the significance of ultrasonic measurement of pyloric tube diameter in the diagnosis of duodenogastric reflux (DGR).

METHODS: Sixty-eight patients diagnosed with duodenogastric reflux by contrast-enhanced ultrasound at our hospital were selected and divided into a high reflux group and a low reflux group on the basis of reflux time and frequency. Thirty subjects without DGR were used controls. All patients were subjected to measurement of pyloric tube diameter to analyze the relationship between pyloric tube diameter and reflux time and frequency. The ROC curve analysis was also performed.

RESULTS: The pyloric tube diameter in both the high reflux and low reflux groups was significantly

cantly higher than that in the control group. The pyloric tube diameter was positively correlated with reflux time and frequency ($r = 0.822, 0.718$). ROC curve analysis revealed that the area under the curve (AUC) of duodenogastric reflux and high reflux was 0.920 and 0.789, respectively.

CONCLUSION: Ultrasonic measurement of pyloric canal diameter is useful for the clinical diagnosis of DGR.

© 2013 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

Key Words: Ultrasonic; Pyloric tube diameter; Duodenogastric reflux

Wang HP, Wang XM, Wang YZ. Significance of ultrasonic measurement of pyloric canal diameter in diagnosis of duodenogastric reflux. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(35): 4014-4018 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/4014.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i35.4014>

摘要

目的: 探讨通过超声测量幽门管内径诊断十二指肠胃反流(duodenogastric reflux, DGR)的临床意义。

方法: 选取在我院进行胃超声造影检查被诊断为DGR的患者68例作为病例组,依据反流时间及反流频率分为高反流组与低反流组,并与30例无DGR的检查者作对照,测量所有检查者的幽门管内径,分析其与反流时间及反流频率的关系,并绘制ROC曲线。

结果: 高反流组与低反流组的幽门管内径明显高于对照组,组间差异有统计学意义。幽门管内径与反流时间及反流频率呈正相关,相关系数分别为 $r = 0.822$ 和 $r = 0.718$ ($P < 0.05$)。幽门管内径诊断DGR及诊断高反流患者的ROC曲线下面积分别为0.920和0.789。

结论: 通过测量幽门管内径有助于DGR的临床诊断。

© 2013年版权归百世登出版集团有限公司所有。

■同行评议者

李健丁, 教授, 山西医科大学第一医院放射科CT室

关键词: 超声; 幽门管内径; 十二指肠胃反流

核心提示: 胃超声造影检查是近年来兴起的一项检查技术, 使用专用的胃肠超声造影剂可以直接的观察十二指肠胃反流的持续时间及反流频率. 临床工作中发现超声诊断为十二指肠胃反流(duodenogastric reflux, DGR)患者, 其幽门管内径较正常检查者明显增宽, 本文研究表明测量幽门管内径有助于DGR的临床诊断.

汪惠鹏, 王学梅, 王云忠. 超声测量幽门管内径对诊断十二指肠胃反流的临床意义. 世界华人消化杂志 2013; 21(35): 4014-4018
URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/4014.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i35.4014>

0 引言

十二指肠胃反流(duodenogastric reflux, DGR)是指十二指肠内容物经幽门或不经幽门(手术切除者)反流到胃腔内, 是消化系统常见的一种病理生理现象. 我国曾进行过多中心调研, 结果提示约16.4%的慢性胃炎患者存在十二指肠胃反流^[1]. 胃超声造影检查是近年来兴起的一项检查技术, 可以直接的观察十二指肠胃反流的持续时间及反流频率, 目前国内尚未见应用该技术诊断DGR的公开报道. 临床工作中发现超声诊断为DGR患者, 其幽门管内径较正常检查者明显增宽, 本文将对这一现象进行详细的研究.

1 材料和方法

1.1 材料 收集2013-01/2013-08在我院进行胃超声造影检查的患者, 其中诊断为十二指肠胃反流的患者68例作为病例组, 男32例, 女36例, 年龄14-88岁, 平均年龄44.3岁 \pm 10.6岁; 并选取同一时期进行检查并诊断无十二指肠胃反流的患者30例作为正常对照组, 其年龄分布及性别比例与病例组相似. 本项研究排除曾做过胃部手术的患者. 采用东芝SSA-790、飞利浦IU22型超声诊断仪, 使用电子凸阵探头, 中心频率为4 MHz. 胃肠造影剂为“天下”牌速溶胃肠超声助显剂(浙江湖州东亚医疗器械有限公司生产), 为均匀有回声型超声造影剂, 可以清楚地观察到造影剂的流动方向.

1.2 方法 患者常规禁食8 h, 禁水6 h, 患者将造影剂服下后即刻进行检查. 患者取右侧卧位, 扫描胃幽门部, 观察十二指肠内造影剂是否反流入胃腔内, 并于造影剂通过幽门管时, 测量其内径. 如有反流, 则通过超声工作站留取2 min

的动态影像, 记录并计算其2 min内的反流次数、平均反流时间及胃幽门管的内径. 将平均反流时间 ≥ 4 s且反流次数 ≥ 5 次称为高反流组, 平均反流时间 < 4 s或反流次数 < 5 次称为低反流组.

统计学处理 采用SPSS18.0统计软件进行分析, 计量资料用mean \pm SD表示. 多个样本均数比较采用单因素方差分析, 两样本均数比较采用独立样本 t 检验. 幽门管内径与反流时间及反流次数的关系采用Pearson相关分析. $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 各组检查者观测值的比较 所有受检者均清晰显示胃幽门部图像, 并于造影剂通过幽门管时测量其内径(图1). 高反流组幽门管内径为 $6.31 \text{ mm} \pm 1.36 \text{ mm}$, 低反流组幽门管内径为 $4.98 \text{ mm} \pm 1.18 \text{ mm}$, 正常对照组幽门管内径为 $3.36 \text{ mm} \pm 1.03 \text{ mm}$, 组间差异有统计学意义($F = 45.453, P < 0.01$). 高反流组与低反流组、正常对照组幽门管内径比较差异均有统计学意义($t = 4.484, P < 0.01$ 和 $t = 9.648, P < 0.01$). 低反流组与正常对照组幽门管内径比较差异有统计学意义($t = 5.976, P < 0.01$). 高反流组与低反流组的平均反流时间分别为 $5.63 \text{ s} \pm 1.09 \text{ s}$ 和 $3.37 \text{ s} \pm 0.58 \text{ s}$, 差异有统计学意义($t = 10.2, P < 0.01$). 高反流组与低反流组2 min内反流次数分别为 $6.60 \text{ 次} \pm 1.19 \text{ 次}$ 和 $2.73 \text{ 次} \pm 1.11 \text{ 次}$, 差异有统计学意义($t = 13.757, P < 0.01$). 检查结果如表1.

2.2 幽门管内径与反流时间及反流次数的关系 十二指肠胃反流患者的幽门管内径与反流时间及反流次数呈正相关, 相关系数分别为($r = 0.822, P < 0.01$)、($r = 0.718, P < 0.01$). 幽门管内径与平均反流时间的相关性如图2.

2.3 幽门管内径诊断十二指肠胃反流的ROC曲线 幽门管内径诊断十二指肠胃反流ROC曲线下面积为0.92, 此时幽门管内径的诊断界值为4.25 mm, 即 $> 4.25 \text{ mm}$ 诊断为十二指肠胃反流, 诊断敏感度为82.4%, 特异度为86.7%. 幽门管内径诊断高反流患者的ROC曲线下面积为0.789, 幽门管内径的诊断界值为5.05 mm, 诊断敏感度为87.1%, 特异度为62.2%. 幽门管内径诊断十二指肠胃反流的ROC曲线如图3.

3 讨论

生理性十二指肠胃反流在人群中普遍存在^[2,3],

■ 研发前沿

目前评价DGR的方法较多, 如钡剂检查、内镜检查、超声及放射性核素检查、胃腔内压力测定及胆红素监测等. 这些方法存在很多问题, 除了方法、仪器自身需要进一步改进完善外, 很多方法并无明确的诊断指标和正常值. 胃超声造影检查目前对生理性和病理性DGR的划分亦无统一的标准, 亟待进一步的大样本研究.

■创新盘点

本文采用胃超声造影检查对DGR进行诊断,依据反流时间及反流频率将其分为高反流组与低反流组,并结合其幽门管内径进行分析,结果表明随着反流的程度加重,幽门管内径也逐渐增宽,可见通过幽门管内径的测量有助对该病的诊断。

表 1 各组检查者观测值的比较

分组	n	幽门管内径(mm)	平均反流时间(s)	2 min反流次数(次)
高反流组	30	6.31 ± 1.36	5.63 ± 1.09	6.60 ± 1.19
低反流组	38	4.98 ± 1.18	3.37 ± 0.58	2.73 ± 1.11
正常对照组	30	3.36 ± 1.03	—	—

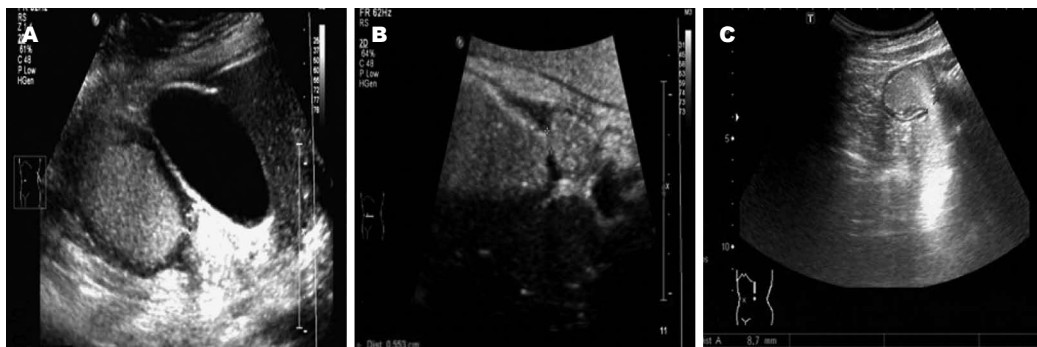


图 1 各组检查者声像图表现. A: 正常对照组检查者声像图, 幽门管内径为2.43 mm; B: 低反流组检查者声像图, 幽门管内径为5.53 mm; C: 高反流组检查者声像图, 幽门管内径为8.70 mm.

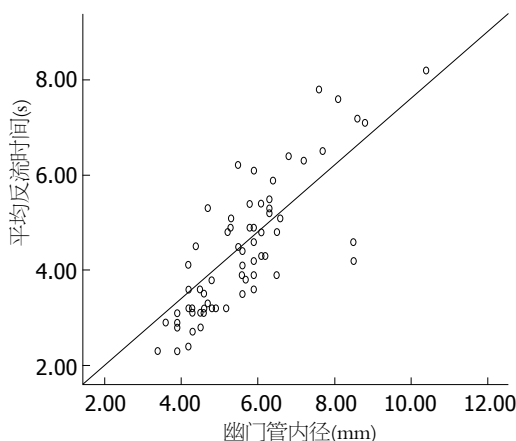


图 2 幽门管内径与平均反流时间的相关性.

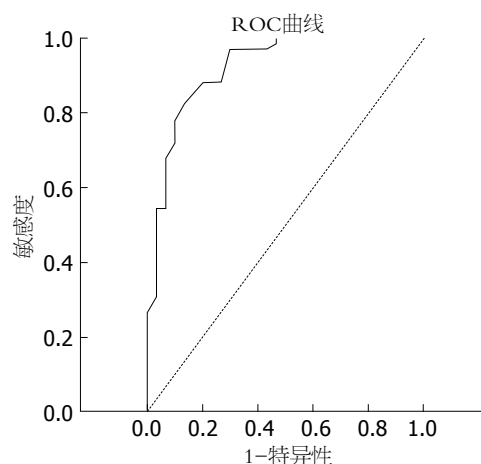


图 3 幽门管内径诊断十二指肠胃反流的ROC曲线.

十二指肠内容物反流入胃的时间短,胃窦部充分的蠕动能将通过幽门的少量十二指肠内容物清除,故不会对胃黏膜造成损害。当反流频率增加、反流持续时间延长以及反流量增大,造成胃黏膜损伤时,称为病理性DGR,又称为胆汁反流性胃炎(bile reflux gastritis, BRG)。严重的DGR不仅可造成胃黏膜的慢性炎症,还与胃食管反流病^[4]、Barrett食管^[5]、食管腺癌^[6]、胃溃疡^[7]、胃癌^[8]等疾病的发生有关。在解剖结构正常者中,幽门起着重要的抗十二指肠胃反流作用,由于幽门本身内在的缺陷^[9]或受到内源性、外源性胃肠刺激引起幽门括约肌功能失调,这是发生DGR的重要机制^[10]。胃超声造影检查可发现十二指肠内造影剂反流入胃内,表现为幽门管松弛、增宽、

关闭不全,与X线检查表现相似^[11],这是本研究的理论基础。

目前评价DGR的方法较多,如把钡剂注入十二指肠后用X线观察DGR,食用清肉汤后彩色多普勒超声检测法、内镜检查、放射性核素检查、十二指肠-胃腔内压力测定及十二指肠-胃腔内胆红素监测等。这些方法有的需要插管到胃或十二指肠,是一种侵入性检查,本身也会引起DGR^[12]。有的方法如放射性核素检查和X线钡剂检查都要接触射线,对身体危害较大。这些方法存在很多问题,除了方法、仪器自身需要进一步改进完善外,很多方法并无明确的诊断指标和正常值,对生理性和病理性DGR的划分亦

无统一的标准^[13]。

胃超声造影检查是使用专用的胃肠超声造影剂充盈胃腔以排除胃内气体干扰, 使得胃结构及其病变显示更加清晰的一种检查方法。所使用的胃肠超声造影剂分为无回声型和有回声型两种。本研究使用的是有回声型超声造影剂, 造影剂进入胃腔后呈均质点状高回声, 此类造影剂滞留时间长, 并可以清楚的显示内容物流动方向, 国内已有通过胃超声造影观察胃食管反流^[14,15]及食管裂孔疝^[16]的研究报道。通过胃超声造影检查可以直接观察十二指肠内的造影剂是否反流入胃腔内, 其他方法多为通过监测胃内成分的改变间接诊断十二指肠胃反流。胃超声造影检查具有方便、廉价、无创伤、无痛苦、无放射线、造影剂口感好等优势, 易于为患者接受, 可作为诊断十二指肠胃反流的首选方法。

临床工作中, 我们发现随着反流的出现及程度的加重幽门管内径逐渐增大, 统计学分析表明幽门管内径与平均反流时间及2 min内的反流次数呈明显的相关性, 由此我们认为通过测量幽门管内径有助于十二指肠胃反流的临床诊断。本研究将十二指肠胃反流的患者分为高反流组与低反流组。由于对胃黏膜破坏的程度与反流物的量和作用时间有关^[17-19], 因此我们认为高反流组多为病理性反流, 低反流组多为生理性反流。部分患者同时行胃镜检查, 结果表明超声诊断为高反流的患者胃镜多有胃黏膜黄染、黏膜充血水肿、组织有糜烂和溃疡等表现, 但例数较少所以对于生理性与病理性DGR的诊断标准还有待于今后大样本量的研究。通过ROC曲线分析我们可以看出, 以幽门管内径为4.25 mm作为诊断十二指肠胃反流的诊断界值时, 有较高的敏感度及特异度。以5.05 mm作为诊断高反流患者的诊断界值时, 特异度仅为62.2%, 可见单纯以幽门管内径诊断病理性DGR时特异度相对较低, 所以临床上应联合几种检测方法做出诊断。

在临床工作中由于患者量较大, 不能长时间观测反流的频率, 故对反流的程度缺乏评价指标, 但结合幽门管的内径测量可以在一定程度上弥补这一缺陷。一些基层医院还没有开展胃超声造影检查, 常为饮用矿泉水后扫查, 由于水在超声下为均质的无回声, 很难判断流动方向, 因此不能对十二指肠胃反流作出准确诊断, 但通过对幽门管内径的测量我们可以评估其患有

十二指肠胃反流的可能性。

总之, 超声测量幽门管内径有助于十二指肠胃反流的临床诊断, 并可以在一定程度上反映其严重程度, 对我们的临床工作具有一定指导意义。

4 参考文献

- 1 中华医学会消化病学分会胃肠动力学组. 慢性胃炎患者消化不良症状、胃动力功能及有关因素的多中心调研. 中华消化杂志 2006; 26: 602-605
- 2 Bollschweiler E, Wolfgarten E, Pütz B, Gutschow C, Hölscher AH. Bile reflux into the stomach and the esophagus for volunteers older than 40 years. *Digestion* 2005; 71: 65-71 [PMID: 15775673 DOI: 10.1159/000084521]
- 3 Hermans D, Sokal EM, Collard JM, Romagnoli R, Buts JP. Primary duodenogastric reflux in children and adolescents. *Eur J Pediatr* 2003; 162: 598-602 [PMID: 12836018 DOI: 10.1007/s00431-003-1259-y]
- 4 Koek GH, Tack J, Sifrim D, Lerut T, Janssens J. The role of acid and duodenal gastroesophageal reflux in symptomatic GERD. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 2033-2040 [PMID: 11467629 DOI: 10.1111/j.1572-0241.2001.03863.x]
- 5 Wolfgarten E, Pütz B, Hölscher AH, Bollschweiler E. Duodeno-gastric-esophageal reflux--what is pathologic? Comparison of patients with Barrett's esophagus and age-matched volunteers. *J Gastrointest Surg* 2007; 11: 479-486 [PMID: 17436133 DOI: 10.1007/s11605-006-0017-7]
- 6 Chen KH, Mukaisho K, Ling ZQ, Shimomura A, Sugihara H, Hattori T. Association between duodenal contents reflux and squamous cell carcinoma--establishment of an esophageal cancer cell line derived from the metastatic tumor in a rat reflux model. *Anticancer Res* 2007; 27: 175-181 [PMID: 17352229]
- 7 Kolesnikova Iu. [Quantitative-qualitative assessment of duodenogastric reflux at 24-h pH-metry]. *Ter Arkh* 2006; 78: 32-35 [PMID: 16613093]
- 8 Mabrut JY, Collard JM, Baulieux J. [Duodenogastric and gastroesophageal bile reflux]. *J Chir (Paris)* 2006; 143: 355-365 [PMID: 17285081]
- 9 Mason RJ, DeMeester TR. Importance of duodenogastric reflux in the surgical outpatient practice. *Hepatogastroenterology* 1999; 46: 48-53 [PMID: 10228764]
- 10 戴菲. 十二指肠胃反流病因及发生机制的研究进展. 国外医学·消化疾病分册 2001; 21: 74-77
- 11 罗宏超, 周楠, 马晓燕. 十二指肠胃返流病X线诊断分型探讨. 中国中西医结合影像学杂志 2010; 8: 466-467
- 12 马进玉, 赵景涛. 胃镜对诊断肠胃反流的可靠性研究. 中国误诊学杂志 2001; 1: 390
- 13 姜志茹, 雷莉. 十二指肠胃反流的检查方法. 陕西医学杂志 2003; 32: 149-152
- 14 李献亮, 李义红, 韩文峰, 郑亚珍, 杨赞峰, 刘旭静. 胃超声造影对胃食管反流的诊断价值. 临床超声医学杂志 2012; 14: 124-126
- 15 李献亮, 李义红. 超声造影在生理与病理性胃食管反流鉴别中的价值. 河北医药 2012; 34: 745
- 16 李义红, 李献亮, 韩文峰, 郑亚珍. 胃超声造影诊断食管裂孔疝的价值. 中华医学超声杂志(电子版) 2012; 9: 525-528
- 17 Tack J. Review article: the role of bile and pepsin in the pathophysiology and treatment of gastro-

■应用要点

一些基层医院常为饮用矿泉水后扫查, 很难判断流动方向, 因此不能对DGR作出准确诊断, 但通过对幽门管内径的测量我们可以评估其患有DGR的可能性, 其内径越宽说明其为病理性反流的可能性就越大, 对我们的临床工作有一定指导意义。

■同行评价

本文通过超过测量幽门管内径评价其对DGR诊断的临床意义。总体设计严谨,科学性较强,有一定的实用性。

- oesophageal reflux disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 24 Suppl 2: 10-16 [PMID: 16939428]
- 18 Fein M, Maroske J, Fuchs KH. Importance of duodenogastric reflux in gastro-oesophageal reflux dis-

ease. *Br J Surg* 2006; 93: 1475-1482 [PMID: 17051600 DOI: 10.1002/bjs.5486]

- 19 罗和生, 陈敏. 胆汁反流与急性胃黏膜病变. 世界华人消化杂志 2005; 13: 1489-1492

编辑 田滢 电编 鲁亚静



ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) DOI: 10.11569 2013年版权归Baishideng所有

• 消息 •

《世界华人消化杂志》再次入选《中文核心期刊要目总览》 (2011年版)

本刊讯 依据文献计量学的原理和方法,经研究人员对相关文献的检索、计算和分析,以及学科专家评审,《世界华人消化杂志》再次入选《中文核心期刊要目总览》2011年版(即第六版)核心期刊。

对于核心期刊的评价仍采用定量评价和定性评审相结合的方法。定量评价指标体系采用了被引量、被摘量、被引量、他引量、被摘率、影响因子、被国内外重要检索工具收录、基金论文比、Web下载量等9个评价指标,选作评价指标统计源的数据库及文摘刊物达到60余种,统计到的文献数量共计221177余万篇次,涉及期刊14400余种。参加核心期刊评审的学科专家达8200多位。经过定量筛选和专家定性评审,从我国正在出版的中文期刊中评选出1982种核心期刊。

《世界华人消化杂志》在编委、作者和读者的支持下,期刊学术水平稳步提升,编校质量稳定,再次被北京大学图书馆《中文核心期刊要目总览》(2011年版)收录。在此,向关心、支持《世界华人消化杂志》的编委、作者和读者,表示衷心的感谢!(《世界华人消化杂志》编辑部)。

落新妇对缺血再灌注损伤肝脏HO-1表达的影响

慕宁, 江艺, 吕立志

慕宁, 江艺, 吕立志, 中国人民解放军南京军区福州总院肝胆外科 福建省福州市 350025

慕宁, 主治医师, 主要从事肝胆外科、肝移植临床及相关的基础研究。

福建省自然科学基金重点资助项目, No. 2011Y0046

作者贡献分布: 慕宁与江艺完成研究总体设计与主要实验内容; 吕立志完成部分实验及数据的整理、分析。

通讯作者: 江艺, 主任医师, 博士生导师, 350025, 福建省福州鼓楼区西二环路156号, 中国人民解放军南京军区福州总院肝胆外科. jiangyi183@yahoo.com.cn

收稿日期: 2013-07-19 修回日期: 2013-08-06

接受日期: 2013-11-19 在线出版日期: 2013-12-18

Effect of astilbin on HO-1 expression in hepatic warm ischemia-reperfusion injury

Ning Mu, Yi Jiang, Li-Zhi Lv

Ning Mu, Yi Jiang, Li-Zhi Lv, Department of Hepatobiliary Surgery, Fuzhou General Hospital of Nanjing Command of PLA, Fuzhou 350025, Fujian Province, China

Supported by: the Fujian Province Natural Science Foundation, No. 2011Y0046

Correspondence to: Yi Jiang, Chief Physician, Department of Hepatobiliary Surgery, Fuzhou General Hospital of Nanjing Command of PLA, Fuzhou 350025, Fujian Province, China. jiangyi183@yahoo.com.cn

Received: 2013-07-19 Revised: 2013-08-06

Accepted: 2013-11-19 Published online: 2013-12-18

Abstract

AIM: To study the molecular mechanism behind the effects of astilbin in protecting the liver against warm ischemia-reperfusion injury.

METHODS: C57BL/6 mice were randomly divided into four groups ($n = 8$ for each): a sham-operated group (Sham), a model control group (I/R), a low dose astilbin treatment group (10 mg/kg) and a high dose astilbin (40 mg/kg) treatment group. At 24 h and 1 h before ischemia, mice in the two treatment groups were intraperitoneally injected with 10 and 40 mg/kg astilbin, respectively. Then 70% hepatic ischemia-reperfusion, including the left and middle hepatic lobes, were induced. The I/R model control group and the sham-operated group were administered with equal volume of normal saline. After 90 min ischemia and 6 h reperfusion

of the partial hepatic lobe, blood and liver tissue samples were collected. Serum ALT activity was detected, and the levels of NF- κ B and HO-1 in liver tissues were detected by Western blot. The mRNA expression of these molecules was detected by semiquantitative RT-PCR.

RESULTS: Compared with the I/R model control group, serum ALT in both low and high dose treatment groups significantly decreased (sham: $142 \text{ U/L} \pm 25 \text{ U/L}$; I/R: $3521 \text{ U/L} \pm 270 \text{ U/L}$; low dose group: $1766 \pm 179 \text{ U/L}$; high dose group: $1067 \text{ U/L} \pm 101 \text{ U/L}$, $P < 0.01$), and the decline was more significant in the high dose group than in the low dose group ($P < 0.01$). The protein content of NF- κ B in liver tissues gradually decreased in both treatment groups compared with the I/R model control group, and was lower in the high dose group than in the low dose group. HO-1 levels gradually increased in treatment groups, and the increase was more significant in the high dose group than in the low dose group. The results of mRNA expression showed a similar trend (sham: 0.53 ± 0.07 ; I/R: 1.00 ± 0.11 ; low dose group: 1.17 ± 0.16 ; high dose group: 1.57 ± 0.07 , $P < 0.05$ or < 0.01).

CONCLUSION: Intervention with astilbin can reduce the high levels of serum ALT caused by ischemia-reperfusion injury, down-regulate the high expression of NF- κ B protein and up-regulate the expression of HO-1 protein and mRNA in IRI liver tissues. The protective effect of astilbin against liver IRI is possibly related to the promotion of the expression of HO-1.

© 2013 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

Key Words: Alanine transaminase; Nuclear factor κ B; Heme oxygenase-1; Western blot; Semiquantitative RT-PCR

Mu N, Jiang Y, Lv LZ. Effect of astilbin on HO-1 expression in hepatic warm ischemia-reperfusion injury. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(35): 4019-4023
URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/4019.asp>
DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i35.4019>

■背景资料

缺血再灌注损伤是外科临床时常面对的难题, 肝脏是对缺血再灌注损伤最敏感的器官之一。多种信号通路参与其中, 肝脏热缺血再灌注过程中的炎症和损伤部分的依赖于Toll样受体4(Toll like receptor 4, TLR-4)信号通路, 因此通过抑制该信号通路达到减轻肝脏IRI的目的就显得前景诱人。血红素加氧酶1(heme oxygenase-1, HO-1)是热休克蛋白32成员, 肝脏HO-1最初由Kupffer细胞产生, 作为TLR-4的配体之一, 通过阻抑TLR-4信号通路产生较强的抗氧化、抗炎功能从而起到保护肝脏缺血再灌注损伤(ischemia/reperfusion injury, IRI)的作用。

■同行评议者

门秀丽, 教授, 河北联合大学(原华北煤炭医学院)病理生理学教研室

■ 研发前沿

祖国传统医药对缺血再灌注损伤的保护作用是研究的热点。有研究表明葛根素可显著抑制缺血再灌注诱导的Caspase23的活化,减少缺血再灌注诱导的N2a细胞的凋亡程度,而人参皂甙Rb1被认为可以通过上调葡萄糖转运体1表达以维持脑组织的能量供给而发挥缺血再灌注脑损伤保护作用。落新妇甙属天然药物,口服吸收好,高效无不良反应,有文献报道落新妇甙能够通过干预氧自由基和脂质过氧化物生成,明显减轻四氯化碳引起的肝损伤;在刀豆球蛋白A(concanavalin A, Con A)诱导肝炎后,落新妇甙能够显著降低肿瘤坏死因子- α 的生成和肝脏Kupffer细胞的增殖。

摘要

目的:通过观察落新妇甙对肝脏热缺血再灌注损伤中血红素加氧酶1(heme oxygenase-1, HO-1)表达的影响,探讨其缺血再灌注保护作用的分子机制。

方法:C57BL/6小鼠随机分为4组($n=8$):假手术组(Sham)、模型组(I/R)、落新妇甙小剂量(10 mg/kg)干预组和落新妇甙大剂量(40 mg/kg)干预组。缺血前24和1 h干预组小鼠腹腔注射分别给予10或40 mg/kg的落新妇甙,建立肝左、中叶70%部分肝缺血再灌注模型,模型组和假手术组给予同样体积的生理盐水。小鼠肝脏左叶缺血90 min、再灌注6 h后各实验组采集血液和肝脏组织样本。检测血清中丙氨酸转氨酶(alanine transaminase, ALT)活性, Western blot检测肝组织中核因子 κ B(nuclear factor κ B, NF- κ B)和HO-1蛋白含量,半定量RT-PCR检测上述分子mRNA表达情况。

结果:落新妇甙小、大剂量干预后血清ALT含量较I/R对照组均明显下降(假手术组:142 U/L \pm 25 U/L;模型组:3521 U/L \pm 270 U/L;落新妇甙小剂量干预组:1766 U/L \pm 179 U/L;落新妇甙大剂量干预组:1067 U/L \pm 101 U/L, $P<0.01$);落新妇甙小、大剂量干预组肝组织中NF- κ B蛋白表达与I/R模型对照组比较均渐次降低;落新妇甙小、大剂量干预组肝组织中HO-1蛋白表达与I/R模型对照组比较均渐次升高,亦与半定量RT-PCR结果相符(假手术组:0.53 U/L \pm 0.07 U/L;模型组:1.00 U/L \pm 0.11 U/L;落新妇甙小剂量干预组:1.17 U/L \pm 0.16 U/L;落新妇甙大剂量干预组:1.57 U/L \pm 0.07 U/L小剂量干预组 $P<0.05$;大剂量干预组 $P<0.01$)。

结论:落新妇甙干预能降低缺血再灌注损伤(ischemia/reperfusion injury, IRI)引起的血清ALT水平升高;落新妇甙干预能降低IRI肝组织中NF- κ B蛋白的高表达,促进IRI肝组织HO-1蛋白和mRNA的表达,显示其保护作用与促进HO-1的表达密切相关。

© 2013年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词:丙氨酸转氨酶;核因子- κ B;血红素加氧酶1; Western blot; 半定量RT-PCR

核心提示:落新妇甙对小鼠肝脏热缺血再灌注损伤具有保护作用,落新妇甙干预能降低缺血再灌注损伤肝脏核因子 κ B(nuclear factor κ B)蛋白的

高表达,显示其对Toll样受体4(Toll like receptor-4, TLR-4)炎症信号通路具有抑制作用。同时落新妇甙干预能促进缺血再灌注损伤(ischemia/reperfusion injury, IRI)肝组织血红素加氧酶1(heme oxygenase-1, HO-1)蛋白和mRNA的表达,显示其对TLR-4通路的抑制与促进HO-1的表达密切相关。

慕宁, 江艺, 吕立志. 落新妇甙对缺血再灌注损伤肝脏HO-1表达的影响. 世界华人消化杂志 2013; 21(35): 4019-4023 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/4019.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v21.i35.4019>

0 引言

血红素加氧酶1(heme oxygenase-1, HO-1)是热休克蛋白32成员,肝脏HO-1最初由Kupffer细胞产生,作为Toll样受体4(Toll like receptor 4, TLR-4)的配体之一,通过阻抑TLR-4信号通路产生较强的抗氧化、抗炎症功能^[1]从而起到保护肝脏缺血再灌注损伤(ischemia/reperfusion injury, IRI)的作用。

落新妇甙(astilbin)是从土茯苓的乙醇提取液中分离得到的3个二氢黄酮醇之一,黄酮类化合物有较强的抗氧化作用,可作为递氢体清除氧自由基,从而在抗炎、减轻缺血再灌注损伤等方面发挥作用。本课题前期研究发现落新妇甙对小鼠肝脏热缺血再灌注损伤具有保护作用,显著降低肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)的生成并提高白细胞介素10(interleukin-10, IL-10)含量^[2,3]。本文继续探讨落新妇甙对HO-1和核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)在蛋白和/或mRNA水平上的影响,以期深入探讨其肝脏IRI保护作用的分子机制。

1 材料和方法

1.1 材料 分析纯落新妇甙粉剂由杭州华东医药有限责任公司提供。实验中落新妇甙粉剂首先用二甲基亚砜溶解(40 mg/mL),使用时用生理盐水稀释至所需浓度。戊巴比妥钠(上海国药集团化学试剂有限公司);抗小鼠NF- κ B多抗(美国CST公司);抗小鼠HO-1单抗(StressGen Biotechnologies Canada);抗 β -actin抗体(Santa Cruz);羊抗鼠IgG二抗(KPL); SuperSignal West Femto超敏底物(Pierce); BCA法蛋白浓度检测试剂盒(凯基公司); TRIzol Reagent(Invitrogen); RNA PCR kit(AMV)Ver3.0试剂盒(TaKaRa); DNA Mark-

er(宝生物工程大连有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及处理: 清洁级♂ C57BL/6小鼠40只, 体质量22-25 g(由中国人民解放军第二军医大学实验动物中心提供)用于实验。动物分笼饲养于第二军医大学免疫教研室, 提供标准饮食。动物实验遵守学校及实验室相应的动物实验有关规定。随机分为4组(每组8只): 假手术组(假手术)、模型组(I/R), 落新妇小剂量(10 mg/kg)干预组、落新妇大剂量(40 mg/kg)干预组。于缺血前24和1 h, 分别给落新妇干预组小鼠腹腔注射10或40 mg/kg的落新妇, 模型组和假手术组给予同样体积生理盐水。再灌注时干预组经尾静脉注射第3次给同样剂量落新妇干预, 模型组和假手术组给予同样体积生理盐水。

1.2.2 建立动物模型: 采用70%部分肝脏缺血再灌注损伤模型, 按Zhai等^[4]报道的方法操作。

1.2.3 肝功检测: 缺血90 min, 再灌注6 h后, 采集小鼠血液0.3-0.5 mL于1.5 mL EP管中, 3000 r/min离心5 min, 小心吸取上层血清装于干净EP管中, 检测丙氨酸氨基转移酶(alanine transaminase, ALT)的活性。

1.2.4 肝脏组织样品准备: 缺血90 min, 再灌注6 h后各实验组小鼠左叶肝组织取样, 分为3部分。一部分固定于甲醛溶液, 切片用于组织病理学检测(HE染色); 另一部分肝组织制成匀浆, 用于酶学指标; 第3部分肝组织于液氮中保存, 用于Western blot及RT-PCR分析。

1.2.5 Western blot检测肝组织HO-1和NF- κ B蛋白表达: 取各组冻存的缺血90 min, 再灌注6 h肝组织100 mg, 用研钵粉碎组织块, 按照3 mL/g加入放射免疫沉淀测定(radio immunoprecipitation assay, RIPA)缓冲液及苯甲基磺酰氟, 以12000 r/min, 4℃高速离心30 min, 小心收集上清, 按照凯基公司BCA法蛋白浓度检测试剂盒说明书进行蛋白定量, 空白对照采用RIPA。调整各组样品蛋白浓度至一致, 常规电泳、转膜、封闭。按说明书要求加入一抗、二抗, 将Western印迹发光检测试剂中的A液和B液等体积混匀, 室温孵育5 min, 于凝胶成像分析检测仪上进行检测。

1.2.6 半定量RT-PCR检测肝组织HO-1 mRNA表达: (1)总RNA的抽提与纯度鉴定: 取各组冻存的小鼠肝脏组织100 mg。按TRIzol试剂说明书进行抽提。紫外分光光度仪在波长260和280 nm的紫外吸光度(A)值, 计算 $A_{260/280}$ 的比值, 鉴定mRNA浓度和纯度, 根据所测浓度加入DEPC水稀释

成0.5 g/L浓度, 保存于-80℃; (2)RT-PCR: 应用TaKaRa公司RT-PCR扩增试剂盒扩增目的基因。各基因引物序列: HO-1正义5'- AAG CCG AGA ATG CTG AGT TCA -3'; 反义5'- CAG TGA GGC CCA TAC CAG AA -3'; β -actin正义5'- AGT GTG ACG TTG ACA TCC GT -3'; 反义5'- GCA GCT CAG TAA CAG TCC GC -3'; 引物合成由上海生物工程技术有限公司完成。反应条件: 94℃预变性2 min后, 94℃变性30 s, 退火30 s 72℃延伸1 min, 共35个循环, 最后72℃延伸10 min。HO-1扩增片段223 bp, 退火温度50℃, 循环次数35次; (3)电泳及扩增产物成像分析: PCR产物9 μ L加1 μ L含溴酚蓝指示剂的缓冲液(10 \times)混匀, 置于1.2%琼脂糖凝胶中, 其中包括DNA marker, 稳定电压80 V, 电泳1 h。紫外透射仪下查看, 再用Gel-Pro IMAGER 60-2517型成像分析系统进行分析, 测定各条带A值, 计算各产物与 β -actin的A值比值, 即为目的RNA的相对表达量, 计算公式: 相对产物电泳条带A值/ β -actin产物电泳条带A值。

统计学处理 实验数据以mean \pm SD表示。采用SPSS10.0软件进行所有数据的统计学处理。多组间比较采用完全随机方差分析, SNK法分析组间差异, 检验水准 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 实验动物数量分析 实验选用C57BL/6小鼠40只, 分为4组, 进入结果分析32只。

2.2 落新妇对血清中ALT的影响 10和40 mg/kg落新妇干预组血清ALT含量与模型组相比均明显下降($P < 0.01$), 大剂量干预组(40 mg/kg)较小剂量组更明显($P < 0.01$)(图1)。

2.3 落新妇对肝组织NF- κ B蛋白表达的影响 Western blot检测肝组织中NF- κ B蛋白水平的表达, 结果显示: I/R对照组与Sham组比较, NF- κ B表达明显增强, 落新妇小、大剂量干预后, NF- κ B表达渐次减弱(图2)。

2.4 落新妇对HO-1表达的影响

2.4.1 落新妇对肝组织HO-1蛋白表达的影响: Western blot检测肝组织中HO-1蛋白水平的表达, 结果显示: 与I/R对照组比较, 落新妇小、大剂量干预后, HO-1表达渐次增强(图3)。

2.4.2 落新妇对肝组织HO-1 mRNA表达的影响: 半定量结果显示, Sham组HO-1表达较低(0.53 ± 0.07), 与I/R对照组比较(1.00 ± 0.11), 落新妇(A)小剂量干预能上调HO-1 mRNA表达

■ 相关报道

有研究报道落新妇在接触性皮炎模型中能显著促进IL-10、SOCS1和SOCS3的表达, 减轻炎症反应。在肾缺血再灌注损伤中, 研究发现落新妇通过抑制巨噬细胞的趋化和活化发挥保护作用。

■应用要点

本文探讨落新妇甙对HO-1和核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)在蛋白和/或mRNA水平上的影响, 研究发现落新妇甙干预能降低NF- κ B蛋白的高表达, 显示其对TLR-4炎症信号通路具有抑制作用。同时落新妇甙干预能促进IRI肝组织HO-1蛋白和mRNA的表达, 显示其对TLR-4通路的抑制与促进HO-1的表达密切相关。探讨了落新妇甙在肝脏缺血再灌注保护作用的分子机制, 从而为其进一步应用于临床提供了理论依据。

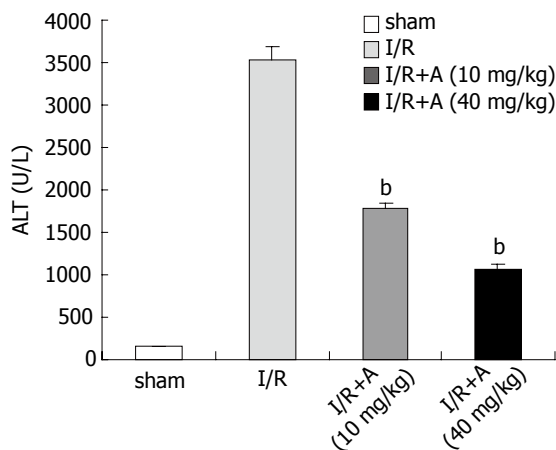


图1 落新妇甙对血清ALT的影响。热缺血90 min, 再灌注6 h后ELISA法检测各组血清ALT。 ^b $P<0.01$ vs I/R组。ALT: 丙氨酸转氨酶。

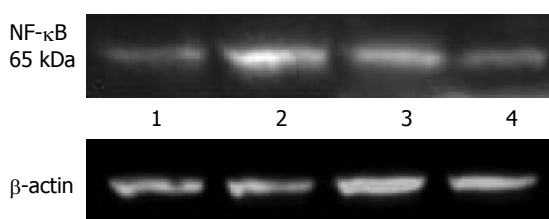


图2 落新妇甙对肝组织NF- κ B蛋白的影响。1: Sham; 2: I/R; 3: I/R+A (10 mg/kg); 4: I/R+A (40 mg/kg)。NF- κ B: 核因子- κ B。

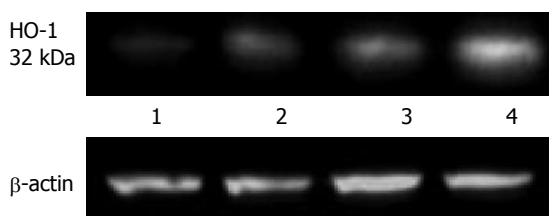


图3 落新妇甙对肝组织HO-1蛋白的影响。1: Sham; 2: I/R; 3: I/R+A (10 mg/kg); 4: I/R+A (40 mg/kg)。HO-1: 血红素加氧酶1。

(1.17 ± 0.16 , $P<0.05$), 大剂量则明显增强HO-1 mRNA表达(1.57 ± 0.07 , $P<0.01$)(图4, 5)。

3 讨论

肝脏缺血再灌注损伤涉及复杂的分子机制, 诸多分子通道与炎症因子产物相互反馈、作用, 产生一系列的级联效应, 导致肝组织的严重损伤。研究发现激活的肝脏非实质细胞(尤其Kupffer细胞)通过TLR-4信号通路在肝脏热缺血再灌注损伤中发挥重要作用^[5]。肝脏热缺血再灌注过程中的炎症和损伤部分的依赖于TLR-4信号通路^[4,6]。本课题前期研究发现落新妇甙对

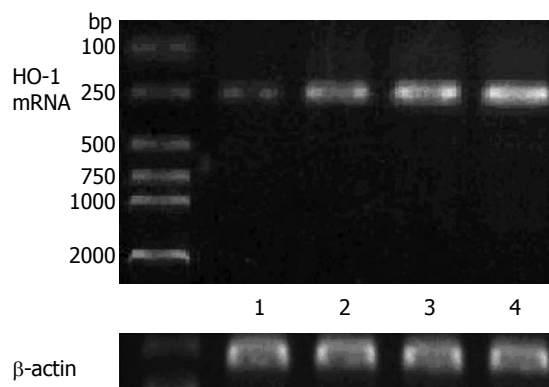


图4 落新妇甙(A)对肝组织HO-1 mRNA的影响。1: Sham; 2: I/R; 3: I/R+A (10 mg/kg); 4: I/R+A (40 mg/kg)。HO-1: 血红素加氧酶1。

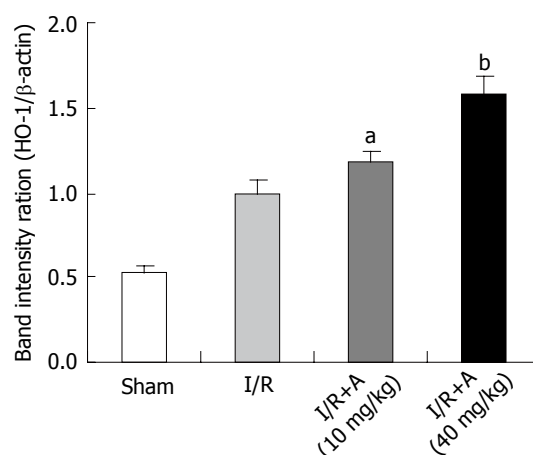


图5 落新妇甙(A)对肝组织HO-1 mRNA表达影响半定量分析。A: SO组; B: AEP组; C: ANP组。 ^a $P<0.05$ vs I/R组; ^b $P<0.01$ vs I/R组。HO-1: 血红素加氧酶1。

小鼠肝脏热缺血再灌注损伤具有保护作用, 显著降低TNF- α 的生成并提高白介素10(interleukin-10, IL-10)含量。文献报道^[7], 在刀豆球蛋白A(concanavalin A, Con A)诱导肝炎后, 落新妇甙能够显著降低TNF- α 的生成和肝脏Kupffer细胞的增殖。提示落新妇甙对肝脏IRI保护作用的机制可能是通过干预TLR-4信号通路实现的。

HO-1是热休克蛋白32成员, 而热休克蛋白正是TLR-4的内源性配体之一。因其具有较强的抗氧化、抗炎症功能而在IRI研究中得到关注。Tsuchihashi等^[8]利用钴原卟啉(cobalt protoporphyrin, CoPP)诱导HO-1过表达, 过表达的HO-1下调信号转导子及转录激活子(signal transducer and activator of transcription-1, STAT-1)的表达及其所触发的CXCL-10的产生, 而CXCL-10是TLR4活化下游I型IFN途径的主要产物。HO-1

的上述作用带来了明显改善的小鼠肝脏热缺血再灌注损伤的保护效果. 本研究结果观察到落新妇干预能明显促进肝组织HO-1蛋白和mRNA的表达, 这种促进作用在大剂量给药时更为明显, 提示其对肝脏IRI的保护作用与促进HO-1的表达密切相关.

NF- κ B属于NF- κ B/Rel蛋白家族, 是TLR-4信号通路中的关键分子. NF- κ B可能通过多个方式和途径参与肝缺血再灌注损伤. 组织缺血再灌注时伴有NF- κ B活性增高, 并可诱发和加重组织的损伤^[9], 而阻断NF- κ B的活性可明显减轻组织器官的再灌注损伤^[10,11]. 白介素-10、糖皮质激素、水杨酸类等药物预处理, 均可通过下调NF- κ B活性拮抗肝缺血再灌注损伤, 发挥保护效应^[12,13]. 本研究结果亦观察到肝脏IRI导致肝脏NF- κ B蛋白表达增强, 落新妇干预能显著降低肝脏NF- κ B增强表达的趋势, 显示出落新妇可能通过抑制NF- κ B炎症反应通路发挥对肝脏IRI的保护作用.

4 参考文献

- 1 Ben-Ari Z, Issan Y, Katz Y, Sultan M, Safran M, Michal LS, Nader GA, Kornowski R, Grief F, Pappo O, Hochhauser E. Induction of heme oxygenase-1 protects mouse liver from apoptotic ischemia/reperfusion injury. *Apoptosis* 2013; 18: 547-555 [PMID: 23435964 DOI: 10.1007/s10495-013-0814-x]
- 2 慕宁, 江艺, 张绍庚, 陈少华, 吕立志, 张坤, 杨芳, 张小进, 蔡秋程, 潘凡. 落新妇对肝缺血再灌注损伤的保护作用. *中国组织工程研究与临床康复* 2011; 15: 865-869
- 3 慕宁, 王海梁, 傅宏, 林峰, 施晓敏, 邹绍武, 王全兴, 傅志仁. 落新妇通过促进IL-10表达保护小鼠缺血再灌注损伤肝脏. *第二军医大学学报* 2008; 12: 1429-1432
- 4 Zhai Y, Shen XD, O'Connell R, Gao F, Lassman C, Busuttil RW, Cheng G, Kupiec-Weglinski JW. Cutting edge: TLR4 activation mediates liver ischemia/reperfusion inflammatory response via IFN regulatory factor 3-dependent MyD88-independent pathway. *J Immunol* 2004; 173: 7115-7119 [PMID: 15585830]
- 5 Tsung A, Hoffman RA, Izuishi K, Critchlow ND, Nakao A, Chan MH, Lotze MT, Geller DA, Billiar TR. Hepatic ischemia/reperfusion injury involves functional TLR4 signaling in nonparenchymal cells. *J Immunol* 2005; 175: 7661-7668 [PMID: 16301676]
- 6 Uchida Y, Ke B, Freitas MC, Yagita H, Akiba H, Busuttil RW, Najafian N, Kupiec-Weglinski JW. T-cell immunoglobulin mucin-3 determines severity of liver ischemia/reperfusion injury in mice in a TLR4-dependent manner. *Gastroenterology* 2010; 139: 2195-2206 [PMID: 20637206 DOI: 10.1053/j.gastro.2010.07.003]
- 7 Wang J, Zhao Y, Xu Q. Astilbin prevents concanavalin A-induced liver injury by reducing TNF-alpha production and T lymphocytes adhesion. *J Pharm Pharmacol* 2004; 56: 495-502 [PMID: 15104095]
- 8 Tsuchihashi S, Zhai Y, Bo Q, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW. Heme oxygenase-1 mediated cytoprotection against liver ischemia and reperfusion injury: inhibition of type-1 interferon signaling. *Transplantation* 2007; 83: 1628-1634 [PMID: 17589347]
- 9 Sun K, Chen Y, Liang SY, Liu ZJ, Liao WY, Ou ZB, Tu B, Gong JP. Effect of taurine on IRAK4 and NF-kappa B in Kupffer cells from rat liver grafts after ischemia-reperfusion injury. *Am J Surg* 2012; 204: 389-395 [PMID: 22771449 DOI: 10.1016/j.amjsurg.2011.10.020]
- 10 Xia Y, Rao J, Yao A, Zhang F, Li G, Wang X, Lu L. Lithium exacerbates hepatic ischemia/reperfusion injury by inhibiting GSK-3 β /NF- κ B-mediated protective signaling in mice. *Eur J Pharmacol* 2012; 697: 117-125 [PMID: 23051669 DOI: 10.1016/j.ejphar.2012.09.009]
- 11 Shi J, Li XH, Sun BC, Lin XT, Zhang XY, Zhang F, Ou K, Chen QP. [Protective functions of recombinant protein targeted at RANKL against hepatic ischemia/reperfusion injury transfected by retrovirus in mice]. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2011; 91: 2719-2724 [PMID: 22321985]
- 12 Yun N, Kang JW, Lee SM. Protective effects of chlorogenic acid against ischemia/reperfusion injury in rat liver: molecular evidence of its antioxidant and anti-inflammatory properties. *J Nutr Biochem* 2012; 23: 1249-1255 [PMID: 22209001 DOI: 10.1016/j.jnutbio.2011.06.018]
- 13 Muratore A, Ribero D, Ferrero A, Bergero R, Capusotti L. Prospective randomized study of steroids in the prevention of ischaemic injury during hepatic resection with pedicle clamping. *Br J Surg* 2003; 90: 17-22 [PMID: 12520569]

同行评价

本文内容较新颖, 具有一定的应用价值.

编辑 田滢 电编 鲁亚静



ZIC1和P130在胆管细胞癌中表达及其临床意义

邓昌林, 许辉, 谢明, 邹文俊, 周淑蓉

■背景资料

锌指蛋白1(zic-family member 1, ZIC1)是ZIC 5个家族成员之一, 转录产物为含5个C2H2型锌指区域的转录因子, 可以结合一些富含GC序列的靶基因并形成共同作用的“复合体”, 从而影响靶基因的转录过程。P130是视网膜母细胞瘤基因家族成员之一, 在细胞周期的不同阶段发挥负调控功能, 将正在分裂的细胞阻滞于G₁期。P130通常与转录因子结合, 阻止后者的转录活性。P130功能的丧失使转录活性失控, 为正常细胞的癌变及肿瘤细胞的失控增殖创造了条件。

邓昌林, 许辉, 邹文俊, 周淑蓉, 中国人民解放军第四二二医院普外科 广东省湛江市 524005

谢明, 中国人民解放军第四二二医院病理科 广东省湛江市 524005

邓昌林, 主治医师, 主要从事腹部外科及腹部肿瘤的研究。

作者贡献分布: 此课题设计、数据分析及论文写作均由邓昌林独立完成; 研究资金及课题指导由许辉提供; 研究所用试剂与病理图片由谢明提供; 研究过程由邓昌林、许辉、谢明、邹文俊及周淑蓉共同完成。

通讯作者: 邓昌林, 主治医师, 524005, 广东省湛江市海滨三路40号, 中国人民解放军第四二二医院普外科。

dengclpp@163.com

收稿日期: 2013-08-20 修回日期: 2013-11-18

接受日期: 2013-11-27 在线出版日期: 2013-12-18

Clinical significance of expression of ZIC1 and P130 in cholangiocarcinoma

Chang-Lin Deng, Hui Xu, Ming Xie, Wen-Jun Zou, Shu-Rong Zhou

Chang-Lin Deng, Hui Xu, Wen-Jun Zou, Shu-Rong Zhou, Department of General Surgery, 422nd Hospital of PLA, Zhanjiang 524005, Guangdong Province, China

Ming Xie, Department of Pathology, 422nd Hospital of PLA, Zhanjiang 524005, Guangdong Province, China

Correspondence to: Chang-Lin Deng, Attending Physician, Department of General Surgery, 422nd Hospital of PLA, 40 Haibin Road, Zhanjiang 524005, Guangdong Province, China. dengclpp@163.com

Received: 2013-08-20 Revised: 2013-11-18

Accepted: 2013-11-27 Published online: 2013-12-18

Abstract

AIM: To investigate the expression of zicfamily member 1 (ZIC1) and P130 in cholangiocarcinoma and their correlation with the biological behavior of cholangiocarcinoma.

METHODS: The protein expression of ZIC1 and P130 was detected by immunohistochemistry in 43 cases of cholangiocarcinoma and 20 cases of normal bile duct tissue.

RESULTS: The positive rate of ZIC1 expression was significantly higher in cholangiocarcinoma than in normal bile duct tissue (53.49% vs 25.00%, $P < 0.05$). The positive rate of P130 expression in cholangiocarcinoma was significantly lower than that in normal bile duct tissue (55.81

vs 85.00%, $P < 0.05$). The expression of ZIC1 and P130 protein was related to pathological grade and neoplasm metastasis (both $P < 0.05$), but not to sex or Nevin stage (both $P > 0.05$). There was a negative correlation between ZIC1 and P130 expression ($r = -0.360$, $P < 0.05$) in cholangiocarcinoma. The expression of ZIC1 and P130 proteins was related to the 3-year survival rate (both $P < 0.05$).

CONCLUSION: The abnormal expression of ZIC1 and P130 proteins may be involved in the development and progression of cholangiocarcinoma.

© 2013 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

Key Words: Cholangiocarcinoma; Zicfamily member 1; P130; Immunohistochemistry

Deng CL, Xu H, Xie M, Zou WJ, Zhou SR. Clinical significance of expression of ZIC1 and P130 in cholangiocarcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(35): 4024-4029 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/4024.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i35.4024>

摘要

目的: 探讨锌指蛋白1(zicfamily member 1, ZIC1)和P130蛋白在胆管细胞癌组织中的表达及其与胆管细胞癌生物学行为的关系。

方法: 应用免疫组织化学SP法检测43例胆管细胞癌和20例正常胆管上皮组织中ZIC1和P130蛋白的表达情况。

结果: 胆管细胞癌组织中ZIC1的表达显著高于正常胆管组织(53.49% vs 25.00%, $P < 0.05$), P130表达显著低于正常胆管组织(55.81% vs 85.00%, $P < 0.05$); ZIC1和P130蛋白在胆管细胞癌中的表达与病理分级和是否转移相关($P < 0.05$), 与患者性别, Nevin分期不相关($P > 0.05$); ZIC1和P130蛋白表达呈明显负相关($r = -0.360$, $P < 0.05$); ZIC1和P130蛋白在胆管细胞癌中的表达与3年生存率有明显差异($P < 0.05$)。

■同行评议者

汤朝晖, 副主任医师, 上海交大医学院附属新华医院普外科

结论: ZIC1和P130蛋白的异常表达在胆管细胞癌发生发展中具有重要意义, 多个指标联合检查用来估计患者预后指导意义更佳。

© 2013年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词: 胆管细胞癌; 锌指蛋白1; P130; 免疫组织化学

核心提示: 胆管细胞癌的发病率和死亡率快速上升, 寻找有效的肿瘤生物学标志物是提高胆管细胞癌患者的早期诊断、治疗的一条有效途径, 近年来与细胞周期相关的蛋白成为研究热点。转录调控因子锌指蛋白1(zicfamilymember1, ZIC1)和视网膜母细胞瘤基因家族P130在多种恶性肿瘤的细胞周期增殖、分化中发挥重要作用, 联合检测P130及ZIC1 抗原有助于筛选高危患者, 可能为今后胆管细胞癌的治疗提供了一个新的靶点。

邓昌林, 许辉, 谢明, 邹文俊, 周淑蓉. ZIC1和P130在胆管细胞癌中表达及其临床意义. 世界华人消化杂志 2013; 21(35): 4024-4029
URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/4024.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v21.i35.4024>

0 引言

近年来, 世界范围内胆管细胞癌的发病率和死亡率快速上升, 与肝细胞癌相比其更容易发生淋巴结转移及术后复发, 临床上难于早期发现^[1]。尽管其治疗方法已经由单一的手术治疗发展到今天的手术加放疗和化疗等综合疗法, 但患者的预后并没有明显的改善。寻找有效的肿瘤生物学标志物是提高胆管细胞癌患者的早期诊断、治疗的一条有效途径, 近年来与细胞周期相关的蛋白成为研究热点。转录调控因子锌指蛋白1(zicfamilymember1, ZIC1)和视网膜母细胞瘤基因家族P130在多种恶性肿瘤的细胞周期增殖、分化中发挥重要作用^[2,3]。本文通过应用免疫组织化学方法对43例胆管细胞癌和20例正常胆管上皮组织中进行研究, 以探讨ZIC1和P130在胆管细胞癌组织中的表达情况和预后关系, 为临床判断胆管细胞癌恶性程度、选择治疗措施及评价预后提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料 选择自2001-01/2009-12在我院普通外科住院并行手术治疗的胆管细胞癌患者资料, 选择其中病理确诊、临床资料较完整的43例胆管细胞癌及同期20例经病理证实的正常胆管组织标本(取自其他良性疾病行胆管切除者)作为

正常对照, 标本均行免疫组织化学研究。病程为1 mo-2年不等, 术前均未经放、化疗, 无糖尿病及甲亢等疾病。患者年龄为22-63岁, 中位年龄为55岁, 其中男性23例, 女性20例; 临床病理分期按Nevin法: I-III级28例, IV-V级15例; 淋巴结或其他器官转移的21例, 无转移的22例; 组织学分化程度: 高分化20例, 中-低分化23例, 全部病例跟踪随访, 并以3年生存率作为反映预后的指标。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学染色: 标本经40 g/L甲醛固定, 常规石蜡包埋, 3 μ m连续切片, ZIC1和P130单克隆即用型抗体和S-PKits均购自上海长岛生物技术公司产品, 常规SP法染色: 每张切片加1滴过氧化物酶阻断溶液, 以消除内源性过氧化物酶的活性, 室温孵化10 min, PBS液冲洗3 min \times 3 min; 热抗原修复处理, PBS液冲洗3 min \times 3 min; 加非免疫动物血清, 室温孵育10 min, 以减少非特异性背景; 倾去血清, 勿洗, 滴加1滴一抗ZIC1和P130, 室温孵育60 min, PBS液冲洗3 min \times 3 min; 每张切片滴加1滴生物素标记的二抗, 室温孵育15 min, PBS液冲洗3 min \times 3 min; 甩去PBS液, 每张切片滴加1滴链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶溶液, 室温孵育15 min, PBS液冲洗3 min \times 3 min; DAB显色, 苏木素复染, 脱水, 干燥, 透明, 中性树脂封固, 光学显微镜观察, DAB显色。以已知ZIC1和P130阳性组织切片作为阳性对照, 以PBS代替一抗作为阴性对照。

1.2.2 结果判定: ZIC1和P130的阳性表达结果判定: 阳性细胞表现为细胞核出现棕黄色颗粒, 瘤细胞无棕色颗粒者为阴性(-)。随机观察10个高倍镜视野, 计算1000个瘤组织中阳性染色细胞所占的比例, 按阳性细胞所占百分比并参考着色强度判断分级: 无明显着色阳性细胞为(-), 阳性细胞数>10%为阳性(+).

1.2.3 随访结果: 全部43例胆管细胞癌患者随访调查发现, 其中3年内死亡25例, 3年存活18例。

统计学处理 采用SPSS17.0统计软件对所得数据进行统计分析, 组间数据用 χ^2 检验, 相关分析用Spearman等级相关分析, 检验水准 $\alpha = 0.05$ 。P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ZIC1和P130在胆管细胞癌和正常胆管上皮组织中的表达情况(表1) 43例胆管细胞癌中ZIC1阳性表达者23例(阳性率53.49%)(图1A), 在20例正常胆管上皮中表达5例(阳性率25.00%),

■ 研究前沿

近年来, 世界范围内胆管细胞癌的发病率和死亡率快速上升, 与肝细胞癌相比其更容易发生淋巴结转移及术后复发, 临床上难于早期发现。寻找有效的肿瘤生物学标志物是提高胆管细胞癌患者的早期诊断、治疗的一条有效途径, 近年来与细胞周期相关的蛋白成为研究热点。转录调控因子ZIC1和视网膜母细胞瘤基因家族P130在多种恶性肿瘤的细胞周期增殖、分化中发挥重要作用。

■ 相关报道

国内外对ZIC1的作用研究多集中在胃肠道方面的肿瘤,而对其在胆管细胞癌中的表达及作用机制则未见相关文献报道;而P130的报道在食管癌,子宫内腺癌,前列腺癌及涎腺肿瘤中均见报道,在肝肿瘤中只与肝细胞的报道,未在胆管细胞癌中的报道。

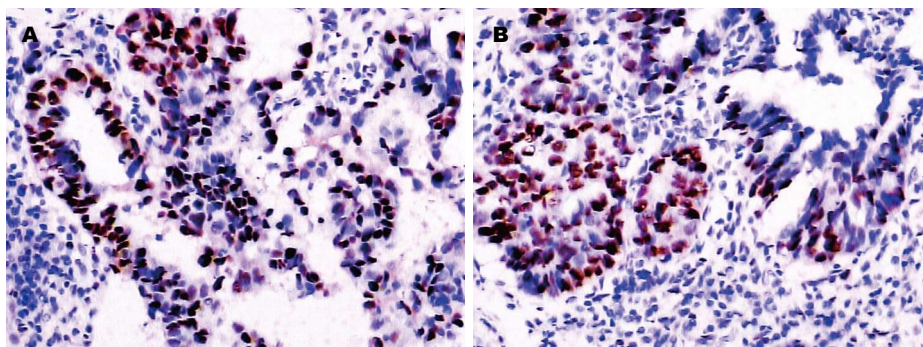


图1 胆管细胞癌组织中锌指蛋白1及P130的表达(SP法×200)。A: 锌指蛋白1在胆管细胞癌中组织中的表达; B: P130在胆管细胞癌中组织中的表达。

表1 锌指蛋白1和P130在胆管细胞癌和正常胆管上皮组织中的表达

组织类别	n	锌指蛋白1的表达			P130的表达		
		+	阳性率(%)	P值	+	阳性率(%)	P值
胆管细胞癌	43	23	53.49		24	55.81	
正常胆管上皮组织	20	5	25.00	0.034	17	85.00	0.048

两者有显著性差异($P<0.05$); 43例胆管细胞癌中P130阳性表达者24例(55.81%)(图1B), 在20例正常胆管上皮中表达17例(阳性率85.00%), 两者有显著性差异($P<0.05$)。

2.2 胆管细胞癌患者临床病理特征与ZIC1和P130蛋白表达的关系 43例胆管细胞癌中ZIC1和P130蛋白表达率均与胆管细胞癌的病理分化程度和淋巴结或器官转移相关, ZIC1蛋白的表达率中-低分化组明显高于高分化组, 有淋巴结或器官转移的表达率高于无淋巴结或器官转移的, 两者差别均有显著性差异($P<0.05$); P130蛋白中-低分化组表达率明显低于高分化组, 有淋巴结或器官转移的表达率低于无淋巴结或器官转移的, 两者差别均有显著性差异($P<0.05$); P130和ZIC1蛋白表达均与患者性别和Nevin分期大小不相关($P>0.05$)(表2)。

2.3 胆管细胞癌中蛋白ZIC1和P130蛋白表达的相关性 应用Spearman等级相关分析分析ZIC1和P130蛋白表达的相关性, 24例P130阳性表达的胆管细胞癌中, ZIC1表达阴性者15例; 19例P130阴性表达的胆管细胞癌中, ZIC1表达阳性者14例。结果显示相关系数 $r = -0.360$, $P = 0.018$, 提示P130蛋白和ZIC1蛋白表达呈负相关($P<0.05$, 表3)。

2.4 胆管细胞癌患者ZIC1蛋白和P130蛋白表达与肿瘤预后关系 43例胆管细胞癌患者随访调查发现, 其中3年内死亡25例, 3年存活18例。

ZIC1蛋白阳性表达组死亡率为68.00%, 明显高于阴性表达组(33.33%, $P<0.05$); P130蛋白阳性表达组死亡率为40.00%, 明显低于阴性表达组(77.78%, $P<0.05$, 表4)。

3 讨论

ZIC1是ZIC 5个家族成员之一, 转录产物为含5个C2H2型锌指区域的转录因子, 可以结合一些富含GC序列的靶基因并形成共同作用的“复合体”, 从而影响靶基因的转录过程。Cornish等^[4]在筛选ZIC1下游靶基因的研究中发现, ZIC1上调水通道蛋白(aquaglyceroporin, aqp-3b)的转录, 而后者与细胞黏附有关, 且其表达量与肿瘤恶性程度有直接关系, 并可增强肿瘤的侵袭和转移能力。近年来, 越来越多的证据表明在多种肿瘤的进展中发挥重要作用^[5-9]。目前, 对于ZIC1在某些类型的癌中异常表达是作为一种肿瘤抑制基因还是致癌基因意见不一。一方面, 某些报道在胃肠道癌中ZIC1为低表达或缺失^[8,9]; 相反, 部分研究表明在脂肪肉瘤中ZIC1高表达促进肿瘤的增殖和侵犯^[5]。目前国内胆管细胞癌ZIC1表达尚未见到相关报道。在本研究中发现, ZIC1蛋白的表达率癌组织明显高于正常胆管上皮, 分化差的肿瘤表达率高于分化好的肿瘤, 均有显著性差异($P<0.05$); 另外ZIC1阳性表达率高的胆管细胞癌患者与阳性率低者相比, 淋巴结或器官转移率高, 术后死亡率率较高, 预后差, 这一结果

表 2 胆管细胞癌患者临床病理特征与ZIC1和P130蛋白表达的关系

临床病理特征	n	ZIC1的表达			P130的表达		
		阳性	阳性率(%)	P值	阳性	阳性率%	P值
性别				0.853			0.258
男	23	12	52.17		11	47.83	
女	20	11	55.00		13	65.00	
Nevin分期				0.205			0.294
I-III级	28	13	46.43		14	50.00	
IV-V级	15	10	66.67		10	66.67	
淋巴结或其他器官转移				0.021			0.022
有	21	15	71.43		8	38.09	
无	22	8	36.37		16	72.73	
病理分级				0.023			0.018
高分化	20	7	35.00		15	75.00	
中-低分化	23	16	69.57		9	39.13	

ZIC1: 锌指蛋白1.

表 3 胆管细胞癌患者ZIC1蛋白和P130蛋白表达的相关性

	P130阳性	P130阴性	r值	P值
ZIC1阳性	9	14	-0.360	0.018
ZIC1阴性	15	5		

ZIC1: 锌指蛋白1.

与Brill等^[5]学者研究类似. 这些研究说明ZIC1在胆管细胞癌的发展、浸润和转移过程中发挥了重要作用.

P130是视网膜母细胞瘤基因家族成员之一, 是抑癌基因*Rb*的一种蛋白表达产物^[10,11], 其与pRb、p107 3者共同组成了视网膜母细胞瘤家族(*Rb*家族)蛋白, 其机制是3种蛋白的结构和功能相似作用相互补充, 在细胞周期的进行中, 通过对转录因子E2F家族成员活性的调节, 在细胞周期的不同阶段发挥负调控功能, 将正在分裂的细胞阻滞于G₁期^[12]. P130通常与转录因子E2F家族成员结合, 阻止后者的转录活性. 在G₁期, 活化的Cdk4通过对P130的磷酸化, 使P130与E2F分离, 受E2F抑制的基因开始转录、表达. P130功能的丧失使E2F的转录活性失控, 为正常细胞的癌变及肿瘤细胞的失控增殖创造了条件. 国内外学者研究表明, *P130*是一个典型的抑癌基因, 在人体内的各种正常组织中有广泛的表达, 而其发生突变或缺失与人类多种肿瘤的发生、发展密切相关, 在多种恶性肿瘤如食管鳞癌^[13]、

涎腺腺样囊性癌^[14]、前列腺癌^[15]等呈低表达, 而在胆管细胞癌中的研究相关文献罕见. 本研究结果显示, P130蛋白中-低分化组表达率明显低于高分化组, 有淋巴结或器官转移的表达率低于无淋巴结或器官转移的, 经统计学检验, 均具有显著性差异($P<0.05$). 这些结果均提示, P130的失活促进了胆管细胞癌的恶性增殖及转移, P130阴性表达的胆管细胞癌患者预后差, 这与苏赓等学者研究其他肿瘤的效果类似^[14], 提示P130蛋白高表达对胆管上皮细胞的异常增殖、胆管细胞癌发生淋巴结转移有阻抑作用; P130蛋白低表达则可能解除其抑制细胞生长的作用, 导致细胞异常增殖, 发生恶性转化, 并局部浸润和侵犯. 因此认为P130的缺失可作为早期肿瘤发生的预兆.

另外本研究发现胆管细胞癌中ZIC1与P130在胆管细胞癌中的表达呈负相关($r = -0.360, P<0.05$). 有研究表明^[16,17], ZIC1可以参与调控某些细胞周期蛋白来调节细胞增殖和凋亡, 从而促进肿瘤形成, 而与细胞周期蛋白密切相关的P130蛋白能够调节E2F转录调节因子家族的活性, 而E2F是许多与G₁/S过渡有关的基因表达所需要的, 这些基因之中就可能包括ZIC1的作用, 我们推测可能的机制是在胆管细胞癌和癌前发生阶段即存在P130表达的缺失, 也存在ZIC1蛋白的异常高表达, 高ZIC1环境和P130表达的缺失两种因素下, 使得细胞周期失控, 促进了细胞的生长和肿瘤的发展, 是胆管细胞癌的

■创新盘点

胆管细胞癌中, 应用转录基因和抑癌基因的结合来推测临床生物学行为及预后, 在国内外属于少见. 联合检测P130及ZIC1抗原有助于筛选高危患者, 为胆管细胞癌患者提供确实有效的、个体化的治疗方案提高一定的参考价值和新途径.

■应用要点

ZIC1在胆管细胞癌表达增高, P130在胆管细胞癌表达降低; P130功能的丧失使ZIC1的转录活性失控, 为正常细胞的癌变及肿瘤细胞的失控增殖创造了条件; ZIC1与P130在胆管细胞癌中的表达呈负相关关系, 表明两者存在调节机制, 联合检测P130及ZIC1抗原有助于筛选高危患者, 可能为今后胆管细胞癌的治疗提供了一个新的靶点。

表 4 胆管细胞癌患者ZIC1蛋白和P130蛋白表达与肿瘤预后关系

3年内是否存活	n	ZIC1表达情况			P130 表达情况		
		阳性	阳性率(%)	P值	阳性	阳性率(%)	P值
死亡	25	17	68.00	0.025	10	40.00	0.032
存活	18	6	33.33		14	77.78	

ZIC1: 锌指蛋白1。

发生、发展中的重要事件。至于其更高层次的分子机制, 有待于进一步深入研究。

总之, P130蛋白低表达或者ZIC1蛋白高表达的胆管细胞癌患者, 肿瘤分化差, 增殖侵袭和转移能力强, 恶性程度高, 术后预后差; 联合检测P130及ZIC1抗原有助于筛选高危患者, 至于能否根据ZIC1和P130蛋白的异常表达为胆管细胞癌患者提供确实有效的、个体化的治疗方案还有待于进一步的临床实践研究。

4 参考文献

- 李彦旭, 柴新群, 童玲, 冯贤松. Twist、E-cadherin在胆管细胞癌中的表达及意义. 世界华人消化杂志 2009; 17: 2744-2747
- Rodríguez-Rodero S, Fernández AF, Fernández-Morera JL, Castro-Santos P, Bayon GF, Ferrero C, Urdinguio RG, Gonzalez-Marquez R, Suarez C, Fernández-Vega I, Fresno Forcelledo MF, Martínez-Cambor P, Mancikova V, Castelblanco E, Perez M, Marrón PI, Mendiola M, Hardisson D, Santisteban P, Riesco-Eizaguirre G, Matías-Guiu X, Carnero A, Robledo M, Delgado-Álvarez E, Menéndez-Torre E, Fraga MF. DNA methylation signatures identify biologically distinct thyroid cancer subtypes. *J Clin Endocrinol Metab* 2013; 98: 2811-2821 [PMID: 23666970 DOI: 10.1210/jc.2012-3566]
- Okamura K, Miki D, Nohara K. Inorganic arsenic exposure induces E2F-dependent G0/G1 arrest via an increase in retinoblastoma family protein p130 in B-cell lymphoma A20 cells. *Genes Cells* 2013; 18: 839-849 [PMID: 23890198 DOI: 10.1111/gtc.12079]
- Cornish EJ, Hassan SM, Martin JD, Li S, Merzdorf CS. A microarray screen for direct targets of Zic1 identifies an aquaporin gene, aqp-3b, expressed in the neural folds. *Dev Dyn* 2009; 238: 1179-1194 [PMID: 19384961 DOI: 10.1002/dvdy.21953]
- Brill E, Gobble R, Angeles C, Lagos-Quintana M, Crago A, Laxa B, Decarolis P, Zhang L, Antonescu C, Socci ND, Taylor BS, Sander C, Koff A, Singer S. ZIC1 overexpression is oncogenic in liposarcoma. *Cancer Res* 2010; 70: 6891-6901 [PMID: 20713527 DOI: 10.1158/0008-5472]
- Pourebahram R, Van Dam K, Bauters M, De Wever I, Sciort R, Cassiman JJ, Tejpar S. ZIC1 gene expression is controlled by DNA and histone methylation in mesenchymal proliferations. *FEBS Lett* 2007; 581: 5122-5126 [PMID: 17936758 DOI: 10.1016/j.febslet.2007.09.061]
- Wong YF, Cheung TH, Lo KW, Yim SF, Siu NS, Chan SC, Ho TW, Wong KW, Yu MY, Wang VW, Li C, Gardner GJ, Bonome T, Johnson WB, Smith DI, Chung TK, Birrer MJ. Identification of molecular markers and signaling pathway in endometrial cancer in Hong Kong Chinese women by genome-wide gene expression profiling. *Oncogene* 2007; 26: 1971-1982 [PMID: 17043662 DOI: 10.1038/sj.onc.1209986]
- Gan L, Chen S, Zhong J, Wang X, Lam EK, Liu X, Zhang J, Zhou T, Yu J, Si J, Wang L, Jin H. ZIC1 is downregulated through promoter hypermethylation, and functions as a tumor suppressor gene in colorectal cancer. *PLoS One* 2011; 6: e16916 [PMID: 21347233 DOI: 10.1371/journal.pone.0016916]
- Wang LJ, Jin HC, Wang X, Lam EK, Zhang JB, Liu X, Chan FK, Si JM, Sung JJ. ZIC1 is downregulated through promoter hypermethylation in gastric cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 379: 959-963 [PMID: 19135984 DOI: 10.1016/j.bbrc.2008.12.180]
- D'Andrilli G, Masciullo V, Bagella L, Tonini T, Minimo C, Zannoni GF, Giuntoli RL, Carlson JA, Soprano DR, Soprano KJ, Scambia G, Giordano A. Frequent loss of pRb2/p130 in human ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 3098-3103 [PMID: 15131049 DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-03-0524]
- Claudio PP, Russo G, Kumar CA, Minimo C, Farina A, Tutton S, Nuzzo G, Giuliani F, Angeloni G, Maria V, Vecchio FM, Campi CD, Giordano A. pRb2/p130, vascular endothelial growth factor, p27(KIP1), and proliferating cell nuclear antigen expression in hepatocellular carcinoma: their clinical significance. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 3509-3517 [PMID: 15161709 DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-03-0662]
- Classon M, Dyson N. p107 and p130: versatile proteins with interesting pockets. *Exp Cell Res* 2001; 264: 135-147 [PMID: 11237530 DOI: 10.1006/excr.2000.5135]
- Nozoe T, Korenaga D, Itoh S, Futatsugi M, Maehara Y. Clinicopathological significance of pRb2/p130 expression in squamous cell carcinoma of the esophagus. *J Cancer Res Clin Oncol* 2002; 128: 691-696 [PMID: 12474056 DOI: 10.1007/s00432-002-0395-5]
- 苏赓, 莫秋荣, 温伟. 涎腺腺样囊性癌中CyclinD1、MMP-7和PRB2/P130表达及对预后的意义. 临床与实验病理学杂志 2013; 29: 36-39
- Bohrer LR, Chen S, Hallstrom TC, Huang H. Androgens suppress EZH2 expression via retinoblastoma (RB) and p130-dependent pathways: a potential mechanism of androgen-refractory progression of prostate cancer. *Endocrinology* 2010; 151: 5136-5145 [PMID: 20881251 DOI: 10.1210/en.2010-0436]
- Aruga J. The role of Zic genes in neural develop-

- ment. *Mol Cell Neurosci* 2004; 26: 205-221 [PMID: 15207846 DOI: 10.1016/j.mcn.2004.01.004]
- 17 Milet C, Maczkowiak F, Roche DD, Monsoro-Burq AH. Pax3 and Zic1 drive induction and differen-

tiation of multipotent, migratory, and functional neural crest in *Xenopus* embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110: 5528-5533 [PMID: 23509273 DOI: 10.1073/pnas.1219124110]

■同行评价

本文总体设计科学, 结果、结论可靠, 在基础研究和临床应用方面具有重要的意义。

编辑 郭鹏 电编 鲁亚静



ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) DOI: 10.11569 2013年版权归Baishideng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^H, *H pylori*不能写成HP, T_{1/2}不能写成t_{1/2}或T_{1/2}¹, V_{max}不能写Vmax, μ不写为英文u. 需排斜体的外文字, 用斜体表示. 如生物学中拉丁学名的属名与种名, 包括亚属、亚种、变种. 如幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*), *Ilex pubescens* Hook, et Arn.*var. glaber* Chang(命名者勿划横线); 常数K; 一些统计学符号(如样本数n, 均数mean, 标准差SD, F检验, t检验和概率P, 相关系数r); 化学名中标明取代位的元素、旋光性和构型符号(如N, O, P, S, d, l)如n-(normal, 正), N-(nitrogen, 氮), o-(ortho, 邻), O-(oxygen, 氧, 习惯不译), d-(dextro, 右旋), p-(para, 对), 例如n-butyl acetate(醋酸正丁酯), N-methylacetanilide(N-甲基乙酰苯胺), o-cresol(邻甲酚), 3-O-methyl-adrenaline(3-O-甲基肾上腺素), d-amphetamine(右旋苯丙胺), l-dopa(左旋多巴), p-aminosalicylic acid(对氨基水杨酸). 拉丁字及缩写in vitro, in vivo, in situ, Ibid, et al, po, vs; 用外文字母代表的物理量, 如m(质量), V(体积), F(力), p(压力), W(功), v(速度), Q(热量), E(电场强度), S(面积), t(时间), z(酶活性, kat), t(摄氏温度, °C), D(吸收剂量, Gy), A(放射性活度, Bq), ρ(密度, 体积质量, g/L), c(浓度, mol/L), φ(体积分数, mL/L), w(质量分数, mg/g), b(质量摩尔浓度, mol/g), l(长度), b(宽度), h(高度), d(厚度), R(半径), D(直径), T_{max}, C_{max}, Vd, T_{1/2} CI等. 基因符号通常用小写斜体, 如ras, c-myc; 基因产物用大写正体, 如P16蛋白.

补锌疗法对于婴幼儿轮状病毒肠炎的意义

金晓荔, 罗晓明

■背景资料

对于婴幼儿轮状病毒肠炎, 目前仍无特效的治疗方法, 多以对症、补液支持治疗为主。补锌疗法是否对于轮状病毒肠炎有确切疗效, 有待研究。

金晓荔, 温州医科大学第二临床医学院 浙江省温州市 325035

罗晓明, 浙江省人民医院儿科 浙江省杭州市 310014

金晓荔, 2011级硕士研究生, 主要从事儿科学的研究。

作者贡献分布: 金晓荔与罗晓明对此文所作贡献均等; 此课题由金晓荔与罗晓明设计; 研究过程由金晓荔与罗晓明操作完成; 数据分析由金晓荔完成; 论文写作由金晓荔与罗晓明完成。

通讯作者: 罗晓明, 教授, 310014, 浙江省杭州市下城区上塘路158号, 浙江省人民医院儿科。lxm_cc@sina.com

电话: 0571-85893626

收稿日期: 2013-09-08 修回日期: 2013-10-21

接受日期: 2013-10-30 在线出版日期: 2013-12-18

Significance of zinc supplementation in infants with rotavirus enteritis

Xiao-Li Jin, Xiao-Ming Luo

Xiao-Li Jin, the Second Clinical Medical College, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, Zhejiang Province, China

Xiao-Ming Luo, Department of Pediatrics, Zhejiang Provincial People's Hospital, Hangzhou 310014, Zhejiang Province, China

Correspondence to: Xiao-Ming Luo, Professor, Department of Pediatrics, Zhejiang Provincial Hospital, 158 Shangtang Road, Under the District, Hangzhou 310014, Zhejiang Province, China. lxm_cc@sina.com

Received: 2013-09-08 Revised: 2013-10-21

Accepted: 2013-10-30 Published online: 2013-12-18

Abstract

AIM: To explore the therapeutic effect and significance of zinc preparation in infants with rotavirus enteritis.

METHODS: One hundred and three patients with rotavirus enteritis were randomly and equally divided into either a treatment group or a control group. Both groups were given conventional treatment, and the treatment group was additionally given zinc gluconate. The therapeutic effect and hospital stay were observed.

RESULTS: The total effective rate was significantly higher in the treatment group than in the control group (80% vs 63.08%, $P < 0.05$). Length of hospital stay was significantly shortened in the treatment group compared to the control group ($P < 0.05$).

CONCLUSION: Zinc supplementation is effective in the treatment of infantile rotavirus diarrhea and can obviously shorten the length of hospital stay.

© 2013 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

Key Words: Zinc supplementation; Rotavirus enteritis; Curative effect; Significance

Jin XL, Luo XM. Significance of zinc supplementation in infants with rotavirus enteritis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(35): 4030-4033 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/4030.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i35.4030>

摘要

目的: 探讨补锌疗法对于婴幼儿轮状病毒肠炎的临床疗效和意义。

方法: 将130例轮转病毒肠炎患儿随机分为治疗组和对照组, 各65例。两组均按照常规治疗, 治疗组在此基础上加用葡萄糖酸锌片, 观察并比较两组疗效及住院时间。

结果: 治疗组总有效率为80%明显高于对照组总有效率的63.08%, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。治疗组的住院时间(5.08 ± 1.41 d)较对照组(6.21 ± 1.03 d)明显缩短, 差异也有统计学意义($P < 0.05$)。

结论: 补锌疗法对于婴幼儿轮状病毒肠炎疗效确切, 并且可明显缩短住院时间, 在一定时间内减少肠炎复发。

© 2013年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词: 补锌; 轮状病毒肠炎; 疗效; 意义

核心提示: 补锌不但能够缩短轮状病毒肠炎患儿的病程, 而且可以在一定时间内预防腹泻的复发。

金晓荔, 罗晓明. 补锌疗法对于婴幼儿轮状病毒肠炎的意义. *世界华人消化杂志* 2013; 21(35): 4030-4033 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/4030.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i35.4030>

■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

0 引言

轮状病毒(rotavirus, RV)肠炎是秋、冬季婴幼儿腹泻最常见的病原, 故曾被称为秋季腹泻。经粪-口传播, 也可通过气溶胶形式经呼吸道感染而致病^[1]。他多发生于6-24 mo的婴幼儿, 起病急, 病初多表现为发热、呕吐、腹泻, 后可并发不同程度脱水、代谢性酸中毒及电解质紊乱。严重者可导致肝炎、心肌炎、肾炎、脑炎、弥散性血管内凝血等各种肠道外疾病, 对婴幼儿健康产生严重影响^[2]。本病多为自限性, 自然病程3-8 d。因为RV型别多, 交叉保护性差, 目前尚无有效的预防和治疗方法。RV感染多以对症、补液支持治疗为主^[3]。近年来, 有报道表明, 锌对肠黏膜的修复是必需的营养物质, 补锌能够缩短腹泻病程、减轻腹泻的严重程度, 而且能够降低以后2-3 mo腹泻的再发生^[4]。本研究旨在探讨应用葡萄糖酸锌片对于婴幼儿轮状病毒肠炎的疗效和意义, 现报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料 选取2011-09/2013-03浙江省人民医院儿科住院部收治的130例急性轮状病毒肠炎患儿(患儿的病情、治疗用药等情况均已明确告知患儿家属, 并在家属同意下用药)。男79例, 女51例, 年龄6-40 mo。酶联免疫吸附试验检测粪便轮状病毒均显示阳性, 大便为黄色稀水样或蛋花汤样便, 量不等, 无黏液脓血, 无腥臭味, 大便常规检查发现31%的患儿大便中可见有白细胞, 大便细菌培养未见致病菌。发病初期基本均有发热和呕吐, 合并轻度脱水63例, 中度脱水16例, 酸中毒4例, 电解质紊乱6例。将所有患儿随机分为治疗组和对照组, 各65例。两组在腹泻程度、脱水、酸中毒程度、病程、年龄、体质量、喂养方式等方面差异均无统计学意义($P>0.05$)。

1.2 方法

1.2.1 治疗: 对照组给予肠黏膜保护剂如蒙脱石粉, 补液以纠正脱水、酸中毒和电解质紊乱, 合理饮食等常规治疗。治疗组在上述基础上予以补充葡萄糖酸锌片(广州白云山侨光制药有限公司生产, 规格: 每片70 mg)。根据国内外儿科专家共识, 急性腹泻患儿能进食后即予以补锌治疗, >6 mo的患儿, 每天补充含元素锌20 mg, <6 mo婴儿每日补充元素锌10 mg, 疗程共10-14 d。元素锌20 mg相当于硫酸锌100 mg, 葡萄糖酸锌140 mg^[5,6]。对于治疗组患儿, 因其年龄均 >6 mo, 故每天补充葡萄糖酸锌片140 mg(每次70 mg, 每

天2次)。

1.2.2 疗效判定: 根据《中国腹泻病诊断治疗方案》的疗效标准分为3级。显效: 治疗72 h粪便性状及次数恢复正常, 全身症状消失。有效: 治疗72 h粪便性状及次数明显好转, 全身症状明显改善。无效: 治疗72 h粪便性状次数及全身症状无明显好转甚至恶化^[7]。总有效率 = (显效+有效)/总例数 $\times 100\%$ 。

1.2.3 随访: 随访3 mo, 比较治疗组和观察组腹泻的复发率。

统计学处理 采用SPSS13.0统计软件进行数据处理分析, 计量资料用mean \pm SD表示, 组间比较采用 t 检验; 计数资料用率(%)表示, 组间比较采用 χ^2 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组临床疗效及住院天数比较 治疗组总有效率明显高于对照组总有效率(80.00% vs 63.08%, $P<0.05$), 差异有统计学意义。治疗组的住院时间较对照组明显缩短, 差异有统计学意义($P<0.05$)(表1)。

2.2 不良反应 治疗组在治疗过程中未发现不良反应。

2.3 随访 随访3 mo补锌治疗组再次发生腹泻5例, 占7.69%, 对照组再次发生腹泻20例, 占30.77%, 对照组较治疗组再次发生腹泻率高, 两组差异有统计学意义($P<0.05$)(表2)。

3 讨论

人类轮状病毒(human rotavirus, HRV)是引起世界范围内婴幼儿腹泻的主要病原。他包括7组病毒, 其中最常见的是A组病毒, 主要感染婴幼儿^[8]。据WHO统计, 全世界每年大约有1.11亿5岁以下儿童患HRV腹泻, 约有453000例儿童死于HRV感染, 占全球5岁以下儿童总死亡人数的5%^[9]。轮状病毒作为一种肠道病毒, 对十二指肠及空肠近端黏膜上皮细胞具有特异的感染性。他与上皮细胞结合, 使绒毛膜变短变粗, 细胞肿胀、空泡变性坏死, 最后使具有吸收功能和富含双糖酶的小肠微绒毛顶端被破坏呈斑点状病灶, 引起其吸收功能障碍和双糖酶不足及其活性下降, 使小肠分泌增加, 钠转运功能降低, 减少对电解质及水分的吸收, 最终因未吸收的肠液和食物中消化不良的糖类积滞肠腔内, 继发肠液的渗透压增高引起渗透性腹泻。同时还破坏肠道内微生态系统, 导致肠黏膜的屏障功能与拮抗作

■研究前沿

补锌疗法对于缩短婴幼儿轮状病毒肠炎的病程及减少其复发率是否效果明显, 以及适于补锌的患儿年龄及相应的补锌量尚存在争议。

■创新盘点

本文不仅研究补锌疗法可以缩短婴幼儿轮状病毒肠炎的病程,还对患儿进行了随访,进一步探讨补锌疗法是否可以减少肠炎的复发率和发病率。

表 1 两组患儿临床疗效及住院天数比较 ($n = 65$)

分组	显效 $n(\%)$	有效 $n(\%)$	无效 $n(\%)$	总有效率 $(\%)$	平均住院时间 (d)
治疗组	23(35.38)	29(44.62)	13(20)	80.00 ^a	5.08 ± 1.41 ^a
对照组	16(24.62)	25(38.46)	24(36.92)	63.08	6.21 ± 1.03

^a $P < 0.05$ vs 对照组。

表 2 两组患儿3 mo内复发腹泻率比较 ($n = 65$)

分组	复发 (n)	复发率 $(\%)$
治疗组	5	7.69 ^a
对照组	20	30.77

^a $P < 0.05$ vs 对照组。

用失衡,促使腹泻加重,导致脱水、酸中毒及电解质紊乱等。HRV不仅可以引起肠道内感染,而且在肠道外其他器官也可以引起感染^[10]。Fuchigami等^[11]研究报道HRV可通过胃肠屏障引起病毒血症,从而导致全身多器官包括中枢神经系统、呼吸、心脏、肝胆、血液等病变。严重者导致中毒性休克和死亡。

目前,针对轮状病毒肠炎尚无特效治疗方法,主要采取口服微生态制剂及肠黏膜保护剂,纠正脱水及代谢性酸中毒,维持电解质的平衡等。近年来,一系列研究报道证实,锌缺乏与儿童腹泻、肺炎等感染性疾病之间存在高度相关性^[12]。世界卫生组织和联合国儿童基金会也早在2002年就已经将补锌治疗措施纳入全球儿童腹泻病的治疗方案中。

锌是人体内必需的微量元素,也是人体内多种酶的辅酶成分。锌与婴幼儿的生长发育、防御机制、免疫功能及某些疾病的发生发展密切相关^[13]。所以锌的缺乏可导致机体多种生理功能紊乱,如引起食欲不振、味觉减退、反复感染、皮炎、体格及性发育延迟等^[14]。而消化功能紊乱也是其中之一。轮状病毒肠炎患儿血锌降低可能与饮食摄入减少、小肠吸收不良和胃肠道丢失增多等因素有关。而腹泻又进一步加重缺锌,形成恶性循环,使病程迁延。锌的补充能促进肠黏膜的修复、加速肠黏膜的再生,能减少肠道对水、电解质的分泌,可促进肠黏膜对水钠的重吸收,缓解腹泻症状。其主要作用机制:(1)锌离子可减少NO的生成,从而减少其对细胞的损伤,保护肠黏膜;(2)通过降低胃肠激素分泌,

降低小肠上皮细胞环磷酸鸟苷浓度,促进钠离子与氯离子的吸收;(3)可能与肠渗透压、肠黏膜酶功能、加强局部肠道免疫、抑制细菌繁殖和早期清除肠道细菌有关,从而在腹泻中发挥作用。至于适于补锌的年龄及补锌的量,尚存在争议。Wuchler等^[15]研究发现血锌浓度的变化与锌剂剂量呈正比,每天补锌5-8 mg,可降低腹泻发病率约20%,但不适用于<6 mo小儿的补锌。有学者研究发现<6 mo婴儿补锌达不到降低腹泻发病率及缩短腹泻持续时间的效果,反而会使患儿发病率增加。Lazzerini等^[16]的Meta分析也表明对于6 mo及以上的急性腹泻患儿,补锌可缩短病程,但对<6 mo的婴儿则无效。均与WHO的补锌建议有所出入,有待进一步研究。本研究对象均为>6 mo的婴幼儿,补元素锌的剂量20 mg/d。结果显示,补锌治疗组的疗效较对照组明显提高,并且住院时间也相应缩短。

随访3 mo发现,补锌后的患儿腹泻复发率较未补锌的患儿要低。一定程度上说明补锌不但能够减少腹泻的持续时间和降低疾病严重程度,还可以预防腹泻、降低腹泻的发病率。

总之,补锌疗法对于婴幼儿轮状病毒性肠炎疗效确切,可缩短住院时间,在一定时间内还可预防腹泻的发生和复发,还是值得临床推广应用的。

4 参考文献

- Medici MC, Abelli LA, Martinelli M, Corradi D, Dodi I, Tummo F, Albonetti V, Martella V, Dettori G, Chezzi C. Clinical and molecular observations of two fatal cases of rotavirus-associated enteritis in children in Italy. *J Clin Microbiol* 2011; 49: 2733-2739 [PMID: 21525221 DOI: 10.1128/JCM.01358-10]
- 周玲, 潘家华. 轮状病毒血症480例临床症状观察. *中国实用儿科杂志* 2011; 26: 620
- 章迎儿, 杨素红. 葡萄糖酸锌联合喂养对小儿轮状病毒肠炎的疗效观察. *中华医院感染学杂志* 2013; 23: 860-861
- 中华医学会儿科学分会消化学组, 中华医学会儿科学分会肠内营养学分会. 婴儿急性腹泻的临床营养干预路径. *中华儿科杂志* 2012; 50: 682-683
- 沈晓明, 王卫平. 儿科学. 第7版. 北京: 人民卫生出版

- 社, 2008: 262
- 6 中华医学会儿科学分会消化组, 中华医学会儿科学分会感染学组, 《中华儿科杂志》编辑委员会. 儿童腹泻病诊断治疗原则的专家共识. 中华儿科杂志 2009; 47: 634-636
- 7 方鹤松, 魏承毓, 段恕诚, 董宗祈, 董永绥, 胡皓夫, 赵祥文, 虞爱华, 陈绍璐, 徐莲芝. 中国腹泻病诊断治疗方案. 中国实用儿科杂志 1998; 13: 381-384
- 8 周瑞, 夏群, 沈怀云, 陈兰举, 刁艳霞, 刘婷婷. 轮状病毒感染婴幼儿预后的相关因素. 实用儿科临床杂志 2012; 27: 502-503
- 9 Tate JE, Burton AH, Boschi-Pinto C, Steele AD, Duque J, Parashar UD. 2008 estimate of world-wide rotavirus-associated mortality in children younger than 5 years before the introduction of universal rotavirus vaccination programmes: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2012; 12: 136-141 [PMID: 22030330 DOI: 10.1016/S1473-3099(11)70253-5]
- 10 Ramani S, Paul A, Saravanabavan A, Menon VK, Arumugam R, Sowmyanarayanan TV, Samuel P, Kang G. Rotavirus antigenemia in Indian children with rotavirus gastroenteritis and asymptomatic infections. *Clin Infect Dis* 2010; 51: 1284-1289 [PMID: 21039217 DOI: 10.1086/657069]
- 11 Fuchigami T, Goto K, Hasegawa M, Saito K, Kida T, Hashimoto K, Fujita Y, Inamo Y, Kuzuya M. A 4-year-old girl with clinically mild encephalopathy with a reversible splenic lesion associated with rotavirus infection. *J Infect Chemother* 2013; 19: 149-153 [PMID: 22569794 DOI: 10.1007/s10156-012-0421-8]
- 12 盛晓阳, 沈晓明. 锌缺乏与儿童感染性疾病. 中华儿科杂志 2007; 45: 164-165
- 13 袁晶, 钱素云. 锌缺乏与感染性疾病相关研究进展. 实用儿科临床杂志 2012; 27: 789-791
- 14 王建红, 张悦, 金春华, 李娜, 王晓燕, 张丽丽. 葡萄糖酸锌治疗儿童锌缺乏症疗效观察. 北京医学 2012; 34: 409-410
- 15 Wuehler SE, Sempértegui F, Brown KH. Dose-response trial of prophylactic zinc supplements, with or without copper, in young Ecuadorian children at risk of zinc deficiency. *Am J Clin Nutr* 2008; 87: 723-733 [PMID: 18326612]
- 16 Lazzerini M, Ronfani L. Oral zinc for treating diarrhoea in children. *Cochrane Database Syst Rev* 2012; 6: CD005436 [PMID: 22696352]

■同行评价

本文选题好, 与临床密切相关, 有很重要的临床指导意义. 设计合理, 条理清晰, 结果可信, 参考文献新, 且有权威性.

编辑 郭鹏 电编 鲁亚静



ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) DOI: 10.11569 2013年版权归Baishideng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)

原发性胃肠道非霍奇金淋巴瘤33例

张迎东, 许腾, 宋军, 徐为

■背景资料

原发性胃肠道非霍奇金淋巴瘤(primary gastrointestinal non-Hodgkin's lymphoma, PGINHL)临床上较为少见, 难以与其他消化系统肿瘤相鉴别, 容易导致误诊, 而且治疗方式存在争议, 本研究旨在探讨其诊断要点及外科治疗策略, 应用于临床工作。

张迎东, 许腾, 徐州医学院研究生学院 江苏省徐州市 221000
宋军, 徐为, 徐州医学院附属医院胃肠外科 江苏省徐州市 221000

张迎东, 主要从事胃肠道肿瘤的基础与临床研究。

作者贡献分布: 此课题研究由张迎东与徐为设计; 病例收集由张迎东、许腾及宋军完成; 数据分析由张迎东与许腾完成; 本论文写作由张迎东与徐为完成。

通讯作者: 徐为, 副教授, 主任医师, 硕士生导师, 221000, 江苏省徐州市淮海西路99号, 徐州医学院附属医院新大楼10病区胃肠外科. eryuanxuwei@126.com

收稿日期: 2013-09-09 修回日期: 2013-10-19

接受日期: 2013-11-06 在线出版日期: 2013-12-18

Primary gastrointestinal non-Hodgkin's lymphoma: Analysis of 33 cases

Ying-Dong Zhang, Teng Xu, Jun Song, Wei Xu

Ying-Dong Zhang, Teng Xu, Graduate School, Xuzhou Medical College, Xuzhou 221000, Jiangsu Province, China
Jun Song, Wei Xu, Department of Gastrointestinal Surgery, the Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou 221000, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Wei Xu, Associate Professor, Chief Physician, Department of Gastrointestinal Surgery, the Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, 99 Huaihai West Road, Xuzhou 221000, Jiangsu Province, China. eryuanxuwei@126.com

Received: 2013-09-09 Revised: 2013-10-19

Accepted: 2013-11-06 Published online: 2013-12-18

Abstract

AIM: To investigate the diagnosis and surgical treatment of primary gastrointestinal non-Hodgkin's lymphoma (PGINHL).

METHODS: The clinical data for 33 patients with PGINHL were retrospectively reviewed.

RESULTS: The tumor was mainly located in the stomach ($n = 16$), small intestine ($n = 9$), appendix ($n = 1$) or the colon ($n = 7$). All cases were pathologically confirmed to have non-Hodgkin's lymphoma. All the patients were treated surgically, containing radical excision in 26 cases, palliative resection in 4 cases, and intestinal short circuit anastomosis and biopsy in 3 cases. There were 2 deaths during the perioperative period. Twenty-two patients were followed and the 1-year survival rate was 85%.

CONCLUSION: The lack of specific clinical manifestations in PGINHL easily leads to misdiagnosis. When the diagnosis is not clear or the patient have surgical indications, surgery should be performed as soon as possible.

© 2013 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

Key Words: Primary gastrointestinal non-Hodgkin's lymphoma; Diagnosis; Surgical treatment

Zhang YD, Xu T, Song J, Xu W. Primary gastrointestinal non-Hodgkin's lymphoma: Analysis of 33 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(35): 4034-4036 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/4034.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i35.4034>

摘要

目的: 探讨原发性胃肠道非霍奇金淋巴瘤(primary gastrointestinal non-Hodgkin's lymphoma, PGINHL)的诊断和外科治疗策略。

方法: 回顾分析我院经过外科治疗的33例PGINHL的临床资料。

结果: 33例患者中肿瘤位于胃者16例, 小肠9例, 阑尾1例, 结肠7例。根治性切除切除26例, 减瘤手术4例, 行短路、活检等手术3例。病理类型均为非霍奇金淋巴瘤。围手术期死亡2例, 26例获得随访, 术后随访1年总体生存率为85%。

结论: PGINHL的临床表现缺乏特异性, 容易导致误诊, 对于不能明确诊断及具备手术指征的患者应尽早手术治疗。

© 2013年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词: 原发性胃肠道非霍奇金淋巴瘤; 诊断; 外科治疗

核心提示: PGINHL临床上诊断较为困难, 容易延误治疗, 而临床分期是影响患者预后的重要因素, 所以应争取早期诊断和早期治疗, 无论采取何种

■同行评议者

姜相君, 主任医师, 青岛市市立医院消化科

治疗方式, 手术对于患者的明确诊断和治疗有很重要的价值。

张迎东, 许腾, 宋军, 徐为. 原发性胃肠道非霍奇金淋巴瘤33例. 世界华人消化杂志 2013; 21(35): 4034-4036 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/4034.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v21.i35.4034>

0 引言

淋巴瘤结外病变最常见于胃肠道, 原发性胃肠道淋巴瘤约占所有结外淋巴瘤的30%-40%, 占所有胃肠道恶性肿瘤的1%-8%^[1], 病理类型主要为非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphoma, NHL). 原发性胃肠道非霍奇金淋巴瘤(primary gastrointestinal non-Hodgkin's lymphoma, PGINHL)发病率低, 起病隐匿, 临床表现不典型, 误诊率较高^[2], 并且由于缺乏有效的前瞻性试验研究、分期和分类的统一性, 难以对PGINHL的治疗给出统一的推荐方案, 目前临床上仍采用外科治疗为主的综合治疗. 现收集2008-2012年本院行外科治疗并经病理确诊的33例PGINHL, 报道如下.

1 材料和方法

1.1 材料 本组33例病例中, 男22例, 女11例, 年龄29-81岁, 平均年龄63.3岁. 发病至就诊时间为7 d-24 mo, 平均就诊时间为3.8 mo. 临床表现为: 腹部不适及腹痛20例(61%), 腹部包块5例(15%), 黑便3例(9%), 进行性体质量下降2例(6%), 急腹症3例(9%).

1.2 方法

1.2.1 诊断和分期标准: 本组33例均经病理确诊, 均为NHL, 都符合Dawson诊断标准: (1)无病理性浅表淋巴结肿大; (2)胸片无纵隔淋巴结肿大; (3)末梢血中无幼稚细胞或异常细胞; (4)肿瘤位于小肠或经淋巴瘤侵犯附近的淋巴结; (5)肝、脾未受侵犯. 用于淋巴瘤的临床分期方法主要是Ann Arbor分期, 将PGINHL分为4期: I期: 肿瘤尚局限, 未侵犯淋巴结; II期: 肿瘤虽局限, 但有淋巴结侵犯; III期: 邻近器官受累; IV期: 已有远处转移.

1.2.2 诊断: 本组中16例胃NHL术前均行胃镜检查, 5例明确诊断, 11例考虑为胃恶性肿瘤, 但未定性. 9例小肠NHL中1例位于十二指肠行胃镜检查发现, 5例行彩超、消化系统造影和CT检查发现小肠管壁增厚或凸向肠腔的肿瘤, 1例行胶

囊内镜检查发现, 术前均诊断为小肠肿瘤, 无法定性, 另外有1例肠梗阻和1例肠穿孔, 行剖腹探查术, 术后病理证实小肠NHL. 1例阑尾NHL术前误诊为慢性阑尾炎. 7例结肠NHL术前行结肠镜和CT检查仅1例明确诊断为NHL, 5例考虑为结肠癌, 1例肠梗阻行剖腹探查, 术后病理证实结肠NHL.

2 结果

2.1 组织学类型和分期 经病理学检查证实, 本组33例均为NHL, 其中弥漫大B细胞性NHL 22例(64%), 结外边缘区B细胞性NHL 7例(21%), 套细胞性NHL 2例(6%), 肠病相关T细胞性NHL 2例(6%), MALT淋巴瘤1例(3%). 临床分期: I期8例, II期12例, III期10例, IV期3例.

2.2 肿瘤部位 本组33例中肿瘤位于胃者16例, 其中胃窦部8例, 胃底及胃体6例, 多部位者2例; 小肠9例中十二指肠1例, 空肠1例, 回肠7例; 位于阑尾1例. 结肠7例中回盲部3例, 升结肠4例.

2.3 手术方法 本组33例均行手术治疗, 其中行根治手术26例, 行减瘤手术4例, 行短路、活检等手术3例.

2.4 结果和随访 围手术期死亡2例, 1例死于术后肺栓塞, 1例因肿瘤侵广泛犯周围脏器, 死于术后多脏器功能衰竭, 均为胃NHL. 术后共26例患者获得随访1年以上, 随访率84%, 其中21例手术后行单纯化疗, 3例行化疗联合局部放疗, 化疗方案用COP方案(环磷酰胺、长春新碱、泼尼松)或CHOP方案(环磷酰胺、多柔比星、长春新碱、泼尼松), 2例出院后未继续治疗. 1年总体生存率为85%(22/26).

3 讨论

PGINHL的临床表现各异, 缺乏特异性, 易与其他消化系肿瘤相混淆^[3]. 胃部主要以上腹部不适、腹痛、腹胀、贫血为主; 小肠主要以腹痛、腹胀、肠梗阻、穿孔、消瘦为主; 结肠以腹痛、腹部包块、黑便、大便次数增多为主, 均无显著特异性. PGINHL的诊断主要依靠内镜活检、超声、CT、消化系造影等, 但这些检查都有各自的局限性, 会造成漏诊和误诊. 在内镜下直接观察下很难明确病变组织到底是消化系癌还是淋巴瘤, 并且由于胃肠道淋巴瘤病变原发于黏膜下层, 常规活检组织既少又浅, 再加上挤压变性等影响, 导致内镜活检阳性率较低^[4]. 消化系统造影检查可以明确肿瘤的位置, 但不

■研究前沿

国内外目前没有明确的指南用于指导PGINHL诊断和治疗, 需要进一步的研究以指导本疾病临床治疗.

■同行评价
本文具有一定指
导意义。

能活检定性。超声和CT检查均可显示可发现肿瘤病灶及腹腔淋巴结的情况,也不能鉴别肿瘤性质^[5]。有研究表明,超声胃镜检查对于鉴别胃淋巴瘤和胃癌有一定价值,因为在超声内镜下浸润性胃癌图像显示垂直性生长的倾向,而胃淋巴瘤图像则显示向水平方向生长^[6]。PET/CT对胃肠道淋巴瘤的诊断也有较高价值,但其检查价格高昂,限制了其在临床上常规应用^[7]。

PGINHL治疗手段主要有手术、化疗、放疗、免疫治疗、基因治疗及抗感染治疗等^[8-10]。目前临床上仍以根治性切除为主,然后再进行放化疗和其他治疗,有文献对大宗经手术治疗的胃肠道淋巴瘤患者进行回顾性分析,显示外科治疗并不能改善患者的总体预后^[11]。虽然手术治疗的作用对PGINHL的作用仍然具有争议,但对于不能明确诊断及有手术指征的患者应果断行剖腹探查术,以免延误治疗的最佳时机。因为早期诊断及治疗对改善患者预后十分重要, Nakamura等^[12]对原发性胃肠道淋巴瘤455例的临床病理资料进行分析显示,临床分期早是原发性胃肠道淋巴瘤的长期存活率的独立预后因素。我们认为有几种情况应该考虑行手术治疗,首先病理组织学类型及临床分期是确定PGINHL治疗方案的两个最重要因素^[11,8],虽然内镜活检可以诊断PGINHL,但有时较小的组织很难得到准确的病理组织学类型,而开腹手术可以使医生获得较大的肿瘤组织样本进行病理分析,可以为PGINHL后续治疗提供可靠依据;其次大部分小肠NHL仍然需要依靠外科手术获取足够组织标本才能明确诊断^[13];还有当PGINHL引起穿孔、肠梗阻、肠套叠时,手术治疗是最佳治疗方案。如果PGINHL可以通过手术根治,手术还是应该作为首选,其他微小转移病灶通过放化疗可以得到有效治疗^[14];最后即使是姑息性手术也可以有效地切除肿瘤,减轻放化疗负荷,提高疗效,并且如果肿瘤组织过大,放化疗容易引起肠出血、穿孔或梗阻等并发症,减瘤手术可以有效减少这些并发症的发生。

总之,虽然PGINHL的术前临床诊断较困难,但是应尽量争取早期诊断和早期治疗,对于不能明确诊断及具备手术指征的PGINHL患者应尽早手术治疗。

4 参考文献

- 1 Nakamura S, Matsumoto T. Gastrointestinal lymphoma: recent advances in diagnosis and treatment. *Digestion* 2013; 87: 182-188 [PMID: 23635497 DOI: 10.1159/000350051]
- 2 梁堂帅, 马艳会, 张路遥, 马东明, 王权, 所剑. 原发性胃肠道淋巴瘤诊断方式的探讨. *中华胃肠外科杂志* 2011; 14: 913-914
- 3 涂蕾, 林军, 杨桂芳, 谭诗云, 郑国荣, 黄晓东, 高晓阳, 童强, 曹佳懿, 郑丽端, 侯晓华. 不同部位原发性胃肠道淋巴瘤的临床特点. *中华消化外科杂志* 2008; 28: 472-475
- 4 杨建锋, 张筱凤, 张啸. 原发性胃肠道淋巴瘤诊治. *医学研究杂志* 2006; 35: 42-44.
- 5 陈勇, 郝凯, 尚莱杰, 杨文魁, 张伟, 薛鹏. 胃肠道淋巴瘤的CT影像表现. *医学影像学杂志* 2012; 22: 578-580
- 6 彭燕, 许国铭, 邹小平, 金震东. 超声内镜在胃淋巴瘤诊断中的应用. *中国内镜杂志* 2002; 8: 28-30
- 7 Makis W, Ciarallo A, Abikhzer G, Stern J, Laufer J. Desmoid tumour (aggressive fibromatosis) of the colon mimics malignancy on dual time-point 18F-FDG PET/CT imaging. *Br J Radiol* 2012; 85: e37-e40 [PMID: 22308225 DOI: 10.1259/bjr/43870228]
- 8 万伟, 克晓燕. 原发胃肠道非霍奇金淋巴瘤治疗进展. *白血病·淋巴瘤* 2011; 20: 766-768
- 9 宋丽萍, 侯惠莲, 赵辉, 郑伟, 张龙, 高娟. 原发性胃肠道非霍奇金淋巴瘤的临床特征及疗效分析. *癌症* 2004; 23: 685-688
- 10 宋丽萍, 张学斌, 邓怀慈. 原发性胃肠道淋巴瘤的诊断治疗进展. *国外医学(肿瘤学分册)* 2004; 3: 214-216
- 11 Cheung MC, Housri N, Ogilvie MP, Sola JE, Koniaris LG. Surgery does not adversely affect survival in primary gastrointestinal lymphoma. *J Surg Oncol* 2009; 100: 59-64 [PMID: 19399785 DOI: 10.1002/jso.21298]
- 12 Nakamura S, Matsumoto T, Iida M, Yao T, Tsuneyoshi M. Primary gastrointestinal lymphoma in Japan: a clinicopathologic analysis of 455 patients with special reference to its time trends. *Cancer* 2003; 97: 2462-2473 [PMID: 12733145]
- 13 章馨允, 王华庆, 钱正子, 张会来, 周世勇, 邱立华, 赵静, 王平. 原发性小肠淋巴瘤45例回顾性分析. *中华外科杂志* 2013; 5: 92-93
- 14 Radman I, Kovacević-Metelko J, Aurer I, Nemet D, Zupancić-Salek S, Bogdanić V, Sertić D, Mrsić M, Pulanić R, Gasparović V, Labar B. Surgical resection in the treatment of primary gastrointestinal non-Hodgkin's lymphoma: retrospective study. *Croat Med J* 2002; 43: 555-560 [PMID: 12402395]

编辑 田滢 电编 鲁亚静



ETV1转录因子在胃肠间质瘤中的作用

李强, 徐龙, 刘先发

李强, 刘先发, 赣南医学院第一附属医院急诊科 江西省赣州市 341000

徐龙, 武汉大学中南医院消化内科 湖北省武汉市 430071

李强, 主要从事胃肠动力学的研究.

江西省卫生厅科技计划基金资助项目, No. 20081028

江西省教育厅科学技术研究基金资助项目, No. GTT09114

作者贡献分布: 本课题由徐龙设计; 研究过程由李强与刘先发操作完成; 数据分析和本文写作由李强完成.

通讯作者: 徐龙, 副教授, 430071, 湖北省武汉市武昌区东湖路169号, 武汉大学中南医院消化内科. dlxulong@yahoo.com.cn

收稿日期: 2013-06-05 修回日期: 2013-07-25

接受日期: 2013-11-19 在线出版日期: 2013-12-18

Role of ETV1 transcription factor in gastrointestinal stromal tumor cells

Qiang Li, Long Xu, Xian-Fa Liu

Qiang Li, Xian-Fa Liu, the First Affiliated Hospital of Gannan Medical College, Ganzhou Municipality, Ganzhou 341000, Jiangxi Province, China

Long Xu, Department of Gastroenterology, Wuhan University Zhongnan Hospital, Wuhan 330006, Hubei Province, China

Supported by: the Scientific and Technological Project of Jiangxi Health Department, No. 20081028; the Scientific and Technological Research Project of Jiangxi Education Department, No. GTT09114

Correspondence to: Long Xu, Associate Professor, Department of Gastroenterology, Wuhan University Zhongnan Hospital, 169 Donghu Road, Wuchang District, Wuhan 330006, Hubei Province, China. dlxulong@yahoo.com.cn

Received: 2013-06-05 Revised: 2013-07-25

Accepted: 2013-11-19 Published online: 2013-12-18

Abstract

AIM: To investigate the role of ETV1 in the proliferation and apoptosis of gastrointestinal stromal tumor (GIST) cells.

METHODS: A recombinant lentiviral vector carrying the small interfering RNA targeting ETV1 was constructed and used to infect GIST-T1 cell. GIST cells were divided into three groups: a blank control group, a negative control group (PLVX-shRNA group), and an experimental group (PLVX-shRNA-ETV1 group). After infection, ETV1 expression was detected by Western blot. GIST cell proliferation and apoptosis were detected by MTT assay and flow cytometry, respectively.

RESULTS: In the early stages after lentiviral infection, cell proliferation in the experimental group showed no significant differences compared to the blank control group ($P = 0.539, 0.188$) and negative control group ($P = 0.877, 0.992$). However, in the late stages, cell proliferation in the experimental group showed significant decreases compared to the blank control group ($P = 0.014, 0.000, 0.020$) and negative control group ($P = 0.011, 0.000, 0.003$). The rate of apoptosis in the experimental group was significantly higher compared to the blank control group ($P = 0.000$) and negative control group ($P = 0.000$).

CONCLUSION: ETV1 transcription factor may play an important role in the proliferation and apoptosis of GIST cells.

© 2013 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

Key Words: Gastrointestinal stromal tumors; ETS variant gene 1

Li Q, Xu L, Liu XF. Role of ETV1 transcription factor in gastrointestinal stromal tumor cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(35): 4037-4042 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/4037.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i35.4037>

摘要

目的: 在前期实验中, 我们通过体外构建干扰人源性ETS变异基因1(human ETS variant gene 1, *hETV1*)基因shRNA的载体, 干扰ETV1表达, 进而影响胃肠间质瘤细胞的侵袭作用, 在此, 我们继续通过上述方法, 观察胃肠间质瘤细胞增殖与凋亡的影响.

方法: 体外构建干扰*hETV1*基因shRNA的慢病毒载体, 感染GIST-T1细胞. 实验分成3组: 空白组、阴性对照组[PLVX(逆转录病毒)-shRNA组]、实验组(PLVX-shRNA-ETV1组), 用Western blot方法对合成的靶点进行筛选, 采用体外增殖培养试验(MTT法)和流式细胞凋亡检测感染前后细胞增殖与凋亡的情况.

结果: 在MTT实验的前期阶段, 实验组细胞增

■背景资料

胃肠间质瘤(gastrointestinal stromal tumor, GIST)是一类起源胃肠道间叶组织的肿瘤, 主要发生于消化道, 是胃肠道最常见的间叶组织肿瘤, 多见于胃和小肠. 主要由kit或pdgfra(kit或pdgfra是酪氨酸激酶受体)基因突变, 导致酪氨酸激酶持续的活化引起细胞增殖分化失控导致GIST.

■同行评议者

王文跃, 主任医师, 中日友好医院普通外科

■ 研发前沿

因临床上对于胃肠间质瘤的靶向药物,其作用靶点是 kit 基因的下游信号分子酪氨酸激酶,因 kit 基因存在二次突变现象,从而导致临床上耐药的发生,继而寻找新的干预靶点。现世界范围一些相关蛋白及信号通路研究较多,对于转录因子研究相对较少,很可能成为今后的热点和难点,本文对其做简单试探性的研究,需要广大医务工作者进行更深入的研究,为以后的临床治疗及药物的研发提供新的思路。

殖数量未见明显下降,与空白组($P = 0.539$ 、 $P = 0.188$)及阴性对照组($P = 0.877$ 、 $P = 0.992$),无显著性差异,而在后期阶段,实验组细胞增殖数量明显受到抑制,与空白组($P = 0.014$ 、 $P = 0.000$ 、 $P = 0.020$)及阴性对照组($P = 0.011$ 、 $P = 0.000$ 、 $P = 0.003$),有显著性差异;同时在细胞凋亡试验中,实验组其凋亡率比空白组($P = 0.000$)及阴性对照组($P = 0.000$)明显增高,有显著性差异。

结论:通过体外干扰ETV1转录因子,导致GIST-T1细胞在实验后期阶段有明显抑制作用,细胞凋亡明显增加,从而影响胃肠间质瘤细胞的进展。

© 2013年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词:胃肠间质瘤; ETS变异基因1

核心提示: ETS变异基因1(ETS variant gene 1, ETV1)转录因子的表达,在一定程度上可以促进胃肠间质瘤细胞的增殖,同时抑制了胃肠间质瘤细胞的凋亡进程。通过对ETV1转录因子研究证明,ETV1转录因子可能成为新的胃肠间质瘤(gastrointestinal stromal tumors)治疗靶点。

李强, 徐龙, 刘先发. ETV1转录因子在胃肠间质瘤中的作用. 世界华人消化杂志 2013; 21(35): 4037-4042 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/4037.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i35.4037>

0 引言

胃肠间质瘤(gastrointestinal stromal tumor, GIST)是胃肠道最常见的间叶组织肿瘤,其形成机制主要由 kit 又名SCFR/CD117, stem cell factor receptor或 $pdgfra$ (platelet-derived growth factor receptor alpha, 血小板源性生长因子受体 α 多肽)基因突变(kit 或 $pdgfra$ 是酪氨酸激酶受体),从而导致酪氨酸激酶的过度活化,引起细胞增生和凋亡失衡,导致其肿瘤的形成及恶变行为^[1]。目前,甲磺酸伊马替尼等一些靶向治疗药可以有效阻止 kit 受体的持续活化,抑制GIST的生长,对GIST的转移和复发均有显著疗效,因长期服用甲磺酸伊马替尼等一些靶向治疗药,有部分病人出现耐药现象,进一步研究证实,由于 kit 基因的二次突变或多次突变,从而导致临床上耐药的发生^[2,3]。前期实验我们发现,ETS变异基因1(ETS variant gene 1, ETV1)是转录因子高表达于GIST,抑制GIST的侵袭作用,在此,我们继续前期实验^[4],干扰ETV1基因表达,观察其对GIST

的增殖与凋亡的影响,进一步证实ETV1基因可能成为GIST治疗的新靶点。

1 材料和方法

1.1 材料 人胃肠间质瘤细胞株GIST-T1由上海拜力生物科技有限公司提供。高糖的DMEM培养基、胎牛血清(美国Hyclone公司)。慢病毒的构建由深圳市百恩维生物科技公司提供。检测的试剂MTT(美国Solarbio公司), ANNEXIN V-FITC凋亡试剂盒(美国Solarbio公司), CO₂培养箱(Sanyo公司), 超净工作台(苏州半导体设备厂), Olympus倒置显微镜及成像系统IX71(日本Olympus公司), M5/M5e多功能酶标仪[美国Molecular Devices(MD)公司], 流式细胞仪Flow Cytometer-FACSAria II(美国BD公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: GIST-T1用含10%胎牛血清的高糖DMEM培养基,置于37℃恒温、5%CO₂的饱和湿度培养箱中进行培养。

1.2.2 观察细胞增殖实验: 调整细胞数大约为 5×10^4 个/mL接种于96孔板中,每孔中加入200 μ L的细胞悬液,以只加不含细胞培养液作为调零孔,每组设6个复孔,接种96孔板后分别与1、4、7、10、14 d检测。检测时每孔加入5 mg/mL MTT 20 μ L,继续置于37℃恒温、5%CO₂的培养箱孵育4 h,吸弃培养液,每孔加入150 μ L DMSO,振荡10 min,用酶标仪测定490 nm波长吸光度值(A_{490}),实验重复3次。采用Compare Means/One-way ANOVA检验,分析空白组、阴性对照组和实验组之间的差异。

1.2.3 细胞凋亡实验: 采用流式细胞仪Annexin V-FITC[Annexin A5-green fluorescein/propidium iodide, 膜联蛋白A5-绿色荧光素/碘化丙啶(propidium iodide, PI)]/PI双染色法,贴壁生长的细胞用含有0.02%EDTA的0.25%胰蛋白酶消化成单细胞悬液,调整待测细胞的浓度为 5×10^5 - 1×10^6 个/mL。取1 mL细胞,1000 r/min, 4℃离心10 min,弃上清。加入1 mL预冷的PBS,轻轻震荡使细胞悬浮,1000 r/min, 4℃离心10 min,弃上清。重复步骤3次。将细胞重悬于200 μ L Binding Buffer。加入10 μ L Annexin V-FITC和10 μ L PI,轻轻混匀,避光室温反应15 min或者4℃反应30 min。加入300 μ L Binding Buffer,在1 h内上机检测。观察:Annexin V-FITC结合到凋亡细胞后,在蓝色光的激发下,发出绿色荧光,可区分凋亡细胞与正常细胞,碘化丙啶是一种核酸染料,他不能穿透完

表 1 干扰hETV1转录因子转染GIST-T1细胞前后4值的变化 ($n = 18$)

分组	第1天	第4天	第7天	第10天	第13天
空白组	0.1683 ± 0.0237	0.4390 ± 0.0638	0.9470 ± 0.0761	1.1383 ± 0.1095	1.1353 ± 0.1045
阴性对照组	0.1633 ± 0.0180	0.4715 ± 0.0339	0.9218 ± 0.0499	1.1228 ± 0.0573	1.1357 ± 0.1193
实验组	0.1605 ± 0.0153	0.4733 ± 0.0355	0.8108 ± 0.1214	0.9123 ± 0.1342	0.9877 ± 0.1065
<i>F</i> 值	0.586	1.716	7.034	17.201	8.103
<i>P</i> 值	0.562	0.195	0.003	0.000	0.001

* $P < 0.05$ vs 阴性对照组. hETV1: 人源性ETS变异基因1; GIST: 胃肠间质瘤.

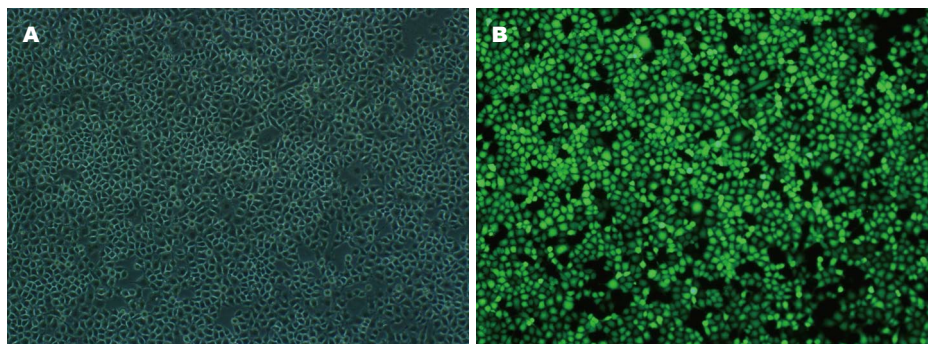


图 1 慢病毒转染GIST-T1细胞72 h的荧光表达情况($\times 200$). A: 经慢病毒转染GIST-T1细胞72 h倒置显微镜下结果; B: 经慢病毒转染GIST-T1细胞72 h荧光倒置显微镜下结果. GIST: 胃肠间质瘤.

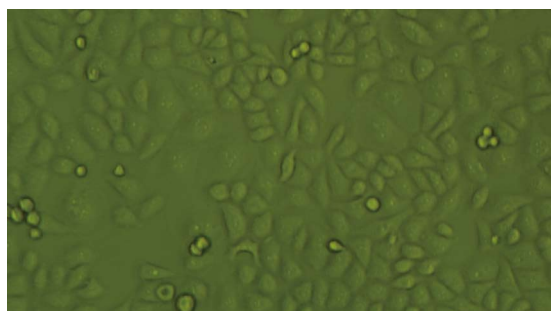


图 2 GIST-T1培养72 h的细胞形态($\times 200$). GIST: 胃肠间质瘤.

整细胞膜,但对凋亡晚期细胞和死细胞的破损细胞膜能够穿透,并使细胞核染成红色,Annexin V-FITC与PI匹配使用,可以将凋亡早期的细胞和晚期的细胞区分开来.结果判断:左上象限显示坏死细胞(FITC/ PI^+);右上象限显示晚期凋亡细胞(FITC/ PI^+);左下象限显示正常细胞(FITC/ PI^-);而右下象限显示早期凋亡细胞(FITC/ PI^+).采用Compare Means/One-Way ANOVA检验,分析空白组、阴性对照组及实验组之间的差异.

统计学处理 采用mean \pm SD表示,样本均数比较采用方差分析,用SPSS13.0统计软件进行方差分析. $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 shRNA-hETV1慢病毒转染GIST-T1细胞 如图1所示,经慢病毒转染的GIST-T1细胞,转染率达90%以上,表明已合成的干扰序列90%以上转入到GIST-T1(胃肠间质瘤细胞)细胞核中.

2.2 体外干扰hETV1转录因子对GIST-T1细胞生长和凋亡的影响

2.2.1 观察干扰前后细胞的生长曲线变化: GIST-T1细胞呈梭形细胞、非普通型上皮样细胞(表1).通过转染GIST-T1细胞后分别于第1、4、7、10、13天通过MTT法测其吸光度(A 值),通过测得的数值并描述其生长曲线.

表1中,空白组、阴性对照组和实验组随着时间的延长,其测定的吸光度也逐渐增加.在第1-7天之间,阴性对照组与试验组相比较,无明显差异性($P > 0.05$),无统计学意义;实验组与空白组及实验组与阴性对照组相比较,均无显著性差异($P > 0.05$),无统计学意义.然而在第7天开始以后,阴性对照组与试验组相比较,无明显差异性($P > 0.05$),无统计学意义;实验组与空白组($P = 0.000$ 和 $P = 0.001$)及实验组与阴性对照组($P = 0.000$ 和 $P = 0.001$)相比较均有显著性差异

■ 相关报道

EST家族参与调节细胞的增生分化,与肿瘤的侵袭和转移关系十分密切,据最新Ping等研究发现,通过对转录因子hETV1和对kit研究证明其共同影响GIST的分化与进展,如果干扰hETV1,从而影响GIST的kit基因表达,将有可能降低突变后KIT蛋白的合成,这种作用不会受kit基因外显子突变种类的影响,有望彻底纠正减少酪氨酸激酶的过度活化.类似对于EST家族的一些成员,与肿瘤关系密切,其相关报道也有一些相关文献.

■ 创新盘点

针对ETS家族的研究报道很多,而对于ETV1(转录因子)对于胃肠间质瘤方面的相关报道比较少,同时因*kii*基因存在二次突变现象,从而针对临床上抑制*kii*基因的下游信号分子酪氨酸激酶的靶向药物耐药的发生,继而寻找新的干预靶点, Ping Chi等通过对转录因子hETV1和对KIT研究证明其共同影响GIST的分化与进展,但对于其胃肠间质瘤的增值、分化及如何影响其肿瘤的转移能力未进行进一步研究,所以在此本文针对hETV1影响胃肠间质瘤的增值、分化及凋亡进行研究,但对其影响其侵袭能力,在前面已经做了研究。

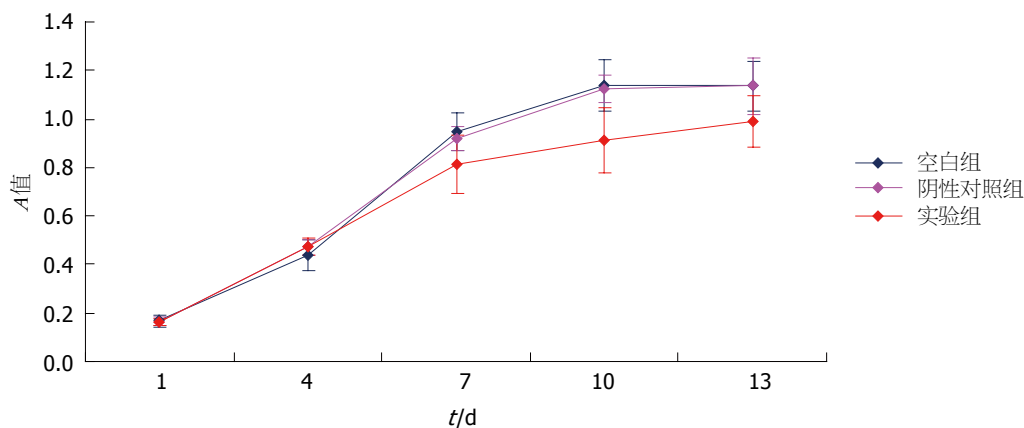


图3 经慢病毒转染GIST-T1(胃肠间质瘤细胞)前后的细胞生长曲线。

表2 干扰hETV1转录因子转染GIST-T1细胞的存活率比较 ($n=3$, %)

分组	第1天	第4天	第7天	第10天	第13天
阴性对照组	97.03	107.40	97.34	99.03	100.04
实验组	95.37	107.81	85.62	80.15	87.00

($P<0.05$), 有统计学意义。

如表2示, 阴性对照组分别与第1-13天, 细胞无明显死亡; 实验组于第1-7天, 细胞无明显死亡, 然而, 在第7天之后, 大约有25%的细胞出现了死亡。

通过表1结果, 采用第1、4、7、10、13天所测的吸光度平均值, 绘制出GIST-T1细胞生长曲线(图2, 3)。图3示, 实验组、空白组和阴性对照组在第1-6天时, 其描述的生长曲线基本重叠, 然而在第6天开始以后实验组的生长曲线与空白组、阴性对照组相比, 有所下降, 其下降幅度不十分明显。

2.2.2 观察干扰前后细胞凋亡情况: 通过慢病毒转染GIST-T1细胞72 h后, 阴性对照组与空白组相比较, 出现了早期凋亡及晚期凋亡现象; 实验组与空白组相比, 其早期凋亡及晚期凋亡显著增多, 实验组与阴性对照组相比, 早期凋亡及晚期凋亡也明显增多(图4)。

通过慢病毒转染GIST-T1细胞72 h后, 空白组、阴性对照组及实验组其早期凋亡率及晚期凋亡率组内相比较, 阴性对照组与空白组相比较, 出现早期凋亡率及晚期凋亡率均有差异($P<0.05$), 有统计学意义。试验组与空白组、实验组与阴性对照组相比较, 出现的早期凋亡率及晚期凋亡率均有显著性差异($P<0.05$), 有统计

表3 慢病毒转染GIST-T1(胃肠间质瘤细胞)72 h后各组细胞凋亡率的比较 (mean \pm SD, %)

分组(区域)	%	P值
空白组		
坏死细胞	2.8563 \pm 0.0853	
晚期凋亡细胞	3.8540 \pm 0.1347	
早期凋亡细胞	0.9090 \pm 0.0146	
正常细胞	92.3806 \pm 0.2215	
阴性对照组		
坏死细胞	3.1353 \pm 0.1082	
晚期凋亡细胞	9.3180 \pm 0.1298	0.000
早期凋亡细胞	32.8277 \pm 1.5802	0.000
正常细胞	54.7190 \pm 1.5691	
实验组		
坏死细胞	6.4520 \pm 0.1820	
晚期凋亡细胞	10.9580 \pm 0.4358	0.000
早期凋亡细胞	61.9930 \pm 1.3725 ^a	0.000
正常细胞	20.5970 \pm 1.9096	

^a $P<0.05$ vs 阴性对照组。

学意义, 其主要表现为一个早期凋亡过程(表3)。

3 讨论

GIST是一类起源于胃肠道间叶组织的肿瘤, 他们好发于胃、小肠和结肠, 其他消化系较为少见^[5,6], 没有典型的临床表现^[7], 现认为, GIST主要起源于胃肠道肌间神经丛周围的Cajal间质细胞^[8,9]。在胃肠间质瘤中, 由于*c-kit*原癌基因的突变, 导致其下游的酪氨酸激酶在没有配体的情况下, 持续活化, 导致其GIST细胞增殖分化失控, 从而引发肿瘤形成。因此, 抑制酪氨酸激酶的持续活化成为控制GIST研究的靶标^[8]。甲磺酸伊马替尼等一些抗肿瘤靶向药可以有效地阻止酪氨酸激酶的

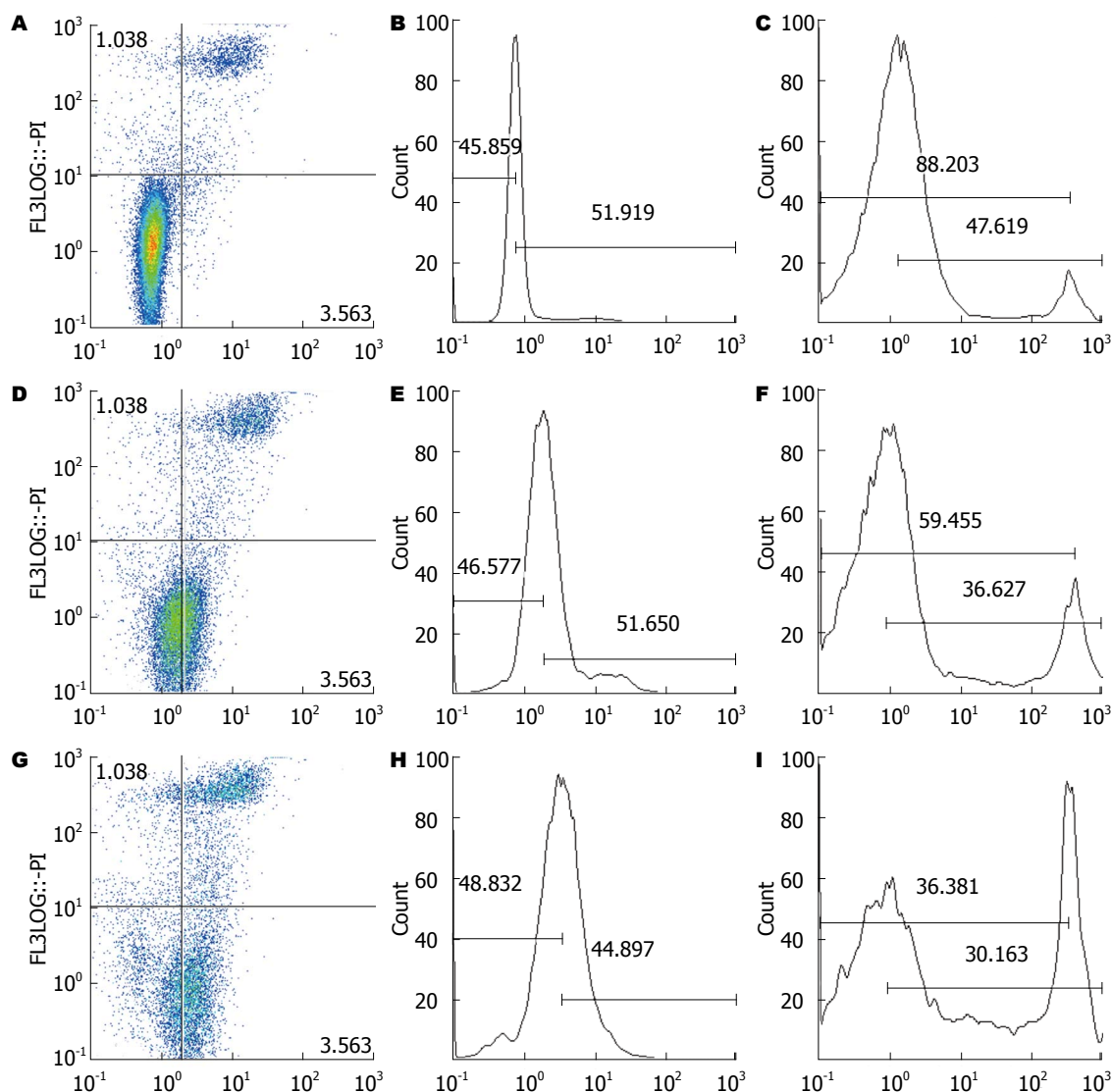


图 4 慢病毒转染GIST-T1细胞72 h后各组细胞凋亡流式图. A-C: 空白组; D-F: 阴性对照组; G-I: 实验组.

■应用要点

临床针对突变 kit 或 $pdgfra$ 基因为干扰靶点研发的药物, 比如伊马替尼等抗肿瘤药物, 由于突变的 kit 或 $pdgfra$ 基因存在多位点和二次突变的现象, 从而导致抗肿瘤药物的耐药, 本研究体外构建干扰 $ETV1$ 基因shRNA的载体, 干扰 $ETV1$ 表达, 观察其对GIST的增殖、分化的影响, 以寻找新的GIST治疗靶点, 为临床胃肠间质瘤的治疗提供新的思路.

持续激活, 抑制肿瘤的生长, 对GIST患者均有一定的疗效^[10,11]. 因长期服用此类药物, 导致临床上部分出现耐药现象, 研究发现, 在出现对耐药患者的基因分析发现, 耐药病人的基因的 kit 基因出现新的突变或者存在二次或多次突变现象发生, 从而解释了临床上耐药现象的发生. 为了进一步解决对于临床耐药患者的治疗, 我们必须进一步寻找新的靶点, 进行靶向干预治疗.

在人类中, ETS域的转录因子家族包括27种蛋白质, $ETV1$ 因子是其中之一, 我们前期实验发现, $ETV1$ 转录因子与GIST的侵袭和转移存在密切关系, 他可以促进GIST的侵袭和转移^[12-14]. 同时Chi等^[15]研究发现, $ETV1$ 普遍高表达在胃肠道间质瘤和伊马替尼的敏感和耐药的GIST细胞株中, 促进其的生长和增殖.

我们继续通过采用基因干扰技术, 沉默掉

GIST-T1细胞株的 $hETV1$ 转录因子, 对其进行生长和凋亡研究, 在其结果示, 干扰 $hETV1$ 基因的实验组和空白组及阴性对照组相比较, 在前期阶段GIST-T1细胞生长没有出现一个明显的抑制状态, 而到后期阶段, 可以看见经沉默掉 $hETV1$ 基因的实验组较空白组及阴性对照组有一个明显的生长抑制, 可能GIST-T1细胞株的生长在早期阶段, $hETV1$ 转录因子只是部分参与肿瘤的生长, 可能存在另外的基因共同参与GIST-T1细胞的生长和分化, $hETV1$ 对于早期胃肠间质瘤的生长只是起一个次要地位. 但是在后期阶段, $hETV1$ 转录因子对GIST-T1细胞存在明显的抑制, 证实说明, 此阶段 $hETV1$ 起主要作用; 另外我们对GIST-T1细胞凋亡加以研究也发现, 经沉默 $hETV1$ 基因的实验组较空白组及阴性对照组有一个明显的凋亡现象, 说明 $hETV1$ 转录

■同行评价

本文设计合理, 具有一定的学术价值, 具有一定指导意义。

因子在调控胃肠间质瘤的凋亡起着主要的作用。经大量文献证实, *c-kit*基因的高表达与突变导致酪氨酸激酶持续的活化, 导致胃肠间质瘤增生与凋亡失衡, 从而导致肿瘤过度增殖, 减缓凋亡的发生。我们在前期试验中在此对发现, 经过沉默掉*hETV1*基因的GIST-T1细胞行免疫化学, 经沉默掉*hETV1*基因的实验组较空白组及阴性对照组相比, 其染色度明显变浅, 说明沉默*hETV1*基因的GIST-T1细胞体外C-KIT蛋白表达明显降低, 从而让我们联想到, *hETV1*转录因子与*c-kit*基因存在着某种密切的联系, 很大可能程度上通过抑制*hETV1*转录因子, 抑制*c-kit*在胃肠间质瘤中的过表达, 稳定其基因, 减少突变的发生率, 从而抑制胃肠间质瘤生长, 加速其凋亡的进程。

4 参考文献

- 1 Al-Batran SE, Hartmann JT, Heidel F, Stoecklacher J, Wardelmann E, Dechow C, Dux M, Izbicki JR, Kraus T, Fischer T, Jäger E. Focal progression in patients with gastrointestinal stromal tumors after initial response to imatinib mesylate: a three-center-based study of 38 patients. *Gastric Cancer* 2007; 10: 145-152 [PMID: 17922091 DOI: 10.1007/s10120-007-0425-8]
- 2 Nishida T, Kanda T, Nishitani A, Takahashi T, Nakajima K, Ishikawa T, Hirota S. Secondary mutations in the kinase domain of the KIT gene are predominant in imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumor. *Cancer Sci* 2008; 99: 799-804 [PMID: 18294292 DOI: 10.1111/j.1349-7006.2008.00727.x]
- 3 Zhu MJ, Ou WB, Fletcher CD, Cohen PS, Demetri GD, Fletcher JA. KIT oncoprotein interactions in gastrointestinal stromal tumors: therapeutic relevance. *Oncogene* 2007; 26: 6386-6395 [PMID: 17452978 DOI: 10.1038/sj.onc.1210464]
- 4 李强, 徐龙. ETV1在胃肠间质瘤中的作用. 世界华人消化杂志 2012; 20: 2888-2894
- 5 Miettinen M, Monihan JM, Sarlomo-Rikala M, Kovatich AJ, Carr NJ, Emory TS, Sobin LH. Gastrointestinal stromal tumors/smooth muscle tumors (GISTs) primary in the omentum and mesentery: clinicopathologic and immunohistochemical study of 26 cases. *Am J Surg Pathol* 1999; 23: 1109-1118 [PMID: 10478672 DOI: 10.1097/00000478-199909000-00015]
- 6 Reith JD, Goldblum JR, Lyles RH, Weiss SW. Extragastric gastrointestinal (soft tissue) stromal tumors: an analysis of 48 cases with emphasis on histologic predictors of outcome. *Mod Pathol* 2000; 13: 577-585 [PMID: 10824931 DOI: 10.1038/modpathol.3880099]
- 7 贺慧颖, 方伟岗, 钟锦镐, 李燕, 郑杰, 杜娟, 衡万杰, 吴秉铨. 165例胃肠道间质瘤中*c-kit*和*PDGFRA*基因突变的检测和临床诊断意义. 中华病理学杂志 2006; 35: 262-266
- 8 林苏, 刘懿. 胃肠道间质瘤. 国外医学·消化系疾病分册 2005; (1): 25-28
- 9 孙现军, 徐忠法. 胃肠道间质瘤的诊断和治疗. 中华肿瘤防治杂志 2006; 13: 7-10
- 10 Li Y, Jiang Z, Xu L, Yao H, Guo J, Ding X. Stability analysis of liver cancer-related microRNAs. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2011; 43: 69-78 [PMID: 21173058 DOI: 10.1093/abbs/gmq114]
- 11 Xu J, Wu C, Che X, Wang L, Yu D, Zhang T, Huang L, Li H, Tan W, Wang C, Lin D. Circulating microRNAs, miR-21, miR-122, and miR-223, in patients with hepatocellular carcinoma or chronic hepatitis. *Mol Carcinog* 2011; 50: 136-142 [PMID: 21229610 DOI: 10.1002/mc.20712]
- 12 Keld R, Guo B, Downey P, Gulmann C, Ang YS, Sharrocks AD. The ERK MAP kinase-PEA3/ETV4-MMP-1 axis is operative in oesophageal adenocarcinoma. *Mol Cancer* 2010; 9: 313 [PMID: 21143918 DOI: 10.1186/1476-4598-9-313]
- 13 Dissanayake K, Toth R, Blakey J, Olsson O, Campbell DG, Prescott AR, MacKintosh C. ERK/p90(RSK)/14-3-3 signalling has an impact on expression of PEA3 Ets transcription factors via the transcriptional repressor capicúa. *Biochem J* 2011; 433: 515-525 [PMID: 21087211 DOI: 10.1042/BJ20101562]
- 14 Keld R, Guo B, Downey P, Cummins R, Gulmann C, Ang YS, Sharrocks AD. PEA3/ETV4-related transcription factors coupled with active ERK signalling are associated with poor prognosis in gastric adenocarcinoma. *Br J Cancer* 2011; 105: 124-130 [PMID: 21673681 DOI: 10.1038/bjc.2011.187]
- 15 Chi P, Chen Y, Zhang L, Guo X, Wongvipat J, Shamu T, Fletcher JA, Dewell S, Maki RG, Zheng D, Antonescu CR, Allis CD, Sawyers CL. ETV1 is a lineage survival factor that cooperates with KIT in gastrointestinal stromal tumours. *Nature* 2010; 467: 849-853 [PMID: 20927104 DOI: 10.1038/nature09409]

编辑 田滢 电编 鲁亚静



苏南地区无症状人群结直肠肿瘤发生风险评分系统的建立与验证

陈国昌, 毛伯能, 刘芊, 钱佶, 刘雷

陈国昌, 毛伯能, 刘芊, 钱佶, 刘雷, 江苏大学附属宜兴医院
消化内科 江苏省宜兴市 214200

陈国昌, 教授, 主任医师, 主要从事消化系恶性肿瘤筛查的研究。

无锡市科学技术局基金资助项目, No. CSZ00N1248

作者贡献分布: 此课题由陈国昌设计; 研究过程由毛伯能、刘芊、钱佶及刘雷共同操作完成; 数据分析由刘芊与钱佶完成; 本论文写作由陈国昌与毛伯能完成。

通讯作者: 陈国昌, 教授, 主任医师, 214200, 江苏省宜兴市通贞观路75号, 江苏大学附属宜兴医院消化内科。

staff167@yxph.com

电话: 0510-87330831 传真: 0510-87921110

收稿日期: 2013-08-29 修回日期: 2013-10-24

接受日期: 2013-11-06 在线出版日期: 2013-12-18

Derivation and validation of a prediction rule for estimating colorectal neoplasm risk in asymptomatic individuals in southern Jiangsu province

Guo-Chang Chen, Bo-Neng Mao, Qian Liu, Ji Qian, Lei Liu

Guo-Chang Chen, Bo-Neng Mao, Qian Liu, Ji Qian, Lei Liu, Department of Gastroenterology, Yixing Hospital, Jiangsu University, Yixing 214200, Jiangsu Province, China

Supported by: the Wuxi Science and Technology Bureau Project, No. CSZ00N1248

Correspondence to: Guo-Chang Chen, Professor, Chief Physician, Department of Gastroenterology, Yixing Hospital, Jiangsu University, 75 Tongzhenguan Road, Yixing 214200, Jiangsu Province, China. staff167@yxph.com

Received: 2013-08-29 Revised: 2013-10-24

Accepted: 2013-11-06 Published online: 2013-12-18

Abstract

AIM: To develop a prediction rule to stratify risk for colorectal neoplasms in asymptomatic individuals in southern Jiangsu province, and to evaluate its screening efficiency.

METHODS: Asymptomatic persons in southern Jiangsu province who had complete colonoscopy data were included in this study. All participants were asked to complete a questionnaire which covered information on potential risk factors, including demographic characteristics, medical history, smoking, alcohol consumption, dietary intake, and other factors that may be

associated with colorectal neoplasms. A multivariable logistic regression method was used to identify independent predictors of colorectal neoplasms. A prediction rule was developed from the logistic regression model by using a regression coefficient-based scoring method, and then internally validated. The screening efficiency of the prediction rule was assessed by its calibration, discrimination, and accuracy.

RESULTS: A total of 905 asymptomatic persons were included in this study. The prediction rule comprised three variables (age, smoking, and alcohol consumption), with scores ranging from 0 to 6. The prediction rule had good calibration ($P = 0.093$) and good discrimination (area under the receiver operating characteristic curve = 0.65, 95%CI: 0.61-0.69). When a score of 1.5 was used as the screening cutoff value, the sensitivity, specificity, accuracy, positive predictive value, negative predictive value, positive likelihood ratio, and negative likelihood ratio were 65.1%, 57.2%, 59.9%, 44.4%, 75.7%, 1.52, and 0.61, respectively.

CONCLUSION: The developed prediction rule had good screening efficiency and, thus, can be used as a preliminary method to screen colorectal neoplasms in asymptomatic individuals in southern Jiangsu province.

© 2013 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

Key Words: Colorectal neoplasms; Colonoscopy; Cross-sectional study; Screening; Risk factors

Chen GC, Mao BN, Liu Q, Qian J, Liu L. Derivation and validation of a prediction rule for estimating colorectal neoplasm risk in asymptomatic individuals in southern Jiangsu province. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(35): 4043-4049 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/4043.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i35.4043>

摘要

目的: 建立苏南地区无症状人群结直肠肿瘤

■背景资料

多数散发性结直肠癌患者来自50岁以上的无症状平均风险人群。对该人群进行结肠镜筛查, 可以明显降低结直肠癌的发病率和死亡率。然而, 我国目前的卫生资源无法支持针对该人群的结肠镜筛查策略。

■同行评议者

肖秀英, 副主任医师, 上海市徐汇区中心医院肿瘤科

■ 研究前沿

无症状平均风险人群的结直肠癌筛查策略是国内、外研究的热点,如何对该人群进行有效危险分层是目前研究的重点。

发生风险评估系统,并评价其筛查效能。

方法:以接受结肠镜检查的苏南地区籍无症状人群为研究对象,通过面对面调查获取其人口学特征、既往疾病史、吸烟史、饮酒史、饮食习惯等信息。采用多元Logistic回归分析方法建立结直肠肿瘤发生风险预测模型。根据模型中各变量的 β 值赋予分值,建立结直肠肿瘤发生风险评估系统,并进行内部人群验证。通过预测一致性、区分能力和筛查准确度评价评分系统的筛查效能。

结果:共纳入905例合格研究对象。所建立的评分系统由年龄、吸烟、饮酒3个变量组成,分值范围为0-6分,其预测的一致性较好($P=0.093$),区分能力较好(受试者工作特性曲线下面积为0.65, 95%CI: 0.61-0.69)。以1.5分作为筛查界值,其敏感度、特异度、准确率、阳性预测值、阴性预测值、阳性似然比、阴性似然比分别为65.1%、57.2%、59.9%、44.4%、75.7%、1.52和0.61。

结论:所建立的结直肠肿瘤发生风险评估系统具有较好的筛查效能,可以作为结直肠肿瘤的初筛工具,应用于苏南地区无症状平均风险人群的结直肠肿瘤筛查。

© 2013年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词:结直肠肿瘤; 结肠镜; 横断面研究; 筛查; 危险因素

核心提示:本研究所建立的结直肠肿瘤发生风险评估系统由年龄、吸烟、饮酒等3个变量组成,具有较好的区分度,较高的敏感度和阴性预测值,适用于苏南地区无症状平均风险人群结直肠肿瘤初筛,可明显提高筛查效能。

陈国昌, 毛伯能, 刘芊, 钱皓, 刘雷. 苏南地区无症状人群结直肠肿瘤发生风险评估系统的建立与验证. 世界华人消化杂志 2013; 21(35): 4043-4049 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/4043.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v21.i35.4043>

0 引言

结直肠肿瘤是我国常见恶性肿瘤之一,近20年来其发病率和死亡率均呈明显上升趋势^[1,2]。结直肠肿瘤主要包括结直肠癌、结直肠腺瘤和结直肠息肉^[3]。目前认为,结直肠癌大多由腺瘤性息肉发展而来,70%-75%新诊断的结直肠癌患者来自于50岁以上的无症状平均风险人群^[4]。所

谓无症状平均风险人群,是指无结直肠癌相关症状或预警症状、无结直肠癌和结直肠腺瘤性息肉病史及家族史、无遗传性结直肠癌和炎症性肠病病史的人群^[4]。对无症状平均风险人群进行结肠镜筛查,可以发现早期结直肠癌和癌前病变并进行及时治疗。所以,可望有效降低该人群结直肠癌的发病率和死亡率^[5]。然而,我国目前的卫生资源无法支持针对全人群的结肠镜筛查策略^[6]。研究表明,平均风险人群并非等同于低风险人群^[4,7]。如果利用容易获得的信息,如年龄、性别等,对无症状平均风险人群的结直肠肿瘤患病风险进行准确预测(危险分层),然后针对其中患病风险较高的人群再进行结肠镜筛查,必将大大提高筛查效能,降低人群筛查费用。本文拟通过研究、探讨我国苏南地区汉族无症状人群结直肠肿瘤发生风险的最佳预测因子,在此基础上建立该人群结直肠肿瘤发生风险评估系统,并评价其作为结直肠肿瘤初筛工具的有效性。

1 材料和方法

1.1 材料 研究对象为2011-07/2012-12在江苏大学附属宜兴医院进行常规健康体检时,接受结肠镜检查的苏南地区籍无症状平均风险人群。纳入标准:拟行结肠镜检查;年龄 ≥ 40 岁;汉族;无症状或仅有结直肠非特异症状(轻微腹痛、间歇腹泻或便秘)的体检人群。排除标准:(1)一、二级亲属有结直肠肿瘤史;(2)60岁以下一级亲属中有腺瘤性息肉病史或家族遗传性综合征(包括家族性腺瘤性息肉病、遗传性非息肉性结直肠癌、Turcot综合征、Oldfield综合征等);(3)有结直肠癌或息肉病、炎症性肠病、其他器官肿瘤等病史;(4)有缺铁性贫血或粪便隐血试验阳性、便血、体重明显减轻、里急后重等症状;(5)近5年结肠镜检查史;(6)结直肠手术史。

1.2 方法 采用横断面研究设计。在结肠镜检查前进行问卷调查,调查内容包括人口学特征、既往疾病史、手术史、服药史、吸烟史、饮酒史、饮茶史、体力活动情况、饮食习惯、排便频率等。由经验丰富的2名消化内镜专家进行结肠镜检查操作,并负责填写结肠镜检查结果。结直肠肿瘤包括息肉和浸润癌。息肉病理类型分为腺瘤性息肉、增生性息肉、炎症性息肉和未能确定类型的息肉。腺瘤性息肉进一步分为管状腺瘤、管状绒毛状腺瘤、绒毛状腺瘤和重度不典型增生。重度不典型增生包括黏膜内癌和

原位癌。浸润癌是指恶性细胞浸润超过黏膜肌层的肿瘤。只有肠道准备良好、完成全结肠检查(结肠镜到达回盲瓣)的研究对象才被纳入统计学分析。

统计学处理 采用EpiData3.02软件, 通过双录入核查方式建立数据库。采用SPSS19.0软件对数据进行统计分析。所有分析均为双侧检验。多因素分析的检验水准为0.05。(1)结直肠癌发生风险预测模型及其评分系统的建立与评价: 以结肠镜检查结果(结直肠癌有或无)作为应变量, 以人口学特征等其他变量作为自变量, 进行单因素分析和多因素分析。根据自变量的数据性质, 分别采用两组资料 t 检验、Mann-Whitney U 检验、 χ^2 检验等方法进行单因素分析。选择单因素分析结果中 $P<0.10$ 的自变量作为潜在的结直肠癌预测变量, 采用多元Logistic回归分析方法进行多因素分析, 建立结直肠癌发生风险预测模型。为了便于临床应用, 将上述模型中的连续性变量转换成分类变量后重新进行多元Logistic回归分析, 根据新Logistic回归模型中各变量的 β 值赋予分值^[6,8], 建立结直肠癌发生风险评分系统。风险预测的一致性评价采用Hosmer-Lemeshow拟合优度检验方法。风险预测模型及其评分系统的区分能力通过受试者工作特性曲线(ROC曲线)下面积进行评价^[6,8]。准确度评价采用敏感度、特异度、准确率、阳性预测值、阴性预测值、阳性似然比、阴性似然比;(2)结直肠癌发生风险评分系统的内部人群验证: 采用非参数Bootstrap方法进行验证^[6,9];(3)与其他类似评分系统的比较: 已报道的类似评分系统包括Cai等^[6]、Yeoh等^[10]、Betés等^[11]和Lin等^[12]建立的评分系统。分别计算上述4个评分系统在本研究人群中的ROC曲线下面积及其95%可信区间。采用 U 检验方法比较本研究所建立的评分系统与上述4个评分系统ROC曲线下面积的差异性。

2 结果

2.1 研究对象特征 共纳入985例合格研究对象, 其中905例(91.9%)完成了全结肠检查, 被纳入后续的统计分析。在905例研究对象中, 男性393例(43.4%), 平均年龄 56.6 ± 10.1 岁。312例(5.3%)结直肠癌中, 息肉占90.1%(281/312), 浸润癌占9.9%(31/312)。在息肉病理类型中, 腺瘤性息肉、增生性息肉、炎症性息肉和未能确定类型息肉的例数分别为100例(35.6%)、72例

(25.6%)、62例(22.1%)和47例(16.7%)。在腺瘤性息肉中, 管状腺瘤、管状绒毛状腺瘤、绒毛状腺瘤和重度不典型增生的例数分别为57例(57%)、35例(35%)、6例(6%)和2例(2%)。

2.2 结直肠癌发生风险预测模型及其评分系统的建立与评价 单因素分析结果显示, 年龄、性别、教育程度、高血压、冠心病、胆囊手术史、吸烟、饮酒、红肉(猪、牛、羊肉任意一种)摄入是结直肠癌发生风险的潜在预测因子($P<0.10$)(表1)。多因素分析结果显示, 年龄、吸烟、饮酒是结直肠癌发生风险的独立预测因子(表1)。Hosmer-Lemeshow拟合优度检验结果显示, Logistic回归模型的拟合优度良好($P=0.093$)。ROC曲线下面积(95%CI)为0.66(0.62-0.69)($P<0.01$), 说明Logistic回归模型的区分度尚可。

为了便于临床应用, 将上述模型中的连续性变量“年龄”转换成分类变量后重新进行多元Logistic回归分析(表2)。ROC曲线下面积(95%CI)为0.66(0.62-0.69)($P<0.001$), 新模型的区分度与原模型的区分度相同。基于新Logistic回归模型建立的结直肠癌发生风险评分系统由3个变量组成(年龄、吸烟、饮酒), 分值范围为0-6分(表2)。随着分值增高, 研究对象中结直肠癌患者的比例呈增高趋势(表3)。评分系统的ROC曲线分析结果显示, ROC曲线下面积(95%CI)为0.65(0.61-0.69)($P<0.001$), 说明其区分度尚可。

基于评分系统ROC曲线, 以1.5分作为界值, 将研究对象划分为结直肠癌低风险人群(448例, 49.5%)和高风险人群(457例, 50.5%)(表3)。高风险人群(>1 分)中结直肠癌的比例为44.4%(203/457), 显著高于低风险人群(0-1分)中结直肠癌的比例(24.3%, 109/448)($P<0.001$)(表3)。预测界值下评分系统筛查工具的敏感度、特异度、准确率、阳性预测值、阴性预测值、阳性似然比、阴性似然比分别为65.1%、57.2%、59.9%、44.4%、75.7%、1.52和0.61。高风险人群中包含了65.1%(203/312)的结直肠癌病例。

2.3 结直肠癌发生风险评分系统的内部人群验证 非参数Bootstrap方法验证结果显示, 评分系统的平均ROC曲线下面积(95%CI)为0.66(0.62-0.68), 与建模人群的ROC曲线分析结果相似。

2.4 与其他类似评分系统的比较 在5种评分系统中, 本文所建立的评分系统的区分度最好, 但与其他4种评分系统的区分度均无明显差别($P>0.05$)(表4)。

■ 相关报道

Cai等建立汉族无症状平均风险人群结直肠进展期肿瘤发生风险评分系统。该评分系统由年龄、性别、吸烟、糖尿病史、蔬菜摄入、腌制食品摄入、油炸食品摄入、白肉摄入等8个变量组成, 分值范围0-14分。建议高风险人群(>3 分)进行结肠镜筛查。

■创新盘点

结直肠肿瘤主要包括结肠癌、结直肠腺瘤和结直肠息肉。本研究首次建立了苏南地区无症状平均风险人群结直肠肿瘤发生风险评估系统。与国内外报道的结直肠进展期腺瘤或进展期肿瘤发生风险评估系统相比,本研究所建立的危险分层评分工具对于苏南地区人群具有更高的区分度。

表 1 结直肠肿瘤危险因素的单因素分析和多因素分析结果

变量	总例数(<i>n</i> = 905)	有结直肠肿瘤(<i>n</i> = 312)			无结直肠肿瘤(<i>n</i> = 593)			<i>P</i> 值 ¹	OR值 ²	95%CI ^c	<i>P</i> 值 ^d
		<i>n</i>	%	mean ± SD	<i>n</i>	%	mean ± SD				
分类变量											
性别								< 0.001			
男	393	167	42.5		226	57.5					
女	512	145	28.3		367	71.7					
教育程度								0.054			
文盲或小学	430	162	37.7		268	62.3					
中学或以上	475	150	31.6		325	68.4					
高血压								0.043			
有	211	85	40.3		126	59.7					
无	694	227	32.7		467	67.3					
糖尿病								0.213			
有	44	19	43.2		25	56.8					
无	861	293	34.0		568	66.0					
高血脂								0.102			
有	33	7	21.2		26	78.8					
无	872	305	35.0		567	65.0					
冠心病								0.001			
有	16	12	75.0		4	25.0					
无	889	300	33.7		589	66.3					
胃手术史								0.657			
有	17	5	29.4		12	70.6					
无	888	307	34.6		581	65.4					
胆囊手术史								0.012			
有	50	9	18.0		41	82.0					
无	855	303	35.4		552	64.6					
阑尾手术史								0.438			
有	78	30	38.5		48	61.5					
无	827	282	34.1		545	65.9					
阿司匹林服用								0.298			
有	21	5	23.8		16	76.2					
无	884	307	34.7		577	65.3					
吸烟								< 0.001			
有	210	100	47.6		110	52.4			1.64	1.13, 2.37	0.009
无	695	212	30.5		483	69.5			1		
饮酒								< 0.001			
有	143	70	49.0		73	51.0			1.66	1.08, 2.54	0.020
无	762	242	31.8		520	68.2			1		
饮茶								0.117			
经常	191	75	39.3		116	60.7					
偶尔	714	237	33.2		477	66.8					
体力活动								0.502			
轻度	169	62	36.7		107	63.3					
中度或重度	736	250	34.0		486	66.0					
绿色蔬菜摄入								0.310			
经常	880	301	34.2		579	65.8					
偶尔	25	11	44.0		14	56.0					
水果摄入								0.173			
经常	472	153	32.4		319	67.6					
偶尔	433	159	36.7		274	63.3					
牛奶摄入								0.306			

经常	88	26	29.5	62	70.5	
偶尔	817	286	35.0	531	65.0	
蛋类摄入						0.731
经常	419	142	33.9	277	66.1	
偶尔	486	170	35.0	316	65.0	
腌制食品摄入						0.920
经常	132	45	34.1	87	65.9	
偶尔	773	267	34.5	506	65.5	
油炸熏制食品摄入						0.990
经常	32	11	34.4	21	65.6	
偶尔	873	301	34.5	572	65.5	
竹笋摄入						0.374
经常	195	62	31.8	133	68.2	
偶尔	710	250	35.2	460	64.8	
红肉摄入 ³						0.031
经常	630	203	32.2	427	67.8	
偶尔	275	109	39.6	166	60.4	
白肉摄入 ⁴						0.199
经常	642	213	33.2	429	66.8	
偶尔	263	99	37.6	164	62.4	
排便频率						0.289
2日或以上1次	219	82	37.4	137	62.6	
每日1次或以上	686	230	33.5	456	66.5	
连续变量						
年龄(岁)			59.2 ± 10.1	55.2 ± 9.9	< 0.001	1.04 1.03, 1.06 < 0.001
体质质量指数(kg/m ²)			23.4 ± 2.7	23.2 ± 3.0	0.374	

■应用要点
本研究所建立的评分系统可以应用于苏南地区无症状平均风险人群结直肠肿瘤的初筛。对于低风险人群(0-1分), 定期随访或进行粪便隐血试验检查即可; 而对于高风险人群(>1分), 建议进行结肠镜筛查, 以发现潜在的结直肠病变。

¹单因素分析结果; ²多因素分析结果; ³红肉包括猪、牛、羊肉; ⁴白肉包括鸡、鸭、鱼肉。

表 2 新Logistic回归模型及其评分系统

变量	β值	OR值	95%CI	P值	分值
年龄(岁)					
40-49		1			0
50-59	0.353	1.42	0.97, 2.09	0.072	1
60-69	0.779	2.18	1.49, 3.19	<0.001	2
>69	1.317	3.73	2.26, 6.15	<0.001	4
吸烟					
无		1			0
有	0.509	1.66	1.15, 2.41	0.007	1
饮酒					
无		1			0
有	0.495	1.64	1.07, 2.51	0.023	1

3 讨论

本研究所建立的结直肠肿瘤发生风险评分系统由年龄、吸烟、饮酒等3个变量组成, 具有良好的预测一致性, 较好的区分度, 较高的敏感度和阴性预测值, 可以应用于苏南地区无症状平均风险人群结直肠肿瘤的初筛。对于被评分系统筛查工具判断为低风险的人群, 定期随访或进

行粪便隐血试验检查即可; 而对于高风险人群, 建议进行全结肠检查, 以发现潜在的结直肠病变。本研究结果有助于建立具有苏南地区特色的结直肠肿瘤筛查策略, 从而明显提高苏南地区结直肠肿瘤筛查的效能, 降低筛查费用, 节约卫生资源。

大量证据显示, 本研究所建立的结直肠肿瘤发生风险评分系统是有效和可信的, 可以作为结直肠肿瘤初筛工具, 应用于苏南地区无症状平均风险人群的结直肠肿瘤筛查。首先, 我们的研究结果显示, 无论是建模还是内部人群验证, 该评分系统均表现出较好的区分度, 可以较为准确地区分高风险人群和低风险人群。其次, 该评分系统的敏感度尚可(65.1%), 高风险人群包含了多数结直肠肿瘤病例, 且其阴性预测值较高(75.7%), 所以, 可以作为结直肠肿瘤的初筛工具应用于人群筛查; 第三, 该评分系统仅由3个变量组成, 方便易用, 与已报道的类似评分系统相比, 具有相似的区分度, 适合于苏南地区人群的结直肠肿瘤筛查; 第四, 采用基于本研究结果的危险分层筛查策略, 在减少

■同行评价

本文立意新颖, 相关报道不多, 统计学处理很好, 具有一定指导意义。

表 3 各种危险得分和不同危险分类结直肠肿瘤的发生风险

危险得分	n	结直肠肿瘤		危险分类	n	%	结直肠肿瘤	
		n	%				n	%
					905	100.0	312	34.5
0	184	28	15.2	低风险(0-1)	448	49.5	109	24.3
1	264	81	30.7					
2	243	92	37.9	高风险(>1)	457	50.5	203	44.4
3	84	43	51.2					
4	107	57	53.3					
5	13	5	38.5					
6	10	6	60.0					

表 4 与现有结直肠肿瘤评分系统的比较

评分系统	包含的变量数	分值范围	ROC曲线下面积	95%CI	P值 ¹
陈国昌等(本研究)	3	0-6	0.65	0.61-0.69	
Cai等 ^[6]	8	0-14	0.63	0.59-0.67	0.412
Yeoh等 ^[10]	4	0-7	0.63	0.59-0.67	0.459
Bet é s等 ^[11]	3	0-8	0.65	0.61-0.68	0.849
Lin等 ^[12]	3	0-6	0.64	0.60-0.68	0.682

¹其他各评分系统分别与本研究所建立的评分系统的比较。

49.5%(448/905)结肠镜检查例数的情况下, 可以筛查出65.1%(203/312)的病例, 所以, 这种策略明显提高了人群筛查效率。第5, 我们的研究发现, 年老、吸烟、饮酒是结直肠肿瘤的独立危险因素, 这与文献报道的结果相一致^[13-17]。已有大量研究证实, 随着年龄增加, 结直肠癌的发病风险明显增大, 所以国外筛查指南建议从50岁开始针对无症状平均风险人群进行结直肠癌筛查^[13]。多数研究结果表明, 吸烟可以明显增加结直肠肿瘤的发病风险^[14,15], 所以国外筛查指南将吸烟量>20包年的人群作为结直肠肿瘤的高危人群进行重点筛查^[13]。来自于多个不同种族人群的研究结果证实, 饮酒可以明显增加结直肠肿瘤的发病风险^[16,17]。

本研究可能存在以下主要缺陷: (1)由于样本量相对较少(合格研究对象905例, 其中结直肠肿瘤312例), 所以, 只能将所有研究对象用于建模。本研究结果需要在更大的外部人群中进一步进行验证。(2)本研究采用横断面研究设计, 很多潜在危险因素的资料来自于研究对象的回忆, 可能存在回忆偏倚。尽管存在上述缺陷, 我们的研究结果显示, 我们所建立的评分系统仍然是有效和可信的。

总之, 本研究所建立的结直肠肿瘤发生风险评分系统具有良好的预测一致性, 较好的区分度, 较高的敏感度和阴性预测值。研究结果有助于建立具有苏南地区特色的结直肠肿瘤筛查策略。该评分系统应用于苏南地区无症状平均风险人群的结直肠肿瘤初筛, 可望明显提高苏南地区结直肠肿瘤筛查的效能, 降低筛查费用, 节约卫生资源。

志谢: 感谢第二军医大学临床流行病学与循证医学中心蔡全才教授和钱维助理研究员在研究设计、资料统计分析方面给予的大力帮助。

4 参考文献

- 1 陈万青, 郑荣寿, 曾红梅, 张思维, 赵平, 赫捷. 1989-2008年中国恶性肿瘤发病趋势分析. 中华肿瘤杂志 2012; 34: 517-524
- 2 任建松, 李倩, 关鹏, 代敏, 杨玲. 中国2008年消化道常见恶性肿瘤发病、死亡和患病情况的估计及预测. 中华流行病学杂志 2012; 33: 1052-1055
- 3 吕翔, 王益华, 戴小波. 消化系统肿瘤病理学. 第1版. 南京: 江苏科学技术出版社, 2008: 251-327
- 4 Nelson RS, Thorson AG. Colorectal cancer screening. *Curr Oncol Rep* 2009; 11: 482-489 [PMID: 19840526 DOI: 10.1007/s11912-009-0065-8]
- 5 Schoenfeld P, Cash B, Flood A, Dobhan R, Eastone J, Coyle W, Kikendall JW, Kim HM, Weiss DG, Emory T, Schatzkin A, Lieberman D. Colonoscopic screen-

- ing of average-risk women for colorectal neoplasia. *N Engl J Med* 2005; 352: 2061-2068 [PMID: 15901859 DOI: 10.1056/NEJMoa042990]
- 6 Cai QC, Yu ED, Xiao Y, Bai WY, Chen X, He LP, Yang YX, Zhou PH, Jiang XL, Xu HM, Fan H, Ge ZZ, Lv NH, Huang ZG, Li YM, Ma SR, Chen J, Li YQ, Xu JM, Xiang P, Yang L, Lin FL, Li ZS. Derivation and validation of a prediction rule for estimating advanced colorectal neoplasm risk in average-risk Chinese. *Am J Epidemiol* 2012; 175: 584-593 [PMID: 22328705 DOI: 10.1093/aje/kwr337]
 - 7 Lieberman D. Screening for colorectal cancer in average-risk populations. *Am J Med* 2006; 119: 728-735 [PMID: 16945604 DOI: 10.1016/j.amjmed.2006.03.037]
 - 8 Moons KG, Harrell FE, Steyerberg EW. Should scoring rules be based on odds ratios or regression coefficients? *J Clin Epidemiol* 2002; 55: 1054-1055 [PMID: 12464384 DOI: 10.1016/S0895-4356(02)00453-5]
 - 9 Steyerberg EW, Bleeker SE, Moll HA, Grobbee DE, Moons KG. Internal and external validation of predictive models: a simulation study of bias and precision in small samples. *J Clin Epidemiol* 2003; 56: 441-447 [PMID: 12812818 DOI: 10.1016/S0895-4356(03)00047-7]
 - 10 Yeoh KG, Ho KY, Chiu HM, Zhu F, Ching JY, Wu DC, Matsuda T, Byeon JS, Lee SK, Goh KL, Sollano J, Rerknimitr R, Leong R, Tsoi K, Lin JT, Sung JJ. The Asia-Pacific Colorectal Screening score: a validated tool that stratifies risk for colorectal advanced neoplasia in asymptomatic Asian subjects. *Gut* 2011; 60: 1236-1241 [PMID: 21402615 DOI: 10.1136/gut.2010.221168]
 - 11 Betés M, Muñoz-Navas MA, Duque JM, Angós R, Macías E, Súbtíl JC, Herraiz M, De La Riva S, Delgado-Rodríguez M, Martínez-González MA. Use of colonoscopy as a primary screening test for colorectal cancer in average risk people. *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 2648-2654 [PMID: 14687811 DOI: 10.1111/j.1572-0241.2003.08771.x]
 - 12 Lin OS, Kozarek RA, Schembre DB, Ayub K, Gluck M, Cantone N, Soon MS, Dominitz JA. Risk stratification for colon neoplasia: screening strategies using colonoscopy and computerized tomographic colonography. *Gastroenterology* 2006; 131: 1011-1019 [PMID: 17030171 DOI: 10.1053/j.gastro.2006.08.015]
 - 13 Rex DK, Johnson DA, Anderson JC, Schoenfeld PS, Burke CA, Inadomi JM. American College of Gastroenterology guidelines for colorectal cancer screening 2009 [corrected]. *Am J Gastroenterol* 2009; 104: 739-750 [PMID: 19240699 DOI: 10.1038/ajg.2009.104]
 - 14 Stürmer T, Glynn RJ, Lee IM, Christen WG, Hennekens CH. Lifetime cigarette smoking and colorectal cancer incidence in the Physicians' Health Study I. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 1178-1181 [PMID: 10904092 DOI: 10.1093/jnci/92.14.1178]
 - 15 Chao A, Thun MJ, Jacobs EJ, Henley SJ, Rodriguez C, Calle EE. Cigarette smoking and colorectal cancer mortality in the cancer prevention study II. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 1888-1896 [PMID: 11106680 DOI: 10.1093/jnci/92.23.1888]
 - 16 Peng XE, Jiang YY, Shi XS, Hu ZJ. NQO1 609C>T polymorphism interaction with tobacco smoking and alcohol drinking increases colorectal cancer risk in a Chinese population. *Gene* 2013; 521: 105-110 [PMID: 23458878 DOI: 10.1016/j.gene.2013.02.029]
 - 17 Ferrari P, McKay JD, Jenab M, Brennan P, Canzian F, Vogel U, Tjønneland A, Overvad K, Tolstrup JS, Boutron-Ruault MC, Clavel-Chapelon F, Morois S, Kaaks R, Boeing H, Bergmann M, Trichopoulos A, Katsoulis M, Trichopoulos D, Krogh V, Panico S, Sacerdote C, Palli D, Tumino R, Peeters PH, van Gils CH, Bueno-de-Mesquita B, Vrieling A, Lund E, Hjärtåker A, Agudo A, Suarez LR, Arriola L, Chirlaque MD, Ardanaz E, Sánchez MJ, Manjer J, Lindkvist B, Hallmans G, Palmqvist R, Allen N, Key T, Khaw KT, Slimani N, Rinaldi S, Romieu I, Boffetta P, Romaguera D, Norat T, Riboli E. Alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase gene polymorphisms, alcohol intake and the risk of colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition study. *Eur J Clin Nutr* 2012; 66: 1303-1308 [PMID: 23149980 DOI: 10.1038/ejcn.2012.173]

编辑 田滢 电编 鲁亚静



KLK10和HER-2/neu基因在结肠癌中的表达及临床意义

朱晓亮, 刘伟中, 饶雪峰, 袁 晟

■背景资料

人组织激肽释放酶10(kallikreins 10, KLK10)是一种分泌型丝氨酸蛋白酶, 起调节上皮细胞生长分化的作用。近年研究发现KLK10参与内分泌肿瘤的发生发展。人类表皮生长因子受体2(human epidermal receptor 2, HER-2)/neu基因属于表皮生长因子受体家族中的一员, 是一种原癌基因, 在许多恶性肿瘤中出现不同程度的表达。目前KLK10和HER-2/neu在肿瘤的发生发展中是否共同起作用研究少。

朱晓亮, 刘伟中, 饶雪峰, 袁晟, 江西省人民医院普外科 江西省南昌市 330006

朱晓亮, 主治医师, 主要从事普外科的相关研究。

作者贡献分布: 课题设计由朱晓亮与饶雪峰共同设计; 课题指导由刘伟中完成; 样本采集由袁晟完成; 研究过程由朱晓亮与饶雪峰共同操作完成; 试剂与分析工具由朱晓亮提供; 数据分析由朱晓亮与饶雪峰完成; 论文写作由朱晓亮与饶雪峰共同完成。

通讯作者: 饶雪峰, 副主任医师, 330006, 江西省南昌市爱国路92号, 江西省人民医院普外科。babyguo2008@163.com

收稿日期: 2013-09-11 修回日期: 2013-10-28

接受日期: 2013-11-19 在线出版日期: 2013-12-18

Clinical significance of KLK10 and HER-2/neu expression in colon cancer

Xiao-Liang Zhu, Wei-Zhong Liu, Xue-Feng Rao, Sheng Yuan

Xiao-Liang Zhu, Wei-Zhong Liu, Xue-Feng Rao, Sheng Yuan, Department of General Surgery, Jiangxi Provincial People's Hospital, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China

Correspondence to: Xue-Feng Rao, Associate Chief Physician, Department of General Surgery, Jiangxi Provincial People's Hospital, 92 Aiguo Road, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China. babyguo2008@163.com

Received: 2013-09-11 Revised: 2013-10-28

Accepted: 2013-11-19 Published online: 2013-12-18

Abstract

AIM: To investigate the clinical significance of kallikreins10 (KLK10) and human epidermal growth factor receptor 2 (HER-2/neu) in colon cancer and analyze the correlation of KLK10 and HER-2 expression with clinical and pathological parameters of colon cancer.

METHODS: Sixty-seven colon cancer specimens, 10 colorectal adenoma specimens and 10 normal colon tissue specimens were used in the study. Immunohistochemistry was used to detect KLK10 and HER-2/neu expression in these specimens. The correlation of KLK10 and HER-2/neu expression with clinical and pathological parameters of colon cancer was analyzed.

RESULTS: KLK10 and HER-2/neu expression levels were significantly higher in colon cancer than in colorectal adenoma specimens and normal

colon tissue specimens (all $P < 0.05$). KLK10 expression in colon cancer was correlated positively with TNM stage, degree of differentiation, lymph node metastasis (all $P < 0.05$), but not with age, sex, tumor size, pathological type, or distant metastasis (all $P > 0.05$). HER-2/neu expression in colon cancer was correlated positively with TNM stage and lymph node metastasis ($P < 0.05$), but not with age, sex, tumor size, pathological type, distant metastasis or differentiation degree (all $P > 0.05$). KLK10 expression was correlated positively with HER-2/neu expression in colon cancer ($r = 0.260$, $P < 0.05$).

CONCLUSION: KLK10 and HER-2/neu may play a critical role in the development, progression, metastasis and angiogenesis of colon cancer. KLK10 and HER-2/neu expression can be used as important prognostic factors for colon cancer.

© 2013 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

Key Words: Colon cancer; Kallikreins 10; Human epidermal receptor 2/neu; Oncogene

Zhu XL, Liu WZ, Rao XF, Yuan S. Clinical significance of KLK10 and HER-2/neu expression in colon cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(35): 4050-4055 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/4050.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v21.i35.4050>

摘要

目的: 分析人组织激肽释放酶10(kallikreins 10, KLK10)和人类表皮生长因子受体2(human epidermal receptor 2, HER-2)/neu与结肠癌临床病理之间的关系, 探讨其与结肠癌临床预后的关系和他们之间的相关性。

方法: 用MaxVision™免疫组织化学方法检测的67例结肠癌患者的病理标本, 10例结肠腺瘤组织以及10例正常结肠组织KLK10和HER-2/neu单/多克隆抗体在结肠癌、结肠腺瘤及正常结肠组织的表达情况, 并对其结果进行了统计学分析。

结果: KLK10和HER-2/neu在结肠癌的阳性率

■同行评议者

刘宝林, 教授, 中国医科大学附属盛京医院

分别均为62.7%(42/67), 56.7%(38/67); *KLK10*和*HER-2/neu*在结肠癌组织中的表达明显高于结肠腺瘤及正常结肠黏膜组织中的表达, 差异有显著性统计学意义($P<0.05$); 在结肠癌组织中*KLK10*表达与结肠癌的TNM分期、分化程度、淋巴结转移呈正相关($P<0.05$), 结肠癌组织中*KLK10*的表达与患者年龄、性别、肿瘤大小、病理分型、远处转移均无相关性($P>0.05$); 在结肠癌组织中*HER2*表达与结肠癌的TNM分期、淋巴结转移呈正相关($P<0.05$), 结肠癌组织中*HER2/neu*的表达与患者年龄、性别、肿瘤大小、病理分型、分化程度、远处转移均无相关性($P>0.05$); 在结肠癌组织中*KLK10*的表达与*HER-2/neu*的表达呈正相关($r=0.260, P<0.05$).

结论: 结肠癌组织中*KLK10*和*HER-2/neu*的阳性表达率明显高于结肠良性病变及正常结肠组织. 在结肠癌组织中*KLK10*表达和*HER-2/neu*表达呈正相关. *KLK10*和*HER-2/neu*表达在结肠癌的发生发展过程中以及淋巴结转移过程中起重要作用. 因此可以作为临床判定结肠癌预后的参考指标.

© 2013年版权归百世登出版集团有限公司所有.

关键词: 结肠癌; 人组织型激肽释放酶10; 人类表皮生长因子受体2; 癌基因

核心提示: 人组织激肽释放酶10(kallikreins 10)和人类表皮生长因子受体2(human epidermal receptor 2)/*neu*在结肠癌组织中的表达均升高, 他们具有正相关性, 在结肠癌的发生发展过程中起重要作用, 因此认为他们共同促进结肠癌浸润转移, 并可成为临床判定预后的良好指标.

朱晓亮, 刘伟中, 饶雪峰, 袁晟. *KLK10*和*HER-2/neu*基因在结肠癌中的表达及临床意义. 世界华人消化杂志 2013; 21(35): 4050-4055 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/4050.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v21.i35.4050>

0 引言

大肠癌是最常见的消化系恶性肿瘤之一, 据统计其发病率处于第2位^[1], 仅次于肺癌, 严重威胁人类的生命健康安全. 肿瘤的发生发展是多步骤、多层次、多基因参与以及多种转录因子调控的复杂过程. 涉及细胞的增殖、黏附、分化、运动、凋亡等多个环节因素. 人组织激肽释放酶10(kallikreins 10, *KLK10*)基因作为人组织型激肽释放酶家族成员之一, 他是一种分泌型丝氨酸蛋白酶, 具有胰岛素样的酶活性, 起

调节上皮细胞生长分化的作用. 近年研究发现*KLK10*参与内分泌肿瘤的发生发展^[2]. 人类表皮生长因子受体2(human epidermal receptor 2, *HER-2*)即*HER-2/neu*基因又名*c-erbB-2*基因, 属于表皮生长因子受体家族中的一员, 是一种原癌基因. *HER-2/neu*基因的扩增在许多恶性肿瘤中出现不同程度的表达, 尤其是上皮源性的肿瘤, 如乳腺癌、肺癌、卵巢癌、胃癌、结直肠癌等. 本研究通过免疫组织化学方法, 检测*KLK10*和*HER-2/neu*在结肠癌、结肠腺瘤、正常结肠组织中的表达和临床病理关系, 分析*KLK10*和*HER-2/neu*是否能成为判断结肠癌的新标志物以及两者在结肠癌中的相互作用.

1 材料和方法

1.1 材料 选用江西省人民医院2011-01/2013-01经病理确诊为结肠癌的病例组织(具有肿瘤原发病灶组织的蜡块标本), 所有病例均为第1次完整手术切除, 手术前未经过放疗、化疗等针对肿瘤的任何治疗且手术前后有完整的病案资料, 术后全程随访资料. 标本有67例年龄在21-93岁之间(平均年龄63.1岁), 其中年龄 >60 岁的有44例, ≤ 60 岁的有23例; 男性41例, 女性26例; 结肠癌多个病灶时, 肿瘤大小以最大肿瘤的最大直径衡量, 肿瘤直径 >5 cm组26例, 直径 ≤ 5 cm组41例; 管状腺癌57例, 黏液腺癌10例; 分化程度高分化7例, 中分化50例, 低分化10例; TNM分期 I 期13例, II 期25例, III期20例, IV期9例; 有淋巴结转移25例, 无淋巴结转移42例; 有远处转移(肝转移2例, 网膜转移2例, 腹膜转移2例, 输尿管转移1例, 膀胱转移1例, 子宫转移1例)9例, 无远处转移58例. 符合以上条件的67例结肠癌标本作为实验组; 同时取同期10例结肠腺瘤(取自结肠腺瘤切除术)和10例正常结肠组织(取自结肠外伤手术组织)作为对照组. 一抗兔抗人*KLK10*多克隆抗体(美国Santa Cruz Biotechnology公司); 一抗兔抗人*HER-2/neu*单克隆抗体(福州迈新生物技术有限公司); 浓缩型MaxvisionTM试剂盒(福州迈新生物技术有限公司); 抗原修复方法采用高温高压柠檬酸盐缓冲液煮沸法. 一抗浓度1:200, 免疫组织化学采用MaxvisionTM/HRP法检测*KLK10*和*HER-2/neu*在结肠癌中的表达情况. PBS缓冲液替代一抗作为阴性对照. 以美国Santa Cruz Biotechnology公司的标准阳性片脑癌标本和福州迈新生物技术有限公司的标准阳性片乳腺癌标本作为阳性对照.

■研究前沿 肿瘤的发生发展是多步骤、多层次、多基因参与的复杂过程, 涉及细胞的增殖、黏附、分化、运动、凋亡等多个环节因素; 目前国内外对肿瘤的肿瘤效果欠佳; 本项目分析*KLK10*和*HER-2/neu*与结肠癌临床病理之间的关系, 探讨其与结肠癌临床预后的关系和他们之间的相关性, 为肿瘤的进一步研究提供理论基础.

■相关报道

研究发现KLK10在一些恶性肿瘤组织中出现高表达或低表达,尤其是一些内分泌肿瘤,但致癌机制尚不明确。*HER-2/neu*基因的扩增在许多恶性肿瘤中出现不同程度的表达,尤其是上皮源性的肿瘤,如乳腺癌、肺癌、卵巢癌、胃癌、结肠直肠癌等,但他们是否具有正相关性尚未见研究。

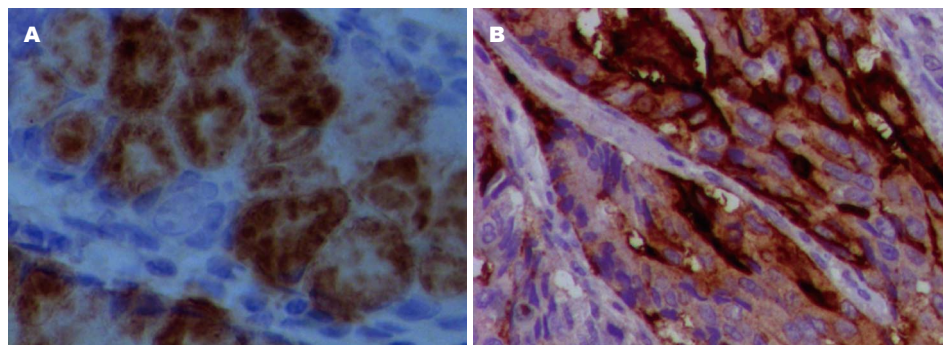


图1 结肠癌中KLK10和HER-2/neu免疫组织化学(染色强阳性×400)。A: KLK10; B: HER-2/neu。KLK10: 人组织激肽释放酶10; HER-2: 人类表皮生长因子受体2。

表1 KLK10及HER-2/neu在结肠癌、结肠息肉、正常结肠组织中的表达

分组	n	KLK10				HER-2/neu			
		-	+	阳性率(%)	P值	-	+	阳性率(%)	P值
结肠癌	67	25	42	62.7	<0.05	29	38	56.7	<0.05
结肠息肉	10	8	2	20.0		9	1	10.0	
正常肠细胞	10	9	1	10.0		10	0	0.0	

KLK10: 人组织激肽释放酶10; HER-2: 人类表皮生长因子受体2。

1.2 方法 KLK10的表达位于细胞浆内, HER2/neu的表达位于细胞膜上。KLK10和HER2/neu的阳性染色表达均为大小不一的黄色或棕黄色颗粒。综合考虑切片中阳性细胞占所观察同类细胞的百分比和阳性细胞着色强度两项指标来判定结果。根据阳性细胞比评分+染色评分得出总分, 每例随机选择10个高倍视野(×400), (1)根据显色程度判断阳性强度: 标本无色为0分; 淡黄色为1分; 棕黄色为2分; 棕黑色为3分; (2)根据阳性细胞占观察细胞的比例分为: 阳性细胞数≤10%为1分; 11%-50%为2分; 51%-75%为3分; >75%为4分。两项分数之和: <2分为阴性(-); 2-3分为弱阳性(+); 4-5分为中度阳性(++); 6-7分为强阳性(+++)。在双盲的情况下由2名病理科副主任医师对每张切片行全面观察。

统计学处理 采用SPSS17.0统计软件处理实验数据。计数资料采用 χ^2 检验, 相关性检验用Spearman等级相关法, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 KLK10和HER2/neu在结肠癌、结肠息肉、正常结肠组织中的表达 KLK10的蛋白阳性产物主要表达于细胞浆(图1A), 而HER2/neu的蛋白阳性产物主要表达于细胞膜(图1B)。67例结肠癌组织中KLK10的阳性表达42例, 阳性率62.7%;

10例结肠息肉组织中KLK10的阳性表达2例, 阳性率20%; 10例正常结肠组织中KLK10的阳性表达1例, 阳性率10%。67例结肠癌组织中HER2/neu的阳性表达38例, 阳性率56.7%; 10例结肠息肉组织中HER2/neu的阳性表达1例, 阳性率10%; 10例正常结肠组织中无HER2/neu的阳性表达。KLK10和HER2/neu在结肠癌组织中的表达率比在结肠息肉及正常结肠组织中明显高, 有显著差异(χ^2 分别为14.227和16.858, $P<0.05$)(表1)。

2.2 KLK10和HER2/neu表达与结肠癌临床病理参数之间关系 结肠癌组织中KLK10的表达与患者年龄、性别、肿瘤大小、病理分型、远处转移均无相关性($P>0.05$), 而与结肠癌的TNM分期、分化程度、淋巴结转移呈正相关($P<0.05$)。TNM分期越晚、分化程度越低、淋巴结转移越多的患者KLK10的表达均强。结肠癌组织中HER2/neu的表达与患者年龄、性别、肿瘤大小、病理分型、分化程度、远处转移均无相关性($P>0.05$)。而与结肠癌的TNM分期、淋巴结转移呈正相关($P<0.05$)。TNM分期越晚、淋巴结转移越多的患者HER-2/neu的表达均强(表2)。

2.3 结肠癌中KLK10和HER2/neu表达的相关性 在结肠癌组织中KLK10和HER2/neu的表达关系密切, 42例KLK10表达阳性结肠癌组中有28例HER2/neu表达阳性; 25例KLK10表达阴性结肠

表 2 *KLK10*及*HER-2/neu*的表达与临床病理参数的关系

参数	<i>n</i>	<i>KLK10</i>				<i>HER-2/neu</i>			
		-	+	阳性率(%)	<i>P</i> 值	-	+	阳性率(%)	<i>P</i> 值
性别					>0.05				>0.05
男	41	16	25	60.9		17	24	58.5	
女	26	9	17	65.4		12	14	53.8	
年龄(岁)					>0.05				>0.05
>60	44	17	27	61.4		16	28	63.6	
≤60	23	8	15	65.2		13	10	43.5	
病理分型					>0.05				>0.05
管状腺癌	57	23	34	59.6		25	32	56.1	
黏液腺癌	10	2	8	80		4	6	60.0	
肿瘤大小(cm)					>0.05				>0.05
>5	26	6	20	76.9		8	18	69.2	
≤5	41	19	22	53.7		21	20	48.8	
分化程度					<0.05				>0.05
高	7	6	1	14.3		5	2	28.6	
中	50	17	33	66.0		20	30	60.0	
低	10	2	8	80		4	6	60.0	
TNM分期					<0.05				<0.05
I	13	10	3	23.1		10	3	23.1	
II	25	10	15	60.0		13	12	48.0	
III	20	4	16	80.0		3	17	85.0	
IV	9	1	8	88.9		3	6	66.7	
淋巴结转移					<0.05				<0.05
有	25	4	21	84.0		3	22	88.0	
无	42	21	21	50.0		26	16	38.1	
远处转移					>0.05				>0.05
有	9	1	8	88.9		3	6	66.7	
无	58	24	34	58.6		26	32	55.2	

KLK10: 人组织激肽释放酶10; *HER-2*: 人类表皮生长因子受体2.

表 3 *KLK10*及*HER-2/neu*基因表达的相关性

<i>KLK10</i>	<i>n</i>	<i>HER2/neu</i>		等级相关系数(<i>r</i>)	<i>P</i> 值
		+	-		
+	42	28	14	0.260	<0.05
-	25	10	15		
合计	67	38	29		

KLK10: 人组织激肽释放酶10; *HER-2*: 人类表皮生长因子受体2.

癌组中有15例*HER2/neu*表达阴性; 经Spearman等级相关分析, 等级相关系数 $r = 0.260$, $P < 0.05$, *KLK10*和*HER2/neu*呈明显正相关(表3).

3 讨论

*KLK10*又名正常上皮细胞特异性-1基因(normal epithelial cell specific-1, *NES1*)定位于人类

■创新盘点

本研究探讨*KLK10*和*HER2/neu*在结肠癌组织中表达相关性, 认为他们可以通过激活基质金属蛋白酶从而降解细胞外基质, 两者可能在结肠癌发生发展中起协同作用, 可共同促进肿瘤的生长侵袭过程.

19q13.3染色体, 长约5.5 kb, 由6个外显子(其中一个未被翻译)和5个内含子组成. 编码一个分泌型丝氨酸蛋白酶(h*KLK10*), 包含276个氨基酸, 分子量约30 kDa. *KLK10*基因是一种分泌型丝氨酸蛋白酶, 具有胰岛素样的酶活性, 起调节上皮细胞生长分化的作用. *KLK10*广泛存在于组织细胞中尤其是腺上皮细胞如: 乳腺、前列腺、睾丸、卵巢、子宫内膜、胃肠道、支气管等, 无组织特异性^[3]. 研究发现*KLK10*基因除了在正常组织中高表达外, 还在一些恶性肿瘤组织中出现高表达或低表达, 尤其是一些内分泌肿瘤, 但致癌机制尚不明确. *KLK10*在肝癌、胃癌、乳腺癌、前列腺癌、睾丸癌、非小细胞肺癌等低表达^[4-8], 在卵巢癌、子宫浆液性乳头状癌、胰腺癌、口腔鳞状细胞癌中高表达^[9,10]. *KLK10*基因受雌二醇等类固醇激素的调

■应用要点

KLK10和HER-2/neu在结肠癌组织中的表达均升高,他们具有正相关性,在结肠癌的发生发展过程中起重要作用,因此认为他们共同促进结肠癌浸润转移,并可成为临床判定预后的良好指标,为肿瘤的进一步研究提供新的理论基础。

节,是内分泌相关肿瘤诊断与预后评价的标志物^[11]。近年来的研究发现KLK10基因在消化系统肿瘤中表达异常,尤其是在结直肠癌和胃癌中。Petraki等^[12]发现KLK10在结肠癌组织细胞中高表达,与分化程度、临床分期、肝转移密切相关, KLK10阳性表达患者的无瘤生存期和总生存期均低于KLK10阴性表达患者, KLK10是一个独立的结肠癌预后指标。本实验结果显示: 67例结肠癌组织中KLK10的阳性表达42例,阳性率62.7%; KLK10在结肠癌组织中表达率较正常结肠组织及结肠良性病变组织中高, TNM分期越晚、分化程度越低、淋巴结转移越多的患者KLK10的表达均强($P<0.05$)。KLK10的表达与患者年龄、性别、肿瘤大小、病理分型、远处转移均无相关性($P>0.05$); 与Petraki等^[12]研究不同的是KLK10的表达与远处转移无相关性,这可能是本研究中的远处转移标本少的原因; 本研究结果提示KLK10的过表达可能是结肠癌发生发展的重要因素, KLK10可以作为结肠癌基因治疗的新靶点, 这与Maroulis等^[13]研究结果基本一致。

HER-2/neu基因是一种原癌基因,属于表皮生长因子受体家族中的一员。定位于17q11-21,编码的蛋白产物由1255个氨基酸组成,属I型跨膜受体酪氨酸激酶。正常组织中HER-2/neu基因处于非激活状态可调节细胞的增殖、分化,当受到体内外各种致癌因素激活后HER-2/neu基因的扩增和过度表达因而参与肿瘤转移形成等过程^[14]。HER-2/neu基因的扩增在许多恶性肿瘤中出现不同程度的表达,尤其是上皮源性的肿瘤,如乳腺癌、肺癌、卵巢癌、胃癌、结直肠癌等^[15]。本研究结果显示: 结肠癌组织中HER2/neu的阳性表达38例,阳性率56.7%,显著高于正常结肠组织及结肠良性病变组织。结肠癌组织中HER-2/neu的表达与患者年龄、性别、肿瘤大小、病理分型、远处转移、分化程度均无相关性($P>0.05$)。而HER-2/neu表达与结肠癌的TNM分期有相关性,分期越晚其表达率越高,结肠癌组织中的HER-2/neu表达与结肠癌淋巴结转移有相关性,有淋巴结转移的表达率高,差异有显著性意义($P<0.05$),提示HER-2/neu的过表达亦可能是结肠癌发生发展的重要因素,可作为临床预后判断指标。

KLK10在肿瘤侵袭转移过程中机制尚不明确,可能机制有诱导细胞外基质降解(如IV/XII胶原和层粘蛋白等)和促进肿瘤细胞增殖和血管的

形成(水解激活微环境中生长因子如转录生长因子- β 等)。Yousef等^[16]发现激肽释放酶、丝氨酸蛋白酶参与降解细胞外基质蛋白,包括胶原蛋白、层粘连蛋白、纤维蛋白原等。丝氨酸蛋白酶系统中尿激酶型纤溶酶原激活物及其受体,可通过激活基质金属蛋白酶参与细胞外基质降解,是肿瘤细胞外基质降解的经典模式。KLK10可通过激活此经典模式中的成员促进肿瘤转移。HER2/neu在肿瘤侵袭转移过程中的机制研究较为清晰。通过Ras/MAPK途径加速白明胶酶的增殖,从而降解基底膜的IV型胶原,使肿瘤细胞易于转移。本研究结果显示KLK10和HER2/neu在结肠癌组织中表达经Spearman等级相关分析,等级相关系数 $r = 0.260$, $P<0.05$,呈正相关性。由于KLK10和HER2/neu均可以通过激活基质金属蛋白酶从而降解细胞外基质,故推测两者可能在结肠癌发生发展中起协同作用,可共同促进肿瘤的生长侵袭过程。

总之, KLK10和HER-2/neu在结肠癌组织中的表达明显高于结肠良性肿瘤和正常结肠组织,且他们具有正相关性,他们在结肠癌的发生发展过程中起重要作用,因此认为他们共同促进结肠癌浸润转移,并可成为临床判定预后的良好指标, 本研究将为结肠癌的诊治进一步研究提供新的理论依据。

4 参考文献

- 1 Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011; 61: 69-90 [PMID: 21296855 DOI: 10.3322/caac.20107]
- 2 El Sherbini MA, Sallam MM, Shaban EA, El-Shalakany AH. Diagnostic value of serum kallikrein-related peptidases 6 and 10 versus CA125 in ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2011; 21: 625-632 [PMID: 21412167 DOI: 10.1097/IGC.0b013e31821283c3]
- 3 Petraki CD, Karavana VN, Luo LY, Diamandis EP. Human kallikrein 10 expression in normal tissues by immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem* 2002; 50: 1247-1261 [PMID: 12185203]
- 4 Huang W, Tian XL, Wu YL, Zhong J, Yu LF, Hu SP, Li B. Suppression of gastric cancer growth by baculovirus vector-mediated transfer of normal epithelial cell specific-1 gene. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 5810-5815 [PMID: 18855978]
- 5 胡胜平, 李彪, 张一帆, 张敏. 乳腺癌裸鼠移植瘤NES1基因去甲基化治疗. *上海交通大学学报(医学版)* 2007; 27: 72-75
- 6 田相龙, 钟捷, 李彪, 黄玮, 张一帆, 王俊, 顾燕云. 5'-杂氮-2'-脱氧胞苷对人胃癌裸鼠移植瘤的抑瘤作用. *上海交通大学学报(医学版)* 2007; 27: 533-536
- 7 Lu CY, Hsieh SY, Lu YJ, Wu CS, Chen LC, Lo SJ, Wu CT, Chou MY, Huang TH, Chang YS. Aberrant DNA methylation profile and frequent methylation of KLK10 and OXGR1 genes in hepatocellular carcinoma.

- noma. *Genes Chromosomes Cancer* 2009; 48: 1057-1068 [PMID: 19760608 DOI: 10.1002/gcc.20708]
- 8 曹虹, 饶雪峰, 邹霞, 廖传文, 陈晓亮. NES1基因在肝细胞肝癌中的表达及临床意义. *江西医药杂志* 2012; 47: 298-300
- 9 Shvartsman HS, Lu KH, Lee J, Lillie J, Deavers MT, Clifford S, Wolf JK, Mills GB, Bast RC, Gershenson DM, Schmandt R. Overexpression of kallikrein 10 in epithelial ovarian carcinomas. *Gynecol Oncol* 2003; 90: 44-50 [PMID: 12821340]
- 10 Zhang Y, Song H, Miao Y, Wang R, Chen L. Frequent transcriptional inactivation of Kallikrein 10 gene by CpG island hypermethylation in non-small cell lung cancer. *Cancer Sci* 2010; 101: 934-940 [PMID: 20180809 DOI: 10.1111/j.1349-7006.2009.01486.x]
- 11 Yousef GM, Yacoub GM, Polymeris ME, Popalis C, Soosaipillai A, Diamandis EP. Kallikrein gene downregulation in breast cancer. *Br J Cancer* 2004; 90: 167-172 [PMID: 14710225]
- 12 Petraki C, Youssef YM, Dubinski W, Lichner Z, Scorilas A, Pasic MD, Komborozos V, Khalil B, Streutker C, Diamandis EP, Yousef GM. Evaluation and prognostic significance of human tissue kallikrein-related peptidase 10 (KLK10) in colorectal cancer. *Tumour Biol* 2012; 33: 1209-1214 [PMID: 22437349 DOI: 10.1007/s13277-012-0368-5]
- 13 Talieri M, Alexopoulou DK, Scorilas A, Kypraios D, Arnogiannaki N, Devetzi M, Patsavela M, Xynopoulos D. Expression analysis and clinical evaluation of kallikrein-related peptidase 10 (KLK10) in colorectal cancer. *Tumour Biol* 2011; 32: 737-744 [PMID: 21487810 DOI: 10.1007/s13277-011-0175-4]
- 14 罗荣城, 韩焕兴. 肿瘤生物治疗学. 北京: 北京人民出版社, 2006: 857-859
- 15 张恒明, 孙振柱, 孔艳青, 王玉环. TEN, Her-2和Glut-1在子宫内膜上皮类瘤变和癌中的表达及意义. *新疆医科大学学报* 2011; 34: 142-146
- 16 Yousef GM, Diamandis EP. The human kallikrein gene family: new biomarkers for ovarian cancer. *Cancer Treat Res* 2009; 149: 165-187 [PMID: 19763436 DOI: 10.1007/978-0-387-98094-2_8]

■同行评价

本文设计合理, 结果可信, 对结肠癌的研究及临床实践有一定的指导意义。

编辑 田滢 电编 鲁亚静



ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) DOI: 10.11569 2013年版权归Baishideng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.

内镜下支架置入联合新辅助化疗治疗结直肠癌恶性梗阻

吴洁, 荣大庆, 柳青峰, 耿宣, 张志强, 董齐, 王燕庆

■背景资料

急性肠梗阻中85%的低位梗阻是由结直肠癌引起, 对于恶性肠梗阻传统常需急诊手术治疗, 由于患者常伴有脱水、电解质紊乱、肠黏膜损伤、腹腔高压, 因此急诊手术风险巨大, 死亡率高达12%, 实施永久的结肠造口术患者也高达40%。

吴洁, 荣大庆, 柳青峰, 耿宣, 张志强, 董齐, 王燕庆, 辽宁省人民医院普外一科 辽宁省沈阳市 110016

吴洁, 副主任医师, 主要从事结直肠癌的研究。

沈阳市科技计划基金资助项目, No. F12-193-9-25

作者贡献分布: 此课题由吴洁、张志强及柳青峰设计; 手术实施和资料采集分析由吴洁、张志强、耿宣、荣大庆及王燕庆操作完成; 论文写作由吴洁、柳青峰及董齐完成。

通讯作者: 柳青峰, 主任医师, 110016, 辽宁省沈阳市沈河区文艺路33号, 辽宁省人民医院普外科。lnsrmyy@sina.com
电话: 024-24016710

收稿日期: 2013-08-29 修回日期: 2013-09-24

接受日期: 2013-11-06 在线出版日期: 2013-12-18

Endoscopic stenting combined with neoadjuvant chemotherapy for treatment of malignant colorectal obstruction

Jie Wu, Da-Qing Rong, Qing-Feng Liu, Xuan Geng, Zhi-Qiang Zhang, Qi Dong, Yan-Qing Wang

Jie Wu, Da-Qing Rong, Qing-Feng Liu, Xuan Geng, Zhi-Qiang Zhang, Qi Dong, Yan-Qing Wang, Department of General Surgery, People's Hospital of Liaoning Province, Shenyang 110016, Liaoning Province, China
Supported by: the Science and Technology Project of Shenyang City, No. F12-193-9-25

Correspondence to: Qing-Feng Liu, Chief Physician, Department of General Surgery, People's Hospital of Liaoning Province, 33 Wenyi Road, Shenhe District, Shenyang 110016, Liaoning Province, China. lnsrmyy@sina.com
Received: 2013-08-29 Revised: 2013-09-24
Accepted: 2013-11-06 Published online: 2013-12-18

Abstract

AIM: To investigate the clinical effect of endoscopic stenting combined with neoadjuvant chemotherapy in the treatment of malignant colorectal obstruction.

METHODS: A retrospective analysis of 75 malignant colorectal obstruction patients who were treated at Liaoning Provincial People's Hospital between 2003 and 2008 was performed. The patients were divided into three groups, a control group ($n = 30$) treated using traditional methods, a stent placement group ($n = 30$) treated using self-expanding metal stents, and a stent placement plus chemotherapy group ($n = 15$) treated using self-expanding metal stents in combina-

tion with neoadjuvant chemotherapy.

RESULTS: The percentage of surgical patients undergoing colostomy was significantly higher in the control group than in the stent placement group and the stent placement plus chemotherapy group (62.5% vs 30.0%, 25.0%, $\chi^2 = 4.619, 4.500$, both $P < 0.05$). The tumor resection rate was significantly lower in the control group than in the stent placement group and the stent placement plus chemotherapy group (37.5% vs 70.0%, 75.0%, $\chi^2 = 4.619, 4.500$, both $P < 0.05$). The radical surgery rate was significantly higher in the stent placement plus chemotherapy than in the control group (41.7% vs 12.5%, $\chi^2 = 3.938$, $P < 0.05$), but showed no significant difference between the control group and stent placement group ($\chi^2 = 0.059$, $P > 0.05$). The five-year survival rate was significantly higher in the stent placement plus chemotherapy group than in the control group (26.7% vs 3.3%, $\chi^2 = 5.513$, $P < 0.05$), but showed no significant difference between the control group and stent placement group ($\chi^2 = 1.071$, $P > 0.05$).

CONCLUSION: Endoscopic stenting combined with neoadjuvant chemotherapy can effectively improve tumor resection rate and radical surgery rate and prolong survival time in patients with advanced colorectal cancer.

© 2013 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

Key Words: Endoscopic Stenting; Neoadjuvant chemotherapy; Malignant colorectal obstruction

Wu J, Rong DQ, Liu QF, Geng X, Zhang ZQ, Dong Q, Wang YQ. Endoscopic stenting combined with neoadjuvant chemotherapy for treatment of malignant colorectal obstruction. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(35): 4056-4059 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/4056.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i35.4056>

摘要

目的: 探讨内镜下支架置入联合新辅助化疗治疗结直肠癌恶性梗阻的临床效果。

■同行评议者

杜群, 副研究员, 广州中医药大学脾胃研究所药理室

方法: 回顾分析辽宁省人民医院普外科2003-2008年收治的结直肠癌恶性肠梗阻患者75例, 按治疗方案将患者分为对照组($n = 30$), 采用传统方法治疗; 支架组($n = 30$), 采用自膨式金属支架治疗; 支架化疗组($n = 15$)采用自膨式金属支架联合新辅助化疗治疗。

结果: 在手术治疗的患者中, 对照组实施结肠造瘘率高达62.5%, 明显高于支架组30.0%($\chi^2 = 4.619, P < 0.05$)及支架化疗组25.0%($\chi^2 = 4.500, P < 0.05$); 对照组肿瘤切除率达37.5%, 明显低于支架组70.0%($\chi^2 = 4.619, P < 0.05$)及支架化疗组75.0%($\chi^2 = 4.500, P < 0.05$); 其中实施根治性手术的患者中, 支架化疗组高达41.7%, 明显高于对照组12.5%($\chi^2 = 3.938, P < 0.05$), 对照组与支架组根治手术切除率比较无统计学意义($\chi^2 = 0.059, P > 0.05$); 支架化疗组5年生存率达26.7%, 明显高于对照组3.3%($\chi^2 = 5.513, P < 0.05$), 对照组与支架组比较无统计学意义($\chi^2 = 1.071, P > 0.05$)。

结论: 内镜下金属支架置入联合新辅助化疗可以有效地提高晚期结直肠癌的手术切除率、根治率, 延长生存时间, 值得临床推广。

© 2013年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词: 支架置入; 新辅助化疗; 恶性肠梗阻

核心提示: 支架置入为恶性肠梗阻患者争取了宝贵治疗筹备时间, 而新辅助化疗则使部分不可切除肿瘤变为可切除肿瘤, 明显提高了肿瘤切除率及根治率、降低了肠造瘘率, 5年生存率显著提高, 为结直肠癌恶性肠梗阻患者提供了新的治疗途径。

吴洁, 荣大庆, 柳青峰, 耿宣, 张志强, 董齐, 王燕庆. 内镜下支架置入联合新辅助化疗治疗结直肠癌恶性梗阻. 世界华人消化杂志 2013; 21(35): 4056-4059 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/4056.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i35.4056>

0 引言

急性肠梗阻(acute ileus)是外科常见的急腹症, 85%的低位梗阻是由结直肠癌(colorectal cancer)引起, 而15%-20%的结直肠癌患者是在治疗肠梗阻的过程中发现的。对于恶性肠梗阻(malignant intestinal obstruction)传统常需急诊手术治疗, 由于患者常伴有脱水、电解质紊乱、肠黏膜损伤、腹腔高压, 因此急诊手术风险巨大, 死亡率高达12%(择期手术死亡率约3.5%), 实施永

久的结肠造口术患者也高达40%^[1,2]。

1991年Tirosh等^[3]和Cirocchi等^[4]首先报道了使用金属支架作为直肠癌的姑息治疗手段并获得满意的疗效。支架置入操作简便, 患者耐受性好, 肠梗阻症状能够迅速改善, 且能有效地提高肠吻合率、降低吻合口瘘发生率。随着内镜的发展, 支架置入成为了治疗恶性肠梗阻的重要手段。

然而支架介入只是一种姑息治疗方法, 并不能提高手术切除率、降低肝转移发生率, 也不能延长患者生存时间^[5]。我院通过内镜下支架置入联合新辅助化疗(neoadjuvant chemotherapy)治疗结直肠癌恶性梗阻取得了良好的疗效, 现报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料 回顾分析辽宁省人民医院普外科2003-2008年收治的结直肠癌恶性肠梗阻患者75例, 按治疗方案将患者分为对照组、支架组、支架化疗组。病例选择标准: 有腹痛、腹胀等肠梗阻症状, 肠镜活检病理诊断为结直肠癌, 临床分型在IIIB以上。排除标准: 患者病情严重不能耐受结肠镜检查者, 包括严重心脑血管疾患、急腹症、生命体征不平稳等; 神志异常不能配合检查者, 有结肠镜禁忌症者。

电子内镜: 富士400电子十二指肠镜系统, 德国西门子公司医用X射线系统, 美国bostorn公司生产的镍钛金属肠道支架、黄斑马导丝。

1.2 方法 对照组($n = 30$): 男20例, 女10例。年龄46-78岁, 65.2 ± 8.6 岁, 所有患者入院后给予胃肠减压, 灌肠导泻等非手术治疗, 如肠道通畅, 则按病情择期手术或行化疗、支持治疗; 如肠梗阻无缓解则急诊手术行开腹肿瘤切除或肠造瘘术。支架组($n = 30$): 男16例, 女14例。年龄54-80岁, 68.5 ± 10.2 岁, 所有患者入院确诊后均行结肠镜下内支架置入术: 结肠镜到达病变部位后, 在X线引导下将导丝放置到狭窄近端, 注入造影剂观察狭窄程度及长度, 选择支架, 在内镜直视和X线引导下将自膨式金属支架(self expanding metallic stent, SEMS)释放于狭窄部位, 两端超过病变部位2 cm左右。支架置入后如肠道通畅, 则按病情择期手术或行化疗、支持治疗; 如肠梗阻无缓解则急诊手术行开腹肿瘤切除或肠造瘘术。支架化疗组($n = 15$): 男9例, 女6例。年龄52-74岁, 67.8 ± 12.5 岁, 所有患者入院确诊后均行结肠镜下内支架置入术(方法同上);

■ 研发前沿

近年来研究较多的肝细胞材料为猪肝细胞和肿瘤源性肝细胞株(C3A、HepG2等), 但动物肝细胞存在发生免疫反应及传播动物源性病毒的危险, 肿瘤源性肝细胞株分化程度低、生物学功能低下且在临床应用中存在细胞逃逸进入患者体内引起肿瘤的危险, 限制了临床的广泛应用。

■ 相关报道

NCCN指南2011版指出,转移性结直肠癌确诊时大多数属于不可切除。然而,对那些转移瘤仅局限于肝脏并且累及重要结构而不可切除患者,越来越倾向于考虑尝试使用术前化疗来缩小转移瘤体积以便尝试将其转化为可切除。

表 1 3组患者治疗方式及生存率分析 n(%)

分组	n	平均年龄(岁)	未手术	手术	手术治疗方式			5年生存例数
					结肠造瘘	局部切除	根治切除	
对照组	30	65.2 ± 8.6	6(20.0)	24(80.0)	15(62.5)	6(25.0)	3(12.5)	1(3.3)
支架组	30	68.5 ± 10.2	10(33.3)	20(66.7)	6(30.0)	11(55.0)	3(15)	3(10.0)
支架化疗组	15	67.8 ± 12.5	3(20.0)	12(80.0)	3(25.0)	4(33.3)	5(41.7)	4(26.7)

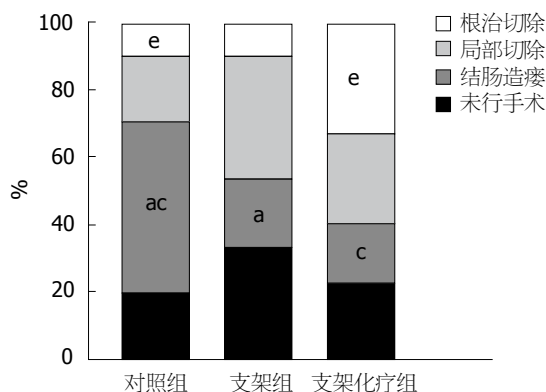


图 1 3组患者治疗方式分析柱状图. $\chi^2 = 4.619$, $P < 0.05$; $\chi^2 = 4.500$, $P < 0.05$; $\chi^2 = 3.938$, $P < 0.05$ vs 对照组.

如肠梗阻无缓解则急诊手术行开腹肿瘤切除或肠造瘘术;如支架置入肠梗阻症状缓解,给予mFOLFOX6方案新辅助化疗. mFOLFOX6方案:奥沙利铂85 mg/m²静脉滴注2 h,第1天;LV400 mg/m²静脉滴注2 h,第1天;5-FU mg/m²静脉推注,第1天,然后1200 mg/(m²·d)×2 d持续静脉滴注(总量2400 mg/m²,滴注46-48 h)每2 wk重复.新辅助化疗患者每月综合评估,如不可切除肿瘤变为可切除肿瘤,则择期行开腹手术切除肿瘤及转移灶^[6-8].

统计学处理 所有数据均以mean±SD表示,采用 χ^2 检验分析方法,经SPSS13.0统计分析软件对数据进行处理. $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义.

2 结果

恶性肠梗阻患者由于肿瘤的不断进展,通过非手术治疗使肠道再通畅的几率较低,常需手术治疗;本实验对照组20%患者行非手术治疗,80%急诊行手术治疗(表1).

在手术治疗的患者中,对照组实施结肠造瘘率高达62.5%,明显高于支架组30.0%($\chi^2 = 4.619$, $P < 0.05$)及支架化疗组25.0%($\chi^2 = 4.500$, $P < 0.05$);对照组肿瘤切除率达37.5%,明显低于支架组70.0%($\chi^2 = 4.619$, $P < 0.05$)及支架化疗组75.0%($\chi^2 = 4.500$, $P < 0.05$);其中实施根治性手术

的患者中,支架化疗组高达41.7%,明显高于对照组12.5%($\chi^2 = 3.938$, $P < 0.05$),对照组与支架组根治手术切除率比较无统计学意义($\chi^2 = 0.059$, $P > 0.05$);支架化疗组5年生存率达26.7%,明显高于对照组3.3%($\chi^2 = 5.513$, $P < 0.05$),对照组与支架组比较无统计学意义($\chi^2 = 1.071$, $P > 0.05$), (表1,图1).

3 讨论

15%-20%的结直肠癌患者会发生恶性肠梗阻,且当患者于急诊就诊时往往身体状况较差,有研究表明,梗阻是一个重要的、独立的不良预后因素,可导致急诊手术的切除率低,肠造口率高,死亡率则高达12%.目前利用SEMS替代恶性肠梗阻急诊手术正在被广泛接受,并逐渐成为第一线的姑息性治疗方案.这种无开腹创伤、低操作风险的方法能有效地缓解梗阻症状,为那些有潜在可治愈的患者提供了术前充分评估、准备、支持的时间^[9,10].

支架置入对恶性肠梗阻的早期治疗效果是毋庸置疑的,但对其是否会损害危重患者的免疫系统、增加并发症的风险、增加可治愈肿瘤扩散的危险性等方面还存在争议;且支架置入虽降低了肠造口率、吻合口瘘发生率、改善了生存质量,但其对于肿瘤的切除率、肝转移发生率、患者的生存时间并没有显著的改善^[11],本实验也证实,对照组与支架组比较,手术根治率及5年生存率无统计学意义($P > 0.05$).

发生恶性肠梗阻的结直肠癌患者绝大部分都是肿瘤晚期,局部浸润及肝转移发生率较高,而手术切除肿瘤是延长患者生存时间最有效的办法,行根治性手术的患者5年生存率为25%-40%,未行手术切除或不可切除的患者5年生存率仅为2%-8%,但适合手术切除的患者仅占10%-20%.近年来国际上开始出现并提倡新辅助化疗来降低肿瘤的临床分期,使一些不能切除的病症变为可能,有研究表明新辅助化疗可使晚期结直肠癌切除率提高到30%^[12,13].

NCCN指南2011版指出, 转移性结直肠癌确诊时大多数属于不可切除。然而, 对那些转移瘤仅局限于肝脏并且累及重要结构而不可切除患者, 越来越倾向于考虑尝试使用术前化疗来缩小转移瘤体积以便尝试将其转化为可切除。

术前化疗相对于术后化疗的潜在优点还包括: 及早治疗微小转移灶; 判断肿瘤对化疗的反应, 有助于制定术后治疗计划; 对那些早期进展的患者可以避免局部治疗。

我们对结直肠癌恶性肠梗阻的患者, 置入支架后给予FOLFOX方案新辅助化疗, 取得了良好的临床效果。支架组及支架化疗组实施结肠造瘘率明显低于对照组、肿瘤切除率明显高于对照组; 支架化疗组实施根治性手术的患者达41.7%明显高于对照组($P<0.05$)、5年生存率达26.7%, 也明显高于对照组($P<0.05$)。

支架置入为恶性肠梗阻患者争取了宝贵治疗筹备时间, 而新辅助化疗则使部分不可切除肿瘤变为可切除肿瘤, 提高了患者的生存率。随着结直肠癌发病率逐步提高, 新的治疗方法不断出现, 支架置入联合新辅助化疗为结直肠癌恶性肠梗阻患者提供了新的治疗途径, 而治疗前评估, 如何减轻化疗不良反应及新辅助化疗后的手术时间上还需要进一步的研究^[14,15]。

4 参考文献

- 1 Jiménez-Pérez J, Casellas J, García-Cano J, Vandervoort J, García-Escribano OR, Barcenilla J, Delgado AA, Goldberg P, Gonzalez-Huix F, Vázquez-Astray E, Meisner S. Colonic stenting as a bridge to surgery in malignant large-bowel obstruction: a report from two large multinational registries. *Am J Gastroenterol* 2011; 106: 2174-2180 [PMID: 22085816 DOI: 10.1038/ajg.2011.360]
- 2 Bonfante P, D'Ambra L, Berti S, Falco E, Cristoni MV, Briglia R. Managing acute colorectal obstruction by "bridge stenting" to laparoscopic surgery: Our experience. *World J Gastrointest Surg* 2012; 4: 289-295 [PMID: 23493809 DOI: 10.4240/wjgs.v4.i12.289]
- 3 Tirosh D, Perry Z, Walfisch S, Rozental A, Fich A, Krugliak P, Mizrahi S, Kirshtein B. Endoscopic self-expanding metal stents for acute colonic obstruction. *Am Surg* 2013; 79: 30-34 [PMID: 23317598]
- 4 Cirocchi R, Farinella E, Trastulli S, Desiderio J, Listorti C, Boselli C, Parisi A, Noya G, Sagar J. Safety and efficacy of endoscopic colonic stenting as a bridge to surgery in the management of intestinal obstruction due to left colon and rectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Surg Oncol* 2013; 22: 14-21 [PMID: 23183301 DOI: 10.1016/j.suronc.2012.10.003]
- 5 Ho KS, Quah HM, Lim JF, Tang CL, Eu KW. Endoscopic stenting and elective surgery versus emergency surgery for left-sided malignant colonic obstruction: a prospective randomized trial. *Int J Colorectal Dis* 2012; 27: 355-362 [PMID: 22033810 DOI: 10.1007/s00384-011-1331-4]
- 6 Shao YC, Chang YY, Lin JK, Lin CC, Wang HS, Yang SH, Jiang JK, Lan YT, Lin TC, Li AF, Chen WS, Chang SC. Neoadjuvant chemotherapy can improve outcome of colorectal cancer patients with unresectable metastasis. *Int J Colorectal Dis* 2013; 28: 1359-1365 [PMID: 23695387 DOI: 10.1007/s00384-013-1713-x]
- 7 Yao HW, Xiu DR, Fu W, Yuan J, Jiang B, Wang DC, Ma CL, Yuan CH, Sun T, Ma LW, Cao BS, Liu JY, Chen M, Chen W, Tan S, Huang YH, Zhang L, Shi XY. [A clinical study on multi-disciplinary team and surgery for resectable colorectal cancer with liver metastases]. *Zhonghua Waike Zazhi* 2012; 50: 961-965 [PMID: 23302476]
- 8 Fontana E, Pucci F, Camisa R, Bui S, Galdy S, Leonardi F, Negri FV, Anselmi E, Losardo PL, Roncoroni L, Dell'abate P, Crafa P, Cascinu S, Ardizzone A. Long-term results of preoperative 5-fluorouracil-oxaliplatin chemoradiation therapy in locally advanced rectal cancer. *Anticancer Res* 2013; 33: 725-730 [PMID: 23393374]
- 9 Fiori E, Lamazza A, Schillaci A, Femia S, Demasi E, Decesare A, Sterpetti AV. Palliative management for patients with subacute obstruction and stage IV unresectable rectosigmoid cancer: colostomy versus endoscopic stenting: final results of a prospective randomized trial. *Am J Surg* 2012; 204: 321-326 [PMID: 22575396 DOI: 10.1016/j.amjsurg.2011.11.013]
- 10 Angenete E, Asplund D, Bergström M, Park PO. Stenting for colorectal cancer obstruction compared to surgery—a study of consecutive patients in a single institution. *Int J Colorectal Dis* 2012; 27: 665-670 [PMID: 22124678 DOI: 10.1007/s00384-011-1374-6]
- 11 Cirocchi R, Farinella E, Trastulli S, Desiderio J, Listorti C, Boselli C, Parisi A, Noya G, Sagar J. Safety and efficacy of endoscopic colonic stenting as a bridge to surgery in the management of intestinal obstruction due to left colon and rectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Surg Oncol* 2013; 22: 14-21 [PMID: 23183301 DOI: 10.1016/j.suronc.2012.10.003]
- 12 张贵阳, 金国祥. 结直肠癌肝转移的治疗体会. *中华胃肠外科杂志* 2007; 10: 52-53
- 13 Ayez N, Burger JW, van der Pool AE, Eggermont AM, Grunhagen DJ, de Wilt JH, Verhoef C. Long-term results of the "liver first" approach in patients with locally advanced rectal cancer and synchronous liver metastases. *Dis Colon Rectum* 2013; 56: 281-287 [PMID: 23392140 DOI: 10.1097/DCR.0b013e318279b743]
- 14 Hermanek P, Merkel S, Hohenberger W. Prognosis of rectal carcinoma after multimodal treatment: ypTNM classification and tumor regression grading are essential. *Anticancer Res* 2013; 33: 559-566 [PMID: 23393349]
- 15 Lu QY, Zhao AL, Deng W, Li ZW, Shen L. Hepatic histopathology and postoperative outcome after preoperative chemotherapy for Chinese patients with colorectal liver metastases. *World J Gastrointest Surg* 2013; 5: 30-36 [PMID: 23556058 DOI: 10.4240/wjgs.v5.i3.30]

■同行评价

本文目标基本明确, 设计合理, 实验数据可靠, 具有一定的创新性, 研究有一定的科学意义。

编辑 田滢 电编 鲁亚静



胶囊内镜与双气囊小肠镜诊断不明原因消化系出血的Meta分析

王柏清, 孙光斌, 娄文辉, 南寿山, 张宝芹

■背景资料

小肠出血的诊治一直都是临床上的难点。近年来, 随着双气囊小肠镜和胶囊内镜的开展与普及, 不明原因消化系出血的检出率有了很大的提高。胶囊内镜与双气囊小肠镜有各自的优缺点, 近年来众多学者对这两种方案诊断不明原因消化系出血方面进行了深入的研究, 但报道结果并不一致。

王柏清, 孙光斌, 娄文辉, 南寿山, 张宝芹, 天津市第五中心医院消化科 天津市 300450

王柏清, 硕士, 主要从事小肠疾病诊治方面的研究。

作者贡献分布: 此课题由王柏清与孙光斌设计; 研究过程由王柏清、娄文辉、南寿山及张宝芹完成; 数据分析由王柏清完成; 本文撰写由王柏清完成。

通讯作者: 孙光斌, 主任医师, 300450, 天津市塘沽区浙江路41号, 天津市第五中心医院消化科, sun19660901@sina.com

电话: 022-65665412

收稿日期: 2013-09-02 修回日期: 2013-10-16

接受日期: 2013-10-30 在线出版日期: 2013-12-18

Double balloon enteroscopy vs capsule endoscopy for obscure gastrointestinal bleeding: A Meta-analysis

Bai-Qing Wang, Guang-Bin Sun, Wen-Hui Lou, Shou-Shan Nan, Bao-Qin Zhang

Bai-Qing Wang, Guang-Bin Sun, Wen-Hui Lou, Shou-Shan Nan, Bao-Qin Zhang, the Fifth Central Hospital of Tianjin, Tianjin 300450, China

Correspondence to: Guang-Bin Sun, Chief Physician, Department of Gastroenterology, the Fifth Central Hospital of Tianjin, 41 Zhejiang Street, Tanggu District, Tianjin 300450, China. sun19660901@sina.com

Received: 2013-09-02 Revised: 2013-10-16

Accepted: 2013-10-30 Published online: 2013-12-18

Abstract

AIM: To compare the diagnostic value of double balloon enteroscopy versus capsule endoscopy in obscure gastrointestinal bleeding to help choose the optimal diagnostic strategy for this clinical condition.

METHODS: A comprehensive literature search was performed in PubMed, Medline, Vip database, Wanfang database, China National Knowledge Infrastructure database (CNKI) and Chinese Biomedical Literature database (CBM) of randomized controlled clinical trial using double balloon enteroscopy and capsule endoscopy for the diagnosis of obscure gastrointestinal bleeding dating from January 2003 to January 2013. Data of included studies were extracted and their quality evaluated independently by two re-

viewers. RevMan5 software was used for Meta-analysis.

RESULTS: Based on inclusion criteria, 13 prospective randomized controlled clinical studies were included in this study. Meta-analysis showed no significant difference in the diagnostic rate between double balloon enteroscopy and capsule endoscopy for obscure gastrointestinal bleeding. Subgroup analysis showed that the diagnostic rate had no significant difference between enteroscopy in patients with positive results in previous capsule endoscopy and enteroscopy in unselected patients.

CONCLUSION: Double balloon enteroscopy and capsule endoscopy have similar diagnostic results in patients with obscure gastrointestinal bleeding, and enteroscopy after capsule endoscopy can not improve the diagnostic rate.

© 2013 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

Key Words: Capsule endoscopy; Double balloon enteroscopy; Meta-analysis; Obscure gastrointestinal bleeding; Intestinal bleeding

Wang BQ, Sun GB, Lou WH, Nan SS, Zhang BQ. Double balloon enteroscopy vs capsule endoscopy for obscure gastrointestinal bleeding: A Meta-analysis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(35): 4060-4065 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/4060.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i35.4060>

摘要

目的: 比较胶囊内镜与双气囊小肠镜对不明原因消化系出血的诊断价值, 用以评估不明原因消化系出血患者的最优检查方案。

方法: 通过PubMed、Medline、维普、万方、中国知网、中国生物医学文献数据库检索2003-01/2013-01期间发表的同时使用胶囊内镜与双气囊小肠镜诊断不明原因消化系出血的前瞻性随机对照临床试验的文章。由2名评

■同行评议者

何松, 教授, 重庆医科大学附属第二医院消化内科

价员独立对纳入文献进行质量评价和数据提取, 并使用RevMan5软件进行Meta分析。

结果: 按照入选标准, 有13项前瞻性随机对照临床试验纳入。Meta分析结果显示: 胶囊内镜和双气囊小肠镜对不明原因消化系出血的诊断率没有显著差别($OR = 1.19, 95\%CI: 0.74-1.91, P = 0.48$)。亚组分析表明胶囊内镜阳性后进行小肠镜检查与小肠镜在所有患者中的诊断率比较没有显著差异($OR = 1.50, 95\%CI: 0.90-2.48, P = 0.12$)。

结论: 胶囊内镜和双气囊小肠镜在不明原因消化系出血的患者中具有相似的诊断率, 胶囊内镜阳性后再进行小肠镜检查并不能提高诊断率。

© 2013年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词: 胶囊内镜; 双气囊小肠镜; Meta分析; 不明原因消化系出血; 小肠出血

核心提示: 胶囊内镜和双气囊小肠镜在不明原因消化系出血的患者中具有相似的诊断率, 胶囊内镜阳性后再进行小肠镜检查并不能提高诊断率。

王柏清, 孙光斌, 娄文辉, 南寿山, 张宝芹. 胶囊内镜与双气囊小肠镜诊断不明原因消化系出血的Meta分析. 世界华人消化杂志 2013; 21(35): 4060-4065 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/4060.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v21.i35.4060>

0 引言

消化系出血约2%-10%的慢性出血病灶位于小肠。近年来, 随着双气囊小肠镜和胶囊内镜的开展与普及, 不明原因消化系出血的检出率有了很大的提高^[1]。胶囊内镜与双气囊小肠镜各有各的优缺点^[2-4], 近年来众多学者对这两种方案诊断不明原因消化系出血方面进行了深入的研究, 但报道结果并不一致。本文通过对近年来有关胶囊内镜与双气囊小肠镜对不明原因消化系出血的诊断的文献进行Meta分析, 比较两种方法对不明原因消化系出血的诊断价值, 用以评估不明原因消化系出血患者的最优检测方案。

1 材料和方法

1.1 材料 查阅2003-01/2013-01期间发表的有关胶囊内镜与双气囊小肠镜诊断不明原因消化系出血的文献。包括检索PubMed, 检索词为: wireless capsule endoscopy或capsule endoscopy

或video capsule endoscopy和double balloon endoscopy或double balloon enteroscopy或push-and-pull endoscopy; 检索维普数据库、中国知网数据库、万方数据库, 以“胶囊内镜、小肠镜、出血”为检索词。查阅所有检出论文的参考文献作为补充。共有来自13篇随机对照临床试验纳入本研究。其中12篇通过检索PubMed所获, 1篇为维普数据库、中国知网数据库和万方数据库所收录。

1.2 方法

1.2.1 入选标准: 收入文献均满足: (1)为前瞻性随机对照临床资料; (2)入选病例均经胃镜、结肠镜等检查除外上消化系出血及大肠出血; (3)为胶囊内镜与双气囊小肠镜对不明原因消化系出血诊断率的比较; (4)入选的病例均为同一患者先后同时经历胶囊内镜和双气囊小肠镜检查, 以保证在相同条件下对两种检查方法进行比较。

1.2.2 数据提取和质量评价: 有2名研究者对入选文献按照入选标准进行独立筛选, 文献质量评价按照Jadad评分^[5]。如有分歧, 协商讨论解决, 必要时征求第三方处理不一致结果。

统计学处理 数据采用Cochrane协作网提供的RevMan5进行Meta分析。Meta分析前, 采用 χ^2 检验进行异质性检验。若 $P > 0.1$ 时, 表明无明显异质性, 用固定效应模型合并效应量; $P < 0.1$, 表明各研究间异质性明显, 用随机效应模型合并效应量。疗效分析的统计量采用比值比(odds ratio, OR)及其95%可信区间(95% confidence interval, 95%CI)。由于我们所纳入的文献均为已发表的文献, 可能存在发表偏倚, 因此我们采用失安全数及漏斗图来分析偏倚情况。失安全数 $Nfs0.05 = (\sum Z/1.645)^2 - k$ ($\sum Z$ 为各独立研究的Z值之和, k 为纳入研究个数), 即在 $P = 0.05$ 水平, 至少需多少篇阴性结果的研究才能使本研究结果发生逆转, 值越大说明发表偏倚的影响越小^[6-8]。

2 结果

按照入选标准, 共检索到相关文献13篇, 其中8篇文献Jadad评分 ≥ 3 分, 属于高质量文章, 文献特征如表1。

2.1 胶囊内镜和小肠镜诊断率的比较 Meta分析发现比较胶囊内镜和双气囊小肠镜对不明原因消化系出血的诊断率没有显著差别($OR = 1.19, 95\%CI: 0.74-1.91, P = 0.48$)(图1)。

2.2 胶囊内镜阳性后进行小肠镜检查与小肠镜在所有患者中的诊断率的比较 亚组分析表明胶

■ 研发前沿

胶囊内镜和双气囊小肠镜诊断不明原因消化系出血有各自的优缺点。近年来众多学者对这两种方案诊断不明原因消化系出血方面进行了深入的研究, 但报道结果并不一致。

■ 相关报道

胶囊内镜和双气囊小肠镜在诊断不明原因的消化道出血中,哪一种是最好的起始检测方法,目前仍有争议。戈之铮等认为,胶囊内镜对不明原因消化道出血具有较高的检出率和诊断率,且明显优于推进式小肠镜;Christopher等研究则提示,胶囊内镜和双气囊小肠镜在不明原因消化道出血中的诊断率相似,胶囊内镜阳性后再进行小肠镜检查可以提高诊断率。

表 1 纳入文献的基本特征

研究者	<i>n</i>	平均年龄(岁)	男/女	阳性例数(胶囊内镜/小肠镜)	CE阳性情况下DBE检查诊断率 $n(\%)$	CE阴性情况下DBE检查诊断率 $n(\%)$
Matsumoto等 ^[9]	13	45	7/6	10/6	—	—
Hadithi等 ^[10]	35	63.2	22/13	28/21	20/28(71.4)	1/7(14.3)
Mehdizadeh等 ^[11]	115	—	—	63/57	41/63(65.1)	16/52(30.8)
Nakamura等 ^[12]	28	58.5	19/9	17/12	9/17(52.9)	3/11(27.3)
Fujimori等 ^[13]	45/36	60.2 ± 15	25/20	18/18	16/18(88.9)	2/20(10)
Ohmiya等 ^[14]	74	56	46/28	37/39	—	—
Kameda等 ^[15]	32	62.4 ± 14.8	13/19	23/21	15/23 (65.2)	2/3(66.7)
Arakawa等 ^[16]	74	—	—	40/47	36/40 (90)	11/34(33)
Fukumoto等 ^[17]	42	—	—	16/18	—	—
Shishido等 ^[18]	54	62.9 ± 18	70/48	25/28	22/25(88)	6/29(20.7)
Kamalaporn等 ^[19]	51	64.1	26/25	42/44	26/33(78.8)	8/44(18.2)
钟捷等 ^[20]	24	39.4	16/8	11/21	7/11(63.6)	3/13(23)
Marmo等 ^[21]	193	61.6 ± 16	119/74	175/132	124/174(71)	8/19 (42.1)

¹Fujimori等研究中45例患者进行了胶囊内镜检查,但只有36例患者进行了小肠镜检查;—: 研究资料未提供该数据。

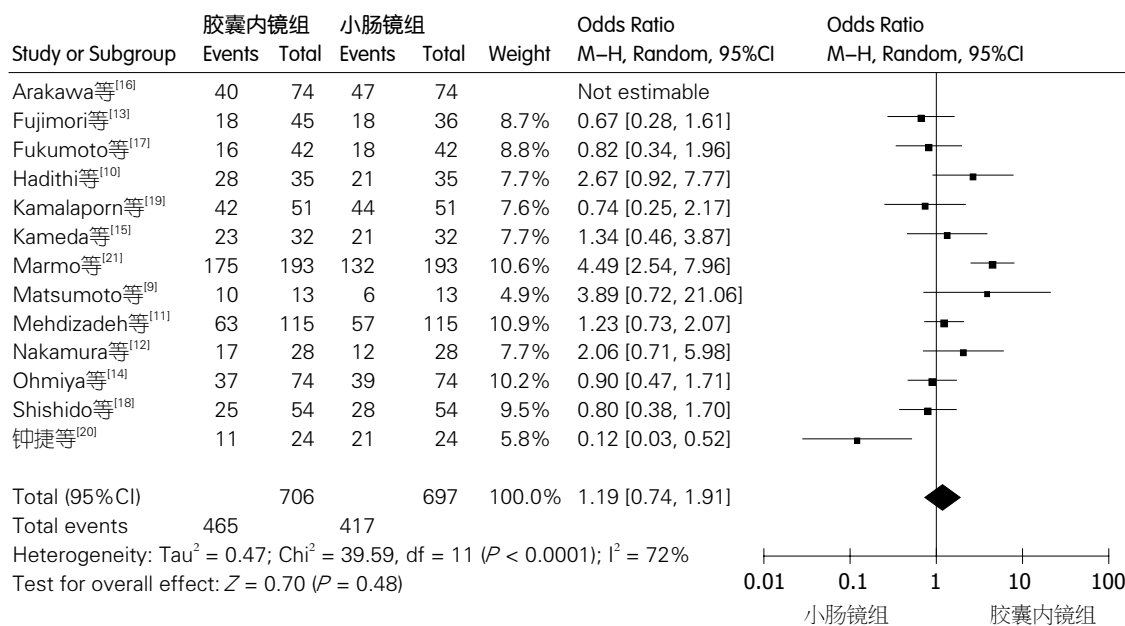


图 1 胶囊内镜和双气囊小肠镜对不明原因消化道出血诊断率的Meta分析结果。

囊内镜阳性后进行小肠镜检查与小肠镜在所有患者中的检出率比较没有明显差异($OR = 1.50$, $95\%CI: 0.90-2.48$, $P = 0.12$)(图2)。

2.3 偏倚分析 由于所纳入的文献均为已发表的文献,可能存在发表偏倚,因此采用失安全系数及漏斗图来分析偏倚情况。胶囊内镜和小肠镜对不明原因消化道出血诊断率比较的Meta分析,失安全系数为99,远高于纳入的文献数,漏斗图显示两侧基本对称,无明显发表偏倚(图3)。胶囊内镜阳性后进行小肠镜检查与小肠镜在所有患者中的诊断率比较的Meta分析,失安全系数为

51, 远高于纳入的文献数,漏斗图显示两侧基本对称,无明显发表偏倚(图4)。因此本研究的结论具有一定的可靠性。

3 讨论

小肠出血的诊治一直都是临床上的难点,随着胶囊内镜和双气囊小肠镜的应用,不明原因消化道出血的诊断率有了明显提高^[22,23]。胶囊内镜和双气囊小肠镜诊断不明原因消化道出血有各自的优缺点:胶囊内镜作为一种非侵袭性的检查,可以覆盖整个胃肠道,无创伤、无导线、无

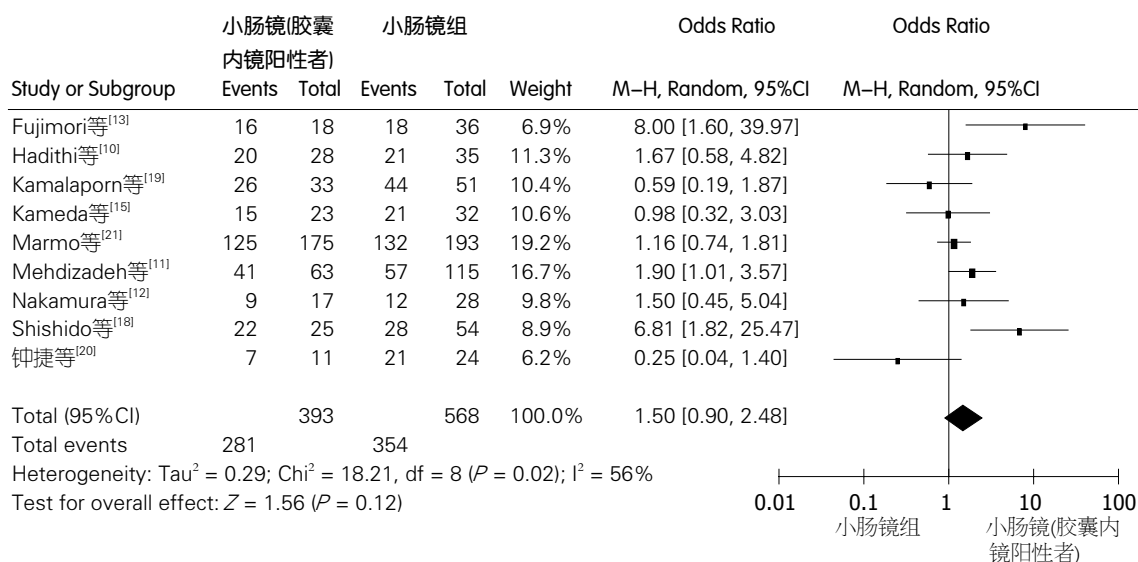


图2 胶囊内镜阳性后进行小肠镜检查与小肠镜在所有患者中诊断率的Meta分析结果。

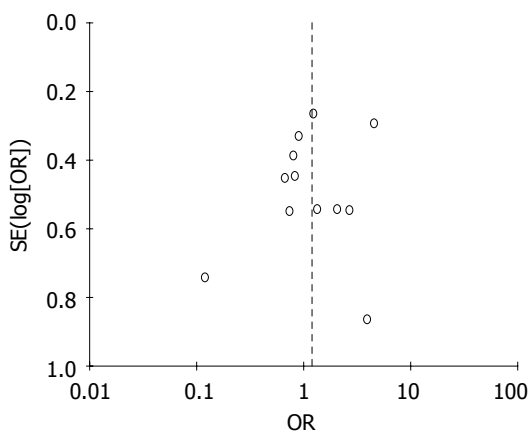


图3 胶囊内镜和小肠镜对不明原因消化系出血诊断率比较的漏斗图。

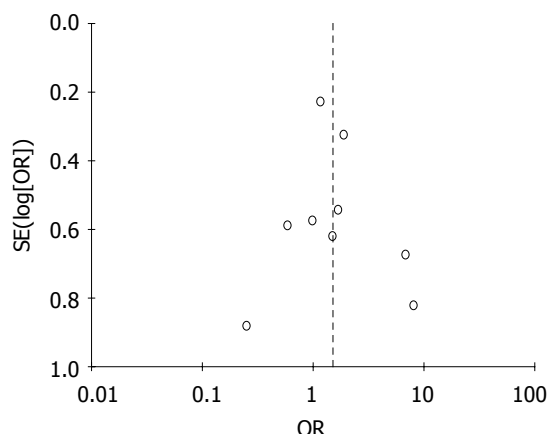


图4 胶囊内镜阳性后进行小肠镜检查与小肠镜在所有患者中的诊断率比较的漏斗图。

痛苦、无交叉感染、不影响患者的正常工作等优点, 患者易于接受, 特别是老年人、不能耐受小肠镜检查的患者。但其因为移动不可控制、图像分辨率不高、没有活检及治疗功能, 而且可能产生胶囊肠道滞留、不能自行排出, 需借助普通内镜或外科手术的情况; 双气囊小肠镜能够对病变部位进行定位观察, 提供高清晰的图像并可以对病变组织取活检及治疗, 但操作复杂、技术要求高、操作时间长、并发症风险高^[24-26]。

本研究通过比较胶囊内镜与双气囊小肠镜对不明原因消化系出血的诊断价值, 用以评估不明原因消化系出血患者的最优检查方案。Meta分析结果显示: 胶囊内镜和双气囊小肠镜对不明原因消化系出血的阳性检出率没有显著差别($OR = 1.19$, $95\%CI: 0.74-1.91$, $P = 0.48$)。亚

组分析表明胶囊内镜阳性后进行小肠镜检查与小肠镜在所有患者中的阳性检出率比较没有显著差异($OR = 1.50$, $95\%CI: 0.90-2.48$, $P = 0.12$)。因此, 胶囊内镜和双气囊小肠镜在不明原因消化系出血的患者中具有相似的诊断率, 并且胶囊内镜阳性后再进行小肠镜检查并不能提高诊断率。

本研究与国外部分相关研究的分析结果不符^[27,28], 考虑主要原因有: 国外的研究纳入文献包括了一些回顾性研究的结果, 而这些回顾性研究结果样本量较大, 对最终结果产生偏差; 纳入文献偏倚较严重, 结果可靠性不高; 近期不同研究结果的文献相继发表, 对最终Meta分析的结果有影响。本比较研究的缺陷是大部分研究胶囊内镜在小肠镜检查之前, 而且未对内镜专业人员进行设盲。考虑到如果有胶囊内镜结果,

■ 创新盘点

本研究提示, 胶囊内镜和双气囊小肠镜在不明原因消化系出血的患者中具有相似的诊断率, 胶囊内镜阳性后再进行小肠镜检查并不能提高诊断率。这与国外部分相关研究的分析结果不一致, 考虑主要原因有: 国外的研究纳入文献包括了一些回顾性研究的结果, 纳入文献偏倚较严重, 结果可靠性不高; 近期不同研究结果的文献相继发表, 对最终Meta分析的结果有影响。

■应用要点

该研究结果表明,对于不明原因消化系出血的患者,先行胶囊内镜检查,若胶囊内镜检查阴性再行小肠镜检查可能是一个可行的检查策略,但对于胶囊内镜检查阳性者,再行小肠镜检查并不能提高诊断率。

可能会使小肠镜诊断率产生检测偏倚。这些研究的联合诊断率结果为偏向于胶囊内镜,但没有显著性差异。

总之,Meta分析结果表明胶囊内镜和双气囊小肠镜在对胃肠道出血患者进行评估中具有相似的诊断率。考虑到胶囊内镜的非创伤性及患者的易接受性,因此对于不明原因消化系出血的患者首先进行胶囊内镜检查可能是更好的选择。胶囊内镜检查阴性的患者行小肠镜检查部分患者可有阳性发现,但胶囊内镜阳性后再行小肠镜检查并不能提高诊断率。因此,对于不明原因消化系出血的患者,先行胶囊内镜检查,若胶囊内镜检查阴性再行小肠镜检查可能是一个可行的检查策略,但对于胶囊内镜检查阳性者,再行小肠镜检查并不能提高诊断率。

4 参考文献

- 1 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]
- 2 Ling J, Lamsen M, Coron R, Deliana D, Siddiqui S, Rangraj M, Jesmajian S. Recurrent Lower Gastrointestinal Bleeding: Ileal GIST Diagnosed by Video Capsule Endoscopy-A Case Report and Literature Review. *Case Rep Gastrointest Med* 2013; 2013: 285457 [PMID: 24027646 DOI: 10.1155/2013/285457]
- 3 Rahmi G, Samaha E, Lorenceau-Savale C, Landi B, Edery J, Manière T, Canard JM, Malamut G, Chatellier G, Cellier C. Small bowel polypectomy by double balloon enteroscopy: Correlation with prior capsule endoscopy. *World J Gastrointest Endosc* 2013; 5: 219-225 [PMID: 23678374 DOI: 10.4253/wjge.v5.i5.219]
- 4 Tenembaum D, Sison C, Rubin M. Accuracy of community based video capsule endoscopy in patients undergoing follow up double balloon enteroscopy. *World J Gastrointest Endosc* 2013; 5: 154-159 [PMID: 23596537 DOI: 10.4253/wjge.v5.i4.154]
- 5 Jadad AR, Moore RA, Carroll D, Jenkinson C, Reynolds DJ, Gavaghan DJ, McQuay HJ. Assessing the quality of reports of randomized clinical trials: is blinding necessary? *Control Clin Trials* 1996; 17: 1-12 [PMID: 8721797]
- 6 Hoeve M, Stams GJ, van der Put CE, Dubas JS, van der Laan PH, Gerris JR. A meta-analysis of attachment to parents and delinquency. *J Abnorm Child Psychol* 2012; 40: 771-785 [PMID: 22278802 DOI: 10.1007/s10802-011-9608-1]
- 7 王珍, 张永红, 徐巧巧. 几种发表性偏倚评估方法介绍. *中国卫生统计* 2009; 26: 539-541
- 8 麦劲壮, 李河, 方积, 刘小清, 饶栩栩. Meta分析中失安全系数的估计. *循证医学* 2006; 6: 297-303
- 9 Matsumoto T, Esaki M, Moriyama T, Nakamura S, Iida M. Comparison of capsule endoscopy and enteroscopy with the double-balloon method in patients with obscure bleeding and polyposis. *Endoscopy* 2005; 37: 827-832 [PMID: 16116533 DOI: 10.1055/s-2005-870207]
- 10 Hadithi M, Heine GD, Jacobs MA, van Bodegraven AA, Mulder CJ. A prospective study comparing video capsule endoscopy with double-balloon enteroscopy in patients with obscure gastrointestinal bleeding. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 52-57 [PMID: 16405533 DOI: 10.1111/j.1572-0241.2005.00346.x]
- 11 Mehdizadeh S, Ross A, Gerson L, Leighton J, Chen A, Schembre D, Chen G, Semrad C, Kamal A, Harrison EM, Binmoeller K, Waxman I, Kozarek R, Lo SK. What is the learning curve associated with double-balloon enteroscopy? Technical details and early experience in 6 U.S. tertiary care centers. *Gastrointest Endosc* 2006; 64: 740-750 [PMID: 17055868 DOI: 10.1016/j.gie.2006.05.022]
- 12 Nakamura M, Niwa Y, Ohmiya N, Miyahara R, Ohashi A, Itoh A, Hirooka Y, Goto H. Preliminary comparison of capsule endoscopy and double-balloon enteroscopy in patients with suspected small-bowel bleeding. *Endoscopy* 2006; 38: 59-66 [PMID: 16429356 DOI: 10.1055/s-2005-870446]
- 13 Fujimori S, Seo T, Gudis K, Tanaka S, Mitsui K, Kobayashi T, Ehara A, Yonezawa M, Tatsuguchi A, Sakamoto C. Diagnosis and treatment of obscure gastrointestinal bleeding using combined capsule endoscopy and double balloon endoscopy: 1-year follow-up study. *Endoscopy* 2007; 39: 1053-1058 [PMID: 18072055 DOI: 10.1055/s-2007-967014]
- 14 Ohmiya N, Yano T, Yamamoto H, Arakawa D, Nakamura M, Honda W, Itoh A, Hirooka Y, Niwa Y, Maeda O, Ando T, Yao T, Matsui T, Iida M, Tanaka S, Chiba T, Sakamoto C, Sugano K, Goto H. Diagnosis and treatment of obscure GI bleeding at double balloon endoscopy. *Gastrointest Endosc* 2007; 66: S72-S77 [PMID: 17709039 DOI: 10.1016/j.gie.2007.05.041]
- 15 Kameda N, Higuchi K, Shiba M, Machida H, Okazaki H, Yamagami H, Tanigawa T, Watanabe K, Watanabe T, Tominaga K, Fujiwara Y, Oshitani N, Arakawa T. A prospective, single-blind trial comparing wireless capsule endoscopy and double-balloon enteroscopy in patients with obscure gastrointestinal bleeding. *J Gastroenterol* 2008; 43: 434-440 [PMID: 18600387 DOI: 10.1007/s00535-008-2182-9]
- 16 Arakawa D, Ohmiya N, Nakamura M, Honda W, Shirai O, Itoh A, Hirooka Y, Niwa Y, Maeda O, Ando T, Goto H. Outcome after enteroscopy for patients with obscure GI bleeding: diagnostic comparison between double-balloon endoscopy and videocapsule endoscopy. *Gastrointest Endosc* 2009; 69: 866-874 [PMID: 19136098 DOI: 10.1016/j.gie.2008.06.008]
- 17 Fukumoto A, Tanaka S, Shishido T, Takemura Y, Oka S, Chayama K. Comparison of detectability of small-bowel lesions between capsule endoscopy and double-balloon endoscopy for patients with suspected small-bowel disease. *Gastrointest Endosc* 2009; 69: 857-865 [PMID: 19136103 DOI: 10.1016/j.gie.2008.06.007]
- 18 Shishido T, Oka S, Tanaka S, Aoyama T, Watari I, Imagawa H, Yoshida S, Chayama K. Diagnostic yield of capsule endoscopy vs. double-balloon endoscopy for patients who have undergone total enteroscopy with obscure gastrointestinal bleeding. *Hepatogastroenterology* 2012; 59: 955-959 [PMID: 22580642]
- 19 Kamalapor P, Cho S, Basset N, Cirocco M, May

- G, Kortan P, Kandel G, Marcon N. Double-balloon enteroscopy following capsule endoscopy in the management of obscure gastrointestinal bleeding: outcome of a combined approach. *Can J Gastroenterol* 2008; 22: 491-495 [PMID: 18478135]
- 20 钟捷, 张晨莉, 马天乐, 金承荣, 吴云林, 江石湖. 双气囊小肠镜与胶囊内镜诊断小肠出血病因比较. *中华消化杂志* 2004; 12: 741-744
- 21 Marmo R, Rotondano G, Casetti T, Manes G, Chilovi F, Sprujevnik T, Bianco MA, Brancaccio ML, Imbesi V, Benvenuti S, Pennazio M. Degree of concordance between double-balloon enteroscopy and capsule endoscopy in obscure gastrointestinal bleeding: a multicenter study. *Endoscopy* 2009; 41: 587-592 [PMID: 19588285 DOI: 10.1055/s-0029-1214896]
- 22 Hu E, Nosato H, Sakanashi H, Murakawa M. A modified anomaly detection method for capsule endoscopy images using non-linear color conversion and Higher-order Local Auto-Correlation (HLAC). *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* 2013; 2013: 5477-5480 [PMID: 24110976]
- 23 Sidhu PS, McAlindon ME, Drew K, Sidhu R. Diagnostic yield of small-bowel capsule endoscopy in patients with iron deficiency anemia: does it affect management? *Gastrointest Endosc* 2013; 78: 800-801 [PMID: 24120341 DOI: 10.1016/j.gie.2013.06.022]
- 24 智发朝, 白杨, 徐智民, 姜泊, 周殿元. 双气囊内镜与胶囊内镜检查对小肠疾病诊断价值的对比研究. *中国消化内镜* 2007; 1: 24-26
- 25 Riccioni ME, Urgesi R, Cianci R, Spada C, Nista EC, Costamagna G. Single-balloon push-and-pull enteroscopy system: does it work? A single-center, 3-year experience. *Surg Endosc* 2011; 25: 3050-3056 [PMID: 21487872 DOI: 10.1007/s00464-011-1669-2]
- 26 Mönkemüller K, Neumann H, Meyer F, Kuhn R, Malfertheiner P, Fry LC. A retrospective analysis of emergency double-balloon enteroscopy for small-bowel bleeding. *Endoscopy* 2009; 41: 715-717 [PMID: 19670141 DOI: 10.1055/s-0029-1214974]
- 27 Teshima CW, Kuipers EJ, van Zanten SV, Mensink PB. Double balloon enteroscopy and capsule endoscopy for obscure gastrointestinal bleeding: an updated meta-analysis. *J Gastroenterol Hepatol* 2011; 26: 796-801 [PMID: 21155884 DOI: 10.1111/j.1440-1746.2010.06530.x]
- 28 Albert JG, Nachtigall F, Wiedbrauck F, Dollinger MM, Gittinger FS, Hollerbach S, Wienke A. Minimizing procedural cost in diagnosing small bowel bleeding: comparison of a strategy based on initial capsule endoscopy versus initial double-balloon enteroscopy. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2010; 22: 679-688 [PMID: 20446352]

■同行评价

本文设计合理, 资料详实, 结果可靠, 讨论结合文献, 依据充分, 有较大的临床指导价值。

编辑 郭鹏 电编 鲁亚静



肝内胆管腺瘤的超声造影表现1例

温艳婷, 敬基刚, 罗燕

■背景资料

该例患者于常规体检时发现肝脏占位, 术前行超声造影提示富血供肿块, 但由于对肝内胆管腺瘤的超声造影特征缺乏认识, 难以在术前确诊。本文提示在发现肝脏富血供肿块时应结合病史, 拓展诊断思路。

温艳婷, 敬基刚, 罗燕, 四川大学华西医院超声诊断科 四川省成都市 610041

温艳婷, 在读硕士, 主要从事肝脏疾病的超声研究。

作者贡献分布: 温艳婷对此文作主要贡献; 资料整理由温艳婷与敬基刚完成; 本文写作由温艳婷完成; 审校由罗燕完成。

通讯作者: 罗燕, 教授, 610041, 四川省成都市武侯区国学巷37号, 四川大学华西医院超声诊断科。luoyan15975@126.com
电话: 028-85422304

收稿日期: 2013-09-11 修回日期: 2013-10-24

接受日期: 2013-10-31 在线出版日期: 2013-12-18

Contrast-enhanced ultrasonographic characteristics of an intrahepatic bile duct adenoma

Yan-Ting Wen, Ji-Gang Jing, Yan Luo

Yan-Ting Wen, Ji-Gang Jing, Yan Luo, Department of Ultrasound, West China Hospital of Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China

Correspondence to: Yan Luo, Professor, Department of Ultrasound, West China Hospital of Sichuan University, 37 Guoxuexiang, Wuhou District, Chengdu 610041, Sichuan Province, China. luoyan15975@126.com

Received: 2013-09-11 Revised: 2013-10-24

Accepted: 2013-10-31 Published online: 2013-12-18

Abstract

Intrahepatic bile duct adenoma is a rare clinical entity which was frequently found in routine physical examinations. It is easy to be misdiagnosed due to its unspecific ultrasonographic characteristics. The major contrast-enhanced ultrasonographic characteristic of the present case was "fast in and fast out" pattern, which is difficult to be differentiated from those hypervascular hepatic tumors. The contrast-enhanced ultrasonographic characteristics need to be further studied.

© 2013 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

Key Words: Intrahepatic bile duct; Adenoma; Ultrasonography; Contrast medium

Wen YT, Jing JG, Luo Y. Contrast-enhanced ultrasonographic characteristics of an intrahepatic bile duct adenoma. Shijie

Huaren Xiaohua Zazhi 2013; 21(35): 4066-4068 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/4066.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i35.4066>

摘要

肝内胆管腺瘤临床少见, 多于常规体检时发现, 其常规超声表现特征性不明显, 易造成误诊。本例患者超声造影表现为“快进快出”, 不易与富血供的肝肿瘤相鉴别。由于病例极少, 其超声造影特征有待进一步研究。

© 2013年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词: 肝内胆管; 腺瘤; 超声检查; 造影剂

核心提示: 本例患者超声造影表现为“快进快出”, 不易与富血供的肝脏肿瘤相鉴别。这与文献报道中肝内胆管腺瘤的造影特征相符, 为该病的临床诊断提供了更多影像学资料。

温艳婷, 敬基刚, 罗燕. 肝内胆管腺瘤的超声造影表现1例. 世界华人消化杂志 2013; 21(35): 4066-4068 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/4066.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i35.4066>

0 引言

肝内胆管腺瘤是一种起源于胆管黏膜上皮的良性肿瘤^[1]。男女发病率无差异, 临床表现以腹痛、胃部不适多见。其影像学检查常表现为肝包膜下的单发性结节, 难与其他肝脏肿瘤鉴别, 因此术前常难以确诊, 多于手术切除后病理证实, 治疗手段以局部手术切除为主。目前国内文献中报道极少, 且尚无其超声造影的相关报道, 现将我院1例肝内胆管腺瘤超声造影的表现报道如下。

1 病例报告

患者, 男, 26岁, 体检发现肝脏占位就诊, 无相关临床症状及阳性体征。葡萄糖7.88 mmol/L(正常值3.9-5.9 mmol/L), 尿酸541 μmol/L(正常值240-490 μmol/L), 甘油三酯4.15 mmol/L(正常值

■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

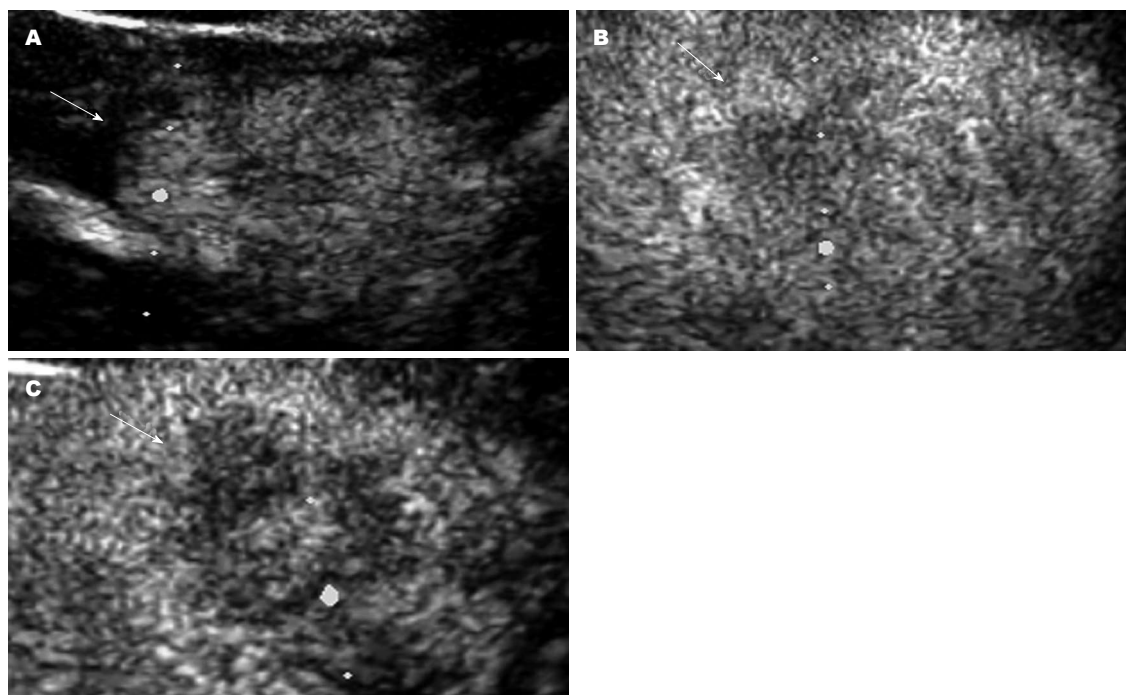


图1 肝左外叶肿块超声造影后表现(白色箭头示)。A: 动脉期呈高增强; B: 门脉期开始廓清, 呈不均匀低增强; C: 实质期呈不均匀低增强。

■ 研究前沿

本病临床较为罕见, 文献报道中造影特征均表现为富血供肿块, 但由于对该病缺乏经验和认识, 往往术前确诊困难, 且易被误诊。目前尚无肝内胆管腺瘤的影像学诊断标准。

0.29-1.83 mmol/L), 甲胎蛋白3.11 ng/mL(正常值<8 ng/mL), 余血清指标无明显异常。患者既往无肝炎及酗酒史。我院彩超示: 肝脏实质回声增强, 左外叶查见大小约48 mm×42 mm×35 mm的弱回声团块, 边界较清楚, 形态欠规则, 内未见明显血流信号。行超声造影检查示: 动脉期团块呈高增强; 门脉期与实质期呈不均匀低增强(图1)。结果示: 脂肪肝, 左肝实性占位: 炎性假瘤? 原发性肝癌(hepatic cell carcinoma, HCC)待排。磁共振成像(magnetic resonance imaging, MRI)增强扫描示: 肝左外叶富动脉血供肿块占位, 考虑原发性肝癌可能。术中见: 肝脏质地柔软, 左外叶见40 mm×30 mm×30 mm包块, 术后剖视标本见包块呈局灶结节增生状。术后诊断: 左肝占位: 肝脏局灶性结节增生(focal nodular hyperplasia, FNH)? 术后病理: 肝内胆管腺瘤。

2 讨论

肝内胆管腺瘤十分罕见, 临床表现多无症状, 几乎不恶变, 预后较好, 是一种起源于胆管黏膜上皮的良性肿瘤, 可广泛累及胆道系统。其声像图表现易与肝脏恶性肿瘤相混淆, 甚至在快速冰冻检查时, 也不易与胆管癌或肝脏转移癌相鉴别。常规超声下肝内胆管腺瘤多表现为单发性

结节, 靠近肝包膜下, 直径多为1-20 mm, 边界较清楚, 无包膜。文献报道中个别体积较大, 可能与肿瘤内部囊性变或出血有关^[2], 本例亦表现为体积较大, 可能与上述因素有关。超声造影在动脉期团块呈高增强(图1A), 门脉期与实质期呈不均匀低增强(图1B, C), 此增强方式与肝细胞癌“快进快出”的表现类似。国外文献报道该病例在增强CT或MRI时表现为动脉期高增强的富血供肿块, 门脉期开始消退或持续增强, 应与具备富血供特征的肝脏肿瘤相鉴别^[3,4], 本例病灶也表现出相似的造影特征, 因此在术前难以确诊, 甚至导致误诊。由于目前该病例文献报道极少, 其超声造影特征有待进一步研究和总结。

3 参考文献

- 1 蒋昭实, 陈杰. 肝内胆管腺瘤1例. 诊断病理学杂志 1998; 6: 117
- 2 Koga F, Tanaka H, Takamatsu S, Baba S, Takihara H, Hasegawa A, Yanagihara E, Inoue T, Nakano T, Ueda C, Ono W. A case of very large intrahepatic bile duct adenoma followed for 7 years. *World J Clin Oncol* 2012; 3: 63-66 [PMID: 22574289 DOI: 10.5306/wjco.v3.i4.63]
- 3 Tajima T, Honda H, Kuroiwa T, Yoshimitsu K, Irie H, Aibe H, Taguchi K, Shimada M, Masuda K. Radiologic features of intrahepatic bile duct adenoma: a look at the surface of the liver. *J Comput Assist Tomogr* 1999; 23: 690-695 [PMID: 10524847 DOI: 10.1097/00004728-199909000-00008]

■同行评价

本文通过对1例肝内胆管腺瘤患者的临床资料进行分析,探讨肝内胆管腺瘤的影像学诊断方法。为肝内胆管腺瘤的诊断提供了影像学资料,有一定的临床价值。

- 4 Takumi K, Fukukura Y, Nagasato K, Nakajo M, Natsugoe S, Higashi M. Intrahepatic bile duct adenoma mimicking hepatic metastasis: case report

and review of the literature. *Magn Reson Med Sci* 2013; 12: 141-145 [PMID: 23666160 DOI: 10.2463/mrms.2012-0078]

编辑 郭鹏 电编 鲁亚静



ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) DOI: 10.11569 2013年版权归Baishideng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30个省、市、自治区、特别行政区的483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。

《世界华人消化杂志》投稿须知

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期刊(*Open Access Journal*, *OAJ*), 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483位专家组成, 分布在30个省市、自治区和特别行政区。

《世界华人消化杂志》的首要任务是出版胃肠病学, 肝病, 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*, *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。OAJ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42种临床医学OAJ期刊, 其中英文版41种, 具备国际一流的编辑与出版水平。

《世界华人消化杂志》被《中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)》, 《中文核心期刊要目总览(2011年版)》, 《Chemical Abstracts》, 《EMBASE/Excerpta Medica》, 《Abstracts

Journals》和《Digital Object Identifier》收录。《世界华人消化杂志》于2012-12-26获得RCCSE中国权威学术期刊(A+)称号。《世界华人消化杂志》在中国科学技术信息研究所, 2012-12-07发布的2011年度《中国科技期刊引证报告(核心版)》统计显示, 总被引频次3871次(他引率0.82), 影响因子0.775, 综合评价总分65.5分, 分别位居内科学研究领域类52种期刊第5位、第7位和第5位, 并荣获2011年度中国精品科技期刊。

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

《世界华人消化杂志》为保证期刊的学术质量, 对所有来稿均进行同行评议, 是一份被《中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)》, 《中文核心期刊要目总览(2011年版)》收录的学术期刊。

《世界华人消化杂志》英文摘要被《Chemical Abstracts》,《EMBASE/Excerpta Medica》,《Abstracts Journals》和《Digital Object Identifier》收录。

RNA, AFP, CEA, ECG, IgG, IgA, IgM, TCM, RIA, ELISA, PCR, CT, MRI等。为减少排印错误, 外文、阿拉伯数字、标点符号必须正确打印在A4纸上。中医药名词英译要遵循以下原则: (1)有对等词者, 直接采用原有英语词, 如中风stroke, 发热fever; (2)有对应词者应根据上下文合理选用原英语词, 如八法eight principal methods; (3)英语中没有对等词或相应词者, 宜用汉语拼音, 如阴yin, 阳yang, 阴阳学说yinyangology, 人中renzhong, 气功qigong; 汉语拼音要以词为单位分写, 如weixibao nizhuanwan(胃细胞逆转丸), guizhitang(桂枝汤)。通常应小写。

2.3 外文字符 注意大小写正斜体与上下角标。静脉注射iv, 肌肉注射im, 腹腔注射ip, 皮下注射sc, 脑室注射icv, 动脉注射ia, 口服po, 灌胃ig。s(秒)不能写成S, kg不能写成Kg, mL不能写成ML, lcpm(应写为1/min)÷E%(仪器效率)÷60 = Bq, pH不能写PH或P^H, *H. pylori*不能写成HP, $T_{1/2}$ 不能写成tl/2或T, V_{max} 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*-methylaniline(*N*-甲基乙酰胺), *o*-cresol(邻甲酚), 3-*O*-methyl-adrenaline(3-*O*-甲基肾上腺素), *d*-amphetamine(右旋苯丙胺), *l*-dopa(左旋多巴), *p*-aminosalicylic acid(对氨基水杨酸)。拉丁字及缩写*in vitro*, *in vivo*, *in situ*; *Ibid*, *et al*, *po*, *vs*; 用外文字母代表的物理量, 如*m*(质量), *V*(体积), *F*(力), *p*(压力), *W*(功), *v*(速度), *Q*(热量), *E*(电场强度), *S*(面积), *t*(时间), *z*(酶活性, kat), *t*(摄氏温度, °C), *D*(吸收剂量, Gy), *A*(放射性活度, Bq), ρ (密度, 体积质量, g/L), *c*(浓度, mol/L), ϕ (体积分数, mL/L), *w*(质量分数, mg/g), *b*(质量摩尔浓度, mol/g), *l*(长度), *b*(宽度), *h*(高度), *d*(厚度), *R*(半径), *D*(直径), T_{max} , C_{max} , V_d , $T_{1/2}$, *CI*等。基因符号通常用小写斜体, 如*ras*, *c-myc*; 基因产物用大写正体, 如P16蛋白。

2.4 计量单位 采用国际单位制并遵照有关国家标准, GB3100-3102-93量和单位。原来的“分子

量”应改为物质的相对分子质量。如30 kD改为*M_r* 30 000或30 kDa(*M*大写斜体, *r*小写正体, 下角标); “原子量”应改为相对原子质量, 即*A_r*(*A*大写斜体, *r*小写正体, 下角标); 也可采用原子质量, 其单位是u(小写正体)。计量单位在+、-及-后列出。在±前后均要列出, 如37.6 °C ± 1.2 °C, 45.6岁 ± 24岁, 56.4 d ± 0.5 d, 3.56 ± 0.27 pg/mL应改为3.56 ng/L ± 0.27 ng/L。BP用kPa(mmHg), RBC数用1 × 10¹²/L, WBC数用1 × 10⁹/L, WBC构成比用0.00表示, Hb用g/L。明确的体内物质以nmol/L或mmol/L表示, 不明确者用g/L表示。1 M硫酸, 改为1 mol/L硫酸, 1 N硫酸, 改为0.5 mol/L硫酸。长10 cm, 宽6 cm, 高4 cm, 应写成10 cm × 6 cm × 4 cm。生化指标一律采用法定计量单位表示, 例如, 血液中的总蛋白、清蛋白、球蛋白、脂蛋白、血红蛋白、总脂用g/L, 免疫球蛋白用mg/L; 葡萄糖、钾、尿素、尿素氮、CO₂结合力、乳酸、磷酸、胆固醇、胆固醇酯、三酰甘油、钠、钙、镁、非蛋白氮、氯化物; 胆红素、蛋白结合碘、肌酸、肌酐、铁、铅、抗坏血酸、尿胆元、氨、维生素A、维生素E、维生素B1、维生素B2、维生素B6、尿酸; 氢化可的松(皮质醇)、肾上腺素、汞、孕酮、甲状腺素、睾酮、叶酸用nmol/L; 胰岛素、雌二醇、促肾上腺皮质激素、维生素B12用pmol/L。年龄的单位有日龄、周龄、月龄和岁。例如, 1秒, 1 s; 2分钟, 2 min; 3小时, 3 h; 4天, 4 d; 5周, 5 wk; 6月, 6 mo; 雌性♀, 雄性♂, 酶活性国际单位IU = 16.67 nkat, 对数log, 紫外uv, 百分比%, 升L, 尽量把1 × 10⁻³ g与5 × 10⁻⁷ g之类改成1 mg与0.5 mg, hr改成h, 重量γ改成mg, 长度m改成mm。国际代号不用于无数值的文句中, 例如每天不写每d, 但每天8 mg可写8 mg/d。在一个组合单位符号内不得有1条以上的斜线, 例如不能写成mg/kg/d, 而应写成mg/(kg·d), 且在整篇文章内应统一。单位符号没有单、复数的区分, 例如, 2 min不是2 mins, 3 h不是3 hs, 4 d不是4 ds, 8 mg不是8 mgs。半个月, 15 d; 15克, 15 g; 10%福尔马林, 40 g/L甲醛; 95%酒精, 950 mL/L乙醇; 5% CO₂, 50 mL/L CO₂; 1 : 1 000肾上腺素, 1 g/L肾上腺素; 胃黏膜含促胃液素36.8 pg/mg, 改为胃黏膜蛋白含促胃液素36.8 ng/g; 10%葡萄糖改为560 mmol/L或100 g/L葡萄糖; 45 ppm = 45 × 10⁻⁶; 离心的旋转频率(原称转速)用r/min, 超速者用g; 药物剂量若按体质量计算, 一律以“/kg”表示。

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χ²; (4)样本的

相关系数用英文小写 r ; (5)自由度用希文小写 ν ; (6)样本数用英文小写 n ; (7)概率用英文斜体大写 P . 在统计学处理中在文字叙述时平均数 \pm 标准差表示为 $\text{mean} \pm \text{SD}$, 平均数 \pm 标准误为 $\text{mean} \pm \text{SE}$. 统计学显著性用 $^aP < 0.05$, $^bP < 0.01$ ($P > 0.05$ 不注). 如同一表中另有一套 P 值, 则 $^cP < 0.05$, $^dP < 0.01$; 第三套为 $^eP < 0.05$, $^fP < 0.01$ 等.

2.6 数字用法 遵照国家标准GB/T 15835-1995出版物上数字用法的规定, 作为汉语词素者采用汉字数字, 如二氧化碳、十二指肠、三倍体、四联球菌、五四运动、星期六等. 统计学数字采用阿拉伯数字, 如1 000-1 500 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6 000分之一的精密度. 任何一个数字, 只允许最后一位有误差, 前面的位数不应有误差. 在一组数字中的 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 应考虑到个体的变差, 一般以SD的1/3来定位数, 例如3 614.5 g \pm 420.8 g, SD的1/3达一百多g, 平均数波动在百位数, 故应写成3.6 kg \pm 0.4 kg, 过多的位数并无意义. 又如8.4 cm \pm 0.27 cm, 其SD/3 = 0.09 cm, 达小数点后第2位, 故平均数也应补到小数点后第2位. 有效位数以后的数字是无效的, 应该舍. 末尾数字, 小于5则舍, 大于5则进, 如恰等于5, 则前一位数逢奇则进, 逢偶(包括“0”)且5之后全为0则舍. 末尾时只可1次完成, 不得多次完成. 例如23.48, 若不要小数点, 则应成23, 而不应该23.48 \rightarrow 23.5 \rightarrow 24. 年月日采用全数字表达法, 请按国家标准GB/T 7408-94书写. 如1985年4月12日, 可写作1985-04-12; 1985年4月, 写作1985-04; 从1985年4月12日23时20分50秒起至1985年6月25日10时30分止, 写作1985-04-12 T23:20:50/1985-06-25 T10:30:00; 从1985年4月12日起至1985年6月15日止, 写作1985-04-12/06-16, 上午8时写作08:00, 下午4时半写作16:30. 百分数的有效位数根据分母来定: 分母 ≤ 100 , 百分数到个位; $101 \leq \text{分母} \leq 1\,000$, 百分数到小数点后1位; 余类推. 小数点前后的阿拉伯数字, 每3位间空1/4阿拉伯数字距离, 如1 486 800.475 65. 完整的阿拉伯数字不移行!

2.7 标点符号 遵照国家标准GB/T 15834-1995标点符号用法的要求, 本刊论文中的句号都采用黑圆点; 数字间的起止号采用“-”字线, 并列的汉语词间用顿号分开, 而并列的外文词、阿拉伯数字、外文缩略词及汉语拼音字母拼写词间改用逗号分开, 参考文献中作者间一律用逗号分开; 表示终了的标点符号, 如句号、逗号、顿号、分号、括号及书名号的后一半, 通常不用

于一行之首; 而表示开头的标点符号, 如括号及书名号的前一半, 不宜用于一行之末. 标点符号通常占一格, 如顿号、逗号、分号、句号等; 破折号应占两格; 英文连字符只占一个英文字符的宽度, 不宜过长, 如5-FU. 外文字符下划一横线表示用斜体, 两横线表示用小写, 三横线表示用大写, 波纹线表示用黑体.

3 稿件格式

3.1 题名 简明确切地反映论文的特定内容, 鲜明而有特色, 阿拉伯数字不宜开头, 不用副题名, 一般20个字. 避免用“的研究”或“的观察”等非特定词.

3.2 作者 论文作者的署名, 按照国际医学杂志编辑委员会(ICMJE, International Committee of Medical Journal Editors)作者资格标准执行. 作者标准为: (1)对研究的理念和设计、数据的获得、分析和解读做出重大贡献; (2)起草文章, 并对文章的重要的知识内容进行批评性修改; (3)接受对准备发表文章的最后一稿. 作者应符合条件1, 2, 3, 对研究工作有贡献的其他人可放入志谢中. 作者署名的次序按贡献大小排列, 多作者时姓名间用逗号, 如是单名, 则在姓与名之间空1格(正文和参考文献中不空格). 《世界华人消化杂志》要求所有署名人写清楚自己对文章的贡献. 世界华人消化杂志不设置共同第一作者和共同通信作者.

3.3 单位 作者后写单位的全称空1格后再写省市及邮政编码. 格式如: 张旭晨, 梅立新, 承德医学院病理教研室 河北省承德市 067000

3.4 第一作者简介 格式如: 张旭晨, 1994年北京中医药大学硕士, 讲师. 主要从事消化系统疾病的病理研究.

3.5 作者贡献分布 格式如: 陈湘川与庞丽娟对此文所作贡献两均等; 此课题由陈湘川、庞丽娟、陈玲、杨兰、张金芳、齐妍及李洪安设计; 研究过程由陈玲、杨兰、张金芳、蒋金芳、杨磊、李锋及曹秀峰操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由曹秀峰提供; 数据分析由陈湘川、杨兰及庞丽娟完成; 本论文写作由陈湘川、庞丽娟及李洪安完成.

3.6 同行评议者 为了确保刊出文章的质量, 本刊即将开始实行接受稿件的同行评议公开策略, 将同行评议者姓名, 职称, 机构的名称与文章一同在脚注出版. 格式如: 房静远, 教授, 上海交通大学医学院附属医院仁济医院, 上海市消化疾病研究所.

《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: 010-8538-1892, 传真: 010-8538-1893, Email: wjcd@wjgnet.com; http://www.wjgnet.com

《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。

3.7 基金资助项目 格式如: 国家自然科学基金资助项目, No. 30224801

3.8 通讯作者 格式如: 通讯作者: 黄缘, 教授, 330006, 江西省南昌市民德路1号, 南昌大学第二附属医院消化内科, 江西省分子医学重点实验室. huang9815@yahoo.com

电话: 0351-4078656 传真: 0351-4086337

收稿日期: 修回日期:

3.9 英文摘要

题名 文章的题名应言简意赅, 方便检索, 英文题名以不超过10个实词为宜, 应与中文题名一致。

作者 作者姓名汉语拼音拼写法规定为: 先名, 后姓; 首字母大写, 双名之间用半字线“-”分开, 多作者时姓名间加逗号。格式如: “潘伯荣”的汉语拼写法为“Bo-Rong Pan”。

单位 先写作者, 后写单位的全称及省市邮政编码。例如: Xu-Chen Zhang, Li-Xin Mei, Department of Pathology, Chengde Medical College, Chengde 067000, Hebei Province, China

基金资助项目 格式如: Supported by National Natural Science Foundation of China, No.30224801

通讯作者 格式如: Correspondence to: Dr. Lian-Sheng Ma, Taiyuan Research and Treatment Center for Digestive Diseases, 77 Shuangta Xijie, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China. wcjd@wjgnet.com

收稿及修回日期 格式如: Received: Revised:

摘要 包括目的、方法、结果、结论, 书写要求与中文摘要一致。

3.10 中文摘要 必须在300字左右, 内容应包括目的(应阐明研究的背景和设想、目的), 方法(必须包括材料或对象, 应描述课题的基本设计, 双盲、单盲还是开放性, 使用什么方法, 如何进行分组和对照, 数据的精确程度, 研究对象选择条件与标准是否遵循随机化、齐同化的原则, 对照组匹配的特征。如研究对象是患者, 应阐明其临床表现, 诊断标准, 如何筛选分组, 有多少例进行过随访, 有多少例因出现不良反应而中途停止研究), 结果(应列出主要结果, 包括主要数据, 有什么新发现, 说明其价值和局限, 叙述要真实、准确、具体, 所列数据经用何种统计学方法处理; 应给出结果的置信区间和统计学显著性检验的确切值; 概率写 P , 后应写出相应显著性检验值), 结论(全文总结, 准确无误的观点及价值)。

3.11 正文标题层次 0 引言; 1 材料和方法, 1.1 材料, 1.2 方法; 2 结果; 3 讨论; 4 参

考文献。序号一律左顶格写, 后空1格写标题; 2级标题后空1格接正文。正文内序号连排用(1), (2), (3)。以下逐条陈述。

0 引言 应包括该研究的目的和该研究与其他相关研究的关系。

1 材料和方法 应尽量简短, 但应让其他有经验的研究者能够重复该实验。对新的方法应该详细描述, 以前发表过的方法引用参考文献即可, 有关文献中或试剂手册中的方法的改进仅描述改进之处即可。

2 结果 实验结果应合理采用图表和文字表示, 在结果中应避免讨论。

3 讨论 要简明, 应集中对所得的结果做出解释而不是重复叙述, 也不应是大量文献的回顾。

图表的数量要精选。表应有表序和表题, 并有足够具有自明性的信息, 使读者不查阅正文即可理解该表的内容。表内每一栏均应有表头, 表内非公知通用缩写应在表注中说明, 表格一律使用三线表(不用竖线), 在正文中该出现的地方应注出。图应有图序、图题和图注, 以使其容易被读者理解, 所有的图应在正文中该出现的地方注出。同一个主题内容的彩色图、黑白图、线条图, 统一用一个注解分别叙述。如: 图1 萎缩性胃炎治疗前后病理变化。A: ...; B: ...; C: ...; D: ...; E: ...; F: ...; G: ...。曲线图可按●、○、■、□、▲、△顺序使用标准的符号。统计学显著性用: $^aP<0.05$, $^bP<0.01$ ($P>0.05$ 不注)。如同一表中另有一套 P 值, 则 $^cP<0.05$, $^dP<0.01$; 第3套为 $^eP<0.05$, $^fP<0.01$ 。 P 值后注明何种检验及其具体数字, 如 $P<0.01$, $t = 4.56$ vs 对照组等, 注在表的左下方。表内采用阿拉伯数字, 共同的计量单位符号应注在表的右上方, 表内个位数、小数点、±、-应上下对齐。“空白”表示无此项或未测, “-”代表阴性未发现, 不能用同左、同上等。表图勿与正文内容重复。表图的标目尽量用 t/min , $c/(\text{mol/L})$, p/kPa , V/mL , $t/^\circ\text{C}$ 表达。

志谢 后加冒号, 排在讨论后及参考文献前, 左齐。

4 参考文献 本刊采用“顺序编码制”的著录方法, 即以文中出现顺序用阿拉伯数字编号排序。提倡对国内同行近年已发表的相关研究论文给予充分的反映, 并在文内引用处右上角加方括号注明角码。文中如列作者姓名, 则需在“Pang等”的右上角注角码号; 若正文中仅引用某文献中的论述, 则在该论述的句末右上

角注码号. 如马连生^[1]报告……, 潘伯荣等^[2-5]认为……; PCR方法敏感性高^[6-7]. 文献序号作正文叙述时, 用与正文同号的数字并排, 如本实验方法见文献[8]. 所引参考文献必须以近2-3年SCIE, PubMed, 《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊为准, 通常应只引用与其观点或数据密切相关的国内外期刊中的最新文献. 期刊: 序号, 作者(列出全体作者). 文题, 刊名, 年, 卷, 起页-止页, PMID和DOI编号; 书籍: 序号, 作者(列出全部), 书名, 卷次, 版次, 出版地, 出版社, 年, 起页-止页.

5 网络版的发表前链接 本刊即将开始实行网络版的每篇文章上都有该文发表前纪录的链接, 包括首次提交的稿件, 同行评议人报告, 作者给审稿人回信和作者修回稿, 以PDF格式上传. 读者可以针对论文、审稿意见和作者的修改情况发表意见, 指出问题与不足; 作者也可以随时修改完善自己发表的论文, 使文章的发表成为一个编者、同行评议者、读者、作者互动的动态过程.

4 写作格式实例

4.1 述评写作格式实例

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

4.2 研究原著写作格式实例

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

4.3 焦点论坛写作格式实例

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

4.4 文献综述写作格式实例

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

4.5 研究快报写作格式实例

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

4.6 临床经验写作格式实例

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

4.7 病例报告写作格式实例

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

5 投稿方式

接受在线投稿, 不接受其他方式的投稿, 如E-mail、打印稿. 在线投稿网址: <http://www.baishideng.com/wcjd/ch/index.aspx>. 无法在线提交的通过submission@wjgnet.com, 电话: 010-8538-1892, 传真: 010-8538-1893寻求帮助. 投

稿须知下载网址<http://www.wjgnet.com/1009-3079/tgxz.pdf>. 审稿过程平均时间需要14-28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, 所有作者均同意该代表其真实研究成果, 保证文责自负; (4)列出通讯作者的姓名、职称、地址、电话、传真和电子邮件; 通讯作者应负责与其他作者联系, 修改并最终审核复核稿; (5)列出作者贡献分布; (6)来稿应附有作者工作单位的推荐信, 保证无泄密, 如果是几个单位合作的论文, 则需要提供所有参与单位的推荐信; (7)愿将印刷版和电子版出版权转让给本刊编辑部.

6.2 稿件修改 来稿经同行专家审查后, 认为内容需要修改、补充或删除时, 本刊编辑部将把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): 起止页码. 如有国内外其他单位和个人复制、翻译出版等商业活动, 须征得《世界华人消化杂志》编辑部书面同意, 其编辑版权属本刊所有.

《世界华人消化杂志》编辑部

北京百世登生物医学科技有限公司

100025, 北京市朝阳区东四环中路62号

远洋国际中心D座903室

电话: 010-5908-0035

传真: 010-8538-1893

E-mail: wcjd@wjgnet.com

<http://www.wjgnet.com>

《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.

2013年国内国际会议预告

2013-01-24/26

美国临床肿瘤学会胃肠肿瘤(ASCO GI)研讨会

会议地点: 美国旧金山

联系方式: www.gicasym.org

2013-02-10/15

2013年肠道微生物组: 免疫网络效应/法规Keystone Symposia 会议

会议地点: 美国

联系方式: info@keystonesymposia.org

2013-02-09/12

美国肠外与肠道营养学会(A.S.P.E.N.): 2013临床营养周(CNW 2013)

会议地点: 美国亚利桑那州凤凰城

联系方式: <http://www.nutritioncare.org/ClinicalNutritionWeek/index.aspx?id=508>

2013-02-22/23

国立压力性溃疡顾问委员会(NPUAP)全国双年会

会议地点: 美国休斯顿

联系方式: [http://www.npuap.org/NPUAPnews-Spring11\[1\]](http://www.npuap.org/NPUAPnews-Spring11[1])

2013-02-22/23

迈阿密大学肝胆疾病临床实践会议

会议地点: 美国

联系方式: cme.med.miami.edu/x88.xml

2013-03-01/31

2013年北京第七届疝和腹壁外科国际学术研讨会

会议地点: 北京市

联系方式: zhshfbwkzz@yahoo.com.cn

2013-03-01/04

2013加拿大消化疾病周(CDDW)

会议地点: 加拿大

联系方式: www.cag-acg.org/cddw

2013-03-07/10

亚太肝脏研究协会(APASL)第23届会议

会议地点: 新加坡

联系方式: www.apaslconference.org

2013-03-15/17

2013年腹腔镜胃肠外科高峰论坛

会议地点: 深圳市

联系方式: ewancool@hotmail.com

2013-03-14/16

中部外科学会(CSA)2013年会

会议地点: 美国佛罗里达州阿米莉亚岛

联系方式: <http://www.centraalsurg.org/meeting/futuremtgs.html>

2013-04-12/14

2013中国肛肠创新论坛(CICS)

会议地点: 北京市

联系方式: www.crdinnovation.com

2013-04-19/23

2013第2届国际肿瘤学论坛

会议地点: 瑞士

联系方式: cihexpo@163.com

2013-05-23/25

2013第六届世界癌症大会

会议地点: 西安市

联系方式: bithuiyi@163.com

2013-05-20/22

2013年第三届内分泌与代谢大会

会议地点: 西安市

联系方式: nancy@bitconferences.cn

2013-05-31/06-04

2013美国临床肿瘤协会年会

会议地点: 美国芝加哥

联系方式: yangxinxue999@163.com

2013-06-07/09

中国国际肿瘤营养与支持治疗研讨会暨第一届全国肿瘤营养与支持治疗学术会议

会议地点: 武汉市

联系方式: csonsc@VIP.163.com

2013-06-21/23

中国消化科学论坛

会议地点: 张家界市

联系方式: casgmail@126.com

2013-07-13/14

中华医学会2013年肝病与代谢学术研讨会

会议地点: 银川市

联系方式: lilyjia@163.com

2014-09-26/30

第39届欧洲临床肿瘤学会年会

会议地点: 西班牙

联系方式: <http://www.esmo.org/events/madrid-2014-esmo-congress.html>

2013-10-18/20

第二十二届亚太抗癌大会

会议地点: 天津市

联系方式: secretariat@apcc2013.com

志谢世界华人消化杂志编委

本期文章审稿中(包括退稿), 我刊编委付出了宝贵的时间和大量的精力, 提高了《世界华人消化杂志》的学术质量, 在此表示衷心感谢!

白爱平 副教授
江西省南昌大学第一附属医院消化病研究所

白岚 教授
南方医院惠侨科

白玉作 教授
中国医科大学附属盛京医院小儿外科

蔡开琳 副教授
华中科技大学同济医学院附属协和医院普通外科

崔莲花 副教授
青岛大学医学院公共卫生系

戈之铮 教授
上海交通大学医学院附属仁济医院消化科

何松 教授
重庆医科大学附属第二医院消化内科

黄颖秋 教授
本溪钢铁(集团)总医院消化内科

姜波健 教授
上海交通大学医学院附属第三人民医院普通外科

康春博 副主任医师
北京大学航天临床医院普通外科

李淑德 教授
第二军医大学长海医院消化内科

李涛 副主任医师
北京大学人民医院肝胆外科

李宗芳 教授
西安交通大学医学院第二附属医院

刘丽江 教授
江汉大学医学院病理学

刘连新 教授
哈尔滨医科大学第一临床医学院

刘亮明 副教授
上海交通大学附属第一人民医院松江分院肝病科

缪应雷 主任医师
昆明医科大学第一附属医院消化内科

倪润洲 教授
南通大学附属医院消化内科

牛英才 研究员
齐齐哈尔医学院医药科学研究所

沈薇 教授
重庆医科大学附属第二医院消化内科

宋振顺 教授
西京医院肝胆外科

汤静 主管药师
上海交通大学附属第一人民医院药学部

虞必光 教授
遵义医学院附属医院消化科

王德盛 副主任医师
中国人民解放军第四军医大学西京医院肝胆外科

王小众 教授
福建医科大学附属协和医院消化内科

杨建民 教授
浙江省人民医院消化内科

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

于珮 主任医师
天津医科大学代谢病医院

余日胜 主任医师
浙江大学医学院附属第二医院放射科

俞继卫 副主任医师
上海交通大学医学院附属第三人民医院普外一科(胃肠外科)

袁建业 副研究员
上海中医药大学附属龙华医院/脾胃病研究所

赵刚 副教授
协和医院胰腺病研究所

《中文核心期刊要目总览》收录证书

《中文核心期刊要目总览》入编通知

尊敬的主编先生/女士：

我们谨此郑重通知：依据文献计量学的原理和方法，经研究人员对相关文献的检索、统计和分析，以及学科专家评审，贵刊《世界华人消化杂志》入编《中文核心期刊要目总览》2011年版（即第六版）之临床医学/特种医学类的核心期刊。该书由北京大学出版社出版。书中按《中国图书馆分类法》的学科体系，列出了73个学科的核心期刊表，并逐一对核心期刊进行了著录。著录项目包括：题名、并列题名、主办单位、创刊时间、出版周期、学科分类号、ISSN号、CN号、邮发代号、编辑部地址、邮政编码、电话、网址、电子邮箱、内容简介等。

评选核心期刊的工作，是运用科学方法对各种刊物在一定时期内所刊载论文的学术水平和学术影响力进行综合评价的一种科研活动，研究工作量浩大。北京地区十几所高校图书馆、中国科学院国家科学图书馆、中国社会科学院文献信息中心、中国人民大学书报资料中心、中国学术期刊（光盘版）电子杂志社、中国科学技术信息研究所、北京万方数据股份有限公司、国家图书馆等相关单位的百余名专家和期刊工作者参加了研究。

课题组对核心期刊的评价理论、评价方法等问题进行了深入研究，进一步改进了核心期刊评价方法，使之更趋科学合理，力求使评价结果符合客观实际。对于核心期刊的评价仍采用定量评价和定性评审相结合的方法。定量评价指标体系采用了被引量、被摘量、被引量、他引量、被摘率、影响因子、被国内外重要检索工具收录、基金论文比、Web下载量等9个评价指标，选作评价指标统计源的数据库及文摘刊物达到60余种，统计到的文献数量共计221177余万篇次，涉及期刊14400余种。参加核心期刊评审的学科专家达8200多位。经过定量筛选和专家定性评审，从我国正在出版的中文期刊中评选出1982种核心期刊。

需要特别指出的是，该研究成果只是一种参考工具书，主要是为图书情报界、出版界等需要对期刊进行评价的用户提供参考，例如为各图书情报部门的中文期刊采购和读者导读服务提供参考帮助等，不应作为评价标准。谨此说明。

顺颂
撰安

《中文核心期刊要目总览》2011年版编委会
代章：_____

2012年1月





Published by **Baishideng Publishing Group Co., Limited**
Flat C, 23/F., Lucky Plaza,
315-321 Lockhart Road, Wan Chai, Hong Kong, China
Fax: +852-3177-9906
Telephone: +852-6555-7188
E-mail: bpgoffice@wjgnet.com
<http://www.wjgnet.com>



ISSN 1009-3079

